

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501340

(P2004-501340A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	M 2 G O 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 2 G O 5 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	A 2 G O 6 0
C 1 2 Q 1/68	GO 1 N 21/78	C 4 B O 2 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 27/04	Z 4 B O 2 9
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 735 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-551239 (P2001-551239)
 (86) (22) 出願日 平成13年1月12日 (2001.1.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/001190
 (87) 国際公開番号 WO2001/051665
 (87) 国際公開日 平成13年7月19日 (2001.7.19)
 (31) 優先権主張番号 60/176,409
 (32) 優先日 平成12年1月13日 (2000.1.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/200,161
 (32) 優先日 平成12年4月26日 (2000.4.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/603,830
 (32) 優先日 平成12年6月26日 (2000.6.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

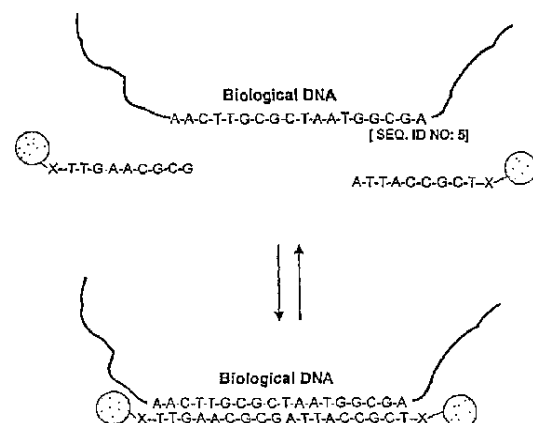
(71) 出願人 501216012
 ナノスフェア インコーポレイテッド
 NANOSPHERE INC.
 アメリカ合衆国 60062 イリノイ州
 ノースブルック スコーキィ ブルバード 1818 スイート 200
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (72) 発明者 マーキン、チャド エイ.
 アメリカ合衆国 60091 イリノイ州
 ウィルメット シックスティーンズ ストリート 111

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子とその使用方法

(57) 【要約】

本発明は核酸の検出方法を提供する。該方法は、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した1または複数種類の粒子と接触させることから成る。該方法の1実施形態では、オリゴヌクレオチドがナノ粒子に取り付けられ、核酸の配列の一部と相補的な配列を有する。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが核酸に対してハイブリダイズした結果として、検出可能な変化（好ましくは色の変化）が生じる。本発明は粒子を含む組成物およびキットも提供する。本発明はさらに、独自のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の合成方法、該方法によって得られた共役体、該共役体の使用方法も提供する。その上、本発明はナノ粒子を含むナノ材料およびナノ構造とナノ粒子を使用したナノファブリケーションの方法を提供する。最後に、本発明は選択核酸を他の核酸から分離する方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの部分を含む核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の該オリゴヌクレオチドが核酸の少なくとも 2 つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸の 2 つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で、核酸とナノ粒子を接触させるステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

【請求項 2】

少なくとも 2 つの部分を含む核酸を検出する方法であって、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 9】

ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を含む、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有さず、核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 12】

核酸がウイルス RNA またはウイルス DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】

核酸が細菌 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

50

【請求項 15】

核酸が真菌 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 16】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

核酸が生物源のものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 18】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅法の産物である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 19】

核酸を第 1 および第 2 種類のナノ粒子と同時に接触させる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 20】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 21】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付着される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって三本鎖複合体が生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、

第 1 種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、前記核酸の配列の 1 または複数の他の部分に相補的な配列を有するステップと、

基板に結び付けられた前記核酸分子を、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 24】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、

第 1 種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、前記核酸の配列の 1 または複数の他の部分に相補的な配列を有するステップと、

前記基板に結び付けられた核酸を、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと、

、

10

20

30

40

50

少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、その第1部分は、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的であるステップと、
結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子と接触させるステップと、
オリゴヌクレオチドを付着した第3種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するステップと、
第3種類のナノ粒子を、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

【請求項26】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、
基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸に有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
基板に結び付けられた前記核酸を、1または複数の種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該1または複数の種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
基板に結び付けられた第1種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドを付着した第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、
第1種類のナノ粒子上の該1または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの1種類の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

30

【請求項28】

第1種類のナノ粒子には、1種類のみオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の第2部分および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子を第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップからさらに成る、請求項28に記載の方法。

40

【請求項30】

第1種類のナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分の配列に相補的な配列を有する、請求項27に記載の方法。

【請求項31】

基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイ

50

ブリダイズさせる条件下で接触させるステップからさらに成る、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 33】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、
該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、
基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板に結び付けられた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板を銀染料と接触させて、検出可能な変化を生成するステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 39】

ナノ粒子が貴金属から形成されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 38～41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した基板と接触させるステップであって、
該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、
基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

前記基板に結び付けられた核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリポソームと接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の一部に相補的な配列を

10

20

30

40

50

有し、前記接触が、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
基板に結び付けられたリボソームを、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付けられ、前記接触が、疎水的相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリボソームへ付着するのを可能にするのに有効な条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項44】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
前記基板に結び付けられた核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリボソームと接触させるステップであって、オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の一部分に相補的な配列を有し、前記接触は、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
前記基板に結び付けられたリボソームを、少なくとも1つの第1種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付けられ、前記接触が、疎水的相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリボソームに付着するのを可能にするのに有効な条件下で起こるステップと、
リボソームに結び付けられた第1種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドを付着した第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、
第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドが付着し、
第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、
前記接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項45】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項43または44に記載の方法。

【請求項46】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項43または44に記載の方法。

【請求項47】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項43または44に記載の方法。

【請求項48】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項43または44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、
前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる

条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供するステップであって、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類ナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、基板に結び付けられた前記核酸分子を、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、凝集体プローブと接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項50】

10

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供するステップと、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、前記核酸、基板、および凝集体プローブを、前記核酸を凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

【請求項52】

前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させ、その後、前記核酸が凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように基板に結び付けられた前記核酸を前記凝集体プローブと接触させる、請求項51

30

【請求項53】

前記核酸が凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体プローブと接触させ、その後、前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

前記核酸を凝集体プローブおよび基板と同時に接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項51に記載の方法。

40

【請求項56】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供するステップであって、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステッ

50

プであって、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着されたオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するステップと、
前記核酸、凝集体プローブ、ナノ粒子、および基板を接触させるステップであって、前記接触が、凝集体プローブ上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項57】

前記核酸が凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドおよびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体プローブおよびナノ粒子と接触させ、その後、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように凝集体プローブおよびナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させる、請求項56に記載の方法。 10

【請求項58】

前記核酸が凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体プローブと接触させ、その後、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、凝集体プローブに結び付けられた前記核酸をナノ粒子上と接触させ、その後、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、凝集体プローブおよびナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させる、請求項56に記載の方法。 20

【請求項59】

前記核酸が凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体プローブと接触させ、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするようにナノ粒子を基板と接触させ、その後、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように凝集体プローブに結び付けられた前記核酸をナノ粒子と接触させる、請求項56に記載の方法。

【請求項60】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項56に記載の方法。 30

【請求項61】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

凝集体プローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項65】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる 50

ステップと、

基板に結び付けた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリポソームと接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の部分に相補的な配列を有し、前記接触は、リポソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供するステップであって、該凝集体プローブのナノ粒子はそれに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着していない端部に疎水基を有するオリゴヌクレオチドが付けられ、

疎水的相互作用の結果として、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドをリポソームへ付着するのを可能にするのに有効な条件下で、基板に結び付けられたリポソームを凝集体プローブと接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項67】

凝集体プローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項66に記載の方法。

【請求項70】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを有する基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、

少なくとも2種類のナノ粒子を有するコアプローブを提供するステップであって、各種類のナノ粒子には、他の種類のナノ粒子の少なくとも1種の上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着しており、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果互いに結び付けられるステップと、

2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、前記コアプローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸、ナノ粒子、基板、およびコアプローブを、前記核酸をナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをコアプローブ上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項71】

核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させ、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように基板に結び付けられた前記核酸をナノ粒子と接触させ、コアプローブ上のオリゴヌクレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸に結び付けられたナノ粒子をコアプローブと接触させる、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸をナノ粒子と接触させ、その後、前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするようにナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させ、コアプローブ上のオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、前記核酸に結び付けられたナノ粒子をコアプローブと接触させる、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、
少なくとも 2 種類のナノ粒子を有するコアプローブを提供するステップであって、各種類のナノ粒子には、少なくとも 1 つの他の種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着しており、凝集体プローブのナノ粒子が、それらに付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果互いに結び付けられるステップと、
前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列と、コアプローブの該少なくとも 2 種類のナノ粒子の少なくとも 1 種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列とを含む、ある種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップと、
前記核酸、連結オリゴヌクレオチド、基板、およびコアプローブを、前記核酸を連結オリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせ、かつ連結オリゴヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドをコアプローブ上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

【請求項 74】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 75】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 77】

コアプローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 78】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、
1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各結合オリゴヌクレオチドは 2 つの部分有し、その一方の部分の配列は、核酸の複数の部分のうちの 1 つの配列に相補的であり、他方の部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であるステップと、
ナノ粒子および結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
核酸および結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

40

【請求項 81】

核酸と接触させるに先立って、ナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させる、請求項

50

80に記載の方法。

【請求項82】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、
1または複数の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各結合オリゴヌクレオチドは2つの部分を有し、その一方の部分の配列は、核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的であり、他方の部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であるステップと、
ナノ粒子および結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
核酸および結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項83】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類の粒子と接触させるステップであって、
第1種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列が有し、エネルギー供与体で標識されており、
第2種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列が有し、エネルギー受容体で標識されており、
前記接触が、粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
粒子上のオリゴヌクレオチドの核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項84】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着したある種類のマイクロスフェアを提供するステップであって、
該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されているステップと、
オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、該ナノ粒子は検出可能な変化を生成可能であるステップと、
核酸を、マイクロスフェア上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、マイクロスフェアおよびナノ粒子と接触させるステップと、
蛍光の変化、ナノ粒子によって生成される別の検出可能な変化、またはその両方を観察するステップと、から成る方法。

【請求項86】

ナノ粒子によって生成される検出可能な変化が色の変化である、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

マイクロスフェアがラテックスマイクロスフェアであり、ナノ粒子が金ナノ粒子であり、蛍光、色または両方の変化を観察する、請求項85に記載の方法。

【請求項88】

ラテックスマイクロスフェア、ナノ粒子および核酸の混合物の一部を、微孔質材料に位置する観察領域に配置し、観察領域から非結合の金ナノ粒子を取り除くために微孔質材料を処理し、その後、蛍光、色、または両方の変化を観察するステップからさらに成る、請

求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着した第 1 種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供する
ステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し
、蛍光分子で標識されているステップと、
オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供する
ステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し
、蛍光分子で標識されているステップと、
2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で
核酸を前記 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと、
蛍光の変化を観察するステップと、から成る方法。 10

【請求項 90】

ナノ粒子および核酸の混合物の一部を、微孔質材料に位置する観察領域に配置し、観察
領域から非結合のナノ粒子を取り除くために微孔質材料を処理し、その後、蛍光の変化を
観察するステップからさらに成る、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着したある種類の粒子を提供するステップであって、該オリゴヌ
クレオチドが第 1 部分と第 2 部分を有し、両方の部分が核酸の配列の一部に相補的であ
るステップと、
第 1 部分と第 2 部分を有するある種類のプローブオリゴヌクレオチドを提供するステップ
であって、該第 1 部分は、粒子に付着したオリゴヌクレオチドの前記第 1 部分に相補的な
配列を有し、両部分は核酸の配列の一部に相補的であり、プローブオリゴヌクレオチド
がさらにその一端でリポーター分子で標識されているステップと、
粒子上のオリゴヌクレオチドをプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせ
る条件下で、粒子およびプローブオリゴヌクレオチドを接触させて、サテライトプローブ
を生成するステップと、
その後、核酸をプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で、サ
テライトプローブを核酸と接触させるステップと、
粒子を取り除くステップと、
リポーター分子を検出するステップと、から成る方法。 20 30

【請求項 92】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子が蛍光分子である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子が染料分子である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 94】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子がレドックス活性分子である、請求項 91 に記載の方
法。

【請求項 95】

少なくとも 1 つの容器を備えたキットであって、前記容器には前記オリゴヌクレオチドを
付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む組成物が入っており、第 1 種類のナノ粒子
上のオリゴヌクレオチドは核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒
子上のオリゴヌクレオチドは核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有する、キット。 40

【請求項 96】

容器中の組成物が、第 1 および第 2 部分間に位置する核酸の第 3 部分に相補的な配列を有
するフィラーオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 97】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 98】

固体表面をさらに備えた、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 99】

少なくとも 2 つの容器を備えたキットであって、

第 1 容器には、核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っており、

第 2 容器には、核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っている、キット。

【請求項 100】

第 1 および第 2 部分間に位置する核酸の第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドを保持する第 3 容器を備えた請求項 99 に記載のキット。

10

【請求項 101】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 102】

固体表面をさらに備えた、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 103】

少なくとも 2 つの容器を備えたキットであって、

第 1 容器には、結合オリゴヌクレオチドの第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っており、

第 2 容器には、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり第 2 部分が核酸の一部分の配列に相補的である、少なくとも 2 つの部分を含む配列を有する、1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドが入っている、キット。

20

【請求項 104】

追加の容器を備え、該追加の容器の各々には追加的結合オリゴヌクレオチドが入っており、個々の追加的結合オリゴヌクレオチドは、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列と相補的であり第 2 部分が核酸の別の部分の配列に相補的である、少なくとも 2 つの部分を含む配列を有する、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 105】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 106】

固体表面をさらに備えた、請求項 103 に記載のキット。

30

【請求項 107】

キットであって、

オリゴヌクレオチドを付着した 1 種類のナノ粒子と、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため結合オリゴヌクレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされるようになっており、第 2 部分が核酸の 1 または複数の部分の配列に相補的である少なくとも 2 つの部分を含む配列を各種類が有する 1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドとが入った容器、を備えたキット。

【請求項 108】

少なくとも 1 つの容器を備え得たキットであって、該容器にはオリゴヌクレオチドを付着した金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入っており、該オリゴヌクレオチドは核酸の一部分に相補的な配列を有し、該オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には蛍光分子が付けられている、キット。

40

【請求項 109】

キットであって、

核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を付着させた基板と、

核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 1 容器と、を備えたキット。

【請求項 110】

第 1 部分が第 1 容器内のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相

50

補的である、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第3容器と、をさらに備えた請求項109に記載のキット。

【請求項111】

少なくとも3つの容器を備えたキットであって、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、を備えたキット。 10

【請求項112】

第1および第2部分間に位置する核酸の第3部分の配列に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器をさらに備えた、請求項111に記載のキット。

【請求項113】

基板をさらに備えた、請求項111に記載のキット。

【請求項114】

第1部分が第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、

結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが入った第5容器と、をさらに備えた請求項113に記載のキット。 20

【請求項115】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方が、オリゴヌクレオチドをナノ粒子へ付着するための官能基を担持している、請求項111に記載のキット。

【請求項116】

基板、ナノ粒子、またはその両方が、基板へナノ粒子を付着するための官能基を担持している、請求項113に記載のキット。

【請求項117】

基板にナノ粒子が付着されている、請求項113に記載のキット。

【請求項118】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項111に記載のキット。

30

【請求項119】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを一部に付着させたナノ粒子が入った第1容器と、

第1容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項120】

キットであって、

基板と、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、

第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、を備えたキット。

【請求項121】

50

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、基板、またはそれらすべてが、ナノ粒子へオリゴヌクレオチドを付着させるか、または基板へオリゴヌクレオチドを付着するための、官能基を担持している、請求項 120 に記載のキット。

【請求項 122】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 120 に記載のキット。

【請求項 123】

キットであって、

核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着したリボソームが入った第 1 容器と、

10

少なくとも第 1 種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 2 容器であって前記第 1 種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には疎水基が付いている、第 2 容器と、を備えたキット。

【請求項 124】

第 2 容器のナノ粒子には、第 2 の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、該第 2 種類のオリゴヌクレオチドは第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

キットはさらに、

第 1 種類のナノ粒子上の第 2 種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第 2 種類のナノ粒子が入った第 3 容器をさらに備える、請求項 123 に記載のキット。

20

【請求項 125】

キットであって、

核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を付着させた基板と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む凝集体プローブが入った第 1 容器であって、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも 2 種類のナノ粒子の少なくとも 1 種類には、前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第 1 容器と、を備えたキット。

30

【請求項 126】

キットであって、

核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む凝集体プローブが入った第 1 容器であって、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも 2 種類のナノ粒子の少なくとも 1 種類には、前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第 1 容器と、を備えたキット。

【請求項 127】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 126 に記載のキット。

40

【請求項 128】

キットであって、

オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む凝集体プローブが入った第 1 容器であって、凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも 2 種類のナノ粒子の少なくとも 1 種類には、核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第 1 容器と、

50

少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器であって、第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着させたオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、第2容器と、を備えたキット。

【請求項129】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着したリポソームが入った第1容器と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブが入った第2容器であって、凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている、第2容器と、を備えたキット。

【請求項130】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項125～129いずれか一項に記載のキット。

【請求項131】

凝集体プローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項125～129いずれか一項に記載のキット。

【請求項132】

少なくとも3つの容器を備えたキットであって、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、を備えたキット。

【請求項133】

第1部分と第2部分の間に位置する核酸の第3部分の配列に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器をさらに備えた、請求項132に記載のキット。

【請求項134】

基板をさらに備えた。請求項132に記載のキット。

【請求項135】

第1部分が第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが入った第5容器と、をさらに備えた請求項134に記載のキット。

【請求項136】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方が、オリゴヌクレオチドをナノ粒子へ付着するための官能基を担持している、請求項132に記載のキット。

【請求項137】

基板、ナノ粒子、またはその両方が、基板へナノ粒子を付着するための官能基を担持している、請求項134に記載のキット。

【請求項138】

基板にナノ粒子が付着されている、請求項134に記載のキット。

【請求項139】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項132に記載のキット。

【請求項140】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを一部付着させたナノ粒子が入った第1容器と、第1容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項141】

キットであって、

基板と、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、

第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、を備えたキット。

【請求項142】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、基板、またはそれらすべてが、ナノ粒子へオリゴヌクレオチドを付着させるか、または基板へオリゴヌクレオチドを付着するための、官能基を担持している、請求項141に記載のキット。

【請求項143】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項141に記載のキット。

【請求項144】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたリボソームが入った第1容器と、

少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器であって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には疎水基が付いている、第2容器と、を備えたキット。

【請求項145】

第2容器内のナノ粒子には、第2の種類のオリゴヌクレオチドが付着され、該第2種類のオリゴヌクレオチドは第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

キットはさらに、

第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類のナノ粒子が入った第3容器をさらに備える、請求項144に記載のキット。

【請求項146】

少なくとも2つの容器を備えたキットであって、

第1容器には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有し、かつ粒子に付着していない端部がエネルギー供与体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた粒子が入っており、

第2容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有し、かつ粒子に付着していない端部がエネルギー受容体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた粒子が入っている、キット。

【請求項147】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項146に記載のキット。

【請求項148】

少なくとも1つの容器を備えたキットであって、前記容器には、核酸の第1部分の配列に

10

20

30

40

50

相補的な配列を有し、かつ該粒子に付着していない端部がエネルギー供与体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の粒子と、それに付けられた、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有し、かつ該粒子に付着していない端部がエネルギー受容体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の粒子とが入っている、キット。

【請求項149】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項148に記載のキット。

【請求項150】

キットであって、

核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させたマイクロスフェアが入った第1容器と、 10

核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項151】

マイクロスフェアがラテックスマイクロスフェアであり、ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項150に記載のキット。

【請求項152】

微孔質材料をさらに備えた、請求項150に記載のキット。

【請求項153】

キットであって、

核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入った第1容器と、 20

核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項154】

微孔質材料をさらに備えた、請求項153に記載のキット。

【請求項155】

サテライトプローブが入った容器を備えたキットであって、該サテライトプローブが、両部分が核酸の配列の一部分に相補的な配列を有する、第1部分および第2部分を有するオリゴヌクレオチドを付着させた粒子と、 30

第1部分および第2部分を有し、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、さらにリポーター分子が一端に付いた、プローブオリゴヌクレオチドであって、該第1部分は粒子に付着した該オリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有し、両部分は核酸の配列の部分に相補的な配列を有するプローブオリゴヌクレオチドと、を含むキット。

【請求項156】

凝集体プローブが入った容器を備えたキットであって、凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、キット。 40

【請求項157】

凝集体プローブが入った容器を備えたキットであって、凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着していない端部に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している、キット。

【請求項158】

凝集体プローブであって、該凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも 50

も2種類のナノ粒子を含み、凝集体プローブの該ナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、凝集体プローブ。

【請求項159】

各々2種類のオリゴヌクレオチドを付着させた2種類のナノ粒子を含み、各種類のナノ粒子に付着した第1種類のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の一部に相補的な配列を有し、第1種類のナノ粒子に付着した第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子に付着した第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項158に記載の凝集体プローブ。

10

【請求項160】

オリゴヌクレオチドを付着させた3種類のナノ粒子を含み、第1種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、第3種類のナノ粒子には2種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは1番目または第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項158に記載の凝集体プローブ。

20

【請求項161】

凝集体プローブであって、該凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている、凝集体プローブ。

【請求項162】

コアプローブが入った容器を備えたキットであって、該コアプローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、コアプローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられている、キット。

30

【請求項163】

検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板をさらに備えた、請求項162に記載のキット。

【請求項164】

2種類のオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子が入った容器をさらに備え、第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、コアプローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部に相補的な配列を有する、請求項162または163に記載のキット。

40

【請求項165】

核酸の配列の第2部分に相補的な配列と、コアプローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部に相補的な配列とを有するある種類の連結オリゴヌクレオチドが入った容器をさらに備えた、請求項162または163に記載のキット。

【請求項166】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアプローブであって、コアプローブのナノ粒子が、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられている、コアプローブ。

50

【請求項 167】

ナノ粒子を付着させた基板。

【請求項 168】

前記ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着している、請求項167に記載の基板。

【請求項 169】

オリゴヌクレオチドを付着した金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であって、オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部が蛍光分子で標識されている、金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子。

【請求項 170】

サテライトプローブであって、

第1部分および第2部分を有し、かつ両部分が核酸の配列の部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた粒子と、

ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドであって、第1部分および第2部分を有し、第1部分は前記粒子に付着したオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有し、両部分が核酸の配列の一部分に相補的な配列を有し、さらにリポーター分子が一端に付いた、プローブオリゴヌクレオチドと、を含むサテライトプローブ。

【請求項 171】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、連結オリゴヌクレオチドの各種類の配列が少なくとも2つの部分を有するステップと、

オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドへ有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 172】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子が提供され、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌクレオチドの配列の第1部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有する、請求項171に記載の方法。

【請求項 173】

ナノ粒子は金属ナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項171または172に記載の方法。

【請求項 174】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子はCdSe/ZnS（コア/シェル）から形成されている、請求項173に記載の方法。

【請求項 175】

ナノファブリケーションの方法であって、

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を提供するステップであって、

第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するステップと、

所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、第1と第2種類のナノ粒子を、ナノ

10

20

30

40

50

粒子上のオリゴヌクレオチドを互いに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 176】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 177】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe / ZnS (コア / シェル) から形成されている、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 178】

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタにより一緒に纏められている、ナノ材料またはナノ構造。 10

【請求項 179】

少なくともオリゴヌクレオチドコネクタの一部が三本鎖である、請求項 178 に記載のナノ材料またはナノ構造。

【請求項 180】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 178 のナノ材料またはナノ構造。

【請求項 181】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe / ZnS (コア / シェル) から形成されている、請求項 180 に記載のナノ材料またはナノ構造。 20

【請求項 182】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む組成物であって、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第 1 部分または連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第 2 部分または連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する、組成物。

【請求項 183】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 182 に記載の組成物。

【請求項 184】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe / ZnS (コア / シェル) から形成されている、請求項 183 に記載の組成物。 30

【請求項 185】

容器のアセンブリであって、

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 1 容器と、

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 2 容器とを備え、

第 1 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する、アセンブリ。 40

【請求項 186】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 185 のアセンブリ

【請求項 187】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe / ZnS (コア / シェル) から形成されている、請求項 186 に記載のアセンブリ。

【請求項 188】

複数の異なるオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子。

【請求項 189】

少なくとも 2 つの部分を含む選択核酸を、他の核酸から分離する方法であって、 50

オリゴヌクレオチドを付着させた2種類以上のナノ粒子を提供するステップであって、各種のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、選択核酸の複数の部分のうちの1つの配列に相補的な配列を有するステップと、
核酸およびナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、その結果、選択核酸にハイブリダイズしたナノ粒子が凝集して沈降するようにするステップと、

【請求項190】

安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子へ結合させる方法であって、

ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分を共有結合で結合させた、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、 10

少なくともオリゴヌクレオチドの一部がナノ粒子に結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、

該水へ少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、

追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。 20

【請求項191】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項190に記載の方法。

【請求項192】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項191に記載の方法。

【請求項193】

ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分がアルカンチオールである、請求項192に記載の方法。

【請求項194】

すべての塩が1回の追加で水に加えられる、請求項190に記載の方法。

【請求項195】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項190に記載の方法。 30

【請求項196】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の2以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の1つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の2以上の組合せから成る群から選択される、請求項190に記載の方法。

【請求項197】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

少なくとも10ピコモル/cm²の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項190に記載の方法。 40

【請求項199】

オリゴヌクレオチドが少なくとも15ピコモル/cm²の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項198に記載の方法。

【請求項200】

オリゴヌクレオチドが約15ピコモル/cm²～約40ピコモル/cm²の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項199に記載の方法。

【請求項201】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子へ 50

結合させる方法であって、

少なくとも１種類の認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されているステップと、

認識オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子に結合して、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 202】

認識オリゴヌクレオチドの各スペーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 201 に記載の方法。

10

【請求項 203】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 201 に記載の方法。

【請求項 204】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 203 に記載の方法。

【請求項 205】

スペーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 204 に記載の方法。

【請求項 206】

スペーサー部分が約 10 ～約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 205 に記載の方法。

【請求項 207】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 206 に記載の方法。

20

【請求項 208】

ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子へ結合させる方法であって、

ある種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含む、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、

前記オリゴヌクレオチドを前記ナノ粒子と、前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子に結合して、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するために有効な条件下で、接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 209】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 208 に記載の方法。

30

【請求項 210】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 209 に記載の方法。

【請求項 211】

各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されている、請求項 208 に記載の方法。

【請求項 212】

認識オリゴヌクレオチドの各スペーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 211 に記載の方法。

【請求項 213】

認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 211 に記載の方法。

40

【請求項 214】

認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分が約 10 ヌクレオチド～約 30 ヌクレオチドを含む、請求項 213 に記載の方法。

【請求項 215】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 211 に記載の方法。

【請求項 216】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるのと

50

ほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 0 8 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子へ結合させる方法であって、

10

ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられ、かつある種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含む、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、

前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子に結合するのに十分な期間、水中で該オリゴヌクレオチドをナノ粒子と接触させるステップと、

該水へ少なくとも 1 つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、

前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

20

【請求項 2 2 0】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分がアルカンチオールである、請求項 2 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

30

すべての塩が 1 回の追加で水に加えられる、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の 2 以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の 1 つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の 2 以上の組合せから成る群から選択される、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項 2 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 2 7】

少なくとも $10 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

オリゴヌクレオチドが約 $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2 \sim$ 約 $40 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 2 8 に記載の方法。

50

【請求項 2 3 0】

各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、各スペーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

スペーサー部分が少なくとも約 1 0 ヌクレオチドを含む、請求項 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

スペーサー部分が約 1 0 ～約 3 0 のヌクレオチドを含む、請求項 2 3 1 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 2 3 0 に記載の方法。 10

【請求項 2 3 4】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 5】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項 2 3 4 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 1 9 に記載の方法。 20

【請求項 2 3 7】

オリゴヌクレオチドを付着したナノ粒子であるナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドは共役体が安定であるように十分な表面密度でナノ粒子表面に存在し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 2 3 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 0 ピコモル／ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 3 7 に記載の共役体

【請求項 2 3 9】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 5 ピコモル／ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 3 8 に記載のナノ粒子。 30

【請求項 2 4 0】

オリゴヌクレオチドが約 1 5 ピコモル／ cm^2 ～約 4 0 ピコモル／ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 3 9 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 1】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 2 3 7 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 2】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 2 4 1 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 3】

オリゴヌクレオチドを有するナノ粒子であって、該オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、該認識オリゴヌクレオチドの各々はスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分はナノ粒子に結び付けられるように設計され、該認識部分は核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、ナノ粒子。 40

【請求項 2 4 4】

前記スペーサー部分が、ナノ粒子に共有結合で結び付けられる部分を有し、該部分は、スペーサー部分をナノ粒子に結び付ける官能基を含む、請求項 2 4 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 5】

スペーサー部分が少なくとも約 1 0 ヌクレオチドを含む、請求項 2 4 3 に記載のナノ粒子。
。

【請求項 2 4 6】

スペーサー部分が約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 2 4 5 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 7】

スペーサー部分のヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 2 4 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 4 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 4 9】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 4 8 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 0】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ～ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 4 9 のナノ粒子。

【請求項 2 5 1】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 2 4 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 2】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 2 5 1 に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子であって、該オリゴヌクレオチドが、核酸またはまたは別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を各々が有する少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドと、を含む、ナノ粒子。

【請求項 2 5 4】

認識オリゴヌクレオチドの各々がスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分はナノ粒子に結び付けられるように設計され、該認識部分は核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項 2 5 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 5】

前記スペーサー部分が、ナノ粒子に共有結合で結び付けられる部分を有し、該部分は、スペーサー部分をナノ粒子に結び付ける官能基を含む、請求項 2 5 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 6】

スペーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 2 5 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 7】

スペーサー部分が約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 2 5 6 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 8】

スペーサー部分のヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 2 5 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 5 9】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 5 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 0】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 5 9 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 1】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ～ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナ

10

20

30

40

50

ノ粒子表面に存在する、請求項 2 6 0 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 2】

前記希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるヌクレオチドとほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 2 5 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 3】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項 2 6 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 4】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 2 5 3 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 5】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 2 6 4 に記載のナノ粒子。

【請求項 2 6 6】

核酸を検出する方法であって、

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体と核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 2 6 7】

核酸を検出する方法であって、

請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種類のナノ粒子と核酸を、ナノ粒子上の少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、

認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 2 6 8】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載のある種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の少なくとも 2 つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸の 2 つ以上の部分とを有効にハイブリダイズさせる条件下で、核酸と共役体を接触させるステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 2 6 9】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、

請求項 2 3 7～2 4 0 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を核酸と接触させるステップであって、第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 2 7 0】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 2 6 9 に記載の方法。

【請求項 2 7 1】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 2 6 9 に記載の方法。

【請求項 2 7 2】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 2 6 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 273】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 274】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 273 に記載の方法。

【請求項 275】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 276】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 277】

ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸との
ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を
生成する分子によって標識される、請求項 269 に記載の方法。 10

【請求項 278】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレ
オチドは蛍光分子で標識される、請求項 277 に記載の方法。

【請求項 279】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオ
チドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有さず、
核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに
接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせ
る条件下で起こる、請求項 269 に記載の方法。 20

【請求項 280】

核酸がウイルス RNA または DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 281】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 282】

核酸が細菌 DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 283】

核酸が真菌 DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 284】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構
造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 269 に記載の方法。 30

【請求項 285】

核酸が生物源のものである、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 286】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅の産物である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 287】

核酸を第 1 と第 2 種類の共役体と同時に接触させる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 288】

核酸を、第 2 種類の共役体と接触させる前に、第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴ
ヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 269 に記載の方法。 40

【請求項 289】

第 1 種類の共役体が基板に付着される、請求項 288 に記載の方法。

【請求項 290】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによ
って三本鎖複合体が生じる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 291】

少なくとも 2 つの部分の有する核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 243 ～ 252 のいずれか一項に記載の少な
くともある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の認識オリゴヌク 50

レオチドは核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、核酸とナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸の2つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項292】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項243～250に記載のいずれか一項に記載の少なくとも2種類のナノ粒子と核酸を接触させるステップであって、第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項293】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項292に記載の方法。

【請求項294】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項292に記載の方法。

【請求項295】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項292に記載の方法。

【請求項296】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項292に記載の方法。

【請求項297】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項296に記載の方法。

【請求項298】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項292に記載の方法。

【請求項299】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項298に記載の方法。

【請求項300】

ナノ粒子に付着した認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項292に記載の方法。

【請求項301】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項300に記載の方法。

【請求項302】

核酸は第1部分と第2部分の間に位置する第3部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第3部分に相補的な配列を有さず、核酸を、核酸の該第3部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項292に記載の方法。

【請求項303】

核酸がウイルスRNAまたはDNAである、請求項292に記載の方法。

【請求項304】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項292に記載の方法。

【請求項305】

核酸が細菌DNAである、請求項292に記載の方法。

【請求項306】

核酸が真菌DNAである、請求項292に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 0 7】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 2 9 2 に記載の方法。

【請求項 3 0 8】

核酸が生物源のものである、請求項 2 9 2 に記載の方法。

【請求項 3 0 9】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅法の産物である、請求項 2 9 2 に記載の方法。

【請求項 3 1 0】

核酸を、第 1 および第 2 種類のナノ粒子と同時に接触させる、請求項 2 9 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 1 1】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 2 9 2 に記載の方法。

【請求項 3 1 2】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付けられる、請求項 3 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 1 3】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって三本鎖複合体が生じる、請求項 2 9 2 に記載の方法。

【請求項 3 1 4】

少なくとも 2 つの部分を持つ核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 5 3 ~ 2 6 5 のいずれか一項に記載のある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の少なくとも 2 つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、
核酸とナノ粒子を、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸の 2 つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

【請求項 3 1 5】

少なくとも 2 つの部分を持つ核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 5 3 ~ 2 6 3 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子を核酸と接触させるステップであって、第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

30

【請求項 3 1 6】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 1 7】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

40

【請求項 3 1 8】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 1 9】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 0】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 3 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 2 1】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 2】

50

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 3 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2 3】

ナノ粒子に付着した認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 4】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有さず、
核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項 3 1 5 に記載の方法。 10

【請求項 3 2 6】

核酸がウイルス RNA または DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 7】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 8】

核酸が細菌 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。 20

【請求項 3 2 9】

核酸が真菌 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 0】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 1】

核酸が生物源のものである、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 2】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅の産物である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 3】

核酸を第 1 と第 2 種類の共役体と同時に接触させる、請求項 3 1 5 に記載の方法。 30

【請求項 3 3 4】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 5】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付けられる、請求項 3 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 3 6】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって三本鎖複合体が生じる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 7】

少なくとも 2 つの部分の有する核酸を検出する方法であって、 40

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板を核酸と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(b) 請求項 2 3 7 ~ 2 4 0 のいずれか一項に記載の第 1 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、前記核酸配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。 50

【請求項 3 3 8】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、請求項 2 3 7～2 4 0 のいずれか一項に記載の第 2 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体と接触させるステップであって、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有するステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 3 9】

第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第 2 種類の共役体を、第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 および第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 3 8 に記載の方法。

【請求項 3 4 0】

ステップ (d) か、ステップ (d) および (f) かを、1 または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項 3 3 9 に記載の方法。

【請求項 3 4 1】

(d) 少なくとも 2 つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第 1 部分は、第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類に相補的であるステップと、

(e) 結合オリゴヌクレオチドを基板に結び付けた第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 請求項 2 3 7～2 4 0 のいずれか一項に記載の第 2 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、結合オリゴヌクレオチドの配列の第 2 部分に相補的な配列を有するステップと、

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第 2 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3 4 2】

(i) 基板に結び付けた第 2 種類の共役体を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドと第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを、第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと結合オリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 4 1 に記載の方法。

【請求項 3 4 3】

ステップ (e) および (g) か、ステップ (e), (g), (i) ならびに (j) かを 1 または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項 3 4 2 に記載の方法。

【請求項 3 4 4】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 5】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 3 4 4 に記載の方法。

【請求項 3 4 6】

共役体のナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 7】

共役体のナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 3 4 6 に記載の方法。

【請求項 3 4 8】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 9】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 0】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 4 8 に記載の方法。

【請求項 3 5 1】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 2】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 3】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 4】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが2つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 5】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 5 4 に記載の方法。

【請求項 3 5 6】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 5 4 に記載の方法。

【請求項 3 5 7】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が2つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 4 8 に記載の方法。

【請求項 3 5 8】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 5 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 9】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 5 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 0】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触は、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(b) 1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 4 3～2 5 0 のいずれか一項に記載の第1種類のナノ粒子を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、該1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3 6 1】

(d) 認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 4 3～2 5 0 のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を、基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第1種

10

20

30

40

50

類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。

【請求項362】

第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。

【請求項363】

ステップ(d)か、ステップ(d)および(f)かを1または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項362に記載の方法。

【請求項364】

(d) 少なくとも2つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第1部分は第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類に相補的であるステップと、

(e) 基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と結合オリゴヌクレオチドを接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項243～250のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を提供するステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は、結合オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有するステップと、

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。

【請求項365】

(i) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項364に記載の方法。

【請求項366】

ステップ(e)および(g)か、ステップ(e), (g), (i), ならびに(j)かを1または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項365に記載の方法。

【請求項367】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項360に記載の方法。

【請求項368】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項367に記載の方法。

【請求項369】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項360に記載の方法。

【請求項370】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項369に記載の方法。

【請求項371】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの

10

20

30

40

50

両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 3 6 0 に記載の方法。

【請求項 3 7 2】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 6 0 に記載の方法。

【請求項 3 7 3】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 7 1 に記載の方法。

【請求項 3 7 5】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 3 6 0 に記載の方法。

【請求項 3 7 6】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 3 7 5 に記載の方法。

10

【請求項 3 7 7】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 3 7 5 に記載の方法。

【請求項 3 7 8】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが 2 つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 6 0 に記載の方法。

【請求項 3 7 9】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 7 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 8 0】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 7 8 に記載の方法。

【請求項 3 8 1】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が 2 つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 7 1 に記載の方法。

【請求項 3 8 2】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 8 1 に記載の方法。

【請求項 3 8 3】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 8 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 8 4】

少なくとも 2 つの部分を含む核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと

(b) 1 または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 5 3 ~ 2 6 3 のいずれか一項に記載の第 1 種類のナノ粒子を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、該 1 または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

40

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3 8 5】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子を、認識オリゴヌクレオチドが付着した請求項 2 5 3 ~ 2 6 3 のいずれか一項に記載の第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第 2 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第 1 および第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 8 4 に記載の方法。

50

【請求項 386】

第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項385に記載の方法。

【請求項 387】

ステップ(d)か、ステップ(d)および(f)かを1または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項386に記載の方法。

10

【請求項 388】

(d) 少なくとも2つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第1部分は第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類に相補的であるステップと、

(e) 結合オリゴヌクレオチドを、基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 認識オリゴヌクレオチドが付着した請求項253～263のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を提供するステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が結合オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有するステップと、

20

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記ステップが、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項386に記載の方法。

【請求項 389】

(i) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

30

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項384に記載の方法。

【請求項 390】

ステップ(e)および(g)か、ステップ(e), (g), (i), ならびに(j)かを1または複数回繰り返し、検出可能な変化を観察する、請求項389に記載の方法。

【請求項 391】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項384に記載の方法。

【請求項 392】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項391に記載の方法。

40

【請求項 393】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項384に記載の方法。

【請求項 394】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項393に記載の方法。

【請求項 395】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項384に記載の方法。

【請求項 396】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項384に記載の方法。

50

【請求項 3 9 7】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 9 5 に記載の方法。

【請求項 3 9 8】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 3 8 4 の方法

【請求項 3 9 9】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 3 9 8 に記載の方法。

【請求項 4 0 0】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 3 9 8 に記載の方法。

10

【請求項 4 0 1】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが 2 つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 8 4 に記載の方法は。

【請求項 4 0 2】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 4 0 1 に記載の方法。

【請求項 4 0 3】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 4 0 1 に記載の方法。

【請求項 4 0 4】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が 2 つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 9 7 に記載の方法。

20

【請求項 4 0 5】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 4 0 4 に記載の方法。

【請求項 4 0 6】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 4 0 4 に記載の方法。

【請求項 4 0 7】

少なくとも 2 つの部分をもつ核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは一对の電極の間に配置されると共に、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

30

(b) 基板に結び付けた前記核酸を第 1 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記ナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されていると共に、前記ナノ粒子には 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 導電率の変化を検出するステップと、から成る方法。

【請求項 4 0 8】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が配置されており、前記電極対の各々は、対の間に基板に付着させたある種類のオリゴヌクレオチドを有する、請求項 4 0 7 に記載の方法。

40

【請求項 4 0 9】

ナノ粒子が金属から形成されている、請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 0】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 1】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 4 0 7 に記載の方法。

50

【請求項 4 1 2】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子を、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記ナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されていると共に、前記ナノ粒子には 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類のナノ粒子上の 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの 1 種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第 1 および第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 導電率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 3】

第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第 2 種類のナノ粒子を第 1 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 および第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 伝導率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 1 2 に記載の方法。

【請求項 4 1 4】

ステップ (d) か、ステップ (d) および (f) かを 1 または複数回繰り返し、導電率の変化を検出する、請求項 4 1 3 に記載の方法。

【請求項 4 1 5】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドが付着した凝集体プローブと接触させるステップであって、凝集体プローブのナノ粒子が電気を伝導可能な材料から形成されており、凝集体上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類のナノ粒子上の 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの 1 種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドと第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 導電率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 6】

少なくとも 2 つの部分の有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板を核酸と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは一对の電極の間に配置されると共に、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(b) 基板に結び付けた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた凝集体プローブと接触させるステップであって、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、前記核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有し、凝集体プローブのナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されており、前記接触が、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 導電率の変化を検出するステップと、から成る方法。

【請求項 4 1 7】

核酸の検出方法であって、基板上で行われ、かつ核酸の存在、量、またはその両方を光学式スキャナで検出するステップから成る方法。

【請求項 4 1 8】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 9】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 0】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータ

10

20

30

40

50

に連結し、核酸の存在、核酸の量、またはその両方を定性的に決定する、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 1】

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が入った容器を含むキット。

【請求項 4 2 2】

請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載のナノ粒子が入った容器を含むキット。

【請求項 4 2 3】

少なくとも 1 対の電極が付着された基板を備え、該電極の間に基板に付着させたオリゴヌクレオチドが存在する、キット。

【請求項 4 2 4】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が付着されている、請求項 4 2 3 に記載のキット。

【請求項 4 2 5】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも 1 種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列は少なくとも 2 つの部分を含むステップと

、
請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載の 1 または複数の種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、該 1 または複数の種類の共役体の各ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの一部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子に付着させたオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせ、その結果、共役体のナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、連結オリゴヌクレオチドと共役体を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 2 6】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも 1 種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列は少なくとも 2 つの部分を含むステップと

、
請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載の 1 または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、該 1 または複数の種類の各々のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせ、その結果、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子と接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 2 7】

ナノファブリケーションの方法であって、

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、

第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが互いに有効にハイブリダイズして、その結果、所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、第 1 および第 2 種類の共役体を接触させるステップと、から成る方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2 8】

ナノファブリケーションの方法であって、

請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、

第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第 2 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが互いに有効にハイブリダイズして、その結果、所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、第 1 および第 2 種類のナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。 10

【請求項 4 2 9】

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められているナノ材料またはナノ構造。

【請求項 4 3 0】

請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載のナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められているナノ材料またはナノ構造。

【請求項 4 3 1】

20

少なくとも 2 つの部分有する選択核酸を他の核酸から分離する方法であって、

請求項 2 3 7～2 4 2 のいずれか一項に記載の 2 つ種類以上のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、該 2 種類以上の共役体の各々のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは選択核酸の該少なくとも 2 つの部分のうちの 1 つの配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効な条件下でハイブリダイズさせ、その結果、選択核酸にハイブリダイズした共役体が凝集して沈降するように、核酸および共役体を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 3 2】

30

少なくとも 2 つの部分有する選択核酸を他の核酸から分離する方法であって、

請求項 2 4 3～2 6 5 のいずれか一項に記載の 2 種類以上のナノ粒子を提供するステップであって、前記 2 種類以上のナノ粒子の各々の上のオリゴヌクレオチドは、選択核酸の該少なくとも 2 つの部分のうちの 1 つの配列に相補的な配列を有するステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効な条件下でハイブリダイズさせ、その結果、選択核酸にハイブリダイズしたナノ粒子が凝集して沈降するように、核酸とナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 3 3】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合する環式ジスルフィド官能基を有する、共役体。 40

【請求項 4 3 4】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するポリチオール官能基を有する、共役体。

【請求項 4 3 5】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するジスルフィド官能基を有し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 4 3 6】

50

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するポリチオール官能基を有し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 4 3 7】

共役体が安定するのに十分な表面密度で前記オリゴヌクレオチドが存在する、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 3 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 7 に記載の共役体。

10

【請求項 4 3 9】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 8 に記載の共役体。

【請求項 4 4 0】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ~ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 9 に記載の共役体。

【請求項 4 4 1】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 4 2】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 4 4 1 に記載の共役体。

20

【請求項 4 4 3】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、該認識部分が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 4 4】

各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されている、請求項 4 4 3 に記載の共役体。

【請求項 4 4 5】

スペーサー部分には、スペーサー部分をナノ粒子に結び付ける環式ジスルフィド官能基を有する部分が、共有結合によって結び付けられる、請求項 4 4 4 に記載の共役体。

30

【請求項 4 4 6】

スペーサー部分には、スペーサー部分をナノ粒子に結び付けるポリチオール官能基を有する部分が、共有結合によって結び付けられる、請求項 4 4 4 に記載の共役体。

【請求項 4 4 7】

スペーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 4 4 2 に記載の共役体。

【請求項 4 4 8】

スペーサー部分が約 10 ~ 約 30 のヌクレオチドまで含む、請求項 4 4 7 に記載の共役体。

【請求項 4 4 9】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 4 4 8 に記載の共役体。

40

【請求項 4 5 0】

ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 5 1】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含んでいる、請求項 4 5 0 に記載のナノ粒子。

【請求項 4 5 2】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同

50

じである、請求項 4 5 1 に記載のナノ粒子。

【請求項 4 5 3】

ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するための、ナノ粒子へのオリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能な環式スルフィド官能基が共有結合されたオリゴヌクレオチドを提供するステップと、
少なくともオリゴヌクレオチドのうちの一部をナノ粒子と結合させてナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 5 4】

ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するための、ナノ粒子へのオリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基が共有結合されたオリゴヌクレオチドを提供するステップと、
少なくともオリゴヌクレオチドのうちの一部をナノ粒子と結合させてナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 4 5 5】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 4 5 4 または 4 5 5 項に記載の方法。

【請求項 4 5 6】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 4 5 5 に記載の方法。

【請求項 4 5 7】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、該スペーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 4 5 3 または 4 5 4 に記載の方法。

【請求項 4 5 8】

スペーサー部分が少なくとも約 1 0 ヌクレオチドを含む、請求項 4 5 7 に記載の方法。

【請求項 4 5 9】

スペーサー部分が約 1 0 ～約 3 0 のヌクレオチドを含む、請求項 4 5 8 に記載の方法。

【請求項 4 6 0】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 4 5 9 に記載の方法。

【請求項 4 6 1】

オリゴヌクレオチドがある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドをさらに含み、前記オリゴヌクレオチドと前記ナノ粒子を、前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合して、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で接触させる、請求項 4 5 7 に記載の方法。

【請求項 4 6 2】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 4 6 1 に記載の方法。

【請求項 4 6 3】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項 4 6 2 に記載の方法。

【請求項 4 6 4】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 4 5 7 に記載の方法。

【請求項 4 6 5】

ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するための、荷電ナノ粒子へのオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能な環式ジスルフィド官能基が共有結合で結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、
ある種類の認識オリゴヌクレオチドと、
ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含むステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、
前記水に少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドのさらなるオリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項466】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するための、荷電ナノ粒子への結合オリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基が共有結合で結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、
ある種類の認識オリゴヌクレオチド、
ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含むステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、
前記水に少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドのさらなるオリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項467】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項465または466に記載の方法。

【請求項468】

ナノ粒子が金ナノ粒子である請求項467に記載の方法。

【請求項469】

すべての塩が1回の追加で水に加えられる、請求項465または466に記載の方法。

【請求項470】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項465または466に記載の方法。

【請求項471】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の2以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の1つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の2以上の組合せから成る群から選択される、請求項465または466に記載の方法。

【請求項472】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項471に記載の方法。

【請求項 473】

少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項 465 または 466 に記載の方法。

【請求項 474】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 473 に記載の方法。

【請求項 475】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ~ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、オリゴヌクレオチドが上に存在する請求項 474 に記載の方法。 10

【請求項 476】

各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、スペーサー部分にはナノ粒子に結合可能な環式ジスルフィド官能基を有する部分が付着されている、請求項 465 に記載の方法。

【請求項 477】

各認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分と認識部分を有し、スペーサー部分にはナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基を有する部分が付着されている、請求項 466 に記載の方法。

【請求項 478】

スペーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。 20

【請求項 479】

スペーサー部分約 10 ~ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 478 に記載の方法。

【請求項 480】

スペーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 476 または 477 に記載の方法。

【請求項 481】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。 30

【請求項 482】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項 481 に記載の方法。

【請求項 483】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。

【請求項 484】

ナノ粒子に結合可能な、共有結合した環式ジスルフィド官能基を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 485】

ナノ粒子に結合可能な、共有結合したポリチオール官能基を有するオリゴヌクレオチド。 40

【請求項 486】

オリゴヌクレオチドと環式ジスルフィド官能基の間に大きな疎水基が位置する、請求項 433、435、445、446、453、465 および 484 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は米国国立衛生研究所 (NIH) 助成番号 GM10265 および陸軍研究所 (ARO) 助成番号 DAAG55-0967-1-0133 の下で政府支援によって完成されたものである。政府は本発明に関し一定の権利を有する。

【0002】

本願は、係属中のPCT出願第PCT/US97/12783号(1997年7月21日出願)の一部継続出願であった、係属中の出願番号第09/240,755号(1999年1月29日出願)の一部継続出願であった、係属出願番号第09/344,667号(1999年6月25日出願)の一部継続出願である。上記の文献は引用により本願に組み込まれる。仮出願番号第60/031,809号(1996年7月29日出願)、第60/200,161号(2000年4月26日出願)、第60/176,409号(2000年1月13日出願)の利益も主張する。上記文献の開示は引用により本願に組み込まれる。

【0003】

(発明の分野)

10

本発明は、天然または合成の、かつ修飾または非修飾の、核酸を検出する方法に関する。また、本発明は、核酸を検出するための材料およびそれらの材料を調製する方法にも関する。本発明はさらに、ナノファブリケーション法に関する。最後に、本発明は、選択核酸を他の核酸から分離する方法に関する。

【0004】

(発明の背景)

核酸を検出し、スクリーニングする方法の開発は、遺伝的、細菌性およびウイルス性疾患の診断に重要である。Mansfield, E. S. ら, *Molecular and Cellular Probe*, 第9巻, 145-156ページ(1995年)参照。現在、特定の核酸配列の検出に使用されている方法には様々なものがある。同上。しかし、これらの方法は、複雑で、時間がかかり、かつ/または特殊化された高価な装置を必要とする。そのような装置を必要としない簡単に高速の核酸検出法が望ましいことは明らかである。

20

【0005】

金属および半導体コロイドをナノ材料へと集合させるために様々な方法が開発されている。これらの方法は、対向する両端に対象コロイドに対して化学的親和性を持つ官能価を有する共有結合リンカー分子を使用することに焦点を合わせている。これまでに最も成功した方法の1つ、Brust ら, *Adv. Mater.*, 第7巻, 795-797ページ(1995年)は、金コロイドと、十分に確立されたチオール吸着化学の使用を伴っている。Bain & Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 第28巻, 506-512ページ(1989年)およびDubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 第43巻, 437-464ページ(1992年)。この方法では、粒子リンカー分子として線状アルカンジチオールを用いる。リンカー分子の各末端のチオール基は、コロイド粒子に共有結合して凝集体構造を形成する。この方法の難点は、プロセスが制御しにくく、集合体が不可逆的に形成されることである。これらの構造の材料特性を十分に利用しようとするならば、集合プロセスを系統的に制御する方法が必要である。

30

【0006】

医用生体材料の調製およびナノファブリケーション法におけるDNA利用の可能性が認識されている。この研究では、研究者らは、十分に決定された幾何学的形状およびサイズを有する印象的な構造を設計するために、オリゴヌクレオチドの配列特異的分子認識特性を用いることに焦点を当てている。Shekhtman ら, *New J. Chem.*, 第17巻, 757-763ページ(1993年); Shaw & Wang, *Science*, 第260巻, 533-536ページ(1993年); Chen ら, *J. Am. Chem. Soc.*, 第111巻, 6402-6407ページ(1989年); Chen & Seeman, *Nature*, 第350巻, 631-633ページ(1991年); Smith and Feigon, *Nature*, 第356巻, 164-168ページ(1992年); Wang ら, *Biochem.*, 第32巻, 1899-1904ページ(1993年); Chen ら, *Biochem.*, 第33巻, 13540-13546ページ(1994年); Marsh ら, *Nucleic Acids Res.*, 第23巻, 69

40

50

6-700ページ(1995年);Mirkin, Annu. Review Biophys. Biomol. Struct., 第23巻, 541-576ページ(1994年);Wells, J. Biol. Chem., 第263巻, 1095-1098ページ(1988年);Wangら, Biochem., 第30巻, 5667-5674ページ(1991年)。しかし、DNA構造生成理論を実験的に確認するのはまだまだ先のことである。Seemanら, New J. Chem., 第17巻, 739-755ページ(1993年)。

【0007】

(発明の要約)

本発明は、核酸を検出する方法を提供する。1実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子(ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体)を核酸と接触させるステップを含む。核酸は少なくとも2つの部分を有し、各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、該核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的な配列を有している。接触は、核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイズによって、検出可能な変化が生じる。

【0008】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を核酸と接触させるステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。接触は、核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こり、このハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0009】

さらなる実施形態では、方法は、第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップを含む。第1種類のナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。基板を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で核酸と接触させる。その後、オリゴヌクレオチドが付着した第2種類のナノ粒子を提供する。該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の1または複数の他の部分に相補的な配列を有する。基板に結び付けられた核酸を、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第2種類のナノ粒子オリゴヌクレオチドと接触させる。検出可能な変化はこの時点で観察可能となる。方法は、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを提供するステップをさらに含む。該2つの部分の、第1部分は、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である。結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と接触させる。その後、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第3種類のナノ粒子を、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた結合オリゴヌクレオチドと接触させる。最後に、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0010】

さらに別の実施形態では、方法は、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップを含む。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸を、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類のナノ粒子と接触させる。接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられた第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、オリゴヌクレオチドを付着させた第

2種類のナノ粒子と接触させる。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有する。接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。最後に、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0011】

別の実施形態では、方法は、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップを含む。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸を、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着
10
させたリポソームと接触させる。接触は、リポソーム上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられたリポソームーオリゴヌクレオチド共役体を、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類のナノ粒子と接触させる。第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている。接触は、疎水的相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリポソームに有効に付着する条件下で起こる。検出可能な変化はこの時点で観察可能となる。方法は、リポソームに結び付けられた第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類のナノ粒子と接触
20
させるステップをさらに含み得る。第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドが付着する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、検出可能な変化を観察する。

【0012】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、検出する核酸を接触させるステップを含む。オリゴヌクレオチドは、該核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられた核酸を、該核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子と接触させる。接
30
触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成し、その検出可能な変化を観察する。

【0013】

さらに別の実施形態では、方法は、第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップを含む。ナノ粒子には、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。その後、核酸を、該核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付けられたナノ粒子と接触させる。次に、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供する。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチド
40
の一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。最後に、基板に結び付けられた核酸を、該核酸と凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、凝集体プローブと接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0014】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供する。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの
50

一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類ナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するそれにオリゴヌクレオチドが付着している。核酸、基板および凝集体プローブを、凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とを有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0015】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供する。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類ナノ粒子の少なくとも1種類には、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子を提供する。第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、基板に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。核酸、凝集体プローブ、ナノ粒子および基板を、凝集体プローブ上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

10

【0016】

別の実施形態では、方法は、検出する核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップを含む。オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。基板に結び付けられた核酸を、前記核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたりポソームと接触させる。接触は、リポソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを提供する。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着する。基板に結び付けられたリポソームを、疎水的相互作用の結果として凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドがリポソームに付着するのに有効な条件下で、凝集体プローブと接触させ、検出可能な変化を観察する。

20

30

【0017】

さらに別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。該オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアプローブを提供する。各種類のナノ粒子には、他の種類のナノ粒子の少なくとも1つの上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。次に、2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、該核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。第2種類のオリゴヌクレオチドは、コアプローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列を有する。核酸、ナノ粒子、基板およびコアプローブを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとおよび基板上のオリゴヌクレオチドと該核酸を有効にハイブリダイズさせ、かつコアプローブ上のオリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

40

【0018】

方法の別の実施形態は、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌ

50

クレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアプローブを提供する。各種類のナノ粒子には、少なくとも1つの他の種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。凝集体プローブのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列と、コアプローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列とを含む、ある種類の連結オリゴヌクレオチドを提供する。核酸、連結オリゴヌクレオチド、基板およびコアプローブを、連結オリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせ、かつコアプローブ上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。 10

【0019】

さらに別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。各結合オリゴヌクレオチドは2つの部分を有しており、1つの部分の配列は、核酸の複数の部分の1つの配列に相補的である。また、もう1つの部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的である。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。核酸と結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。その後、検出可能な変化を観察する。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、核酸との接触に先立って、結合オリゴヌクレオチドと接触させてもよいし、または3つすべてを同時に接触させてもよい。 20

【0020】

別の実施形態では、方法は、核酸をオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類の粒子と接触させるステップを含む。第1種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、該粒子に付けられない端部にエネルギー供与体分子を有する。第2種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、該粒子に付けられない端部にエネルギー受容体分子を有する。接触は、粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。また、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。エネルギー供与体および受容体分子は蛍光分子であってよい。 30

【0021】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のマイクロスフェアを提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた、検出可能な変化を生成するある種類のナノ粒子を提供する。核酸を、ラテックスマイクロスフェア上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下でマイクロスフェアおよびナノ粒子と接触させ、その後、蛍光の変化、別の検出可能な変化またはその両方を観察する。 40

【0022】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子も提供する。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、蛍光分子と同様に標識される。核酸を、核酸と該2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、2種類のナノ粒子と接触させ、その後、蛍光の変化を観察する。

【0023】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類の粒子を提供 50

するステップを含む。該オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有し、両部分は、核酸の配列の一部に相補的である。第1部分と第2部分を含むある種類のプローブオリゴヌクレオチドも提供する。該第1部分は、粒子に付着させたオリゴヌクレオチドの該第1部分に相補的な配列を有し、また、両部分は核酸の配列の一部に相補的である。またプローブオリゴヌクレオチドは、その一端を、リポーター分子で標識される。その後、粒子およびプローブオリゴヌクレオチドを、粒子上のオリゴヌクレオチドをプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせてサテライトプローブを生成する条件下で接触させる。その後、サテライトプローブを、プローブオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で核酸と接触させる。粒子は除去し、リポーター分子を検出する。

10

【0024】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させることにより検出する。該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。該オリゴヌクレオチドは、基板に置かれた一対の電極の間に配置される。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸をある種類のナノ粒子と接触させる。ナノ粒子は、電気を伝導可能な材料で形成されている。ナノ粒子には1または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、該1または複数の種類オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。核酸が存在する場合、導電率の変化を検出することが可能である。好ましい実施形態では、基板上には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはその両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が配置されている。アレイ中の各電極対は、2つの電極間に、基板に付着されたある種類のオリゴヌクレオチドを有するだろう。

20

【0025】

本発明は、方法が基板上で行われる、核酸の検出方法をさらに提供する。該方法は、光学式スキャナで核酸の存在、量またはその両方を検出するステップを含む。

【0026】

本発明は、核酸を検出するためのキットをさらに提供する。1実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を入れた少なくとも1つの容器を含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する。

30

【0027】

代わりに、キットは少なくとも2つの容器を含んでもよい。第1容器には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着されたナノ粒子が入る。第2容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入る。

【0028】

さらなる実施形態では、キットは少なくとも1つの容器を含む。該容器には、オリゴヌクレオチドを付着させた金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入っている。オリゴヌクレオチドは核酸の一部に相補的な配列を有し、ナノ粒子に付着されないオリゴヌクレオチドの端部には蛍光分子が付いている。

40

【0029】

さらに別の実施形態では、キットは基板を含む。基板にはナノ粒子が付着し、該ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた、第1容器も含む。キットは、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを入れた第2容器もさらに含む。2つの部分のうちの第1部分は、第1容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも

50

1つの部分に相補的である。キットはさらに、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第3容器も含む。

【0030】

別の実施形態では、キットは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子を入れた第1容器と、第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子を入れた第2容器とを含む。

【0031】

さらに別の実施形態では、キットは、基板と、ナノ粒子を入れた第1容器と、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1種類のオリゴヌクレオチドを入れた第2容器と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドを入れた第3容器と、第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部と相補的な配列を有する第3の種類のオリゴヌクレオチドを入れた第4容器とを含む。

【0032】

さらなる実施形態では、キットは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板を含む。キットはまた、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたリポソームを入れた第1容器と、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第2容器とを有する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、疎水的相互作用によりナノ粒子をリポソームに付着できるように、そのナノ粒子に付着されない端部に疎水基を有する。キットは、第1種類のナノ粒子に付着された第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着された第2種類のナノ粒子を入れた第3容器をさらに含み得る。第1種類のナノ粒子に付着された第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

【0033】

別の実施形態では、キットは、ナノ粒子を付着させた基板を含む。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはまた、凝集体プローブを入れた第1容器も含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0034】

さらに別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。キットはさらに、凝集体プローブを入れた第1容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0035】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、凝集体プローブを入れた第1容器とを含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも1種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはまた、ナノ粒子を入れた第2容器も含む。該ナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着し

10

20

30

40

50

ている。第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。第2種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。

【0036】

別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドが付着した基板を含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。キットはまた、オリゴヌクレオチドが付着したリボソームを入れた第1容器も含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを入れた、第2容器も含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基を有するオリゴヌクレオチドが付着している。 10

【0037】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器を含み得る。キットはまた、1または複数の追加の容器も含み、各容器には結合オリゴヌクレオチドを入れる。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第1部分と、検出する核酸の一部分の配列に相補的な配列を有する第2部分とを有する。各配列が検出する核酸の配列の一部分に相補的である限り、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は異なってもよい。別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた1種類のナノ粒子と、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドとを入れた容器を含む。該1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドの各々は、少なくとも2つの部分を含む配列を有している。第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため、容器内で結合オリゴヌクレオチドはナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。第2部分は、核酸の一部分の配列に相補的である。 20

【0038】

別の実施形態では、キットは、2種類の粒子を入れた1または2つの容器を含み得る。第1種類の粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着している。オリゴヌクレオチドは、その粒子に付着しない端部が、エネルギー供与体で標識される。第2種類の粒子には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドは、その粒子に付着しない端部が、エネルギー受容体で標識される。エネルギー供与体と受容体は蛍光分子であってよい。 30

【0039】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器を含む。キットはまた、各容器に結合オリゴヌクレオチドを入れた、1または複数の追加の容器も含む。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第1部分と、検出する核酸の部分の配列に相補的な配列を有する第2部分とを有する。各配列が検出する核酸の配列の部分に相補的である限り、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は異なってもよい。さらに 40
別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた1種類のナノ粒子と、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドとを入れた容器を含む。該1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドの各々は、少なくとも2つの部分を含む配列を有する。その第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため、容器内で結合オリゴヌクレオチドはナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。第2部分は、核酸の一部分の配列に相補的である。

【0040】

別の代替実施形態では、キットは少なくとも3つの容器を含む。第1容器にはナノ粒子が入っている。第2容器は、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1のオリゴヌクレオチドが入っている。第3容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する 50

第2のオリゴヌクレオチドが入っている。キットはさらに、少なくとも2つの部分（第1部分は第2のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的）を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを入れた第4容器と、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを入れた第5の容器も含む。

【0041】

別の実施形態では、キットは2種類の粒子を入れた1または2つの容器を含む。第1種類の粒子には、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつナノ粒子に付着しない端部にエネルギー供与体分子が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。第2種類の粒子には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、かつナノ粒子に付着しない端部にエネルギー受容体分子が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。エネルギー供与体と受容体は蛍光分子であってよい。

10

【0042】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のマイクロスフェアを入れた第1容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子を入れた第2容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、キットは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。

【0043】

別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を入れた第1容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。キットはまた、オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を入れた第2容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。

20

【0044】

別の実施形態では、キットは、凝集体プローブを入れた容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

30

【0045】

さらなる実施形態では、キットは、凝集体プローブを入れた容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。

【0046】

さらなる実施形態では、キットは、サテライトプローブを入れた容器を含む。サテライトプローブは、オリゴヌクレオチドが付着した粒子を含む。オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有し、両部分は核酸の配列の部分に相補的な配列を有する。サテライトプローブは、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするプローブオリゴヌクレオチドも含む。プローブオリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有する。該第1部分は、粒子に付着したオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有する。また、両部分は、核酸の配列の部分に相補的な配列を有する。プローブオリゴヌクレオチドはさらに、その一端にリポーター分子を有する。

40

【0047】

別の実施形態では、キットはコアプローブを入れた容器を含む。コアプローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。コアプローブのナノ粒子

50

は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。

【0048】

さらに別の実施形態では、キットは、少なくとも1対の電極が付着された基板であって、該電極間で基板に対してオリゴヌクレオチドが付着された基板を含む。オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。

【0049】

本発明はさらに、サテライトプローブ、凝集体プローブおよびコアプローブを提供する。本発明はさらに、ナノ粒子を付着させた基板を提供する。該ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着され得る。

10

【0050】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させた金属または半導体ナノ粒子を提供する。オリゴヌクレオチドはナノ粒子に付着しない端部が蛍光分子で標識される。

【0051】

本発明はさらに、ナノファブリケーションの方法を提供する。方法は、選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列が少なくとも2つの部分を有するステップを含む。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの配列の部分に相補的な配列を有するステップをさらに含む。連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、所望のナノ材料かナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。

20

【0052】

本発明は、ナノファブリケーションの別の方法を提供する。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を提供するステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第1および第2種類のナノ粒子を、所望のナノ材料かナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを互いに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。

30

【0053】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、該ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められたナノ材料またはナノ構造を提供する。

【0054】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む組成物を提供する。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分か連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分か連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

【0055】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器とオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第2容器を含む容器のアセンブリを提供する。第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第2容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

40

【0056】

本発明はさらに、複数の異なるオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供する。本発明は、少なくとも2つの部分を有する選択核酸を他の核酸から分離する方法をさらに提供する。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提

50

供するステップであって、該1または複数のナノ粒子の各々の上のオリゴヌクレオチドは選択核酸の前記少なくとも2つの部分のうちの1つの配列に相補的な配列を有するステップを含む。選択核酸および他の核酸を、選択核酸とハイブリダイズしたナノ粒子が凝集して沈降するように、選択核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、ナノ粒子と接触させる。

【0057】

さらに、本発明は、ユニークなナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を作製する方法を提供する。第1のそのような方法は、安定したナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するために荷電ナノ粒子へオリゴヌクレオチドを結合させるステップを含む。そうするために、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合で結び付いているオリゴヌクレオチドを、少なくともオリゴヌクレオチドの一部が該官能基によってナノ粒子に結び付けられるのに十分な時間、ナノ粒子と水中で接触させる。次に、少なくとも1つの塩を水に加えて、塩溶液を作製する。塩溶液のイオン強度は、オリゴヌクレオチドの互いに対する静電斥力と、正に帯電したナノ粒子に対する負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力か、負に帯電したナノ粒子に対する正に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力かの一方とを少なくとも部分的に克服するのに十分な強度でなければならない、塩を加えた後、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して安定したナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でインキュベートされる。本発明はさらに、安定したナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するための該共役体の使用方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブリケーションの方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。

10

20

【0058】

本発明は、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させる別の方法を提供する。方法は、ある種類の認識オリゴヌクレオチドとある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、該ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子と結合して共役体を生成するのに有効な条件下で接触させる。本発明はさらに、該方法によって生成されたナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するために該共役体を使用する方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブリケーションの方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。「認識オリゴヌクレオチド」とは、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである。「希釈剤オリゴヌクレオチド」は、認識オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結び付けられる能力または、認識オリゴヌクレオチドがその標的に結び付く能力に干渉しない任意の配列を有し得る。

30

【0059】

本発明はさらに、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させる別の方法を提供する。方法は、少なくとも1種類の認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。認識オリゴヌクレオチドは認識部分とスペーサー部分を含む。認識オリゴヌクレオチドの認識部分は、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも1部分に相補的な配列を有する。認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分は、スペーサー部分がナノ粒子に結合可能であるように設計される。ナノ粒子に認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分が結合した結果、認識部分はナノ粒子の表面から離れ、その標的とのハイブリダイズのためによりアクセス可能とある。共役体を生成するために、少なくとも認識オリゴヌクレオチドの一部がナノ粒子に結合するのに有効な条件下で、認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させる。本発明はさらに、この方法によって生成されたナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するために該共役体を使用する方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブリケーションの方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。

40

50

【0060】

本発明は、環式ジスルフィドを含むリンカーによって、ナノ粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法を含む。適切な環式ジスルフィドは、その環内に2つの硫黄原子を含めた5つまたは6つの原子を有する。適切な環式ジスルフィドは市販されている。環式のジスルフィドの還元形も使用することが可能である。好ましくは、リンカーは、環式ジスルフィドに付着された炭化水素部分をさらに含む。適切な炭化水素は市販されており、（例えば付表に記述されるように）環式ジスルフィドに取り付けられる。好ましくは、炭化水素部分はステロイド残基である。リンカーがオリゴヌクレオチドに付けられ、オリゴヌクレオチドリンカーが本明細書に記載したようにナノ粒子に付着される。

【0061】

本明細書に使用する場合、ある「～種類のオリゴヌクレオチド」とは、同じ配列を有する複数のオリゴヌクレオチド分子を表す。オリゴヌクレオチドが付着している、ある「種類の」ナノ粒子、共役体、粒子、ラテックスミクロスフェアなどは、同種類のオリゴヌクレオチドが付着している複数の上記物質を指す。また、「オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子」は、「ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体」、または、本発明の検出法の場合には、「ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドプローブ」、「ナノ粒子プローブ」もしくは単に「プローブ」と称されることもある。

【0062】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明の実施に有用なナノ粒子としては、金属（例えば、金、銀、銅および白金）、半導体（例えば、CdSe、CdS、およびCdSまたはZnSでコートしたCdSe）ならびに磁性（例えば、強磁性）コロイド材料が挙げられる。本発明の実施に有用な他のナノ粒子には、ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAsが含まれる。ナノ粒子のサイズは、好ましくは約5～約150nm（平均直径）、より好ましくは約5～約50nm、最も好ましくは約10～約30nmである。ナノ粒子はロッドであってもよい。

【0063】

金属、半導体および磁気ナノ粒子の調製法は当該技術分野において周知である。例えば、Schmid, G. (編), Clusters and Colloids (VCH, Weinheim, 1994年); Hayat, M. A. (編), Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1991年); Massart, R., IEEE Transactions On Magnetism, 第17巻, 1247ページ (1981年); Ahmadi, T. S. ら, Science, 第272巻, 1924ページ (1996年); Henglein, A. ら, J. Phys. Chem., 第99巻, 14129ページ (1995年); Curtis, A. C. ら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 第27巻, 1530ページ (1988年) 参照。

【0064】

ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAsナノ粒子の調製法も当該技術分野において公知である。例えば、Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 第32巻, 41ページ (1993年); Henglein, Top. Curr. Chem., 第143巻, 113ページ (1988年); Henglein, Chem. Rev., 第89巻, 1861ページ (1989年); Brus, Appl. Phys. A., 第53巻, 465ページ (1991年); Bahncmann, Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy (PelizzettiおよびSchiaavello編, 1991年), 251ページ; WangおよびHerron, J. Ph

10

20

30

40

50

y s. Chem., 第95巻, 525ページ(1991年); Olshavskyら, J. Am. Chem. Soc., 第112巻, 9438ページ(1990年); Ushidaら, J. Phys. Chem., 第95巻, 5382ページ(1992年)参照。

【0065】

適当なナノ粒子は、例えば、テッド・ペラ社(Ted Pella, Inc.)(金)、アマーシャム社(Amersham Corporation)(金)およびナノプローブス社(Nanoprobes, Inc.)(金)からも市販されている。

【0066】

核酸の検出に用いるのに好ましいのは金ナノ粒子である。金コロイド粒子は、美しい色を発するバンドに対して高い吸光係数を有する。これらの印象的な色は、粒度、濃度、粒子間間隔や、凝集体の凝集度および形状(幾何学)に応じて変化し、それが、これらの材料を比色アッセイ用に特に魅力的なものとしている。例えば、金ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドおよび核酸とがハイブリダイズすると直ぐに、肉眼にも見える変色が生じる(例えば、実施例参照)。

10

【0067】

金ナノ粒子は、上記に挙げたのと同じ理由で、また、それらの安定性、電子顕微鏡検査による画像化の容易さや、十分に特性決定されたチオール官能基による修飾(以下参照)などの理由から、ナノファブリケーションに用いるのにも特に好ましい。また、半導体ナノ粒子も、それらの固有の電子特性および発光特性のゆえにナノファブリケーション用に好ましい。

20

【0068】

オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるために、ナノ粒子もしくはオリゴヌクレオチドまたは両者を官能化する。そのような方法は当該技術分野では公知である。例えば、3'末端または5'末端がアルカンチオールにより官能化されたオリゴヌクレオチドは、金ナノ粒子に容易に付着する。Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, TX, 109-121ページ(1995年)参照。さらに、Mucicら, Chem. Commun., 555-557ページ(1996年)(平らな金表面に3'チオールDNAを付着させる方法を記載している;この方法は、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるのに用い得る)参照。アルカンチオール法は、オリゴヌクレオチドを、他の金属、半導体および磁性コロイドや、上記にリストした他のナノ粒子に付着させるのにも用い得る。オリゴヌクレオチドを固体表面に付着させるための他の官能基には、ホスホロチオエート基(例えば、オリゴヌクレオチド-ホスホロチオエートを金表面に結合させることに関しては、米国特許第5,472,881号参照)、置換アルキルシロキサン(例えば、シリカおよびガラス表面へのオリゴヌクレオチドの結合に関しては、Burwell, Chemical Technology, 第4巻, 370-377ページ(1974年)ならびにMatteucciおよびCaruthers, J. Am. Chem. Soc., 第103巻, 3185-3191ページ(1981年)、アミノアルキルシロキサンおよび類似のメルカプトアルキルシロキサンの結合に関しては、Grabarら, Anal. Chem., 第67巻, 735-745ページ参照)が含まれる。オリゴヌクレオチドを固体表面に付着させるには、5'チオヌクレオシドまたは3'チオヌクレオシドを末端基とするオリゴヌクレオチドを用いてもよい。以下の参考文献はオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるのに用い得る他の方法を記載している: Nuzzoら, J. Am. Chem. Soc., 第109巻, 2358ページ(1987年)(金上のジスルフィド); AllaraおよびNuzzo, Langmuir, 第1巻, 45ページ(1985年)(アルミニウム上のカルボン酸); AllaraおよびTompkins, J. Colloid Interface Sci., 第49巻, 410-421ページ(1974年)(銅上のカルボン酸); Iler, The Chemistry Of Siica, 第6章, (Wiley, 1979年)(シリカ上のカル

30

40

50

ボン酸) ; Timmons and Zisman, J. Phys. Chem., 第69巻, 984-990ページ(1965年)(白金上のカルボン酸); SoriagaおよびHubbard, J. Am. Chem. Soc., 第104巻, 3937ページ(1982年)(白金上の芳香環化合物); Hubbard, Acc. Chem. Res., 第13巻, 177ページ(1980年)(白金上のスルホラン、スルホキシドおよび他の官能化溶剤); Hickmanら, J. Am. Chem. Soc., 第111巻, 7271ページ(1989年)(白金上のイソニトリル); MaozおよびSagiv, Langmuir, 第3巻, 1045ページ(1987年)(シリカ上のシラン); MaozおよびSagiv, Langmuir, 第3巻, 1034ページ(1987年)(シリカ上のシラン); Wassermanら, Langmuir, 第5巻, 1074ページ(1989年)(シリカ上のシラン); EltekováおよびEltekov, Langmuir, 第3巻, 951ページ(1987年)(二酸化チタンおよびシリカ上の芳香族カルボン酸、アルデヒド、アルコールおよびメトキシ基); Lecら, J. Phys. Chem., 第92巻, 2597ページ(1988年)(金属上の硬質ホスフェート)。

10

【0069】

環式ジスルフィドで官能化されたオリゴヌクレオチドは本発明の範囲内にある。環式ジスルフィドは、好ましくは、その環の中に2つの硫黄原子を含めて5または6つの原子を有している。適切な環式ジスルフィドは市販されているか、既知の方法によって合成される。環式ジスルフィドの還元形も使用することができる。

【0070】

好ましくは、リンカーは、環式ジスルフィドに付けられた炭化水素部分をさらに含む。適切な炭化水素は市販されており、環式ジスルフィドに付けられる。好ましくは炭化水素部分はステロイド残基である。環式ジスルフィドに付けられたステロイド残基を含むリンカーを使用して調製されたオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体は、期せずしてアルカンチオールまたは非環式ジスルフィドをリンカーとして使用して調製した共役体と比較して、チオール(例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)溶液中で使用されるジチオスレイトール)に対して著しく安定であることが分かった。確かに、本発明のオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体は300倍安定していることがわかった。この予期しなかった安定性は、恐らく各オリゴヌクレオチドが、1つの硫黄原子ではなく、2つの硫黄原子によってナノ粒子に固定されているという事実による。詳しく説明すると、環式ジスルフィドの2つの隣接した硫黄原子が、オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体の安定化に有効なキレート化効果を有することが考えられる。リンカーの大きな疎水性ステロイド残基も、ナノ粒子の表面への水溶性分子の接近からナノ粒子を遮ることにより、共役体の安定性に寄与するように思われる。

20

30

【0071】

以上を考慮すると、両方の硫黄原子がナノ粒子に同時にくっ付くことができるように、環式ジスルフィドの2つの硫黄原子は好ましくは十分に接近しなければならない。より好ましくは、2つの硫黄原子は互いに隣接する。また、炭化水素部分は、ナノ粒子の表面を遮る大きな疎水性表面を示すように大きくなくてはならない。

【0072】

環式ジスルフィドリンカーを使用したオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体は、核酸検出用の診断アッセイや本明細書に記載したナノファブリケーションの方法において、プローブとして使用され得る。本発明のそのような共役体は、それを使用した診断アッセイの感度を向上させることが期せずして分かった。特に、環式ジスルフィドに付けられたステロイド残基を含むリンカーを使用して調製されたオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体を使用したアッセイは、約10倍アルカンチオールまたは非環式ジスルフィドをリンカーとして使用して調製された共役体を使用したアッセイよりも10倍感度が高いと分かった。

40

【0073】

上記のチオールに対する本発明のオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体の驚くべき安定性

50

は、それらをPCR溶液中で直接使用することを可能にする。したがって、PCRによって増幅されるDNA標的に対してプローブとして加えられた本発明のオリゴヌクレオチドナノ粒子は、30または40回のPCRの加熱-冷却サイクルを受け、チューブを開かなくてもなおアンプリコンを検出することができる。PCR後にプローブ追加のためにサンプルチューブを開くと、後のテストに使用する機器の汚染による深刻な問題が起こる可能性がある。

【0074】

最後に、本発明は、本発明のある種類のオリゴヌクレオチド環式ジスルフィドリンカーが入った容器または本発明のある種類のオリゴヌクレオチドナノ粒子共役体が入った容器を含むキットを提供する。該キットは、核酸検出またはナノファブリケーションに有効な他の試薬や品目をさらに含んでもよい。

10

【0075】

各ナノ粒子には多数のオリゴヌクレオチドが付着する。その結果、各ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、相補的配列を有する多数のオリゴヌクレオチドまたは核酸に結合し得る。

【0076】

本発明の実施に際して、規定配列を有するオリゴヌクレオチドが様々な目的に使用される。予め決定した配列を有するオリゴヌクレオチドを調製する方法は周知である。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年) および F. Eckstein (編) Oligonucleotides and Analogues, 第1版 (Oxford University Press, New York, 1991年) 参照。オリゴヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成には、共に固相合成法が好ましい (周知のDNA合成法は、RNAの合成にも有用である)。オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドは、酵素的に調製することもできる。

20

【0077】

本発明は核酸検出法を提供する。これらの方法はまた、どの種類の核酸をも検出し得るし、例えば、病気の診断や核酸の配列決定にも用い得る。本発明の方法により検出し得る核酸の例としては、遺伝子 (例えば、特定の疾患に関与する遺伝子)、ウイルスRNAおよびDNA、細菌DNA、菌類DNA、cDNA、mRNA、RNAおよびDNAフラグメント、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸などがある。例えば、核酸検出法の用途例には、ウイルス性疾患 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスおよびエプスタイン-バーウイルス)、細菌性疾患 (例えば、結核、ライム病、H. ピロリ、大腸菌感染症、レジオネラ感染症、マイコプラズマ感染症、サルモネラ感染症) 性的伝染病 (例えば、淋病)、遺伝性疾患 (例えば、嚢胞性線維症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フェニルケトン尿症、鎌状赤血球貧血)、ならびにガン (例えば、ガン発症に関与する遺伝子) の診断および/またはモニター用; 法医学用; DNA配列決定用; 親子鑑定テスト用; 細胞系確認用; 遺伝子療法のモニター用; ならびに他の多くの目的が含まれる。

30

40

【0078】

肉眼による変色の観察に基づく核酸検出法は、安価、高速、簡単、強靱 (試薬が安定している) であり、特殊化装置または高価な装置を必要とせず、かつ計器による計測がほとんど不要である。これらの点から、上記方法は、例えば、DNA配列決定における研究および解析実験において、特定病原体の存在を検出する分野において、治療薬の処方を支援するために感染症の迅速な同定を必要とする医院において、また費用のかからない最前線のスクリーニングをするために家庭や保険センターにおいて用いるのに特に適している。

【0079】

検出すべき核酸は、公知方法で単離することもできるし、細胞、組織試料、生物流体 (例えば、唾液、尿、血液、血清)、PCR成分を含有する溶液、大過剰量のオリゴヌクレオ

50

チドまたは高分子量DNAを含有する溶液、および当該技術分野においても既知の他の試料中で直接検出することもできる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年)ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編、Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年)参照。ハイブリダイズ用プローブを用いて検出するための核酸の調製法は当該技術分野では周知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年)ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編、Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年)参照。

10

【0080】

核酸が少量で存在する場合、当該技術分野において公知の方法を用い得る。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年)ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編、Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年)参照。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅が好ましい。

【0081】

本発明の1つの核酸検出法は、核酸とオリゴヌクレオチドが付着している1つ以上の種類のナノ粒子とを接触させるステップを含む。検出すべき核酸は少なくとも2つの部分を有している。これらの部分の長さ、もしあれば、それらの間隔は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが核酸とハイブリダイズしたときに検出可能な変化が生じるように選択される。これらの長さ、間隔は、経験的に決定可能であり、用いられる粒子の種類およびそのサイズ、ならびにアッセイに用いられる溶液中に存在する電解質の種類(当該技術分野では公知のように、ある種の電解質は、核酸のコンホメーションに影響を与える)に依存するであろう。

20

【0082】

また、核酸を他の核酸の存在下に検出しようとする場合、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが結合すべき核酸部分は、核酸の検出を特異的にするのに十分なユニーク配列を含むように選択しなければならない。そのようにするためのガイドラインは当該技術分野では周知である。

30

【0083】

核酸は、1種類のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を用いればすむように互いに十分に近接した反復配列を含んでいることがあるが、このようなことはめったに起こらない。一般に、核酸の選択した複数の部分は異なる配列を有し、好ましくは異なるナノ粒子に付着している、該選択部分は、2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子と接触することになる。核酸を検出するための系の1つの例が図2に示されている。図で分るように、第1ナノ粒子に付着している第1オリゴヌクレオチドは、一本鎖DNA中の標的配列の第1部分に対して相補的な配列を有している。第2ナノ粒子に付着している第2オリゴヌクレオチドは、一本鎖DNA中の標的配列の第2部分に対して相補的な配列を有している。DNAの追加部分是对应ナノ粒子の標的となり得る。図17参照。核酸のいくつかの部分の部分を標的のすると、検出可能な変化の大きさが増大する。

40

【0084】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と核酸との接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸の標的配列とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年)参照。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いるのが好ましい。

【0085】

検出すべき核酸とナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を含有する溶液を凍結解凍するこ

50

とにより、ハイブリダイゼーションをより高速にすることができる。溶液は、ドライアイス-アルコール浴中に凍結させるのに十分な時間（一般に、 $100\mu\text{l}$ の溶液の場合、約1分）入れる方法などの任意の慣用法で凍結し得る。溶液は、熱変性温度より低い温度で解凍しなければならないが、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と核酸とのほとんどの組合せに対しては、室温が好都合であろう。溶液の解凍後、ハイブリダイゼーションが完了し、溶液解凍後に検出可能な変化が観察される。

【0086】

検出すべき核酸およびナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を含有する溶液を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと標的核酸とで形成された複合体の解離温度（ T_m ）より低い温度まで温めて、ハイブリダイゼーション速度を増大させることもできる。あるいは、解離温度（ T_m ）以上に加熱し、溶液を冷却することにより、高速ハイブリダイゼーションを達成することもできる。

10

【0087】

ハイブリダイゼーションの速度は、塩濃度を（例えば、 0.1M から 0.3M NaCl に）高めることにより、増大させることも可能である。

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とがハイブリダイズすると生じる検出可能な変化は、変色、ナノ粒子凝集体の形成、または凝集したナノ粒子の沈殿であり得る。変色は、肉眼または分光分析により観察し得る。ナノ粒子凝集体の形成は、電子顕微鏡検査または比濁分析によって観察し得る。凝集したナノ粒子の沈殿は、肉眼でも顕微鏡検査によっても観察し得る。好ましいのは、肉眼で観察し得る変化である。特に好ましいのは、肉眼で観察し得る変色である。

20

【0088】

肉眼による変色の観察は、対照的な色を背景にするとより容易に実施し得る。例えば、金ナノ粒子を用いる場合、変色の観察は、（シリカまたはアルミナTLCプレート、濾紙、セルロイドメンブレン、およびナイロンメンブレン、好ましくはC-18シリカTLCプレートなどの）固体白色表面上にハイブリダイゼーション溶液をスポットし、スポットを乾燥させることにより容易になる。初めは、スポットは、（ハイブリダイゼーション不在下のピンク／赤色から、ハイブリダイゼーション存在下の紫がかった赤／紫色の範囲の）ハイブリダイゼーション溶液の色を呈する。室温下または 80°C （温度は重要ではない）下に乾燥させたとき、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体がスポットする前に標的核酸とハイブリダイズして結合していると、青色スポットが生じる。（例えば、標的核酸が存在しないために）ハイブリダイゼーションが起こらないと、スポットはピンク色である。青色スポットとピンク色スポットは安定であり、のちに冷却しても、加熱しても、経時的にも、変化しない。それらのスポットはテストの便利な永久記録を提供する。変色を観察するのに、（ハイブリダイズしたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とハイブリダイズしていないものの分離などの）他のステップは不要である。

30

【0089】

アッセイ結果を容易に視覚化するための代替法は、液体を吸引してフィルターに通過させながら、標的核酸にハイブリダイズしたナノ粒子プローブ試料をガラス繊維フィルター（例えば、サイズが 13nm の金ナノ粒子と共に用いる場合には、細孔サイズ $0.7\mu\text{m}$ 、グレードFG75のホウケイ酸塩マイクロファイバーフィルター）に対してスポットする方法である。その後、（フィルターの細孔より大きいために保持された）ナノ粒子プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションにより生成した凝集体を含む観察可能なスポットを残して、過剰なハイブリダイズしていないプローブをフィルターに通して水で洗い流す。この技術は、過剰なナノ粒子プローブを使用し得るので、高い感度を提供し得る。残念ながら、ナノ粒子プローブは、試みた他の多くの固体表面（シリカスライド、逆相プレート、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースおよび他のメンブレン）には粘着するために、これらの表面は使用できない。

40

【0090】

図2に示されている検出系の重要な側面は、検出可能な変化を得るステップが、2つの異

50

なるオリゴヌクレオチドと核酸中の所与の標的配列との協同ハイブリダイゼーションによって決まることである。2つのオリゴヌクレオチドのいずれにおける誤対合も、粒子間の結合を不安定にするであろう。塩基対における誤対合が、長いオリゴヌクレオチドプローブの結合よりも短いオリゴヌクレオチドプローブの結合に対してはるかに大きな不安定化作用を及ぼすことは周知である。図2に示されている系の利点は、この系が、長い標的配列およびプローブ（図2に示されている実施例では18塩基対）に関連する塩基識別を利用するにも拘わらず、短いオリゴヌクレオチドプローブ（図2に示されている実施例では9塩基対）に特徴的な感度を有することである。

【0091】

核酸の標的配列は、図2のように連続的なこともあるし、図3に示されているように、標10
的配列の2つの部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと相補的ではない第3部分によって分離されていることもある。後者の場合、溶液中で遊離すると共にこの第3部分の配列に対して相補的な配列を有する、フィラー（filler、充填）オリゴヌクレオチドを用いるというオプションもある（図3参照）。フィラーオリゴヌクレオチドが核酸の第3部分とハイブリダイズすると、二本鎖セグメントができ、それによってナノ粒子間の平均間隔が変化し、その結果、色が変わる。図3に示されている系は、検出法の感度を高め得る。

【0092】

核酸検出法の実施態様のなかには基板を利用するものもある。基板を用いることにより、20
検出可能な変化（シグナル）を増幅し、アッセイの感度を高めることができる。

【0093】

検出可能な変化を観察し得る任意の基板を用いてよい。適当な基板としては、透明固体表面（例えば、ガラス、石英、プラスチックおよび他のポリマー類）、不透明固体表面（例えば、TLCシリカプレート、濾紙、ガラス繊維フィルター、セルロイドメンブレン、ナイロンメンブレンなどの白色固体表面）、および導電性固体表面（例えば、インジウムスズーオキシド（ITO））が挙げられる。基板は、任意の形状または厚さであってよいが、一般的には、平坦で薄い。好ましいのは、ガラス（例えば、ガラス製スライド）またはプラスチック（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）などの透明な基板である。

【0094】

1つの実施態様において、オリゴヌクレオチドを基板に付着させる。オリゴヌクレオチドは、例えば、Chrisseyら, Nucleic Acids Res., 第24巻, 3031-3039ページ（1996年）; Chrisseyら, Nucleic Acids Res., 第24巻, 3040-3047ページ（1996年）; Mucicら, Chem. Commun., 第555巻（1996年）; ZimmermannおよびCox, Nucleic Acids Res., 第22巻, 492ページ（1994年）; Bottomleyら, J. Vac. Sci. Technol. A, 第10巻, 591ページ（1992年）; およびHegnerrら, FEBS Lett., 第336巻, 452ページ（1993年）に記載のように、基板に付着させることができる。

【0095】

基板に付着しているオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。核酸と基板とを、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板と結合した状態になる。結合しなかった核酸は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。

【0096】

次いで、基板に結合した核酸と、オリゴヌクレオチドが付着している第1種類のナノ粒子とを接触させる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このようにして、第1種類のナノ粒子は基板に結合し

10

20

30

40

50

た状態になる。ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を基板に結合させた後、基板を洗浄して、結合していないナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体および核酸を除去する。

【0097】

第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、すべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各ナノ粒子に、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着してもよいが、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着するのが好ましい。図17は、核酸の複数の部分にハイブリダイズするように設計されたナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体の使用を示している。代わりに、各第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは複数の異なる配列を有していてもよいが、そのうちの少なくとも1つは、検出すべき核酸の一部とハイブリダイズしなければならない（図25B参照）。 10

【0098】

最後に、基板に結合した第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子とを接触させる。該オリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下で行う。ナノ粒子を結合させ後、結合しなかったナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を除去するために基板を洗浄するのが好ましい。

【0099】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各第1種類のナノ粒子には、（同一または異なる配列を有する）複数のオリゴヌクレオチドが付着しているので、各第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、複数の第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。また、第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションにより得られる増幅は、変化を初めて検出し得るものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大させたりし得る。この増幅によって、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。 20

【0100】

所望の場合には、第1および第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。この方法で、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数を増加させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。 30

【0101】

また、互いに直接ハイブリダイズするように設計された第1および第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体の代わりに、連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの結果としてナノ粒子を共に結合させる働きをするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を用いてもよい。

【0102】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る（上記参照）。 40

【0103】

この核酸（検体DNA）検出法の1つの実施例が図13Aに示されている。図に示されているように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域が生じる。これらの暗色領域は、周囲光を使って肉眼で、好ましくは白い背景を背に基板を見れば容易に観察し得る。図13Aから容易に分るように、この方法は、検出可能な変化を増幅させる手段を提供する。

【0104】

この核酸検出法の別の実施例が図25Bに示されている。図13Aに示されている実施例と同じように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域ができ、これは肉眼で観察することができる。

【0105】

別の実施態様では、ナノ粒子を基板に付着させる。ナノ粒子は、例えば、Grabarr, Analyt. Chem., 第67巻, 73-743ページ(1995年); Bethellら, J. Electroanal. Chem., 第409巻, 137ページ(1996年); Barrら, Langmuir, 第12巻, 1172ページ(1996年); Colvinら, J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 5221ページ(1992年)に記載のように基板に付着させることができる。

10

【0106】

ナノ粒子を基板に付着させた後、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる。これは、溶液中でオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるための上記方法と同じ方法で達成し得る。ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。

【0107】

基板と核酸とを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板に結合した状態になる。結合しなかった核酸は、さらにナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。

20

【0108】

次いで、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子を用意する。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、基板に結合した核酸と第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とを、第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は基板と結合した状態になる。ナノ粒子を結合させた後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と核酸を基板から洗い流す。この時点で、ある変化(例えば、変色)を検出し得る。

【0109】

第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドはすべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各ナノ粒子に、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着してもよいが、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着するのが好ましい。図17を参照されたい。

30

【0110】

次いで、第1部分が第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部の配列と相補的である少なくとも2つの部分を含む選択された配列を有する結合オリゴヌクレオチドと、基板に結合した第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とを、結合オリゴヌクレオチドとナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、結合オリゴヌクレオチドは基板と結合した状態になる。結合オリゴヌクレオチドを結合させた後、結合しなかった結合オリゴヌクレオチドを基板から洗い流す。

40

【0111】

最後に、オリゴヌクレオチドが付着している第3種類のナノ粒子を用意する。これらのオリゴヌクレオチドは、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、基板に結合した結合オリゴヌクレオチドとを、結合オリゴヌクレオチドとナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。ナノ粒子を結合させた後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

50

【0112】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各第2種類のナノ粒子には、（同一または異なる配列を有する）多数のオリゴヌクレオチドが付着するので、各第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、（結合オリゴヌクレオチドを介して）複数の第3種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。また、第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションによりもたらされる増幅は、変化を初めて検出可能なものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大させたりし得る。この増幅により、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。 10

【0113】

所望の場合には、結合オリゴヌクレオチドと第2および第3種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体とを連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。このようにして、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数をさらに増強させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。

【0114】

また、結合オリゴヌクレオチドの使用を排除することも可能であり、第2および第3種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、直接互いにハイブリダイズするように設計し得る。 20

【0115】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る（上記参照）。

【0116】

この核酸（検体DNA）検出法の1つの実施例が図13Bに示されている。その図に示されているように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域が生じる。これらの暗色領域は、上述したように肉眼で容易に観察し得る。図13Bから分るように、本発明の方法のこの実施態様は、検出可能な変化を増幅させる別の手段を提供する。 30

【0117】

別の増幅計画はリポソームの使用である。この計画では、オリゴヌクレオチドを基板に付着させる。適当な基板は上述のものであり、オリゴヌクレオチドは上述のように基板に付着させることができる。例えば、基板がガラスの場合、これは、ホスホリルまたはカルボン酸基を介してオリゴヌクレオチドを基板表面上のアミノアルキル基に縮合させることにより達成し得る（関連化学に関しては、Grabarr, Anal. Chem., 第67巻, 735-743ページ（1995年）参照）。

【0118】

基板に付着したオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。核酸と基板とを、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板と結合した状態になる。結合しなかった核酸は、この系の追加成分を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。 40

【0119】

次いで、基板に結合した核酸をオリゴヌクレオチドが付着しているリポソームと接触させる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、リポソーム上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このようにして、リポソームは基板と結合した状態になる。リポソームを基板に結合させた後、基板を洗浄して、結合しなかったリポソームと核酸を除去する。 50

【0120】

リポソーム上のオリゴヌクレオチドはすべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各リポソームに、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着するか、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着し得る。

【0121】

オリゴヌクレオチド-リポソーム共役体を調製するために、オリゴヌクレオチドを、コレステリルなどの疎水基に結合させ (L e t s i n g e r ら, J. A m. C h e m. S o c. , 第115巻, 7535-7536ページ (1993年) 参照)、疎水基-オリゴヌクレオチド共役体をリポソーム溶液と混合して、疎水基-オリゴヌクレオチド共役体が膜に固定化された状態のリポソームを形成する (Z h a n g ら, T e t r a h e d r o n L e t t. , 第37巻, 6243-6246ページ (1996年) 参照)。リポソーム表面上での疎水基-オリゴヌクレオチド共役体の充填は、混合物中の疎水基-オリゴヌクレオチド共役体とリポソームの比率を調節することにより制御し得る。コレステリル側基の疎水性相互作用によって付着しているオリゴヌクレオチドを担持するリポソームは、ニトロセルロース膜上に固定化されたポリヌクレオチドを標的とするのに有効であることが認められた (同上)。リポソーム膜内に固定化されたフルオレセイン基をレポーター基として用いた。フルオレセイン基は効果的な働きをしたが、(例えば、リポソーム表面上の) 高局所濃度領域のフルオレセイン由来のシグナルが自己消光により弱められるという事実により感度が制限される。

10

20

【0122】

リポソームは当該技術分野で周知の方法により調製される。Z h a n g ら, T e t r a h e d r o n L e t t. , 第37巻, 6243ページ (1996年) 参照。一般にリポソームの大きさは、サイズ (直径) が、後続ステップで用いられるナノ粒子の約5~50倍である。例えば、直径約13nmのナノ粒子には、直径約100nmのリポソームを用いるのが好ましい。

【0123】

基板に結合したリポソームと、少なくとも1つの第1種類のオリゴヌクレオチドが付着している第1種類のナノ粒子とを接触させる。第1種類のオリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない末端には疎水基が付着しており、接触ステップは、疎水性相互作用の結果として、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをリポソームに付着させるのに有効な条件下に行う。この時点で、検出可能な変化を観察し得る。

30

【0124】

この方法はさらに、リポソームに結合した第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とオリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子とを接触させるステップを含む。第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しており、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有している。接触ステップは、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このハイブリダイゼーションは、一般に、穏和な温度 (例えば、5~60℃) 下を実施され、したがって、室温下にハイブリダイゼーションを導き得る条件 (例えば、0.3~1.0M NaCl) が用いられる。ハイブリダイゼーション後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

40

【0125】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各リポソームには、(同一または異なる配列を有する) 複数のオリゴヌクレオチドが付着しているので、各リポソームは、複数の第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。同様に、各第1種類のナノ粒子-オリゴヌ

50

クレオチド共役体には、多重オリゴヌクレオチドが付着しているので、各第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体は、複数の第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体とハイブリダイズし得る。また、リポソームは、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションによりもたらされる増幅は、変化を初めて検出し得るものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大させたりし得る。この増幅により、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。

【0126】

所望の場合には、第1および第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。この方法で、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数をさらに増加させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。 10

【0127】

また、互いに直接ハイブリダイズするように設計された第2および第3種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体の代わりに、結合オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの結果としてナノ粒子を結合させる働きをするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を用いてもよい。

【0128】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ナノ粒子と結合させるために一方の末端を官能化した、他方の末端に疎水基を有するかまたは有さないオリゴヌクレオチド混合物を、第1種類のナノ粒子上に用いてもよい。平均的なナノ粒子に結合したこれらのオリゴヌクレオチドの相対比は、混合物中の2種のオリゴヌクレオチドの濃度比によって制御される。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る（上記参照）。 20

【0129】

この核酸検出法の1つの例が図18に示されている。第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体とリポソームとのハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が生じ得る。金ナノ粒子の場合、ピンク／赤色が観察され得るし、ナノ粒子が互いに十分に近接していれば、紫／青色が観察され得る。第2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体と第1種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体がハイブリダイズすると、検出可能な変化が生じる。金ナノ粒子の場合、紫／青色が観察されるであろう。これらの変色はいずれも肉眼で観察し得る。 30

【0130】

基板を利用するさらに他の実施態様では、「凝集体プローブ」を用い得る。凝集体プローブは、相補的オリゴヌクレオチド（aおよびa'）が付着している2種類のナノ粒子をハイブリダイズさせて（図28Aに示されている）コアを形成することにより調製し得る。各種類のナノ粒子には、複数のオリゴヌクレオチドが付着しているので、各種類のナノ粒子は、複数の他の種類のナノ粒子にハイブリダイズし得る。ゆえに、コアは両種類の多数のナノ粒子を含む凝集体である。次いで、コアに、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している第3種類のナノ粒子でキャップ形成する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の一部の配列b'に対して相補的な配列bを有している。第2種類のオリゴヌクレオチドは、第3種類のナノ粒子がコアの外側のナノ粒子にハイブリダイズするように配列aまたはa'を有している。凝集体プローブは、2つの種類のナノ粒子を利用して調製することもできる（図28B参照）。各種類のナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している。2つの種類のナノ粒子それぞれの上に存在する第1種類のオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の一部の配列b'に対して相補的な配列bを有している。第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドは、2つの種類のナノ粒子が互いにハイブリダイズして凝集体プローブを形成するように第2種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列a'に対して相補的な配列aを有している（図28B参照）。各種類のナノ粒子には、複数のオリゴヌクレオチドが付着してい 40 50

るので、各種類のナノ粒子は、複数の他の種類のナノ粒子とハイブリダイズして、両種類の多数のナノ粒子を含む凝集体を形成するであろう。

【0131】

凝集体プローブは、基板上で実施される上記の任意のアッセイ形式における核酸の検出にも利用可能であり、それによって、検出可能な変化を得たり増強したりするために個別のナノ粒子層を堆積する必要がなくなる。検出可能な変化をさらにもっと増強するために、2つの種類の凝集体プローブを用いて凝集体プローブ層を堆積することができ、第1種類の凝集体プローブには、他方の種類の凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。特に、凝集体プローブを図28Bに示されているように調製すると、凝集体プローブは、互いにハイブリダイズして多重層を形成し得る。凝集体プローブを利用するいくつかの可能なアッセイ形式が図28C-Dに示されている。例えば、配列cを含む1種類のオリゴヌクレオチドを基板に付着させる（図28C参照）。配列cは、検出すべき核酸の一部の配列c'と相補的である。標的核酸を加え、基板に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた後、凝集体プローブを加え、配列b'を有する標的核酸部分にハイブリダイズさせると、検出可能な変化が生じる。あるいは、先ず、溶液中で標的核酸を凝集体プローブとハイブリダイズさせ、その後、基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせてもよいし、標的核酸を凝集体プローブと基板上のオリゴヌクレオチドと同時にハイブリダイズさせてもよい。別の実施態様では、溶液中で、標的核酸を凝集体プローブおよび別の種類のナノ粒子と反応させる（図28D参照）。この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、それらが標的核酸の配列c'にハイブリダイズするように配列cを有しているものがあるし、この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、それらが基板に付着している配列d'を有するオリゴヌクレオチドにのちにハイブリダイズし得るように配列dを含んでいるものもある。

10

20

【0132】

コア自体も核酸検出用のプローブとして用い得る。1つの可能なアッセイ形式が図28Eに示されている。この図に示されているように、配列bを含む1種類のオリゴヌクレオチドを基板に付着させる。配列bは、検出すべき核酸の一部の配列b'と相補的である。標的核酸を基板と接触させ、基板に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。次いで、別の種類のナノ粒子を加える。この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、ナノ粒子が基板に結合している標的核酸とハイブリダイズするように標的核酸の配列c'に対して相補的な配列cを有するものがある。また、追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、コアプローブ上の配列aおよびa'に対して相補的な配列aまたはa'を含むものがある。コアプローブを加え、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。各コアプローブは、コアを含むナノ粒子に付着している配列aおよびa'を有しているので、コアプローブは、互いにハイブリダイズして、基板に付着した多重層を形成して、検出可能な変化を大きく増強させることができる。代替実施態様では、標的核酸を基板と接触させる前に溶液中で追加種類のナノ粒子と接触させるか、標的核酸、ナノ粒子、および基板をすべて同時に接触させ得る。さらに別の実施態様では、追加種類のナノ粒子を、配列cと配列aまたはa'を共に含む連結オリゴヌクレオチドに置き換え得る。

30

40

【0133】

基板を用いると、複数の初期種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体またはオリゴヌクレオチドを、1つの標的核酸中の複数の部分を検出するため、多数の異なる核酸を検出するため、またはその両方の目的のために、基板にアレイ状に付着させることができる。例えば、1つの基板に、各スポットが標的核酸の一部に結合するように設計された、異なる種類のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体を含む幾列ものスポットを設け得る。1種以上の核酸を含有する試料を各スポットに加え、適切なオリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体、オリゴヌクレオチドーリポソーム共役体、凝集体プローブ、コアプローブおよび結合オリゴヌクレオチドを用いて、上述の方法の1つでアッセイ

50

の残りの部分を実施する。

【0134】

最後に、基板を用いると、検出可能な変化を生成させたり、銀染色法によって検出可能な変化を強化したりことができる。銀染色法は、銀の還元を触媒する任意の種類のナノ粒子と共に用い得る。好ましいのは、貴金属（例えば、金および銀）製ナノ粒子である。Bassellら, J. Cell Biol., 第126巻, 863-876ページ（1994年）; Braun-Howlandら, Biotechniques, 第13巻, 928-931ページ（1992年）参照。核酸の検出に用いられているナノ粒子が銀の還元を触媒しない場合、還元を触媒させるために、銀イオンと核酸との複合体を形成させ得る。Braunら, Nature, 第391巻, 775ページ（1998年）参照。また、核酸上のリン酸基と反応し得る銀染料は公知である。

10

【0135】

銀染色法を用いて、上述のものを含めた基板上で実施される任意のアッセイにおける検出可能な変化を生成または増強することができる。特に、銀染色法は、図25Aに示されているものなどの単1種類のナノ粒子を用いるアッセイの感度を著しく増強させることが判明しており、そのために、ナノ粒子層、凝集体ブローブおよびコアブローブを使わなくて済むことが多い。

【0136】

基板上で実施される核酸検出アッセイにおいて、検出可能な変化は、光学式スキャナを用いて観察し得る。適当なスキャナには、反射モードで操作し得るコンピュータに文書をスキャンするのに用いられるもの（例えば、平台型スキャナ）、この機能を果たし得るか、または同種類の光学を利用する他のデバイス、任意の種類のグレースケール感受性測定デバイス、および本発明にしたがって基板をスキャンするように改変された標準型スキャナ（例えば、基板用容器を含むように改変された平台型スキャナ）（現在までのところ、透過モードで操作するスキャナを用いるのは不可能であることが判明している）が含まれる。スキャナの解像度は、基板上の反応領域をスキャナの1ピクセルより大きくするのに十分大きくなければならない。スキャナは、任意の基板と共に用い得るが、但し、アッセイによって生じた検出可能な変化は、基板を背景にして観察しなければならない（例えば、銀染色法によって生成したようなグレースポットは、白を背景にすると観察し得るが、灰色を背景にすると観察できない）。スキャナは、白黒スキャナでもよいが、カラーズスキャナが好ましい。スキャナは、文書をコンピュータにスキャンするのに使用されるタイプの標準型カラーズスキャナが最も好ましい。そのようなスキャナは安価であり、容易に購入し得る。例えば、Epson Expression 636（600×600dpi）、UMAX Astra 1200（300×300dpi）、またはMicrotec 1600（1600×1600dpi）を用い得る。スキャナは、基板をスキャンして得た画像をプロセスするためのソフトウェアをロードしたコンピュータにつなぐ。ソフトウェアは、容易に購入し得る、Adobe Photoshop 5.1およびCorel Photopaint 8.0などの標準ソフトウェアであってよい。グレースケール測定値計算ソフトウェアを用いることにより、アッセイ結果の定量手段が得られる。このソフトウェアで、カラーズポットの色数を得ることもできるし、核酸の存在、核酸の量、またはその両方を定量するために観察することができるスキャン画像（例えば、プリントアウト）を生成することができる。また、実施例5に記載したようなアッセイを初めとするアッセイの感度は、陰性結果を表す色（実施例5では赤色）を陽性結果を表す色（実施例5では青色）から減色して改良することができる。コンピュータは、容易に購入し得る標準パーソナルコンピュータであってよい。このように、標準ソフトウェアがロードされている標準コンピュータにつないだ標準スキャナを用いることにより、アッセイを基板上で実施する際に核酸を検出かつ定量する便利かつ容易で安価な手段が得られる。スキャン画像および計算結果は、その後の参照および使用のために結果の記録を維持するべくコンピュータに記憶させることができる。もちろん、所望の場合には、より精密な機器やソフトウェアを使用することが可能である。

20

30

40

50

【0137】

任意の核酸用アッセイに用い得るナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が、図17D-Eに示されている。この「万能プローブ」(universal probe)には、単一配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。これらのオリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの部分を含む配列を有する結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズし得る。第1部分は、ナノ粒子上の少なくとも一部の配列と相補的である。第2部分は、検出すべき核酸の一部の配列と相補的である。同一の第1部分と異なる第2部分を有する複数の結合オリゴヌクレオチドを用いることができ、その場合、「万能プローブ」は、結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした後、検出すべき核酸の多重部分または異なる核酸標的に結合し得る。

10

【0138】

本発明の他の多くの実施態様において、検出可能な変化は、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと標的核酸とがハイブリダイズすると検出可能な変化を生成する分子(例えば、蛍光分子および染料)で標識することにより生じる。例えば、金属および半導体ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない末端には、蛍光分子が付着され得る。金属および半導体ナノ粒子は、公知の蛍光消光物質であり、その消光効果の大きさは、ナノ粒子と蛍光分子との間隔に依存する。ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズしていない状態では、ナノ粒子と相互作用し、その結果、有意な消光が観察される。蛍光分子は、標的核酸とハイブリダイズすると、ナノ粒子から間隔が離れた状態になり、それによって、蛍光の消光が減少する。図20A参照。オリゴヌクレオチドが長くなるにつれ、少なくとも変化の増大がもはや観察し得ない程遠くに蛍光基がナノ粒子表面から離れて移動するまで、蛍光の変化は大きくなる筈である。オリゴヌクレオチドの有用な長さは経験的に決定し得る。蛍光標識オリゴヌクレオチドが付着している金属および半導体ナノ粒子は、溶液中または基板上で実施されるものを含めた上述のいずれのアッセイ形式にも用い得る。

20

【0139】

オリゴヌクレオチドを蛍光分子で標識する方法および蛍光を測定する方法は当該技術分野では周知である。適当な蛍光分子も当該技術分野では周知であり、それにはフルオレセイン、ローダミンおよびテキサスレッドが含まれる。オリゴヌクレオチドは上述のようにナノ粒子に付着するのである。

30

【0140】

さらに別の実施態様においては、2つの異なる粒子に付着している2つの種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドを用い得る。適当な粒子としては、(ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、アクリレートおよびメタクリレート粒子などの)ポリマー粒子、ガラス粒子、ラテックス粒子、セファロースビーズおよび当該技術分野では周知の他の同様な粒子が挙げられる。そのような粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法は当該技術分野では周知である。Chrisseyら, Nucleic Acids Research, 第24巻, 3031-3039ページ(1996年)(ガラス)およびCharreyreら, Langmuir, 第13巻, 3103-3110ページ(1997年), Fahyら, Nucleic Acids Research, 第21巻, 1819-1826ページ(1993年), Elaissariら, J. Colloid Interface Sci., 第202巻, 251-260ページ(1998年), Kolárovaら, Biotechniques, 第20巻, 196-198ページ(1996年)およびWolfら, Nucleic Acids Research, 第15巻, 2911-2926ページ(1987年)(ポリマー/ラテックス)参照。特に、多様な官能基がこれらの粒子上に対して利用可能であり、そのような粒子に組み込むことができる。官能基には、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などがある。金属および半導体ナノ粒子を含めたナノ粒子を用いてもよい。

40

【0141】

2種の発蛍光団は、供与体および受容体としてdおよびaと称される。そのような組合せ

50

に有用な種々の蛍光分子は当該技術分野では周知であり、例えば、モレキュラー・プローブ社（Molecular Probes）から入手できる。魅力的な組合せは、供与体としてのフルオレセインと、受容体としてのテキサスレッドである。dおよびaが付着している2つの種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を標的核酸と混合し、蛍光光度計で蛍光を測定する。dを励起する波長の光で混合物を励起させ、混合物をa由来の蛍光についてモニターする。ハイブリダイズすると、dとaは近接するであろう（図20B参照）。非金属、非半導体粒子の場合、ハイブリダイゼーションは、蛍光がdのものからaのものにシフトすること、またはaの蛍光に加えてdの蛍光が出現することによって示されるであろう。ハイブリダイゼーションがない場合、発蛍光団は離れ過ぎていて有意なエネルギー伝達が起こらず、dの蛍光のみが観察されるであろう。金属および半導体ナノ粒子の場合、ハイブリダイゼーションの欠如は、dまたはaに帰因する消光による蛍光の欠如によって示されるであろう（上記参照）。ハイブリダイゼーションはaに帰因する蛍光の増大により示される。

10

【0142】

受容体および供与体蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドが付着している上述の粒子およびナノ粒子は、溶液中および基板上で実施されるものを含めた上述のアッセイ形式に使用し得る。溶液形式の場合、オリゴヌクレオチド配列は、図15A-Gに示されているように標的核酸に結合するように好ましくは選択する。図13A-Bおよび図18に示されている形式では、結合オリゴヌクレオチドを使って、2つのナノ粒子上の受容体および供与体蛍光分子を近接させ得る。また、図13Aに示されている形式では、基板に付着しているオリゴヌクレオチドはdで標識し得る。さらに、蛍光分子以外の他の標識、例えば、ハイブリダイズすると検出可能なシグナルを生成するかまたは検出可能なシグナルに変化をもたらす化学発光分子を用いてもよい。

20

【0143】

本発明の検出法の別の実施態様は、（図21に示されている）蛍光および変色の検出を利用する極めて感度の高い系である。この系は、蛍光分子で標識したオリゴヌクレオチドを付着させたラテックスミクロスフェアと、オリゴヌクレオチドを付着させた金ナノ粒子とを用いる。オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体は、上述のように調製し得る。オリゴヌクレオチドをラテックスミクロスフェアに付着させる方法（例えば、Charreyreら, Langmuir, 第13巻, 3103-3110ページ（1997年）；Elaissariら, J. Colloid Interface Sci., 第202巻, 251-260ページ（1998年）参照）は、オリゴヌクレオチドを蛍光分子で標識する方法（上記参照）と同様に周知である。ラテックスミクロスフェア上のオリゴヌクレオチドと金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の配列の異なる部分とハイブリダイズし得るが互いにはハイブリダイズし得ない配列を有している。ラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を含む標的核酸と2つのプローブを接触させると、網目構造が形成される（図21参照）。金ナノ粒子の消光特性のために、ラテックスミクロスフェアに付着しているオリゴヌクレオチドの蛍光は、この網目構造の一部の間で消光される。実際、金ナノ粒子は極めて大きい吸収係数を有しているために、1つの金ナノ粒子が多くの発蛍光団分子を消光し得る。したがって、核酸および2種の粒子を含有する溶液の蛍光をモニターして結果を検出することが可能であり、蛍光の減少または排除は陽性結果を示す。しかし、アッセイ結果は、溶液の小滴を微孔質材料上に並べて検出するのが好ましい（図21参照）。微孔質材料は、金ナノ粒子のピンク／赤色を検出できる透明またはカラー（例えば、白）でなければならない。また、微孔質材料は、微孔質材料を洗浄したときに、金ナノ粒子が細孔を通過し得る程大きく、かつ微孔質材料表面上のラテックスミクロスフェアを保持するのに十分な程小さい細孔サイズをも有していなければならない。したがって、そのような微孔質材料を用いる場合、ラテックスミクロスフェアのサイズ（直径）は、金ナノ粒子のサイズ（直径）より大きくなければならない。また、微孔質材料は生物媒体に対して不活性でなければならない。多くの適当な微孔質材料は当該技術分野では公知であり、そのような材料としては、種々の

30

40

50

フィルターや膜、例えば、改質ポリフッ化ビニリデン（ミリポア社（Millipore Corp.）から市販されているDuraporeTMメンブレンフィルターなどのPVDF）や、（ミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc.）から市販されているAcetate PlusTMメンブレンフィルターなどの）純粋酢酸セルロースが挙げられる。そのような微孔質材料は、標的核酸と2種のプローブからなる網目構造を保持し、陽性結果（標的核酸の存在）は、（金ナノ粒子の存在に帰する）赤／ピンク色と、（金ナノ粒子による蛍光の消光に帰する）蛍光の欠如によって証明される（図21参照）。陰性結果（標的核酸の不在）は、微孔質材料を洗浄したときに金ナノ粒子が微孔質材料の細孔を通過し（したがって、蛍光の消光が起こらない）、かつ白色ラテックスミクロスフェアがその上に捕捉されるために、白色および蛍光によって証明される（図21参照）。さらに、陽性結果の場合、蛍光および変色は温度の関数として観察し得る。例えば、温度を上昇させて行くと、デハイブリダイゼーション温度に達すると同時に蛍光が観察されるであろう。したがって、温度の関数として色または蛍光を見れば、オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸との相補性の程度についての情報を得ることができる。上述のように、この検出法は高感度を示す。長さ24塩基の3 fmol（フェムトモル）の一本鎖標的核酸と、長さ24塩基の20 fmolの二本鎖標的核酸という少量が、肉眼で検出された。この方法は、その使用法も極めて簡単である。蛍光は、ただUVランプで溶液または微孔質材料を照明するだけで生成させることができ、蛍光シグナルおよび比色シグナルは肉眼でモニターし得る。代わりに、より定量的な結果を得るために、蛍光光度計を前面モード（front-face mode）を用いて、短経路長で溶液の蛍光を測定してもよい。

10

20

【0144】

上記実施態様は、特に、ラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子に関連して説明した。これらの粒子の代わりに、上述の他の特性を有すると共にオリゴヌクレオチドを付着させ得る任意の他のミクロスフェアまたはナノ粒子を用いてもよい。多くの適当な粒子およびナノ粒子が、それらにオリゴヌクレオチドを付着させる方法と共に上述されている。さらに、他の測定可能な特性を有するミクロスフェアおよびナノ粒子も用い得る。例えば、ポリマーを蛍光、色または電気化学的活性などの任意の所望特性を有するように改質し得るポリマー改質粒子およびナノ粒子を用いてもよい。Watsonら, J. Am. Chem. Soc., 第121巻, 462-463ページ（1999年）（ポリマー改質金ナノ粒子）。また、磁性粒子、ポリマーコート磁性粒子、および半導体粒子も使用し得る。Chanら, Science, 第281巻, 2016ページ（1998年）；Bruchezら, Science, 第281巻, 2013ページ（1998年）；Kolarovaら, Biotechniques, 第20巻, 196-198ページ（1996年）参照。

30

【0145】

さらに別の実施態様において、蛍光分子で標識したオリゴヌクレオチドが付着している金属または半導体ナノ粒子を含む2つのプローブを用いる（図22に示されている）。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体は、上述のように調製しかつ蛍光分子で標識し得る。2つの種類のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体上のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の配列の異なる部分とハイブリダイズし得るが互いにはハイブリダイズし得ない配列を有している。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を含む標的核酸を2つのプローブと接触させると、網目構造が形成される（図22参照）。金属または半導体ナノ粒子の消光特性のために、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの蛍光は、この網目構造の一部の間で消光される。したがって、核酸および2つのプローブを含有する溶液の蛍光をモニターして結果を検出することが可能であり、蛍光の減少または排除は陽性結果を示す。しかし、アッセイ結果は、溶液の小滴を微孔質材料上に並べて検出するのが好ましい（図22参照）。微孔質材料は、洗浄したときに、ナノ粒子がその細孔を通過し得る程大きくかつその表面上に網目構造を保持するのに十分な程小さい細孔サイズを有していなければならない（図22参照）。多くの適当な微孔質材料が当該技術分野では

40

50

公知であり、そのような材料には上述のものが含まれる。そのような微孔質材料は、標的核酸と2つのプローブとからなる網目構造を保持し、陽性結果（標的核酸の存在）は、（金属または半導体ナノ粒子による蛍光の消光に起因する）蛍光の欠如によって証明される（図22参照）。陰性結果（標的核酸の不在）は、微孔質材料を洗浄したときにナノ粒子が微孔質材料の細孔を通過する（したがって、蛍光の消光が起こらない）ために、蛍光によって証明される（図22参照）。結合しなかったプローブが検出領域から洗い流されるので、バックグラウンド蛍光は低い。さらに、陽性結果の場合、蛍光の変化は温度の関数として観察され得る。例えば、温度を上昇させて行くと、デハイブリダイゼーション温度に達すると同時に蛍光が観察されるであろう。したがって、温度の関数として蛍光を見れば、オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸との相補性度についての情報を得ることができ、蛍光は、UVランプで溶液または微孔質材料を照明するだけで生成させることができ、蛍光シグナルは肉眼でモニターし得る。代わりに、より定量的な結果を得るために、蛍光光度計を前面モードで用いて、短経路長で溶液の蛍光を測定してもよい。

10

20

30

40

50

【0146】

さらに別の実施態様では、「サテライトプローブ」を用いる（図24参照）。サテライトプローブは、核酸用アッセイにおける検出に用い得る1種または数種の物性（例えば、濃色、蛍光消光能、磁性）を有する中心粒子を含んでいる。適当な粒子としては、ナノ粒子や上述の他の粒子などがある。粒子には、オリゴヌクレオチド（すべて同じ配列を有する）が付着している（図24参照）。粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法は上記に説明されている。オリゴヌクレオチドは、少なくとも第1部分と第2部分を含んでおり、これらの部分はどちらも標的核酸の配列の部分と相補的である（図24参照）。サテライトプローブはさらに、プローブオリゴヌクレオチドを含んでいる。各プローブオリゴヌクレオチドは、少なくとも第1部分と第2部分を有している（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドの第1部分の配列は、中心粒子上に固定化されているオリゴヌクレオチドの第1部分の配列と相補的である（図24参照）。その結果、中心粒子とプローブオリゴヌクレオチドとを接触させると、中心粒子上のオリゴヌクレオチドは、プローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしてサテライトプローブを形成する（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドの第1および第2部分は共に、標的核酸の配列の部分と相補的である（図24参照）。各プローブオリゴヌクレオチドは、以下に詳細に説明するように、レポーター分子で標識されている（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドと標的との間のハイブリダイゼーションオーバーラップの量（ハイブリダイズしている部分の長さ）は、プローブオリゴヌクレオチドと粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションオーバーラップと同じかそれより大きい（図24参照）。したがって、デハイブリダイゼーションおよびリハイブリダイゼーションをもたらす温度循環により、プローブオリゴヌクレオチドの中心粒子から標的への移動が促進される。次いで、標的にハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドから粒子を分離し、レポーター分子を検出する。

【0147】

サテライトプローブは種々の検出法に用い得る。例えば、中心粒子が磁性コアを有し、かつ周囲のプローブオリゴヌクレオチドに付着している発蛍光団の蛍光を消光し得る材料で被覆されている場合、この系は、核酸用の *in situ* 蛍光光度検出計画に用い得る。官能化ポリマーコート磁性粒子 (Fe_3O_4) は、ディナル社 (Dynal) (*DynabeadsTM*) およびバングス・ラボラトリーズ社 (Bangs Laboratories) (*EstaporTM*) を含めたいくつかの調製業者から入手可能であり、シリカコート磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子は、十分に開発されたシリカ表面化学 (Chriselyら, *Nucleic Acids Research*, 第24巻, 3031-3039ページ (1996年)) を用いて改質し (Liuら, *Chem. Mater.*, 第10巻, 3936-3940ページ (1998年))、磁性プローブとしても用い得る。さらに、染料分子、4-((4-(ジメチルアミノ)フェニル)-アゾ)安息香酸 (DABCYL) は、オリゴヌクレオチドに付加された多様な発蛍光団に対して有能な蛍光消光物質であ

ることが証明されている (Tyagiら, Nature Biotech., 第16巻, 49-53ページ (1998年))。市販のDABCYLスクシンイミジルエステル (分子プローブ) は、第一級アルキルアミノ基と反応すると極めて安定なアミド結合を形成する。このように、任意の磁性粒子または第一級アルキルアミノ基でポリマーコートされた磁性粒子は、両オリゴヌクレオチドに加えてこれらの消光物質分子を用いて改質し得る。あるいは、DABCYL消光物質は、アルキルアミノ改質表面の代わりに、表面結合オリゴヌクレオチドに直接付着させてもよい。プローブオリゴヌクレオチドを含むサテライトプローブを標的と接触させる。デハイブリダイゼーションおよび再ハイブリダイゼーションを起こすように温度を循環させ、それによって、プローブオリゴヌクレオチドを中心粒子から標的に移動させる。磁場を印加、粒子を溶液から除去し、標的にハイブリダイズした溶液中に残留するプローブオリゴヌクレオチドの蛍光を測定することにより検出が達成される。

10

【0148】

この方法は、染料コーティングを有する磁性粒子と共に、磁気ナノ粒子上の染料とは異なる光学特性を有するか、または磁気ナノ粒子上の染料の光学特性を摂動させる染料で標識したプローブオリゴヌクレオチドを用いて比色アッセイにも応用することができる。粒子およびプローブオリゴヌクレオチドが共に溶液中に存在する場合、この溶液は、2種の染料の組合せに由来する1つの色を呈するであろう。しかし、標的核酸の存在下に温度を循環させると、プローブオリゴヌクレオチドは、サテライトプローブから標的に移動するであろう。一旦これが起こると、磁場の印加により、標的にハイブリダイズした、単一染料で標識されたプローブオリゴヌクレオチドを残して、染料コート磁性粒子が溶液から除去される。この系は、標的レベルまたは色の濃さに応じて、比色計または肉眼で追うことができる。

20

【0149】

また、この方法は、オリゴヌクレオチド-磁性粒子共役体と共に、レドックス活性分子が付着しているプローブオリゴヌクレオチドを用いることにより、電気化学アッセイにも応用することもできる。十分に研究が進んだレドックス活性フェロセン誘導体などの任意の改質可能なレドックス活性種を用い得る。標準ホスホロアミダイト化学を用いて、フェロセン誘導体化ホスホロアミダイトを直接オリゴヌクレオチドに付着させることができる。Mucicら, Chem. Commun., 第555巻 (1996年); Eckstein編, Oligonucleotides and Analogues, 第1版, Oxford University, New York, NY (1991年)。フェロセニルホスホロアミダイトは、6-ブロモヘキシルフェロセンから2段階合成法で調製する。通常の調製においては、6-ブロモヘキシルフェロセンを水性HMPA溶液中120℃で6時間攪拌して、6-ヒドロキシヘキシルフェロセンを生成する。精製後、6-ヒドロキシヘキシルフェロセンをN, N-ジイソプロピルエチルアミンおよびβ-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロロホスホラミドのTHF溶液に加えてフェロセニルホスホロアミダイトを生成する。ポリマーが電気化学活性フェロセン分子を含有するオリゴヌクレオチド改質ポリマーコート金ナノ粒子を利用してもよい。Watsonら, J. Am. Chem. Soc., 第121巻, 462-463ページ (1999年)。アミノ修飾オリゴヌクレオチドと反応させるために、このポリマーにアミノ反応性部位のコポリマー (例えば、無水物) を組み込んでもよい。Mollerら, Bioconjugate Chem., 第6巻, 174-178ページ (1995年)。標的の存在下に温度を循環させると、レドックス活性プローブオリゴヌクレオチドは、サテライトプローブから標的に移動するであろう。一旦これが起こると、磁場の印加により、標的核酸にハイブリダイズしたレドックス活性プローブオリゴヌクレオチドを残して、磁性粒子が溶液から除去されるであろう。次いで、レドックス活性分子を調べることができるサイクリックボルタンメトリ-または任意の電気化学的技術により標的の量を定量し得る。

30

40

【0150】

本発明のさらに別の実施態様において、核酸は、核酸とオリゴヌクレオチドが付着してい

50

る基板とを接触させて検出する。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。オリゴヌクレオチドは、基板上に配置されている1対の電極間に配置されている。基板は、導電体ではない材料（例えば、ガラス、石英、ポリマー、プラスチック）製でなければならない。電極は、任意の標準材料（例えば、金、白金、酸化スズなどの金属）製であってよい。電極は、慣用のマイクロファブリケーション技術を用いて作製することができる。例えば、Introduction To Microlithography (L. F. Thompsonら編, ACS, Washington, D. C., 1983年) 参照。基板の上には、単一の核酸の多重部分、複数の異なる核酸、またはその両方を検出できるように複数の電極対をアレイ状に配置し得る。電極アレイは、（例えば、アブテック・サイエンティフィック社、バージニア州リッチモンド所在 (Abbttech Scientific, Inc., Richmond, Virginia) から）購入することもできるし、慣用のマイクロファブリケーション技術を用いて作製することもできる。例えば、Introduction To Microlithography (L. F. Thompsonら編, ACS, Washington, D. C., 1983年) 参照。アレイを作製するのに適したフォトマスクは、（例えば、フォトロニクス社、カリフォルニア州ミルピタス所在 (Photronics, Milpitas, CA) から）購入し得る。各アレイ電極対は、2つの電極間で基板に付着したある種類のオリゴヌクレオチドを有している。接触ステップは、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。次いで、基板に結合した核酸をある種類のナノ粒子と接触させる。ナノ粒子は導電性でなければならない。そのようなナノ粒子としては、金ナノ粒子のように金属でできたナノ粒子や、半導体材料製でできたナノ粒子が含まれる。ナノ粒子には、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有する、1つ以上の種類のオリゴヌクレオチドが付着しているであろう。接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。核酸が存在する場合、電極間の回路は、ナノ粒子が基板の電極間に付着するために閉鎖するはずであり、導電率の変化が検出される。1種類のナノ粒子が結合すると、回路の閉鎖は起こらず、この状況は、もっと狭い電極間間隔を用いるか、もっと大きいナノ粒子を用いるか、または回路を閉鎖する別の材料を用いる（但し、ナノ粒子が基板の電極間に結合した場合のみ）ことにより対応し得る。例えば、金ナノ粒子を用いる場合、基板を（上述のように）銀染料と接触させて銀を電極間に堆積させることにより回路を閉鎖し、導電率の検出可能な変化を生成させる。1種類のナノ粒子の付加が十分ではない場合に回路を閉鎖させる別の方法は、基板に結合している第1種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子と接触させる方法である。接触ステップは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。必要または所望なら、回路の閉鎖に十分な数のナノ粒子が基板に付着するまで、第1および第2種類のナノ粒子を交互に加えて、追加のナノ粒子層を堆積することができる。個々のナノ粒子を堆積する別の代替法は、凝集体プローブの使用である（上記参照）。

【0151】

本発明はさらに、核酸を検出するためのキットも提供する。キットは、1つの実施態様において、少なくとも1つの容器を含み、この容器は、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を保持している。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。容器はさらに、核酸の第3部分に対して相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドを含むこともあり、この第3部分は、第1部分と第2部分の間に配置されている。フィラーオリゴヌクレオチドは別個の容器中に入れておいてもよい。

【0152】

第2の実施態様において、キットは少なくとも2つの容器を含む。第1容器は、核酸の第

1 部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を保持している。第2容器は、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を保持している。キットはさらに、核酸の第3部分に対して相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドが入った第3容器を含むこともあり、第3部分は第1部分と第2部分の間に配置されている。

【0153】

別の代替実施態様において、キットは、別々の容器に入ったオリゴヌクレオチドとナノ粒子を有し、オリゴヌクレオチドは核酸検出アッセイの実施前にナノ粒子に付着させる必要がある。オリゴヌクレオチドおよび／またはナノ粒子は、オリゴヌクレオチドがナノ粒子に付着し得るように官能化させ得る。あるいは、オリゴヌクレオチドおよび／またはナノ粒子は、キット中に官能基を有さない状態で供給してもよいが、その場合、オリゴヌクレオチドはアッセイの実施前に官能化しなければならない。

10

【0154】

別の実施態様において、キットは、少なくとも1つの容器を含む。容器は、オリゴヌクレオチドが付着している金属または半導体ナノ粒子を保持している。オリゴヌクレオチドは核酸の一部に対して相補的な配列を有しており、オリゴヌクレオチドのナノ粒子には付着していない末端には蛍光分子が付着している。

【0155】

さらに別の実施態様において、キットは基板を含み、基板にはナノ粒子が付着している。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、同一または異なる配列を有してよいが、各オリゴヌクレオチドは、核酸の一部に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、少なくとも2つの部分を含む選択された配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第2容器を含んでおり、選択配列の第1部分は、第1容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部と相補的である。また、キットは、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第3容器を含む。

20

【0156】

別の実施態様において、キットは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、同一または異なる配列を有してよいが、各オリゴヌクレオチドは核酸の一部に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、第1容器中のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。

30

【0157】

さらに別の実施態様において、キットは、別々の容器に入った基板、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を有してよい。基板、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子は、核酸検出アッセイを実施する前に互いに適切に付着させなければならない。基板、オリゴヌクレオチドおよび／またはナノ粒子は、この付着を促進するために官能化し得る。あるいは、基板、オリゴヌクレオチドおよび／またはナノ粒子は、キット中に官能基を有さない状態で提供してもよいが、その場合、アッセイ実施前に官能化しなければならない。

40

【0158】

さらなる実施態様において、キットは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。また、キットは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているリポソームが入った第1容器と、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子

50

が入った第2容器を含んでおり、第1種類のオリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない末端には、ナノ粒子が疎水性相互作用によりリポソームに付着し得るように、コレステリル基が付着されている。キットは、さらに、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子が入った第3容器を含んでおり、オリゴヌクレオチドは第1種類のナノ粒子に付着している第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有している。第1種類のナノ粒子に付着している第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。

【0159】

別の実施態様において、キットは、ナノ粒子が付着している基板を含み得る。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、凝集体プローブが入った第1容器を含んでいる。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0160】

さらに別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板を含み得る。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、凝集体プローブが入った第1容器を含んでいる。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0161】

追加実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板と、凝集体プローブが入った第1容器とを含んでいる。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸配列の第1部分に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。ナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している。第1種類のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のオリゴヌクレオチドは、基板に付着しているオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有している。

【0162】

別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着しているリポソームが入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブが入った第2容器を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、ナノ粒子に付着していない末端に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している。

【0163】

さらなる実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含み得る。キットはさらに、1つ以上の追加の容器を含んでおり、各容器

は、結合オリゴヌクレオチドを保持している。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有する第1部分と、検出すべき核酸の一部の配列に対して相補的な配列を有する第2部分とを有している。結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は、各配列が検出すべき核酸の配列の一部と相補的である限り異なってもよい。別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している1つの種類のナノ粒子と、1つ以上の種類の結合オリゴヌクレオチドが入った容器を含んでいる。各種類の結合オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの部分を含む配列を有している。第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列と相補的であり、それによって結合オリゴヌクレオチドは、容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。第2部分は、核酸の一部の配列と相補的である。

10

【0164】

別の実施態様において、キットは、2つの種類の粒子が入った1つ以上の容器を含み得る。第1種類の粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドの粒子に付着していない方の末端はエネルギー供与体で標識されている。第2種類の粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドの粒子に付着していない方の末端はエネルギー受容体で標識されている。エネルギー供与体および受容体は蛍光分子であってよい。

【0165】

さらなる実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着しているある種類のラテックスミクロスフェアが入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有しており、蛍光分子で標識されている。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着しているある種類の金ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。

20

【0166】

別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している第1種類の金属または半導体ナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に対して相補的な配列を有し、蛍光分子で標識されている。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類の金属または半導体ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、蛍光分子で標識されている。

30

【0167】

さらなる実施態様において、キットは、サテライトプローブが入った容器を含んでいる。サテライトプローブは、オリゴヌクレオチドが付着している粒子を含んでいる。オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有しており、どちらの部分も核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有している。サテライトプローブはさらに、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドを含んでいる。プローブオリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有している。第1部分は、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に対して相補的な配列を有しており、両部分とも、核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有している。また、プローブオリゴヌクレオチドの一方の末端には、レポーター分子が付着している。

40

【0168】

別の実施態様において、キットは、凝集体プローブが入った容器を含んでいる。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0169】

50

追加実施態様において、キットは、凝集体プローブが入った容器を含み得る。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、ナノ粒子に付着していない方の末端に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している。

【0170】

さらに別の実施態様において、本発明は、基板の電極間にオリゴヌクレオチドが付着された、少なくとも1対の電極が配置されている基板を含む。好ましい実施態様において、基板には、単一核酸の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出またはその両方を可能にするように、複数の電極対がアレイ状に付着されている。 10

【0171】

キットはさらに、核酸の検出に有用な他の試薬および品目を含み得る。試薬には、PCR試薬、銀染色法用試薬、ハイブリダイゼーション試薬、緩衝剤などが含まれ得る。キットの一部として提供され得る他の品目には、TLCシリカプレートなどの（ハイブリダイゼーションを視覚化するための）固体表面、微孔質材料、シリンジ、ピペット、キュベット、容器、および（ハイブリダイゼーションおよびデハイブリダイゼーション温度を制御するための）サーモサイクラーが含まれる。キットには、ヌクレオチドまたはナノ粒子を官能化する試薬を含めてもよい。

【0172】

凝集したナノ粒子の沈殿は、選択された核酸を他の核酸から分離する手段を提供する。この分離は、核酸精製における1ステップとして用い得る。ハイブリダイゼーション条件は核酸検出に関して上述したとおりである。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸に結合させる温度が T_m （オリゴヌクレオチドの半分をその相補鎖に結合させる温度）より低い場合、凝集体を沈殿させるのに十分な時間が必要である。（例えば、 T_m により測定した）ハイブリダイゼーション温度は、塩の種類（NaClまたは $MgCl_2$ ）およびその濃度に依りて異なる。塩の組成および濃度は、核酸の不在下にコロイドの凝集を誘発させることなく都合の良い作業温度でナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションを促進するように選択される。 20

【0173】

本発明はさらに、ナノファブリケーション法を提供する。この方法は、選択された配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを用意するステップを含む。ナノファブリケーションに用いられる連結オリゴヌクレオチドは、任意の所望配列を含んでいてよく、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。連結オリゴヌクレオチドはさらに、塩基、糖、または主鎖部分に化学修飾を含み得る。連結オリゴヌクレオチド用に選択される配列や、それらの長さおよび鎖の数は、得られるナノ材料もしくはナノ構造、またはナノ材料もしくはナノ構造の部分の剛性もしくは可撓性に寄与するであろう。単1種類の連結オリゴヌクレオチドに加えて、2つ以上の異なる種類の連結オリゴヌクレオチドを用いることも考えられる。異なる連結オリゴヌクレオチドの使用数およびそれらの長さは、得られるナノ材料およびナノ構造の形状、細孔サイズおよび他の構造的特徴に寄与するであろう。 30 40

【0174】

連結オリゴヌクレオチドの配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに結合させるための第1部分と第2部分を有するであろう。連結オリゴヌクレオチドの第1、第2またはそれ以上の結合部分は、同一または異なる配列を有し得る。

【0175】

連結オリゴヌクレオチドの結合部分がすべて同じ配列を有している場合、ナノ材料またはナノ構造の形成には、相補的配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している単1種類のナノ粒子だけしか使わなくてよい。連結オリゴヌクレオチドの2つ以上の結合部分が異なる配列を有している場合、2つ以上のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を使わなければならない。例えば、図17参照。各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌ 50

クレオチドの配列の2つ以上の結合部分の1つに対して相補的な配列を有しているであろう。結合部分の数、配列および長さ、もしあれば、それらの間の間隔は、得られるナノ材料およびナノ構造の構造特性および物性に寄与するであろう。連結オリゴヌクレオチドが2つの以上の部分を含む場合、結合部分の配列は、結合ヌクレオチドの1つの部分を別の部分に結合するのを回避するために互いに対して相補的でないように選択する必要がある。

【0176】

連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタを介して纏まっている所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、特定のナノファブリケーション計画に合わせて最適化し得る（上記参照）。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が好ましい。

10

【0177】

さらに本発明は別のナノファブリケーション法を提供する。この方法は、少なくとも2種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を与えるステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタを介して纏まっている所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを互いにハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。この場合も、これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、特定のナノファブリケーション計画に合わせて最適化し得る。

20

【0178】

本発明のどちらのナノファブリケーション法においても、1つ以上の異なる種類のオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子の使用が想定される。ナノ粒子に付着している異なるオリゴヌクレオチドの数や、1つ以上のオリゴヌクレオチドの長さおよび配列は、得られるナノ材料およびナノ構造の剛性および構造特徴に寄与するであろう。

【0179】

また、ナノ粒子のサイズ、形状および化学組成も、得られるナノ材料およびナノ構造の特性に寄与するであろう。これらの特性には、光学特性、光電子特性、電気化学特性、電子特性、種々の溶液中での安定性、細孔およびチャンネルサイズの変化、フィルターとしての役割を果たす間の生物活性分子の分離能などが含まれる。異なるサイズ、形状および／または化学組成を有するナノ粒子混合物の使用に加えて、均一なサイズ、形状および化学組成を有するナノ粒子の使用も想定される。

30

【0180】

いずれのファブリケーション法においても、得られるナノ材料またはナノ構造中のナノ粒子は、オリゴヌクレオチドコネクタを介して結合する。オリゴヌクレオチドコネクタの配列、長さおよび鎖の数や、存在する異なるオリゴヌクレオチドコネクタの数は、ナノ材料またはナノ構造の剛性および構造特性に寄与するであろう。オリゴヌクレオチドコネクタが部分的に二本鎖である場合、その剛性は、核酸検出法に関連して上述したフィラーオリゴヌクレオチドを用いることによって増強し得る。完全二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの剛性は、完全二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタに結合して三本鎖オリゴにコネクタを形成するように相補的配列を有する1つ以上の強化オリゴヌクレオチドを用いて増強し得る。デオキシクアノシン（deoxyquanosine）またはデオキシシチジン四重鎖をベースとする四本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの使用も想定される。

40

【0181】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションに基づいてナノ粒子を組織化するための様々な系のいくつかを図面に示されている。単純な系（図1）では、一方のナノ粒子セットは

50

規定配列を有するオリゴヌクレオチドを有し、別のナノ粒子セットはそれに相補的配列を有するオリゴヌクレオチドを有している。2種のナノ粒子ーオリゴヌクレオチドセットをハイブリダイゼーション条件下に混合すると、2つの種類のナノ粒子が、ナノ粒子を選択された間隔で配置するスパーサーとしての働きをする二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを介して結合する。

【0182】

ナノ粒子を間隔を置いて配置するための魅力的な系は、図2に示されているような1つの自由連結オリゴヌクレオチドの添加を伴う。この連結オリゴヌクレオチドの配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに結合させるための少なくとも第1部分と第2部分を有するであろう。この系は、基本的には核酸検出法に利用されるものと同じであるが、但し、添加される連結オリゴヌクレオチドの長さは、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドを合わせた長さに等しくなるように選択し得る。図3に示されている関連系は、用いられるナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体セットを変更する必要なく、ナノ粒子間の間隔を要求通りに調節する便利な手段を提供する。

10

【0183】

ナノ粒子間に規定間隔を創出するためのさらに精巧な計画が図4に示されている。この場合、オーバーハング末端を含むDNAまたはRNAの二本鎖セグメントが連結オリゴヌクレオチドとして用いられている。連結オリゴヌクレオチドの一本鎖オーバーハングセグメントとナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、ナノ粒子間に多重二本鎖オリゴヌクレオチド架橋が得られる。

20

【0184】

より剛性のナノ材料およびナノ構造またはその部分は、ナノ粒子間に三本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを用いることによって調製し得る。三本鎖を生成させる際には、ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフ (Moser, H. E. および Dervan, P. B., Science, 第238巻, 645-650ページ (1987)) またはプリン：プリン：ピリミジンモチーフ (Pilch, D. S. ら, Biochemistry, 第30巻, 6081-6087ページ (1991年)) のいずれかを利用し得る。ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフを用いた三本鎖コネクタの調製によるナノ粒子組織化の1つの例が図10に示されている。図10に示されている系において、1つのナノ粒子セットをピリミジンヌクレオチドを含む規定鎖と結合させ、他のセットをプリンヌクレオチドを含む相補的オリゴヌクレオチドと結合させる。オリゴヌクレオチドの付着は、ナノ粒子がハイブリダイゼーション時に形成された二本鎖オリゴヌクレオチドによって分離されるように設計する。次いで、この系に、ナノ粒子を混合する前、混合と同時に、または混合直後に、ナノ粒子に結合しているピリミジン鎖の配向と反対配向の自由ピリミジンオリゴヌクレオチドを加える。この系中の第3の鎖は、フーグスティーン型塩基対を介して保持されているので、三本鎖は比較的熱に不安定である。二本鎖の幅にわたる共有結合架橋は三本鎖複合体を安定化することが知られている (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R. L., J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 8768-8772ページ (1992年); Letsinger, R. L. および Wu, T., J. Am. Chem. Soc., 第117巻, 7323-7328ページ (1995年); Prakash, G. および Kool, J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 3523-3527ページ (1992年))。

30

40

【0185】

ナノ材料およびナノ構造を構築するためには、オリゴヌクレオチド成分のハイブリダイゼーションによるナノ材料またはナノ構造の形成後に、集合体を共有結合架橋により適切な場所で「ロック」するのが望ましい場合がある。これは、オリゴヌクレオチドに、不可逆反応を始動させる官能基を組み込むことによって達成し得る。このための官能基の1つの例は、スチルベンジカルボン酸基である。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド内で整列している2つのスチルベンジカルボキサミド基に紫外光 (340 nm) を照射すると容易に架橋が達成されることが証明された (Lewis, F. D. ら, J. Am. Chem

50

. Soc. , 第117巻, 8785-8792ページ(1995年))。

【0186】

代わりに、メルカプトアルキル基を介してナノ粒子の3'位に保持されているオリゴヌクレオチドの5'-オートシル基を、メルカプトアルキル基を介してナノ粒子に保持されているオリゴヌクレオチドの3'末端のチオホスホリル基で、置換する方法を用いてもよい。両オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、それによってチオホスホリル基をトシル基に近接させるオリゴヌクレオチドの存在下では、トシル基はチオホスホリル基で置換され、両末端が2つの異なるナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドが生成する。この種類の置換反応に関しては、Herrleinら, J. Am. Chem. Soc. , 第177巻, 10151-10152ページ(1995年)を参照されたい。チオホスホリルオリゴヌクレオチドが、メルカプトアルキル-オリゴヌクレオチドの金ナノ粒子への付着に用いられる条件下では金ナノ粒子と反応しないという事実から、メルカプト基を介してナノ粒子に結合し、カップリング反応に利用できる末端チオホスホリル基を含む金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の調製が可能になる。

10

【0187】

集合したナノ粒子系を適切な場所でロックするための関連カップリング反応は、GryaznovおよびLetsinger, J. Am. Chem. Soc. , 第115巻, 3808ページに記載のように、末端プロモアセチルアミノヌクレオシドのプロミドの末端チオホスホリル-オリゴヌクレオチドによる置換を利用する。この反応は、上述のトシラートの置換と同じように進行するが、反応速度がもっと速い。チオホスホリル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子は上述のように調製する。プロモアセチルアミノ基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を調製するためには、先ず、一方の末端がアミノヌクレオシド(例えば、5'-アミノ-5'-デオキシチミジンまたは3'-アミノ-3'-デオキシチミジン)を末端基とし、他方の末端がメルカプトアルキル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを作製する。次いで、このオリゴヌクレオチド分子をメルカプト基を介してナノ粒子に固定し、次いで、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体をプロモアセチルアシル化剤と反応させてN-プロモアセチルアミノ誘導体に転化させる。

20

【0188】

集合体を適切な場所でロックするための第4のカップリング計画は、チオホスホリル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子の酸化を利用する。三ヨウ化カリウム、フェリシアン化カリウム(GryaznovおよびLetsinger, Nucleic Acids Research, 第21巻, 1403ページ)または酸素などの穏和な酸化剤が好ましい。

30

【0189】

さらに、ナノ材料およびナノ構造の特性は、連続オリゴヌクレオチド鎖に、オリゴヌクレオチド鎖に共有結合付加されて適切な場所に保持された有機および無機官能基を組み込むことにより変性させ得る。多様な主鎖、塩基および糖修飾が周知である(例えば、Uhlmann, E. およびPeyman, A. , Chemical Reviews, 第90巻, 544-584ページ(1990年)参照)。また、オリゴヌクレオチド鎖は、ヌクレオチド塩基がポリペプチド主鎖によって保持されている「ペプチド核酸」鎖(PNA)で置換し得る(Wittung, P. ら, Nature, 第367巻, 561-563ページ(1994年)参照)。

40

【0190】

上記から分るように、本発明のナノファブリケーション法は極めて用途が広い。連結オリゴヌクレオチドの長さ、配列および鎖の数や、ナノ粒子に付着させるオリゴヌクレオチドの長さ、配列および数、ナノ粒子のサイズ、形状および化学組成、用いられる異なる連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子の数および種類、オリゴヌクレオチドコネクタの鎖の数を変えることにより、多岐にわたる構造および特性を有するナノ材料およびナノ構造を調製することができる。これらの構造および特性は、オリゴヌクレオチドコネクタを架橋

50

したり、オリゴヌクレオチドを官能化したり、オリゴヌクレオチドの主鎖、塩基または糖を修飾したり、またはペプチド核酸を用いたりしてさらに変えることができる。

【0191】

本発明のナノファブリケーション法によって調製し得るナノ材料およびナノ構造には、ナノスケール機械装置、分離膜、バイオフィルターおよびバイオチップなどがある。本発明のナノ材料およびナノ構造は、化学センサーとして、コンピュータに、薬剤送出用に、タンパク質工學用に、また、生合成／ナノ構造ファブリケーション／他の構造の指定集合体の鋳型として、使用可能であると想定される。他の可能な用途に関しては、一般に、See manら, New J. Chem., 第17巻, 739ページ(1993年)を参照されたい。本発明のナノファブリケーション法によって調製し得るナノ材料およびナノ構造としてはさらに電子デバイスを挙げることができる。核酸が電子を移動させ得るかどうかについてはかなり議論されてきた。以下の実施例21に示されているように、DNAを介して集合したナノ粒子は電気を伝導する(DNAコネクタは半導体として機能する)。

10

【0192】

最後に、本発明は、いくつかの独特なナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体調製法を提供する。最初のそのような方法において、オリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子に結合させて安定なナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を生成する。荷電ナノ粒子には、金ナノ粒子などの金属製ナノ粒子が含まれる。

【0193】

上記方法は、ナノ粒子に結合し得る官能基を含む部分が共有結合しているオリゴヌクレオチドを用意するステップを含む。そのような部分と官能基は、オリゴヌクレオチドとナノ粒子との結合(すなわち、化学吸着または共有結合)に関して上述したものである。例えば、5'または3'末端にアルカンチオール、アルカンジスルフィド、または環式ジスルフィドが共有結合しているオリゴヌクレオチドを、金ナノ粒子を含めた種々のナノ粒子に結合させることができる。

20

【0194】

水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子とを、少なくとも一部のオリゴヌクレオチドを官能基を介してナノ粒子に結合させるのに十分な時間接触させる。そのような時間は経験的に決定し得る。例えば、約12～24時間で良好な結果が得られることが判明した。他の適当なオリゴヌクレオチド結合条件も経験的に決定し得る。例えば、約12～20 nMのナノ粒子濃度および室温下のインキュベーションによって良好な結果が得られる。

30

【0195】

次いで、少なくとも1種の塩を水に添加して塩溶液をつくる。塩は任意の水溶性塩であってよい。例えば、塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、2種以上のこれらの塩の組合せ、またはリン酸緩衝液中のこれらの塩の1種であってよい。塩は、濃縮溶液として添加するのが好ましいが、固体として添加してもよい。塩は、水に一度に添加してもよいし、経時的に漸進的に添加してもよい。「経時的に漸進的に」とは、塩を少なくとも2つの部分に分けて一定の時間間隔を置いて添加することを意味する。適当な時間間隔は経験的に決定し得る。

【0196】

塩溶液のイオン強度は、オリゴヌクレオチドの互いからの静電斥力と、正に帯電したナノ粒子に対する負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力、または負に帯電したナノ粒子からの負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電斥力とを少なくとも部分的に克服するのに十分でなければならない。経時的に漸進的に塩を添加することにより静電引力および静電斥力を漸進的に減少させると、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの表面密度が最も高くなることが判明した。各塩または塩の組合せに適したイオン強度は経験的に決定し得る。塩化ナトリウムの濃度は経時的に漸進的に増大させるのが好ましく、リン酸緩衝液中約0.1 M～約1.0 Mの塩化ナトリウム最終濃度が良好な結果を生じることが判明した。

40

【0197】

塩を添加した後、塩溶液中で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、追加のオリゴヌクレオ

50

チドをナノ粒子に結合させて安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加時間インキュベートする。以下に詳細に説明するように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの表面密度が増加すると、共役体が安定化することが判明した。このインキュベーションの時間は経験的に決定し得る。合計約24~48（好ましくは40時間）のインキュベーション時間で良好な結果が得られることが分った（これは、合計インキュベーション時間である。上述のように、塩濃度は、この合計時間にわたって漸進的に増大させ得る）。塩溶液中でのこの第2インキュベーション時間は、本明細書では「熟成」ステップと称する。この「熟成」ステップに適した他の条件は経験的に決定し得る。例えば、室温下のインキュベーションおよびpH 7.0で良好な結果が得られる。

【0198】

「熟成」ステップを用いて生成した共役体は、「熟成」ステップを用いずに生成したものよりかなり安定度が高いことが分った。上述のように、この安定性の向上は、「熟成」ステップによって達成されるナノ粒子表面上のオリゴヌクレオチド密度の増加によるものである。「熟成」ステップにより達成される表面密度は、ナノ粒子のサイズおよび種類、ならびにオリゴヌクレオチドの長さ、配列および濃度に依存するであろう。ナノ粒子を安定化するのに適した表面密度および所望のナノ粒子とオリゴヌクレオチドの組合せを得るのに必要な条件は、経験的に決定し得る。一般に、安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を得るためには、少なくとも 10 pmol/cm^2 の表面密度が適当であろう。表面密度は少なくとも 15 pmol/cm^2 が好ましい。共役体のオリゴヌクレオチドが核酸およびオリゴヌクレオチド標的とハイブリダイズする能力は表面密度が高すぎると低下するので、表面密度は約 $35 \sim 40 \text{ pmol/cm}^2$ 以下が好ましい。

【0199】

本明細書に使用する場合、「安定な」とは、共役体生成後少なくとも6ヶ月間に、大多数のオリゴヌクレオチドがナノ粒子に付着したままであり、オリゴヌクレオチドが、核酸検出法およびナノファブリケーション法において遭遇する標準条件下に核酸およびオリゴヌクレオチド標的とハイブリダイズし得ることを意味する。

【0200】

この方法で調製されたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、それらの安定性の他に、他の優れた特性を示す。例えば、本願の実施例5、7および19を参照されたい。特に、共役体の表面密度が高いため、共役体は、標的核酸またはオリゴヌクレオチドの存在下では、大きな凝集体として集合するであろう。凝集体が生成し、解離する温度範囲は予想外に極めて狭いことが判明したが、この固有の特徴は、重要な実用的成果をもたらす。特に、これは、本発明の検出法の選択性および感度を高める。この共役体を用いて、1塩基誤対合および 20 fmol 程度の小さい標的を検出することができる。これらの特徴はもともとは溶液中で実施したアッセイで発見されたものであるが、これらの共役体を用いることの利点は、1種類のみの共役体しか使用しないアッセイを含めた、基板上で実施するアッセイにも及ぶことが判明した。

【0201】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーション効率を、認識部分とスペーサー部分を含む認識オリゴヌクレオチドの使用によって劇的に増加させることができることがわかっている。「認識オリゴヌクレオチド」とは、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである。この実施形態では、認識オリゴヌクレオチドは認識部分およびスペーサー部分を含み、認識部分が核酸またはオリゴヌクレオチド標的にハイブリダイズする。認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分は、該スペーサー部分がナノ粒子に結合できるように設計される。例えば、スペーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分が、共有結合によって結び付けられる。これらは上述したのと同じ部分および官能基である。ナノ粒子に対して認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分が結合した結果、認識部分はナノ粒子の表面から遠ざかり、その標的とのハイブリダイゼーションのためによりアクセス可能となる。認識部分のナノ粒子からのよい離間性を提供するスペーサー部分の長さと配列は、経験的に決

定することが可能である。少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは10～30ヌクレオチドを含むスペーサー部分が、好結果を与えることがわかった。スペーサー部分は、認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子への結合能もしくは核酸またはオリゴヌクレオチド標的への結合能に干渉しない、任意の配列を有してよい。例えば、スペーサー部分は、認識オリゴヌクレオチドの配列や認識オリゴヌクレオチドの核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列に対し、互い相補的な配列を有するべきではない。好ましくは、スペーサー部分のヌクレオチドの塩基は、すべてアデニン、すべてのチミン、すべてシチジン、またはすべてグアニンであり、そうでなければ上述のような問題が起こる可能性がある。より好ましくは、塩基はすべてアデニンまたはすべてのチミンである。好ましくは、塩基はすべてチミンである。

10

【0202】

所望のレベルのハイブリダイゼーションを与えるために、認識オリゴヌクレオチドに加えての希釈剤オリゴヌクレオチドの使用が、共役体を要求に合わせて作製する（あつらえる）手段を提供することがさらに知られている。希釈剤オリゴヌクレオチドと認識オリゴヌクレオチドは、共役体を調製するためにナノ粒子に接触させた時の溶液中の比とほぼ同じ比率でナノ粒子に付くことが分かった。したがって、共役体が所望の数のハイブリダイゼーション事象に参加するように、ナノ粒子に結び付けられた希釈剤オリゴヌクレオチド対認識オリゴヌクレオチドの比を制御することができる。希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子への結合能もしくは核酸またはオリゴヌクレオチド標的への結合能に干渉しない、任意の配列を有してよい。例えば、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの配列や認識オリゴヌクレオチドの核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列に対し、互い相補的な配列を有するべきではない。希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドがその核酸またはオリゴヌクレオチド標的に結合できるように、認識オリゴヌクレオチドよりも短い長さを好ましくは有する。認識オリゴヌクレオチドがスペーサー部分を含む場合、希釈剤オリゴヌクレオチドは、最も好ましくはスペーサー部分とほぼ同じ長さである。このように、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの認識部分の核酸またはオリゴヌクレオチド標的とハイブリダイズする能力に干渉しない。さらにより好ましくは、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じ配列を有する。

20

【0203】

容易に理解できるように、非常に望ましいナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を、上述のすべての方法を用いて調製することができる。そうすることによって、要求に合わせたハイブリダイゼーション能力を有する安定した共役体を作製することが可能である。

30

【0204】

上記の共役体の任意のものは、上述の核酸検出方法のいずれに使用してもよいし、好ましくは使用される。また、本発明は、上記共役体のうちの任意のものを入れた容器を含むキットも提供する。その上、該共役体は、本発明のナノファブリケーションの方法ならびに核酸分離方法のいずれに使用してもよいし、好ましくは使用される。

【0205】

用語「ある」存在とは、「1つ以上の」その存在を表す。例えば、「ある特徴」とは、1つ以上の特徴または少なくとも1つの特徴を表す。したがって、本明細書においては、用語「ある」「1つ以上」および「少なくとも1つ」は互換的に用いられる。用語「含んでなる」「含む」および「有する」は互換的に用いられていることに留意されたい。

40

【0206】

（実施例）

実施例1：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子

A：金ナノ粒子の調製

Frens, Nature Phys. Sci., 第241巻, 20ページ(1973年)およびGrabar, Anal. Chem., 第67巻, 735ページ(1995年)に記載のように、 HAuCl_4 をクエン酸塩で還元して、金コロイド(直径13nm)を

50

調製した。簡単に説明すると、すべてのガラス器を王水（3部のHCl、1部のHNO₃）で洗浄し、Nanopure H₂Oでリンス、次いで使用前にオーブンで乾燥させた。HAuCl₄およびクエン酸ナトリウムはオールドリッチケミカル社（Aldrich Chemical Company）から購入した。水性HAuCl₄（1mM、500ml）を攪拌還流させた。次いで、38.8mMのクエン酸ナトリウム（50ml）を素早く添加した。溶液の色は薄黄色から暗紅色に変わったが、還流を15分間継続した。室温に冷ました後、赤色溶液をミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc.）の1ミクロンフィルターに通して濾過した。Auコロイドを、Hewlett Packard 8452Aダイオードアレイ分光光度計を用いたUV-可視分光法および日立 8100透過型電子顕微鏡を用いた透過型電子顕微鏡検査（TEM）により特性決定した。直径13nmの金粒子は、標的および10～35ヌクレオチド範囲のプロブオリゴヌクレオチドと共に凝集させると目に見える変色を生じる。

【0207】

B. オリゴヌクレオチドの合成

ホスホロアミダイト化学を用いる単カラムモードのMilligene Expedite DNA合成機を用いて1μmolスケールでオリゴヌクレオチドを合成した。Eckstein, F.（編）, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach（IRL Press, Oxford, 1991年）。すべての溶液はミリジーン社（Milligene）（DNA合成グレード）から購入した。平均カップリング効率は98～99.8%の範囲であり、最終ジメトキシトリチル（DMT）保護基は精製を支援するためにオリゴヌクレオチドから切断しなかった。

【0208】

3'-チオールオリゴヌクレオチドを得るために、チオール修飾剤C₃-S-S-CPG支持体をグレン・リサーチ社（Glen Research）から購入し、自動合成機に使用した。固相支持体からの通常の切断の間（55℃で16時間）に、NH₄OH溶液に0.05M ジチオトレイトール（DTT）を加えて、3'-ジスルフィドをチオールに還元した。逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製する前に、過剰なDTTを酢酸エチルで抽出して除去した。

【0209】

5'-チオールオリゴヌクレオチドを得るために、5'-チオール修飾剤C₆-ホスホロアミダイト試薬をヴァージニア州 20166、スターリング、ファルコン・プレイス 44901 所在のグレン・リサーチ社（Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166）から購入した。オリゴヌクレオチドを合成し、最終DMT保護を除去した。次いで、100μmolの5'-チオール変性剤C₆-ホスホロアミダイトに、1mlの無水アセトニトリルを加えた。200μlのアミダイト溶液と200μlの（合成機から出来たばかりの）アクチベーターとを混合し、まだ固相支持体上の合成オリゴヌクレオチドを含有するカラム上にシリンジで導入し、カラム中で10分間往復運動させた。次いで、支持体を無水アセトニトリルで30秒間洗浄（2×1ml）した。カラムに700μlの0.016M I₂/H₂O/ピリジン混合物（酸化剤溶液）を導入し、次いで、2つのシリンジを用いてカラム中で30秒間往復運動させた。次いで、支持体をCH₃CN/ピリジンの1:1混合物（2×1ml）で1分間洗浄した後、無水アセトニトリル（2×1ml）で最終洗浄し、その後、カラムを窒素流で乾燥させた。精製を支援するために、トリチル保護基は除去しなかった。

【0210】

0.03M Et₃NH⁺OAc⁻緩衝液（TEAA）、pH7と共に、1%/分勾配の95%CH₃CN/5%TEAAを用いて、Hewlett Packard ODSハイパーシル（hypersil）カラム（4.6×200mm、5mm粒度）を具備したDionex DX500システムで、逆相HPLCを実施した。流速は1ml/分、UV検出は260nmであった。DMT保護非修飾オリゴヌクレオチドの精製には、分取

HPLC（溶離時間 27 分）を用いた。緩衝液を回収して蒸発させた後、80%酢酸で室温下に 30 分間処理してオリゴヌクレオチドから DMT を切断した。次いで、溶液を蒸発させてほぼ乾固し、水を加え、酢酸エチルを用いて切断 DMT をオリゴヌクレオチド水溶液から抽出した。オリゴヌクレオチドの量は、260 nm での吸光度により定量し、最終純度を逆相 HPLC（溶離時間 14.5 分）で評価した。

【0211】

3'-チオールオリゴヌクレオチドの精製には同じプロトコルを用いたが、但し、形成されるジスルフィドの量を減少させるために DMT を抽出した後で DTT を加えた。4℃下に 5 時間後、酢酸エチルを用いて DTT を抽出し、オリゴヌクレオチドを HPLC（溶離時間 15 分）で再精製した。

10

【0212】

5'-チオール修飾オリゴヌクレオチドを精製するために、非修飾オリゴヌクレオチドの場合と同じ条件下に分取 HPLC を実施した。精製後、無水オリゴヌクレオチド試料に、150 µl の 50 mM AgNO₃ 溶液を加えて、トリチル保護基を除去した。試料は、切断が起こると同時に乳白色に変わった。20 分後、DTT の 10 mg/ml 溶液 200 µl を加えて Ag を複合体化（反応時間 5 分）し、試料を遠心して黄色複合体を沈殿させた。次いで、オリゴヌクレオチド溶液（< 50 OD）を、（10 塩基を超えるオリゴヌクレオチドの脱塩および緩衝液交換用の DNA Grade Sephadex D-25 Medium を有する）精製用の脱塩 NAP-5 カラム（スウェーデンのウプサラ所在ファルマシア・バイオテック社（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden））上に移した。5'-チオール修飾オリゴヌクレオチドの量を、UV-可視分光法により 260 nm での吸光度を測定して定量した。10 mM NaOH 溶液（pH 12）と共に、2% / 分勾配の 10 mM NaOH、1 M NaCl 溶液を用いて、Dionex Nucleopak PA-100（4 × 250）カラムでイオン交換 HPLC を実施して、最終純度を評価した。典型的には、約 19 分および 25 分の溶離時間で 2 つのピークを得た（溶離時間はオリゴヌクレオチド鎖長に依存する）。これらのピークはそれぞれチオールオリゴヌクレオチドおよびジスルフィドオリゴヌクレオチドに対応していた。

20

【0213】

C. オリゴヌクレオチドの金ナノ粒子への付着

30

上記パート A に記載のように調製した 17 nM（150 µl）Au コロイドの水溶液を、パート B に記載のように調製した 3.75 µM（46 µl）3'-チオール-TTTGTGA と混合し、キャップをした 1 ml 容量 Eppendorf バイアル中室温下に 24 時間放置した。第 2 コロイド溶液を 3.75 µM（46 µl）3'-チオール-TACCGTTG と反応させた。これらのオリゴヌクレオチドは非相補的であることに留意されたい。使用直前に、等量の 2 種のナノ粒子溶液を合わせた。オリゴヌクレオチドは非相補的であるから、反応は起こらなかった。

【0214】

オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子は高温（80℃）および高塩濃度（1 M NaCl）下に何日も安定であり、粒子の成長は認められなかった。高塩濃度下に安定であることは、そのような条件が本発明の検出法およびナノファブリケーションの基礎を構成するハイブリダイゼーション反応に要求されるために重要である。

40

【0215】

実施例 2： ナノ粒子凝集体の形成

A. 連結オリゴヌクレオチドの作製

実施例 1 のパート B に記載のように、2 種（非チオール化）オリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドは以下の配列を有していた：

3' ATATGCGCGA TCTCAGCAAA（配列番号 1）；および

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA（配列番号 2）。

これら 2 種のオリゴヌクレオチドを 1 M NaCl、10 mM リン酸緩衝（pH 7.0）

50

）溶液中で混合すると、ハイブリダイズして、12塩基対オーバーラップおよび2つの8塩基対付着末端を有する二本鎖が形成された。付着末端はそれぞれ、実施例1のパートCで調製したAuコロイドに付着しているオリゴヌクレオチドの1つの配列に対して相補的な配列を有していた。

【0216】

B. ナノ粒子凝集体の形成

この実施例のパートAで作製した連結オリゴヌクレオチド(NaClで希釈後の最終濃度0.17μM)を、室温下に、実施例1のパートCで調製したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体(NaClで希釈後の最終濃度5.1nM)に加えた。次いで、溶液をNaCl水溶液で(1Mの最終濃度に)希釈し、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに適した条件である10mMリン酸、pH7で緩衝した。その直後に赤から紫への変色が観察され、続いて沈殿反応が生じた。図6参照。数時間の間に、溶液は透明になり、反応容器の底にピンクがかった灰色の沈殿物が沈殿した。図6参照。

10

【0217】

このプロセスがオリゴヌクレオチドとコロイドを共に含むことを確認するために、沈殿物を回収し、pH7で緩衝する1M NaCl水溶液中で(振とうして)再懸濁させた。このようにして、ナノ粒子にハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドを除去する。次いで、ハイブリダイズしたオリゴデオキシリボヌクレオチドに特徴的な吸光度(260nm)および金粒子間の間隔を表す凝集コロイドに特徴的な吸光度(700nm)をモニターして、温度/時間解離実験を行った。図7参照。

20

【0218】

温度を0~80℃の間で1℃/分の速度で循環させながら、Peltier PTP-1 Temperature Controlled Cell Holderを用いるPerkin-Elmer Lambda 2 UV-可視分光光度計で260および700nmでの吸光度の変化を記録した。10mMリン酸緩衝液を用いてpH7で緩衝し、1M NaCl濃度のDNA溶液は、約1吸光度単位(OD)であった。

【0219】

その結果は図8Aに示されている。温度を0℃~(二本鎖の解離温度(T_m))($T_m = 42^\circ\text{C}$)より38℃高い)80℃の間で循環させると、コロイドとオリゴヌクレオチドの両方の光学的シグナチャーの間に良好な相関が存在した。何も結合していないAuコロイドのUV-可視スペクトルははるかに温度依存度が低かった(図8B)。

30

【0220】

ポリマーオリゴヌクレオチド-コロイド沈殿物をその融解点より高い温度で加熱すると、肉眼で見える実質的な光学的変化があった。透明溶液は、ポリマー生体材料がデハイブリダイズして水溶液に可溶である非結合コロイドを生成すると、暗紅色に変わった。図8Aの温度トレースにより証明されるように、このプロセスは可逆的であった。

【0221】

対照実験において、14-T:14-A二本鎖は、可逆的Auコロイド粒子の凝集を誘発するには有効でないことが明らかにされた。別の対照実験で、付着末端に4塩基対誤対合がある連結オリゴヌクレオチド二本鎖は、(実施例1のC部に記載のように調製し、上記のように反応させた)オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子の可逆的粒子凝集を誘発しないことが判明した。第3の対照実験において、連結オリゴヌクレオチドの付着末端に対して相補的な配列を有し、ナノ粒子と反応させた非チオール化オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子を連結オリゴヌクレオチドと合わせたときに可逆凝集を生成しなかった。

40

【0222】

重合/集合体プロセスについてのさらなる事実が沈殿物の透過型電子顕微鏡検査(TEM)研究から明らかになった。TEMは、日立8100透過型電子顕微鏡で実施した。孔の多い炭素格子に100μlのコロイド溶液をスポット

【0223】

して典型的な試料を調製した。次いで、格子を真空乾燥させ、画像を形成した。ハイブリ

50

ダイズしたオリゴヌクレオチドを介して結合したAuコロイドのTEM画像は、集合した大きなAuコロイド網目構造を示した(図9A)。何も結合していないAuコロイドは、同等な条件下には凝集せずに、分散するか、または粒子成長反応を起こす。Hayat, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1991年)。今日までに実施された実験ではコロイド粒子の成長の事実は全く存在しないことに留意されたい；ハイブリダイズしたコロイドは、平均直径が13nmの著しく一定したサイズを有するようである。

【0224】

TEMにより、三次元凝集体の秩序度の評価を困難にする層の重ね合わせが得られる。しかし、単層の二次元凝集体のもっと小規模の画像から、自己集合体プロセスに関するより多くの事実が得られた(図9B)。均一な粒子が約60Å離れている密集凝集体集合体が見られる。この間隔は、用いられた配列を有する剛性オリゴヌクレオチドハイブリッドを介して結合したコロイドに関して予測された95Å間隔よりいくらか短い。しかし、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせた後で得られた二本鎖中のニックのために、これらの凝集体は剛性ハイブリッドではなく、極めて可撓性であった。これは、系オーバーラップ鎖を4つから3つに減らす(それによってニックの数を減らす)か、または二本鎖の代わりに三本鎖を用いることにより制御し得る可変要素であることに留意されたい。

【0225】

実施例3：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

実施例1に記載のように金コロイド(直径13nm)を調製した。チオールーオリゴヌクレオチド[HS(CH₂)₆OP(O)(O⁻)ーオリゴヌクレオチド]も実施例1に記載のように調製した。

【0226】

実施例1に記載のチオールーオリゴヌクレオチドを金ナノ粒子に付着させる方法は、満足すべき結果をもたらさない場合があることが判明した。特に、長いオリゴヌクレオチドを用いたとき、オリゴヌクレオチドーコロイド共役体は、診断系に通常存在するバックグラウンドDNA用のモデルとして用いられる大過剰の高分子量サケ精子DNAの存在下では安定でなかった。コロイドをチオールーオリゴヌクレオチドに長く暴露すると、サケ精子DNAに対して安定なオリゴヌクレオチドーコロイド共役体が生成したが、得られた共役体は、満足にハイブリダイズしていなかった。さらなる実験により、共役体が高分子DNAに対して安定でありかつ満足にハイブリダイズするように任意の長さのチオールーオリゴヌクレオチドを金コロイドに付着させる以下の手順を得た。

【0227】

水中の金コロイド(17nM)の1ml溶液を水中の過剰な(3.68μM)チオールーオリゴヌクレオチド(28塩基長)と混合し、混合物を室温下に12~24時間放置した。次いで、100μlの0.1Mリン酸水素ナトリウム緩衝液、pH7.0および100μlの1.0M NaClを予備混合して加えた。10分後、10μlの1%水性NaN₃を添加し、混合物をさらに40時間放置した。この「熟成」ステップは、チオールーオリゴヌクレオチドにより表面被覆面積を増大させて、金表面からオリゴヌクレオチド塩基を置換させるように設計された。その後のアッセイで、40時間のインキュベーション後に溶液をドライアイス浴中で凍結し、次いで室温下に解凍すると、いくらか透明度が増し、境界がよりはっきりした赤色スポットが得られた。どちらにしても、次ぎに、溶液をEppendorf Centrifuge 5414にて14,000rpmで約15分間遠心して、(260nmでの吸光度によって示されている)ほとんどのオリゴヌクレオチドと共に、(520nmでの吸光度により示されている)7~10%の金コロイドを含有する極めて薄いピンク色の上清と、管の底に密で暗色のゼラチン質残留物を得た。上清を除去し、残留物を約200μlの緩衝液(10mMリン酸、1.0M NaCl)中に再懸濁し、再遠心した。上清溶液を除去した後、残留物を1.0mlの緩衝液(10

10

20

30

40

50

mM リン酸、0.1M NaCl) および10 μ lの1%NaN₃水溶液中に入れた。溶液をピペットで数回吸い込んだり、吐出したりして溶解を支援した。得られた赤色マスター溶液は、室温下に数ヶ月間放置し、シリカ薄相クロマトグラフィー(TLC)プレート(実施例4参照)上に置き、2M NaCl、10mM MgCl₂、または高濃度のサケ精子DNA含有溶液を添加しても、安定であった(すなわち、赤色を保ち、凝集しなかった)。

【0228】

実施例4：ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーションの促進

実施例3に記載のように、図11に示されているオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体IおよびIIを調製した。これら2種の共役体のハイブリダイゼーションは極めて緩慢であった。特に、水性0.1M NaClまたは10mM MgCl₂+0.1M NaCl中で共役体IおよびII試料を混合し、混合物を室温下に1日放置しても、変色はほとんどまたは全く生じなかった。

【0229】

2つの方法がハイブリダイゼーションを改善することが分った。最初の方法では、共役体IおよびIIの混合物(0.1M NaCl溶液中に各15nMを含有)をドライアイス-イソプロピルアルコール浴中で5分間凍結し、次いで混合物を室温下に解凍すると、より高速の結果が得られた。解凍した溶液は、青みを帯びた色を示した。標準C-18TLCシリカプレート(オールテック・アソシエイツ社(Alltech Associates))上に溶液1 μ lをスポットすると、直ぐに濃青色が見られた。ハイブリダイゼーションおよびその結果として起こる凍結-解凍手順により起こった変色は可逆的であった。ハイブリダイズした溶液を80℃に加熱すると、溶液は赤色に変わり、TLCプレート上にピンク色のスポットを生成した。次いで、凍結、解凍すると、系は(青色の)ハイブリダイズ状態に戻った(C-18TLCプレート上の溶液とスポット両方共)。溶液を凍結しなかった同様な実験では、C-18TLCプレート上で得られたスポットはピンク色であった。

【0230】

高速結果を得る第2の方法は、共役体と標的を温める方法である。例えば、別の実験では、0.1M NaCl溶液中にオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体とオリゴヌクレオチド標的配列とを急速に65℃に温め、20分かけて室温に冷ました。C-18シリカプレート上にスポットして、乾燥させると、ハイブリダイゼーションを示す青いスポットが得られた。それに対し、共役体と標的を室温下に1時間0.1M NaCl中でインキュベートしても、ハイブリダイゼーションを示す青色を生成しなかった。0.3M NaCl中でのハイブリダイゼーションはさらに高速である。

【0231】

実施例5：ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図12A-Fに示されているオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体1および2は実施例3に記載のように作製し、図12Aに示されているオリゴヌクレオチド標的3は、実施例2に記載のように作製した。誤対合標的および欠失標的4、5、6および7は、イリノイ州シカゴ所在のノースウェスタン大学バイオテクノロジー施設(Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL)から購入した。これらのオリゴヌクレオチドを40nmolスケールで合成し、逆相C18カートリッジ(OPC)上で精製した。それらの純度は、イオン交換HPLCを実施して定量した。

【0232】

ストリンジェントな温度に、急速加熱し、次いで急速に冷却して、選択的ハイブリダイゼーションを達成した。例えば、15nMの各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体1および2と、3nmolの標的オリゴヌクレオチド3、4、5、6または7を含有する100 μ lの0.1M NaCl+5mM MgCl₂を、74℃に加熱し、以下の表に示されている温度に冷却し、混合物をこの温度で10分間インキュベートしてハイブリダイゼー

ションを実施した。次いで、各反応混合物の $3 \mu\text{l}$ 試料を C-18 T L C シリカプレート上にスポットした。(5 分間) 乾燥させると、ハイブリダイゼーションが起こった場合には濃青色が現われた。

【0 2 3 3】

結果を以下の表 1 に示す。ピンク色のスポットは陰性テスト（すなわち、ナノ粒子がハイブリダイゼーションによって結合しなかったこと）を示し、青色のスポットは陽性テスト（すなわち、ナノ粒子が両オリゴヌクレオチド-コロイド共役体に関するハイブリダイゼーションにより近接させたこと）を示す。

【0 2 3 4】

【表 1】

10

表 1

反応物	結果 (色)			
	4 5℃	5 0℃	6 0℃	7 4℃
1 + 2	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
1 + 2 + 3 (対合)	青	青	青	青
1 + 2 + 4 (半相補的誤対合)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
1 + 2 + 5 (- 6 b p)	青	ピンク	ピンク	ピンク
1 + 2 + 6 (1 b p 誤対合)	青	青	ピンク	ピンク
1 + 2 + 7 (2 b p 誤対合)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

20

表 1 から分るように、6 0℃のハイブリダイゼーションでは、完全対合標的 3 の場合のみ青色スポットが得られた。5 0℃のハイブリダイゼーションでは、標的 3 と 6 の両方で青色スポットを生成した。4 5℃のハイブリダイゼーションでは、標的 3、5 および 6 で青色スポットが得られた。

【0 2 3 5】

30

関連シリーズにおいて、1 誤対合 T ヌクレオチドを含む標的は、5 8℃で陽性テスト（青色）を生成し、共役体 1 および 2 は 6 4℃で陰性テスト（赤色）を生成した。同一条件下で、完全対合標的（3）は、どちらの温度下にも陽性テストを生成したが、これは、このテストが完全対合標的と、1 誤対合塩基を含む標的とを識別し得ることを示している。

【0 2 3 6】

異なるハイブリダイゼーション法を用いても同様な結果が得られた。特に、凍結、解凍し、次いで急速にストリンジェントな温度に温めることにより、選択的ハイブリダイゼーションが達成された。例えば、1 5 n M の各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体 1 および 2 と、1 0 p m o l の標的オリゴヌクレオチド 3、4、5、6 または 7 を含有する 1 0 0 μl の 0. 1 M NaCl を、ドライアイス-イソプロピルアルコール浴中で 5 分間凍結し、室温下に解凍し、次いで、急速に以下の表 2 に示されている温度に冷却し、混合物をこの温度で 1 0 分間インキュベートしてハイブリダイゼーションを実施した。次いで、各反応混合物の $3 \mu\text{l}$ 試料を C-1 8 T L C シリカプレート上にスポットした。結果を表 2 に示す。

40

【0 2 3 7】

【表 2】

表 2

反応物（プローブ）＋標的	結果（色）				
	R T	3 5℃	4 0℃	5 4℃	6 4℃
(1 + 2) + 3	青	青	青	青	ピンク
(1 + 2)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 4	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 5	青	青	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 6	青	青	青	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 7	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

10

これらの系の重要な特徴は、温度変化に関連する変色が極めて急激であり、かつ約 1℃の温度範囲にわたって発生することである。これは、コロイド共役体が関与する融解および会合プロセスにおける高い協同性を示しており、完全対合配列と 1 塩基対誤対合を含むオリゴヌクレオチド標的を容易に識別し得ることを示している。

【0238】

高い識別度は 2 つの特徴によるものと考えられる。第 1 に、陽性シグナルを得るには、標的上の 2 つの比較的短いプローブオリゴヌクレオチドセグメント（15 ヌクレオチド）の整列が必要である。同等な 2 成分検出系において、どちらかのセグメント中に誤対合があると、もっと長いプローブ（例えば、30 塩基長のオリゴヌクレオチド）中の誤対合より不安定になる。第 2 に、溶液中の標的オリゴヌクレオチドとナノ粒子共役体とのハイブリダイゼーションで得られた 260 nm でのシグナルは、DNA に基づくものではなく、ナノ粒子に基づいている。このシグナルは、多重オリゴヌクレオチド二本鎖によるポリマー網目構造として組織化されたナノ粒子集合体の解離に依存する。これによって、凝集体の解離に関して観察される温度範囲が、標準 DNA 熱変性と比べて狭められる。簡単に説明すると、架橋凝集体中の一部の二本鎖は、ナノ粒子を溶液中に分散させることなく解離し得る。したがって、凝集体を融解させる温度範囲は、ナノ粒子を含まない同等な系の融解に関わる温度範囲（12℃）に比べて極めて狭い（4℃）。この検出法のさらに顕著かつ有利な点は、C-18 シリカプレート上で観察される比色応答（<1℃）の温度範囲である。原則的に、この 3 成分ナノ粒子をベースとする方法は、標的核酸とハイブリダイズしている一本鎖プローブをベースとする任意の 2 成分検出系よりも選択的であろう。

20

30

40

【0239】

100 μl のハイブリダイゼーション緩衝液（0.3 M NaCl、10 mM リン酸、pH 7）中で、1 nmol の標的 3 を含有するマスター溶液を調製した。この溶液 1 μl は、標的オリゴヌクレオチド 10 pmol に相当する。マスター溶液からアリコートを取り、ハイブリダイゼーション緩衝液で所望の濃度に希釈して、連続希釈を実施した。表 3 は、プローブ 1 および 2 と異なる量の標的 3 との混合物 3 μl を用いて得た感度を示している。凍結－解凍条件を用いてハイブリダイゼーションを実施した後、これらの溶液の 3 μl アリコートを C-18 TLC プレート上にスポットして、色を定量した。以下の表 3 において、ピンク色は陰性テストを示し、青色は陽性テストを示す。

【0240】

【表 3】

表 3

標的の量	結果
1 p m o l	青 (陽性)
2 0 0 f m o l	青 (陽性)
1 0 0 f m o l	青 (陽性)
2 0 f m o l	青 (陽性)
1 0 f m o l	紫がかった色 (曖昧)

10

この実験は、1 0 f m o l がこの特定の系の検出下限であることを示している。

【0 2 4 1】

実施例 6 : ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図 1 3 B に示されているように、DNA 修飾ナノ粒子を修飾透明基板上に吸着させた。この方法は、DNA ハイブリダイゼーション相互作用を用いて、DNA 修飾ナノ粒子をガラス製基板に付着しているナノ粒子に結合させるステップから成る。

【0 2 4 2】

ガラス製顕微鏡スライドはフィッシャー・サイエンティフィック社 (F i s h e r S c i e n f i t i c) から購入した。先端にダイヤモンドが付いたけがきペンを用いて、スライドを約 5×15 mm の部片に切断した。スライドを、 50°C の $4:1 \text{ H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}$ 溶液中に 20 分間浸漬して清浄した。次いで、スライドを、多量の水、次いでエタノールでリンスし、乾燥窒素流下に乾燥させた。スライド表面をチオール末端シランで官能化するために、スライドを脱気エタノール 1 % (質量) メルカプトプロピルトリメトキシシラン溶液に 12 時間浸漬した。スライドをエタノール溶液から取り出し、エタノール、次いで水でリンスした。直径 13 nm の金ナノ粒子を含有する溶液 (実施例 1 に記載の配合物) にナノ粒子を浸漬して、スライドのチオール末端表面上に吸着させた。コロイド溶液中で 12 時間後、スライドを取り出し、水でリンスした。得られたスライドは、吸着されたナノ粒子に帰するピンク色を有し、水性金ナノ粒子コロイド溶液と同様な UV-可視吸光度プロファイル (520 nm での表面プラズモン吸光度ピーク) を示す。図 1 4 A 参照。

20

30

【0 2 4 3】

ガラス製スライドを、新たに精製された 3' チオールオリゴヌクレオチド (3' チオール A T G C T C A A C T C T [配列番号 33] (実施例 1 および 3 に記載のように合成) を含有する 0.2 OD (1.7 μM) 溶液中に浸漬して、DNA をナノ粒子修飾表面に付着させた。12 時間浸漬させた後、スライドを取り出し、水でリンスした。

【0 2 4 4】

検体 DNA 鎖がナノ粒子を修飾表面に結合させる能力を証明するために、連結オリゴヌクレオチドを調製した。(実施例 2 に記載のように調製した) 連結オリゴヌクレオチドは、既に基板表面上に吸着されている DNA (配列番号 33) と相補的な 12 bp 末端を有する配列を含む 24 bp 長 (5' T A C G A G T T G A G A A T C C T G A A T G C G) [配列番号 34] であった。次いで、基板を、連結オリゴヌクレオチド (0.4 OD、1.7 μM) を含有するハイブリダイゼーション緩衝液 (0.5 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液 pH 7) 溶液中に 12 時間浸漬した。基板を取り出し、類似緩衝液でリンスした後、基板を、基板に付着している連結オリゴヌクレオチドのハイブリダイズしていない部分と相補的なオリゴヌクレオチド (T A G G A C T T A C G C 5' チオール [配列番号 35]) (実施例 3 に記載のように調製) で修飾された直径 13 nm の金ナノ粒子を含有する溶液中に浸漬した。12 時間浸漬した後、基板を取り出し、ハイブリダイゼーション緩衝液でリンスした。基板の色は紫色に変わっており、520 nm での UV-可視吸光度はほぼ二倍になった (図 1 4 A)。

40

【0 2 4 5】

50

オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子が、連結オリゴヌクレオチドとのDNAハイブリダイゼーション相互作用によりオリゴヌクレオチド／ナノ粒子修飾表面に付着したことを確認するために、融解曲線を作成した。融解実験のために、基板を1 mlのハイブリダイゼーション緩衝液を含有するキュベットに入れ、実施例2のパートBで用いたものと同じ装置を用いた。基板の温度を0.5℃/分の速度で増大させながら、ナノ粒子に帰する吸光度シグナル(520 nm)をモニターした。温度が60℃を越えたときに、ナノ粒子のシグナルは劇的に低下した。図14B参照。シグナルの一次導関数は62℃の融解温度を示したが、これは、ナノ粒子を含まない溶液中でハイブリダイズした3つのDNA配列に関して見られた温度と一致する。図14B参照。

【0246】

実施例7：ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図15A-Gに示されている検出系は、2種のプローブ1および2が相補的標的4上に末端同士で整列するように設計した。これは、2つのプローブが標的鎖上に近接して整列している実施例5に記載の系とは異なる(図12A-F参照)。

【0247】

図15A-Gに示されているオリゴヌクレオチドー金ナノ粒子共役体は、実施例3に記載のように調製したが、但し、ナノ粒子は、ハイブリダイゼーション緩衝液(0.3M NaCl、10mM リン酸、pH7)に再分散させた。最終ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体濃度は、赤色のナノ粒子を生成する522nmでの表面プラズモンバンド強度の低下を測定して、13nMであると予測した。図15A-Gに示されているオリゴヌクレオチド標的は、イリノイ州エバンストン所在のノースウエスタン大学バイオテクノロジー施設(Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL)から購入した。

【0248】

13nM オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体1および2を含有するハイブリダイゼーション緩衝液150μlと、60pmol(60μl)の標的4とを混合すると、溶液の色は直ぐに赤色から紫色に変化した。この変色は、金ナノ粒子の大きなオリゴヌクレオチド結合ポリマー網目構造の形成の結果として起こり、これは、ナノ粒子の表面プラズモン共鳴の赤色シフトをもたらす。溶液を2時間にわたって放置すると、大きな巨視的性質の凝集体の沈殿が観察された。懸濁凝集体を含む溶液の「融解分析」を実施した。「融解分析」を実施するために、溶液をハイブリダイゼーション緩衝液で1mlに希釈し、温度を25℃から75℃まで上昇させながら、1分/1℃の保持時間で、260nmでの凝集体の光学シグナチャーを1分間隔で記録した。53.5℃の「融解温度」(T_m)で、オリゴヌクレオチドーナノ粒子ポリマーとしての凝集体の特性決定と一致する、特徴的な急激な転移(半値全幅、一次導関数の $FW_{1/2} = 3.5^\circ\text{C}$)が観察された。これは、ナノ粒子を含まないオリゴヌクレオチドに関して観察されたもっと広幅の転移($T_m = 54^\circ\text{C}$ 、 $FW_{1/2} = \sim 13.5^\circ\text{C}$)に関連する T_m に十分匹敵する。ナノ粒子を含む分析と類似の条件下に、ナノ粒子を含まないオリゴヌクレオチド溶液の「融解分析」を実施したが、但し、温度は10℃から80℃まで増大させた。また、溶液の各オリゴヌクレオチド成分は1.04μMであった。

【0249】

系の選択性をテストするために、プローブ1と2の完全相補体4から形成された凝集体の T_m を、1単塩基誤対合、欠失または挿入を含む標的から形成された凝集体の T_m' と比較した(図15A-G参照)。不完全標的を含むすべての金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド凝集体は、種々の凝集体の T_m 値によって証明されているように、完全相補体から形成された凝集体と比べて、有意な測定可能不安定化を示した(図15A-G参照)。不完全標的を含有する溶液は、52.5℃に保持された水浴に入れたときのそれらの色によって完全相補体を含有する溶液から容易に区別し得る。この温度は、誤対合ポリヌクレオチドの T_m より高く、したがって、完全標的を含有する溶液のみがこの温度下に紫色を呈した。半相補的標的を含むプローブ溶液に関して「融解分析」を実施した。260nmでの

10

20

30

40

50

吸光度は極くわずかに増大したことが観察された。

【0250】

次いで、ハイブリダイゼーション緩衝液中に $50\ \mu\text{l}$ の各プローブ ($13\ \text{nM}$) を含有する溶液に、 $2\ \mu\text{l}$ ($20\ \text{pmol}$) の各オリゴヌクレオチド標的 (図15A-G参照) を加えた。室温下に15分間放置した後、溶液を、温度制御水浴に移し、以下の表4に示されている温度下に5分間インキュベートした。次いで、各反応混合物の $3\ \mu\text{l}$ 試料をC-18シリカプレート上にスポットした。凝集、したがって変色を誘発させるためには両プローブを標的上で整列させる必要があることを証明するために、2回の対照実験を行った。1回目の対照実験は、標的が存在しないプローブ1とプローブ2とから構成した。2回目の対照実験は、一方のプローブ配列のみと相補的な標的3を含むプローブ1とプローブ2とから構成した (図15B参照)。結果は以下の表4に示されている。ピンク色のスポットは陰性テストを示し、青色のスポットは陽性テストを示している。

10

【0251】

注目すべきは、肉眼で検出し得る比色変化は、 1°C 未満にわたって発生し、それによって、完全標的4は、誤対合 (5および6)、末端欠失 (7) および2種のオリゴヌクレオチドプローブが会う標的個所での1単塩基の挿入 (8) を有する標的から容易に区別し得る (表4参照) ことである。比色変化 T_c は、 T_m と温度では近いが、同一ではない。どちらの対照の場合も、すべての温度下に観察されたピンクがかった赤色によって証明されるように、溶液中の粒子の凝集または不安定性の徴候はなく、すべての温度下のプレートテストで陰性スポット (ピンク色) を示した (表4)。

20

【0252】

1単塩基挿入標的8が完全相補性標的4から区別し得るという観察結果は、2種のプローブ配列を有する挿入鎖の完全相補性を考えれば、本当に注目すべきことである。8およびナノ粒子プローブから形成された凝集体の不安定化は、2つの短いプローブの使用と、完全相補性標的にハイブリダイズしたときにプローブの末端が会う2つのチミジン塩基間の塩基の積み重ねの喪失とによるようである。同等条件 ($T_m = 51^\circ\text{C}$) 下に3塩基対挿入 (CCC) を含む標的をプローブとハイブリダイズさせると、類似の結果が観察された。実施例5で上述した系において、塩基挿入を有する標的は、完全相補性標的から区別できなかった。したがって、この実施例に記載されている系は選択性の点で極めて好ましい。また、この系は、増幅技術を用いずにおよそ $10\ \text{fmol}$ の実施例5に記載の系と同じ感度を示した。

30

【0253】

これらの結果は、標的鎖に沿った任意の1単塩基誤対合と共に、標的鎖への任意の挿入をも検出し得ることを示している。変色を検出し得る温度範囲は極めて急勾配であり、変化は極めて狭い温度範囲にわたって生じる。この急激な変化は、標的オリゴヌクレオチド鎖を介して結合された大きなコロイド網目構造が関与する融解プロセスに大きな協同度が存在することを示している。これは、データで示されているように顕著な選択性をもたらす。

【表4】

表 4

反応物(プローブ) + 標的	結果 (色)					
	R T	47.6℃	50.5℃	51.4℃	52.7℃	54.5℃
(1 + 2)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 3	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 4	青	青	青	青	青	ピンク
(1 + 2) + 5	青	青	青	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 6	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 7	青	青	青	青	ピンク	ピンク
(1 + 2) + 8	青	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

10

20

30

40

50

【0254】

実施例 8： ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

「充填」二本鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを含む 1 式の実験を行った。図 16 A に示されているナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体 1 および 2 を、図 16 A-C に示されているような種々の長さの標的 (24、48 および 72 塩基長) および相補的フィラーオリゴヌクレオチドと共にインキュベートした。条件は、その他の点では、実施例 7 に記載の通りであった。また、オリゴヌクレオチドとナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は実施例 7 に記載のように調製した。

【0255】

予測したように、異なる反応溶液は、ハイブリダイゼーション後に、金ナノ粒子の間隔依存性光学特性による顕著に異なる光学特性を有していた。以下の表 5 参照。しかし、これらの溶液を C-18 TLC プレート上にスポットして、室温または 80℃ で乾燥させると、標的オリゴヌクレオチドの長さや金ナノ粒子間の間隔とは無関係に、青色を呈色した。表 5 参照。これは、固相支持体がハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の凝集を促進するために起こると考えられる。これは、溶液を TLC プレート上にスポットすることにより、金ナノ粒子間の間隔がかなり (少なくとも 72 塩基) になるが、それでも比色検出が可能であることを証明している。

【0256】

【表 5】

表 5

標的の長さ	結果 (色)	
	溶液	TLC プレート
24 塩基	青	青
48 塩基	ピンク	青
72 塩基	ピンク	青
プローブ 1 + 2 のみ	ピンク	ピンク

この実施例や他の実施例で観察された変色は、金ナノ粒子間の間隔 (粒子間間隔) がナノ粒子の直径とほぼ同じかそれより小さいときに起こる。したがって、ナノ粒子のサイズ、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのサイズ、およびナノ粒子を標的核酸にハイブリダイズさせるときのナノ粒子の間隔は、オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体が核酸標的とハイブリダイズして凝集体を形成するときに変色が観察可能であるかどうかに影響を与える。例えば、13 nm の直径を有する金ナノ粒子は、長さが 10 ~ 35 ヌクレオチ

ドの標的配列とハイブリダイズするように設計されたナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドを用いて凝集させると、変色を生じるであろう。ナノ粒子を標的核酸にハイブリダイズさせたときに変色を生じさせるのに適したナノ粒子間間隔は、結果が証明しているように、凝集の度合いに応じて異なるであろう。これらの結果はさらに、固体表面が既に凝集している試料の凝集をさらに促進し、金ナノ粒子をさらに近接させることを示している。

【0257】

金ナノ粒子に関して観察された変色は、金の表面プラズモン共鳴のシフトや広がりによるものであり得る。この変色が直径が約4 nm未満の金ナノ粒子に関して起こる可能性はありそうにない。というのは、核酸の特異的検出に必要なオリゴヌクレオチドの長さがナノ粒子の直径を超えるからである。

10

【0258】

実施例9：ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

それぞれプローブ1と2（図12A）から5 μ lを緩衝液（10 mM リン酸、pH 7）と合わせて0.1 M NaClの最終濃度とし、この溶液にヒト尿1 μ lを添加した。この溶液を凍結、解凍し、次いでC-18 TLCプレート上にスポットしたが、青色は発生しなかった。12.5 μ lの各プローブと、2.5 μ lのヒト尿を含有する類似溶液に、0.25 μ l（10 pmol）の標的3（図12A）を加えた。溶液を凍結、解凍し、次いでC-18 TLCプレート上にスポットすると、青色スポットが得られた。

【0259】

ヒト唾液の存在下で類似実験を行った。12.5 μ lの各プローブ1および2と、2および2.5 μ lの標的3を含有する溶液を70℃に加熱した。室温に冷ました後、2.5 μ lの唾液溶液（水で1：10希釈したヒト唾液）を加えた。得られた溶液を凍結、解凍し、次いで、C-18 TLCプレート上にスポットした後、プローブと標的のハイブリダイゼーションを示す青色スポットが得られた。標的を加えなかった対照実験では、青色スポットは観察されなかった。

20

【0260】

実施例10：ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図13Aに示されているようにアッセイを実施した。まず、フィッシャー・サイエンティフィック社から購入したガラス製顕微鏡スライドを先端にダイヤモンドが付いたけがきペンで約5×15 mmの部片に切断した。スライドを50℃の4：1のH₂SO₄：H₂O₂溶液中に20分間浸漬して清浄した。次いで、スライドを多量の水、次いでエタノールでリンスし、乾燥窒素流下に乾燥させた。改変した文献記載手順（Chrisseyら，Nucleic Acids Res.，第24巻，3031-3039ページ（1996年））を用いてチオール修飾DNAをスライド上に吸着させた。まず、スライドを、室温下に、Nanopure水中の1 mM酢酸中のトリメトキシシリルプロピルジエチルトリアミン1%溶液（DETA、ペンシルベニア州ブリストル所在のユナイテッド・ケミカル・テクノロジー社（United Chemical Technology, Bristol, PA）から購入）中に20分間浸漬した。スライドを水、次いでエタノールでリンスした。乾燥窒素流で乾燥させた後、温度制御加熱ブロックを用いて120℃で5分間焼成した。スライドを冷まし、次いで、室温下に2時間、80：20メタノール：ジメトキシスルホキシド中1 mMのスクシンイミジル-4-（マレイミドフェニル）-ブチレート（SMPB、シグマ・ケミカルズ社（Sigma Chemicals）から購入）中に浸漬した。SMPB溶液から取り出して、エタノールでリンスした後、SMPB架橋剤と結合しなかったアミン部位に以下のようにキャップ形成した。まず、スライドを、10% 1-メチルイミダゾールを含有する8：1 THF：ピリジン溶液中に5分間浸漬した。次いで、スライドを、9：1 THF：無水酢酸溶液中に5分間浸漬した。これらのキャッピング溶液は、ヴァージニア州スターリング所在のグレン・リサーチ社から購入した。スライドをTHF、次いでエタノール、最後に水でリンスした。

30

40

【0261】

50

修飾ガラス製スライドを、新たに精製されたオリゴヌクレオチド（3'チオールATGCTCAACTCT [配列番号33]）を含有する0.2OD（1.7μM）溶液中に浸漬して、DNAを表面に付着させた。12時間浸漬した後、スライドを取り出し、水でリンスした。

【0262】

検体DNA鎖がナノ粒子を修飾基板表面に結合させる能力を証明するために、連結オリゴヌクレオチドを調製した。連結オリゴヌクレオチドは、既に基板表面上に吸着されているDNAと相補的な12bp末端を含む配列を有する24bp長（5'TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG） [配列番号34]であった。次いで、基板を、連結オリゴヌクレオチド（0.4OD、1.7μM）を含有するハイブリダイゼーション緩衝液（0.5M NaCl, 10mM リン酸緩衝液pH7）溶液中に12時間浸漬した。基板を取り出し、類似緩衝液でリンスした後、基板を、基板に付着している連結オリゴヌクレオチドのハイブリダイズしていない部分と相補的なオリゴヌクレオチド（TAGGACTTACGC 5'チオール [配列番号35]）で修飾されている直径13nmの金ナノ粒子を含有する溶液中に浸漬した。12時間浸漬した後、基板を取り出し、ハイブリダイゼーション緩衝液でリンスした。ガラス製基板の色は透明な無色から透明なピンク色に変わっていた。図19A参照。

10

【0263】

スライドを上記のような連結オリゴヌクレオチド溶液に浸漬し、次いで、オリゴヌクレオチド（3'チオールATGCTCAACTCT [配列番号33]）が付着している直径13nmの金ナノ粒子を含有する溶液に浸漬して、スライドに追加のナノ粒子層を加えた。12時間浸漬した後、上記のように、スライドをナノ粒子溶液から取り出し、リンスして、ハイブリダイゼーション溶液中に浸漬した。スライドの色は、はっきり分るほど赤色が濃くなっていた。図19A参照。最終ナノ粒子層としてオリゴヌクレオチド（TAGGACTTACGC 5'チオール [配列番号35]）で修飾した13nmの金ナノ粒子を用いて連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子浸漬手順を繰り返して最終ナノ粒子層を加えた。この場合も、色は濃くなり、520nmのUV-可視吸光度は増大した。図19A参照。

20

【0264】

オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子が連結オリゴヌクレオチドとのDNAハイブリダイゼーション相互作用によりオリゴヌクレオチド修飾表面に付着したことを確認するために、融解曲線を作成した。融解実験のために、スライドを、1.5mlのハイブリダイゼーション緩衝液を含有するキュベットに入れ、実施例2のパートBで用いたものと類似の装置を用いた。基板の温度を20℃から80℃まで増大させながら、1℃/1分の保持時間で、ナノ粒子に帰する吸光度シグナル（520nm）をモニターした。温度が52℃を越えたとき、ナノ粒子のシグナルは劇的に低下した。図19B参照。シグナルの一次導関数は、55℃の融解温度を示したが、これは、溶液中でハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体と連結オリゴヌクレオチドに関して見られた温度と一致する。図19B参照。

30

【0265】

実施例11：プローブとしてナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたポリリボヌクレオチドアッセイ

40

これまでの実施例は、アッセイにおける標的としてオリゴデオキシリボヌクレオチドを利用した。本実施例は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体をポリリボヌクレオチドアッセイにおけるプローブとして用い得ることを証明する。ポリ（rA）（0.004_{2.6}。単位）の溶液1μlを、5'末端のメルカプトアルキルリンカーを介してdT₂₀（チミジレート残基を含有する20merオリゴヌクレオチド）に結合している100μLの金ナノ粒子（粒子中〜10nM）に加えて、実験を行った。結合手順は、実施例3に記載のものであった。実施例4に記載のように、ドライアイス/イソプロピルアルコール浴中で凍結し、室温下に解凍し、C18 TLCプレート上にスポットした後、ハイブリダイ

50

ゼーションによるナノ粒子の凝集の特徴を示す青色スポットが観察された。標的の不在下に実施した対照実験では、青色スポットではなく、ピンク色のスポットを得た。

【0266】

実施例12：ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を用いた炭疽菌保護抗原セグメントのアッセイ

多くの場合、PCRによる二本鎖DNA標的の増幅にはアッセイに十分な材料を提供することが必要である。本実施例は、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が、DNA鎖をその相補体の存在下にアッセイする（すなわち、二本鎖標的の熱デハイブリダイゼーション後に一本鎖に関してアッセイする）ために使用し得、かつPCR反応から得られたアンプリコンを認識して、特異的に結合し得ることを証明する。

10

【0267】

炭疽菌の保護抗原セグメントの141塩基対二本鎖アンプリコンを含有するPCR溶液は海軍省(Navy)から提供された(図12に示されている配列)。このアンプリコンのアッセイは、Qiaquick Nucleotide Removal Kit(カリフォルニア州サンタ・クラリタ所在のキアゲン社(Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA))およびこのキット用の標準プロトコルを用いて、100μlのPCR溶液からDNAを単離して実施したが、但し、DNAの溶離は、キットで提供された緩衝液を用いるのではなく、pH8.5の10mMリン酸緩衝液を用いて実施した。次いで、Speed Vac(サバント社(Savant))上で溶離液を蒸発乾固した。この残留物に、2種の異なるオリゴヌクレオチドーナノ粒子プローブ(図23参照)からなる2種の各溶液を等量混合して調製した5μlのマスター混合物を添加した。各オリゴヌクレオチドーナノ粒子プローブは、実施例3に記載のように調製した。マスター混合物を形成するために合わせたプローブ溶液は、10μlの2M NaClおよび5μlのオリゴヌクレオチドブロkker溶液(0.3M NaCl、10mMリン酸、pH7.0溶液中50pmolの各ブロkkerオリゴヌクレオチド(図23および以下参照))を、5μlの全強度(約10nM)のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド溶液に加えて調製した。アンプリコンープローブ混合物を3分間で100℃に加熱し、次いで、ドライアイス/エタノール浴中で凍結し、室温に解凍した。小アリコート(2μl)をC18 TLCプレート上にスポットし、乾燥させた。ハイブリダイゼーションを示す濃い青色のスポットを得た。

20

30

【0268】

アンプリコン標的の不在下、プローブ1の不在下、プローブ2の不在下、または塩化ナトリウムの不在下に、同様な方法で対照テストを実施したが、すべて陰性、すなわち、ピンク色のスポットを得た。同様に、保護抗原セグメントの代わりに炭疽菌の致死因子セグメント由来のPCRアンプリコンを含むプローブ1および2を用いて実施したテストは陰性(ピンク色のスポット)。これらの対照により、どちらのプローブも必要不可欠であり、ハイブリダイゼーションに適した塩条件が必要であり、かつテストは特定の標的配列特異的であることが確認された。

【0269】

初期二本鎖標的の第2鎖(すなわち、標的鎖と相補的な鎖)がプローブに結合するセグメントの外側の標的核酸領域に結合するのを阻止するためにオリゴヌクレオチドブロkkerを付加した(配列に関しては図23参照)。というのは、そのような結合はナノ粒子オリゴヌクレオチドプローブと標的鎖との結合に干渉するからである。この実施例では、ブロkkerオリゴヌクレオチドは、プローブによって被覆されない領域の一本鎖標的と相補的であった。代替計画は、プローブオリゴヌクレオチドと競合する領域外のPCR相補鎖(標的鎖と相補的な鎖)と相補的なブロkkerオリゴヌクレオチドを用いるものである。

40

【0270】

実施例13：PCR溶液からアンプリコンを単離しないPCRアンプリコンの直接アッセイ

実施例12に記載の手順は、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドプローブを付加する前にPC

50

R 溶液から PCR アンプリコンを分離するステップを含むものであった。多くの目的のためには、前以てポリヌクレオチド産物を単離することなく、PCR 溶液中で直接アッセイを実施し得ることが望ましいであろう。そのようなアッセイ用のプロトコルが開発されており、それを以下に説明する。このプロトコルは、AmpliTaq DNA ポリメラーゼを含む GeneAmp PCR Reagent Kit を用い、標準条件下に誘導されたいくつかの PCR 産物を使って首尾良く実施されている。

【0271】

50 μ l の PCR 試料溶液に、2 種の金ナノ粒子-オリゴヌクレオチドプローブ（それぞれ 0.008 A₅₂₀ 単位）の混合物 5 μ l を添加し、次いで、1 μ l のブロッカーオリゴヌクレオチド（各 10 pmol）と、5 μ l の 5M NaCl と、2 μ l の 150 mM MgCl₂ を加えた。この混合物を 100 °C 下に 2 分間加熱して二本鎖標的の鎖を分離し、管を直接冷浴（例えば、ドライアイス／エタノール）に 2 分間浸漬し、次いで、管を取り出して、溶液を室温下に解凍した（凍結-解凍サイクルにより、プローブと標的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが容易になる）。最後に、数 μ l の溶液をプレート（例えば、C18 RPTLC プレート、シリカプレート、ナイロン膜など）上にスポットした。例の通り、青色は PCR 溶液中の標的核酸の存在を示し、ピンク色はこの標的に関して陰性である。

【0272】

実施例 14：ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の集合体を用いた、デハイブリダイゼーションを行わない二本鎖オリゴヌクレオチドの直接認識

これ以前の実施例では、ナノ粒子に結合している一本鎖オリゴヌクレオチドプローブと相互作用させる一本鎖を生成するために、二本鎖標的を加熱してデハイブリダイズさせた。本実施例は、三本鎖複合体を形成し得る場合、前以て標的をデハイブリダイズさせなくても、二本鎖オリゴヌクレオチド配列がナノ粒子によって認識され得ることを証明する。

【0273】

2 種の異なる系、ポリ A：ポリ U および dA₄₀：dT₄₀ を用い、100 μ l の緩衝液（0.1M NaCl、10mM リン酸、pH 7.0）中に 0.8 A₂₆₀ 単位の標的二本鎖を含有する溶液 1 μ l を、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液（pH 7.0）中の Au-sdT₂₀ ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体（粒子中～10 nM；実施例 11 参照）のコロイド溶液 100 μ l に加えて、テストを実施した。その後、管をドライアイス／イソプロピルアルコール浴中に浸漬して急速凍結し、管を浴から取り出して解凍して、室温（22 °C）下に放置し、次いで、3 μ l の溶液を C18 TLC プレート上にスポットして、ナノ粒子のハイブリダイゼーションおよび凝集の特徴を示す青色のスポットを得た。

【0274】

このテストの原理は、（この実施例ではピリミジンオリゴヌクレオチドを担持する）ナノ粒子プローブが、配列特異的に、二本鎖標的に沿ったプリンオリゴヌクレオチド／ピリミジンオリゴヌクレオチド部位で結合することである。各二本鎖体上の多くの結合部位が利用可能なので、結合によって、ナノ粒子凝集体が形成される。これらの結果は、ナノ粒子プローブを含む三本鎖複合体をベースとするこのアッセイが、オリゴリボヌクレオチド二本鎖標的にも、オリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖標的にも機能することを示している。

【0275】

実施例 15：蛍光検出と比色検出とを用いるアッセイ

すべてのハイブリダイゼーション実験は、0.3M NaCl、10mM リン酸、pH 7.0、緩衝液中で実施した。Acetate PlusTM 濾過メンブレン（0.45 μ m）は、マサチューセッツ州ウエストボロ所在のミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc., Westboro, MA）から購入した。アルキルアミン官能化ラテックスミクロスフェア（3.1 μ m）は、インディアナ州フィッシャーズ所在のバングス・ラボラトリーズ社（Bangs Laboratories

10

20

30

40

50

、Fishers, IN) から購入した。Amino-Modifier C7 CPG 固相支持体 (グレン・リサーチ社) および Expedite 8909 合成機上の 5'-フルオロセインホスホロアミダイト (6-FAM, グレン・リサーチ社) を使う標準ホスホロアミダイト化学 (Eckstein 編, Oligonucleotides and Analogues, 第 1 版, Oxford University, New York, N. Y., 1991 年) を用いて、3' 末端をアルキルアミノ基で官能化した発蛍光団標識オリゴヌクレオチドを合成し、逆相 HPLC で精製した。これらのオリゴヌクレオチドを、Charreyre ら, Langmuir, 第 13 巻, 3103-3110 ページ (1997 年) に記載のようにジチオ尿素結合を生成するジイソチオシアネートカップリングを用いて、アミン官能化ラテックスミクロスフェアに付着させた。簡単に説明すると、1000 倍過剰の 1, 4-フェニレンジチオシアネートの DMF 溶液を、アミノ修飾オリゴヌクレオチドの水性ホウ酸緩衝液 (0.1 M、pH 9.3) に加えた。数時間後、過剰な 1, 4-フェニレンジイソチオシアネートをブタノールで抽出し、水溶液を凍結乾燥した。活性化オリゴヌクレオチドをホウ酸緩衝液に再溶解させて、炭酸緩衝液 (0.1 M、pH 9.3、1 M NaCl) 中でアミノ官能化ラテックスミクロスフェアと反応させた。12 時間後、粒子を遠心分離し、緩衝塩類溶液 (0.3 M NaCl、10 mM リン酸、pH 7.0) で 3 回洗浄した。5'-オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子を実施例 3 に記載のように調製した。

10

【0276】

標的オリゴヌクレオチド (1~5 μ l、3 nM) を、3 μ l の発蛍光団で標識したオリゴヌクレオチド修飾ラテックスミクロスフェアプローブ溶液 (3.1 μ m; 100 fM) に添加した。5 分後、3 μ l の 5'-オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子プローブ溶液 (13 nm; 8 nM) を、標的およびラテックスミクロスフェアプローブを含有する溶液に加えた。さらに 10 分間放置した後、プローブと標的とを含有する溶液を Acetate Plus メンブレンに通じて真空濾過した。メンブレンは、比較的大きいラテックス粒子を保持し、ハイブリダイズしなかった金ナノ粒子プローブはすべて通過させた。十分な濃度の標的と、標的にハイブリダイズしたラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子との存在下、メンブレン上に赤色スポットが観察された (陽性結果)。標的オリゴヌクレオチドを含有する溶液のアリコート等を等量の水に代えた対照実験を常に行った。この場合、メンブレン上には白色スポットが残された (陰性結果)。24 塩基対モデル系の場合、比色計で 3 fmol の標的オリゴヌクレオチドを肉眼検出できた。

20

30

【0277】

二本鎖標的オリゴヌクレオチド (1~5 μ l、20 nM)、3 μ l の発蛍光団標識オリゴヌクレオチド-ラテックスミクロスフェア (3.1 μ m; 100 fM) および 3 μ l の 5'-オリゴヌクレオチド-金ナノ粒子 (13 nm; 8 nM) を合わせ、3 分間で 100 °C に加熱した。次いで、直ぐに溶液を含有する反応容器を液体 N₂ 浴に 3 分間に浸漬して凍結した。次いで、この溶液を室温下に解凍し、上記のように濾過した。24 塩基対のモデル系に関して、比色計で、20 fmol の二本鎖オリゴヌクレオチドが肉眼検出できた。

【0278】

蛍光によってモニターする場合、上記検出法はメンブレンからのバックグラウンド蛍光のために困難であることが証明された。この問題は、アリコート逆相 TLC プレート上にスポットする前に過剰な金ナノ粒子プローブを除去するためにラテックスミクロスフェアを遠心して「洗浄」することによって克服された。ハイブリダイゼーション実験を上述のように実施した。プローブと標的とのハイブリダイゼーションを実施した後、溶液に 10 μ l の緩衝液を添加し、次いで、10,000 $\times$ g で 2 分間遠心した。上清を除去し、沈殿物の再懸濁を支援するために 5 μ l の緩衝液を添加した。次いで、3 μ l アリコートを逆相 TLC プレート上にスポットした。一本鎖オリゴヌクレオチドと二本鎖標的オリゴヌクレオチドのどちらに関しても、比色計により 25 fmol が肉眼検出できた。スポットの形成に用いた 3 μ l アリコート中の標的の量が 50 fmol の低さになるまで、ハンドヘルド UV ランプを用いて肉眼で蛍光スポットを視ることができた。この系を最適化する

40

50

ことにより、もっと低量の標的核酸の検出も可能になるであろう。

【0279】

実施例16： 銀染色法を用いたアッセイ

溶液中の特定のDNA配列の存在を検出するためには、一般に、オリゴヌクレオチド修飾基板上のDNAハイブリダイゼーションテストが用いられる。遺伝子情報を精査するための組合せDNA配列の有望性が増してきていることは、未来の科学に対するこれらの異種配列アッセイの重要性を物語っている。ほとんどのアッセイにおいて、発蛍光団標識標的と表面結合プローブとのハイブリダイゼーションは、蛍光顕微鏡検査またはデンシトメーター検査によりモニターされている。蛍光検出は極めて感度が良いが、その使用は、実験装置費用とほとんどの慣用基板からのバックグラウンド放射とにより制限される。さらに、1単塩基誤対合を有するものに比べ完全相補性プローブに対する標識オリゴヌクレオチド標的への選択性の方が低いために、一ヌクレオチド多形を検出するための表面ハイブリダイゼーションテストが使用できない。蛍光法の簡易性、感度および選択性が改良された検出計画によって、組合せ配列の全ての可能性を具現化することができる。本発明はそのような改良型検出計画を提供する。

【0280】

例えば、3成分サンドイッチアッセイにおいて、オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子と非修飾DNA標的を、ガラス基板に付着しているオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせることができた（図25A-B参照）。ナノ粒子は、個別のもの（図25A参照）であっても、複数のナノ粒子の「ツリー」（tree）（図25B参照）であってもよい。「ツリー」は、個別のナノ粒子に比べてシグナル感度を増大させ、ハイブリダイズした金ナノ粒子の「ツリー」は、ガラス基板上の暗色領域として肉眼で観察できることが多い。「ツリー」を用いない場合、または「ツリー」によって生成されたシグナルを増幅させるためには、ハイブリダイズした金ナノ粒子を銀染色溶液で処理し得る。「ツリー」は、染色プロセスを促進し、個別ナノ粒子に比べて標的核酸の検出をより高速にする。

【0281】

以下は、（図25Aに例示されている）1つの特定の系の説明である。捕獲オリゴヌクレオチド（3'-HS(CH₂)₃-A₁₀ATGCTCAACTCT；配列番号43）を、実施例10に記載のように、ガラス基板上に固定した。標的オリゴヌクレオチド（5'-TACGAGTTGAGAAATCCTGAAATGCG-3'、配列番号44、各実験用に以下の表6に示されている濃度）と捕獲オリゴヌクレオチドとを、実施例10に記載のように、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液中でハイブリダイズさせた。基板を同一緩衝液で2回リンスし、標的相補性DNA（5'-HS(CH₂)₆A₁₀CGCAATTCAGGAT、配列番号45）（実施例3に記載の配合物）で官能化した金ナノ粒子プローブを含有する溶液中に12時間浸漬した。次いで、基板を0.3M NaNO₃で何回もリンスしてCl⁻を除去した。次いで、基板を銀染色溶液（Silver Enhancer Solution AとBの1:1混合物、シグマ・ケミカル社、#S-5020および#S-5145）で3分間現像した。グレースケール測定値を計算し得るソフトウェア（例えば、Adobe Photoshop）をロードしたコンピュータに連結した（通常、文書をコンピュータにスキャンするのに用いられる）平台型スキャナで基板をスキャンしてグレースケール測定を行った。結果を以下の表6に示す。

【表6】

表 6

標的DNA濃度	平均グレースケール	標準偏差
10 nM	47.27	2.10
5 nM	53.45	0.94
2 nM	54.56	1.17
1 nM	59.98	1.82
500 pM	61.61	2.26
200 pM	90.06	3.71
100 pM	99.04	2.84
50 pM	135.20	7.49
20 pM	155.39	3.66
無し (対照)	168.16	10.03

10

【0282】

実施例 17: 量子ドットを含む集合体

この実施例は、半導体ナノ粒子量子ドット (QD) 上の合成一本鎖 DNA の固定化を説明する。天然 CdSe/ZnS コア/シェル QD (～4 nm) は有機媒質にのみ可溶であるために、アルキルチオールを末端基とする一本鎖 DNA と直接反応しにくい。この問題は、まず、QD に 3-メルカプトプロピオン酸でキャップ形成することにより回避された。次いで、カルボン酸基を 4-(ジメチルアミノ)ピリジンで脱保護して、粒子を水溶性とし、QD と、3'-プロピルチオールまたは 5'-ヘキシルチオール修飾オリゴヌクレオチド配列とを反応し易くした。DNA 修飾後、透析により、反応しなかった DNA から粒子を分離した。次いで、「リンカー」DNA 鎖を表面結合配列とハイブリダイズさせて、長いナノ粒子集合体を生成した。TEM、UV/可視分光法および蛍光顕微鏡検査により特性決定した QD 集合体は、溶液温度を制御することにより可逆的に集合させ得る。新規 QD 集合体および QD と金ナノ粒子 (～13 nm) 間に形成された複合凝集体の温度依存性 UV-可視スペクトルを得た。

20

【0283】

A. 一般法

NANO pure 超純水精製系を用いて調製したナノピュア水 (18.1 MΩ) を一貫して用いた。Perkin Elmer LS 50B 蛍光分光計を用いて蛍光スペクトルを得た。Hp 9090a Peltier Temperature Controller を具備した HP 8453 ダイオードアレイ分光光度計を用いて融解分析を実施した。Eppendorf 5415 遠心機または Beckman Avanti 30 遠心機を用いて遠心を行った。200 kV で操作する日立 HF-2000 電界放出 TEM を用いて TEM 画像を得た。

30

【0284】

B. オリゴヌクレオチド-QD 共役体の調製

半導体量子ドット (QD) の合成法は最近の数年間に大きく改良されており、ある種の材料、最も注目すべきことには CdSe に関して、今や予備決定サイズの単分散試料を比較的容易に調製し得る。Murray ら, J. Am. Chem. Soc., 第 115 巻, 8706 ページ, 1993 年; Hines ら, J. Phys. Chem., 第 100 巻, 468 ページ, 1996 年。その結果、QD を発光ダイオード (Schlamp ら, J. Appl. Phys., 第 82 巻, 5837 ページ, 1997 年; Dabbousi ら, Appl. Phys. Lett., 第 66 巻, 1316 ページ, 1995 年) および非放射性生物学的標識 (Bruchez ら, Science, 第 281 巻, 2013 ページ, 1998 年; Chan ら, Science, 第 281 巻, 2016 ページ, 1998 年) などの多様なテクノロジーに用いるための道を開く可能性があるこれらの粒子の固有の電子特性および蛍光特性が広範囲に研究されている (Alivisatos, J., Phys

40

50

. Chem., 第100巻, 13226ページ, 1996年、およびその中の参考文献; Kleinら, Nature, 699, 1997年; Kunoら, J. Chem. Phys., 第106巻, 9869ページ, 1997年; Nirmalら, Nature, 第383巻, 802ページ, 1996年参照)。しかし、多くの用途では、これらの粒子は表面上に空間的に配列されるか、または三次元物質中に組織化されることが要求されるであろう (Vossmeierら, J. Appl. Phys., 第84巻, 3664ページ, 1998年)。さらに、1種以上のナノ粒子を超格子構造 (Murrayら, Science, 第270巻, 1335ページ, 1995年) 中に組織化する能力があれば、新規かつ潜在的に興味深く有用な特性を有する完全に新しい種類のハイブリッド材料の構築が可能になるであろう。

10

【0285】

DNAは、ナノスケールの構築ブロック集合体を周期的な二次元および三次元拡張構造中にプログラムするための理想的なシントンである。合成し易さ、非常に高い結合特異性およびヌクレオチド配列による実質的に無制限のプログラム可能性を含むDNAの多くの特性をQD集合体の使用に利用し得る。

【0286】

DNAによるQDの修飾は、金ナノ粒子の場合よりも困難であることが証明された。高い蛍光CdSe QDを調製するための一般法によって、トリオクチルホスフィンオキシド (TOPO) とトリオクチルホスフィン (TOP) の混合物でコートされた材料が得られる。その結果、これらのQDは、非極性溶媒にのみ可溶になり、そのため、QDを高荷電DNA鎖で直接反応により官能化するのは難しい。この難点は、初めて半導体ナノ粒子を一本鎖DNAで修飾することに成功した以下に記載の方法により克服された。他の人々は、精密な研究において、QDと二本鎖DNAとの相互作用を考えていたが、これらの研究は、拡張QD構造の集合体を誘導するDNAの配列特異的結合特性を利用しなかったことに留意されたい。Cofferrら, Appl. Phys. Lett., 第69巻, 3851ページ, 1996年; Mahatabら, J. Am. Chem. Soc., 第148巻, 7028ページ, 1996年。

20

【0287】

CdSe/ZnSコア/シェルQDの表面は有機チオールと結合するので、これらの半導体粒子を、置換反応により、アルキルチオールを末端基とするDNA鎖で修飾することが望ましかった。しかし、これらのQDは水溶性ではないので、そのような方法は妨げられた。最近、QDを水溶性にして、QD表面上にタンパク質構造を固定化させるための2種の異なる方法が報告された。一方は、シリカ層でコア/シェル構造を封入するステップを含み (Bruchezら, Science, 第281巻, 2013ページ, 1998年)、他方は、粒子を安定させ、かつ水溶性とするためにメルカプト酢酸を利用する (Chanら, Science, 第281巻, 2016ページ, 1998年)。DNAハイブリダイゼーション条件下に著しく安定したコロイドを生成する、この実施例に記載されている手順は、QD表面を不動態化するために3-メルカプトプロピオン酸を利用する。

30

【0288】

1. 0mlのN, N-ジメチルホルムアミド (DMF; オールドリッチ社) 中の (Hinesら, J. Phys. Chem., 第100巻, 468ページ, 1996年に記載のように調製した) ~20mgのTOP/TOP安定化CdSe/ZnS QDの懸濁液に、シリンジを用いて、過剰な3-メルカプトプロピオン酸 (0.10ml、1.15mmol; オールドリッチ社) を添加して、3-メルカプトプロピオン酸官能化QDを含有する透明な黒みがかったオレンジ色の溶液を生成した。反応は急速に起こった。後続反応のために、過剰な3-メルカプトプロピオン酸を除去せず、粒子を室温下にDMF中に保存した。

40

【0289】

しかし、QDの特性決定のために、試料の一部から反応しなかった3-メルカプトプロピオン酸を以下のように除去して精製した。0.50ml試料を (30,000rpmで4

50

時間)遠心し、上清を除去した。残りの溶液を $\sim 0.3 \text{ ml}$ のDMFで洗浄し、再遠心した。このステップをさらに2回繰り返してから、FTIRスペクトルを記録した。FTIR (ポリエチレンカード、3M社): 1710 cm^{-1} (s)、 1472 cm^{-1} (m)、 1278 cm^{-1} (w)、 1189 cm^{-1} (m)、 1045 cm^{-1} (w)、 993 cm^{-1} (m)、 946 cm^{-1} (w)、 776 cm^{-1} (m)、 671 cm^{-1} (m)。TOP/TOP安定化天然QDとは異なり、3-メルカプトプロピオン酸修飾QDは、表面結合プロピオン酸に特徴的な 1710 cm^{-1} の $\nu_{\text{C=O}}$ バンドを示した。

【0290】

3-メルカプトプロピオン酸修飾QDは水に実質的に不溶であるが、それらの溶解度は、以下のパラグラフに記載のように、表面結合メルカプトプロピオン酸部位を4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP; オールドリッチ社)で脱保護して有意に高めることができた。そうすると、QDは水に容易に分散し、オレンジ色の溶液となり、この溶液は室温下に1週間まで安定であった。

10

【0291】

オリゴヌクレオチドをQDに付着させるために、DMF中の3-メルカプトプロピオン酸官能化粒子溶液 $150 \mu\text{l}$ (530 nm での光学密度 $=21.4$)を、 0.4 ml のDMF中のDMAP (8.0 mg 、 0.065 mmol)の溶液に添加した。オレンジ色の沈殿物が形成された。これを、遠心 ($3,000 \text{ rpm}$ で ~ 30 秒)により分離し、次いで、3'-プロピルチオールまたは5'-ヘキシルチオールを末端基とするオリゴヌクレオチド ($1.0 \sim 2.0 \text{ OD/ml}$; 実施例1に記載のように調製; 配列は以下に記載)の溶液 1.0 ml に溶解させた。(水に溶解した)沈殿物をIRスペクトロスコピー (ポリエチレンカード、3M社)によって特性決定した。IR (cm^{-1}): 1647 (m)、 1559 (s)、 1462 (m)、 1214 (w)、 719 (w)、 478 (s)。12時間放置した後、オリゴヌクレオチド含有溶液を 0.15 M NaCl に加え、粒子をさらに12時間熟成させた。次いで、NaClの濃度を 0.3 M に高め、混合物をさらに24~40時間放置してから、 100 kDa メンブレン (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane)を用いてPBS (0.3 M NaCl 、 10 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7$ 、 0.01% アジ化ナトリウム)で透析した。透析は48時間にわたって実施し、その間に、透析浴を3回新しくした。

20

【0292】

このようにして調製したオリゴヌクレオチド-QD共役体は、不定な水安定性を示した。さらに、コロイドは、($\sim 3.2 \text{ nm CdSe}$ コアを示す; Murrayら, J. Am. Chem. Soc., 第115巻, 8706ページ, 1993年) 546 nm での急激な[半値全幅 (FWHM) $= 33 \text{ nm}$]対称発光を有し、強力に蛍光性のままであった。

30

【0293】

このプロトコルにより、2種の異なるオリゴヌクレオチド-QD共役体を調製し、PBS中に保存した。一方は、3'末端のプロピルチオール官能基と、 12 mer 捕獲配列と、介在10塩基 (すべてA) スペース: $5' \text{---TCTCAACTCGTAA}_{10} \text{---(CH}_2\text{)}_3 \text{---SH}$ [配列番号46]とからなる 22 mer で修飾した。他方は、5'-ヘキシルチオールを末端基とする配列と、さらに10塩基 (すべてA) スペース、および3'-プロピルチオール配列とは非相補的な 12 mer 捕獲配列: $5' \text{---SH---(CH}_2\text{)}_6 \text{---A}_{10} \text{CGCATTCAGGAT---3'}$ [配列番号47]を用いた。

40

【0294】

C. QD集合体の調製

ほぼ等量のこれら2種のオリゴヌクレオチド (それぞれ、 $200 \mu\text{l}$ 、 $\text{OD}_{530} = 0.224$ および 0.206)を混合し、次いで、相補的な連結 24 mer 配列 ($5' \text{---TCGAGTTTGAGAAATCCT---GAAATGCG---3'}$ 、配列番号48)の溶液 $6 \mu\text{l}$ (60 pmol)と合わせて、室温下に20~30分以内でQD集合体を形成した (図26)。混合物を凍結 (-78°C)し、ゆっくり室温まで温めると、連結が速く起こった。

【0295】

50

生成したクラスターは、溶液から沈殿するほど大きくはなかった。しかし、クラスターは、連結しなかった粒子（30,000 rpmで2～3時間）と比べて、比較的低速で遠心（10,000 rpmで10分間）することにより分離することができた。

【0296】

ハイブリダイゼーション直後の蛍光の減少を、4対の試料の475 nmから625 nmまでの蛍光シグナル（励起波長320 nm）の積分により定量した。各対は以下の方法で調製した。Eppendorf遠心管中で、3'プロピルチオールを末端基とするDNAで修飾した粒子（30 μ l、530 nmでの光学密度=0.224）の溶液を、5'ヘキシルチオールを末端基とするDNAで修飾したQD（30 μ l、530 nmでの光学密度=0.206）と合わせ、次いで140 μ lのPBSで希釈した。次いで、混合物を2つの等量部分に分け、一方には相補的「リンカー」DNA（3 μ l、30 pmol）を、他方には、非相補的「リンカー」DNA（5'-CTACTTAGATCCGAGTGCCCACT-3'、配列番号49）（3 μ l、30 pmol）を加えた。次いで、全8種の試料をドライアイス／アセトン浴（-78℃）中で凍結し、その後、試料を浴から取り出し、ゆっくり室温まで温めた。ハイブリダイゼーション時の蛍光効率の変化を予測するために、「標的」（相補的「リンカー」）試料の蛍光強度を、非相補的「リンカー」を含む対照試料由来の320 nmでの吸光度における差を明らかにするように調整した。

10

【0297】

結果は、QD/QD集合体が、平均して26.4 $\pm$ 6.1%の積分蛍光強度の減少と、QD間の協同事象によると考えられる発光最大の～2 nmのレッドシフトを伴うことを示した。興味深いことには、Bawendiらは、密集QDと凍結マトリックス中で広く分離している隔離ドットの蛍光を比較したときに、類似ではあるが、わずかに大きなレッドシフトに気づいていた（Murrayら, Science, 第270巻, 1335ページ, 1995年）。蛍光スペクトルにおけるこれらの変化は、QD間にエキシマが形成されたことを示しているのかもしれないが、そのような複合体の正確な性質は、大部分まだ類推の域を出ないものである。予測したように、「リンカー」が無い場合、もしくは相補的でない場合、または2種の粒子のどちらかが不在の場合に、凝集は観察されなかった。

20

【0298】

温度の関数として凝集体のUV-可視スペクトルを観察して、DNAの「融解」挙動をモニターした。この「融解」分析のために、QD/QD集合体を含む沈殿物を10,000 rpmで10分間遠心し、7 μ lのPBSで洗浄、再遠心して、0.7 mlのPBSに懸濁させた。温度を25℃から75℃まで上昇させながら、各測定の前に1分間の保持時間をとって、集合体のUV/可視分光シグナチャーを2℃間隔で記録した。実験を通じて均一性を確実にするために、混合物を500 rpmの速度で攪拌した。次いで、600 nmでの消光から温度対消光プロファイルを作製した。これらのプロファイルの一次導関数を用いて「融解」温度を決定した。

30

【0299】

結果、図27B（ T_m = 57℃）は、DNAがQD表面上に固定化され、ハイブリダイゼーションが集合体プロセスに関与することを明確に証明した。DNAだけと比較したときの偏移は極めて急激（それぞれの一次導関数のFWHM：4℃対9℃）であり、これは、1粒子当たり多重DNA結合を有する凝集体構造の形成と一致する。変性により消光の増大が観察されたが、これは、集合体内の粒子がその周囲のQDによる光の吸収から防止されるスクリーニング効果のためである可能性が高い。

40

【0300】

D. QD/金集合体の調製

DNA官能化QDが得られたので、多重種類のナノ粒子構築ブロックから作製したハイブリッド集合体の構成が実現可能になった。これらのハイブリッド集合体を作製するために、Eppendorf遠心管中で、～17 nMの3'-ヘキシルチオールで修飾した13 nmの金ナノ粒子（30 μ l、～5 fmol；実施例3に記載のように調製）の溶液を、

50

5'-ヘキシルチオールを末端基とするDNA修飾QD (15 μ l、530 nmでの光学密度は0.206)と混合した。「リンカー」DNA (5 μ l、50 pmol)を加え、混合物を-78℃に冷却し、次いで、ゆっくり室温まで温めると、赤みを帯びた紫色の沈殿物が生成した。両種類の粒子と相補的標的の不在下には、凝集挙動は観察されなかった。遠心 (3,000 rpmで1分間)し、上清を除去した後、沈殿物を100 μ lのPBSで洗浄し、再遠心した。

【0301】

「融解」分析のために、洗浄した沈殿物を0.7 mlのPBSに懸濁した。UV-可視分光法を用いて、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴の変化を追跡して、525 nmでの温度対消光プロファイルを作製した。金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴を用いると、ハイブリダイゼーションをモニターするために、QDだけのUV-可視分光シグナチャーを用いるよりも、はるかに高感度のプローブが得られる。したがって、「融解」実験は、はるかに小さい試料 (QD溶液の~10%が必要) に関して実施し得るが、プラズモンバンドの強さによって、QD由来のUV/可視シグナルが不鮮明になる。上記の純粋QD系と同様に、急激な (一次導関数のFWHM=4.5℃) 融解転移は、58℃で起こった (図27D参照)。

10

【0302】

これらの集合体の高解像度TEM画像は、多重QDにより相互連絡された金ナノ粒子網目構造を示した (図27C)。TEM画像では金ナノ粒子よりはるかにコントラストが弱いQDは、それらの格子干渉縞によって識別し得る。QDは、高解像度TEMでかろうじて解像できるが、これらの複合体集合体の周期的構造やそれらの形成にDNAが果たす役割を明瞭に示している。

20

【0303】

E. 要約

この実施例に記載されている結果は、QD表面へのDNAの固定化が達成され、かつ今やこれらの粒子をハイブリダイゼーション条件下にDNAと組合せて使用し得ることを最も確実に立証している。DNA官能化QDを用いて、最初のDNA誘導QD形成および混合金/QDナノ粒子構造が実証された。半導体QDをDNAで首尾良く修飾することは、材料研究にとって重要な意味を有しており、これらの固有の構築ブロックは新規かつ機能的な多成分ナノ構造およびナノスケール材料に組み込まれるので、今や、これらのブロックの蛍光、電子、および化学特性の広範囲な研究への扉が開かれている。

30

【0304】

実施例18: オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の合成法およびそれらの方法により生成された共役体

A. 一般法

HAuCl₄ · 3H₂Oおよびクエン酸三ナトリウムは、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在のオールドリッチ・ケミカル社 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) から購入した。純度99.999%の金ワイヤ、およびチタンワイヤは、イリノイ州エバンストン所在のゴールドスミス社 (Goldsmith Inc., Evanston, IL) から購入した。厚さ1ミクロンの酸化物層を有するシリコンウェーハ (100) は、カリフォルニア州サンタクララ所在のシリコン・クエスト・インターナショナル社 (Silicon Quest International, Santa Clara, CA) から購入した。5'-チオール修飾剤C6-ホスホロアミダイト試薬、3'-プロピルチオール修飾剤CPG、フルオレセインホスホロアミダイト、およびオリゴヌクレオチド合成に必要な他の試薬は、ヴァージニア州スターリング所在のグレン・リサーチ社から購入した。すべてのオリゴヌクレオチドは、標準ホスホロアミダイト化学 (Eckstein, F., Oligonucleotides and Analogues; 第1版; Oxford University Press, New York, 1991年) を用いるDNA自動合成機 (エキスペダイト社 (Expeditite)) を使って調製した。5'-ヘキシルチオール修飾体のみを含むオリゴヌク

40

50

レオチドを実施例1に記載のように調製した。5-（および6-）-カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステルは、オレゴン州ユージーン所在のモレキュラー・プローブ社（Molecular Probes, Eugene, OR）から購入した。NAP-5カラム（Sephadex G-25 Medium、DNAグレード）は、ファルマシア・バイオテック社（Pharmacia Biotech）から購入した。すべての実験に、Barnstead NANOpure超純水系を用いて精製したナノピュアH₂O（>18.0 MΩ）を用いた。Auナノ粒子溶液の遠心には、Eppendorf 5415CまたはBeckman Avanti 30遠心機を用いた。高速液体クロマトグラフィーは、HPシリーズ1100 HPLCを用いて実施した。

【0305】

10

B. 物理測定

オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子溶液の電子吸収スペクトルは、Hewlett-Packard（HP）8452aダイオードアレイ分光光度計を用いて記録した。蛍光分光法は、Perkin-Elmer LS50蛍光光度計を用いて実施した。透過型電子顕微鏡検査（TEM）は、200 kVで操作する日立8100透過型電子顕微鏡で実施した。ナノ粒子溶液中の金の原子濃度の定量には、誘導結合プラズマ（ICP）源を備えたAtomScan 25原子分光計を用いた（金の発光は242.795 nmでモニターした）。

【0306】

C. 蛍光標識したアルカンチオール修飾オリゴヌクレオチドの合成および精製 5'ヘキシルチオール部分および3'フルオレセイン部分を用いて、12塩基を含むチオール修飾オリゴヌクレオチド鎖を調製した。12mer（S12F）の配列は、HS（CH₂）₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-3'-(CH₂)₆-F [配列番号50]であり、32mer（SA₂₀12F）は同じ12mer配列とさらなる20dAスパーサー配列を5'端に有していた [配列番号51]。チオール修飾オリゴヌクレオチドは、Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻: 1959-1964ページ（1998年）に記載のように調製した。自動合成にはアミノ修飾剤C7 CPG固相支持体を用い、5'末端は、先に記載のように、ヘキシルチオールホスホロアミダイトで手で修飾した。3'アミノ、5'トリチルで保護したチオール修飾オリゴヌクレオチドを、254 nmでDNAのUVシグナルをモニターしながら、0.03 M トリエチルアンモニウムアセテート（TEAA）、pH7および1% / 分勾配の95% CH₃CN / 5% 0.03 M TEAAを含むHP ODS HyperSilカラム（5 mm、250 × 4 mm）を用いて、1 ml / 分の流速で逆相HPLCにより精製した。5'-S-トリチル、3'アミノ修飾12塩基および32塩基オリゴヌクレオチドの保持時間はそれぞれ36分、32分であった。

20

30

【0307】

凍結乾燥産物を1 mlの0.1 M Na₂CO₃に再分散させ、調製業者の指示（モレキュラー・プローブ社の文献）に従って、暗所で攪拌しながら、無水DMF中10 mg / mlのフルオレセインスクシンイミジルエステル（5, 6 FAM-SE、モレキュラー・プローブ社）100 μlを1.5時間かけて加えた。溶液を室温下にさらに15時間攪拌し、次いで、-20 °C下に100%エタノールから沈殿させた。沈殿物を遠心して回収し、H₂Oに溶解させ、イオン交換HPLCにより、結合産物を反応しなかったアミノを末端基とするオリゴヌクレオチドから分離した。10 mM NaOH水性溶離液および1% / 分勾配の1 M NaCl / 10 mM NaOHを用いて、0.8 ml / 分の流速で、Dionex Nucleopac PA-100カラム（250 × 4 mm）を操作した。5'-S-トリチル、3'フルオレセイン修飾12merおよび32merの保持時間はそれぞれ50分、49分であった。オリゴヌクレオチド産物を逆相HPLCで脱塩した。フルオレセインを末端基とするトリチルオリゴヌクレオチドのトリチル保護基の除去は、先に記載のように、（Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959-1964（1998年））、硝酸銀およびジチオトレイトール（DTT）を

40

50

用いて行った。オリゴヌクレオチドの収率および純度は、アルキルチオールオリゴヌクレオチドに関して先に記載した技術 (Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻: 1959-1964ページ (1998年)) を用いて評価した。オリゴヌクレオチドは、チオール基のトリチル除去処理直後に使用した。

【0308】

3' がプロピルチオールで5' フルオレセイン部分 ($\text{HS}(\text{CH}_2)_3-3'-(\text{W})_{20}-\text{TAG}-\text{GAC}-\text{T TA}-\text{CGC}-5'-(\text{CH}_2)_6-\text{F}$ 、 $\text{W}=\text{A}$ または T) である32塩基を含むチオール修飾オリゴヌクレオチド [配列番号52] を、3' チオール修飾剤CPGを使用して自動合成装置で合成した。各オリゴヌクレオチドの5' 末端を、手作業で、フルオレセインホスホロアミダイト (6-FAM (6-FAM、Glen Research) につないた。修飾オリゴヌクレオチドを、イオン交換HPLCで精製した (1M NaClの1%/分勾配、10mM NaOH; 保持時間 (Rt) ~48分 ($\text{W}=\text{T}$)、Rt~29分 ($\text{W}=\text{A}$))。精製後、オリゴヌクレオチド溶液を逆相HPLCで脱塩した。3' チオール部分を、以前に記述された方法 (Storhoffら, J. Am. Chem. Soc. 120: 1959-1964 (1998)) により、ジチオスレイトールで脱保護した。

【0309】

D. フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドの合成および精製

発蛍光団標識相補体 (12' F) は、S12FおよびSA₂₀12Fの12mer配列と相補的な12塩基3'-GCG-TAA-GTC-CTA-5'-(CH_2)₆-F [配列番号53] から構成した。標準法を用いてオリゴヌクレオチドを合成し、5' アルキルチオール修飾に関して上述した手順に類似のシリンジベース手順を用いて、フルオレセインホスホロアミダイト (6-FAM、グレン・リサーチ社) とCPG連結オリゴヌクレオチドの5' 末端とをカップリングした。上記のような逆相HPLCを用いて精製を実施した。フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドの保持時間は18分であった。自動合成機用のアミノ修飾剤C7 CPG固相支持体を用いて発蛍光団標識相補体、3' 12F (5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F; [配列番号54]) を調製し、次いで、上記手順を用いて、5-(6)-カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルを3' アミンにカップリングした。

【0310】

E. 金ナノ粒子の調製および特性決定

金ナノ粒子は、実施例1に記載のように、 HAuCl_4 をクエン酸塩で還元して調製した。得られたナノ粒子のサイズ分布の定量には、日立8100TEMを用いて実施する透過型電子顕微鏡検査 (TEM) を用いた。グラフィックソフトウェア (ImageTool) を用いてTEMネガから少なくとも250粒子を分粒した。典型的な粒子配合物の平均直径は $15.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ であった。球状ナノ粒子と密度がバルク金の密度 (19.30 g/cm^3) と等しいと仮定して、粒子当たりの平均分子量を計算した ($2.4 \times 10^7 \text{ g/mol}$)。金ナノ粒子溶液中の金原子の濃度を、ICP-AES (誘導結合プラズマ原子発光分光法) によって決定した。校正には、金原子吸着標準溶液 (オールドリッチ社) を用いた。粒子溶液中の金原子濃度とTEM分析によって得た平均粒子質量とを比較して、所与の配合物中の金粒子のモル濃度、典型的には $\sim 10 \text{ nM}$ を得た。表面プラズモン周波数 (520 nm) でのナノ粒子溶液のUV-可視吸光度を測定して、粒子のモル消光係数 (520 nm での ϵ) を計算すると、典型的には、直径 $15.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ の粒子では $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。

【0311】

F. 金薄膜の調製

シリコンウェーハを $\sim 10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 部片に切断し、 50°C 下にピラニア腐蝕溶液 (4:1の濃 H_2SO_4 :30% H_2O_2) で30分清浄し、次いで、多量の水、次いでエタノールでリンスした。(警告: ピラニア腐蝕溶液は有機物質と激しく反応するので、取り扱いには厳重な注意が必要である。) Edwards FTM6石英結晶微量天秤を具備

した Edwards Auto 306 エバポレータ (3×10^{-7} ミリバールの基準圧力) を用いて 0.2 nm/秒 の速度で金属を蒸着させた。シリコンの酸化された側面を、 5 nm の Ti 接着層、次いで 200 nm の金でコートした。

【0312】

G. 5' アルキルチオールオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

新たに脱保護したオリゴヌクレオチドをナノ粒子水溶液 (粒子濃度 $\sim 10 \text{ nM}$) に $3 \mu\text{M}$ の最終オリゴヌクレオチド濃度まで加えて、金ナノ粒子をフルオレセイン-アルキルチオールオリゴヌクレオチドで修飾した。24 時間後、溶液を $\text{pH} 7$ (0.01 M リン酸) で緩衝し、 NaCl 溶液を (0.1 M の最終濃度まで) 加えた。これらの条件下にさらに 40 時間、溶液を「熟成」させた。次いで、 $14,000 \text{ rpm}$ で 30 分間遠心して、過剰な試薬を除去した。上清を除去した後、赤色の油性沈殿物を、 0.3 M NaCl 、 10 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7$ (PBS) で 2 回洗浄し、連続遠心して、再分散させ、最後に新鮮な緩衝液中に再分散させた。洗浄手順中、常に、少量 (UV-可視分光法により測定して $\sim 10\%$) のナノ粒子が上清と共に廃棄される。したがって、最終ナノ粒子濃度を、TEM、ICP-AES、および UV-可視分光法 (上記参照) で測定した。消光係数および粒度分布は、オリゴヌクレオチド修飾の結果として有意には変化しなかった。

10

【0313】

H. 5' アルキルチオールオリゴヌクレオチド修飾金薄膜の調製

シリコン支持金薄膜を、金ナノ粒子の場合と同じ回数および同じ緩衝条件下に、脱保護したアルキルチオール修飾オリゴヌクレオチドの蒸着溶液中に浸漬した。オリゴヌクレオチド蒸着の後、膜を 0.3 M PBS でよくリンスし、緩衝液中に保存した。不動態化されていないケイ素/酸化ケイ素面を残して、片面の金のみを蒸発させた。しかし、アルキルチオール修飾 DNA は、PBS に浸漬した何も結合していない酸化ケイ素表面には有意に吸着しなかった。

20

【0314】

I. ナノ粒子上に充填したアルキルチオールオリゴヌクレオチドの定量

オリゴヌクレオチドを置換するために、 0.3 M PBS 中の発蛍光団標識オリゴヌクレオチドで修飾したナノ粒子または薄膜に、メルカプトエタノール (ME) を (12 mM の最終濃度まで) 添加した。間欠的に振とうしながら、室温下に 18 時間後、金ナノ粒子を遠心するか、または金薄膜を除去して、置換オリゴヌクレオチドを含有する溶液を金から分離した。 0.3 M PBS、 $\text{pH} 7$ を添加して、上清のアリコートをして 2 倍希釈した。試料および校正標準溶液の pH とイオン強度を、これらの条件に対するフルオレセインの光学的性質の感度によるすべての測定値に関して、同じに維持するように注意した (Zhao ら, Spectrochimica Acta, 45A:1113-1116 ページ (1989 年))。 (520 nm で測定した) 最大蛍光を、標準線形校正曲線からの補間によりフルオレセイン-アルキルチオール修飾オリゴヌクレオチドのモル濃度に変換した。標準曲線は、同一の緩衝液および塩濃度を用いて発蛍光団標識オリゴヌクレオチドの既知濃度を用いて作製した。最後に、測定したオリゴヌクレオチドのモル濃度を元の金ナノ粒子濃度で割って、粒子当たりの平均オリゴヌクレオチド数を得た。次いで、ナノ粒子溶液中の (球状粒子を想定して) 予測した粒子表面積で割って、正規表面被覆面積値を計算した。真円度の仮定条件は、計算した 0.93 の平均真円度に基づく。真円度因数は、Baxes, Gregory, Digital Image Processing, 157 ページ (1994 年) から引用した ($4 \times \pi \times \text{面積}$) ($\text{周長} \times 2$) として計算する。

30

40

【0315】

J. ハイブリダイズされた標的表面密度の定量

付着したオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション活性を測定するために、蛍光発色団で標識したオリゴヌクレオチド (表面結合オリゴヌクレオチド ($12' \text{ F}$) に相補的) を、ハイブリダイゼーション条件 ($3 \mu\text{M}$ 相補的オリゴヌクレオチド、 0.3 M PBS、 $\text{pH} 7$ 、24 時間) 下で、オリゴヌクレオチド修飾表面 (金のナノ粒子または薄膜) と反応させた。ハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドは、上述したように緩衝塩

50

溶液で2度リンスすることにより金から取り外した。その後、蛍光発色団で標識したオリゴヌクレオチドを、NaOHの添加（最終濃度～50mM、pH11～12、4時間）により、デハイブリダイズした。遠心によってナノ粒子溶液から12'F含有溶液を分離した後、1M HClの追加によって溶液を中和し、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの濃度とそれに対応するハイブリダイズされた標的の表面密度を、蛍光分光法により測定した。

【0316】

K. 表面被覆面積の定量とハイブリダイゼーション

クエン酸塩安定化金ナノ粒子を12merフルオレセイン修飾アルキルチオールDNA (HS-(CH₂)₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-(CH₂)₄-F [配列番号50]) で官能化した。次いで、化学吸着していないオリゴヌクレオチドを完全に洗い流した後で、発蛍光団標識オリゴヌクレオチドを金表面から除去して表面被覆面積研究を実施し、(上記のような) 蛍光分光法を用いてオリゴヌクレオチド濃度を定量した。

【0317】

金表面からすべてのオリゴヌクレオチドを除去し、次いで溶液から金ナノ粒子を除去することは、いくつかの理由で、蛍光による正確な被覆面積データを得るために重要である。第1に、標識した表面結合DNAの蛍光シグナルは、金ナノ粒子への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の結果として効率的に消光される。実際、フルオレセイン修飾オリゴヌクレオチド(12～32ヌクレオチド鎖、配列は上記に記載)が15.7±1.2nmの金ナノ粒子上に固定化され、溶液中の残留オリゴヌクレオチドが洗い流された後では、フルオレセイン修飾オリゴヌクレオチドに関して測定可能なシグナルはほとんど存在しない。第2に、金ナノ粒子は、200～530nmの間に有意な量の光を吸収し、そのために、蛍光測定時の溶液中の金ナノ粒子の存在は、フィルターとしての役割を果たし、利用可能な励起エネルギーだけでなく放出される放射線の強度をも低下させる。フルオレセインの最大放出時には、520nmでの金表面プラズモンバンドが減少する。

【0318】

メルカプトエタノール(ME)を用いて、交換反応により表面結合オリゴヌクレオチドを急速に置換させた。置換動力学を調べるために、遠心および蛍光測定の前に、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子を、増加時間、ME(12mM)に暴露した。ナノ粒子を含まない溶液に関連する蛍光の強さを用いて、ナノ粒子からどの位多くのオリゴヌクレオチドが放出されるかを測定することができる。MEと交換に放出されたオリゴヌクレオチドの量は、約10時間の暴露まで増大した(図29)が、これは、完全なオリゴヌクレオチドの置換を示している。置換反応は高速であり、これは、オリゴヌクレオチド膜がMEの金表面へのアクセスをブロックし得ないためであると考えられる(Biebuyckら, Langmuir, 第9巻, 1766ページ(1993年))。

【0319】

金ナノ粒子上のアルキルチオール修飾12merオリゴヌクレオチド(S12F)の平均オリゴヌクレオチド表面被覆面積は、34±1pmol/cm²(試料の10回の個別測定値の平均)であった。直径15.7±1.2nmの粒子の場合、これは、金粒子1個当たりおよそ159チオール結合12mer鎖に相当する。バッチ毎に粒径はわずかに異なるものの、面積が正規化された表面被覆面積は、異なるナノ粒子配合物に関して類似していた。

【0320】

この方法が正確なオリゴヌクレオチド表面被覆面積を得るために有用であることを確認するために、金薄膜から発蛍光団標識オリゴヌクレオチドを置換する方法を用い、表面被覆面積データと類似の情報を得ることを目的とするが異なる技術を用いた実験と比較した。これらの実験では、金薄膜に対し、クエン酸塩安定化金ナノ粒子(上記参照)と類似のオリゴヌクレオチド修飾およびME置換手順を課した。金薄膜のオリゴヌクレオチド置換対時間曲線は、金ナノ粒子に関して測定したものと極めて類似している。これは、これらの薄膜に関して測定した典型的な表面被覆面積値が金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチド被覆

面積よりいくらか低かったにも拘わらず、薄膜の置換速度は類似していることを示唆している。本発明者らの技術によって測定した金薄膜上のオリゴヌクレオチド表面被覆面積 ($18 \pm 3 \text{ pmol/cm}^2$) が、既に報告されたオリゴヌクレオチド薄膜上の被覆面積の範囲内 (電気化学または表面プラズモン共鳴分光法 (SPRS) を用いて測定された金電極上の 25 塩基オリゴヌクレオチドに関しては 10 pmol/cm^2 (Steel ら, Anal. Chem., 第 70 巻, 4670-4677 ページ (1998 年)) に含まれることは重要である。表面被覆面積の相違は、オリゴヌクレオチドの配列と長さの違いおよび薄膜の調整方法の違いによるものと考えられる。

【0321】

表面結合 12mer オリゴヌクレオチドを備えたナノ粒子への相補的な蛍光発色団標識されたオリゴヌクレオチド (12'F) のハイブリダイゼーションの範囲を、上述のように測定した。簡潔に説明すると、S12F 修飾ナノ粒子を、12F' に $3 \mu\text{M}$ の濃度でハイブリダイゼーション条件 (0.3 M PBS, pH 7) 下で 24 時間暴露し、次に、緩衝液で入念にリンスした。やはり、蛍光測定前に金からハイブリダイズした鎖を取り外すことが必要であった。これは、高 pH 溶液 (NaOH, pH 11) 中で二重鎖 DNA を変性させてから遠心にかけることにより遂行した。ハイブリダイズした 12'F は、総計 $1.3 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$ (15.7 nm 粒子当たり約 6 つの二本鎖; 1 粒子当たりの二本鎖の平均数は、正規化したハイブリダイズされた表面被覆範囲 (pmol/cm^2) に、TEM によって測定した粒度分布から求められる平均粒子表面積を掛けることにより算出した。) に達した。非特異性吸着の程度を測定するために、S12F 修飾金ナノ粒子を、 0.3 M PBS 中で、蛍光発色団標識した非相補的な 12 塩基オリゴヌクレオチド (12F') に暴露した。入念なリンス (連続する遠心/再分散ステップ) とそれに続く高 pH 処理後、ナノ粒子上の非特異的に吸着したオリゴヌクレオチドの被覆範囲は約 0.1 pmol/cm^2 であるとわかった。金電極に関する報告値とハイブリダイゼーション結果を比較するために、類似の方法を使用して、S12F 修飾金薄膜へのハイブリダイゼーションを測定した。ハイブリダイゼーション $6+2 \text{ pmol/cm}^2$ の程度は、金電極上の混合塩基 25mer に対して報告されているハイブリダイゼーション ($2-6 \text{ pmol/cm}^2$) (Steel ら, Anal. Chem. 70: 4670-4677 (1998)) と一致していた。

【0322】

ナノ粒子用システムおよび薄膜の両方に対する S12F/12F' 系の表面被覆範囲およびハイブリダイゼーション値を、表 7 に要約する。最も顕著な結果は、ハイブリダイゼーション効率の低さである (ナノ粒子上の表面結合鎖の 4% 未満、薄膜上の鎖の 33% がハイブリダイズ)。以前の研究では、十分に密に充填されたオリゴヌクレオチド単分子層に対して、同様に低いハイブリダイゼーションが示されていた。これは、塩基の立体的密集性の組合せ (特に金表面付近の) と静電気反発相互作用とにより、入って来るハイブリダイズ鎖への接近容易性が低いことを反映している可能性がある。

【0323】

L. 表面被覆範囲とハイブリダイゼーションに対するオリゴヌクレオチドスペーサーの影響

S12F オリゴヌクレオチドの適用範囲が高いことは、ナノ粒子安定化の点から有利であるが、その低いハイブリダイゼーション効率により、本願発明者らは、ハイブリダイズする配列の周囲の立体的混雑を減少させる手段を考案するように促された。アルキルチオール基と最初の 12 塩基認識配列との間に 20 dA スペーサー配列が挿入された、オリゴヌクレオチド (32mer) を合成した。このストラテジーを、以下の 2 つの仮定に基づき選択した。すなわち、1) ナノ粒子表面付近の塩基は、含窒素塩基と金表面間の相互作用の弱さと、鎖間の立体密集との故に、立体的に接近不能であること、および、2) 直径 15.7 nm の概ね球状の粒子では、概ねその表面に対して垂直な 20mer スペーサーユニットの端部に付着された 12mer 配列 (Levicky ら, J. Am. Chem. Soc. 120: 9787-9792 (1998)) は、表面に直接結び付けられた同じ 1

10

20

30

40

50

2merから形成されたフィルムに比べてより大きな自由体積を有するフィルムにつながるだろう。

【0324】

一本鎖 $SA_{20}12F$ 鎖の表面密度($15 \pm 4 \text{ pmol/cm}^2$)は $S12F$ ($34 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)よりも低い、同一の表面修飾を使用して3merで修飾した粒子は、1merで修飾した粒子と比較して、かなりの安定性を示した。予想されたように、 $SA_{20}12F/12F'$ 系のハイブリダイゼーション効率($6.6 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$ 、44%)は、元の $S12F/12F'$ 系のハイブリダイゼーション効率の約10倍に増大した(表7)。

【0325】

M. オリゴヌクレオチド付着時の電解質濃度の効果

$S12F$ 配列を用いた研究において、塩熟成ステップが、安定したオリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子を得るのに重要であることが判明した(実施例3参照)。純水中 $S12F$ で修飾した金ナノ粒子を不可逆的に融解し、遠心すると、黒色沈殿物が形成されたが、塩中で熟成させたものは、高イオン強度溶液中で遠心しても凝集しなかった。安定性の増大は、立体保護作用および静電保護作用をもたらす高いオリゴヌクレオチド表面被覆面積によるものと考えられる。 $SA_{20}12F$ 修飾粒子を用いて、オリゴヌクレオチド表面添加に及ぼす電解質条件の効果を調べた。図8に示すように、5'ヘキシルチオールおよび3'フルオレセイン部分を有するチオール修飾オリゴヌクレオチドを調製し、上記のように金ナノ粒子に付着させ、ナノ粒子上のこれらのオリゴヌクレオチドの表面被覆面積を上記のように定量した。結果は以下の表7に示されている。水中のオリゴヌクレオチドに48時間暴露した金ナノ粒子の最終表面被覆面積は、塩で「熟成」させるか、または実験の最後の24時間にわたって漸進的に塩濃度を増大させて(最終濃度は 1.0 M NaCl)調製したものと比べると、はるかに低かった($7.9 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$)(上記参照)。

【0326】

合成された金ナノ粒子は、極めて低いイオン強度媒質中でさえ不可逆的に凝集することは注目に値する。確かに、金ナノ粒子は本来、塩、特にオリゴヌクレオチドなどのポリアニオンには不相溶である。安定したオリゴヌクレオチド粒子を調製するためには、この熟成処理が必須である。したがって、粒子は、イオン強度を徐々に増大させる前に、まず、水中のアルキルチオールオリゴヌクレオチドで修飾しなければならない。オリゴヌクレオチドは、初期には、窒素含有塩基と金との弱い相互作用を介して結合した状態で平らに横たわっていると思われる。類似の相互作用モードが薄膜に付けたオリゴヌクレオチドに関して提案されている(Herneら, J. Am. Chem. Soc., 第119巻, 8916-8920ページ(1997年))。しかし、オリゴヌクレオチドと正に帯電したナノ粒子表面との相互作用は、さらに強力であると予想される(Weitzら, Surf. Sci., 第158巻, 147-164ページ(1985年))。熟成ステップにおいて、高イオン強度媒質は、隣接するオリゴヌクレオチド間の電荷反発だけでなくポリアニオンオリゴヌクレオチドと正に帯電した金表面との間の引力をも効率的に遮蔽する。これにより、より多くのオリゴヌクレオチドがナノ粒子表面に結合し、それによってオリゴヌクレオチド表面被覆面積が増大する。

【0327】

N. 表面被覆範囲に対するオリゴヌクレオチドスペーサー配列の影響

スペーサーの配列がどのようにAuナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの被覆範囲に影響するかを調べるために、3'プロピルチオールとフルオレセイン標識1mer配列の間に20dAスペーサーおよび20dTスペーサーが挿入されたフルオレセイン修飾3mer鎖を、調製した。 $S3'T_{20}12F$ と $S3'A_{20}12F$ で修飾したナノ粒子に関する表面被覆範囲とハイブリダイゼーションの研究で最も顕著な結果は、20dAスペーサー($24 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)と比較して、20dTスペーサー($35 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)でより大きな表面被覆範囲が達成されたことである。ハイブリダイズした表面結

10

20

30

40

50

合鎖のパーセンテージは $SA_{2012mer}$ ナノ粒子 (79%) では SA_{2012} ナノ粒子 (「~94%」より低かったが、ハイブリダイズした鎖の数は匹敵していた。これらの結果は、dT 豊富なオリゴヌクレオチド鎖が、dA 豊富なオリゴヌクレオチドよりも低い程度でナノ粒子表面と非特異的に相互作用することを示唆している。従って、20dA スペーサーセグメントが粒子表面上で平坦に横渡ることにより金の部位をブロックする一方、20dT スペーサーセグメントは、金の表面から垂直に延びることができ、これはより高い表面被覆範囲を促す。

【0328】

O. 同時吸着された希釈剤オリゴヌクレオチドの影響

効率的なハイブリダイゼーションに加えて、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子の別の重要な特性は、ハイブリダイゼーション事象の総数を調節する可能性である。これは、認識鎖の表面密度の調節により最も容易に遂行される。他の研究者は、ハイブリダイゼーションを制御するために、金電極上の修飾オリゴヌクレオチドと共に、メルカプトヘキサノールのような同時吸着される希釈剤アルキルチオールを使用した (Steel ら、Anal. Chem. 70: 4670-4677 (1998); Herner ら、J. Am. Chem. Soc. 119: 8916-8920 (1997))。しかしながら、保護されていない金ナノ粒子の固有の低い安定性は、希釈剤分子の選択に重大な制約を提起した。チオール修飾 20dA 配列 (SA_{20}) [配列番号 55] は、ハイブリダイゼーションに必要な高いイオン強度の緩衝液中での粒子安定性を維持し、かつ非特異的吸着から表面を保護する点で、適切していることがわかった。

【0329】

ナノ粒子を、種々の認識鎖 (SA_{2012F}) 対希釈剤 (SA_{20}) 鎖の分子比を有する溶液を用いて修飾した。得られた粒子を、 SA_{2012F} 表面密度の測定のために上述の蛍光方法で分析し、次に、12'F とのハイブリダイゼーション効率に関してテストした。

【0330】

SA_{2012F} 表面密度は、堆積溶液中の SA_{2012F} 対 SA_{20} の比率に関して直線的に増加した (図 30)。これは、ナノ粒子に付けられた SA_{2012F} と SA_{20} の比が溶液の比を反映することを示唆しているので、面白い結果である。この結果は、溶解度と鎖長が吸着動力学に重大な役割を果たす、短鎖アルキルまたは T 官能化チオールの混合物に通常見られる結果と対照的である (Bain ら、J. Am. Chem. Soc. 111: 7155-7164 (1989); Bain ら、J. Am. Chem. Soc. 111: 7164-7175 (1989))。

【0331】

個々の異なるサンプルにハイブリダイズした相補的な 12F オリゴヌクレオチドの量も、 SA_{2012F} 表面被覆範囲の増加につれて直線的に増加した (図 31)。この関係が良好に定義されるという事実は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーションの程度を予測および制御できることを示す。これは 12F' のハイブリダイゼーションがより高い SA_{2012F} 被覆範囲ではより困難になり、オリゴヌクレオチド間に立体的密集と静電気反発が起こる可能性が高いことを示唆している。

【0332】

P. 要約

本研究は、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を安定化させる程度に高いが、高い割合の鎖が溶液中のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのために接近できる程度に低く、オリゴヌクレオチド被覆範囲間のバランスを達成することが重要であることを示している。それは、オリゴヌクレオチドを、高いオリゴヌクレオチド表面被覆範囲を得るためにナノ粒子に付着させたり、静電相互作用を減らすためにオリゴヌクレオチドスペーサーセグメントに付着させたり、各ナノ粒子に対するハイブリダイゼーション事象の平均数を再現可能に制御するために同時吸着鎖を付着したりしている間に、塩条件を調節させることにより達成される。鎖 (スペーサー) の配列の性質が、金ナノ粒子に装填され

たオリゴヌクレオチド鎖の数に影響を及ぼすことも示された。この研究は、オリゴヌクレオチドとナノ粒子の間の相互作用の理解ならびにナノ粒子ーオリゴヌクレオチド検出方法の感度の最良化に関して重要な意味合いを持つ。

【0333】

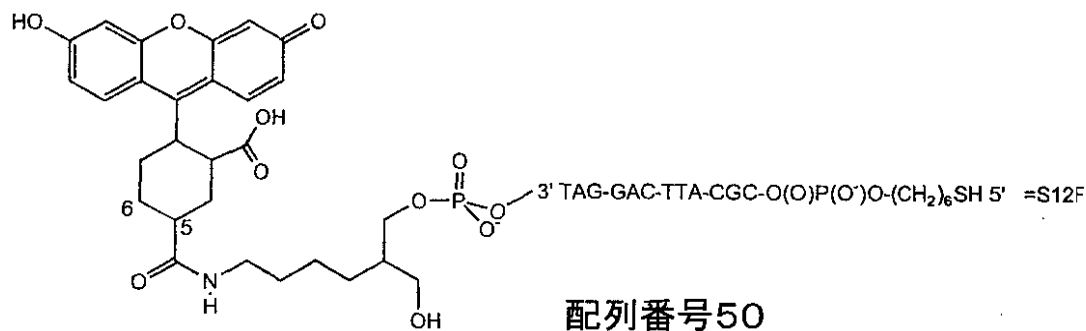
【表7】

表7

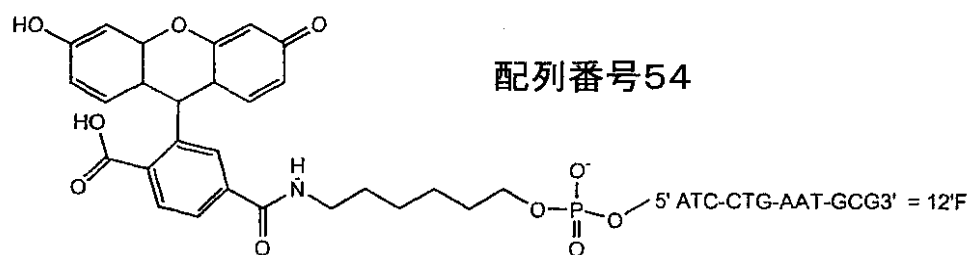
金薄膜と金ナノ粒子に対する一本鎖の表面被覆範囲とそれに対応するハイブリダイズされた表面被覆範囲。S12FとSA₂₀12Fの表面被覆範囲およびハイブリダイゼーションの比較。チオール修飾オリゴヌクレオチドを3 μM水溶液から金に付着させ、0.1M NaClで熟成した。ハイブリダイゼーション試験はすべて0.3M PBS、pH7で行った。

オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼーション被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼーション効率 (%)
Auナノ粒子			
S12F/12F'	34 ± 1	1.3 ± 0.2	-4%
SA ₂₀ 12F/12F'	15 ± 4	6.6 ± 0.2	-44%
Au薄膜			
S12F/12F'	18 ± 3	6 ± 2	-33%

【化1】



【化2】



【表8】

金ナノ粒子に対する S A₂₀ 1 2 F オリゴヌクレオチドの表面被覆範囲と 1 2 F' へのハイブリダイゼーションに対する塩による熟成の影響

アルキルチオール DNA	表面被覆範囲	ハイブリダイゼーション被覆範囲	ハイブリダイゼーション効率
吸着中の緩衝液条件	(pmol/cm ²)	(pmol/cm ²)	(%)
H ₂ O	7. 9 ± 0. 2	— ^a	—
0.1M NaCl, 10mM リン酸	1 5 ± 4	6. 6 ± 0. 2	～ 4 4
1.0M NaCl, 10mM リン酸	2 0 ± 2	6. 5 ± 0. 2	～ 3 3

^a 上記実験に対する信頼できる値は、遠心後に起こった粒子の凝集体が少量であるために得られなかった。

10

【表 9】

表面被覆範囲とハイブリダイゼーション効率に対するオリゴヌクレオチドスペーサー配列の影響

オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲	ハイブリダイゼーション被覆範囲	ハイブリダイゼーション効率
	(pmol/cm ²)	(pmol/cm ²)	(%)
S3'A ₂₀ 12F/3'12F'	2 4 ± 1	9 ± 2	～ 3 8
S3'T ₂₀ 12F/3'12F'	3 5 ± 1	1 2 ± 1	～ 3 4

20

S3'A₂₀12F/S3'T₂₀12F=HS(CH₂)₃-3'-W₂₀-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F [配列番号 5 2]

3'12F=5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F [配列番号 5 4]

30

実施例 19： 遺伝子チップアッセイ

この実施例では、オリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子を用いたコンビナトリアル DNA アレイの選択的が非常に高くかつ非常に高感度な分析法を説明する。非常に狭いナノ粒子一標的複合体熱解離温度範囲により、ヌクレオチド誤対合を 1 つ有する標的から所与のオリゴヌクレオチド配列を、非常に高い選択性で識別することができる。さらに、銀 (I) のナノ粒子触媒還元に基づくシグナル増幅法と組合せると、このナノ粒子配列検出系の感度は、慣用の類似発蛍光団系の感度よりも 2 桁の大きさだけ優れている。

【0334】

科学者が病気の遺伝的根拠を明らかにし、この新規な情報を医学診断や治療の改良に用いるにつれ、配列選択的 DNA 検出はますますその重要度を増している。サザンブロットやコンビナトリアル DNA チップなどの一般に用いられている異種 DNA 配列検出系は、標的 DNA と相補的な表面結合一本鎖オリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーションに基づいている。これらのアッセイの特異性も感度も、全対合配列および誤対合配列にハイブリダイズした捕獲鎖の解離特性に依存する。以下に説明するように、驚くべきことには、基板にハイブリダイズした単 1 種類のナノ粒子が類似の発蛍光団ベース系や非標識 DNA よりも実質的に急激な融解プロファイルを示すことが発見された。さらに、ナノ粒子二本鎖の融解温度は、同一配列を有する類似の発蛍光団系の場合より 11℃ も高い。これら 2 つの観察結果を、銀 (I) のナノ粒子触媒還元に基づく定量的シグナル増幅法の開発と合わせると、1 単塩基誤対合選択性および類似の慣用発蛍光団ベースアッセイよりも 2

40

50

桁も高い感度を有する新規なチップベースDNA検出系の開発が可能になる。

【0335】

3成分サンドイッチアッセイ形式（図32参照）において、透明な基板にハイブリダイズした特定のDNA配列の存在を示すために、実施例3に記載のように調製したオリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子（直径13nm）を用いた。典型的な実験では、基板は、実施例10に記載のようなアミン修飾プローブオリゴヌクレオチドを用いて、フロートガラス製顕微鏡スライド（フィッシャー・サイエンティフィック社）を官能化して作製した。この方法を用いて、スライドの表面全体に1種類のオリゴヌクレオチドかまたは市販のマイクロアレイヤーを用いてスポットした複数種類のオリゴヌクレオチドアレイで官能化したスライドを作製した。次いで、指示オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子および（炭疽菌保護抗原配列をベースとする）合成30merオリゴヌクレオチド標的をこれらの基板に同時ハイブリダイズさせた（図32参照）。したがって、表面のナノ粒子の存在によって、特定の30塩基配列の検出が示された。標的濃度が高い（ $\geq 1 \text{ nM}$ ）と、表面上のハイブリダイズした高密度のナノ粒子が、表面を明るいピンク色にした（図33参照）。標的濃度が低い場合、付着しているナノ粒子は、（電界放出走査電子顕微鏡検査では画像が見られたが）肉眼で見えることはできなかった。基板表面にハイブリダイズしたナノ粒子の視覚化を容易にするために、銀イオンをヒドロキノンによって触媒的に還元してスライド表面上に銀金属を形成するシグナル増幅法を用いた。この方法は、組織化学顕微鏡検査研究において、タンパク質—および抗体—結合金ナノ粒子を拡大するために用いられている（Hacker, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications, M. A. Hayat編（Academic Press, San Diego, 1989年）、第1巻、第10章；Zehbeら, Am. J. Pathol., 第150巻、1553ページ（1997年））が、その定量的DNAハイブリダイゼーションアッセイにおける使用は新規である（Tomlinsonら, Anal. Biochem., 第171巻、217ページ（1988年））。この方法は、ナノ粒子プローブの極めて低い表面被覆面積を簡単な平台型スキャナや肉眼で視覚化し得た（図33）だけでなく、染色面積の光学密度に基づく標的ハイブリダイゼーションの定量も可能になった（図34）。重要なことには、標的の不在下、または非相補的標的の存在下には、表面の染色は観察されず、これは、ナノ粒子の表面への非特異的結合も、非特異的銀染色も起こらないことを証明している。この結果は、核酸の非常に高い感度かつ非常に選択的な検出を可能にするこれらのナノ粒子—オリゴヌクレオチド共役体の優れた特徴である。

【0336】

さらに、本発明のオリゴヌクレオチド官能化ナノ粒子の固有のハイブリダイゼーション特性を、さらにコンビナトリアルオリゴヌクレオチドアレイ（または「遺伝子チップ」）の選択性を改良するために用い得ることが確認された（Fodor, Science, 第27巻、393ページ（1997年））。オリゴヌクレオチドアレイの異なる素子にハイブリダイズした標的の相対比は、標的配列決定時のアレイの正確性を決定するであろう。この比率は、異なる捕獲鎖とDNA標的との間で形成された二本鎖のハイブリダイゼーション特性に依存する。驚くべきことには、これらのハイブリダイゼーション特性は、発蛍光団標識の代わりにナノ粒子標的を用いることにより劇的に改良される。図35に示されているように、ナノ粒子標識標的の表面結合捕獲鎖からのデハイブリダイゼーションは、同一配列を有する発蛍光団標識標的のものよりはるかに温度感受性である。発蛍光団標識標的は、極めて広範な温度範囲（一次導関数FWHM = 16°C ）にわたって表面捕獲鎖からデハイブリダイズしたが、同一ナノ粒子標識標的ははるかに急激に融解した（一次導関数FWHM = 3°C ）。これらの急勾配の解離プロファイルは、通常、ハイブリダイゼーションストリンジェンシー洗浄によって影響を受ける、チップベースの配列分析のストリンジェンシーを改善すると予想された。確かに、相補的表面プローブにハイブリダイズした標的と、（図35の水平線によって表される）特定温度下のストリンジェンシー洗浄後に、誤対合プローブにハイブリダイズした標的との比率は、発蛍光団標識よりナノ粒子標識の

10

20

30

40

50

方がはるかに高い。これは、チップ検出形式における高選択性を意味する筈である。さらに、ナノ粒子標識は、それによって、それより低いと、二本鎖が室温下に自発融解する臨界濃度を低下させる表面二本鎖の融解温度 (T_m) を上昇させることによりアレイ感度を向上させるであろう。

【0337】

オリゴヌクレオチドアレイの比色指示剤としてのナノ粒子の有効性を評価するために、テストチップを合成標的でプローブし、発蛍光団指示剤とナノ粒子指示剤とで標識した。テストアレイとオリゴヌクレオチド標的は、公開されているプロトコル (Guoら, *Nucl. Acids Res.*, 第22巻, 5456ページ (1994年); Genetic Microsystems 417 Microarrayerを用いて、 $375\mu\text{m}$ で分離された直径 $175\mu\text{m}$ のスポットアレイをパターン化した) に従って作製した。アレイは、標的の8位の4つの可能なヌクレオチド (N) それぞれに対応する4つの素子を含んでいた (図32参照)。ハイブリダイゼーション緩衝液中で、合成標的と、蛍光標識またはナノ粒子標識プローブとを段階的にアレイにハイブリダイズさせたが、各ステップの後で、 35°C のストリンジェンシー緩衝液洗浄を行った。先ず、 $2\times\text{PBS}$ (0.3M NaCl 、 $10\text{mM Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH}7$) 中の 1nM 合成標的溶液 $20\mu\text{l}$ とアレイとを、室温下に4時間、ハイブリダイゼーションチャンバ (Grace Bio-Labs Cover Well PC20) 中でハイブリダイズさせ、次いで、 35°C 下に清浄な $2\times\text{PBS}$ 緩衝液で洗浄した。次いで、 $2\times\text{PBS}$ 中 100pM オリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子溶液 $20\mu\text{l}$ とアレイとを、室温下に4時間、新鮮なハイブリダイゼーションチャンバ中でハイブリダイズさせた。アレイを 35°C 下に清浄な $2\times\text{PBS}$ で洗浄し、次いで、 $2\times\text{PBS}$ (0.3M NaNO_3 、 $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH}7$) で2回洗浄した。次いで、ナノ粒子アレイを銀増幅溶液 (シグマ・ケミカル社、Silver Enhancer Solution) 中に5分間浸漬し、水で洗浄した。銀増幅により、アレイ素子はかなり暗色化し、直径 $200\mu\text{m}$ の素子は平台型スキャナまたは肉眼でさえ容易に見ることができた。

【0338】

モデル標的およびナノ粒子標識プローブで攻撃し、銀溶液で染色したアレイは、相補的アレイ素子への選択性の高いハイブリダイゼーションを明瞭に示した (図36A)。同じ捕獲配列の重複スポットは、再現性があってばらつきのないハイブリダイゼーションシグナルを示した。ナノ粒子または銀染料によるバックグラウンド吸着は全く観察されなかった。平台型スキャナによって記録された画像グレースケール値は、清浄な顕微鏡スライドに関して観察されたものと同じであった。8位のアデニン ($N=A$) に対応する暗いスポットは、オリゴヌクレオチド標的が、 $3:1$ を超える比率で、誤対合鎖よりも完全相補性捕獲鎖に選択的にハイブリダイズしたことを示している。さらに、各スポットセットの総合グレースケール値は、ワトソン・クリック型塩基対、 $A:T>G:T>C:T>T:T$ (Allawira, *Biochemistry*, 第36巻, 10581ページ (1988年)) の予測安定性に従う。通常、 $G:T$ 誤対合を $A:T$ 相補体から識別するのは特に難しく (Saikiら, *Mutation Detection*, Cottonら編 (Oxford University Press, Oxford, 1998年), 第7章; S. Ikutara, *Nucl. Acids Res.*, 第15巻, 797ページ (1987年))、これら2種のアレイ素子の識別は、1つのヌクレオチド誤対合の検出におけるナノ粒子標識の驚異的な分解能を証明している。ナノ粒子ベースアレイの選択性は、発蛍光団指示アレイの選択性より高く (図36B)、発蛍光団標識は8位のアデニンに対して $2:1$ の選択性を提供したに過ぎない。

【0339】

ナノ粒子標識プローブを利用するアッセイは、発蛍光団標識プローブを利用するものより感度が有意に高かった。ハイブリダイゼーションシグナルを、 50fM 程度の低さ (または、 $20\mu\text{l}$ の溶液を含有するハイブリダイゼーションチャンバの場合は、 1×10^6 総

コピー数)の標的濃度の $N = A$ 要素で分解することができた。これは、通常、 1 pM 以上の標的濃度が要求される慣用の $Cy3/C75$ 発蛍光団標識アレイに比べて劇的な感度の向上を示している。表面上に固定化されたナノ粒子-標的複合体に関して観察された高融解温度がアレイの感度に寄与していることは疑いもない。ナノ粒子系の場合に発蛍光団系に比べてプローブ/標的/表面-オリゴヌクレオチド複合体の安定性が増大すると、洗浄ステップ中に失われる標的およびプローブが少なくなると考えられる。

【0340】

コンビナトリアルオリゴヌクレオチドアレイの比色性ナノ粒子標識は、誤対合1つの解像、感度、コスト、使用し易さが重要な要素である-ヌクレオチド多型分析などの用途に有用であろう。さらに、全体的に最適化する必要があるこの系の感度は、ポリメラーゼ連鎖反応などの標的増幅計画を必要とせずに、オリゴヌクレオチド標的を検出するための潜在的な方法を示している。

10

【0341】

実施例20: ナノ粒子構造

ハイブリダイズしたDNAリンカーを媒介としたガラス支持体上への超分子重層金ナノ粒子構造の可逆的集合体を説明する。オリゴヌクレオチド官能化ナノ粒子を、相補的DNAリンカーの存在下、オリゴヌクレオチド官能化ガラス支持体に連続付着させる。DNAの独特な認識特性により、相補的リンカーの存在下にナノ粒子構造が選択的に集合する。さらに、これらの構造は、溶液の温度、pH、およびイオン強度を含めた連結二本鎖DNAのハイブリダイゼーションを媒介する外部刺激に応答して集合したり、離散したりし得る。この系は、固相支持体上にナノ粒子ベース構造を構築する極めて選択的かつ制御された方法を提供することに加えて、DNAによって連結されたナノ粒子網目構造の光学特性と融解特性とに影響を与える要素の研究を可能にする。

20

【0342】

別の者は、いかにして、二官能価有機分子(Gittinsら, Adv. Mater., 第11巻, 737ページ(1999年); Brustら, Langmuir, 第14巻: 5425ページ(1998年); Brightら, Langmuir, 第14巻: 5696ページ(1998年); Grabarら, J. Am. Chem. Soc., 第118巻: 1148ページ(1996年); Freemanら, Science, 第267巻: 1629ページ(1995年); Schmidら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 第39巻: 181ページ(2000年); Marinakosら, Chem. Mater., 第10巻: 1214ページ(1998年))または高分子電解質(Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959ページ(1998年); Storhoffら, J. Cluster Sci., 第8巻: 179ページ(1997年); Elghanianら, Science, 第277巻: 1078ページ(1997年); Mirkinら, Nature 第382巻, 607ページ(1996年))を使用して平面構造から単層および多層ナノ粒子材料を制御可能に構築し得るかを証明した。ナノ粒子の相互連結体としてDNAを用いることの魅力的な特徴は、DNA配列を選択することにより、粒子間間隔、粒子周期性および粒子組成を合成的にプログラムし得ることである。さらに、オリゴヌクレオチドの可逆結合特性を利用して、動構造ではなく熱力学的構造を確実に形成し得る。この方法は、固相支持体からのナノ粒子ベース構造の成長を制御する新規かつ強力な方法を提供するだけでなく、ナノ粒子凝集体サイズと、凝集体DNA相互連結構造の融解特性および光学特性との関係を評価することもできる。これら2つの物理的パラメータとそれらの材料構築物との関係は、特にバイオ検出分野におけるナノ粒子網目構造材料の利用に必須である。

30

40

【0343】

多層集合体の構築に用いられる直径 13 nm のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子を実施例1および3に記載のように調製した。これらのナノ粒子には、それぞれナノ粒子aおよびbを生成する、 $5' \text{---ヘキシルチオール---}$ キャップオリゴヌクレオチド $1(5' \text{---HSC(CH}_2)_6\text{O(PO}_2^-)\text{---CGCATTCAGGAT---}3')$ [配列番号50]と

50

、3'-プロパンチオール-キープオリゴヌクレオチド2 (3'-HS(CH₂)₃O (PO₂⁻)O-ATGCTCAACTCT-5' [配列番号59] が付着していた (図37参照)。実施例10に記載のように、ガラス製スライドを12merオリゴヌクレオチド2で官能化した。ナノ粒子層を構築するために、まず、基板を24merリンカー3 (5'-TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG-3' [配列番号60]) の10nM溶液に浸漬し、室温下に4時間ハイブリダイズさせた (図37参照)。支持体を清浄な緩衝液で洗浄し、次いで、第1ナノ粒子層を付着させるために室温下に4時間、粒子aの2nM溶液とハイブリダイズさせた。同様に基板表面をリンカー3とナノ粒子bの溶液に暴露するだけで第2ナノ粒子層を第1ナノ粒子層に付着させることができた。これらのハイブリダイゼーションステップを繰り返して、各層がリンカー3を介して前の層に連結したナノ粒子aとbの多重交互層を付着させることができた。リンカーの不在下、または非相補的オリゴヌクレオチドの存在下では、表面へのナノ粒子のハイブリダイゼーションは観察されなかった。さらに、DNAリンカーのハイブリダイゼーションを促進させる条件：中性pH、穏和な塩濃度 (>0.05M NaCl) および二本鎖融解温度 (T_m) を下回る温度下にのみ多層集合体が観察された。

10

【0344】

ハイブリダイズした各ナノ粒子層は、基板をより暗紅色とし、10層がハイブリダイズした後の支持ガラス製スライドには、反射による金色が出現した。表面へのナノ粒子の連続ハイブリダイゼーションのモニターには、基板の透過UV-可視分光法を用いた (図38A)。初期ナノ粒子層の吸光度の低さは、この層がさらなる層の形成を促進するものとなったことを示唆しており、層を追加するに従って、プラズモンバンドの強度がほぼ線形に増大することが示された (各連続ナノ粒子層の形成に関して、リンカー3またはナノ粒子溶液の暴露時間を長くしたり、濃度を増大させたりしても、さらなる吸光度の増大は観察されなかった)。初期ナノ粒子層生成後に吸光度が線形に増大したことは、連続的に層を加えるに従って、表面がハイブリダイズしたナノ粒子で飽和されたことを示している (図38B)。これは、1層の場合には低いナノ粒子被覆を示すが、2層の場合にはほぼ完全な被覆を示す表面上の1つ (図39A) および2つ (図39B) のナノ粒子層の電界放出走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) 画像によって支持される。多層集合体のプラズモンバンドλ_{max} は、5層になった後でさえ、10nm以下しかシフトしない。このシフトの検出は、金ナノ粒子凝集体の他の実験的処理 (Grabarら, J. Am. Chem. Soc., 第118巻, 1148ページ (1996年)) および理論的処理 (Quintenら, Surf. Sci., 第172巻, 557ページ (1996年); Yangら, J. Chem. Phys., 第103巻: 869ページ (1995年)) と一致する。しかし、シフトの大きさは、λ_{max} > 570nmを示す、オリゴヌクレオチドに連結した金ナノ粒子網目構造の懸濁液に関して先に観察されたものと比較すると小さい (先の実施例参照)。これは、金ナノ粒子ベースのオリゴヌクレオチドプローブに関して観察された赤色から青色への劇的な変色を生成するには、恐らく何百または何千ものもっと多くのナノ粒子が連結する必要があることを示唆している。(Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959ページ (1998年); Storhoffら, J. Cluster Sci., 第8巻, 179ページ (1997年); Elghaniaら, Science, 第277巻, 1078ページ (1997年); Mirkinら, Nature, 第382巻, 607ページ (1996年))。凝集した金ナノ粒子の表面プラズモンシフトは、粒子間間隔に大きく依存することが明らかにされた (Quintenら, Surf. Sci., 第172巻: 557ページ (1986年); Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 前掲)。オリゴヌクレオチドリリンカーにより提供される大きな間隔 (この系の場合8.2nm) によって、金表面プラズモンバンドに及ぼすナノ粒子凝集の累積的効果が有意に低下する。

20

30

40

【0345】

集合したナノ粒子多層の解離特性は、層の数に大きく依存していた。多層でコートされた基板を緩衝液に懸濁し、温度を連結オリゴヌクレオチドのT_m より高い温度 (53℃) に

50

上げると、ナノ粒子は、無色のガラス表面を残して、溶液中に解離した。緩衝懸濁液の pH を上下させたり (> 11 または < 3)、塩濃度を低下させたり (0.01 M NaCl 未満) しても、連結した DNA をデハイブリダイズすることによりナノ粒子は解離した。多層集合体は完全に可逆性であり、ナノ粒子は、ガラス基板にハイブリダイズしたり、ガラス基板からデハイブリダイズしたりし得る (例えば、3 つのサイクルは、検出可能な不可逆性ナノ粒子結合がないことが示された)。

【0346】

重要なことには、表面結合ナノ粒子集合体はすべて連結オリゴヌクレオチドの T_m を超える温度で解離したが、これらの転移の急激さは、支持されている凝集体のサイズに依存していた (図 39D-F)。驚くべきことには、支持体からの第 1 ナノ粒子層の解離は、溶液中にナノ粒子を含まない同じオリゴヌクレオチド (図 39C) のものより急激な転移 (図 39D、一次導関数の $\text{FWHM} = 5^\circ\text{C}$) を示した。基板にさらにナノ粒子層がハイブリダイズするにつれ、オリゴヌクレオチド連結ナノ粒子の融解転移は、溶液中に見出された大きなナノ粒子網目構造集合体の融解転移と同等になるまで連続的に急激さを増した (図 39E-F、一次導関数の $\text{FWHM} = 3^\circ\text{C}$)。 (Gittins ら, *Adv. Mater.*, 第 11 巻: 737 ページ (1999 年); Brust ら, *Langmuir*, 第 14 巻: 5425 ページ (1998 年)。) これらの実験は、最適な急激融解曲線を得るためには、3 つ以上のナノ粒子と多重 DNA の相互連結体が必要であることを立証している。これらの実験はさらに、この系における光学的変化が融解特性から完全に切り離されている (すなわち、凝集が小さいと、急激な転移は生じ得るが、それでも変色は生じない) ことを示している。

【0347】

実施例 21: 金ナノ粒子集合体の電気的性質

DNA を介した電子の移動は、過去数年にわたり化学の分野で最も広範囲に討議されている問題の 1 つである。 (Kelley ら, *Science*, 第 283 巻: 375-381 ページ (1999 年); Turro ら, *J BIC*, 第 3 巻: 201-209 ページ (1998 年); Lewis ら, *J BIC*, 第 3 巻: 215-221 ページ (1998 年); Ratner, M., *Nature*, 第 397 巻, 480-481 ページ (1999 年); Okahata ら, *J. Am. Chem. Soc.*, 第 120 巻, 6165-6166 ページ (1998 年))。DNA は効率的に電子を移動させ得ると主張するものもいるが、DNA は絶縁体であると考えられるものもいる。

【0348】

表面上類似点の無い研究分野において、ナノ粒子をベースとした材料の電気的性質の研究に多大な努力が傾けられてきた (Terrill ら, *J. Am. Chem. Soc.*, 第 117 巻, 12537-12548 ページ (1995 年); Brust ら, *Adv. Mater.*, 第 7 巻, 795-797 ページ (1995 年); Bethell ら, *J. Electroanal. Chem.*, 第 409 巻: 137-143 ページ (1996 年); Music ら, *Chem. Mater.*, 第 9 巻: 1499-1501 ページ (1997 年); Brust ら, *Langmuir*, 第 14 巻, 5425-5429 ページ (1998 年); Collier ら, *Science*, 第 277 巻: 1978-1981 ページ (1997 年))。確かに、多くのグループがナノ粒子を二次元および三次元網目構造に集合させる方法を探求し、そのような構造の電子特性を調査してきた。しかし、DNA と連結させたナノ粒子ベース材料の電気的性質については実質的に何も分っていない。

【0349】

この研究において初めて、異なる長さの DNA 相互連結体によって形成された金ナノ粒子集合体の電気的性質が調査された。以下に示されているように、これらのハイブリッド無機集合体は、24~72 ヌクレオチド範囲にわたるオリゴヌクレオチド粒子相互連結体長にも拘わらず、半導体として挙動する。本明細書に記載されている結果は、DNA 相互共役体が、金属ナノ粒子間の絶縁バリアを形成不要で、このため粒子の電気的性質を破壊することのない、金属ナノ粒子用の化学的に特異的な足場材料として用い得ることを示して

いる。これらの結果は、そのようなハイブリッド集合体を電子材料として利用し得る新規な方法を示している。

【0350】

この主題の中心には以下の問題がある：DNAを介して集合したナノ粒子は、それでも電気を伝導し得るか、または各粒子上に重度に添加されたDNA相互共役体は絶縁シェルとして作用し得るか、ということである（Mucic, R. C., Synthetically Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA, Thesis Ph. D., Northwestern University (1999年)）。これらの材料の導電率を、温度、オリゴヌクレオチド長および相対湿度の関数として調べた。DNAによって連結されたナノ粒子構造を、電界放出走査型電子顕微鏡検査（FE-SEM）、シンクロトロン小角X線散乱（SAXS、synchrotron small angle x-ray scattering）実験、熱変性プロファイル、およびUV-可視分光法によって特性決定した。

【0351】

典型的な実験（図40参照）では、クエン酸塩で安定化した13nm金ナノ粒子を、実施例1および3に記載のように、3'および5'アルカンチオールでキャップした12merオリゴヌクレオチド1（3' SH(CH₂)₂O(PO₂⁻)O-ATGCTCAAC TCT5' [配列番号59]）および2（5' SH(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGCATTCAAGGAT3' [配列番号50]）で修飾した。24、48または72塩基長のDNA鎖3（5' TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG3' [配列番号60]）、4（5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATC-ATGCAATCCTGAATGCG3' [配列番号61]）、および5（5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCAATATATTG GACGCTTTACGGACAAACATCCTGAATGCG3' [配列番号62]）をリンカーとして用いた。充填剤6（3' GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT5' [配列番号63]）および7（3' GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGTATATAACCTGCGAAATGCCCTGTTTG5' [配列番号64]）を48塩基リンカーおよび72塩基リンカーと共に用いた。DNA修飾ナノ粒子とDNAリンカーおよび充填剤は、使用前に、0.3M NaCl、10mM リン酸（pH7）緩衝液（0.3M PBSと称される）中に貯蔵した。ナノ粒子集合体を構築するために、1で修飾した金ナノ粒子（652μl、9.7nM）と2で修飾した金ナノ粒子（652μl、9.7μM）をリンカーDNA3、4、または5（30μl、10nM）に加えた。完全に沈殿させた後、凝集体を0.3M CH₃COONH₄溶液で洗浄して過剰なDNAおよびNaClを除去した。

【0352】

凝集体を凍結乾燥（10⁻³～10⁻²トル）乾固してペレットを得、揮発性塩CH₃COONH₄を除去した。Frens法（Frens, Nature Phys. Sci., 第241巻：20-22ページ（1973年））により調製した官能化されていないクエン酸塩安定化粒子を膜として乾燥させ、比較用に用いた。得られた乾燥凝集体は曇った黄銅に似た色を有しており、非常に脆かった。FE-SEM画像は、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子は乾燥しても無傷のままであるが、クエン酸塩安定化ナノ粒子は互いに融合したことを示した。乾燥したDNAを介して連結された凝集体が0.3M PBS緩衝液（1ml）に再分散し得、かつ優れた融解特性を示したことは重要である。そのような分散液を60℃に加熱すると、DNA相互共役体のハイブリダイゼーションが起こり、分散したナノ粒子の赤色溶液が得られた。これをFE-SEMデータと合わせると、DNA修飾金ナノ粒子は、乾燥させると、不可逆的には凝集しないことが最終的に証明された。

【0353】

コンピュータ制御4プローブ技術を用いて、3種の試料（それぞれ3、4および5を介して連結された乾燥凝集体）の導電率を測定した。電気接点は、金ペーストでペレットに付着させた細い金ワイヤ（直径25および60μm）から構成した。試料を中程度の真空（

$10^{-3} \sim 10^{-2}$ トル) 下に冷却し、低圧のドライヘリウムガス下に温度を増大させながら導電率を測定した。起こり得る光電子事象を排除するために、試料チャンバを光から隔離した。励起電流を 100 nA 以下に維持し、試料全体にわたる圧力を最大 20 V に制限した。驚くべきことには、3 種すべてのリンカーから形成された凝集体の導電率は、室温下に $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ S/cm}$ の範囲であり、これらの凝集体は、類似した温度依存性挙動を示した。DNA 連結凝集体の導電率は、半導体材料の特徴を示す、約 190°K までのアレニウス挙動を示した。これは、不連続金属島状膜に認められる活性化電子ホッピング挙動に似ている (Barwinski, Thin Solid Films, 第 128 巻: 1-9 ページ (1985 年))。アルカンジチオールを介して連結された金ナノ粒子の網目構造は類似の温度依存性を示した (Brust ら, Adv. Mater., 第 7 巻: 795-797 ページ (1995 年); Bethell ら, J. Electroanal. Chem., 第 409 巻: 137-143 ページ (1996 年))。電荷移動の活性化エネルギーは、方程式 (1)

【0354】

$$\sigma = \sigma_0 \exp[-E_a / kT] \quad (1)$$

を用いる $\ln \sigma$ 対 $1/T$ のプロットから得ることができる。3 つの測定値から計算した平均活性化エネルギーは、それぞれ 24 、 48 および 72 mer リンカーに関して、 $7.4 \pm 0.2 \text{ meV}$ 、 $7.5 \pm 0.3 \text{ meV}$ 、 $7.6 \pm 0.4 \text{ meV}$ であった。これらの計算には、 50°K から 150°K までの導電率を用いた。

【0355】

これらの種類の材料の電気的性質は粒子間間隔に依存する筈なので、シンクロトロン SAXS 実験を用いて、分散した乾燥凝集体の粒子間間隔を測定した。SAXS 実験は、Advanced Proton Source、Argonne National Laboratory の Dupont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team (DND-CAT) Sector 5 で実施した。DNA 連結凝集体および DNA 修飾コロイドの希釈物試料を 0.3 m クロムビームの $1.54 \text{ \AA}$ 放射線で照射し、散乱放射線を CCD 検出器で回収した。2D データを循環的に平均し、散乱ベクトル量、 $s = 2 \sin(\theta) / \lambda$ (ここで、 2θ は散乱角、 λ は入射放射線の波長) の関数、 $I(s)$ に変換した。すべてのデータをバックグラウンド散乱および試料吸収に対して補正した。3 種すべての凝集体構造を乾燥させると、粒子間間隔感受性の第 1 ピーク位置は、それぞれ、 24 mer 、 48 mer および 72 mer 連結凝集体の 0.063 nm^{-1} 、 0.048 nm^{-1} 、および 0.037 nm^{-1} の s 値から 0.087 nm^{-1} の s 値へ大きく変化した。これは、乾燥させると、粒子が殆ど接触するポイントまで粒子間間隔が有意に減少したこと、およびそのような間隔は実質的にはリンカー長とは無関係であるが、溶液中での粒子間隔はリンカー長に大きく依存していたことを示している。これによって、乾燥ペレットの導電率実験における 3 種の異なる系に関して何故類似の活性化エネルギーが観察されたかが分る。さらに、これによって、何故、DNA の電子特性の見方とは無関係に比較的高い導電率が観察されたかも明らかになる。DNA 連結材料とは異なり、乾燥させたクエン酸塩安定化金ナノ粒子膜は、金属様挙動を示した。これは、そのような粒子が互いに融合することを示した SEM データと一致する。

【0356】

190°K を超えると、測定した DNA 連結試料の導電率は非常に急な低下挙動を示した。すべての試料について、導電率は約 190°K で急激に低下し始め、およそ 250°K まで低下し続け、そこから再度増大した。この挙動を詳細に調査するために、試料を繰返し冷却、加熱しながら導電率を測定した。興味深いことには、導電率の低下は、温度が増大方向にあるときにのみ起こった。DNA は親水性であり、かつ水は潜在的にハイブリッド構造の電気的性質に影響を与え得るので、金凝集体の導電率に及ぼす相対湿度の影響を調べた。湿度を 1% から 10% に増大させると、抵抗が 10 因数増大した。導電率測定前に、試料を真空 (10^{-6} トル) 下に 48 時間維持したときには、特有な急低下が非常に弱かったことに留意されたい。これらの観察結果から、 190°K を超えたときの導電率

の非常に急な低下およびその後の増大は、粒子間間隔を（蒸発が起こるまで）一時的に増大させた水の融解およびDNAの吸湿性に関連すると推断した。この仮説と一致して、0.3 M PBS緩衝液で湿らせた乾燥凝集体に関するSAXS測定値は、粒子間間隔の200%の増大（ $\sim 2\text{ nm}$ ）を示した。

【0357】

これらの研究は以下の理由から重要である。先ず、これらの研究は、DNAの分子認識特性を用いれば、ナノ粒子ベース材料を、不動態化したり、それらの離散構造または電気的性質を破壊せずに集合させ得ることを証明している。これらのDNA官能化粒子を用いて三次元巨視的集合体または、さらにリトグラフィパターン化構造（Pinerら, Science, 第283巻: 661-663 (1999年)）における電気的移動を研究しようとする場合、それらの電気的移動特性を正確に叙述することが絶対に必要である。第2に、これらの研究は、かなり長いリンカー間隔（ $8\sim 24\text{ nm}$ ）にわたって、乾燥集合体の導電率がDNAリンカー長には実質的に無関係であることを示している。これは、これらの実験において、水を除去したり、揮発性塩を用いたりした結果であると考えられる。確かに、溶媒および塩の除去によって創出された自由体積によって、DNAが表面に圧縮され、凝集体内の粒子が近接する。第3に、DNA保護ナノ粒子を有する凝集体は半導体として挙動するが、クエン酸塩安定化粒子から形成された膜は、不可逆的粒子融合および金属様挙動を示す。最後に、これらの結果は、オリゴヌクレオチドで官能化されたナノ粒子と標的DNAとの間の配列特異的結合事象が回路の閉鎖および導電率の急激な増大（すなわち、絶縁体から半導体へ）を起こすDNA診断用途におけるこれらの材料の使用を示している（次ぎの実施例参照）。 10 20

【0358】

実施例22： 金電極を用いた核酸の検出

金電極を用いた核酸検出法が図39に略図で示されている。Guoら, Nucleic Acids Res., 第22巻, 5456-5465ページ（1994年）の方法に従って、2つの金電極の間のガラス表面を、標的DNA3（ $5' \text{ TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG}$ [配列番号60]）と相補的な12merオリゴヌクレオチド1（ $3' \text{ NH}_2(\text{CH}_2)_7\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-\text{ATG}-\text{CTC}-\text{AAC}-\text{TCT}$ [配列番号59]）で修飾した。オリゴヌクレオチド2（ $5' \text{ SH}(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-\text{CGC}-\text{ATT}-\text{CAG}-\text{GAT}$ [配列番号50]）を作製し、実施例1および18に記載のように13nm金ナノ粒子に付着させて、ナノ粒子aを生成した。標的DNA3とナノ粒子aをデバイスに付加した。ガラス表面の色はピンク色に変わったが、これは、標的DNA-金ナノ粒子集合体がガラス基板上に形成されたことを示している。次いで、デバイスを0.3 M NaCl、10mM リン酸緩衝液中に浸漬し、 40°C で1時間加熱して、非特異的に結合したDNAを除去し、次いで、実施例19に記載のような銀染色溶液で5分間処理した。電極の抵抗は67k Ω であった。 30

【0359】

比較のために、電極間に、オリゴヌクレオチド1の代わりにオリゴヌクレオチド4を付着させて対照デバイスを修飾した。オリゴヌクレオチド4は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチド2と同じ配列（ $5' \text{ NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{O}(\text{PO}_2^-)\text{O}-\text{CGC}-\text{ATT}-\text{CAG}-\text{GAT}$ [配列番号50]）を有しており、ナノ粒子の結合を阻止するように標的DNA3に結合するであろう。その他の点では上記のようにテストを実施した。抵抗は、使用したマルチメーターの検出限度である40M Ω より高かった。 40

【0360】

この実験は、相補的標的DNA鎖のみがデバイスの2つの電極間にナノ粒子集合体を形成し、回路は、ナノ粒子のハイブリダイゼーションおよびその後の銀染色によって完成し得ることを示している。したがって、相補的DNAおよび非相補的DNAは、導電率を測定することにより識別し得る。この形式は、何千もの異なる核酸を同時にテストし得る何千対もの電極を用いた基板アレイ（チップ）にも適用範囲を広げ得る。

【0361】

実施例 23：環式ジスルフィドリンカーを用いたオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

この実施例では、調製が簡単で、広く有用で、メルカプトヘキシルリンカーを使用して調製した金-オリゴヌクレオチド共役体よりも DTT に対して大きな安定性を示す金-オリゴヌクレオチド共役体を与える、ステロイドジスルフィド 1a (図 42) に基づく金表面にオリゴヌクレオチドを結合させる新しい環式ジスルフィドリンカーについて説明する。1, 2-ジチアン-4, 5-ジオールのエステル誘導体は金表面上で単分子層を形成することが知られているため (Nuzzo ら、J. Am. Chem. Soc. 105, 4481-4483)、環式ジスルフィドを、アンカーユニットの反応部位として選択した。環式ジスルフィドは、両方の硫黄原子を介して立とうに表面に結合し (Ulman, A.、MRS Bulletin、6月46-51)、向上した安定性を示し得るキレート構造を与えるだろう。リンク要素としては、入手が容易で、容易に誘導退化されるケトアルコールであり、大きな疎水性表面を備えた置換体として、金の表面への水溶性分子の接近を選別するのに役立つよう期待されるため、エピアンドロステロンを選択した (Rettinger ら、J. Am. Chem. Soc. 115, 7535-7536-Bioconjugate Chem. 9, 826-830)。

10

【0362】

先の研究に使用していたオリゴヌクレオチド-金プローブを、水性緩衝液中で末端メルカプトヘキシル基を有するオリゴヌクレオチドを金ナノ粒子と反応させることによって調製した。該プローブは、驚くほど丈夫で、100℃まで加熱した後や5℃で3年間保存した後でさえ良好に機能することが分かった。しかしながら、本願発明者らは、この共役体が、金の表面から誘導体化したオリゴヌクレオチドを取り外すことで作用するチオールを含む溶液に浸漬させた時に、ハイブリダイゼーションプローブとしての活性を失うことを見出した。この特徴は、ナノ粒子プローブが、チオールを含む溶液 (例えばポリマーゼ酵素の安定化剤としてジチオスレイトール (DTT) を含む PCR 溶液) 中で使用される場合に、問題を提起する。

20

【0363】

(a) 一般法

NMR スペクトルを、溶媒として CDCl_3 、内部 (H) 標準として TMS、外部 (^3P) 標準として H_3PO_4 を使用して、500 MHz (^1H) および 400 MHz (^3P ; 161.9 MHz の獲得) Varian 分光計により記録した。化学シフトは δ ユニットで表される。MS データを Quattro II 三重四極子質量分析計により得た。自動オリゴヌクレオチド合成を、ミリジーン Expedite DNA/DNA 合成装置で行った。S の分析は、Oneida 研究サービスによって行われた。

30

【0364】

(b) ステロイド-ジスルフィドケタール (1a) の調製

合成スキームは図 43 に示される。エピアンドロステロン (0.5 g)、1, 2-ジチアン-4, 5-ジオール (0.28 g) および p-トルエンスルホン酸 (15 mg) をトルエン (30 mL) に溶かした溶液を、脱水条件下で 7 時間環流した (Dean Stark 装置)。その後、トルエンを、減圧下で除去し、残留物を酢酸エチルに溶解した。この溶液を水で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥し、シロップ条の残留物に濃縮した。これをペンタン/エーテル中に一晩静置すると、白色固体 (400 mg) として化合物 1a が得られた。Rf 値 (TLC、シリカプレート、溶離液としてエーテル) は 0.5 であった。比較として、同じ条件下でのエピアンドロステロンおよびの 1, 2-ジチアン-4, 5-ジオールの Rf 値は、それぞれ 0.4 および 0.3 である。ペンタン/エーテルからの再結晶により、白い粉末 (融点 110~112℃) を生じた。 ^1H NMR、 δ 3.6、(1H, C^3OH) 3.54-3.39 (2H, m ジチアン環の 2 OCH)、3.2-3.0 (4H, m 2 CH_2S)、2.1-0.7 (29H, m ステロイドの H)；質量スペクトル (ES^+) $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}_2$ (M+H) に対する計算値 425.2179、実測値 425.2151 ($\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{S}_2$) 分析 計算値 15.12、実測値 15

40

50

. 26。

【0365】

(c) ステロイドジスルフィドケタールホスホロアミダイト誘導体(1b)の調製
化合物1a(100mg)をTHF(3mL)に溶解し、ドライアイスアルコール浴で冷却した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(80μL)およびβ-シアノエチルクロロイソプロピルホスホルアミダイト(80μL)を連続して加えた。その後、混合物を室温まで温め、2時間攪拌し、酢酸エチル(100mL)と混ぜ、5%NaHCO₃水溶液で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥させ、干し上がるまで濃縮した。残留物を最小量のジクロロメタンに溶かし、ヘキサンを加えて-70℃で沈降させ、真空下で乾燥させ、100mgを生成した。; ³¹P NMR 146.02。

10

【0366】

(d) 5'修飾オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の調製

最後の垂リン酸化工程で化合物1b(図42)を使用した以外には、従来のホスホロアミダイト化学機構を使用して5'修飾オリゴヌクレオチドIc1およびIc2をCPG支持体上に構築した。生成物を、濃縮NH₄OHで16時間、55℃で処理することにより支持体から外した。オリゴヌクレオチドを、Hewlett Packard ODS Hypersilカラム(4.6×200nm、5μm粒径)を備えたDionex DX500システムで、TEAA緩衝液(pH7.0)と1%/分勾配の95%CH₃CN/5%0.03TEAAを1mL/分の流量で使用して、逆相HPLCにより精製した。疎水性ステロイド基の優れた特徴は、キャップされた誘導体が、キャップが外されたオリゴマーから楽に分離されることである。硫黄で誘導体化したオリゴヌクレオチドIIa、IIc1, およびIIc2(図43)を、市販の「5'-チオール修飾試薬」(C6Glen Research)と、以前に説明されたような(Storhoff、J. J. ら、J. Am. Chem. Soc. 120、1959-1964)硝酸銀によるトリチル保護基の解離とを使用して調製した。ジスルフィドIIc1の調製に関しては、「チオール修飾C6-S-S」(Glen Research)を最後の垂リン酸化に使用し、末端のジメトキシトリチル基を80%酢酸水溶液中で解離させた。

20

【0367】

各修飾オリゴヌクレオチドを、固定されたメルカプトヘキシル基を介したオリゴヌクレオチドの固定に使用された方法(Storhoffら(1998)J. Am. Chem. Soc. 120、1959-1964)により、~13nmの金ナノ粒子に固定化した。これは、クエン酸塩で安定化ナノ粒子(直径~13nm)を56時間末端硫黄置換基(HS-または非環式または環式ジスルフィド)を有するオリゴヌクレオチドを含む緩衝塩溶液に浸漬してから、0.1MまでのNaClを添加し、24時間静置することを含んでいた。ナノ粒子を遠心によってペレットにし、上澄溶液を除去した。ナノ粒子を洗浄し、緩衝液に再懸濁し、再び遠心し、0.1M NaCl、10mMリン酸塩に懸濁した。この方法により、装填プロセスに使用される過剰な硫化オリゴヌクレオチドのない、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を得られた。

30

【0368】

(e) ハイブリダイゼーション

ジスルフィドステロイドアンカーを含むナノ粒子-オリゴヌクレオチドプローブの一体性を評価するために、金ナノ粒子上の修飾オリゴヌクレオチドの固定により、プローブIc1、Ic2、IIc1、IIc2、およびIIIC1を作製した。与えたシリーズ中のオリゴマーは同じヌクレオチド配列を有するが、5'先端基Yの構造が異なっている。Ic1とIc2はステロイドジスルフィド先端基を有し; IIc1、IIc2はメルカプトヘキシル先端基を有し、IIIC1は非環式ジスルフィド先端基を有する。(dA)₂₀鎖はハイブリダイゼーションを促進するための、金とオリゴヌクレオチド認識部分との間のスペーサーとして機能する。硫黄で誘導体化されたオリゴマーの多くは各ナノ粒子に結合する。標的オリゴヌクレオチドとのナノ粒子プローブ対のハイブリダイゼーションは3次元のネットワークの生成と、および赤から青灰色への色の変化につながる(Muci

40

50

c, R. C. ら、J. Am. Chem. Soc. 120、12674-12675)。

【0369】

プローブのハイブリダイゼーションを、プローブに相補的な配列を含む79merオリゴヌクレオチド標的を用いて調べた。(図43)。その反応は、0.5MのNaCl、10mMリン酸塩(pH7.0)で、プローブ対Ic1、Ic2、およびIIc1、IIc2、およびIIIc1、IIIc2のコロイド溶液(各ナノ粒子プローブに関して50μLおよび1.0A₅₂₀ユニット)に1μLの標的溶液(10pmolのIV)を加えることにより、室温で行った。10秒、5分、および10分目に、アリコート(3μL)を取り、C-18逆相TLCプレート上にスポットした。様々なプローブ対はすべて同じに作用した。すなわち、10秒間の反応のスポットは赤くなり(ナノ粒子が自由であること示す)；10分間の反応のスポットは紺青灰色となり(ナノ粒子の凝集物の特徴)；5分間の反応は、赤茶けた青色のスポットを与えた(非結合ナノ粒子と結合ナノ粒子の混合物を示す)。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって達成されるナノ粒子の凝集に関する以前の観察と一致して(Storhoff, J. J. ら、J. Am. Chem. Soc. 120、1959-1964；Elghanian、Science、277、1078-1081；Mucic R. C. ら、J. Am. Chem. Soc. 120、12674-12675；Mitchell, G. P.、J. Am. Chem. Soc. 121、8122-8123)、反応は可逆的だった。凝集物を90℃(ナノ粒子を一緒にリンクするオリゴマーの解離温度を超える温度)に温め、熱いうちにスポットすると、赤いスポットが得られた。オリゴヌクレオチド標的を省略したかオリゴヌクレオチド標的がプローブに相補的でない対照実験では、すべての条件下で色が赤かった。

10

20

【0370】

本願発明者が結論づけるのは、ステロイドジスルフィドアンカーによって生成されたナノ粒子共役体が、ハイブリダイゼーションプローブとして有効に機能することである。さらに、スポット試験によって判断されるように、様々なアンカーユニットを備えた共役体が、かなりの割合で標的オリゴヌクレオチドと反応する。この特徴は、プローブが、ナノ粒子の表面にかなりの密度のオリゴヌクレオチドを有し、5'先端基から比較的遠くに離れているヌクレオチド認識部分を有するという予想と一致している。

【0371】

(f) ナノ粒子プローブとジチオスレイトールの反応

金ナノ粒子かメルカプトヘキシルオリゴヌクレオチドを装填した金ナノ粒子のコロイド溶液へのチオール追加は、ナノ粒子の凝集につながる。色は赤から紺青まで変化し、静置すると、暗色沈殿物が沈着する。蛍光標識したオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子の実験で実証されるように、チオールは、金表面に結び付けられたメルカプトアルキルオリゴヌクレオチドを置換する(Mucic、R. C. (1999) Synthetic Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA PhD論文、ノースウェスタン大学)。オリゴヌクレオチドナノ粒子共役体のハイブリダイゼーションによって起こった凝集とは対照的に、そのような反応は不可逆であり、加熱しても、NaOHを加えても、凝集物を分解することはできない。

30

【0372】

本願発明者らは、この色を、ステロイド環式ジスルフィド先端基、メルカプトヘキシル先端基、および非環式ジスルフィド先端基を用いて作製したプローブとDTTとの反応をモニタするために使用した。実験は、1μLの1M DTT溶液を、0.5M NaClおよび10mMリン酸塩(pH7.0)の100μLのナノ粒子オリゴヌクレオチドプローブ溶液(ナノ粒子の2A₅₂₀ユニット)に加え、次に、様々な時間に3μLのアリコートをTLCプレート上にスポットし、色を観察するにより行った。表1に示されるように、メルカプトヘキシル(IIc1とIIc2)と非環式オリゴヌクレオチド先端基(IIIc1)を備えたオリゴヌクレオチドに由来するコロイドプローブは、急速に反応した。赤青色のスポットが20秒で得られ、強い青色のスポットが5分以内に得られた。100分までに、ほとんどの金は沈殿した。対照的に、ステロイド環式ジスルフィド先端基(

40

50

I c 1、I c 2) を用いて作製したプローブの反応では、40分以内に、色の変化が観察されなかった。I I c 1、I I c 2を用いて作製したプローブで得られたのと同じ色に達するには100分かかった。I I I c 1では20秒かかった。これに基づいて、本願発明者らは、ステロイドジスルフィドプローブのD T Tとの反応速度は、他のプローブの反応速度の約300分の1であると推測する、非環式ジスルフィドアンカー3cから作製したプローブは、メルカプトヘキシルアンカーから作製したプローブとほぼ同じ速度で反応する。この後者の結果は、非環式ジスルフィドの金との反応がS-S結合の開裂に関与しているという証拠を考慮すれば、驚くことではない(Z h o n g、C. J. L a n g m u i r、15、518-525)。従って、非環式先端基を備えたオリゴヌクレオチドは、メルカプトヘキシル-オリゴヌクレオチド誘導体の場合のように、1つの硫黄原子によって恐らく金にリンクされるだろう。 10

【0373】

D T Tの存在下で静置した後に、I c 1およびI c 2から作製したプローブが実際にハイブリダイゼーションプローブとして依然として機能するかどうか確かめるために、本願発明者らは、表1の反応に使用した条件下でプローブ混合物の2つのサンプルをD T Tで処理した。30分後に、1 μ Lの79mer 標的オリゴヌクレオチド溶液(10 pmol)を加えた。サンプルを急速凍結し、解凍し、スポット試験によって測定した。標的を含むサンプルのスポットは青く、標的を欠く対照のスポットは赤かった。これは、ナノ粒子共役体が安定しているだけでなく、メルカプトヘキシルか線形ジスルフィドアンカー基に由来するプローブの凝集を生じさせる条件下でD T Tに暴露した後でプローブとして有効であることを実証した。 20

【0374】

【表10】

表1. D T Tとの金ナノ粒子プローブの反応によって生じた色

1c1 + 1c2	時間0	20秒	5分	40分	100分
	赤	赤	赤	赤	赤-青
IIc1+IIc2	赤	赤-青	青	青	(黒色沈殿)
IIIc1	赤	赤-青	青	青	(黒色沈殿)

30

(g) 結論

この環式ジスルフィドリンカーを用いて作られた金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、特定のオリゴヌクレオチド配列を検出するのに有効なプローブとして機能し、従来のメルカプトヘキシル基または非環式ジスルフィドユニットを用いて作製された対応する共役体よりも、ジチオスレイトールへのはるかに大きな安定性を示す。チオール不活性化に対する高い安定性は、少なくとも一部では、2つの硫黄原子によって各オリゴヌクレオチドを金に固定することに因ると考えられる。

【0375】

実施例24：単純な環式ジスルフィドリンカーを使用したオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製 40

この実施例では、本願発明者らは非ステロイド環式ジスルフィドリンカーと、このリンカーからオリゴヌクレオチド-ナノ粒子プローブとを調製し、ステロイド環式ジスルフィドとアルキルチオールリンカーにより調製されたプローブに対する、チオール含有溶液の存在下でのプローブ安定性を評価した。アルキルチオールアンカー基I (図44) [C. A. M i r k i n ら、N a t u r e、382、607 (1996) ; S t o r h o f f ら、J. Am. Chem. Soc. 120、1959年 (1998)] またはステロイド環式ジスルフィドアンカー基II (図44) [R. L. L e t s i n g e r ら、B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y、11、289 (2000)] を使用して金ナノ粒子にオリゴヌクレオチドを結合することにより、DNAまたはRNAの配列を検出するため 50

のプローブの調製方法が記載されている。プローブとしてステロイド環式ジスルフィドリンカーを使用して調製した共役体は、メルカプトエタノールやジチオスレイトール（D T T）のようなチオール化合物の存在下ではるかにより安定している点でアルキルチオールアンカーを使用して調製した共役体よりも遊離であることがわかった。検出するDNAサンプルを増幅するのに使用されるPCR溶液は、酵素を保護するために少量のD T Tを含んでいるため、この特徴は重要である。PCR産物の単純かつ迅速な検出の場合、最初に増幅されたDNAを分離せずにPCR溶液中で直接試験を行えるように、D T Tへの高い安定性を有するプローブを使用することが望ましい。

【0376】

2つの特徴がステロイド環式アンカー（化合物1、図42）を際だたせている。すなわち、（1）環式ジスルフィド（金表面で所与オリゴヌクレオチドを保持するのに共同的に作用する2つの結合部位を原則的に与えることができる）と、（2）疎水的相互作用により金上の隣接鎖を安定させることが可能なステロイドユニット（例えばR. L. L e t s i n g e rら、J. A m. C h e m. S o c. 115, 7535（1993）参照）である。それらの寄与の重要性を評価するために、本願発明者らは、ステロイド基を欠く環式ジスルフィド化合物I I I c（図44）によって固定された金共役体を調製し、調べた。

【0377】

トランス-1, 2-ジチアン-4, 5-ジチオールを、トルエン中でアセトールと加熱することにより調製した化合物2 aを、シアノエチルN, N-ジ-*i*-プロピルホスホロアミダイト試薬2 bに変換した。該試薬2 bは、修飾オリゴヌクレオチド2 c 1および2 c 2の合成の最終結合ステップに使用した。1つの金共役体プローブを、2 c 1および等モル量の2 dで金コロイド溶液を処理することにより調製した。2 dは金表面上の希釈剤として機能する。コンパニオンプローブを、2 c 2および2 dから同様に作製した。これらのナノ粒子共役体は、静置と、凍結・融解との両方に関して、塩化ナトリウム溶液の0.1、0.3、0.5、0.7 Mの範囲で安定していた。

【0378】

（a）化合物2 a、2 b、2 c 1、2 c 2の調製

実施例23に記述したように化合物2 aを調製した。2 aの垂リン酸化とオリゴヌクレオチド2 c 1および2 c 2の合成を、実施例23や他の箇所でステロイド環式ジスルフィド誘導体に関して先に述べたように行った[R. L. L e t s i n g e rら、B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y、11、289（2000）、この文献の開示は引用によりその全体が組み込まれる]。C P G支持体上のオリゴマーにI I I bを縮合することに関与するステップの反応時間は、10分であった。

【0379】

（b）金-オリゴヌクレオチド共役体の調製

1.7 μ mol/mLの各オリゴヌクレオチドを含む溶液を提供するために、等モル量のオリゴヌクレオチド2 c 1および2 dまたは2 c 2および2 dを13 nmの金コロイド（ $\sim$ 10 nM）に加えた。該溶液を暗所で24時間保存し、その後、塩類を加えて、該溶液を0.3 M NaCl、10 mM リン酸塩（pH 7.0）、0.01%アジ化ナトリウムとなるようにした。24時間後に、NaCl濃度を0.8 Mに増大し、溶液をさらに24時間静置した。その後、凝集物を除去するためにコロイドをろ過し、溶液を遠心してナノ粒子を集める。ペレットを、ナノピュア水で洗浄し、再び遠心し、0.1 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）、0.01%アジ化ナトリウムに再分散した。

【0380】

（c）ナノ粒子プローブとジチオスレイトールの反応

置換の研究は、20 μ Lの2 c 1と2 c 2から得たコロイド共役体の等量混合物に、2 μ Lの0.1 M D T Tを加えることにより、室温（22 $^{\circ}$ C）で行った。アリコート（3 μ L）を定期的に取り、白いナイロン膜上にスポットした。最初、スポットは赤かった。D T Tによる金からのオリゴヌクレオチド硫黄誘導体の置換により、スポット試験で青灰色のスポットを与える混合物が生じた。D T Tによる置換の時間を、混合物がスポット試験

10

20

30

40

50

で強い青灰色を与える時間として採用した。2 c 1 および 2 c 2 に由来する共役体の混合物の場合、この時は 10 時間だった。

【0381】

比較のために、オリゴヌクレオチド共役体を、同様にメルカプトヘキシルアンカー（化合物 2、図 4 2）およびステロイド環式ジスルフィドアンカー（化合物 1、図 4 2）を使用して、オリゴヌクレオチド配列 c 1 および c 2（図 4 4）から調製した。青灰色のスポットを与える時間によって測定される、単チオール誘導体（2 および図 4 2）およびステロイド環式ジスルフィドから調製した共役体の反応時間は、それぞれ 5 分と 53 時間であった。これらの値は、メルカプトアルキル誘導体、非ステロイド環式ジスルフィドおよびステロイド環式ジスルフィドに由来するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体に対する相対安定性の 1、～60、～300 に対応する。結果は、環式ジスルフィドアンカーユニット自体が、これらの系でメルカプトアルキル基に対して高い安定性を与えるのに十分であることを示す。化合物 1 に由来するナノ粒子共役体中の大きな疎水基も、オリゴヌクレオチドのチオール置換に対して安定性を増強するのに役割を果たしているように思われる。

10

【0382】

実施例 25：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

この実施例では、本願発明者らは、チオール含有溶液の存在下での、アルキルチオールおよびステロイド環式ジスルフィドリankerと比較した、新しい非環式ジスルフィドリankerであるトリチオールの安定性を評価した。比較のために、メルカプトヘキシルアンカー（化合物 5、図 4 5）およびステロイド環式ジスルフィドアンカー（化合物 6、図 4 5）を備えたオリゴヌクレオチドを調製した。

20

【0383】

（a）5'-トリメルカプトアルキルオリゴヌクレオチドの合成および特徴付け

図 4 7 に示したように、5'-トリメルカプトアルキルチオールオリゴヌクレオチドを合成した。Trembler ホスホロアミダイト 7（Glenn Research 社、バージニア州スターリング）（図 4 5）およびチオール修飾剤 C6-S-S ホスホロアミダイトを、CPG 支持体に結合された保護オリゴマーの 5' 端に逐次結合した。生成物を CPG から解離し、上述のように精製した。3 つの DMT 基を備えたトリチオールオリゴヌクレオチドに対する保持時間は、約 64 分である。続いて、5'-DMT 基を、80% 酢酸に 30 分間オリゴヌクレオチドを溶解し、その後蒸発により取り外した。オリゴヌクレオチドを 500 μ L のナノピュア水に再溶解した、溶液を酢酸エチル（3 $\times$ 300 μ L）で抽出した。溶媒の蒸発後、オリゴヌクレオチドを白色固体として得られた。DMT 基がないこの 5'-トリジスルフィドオリゴヌクレオチドの保持時間は、逆相カラムで約 35 分であり、イオン交換カラムでは 24 分であった。これらのピークはいずれもスペクトル面積の 97% 以上であり、オリゴヌクレオチドが高純度であることを示している。オリゴヌクレオチド 8（図 4 5）の式量を、エレクトロスプレー MS（計算値 12242.85、実測値 12244.1）により得た。DNA 鎖上の 3 つのジスルフィド基を 5' モノチオール DNA に対して上述したようにトリチオール基に還元し、その後、NAP-5 カラムでオリゴヌクレオチドを精製した。

30

【0384】

（b）5'-チオールまたはジスルフィド DNA 修飾金ナノ粒子の調製

ベクター研究所（カリフォルニア州 Burlingame）より購入した金のナノ粒子を使用した。10 mL の 30 nm 金コロイドに、5 OD のチオール修飾 DNA を添加した。溶液を、徐々に 0.3 M NaCl / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7）（PBS）にした。その後、ナノ粒子を遠心によって沈降させた。無色の上清を除去した後、赤色の油状沈殿物を 10 mL の新しい PBS 緩衝液に再分散した。このプロセスを繰り返すことにより、コロイドを 10 mL の新しい PBS 緩衝液を用いて 2 回洗浄した。

40

【0385】

（c）チオール-DNA 修飾金ナノ粒子の安定性試験

固体の DTT を、DTT 濃度が 0.017 M となるまで、様々な種類のチオールまたはジ

50

スルフィドDNAで修飾した30nm金ナノ粒子コロイドの600μL溶液に加えた。D
T Tがオリゴヌクレオチドを置換するにつれて、コロイドの色は赤から青に代わる。UV
／VISスペクトルを時間の関数として取った。分散した30nm金粒子に関連する～5
28nmの吸光度は減少し始め、700nmの広幅のバンドが伸び始めた。700nmの
バンドはコロイドの凝集に関連している。図48に示されるように、1つのチオールオリ
ゴヌクレオチド(1)で修飾した30nm金の粒子は、0.017M D T Tで迅速に凝
集物を形成し、1.5時間後にはコロイドが完全に青くなる。ジスルフィドオリゴヌクレ
オチド(4)で修飾したナノ粒子を含む溶液は、同一条件下では20時間後に青くなる。
トリチオールオリゴヌクレオチド(開裂した6)で修飾したナノ粒子では、溶液が青く
なるのに40時間かかった。

10

【0386】

本明細書に引用した特許、特許出願および参考文献はすべて、引用によりその全体が組み
込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】相補的オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を結合させることによるナノ
粒子凝集体の形成を示す略図。ナノ粒子は、相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼ
ーションの結果として凝集体をなして結合している。Xは、 $(-S(CH_2)_3OP(O)(O^-)-)$ (ここで、Sは金ナノ粒子に接合している)などの)任意の共有結合アンカ
ーを表す。図1および後続のいくつかの図面では、分かり易くするために、各ナノ粒子に
は単一のオリゴヌクレオチドしか付着していないように示されているが、実際には、各ナ
ノ粒子には、いくつかのオリゴヌクレオチドが付着している。また、図1および後続図面
において、金ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとの相対サイズは正確な縮尺率では描かれて
いない点に留意することが重要である。

20

【図2】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いて核酸を検出する系を示す略
図。2つのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、示されている一本鎖DNAの2つの異なる
部分に対して相補的な配列を有している。その結果、これらのオリゴヌクレオチドがD
NAとハイブリダイズすると、(凝集体を形成し、変色を起こす)検出可能な変化が生じ
る。

【図3】図2に示されている系の変型の略図。2つのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは
、示されているナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとは相補的でない第3部分によって分離
された一本鎖DNAの2つの異なる部分に対して相補的な配列を有している。一本鎖DNA
の非相補的部分とのハイブリダイズに用い得る任意のフィラーオリゴヌクレオチドも示
されている。DNA、ナノ粒子およびフィラーオリゴヌクレオチドを合わせると、ナノ粒
子は、切れ目が入った(nicked)二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを形成して凝
集する。

30

【図4】連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションおよびデハイブリダイゼー
ションの結果としての、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子の可逆的凝集を示す
略図。例示されている連結オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレ
オチドと相補的なオーバーハング末端(付着末端)を有する二本鎖DNAである。

【図5】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子とナノ粒子に付着しているオリゴヌ
クレオチドに対して相補的な配列を有する連結オリゴヌクレオチドとを合わせることによ
るナノ粒子凝集体の形成を示す略図。

40

【図6A】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している2つの種類の金コロイドと
、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オ
リゴヌクレオチドとが入ったキュベット(図4参照)。キュベットAー連結DNAのTm
を超える80℃;デハイブリダイズ(熱変性)した。色は暗赤色。

【図6B】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している2つの種類の金コロイドと
、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オ
リゴヌクレオチドとが入ったキュベット(図4参照)。キュベットBーリンカーDNAの
Tmより低い室温に冷却後。ハイブリダイゼーションが起って、ナノ粒子は凝集したが、

50

凝集体は沈殿しなかった。色は紫色。

【図 6 C】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している 2 つの種類の金コロイドと、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オリゴヌクレオチドとが入ったキュベット（図 4 参照）。キュベット C 室温下に数時間後、凝集したナノ粒子はキュベットの底に沈殿した。溶液は清澄で、沈殿物はピンクがかった灰色。B または C を加熱すると A が生じる。

【図 7】図 4 に示されているように、オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子が温度を下げると連結オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたために凝集するときの吸光度の変化を示す吸光度対波長（nm）のグラフ。

【図 8 A】図 4 に示されている系に関する吸光度対温度／時間の変化のグラフである。低温下、オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子は、連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより凝集する（図 4 参照）。高温（80℃）下で、ナノ粒子はデハイブリダイズする。経時的な温度の変化は、これが可逆的プロセスであることを示している。 10

【図 8 B】修飾していない金ナノ粒子の水溶液を用いて図 8 A と同じ方法で実施した吸光度対温度／時間における変化のグラフである。図 8 A に見られた可逆的变化は観測されない。

【図 9 A】透過型電子顕微鏡（TEM）画像。金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより結合した凝集金ナノ粒子の TEM 画像である。 20

【図 9 B】透過型電子顕微鏡（TEM）画像。結合したナノ粒子の順序づけ（ordering）を示す二次元凝集体の TEM 画像である。

【図 10】ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフを有するナノ粒子間の熱安定性三本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの形成を示す略図。このような三本鎖コネクタは、二本鎖コネクタより剛性が大きい。図 10 において、一方のナノ粒子には、全てがプリンからなるオリゴヌクレオチドが付着しており、他方のナノ粒子には、全てがピリミジンからなるオリゴヌクレオチドが付着している。（ナノ粒子には付着していない）三本鎖コネクタを形成するための第 3 オリゴヌクレオチドはピリミジンからなる。

【図 11】相補的オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を合わせることによるナノ粒子凝集体の形成を示す略図であり、ナノ粒子は、相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの結果として凝集体をなして結合している。図 11 において、丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、s はチオールキルリンカーである。2 種類のナノ粒子上の多数のオリゴヌクレオチドは、互いにハイブリダイズして凝集体構造を形成し得る。 30

【図 12 A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 3 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 12 B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体 1 および 2 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。 40

【図 12 C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 4 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 12 D】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 5 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。 50

【図 1 2 E】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 6 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 1 2 F】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 7 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 1 3 A】ナノ粒子および透明基板を用いた DNA (検体 DNA) 検出系を示す略図である。

10

【図 1 3 B】ナノ粒子および透明基板を用いた DNA (検体 DNA) 検出系を示す略図である。

【図 1 4 A】オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子 (その 1 つの集団は溶液中にあり、1 つの集団は図 1 3 B に示されているような透明基板に付着している) が連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより凝集したときの吸光度の変化を示す吸光度対波長 (nm) のグラフである。

【図 1 4 B】温度の増大 (融解する) に従った、図 1 4 A に示されているハイブリダイズした系に関する吸光度の変化のグラフである。

【図 1 5 A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

20

【図 1 5 B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 3 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

【図 1 5 C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 4 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

【図 1 5 D】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 5 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

30

【図 1 5 E】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 6 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

【図 1 5 F】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 7 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

40

【図 1 5 G】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 8 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

【図 1 6 A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、長さが異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールアルキルリンカーを表す。

【図 1 6 B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図

50

。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、長さが異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールキリンカーを表す。

【図 16C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、長さが異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、S はチオールキリンカーを表す。

【図 17A】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い 2 本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（a は a' と相補的、b は b' の相補的である、など）を示す。

10

【図 17B】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い 2 本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（a は a' と相補的、b は b' の相補的である、など）を示す。

【図 17C】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い 2 本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（a は a' と相補的、b は b' の相補的である、など）を示す。

20

【図 17D】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い 2 本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（a は a' と相補的、b は b' の相補的である、など）を示す。

【図 17E】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い 2 本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（a は a' と相補的、b は b' の相補的である、など）を示す。

30

【図 18】リポソーム（大きい二重丸）、ナノ粒子（小さい白丸）および透明基板を用いた核酸検出系を示す略図。黒い四角はコレステリル基を表し、ねじれ線はオリゴヌクレオチドを表し、梯子は二本鎖（ハイブリダイズした）オリゴヌクレオチドを表す。

【図 19A】金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が図 13A に示されているような透明基板上の多重層として集合したときの吸光度の変化を示す吸光度対波長（nm）のグラフである。

【図 19B】温度の増大（融解）に従った図 19A に示されているハイブリダイズした系に関する吸光度の変化のグラフである。

40

【図 20A】金属もしくは半導体消光ナノ粒子（図 20A）に付着している蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた計画の略図。

【図 20B】非金属、非半導体粒子（図 20B）に付着している蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた計画の略図。

【図 21】オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子および蛍光標識オリゴヌクレオチドが付着しているラテックスミクロスフェアを用いた標的核酸検出系を示す略図。小さい黒丸はナノ粒子を表し、大きい白丸はラテックスミクロスフェアを表し、大きい楕円は微孔質膜を表す。

【図 22】2 つの種類の蛍光標識オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を用いた標的核酸検出系を示す略図。黒丸はナノ粒子を表し、大きな楕円は微孔質膜を表す。

50

【図 2 3】炭疽菌保護抗原（実施例 1 2 参照）用アッセイに利用される材料の配列。

【図 2 4】オリゴヌクレオチド（直線）が付着している磁気ナノ粒子（黒球）、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチド（直線）を含む「サテライトプローブ」を用いた標的核酸検出系を示す略図であり、プローブオリゴヌクレオチドはレポーター基（白四角）で標識されている。A、B、C、A'、B'、およびC'は、特異的ヌクレオチド配列を表し、A、BおよびCはそれぞれ、A'、B'およびC'と相補的である。

【図 2 5 A】ナノ粒子と透明基板を用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、bおよびcは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'およびc'は、それぞれa、bおよびcと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

10

【図 2 5 B】ナノ粒子と透明基板を用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、bおよびcは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'およびc'は、それぞれa、bおよびcと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 6】CdSe/ZnSコア/シェル量子ドット（QD）の集合体を形成する系を示す略図。

【図 2 7】（A）は、400nmでの励起で、分散QDと凝集QDを比較する蛍光スペクトルを示している。試料は同じように調製したが、但し、一方には相補的「リンカー」DNAを付加し、他方には等量、等濃度の非相補的DNAを付加した。（B）は、「融解」の前、間および後の異なる温度下のQD/QD集合体のUV-可視スペクトルを示している。図中の挿入図は、集合体の熱変性に関する温度対消光プロファイルを示している。変性実験は、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液（pH7）、0.01%アジ化ナトリウム中、13nmの金ナノ粒子および／または～4nmのCdSe/ZnSコア/シェルQDを用いて実施した。（C）は、ハイブリッド金/QD集合体の一部の高解像度TEM画像を示している。指紋に似たQDの格子干渉縞が各金ナノ粒子の近くに見える。

20

（D）は、「融解」の前、間および後の異なる温度下のハイブリッド金/QD集合体のUV-可視スペクトルを示している。図中の挿入図は、集合体の熱変性に関する温度対消光プロファイルを示している。変性実験は、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液（pH7）、0.01%アジ化ナトリウム中、13nmの金ナノ粒子および／または～4nmのCdSe/ZnSコア/シェルQDを用いて実施した。

【図 2 8 A】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、cおよびdは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c'およびd'はそれぞれ、a、b、cおよびdと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

30

【図 2 8 B】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、cおよびdは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c'およびd'はそれぞれ、a、b、cおよびdと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 8 C】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、cおよびdは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c'およびd'はそれぞれ、a、b、cおよびdと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

40

【図 2 8 D】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、cおよびdは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c'およびd'はそれぞれ、a、b、cおよびdと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 8 E】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いたDNA検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、cおよびdは、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c'およびd'はそれぞれ、a、b、cおよびdと相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 9】メルカプトエタノールによる、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子（

50

黒丸) または金薄膜 (白四角) からのオリゴヌクレオチドの置換分率のグラフ。

【図 3 0】 ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の調製に使用される、様々な認識オリゴヌクレオチド: 希釈剤オリゴヌクレオチド比に対して得られた、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの表面被覆範囲のグラフ。

【図 3 1】 ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの様々な表面被覆範囲に対する、ハイブリダイズした相補的なオリゴヌクレオチドの表面被覆範囲のグラフ。

【図 3 2】 ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体および銀染色法による増幅を用いた基板上の 4 素子アレイ中の標的 DNA を検出する系を示す略図。

【図 3 3】 平台型スキャナを用いて得た、7 mm × 13 mm のオリゴヌクレオチド官能化フロートガラススライドの画像。(A) DNA 標的と金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズする前のスライド。(B) 10 nM の標的 DNA と 5 nM のナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズした後のスライド A。ピンク色は赤い直径 13 nm 金ナノ粒子が付着したためである。(C) 銀増幅溶液に 5 分間暴露した後のスライド B。(D) (A) と同じ。(E) 100 pM の標的と 5 nM のナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズした後のスライド D。ナノ粒子層の吸光度は低過ぎて肉眼または平台型スキャナで観測できなかった。(F) 銀増幅溶液に 5 分間暴露した後のスライド E。スライド F はスライド C よりはるかに明るく、これは、標的濃度が低いことを示している。(G) 5 nM のナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体に暴露し、かつ銀増幅溶液に 5 分間暴露した対照スライド。スライドの黒ずみは観測されなかった。

【図 3 4】 種々の濃度の標的 DNA に暴露した後、5 nM の金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体に暴露し、銀増幅溶液に 5 分間暴露した、オリゴヌクレオチド官能化ガラス表面のグレースケール (光学密度) のグラフ。

【図 3 5】 (A) は、発蛍光団で標識した標的のオリゴヌクレオチド官能化ガラス表面からの解離を示すハイブリダイズ標的 % 対温度のグラフ。(B) は、ナノ粒子で標識した標的 (図 3 5 B) のオリゴヌクレオチド官能化ガラス表面からの解離を示すハイブリダイズ標的 % 対温度のグラフ。図 3 5 A および B において、測定は、ガラス表面上の溶液中の解離した標識の蛍光 (図 3 5 A) および吸光度 (図 3 5 B) を測定して実施した。「b」と標示された線は、ガラス上の完全対合オリゴヌクレオチドの解離曲線を示し、「r」と標示されている線は、ガラス上の誤対合オリゴヌクレオチド (1 塩基誤対合) の曲線を示している。グラフ中の垂線は、各測定に関して所与の温度 (各曲線の融解温度 T_m の中間) で解離した標的分画および発蛍光団およびナノ粒子ベース遺伝子チップに関する予測された配列同定選択率を示している。蛍光 (図 3 5 A): 相補体 (69%) / 誤対合 (38%) = 1.8 : 1。吸光度 (図 3 5 B): 相補体 (85%) / 誤対合 (14%) = 6 : 1。発蛍光団標識曲線 (図 3 5 A) の幅は、発蛍光団標識標的の遺伝子チップからの解離に特徴的なものである (Forman ら, Molecular Modeling of Nucleic Acids, Leontis ら編 (ACS Symposium Series 682, American Chemical Society, Washington, D. C., 1998 年), 206-228 ページ)。

【図 3 6 A】 合成標的および蛍光標識ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体プローブで攻撃したモデルオリゴヌクレオチド配列の画像。

【図 3 6 B】 ナノ粒子標識ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体プローブで攻撃したモデルオリゴヌクレオチド配列の画像。図 3 6 A および B において、C、A、T および G は、基板に付着しているオリゴヌクレオチドに 1 単塩基変化が起こって標的との完全対合 (塩基 A) または 1 塩基誤対合 (塩基 A との完全対合の代わりに塩基 C、T または G) をもたらした配列上のスポット (要素) を表している。要素 C : A : T : G のグレースケール比は、図 3 6 A に関しては 9 : 37 : 9 : 11、図 3 6 B に関しては 3 : 62 : 7 : 34 である。

【図 3 7】 連結核酸 (3) を介して結合したナノ粒子 (a および b) の凝集体 (A) または層 (B) を形成する系を示す略図。

【図 3 8 A】相補的リンカー 3 を介してオリゴヌクレオチド官能化ガラス製顕微鏡スライドにハイブリダイズした金ナノ粒子の a と b の交互層（図 3 7 参照）の UV-可視スペクトル。これらのスペクトルは、1（a、 $\lambda_{max} = 524 \text{ nm}$ ）、2（b、 $\lambda_{max} = 529 \text{ nm}$ ）、3（c、 $\lambda_{max} = 532 \text{ nm}$ ）、4（d、 $\lambda_{max} = 534 \text{ nm}$ ）または 5（e、 $\lambda_{max} = 534 \text{ nm}$ ）層を有する集合体に関する。これらのスペクトルは、スライドを介して直接測定した。

【図 3 8 B】層の数の増大に伴うナノ粒子集合体（図 3 8 A 参照）の λ_{max} での吸光度のグラフ。

【図 3 9 A】DNA リンカーと共にオリゴヌクレオチド官能化導電性インジウムスズーオキシド（ITO）スライド（オリゴヌクレオチド官能化ガラススライドと同じ方法で作製）に同時ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の 1 つの層の FE-SEM。このスライドの可視吸光度スペクトルは、図 3 8 A と同一であったが、これは、ITO 上の官能化およびナノ粒子被覆面積がガラス上のものと類似であることを示している。10 枚のそのような画像から計数したナノ粒子の平均密度は約 800 ナノ粒子/ μm^2 であった。

【図 3 9 B】ITO スライド上の 2 つのナノ粒子層の FE-SEM 画像。10 枚のそのような画像から計数したナノ粒子の平均密度は約 2800 ナノ粒子/ μm^2 であった。

【図 3 9 C】0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液（pH 7）中の一本鎖とのオリゴヌクレオチド二本鎖分子（1 + 2 + 3；図 3 5 A 参照）の 0.5 μM 溶液の解離を示す 260 nm (A_{260}) の吸光度。

【図 3 9 D】0.3 M NaCl、10 mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの 1 層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す 260 nm (A_{260}) の吸光度。

【図 3 9 E】0.3 M NaCl、10 mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの 4 層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す 260 nm (A_{260}) の吸光度。

【図 3 9 F】0.3 M NaCl、10 mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの 10 層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す 260 nm (A_{260}) の吸光度。図 D ~ F に関して、温度の増大に従って減少するスライドを介した 520 nm (A_{520}) での吸光度を測定して融解プロファイルを得た。図 3 9 D - F それぞれの挿入図は、測定した解離曲線の一次導関数を示している。これらの曲線の FWHM は、（図 3 9 C の挿入図）13.2 °C、（図 3 9 D の挿入図）5.6 °C、（図 3 9 E の挿入図）3.2 °C、（図 3 9 F の挿入図）2.9 °C であった。

【図 4 0】DNA を介して結合している金ナノ粒子集合体の電気的性質の測定に用いられる系を示す略図。分かり易くするために、単一のハイブリダイゼーション事象のみが描かれている。

【図 4 1】金電極および金ナノ粒子を用いた核酸検出法を示す略図。

【図 4 2】オリゴヌクレオチドをナノ粒子に連結する際に使用されるステロイド部分を有する好ましい化合物 1 を含む、環式ジスルフィド 1 の構造を例証する略図。ステロイドジスルフィド分子は、4,5-ジヒドロキシー-1,2-ジチアンをエピアンドロステロンと縮合することにより得られる。金のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、ステロイドジスルフィドにより修飾したオリゴヌクレオチドを使用して調製され、その調製用にオリゴヌクレオチド-メルカプトヘキシルリンカーを使用したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と比べて、DTT に対するより大きな安定性を示す。

【図 4 3】ステロイド環式スルフィドアンカー基に対する合成と化学式を示す略図。

【図 4 4】実施例 2 4 に説明したオリゴヌクレオチド環式ジスルフィドリリンカーの調製に使用される化学式 2 の環式ジスルフィドと、アンカー基として使用される同様な関連環式ジスルフィドを示す略図。

【図 4 5】実施例 2 5 に記述した構造を示す略図。図 4 5 (a) は、5'-モノチオール-修飾オリゴヌクレオチド 5、35 塩基 5'-ステロイドジスルフィドオリゴマー 6、T

10

20

30

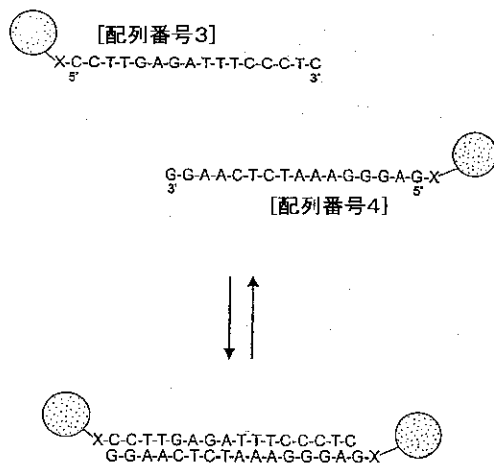
40

50

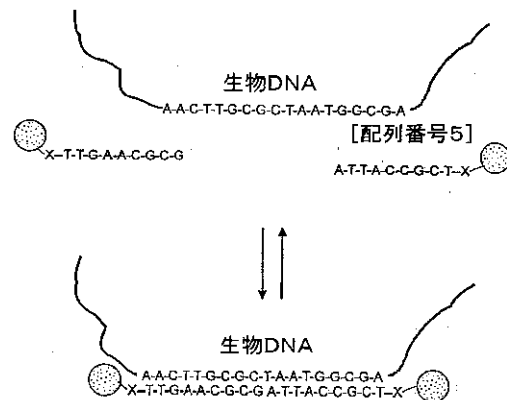
rembler ホスホルアミド 7、および 5-トリメルカプトアルキルオリゴヌクレオチド 8 を示す。

【図 46】新規トリチオールオリゴヌクレオチドを作製する化学的機構を示す略図。

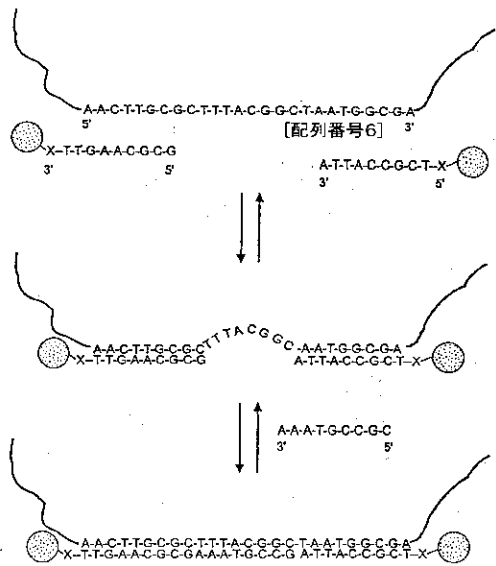
【図 1】



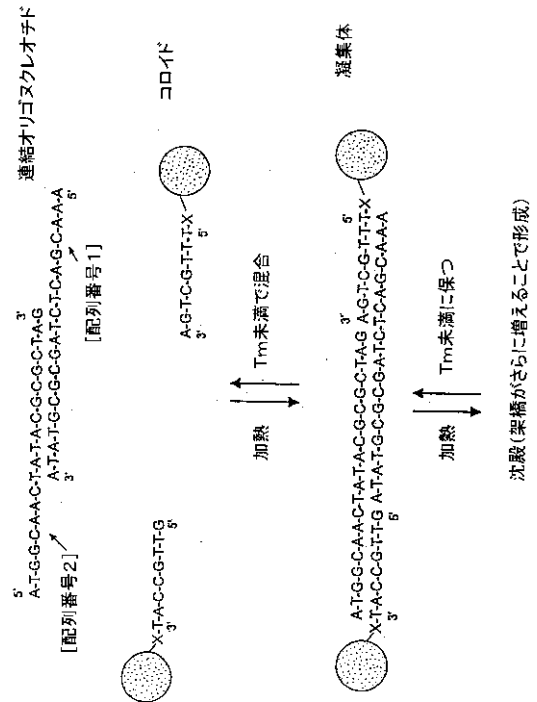
【図 2】



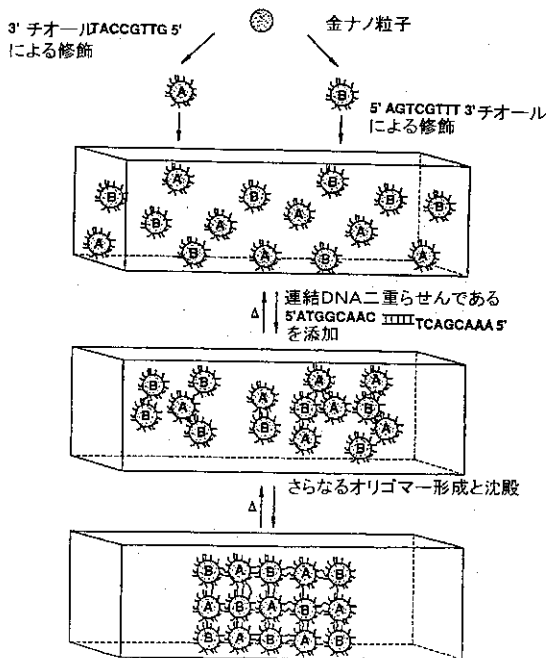
【 図 3 】



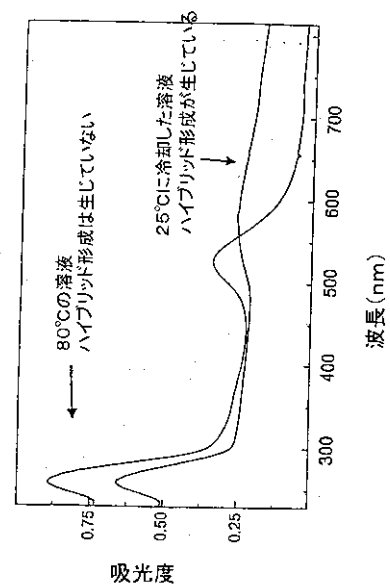
【図 4】



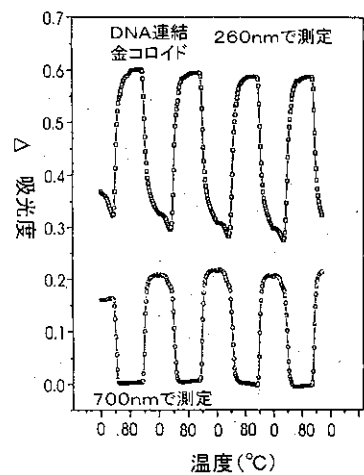
【 図 5 】



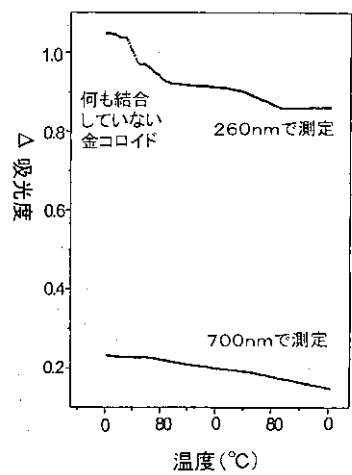
【图 7】



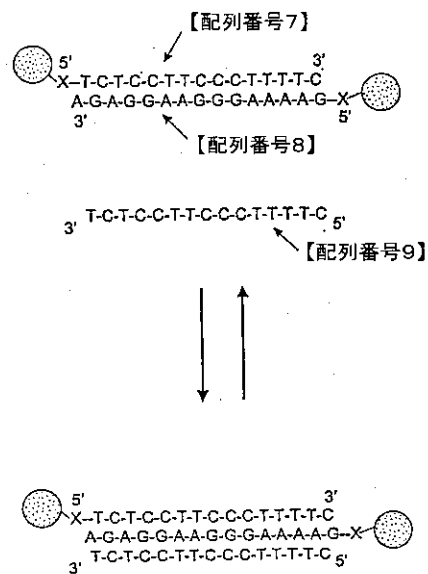
【図 8 A】



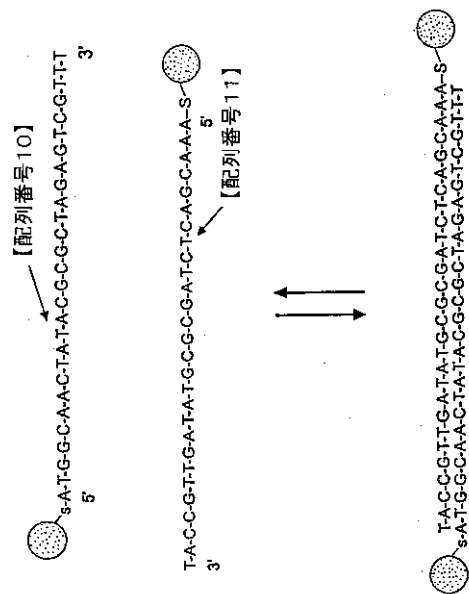
【図 8 B】



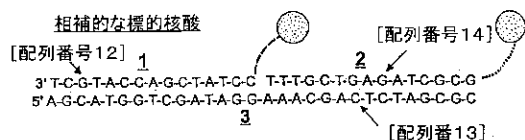
【図 10】



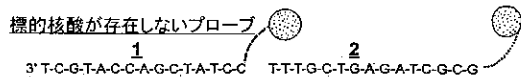
【図 11】



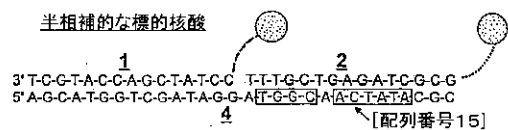
【図 1 2 A】



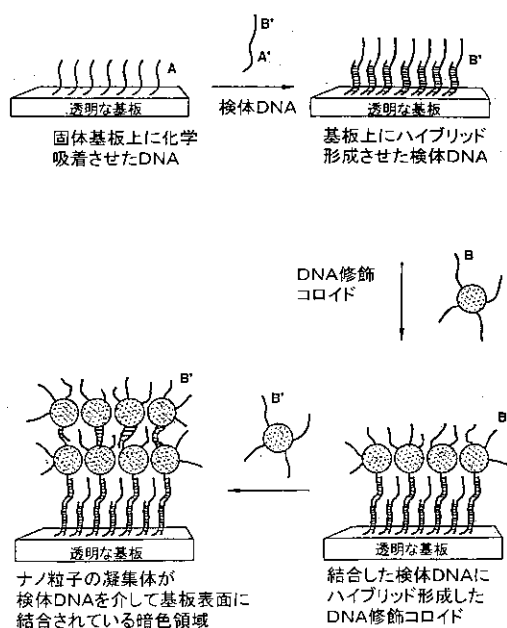
【図 1 2 B】



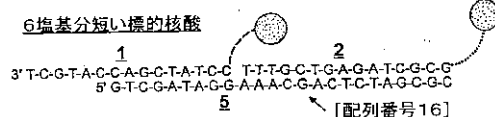
【図 1 2 C】



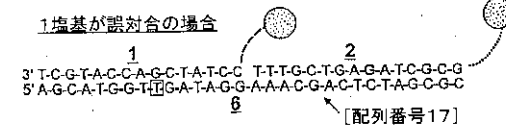
【図 1 3 A】



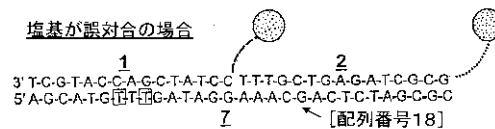
【図 1 2 D】



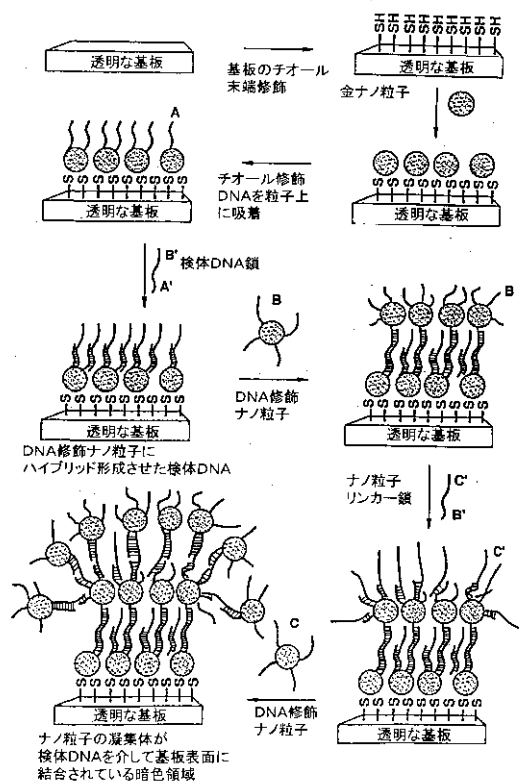
【図 1 2 E】



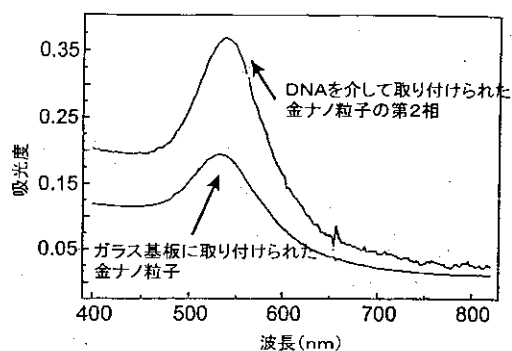
【図 1 2 F】



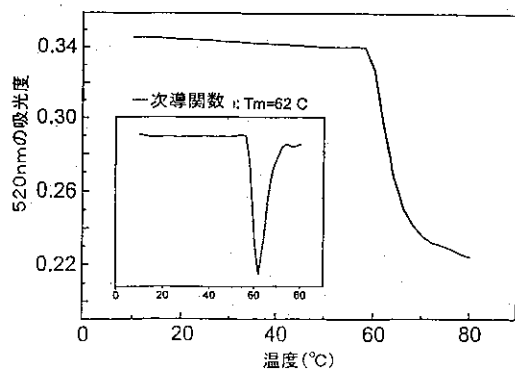
【図 1 3 B】



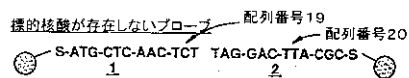
【図 1 4 A】



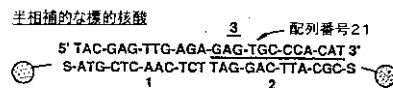
【図 1 4 B】



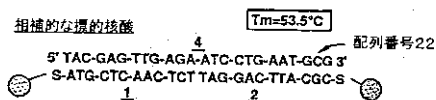
【図 1 5 A】



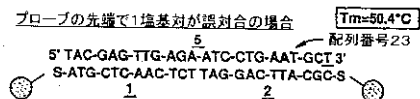
【図 1 5 B】



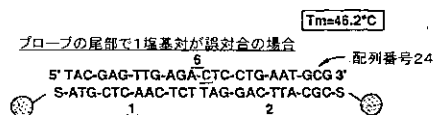
【図 1 5 C】



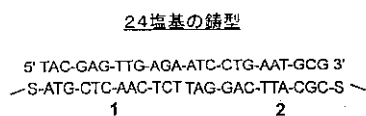
【図 1 5 D】



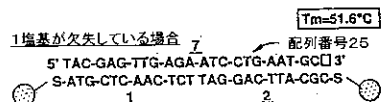
【図 1 5 E】



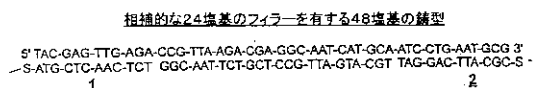
【図 1 6 A】



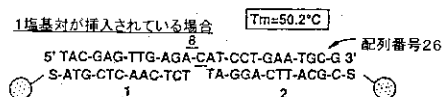
【図 1 5 F】



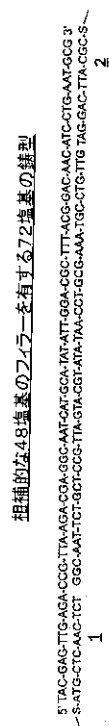
【図 1 6 B】



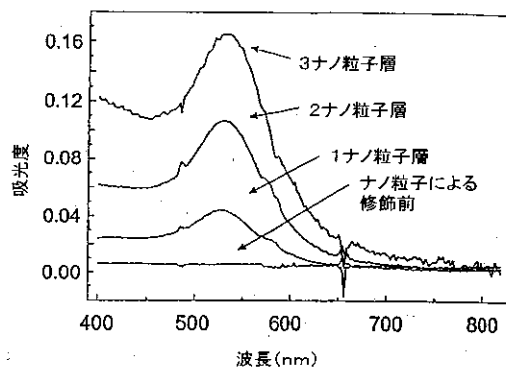
【図 1 5 G】



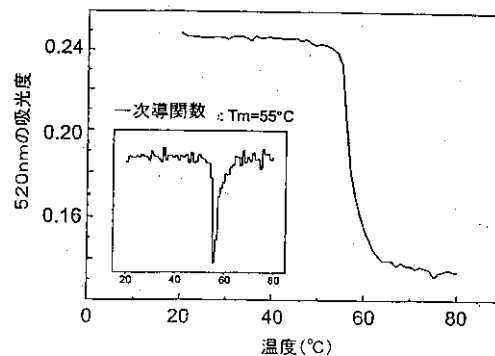
【図 16 C】



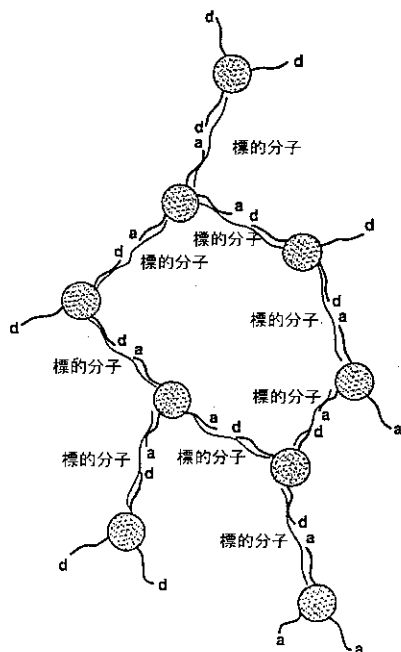
【図 19 A】



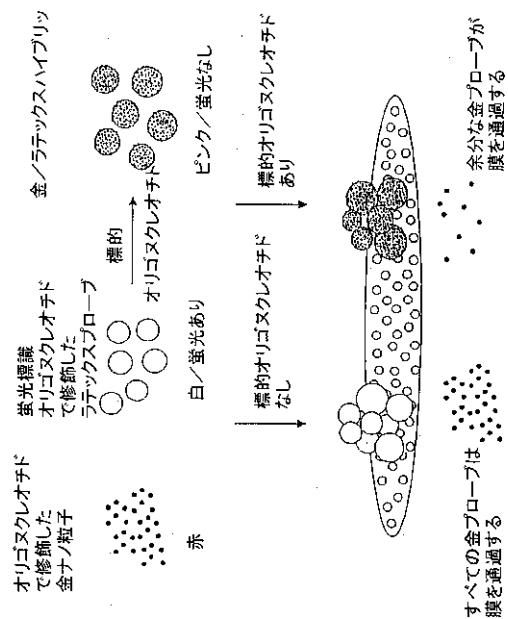
【図 19 B】



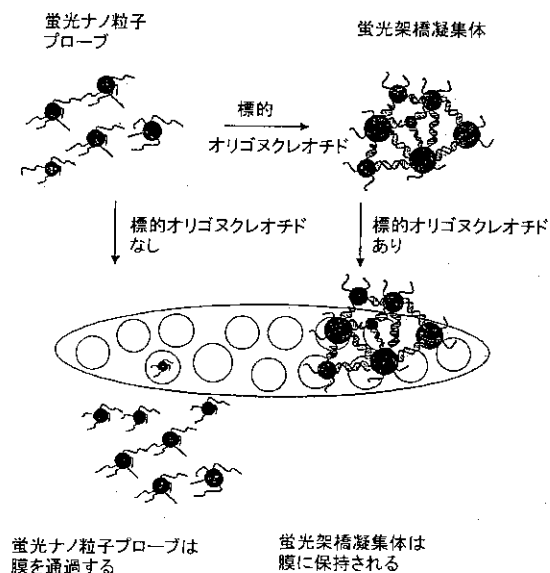
【図 20 B】



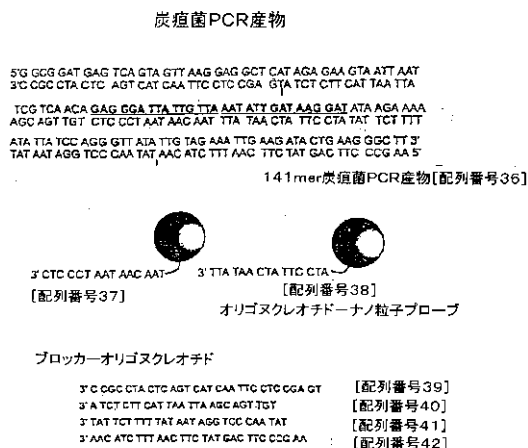
【図 21】



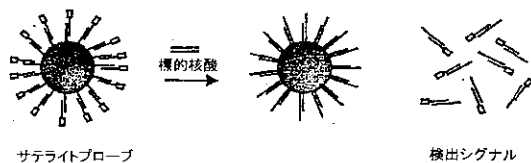
【図 2 2】



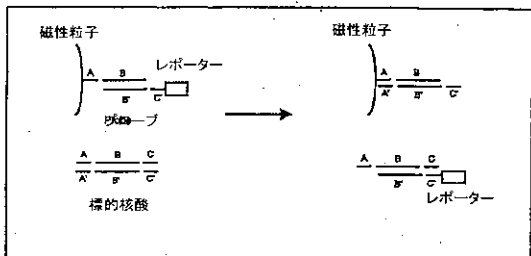
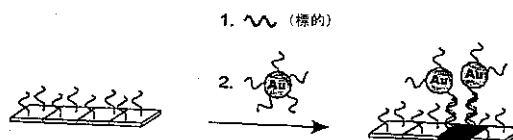
【図 2 3】



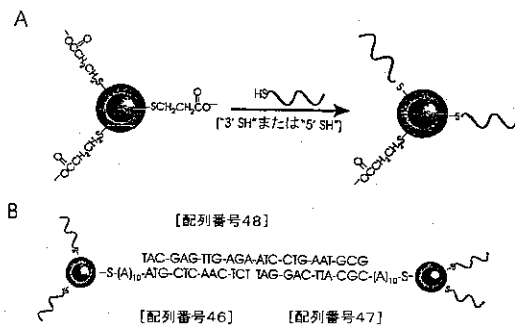
【図 2 4】



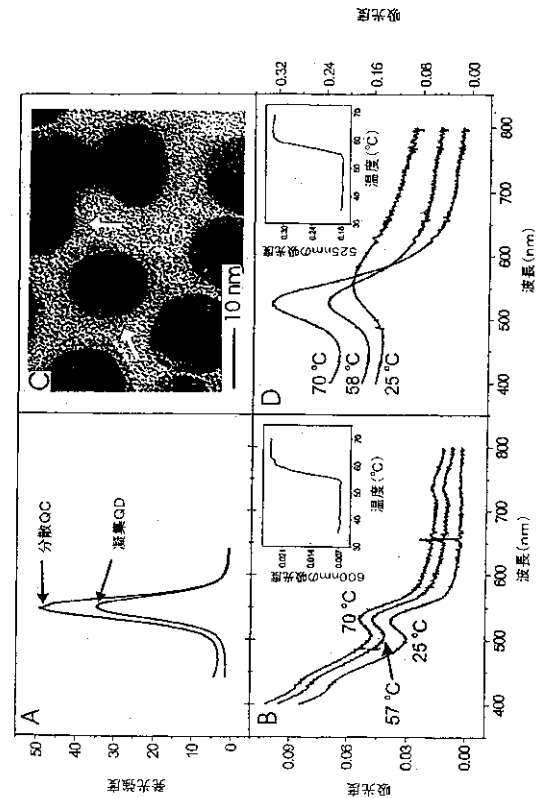
【図 2 5 A】



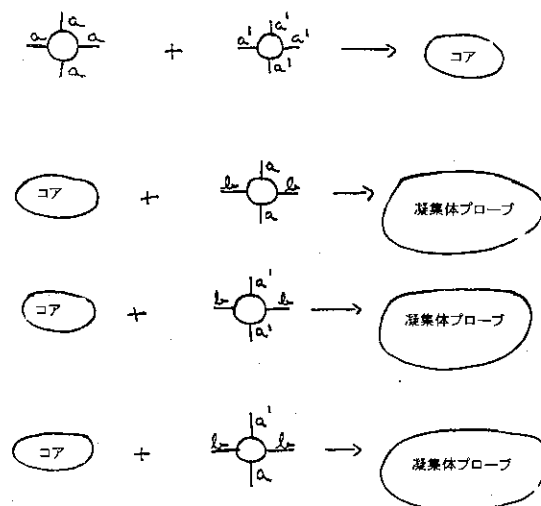
【図 26】



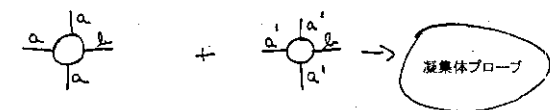
【図 27】



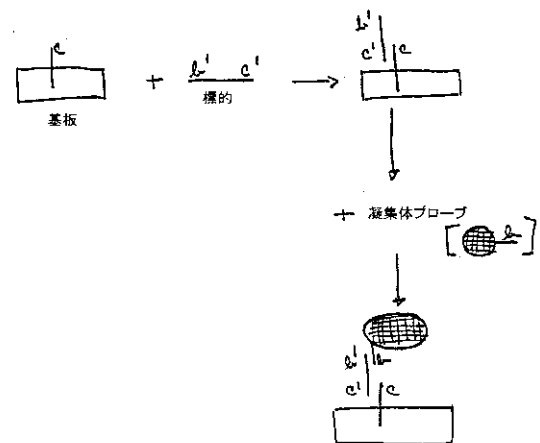
【図 28 A】



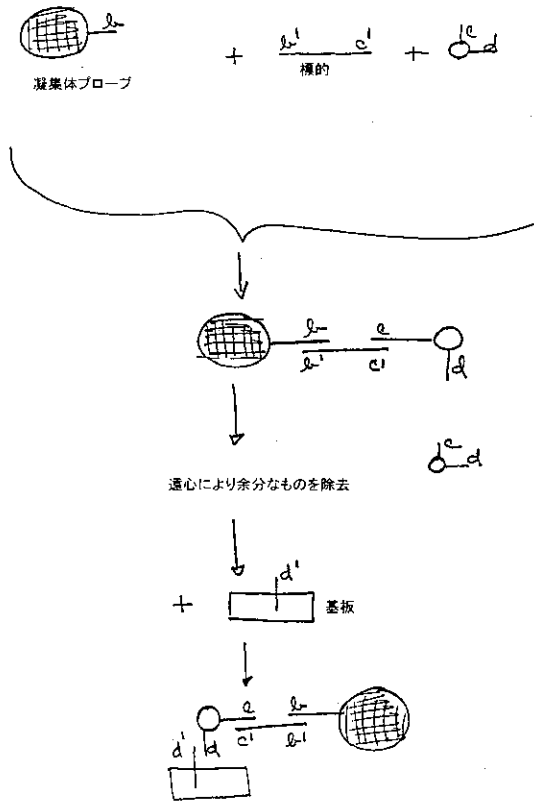
【図 28 B】



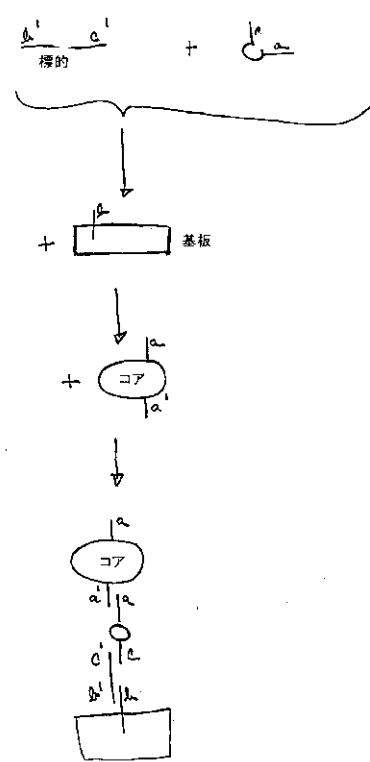
【図 28 C】



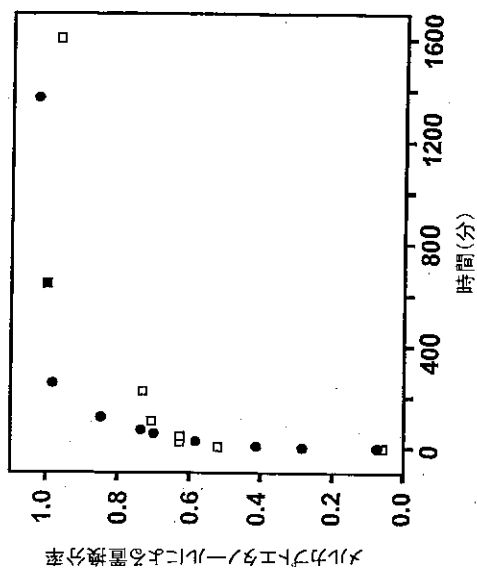
【図 28 D】



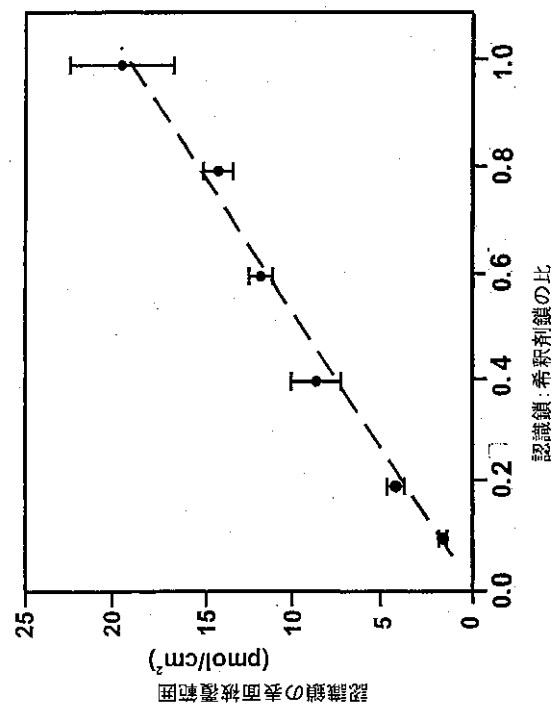
【図 28 E】



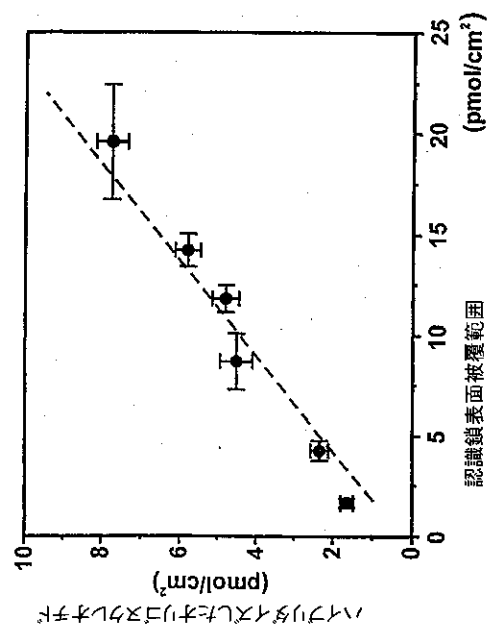
【図 29】



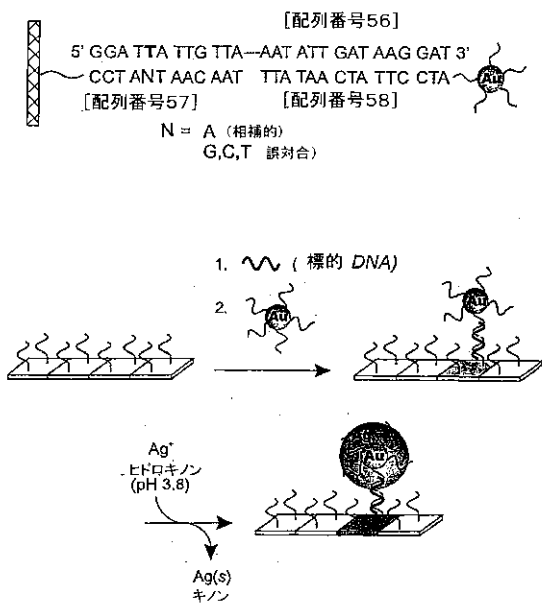
【図 30】



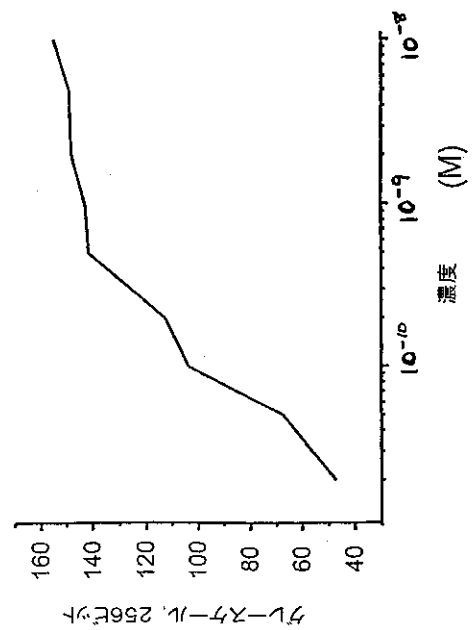
【図 3 1】



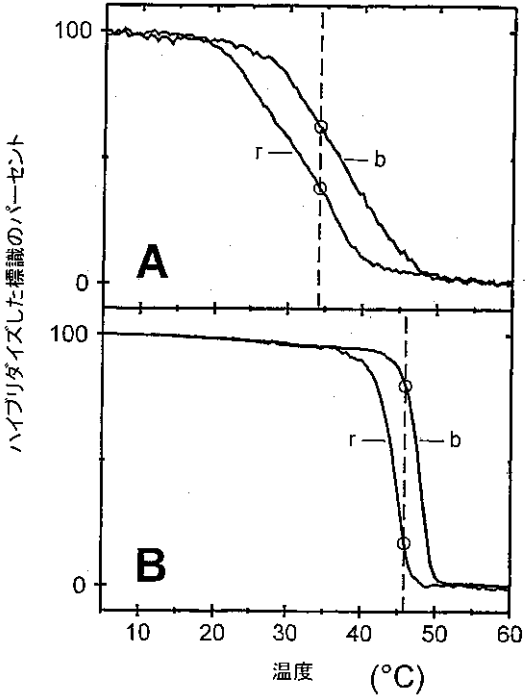
【図 3 2】



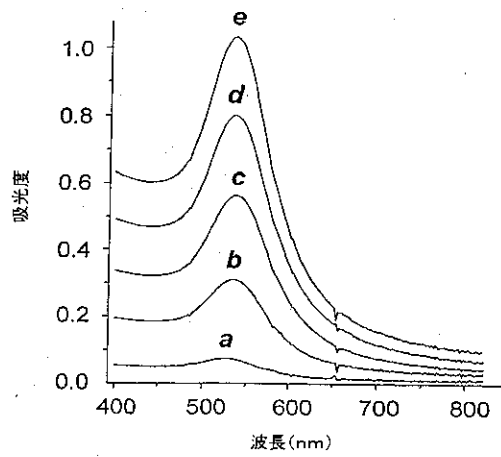
【図 3 4】



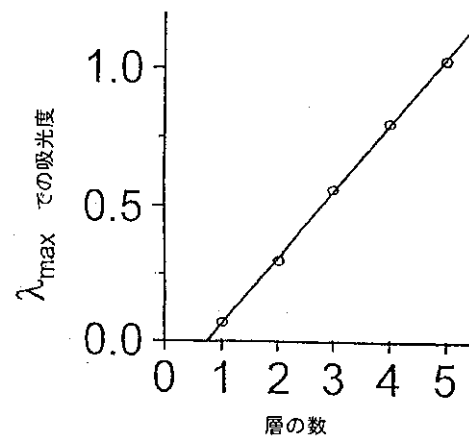
【図 3 5】



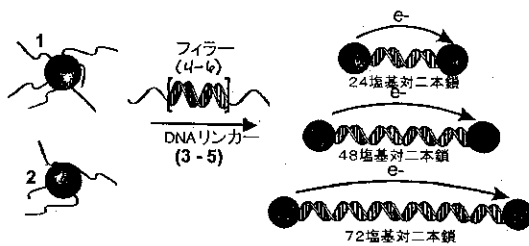
【図 38 A】



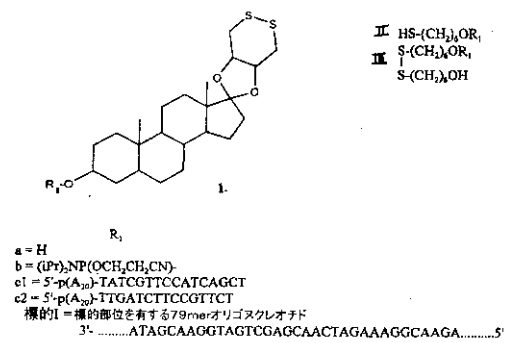
【図 38 B】



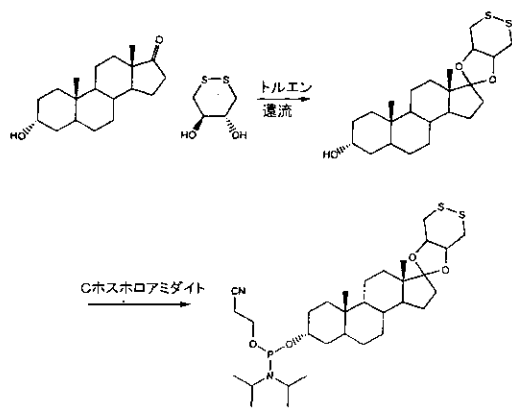
【図 40】



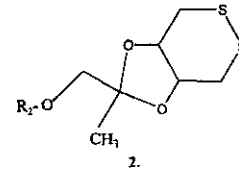
【図 42】



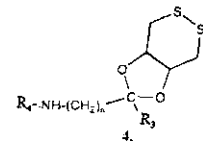
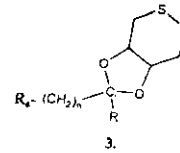
【図 4 3】



【図 4 4】



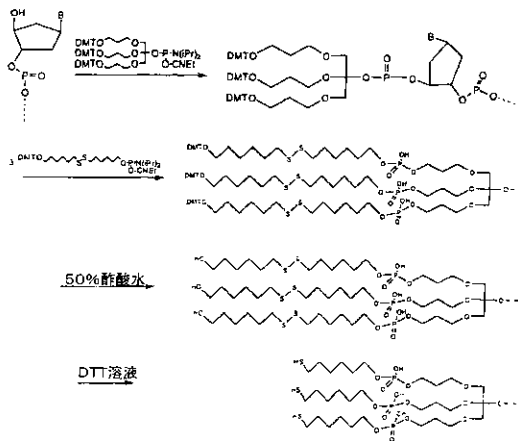
R_2
 a = H
 b = (iPr)₂NP(OCH₂CH₂CN)-
 c1 = 5'-p(A₂₀)-GCAGACCTCA
 c2 = 5'-p(A₂₀)-CCTATGTCG
 d = 5'-p(A₂₀)
 標的I = 標的部を備えた63merオリゴヌクレオチド
 3'.....CGTCGGAGTGGATACACAGC.....5'



R_3 = 水素、アルキル基、アリル基、または置換アルキルまたはアリル基

R_4 = 付着オリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチド

【図 4 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 July 2001 (19.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/51665 A2(51) International Patent Classification⁴: C12Q 1/68,
C07H 21/00

(21) International Application Number: PCT/US01/01190

(22) International Filing Date: 12 January 2001 (12.01.2001)

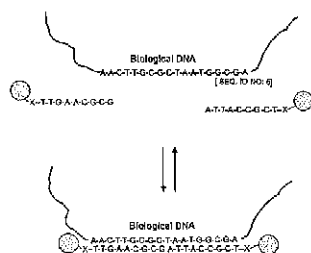
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/176,409 13 January 2000 (13.01.2000) US
60/200,161 20 April 2000 (20.04.2000) US
09/603,830 26 June 2000 (26.06.2000) US
09/760,500 12 January 2001 (12.01.2001) US(71) Applicant: NANOSPHERE INC. (US/US), 1801 Maple
Avenue, Evanston, IL (US).(72) Inventors: MIRKIN, Chad, A., 111 16th Street, Wili-
neta, IL 60091 (US); LEISINGER, Robert, L., 316
Third Street, Wilmette, IL 60091 (US); MUCKE, Robert,
C., 1600 Bel Aire Drive, Glendale, CA 91201 (US);
STORIOFF, James, J., Apartment 2J, 2121 Ridge
Ave., Evanston, IL 60201 (US); ELGHANIAN, Robert,
Apartment 602, 8503 West Catherine Avenue, Chicago,IL 60656 (US); TATON, Thomas, Andrew, 3368 West
Greene, Apt. 1S, Chicago, IL 60623 (US); LI, Zhi, 911
Sharman Avenue, Apt. 307, Evanston, IL 60202 (US).(74) Agent: MIAO, Emily; McDonnell Boehnen Holbert &
Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago,
IL 60606 (US).(81) Designated States (optional): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (optional): AKIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR



(57) Abstract: The invention provides methods of detecting a nucleic acid. The methods comprise contacting the nucleic acid with one or more types of particles having oligonucleotides attached thereto. In one embodiment of the method, the oligonucleotides are attached to nanoparticles and have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A detectable change (preferably a color change) is brought about as a result of the hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid. The invention also provides compositions and kits comprising particles. The invention further provides methods of synthesizing unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the conjugates produced by the methods, and methods of using the conjugates. In addition, the invention provides nanomaterials and nanostructures comprising nanoparticles and methods of nanofabrication utilizing nanoparticles. Finally, the invention provides a method of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

WO 01/51665 A2

WO 01/51665 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

**NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES
ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR**

5

This invention was made with government support under National Institutes Of Health (NIH) grant GM10265 and Army Research Office (ARO) grant DAAG55-0967-1-0133. The government has certain rights in the invention.

10

This application is a continuation-in-part of pending application number 09/344,667, filed June 25, 1999, which was a continuation-in-part of pending application number 09/240,755, filed January 29, 1999, which was a continuation-in-part of pending PCT application PCT/US97/12783, which was filed July 21, 1997, which are incorporated by reference. Benefit of provisional applications nos.

15

60/031,809, filed July 29, 1996; 60/200,161, filed April 26, 2000; 60/176,409, filed January 13, 2000 is also claimed, the disclosures are incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to methods of detecting nucleic acids, whether natural or synthetic, and whether modified or unmodified. The invention also relates to materials for detecting nucleic acids and methods of making those materials. The invention further relates to methods of nanofabrication. Finally, the invention relates to methods of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

The development of methods for detecting and sequencing nucleic acids is critical to the diagnosis of genetic, bacterial, and viral diseases. *See* Mansfield, E.S. et al. *Molecular and Cellular Probes*, 9, 145-156 (1995). At present, there are a variety of methods used for detecting specific nucleic acid sequences. *Id.* However, these methods are complicated, time-consuming and/or require the use of specialized and expensive equipment. A simple, fast method of detecting nucleic acids which does not require the use of such equipment would clearly be desirable.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

A variety of methods have been developed for assembling metal and semiconductor colloids into nanomaterials. These methods have focused on the use of covalent linker molecules that possess functionalities at opposing ends with chemical affinities for the colloids of interest. One of the most successful approaches to date, Brust et al., *Adv. Mater.*, **7**, 795-797 (1995), involves the use of gold colloids and well-established thiol adsorption chemistry, Bain & Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 506-512 (1989) and Dubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 437-464 (1992). In this approach, linear alkanedithiols are used as the particle linker molecules. The thiol groups at each end of the linker molecule covalently attach themselves to the colloidal particles to form aggregate structures. The drawbacks of this method are that the process is difficult to control and the assemblies are formed irreversibly. Methods for systematically controlling the assembly process are needed if the materials properties of these structures are to be exploited fully.

The potential utility of DNA for the preparation of biomaterials and in nanofabrication methods has been recognized. In this work, researchers have focused on using the sequence-specific molecular recognition properties of oligonucleotides to design impressive structures with well-defined geometric shapes and sizes. Shekhtman et al., *New J. Chem.*, **17**, 757-763 (1993); Shaw & Wang, *Science*, **260**, 533-536 (1993); Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6402-6407 (1989); Chen & Seeman, *Nature*, **350**, 631-633 (1991); Smith and Feigon, *Nature*, **356**, 164-168 (1992); Wang et al., *Biochem.*, **32**, 1899-1904 (1993); Chen et al., *Biochem.*, **33**, 13540-13546 (1994); Marsh et al., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 696-700 (1995); Mirkin, *Annu. Review Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 541-576 (1994); Wells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1095-1098 (1988); Wang et al., *Biochem.*, **30**, 5667-5674 (1991). However, the theory of producing DNA structures is well ahead of experimental confirmation. Seeman et al., *New J. Chem.*, **17**, 739-755 (1993).

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides methods of detecting nucleic acids. In one embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (nanoparticle-oligonucleotide

WO 01/51665

PCT/US01/01190

conjugates). The nucleic acid has at least two portions, and the oligonucleotides on each nanoparticle have a sequence complementary to the sequences of at least two portions of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

- 5 The hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid results in a detectable change.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid, and a detectable change brought about by this hybridization is observed.

- 15 In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The first type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto, and the oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid. The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with the nucleic acid. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise providing a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The binding oligonucleotide is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under

WO 01/51665

PCT/US01/01190

conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Then, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide, is
5 contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Finally, the detectable change produced by these hybridizations is observed.

In yet another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid
10 with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides
15 attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Next, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of
20 nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Finally, a detectable change produced
25 by these hybridizations is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the
30 oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid. This contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. Next, the liposome-oligonucleotide conjugates bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Then, a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. Next, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Then, the substrate is

WO 01/51665

PCT/US01/01190

contacted with silver stain to produce a detectable change, and the detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The nanoparticles have
5 oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. Then, the nucleic acid is contacted with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Next, an aggregate probe comprising at least
10 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said
15 nucleic acid. Finally, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with said nucleic acid, and a detectable change is observed.

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having
20 oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate
25 probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The nucleic acid, the substrate and the aggregate probe are contacted under conditions effective to
30 allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate. The nucleic acid, the aggregate probe, the nanoparticles and the substrate are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and on the nanoparticles and hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. The nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto

WO 01/51665

PCT/US01/01190

which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles. The liposomes bound to the substrate are contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the aggregate probe to the liposomes as a result of hydrophobic interactions, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one of the other types of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. Next, a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe. The nucleic acid, the nanoparticles, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the nanoparticles and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

Another embodiment of the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one other type of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. A type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe is provided. The nucleic acid, the linking oligonucleotides, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the linking oligonucleotides and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the linking oligonucleotides with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and providing one or more types of binding oligonucleotides. Each of the binding oligonucleotides has two portions. The sequence of one portion is complementary to the sequence of one of the portions of the nucleic acid, and the sequence of the other portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides. The nucleic acid and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid. Then, a detectable change is observed. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be contacted with the binding oligonucleotides prior to being contacted with the nucleic acid, or all three may be contacted simultaneously.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of particles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of particles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and have energy donor molecules on the ends not attached to the particles. The oligonucleotides on the second type of particles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and have energy acceptor molecules on the ends not attached to the particles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid, and a detectable change

WO 01/51665

PCT/US01/01190

brought about by this hybridization is observed. The energy donor and acceptor molecules may be fluorescent molecules.

In a further embodiment, the method comprises providing a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. A type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and which produce a detectable change is also provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The nucleic acid is contacted with the microspheres and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the latex microspheres and on the nanoparticles with the nucleic acid. Then, changes in fluorescence, another detectable change, or both are observed.

In another embodiment, the method comprises providing a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. A second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is also provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and are also labeled with a fluorescent molecule. The nucleic acid is contacted with the two types of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the two types of nanoparticles with the nucleic acid. Then, changes in fluorescence are observed.

In a further embodiment, the method comprises providing a type of particle having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A type of probe oligonucleotides comprising a first portion and a second portion is also provided. The first portion has a sequence complementary to the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions are complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides are also labeled with a reporter molecule at one end. Then, the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

particles and the probe oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe oligonucleotides to produce a satellite probe. Then, the satellite probe is contacted with the nucleic acid under conditions effective to provide for hybridization of the
 5 nucleic acid with the probe oligonucleotides. The particles are removed and the reporter molecule detected.

In yet another embodiment of the method of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first
 10 portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles are made of a material which can conduct
 15 electricity. The nanoparticles will have one or more types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is
 20 present, a change in conductivity can be detected. In a preferred embodiment, the substrate will have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes.

25 The invention further provides a method of detecting a nucleic acid wherein the method is performed on a substrate. The method comprises detecting the presence, quantity or both, of the nucleic acid with an optical scanner.

The invention further provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least
 30 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

Alternatively, the kit may comprise at least two containers. The first container
5 holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

In a further embodiment, the kit comprises at least one container. The
10 container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to portion of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having
15 attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second
20 container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a
25 second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, a first container holding nanoparticles having
oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the
30 sequence of a second portion of the nucleic acid, and a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, a first container holding nanoparticles, a second container holding a first type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, a third container holding a second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid, and a fourth container holding a third type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides.

10 In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding
15 nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles so that the nanoparticles can be attached to the liposomes by hydrophobic interactions. The kit may further comprise a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the
20 oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

25 In another embodiment, the kit comprises a substrate having nanoparticles attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregated probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to
30 them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least

WO 01/51665

PCT/US01/01190

one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having
5 oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of
10 the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The
15 aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence
20 of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles. The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached
25 to the substrate.

In another embodiment, the kit comprises a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first
30 container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate

WO 01/51665

PCT/US01/01190

probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the nanoparticles.

In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another embodiment, kits may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the kit comprises a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding binding oligonucleotides. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In yet another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another alternative embodiment, the kit comprises at least three containers. The first container holds nanoparticles. The second container holds a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The third container holds a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide, and a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises one or two containers, the container(s) holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and have energy donor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The second type of particles having

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and have energy acceptor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

5 In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The
10 oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the
15 sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule.

20 In another embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate
25 probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe
30 are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereto
 5 oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to
 10 the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

In another embodiment, the kit comprising a container holding a core probe,
 15 the core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having attached to it at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between
 20 the electrodes. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected.

The invention also provides the satellite probe, an aggregate probe and a core probe.

The invention further provides a substrate having nanoparticles attached
 25 thereto. The nanoparticles may have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid.

The invention also provides a metallic or semiconductor nanoparticle having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides are labeled with fluorescent molecules at the ends not attached to the nanoparticle.

30 The invention further provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions. The method further comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a portion of the sequence of a
5 linking oligonucleotide. The linking oligonucleotides and nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

The invention provides another method of nanofabrication. This method
10 comprises providing at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of
15 nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first and second types of nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

The invention further provides nanomaterials or nanostructures composed of
20 nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

The invention also provides a composition comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first
25 portion of a nucleic acid or a linking oligonucleotide. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid or linking oligonucleotide.

The invention further provides an assembly of containers comprising a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, and a
30 second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container have a sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container have a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

5 The invention also provides a nanoparticle having a plurality of different oligonucleotides attached to it.

The invention further provides a method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids. The method comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence
10 complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid. The selected nucleic acid and other nucleic acids are contacted with the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the
15 selected nucleic acid aggregate and precipitate.

In addition, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first such method comprises binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. To do so, oligonucleotides having covalently bound
20 thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the
25 electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional
30 period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The

WO 01/51665

PCT/US01/01190

invention also includes the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

5 The invention provides another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising a type of recognition oligonucleotides and a type of diluent oligonucleotides. The oligonucleotides and the nanoparticles are contacted under conditions effective to
10 allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the conjugates. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures
15 comprising the conjugates. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. "Diluent oligonucleotides" may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to their targets.

20 The invention provides yet another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides. The recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion. The recognition portion of the recognition
25 oligonucleotides has a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotide is designed so that it can bind to the nanoparticles. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the
30 nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. To make the conjugates, the oligonucleotides, including the recognition oligonucleotides, and the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles are contacted under conditions effective allow at least some of the recognition oligonucleotides to bind to the nanoparticles. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

The invention comprises a method of attaching oligonucleotides to nanoparticles by means of a linker comprising a cyclic disulfide. Suitable cyclic disulfides have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used. Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfides, e.g., as described in the Appendix. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. The linkers are attached to the oligonucleotides and the oligonucleotide-linkers are attached to nanoparticles as described herein.

As used herein, a "type of oligonucleotides" refers to a plurality of oligonucleotide molecules having the same sequence. A "type of" nanoparticles, conjugates, particles, latex microspheres, etc. having oligonucleotides attached thereto refers to a plurality of that item having the same type(s) of oligonucleotides attached to them. "Nanoparticles having oligonucleotides attached thereto" are also sometimes referred to as "nanoparticle-oligonucleotide conjugates" or, in the case of the detection methods of the invention, "nanoparticle-oligonucleotide probes," "nanoparticle probes," or just "probes."

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. X represents any covalent anchor (such as $-S(CH_2)_3OP(O)(O^-)-$, where S is joined to a gold nanoparticle). For

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the sake of simplicity in Figure 1 and some subsequent figures, only one oligonucleotide is shown to be attached to each particle but, in fact, each particle has several oligonucleotides attached to it. Also, it is important to note that in Figure 1 and subsequent figures, the relative sizes of the gold nanoparticles and the oligonucleotides are not drawn to scale.

Figure 2: Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown. As a consequence, they hybridize to the DNA producing detectable changes (forming aggregates and producing a color change).

Figure 3: Schematic diagram of a variation of the system shown in Figure 2. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown which are separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles.

Also shown is an optional filler oligonucleotide which can be used to hybridize with the noncomplementary portion of the single-stranded DNA. When the DNA, nanoparticles and filler oligonucleotides are combined, the nanoparticles aggregate, with the formation of nicked, double-stranded oligonucleotide connectors.

Figure 4: Schematic diagram illustrating reversible aggregation of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto as a result of hybridization and de-hybridization with a linking oligonucleotide. The illustrated linking oligonucleotide is a double-stranded DNA having overhanging termini (sticky ends) which are complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 5: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having oligonucleotides attached thereto with linking oligonucleotides having sequences complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 6: Cuvettes containing two types of gold colloids, each having a different oligonucleotide attached thereto and a linking double-stranded oligonucleotide with sticky ends complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles (see Figure 4). Cuvette A - at 80°C, which is above the T_m of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

linking DNA; de-hybridized (thermally denatured). The color is dark red. Cuvette B - after cooling to room temperature, which is below the T_m of the linking DNA; hybridization has taken place, and the nanoparticles have aggregated, but the aggregates have not precipitated. The color is purple. Cuvette C - after several hours at room temperature, the aggregated nanoparticles have settled to the bottom of the cuvette. The solution is clear, and the precipitate is pinkish gray. Heating B or C will result in A.

Figure 7: A graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides upon lowering of the temperature, as illustrated in Figure 4.

Figures 8A-B: Figure 8A is a graph of change in absorbance versus temperature/time for the system illustrated in Figure 4. At low temperatures, gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides (see Figure 4). At high temperature (80°C), the nanoparticles are de-hybridized. Changing the temperature over time shows that this is a reversible process. Figure 8B is a graph of change in absorbance versus temperature/time performed in the same manner using an aqueous solution of unmodified gold nanoparticles. The reversible changes seen in Figure 8A are not observed.

Figures 9A-B: Transmission Electron Microscope (TEM) images. Figure 9A is a TEM image of aggregated gold nanoparticles held together by hybridization of the oligonucleotides on the gold nanoparticles with linking oligonucleotides. Figure 9B is a TEM image of a two-dimensional aggregate showing the ordering of the linked nanoparticles.

Figure 10: Schematic diagram illustrating the formation of thermally-stable triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles having the pyrimidine:purine:pyrimidine motif. Such triple-stranded connectors are stiffer than double-stranded connectors. In Figure 10, one nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all purines, and the other nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all pyrimidines. The third

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotide for forming the triple-stranded connector (not attached to a nanoparticle) is composed of pyrimidines.

Figure 11: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. In Figure 11, the circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and s is the thio-alkyl linker. The multiple oligonucleotides on the two types of nanoparticles can hybridize to each other, leading to the formation of an aggregate structure.

Figures 12A-F: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6 and 7 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and the dotted and dashed lines represent connecting links of nucleotide.

Figures 13A-B: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA (analyte DNA) using nanoparticles and a transparent substrate.

Figures 14A-B: Figure 14A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (one population of which is in solution and one population of which is attached to a transparent substrate as illustrated in Figure 13B) aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides. Figure 14B is a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 14A as the temperature is increased (melted).

Figures 15A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6, 7 and 8 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

Figures 16A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticle conjugates 1 and 2, single-stranded oligonucleotide targets of different lengths, and filler oligonucleotides of different lengths are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

5 Figures 17A-E: Schematic diagrams illustrating nanoparticle-oligonucleotide conjugates and systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The circles represent the nanoparticles, the straight lines represent oligonucleotide chains (bases not shown), two closely-spaced parallel lines represent duplex segments, and the small letters indicate specific nucleotide sequences (a is complementary to a', b is complementary to b', etc.).

10 Figure 18: Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using liposomes (large double circle), nanoparticles (small open circles) and a transparent substrate. The filled-in squares represent cholesteryl groups, the squiggles represent oligonucleotides, and the ladders represent double-stranded (hybridized) oligonucleotides.

15 Figures 19A-B: Figure 19A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates assemble in multiple layers on a transparent substrate as illustrated in Figure 13A. Figure 19B is a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 19A as the temperature is increased (melted).

20 Figures 20A-B: Illustrations of schemes using fluorescent-labeled oligonucleotides attached to metallic or semiconductor quenching nanoparticles (Figure 20A) or to non-metallic, non-semiconductor particles (Figure 20B).

25 Figure 21: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and latex microspheres having fluorescently-labeled oligonucleotides attached thereto. The small, closed, dark circles represent the nanoparticles, the large, open circles represent the latex microspheres, and the large oval represents a microporous membrane.

30 Figure 22: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using two types of fluorescently-labeled oligonucleotide-nanoparticle

WO 01/51665

PCT/US01/01190

conjugates. The closed circles represent the nanoparticles, and the large oval represents a microporous membrane.

Figure 23: Sequences of materials utilized in an assay for Anthrax Protective Antigen (see Example 12).

5 Figure 24: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using a "satellite probe" which comprises magnetic nanoparticles (dark spheres) having oligonucleotides (straight lines) attached to them, probe oligonucleotides (straight lines) hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides being labeled with a reporter group (open rectangular box). A, B, C, A', B', and C' represent specific nucleotide sequences, with A, B and C being complementary to A', B' and C', respectively.

10 Figures 25A-B: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA using nanoparticles and a transparent substrate. In these figures, a, b and c refer to different oligonucleotide sequences, and a', b' and c' refer to oligonucleotide sequences complementary to a, b and c, respectively.

15 Figure 26: Schematic diagram illustrating systems for forming assemblies of CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QD).

20 Figures 27A-D: Figure 27A shows fluorescence spectra comparing dispersed and aggregated QDs, with an excitation at 400 nm. The samples were prepared identically, except for the addition of complementary "linker" DNA to one and an equal volume and concentration of non-complementary DNA to the other. Figure 27B shows UV-Visible spectra of QD/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". Figure 27C shows high resolution TEM image of a portion of a hybrid gold/QD assembly. The lattice fringes of the QDs, which resemble fingerprints, appear near each gold nanoparticle. Figure 27D shows UV-Visible spectra of hybrid gold/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". The insets in Figures 27B and 27D display temperature versus extinction profiles for the thermal denaturation of the assemblies. Denaturation experiments were conducted in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7), 0.01% sodium azide with 13 nm gold nanoparticles and/or ~4 nm CdSe/ZnS core/shell QDs.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Figures 28A-E: Schematic diagrams illustrating the preparation of core probes, aggregate probes and systems for detecting DNA using these probes. In these figures, a, b, c and d refer to different oligonucleotide sequences, and a', b', c' and d' refer to oligonucleotide sequences complementary to a, b, c and d, respectively.

Figure 29: Graph of fractional displacement of oligonucleotides by mercaptoethanol from nanoparticles (closed circles) or gold thin films (open squares) to which the oligonucleotides had been attached.

Figure 30: Graph of surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles obtained for different ratios of recognition:diluent oligonucleotides used in the preparation of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

Figure 31: Graph of surface coverages of hybridized complementary oligonucleotides versus different surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles.

Figure 32: Schematic diagram illustrating system for detecting a target DNA in a four-element array on a substrate using nanoparticle-oligonucleotide conjugates and amplification with silver staining.

Figure 33: Images obtained with a flatbed scanner of 7 mm x 13 mm oligonucleotide-functionalized float glass slides. (A) Slide before hybridization of DNA target and gold nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. (B) Slide A after hybridization of 10 nM target DNA and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. A pink color was imparted by attached, red 13 nm diameter gold nanoparticles. (C) Slide B after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. (D) Same as (A). (E) Slide D after hybridization of 100 pM target and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. The absorbance of the nanoparticle layer was too low to be observed with the naked eye or flatbed scanner. (F) Slide E after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. Note that slide F is much lighter than slide C, indicating lower target concentration. (G) Control slide, exposed to 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate and exposed to silver amplification solution for 5 minutes. No darkening of the slide was observed.

Figure 33: Graph of greyscale (optical density) of oligonucleotide-functionalized glass surface exposed to varying concentrations of target DNA,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

followed by 5 nM gold of nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugates and silver amplification for 5 minutes.

Figures 35A-B: Graphs of percent hybridized label versus temperature showing dissociation of fluorophore-labeled (Figure 35A) and nanoparticle-labeled (Figure 35B) targets from an oligonucleotide-functionalized glass surface. Measurements were made by measuring fluorescence (Figure 35A) or absorbance (Figure 35B) of dissociated label in the solution above the glass surface. The lines labeled "h" show the dissociation curves for perfectly matched oligonucleotides on the glass, and the lines labeled "t" show curves for mismatched oligonucleotides (a one-base mismatch) on the glass. Vertical lines in the graphs illustrate the fraction of target dissociated at a given temperature (halfway between the melting temperatures T_m of each curve) for each measurement, and the expected selectivity of sequence identification for fluorophore- and nanoparticle-based gene chips. Fluorescence (Figure 35A): complement (69%)/mismatch (38%) = 1.8:1. Absorbance (Figure 35B): complement (85%)/mismatch (14%) = 6:1. The breadth of the fluorophore-labeled curves (Figure 35A) is characteristic of the dissociation of fluorophore-labeled targets from gene chips (Forman et al., in *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, Leontis et al., eds., (ACS Symposium Series 682, American Chemical Society, Washington D.C., 1998), pages 206-228).

Figures 36A-B: Images of model oligonucleotide arrays challenged with synthetic target and fluorescent-labeled (Figure 36A) or nanoparticle-labeled (Figure 36B) nanoparticle-oligonucleotide conjugate probes. C, A, T, and G represent spots (elements) on the array where a single base change has been made in the oligonucleotide attached to the substrate to give a perfect match with the target (base A) or a single base mismatch (base C, T or G in place of the perfect match with base A). The greyscale ratio for elements C:A:T:G is 9:37:9:11 for Figure 36A and 3:62:7:34 for Figure 36B.

Figure 37: Schematic diagram illustrating system for forming aggregates (A) or layers (B) of nanoparticles (a and b) linked by a linking nucleic acid (3).

Figure 38A: UV-visible spectra of alternating layers of gold nanoparticles a and b (see Figure 37) hybridized to an oligonucleotide-functionalized glass

WO 01/51665

PCT/US01/01190

microscope slide via the complementary linker 3. The spectra are for assemblies with 1 (a, $\lambda_{max} = 524$ nm), 2 (b, $\lambda_{max} = 529$ nm), 3 (c, $\lambda_{max} = 532$ nm), 4 (d, $\lambda_{max} = 534$ nm) or 5 (e, $\lambda_{max} = 534$ nm) layers. These spectra were measured directly through the slide.

Figure 38B: Graph of absorbance for nanoparticle assemblies (see Figure 38A) at λ_{max} with increasing numbers of layers.

Figures 39A-F: Figure 39A: FE-SEM of one layer of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles cohybridized with DNA linker to an oligonucleotide-functionalized, conductive indium-tin-oxide (ITO) slide (prepared in the same way as oligonucleotide-functionalized glass slide). The visible absorbance spectrum of this slide was identical to Figure 38A, indicating that functionalization and nanoparticle coverage on ITO is similar to that on glass. The average density of counted nanoparticles from 10 such images was approximately 800

nanoparticles/ μm^2 . Figure 39B: FE-SEM image of two layers of nanoparticles on the ITO slide. The average density of counted nanoparticles from 10 such images was approximately 2800 particles/ μm^2 . Figure 39C: Absorbance at 260 nm (A_{260})

showing dissociation of a 0.5 μM solution of the oligonucleotide duplex (1 + 2 + 3; see Figure 37, A) to single strands in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution (pH 7). Figures 39D-F: Absorbance at 260 nm (A_{260}) showing dissociation of 1 layer

(Figure 39D), 4 layers (Figure 39E) and 10 layers (Figure 39F) of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles from glass slides immersed in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution. Melting profiles were obtained by measuring the decreasing absorption at 520 nm (A_{520}) through the slides with increasing temperature. In each of Figures 39D-F, the insets show the first derivatives of the measured dissociation curves. FWHM of these curves were (Figure 39C inset) 13.2 $^{\circ}C$, (Figure 39D inset) 5.6 $^{\circ}C$, (Figure 39E inset) 3.2 $^{\circ}C$, and (Figure 39F inset) 2.9 $^{\circ}C$.

Figure 40: Schematic diagram illustrating system used to measure the electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA. For simplicity, only one hybridization event is drawn.

Figure 41: Schematic diagram illustrating a method of detecting nucleic acid using gold electrodes and gold nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Figure 42: Schematic diagram illustrating the structures of a cyclic disulfide 1, including the preferred compound 1, having a steroid moiety for use in linking oligonucleotides to nanoparticles. The steroid disulfide molecule was obtained by condensation of 4,5-dihydroxy-1,2-dithiane with epiandrosterone. Gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates were prepared using oligonucleotides modified with the steroid disulfide exhibit greater stability towards DTT relative to those nanoparticles-oligonucleotides that employ oligonucleotide-mercaptohexyl linkers for their preparation.

Figure 43: Schematic diagram for the synthesis and formulas for the steroid cyclic disulfide anchor group.

Figure 44: Schematic diagram illustrating cyclic disulfides of formulas 2 for use in preparing oligonucleotide-cyclic disulfide linkers as described in Example 24, and same related cyclic disulfides for use as anchor groups.

Figure 45: Schematic diagram illustrating the structures described in Example 25. Figure 45(a) illustrates the structures of 5'-monothiol-modified oligonucleotide 5, a 35-base 5'-steroid disulfide oligomer 6 and Trembler phosphoramidite 7 and 5-tri-mercaptoalkyl oligonucleotide 8.

Figure 46: Schematic diagram illustrating the chemistry of making a novel tri-thiol oligonucleotide.

DETAILED DESCRIPTION OF THE
PRESENTLY PREFERRED EMBODIMENTS

Nanoparticles useful in the practice of the invention include metal (e.g., gold, silver, copper and platinum), semiconductor (e.g., CdSe, CdS, and CdS or CdSe coated with ZnS) and magnetic (e.g., ferromagnetic) colloidal materials. Other nanoparticles useful in the practice of the invention include ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, and GaAs. The size of the nanoparticles is preferably from about 5 nm to about 150 nm (mean diameter), more preferably from about 5 to about 50 nm, most preferably from about 10 to about 30 nm. The nanoparticles may also be rods.

Methods of making metal, semiconductor and magnetic nanoparticles are well-known in the art. See, e.g., Schmid, G. (ed.) *Clusters and Colloids* (VCH, Weinheim, 1994); Hayat, M.A. (ed.) *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991); Massart, R., *IEEE Transactions on Magnetics*, **17**, 1247 (1981); Ahmadi, T.S. et al., *Science*, **272**, 1924 (1996); Henglein, A. et al., *J. Phys. Chem.*, **99**, 14129 (1995); Curtis, A.C., et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1530 (1988).

Methods of making ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, and GaAs nanoparticles are also known in the art. See, e.g., Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 41 (1993); Henglein, *Top. Curr. Chem.*, **143**, 113 (1988); Henglein, *Chem. Rev.*, **89**, 1861 (1989); Brus, *Appl. Phys. A.*, **53**, 465 (1991); Bahnemann, in *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (eds. Pelizzetti and Schiavello 1991), page 251; Wang and Herron, *J. Phys. Chem.*, **95**, 525 (1991); Olshavsky et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9438 (1990); Ushida et al., *J. Phys. Chem.*, **95**, 5382 (1992).

Suitable nanoparticles are also commercially available from, e.g., Ted Pella, Inc. (gold), Amersham Corporation (gold) and Nanoprobes, Inc. (gold).

Presently preferred for use in detecting nucleic acids are gold nanoparticles. Gold colloidal particles have high extinction coefficients for the bands that give rise to their beautiful colors. These intense colors change with particle size, concentration, interparticle distance, and extent of aggregation and shape (geometry)

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of the aggregates, making these materials particularly attractive for colorimetric assays. For instance, hybridization of oligonucleotides attached to gold nanoparticles with oligonucleotides and nucleic acids results in an immediate color change visible to the naked eye (see, e.g., the Examples).

- 5 Gold nanoparticles are also presently preferred for use in nanofabrication for the same reasons given above and because of their stability, ease of imaging by electron microscopy, and well-characterized modification with thiol functionalities (see below). Also preferred for use in nanofabrication are semiconductor nanoparticles because of their unique electronic and luminescent properties.
- 10 The nanoparticles, the oligonucleotides or both are functionalized in order to attach the oligonucleotides to the nanoparticles. Such methods are known in the art. For instance, oligonucleotides functionalized with alkanethiols at their 3'-termini or 5'-termini readily attach to gold nanoparticles. See Whitesides, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry*, Houston, TX, pages 109-121 (1995). See also, Mucic et al. *Chem. Commun.* 555-557 (1996) (describes a method of attaching 3' thiol DNA to flat gold surfaces; this method can be used to attach oligonucleotides to nanoparticles). The alkanethiol method can also be used to attach oligonucleotides to other metal, semiconductor and magnetic colloids and to the other nanoparticles listed above.
- 20 Other functional groups for attaching oligonucleotides to solid surfaces include phosphorothioate groups (see, e.g., U.S. Patent No. 5,472,881 for the binding of oligonucleotide-phosphorothioates to gold surfaces), substituted alkylsiloxanes (see, e.g. Burwell, *Chemical Technology*, 4, 370-377 (1974) and Matteucci and Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981) for binding of oligonucleotides to silica
- 25 and glass surfaces, and Grabar et al., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 for binding of aminoalkylsiloxanes and for similar binding of mercaptoalkylsiloxanes). Oligonucleotides terminated with a 5' thionucleoside or a 3' thionucleoside may also be used for attaching oligonucleotides to solid surfaces. The following references describe other methods which may be employed to attached oligonucleotides to
- 30 nanoparticles: Nuzzo et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 2358 (1987) (disulfides on gold); Allara and Nuzzo, *Langmuir*, 1, 45 (1985) (carboxylic acids on aluminum); Allara

WO 01/51665

PCT/US01/01190

and Tompkins, *J. Colloid Interface Sci.*, **49**, 410-421 (1974) (carboxylic acids on copper); Iler, *The Chemistry Of Silica*, Chapter 6, (Wiley 1979) (carboxylic acids on silica); Timmons and Zisman, *J. Phys. Chem.*, **69**, 984-996 (1965) (carboxylic acids on platinum); Soriaga and Hubbard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3937 (1982) (aromatic ring compounds on platinum); Hubbard, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 177 (1980) (sulfolanes, sulfoxides and other functionalized solvents on platinum); Hickman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7271 (1989) (isonitriles on platinum); Maoz and Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1045 (1987) (silanes on silica); Maoz and Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1034 (1987) (silanes on silica); Wasserman et al., *Langmuir*, **5**, 1074 (1989) (silanes on silica); Eltekova and Eltekov, *Langmuir*, **3**, 951 (1987) (aromatic carboxylic acids, aldehydes, alcohols and methoxy groups on titanium dioxide and silica); Lee et al., *J. Phys. Chem.*, **92**, 2597 (1988) (rigid phosphates on metals).

Oligonucleotides functionalized with a cyclic disulfide are within the scope of this invention. The cyclic disulfides preferably have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially or may be synthesized by known procedures. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used.

Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfides. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have unexpectedly been found to be remarkably stable to thiols (e.g., dithiothreitol used in polymerase chain reaction (PCR) solutions) as compared to conjugates prepared using alkanethiols or acyclic disulfides as the linker. Indeed, the oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention have been found to be 300 times more stable. This unexpected stability is likely due to the fact that each oligonucleotide is anchored to a nanoparticle through two sulfur atoms, rather than a single sulfur atom. In particular, it is thought that two adjacent sulfur atoms of a cyclic disulfide would have a chelation effect which would be advantageous in stabilizing the oligonucleotide-nanoparticle conjugates. The large hydrophobic steroid residues of the linkers also appear to contribute to the stability of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the conjugates by screening the nanoparticles from the approach of water-soluble molecules to the surfaces of the nanoparticles.

In view of the foregoing, the two sulfur atoms of the cyclic disulfide should preferably be close enough together so that both of the sulfur atoms can attach simultaneously to the nanoparticle. Most preferably, the two sulfur atoms are adjacent each other. Also, the hydrocarbon moiety should be large so as to present a large hydrophobic surface screening the surfaces of the nanoparticles.

The oligonucleotide-cyclic nanoparticle conjugates that employ cyclic disulfide linkers may be used as probes in diagnostic assays for detecting nucleic acids or in methods of nanofabrication as described herein. These conjugates according to the present invention have unexpectedly been found to improve the sensitivity of diagnostic assays in which they are used. In particular, assays employing oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have been found to be about 10 times more sensitive than assays employing conjugates prepared using alkanethiols or acyclic disulfides as the linker.

The surprising stability of the resulting oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention to thiols described above allows them to be used directly in PCR solutions. Thus, oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention added as probes to a DNA target to be amplified by PCR can be carried through the 30 or 40 heating-cooling cycles of the PCR and are still able to detect the amplicons without opening the tubes. Opening the sample tubes for addition of probes after PCR can cause serious problems through contamination of the equipment to be used for subsequent tests.

Finally, the invention provides kits comprising a container holding a type of oligonucleotide-cyclic disulfide linkers of the invention or a container holding a type of oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention. The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acids or for nanofabrication.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Each nanoparticle will have a plurality of oligonucleotides attached to it. As a result, each nanoparticle-oligonucleotide conjugate can bind to a plurality of oligonucleotides or nucleic acids having the complementary sequence.

Oligonucleotides of defined sequences are used for a variety of purposes in the practice of the invention. Methods of making oligonucleotides of a predetermined sequence are well-known. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and F. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991). Solid-phase synthesis methods are preferred for both oligoribonucleotides and oligodeoxyribonucleotides (the well-known methods of synthesizing DNA are also useful for synthesizing RNA). Oligoribonucleotides and oligodeoxyribonucleotides can also be prepared enzymatically.

The invention provides methods of detecting nucleic acids. Any type of nucleic acid may be detected, and the methods may be used, e.g., for the diagnosis of disease and in sequencing of nucleic acids. Examples of nucleic acids that can be detected by the methods of the invention include genes (e.g., a gene associated with a particular disease), viral RNA and DNA, bacterial DNA, fungal DNA, cDNA, mRNA, RNA and DNA fragments, oligonucleotides, synthetic oligonucleotides, modified oligonucleotides, single-stranded and double-stranded nucleic acids, natural and synthetic nucleic acids, etc. Thus, examples of the uses of the methods of detecting nucleic acids include: the diagnosis and/or monitoring of viral diseases (e.g., human immunodeficiency virus, hepatitis viruses, herpes viruses, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus), bacterial diseases (e.g., tuberculosis, Lyme disease, *H. pylori*, *Escherichia coli* infections, *Legionella* infections, *Mycoplasma* infections, *Salmonella* infections), sexually transmitted diseases (e.g., gonorrhea), inherited disorders (e.g., cystic fibrosis, Duchene muscular dystrophy, phenylketonuria, sickle cell anemia), and cancers (e.g., genes associated with the development of cancer); in forensics; in DNA sequencing; for paternity testing; for cell line authentication; for monitoring gene therapy; and for many other purposes.

The methods of detecting nucleic acids based on observing a color change with the naked eye are cheap, fast, simple, robust (the reagents are stable), do not

WO 01/51665

PCT/US01/01190

require specialized or expensive equipment, and little or no instrumentation is required. This makes them particularly suitable for use in, e.g., research and analytical laboratories in DNA sequencing, in the field to detect the presence of specific pathogens, in the doctor's office for quick identification of an infection to
 5 assist in prescribing a drug for treatment, and in homes and health centers for inexpensive first-line screening.

The nucleic acid to be detected may be isolated by known methods, or may be detected directly in cells, tissue samples, biological fluids (e.g., saliva, urine, blood, serum), solutions containing PCR components, solutions containing large excesses of
 10 oligonucleotides or high molecular weight DNA, and other samples, as also known in the art. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995). Methods of preparing nucleic acids for detection with hybridizing probes are well known in the art. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A
 15 Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995).

If a nucleic acid is present in small amounts, it may be applied by methods known in the art. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL
 20 Press, New York, 1995). Preferred is polymerase chain reaction (PCR) amplification.

One method according to the invention for detecting nucleic acid comprises contacting a nucleic acid with one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The nucleic acid to be detected has at least two
 portions. The lengths of these portions and the distance(s), if any, between them are
 25 chosen so that when the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize to the nucleic acid, a detectable change occurs. These lengths and distances can be determined empirically and will depend on the type of particle used and its size and the type of electrolyte which will be present in solutions used in the assay (as is known in the art, certain electrolytes affect the conformation of nucleic acids).

Also, when a nucleic acid is to be detected in the presence of other nucleic
 30 acids, the portions of the nucleic acid to which the oligonucleotides on the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles are to bind must be chosen so that they contain sufficient unique sequence so that detection of the nucleic acid will be specific. Guidelines for doing so are well known in the art.

Although nucleic acids may contain repeating sequences close enough to each other so that only one type of oligonucleotide-nanoparticle conjugate need be used, this will be a rare occurrence. In general, the chosen portions of the nucleic acid will have different sequences and will be contacted with nanoparticles carrying two or more different oligonucleotides, preferably attached to different nanoparticles. An example of a system for the detection of nucleic acid is illustrated in Figure 2. As can be seen, a first oligonucleotide attached to a first nanoparticle has a sequence complementary to a first portion of the target sequence in the single-stranded DNA. A second oligonucleotide attached to a second nanoparticle has a sequence complementary to a second portion of the target sequence in the DNA. Additional portions of the DNA could be targeted with corresponding nanoparticles. See Figure 17. Targeting several portions of a nucleic acid increases the magnitude of the detectable change.

The contacting of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid takes place under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the target sequence(s) of the nucleic acid. These hybridization conditions are well known in the art and can readily be optimized for the particular system employed. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989). Preferably stringent hybridization conditions are employed.

Faster hybridization can be obtained by freezing and thawing a solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The solution may be frozen in any convenient manner, such as placing it in a dry ice-alcohol bath for a sufficient time for the solution to freeze (generally about 1 minute for 100 μ L of solution). The solution must be thawed at a temperature below the thermal denaturation temperature, which can conveniently be room temperature for most combinations of nanoparticle-oligonucleotide conjugates and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nucleic acids. The hybridization is complete, and the detectable change may be observed, after thawing the solution.

The rate of hybridization can also be increased by warming the solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates to a temperature below the dissociation temperature (T_m) for the complex formed between the oligonucleotides on the nanoparticles and the target nucleic acid. Alternatively, rapid hybridization can be achieved by heating above the dissociation temperature (T_m) and allowing the solution to cool.

The rate of hybridization can also be increased by increasing the salt concentration (e.g., from 0.1 M to 0.3 M NaCl).

The detectable change that occurs upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid may be a color change, the formation of aggregates of the nanoparticles, or the precipitation of the aggregated nanoparticles. The color changes can be observed with the naked eye or spectroscopically. The formation of aggregates of the nanoparticles can be observed by electron microscopy or by nephelometry. The precipitation of the aggregated nanoparticles can be observed with the naked eye or microscopically. Preferred are changes observable with the naked eye. Particularly preferred is a color change observable with the naked eye.

The observation of a color change with the naked eye can be made more readily against a background of a contrasting color. For instance, when gold nanoparticles are used, the observation of a color change is facilitated by spotting a sample of the hybridization solution on a solid white surface (such as silica or alumina TLC plates, filter paper, cellulose nitrate membranes, and nylon membranes, preferably a C-18 silica TLC plate) and allowing the spot to dry. Initially, the spot retains the color of the hybridization solution (which ranges from pink/red, in the absence of hybridization, to purplish-red/purple, if there has been hybridization). On drying at room temperature or 80°C (temperature is not critical), a blue spot develops if the nanoparticle-oligonucleotide conjugates had been linked by hybridization with the target nucleic acid prior to spotting. In the absence of hybridization (e.g., because no target nucleic acid is present), the spot is pink. The blue and the pink spots are

WO 01/51665

PCT/US01/01190

stable and do not change on subsequent cooling or heating or over time. They provide a convenient permanent record of the test. No other steps (such as a separation of hybridized and unhybridized nanoparticle-oligonucleotide conjugates) are necessary to observe the color change.

- 5 An alternate method for easily visualizing the assay results is to spot a sample of nanoparticle probes hybridized to a target nucleic acid on a glass fiber filter (e.g., Borosilicate Microfiber Filter, 0.7 micron pore size, grade PG75, for use with gold nanoparticles (3 nm in size), while drawing the liquid through the filter. Subsequent rinsing with water washes the excess, non-hybridized probes through the filter, leaving behind an observable spot comprising the aggregates generated by
- 10 hybridization of the nanoparticle probes with the target nucleic acid (retained because these aggregates are larger than the pores of the filter). This technique may provide for greater sensitivity, since an excess of nanoparticle probes can be used. Unfortunately, the nanoparticle probes stick to many other solid surfaces that have
- 15 been tried (silica slides, reverse-phase plates, and nylon, nitrocellulose, cellulose and other membranes), and these surfaces cannot be used.

- An important aspect of the detection system illustrated in Figure 2 is that obtaining a detectable change depends on cooperative hybridization of two different oligonucleotides to a given target sequence in the nucleic acid. Mismatches in either
- 20 of the two oligonucleotides will destabilize the interparticle connection. It is well known that a mismatch in base pairing has a much greater destabilizing effect on the binding of a short oligonucleotide probe than on the binding of a long oligonucleotide probe. The advantage of the system illustrated in Figure 2 is that it utilizes the base discrimination associated with a long target sequence and probe (eighteen base-pairs
- 25 in the example illustrated in Figure 2), yet has the sensitivity characteristic of a short oligonucleotide probe (nine base-pairs in the example illustrated in Figure 2).

- The target sequence of the nucleic acid may be contiguous, as in Figure 2, or the two portions of the target sequence may be separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles, as illustrated in
- 30 Figure 3. In the latter case, one has the option of using a filler oligonucleotide which is free in solution and which has a sequence complementary to that of this third

WO 01/51665

PCT/US01/01190

portion (see Figure 3). When the filler oligonucleotide hybridizes with the third portion of the nucleic acid, a double-stranded segment is created, thereby altering the average distance between the nanoparticles and, consequently, the color. The system illustrated in Figure 3 may increase the sensitivity of the detection method.

5 Some embodiments of the method of detecting nucleic acid utilize a substrate. By employing a substrate, the detectable change (the signal) can be amplified and the sensitivity of the assay increased.

Any substrate can be used which allows observation of the detectable change. Suitable substrates include transparent solid surfaces (e.g., glass, quartz, plastics and
10 other polymers), opaque solid surface (e.g., white solid surfaces, such as TLC silica plates, filter paper, glass fiber filters, cellulose nitrate membranes, nylon membranes), and conducting solid surfaces (e.g., indium-tin-oxide (ITO)). The substrate can be any shape or thickness, but generally will be flat and thin. Preferred are transparent substrates such as glass (e.g., glass slides) or plastics (e.g., wells of microtiter plates).

15 In one embodiment, oligonucleotides are attached to the substrate. The oligonucleotides can be attached to the substrates as described in, e.g., Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996); Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996); Mucic et al., *Chem. Commun.*, **555** (1996); Zimmermann and Cox, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 492 (1994); Bottomley et al., *J. Vac. Sci. Technol. A*, **10**, 591
20 (1992); and Hegner et al., *FEBS Lett.*, **336**, 452 (1993).

The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic
25 acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and
30 the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the first

WO 01/51665

PCT/US01/01190

type of nanoparticles become bound to the substrate. After the nanoparticle-oligonucleotide conjugates are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid.

The oligonucleotides on the first type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides are attached to different nanoparticles. Figure 17 illustrates the use of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to multiple portions of a nucleic acid. Alternatively, the oligonucleotides on each of the first type of nanoparticles may have a plurality of different sequences, at least one of which must hybridize with a portion of the nucleic acid to be detected (see Figure 25B).

Finally, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to at least a portion of the sequence(s) of the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles with those on the second type of nanoparticles. After the nanoparticles are bound, the substrate is preferably washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, instead of using first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing oligonucleotides that would serve to bind the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13A. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye using ambient light, preferably viewing the substrate against a white background. As can be readily seen from Figure 13A, this method provides a means of amplifying a detectable change.

Another example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 25B. As in the example illustrated in Figure 13A, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA which can be observed with the naked eye.

In another embodiment, nanoparticles are attached to the substrate. Nanoparticles can be attached to substrates as described in, e.g., Grabar et al., *Analyt. Chem.*, 67, 73-743 (1995); Bethell et al., *J. Electroanal. Chem.*, 409, 137 (1996); Bar et al., *Langmuir*, 12, 1172 (1996); Colvin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5221 (1992).

After the nanoparticles are attached to the substrate, oligonucleotides are attached to the nanoparticles. This may be accomplished in the same manner

WO 01/51665

PCT/US01/01190

described above for the attachment of oligonucleotides to nanoparticles in solution. The oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid.

5 The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate prior to adding further nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

10 Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid. In this manner, the
15 second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates becomes bound to the substrate. After the nanoparticles are bound, any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid are washed from the substrate. A change (e.g., color change) may be detectable at this point.

20 The oligonucleotides on the second type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides may be attached to different nanoparticles. See Figure 17.

25 Next, a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the
30 oligonucleotides on the nanoparticles. In this manner, the binding oligonucleotide

WO 01/51665

PCT/US01/01190

becomes bound to the substrate. After the binding oligonucleotides are bound, unbound binding oligonucleotides are washed from the substrate.

Finally, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. After the nanoparticles are bound, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the second type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the third type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates (through the binding oligonucleotide). Also, the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. The amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the binding oligonucleotides and second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, the use of the binding oligonucleotide can be eliminated, and the second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be designed so that they hybridize directly to each other.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization

WO 01/51665

PCT/US01/01190

conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13B. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye as described above. As can be seen from Figure 13B, this embodiment of the method of the invention provides another means of amplifying the detectable change.

Another amplification scheme employs liposomes. In this scheme, oligonucleotides are attached to a substrate. Suitable substrates are those described above, and the oligonucleotides can be attached to the substrates as described above. For instance, where the substrate is glass, this can be accomplished by condensing the oligonucleotides through phosphoryl or carboxylic acid groups to aminoalkyl groups on the substrate surface (for related chemistry see Grabar et al., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 (1995)).

The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding additional components of the system.

Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. In this manner the liposomes become bound to the substrate. After the liposomes are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound liposomes and nucleic acid.

The oligonucleotides on the liposomes may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each

WO 01/51665

PCT/US01/01190

liposome may have all of the different oligonucleotides attached to it or the different oligonucleotides may be attached to different liposomes.

To prepare oligonucleotide-liposome conjugates, the oligonucleotides are linked to a hydrophobic group, such as cholesteryl (see Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 7535-7536 (1993)), and the hydrophobic-oligonucleotide conjugates are mixed with a solution of liposomes to form liposomes with hydrophobic-oligonucleotide conjugates anchored in the membrane (see Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, 37, 6243-6246 (1996)). The loading of hydrophobic-oligonucleotide conjugates on the surface of the liposomes can be controlled by controlling the ratio of hydrophobic-oligonucleotide conjugates to liposomes in the mixture. It has been observed that liposomes bearing oligonucleotides attached by hydrophobic interaction of pendent cholesteryl groups are effective in targeting polynucleotides immobilized on a nitrocellulose membrane (*Id.*). Fluorescein groups anchored in the membrane of the liposome were used as the reporter group. They served effectively, but sensitivity was limited by the fact that the signal from fluorescein in regions of high local concentration (*e.g.*, on the liposome surface) is weakened by self quenching.

The liposomes are made by methods well known in the art. See Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, 37, 6243 (1996). The liposomes will generally be about 5-50 times larger in size (diameter) than the nanoparticles used in subsequent steps. For instance, for nanoparticles about 13 nm in diameter, liposomes about 100 nm in diameter are preferably used.

The liposomes bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point.

The method may further comprise contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting
5 takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. This hybridization will generally be performed at mild temperatures (e.g., 5°C to 60°C), so conditions (e.g., 0.3-1.0 M NaCl) conducive to hybridization at room temperature are employed. Following hybridization, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the
10 substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the liposomes has multiple oligonucleotides (having the same or different
15 sequences) attached to it, each of the liposomes can hybridize to a plurality of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Similarly, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the liposomes may be hybridized to
20 more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive
25 additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in the intensity of the signal.

Also, instead of using second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing
30 oligonucleotides that would serve to bring the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. A mixture of oligonucleotides functionalized at one end for binding to the nanoparticles and with or without a hydrophobic group at the other end can be used on the first type of

5 nanoparticles. The relative ratio of these oligonucleotides bound to the average nanoparticle will be controlled by the ratio of the concentrations of the two oligonucleotides in the mixture. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 18.

10 The hybridization of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the liposomes may produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a pink/red color may be observed or a purple/blue color may be observed if the nanoparticles are close enough together. The hybridization of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the first type of nanoparticle-

15 oligonucleotide conjugates will produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a purple/blue color will be observed. All of these color changes may be observed with the naked eye.

In yet other embodiments utilizing a substrate, an "aggregate probe" can be used. The aggregate probe can be prepared by allowing two types of nanoparticles

20 having complementary oligonucleotides (a and a') attached to them to hybridize to form a core (illustrated in Figure 28A). Since each type of nanoparticle has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles. Thus, the core is an aggregate containing numerous nanoparticles of both types. The core is then capped with a third type of

25 nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides has sequence a or a' so that the third type of nanoparticles will hybridize to nanoparticles on the exterior of the core. The aggregate probe can also be prepared by utilizing two

30 types of nanoparticles (see Figure 28B). Each type of nanoparticles has at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides present

WO 01/51665

PCT/US01/01190

on each of the two types of nanoparticles has sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of the nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles has a sequence a which is complementary to the sequence a' of the second type of oligonucleotides on the
 5 second type of nanoparticles (see Figure 28B) so that the two types of nanoparticles hybridize to each other to form the aggregate probe. Since each type of nanoparticles has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles to form an aggregate containing numerous nanoparticles of both types.

10 The aggregate probe can be utilized to detect nucleic acid in any of the above assay formats performed on a substrate, eliminating the need to build up layers of individual nanoparticles in order to obtain or enhance a detectable change. To even further enhance the detectable change, layers of aggregate probes can be built up by using two types of aggregate probes, the first type of aggregate probe having
 15 oligonucleotides attached to it that are complementary to oligonucleotides on the other type of aggregate probe. In particular, when the aggregate probe is prepared as illustrated in Figure 28B, the aggregate probes can hybridize to each other to form the multiple layers. Some of the possible assay formats utilizing aggregate probes are illustrated in Figures 28C-D. For instance, a type of oligonucleotides comprising
 20 sequence c is attached to a substrate (see Figure 28C). Sequence c is complementary to the sequence c' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is added and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate, after which the aggregate probe is added and allowed to hybridize to the portion of the target nucleic acid having sequence b', thereby producing a detectable
 25 change. Alternatively, the target nucleic acid can first be hybridized to the aggregate probe in solution and subsequently hybridized to the oligonucleotides on the substrate, or the target nucleic acid can simultaneously be hybridized to the aggregate probe and the oligonucleotides on the substrate. In another embodiment, the target nucleic acid is allowed to react with the aggregate probe and another type of nanoparticles in
 30 solution (see Figure 28D). Some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence c so that they hybridize to sequence c' of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

target nucleic acid and some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence d so that they can subsequently hybridize to oligonucleotides comprising sequence d' which are attached to the substrate.

The core itself can also be used as a probe to detect nucleic acids. One possible assay format is illustrated in Figure 28E. As illustrated there, a type of oligonucleotides comprising sequence b is attached to a substrate. Sequence b is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is contacted with the substrate and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate. Then, another type of nanoparticles is added. Some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence c so which is complementary to sequence c' of the target nucleic acid so that the nanoparticles hybridize to the target nucleic acid bound to the substrate. Some of the oligonucleotides attached to the additional type of nanoparticles comprise sequence a or a' complementary to sequences a and a' on the core probe, and the core probe is added and allowed to hybridize to the oligonucleotides on the nanoparticles. Since each core probe has sequences a and a' attached to the nanoparticles which comprise the core, the core probes can hybridize to each other to form multiple layers attached to the substrate, providing a greatly enhanced detectable change. In alternative embodiments, the target nucleic acid could be contacted with the additional type of nanoparticles in solution prior to being contacted with the substrate, or the target nucleic acid, the nanoparticles and the substrate could all be contacted simultaneously. In yet another alternative embodiment, the additional type of nanoparticles could be replaced by a linking oligonucleotide comprising both sequences c and a or a'.

When a substrate is employed, a plurality of the initial types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates or oligonucleotides can be attached to the substrate in an array for detecting multiple portions of a target nucleic acid, for detecting multiple different nucleic acids, or both. For instance, a substrate may be provided with rows of spots, each spot containing a different type of oligonucleotide or oligonucleotide-nanoparticle conjugate designed to bind to a portion of a target nucleic acid. A sample containing one or more nucleic acids is applied to each spot, and the rest of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the assay is performed in one of the ways described above using appropriate oligonucleotide-nanoparticle conjugates, oligonucleotide-liposome conjugates, aggregate probes, core probes, and binding oligonucleotides.

Finally, when a substrate is employed, a detectable change can be produced or
 5 further enhanced by silver staining. Silver staining can be employed with any type of nanoparticles that catalyze the reduction of silver. Preferred are nanoparticles made of noble metals (e.g., gold and silver). See Bassell, et al., *J. Cell Biol.*, 126, 863-876 (1994); Braun-Howland et al., *Biotechniques*, 13, 928-931 (1992). If the nanoparticles being employed for the detection of a nucleic acid do not catalyze the
 10 reduction of silver, then silver ions can be complexed to the nucleic acid to catalyze the reduction. See Braun et al., *Nature*, 391, 775 (1998). Also, silver stains are known which can react with the phosphate groups on nucleic acids.

Silver staining can be used to produce or enhance a detectable change in any assay performed on a substrate, including those described above. In particular, silver
 15 staining has been found to provide a huge increase in sensitivity for assays employing a single type of nanoparticle, such as the one illustrated in Figure 25A, so that the use of layers of nanoparticles, aggregate probes and core probes can often be eliminated.

In assays for detecting nucleic acids performed on a substrate, the detectable change can be observed with an optical scanner. Suitable scanners include those used
 20 to scan documents into a computer which are capable of operating in the reflective mode (e.g., a flatbed scanner), other devices capable of performing this function or which utilize the same type of optics, any type of greyscale-sensitive measurement device, and standard scanners which have been modified to scan substrates according to the invention (e.g., a flatbed scanner modified to include a holder for the substrate)
 25 (to date, it has not been found possible to use scanners operating in the transmissive mode). The resolution of the scanner must be sufficient so that the reaction area on the substrate is larger than a single pixel of the scanner. The scanner can be used with any substrate, provided that the detectable change produced by the assay can be observed against the substrate (e.g., a grey spot, such as that produced by silver
 30 staining, can be observed against a white background, but cannot be observed against a grey background). The scanner can be a black-and-white scanner or, preferably, a

WO 01/51665

PCT/US01/01190

color scanner. Most preferably, the scanner is a standard color scanner of the type used to scan documents into computers. Such scanners are inexpensive and readily available commercially. For instance, an Epson Expression 636 (600 x 600 dpi), a UMAX Astra 1200 (300 x 300 dpi), or a Microtec 1600 (1600 x 1600 dpi) can be used. The scanner is linked to a computer loaded with software for processing the images obtained by scanning the substrate. The software can be standard software which is readily available commercially, such as Adobe Photoshop 5.2 and Corel Photopaint 8.0. Using the software to calculate greyscale measurements provides a means of quantitating the results of the assays. The software can also provide a color number for colored spots and can generate images (*e.g.*, printouts) of the scans which can be reviewed to provide a qualitative determination of the presence of a nucleic acid, the quantity of a nucleic acid, or both. In addition, it has been found that the sensitivity of assays such as that described in Example 5 can be increased by subtracting the color that represents a negative result (red in Example 5) from the color that represents a positive result (blue in Example 5). The computer can be a standard personal computer which is readily available commercially. Thus, the use of a standard scanner linked to a standard computer loaded with standard software can provide a convenient, easy, inexpensive means of detecting and quantitating nucleic acids when the assays are performed on substrates. The scans can also be stored in the computer to maintain a record of the results for further reference or use. Of course, more sophisticated instruments and software can be used, if desired.

A nanoparticle-oligonucleotide conjugate which may be used in an assay for any nucleic acid is illustrated in Figures 17D-E. This "universal probe" has oligonucleotides of a single sequence attached to it. These oligonucleotides can hybridize with a binding oligonucleotide which has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The second portion is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. A plurality of binding oligonucleotides having the same first portion and different second portions can be used, in which case the "universal probe", after hybridization to the binding

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides, can bind to multiple portions of the nucleic acid to be detected or to different nucleic acid targets.

In a number of other embodiments of the invention, the detectable change is created by labeling the oligonucleotides, the nanoparticles, or both with molecules (e.g., fluorescent molecules and dyes) that produce detectable changes upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the target nucleic acid. For instance, oligonucleotides attached to metal and semiconductor nanoparticles can have a fluorescent molecule attached to the end not attached to the nanoparticles. Metal and semiconductor nanoparticles are known fluorescence quenchers, with the magnitude of the quenching effect depending on the distance between the nanoparticles and the fluorescent molecule. In the unhybridized state, the oligonucleotides attached to the nanoparticles interact with the nanoparticles, so that significant quenching will be observed. See Figure 20A. Upon hybridization to a target nucleic acid, the fluorescent molecule will become spaced away from the nanoparticles, diminishing quenching of the fluorescence. See Figure 20A. Longer oligonucleotides should give rise to larger changes in fluorescence, at least until the fluorescent groups are moved far enough away from the nanoparticle surfaces so that an increase in the change is no longer observed. Useful lengths of the oligonucleotides can be determined empirically. Metallic and semiconductor nanoparticles having fluorescent-labeled oligonucleotides attached thereto can be used in any of the assay formats described above, including those performed in solution or on substrates.

Methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules and measuring fluorescence are well known in the art. Suitable fluorescent molecules are also well known in the art and include the fluoresceins, rhodamines and Texas Red. The oligonucleotides will be attached to the nanoparticles as described above.

In yet another embodiment, two types of fluorescent-labeled oligonucleotides attached to two different particles can be used. Suitable particles include polymeric particles (such as polystyrene particles, polyvinyl particles, acrylate and methacrylate particles), glass particles, latex particles, Sepharose beads and others like particles well known in the art. Methods of attaching oligonucleotides to such particles are well known in the art. See Chrissey et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039

WO 01/51665

PCT/US01/01190

(1996) (glass) and Charreyre et al., *Langmuir*, **13**, 3103-3110 (1997), Faby et al., *Nucleic Acids Research*, **21**, 1819-1826 (1993), Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **202**, 251-260 (1998), Kolarova et al., *Biotechniques*, **20**, 196-198 (1996) and Wolf et al., *Nucleic Acids Research*, **15**, 2911-2926 (1987) (polymer/latex). In particular, a wide variety of functional groups are available on the particles or can be incorporated into such particles. Functional groups include carboxylic acids, aldehydes, amino groups, cyano groups, ethylene groups, hydroxyl groups, mercapto groups, and the like. Nanoparticles, including metallic and semiconductor nanoparticles, can also be used.

The two fluorophores are designated **d** and **a** for donor and acceptor. A variety of fluorescent molecules useful in such combinations are well known in the art and are available from, e.g., Molecular Probes. An attractive combination is fluorescein as the donor and Texas Red as acceptor. The two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with **d** and **a** attached are mixed with the target nucleic acid, and fluorescence measured in a fluorimeter. The mixture will be excited with light of the wavelength that excites **d**, and the mixture will be monitored for fluorescence from **a**. Upon hybridization, **d** and **a** will be brought in proximity (see Figure 20B). In the case of non-metallic, non-semiconductor particles, hybridization will be shown by a shift in fluorescence from that for **d** to that for **a** or by the appearance of fluorescence for **a** in addition to that for **d**. In the absence of hybridization, the fluorophores will be too far apart for energy transfer to be significant, and only the fluorescence of **d** will be observed. In the case of metallic and semiconductor nanoparticles, lack of hybridization will be shown by a lack of fluorescence due to **d** or **a** because of quenching (see above). Hybridization will be shown by an increase in fluorescence due to **a**.

As will be appreciated, the above described particles and nanoparticles having oligonucleotides labeled with acceptor and donor fluorescent molecules attached can be used in the assay formats described above, including those performed in solution and on substrates. For solution formats, the oligonucleotide sequences are preferably chosen so that they bind to the target nucleic acid as illustrated in Figures 15A-G. In the formats shown in Figure 13A-B and 18, the binding oligonucleotides may be used

WO 01/51665

PCT/US01/01190

to bring the acceptor and donor fluorescent molecules on the two nanoparticles in proximity. Also, in the format illustrated in Figure 13A, the oligonucleotides attached to the substrate may be labeled with d. Further, other labels besides fluorescent molecules can be used, such as chemiluminescent molecules, which will give a detectable signal or a change in detectable signal upon hybridization.

Another embodiment of the detection method of the invention is a very sensitive system that utilizes detection of changes in fluorescence and color (illustrated in Figure 21). This system employs latex microspheres to which are attached oligonucleotides labeled with a fluorescent molecule and gold nanoparticles to which are attached oligonucleotides. The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared as described above. Methods of attaching oligonucleotides to latex microspheres are well known (see, e.g., Charreyre et al., *Langmuir*, 13:3103-3110 (1997); Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 202:251-260 (1998)), as are methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules (see above). The oligonucleotides on the latex microspheres and the oligonucleotides on the gold nanoparticles have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the latex microspheres and gold nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 21). Due to the quenching properties of the gold nanoparticles, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the latex microspheres is quenched while part of this network. Indeed, one gold nanoparticle can quench many fluorophore molecules since gold nanoparticles have very large absorption coefficients. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two particles can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 21). The microporous material should be transparent or a color (e.g., white) which allows for detection of the pink/red color of the gold nanoparticles. The microporous material should also have a pore size sufficiently large to allow the gold nanoparticles to pass through the pores and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sufficiently small to retain the latex microspheres on the surface of the microporous material when the microporous material is washed. Thus, when using such a microporous material, the size (diameter) of the latex microspheres must be larger than the size (diameter) of the gold nanoparticles. The microporous material must also be inert to biological media. Many suitable microporous materials are known in the art and include various filters and membranes, such as modified polyvinylidene fluoride (PVDF, such as Durapore™ membrane filters purchased from Millipore Corp.) and pure cellulose acetate (such as AcetatePlus™ membrane filters purchased from Micron Separations Inc.). Such a microporous material retains the network composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a red/pink color (due to the presence of the gold nanoparticles) and a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the gold nanoparticles) (see Figure 21). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by a white color and fluorescence, because the gold nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur), and the white latex microspheres would be trapped on top of it (see Figure 21). In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence and color can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the dehybridization temperature has been reached. Therefore, by looking at color or fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. As noted above, this detection method exhibits high sensitivity. As little as 3 femtomoles of single-stranded target nucleic acid 24 bases in length and 20 femtomoles of double-stranded target nucleic acid 24 bases in length have been detected with the naked eye. The method is also very simple to use. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorescent and colorimetric signals can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorimeter can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short pathlength.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

The above embodiment has been described with particular reference to latex microspheres and gold nanoparticles. Any other microsphere or nanoparticle, having the other properties described above and to which oligonucleotides can be attached, can be used in place of these particles. Many suitable particles and nanoparticles are described above, along with techniques for attaching oligonucleotides to them. In addition, microspheres and nanoparticles having other measurable properties may be used. For instance, polymer-modified particles and nanoparticles, where the polymer can be modified to have any desirable property, such as fluorescence, color, or electrochemical activity, can be used. See, Watson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 462-463 (1999) (polymer-modified gold nanoparticles). Also, magnetic, polymer-coated magnetic, and semiconducting particles can be used. See Chan et al., *Science*, **281**, 2016 (1998); Bruchez et al., *Science*, **281**, 2013 (1998); Kolarova et al., *Biotechniques*, **20**, 196-198 (1996).

In yet another embodiment, two probes comprising metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides labeled with fluorescent molecules attached to them are employed (illustrated in Figure 22). The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared and labeled with fluorescent molecules as described above. The oligonucleotides on the two types of oligonucleotide-nanoparticle conjugates have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 22). Due to the quenching properties of the metallic or semiconductor nanoparticles, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles is quenched while part of this network. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two probes can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 22). The microporous material should have a pore size sufficiently large to allow the nanoparticles to pass through the pores and sufficiently small to retain the network on the surface of the microporous material

WO 01/51665

PCT/US01/01190

when the microporous material is washed (see Figure 22). Many suitable microporous materials are known in the art and include those described above. Such a microporous material retains the network composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the metallic or semiconductor nanoparticles) (see Figure 22). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by fluorescence because the nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur) (see Figure 22). There is low background fluorescence because unbound probes are washed away from the detection area. In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the dehybridization temperature has been reached. Therefore, by looking at fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorescent signal can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorimeter can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short path length.

In yet other embodiments, a "satellite probe" is used (see Figure 24). The satellite probe comprises a central particle with one or several physical properties that can be exploited for detection in an assay for nucleic acids (e.g., intense color, fluorescence quenching ability, magnetism). Suitable particles include the nanoparticles and other particles described above. The particle has oligonucleotides (all having the same sequence) attached to it (see Figure 24). Methods of attaching oligonucleotides to the particles are described above. Those oligonucleotides comprise at least a first portion and a second portion, both of which are complementary to portions of the sequence of a target nucleic acid (see Figure 24). The satellite probe also comprises probe oligonucleotides. Each probe oligonucleotide has at least a first portion and a second portion (see Figure 24). The

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sequence of the first portion of the probe oligonucleotides is complementary to the first portion of the sequence of the oligonucleotides immobilized on the central particle (see Figure 24). Consequently, when the central particle and the probe oligonucleotides are brought into contact, the oligonucleotides on the particle
5 hybridize with the probe oligonucleotides to form the satellite probe (see Figure 24). Both the first and second portions of the probe oligonucleotides are complementary to portions of the sequence of the target nucleic acid (see Figure 24). Each probe oligonucleotide is labeled with a reporter molecule (see Figure 24), as further described below. The amount of hybridization overlap between the probe
10 oligonucleotides and the target (length of the portion hybridized) is as large as, or greater than, the hybridization overlap between the probe oligonucleotides and the oligonucleotides attached to the particle (see Figure 24). Therefore, temperature cycling resulting in dehybridization and rehybridization would favor moving the probe oligonucleotides from the central particle to the target. Then, the particles are
15 separated from the probe oligonucleotides hybridized to the target, and the reporter molecule is detected.

The satellite probe can be used in a variety of detection strategies. For example, if the central particle has a magnetic core and is covered with a material capable of quenching the fluorescence of fluorophores attached to the probe
20 oligonucleotides that surround it, this system can be used in an *in situ* fluorometric detection scheme for nucleic acids. Functionalized polymer-coated magnetic particles (Fe_3O_4) are available from several commercial sources including Dynal (DynabeadsTM) and Bangs Laboratories (EstaporSM), and silica-coated magnetic Fe_3O_4 nanoparticles could be modified (Liu et al., *Chem. Mater.*, 10, 3936-3940
25 (1998)) using well-developed silica surface chemistry (Chrissey et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039 (1996)) and employed as magnetic probes as well. Further, the dye molecule, 4-((4-(dimethylamino)phenyl)-azo)benzoic acid (DABCYL) has been shown to be an efficient quencher of fluorescence for a wide variety of fluorophores attached to oligonucleotides (Tyagi et al., *Nature Biotech.*, 16, 49-53
30 (1998)). The commercially-available succinimidyl ester of DABCYL (Molecular Probes) forms extremely stable amide bonds upon reaction with primary alkylamino

WO 01/51665

PCT/US01/01190

groups. Thus, any magnetic particle or polymer-coated magnetic particle with primary alkyl amino groups could be modified with both oligonucleotides, as well as these quencher molecules. Alternatively, the DABCYL quencher could be attached directly to the surface-bound oligonucleotide, instead of the alkyl amino-modified surface. The satellite probe comprising the probe oligonucleotides is brought into contact with the target. The temperature is cycled so as to cause dehybridization and rehybridization, which causes the probe oligonucleotides to move from the central particle to the target. Detection is accomplished by applying a magnetic field and removing the particles from solution and measuring the fluorescence of the probe oligonucleotides remaining in solution hybridized to the target.

This approach can be extended to a colorimetric assay by using magnetic particles with a dye coating in conjunction with probe oligonucleotides labeled with a dye which has optical properties that are distinct from the dye on the magnetic nanoparticles or perturb those of the dye on the magnetic nanoparticles. When the particles and the probe oligonucleotides are in solution together, the solution will exhibit one color which derives from a combination of the two dyes. However, in the presence of a target nucleic acid and with temperature cycling, the probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of a magnetic field will remove the magnetic, dye-coated particles from solution leaving behind probe oligonucleotides labeled with a single dye hybridized to the target. The system can be followed with a colorimeter or the naked eye, depending upon target levels and color intensities.

This approach also can be further extended to an electrochemical assay by using an oligonucleotide-magnetic particle conjugate in conjunction with a probe oligonucleotide having attached a redox-active molecule. Any modifiable redox-active species can be used, such as the well-studied redox-active ferrocene derivative. A ferrocene derivatized phosphoramidite can be attached to oligonucleotides directly using standard phosphoramidite chemistry. Mucic et al., *Chem. Commun.*, 555 (1996); Eckstein, ed., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, NY (1991). The ferrocenylphosphoramidite is prepared in a two-step synthesis from 6-bromohexylferrocene. In a typical preparation, 6-

WO 01/51665

PCT/US01/01190

bromohexylferrocene is stirred in an aqueous HMPA solution at 120°C for 6 hours to form 6-hydroxyhexylferrocene. After purification, the 6-hydroxyhexylferrocene is added to a THF solution of N,N-diisopropylethylamine and beta-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite to form the ferrocenylphosphoramidite.

5 Oligonucleotide-modified polymer-coated gold nanoparticles, where the polymer contains electrochemically-active ferrocene molecules, could also be utilized. Watson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 462-463 (1999). A copolymer of amino reactive sites (e.g., anhydrides) could be incorporated into the polymer for reaction with amino-modified oligonucleotides. Moller et al., *Bioconjugate Chem.*, 6, 174-178 (1995). In

10 the presence of target and with temperature cycling, the redox-active probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of the magnetic field will remove the magnetic particles from solution leaving behind the redox-active probe oligonucleotides hybridized with the target nucleic acid. The amount of target then can be determined by cyclic

15 voltammetry or any electrochemical technique that can interrogate the redox-active molecule.

In yet another embodiment of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the

20 sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The substrate must be made of a material which is not a conductor of electricity (e.g., glass, quartz, polymers, plastics). The electrodes may be made of any standard material (e.g., metals, such as gold, platinum, tin oxide). The electrodes can be fabricated by conventional microfabrication

25 techniques. See, e.g., *Introduction To Microlithography* (L.F. Thompson et al., eds., American Chemical Society, Washington, D.C. 1983). The substrate may have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Arrays of electrodes can be purchased (e.g., from AbbtchScientific,

30 Inc., Richmond, Virginia) or can be made by conventional microfabrication techniques. See, e.g., *Introduction To Microlithography* (L.F. Thompson et al., eds.,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

American Chemical Society, Washington, D.C. 1983). Suitable photomasks for making the arrays can be purchased (e.g., from Photonics, Milpitas, CA). Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes. The contacting takes place under conditions

5 effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles must be made of a material which can conduct electricity. Such nanoparticles include those made of metal, such as gold nanoparticles, and semiconductor materials. The nanoparticles will have one or more

10 types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is present, the circuit between the electrodes should be closed

15 because of the attachment of the nanoparticles to the substrate between the electrodes, and a change in conductivity will be detected. If the binding of a single type of nanoparticles does not result in closure of the circuit, this situation can be remedied by using a closer spacing between the electrodes, using larger nanoparticles, or employing another material that will close the circuit (but only if the nanoparticles

20 have been bound to the substrate between the electrodes). For instance, when gold nanoparticles are used, the substrate can be contacted with silver stain (as described above) to deposit silver between the electrodes to close the circuit and produce the detectable change in conductivity. Another way to close the circuit in the case where the addition of a single type of nanoparticles is not sufficient, is to contact the first

25 type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached to them that have a sequence complementary to the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting will take place under conditions effective so that the oligonucleotides on the second type of nanoparticle hybridize to those on the first type of oligonucleotides. If needed, or

30 desired, additional layers of nanoparticles can be built up by alternately adding the first and second types of nanoparticles until a sufficient number of nanoparticles are

WO 01/51665

PCT/US01/01190

attached to the substrate to close the circuit. Another alternative to building up individual layers of nanoparticles would be the use of an aggregate probe (see above).

The invention also provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least
5 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The container may further comprise filler
10 oligonucleotides having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions. The filler oligonucleotide may also be provided in a separate container.

In a second embodiment, the kit comprises at least two containers. The first container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a
15 sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a third container holding a filler oligonucleotide having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third
20 portion being located between the first and second portions.

In another alternative embodiment, the kits can have the oligonucleotides and nanoparticles in separate containers, and the oligonucleotides would have to be attached to the nanoparticles prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized so that the
25 oligonucleotides can be attached to the nanoparticles. Alternatively, the oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

In another embodiment, the kit comprises at least one container. The container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides
30 attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a portion

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles. The nanoparticles have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kits can have the substrate, oligonucleotides and nanoparticles in separate containers. The substrate, oligonucleotides, and nanoparticles would have to be appropriately attached to each other prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The substrate, oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized to expedite this attachment. Alternatively,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the substrate, oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides
5 attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first
portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes
having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the
sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding
nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first
10 type of oligonucleotides having a cholesterol group attached to the end not attached to
the nanoparticles so that the nanoparticles can attach to the liposomes by hydrophobic
interactions. The kit may further comprise a third container holding a second type of
nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a
sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of
15 oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of
oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence
complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of
nanoparticles.

In another embodiment, the kit may comprise a substrate having nanoparticles
20 attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a
sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit
also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregated probe
comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to
them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of
25 the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least
one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached
to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the
nucleic acid.

In yet another embodiment, the kit may comprise a substrate having
30 oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary
to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first

WO 01/51665

PCT/US01/01190

container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit may comprise a substrate having oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles. The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

In another embodiment, the kit may comprise a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another embodiment, kits may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of latex microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of gold nanoparticles having oligonucleotides attached

WO 01/51665

PCT/US01/01190

thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto.

5 The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are
10 labeled with a fluorescent molecule.

In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereto oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic
15 acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the
20 nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

In another embodiment, the kit may comprise a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are
25 bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit may comprise a container holding an
30 aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe

WO 01/51665

PCT/US01/01190

are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

5 In yet another embodiment, the invention provides a kit comprising a substrate having located thereon at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between the electrodes. In a preferred embodiment, the substrate has a plurality of pairs of electrodes attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

10 The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acid. The reagents may include PCR reagents, reagents for silver staining, hybridization reagents, buffers, etc. Other items which may be provided as part of the kit include a solid surface (for visualizing hybridization) such as a TLC silica plate, microporous materials, syringes, pipettes, cuvettes, containers, and a thermocycler (for controlling hybridization and de-hybridization temperatures). Reagents for functionalizing the nucleotides or nanoparticles may also be included in the kit.

The precipitation of aggregated nanoparticles provides a means of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids. This separation may be used as a step in the purification of the nucleic acid. Hybridization conditions are those described above for detecting a nucleic acid. If the temperature is below the T_m (the temperature at which one-half of an oligonucleotide is bound to its complementary strand) for the binding of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid, then sufficient time is needed for the aggregate to settle. The temperature of hybridization (e.g., as measured by T_m) varies with the type of salt (NaCl or $MgCl_2$) and its concentration. Salt compositions and concentrations are selected to promote hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid at convenient working temperatures without inducing aggregation of the colloids in the absence of the nucleic acid.

30 The invention also provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sequence. A linking oligonucleotide used for nanofabrication may have any desired sequence and may be single-stranded or double-stranded. It may also contain chemical modifications in the base, sugar, or backbone sections. The sequences chosen for the linking oligonucleotides and their lengths and strandedness will
 5 contribute to the rigidity or flexibility of the resulting nanomaterial or nanostructure, or a portion of the nanomaterial or nanostructure. The use of a single type of linking oligonucleotide, as well as mixtures of two or more different types of linking oligonucleotides, is contemplated. The number of different linking oligonucleotides used and their lengths will contribute to the shapes, pore sizes and other structural
 10 features of the resulting nanomaterials and nanostructures.

The sequence of a linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. The first, second or more binding portions of the linking oligonucleotide may have the same or different sequences.

15 If all of the binding portions of a linking oligonucleotide have the same sequence, only a single type of nanoparticle with oligonucleotides having a complementary sequence attached thereto need be used to form a nanomaterial or nanostructure. If the two or more binding portions of a linking oligonucleotide have different sequences, then two or more nanoparticle-oligonucleotide conjugates must
 20 be used. See, e.g., Figure 17. The oligonucleotides on each of the nanoparticles will have a sequence complementary to one of the two or more binding portions of the sequence of the linking oligonucleotide. The number, sequence(s) and length(s) of the binding portions and the distance(s), if any, between them will contribute to the structural and physical properties of the resulting nanomaterials and nanostructures.
 25 Of course, if the linking oligonucleotide comprises two or more portions, the sequences of the binding portions must be chosen so that they are not complementary to each other to avoid having one portion of the linking nucleotide bind to another portion.

The linking oligonucleotides and nanoparticle-oligonucleotide conjugates are
 30 contacted under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles with the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanostucture is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. These hybridization conditions are well known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme (see above). Stringent hybridization conditions are preferred.

5 The invention also provides another method of nanofabrication. This method comprises providing at least two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence
10 complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. Again, these hybridization conditions are
15 well-known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme.

In both nanofabrication methods of the invention, the use of nanoparticles having one or more different types of oligonucleotides attached thereto is contemplated. The number of different oligonucleotides attached to a nanoparticle and the lengths and sequences of the one or more oligonucleotides will contribute to
20 the rigidity and structural features of the resulting nanomaterials and nanostructures.

Also, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles will contribute to the properties of the resulting nanomaterials and nanostructures. These properties include optical properties, optoelectronic properties, electrochemical properties, electronic properties, stability in various solutions, pore and channel size
25 variation, ability to separate bioactive molecules while acting as a filter, etc. The use of mixtures of nanoparticles having different sizes, shapes and/or chemical compositions, as well as the use of nanoparticles having uniform sizes, shapes and chemical composition, are contemplated.

In either fabrication method, the nanoparticles in the resulting nanomaterial or
30 nanostructure are held together by oligonucleotide connectors. The sequences, lengths, and strandedness of the oligonucleotide connectors, and the number of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

different oligonucleotide connectors present will contribute to the rigidity and structural properties of the nanomaterial or nanostructure. If an oligonucleotide connector is partially double-stranded, its rigidity can be increased by the use of a filler oligonucleotide as described above in connection with the method of detecting nucleic acid. The rigidity of a completely double-stranded oligonucleotide connector can be increased by the use of one or more reinforcing oligonucleotides having complementary sequences so that they bind to the double-stranded oligonucleotide connector to form triple-stranded oligonucleotide connectors. The use of quadruple-stranded oligonucleotide connectors based on deoxyquanosine or deoxycytidine quartets is also contemplated.

Several of a variety of systems for organizing nanoparticles based on oligonucleotide hybridization are illustrated in the figures. In a simple system (Figure 1) one set of nanoparticles bears oligonucleotides with a defined sequence and another set of nanoparticles bears oligonucleotides with a complementary sequence. On mixing the two sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under hybridization conditions, the two types of particles are linked by double stranded oligonucleotide connectors which serve as spacers to position the nanoparticles at selected distances.

An attractive system for spacing nanoparticles involves the addition of one free linking oligonucleotide as illustrated in Figure 2. The sequence of the linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. This system is basically the same as utilized in the nucleic acid detection method, except that the length of the added linking oligonucleotide can be selected to be equal to the combined lengths of oligonucleotides attached to the nanoparticles. The related system illustrated in Figure 3 provides a convenient means to tailor the distance between nanoparticles without having to change the sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates employed.

A further elaboration of the scheme for creating defined spaces between nanoparticles is illustrated in Figure 4. In this case a double stranded segment of DNA or RNA containing overhanging ends is employed as the linking oligonucleotide. Hybridization of the single-stranded, overhanging segments of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

linking oligonucleotide with the oligonucleotides attached to the nanoparticles affords multiple double-stranded oligonucleotide cross-links between the nanoparticles.

Stiffer nanomaterials and nanostructures, or portions thereof, can be generated by employing triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles. In forming the triple strand, one may exploit either the pyrimidine:purine:pyrimidine motif (Moser, H.E. and Dervan, P.B. *Science*, **238**, 645-650 (1987) or the purine:purine:pyrimidine motif (Pilch, D.S. et al. *Biochemistry*, **30**, 6081-6087 (1991). An example of the organization of nanoparticles by generating triple-stranded connectors by the pyrimidine:purine:pyrimidine motif are illustrated in Figure 10. In the system shown in Figure 10, one set of nanoparticles is conjugated with a defined strand containing pyrimidine nucleotides and the other set is conjugated with a complementary oligonucleotide containing purine nucleotides. Attachment of the oligonucleotides is designed such that the nanoparticles are separated by the double-stranded oligonucleotide formed on hybridization. Then, a free pyrimidine oligonucleotide with an orientation opposite that for the pyrimidine strand linked to the nanoparticle is added to the system prior to, simultaneously with, or just subsequent to mixing the nanoparticles. Since the third strand in this system is held by Hoogsteen base pairing, the triple strand is relatively unstable thermally. Covalent bridges spanning the breadth of the duplex are known to stabilize triple-stranded complexes (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R.L., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8768-8772, (1992). Letsinger, R.L. and Wu, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7323-7328 (1995). Prakash, G. and Kool, J. *Am. Chem. Soc.*, **114**, 3523-3527 (1992).

For construction of nanomaterials and nanostructures, it may be desirable in some cases to "lock" the assembly in place by covalent cross-links after formation of the nanomaterial or nanostructure by hybridization of the oligonucleotide components. This can be accomplished by incorporating functional groups that undergo a triggered irreversible reaction into the oligonucleotides. An example of a functional group for this purpose is a stilbenedicarboxamide group. It has been demonstrated that two stilbenedicarboxamide groups aligned within hybridized oligonucleotides readily undergo cross-linking on irradiation with ultraviolet light (340 nm) (Lewis, F.D. et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8785-8792).

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Alternatively, one could employ the displacement of a 5'-O-tosyl group from an oligonucleotide, held at the 3'-position to a nanoparticle by a mercaptoalkyl group, with a thiophosphoryl group at the 3'-end of an oligonucleotide held to a nanoparticle by a mercaptoalkyl group. In the presence of an oligonucleotide that
5 hybridizes to both oligonucleotides and, thereby, brings the thiophosphoryl group into proximity of the tosyl group, the tosyl group will be displaced by the thiophosphoryl group, generating an oligonucleotide linked at the ends to two different nanoparticles. For displacement reactions of this type, see Herrlein et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 10151-10152 (1995). The fact that thiophosphoryl oligonucleotides do not react with
10 gold nanoparticles under the conditions employed in attaching mercaptoalkyl-oligonucleotides to gold nanoparticles enables one to prepare gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates anchored through the mercapto group to the nanoparticles and containing a terminal thiophosphoryl group free for the coupling reaction.

A related coupling reaction to lock the assembled nanoparticle system in place
15 utilizes displacement of bromide from a terminal bromoacetylaminonucleoside by a terminal thiophosphoryl-oligonucleotide as described in Gryaznov and Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 3808. This reaction proceeds much like the displacement of tosylate described above, except that the reaction is faster. Nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with thiophosphoryl groups are prepared as described
20 above. For preparation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with bromoacetyl amino groups, one first prepares an oligonucleotide terminated at one end by an aminonucleoside (e.g., either 5'-amino-5'-deoxythymidine or 3'-amino-3'-deoxythymidine) and at the other end by a mercaptoalkyl group. Molecules of this oligonucleotide are then anchored to the nanoparticles through the mercapto groups,
25 and the nanoparticle-oligonucleotide conjugate is then converted the N-bromoacetyl amino derivative by reaction with a bromoacetyl acylating agent.

A fourth coupling scheme to lock the assemblies in place utilizes oxidation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated by thiophosphoryl groups. Mild oxidizing agents, such as potassium triiodide, potassium ferricyanide (see Gryaznov
30 and Letsinger, *Nucleic Acids Research*, 21, 1403) or oxygen, are preferred.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

In addition, the properties of the nanomaterials and nanostructures can be altered by incorporating into the interconnecting oligonucleotide chains organic and inorganic functions that are held in place by covalent attachment to the oligonucleotide chains. A wide variety of backbone, base and sugar modifications are well known (see for example Uhlmann, E., and Peyman, A. *Chemical Reviews*, **90**, 544-584 (1990). Also, the oligonucleotide chains could be replaced by "Peptide Nucleic Acid" chains (PNA), in which the nucleotide bases are held by a polypeptide backbone (see Wittung, P. et al., *Nature*, **368**, 561-563 (1994).

As can be seen from the foregoing, the nanofabrication method of the invention is extremely versatile. By varying the length, sequence and strandedness of the linking oligonucleotides, the number, length, and sequence of the binding portions of the linking oligonucleotides, the length, sequence and number of the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles, the number and types of different linking oligonucleotides and nanoparticles used, and the strandedness of the oligonucleotide connectors, nanomaterials and nanostructures having a wide range of structures and properties can be prepared. These structures and properties can be varied further by cross-linking of the oligonucleotide connectors, by functionalizing the oligonucleotides, by backbone, base or sugar modifications of the oligonucleotides, or by the use of peptide-nucleic acids.

The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention include nanoscale mechanical devices, separation membranes, bio-filters, and biochips. It is contemplated that the nanomaterials and nanostructures of the invention can be used as chemical sensors, in computers, for drug delivery, for protein engineering, and as templates for biosynthesis/nanostructure fabrication/directed assembly of other structures. See generally Seeman et al., *New J. Chem.*, **17**, 739 (1993) for other possible applications. The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention also can include electronic devices. Whether nucleic acids could transport electrons has been the subject of substantial controversy. As shown in Example 21 below,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles assembled by DNA conduct electricity (the DNA connectors function as semiconductors).

Finally, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In the first such method, oligonucleotides are bound to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Charged nanoparticles include nanoparticles made of metal, such as gold nanoparticles.

The method comprises providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles. The moieties and functional groups are those described above for binding (*i.e.* by chemisorption or covalent bonding) oligonucleotides to nanoparticles. For instance, oligonucleotides having an alkanethiol, an alkanedisulfide or a cyclic disulfide covalently bound to their 5' or 3' ends can be used to bind the oligonucleotides to a variety of nanoparticles, including gold nanoparticles.

The oligonucleotides are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Such times can be determined empirically. For instance, it has been found that a time of about 12-24 hours gives good results. Other suitable conditions for binding of the oligonucleotides can also be determined empirically. For instance, a concentration of about 10-20 nM nanoparticles and incubation at room temperature gives good results.

Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The salt can be any water-soluble salt. For instance, the salt may be sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, or one of these salts in phosphate buffer. Preferably, the salt is added as a concentrated solution, but it could be added as a solid. The salt can be added to the water all at one time or the salt is added gradually over time. By "gradually over time" is meant that the salt is added in at least two portions at intervals spaced apart by a period of time. Suitable time intervals can be determined empirically.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. Gradually reducing the electrostatic attraction and repulsion by adding the salt gradually over time has been found to give the highest surface density of oligonucleotides on the nanoparticles. Suitable ionic strengths can be determined empirically for each salt or combination of salts. A final concentration of sodium chloride of from about 0.1 M to about 1.0 M in phosphate buffer, preferably with the concentration of sodium chloride being increased gradually over time, has been found to give good results.

After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. As will be described in detail below, an increased surface density of the oligonucleotides on the nanoparticles has been found to stabilize the conjugates. The time of this incubation can be determined empirically. A total incubation time of about 24-48, preferably 40 hours, has been found to give good results (this is the total time of incubation; as noted above, the salt concentration can be increased gradually over this total time). This second period of incubation in the salt solution is referred to herein as the "aging" step. Other suitable conditions for this "aging" step can also be determined empirically. For instance, incubation at room temperature and pH 7.0 gives good results.

The conjugates produced by use of the "aging" step have been found to be considerably more stable than those produced without the "aging" step. As noted above, this increased stability is due to the increased density of the oligonucleotides on the surfaces of the nanoparticles which is achieved by the "aging" step. The surface density achieved by the "aging" step will depend on the size and type of nanoparticles and on the length, sequence and concentration of the oligonucleotides. A surface density adequate to make the nanoparticles stable and the conditions necessary to obtain it for a desired combination of nanoparticles and oligonucleotides

WO 01/51665

PCT/US01/01190

can be determined empirically. Generally, a surface density of at least 10 picomoles/cm² will be adequate to provide stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Preferably, the surface density is at least 15 picomoles/cm². Since the ability of the oligonucleotides of the conjugates to hybridize with nucleic acid and
 5 oligonucleotide targets can be diminished if the surface density is too great, the surface density is preferably no greater than about 35-40 picomoles/cm².

As used herein, "stable" means that, for a period of at least six months after the conjugates are made, a majority of the oligonucleotides remain attached to the nanoparticles and the oligonucleotides are able to hybridize with nucleic acid and
 10 oligonucleotide targets under standard conditions encountered in methods of detecting nucleic acid and methods of nanofabrication.

Aside from their stability, the nanoparticle-oligonucleotide conjugates made by this method exhibit other remarkable properties. See, e.g., Examples 5, 7, and 19 of the present application. In particular, due to the high surface density of the
 15 conjugates, they will assemble into large aggregates in the presence of a target nucleic acid or oligonucleotide. The temperature over which the aggregates form and dissociate has unexpectedly been found to be quite narrow, and this unique feature has important practical consequences. In particular, it increases the selectivity and sensitivity of the methods of detection of the present invention. A single base
 20 mismatch and as little as 20 femtomoles of target can be detected using the conjugates. Although these features were originally discovered in assays performed in solution, the advantages of the use of these conjugates have been found to extend to assays performed on substrates, including those in which only a single type of conjugate is used.

It has been found that the hybridization efficiency of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be increased dramatically by the use of recognition oligonucleotides which comprise a recognition portion and a spacer portion. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence
 25 complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. In this embodiment, the recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion, and it is the recognition portion which
 30

WO 01/51665

PCT/US01/01190

hybridizes to the nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotide is designed so that it can bind to the nanoparticles. For instance, the spacer portion could have a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles. These are the same moieties and functional groups as described above. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. The length and sequence of the spacer portion providing good spacing of the recognition portion away from the nanoparticles can be determined empirically. It has been found that a spacer portion comprising at least about 10 nucleotides, preferably 10-30 nucleotides, gives good results. The spacer portion may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to become bound to the nanoparticles or to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the spacer portions should not be sequences complementary to each other, to that of the recognition oligonucleotides, or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. Preferably, the bases of the nucleotides of the spacer portion are all adenines, all thymines, all cytidines, or all guanines, unless this would cause one of the problems just mentioned. More preferably, the bases are all adenines or all thymines. Most preferably the bases are all thymines.

It has further been found that the use of diluent oligonucleotides in addition to recognition oligonucleotides provides a means of tailoring the conjugates to give a desired level of hybridization. The diluent and recognition oligonucleotides have been found to attach to the nanoparticles in about the same proportion as their ratio in the solution contacted with the nanoparticles to prepare the conjugates. Thus, the ratio of the diluent to recognition oligonucleotides bound to the nanoparticles can be controlled so that the conjugates will participate in a desired number of hybridization events. The diluent oligonucleotides may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the diluent oligonucleotides should not have a sequence complementary to that of the recognition

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. The diluent oligonucleotides are also preferably of a length shorter than that of the recognition oligonucleotides so that the recognition oligonucleotides can bind to their nucleic acid or oligonucleotide targets. If the
5 recognition oligonucleotides comprise spacer portions, the diluent oligonucleotides are, most preferably, about the same length as the spacer portions. In this manner, the diluent oligonucleotides do not interfere with the ability of the recognition portions of the recognition oligonucleotides to hybridize with nucleic acid or oligonucleotide targets. Even more preferably, the diluent oligonucleotides have the same sequence as
10 the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

As can be readily appreciated, highly desirable nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be prepared by employing all of the methods described above. By doing so, stable conjugates with tailored hybridization abilities can be produced.

Any of the above conjugates can be, and are preferably, used in any of the
15 methods of detecting nucleic acids described above, and the invention also provides a kit comprising a container holding any of the above conjugates. In addition, the conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of nanofabrication of the invention and the method of separating nucleic acids.

It is to be noted that the term "a" or "an" entity refers to one or more of that
20 entity. For example, "a characteristic" refers to one or more characteristics or at least one characteristic. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more" and "at least one" are used interchangeably herein. It is also to be noted that the terms "comprising", "including", and "having" have been used interchangeably.

EXAMPLES

Example 1: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold NanoparticlesA. Preparation Of Gold Nanoparticles

5 Gold colloids (13 nm diameter) were prepared by reduction of HAuCl_4 with citrate as described in Frens, *Nature Phys. Sci.*, **241**, 20 (1973) and Grabar, *Anal. Chem.*, **67**, 735 (1995). Briefly, all glassware was cleaned in aqua regia (3 parts HCl , 1 part HNO_3), rinsed with Nanopure H_2O , then oven dried prior to use. HAuCl_4 and sodium citrate were purchased from Aldrich Chemical Company. Aqueous HAuCl_4 (1 mM, 500

10 mL) was brought to reflux while stirring. Then, 38.8 mM sodium citrate (50 mL) was added quickly. The solution color changed from pale yellow to burgundy, and refluxing was continued for 15 min. After cooling to room temperature, the red solution was filtered through a Micron Separations Inc. 1 micron filter. Au colloids were characterized by UV-vis spectroscopy using a Hewlett Packard 8452A diode array

15 spectrophotometer and by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a Hitachi 8100 transmission electron microscope. Gold particles with diameters of 13 nm will produce a visible color change when aggregated with target and probe oligonucleotide sequences in the 10-35 nucleotide range.

B. Synthesis Of Oligonucleotides

20 Oligonucleotides were synthesized on a 1 micromole scale using a Milligene Expedite DNA synthesizer in single column mode using phosphoramidite chemistry. Eckstein, F. (ed.) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991). All solutions were purchased from Milligene (DNA synthesis grade). Average coupling efficiency varied from 98 to 99.8%, and the final dimethoxytrityl

25 (DMT) protecting group was not cleaved from the oligonucleotides to aid in purification.

For 3'-thiol-oligonucleotides, Thiol-Modifier C3 S-S CPG support was purchased from Glen Research and used in the automated synthesizer. During normal cleavage from the solid support (16 hr at 55° C), 0.05 M dithiothreitol (DTT) was added to the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

NH₄OH solution to reduce the 3' disulfide to the thiol. Before purification by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC), excess DTT was removed by extraction with ethyl acetate.

For 5'-thiol oligonucleotides, 5'-Thiol-Modifier C₆-phosphoramidite reagent was purchased from Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166. The oligonucleotides were synthesized, and the final DMT protecting group removed. Then, 1 ml of dry acetonitrile was added to 100 μmole of the 5' Thiol Modifier C₆-phosphoramidite. 200 μL of the amidite solution and 200 μL of activator (fresh from synthesizer) were mixed and introduced onto the column containing the synthesized oligonucleotides still on the solid support by syringe and pumped back and forth through the column for 10 minutes. The support was then washed (2 x 1 mL) with dry acetonitrile for 30 seconds. 700 μL of a 0.016 M I₂/H₂O/pyridine mixture (oxidizer solution) was introduced into the column, and was then pumped back and forth through the column with two syringes for 30 second. The support was then washed with a 1:1 mixture of CH₃CN pyridine (2 x 1 mL) for 1 minute, followed by a final wash with dry acetonitrile (2 x 1 mL) with subsequent drying of the column with a stream of nitrogen. The trityl protecting group was not removed, which aids in purification.

Reverse phase HPLC was performed with a Dionex DX500 system equipped with a Hewlett Packard ODS hypersil column (4.6 x 200 mm, 5 μm particle size) using 0.03 M Et₃NH⁺ OAc⁻ buffer (TEAA), pH 7, with a 1%/min. gradient of 95% CH₃CN/5% TEAA. The flow rate was 1 mL/min. with UV detection at 260 nm. Preparative HPLC was used to purify the DMT-protected unmodified oligonucleotides (elution at 27 min). After collection and evaporation of the buffer, the DMT was cleaved from the oligonucleotides by treatment with 80% acetic acid for 30 min at room temperature. The solution was then evaporated to near dryness, water was added, and the cleaved DMT was extracted from the aqueous oligonucleotide solution using ethyl acetate. The amount of oligonucleotide was determined by absorbance at 260 nm, and final purity assessed by reverse phase HPLC (elution time 14.5 minutes).

WO 01/51665

PCT/US01/01190

The same protocol was used for purification of the 3'-thiol-oligonucleotides, except that DTT was added after extraction of DMT to reduce the amount of disulfide formed. After six hours at 40°C, the DTT was extracted using ethyl acetate, and the oligonucleotides repurified by HPLC (elution time 15 minutes).

- 5 For purification of the 5' thiol modified oligonucleotides, preparatory HPLC was performed under the same conditions as for unmodified oligonucleotides. After purification, the trityl protecting group was removed by adding 150 μ L of a 50 mM AgNO_3 solution to the dry oligonucleotide sample. The sample turned a milky white color as the cleavage occurred. After 20 minutes, 200 μ L of a 10 mg/ml solution of DTT
- 10 was added to complex the Ag (five minute reaction time), and the sample was centrifuged to precipitate the yellow complex. The oligonucleotide solution (<50 OD) was then transferred onto a desalting NAP-5 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for purification (contains DNA Grade Sephadex G-25 Medium for desalting and buffer exchange of oligonucleotides greater than 10 bases). The amount of 5' thiol modified
- 15 oligonucleotide was determined by UV-vis spectroscopy by measuring the magnitude of the absorbance at 260 nm. The final purity was assessed by performing ion-exchange HPLC with a Dionex Nucleopak PA-100 (4 x 250) column using a 10 mM NaOH solution (pH 12) with a 2%/min gradient of 10 mM NaOH, 1M NaCl solution. Typically, two peaks resulted with elution times of approximately 19 minutes and 25 minutes
- 20 (elution times are dependent on the length of the oligonucleotide strand). These peaks corresponded to the thiol and the disulfide oligonucleotides respectively.

C. Attachment Of Oligonucleotides To Gold Nanoparticles

- An aqueous solution of 17nM (150 μ L) Au colloids, prepared as described in part A above, was mixed with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TTGCTGA, prepared as described
- 25 in part B and allowed to stand for 24 hours at room temperature in 1 ml Eppendorf capped vials. A second solution of colloids was reacted with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TACCGTTG. Note that these oligonucleotides are noncomplementary. Shortly before use, equal amounts of each of the two nanoparticle solutions were combined. Since the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides are noncomplementary, no reaction took place.

The oligonucleotide-modified nanoparticles are stable at elevated temperatures (80°C) and high salt concentrations (1M NaCl) for days and have not been observed to undergo particle growth. Stability in high salt concentrations is important, since such
 5 conditions are required for the hybridization reactions that form the basis of the methods of detection and nanofabrication of the invention.

Example 2: Formation Of Nanoparticle Aggregates

A. Preparation Of Linking Oligonucleotide

10 Two (nonthiolated) oligonucleotides were synthesized as described in part B of Example 1. They had the following sequences:

3' ATATGCGCGA TCTCAGCAAA [SEQ ID NO:1]; and

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA [SEQ ID NO:2].

Mixing of these two oligonucleotides in a 1 M NaCl, 10 mM phosphate buffered
 15 (pH 7.0) solution, resulted in hybridization to form a duplex having a 12-base-pair overlap and two 8-base-pair sticky ends. Each of the sticky ends had a sequence which was complementary to that of one of the oligonucleotides attached to the Au colloids prepared in part C of Example 1.

B. Formation Of Nanoparticle Aggregates

20 The linking oligonucleotides prepared in part A of this example (0.17 μ M final concentration after dilution with NaCl) were added to the nanoparticle-oligonucleotide conjugates prepared in part C of Example 1 (5.1 nM final concentration after dilution with NaCl) at room temperature. The solution was then diluted with aqueous NaCl (to a final concentration of 1 M) and buffered at pH 7 with 10 mM phosphate, conditions
 25 which are suitable for hybridization of the oligonucleotides. An immediate color change from red to purple was observed, and a precipitation reaction ensued. See Figure 6. Over the course of several hours, the solution became clear and a pinkish-gray precipitate settled to the bottom of the reaction vessel. See Figure 6.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

To verify that this process involved both the oligonucleotides and colloids, the precipitate was collected and resuspended (by shaking) in 1 M aqueous NaCl buffered at pH 7. Any of the oligonucleotides not hybridized to the nanoparticles are removed in this manner. Then, a temperature/time dissociation experiment was performed by monitoring the characteristic absorbance for the hybridized oligodeoxyribonucleotides (260 nm) and for the aggregated colloids which is reflective of the gold interparticle distance (700 nm). See Figure 7.

Changes in absorbance at 260 and 700 nm were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 2 UV-vis Spectrophotometer using a Peltier PTP-1 Temperature Controlled Cell Holder while cycling the temperature at a rate of 1°C/minute between 0°C and 80°C. DNA solutions were approximately 1 absorbance unit(s) (OD), buffered at pH 7 using 10 mM phosphate buffer and at 1M NaCl concentration.

The results are shown in Figure 8A. As the temperature was cycled between 0°C and 80°C (which is 38°C above the dissociation temperature (T_m) for the duplex ($T_m=42$ °C)), there was an excellent correlation between the optical signatures for both the colloids and oligonucleotides. The UV-vis spectrum for naked Au colloids was much less temperature dependent, Figure 8B.

There was a substantial visible optical change when the polymeric oligonucleotide-colloid precipitate was heated above its melting point. The clear solution turned dark red as the polymeric biomaterial de-hybridized to generate the unlinked colloids which are soluble in the aqueous solution. The process was reversible, as evidenced by the temperature traces in Figure 8A.

In a control experiment, a 14-T:14-A duplex was shown to be ineffective at inducing reversible Au colloid particle aggregation. In another control experiment, a linking oligonucleotide duplex with four base pair mismatches in the sticky ends was found not to induce reversible particle aggregation of oligonucleotide-modified nanoparticles (prepared as described in part C of Example 1 and reacted as described above). In a third control experiment, non-thiolated oligonucleotides having sequences

complementary to the sticky ends of the linking oligonucleotide and reacted with nanoparticles did not produce reversible aggregation when the nanoparticles were combined with the linking oligonucleotide.

Further evidence of the polymerization/assembly process came from

- 5 Transmission Electron Microscopy (TEM) studies of the precipitate. TEM was performed on a Hitachi 8100 Transmission Electron Microscope. A typical sample was prepared by dropping 100 μ L of colloid solution onto a holey carbon grid. The grid, then, was dried under vacuum and imaged. TEM images of Au colloids linked by hybridized oligonucleotides showed large assembled networks of the Au colloids, Figure
- 10 9A. Naked Au colloids do not aggregate under comparable conditions but rather disperse or undergo particle growth reactions. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991). Note that there is no evidence of colloid particle growth in the experiments performed to date; the hybridized colloids seem to be remarkably regular in size with an average diameter of 13 nm.
- 15 With TEM, a superposition of layers is obtained, making it difficult to assess the degree of order for three-dimensional aggregates. However, smaller scale images of single layer, two-dimensional aggregates provided more evidence for the self-assembly process, Figure 9B. Close-packed assemblies of the aggregates with uniform particle separations of approximately 60 Å can be seen. This distance is somewhat shorter than
- 20 the estimated 95 Å spacing expected for colloids connected by rigid oligonucleotide hybrids with the sequences that were used. However, because of the nicks in the duplex obtained after hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides, these were not rigid hybrids and were quite flexible. It should be noted that this is a variable that can be controlled by reducing the system from four overlapping
- 25 strands to three (thereby reducing the number of nicks) or by using triplexes instead of duplexes.

Example 3: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Gold colloids (13 nm diameter) were prepared as described in Example 1. Thiol-oligonucleotides [HS(CH₂)₆OP(O)(O')-oligonucleotide] were also prepared as described in Example 1.

The method of attaching thiol-oligonucleotides to gold nanoparticles described in Example 1 was found not to produce satisfactory results in some cases. In particular, when long oligonucleotides were used, the oligonucleotide-colloid conjugates were not stable in the presence of a large excess of high molecular weight salmon sperm DNA used as model for the background DNA that would normally be present in a diagnostic system. Longer exposure of the colloids to the thiol-oligonucleotides produced oligonucleotide-colloid conjugates that were stable to salmon sperm DNA, but the resulting conjugates failed to hybridize satisfactorily. Further experimentation led to the following procedure for attaching thiol-oligonucleotides of any length to gold colloids so that the conjugates are stable to high molecular weight DNA and hybridize satisfactorily.

A 1 mL solution of the gold colloids (17nM) in water was mixed with excess (3.68 :M) thiol-oligonucleotide (28 bases in length) in water, and the mixture was allowed to stand for 12-24 hours at room temperature. Then, 100 μ L of a 0.1 M sodium hydrogen phosphate buffer, pH 7.0, and 100 μ L of 1.0 M NaCl were premixed and added. After 10 minutes, 10 μ L of 1% aqueous NaN₃ were added, and the mixture was allowed to stand for an additional 40 hours. This "aging" step was designed to increase the surface coverage by the thiol-oligonucleotides and to displace oligonucleotide bases from the gold surface. Somewhat cleaner, better defined red spots in subsequent assays were obtained if the solution was frozen in a dry-ice bath after the 40-hour incubation and then thawed at room temperature. Either way, the solution was next centrifuged at 14,000 rpm in an Eppendorf Centrifuge 5414 for about 15 minutes to give a very pale pink supernatant containing most of the oligonucleotide (as indicated by the absorbance at 260 nm) along with 7-10% of the colloidal gold (as indicated by the absorbance at 520 nm), and a compact, dark, gelatinous residue at the bottom of the tube. The supernatant was removed, and the residue was resuspended in about 200 μ L of buffer (10 mM

WO 01/51665

PCT/US01/01190

phosphate, 0.1 M NaCl) and recentrifuged. After removal of the supernatant solution, the residue was taken up in 1.0 mL of buffer (10 mM phosphate, 0.1 M NaCl) and 10 μ L of a 1% aqueous solution of NaN_3 . Dissolution was assisted by drawing the solution into, and expelling it from, a pipette several times. The resulting red master solution was stable (i.e., remained red and did not aggregate) on standing for months at room temperature, on spotting on silica thin-layer chromatography (TLC) plates (see Example 4), and on addition to 2 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , or solutions containing high concentrations of salmon sperm DNA.

10 Example 4: Acceleration Of Hybridization of Nanoparticle-Oligonucleotide
Conjugates

The oligonucleotide-gold colloid conjugates I and II illustrated in Figure 11 were prepared as described in Example 3. The hybridization of these two conjugates was extremely slow. In particular, mixing samples of conjugates I and II in aqueous 0.1 M NaCl or in 10 mM MgCl_2 plus 0.1 M NaCl and allowing the mixture to stand at room temperature for a day produced little or no color change.

Two ways were found to improve hybridization. First, faster results were obtained by freezing the mixture of conjugates I and II (each 15 nM contained in a solution of 0.1 M NaCl) in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 5 minutes and then thawing the mixture at room temperature. The thawed solution exhibited a bluish color. When 1 μ L of the solution was spotted on a standard C-18 TLC silica plate (Alltech Associates), a strong blue color was seen immediately. The hybridization and consequent color change caused by the freeze-thawing procedure were reversible. On heating the hybridized solution to 80°C, the solution turned red and produced a pink spot on a TLC plate. Subsequent freezing and thawing returned the system to the (blue) hybridized state (both solution and spot on a C-18 TLC plate). In a similar experiment in which the solution was not refrozen, the spot obtained on the C-18 TLC plate was pink.

A second way to obtain faster results is to warm the conjugates and target. For

WO 01/51665

PCT/US01/01190

instance, in another experiment, oligonucleotide-gold colloid conjugates and an oligonucleotide target sequence in a 0.1 M NaCl solution were warmed rapidly to 65°C and allowed to cool to room temperature over a period of 20 minutes. On spotting on a C-18 silica plate and drying, a blue spot indicative of hybridization was obtained. In contrast, incubation of the conjugates and target at room temperature for an hour in 0.1 M NaCl solution did not produce a blue color indicative of hybridization. Hybridization is more rapid in 0.3 M NaCl.

Example 5: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The oligonucleotide-gold colloid conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 12A-F were prepared as described in Example 3, and the oligonucleotide target 3 illustrated in Figure 12A was prepared as described in Example 2. Mismatched and deletion targets 4, 5, 6, and 7 were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL. These oligonucleotides were synthesized on a 40 nmol scale and purified on an reverse phase C18 cartridge (OPC). Their purity was determined by performing ion exchange HPLC.

Selective hybridization was achieved by heating rapidly and then cooling rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 µL of 0.1 M NaCl plus 5 mM MgCl₂ containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 3 nanomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, heating to 74°C, cooling to the temperatures indicated in Table 1 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 µL sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. On drying (5 minutes), a strong blue color appeared if hybridization had taken place.

The results are presented in Table 1 below. Pink spots signify a negative test (*i.e.*, that the nanoparticles were not brought together by hybridization), and blue spots signify a positive test (*i.e.*, that the nanoparticles were brought into proximity due to hybridization involving both of the oligonucleotide-colloid conjugates).

WO 01/51665

PCT/US01/01190

TABLE 1

Reactants	Results (Color)			
	45°C	50°C	60°C	74°C
1 + 2	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 3 (match)	Blue	Blue	Blue	Blue
1 + 2 + 4 (half complement mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 5 (-6 bp)	Blue	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 6 (1 bp mismatch)	Blue	Blue	Pink	Pink
1 + 2 + 7 (2 bp mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink

5

As can be seen in Table 1, hybridization at 60°C gave a blue spot only for the fully-matched target 3. Hybridization at 50°C yielded blue spots with both targets 3 and 6. Hybridization at 45°C gave blue spots with targets 3, 5 and 6.

10 In a related series, a target containing a single mismatch T nucleotide was found to give a positive test at 58°C (blue color) and a negative test (red color) at 64°C with conjugates 1 and 2. Under the same conditions, the fully-matched target (3) gave a positive test at both temperatures, showing that the test can discriminate between a target that is fully matched and one containing a single mismatched base.

15 Similar results were achieved using a different hybridization method. In particular, selective hybridization was achieved by freezing, thawing and then warming rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 μ L of 0.1 M NaCl containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 10 picomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, freezing in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 5 minutes, thawing at room temperature, then warming rapidly to the
20 temperatures indicated in Table 2 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. The results are presented in Table 2.

TABLE 2

Reactants (probes) + target	Results (color)				
	RT	35°C	40°C	54°C	64°C
(1 + 2) + 3	blue	blue	blue	blue	pink
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	pink	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 7	blue	pink	pink	pink	pink

- 5 An important feature of these systems was that the color change associated with the temperature change was very sharp, occurring over a temperature range of about 1°C. This indicates high cooperativity in the melting and association processes involving the colloid conjugates and enables one to easily discriminate between oligonucleotide targets containing a fully-matched sequence and a single basepair mismatch.
- 10 The high degree of discrimination may be attributed to two features. The first is the alignment of two relatively short probe oligonucleotide segments (15 nucleotides) on the target is required for a positive signal. A mismatch in either segment is more destabilizing than a mismatch in a longer probe (e.g., an oligonucleotide 30 bases long) in a comparable two-component detection system. Second, the signal at 260 nm, obtained
- 15 on hybridization of the target oligonucleotides with the nanoparticle conjugates in solution, is nanoparticle-based, not DNA-based. It depends on dissociation of an assembly of nanoparticles organized in a polymeric network by multiple oligonucleotide duplexes. This results in a narrowing of the temperature range that is observed for aggregate dissociation, as compared with standard DNA thermal denaturation. In short,
- 20 some duplexes in the crosslinked aggregates can dissociate without dispersing the nanoparticles into solution. Therefore, the temperature range for aggregate melting is very narrow (4°C) as compared with the temperature range associated with melting the comparable system without nanoparticles (12°C). Even more striking and advantageous

WO 01/51665

PCT/US01/01190

for this detection approach is the temperature range for the colorimetric response ($<1^{\circ}\text{C}$) observe on the C18 silica plates. In principle, this three-component nanoparticle based strategy will be more selective than any two-component detection system based on a single-strand probe hybridizing with target nucleic acid.

- 5 A master solution containing 1 nmol of target 3 was prepared in 100 μl of hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). One μl of this solution corresponds to 10 picomole of target oligonucleotide. Serial dilutions were performed by taking an aliquot of the master solution and diluting it to the desired concentration with hybridization buffer. Table 3 shows the sensitivity obtained using 3 μl of a mixture of
- 10 probes 1 and 2 with different amounts of target 3. After performing the hybridization using freeze-thaw conditions, 3 μl aliquots of these solutions were spotted onto C-18 TLC plates to determine color. In Table 3 below, pink signifies a negative test, and blue signifies a positive test.

15

TABLE 3

Amount of Target	Results
1 picomole	blue (positive)
200 femtomole	blue (positive)
100 femtomole	blue (positive)
20 femtomole	blue (positive)
10 femtomole	purplish (ambiguous)

This experiment indicates that 10 femtomoles is the lower limit of detection for this particular system.

20

Example 6: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

DNA modified nanoparticles were adsorbed onto modified transparent substrates as shown in Figure 13B. This method involved the linking of DNA modified nanoparticles to nanoparticles that were attached to a glass substrate, using DNA

25 hybridization interactions.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Glass microscope slides were purchased from Fisher scientific. Slides were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scribing pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. To functionalize the slide surface with a thiol terminated silane, the slides were soaked in a degassed ethanolic 1% (by volume) mercaptopropyl-trimethoxysilane solution for 12 hours. The slides were removed from the ethanol solutions and rinsed with ethanol, then water. Nanoparticles were adsorbed onto the thiol terminated surface of the slides by soaking in solutions containing the 13 nm diameter gold nanoparticles (preparation described in Example 1). After 12 hours in the colloidal solutions, the slides were removed and rinsed with water. The resulting slides have a pink appearance due to the adsorbed nanoparticles and exhibit similar UV-vis absorbance profiles (surface plasmon absorbance peak at 520 nm) as the aqueous gold nanoparticle colloidal solutions. See Figure 14A.

DNA was attached to the nanoparticle modified surface by soaking the glass slides in 0.2 OD (1.7 µM) solution containing freshly purified 3' thiol oligonucleotide (3' thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) (synthesized as described in Examples 1 and 3). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.

To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide (prepared as described in Example 2) was 24 bp long (5' TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface (SEQ ID NO:33). The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.5 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 µM) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35])

WO 01/51665

PCT/US01/01190

(prepared as described in Example 3) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The substrate color had darkened to a purple color and the UV-vis absorbance at 520 nm approximately doubled (Figure 14A).

To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide/nanoparticle modified surface through DNA hybridization interactions with the linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, the substrate was placed in a cuvette containing 1 mL of hybridization buffer and the same apparatus used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored as the temperature of the substrate was increased at a rate of 0.5°C per minute. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 60°C. See Figure 14B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 62°C, which corresponds with the temperature seen for the three DNA sequences hybridized in solution without nanoparticles. See Figure 14B.

Example 7: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The detection system illustrated in Figures 15A-G was designed so that the two probes 1 and 2 align in a tail-to-tail fashion onto a complementary target 4 (see Figures 15A-G). This differs from the system described in Example 5 where the two probes align contiguously on the target strand (see Figures 12A-F).

The oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 15A-G were prepared as described in Example 3, except that the nanoparticles were redispersed in hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). The final nanoparticle-oligonucleotide conjugate concentration was estimated to be 13 nM by measuring the reduction in intensity of the surface plasmon band at 522 nm which gives rise to the red color of the nanoparticles. The oligonucleotide targets illustrated in

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Figures 15A-G were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL.

When 150 μ L of hybridization buffer containing 13 nM oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 was mixed with 60 picomoles (6 μ L) of target 4, the solution color immediately changed from red to purple. This color change occurs as a result of the formation of large oligonucleotide-linked polymeric networks of gold nanoparticles, which leads to a red shift in the surface plasmon resonance of the nanoparticles. When the solution was allowed to stand for over 2 hours, precipitation of large macroscopic aggregates was observed. A 'melting analysis' of the solution with the suspended aggregates was performed. To perform the 'melting analysis', the solution was diluted to 1 ml with hybridization buffer, and the optical signature of the aggregates at 260 nm was recorded at one minute intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute/degree. Consistent with characterization of the aggregate as an oligonucleotide-nanoparticle polymer, a characteristic sharp transition (full width at half maximum, $FW_{1/2}$ of the first derivative = 3.5°C) was observed with a "melting temperature" (T_m) of 53.5°C. This compares well with the T_m associated with the broader transition observed for oligonucleotides without nanoparticles (T_m = 54°C, $FW_{1/2}$ = ~13.5°C). The 'melting analysis' of the oligonucleotide solution without nanoparticles was performed under similar conditions as the analysis with nanoparticles, except that the temperature was increased from 10-80 °C. Also, the solution was 1.04 μ M in each oligonucleotide component.

To test the selectivity of the system, the T_m for the aggregate formed from the perfect complement 4 of probes 1 and 2 was compared with the T_m 's for aggregates formed from targets that contained one base mismatches, deletions, or insertions (Figures 15A-G). Significantly, all of the gold nanoparticle-oligonucleotide aggregates that contained imperfect targets exhibited significant, measurable destabilization when compared to the aggregates formed from the perfect complement, as evidenced by T_m values for the various aggregates (see Figures 15A-G). The solutions containing the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

imperfect targets could easily be distinguished from the solution containing the perfect complement by their color when placed in a water bath held at 52.5°C. This temperature is above the T_m of the mismatched polynucleotides, so only the solution with the perfect target exhibited a purple color at this temperature. A 'melting analysis' was also

5 performed on the probe solution which contained the half-complementary target. Only a minute increase in absorbance at 260 nm was observed.

Next, 2 μ L (20 picomoles) of each of the oligonucleotide targets (Figures 15A-G) were added to a solution containing 50 μ L of each probe (13 nM) in hybridization buffer. After standing for 15 minutes at room temperature, the solutions were transferred to a temperature-controlled water bath and incubated at the temperatures indicated in Table 4 below for five minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 silica plate. Two control experiments were performed to demonstrate that the alignment of both probes onto the target is necessary to trigger aggregation and, therefore, a color change. The first control experiment consisted of both probes 1 and 2 without target present. The second control experiment consisted of both probes 1 and 2 with a target 3 that is complementary to only one of the probe sequences (Figure 15B). The results are presented in Table 4 below. Pink spots signify a negative test, and blue spots signify a positive test.

Notably, the colorimetric transition that can be detected by the naked eye occurs over less than 1°C, thereby allowing one to easily distinguish the perfect target 4 from the targets with mismatches (5 and 6), an end deletion (7), and a one base insertion at the point in the target where the two oligonucleotide probes meet (8) (see Table 4). Note that the colorimetric transition T_c is close in temperature, but not identical, to T_m . In both controls, there were no signs of particle aggregation or instability in the solutions, as evidenced by the pinkish red color which was observed at all temperatures, and they showed negative spots (pink) in the plate test at all temperatures (Table 4).

The observation that the one base insertion target 8 can be differentiated from the fully complementary target 4 is truly remarkable given the complete complementarity of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the insertion strand with the two probe sequences. The destabilization of the aggregate formed from 8 and the nanoparticle probes appears to be due to the use of two short probes and the loss of base stacking between the two thymidine bases where the probe tails meet when hybridized to the fully complementary target. A similar effect was

5 observed when a target containing a three base pair insertion (CCC) was hybridized to the probes under comparable conditions, ($T_m = 51^\circ\text{C}$). In the system described above in Example 5, targets with base insertions could not be distinguished from the fully complementary target. Therefore, the system described in this example is very favorable

10 in terms of selectivity. This system also exhibited the same sensitivity as the system described in Example 5, which is approximately 10 femtomoles without amplification techniques.

The results indicate that any one base mismatch along the target strand can be detected, along with any insertions into the target strand. Importantly, the temperature range over which a color change can be detected is extremely sharp, and the change

15 occurs over a very narrow temperature range. This sharp transition indicates that there is a large degree of cooperativity in the melting process involving the large network of colloids which are linked by the target oligonucleotide strands. This leads to the remarkable selectivity as shown by the data.

20

TABLE 4

Reactants (probes) + target	Results (color)					
	RT	47.6°C	50.5°C	51.4°C	52.7°C	54.5°C
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 3	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	blue	blue	blue	blue	blue	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	blue	pink	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 7	blue	blue	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 8	blue	blue	pink	pink	pink	pink

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Example 8: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

A set of experiments were performed involving hybridization with 'filler' duplex oligonucleotides. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates 1 and 2 illustrated in Figure 16A were incubated with targets of different lengths (24, 48 and 72 bases in length) and complementary filler oligonucleotides, as illustrated in Figures 16A-C. Otherwise, the conditions were as described in Example 7. Also, the oligonucleotides and nanoparticle-oligonucleotide conjugates were prepared as described in Example 7.

As expected, the different reaction solutions had markedly different optical properties after hybridization due to the distance-dependent optical properties of the gold nanoparticles. See Table 5 below. However, when these solutions were spotted onto a C-18 TLC plate, a blue color developed upon drying at room temperature or 80°C, regardless of the length of the target oligonucleotide and the distance between the gold nanoparticles. See Table 5. This probably occurs because the solid support enhances aggregation of the hybridized oligonucleotide-nanoparticle conjugates. This demonstrates that by spotting solutions onto the TLC plate, the distance between the gold nanoparticles can be substantial (at least 72 bases), and colorimetric detection is still possible.

TABLE 5

Target Length	Results (Color)	
	Solution	TLC Plate
24 bases	Blue	Blue
48 bases	Pink	Blue
72 bases	Pink	Blue
Probes 1 + 2 only	Pink	Pink

The color changes observed in this and other examples occur when the distance between the gold nanoparticles (the interparticle distance) is approximately the same or less than the diameter of the nanoparticle. Thus, the size of the nanoparticles, the size of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the oligonucleotides attached to them, and the spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid affect whether a color change will be observable when the oligonucleotide-nanoparticle conjugates hybridize with the nucleic acid targets to form aggregates. For instance, gold nanoparticles with diameters of 13 nm will
 5 produce a color change when aggregated using oligonucleotides attached to the nanoparticles designed to hybridize with target sequences 10-35 nucleotides in length. The spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid adequate to give a color change will vary with the extent of aggregation, as the results demonstrate. The results also indicate that the solid surface enhances further aggregation
 10 of already-aggregated samples, bringing the gold nanoparticles closer together.

The color change observed with gold nanoparticles is attributable to a shift and broadening of the surface plasmon resonance of the gold. This color change is unlikely for gold nanoparticles less than about 4 nm in diameter because the lengths of the oligonucleotides necessary for specific detection of nucleic acid would exceed the
 15 nanoparticle diameter.

Example 9: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

Five microliters of each probe 1 and 2 (Figure 12A) were combined to a final concentration of 0.1 M NaCl with buffer (10 mM phosphate, pH 7), and 1 microliter of
 20 human urine was added to the solution. When this solution was frozen, thawed, and then spotted on a C-18 TLC plate, a blue color did not develop. To a similar solution containing 12.5 microliters of each probe and 2.5 microliters of human urine, 0.25 microliters (10 picomoles) of target 3 (Figure 12A) was added. The solution was frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, and a blue spot was obtained.

25 Similar experiments were performed in the presence of human saliva. A solution containing 12.5 microliters of each probe 1 and 2 and 0.25 microliters of target 3 was heated to 70°C. After cooling to room temperature, 2.5 microliters of a saliva solution (human saliva diluted 1:10 with water) was added. After the resultant solution was

WO 01/51665

PCT/US01/01190

frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, a blue spot was obtained, indicating hybridization of the probes with the target. In control experiments with no target added, blue spots were not observed.

5 Example 10: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

An assay was performed as illustrated in Figure 13A. First, glass microscope slides, purchased from Fisher scientific, were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scribing pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of
10 water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. Thiol-modified DNA was adsorbed onto the slides using a modified procedure reported in the literature (Chrissey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996) and Chrissey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996)). First, the slides were soaked in a 1% solution of trimethoxysilylpropyldiethyltriamine (DETA, purchased from United Chemical
15 Technologies, Bristol, PA) in 1 mM acetic acid in Nanopure water for 20 minutes at room temperature. The slides were rinsed with water, then ethanol. After drying with a dry nitrogen stream, the slides were baked at 120°C for 5 minutes using a temperature-controlled heating block. The slides were allowed to cool, then were soaked in a 1 mM succinimidyl 4-(maleimidophenyl)-butyrate (SMPB, purchased from Sigma Chemicals)
20 solution in 80:20 methanol:dimethoxy sulfoxide for 2 hours at room temperature. After removal from the SMPB solution and rinsing with ethanol, amine sites that were not coupled to the SMPB crosslinker were capped as follows. First, the slides were soaked for 5 minutes in a 8:1 THF:pyridine solution containing 10% 1-methyl imidazole. Then the slides were soaked in 9:1 THF:acetic anhydride solution for five minutes. These
25 capping solutions were purchased from Glen Research, Sterling, VA. The slides were rinsed with THF, then ethanol, and finally water.

DNA was attached to the surfaces by soaking the modified glass slides in a 0.2 OD (1.7 μM) solution containing freshly purified oligonucleotide (3' thiol

WO 01/51665

PCT/US01/01190

ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.

To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide
 5 was 24 bp long (3' TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface. The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.5 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 μ M) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the
 10 substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35]) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The glass substrate's color had changed from clear
 15 and colorless to a transparent pink color. See Figure 19A.

Additional layers of nanoparticles were added to the slides by soaking the slides in a solution of the linking oligonucleotide as described above and then soaking in a solution containing 13 nm gold nanoparticles having oligonucleotides (3' thiol
 ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) attached thereto. After soaking for 12 hours, the
 20 slides were removed from the nanoparticle solution and rinsed and soaked in hybridization buffer as described above. The color of the slide had become noticeably more red. See Figure 19A. A final nanoparticle layer was added by repeating the linking oligonucleotide and nanoparticle soaking procedures using 13 nm gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID
 25 NO:35]) as the final nanoparticle layer. Again, the color darkened, and the UV-vis absorbance at 520 nm increased. See Figure 19A.

To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide modified surface through DNA hybridization interactions with the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, a slide was placed in a cuvette containing 1.5 mL of hybridization buffer, and an apparatus similar to that used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored at each degree as the temperature of the substrate was increased from 20°C to 80°C, with a hold time of 1 minute at each integral degree. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 52°C. See Figure 19B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 55°C, which corresponds with the temperature seen for the oligonucleotide-nanoparticle conjugates and linking oligonucleotides hybridized in solution. See Figure 19B.

10 Example 11: Assay of a Polyribonucleotide Using
Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates as Probes

The previous Examples utilized oligo-deoxyribonucleotides as targets in the assays. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide conjugates can also be used as probes in assaying a polyribonucleotide. The experiment was carried out by adding 1 µL of a solution of poly(rA) (0.004 A₂₆₀ Units) to 100 µL of gold nanoparticles (~10 nM in particles) conjugated to dT₂₀ (a 20-mer oligonucleotide containing thymidylate residues) through a mercaptoalkyl linker at the 5'-terminus. The conjugation procedure was that described in Example 3. Following freezing in a Dry Ice/isopropyl alcohol bath, thawing at room temperature, and spotting on a C18 TLC plate as described in Example 4, a blue spot characteristic of aggregation of the nanoparticles by hybridization was observed. Control experiments carried out in absence of the target gave a pink spot, rather than a blue spot.

25 Example 12: Assay for Protective Antigen DNA Segment of Anthrax
Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

In many cases amplification of a double-stranded DNA target by PCR is needed to provided sufficient material for an assay. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be used to assay for a DNA strand in the presence of its complement (*i.e.*, assaying for a single strand after thermal

WO 01/51665

PCT/US01/01190

dehybridization of a double-stranded target) and can recognize and specifically bind to an amplicon obtained from a PCR reaction.

A PCR solution containing a 141 base pair duplex amplicon of the Protective Antigen segment of Anthrax was provided by the Navy (sequence given in Figure 23).

- 5 The assay for this amplicon was carried out by isolating the DNA from 100 μ L of the PCR solution using a Qiaquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) and the standard protocol for this kit, with the exception that elution of the DNA was effected with 10 mM phosphate buffer at pH 8.5, rather than with the buffer provided with the kit. The eluant was then evaporated to dryness on a Speed Vac (Savant). To this
- 10 residue was added 5 μ L of a master mix prepared by mixing equal volumes of each of two solutions of two different oligonucleotide-nanoparticle probes (see Figure 23). Each oligonucleotide-nanoparticle probe was prepared as described in Example 3. The solutions of the probes which were combined to form the master mix were prepared by adding 10 μ L of 2 M NaCl and 5 μ L of oligonucleotide blocker solution (50 pmoles of
- 15 each Blocker oligonucleotide (see Figure 23 and below) in a 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0., solution) to 5 μ L of full-strength (about 10 nM) nanoparticle-oligonucleotide solution. The amplicon-probe mixture was heated to 100°C for 3 minutes, then frozen in a DRY ICE/ethanol bath and allowed to come to room temperature. A small aliquot (2 μ L) was spotted on a C18 TLC plate and allowed to dry.
- 20 A strong blue spot indicative of hybridization was obtained.

- Control tests carried out in the same manner in absence of the amplicon target DNA, in the absence of Probe 1, in the absence of Probe 2, or in the absence of the sodium chloride, were all negative, that is, gave a pink spot. Similarly a test carried out using probes 1 and 2 with a PCR amplicon derived from the Lethal Factor segment of
- 25 Anthrax in place of the Protective Antigen Segment was negative (pink spot). These controls confirmed that both probes were essential, that salt conditions appropriate for hybridization were needed, and that the test was specific for the specified target sequence.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

The oligonucleotide Blockers were added to inhibit binding of the second strand of the initial duplex target (*i.e.*, the strand complementary to the target strand) to regions of the target nucleic acid strand outside the segment that binds to the probes (see Figure 23 for sequences), since such binding interferes with binding of the nanoparticle oligonucleotide probes to the target strand. In this example, the Blocker oligonucleotides were complementary to the single-stranded target in regions not covered by the probes. An alternative scheme is to use blocker oligonucleotides that are complementary to the PCR complementary strand (the strand complementary to the target strand) outside the region that competes with the probe oligonucleotides.

Example 13: Direct assay of PCR Amplicons without isolation
of the amplicons from the PCR solution

The procedure described in Example 12 involved separation of the PCR amplicon from the PCR solution before addition of the nanoparticle-oligonucleotide probes. For many purposes it would be desirable to be able to carry out the assay directly in the PCR solution without preliminary isolation of the polynucleotide products. A protocol for such an assay has been developed and is described below. This protocol has been performed successfully with several PCR products derived under standard conditions using a GeneAmp PCR Reagent Kit with Amplitaq DNA polymerase.

To 50 μ L of the PCR sample solution, 5 μ L of a mixture of two gold nanoparticle-oligonucleotide probes (0.008 A₂₂₀ Units of each) was added, followed by addition of a solution made up from 1 μ L of Blocker oligonucleotides (10 pmols each), 5 μ L of 5 M NaCl, and 2 μ L of 150 mM MgCl₂. This mixture was heated for 2 minutes at 100°C to separate the strands of the duplex target, the tube was immersed directly in a cold bath (*e.g.*, Dry Ice/ethanol) for 2 minutes, then removed, and the solution allowed to thaw at room temperature (the freeze-thaw cycle facilitates hybridization of the probes with the target oligonucleotide). Finally, a few μ L of the solution were spotted on a plate (*e.g.*, C18 RP TLC plate, a silica plate, a nylon membrane, etc.). As usual, blue color

WO 01/51665

PCT/US01/01190

signifies the presence of the targeted nucleic acid in the PCR solution; a pink color is negative for this target.

5 **Example 14: Direct Recognition of Duplex Oligonucleotides Without Dehybridization, Using Assembly of Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates**

In the previous Examples, double-stranded targets were dehybridized by heating to generate single strands which interacted with single-stranded oligonucleotide probes bound to nanoparticles. The present example demonstrates that in cases where triple-stranded complexes can form, double-stranded oligonucleotide sequences can be
10 recognized by the nanoparticle probes without prior dehybridization of the target.

Tests were carried out with two different systems-- polyA:polyU and dA₄₀:dT₄₀-- by adding 1 μ L of a solution containing 0.8 A₂₆₀ Units of the target duplex in 100 μ L of buffer (0.1 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0) to 100 μ L of a colloidal solution of Au-sdT₂₀ nanoparticle-oligonucleotide conjugate (~10 nM in particles; see Example 11) in
15 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. Subsequent quick freezing by immersing the tube in a Dry Ice/isopropyl alcohol bath and thawing by removing the tube from the bath and letting it stand at room temperature (22°C), followed by spotting 3 μ L of the solution on a C18 TLC plate, afforded a blue spot characteristic of hybridization and aggregation of the nanoparticles.

20 The rationale for this test is that the nanoparticle probes (bearing pyrimidine oligonucleotides in this example) bind in a sequence specific manner at purine oligonucleotide/pyrimidine oligonucleotide sites along the duplex target. Since many binding sites are available on each double stranded entity, the binding leads to formation of an aggregate of nanoparticles. The results show that this assay, based on formation of
25 triple-stranded complexes involving the nanoparticle probes, works both for oligonucleotide and oligodeoxyribonucleotide double-stranded targets.

Example 15: Assay Employing Both Fluorescence And Colorimetric Detection

WO 01/51665

PCT/US01/01190

All hybridization experiments were performed in a 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0, buffer solution. AcetatePlus™ filtration membranes (0.45 µm) were purchased from Micron Separations Inc., Westboro, MA. Alkylamine-functionalized latex microspheres (3.1 µm) were purchased from Bangs Laboratories, Fishers IN.

5 Fluorophore-labeled oligonucleotides functionalized with alkylamino groups at the 3'-terminus were synthesized using standard phosphoramidite chemistry (Eckstein, ed., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, N.Y. 1991) with an Amino-Modifier C7 CPG solid support (Glen Research) and a 5'-fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research) on an Expedite 8909 synthesizer and were

10 purified by reverse phase HPLC. They were attached to the amine-functionalized latex microspheres by means of diisothiocyanate coupling to yield a dithiurea linkage as described in Charreyre et al., *Langmuir*, 13, 3103-3110 (1997). Briefly, a DMF solution of a one thousand fold excess of 1,4-phenylene diisothiocyanate was added to an aqueous borate buffer solution (0.1 M, pH 9.3) of the amino-modified oligonucleotide. After

15 several hours, the excess 1,4-phenylene diisothiocyanate was extracted with butanol and the aqueous solution lyophilized. The activated oligonucleotides were redissolved in borate buffer and reacted with the amino-functionalized latex microspheres in a carbonate buffer (0.1 M, pH 9.3, 1 M NaCl). After 12 hrs, the particles were isolated by centrifugation and washed three times with buffered saline solution (0.3 M NaCl, 10 mM

20 phosphate pH 7.0). The 5'-oligonucleotide-modified gold nanoparticle probes were prepared as described in Example 3.

The target oligonucleotide (1-5 µl, 3 nM) was added to 3 µl of fluorophore-labeled oligonucleotide-modified latex microsphere probe solution (3.1 µm; 100 fM). After 5 minutes, 3 µl of the 5' oligonucleotide-modified gold nanoparticle probe solution

25 (13 nm; 8 nM) were added to the solution containing the target and latex microsphere probes. Upon standing for an additional 10 minutes, the solution containing both probes and target was vacuum-filtered through the AcetatePlus membrane. The membrane retained the relatively large latex particles and allowed any non-hybridized gold

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticle probes to pass through. In the presence of a sufficient concentration of target, the latex microspheres and the gold nanoparticles hybridized with the target, and a red spot was observed on the membrane (positive result). A control experiment was always carried out where the aliquot of solution containing the target oligonucleotide was replaced by an equal volume of water. In this case, a white spot was left on the membrane (negative result). For a 24-base-pair model system, using the unaided eye, 3 femtomoles of target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

A double-stranded target oligonucleotide (1-5 μ l, 20 nM), 3 μ l of a solution of fluorophore-labeled- oligonucleotide-latex microspheres (3.1 μ m; 100 fM) and 3 μ l of a solution of 5'-oligonucleotide-gold nanoparticles (13 nm; 8 nM) were combined and heated to 100 °C for 3 minutes. Then, the solution was immediately frozen by immersing the reaction vessel containing it in a liquid N₂ bath for 3 minutes. This solution was then thawed at room temperature and filtered as described above. For a 24-base pair model system, using the unaided eye, 20 femtomoles of duplex target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

When monitored by fluorescence, the detection method described above proved to be difficult due to background fluorescence from the membrane. This problem was overcome by "washing" the latex microspheres by centrifugation to remove excess gold nanoparticle probes before spotting an aliquot on a reverse-phase TLC plate. The hybridization experiments were performed as described above. After hybridization was effected between the probes and target, 10 μ l of buffer were added to the solution, which was subsequently centrifuged at 10,000 x g for 2 minutes. The supernatant was removed, and 5 μ l of buffer were added to help resuspend the precipitate. A 3 μ l aliquot was then spotted on a reverse-phase TLC plate. For both single-stranded and duplex target oligonucleotides, 25 femtomoles could be detected colorimetrically by the naked eye. Fluorescent spots could be visualized by the naked eye with a hand-held UV-lamp until the target amount in the 3 μ l aliquot used to form the spot was as low as 50 femtomoles. It is believed that optimization of this system will allow for detection of even lower

WO 01/51665

PCT/US01/01190

amounts of target nucleic acid.

Example 16: Assays Employing Silver Staining

DNA hybridization tests on oligonucleotide-modified substrates are commonly
5 used to detect the presence of specific DNA sequences in solution. The developing
promise of combinatorial DNA arrays for probing genetic information illustrates the
importance of these heterogeneous sequence assays to future science. In most assays, the
hybridization of fluorophore-labeled targets to surface-bound probes is monitored by
fluorescence microscopy or densitometry. Although fluorescence detection is very
10 sensitive, its use is limited by the expense of the experimental equipment and by
background emissions from most common substrates. In addition, the selectivity of
labeled oligonucleotide targets for perfectly complementary probes over those with
single-base mismatches is poor, preventing the use of surface hybridization tests for
detection of single nucleotide polymorphisms. A detection scheme which improved upon
15 the simplicity, sensitivity and selectivity of fluorescent methods could allow the full
potential of combinatorial sequence analysis to be realized. The present invention
provides such improved detection schemes.

For instance, oligonucleotide-modified gold nanoparticles and unmodified DNA
target could be hybridized to oligonucleotide probes attached to a glass substrate in a
20 three-component sandwich assay (see Figures 25A-B). Note that the nanoparticles can
either be individual ones (see Figure 25A) or "trees" of nanoparticles (see Figure 25B).
The "trees" increase signal sensitivity as compared to the individual nanoparticles, and
the hybridized gold nanoparticles "trees" often can be observed with the naked eye as
dark areas on the glass substrate. When "trees" are not used, or to amplify the signal
25 produced by the "trees," the hybridized gold nanoparticles can be treated with a silver
staining solution. The "trees" accelerate the staining process, making detection of target
nucleic acid faster as compared to individual nanoparticles.

The following is a description of one specific system (illustrated in Figure 25A).

WO 01/51665

PCT/US01/01190

- Capture oligonucleotides (3' - HS(CH₂)₃ - A₁₀ATGCTCAACTCT; SEQ ID NO: 43) were immobilized on a glass substrate as described in Example 10. A target oligonucleotide (5' - TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG - 3', SEQ ID NO: 44, concentrations given below in Table 6 for each experiment) was hybridized with the capture oligonucleotides in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer as described in Example 10. The substrate was rinsed twice with the same buffer solution and immersed in a solution containing gold nanoparticle probes functionalized with target-complementary DNA (5' - HS(CH₂)₆A₁₀CGCATTTCAGGAT, SEQ ID NO: 45)(preparation described in Example 3) for 12 hours. Next, the substrate was rinsed copiously with 0.3 M NaNO₃ to remove Cl⁻.
- 10 The substrate was then developed with silver staining solution (1:1 mixture of Silver Enhancer Solutions A and B, Sigma Chemical Co., # S-5020 and # S-5145) for 3 minutes. Greyscale measurements were made by scanning the substrate on a flatbed scanner (normally used for scanning documents into a computer) linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements (e.g., Adobe
- 15 Photoshop). The results are presented in Table 6 below.

TABLE 6

Target DNA Concentration	Mean Greyscale	Standard Deviation
10 nM	47.27	2.10
5 nM	53.46	0.94
2 nM	54.66	1.17
1 nM	59.98	1.82
500 pM	61.61	2.26
200 pM	80.06	3.71
100 pM	99.04	2.84
50 pM	135.20	7.49
20 pM	155.39	3.66
None (control)	168.16	10.03

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Example 17: Assemblies Containing Quantum Dots

This example describes the immobilization of synthetic single-stranded DNA on semiconductor nanoparticle quantum dots (QDs). Native CdSe/ZnS core/shell QDs (~4
5 nm) are soluble only in organic media, making direct reaction with alkylthiol-terminated single-stranded DNA difficult. This problem was circumvented by first capping the QDs with 3-mercaptopropionic acid. The carboxylic acid group was then deprotonated with 4-(dimethylamino)pyridine, rendering the particles water soluble, and facilitating reaction
10 of the QDs with either 3'-propylthiol- or 5'-hexylthiol-modified oligonucleotide sequences. After DNA modification, the particles were separated from unreacted DNA by dialysis. A "linker" DNA strand was then hybridized to surface-bound sequences, generating extended assemblies of nanoparticles. The QD assemblies, which were characterized by TEM, UV/Visible spectroscopy, and fluorescence spectroscopy, could be reversibly assembled by controlling the temperature of the solution. The temperature
15 dependent UV-Vis spectra were obtained for the novel QD assemblies and composite aggregates formed between QDs and gold nanoparticles (~13 nm).

A. General Methods

Nanopure water (18.1 M Ω) prepared using a NANOpure ultrapure water purification system was employed throughout. Fluorescence spectra were obtained using
20 a Perkin Elmer LS 50 B Luminescence Spectrometer. Melting analyses were performed using a HP 8453 diode array spectrophotometer equipped with a HP 9090a Peltier Temperature Controller. Centrifugation was carried out using either an Eppendorf 5415C centrifuge or a Beckman Avanti 30 centrifuge. TEM images were acquired using a Hitachi HF-2000 field emission TEM operating at 200 kV.

25 B. Preparation Of Oligonucleotide-QD Conjugates

Synthetic methodologies for semiconductor quantum dots (QDs) have improved greatly in recent years, and for some materials, most notably CdSe, monodisperse samples of pre-determined size can now be prepared with relative ease. Murray et al., *J.*

WO 01/51665

PCT/US01/01190

- Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706; Hines, et al., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468. As a result, the unique electronic and luminescent properties of these particles have been studied extensively (see, Alivisatos, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13226, and references therein; Klein et al., *Nature* **1997**, 699; Kuno et al., *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 9869;
- 5 Nirmal et al., *Nature* **1996**, *383*, 802), potentially paving the way for QDs to be employed in diverse technologies, such as light-emitting diodes (Schlamp et al., *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 5837; Dabbousi et al., *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *66*, 1316) and as non-radioactive biological labels (Bruchez et al., *Science* **1998**, *281*, 2013; Chan et al., *Science* **1998**, *281*, 2016). However, many applications will require that the particles be arranged spatially
- 10 on a surface or organized into three-dimensional materials (Vossmeier et al., *J. Appl. Phys.* **1998**, *84*, 3664). Moreover, the ability to organize one or more types of nanoparticles into superlattice structures (Murray et al., *Science* **1995**, *270*, 1335) would allow for the construction of completely new types of hybrid materials with new and potentially interesting and useful properties.
- 15 DNA is the ideal synthon for programming the assembly of nanoscale building blocks into periodic two- and three-dimensional extended structures. The many attributes of DNA, which include ease of synthesis, extraordinary binding specificity, and virtually unlimited programmability by virtue of nucleotide sequence, can be exploited for the use of QD assembly.
- 20 The modification of QDs with DNA has proven to be more difficult than for gold nanoparticles. The common methods for preparing highly luminescent CdSe QDs yield materials that are coated with a mixture of trioctylphosphine oxide (TOPO) and trioctylphosphine (TOP). As a result, these QDs are soluble only in non-polar solvents, making them difficult to functionalize with highly charged DNA strands by direct
- 25 reaction. This difficulty has been overcome by the method described below, which is the first successful modification of semiconductor nanoparticles with single-stranded DNA. It should be noted that others, in elegant studies, have looked at the interactions between QDs and duplex DNA, but these studies did not make use of the sequence specific

WO 01/51665

PCT/US01/01190

binding properties of DNA to direct the assembly of extended QD structures. Coffey et al., *Appl. Phys. Lett.*, 1996, 69, 3851; Mahtab et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7028.

Since the surface of CdSe/ZnS core/shell QDs binds organic thiols, it was desired to modify these semiconductor particles with alkythiol-terminated DNA strands by a substitution reaction. The lack of water solubility of these QDs, though, hindered such an approach. Two different methods recently have been reported for making QDs water soluble, allowing for the immobilization of protein structures on the QD surfaces. One involves encapsulation of the core/shell structures with a silica layer (Bruchez et al., *Science* 1998, 281, 2013), while the other utilizes mercaptoacetic acid both to stabilize the particles and provide water solubility (Chan et al., *Science* 1998, 281, 2016). The procedure described in this example, which produces remarkably stable colloid under DNA hybridization conditions, utilizes 3-mercaptopropionic acid to passivate the QD surface.

An excess of 3-mercaptopropionic acid (0.10 mL, 1.15 mmol; Aldrich) was added by syringe to a suspension of ~20 mg of TOP/TOPO stabilized CdSe/ZnS QDs (prepared as described in Hines, et al., *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 468) in 1.0 mL of N,N-dimethyl formamide (DMF; Aldrich) generating a clear, dark orange solution containing 3-mercaptopropionic acid functionalized QDs. The reaction occurred quickly. For subsequent reactions, excess 3-mercaptopropionic acid was not removed, and the particles were stored at room temperature in DMF.

However, to characterize the QDs, a portion of the sample was purified by removing unreacted 3-mercapto-propionic acid as follows. A 0.50 mL sample was centrifuged (4 hours at 30,000 rpm), and the supernatant was removed. The remaining solution was washed with ~0.3 mL of DMF and recentrifuged. This step was repeated two additional times before recording the FTIR spectrum. FTIR (polyethylene card, 3M): 1710 cm^{-1} (s), 1472 cm^{-1} (m), 1278 cm^{-1} (w), 1189 cm^{-1} (m), 1045 cm^{-1} (w), 993 cm^{-1} (m), 946 cm^{-1} (w), 776 cm^{-1} (n), 671 cm^{-1} (m). Unlike the TOP/TOPO stabilized native QDs, the 3-mercaptopropionic acid modified QDs exhibited a characteristic ν_{CO} band at

WO 01/51665

PCT/US01/01190

1710 cm^{-1} for the surface bound propionic acid.

Although the 3-mercaptopropionic acid modified QDs were practically insoluble in water, their solubility could be significantly enhanced by deprotonating the surface bound mercaptopropionic acid sites with 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP; Aldrich) as described in the next paragraph. The QDs then dispersed readily in water, producing orange solutions that were stable for up to a week at room temperature.

To attach oligonucleotides to QDs, 150 μL (optical density at 530 nm = 21.4) of a solution of the 3-mercaptopropionic acid functionalized particles in DMF were added to a solution of DMAP (8.0 mg, 0.065 mmol) in 0.4 mL of DMF. An orange precipitate was formed. It was separated by centrifugation (~30 seconds at 3000 rpm) and then dissolved in 1.0 mL of a solution of 3'-propylthiol- or 5'-hexylthiol-terminated oligonucleotides (1.0-2.0 ODs/mL; prepared as described in Example 1; sequences given below). Precipitate (dissolved in water) was characterized by IR spectroscopy (polyethylene card, 3M). IR (cm^{-1}): 1647 (m), 1559 (s), 1462 (m), 1214 (w), 719 (w), 478 (s). After standing for 12 hours, the oligonucleotide-containing solution was brought to 0.15 M NaCl, and the particles were aged for an additional 12 hours. The NaCl concentration was then raised to 0.3 M, and the mixture was allowed to stand for a further 24-40 hours before dialyzing against PBS (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7, 0.01% sodium azide) using a 100 kDa membrane (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane). The dialysis was carried out over a period of 48 hours, during which time the dialysis bath was refreshed three times.

Oligonucleotide-QD conjugates prepared in this manner displayed indefinite aqueous stability. Moreover, the colloid remained strongly fluorescent, with a sharp (full width at half maximum (FWHM) = 33 nm), symmetrical emission at 546 nm (indicative of a ~3.2 nm CdSe core; Murray et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706).

Two different oligonucleotide-QD conjugates were prepared by this protocol and stored in PBS. One was modified with a 22mer, comprised of a propylthiol functionality at the 3'-end, a 12mer capture sequence, and an intervening 10 base (all A) spacer: 5'-

WO 01/51665

PCT/US01/01190

TCCTCAACTCGTAA₁₀-(CH₂)₃-SH [SEQ ID NO: 46]. The other employed a 5'-hexylthiol-terminated sequence, also with a 10 base (all A) spacer, and a 12mer capture sequence which was non-complementary with the 3'-propylthiol sequence: 5'-SH-(CH₂)₆-A₁₀CGCATTGAGGAT-3' [SEQ ID NO: 47].

5 C. Preparation Of QD Assemblies

When approximately equal quantities of these two oligonucleotides (200 μL, OD₂₃₀=0.224 and 0.206, respectively) were mixed and then combined with 6 μL (60 pmol) of a solution of a complementary linking 24mer sequence (5'-TACGAGTTGAGAATCCT-GAATGCG-3', SEQ ID NO: 48), QD assemblies formed within 20-30 minutes at room temperature, Figure 26. Faster linking took place when the mixture was frozen (-78° C) and then allowed to warm slowly to room temperature.

The clusters generated were not large enough to settle out of solution. However, they could be separated by centrifugation at relatively low speeds (10,000 RPM for 10 min), as compared with the unlinked particles (30,000 RPM for 2-3 hours).

15 The decrease in fluorescence upon hybridization was determined by integration of the fluorescence signal (320 nm excitation wavelength) from 475 nm to 625 nm of 4 pairs of samples. Each pair was prepared in the following manner. A solution of 3' propylthiol-terminated DNA-modified particles (30 μL, optical density at 530 nm = 0.224) was combined with a solution of 5' hexylthiol-terminated DNA-modified QDs (30 μL, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube, and then diluted with 140 μL of PBS. The mixture was then split into two equal portions, and complementary "linker" DNA (3 μL, 30 pmol) was added to one, while non-complementary "linker" DNA (5'-CTACTTAGATCCGAGTCCCACAT-3', SEQ ID NO: 49) (3 μL, 30 pmol) was added to the other. All eight of the samples were then frozen in a dry ice/acetone bath (-78° C), after which they were removed from the bath and allowed to warm slowly to room temperature. To estimate the change in fluorescence efficiency upon hybridization, the fluorescence intensities of the "target" (complementary "linker") samples were adjusted to account for the difference in

WO 01/51665

PCT/US01/01190

absorbance at 320 nm from the corresponding control samples, which contained non-complementary "linker".

The results showed that hybridization of QD/QD assemblies was accompanied by a decrease in integrated fluorescence intensity by an average of $26.4 \pm 6.1\%$, and a -2 nm red shift of the emission maximum, presumably due to cooperative effects between QDs, Figure 27A. Interestingly, Bawendi, *et al.* noticed a similar, albeit slightly larger, red shift when comparing the fluorescence of close-packed QDs and widely separated dots isolated in a frozen matrix (Murray *et al.*, *Science* 1995, 270, 1335). These changes in the fluorescence spectra may be an indication of excimer formation between QDs, but the exact nature of such a complex is still largely a matter of speculation. As expected, no aggregation was observed when the "linker" was missing or not complementary, or when either one of the two types of particles was absent.

The "melting" behavior of the DNA was monitored by observing the UV-Vis spectra of the aggregates as a function of temperature. For this "melting" analysis, the precipitate containing the QD/QD assemblies was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes, washed with 7 μ L of PBS, recentrifuged, and suspended in 0.7 mL of PBS. The UV/Visible spectroscopic signature of the assemblies was recorded at two degree intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute prior to each measurement. The mixture was stirred at a rate of 500 rpm to ensure homogeneity throughout the experiment. Temperature vs extinction profiles were then compiled from the extinction at 600 nm. The first derivative of these profiles was used to determine the "melting" temperatures.

The results, Figure 27B ($T_m = 57^\circ\text{C}$), demonstrated conclusively that DNA had been immobilized on the QD surfaces and that hybridization was responsible for the assembly process. The transition also was extremely sharp when compared with DNA alone (FWHM of the respective first derivatives: 4°C vs 9°C), which is consistent with the formation of an aggregate structure with multiple DNA links per particle. An increase in extinction was observed upon denaturation, most likely because of a screening

WO 01/51665

PCT/US01/01190

effect whereby particles in the interiors of the assemblies are prevented from absorbing light by the surrounding QDs.

D. Preparation Of QD/Gold Assemblies

With DNA-functionalized QDs in hand, the assembly of hybrid assemblies made from multiple types of nanoparticle building blocks became feasible. To prepare these hybrid assemblies, a solution of ~17 nM 3'-hexylthiol-modified 13 nm gold nanoparticles (30 μ L, ~5 μ mol; prepared as described in Example 3) was mixed with a solution of 5'-hexylthiol-terminated DNA-modified QDs (15 μ L, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube. "Linker" DNA (5 μ L, 50 pmol) was added, and the mixture cooled to -78°C, and then allowed to warm slowly to room temperature, generating a reddish-purple precipitate. No aggregation behavior was observed unless both types of particles and a complementary target were present. After centrifugation (1 min at 3,000 rpm) and removal of the supernatant, the precipitate was washed with 100 μ L of PBS and recentrifuged.

For "melting" analysis, the washed precipitate was suspended in 0.7 mL of PBS. UV-Vis spectroscopy was used to follow the changes in the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles, so temperature vs. extinction profiles were compiled at 525 nm. Using the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles provides a much more sensitive probe with which to monitor hybridization than does the UV-Vis spectroscopic signature of the QDs alone. Therefore, a "melting" experiment can be performed on a much smaller sample (~10% of the QD solution is needed), although the intensity of the plasmon band obscures the UV/Vis signal from the QDs. Similar to the pure QD system described above, a sharp (FWHM of the first derivative = 4.5°C) melting transition occurred at 58°C (see Figure 27D).

High resolution TEM images of these assemblies showed a network of gold nanoparticles interconnected by multiple QDs, Figure 27C. The QDs, which have a much lower contrast in the TEM image than gold nanoparticles, can be identified by their lattice fringes. They are just barely resolvable with the high resolution TEM, but clearly

WO 01/51665

PCT/US01/01190

indicate the periodic structure of these composite assemblies and the role that DNA plays in forming them.

E. Summary

The results described in this example definitively establish that the immobilization of DNA onto QD surfaces has been achieved and that these particles can now be used in combination with DNA under hybridization conditions. Using DNA-functionalized QDs, the first DNA-directed formation of QD and mixed gold/QD nanoparticle structures has been demonstrated. The successful modification of semiconductor QDs with DNA has significant implications for materials research, and the door is now open for more extensive inquiries into the luminescent, electronic, and chemical properties of these unique building blocks as they are incorporated into new and functional *multi-component* nanostructures and nanoscale materials.

15 Example 18: Methods of Synthesizing Oligonucleotide-Nanoparticle Conjugates And The Conjugates Produced By The Methods

A. General Methods

HAuCl₄•3H₂O and trisodium citrate were purchased from Aldrich chemical company, Milwaukee, WI. Gold wire, 99.999% pure, and titanium wire were purchased from Goldsmith Inc., Evanston, IL. Silicon wafers (100) with a 1 micron thick oxide layer were purchased from Silicon Quest International, Santa Clara, CA. 5'-thiol-modifier C6-phosphoramidite reagent, 3'-propylthiol modifier CPG, fluorescein phosphoramidite, and other reagents required for oligonucleotide synthesis were purchased from Glen Research, Sterling, VA. All oligonucleotides were prepared using an automated DNA synthesizer (Expedite) using standard phosphoramidite chemistry (Eckstein, F. *Oligonucleotides and Analogues*; 1st ed.; Oxford University Press, New York, 1991). Oligonucleotides containing only 5' hexylthiol modifications were prepared as described in Example 1. 5-(and 6)-carboxyfluorescein, succinimidyl ester was purchased from Molecular Probes, Eugene, OR. NAP-5 columns (Sephadex G-25

WO 01/51665

PCT/US01/01190

Medium, DNA grade) were purchased from Pharmacia Biotech. Nanopure H₂O (>18.0 MΩ), purified using a Barnstead NANOpure ultrapure water system, was used for all experiments. An Eppendorf 5415C or a Beckman Avanti 30 centrifuge was used for centrifugation of Au nanoparticle solutions. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed using a HP series 1100 HPLC.

B. Physical Measurements.

Electronic absorption spectra of the oligonucleotide and nanoparticle solutions were recorded using a Hewlett-Packard (HP) 8452a diode array spectrophotometer. Fluorescence spectroscopy was performed using a Perkin-Elmer LS50 fluorimeter. Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed with a Hitachi 8100 Transmission Electron Microscope operating at 200 kV. A Thermo Jarrell Ash AtomScan 25 atomic emission spectrometer with an inductively coupled plasma (ICP) source was used to determine the atomic concentration of gold in the nanoparticle solutions (gold emission was monitored at 242.795 nm).

15 C. Synthesis and Purification of Fluorescein-Labeled Alkanethiol-Modified Oligonucleotides

Thiol-modified oligonucleotide strands containing either 12 or 32 bases, with 5' hexylthiol and 3' fluorescein moieties, were prepared. The sequence of the 12mer (S12F) was HS(CH₂)₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-3'-(CH₂)₆-F [SEQ ID NO:50], and the 32mer (SA₂₀12F) contained the same 12mer sequence with the addition of a 20 dA spacer sequence to the 5' end [SEQ ID NO:51]. The thiol-modified oligonucleotides were prepared as described in Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998). An amino-modifier C7 CPG solid support was used in automated synthesis, and the 5' terminus was manually modified with hexylthiol phosphoramidite, as described previously. The 3' amino, 5' trityl-protected thiol modified oligonucleotides were purified by reverse-phase HPLC using an HP ODS Hypersil column (5 mm, 250 x 4 mm) with 0.03 M triethyl ammonium acetate (TEAA), pH 7 and a 1% / minute gradient of 95% CH₃CN / 5% 0.03 M TEAA at a flow rate of 1 mL/min., while monitoring the UV signal

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of DNA at 254 nm. The retention times of the 5'-S-trityl, 3' amino modified 12-base and 32-base oligonucleotides were 36 and 32 minutes respectively.

The lyophilized product was redispersed in 1 ml of 0.1 M Na₂CO₃ and, while stirring in the dark, 100 µL of 10 mg/ml succinimidyl ester of fluorescein (5,6 FAM-SE, Molecular Probes) in dry DMF was added over 1.5 hours according to the directions of the manufacturer (Molecular Probes literature). The solution was stirred at room temperature for an additional 15 hours, then precipitated from 100% ethanol at -20 °C. The precipitate was collected by centrifugation, dissolved in H₂O and the coupled product separated from unreacted amino-terminated oligonucleotide by ion-exchange HPLC. A Dionex Nucleopac PA-100 column (250 x 4 mm) was operated with 10 mM NaOH aqueous eluent and a 1% / minute gradient of 1 M NaCl/10mM NaOH at a flow rate of 0.8 mL/minute. Retention times of 5'-S-trityl, 3' fluorescein modified 12mer and 32mer were 50 and 49 minutes respectively. The oligonucleotide product was desalted by reverse-phase HPLC. Removal of the trityl protection group of the fluorescein-terminated, trityl oligonucleotide was performed using silver nitrate and dithiothreitol (DTT) as previously described (Storhoff et al., *J. Am. Chem.Soc.* 120:1959-1964 (1998)). The yield and purity of the oligonucleotides were assessed using the techniques previously described for alkylthiol oligonucleotides (Storhoff et al., *J. Am. Chem.Soc.* 120:1959-1964 (1998)). Oligonucleotides were used immediately after detritylation of the thiol group.

Thiol-modified oligonucleotides containing 32 bases, with 3' propylthiol and 5' fluorescein moieties (HS(CH₂)₃-3'-(W)₂₉-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F, W= A or T) [SEQ ID NO:52] were synthesized on an automated synthesizer using 3' thiol modifier CPG. The 5' terminus of each oligonucleotide was coupled manually to fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research). The modified oligonucleotides were purified by ion exchange HPLC (1% / min gradient of 1 M NaCl, 10 mM NaOH; retention time (Rt) ~ 43 min (W = T), Rt ~ 29 min (W = A)). After purification, the oligonucleotide solutions were desalted by reverse phase HPLC. The 3' thiol moieties were deprotected

WO 01/51665

PCT/US01/01190

with dithiothreitol by a procedure previously described (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* **120**:1959-1964 (1998)).

D. Synthesis and Purification of Fluorescein Labeled Oligonucleotides.

The fluorophore labeled complement (12F) consisted of 12 bases 3'-GCG-TAA-
 5 GTC-CTA-5'-(CH₂)₆-F (SEQ ID NO:53) complementary to the 12mer sequence in S12F
 and SA₂₀12F. The oligonucleotide was synthesized using standard methods, and a
 syringe-based procedure, similar to the procedure reported above for the 5' alkylthiol
 modification, was used to couple fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research)
 to the 5' end of the CPG-bound oligonucleotide. Purification was performed using
 10 reverse-phase HPLC as above. The fluorescein-labeled oligonucleotide had a retention
 time of 18 min. The fluorophore labeled complement, 3'12F (5'-ATC-CTG-AAT-GCG-
 F; [SEQ ID NO:54]) was prepared using an amino-modifier C7 CPG solid support for
 automated synthesis, followed by coupling of 5-(6)-carboxyfluorescein succinimidyl
 ester to the 3' amine using the procedure described above.

15 E. Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles were prepared by citrate reduction of HAuCl₄ as described in
 Example 1. Transmission Electron Microscopy (TEM) performed with a Hitachi 8100
 TEM was used to determine the size distribution of the resulting nanoparticles. At least
 250 particles were sized from TEM negatives using graphics software (ImageTool). The
 20 average diameter of a typical particle preparation was 15.7 ± 1.2 nm. Assuming spherical
 nanoparticles and density equivalent to that of bulk gold (19.30 g/cm^3), an average
 molecular weight per particle was calculated ($2.4 \times 10^7 \text{ g/mol}$). The atomic gold
 concentration in a solution of gold nanoparticles was determined by ICP-AES
 (inductively coupled plasmon atomic emission spectroscopy). A gold atomic absorption
 25 standard solution (Aldrich) was used for calibration. Comparison of atomic gold
 concentration in the particle solution to the average particle volume obtained by TEM
 analysis yielded the molar concentration of gold particles in a given preparation, typically
 ~10 nM. By measuring the UV-vis absorbance of nanoparticle solutions at the surface

WO 01/51665

PCT/US01/01190

plasmon frequency (520 nm), the molar extinction coefficients (ϵ at 520 nm) were calculated for the particles, typically $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for 15.7 ± 1.2 nm diameter particles.

F. Preparation of Gold Thin Films.

5 Silicon wafers were cut into $\sim 10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ pieces and cleaned with piranha etch solution (4:1 concentrated H_2SO_4 : 30% H_2O_2) for 30 min at 50°C , then rinsed with copious amounts of water, followed by ethanol. (*Warning: piranha etch solution reacts violently with organic materials and should be handled with extreme caution.*) Metal was deposited at a rate of 0.2 nm/s using an Edwards Auto 306 evaporator (base pressure of 3×10^{-7} millibar) equipped with an Edwards FTM6 quartz crystal microbalance. The oxidized sides of the silicon were coated with a Ti adhesion layer of 5 nm, followed by 200 nm of gold.

G. Preparation of 5' Alkylthiol Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles.

Gold nanoparticles were modified with fluorescein-alkylthiol oligonucleotides by adding freshly deprotected oligonucleotides to aqueous nanoparticle solution (particle concentration $\sim 10 \text{ nM}$) to a final oligonucleotide concentration of $3 \mu\text{M}$. After 24 hours, the solution was buffered at pH 7 (0.01 M phosphate), and NaCl solution was added (to final concentration of 0.1 M). The solution was allowed to 'age' under these conditions for an additional 40 hours. Excess reagents were then removed by centrifugation for 30 minutes at 14,000 rpm. Following removal of the supernatant, the red oily precipitate was washed twice with 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7, solution (PBS) by successive centrifugation and redispersion, then finally redispersed in fresh buffer solution. Invariably, a small amount ($\sim 10\%$ as determined by UV-vis spectroscopy) of nanoparticle is discarded with the supernatant during the washing procedure. Therefore, final nanoparticle concentrations were determined by TEM, ICP-AES, and UV-vis spectroscopy (see above). Extinction coefficients and particle size distributions did not change significantly as a result of the oligonucleotide modification.

H. Preparation of 5' Alkylthiol Oligonucleotide-Modified Gold Thin Films.

Silicon supported gold thin films were immersed in deposition solutions of deprotected alkylthiol modified oligonucleotides for equal times and buffer conditions as for the gold nanoparticles. Following oligonucleotide deposition, the films were rinsed extensively with 0.3 M PBS and stored in buffer solution. Gold was evaporated on one side only, leaving an unpassivated silicon/silicon oxide face. However, alkylthiol modified DNA did not adsorb appreciably to bare silicon oxide surfaces that were rinsed with PBS.

I. Quantitation of Alkylthiol-Oligonucleotides Loaded on Nanoparticles.

Mercaptoethanol (ME) was added (final concentration 12 mM) to fluorophore-labeled oligonucleotide modified nanoparticles or thin films in 0.3 M PBS, to displace the oligonucleotides. After 18 hours at room temperature with intermittent shaking, the solutions containing displaced oligonucleotides were separated from the gold by either centrifugation of the gold nanoparticles, or by removal of the gold thin film. Aliquots of the supernatant were diluted two-fold by addition of 0.3 M PBS, pH 7. Care was taken to keep the pH and ionic strength of the sample and calibration standard solutions the same for all measurements due to the sensitivity of the optical properties of fluorescein to these conditions (Zhao et al., *Spectrochimica Acta* **45A**:1113-1116 (1989)). The fluorescence maxima (measured at 520 nm) were converted to molar concentrations of the fluorescein-alkylthiol modified oligonucleotide by interpolation from a standard linear calibration curve. Standard curves were prepared with known concentrations of fluorophore-labeled oligonucleotides using identical buffer and salt concentrations. Finally, the average number of oligonucleotides per particle was obtained by dividing the measured oligonucleotide molar concentration by the original Au nanoparticle concentration. Normalized surface coverage values were then calculated by dividing by the estimated particle surface area (assuming spherical particles) in the nanoparticle solution. The assumption of roundness is based on a calculated average roundness factor of 0.93. Roundness factor is computed as: $(4 \times \pi \times \text{Area})/(\text{perimeter} \times 2)$ taken from Baxes, Gregory, *Digital Image Processing*, p. 157 (1994).

WO 01/51665

PCT/US01/01190

J. Quantitation of the Hybridized Target Surface Density.

To determine the activity of attached oligonucleotides for hybridization, fluorophore-labeled oligonucleotides, which were complementary to the surface-bound oligonucleotides (12F), were reacted with oligonucleotide modified surfaces (gold nanoparticles or thin films) under hybridization conditions (3 μ M complementary oligonucleotide, 0.3 M PBS, pH 7, 24 hr). Non-hybridized oligonucleotides were removed from the gold by rinsing twice with buffered saline as described above. Then, the fluorophore-labeled oligonucleotides were dehybridized by addition of NaOH (final concentration ~ 50 mM, pH 11-12, 4 hr). Following separation of the solution containing the 12F from the nanoparticle solutions by centrifugation, and neutralization of the solutions by addition of 1 M HCl, the concentrations of hybridized oligonucleotide and corresponding hybridized target surface density were determined by fluorescence spectroscopy.

K. Quantitation of Surface Coverage and Hybridization

Citrate stabilized gold nanoparticles were functionalized with 12mer fluorescein-modified alkylthiol DNA (HS-(CH₂)₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-(CH₂)₄-F [SEQ ID NO:50]). Surface coverage studies were then performed by thoroughly rinsing away non-chemisorbed oligonucleotides, followed by removal of the fluorophore-labeled oligonucleotides from the gold surface, and quantitation of oligonucleotide concentration using fluorescence spectroscopy (as described above).

Removal of all the oligonucleotides from the gold surface and subsequent removal of gold nanoparticles from the solution is critical for obtaining accurate coverage data by fluorescence for several reasons. First, the fluorescence signal of labeled, surface bound DNA is efficiently quenched as a result of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to the gold nanoparticle. Indeed, there is almost no measurable signal for fluorescein-modified oligonucleotides (12-32 nucleotide strands, sequences are given above) after they are immobilized on 15.7 ± 1.2 nm gold nanoparticles and residual oligonucleotide in solution is washed away. Second, the gold nanoparticles absorb a

WO 01/51665

PCT/US01/01190

significant amount of light between 200 nm and 530 nm, so their presence in solution during fluorescence measurements acts as a filter and diminishes the available excitation energy, as well as the intensity of emitted radiation. The gold surface plasmon band at 520 nm falls at the emission maximum of fluorescein.

5 Mercaptoethanol (ME) was used to rapidly displace the surface bound oligonucleotides by an exchange reaction. To examine the displacement kinetics, oligonucleotide-modified nanoparticles were exposed to ME (12 mM) for increasing periods of time prior to centrifugation and fluorescence measurements. The intensity of fluorescence associated with the solution free of nanoparticles can be used to determine
10 how much oligonucleotide was released from the nanoparticles. The amount of oligonucleotide freed in exchange with ME increased until about 10 hours of exposure (Figure 29), which is indicative of complete oligonucleotide displacement. The displacement reaction was rapid, which is presumably due to the inability of the oligonucleotide film to block access of the ME to the gold surface (Bichayek et al.,
15 *Langmuir* 9:1766 (1993)).

 The average oligonucleotide surface coverage of alkylthiol-modified 12mer oligonucleotide (S12F) on gold nanoparticles was 34 ± 1 pmol/cm² (average of ten independent measurements of the sample.) For 15.7 ± 1.2 nm diameter particles, this corresponds to roughly 159 thiol-bound 12mer strands per gold particle. Despite slight
20 particle diameter variation from batch to batch, the area-normalized surface coverages were similar for different nanoparticle preparations.

 In order to verify that this method is useful for obtaining accurate oligonucleotide surface coverages, it was used to displace fluorophore-labeled oligonucleotides from gold thin films, and the surface coverage data was compared with experiments aimed at
25 getting similar information but with different techniques. In these experiments, gold thin films were subjected to a similar oligonucleotide modification and ME displacement procedure as the citrate stabilized gold nanoparticles (see above). The oligonucleotide displacement versus time curves for the gold thin films are very similar to those measured

for gold nanoparticles. This suggests a similar rate of displacement for the thin films, even though the typical surface coverage values measured for these films were somewhat lower than the oligonucleotide coverages on gold nanoparticles. Importantly, the oligonucleotide surface coverages on gold thin films measured by our technique (18 ± 3 pmol/cm²) fall within the range of previously reported coverages on oligonucleotide thin films (10 pmol/cm² for a 25 base oligonucleotide on gold electrodes determined using electrochemistry or surface plasmon resonance spectroscopy (SPRS) (Steel et al., *Anal. Chem.* 70:4670-4677 (1998)). Differences in surface coverages are expected due to different oligonucleotide sequences and lengths, as well as film preparation methods.

The extent of hybridization of complementary fluorophore-labeled oligonucleotides (12F') to nanoparticles with surface-bound 12mer oligonucleotides was measured as described above. Briefly, S12F modified nanoparticles were exposed to 12F' at a concentration of 3 μ M for 24 hours under hybridization conditions (0.3 M PBS, pH 7) and then rinsed extensively with buffer solution. Again, it was necessary to remove the hybridized strands from the gold before measuring fluorescence. This was accomplished by denaturing the duplex DNA in a high pH solution (NaOH, pH 11) followed by centrifugation. Hybridized 12F' amounted to 1.3 ± 0.2 pmol/cm² (approximately 6 duplexes per 15.7 nm particle; the average number of duplexes per particle was computed by multiplying the normalized hybridized surface coverage in pmol/cm² by the average particle surface area as found from size distributions measured by TEM.). In order to measure the extent of non-specific adsorption, S12F modified gold nanoparticles were exposed to fluorophore-labeled non-complementary 12 base oligonucleotides (12F') in 0.3 M PBS. After extensive rinsing (successive centrifugation/redispersion steps) and subsequent high pH treatment, the coverage of non-specifically adsorbed oligonucleotides on the nanoparticles was determined to be on the order of 0.1 pmol/cm². An analogous procedure was used to measure hybridization to S12F modified gold thin films in order to compare the hybridization results to reported values on gold electrodes. The degree of hybridization, 6 ± 2 pmol/cm², was consistent

with hybridization reported for mixed base 25mer on an gold electrode ($2\text{-}6\text{ pmol/cm}^2$) (Steel et al., *Anal. Chem.* 70:4670-4677 (1998)).

Surface coverages and hybridization values of the S12F/12F' system for both nanoparticles and thin films are summarized in Table 7. The most striking result is the low hybridization efficiency ($\sim 4\%$ of surface-bound strands on nanoparticles while 33% of strands on thin films hybridize). Previous studies have shown similarly low hybridization for sufficiently densely packed oligonucleotide monolayers. This may reflect a low accessibility to incoming hybridizing strands, due to a combination of steric crowding of the bases, especially those near the gold surface, as well as electrostatic repulsive interactions.

L. Effect of Oligonucleotide Spacer on Surface Coverage and Hybridization.

Although the high coverage of the S12F oligonucleotide is advantageous in terms of nanoparticle stabilization, the low hybridization efficiency prompted us to devise a means of decreasing steric congestion around the hybridizing sequence. Oligonucleotides (32mer) were synthesized having a 20 dA spacer sequence inserted between the alkylthiol group and the original 12 base recognition sequence. This strategy was chosen based on the assumption that: 1) bases near the nanoparticle surface are sterically inaccessible because of weak interactions between the nitrogenous bases and the gold surface, as well as interstrand steric crowding, and 2) on a 15.7 nm diameter roughly spherical particle, 12mer sequences attached to the end of 20mer spacer units roughly perpendicular to the surface (Levicky et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:9787-9792 (1998)) will lead to a film with a greater free volume as compared with a film formed from the same 12mer directly bound to the surface.

While the surface density of single-stranded SA₂₀12F strands ($15 \pm 4\text{ pmol/cm}^2$) was lower than that of S12F ($34 \pm 1\text{ pmol/cm}^2$), the particles modified with a 32-mer using the identical surface modification showed comparable stability compared to those modified with 12-mer. As anticipated, the hybridization efficiency of the SA₂₀12F/12F' system ($6.6 \pm 0.2\text{ pmol/cm}^2$, 44%) was increased to approximately 10 times that of the

original S12F/12F' system, Table 7.

M. Effect of Electrolyte Concentration During Oligonucleotide Attachment

- In working with the S12F sequence a salt aging step was found to be crucial in obtaining stable oligonucleotide modified nanoparticles (see Example 3). The gold nanoparticles modified with S12F in pure water fused together irreversibly to form a black precipitate upon centrifugation, while those aged in salt resisted aggregation when centrifuged, even in high ionic strength solutions. It is proposed that the increased stability is due to higher oligonucleotide surface coverages which leads to greater steric and electrostatic protection. Using the SA₂₀12F modified particles, the effect of electrolyte conditions on oligonucleotide surface loading was investigated. As shown in Table 8, final surface coverages for gold nanoparticles which were exposed to oligonucleotides in water for 48 hours are much lower (7.9 ± 0.2 pmol/cm²) compared to those that were 'aged' in salt, or prepared by increasing the salt concentration gradually over the course of the final 24 hours of the experiment (see above).
- It is important to note that gold nanoparticles as synthesized irreversibly agglomerate even in very low ionic strength media. Indeed, they are naturally incompatible with salts and especially polyanions such as oligonucleotides. This aging treatment is essential for preparing stable oligonucleotide particles. Therefore, the particles must be initially modified with alkylthiol oligonucleotides in water prior to gradually increasing the ionic strength. It is likely that oligonucleotides initially lie flat, bound through weak interactions of the nitrogenous bases with gold. A similar mode of interaction has been proposed for oligonucleotides on thin films (Herne et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119:8916-8920 (1997)). However, the interaction between oligonucleotides and the positively charged nanoparticle surface (Weitz et al., *Surf. Sci.* 158:147-164 (1985)) is expected to be even stronger. In the aging step, the high ionic strength medium effectively screens charge repulsion between neighboring oligonucleotides, as well as, attraction between the polyanionic oligonucleotide and the positively charged gold surface. This allows more oligonucleotides to bind to the nanoparticle surface, thereby

increasing oligonucleotide surface coverage.

N. Effect of Oligonucleotide Spacer Sequence on Surface Coverage.

In order to examine how the sequence of the spacer affects oligonucleotide coverage on Au nanoparticles, fluorescein-modified 32-mer strands, with 20 dA and 20 dT spacers inserted between a 3' propylthiol and the fluorescein-labeled 12-mer sequence, were prepared. The most notable result of surface coverage and hybridization studies of nanoparticles modified with S3'T₂₀12F and S3'A₂₀12F is the greater surface coverage achieved with the 20 dT spacer (35 ± 1 pmol/cm²), in comparison to the 20 dA spacer (24 ± 1 pmol/cm²). The number of hybridized strands was comparable, although the percentage of surface bound strands which hybridized was lower for ST₂₀12mer nanoparticles (79 %) than the SA₂₀12 nanoparticles (~94%). These results suggest that dT rich oligonucleotide strands interact non-specifically with the nanoparticle surface to a lesser degree than dA rich oligonucleotide strands. Consequently, 20dT spacer segments may extend perpendicular from the gold surface, promoting higher surface coverages, while 20dA spacer segments block gold sites by lying flat on the particle surface.

O. Effect of Coadsorbed Diluent Oligonucleotides

In addition to efficient hybridization, another important property of oligonucleotide modified nanoparticles is the possibility of adjusting the total number of hybridization events. This is most readily accomplished by adjusting the surface density of recognition strands. Other researchers have used coadsorbed diluent alkylthiols such as mercaptohexanol with modified oligonucleotides on gold electrodes to control hybridization (Steel et al., *Anal. Chem.* 70:4670-4677 (1998); Heme et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119:8916-8920 (1997)). However, the inherent low stability of unprotected gold nanoparticles poses serious constraints on the choice of diluent molecule. A thiol modified 20 dA sequence (SA₂₀) [SEQ ID NO:55] proved to be suitable in terms of maintaining particle stability in the high ionic strength buffers which are needed for hybridization and protecting the surface from non-specific adsorption.

Nanoparticles were modified using solutions containing different recognition

WO 01/51665

PCT/US01/01190

strand (SA₂₀12F) to diluent (SA₂₀) strand molar ratios. The resulting particles were analyzed by the fluorescence method described above to determine the SA₂₀12F surface density, and then tested for hybridization efficiency with 12F.

- 5 The SA₂₀12F surface density increased linearly with respect to the proportion of SA₂₀12F to SA₂₀ in the deposition solution, Figure 30. This is an interesting result because it suggests that the ratio of SA₂₀12F to SA₂₀ attached to the nanoparticles reflects that of the solution. This result is in contrast to what is normally seen for mixtures of short chain alkyl or T-functionalized thiols, where solubility and chain length play a crucial role in adsorption kinetics (Bain et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:7155-7164 (1989);
- 10 Bain et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:7164-7175 (1989)).

- The amount of complementary 12F' oligonucleotide which hybridized to each different sample also increased linearly with increasing SA₂₀12F surface coverage, Figure 31. The fact that this relationship is well defined indicates that it is possible to predict and control the extent of hybridization of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.
- 15 This suggests that hybridization of 12F' becomes more difficult at higher SA₂₀12F coverages, which is most likely a result of steric crowding and electrostatic repulsion between oligonucleotides.

P. Summary.

- This study has shown that it is important to achieve a balance between
- 20 oligonucleotide coverage high enough to stabilize the nanoparticles to which they are attached, yet low enough so that a high percentage of the strands are accessible for hybridization with oligonucleotides in solution. This has been achieved by adjusting salt conditions during oligonucleotide attachment to the nanoparticles to gain high oligonucleotide surface coverages, oligonucleotide spacer segments to reduce
- 25 electrosteric interactions, and coadsorbed diluent strands to reproducibly control the average number of hybridization events for each nanoparticle. It has also been shown that the nature of the tether (spacer) sequence influences the number of oligonucleotide strands loaded onto gold nanoparticles. This work has important implications regarding

WO 01/51665

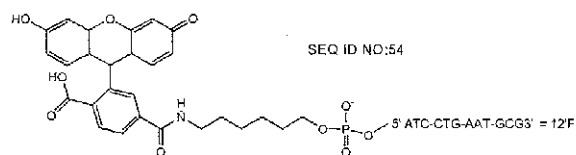
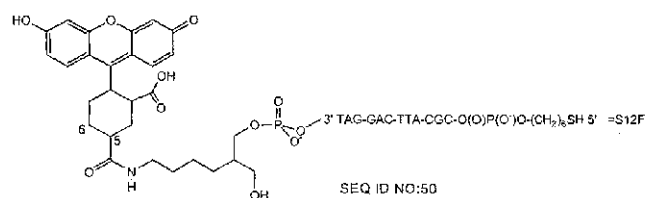
PCT/US01/01190

understanding interactions between oligonucleotides and nanoparticles, as well as optimizing the sensitivity of nanoparticle-oligonucleotide detection methods.

TABLE 7

Single strand surface coverage and corresponding hybridized surface coverages for gold thin films and gold nanoparticles. Comparison between S12F and SA₃₀12F surface coverage and hybridization. Thiol modified oligonucleotides were attached to the gold from 3 μ M aqueous solutions and aged in 0.1 M NaCl. All hybridization studies were performed in 0.3 M PBS, pH 7.

Oligonucleotide Pair	Surface Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Coverage (pmol/cm ²)	% Hybridization Efficiency
Au nanoparticles			
S12F/12F'	34 $\pm$ 1	1.3 $\pm$ 0.2	~ 4%
SA ₃₀ 12F/12F'	15 $\pm$ 4	6.6 $\pm$ 0.2	~ 44%
Au thin films			
S12F/12F'	18 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	~ 33%



WO 01/51665

PCT/US01/01190

TABLE 8

- 5 Effect of salt aging on surface coverage of SA₂₀12F oligonucleotides to gold nanoparticles and hybridization to 12F¹. All hybridization experiments were performed in 0.3 M PBS, pH 7.

Buffer conditions during adsorption of alkylthiol DNA	Surface Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Efficiency (%)
H ₂ O	7.9 ± 0.2	— ^a	—
0.1 M NaCl, 10 mM phosphate	15 ± 4	6.6 ± 0.2	~44
1.0 M NaCl, 10 mM phosphate	20 ± 2	6.5 ± 0.2	~33

- 10 ^a Reliable values for these experiments could not be obtained due to a small amount of particle aggregation which occurred after centrifugation.

TABLE 9

- 15 Effect of oligonucleotide spacer sequence on surface coverage and hybridization efficiency.

Oligonucleotide Pair	Surface Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Efficiency (%)
S3'A ₂₀ 12F / 3'12F	24 ± 1	9 ± 2	~38
S3'T ₂₀ 12F / 3'12F	35 ± 1	12 ± 1	~34

- 20 S3'A₂₀12F / S3'T₂₀12F = HS(CH₂)₂-3'-W₂₀-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F [SEQ ID NO:52]
3'12F = 5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F [SEQ ID NO:54]

Example 19: Gene Chip Assay

- 25 An ultrasensitive and ultrasensitive method for analyzing combinatorial DNA arrays using oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles is described in this example. An unusually narrow temperature range for thermal dissociation of nanoparticle-target complexes permits the discrimination of a given oligonucleotide sequence from targets with single nucleotide mismatches with extraordinary selectivity. In addition, when coupled with signal amplification method based on nanoparticle-catalyzed reduction of silver(I), the sensitivity of this nanoparticle array detection system

WO 01/51665

PCT/US01/01190

exceeds that of the analogous, conventional fluorophore system by two orders of magnitude.

Sequence-selective DNA detection has become increasingly important as scientists unravel the genetic basis of disease and use this new information to improve medical diagnosis and treatment. Commonly used heterogeneous DNA sequence detection systems, such as Southern blots and combinatorial DNA chips, rely on the specific hybridization of surface-bound, single-strand capture oligonucleotides complementary to target DNAs. Both the specificity and sensitivity of these assays are dependent upon the dissociation properties of capture strands hybridized to perfectly-matched and mismatched targets. As described below, it has surprisingly been discovered that a single type of nanoparticles hybridized to a substrate exhibits a melting profile that is substantially sharper than both the analogous fluorophore-based system and unlabeled DNA. Moreover, the melting temperature for the nanoparticle duplex is 11 degrees higher than for the analogous fluorophore system with identical sequences. These two observations, combined with the development of a quantitative signal amplification method based upon nanoparticle catalyzed reduction of silver(I), have allowed the development of a new chip-based detection system for DNA that has single-base mismatch selectivity and a sensitivity that is two orders of magnitude more sensitive than the conventional analogous fluorescence-based assays.

Gold nanoparticles (13 nm diameter) having oligonucleotide attached to them prepared as described in Example 3 were used to indicate the presence of a particular DNA sequence hybridized to a transparent substrate in a three-component sandwich assay format (see Figure 32). In a typical experiment, a substrate was fabricated by functionalizing a float glass microscope slide (Fisher Scientific) with amine-modified probe oligonucleotides as described in Example 10. This method was used to generate slides functionalized with a single type of oligonucleotides over their entire surface or in arrays of multiple types of oligonucleotides spotted with a commercial microarrayer. Nanoparticles having indicator oligonucleotides attached to them and synthetic 30-mer

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotide targets (based on the anthrax protective antigen sequence) were then cohybridized to these substrates (see Figure 32). Therefore, the presence of nanoparticles at the surface indicated the detection of a particular 30-base sequence. At high target concentrations (≥ 1 nM), the high density of hybridized nanoparticles on the surface

5 made the surface appear light pink (see Figure 33). At lower target concentrations, attached nanoparticles could not be visualized with the naked eye (although they could be imaged by field-emission scanning electron microscopy). In order to facilitate the visualization of nanoparticles hybridized to the substrate surface, a signal amplification method in which silver ions are catalytically reduced by hydroquinone to form silver

10 metal on the slide surface was employed. Although this method has been used for enlargement of protein- and antibody-conjugated gold nanoparticles in histochemical microscopy studies (Hecker, in *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, M. A. Hayat, Ed. (Academic Press, San Diego, 1989), vol. 1, chap. 10; Zehbe et al., *Am. J. Pathol.* **150**, 1553 (1997)) its use in quantitative DNA hybridization assays is novel

15 (Tomlinson et al., *Anal. Biochem.*, **171**:217 (1988)). Not only did this method allow very low surface coverages of nanoparticle probes to be visualized by a simple flatbed scanner or the naked eye (Figure 33), it also permitted quantification of target hybridization based on the optical density of the stained area (Figure 34). Significantly, in the absence of the target, or in the presence of noncomplementary target, no staining of the surface was

20 observed, demonstrating that neither nonspecific binding of nanoparticles to the surface, nor nonspecific silver staining, occurs. This result is an extraordinary feature of these nanoparticle-oligonucleotide conjugates which enables ultra-sensitive and -selective detection of nucleic acids.

It has been determined that the unique hybridization properties of oligonucleotide-

25 functionalized nanoparticles of the present invention can be further used to improve the selectivity of combinatorial oligonucleotide arrays (or "gene chips") (Fodor, *Science* **277**, 393 (1997)). The relative ratio of target hybridized to different elements of an oligonucleotide array will determine the accuracy of the array in determining the target

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sequence; this ratio is dependent upon the hybridization properties of the duplex formed between different capture strands and the DNA target. Remarkably, these hybridization properties are dramatically improved by the use of nanoparticle labels instead of fluorophore labels. As shown in Figure 35, the dehybridization of nanoparticle-labeled targets from surface-bound capture strands was much more sensitive to temperature than that of fluorophore-labeled targets with identical sequences. While the fluorophore-labeled targets dehybridized from surface capture strands over a very broad temperature range (first derivative FWHM = 16 °C), identical nanoparticle-labeled targets melted much more sharply (first derivative FWHM = 3 °C). It was anticipated that these sharpened dissociation profiles would improve the stringency of chip-based sequence analysis, which is usually effected by a post-hybridization stringency wash. Indeed, the ratio of target hybridized to complementary surface probes to that hybridized to mismatched probes after a stringency wash at a specific temperature (represented by the vertical lines in Figure 35) is much higher with nanoparticle labels than fluorophore labels. This should translate to higher selectivity in chip detection formats. In addition, nanoparticle labels should increase array sensitivity by raising the melting temperature (T_m) of surface duplexes, which lowers the critical concentration below which duplexes spontaneously melt at room temperature.

In order to evaluate the effectiveness of nanoparticles as colorimetric indicators for oligonucleotide arrays, test chips were probed with a synthetic target and labeled with both fluorophore and nanoparticle indicators. The test arrays and oligonucleotide target were fabricated according to published protocols (Guo et al., *Nucl. Acids Res.*, 22:5456 (1994); arrays of 175 μ m diameter spots separated by 375 μ m were patterned using a Genetic Microsystems 417 Microarrayer). Arrays contained four elements corresponding to the each of the four possible nucleotides (N) at position 8 of the target (see Figure 32). The synthetic target and either fluorescent-labeled or nanoparticle-labeled probes were hybridized stepwise to arrays in hybridization buffer, and each step was followed with a stringency buffer wash at 35 °C. First, 20 μ L of a 1 nM solution of synthetic target in 2

WO 01/51665

PCT/US01/01190

X PBS (0.3 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer, pH 7) was hybridized to the array for 4 hours at room temperature in a hybridization chamber (Grace Bio-Labs Cover Well PC20), and then washed at 35°C with clean 2 X PBS buffer. Next, 20 µL of a 100 pM solution of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles in 2 X PBS was

5 hybridized to the array for 4 hours at room temperature in a fresh hybridization chamber. The array was washed at 35°C with clean 2 X PBS, then twice with 2 X PBN (0.3 M NaNO₃, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer, pH 7). Then, the nanoparticle arrays were immersed in a silver amplification solution (Sigma Chemical, Silver Enhancer Solution) for 5 min and washed with water. Silver amplification darkened the array elements

10 considerably, and 200 µm diameter elements could be easily imaged with a flatbed scanner or even the naked eye.

Arrays challenged with the model target and nanoparticle-labeled probes and stained with the silver solution clearly exhibited highly selective hybridization to complementary array elements (Figure 36A). Redundant spots of the same capture

15 sequence showed reproducible and consistent hybridization signal. No background adsorption by nanoparticles or silver stain was observed; the image greyscale value reported by the flatbed scanner is the same as that observed for a clear microscope slide. The darker spots corresponding to adenine at position 8 (N=A) indicate that oligonucleotide target hybridized preferentially to perfectly complementary capture

20 strands over mismatched ones, by a greater than 3:1 ratio. In addition, integrated greyscale values for each set of spots follows the predicted stability of the Watson-Crick base pairs, A:T > G:C > T:A > C:T (Allawi et al., *Biochemistry* 36, 10581, (1988)). Normally, G:T mismatches are particularly difficult to discriminate from A:T complements (Saiki et al., in *Mutation Detection*, Cotton et al., eds. (Oxford University

25 Press, Oxford, 1998), chap. 7; S. Ikuta et al., *Nucl. Acids Res.* 15, 797 (1987)), and the distinction of these two array elements demonstrates the remarkable resolving power of nanoparticle labels in single nucleotide mismatch detection. The selectivity of the nanoparticle-based arrays was higher than that of the fluorophore-indicated arrays, Figure

WO 01/51665

PCT/US01/01190

36B; fluorophore labels provided only 2:1 selectivity for adenine at position 8.

The assays utilizing nanoparticle-labeled probes were significantly more sensitive than those utilizing fluorophore-labeled probes. Hybridization signal could be resolved at the N=A elements at target concentrations as low as 50 fM (or, for a hybridization chamber containing 20 μ L of solution, 1×10^6 total copies); this represents a dramatic increase in sensitivity over common Cy3/Cy5 fluorophore-labeled arrays, for which ~ 1 pM or greater target concentrations are typically required. The higher melting temperatures observed for nanoparticle-target complexes immobilized on surfaces undoubtedly contribute to array sensitivity. The greater stability of the probe/target/surface-oligonucleotide complex in the case of the nanoparticle system as compared with the fluorophore system presumably results in less target and probe lost during washing steps.

Colorimetric, nanoparticle labeling of combinatorial oligonucleotide arrays will be useful in applications such as single nucleotide polymorphism analysis, where single mismatch resolution, sensitivity, cost and ease of use are important factors. Moreover, the sensitivity of this system, which has yet to be totally optimized, points toward a potential method for detecting oligonucleotide targets without the need for target amplification schemes such as polymerase chain reaction.

20 Example 20: Nanoparticle Structures

The reversible assembly of supramolecular layered gold nanoparticle structures onto glass supports, mediated by hybridized DNA linkers, is described. Layers of oligonucleotide-functionalized nanoparticles were successively attached to oligonucleotide-functionalized glass substrates in the presence of a complementary DNA linker. The unique recognition properties of DNA allow the nanoparticle structures to be assembled selectively in the presence of the complementary linker. In addition, the structures can be assembled and disassembled in response to external stimuli which mediate hybridization of the linking duplex DNA, including solution temperature, pH,

WO 01/51665

PCT/US01/01190

and ionic strength. In addition to offering a very selective and controlled way of building nanoparticle based architectures on a solid support, this system allows one to study the factors that influence both the optical and melting properties of nanoparticle network structures linked with DNA.

- 5 Others have demonstrated how bifunctional organic molecules (Gittins et al., *Adv. Mater.* **11**:737 (1999); Brust et al., *Langmuir* **14**:5425 (1998); Bright et al., *Langmuir* **14**:5695 (1998); Grabar et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**:1148 (1996); Freeman et al., *Science* **267**:1629 (1995); Schmid et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**:181 (2000); Marinakos et al., *Chem. Mater.* **10**:1214 (1998)) or polyelectrolytes (Storhoff et al., *J.*
 10 *Am. Chem. Soc.* **120**:1959 (1998); Storhoff et al., *J. Cluster Sci.* **8**:179 (1997); Elghariani et al., *Science* **277**:1078 (1997); Mirkin et al., *Nature* **382**:607 (1996)) can be used to controllably construct mono- and multilayered nanoparticle materials off of planar substrates. The attractive feature of using DNA as a nanoparticle interconnect is that one
 15 can synthetically program interparticle distances, particle periodicities, and particle compositions through choice of DNA sequence. Moreover, one can utilize the reversible binding properties of oligonucleotides to ensure the formation of thermodynamic rather than kinetic structures. In addition to providing a new and powerful method for controlling the growth of nanoparticle-based architectures from solid substrates, this strategy also allows one to evaluate the relationship between nanoparticle aggregate size
 20 and both melting and optical properties of aggregate DNA-interlinked structures. An understanding of these two physical parameters and their relationship to materials architecture is essential for utilizing nanoparticle network materials, especially in the area of biodetection.

- The oligonucleotide-functionalized, 13-nm-diameter gold nanoparticles used to
 25 construct the multilayer assemblies were prepared as described in Examples 1 and 3. The nanoparticles had 5'-hexanethiol-capped oligonucleotide 1 (5'-HS(CH₂)₆O(PO₃)O-CGCATTGAGGAT-3' [SEQ ID NO:50]) and 3'-propanethiol-capped oligonucleotide 2 (3'-HS(CH₂)₃O(PO₃)O-ATGCTCAACTCT-5' [SEQ ID NO:59]) attached to them to

WO 01/51665

PCT/US01/01190

yield nanoparticles *a* and *b*, respectively (see Figure 37). Glass slides were functionalized with 12-mer oligonucleotide **2** as described in Example 10. To build nanoparticle layers, the substrates were first immersed in a 10 nM solution of 24-mer linker **3** (5'-TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG-3' [SEQ ID NO:60]) and allowed to

5 hybridize with it for 4 hours at room temperature (see Figure 37). The substrates were washed with clean buffer solution, and then hybridized with a 2 nM solution of particle *a* for 4 hours at room temperature to attach the first nanoparticle layer. A second nanoparticle layer could be attached to the first one by similarly exposing the surface to solutions of linker **3** and nanoparticle *b*. These hybridization steps could be repeated to

10 attach multiple, alternating layers of nanoparticles *a* and *b*, each layer connected to the previous one by linker **3**. In the absence of linker, or in the presence of noncomplementary oligonucleotide, no hybridization of nanoparticles to the surface was observed. In addition, multilayer assembly was only observed under conditions which promoted the hybridization of the DNA linkers: neutral pH, moderate salt concentration

15 (> 0.05 M NaCl), and a temperature below the duplex melting temperature (T_m).

Each hybridized nanoparticle layer imparted a deeper red color to the substrate, and after ten hybridized layers, the supporting glass slide appeared reflective and gold in color. Transmission UV-vis spectroscopy of the substrate was used to monitor the successive hybridization of nanoparticle layers to the surface, Figure 38A. The low

20 absorbance of the initial nanoparticle layer suggests that it seeded the formation of further layers, which showed a near linear increase in the intensity of the plasmon band with each additional layer (for each successive nanoparticle layer formation, no additional absorbance was observed on exposure for longer times or to higher concentrations of either linker **3** or nanoparticle solution). The linearity of the absorbance increase after the

25 generation of the initial nanoparticle layer indicates that the surface was saturated with hybridized nanoparticles with each successive application, Figure 38B. This is supported by field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) images of one (Figure 39A) and two (Figure 39B) nanoparticle layers on a surface, which show low nanoparticle

WO 01/51665

PCT/US01/01190

coverage with one layer, but near complete coverage with two layers. The λ_{max} of the plasmon band for the multilayer assemblies shifts no more than 10 nm, even after 5 layers. The direction of this shift is consistent with other experimental (Grabar et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**:1148 (1996)) and theoretical (Quinten et al., *Surf. Sci.* **172**:557 (1986); Yang et al., *J. Chem. Phys.* **103**:869 (1995)) treatments of gold nanoparticle aggregates. However, the magnitude of the shift is small compared to that previously observed for suspensions of oligonucleotide-linked gold nanoparticle networks, which show $\lambda_{\text{max}} > 570$ nm (see previous examples). This suggests that many more linked nanoparticles --- perhaps hundreds or thousands --- are required to produce the dramatic color change from red to blue observed for gold nanoparticle-based oligonucleotide probes. (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* **120**:1959 (1998); Storhoff et al., *J. Cluster Sci.* **8**:179 (1997); Elghariani et al., *Science* **277**:1078 (1997); Mirkin et al., *Nature* **382**:607 (1996).). Surface plasmon shifts for aggregated gold nanoparticles have been shown to be highly dependent on interparticle distance (Quinten et al., *Surf. Sci.* **172**:557 (1986); Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.*, in press), and the large distances provided by oligonucleotide linkers (8.2 nm for this system)) significantly reduce the progressive effect of nanoparticle aggregation on the gold surface plasmon band.

The dissociation properties of the assembled nanoparticle multilayers were highly dependent upon the number of layers. When the multilayer-coated substrates were suspended in buffer solution and the temperature raised above the T_m of the linking oligonucleotides (53°C), the nanoparticles dissociated into solution, leaving behind a colorless glass surface. Increasing or decreasing the pH (>11 or <3) or decreasing the salt concentration of the buffer suspension (below ~0.01 M NaCl) also dissociated the nanoparticles by dehybridizing the linking DNA. The multilayer assembly was fully reversible, and nanoparticles could be hybridized to, and dehybridized from, the glass substrates (e.g. three cycles were demonstrated with no detectable irreversible nanoparticle binding).

Significantly, while all of the surface bound nanoparticle assemblies dissociated

above the T_m of the linking oligonucleotides, the sharpness of these transitions depended on the size of the supported aggregate, Figure 39D-F. Surprisingly, the dissociation of the first nanoparticle layer from the substrate exhibited a transition (Figure 39D, FWHM of the first derivative = 5 °C) that was sharper than that of the same oligonucleotides without nanoparticles in solution, Figure 39C. As more nanoparticle layers were hybridized to the substrate, the melting transition of the oligonucleotide-linked nanoparticles became successively sharper (Figure 39E-F, FWHM of the first derivative = 3 °C), until it matched that of the large nanoparticle network assemblies found in solution. (Gittins et al., *Adv. Mater.* 11:737 (1999); Brust et al., *Langmuir* 14:5425 (1998)). These experiments confirm that more than two nanoparticles and multiple DNA interconnects are required to obtain the optimally sharp melting curves. They also show that the optical changes in this system are completely decoupled from the melting properties (*i.e.*, small aggregates can give sharp transitions but still not change color).

15 Example 21: Electrical Properties of Gold Nanoparticle Assemblies

Electron transport through DNA has been one of the most intensely debated subjects in chemistry over the past five years. (Kelley et al., *Science* 283:375-381 (1999); Turro et al., *JBIC* 3:201-209 (1998); Lewis et al., *JBIC* 3:215-221 (1998); Ratner, M. *Nature* 397:480-481 (1999); Okahata et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:6165-6166 (1998))
 20 Some claim that DNA is able to efficiently transport electrons, while others believe it to be an insulator.

In a seemingly disparate field of study, a great deal of effort has been devoted to examining the electrical properties of nanoparticle-based materials. (Terrill et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117:12537-12548 (1995); Brust et al., *Adv. Mater.* 7:795-797 (1995); Bethell et al., *J. Electroanal. Chem.* 409:137-143 (1996); Musick et al., *Chem. Mater.* 9:1499-1501 (1997); Brust et al., *Langmuir* 14:5425-5429 (1998); Collier et al., *Science* 277:1978-1981 (1997)). Indeed, many groups have explored ways to assemble nanoparticles into two- and three-dimensional networks and have investigated the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

electronic properties of such structures. However, virtually nothing is known about the electrical properties of nanoparticle-based materials linked with DNA.

For the first time, in this study, the electrical properties of gold nanoparticle assemblies, formed with different length DNA interconnects have been examined. As shown below, these hybrid inorganic assemblies behave as semiconductors, regardless of oligonucleotide particle interconnect length over a 24 to 72 nucleotide range. The results reported herein indicate that DNA interconnects can be used as chemically specific scaffolding materials for metallic nanoparticles without forming insulating barriers between them and thereby destroying their electrical properties. These results point towards new ways such hybrid assemblies can be exploited as electronic materials.

At the heart of this issue is the following question: Can nanoparticles assembled by DNA still conduct electricity or will the DNA interconnects, which are heavily loaded on each particle, (Mucic, R. C. *Synthetically Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA*, Thesis Ph. D., Northwestern University (1999)) act as insulating shells? The conductivities of these materials as a function of temperature, oligonucleotide length, and relative humidity were examined. The DNA-linked nanoparticle structures were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), synchrotron small angle x-ray scattering (SAXS) experiments, thermal denaturation profiles, and UV-vis spectroscopy.

In a typical experiment (see Figure 40), citrate-stabilized 13 nm gold nanoparticles were modified with 3' and 5' alkanethiol-capped 12-mer oligonucleotides 1 (3' SH (CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-ATGCTCAACTCT 5' [SEQ ID NO:59]) and 2 (5' SH (CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-CGCATTTCAGGAT 3' [SEQ ID NO:50]) as described in Examples 1 and 3. DNA strands with lengths of 24, 48, or 72 bases (3 (5'TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG3' [SEQ ID NO:60]), 4 (5'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATC-ATGCAATCCTGAATGCG 3'[SEQ ID NO:61]), and 5 (5'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCATATATTGACGCTTT

WO 01/51665

PCT/US01/01190

ACGGACAACATCCTGAATGCG3'(SEQ ID NO:62)) were used as linkers. Fillers 6 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT5'(SEQ ID NO:63)) and 7 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGTATATAACCTGCGAAATGCCTGTG5' [SEQ ID NO:64]) were used with the 48 and 72 base linkers. The DNA-modified nanoparticles and DNA linkers and fillers were stored in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate (pH 7) buffer (referred as to 0.3 M PBS) prior to use. To construct nanoparticle assemblies, 1-modified gold nanoparticles (652 μ l, 9.7 nM) and 2-modified gold nanoparticles (652 μ l, 9.7 nM) were added to linker DNA 3, 4, or 5 (30 μ l, 10 nM). After full precipitation, the aggregates were washed with 0.3 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ solution to remove excess linker DNA and NaCl.

Lyophilization (10^{-3} – 10^{-2} torr) of the aggregate to dryness results in pellets and removal of the volatile salt, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Unfunctionalized, citrate-stabilized particles, prepared by the Frens method, (Frens, *Nature Phys. Sci.* 241:20-22 (1973)) were dried as a film and used for comparison purposes. The resulting dried aggregates had a color resembling tarnished brass and were very brittle. FE-SEM images demonstrated that oligonucleotide-modified nanoparticles remained intact upon drying, while citrate-stabilized nanoparticles fused to one another. Significantly, the dried DNA-linked aggregates could be redispersed in 0.3 M PBS buffer (1 ml), and exhibited excellent melting properties; heating such a dispersion to 60 °C resulted in dehybridization of the DNA interconnects, yielding a red solution of dispersed nanoparticles. This combined with the FE-SEM data conclusively demonstrated that DNA-modified gold nanoparticles are not irreversibly aggregated upon drying.

The electrical conductivities of the three samples (dried aggregates linked by 3, 4, and 5, respectively) were measured using a computer-controlled, four-probe technique. Electrical contacts consisted of fine gold wires (25 and 60 μ m diameter) attached to pellets with gold paste. Samples were cooled in a moderate vacuum (10^{-3} to 10^{-2} torr), and conductivity was measured as the temperature was increased under a dry, low pressure of helium gas. The sample chamber was insulated from light in order to

WO 01/51665

PCT/US01/01190

eliminate possible optoelectronic effects. Excitation currents were kept at or below 100 nA, and the voltage across the entire sample was limited to a maximum of 20 V. Surprisingly, the conductivities of the aggregates formed from all three linkers, ranged from 10^{-5} to 10^{-4} S/cm at room temperature, and they showed similar temperature
 5 dependent behavior. The conductivities of the DNA-linked aggregates showed Arrhenius behavior up to about 190°K, which is characteristic of a semiconducting material. This is similar to the behavior of activated electron hopping observed in discontinuous metal island films (Barwinski, *Thin Solid Films* 128:1-9 (1985)). Gold nanoparticle networks linked by alkanedithiols have shown similar temperature dependence (Brust et al., *Adv.*
 10 *Mater.* 7:795-797 (1995); Bethell et al., *J. Electroanal. Chem.* 409:137-143 (1996)). Activation energies of charge transport can be obtained from a plot of $\ln \sigma$ versus $1/T$ using equation (1).

$$\sigma = \sigma_0 \exp[-E_a/(kT)] \quad (1)$$

15

The average activation energies calculated from three measurements were 7.4 ± 0.2 meV, 7.5 ± 0.3 meV, and 7.6 ± 0.4 meV for the 24-, 48-, and 72-mer linkers, respectively. Conductivity data from 50°K to 150°K were used for these calculations.

Since the electrical properties of these types of materials should depend on the
 20 distance between particles, synchrotron SAXS experiments were used to determine interparticle distances of the dispersed and dried aggregates. The SAXS experiments were performed at the Dupont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team (DND-CAT) Sector 5 of the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory. DNA-linked aggregates and dilute samples of DNA-modified colloid were irradiated with an
 25 0.3 micron beam of 1.54 Å radiation, and scattered radiation was collected on a CCD detector. The 2D data were circularly averaged and transformed into a function, $I(s)$, of the scattering vector magnitude, $s = 2\sin(\Theta)/\lambda$, where 2Θ is the scattering angle and λ is the wavelength of the incident radiation. All data were corrected for background

WO 01/51665

PCT/US01/01190

scattering and sample absorption. The first peak position, which is sensitive to interparticle distance, drastically changed from s values of 0.063 nm^{-1} , 0.048 nm^{-1} , and 0.037 nm^{-1} for the 24-, 48-, and 72-mer linked aggregates, respectively, to an s value of 0.087 nm^{-1} upon drying for all three aggregates structures. This indicates that
5 interparticle distances decreased significantly upon drying, to the point where the particles were almost touching, and that such distances were virtually independent of linker length, while those in solution were highly dependent on linker length. This explains why similar activation energies were observed for the three different linker systems in the dried pellet conductivity experiments. Moreover, it also explains why
10 relatively high conductivities were observed, regardless of how one views the electronic properties of DNA. Unlike the DNA-linked materials, the dried film of citrate-stabilized gold nanoparticles showed metallic behavior. This is consistent with the SEM data, which showed that such particles fuse together.

Above 190°K , the measured conductivities of the DNA-linked samples showed an
15 anomalous dipping behavior. For all samples, the conductivity started to decrease abruptly at approximately 190°K and continued to decrease until approximately 250°K , at which point it increased again. To investigate this unusual behavior in detail, the electrical conductivity was measured as the sample was cooled and warmed repeatedly. Interestingly, the dip in conductivity only occurred in the direction of increasing
20 temperature. Since DNA is hydrophilic and water could potentially affect the electrical properties of the hybrid structures, the effect of relative humidity on the conductivity of the gold aggregates was examined. The resistance increased by a factor of 10 with increasing humidity from 1% to 100%. It should be noted that the characteristic dip was very weak when the sample was kept in vacuum (10^{-6} Torr) for 48 hours prior to the
25 conductivity measurement. From these observations, it was concluded that the unusual dip and subsequent rise in conductivity above 190°K is associated with water melting and the hygroscopic nature of the DNA, which temporarily increased the interparticle distance (until evaporation took place). Consistent with this hypothesis, SAXS

WO 01/51665

PCT/US01/01190

measurements on a dried aggregate that was wetted with 0.3 M PBS buffer showed a 200% increase in interparticle distance (~2 nm).

These studies are important for the following reasons. First, they show that one can use the molecular recognition properties of DNA to assemble nanoparticle-based materials without passivating them or destroying their discrete structural or electrical properties. If these DNA-functionalized particles are to be used to study electrical transport in three-dimensional macroscopic assemblies or even lithographically patterned structures (Piner et al., *Science* **283**:661-663 (1999)), it is imperative that their electrical transport properties be delineated. Second, it shows that over a fairly long linker distance (8 ~ 24 nm), the conductivities of the dried assemblies are virtually independent of DNA linker length. This is likely a result of the removal of water and the use of a volatile salt in these experiments; indeed, the free volume created by removal of solvent and salt allows the DNA to be compressed on the surface and close approach of the particles within the aggregates. Third, the aggregates with the DNA-protected nanoparticles behave as semiconductors, while films formed from citrate-stabilized particles exhibit irreversible particle fusion and metallic behavior. Finally, these results point toward the use of these materials in DNA diagnostic applications where sequence specific binding events between nanoparticles functionalized with oligonucleotides and target DNA effect the closing of a circuit and a dramatic increase in conductivity (*i.e.* from an insulator to a semiconductor) (see next example).

Example 22: Detection Of Nucleic Acid Using Gold Electrodes

A method of detecting nucleic acid using gold electrodes is illustrated diagrammatically in Figure 41. A glass surface between two gold electrodes was modified with 12-mer oligonucleotides **1** (3' NH₂(CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-ATG-CTC-AAC-TCT [SEQ ID NO:59]) complementary to target DNA **3** (5' TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG [SEQ ID NO:60]) by the method of Guo *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5456-5465 (1994). Oligonucleotides **2** (5' SH(CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-CGC-ATT-CAG-GAT [SEQ ID NO:50]) were

WO 01/51665

PCT/US01/01190

prepared and attached to 13 nm gold nanoparticles as described in Examples 1 and 18 to yield nanoparticles a. Target DNA 3 and nanoparticles a were added to the device. The color of the glass surface turned pink, indicating that target DNA-gold nanoparticle assemblies were formed on the glass substrate. Next, the device was immersed in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer and heated at 40 °C for 1 hour to remove nonspecifically bound DNA, and then treated with a silver staining solution as described in Example 19 for 5 minutes. The resistance of the electrode was 67 kΩ.

For comparison, a control device modified by attaching oligonucleotides 4, instead of oligonucleotides 1, between the electrodes. Oligonucleotides 4 have the same sequence (5' NH₂(CH₂)₆O(PO₃)O-CGC-ATT-CAG-GAT [SEQ ID NO:50]) as oligonucleotides 2 on the nanoparticles and will bind to target DNA 3 so as to prevent binding of the nanoparticles. The test was otherwise performed as described above. The resistance was higher than 40 MΩ, the detection limit of the multimeter that was used.

This experiment shows that only complementary target DNA strands form nanoparticle assemblies between the two electrodes of the device, and that the circuit can be completed by nanoparticle hybridization and subsequent silver staining. Therefore, complementary DNA and noncomplementary DNA can be differentiated by measuring conductivity. This format is extendable to substrate arrays (chips) with thousands of pairs of electrodes capable of testing for thousands of different nucleic acids simultaneously.

Example 23: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles using cyclic disulfide linkers

In this Example, we describe a new cyclic disulfide linker for binding oligonucleotides to gold surfaces, based on steroid disulfide 1a (Figure 42) that is simple to prepare, is broadly useful, and affords gold-oligonucleotide conjugates exhibiting greater stability toward DTT than those prepared using mercaptohexyl linkers. A cyclic disulfide was selected as the reactive site of the anchor unit since ester derivatives of 1,2-

WO 01/51665

PCT/US01/01190

dithiane-4,5-diol were known to form monolayers on gold surfaces (Nuzzo, et al., J. Am. Chem. Soc. 105,4481-4483) and a cyclic disulfide would plausibly bind to the surface through both sulfur atoms (Ulman, A., MRS Bulletin, June 46-51) to give a chelate structure that could exhibit enhanced stability. Epiandrosterone was selected as a linking element since it is a readily available, easily derivatized ketoalcohol and, as a substituent with a large hydrophobic surface, might be expected to help screen the approach of water soluble molecules to the gold surface (Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 7535-7536 – Bioconjugate Chem. 9, 826-830).

The oligonucleotide-gold probes used in previous studies were prepared by the reaction of oligonucleotides bearing terminal mercaptohexyl groups with gold nanoparticles in an aqueous buffer. They proved to be surprisingly robust, functioning well even after heating to 100°C or after storing for 3 years at 5 °C. We have found, however, that these conjugates lose activity as hybridization probes when soaked in solutions containing thiols, which act by displacing the derivatized oligonucleotides from the gold surface. This feature poses a problem when the nanoparticle probes are to be used in a solution containing a thiol, as for example, a PCR solution that contains dithiothreitol (DTT) as a stabilizer for the polymerase enzyme.

(a) General

NMR spectra were recorded on 500 MHz (¹H) and 400 MHz (³¹P; acquisition at 161.9 MHz) Varian spectrometers using CDCl₃ as a solvent and TMS as an internal (¹H) and H₃PO₄ as an external (³¹P) standard; chemical shifts are expressed in δ units. MS data were obtained on a Quattro II triple quadrupole mass spectrometer. Automated oligonucleotide synthesis was carried out on a milligene Expedite DNA synthesizer. The analysis for S was made by Oneida Research Services.

(b) Preparation of Steroid-Disulfide Ketal (1a)

The synthetic scheme is shown in Figure 43. A solution of epiandrosterone (0.5g), 1,2-dithiane-4,5-diol (0.28 g), and p-toluenesulfonic acid (15 mg) in toluene (30 mL) was refluxed for 7 h under conditions for removal of water (Dean Stark apparatus);

WO 01/51665

PCT/US01/01190

then the toluene was removed under reduced pressure and the residue taken up in ethyl acetate. This solution was washed with water, dried over sodium sulfate, and concentrated to a syrupy residue, which on standing overnight in pentane/ether afforded compound **1a** as a white solid (400 mg); Rf (TLC, silica plate, ether as eluent) 0.5; for comparison, Rf values for epiandrosterone and 1,2-dithiane-4,5-diol obtained under the same conditions are 0.4, and 0.3, respectively. Recrystallization from pentane/ether afforded a white powder, mp 110-112 °C; ¹H NMR, δ 3.6 (1H, C³OH), 3.54-3.39 (2H, m 2OCH of the dithiane ring), 3.2-3.0 (4H, m 2CH₂S), 2.1-0.7 (29H, m steroid H); mass spectrum (ES⁺) calcd for C₂₃H₃₆O₃S₂ (M⁺H) 425.2179, found 425.2151. Anal. (C₂₃H₃₆O₃S₂)₂ S: calcd, 15.12; found, 15.26.

(c) Preparation of Steroid-Disulfide Ketal Phosphoramidite Derivative (1b)

Compound **1a** (100 mg) was dissolved in THF (3 mL) and cooled in a dry ice alcohol bath. N,N-diisopropylethylamine (80 μL) and β-cyanoethyl chlorodiisopropylphosphoramidite (80 μL) were added successively; then the mixture was warmed to room temperature, stirred for 2 h, mixed with ethyl acetate (100 mL), washed with 5% aq. NaHCO₃ and with water, dried over sodium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was taken up in the minimum amount of dichloromethane, precipitated at -70 °C by addition of hexane, and dried under vacuum; yield 100 mg; ³¹P NMR 146.02.

(d) Preparation of 5'-Modified Oligonucleotides and Nanoparticle Conjugates

5'-Modified oligonucleotides 1c1 and 1c2 were constructed on CPG supports using conventional phosphoramidite chemistry, except that compound 1b (Figure 42) was employed in the final phosphitilation step. Products were cleaved from the support by treatment with concentrated NH₄OH for 16 h at 55 °C. The oligonucleotides were purified by reversed phase HPLC on a Dionex DX300 system equipped with a Hewlett Packard ODS Hypersil column (4.6 x 200 mm, 5 μm particle size) using TEAA buffer (pH 7.0) and a 1%/min gradient of 95% CH₃CN/5% 0.03 TEAA at a flow rate of 1

WO 01/51665

PCT/US01/01190

mL/min. A nice feature of the hydrophobic steroid group is that the capped derivatives separate cleanly from uncapped oligomers. Sulfur derivatized oligonucleotides IIa, IIc1 and IIc2 (Figure 43) were prepared similarly using the commercially available "5'-Thiol-Modifier reagent" (C6 Glen Research) and cleavage of the trityl protecting group with silver nitrate as previously described (Storhoff, J.J., et al., J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964). For preparation of disulfide IIIc1, "Thiol-Modifier C6 S-S" (Glen Research) was used in the final phosphitilation and the terminal dimethoxytrityl group was cleaved with aqueous 80% acetic acid.

Each of the modified oligonucleotides was immobilized on ~ 13 nm gold nanoparticles by the procedure used for anchoring oligonucleotides through a mercaptohexyl head group (Storhoff et al. (1998) J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964). This involved soaking citrate stabilized nanoparticles (~ 13 nm in diameter) for 56 hours in a buffer-salt solution containing an oligonucleotide bearing a terminal sulfur substituent (HS- or acyclic or cyclic disulfide) followed by addition of NaCl to 0.1 M and 24h of standing. The nanoparticles were pelleted by centrifugation, the supernatant solution was removed, and the nanoparticles were washed, resuspended in buffer, recentrifuged, and then suspended in 0.1 M NaCl, 10 mM phosphate. This procedure afforded the nanoparticle oligonucleotide conjugates free from the excess sulfurized oligonucleotides employed in the loading process.

20 (e) Hybridization

To evaluate the utility of nanoparticle-oligonucleotide probes containing the disulfide-steroid anchor we prepared probes Ic1, Ic2, IIc1, IIc2, and IIIc1 by immobilizing the modified oligonucleotides on gold nanoparticles (Figure 2). The oligomers in a given series have the same nucleotide sequence but differ in structure of the 5'-head group Y. Conjugates Ic1 and Ic2 have steroid-disulfide head groups; IIc1, IIc2, mercaptohexyl head groups; and IIIc1, acyclic disulfide head groups. The (dA)₂₀ chains serve as spacers between the gold and the oligonucleotide recognition regions to facilitate hybridization. Many of the sulfur derivatized oligomers bind to each

nanoparticle. Hybridization of pairs of nanoparticle probes with target oligonucleotides leads to formation of three dimensional networks and a change in color from red to blue-gray (Mucic, R. C., et al., J. Am. Chem. Soc. 120, 12674-12675).

Hybridization of the probes was examined using a 79-mer oligonucleotide targets, containing sequences complementary to the probes (Figure 43). The reactions were carried out at room temperature by adding 1 μ L of the target solution (10 pmol of IV) to colloidal solutions of the probe pairs Ic1, Ic2, and IIc1 and IIc2, and IIIc1 and IIIc2 (50 μ L and 1.0 A₅₂₀ Unit of each nanoparticle probe) in 0.5 M NaCl, 10 mM phosphate (pH 7.0). At times 10 seconds, 5 minutes, and 10 minutes, aliquots (3 μ L) were removed and spotted on a C-18 reversed phase TLC plate. The various probe pairs all behaved the same: the spots for the 10 second reactions were red, indicative of free nanoparticles; those for the 10 minute reactions were deep blue-gray, characteristic of aggregates of nanoparticles; and the 5 minute reactions afforded spots with a reddish blue color, indicative of a mixture of non-associated and associated nanoparticles. In agreement with previous observations for aggregation of nanoparticles effected by hybridization of oligonucleotides (Storhoff, J. J., et al., J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964; Elghanian, et al., Science, 277, 1078-1081; Mucic, R. C., et al., J. Am. Chem. Soc. 120, 12674-12675; Mitchell, G. P., J. Am. Chem. Soc. 121, 8122-8123), the reactions were reversible. Thus, warming the aggregate mixture to 90 °C (above the dissociation temperature for the oligomers linking the nanoparticles together) and spotting while hot afforded a red spot. For control experiments in which the oligonucleotide target was omitted or was not complementary to the probes, the color was red under all conditions.

We conclude that the nanoparticle conjugates generated via the steroid-disulfide anchor function effectively as hybridization probes. Moreover, as judged by the spot test, the conjugates with the various anchor units react with the target oligonucleotides at comparable rates. This feature is consistent with expectations for probes having comparable densities of oligonucleotides on the surface of the nanoparticles and nucleotide recognition regions relatively far removed from the 5'-head groups.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

(f) Reaction of Nanoparticle Probes with Dithiothreitol.

Addition of thiols to colloidal solutions of gold nanoparticles or gold nanoparticles loaded with mercaptohexyl-oligonucleotides leads to aggregation of the nanoparticles. The color changes from red to deep blue, and on standing a dark precipitate settles out. As demonstrated with experiments with nanoparticles bearing fluorescently labeled oligonucleotides, the thiol displaces the mercaptoalkyl-oligonucleotides bound at the gold surface (Mucic, R. C., (1999) Synthetic Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA, PhD Thesis, Northwestern University). In contrast to aggregation induced by hybridization of oligonucleotide-nanoparticle conjugates, these reactions are irreversible; neither heating nor addition of NaOH disassembles the aggregates.

We have used this color to monitor the reaction of DTT with probes prepared with the steroid cyclic disulfide, the mercaptohexyl, and the acyclic disulfide head groups. The experiments were carried out by adding 1 μ L of 1M DTT in water to 100 μ L of the nanoparticle-oligonucleotide probe solution (2 A_{520} Units of nanoparticles) in 0.5 M NaCl and 10 mM phosphate (pH 7.0), then spotting 3 μ L aliquots on a TLC plate at various times and observing the color. As shown in Table 1, colloidal probes derived from oligonucleotides with the mercaptohexyl (IIc1 and IIc2) and acyclic oligonucleotide headgroups (IIIc1) reacted rapidly. A red-blue spot was obtained in 20 seconds and a strong blue spot within 5 minutes. By 100 minutes, most of the gold had precipitated. In contrast, no color change was observed for the reaction of the probes prepared with the steroid-cyclic disulfide head group (Ic1, Ic2) within 40 minutes. It took 100 minutes to reach the same color obtained with probes prepared with IIc1, IIc2, or with IIIc1 in 20 seconds. On this basis, we estimate that the rate of reaction of the steroid disulfide probes with DTT is of the order of 1/300th that of the other probes. The probe prepared from the acyclic disulfide anchor 3c reacts at about the same rate as the probes prepared with the mercaptohexyl anchor. The latter result is not surprising in view of evidence that the reaction of an acyclic disulfide with gold probably involves cleavage of the S-S

WO 01/51665

PCT/US01/01190

bond (Zhong, C. J., *Langmuir*, 15, 518-525). Accordingly, an oligonucleotide with an acyclic head group would likely be linked to gold through a single sulfur atom, as in the case of mercaptohexyl-oligonucleotide derivatives.

- To see if probes prepared from Ic1 and Ic2 in fact still serve as hybridization probes after standing in the presence of DTT, we treated two samples of mixtures of the probes with DTT under the conditions used for the reactions in Table I. After 30 minutes, 1 μ L of a solution of the 79-mer target oligonucleotide (10 pmol) was added to one. Both samples were frozen quickly, allowed to thaw, and assayed by the spot test. The spot for the sample containing the target was blue and that for the control lacking the target was red, demonstrating that these nanoparticle conjugates were not only stable but also effective as probes after exposure to DTT under conditions causing aggregation of probes derived from the mercaptohexyl or linear disulfide anchoring group.

Table I. Colors from reactions of Gold Nanoparticle Probes with DTT

Ic1 + Ic2	Time 0	20 sec	5 min	40 min	100 min
	red	red	red	red	red-blue
IIc1 + IIc2	red	red-blue	blue	blue	(black prec.)
IIIc1	red	red-blue	blue	blue	(black prec.)

(g) Conclusion

- Gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates made using this cyclic disulfide linker serve as effective probes for detecting specific oligonucleotide sequences, and they exhibit much greater stability toward dithiothreitol than corresponding conjugates prepared with the conventional mercaptohexyl group or an acyclic disulfide unit. The high stability toward thiol deactivation likely results, in part at least, from anchoring each

oligonucleotide to gold through two sulfur atoms.

Example 24: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles using a simple cyclic disulfide linker.

5 In this Example, we prepared a non-steroid cyclic disulfide linker and oligonucleotide-nanoparticle probes from this linker and evaluated the probes stability in the presence of thiol-containing solutions relative to probes prepared with steroidal cyclic disulfide and alkyl thiol linkers. Procedures have been described for preparing probes for detecting DNA or RNA sequences by binding oligonucleotides to gold nanoparticles using alkylthiol anchor groups, I, Figure 44 [C. A. Mirkin et al., Nature, 382, 607 (1996); 10 Strohoff, et al. J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)] or a steroid cyclic disulfide anchor group, II, Figure 44 [R. L. Letsinger et al., Bioconjugate Chemistry, 11, 289 (2000)]. As probes, the conjugates prepared using the steroid cyclic disulfide linker have proved advantageous in that they are much more stable in the presence of thiol compounds, such as mercaptoethanol or dithiothreitol (DTT), than are conjugates prepared using an 15 alkylthiol anchor. This feature is important since PCR solutions employed in amplifying DNA samples for detection contain small amounts of DTT to protect the enzyme. For simple and rapid detection of PCR products it is desirable to use probes with high stability toward DTT so that the test can be carried out directly in the PCR solution 20 without having to first isolate the amplified DNA.

Two features distinguish the steroid cyclic anchor (compound 1, Figure 42): (1) the cyclic disulfide, which can in principle provide two binding sites that could act cooperatively in holding a given oligonucleotide at the gold surface, and (2) the steroid unit which could stabilize neighboring chains on the gold by hydrophobic interactions (see for example, R. L. Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 7535 (1993). To assess 25 the importance of these contributions we have prepared and examined gold conjugates anchored by a cyclic disulfide lacking a steroid group, compound IIIc (Figure 44).

Compound 2a, prepared by heating trans-1,2-dithiane-4,5-dithiol with acetol in

WO 01/51665

PCT/US01/01190

toluene, was converted to a cyanoethyl N,N-di-i-propyl phosphoramidite reagent, 2b, which was employed in the final coupling step in the synthesis of modified oligonucleotides 2c1 and 2c2. One gold conjugate probe was prepared by treating a gold colloid solution with 2c1 and an equimolar amount of 2d, which serves a diluent on the gold surface. A companion probe was made from 2c2 and 2d in the same way. These nanoparticle conjugates were stable in a range of solutions of sodium chloride (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 M), both on standing and on freezing and thawing.

(a) Preparation of compounds 2a, 2b, 2c1 and 2c2.

Compounds 2a was prepared as described in Example 23. Phosphitilation of 2a and synthesis of oligonucleotides 2c1 and 2c2 were carried out as described previously for the steroid cyclic disulfide derivatives in Example 23 and elsewhere [R. L. Letsinger et al., Bioconjugate Chemistry, 11, 289 (2000), the disclosure which is incorporated by reference in its entirety]. The time of reaction in the step involving condensation of IIIb with the oligomer on the CPG support was 10 min.

(b) Preparation of Gold-Oligonucleotide Conjugates.

Equimolar amount of oligonucleotides 2c1 and 2d or 2c2 and 2d were added to 13 nm gold colloids (~ 10 nM) to provide solutions containing 1.7 $\mu\text{mole/mL}$ of each oligonucleotide. The solutions were stored in the dark for 24 h; then salts were added to make the solutions 0.3 M in NaCl, 10 mM in phosphate (pH 7.0), and 0.01% in sodium azide. After 24 h the NaCl concentration was increased to 0.8 M and the solution were allowed to stand for another 24 h. The colloid was then filtered to remove any aggregates and the solution was centrifuged to collect the nanoparticles. The pellets were washed with nanopure water, recentrifuged and redispersed in 0.1 M NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.01 % sodium azide.

(c) Reaction of nanoparticles probes with dithiothreitol

Displacement studies were carried out at room temperature (22°C) by adding 2 μL of 0.1 M DTT to 20 μL of a mixture of equal volumes of the colloidal conjugates obtained from 2c1 and 2c2. Aliquots (3 μL) were periodically removed and spotted onto

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a white Nylon membrane. Initially the spots were red. Displacement of the oligonucleotide sulfur derivatives from the gold by DTT led to mixtures that afforded a blue-gray spot in the spot test. The time for displacement by DTT was taken as the time for the mixture to give a strong blue-gray color in a spot test. For the mixture of

5 conjugates derived from 2c1 and 2c2 this time was 10 hours.

For comparison, oligonucleotide conjugates were similarly prepared from oligonucleotide sequences c1 and c2 (Figure 44) using the mercaptohexyl anchor (compound 2, Figure 42) and the steroid cyclic disulfide anchor (compound 1, Figure 42). The reaction times for the conjugates prepared from the monothiol derivative (2, Figure 10 42) and the steroid cyclic disulfide as measured by the time to afford a blue-gray spot, were 5 minutes and 53 hours, respectively. These values correspond to relative stabilities of 1, ~60, and ~300 for the nanoparticle oligonucleotide conjugates derived from the mercaptoalkyl derivatives, the non-steroid cyclic disulfide, and the steroid cyclic disulfide derivatives, respectively. The results show that the cyclic disulfide anchor unit 15 itself is sufficient to afford high stability relative to the mercaptoalkyl group in these systems. The large hydrophobic group in nanoparticle conjugates derived from compound 1 also appears to play a role in enhancing stability toward thiol displacement of the oligonucleotides.

20 Example 25: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

In this Example, we evaluated the stability of a new acyclic disulfide linker, a tri thiol, relative to alkyl thiol and steroidal cyclic disulfide linkers in the presence of thiol-containing solutions. For comparison, oligonucleotides with a mercaptohexyl anchor (compound 5, Figure 45) and with a steroid cyclic disulfide anchor (compound 6, Figure 25 45) were prepared.

(a) Synthesis and characterization of 5'-tri-mercaptoalkyl oligonucleotide.

The 5'-trimercaptoalkylthiol oligonucleotide was synthesized as shown in Figure 47. Trembler phosphoramidite 7 (Glen Research Inc, Sterling, VA), Figure 45, and Thiol-

WO 01/51665

PCT/US01/01190

modifier C6 S-S phosphoramidite, were sequentially coupled to the 5' end of a protected oligomer still bound to the CPG support. The product was cleaved from the CPG and purified as describe above. The retention time for tri-thiol oligonucleotide with three DMT group on the end is approximately 64 minutes. 5'-DMT groups were subsequently removed by dissolving the oligonucleotide in 80% acetic acid for 30 min, followed by evaporation. The oligonucleotide was redissolved in 500 μ L nanopure water and the solution was extracted with ethyl acetate ($3 \times 300 \mu$ L). After evaporation of the solvent, the oligonucleotide was obtained as a white solid. The retention time of this 5'-tri-disulfide oligonucleotide with no DMT group was around 35 minutes on reverse phase columns while 24 minutes on the ion-exchange column. These peaks were both more than 97% of the area in the spectra, which indicates the high purity of the oligonucleotide. The formula weight of oligonucleotide 8 (Figure 45) was obtained by electrospray MS (calculated: 12242.85, found 12244.1). The three disulfide groups on the DNA stand were reduced tri thiol groups as described above for 5' monothiol DNA; then the oligonucleotide was purified though a NAP-5 column.

(b) Preparation of 5'-thiol or disulfide DNA modified gold nanoparticle

Gold nanoparticles were used as purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). To 10 mL of 30nm gold colloid was added 5 OD of thiol modified DNA. The solution was brought to 0.3 M NaCl/10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) (PBS) gradually. Then the nanoparticles were thrown down by centrifugation. After removing the colorless supernatant, the red oily precipitate was redispersed in 10 mL of fresh PBS buffer. The colloid was washed twice more using 10ml fresh PBS buffer by repeating this process.

(c) Stability test of thiol-DNA modified gold nanoparticles

Solid DTT was added to 600 μ L solutions of the different types of thiol- or disulfide DNA modified 30 nm gold nanoparticle colloids until the DTT concentration was 0.017M. As DTT displaces the oligonucleotides, the color of the colloid turns from red to blue. UV/VIS spectra were taken as a function of time. The absorbance at ~ 528 nm

WO 01/51665

PCT/US01/01190

- associated with dispersed 30nm gold particles began to decrease and a broad band at 700nm began to grow. The band at 700 nm is associated with colloid aggregation. As shown in Figure 48, single thiol oligonucleotide (1)-modified 30 nm gold particles quickly form an aggregate in 0.017M DTT; after 1.5 hours, the colloid totally turns blue.
- 5 The solution containing disulfide oligonucleotide (4)-modified nanoparticles turns blue after 20 hours under identical conditions. For the trithiol-oligonucleotide (cleaved 6) modified nanoparticles, it took 40 h to turn the solution blue.

All patents, patent applications and references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

WE CLAIM:

1. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:
providing a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the
5 oligonucleotides on each nanoparticle having a sequence complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid;
contacting the nucleic acid and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the two or more portions of the nucleic acid; and
10 observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
2. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
15 contacting the nucleic acid with at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, the contacting
20 taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
- 25 3. The method of Claim 2 wherein the contacting conditions include freezing and thawing.
4. The method of Claim 2 wherein the contacting conditions include heating.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

5. The method of Claim 2 wherein the detectable change is observed on a solid surface.
- 5 6. The method of Claim 2 wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.
7. The method of Claim 6 wherein the color change is observed on a solid surface.
- 10 8. The method of Claim 2 wherein the nanoparticles are made of gold.
9. The method of Claim 2 wherein the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled on their ends not attached to the nanoparticles with molecules that produce a detectable change upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
- 15 10. The method of Claim 9 wherein the nanoparticles are metallic or semiconductor nanoparticles and the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled with fluorescent molecules.
- 20 11. The method of Claim 2 wherein:
- the nucleic acid has a third portion located between the first and second portions, and the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles do not include sequences complementary to this third portion of the nucleic acid; and
- 25 the nucleic acid is further contacted with a filler oligonucleotide having a sequence complementary to this third portion of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the filler oligonucleotide with

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the nucleic acid.

12. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.
13. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a gene associated with
5 a disease.
14. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a bacterial DNA.
15. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a fungal DNA.
10
16. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a synthetic DNA, a
synthetic RNA, a structurally-modified natural or synthetic RNA, or a structurally-
modified natural or synthetic DNA.
17. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is from a biological
15 source.
18. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a product of a
polymerase chain reaction amplification.
20
19. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is contacted with the first
and second types of nanoparticles simultaneously.
20. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is contacted and
25 hybridized with the oligonucleotides on the first type of nanoparticles before being
contacted with the second type of nanoparticles.
21. The method of Claim 20 wherein the first type of nanoparticles is attached

WO 01/51665

PCT/US01/01190

to a substrate.

22. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is double-stranded and hybridization with the oligonucleotides on the nanoparticles results in the production of a
5 triple-stranded complex.

23. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

10 providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;

contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the
15 nanoparticles with said nucleic acid;

providing a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of said nucleic acid;

20 contacting said nucleic acid bound to the substrate with the second type of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with said nucleic acid; and

observing a detectable change.

24. The method of Claim 23 wherein the substrate has a plurality of types of
25 nanoparticles attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

25. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

comprising:

- providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be
 - 5 detected;
 - contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;
 - providing a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached
 - 10 thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of said nucleic acid;
 - contacting said nucleic acid bound to the substrate with the second type of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with said nucleic acid;
 - 15 providing a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles;
 - contacting the binding oligonucleotide with the second type of nanoparticles bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of
 - 20 the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles;
 - providing a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide;
 - contacting the third type of nanoparticles with the binding oligonucleotide
 - 25 bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles; and
 - observing a detectable change.

5 27. A method of detecting nucleic acid having at least two portions
comprising:

contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticles having one or more types of oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;

25 28. The method of Claim 27 wherein the first type of nanoparticles has only one type of oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the second portion of the sequence of said nucleic acid and to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

29. The method of Claim 28 further comprising contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles.

30. The method of Claim 27 wherein the first type of nanoparticles has at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to the second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of at least a portion of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

31. The method of Claim 30 further comprising contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles.

32. The method of Claim 27 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

33. The method of any one of Claims 23-32 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

34. The method of Claim 33 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

35. The method of any one of Claims 23-32 wherein the nanoparticles are

WO 01/51665

PCT/US01/01190

made of gold.

36. The method of any one of Claims 23-32 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

5

37. The method of any one of Claims 23-32 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

38. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

10

contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

15

contacting said nucleic acid bound to the substrate with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;

20

contacting the substrate with silver stain to produce a detectable change; and

observing the detectable change.

25

39. The method of Claim 38 wherein the nanoparticles are made of a noble metal.

40. The method of Claim 39 wherein the nanoparticles are made of gold or silver.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

41. The method of Claim 38 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

5 42. The method of any one of Claims 38-41 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

43. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

10 contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

15 contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

20 contacting the liposomes bound to the substrate with a first type of nanoparticles having at least a first type oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic
25 interactions; and

 observing a detectable change.

44. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

comprising

contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

contacting the liposomes bound to the substrate with a first type of nanoparticles having at least a first type oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions;

contacting the first type of nanoparticles bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,

the first type of nanoparticles having a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles,

the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles,

the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and observing a detectable change.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

45. The method of Claim 43 or 44 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.
- 5 46. The method of Claim 43 or 44 wherein the nanoparticles are made of gold.
47. The method of Claim 43 or 44 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.
- 10 48. The method of any one of Claims 43 or 44 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.
49. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
- 15 providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- 20 contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;
- providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid;
- 25

WO 01/51665

PCT/US01/01190

contacting said nucleic acid bound to the substrate with the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with said nucleic acid; and
observing a detectable change.

5

50. The method of Claim 49 wherein the substrate has a plurality of types of nanoparticles attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

10

51. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;

15

providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid;

20

contacting said nucleic acid, the substrate and the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the substrate; and

observing a detectable change.

25

52. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the substrate is then contacted with the aggregate probe so

WO 01/51665

PCT/US01/01190

that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe.

53. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, and said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate.

54. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted simultaneously with the aggregate probe and the substrate.

55. The method of Claim 51 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

56. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

- providing a substrate having oligonucleotides attached thereto;
- providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- providing a type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

sequence of the oligonucleotides attached to the substrate;

contacting said nucleic acid, the aggregate probe, the nanoparticles and the substrate, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and on the nanoparticles and hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the substrate; and
observing a detectable change.

57. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe and the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the nanoparticles, and said nucleic acid bound to the aggregate probe and nanoparticles is then contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate.

58. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, and said nucleic acid bound to the aggregate probe and nanoparticles is then contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate.

59. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, the nanoparticles are contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles bound to the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles.

60. The method of Claim 56 wherein the substrate has the oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

61. The method of any one of Claims 49-60 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

62. The method of Claim 61 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

63. The method of any one of Claims 49-60 wherein the nanoparticles in the aggregate probe are made of gold.

64. The method of any one of Claims 49-60 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

65. The method of any one of Claims 49-60 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

66. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with

WO 01/51665

PCT/US01/01190

said nucleic acid;

contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under
5 conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the
10 oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles;

contacting the liposomes bound to the substrate with the aggregate probe under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the aggregate
15 probe to the liposomes as a result of hydrophobic interactions; and
observing a detectable change.

67. The method of Claim 66 wherein the nanoparticles in the aggregate probe are made of gold.
20

68. The method of Claim 66 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

69. The method of Claim 66 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions
25 of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

70. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

comprising:

providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;

5 providing a core probe comprising at least two types of nanoparticles, each type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one of the other types of nanoparticles, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them;

10 providing a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe;

15 contacting said nucleic acid, the nanoparticles, the substrate and the core probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the nanoparticles and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the core probe; and

20 observing a detectable change.

71. The method of Claim 70 wherein said nucleic acid is contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the substrate is then contacted with the nanoparticles so
25 that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, and the nanoparticles bound to said nucleic acid are contacted with the core probe so that the oligonucleotides on the core probe hybridize with the oligonucleotides on the nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

72. The method of Claim 70 wherein said nucleic acid is contacted with the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, said nucleic acid bound to the nanoparticles is then contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and the nanoparticles bound to said nucleic acid are contacted with the core probe so that the oligonucleotides on the core probe hybridize with the oligonucleotides on the nanoparticles.

73. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

- providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- providing a core probe comprising at least two types of nanoparticles, each type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one other type of nanoparticles, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them;
- providing a type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid and a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe;
- contacting said nucleic acid, the linking oligonucleotides, the substrate and the core probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the linking oligonucleotides and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the linking oligonucleotides with the oligonucleotides on the core probe; and
- observing a detectable change.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

74. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

75. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

76. The method of Claim 76 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

77. The method of any one of Claims 70-73 wherein the nanoparticles in the core probe are made of gold.

78. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

79. The method of any one of Claims 70-73 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

80. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

- providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto;
- providing one or more types of binding oligonucleotides, each of the binding oligonucleotides having two portions, the sequence of one portion being complementary to the sequence of one of the portions of the nucleic acid and the sequence of the other portion being complementary to the sequence of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

- oligonucleotides on the nanoparticles;
contacting the nanoparticles and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides;
- 5 contacting the nucleic acid and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid; and
observing a detectable change.
- 10 81. The method of Claim 80 wherein the nanoparticles are contacted with the binding oligonucleotides prior to being contacted with the nucleic acid.
82. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:
- 15 providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto;
providing one or more binding oligonucleotides, each of the binding oligonucleotides having two portions, the sequence of one portion being complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid and the sequence of the other portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the
- 20 nanoparticles;
contacting the nanoparticles and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides;
contacting the nucleic acid and the binding oligonucleotides under
- 25 conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid; and
observing a detectable change.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

83. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
- contacting the nucleic acid with at least two types of particles having oligonucleotides attached thereto,
- 5 the oligonucleotides on the first type of particles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with an energy donor,
- the oligonucleotides on the second type of particles having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled
- 10 with an energy acceptor,
- the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid; and
- observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid.
- 15 84. The method of Claim 83 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.
85. A method of detecting nucleic acid having at least two portions
- 20 comprising:
- providing a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;
- providing a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,
- 25 the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, nanoparticles being capable of producing a detectable change;
- contacting the nucleic acid with the microspheres and the nanoparticles

WO 01/51665

PCT/US01/01190

under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the microspheres and on the nanoparticles with the nucleic acid; and

observing a change in fluorescence, another detectable change produced by the nanoparticles, or both.

5

86. The method of Claim 85 wherein the detectable change produced by the nanoparticles is a change in color.

87. The method of Claim 85 wherein the microspheres are latex microspheres and the nanoparticles are gold nanoparticles, and changes in fluorescence, color or both are observed.

88. The method of Claim 87 further comprising placing a portion of the mixture of the latex microspheres, nanoparticles and nucleic acid in an observation area located on a microporous material, treating the microporous material so as to remove any unbound gold nanoparticles from the observation area, and then observing the changes in fluorescence, color, or both.

89. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;

providing a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;

WO 01/51665

PCT/US01/01190

contacting the nucleic acid with the two types of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the two types of nanoparticles with the nucleic acid; and

observing changes in fluorescence.

5

90. The method of Claim 89 further comprising placing a portion of the mixture of the nanoparticles and nucleic acid in an observation area located on a microporous material, treating the microporous material so as to remove any unbound nanoparticles from the observation area, and then observing the changes in fluorescence.

10

91. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a type of particle having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid;

15

providing a type of probe oligonucleotides comprising a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the first portion of the oligonucleotides attached to the particles and both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further being labeled with a reporter molecule at one end;

20

contacting the particle and the probe oligonucleotides under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe oligonucleotides to produce a satellite probe;

then contacting the satellite probe with the nucleic acid under conditions effective to provide for hybridization of the nucleic acid with the probe oligonucleotides;

25

removing the particles; and
detecting the reporter molecule.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

92. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the reporter molecule is a fluorescent molecule.

93. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the
5 reporter molecule is a dye molecule.

94. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the reporter molecule is a redox-active molecule.

10 95. A kit comprising at least one container, the container holding a composition comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, the oligonucleotides
15 on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

96. The kit of Claim 95 wherein the composition in the container further comprises a filler oligonucleotide having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

20

97. The kit of Claim 95 wherein the nanoparticles are made of gold.

98. The kit of Claim 95 further comprising a solid surface.

25 99. A kit comprising at least two containers,
the first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

5 100. The kit of Claim 99 comprising a third container holding oligonucleotides having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

101. The kit of Claim 99 wherein the nanoparticles are made of gold.

10

102. The kit of Claim 99 further comprising a solid surface.

103. A kit comprising at least two containers,

15 the first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a binding oligonucleotide, and

 the second container holding one or more types of binding oligonucleotides, each of which has a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles
20 and the second portion being complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid.

104. The kit of Claim 103 which comprises additional containers, each holding an additional binding oligonucleotide, each additional binding oligonucleotide having a
25 sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles and the second portion being complementary to the sequence of another portion of the nucleic acid.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

105. The kit of Claim 103 wherein the nanoparticles are made of gold.
106. The kit of Claim 103 further comprising a solid surface.
- 5 107. A kit comprising:
a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides, each of the types of binding oligonucleotides having a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the
10 oligonucleotides on the nanoparticles, and the second portion being complementary to the sequence of one or more portions of a nucleic acid.
108. A kit comprising at least one container, the container holding metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of a nucleic acid and having fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.
- 15 109. A kit comprising:
a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and
a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached
20 thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.
110. The kit of Claim 109 further comprising:

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a second container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container; and

5 a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

111. A kit comprising at least three containers:
10 the first container holding nanoparticles;
the second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and
the third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

15 112. The kit of Claim 111 further comprising a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

20 113. The kit of Claim 111 further comprising a substrate.

114. The kit of Claim 113 further comprising:
a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a
25 portion of the sequence of the second oligonucleotide; and
a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

115. The kit of Claim 111 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, or both bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles.
116. The kit of Claim 113 wherein the substrate, nanoparticles, or both bear functional groups for attachment of the nanoparticles to the substrate.
117. The kit of Claim 113 wherein the substrate has nanoparticles attached to it.
118. The kit of Claim 111 wherein the nanoparticles are made of gold.
119. A kit comprising:
- a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
 - a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, some of which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
 - a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.
120. A kit comprising:
- a substrate;
 - a first container holding nanoparticles;
 - a second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
 - a third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
 - a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide.

121. The kit of Claim 120 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, substrate or all bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles or for attachment of the oligonucleotides to the substrate.

122. The kit of Claim 120 wherein the nanoparticles are made of gold.

123. A kit comprising:
10 a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
15 a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

124. The kit of Claim 123 wherein:
20 the nanoparticles in the second container have a second type of oligonucleotides attached thereto, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on a second type of nanoparticles;
and the kit further comprises:
a third container holding a second type of nanoparticles having
25 oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

125. A kit comprising:

a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and

5 a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence
10 complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

126. A kit comprising:

a substrate, the substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a
15 nucleic acid; and

a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the
20 aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

127. The kit of Claim 126 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions
25 of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

128. A kit comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto;

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid; and

a second container holding nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

129. A kit comprising:

a substrate, the substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a second container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

130. The kit of any one of Claims 125-129 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

131. The kit of any one of Claims 125-129 wherein the nanoparticles of the aggregate probe are made of gold.
- 5 132. A kit comprising at least three containers:
 the first container holding nanoparticles;
 the second container holding a first oligonucleotide having a sequence
 complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and
 the third container holding a second oligonucleotide having a sequence
10 complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.
133. The kit of Claim 132 further comprising a fourth container holding a third
 oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a third portion of
 the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.
- 15 134. The kit of Claim 132 further comprising a substrate.
135. The kit of Claim 134 further comprising:
 a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected
20 sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a
 portion of the sequence of the second oligonucleotide; and
 a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence
 complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.
- 25 136. The kit of Claim 132 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, or both
 bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles.
137. The kit of Claim 134 wherein the substrate, nanoparticles, or both bear

WO 01/51665

PCT/US01/01190

functional groups for attachment of the nanoparticles to the substrate.

138. The kit of Claim 134 wherein the substrate has nanoparticles attached to it.

5 139. The kit of Claim 132 wherein the nanoparticles are made of gold.

140. A kit comprising:

- a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
- 10 a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, some of which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
- a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the
- 15 oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

141. A kit comprising:

- a substrate;
- a first container holding nanoparticles;
- 20 a second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
- a third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
- a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence
- 25 complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide.

142. The kit of Claim 141 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, substrate or all bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles or for attachment of the oligonucleotides to the substrate.

143. The kit of Claim 141 wherein the nanoparticles are made of gold.

5 144. A kit comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

10 a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

15 145. The kit of Claim 144 wherein:

the nanoparticles in the second container have a second type of oligonucleotides attached thereto, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on a second type of nanoparticles; and the kit further comprises:

20 a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles.

25 146. A kit comprising at least two containers,

the first container holding particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy donor on the ends not

WO 01/51665

PCT/US01/01190

attached to the particles,

the second container holding particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy acceptor on the ends not
5 attached to the particles.

147. The kit of Claim 146 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.

10 148. A kit comprising at least one container, the container holding a first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles, and a second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence
15 complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles.

149. The kit of Claim 148 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.

20

150. A kit comprising:

a first container holding a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule; and

25 a second container holding a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

151. The kit of Claim 150 wherein the microspheres are latex microspheres and the nanoparticles are gold nanoparticles.

152. The kit of Claim 150 further comprising a microporous material.

5

153. A kit comprising:

a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule; and

10 a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule.

15

154. The kit of Claim 153 further comprising a microporous material.

155. A kit comprising a container holding a satellite probe, the satellite probe comprising:

20 a particle having attached thereto oligonucleotides, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid; and

probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides having a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further having a reporter molecule attached to one end.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

156. A kit comprising a container holding an aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

157. A kit comprising a container holding an aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

158. An aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

159. The aggregate probe of Claim 158 comprising two types of nanoparticles each having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides attached to each type of nanoparticles having a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid, the second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides attached to the second type

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of nanoparticles.

160. The aggregate probe of Claim 158 comprising three types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the second type of nanoparticles, the oligonucleotides attached to the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles, and the third type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the first or second type of nanoparticles.

161. An aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

162. A kit comprising a container holding a core probe, the core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

163. The kit of Claim 162 further comprising a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of the sequence of a nucleic acid to be detected.

164. The kit of Claim 162 or 163 further comprising a container holding a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe.

165. The kit of Claim 162 or 163 further comprising a container holding a type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe.

166. A core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

167. A substrate having nanoparticles attached thereto.

168. The substrate of Claim 167 wherein the nanoparticles have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid.

169. A metallic or semiconductor nanoparticle having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides being labeled with fluorescent molecules at the ends not attached to the nanoparticle.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

170. A satellite probe comprising:

- a particle having attached thereto oligonucleotides, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid; and
- probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides having a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further having a reporter molecule attached to one end.

171. A method of nanofabrication comprising

- providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions;
- providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a portion of a linking oligonucleotide; and
- contacting the linking oligonucleotides and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors.

172. The method of Claim 171 wherein at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto are provided, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles

WO 01/51665

PCT/US01/01190

having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide.

173. The method of Claim 171 or 172 wherein the nanoparticles are metallic
S nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

174. The method of Claim 173 wherein the metallic nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

10 175. A method of nanofabrication comprising:
providing at least two types of nanoparticles having oligonucleotides
attached thereto,
the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence
complementary to that of the oligonucleotides on the second of the nanoparticles;
15 the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a
sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles;
and
contacting the first and second types of nanoparticles under conditions
effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other
20 so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

176. The method of Claim 175 wherein the nanoparticles are metallic
nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

25 177. The method of Claim 176 wherein the metallic nanoparticles are made of
gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

178. Nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticles having

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

179. The nanomaterials or nanostructures of Claim 178 wherein at least some of
5 the oligonucleotide connectors are triple-stranded.

180. The nanomaterials or nanostructures of Claim 178 wherein the
nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination
thereof.
10

181. The nanomaterials or nanostructures of Claim 180 wherein the metallic
nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of
CdSe/ZnS (core/shell).

182. A composition comprising at least two types of nanoparticles having
oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles
having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid or a
linking oligonucleotide, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a
sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid or
20 linking oligonucleotide.

183. The composition of Claim 182 wherein the nanoparticles are metallic
nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

25 184. The composition of Claim 183 wherein the metallic nanoparticles are
made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

185. An assembly of containers comprising:

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, and

a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,

5 the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container,

the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container.

186. The assembly of Claim 185 wherein the nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

187. The assembly of Claim 186 wherein the metallic nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

188. A nanoparticle having a plurality of different oligonucleotides attached thereto.

189. A method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids, the method comprising:

providing two or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid; and

contacting the nucleic acids and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the selected nucleic acid aggregate and precipitate.

190. A method of binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce
5 stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:
providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety
comprising a functional group which can bind to the nanoparticles;
contacting the oligonucleotides and the nanoparticles in water for a period
of time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the
10 nanoparticles;
adding at least one salt to the water to form a salt solution, the ionic
strength of the salt solution being sufficient to overcome at least partially the electrostatic
attraction or repulsion of the oligonucleotides for the nanoparticles and the electrostatic
repulsion of the oligonucleotides for each other; and
15 contacting the oligonucleotides and nanoparticles in the salt solution for an
additional period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind
to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

191. The method of Claim 190 wherein the nanoparticles are metal
20 nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

192. The method of Claim 191 wherein the nanoparticles are gold
nanoparticles.

- 25 193. The method of Claim 192 wherein the moiety comprising a functional
group which can bind to the nanoparticles is an alkanethiol.

194. The method of Claim 190 wherein all of the salt is added to the water in a

WO 01/51665

PCT/US01/01190

single addition.

195. The method of Claim 190 wherein the salt is added gradually over time.

5 196. The method of Claim 190 wherein the salt is selected from the group consisting of sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, one of these salts in a phosphate buffer, and a combination of two or more these salts in a phosphate buffer.

10

197. The method of Claim 196 wherein the salt is sodium chloride in a phosphate buffer.

15 198. The method of Claim 190 wherein nanoparticle-oligonucleotide conjugates are produced which have the oligonucleotides present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

199. The method of Claim 198 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

20

200. The method of Claim 199 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².

25 201. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides, each of the recognition oligonucleotides comprising

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion being designed so that it can bind to the nanoparticles; and

contacting the oligonucleotides and the nanoparticles under conditions effective to allow at least some of the recognition oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

202. The method of Claim 201 wherein each of the spacer portions of the recognition oligonucleotides has a moiety covalently bound thereto, the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles.

203. The method of Claim 201 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

204. The method of Claim 203 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

205. The method of Claim 204 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

206. The method of Claim 205 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

207. The method of Claim 206 wherein the bases of the nucleotides of the spacer are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils, or all guanines.

208. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising:

WO 01/51665

PCT/US01/01190

a type of recognition oligonucleotides; and
a type of diluent oligonucleotides;
contacting the oligonucleotides with the nanoparticles under conditions
effective to allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the
5 nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

209. The method of Claim 208 wherein the nanoparticles are metal
nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

10 210. The method of Claim 209 wherein the nanoparticles are gold
nanoparticles.

211. The method of Claim 208 wherein each of the recognition
oligonucleotides comprises a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion
15 being designed so that it can bind to the nanoparticles.

212. The method of Claim 211 wherein each of the spacer portions of the
recognition oligonucleotides has a moiety covalently bound thereto, the moiety
comprising a functional group which can bind to the nanoparticles.

20 213. The method of Claim 211 wherein the spacer portions of the recognition
oligonucleotides comprises at least about 10 nucleotides.

214. The method of Claim 213 wherein the spacer portions of the recognition
25 oligonucleotides comprises from about 10 nucleotides to about 30 nucleotides.

215. The method of Claim 211 wherein the bases of the nucleotides of the
spacer are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils or all guanines.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

216. The method of Claim 211 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

5

217. The method of Claim 216 wherein the sequence of the diluent oligonucleotides is the same as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

10 218. The method of Claim 208 wherein the oligonucleotides comprise at least two types of recognition oligonucleotides.

219. A method of binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

15 providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles, the oligonucleotides comprising:

a type of recognition oligonucleotides; and

a type of diluent oligonucleotides;

20 contacting the oligonucleotides with the nanoparticles in water for a period of time sufficient to allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles;

25 adding at least one salt to the water to form a salt solution, the ionic strength of the salt solution being sufficient to overcome at least partially the electrostatic attraction or repulsion of the oligonucleotides for the nanoparticles and the electrostatic repulsion of the oligonucleotides for each other; and

contacting the oligonucleotides and nanoparticles in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow additional oligonucleotides of each of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

220. The method of Claim 219 wherein the nanoparticles are metal
5 nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

221. The method of Claim 220 wherein the nanoparticles are gold
nanoparticles.

10 222. The method of Claim 221 wherein the moiety comprising a functional
group which can bind to the nanoparticles is an alkanethiol.

223. The method of Claim 219 wherein all of the salt is added to the water in a
single addition.
15

224. The method of Claim 219 wherein the salt is added gradually over time.

225. The method of Claim 219 wherein the salt is selected from the group
consisting of sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium,
20 chloride, sodium, acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these
salts, one of these salts in a phosphate buffer, and a combination of two or more these
salts in a phosphate buffer.

226. The method of Claim 225 wherein the salt is sodium chloride in a
25 phosphate buffer.

227. The method of Claim 219 wherein nanoparticle-oligonucleotide
conjugates are produced which have the oligonucleotides are present on surface of the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

228. The method of Claim 227 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

5

229. The method of Claim 228 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².

10 230. The method of Claim 219 wherein each of the recognition oligonucleotides comprises a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion having attached to it the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles.

15 231. The method of Claim 230 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

20 232. The method of Claim 231 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

233. The method of Claim 230 wherein the bases of the nucleotides of the spacers are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils, or all guanines.

25 234. The method of Claim 230 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

235. The method of Claim 234 wherein the sequence of the diluent

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides is the same as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

236. The method of Claim 219 wherein the oligonucleotides comprise at least
5 two types of recognition oligonucleotides.

237. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates which are nanoparticles having
oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides being present on surface of the
nanoparticles at a surface density sufficient so that the conjugates are stable, at least some
10 of the oligonucleotides having a sequence complementary to at least one portion of the
sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

238. The conjugates of Claim 237 wherein the oligonucleotides are present on
surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm²
15

239. The nanoparticles of Claim 238 wherein the oligonucleotides are present
on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

240. The nanoparticles of Claim 239 wherein the oligonucleotides are present
20 on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to
about 40 picomoles/cm².

241. The nanoparticles of Claim 237 wherein the nanoparticles are metal
nanoparticles or semiconductor nanoparticles.
25

242. The nanoparticles of Claim 241 wherein the nanoparticles are gold
nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

243. Nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides, each of the recognition oligonucleotides comprising a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion being designed so that it is bound to the nanoparticles, the recognition
5 portion having a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

244. The nanoparticles of Claim 243 wherein the spacer portion has a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a functional group through which the
10 spacer portion is bound to the nanoparticles.

245. The nanoparticles of Claim 243 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

15 246. The nanoparticles of Claim 245 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

247. The nanoparticles of Claim 243 wherein the bases of the nucleotides of the spacer portion are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils or all guanines.
20

248. The nanoparticles of Claim 243 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

249. The nanoparticles of Claim 248 wherein the oligonucleotides are present
25 on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

250. The nanoparticles of Claim 249 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to

WO 01/51665

PCT/US01/01190

about 40 picomoles/cm².

251. The nanoparticles of Claim 243 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

5

252. The method of Claim 251 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

253. Nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides comprising:

10

at least one type of recognition oligonucleotides, each of the types of recognition oligonucleotides comprising a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide; and

a type of diluent oligonucleotides.

15

254. The nanoparticles of Claim 253 wherein, each of the recognition oligonucleotides comprises a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion being designed so that it is bound to the nanoparticles, the recognition portion having a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

20

255. The nanoparticles of Claim 254 wherein the spacer portion has a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a functional group through which the spacer portion is bound to the nanoparticles.

25

256. The nanoparticles of Claim 254 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

257. The nanoparticles of Claim 256 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

258. The nanoparticles of Claim 254 wherein the bases of the nucleotides of the
5 spacer portion are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils or all guanines.

259. The nanoparticles of Claim 253 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

260. The nanoparticles of Claim 259 wherein the oligonucleotides are present
10 on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

261. The nanoparticles of Claim 260 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².
15

262. The nanoparticles of Claim 254 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

263. The nanoparticles of Claim 262 wherein the sequence of the diluent oligonucleotides is the same as that of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.
20

264. The nanoparticles of Claim 253 wherein the nanoparticles are metal
25 nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

265. The nanoparticles of Claim 264 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

266. A method of detecting a nucleic acid comprising:
contacting the nucleic acid with at least one type of nanoparticle-oligonucleotide
conjugates according to any one of Claims 237-242 under conditions effective to allow
5 hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
observing a detectable change brought about by hybridization of the
oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

267. A method of detecting a nucleic acid comprising:
10 contacting the nucleic acid with at least one type of nanoparticles according to
any one of Claims 243-265 under conditions effective to allow hybridization of at least
one of the types of recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic
acid; and
15 observing a detectable change brought about by hybridization of the recognition
oligonucleotides with the nucleic acid.

268. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions
comprising:
20 providing a type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to
any one of Claims 237-242, the oligonucleotides on each nanoparticle having a sequence
complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid;
contacting the nucleic acid and the conjugates under conditions effective
to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the two or more
portions of the nucleic acid; and
25 observing a detectable change brought about by hybridization of the
oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

269. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

comprising:

- contacting the nucleic acid with at least two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-240, the oligonucleotides on the nanoparticles of the first type of conjugates having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid, the oligonucleotides on the nanoparticles of the second type of conjugates having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
- observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

270. The method of Claim 269 wherein the contacting conditions include freezing and thawing.

271. The method of Claim 269 wherein the contacting conditions include heating.

272. The method of Claim 269 wherein the detectable change is observed on a solid surface.

273. The method of Claim 269 wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.

274. The method of Claim 273 wherein the color change is observed on a solid surface.

275. The method of Claim 269 wherein the nanoparticles are metal

WO 01/51665

PCT/US01/01190

nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

276. The method of Claim 269 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

5

277. The method of Claim 269 wherein the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled on their ends not attached to the nanoparticles with molecules that produce a detectable change upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

10

278. The method of Claim 277 wherein the nanoparticles are metallic or semiconductor nanoparticles and the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled with fluorescent molecules.

15

279. The method of Claim 269 wherein:

the nucleic acid has a third portion located between the first and second portions, and the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles do not include sequences complementary to this third portion of the nucleic acid; and

the nucleic acid is further contacted with a filler oligonucleotide having a sequence complementary to this third portion of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the filler oligonucleotide with the nucleic acid.

20

280. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.

25

281. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a gene associated with a disease.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

282. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a bacterial DNA.
283. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a fungal DNA.
- 5 284. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a synthetic DNA, a synthetic RNA, a structurally-modified natural or synthetic RNA, or a structurally-modified natural or synthetic DNA.
- 10 285. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is from a biological source.
286. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a product of a polymerase chain reaction amplification.
- 15 287. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is contacted with the first and second types of conjugates simultaneously.
288. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is contacted and hybridized with the oligonucleotides on the nanoparticles of first type of conjugates
20 before being contacted with the second type of conjugates.
289. The method of Claim 288 wherein the first type of conjugates is attached to a substrate.
- 25 290. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is double-stranded and hybridization with the oligonucleotides on the nanoparticles results in the production of a triple-stranded complex.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

291. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:
- providing a type of nanoparticles according to any one of Claims 243-252 having recognition oligonucleotides attached thereto, the recognition oligonucleotides on
- 5 each nanoparticle comprising a sequence complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid;
- contacting the nucleic acid and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the two or more portions of the nucleic acid; and
- 10 observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
292. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
- 15 contacting the nucleic acid with at least two types of nanoparticles according to any one of Claims 243-250 having recognition oligonucleotides attached thereto, the recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles comprising a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid, the
- recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence
- 20 complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
- observing a detectable change brought about by hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
- 25
293. The method of Claim 292 wherein the contacting conditions include freezing and thawing.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

294. The method of Claim 292 wherein the contacting conditions include heating.
295. The method of Claim 292 wherein the detectable change is observed on a
5 solid surface.
296. The method of Claim 292 wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.
- 10 297. The method of Claim 296 wherein the color change is observed on a solid surface.
298. The method of Claim 292 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.
15
299. The method of Claim 298 wherein the nanoparticles are made of gold.
300. The method of Claim 292 wherein the recognition oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled on their ends not attached to the nanoparticles
20 with molecules that produce a detectable change upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
301. The method of Claim 300 wherein the nanoparticles are metallic or semiconductor nanoparticles and the oligonucleotides attached to the nanoparticles are
25 labeled with fluorescent molecules.
302. The method of Claim 292 wherein:
the nucleic acid has a third portion located between the first and second

WO 01/51665

PCT/US01/01190

portions, and the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles do not include sequences complementary to this third portion of the nucleic acid; and

the nucleic acid is further contacted with a filler oligonucleotide having a sequence complementary to this third portion of the nucleic acid, the contacting taking
5 place under conditions effective to allow hybridization of the filler oligonucleotide with the nucleic acid.

303. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.

10 304. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is a gene associated with a disease.

305. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is a bacterial DNA.

15 306. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is a fungal DNA.

307. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is a synthetic DNA, a synthetic RNA, a structurally-modified natural or synthetic RNA, or a structurally-modified natural or synthetic DNA.

20 308. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is from a biological source.

25 309. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is a product of a polymerase chain reaction amplification.

310. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is contacted with the first and second types of nanoparticles simultaneously.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

311. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is contacted and hybridized with the oligonucleotides on the first type of nanoparticles before being contacted with the second type of nanoparticles.

5

312. The method of Claim 311 wherein the first type of nanoparticles is attached to a substrate.

313. The method of Claim 292 wherein the nucleic acid is double-stranded and hybridization with the oligonucleotides on the nanoparticles results in the production of a triple-stranded complex.

314. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

15 providing a type of nanoparticles according to any one of Claims 253-265 having recognition oligonucleotides attached thereto, the recognition oligonucleotides on each nanoparticle comprising a sequence complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid;

20 contacting the nucleic acid and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the two or more portions of the nucleic acid; and

observing a detectable change brought about by hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

25 315. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

contacting the nucleic acid with at least two types of nanoparticles according to any one of Claims 253-263 having recognition oligonucleotides attached

WO 01/51665

PCT/US01/01190

thereto, the recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles comprising a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid, the recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, the contacting
5 taking place under conditions effective to allow hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
observing a detectable change brought about by hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

10 316. The method of Claim 315 wherein the contacting conditions include freezing and thawing.

317. The method of Claim 315 wherein the contacting conditions include heating.

15 318. The method of Claim 315 wherein the detectable change is observed on a solid surface.

319. The method of Claim 315 wherein the detectable change is a color change
20 observable with the naked eye.

320. The method of Claim 319 wherein the color change is observed on a solid surface.

25 321. The method of Claim 315 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

322. The method of Claim 321 wherein the nanoparticles are made of gold.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

323. The method of Claim 315 wherein the recognition oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled on their ends not attached to the nanoparticles with molecules that produce a detectable change upon hybridization of the recognition
5 oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

324. The method of Claim 323 wherein the nanoparticles are metallic or semiconductor nanoparticles and the recognition oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled with fluorescent molecules.
10

325. The method of Claim 315 wherein:
the nucleic acid has a third portion located between the first and second portions, and the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles do not include sequences complementary to this third portion of the nucleic acid; and
15 the nucleic acid is further contacted with a filler oligonucleotide having a sequence complementary to this third portion of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the filler oligonucleotide with the nucleic acid.

20 326. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.

327. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is a gene associated with a disease.

25 328. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is a bacterial DNA.

329. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is a fungal DNA.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

330. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is a synthetic DNA, a synthetic RNA, a structurally-modified natural or synthetic RNA, or a structurally-modified natural or synthetic DNA.

5 331. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is from a biological source.

332. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is a product of a polymerase chain reaction amplification.

10 333. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is contacted with the first and second types of nanoparticles simultaneously.

15 334. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is contacted and hybridized with the recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles before being contacted with the second type of nanoparticles.

20 335. The method of Claim 334 wherein the first type of nanoparticles is attached to a substrate.

336. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is double-stranded and hybridization with the oligonucleotides on the nanoparticles results in the production of a triple-stranded complex.

25 337. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

(a) contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

(b) contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-240, at least one of the types of oligonucleotides attached to the nanoparticles of the conjugates having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the conjugates with said nucleic acid;

10 and

(c) observing a detectable change.

338. The method of Claim 337 further comprising:

(d) contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate with a second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-240, at least one of the types of oligonucleotides attached to the nanoparticles of the second type of conjugates having a sequence complementary to the sequence of one of the types of oligonucleotides attached to the nanoparticles of the first type of conjugates, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the first and second types of conjugates; and

20

(e) observing the detectable change.

339. The method of Claim 338 wherein at least one of the types of oligonucleotides on the nanoparticles of the first type of conjugates has a sequence complementary to the sequence of at least one of the types of oligonucleotides on the nanoparticles of the second type of conjugates and the method further comprises:

25

(f) contacting the second type of conjugates bound to the substrate with

WO 01/51665

PCT/US01/01190

the first type of conjugates, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles of the first and second types of conjugates; and

(g) observing the detectable change.

5

340. The method of Claim 339 wherein step (d) or steps (d) and (f) are repeated one or more times and the detectable change is observed.

341. The method of Claim 337 further comprising:

10 (d) providing a type of binding oligonucleotides having a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to at least one of the types of oligonucleotides attached to the nanoparticles of the first type of conjugates;

15 (e) contacting the binding oligonucleotides with the first type of conjugates bound to the substrate, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides on the nanoparticles of the first type of conjugates;

(f) providing a second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-240, at least one of the types of oligonucleotides attached to the nanoparticles of the second type of conjugates having a sequence
20 complementary to the second portion of the sequence of the binding oligonucleotides;

(g) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the second type of conjugates, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the second type of conjugates with the binding oligonucleotides; and

25 (h) observing the detectable change.

342. The method of Claim 341 further comprising:

(i) contacting the second type of conjugates bound to the substrate with the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

binding oligonucleotides, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides on the nanoparticles of the second type of conjugates;

(j) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the first type of conjugates, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles of the first type of conjugates with the binding oligonucleotides; and

(k) observing the detectable change.

10 343. The method of Claim 342 wherein steps (c) and (g) or steps (c), (g), (i) and (j) are repeated one or more times, and the detectable change is observed.

344. The method of Claim 337 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

15 345. The method of Claim 344 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

20 346. The method of Claim 337 wherein the nanoparticles of the conjugates are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

347. The method of Claim 346 wherein the nanoparticles of the conjugates are made of gold or silver.

25 348. The method of Claim 337 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

349. The method of Claim 337 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

350. The method of Claim 348 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

351. The method of Claim 337 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

10 352. The method of Claim 351 wherein the device is a flatbed scanner.

353. The method of Claim 351 wherein the scanner is linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements, and the greyscale measurements are calculated to provide a quantitative measure of the amount of nucleic acid detected.

354. The method of Claim 337 wherein the oligonucleotides attached to the substrate are located between two electrodes, the nanoparticles of the conjugates are made of a material which is a conductor of electricity, and the detectable change is a change in conductivity.

355. The method of Claim 354 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.

25 356. The method of Claim 354 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

357. The method of Claim 348 wherein each of the plurality of

WO 01/51665

PCT/US01/01190

oligonucleotides attached to the substrate in the array is located between two electrodes, the nanoparticles are made of a material which is a conductor of electricity, and the detectable change is a change in conductivity.

5 358. The method of Claim 357 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.

359. The method of Claim 357 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

10 360. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

(a) contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

15 (b) contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticles according to any one of Claims 243-250 having one or more types of recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of recognition oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid; and

25 (c) observing a detectable change.

361. The method of Claim 360 further comprising:

(d) contacting the first type of nanoparticles bound to the substrate with a

WO 01/51665

PCT/US01/01190

second type of nanoparticles according to any one of Claims 243-250 having recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence complementary to the sequence of one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the
5 contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and
(e) observing the detectable change.

362. The method of Claim 360 wherein at least one of the types of recognition
10 oligonucleotides on the first type of nanoparticles has a sequence complementary to the sequence of at least one of the types of oligonucleotides on the second type of nanoparticles and the method further comprises:

(f) contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to
15 allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and
(g) observing the detectable change.

363. The method of Claim 362 wherein step (d) or steps (d) and (f) are repeated
20 one or more times and the detectable change is observed.

364. The method of Claim 360 further comprising:

(d) providing a type of binding oligonucleotides having a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to at least one of
25 the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles;

(e) contacting the binding oligonucleotides with the first type of nanoparticles bound to the substrate, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides

WO 01/51665

PCT/US01/01190

on the first type of nanoparticles;

(f) providing a second type of nanoparticles according to any one of Claims 243-250 having recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence complementary to the second portion of the sequence of the binding oligonucleotides;

(g) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the second type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with the binding oligonucleotides; and

(h) observing the detectable change.

365. The method of Claim 364 further comprising:

(i) contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the binding oligonucleotides, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides on the second type of nanoparticles;

(j) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles with the binding oligonucleotides; and

(k) observing the detectable change.

366. The method of Claim 365 wherein steps (e) and (g) or steps (e), (g), (i) and (j) are repeated one or more times, and the detectable change is observed.

367. The method of Claim 360 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

368. The method of Claim 367 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

5 369. The method of Claim 360 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

370. The method of Claim 369 wherein the nanoparticles are made of gold or silver.

10 371. The method of Claim 360 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

15 372. The method of Claim 360 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

373. The method of Claim 371 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

20 375. The method of Claim 360 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

376. The method of Claim 375 wherein the device is a flatbed scanner.

25 377. The method of Claim 375 wherein the scanner is linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements, and the greyscale measurements are calculated, to provide a quantitative measure of the amount of nucleic

WO 01/51665

PCT/US01/01190

acid detected.

378. The method of Claim 360 wherein the oligonucleotides attached to the substrate are located between two electrodes, the nanoparticles are made of a material
5 which is a conductor of electricity, and the detectable change is a change in conductivity.

379. The method of Claim 378 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.

10 380. The method of Claim 378 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

381. The method of Claim 371 wherein each of the plurality of oligonucleotides attached to the substrate in the array is located between two electrodes,
15 the nanoparticles are made of a material which is a conductor of electricity, and the detectable change is a change in conductivity.

382. The method of Claim 381 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.
20

383. The method of Claim 381 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

384. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions
25 comprising:

(a) contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

(b) contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticles according to any one of Claims 253-263 having one or more types of recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of recognition oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the recognition oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid; and

10 (c) observing a detectable change.

385. The method of Claim 384 further comprising:

(d) contacting the first type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles according to any one of Claims 253-263 having recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence complementary to the sequence of one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and

20 (e) observing the detectable change.

386. The method of Claim 385 wherein at least one of the types of recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles comprises a sequence complementary to the sequence of at least one of the types of oligonucleotides on the second type of nanoparticles and the method further comprises:

(f) contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles;

WO 01/51665

PCT/US01/01190

and

(g) observing the detectable change.

387. The method of Claim 386 wherein step (d) or steps (d) and (f) are repeated
5 one or more times and the detectable change is observed.

388. The method of Claim 384 further comprising:

(d) providing a type of binding oligonucleotides having a sequence
comprising at least two portions, the first portion being complementary to at least one of
10 the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles;

(e) contacting the binding oligonucleotides with the first type of
nanoparticles bound to the substrate, the contacting taking place under conditions
effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides
on the first type of nanoparticles;

15 (f) providing a second type of nanoparticles according to any one of
Claims 253-263 having recognition oligonucleotides attached thereto, at least one of the
types of recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a
sequence complementary to the second portion of the sequence of the binding
oligonucleotides;

20 (g) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the
second type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to
allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with the
binding oligonucleotides; and

(h) observing the detectable change.

25

389. The method of Claim 388 further comprising:

(i) contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with
the binding oligonucleotides, the contacting taking place under conditions effective to

WO 01/51665

PCT/US01/01190

allow hybridization of the binding oligonucleotides with the oligonucleotides on the second type of nanoparticles;

(j) contacting the binding oligonucleotides bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles with the binding oligonucleotides; and

(k) observing the detectable change.

390. The method of Claim 389 wherein steps (e) and (g) or steps (e), (g), (i) and (j) are repeated one or more times, and the detectable change is observed.

391. The method of Claim 384 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

392. The method of Claim 391 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

393. The method of Claim 384 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

394. The method of Claim 393 wherein the nanoparticles are made of gold or silver.

395. The method of Claim 384 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

396. The method of Claim 384 wherein the substrate is contacted with silver

WO 01/51665

PCT/US01/01190

stain to produce the detectable change.

397. The method of Claim 395 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

5

398. The method of Claim 384 wherein the detectable change is observed with an optical scanner

399. The method of Claim 398 wherein the device is a flatbed scanner.

10

400. The method of Claim 398 wherein the scanner is linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements, and the greyscale measurements are calculated to provide a quantitative measure of the amount of nucleic acid detected.

15

401. The method of Claim 384 wherein the oligonucleotides attached to the substrate are located between two electrodes, the nanoparticles are made of a material which is a conductor of electricity, and the detectable change is a change in conductivity.

20

402. The method of Claim 401 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.

403. The method of Claim 401 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

25

404. The method of Claim 397 wherein each of the plurality of oligonucleotides attached to the substrate in the array is located between two electrodes, the nanoparticles are made of a material which is a conductor of electricity, and the

WO 01/51665

PCT/US01/01190

detectable change is a change in conductivity.

405. The method of Claim 404 wherein the electrodes are made of gold, and the nanoparticles are made of gold.

5

406. The method of Claim 404 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

407. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions
10 comprising:

(a) contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides being located between a pair of electrodes, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow
15 hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

(b) contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticles, the nanoparticles being made of a material which can conduct electricity, the nanoparticles having one or more types of oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second
20 portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid; and

(c) detecting a change in conductivity.

25 408. The method of Claim 407 wherein the substrate has a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both, each of the pairs of electrodes having a type of oligonucleotides attached to the substrate between

WO 01/51665

PCT/US01/01190

them.

409. The method of Claim 407 wherein the nanoparticles are made of metal.

5 410. The method of Claim 407 wherein the nanoparticles are made of gold or silver.

411. The method of Claim 407 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the change in conductivity.

10

412. The method of Claim 407 further comprising:

(d) contacting the first type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles, the nanoparticles being made of a material which can conduct electricity, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of oligonucleotides on the second type of nanoparticles comprising a sequence complementary to the sequence of one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and

(e) detecting the change in conductivity.

20

413. The method of Claim 412 wherein at least one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles has a sequence complementary to the sequence of at least one of the types of oligonucleotides on the second type of nanoparticles and the method further comprises:

25 (f) contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

(g) detecting the change in conductivity.

414. The method of Claim 413 wherein step (d) or steps (d) and (f) are repeated one or more times and the change in conductivity is detected.

5

415 The method of Claim 407 further comprising:

(d) contacting the first type of nanoparticles bound to the substrate with an aggregate probe having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being made of a material which can conduct electricity, at least one of the types of oligonucleotides on the aggregate probe comprising a sequence complementary to the sequence of one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with the oligonucleotides on the first type of nanoparticles;

15 (e) and detecting the change in conductivity.

416. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

(a) contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides being located between a pair of electrodes, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

(b) contacting said nucleic acid bound to the substrate with an aggregate probe having oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of oligonucleotides on the aggregate probe comprising a sequence complementary to the sequence of a second portion of said nucleic acid, the nanoparticles of the aggregate probe being made of a material which can conduct electricity, the contacting taking place

WO 01/51665

PCT/US01/01190

under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with the nucleic acid; and

(c) detecting a change in conductivity.

5 417. A method of detecting a nucleic acid wherein the method is performed on a substrate, the method comprising detecting the presence, quantity, or both, of the nucleic acid with an optical scanner.

 418. The method of Claim 417 wherein the device is a flatbed scanner.

10

 419. The method of Claim 417 wherein the scanner is linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements, and the greyscale measurements are calculated, to provide a quantitative measure of the amount of nucleic acid detected.

15

 420. The method of Claim 417 wherein the scanner is linked to a computer loaded with software capable of providing an image of the substrate, and a qualitative determination of the presence of the nucleic acid, the quantity of the nucleic acid, or both, is made.

20

 421. A kit comprising a container holding nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-242.

 422. A kit comprising a container holding nanoparticles according to any one of Claims 243-265.

25

 423. A kit comprising a substrate having attached thereto at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between the electrodes.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

424. The kit of Claim 423 wherein the substrate has a plurality of pairs of electrodes attached to it in an array, to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

5

425. A method of nanofabrication comprising

providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions;

10 providing one or more types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-242, the oligonucleotides attached to the nanoparticles of each of the types of conjugates having a sequence complementary to the sequence of a portion of a linking oligonucleotide; and

15 contacting the linking oligonucleotides and conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the conjugates to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles of the conjugates are held together by oligonucleotide connectors.

20 426. A method of nanofabrication comprising

providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions;

25 providing one or more types of nanoparticles according to any one of Claims 243-265, the recognition oligonucleotides on each of the types of nanoparticles comprising a sequence complementary to the sequence of a portion of a linking oligonucleotide; and

contacting the linking oligonucleotides and nanoparticles under conditions

WO 01/51665

PCT/US01/01190

effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors.

- 5 427. A method of nanofabrication comprising:
 providing at least two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates
 according to any one of Claims 237-242,
 the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the first type of
 conjugates having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to
10 the nanoparticles of the second type of conjugates;
 the oligonucleotides attached to the nanoparticles of the second type of
 conjugates having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to
 the nanoparticles of the first type of conjugates; and
 contacting the first and second types of conjugates under conditions
15 effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles of the
 conjugates to each other so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

428. A method of nanofabrication comprising:
 providing at least two types of nanoparticles according to any one of
20 Claims 243-265,
 the recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles
 comprising a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second of
 the nanoparticles;
 the recognition oligonucleotides on the second type of nanoparticles
25 comprising a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of
 nanoparticles; and
 contacting the first and second types of nanoparticles under conditions
 effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other

WO 01/51665

PCT/US01/01190

so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

429. Nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-242, the nanoparticles
5 being held together by oligonucleotide connectors.

430. Nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticles according to any one of Claims 243-265, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

10 431. A method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids, the method comprising:
providing two or more types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to any one of Claims 237-242, the oligonucleotides attached to the
15 nanoparticles of each of the types of conjugates having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid; and

contacting the nucleic acids and conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles of the conjugates with the selected nucleic acid so that the conjugates hybridized to the selected nucleic acid
20 aggregate and precipitate.

432. A method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids, the method comprising:

providing two or more types of nanoparticles according to any one of
25 Claims 243-265, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid; and

contacting the nucleic acids and nanoparticles under conditions effective

WO 01/51665

PCT/US01/01190

to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the selected nucleic acid aggregate and precipitate.

5 433. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates which are nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides having a covalently bound cyclic disulfide functional group that can bind to the nanoparticles.

10 434. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates which are nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides having a covalently bound polythiol functional group that can bind to the nanoparticles.

15 435. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates which are nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides having a covalently bound cyclic disulfide functional group that can bind to the nanoparticles, at least some of the oligonucleotides having a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

20 436. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates which are nanoparticles having oligonucleotides attached to them, the oligonucleotides having a covalently bound polythiol functional group that can bind to the nanoparticles, at least some of the oligonucleotides having a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

25 437. The conjugates of claims 435 or 436 wherein the oligonucleotides are further present at a surface density sufficient so that the conjugates are stable.

 438. The conjugates of claim 437 wherein the oligonucleotides are present on

WO 01/51665

PCT/US01/01190

surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm²

439. The conjugates of claim 438 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

5

440. The conjugates of claim 439 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².

10

441. The conjugates of claims 435 or 436 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

442. The conjugates of claim 441 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

15

443. The conjugates of claims 435 or 436 wherein the oligonucleotides comprise at least one type of recognition oligonucleotides, the recognition portion having a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or another oligonucleotide.

20

444. The conjugates of claim 443 wherein each of the recognition oligonucleotides comprising a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion being designed so that it is bound to the nanoparticles.

25

445. The conjugates of claim 444 wherein the spacer portion has a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a cyclic disulfide functional group through which the spacer portion is bound to the nanoparticles.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

446. The conjugates of claim 444 wherein the spacer portion has a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a polythiol functional group through which the spacer portion is bound to the nanoparticles.
- 5 447. The conjugates of claim 442 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.
448. The conjugates of claim 447 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.
- 10 449. The conjugates of claim 448 wherein the bases of the nucleotides of the spacer portion are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils or all guanines.
450. The conjugates of claims 435 or 436 further a type of diluent
15 oligonucleotides.
451. The nanoparticles of claim 450 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.
- 20 452. The nanoparticles of claim 451 wherein the sequence of the diluent oligonucleotides is the same as that of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.
- 25 453. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:
providing oligonucleotides having covalently bound cyclic disulfide function groups that can bind to nanoparticles; and

WO 01/51665

PCT/US01/01190

contacting the oligonucleotides and the nanoparticles under conditions effective to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

5 454. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

providing oligonucleotides having covalently bound polythiol function groups that can bind to nanoparticles; and

10 contacting the oligonucleotides and the nanoparticles under conditions effective to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

455. The method of claims 454 or 455 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

15 456. The method of claim 455 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

457. The method of claims 453 or 454 wherein, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides, each of the recognition
20 oligonucleotides comprising a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion having a moiety covalently bound thereto, the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles.

458. The method of claim 457 wherein the spacer portion comprises at least
25 about 10 nucleotides.

459. The method of claims 458 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

460. The method of claims 459 wherein the bases of the nucleotides of the spacer are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils, or all guanines.

5 461. The method of claim 457, wherein the oligonucleotides further comprising a type of diluent oligonucleotides and contacting the oligonucleotides with the nanoparticles under conditions effective to allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

10 462. The method of claim 461 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

15 463. The method of claim 462 wherein the sequence of the diluent oligonucleotides is the same as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

20 464. The method of claim 457 wherein the oligonucleotides comprise at least two types of recognition oligonucleotides.

465. A method of binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

25 providing oligonucleotides having covalently bound cyclic disulfide function groups that can bind to nanoparticles, the oligonucleotides comprising:
 a type of recognition oligonucleotides, and
 a type of diluent oligonucleotides;
 contacting the oligonucleotides with the nanoparticles in water for a period

WO 01/51665

PCT/US01/01190

of time sufficient to allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles;

5 adding at least one salt to the water to form a salt solution, the ionic strength of the salt solution being sufficient to overcome at least partially the electrostatic attraction or repulsion of the oligonucleotides for the nanoparticles and the electrostatic repulsion of the oligonucleotides for each other; and

10 contacting the oligonucleotides and nanoparticles in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow additional oligonucleotides of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

466. A method of binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

15 providing oligonucleotides having covalently bound polythiol function groups that can bind to nanoparticles, the oligonucleotides comprising:

a type of recognition oligonucleotides; and

a type of diluent oligonucleotides;

20 contacting the oligonucleotides with the nanoparticles in water for a period of time sufficient to allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles;

adding at least one salt to the water to form a salt solution, the ionic strength of the salt solution being sufficient to overcome at least partially the electrostatic attraction or repulsion of the oligonucleotides for the nanoparticles and the electrostatic repulsion of the oligonucleotides for each other; and

25 contacting the oligonucleotides and nanoparticles in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow additional oligonucleotides of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

467. The method of claims 465 or 466 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

5 468. The method of claims 467 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

469. The method of claims 465 or 466 wherein all of the salt is added to the water in a single addition.

10

470. The method of claims 465 or 466 wherein the salt is added gradually over time.

15 471. The method of claims 465 or 466 wherein the salt is selected from the group consisting of sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, one of these salts in a phosphate buffer, and a combination of two or more these salts in a phosphate buffer.

20 472. The method of claim 471 wherein the salt is sodium chloride in a phosphate buffer.

25 473. The method of claims 465 or 466 wherein nanoparticle-oligonucleotide conjugates are produced which have the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

474. The method of claim 473 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

WO 01/51665

PCT/US01/01190

475. The method of claim 474 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².
- 5 476. The method of claim 465 wherein each of the recognition oligonucleotides comprises a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion having attached to it the moiety comprising a cyclic disulfide functional group which can bind to the nanoparticles.
- 10 477. The method of claim 466 wherein each of the recognition oligonucleotides comprises a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion having attached to it the moiety comprising a polythiol functional group which can bind to the nanoparticles.
- 15 478. The method of claims 476 or 477 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.
- 20 479. The method of claim 478 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.
480. The method of claims 476 or 477 wherein the bases of the nucleotides of the spacers are all adenines, all thymines, all cytosines, all uracils, or all guanines.
- 25 481. The method of claims 476 or 477 wherein the diluent oligonucleotides contain about the same number of nucleotides as are contained in the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

WO 01/51665

PCT/US01/01190

482. The method of claim 481 wherein the sequence of the diluent oligonucleotides is the same as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

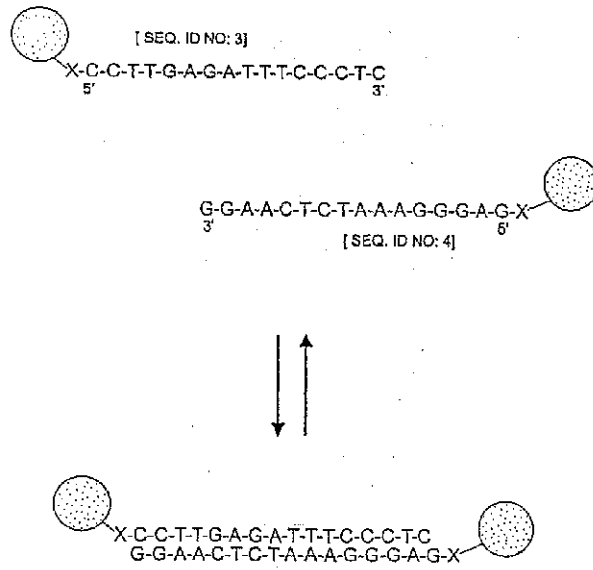
5 483. The method of claims 476 or 477 wherein the oligonucleotides comprise at least two types of recognition oligonucleotides.

484. Oligonucleotides having a covalently bound cyclic disulfide functional group that can bind to the nanoparticles.

10 485. Oligonucleotides having a covalently bound polythiol functional group that can bind to the nanoparticles.

486. The compositions according to claims 433, 435, 445, 446, 453, 465, and
15 484 wherein a large hydrophobic group is located between the oligonucleotide and the cyclic disulfide functional group.

FIG. 1



WO 01/51665

2/51

PCT/US01/01190

FIG.2

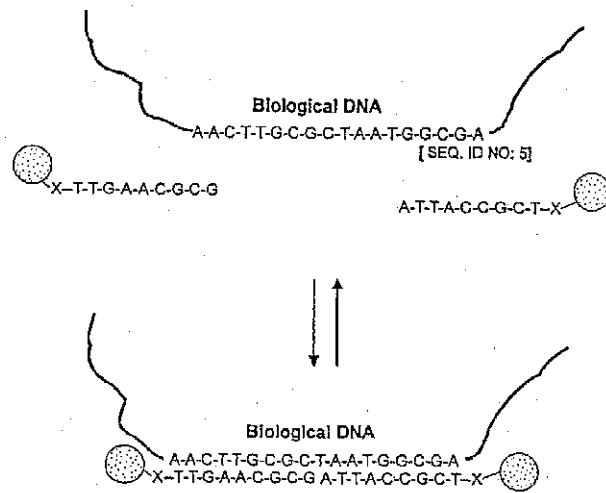
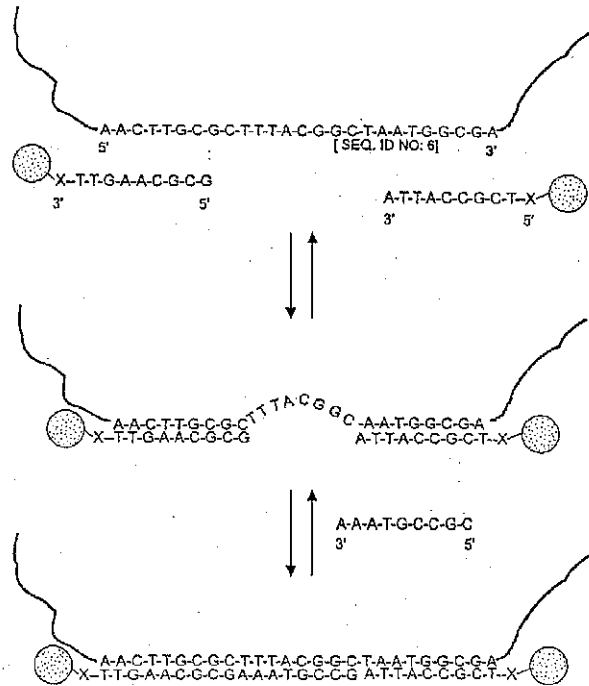


FIG.3



WO 01/51665

4/51

PCT/US01/01190

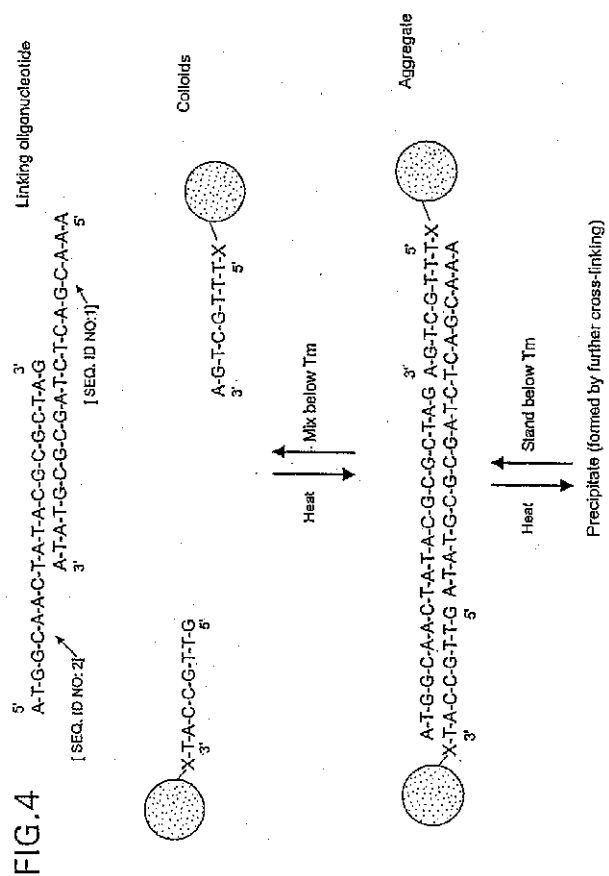
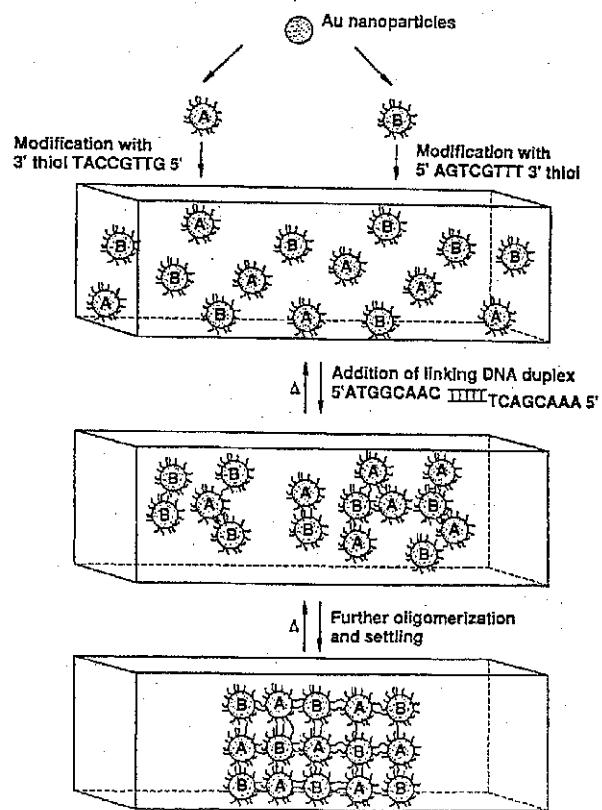


FIG.5



WO 01/51665

6/51

CT/US01/01190



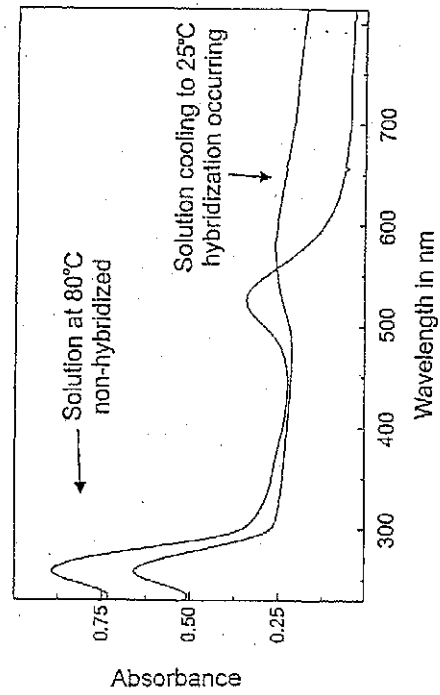
FIG.6A FIG.6B FIG.6C

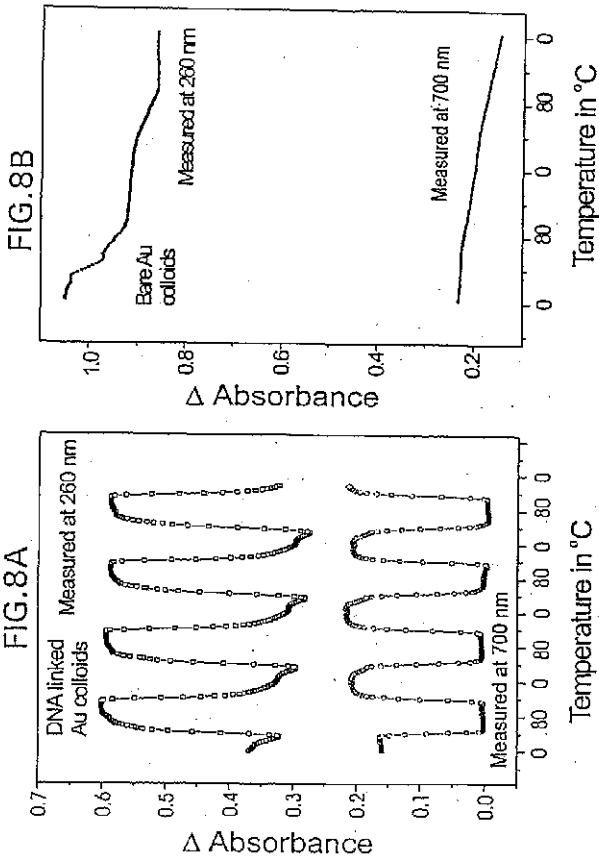
WO 01/51665

7/51

CT/US01/01190

FIG. 7





WO 01/51665

9/51

PCT/US01/01190



FIG.9A



FIG.9B

WO 01/51665

10/51

PCT/US01/01190

FIG.10

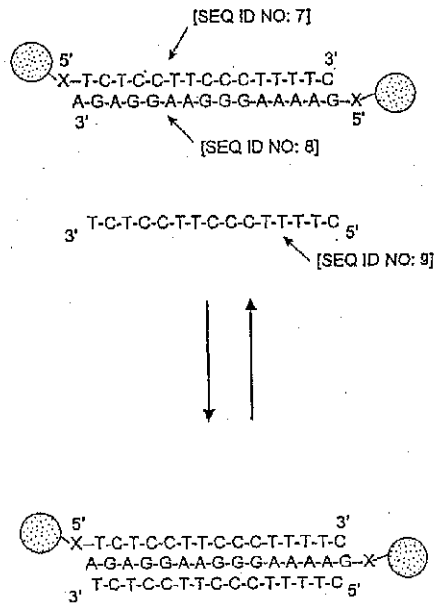
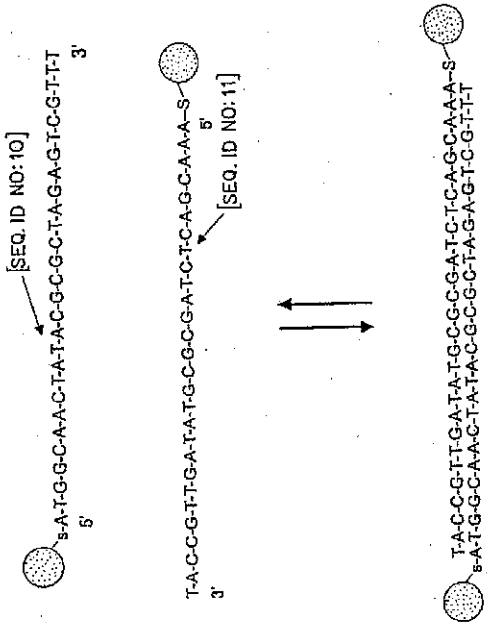


FIG. 11



WO 01/51665

12/51

PCT/US01/01190

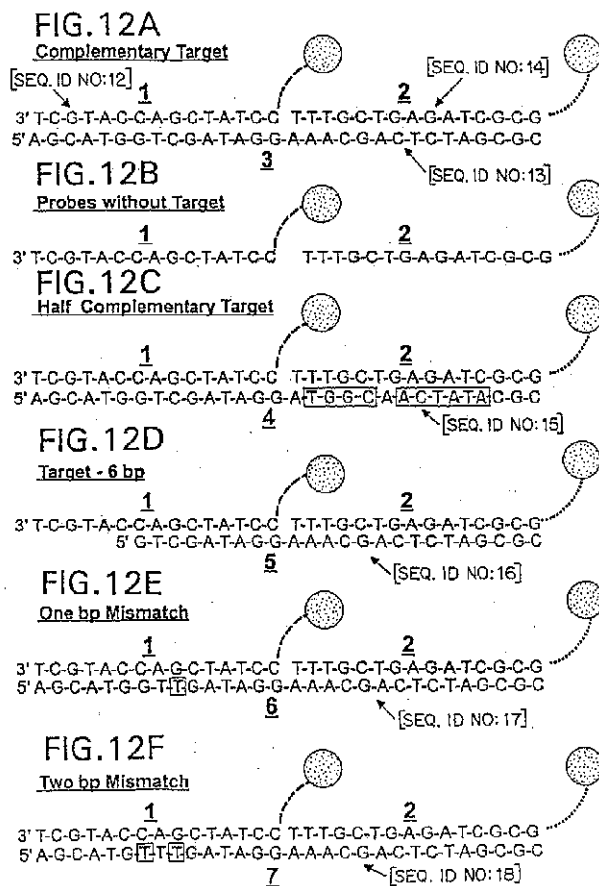
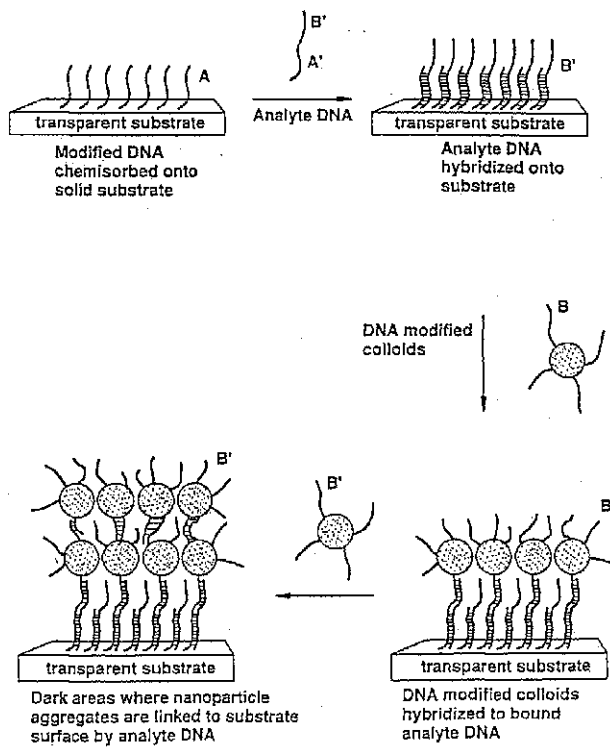


FIG.13A

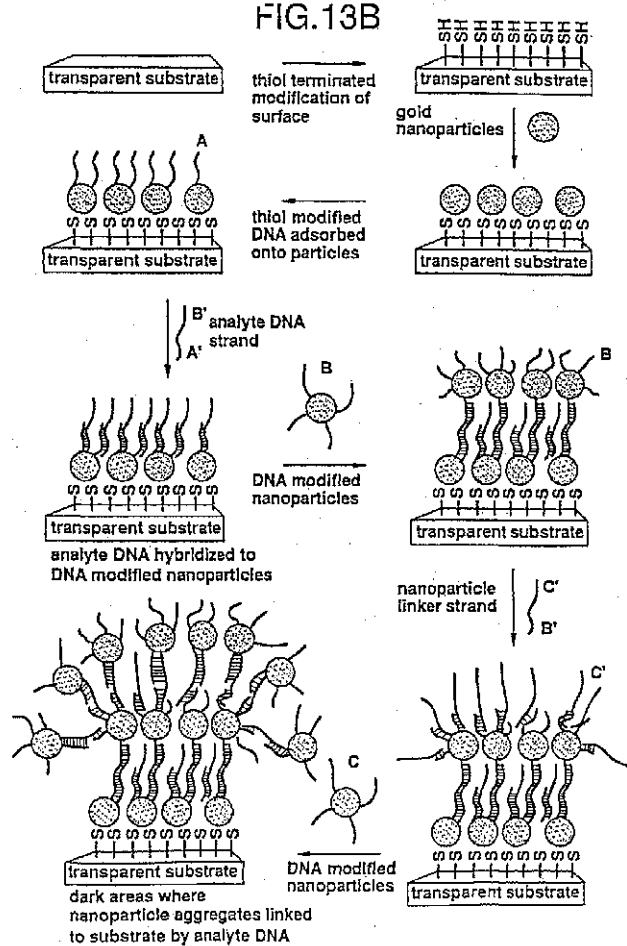


WO 01/51665

14/51

PCT/US01/01190

FIG.13B



WO 01/51665

15/51

PCT/US01/01190

FIG. 14A

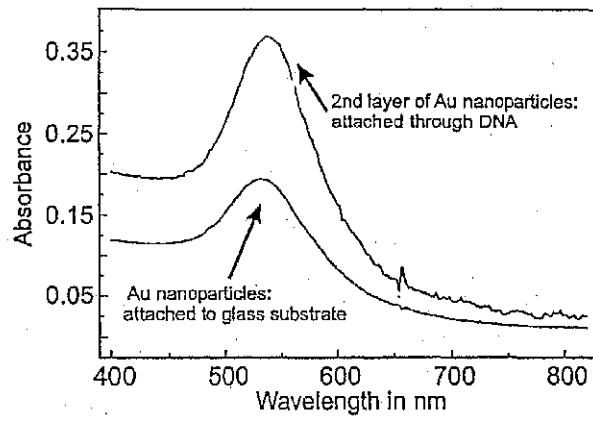


FIG. 14B

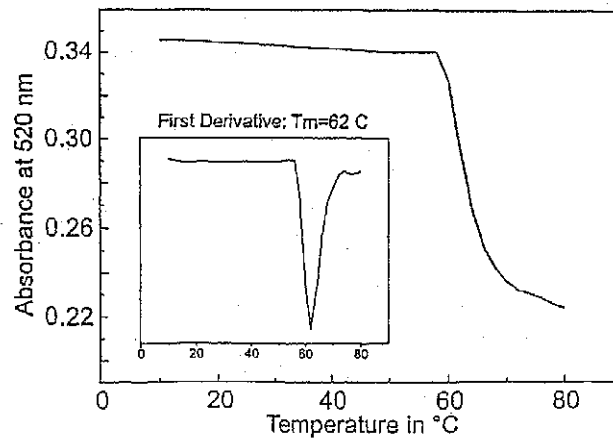


FIG15A

Probes with No Target

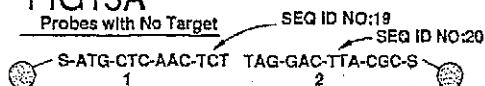


FIG15B

Half-Complementary Target

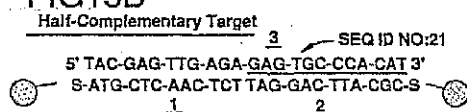


FIG15C

Complementary Target

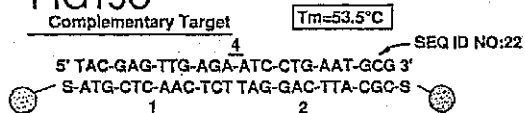


FIG15D

ONE Base-Pair Mismatch at Probe Head

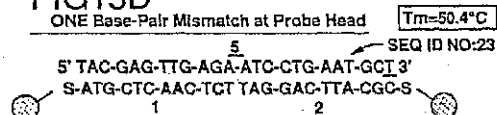


FIG15E

ONE Base-Pair Mismatch at Probe Tail

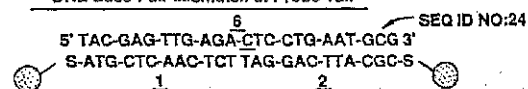


FIG15F

ONE Base Deletion

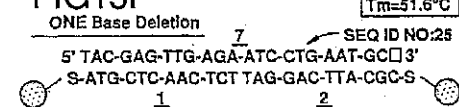
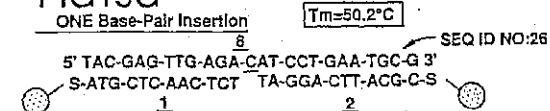


FIG15G

ONE Base-Pair Insertion



WO 01/51665

17/51

PCT/US01/01190

FIG. 16A 24 Base Template

5' TAC-GAG-TTG-AGA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 ↗ S-ATG-CTC-AAC-TCT TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

FIG. 16B 48 Base Template with Complementary 24 Base Filler

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 ↗ S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-TTA-GTA-CGT TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

FIG. 16C 72 Base Template with Complementary 48 Base Filler

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-TAT-ATT-GGA-CGC-TTT-ACG-GAC-AAC-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 ↗ S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-TTA-GTA-CGT-ATA-TAA-CCT-GCG-AAA-TGC-CTG-TTG TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

FIG.17A

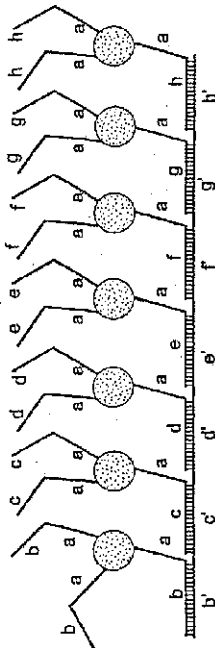
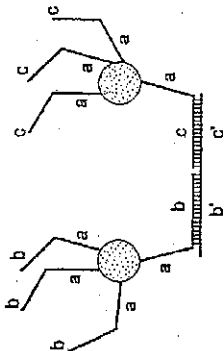
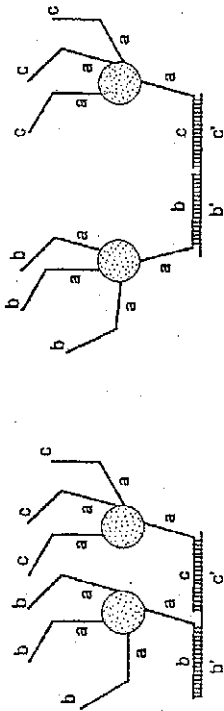


FIG.17D

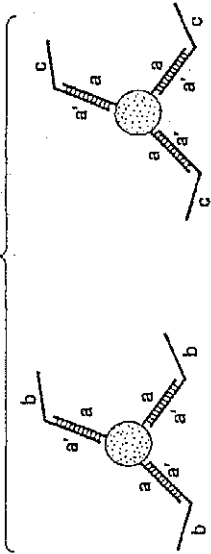
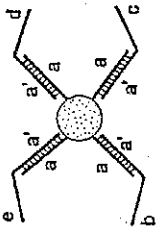


FIG.17E

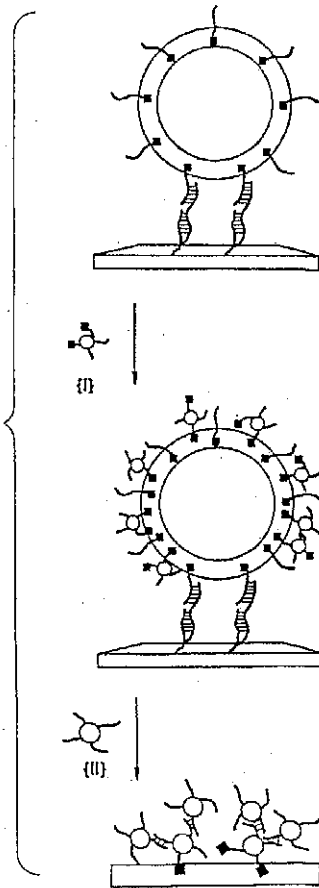


WO 01/51665

20/51

PCT/US01/01190

FIG.18



WO 01/51665

21/51

PCT/US01/01190

FIG. 19A

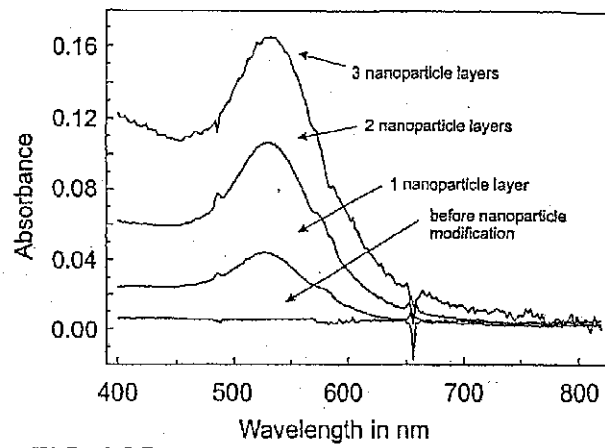
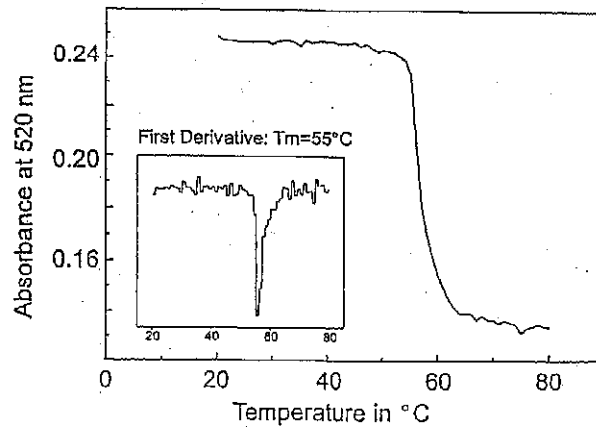


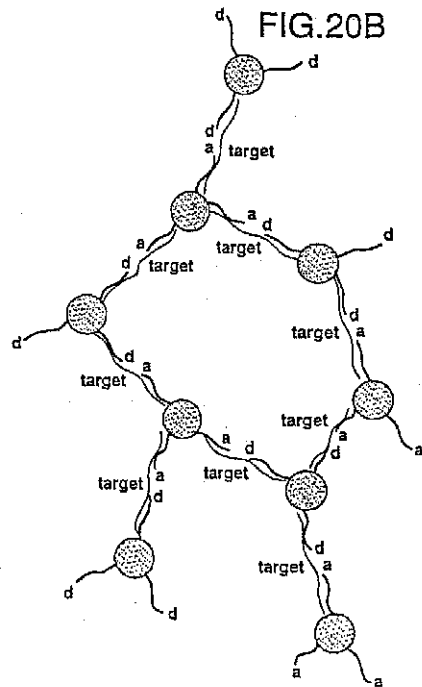
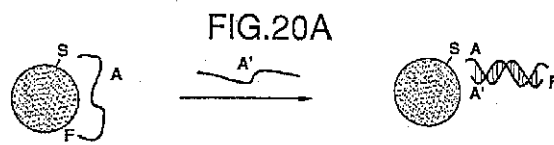
FIG. 19B



WO 01/51665

22/51

PCT/US01/01190



WO 01/51665

23/51

PCT/US01/01190

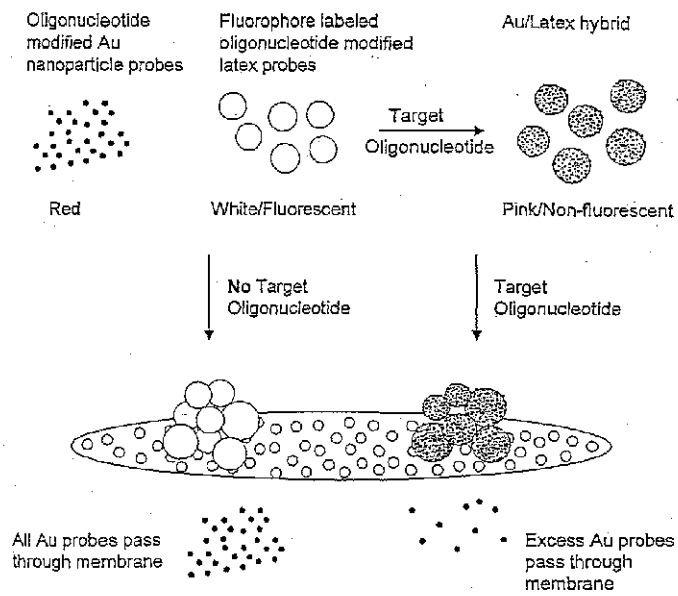


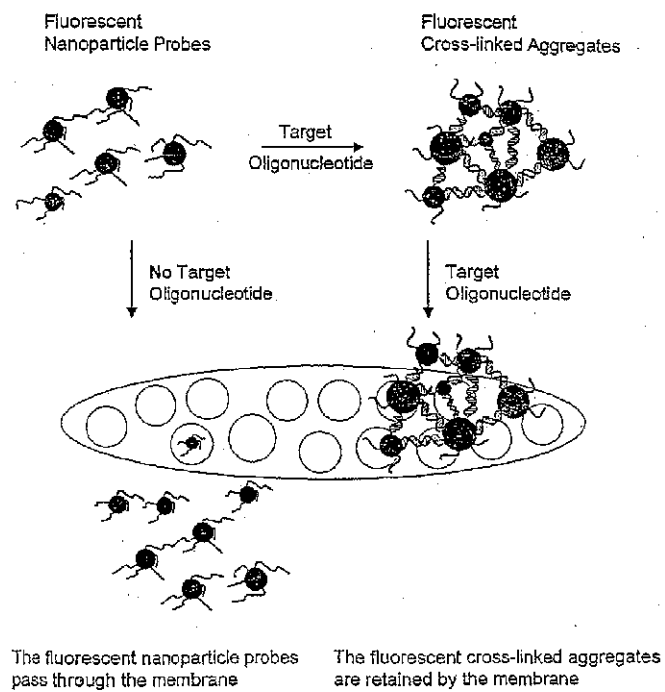
FIGURE 21

WO 01/51665

24/51

PCT/US01/01190

FIGURE 2a



WO 01/51665

25/51

PCT/US01/01190

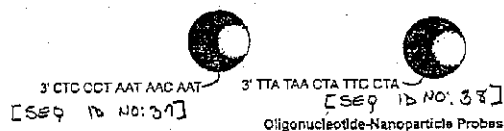
Anthrax PCR Product

5'G GCG GAT GAG TCA GTA GTT AAG GAG GCT CAT AGA GAA GTA ATT AAT
 3'C CGC CTA CTC AGT CAT CAA TTC CTC CGA GTA TCT CTT CAT TAA TTA

TGG TCA ACA GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT ATA AGA AAA
 AGC AGT TGT CTC CCT AAT AAC AAT TTA TAA CTA TTC CTA TAT TCT TTT

ATA TTA TCC AGG GTT ATA TTG TAG AAA TTG AAG ATA CTG AAG GGC TT 3'
 TAT AAT AGG TCC CAA TAT AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA 5'

141 mer Anthrax PCR product [SEQ ID NO: 36]



Blocker Oligonucleotides

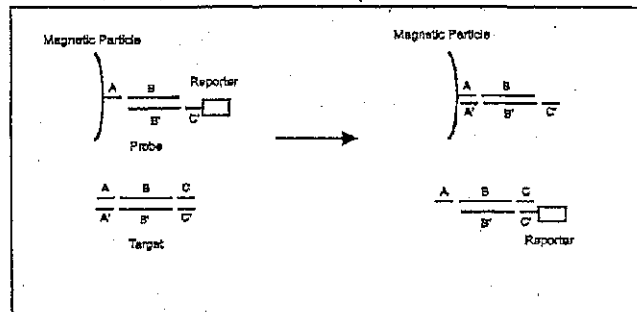
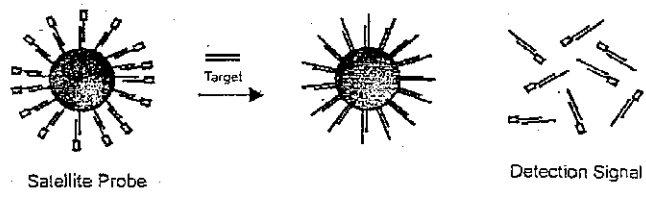
3' C CGC CTA CTC AGT CAT CAA TTC CTC CGA GT	[SEQ ID NO: 39]
3' A TCT CTT CAT TAA TTA AGC AGT TGT	[SEQ ID NO: 40]
3' TAT TCT TTT TAT AAT AGG TCC CAA TAT	[SEQ ID NO: 41]
3' AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA	[SEQ ID NO: 42]

FIGURE 23

WO 01/51665

26/51

PCT/US01/01190



WO 01/51665

27/51

PCT/US01/01190

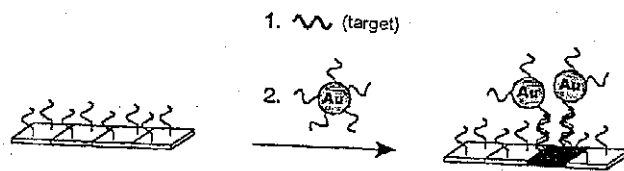


FIGURE 25A

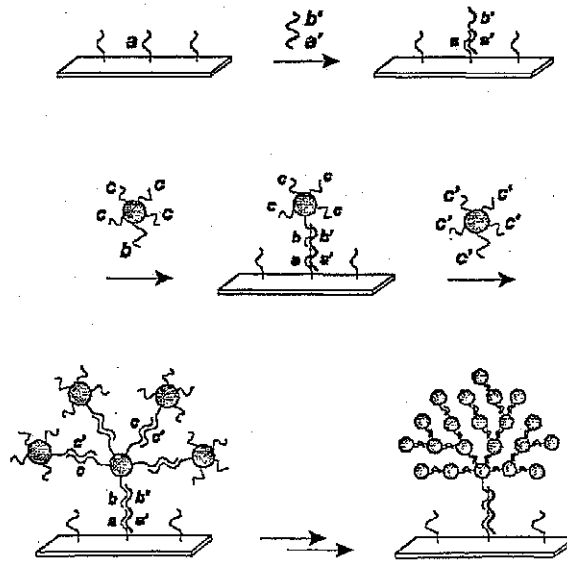


FIGURE 25B

WO 01/51665

28/51

PCT/US01/01190

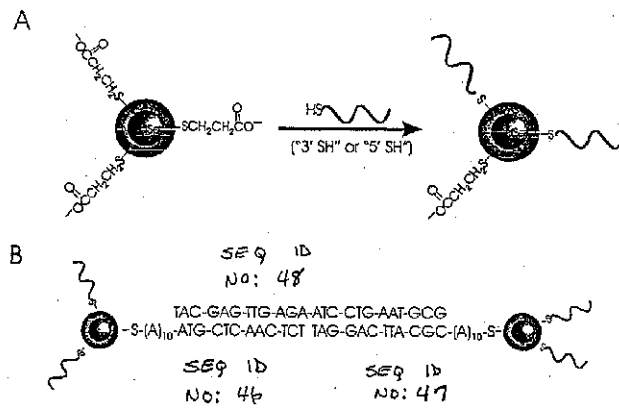


FIGURE 26

WO 01/51665

29/51

PCT/US01/01190

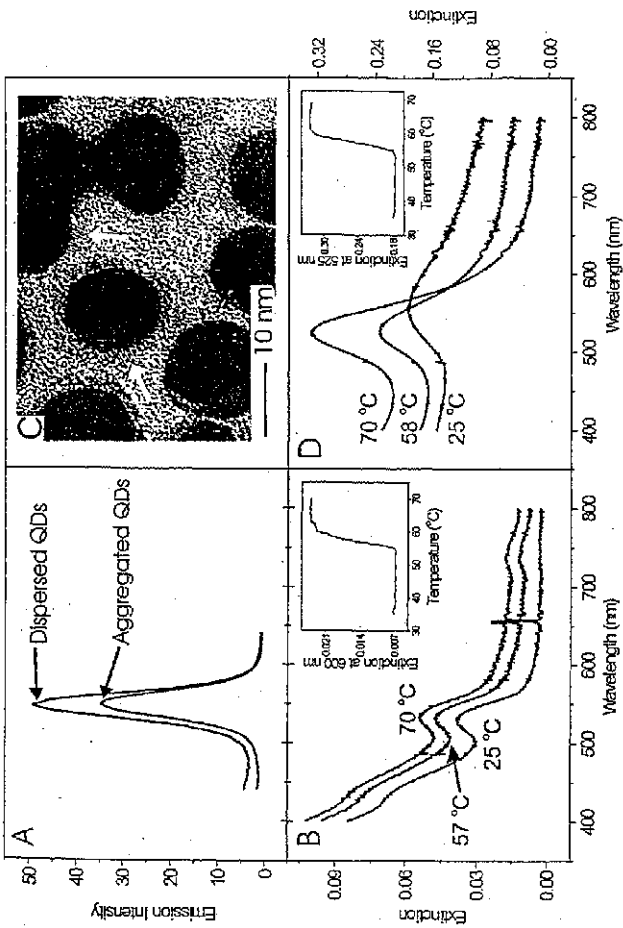


FIGURE 2

WO 01/51665

30/51

PCT/US01/01190

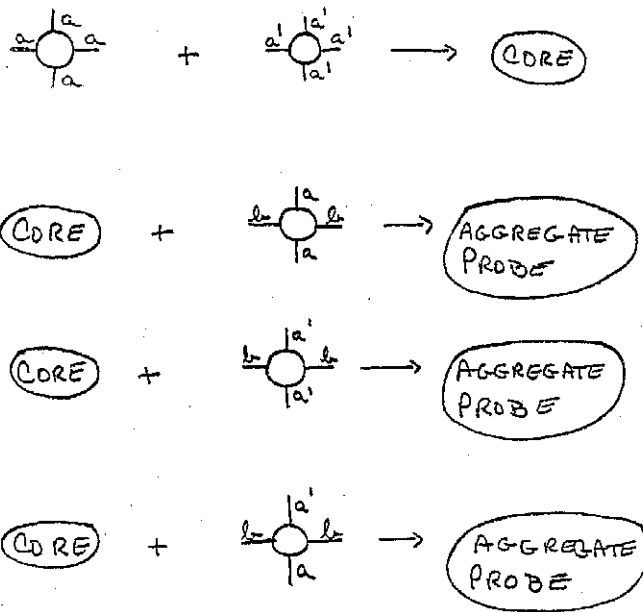


FIGURE 28A

WO 01/51665

31/51

PCT/US01/01190

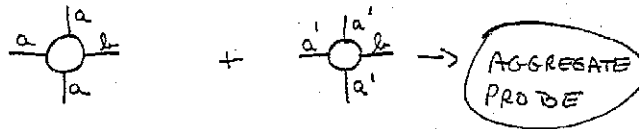


FIGURE 88B

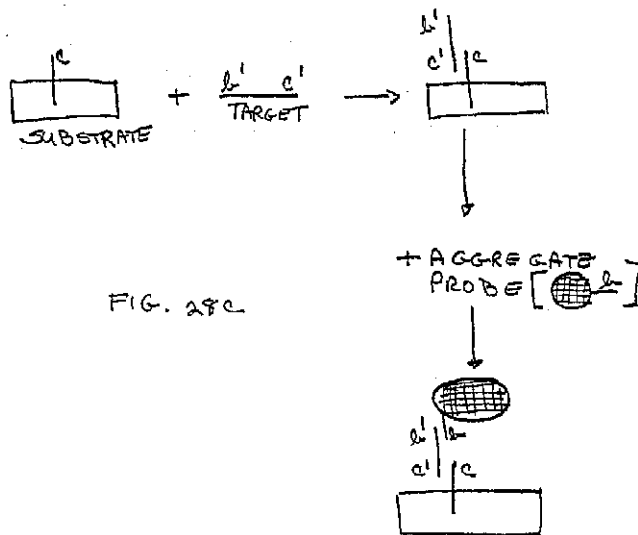


FIG. 28C

WO 01/51665

32/51

PCT/US01/01190

AGGREGATE
PROBE

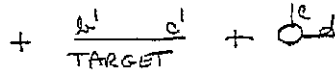
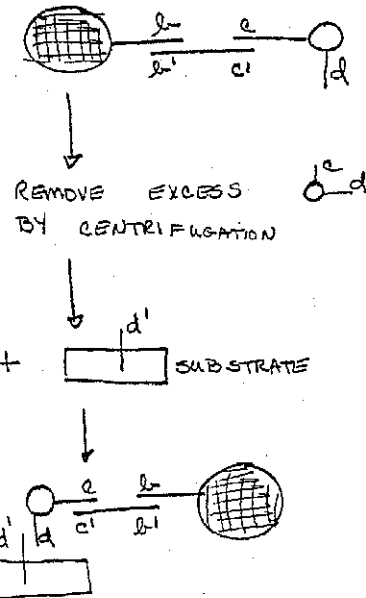


FIG. 28D



WO 01/51665

33/51

PCT/US01/01190

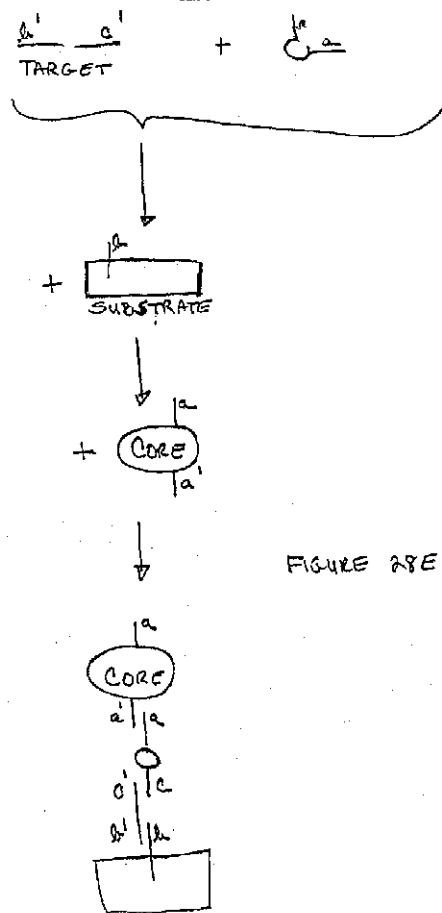


FIGURE 28E

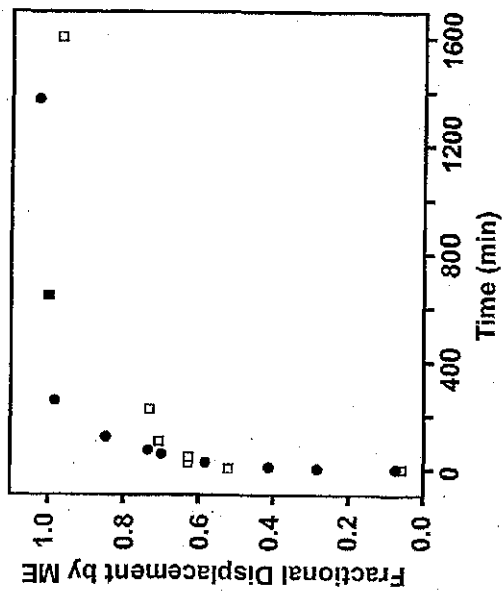


Figure 29

WO 01/51665

35/51

PCT/US01/01190

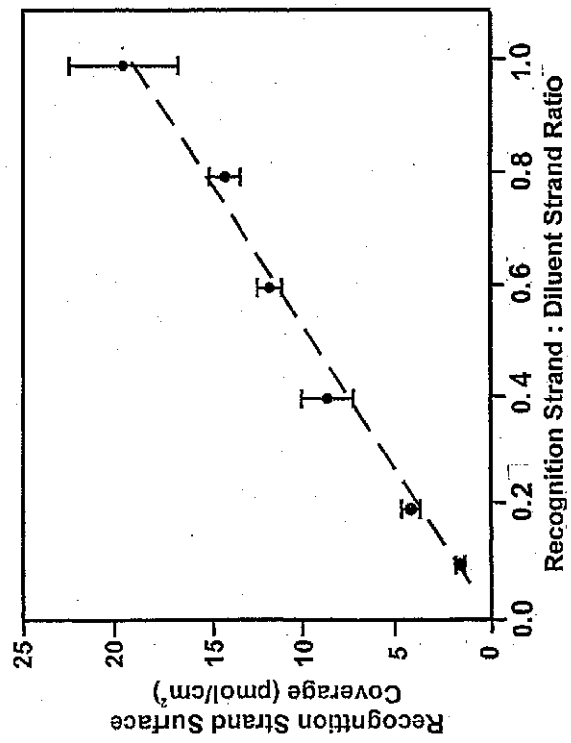


Figure 30

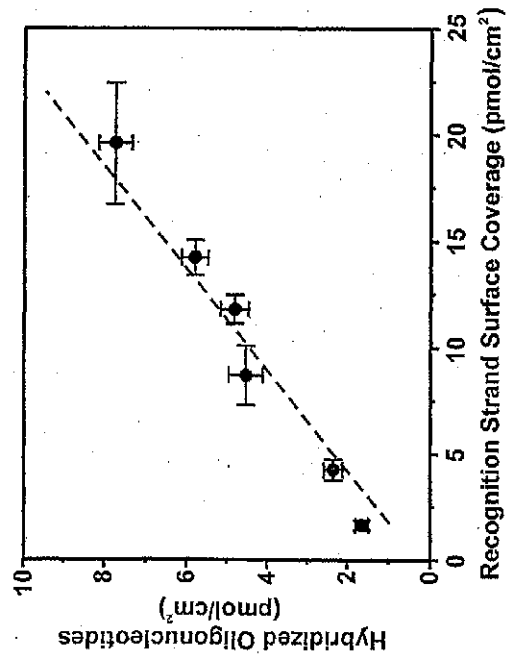


Figure 31

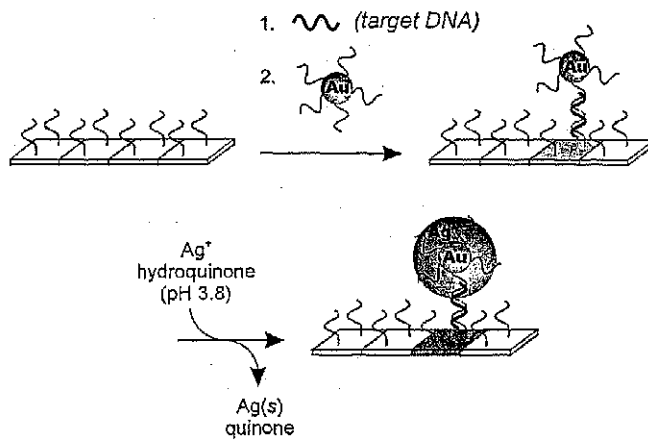
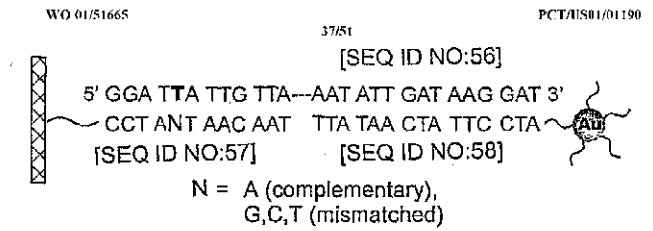


Figure 32

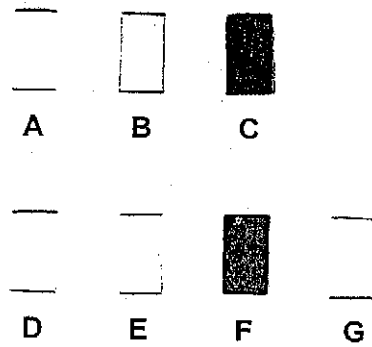


Figure 33

WO 01/51665

39/51

PCT/US01/01190

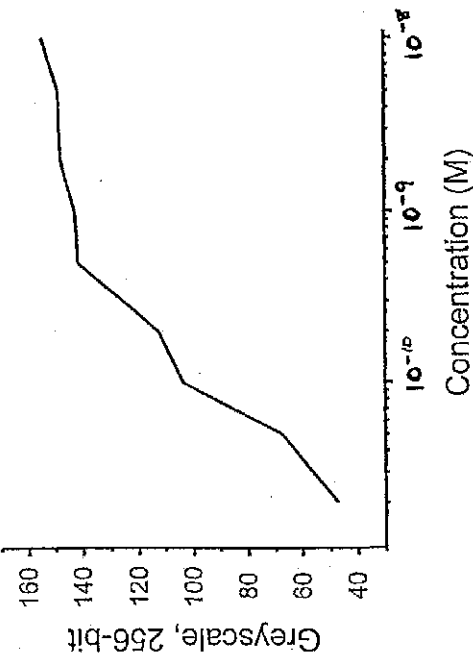


Figure 34

WO 01/51665

40/51

PCT/US01/01190

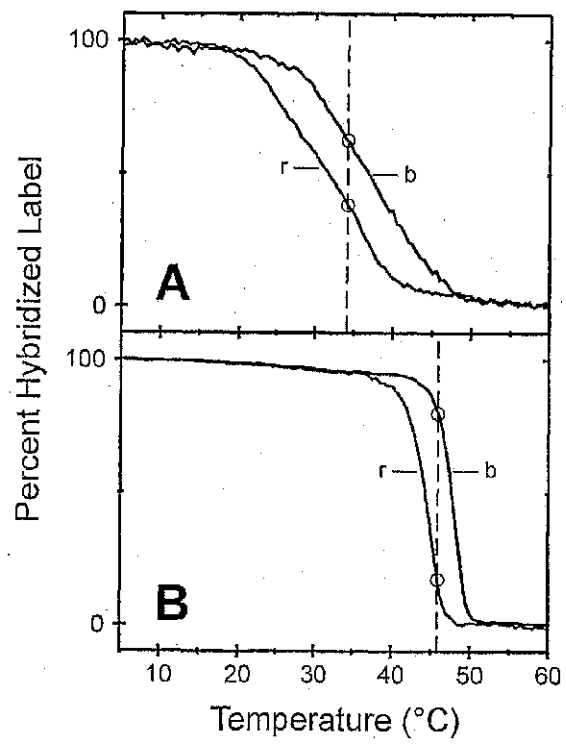


Figure 35

WO 01/51665

41/51

PCT/US01/01190

FIG. 36A

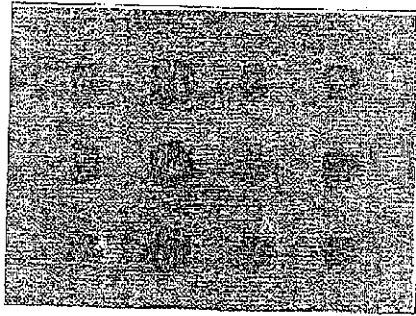
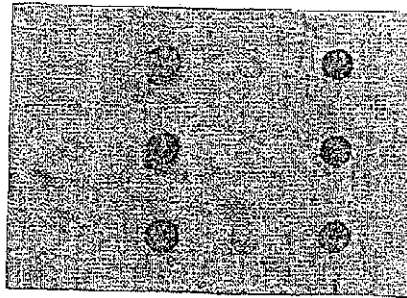
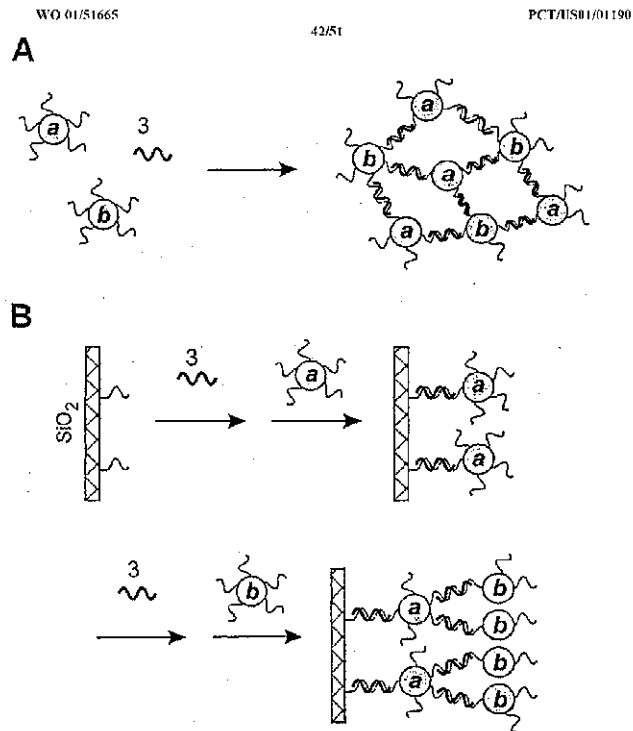


FIG. 36B



C A T G



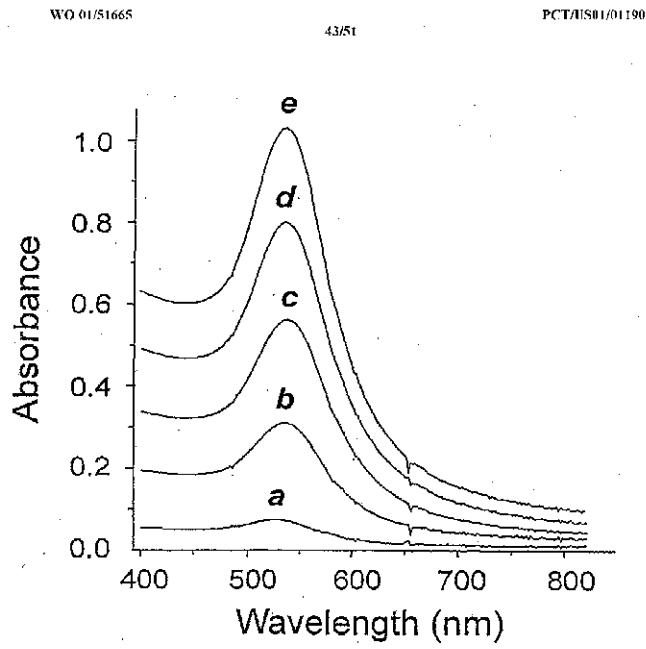


Figure 38A

WO 01/51665

44/51

PCT/US01/01190

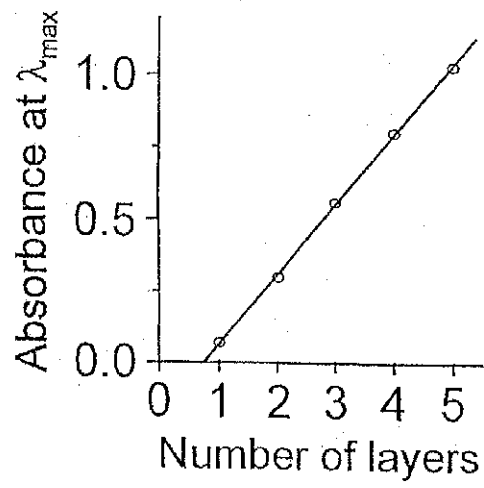


Figure 38B

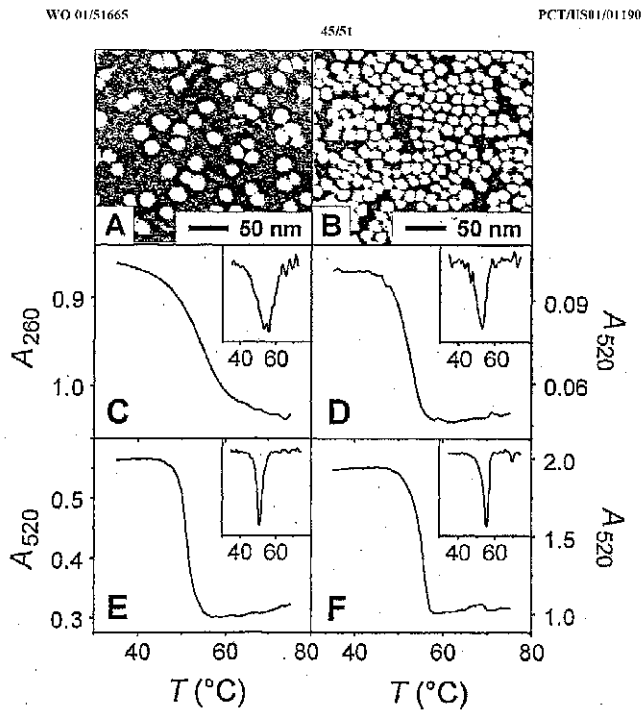


Figure 39

WO 01/51665

46/51

PCT/US01/01190

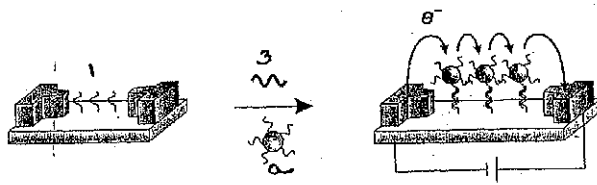
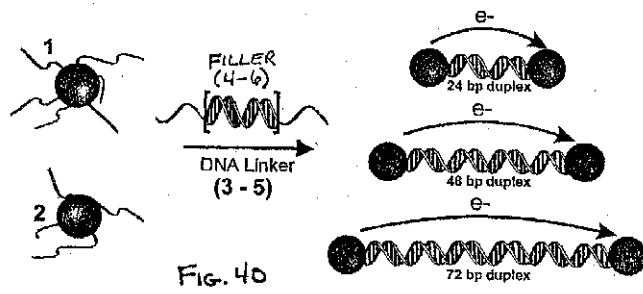


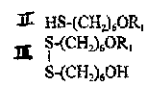
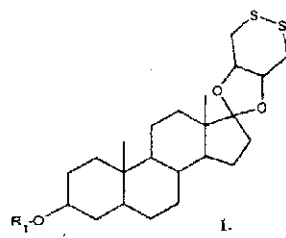
FIG. 41

WO 01/51665

47/51

PCT/US01/01190

Fig. 42

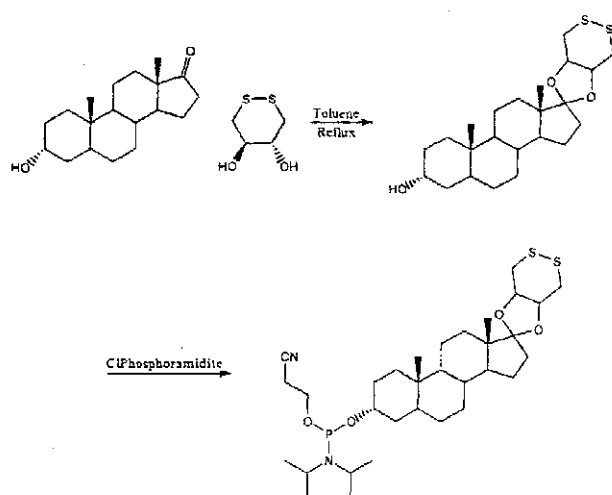


R_1
 $a = \text{H}$
 $b = (\text{IPr})_2\text{NP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-$
 $c1 = 5'-\text{p}(\text{A}_{20})-\text{TATCGTTCCATCAGCT}$
 $c2 = 5'-\text{p}(\text{A}_{20})-\text{TTCATCTTCCGTTCT}$
 Target I = 79-mer oligonucleotide with target region:
 3' ATAGCAAGGTAGTCGAGCAACTAGAAAGGCAAGA.....5'

WO 01/51665

48/51

PCT/US01/01190

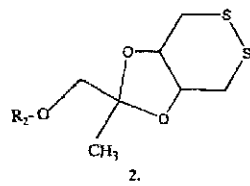


WO 01/51665

PCT/US01/01190

Fig. 44

49/51

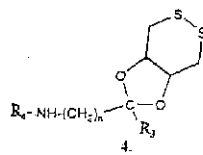
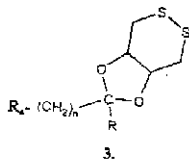
R₂

a = H

b = (iPr)₃NP(OCH₂CH₂CN)-c1 = 5'-p(A₂₀)-GCAGACCTCAc2 = 5'-p(A₃₀)-CCTATGTGTCGd = 5'-p(A₂₀)

Target I = 63-mer oligonucleotide with target region:

3'.....CGTCTGGAGTGGATACACAGC.....5'

R₂ = hydrogen, an alkyl group, an aryl group, or a substituted alkyl or aryl groupR₄ = an attached oligonucleotide or modified oligonucleotide

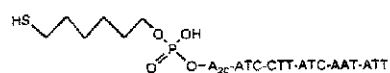
WO 01/51665

50/51

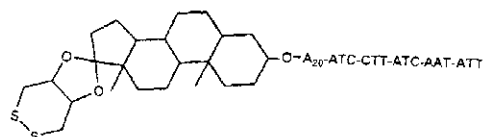
PCT/US01/01190

FIG. 45

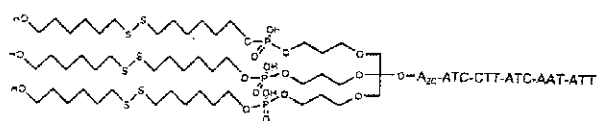
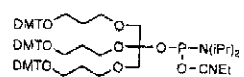
5.



6.



7.



8.

WO 01/51665

51/51

PCT/US01/01190

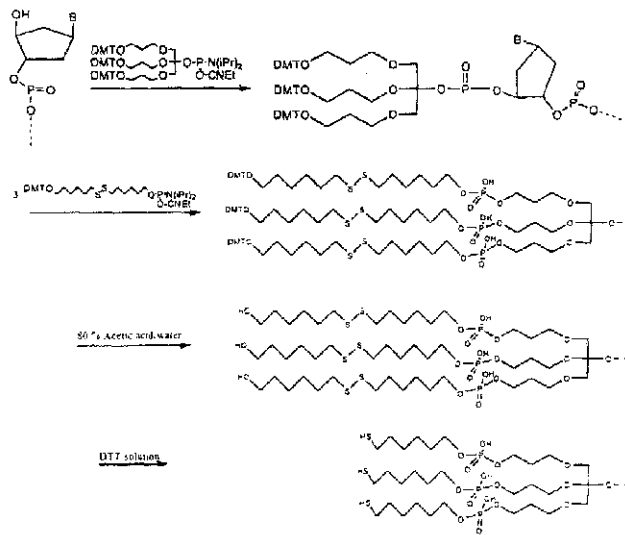


Fig. 46

WO 01/51665

PCT/US01/01190

SEQUENCE LISTING

<110> Mirkin, Chad A.
Letsinger, Robert E.
Mucic, Robert C.
Storhoff, James J.
Elghanian, Robert
Taton, Thomas A.

<120> NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES ATTACHED THERETO
AND USES THEREFOR

<130> 4149-1-1-1-1

<140> Not Yet Assigned

<141> 2000-06-26

<150> 60/031,809

<151> 1996-07-29

<150> PCT/US97/12783

<151> 1997-07-21

<150> 09/240,755

<151> 1999-01-29

<150> 09/344,667

<151> 1999-06-25

<150> 60/200,161

<151> 2000-04-26

<160> 64

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 1
aaacgaatct agcgcgatata

20

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 2
atggcaacta tacgcgctag 20

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 3
cattgagatt tccctc 16

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 4
gagggaaatc tcaagg 16

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<400> 5
aaattgcgct aatggcga

18

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 6
aagttgcgct ttaaggctaa tggcga

26

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 7
tctccttccc ttttc

15

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 8
gaaaaggga ggaga

15

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 9

ctttccctt cctct

15

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 10

aaacgactct agsgcgtata gttgccat

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 11

atggcaacta tacgcgctag agtcgttt

20

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 12

cctatcgacc atgct

15

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 13
agcatgggtcg ataggaaacg actctagcgc 30

<210> 14
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 14
ggcctagagt cgttt 15

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 15
agcatgggtcg ataggatggc aactatagc 30

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<400> 16
gtcgatagga aacgactcta ggcg

24

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 17
agcgtggttg ataggaaacg actctagcgc

30

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 18
agcgtggttg ataggaaacg actctagcgc

30

<210> 19
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 19
tctcgaactcg ta

12

<210> 20
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 20

ggcattcagg at

12

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 21

tacgagttga gagagtgccc acat

24

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 22

tacgagttga gaatcctgaa tgcg

24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 23

tacgagttga gaatcctgaa tgct

24

<210> 24

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 24
tacgagttga gactactgaa tgcg

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 25
tacgagttga gaatactgaa tgc

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 26
tacgagttga gacatctga atgcg

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 27

24

23

25

WO 01/51665

PCT/US01/01190

tacgagttga gaatactgaa tgcg

24

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 28

taggaattac gc

12

<210> 29

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 29

tacgagttga gacggttaag acgaggcaat catgcaatcc tgaatgcg

48

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 30

tgcagatttg cctcgtotta acgg

24

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 31
taccggttga gaccgttaag acgaggcaat catgcatata ttggagcgtt taaggacaa 60
atcctgaatg cg 72

<210> 32
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 32
gttgctccga aagcgtocaa tatatgcctg attgcctegt cttaacgg 48

<210> 33
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 33
tctcaactcg ta 12

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 34
tacgagttga gaatactgaa tgcg 24

<210> 35

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 35

cgattcagg at

12

<210> 36

<211> 141

<212> DNA

<213> anthrax

<400> 36

ggcggatgag taagtattta agggggctca tagagaagta attaattcgt caacagaggg 60
attattgtta aatattgata aggatataag aaantatta tccagggtta tattgtagaa 120
attgaagata ctgaagggtt t 141

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 37

taacaataat ccttc

15

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 38

atcattatca atatt

15

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 39
tggagctctct taactactga ctcacccgcc
30

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 40
tggttgacgaa ttaattactt ctata
25

<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 41
tataaccctg gataatattt ttcttat
27

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<400> 42
aagcccttca gtatcttcaa tttctacaa 29

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 43
tctcaactcg taaaaaaaa aa 22

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 44
tacgagttga gaatcctgaa tgcg 24

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 45
aaaaaaaaa cgcattcagg at 22

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 46
tctcaactcg taataaaaaa ca

22

<210> 47
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 47
aaaaaaaaa cgcattcagg at

22

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 48
tacgagttga gaatcctgaa tgcg

24

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 49
ctacttagat ccgagtgccc acat

24

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 50
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 50
cgcattoagg at

12

<210> 51
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 51
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgcattoagg at

32

<210> 52
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 52
cgcattoagg atwwwwwww wwwwwww wwww

32

<210> 53
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/51665	PCT/US01/01190
<400> 53 atcttgatg cg	12
<210> 54 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: random synthetic sequence	
<400> 54 atcttgatg cg	12
<210> 55 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: random synthetic sequence	
<400> 55 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	20
<210> 56 <211> 27 <212> DNA <213> Anthrax	
<400> 56 ggattattgt taattattga taaggat	27
<210> 57 <211> 12 <212> DNA <213> Anthrax	
<400> 57 taacaatnat cc	12

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 58
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Anthrax

<400> 58
 atccttatca atatt

15

<210> 59
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
 synthetic sequence

<400> 59
 tctcaactcg ta

12

<210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
 synthetic sequence

<400> 60
 tacgagttga gaatactgaa tgcg

24

<210> 61
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:random
 synthetic sequence

<400> 61
 gcgtaagtcc taacgtacta acggagcaga atgcccagag ttgagcat

48

WO 01/51665

PCT/US01/01190

<210> 62
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 62
gggttaagtc tacacacggc atttgcgagg ttatatacgt actaacggag cagaattgcc 60
agagttgagc at 72

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 63
tgcattgattg cctcgttatta acgg 24

<210> 64
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 64
gttgtcagta aagcgtccaa tatatgcattg attgcctcgt ottaacgg 48

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 July 2001 (19.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/051665 A2

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68, (74) Agent: MIAO, Emily, McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 500 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago, IL 60606 (US);

(21) International Application Number: PCT/US01/01190

(22) International Filing Date: 12 January 2001 (12.01.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/176,399 13 January 2000 (13.01.2000) US
60/200,161 26 April 2000 (26.04.2000) US
09/603,830 26 June 2000 (26.06.2000) US
09/760,500 12 January 2001 (12.01.2001) US

(81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BT, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant: NANOSPHERE INC. (US/US); 1801 Maple Avenue, Evanston, IL (US);

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventors: MIRKIN, Chad, A.; 111 16th Street, Wilmette, IL 60091 (US); LETSINGER, Robert, L.; 316 Third Street, Wilmette, IL 60091 (US); MURPHY, Robert, C.; 1600 Bel Aire Drive, Glendale, CA 91201 (US); STORJOFF, James, J.; Apartment 21, 2121 Ridge Ave., Evanston, IL 60201 (US); ELGHANIAN, Robert; Apartment 602, 8501 West Coderline Avenue, Chicago, IL 60656 (US); TATON, Thomas, Andrew; 3368 West Greendale, Apt. 1S, Chicago, IL 60623 (US); LI, Zhi; 911 Sherman Avenue, Apt. 307, Evanston, IL 60202 (US); GARIMELIA, Viswanathan; 1915 Maple, Evanston, IL 60201 (US);

(48) Date of publication of this corrected version: 3, October 2002

(15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 44/2002 of 3, October 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/051665 A2

(54) Title: NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES ATTACHED THERETO AND USES THEREOF

(57) Abstract: The invention provides methods of detecting a nucleic acid. The methods comprise contacting the nucleic acid with one or more types of particles having oligonucleotides attached thereto. In one embodiment of the method, the oligonucleotides are attached to nanoparticles and have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A detectable change (preferably a color change) is brought about as a result of the hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid. The invention also provides compositions and kits comprising particles. The invention further provides methods of synthesizing unique nanoparticle oligonucleotide conjugates, the conjugates produced by the methods, and methods of using the conjugates. In addition, the invention provides biomaterials and microstructures comprising nanoparticles and methods of nanofabrication utilizing nanoparticles. Finally, the invention provides a method of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

**NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES
ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR**

5

This invention was made with government support under National Institutes Of Health (NIH) grant GM10265 and Army Research Office (ARO) grant DAAAG55-0967-1-0133. The government has certain rights in the invention.

10

This application is a continuation-in-part of pending application number 09/344,667, filed June 25, 1999, which was a continuation-in-part of pending application number 09/240,755, filed January 29, 1999, which was a continuation-in-part of pending PCT application PCT/US97/12783, which was filed July 21, 1997, which are incorporated by reference. Benefit of provisional applications nos.

15

60/031,809, filed July 29, 1996; 60/200,161, filed April 26, 2000; 60/176,409, filed January 13, 2000 is also claimed, the disclosures are incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to methods of detecting nucleic acids, whether natural or synthetic, and whether modified or unmodified. The invention also relates to materials for detecting nucleic acids and methods of making those materials. The invention further relates to methods of nanofabrication. Finally, the invention relates to methods of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

The development of methods for detecting and sequencing nucleic acids is critical to the diagnosis of genetic, bacterial, and viral diseases. See Mansfield, E.S. et al. *Molecular and Cellular Probes*, 9, 145-156 (1995). At present, there are a variety of methods used for detecting specific nucleic acid sequences. *Id.* However, these methods are complicated, time-consuming and/or require the use of specialized and expensive equipment. A simple, fast method of detecting nucleic acids which does not require the use of such equipment would clearly be desirable.

30

WO 01/051665

PCT/US01/01190

A variety of methods have been developed for assembling metal and semiconductor colloids into nanomaterials. These methods have focused on the use of covalent linker molecules that possess functionalities at opposing ends with chemical affinities for the colloids of interest. One of the most successful approaches to date, Brust et al., *Adv. Mater.*, **7**, 795-797 (1995), involves the use of gold colloids and well-established thiol adsorption chemistry, Bain & Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 506-512 (1989) and Dubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 437-464 (1992). In this approach, linear alkanedithiols are used as the particle linker molecules. The thiol groups at each end of the linker molecule covalently attach themselves to the colloidal particles to form aggregate structures. The drawbacks of this method are that the process is difficult to control and the assemblies are formed irreversibly. Methods for systematically controlling the assembly process are needed if the materials properties of these structures are to be exploited fully.

The potential utility of DNA for the preparation of biomaterials and in nanofabrication methods has been recognized. In this work, researchers have focused on using the sequence-specific molecular recognition properties of oligonucleotides to design impressive structures with well-defined geometric shapes and sizes. Shekhtman et al., *New J. Chem.*, **17**, 757-763 (1993); Shaw & Wang, *Science*, **260**, 533-536 (1993); Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6402-6407 (1989); Chen & Seeman, *Nature*, **350**, 631-633 (1991); Smith and Feigon, *Nature*, **356**, 164-168 (1992); Wang et al., *Biochem.*, **32**, 1899-1904 (1993); Chen et al., *Biochem.*, **33**, 13540-13546 (1994); Marsh et al., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 696-700 (1995); Mirkin, *Annu. Review Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 541-576 (1994); Wells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1095-1098 (1988); Wang et al., *Biochem.*, **30**, 5667-5674 (1991). However, the theory of producing DNA structures is well ahead of experimental confirmation. Seeman et al., *New J. Chem.*, **17**, 739-755 (1993).

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides methods of detecting nucleic acids. In one embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (nanoparticle-oligonucleotide

WO 01/051665

PCT/US01/01190

conjugates). The nucleic acid has at least two portions, and the oligonucleotides on each nanoparticle have a sequence complementary to the sequences of at least two portions of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

5 The hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid results in a detectable change.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to

10 a first portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid, and a detectable change brought about by this hybridization is observed.

15 In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The first type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto, and the oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid. The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of

20 the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under conditions

25 effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with the nucleic acid. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise providing a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the

30 second type of nanoparticles. The binding oligonucleotide is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under

WO 01/051665

PCT/US01/01190

conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Then, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide, is contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Finally, the detectable change produced by these hybridizations is observed.

In yet another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Next, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Finally, a detectable change produced by these hybridizations is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid. This contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. Next, the liposome-oligonucleotide conjugates bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Then, a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. Next, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Then, the substrate is

WO 01/051665

PCT/US01/01190

contacted with silver stain to produce a detectable change, and the detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The nanoparticles have oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. Then, the nucleic acid is contacted with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. Finally, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with said nucleic acid, and a detectable change is observed.

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The nucleic acid, the substrate and the aggregate probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the

5 hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A type of nanoparticles having at least two types of

10 oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate. The nucleic acid, the aggregate probe, the nanoparticles and the substrate are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the

15 oligonucleotides on the aggregate probe and on the nanoparticles and hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The

20 oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. The nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence

25 complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the

30 hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto

WO 01/051665

PCT/US01/01190

which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles. The liposomes bound to the substrate are contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the aggregate probe to the liposomes as a result of hydrophobic interactions, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one of the other types of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. Next, a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe. The nucleic acid, the nanoparticles, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the nanoparticles and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

Another embodiment of the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one other type of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. A type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid and

WO 01/051665

PCT/US01/01190

a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe is provided. The nucleic acid, the linking oligonucleotides, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the linking oligonucleotides and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the linking oligonucleotides with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and providing one or more types of binding oligonucleotides. Each of the binding oligonucleotides has two portions. The sequence of one portion is complementary to the sequence of one of the portions of the nucleic acid, and the sequence of the other portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides. The nucleic acid and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid. Then, a detectable change is observed. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be contacted with the binding oligonucleotides prior to being contacted with the nucleic acid, or all three may be contacted simultaneously.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of particles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of particles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and have energy donor molecules on the ends not attached to the particles. The oligonucleotides on the second type of particles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and have energy acceptor molecules on the ends not attached to the particles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid, and a detectable change

WO 01/051665

PCT/US01/01190

brought about by this hybridization is observed. The energy donor and acceptor molecules may be fluorescent molecules.

In a further embodiment, the method comprises providing a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. A type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and which produce a detectable change is also provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The nucleic acid is contacted with the microspheres and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the latex microspheres and on the nanoparticles with the nucleic acid. Then, changes in fluorescence, another detectable change, or both are observed.

In another embodiment, the method comprises providing a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. A second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is also provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and are also labeled with a fluorescent molecule. The nucleic acid is contacted with the two types of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the two types of nanoparticles with the nucleic acid. Then, changes in fluorescence are observed.

In a further embodiment, the method comprises providing a type of particle having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A type of probe oligonucleotides comprising a first portion and a second portion is also provided. The first portion has a sequence complementary to the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions are complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides are also labeled with a reporter molecule at one end. Then, the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

particles and the probe oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe oligonucleotides to produce a satellite probe. Then, the satellite probe is contacted with the nucleic acid under conditions effective to provide for hybridization of the

5 nucleic acid with the probe oligonucleotides. The particles are removed and the reporter molecule detected.

In yet another embodiment of the method of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first

10 portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles are made of a material which can conduct

15 electricity. The nanoparticles will have one or more types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is

20 present, a change in conductivity can be detected. In a preferred embodiment, the substrate will have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes.

25 The invention further provides a method of detecting a nucleic acid wherein the method is performed on a substrate. The method comprises detecting the presence, quantity or both, of the nucleic acid with an optical scanner.

The invention further provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least

30 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

Alternatively, the kit may comprise at least two containers. The first container
5 holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

In a further embodiment, the kit comprises at least one container. The
10 container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to portion of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having
15 attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second
20 container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a
25 second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the
30 sequence of a second portion of the nucleic acid, and a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WO 01/051665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, a first container holding nanoparticles, a second container holding a first type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, a third container holding a second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid, and a fourth container holding a third type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides.

In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles so that the nanoparticles can be attached to the liposomes by hydrophobic interactions. The kit may further comprise a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having nanoparticles attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least

WO 01/051665

PCT/US01/01190

one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having
5 oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of
10 the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The
15 aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence
20 of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles. The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached
25 to the substrate.

In another embodiment, the kit comprises a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The
30 oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate

WO 01/051665

PCT/US01/01190

probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the nanoparticles.

In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another embodiment, kits may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the kit comprises a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding binding oligonucleotides. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In yet another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another alternative embodiment, the kit comprises at least three containers. The first container holds nanoparticles. The second container holds a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The third container holds a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide, and a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises one or two containers, the container(s) holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and have energy donor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The second type of particles having

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and have energy acceptor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

5 In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The
10 oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the
15 sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule.

20 In another embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate
25 probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe
30 are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereto
5 oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a
10 first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

In another embodiment, the kit comprising a container holding a core probe,
15 the core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having attached to it at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between
20 the electrodes. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected.

The invention also provides the satellite probe, an aggregate probe and a core probe.

The invention further provides a substrate having nanoparticles attached
25 thereto. The nanoparticles may have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid.

The invention also provides a metallic or semiconductor nanoparticle having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides are labeled with fluorescent molecules at the ends not attached to the nanoparticle.

30 The invention further provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions. The method further comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a portion of the sequence of a linking oligonucleotide. The linking oligonucleotides and nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

The invention provides another method of nanofabrication. This method comprises providing at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first and second types of nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

The invention further provides nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

The invention also provides a composition comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid or a linking oligonucleotide. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid or linking oligonucleotide.

The invention further provides an assembly of containers comprising a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, and a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container have a sequence

WO 01/051665

PCT/US01/01190

complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container have a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

5 The invention also provides a nanoparticle having a plurality of different oligonucleotides attached to it.

The invention further provides a method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids. The method comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached
10 thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid. The selected nucleic acid and other nucleic acids are contacted with the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the
15 selected nucleic acid aggregate and precipitate.

In addition, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first such method comprises binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. To do so, oligonucleotides having covalently bound
20 thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the
25 electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional
30 period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The

WO 01/051665

PCT/US01/01190

invention also includes the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

5 The invention provides another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising a type of recognition oligonucleotides and a type of diluent oligonucleotides. The oligonucleotides and the nanoparticles are contacted under conditions effective to
10 allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the conjugates. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures
15 comprising the conjugates. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. "Diluent oligonucleotides" may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to their targets.

20 The invention provides yet another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides. The recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion. The recognition portion of the recognition
25 oligonucleotides has a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotide is designed so that it can bind to the nanoparticles. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the
30 nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. To make the conjugates, the oligonucleotides, including the recognition oligonucleotides, and the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticles are contacted under conditions effective allow at least some of the recognition oligonucleotides to bind to the nanoparticles. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

The invention comprises a method of attaching oligonucleotides to nanoparticles by means of a linker comprising a cyclic disulfide. Suitable cyclic disulfides have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used. Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfides, e.g., as described in the Appendix. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. The linkers are attached to the oligonucleotides and the oligonucleotide-linkers are attached to nanoparticles as described herein.

As used herein, a "type of oligonucleotides" refers to a plurality of oligonucleotide molecules having the same sequence. A "type of" nanoparticles, conjugates, particles, latex microspheres, etc. having oligonucleotides attached thereto refers to a plurality of that item having the same type(s) of oligonucleotides attached to them. "Nanoparticles having oligonucleotides attached thereto" are also sometimes referred to as "nanoparticle-oligonucleotide conjugates" or, in the case of the detection methods of the invention, "nanoparticle-oligonucleotide probes," "nanoparticle probes," or just "probes."

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. X represents any covalent anchor (such as $-S(CH_2)_3OP(O)(O^-)-$, where S is joined to a gold nanoparticle). For

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the sake of simplicity in Figure 1 and some subsequent figures, only one oligonucleotide is shown to be attached to each particle but, in fact, each particle has several oligonucleotides attached to it. Also, it is important to note that in Figure 1 and subsequent figures, the relative sizes of the gold nanoparticles and the

5 oligonucleotides are not drawn to scale.

Figure 2: Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown. As a consequence, they hybridize to the DNA producing

10 detectable changes (forming aggregates and producing a color change).

Figure 3: Schematic diagram of a variation of the system shown in Figure 2. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown which are separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles. Also shown is an optional filler oligonucleotide which can be used to hybridize with the noncomplementary portion of the single-stranded DNA. When the DNA,

15 nanoparticles and filler oligonucleotides are combined, the nanoparticles aggregate, with the formation of nicked, double-stranded oligonucleotide connectors.

Figure 4: Schematic diagram illustrating reversible aggregation of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto as a result of hybridization and de-hybridization with a linking oligonucleotide. The illustrated linking oligonucleotide is a double-stranded DNA having overhanging termini (sticky ends) which are complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 5: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having oligonucleotides attached thereto with linking oligonucleotides having sequences complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 6: Cuvettes containing two types of gold colloids, each having a different oligonucleotide attached thereto and a linking double-stranded oligonucleotide with sticky ends complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles (see Figure 4). Cuvette A - at 80°C, which is above the T_m of the

30

WO 01/051665

PCT/US01/01190

linking DNA; de-hybridized (thermally denatured). The color is dark red. Cuvette B - after cooling to room temperature, which is below the T_m of the linking DNA; hybridization has taken place, and the nanoparticles have aggregated, but the aggregates have not precipitated. The color is purple. Cuvette C - after several hours at room temperature, the aggregated nanoparticles have settled to the bottom of the cuvette. The solution is clear, and the precipitate is pinkish gray. Heating B or C will result in A.

Figure 7: A graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides upon lowering of the temperature, as illustrated in Figure 4.

Figures 8A-B: Figure 8A is a graph of change in absorbance versus temperature/time for the system illustrated in Figure 4. At low temperatures, gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides (see Figure 4). At high temperature (80°C), the nanoparticles are de-hybridized. Changing the temperature over time shows that this is a reversible process. Figure 8B is a graph of change in absorbance versus temperature/time performed in the same manner using an aqueous solution of unmodified gold nanoparticles. The reversible changes seen in Figure 8A are not observed.

Figures 9A-B: Transmission Electron Microscope (TEM) images. Figure 9A is a TEM image of aggregated gold nanoparticles held together by hybridization of the oligonucleotides on the gold nanoparticles with linking oligonucleotides. Figure 9B is a TEM image of a two-dimensional aggregate showing the ordering of the linked nanoparticles.

Figure 10: Schematic diagram illustrating the formation of thermally-stable triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles having the pyrimidine-purine:pyrimidine motif. Such triple-stranded connectors are stiffer than double-stranded connectors. In Figure 10, one nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all purines, and the other nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all pyrimidines. The third

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotide for forming the triple-stranded connector (not attached to a nanoparticle) is composed of pyrimidines.

Figure 11: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. In Figure 11, the circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and s is the thio-alkyl linker. The multiple oligonucleotides on the two types of nanoparticles can hybridize to each other, leading to the formation of an aggregate structure.

Figures 12A-F: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6 and 7 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and the dotted and dashed lines represent connecting links of nucleotide.

Figures 13A-B: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA (analyte DNA) using nanoparticles and a transparent substrate.

Figures 14A-B: Figure 14A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (one population of which is in solution and one population of which is attached to a transparent substrate as illustrated in Figure 13B) aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides. Figure 14B a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 14A as the temperature is increased (melted).

Figures 15A-G: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6, 7 and 8 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

Figures 16A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticle conjugates 1 and 2, single-stranded oligonucleotide targets of different lengths, and filler oligonucleotides of different lengths are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

5 Figures 17A-E: Schematic diagrams illustrating nanoparticle-oligonucleotide conjugates and systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The circles represent the nanoparticles, the straight lines represent oligonucleotide chains (bases not shown), two closely-spaced parallel lines represent duplex segments, and the small letters indicate specific nucleotide sequences (a is complementary to a', b is complementary to b', etc.).

10 Figure 18: Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using liposomes (large double circle), nanoparticles (small open circles) and a transparent substrate. The filled-in squares represent cholesteryl groups, the squiggles represent oligonucleotides, and the ladders represent double-stranded (hybridized) oligonucleotides.

15 Figures 19A-B: Figure 19A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates assemble in multiple layers on a transparent substrate as illustrated in Figure 13A. Figure 19B is a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 19A as the temperature is increased (melted).

20 Figures 20A-B: Illustrations of schemes using fluorescent-labeled oligonucleotides attached to metallic or semiconductor quenching nanoparticles (Figure 20A) or to non-metallic, non-semiconductor particles (Figure 20B).

25 Figure 21: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and latex microspheres having fluorescently-labeled oligonucleotides attached thereto. The small, closed, dark circles represent the nanoparticles, the large, open circles represent the latex microspheres, and the large oval represents a microporous membrane.

30 Figure 22: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using two types of fluorescently-labeled oligonucleotide-nanoparticle

WO 01/051665

PCT/US01/01190

conjugates. The closed circles represent the nanoparticles, and the large oval represents a microporous membrane.

Figure 23: Sequences of materials utilized in an assay for Anthrax Protective Antigen (see Example 12).

5 Figure 24: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using a "satellite probe" which comprises magnetic nanoparticles (dark spheres) having oligonucleotides (straight lines) attached to them, probe oligonucleotides (straight lines) hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides being labeled with a reporter group (open
10 rectangular box). A, B, C, A', B', and C' represent specific nucleotide sequences, with A, B and C being complementary to A', B' and C', respectively.

Figures 25A-D: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA using nanoparticles and a transparent substrate. In these figures, a, b and c refer to different oligonucleotide sequences, and a', b' and c' refer to oligonucleotide
15 sequences complementary to a, b and c, respectively.

Figure 26: Schematic diagram illustrating systems for forming assemblies of CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QD).

Figures 27A-D: Figure 27A shows fluorescence spectra comparing dispersed and aggregated QDs, with an excitation at 400 nm. The samples were prepared
20 identically, except for the addition of complementary "linker" DNA to one and an equal volume and concentration of non-complementary DNA to the other. Figure 27B shows UV-Visible spectra of QD/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". Figure 27C shows high resolution TEM image of a portion of a hybrid gold/QD assembly. The lattice fringes of the QDs, which
25 resemble fingerprints, appear near each gold nanoparticle. Figure 27D shows UV-Visible spectra of hybrid gold/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". The insets in Figures 27B and 27D display temperature versus extinction profiles for the thermal denaturation of the assemblies. Denaturation experiments were conducted in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7), 0.01%
30 sodium azide with 13 nm gold nanoparticles and/or -4 nm CdSe/ZnS core/shell QDs.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Figures 28A-E: Schematic diagrams illustrating the preparation of core probes, aggregate probes and systems for detecting DNA using these probes. In these figures, a, b, c and d refer to different oligonucleotide sequences, and a', b', c' and d' refer to oligonucleotide sequences complementary to a, b, c and d, respectively.

5 Figure 29: Graph of fractional displacement of oligonucleotides by mercaptoethanol from nanoparticles (closed circles) or gold thin films (open squares) to which the oligonucleotides had been attached.

10 Figure 30: Graph of surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles obtained for different ratios of recognition:diluent oligonucleotides used in the preparation of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

Figure 31: Graph of surface coverages of hybridized complementary oligonucleotides versus different surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles.

15 Figure 32: Schematic diagram illustrating system for detecting a target DNA in a four-element array on a substrate using nanoparticle-oligonucleotide conjugates and amplification with silver staining.

Figure 33: Images obtained with a flatbed scanner of 7 mm x 13 mm oligonucleotide-functionalized float glass slides. (A) Slide before hybridization of DNA target and gold nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. (B) Slide A after hybridization of 10 nM target DNA and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. A pink color was imparted by attached, red 13 nm diameter gold nanoparticles. (C) Slide B after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. (D) Same as (A). (E) Slide D after hybridization of 100 pM target and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. The absorbance of the nanoparticle layer was too low to be observed with the naked eye or flatbed scanner. (F) Slide E after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. Note that slide F is much lighter than slide C, indicating lower target concentration. (G) Control slide, exposed to 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate and exposed to silver amplification solution for 5 minutes. No darkening of the slide was observed.

25 Figure 33: Graph of greyscale (optical density) of oligonucleotide-functionalized glass surface exposed to varying concentrations of target DNA,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

followed by 5 nM gold of nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugates and silver amplification for 5 minutes.

Figures 35A-B: Graphs of percent hybridized label versus temperature showing dissociation of fluorophore-labeled (Figure 35A) and nanoparticle-labeled (Figure 35B) targets from an oligonucleotide-functionalized glass surface. Measurements were made by measuring fluorescence (Figure 35A) or absorbance (Figure 35B) of dissociated label in the solution above the glass surface. The lines labeled "b" show the dissociation curves for perfectly matched oligonucleotides on the glass, and the lines labeled "r" show curves for mismatched oligonucleotides (a one-base mismatch) on the glass. Vertical lines in the graphs illustrate the fraction of target dissociated at a given temperature (halfway between the melting temperatures T_m of each curve) for each measurement, and the expected selectivity of sequence identification for fluorophore- and nanoparticle-based gene chips. Fluorescence (Figure 35A): complement (69%)/mismatch (38%) = 1.8:1. Absorbance (Figure 35B): complement (85%)/mismatch (14%) = 6:1. The breadth of the fluorophore-labeled curves (Figure 35A) is characteristic of the dissociation of fluorophore-labeled targets from gene chips (Forman et al., in *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, Leontis et al., eds., (ACS Symposium Series 682, American Chemical Society, Washington D.C., 1998), pages 206-228).

Figures 36A-B: Images of model oligonucleotide arrays challenged with synthetic target and fluorescent-labeled (Figure 36A) or nanoparticle-labeled (Figure 36B) nanoparticle-oligonucleotide conjugate probes. C, A, T, and G represent spots (elements) on the array where a single base change has been made in the oligonucleotide attached to the substrate to give a perfect match with the target (base A) or a single base mismatch (base C, T or G in place of the perfect match with base A). The grayscale ratio for elements C:A:T:G is 9:37:9:11 for Figure 36A and 3:62:7:34 for Figure 36B.

Figure 37: Schematic diagram illustrating system for forming aggregates (A) or layers (B) of nanoparticles (a and b) linked by a linking nucleic acid (3).

Figure 38A: UV-visible spectra of alternating layers of gold nanoparticles a and b (see Figure 37) hybridized to an oligonucleotide-functionalized glass

WO 01/051665

PCT/US01/01190

microscope slide via the complementary linker 3. The spectra are for assemblies with 1 (a, $\lambda_{\max} = 524$ nm), 2 (b, $\lambda_{\max} = 529$ nm), 3 (c, $\lambda_{\max} = 532$ nm), 4 (d, $\lambda_{\max} = 534$ nm) or 5 (e, $\lambda_{\max} = 534$ nm) layers. These spectra were measured directly through the slide.

5 Figure 38B: Graph of absorbance for nanoparticle assemblies (see Figure 38A) at $\lambda_{\max}$ with increasing numbers of layers.

Figures 39A-E: Figure 39A: FE-SEM of one layer of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles cohybridized with DNA linker to an oligonucleotide-functionalized, conductive indium-tin-oxide (ITO) slide (prepared in the same way as oligonucleotide-functionalized glass slide). The visible absorbance spectrum of this slide was identical to Figure 38A, indicating that functionalization and nanoparticle coverage on ITO is similar to that on glass. The average density of counted nanoparticles from 10 such images was approximately 800 nanoparticles/ μm^2 . Figure 39B: FE-SEM image of two layers of nanoparticles on the ITO slide. The average density of counted nanoparticles from 10 such images was approximately 2800 particles/ μm^2 . Figure 39C: Absorbance at 260 nm (A_{260}) showing dissociation of a 0.5 μM solution of the oligonucleotide duplex (1 + 2 + 3; see Figure 37, A) to single strands in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution (pH 7). Figures 39D-F: Absorbance at 260 nm (A_{260}) showing dissociation of 1 layer (Figure 39D), 4 layers (Figure 39E) and 10 layers (Figure 39F) of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles from glass slides immersed in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution. Melting profiles were obtained by measuring the decreasing absorption at 520 nm (A_{520}) through the slides with increasing temperature. In each of Figures 39D-F, the insets show the first derivatives of the measured dissociation curves. FWHM of these curves were (Figure 39C inset) 13.2 °C, (Figure 39D inset) 5.6 °C, (Figure 39E inset) 3.2 °C, and (Figure 39F inset) 2.9 °C.

Figure 40: Schematic diagram illustrating system used to measure the electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA. For simplicity, only one hybridization event is drawn.

30 Figure 41: Schematic diagram illustrating a method of detecting nucleic acid using gold electrodes and gold nanoparticles.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Figure 42: Schematic diagram illustrating the structures of a cyclic disulfide 1, including the preferred compound 1, having a steroid moiety for use in linking oligonucleotides to nanoparticles. The steroid disulfide molecule was obtained by condensation of 4,5-dihydroxy-1,2-dithiane with epiandrosterone. Gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates were prepared using oligonucleotides modified with the steroid disulfide exhibit greater stability towards DTT relative to those nanoparticles-oligonucleotides that employ oligonucleotide-mercaptohexyl linkers for their preparation.

Figure 43: Schematic diagram for the synthesis and formulas for the steroid cyclic disulfide anchor group.

Figure 44: Schematic diagram illustrating cyclic disulfides of formulas 2 for use in preparing oligonucleotide-cyclic disulfide linkers as described in Example 24, and same related cyclic disulfides for use as anchor groups.

Figure 45: Schematic diagram illustrating the structures described in Example 25. Figure 45(a) illustrates the structures of 5'-monothiol-modified oligonucleotide 5, a 35-base 5'-steroid disulfide oligomer 6 and Trembler phosphoramidite 7 and 5-tri-mercaptoualkyl oligonucleotide 8.

Figure 46: Schematic diagram illustrating the chemistry of making a novel tri-thiol oligonucleotide.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

DETAILED DESCRIPTION OF THE
PRESENTLY PREFERRED EMBODIMENTS

Nanoparticles useful in the practice of the invention include metal (e.g., gold, silver, copper and platinum), semiconductor (e.g., CdSe, CdS, and CdS or CdSe coated with ZnS) and magnetic (e.g., ferromagnetite) colloidal materials. Other nanoparticles useful in the practice of the invention include ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, and GaAs. The size of the nanoparticles is preferably from about 5 nm to about 150 nm (mean diameter), more preferably from about 5 to about 50 nm, most preferably from about 10 to about 30 nm. The nanoparticles may also be rods.

Methods of making metal, semiconductor and magnetic nanoparticles are well-known in the art. See, e.g., Schmid, G. (ed.) *Clusters and Colloids* (VCH, Weinheim, 1994); Hayat, M.A. (ed.) *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991); Massart, R., *IEEE Transactions On Magnetism*, 17, 1247 (1981); Ahmadi, T.S. et al., *Science*, 272, 1924 (1996); Henglein, A. et al., *J. Phys. Chem.*, 99, 14129 (1995); Curtis, A.C., et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 1530 (1988).

Methods of making ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, and GaAs nanoparticles are also known in the art. See, e.g., Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 41 (1993); Henglein, *Top. Curr. Chem.*, 143, 113 (1988); Henglein, *Chem. Rev.*, 89, 1861 (1989); Brus, *Appl. Phys. A.*, 53, 465 (1991); Bahnemann, in *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (eds. Polizetti and Schiavello 1991), page 251; Wang and Herron, *J. Phys. Chem.*, 95, 525 (1991); Olshavsky et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9438 (1990); Ushida et al., *J. Phys. Chem.*, 95, 5382 (1992).

Suitable nanoparticles are also commercially available from, e.g., Ted Pella, Inc. (gold), Amersham Corporation (gold) and Nanoprobes, Inc. (gold).

Presently preferred for use in detecting nucleic acids are gold nanoparticles. Gold colloidal particles have high extinction coefficients for the bands that give rise to their beautiful colors. These intense colors change with particle size, concentration, interparticle distance, and extent of aggregation and shape (geometry)

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of the aggregates, making these materials particularly attractive for colorimetric assays. For instance, hybridization of oligonucleotides attached to gold nanoparticles with oligonucleotides and nucleic acids results in an immediate color change visible to the naked eye (see, e.g., the Examples).

- 5 Gold nanoparticles are also presently preferred for use in nanofabrication for the same reasons given above and because of their stability, ease of imaging by electron microscopy, and well-characterized modification with thiol functionalities (see below). Also preferred for use in nanofabrication are semiconductor nanoparticles because of their unique electronic and luminescent properties.
- 10 The nanoparticles, the oligonucleotides or both are functionalized in order to attach the oligonucleotides to the nanoparticles. Such methods are known in the art. For instance, oligonucleotides functionalized with alkanethiols at their 3'-termini or 5'-termini readily attach to gold nanoparticles. See Whitesides, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase*
- 15 *Chemistry*, Houston, TX, pages 109-121 (1995). See also, Mucic et al. *Chem. Commun.* 555-557 (1996) (describes a method of attaching 3' thiol DNA to flat gold surfaces; this method can be used to attach oligonucleotides to nanoparticles). The alkanethiol method can also be used to attach oligonucleotides to other metal, semiconductor and magnetic colloids and to the other nanoparticles listed above.
- 20 Other functional groups for attaching oligonucleotides to solid surfaces include phosphorothioate groups (see, e.g., U.S. Patent No. 5,472,881 for the binding of oligonucleotide-phosphorothioates to gold surfaces), substituted alkylsiloxanes (see, e.g. Burwell, *Chemical Technology*, 4, 370-377 (1974) and Matteucci and Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981) for binding of oligonucleotides to silica
- 25 and glass surfaces, and Grabar et al., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 for binding of aminoalkylsiloxanes and for similar binding of mercaptoalkylsiloxanes). Oligonucleotides terminated with a 5' thionucleoside or a 3' thionucleoside may also be used for attaching oligonucleotides to solid surfaces. The following references describe other methods which may be employed to attached oligonucleotides to
- 30 nanoparticles: Nuzzo et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 2358 (1987) (disulfides on gold); Allara and Nuzzo, *Langmuir*, 1, 45 (1985) (carboxylic acids on aluminum); Allara

WO 01/051665

PCT/US01/01190

and Tompkins, *J. Colloid Interface Sci.*, **49**, 410-421 (1974) (carboxylic acids on copper); Iler, *The Chemistry Of Silica*, Chapter 6, (Wiley 1979) (carboxylic acids on silica); Timmons and Zisman, *J. Phys. Chem.*, **69**, 984-990 (1965) (carboxylic acids on platinum); Soriaga and Hubbard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3937 (1982) (aromatic ring compounds on platinum); Hubbard, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 177 (1980) (sulfolanes, sulfoxides and other functionalized solvents on platinum); Hickman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7271 (1989) (isonitriles on platinum); Maoz and Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1045 (1987) (silanes on silica); Maoz and Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1034 (1987) (silanes on silica); Wasserman et al., *Langmuir*, **5**, 1074 (1989) (silanes on silica); Eltekova and Eltekov, *Langmuir*, **3**, 951 (1987) (aromatic carboxylic acids, aldehydes, alcohols and methoxy groups on titanium dioxide and silica); Lee et al., *J. Phys. Chem.*, **92**, 2597 (1988) (rigid phosphates on metals).

Oligonucleotides functionalized with a cyclic disulfide are within the scope of this invention. The cyclic disulfides preferably have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially or may be synthesized by known procedures. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used.

Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfides. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have unexpectedly been found to be remarkably stable to thiols (e.g., dithiothreitol used in polymerase chain reaction (PCR) solutions) as compared to conjugates prepared using alkanethiols or acyclic disulfides as the linker. Indeed, the oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention have been found to be 300 times more stable. This unexpected stability is likely due to the fact that each oligonucleotide is anchored to a nanoparticle through two sulfur atoms, rather than a single sulfur atom. In particular, it is thought that two adjacent sulfur atoms of a cyclic disulfide would have a chelation effect which would be advantageous in stabilizing the oligonucleotide-nanoparticle conjugates. The large hydrophobic steroid residues of the linkers also appear to contribute to the stability of

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the conjugates by screening the nanoparticles from the approach of water-soluble molecules to the surfaces of the nanoparticles.

In view of the foregoing, the two sulfur atoms of the cyclic disulfide should preferably be close enough together so that both of the sulfur atoms can attach simultaneously to the nanoparticle. Most preferably, the two sulfur atoms are adjacent each other. Also, the hydrocarbon moiety should be large so as to present a large hydrophobic surface screening the surfaces of the nanoparticles.

The oligonucleotide-cyclic nanoparticle conjugates that employ cyclic disulfide linkers may be used as probes in diagnostic assays for detecting nucleic acids or in methods of nanofabrication as described herein. These conjugates according to the present invention have unexpectedly been found to improve the sensitivity of diagnostic assays in which they are used. In particular, assays employing oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have been found to be about 10 times more sensitive than assays employing conjugates prepared using alkanethiols or acyclic disulfides as the linker.

The surprising stability of the resulting oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention to thiols described above allows them to be used directly in PCR solutions. Thus, oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention added as probes to a DNA target to be amplified by PCR can be carried through the 30 or 40 heating-cooling cycles of the PCR and are still able to detect the amplicons without opening the tubes. Opening the sample tubes for addition of probes after PCR can cause serious problems through contamination of the equipment to be used for subsequent tests.

Finally, the invention provides kits comprising a container holding a type of oligonucleotide-cyclic disulfide linkers of the invention or a container holding a type of oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention. The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acids or for nanofabrication.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Each nanoparticle will have a plurality of oligonucleotides attached to it. As a result, each nanoparticle-oligonucleotide conjugate can bind to a plurality of oligonucleotides or nucleic acids having the complementary sequence.

Oligonucleotides of defined sequences are used for a variety of purposes in the practice of the invention. Methods of making oligonucleotides of a predetermined sequence are well-known. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and F. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991). Solid-phase synthesis methods are preferred for both oligoribonucleotides and oligodeoxyribonucleotides (the well-known methods of synthesizing DNA are also useful for synthesizing RNA). Oligoribonucleotides and oligodeoxyribonucleotides can also be prepared enzymatically.

The invention provides methods of detecting nucleic acids. Any type of nucleic acid may be detected, and the methods may be used, e.g., for the diagnosis of disease and in sequencing of nucleic acids. Examples of nucleic acids that can be detected by the methods of the invention include genes (e.g., a gene associated with a particular disease), viral RNA and DNA, bacterial DNA, fungal DNA, cDNA, mRNA, RNA and DNA fragments, oligonucleotides, synthetic oligonucleotides, modified oligonucleotides, single-stranded and double-stranded nucleic acids, natural and synthetic nucleic acids, etc. Thus, examples of the uses of the methods of detecting nucleic acids include: the diagnosis and/or monitoring of viral diseases (e.g., human immunodeficiency virus, hepatitis viruses, herpes viruses, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus), bacterial diseases (e.g., tuberculosis, Lyme disease, *H. pylori*, *Escherichia coli* infections, *Legionella* infections, *Mycoplasma* infections, *Salmonella* infections), sexually transmitted diseases (e.g., gonorrhea), inherited disorders (e.g., cystic fibrosis, Duchenne muscular dystrophy, phenylketonuria, sickle cell anemia), and cancers (e.g., genes associated with the development of cancer); in forensics; in DNA sequencing; for paternity testing; for cell line authentication; for monitoring gene therapy; and for many other purposes.

The methods of detecting nucleic acids based on observing a color change with the naked eye are cheap, fast, simple, robust (the reagents are stable), do not

WO 01/051665

PCT/US01/01190

require specialized or expensive equipment, and little or no instrumentation is required. This makes them particularly suitable for use in, *e.g.*, research and analytical laboratories in DNA sequencing, in the field to detect the presence of specific pathogens, in the doctor's office for quick identification of an infection to assist in prescribing a drug for treatment, and in homes and health centers for inexpensive first-line screening.

The nucleic acid to be detected may be isolated by known methods, or may be detected directly in cells, tissue samples, biological fluids (*e.g.*, saliva, urine, blood, serum), solutions containing PCR components, solutions containing large excesses of oligonucleotides or high molecular weight DNA, and other samples, as also known in the art. See, *e.g.*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995). Methods of preparing nucleic acids for detection with hybridizing probes are well known in the art. See, *e.g.*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995).

If a nucleic acid is present in small amounts, it may be applied by methods known in the art. See, *e.g.*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, New York, 1995). Preferred is polymerase chain reaction (PCR) amplification.

One method according to the invention for detecting nucleic acid comprises contacting a nucleic acid with one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The nucleic acid to be detected has at least two portions. The lengths of these portions and the distance(s), if any, between them are chosen so that when the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize to the nucleic acid, a detectable change occurs. These lengths and distances can be determined empirically and will depend on the type of particle used and its size and the type of electrolyte which will be present in solutions used in the assay (as is known in the art, certain electrolytes affect the conformation of nucleic acids).

Also, when a nucleic acid is to be detected in the presence of other nucleic acids, the portions of the nucleic acid to which the oligonucleotides on the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticles are to bind must be chosen so that they contain sufficient unique sequence so that detection of the nucleic acid will be specific. Guidelines for doing so are well known in the art.

Although nucleic acids may contain repeating sequences close enough to each other so that only one type of oligonucleotide-nanoparticle conjugate need be used, this will be a rare occurrence. In general, the chosen portions of the nucleic acid will have different sequences and will be contacted with nanoparticles carrying two or more different oligonucleotides, preferably attached to different nanoparticles. An example of a system for the detection of nucleic acid is illustrated in Figure 2. As can be seen, a first oligonucleotide attached to a first nanoparticle has a sequence complementary to a first portion of the target sequence in the single-stranded DNA. A second oligonucleotide attached to a second nanoparticle has a sequence complementary to a second portion of the target sequence in the DNA. Additional portions of the DNA could be targeted with corresponding nanoparticles. See Figure 17. Targeting several portions of a nucleic acid increases the magnitude of the detectable change.

The contacting of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid takes place under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the target sequence(s) of the nucleic acid. These hybridization conditions are well known in the art and can readily be optimized for the particular system employed. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989). Preferably stringent hybridization conditions are employed.

Faster hybridization can be obtained by freezing and thawing a solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The solution may be frozen in any convenient manner, such as placing it in a dry ice-alcohol bath for a sufficient time for the solution to freeze (generally about 1 minute for 100 μ l. of solution). The solution must be thawed at a temperature below the thermal denaturation temperature, which can conveniently be room temperature for most combinations of nanoparticle-oligonucleotide conjugates and

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nucleic acids. The hybridization is complete, and the detectable change may be observed, after thawing the solution.

The rate of hybridization can also be increased by warming the solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates to a temperature below the dissociation temperature (T_m) for the complex formed between the oligonucleotides on the nanoparticles and the target nucleic acid. Alternatively, rapid hybridization can be achieved by heating above the dissociation temperature (T_m) and allowing the solution to cool.

The rate of hybridization can also be increased by increasing the salt concentration (e.g., from 0.1 M to 0.3 M NaCl).

The detectable change that occurs upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid may be a color change, the formation of aggregates of the nanoparticles, or the precipitation of the aggregated nanoparticles. The color changes can be observed with the naked eye or spectroscopically. The formation of aggregates of the nanoparticles can be observed by electron microscopy or by nephelometry. The precipitation of the aggregated nanoparticles can be observed with the naked eye or microscopically. Preferred are changes observable with the naked eye. Particularly preferred is a color change observable with the naked eye.

The observation of a color change with the naked eye can be made more readily against a background of a contrasting color. For instance, when gold nanoparticles are used, the observation of a color change is facilitated by spotting a sample of the hybridization solution on a solid white surface (such as silica or alumina TLC plates, filter paper, cellulose nitrate membranes, and nylon membranes, preferably a C-18 silica TLC plate) and allowing the spot to dry. Initially, the spot retains the color of the hybridization solution (which ranges from pink/red, in the absence of hybridization, to purplish-red/purple, if there has been hybridization). On drying at room temperature or 80°C (temperature is not critical), a blue spot develops if the nanoparticle-oligonucleotide conjugates had been linked by hybridization with the target nucleic acid prior to spotting. In the absence of hybridization (e.g., because no target nucleic acid is present), the spot is pink. The blue and the pink spots are

WO 01/051665

PCT/US01/01190

stable and do not change on subsequent cooling or heating or over time. They provide a convenient permanent record of the test. No other steps (such as a separation of hybridized and unhybridized nanoparticle-oligonucleotide conjugates) are necessary to observe the color change.

5 An alternate method for easily visualizing the assay results is to spot a sample of nanoparticle probes hybridized to a target nucleic acid on a glass fiber filter (e.g., Horosilicate Microfiber Filter, 0.7 micron pore size, grade FG75, for use with gold nanoparticles 13 nm in size), while drawing the liquid through the filter. Subsequent
10 rinsing with water washes the excess, non-hybridized probes through the filter, leaving behind an observable spot comprising the aggregates generated by hybridization of the nanoparticle probes with the target nucleic acid (retained because these aggregates are larger than the pores of the filter). This technique may provide for greater sensitivity, since an excess of nanoparticle probes can be used. Unfortunately, the nanoparticle probes stick to many other solid surfaces that have
15 been tried (silica slides, reverse-phase plates, and nylon, nitrocellulose, cellulose and other membranes), and these surfaces cannot be used.

An important aspect of the detection system illustrated in Figure 2 is that obtaining a detectable change depends on cooperative hybridization of two different oligonucleotides to a given target sequence in the nucleic acid. Mismatches in either
20 of the two oligonucleotides will destabilize the interparticle connection. It is well known that a mismatch in base pairing has a much greater destabilizing effect on the binding of a short oligonucleotide probe than on the binding of a long oligonucleotide probe. The advantage of the system illustrated in Figure 2 is that it utilizes the base discrimination associated with a long target sequence and probe (eighteen base-pairs in the example illustrated in Figure 2), yet has the sensitivity characteristic of a short
25 oligonucleotide probe (nine base-pairs in the example illustrated in Figure 2).

The target sequence of the nucleic acid may be contiguous, as in Figure 2, or the two portions of the target sequence may be separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles, as illustrated in
30 Figure 3. In the latter case, one has the option of using a filler oligonucleotide which is free in solution and which has a sequence complementary to that of this third

WO 01/051665

PCT/US01/01190

portion (see Figure 3). When the filler oligonucleotide hybridizes with the third portion of the nucleic acid, a double-stranded segment is created, thereby altering the average distance between the nanoparticles and, consequently, the color. The system illustrated in Figure 3 may increase the sensitivity of the detection method.

5 Some embodiments of the method of detecting nucleic acid utilize a substrate. By employing a substrate, the detectable change (the signal) can be amplified and the sensitivity of the assay increased.

Any substrate can be used which allows observation of the detectable change. Suitable substrates include transparent solid surfaces (e.g., glass, quartz, plastics and
10 other polymers), opaque solid surface (e.g., white solid surfaces, such as TFC silica plates, filter paper, glass fiber filters, cellulose nitrate membranes, nylon membranes), and conducting solid surfaces (e.g., indium-tin-oxide (ITO)). The substrate can be any shape or thickness, but generally will be flat and thin. Preferred are transparent substrates such as glass (e.g., glass slides) or plastics (e.g., wells of microtiter plates).

15 In one embodiment, oligonucleotides are attached to the substrate. The oligonucleotides can be attached to the substrates as described in, e.g., Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996); Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996); Mucic et al., *Chem. Commun.*, **555** (1996); Zimmermann and Cox, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 492 (1994); Bottomley et al., *J. Vac. Sci. Technol. A*, **10**, 591
20 (1992), and Hegner et al., *FEBS Lett.*, **336**, 452 (1993).

The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic
25 acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and
30 the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the first

WO 01/051665

PCT/US01/01190

type of nanoparticles become bound to the substrate. After the nanoparticle-oligonucleotide conjugates are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid.

The oligonucleotides on the first type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides are attached to different nanoparticles. Figure 17 illustrates the use of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to multiple portions of a nucleic acid. Alternatively, the oligonucleotides on each of the first type of nanoparticles may have a plurality of different sequences, at least one of which must hybridize with a portion of the nucleic acid to be detected (see Figure 25B).

Finally, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to at least a portion of the sequence(s) of the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles with those on the second type of nanoparticles. After the nanoparticles are bound, the substrate is preferably washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, instead of using first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing oligonucleotides that would serve to bind the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13A. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye using ambient light, preferably viewing the substrate against a white background. As can be readily seen from Figure 13A, this method provides a means of amplifying a detectable change.

Another example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 25B. As in the example illustrated in Figure 13A, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA which can be observed with the naked eye.

In another embodiment, nanoparticles are attached to the substrate. Nanoparticles can be attached to substrates as described in, e.g., Grabar et al., *Analyt. Chem.*, 67, 73-743 (1995); Bothell et al., *J. Electroanal. Chem.*, 409, 137 (1996); Bar et al., *Langmuir*, 12, 1172 (1996); Colvin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5221 (1992).

After the nanoparticles are attached to the substrate, oligonucleotides are attached to the nanoparticles. This may be accomplished in the same manner

WO 01/051665

PCT/US01/01190

described above for the attachment of oligonucleotides to nanoparticles in solution.

The oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid.

5 The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate prior to adding further nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

10 Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid. In this manner, the
15 second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates becomes bound to the substrate. After the nanoparticles are bound, any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid are washed from the substrate. A change (e.g., color change) may be detectable at this point.

20 The oligonucleotides on the second type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides may be attached to different nanoparticles. See Figure 17.

25 Next, a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the
30 oligonucleotides on the nanoparticles. In this manner, the binding oligonucleotide

WO 01/051665

PCT/US01/01190

becomes bound to the substrate. After the binding oligonucleotides are bound, unbound binding oligonucleotides are washed from the substrate.

Finally, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. After the nanoparticles are bound, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the second type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the third type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates (through the binding oligonucleotide). Also, the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. The amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the binding oligonucleotides and second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, the use of the binding oligonucleotide can be eliminated, and the second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be designed so that they hybridize directly to each other.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization

WO 01/051665

PCT/US01/01190

conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13B. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye as described above. As can be seen from Figure 13B, this embodiment of the method of the invention provides another means of amplifying the detectable change.

Another amplification scheme employs liposomes. In this scheme, oligonucleotides are attached to a substrate. Suitable substrates are those described above, and the oligonucleotides can be attached to the substrates as described above. For instance, where the substrate is glass, this can be accomplished by condensing the oligonucleotides through phosphoryl or carboxylic acid groups to aminoalkyl groups on the substrate surface (for related chemistry see Grabar et al., *Anal. Chem.*, **67**, 735-743 (1995)).

The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding additional components of the system.

Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. In this manner the liposomes become bound to the substrate. After the liposomes are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound liposomes and nucleic acid.

The oligonucleotides on the liposomes may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each

WO 01/051665

PCT/US01/01190

liposome may have all of the different oligonucleotides attached to it or the different oligonucleotides may be attached to different liposomes.

To prepare oligonucleotide-liposome conjugates, the oligonucleotides are linked to a hydrophobic group, such as cholesterol (see Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7535-7536 (1993)), and the hydrophobic-oligonucleotide conjugates are mixed with a solution of liposomes to form liposomes with hydrophobic-oligonucleotide conjugates anchored in the membrane (see Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6243-6246 (1996)). The loading of hydrophobic-oligonucleotide conjugates on the surface of the liposomes can be controlled by controlling the ratio of hydrophobic-oligonucleotide conjugates to liposomes in the mixture. It has been observed that liposomes bearing oligonucleotides attached by hydrophobic interaction of pendant cholesterol groups are effective in targeting polynucleotides immobilized on a nitrocellulose membrane (*id.*). Fluorescein groups anchored in the membrane of the liposome were used as the reporter group. They served effectively, but sensitivity was limited by the fact that the signal from fluorescein in regions of high local concentration (e.g., on the liposome surface) is weakened by self quenching.

The liposomes are made by methods well known in the art. See Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6243 (1996). The liposomes will generally be about 5-50 times larger in size (diameter) than the nanoparticles used in subsequent steps. For instance, for nanoparticles about 13 nm in diameter, liposomes about 100 nm in diameter are preferably used.

The liposomes bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point.

The method may further comprise contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WO 01/051665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. This hybridization will generally be performed at mild temperatures (e.g., 5°C to 60°C), so conditions (e.g., 0.3-1.0 M NaCl) conducive to hybridization at room temperature are employed. Following hybridization, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the liposomes has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the liposomes can hybridize to a plurality of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Similarly, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the liposomes may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in the intensity of the signal.

Also, instead of using second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing oligonucleotides that would serve to bring the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. A mixture of oligonucleotides functionalized at one end for binding to the nanoparticles and with or without a hydrophobic group at the other end can be used on the first type of nanoparticles. The relative ratio of these oligonucleotides bound to the average nanoparticle will be controlled by the ratio of the concentrations of the two oligonucleotides in the mixture. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 18. The hybridization of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the liposomes may produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a pink/red color may be observed or a purple/blue color may be observed if the nanoparticles are close enough together. The hybridization of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates will produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a purple/blue color will be observed. All of these color changes may be observed with the naked eye.

In yet other embodiments utilizing a substrate, an "aggregate probe" can be used. The aggregate probe can be prepared by allowing two types of nanoparticles having complementary oligonucleotides (a and a') attached to them to hybridize to form a core (illustrated in Figure 28A). Since each type of nanoparticle has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles. Thus, the core is an aggregate containing numerous nanoparticles of both types. The core is then capped with a third type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides has sequence a or a' so that the third type of nanoparticles will hybridize to nanoparticles on the exterior of the core. The aggregate probe can also be prepared by utilizing two types of nanoparticles (see Figure 28B). Each type of nanoparticles has at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides present

WO 01/051665

PCT/US01/01190

on each of the two types of nanoparticles has sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of the nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles has a sequence a which is complementary to the sequence a' of the second type of oligonucleotides on the
 5 second type of nanoparticles (see Figure 28B) so that the two types of nanoparticles hybridize to each other to form the aggregate probe. Since each type of nanoparticles has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles to form an aggregate containing numerous nanoparticles of both types.

10 The aggregate probe can be utilized to detect nucleic acid in any of the above assay formats performed on a substrate, eliminating the need to build up layers of individual nanoparticles in order to obtain or enhance a detectable change. To even further enhance the detectable change, layers of aggregate probes can be built up by using two types of aggregate probes, the first type of aggregate probe having
 15 oligonucleotides attached to it that are complementary to oligonucleotides on the other type of aggregate probe. In particular, when the aggregate probe is prepared as illustrated in Figure 28B, the aggregate probes can hybridize to each other to form the multiple layers. Some of the possible assay formats utilizing aggregate probes are illustrated in Figures 28C-D. For instance, a type of oligonucleotides comprising
 20 sequence c is attached to a substrate (see Figure 28C). Sequence c is complementary to the sequence c' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is added and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate, after which the aggregate probe is added and allowed to hybridize to the portion of the target nucleic acid having sequence b', thereby producing a detectable
 25 change. Alternatively, the target nucleic acid can first be hybridized to the aggregate probe in solution and subsequently hybridized to the oligonucleotides on the substrate, or the target nucleic acid can simultaneously be hybridized to the aggregate probe and the oligonucleotides on the substrate. In another embodiment, the target nucleic acid is allowed to react with the aggregate probe and another type of nanoparticles in
 30 solution (see Figure 28D). Some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence c so that they hybridize to sequence c' of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

target nucleic acid and some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence d so that they can subsequently hybridize to oligonucleotides comprising sequence d' which are attached to the substrate.

The core itself can also be used as a probe to detect nucleic acids. One possible assay format is illustrated in Figure 28E. As illustrated there, a type of oligonucleotides comprising sequence b is attached to a substrate. Sequence b is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is contacted with the substrate and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate. Then, another type of nanoparticles is added. Some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles comprise sequence c so which is complementary to sequence c' of the target nucleic acid so that the nanoparticles hybridize to the target nucleic acid bound to the substrate. Some of the oligonucleotides attached to the additional type of nanoparticles comprise sequences a or a' complementary to sequences a and a' on the core probe, and the core probe is added and allowed to hybridize to the oligonucleotides on the nanoparticles. Since each core probe has sequences a and a' attached to the nanoparticles which comprise the core, the core probes can hybridize to each other to form multiple layers attached to the substrate, providing a greatly enhanced detectable change. In alternative embodiments, the target nucleic acid could be contacted with the additional type of nanoparticles in solution prior to being contacted with the substrate, or the target nucleic acid, the nanoparticles and the substrate could all be contacted simultaneously. In yet another alternative embodiment, the additional type of nanoparticles could be replaced by a linking oligonucleotide comprising both sequences c and a or a'.

When a substrate is employed, a plurality of the initial types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates or oligonucleotides can be attached to the substrate in an array for detecting multiple portions of a target nucleic acid, for detecting multiple different nucleic acids, or both. For instance, a substrate may be provided with rows of spots, each spot containing a different type of oligonucleotide or oligonucleotide-nanoparticle conjugate designed to bind to a portion of a target nucleic acid. A sample containing one or more nucleic acids is applied to each spot, and the rest of

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the assay is performed in one of the ways described above using appropriate oligonucleotide-nanoparticle conjugates, oligonucleotide-liposome conjugates, aggregate probes, core probes, and binding oligonucleotides.

Finally, when a substrate is employed, a detectable change can be produced or
 5 further enhanced by silver staining. Silver staining can be employed with any type of nanoparticles that catalyze the reduction of silver. Preferred are nanoparticles made of noble metals (e.g., gold and silver). See Bassell, et al., *J. Cell Biol.*, 126, 863-876 (1994); Braun-Howland et al., *Biotechniques*, 13, 928-931 (1992). If the nanoparticles being employed for the detection of a nucleic acid do not catalyze the
 10 reduction of silver, then silver ions can be complexed to the nucleic acid to catalyze the reduction. See Braun et al., *Nature*, 391, 775 (1993). Also, silver stains are known which can react with the phosphate groups on nucleic acids.

Silver staining can be used to produce or enhance a detectable change in any assay performed on a substrate, including those described above. In particular, silver
 15 staining has been found to provide a huge increase in sensitivity for assays employing a single type of nanoparticle, such as the one illustrated in Figure 25A, so that the use of layers of nanoparticles, aggregate probes and core probes can often be eliminated.

In assays for detecting nucleic acids performed on a substrate, the detectable change can be observed with an optical scanner. Suitable scanners include those used
 20 to scan documents into a computer which are capable of operating in the reflective mode (e.g., a flatbed scanner), other devices capable of performing this function or which utilize the same type of optics, any type of grayscale-sensitive measurement device, and standard scanners which have been modified to scan substrates according to the invention (e.g., a flatbed scanner modified to include a holder for the substrate)
 25 (to date, it has not been found possible to use scanners operating in the transmissive mode). The resolution of the scanner must be sufficient so that the reaction area on the substrate is larger than a single pixel of the scanner. The scanner can be used with any substrate, provided that the detectable change produced by the assay can be observed against the substrate (e.g., a grey spot, such as that produced by silver
 30 staining, can be observed against a white background, but cannot be observed against a grey background). The scanner can be a black-and-white scanner or, preferably, a

WO 01/051665

PCT/US01/01190

color scanner. Most preferably, the scanner is a standard color scanner of the type used to scan documents into computers. Such scanners are inexpensive and readily available commercially. For instance, an Epson Expression 636 (600 x 600 dpi), a UMAX Astra 1200 (300 x 300 dpi), or a Microtec 1600 (1600 x 1600 dpi) can be used. The scanner is linked to a computer loaded with software for processing the images obtained by scanning the substrate. The software can be standard software which is readily available commercially, such as Adobe Photoshop 5.2 and Corel Photopaint 8.0. Using the software to calculate greyscale measurements provides a means of quantitating the results of the assays. The software can also provide a color number for colored spots and can generate images (e.g., printouts) of the scans which can be reviewed to provide a qualitative determination of the presence of a nucleic acid, the quantity of a nucleic acid, or both. In addition, it has been found that the sensitivity of assays such as that described in Example 5 can be increased by subtracting the color that represents a negative result (red in Example 5) from the color that represents a positive result (blue in Example 5). The computer can be a standard personal computer which is readily available commercially. Thus, the use of a standard scanner linked to a standard computer loaded with standard software can provide a convenient, easy, inexpensive means of detecting and quantitating nucleic acids when the assays are performed on substrates. The scans can also be stored in the computer to maintain a record of the results for further reference or use. Of course, more sophisticated instruments and software can be used, if desired.

A nanoparticle-oligonucleotide conjugate which may be used in an assay for any nucleic acid is illustrated in Figures 17D-E. This "universal probe" has oligonucleotides of a single sequence attached to it. These oligonucleotides can hybridize with a binding oligonucleotide which has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The second portion is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. A plurality of binding oligonucleotides having the same first portion and different second portions can be used, in which case the "universal probe", after hybridization to the binding

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides, can bind to multiple portions of the nucleic acid to be detected or to different nucleic acid targets.

In a number of other embodiments of the invention, the detectable change is created by labeling the oligonucleotides, the nanoparticles, or both with molecules (e.g., fluorescent molecules and dyes) that produce detectable changes upon hybridization of the oligonucleotides or the nanoparticles with the target nucleic acid. For instance, oligonucleotides attached to metal and semiconductor nanoparticles can have a fluorescent molecule attached to the end not attached to the nanoparticles. Metal and semiconductor nanoparticles are known fluorescence quenchers, with the magnitude of the quenching effect depending on the distance between the nanoparticles and the fluorescent molecule. In the unhybridized state, the oligonucleotides attached to the nanoparticles interact with the nanoparticles, so that significant quenching will be observed. See Figure 20A. Upon hybridization to a target nucleic acid, the fluorescent molecule will become spaced away from the nanoparticles, diminishing quenching of the fluorescence. See Figure 20A. Longer oligonucleotides should give rise to larger changes in fluorescence, at least until the fluorescent groups are moved far enough away from the nanoparticle surfaces so that an increase in the change is no longer observed. Useful lengths of the oligonucleotides can be determined empirically. Metallic and semiconductor nanoparticles having fluorescent-labeled oligonucleotides attached thereto can be used in any of the assay formats described above, including those performed in solution or on substrates.

Methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules and measuring fluorescence are well known in the art. Suitable fluorescent molecules are also well known in the art and include the fluoresceins, rhodamines and Texas Red. The oligonucleotides will be attached to the nanoparticles as described above.

In yet another embodiment, two types of fluorescent-labeled oligonucleotides attached to two different particles can be used. Suitable particles include polymeric particles (such as polystyrene particles, polyvinyl particles, acrylate and methacrylate particles), glass particles, latex particles, Sepharose beads and others like particles well known in the art. Methods of attaching oligonucleotides to such particles are well known in the art. See Chrissey et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039

WO 01/051665

PCT/US01/01190

(1996) (glass) and Charreyre et al., *Langmuir*, **13**, 3103-3110 (1997), Fahy et al., *Nucleic Acids Research*, **21**, 1819-1826 (1993), Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **202**, 251-260 (1998), Kolarova et al., *Biotechniques*, **20**, 196-198 (1996) and Wolf et al., *Nucleic Acids Research*, **15**, 2911-2926 (1987) (polymer/latex). In particular, a wide variety of functional groups are available on the particles or can be incorporated into such particles. Functional groups include carboxylic acids, aldehydes, amino groups, cyano groups, ethylene groups, hydroxyl groups, mercapto groups, and the like. Nanoparticles, including metallic and semiconductor nanoparticles, can also be used.

10 The two fluorophores are designated **d** and **a** for donor and acceptor. A variety of fluorescent molecules useful in such combinations are well known in the art and are available from, e.g., Molecular Probes. An attractive combination is fluorescein as the donor and Texas Red as acceptor. The two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with **d** and **a** attached are mixed with the target nucleic acid, and fluorescence measured in a fluorimeter. The mixture will be excited with light of the wavelength that excites **d**, and the mixture will be monitored for fluorescence from **a**. Upon hybridization, **d** and **a** will be brought in proximity (see Figure 20B). In the case of non-metallic, non-semiconductor particles, hybridization will be shown by a shift in fluorescence from that for **d** to that for **a** or by the appearance of fluorescence for **a** in addition to that for **d**. In the absence of hybridization, the fluorophores will be too far apart for energy transfer to be significant, and only the fluorescence of **d** will be observed. In the case of metallic and semiconductor nanoparticles, lack of hybridization will be shown by a lack of fluorescence due to **d** or **a** because of quenching (see above). Hybridization will be shown by an increase in fluorescence due to **a**.

25 As will be appreciated, the above described particles and nanoparticles having oligonucleotides labeled with acceptor and donor fluorescent molecules attached can be used in the assay formats described above, including those performed in solution and on substrates. For solution formats, the oligonucleotide sequences are preferably chosen so that they bind to the target nucleic acid as illustrated in Figures 15A-G. In the formats shown in Figure 13A-B and 18, the binding oligonucleotides may be used

WO 01/051665

PCT/US01/01190

to bring the acceptor and donor fluorescent molecules on the two nanoparticles in proximity. Also, in the format illustrated in Figure 13A, the oligonucleotides attached to the substrate may be labeled with d. Further, other labels besides fluorescent molecules can be used, such as chemiluminescent molecules, which will give a detectable signal or a change in detectable signal upon hybridization.

Another embodiment of the detection method of the invention is a very sensitive system that utilizes detection of changes in fluorescence and color (illustrated in Figure 21). This system employs latex microspheres to which are attached oligonucleotides labeled with a fluorescent molecule and gold nanoparticles to which are attached oligonucleotides. The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared as described above. Methods of attaching oligonucleotides to latex microspheres are well known (see, e.g., Charreyre et al., *Langmuir*, 13:3103-3110 (1997); Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 202:251-260 (1998)), as are methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules (see above). The oligonucleotides on the latex microspheres and the oligonucleotides on the gold nanoparticles have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the latex microspheres and gold nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 21). Due to the quenching properties of the gold nanoparticles, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the latex microspheres is quenched while part of this network. Indeed, one gold nanoparticle can quench many fluorophore molecules since gold nanoparticles have very large absorption coefficients. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two particles can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 21). The microporous material should be transparent or a color (e.g., white) which allows for detection of the pink/red color of the gold nanoparticles. The microporous material should also have a pore size sufficiently large to allow the gold nanoparticles to pass through the pores and

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sufficiently small to retain the latex microspheres on the surface of the microporous material when the microporous material is washed. Thus, when using such a microporous material, the size (diameter) of the latex microspheres must be larger than the size (diameter) of the gold nanoparticles. The microporous material must also be inert to biological media. Many suitable microporous materials are known in the art and include various filters and membranes, such as modified polyvinylidene fluoride (PVDF, such as Durapore™ membrane filters purchased from Millipore Corp.) and pure cellulose acetate (such as AcetatePlus™ membrane filters purchased from Micron Separations Inc.). Such a microporous material retains the network composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a red/pink color (due to the presence of the gold nanoparticles) and a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the gold nanoparticles) (see Figure 21). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by a white color and fluorescence, because the gold nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur), and the white latex microspheres would be trapped on top of it (see Figure 21). In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence and color can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the dehybridization temperature has been reached. Therefore, by looking at color or fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. As noted above, this detection method exhibits high sensitivity. As little as 3 femtomoles of single-stranded target nucleic acid 24 bases in length and 20 femtomoles of double-stranded target nucleic acid 24 bases in length have been detected with the naked eye. The method is also very simple to use. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorescent and colorimetric signals can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorimeter can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short pathlength.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

The above embodiment has been described with particular reference to latex microspheres and gold nanoparticles. Any other microsphere or nanoparticle, having the other properties described above and to which oligonucleotides can be attached, can be used in place of these particles. Many suitable particles and nanoparticles are described above, along with techniques for attaching oligonucleotides to them. In addition, microspheres and nanoparticles having other measurable properties may be used. For instance, polymer-modified particles and nanoparticles, where the polymer can be modified to have any desirable property, such as fluorescence, color, or electrochemical activity, can be used. See, Watson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 462-463 (1999) (polymer-modified gold nanoparticles). Also, magnetic, polymer-coated magnetic, and semiconducting particles can be used. See Chan et al., *Science*, **281**, 2016 (1998); Bruchez et al., *Science*, **281**, 2013 (1998); Kolarova et al., *Biotechniques*, **20**, 196-198 (1996).

In yet another embodiment, two probes comprising metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides labeled with fluorescent molecules attached to them are employed (illustrated in Figure 22). The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared and labeled with fluorescent molecules as described above. The oligonucleotides on the two types of oligonucleotide-nanoparticle conjugates have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 22). Due to the quenching properties of the metallic or semiconductor nanoparticles, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles is quenched while part of this network. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two probes can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 22). The microporous material should have a pore size sufficiently large to allow the nanoparticles to pass through the pores and sufficiently small to retain the network on the surface of the microporous material

WO 01/051665

PCT/US01/01190

when the microporous material is washed (see Figure 22). Many suitable microporous materials are known in the art and include those described above. Such a microporous material retains the network composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the metallic or semiconductor nanoparticles) (see Figure 22). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by fluorescence because the nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur) (see Figure 22). There is low background fluorescence because unbound probes are washed away from the detection area. In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the dehybridization temperature has been reached. Therefore, by looking at fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorescent signal can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorimeter can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short path length.

In yet other embodiments, a "satellite probe" is used (see Figure 24). The satellite probe comprises a central particle with one or several physical properties that can be exploited for detection in an assay for nucleic acids (*e.g.*, intense color, fluorescence quenching ability, magnetism). Suitable particles include the nanoparticles and other particles described above. The particle has oligonucleotides (all having the same sequence) attached to it (see Figure 24). Methods of attaching oligonucleotides to the particles are described above. These oligonucleotides comprise at least a first portion and a second portion, both of which are complementary to portions of the sequence of a target nucleic acid (see Figure 24). The satellite probe also comprises probe oligonucleotides. Each probe oligonucleotide has at least a first portion and a second portion (see Figure 24). The

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sequence of the first portion of the probe oligonucleotides is complementary to the first portion of the sequence of the oligonucleotides immobilized on the central particle (see Figure 24). Consequently, when the central particle and the probe oligonucleotides are brought into contact, the oligonucleotides on the particle hybridize with the probe oligonucleotides to form the satellite probe (see Figure 24). Both the first and second portions of the probe oligonucleotides are complementary to portions of the sequence of the target nucleic acid (see Figure 24). Each probe oligonucleotide is labeled with a reporter molecule (see Figure 24), as further described below. The amount of hybridization overlap between the probe oligonucleotides and the target (length of the portion hybridized) is as large as, or greater than, the hybridization overlap between the probe oligonucleotides and the oligonucleotides attached to the particle (see Figure 24). Therefore, temperature cycling resulting in dehybridization and rehybridization would favor moving the probe oligonucleotides from the central particle to the target. Then, the particles are separated from the probe oligonucleotides hybridized to the target, and the reporter molecule is detected.

The satellite probe can be used in a variety of detection strategies. For example, if the central particle has a magnetic core and is covered with a material capable of quenching the fluorescence of fluorophores attached to the probe oligonucleotides that surround it, this system can be used in an *in situ* fluorometric detection scheme for nucleic acids. Functionalized polymer-coated magnetic particles (Fe_3O_4) are available from several commercial sources including Dynal (DynabeadsTM) and Bangs Laboratories (EstaporTM), and silica-coated magnetic Fe_3O_4 nanoparticles could be modified (Liu et al., *Chem. Mater.*, 10, 3936-3940 (1998)) using well-developed silica surface chemistry (Chrissey et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039 (1996)) and employed as magnetic probes as well. Further, the dye molecule, 4-((4-(dimethylamino)phenyl)-azo)benzoic acid (DABCYL) has been shown to be an efficient quencher of fluorescence for a wide variety of fluorophores attached to oligonucleotides (Tyagi et al., *Nature Biotech.*, 16, 49-53 (1998)). The commercially-available succinimidyl ester of DABCYL (Molecular Probes) forms extremely stable amide bonds upon reaction with primary alkylamino

WO 01/051665

PCT/US01/01190

groups. Thus, any magnetic particle or polymer-coated magnetic particle with primary alkyl amino groups could be modified with both oligonucleotides, as well as these quencher molecules. Alternatively, the DABCYL quencher could be attached directly to the surface-bound oligonucleotide, instead of the alkyl amino-modified surface. The satellite probe comprising the probe oligonucleotides is brought into contact with the target. The temperature is cycled so as to cause dehybridization and rehybridization, which causes the probe oligonucleotides to move from the central particle to the target. Detection is accomplished by applying a magnetic field and removing the particles from solution and measuring the fluorescence of the probe oligonucleotides remaining in solution hybridized to the target.

This approach can be extended to a colorimetric assay by using magnetic particles with a dye coating in conjunction with probe oligonucleotides labeled with a dye which has optical properties that are distinct from the dye on the magnetic nanoparticles or perturb those of the dye on the magnetic nanoparticles. When the particles and the probe oligonucleotides are in solution together, the solution will exhibit one color which derives from a combination of the two dyes. However, in the presence of a target nucleic acid and with temperature cycling, the probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of a magnetic field will remove the magnetic, dye-coated particles from solution leaving behind probe oligonucleotides labeled with a single dye hybridized to the target. The system can be followed with a colorimeter or the naked eye, depending upon target levels and color intensities.

This approach also can be further extended to an electrochemical assay by using an oligonucleotide-magnetic particle conjugate in conjunction with a probe oligonucleotide having attached a redox-active molecule. Any modifiable redox-active species can be used, such as the well-studied redox-active ferrocene derivative. A ferrocene derivatized phosphoramidite can be attached to oligonucleotides directly using standard phosphoramidite chemistry. Mucic et al., *Chem. Commun.*, 555 (1996); Eckstein, ed., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, NY (1991). The ferrocenylphosphoramidite is prepared in a two-step synthesis from 6-bromohexylferrocene. In a typical preparation, 6-

WO 01/051665

PCT/US01/01190

bromohexylferrocene is stirred in an aqueous HMPA solution at 120°C for 6 hours to form 6-hydroxyhexylferrocene. After purification, the 6-hydroxyhexylferrocene is added to a THF solution of N,N-diisopropylethylamine and beta-cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite to form the ferrocenylphosphoramidite.

5 Oligonucleotide-modified polymer-coated gold nanoparticles, where the polymer contains electrochemically-active ferrocene molecules, could also be utilized. Watson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 462-463 (1999). A copolymer of amino reactive sites (e.g., anhydrides) could be incorporated into the polymer for reaction with amino-

10 modified oligonucleotides. Moller et al., *Bioconjugate Chem.*, **6**, 174-178 (1995). In the presence of target and with temperature cycling, the redox-active probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of the magnetic field will remove the magnetic particles from solution leaving behind the redox-active probe oligonucleotides hybridized with the target nucleic acid. The amount of target then can be determined by cyclic

15 voltammetry or any electrochemical technique that can interrogate the redox-active molecule.

In yet another embodiment of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the

20 sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The substrate must be made of a material which is not a conductor of electricity (e.g., glass, quartz, polymers, plastics). The electrodes may be made of any standard material (e.g., metals, such as gold, platinum, tin oxide). The electrodes can be fabricated by conventional microfabrication

25 techniques. See, e.g., *Introduction To Microlithography* (J.F. Thompson et al., eds., American Chemical Society, Washington, D.C. 1983). The substrate may have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Arrays of electrodes can be purchased (e.g., from AbbtchScientific,

30 Inc., Richmond, Virginia) or can be made by conventional microfabrication techniques. See, e.g., *Introduction To Microlithography* (J.F. Thompson et al., eds.,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

American Chemical Society, Washington, D.C. 1983). Suitable photomasks for making the arrays can be purchased (e.g., from Photronics, Milpitas, CA). Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles must be made of a material which can conduct electricity. Such nanoparticles include those made of metal, such as gold nanoparticles, and semiconductor materials. The nanoparticles will have one or more types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is present, the circuit between the electrodes should be closed because of the attachment of the nanoparticles to the substrate between the electrodes, and a change in conductivity will be detected. If the binding of a single type of nanoparticles does not result in closure of the circuit, this situation can be remedied by using a closer spacing between the electrodes, using larger nanoparticles, or employing another material that will close the circuit (but only if the nanoparticles have been bound to the substrate between the electrodes). For instance, when gold nanoparticles are used, the substrate can be contacted with silver stain (as described above) to deposit silver between the electrodes to close the circuit and produce the detectable change in conductivity. Another way to close the circuit in the case where the addition of a single type of nanoparticles is not sufficient, is to contact the first type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached to them that have a sequence complementary to the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting will take place under conditions effective so that the oligonucleotides on the second type of nanoparticle hybridize to those on the first type of oligonucleotides. If needed, or desired, additional layers of nanoparticles can be built up by alternately adding the first and second types of nanoparticles until a sufficient number of nanoparticles are

WO 01/051665

PCT/US01/01190

attached to the substrate to close the circuit. Another alternative to building up individual layers of nanoparticles would be the use of an aggregate probe (see above).

The invention also provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least
5 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The container may further comprise filler
10 oligonucleotides having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions. The filler oligonucleotide may also be provided in a separate container.

In a second embodiment, the kit comprises at least two containers. The first container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a
15 sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a third container holding a filler oligonucleotide having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third
20 portion being located between the first and second portions.

In another alternative embodiment, the kits can have the oligonucleotides and nanoparticles in separate containers, and the oligonucleotides would have to be attached to the nanoparticles prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized so that the
25 oligonucleotides can be attached to the nanoparticles. Alternatively, the oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

In another embodiment, the kit comprises at least one container. The container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides
30 attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a portion

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles. The nanoparticles have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kits can have the substrate, oligonucleotides and nanoparticles in separate containers. The substrate, oligonucleotides, and nanoparticles would have to be appropriately attached to each other prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The substrate, oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized to expedite this attachment. Alternatively,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the substrate, oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a cholesterol group attached to the end not attached to the nanoparticles so that the nanoparticles can attach to the liposomes by hydrophobic interactions. The kit may further comprise a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

In another embodiment, the kit may comprise a substrate having nanoparticles attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregated probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In yet another embodiment, the kit may comprise a substrate having oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first

WO 01/051665

PCT/US01/01190

container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of

5 nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit may comprise a substrate having oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides

10 attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles.

15 The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

20 In another embodiment, the kit may comprise a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion

25 of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the

30 nanoparticles.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another embodiment, kits may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of latex microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of gold nanoparticles having oligonucleotides attached

WO 01/051665

PCT/US01/01190

thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto.

- 5 The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are
- 10 labeled with a fluorescent molecule.

- In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereto oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the
- 15 oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the
- 20 nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

- In another embodiment, the kit may comprise a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are
- 25 bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

- In an additional embodiment, the kit may comprise a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe
- 30

WO 01/051665

PCT/US01/01190

are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

5 In yet another embodiment, the invention provides a kit comprising a substrate having located thereon at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between the electrodes. In a preferred embodiment, the substrate has a plurality of pairs of electrodes attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

10 The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acid. The reagents may include PCR reagents, reagents for silver staining, hybridization reagents, buffers, etc. Other items which may be provided as part of the kit include a solid surface (for visualizing hybridization) such as a TLC silica plate, microporous materials, syringes, pipettes, cuvettes, containers, and a thermocycler (for controlling hybridization and de-hybridization temperatures). Reagents for functionalizing the nucleotides or nanoparticles may also be included in the kit.

15 The precipitation of aggregated nanoparticles provides a means of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids. This separation may be used as a step in the purification of the nucleic acid. Hybridization conditions are those described above for detecting a nucleic acid. If the temperature is below the T_m (the temperature at which one-half of an oligonucleotide is bound to its complementary strand) for the binding of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid, then sufficient time is needed for the aggregate to settle. The temperature of hybridization (e.g., as measured by T_m) varies with the type of salt (NaCl or MgCl₂) and its concentration. Salt compositions and concentrations are selected to promote hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid at convenient working temperatures without inducing aggregation of the colloids in the absence of the nucleic acid.

20 The invention also provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sequence. A linking oligonucleotide used for nanofabrication may have any desired sequence and may be single-stranded or double-stranded. It may also contain chemical modifications in the base, sugar, or backbone sections. The sequences chosen for the linking oligonucleotides and their lengths and strandedness will contribute to the rigidity or flexibility of the resulting nanomaterial or nanostructure, or a portion of the nanomaterial or nanostructure. The use of a single type of linking oligonucleotide, as well as mixtures of two or more different types of linking oligonucleotides, is contemplated. The number of different linking oligonucleotides used and their lengths will contribute to the shapes, pore sizes and other structural features of the resulting nanomaterials and nanostructures.

The sequence of a linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. The first, second or more binding portions of the linking oligonucleotide may have the same or different sequences.

If all of the binding portions of a linking oligonucleotide have the same sequence, only a single type of nanoparticle with oligonucleotides having a complementary sequence attached thereto need be used to form a nanomaterial or nanostructure. If the two or more binding portions of a linking oligonucleotide have different sequences, then two or more nanoparticle-oligonucleotide conjugates must be used. *See, e.g.,* Figure 17. The oligonucleotides on each of the nanoparticles will have a sequence complementary to one of the two or more binding portions of the sequence of the linking oligonucleotide. The number, sequence(s) and length(s) of the binding portions and the distance(s), if any, between them will contribute to the structural and physical properties of the resulting nanomaterials and nanostructures. Of course, if the linking oligonucleotide comprises two or more portions, the sequences of the binding portions must be chosen so that they are not complementary to each other to avoid having one portion of the linking nucleotide bind to another portion.

The linking oligonucleotides and nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles with the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanosstructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. These hybridization conditions are well known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme (see above). Stringent hybridization conditions are preferred.

5 The invention also provides another method of nanofabrication. This method comprises providing at least two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence
10 complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterial or nanosstructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. Again, these hybridization conditions are
15 well-known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme.

 In both nanofabrication methods of the invention, the use of nanoparticles having one or more different types of oligonucleotides attached thereto is contemplated. The number of different oligonucleotides attached to a nanoparticle and the lengths and sequences of the one or more oligonucleotides will contribute to
20 the rigidity and structural features of the resulting nanomaterials and nanosstructures.

 Also, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles will contribute to the properties of the resulting nanomaterials and nanosstructures. These properties include optical properties, optoelectronic properties, electrochemical properties, electronic properties, stability in various solutions, pore and channel size
25 variation, ability to separate bioactive molecules while acting as a filter, etc. The use of mixtures of nanoparticles having different sizes, shapes and/or chemical compositions, as well as the use of nanoparticles having uniform sizes, shapes and chemical composition, are contemplated.

 In either fabrication method, the nanoparticles in the resulting nanomaterial or
30 nanosstructure are held together by oligonucleotide connectors. The sequences, lengths, and strandedness of the oligonucleotide connectors, and the number of

WO 01/051665

PCT/US01/01190

different oligonucleotide connectors present will contribute to the rigidity and structural properties of the nanomaterial or nanostructure. If an oligonucleotide connector is partially double-stranded, its rigidity can be increased by the use of a filler oligonucleotide as described above in connection with the method of detecting nucleic acid. The rigidity of a completely double-stranded oligonucleotide connector can be increased by the use of one or more reinforcing oligonucleotides having complementary sequences so that they bind to the double-stranded oligonucleotide connector to form triple-stranded oligonucleotide connectors. The use of quadruple-stranded oligonucleotide connectors based on deoxyquanosine or deoxycytidine quartets is also contemplated.

Several of a variety of systems for organizing nanoparticles based on oligonucleotide hybridization are illustrated in the figures. In a simple system (Figure 1) one set of nanoparticles bears oligonucleotides with a defined sequence and another set of nanoparticles bears oligonucleotides with a complementary sequence. On mixing the two sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under hybridization conditions, the two types of particles are linked by double stranded oligonucleotide connectors which serve as spacers to position the nanoparticles at selected distances.

An attractive system for spacing nanoparticles involves the addition of one free linking oligonucleotide as illustrated in Figure 2. The sequence of the linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. This system is basically the same as utilized in the nucleic acid detection method, except that the length of the added linking oligonucleotide can be selected to be equal to the combined lengths of oligonucleotides attached to the nanoparticles. The related system illustrated in Figure 3 provides a convenient means to tailor the distance between nanoparticles without having to change the sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates employed.

A further elaboration of the scheme for creating defined spaces between nanoparticles is illustrated in Figure 4. In this case a double stranded segment of DNA or RNA containing overhanging ends is employed as the linking oligonucleotide. Hybridization of the single-stranded, overhanging segments of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

linking oligonucleotide with the oligonucleotides attached to the nanoparticles affords multiple double-stranded oligonucleotide cross-links between the nanoparticles.

Stiffer nanomaterials and nanostructures, or portions thereof, can be generated by employing triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles. In forming the triple strand, one may exploit either the pyrimidine:purine:pyrimidine motif (Moser, H.E. and Dervan, P.B. *Science*, **238**, 645-650 (1987) or the purine:purine:pyrimidine motif (Pilch, D.S. et al. *Biochemistry*, **30**, 6081-6087 (1991). An example of the organization of nanoparticles by generating triple-stranded connectors by the pyrimidine:purine:pyrimidine motif are illustrated in Figure 10. In the system shown in Figure 10, one set of nanoparticles is conjugated with a defined strand containing pyrimidine nucleotides and the other set is conjugated with a complementary oligonucleotide containing purine nucleotides. Attachment of the oligonucleotides is designed such that the nanoparticles are separated by the double-stranded oligonucleotide formed on hybridization. Then, a free pyrimidine oligonucleotide with an orientation opposite that for the pyrimidine strand linked to the nanoparticle is added to the system prior to, simultaneously with, or just subsequent to mixing the nanoparticles. Since the third strand in this system is held by Hoogsteen base pairing, the triple strand is relatively unstable thermally. Covalent bridges spanning the breadth of the duplex are known to stabilize triple-stranded complexes (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R.L., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8768-8772, (1992). Letsinger, R.L. and Wu, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7323-7328 (1995). Prakash, G. and Koel, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3523-3527 (1992).

For construction of nanomaterials and nanostructures, it may be desirable in some cases to "lock" the assembly in place by covalent cross-links after formation of the nanomaterial or nanostructure by hybridization of the oligonucleotide components. This can be accomplished by incorporating functional groups that undergo a triggered irreversible reaction into the oligonucleotides. An example of a functional group for this purpose is a stilbenedicarboxamide group. It has been demonstrated that two stilbenedicarboxamide groups aligned within hybridized oligonucleotides readily undergo cross-linking on irradiation with ultraviolet light (340 nm) (Lewis, F.D. et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8785-8792).

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Alternatively, one could employ the displacement of a 5'-O-tosyl group from an oligonucleotide, held at the 3'-position to a nanoparticle by a mercaptoalkyl group, with a thiophosphoryl group at the 3'-end of an oligonucleotide held to an nanoparticle by a mercaptoalkyl group. In the presence of an oligonucleotide that
5 hybridizes to both oligonucleotides and, thereby, brings the thiophosphoryl group into proximity of the tosyl group, the tosyl group will be displaced by the thiophosphoryl group, generating an oligonucleotide linked at the ends to two different nanoparticles. For displacement reactions of this type, see Herrlein et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 10151-10152 (1995). The fact that thiophosphoryl oligonucleotides do not react with
10 gold nanoparticles under the conditions employed in attaching mercaptoalkyl-oligonucleotides to gold nanoparticles enables one to prepare gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates anchored through the mercapto group to the nanoparticles and containing a terminal thiophosphoryl group free for the coupling reaction.

A related coupling reaction to lock the assembled nanoparticle system in place
15 utilizes displacement of bromide from a terminal bromoacetylaminonucleoside by a terminal thiophosphoryl-oligonucleotide as described in Gryaznov and Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 3808. This reaction proceeds much like the displacement of tosylate described above, except that the reaction is faster. Nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with thiophosphoryl groups are prepared as described
20 above. For preparation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with bromoacetyl amino groups, one first prepares an oligonucleotide terminated at one end by an aminonucleoside (e.g., either 5'-amino-5'-deoxythymidine or 3'-amino-3'-deoxythymidine) and at the other end by a mercaptoalkyl group. Molecules of this oligonucleotide are then anchored to the nanoparticles through the mercapto groups,
25 and the nanoparticle-oligonucleotide conjugate is then converted the N-bromoacetyl amino derivative by reaction with a bromoacetyl acylating agent.

A fourth coupling scheme to lock the assemblies in place utilizes oxidation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated by thiophosphoryl groups. Mild oxidizing agents, such as potassium triiodide, potassium ferricyanide (see Gryaznov
30 and Letsinger, *Nucleic Acids Research*, 21, 1403) or oxygen, are preferred.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

In addition, the properties of the nanomaterials and nanostructures can be altered by incorporating into the interconnecting oligonucleotide chains organic and inorganic functions that are held in place by covalent attachment to the oligonucleotide chains. A wide variety of backbone, base and sugar modifications are well known (see for example Uhlmann, E., and Peyman, A. *Chemical Reviews*, **90**, 544-584 (1990). Also, the oligonucleotide chains could be replaced by "Peptide Nucleic Acid" chains (PNA), in which the nucleotide bases are held by a polypeptide backbone (see Wittung, P. et al., *Nature*, **368**, 561-563 (1994).

As can be seen from the foregoing, the nanofabrication method of the invention is extremely versatile. By varying the length, sequence and strandedness of the linking oligonucleotides, the number, length, and sequence of the binding portions of the linking oligonucleotides, the length, sequence and number of the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles, the number and types of different linking oligonucleotides and nanoparticles used, and the strandedness of the oligonucleotide connectors, nanomaterials and nanostructures having a wide range of structures and properties can be prepared. These structures and properties can be varied further by cross-linking of the oligonucleotide connectors, by functionalizing the oligonucleotides, by backbone, base or sugar modifications of the oligonucleotides, or by the use of peptide-nucleic acids.

The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention include nanoscale mechanical devices, separation membranes, bio-filters, and biochips. It is contemplated that the nanomaterials and nanostructures of the invention can be used as chemical sensors, in computers, for drug delivery, for protein engineering, and as templates for biosynthesis/nanostructure fabrication/directed assembly of other structures. See generally Seeman et al., *New J. Chem.*, **17**, 739 (1993) for other possible applications. The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention also can include electronic devices. Whether nucleic acids could transport electrons has been the subject of substantial controversy. As shown in Example 21 below,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticles assembled by DNA conduct electricity (the DNA connectors function as semiconductors).

Finally, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In the first such method, oligonucleotides are bound to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Charged nanoparticles include nanoparticles made of metal, such as gold nanoparticles.

The method comprises providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles. The moieties and functional groups are those described above for binding (*i.e.*, by chemisorption or covalent bonding) oligonucleotides to nanoparticles. For instance, oligonucleotides having an alkanethiol, an alkanedisulfide *or a cyclic disulfide* covalently bound to their 5' or 3' ends can be used to bind the oligonucleotides to a variety of nanoparticles, including gold nanoparticles.

The oligonucleotides are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Such times can be determined empirically. For instance, it has been found that a time of about 12-24 hours gives good results. Other suitable conditions for binding of the oligonucleotides can also be determined empirically. For instance, a concentration of about 10-20 nM nanoparticles and incubation at room temperature gives good results.

Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The salt can be any water-soluble salt. For instance, the salt may be sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, or one of these salts in phosphate buffer. Preferably, the salt is added as a concentrated solution, but it could be added as a solid. The salt can be added to the water all at one time or the salt is added gradually over time. By "gradually over time" is meant that the salt is added in at least two portions at intervals spaced apart by a period of time. Suitable time intervals can be determined empirically.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. Gradually reducing the electrostatic attraction and repulsion by adding the salt gradually over time has been found to give the highest surface density of oligonucleotides on the nanoparticles. Suitable ionic strengths can be determined empirically for each salt or combination of salts. A final concentration of sodium chloride of from about 0.1 M to about 1.0 M in phosphate buffer, preferably with the concentration of sodium chloride being increased gradually over time, has been found to give good results.

After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. As will be described in detail below, an increased surface density of the oligonucleotides on the nanoparticles has been found to stabilize the conjugates. The time of this incubation can be determined empirically. A total incubation time of about 24-48, preferably 40 hours, has been found to give good results (this is the total time of incubation; as noted above, the salt concentration can be increased gradually over this total time). This second period of incubation in the salt solution is referred to herein as the "aging" step. Other suitable conditions for this "aging" step can also be determined empirically. For instance, incubation at room temperature and pH 7.0 gives good results.

The conjugates produced by use of the "aging" step have been found to be considerably more stable than those produced without the "aging" step. As noted above, this increased stability is due to the increased density of the oligonucleotides on the surfaces of the nanoparticles which is achieved by the "aging" step. The surface density achieved by the "aging" step will depend on the size and type of nanoparticles and on the length, sequence and concentration of the oligonucleotides. A surface density adequate to make the nanoparticles stable and the conditions necessary to obtain it for a desired combination of nanoparticles and oligonucleotides

WO 01/051665

PCT/US01/01190

can be determined empirically. Generally, a surface density of at least 10 picomoles/cm² will be adequate to provide stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Preferably, the surface density is at least 15 picomoles/cm². Since the ability of the oligonucleotides of the conjugates to hybridize with nucleic acid and oligonucleotide targets can be diminished if the surface density is too great, the surface density is preferably no greater than about 35-40 picomoles/cm².

As used herein, "stable" means that, for a period of at least six months after the conjugates are made, a majority of the oligonucleotides remain attached to the nanoparticles and the oligonucleotides are able to hybridize with nucleic acid and oligonucleotide targets under standard conditions encountered in methods of detecting nucleic acid and methods of nanofabrication.

Aside from their stability, the nanoparticle-oligonucleotide conjugates made by this method exhibit other remarkable properties. See, e.g., Examples 5, 7, and 19 of the present application. In particular, due to the high surface density of the conjugates, they will assemble into large aggregates in the presence of a target nucleic acid or oligonucleotide. The temperature over which the aggregates form and dissociate has unexpectedly been found to be quite narrow, and this unique feature has important practical consequences. In particular, it increases the selectivity and sensitivity of the methods of detection of the present invention. A single base mismatch and as little as 20 femtomoles of target can be detected using the conjugates. Although these features were originally discovered in assays performed in solution, the advantages of the use of these conjugates have been found to extend to assays performed on substrates, including those in which only a single type of conjugate is used.

It has been found that the hybridization efficiency of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be increased dramatically by the use of recognition oligonucleotides which comprise a recognition portion and a spacer portion. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. In this embodiment, the recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion, and it is the recognition portion which

WO 01/051665

PCT/US01/01190

hybridizes to the nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotide is designed so that it can bind to the nanoparticles. For instance, the spacer portion could have a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles. These are the same moieties and functional groups as described above. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. The length and sequence of the spacer portion providing good spacing of the recognition portion away from the nanoparticles can be determined empirically. It has been found that a spacer portion comprising at least about 10 nucleotides, preferably 10-30 nucleotides, gives good results. The spacer portion may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to become bound to the nanoparticles or to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the spacer portions should not be sequences complementary to each other, to that of the recognition oligonucleotides, or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. Preferably, the bases of the nucleotides of the spacer portion are all adenines, all thymines, all cytidines, or all guanines, unless this would cause one of the problems just mentioned. More preferably, the bases are all adenines or all thymines. Most preferably the bases are all thymines.

It has further been found that the use of diluent oligonucleotides in addition to recognition oligonucleotides provides a means of tailoring the conjugates to give a desired level of hybridization. The diluent and recognition oligonucleotides have been found to attach to the nanoparticles in about the same proportion as their ratio in the solution contacted with the nanoparticles to prepare the conjugates. Thus, the ratio of the diluent to recognition oligonucleotides bound to the nanoparticles can be controlled so that the conjugates will participate in a desired number of hybridization events. The diluent oligonucleotides may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the diluent oligonucleotides should not have a sequence complementary to that of the recognition

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. The diluent oligonucleotides are also preferably of a length shorter than that of the recognition oligonucleotides so that the recognition oligonucleotides can bind to their nucleic acid or oligonucleotide targets. If the recognition oligonucleotides comprise spacer portions, the diluent oligonucleotides are, most preferably, about the same length as the spacer portions. In this manner, the diluent oligonucleotides do not interfere with the ability of the recognition portions of the recognition oligonucleotides to hybridize with nucleic acid or oligonucleotide targets. Even more preferably, the diluent oligonucleotides have the same sequence as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

As can be readily appreciated, highly desirable nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be prepared by employing all of the methods described above. By doing so, stable conjugates with tailored hybridization abilities can be produced.

Any of the above conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of detecting nucleic acids described above, and the invention also provides a kit comprising a container holding any of the above conjugates. In addition, the conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of nanofabrication of the invention and the method of separating nucleic acids.

It is to be noted that the term "a" or "an" entity refers to one or more of that entity. For example, "a characteristic" refers to one or more characteristics or at least one characteristic. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more" and "at least one" are used interchangeably herein. It is also to be noted that the terms "comprising", "including", and "having" have been used interchangeably.

EXAMPLES

Example 1: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

A. Preparation Of Gold Nanoparticles

5 Gold colloids (13 nm diameter) were prepared by reduction of HAuCl₄ with citrate as described in Frens, *Nature Phys. Sci.*, **241**, 20 (1973) and Grabar, *Anal. Chem.*, **67**, 735 (1995). Briefly, all glassware was cleaned in aqua regia (3 parts HCl, 1 part HNO₃), rinsed with Nanopure H₂O, then oven dried prior to use. HAuCl₄ and sodium citrate were purchased from Aldrich Chemical Company. Aqueous HAuCl₄ (1 mM, 500

10 mL) was brought to reflux while stirring. Then, 38.8 mM sodium citrate (50 mL) was added quickly. The solution color changed from pale yellow to burgundy, and refluxing was continued for 15 min. After cooling to room temperature, the red solution was filtered through a Micron Separations Inc. 1 micron filter. Au colloids were characterized by UV-vis spectroscopy using a Hewlett Packard 8452A diode array

15 spectrophotometer and by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a Hitachi 8100 transmission electron microscope. Gold particles with diameters of 13 nm will produce a visible color change when aggregated with target and probe oligonucleotide sequences in the 10-35 nucleotide range.

B. Synthesis Of Oligonucleotides

20 Oligonucleotides were synthesized on a 1 micromole scale using a Milligene Expedite DNA synthesizer in single column mode using phosphoramidite chemistry. Eckstein, F. (ed.) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991). All solutions were purchased from Milligene (DNA synthesis grade). Average coupling efficiency varied from 98 to 99.8%, and the final dimethoxytrityl

25 (DMT) protecting group was not cleaved from the oligonucleotides to aid in purification.

For 3'-thiol-oligonucleotides, Thiol-Modifier C3 S-S CPG support was purchased from Glen Research and used in the automated synthesizer. During normal cleavage from the solid support (16 hr at 55° C), 0.05 M dithiothreitol (DTT) was added to the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

NH₄OH solution to reduce the 3' disulfide to the thiol. Before purification by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC), excess DTT was removed by extraction with ethyl acetate.

For 5'-thiol oligonucleotides, 5'-Thiol-Modifier C₆-phosphoramidite reagent was purchased from Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166. The oligonucleotides were synthesized, and the final DMT protecting group removed. Then, 1 ml of dry acetonitrile was added to 100 μmole of the 5' Thiol Modifier C₆-phosphoramidite. 200 μL of the amidite solution and 200 μL of activator (fresh from synthesizer) were mixed and introduced onto the column containing the synthesized oligonucleotides still on the solid support by syringe and pumped back and forth through the column for 10 minutes. The support was then washed (2 x 1 mL) with dry acetonitrile for 30 seconds. 700 μL of a 0.016 M I₂/H₂O/pyridine mixture (oxidizer solution) was introduced into the column, and was then pumped back and forth through the column with two syringes for 30 second. The support was then washed with a 1:1 mixture of CH₃CN/pyridine (2 x 1 mL) for 1 minute, followed by a final wash with dry acetonitrile (2 x 1 mL) with subsequent drying of the column with a stream of nitrogen. The trityl protecting group was not removed, which aids in purification.

Reverse phase HPLC was performed with a Dionex DX500 system equipped with a Hewlett Packard ODS hypersil column (4.6 x 200 mm, 5 mm particle size) using 0.03 M Et₃NH⁺ OAc⁻ buffer (TEAA), pH 7, with a 1%/min. gradient of 95% CH₃CN/5% TEAA. The flow rate was 1 mL/min. with UV detection at 260 nm. Preparative HPLC was used to purify the DMT-protected unmodified oligonucleotides (elution at 27 min). After collection and evaporation of the buffer, the DMT was cleaved from the oligonucleotides by treatment with 80% acetic acid for 30 min at room temperature. The solution was then evaporated to near dryness, water was added, and the cleaved DMT was extracted from the aqueous oligonucleotide solution using ethyl acetate. The amount of oligonucleotide was determined by absorbance at 260 nm, and final purity assessed by reverse phase HPLC (elution time 14.5 minutes).

WO 01/051665

PCT/US01/01190

The same protocol was used for purification of the 3'-thiol-oligonucleotides, except that DTT was added after extraction of DMT to reduce the amount of disulfide formed. After six hours at 40°C, the DTT was extracted using ethyl acetate, and the oligonucleotides repurified by HPLC (elution time 15 minutes).

- 5 For purification of the 5' thiol modified oligonucleotides, preparatory HPLC was performed under the same conditions as for unmodified oligonucleotides. After purification, the trityl protecting group was removed by adding 150 μ L of a 50 mM AgNO_3 solution to the dry oligonucleotide sample. The sample turned a milky white color as the cleavage occurred. After 20 minutes, 200 μ L of a 10 mg/ml solution of DTT
- 10 was added to complex the Ag (five minute reaction time), and the sample was centrifuged to precipitate the yellow complex. The oligonucleotide solution (<50 OD) was then transferred onto a desalting NAP-5 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for purification (contains DNA Grade Sephadex G-25 Medium for desalting and buffer exchange of oligonucleotides greater than 10 bases). The amount of 5' thiol modified
- 15 oligonucleotide was determined by UV-vis spectroscopy by measuring the magnitude of the absorbance at 260 nm. The final purity was assessed by performing ion-exchange HPLC with a Dionex Nucleopac PA-100 (4 x 250) column using a 10 mM NaOH solution (pH 12) with a 2%/min gradient of 10 mM NaOH, 1M NaCl solution. Typically, two peaks resulted with elution times of approximately 19 minutes and 25 minutes
- 20 (elution times are dependent on the length of the oligonucleotide strand). These peaks corresponded to the thiol and the disulfide oligonucleotides respectively.

C. Attachment Of Oligonucleotides To Gold Nanoparticles

- An aqueous solution of 17nM (150 μ L) Au colloids, prepared as described in part A above, was mixed with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TTTGCTGA, prepared as described
- 25 in part B and allowed to stand for 24 hours at room temperature in 1 ml Eppendorf capped vials. A second solution of colloids was reacted with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TACCGTTG. Note that these oligonucleotides are noncomplementary. Shortly before use, equal amounts of each of the two nanoparticle solutions were combined. Since the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides are noncomplementary, no reaction took place.

The oligonucleotide-modified nanoparticles are stable at elevated temperatures (80°C) and high salt concentrations (1M NaCl) for days and have not been observed to undergo particle growth. Stability in high salt concentrations is important, since such conditions are required for the hybridization reactions that form the basis of the methods of detection and nanofabrication of the invention.

Example 2: Formation Of Nanoparticle Aggregates

A. Preparation Of Linking Oligonucleotide

Two (nonthiolated) oligonucleotides were synthesized as described in part B of Example 1. They had the following sequences:

3' ATATGCGCGA TCTCAGCAAA [SEQ ID NO:1]; and

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA [SEQ ID NO:2].

Mixing of these two oligonucleotides in a 1 M NaCl, 10 mM phosphate buffered (pH 7.0) solution, resulted in hybridization to form a duplex having a 12-base-pair overlap and two 8-base-pair sticky ends. Each of the sticky ends had a sequence which was complementary to that of one of the oligonucleotides attached to the Au colloids prepared in part C of Example 1.

B. Formation Of Nanoparticle Aggregates

The linking oligonucleotides prepared in part A of this example (0.17 μ M final concentration after dilution with NaCl) were added to the nanoparticle-oligonucleotide conjugates prepared in part C of Example 1 (5.1 nM final concentration after dilution with NaCl) at room temperature. The solution was then diluted with aqueous NaCl (to a final concentration of 1 M) and buffered at pH 7 with 10 mM phosphate, conditions which are suitable for hybridization of the oligonucleotides. An immediate color change from red to purple was observed, and a precipitation reaction ensued. See Figure 6. Over the course of several hours, the solution became clear and a pinkish-gray precipitate settled to the bottom of the reaction vessel. See Figure 6.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

To verify that this process involved both the oligonucleotides and colloids, the precipitate was collected and resuspended (by shaking) in 1 M aqueous NaCl buffered at pH 7. Any of the oligonucleotides not hybridized to the nanoparticles are removed in this manner. Then, a temperature/time dissociation experiment was performed by monitoring the characteristic absorbance for the hybridized oligodeoxyribonucleotides (260 nm) and for the aggregated colloids which is reflective of the gold interparticle distance (700 nm). See Figure 7.

Changes in absorbance at 260 and 700 nm were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 2 UV-vis Spectrophotometer using a Peltier PTP-1 Temperature Controlled Cell Holder while cycling the temperature at a rate of 1°C/minute between 0°C and 80°C. DNA solutions were approximately 1 absorbance unit(s) (OD), buffered at pH 7 using 10 mM phosphate buffer and at 1M NaCl concentration.

The results are shown in Figure 8A. As the temperature was cycled between 0°C and 80°C (which is 38°C above the dissociation temperature (T_m) for the duplex ($T_m=42$ °C)), there was an excellent correlation between the optical signatures for both the colloids and oligonucleotides. The UV-vis spectrum for naked Au colloids was much less temperature dependent, Figure 8B.

There was a substantial visible optical change when the polymeric oligonucleotide-colloid precipitate was heated above its melting point. The clear solution turned dark red as the polymeric biomaterial de-hybridized to generate the unlinked colloids which are soluble in the aqueous solution. The process was reversible, as evidenced by the temperature traces in Figure 8A.

In a control experiment, a 14-T:14-A duplex was shown to be ineffective at inducing reversible Au colloid particle aggregation. In another control experiment, a linking oligonucleotide duplex with four base pair mismatches in the sticky ends was found not to induce reversible particle aggregation of oligonucleotide-modified nanoparticles (prepared as described in part C of Example 1 and reacted as described above). In a third control experiment, non-thiolated oligonucleotides having sequences

WO 01/051665

PCT/US01/01190

complementary to the sticky ends of the linking oligonucleotide and reacted with nanoparticles did not produce reversible aggregation when the nanoparticles were combined with the linking oligonucleotide.

Further evidence of the polymerization/assembly process came from

5 Transmission Electron Microscopy (TEM) studies of the precipitate. TEM was performed on a Hitachi 8100 Transmission Electron Microscope. A typical sample was prepared by dropping 100 μ L of colloid solution onto a holey carbon grid. The grid, then, was dried under vacuum and imaged. TEM images of Au colloids linked by hybridized oligonucleotides showed large assembled networks of the Au colloids, Figure
10 9A. Naked Au colloids do not aggregate under comparable conditions but rather disperse or undergo particle growth reactions. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991). Note that there is no evidence of colloid particle growth in the experiments performed to date; the hybridized colloids seem to be remarkably regular in size with an average diameter of 13 nm.

15 With TEM, a superposition of layers is obtained, making it difficult to assess the degree of order for three-dimensional aggregates. However, smaller scale images of single layer, two-dimensional aggregates provided more evidence for the self-assembly process, Figure 9B. Close-packed assemblies of the aggregates with uniform particle separations of approximately 60 Å can be seen. This distance is somewhat shorter than
20 the estimated 95 Å spacing expected for colloids connected by rigid oligonucleotide hybrids with the sequences that were used. However, because of the nicks in the duplex obtained after hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides, these were not rigid hybrids and were quite flexible. It should be noted that this is a variable that can be controlled by reducing the system from four overlapping
25 strands to three (thereby reducing the number of nicks) or by using triplexes instead of duplexes.

Example 3: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Gold colloids (13 nm diameter) were prepared as described in Example 1. Thiol-oligonucleotides [HS(CH₂)₆OP(O)(O⁻)-oligonucleotide] were also prepared as described in Example 1.

The method of attaching thiol-oligonucleotides to gold nanoparticles described in Example 1 was found not to produce satisfactory results in some cases. In particular, when long oligonucleotides were used, the oligonucleotide-colloid conjugates were not stable in the presence of a large excess of high molecular weight salmon sperm DNA used as model for the background DNA that would normally be present in a diagnostic system. Longer exposure of the colloids to the thiol-oligonucleotides produced oligonucleotide-colloid conjugates that were stable to salmon sperm DNA, but the resulting conjugates failed to hybridize satisfactorily. Further experimentation led to the following procedure for attaching thiol-oligonucleotides of any length to gold colloids so that the conjugates are stable to high molecular weight DNA and hybridize satisfactorily.

A 1 mL solution of the gold colloids (17nM) in water was mixed with excess (3.68 :M) thiol-oligonucleotide (28 bases in length) in water, and the mixture was allowed to stand for 12-24 hours at room temperature. Then, 100 μ L of a 0.1 M sodium hydrogen phosphate buffer, pH 7.0, and 100 μ L of 1.0 M NaCl were premixed and added. After 10 minutes, 10 μ L of 1% aqueous NaN₃ were added, and the mixture was allowed to stand for an additional 40 hours. This "aging" step was designed to increase the surface coverage by the thiol-oligonucleotides and to displace oligonucleotide bases from the gold surface. Somewhat cleaner, better defined red spots in subsequent assays were obtained if the solution was frozen in a dry-ice bath after the 40-hour incubation and then thawed at room temperature. Either way, the solution was next centrifuged at 14,000 rpm in an Eppendorf Centrifuge 5414 for about 15 minutes to give a very pale pink supernatant containing most of the oligonucleotide (as indicated by the absorbance at 260 nm) along with 7-10% of the colloidal gold (as indicated by the absorbance at 520 nm), and a compact, dark, gelatinous residue at the bottom of the tube. The supernatant was removed, and the residue was resuspended in about 200 μ L of buffer (10 mM

WO 01/051665

PCT/US01/01190

phosphate, 0.1 M NaCl) and recentrifuged. After removal of the supernatant solution, the residue was taken up in 1.0 mL of buffer (10 mM phosphate, 0.1 M NaCl) and 10 μ L of a 1% aqueous solution of NaN₃. Dissolution was assisted by drawing the solution into, and expelling it from, a pipette several times. The resulting red master solution was stable (i.e., remained red and did not aggregate) on standing for months at room temperature, on spotting on silica thin-layer chromatography (TLC) plates (see Example 4), and on addition to 2 M NaCl, 10 mM MgCl₂, or solutions containing high concentrations of salmon sperm DNA.

10 Example 4: Acceleration Of Hybridization of Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The oligonucleotide-gold colloid conjugates I and II illustrated in Figure 11 were prepared as described in Example 3. The hybridization of these two conjugates was extremely slow. In particular, mixing samples of conjugates I and II in aqueous 0.1 M NaCl or in 10 mM MgCl₂ plus 0.1 M NaCl and allowing the mixture to stand at room temperature for a day produced little or no color change.

Two ways were found to improve hybridization. First, faster results were obtained by freezing the mixture of conjugates I and II (each 15 nM contained in a solution of 0.1 M NaCl) in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 5 minutes and then thawing the mixture at room temperature. The thawed solution exhibited a bluish color. When 1 μ L of the solution was spotted on a standard C-18 TLC silica plate (Alltech Associates), a strong blue color was seen immediately. The hybridization and consequent color change caused by the freeze-thawing procedure were reversible. On heating the hybridized solution to 80°C, the solution turned red and produced a pink spot on a TLC plate. Subsequent freezing and thawing returned the system to the (blue) hybridized state (both solution and spot on a C-18 TLC plate). In a similar experiment in which the solution was not refrozen, the spot obtained on the C-18 TLC plate was pink.

A second way to obtain faster results is to warm the conjugates and target. For

WO 01/051665

PCT/US01/01190

instance, in another experiment, oligonucleotide-gold colloid conjugates and an oligonucleotide target sequence in a 0.1 M NaCl solution were warmed rapidly to 65°C and allowed to cool to room temperature over a period of 20 minutes. On spotting on a C-18 silica plate and drying, a blue spot indicative of hybridization was obtained. In contrast, incubation of the conjugates and target at room temperature for an hour in 0.1 M NaCl solution did not produce a blue color indicative of hybridization. Hybridization is more rapid in 0.3 M NaCl.

Example 5: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The oligonucleotide-gold colloid conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 12A-F were prepared as described in Example 3, and the oligonucleotide target 3 illustrated in Figure 12A was prepared as described in Example 2. Mismatched and deletion targets 4, 5, 6, and 7 were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL. These oligonucleotides were synthesized on a 40 nmol scale and purified on an reverse phase C18 cartridge (OPC). Their purity was determined by performing ion exchange HPLC.

Selective hybridization was achieved by heating rapidly and then cooling rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 µL of 0.1 M NaCl plus 5 mM MgCl₂ containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 3 nanomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, heating to 74°C, cooling to the temperatures indicated in Table 1 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 µL sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. On drying (5 minutes), a strong blue color appeared if hybridization had taken place.

The results are presented in Table 1 below. Pink spots signify a negative test (*i.e.*, that the nanoparticles were not brought together by hybridization), and blue spots signify a positive test (*i.e.*, that the nanoparticles were brought into proximity due to hybridization involving both of the oligonucleotide-colloid conjugates).

WO 01/051665

PCT/US01/01190

TABLE 1

Reactants	Results (Color)			
	45°C	50°C	60°C	74°C
1 + 2	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 3 (match)	Blue	Blue	Blue	Blue
1 + 2 + 4 (half complement mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 5 (-6 bp)	Blue	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 6 (1 bp mismatch)	Blue	Blue	Pink	Pink
1 + 2 + 7 (2 bp mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink

5

As can be seen in Table 1, hybridization at 60°C gave a blue spot only for the fully-matched target 3. Hybridization at 50°C yielded blue spots with both targets 3 and 6. Hybridization at 45°C gave blue spots with targets 3, 5 and 6.

10 In a related series, a target containing a single mismatch T nucleotide was found to give a positive test at 55°C (blue color) and a negative test (red color) at 64°C with conjugates 1 and 2. Under the same conditions, the fully-matched target (3) gave a positive test at both temperatures, showing that the test can discriminate between a target that is fully matched and one containing a single mismatched base.

15 Similar results were achieved using a different hybridization method. In particular, selective hybridization was achieved by freezing, thawing and then warming rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 µL of 0.1 M NaCl containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 10 picomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, freezing in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 5 minutes, thawing at room temperature, then warming rapidly to the
20 temperatures indicated in Table 2 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 µL sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. The results are presented in Table 2.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

TABLE 2

Reactants (probes) + target	Results (color)				
	RT	35°C	40°C	54°C	64°C
(1 + 2) + 3	blue	blue	blue	blue	pink
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	pink	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 7	blue	pink	pink	pink	pink

- 5 An important feature of these systems was that the color change associated with the temperature change was very sharp, occurring over a temperature range of about 1°C. This indicates high cooperativity in the melting and association processes involving the colloid conjugates and enables one to easily discriminate between oligonucleotide targets containing a fully-matched sequence and a single basepair mismatch.
- 10 The high degree of discrimination may be attributed to two features. The first is the alignment of two relatively short probe oligonucleotide segments (15 nucleotides) on the target is required for a positive signal. A mismatch in either segment is more destabilizing than a mismatch in a longer probe (*e.g.*, an oligonucleotide 30 bases long) in a comparable two-component detection system. Second, the signal at 260 nm, obtained
- 15 on hybridization of the target oligonucleotides with the nanoparticle conjugates in solution, is nanoparticle-based, not DNA-based. It depends on dissociation of an assembly of nanoparticles organized in a polymeric network by multiple oligonucleotide duplexes. This results in a narrowing of the temperature range that is observed for aggregate dissociation, as compared with standard DNA thermal denaturation. In short,
- 20 some duplexes in the crosslinked aggregates can dissociate without dispersing the nanoparticles into solution. Therefore, the temperature range for aggregate melting is very narrow (4°C) as compared with the temperature range associated with melting the comparable system without nanoparticles (12°C). Even more striking and advantageous

WO 01/051665

PCT/US01/01190

for this detection approach is the temperature range for the colorimetric response ($<1^{\circ}\text{C}$) observe on the C18 silica plates. In principle, this three-component nanoparticle based strategy will be more selective than any two-component detection system based on a single-strand probe hybridizing with target nucleic acid.

- 5 A master solution containing 1 nmol of target 3 was prepared in 100 μl of hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). One μl of this solution corresponds to 10 picomole of target oligonucleotide. Serial dilutions were performed by taking an aliquot of the master solution and diluting it to the desired concentration with hybridization buffer. Table 3 shows the sensitivity obtained using 3 μl of a mixture of
- 10 probes 1 and 2 with different amounts of target 3. After performing the hybridization using freeze-thaw conditions, 3 μl aliquots of these solutions were spotted onto C-18 TLC plates to determine color. In Table 3 below, pink signifies a negative test, and blue signifies a positive test.

15

TABLE 3

Amount of Target	Results
1 picomole	blue (positive)
200 femtomole	blue (positive)
100 femtomole	blue (positive)
20 femtomole	blue (positive)
10 femtomole	purplish (ambiguous)

This experiment indicates that 10 femtomoles is the lower limit of detection for this particular system.

20

Example 6: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

DNA modified nanoparticles were adsorbed onto modified transparent substrates as shown in Figure 13B. This method involved the linking of DNA modified nanoparticles to nanoparticles that were attached to a glass substrate, using DNA

- 25 hybridization interactions.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Glass microscope slides were purchased from Fisher scientific. Slides were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scribing pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. To functionalize the slide surface with a thiol terminated silane, the slides were soaked in a degassed ethanolic 1% (by volume) mercaptopropyl-trimethoxysilane solution for 12 hours. The slides were removed from the ethanol solutions and rinsed with ethanol, then water. Nanoparticles were adsorbed onto the thiol terminated surface of the slides by soaking in solutions containing the 13 nm diameter gold nanoparticles (preparation described in Example 1). After 12 hours in the colloidal solutions, the slides were removed and rinsed with water. The resulting slides have a pink appearance due to the adsorbed nanoparticles and exhibit similar UV-vis absorbance profiles (surface plasmon absorbance peak at 520 nm) as the aqueous gold nanoparticle colloidal solutions. See Figure 14A.

DNA was attached to the nanoparticle modified surface by soaking the glass slides in 0.2 OD (1.7 µM) solution containing freshly purified 3' thiol oligonucleotide (3' thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) (synthesized as described in Examples 1 and 3). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.

To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide (prepared as described in Example 2) was 24 bp long (5' TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface (SEQ ID NO:33). The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.5 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 µM) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35])

WO 01/051665

PCT/US01/01190

(prepared as described in Example 3) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The substrate color had darkened to a purple color and the UV-vis absorbance at 520 nm approximately doubled (Figure 14A).

To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide/nanoparticle modified surface through DNA hybridization interactions with the linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, the substrate was placed in a cuvette containing 1 mL of hybridization buffer and the same apparatus used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored as the temperature of the substrate was increased at a rate of 0.5°C per minute. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 60°C. See Figure 14B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 62°C, which corresponds with the temperature seen for the three DNA sequences hybridized in solution without nanoparticles. See Figure 14B.

Example 7: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The detection system illustrated in Figures 15A-G was designed so that the two probes 1 and 2 align in a tail-to-tail fashion onto a complementary target 4 (see Figures 15A-G). This differs from the system described in Example 5 where the two probes align contiguously on the target strand (see Figures 12A-F).

The oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 15A-G were prepared as described in Example 3, except that the nanoparticles were redispersed in hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). The final nanoparticle-oligonucleotide conjugate concentration was estimated to be 13 nM by measuring the reduction in intensity of the surface plasmon band at 522 nm which gives rise to the red color of the nanoparticles. The oligonucleotide targets illustrated in

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Figures 15A-G were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL.

When 150 μ L of hybridization buffer containing 13 nM oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 was mixed with 60 picomoles (6 μ L) of target 4, the solution color immediately changed from red to purple. This color change occurs as a result of the formation of large oligonucleotide-linked polymeric networks of gold nanoparticles, which leads to a red shift in the surface plasmon resonance of the nanoparticles. When the solution was allowed to stand for over 2 hours, precipitation of large macroscopic aggregates was observed. A 'melting analysis' of the solution with the suspended aggregates was performed. To perform the 'melting analysis', the solution was diluted to 1 ml with hybridization buffer, and the optical signature of the aggregates at 260 nm was recorded at one minute intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute/degree. Consistent with characterization of the aggregate as an oligonucleotide-nanoparticle polymer, a characteristic sharp transition (full width at half maximum, $FW_{1/2}$ of the first derivative = 3.5°C) was observed with a 'melting temperature' (T_m) of 53.5°C. This compares well with the T_m associated with the broader transition observed for oligonucleotides without nanoparticles (T_m = 54°C, $FW_{1/2}$ = ~13.5°C). The 'melting analysis' of the oligonucleotide solution without nanoparticles was performed under similar conditions as the analysis with nanoparticles, except that the temperature was increased from 10-80 °C. Also, the solution was 1.04 μ M in each oligonucleotide component.

To test the selectivity of the system, the T_m for the aggregate formed from the perfect complement 4 of probes 1 and 2 was compared with the T_m 's for aggregates formed from targets that contained one base mismatches, deletions, or insertions (Figures 15A-G). Significantly, all of the gold nanoparticle-oligonucleotide aggregates that contained imperfect targets exhibited significant, measurable destabilization when compared to the aggregates formed from the perfect complement, as evidenced by T_m values for the various aggregates (see Figures 15A-G). The solutions containing the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

imperfect targets could easily be distinguished from the solution containing the perfect complement by their color when placed in a water bath held at 52.5°C. This temperature is above the T_m of the mismatched polynucleotides, so only the solution with the perfect target exhibited a purple color at this temperature. A 'melting analysis' was also

5 performed on the probe solution which contained the half-complementary target. Only a minute increase in absorbance at 260 nm was observed.

Next, 2 μ L (20 picomoles) of each of the oligonucleotide targets (Figures 15A-G) were added to a solution containing 50 μ L of each probe (13 nM) in hybridization buffer. After standing for 15 minutes at room temperature, the solutions were transferred to a
10 temperature-controlled water bath and incubated at the temperatures indicated in Table 4 below for five minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 silica plate. Two control experiments were performed to demonstrate that the alignment of both probes onto the target is necessary to trigger aggregation and, therefore, a color change. The first control experiment consisted of both probes 1 and 2
15 without target present. The second control experiment consisted of both probes 1 and 2 with a target 3 that is complementary to only one of the probe sequences (Figure 15B). The results are presented in Table 4 below. Pink spots signify a negative test, and blue spots signify a positive test.

Notably, the colorimetric transition that can be detected by the naked eye occurs
20 over less than 1°C, thereby allowing one to easily distinguish the perfect target 4 from the targets with mismatches (5 and 6), an end deletion (7), and a one base insertion at the point in the target where the two oligonucleotide probes meet (8) (see Table 4). Note that the colorimetric transition T_c is close in temperature, but not identical, to T_m . In both controls, there were no signs of particle aggregation or instability in the solutions, as
25 evidenced by the pinkish red color which was observed at all temperatures, and they showed negative spots (pink) in the plate test at all temperatures (Table 4).

The observation that the one base insertion target 8 can be differentiated from the fully complementary target 4 is truly remarkable given the complete complementarity of

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the insertion strand with the two probe sequences. The destabilization of the aggregate formed from 8 and the nanoparticle probes appears to be due to the use of two short probes and the loss of base stacking between the two thymidine bases where the probe tails meet when hybridized to the fully complementary target. A similar effect was observed when a target containing a three base pair insertion (CCC) was hybridized to the probes under comparable conditions, ($T_m \approx 51^\circ\text{C}$). In the system described above in Example 5, targets with base insertions could not be distinguished from the fully complementary target. Therefore, the system described in this example is very favorable in terms of selectivity. This system also exhibited the same sensitivity as the system described in Example 5, which is approximately 10 femtomoles without amplification techniques.

The results indicate that any one base mismatch along the target strand can be detected, along with any insertions into the target strand. Importantly, the temperature range over which a color change can be detected is extremely sharp, and the change occurs over a very narrow temperature range. This sharp transition indicates that there is a large degree of cooperativity in the melting process involving the large network of colloids which are linked by the target oligonucleotide strands. This leads to the remarkable selectivity as shown by the data.

TABLE 4

Reactants (probes) + target	Results (color)					
	RT	47.6°C	50.5°C	51.4°C	52.7°C	54.5°C
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 3	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	blue	blue	blue	blue	blue	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	blue	pink	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 7	blue	blue	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 8	blue	blue	pink	pink	pink	pink

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Example 8: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

A set of experiments were performed involving hybridization with 'filler' duplex oligonucleotides. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates 1 and 2 illustrated in Figure 16A were incubated with targets of different lengths (24, 48 and 72 bases in length) and complementary filler oligonucleotides, as illustrated in Figures 16A-C. Otherwise, the conditions were as described in Example 7. Also, the oligonucleotides and nanoparticle-oligonucleotide conjugates were prepared as described in Example 7.

As expected, the different reaction solutions had markedly different optical properties after hybridization due to the distance-dependent optical properties of the gold nanoparticles. See Table 5 below. However, when these solutions were spotted onto a C-18 TLC plate, a blue color developed upon drying at room temperature or 80°C, regardless of the length of the target oligonucleotide and the distance between the gold nanoparticles. See Table 5. This probably occurs because the solid support enhances aggregation of the hybridized oligonucleotide-nanoparticle conjugates. This demonstrates that by spotting solutions onto the TLC plate, the distance between the gold nanoparticles can be substantial (at least 72 bases), and colorimetric detection is still possible.

TABLE 5

Target Length	Results (Color)	
	<u>Solution</u>	<u>TLC Plate</u>
24 bases	Blue	Blue
48 bases	Pink	Blue
72 bases	Pink	Blue
Probes 1 + 2 only	Pink	Pink

20

The color changes observed in this and other examples occur when the distance between the gold nanoparticles (the interparticle distance) is approximately the same or less than the diameter of the nanoparticle. Thus, the size of the nanoparticles, the size of

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the oligonucleotides attached to them, and the spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid affect whether a color change will be observable when the oligonucleotide-nanoparticle conjugates hybridize with the nucleic acid targets to form aggregates. For instance, gold nanoparticles with diameters of 13 nm will
 5 produce a color change when aggregated using oligonucleotides attached to the nanoparticles designed to hybridize with target sequences 10-35 nucleotides in length. The spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid adequate to give a color change will vary with the extent of aggregation, as the results demonstrate. The results also indicate that the solid surface enhances further aggregation
 10 of already-aggregated samples, bringing the gold nanoparticles closer together.

The color change observed with gold nanoparticles is attributable to a shift and broadening of the surface plasmon resonance of the gold. This color change is unlikely for gold nanoparticles less than about 4 nm in diameter because the lengths of the oligonucleotides necessary for specific detection of nucleic acid would exceed the
 15 nanoparticle diameter.

Example 9: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

Five microliters of each probe 1 and 2 (Figure 12A) were combined to a final concentration of 0.1 M NaCl with buffer (10 mM phosphate, pH 7), and 1 microliter of
 20 human urine was added to the solution. When this solution was frozen, thawed, and then spotted on a C-18 TLC plate, a blue color did not develop. To a similar solution containing 12.5 microliters of each probe and 2.5 microliters of human urine, 0.25 microliters (10 picomoles) of target 3 (Figure 12A) was added. The solution was frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, and a blue spot was obtained.

25 Similar experiments were performed in the presence of human saliva. A solution containing 12.5 microliters of each probe 1 and 2 and 0.25 microliters of target 3 was heated to 70°C. After cooling to room temperature, 2.5 microliters of a saliva solution (human saliva diluted 1:10 with water) was added. After the resultant solution was

WO 01/051665

PCT/US01/01190

frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, a blue spot was obtained, indicating hybridization of the probes with the target. In control experiments with no target added, blue spots were not observed.

5 **Example 10: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates**

10 An assay was performed as illustrated in Figure 13A. First, glass microscope slides, purchased from Fisher scientific, were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scribing pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of
 15 water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. Thiol-modified DNA was adsorbed onto the slides using a modified procedure reported in the literature (Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996) and Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996)). First, the slides were soaked in a 1% solution of trimethoxystyrylpropyldiethyltriamine (DETA, purchased from United Chemical
 20 Technologies, Bristol, PA) in 1 mM acetic acid in Nanopure water for 20 minutes at room temperature. The slides were rinsed with water, then ethanol. After drying with a dry nitrogen stream, the slides were baked at 120°C for 5 minutes using a temperature-controlled heating block. The slides were allowed to cool, then were soaked in a 1 mM succinimidyl 4-(maleimidophenyl)-butyrate (SMPB, purchased from Sigma Chemicals)
 25 solution in 80:20 methanol:dimethoxysulfoxide for 2 hours at room temperature. After removal from the SMPB solution and rinsing with ethanol, amine sites that were not coupled to the SMPB crosslinker were capped as follows. First, the slides were soaked for 5 minutes in a 8:1 THF:pyridine solution containing 10% 1-methyl imidazole. Then the slides were soaked in 9:1 THF:acetic anhydride solution for five minutes. These
 30 capping solutions were purchased from Glen Research, Sterling, VA. The slides were rinsed with THF, then ethanol, and finally water.

DNA was attached to the surfaces by soaking the modified glass slides in a 0.2 OD (1.7 μM) solution containing freshly purified oligonucleotide (3' thiol

WO 01/051665

PCT/US01/01190

ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.

To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide was 24 bp long (5' TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface. The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.5 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 μ M) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35]) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The glass substrate's color had changed from clear and colorless to a transparent pink color. See Figure 19A.

Additional layers of nanoparticles were added to the slides by soaking the slides in a solution of the linking oligonucleotide as described above and then soaking in a solution containing 13 nm gold nanoparticles having oligonucleotides (3' thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) attached thereto. After soaking for 12 hours, the slides were removed from the nanoparticle solution and rinsed and soaked in hybridization buffer as described above. The color of the slide had become noticeably more red. See Figure 19A. A final nanoparticle layer was added by repeating the linking oligonucleotide and nanoparticle soaking procedures using 13 nm gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35]) as the final nanoparticle layer. Again, the color darkened, and the UV-vis absorbance at 520 nm increased. See Figure 19A.

To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide modified surface through DNA hybridization interactions with the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, a slide was placed in a cuvette containing 1.5 mL of hybridization buffer, and an apparatus similar to that used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored at each degree as the temperature of the substrate was increased from 20°C to 80°C, with a hold time of 1 minute at each integral degree. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 52°C. See Figure 19B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 55°C, which corresponds with the temperature seen for the oligonucleotide-nanoparticle conjugates and linking oligonucleotides hybridized in solution. See Figure 19B.

10 Example 11: Assay of a Polyribonucleotide Using
Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates as Probes

The previous Examples utilized oligo-deoxyribonucleotides as targets in the assays. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide conjugates can also be used as probes in assaying a polyribonucleotide. The experiment was carried out by adding 1 µL of a solution of poly(rA) (0.004 A₂₆₀ Units) to 100 µL of gold nanoparticles (~ 10 nM in particles) conjugated to dT₂₀ (a 20-mer oligonucleotide containing thymidylate residues) through a mercaptoalkyl linker at the 5'-terminus. The conjugation procedure was that described in Example 3. Following freezing in a Dry Ice/isopropyl alcohol bath, thawing at room temperature, and spotting on a C18 TLC plate as described in Example 4, a blue spot characteristic of aggregation of the nanoparticles by hybridization was observed. Control experiments carried out in absence of the target gave a pink spot, rather than a blue spot.

25 Example 12: Assay for Protective Antigen DNA Segment of Anthrax
Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

In many cases amplification of a double-stranded DNA target by PCR is needed to provide sufficient material for an assay. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be used to assay for a DNA strand in the presence of its complement (i.e., assaying for a single strand after thermal

WO 01/051665

PCT/US01/01190

dehybridization of a double-stranded target) and can recognize and specifically bind to an amplicon obtained from a PCR reaction.

A PCR solution containing a 141 base pair duplex amplicon of the Protective Antigen segment of Anthrax was provided by the Navy (sequence given in Figure 23).

- 5 The assay for this amplicon was carried out by isolating the DNA from 100 μ L of the PCR solution using a Qiaquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) and the standard protocol for this kit, with the exception that elution of the DNA was effected with 10 mM phosphate buffer at pH 8.5, rather than with the buffer provided with the kit. The eluant was then evaporated to dryness on a Speed Vac (Savant). To this
- 10 residue was added 5 μ L of a master mix prepared by mixing equal volumes of each of two solutions of two different oligonucleotide-nanoparticle probes (see Figure 23). Each oligonucleotide-nanoparticle probe was prepared as described in Example 3. The solutions of the probes which were combined to form the master mix were prepared by adding 10 μ L of 2 M NaCl and 5 μ L of oligonucleotide blocker solution (50 pmoles of each Blocker oligonucleotide (see Figure 23 and below) in a 0.3 M NaCl, 10 mM
- 15 phosphate, pH 7.0, solution) to 5 μ L of full-strength (about 10 nM) nanoparticle-oligonucleotide solution. The amplicon-probe mixture was heated to 100°C for 3 minutes, then frozen in a DRY ICE/ethanol bath and allowed to come to room temperature. A small aliquot (2 μ L) was spotted on a C18 TLC plate and allowed to dry.
- 20 A strong blue spot indicative of hybridization was obtained.

- Control tests carried out in the same manner in absence of the amplicon target DNA, in the absence of Probe 1, in the absence of Probe 2, or in the absence of the sodium chloride, were all negative; that is, gave a pink spot. Similarly a test carried out using probes 1 and 2 with a PCR amplicon derived from the Lethal Factor segment of
- 25 Anthrax in place of the Protective Antigen Segment was negative (pink spot). These controls confirmed that both probes were essential, that salt conditions appropriate for hybridization were needed, and that the test was specific for the specified target sequence.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

The oligonucleotide Blockers were added to inhibit binding of the second strand of the initial duplex target (*i.e.*, the strand complementary to the target strand) to regions of the target nucleic acid strand outside the segment that binds to the probes (see Figure 23 for sequences), since such binding interferes with binding of the nanoparticle oligonucleotide probes to the target strand. In this example, the Blocker oligonucleotides were complementary to the single-stranded target in regions not covered by the probes. An alternative scheme is to use blocker oligonucleotides that are complementary to the PCR complementary strand (the strand complementary to the target strand) outside the region that competes with the probe oligonucleotides.

10

Example 13: Direct assay of PCR Amplicons without isolation
of the amplicons from the PCR solution

The procedure described in Example 12 involved separation of the PCR amplicon from the PCR solution before addition of the nanoparticle-oligonucleotide probes. For many purposes it would be desirable to be able to carry out the assay directly in the PCR solution without preliminary isolation of the polynucleotide products. A protocol for such an assay has been developed and is described below. This protocol has been performed successfully with several PCR products derived under standard conditions using a GeneAmp PCR Reagent Kit with Amplitaq DNA polymerase.

20

To 50 μ L of the PCR sample solution, 5 μ L of a mixture of two gold nanoparticle-oligonucleotide probes (0.008 A₅₂₀ Units of each) was added, followed by addition of a solution made up from 1 μ L of Blocker oligonucleotides (10 pmoles each), 5 μ L of 5 M NaCl, and 2 μ L of 150 mM MgCl₂. This mixture was heated for 2 minutes at 100°C to separate the strands of the duplex target, the tube was immersed directly in a cold bath (*e.g.*, Dry Ice/ethanol) for 2 minutes, then removed, and the solution allowed to thaw at room temperature (the freeze-thaw cycle facilitates hybridization of the probes with the target oligonucleotide). Finally, a few μ L of the solution were spotted on a plate (*e.g.*, C18 RP TLC plate, a silica plate, a nylon membrane, etc.). As usual, blue color

25

WO 01/051665

PCT/US01/01190

signifies the presence of the targeted nucleic acid in the PCR solution; a pink color is negative for this target.

5 Example 14: Direct Recognition of Duplex Oligonucleotides Without Dehybridization, Using Assembly of Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

In the previous Examples, double-stranded targets were dehybridized by heating to generate single strands which interacted with single-stranded oligonucleotide probes bound to nanoparticles. The present example demonstrates that in cases where triple-stranded complexes can form, double-stranded oligonucleotide sequences can be
10 recognized by the nanoparticle probes without prior dehybridization of the target.

Tests were carried out with two different systems-- polyA:polyU and dA₁₀:dT₁₀ -- by adding 1 :L of a solution containing 0.8 A₂₆₀ Units of the target duplex in 100 µL of buffer (0.1 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0) to 100 µL of a colloidal solution of Au-sdT₁₀ nanoparticle-oligonucleotide conjugate (~10 nM in particles; see Example 11) in
15 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. Subsequent quick freezing by immersing the tube in a Dry Ice/isopropyl alcohol bath and thawing by removing the tube from the bath and letting it stand at room temperature (22°C), followed by spotting 3 µL of the solution on a C18 TLC plate, afforded a blue spot characteristic of hybridization and aggregation of the nanoparticles.

The rationale for this test is that the nanoparticle probes (bearing pyrimidine oligonucleotides in this example) bind in a sequence specific manner at purine oligonucleotide/pyrimidine oligonucleotide sites along the duplex target. Since many binding sites are available on each double stranded entity, the binding leads to formation of an aggregate of nanoparticles. The results show that this assay, based on formation of
20 triple-stranded complexes involving the nanoparticle probes, works both for oligoribo- and oligodeoxyribonucleotide double-stranded targets.

Example 15: Assay Employing Both Fluorescence And Colorimetric Detection

WO 01/051665

PCT/US01/01190

All hybridization experiments were performed in a 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0, buffer solution. AcetatePlusTM filtration membranes (0.45 µm) were purchased from Micron Separations Inc., Westboro, MA. Alkylamine-functionalized latex microspheres (3.1 µm) were purchased from Bangs Laboratories, Fishers IN.

- 5 Fluorophore-labeled oligonucleotides functionalized with alkylamino groups at the 3'-terminus were synthesized using standard phosphoramidite chemistry (Eckstein, ed., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, N.Y. 1991) with an Amino-Modifier C7 CPG solid support (Glen Research) and a 5'-fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research) on an Expedite 8909 synthesizer and were
- 10 purified by reverse phase HPLC. They were attached to the amine-functionalized latex microspheres by means of diisothiocyanate coupling to yield a dithiourea linkage as described in Charreyre et al., *Langmuir*, 13, 3103-3110 (1997). Briefly, a DMF solution of a one thousand fold excess of 1,4-phenylene diisothiocyanate was added to an aqueous borate buffer solution (0.1 M, pH 9.3) of the amino-modified oligonucleotide. After
- 15 several hours, the excess 1,4-phenylene diisothiocyanate was extracted with butanol and the aqueous solution lyophilized. The activated oligonucleotides were redissolved in borate buffer and reacted with the amino-functionalized latex microspheres in a carbonate buffer (0.1 M, pH 9.3, 1 M NaCl). After 12 hrs, the particles were isolated by centrifugation and washed three times with buffered saline solution (0.3 M NaCl, 10 mM
- 20 phosphate pH 7.0). The 5'-oligonucleotide-modified gold nanoparticle probes were prepared as described in Example 3.

- The target oligonucleotide (1-5 µl, 3 nM) was added to 3 µl of fluorophore-labeled oligonucleotide-modified latex microsphere probe solution (3.1 µm; 100 fM). After 5 minutes, 3 µl of the 5' oligonucleotide-modified gold nanoparticle probe solution
- 25 (13 nm; 8 nM) were added to the solution containing the target and latex microsphere probes. Upon standing for an additional 10 minutes, the solution containing both probes and target was vacuum-filtered through the AcetatePlus membrane. The membrane retained the relatively large latex particles and allowed any non-hybridized gold

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticle probes to pass through. In the presence of a sufficient concentration of target, the latex microspheres and the gold nanoparticles hybridized with the target, and a red spot was observed on the membrane (positive result). A control experiment was always carried out where the aliquot of solution containing the target oligonucleotide was replaced by an equal volume of water. In this case, a white spot was left on the membrane (negative result). For a 24-base-pair model system, using the unaided eye, 3 femtomoles of target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

A double-stranded target oligonucleotide (1-5 μ l, 20 nM), 3 μ l of a solution of fluorophore-labeled- oligonucleotide-latex microspheres (3.1 μ m; 100 fM) and 3 μ l of a solution of 5'-oligonucleotide-gold nanoparticles (13 nm; 8 nM) were combined and heated to 100 °C for 3 minutes. Then, the solution was immediately frozen by immersing the reaction vessel containing it in a liquid N₂ bath for 3 minutes. This solution was then thawed at room temperature and filtered as described above. For a 24-base pair model system, using the unaided eye, 20 femtomoles of duplex target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

When monitored by fluorescence, the detection method described above proved to be difficult due to background fluorescence from the membrane. This problem was overcome by "washing" the latex microspheres by centrifugation to remove excess gold nanoparticle probes before spotting an aliquot on a reverse-phase TLC plate. The hybridization experiments were performed as described above. After hybridization was effected between the probes and target, 10 μ l of buffer were added to the solution, which was subsequently centrifuged at 10,000 x g for 2 minutes. The supernatant was removed, and 5 μ l of buffer were added to help resuspend the precipitate. A 3 μ l aliquot was then spotted on a reverse-phase TLC plate. For both single-stranded and duplex target oligonucleotides, 25 femtomoles could be detected colorimetrically by the naked eye. Fluorescent spots could be visualized by the naked eye with a hand-held UV-lamp until the target amount in the 3 μ l aliquot used to form the spot was as low as 50 femtomoles. It is believed that optimization of this system will allow for detection of even lower

WO 01/051665

PCT/US01/01190

amounts of target nucleic acid.

Example 16: Assays Employing Silver Staining

DNA hybridization tests on oligonucleotide-modified substrates are commonly
5 used to detect the presence of specific DNA sequences in solution. The developing
promise of combinatorial DNA arrays for probing genetic information illustrates the
importance of these heterogeneous sequence assays to future science. In most assays, the
hybridization of fluorophore-labeled targets to surface-bound probes is monitored by
fluorescence microscopy or densitometry. Although fluorescence detection is very
10 sensitive, its use is limited by the expense of the experimental equipment and by
background emissions from most common substrates. In addition, the selectivity of
labeled oligonucleotide targets for perfectly complementary probes over those with
single-base mismatches is poor, preventing the use of surface hybridization tests for
detection of single nucleotide polymorphisms. A detection scheme which improved upon
15 the simplicity, sensitivity and selectivity of fluorescent methods could allow the full
potential of combinatorial sequence analysis to be realized. The present invention
provides such improved detection schemes.

For instance, oligonucleotide-modified gold nanoparticles and unmodified DNA
target could be hybridized to oligonucleotide probes attached to a glass substrate in a
20 three-component sandwich assay (see Figures 25A-B). Note that the nanoparticles can
either be individual ones (see Figure 25A) or "trees" of nanoparticles (see Figure 25B).
The "trees" increase signal sensitivity as compared to the individual nanoparticles, and
the hybridized gold nanoparticles "trees" often can be observed with the naked eye as
dark areas on the glass substrate. When "trees" are not used, or to amplify the signal
25 produced by the "trees," the hybridized gold nanoparticles can be treated with a silver
staining solution. The "trees" accelerate the staining process, making detection of target
nucleic acid faster as compared to individual nanoparticles.

The following is a description of one specific system (illustrated in Figure 25A).

WO 01/051665

PCT/US01/01190

- Capture oligonucleotides (3' - HS(CH₂)₃ - A₁₀ATGCTCAACTCT; SEQ ID NO: 43) were immobilized on a glass substrate as described in Example 10. A target oligonucleotide (5' - TACGAGTTGAGAA¹CCTGAATGCG - 3', SEQ ID NO: 44, concentrations given below in Table 6 for each experiment) was hybridized with the capture oligonucleotides
- 5 in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer as described in Example 10. The substrate was rinsed twice with the same buffer solution and immersed in a solution containing gold nanoparticle probes functionalized with target-complementary DNA (5' - HS(CH₂)₆A₁₃CGCAATCAGGAT, SEQ ID NO: 45)(preparation described in Example 3) for 12 hours. Next, the substrate was rinsed copiously with 0.3 M NaNO₃ to remove Cl⁻.
- 10 The substrate was then developed with silver staining solution (1:1 mixture of Silver Enhancer Solutions A and B, Sigma Chemical Co., # S-5020 and # S-5145) for 3 minutes. Greyscale measurements were made by scanning the substrate on a flatbed scanner (normally used for scanning documents into a computer) linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements (e.g., Adobe
- 15 Photoshop). The results are presented in Table 6 below.

TABLE 6

Target DNA Concentration	Mean Greyscale	Standard Deviation
10 nM	47.27	2.10
5 nM	53.45	0.94
2 nM	54.56	1.17
1 nM	59.98	1.82
500 pM	61.61	2.26
200 pM	90.06	3.71
100 pM	99.04	2.84
50 pM	135.20	7.49
20 pM	155.39	3.65
None (control)	168.16	10.03

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Example 17: Assemblies Containing Quantum Dots

This example describes the immobilization of synthetic single-stranded DNA on semiconductor nanoparticle quantum dots (QDs). Native CdSe/ZnS core/shell QDs (~4 nm) are soluble only in organic media, making direct reaction with alkylthiol-terminated single-stranded DNA difficult. This problem was circumvented by first capping the QDs with 3-mercaptopropionic acid. The carboxylic acid group was then deprotonated with 4-(dimethylamino)pyridine, rendering the particles water soluble, and facilitating reaction of the QDs with either 3'-propylthiol- or 5'-hexylthiol-modified oligonucleotide sequences. After DNA modification, the particles were separated from unreacted DNA by dialysis. A "linker" DNA strand was then hybridized to surface-bound sequences, generating extended assemblies of nanoparticles. The QD assemblies, which were characterized by TEM, UV/Visible spectroscopy, and fluorescence spectroscopy, could be reversibly assembled by controlling the temperature of the solution. The temperature dependent UV-Vis spectra were obtained for the novel QD assemblies and composite aggregates formed between QDs and gold nanoparticles (~13 nm).

A. General Methods

Nanopure water (18.1 M Ω) prepared using a NANOpure ultrapure water purification system was employed throughout. Fluorescence spectra were obtained using a Perkin Elmer LS 50 B Luminescence Spectrometer. Melting analyses were performed using a HP 8453 diode array spectrophotometer equipped with a HP 9090a Peltier Temperature Controller. Centrifugation was carried out using either an Eppendorf 5415C centrifuge or a Beckman Avanti 30 centrifuge. TEM images were acquired using a Hitachi HF-2000 field emission TEM operating at 200 kV.

B. Preparation Of Oligonucleotide-QD Conjugates

Synthetic methodologies for semiconductor quantum dots (QDs) have improved greatly in recent years, and for some materials, most notably CdSe, monodisperse samples of pre-determined size can now be prepared with relative ease. Murray et al., *J.*

WO 01/051665

PCT/US01/01190

- Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706; Hines, et al., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468. As a result, the unique electronic and luminescent properties of these particles have been studied extensively (see, Alivisatos, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13226, and references therein; Klein et al., *Nature* **1997**, 699; Kuno et al., *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 9869;
- 5 Nirmal et al., *Nature* **1996**, *383*, 802), potentially paving the way for QDs to be employed in diverse technologies, such as light-emitting diodes (Schlamp et al., *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 5837; Dabbousi et al., *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *66*, 1316) and as non-radioactive biological labels (Bruchez et al., *Science* **1998**, *281*, 2012; Chan et al., *Science* **1998**, *281*, 2016). However, many applications will require that the particles be arranged spatially
- 10 on a surface or organized into three-dimensional materials (Vossmeier et al., *J. Appl. Phys.* **1998**, *84*, 3664). Moreover, the ability to organize one or more types of nanoparticles into superlattice structures (Murray et al., *Science* **1995**, *270*, 1335) would allow for the construction of completely new types of hybrid materials with new and potentially interesting and useful properties.
- 15 DNA is the ideal synthon for programming the assembly of nanoscale building blocks into periodic two- and three-dimensional extended structures. The many attributes of DNA, which include ease of synthesis, extraordinary binding specificity, and virtually unlimited programmability by virtue of nucleotide sequence, can be exploited for the use of QD assembly.
- 20 The modification of QDs with DNA has proven to be more difficult than for gold nanoparticles. The common methods for preparing highly luminescent CdSe QDs yield materials that are coated with a mixture of trioctylphosphine oxide (TOPO) and trioctylphosphine (TOP). As a result, these QDs are soluble only in non-polar solvents, making them difficult to functionalize with highly charged DNA strands by direct
- 25 reaction. This difficulty has been overcome by the method described below, which is the first successful modification of semiconductor nanoparticles with single-stranded DNA. It should be noted that others, in elegant studies, have looked at the interactions between QDs and duplex DNA, but these studies did not make use of the sequence specific

WO 01/051665

PCT/US01/01190

binding properties of DNA to direct the assembly of extended QD structures. Coffey et al., *Appl. Phys. Lett.*, **1996**, *69*, 3851; Mahtab et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7028.

Since the surface of CdSe/ZnS core/shell QDs binds organic thiols, it was desired to modify these semiconductor particles with alkylthiol-terminated DNA strands by a substitution reaction. The lack of water solubility of these QDs, though, hindered such an approach. Two different methods recently have been reported for making QDs water soluble, allowing for the immobilization of protein structures on the QD surfaces. One involves encapsulation of the core/shell structures with a silica layer (Bruchez et al., *Science* **1998**, *281*, 2013), while the other utilizes mercaptoacetic acid both to stabilize the particles and provide water solubility (Chan et al., *Science* **1998**, *281*, 2016). The procedure described in this example, which produces remarkably stable colloid under DNA hybridization conditions, utilizes 3-mercaptopropionic acid to passivate the QD surface.

An excess of 3-mercaptopropionic acid (0.10 mL, 1.15 mmol; Aldrich) was added by syringe to a suspension of ~20 mg of TOP/TOPO stabilized CdSe/ZnS QDs (prepared as described in Hines, et al., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468) in 1.0 mL of N,N-dimethylformamide (DMF; Aldrich) generating a clear, dark orange solution containing 3-mercaptopropionic acid functionalized QDs. The reaction occurred quickly. For subsequent reactions, excess 3-mercaptopropionic acid was not removed, and the particles were stored at room temperature in DMF.

However, to characterize the QDs, a portion of the sample was purified by removing unreacted 3-mercaptopropionic acid as follows. A 0.50 mL sample was centrifuged (4 hours at 30,000 rpm), and the supernatant was removed. The remaining solution was washed with ~0.3 mL of DMF and recentrifuged. This step was repeated two additional times before recording the FTIR spectrum. FTIR (polyethylene card, 3M): 1710 cm⁻¹ (s), 1472 cm⁻¹ (m), 1278 cm⁻¹ (w), 1189 cm⁻¹ (m), 1045 cm⁻¹ (w), 993 cm⁻¹ (m), 946 cm⁻¹ (w), 776 cm⁻¹ (m), 671 cm⁻¹ (m). Unlike the TOP/TOPO stabilized native QDs, the 3-mercaptopropionic acid modified QDs exhibited a characteristic ν_{CO} band at

WO 01/051665

PCT/US01/01190

1710 cm^{-1} for the surface bound propionic acid.

Although the 3-mercaptopropionic acid modified QDs were practically insoluble in water, their solubility could be significantly enhanced by deprotonating the surface bound mercaptopropionic acid sites with 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP; Aldrich) as described in the next paragraph. The QDs then dispersed readily in water, producing orange solutions that were stable for up to a week at room temperature.

To attach oligonucleotides to QDs, 150 μL (optical density at 530 nm = 21.4) of a solution of the 3-mercaptopropionic acid functionalized particles in DMF were added to a solution of DMAP (8.0 mg, 0.065 mmol) in 0.4 mL of DMF. An orange precipitate was formed. It was separated by centrifugation (–30 seconds at 3000 rpm) and then dissolved in 1.0 mL of a solution of 3'-propylthiol- or 5'-hexylthiol-terminated oligonucleotides (1.0–2.0 ODs/mL; prepared as described in Example 1; sequences given below). Precipitate (dissolved in water) was characterized by IR spectroscopy (polyethylene card, 3M). IR (cm^{-1}): 1647 (m), 1559 (s), 1462 (m), 1214 (w), 719 (w), 478 (s). After standing for 12 hours, the oligonucleotide-containing solution was brought to 0.15 M NaCl, and the particles were aged for an additional 12 hours. The NaCl concentration was then raised to 0.3 M, and the mixture was allowed to stand for a further 24–40 hours before dialyzing against PBS (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7, 0.01% sodium azide) using a 100 kDa membrane (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane). The dialysis was carried out over a period of 48 hours, during which time the dialysis bath was refreshed three times.

Oligonucleotide-QD conjugates prepared in this manner displayed indefinite aqueous stability. Moreover, the colloid remained strongly fluorescent, with a sharp [full width at half maximum (FWHM) = 33 nm], symmetrical emission at 546 nm (indicative of a ~3.2 nm CdSe core; Murray et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706).

Two different oligonucleotide-QD conjugates were prepared by this protocol and stored in PBS. One was modified with a 22mer, comprised of a propylthiol functionality at the 3'-end, a 12mer capture sequence, and an intervening 10 base (all A) spacer: 5'-

WO 01/051665

PCT/US01/01190

TCTCAACTCGTAA₁₀-(CH₂)₂-SH [SEQ ID NO: 46]. The other employed a 5'-hexylthiol-terminated sequence, also with a 10 base (all A) spacer, and a 12mer capture sequence which was non-complementary with the 3'-propylthiol sequence: 5'-SH-(CH₂)₆-A₁₀CGCATTTCAGGAT-3' [SEQ ID NO: 47].

5 C. Preparation Of QD Assemblies

When approximately equal quantities of these two oligonucleotides (200 μL, OD₂₅₀=0.224 and 0.206, respectively) were mixed and then combined with 6 μL (60 pmol) of a solution of a complementary linking 24mer sequence (5'-TACGAGTTGAGAATCCT-GAATGCG-3', SEQ ID NO: 48), QD assemblies formed within 20-30 minutes at room temperature, Figure 26. Faster linking took place when the mixture was frozen (-78° C) and then allowed to warm slowly to room temperature.

The clusters generated were not large enough to settle out of solution. However, they could be separated by centrifugation at relatively low speeds (10,000 RPM for 10 min), as compared with the unlinked particles (30,000 RPM for 2-3 hours).

15 The decrease in fluorescence upon hybridization was determined by integration of the fluorescence signal (320 nm excitation wavelength) from 475 nm to 625 nm of 4 pairs of samples. Each pair was prepared in the following manner. A solution of 3' propylthiol-terminated DNA-modified particles (30 μL, optical density at 530 nm = 0.224) was combined with a solution of 5' hexylthiol-terminated DNA-modified QDs (30 μL, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube, and then diluted with 140 μL of PBS. The mixture was then split into two equal portions, and complementary "linker" DNA (3 μL, 30 pmol) was added to one, while non-complementary "linker" DNA (5'-CTACTTAGATCCGAGTCCCCACAT-3', SEQ ID NO: 49) (3 μL, 30 pmol) was added to the other. All eight of the samples were then frozen in a dry ice/acetone bath (-78°C), after which they were removed from the bath and allowed to warm slowly to room temperature. To estimate the change in fluorescence efficiency upon hybridization, the fluorescence intensities of the "target" (complementary "linker") samples were adjusted to account for the difference in

WO 01/051665

PCT/US01/01190

absorbance at 320 nm from the corresponding control samples, which contained non-complementary "linker".

The results showed that hybridization of QD/QD assemblies was accompanied by a decrease in integrated fluorescence intensity by an average of $26.4 \pm 6.1\%$, and a -2 nm red shift of the emission maximum, presumably due to cooperative effects between QDs, Figure 27A. Interestingly, Bawendi, *et al.* noticed a similar, albeit slightly larger, red shift when comparing the fluorescence of close-packed QDs and widely separated dots isolated in a frozen matrix (Murray *et al.*, *Science* 1995, 270, 1335). These changes in the fluorescence spectra may be an indication of excimer formation between QDs, but the exact nature of such a complex is still largely a matter of speculation. As expected, no aggregation was observed when the "linker" was missing or not complementary, or when either one of the two types of particles was absent.

The "melting" behavior of the DNA was monitored by observing the UV-Vis spectra of the aggregates as a function of temperature. For this "melting" analysis, the precipitate containing the QD/QD assemblies was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes, washed with 7 μ L of PBS, recentrifuged, and suspended in 0.7 mL of PBS. The UV/Visible spectroscopic signature of the assemblies was recorded at two degree intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute prior to each measurement. The mixture was stirred at a rate of 500 rpm to ensure homogeneity throughout the experiment. Temperature vs extinction profiles were then compiled from the extinction at 600 nm. The first derivative of these profiles was used to determine the "melting" temperatures.

The results, Figure 27B ($T_m = 57^\circ\text{C}$), demonstrated conclusively that DNA had been immobilized on the QD surfaces and that hybridization was responsible for the assembly process. The transition also was extremely sharp when compared with DNA alone (FWHM of the respective first derivatives: 4°C vs 9°C), which is consistent with the formation of an aggregate structure with multiple DNA links per particle. An increase in extinction was observed upon denaturation, most likely because of a screening

WO 01/051665

PCT/US01/01190

effect whereby particles in the interiors of the assemblies are prevented from absorbing light by the surrounding QDs.

D. Preparation Of QD/Gold Assemblies

- With DNA-functionalized QDs in hand, the assembly of hybrid assemblies made from multiple types of nanoparticle building blocks became feasible. To prepare these hybrid assemblies, a solution of ~17 nM 3'-hexylthiol-modified 13 nm gold nanoparticles (30 μ L, ~5 fmol; prepared as described in Example 3) was mixed with a solution of 5'-hexylthiol-terminated DNA-modified QDs (15 μ L, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube. "Linker" DNA (5 μ L, 50 pmol) was added, and the mixture cooled to -78°C, and then allowed to warm slowly to room temperature, generating a reddish-purple precipitate. No aggregation behavior was observed unless both types of particles and a complementary target were present. After centrifugation (1 min at 3,000 rpm) and removal of the supernatant, the precipitate was washed with 100 μ L of PBS and re-centrifuged.
- For "melting" analysis, the washed precipitate was suspended in 0.7 mL of PBS. UV-Vis spectroscopy was used to follow the changes in the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles, so temperature vs. extinction profiles were compiled at 525 nm. Using the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles provides a much more sensitive probe with which to monitor hybridization than does the UV-Vis spectroscopic signature of the QDs alone. Therefore, a "melting" experiment can be performed on a much smaller sample (~10% of the QD solution is needed), although the intensity of the plasmon band obscures the UV/Vis signal from the QDs. Similar to the pure QD system described above, a sharp (FWHM of the first derivative = 4.5°C) melting transition occurred at 58°C (see Figure 27D).
- High resolution TEM images of these assemblies showed a network of gold nanoparticles interconnected by multiple QDs, Figure 27C. The QDs, which have a much lower contrast in the TEM image than gold nanoparticles, can be identified by their lattice fringes. They are just barely resolvable with the high resolution TEM, but clearly

WO 01/051665

PCT/US01/01190

indicate the periodic structure of these composite assemblies and the role that DNA plays in forming them.

E. Summary

The results described in this example definitively establish that the immobilization of DNA onto QD surfaces has been achieved and that these particles can now be used in combination with DNA under hybridization conditions. Using DNA-functionalized QDs, the first DNA-directed formation of QD and mixed gold/QD nanoparticle structures has been demonstrated. The successful modification of semiconductor QDs with DNA has significant implications for materials research, and the door is now open for more extensive inquiries into the luminescent, electronic, and chemical properties of these unique building blocks as they are incorporated into new and functional multi-component nanostructures and nanoscale materials.

Example 18: Methods of Synthesizing Oligonucleotide-Nanoparticle Conjugates And The Conjugates Produced By The Methods

A. General Methods

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and trisodium citrate were purchased from Aldrich chemical company, Milwaukee, WI. Gold wire, 99.999% pure, and titanium wire were purchased from Goldsmith Inc., Evanston, IL. Silicon wafers (100) with a 1 micron thick oxide layer were purchased from Silicon Quest International, Santa Clara, CA. 5'-thiol-modifier C6-phosphoramidite reagent, 3'-propylthiol modifier CPG, fluorescein phosphoramidite, and other reagents required for oligonucleotide synthesis were purchased from Glen Research, Sterling, VA. All oligonucleotides were prepared using an automated DNA synthesizer (Expedite) using standard phosphoramidite chemistry (Eckstein, F. *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed.; Oxford University Press, New York, 1991). Oligonucleotides containing only 5' hexylthiol modifications were prepared as described in Example 1. 5-(and 6)-carboxyfluorescein, succinimidyl ester was purchased from Molecular Probes, Eugene, OR. NAP-5 columns (Sephadex G-25

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Medium, DNA grade) were purchased from Pharmacia Biotech. Nanopure H₂O (>18.0 MΩ), purified using a Barnstead NANOpure ultrapure water system, was used for all experiments. An Eppendorf 5415C or a Beckman Avanti 30 centrifuge was used for centrifugation of Au nanoparticle solutions. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed using a IIP series 1100 HPLC.

B. Physical Measurements.

Electronic absorption spectra of the oligonucleotide and nanoparticle solutions were recorded using a Hewlett-Packard (HP) 8452a diode array spectrophotometer. Fluorescence spectroscopy was performed using a Perkin-Elmer LS50 fluorimeter. Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed with a Hitachi 8100 Transmission Electron Microscope operating at 200 kV. A Thermo Jarrell Ash AtomScan 25 atomic emission spectrometer with an inductively coupled plasma (ICP) source was used to determine the atomic concentration of gold in the nanoparticle solutions (gold emission was monitored at 242.795 nm).

C. Synthesis and Purification of Fluorescein-Labeled Alkanethiol-Modified Oligonucleotides

Thiol-modified oligonucleotide strands containing either 12 or 32 bases, with 5' hexylthiol and 3' fluorescein moieties, were prepared. The sequence of the 12mer (S12F) was HS(CH₂)₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-3'-(CH₂)₆-F [SEQ ID NO:50], and the 32mer (SA₂₀I2F) contained the same 12mer sequence with the addition of a 20 dA spacer sequence to the 5' end [SEQ ID NO:51]. The thiol-modified oligonucleotides were prepared as described in Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* **120**:1959-1964 (1998). An amino-modifier C7 CPG solid support was used in automated synthesis, and the 5' terminus was manually modified with hexylthiol phosphoramidite, as described previously. The 3' amino, 5' trityl-protected thiol modified oligonucleotides were purified by reverse-phase HPLC using an HP ODS Hypersil column (5 mm, 250 x 4 mm) with 0.03 M triethyl ammonium acetate (TEAA), pH 7 and a 1% / minute gradient of 95% CH₃CN / 5% 0.03 M TEAA at a flow rate of 1 mL/min., while monitoring the UV signal

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of DNA at 254 nm. The retention times of the 5'-S-trityl, 3' amino modified 12-base and 32-base oligonucleotides were 36 and 32 minutes respectively.

The lyophilized product was redispersed in 1 ml of 0.1 M Na₂CO₃ and, while stirring in the dark, 100 µL of 10 mg/ml succinimidyl ester of fluorescein (5,6 FAM-SE, Molecular Probes) in dry DMF was added over 1.5 hours according to the directions of the manufacturer (Molecular Probes literature). The solution was stirred at room temperature for an additional 15 hours, then precipitated from 100% ethanol at -20 °C. The precipitate was collected by centrifugation, dissolved in H₂O and the coupled product separated from unreacted amino-terminated oligonucleotide by ion-exchange HPLC. A Dionex Nucleopac PA-100 column (250 x 4 mm) was operated with 10 mM NaOH aqueous eluent and a 1% / minute gradient of 1 M NaCl/10mM NaOH at a flow rate of 0.8 mL/minute. Retention times of 5'-S-trityl, 3' fluorescein modified 12mer and 32mer were 50 and 49 minutes respectively. The oligonucleotide product was desalted by reverse-phase HPLC. Removal of the trityl protection group of the fluorescein-terminated, trityl oligonucleotide was performed using silver nitrate and dithiothreitol (DTT) as previously described (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998)). The yield and purity of the oligonucleotides were assessed using the techniques previously described for alkylthiol oligonucleotides (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998)). Oligonucleotides were used immediately after detritylation of the thiol group.

Thiol-modified oligonucleotides containing 32 bases, with 3' propylthiol and 5' fluorescein moieties (HS(CH₂)₃-3'-(W)₂₉-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F, W= A or T) [SEQ ID NO:52] were synthesized on an automated synthesizer using 3' thiol modifier CPG. The 5' terminus of each oligonucleotide was coupled manually to fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research). The modified oligonucleotides were purified by ion exchange HPLC (1% / min gradient of 1 M NaCl, 10 mM NaOH; retention time (Rt) ~ 48 min (W = T), Rt ~ 29 min (W = A)). After purification, the oligonucleotide solutions were desalted by reverse phase HPLC. The 3' thiol moieties were deprotected

WO 01/051665

PCT/US01/01190

with dithiothreitol by a procedure previously described (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998)).

D. Synthesis and Purification of Fluorescein Labeled Oligonucleotides.

The fluorophore labeled complement (12F) consisted of 12 bases 3'-GCG-TAA-
 5 GTC-CTA-5'-(CH₂)₆-F [SEQ ID NO:53] complementary to the 12mer sequence in S12F
 and SA₃₀12F. The oligonucleotide was synthesized using standard methods, and a
 syringe-based procedure, similar to the procedure reported above for the 5' alkylthiol
 modification, was used to couple fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research)
 to the 5' end of the CPG-bound oligonucleotide. Purification was performed using
 10 reverse-phase HPLC as above. The fluorescein-labeled oligonucleotide had a retention
 time of 18 min. The fluorophore labeled complement, 3'12F (5'-ATC-CTG-AAT-GCG-
 F; [SEQ ID NO:54]) was prepared using an amino-modifier C7 CPG solid support for
 automated synthesis, followed by coupling of 5-(6)-carboxyfluorescein succinimidyl
 ester to the 3' amine using the procedure described above.

15 E. Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles were prepared by citrate reduction of HAuCl₄ as described in
 Example 1. Transmission Electron Microscopy (TEM) performed with a Hitachi 8100
 TEM was used to determine the size distribution of the resulting nanoparticles. At least
 250 particles were sized from TEM negatives using graphics software (ImageTool). The
 20 average diameter of a typical particle preparation was 15.7 ± 1.2 nm. Assuming spherical
 nanoparticles and density equivalent to that of bulk gold (19.30 g/cm³), an average
 molecular weight per particle was calculated (2.4 × 10⁷ g/mol). The atomic gold
 concentration in a solution of gold nanoparticles was determined by ICP-AES
 (inductively coupled plasmon atomic emission spectroscopy). A gold atomic absorption
 25 standard solution (Aldrich) was used for calibration. Comparison of atomic gold
 concentration in the particle solution to the average particle volume obtained by TEM
 analysis yielded the molar concentration of gold particles in a given preparation, typically
 ~10 nM. By measuring the UV-vis absorbance of nanoparticle solutions at the surface

WO 01/051665

PCT/US01/01190

plasmon frequency (520 nm), the molar extinction coefficients (ϵ at 520 nm) were calculated for the particles, typically $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for $15.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ diameter particles.

F. Preparation of Gold Thin Films.

- 5 Silicon wafers were cut into $\sim 10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ pieces and cleaned with piranha etch solution (4:1 concentrated H_2SO_4 : 30% H_2O_2) for 30 min at 50°C , then rinsed with copious amounts of water, followed by ethanol. (*Warning: piranha etch solution reacts violently with organic materials and should be handled with extreme caution.*) Metal was deposited at a rate of 0.2 nm/s using an Edwards Auro 306 evaporator (base pressure of 3×10^{-7} millibar) equipped with an Edwards FTM6 quartz crystal microbalance. The oxidized sides of the silicon were coated with a Ti adhesion layer of 5 nm, followed by 200 nm of gold.

G. Preparation of 5' Alkylthiol Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles.

- Gold nanoparticles were modified with fluorescein-alkylthiol oligonucleotides by adding freshly deprotected oligonucleotides to aqueous nanoparticle solution (particle concentration $\sim 10 \text{ nM}$) to a final oligonucleotide concentration of $3 \mu\text{M}$. After 24 hours, the solution was buffered at pH 7 (0.01 M phosphate), and NaCl solution was added (to final concentration of 0.1 M). The solution was allowed to 'age' under these conditions for an additional 40 hours. Excess reagents were then removed by centrifugation for 30 minutes at 14,000 rpm. Following removal of the supernatant, the red oily precipitate was washed twice with 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7, solution (PBS) by successive centrifugation and redispersion, then finally redispersed in fresh buffer solution. Invariably, a small amount ($\sim 10\%$ as determined by UV-vis spectroscopy) of nanoparticle is discarded with the supernatant during the washing procedure. Therefore, final nanoparticle concentrations were determined by TEM, ICP-AES, and UV-vis spectroscopy (see above). Extinction coefficients and particle size distributions did not change significantly as a result of the oligonucleotide modification.

H. Preparation of 5' Alkylthiol Oligonucleotide-Modified Gold Thin Films.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

Silicon supported gold thin films were immersed in deposition solutions of deprotected alkylthiol modified oligonucleotides for equal times and buffer conditions as for the gold nanoparticles. Following oligonucleotide deposition, the films were rinsed extensively with 0.3 M PBS and stored in buffer solution. Gold was evaporated on one side only, leaving an unpassivated silicon/silicon oxide face. However, alkylthiol modified DNA did not adsorb appreciably to bare silicon oxide surfaces that were rinsed with PBS.

1. Quantitation of Alkylthiol-Oligonucleotides Loaded on Nanoparticles.

Mercaptoethanol (ME) was added (final concentration 12 mM) to fluorophore-labeled oligonucleotide modified nanoparticles or thin films in 0.3 M PBS, to displace the oligonucleotides. After 18 hours at room temperature with intermittent shaking, the solutions containing displaced oligonucleotides were separated from the gold by either centrifugation of the gold nanoparticles, or by removal of the gold thin film. Aliquots of the supernatant were diluted two-fold by addition of 0.3 M PBS, pH 7. Care was taken to keep the pH and ionic strength of the sample and calibration standard solutions the same for all measurements due to the sensitivity of the optical properties of fluorescein to these conditions (Zhao et al., *Spectrochimica Acta* **45A**:1113-1116 (1989)). The fluorescence maxima (measured at 520 nm) were converted to molar concentrations of the fluorescein-alkylthiol modified oligonucleotide by interpolation from a standard linear calibration curve. Standard curves were prepared with known concentrations of fluorophore-labeled oligonucleotides using identical buffer and salt concentrations. Finally, the average number of oligonucleotides per particle was obtained by dividing the measured oligonucleotide molar concentration by the original Au nanoparticle concentration. Normalized surface coverage values were then calculated by dividing by the estimated particle surface area (assuming spherical particles) in the nanoparticle solution. The assumption of roundness is based on a calculated average roundness factor of 0.93. Roundness factor is computed as: $(4 \times \pi \times \text{Area})/(\text{perimeter} \times 2)$ taken from Baxes, Gregory, *Digital Image Processing*, p. 157 (1994).

WO 01/051665

PCT/US01/01190

J. Quantitation of the Hybridized Target Surface Density.

To determine the activity of attached oligonucleotides for hybridization, fluorophore-labeled oligonucleotides, which were complementary to the surface-bound oligonucleotides (12'F), were reacted with oligonucleotide modified surfaces (gold nanoparticles or thin films) under hybridization conditions (3 μ M complementary oligonucleotide, 0.3 M PBS, pH 7, 24 hr). Non-hybridized oligonucleotides were removed from the gold by rinsing twice with buffered saline as described above. Then, the fluorophore-labeled oligonucleotides were dehybridized by addition of NaOH (final concentration ~ 50 mM, pH 11-12, 4 hr). Following separation of the solution containing the 12'F from the nanoparticle solutions by centrifugation, and neutralization of the solutions by addition of 1 M HCl, the concentrations of hybridized oligonucleotide and corresponding hybridized target surface density were determined by fluorescence spectroscopy.

K. Quantitation of Surface Coverage and Hybridization

Citrate stabilized gold nanoparticles were functionalized with 12mer fluorescein-modified alkylthiol DNA (HS-(CH₂)₆-5'-CGC-ATT-CAG-GAT-(CH₂)₄-F [SEQ ID NO:50]). Surface coverage studies were then performed by thoroughly rinsing away non-chemisorbed oligonucleotides, followed by removal of the fluorophore-labeled oligonucleotides from the gold surface, and quantitation of oligonucleotide concentration using fluorescence spectroscopy (as described above).

Removal of all the oligonucleotides from the gold surface and subsequent removal of gold nanoparticles from the solution is critical for obtaining accurate coverage data by fluorescence for several reasons. First, the fluorescence signal of labeled, surface bound DNA is efficiently quenched as a result of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to the gold nanoparticle. Indeed, there is almost no measurable signal for fluorescein-modified oligonucleotides (12-32 nucleotide strands, sequences are given above) after they are immobilized on 15.7 ± 1.2 nm gold nanoparticles and residual oligonucleotide in solution is washed away. Second, the gold nanoparticles absorb a

WO 01/051665

PCT/US01/01190

significant amount of light between 200 nm and 530 nm, so their presence in solution during fluorescence measurements acts as a filter and diminishes the available excitation energy, as well as the intensity of emitted radiation. The gold surface plasmon band at 520 nm falls at the emission maximum of fluorescein.

5 Mercaptoethanol (ME) was used to rapidly displace the surface bound oligonucleotides by an exchange reaction. To examine the displacement kinetics, oligonucleotide-modified nanoparticles were exposed to ME (12 mM) for increasing periods of time prior to centrifugation and fluorescence measurements. The intensity of fluorescence associated with the solution free of nanoparticles can be used to determine
10 how much oligonucleotide was released from the nanoparticles. The amount of oligonucleotide freed in exchange with ME increased until about 10 hours of exposure (Figure 29), which is indicative of complete oligonucleotide displacement. The displacement reaction was rapid, which is presumably due to the inability of the oligonucleotide film to block access of the ME to the gold surface (Biebuyck et al.,
15 *Langmuir* 9:1766 (1993)).

 The average oligonucleotide surface coverage of alky(thiol)-modified 12mer oligonucleotide (S12F) on gold nanoparticles was 34 ± 1 pmol/cm² (average of ten independent measurements of the sample.) For 15.7 ± 1.2 nm diameter particles, this corresponds to roughly 159 thiol-bound 12mer strands per gold particle. Despite slight
20 particle diameter variation from batch to batch, the area-normalized surface coverages were similar for different nanoparticle preparations.

 In order to verify that this method is useful for obtaining accurate oligonucleotide surface coverages, it was used to displace fluorophore-labeled oligonucleotides from gold thin films, and the surface coverage data was compared with experiments aimed at
25 getting similar information but with different techniques. In these experiments, gold thin films were subjected to a similar oligonucleotide modification and ME displacement procedure as the citrate stabilized gold nanoparticles (see above). The oligonucleotide displacement versus time curves for the gold thin films are very similar to those measured

WO 01/051665

PCT/US01/01190

for gold nanoparticles. This suggests a similar rate of displacement for the thin films, even though the typical surface coverage values measured for these films were somewhat lower than the oligonucleotide coverages on gold nanoparticles. Importantly, the oligonucleotide surface coverages on gold thin films measured by our technique (18 ± 3 pmol/cm²) fall within the range of previously reported coverages on oligonucleotide thin films (10 pmol/cm² for a 25 base oligonucleotide on gold electrodes determined using electrochemistry or surface plasmon resonance spectroscopy (SPRS) (Steel et al., *Anal. Chem.* **70**:4670-4677 (1998))). Differences in surface coverages are expected due to different oligonucleotide sequences and lengths, as well as film preparation methods.

The extent of hybridization of complementary fluorophore-labeled oligonucleotides (12F') to nanoparticles with surface-bound 12mer oligonucleotides was measured as described above. Briefly, S12F modified nanoparticles were exposed to 12F' at a concentration of 3 μ M for 24 hours under hybridization conditions (0.3 M PBS, pH 7) and then rinsed extensively with buffer solution. Again, it was necessary to remove the hybridized strands from the gold before measuring fluorescence. This was accomplished by denaturing the duplex DNA in a high pH solution (NaOH, pH 11) followed by centrifugation. Hybridized 12F amounted to 1.3 ± 0.2 pmol/cm² (approximately 6 duplexes per 15.7 nm particle; the average number of duplexes per particle was computed by multiplying the normalized hybridized surface coverage in pmol/cm² by the average particle surface area as found from size distributions measured by TEM.). In order to measure the extent of non-specific adsorption, S12F modified gold nanoparticles were exposed to fluorophore-labeled non-complementary 12 base oligonucleotides (12F'') in 0.3 M PBS. After extensive rinsing (successive centrifugation/redispersion steps) and subsequent high pH treatment, the coverage of non-specifically adsorbed oligonucleotides on the nanoparticles was determined to be on the order of 0.1 pmol/cm². An analogous procedure was used to measure hybridization to S12F modified gold thin films in order to compare the hybridization results to reported values on gold electrodes. The degree of hybridization, 6 ± 2 pmol/cm², was consistent

WO 01/051665

PCT/US01/01190

with hybridization reported for mixed base 25mer on an gold electrode ($2\text{--}6\text{ pmol/cm}^2$) (Steel et al., *Anal. Chem.* 70:4670-4677 (1998)).

Surface coverages and hybridization values of the S12F/12F⁺ system for both nanoparticles and thin films are summarized in Table 7. The most striking result is the low hybridization efficiency (~ 4 % of surface-bound strands on nanoparticles while 33 % of strands on thin films hybridize). Previous studies have shown similarly low hybridization for sufficiently densely packed oligonucleotide monolayers. This may reflect a low accessibility to incoming hybridizing strands, due to a combination of steric crowding of the bases, especially those near the gold surface, as well as electrostatic repulsive interactions.

L. Effect of Oligonucleotide Spacer on Surface Coverage and Hybridization.

Although the high coverage of the S12F oligonucleotide is advantageous in terms of nanoparticle stabilization, the low hybridization efficiency prompted us to devise a means of decreasing steric congestion around the hybridizing sequence. Oligonucleotides (32mer) were synthesized having a 20 dA spacer sequence inserted between the alkylthiol group and the original 12 base recognition sequence. This strategy was chosen based on the assumption that: 1) bases near the nanoparticle surface are sterically inaccessible because of weak interactions between the nitrogenous bases and the gold surface, as well as interstrand steric crowding, and 2) on a 15.7 nm diameter roughly spherical particle, 12mer sequences attached to the end of 20mer spacer units roughly perpendicular to the surface (Levicky et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:9787-9792 (1998)) will lead to a film with a greater free volume as compared with a film formed from the same 12mer directly bound to the surface.

While the surface density of single-stranded SA₂₀12F strands ($15 \pm 4\text{ pmol/cm}^2$) was lower than that of S12F ($34 \pm 1\text{ pmol/cm}^2$), the particles modified with a 32-mer using the identical surface modification showed comparable stability compared to those modified with 12-mer. As anticipated, the hybridization efficiency of the SA₂₀12F/12F⁺ system ($6.6 \pm 0.2\text{ pmol/cm}^2$, 44%) was increased to approximately 10 times that of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

original S12F/12F' system, Table 7.

M. Effect of Electrolyte Concentration During Oligonucleotide Attachment

- In working with the S12F sequence a salt aging step was found to be crucial in obtaining stable oligonucleotide modified nanoparticles (see Example 3). The gold nanoparticles modified with S12F in pure water fused together irreversibly to form a black precipitate upon centrifugation, while those aged in salt resisted aggregation when centrifuged, even in high ionic strength solutions. It is proposed that the increased stability is due to higher oligonucleotide surface coverages which leads to greater steric and electrostatic protection. Using the SA₂₀S12F modified particles, the effect of electrolyte conditions on oligonucleotide surface loading was investigated. As shown in Table 8, final surface coverages for gold nanoparticles which were exposed to oligonucleotides in water for 48 hours are much lower (7.9 ± 0.2 pmol/cm²) compared to those that were 'aged' in salt, or prepared by increasing the salt concentration gradually over the course of the final 24 hours of the experiment (see above).
- It is important to note that gold nanoparticles as synthesized irreversibly agglomerate even in very low ionic strength media. Indeed, they are naturally incompatible with salts and especially polyanions such as oligonucleotides. This aging treatment is essential for preparing stable oligonucleotide particles. Therefore, the particles must be initially modified with alkylthiol oligonucleotides in water prior to gradually increasing the ionic strength. It is likely that oligonucleotides initially lie flat, bound through weak interactions of the nitrogenous bases with gold. A similar mode of interaction has been proposed for oligonucleotides on thin films (Herne et al., *J. Am. Chem. Soc.* **119**:8916-8920 (1997)). However, the interaction between oligonucleotides and the positively charged nanoparticle surface (Weitz et al., *Surf. Sci.* **158**:147-164 (1985)) is expected to be even stronger. In the aging step, the high ionic strength medium effectively screens charge repulsion between neighboring oligonucleotides, as well as, attraction between the polyanionic oligonucleotide and the positively charged gold surface. This allows more oligonucleotides to bind to the nanoparticle surface, thereby

WO 01/051665

PCT/US01/01190

increasing oligonucleotide surface coverage.

N. Effect of Oligonucleotide Spacer Sequence on Surface Coverage.

In order to examine how the sequence of the spacer affects oligonucleotide coverage on Au nanoparticles, fluorescein-modified 32-mer strands, with 20 dA and 20 dT spacers inserted between a 3' propylthiol and the fluorescein-labeled 12-mer sequence, were prepared. The most notable result of surface coverage and hybridization studies of nanoparticles modified with S3'T₂₀12F and S3'A₂₀12F is the greater surface coverage achieved with the 20 dT spacer (35 ± 1 pmol/cm²), in comparison to the 20 dA spacer (24 ± 1 pmol/cm²). The number of hybridized strands was comparable, although the percentage of surface bound strands which hybridized was lower for ST₂₀12mer nanoparticles (79 %) than the SA₂₀12 nanoparticles (~94%). These results suggest that dT rich oligonucleotide strands interact non-specifically with the nanoparticle surface to a lesser degree than dA rich oligonucleotide strands. Consequently, 20dT spacer segments may extend perpendicular from the gold surface, promoting higher surface coverages, while 20dA spacer segments block gold sites by lying flat on the particle surface.

O. Effect of Coadsorbed Diluent Oligonucleotides

In addition to efficient hybridization, another important property of oligonucleotide modified nanoparticles is the possibility of adjusting the total number of hybridization events. This is most readily accomplished by adjusting the surface density of recognition strands. Other researchers have used coadsorbed diluent alkylthiols such as mercaptohexanol with modified oligonucleotides on gold electrodes to control hybridization (Steel et al., *Anal. Chem.* 70:4670-4677 (1998); Herne et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119:8916-8920 (1997)). However, the inherent low stability of unprotected gold nanoparticles poses serious constraints on the choice of diluent molecule. A thiol modified 20 dA sequence (SA₂₀) [SEQ ID NO:55] proved to be suitable in terms of maintaining particle stability in the high ionic strength buffers which are needed for hybridization and protecting the surface from non-specific adsorption.

Nanoparticles were modified using solutions containing different recognition

WO 01/051665

PCT/US01/01190

strand (SA₂₀12F) to diluent (SA₂₀) strand molar ratios. The resulting particles were analyzed by the fluorescence method described above to determine the SA₂₀12F surface density, and then tested for hybridization efficiency with 12F.

The SA₂₀12F surface density increased linearly with respect to the proportion of SA₂₀12F to SA₂₀ in the deposition solution, Figure 30. This is an interesting result because it suggests that the ratio of SA₂₀12F to SA₂₀ attached to the nanoparticles reflects that of the solution. This result is in contrast to what is normally seen for mixtures of short chain alkyl or T-functionalized thiols, where solubility and chain length play a crucial role in adsorption kinetics (Bain et al., *J. Am. Chem. Soc.* **111**:7155-7164 (1989); Bain et al., *J. Am. Chem. Soc.* **111**:7164-7175 (1989)).

The amount of complementary 12F' oligonucleotide which hybridized to each different sample also increased linearly with increasing SA₂₀12F surface coverage, Figure 31. The fact that this relationship is well defined indicates that it is possible to predict and control the extent of hybridization of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates. This suggests that hybridization of 12F' becomes more difficult at higher SA₂₀12F coverages, which is most likely a result of steric crowding and electrostatic repulsion between oligonucleotides.

P. Summary.

This study has shown that it is important to achieve a balance between oligonucleotide coverage high enough to stabilize the nanoparticles to which they are attached, yet low enough so that a high percentage of the strands are accessible for hybridization with oligonucleotides in solution. This has been achieved by adjusting salt conditions during oligonucleotide attachment to the nanoparticles to gain high oligonucleotide surface coverages, oligonucleotide spacer segments to reduce electrosteric interactions, and coadsorbed diluent strands to reproducibly control the average number of hybridization events for each nanoparticle. It has also been shown that the nature of the tether (spacer) sequence influences the number of oligonucleotide strands loaded onto gold nanoparticles. This work has important implications regarding

WO 01/051665

PCT/US01/01190

TABLE 8

- 5 Effect of salt aging on surface coverage of SA₂₀12F oligonucleotides to gold nanoparticles and hybridization to 12F. All hybridization experiments were performed in 0.3 M PBS, pH 7.

Buffer conditions during adsorption of alkylthiol DNA	Surface Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Efficiency (%)
H ₂ O	7.9 ± 0.2	— ^a	—
0.1 M NaCl, 10 mM phosphate	15 ± 4	6.6 ± 0.2	~44
1.0 M NaCl, 10 mM phosphate	20 ± 2	6.5 ± 0.2	~33

- 10 ^a Reliable values for these experiments could not be obtained due to a small amount of particle aggregation which occurred after centrifugation.

TABLE 9

- 15 Effect of oligonucleotide spacer sequence on surface coverage and hybridization efficiency.

Oligonucleotide Pair	Surface Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Coverage (pmol/cm ²)	Hybridization Efficiency (%)
S3'A ₂₀ 12F / 3'12F	24 ± 1	9 ± 2	~38
S3'T ₂₀ 12F / 3'12F	35 ± 1	12 ± 1	~34

- 20 S3'A₂₀12F / S3'T₂₀12F = HS(CH₂)₆-3'-W₂₀-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₅-F [SEQ ID NO:52]
3'12F = 5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F [SEQ ID NO:54]

Example 19: Gene Chip Assay

- 25 An ultrasensitive and ultrasensitive method for analyzing combinatorial DNA arrays using oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles is described in this example. An unusually narrow temperature range for thermal dissociation of nanoparticle-target complexes permits the discrimination of a given oligonucleotide sequence from targets with single nucleotide mismatches with extraordinary selectivity. In addition, when coupled with signal amplification method based on nanoparticle-catalyzed reduction of silver(I), the sensitivity of this nanoparticle array detection system

WO 01/051665

PCT/US01/01190

exceeds that of the analogous, conventional fluorophore system by two orders of magnitude.

Sequence-selective DNA detection has become increasingly important as scientists unravel the genetic basis of disease and use this new information to improve medical diagnosis and treatment. Commonly used heterogeneous DNA sequence detection systems, such as Southern blots and combinatorial DNA chips, rely on the specific hybridization of surface-bound, single-strand capture oligonucleotides complementary to target DNAs. Both the specificity and sensitivity of these assays are dependent upon the dissociation properties of capture strands hybridized to perfectly-matched and mismatched targets. As described below, it has surprisingly been discovered that a single type of nanoparticles hybridized to a substrate exhibits a melting profile that is substantially sharper than both the analogous fluorophore-based system and unlabeled DNA. Moreover, the melting temperature for the nanoparticle duplex is 11 degrees higher than for the analogous fluorophore system with identical sequences. These two observations, combined with the development of a quantitative signal amplification method based upon nanoparticle catalyzed reduction of silver(I), have allowed the development of a new chip-based detection system for DNA that has single-base mismatch selectivity and a sensitivity that is two orders of magnitude more sensitive than the conventional analogous fluorescence-based assays.

Gold nanoparticles (13 nm diameter) having oligonucleotide attached to them prepared as described in Example 3 were used to indicate the presence of a particular DNA sequence hybridized to a transparent substrate in a three-component sandwich assay format (see Figure 32). In a typical experiment, a substrate was fabricated by functionalizing a float glass microscope slide (Fisher Scientific) with amine-modified probe oligonucleotides as described in Example 10. This method was used to generate slides functionalized with a single type of oligonucleotides over their entire surface or in arrays of multiple types of oligonucleotides spotted with a commercial microarrayer. Nanoparticles having indicator oligonucleotides attached to them and synthetic 30-mer

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotide targets (based on the anthrax protective antigen sequence) were then cohybridized to these substrates (see Figure 32). Therefore, the presence of nanoparticles at the surface indicated the detection of a particular 30-base sequence. At high target concentrations (≥ 1 nM), the high density of hybridized nanoparticles on the surface made the surface appear light pink (see Figure 33). At lower target concentrations, attached nanoparticles could not be visualized with the naked eye (although they could be imaged by field-emission scanning electron microscopy). In order to facilitate the visualization of nanoparticles hybridized to the substrate surface, a signal amplification method in which silver ions are catalytically reduced by hydroquinone to form silver metal on the slide surface was employed. Although this method has been used for enlargement of protein- and antibody-conjugated gold nanoparticles in histochemical microscopy studies (Hacker, in *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, M. A. Hayat, Ed. (Academic Press, San Diego, 1989), vol. 1, chap. 10; Zehbe et al., *Am. J. Pathol.* **150**, 1553 (1997)) its use in quantitative DNA hybridization assays is novel (Tomlinson et al., *Anal. Biochem.*, **171**:217 (1988)). Not only did this method allow very low surface coverages of nanoparticle probes to be visualized by a simple flatbed scanner or the naked eye (Figure 33), it also permitted quantification of target hybridization based on the optical density of the stained area (Figure 34). Significantly, in the absence of the target, or in the presence of noncomplementary target, no staining of the surface was observed, demonstrating that neither nonspecific binding of nanoparticles to the surface, nor nonspecific silver staining, occurs. This result is an extraordinary feature of these nanoparticle-oligonucleotide conjugates which enables ultra-sensitive and -selective detection of nucleic acids.

It has been determined that the unique hybridization properties of oligonucleotide-functionalized nanoparticles of the present invention can be further used to improve the selectivity of combinatorial oligonucleotide arrays (or "gene chips") (Iodor, *Science* **277**, 393 (1997)). The relative ratio of target hybridized to different elements of an oligonucleotide array will determine the accuracy of the array in determining the target

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sequence; this ratio is dependent upon the hybridization properties of the duplex formed between different capture strands and the DNA target. Remarkably, these hybridization properties are dramatically improved by the use of nanoparticle labels instead of fluorophore labels. As shown in Figure 35, the dehybridization of nanoparticle-labeled targets from surface-bound capture strands was much more sensitive to temperature than that of fluorophore-labeled targets with identical sequences. While the fluorophore-labeled targets dehybridized from surface capture strands over a very broad temperature range (first derivative FWHM = 16 °C), identical nanoparticle-labeled targets melted much more sharply (first derivative FWHM = 3 °C). It was anticipated that these sharpened dissociation profiles would improve the stringency of chip-based sequence analysis, which is usually effected by a post-hybridization stringency wash. Indeed, the ratio of target hybridized to complementary surface probes to that hybridized to mismatched probes after a stringency wash at a specific temperature (represented by the vertical lines in Figure 35) is much higher with nanoparticle labels than fluorophore labels. This should translate to higher selectivity in chip detection formats. In addition, nanoparticle labels should increase array sensitivity by raising the melting temperature (T_m) of surface duplexes, which lowers the critical concentration below which duplexes spontaneously melt at room temperature.

In order to evaluate the effectiveness of nanoparticles as colorimetric indicators for oligonucleotide arrays, test chips were probed with a synthetic target and labeled with both fluorophore and nanoparticle indicators. The test arrays and oligonucleotide target were fabricated according to published protocols (Guo et al., *Nucl. Acids Res.*, 22:5456 (1994); arrays of 175 μ m diameter spots separated by 375 μ m were patterned using a Genetic Microsystems 417 Microarrayer). Arrays contained four elements corresponding to the each of the four possible nucleotides (N) at position 8 of the target (see Figure 32). The synthetic target and either fluorescent-labeled or nanoparticle-labeled probes were hybridized stepwise to arrays in hybridization buffer, and each step was followed with a stringency buffer wash at 35 °C. First, 20 μ L of a 1 nM solution of synthetic target in 2

WO 01/051665

PCT/US01/01190

X PBS (0.3 M NaCl, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer, pH 7) was hybridized to the array for 4 hours at room temperature in a hybridization chamber (Grace Bio-Labs Cover Well PC20), and then washed at 35°C with clean 2 X PBS buffer. Next, 20 μL of a 100 pM solution of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles in 2 X PBS was

5 hybridized to the array for 4 hours at room temperature in a fresh hybridization chamber. The array was washed at 35°C with clean 2 X PBS, then twice with 2 X PBN (0.3 M NaNO_3 , 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer, pH 7). Then, the nanoparticle arrays were immersed in a silver amplification solution (Sigma Chemical, Silver Enhancer Solution) for 5 min and washed with water. Silver amplification darkened the array elements

10 considerably, and 200 μm diameter elements could be easily imaged with a flatbed scanner or even the naked eye.

Arrays challenged with the model target and nanoparticle-labeled probes and stained with the silver solution clearly exhibited highly selective hybridization to complementary array elements (Figure 36A). Redundant spots of the same capture

15 sequence showed reproducible and consistent hybridization signal. No background adsorption by nanoparticles or silver stain was observed; the image greyscale value reported by the flatbed scanner is the same as that observed for a clear microscope slide. The darker spots corresponding to adenine at position 8 ($N=A$) indicate that oligonucleotide target hybridized preferentially to perfectly complementary capture

20 strands over mismatched ones, by a greater than 3:1 ratio. In addition, integrated greyscale values for each set of spots follows the predicted stability of the Watson-Crick base pairs, $A:T > G:C > T:A$ (Allawi et al., *Biochemistry* 36, 10581, (1988)). Normally, G:T mismatches are particularly difficult to discriminate from A:T complements (Saiki et al., in *Mutation Detection*, Cotton et al., eds. (Oxford University

25 Press, Oxford, 1998), chap. 7; S. Ikuta et al., *Nucl. Acids Res.* 15, 797 (1987)), and the distinction of these two array elements demonstrates the remarkable resolving power of nanoparticle labels in single nucleotide mismatch detection. The selectivity of the nanoparticle-based arrays was higher than that of the fluorophore-indicated arrays, Figure

WO 01/051665

PCT/US01/01190

36B; fluorophore labels provided only 2:1 selectivity for adenine at position 8.

The assays utilizing nanoparticle-labeled probes were significantly more sensitive than those utilizing fluorophore-labeled probes. Hybridization signal could be resolved at the N=A elements at target concentrations as low as 50 fM (or, for a hybridization chamber containing 20 μ L of solution, 1×10^6 total copies); this represents a dramatic increase in sensitivity over common Cy3/Cy5 fluorophore-labeled arrays, for which ~ 1 pM or greater target concentrations are typically required. The higher melting temperatures observed for nanoparticle-target complexes immobilized on surfaces undoubtedly contribute to array sensitivity. The greater stability of the probe/target/surface-oligonucleotide complex in the case of the nanoparticle system as compared with the fluorophore system presumably results in less target and probe lost during washing steps.

Colorimetric, nanoparticle labeling of combinatorial oligonucleotide arrays will be useful in applications such as single nucleotide polymorphism analysis, where single mismatch resolution, sensitivity, cost and ease of use are important factors. Moreover, the sensitivity of this system, which has yet to be totally optimized, points toward a potential method for detecting oligonucleotide targets without the need for target amplification schemes such as polymerase chain reaction.

20 Example 20: Nanoparticle Structures

The reversible assembly of supramolecular layered gold nanoparticle structures onto glass supports, mediated by hybridized DNA linkers, is described. Layers of oligonucleotide-functionalized nanoparticles were successively attached to oligonucleotide-functionalized glass substrates in the presence of a complementary DNA linker. The unique recognition properties of DNA allow the nanoparticle structures to be assembled selectively in the presence of the complementary linker. In addition, the structures can be assembled and disassembled in response to external stimuli which mediate hybridization of the linking duplex DNA, including solution temperature, pH,

WO 01/051665

PCT/US01/01190

and ionic strength. In addition to offering a very selective and controlled way of building nanoparticle based architectures on a solid support, this system allows one to study the factors that influence both the optical and melting properties of nanoparticle network structures linked with DNA.

- 5 Others have demonstrated how bifunctional organic molecules (Gittins et al., *Adv. Mater.* **11**:737 (1999); Brust et al., *Langmuir* **14**:5425 (1998); Bright et al., *Langmuir* **14**:5695 (1998); Grabar et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**:1148 (1996); Freeman et al., *Science* **267**:1629 (1995); Schmid et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**:181 (2000); Marinakos et al., *Chem. Mater.* **10**:1214 (1998)) or polyelectrolytes (Storhoff et al., *J.*
 10 *Am. Chem. Soc.* **120**:1959 (1998); Storhoff et al., *J. Cluster Sci.* **8**:179 (1997); Elghanian et al., *Science* **277**:1078 (1997); Mirkin et al., *Nature* **382**:607 (1996)) can be used to controllably construct mono- and multilayered nanoparticle materials off of planar substrates. The attractive feature of using DNA as a nanoparticle interconnect is that one
 15 can synthetically program interparticle distances, particle periodicities, and particle compositions through choice of DNA sequence. Moreover, one can utilize the reversible binding properties of oligonucleotides to ensure the formation of thermodynamic rather than kinetic structures. In addition to providing a new and powerful method for controlling the growth of nanoparticle-based architectures from solid substrates, this
 20 strategy also allows one to evaluate the relationship between nanoparticle aggregate size and both melting and optical properties of aggregate DNA-interlinked structures. An understanding of these two physical parameters and their relationship to materials architecture is essential for utilizing nanoparticle network materials, especially in the area of biodetection.

- The oligonucleotide-functionalized, 13-nm-diameter gold nanoparticles used to
 25 construct the multilayer assemblies were prepared as described in Examples 1 and 3. The nanoparticles had 5'-hexanethiol-capped oligonucleotide **1** (5'-HS(CH₂)₆O(PO₃)O-CGCATTGAGGAT-3' [SEQ ID NO:50]) and 3'-propanethiol-capped oligonucleotide **2** (3'-HS(CH₂)₃O(PO₃)O-ATGCTCAACTCT-5' [SEQ ID NO:51]) attached to them to

WO 01/051665

PCT/US01/01190

yield nanoparticles *a* and *b*, respectively (see Figure 37). Glass slides were functionalized with 12-mer oligonucleotide 2 as described in Example 10. To build nanoparticle layers, the substrates were first immersed in a 10 nM solution of 24-mer linker 3 (5'-TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG-3' [SEQ ID NO:60]) and allowed to hybridize with it for 4 hours at room temperature (see Figure 37). The substrates were washed with clean buffer solution, and then hybridized with a 2 nM solution of particle *a* for 4 hours at room temperature to attach the first nanoparticle layer. A second nanoparticle layer could be attached to the first one by similarly exposing the surface to solutions of linker 3 and nanoparticle *b*. These hybridization steps could be repeated to attach multiple, alternating layers of nanoparticles *a* and *b*, each layer connected to the previous one by linker 3. In the absence of linker, or in the presence of noncomplementary oligonucleotide, no hybridization of nanoparticles to the surface was observed. In addition, multilayer assembly was only observed under conditions which promoted the hybridization of the DNA linkers: neutral pH, moderate salt concentration (> 0.05 M NaCl), and a temperature below the duplex melting temperature (T_m).

Each hybridized nanoparticle layer imparted a deeper red color to the substrate, and after ten hybridized layers, the supporting glass slide appeared reflective and gold in color. Transmission UV-vis spectroscopy of the substrate was used to monitor the successive hybridization of nanoparticle layers to the surface, Figure 38A. The low absorbance of the initial nanoparticle layer suggests that it seeded the formation of further layers, which showed a near linear increase in the intensity of the plasmon band with each additional layer (for each successive nanoparticle layer formation, no additional absorbance was observed on exposure for longer times or to higher concentrations of either linker 3 or nanoparticle solution). The linearity of the absorbance increase after the generation of the initial nanoparticle layer indicates that the surface was saturated with hybridized nanoparticles with each successive application, Figure 38B. This is supported by field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) images of one (Figure 39A) and two (Figure 39B) nanoparticle layers on a surface, which show low nanoparticle

WO 01/051665

PCT/US01/01190

coverage with one layer, but near complete coverage with two layers. The λ_{max} of the plasmon band for the multilayer assemblies shifts no more than 10 nm, even after 5 layers. The direction of this shift is consistent with other experimental (Grabar et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**:1148 (1996)) and theoretical (Quinten et al., *Surf. Sci.* **172**:557 (1986); Yang et al., *J. Chem. Phys.* **103**:869 (1995)) treatments of gold nanoparticle aggregates. However, the magnitude of the shift is small compared to that previously observed for suspensions of oligonucleotide-linked gold nanoparticle networks, which show $\lambda_{\text{max}} > 570$ nm (see previous examples). This suggests that many more linked nanoparticles --- perhaps hundreds or thousands --- are required to produce the dramatic color change from red to blue observed for gold nanoparticle-based oligonucleotide probes. (Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* **120**:1959 (1998); Storhoff et al., *J. Cluster Sci.* **8**:179 (1997); Elghanian et al., *Science* **277**:1208 (1997); Mirkin et al., *Nature* **382**:607 (1996).). Surface plasmon shifts for aggregated gold nanoparticles have been shown to be highly dependent on interparticle distance (Quinten et al., *Surf. Sci.* **172**:557 (1986); Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.*, in press), and the large distances provided by oligonucleotide linkers (8.2 nm for this system)) significantly reduce the progressive effect of nanoparticle aggregation on the gold surface plasmon band.

The dissociation properties of the assembled nanoparticle multilayers were highly dependent upon the number of layers. When the multilayer-coated substrates were suspended in buffer solution and the temperature raised above the T_m of the linking oligonucleotides (53°C), the nanoparticles dissociated into solution, leaving behind a colorless glass surface. Increasing or decreasing the pH (>11 or <3) or decreasing the salt concentration of the buffer suspension (below ~0.01 M NaCl) also dissociated the nanoparticles by dehybridizing the linking DNA. The multilayer assembly was fully reversible, and nanoparticles could be hybridized to, and dehybridized from, the glass substrates (e.g. three cycles were demonstrated with no detectable irreversible nanoparticle binding).

Significantly, while all of the surface-bound nanoparticle assemblies dissociated

WO 01/051665

PCT/US01/01190

above the T_m of the linking oligonucleotides, the sharpness of these transitions depended on the size of the supported aggregate, Figure 39D-F. Surprisingly, the dissociation of the first nanoparticle layer from the substrate exhibited a transition (Figure 39D, FWHM of the first derivative = 5 °C) that was sharper than that of the same oligonucleotides without nanoparticles in solution, Figure 39C. As more nanoparticle layers were hybridized to the substrate, the melting transition of the oligonucleotide-linked nanoparticles became successively sharper (Figure 39E-F, FWHM of the first derivative = 3 °C), until it matched that of the large nanoparticle network assemblies found in solution. (Gittins et al., *Adv. Mater.* 11:737 (1999); Brust et al., *Langmuir* 14:5425 (1998)). These experiments confirm that more than two nanoparticles and multiple DNA interconnects are required to obtain the optimally sharp melting curves. They also show that the optical changes in this system are completely decoupled from the melting properties (*i.e.*, small aggregates can give sharp transitions but still not change color).

15 Example 21: Electrical Properties of Gold Nanoparticle Assemblies

Electron transport through DNA has been one of the most intensely debated subjects in chemistry over the past five years. (Kelley et al., *Science* 283:375-381 (1999); Turro et al., *JBIC* 3:201-209 (1998); Lewis et al., *JBIC* 3:215-221 (1998); Ratner, M. *Nature* 397:480-481 (1999); Okahata et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:6165-6166 (1998))
 20 Some claim that DNA is able to efficiently transport electrons, while others believe it to be an insulator.

In a seemingly disparate field of study, a great deal of effort has been devoted to examining the electrical properties of nanoparticle-based materials. (Terrill et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117:12537-12548 (1995); Brust et al., *Adv. Mater.* 7:795-797 (1995); Bothell et al., *J. Electroanal. Chem.* 409:137-143 (1996); Musick et al., *Chem. Mater.* 9:1499-1501 (1997); Brust et al., *Langmuir* 14:5425-5429 (1998); Collier et al., *Science* 277:1978-1981 (1997)). Indeed, many groups have explored ways to assemble nanoparticles into two- and three-dimensional networks and have investigated the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

electronic properties of such structures. However, virtually nothing is known about the electrical properties of nanoparticle-based materials linked with DNA.

For the first time, in this study, the electrical properties of gold nanoparticle assemblies, formed with different length DNA interconnects have been examined. As shown below, these hybrid inorganic assemblies behave as semiconductors, regardless of oligonucleotide particle interconnect length over a 24 to 72 nucleotide range. The results reported herein indicate that DNA interconnects can be used as chemically specific scaffolding materials for metallic nanoparticles without forming insulating barriers between them and thereby destroying their electrical properties. These results point towards new ways such hybrid assemblies can be exploited as electronic materials.

At the heart of this issue is the following question: Can nanoparticles assembled by DNA still conduct electricity or will the DNA interconnects, which are heavily loaded on each particle, (Mucic, R. C. *Synthetically Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA*, Thesis Ph. D., Northwestern University (1999)) act as insulating shells? The conductivities of these materials as a function of temperature, oligonucleotide length, and relative humidity were examined. The DNA-linked nanoparticle structures were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), synchrotron small angle x-ray scattering (SAXS) experiments, thermal denaturation profiles, and UV-vis spectroscopy.

In a typical experiment (see Figure 40), citrate-stabilized 13 nm gold nanoparticles were modified with 3' and 5' alkanethiol-capped 12-mer oligonucleotides **1** (3' SH (CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-ATGCICAACTCT 5' [SEQ ID NO:59]) and **2** (5' SH (CH₂)₆O(PO₃²⁻)O-CGCATTTCAGGAT 3' [SEQ ID NO:50]) as described in Examples 1 and 3. DNA strands with lengths of 24, 48, or 72 bases (**3** (5'TACGAGTTGAGAATCCTGAAIGCG3' [SEQ ID NO:60]), **4** (5'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATC-ATGCAATCCTGAATGCC 3'[SEQ ID NO:61]), and **5** (5'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCATATATTGGACGCTTT

WO 01/051665

PCT/US01/01190

ACGGACAACATCCTGAATGCG3' [SEQ ID NO:62]) were used as linkers. Fillers 6 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT5' [SEQ ID NO:63]) and 7 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGTATATAACCTGCGAAATGCCTGTTG5' [SEQ ID NO:64]) were used with the 48 and 72 base linkers. The DNA-modified nanoparticles and DNA linkers and fillers were stored in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate (pH 7) buffer (referred to as 0.3 M PBS) prior to use. To construct nanoparticle assemblies, 1-modified gold nanoparticles (652 μ l, 9.7 nM) and 2-modified gold nanoparticles (652 μ l, 9.7 nM) were added to linker DNA 3, 4, or 5 (30 μ l, 10 nM). After full precipitation, the aggregates were washed with 0.3 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ solution to remove excess linker DNA and NaCl.

Lyophilization (10^{-3} – 10^{-2} torr) of the aggregate to dryness results in pellets and removal of the volatile salt, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Unfunctionalized, citrate-stabilized particles, prepared by the Frens method, (Frens, *Nature Phys. Sci.* **241**:20-22 (1973)) were dried as a film and used for comparison purposes. The resulting dried aggregates had a color resembling tarnished brass and were very brittle. FE-SEM images demonstrated that oligonucleotide-modified nanoparticles remained intact upon drying, while citrate-stabilized nanoparticles fused to one another. Significantly, the dried DNA-linked aggregates could be redispersed in 0.3 M PBS buffer (1ml), and exhibited excellent melting properties; heating such a dispersion to 60 °C resulted in dehybridization of the DNA interconnects, yielding a red solution of dispersed nanoparticles. This combined with the FE-SEM data conclusively demonstrated that DNA-modified gold nanoparticles are not irreversibly aggregated upon drying.

The electrical conductivities of the three samples (dried aggregates linked by 3, 4, and 5, respectively) were measured using a computer-controlled, four-probe technique. Electrical contacts consisted of fine gold wires (25 and 60 μ m diameter) attached to pellets with gold paste. Samples were cooled in a moderate vacuum (10^{-3} to 10^{-2} torr), and conductivity was measured as the temperature was increased under a dry, low pressure of helium gas. The sample chamber was insulated from light in order to

WO 01/051665

PCT/US01/01190

eliminate possible optoelectronic effects. Excitation currents were kept at or below 100 nA, and the voltage across the entire sample was limited to a maximum of 20 V. Surprisingly, the conductivities of the aggregates formed from all three linkers, ranged from 10^{-5} to 10^{-4} S/cm at room temperature, and they showed similar temperature
 5 dependent behavior. The conductivities of the DNA-linked aggregates showed Arrhenius behavior up to about 190°K, which is characteristic of a semiconducting material. This is similar to the behavior of activated electron hopping observed in discontinuous metal island films (Barwinski, *Thin Solid Films* 128:1-9 (1985)). Gold nanoparticle networks linked by alkanedithiols have shown similar temperature dependence (Brust et al., *Adv.*
 10 *Mater.* 7:795-797 (1995); Bothell et al., *J. Electroanal. Chem.* 409:137-143 (1996)). Activation energies of charge transport can be obtained from a plot of $\ln \sigma$ versus $1/T$ using equation (1).

$$\sigma = \sigma_0 \exp[-E_a/(kT)] \quad (1)$$

15

The average activation energies calculated from three measurements were 7.4 ± 0.2 meV, 7.5 ± 0.3 meV, and 7.6 ± 0.4 meV for the 24-, 48-, and 72-mer linkers, respectively. Conductivity data from 50°K to 150°K were used for these calculations.

Since the electrical properties of these types of materials should depend on the
 20 distance between particles, synchrotron SAXS experiments were used to determine interparticle distances of the dispersed and dried aggregates. The SAXS experiments were performed at the Dupont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team (DND-CAT) Sector 5 of the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory. DNA-linked aggregates and dilute samples of DNA-modified colloid were irradiated with an
 25 0.3 micron beam of 1.54 Å radiation, and scattered radiation was collected on a CCD detector. The 2D data were circularly averaged and transformed into a function, $I(s)$, of the scattering vector magnitude, $s = 2\sin(\Theta)/\lambda$, where 2Θ is the scattering angle and λ is the wavelength of the incident radiation. All data were corrected for background

WO 01/051665

PCT/US01/01190

scattering and sample absorption. The first peak position, which is sensitive to interparticle distance, drastically changed from s values of 0.063 nm^{-1} , 0.048 nm^{-1} , and 0.037 nm^{-1} for the 24-, 48-, and 72-mer linked aggregates, respectively, to an s value of 0.087 nm^{-1} upon drying for all three aggregates structures. This indicates that

5 interparticle distances decreased significantly upon drying, to the point where the particles were almost touching, and that such distances were virtually independent of linker length, while those in solution were highly dependent on linker length. This explains why similar activation energies were observed for the three different linker

10 systems in the dried pellet conductivity experiments. Moreover, it also explains why relatively high conductivities were observed, regardless of how one views the electronic properties of DNA. Unlike the DNA-linked materials, the dried film of citrate-stabilized gold nanoparticles showed metallic behavior. This is consistent with the SEM data, which showed that such particles fuse together.

Above 190°K , the measured conductivities of the DNA-linked samples showed an

15 anomalous dipping behavior. For all samples, the conductivity started to decrease abruptly at approximately 190°K and continued to decrease until approximately 250°K , at which point it increased again. To investigate this unusual behavior in detail, the electrical conductivity was measured as the sample was cooled and warmed repeatedly. Interestingly, the dip in conductivity only occurred in the direction of increasing

20 temperature. Since DNA is hydrophilic and water could potentially affect the electrical properties of the hybrid structures, the effect of relative humidity on the conductivity of the gold aggregates was examined. The resistance increased by a factor of 10 with increasing humidity from 1% to 100%. It should be noted that the characteristic dip was very weak when the sample was kept in vacuum (10^{-6} Torr) for 48 hours prior to the

25 conductivity measurement. From these observations, it was concluded that the unusual dip and subsequent rise in conductivity above 190°K is associated with water melting and the hygroscopic nature of the DNA, which temporarily increased the interparticle distance (until evaporation took place). Consistent with this hypothesis, SAXS

WO 01/051665

PCT/US01/01190

measurements on a dried aggregate that was wetted with 0.3 M PBS buffer showed a 200% increase in interparticle distance (~2 nm).

These studies are important for the following reasons. First, they show that one can use the molecular recognition properties of DNA to assemble nanoparticle-based materials without passivating them or destroying their discrete structural or electrical properties. If these DNA-functionalized particles are to be used to study electrical transport in three-dimensional macroscopic assemblies or even lithographically patterned structures (Piner et al., *Science* 283:661-663 (1999)), it is imperative that their electrical transport properties be delineated. Second, it shows that over a fairly long linker distance (8 ~ 24 nm), the conductivities of the dried assemblies are virtually independent of DNA linker length. This is likely a result of the removal of water and the use of a volatile salt in these experiments; indeed, the free volume created by removal of solvent and salt allows the DNA to be compressed on the surface and close approach of the particles within the aggregates. Third, the aggregates with the DNA-protected nanoparticles behave as semiconductors, while films formed from citrate-stabilized particles exhibit irreversible particle fusion and metallic behavior. Finally, these results point toward the use of these materials in DNA diagnostic applications where sequence specific binding events between nanoparticles functionalized with oligonucleotides and target DNA effect the closing of a circuit and a dramatic increase in conductivity (*i.e.* from an insulator to a semiconductor) (see next example).

Example 22: Detection Of Nucleic Acid Using Gold Electrodes

A method of detecting nucleic acid using gold electrodes is illustrated diagrammatically in Figure 41. A glass surface between two gold electrodes was modified with 12-mer oligonucleotides **1** (3' NH₂(CH₂)₆O(PO₃⁻)O-ATG-CTC-AAC-TCT [SEQ ID NO:59]) complementary to target DNA **3** (5' TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG [SEQ ID NO:60]) by the method of Guo *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5456-5465 (1994). Oligonucleotides **2** (5' SH(CH₂)₆O(PO₃⁻)O-CGC-ATT-CAG-GAT [SEQ ID NO:58]) were

WO 01/051665

PCT/US01/01190

prepared and attached to 13 nm gold nanoparticles as described in Examples 1 and 18 to yield nanoparticles **a**. Target DNA **3** and nanoparticles **a** were added to the device. The color of the glass surface turned pink, indicating that target DNA-gold nanoparticle assemblies were formed on the glass substrate. Next, the device was immersed in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer and heated at 40 °C for 1 hour to remove nonspecifically bound DNA, and then treated with a silver staining solution as described in Example 19 for 5 minutes. The resistance of the electrode was 67 kΩ.

For comparison, a control device modified by attaching oligonucleotides **4**, instead of oligonucleotides **1**, between the electrodes. Oligonucleotides **4** have the same sequence (5' NH₂(CH₂)₆O(PO₃⁻)O-CGC-ATT-CAG-GAT [SEQ ID NO:50]) as oligonucleotides **2** on the nanoparticles and will bind to target DNA **3** so as to prevent binding of the nanoparticles. The test was otherwise performed as described above. The resistance was higher than 40 MΩ, the detection limit of the multimeter that was used.

This experiment shows that only complementary target DNA strands form nanoparticle assemblies between the two electrodes of the device, and that the circuit can be completed by nanoparticle hybridization and subsequent silver staining. Therefore, complementary DNA and noncomplementary DNA can be differentiated by measuring conductivity. This format is extendable to substrate arrays (chips) with thousands of pairs of electrodes capable of testing for thousands of different nucleic acids simultaneously.

Example 23: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles using cyclic disulfide linkers

In this Example, we describe a new cyclic disulfide linker for binding oligonucleotides to gold surfaces, based on steroid disulfide **1a** (Figure 42) that is simple to prepare, is broadly useful, and affords gold-oligonucleotide conjugates exhibiting greater stability toward DTT than those prepared using mercaptohexyl linkers. A cyclic disulfide was selected as the reactive site of the anchor unit since ester derivatives of 1,2-

WO 01/051665

PCT/US01/01190

dithiane-4,5-diol were known to form monolayers on gold surfaces (Nuzzo, et al., J. Am. Chem. Soc. 105,4481-4483) and a cyclic disulfide would plausibly bind to the surface through both sulfur atoms (Ulman, A., MRS Bulletin, June 46-51) to give a chelate structure that could exhibit enhanced stability. Epiandrosterone was selected as a linking element since it is a readily available, easily derivatized ketolcohol and, as a substituent with a large hydrophobic surface, might be expected to help screen the approach of water soluble molecules to the gold surface (Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 7535-7536 · Bioconjugate Chem. 9, 826-830).

The oligonucleotide-gold probes used in previous studies were prepared by the reaction of oligonucleotides being terminal mercaptohexyl groups with gold nanoparticles in an aqueous buffer. They proved to be surprisingly robust, functioning well even after heating to 100°C or after storing for 3 years at 5 °C. We have found, however, that these conjugates lose activity as hybridization probes when soaked in solutions containing thiols, which act by displacing the derivatized oligonucleotides from the gold surface. This feature poses a problem when the nanoparticle probes are to be used in a solution containing a thiol, as for example, a PCR solution that contains dithiothreitol (DTT) as a stabilizer for the polymerase enzyme.

(a) General

NMR spectra were recorded on 500 MHz (¹H) and 400 MHz (³¹P); acquisition at 161.9 MHz Varian spectrometers using CDCl₃ as a solvent and TMS as an internal (¹H) and H₃PO₄ as an external (³¹P) standard; chemical shifts are expressed in δ units. MS data were obtained on a Quattro II triple quadrupole mass spectrometer. Automated oligonucleotide synthesis was carried out on a milligene Expedite DNA synthesizer. The analysis for S was made by Oncida Research Services.

(b) Preparation of Steroid-Disulfide Ketol (1a)

The synthetic scheme is shown in Figure 43. A solution of epiandrosterone (0.5g), 1,2-dithiane-4,5-diol (0.28 g), and p-toluenesulfonic acid (15 mg) in toluene (30 mL) was refluxed for 7 h under conditions for removal of water (Dean Stark apparatus);

WO 01/051665

PCT/US01/01190

then the toluene was removed under reduced pressure and the residue taken up in ethyl acetate. This solution was washed with water, dried over sodium sulfate, and concentrated to a syrupy residue, which on standing overnight in pentane/ether afforded compound 1a as a white solid (400 mg); Rf (TLC, silica plate, ether as eluent) 0.5; for comparison, Rf values for epiandrosterone and 1,2-dithiane-4,5-diol obtained under the same conditions are 0.4, and 0.3, respectively. Recrystallization from pentane/ether afforded a white powder, mp 110-112 °C; ¹H NMR, δ 3.6 (1H, C³OH), 3.54-3.39 (2H, m 2OCH of the dithiane ring), 3.2-3.0 (4H, m 2CH₂S), 2.1-0.7 (29H, m steroid H); mass spectrum (ES⁺) calcd for C₂₃H₃₆O₃S₂ (M+H) 425.2179, found 425.2151. Anal. (C₂₃H₃₆O₃S₂) S: calcd, 15.12; found, 15.26.

(c) Preparation of Steroid-Disulfide Ketal Phosphoramidite Derivative (1b)

Compound 1a (100 mg) was dissolved in THF (3 mL) and cooled in a dry ice alcohol bath. N,N-diisopropylethylamine (80 µL) and β-cyanoethyl chlorodiisopropylphosphoramidite (80 µL) were added successively; then the mixture was warmed to room temperature, stirred for 2 h, mixed with ethyl acetate (100 mL), washed with 5% aq. NaHCO₃ and with water, dried over sodium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was taken up in the minimum amount of dichloromethane, precipitated at -70 °C by addition of hexane, and dried under vacuum; yield 100 mg; ³¹P NMR 146.02.

(d) Preparation of 5'-Modified Oligonucleotides and Nanoparticle

Conjugates

5'-Modified oligonucleotides 1c1 and 1c2 were constructed on CPG supports using conventional phosphoramidite chemistry, except that compound 1b (Figure 42) was employed in the final phosphitilation step. Products were cleaved from the support by treatment with concentrated NH₄OH for 16 h at 55 °C. The oligonucleotides were purified by reversed phase HPLC on a Dionex DX500 system equipped with a Hewlett Packard ODS Hypersil column (4.6 x 200 mm, 5 µm particle size) using TEAA buffer (pH 7.0) and a 1%/min gradient of 95% CH₃CN/5% 0.03 TEAA at a flow rate of 1

WO 01/051665

PCT/US01/01190

mL/min. A nice feature of the hydrophobic steroid group is that the capped derivatives separate cleanly from uncapped oligomers. Sulfur derivatized oligonucleotides IIa, IIc1 and IIc2 (Figure 43) were prepared similarly using the commercially available "5'-Thiol-Modifier reagent" (C6 Glen Research) and cleavage of the trityl protecting group with silver nitrate as previously described (Storhoff, J.J., et al., J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964). For preparation of disulfide IIIc1, "Thiol-Modifier C6 S-S" (Glen Research) was used in the final phosphitylation and the terminal dimethoxytrityl group was cleaved with aqueous 80% acetic acid.

Each of the modified oligonucleotides was immobilized on ~ 13 nm gold nanoparticles by the procedure used for anchoring oligonucleotides through a mercaptohexyl head group (Storhoff et al. (1998) J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964). This involved soaking citrate stabilized nanoparticles (~ 13 nm in diameter) for 56 hours in a buffer-salt solution containing an oligonucleotide bearing a terminal sulfur substituent (HS- or acyclic or cyclic disulfide) followed by addition of NaCl to 0.1 M and 24h of standing. The nanoparticles were pelleted by centrifugation, the supernatant solution was removed, and the nanoparticles were washed, resuspended in buffer, recentrifuged, and then suspended in 0.1 M NaCl, 10 mM phosphate. This procedure afforded the nanoparticle oligonucleotide conjugates free from the excess sulfurized oligonucleotides employed in the loading process.

20 (e) Hybridization

To evaluate the utility of nanoparticle-oligonucleotide probes containing the disulfide-steroid anchor we prepared probes Ic1, Ic2, IIc1, IIc2, and IIIc1 by immobilizing the modified oligonucleotides on gold nanoparticles (Figure 2). The oligomers in a given series have the same nucleotide sequence but differ in structure of the 5'-head group Y. Conjugates Ic1 and Ic2 have steroid-disulfide head groups; IIc1, IIc2, mercaptohexyl head groups; and IIIc1, acyclic disulfide head groups. The (dA)₂₉ chains serve as spacers between the gold and the oligonucleotide recognition regions to facilitate hybridization. Many of the sulfur derivatized oligomers bind to each

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticle. Hybridization of pairs of nanoparticle probes with target oligonucleotides leads to formation of three dimensional networks and a change in color from red to blue-gray (Mucic, R. C., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12674-12675).

Hybridization of the probes was examined using a 79-mer oligonucleotide targets, containing sequences complementary to the probes (Figure 43). The reactions were carried out at room temperature by adding 1 μ L of the target solution (10 pmol of IV) to colloidal solutions of the probe pairs Ic1, Ic2, and Ilc1 and Ilc2, and IIIc1 and IIIc2 (50 μ L and 1.0 A₂₂₀ Unit of each nanoparticle probe) in 0.5 M NaCl, 10 mM phosphate (pH 7.0). At times 10 seconds, 5 minutes, and 10 minutes, aliquots (3 μ L) were removed and spotted on a C-18 reversed phase TLC plate. The various probe pairs all behaved the same: the spots for the 10 second reactions were red, indicative of free nanoparticles; those for the 10 minute reactions were deep blue-gray, characteristic of aggregates of nanoparticles; and the 5 minute reactions afforded spots with a reddish blue color, indicative of a mixture of non-associated and associated nanoparticles. In agreement with previous observations for aggregation of nanoparticles effected by hybridization of oligonucleotides (Storhoff, J. J., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959-1964; Elghanian, et al., *Science*, 277, 1078-1081; Mucic, R. C., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12674-12675; Mitchell, G. P., *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8122-8123), the reactions were reversible. Thus, warming the aggregate mixture to 90 °C (above the dissociation temperature for the oligomers linking the nanoparticles together) and spotting while hot afforded a red spot. For control experiments in which the oligonucleotide target was omitted or was not complementary to the probes, the color was red under all conditions.

We conclude that the nanoparticle conjugates generated via the steroid-disulfide anchor function effectively as hybridization probes. Moreover, as judged by the spot test, the conjugates with the various anchor units react with the target oligonucleotides at comparable rates. This feature is consistent with expectations for probes having comparable densities of oligonucleotides on the surface of the nanoparticles and nucleotide recognition regions relatively far removed from the 5'-head groups.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

(f) Reaction of Nanoparticle Probes with Dithiothreitol.

Addition of thiols to colloidal solutions of gold nanoparticles or gold nanoparticles loaded with mercaptohexyl-oligonucleotides leads to aggregation of the nanoparticles. The color changes from red to deep blue, and on standing a dark precipitate settles out. As demonstrated with experiments with nanoparticles bearing fluorescently labeled oligonucleotides, the thiol displaces the mercaptoalkyl-oligonucleotides bound at the gold surface (Mucic, R. C., (1999) Synthetic Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA, PhD Thesis, Northwestern University). In contrast to aggregation induced by hybridization of oligonucleotide-nanoparticle conjugates, these reactions are irreversible; neither heating nor addition of NaOH disassembles the aggregates.

We have used this color to monitor the reaction of DTT with probes prepared with the steroid cyclic disulfide, the mercaptohexyl, and the acyclic disulfide head groups. The experiments were carried out by adding 1 μ L of 1M DTT in water to 100 μ L of the nanoparticle-oligonucleotide probe solution (2 A_{520} Units of nanoparticles) in 0.5 M NaCl and 10 mM phosphate (pH 7.0), then spotting 3 μ L aliquots on a TLC plate at various times and observing the color. As shown in Table 1, colloidal probes derived from oligonucleotides with the mercaptohexyl (IIc1 and IIc2) and acyclic oligonucleotide headgroups (IIIc1) reacted rapidly. A red-blue spot was obtained in 20 seconds and a strong blue spot within 5 minutes. By 100 minutes, most of the gold had precipitated. In contrast, no color change was observed for the reaction of the probes prepared with the steroid-cyclic disulfide head group (Ic1, Ic2) within 40 minutes. It took 100 minutes to reach the same color obtained with probes prepared with IIc1, IIc2, or with IIIc1 in 20 seconds. On this basis, we estimate that the rate of reaction of the steroid disulfide probes with DTT is of the order of 1/300th that of the other probes. The probe prepared from the acyclic disulfide anchor 3c reacts at about the same rate as the probes prepared with the mercaptohexyl anchor. The latter result is not surprising in view of evidence that the reaction of an acyclic disulfide with gold probably involves cleavage of the S-S

WO 01/051665

PCT/US01/01190

bond (Zhong, C. J., Langmuir, 15, 518-525). Accordingly, an oligonucleotide with an acyclic head group would likely be linked to gold through a single sulfur atom, as in the case of mercaptohexyl-oligonucleotide derivatives.

- To see if probes prepared from 1c1 and 1c2 in fact still serve as hybridization probes after standing in the presence of DTT, we treated two samples of mixtures of the probes with DTT under the conditions used for the reactions in Table I. After 30 minutes, 1 μ L of a solution of the 79-mer target oligonucleotide (10 pmol) was added to one. Both samples were frozen quickly, allowed to thaw, and assayed by the spot test. The spot for the sample containing the target was blue and that for the control lacking the target was red, demonstrating that these nanoparticle conjugates were not only stable but also effective as probes after exposure to DTT under conditions causing aggregation of probes derived from the mercaptohexyl or linear disulfide anchoring group.

Table 1. Colors from reactions of Gold Nanoparticle Probes with DTT

1c1 + 1c2	Time 0	20 sec	5 min	40 min	100 min
	red	red	red	red	red-blue
11c1 + 11c2	red	red-blue	blue	blue	(black prec.)
111c1	red	red-blue	blue	blue	(black prec.)

(g) Conclusion

- Gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates made using this cyclic disulfide linker serve as effective probes for detecting specific oligonucleotide sequences, and they exhibit much greater stability toward dithiothreitol than corresponding conjugates prepared with the conventional mercaptohexyl group or an acyclic disulfide unit. The high stability toward thiol deactivation likely results, in part at least, from anchoring each

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotide to gold through two sulfur atoms.

Example 24: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles using a simple cyclic disulfide linker.

5 In this Example, we prepared a non-steroid cyclic disulfide linker and oligonucleotide-nanoparticle probes from this linker and evaluated the probes stability in the presence of thiol-containing solutions relative to probes prepared with steroidal cyclic disulfide and alkyl thiol linkers. Procedures have been described for preparing probes for detecting DNA or RNA sequences by binding oligonucleotides to gold nanoparticles using alkylthiol anchor groups, I, Figure 44 [C. A. Mirkin et al., Nature, 382, 607 (1996); 10 Sterhoff, et al. J. Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)] or a steroid cyclic disulfide anchor group, II, Figure 44 [R. L. Letsinger et al., Bioconjugate Chemistry, 11, 289 (2000)]. As probes, the conjugates prepared using the steroid cyclic disulfide linker have proved advantageous in that they are much more stable in the presence of thiol compounds, such as mercaptoethanol or dithiothreitol (DTT), than are conjugates prepared using an 15 alkylthiol anchor. This feature is important since PCR solutions employed in amplifying DNA samples for detection contain small amounts of DTT to protect the enzyme. For simple and rapid detection of PCR products it is desirable to use probes with high stability toward DTT so that the test can be carried out directly in the PCR solution without having to first isolate the amplified DNA. 20

Two features distinguish the steroid cyclic anchor (compound I, Figure 42): (1) the cyclic disulfide, which can in principle provide two binding sites that could act cooperatively in holding a given oligonucleotide at the gold surface, and (2) the steroid unit which could stabilize neighboring chains on the gold by hydrophobic interactions (see for example, R. L. Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 7535 (1993). To assess 25 the importance of these contributions we have prepared and examined gold conjugates anchored by a cyclic disulfide lacking a steroid group, compound IIIc (Figure 44).

Compound 2a, prepared by heating trans-1,2-dithiane-4,5-dithiol with acetol in

WO 01/051665

PCT/US01/01190

toluene, was converted to a cyanoethyl N,N-di-i-propyl phosphoramidite reagent, 2b, which was employed in the final coupling step in the synthesis of modified oligonucleotides 2c1 and 2c2. One gold conjugate probe was prepared by treating a gold colloid solution with 2c1 and an equimolar amount of 2d, which serves a diluent on the gold surface. A comparison probe was made from 2c2 and 2d in the same way. These nanoparticle conjugates were stable in a range of solutions of sodium chloride (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 M), both on standing and on freezing and thawing.

(a) Preparation of compounds 2a, 2b, 2c1 and 2c2.

Compounds 2a was prepared as described in Example 23. Phosphitilation of 2a and synthesis of oligonucleotides 2c1 and 2c2 were carried out as described previously for the steroid cyclic disulfide derivatives in Example 23 and elsewhere [R. L. Letsinger et al., Bioconjugate Chemistry, 11, 289 (2000), the disclosure which is incorporated by reference in its entirety]. The time of reaction in the step involving condensation of IIIb with the oligomer on the CPG support was 10 min.

(b) Preparation of Gold-Oligonucleotide Conjugates.

Equimolar amount of oligonucleotides 2c1 and 2d or 2c2 and 2d were added to 13 nm gold colloids (~ 10 nM) to provide solutions containing 1.7 $\mu\text{mole/mL}$ of each oligonucleotide. The solutions were stored in the dark for 24 h; then salts were added to make the solutions 0.3 M in NaCl, 10 mM in phosphate (pH 7.0), and 0.01% in sodium azide. After 24 h the NaCl concentration was increased to 0.8 M and the solution were allowed to stand for another 24 h. The colloid was then filtered to remove any aggregates and the solution was centrifuged to collect the nanoparticles. The pellets were washed with nanopure water, recentrifuged and redispersed in 0.1 M NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.01 % sodium azide.

(c) Reaction of nanoparticles probes with dithiothreitol

Displacement studies were carried out at room temperature (22°C) by adding 2 μL of 0.1 M DTT to 20 μL of a mixture of equal volumes of the colloidal conjugates obtained from 2c1 and 2c2. Aliquots (3 μL) were periodically removed and spotted onto

WO 01/051665

PCT/US01/01190

a white Nylon membrane. Initially the spots were red. Displacement of the oligonucleotide sulfur derivatives from the gold by DTT led to mixtures that afforded a blue-gray spot in the spot test. The time for displacement by DTT was taken as the time for the mixture to give a strong blue-gray color in a spot test. For the mixture of

5 conjugates derived from 2c1 and 2c2 this time was 10 hours.

For comparison, oligonucleotide conjugates were similarly prepared from oligonucleotide sequences c1 and c2 (Figure 44) using the mercaptohexyl anchor (compound 2, Figure 42) and the steroid cyclic disulfide anchor (compound 1, Figure 42). The reaction times for the conjugates prepared from the monothiol derivative (2, Figure 10 42) and the steroid cyclic disulfide as measured by the time to afford a blue-gray spot, were 5 minutes and 53 hours, respectively. These values correspond to relative stabilities of 1, ~60, and ~300 for the nanoparticle oligonucleotide conjugates derived from the mercaptoalkyl derivatives, the non-steroid cyclic disulfide, and the steroid cyclic disulfide derivatives, respectively. The results show that the cyclic disulfide anchor unit 15 itself is sufficient to afford high stability relative to the mercaptoalkyl group in these systems. The large hydrophobic group in nanoparticle conjugates derived from compound 1 also appears to play a role in enhancing stability toward thiol displacement of the oligonucleotides.

20 Example 25: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

In this Example, we evaluated the stability of a new acyclic disulfide linker, a tri thiol, relative to alkyl thiol and steroidal cyclic disulfide linkers in the presence of thiol-containing solutions. For comparison, oligonucleotides with a mercaptohexyl anchor (compound 5, Figure 45) and with a steroid cyclic disulfide anchor (compound 6, Figure 25 45) were prepared.

(a) Synthesis and characterization of 5'-tri-mercaptoalkyl oligonucleotide.

The 5'-trimercaptoalkylthiol oligonucleotide was synthesized as shown in Figure 47. Trembler phosphoramidite 7 (Glen Research Inc, Sterling, VA), Figure 45, and Thiol-

WO 01/051665

PCT/US01/01190

modifier C6 S-S phosphoramidite, were sequentially coupled to the 5' end of a protected oligomer still bound to the CPG support. The product was cleaved from the CPG and purified as describe above. The retention time for tri-thiol oligonucleotide with three DMT group on the end is approximately 64 minutes. 5'-DMT groups were subsequently removed by dissolving the oligonucleotide in 80% acetic acid for 30 min. followed by evaporation. The oligonucleotide was redissolved in 500 μ L nanopure water and the solution was extracted with ethyl acetate ($3 \times 300 \mu$ L). After evaporation of the solvent, the oligonucleotide was obtained as a white solid. The retention time of this 5'-tri-disulfide oligonucleotide with no DMT group was around 35 minutes on reverse phase columns while 24 minutes on the ion-exchange column. These peaks were both more than 97% of the area in the spectra, which indicates the high purity of the oligonucleotide. The formula weight of oligonucleotide 8 (Figure 45) was obtained by electrospray MS (calculated: 12242.85, found 12244.1). The three disulfide groups on the DNA stand were reduced tri thiol groups as described above for 5' monothiol DNA; then the oligonucleotide was purified through a NAP-5 column.

(b) Preparation of 5'-thiol or disulfide DNA modified gold nanoparticle

Gold nanoparticles were used as purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). To 10 mL of 30nm gold colloid was added 5 OD of thiol modified DNA. The solution was brought to 0.3 M NaCl/10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) (PBS) gradually. Then the nanoparticles were thrown down by centrifugation. After removing the colorless supernatant, the red oily precipitate was redispersed in 10 mL of fresh PBS buffer. The colloid was washed twice more using 10mL fresh PBS buffer by repeating this process.

(c) Stability test of thiol-DNA modified gold nanoparticles

Solid DTT was added to 600 μ L solutions of the different types of thiol- or disulfide DNA modified 30 nm gold nanoparticle colloids until the DTT concentration was 0.017M. As DTT displaces the oligonucleotides, the color of the colloid turns from red to blue. UV/VIS spectra were taken as a function of time. The absorbance at ~ 528 nm

WO 01/051665

PCT/US01/01190

- associated with dispersed 30nm gold particles began to decrease and a broad band at 700nm began to grow. The band at 700 nm is associated with colloid aggregation. As shown in Figure 48, single thiol oligonucleotide (1)-modified 30 nm gold particles quickly form an aggregate in 0.017M DTT; after 1.5 hours, the colloid totally turns blue.
- 5 The solution containing disulfide oligonucleotide (4)-modified nanoparticles turns blue after 20 hours under identical conditions. For the trithiol-oligonucleotide (cleaved 6) modified nanoparticles, it took 40 h to turn the solution blue.

All patents, patent applications and references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

WE CLAIM:

1. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:
 - providing a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the
 - 5 oligonucleotides on each nanoparticle having a sequence complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid;
 - contacting the nucleic acid and the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the two or more portions of the nucleic acid; and
 - 10 observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
2. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
 - 15 contacting the nucleic acid with at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, the contacting
 - 20 taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid; and
 - observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
- 25 3. The method of Claim 2 wherein the contacting conditions include freezing and thawing.
4. The method of Claim 2 wherein the contacting conditions include heating.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

5. The method of Claim 2 wherein the detectable change is observed on a solid surface.
- 5 6. The method of Claim 2 wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.
7. The method of Claim 6 wherein the color change is observed on a solid surface.
- 10 8. The method of Claim 2 wherein the nanoparticles are made of gold.
9. The method of Claim 2 wherein the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled on their ends not attached to the nanoparticles with molecules that produce a detectable change upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.
- 15 10. The method of Claim 9 wherein the nanoparticles are metallic or semiconductor nanoparticles and the oligonucleotides attached to the nanoparticles are labeled with fluorescent molecules.
- 20 11. The method of Claim 2 wherein:
the nucleic acid has a third portion located between the first and second portions, and the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles do not include sequences complementary to this third portion of the nucleic acid; and
25 the nucleic acid is further contacted with a filler oligonucleotide having a sequence complementary to this third portion of the nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the filler oligonucleotide with

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the nucleic acid.

12. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.
13. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a gene associated with
5 a disease.
14. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a bacterial DNA.
15. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a fungal DNA.
- 10 16. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a synthetic DNA, a synthetic RNA, a structurally-modified natural or synthetic RNA, or a structurally-modified natural or synthetic DNA.
- 15 17. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is from a biological source.
18. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is a product of a polymerase chain reaction amplification.
- 20 19. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is contacted with the first and second types of nanoparticles simultaneously.
20. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is contacted and
25 hybridized with the oligonucleotides on the first type of nanoparticles before being contacted with the second type of nanoparticles.
21. The method of Claim 20 wherein the first type of nanoparticles is attached

WO 01/051665

PCT/US01/01190

to a substrate.

22. The method of Claim 2 wherein the nucleic acid is double-stranded and hybridization with the oligonucleotides on the nanoparticles results in the production of a
5 triple-stranded complex.

23. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto,
10 the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the
15 nanoparticles with said nucleic acid;
providing a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of said nucleic acid;
contacting said nucleic acid bound to the substrate with the second type of
20 nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with said nucleic acid; and
observing a detectable change.

24. The method of Claim 23 wherein the substrate has a plurality of types of
25 nanoparticles attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

25. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/051665

PCT/US01/01190

comprising:

- providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be
5 detected;
- contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;
- providing a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached
10 thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of said nucleic acid;
- contacting said nucleic acid bound to the substrate with the second type of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with said nucleic acid;
- 15 providing a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles;
- contacting the binding oligonucleotide with the second type of nanoparticles bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of
20 the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles;
- providing a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide;
- contacting the third type of nanoparticles with the binding oligonucleotide
25 bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles; and
- observing a detectable change.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

26. The method of Claim 25 wherein the substrate has a plurality of types of nanoparticles attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

5 27. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under
10 conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

contacting said nucleic acid bound to the substrate with a first type of nanoparticles having one or more types of oligonucleotides attached thereto, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of
15 the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;

contacting the first type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary
20 to at least a portion of the sequence of one of the types of oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and
observing a detectable change.

25 28. The method of Claim 27 wherein the first type of nanoparticles has only one type of oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the second portion of the sequence of said nucleic acid and to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

29. The method of Claim 28 further comprising contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles.

30. The method of Claim 27 wherein the first type of nanoparticles has at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to the second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of at least a portion of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

31. The method of Claim 30 further comprising contacting the second type of nanoparticles bound to the substrate with the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles.

32. The method of Claim 27 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

33. The method of any one of Claims 23-32 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

34. The method of Claim 33 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

35. The method of any one of Claims 23-32 wherein the nanoparticles are

WO 01/051665

PCT/US01/01190

made of gold.

36. The method of any one of Claims 23-32 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

5

37. The method of any one of Claims 23-32 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

38. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

10

contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

15

contacting said nucleic acid bound to the substrate with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;

20

contacting the substrate with silver stain to produce a detectable change; and

observing the detectable change.

25

39. The method of Claim 38 wherein the nanoparticles are made of a noble metal.

40. The method of Claim 39 wherein the nanoparticles are made of gold or silver.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

41. The method of Claim 38 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

5 42. The method of any one of Claims 38-41 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

43. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

10 contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

15 contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

20 contacting the liposomes bound to the substrate with a first type of nanoparticles having at least a first type oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic
25 interactions; and

 observing a detectable change.

44. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/051665

PCT/US01/01190

comprising

5 contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

10 contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

15 contacting the liposomes bound to the substrate with a first type of nanoparticles having at least a first type oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions;

20 contacting the first type of nanoparticles bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,

25 the first type of nanoparticles having a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles,

 the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles,

 the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles; and observing a detectable change.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

45. The method of Claim 43 or 44 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.
- 5 46. The method of Claim 43 or 44 wherein the nanoparticles are made of gold.
47. The method of Claim 43 or 44 wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.
- 10 48. The method of any one of Claims 43 or 44 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.
49. A method of detecting nucleic acid having at least two portions
- 15 comprising:
- providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- 20 contacting said nucleic acid with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid;
- providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate
- 25 probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid;

WO 01/051665

PCT/US01/01190

contacting said nucleic acid bound to the substrate with the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with said nucleic acid; and

observing a detectable change.

5

50. The method of Claim 49 wherein the substrate has a plurality of types of nanoparticles attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

10

51. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;

15

providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid;

20

contacting said nucleic acid, the substrate and the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the substrate; and

observing a detectable change.

25

52. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the substrate is then contacted with the aggregate probe so

WO 01/051665

PCT/US01/01190

that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe.

53. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, and said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate.

54. The method of Claim 51 wherein said nucleic acid is contacted simultaneously with the aggregate probe and the substrate.

55. The method of Claim 51 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

56. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

- providing a substrate having oligonucleotides attached thereto;
- providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- providing a type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

sequence of the oligonucleotides attached to the substrate;

contacting said nucleic acid, the aggregate probe, the nanoparticles and the substrate, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and on the nanoparticles and hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the substrate; and
observing a detectable change.

57. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe and the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the nanoparticles, and said nucleic acid bound to the aggregate probe and nanoparticles is then contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate.

58. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, and said nucleic acid bound to the aggregate probe and nanoparticles is then contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate.

59. The method of Claim 56 wherein said nucleic acid is contacted with the aggregate probe so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the aggregate probe, the nanoparticles are contacted with the substrate so that the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the aggregate probe is then contacted with the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticles bound to the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles.

5 60. The method of Claim 56 wherein the substrate has the oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

61. The method of any one of Claims 49-60 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.
10

62. The method of Claim 61 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

63. The method of any one of Claims 49-60 wherein the nanoparticles in the aggregate probe are made of gold.
15

64. The method of any one of Claims 49-60 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

20 65. The method of any one of Claims 49-60 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

66. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
25 contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with

WO 01/051665

PCT/US01/01190

said nucleic acid;

contacting said nucleic acid bound to the substrate with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting taking place under
5 conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid;

providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the
10 aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles;

contacting the liposomes bound to the substrate with the aggregate probe under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the aggregate
15 probe to the liposomes as a result of hydrophobic interactions; and
observing a detectable change.

67. The method of Claim 66 wherein the nanoparticles in the aggregate probe are made of gold.
20

68. The method of Claim 66 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

69. The method of Claim 66 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions
25 of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

70. A method of detecting nucleic acid having at least two portions

WO 01/051665

PCT/US01/01190

comprising:

- providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;
- 5 providing a core probe comprising at least two types of nanoparticles, each type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one of the other types of nanoparticles, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them;
- 10 providing a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe;
- 15 contacting said nucleic acid, the nanoparticles, the substrate and the core probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the nanoparticles and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the core probe; and
- 20 observing a detectable change.

- 71. The method of Claim 70 wherein said nucleic acid is contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and said nucleic acid bound to the substrate is then contacted with the nanoparticles so
- 25 that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, and the nanoparticles bound to said nucleic acid are contacted with the core probe so that the oligonucleotides on the core probe hybridize with the oligonucleotides on the nanoparticles.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

72. The method of Claim 70 wherein said nucleic acid is contacted with the nanoparticles so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the nanoparticles, said nucleic acid bound to the nanoparticles is then contacted with the substrate so that said nucleic acid hybridizes with the oligonucleotides on the substrate, and the nanoparticles bound to said nucleic acid are contacted with the core probe so that the oligonucleotides on the core probe hybridize with the oligonucleotides on the nanoparticles.

73. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected;

providing a core probe comprising at least two types of nanoparticles, each type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one other type of nanoparticles, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them;

providing a type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid and a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe;

contacting said nucleic acid, the linking oligonucleotides, the substrate and the core probe under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the linking oligonucleotides and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the linking oligonucleotides with the oligonucleotides on the core probe; and

observing a detectable change.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

74. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

75. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

76. The method of Claim 76 wherein the detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

77. The method of any one of Claims 70-73 wherein the nanoparticles in the core probe are made of gold.

78. The method of any one of Claims 70-73 wherein the substrate is contacted with a silver stain to produce the detectable change.

79. The method of any one of Claims 70-73 wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

80. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto;
providing one or more types of binding oligonucleotides, each of the binding oligonucleotides having two portions, the sequence of one portion being complementary to the sequence of one of the portions of the nucleic acid and the sequence of the other portion being complementary to the sequence of the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides on the nanoparticles;

contacting the nanoparticles and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides;

5 contacting the nucleic acid and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid; and

observing a detectable change.

10 81. The method of Claim 80 wherein the nanoparticles are contacted with the binding oligonucleotides prior to being contacted with the nucleic acid.

82. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions comprising:

15 providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto;

providing one or more binding oligonucleotides, each of the binding oligonucleotides having two portions, the sequence of one portion being complementary to the sequence of at least two portions of the nucleic acid and the sequence of the other portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the

20 nanoparticles;

contacting the nanoparticles and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides;

25 contacting the nucleic acid and the binding oligonucleotides under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid; and

observing a detectable change.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

83. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:
- contacting the nucleic acid with at least two types of particles having oligonucleotides attached thereto,
- 5 the oligonucleotides on the first type of particles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with an energy donor,
- the oligonucleotides on the second type of particles having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled
- 10 with an energy acceptor,
- the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid; and
- observing a detectable change brought about by hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid.
- 15
84. The method of Claim 83 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.
85. A method of detecting nucleic acid having at least two portions
- 20 comprising:
- providing a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;
- providing a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,
- 25 the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, nanoparticles being capable of producing a detectable change;
- contacting the nucleic acid with the microspheres and the nanoparticles

WO 01/051665

PCT/US01/01190

under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the microspheres and on the nanoparticles with the nucleic acid; and

observing a change in fluorescence, another detectable change produced by the nanoparticles, or both.

5

86. The method of Claim 85 wherein the detectable change produced by the nanoparticles is a change in color.

87. The method of Claim 85 wherein the microspheres are latex microspheres and the nanoparticles are gold nanoparticles, and changes in fluorescence, color or both are observed.

88. The method of Claim 87 further comprising placing a portion of the mixture of the latex microspheres, nanoparticles and nucleic acid in an observation area located on a microporous material, treating the microporous material so as to remove any unbound gold nanoparticles from the observation area, and then observing the changes in fluorescence, color, or both.

89. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;

providing a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule;

WO 01/051665

PCT/US01/01190

contacting the nucleic acid with the two types of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the two types of nanoparticles with the nucleic acid; and
observing changes in fluorescence.

5

90. The method of Claim 89 further comprising placing a portion of the mixture of the nanoparticles and nucleic acid in an observation area located on a microporous material, treating the microporous material so as to remove any unbound nanoparticles from the observation area, and then observing the changes in fluorescence.

10

91. A method of detecting nucleic acid having at least two portions comprising:

providing a type of particle having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid;

providing a type of probe oligonucleotides comprising a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the first portion of the oligonucleotides attached to the particles and both portions being complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further being labeled with a reporter molecule at one end;

20

contacting the particle and the probe oligonucleotides under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe oligonucleotides to produce a satellite probe;

then contacting the satellite probe with the nucleic acid under conditions effective to provide for hybridization of the nucleic acid with the probe oligonucleotides; removing the particles; and
detecting the reporter molecule.

25

WO 01/051665

PCT/US01/01190

92. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the reporter molecule is a fluorescent molecule.

93. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the
5 reporter molecule is a dye molecule.

94. The method of Claim 91 wherein the particles are magnetic and the reporter molecule is a redox-active molecule.

10 95. A kit comprising at least one container, the container holding a composition comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, the oligonucleotides
15 on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

96. The kit of Claim 95 wherein the composition in the container further comprises a filler oligonucleotide having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

20

97. The kit of Claim 95 wherein the nanoparticles are made of gold.

98. The kit of Claim 95 further comprising a solid surface.

25 99. A kit comprising at least two containers,
the first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, and

WO 01/051665

PCT/US01/01190

the second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

5 100. The kit of Claim 99 comprising a third container holding oligonucleotides having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

10 101. The kit of Claim 99 wherein the nanoparticles are made of gold.

 102. The kit of Claim 99 further comprising a solid surface.

 103. A kit comprising at least two containers,
15 the first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a binding oligonucleotide, and

 the second container holding one or more types of binding oligonucleotides, each of which has a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles
20 and the second portion being complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid.

 104. The kit of Claim 103 which comprises additional containers, each holding an additional binding oligonucleotide, each additional binding oligonucleotide having a
25 sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles and the second portion being complementary to the sequence of another portion of the nucleic acid.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

105. The kit of Claim 103 wherein the nanoparticles are made of gold.

106. The kit of Claim 103 further comprising a solid surface.

5 107. A kit comprising:

a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides, each of the types of binding oligonucleotides having a sequence comprising at least two portions, the first portion being complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the
10 oligonucleotides on the nanoparticles, and the second portion being complementary to the sequence of one or more portions of a nucleic acid.

108. A kit comprising at least one container, the container holding metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the
15 oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of a nucleic acid and having fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

20 109. A kit comprising:

a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and

a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached
25 thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

110. The kit of Claim 109 further comprising:

WO 01/051665

PCT/US01/01190

a second container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container; and

5 a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

10 111. A kit comprising at least three containers:
the first container holding nanoparticles;
the second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and
the third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

15 112. The kit of Claim 111 further comprising a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

20 113. The kit of Claim 111 further comprising a substrate.

114. The kit of Claim 113 further comprising:
a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide; and
25 a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

115. The kit of Claim 111 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, or both bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles.

116. The kit of Claim 113 wherein the substrate, nanoparticles, or both bear functional groups for attachment of the nanoparticles to the substrate.

117. The kit of Claim 113 wherein the substrate has nanoparticles attached to it.

118. The kit of Claim 111 wherein the nanoparticles are made of gold.

10

119. A kit comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, some of which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

20

120. A kit comprising:

a substrate;

a first container holding nanoparticles;

a second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

a third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence

WO 01/051665

PCT/US01/01190

complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide.

121. The kit of Claim 120 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, substrate or all bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles or for attachment of the oligonucleotides to the substrate.

122. The kit of Claim 120 wherein the nanoparticles are made of gold.

123. A kit comprising:
10 a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and
15 a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

124. The kit of Claim 123 wherein:
20 the nanoparticles in the second container have a second type of oligonucleotides attached thereto, the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on a second type of nanoparticles;
and the kit further comprises:
a third container holding a second type of nanoparticles having
25 oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

125. A kit comprising:

a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and

5 a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence
10 complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

126. A kit comprising:

a substrate, the substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a
15 nucleic acid; and

a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the
20 aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

127. The kit of Claim 126 wherein the substrate has a plurality of types of oligonucleotides attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions
25 of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

128. A kit comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto;

WO 01/051665

PCT/US01/01190

a first container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the
5 aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid; and

a second container holding nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the second
10 type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

129. A kit comprising:

a substrate, the substrate having oligonucleotides attached thereto, the
15 oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a second container holding an aggregate probe comprising at least two
20 types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic
25 group attached to the end not attached to the nanoparticles.

130. The kit of any one of Claims 125-129 wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

131. The kit of any one of Claims 125-129 wherein the nanoparticles of the aggregate probe are made of gold.
- 5 132. A kit comprising at least three containers:
 the first container holding nanoparticles;
 the second container holding a first oligonucleotide having a sequence
 complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid; and
 the third container holding a second oligonucleotide having a sequence
10 complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.
133. The kit of Claim 132 further comprising a fourth container holding a third
 oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a third portion of
 the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.
- 15 134. The kit of Claim 132 further comprising a substrate.
135. The kit of Claim 134 further comprising:
 a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected
20 sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a
 portion of the sequence of the second oligonucleotide; and
 a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence
 complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.
- 25 136. The kit of Claim 132 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, or both
 bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the nanoparticles.
137. The kit of Claim 134 wherein the substrate, nanoparticles, or both bear

WO 01/051665

PCT/US01/01190

functional groups for attachment of the nanoparticles to the substrate.

138. The kit of Claim 134 wherein the substrate has nanoparticles attached to it.

5 139. The kit of Claim 132 wherein the nanoparticles are made of gold.

140. A kit comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

10 a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, some of which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

141. A kit comprising:

a substrate;

a first container holding nanoparticles;

20 a second container holding a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;

a third container holding a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid; and

25 a fourth container holding a third oligonucleotide having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide.

142. The kit of Claim 141 wherein the oligonucleotides, nanoparticles, substrate or all bear functional groups for attachment of the oligonucleotides to the

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nanoparticles or for attachment of the oligonucleotides to the substrate.

143. The kit of Claim 141 wherein the nanoparticles are made of gold.

5 144. A kit comprising:
 a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a
 sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid;
 a first container holding liposomes having oligonucleotides attached
 thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the
 10 nucleic acid; and
 a second container holding nanoparticles having at least a first type of
 oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic
 group attached to the end not attached to the nanoparticles.

15 145. The kit of Claim 144 wherein:
 the nanoparticles in the second container have a second type of
 oligonucleotides attached thereto, the second type of oligonucleotides having a sequence
 complementary to the sequence of the oligonucleotides on a second type of nanoparticles;
 and the kit further comprises:
 20 a third container holding a second type of nanoparticles having
 oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary
 to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first
 type of nanoparticles.

25 146. A kit comprising at least two containers,
 the first container holding particles having oligonucleotides attached
 thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a
 nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy donor on the ends not

WO 01/051665

PCT/US01/01190

attached to the particles,

the second container holding particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy acceptor on the ends not
5 attached to the particles.

147. The kit of Claim 146 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.

10 148. A kit comprising at least one container, the container holding a first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles, and a second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence
15 complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid, the oligonucleotides being labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles.

149. The kit of Claim 148 wherein the energy donor and acceptor are fluorescent molecules.

20

150. A kit comprising:

a first container holding a type of microspheres having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule; and

25 a second container holding a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

151. The kit of Claim 150 wherein the microspheres are latex microspheres and the nanoparticles are gold nanoparticles.

152. The kit of Claim 150 further comprising a microporous material.

5

153. A kit comprising:

a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule; and

10

a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and being labeled with a fluorescent molecule.

15

154. The kit of Claim 153 further comprising a microporous material.

155. A kit comprising a container holding a satellite probe, the satellite probe comprising:

20

a particle having attached thereto oligonucleotides, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid; and

25

probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides having a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further having a reporter molecule attached to one end.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

156. A kit comprising a container holding an aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

157. A kit comprising a container holding an aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

158. An aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

159. The aggregate probe of Claim 158 comprising two types of nanoparticles each having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides attached to each type of nanoparticles having a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid, the second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides attached to the second type

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of nanoparticles.

160. The aggregate probe of Claim 158 comprising three types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the second type of nanoparticles, the oligonucleotides attached to the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles, and the third type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the first or second type of nanoparticles.

161. An aggregate probe, the aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the aggregate probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

162. A kit comprising a container holding a core probe, the core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

163. The kit of Claim 162 further comprising a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion

WO 01/051665

PCT/US01/01190

of the sequence of a nucleic acid to be detected.

164. The kit of Claim 162 or 163 further comprising a container holding a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto, the first type of
5 oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the nucleic acid, and the second type of oligonucleotides having sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe.

10 165. The kit of Claim 162 or 163 further comprising a container holding a type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe.

15 166. A core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

20 167. A substrate having nanoparticles attached thereto.

168. The substrate of Claim 167 wherein the nanoparticles have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid.

25 169. A metallic or semiconductor nanoparticle having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides being labeled with fluorescent molecules at the ends not attached to the nanoparticle.

WO 01/051665

PCT/US01/01190

170. A satellite probe comprising:

a particle having attached thereto oligonucleotides, the oligonucleotides having a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid; and

probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides having a first portion and a second portion, the first portion having a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid, the probe oligonucleotides further having a reporter molecule attached to one end.

171. A method of nanofabrication comprising

providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions;

providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of a portion of a linking oligonucleotide; and

contacting the linking oligonucleotides and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors.

172. The method of Claim 171 wherein at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto are provided, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles

WO 01/051665

PCT/US01/01190

having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide.

173. The method of Claim 171 or 172 wherein the nanoparticles are metallic
5 nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

174. The method of Claim 173 wherein the metallic nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

10 175. A method of nanofabrication comprising:
providing at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,
the oligonucleotides on the first type of nanoparticles having a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second of the nanoparticles;
15 the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles;
and
contacting the first and second types of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other
20 so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

176. The method of Claim 175 wherein the nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

25 177. The method of Claim 176 wherein the metallic nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

178. Nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticles having

WO 01/051665

PCT/US01/01190

oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

179. The nanomaterials or nanostructures of Claim 178 wherein at least some of
5 the oligonucleotide connectors are triple-stranded.

180. The nanomaterials or nanostructures of Claim 178 wherein the
nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination
thereof.

10

181. The nanomaterials or nanostructures of Claim 180 wherein the metallic
nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of
CdSe/ZnS (core/shell).

182. A composition comprising at least two types of nanoparticles having
oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the first type of nanoparticles
having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid or a
linking oligonucleotide, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a
sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid or
linking oligonucleotide.

20

183. The composition of Claim 182 wherein the nanoparticles are metallic
nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

25 184. The composition of Claim 183 wherein the metallic nanoparticles are
made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

185. An assembly of containers comprising:

WO 01/051665

PCT/US01/01190

a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, and

a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto,

5 the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container,

the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container having a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container.

186. The assembly of Claim 185 wherein the nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

15 187. The assembly of Claim 186 wherein the metallic nanoparticles are made of gold, and the semiconductor nanoparticles are made of CdSe/ZnS (core/shell).

188. A nanoparticle having a plurality of different oligonucleotides attached thereto.

20 189. A method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids, the method comprising:

providing two or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid; and

25 contacting the nucleic acids and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected

WO 01/051665

PCT/US01/01190

nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the selected nucleic acid aggregate and precipitate.

190. A method of binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce
5 stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety
comprising a functional group which can bind to the nanoparticles;

10 contacting the oligonucleotides and the nanoparticles in water for a period
of time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the
nanoparticles;

adding at least one salt to the water to form a salt solution, the ionic
strength of the salt solution being sufficient to overcome at least partially the electrostatic
attraction or repulsion of the oligonucleotides for the nanoparticles and the electrostatic
repulsion of the oligonucleotides for each other; and

15 contacting the oligonucleotides and nanoparticles in the salt solution for an
additional period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind
to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

191. The method of Claim 190 wherein the nanoparticles are metal
20 nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

192. The method of Claim 191 wherein the nanoparticles are gold
nanoparticles.

25 193. The method of Claim 192 wherein the moiety comprising a functional
group which can bind to the nanoparticles is an alkanethiol.

194. The method of Claim 190 wherein all of the salt is added to the water in a

WO 01/051665

PCT/US01/01190

single addition.

195. The method of Claim 190 wherein the salt is added gradually over time.

5 196. The method of Claim 190 wherein the salt is selected from the group consisting of sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, one of these salts in a phosphate buffer, and a combination of two or more these salts in a phosphate buffer.

10

197. The method of Claim 196 wherein the salt is sodium chloride in a phosphate buffer.

15 198. The method of Claim 190 wherein nanoparticle-oligonucleotide conjugates are produced which have the oligonucleotides present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 10 picomoles/cm².

199. The method of Claim 198 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of at least 15 picomoles/cm².

20

200. The method of Claim 199 wherein the oligonucleotides are present on surface of the nanoparticles at a surface density of from about 15 picomoles/cm² to about 40 picomoles/cm².

25 201. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:

providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides, each of the recognition oligonucleotides comprising

FIG. 1

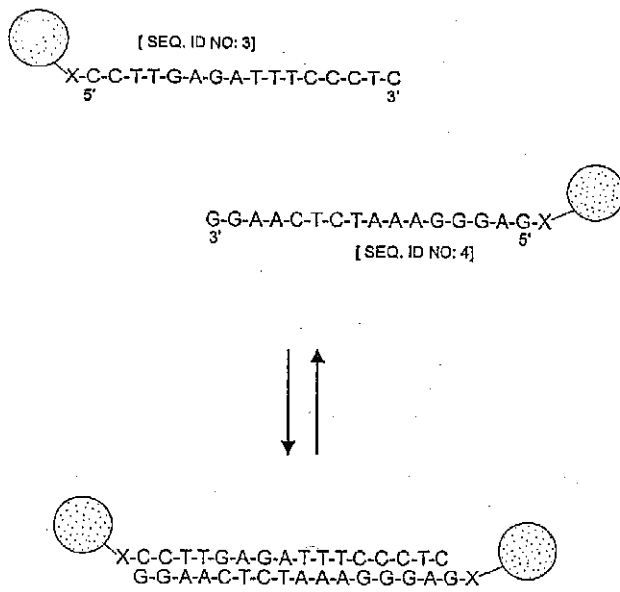


FIG.2

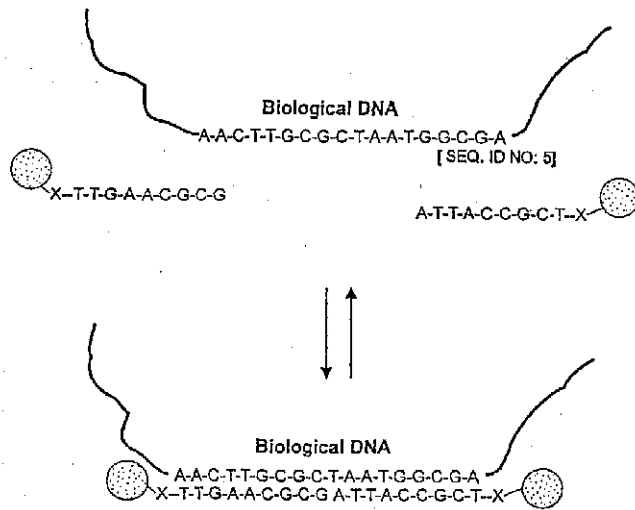


Diagram illustrating the formation of a DNA hairpin structure. The top part shows a single-stranded DNA sequence: 5'-A-A-C-T-T-G-C-G-C-T-T-T-A-C-G-G-C-T-A-A-T-G-G-C-G-A-3' [SEQ. ID NO: 6]. Below this, a shorter sequence is shown: 3'-X-T-T-G-A-A-C-G-C-G-5'. A double-headed arrow indicates a transition to the bottom part, which shows a hairpin structure. The top strand of the hairpin is 5'-A-A-C-T-T-G-C-G-C-T-T-T-A-C-G-G-C-A-A-T-G-G-C-G-A-3'. The bottom strand is 3'-X-T-T-G-A-A-C-G-C-G-5'. A double-headed arrow indicates a transition to the final state, which shows the hairpin structure with the sequence 5'-A-A-C-T-T-G-C-G-C-T-T-T-A-C-G-G-C-T-A-A-T-G-G-C-G-A-3' and 3'-X-T-T-G-A-A-C-G-C-G-5'.

WO 01/051665

4/51

PCT/US01/01190

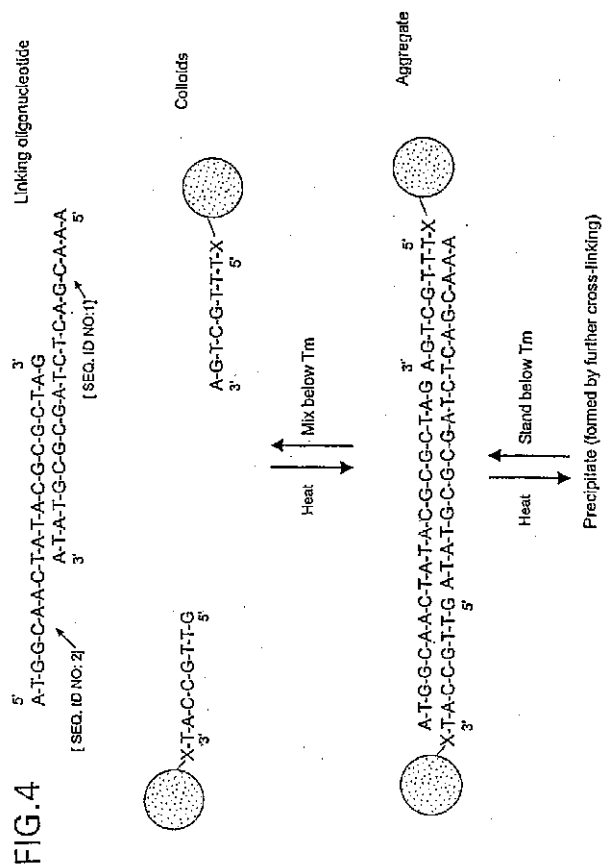
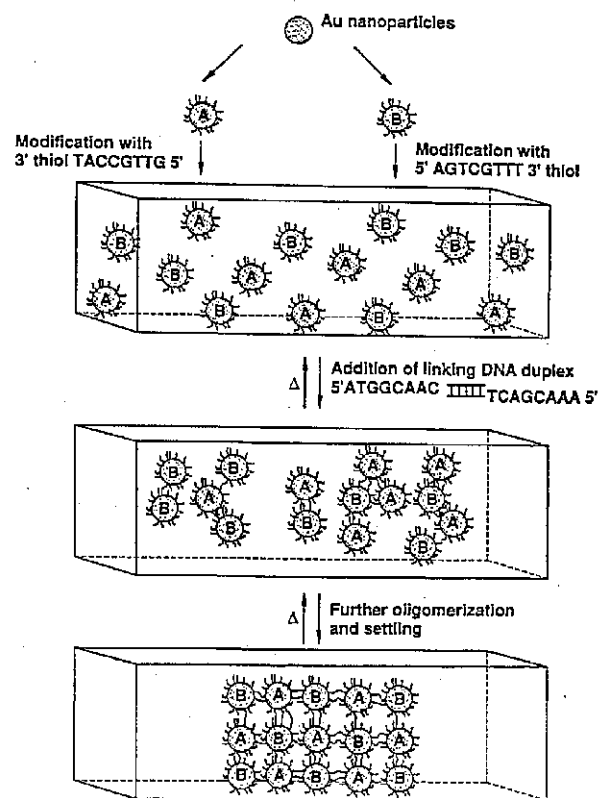


FIG.5



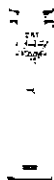


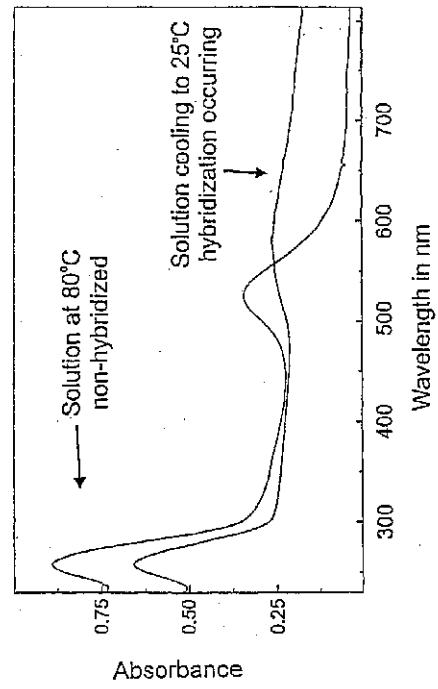
FIG.6A FIG.6B FIG.6C

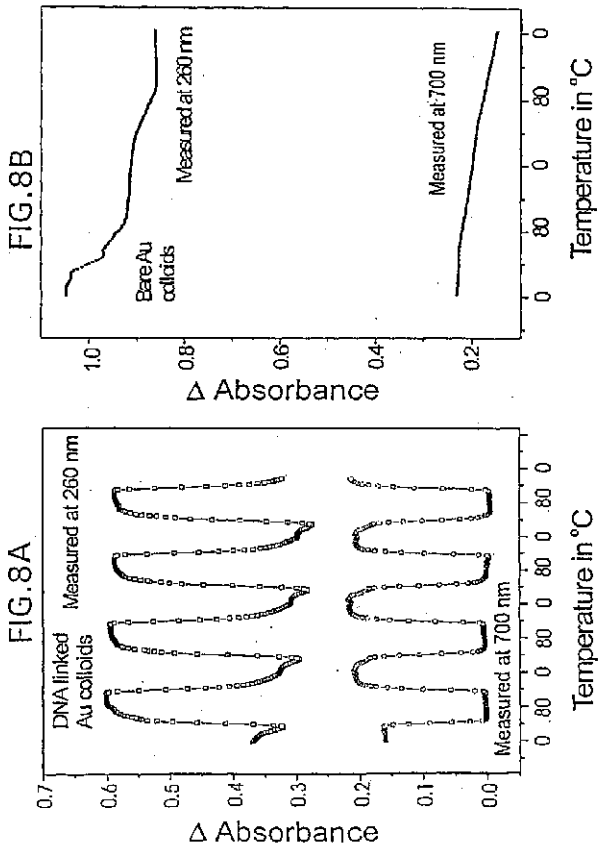
WO 01/051665

7/51

PCT/US01/01190

FIG. 7





WO 01/051665

9/51

PCT/US01/01190



FIG.9A

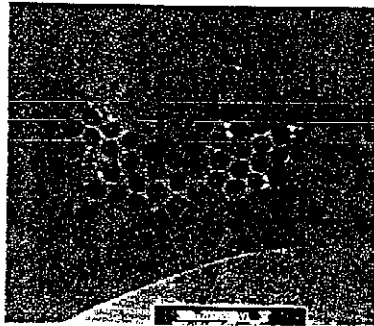


FIG.9B

FIG.10

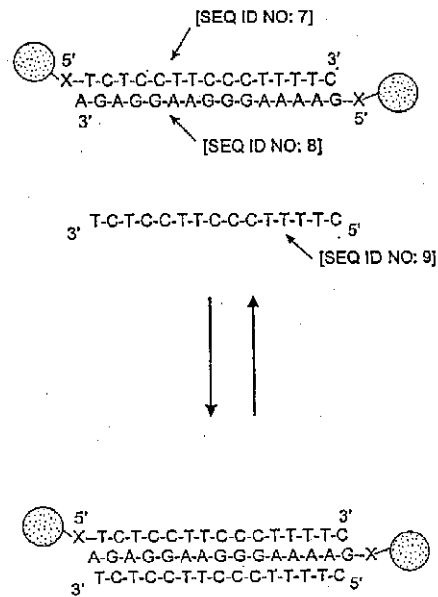
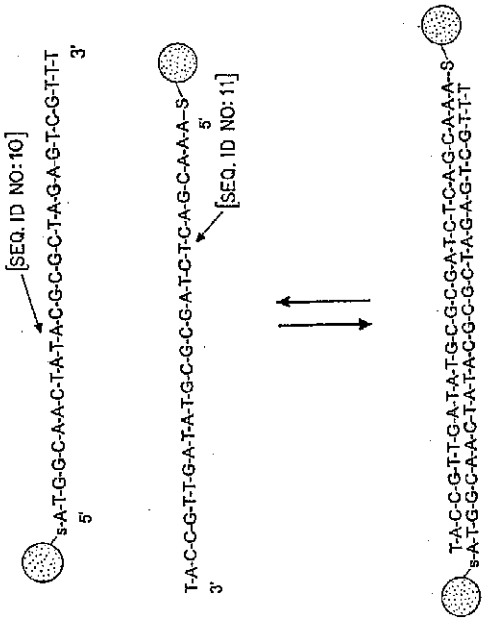


FIG. 11



WO 01/051665

12/51

PCT/US01/01190

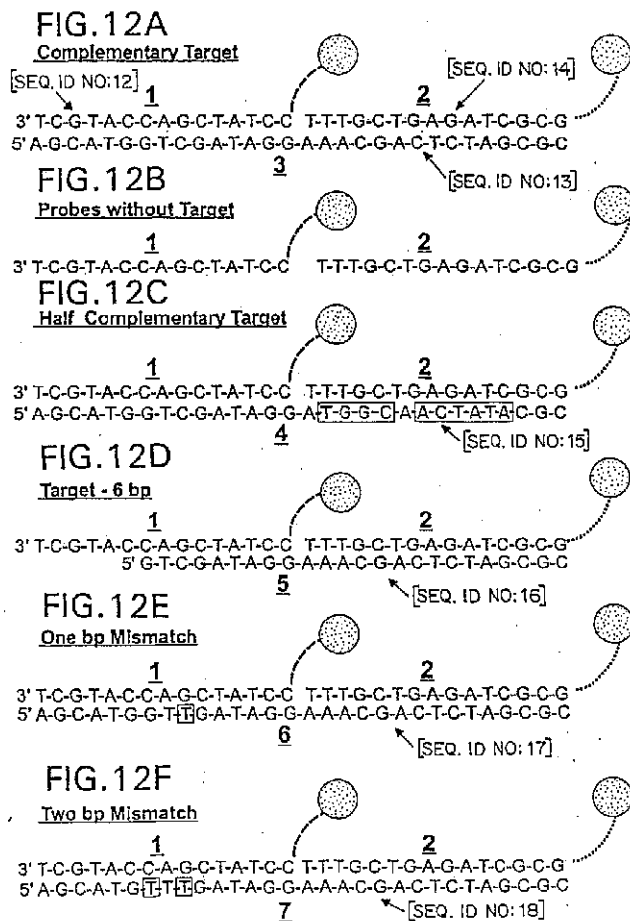
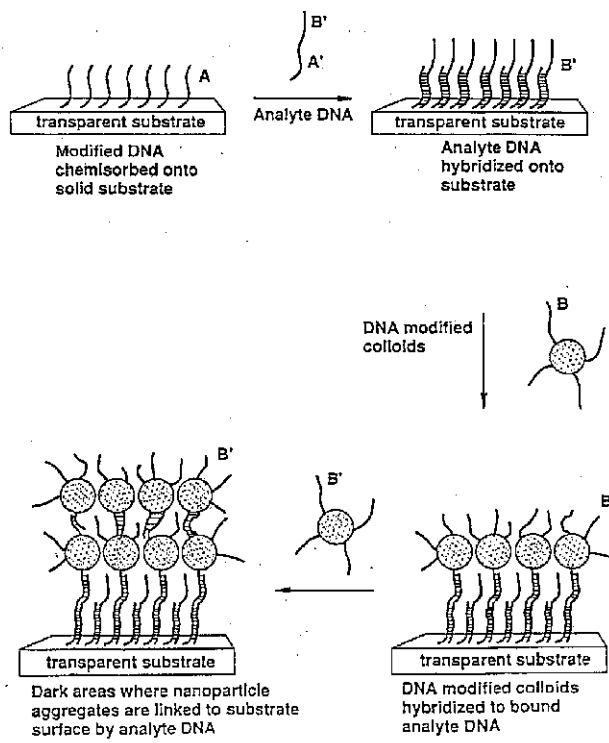


FIG.13A

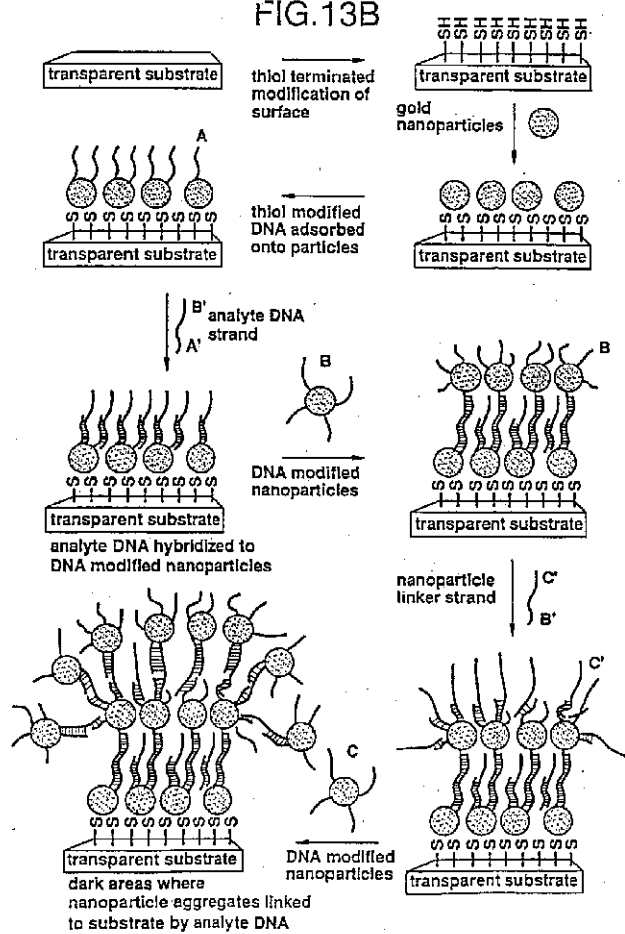


WO 01/051665

14/51

PCT/US01/01190

FIG.13B



WO 01/051665

15/51

PCT/US01/01190

FIG. 14A

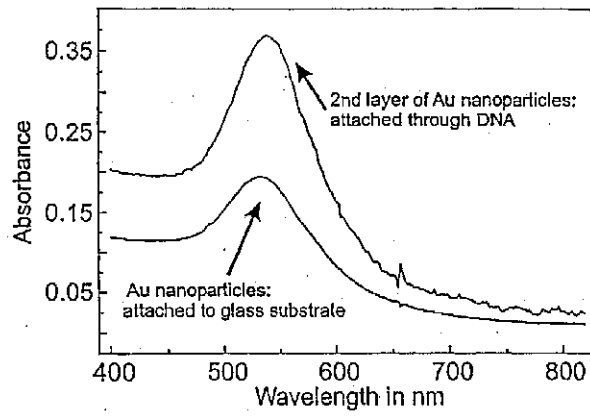


FIG. 14B

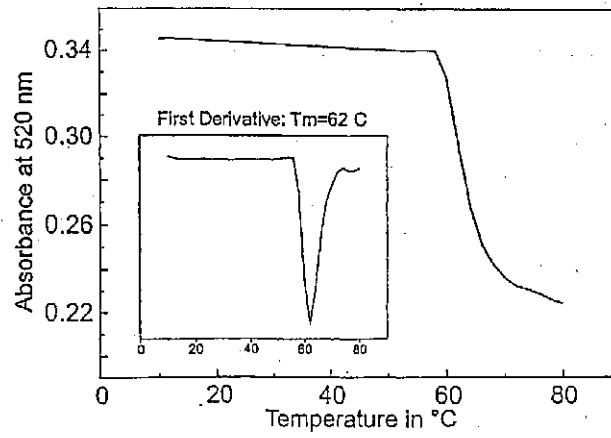
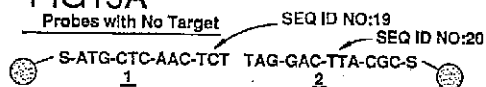
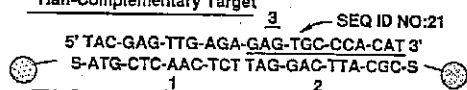


FIG15A

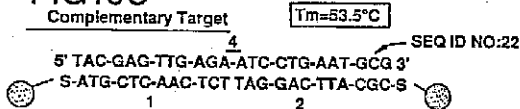
Probes with No Target

**FIG15B**

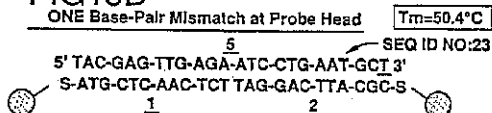
Half-Complementary Target

**FIG15C**

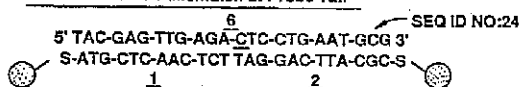
Complementary Target

**FIG15D**

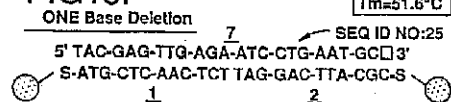
ONE Base-Pair Mismatch at Probe Head

**FIG15E**

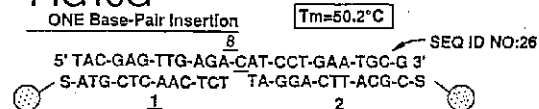
ONE Base-Pair Mismatch at Probe Tail

**FIG15F**

ONE Base Deletion

**FIG15G**

ONE Base-Pair Insertion



WO 01/051665

17/51

PCT/US01/01190

FIG. 16A 24 Base Template

5' TAC-GAG-TTG-AGA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

FIG. 16B 48 Base Template with Complementary 24 Base Filler

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-CCG-TTA-GTA-CGT TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

FIG. 16C 72 Base Template with Complementary 48 Base Filler

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-TAT-ATT-GGA-CGC-TTT-ACG-GAC-AAC-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-CCG-TTA-GTA-CGT-ATA-TAA-CCT-GCG-AAA-TGC-CTG-TTG TAG-GAC-TTA-CGC-S ~

1

2

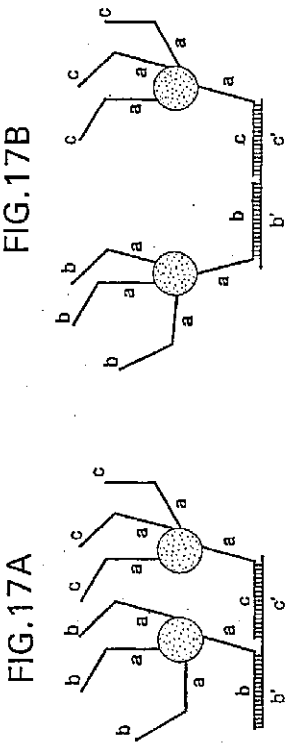


FIG.17C

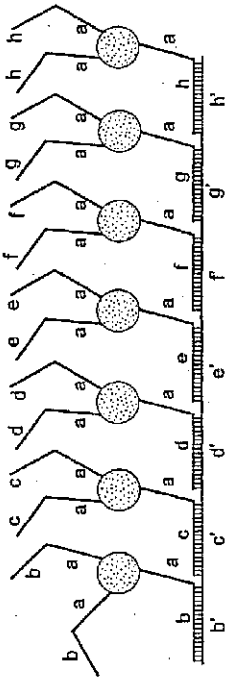


FIG.17D

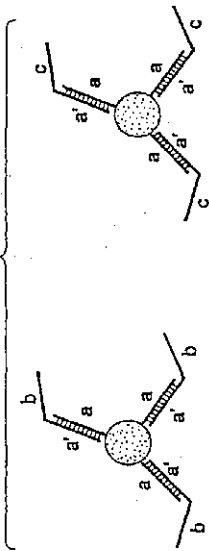


FIG.17E

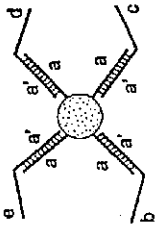
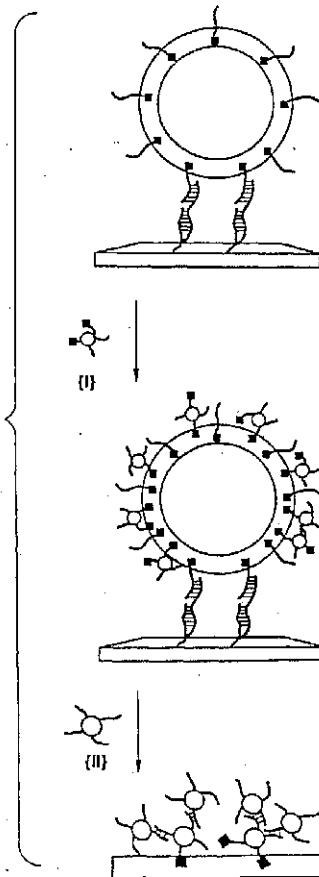


FIG.18



WO 01/051665

21/51

PCT/US01/01190

FIG. 19A

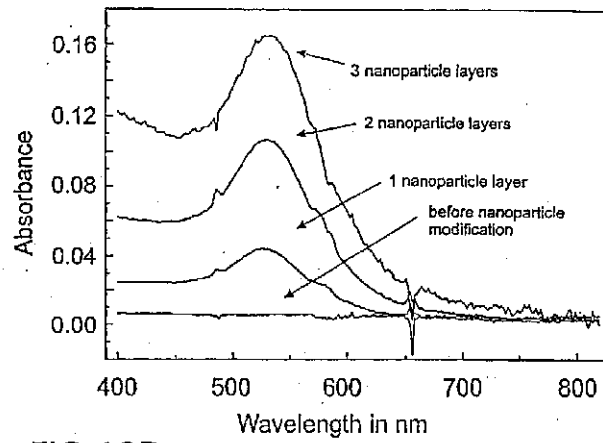
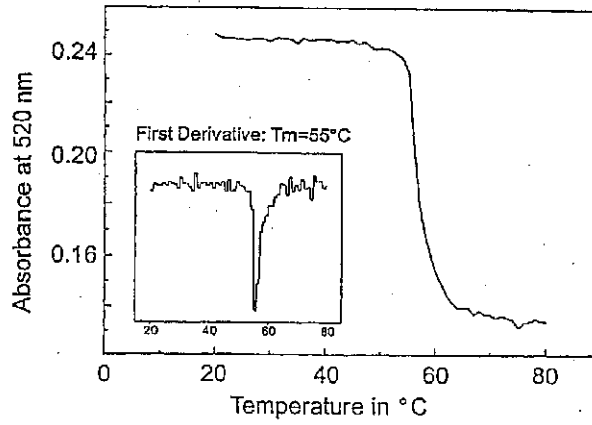


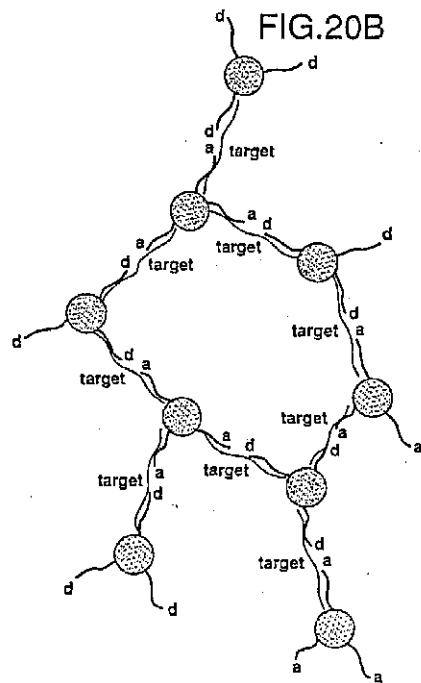
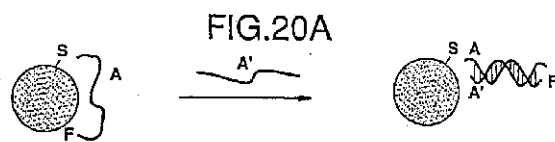
FIG. 19B



WO 01/051665

22/51

PCT/US01/01190



WO 01/051665

23/51

PCT/US01/01190

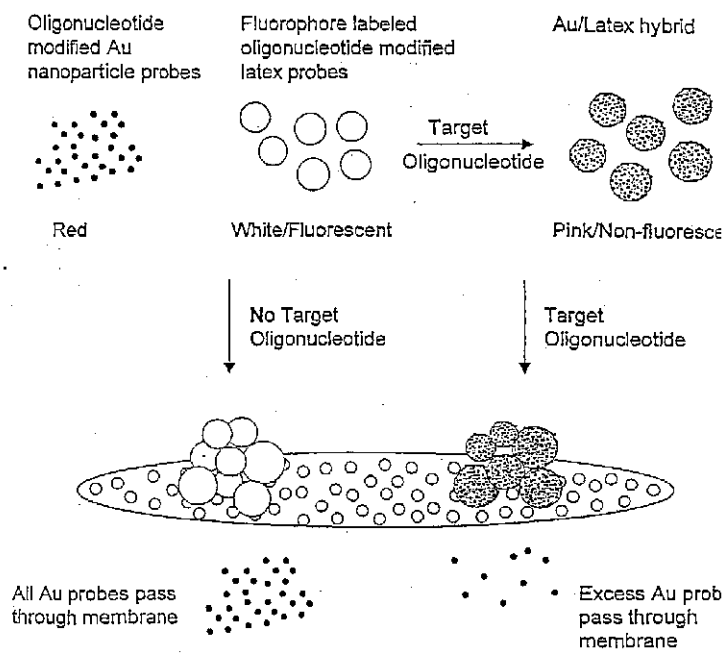


FIGURE 21

WO 01/051665

24/51

PCT/US01/01190

FIGURE 22

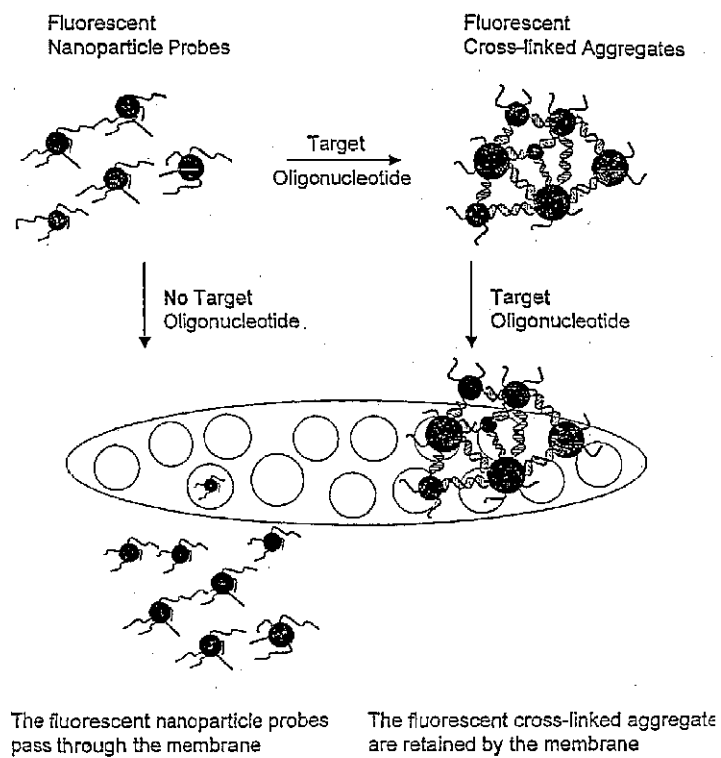


FIG. 23

Anthrax PCR Product

5'G GCG GAT GAG TCA GTA GTT AAG GAG GCT CAT AGA GAA GTA ATT AAT
 3'C CGC CTA CTC AGT CAT CAA TTC CTC CGA GTA TCT CTT CAT TAA TTA

TCG TCA ACA GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT ATA AGA AAA
 AGC AGT TGT CTC CCT AAT AAC AAT TTA TAA CTA TTC CTA TAT TCT TTT

ATA TTA TCC AGG GTT ATA TTG TAG AAA TTG AAG ATA CTG AAG GGC TT 3'
 TAT AAT AGG TCC CAA TAT AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA 5'

141 mer Anthrax PCR product [SEQ ID NO:36]

3' CTC CCT AAT AAC AAT

[SEQ ID NO:37]

3' TTA TAA CTA TTC CTA

[SEQ ID NO:38]

Oligonucleotide-Nanoparticle Probes

Blocker Oligonucleotides

3' C CGC CTA CTC AGT CAT CAA TTC CTC CGA GT

[SEQ ID NO:39]

3' A TCT CTT CAT TAA TTA AGC AGT TGT

[SEQ ID NO:40]

3' TAT TCT TTT TAT AAT AGG TCC CAA TAT

[SEQ ID NO:41]

3' AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA

[SEQ ID NO:42]

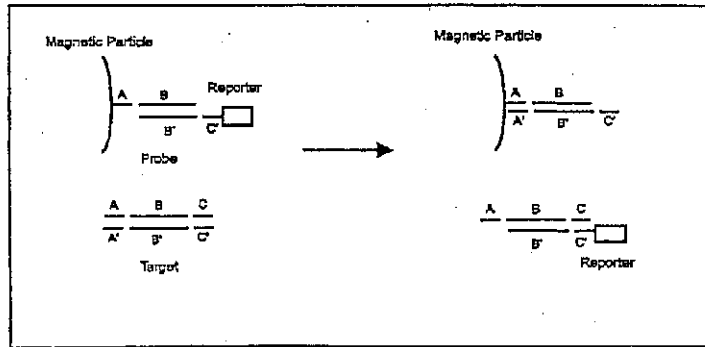
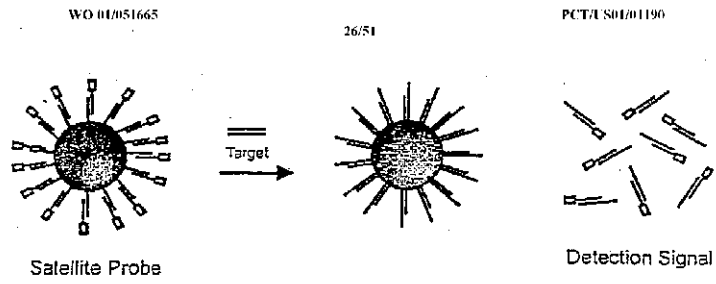


FIGURE 24

WO 01/051665

27/51

PCT/US01/01190

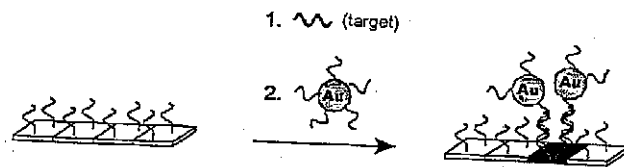


FIGURE 25A

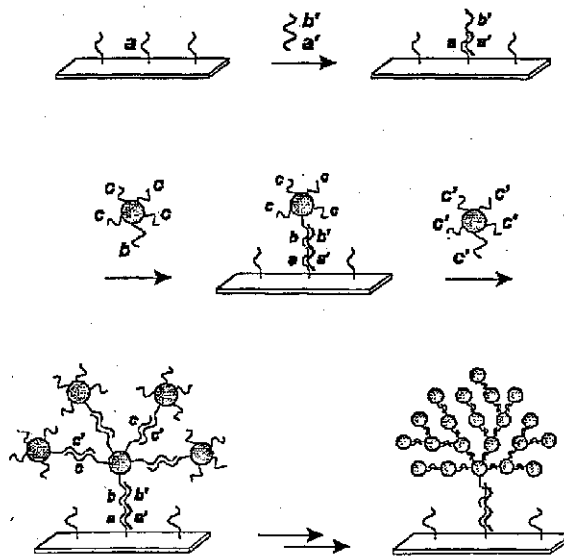


FIGURE 25B

WO 01/051665

28/51

PCT/US01/01190

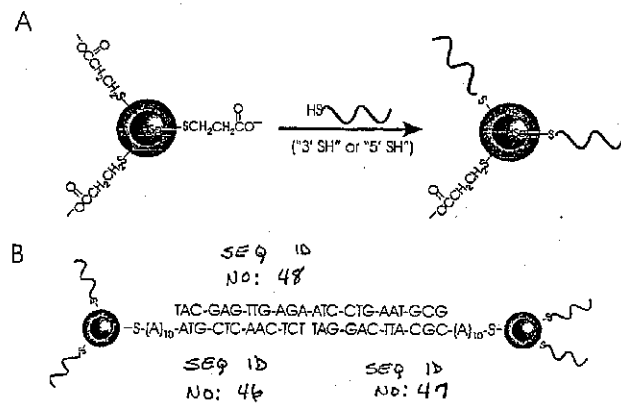


FIGURE 26

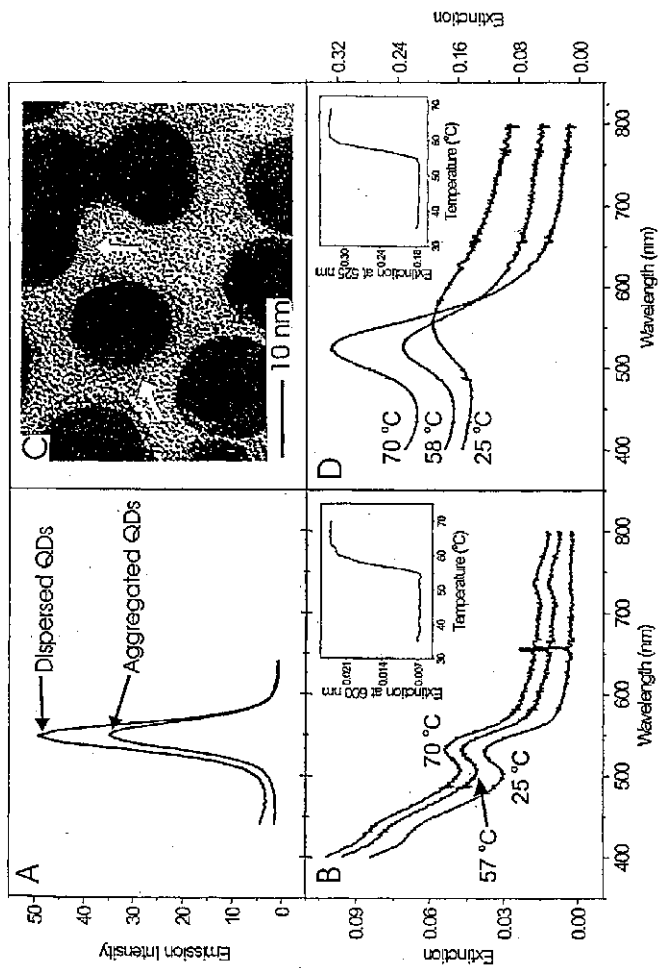


FIGURE 2

WO 01/051665

30/51

PCT/US01/01190

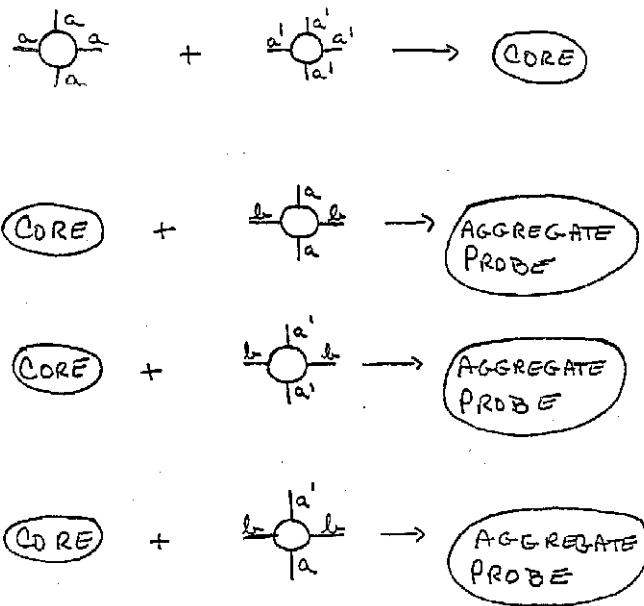


FIGURE 28A

WO 01/051665

31/51

PCT/US01/01190

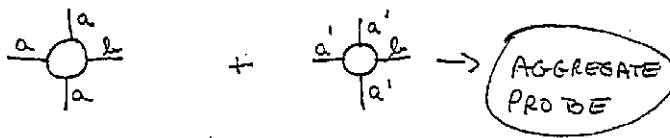


FIGURE 88B

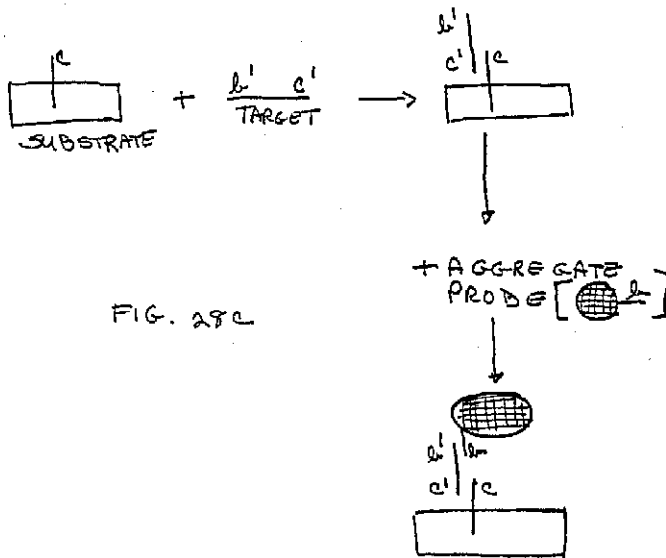


FIG. 28C

FIG. 28D

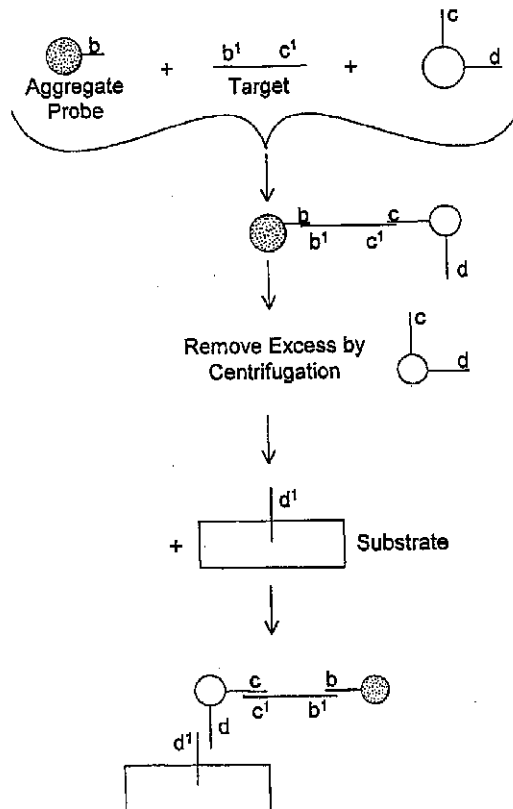
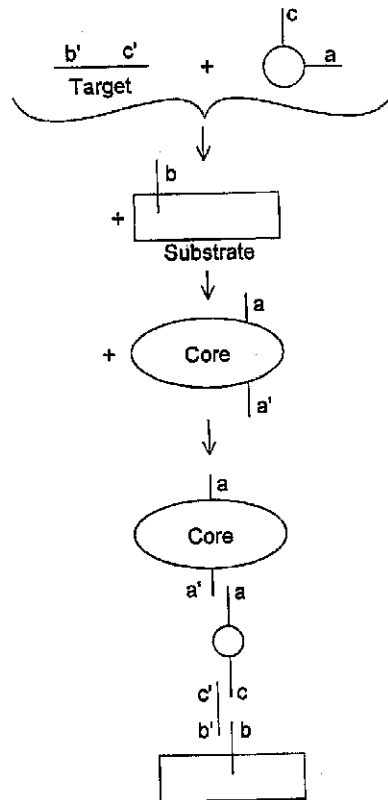


FIG. 28E



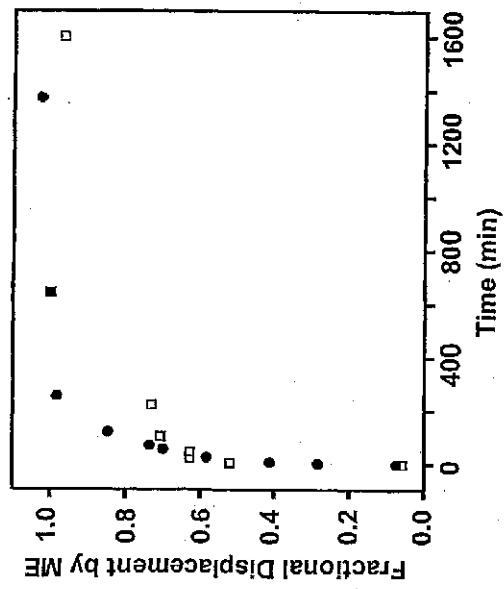
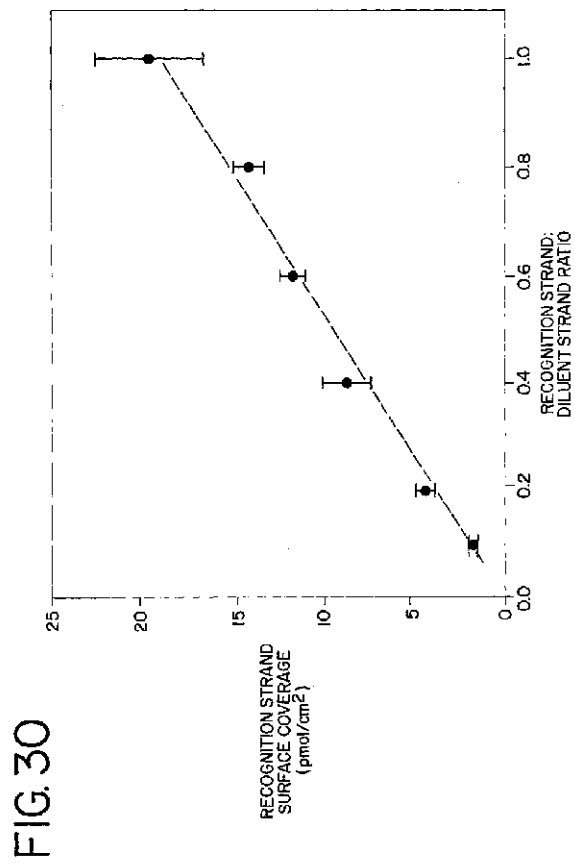


Figure 29

WO 01/051665

35/51

PCT/US01/01190



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

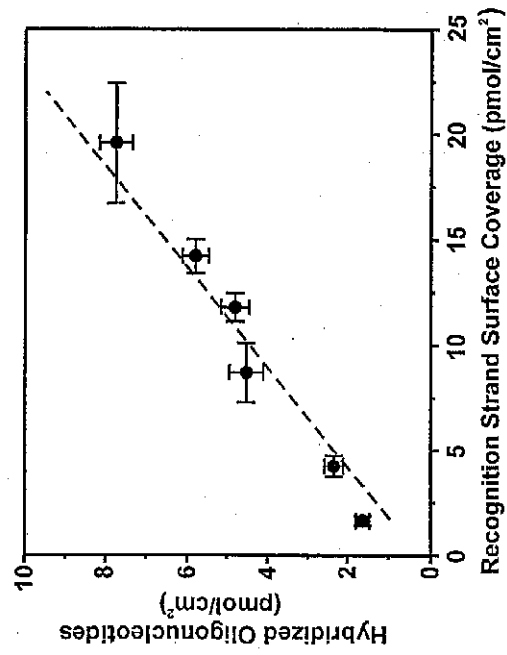
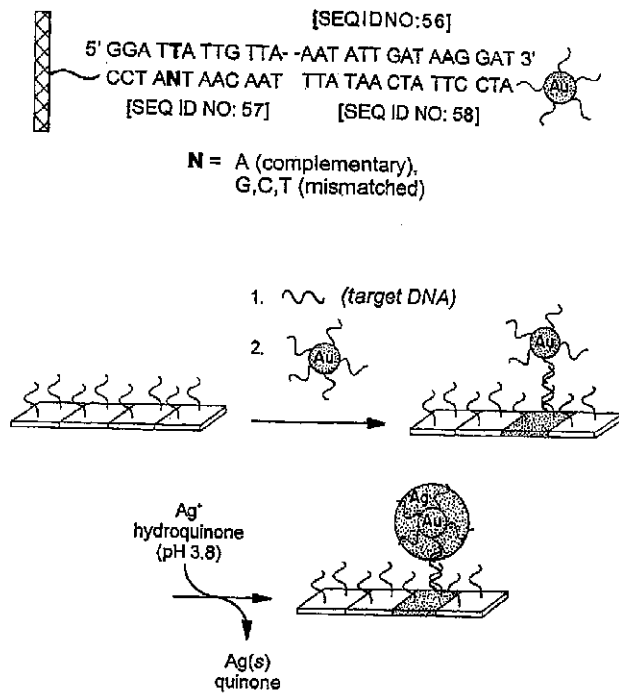


Figure 31

FIG. 32



WO 01/051665

38/51

PCT/US01/01190

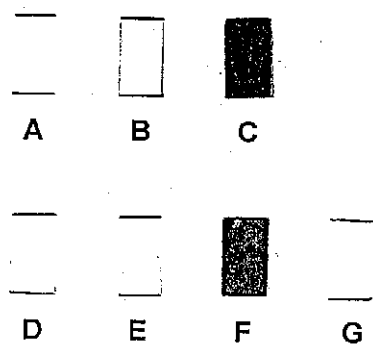


Figure 33

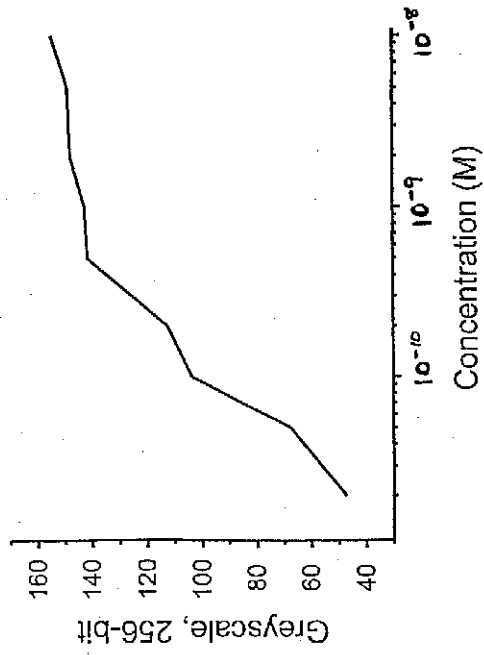


Figure 34

WO 01/051665

40/51

PCT/US01/01190

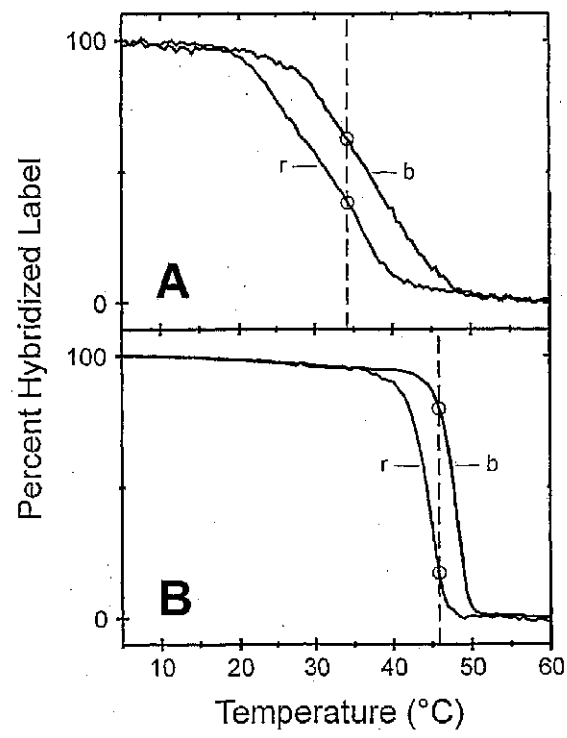


Figure 35

WO 01/051665

41/51

PCT/US01/01190

FIG. 36A

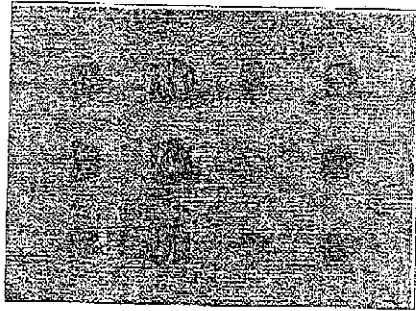
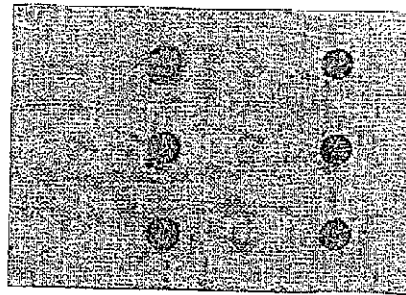


FIG. 36B



C A T G

WO 01/051665

42/51

PCT/US01/01190

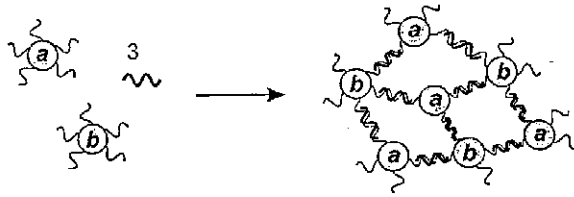
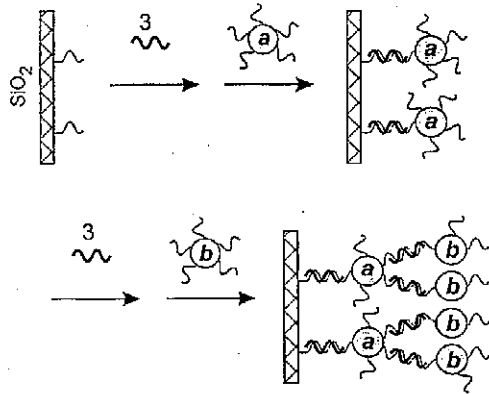
A**B**

Figure 37

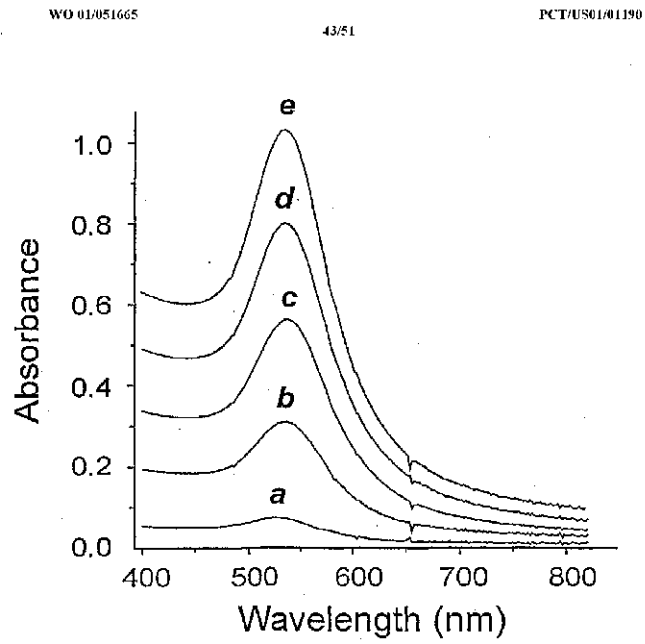


Figure 38A

WO 01/051665

44/51

PCT/US01/01190

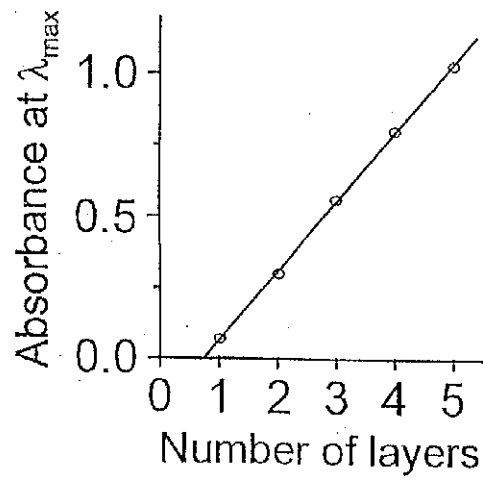


Figure 38B

WO 01/051665

45/51

PCT/US01/01190

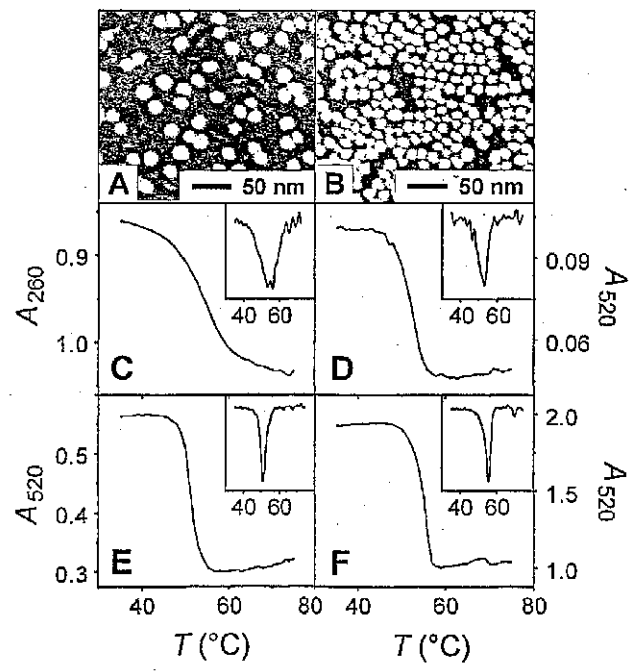
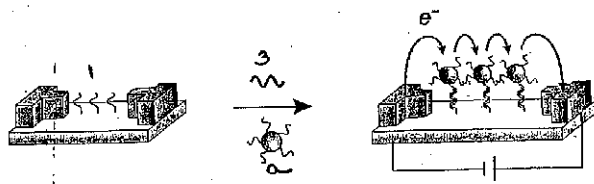
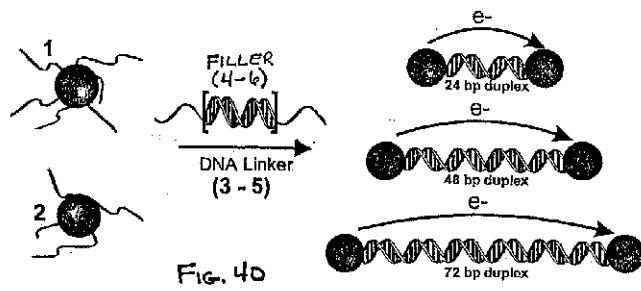


Figure 39

WO 01/051665

46/51

PCT/US01/01190

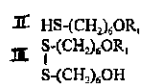
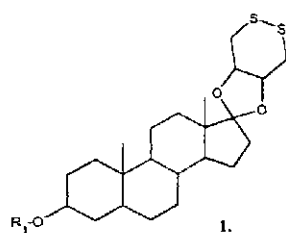


WO 01/051665

47/51

PCT/US01/01190

Fig. 42

R₁

a = H

b = (iPr)₂NP(OCH₂CH₂CN)-c1 = 5'-p(A₂₀)-TATCGTTCCATCAGCTc2 = 5'-p(A₂₀)-TTGATCTTCCGTTCT

Target I = 79-mer oligonucleotide with target region:

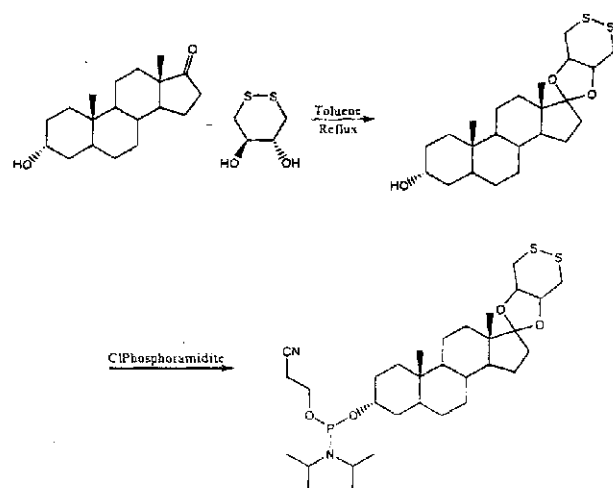
3'-.....ATAGCAAGGTAGTCGAGCAACTAGAAAGGCAAGA.....5'

WO 01/051665

48/51

PCT/US01/01190

Fig. 43

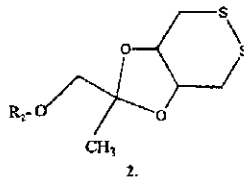


WO 01/051665

49/51

PCT/US01/01190

Fig. 44

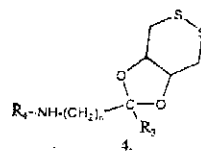
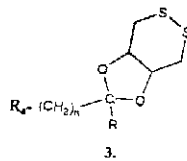
 R_2

a = H

b = (iPr)₂NP(OCH₂CH₂CN)-c1 = 5'-p(A₂₀)-GCAGACCTCAc2 = 5'-p(A₂₀)-CCTATGTGTCGd = 5'-p(A₂₀)

Target I = 63-mer oligonucleotide with target region:

3'.....CGTCTGGAGTGGATACACAGC.....5'

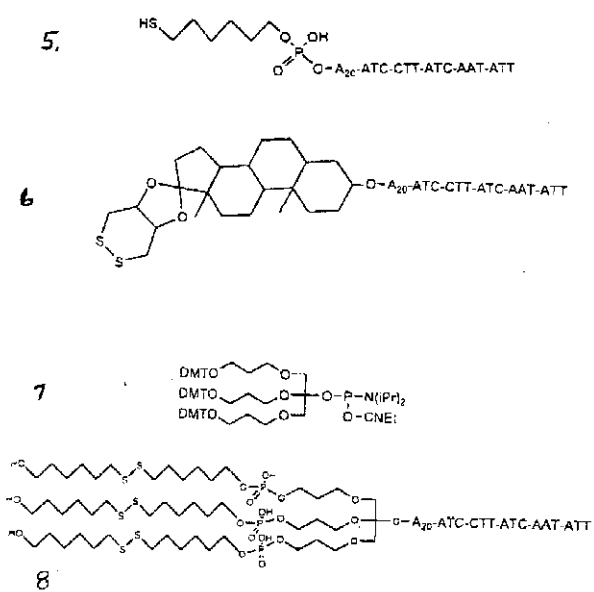
 R_2 = hydrogen, an alkyl group, an aryl group, or a substituted alkyl or aryl group R_4 = an attached oligonucleotide or modified oligonucleotide

WO 01/051665

50/51

PCT/US01/01190

FIG. 45

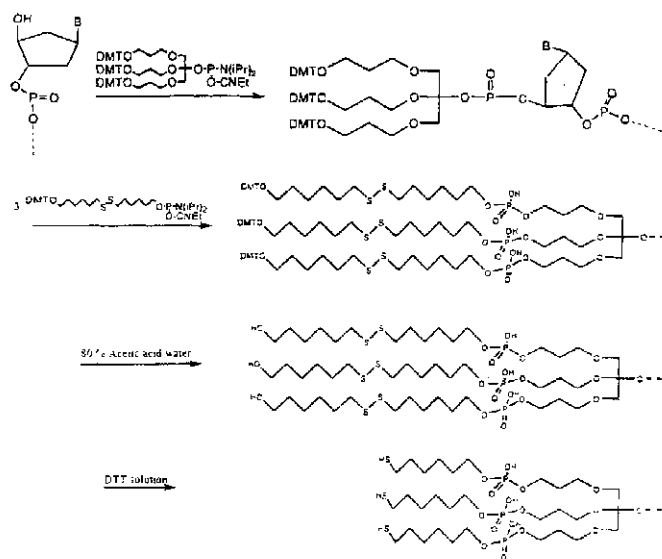


WO 01/051665

51/51

PCT/US01/01190

Fig. 46



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 July 2001 (19.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/051665 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/68.
(07H 21/00)

(21) International Application Number: PCT/US01/01190

(22) International Filing Date: 12 January 2001 (12.01.2001)

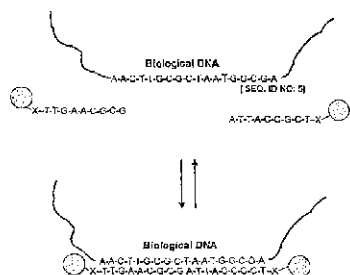
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/176,409 13 January 2000 (13.01.2000) US
60/200,161 26 April 2000 (26.04.2000) US
09/003,830 26 June 2000 (26.06.2000) US
09/764,500 17 January 2001 (17.01.2001) US(71) Applicant: NANOSPHERE INC. [US/US], 1801 Maple
Avenue, Evanston, IL (US).Apartment 602, 8504 West Catherine Avenue, Chicago,
IL 60656 (US); TATON, Thomas, Andrew, 9568 West
Greenleaf Ave. 15, Chicago, IL 60623 (US); LI, Zhi-911
Sheridan Avenue, Apt. 307, Evanston, IL 60202 (US);
GAKIMELLA, Viswanadham, 1915 Maple, Evanston,
IL 60201 (US).(74) Agent: MIAO, Emily, McDonnell Boehnen Hulbert &
Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago,
IL 60606 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR,
HR, HU, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NG, NZ, PA, PE, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TH, TJ, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(84) Title: NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR



(57) Abstract: The invention provides methods of detecting a nucleic acid. The methods comprise contacting the nucleic acid with one or more types of particles having oligonucleotides attached thereto. In one embodiment of the method, the oligonucleotides are attached to nanoparticles and have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A detectable change (preferably a color change) is brought about as a result of the hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid. The invention also provides compositions and kits comprising particles. The invention further provides methods of synthesizing unique nanoparticle oligonucleotide conjugates, the conjugates produced by the methods, and methods of using the conjugates. In addition, the invention provides nanomaterials and nanostructures comprising nanoparticles and methods of nanofabrication utilizing nanoparticles. Finally, the invention provides a method of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

WO 01/051665 A3

WO 01/051665 A3



Published:
— with international search report

Previous Correction:
see I.C.T. Gazette No. 44/2002 of 31 October 2002, Sec-
tion II

(88) Date of publication of the international search report:
30 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(15) Information about Correction:

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. App. No. PCT/US 01/01190
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C07H21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Mervin: documents searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documents on country other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, MPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 04740 A (UNIV NORTH-WESTERN ; MIRKIN CHAD A (US); MUCIC ROBERT C (US); ELGHAN) 5 February 1998 (1998-02-05)	
A	WO 99 60169 A (MOLECULAR MACHINES INC) 25 November 1999 (1999-11-25)	
A	WO 98 17317 A (SUEDEDEUTSCHE KALKSTICKSTOFF ; BAYER ERNST (DE); FRITZ HANS (DE); MA) 30 April 1998 (1998-04-30)	
A	WO 93 25709 A (MEDICAL RES COUNCIL ; HAWKINS TREVOR LEONARD (US)) 23 December 1993 (1993-12-23)	
A	US 5 900 481 A (LOUGH DAVID M ET AL) 4 May 1999 (1999-05-04)	
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of this C. ☒ Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *F* earlier document but published on or after the international filing date *F* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *Q* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or sale of an invention *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicable but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step in all the documents to which it refers *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step which the document is combined with one or more other documents, taken together, constitute a teaching obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
12 July 2002		12/08/2002
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 2016, D-69110 Heidelberg, Germany Tel. (+49) 7141 91-3100, Fax (+49) 7141 91-3101		Authorized officer: Molina Galan, E

Form PCT/ISOR/10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/01190
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document(s), with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 132, no. 4, 24 January 2000 (2000-01-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 3133C, LETSINGER, ROBERT L. ET AL: "Chemistry of oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates" XP002205341 abstract & PHOSPHORUS, SULFUR AND SILICON AND THE RELATED ELEMENTS (1999), 144-146, 359-362 .	
P, A	LETSINGER R L ET AL: "Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates." BIOCONJUGATE CHEMISTRY, (2000 MAR-APR) 11 (2) 289-91. , XP002205939	
T	LI ZHI ET AL: "Multiple thiol-anchor capped DNA gold nanoparticle conjugates." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (2002 APR 1) 30 (7) 1558-62. , XP002205940	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National application No. PCT/US 01/01190
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☒ Claims Nos.: 1-486 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without incurring an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01/01190

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-486 (partially)

In view of the large number of (independent) claims presently on file and their wording, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible.

An effort was nevertheless made by the ISA to identify a main subject on which a meaningful search could be performed. The subject apparently most important for the applicant is the preparation of oligonucleotide-nanoparticle conjugates using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide (cf page 34, line 18 to page 35, line 24). The resulting conjugates have, according to the applicant, an unexpectedly improved sensitivity and surprising stability. This was the only indication enabling the ISA to focus the search within the hundreds of possible embodiments disclosed in the application. The search has therefore been globally performed for the preparation of oligonucleotide-nanoparticle conjugates using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide, the resulting conjugates and their uses in nucleic acid detection.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

Int. Application No.
PCT/US 01/01190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9804740	A	05-02-1998	AU 4043497 A
			EP 0918885 A1
			JP 2000516460 T
			WO 9804740 A1
			US 6361944 B1
WO 9960169	A	25-11-1999	JS 6287765 B1
			AU 4194799 A
			CA 2328599 A1
			EP 1080231 A1
			WO 9960169 A1
WO 9817317	A	30-04-1998	US 2002034757 A1
			11-09-2001
			06-12-1999
			25-11-1999
			07-03-2001
WO 9325709	A	23-12-1993	25-11-1999
			21-03-2002
			15-05-1998
			30-04-1998
			30-04-1998
US 5900481	A	04-05-1999	EP 0934082 A2
			11 08 1999
			JP 2001503041 T
			06-03-2001
			04-01-1994
			04 01-1994
			23-12-1993
			23-12-1993
			15-09-2001
			05-07-2001
			29-05-1998
			02-06-2002
			29-05-1998
			23-03-2000
			14-10-1999
			20-09-2001
			11-04-2002
			19-12-2001
			10-11-1999
			25-08-1999
			13-02-2001
			05-07-1999
			06-07-1999
			14-05-1998
			14-05-1998
			11-04-2002
			17-10-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/04	G O 1 N 33/483	C 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/483	G O 1 N 33/483	F
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 33/58	G O 1 N 33/58	A
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	C 1 2 N 15/00	F

(31)優先権主張番号 09/760,500

(32)優先日 平成13年1月12日(2001.1.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 レッシンガー、ロバート エル.

アメリカ合衆国 6 0 0 9 1 イリノイ州 ウィルメット サード ストリート 3 1 6

(72)発明者 ミューシク、ロバート シー.

アメリカ合衆国 9 1 2 0 1 カリフォルニア州 グレンデール ベル エア ドライブ 1 6 0 0

(72)発明者 ストーホフ、ジェームズ ジェイ.

アメリカ合衆国 6 0 2 0 1 イリノイ州 エバンストン リッジ アベニュー 2 1 2 1 アパートメント 2 ジェイ

(72)発明者 エルガニアン、ロバート

アメリカ合衆国 6 0 6 5 6 イリノイ州 シカゴ ウェスト キャサリン アベニュー 8 5 0 3 アパートメント 6 0 2

(72)発明者 タトン、トーマス アンドリュウ

アメリカ合衆国 6 0 6 2 3 イリノイ州 シカゴ ウェスト グリーンリーフ 3 3 6 8 アパートメント 1 エス

(72)発明者 リー、ツイ

アメリカ合衆国 6 0 2 0 2 イリノイ州 エバンストン シャーマン アベニュー 9 1 1 アパートメント 3 0 7

(72)発明者 ガリメラ、ヴィスワナダム

アメリカ合衆国 6 0 2 0 1 イリノイ州 エバンストン メイプル アベニュー 1 9 1 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02 FB12 GC15 GC16

2G054 BB08 CA22 EA03 GA04

2G060 AD06 AE20 AF08 AG11 GA04 HC08 HC13 HC19 HC22 KA10

4B024 AA11 AA19 CA04 CA09 HA12

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34

QS39 QX02