

(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2004-515208

(P2004-515208A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 21/78

G O 1 N 27/04

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 21/78

G O 1 N 27/04

Z N A A

A

A

C

Z

テーマコード (参考)

2 G O 4 5

2 G O 5 4

2 G O 6 0

4 B O 2 4

4 B O 2 9

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 608 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-570836 (P2001-570836)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月28日 (2001.3.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年9月30日 (2002.9.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/010071
 (87) 国際公開番号 W02001/073123
 (87) 国際公開日 平成13年10月4日 (2001.10.4)
 (31) 優先権主張番号 60/192,699
 (32) 優先日 平成12年3月28日 (2000.3.28)
 (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)

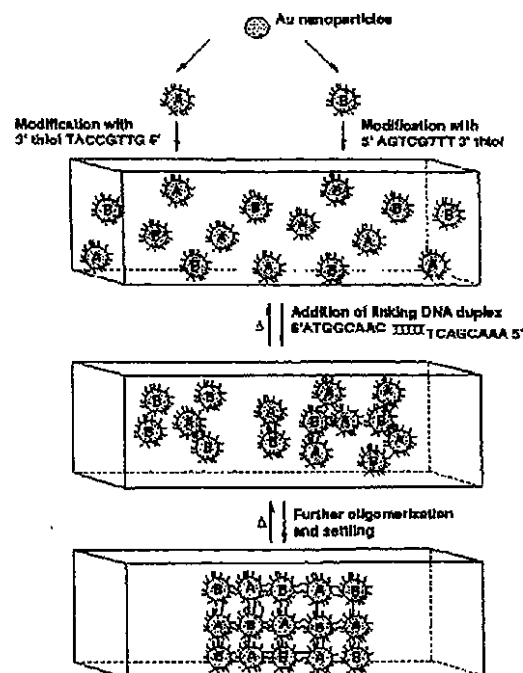
(71) 出願人 501216012
 ナノスフェア インコーポレイテッド
 NANOSPHERE INC.
 アメリカ合衆国 60062 イリノイ州
 ノースブルック コマーシャル アベニ
 ュー 4088
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (72) 発明者 マーキン、チャド エイ.
 アメリカ合衆国 60091 イリノイ州
 ウィルメット シックスティーン ス
 トリート 111

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

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、

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、

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、

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。

【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、

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。

10

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/ 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/ cm^2 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/ 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 に記載のナノ粒子。

【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 260 に記載のナノ粒子。

【請求項 262】

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 254 に記載のナノ粒子。

【請求項 263】

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 262 に記載のナノ粒子。

【請求項 264】

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 253 に記載のナノ粒子。

【請求項 265】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 264 に記載のナノ粒子。

【請求項 266】

核酸を検出する方法であって、

請求項 237～242 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 267】

核酸を検出する方法であって、

請求項 243～265 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 268】

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 237～242 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 269】

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 237～240 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 270】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 271】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 272】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 269 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 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 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、 10

(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、 20

(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、 30

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、からさらに成る請求項 3 3 7 に記載の方法。

【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、 40

(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

10

20

30

40

50

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、 10

(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、 20

(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。 30

【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。 40

【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360に記載の方法。

【請求項372】

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360に記載の方法。

【請求項373】

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371に記載の方法。

【請求項375】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項360に記載の方法。

【請求項376】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項375に記載の方法。

【請求項377】

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375に記載の方法。

【請求項378】

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360に記載の方法。

【請求項379】

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378に記載の方法。

【請求項380】

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378に記載の方法。

【請求項381】

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371に記載の方法。

【請求項382】

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381に記載の方法。

【請求項383】

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381に記載の方法。

【請求項384】

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253～263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、

(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385】

(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253～263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、

10

20

30

40

50

(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 384 に記載の方法。

【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、 30

(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、

(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 388 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】 40

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。

【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。

【請求項 397】

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 395 に記載の方法。

【請求項 398】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 384 の方法

【請求項 399】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 398 に記載の方法。

【請求項 400】

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 398 に記載の方法。 10

【請求項 401】

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 384 に記載の方法。

【請求項 402】

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 401 に記載の方法。

【請求項 403】

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 401 に記載の方法。

【請求項 404】

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 397 に記載の方法。 20

【請求項 405】

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 404 に記載の方法。

【請求項 406】

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 404 に記載の方法。

【請求項 407】

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。 40

【請求項 408】

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 407 に記載の方法。

【請求項 409】

ナノ粒子が金属から形成されている、請求項 407 に記載の方法。

【請求項 410】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 407 に記載の方法。

【請求項 411】

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。

【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。

10

【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。

20

【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、

30

(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。

40

【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】

50

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、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。 10

【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 つの部分をもつステップと、 20

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、 30

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 つの部分をもつステップと、

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。 40

【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 50

接触させるステップと、から成る方法。

【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。 20

【請求項 4 3 1】

少なくとも 2 つの部分の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 つの部分の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。 50

【請求項 4 3 6】

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 $10 \text{ ピコモル} / \text{cm}$ 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 $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 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 $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2 \sim$ 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 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。 20

【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。

【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 $10 \sim$ 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。 40

【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。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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】

50

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。

【請求項466】

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。

【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】

10

20

30

40

50

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。 40

【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。

【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。

【請求項 487】

サンプルの検体を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子共役体を提供するステップであって、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体に結び付けられた第 2 のオリゴヌクレオチドに結 50

合するステップと、

検体を、検体とナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、
検体と検体の特異的結合補体との特異的結合相互作用によってもたらされた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 488】

検体を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子共役体を提供するステップであって、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、ハイブリダイゼーションの結果、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分に結合し、連結オリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する第 2 部分を有するステップと、

検体を、検体とナノ粒子共役体に結び付けた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、
検体と検体の特異的結合補体との特異的結合相互作用によってもたらされた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 489】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(ii) 検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた第 1 種類のナノ粒子、および (iii) オリゴヌクレオチドを結び付けた第 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、第 2 種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチド一部が、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合するを提供するステップと、

検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、第 1 種類のナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドとがハイブリダイズしてナノ粒子-検体共役体を形成するのに有効な条件下で、検体に結び付けた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と、

検体と第 2 種類のナノ粒子の特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子-検体共役体を第 2 種類のナノ粒子共役体と接触させるステップと、

検体と検体の特異的結合補体との特異的結合相互作用によってもたらされた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 490】

検体を検出する方法であって、

(i) 少なくとも 2 つの部分有する連結オリゴヌクレオチド、(iii) オリゴヌクレオチドであって、その一部が連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを取り付けた第 1 種類のナノ粒子、(i) 連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた検体、および (iv) オリゴヌクレオチドであって、その一部が、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドを結び付けた第 2 種類のナノ粒子、を提供するステップと、

第 1 種類のナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドと、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で連結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と、

検体に結び付けたオリゴヌクレオチドと、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、連結オリゴヌクレオチドを、検体に結び付けたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

第 1 種類のナノ粒子に結び付けた検体と、第 2 種類のナノ粒子に結び付けた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、第 1 種類のナノ粒子に結

10

20

30

40

50

び付けられた検体と、第2種類のナノ粒子とを接触させるステップと、
検体の、検体の特異的結合補体に対する特異的結合によってもたらされた検出可能な変化
を観察するステップと、から成る方法。

【請求項491】

検体は多価であり、2つ以上のナノ粒子共役体に結合する、請求項487～490のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項492】

検体は多価であり、2つ以上のナノ粒子共役体に特異的に結合する、請求項487～49
0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項493】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項487～490のいずれか一項に記載の
方法。

【請求項494】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項487～490のいずれか一項に記載の方法。

【請求項495】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項487～490のいずれか一項に記載
の方法。

【請求項496】

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487～490のいずれか一
項に記載の方法。

【請求項497】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項487～490のいずれか一項に記載の方法
。

【請求項498】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項487～490のいずれか一項に記載の方法。

【請求項499】

検体を検出する方法であって、

(i) 検体を結び付けた支持体、および(ii) オリゴヌクレオチドであって、その一部
がハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を有する第2のオリゴヌクレオ
チドに結合するオリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子共役体を提供するステップと、
支持体に結び付けられた検体を、検体とナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体
との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体に接触させ
るステップと、
検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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500】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、および(ii) 支持体に結び付けられた
オリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた検体、およ
び(iii) オリゴヌクレオチドであって、その一部が、ハイブリダイゼーションの結果
、検体の特異的結合補体に結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌ
クレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子共役体を提供するステップと、
支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオ
チドと検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容
するのに有効な条件下で、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステッ
プと、
支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体とナノ粒子に結び付けられ
た特異的結合補体との間の特異的結合補体を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役
体と接触させるステップと、
検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、検出可能な変化を観察する

10

20

30

40

50

ステップと、から成る方法。

【請求項 501】

サンプルの検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、(ii) 連結オリゴヌクレオチド、(iii) オリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(iiii) オリゴヌクレオチドを結合させたある種類のナノ粒子共役体を提供するステップであって、ナノ粒子共役体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体に結合されたオリゴヌクレオチドに結合し、連結オリゴヌクレオチドの配列は少なくとも2つの部分を有し、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドの第1部分に相補的な配列を有し、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌクレオチドの第2部分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を、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、連結オリゴヌクレオチドの第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、
連結オリゴヌクレオチドを、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドの第2部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、
支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体とナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、
検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

20

【請求項 502】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、(ii) 支持体に結び付けたオリゴヌクレオチドの配列に相補的であるオリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(iii) オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子を提供するステップであって、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイゼーションの結果、連結オリゴヌクレオチドの第1部分に結合し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分がさらに、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドに結び付けられるステップと、
支持体に結び付けたオリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けたオリゴヌクレオチドと検体に結び付けたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、検体に結び付けたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、
支持体に結び付けた検体を、支持体に結び付けた検体とナノ粒子に結び付けた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、
検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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 503】

検体を検出する方法であって、

(i) 検体を結び付けた支持体、および(ii) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに取り付けられ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として互いに結合し、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、ハイブリダイズした結果検体の特異的結合補体を結び付けた第2のオリゴヌクレオチドに結合されるステップと、
支持体に結び付けられた検体と凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、支持体を凝集体プローブと接触させるステップと、

40

50

検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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 504】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、(ii) 支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(iii) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに取り付け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として互いに結合し、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合する提供するステップと、
オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体とオリゴヌクレオチドを結び付けた検体を接触させるステップであって、接触は、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが有効な条件下で起こるステップと、

10

支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体を凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、凝集体プローブと接触させるステップと、

検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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 505】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、(ii) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチド、(iii) オリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(iv) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに取り付け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として互いに結合し、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合し、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドの第1部分に相補的な配列を有し、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドの第2部分と相補的な配列を有しているステップと、

30

連結オリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドの第1部分の間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

連結オリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられた連結オリゴヌクレオチドの第2部分と検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体と凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、凝集体プローブと接触させるステップと、

40

検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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 506】

検体を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体、(ii) 支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた検体、(iii) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブとを提供するステップであって、凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに取り付けた

50

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、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類は、ハイブリダイゼーションの結果、連結オリゴヌクレオチドの第1部分に結合するオリゴヌクレオチドを有し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合するステップと、

オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体と凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、凝集体プローブと接触させるステップと、
検体の特異的結合補体に対する検体の特異的結合に基づいて、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507】

検体を検出する方法であって、

(i) 検体を結び付けた支持体、および(ii) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を提供するステップであって、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの一部は、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体に結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドと結合するステップと、

検体を結び付けた支持体を、支持体に結び付けられた検体と、ナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、

20

支持体に結び付けられたナノ粒子共役体を、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、

検体との検体の特異的結合補体との特異的結合に基づいて、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508】

多価検体を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子プローブを提供するステップであって、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、リポーターオリゴヌクレオチドの第1部分に結合し、リポーターオリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合するステップと、

30

多価検体を、検体とナノ粒子プローブ間の特異的結合相互作用を許容し、凝集複合体を形成するのに有効な条件下で、ナノ粒子プローブと接触させるステップと、

凝集複合体を分離するステップと、

凝集複合体を、凝集複合体をデハイブリダイズし、レポーターオリゴヌクレオチドをかつレポーターオリゴヌクレオチドを放出するのに有効な条件に供するステップと、

リポーターオリゴヌクレオチドの存在を検出するステップと、から成る方法。

【請求項509】

40

核酸を検出する方法であって、

(i) 核酸の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた、1または複数の種類のナノ粒子と、(ii) 各々にオリゴヌクレオチドが結び付けられた2つ以上のビオチン分子に対して、特異的結合相互作用により結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンを含む複合体と、を提供するステップと、

核酸、ナノ粒子、および複合体を、核酸の第1部分とナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドとのならびに核酸の第2部分と複合体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させるステップと、

ナノ粒子、複合体および核酸のハイブリダイゼーションから生じた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 5 1 0】

核酸を検出する方法であって、

(i) 核酸の第 1 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた、1 または複数の種類のナノ粒子、(i i) 核酸の第 2 部分と相補的な配列を有するビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチド、および(i i i) ストレプトアビジンまたはアビジンを提供するステップと、

核酸を、核酸の第 1 部分とナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドとのならびに核酸の第 2 部分とビオチンに取り付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションと、それによる複合体の形成を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体およびビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

複合体を、複合体に結び付けられたビオチンと、ストレプトアビジンまたはアビジンとの間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させるステップと、

複合体に結び付けられたビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンとの特異的結合により生じた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 5 1 1】

核酸を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた第 1 種類のナノ粒子共役体であって、ナノ粒子に取り付けた該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部が核酸の第 1 部分に相補的な配列を有する第 1 種類のナノ粒子共役体を提供するステップと、

核酸を、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第 1 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、第 1 種類のナノ粒と接触させるステップと、

s b p メンバーを結び付けたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、s b p メンバーに結び付けられた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ステップと、

s b p メンバーに結び付けられた核酸を、s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドをと核酸の第 2 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドを結び付けた第 2 種類のナノ粒子共役体を提供するステップであって、第 2 種類のナノ粒子に結び付けられた該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合するステップと、

第 1 種類のナノ粒子に結び付けられた核酸および s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドを、第 1 種類のナノ粒子に結び付けられた s b p メンバーと第 2 種類のナノ粒子に結び付けられた s b p 補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、第 2 種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

、
ストレプトアビジンまたはアビジンとの特異的結合から生じた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

40

【請求項 5 1 2】

s b p メンバーはビオチンである請求項 5 1 1 に記載の方法。

【請求項 5 1 3】

s b 補体はストレプトアビジンまたはアビジンである請求項 5 1 1 に記載の方法。

【請求項 5 1 4】

核酸を検出する方法であって、

核酸の第 1 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を提供するステップと、

核酸を、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、核酸の第 1 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持

50

体と接触させるステップと、

s b p メンバーに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 s b p メンバーに結び付けられた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ているステップと、

支持体に結び付けられた核酸を、s b p メンバーに結び付けられた核酸と核酸の第 2 部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドが結び付けられたある種類のナノ粒子共役体を提供するステップであって、ナノ粒子共役体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部が、ハイブリダイゼーションの結果、s b p メンバーの特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合させるステップと、 10

支持体に結び付けられた s b p メンバーを、支持体に結び付けられた s b p メンバーとナノ粒子に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下でナノ粒子共役体と接触させるステップと、

支持体に結び付けられた s b p メンバーを、支持体に結び付けられた s b p メンバーとナノ粒子に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子共役体と接触させるステップと、

s b p メンバーと特異的結合補体との間の特異的結合に基づいて、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 515】

20

s b p メンバーはストレプトアビジンまたはアビジンである請求項 514 に記載の方法。

【請求項 516】

s b 補体はビオチンである請求項 514 に記載の方法。

【請求項 517】

核酸を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを取り付けたナノ粒子共役体を提供するステップであって、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、核酸の第 1 部分に相補的な配列を有しているステップと、

核酸を、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第 1 部分とのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、 30

s b p メンバーを結び付けたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、s b p メンバーに結び付けられた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するステップと、

核酸を、s b p メンバーを有するオリゴヌクレオチドと核酸との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、s b p メンバーを有するオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

s b p メンバーの特異的結合補体に結び付けた支持体を提供するステップと、

支持体を、s b p メンバーと支持体に結び付けられた s b 補体との間に特異的結合相互作用が起こるのに有効な条件下で、ナノ粒子に結び付けられた s b p メンバーと接触させるステップと、 40

s b p メンバーと s b p メンバーの補体との特異的結合に基づいて、検出可能な出来事を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 518】

s b p メンバーはビオチンである請求項 517 に記載の方法。

【請求項 519】

s b 補体はストレプトアビジンまたはアビジンである請求項 517 に記載の方法。

【請求項 520】

核酸を検出する方法であって、

オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を提供するステップであって、支持体に結び付け 50

られたオリゴヌクレオチドは核酸の第1部分に相補的な配列を有するステップと、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第1部分の間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、核酸と支持体を接触させるステップと、s b pメンバーに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、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分と相補的な配列を有するステップと、

支持体に結び付けられた核酸の第2部分とs b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、支持体に結び付けられた核酸と、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドとを接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに取り付けられ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として互いに結合し、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、ハイブリダイズした結果s b pメンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合されるステップと、支持体に結び付けられたs b pメンバーと凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、支持体に結び付けられたs b pメンバーを凝集体プローブと接触させるステップと、

s b pメンバーとs b pメンバーのs b補体の特異的結合に基づいて、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521】

s b pメンバーはビオチンである請求項520に記載の方法。

【請求項522】

s b補体はストレプトアビジンまたはアビジンである請求項520に記載の方法。

【請求項523】

核酸を検出する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブであって、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに取り付けられ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として互いに結合し、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、核酸の第1部分に相補的ないくつかのオリゴヌクレオチドが取り付けられた凝集体プローブ、および(ii) 核酸の第2部分に相補的な配列を有する、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドを提供するステップと、凝集体プローブに結び付けられたオリゴヌクレオチドの一部と核酸の第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、凝集体プローブに結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、核酸を凝集体プローブと接触させるステップと、

核酸を、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、s b pメンバーを結び付けたオリゴヌクレオチドは、s b pメンバーを結び付けたオリゴヌクレオチドと核酸の第2部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、核酸の第2部分に相補的な配列を有するステップと、

s b pメンバーの特異的結合補体を結び付けた支持体を提供するステップと、凝集体プローブに結び付けられたs b pメンバーと支持体に結び付けられたs b補体との間に生じる特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、凝集体プローブに結び付けた特異的結合補体と凝集体に結び付けられたs b pメンバーとを接触させるステップと、

s b pメンバーおよびs b補体の特異的結合に基づいて、検出可能な出来事を観察するステップと、から成る方法。

【請求項524】

s b pメンバーはストレプトアビジンまたはアビジンである請求項523に記載の方法。

【請求項525】

10

20

30

40

50

s b 補体はビオチンである請求項 5 2 3 に記載の方法。

【請求項 5 2 6】

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 4 9 9 ~ 5 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2 7】

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 4 9 9 ~ 5 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2 8】

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 4 9 9 ~ 5 2 5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5 2 9】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 4 9 9 ~ 5 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3 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 4 9 8 ~ 5 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3 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 4 9 8 ~ 5 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3 2】

検体を検出するためのナノ粒子共役体であって、 20

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子と、

(i i) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドであって、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有し、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合する、オリゴヌクレオチドと、を備えたナノ粒子共役体。

【請求項 5 3 3】

検体を検出するためのナノ粒子共役体であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子と、

(i i) 検体メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドと、 30

(i i i) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチドと、
を備えたナノ粒子共役体。

【請求項 5 3 4】

検体を検出するための凝集体プローブであって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子であって、それらに取り付けられ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として互いに結合するナノ粒子と、 40

(i i) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、ハイブリダイゼーションの結果、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドと、
を備えた凝集体プローブ。

【請求項 5 3 5】

検体を検出するための凝集体プローブであって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子であって、それらに取り付けられ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として互いに結合するナノ粒子と、 50

(i i) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドと、
 (i i i) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、ハイブリダイゼーションの結果、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチドと、
 を備えた凝集体プローブ。

【請求項536】

検体を検出するためのナノプローブ共役体を調製する方法であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子共役体、および(i i) 検体の特異的結合補体に結び付けたオリゴヌクレオチドであって、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、を提供するステップと、
 ナノ粒子共役体に取り付けられたオリゴヌクレオチドを、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下でナノ粒子共役体に取り付けたオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、から成る方法。

【請求項537】

検体を検出するためのキットであって、

(a) 以下の(i)～(i i i)を含むナノ粒子共役体を保持する少なくとも1つの容器と、
 (i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子
 (i i) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドであって、特異的結合対メンバーを有する該オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に結合するオリゴヌクレオチドと、
 (b) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項538】

検体を検出するためのキットであって、

(a) 以下の(i)～(i i i)を含むナノ粒子共役体を保持する少なくとも1つの容器と、
 (i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子
 (i i) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチド
 (i i i) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチド
 (b) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項539】

検体を検出するためのキットであって、

(b) 以下の(i)～(i i i)を含む凝集体プローブを保持する少なくとも1つの容器と、
 (i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子であって、それらに取り付けられ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として互いに結合するナノ粒子と、
 (i i) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、ハイブリダイゼーションの結果、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチド
 (b) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項 5 4 0】

検体を検出するためのキットであって、

(a) 以下の (i) ~ (i i i) を含む凝集体プローブを保持する少なくとも 1 つの容器であって、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子であって、それらに取り付けられ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として互いに結合するナノ粒子と、

(i i) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドと、

(i i i) 少なくとも 2 つの部分有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、凝集体プローブの少なくとも 2 種類のナノ粒子のうちの少なくとも 1 種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチドとを備えた容器と、

(b) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項 5 4 1】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を含むある種類のナノ粒子を保持する少なくとも 1 つの容器と、

(b) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、該特異的結合対メンバーを結び付けたオリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に結び付けたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有することと、

(c) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項 5 4 2】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子共役体を保持する少なくとも 1 つの容器と、

(b) 検体メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、

(c) 少なくとも 2 つの部分有する連結オリゴヌクレオチドを保持する容器と、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分は、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的であり、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドと相補的であることと、

(d) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項 5 4 3】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを保持する少なくとも 1 つの容器と、凝集体プローブは、それらに取り付けられ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として互いに結び付けられることと、

(b) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、該特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドは、凝集体プローブの少なくとも 2 種類のナノ粒子のうちの少なくとも 1 種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドに相補的であることと、

(c) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項 5 4 4】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを保持する少なくとも 1 つの容器と、凝集体プローブは、それらに取り付けられ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として互いに結び付けられることと、

(b) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドが保持する容器と、

(c) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドを保持する容器と、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有し、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有することと、

(d) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項545】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子を保持する少なくとも1つの容器と、

(b) 検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有することと、

(c) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項546】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を保持する少なくとも1つの容器と、

(b) 検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、

(c) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドを保持する容器と、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的であり、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、官能基を有するオリゴヌクレオチドに相補的であることと、

(d) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項547】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを保持する少なくとも1つの容器であって、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに取り付けられ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として互いに結合することと、

(b) 検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、凝集体の少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有することと、

(c) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項548】

検体を検出するためのキットであって、

(a) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブを保持する少なくとも1つの容器であって、凝集体プローブのナノ粒子は、それらに取り付けられ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として互いに結合することと、

(b) 検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドを保持する容器と、

(c) 少なくとも2つの部分を有する連結オリゴヌクレオチドを保持する容器と、連結オリゴヌクレオチドの第1部分は、凝集体プローブの少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドに相補的であり、連結オリゴヌクレオチドの第2部分は、官能基が結び付けられたオリゴヌクレオチドに相補的であることと、

(d) 検出可能な変化を観察するための任意選択の支持体と、を備えたキット。

【請求項549】

10

20

30

40

50

検体を検出するためのキットであって、
オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、

検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドと、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有することと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子、(ii) 検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドであって、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有し、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合する、オリゴヌクレオチドと、を含むナノ粒子共役体と、を備えたキット。

10

【請求項 550】

検体を検出するためのキットであって、
オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、

検体の特異的結合補体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドと、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有することと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子、(ii) s b p メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチド、および (iii) 少なくとも 2 つの部分に有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチドとを含むナノ粒子共役体と、を備えたキット。

20

【請求項 551】

検体を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、
核酸の第 1 部分に相補的な配列を有していることと、

s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、核酸の第 2 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子、(ii) s b p メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドであって、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有し、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合するオリゴヌクレオチドと、を含むナノ粒子共役体と、を備えたキット。

30

【請求項 552】

s b p メンバーがビオチンである、請求項 551 に記載のキット。

【請求項 553】

s b p メンバーの特異的結合補体がストレプトアビジンまたはアビジンである、請求項 551 に記載のキット。

【請求項 554】

40

核酸を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、
核酸の第 1 部分に相補的な配列を有していることと、

s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、核酸の第 2 部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子、(ii) s b p メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチド、および (iii) 少なくとも 2 つの部分に有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結

50

び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチドとを含むナノ粒子共役体と、を備えたキット。

【請求項 5 5 5】

s b p メンバーはビオチンである、請求項 5 5 4 に記載のキット。

【請求項 5 5 6】

s b p メンバーの特異的結合補体がストレプトアビジンまたはアビジンである、請求項 5 5 4 に記載のキット。

【請求項 5 5 7】

検体を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、

検体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドであって、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチド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と、

以下の (i)、(i i) を含む凝集体プローブと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子であって、それぞれに取り付け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として互いに結合するナノ粒子

(i i) 検体の特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、ハイブリダイゼーションの結果、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 種類のナノ粒子のオリゴヌクレオチドがさらに結合するオリゴヌクレオチド

【請求項 5 5 8】

検体を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、

検体に結合するための官能基が共有結合により結合されたオリゴヌクレオチドであって、該官能基に結合されたオリゴヌクレオチドは、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチド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と、

以下の (i) ~ (i i i) を含む凝集体プローブと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子であって、それぞれに取り付け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として互いに結合するナノ粒子

(i i) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチド

(i i i) 少なくとも 2 つの部分の有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、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 種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結オリゴヌクレオチド

を備えたキット。

【請求項 5 5 9】

核酸を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第 1 部分に相補的な配列を有していることと、

以下の (i)、(i i) を含む凝集体プローブと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子であって、それぞれに取り付け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として互いに結合するナノ粒子

(i i) s b p メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドであって、ハイブリダイゼーションの結果、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 種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドと結合するオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチド
を備えたキット。

【請求項 5 6 0】

s b p メンバーがビオチンである、請求項 5 5 9 に記載のキット。

【請求項 5 6 1】

s b p メンバーの特異的結合補体がストレプトアビジンまたはアビジンである、請求項 5 5 9 に記載のキット。

【請求項 5 6 2】

核酸を検出するためのキットであって、

オリゴヌクレオチドを取り付けた基板と、基板に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、
核酸の第 1 部分に相補的な配列を有していることと、 10

s b p メンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドであって、核酸の第 2 部分に相補的
な配列を有するオリゴヌクレオチドと、

以下の (i) ~ (i i i) を含む凝集体プローブと、

(i) オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも 2 種類のナノ粒子であって、それぞれ
に取り付け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として互いに結合する
ナノ粒子

(i i) 検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチド

(i i i) 少なくとも 2 つの部分有する連結オリゴヌクレオチドであって、連結オリゴ
ヌクレオチドの第 1 部分は、ハイブリダイゼーションの結果、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 種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌ
クレオチドと結合し、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分は、ハイブリダイゼーションの
結果、s b p メンバーの特異的結合補体を結び付けたオリゴヌクレオチドに結合する連結
オリゴヌクレオチド 20

を備えたキット。

【請求項 5 6 3】

s b p メンバーがビオチンである、請求項 5 6 2 に記載のキット。

【請求項 5 6 4】

s b p メンバーの特異的結合補体がストレプトアビジンまたはアビジンである、請求項 5
6 2 に記載のキット。 30

【請求項 5 6 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 つの部分有するステップと、

オリゴヌクレオチドを取り付けた 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第 2
部分に相補的な配列を有するステップと、

2 つ以上のビオチン分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成さ
れた複合体を提供するステップであって、各分子にはオリゴヌクレオチドが結び付けられ
、該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
有するステップと、 40

連結オリゴヌクレオチド、複合体およびナノ粒子を、所望のナノ材料またはナノ構造を形
成するよう、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよびビオチンに結び付けられた第 1 のオ
リゴヌクレオチドの連結オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを許容する
の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 5 6 6】

ナノファブリケーションの方法であって、

(i) 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 つの部分有する、少な
くとも 1 種類の連結オリゴヌクレオチド、(i i) オリゴヌクレオチドが取り付けられた少
なくとも 2 種類のナノ粒子であって、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第 50

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と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とを有し、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と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とを有するナノ粒子と、(i i i) 2つ以上のビオチン分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成された複合体であって、各分子にはオリゴヌクレオチドが結び付けられ、該ビオチンに結び付けられた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複合体と、を提供するステップと、
第1および第2種類のナノ粒子、連結オリゴヌクレオチド、および複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するよう、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの互いに対するおよび連結オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションならびに連結オリゴヌクレオチドに対する複合体のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させるステップと、から成る方法。

10

【請求項567】

ナノファブリケーションの方法であって、

(a) 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、少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチド、(b) オリゴヌクレオチドが取り付けられた1または複数のナノ粒子であって、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第1部分に相補的な配列を有するナノ粒子、(c) オリゴヌクレオチドが結び付けられたビオチンであって、ビオチン分子に結び付けられた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ビオチン、(d) ストレプトアビジンまたはアビジンを提供するステップと、
連結オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドが結び付けられたビオチン、およびナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチドとが連結オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションし、複合体を形成するのに十分な条件下で接触させるステップと、
複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するよう、ビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンとの間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させるステップと、から成る方法。

20

【請求項568】

ナノ材料であって、

(i) 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、少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチド、(i i) オリゴヌクレオチドが取り付けられた少なくとも2種類のナノ粒子であって、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と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とを有し、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と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とを有するナノ粒子と、(i i i) 2つ以上のビオチン分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成された複合体であって、各分子にはオリゴヌクレオチドが結び付けられ、該ビオチンに結び付けられた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複合体と、を提供するステップと、
第1および第2種類のナノ粒子、連結オリゴヌクレオチド、および複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するよう、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの互いに対するおよび連結オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションならびに連結オリゴヌクレオチドに対する複合体のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させるステップと、から成る方法によって製造されたナノ材料。

30

40

【請求項569】

ナノ材料であって、

(a) 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、少なく

50

とも1種類の連結オリゴヌクレオチド、(b)オリゴヌクレオチドが取り付けられた1または複数のナノ粒子であって、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第1部分に相補的な配列を有するナノ粒子、(c)オリゴヌクレオチドが結び付けられたビオチンであって、ビオチン分子に結び付けられた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ビオチン、(d)ストレプトアビジンまたはアビジンを提供するステップと、
連結オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドが結び付けられたビオチン、およびナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチドとが連結オリゴヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションし、複合体を形成するのに十分な条件下で接触させるステップと、
複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するように、ビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンとの間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させるステップと、から成る方法によって製造されたナノ材料。

10

【請求項570】

少なくとも2つの部分を有する選択標的核酸を、他の核酸から分離する方法であって、
(a)各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第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取り付けた1または複数の種類のナノ粒子、および
(b)各分子に第1のオリゴヌクレオチドが結び付けられ、第1のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する、2つ以上のビオチン分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成された複合体、を提供するステップと、
選択核酸および他の核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよび複合体の第1のオリゴヌクレオチドの、選択核酸とのハイブリダイゼーションを許容して、続いて凝集体を形成するのを許容するのに有効な条件下でナノ粒子と接触させるステップと、
選択核酸を含む凝集体を分別するステップと、から成る方法。

20

【請求項571】

少なくとも2つの部分を有する選択標的核酸を、他の核酸から分離する方法であって、
(a)各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第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取り付けた1または複数の種類のナノ粒子、(b)選択核酸の第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結び付けたビオチン、および(c)ストレプトアビジンまたはアビジンを提供するステップと、
選択核酸および他の核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとビオチン構築物のオリゴヌクレオチドの、選択核酸とのハイブリダイゼーションを許容して、複合体を形成するのを許容するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子およびビオチンと接触させるステップと、
ビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンとの間の特異的結合相互作用を許容し、続いて凝集体を形成するのを許容するのに有効な条件下で、複合体を、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させるステップと、
選択核酸を含む凝集体を分別するステップと、から成る方法。

30

40

【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DAG55-0967-1-0133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る、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る、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、係属中の出願番号第09/760,500号

50

(2001年1月12日出願)の一部係属出願である。上記の各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60/176,409号(2000年1月13日出願)、第60/200,161号(2000年4月26日出願)、第60/192,699号(2000年3月28日出願)、第60/254,392号(2000年12月8日出願)、第60/255,235号(2000年12月11日出願)の利益も主張する。上記の各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)

本発明は、天然または合成の、かつ修飾または非修飾の、核酸およびタンパク質を含む検体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。

【0005】

金コロイドタンパク質プローブは、免疫細胞化学における広い用途が見出されている[S. GarzonとM. Bendayan, 「免疫金電子顕微鏡(Immuno-Gold Electron Microscopy)の「金コロイドプローブ:およびウイルス細胞化学におけるその応用の概観(Colloidal Gold Probe: An Overview of its Applications in Viral Cytochemistry)」, A. D. HyattおよびB. T. Eaton編, CRC出版, Ann Arbor, MI(1993); J. E. Beesley, 金コロイド:細胞化学マーキングのための新しい展望(Colloidal Gold: A New Perspective for Cytochemical marking)」, オックスフォード大学出版, オックスフォード(1989)]。これらのプローブは、注意深く定義した条件下で水溶液から金表面上に抗体を吸着することにより調製される。この方法で生産された複合体は、機能的であるが、いくつかの欠点を有している:例えば、そのようなタンパク質の一部は、放置すると脱着し、抗原標的に対する吸着抗体と競合する抗体を溶液中へ遊離する;吸着量が低く抗体の一部が吸着時に変性するため、活性が低い;およびそのようなタンパク質でコートされた粒子は、特にイオン強度の高い溶液中で自己集合する蛍光がある。ナノ粒子タンパク質プローブを調整するための別の手段が、J. E. Hainfeld, R. D. Leone, F. R. Furuya, およびR. D. Powellにより説明されている(米国特許第5,521,289号(1996年5月28日))、「小さな有機金属プローブ(Small Organometallic Probes)」)。典型的には、この方法は、反応置換基(X)を生じるトリアルホスフィンまたはメルカプトアルキル誘導体を含む有機溶媒中で金の塩を還元し、Au-PまたはAu-S結合を介して表面に結び付けられたリンカー上にX置換基を運ぶ小さなナノ粒子(50~70の金の原子)を与えることを含む。続いて、コロイド溶液を、タンパク質Xと反応する置換基Yを有するタンパク質と反応させ、このタンパク質をナノ粒子に共有結合でリンクする。そのようなナノ粒子に関する作用は、多くのタンパク質の水への溶解度の低さによって制限され、これにより有効に利用できるタンパク質-ナノ粒子共役体の範囲が制限される。さらに、これらの粒子の表面にはほんの少数の金の原子しか存在

しないため、ある所定粒子の表面に結び付けることが可能な「捕獲」鎖の数は非常に低い。

【0006】

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。

【0007】

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, 696-700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)。

【0008】

(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。

【0009】

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。

【0010】

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種類のナノ粒子ー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。

【0011】

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。

【0012】

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。

【0013】

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。

10

【0014】

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。

20

【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。

30

【0016】

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。

40

【0017】

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

50

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。 10

【0018】

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。 20

【0019】

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。 30 40

【0020】

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 50

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。

【0021】

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。

10

【0022】

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。

【0023】

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、蛍光分子で同様に標識される。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。

20

【0024】

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、核酸の配列の一部分に相補的である。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分に相補的である。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。

30

【0025】

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、

40

50

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。

【0026】

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。

【0027】

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。 10

【0028】

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。

【0029】

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。 20

【0030】

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。 30

【0031】

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。

【0032】

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。 40

【0033】

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 50

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。

【0034】

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。

10

【0035】

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。

20

【0036】

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。

30

【0037】

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ポソームを入れた第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。

40

【0038】

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

50

、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。

【0039】

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
10
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。

【0040】

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
20
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。

【0041】

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
30
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。

【0042】

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
40
と受容体は蛍光分子であってよい。

【0043】

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。

【0044】

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
50

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。

【0045】

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。

10

【0046】

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。

【0047】

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。

20

【0048】

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。

30

【0049】

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。

【0050】

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。

【0051】

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。

40

【0052】

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

50

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。

【0053】

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。

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

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。

【0057】

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。

【0058】

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

10

20

30

40

50

造を包含する。

【0059】

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。

10

【0060】

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さらに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。

20

【0061】

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。

30

【0062】

本発明は、さらに、抗体抗原結合のような特異的結合相互作用を利用する新規なナノ粒子プローブ、そのようなプローブの調製方法および使用方法、ならびにそのようなプローブを含むキットに関する。

40

【0063】

1実施形態では、本発明は、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を検体と接触させることを含む、検体を検出する方法を提供する。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体に結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、検体と、ナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体とを有効に特異的結合相互作用させる条件下で起こる。検体とプローブ間の特異的結合相互作用の結果、検出可能な変化が観察され得る。

【0064】

50

本発明の別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子の検体との接触を提供することを含む。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、リンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に結合する。リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体に結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、検体とナノ粒子共役体とを有効に特異的結合相互作用させる条件下で起こり、検出可能な変化が観察され得る。

【0065】

別の実施形態では、検体を検出する方法は、第1のオリゴヌクレオチドを結び付けた検体を提供し、検体に結び付けられた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ことを含む。接触は、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドが第1種類のナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズして、ナノ粒子検体共役体を形成するのに有効な条件下で起こる。上記方法はさらに、ナノ粒子検体を、オリゴヌクレオチドが結び付けられた第2種類のナノ粒子と接触させることを含む。第2種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、前記検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。検体に結合したオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有する。接触は、検体と、第2種類のナノ粒子共役体に結合された特異的結合補体とを有効に特異的結合相互作用させる条件下で起こり、検出可能な変化が、特異的結合相互作用の結果として観察され得る。

10

20

【0066】

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた検体、2つの部分を有するオリゴヌクレオチドリンカー、およびオリゴヌクレオチドが取り付けられた第1種類のナノ粒子を提供することを含む。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドはリンカー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する。第1種類のナノ粒子に結合するオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分に相補的な配列を有する。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチド、ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチド、およびリンカーオリゴヌクレオチドは、リンカーヌクレオチドと、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドおよび第1種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドとが有効にハイブリダイズしてナノ粒子検体共役体を生成する条件下で接触させる。上記方法はさらに、検体共役体を、オリゴヌクレオチドを結び付けた第2種類のナノ粒子共役体と接触させることを含む。第2種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、ナノ粒子検体共役体と、第2種類のナノ粒子の特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。特異的結合相互作用の結果として、検出可能な変化が観察され得る。

30

【0067】

別の実施形態では、検体を検出する方法は、検体を結び付けた支持体を提供することを含む。上記方法はさらに、支持体に結び付けられた検体をナノ粒子と接触させることを含む。オリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、検体と、ナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。この時点で検出可能な変化が観察され得る。

40

【0068】

別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体と、オリゴヌクレオチドを結び付けた検体とを提供することを含む。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、支持体に結び付けられたリンカーオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有する。方法はさらに、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとを、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと検体

50

に結び付けられたオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させることを含む。その後、オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子が与えられる。ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合する。最後に、支持体に結び付けられた検体と、ナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体とを、支持体に結び付けられた検体とナノ粒子に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0069】

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体と、配列が少なくとも2つの部分を有するリンカーオリゴヌクレオチドとを提供することを含む。支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、リンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に相補的な配列を有する。その後、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとリンカーオリゴヌクレオチドの第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下でリンカーオリゴヌクレオチドと接触させる。次に、オリゴヌクレオチドを結び付けた検体を提供する。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分に相補的な配列を有する。その後、支持体に結び付けられたリンカーオリゴヌクレオチドを、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとリンカーオリゴヌクレオチドの第2部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させる。その後、オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子共役体を提供する。ナノ粒子共役体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。その後、支持体に結び付けた検体を、支持体に結び付けた検体と、ナノ粒子に結び付けた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0070】

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させることを含む。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列と相補的である。接触は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。その後、オリゴヌクレオチドを取り付けたある種類のナノ粒子を提供する。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、ハイブリダイゼーションの結果、リンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に結合する。さらにはリンカーオリゴヌクレオチドの第2部分が、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドに結合する。次に、支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体とナノ粒子に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下でナノ粒子で接触させる。その後、検出可能な変化を観察する。

【0071】

別の実施形態では、検体を検出する方法は、検体を結び付けた支持体を提供することを含む。支持体を、オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブと接触させる。凝集体プローブのナノ粒子は、それらに付けられ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、ハイブリダイゼーションの結果として検体の特異的結合補体が結び付けられる第2のオリゴヌクレオチドに結合するいくつかのオリゴヌクレオチドが取り付けられる。接触は、支持体に結び付けられた検体と、凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。この時点で検出可能な変化が観察され得る。

【0072】

別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を、オリゴヌクレオチドを結び付けた検体と接触させることを含む。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。接触は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。次に、オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、それらに付けられ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、ハイブリダイゼーションの結果として検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドが取り付けられる。接触は、支持体に結び付けられた検体と凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。その後、検出可能な変化を観察する。

10

【0073】

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを結び付けた支持体を、第2のリンカーオリゴヌクレオチドの配列が少なくとも2つの部分を有するリンカーオリゴヌクレオチドと接触させることを提供することを含む。接触は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとリンカーオリゴヌクレオチドの第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。その後、オリゴヌクレオチドを結び付けた検体を提供する。検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分と相補的な配列を有する。次に、支持体に結び付けられたリンカーオリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられたリンカーオリゴヌクレオチドの第2部分と検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させる。次に、オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、それらに取り付けられ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、ハイブリダイゼーションの結果として検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドが取り付けられる。次に支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体と、凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で凝集体プローブと接触させる。この時点で検出可能な変化を観察し得る。

20

30

【0074】

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドを、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させることを含む。接触は、検体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。次に、オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも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、それらに取り付け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種類では、オリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイゼーションの結果としてリンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に結び付けられる。第2リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分が、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。その後、支持体に結び付けられた検体を、支持体に結び付けられた検体と、凝集体プローブに結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で凝集体プローブと接触させる。その後、検出可能な変化を観察する。

40

【0075】

50

さらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、検体を結び付けた支持体を、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子共役体と接触させることを含む。ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体が結び付けられた第2のオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、支持体に結び付けられた検体とナノ粒子共役体に結び付けられた特異的結合補体の間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。その後、基板を銀染料と接触させて検出可能を生成し、その検出可能な変化を観察する。

【0076】

本発明のさらに別の実施形態では、検体を検出する方法は、多価検体を、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子プローブと接触させることを含む。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、ハイブリダイゼーションの結果、レポーターオリゴヌクレオチドの第1部分に結び付けられる。レポーターオリゴヌクレオチドの第2部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体に対する特異的結合補体が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、検体とナノ粒子プローブの間の特異的結合相互作用を許容し、ナノ粒子を凝集させるのに有効な条件下で起こる。その後、凝集物を分離し、凝集物をデハイブリダイズし、かつレポーターオリゴヌクレオチドを放出するのに有効な条件に供する。その後、レポーターオリゴヌクレオチドを分離する。検体の検出は、DNAチップのような従来の手段によりレポーターオリゴヌクレオチドの存在を確認することによって起こる。

【0077】

本発明は、(i) 核酸、(ii) オリゴヌクレオチドを結び付けた1または複数の種類のナノ粒子、および(iii) 各々にオリゴヌクレオチドが結び付けられた2つ以上のビオチン分子に対して、特異的結合相互作用により結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンを含む複合体、を提供することを含む、核酸を検出する方法を提供する。核酸の配列は、少なくとも2つの部分を有する。ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分に相補的な配列を有する一方、ビオチンに結び付けられた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する。その後、核酸を、ナノ粒子、複合体および核酸のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下でナノ粒子共役体および複合体と接触させる。続く凝集より生じる検出可能な変化を観察する。

【0078】

別の実施形態では、(i) 核酸、(ii) オリゴヌクレオチドを結び付けた1または複数の種類のナノ粒子、(iii) ビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチド、および(iv) ストレプトアビジンまたはアビジン、を提供することを含む、核酸を検出する方法を提供する。核酸の配列は少なくとも2つの部分を有する。ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分に相補的な配列を有する一方、ビオチンに結び付けられた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する。その後、核酸を、核酸とナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドおよびビオチンに取り付けられたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下でナノ粒子共役体およびビオチンに結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させる。続く凝集より生じる検出可能な変化を観察する。

【0079】

別の実施形態では、核酸を検出する方法は、オリゴヌクレオチドを取り付けた第1種類のナノ粒子を核酸と接触させることを含む。核酸の配列は少なくとも2つの部分を有する。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、核酸の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。その後、sbpメンバー（例えばビオチン）を結び付けたオリゴヌクレオチドを提供する。sbpメンバーに結び付けられるオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。その後、sbpメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドを、sbpメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第2部分との間のハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーションを許容するのに有効な条件下で、第1種類のナノ粒子に結び付けられた核酸に接触させる。その後、オリゴヌクレオチドを結び付けた第2種類のナノ粒子共役体を提供する。第2種類のナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、検体の特異的結合補体（例えばストレプトアビジンまたはアビジン）が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。接触は、第1種類のナノ粒子に結び付けられたs b pメンバー（例えばビオチン）と、第2種類のナノ粒子に結び付けられたs b p補体（例えばストレプトアビジンまたはアビジン）との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で起こる。検出可能な変化が生じ得る。

【0080】

別の実施形態では、核酸を検出する方法は、オリゴヌクレオチドが結び付けられた支持体を、配列が少なくとも2つの部分を有する核酸と接触させることを含む。支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。次に、s b pメンバー（例えばビオチン）が結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供する。s b pメンバーに結び付けられた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する。次に、支持体に結び付けられた核酸を、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第2部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドと接触させる。その後、オリゴヌクレオチドを結び付けたある種類のナノ粒子共役体を提供する。ナノ粒子共役体に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、ハイブリダイゼーションの結果、s b pメンバーの特異的結合補体（例えばストレプトアビジンまたはアビジン）が結び付けられたオリゴヌクレオチドに結合する。その後、支持体に結び付けられたs b pメンバーを、支持体に結び付けられたs b pメンバーとナノ粒子に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子と接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0081】

別の実施形態では、核酸を検出する方法は、核酸を、オリゴヌクレオチドを取り付けたナノ粒子共役体と接触させることを含む。核酸の配列は少なくとも2つの部分を有する。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、核酸の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドの核酸の第1部分とのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。その後、s b pメンバー（例えばストレプトアビジン）を有するオリゴヌクレオチドを提供する。s b pメンバーが結び付けられた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する。その後、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドを、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドと核酸との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子に結び付けられた核酸と接触させる。次に、s b pメンバーに対する特異的結合補体（例えばビオチン）を結び付けた支持体を提供する。その後、支持体を、s b pメンバーとs b p補体の間に特異的結合相互作用が生じることを許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子を結び付けたs b pメンバーと接触させる。検出可能な出来事を観察し得る。

【0082】

別の実施形態では、核酸を検出する方法は、オリゴヌクレオチドが結び付けられた支持体と核酸を接触させることを提供することを含む。核酸の配列は少なくとも2つの部分を有し、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分と相補的な配列を有する。接触は、支持体に結び付けられたオリゴヌクレオチドと核酸の第1部分との間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で起こる。その後、s b pメンバー（例えばビオチン）に結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供する。s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分と相補的な配列を有する。その後、支持体に結び付けられた核酸を、支持体に結び付けられた核酸の第2部分と、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドと接触させる。次にオリゴヌクレオチドを結び付

けた少なくとも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、それらに取り付けられ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、ハイブリダイゼーションの結果としてs b pメンバーの補体（例えばストレプトアビジン）が結び付けられる第2のオリゴヌクレオチドに結合するオリゴヌクレオチドが取り付けられる。その後、支持体に結び付けられたs b pメンバーを、支持体に結び付けられたs b pメンバーと凝集体に結び付けられた特異的結合補体との間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で凝集体プローブと接触させる。この時点で検出可能な変化を観察し得る。

【0083】

10

別の実施形態では、核酸を検出する方法は、核酸を、オリゴヌクレオチドを結び付けた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体プローブと接触させることを含む。核酸は2つの部分を有する。凝集体プローブのナノ粒子は、それらに付けられ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、ハイブリダイゼーションの結果核酸の第1部分に結合されるいくつかのオリゴヌクレオチドが取り付けられる。その後、s b pメンバー（例えばストレプトアビジン）を有するオリゴヌクレオチドを提供する。s b pメンバーが結び付けられた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する。その後、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドを、s b pメンバーを有するオリゴヌクレオチドとプローブに取り付けられた核酸との間のハイブリダイゼーションを許容するの

20

【0084】

本発明はさらに、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドーs b pメンバー共役体（ナノ粒子s b p共役体）および同共役体を含む組成物をさらに提供する。ナノ粒子s b p共役体には、オリゴヌクレオチドが結び付けられ、同オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、共有結合によって特異的結合対（s b p）メンバーが結合された第1のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。ナノ粒子に付けられたオリゴヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有する。

30

【0085】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドが結び付けられたナノ粒子共役体と、s b pメンバーが結び付けられたオリゴヌクレオチドとを提供することと、ナノ粒子に取り付けたオリゴヌクレオチドを、s b pメンバーに結び付けたオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、ナノプローブs b p共役体の製造方法も提供する。ナノ粒子に結び付けられたオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、s b pメンバーに結び付けられたオリゴヌクレオチドの配列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の第1のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを許容するの

40

【0086】

本発明はさらに、検体を検出するためのキットを提供する。1実施形態では、キットは少なくとも1つの容器を備える。容器はオリゴヌクレオチドが結び付けられたナノ粒子を含むナノ粒子s b p共役体を入れる。オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、共有結合により特異的結合対（s b p）メンバーが結合された第1のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。ナノ粒子に取り付けられたオリゴヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な配列を有する。キットは、検出可能な変化を観察するための基質をさらに備えてもよい。

【0087】

50

本発明の別の実施形態では、キットは少なくとも2つの容器を備える。第1の容器は、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を含む。オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、第1のオリゴヌクレオチドの一部分に相補的な配列を有する。第2の容器は、s b pメンバーが共有結合された第1のオリゴヌクレオチドを含む。キットは、検出可能な変化を観察するための基質をさらに備えてもよい。

【0088】

本発明のさらに別の実施形態では、キットは少なくとも2つの容器を備える。第1の容器は、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を含む。オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、第1のオリゴヌクレオチドの一部分に相補的な配列を有する。第2の容器は、s b pメンバーを共有結合するのに使用できる部分を有する第1のオリゴヌクレオチドを含む。キットは、検出可能な変化を観察するための基質をさらに備えてもよい。

10

【0089】

本発明のさらに別の実施形態では、キットは少なくとも3つの容器を備える。第1の容器は、オリゴヌクレオチドを結び付けたナノ粒子を含む。第2の容器は、少なくとも2つの部分を有するリンカーオリゴヌクレオチドを含む。第3の容器は、s b pメンバーを共有結合するのに使用できる部分を有する第1のオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、リンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に相補的な配列を有する。第1のオリゴヌクレオチドは、リンカーオリゴヌクレオチドの少なくとも第2の部分に相補的な配列を有する。キットは、検出可能な変化を観察するための基質をさらに備えてもよい。

20

【0090】

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。この方法は、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、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ことを含む。上記方法はさらに、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取り付けられた1または複数の種類のナノ粒子を提供することを含む。上記方法はさらに、各分子に第1のオリゴヌクレオチドが結び付けられ、該第1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2つ以上のデオキシ核糖核酸分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジン境界より構成された複合体を提供することを含む。連結オリゴヌクレオチド、複合体およびナノ粒子を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するよう、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよびデオキシ核糖核酸に結び付けられた第1のオリゴヌクレオチドの連結オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させる。

30

【0091】

本発明は、別のナノファブリケーション方法を提供する。この方法は、(a) オリゴヌクレオチドを取り付けた少なくとも2種類のナノ粒子と、(b) 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、選択配列を有する少なくとも2種類の連結オリゴヌクレオチドと、(c) 各分子に第1のオリゴヌクレオチドが結び付けられた2以上のデオキシ核糖核酸分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成された複合体とを提供することを含む。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と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とを有する。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と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とを有する。第1および第2種類のナノ粒子、連結オリゴヌクレオチド、および複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するよう、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの互いに対するおよび連結オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションならびに連結オリゴヌクレオチドに対する複合体のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させる。

40

【0092】

50

本発明はまた、さらに別のナノファブリケーション方法を提供する。この方法は、(a) 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、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、(b) 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取り付けられた1または複数の種類のナノ粒子、(c) 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第1のオリゴヌクレオチドが結び付けられたビオチン、および(d) ストレプトアビジンまたはアビジンを提供することを含む。連結オリゴヌクレオチド、ビオチン、共役体、ナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとビオチンに結び付けられた第1オリゴヌクレオチドの連結オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で接触させる。その後、生じた複合体を、所望のナノ材料またはナノ構造を形成するように、ビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンの間の特異的結合相互作用を許容するのに有効な条件下で、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させる。

10

【0093】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドコネクタとsbp相互作用によってナノ粒子がひとまとめにされた、オリゴヌクレオチドを取り付けたナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造を提供する。

【0094】

本発明はさらに、少なくとも2つの部分を有する選択標的核酸を、他の核酸から分離する方法を提供する。この方法は、(a) 各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第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取り付けた1または複数の種類のナノ粒子、および(b) 各分子に第1のオリゴヌクレオチドが結び付けられ、第1のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する、2つ以上のビオチン分子に結び付けられたストレプトアビジンまたはアビジンより構成された複合体、を提供することを含む。選択核酸および他の核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよび複合体の第1のオリゴヌクレオチドの選択核酸とのハイブリダイゼーションして、選択核酸にハイブリダイズした選択核酸と複合体が凝集して沈降するのに有効な条件下でナノ粒子と接触させる。

20

【0095】

本発明はさらに、少なくとも2つの部分を有する選択標的酸を、他の核酸から分離する方法を提供する。この方法は、(a) 各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第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取り付けた1または複数の種類のナノ粒子、(b) 第1のオリゴヌクレオチドが選択核酸の第2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を結び付けたビオチン、および(c) ストレプトアビジンまたはアビジンを提供することを含む。選択された核酸および他の核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよびビオチン構築物の第1のオリゴヌクレオチドの選択核酸とのハイブリダイゼーションを許容するのに有効な条件下で、ナノ粒子およびビオチン構築物と接触させる。得られた複合体を、ビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンとの間の特異的結合相互作用および得られた選択核酸複合体の後の凝集および沈降を許容するのに有効な条件下で、ストレプトアビジンまたはアビジンと接触させる。

30

40

【0096】

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。

【0097】

用語「検体」とは、薬物、代謝産物、農薬、汚染物質およびその他同種のものを含む、検

50

出すべき化合物または組成物のことを指す。被検体は、特異的結合対 (s b p) のメンバーから構成することができ、通常は抗原またはハプテンである、一価 (モノエピトープ) または多価 (ポリエピトープ) リガンドであり、単一の化合物または少なくとも1つの共通エピトープまたは決定基を共有する複数の化合物である。検体は、最近のような細胞またはA、B、Dなどの血液群抗原またはHLA抗原を担持する細胞のような細胞の一部であってもよいし、微生物 (例えば細菌、真菌類、原生動物、ウイルス) であってもよい。

【0098】

多価リガンド検体は、通常、ポリ (アミノ酸) つまりポリペプチド、タンパク質、多糖、核酸、およびそれらの組み合わせである。そのような組み合わせには、細菌、ウイルス、染色体、遺伝子、ミトコンドリア、核、細胞膜およびその他同種のものの構成要素が含まれる。 10

【0099】

大部分は、本発明を適用することができるポリエピトープリガンド検体は、少なくとも約5,000、より一般的には少なくとも約10,000の分子量を有する。ポリ (アミノ酸) の分類では、問題のポリ (アミノ酸) は一般に約5,000~5,000,000の分子量であり、より一般的には約20,000~1,000,000の分子量であり、とりわけ問題のホルモンでは、分子量は一般に約5,000~60,000に及ぶ。

【0100】

同様の構造的特徴を有するタンパク質、特定の生物学的機能を有するタンパク質、特定の微生物に関する (特に疾病を引き起こす微生物) タンパク質等のファミリーに関して、様々のタンパク質を考慮することができる。そのようなタンパク質としては、例えば、免疫グロブリン、サイトカイン、酵素、ホルモン、癌抗原、栄養学的マーカー、組織特異抗原などが含まれる。 20

【0101】

タンパク質、血液凝固因子、タンパク質ホルモン、抗原性多糖、微生物、および本発明で問題となる他の病原体が、特に米国特許第4,650,770号に開示されている。その開示全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0102】

モノエピトープリガンド検体は、一般に約100~2,000、より一般的には約125~1,000の分子量であろう。 30

そのような検体は、ホストからの体液等のサンプルに直接見出される分子であり得る。サンプルは、直接検査してもよいし、または検体をより容易に検出できるようにするために予め処理してもよい。更に、問題の検体は、問題の検体に相補的な特異的結合対メンバー等の、問題の検体の存在を証明する作用物質の検出により、決定することができる。作用物質の存在は、問題の検体がサンプル中に存在するときのみ検出される。したがって、検体の存在を証明する作用物質は、アッセイで検出される検体となる。体液は、例えば、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、便、痰、脳脊髄液、涙、粘液、およびその他同種のものであってよい。

【0103】

用語「特異的結合対 (s b p) メンバー」とは、2つの異なる分子の一方であって、他方の分子の特定の空間的および極性の組織に特異的に結合しそれゆえ該組織に相補的と定義されるある領域を表面上または空洞内に有する分子のことを指す。この特異的結合対メンバーは、リガンドおよび受容体 (アンチリガンド) とともに称される。これらは通常、抗原-抗体のような免疫学的な対であり、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、核酸二本鎖、IgG-プロテインA、DNA-DNA、DNA-RNA等のポリヌクレオチド対のような他の特異的結合は免疫学的な対ではないが、通常本発明およびs b pメンバーの定義に含まれる。 40

【0104】

用語「リガンド」は、それに対する受容体が当然存在するか、それに対する受容体を調製することができる、任意の有機化合物のことを指す。用語「リガンド」はさらに、通常1 50

00を超える分子量を有し、受容体に対する類似リガンドと競合できる修飾リガンドであり、通常は有機ラジカルまたは検体類似体である、リガンド類似体も含む。修飾により、リガンド類似体を別の分子とつなぐ手段が提供される。リガンド類似体は、通常、リガンドをハブまたは表漆器に連結する結合と水素の置換以上にリガンドとは異なるが、必ずしもその必要はない。リガンド類似体はリガンドと類似の様式で受容体に結合することができる。リガンド類似体は、例えば、抗体のイディオタイプに対してリガンドに向けられた抗体であり得る。

【0105】

用語「受容体」または「アンチリガンド」とは、例えば、分子の特定の空間的および極性の組織（例えばエピトープまたは抗原決定基）を認識することができる任意の化合物または組成物のことを指す。例となる受容体には、天然受容体、例えばチロキシン結合性グロブリン、抗体、酵素、Fabフラグメント、レクチン、核酸、アビジン、プロテインA、バースター（barstar）、補体成分Clq、およびその他同種のものが含まれる。アビジンには、卵白アビジンや、ストレプトアビジンのような他の供給源から得られたビオチン結合タンパク質が含まれる。

10

【0106】

用語「特異的結合」とは、2つの異なる分子の1つが、他の分子の認識が本質的により少ないのに比べて、もう1つの分子を特異的に認識することを指す。一般に、分子は、分子間の特定の認識を生じさせる領域を、それらの表面上にまたは空洞内で有する。特異的結合の典型例は、抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド相互作用等

20

【0107】

用語「非特異的結合」とは、特定の表面構造から比較的独立した、分子間の非共有結合のことを指す。非特異的結合は、分子間の疎水的相互作用を含むいくつかの要因によって起こり得る。

【0108】

用語「抗体」とは、もう1つの分子の特定の空間的および極性の組織に特異的に結合し、それゆえ該組織に相補的と定義される、免疫グロブリンのことを指す。抗体は、モノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、ホストの免疫や血清の収集のような当該技術分野で周知の技術により（ポリクローナル）、または連続的なハイブリッド細胞系の調製と分泌タンパク質の収集により（モノクローナル）、または天然抗体の特異的結合に必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列またはその変異配列をクローニングおよび発現することにより、調製することができる。抗体には完全な免疫グロブリンまたはその断片が含まれ、免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3、IgMのような様々なクラスとアイソタイプが含まれる。その断片には、Fab、Fv、およびF(ab')sub.2、Fab'等が含まれる。さらに、免疫グロブリンまたはそのフラグメントの凝集体、ポリマー、および共役体も、特定の分子に対する結合親和性を維持する限り、適宜使用することができる。

30

【0109】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

40

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。

【0110】

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、

50

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。

10

【0111】

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. Phys. 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。

20

【0112】

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) から市販されている。

【0113】

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)。

30

【0114】

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。

40

【0115】

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

50

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）10、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、Grabarra, 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 Chem 20istry Of Siica, 第6章, (Wiley, 1979年)（シリカ上のカルボン酸）；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 30シラン）；Wassermanら, Langmuir, 第5巻, 1074ページ（1989年）（シリカ上のシラン）；EltekhovaおよびEltekhov, 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）。

【0116】

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。 40

【0117】

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-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-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 50

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-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。

【0118】

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。

10

【0119】

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-環式ナノ粒子共役体は、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-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。

【0120】

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

20

【0121】

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。

30

【0122】

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。

【0123】

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。

40

【0124】

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

50

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。 10

【0125】

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。

【0126】

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。 20 30

【0127】

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。

【0128】

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。 40

【0129】

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 50

知である。

【0130】

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ろう。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。

10

【0131】

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。

【0132】

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 μ 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。

20

【0133】

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。

30

【0134】

ハイブリダイゼーションの速度は、塩濃度を（例えば、0.1 M から 0.3 M 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。

40

【0135】

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 $^{\circ}$ C（温度は重要ではない）

50

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。

【0136】

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13 nmの金ナノ粒子と共に用いる場合には、細孔サイズ0.7 μm 、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。

【0137】

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。

【0138】

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。

【0139】

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、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。

【0140】

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-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。

10

20

30

40

50

【0141】

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。

10

【0142】

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。

【0143】

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た状態になる。ナノ粒子-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-オリゴヌクレオチド共役体および核酸を除去する。

20

【0144】

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-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)。

30

【0145】

最後に、基板に結合した第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。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に行う。ナノ粒子を結合させ後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を除去するために基板を洗浄するのが好ましい。

40

【0146】

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-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-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-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。

50

【0147】

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。

【0148】

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。

10

【0149】

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）。

【0150】

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。

20

【0151】

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。

【0152】

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、Grabarra, 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）；Barra, 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。

30

【0153】

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。

【0154】

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、さらにナノ粒子ー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。

40

【0155】

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種類のナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体とを、第2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種類のナノ粒子ー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ー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。

50

【0156】

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。

【0157】

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種類のナノ粒子ー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。

10

【0158】

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。ナノ粒子ー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ーオリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

20

【0159】

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。

30

【0160】

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。

【0161】

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。

40

【0162】

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)。

【0163】

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

50

可能な変化を増幅させる別の手段を提供する。

【0164】

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ら, Anal. Chem., 第67巻, 735-743ページ（1995年）参照）。

【0165】

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。

10

【0166】

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。

20

【0167】

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。

【0168】

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（Lettingerら, J. Am. Chem. Soc., 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（Zhangら, Tetrahedron Lett., 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。

30

40

【0169】

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。Zhangら, Tetrahedron Lett., 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。

【0170】

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

50

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。

【0171】

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ーオリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

10

【0172】

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種類のナノ粒子ー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種類のナノ粒子ーオリゴヌ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。

20

【0173】

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。

30

【0174】

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。

【0175】

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）。

40

【0176】

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

50

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。

【0177】

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。

10

20

【0178】

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に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。

30

40

【0179】

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

50

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。 10

【0180】

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つでアッセイの残りの部分を実施する。 20

【0181】

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することができる。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。 30

【0182】

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、凝集体プローブおよびコアプローブを使わなくて済むことが多い。

【0183】

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 40 50

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 (600×600 dpi)、UMAX Astra 1200 (300×300 dpi)、またはMicrotec 1600 (1600×1600 dpi)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、カラース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。

10

20

【0184】

任意の核酸用アッセイに用い得るナノ粒子-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。

30

【0185】

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。

40

【0186】

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

50

ノ粒子に付着するであろう。

【0187】

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。

10

【0188】

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・プローブス社(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-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。

20

30

【0189】

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。

40

【0190】

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-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

50

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。

【0191】

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

m. 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); Kolárovaら, Biotechniques, 第20巻, 196-198ページ(1996年)参照。

【0192】

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。

【0193】

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。

【0194】

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、ディナール社 (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 (Chrisery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。

【0195】

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。

【0196】

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メトリー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。

【0197】

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(Abbtech 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、フォトリソクス社、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）。 10

【0198】

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。

【0199】

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。 20

【0200】

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。 30

【0201】

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。

【0202】

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いてもよいが、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。 40 50

【0203】

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いてもよいが、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。

【0204】

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いてもよい。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。

【0205】

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。

【0206】

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。凝集したプローブは、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。

【0207】

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。

【0208】

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

10

20

30

40

50

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。

【0209】

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。

【0210】

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。

【0211】

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。

【0212】

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。

【0213】

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。

【0214】

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。

10

【0215】

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。

20

【0216】

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。

【0217】

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。

30

【0218】

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。

40

【0219】

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 ）およびその濃度に応じて異なる。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。

50

【0220】

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。 10

【0221】

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。

【0222】

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つ以上のナノ粒子ー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。 20

【0223】

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。 30

【0224】

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。 40

【0225】

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。 50

【0226】

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。

【0227】

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。

【0228】

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ペ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。

【0229】

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。

【0230】

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。

【0231】

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

10

20

30

40

50

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、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))。

【0232】

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(340nm)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. Soc., 第117巻, 8785-8792ページ (1995年))。

【0233】

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、Herlein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。

【0234】

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、末端ブロモアセチルアミノヌクレオシドのブ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。ブ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、まず、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ブロモアセチルアシル化剤と反応させてN-ブロモアセチルアミノ誘導体に転化させる。

【0235】

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。

【0236】

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)。

10

【0237】

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。

20

【0238】

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、タンパク質工学用に、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、Seeman 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)。

30

【0239】

最後に、本発明は、いくつかの独特なナノ粒子-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-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。

【0240】

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。

40

【0241】

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

50

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。

【0242】

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。 10

【0243】

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。

【0244】

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。 20 30

【0245】

「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 $10 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ の表面密度が適当であろう。表面密度は少なくとも $15 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ が好ましい。共役体のオリゴヌクレオチドが核酸 40 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 $35 \sim 40 \text{ pmol} / \text{cm}^2$ 以下が好ましい。

【0246】

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。

【0247】

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、 50

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。

【0248】

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や配列は、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。

【0249】

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。

10

20

30

40

50

【0250】

タンパク質受容体及びその他の特異的結合対メンバーは、オリゴヌクレオチドにより機能化し、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子に固定化されて、DNAよりむしろタンパク質受容体が指図する分子認識特性を備える以外に、オリゴヌクレオチド修飾粒子の高度安定性を呈する新しい分類のハイブリッド粒子（ナノ粒子－受容体共役体）を生成することができる。或いは、受容体修飾オリゴヌクレオチドを備えた多重受容体結合部位を有するタンパク質を機能化し、それにより先に論じた本来のナノ材料組立スキームにおいて、タンパク質受容体複合体を無機ナノ粒子の1つの代わりに部分構造の1つとして用いることができる。検体の検出戦略におけるこれらの新規なナノ粒子－受容体共役体の使用は、ターゲットの同定及びタンパク質－タンパク質相互作用のスクリーニングをはじめとする多数の方法で評価されてきた。

10

【0251】

本発明の1つの実施形態において、広範囲の水性塩濃度で安定しており、長期の貯蔵寿命を有し、水溶性が低いタンパク質だけでなく水溶性が高いタンパク質の使用も可能な、新規なハイブリッド粒子又はナノ粒子受容体共役体が提供される。プローブシステム（図47の代表的構造IIを参照）を用いて、表面の別個の部位に固定化したタンパク質のアレイをスクリーニングすることができる（図48）。タンパク質、ペプチド、炭水化物、糖、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、及び小分子（図49では、A及びBがタンパク質、ペプチド、炭水化物、糖、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、合成ポリマー、合成オリゴマー、又は小分子、或いはそれらのいずれかの組み合わせ）など特異的結合対メンバーの組み合わせを含む非常に様々な特異的結合反応を研究するために、プローブの構築及び適用のための同様の原理を適用することができる。基本的概念は、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドに「受容体ユニット」（図49ではA）を結合させることである。その後、ハイブリダイゼーションにより、そのシステムの水溶性を高め凝集に関わるコロイドを安定化させる作用があるナノ粒子マトリックス周辺のオリゴヌクレオチドのシースを含有するナノ粒子プローブが生成する。その後、プローブII'を用いて、固体表面に固定化したターゲット（B）にインターロゲートする。AのBへの結合は、固体表面に結合したナノ粒子の検出によりモニタリングする（例えば比色法、蛍光法、銀染色などによる）。このスキームは、Aをオリゴヌクレオチドに共役でき、Bを表面に固定化できるいずれの分子でも用いることができる。

20

30

【0252】

本発明の実施例を図47に示しており、ここではIは、金表面に強固に連結した（例えば、硫黄－金結合による）多数のオリゴヌクレオチドを含む金ナノ粒子であり、1は、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を備えた側基オリゴヌクレオチドを含有するタンパク質である。表面密度の高い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を構築するための手順は、本明細書に記載している。例えば、実施例3及びC. A. Mirkira, Nature, 第382巻, 607-609ページ（1996年）；R. Elghanianら, Science, 第277巻, 1078-1081ページ（1997年）；J. J. Storhoffら, J. Am. Chem. Soc. 第120巻, 1959-1964ページ（1998年）を参照されたい。オリゴヌクレオチドをタンパク質に共役させるための方法は周知であり、1つの方法の詳細は、E. R. Hendricksonら, Nucleic Acids Research, 第23巻, 522-529ページ（1995年）に記載されている。ナノ粒子に共役したオリゴヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド－タンパク質共役体を、共にハイブリダイゼーションの条件下におくと、1つ以上のオリゴヌクレオチド－タンパク質共役体分子が、ハイブリダイゼーションにより所定のナノ粒子に結合して、ナノ粒子タンパク質共役体を生成する。図47及び50(a)を参照されたい。ナノ粒子受容体共役体の別の実施形態は、図50(b)に示されており、そこでは連結オリゴヌクレオチドの使用を必要とし、ナノ粒子－オリゴヌクレオチド構造物及びオリゴヌクレオチド－タンパク質共役体を共にハイブリダイゼーションの条件下におく。この実施形態において、リンカーオリゴヌク

40

50

レオチドは、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチド（a）に相補的な1つのセグメント（a'）、及び受容体に結合したオリゴヌクレオチド（b）に相補的な別のセグメント（b'）を有する。

【0253】

得られたナノ粒子-タンパク質複合体は、遠心分離又はゲル濾過により非結合のタンパク質から分離することができ、抗原などのターゲット検体のためのプローブとして用いることができる。図51は、ナノ粒子-タンパク質共役体をプローブとして使用し得る複数の代表的検出スキームを示している。ナノ粒子-タンパク質共役体は、ターゲット検体を同定すること、支持体上に整列して固定化した薬物など分子のライブラリをスクリーニングすること（図51（a））、又は組織化学的適用においては細胞若しくは組織内の検体の存在を同定すること、をはじめとする非常に様々な適用例を有する。そのプローブは、検体、例えばタンパク質又は薬物が多重結合部位を有する場合も、スポットテストにおいて用いることができる。

10

【0254】

これらの検査から得られる金プローブ-受容体-リガンドターゲットの組み合わせは、視覚的（例えばスポットテスト、凝集体の形成、又は銀染色）、又はいずれか公知の手順により観察することができる。例えば、ナノ粒子-タンパク質共役体システムを用いて、ナノ粒子/DNA/タンパク質複合材料の凝集特性に依存する、核酸のための比色テストを開発することができる（図52（A））。典型的実験において、ターゲット核酸（3）を含むか或いは含まない4種のビオチン-オリゴヌクレオチド共役体（1-STV）及び金ナノ粒子DNA共役体（2-Au）に結合したストレプトアビジンを含む複合体の溶液を調製した。ターゲット核酸の配列は、2つの部分を有する。複合体に結合したオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分に相補的であるが、ナノ粒子の結合したオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分に相補的である。その溶液を、53℃で30分間加熱し、その後溶液の一部3LをC18逆相薄層クロマトグラフィープレートにスポットした。ターゲット核酸を含む溶液は、青色のスポットを示し、ターゲットを含まない溶液は、赤色のスポットを示した。この結果及びシャープな融解曲線により、上記スポットテスト（図52（B））中の金ナノ粒子プローブの1つを、金プローブよりも簡単に調製されるストレプトアビジン/DNA共役体により置換し得ることを実証している。

20

【0255】

52（a）に示したシステムを用いて、先に論じた新規な3次元ナノ材料又はアセンブリを調製することもできる。図52（a）の簡単な変形例において、図52（c）に示すように、連結オリゴヌクレオチドは用いられず、複合体に結合したオリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドに相補的である。

30

【0256】

これらの新しいナノ粒子-タンパク質プローブ（II）は、独特の特徴を有しており、それにより過去に記載されたナノ粒子タンパク質共役体をしのぐ重要な利点が提供される。特に、ナノ粒子の表面の高密度オリゴヌクレオチドは、ポリアニオンのシースとして機能して、非常に広範囲の溶解度にわたって水中のナノ粒子-タンパク質共役体の溶解度及び安定性を高め、非常に広範囲の塩濃度にわたって水中のナノ粒子-タンパク質共役体の安定性を高める。更に、オリゴヌクレオチド-オリゴヌクレオチド結合の可逆性は、ターゲットと共に形成された複合体を特徴づけるための格別な手法を提供する。加えて、ナノ粒子-タンパク質は、非特異的結合に対してより抵抗性がある（図53参照）。

40

【0257】

好ましいナノ粒子-タンパク質複合体は、金ナノ粒子を基にしているが、非常に様々なその他の材料（例えば、銀、プラチナ、金及び銀の混合物、磁気粒子、半導体、量子点）を基にしたその他の粒子を用いてもよく、粒子サイズは、上記のように2～100nmの範囲であってよい。米国特許出願第09/344,667号明細書及びPCT出願WO第98/04740号は両者とも、引用により完全に本明細書に援用されており、適切なナノ粒子と、それらにオリゴヌクレオチドを結合させる方法とを記載している。

50

【0258】

別の実施形態において、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-タンパク質複合体 (I I) は、滑面に固定化したタンパク質など特異的ターゲット分子を検出する際のプローブとして使用される。例えば図 48、49、51、及び 54 を参照されたい。この目的のために、多数の異なるタンパク質を、異なる別個のスポットにガラススライド上のアレイとして固定化してもよい。多数の連結方法が用いられてもよい。当該技術で周知の 1 つの方法は、そのガラスを 3-アミノプロピルトリエトキシシランと、その後 1, 4-フェニレンジイソチオシアネートとで処理することである。この配列は、1 つ以上のアミノ基を含有する物質に結合させるために用い得る側基のイソチオシアネート基を保持する表面を生成する。アミノ基を含有するターゲットは、この修飾した表面に直接固定化することができる。その他の物質では、アミノアルキル基をターゲットにつないで、必要な反応基を提供することができる。表面上のターゲットの固定化、残余のイソチオシアネート基の不活性化、及び洗浄の後、表面を I I のコロイド溶液に暴露する。タンパク質を固定化するための別の方法は、結合したアルデヒド基を有するガラススライド上にタンパク質を「プリント」して、タンパク質チップを生成することを含む。G. Mac Beath ら, Science, 第 289 巻, 1760-1763 ページ (2000 年); Nature, 2000 年, 405 巻, 837 ページ; 及び Anal. Biochem., 第 278 巻, 123 ページは全て、引用により完全に援用されている。タンパク質上のアミノ基は、反応してタンパク質の 3 次構造を有意に破壊することなく共有結合を形成し、それによりタンパク質は、受容体及びその他のターゲット分子とも反応することができる。或いは、特異的ターゲット分子又は検体は、オリゴヌクレオチドに結合して、検体に結合したオリゴヌクレオチドが支持体に結合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オリゴヌクレオチド-検体共役体を形成する。オリゴヌクレオチドにタンパク質及びその他の物質を共有結合させる方法は多数ある。1 つの方法は、チオール修飾オリゴヌクレオチドとストレプトアビジンとを結合させるための SMPB (スルホスクシンイミジル 4-[p-マレイミドフェニル] ブチレート) の使用を含む。Nucleic Acids Research, 1994 年, 第 22 巻, 5530 ページは、引用により完全に援用されている。支持体に結合したオリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション条件下で検体に結合したオリゴヌクレオチドと接触させることにより、検体を支持体と結合させてもよい。

10

20

30

40

【0259】

その後、プローブを支持体と接触させる。タンパク質-タンパク質特異的結合相互作用が生じるのに十分な時間を経た後、過剰のナノ粒子共役体を洗い流して、ナノ粒子を検出する。金属性ナノ粒子は、色により又は銀染色による灰色のスポットとして、直接検出してもよい。こうして、特異的タンパク質/受容体結合相互作用を、ガラススライド上でいずれか 1 つの存在を指示する方法として活用してもよい (図 54)。典型的な実験において、本明細書に記載した高 DNA 密度金ナノ粒子プローブにハイブリダイズさせたビオチン化 DNA に結合したストレプトアビジンを含有する溶液にガラススライドを暴露させることにより、ガラススライドの一部に、相補的 DNA を含むハイブリダイズさせたビオチン化 DNA をプローブし得る。プローブは、ビオチンを含むスライドの一部に結合する。複合化したプローブに関連するシグナルは、銀強化溶液で処理することにより更に発色することができる (図 54 参照)。

【0260】

上に示したように、有用な I I 型のプローブは、機能的認識要素として非常に多様な物質を用いて作製することができる。図 49, 50 に示すプローブの合成及び適用例のスキームは、タンパク質-タンパク質相互作用を研究するために図 48 に表したものと全く類似している。図 49 の一般例として、共役プローブを I I' と呼称し、受容体ユニットを A と呼称し、固体表面に固定化されたターゲットを B と呼称する。図 48 のシステム及び本明細書に記載の変形例は、図 49 に示した一般的システムの特別な例である。

【0261】

場合により、非金属ナノ粒子から構築される I I 型のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子プロ

50

ープを用いることが好ましい場合もある。本来蛍光性のナノ粒子を基にした I I 型プローブは、それらの蛍光により観察することができる。その他のナノ粒子は、オリゴヌクレオチドのシースが添加される前、又は後のいずれかに粒子に蛍光標識を付加することにより、蛍光性にしてもよい。

【0262】

本発明の別の実施形態において、新規なタンパク質検出方法が提供される。連結 DNA を特異的タンパク質のマーカとして用い得る場合には、タンパク質結合分子を、連結オリゴヌクレオチドにより、金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体に接続する。図 55 は、レポータ DNA として連結オリゴヌクレオチドを利用するタンパク質検出方法を記載している。この方法において、オリゴヌクレオチドは、各タンパク質粒子が異なるオリゴヌクレオチド配列を有するような方法でタンパク質結合分子により修飾され、その後タンパク質-オリゴヌクレオチド共役体が、ハイブリダイゼーションの結果 Au 粒子上に固定化される。例えば、ビオチン化 DNA は、金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体上に固定化されて、ビオチンナノ粒子共役体を生成することができる。ストレプトアビジンの存在において、ビオチン修飾ナノ粒子は、凝集体を形成し、その凝集体は、その他の粒子から容易に分離することができる。その凝集体は、その後 DNA デハイブリダイゼーションにより解離され、レポータ DNA が Au 粒子及びタンパク質から単離される。各タンパク質結合分子は固有の DNA 配列を有しているため、タンパク質は、DNA チップの使用など確立された DNA 検出方法により同定することができる。一旦レポータ DNA が単離されると、レポータ DNA は PCR により増幅され得るため、検出限界は非常に低くなり得る。

10

20

【0263】

これらのナノ粒子-オリゴヌクレオチド-受容体共役体システムの全てに共通する特徴は、試験される成分、例えば図 49 の受容体 A 及び B の相互作用のためのシグナルが、B に結合する A と、オリゴヌクレオチド a' によるオリゴヌクレオチド a の相互作用の両者に基づいて決まることである。オリゴヌクレオチド二本鎖セグメントの解離温度は、相補鎖の長さ及び配列、並びに塩濃度を制御することにより変えることができるため、研究者の意図に従って、オリゴヌクレオチド二本鎖がテストされる成分よりも低温又は高温で解離されるようにシステムを設計することが多くの場合可能である。ここに論じたように、他のナノ粒子に、又はガラス表面に連結するオリゴヌクレオチドとのオリゴヌクレオチド金ナノ粒子プローブのハイブリダイゼーションにより形成した複合体は、通常は狭い温度範囲で解離する。我々の知る限りでは、そのようなシャープな融解推移は、このサイズのオリゴヌクレオチドに由来する複合体としては前例がない。この特性により、ナノ粒子及びオリゴヌクレオチドを基にしたその他のプローブをはじめとするその他のプローブシステムとは別の、図 47 におけるこれらのナノ粒子オリゴヌクレオチドプローブが設定される。従って、観察されたシグナルがオリゴヌクレオチド二本鎖の解離を反映するように I V 型（図 48）又は V 型（図 54）のシステムを設計すれば、解離推移が極めてシャープになる。この特徴により、I V 型及び V 型の複合体を特徴づけるための特定の寸法が提供される。或いは、A と B との相互作用の強度に関する情報を得るために、A-B 複合体の初期解離を最適化するシステムを設計することもできる。

30

40

【0264】

容易に理解できるように、非常に望ましいナノ粒子-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。

【0265】

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。

【0266】

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

50

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。

【0267】

(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 HNO_3)で洗浄し、Nanopure H_2O でリンス、次いで使用前にオーブンで乾燥させた。 HAuCl_4 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 HAuCl_4 (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ー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。

【0268】

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。

【0269】

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 $\text{C}_3\text{-S-S-CPG}$ 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、 NH_4OH 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。

【0270】

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 C_6 -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 C_6 -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 $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$ /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 CH_3CN ／ピリジンの1：1混合物（ $2 \times 1\text{ml}$ ）で1分間洗浄した後、無水アセトニトリル（ $2 \times 1\text{ml}$ ）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。

【0271】

0.03M $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{OAc}^-$ 緩衝液（TEAA）、pH7と共に、1%／分勾配の95% CH_3CN ／5%TEAAを用いて、Hewlett Packard ODSハイパーシル（hypersil）カラム（ $4.6 \times 200\text{mm}$ 、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 $1\text{ml}/\text{分}$ 、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、260nm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。

10

【0272】

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。

20

【0273】

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、 $150\mu\text{l}$ の50mM AgNO_3 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 $10\text{mg}/\text{ml}$ 溶液 $200\mu\text{l}$ 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（ $<50\text{OD}$ ）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260nmでの吸光度を測定して定量した。 10mM NaOH溶液（pH12）と共に、2%／分勾配の 10mM NaOH、 1M NaCl溶液を用いて、Dionex Nucleopac 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。

30

【0274】

C. オリゴヌクレオチドの金ナノ粒子への付着

40

上記パートAに記載のように調製した 17nM （ $150\mu\text{l}$ ）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 $3.75\mu\text{M}$ （ $46\mu\text{l}$ ）3'-チオール-TTTGCTGAと混合し、キャップをした 1ml 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 $3.75\mu\text{M}$ （ $46\mu\text{l}$ ）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。

【0275】

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（ 1M 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、

50

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。

【0276】

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' A T A T G C G C G A T C T C A G C A A A（配列番号1）；および

3' G A T C G C G C A T A T C A A C G G T A（配列番号2）。

これら2種のオリゴヌクレオチドを1M NaCl、10mM リン酸緩衝（pH7.0）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。

【0277】

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。

【0278】

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。

【0279】

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。

【0280】

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）。

【0281】

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。

【0282】

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。

【0283】

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100 μ lのコロイド溶液をスポット

【0284】

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13 nmの著しく一定したサイズを有するようである。

【0285】

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60 Å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95 Å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。

【0286】

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13 nm)を調製した。チオール-オリゴヌクレオチド[HS(CH₂)₆OP(O)(O⁻)-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。

【0287】

実施例1に記載のチオール-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-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-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-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-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。

【0288】

水中の金コロイド(17 nM)の1 ml溶液を水中の過剰な(3.68 μ M)チオール-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、100 μ lの0.1M リン酸水素ナトリウム緩衝液、pH 7.0および100 μ lの1.0M NaClを予備混合して加えた。10分後、10 μ l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-

10

20

30

40

50

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 E p p e n d o r f C e n t r i f u g e 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(10mM リン酸、0.1M NaCl)および10μl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)。

10

【0289】

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。

20

【0290】

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1μl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。

30

【0291】

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。

40

【0292】

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

50

n 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 40 nmol スケールで合成し、逆相 C18 カートリッジ (O P C) 上で精製した。それらの純度は、イオン交換 H P L C を実施して定量した。

【0293】

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、15 nM の各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体 1 および 2 と、3 nmol 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 0.1 M NaCl + 5 mM MgCl₂ を、74 $^{\circ}$ C 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 μ 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。

10

【0294】

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。

【0295】

【表 1】

20

表 1

反応物	結果 (色)			
	45 $^{\circ}$ C	50 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C	74 $^{\circ}$ C
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

30

表 1 から分るように、60 $^{\circ}$ C 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。50 $^{\circ}$ C 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。45 $^{\circ}$ C 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。

【0296】

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、58 $^{\circ}$ C で陽性テスト (青色) を生成し、共役体 1 および 2 は 64 $^{\circ}$ C 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。

40

【0297】

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、15 nM の各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体 1 および 2 と、10 pmol 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 0.1 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 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

50

反応混合物の 3 μ l 試料を C-18 TLC シリカプレート上にスポットした。結果を表 2 に示す。

【0298】

【表 2】

表 2

反応物（プローブ）+標的	結果（色）				
	RT	35℃	40℃	54℃	64℃
(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。

【0299】

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 260nm 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

【0300】

100 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液（0.3M NaCl、10mM リン酸、pH7）中で、1nmol 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 μ l は、標的オリゴヌクレオチド 10pmol 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 μ l 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 μ l 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。

40

【0301】

【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)

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。

【0302】

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。

【0303】

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。

【0304】

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。

【0305】

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)。

【0306】

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。

【0307】

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)。

【0308】

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ェ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。

【0309】

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。

【0310】

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も「融解分析」を実施した。260nmでの吸光度は極くわずかに増大したことが観察された。

【0311】

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 nM) を含有する溶液に、 $2 \mu\text{l}$ (20 pmol) の各オリゴヌクレオチド標的 (図 15 A-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 15 B 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

【0312】

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出会う標的個所での 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)。

【0313】

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出会う 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 fmol の実施例 5 に記載の系と同じ感度を示した。

20

【0314】

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。

30

【0315】

【表 4】

表 4

反応物(プローブ) + 標的	結果 (色)					
	R T	47.6°C	50.5°C	51.4°C	52.7°C	54.5°C
(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

40

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

50

「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16A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16A-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。

【0316】

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。

【0317】

【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、金ナノ粒子間隔(粒子間隔)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、13nm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。

【0318】

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4nm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。

【0319】

実施例9: ナノ粒子-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5μlを緩衝液(10mM リン酸、pH7)と合わせて0.1M NaClの最終濃度とし、この溶液にヒト尿1μl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。12.5μlの各プローブと、2.5μlのヒト尿を含有する類似溶液に

、 $0.25\ \mu\text{l}$ ($10\ \text{pmol}$) の標的 3 (図 12 A) 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。

【0320】

ヒト唾液の存在下で類似実験を行った。 $12.5\ \mu\text{l}$ の各プローブ 1 および 2 と、 2 および $2.5\ \mu\text{l}$ の標的 3 を含有する溶液を 70°C に加熱した。室温に冷ました後、 $2.5\ \mu\text{l}$ 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。

【0321】

実施例 10: 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 13 A 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 $5 \times 15\ \text{mm}$ の部片に切断した。スライドを 50°C の $4:1$ の $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 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 $1\ \text{mM}$ 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istol 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°C 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 $1\ \text{mM}$ 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。

【0322】

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 $0.2\ \text{OD}$ ($1.7\ \mu\text{M}$) 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。

【0323】

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 $12\ \text{bp}$ 末端を含む配列を有する $24\ \text{bp}$ 長 ($5'$ TACGAGTTGAGAAATCC TGAATGCG) [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 ($0.4\ \text{OD}$ 、 $1.7\ \mu\text{M}$) を含有するハイブリダイゼーション緩衝液 ($0.5\ \text{M}$ NaCl, $10\ \text{mM}$ 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 (TAGGACTTACGC $5'$ チオール [配列番号 35]) で修飾されている直径 $13\ \text{nm}$ 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。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 19 A 参照。

10

20

30

40

50

【0324】

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ATGCTCAACCTCT [配列番号33]）が付着している直径13 nm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（TAGGACCTTACGC5'チオール [配列番号35]）で修飾した13 nm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、520 nmのUV-可視吸光度は増大した。図19A参照。

10

【0325】

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、1.5 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（520 nm）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。

20

【0326】

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

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) (0.004₂₆。単位)の溶液1 μl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100 μLの金ナノ粒子 (粒子中~10 nM)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。

30

【0327】

実施例12：ナノ粒子-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-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。

40

【0328】

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、100 μl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

50

れた緩衝液を用いるのではなく、pH 8.5 の 10 mM 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5 μ l のマスター混合物を添加した。各オリゴヌクレオチド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、10 μ l の 2 M NaCl および 5 μ l のオリゴヌクレオチドブロッカー溶液（0.3 M NaCl、10 mM リン酸、pH 7.0 溶液中 50 pmol の各ブロッカーオリゴヌクレオチド（図23および以下参照））を、5 μ l の全強度（約 10 nM）のナノ粒子オリゴヌクレオチド溶液に加えて調製した。アンプリコンプローブ混合物を3分間で100 $^{\circ}$ C 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（2 μ l）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。

10

【0329】

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。

20

【0330】

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ッカーを付加した（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、ブロッカー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）と相補的なブロッカーオリゴヌクレオチドを用いるものである。

【0331】

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

30

実施例12に記載の手順は、ナノ粒子オリゴヌクレオチドプローブを付加する前にPCR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。

【0332】

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 5 M NaCl と、2 μ l の 150 mM MgCl₂ を加えた。この混合物を100 $^{\circ}$ 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 RP TLC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。

40

50

【0333】

実施例14：ナノ粒子ー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。

【0334】

2種の異なる系、ポリA：ポリUおよびdA₄₀：dT₄₀を用い、100μlの緩衝液（0.1M NaCl、10mM リン酸、pH7.0）中に0.8A₂₆₀単位の標的二本鎖を含有する溶液1μlを、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液（pH7.0）中のAu-sdT₂₀ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体（粒子中～10nM；実施例11参照）のコロイド溶液100μl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℃）下に放置し、次いで、3μl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。

【0335】

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。

【0336】

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、pH7.0、緩衝液中で実施した。Acetate PlusTM濾過メンブレン（0.45μm）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（3.1μm）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, 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（0.1M、pH9.3）に加えた。数時間後、過剰な1,4-フェニレンジ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（0.1M、pH9.3、1M 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（0.3M NaCl、10mM リン酸、pH7.0）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。

【0337】

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。

【0338】

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 $^{\circ}$ 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。

【0339】

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、アリコートを逆相 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。

【0340】

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 塩基対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。

【0341】

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。

【0342】

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'-TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG-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)₆A₁₀CGCATTCAGGAT、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。

【0343】

【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

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（～4nm）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

Q D 集合体および Q D と金ナノ粒子 (~ 1 3 n m) 間に形成された複合凝集体の温度依存性 U V - 可視スペクトルを得た。

【0344】

A. 一般法

N A N O p u r e 超純水精製系を用いて調製したナノピュア水 (1 8 . 1 M Ω) を一貫して用いた。P e r k i n E l m e r L S 5 0 B 蛍光分光計を用いて蛍光スペクトルを得た。H p 9 0 9 0 a P e l t i e r T e m p e r a t u r e C o n t r o l l e r を具備した H P 8 4 5 3 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。E p p e n d o r f 5 4 1 5 遠心機または B e c k m a n A v a n t i 3 0 遠心機を用いて遠心を行った。2 0 0 k V で操作する日立 H F - 2 0 0 0 電界放出 T E M を用いて T E M 画像を得た。

10

【0345】

B. オリゴヌクレオチド-Q D 共役体の調製

半導体量子ドット (Q D) 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 C d S e 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。M u r r a y ら, J . A m . C h e m . S o c . , 第 1 1 5 巻, 8 7 0 6 ページ, 1 9 9 3 年; H i n e s ら, J . P h y s . C h e m . , 第 1 0 0 巻, 4 6 8 ページ, 1 9 9 6 年。その結果、Q D を発光ダイオード (S c h l a m p ら, J . A p p l . P h y s . , 第 8 2 巻, 5 8 3 7 ページ, 1 9 9 7 年; D a b b o u s i ら, A p p l . P h y s . L e t t . , 第 6 6 巻, 1 3 1 6 ページ, 1 9 9 5 年) および非放射性生物学的標識 (B r u c h e z ら, S c i e n c e , 第 2 8 1 巻, 2 0 1 3 ページ, 1 9 9 8 年; C h a n ら, S c i e n c e , 第 2 8 1 巻, 2 0 1 6 ページ, 1 9 9 8 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 (A l i v i s a t o s , J . , P h y s . C h e m . , 第 1 0 0 巻, 1 3 2 2 6 ページ, 1 9 9 6 年、およびその中の参考文献; K l e i n ら, N a t u r e , 6 9 9 , 1 9 9 7 年; K u n o ら, J . C h e m . P h y s . , 第 1 0 6 巻, 9 8 6 9 ページ, 1 9 9 7 年; N i r m a l ら, N a t u r e , 第 3 8 3 巻, 8 0 2 ページ, 1 9 9 6 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 (V o s s m e y e r ら, J . A p p l . P h y s . , 第 8 4 巻, 3 6 6 4 ページ, 1 9 9 8 年)。さらに、1 種以上のナノ粒子を超格子構造 (M u r r a y ら, S c i e n c e , 第 2 7 0 巻, 1 3 3 5 ページ, 1 9 9 5 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。

20

30

【0346】

D N A 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 D N A の多くの特性を Q D 集合体の使用に利用し得る。

【0347】

D N A による Q D 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 C d S e Q D 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 (T O P O) とトリオクチルホスフィン (T O P) 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 Q D は、非極性溶媒にのみ可溶になり、そのため、Q D を高荷電 D N A 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 D N A 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、Q D と二本鎖 D N A との相互作用を考えていたが、これらの研究は、拡張 Q D 構造の集合体を誘導する D N A 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。C o f f e r ら, A p p l . P h y s . L e t t . , 第 6 9 巻, 3 8 5 1 ページ, 1 9 9 6 年; M a h t a b ら, J . A m . C h e m . S o c . , 第 1 4 8 巻,

40

50

7028 ページ, 1996 年。

【0348】

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。

【0349】

1. 0 ml 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) ~20 mg の TOP/TOP O 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 (0.10 ml, 1.15 mmol; 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。

【0350】

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。0.50 ml 試料を (30,000 rpm で 4 時間) 遠心し、上清を除去した。残りの溶液を ~0.3 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 O 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。

【0351】

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 (DMA P; 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。

【0352】

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 $150\text{ }\mu\text{l}$ (530 nm での光学密度 = 21.4) を、0.4 ml の DMF 中の DMA P (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 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 ~ 2.0 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 Ce

l l u l o s e E s t e r M e m b r a n e) を用いて P B S (0.3 M N a C l、10 mM リン酸緩衝液、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。

【0353】

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、(~ 3.2 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 nm] 対称発光を有し、強力に蛍光性のままであった。

【0354】

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、P B S 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) スペーサー: 5'-T C T C A A C T C G T A A₁₀-(C H₂)₃-S H [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) スペーサー、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'-S H-(C H₂)₆-A₁₀C G C A T T C A G G A T-3' [配列番号 47] を用いた。

【0355】

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 μ l、OD₅₃₀ = 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'-T A C G A G T T G A G A A T C C T-G A A T G C G-3'、配列番号 48) の溶液 6 μ 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。

【0356】

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。

【0357】

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。E p p e n d o r f 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 P B S 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'-C T A C T T A G A T C C G A G T G C C C A C A T-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°C) 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」を含む対応する対照試料由来の 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。

【0358】

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、B a w e n d i 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 (M u r r a y ら, S c i e n c e, 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、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。

【0359】

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10,000rpmで10分間遠心し、7μlのPBSで洗浄、再遠心して、0.7ml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500rpmの速度で攪拌した。次いで、600nm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。 10

【0360】

結果、図27B ($T_m = 57^\circ\text{C}$)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°C 対 9°C ）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。

【0361】

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、 $\sim 17\text{nM}$ の3'-ヘキシルチオールで修飾した13nmの金ナノ粒子（30μl、 $\sim 5\text{fmol}$ ；実施例3に記載のように調製）の溶液を、5'-ヘキシルチオールを末端基とするDNA修飾QD（15μl、530nmでの光学密度は0.206）と混合した。「リンカー」DNA（5μl、50pmol）を加え、混合物を -78°C 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（3,000rpmで1分間）し、上清を除去した後、沈殿物を100μlのPBSで洗浄し、再遠心した。 20 30

【0362】

「融解」分析のために、洗浄した沈殿物を0.7ml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、525nm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 $\sim 10\%$ 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°C ）融解転移は、 58°C で起こった（図27D参照）。 40

【0363】

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。

【0364】

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 50

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。

【0365】

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sein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 (Expedita)) 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sein、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・プローブス社 (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。

【0366】

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)。

【0367】

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sein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-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: 1959-196

10

20

30

40

50

4 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)、pH 7 および 1% / 分勾配の 95% CH₃CN / 5% 0.03 M TEAA を含む HP ODS Hyper sil 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。

【0368】

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 12 mer および 32 mer 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。

【0369】

3' がプロピルチオールで 5' フルオレセイン部分 (HS (CH₂)₃ - 3' - (W)₂₀ - TAG - GAC - TTA - CGC - 5' - (CH₂)₆ - F、W = 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 (1 M NaCl の 1% / 分勾配、10 mM NaOH; 保持時間 (Rt) ~ 48 分 (W = T)、Rt ~ 29 分 (W = 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。

【0370】

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 12 mer 配列と相補的な 12 塩基 3' - GCG - TAA - GTC - CTA - 5' - (CH₂)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' 12 F (5'

10

20

30

40

50

－A T C－C T G－A A T－G C G－F；〔配列番号 5 4〕）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。

【0371】

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 8100 TEM 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 (Image Tool) 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 (19.3 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。較正には、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。

【0372】

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 分洗浄し、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。

【0373】

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 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、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。

【0374】

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。

【0375】

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、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。

10

【0376】

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' F) に相補的) を、ハイブリダイゼーション条件 (3 μ M 相補的オリゴヌクレオチド、0.3 M PBS、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 $\sim$ 50 mM、pH 11 $\sim$ 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、1 M 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表面密度を、蛍光分光法により測定した。

30

【0377】

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 ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-5'-\text{CGC}-\text{ATT}-\text{CAG}-\text{GAT}-(\text{CH}_2)_4-\text{F}$ [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。

【0378】

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 $\sim$ 32ヌクレオチド鎖、配列は上記に記載) が15.7 $\pm$ 1.2 nm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 $\sim$ 530 nm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、520 nmでの金表面プラズモンバンドが減少する。

40

【0379】

50

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 (12 mM) 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))。

【0380】

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、 $34 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$ (試料の10回の個別測定値の平均) であった。直径 $15.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ 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。

【0381】

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。

【0382】

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, pH7) 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, pH11) 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

10

20

30

40

50

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。

【0383】

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。

10

【0384】

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20dA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15.7nm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12mer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。

20

【0385】

一本鎖 SA₂₀12F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32merで修飾した粒子は、12mer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、SA₂₀12F/12F'系のハイブリダイゼーション効率 (6.6 ± 0.2 pmol/cm²、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)。

30

【0386】

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。SA₂₀12F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sein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1.0M 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)。

40

【0387】

50

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、先ず、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 (H e r n e ら, J. A m. C h e m. S o c., 第 1 1 9 巻, 8 9 1 6 - 8 9 2 0 ページ (1 9 9 7 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 (W e i t z ら, S u r f. S c i., 第 1 5 8 巻, 1 4 7 - 1 6 4 ページ (1 9 8 5 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。

【0388】

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 A u 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 1 2 m e r 配列の間に 2 0 d A スペーサーおよび 2 0 d T スペーサーが挿入されたフルオレセイン修飾 3 2 m e r 鎖を、調製した。S 3' T₂₀ 1 2 F と S 3' A₂₀ 1 2 F 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、2 0 d A スペーサー (2 4 ± 1 p m o l / c m²) と比較して、2 0 d T スペーサー (3 5 ± 1 p m o l / c m²) 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合鎖のパーセンテージは S T₂₀ 1 2 m e r ナノ粒子 (7 9 %) では S A₂₀ 1 2 ナノ粒子 (「~ 9 4 %」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、d T 豊富なオリゴヌクレオチド鎖が、d A 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、2 0 d A 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、2 0 d T 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。

【0389】

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 (S t e e l ら, A n a l. C h e m. 7 0 : 4 6 7 0 - 4 6 7 7 (1 9 9 8) ; H e r n e ら, J. A m. C h e m. S o c. 1 1 9 : 8 9 1 6 - 8 9 2 0 (1 9 9 7))。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 2 0 d A 配列 (S A₂₀) [配列番号 5 5] 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。

【0390】

ナノ粒子を、種々の認識鎖 (S A₂₀ 1 2 F) 対希釈剤 (S A₂₀) 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、S A₂₀ 1 2 F 表面密度の測定のために上述の蛍光方法で分析し、次に、1 2' 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。

【0391】

S A₂₀ 1 2 F 表面密度は、堆積溶液中の S A₂₀ 1 2 F 対 S A₂₀ の比率に関して直線的に増加した（図 3 0）。これは、ナノ粒子に付けられた S A₂₀ 1 2 F と S A₂₀ 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 官能化チオール混合物に通常見られる結果と対照的である（B a i n ら、J. A m. C h e m. S o c. 1 1 1 : 7 1 5 5 - 7 1 6 4 (1 9 8 9) ; B a i n ら、J. A m. C h e m. S o c. 1 1 1 : 7 1 6 4 - 7 1 7 5 (1 9 8 9) 。

【0392】

個々の異なるサンプルにハイブリダイズした相補的な 1 2 F オリゴヌクレオチドの量も、S A₂₀ 1 2 F 表面被覆範囲の増加につれて直線的に増加した（図 3 1）。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 1 2 F ' のハイブリダイゼーションがより高い S A₂₀ 1 2 F 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。

【0393】

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-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。

【0394】

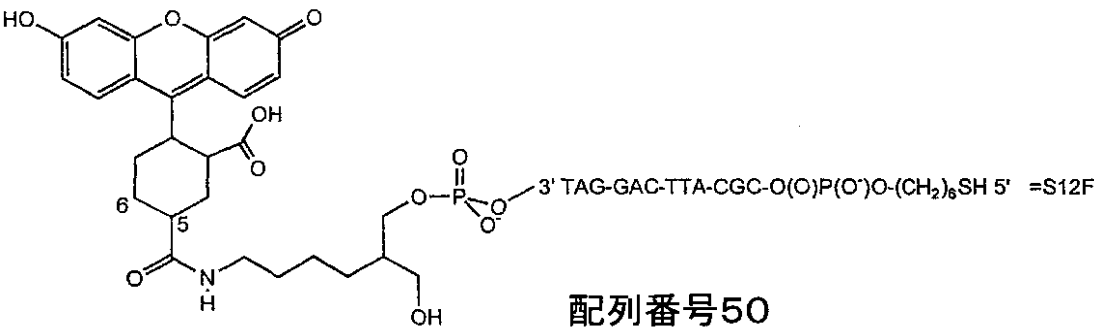
【表 7】

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。S 1 2 F と S A₂₀ 1 2 F 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 μ M 水溶液から金に付着させ、0. 1 M N a C l で熟成した。ハイブリダイゼーション試験はすべて 0. 3 M P B S、p H 7 で行った。

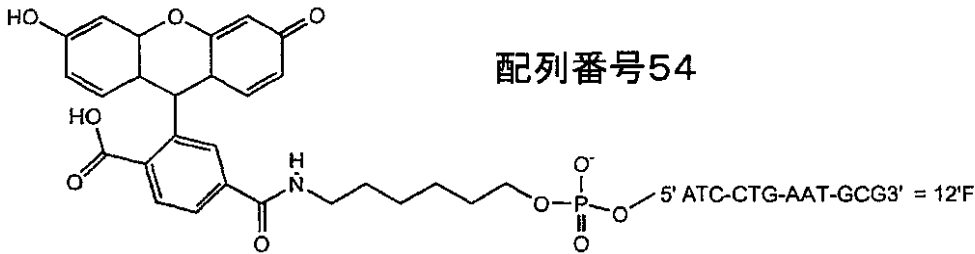
オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼーション被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼーション効率 (%)
A u ナノ粒子			
S12F/12F'	3 4 ± 1	1. 3 ± 0. 2	~ 4 %
SA ₂₀ 12F/12F'	1 5 ± 4	6. 6 ± 0. 2	~ 4 4 %
A u 薄膜			
S12F/12F'	1 8 ± 3	6 ± 2	~ 3 3 %

【化 1】



10

【化 2】



【表 8】

20

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

30

^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。

【表 9】

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パーサー配列の影響

オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	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
		($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	(%)
S3'A ₂₀ 12F/3'12F'	2.4 ± 1	9 ± 2	~ 38
S3'T ₂₀ 12F/3'12F'	3.5 ± 1	1.2 ± 1	~ 34

S3'A₂₀12F/S3'T₂₀12F=HS(CH₂)₃-3'-W₂₀-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F [配列番号 52]

3'12F=5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F [配列番号 54]

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。

【0395】

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 °C 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 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 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。

【0396】

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 13 nm) 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 30 mer 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

10

20

30

40

50

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。

【0397】

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。

【0398】

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, Nucleic Acids Res., 第22巻, 5456ページ (1994年); Genetic Microsystems 417 Microarrayerを用いて、375 μm で分離された直径175 μm 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。まず、2 × PBS (0.3 M NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ / Na_2HPO_4 緩衝液、pH 7) 中の1 nM

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 100 pM 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、 $2 \times \text{PBS}$ (0.3 M 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。

10

【0399】

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、再現性がある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 ($\text{N}=\text{A}$) 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、 $\text{A}:\text{T} > \text{G}:\text{T} > \text{C}:\text{T} > \text{T}:\text{T}$ (Allawiら, Biochemistry, 第36巻, 10581ページ (1988年)) の予測安定性に従う。通常、 $\text{G}:\text{T}$ 誤対合を $\text{A}:\text{T}$ 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. Ikutaら, 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。

20

30

【0400】

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、 50 fM 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 $\text{N}=\text{A}$ 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 $\text{Cy}3 / \text{Cy}5$ 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。

40

【0401】

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方法を示している。

【0402】

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

50

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。

【0403】

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性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性は、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。

【0404】

多層集合体の構築に用いられる直径13nm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'-ヘキシルチオール-キャップオリゴヌクレオチド1 (5'-HS(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGCATTCAAGGAT-3' [配列番号50]) と、3'-プロパンチオール-キャッ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。

【0405】

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、 $\lambda_{max} > 570\text{nm}$ 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）；Mirkina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效果が有意に低下する。

【0406】

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（0.01M 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）。

【0407】

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FWHM=5℃）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FWHM=3℃）。（Gittinsら, Adv. Mater., 第11巻: 737ページ（1999年）；Brustら, Langmuir, 第14

10

20

30

40

50

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。

【0408】

実施例21：金ナノ粒子集合体の電気的性質

DNAを介した電子的移动は、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，JBIC，第3巻：201－209ページ（1998年）；Lewisら，JBIC，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るものもいる。

10

【0409】

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究し、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。

20

【0410】

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。

30

【0411】

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。

40

【0412】

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12me

50

r オリゴヌクレオチド 1 (3' SH(CH₂)₂O(PO₂⁻)O-ATGCTCAACTCT5' [配列番号 59]) および 2 (5' SH(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGCAATTCAGGAT3' [配列番号 50]) で修飾した。24、48 または 72 塩基長の DNA 鎖 3 (5' TACGAGTTGAGAAATCCTGAAATGCG3' [配列番号 60])、4 (5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATC-ATGCAATCCTGAAATGCG3' [配列番号 61])、および 5 (5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCATATATTGGACGCTTTACGGACAAACATCCTGAAATGCG3' [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' GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGTATATAACCTGCGAAATGCCCTGTTG5' [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 (652 μl、9.7 nM) と 2 で修飾した金ナノ粒子 (652 μl、9.7 μM) をリンカー DNA 3、4、または 5 (30 μl、10 nM) 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。

【0413】

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。

【0414】

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 60 μm) から構成した。試料を中程度の真空 (10⁻³ ~ 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 ~ 10⁻⁴ 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)

【0415】

$$\sigma = \sigma_0 \exp [-E_a / kT] \quad (1)$$

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。

【0416】

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 (DNDCAT) 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 ミクロンビーム 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。

【0417】

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。

【0418】

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 (Pinner 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

10

20

30

40

50

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）。

【0419】

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' TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [配列番号60])と相補的な12merオリゴヌクレオチド1(3' NH₂(CH₂)₇O(PO₂⁻)O-ATG-CTC-AAC-TCCT [配列番号59])で修飾した。オリゴヌクレオチド2(5' SH(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGC-ATT-CAG-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0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液中に浸漬し、40℃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67kΩであった。

【0420】

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' NH₂(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGC-ATT-CAG-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40MΩより高かった。

【0421】

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。

【0422】

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(Retsingerら, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7535-7536-Bioconjugate Chem. 9, 826-830)。

10

20

30

40

50

【0423】

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（例えばポリメラ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。

10

【0424】

(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(^{31}P)標準として H_3PO_4 を使用して、500MHz(^1H)および400MHz(^{31}P ; 161.9MHz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 I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。

【0425】

(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(0.5g)、1,2-ジチアン-4,5ジオール(0.28g)およびp-トルエンスルホン酸(15mg)をトルエン(30mL)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(400mg)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2OCH)、3.2-3.0(4H, m $2\text{CH}_2\text{S}$)、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15.26。

20

30

【0426】

(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(80 μL)および β -シアノエチルクロロイソプロピルホスホロアミダイト(80 μL)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% NaHCO_3 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。; ^{31}P NMR 146.02。

40

【0427】

(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 NH_4OH 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 H

50

ypersilカラム（ $4.6 \times 200 \text{ nm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 粒径）を備えたDionex DX 500システムで、TEA緩衝液（ $\text{pH} 7.0$ ）と1%／分勾配の95% CH_3CN ／5% 0.03 TEAを1 mL／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、Ic1, およびIIc2（図43）を、市販の「5'-チオール修飾試薬」（C6 Glen 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Ic1の調製に関しては、「チオール修飾C6 S-S」（Glen Research）を最後の亜リン酸化に使用し、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。

10

【0428】

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、 $\sim 13 \text{ nm}$ 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 $\sim 13 \text{ nm}$ ）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、0.1 M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、0.1 M NaCl、10 mM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、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体を得られた。

20

【0429】

(e) ハイブリダイゼーション

ジスルフィドーステロイドアンカーを含むナノ粒子ー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IIIIc1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、IIIIc1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（Mucic, R. C. ら、J. Am. Chem. Soc. 120, 12674-12675）。

30

【0430】

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、0.5 MのNaCl、10 mMリン酸塩（ $\text{pH} 7.0$ ）で、プローブ対Ic1、Ic2、およびIIc1、IIc2、およびIIIIc1、IIIIc2のコロイド溶液（各ナノ粒子プローブに関して50 μL および1.0 A₅₂₀ ユニット）に1 μL の標的溶液（10 pmol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（3 μL ）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

40

50

、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℃(ナノ粒子と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。

【0431】

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。

10

【0432】

(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を追加は、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(Muccic, 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。

20

【0433】

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 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(IC1、IC2)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。IIC1、IIC2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。IIIC1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DTT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(Zhong, C. J. Langmuir, 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。

30

40

【0434】

DTTの存在下で静置した後に、IC1およびIC2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DTTで処理した。30分後に、1μLの79mer標的オリゴヌクレオチド溶液(10pmol)

50

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。

【0 4 3 5】

【表 1 0】

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	2 0 秒	5 分	4 0 分	1 0 0 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)

10

(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 20 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。

【0 4 3 6】

実施例 2 4 : 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

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 4 4) [C. A. M i r k i n ら、N a t u r e、3 8 2、6 0 7 (1 9 9 6) ; S t o r h o f f ら、 30 J. A m. C h e m. S o c. 1 2 0、1 9 5 9 年 (1 9 9 8)] またはステロイド環式ジスルフィドアンカー基 II (図 4 4) [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、1 1、2 8 9 (2 0 0 0)] 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 P C R 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。P C R 産物の単純かつ迅速な検出の場合、最初に 40 増幅された DNA を分離せずに P C R 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。

【0 4 3 7】

2つの特徴がステロイド環式アンカー (化合物 1、図 4 2) を際立たせている。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. 1 1 5、7 5 3 5 (1 9 9 3) 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 4 4) によって固定された金共役体を調製し、調べた。

50

【0438】

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。

【0439】

10

(a) 化合物 2 a、2 b、2 c 1、2 c 2 の調製

実施例 2 3 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 2 3 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. Letsinger ら、Bioconjugate Chemistry、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]。CPG 支持体上のオリゴマーに III 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。

【0440】

(b) 金-オリゴヌクレオチド共役体の調製

1. 7 μ モル/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 (～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。

20

【0441】

(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 DTT 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。DTT 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。DTT による置換の時間を、混合物がスポット試験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。

30

【0442】

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。

40

【0443】

実施例 2 5 : オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

50

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ンカーと比較した、新しい非環式ジスルフィドリンカー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。

【0444】

（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'-トリー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。

【0445】

（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。

【0446】

（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スルフィド DNA で修飾した 30 nm 金ナノ粒子コロイドの 600 μ L 溶液に加えた。DTT 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 30 nm 金粒子に関連する ~528 nm の吸光度は減少し始め、700 nm の広幅のバンドが伸び始めた。700 nm のバンドはコロイドの凝集に関連している。図 4 8 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 30 nm 金の粒子は、0.017 M DTT 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。

【0447】

実施例 26：ナノ粒子-核酸-sfp メンバー共役体を用いた検体の検出

この実施例では、ナノ粒子-ストレプトアビジンプローブを用いて検体（ビオチン）の検出を実証する（図 5 4, 5 6）。

（a）ナノ粒子-核酸-タンパク質共役体の調製

ナノ粒子-核酸共役体を、実施例 3 に記載したように調製する。これらの共役体を調製す

るために用いたオリゴヌクレオチド修飾因子は、以下の配列を有する：5' SH (CH₂)₆ - A₁₀ - CGCATTCAGGAT 3' (2)。図56に示すように、ビオチン標識オリゴヌクレオチド (1) [3' - ビオチン - TEG - A₁₀ - ATGCTCAAC TCT 5'] を、ビオチン TEG CPG 支持体 (グレン・リサーチ社 (Glenn Research), Sterling, Virginia; カタログ番号 20-2955-01) を用いて文献の手順により調製する。ストレプトアビジン/DNA 共役体を作製するために、ストレプトアビジンを 20 mM Tris (pH 7.2)、0.2 mM EDTA 緩衝液中の 1 当量のビオチン修飾オリゴヌクレオチドと、攪拌器にて室温で 2 時間反応させた。異なる数のオリゴヌクレオチドと複合化したストレプトアビジンを、20 mM Tris (pH 7.2) 及び 0.5 % 勾配の 20 mM Tris、1 M NaCl による流速 1 mL/分のイオン交換 HPLC で分離しながら、DNA の UV シグナルを 260 nM 及び 280 nM でモニタリングした。ストレプトアビジン/ビオチン修飾オリゴヌクレオチド混合物は、45 分、56 分、67 分、及び 71 分に、それぞれ 1:1、2:1、3:1、及び 4:1 オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン複合体に対応する 4 つのピークを示した。ストレプトアビジン/オリゴヌクレオチドの 1:1 複合体 (10 µM、5 µL) を単離して、0.3 M PBS (0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液、pH 7) 中のリンカー DNA [5' TACGAGTTGAGAA TCC TGA TTGCG 3'] (3) (10 µM、5 µL) と予備混合し、その後その混合物を 0.3 M PBS 中のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体 (10 nM、130 µL) に添加して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン共役体を調製した。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体、ストレプトアビジン/オリゴヌクレオチド、及びリンカー DNA を含有する溶液を、ドライアイス中で 10 分間凍結させ、解凍して DNA ハイブリダイゼーションを促進させた。12 時間後に、その溶液を 1000 rpm で 20 分間遠心分離して、上清を除去した。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン共役体の赤色油状沈殿物を、0.3 M PBS 緩衝液に再分散させた。

【0448】

その後、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン共役体を使用して、ターゲット検体、つまりガラス表面に固定化したビオチンの存在を検出した。

【0449】

(b) ビオチンの検出

ビオチンは、以下の手順に従ってガラススライドに固定化した：オリゴヌクレオチド修飾ガラススライドを、過去に報告された方法 (Science, 2000 年, 第 289 巻, 1757-1760 ページ) により調製し、その後ビオチン修飾オリゴヌクレオチドを表面 DNA にハイブリダイズさせた。(ビオチン修飾ガラススライドは、様々な方法により調製することができる。1 つの例は、アミン修飾ガラススライドを調製し、その後表面のアミンを、アミンと反応する様々な市販のビオチン化試薬と反応させることである。) 図54に示すように、固定化ビオチンガラススライドは、その後ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジンを含有する媒体 (0.3 M PBS 中に 2 nM) で処理した。洗浄し銀強化溶液で処理した後、灰色又は光沢のある銀色のスポットの発現により、捕獲したプローブの存在が実証された [銀強化溶液 A (カタログ番号 S5020, シグマ社 (Sigma Company), 米国ミズーリ州セントルイス)、及び銀強化溶液 B (カタログ番号 S5145, シグマ社 (Sigma Company))、Science, 2000 年, 第 289 巻, 1757 ページも参照]。所望なら、オリゴヌクレオチドに連結する蛍光標識した特異的結合対メンバーを用いて、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-spf プローブを調製してもよい。その後、この発蛍光団標識プローブを用いて、検体の存在を検出してもよい。

【0450】

実施例 27: 金コロイドストレプトアビジン共役体の特異的結合の比較

この実施例において、実施例 26 に従って調製したナノ粒子ストレプトアビジンプローブ、及び市販の Au コロイド (20 nm) / ストレプトアビジン共役体 (フルネーム: 金標

10

20

30

40

50

識ストレプトアビジン標識) (シグマ社 (Sigma Company), 米国ミズーリ州セントルイスから購入, カタログ番号 S 6 5 1 4) の非特異的結合を評価した。共役体を含有する市販の溶液及び本発明のプローブ (0.3 M PBS 中に 2 nM) を含有する溶液各 5 μ l を、ガラススライド上にスポットした。20 時間後に、スライドを水で洗浄して、銀強化溶液 [実施例 26 参照] で処理した。市販の共役体は、発色の 5 分後に灰色のスポットを示しており、ガラス表面に Au コロイドが存在することが示されたが、実施例 3 のナノ粒子ストレプトアビジンプローブでは、認識できる銀色染色は示されなかった (図 5 3)。シグナルの差は、銀色染色したスライドに第 2 の DNA 修飾ナノ粒子を載せてそれを再染色することにより高めることができた。これにより、本発明のナノ粒子-オリゴヌクレオチド-sbp 共役体が、市販の Au コロイド/ストレプトアビジン共役体よりも非特異的結合に対して抵抗性があることが実証される。

【0451】

実施例 28 : ナノ粒子アセンブリの調製

本明細書に論じたように、特異的結合対メンバー、例えば受容体又はリガンドは、オリゴヌクレオチドにより機能化され、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子に固定化されて、DNA よりむしろ特異的結合対メンバーが指向する分子認識特性を備える以外に、オリゴヌクレオチド修飾粒子の高度安定性を呈する新しい分類のハイブリッド粒子を生成することができる。或いは、受容体修飾オリゴヌクレオチドを備えた多重受容体結合部位を有するタンパク質を機能化し、それにより我々の本来の材料の組立スキームにおいて、タンパク質受容体複合体を無機ナノ粒子の 1 つの代わりに部分構造の 1 つとして用いることができる。この実施例において、我々は、13 nm 金ナノ粒子、ストレプトアビジン、及びビオチン化 DNA を用いて、新しいナノ粒子アセンブリ (図 5 2) を調製して、得られた新しい生物無機材料の物理的及び化学的特性の幾つかを研究する。

【0452】

(a) 実験

オリゴヌクレオチド修飾 13 nm Au 粒子 (2-Au) 及びリンカー DNA (3) を調製するための方法は、他の文献で報告されている。これらの共役体を調製するために用いるオリゴヌクレオチド修飾因子は、以下の配列を有する: 5' SH(CH₂)₆-A₁₀-CGCATTCAGGAT3'。リンカー DNA (3) は、以下の配列を有する: [5' TACGAGTTGAGAAATCCTGATTGCG3']。J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 1998 年, 第 120 巻, 1959 ページを参照されたい。Au 粒子 (2-Au) 及びリンカー DNA (3) は、使用の前に 0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7、0.3 M PBS) に保存した。ビオチン修飾 DNA (2) は、ビオチン TEG CPG 支持体 (グレン・リサーチ社 (Glen Research)) を用いて合成し、文献の方法により精製した。J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 1998 年, 第 120 巻, 1959 ページ; T. Brown, D. J. S. Brown, in Oligonucleotides and Analogues (F. Eckstein 編集), Oxford University Press, New York, 1991 年を参照されたい。ストレプトアビジンは、シグマ社 (Sigma) から購入し、20 mM Tris 緩衝液 (30 M、pH 7.2) に溶解した。ストレプトアビジン/DNA 共役体 (1-STV) を作製するために、ストレプトアビジンを 20 mM Tris (pH 7.2)、0.2 mM EDTA 緩衝液中の 8 当量のビオチン-オリゴヌクレオチド共役体 1 と攪拌器にて室温で 2 時間反応させた。ビオチン-オリゴヌクレオチド共役体は、配列 [3-ビオチン-TEG-A₁₀-ATGCTCAACTCT5'] を有している。DNA に対するストレプトアビジンの割合が異なる混合物 (1:0.4、1:1、1:4) も、HPLC 分析のために調製した。ストレプトアビジン/DNA 共役体は、20 mM Tris (pH 7.2) 及び 0.5 %/分 勾配の 20 mM Tris、1 M NaCl による流

速 1 mL/分のイオン交換 HPLC で過剰の DNA から分離しながら、260 nm 及び 280 nm で DNA の UV シグナルをモニタリングした。1:0.4 ストレプトアビジン/DNA 混合物は、45 分、56 分に 2 つのピークを、1:1 混合物は 45 分、56 分、67 分、及び 71 分に、それぞれ 1:1、2:1、3:1、及び 4:1 オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン複合体に対応する 4 つのピークを示した。1:4 混合物は、3 番目のピーク (67 分) 及び 4 番目のピーク (71 分) の強度が増大することを除けば、同様の位置に 4 つのピークを示した。1:8 ストレプトアビジン/DNA 混合物の HPLC スペクトルは、2 つの主なピーク、つまり 1 つは 59 分の未反応の DNA のもの、もう一方は 71 分の 4:1 オリゴヌクレオチド-ストレプトアビジン複合体のものを示した。加えて、3:1 複合体にあたる 67 分のショルダーも存在した。精製したストレプトアビジン-ビオチン化 DNA 共役体は、濃縮して、限外濾過 (セントリコン 30) により 0.3 M PBS に分散させた。TEM、熱変性実験、及び SAXS 測定用の凝集体は、ストレプトアビジン-オリゴヌクレオチド共役体 (1-STV)、金ナノ粒子 DNA 共役体 (2-Au)、及びリンカー DNA (3) を含有する溶液をドライアイス中で 10 分間凍結することにより調製し、測定する前に解凍して、ハイブリダイゼーションを促進させた。

10

【0453】

(b) 結果

本明細書に報告したナノ粒子/タンパク質アセンブリ (図 52) は、3 つの部分構造: 4 つのビオチン化オリゴヌクレオチドに複合化したストレプトアビジン (1-STV) と、オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子 (2-Au) と、1 に相補的な配列の半分及び 2 に相補的なもう半分を有するリンカーオリゴヌクレオチド (3) とに依存する (図 52 参照)。典型的な実験において、リンカー DNA 3 (10 M、21 L) を、2-Au (9.7 nM、260 L) と 1-STV (1.8 M、27 L) の混合物に導入するか、或いはリンカー DNA 3 (10 M、21 L) を、1-STV (1.8 M、27 L) と予備混合し、その後混合物を 0.3 M PBS 中の 2-Au (9.7 nM、260 L) に添加した。同等の特性を備えた凝集体が、両方の方法から形成し得るが、3 及び 1-STV の予備混合は、凝集体の形成を促進する。13 nm 金ナノ粒子は、ストレプトアビジン (4 nm x 4 nm x 5 nm) よりも実質的に大きいため [P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, Science, 1989 年, 第 243 巻, 85 ページ; N. M. Green, Methods Enzymol. 1990 年, 第 184 巻, 51 ページ]、ストレプトアビジンに対する Au ナノ粒子のモル比 1:20 を利用して、数個のナノ粒子を含む小さな凝集体より、又はストレプトアビジンのハイブリダイズされた層に機能化された単一の金ナノ粒子からなる構造よりどちらかといえば伸長した高分子構造の形成を好適化した。

20

30

【0454】

興味深いことに、室温では、1-STV、2-Au、及び 3 を混合した場合、1-STV、2-Au、及び 3 を含有する溶液の UV-vis スペクトルが安定していることが示すように、3 日後でも観察可能な粒子の凝集は起こらない。しかし、溶液の温度 (53 °C) を DNA 相互連結の融点 (T_m) 未満で 2、3 °C 上昇させると、ミリサイズの凝集体の成長 (図 57A) と、粒子アセンブリに関連する Au プラズモン共鳴の特徴的な赤色のシフト及び低下とがもたらされた。C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, Nature 1996 年, 第 382 巻, 607 ページを参照されたい。透過電子顕微鏡 (TEM) 像 (図 57B) は、凝集体内の粒子がアニーリングの前後にその物理的形状を保持していることを示していることから、粒子の融合がないことが示され、更に表面オリゴヌクレオチド層の安定した影響が実証される。粒子アセンブリを開始するための熱活性化の要件は、過去に研究されたシステム (図 52b) とは相反しており、過去のシステムは、非常に類似した条件下でオリゴヌクレオチド修飾金粒子が室温でリンカー DNA を加えると数分以内に凝集体内に組込まれる 2 つの金ナノ粒子共役体を含んでいる。C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, Nature 1996 年, 第

40

50

382 巻, 607 ページを参照されたい。この特徴は、：(1) Au ナノ粒子上の DNA 被覆 (DNA : 粒子 = ~110 : 1) に比べストレプトアビジン上のもの (DNA : ストレプトアビジン = 4 : 1) が比較的少ないことによる、Au-STV アセンブリシステム内の低い衝突確率 [L. M. Demer, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, Anal. Chem. 2000 年, 第 72 巻, 5535 ページを参照]、又は (2) 単一ストレプトアビジン上の DNA のほとんど又は全てが単一粒子上の DNA に結合する動力学的構造の初期形成、を原因とする可能性がある。凝集体形成は、溶液の凍結だけでなく加熱により促進することができる。R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, Science 1997 年, 第 277 巻, 1078 ページを参照されたい。

10

【0455】

UV-vis 分光光学に基づいた融解実験を、ストレプトアビジン／ナノ粒子凝集体で実施し、それらが DNA ハイブリダイゼーションにより形成されることが確認された (図 58 A)。加熱すると、520 nm での吸光度が最初に低下し、その結果融解曲線が一時的に下降し、その後 DNA 融解が起こり粒子が分散すると、その吸光度が急激に上昇する。この一時的下降という挙動は、純粋な金ナノ粒子システムで観察され、融解の前の凝集体成長、つまりある種の凝集体の「熟成」に起因させた。J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, G. C. Schatz, J. Am. Chem. Soc. 2000 年, 第 122 巻, 4640 ページを参照されたい。融解の後、Au プラズモン共鳴が 520 nm に集中し、それは分散した 13 nm ナノ粒子の特徴である。これらの実験により、結果的に、非特異的相互作用よりむしろ配列特異性ハイブリダイゼーションが、粒子／タンパク質アセンブリを実行すること、及びその工程が完全に可逆的であることが実証される。

20

【0456】

Au ナノ粒子／タンパク質アセンブリは、ハイブリダイゼーション誘導性アセンブリとは逆に、ストレプトアビジン／ビオチン相互作用によっても形成することができる。例えば、典型的な実験において、1 (0.24 mM、1.3 L)、3 (10 M、32 L)、及び 2-修飾ナノ粒子 (Au ナノ粒子濃度 : 9.7 nM、260 L) を、0.3 M PBS 緩衝液中で混合して、ビオチン修飾 Au 粒子を生成した。この混合物を 60 °C に 10 分間加熱し、その後室温に冷却して、ハイブリダイゼーションを促進させた。24 時間後に、1、3、及び 2-修飾 Au ナノ粒子を含有する溶液を、0.3 M PBS 中のストレプトアビジン (10 M、4.2 L) に添加し、50 °C に加熱して、ナノ粒子凝集体を形成した。溶液の色は、凝集体の形成を示す紫色に変化し、溶液温度を T_m (65 °C) を超えて上昇させることにより、凝集体を 2-修飾 Au 粒子、1-修飾ストレプトアビジン、及び 3 に解体することができた。小角 X 線散乱 (SAXS) [S. J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kanneur, R. L. Letsinger, Angew. Chem. Int. Ed. 2000 年, 第 39 巻, 3845 ページ; A. Guinier, F. G., Small Angle Scattering of X-rays, Wiley, New York, 1995 年; B. A. Korgel, D. Fitzmaurice, Phys. Rev. B 1999 年, 第 59 巻, 14191 ページ] のデータを、Au 及びストレプトアビジン部分構造 (1-STV、2-Au) と 2 つの異なる長さの DNA リンカー (24 量体 (3) 及び 48 量体) とから形成した凝集体について回収し、Au-Au アセンブリ及び同様の連結オリゴヌクレオチド (2-Au、4-Au、24 量体リンカー (3)、48 量体リンカー) を基にした凝集体のものと比較した (図 59)。48 量体リンカーは、：1 及び 2 に相補的な 12 量体の付着末端を含有する 5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCAATCCTGAATGCG 及び 3' GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT からなる 2 本鎖であった (2 本鎖領域は下線で示す)

30

40

50

。SAXS実験を設計するために、上記実験で用いられ、DNAハイブリダイゼーションでより高い接近容易性を提供した1, 2, 及び4のA₁₀スパーサ [L. M. Demer, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, Anal. Chem. 2000年, 第72巻, 5535ページを参照] を除去して、より強固なシステムを生成した。DNAにより連結された凝集体は、比較的明確な回折ピークを示し、Au-STV凝集体は、同じリンカーから形成されたAu-Au凝集体よりも小さなs値で回折ピークを呈した。これは、Au-STVシステムでのAu粒子間距離がより大きいことを示唆している。その上、Au-Au及びAu-STVアセンブリの両方でリンカーとして24量体 DNAの代わりに48量体 DNAを用いた場合、回折ピークはより小さなs値にシフトする。 10

【0457】

対距離分布関数 (pair distance distribution function) (PDDF) である $g(r)$ を、方程式 (1) (式中、 $q = (4/\lambda) \sin(\theta/2)$ で、粒子数密度である) を用いて、SAXSパターンから計算した [A. Guinier, F. G., Small Angle Scattering of X-rays, Wiley, New York, 1955年; B. A. Korgel, D. Fitzmaurice, Phys. Rev. B 1999年, 第59巻, 14191ページ]。

【0458】

$g(r) = 1 + (1/2B^2 \Delta r) \int q (s(q) - 1) \sin(qr) dq$ 方程式 (1) 20

ここで、 $g(r)$ は、第2の粒子を選択された粒子からの距離 r の関数として見出す確率を示している。PDDFから得られた最も近い近接Au粒子間距離 (中心から中心までの距離) は、24量体連結Au-Au、48量体連結Au-Au、24量体連結Au-STV、及び48量体連結Au-STVアセンブリで、それぞれ19.3 nm、25.4 nm、28.7 nm、及び40.0 nmである。Au-STVシステムとAu-Auシステムの粒子間距離を比較すると、Au-STVアセンブリが予測されたAuナノ粒子/ストレプトアビジン周期性を有し、2つの成分 (Auナノ粒子及びストレプトアビジン) が、強固なDNA 2本鎖リンカーにより十分に分離されることが明瞭に示される。

【0459】

(c) 結論

この研究は、以下の理由により重要である。1) DNA依存性ナノ粒子アセンブリ (組立法 (DNA-directed nanoparticle assembly method) が、これまで研究された無機ナノ粒子に加えて、タンパク質の構造にまで拡張できることが実証される。実際にこれは、Auナノ粒子の可逆的なDNA依存性アセンブリと、DNAにより機能化されたタンパク質性構造とを実証する最初の報告である。2) ストレプトアビジンをはじめとする多くのタンパク質が、コロイド金の表面に吸着し、強力に結合した複合体を形成することは周知である。我々の実験は、ナノ粒子表面の高密度DNA層の安定した影響と、ハイブリダイゼーションを行わない場合のストレプトアビジン吸着への抵抗性を実証している。それ故、それらは、タンパク質の活性を実質的に乱さないような方法で、非常に特異的な相互作用によりナノ粒子表面のタンパク質構造を特異的に固定化する方法に向かうものである。表面に吸着されたタンパク質を備えた粒子は、免疫化学において重要な役割を演じ [M. A. Hayat, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications, Academic Press, San Diego, 1991年]、タンパク質がナノ粒子表面と直接相互作用する安定したタンパク質/粒子共役体の開発により、組織化学的研究及び免疫検査のための改良ナノ粒子プローブが誘導され得る。 40

【0460】

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。

10

【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DNA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。

20

【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。

【図 6 A】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—連結DNAの T_m を超える 80°C ；デハイブリダイズ（熱変性）した。色は暗赤色。

30

【図 6 B】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—リンカーDNAの T_m 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、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。

40

【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°C ）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

50

いる。

【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 (T E M) 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 T E M 画像である。

【図 9 B】透過型電子顕微鏡 (T E M) 画像。結合したナノ粒子の順序づけ (o r d e r i n g) を示す二次元凝集体の T E M 画像である。

【図 1 0】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 1 0 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 1 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 1 1 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。

【図 1 2 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 1 2 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。

【図 1 2 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 1 2 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。

【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 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 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 D N A (検体 D N A) 検出系を示す略図である。

【図 1 3 B】ナノ粒子および透明基板を用いた D N A (検体 D N A) 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13B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14B】温度の増大(融解する)に従った、図14A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15A】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15B】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15C】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15D】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15E】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15F】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はチオールキルリンカーを表す。

【図15G】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はチオールキルリンカーを表す。

【図16A】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はチオールキルリンカーを表す。

【図16B】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はチオールキルリンカーを表す。

【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はチオールキルリンカーを表す。

【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。

【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17D】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17E】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。 20

【図19A】金ナノ粒子ー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。

【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。 30

【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ー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。

【図23】炭疽菌保護抗原（実施例12参照）用アッセイに利用される材料の配列。

【図24】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。 40

【図25A】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25B】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。 50

【図26】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27A】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。

【図27B】「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。

10

【図27C】ハイブリッド金/QD集合体の一部の高分解像度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。

【図27D】「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28A】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。

20

【図28B】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28C】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28D】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28E】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29】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(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30】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。

40

【図31】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32】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33】平台型スキャナを用いて得た、7mm×13mm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) 10nMの標的DNAと5nM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

50

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34】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。 10

【図35A】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。

【図35B】ナノ粒子で標識した標的(図35B)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35A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35A)および吸光度(図35B)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35A): 相補体(69%) / 誤対合(38%) = 1.8:1。吸光度(図35B): 相補体(85%) / 誤対合(14%) = 6:1。発蛍光団標識曲線(図35A)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)。 20

【図36A】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。 30

【図36B】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36A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36Aに関しては9:37:9:11、図36Bに関しては3:62:7:34である。

【図37】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38A】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37参照)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。 40

【図38B】層の数の増大に伴うナノ粒子集合体(図38A参照)の λ_{max} での吸光度のグラフ。

【図39A】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- 50

SEM。このスライドの可視吸光度スペクトルは、図38A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39B】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39C】0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液(pH7)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35A参照)の0.5 μM 溶液の解離を示す260nm(A_{260})の吸光度。

【図39D】0.3M NaCl、10mM 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260nm(A_{260})の吸光度。 10

【図39E】0.3M NaCl、10mM 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260nm(A_{260})の吸光度。

【図39F】0.3M NaCl、10mM 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260nm(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520nm(A_{520})での吸光度を測定して融解プロファイルを得た。図39D-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39Cの挿入図)13.2 $^{\circ}\text{C}$ 、(図39Dの挿入図)5.6 $^{\circ}\text{C}$ 、(図39Eの挿入図)3.2 $^{\circ}\text{C}$ 、(図39Fの挿入図)2.9 $^{\circ}\text{C}$ であった。 20

【図40】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41】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42】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。 30

【図43】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44】実施例24に説明したオリゴヌクレオチド環式ジスルフィド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45】実施例25に記述した構造を示す略図。図45(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、Trembler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。 40

【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47】高密度オリゴヌクレオチドナノ粒子共役体I、オリゴヌクレオチドタンパク質共役体1、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-タンパク質共役体II、及びプローブターゲット複合体IIIの略図。オリゴヌクレオチド共役体Iは、共役体Iに結合したオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有している。プローブIIは、タンパク質のための代表的プローブである。複合体IIIは、タンパク質ターゲットとプローブに結合したタンパク質との特異的結合相互作用からもたらされる。

【図48】特異的タンパク質を、ガラス表面に固定化した異なるタンパク質のアレイ中で検出する際のプローブIIの適用例の略図。金ナノ粒子は、視覚的に、或いは銀染色に 50

より認識することができる。蛍光ナノ粒子は、それらの蛍光により認識することができる。この図に示すように、ガラスプレートは、表面に固定化した3種の異なるタンパク質を示しており、そのうち1種は、プローブ I I でタンパク質に結合する。段階 1 において、そのプレートをプローブ I I を含有する溶液に暴露する。段階 2 において、非結合のプローブ I I を洗い流す。段階 3 において、その一連のタンパク質のうち第 1 のタンパク質が占める部位の結合したナノ粒子 (I V) の存在を観察する。

【図 4 9】ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドー受容体プローブ (I I') の略図、及び特異的ターゲットを、滑面に固定化した物質のアレイで検出する際の適用例の略図。認識受容体ユニット (ターゲットに相補的な特異的結合) は、A と呼称し、ターゲットは B と称する。

10

【図 5 0】(a) 受容体 (R) に連結したオリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドに相補的であり、ナノ粒子共役体が、受容体に結合したオリゴヌクレオチドに、ハイブリダイゼーションにより結合することを示すナノ粒子ーオリゴヌクレオチドー受容体プローブ (I I) の略図、及び (b) 受容体 (R) に連結するオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションの結果、連結オリゴヌクレオチドの第 1 部分に結合し、ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションの結果、連結オリゴヌクレオチドの第 2 部分に結合することを示すナノ粒子ーオリゴヌクレオチドー受容体プローブ (I I) の略図。簡略化のために、オリゴヌクレオチドーナノ粒子共役体に結合したオリゴヌクレオチドータンパク質共役体を 1 種のみ示しているが、実際の数はいくつもある。

20

【図 5 1 A】特異的ターゲット、例えば薬物又はタンパク質を、ガラス表面に固定化した異なる薬物又はタンパク質のアレイで検出する際のプローブ (図 5 0 b) の適用例の略図。

【図 5 1 B】特異的ターゲットを、異なる分子の混合物を有する細胞で検出する際のプローブ図 5 0 b の適用例の略図。図 5 1 A, B において、プローブは、検体、例えばタンパク質又は薬物が多重結合部位を有する場合も、スポットテストにおいて用いることができる。

【図 5 2】結合したオリゴヌクレオチド 1、ナノ粒子オリゴヌクレオチド共役体 2、及びターゲット核酸 3 を有するビオチン分子に結合したストレプトアビジンの複合体のハイブリダイゼーション。

30

【図 5 2 B】ある種のナノ粒子のオリゴヌクレオチドを第 2 の種のナノ粒子とハイブリダイゼーションさせることによる金ナノ粒子アセンブリ。

【図 5 2 C】ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに各ビオチン分子が結合するような 4 種のビオチン分子に特異的に結合したアビジンの複合体のハイブリダイゼーションによる金ナノ粒子アセンブリ、の結果形成した 3 次元金ナノ粒子ーストレプトアビジンアセンブリ又は凝集体の略図。図 5 2 A ~ B の 3 例全てにおいて、凝集体が形成すると、溶液の色が赤色から紫色又は青灰色に変化した。

【図 5 3】本発明の金ナノ粒子／オリゴヌクレオチド／ストレプトアビジン共役体 (左) 及び市販の金コロイド／ストレプトアビジン共役体 (右) の非特異的結合テスト (実施例 2 7) を示す写真。市販の共役体は、灰色のスポットを示し、その共役体がガラス表面に

40

接着していることが示されたが、本発明の共役体は、有意な銀染色を示さなかった。

【図 5 4】表面に結合したビオチンへの金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドーストレプトアビジン共役体の結合の略図。ビオチンは、支持体表面に結合したオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに連結し、オリゴヌクレオチドービオチン共役体は、表面に結合したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。

【図 5 5】リンカーをタンパク質のための DNA 受容体として用いるタンパク質検出方法の略図。図示するように、結合した受容体 DNA を有するナノ粒子ーオリゴヌクレオチドービオチン共役体は、ストレプトアビジンを付加すると、3 次元ナノ粒子アセンブリを形成する。その凝集体は、その後単離され、デハイブリダイゼーションに付されて、ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体と、結合するオリゴヌクレオチドを有するビオチン分子に

50

結合するストレプトアビジンの複合体と、その受容体とを遊離する。そのタンパク質は、DNAチップの使用をはじめとする従来法での受容体DNAの同定により検出される。

【図56】(a)オリゴヌクレオチドに連結した単一のビオチンに結合するストレプトアビジン(ビオチンに結合したオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションの結果、リンカーオリゴヌクレオチドの第1部分に更に結合する)、及び(b)結合するオリゴヌクレオチドを有する金ナノ粒子(ナノ粒子に結合したそのオリゴヌクレオチドは、リンカーオリゴヌクレオチドの第2部分に相補的な配列を有する)、からの金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチドーストレプトアビジン共役体の調製(実施例26)を示す略図。

【図57】(a)ストレプトアビジンーオリゴヌクレオチド共役体(1-STV)、13nmの金粒子(2-Au)、及びリンカーDNA(3)の溶液を53℃に加熱すると凝集体を形成すること、及び(b)アニーリングの前後に凝集体内の粒子がそれらの物理的形状を残していること、を示す透過電子顕微鏡(TEM)像(実施例28)は、粒子の融合がないことを示しており、更に表面オリゴヌクレオチド層の安定した影響を実証している。

10

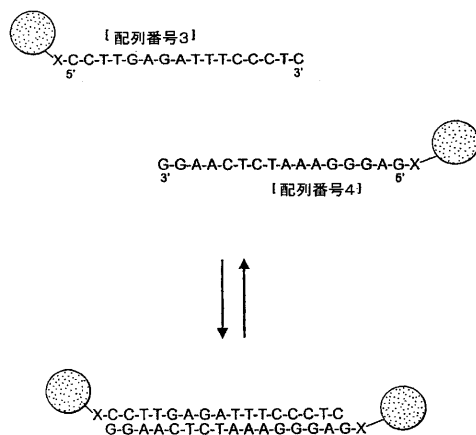
【図58A】温度の関数としての融解曲線により、ストレプトアビジンーナノ粒子凝集体が非特異的相互作用ではなくDNAハイブリダイゼーション相互作用により形成し、その工程が可逆的であることが確認される。実施例28を参照されたい。

【図58B】波長の関数としての融解曲線により、ストレプトアビジンーナノ粒子凝集体が非特異的相互作用ではなくDNAハイブリダイゼーション相互作用により形成し、その工程が可逆的であることが確認される。実施例28を参照されたい。

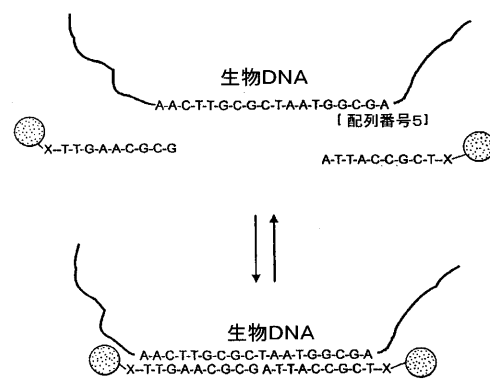
20

【図59】実施例28に記載するような様々な凝集体の様々な粒子間距離を示す小角X線散乱回折パターン。

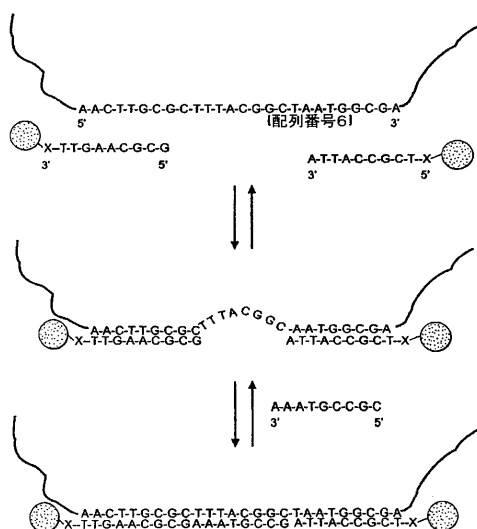
【図1】



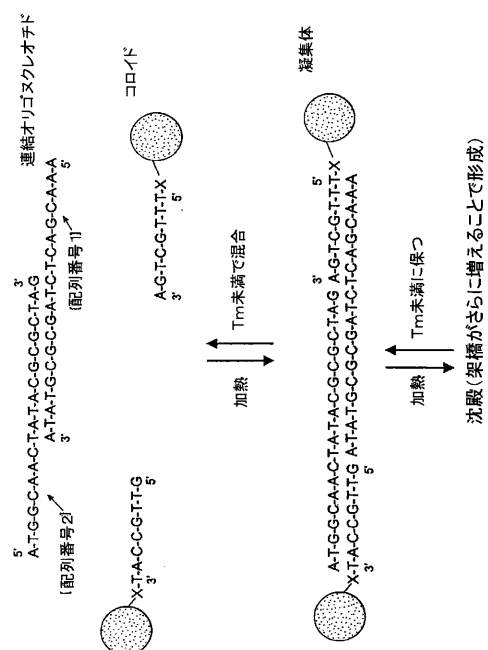
【図2】



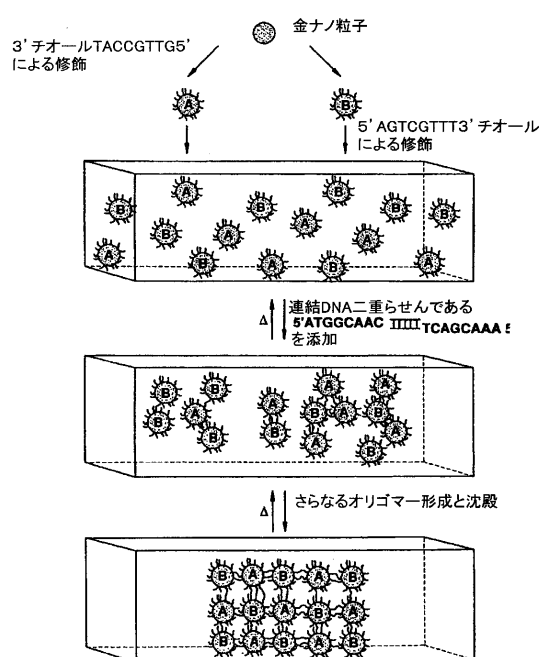
【図 3】



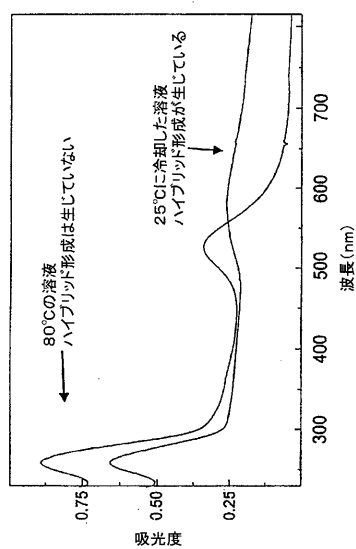
【図 4】



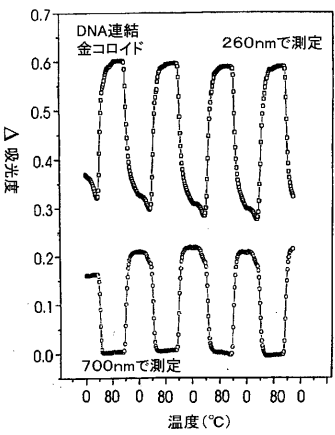
【図 5】



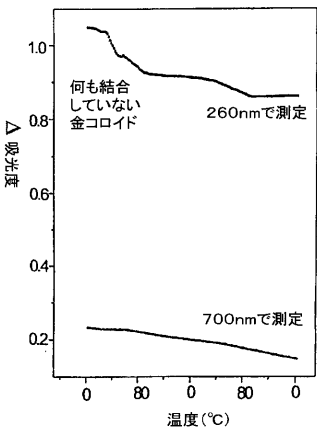
【図 7】



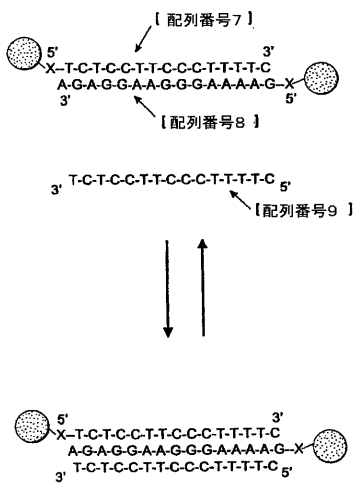
【図 8 A】



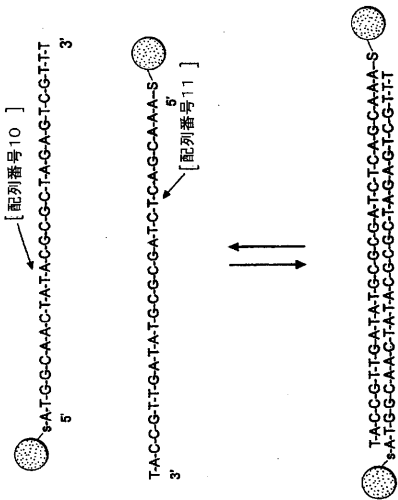
【図 8 B】



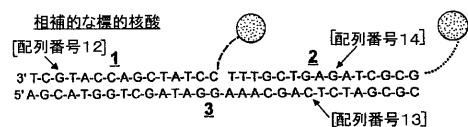
【図 1 0】



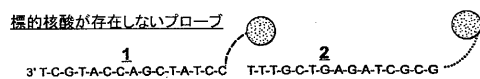
【図 1 1】



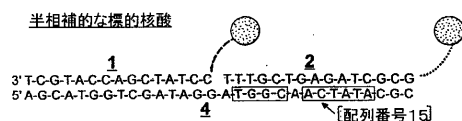
【图 1 2 A】



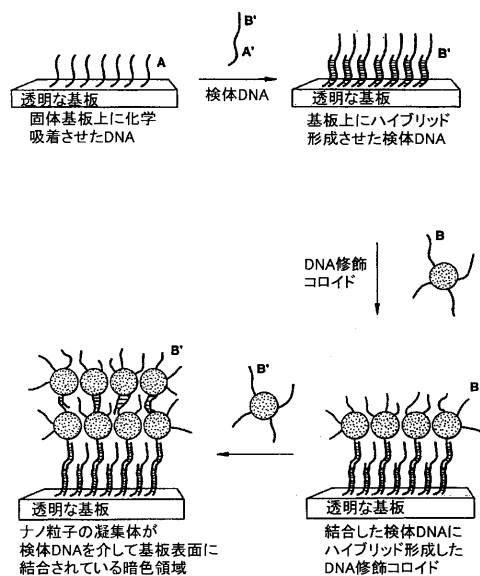
【 ㄨ 1 2 B 】



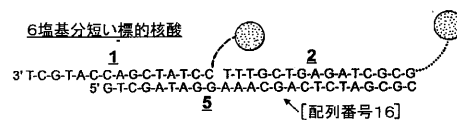
【☒ 1 2 C】



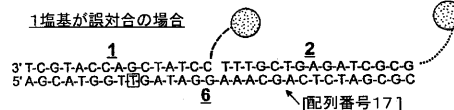
【图 1 3 A】



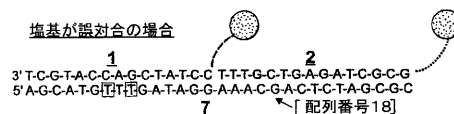
【图 1 2 D】



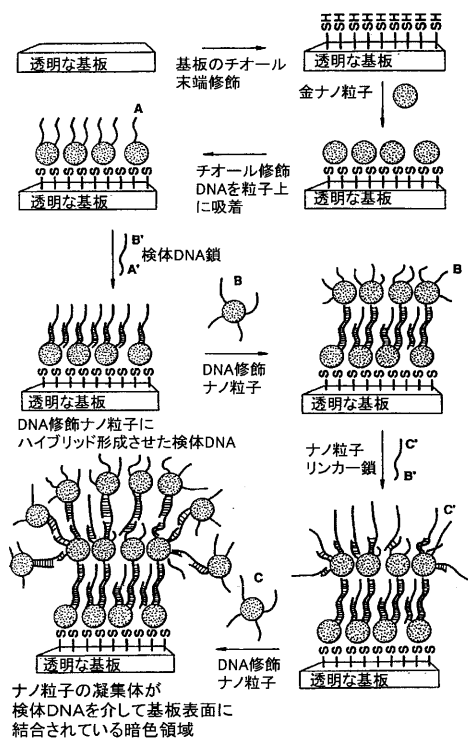
【図 1 2 E】



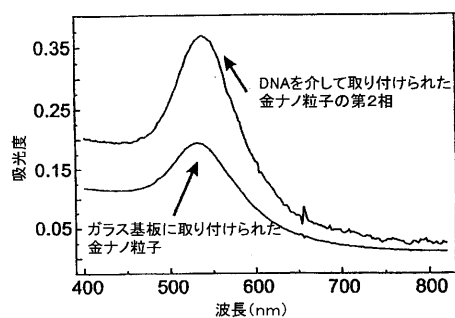
【图 12 F】



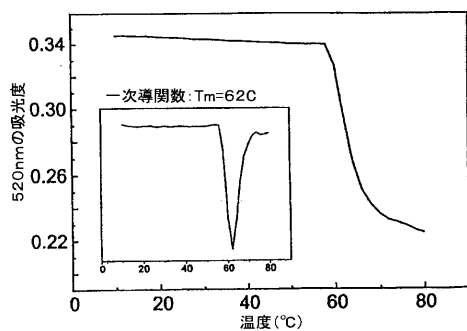
【 1 3 B】



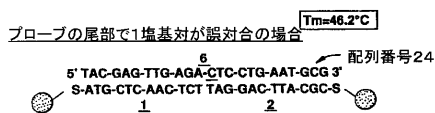
【図 1 4 A】



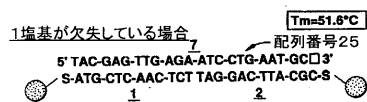
【図 1 4 B】



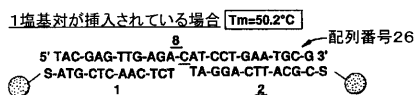
【図 1 5 E】



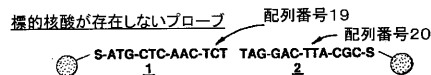
【図 1 5 F】



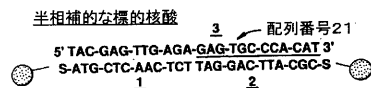
【図 1 5 G】



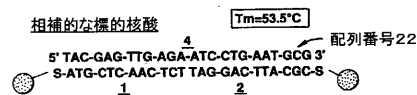
【図 1 5 A】



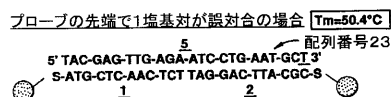
【図 1 5 B】



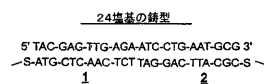
【図 1 5 C】



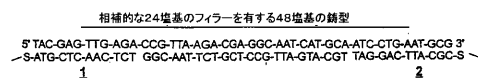
【図 1 5 D】



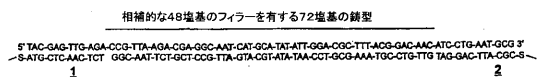
【図 1 6 A】



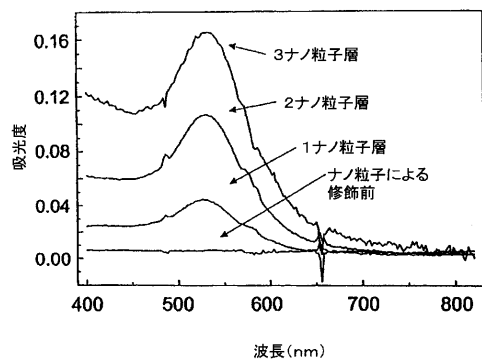
【図 1 6 B】



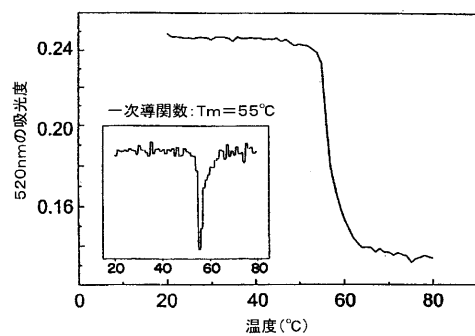
【図 1 6 C】



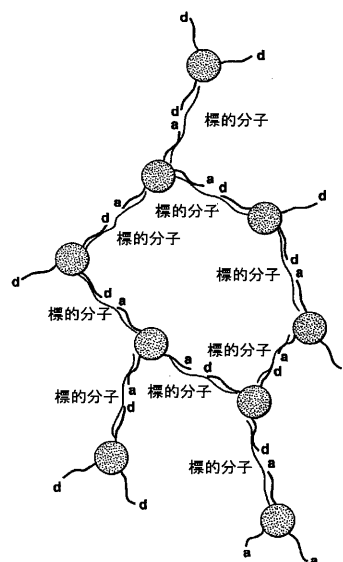
【図 19 A】



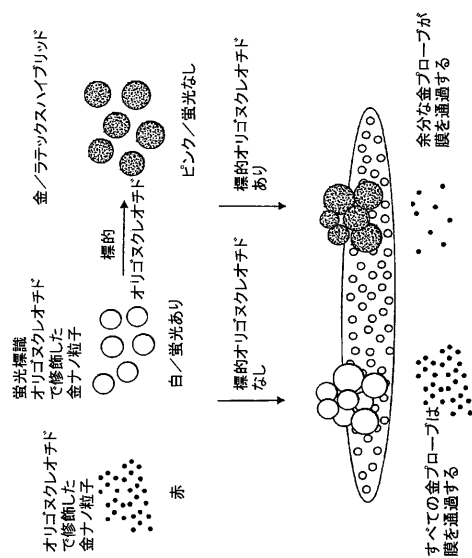
【図 19 B】



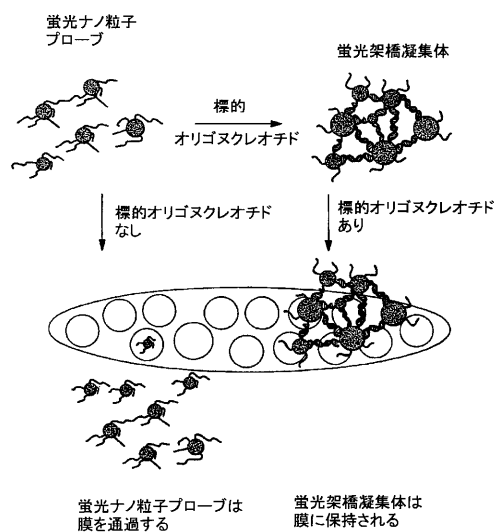
【図 20 B】



【図 21】



【図 22】



【図 2 3】

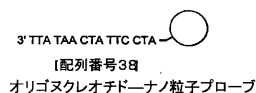
炭疽菌PCR産物

5' GCG GAT GAG TCA GTA GTT AAG GAG GCT CAT AGA GAA GTA ATT AAT
3' 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'

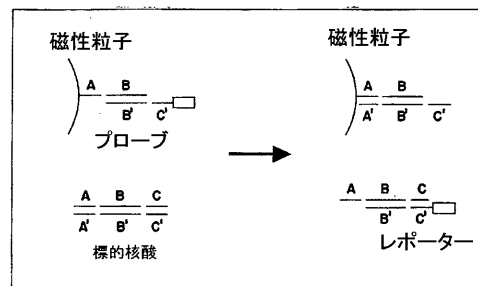
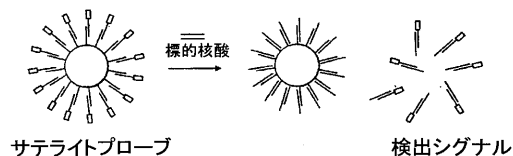
141mer炭疽菌PCR産物[配列番号36]



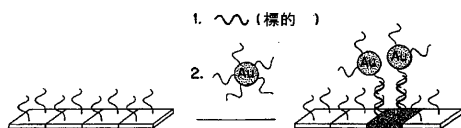
ブロッカー—オリゴヌクレオチド

3' C CGC CTA CTC AGT CAT CAA TTC CTC CGA GT [配列番号39]
3' A TCT CTT CAT TAA TTA AGC AGT TGT [配列番号40]
3' TAT TCT TTT TAT AAT AGG TCC CAA TAT [配列番号41]
3' AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA [配列番号42]

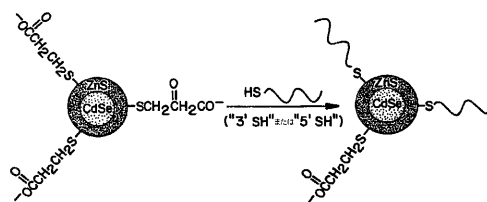
【図 2 4】



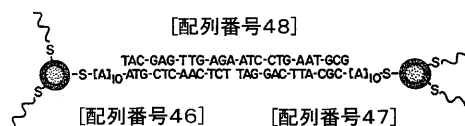
【図 2 5 A】



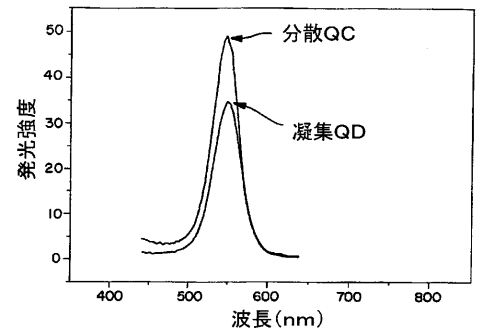
【図 2 6 A】



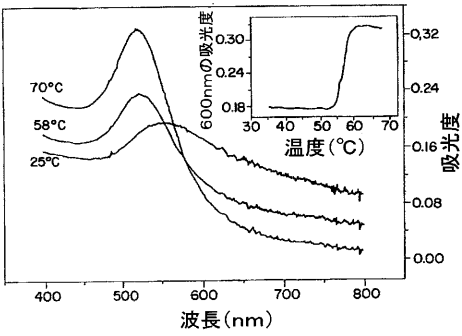
【図 2 6 B】



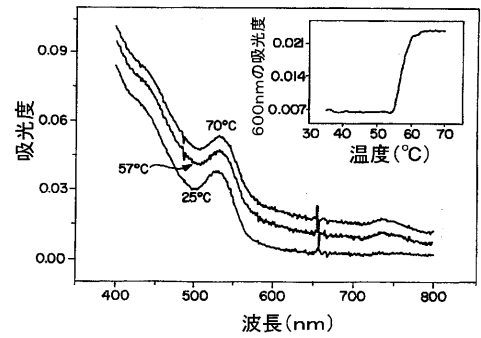
【図 2 7 A】



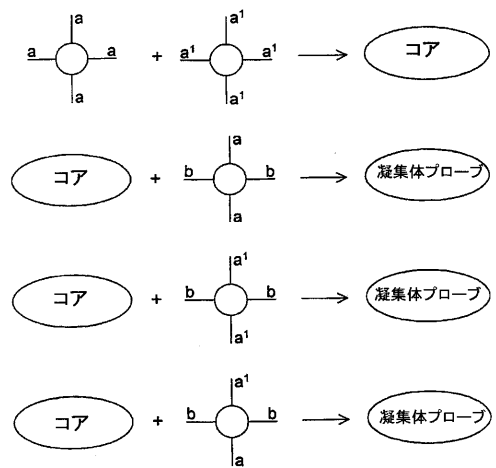
【図 2 7 D】



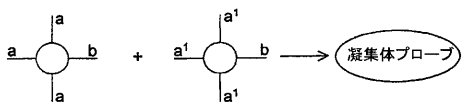
【図 2 7 B】



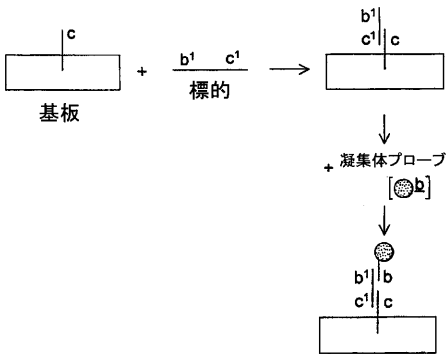
【図 2 8 A】



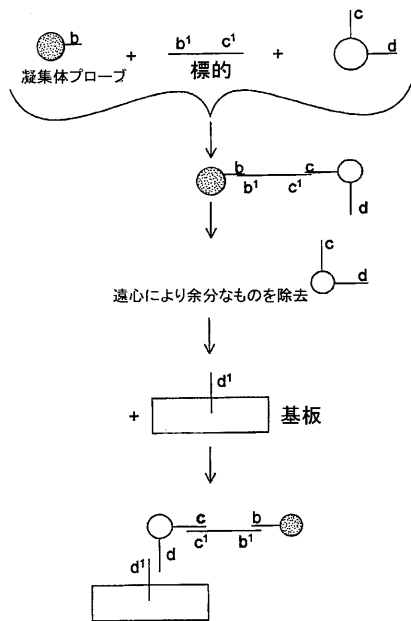
【図 2 8 B】



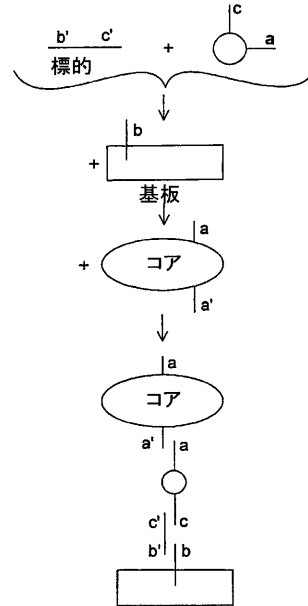
【図 2 8 C】



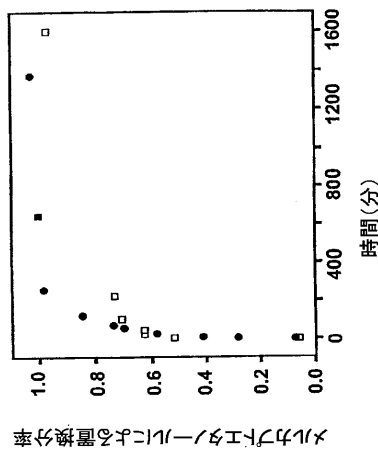
【図 2 8 D】



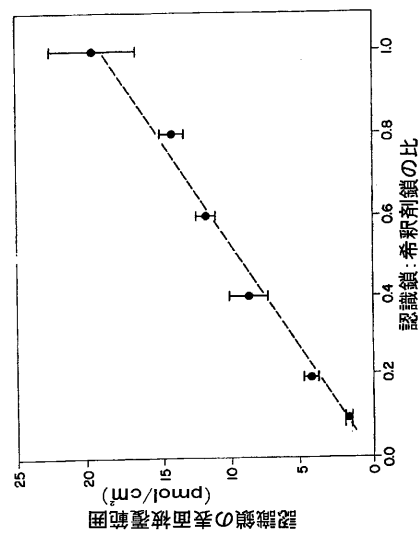
【図 2 8 E】



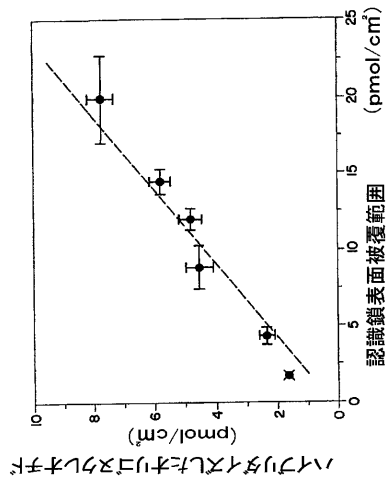
【図 2 9】



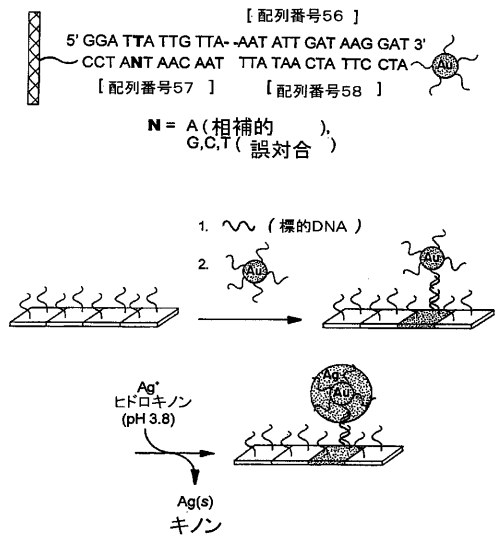
【図 3 0】



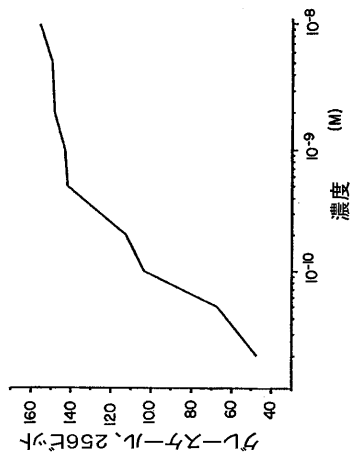
【図 3 1】



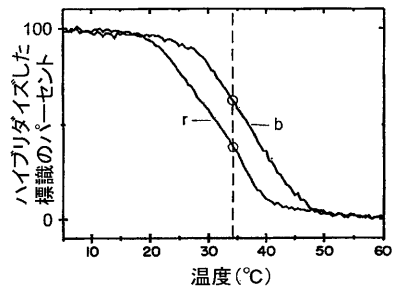
【図 3 2】



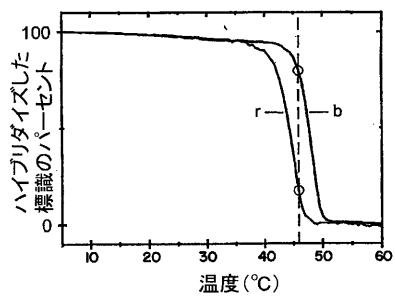
【図 3 4】



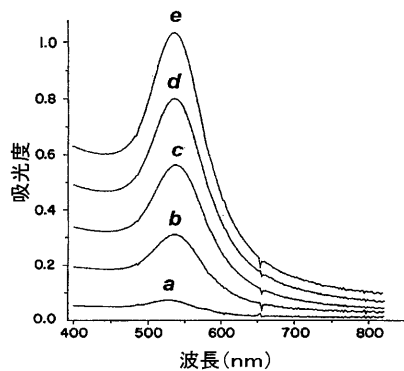
【図 3 5 A】



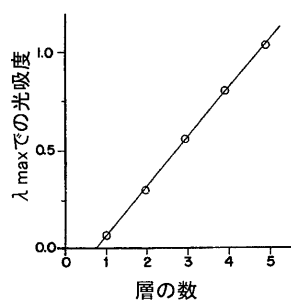
【図 3 5 B】



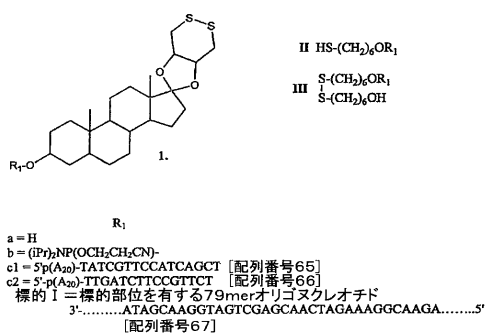
【図 38 A】



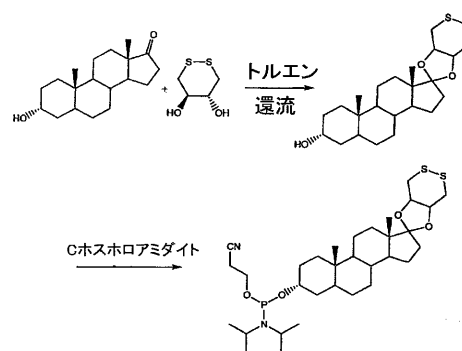
【図 38 B】



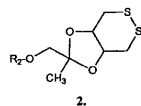
【図 42】



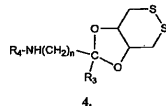
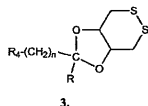
【図 43】



【図 4 4】



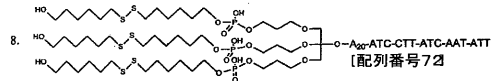
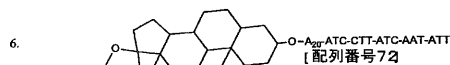
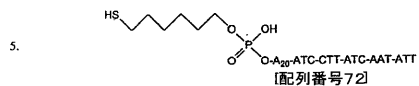
R_2
 $a = H$
 $b = (IPr)_2NP(OCH_2CH_2CN)-$
 $c1 = 5'-p(A_{20})-GCAGACCTCA$ [配列番号68]
 $c2 = 5'-p(A_{20})-CCTATGTGTCG$ [配列番号69]
 $D = 5'-p(A_{20})$ [配列番号70]
 標的 I = 標的部位を備えた63merオリゴヌクレオチド
 $3'-\dots CGTCTGGAGTGGATACACAGC \dots 5'$
 [配列番号71]



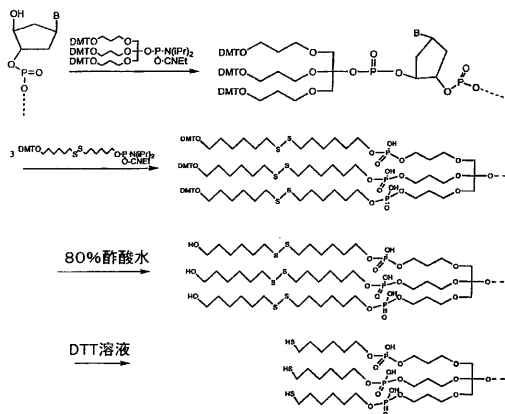
$R_3 =$ 水素、アルキル基、アリル基、または置換アルキルまたはアリル基

$R_4 =$ 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

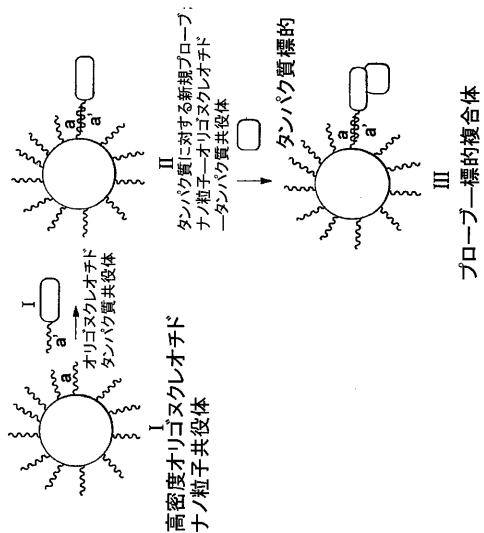
【図 4 5】



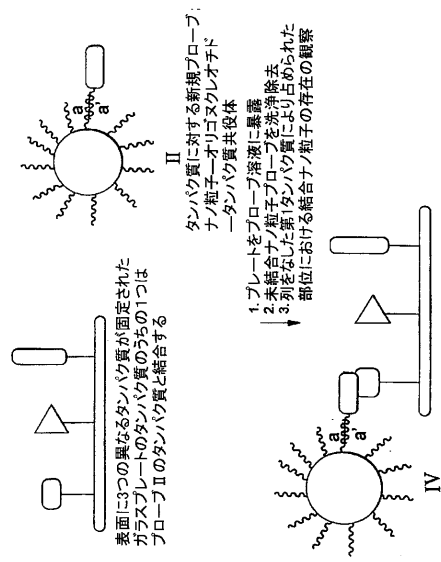
【図 4 6】



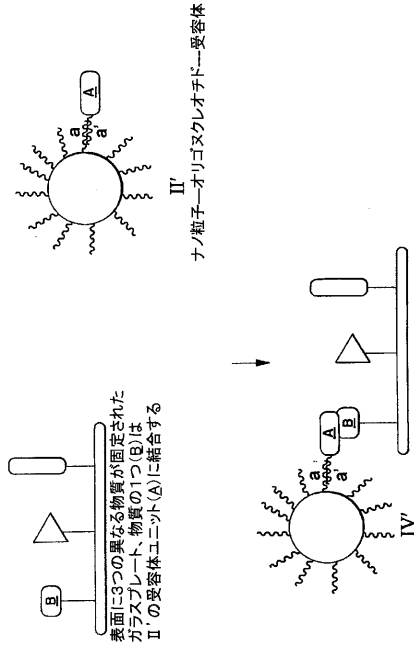
【図 4 7】



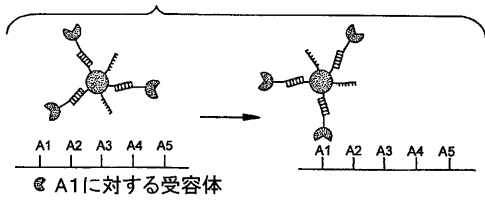
【図 4 8】



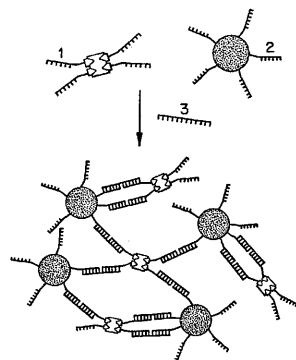
【図 4 9】



【図 5 1 A】

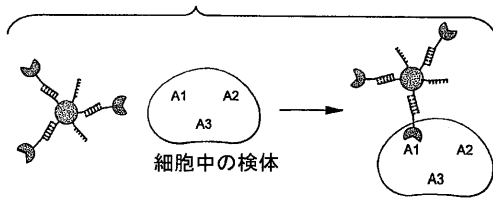


【図 5 2 A】

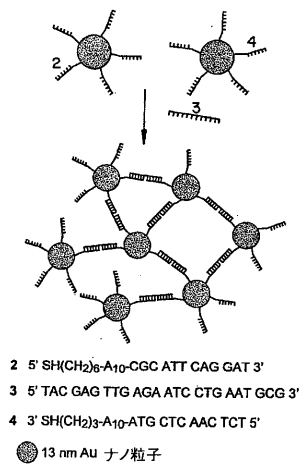


1 3' biotin-TEG-A10-ATG CTC AAC TCT 5' [配列番号73]
2 5' SH(CH₂)₆-A10-CGC ATT CAG GAT 3' [配列番号74]
3 5' TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG 3' [配列番号75]
● 13 nm Au ナノ粒子 ☒ ストレプトアビジン

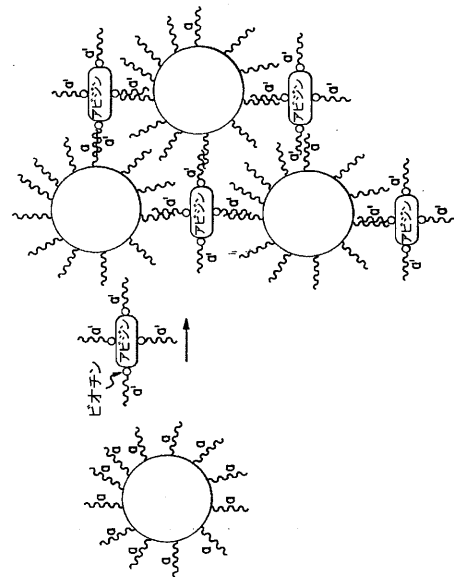
【図 5 1 B】



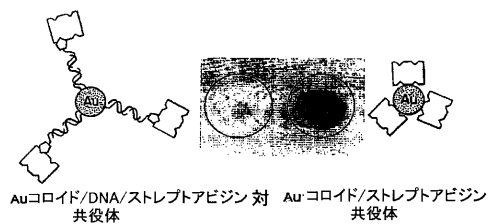
【図 5 2 B】



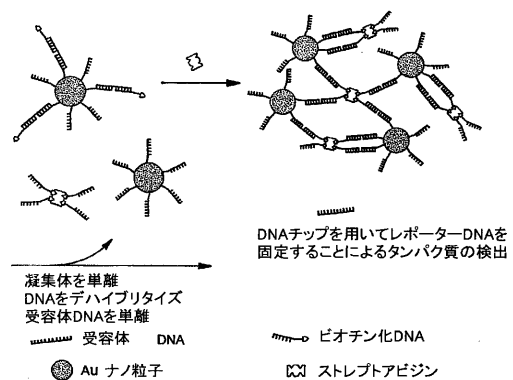
【図 5 2 C】



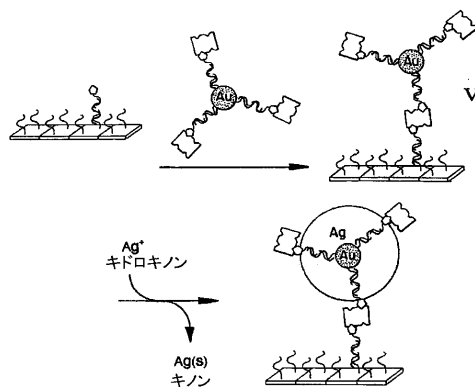
【図 5 3】



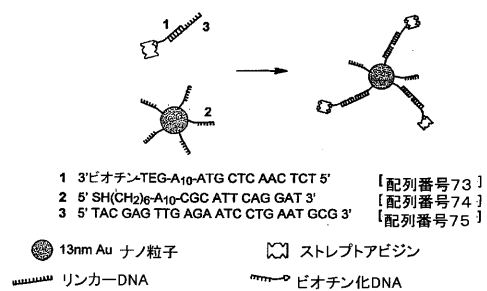
【図 5 5】



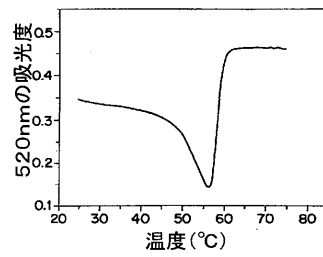
【図 5 4】



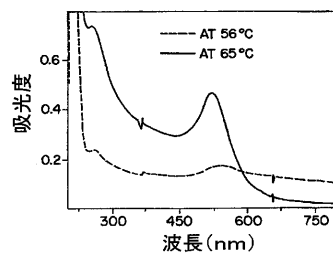
【図 5 6】



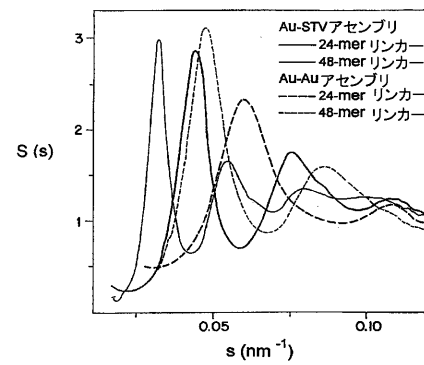
【図 5 8 A】



【図 5 8 B】



【図 5 9】



【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
4 October 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/73123 A2

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/10071

(22) International Filing Date: 28 March 2001 (28.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/192,699	28 March 2000 (28.03.2000)	US
60/200,161	26 April 2000 (26.04.2000)	US
09/603,830	26 June 2000 (26.06.2000)	US
60/213,906	26 June 2000 (26.06.2000)	US
60/254,392	8 December 2000 (08.12.2000)	US
60/255,235	11 December 2000 (11.12.2000)	US
09/760,500	12 January 2001 (12.01.2001)	US
09/820,279	28 March 2001 (28.03.2001)	US

(71) Applicant: NANOSPHERE INC. [US/US]; 1818 Skokie Boulevard, Northbrook, IL 60062 (US).

(72) Inventors: MIRKIN, Chad, A.; 111 16th Street, Wilmette, IL 60091 (US). LETSINGER, Robert, L.; 316 Third Street, Wilmette, IL 60091 (US). MUCIC, Robert, C.; 1600 Bel Aire Drive, Glendale, CA 91201 (US). STORHOFF, James, J.; Apartment 21, 2121 Ridge Avenue, Evanston, IL 60201 (US). ELGHANIAN, Robert; Apartment 602, 8503 West Catherine Avenue, Chicago, IL 60656 (US). TATON, Thomas, Andrew; 1368 West

Greenleaf Avenue, Apartment 15, Chicago, IL 60626 (US). PARK, So-Jung; 800 Custer Avenue, Apartment #3H, Evanston, IL 60202 (US). LI, Zhi, 911 Sherman Avenue, Apartment 307, Evanston, IL 60202 (US).

(74) Agent: MIAO, Emily; McDonnell Boehnen Holbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, 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, 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, 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, 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).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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 01/73123 A2

(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 01/73123

PCT/US01/10071

**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 09/760,500, filed January 12, 2001, which is a continuation-in-part of 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. 60/031,809, filed July 29, 1996; 60/176,409, filed January 13, 2000, 60/200,161, filed April 26, 2000, 60/192699, filed March 28, 2000, 60/254,392, filed December 8, 2000, and 60/255,235, filed December 11, 2000 is also claimed, the disclosures are incorporated by reference.

20

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to methods of detecting analytes, including nucleic acids and proteins, whether natural or synthetic, and whether modified or unmodified. The invention also relates to materials for detecting analytes, including nucleic acids and proteins, 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

30

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.

- 5 Colloidal gold-protein probes have found wide applications in immunocytochemistry [S. Garzon and M. Bendayan, "Colloidal Gold Probe: An Overview of its Applications in Viral Cytochemistry," in "Immuno-Gold Electron Microscopy," Ed. A. D. Hyatt and B. T. Eaton, CrC Press, Ann Arbor, MI (1993); J. E. Beesley, Colloidal Gold: A New Perspective for Cytochemical marking," Oxford University Press, Oxford, (1989)]. These probes have been prepared by adsorbing the antibodies onto the gold surface from an aqueous solution under carefully defined conditions. The complexes produced in this manner are functional but suffer from several drawbacks: e.g., some of the protein desorbs on standing, liberating antibody into solution that competes with adsorbed antibodies for the antigen target; the activity is low since the amount adsorbed is low and some of the antibody denatures on adsorption; and the protein-coated particles are prone to self aggregation, especially in solutions of high ionic strength. An alternative means for preparing nanoparticle-protein probes has been described by J. E. Hainfeld, R. D. Leone, F. R. Furuya, and R. D. Powell (U.S. Patent 5,521,289, May 28, 1996, "Small Organometallic Probes"). Typically, this procedure involves reduction of a gold salt in an organic solvent containing a triarylphosphine or mercapto-alkyl derivative bearing a reactive substituent, X, to give small nanoparticles (50-70 gold atoms) carrying X substituents on linkers bound to the surface through Au-P or Au-S bonds. Subsequently the colloidal solution is treated with a protein bearing a substituent Y that reacts with X to link the protein covalently to the nanoparticle. Work with these nanoparticle is limited by the poor water solubility of many proteins, which limits the range of protein-nanoparticle conjugates that can be utilized effectively. Also, since there are only a few gold atoms at the surface of these particles, the number of "capture" strands that can be bound to the surface of a given particle is very low.
- 30 A variety of methods have been developed for assembling metal and semiconductor colloids into nanomaterials. These methods have focused on the use

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 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

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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. The hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid results in a detectable change.

5 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
10 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.

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The first type of nanoparticles has
15 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
20 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
25 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
30 conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Then, a third type of nanoparticles having

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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, 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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 contacted with silver stain to produce a detectable change, and the detectable change
30 is observed.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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.

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 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.

- 30 In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. An aggregate probe comprising at least two types

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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
30 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

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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 brought about by this hybridization is observed. The energy donor and acceptor
30 molecules may be fluorescent molecules.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 particles and the probe oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 nucleic acid with the probe oligonucleotides. The particles are removed and the reporter molecule detected.

5 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 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
10 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 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
15 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, 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
20 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.

The invention further provides a method of detecting a nucleic acid wherein the method is performed on a substrate. The method comprises detecting the
25 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 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to
30 the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence
5 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 container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides
10 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 attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached
15 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 container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least
20 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, a first container holding nanoparticles having
25 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 oligonucleotides attached thereto which have a sequence
30

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 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.

5 In yet another embodiment, the kit comprises 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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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
15 attached to the oligonucleotides and the oligonucleotide-linkers are attached to nanoparticles as described herein.

The present invention also relates to novel nanoparticle probes that exploit specific binding interactions such as antibody-antigen binding, methods for preparing and using the same, and kits including such probes.

20 In one embodiment, the invention provides a method for detecting an analyte comprising contacting the analyte with a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto. At least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting
25 takes place under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte and specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate. A detectable change may be observed as a result of the specific binding interaction between the analyte and the probe.

In another embodiment of the invention, the method for detecting an analyte
30 comprises providing contacting the analyte with a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto. At least a portion of the oligonucleotides attached to

WO 01/73123

PCT/US01/10071

the nanoparticles are bound, as a result of hybridization, to a first portion of a linker oligonucleotide. The second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to
5 allow specific binding interaction between the analyte and the nanoparticle conjugate and a detectable change may be observed.

In another embodiment, the method for detecting an analyte comprising providing an analyte having a first oligonucleotide bound thereto, and contacting the oligonucleotide bound to the analyte with a first type of nanoparticles having
10 oligonucleotides bound thereto. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles to form a nanoparticle analyte conjugate. The method further comprising contacting the nanoparticle analyte conjugate with a second type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound
15 thereto. At least a portion of the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the first type of nanoparticles. The contacting takes place
20 under conditions effective to allow specific binding interaction between the analyte and specific binding complement bound to the second type of nanoparticle conjugate and a detectable change may be observed a result of the specific binding interaction.

In yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing an analyte having an oligonucleotide bound thereto, a linker
25 oligonucleotide having two portions, and a first type of nanoparticle have oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the first portion of the sequence of the linker oligonucleotide. At least a portion of the oligonucleotides bound to the first type of nanoparticles have a sequence that is complementary to a second portion of the linker
30 oligonucleotide. The oligonucleotide bound to the analyte, the oligonucleotide bound to the nanoparticle and the linker oligonucleotide are contacted under conditions

WO 01/73123

PCT/US01/10071

effective to allow hybridization between the linker oligonucleotide with the oligonucleotide bound to the analyte and the oligonucleotides bound to the first type of nanoparticles to form a nanoparticle analyte conjugate. The method further comprises contacting the analyte conjugate with a second type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, a least a portion of the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding interaction between the nanoparticle analyte conjugate and the specific binding complement second type of nanoparticle. A detectable change may be observed as a result of the specific bind interaction.

In another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing a support having an analyte bound thereto. The method further comprises contacting the analyte bound to the support to a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, a least a portion of the oligonucleotides are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte and specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate. A detectable change may be observable at this point.

In another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing a support having a oligonucleotides bound thereto and an analyte having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the linker oligonucleotides bound to the support. The method further comprises contacting the oligonucleotides bound to the support with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the oligonucleotides bound to the analytes. Then, a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto is provided. At least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

Finally, the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate are contacted under conditions effective to allow for specific binding interactions between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle, and a detectable change is observed.

5 In yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing a support having oligonucleotides bound thereto and a linker oligonucleotide, the sequence of the linker oligonucleotide having at least two portions. The oligonucleotides bound to the support have a sequence that is complementary to the first portion of the linker oligonucleotide. The oligonucleotide
10 bound to the support is then contacted with the linker oligonucleotide under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the first portion of the linker oligonucleotide. Next, an analyte having an oligonucleotide bound thereto is provided. The oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the second portion of the linker
15 oligonucleotides. The linker oligonucleotide bound to the support is then contacted with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide bound to the analyte and the second portion of the linker oligonucleotide. Then, a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto is provided. At least a portion of the oligonucleotides
20 bound to the nanoparticle conjugate are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The analyte bound to the support is then contacted with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interaction between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle
25 and detectable change is observed.

In still yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises contacting a support having oligonucleotides bound thereto with oligonucleotide bound to an analyte, the sequence of the oligonucleotide bound to the analyte is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound the the support. The
30 contacting occurs on under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the oligonucleotides bound to the analyte.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

Then, a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides attached thereto is provided. At least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to a first portion of a linker oligonucleotide. A second portion of the linker oligonucleotide is further bound, as a result of

5 hybridization, to an oligonucleotide having a oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of said analyte. Next, the analyte bound to the support is then contacted with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle. Then, a detectable change is

10 observed.

In another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing a support having an analyte bound thereto. The support is contacted with an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to

15 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 bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding

20 interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe. A detectable change may be observable at this point.

In another embodiment, the method for detecting an analyte comprises contacting a support having oligonucleotides bound thereto with an analyte having an

25 oligonucleotide bound thereto. The oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound to the support. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides bound to the support. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles

30 having oligonucleotides bound thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the

WO 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have some oligonucleotides attached thereto which are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe. Then, a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises providing contacting a support having a oligonucleotides bound thereto with linker oligonucleotides, the sequence of the second linker oligonucleotide having at least two portions. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the first portion of the linker oligonucleotide. Then, an analyte having an oligonucleotide bound thereto is provided. The oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary with the second portion of the linker oligonucleotide. Next, the linker oligonucleotide bound to the support is then contacted with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the second portion of the linker oligonucleotide bound to the support and the oligonucleotide bound to the analyte. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound 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 some oligonucleotides attached thereto which bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The analyte bound to the support is then contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe. A detectable change may be observable at this point.

In still yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises contacting a support having oligonucleotides bound thereto with an oligonucleotide having analyte bound thereto, the oligonucleotide has a sequence that is

complementary to the sequence of the oligonucleotide bound to the support. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides bound to the support. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having
5 oligonucleotides bound 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 some oligonucleotides attached thereto which bound to a first portion of a linker oligonucleotide as a result of hybridization. A second portion of
10 the second linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to a oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of said analyte. Then, the analyte bound to the support is contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe. A
15 detectable change is then observed.

In yet another embodiment, the method for detecting an analyte comprises contacting a support having an analyte bound thereto with a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, at least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides
20 having bound thereto a specific binding complement of said analyte. The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate. Then, the substrate is contacted with silver stain to produce a detectable change, and the detectable change is observed.

In yet another embodiment of the invention, the method for detecting an analyte comprises contacting a polyvalent analyte with a nanoparticle probe having oligonucleotides bound thereto. At least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound to a first portion of a reporter oligonucleotide as a result of
25 hybridization. A second portion of the reporter oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to an oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement to the analyte. The contacting takes place under conditions effective to
30

WO 01/73123

PCT/US01/10071

allow specific binding interactions between the analyte and the nanoparticle probe and to aggregation of the nanoparticles. Then, the aggregates are isolated and subject to conditions effective to dehybridize the aggregate and to release the reporter oligonucleotide. The reporter oligonucleotide is then isolated. Analyte detection
5 occurs by ascertaining for the presence of reporter oligonucleotide by conventional means such as a DNA chip.

The invention also provides a method for detecting a nucleic acid comprising providing (i) a nucleic acid, (ii) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, and (iii) a complex comprising streptavidin or avidin
10 bound, by specific binding interaction, to two or more biotin molecules each having oligonucleotides bound thereto. The sequence of the nucleic acid has at least two portions. The oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid while the oligonucleotides bound to biotin have a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic
15 acid. Then, the nucleic acid is contacted with the nanoparticle conjugate and complex under conditions effective to allow hybridization of the nanoparticles, the complex and the nucleic acid. A detectable change resulting from the subsequent aggregation is observed.

In another embodiment, a method for detecting a nucleic acid comprising
20 providing (i) a nucleic acid, (ii) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, (iii) oligonucleotides have biotin bound thereto; and (iv) streptavidin or avidin. The sequence of the nucleic acid has at least two portions. The oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid while the oligonucleotides bound
25 to biotin have a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic acid. Then, the nucleic acid is contacted with the nanoparticle conjugate and oligonucleotide bound to biotin under conditions effective to allow hybridization between the nucleic acid with the oligonucleotides attached to the nanoparticles and the oligonucleotides attached to the biotin. The resulting biotin complex is then
30 contacted with streptavidin or avidin. A detectable change resulting from the subsequent aggregation is observed.

In another embodiment, the method for detecting a nucleic acid comprises contacting a first type of nanoparticle having oligonucleotides attached thereto with the nucleic acid. The sequence of the nucleic acid has at least two portions. At least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence that is
5 complementary to the first portion of the nucleic acid. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides attached to the nanoparticle and the first portion of the nucleic acid. Then, an oligonucleotide having a sbp member, e.g., biotin, bound thereto is provided. The sequence of the oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is complementary to the
10 second portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotide bound to the sbp member is then contacted to the nucleic acid bound to the first type of nanoparticle under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide bound to the sbp member and the second portion of the nucleic acid. Then, a second type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto
15 is provided. At least a portion of the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte (e.g., streptavidin or avidin). The contacting takes place under conditions effective to allow specific binding interaction between the sbp member (e.g., biotin) bound to the first type of
20 nanoparticle and the sbp complement (e.g., streptavidin or avidin) bound to the second type of nanoparticle. A detectable change may result.

In another embodiment, the method for detecting a nucleic acid comprises contacting a support having oligonucleotides bound thereto with a nucleic acid, the sequence of the nucleic acid having at least two portions. The oligonucleotides bound
25 to the support have a sequence that is complementary to the first portion of the nucleic acid. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the first portion of the nucleic acid. Next, an oligonucleotide having a sbp member (e.g., biotin) bound thereto is provided. The oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is
30 complementary to the second portion of the nucleic acid. The nucleic acid bound to the support is then contacted with the oligonucleotide bound to the sbp member under

conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide bound to the sbp member and the second portion of the nucleic acid. Then, a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto is provided. At least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle conjugate are bound, as a result of
5 hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement (e.g., streptavidin or avidin) of said sbp member. The sbp member bound to the support is then contacted with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interaction between the sbp member bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle
10 and a detectable change is observed.

In another embodiment, the method for detecting a nucleic acid comprises contacting a nucleic acid with a nanoparticle conjugate having oligonucleotides attached thereto. The sequence of the nucleic acid has at least two portions. At least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence that is
15 complementary to the first portion of the nucleic acid. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles with the first portion of the nucleic acid. Then, an oligonucleotide having sbp member (e.g., streptavidin) is provided. The oligonucleotide have an sbp member bound thereto has a sequence that is complementary to the second portion of
20 the nucleic acid. The oligonucleotide having the sbp member is then contacted with the nucleic acid bound to the nanoparticle under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide having the sbp member and the nucleic acid. Next, a support having bound thereto a specific binding complement (e.g., biotin) to the sbp member is provided. The support is then contacted with the sbp
25 member bound to the nanoparticle under conditions effective to allow specific binding interactions to occur between the sbp member and the sb complement bound to the support. A detectable event can be observed.

In another embodiment, the method for detecting a nucleic acid comprises providing contacting the nucleic acid with a support having oligonucleotides bound
30 thereto. The sequence of the nucleic acid has at least two portions and oligonucleotide bound the the support has a sequence that is complementary to the first portion of the

nucleic acid. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the first portion of the nucleic acid. Then, an oligonucleotide having a sbp member (e.g., biotin) bound thereto is provided. The oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is
5 complementary with the second portion of the nucleic acid. Next, the nucleic acid bound to the support is then contacted with the oligonucleotide bound to the sbp member under conditions effective to allow hybridization between the second portion of the nucleic acid bound to the support and the oligonucleotide bound to the sbp member. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles
10 having oligonucleotides bound 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 some oligonucleotides attached thereto which bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding
15 complement (e.g., streptavidin) of said sbp member. The sbp member bound to the support is then contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the sbp member bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe. A detectable change may be observable at this point.

20 In another embodiment, the method for detecting a nucleic acid comprises contacting a nucleic acid with an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto is provided. The nucleic acid has two portions. 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
25 one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have some oligonucleotides attached thereto which bound to a first portion of the nucleic acid as a result of hybridization. Then, an oligonucleotide having sbp member (e.g., streptavidin) is provided. The oligonucleotide have an sbp member bound thereto has a sequence that is complementary to the second portion of the nucleic acid. The oligonucleotide
30 having the sbp member is then contacted with the nucleic acid bound to the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide

having the sbp member and the nucleic acid attached to the probe. Next, a support having bound thereto a specific binding complement (e.g., biotin) to the sbp member is provided. The support is then contacted with the sbp member bound to the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions to occur between the sbp member bound to the aggregate probe and the sb complement bound to the support. A detectable event can be observed.

The invention further provides a nanoparticle-oligonucleotide-sbp member conjugate (nanoparticle sbp conjugate) and compositions containing the same. The nanoparticle sbp conjugate comprise nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides are hybridized to a first oligonucleotide having a specific binding pair (sbp) member covalently linked thereto. The oligonucleotides attached to the nanoparticles have at a sequence that is complementary to at least a portion of the first oligonucleotides.

The invention also provides a method for preparing a nanoprobe sbp conjugate comprising providing a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto and a oligonucleotides having a sbp member bound thereto, and contacting the oligonucleotides attached to the nanoparticle conjugate with the oligonucleotides bound to the sbp member. At least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound to the sbp member. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the first oligonucleotide.

The invention also provides kits for detecting an analyte. In one embodiment, the kit includes at least one container. The container holds nanoparticle sbp conjugates comprising nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides are hybridized to a first oligonucleotide having a specific binding pair (sbp) member covalently linked thereto. The oligonucleotides attached to the nanoparticles have at a sequence that is complementary to at least a portion of the first oligonucleotides. The kit may also include a substrate for observing a detectable change.

In another embodiment of the invention, the kit includes at least two containers. The first container includes nanoparticles having oligonucleotides bound thereto. At least a portion of the oligonucleotides have a sequence that is complementary to a portion of a first oligonucleotide. The second container includes
5 first oligonucleotides having an sbp member covalently bound thereto. The kit may also include a substrate for observing a detectable change.

In yet another embodiment of the invention, the kit includes at least two containers. The first container includes nanoparticles having oligonucleotides bound thereto. At least a portion of the oligonucleotides have a sequence that is
10 complementary to a portion of a first oligonucleotide. The second container includes first oligonucleotides having a moiety that can be used to covalently link an sbp member. The kit may also include a substrate for observing a detectable change.

In yet another embodiment of the invention, the kit includes at least three containers. The first container includes nanoparticles having oligonucleotides bound
15 thereto. The second container contains a linker oligonucleotide having at least two portions. The third container includes first oligonucleotides having a moiety that can be used to covalently link an sbp member. At least a portion of the oligonucleotides have a sequence that is complementary to a first portion of a linker oligonucleotide. The first oligonucleotides have a sequence that is complementary to at least a second
20 portion of the linker oligonucleotides. The kit may also include a substrate for observing a detectable change.

The invention further provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two
25 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 first portion of the sequence of a linking oligonucleotide. The method further comprises providing a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or more biotin molecules, each
30 having a first oligonucleotide bound thereto, the first oligonucleotide having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking

WO 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotide. The linking oligonucleotides, complex, and nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the first oligonucleotides bound to the biotin to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

5 The invention provides another method of nanofabrication. This method comprises providing (a) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto; (b) at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; and (c) a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or more
10 biotin molecules, each having a first oligonucleotide bound thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles and a sequence that is complementary to the first portion of the sequence of the linking oligonucleotides. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence
15 complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates and a sequence that is complementary to the second portion of the sequence of the linking oligonucleotide. The first and second types of nanoparticles, the linking oligonucleotides, and the complex are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the
20 nanoparticles to each other and to the linking oligonucleotide and the hybridization of the oligonucleotides of the complexes to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

 The invention further provides yet another method of nanofabrication. The method comprises providing (a) at least one type of linking oligonucleotide having a
25 selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; (b) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide; (c)
30 biotin having a first oligonucleotide bound thereto, the first oligonucleotide having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and (d) strepavidin or avidin. The linking oligonucleotides, biotin

conjugate, and nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the first oligonucleotides bound to the biotin to the linking oligonucleotides. Then, the resulting complex is contacting with streptavidin or avidin under conditions effective to allow specific binding interaction between biotin and streptavidin or avidin 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 and sbp interactions.

The invention further provides a method of separating a selected target nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids. The method comprises providing (a) 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 the first portion of the selected nucleic acid; (b) a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or more biotin molecules, each having a first oligonucleotide bound thereto, the first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of the second portion 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 and the first oligonucleotides of the complex with the selected nucleic acid so that the nanoparticles and complex hybridized to the selected nucleic acid aggregate and precipitate.

The invention further provides a method of separating a selected target nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids. The method comprises providing (a) 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 the first portion of the selected nucleic acid; (b) biotin having a first oligonucleotide bound thereto, the first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of the second portion of the selected nucleic acid; and (c) strepavidin or avidin. The selected nucleic acid and other nucleic acids are contacted with the nanoparticles and biotin construct under conditions effective to

allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the first oligonucleotides of the biotin construct with the selected nucleic acid. Then, the resulting complex is contacted with streptavidin or avidin under conditions effective to allow specific binding interactions between the biotin and streptavidin or avidin and subsequent aggregation and precipitation of the resulting selected nucleic acid complex.

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."

The term "analyte" refers to the compound or composition to be detected, including drugs, metabolites, pesticides, pollutants, and the like. The analyte can be comprised of a member of a specific binding pair (sbp) and may be a ligand, which is monovalent (monoeptopic) or polyvalent (polyepitopic), usually antigenic or haptenic, and is a single compound or plurality of compounds which share at least one common epitopic or determinant site. The analyte can be a part of a cell such as bacteria or a cell bearing a blood group antigen such as A, B, D, etc., or an HLA antigen or a microorganism, e.g., bacterium, fungus, protozoan, or virus.

The polyvalent ligand analytes will normally be poly(amino acids), i.e., polypeptides and proteins, polysaccharides, nucleic acids, and combinations thereof. Such combinations include components of bacteria, viruses, chromosomes, genes, mitochondria, nuclei, cell membranes and the like.

For the most part, the polyepitopic ligand analytes to which the subject invention can be applied will have a molecular weight of at least about 5,000, more usually at least about 10,000. In the poly(amino acid) category, the poly(amino acids) of interest will generally be from about 5,000 to 5,000,000 molecular weight, more usually from about 20,000 to 1,000,000 molecular weight; among the hormones of

interest, the molecular weights will usually range from about 5,000 to 60,000 molecular weight.

A wide variety of proteins may be considered as to the family of proteins having similar structural features, proteins having particular biological functions, proteins related to specific microorganisms, particularly disease causing microorganisms, etc. Such proteins include, for example, immunoglobulins, cytokines, enzymes, hormones, cancer antigens, nutritional markers, tissue specific antigens, etc.

The types of proteins, blood clotting factors, protein hormones, antigenic polysaccharides, microorganisms and other pathogens of interest in the present invention are specifically disclosed in U.S. Pat. No. 4,650,770, the disclosure of which is incorporated by reference herein in its entirety.

The monoclonal ligand analytes will generally be from about 100 to 2,000 molecular weight, more usually from 125 to 1,000 molecular weight.

The analyte may be a molecule found directly in a sample such as a body fluid from a host. The sample can be examined directly or may be pretreated to render the analyte more readily detectible. Furthermore, the analyte of interest may be determined by detecting an agent probative of the analyte of interest such as a specific binding pair member complementary to the analyte of interest, whose presence will be detected only when the analyte of interest is present in a sample. Thus, the agent probative of the analyte becomes the analyte that is detected in an assay. The body fluid can be, for example, urine, blood, plasma, serum, saliva, semen, stool, sputum, cerebral spinal fluid, tears, mucus, and the like.

The term "specific binding pair (sbp) member" refers to one of two different molecules, having an area on the surface or in a cavity which specifically binds to and is thereby defined as complementary with a particular spatial and polar organization of the other molecule. The members of the specific binding pair are referred to as ligand and receptor (antiligand). These will usually be members of an immunological pair such as antigen-antibody, although other specific binding pairs such as biotin-avidin, hormones-hormone receptors, nucleic acid duplexes, IgG-protein A, polynucleotide pairs such as DNA-DNA, DNA-RNA, and the like are not

immunological pairs but are included in the invention and the definition of sbp member.

The term "ligand" refers to any organic compound for which a receptor naturally exists or can be prepared. The term ligand also includes ligand analogs, which are modified ligands, usually an organic radical or analyte analog, usually of a molecular weight greater than 100, which can compete with the analogous ligand for a receptor, the modification providing means to join the ligand analog to another molecule. The ligand analog will usually differ from the ligand by more than replacement of a hydrogen with a bond which links the ligand analog to a hub or label, but need not. The ligand analog can bind to the receptor in a manner similar to the ligand. The analog could be, for example, an antibody directed against the idiotype of an antibody to the ligand.

The term "receptor" or "antiligand" refers to any compound or composition capable of recognizing a particular spatial and polar organization of a molecule, e.g., epitopic or determinant site. Illustrative receptors include naturally occurring receptors, e.g., thyroxine binding globulin, antibodies, enzymes, Fab fragments, lectins, nucleic acids, avidin, protein A, barstar, complement component C1q, and the like. Avidin is intended to include egg white avidin and biotin binding proteins from other sources, such as streptavidin.

The term "specific binding" refers to the specific recognition of one of two different molecules for the other compared to substantially less recognition of other molecules. Generally, the molecules have areas on their surfaces or in cavities giving rise to specific recognition between the two molecules. Exemplary of specific binding are antibody-antigen interactions, enzyme-substrate interactions, polynucleotide interactions, and so forth.

The term "non-specific binding" refers to the non-covalent binding between molecules that is relatively independent of specific surface structures. Non-specific binding may result from several factors including hydrophobic interactions between molecules.

The term "antibody" refers to an immunoglobulin which specifically binds to and is thereby defined as complementary with a particular spatial and polar organization of

another molecule. The antibody can be monoclonal or polyclonal and can be prepared by techniques that are well known in the art such as immunization of a host and collection of sera (polyclonal) or by preparing continuous hybrid cell lines and collecting the secreted protein (monoclonal), or by cloning and expressing nucleotide sequences or mutagenized versions thereof coding at least for the amino acid sequences required for specific binding of natural antibodies. Antibodies may include a complete immunoglobulin or fragment thereof, which immunoglobulins include the various classes and isotypes, such as IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3, IgM, etc. Fragments thereof may include Fab, Fv and F(ab')₂, Fab', and the like.

In addition, aggregates, polymers, and conjugates of immunoglobulins or their fragments can be used where appropriate so long as binding affinity for a particular molecule is maintained.

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 $-(CH_2)_3OP(O)(O)-$, where S is joined to a gold nanoparticle). For 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,
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 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.

5 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).

10 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.

15 Figures 16A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-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.

20 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.).

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)

5 oligonucleotides.

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
10 Figure 19A as the temperature is increased (melted).

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).

Figure 21: Schematic diagram illustrating a system for detecting target
15 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.

20 Figure 22: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using two types of fluorescently-labeled oligonucleotide-nanoparticle 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
25 Antigen (see Example 12).

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
30 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.

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.

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 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.

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, 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 5 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).

10 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 15 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).

20 Figure 38A: UV-visible spectra of alternating layers of gold nanoparticles *a* and *b* (see Figure 37) hybridized to an oligonucleotide-functionalized glass 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 25 slide.

Figure 38B: Graph of absorbance for nanoparticle assemblies (see Figure 38A) at λ_{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 30 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 $^{\circ}\text{C}$, (Figure 39D inset) 5.6 $^{\circ}\text{C}$, (Figure 39E inset) 3.2 $^{\circ}\text{C}$, and (Figure 39F inset) 2.9 $^{\circ}\text{C}$.

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.

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 phosphoramidate 7 and 5-tri-mercaptoalkyl oligonucleotide 8.

Figure 46: Schematic diagram illustrating the chemistry of making a novel tri-thiol oligonucleotide.

Figure 47: Schematic representation of high density oligonucleotide nanoparticle conjugate I, oligonucleotide protein conjugate I, a nanoparticle-oligonucleotide-protein conjugate II, and probe-target complex III. The oligonucleotide conjugate I has a sequence that is complementary to the oligonucleotide bound to conjugate I. Probe II is a representative probe for proteins. Complex III results from the specific binding interaction between the protein target and the protein bound to probe II.

Figure 48: Schematic representation of the application of Probe II in detecting a specific protein in an array of different proteins immobilized on a glass surface. The gold nanoparticles can be recognized visually or by silver staining. Fluorescent nanoparticles can be recognized by their fluorescence. As shown in this Figure, the glass plate shows three different proteins immobilized on the surface, one of which binds to the protein in Probe II. In step 1, the plate is exposed to a solution containing Probe II. In step 2, unbound Probe II is washed away. In step 3, the presence of bound nanoparticles (IV) at the site occupied by the first protein in the series is observed.

Figure 49: Schematic representation of nanoparticle-oligonucleotide-receptor probes (II') and applications in detecting a specific target in an array of substances immobilized on a smooth surface. The recognition receptor unit (specific binding complement to target) is designated A and the target, B.

Figure 50: Schematic representation of (a) nanoparticle-oligonucleotide-receptor probe (II) showing that the oligonucleotide linked to the receptor (R) is

complementary to the oligonucleotide bound to the nanoparticle and that the nanoparticle conjugate is bound by hybridization to the oligonucleotide bound to the receptor and (b) nanoparticle-oligonucleotide-receptor probe (II) showing that the oligonucleotide linked to the receptor (R) is bound, as a result of hybridization, to a first portion of the linking oligonucleotide and the oligonucleotides bound to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to a second portion of the linking oligonucleotide. For simplicity, only one oligonucleotide-protein conjugate is shown bound to the oligonucleotide-nanoparticle conjugate; the actual number may be greater.

10 **Figure 51:** Schematic representation of the application of a probe (Figure 50(b), in (a) detecting a specific target, e.g., drug or protein, in an array of different drug or proteins immobilized on a glass surface and (b) detecting a specific target in a cell having a mixture of different molecules. The probe can also be used in a spot test where the analyte, e.g., protein or drug, has multiple binding sites.

15 **Figure 52:** Schematic representation of a 3-dimensional gold nanoparticle-streptavidin assembly or aggregate formed as a result of (a) the hybridization of a complex of streptavidin bound to biotin molecules having bound thereto an oligonucleotide 1, nanoparticle oligonucleotide conjugates 2 and a target nucleic acid 3; (b) a gold nanoparticle assembly from by the hybridization of oligonucleotides of one type of nanoparticle with a second type of nanoparticle; and (c) a gold nanoparticle assembly by the hybridization of a complex of avidin specifically bound to four biotin molecules, each molecule bound to an oligonucleotide that has a sequence that is complementary to the oligonucleotides bound to the nanoparticle. In all three cases, the colors of the solutions changed from red to purple or blue-gray upon aggregate formation.

25 **Figure 53:** Photograph illustrating the nonspecific binding test (Example 27) of the inventive gold nanoparticle/oligonucleotide/streptavidin conjugate (left) a commercial gold colloid/streptavidin conjugate (right). The commercial conjugate showed a gray spot, indicating that the conjugate sticks to the glass surface while the inventive conjugate showed no significant silver stain.

30

Figure 54: Schematic diagram of a gold nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin conjugate binding to a biotin bound to surface. The biotin is linked to an oligonucleotide having a sequence that is complementary to an oligonucleotide bound to the surface of the support and oligonucleotide-biotin conjugate is hybridized to the
 5 *oligonucleotide bound to the surface.*

Figure 55: Schematic diagram of a protein detection method using a linker as a DNA reporter for protein. As shown, a nanoparticle-oligonucleotide-biotin conjugate having the reporter DNA bound thereto forms a 3-D nanoparticle assembly on addition of streptavidin. The aggregate is then isolated, and subjected to
 10 *dehybridization to release nanoparticle-oligonucleotide conjugates, a complex of streptavidin bound to biotin molecules having oligonucleotides bound thereto, and the reporter. The protein is detected by the identification of the reporter DNA by conventional means, including the use of a DNA chip.*

Figure 56: Schematic diagram showing the preparation of a gold nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin conjugate (Example 26) from (a) streptavidin bound to a single biotin linked to a oligonucleotide, the oligonucleotide bound to the biotin is further bound, as a result of hybridization, to a first portion of a linker oligonucleotide and (b) a gold nanoparticle having oligonucleotides bound thereto, the oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is complementary to
 15 *a second portion of the linker oligonucleotide.*

Figure 57: Transmission electron microscopy (TEM) images (Example 28) showing (a) formation of aggregates upon heating a solution of streptavidin-oligonucleotide conjugate (1-STV), 13 nm gold particles (2-Au) and linker DNA (3) to 53C and (b) particles within the aggregates retain their physical shape prior to and
 20 *after annealing, show no particle fusion and further demonstrate stabilizing influence of the surface oligonucleotide layer.*

Figure 58: Melting curves (a) as a function of temperature (b) function of wavelength confirm that streptavidin-nanoparticle aggregates are formed by DNA hybridization interactions, not nonspecific interactions, and that the process is
 25 *reversible. See Example 28.*

WO 01/73123

PCT/US01/10071

Figure 59: Small Angle X-ray Scattering diffraction patterns showing various interparticle distances of various aggregates as described in Example 28.

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. 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)

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

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); Lec 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

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.

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

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
25 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).

30 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

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 :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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 FG75, for use with gold nanoparticles 13 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

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 other polymers), opaque solid surface (e.g., white solid surfaces, such as TLC silica
10 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

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
5 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
10 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).

15 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
20 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
25 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).

30 After the nanoparticles are attached to the substrate, oligonucleotides are attached to the nanoparticles. This may be accomplished in the same manner

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

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
5 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.

10 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-
15 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
20 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
25 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.

30 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 13B. As shown in that Figure, the combination of hybridizations
5 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,
10 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-
15 743 (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
20 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
25 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
30 have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each

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

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.

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

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

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

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
10 nanoparticles being employed for the detection of a nucleic acid do not catalyze the 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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 Chrisey et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039

WO 01/73123

PCT/US01/10071

(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**.

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

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

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 path length.

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

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

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 succinimide ester of DABCYL (Molecular Probes) forms extremely stable amide bonds upon reaction with primary alkylamino

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-

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.,

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

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 two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The
5 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

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,

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.

5 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
10 type of oligonucleotides having a cholesteryl 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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

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

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

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
10 acids, or both.

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,
15 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
20 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
25 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

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

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

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 DNA or RNA containing overhanging ends is employed as the linking oligonucleotide. Hybridization of the single-stranded, overhanging segments of the

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 (Pitich, 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).

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.

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,

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.

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

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

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

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.

Protein receptors and other specific binding pair members can be functionalized with oligonucleotides and immobilized onto oligonucleotide-modified nanoparticles to generate a new class of hybrid particles (nanoparticle-receptor conjugates) that exhibit the high stability of the oligonucleotide modified particles but
15 with molecular recognition properties that are dictated by the protein receptor rather than DNA. Alternatively, one could functionalize a protein that has multiple receptor binding sites with receptor-modified oligonucleotides so that the protein receptor complex could be used as one of the building blocks, in place of one of the inorganic nanoparticles, in the original nanomaterials assembly scheme discussed above. The
20 use of these novel nanoparticle-receptor conjugates in analyte detection strategies have been evaluated in a number of ways including identification of targets and screening for protein-protein interactions.

In one embodiment of the invention, novel hybrid particles or nanoparticle-receptor conjugates that are stable in a wide range of aqueous salt concentrations,
25 have a long shelf life, and enable use of proteins that are poorly soluble in water as well as those of high water solubility are provided. The probe system (see representative Construct II, Figure 47) can be used to screen an array of proteins immobilized at discrete positions on a surface (Figure 48). The same principles for probe construction and application can be adapted for studying a great variety of
30 specific binding reactions involving combinations of specific binding pair members such as proteins, peptides, carbohydrates, sugars, oligo- and polynucleotides, and

small molecules (Figure 49, where A and B can be a protein, peptide, carbohydrate, sugar, oligo- or polynucleotide, synthetic polymer or oligomer, or a small molecule and any combination thereof). The basic concept is to attach a "receptor unit" (A in Figure 49) to an oligonucleotide which is complementary to oligonucleotides bound to the nanoparticle. Hybridization then generates a nanoparticle probe containing a sheath of oligonucleotides around the nanoparticle matrix which serves to enhance water solubility of the system and to stabilize the colloids with respect to aggregation. Probe II' is then used to interrogate a target (B) immobilized on a solid surface. Binding of A to B is monitored by detection of the nanoparticles bound to the solid surface (e.g. colorimetrically, by fluorescence, silver staining, etc.). This scheme can be used for any molecules wherein A can be conjugated to an oligonucleotide and B can be immobilized on a surface.

An example of the invention is illustrated in Figure 47, where 1 is a gold nanoparticle bearing a large number of oligonucleotides linked firmly to the gold surface (e.g. via a sulfur-gold bond) and 1 is a protein containing a pendant oligonucleotide with a sequence complementary to the sequence for the oligonucleotides attached to the nanoparticle. Procedures for constructing nanoparticle-oligonucleotide conjugates having a high surface density of oligonucleotides are described herein. See for instance Example 3 and C. A. Mirkin et al. *Nature*, 382, 607-609 (1996); R. Elghanian et al., *Science*, 277, 1078-1081 (1997); J. J. Storhoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959-1964 (1998). Methods for conjugating oligonucleotides to proteins are well known; details for one method were described by E. R. Hendrickson, et al. *Nucleic Acids Research*, 23, 522-529 (1995). When the oligonucleotides conjugated to the nanoparticles and the oligonucleotide-protein conjugate are brought together under conditions for hybridization, one or more of the oligonucleotide-protein conjugate molecules will bind to a given nanoparticle by hybridization to produce a nanoparticle protein conjugate. See Figures 47 and 50(a). An alternative embodiment of the nanoparticle receptor conjugate is shown in Figure 50(b) which entails the use of a linking oligonucleotide that brings the nanoparticle-oligonucleotide constructs and oligonucleotide-protein conjugate together under conditions for hybridization. In this embodiment, the linker

oligonucleotide has one segment (a') complementary to oligonucleotide (a) bound to the nanoparticle and another segment (b') complementary to oligonucleotide (b) bound to the receptor.

The resulting nanoparticle-protein complexes can be separated from unbound protein by centrifugation or gel filtration, and used as probes for target analytes such as antigens. Figure 51 illustrates a number of representative detection schemes that can employ the nanoparticle-protein conjugates as a probe. The nanoparticle-protein conjugates have a wide variety of applications including identifying target analytes, screening a library of molecules such as drugs immobilized in array onto a support (Figure 51(a)) or in histochemical applications to identify for the presence of analytes in cells or tissues. The probe can also be used in a spot test where the analyte, e.g., protein or drug, has multiple binding sites.

The gold probe-receptor-ligand target combinations resulting from these assays can be observed by visually (e.g., spot test or formation of aggregates or silver staining) or by any known procedure. For instance, the nanoparticle-protein conjugate system can be used to develop a colorimetric test for nucleic acids, which relies on the aggregate properties of the nanoparticle/DNA/protein composite, Figure 52 (A). In a typical experiment, solutions of a complex comprised of streptavidin bound to four biotin-oligonucleotide conjugates (1-STV) and a gold nanoparticle DNA conjugate (2-Au) with and without target nucleic acid (3) were prepared. The sequence of the target nucleic acid has two portions. The oligonucleotides bound to the complex is complementary to the first portion of the nucleic acid while the oligonucleotides bound to the nanoparticles are complementary to the second part of the nucleic acid. The solutions were heated to 53 °C for 30 min, and then 3 L aliquots of the solutions were spotted on a C18 reverse-phase thin-layer chromatography plate. The solution with target nucleic acid showed a blue spot and the solution without target showed a red spot. This result and the sharp melting curve demonstrate that one of the gold nanoparticle probes in the above-described spot test (Figure 52 (B)) can be replaced by streptavidin/DNA conjugates, which are simpler to prepare than gold probes.

The system shown in 52(a) can also be used to prepare novel 3-dimensional nanomaterials or assemblies as discussed above. In a simple variation of Figure 52(a), as shown in Figure 52(c), no linking oligonucleotides are used and the oligonucleotide attached to the complex are complementary to the oligonucleotides bound to the nanoparticles.

These new nanoparticle-protein probes (II) have unique features which provide significant advantages over the previously describe nanoparticle protein conjugates. In particular, the high density oligonucleotides on the surface of the nanoparticles function as a polyanionic sheath to enhance solubility and stability of the nanoparticles-protein conjugates in water over a very wide range of solubility and salt concentrations. Also, the reversibility of the oligonucleotide-oligonucleotide binding provides an extra means for characterizing the complex that is formed with the target. In addition, the nanoparticle-proteins are more resistant to non-specific binding (see Figure 53).

While the preferred nanoparticle-protein complexes are based on gold nanoparticles, other particles based on a wide variety of other materials (e.g., silver, platinum, mixtures of gold and silver, magnetic particles, semiconductors, quantum dots) can be used, and the particle sizes may range from 2-100 nm as described above. U.S. Patent application Serial No. 09/344,667 and PCT application WO 98/04740, both of which are incorporated herein by reference in their entirety, describe suitable nanoparticles and methods of attaching oligonucleotides to them.

In another embodiment, the nanoparticle-oligonucleotide-protein complexes (II) are employed as probes in detecting specific target molecules such as proteins immobilized on a smooth surface. See, for instance, Figures 48, 49 51 and 54. For this purpose, a number of different proteins may be immobilized at different discrete spots as array on a glass slide. A number of linkage methods may be used. One method, well known in the art, is to treat the glass with 3-aminopropyltriethoxysilane followed by 1,4-phenylene diisothiocyanate. This sequence generates a surface holding pendant isothiocyanate groups that can be used to bind substances containing one or more amino groups. Targets containing amino groups can be immobilized

directly onto this modified surface. For other substances, an aminoalkyl group can be tethered to the target to provide the necessary reactive group. Following immobilization of the target on the surface, deactivation of residual isothiocyanate groups, and washing, the surface is exposed to a colloidal solution of II. Another method for immobilizing proteins involving "printing" proteins onto glass slides having bound aldehyde groups to produce protein chips. G. MacBeath et al., Science, 289, 1760-1763 (2000); Nature, 2000, 405, 837; and Anal. Biochem., 278, 123, all incorporated by reference in their entirety. The amino groups on the proteins react to form covalent bonds without significant disruption of the three dimensional structure of the protein so the proteins can still react with receptors and other targeting molecules. Alternatively, the specific target molecules or analytes can be bound to oligonucleotides to form oligonucleotide-analyte conjugates where the oligonucleotides bound to the analytes have a sequence that is complementary to the sequence of oligonucleotides bound to a support. There are numerous methods for covalently linking proteins and other substances onto oligonucleotides. One method involves the use of SMPB (sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate) to couple thiol-modified oligonucleotide and streptavidin. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 5530, incorporated by reference in its entirety. By contacting the oligonucleotides bound to the support with the oligonucleotides bound to the analyte under hybridization conditions, the analyte may be bound to the support.

The probe is then contacted with the support. After sufficient time for the protein-protein specific binding interaction to occur, the excess nanoparticle conjugates are washed away and the nanoparticles are detected. The metallic nanoparticles may be detected directly by their color or as gray spots following silver staining. Hence, specific protein/receptor binding interactions may be exploited as a way of indicating the presence of one or the other on a glass slide (Figure 54). In a typical experiment, biotinylated DNA hybridized to one portion of a glass slide with complementary DNA could be probed by exposing the glass slide to a solution containing streptavidin bound to biotinylated DNA hybridized to our high DNA density gold nanoparticle probes described herein. The probes bind to the portion of

the slide with biotin. The signal associated with the complexed probes could be further developed by treating with silver enhancing solution (see Figure 54).

As pointed out above, useful probes of type II can be made using a great variety of substances as the functional recognition elements. The scheme for synthesis and application of the probes, shown in Figures 49 and 50, is completely analogous to that presented in Figure 48 for studying protein-protein interactions. For the general case in Figure 49, the conjugate probe is designated II', the receptor unit as A, and the target immobilized on the solid surface as B. The system in Figure 48 and variations described herein is a special case of the general system shown in Figure

49. In some cases, it may be preferable to use oligonucleotide-nanoparticle probes of type II that are constructed from non-metal nanoparticles. Type II probes based on inherently fluorescent nanoparticles may be observed by their fluorescence. Other nanoparticles can be made fluorescent by appending fluorescent tags to the particles either before or after the oligonucleotide sheath has been added.

In another embodiment of the invention, a novel protein detection method is provided. Protein binding molecules are joined to gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates through a linking oligonucleotide where the linking DNA can be used as a marker for the specific protein. Figure 55 describes a protein detection method utilizing the linking oligonucleotide as reporter DNA. In this method, oligonucleotides are modified with protein binding molecules in a way such that each protein molecule has a different oligonucleotide sequence, and then the protein-oligonucleotide conjugates are immobilized on Au particles as a result of hybridization. For example, biotinylated DNA can be immobilized on gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates to generate biotin nanoparticle conjugates. In the presence of streptavidin, the biotin modified nanoparticles will form aggregates and the aggregates can be easily separated from other particles. The aggregates are then disassembled by DNA dehybridization, and the reporter DNA is isolated from Au particles and proteins. Since each protein binding molecule has a unique DNA sequence, the protein can be identified by well established DNA detection methods

such as the use of a DNA chip. Once the reporter DNA is isolated, the detection limit can be very low because the reporter DNA can be amplified by PCR.

A common feature of all these nanoparticle-oligonucleotide-receptor conjugate systems is that the signal for interaction of the components being tested, e.g. receptor A and B in Figure 49, depends both on A binding to B and on the interaction of oligonucleotide a with oligonucleotide a'. Since the dissociation temperature for the oligonucleotide duplex segment can be tuned by controlling the length and sequence of the complementary strands and the salt concentration, one can in many cases design systems such that the oligonucleotide duplexes will dissociate at a lower temperature, or a higher temperature, than the components being tested, according to the wishes of the investigator. As discussed herein, complexes formed by hybridization of oligonucleotide gold nanoparticle probes with oligonucleotides linked to other nanoparticles or to a glass surface dissociate over an unusually narrow temperature range. To our knowledge, such sharp melting transitions are unprecedented for complexes derived from oligonucleotides of this size. This property sets these nanoparticle oligonucleotide probes, I, in Figure 47, apart from other probe systems, including other probes based on nanoparticles and oligonucleotides. Accordingly, if one designs systems of type IV (Figure 48) or V (Figure 54) in such a way that the observed signal reflects dissociation of the oligonucleotide duplex, the dissociation transition will extremely sharp. This feature provides an extra dimension for characterizing the complexes of type IV and V. Alternatively, one can design the system to favor initial dissociation of A-B complex in order to obtain information on the strength of that interaction of A with B.

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 and specific binding abilities can be produced.

Any of the above conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of detecting analytes such as 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

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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

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).

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-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

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.

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

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

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

for this detection approach is the temperature range for the colorimetric response (<1°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.

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 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.

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.

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 hybridization interactions.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

(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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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, ($T_m = 51^\circ\text{C}$). 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 01/73123

PCT/US01/10071

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

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

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 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 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 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 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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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: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
 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 01/73123

PCT/US01/10071

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

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 A_{520} 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 $MgCl_2$. 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 :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-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 µL 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 oligoribo- and oligodeoxyribonucleotide double-stranded targets.

Example 15: Assay Employing Both Fluorescence And Colorimetric Detection

WO 01/73123

PCT/US01/10071

- 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 dithioureia 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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

- 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
- 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)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	53.45	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
None (control)	168.16	10.03

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.*

- 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

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

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'-

TCTCAACTCGTAA₁₀-(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-A₁₀CGCATTTCAGGAT-3' [SEQ ID NO: 47].

5 C. Preparation Of QD Assemblies

When approximately equal quantities of these two oligonucleotides (200μL, OD₅₃₀=0.224 and 0.206, respectively) were mixed and then combined with 6μL (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'-CTACTTAGATCCGAGTGCCACAT-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 01/73123

PCT/US01/10071

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

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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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
20 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
25 (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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

10 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

20 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

25

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)₂₀-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 01/73123

PCT/US01/10071

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/cm³), an average
molecular weight per particle was calculated (2.4×10^7 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

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 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).

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

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 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 (~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); 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

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 12'F.

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 01/73123

PCT/US01/10071

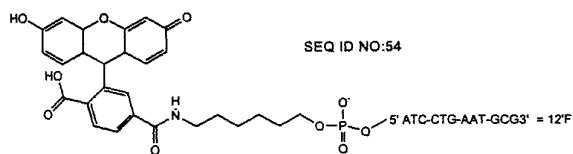
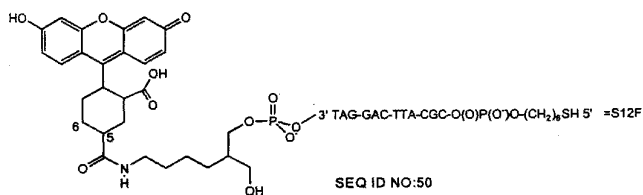
understanding interactions between oligonucleotides and nanoparticles, as well as optimizing the sensitivity of nanoparticle-oligonucleotide detection methods.

TABLE 7

5 Single strand surface coverage and corresponding hybridized surface coverages for gold thin films and gold nanoparticles. Comparison between S12F and SA₂₀12F 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.

10

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 ₂₀ 12F/12F'	15 $\pm$ 4	6.6 $\pm$ 0.2	- 44%
Au thin films			
S12F/12F'	18 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	- 33%



160

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 alkythiol 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

S3'A₂₀12F / S3'T₂₀12F = HS(CH₂)₆-3'-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]

20

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

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

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") (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

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 μm diameter spots separated by 375 μm were patterned using a Genetic Microsystems 417 Microarrayer). Arrays contained four elements corresponding to 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 μL of a 1 nM solution of synthetic target in 2

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:T > C:T > T: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

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

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 25 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,

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 can synthetically program interparticle distances, particle periodicities, and particle
 15 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(PO₂)O-CGCATTCAGGAT-3' [SEQ ID NO:50]) and 3'-propanethiol-capped oligonucleotide 2 (3'-HS(CH₂)₃O(PO₂)O-ATGCTCAACTCT-5' [SEQ ID NO:59]) attached to them to

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

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**: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

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'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCATATATTGGACGCTTT

ACGGACAACATCCTGAATGCG3'[SEQ ID NO:62]) were used as linkers. Fillers 6 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT5'[SEQ ID NO:63]) and 7 (3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGTATATAACCTGCGAAATGCGCTGTTG5'[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 CH₃COONH₄ 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, CH₃COONH₄. 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

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

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

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:50]) were

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(PO₃²⁻)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-

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 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 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);

- 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.
- 10 (C₂₃H₃₇O₃S₂) 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.
- 20 (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 nm, 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
- 25

mL/min. A nice feature of the hydrophobic steroid group is that the capped derivatives separate cleanly from uncapped oligomers. Sulfur derivatized oligonucleotides **Ila**, **Ic1** and **Ic2** (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
5 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 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
10 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
15 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
20 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,
25 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.

(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 $1/300^{\text{th}}$ 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

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
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
10 using alkylthiol anchor groups, I, Figure 44 [C. A. Mirkin et al., Nature, 382, 607 (1996); Storhoff, 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
15 as mercaptoethanol or dithiothreitol (DTT), than are conjugates prepared using an 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
25 (see for example, R. L. Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 7535 (1993). To assess 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

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

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-

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

5 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-

10 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

15 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)

20 (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

25 Solid DTT was added to 600 uL 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 ~528nm

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.

Example 26: Detection of an analyte using a nanoparticle-nucleic acid-sfp member conjugate

- 10 This example demonstrates the detection of an analyte (biotin) using a nanoparticle-streptavidin probe (Figures 54 and 56).

(a) Preparation of nanoparticle-nucleic acid-protein conjugate

Nanoparticle-nucleic acid conjugates are prepared as described in Example 3. The oligonucleotide modifier used to prepare these conjugates have the following sequence:

- 15 5'SH(CH₂)₆-A₁₀-CGCATTCAGGAT 3' (2). As shown in Figure 56, biotin labeled oligonucleotide (1) [3'-biotin-TEG-A₁₀-ATGCTCAACTCT 5'] is prepared by literature procedure using a Biotin TEG CPG support (Glen Research, Sterling, Virginia; Catalog no. 20-2955-01). To make the streptavidin/DNA conjugate, streptavidin was reacted with 1 equivalent of biotin-modified oligonucleotides in 20 mM Tris (pH 7.2), 0.2 mM EDTA
- 20 buffer solution at room temperature for 2 h on a shaker. Streptavidin complexed to different numbers of oligonucleotides were separated by ion exchange HPLC with 20 mM Tris (pH 7.2) and a 0.5 %/min gradient of 20 mM Tris, 1 M NaCl at a flow rate of 1 mL/min, while monitoring the UV signal of DNA at 260 nm and 280 nm. The streptavidin/biotin-modified oligonucleotide mixture showed four peaks at 45 min, 56
- 25 min, 67 min and 71 min, which correspond to the 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 oligonucleotide-streptavidin complexes, respectively. The 1:1 complex of streptavidin/oligonucleotide (10 uM, 5uL) was isolated and premixed with linker DNA [5'TACGAGTTGAGAATCCTGATTGCG3'] (3) (10uM, 5uL) in 0.3 M PBS (0.3 M

NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7) and then the mixture was added to the nanoparticle-oligonucleotide conjugates (10 nM, 130 uL) in 0.3 M PBS to prepare a nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin conjugate. The solution containing nanoparticle-oligonucleotide conjugates, streptavidin/oligonucleotide, and linker DNA
 5 was frozen in dry ice for 10 min and thawed to facilitate DNA hybridization. After 12 hr, the solution was centrifuged at 10000 rpm for 20 min and supernatant was removed. Red oily precipitate of nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin conjugate was redispersed in 0.3 M PBS buffer.

The nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin conjugate was then used to detect
 10 for the presence of a target analyte, biotin immobilized onto a glass surface.

(b) Detection of biotin

Biotin was immobilized to a glass slide according to the following procedure: Oligonucleotide modified glass slide was prepared by previously reported method (Science, 2000, 289, 1757-1760) and then the biotin modified oligonucleotide was
 15 hybridized to the surface DNA. (Biotin modified glass slide can be prepared by various method. One example is to prepare amine modified glass slide and then react the surface amine with various commercially available biotinylation reagents which react with amine.) As shown in Figure 54, the immobilized biotin glass slide was then treated with a medium containing the nanoparticle-oligonucleotide-streptavidin (2 nM in 0.3 M PBS).
 20 The presence of the captured probe was demonstrated, after washing and treating with silver enhancing solution [silver enhancer solution A (catalog no. S5020, Sigma Company, St. Louis, MO, USA) and silver enhancer solution B (catalog no. S 5145, Sigma Company), see also Science, 2000, 289, 1757], by the appearance of a gray or shiny silver spot. If desired, fluorescently labeled specific binding pair members linked
 25 to oligonucleotides can be used to prepare the nanoparticle-oligonucleotide-spf probe. This fluorophore labeled probe can then be used to detect for the presence of analyte.

Example 27: Specific binding comparison of gold colloid streptavidin conjugates

In this Example, nonspecific binding of the nanoparticle streptavidin probe prepared in accordance with Example 26 and a commercial Au colloid (20 nm)/streptavidin conjugate (full name: streptavidin-gold labeled)(purchased from Sigma Company, St. Louis, MO, USA, Catalog No. S6514) were evaluated. 5 ul each of the commercial solution containing the conjugate and a solution containing the inventive probe (2 nM in 0.3 M PBS) were spotted on a glass slide. After 20 hr, the slide was washed with water and treated with silver enhancing solution [see Example 26]. The commercial conjugate showed a grey spot after 5 min of developing, indicating the presence of Au colloids on the glass surface, while the Example 3 nanoparticle streptavidin probe showed no visible silver stain (Figure 53). The signal difference could be enhanced by applying second DNA-modified nanoparticles to the silver stained slide and restaining it. This demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide-sbp conjugates of the invention are more resistant to nonspecific binding than the commercial Au colloid/streptavidin conjugate.

Example 28: Preparation of nanoparticle assembly

As discussed herein, specific binding pair members, e.g., receptors or ligands, can be functionalized with oligonucleotides and immobilized onto oligonucleotide-modified nanoparticles to generate a new class of hybrid particles that exhibit the high stability of the oligonucleotide modified particles but with molecular recognition properties that are dictated by the specific binding pair member rather than DNA. Alternatively, one could functionalize a protein that has multiple receptor binding sites with receptor-modified oligonucleotides so that the protein receptor complex could be used as one of the building blocks, in place of one of the inorganic nanoparticles, in our original materials assembly scheme. In this Example, we use 13 nm gold nanoparticles, streptavidin, and biotinylated DNA to prepare new nanoparticle assemblies (Figure 52) and study some of the physical and chemical properties of the resulting new bioinorganic materials.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

(a) Experimental.

The methods for preparing oligonucleotide-modified 13 nm Au particles (**2-Au**) and linker DNA (**3**) were reported elsewhere. The oligonucleotide modifier used to prepare these conjugates have the following sequence: 5'SH(CH₂)₆-A₁₀-CGCATTCAAGGAT 3'. The linker DNA (**3**) has the following sequence: [5'TACGAGTTGAGAATCCTGATTGCG3']. See J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959. **2-Au** and **3** were stored in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate (pH 7) buffer (0.3 M PBS) prior to use. Biotin modified DNA (**2**) was synthesized with Biotin TEG CPG support (Glen Research) and purified by literature methods. See J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959; T. Brown, D. J. S. Brown, in *Oligonucleotides and Analogues* (Ed.: F. Eckstein), Oxford University Press, New York, **1991**. Streptavidin was purchased from Sigma and dissolved in 20 mM Tris buffer (30 mM, pH 7.2). To make the streptavidin/DNA conjugate (**1-STV**), streptavidin was reacted with 8 equivalents of biotin-oligonucleotide conjugate **1** in 20 mM Tris (pH 7.2), 0.2 mM EDTA buffer solution at room temperature for 2 h on a shaker. The biotin-oligonucleotide conjugate has the sequence: [3' biotin-TEG-A₁₀-ATGCTCAACTCT 5']. Mixtures with different ratios of streptavidin to DNA (1:0.4, 1:1, 1:4) were also prepared for HPLC analysis. The streptavidin/DNA conjugates were separated from excess DNA by ion exchange HPLC with 20 mM Tris (pH 7.2) and a 0.5 %/min gradient of 20 mM Tris, 1 M NaCl at a flow rate of 1 mL/min, while monitoring the UV signal of DNA at 260 nm and 280 nm. The 1:0.4 streptavidin/DNA mixture showed two peaks at 45 min and 56 min, and the 1:1 mixture showed four peaks at 45 min, 56 min, 67 min and 71 min, which correspond to the 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 oligonucleotide-streptavidin complexes, respectively. The 1:4 mixture showed four peaks at the same positions but with increased intensity of third (67 min) and fourth (71 min) peaks. The HPLC spectrum of 1:8 streptavidin/DNA mixture showed two main peaks, one at 59 min for unreacted DNA and the other at 71 min for the 4:1

WO 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotide-streptavidin complex. In addition, a shoulder at 67 min assigned to 3:1 complex was also present. Purified streptavidin-biotinylated DNA conjugates were concentrated and dispersed in 0.3 M PBS by ultrafiltration (centricon 30). Aggregates for TEM, thermal denaturation experiments, and SAXS measurements were prepared by freezing the solution containing 1-STV, 2-Au, and 3 in dry ice for 10 min, and thawed prior to the measurement to facilitate hybridization.

(b) Results

The nanoparticle/protein assembly (Figure 52) reported herein relies on three building blocks: streptavidin complexed to four biotinylated oligonucleotides (1-STV), oligonucleotide modified gold nanoparticles (2-Au), and a linker oligonucleotide (3) that has one half of its sequence complementary to 1 and the other half complementary to 2 (see Figure 52). In a typical experiment, linker DNA 3 (10 M, 21 L) was introduced to the mixture of 2-Au (9.7 nM, 260 L) and 1-STV (1.8 M, 27 L), or linker DNA 3 (10 M, 21 L) was premixed with 1-STV (1.8 M, 27 L) and then the mixture was added to 2-Au (9.7 nM, 260 L) in 0.3 M PBS. Aggregates with similar properties could be formed by both methods, but premixing 3 and 1-STV facilitates aggregate formation. Since a 13 nm gold nanoparticle is substantially larger than streptavidin (4 nm x 4 nm x 5 nm) [P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* 1989, 243, 85; N. M. Green, *Methods Enzymol.* 1990, 184, 51], a 1:20 mole ratio of Au nanoparticle to streptavidin was used to favor the formation of an extended polymeric structure rather than small aggregates comprised of a few nanoparticles or a structure consisting of a single gold nanoparticle functionalized with a hybridized layer of streptavidin.

Interestingly, at room temperature, when 1-STV, 2-Au, and 3 are mixed, no observable particle aggregation takes place, even after three days, as evidenced by an unperturbed UV-vis spectrum of the solution containing 1-STV, 2-Au, and 3. However, raising the temperature of the solution (53 °C) to a few degrees below the melting

temperature (T_m) of the DNA interconnects resulted in the growth of m size aggregates (Figure 57A) and the characteristic red-shift and dampening of the Au plasmon resonance associated with particle assembly. See C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* 1996, 382, 607. The transmission electron microscopy (TEM) image (Figure 57B) shows that the particles within the aggregates retain their physical shape prior to and after annealing, showing no particle fusion and further demonstrating the stabilizing influence of the surface oligonucleotide layer. This requirement of thermal activation for initiating particle assembly is in contrast to the previously studied system involving two gold nanoparticle conjugates (Figure 52 b) where, under very similar conditions, the oligonucleotide-modified gold particles assemble into aggregates within a few minutes upon adding linker DNA at room temperature. See C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* 1996, 382, 607. This feature could be due to: (1) the low collision probability in the Au-STV assembly system because of the relatively lower DNA coverage on streptavidin (DNA:streptavidin = 4:1) relative to that on Au nanoparticles (DNA:particle = ~110:1) [See L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.* 2000, 72, 5535] or (2) initial formation of kinetic structures in which most or all of the DNA on a single streptavidin binds to DNA on a single particle. The aggregate formation could be facilitated by freezing the solution as well as heating it. See R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* 1997, 277, 1078.

Melting experiments, based on UV-vis spectroscopy, were performed on the streptavidin/nanoparticle aggregates to confirm that they were formed by DNA hybridization, Figure 58A. Upon heating, the extinction at 520 nm initially decreases, resulting in a dip in the melting curve, and then abruptly increases when DNA melting takes place and the particles are dispersed. This dipping behavior has been observed in the pure gold nanoparticle system and has been attributed to aggregate growth prior to melting, a type of aggregate "ripening". See J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin,

R. L. Letsinger, R. C. Mucic, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4640. After melting, the Au plasmon resonance is centered at 520 nm, which is characteristic of dispersed 13 nm nanoparticles. These experiments conclusively demonstrate that sequence specific hybridization, rather than nonspecific interactions, are effecting the particle/protein assembly and that the process is completely reversible.

An Au nanoparticle/protein assembly also could be formed through streptavidin/biotin interactions as opposed to hybridization-induced assembly. For example, in a typical experiment, **1** (0.24 mM, 1.3 L), **3** (10 M, 32 L) and **2**-modified nanoparticles (Au nanoparticle concentration: 9.7 nM, 260 L) were mixed in 0.3 M PBS buffer to generate biotin-modified Au particles. The mixture was heated to 60 °C for 10 min and then cooled to room temperature to facilitate hybridization. After 24 h, the solution containing **1**, **3**, and **2**-modified Au nanoparticles was added to streptavidin (10 M, 4.2 L) in 0.3 M PBS and heated to 50 °C to form the nanoparticle aggregates. The color of the solution turned purple indicating aggregate formation, and the aggregates could be disassembled to **2**-modified Au particles, **1**-modified streptavidin, and **3** by raising the temperature of the solution above the T_m (65 °C). Small Angle X-ray Scattering (SAXS) [S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, P. W. Brazis, C. R. Kannewurf, R. L. Letsinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3845; A. Guinier, F. G., *Small Angle Scattering of X-rays*, Wiley, New York, 1955; B. A. Korgel, D. Fitzmaurice, *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 14191] data were collected for aggregates formed from the Au and streptavidin building blocks (**1**-STV, **2**-Au) and two different lengths of DNA linkers (24-mer (**3**) and 48-mer) and compared to those for aggregates based on Au-Au assembly and the same linking oligonucleotides (**2**-Au, **4**-Au, 24-mer linker (**3**), 48-mer linker), Figure 59. The 48-mer linker was a duplex consisting of :

5'TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCAATCCTGAATGCG
 and 3'GGCAATTCTGCTCCGTTAGTACGT (The duplex region is underlined.)
 containing 12-mer sticky ends which are complementary to **1** and **2**. For design of the SAXS experiments, A₁₀ spacers in **1**, **2**, and **4**, which were used in the above experiments

to provide more accessibility for DNA hybridization [See L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, *Anal. Chem.* 2000, 72, 5535, were removed to create a more rigid system. The aggregates linked by DNA showed relatively well defined diffraction peaks, and the Au-STV aggregates exhibited diffraction peaks at smaller s values than the Au-Au aggregates formed from the same linker. This suggests a larger Au interparticle distance in the Au-STV system. Furthermore, the diffraction peaks shift to smaller s values when 48-mer DNA was used as a linker instead of 24-mer for both the Au-Au and Au-STV assemblies, Figure 59.

The pair distance distribution function (PDDF), $g(r)$, has been calculated from the SAXS patterns using equation (1), where $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ and λ is particle number density. [A. Guinier, F. G., *Small Angle Scattering of X-rays*, Wiley, New York, 1955; B. A. Korgel, D. Fitzmaurice, *Phys. Rev. B* 1999, 59, 14191].

$$g(r) = 1 + (1/2\pi^2 \Delta r) \int q(s(q)-1) \sin(qr) dq \quad \text{Equation (1)}$$

where $g(r)$ gives the probability of finding a second particle as a function of distance r from a chosen particle. The nearest neighbor Au interparticle distances (center to center distance) obtained from the PDDFs are 19.3 nm, 25.4 nm, 28.7 nm, and 40.0 nm for the 24-mer linked Au-Au, 48-mer linked Au-Au, 24-mer linked Au-STV, and 48-mer linked Au-STV assemblies, respectively. A comparison of the interparticle distances for the Au-STV system and the Au-Au system clearly shows that the Au-STV assembly has the anticipated Au nanoparticle/streptavidin periodicity and that the two components (Au nanoparticle and streptavidin) are well separated by rigid DNA duplex linkers.

(c) Conclusion

This study is important for the following reasons. 1) It demonstrates that the DNA-directed nanoparticle assembly method is extendable to protein based structures, in addition to the inorganic nanoparticles studied thus far. Indeed, this is the first report demonstrating the reversible DNA-directed assembly of Au nanoparticles and a protein based structure functionalized with DNA. 2) It is well known that many proteins,

WO 01/73123

PCT/US01/10071

including streptavidin, will adsorb onto the surface of colloidal gold to form strongly bound complexes. Our experiments demonstrate the stabilizing influence of the high density DNA layers on the nanoparticle surfaces and their resistance to streptavidin adsorption in the absence of hybridization. Therefore, they point towards a way of

5 specifically immobilizing protein structures on nanoparticle surfaces through very specific interactions in a way that will not substantially perturb the activity of the protein. Particles with surface adsorbed proteins have played an important role in immunochemistry [M. A. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, Academic Press, San Diego, 1991], and the development of stable protein/particle

10 conjugates where the protein does not directly interact with the nanoparticle surface could lead to improved nanoparticle probes for histochemical studies and immunoassays.

All patents, patent applications and references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

- 5 5. The method of Claim 2 wherein the detectable change is observed on a solid surface.
- 6 6. The method of Claim 2 wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.
- 7 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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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;

25

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;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
20 complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid;

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

15 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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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;

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 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 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.

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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

- 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
15 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
20 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
25 effective to provide for hybridization of the nucleic acid with the probe oligonucleotides;
removing the particles; and
detecting the reporter molecule.

25

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 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.

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 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.

97. The kit of Claim 95 wherein the nanoparticles are made of gold.

98. The kit of Claim 95 further comprising a solid surface.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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,
the first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached
15 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 01/73123

PCT/US01/10071

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
10 nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the
 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
15 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.
- 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
15 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
25 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 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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 01/73123

PCT/US01/10071

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;

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.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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

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

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 nucleic acid; and

10 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 01/73123

PCT/US01/10071

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
15 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 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.

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
10 labeled with a fluorescent molecule; and
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
25 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.

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

170. A satellite probe comprising:

5 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
10 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

15 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
20

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.

25 172. 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 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).

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;
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 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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

179. The nanomaterials or nanostructures of Claim 178 wherein at least some of 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.

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.

183. The composition of Claim 182 wherein the nanoparticles are metallic nanoparticles, semiconductor nanoparticles, or a combination thereof.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
10 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
25 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

a spacer portion and a recognition portion, the spacer portion being designed so that it can bind to the nanoparticles; and

5 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.

10 203. 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
15 nanoparticles.

205. The method of Claim 204 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

20 206. 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.

25 208. A method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the method comprising:
providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising:

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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;
- 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

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

232. The method of Claim 231 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

20

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

245

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 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 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.

20

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.

25

264. The nanoparticles of Claim 253 wherein the nanoparticles are metal nanoparticles or semiconductor nanoparticles.

265. The nanoparticles of Claim 264 wherein the nanoparticles are gold nanoparticles.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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
observing a detectable change brought about by hybridization of the recognition
15 oligonucleotides with the nucleic acid.

268. A method of detecting a nucleic acid having at least two portions
comprising:
providing a type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates according to
20 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 01/73123

PCT/US01/10071

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
- 5 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
- 10 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.

15 271. 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.

25 274. 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 01/73123

PCT/US01/10071

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

20

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.

25

280. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is viral RNA or DNA.

281. The method of Claim 269 wherein the nucleic acid is a gene associated with a disease.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 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.

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
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.

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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

334. The method of Claim 315 wherein the nucleic acid is contacted and
15 hybridized with the recognition oligonucleotides on the first type of nanoparticles before being contacted with the second type of nanoparticles.

335. The method of Claim 334 wherein the first type of nanoparticles is
20 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 01/73123

PCT/US01/10071

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;

5 (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:

15 (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

(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:

(f) contacting the second type of conjugates bound to the substrate with

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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;

20 (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 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 (e) and (g) or steps (e), (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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
15 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 nanoparticles according to any one of Claims 243-250 having one or more types of
20 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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 (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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid;

5 (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:

15 (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:

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;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

- 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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:

15 (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

(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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

10 418. The method of Claim 417 wherein the device is a flatbed scanner.

 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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

15 450. The conjugates of claims 435 or 436 further a type of diluent 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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

25 458. The method of claim 457 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

459. The method of claims 458 wherein the spacer portion comprises from about 10 to about 30 nucleotides.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

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

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

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:

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;

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

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 01/73123

PCT/US01/10071

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.

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.

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.

478. The method of claims 476 or 477 wherein the spacer portion comprises at least about 10 nucleotides.

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.

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 01/73123

PCT/US01/10071

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.
487. A method for detecting an analyte in a sample comprising:
providing a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto,
20 at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having a specific binding complement of said analyte bound thereto;
contacting the analyte with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte and specific binding
25 complement bound to the nanoparticle conjugate; and
observing a detectable change brought about by the specific binding interaction of the analyte and the specific binding complement of said analyte.

488. A method for detecting an analyte comprising:
providing a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto,
at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles are bound, as a
result of hybridization, to a first portion of a linker oligonucleotide, the linker
5 oligonucleotide having a second portion that is bound, as a result of hybridization, to
oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte;
contacting the analyte with a nanoparticle conjugate under conditions effective to
allow specific binding interaction between the analyte and specific binding complement
bound to the nanoparticle conjugate; and
10 observing a detectable change brought about by the specific binding interaction of
the analyte and the specific binding complement of said analyte.

489. A method for detecting an analyte comprising:
providing (i) an analyte having an oligonucleotide bound thereto, (ii) a first type
15 of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, the oligonucleotides bound to the
first type of nanoparticles having a sequence that is complementary to the sequence of the
oligonucleotide bound to the analyte, and (iii) a second type of nanoparticle conjugate
having oligonucleotides bound thereto, a portion of the oligonucleotides bound to the
second type of nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides
20 having bound thereto a specific binding complement of said analyte;
contacting the oligonucleotide bound to the analyte with the first type of
nanoparticles under conditions effective to allow hybridization between the
oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides attached to the first type
of nanoparticles to form a nanoparticle analyte conjugate;
25 contacting the nanoparticle analyte conjugate with a second type of nanoparticle
conjugates under conditions effective to allow specific binding interaction between the
analyte and specific binding complement of the second type of nanoparticle conjugate;
and

observing a detectable change brought about by the specific binding interaction of the analyte and the specific binding complement of said analyte.

490. A method for detecting an analyte comprising:

- 5 providing (ii) a linker oligonucleotide, the linker oligonucleotide having at least two portions, (iii) a first type of nanoparticle have oligonucleotides attached thereto, at least a portion of the oligonucleotides bound to the first type of nanoparticles have a sequence that is complementary to a second portion of the linker oligonucleotide; (i) an analyte having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide having a sequence
- 10 complementary to the first portion of the linker oligonucleotide; and (iv) a second type of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticles are bound, as a result of hybridization, to an oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of the analyte;
- 15 contacting the linker oligonucleotide with the first type of nanoparticles under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide attached to the first type of nanoparticles with a first portion of the linker oligonucleotide;
- contacting the linker oligonucleotide with the oligonucleotide having the analyte bound thereto under conditions effective to allow hybridization between the
- 20 oligonucleotide having analyte bound thereto with a second portion of the linker oligonucleotide;
- contacting the analyte bound to the first type of nanoparticles with a second type of nanoparticles under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the first type of nanoparticles and the specific binding complement
- 25 bound to the second type of nanoparticles; and
- observing the detectable change brought about by the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

491. The method according to any one of claim 487-490, wherein the analyte is polyvalent and binds to two or more nanoparticle conjugates.

492. The method according to any one of claim 487-490, wherein the analyte is
5 polyvalent and specifically binds to two or more nanoparticle conjugates.

493. The method according to any one of claim 487-490, wherein the contacting conditions include freezing and thawing.

10 494. The method according to any one of claim 487-490, wherein the contacting conditions include heating.

495. The method according to any one of claim 487-490, wherein the detectable change is observed on a solid surface.

15

496. The method according to any one of claim 487-490, wherein the detectable change is a color change observable with the naked eye.

497. The method according to any one of claim 487-490, wherein the color
20 change is observed on a solid surface.

498. The method according to any one of claim 487-490, wherein the nanoparticles are made of gold.

25

499. A method for detecting an analyte comprising:
providing (i) a support having an analyte bound thereto and (ii) a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having a specific

WO 01/73123

PCT/US01/10071

binding complement of said analyte;

contacting the analyte bound to the support to the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte and specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate; and

- 5 observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

500. A method for detecting an analyte comprising:

- providing (i) a support having a oligonucleotides bound thereto, (ii) an analyte
10 having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the oligonucleotides bound to the support; and (iii) a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said
15 analyte;

contacting the oligonucleotides bound to the support with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the oligonucleotides bound to the analytes;

- contacting the analyte bound to the support with the nanoparticle conjugate under
20 conditions effective to allow for specific binding interactions between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle; and
 observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

- 25 501. A method for detecting an analyte in a sample comprising:

providing (i) a support having oligonucleotides bound thereto, (ii) a linker oligonucleotide, (ii) an analyte having an oligonucleotide bound thereto, (iii) a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, wherein at least a portion

of the oligonucleotides bound to the nanoparticle conjugate are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte, the sequence of the linker oligonucleotide having at least two portions, the oligonucleotides bound to the support have a sequence that is complementary to the first
5 portion of the linker oligonucleotide, the oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the second portion of the linker oligonucleotides;
contacting the linker oligonucleotide with the oligonucleotide bound to the support under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the first portion of the linker oligonucleotide;
10 contacting the linker oligonucleotide with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide bound to the analyte and the second portion of the linker oligonucleotide;
contacting analyte bound to the support with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interaction between the analyte bound to
15 the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate;
and
observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

20 502. A method for detecting an analyte comprising:
providing (i) a support having oligonucleotides bound thereto, (ii) an analyte having oligonucleotides bound thereto, the sequence of the oligonucleotide bound to the analyte is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound the support; (iii)
a type of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the
25 oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to a first portion of a linker oligonucleotide, a second portion of the linker oligonucleotide is further bound, as a result of hybridization, to an oligonucleotide having a oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of said analyte;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

contacting the oligonucleotides bound to the support with oligonucleotide bound to an analyte under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the oligonucleotides bound to the analyte; contacting the analyte bound to the support with the the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle; and observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

503. A method for detecting an analyte comprising:
providing (i) a support having an analyte bound thereto, (ii) an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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, and at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte;
contacting the support with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe; and
observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

504. A method for detecting an analyte comprising:
providing (i) a support having an oligonucleotide bound thereto; (ii) an analyte having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound to the support, (iii) an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having

WO 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotides bound thereto, 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, and at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which are bound, as a result of hybridization, to second
5 oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte;
contacting a support having oligonucleotides bound thereto with the analyte having an oligonucleotide bound thereto. The contacting occurs under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides bound to the support; and
10 contacting the analyte bound to the support with an aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe; and
observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

15

505. A method for detecting an analyte comprising:

providing (i) a support having oligonucleotides bound thereto, (ii) a linker oligonucleotide having at least two portions, (iii) an analyte having oligonucleotides bound thereto, (iv) an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles
20 having oligonucleotides bound thereto, 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 some oligonucleotides attached thereto which bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said
25 analyte, the oligonucleotides bound to the support has a sequence that is complementary to a first portion of the linker oligonucleotide, the oligonucleotide bound to the analyte has a sequence that is complementary with the second portion of the linker oligonucleotide;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

contacting the linker oligonucleotide with the oligonucleotides bound to the support under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the first portion of the linker oligonucleotide;

5 contacting the linker oligonucleotide with the oligonucleotide bound to the analyte under conditions effective to allow hybridization between the second portion of the linker oligonucleotide bound to the support and the oligonucleotide bound to the analyte;

10 contacting the analyte bound to the support with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe; and

observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

506. A method for detecting an analyte comprising:

15 providing (i) a support having oligonucleotides bound thereto, (ii) an analyte having oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide has a sequence that is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound to the support, (iii) an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, the nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result
20 of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them and at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have some oligonucleotides attached thereto which bound to a first portion of a linker oligonucleotide as a result of hybridization, a second portion of the second linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to a oligonucleotide having bound thereto a specific binding
25 complement of said analyte;

contacting a support having oligonucleotides bound thereto with an oligonucleotide having analyte bound thereto under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides bound to the analyte with the oligonucleotides

bound to the support;

contacting the analyte bound to the support with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and the specific binding complement bound to the aggregate probe; and

- 5 observing a detectable change dependent on the specific binding of the analyte to the specific binding complement of the analyte.

507. A method for detecting an analyte comprising:

- 10 providing (i) a support having an analyte bound thereto and (ii) a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, at least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to second oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte;

- 15 contacting a support having an analyte bound thereto with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interactions between the analyte bound to the support and specific binding complement bound to the nanoparticle conjugate;

contacting the nanoparticle conjugate bound to the support with silver stain to produce a detectable change; and

- 20 observing the detectable change dependent on the specific binding of the analyte and the specific binding complement of the analyte.

508. A method for detecting a polyvalent analyte comprising:

- 25 providing a nanoparticle probe having oligonucleotides bound thereto, at least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticle are bound to a first portion of a reporter oligonucleotide as a result of hybridization, a second portion of the reporter oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to an oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of the analyte;

contacting a polyvalent analyte with the nanoparticle probe under conditions

WO 01/73123

PCT/US01/10071

effective to allow specific binding interactions between the analyte and the nanoparticle probe and to form an aggregated complex;
isolating the aggregated complex;
subjecting the aggregated complex to conditions effective to dehybridize the
5 aggregated complex and to release the reporter oligonucleotide; and
detecting for the presence of reporter oligonucleotide.

509. A method for detecting a nucleic acid comprising:
providing (i) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides bound
10 thereto, the oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is
complementary to a first portion of the nucleic acid and (ii) a complex comprising
streptavidin or avidin bound, by specific binding interaction, to two or more biotin
molecules each having oligonucleotides bound thereto, the oligonucleotides bound to
biotin have a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic acid;
15 contacting the nucleic acid, nanoparticle conjugate and complex under conditions
effective to allow hybridization of the first portion of the nucleic acid with the
oligonucleotides bound to the nanoparticles and the second portion of the nucleic acid
with the oligonucleotides bound to the complex; and
observing the detectable change resulting from the hybridization of the
20 nanoparticles, the complex and the nucleic acid.

510. A method for detecting a nucleic acid comprising:
providing (i) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides bound
thereto, the oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is
25 complementary to a first portion of the nucleic acid, (ii) oligonucleotides having biotin
bound thereto; the oligonucleotide bound to the biotins have a sequence that is
complementary to a second portion of the nucleic acid, and (iii) streptavidin or avidin;
contacting the nucleic acid with the nanoparticle conjugate and oligonucleotide

bound to biotin under conditions effective to allow hybridization between the first portion of the nucleic acid with the oligonucleotides attached to the nanoparticles and the second portion of the nucleic acid with the oligonucleotides attached to the biotin to form a complex;

5 contacting the complex with streptavidin or avidin under conditions effective to allow specific binding interaction between the biotin bound to the complex with streptavidin or avidin; and

observing the detectable change resulting from the specific binding of biotin bound to the complex with streptavidin or avidin.

10

511. A method for detecting a nucleic acid comprising:

providing a first type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides attached thereto, at least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid;

15 contacting the nucleic acid with a first type of nanoparticle under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides attached to the nanoparticle and the first portion of the nucleic acid;

providing an oligonucleotide having a sbp member bound thereto is provided, the oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is complementary to the

20 second portion of the sequence of the nucleic acid;

contacting the nucleic acid bound to the first type of nanoparticle under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide bound to the sbp member and the second portion of the nucleic acid;

providing a second type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto is provided, at least a portion of the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticle are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said analyte;

25

contacting the nucleic acid bound to the first type of nanoparticle and the

WO 01/73123

PCT/US01/10071

oligonucleotide bound to the sbp member with the oligonucleotides bound to the second type of nanoparticles under conditions effective to allow specific binding interaction between the sbp member bound to the first type of nanoparticle and the sbp complement bound to the second type of nanoparticle; and

- 5 observing the detectable change resulting from the specific binding of biotin with streptavidin or avidin.

512. The method according to claim 511, wherein the sbp member is biotin.

- 10 513. The method according to claim 511, wherein the sb complement is streptavidin or avidin.

514. A method for detecting a nucleic acid comprising:

- 15 providing a support having oligonucleotides bound thereto, the oligonucleotides bound to the support have a sequence that is complementary to the first portion of the nucleic acid;

contacting the nucleic acid with a support having oligonucleotides bound thereto under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support with the first portion of the nucleic acid;

- 20 providing an oligonucleotide having a sbp member bound thereto, the oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is complementary to the second portion of the nucleic acid;

contacting the nucleic acid bound to the support with the oligonucleotide bound to the sbp member under conditions effective to allow hybridization between the

- 25 oligonucleotide bound to the sbp member and the second portion of the nucleic acid; providing a type of nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto, at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle conjugate are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding

WO 01/73123

PCT/US01/10071

complement of said sbp member;

contacting the sbp member bound to the support with the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow specific binding interaction between the sbp member bound to the support and the specific binding complement bound to the nanoparticle; and

- 5 observing a detectable change dependent on the specific binding of the sbp member and the specific binding complement.

515. The method according to claim 514, wherein the sbp member is streptavidin or avidin.

10

516. The method according to claim 514, wherein the sb complement is biotin.

517. A method for detecting a nucleic acid comprising:

- 15 providing a nanoparticle conjugate having oligonucleotides attached thereto, at least some of the oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence that is complementary to the first portion of the nucleic acid;

contacting a nucleic acid with the oligonucleotides bound to the nanoparticle conjugate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides bound to the nanoparticles with the first portion of the nucleic acid;

- 20 providing an oligonucleotide having sbp member bound thereto, the oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is complementary to the second portion of the nucleic acid;

- 25 contacting the nucleic acid with the oligonucleotide having the sbp member under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotide having the sbp member and the nucleic acid;

providing a support having bound thereto a specific binding complement of the sbp member;

contacting the support with the sbp member bound to the nanoparticle under

WO 01/73123

PCT/US01/10071

conditions effective to allow specific binding interactions to occur between the sbp member and the sb complement bound to the support; and

observing a detectable event dependent on the specific binding of the sbp member and the sb complement of the sbp member.

5

518. The method according to claim 517, wherein the sbp member is biotin.

519. The method according to claim 517, wherein the sb complement is streptavidin or avidin.

10

520. A method for detecting a nucleic acid comprising:

providing a support having oligonucleotides bound thereto, the oligonucleotides bound the support have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid;

15

contacting the nucleic acid with the support under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the support and the first portion of the nucleic acid;

providing an oligonucleotide having a sbp member bound thereto, the oligonucleotide bound to the sbp member has a sequence that is complementary with the second portion of the nucleic acid;

20

contacting the nucleic acid bound to the support with the oligonucleotide bound to the sbp member under conditions effective to allow hybridization between the second portion of the nucleic acid bound to the support and the oligonucleotide bound to the sbp member;

25

providing an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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 and at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have

WO 01/73123

PCT/US01/10071

some oligonucleotides attached thereto which bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of said sbp member;

- 5 contacting the sbp member bound to the support with the aggregate probe under conditions effective to allow specific binding interactions between the sbp member bound to the support and specific binding complement bound to the aggregate probe; and
 observing a detectable change dependent on the specific binding of the sbp member and the sb complement of the sbp member.

10 521. The method according to claim 520, wherein the sbp member is biotin.

 522. The method according to claim 520, wherein the sb complement is strepavidin or avidin.

- 15 523. A method for detecting a nucleic acid comprising:
 providing (i) an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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 and at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have
20 some oligonucleotides attached thereto which are complementary to a first portion of the nucleic acid, and (ii) an oligonucleotide having sbp member, the oligonucleotide having an sbp member bound thereto has a sequence that is complementary to the second portion of the nucleic acid;
 contacting the nucleic acid with an aggregate probe under conditions effective to
25 allow hybridization between a portion of the oligonucleotides bound to the aggregate probe with the first portion of the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the aggregate probe with the first portion of the nucleic acid;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

- contacting the nucleic acid with an oligonucleotide having sbp member, the oligonucleotide having an sbp member bound thereto has a sequence that is complementary to the second portion of the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound the the sbp members with the
- 5 second portion of the nucleic acid;
- providing a support having bound thereto a specific binding complement of the sbp member;
- contacting the specific binding complement bound to the support with the sbp member bound to the aggregate probe under conditions effective to allow specific
- 10 binding interactions to occur between the sbp member bound to the aggregate probe and the sb complement bound to the support; and
- observing a detectable event dependent on the specific binding of the sbp member and the sb complement.
- 15 524. The method according to claim 523, wherein the sbp member is streptavidin or avidin.
525. The method according to claim 523, wherein the sb complement is biotin.
- 20 526. The method according to any one of Claims 499-525, 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.
- 25 527. The method according to any one of Claims 499-525, wherein the substrate is a transparent substrate or an opaque white substrate.
528. The method according to any one of Claims 499-525, wherein the

WO 01/73123

PCT/US01/10071

detectable change is the formation of dark areas on the substrate.

529. The method according to any one of Claims 499-525, wherein the nanoparticles are made of gold.

5

530. The method according to any one of Claims 498-523, wherein the substrate is contacted with silver stain to produce the detectable change.

531. The method according to any one of Claims 498-523, wherein the detectable change is observed with an optical scanner.

10

532. A nanoparticle conjugate for detecting an analyte comprising:

- (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto; and
- (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the specific binding complement bound thereto have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles and are bound, as a result of hybridization, to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles.

15

20 533. A nanoparticle conjugate for detecting an analyte comprising:

- (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;
- (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte member; and
- (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte.

25

WO 01/73123

PCT/US01/10071

534. An aggregate probe for detecting an analyte comprising:

- (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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; and
- (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the specific binding complement bound thereto are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe.

535. An aggregate probe for detecting an analyte comprising:

- (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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;
- (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and
- (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte.

536. A method for preparing a nanoprobe conjugate for detecting an analyte comprising:

- providing (i) a nanoparticle conjugate having oligonucleotides bound thereto and (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte, at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles have a sequence that is complementary to the sequence of the oligonucleotides bound to the specific binding

WO 01/73123

PCT/US01/10071

complement, and

contacting the oligonucleotides attached to the nanoparticle conjugate with the oligonucleotides bound to the specific binding complement under conditions effective to allow hybridization between the oligonucleotides bound to the nanoparticles with the

5. oligonucleotides bound to the specific binding complement.

537. A kit for detecting an analyte comprising

- (a) at least one container holding nanoparticle conjugates comprising (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto; and (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the specific binding pair member have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles and are bound, as a result of hybridization, to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles; and
- (b) an optional support for observing a detectable change.

15

538. A kit for detecting an analyte comprising

- (a) at least one container holding nanoparticle conjugates comprising
- (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;
- (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte member; and
- (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and
- (b) an optional support for observing a detectable change.

20

25

539. A kit for detecting an analyte comprising

WO 01/73123

PCT/US01/10071

- (b) at least one container holding aggregate probes comprising
 - (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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; and
 - 5 (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the specific binding complement bound thereto are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and
 - (b) an optional support for observing a detectable change.
- 10 540. A kit for detecting an analyte comprising
 - (a) at least one container holding aggregate probes comprising
 - (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, the nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the
 - 15 hybridization of some of the oligonucleotides attached to them;
 - (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and
 - (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of
 - 20 at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and
 - (b) an optional support for observing a detectable change.
- 25 541. A kit for detecting an analyte comprising:
 - (a) at least one container holding a type of nanoparticle conjugates comprising nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;
 - (b) a container holding oligonucleotide having bound thereto a specific

WO 01/73123

PCT/US01/10071

binding complement of an analyte, the oligonucleotides having bound thereto the specific binding pair member have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles; and

(c) an optional support for observing a detectable change.

5

542. A kit for detecting an analyte comprising

(a) at least one container holding nanoparticle conjugates comprising nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;

10 (b) a container holding oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte member;

(c) a container holding a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is complementary to the oligonucleotides having bound thereto a specific

15 binding complement of an analyte; and

(d) an optional support for observing a detectable change.

543. A kit for detecting an analyte comprising

20 (a) at least one container holding aggregate probes comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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;

(b) a container holding oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having bound thereto the specific binding complement are complementary to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and

25 (c) an optional support for observing a detectable change.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

544. A kit for detecting an analyte comprising
- (a) at least one container holding aggregate probes comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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;
 - (b) a container holding oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte;
 - (c) a container holding a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide has a sequence that is complementary to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion of the linker oligonucleotide has a sequence that is complementary to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and
 - (d) an optional support for observing a detectable change.
545. A kit for detecting an analyte comprising:
- (a) at least one container holding a type of nanoparticle conjugates comprising nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;
 - (b) a container holding oligonucleotide having covalently bound thereto a functional group for binding a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the bound functional group have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles; and
 - (c) an optional support for observing a detectable change.
546. A kit for detecting an analyte comprising
- (a) at least one container holding nanoparticle conjugates comprising nanoparticles having oligonucleotides bound thereto;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

- (b) a container holding oligonucleotide having covalently bound thereto a functional group for binding a specific binding complement of an analyte;
- (c) a container holding a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is complementary to the oligonucleotides having the bound functional group; and
- (d) an optional support for observing a detectable change.
- 10 547. A kit for detecting an analyte comprising
- (a) at least one container holding aggregate probes comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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;
- 15 (b) a container holding oligonucleotide having covalently bound thereto a functional group for binding a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having the functional group have a sequence that is complementary to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and
- (c) an optional support for observing a detectable change.
- 20 548. A kit for detecting an analyte comprising
- (a) at least one container holding aggregate probes comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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;
- 25 (b) a container holding oligonucleotide having covalently bound thereto a functional group for binding a specific binding complement of an analyte;
- (c) a container holding a linker oligonucleotide having at least two portions, a

WO 01/73123

PCT/US01/10071

first portion of the linker oligonucleonucleotide has a sequence that is complementary to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion of the linker oligonucleotide has a sequence that is complementary to the oligonucleotides having the functional group bound thereto; and

5 (d) an optional support for observing a detectable change.

549. A kit for detecting an analyte comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto;

an oligonucleotide having a covalently bound thereto a functional group

10 for binding a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotide bound to the functional group having a sequence that is complementary to the oligonucleotides bound to the substrate; and

a nanoparticle conjugate comprising (i) nanoparticles having

15 oligonucleotides bound thereto; and (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having bound thereto the specific binding complement have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles and are bound, as a result of hybridization, to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles.

20 550. A kit for detecting an analyte comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto;

an oligonucleotide having a covalently bound thereto a functional group

for binding a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotide bound to the functional group having a sequence that is complementary to the oligonucleotides

25 bound to the substrate; and

nanoparticle conjugates comprising (i) nanoparticles having

oligonucleotides bound thereto; (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of the sbp member; and (iii) a linker oligonucleotide having at least

WO 01/73123

PCT/US01/10071

two portions, a first portion of the linker oligonucleonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte.

5

551. A kit for detecting a nucleic acid comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides bound to the substrate have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid;

10

an oligonucleotide having an sbp member bound thereto, the oligonucleotide having a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic acid; and

15

a nanoparticle conjugate comprising (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto; and (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of an sbp member, the oligonucleotides having bound thereto the specific binding complement have a sequence that is complementary to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles and are bound, as a result of hybridization, to at least a portion of the oligonucleotides bound to the nanoparticles.

20

552. The kit according to claim 551 wherein the sbp member is biotin.

553. The kit according to claim 551 wherein the specific binding complement of the sbp member is streptavidin or avidin.

25

554. A kit for detecting a nucleic acid comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides bound to the substrate have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid;

WO 01/73123

PCT/US01/10071

a oligonucleotide having an sbp member bound thereto, the oligonucleotide having the bound sbp member having a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic acid; and

nanoparticle conjugates comprising (i) nanoparticles having oligonucleotides bound thereto; (ii) oligonucleotide having bound thereto a specific binding complement of the sbp member; and (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides bound to the nanoparticle and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte.

555. The kit according to claim 554, wherein the sbp member is biotin.

556. The kit according to claim 554, wherein the specific binding complement of the sbp member is streptavidin or avidin.

557. A kit for detecting an analyte comprising:

a substrate having oligonucleotides attached thereto;

an oligonucleotide having a covalently bound thereto a functional group for binding an analyte, the oligonucleotide bound to the functional group having a sequence that is complementary to the oligonucleotides bound to the substrate; and

an aggregate probe comprising: (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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; and (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte, the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte are further bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe.

WO 01/73123

PCT/US01/10071

558. A kit for detecting an analyte comprising:
a substrate having oligonucleotides attached thereto;
an oligonucleotide having a covalently bound thereto a functional group for
5 binding an analyte, the oligonucleotide bound to the functional group having a sequence
that is complementary to the oligonucleotides bound to the substrate; and
an aggregate probe comprising: (i) at least two types of nanoparticles having
oligonucleotides bound thereto, the nanoparticles of the aggregate probe are bound to
each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to
10 them; (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an
analyte; and (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of
the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides
of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion
of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides
15 having bound thereto a specific binding complement of an analyte.

559. A kit for detecting a nucleic acid comprising:
a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides
bound to the substrate have a sequence that is complementary to a first portion of the
20 nucleic acid;
an oligonucleotide having an sbp member bound thereto, the
oligonucleotide having a sequence that is complementary to a second portion of the
nucleic acid; and
an aggregate probe for detecting an analyte comprising: (i) at least two
25 types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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; and (ii) oligonucleotides having bound thereto a
specific binding complement of the sbp member, the oligonucleotides having bound

WO 01/73123

PCT/US01/10071

thereto a specific binding complement are bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe.

560. The kit according to claim 559 wherein the sbp member is biotin.

5

561. The kit according to claim 559 wherein the specific binding complement of the sbp member is streptavidin or avidin.

562. A kit for detecting a nucleic acid comprising:

10

a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides bound to the substrate have a sequence that is complementary to a first portion of the nucleic acid;

a oligonucleotide having an sbp member bound thereto, the oligonucleotide having the bound sbp member having a sequence that is complementary to a second portion of the nucleic acid; and

15

aggregate probes comprising (i) at least two types of nanoparticles having oligonucleotides bound thereto, 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; (ii) oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an analyte; and (iii) a linker oligonucleotide having at least two portions, a first portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to oligonucleotides of at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe; and a second portion of the linker oligonucleotide is bound, as a result of hybridization, to the oligonucleotides having bound thereto a specific binding complement of an sbp member.

20

563. The kit according to claim 562 wherein the sbp member is biotin.

564. The kit according to claim 562 wherein the specific binding complement

WO 01/73123

PCT/US01/10071

of the sbp member is streptavidin or avidin.

565. A method for nanofabrication comprising:

- providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence,
- 5 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 type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide;
- providing a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or more
- 10 biotin molecules, each having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotides bound to the biotin molecules have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and
- contacting the linking oligonucleotides, complex, and nanoparticles under
- conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles
- 15 and the first oligonucleotides bound to the biotin to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

566. A method of nanofabrication comprising:

- providing (i) at least one type of linking oligonucleotide having a selected
- 20 sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; (ii) 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 and a sequence that is complementary to the first portion of the sequence of the linking oligonucleotides, the
- 25 oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates and a sequence that is complementary to the first portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and (iii) a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or

WO 01/73123

PCT/US01/10071

more biotin molecules, each having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the biotin molecule has a sequence that is complementary to the second portion of the linking oligonucleotide; and

- 5 contacting the first and second types of nanoparticles, the linking oligonucleotides, and the complex under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other and to the linking oligonucleotide and the hybridization of the oligonucleotides of the complexes to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

- 10 567. A method of nanofabrication comprising:

 providing (a) at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; (b) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide; (c) biotin having a
15 oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the biotin has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and (d) streptavidin or avidin;

- 20 contacting the linking oligonucleotides, biotin having an oligonucleotide bound thereto, and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the oligonucleotides bound to the biotin to the linking oligonucleotides to produce a complex; and

- 25 contacting the complex with streptavidin or avidin under conditions effective to allow specific binding interaction between biotin and streptavidin or avidin so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

568. A nanomaterial produced by the method comprising:

 providing (i) at least one type of linking oligonucleotide having a selected

sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; (ii) 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 and a sequence that is
5 complementary to the first portion of the sequence of the linking oligonucleotides, 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 and a sequence that is complementary to the first portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and (iii) a complex comprised of strepavidin or avidin bound to two or
10 more biotin molecules, each having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the biotin molecule has a sequence that is complementary to the second portion of the linking oligonucleotide; and
contacting the first and second types of nanoparticles, the linking oligonucleotides, and the complex under conditions effective to allow hybridization of
15 the oligonucleotides on the nanoparticles to each other and to the linking oligonucleotide and the hybridization of the oligonucleotides of the complexes to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

569. A nanomaterial produced by the method comprising:
20 providing (a) at least one type of linking oligonucleotide having a selected sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions; (b) one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a linking oligonucleotide; (c) biotin having a
25 oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide bound to the biotin has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the linking oligonucleotide; and (d) strepavidin or avidin;
contacting the linking oligonucleotides, biotin having an oligonucleotide bound

WO 01/73123

PCT/US01/10071

thereto, and nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the oligonucleotides bound to the biotin to the linking oligonucleotides to produce a complex; and

- 5 contacting the complex with streptavidin or avidin under conditions effective to allow specific binding interaction between biotin and streptavidin or avidin so that a desired nanomaterials or nanostructure is formed.

570. A method of separating a selected target nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids comprising:

- 10 providing (a) 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 the first portion of the selected nucleic acid; (b) a complex comprised of streptavidin or avidin bound to two or more biotin molecules, each having a first oligonucleotide bound thereto, the first oligonucleotide having a sequence
15 complementary to the sequence of the second portion of the selected nucleic acid;
 contacting the selected nucleic acid and other nucleic acids with the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the first oligonucleotides of the complex with the selected nucleic acid and subsequent formation of an aggregate; and
20 separating out the aggregate including the selected nucleic acid.

571. A method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids comprising:

- 25 providing (a) 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 the first portion of the selected nucleic acid; (b) biotin having an oligonucleotide bound thereto, the oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of the second portion of the selected nucleic acid; and (c)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

streptavidin or avidin;

contacting the selected nucleic acid and other nucleic acids with the nanoparticles
and biotin having oligonucleotides bound thereto under conditions effective to allow
hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles and the oligonucleotides of the

5 biotin construct with the selected nucleic acid and produce a complex;

contacting the complex with streptavidin or avidin under conditions effective to
allow specific binding interactions between the biotin and streptavidin or avidin and
subsequent formation of an aggregate; and

separating out the aggregate including the selected nucleic acid.

10

WO 01/73123

PCT/US01/10071

SEQUENCE LISTING

<110> Mirkin, Chad A.
Letsinger, Robert L.
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. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 1
aaacgactct agcgcgtata

20

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 2
atggcaacta tacggcctag

20

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 3
ccttgagatt tccctc

16

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 4
gaggggaatc tcaagc

16

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<400> 5
aacttgcgct aatggcga 18

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 6
aagttgcgct ttacggctaa 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
gaasagggaa ggaga 15

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 9
cttttcctt cctct 15

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 10
aaacgactct agcgcgtata gttgccat 28

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 11
atggcaacta tacgcgctag agtcggtt 28

<210> 12
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 12
cctatcgacc atgct 15

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 13
agcatggtcg ataggaaacg actctagcgc 30

<210> 14
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 14
gcgctagagt cgttt 15

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 15
agcatggtcg ataggatggc aactatacgc 30

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<400> 16
gtcgatagga aacgactcta gcgc

24

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 17
agcatggttg ataggaaacg actctagcgc

30

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 18
agcatggttg ataggaaacg actctagcgc

30

<210> 19
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 19
tctcaactcg ta

12

<210> 20
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 20
cgcattcagg at 12

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 21
tacgagttga gagagtgtccc acat 24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 22
tacgagttga gaactctgaa tgcg 24

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 23
tacgagttga gaactctgaa tgct 24

<210> 24

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 24
tacgagttga gactcctgaa tgcg 24

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 25
tacgagttga gaatcctgaa tgc 23

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 26
tacgagttga gacatcctga atgcg 25

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: random
synthetic sequence

<400> 27

WO 01/73123

PCT/US01/10071

tacgagttga gaatcctgaa 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

tgcattgattg cctcgtctta acgg

24

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<213> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 31
tacgagttga gacggttaag acgagggcaat catgcatata ttggacgctt tacggacaac 60
atcctgaatg cg 72

<210> 32
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 32
gtgtctcgta aagcgtccaa tatatgcctg attgctctgt 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 gaatcctgaa tgcg 24

<210> 35

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 35
cgcatccagg at 12

<210> 36
<211> 141
<212> DNA
<213> anthrax

<400> 36
ggcggatgag tcagtagtta aggaggctca tagagaagta attaattcgt caacagaggy 60
attattgtta aatattgata aggatataag aaaaatatta tccaggytta tattgtaga 120
attgaagata ctgaagggt t 141

<210> 37
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 37
taacaataat ccttc 13

<210> 38
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 38
atccttatca atatt 15

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 39
tgagcctctt taactactga ctctcggcc

30

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 40
tggtgacgaa ttaattactt ctcta

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 01/73123

PCT/US01/10071

<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
tttcaactcg taasaaaaaa 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 01/73123

PCT/US01/10071

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 46
tctcaactcg taataaaaaa aa 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 cagagtgcgc acat 24

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<210> 50
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 50
cgcatccagg at

12

<210> 51
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 51
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgcatccagg at

32

<210> 52
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 52
cgcatccagg ataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

32

<210> 53
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<400> 53
atctctgaatg cg

12

<210> 54
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 54
atctctgaatg cg

12

<210> 55
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 55
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa

10

<210> 56
<211> 27
<212> DNA
<213> Anthrax

<400> 56
ggattattgt taattattga taaggat

27

<210> 57
<211> 12
<212> DNA
<213> Anthrax

<400> 57
taacatat cc

12

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<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 gaatcctgaa tgcg

24

<210> 61
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 61
gcgtaagtcg taacgtacta acggagcaga attgccagag ttgagcat

48

WO 01/73123

PCT/US01/10071

<210> 62
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

<400> 62
gcgtaagtc tacaacaggc atttcgcagg ttatatadgt actaacggag gagaattgcc 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 cctcgtctta acgg 24

<210> 64
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:random
synthetic sequence

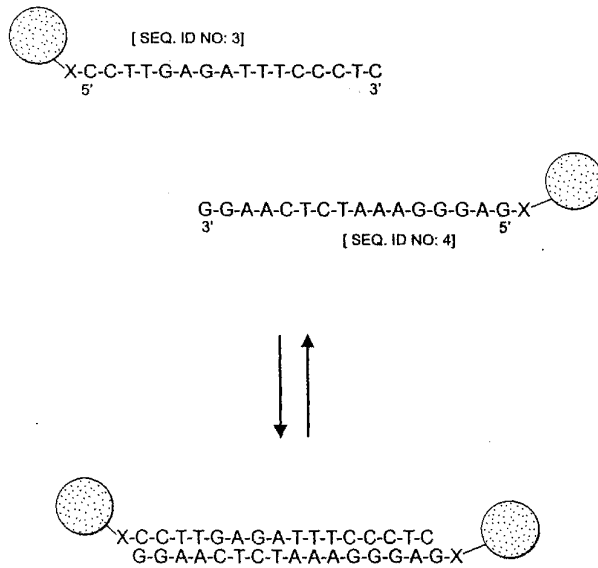
<400> 64
gttgctcgta aagcgtccaa tatatgcattg attgcctcgt cttaacgg 48

WO 01/73123

PCT/US01/10071

1/63

FIG. 1



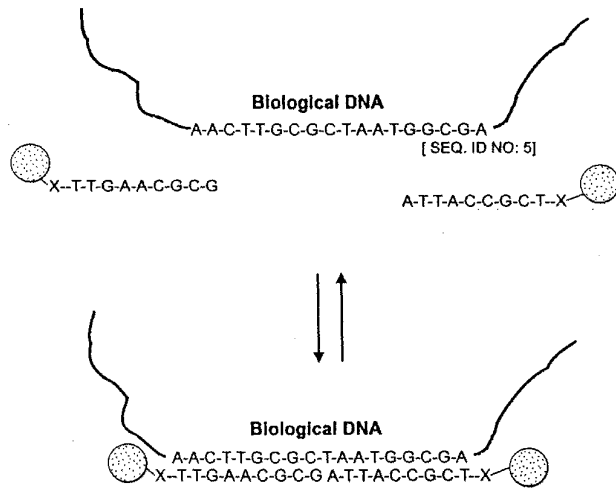
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

2/63

FIG. 2



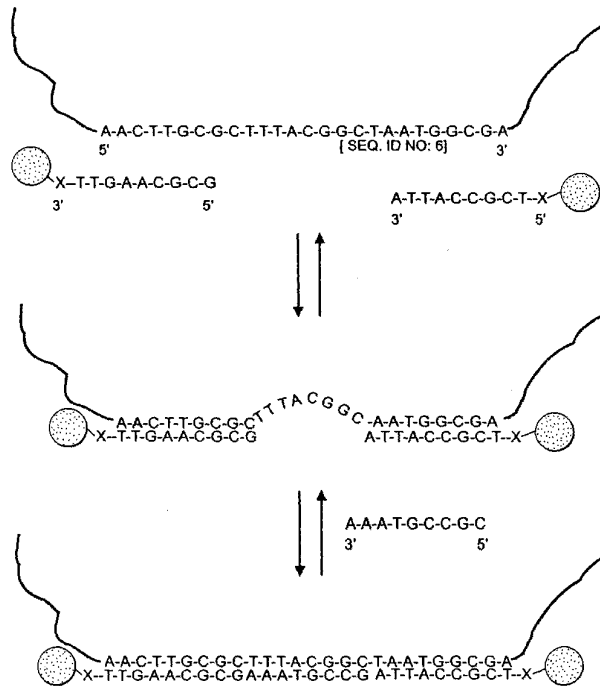
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

3/63

FIG. 3

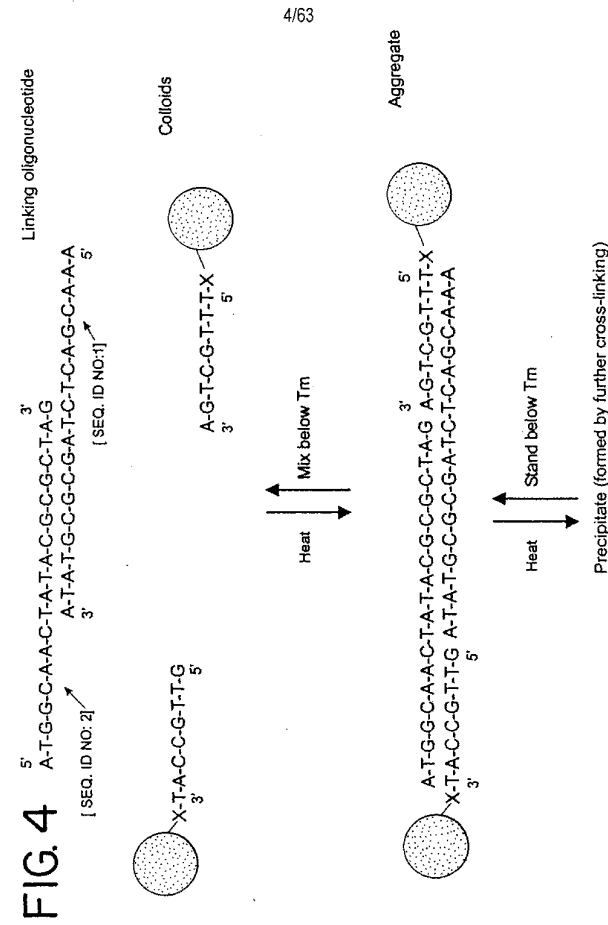


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

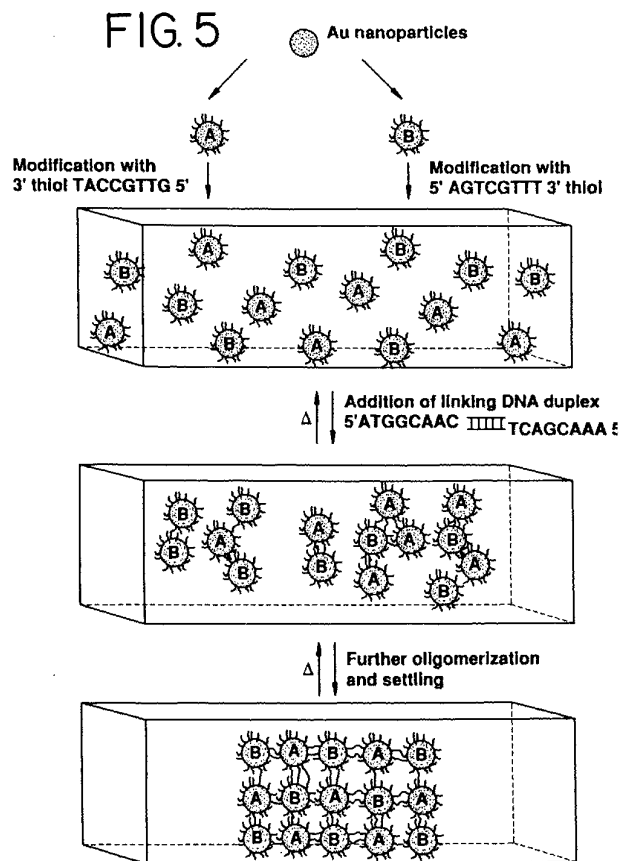
4/63



WO 01/73123

PCT/US01/10071

5/63

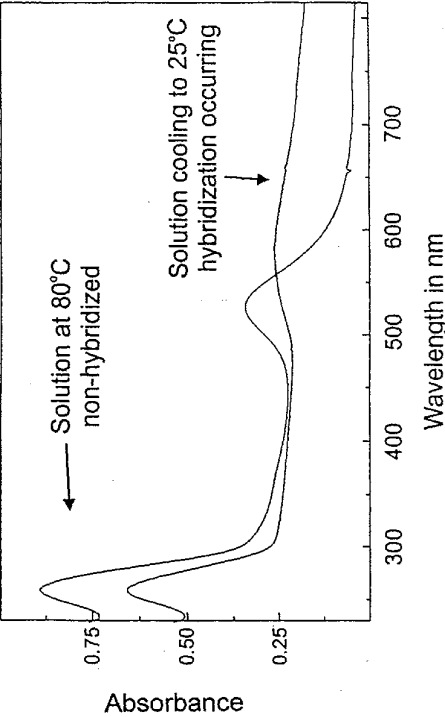


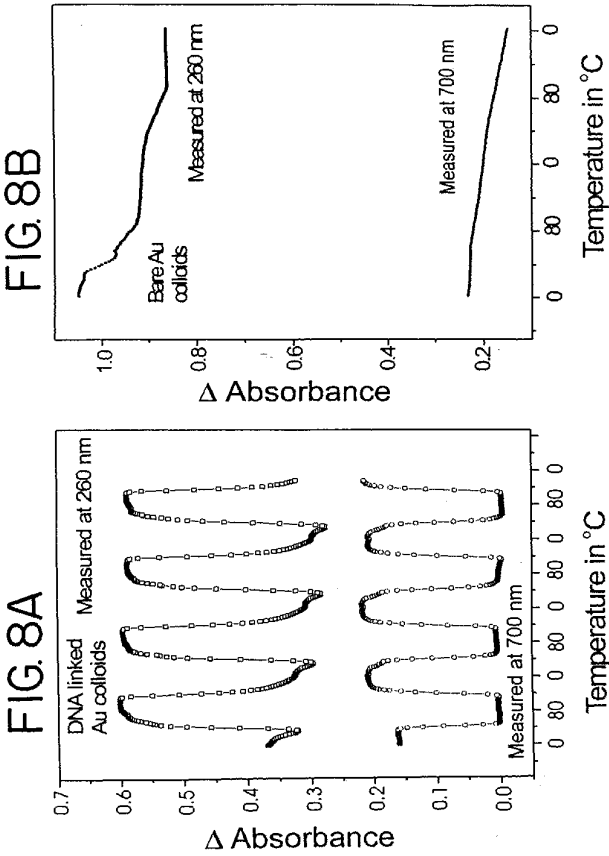
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG.6A FIG.6B FIG.6C



FIG. 7





WO 01/73123

PCT/US01/10071

9/63

FIG. 9A

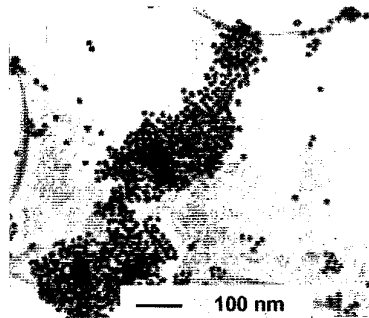


FIG. 9B

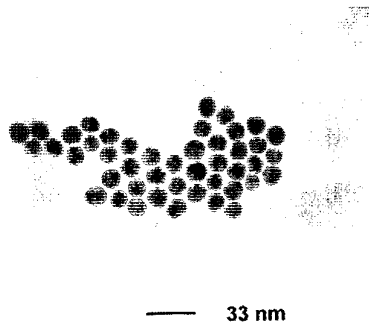


FIG. 10

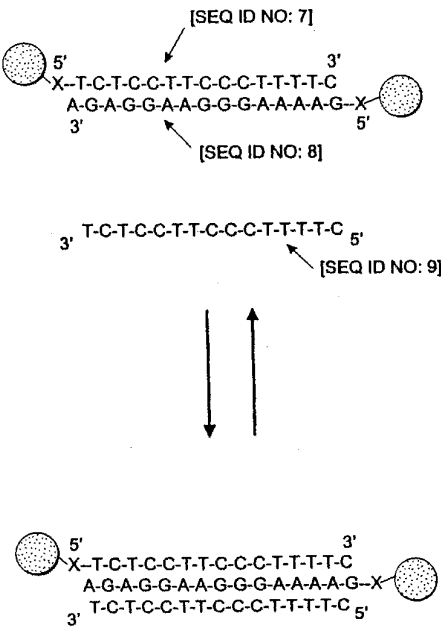
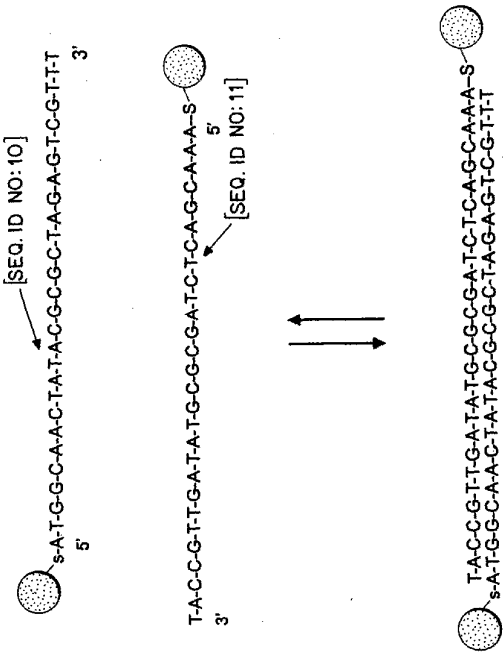
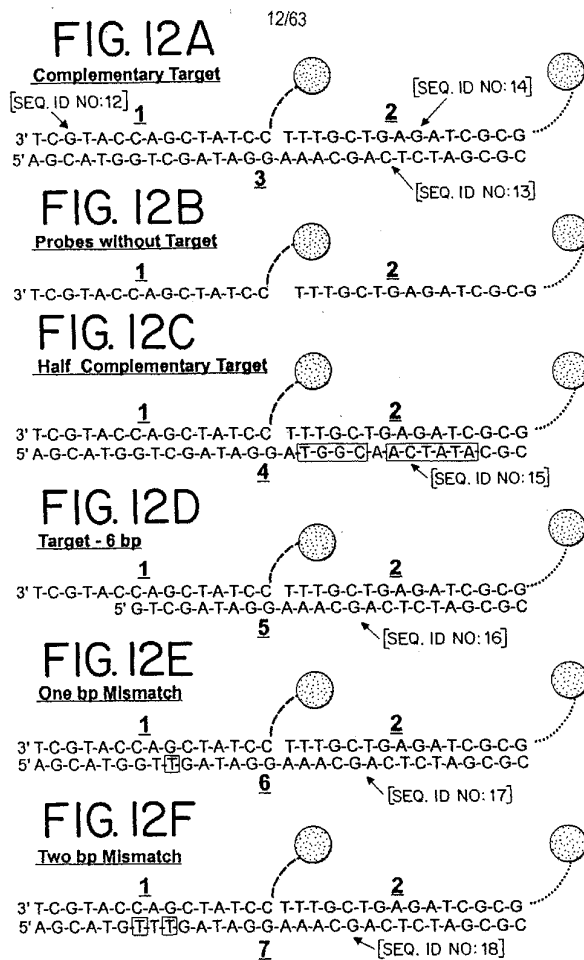


FIG. 11



WO 01/73123

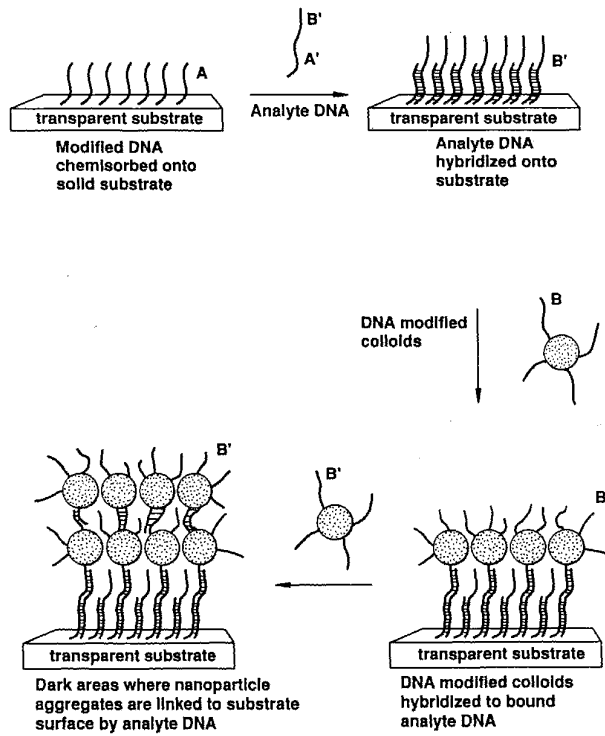
PCT/US01/10071



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

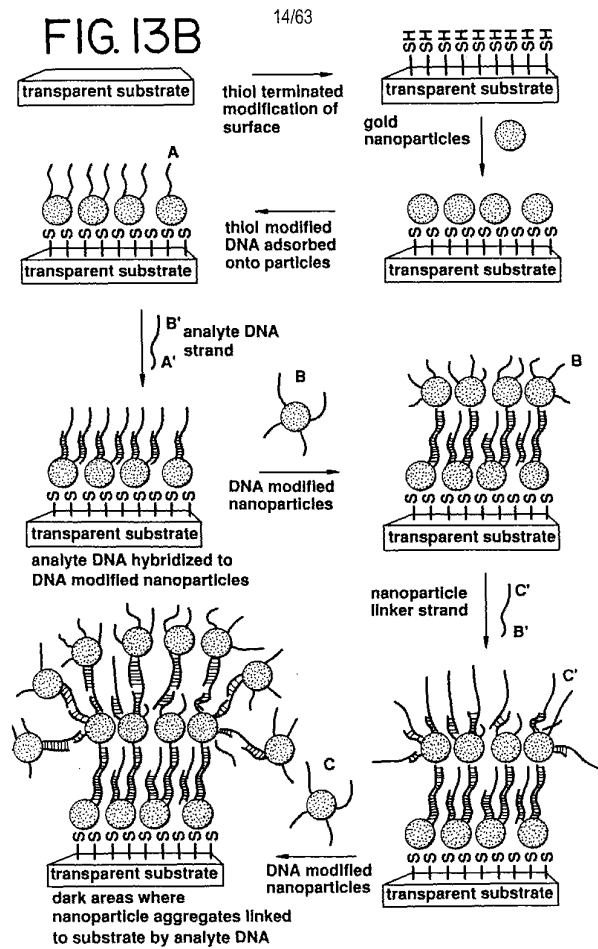
13/63

FIG. 13A



WO 01/73123

PCT/US01/10071



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

15/63

FIG. I4A

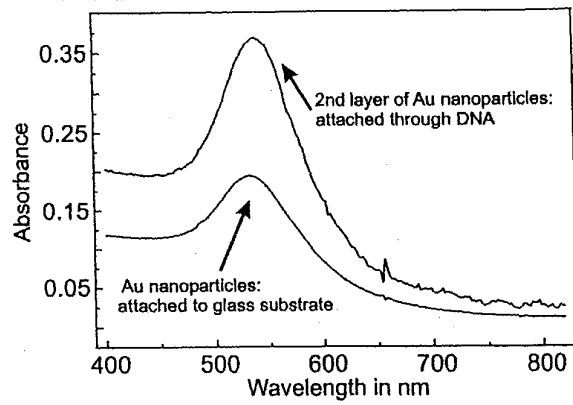
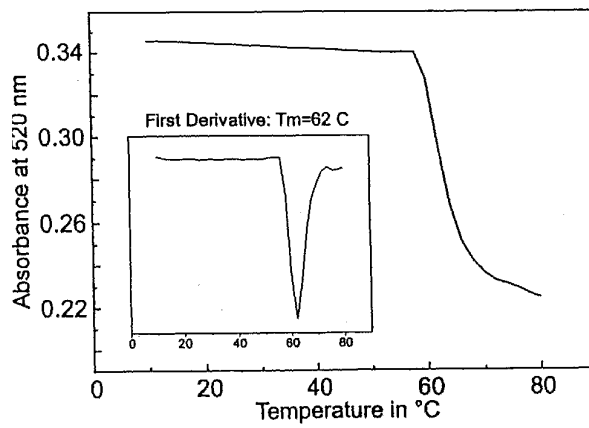


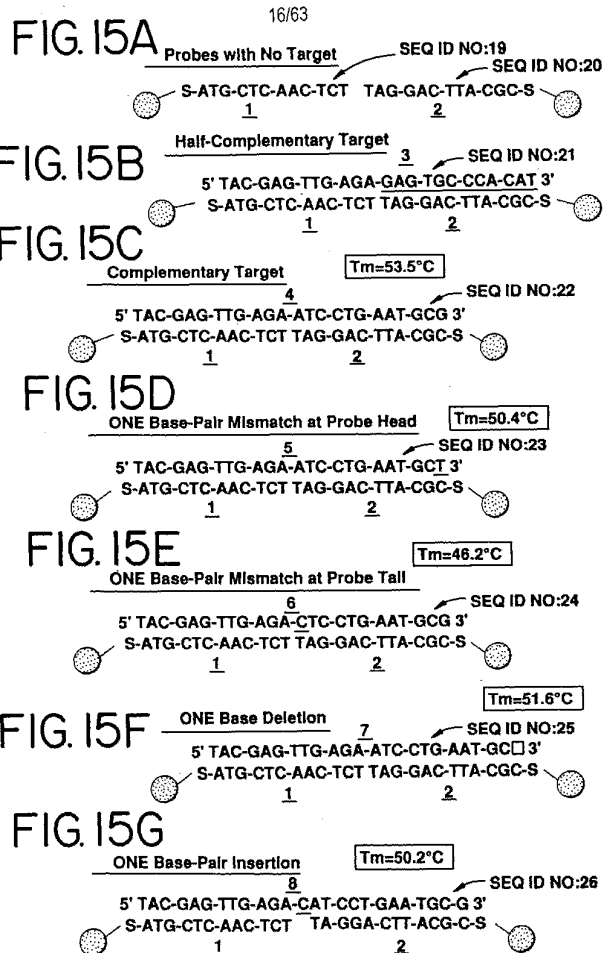
FIG. I4B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

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. 17A

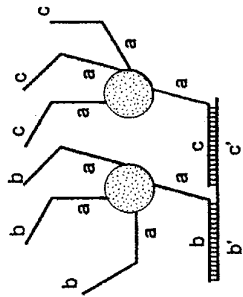


FIG. 17B

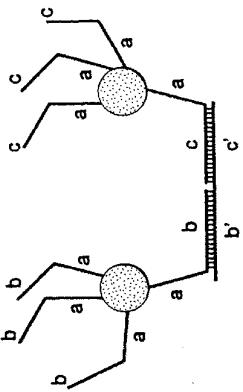
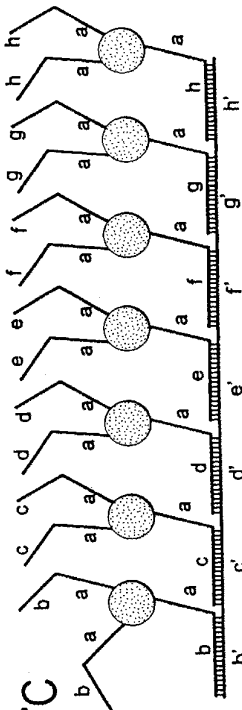
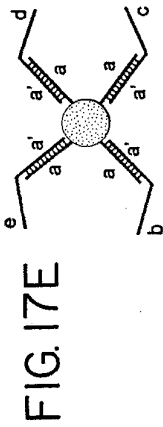
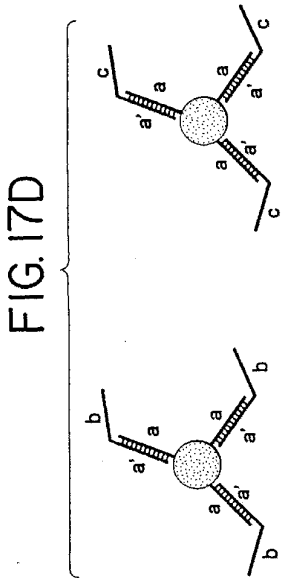


FIG. 17C



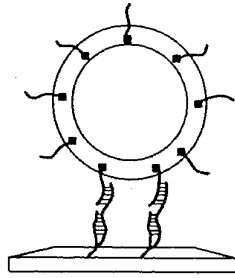
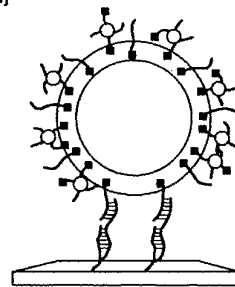
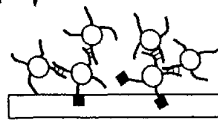


WO 01/73123

PCT/US01/10071

FIG. 18

20/63


(I)
(II)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

21/63

FIG. 19A

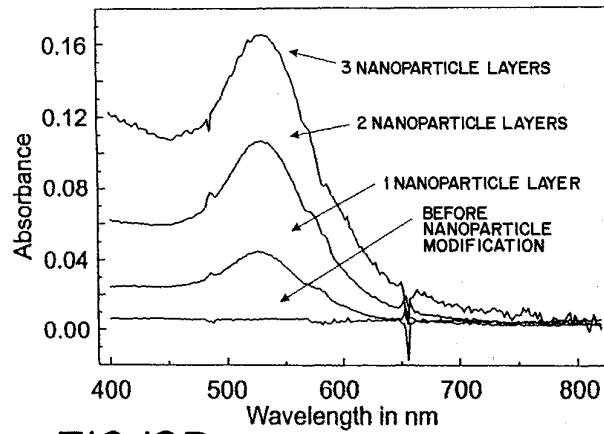
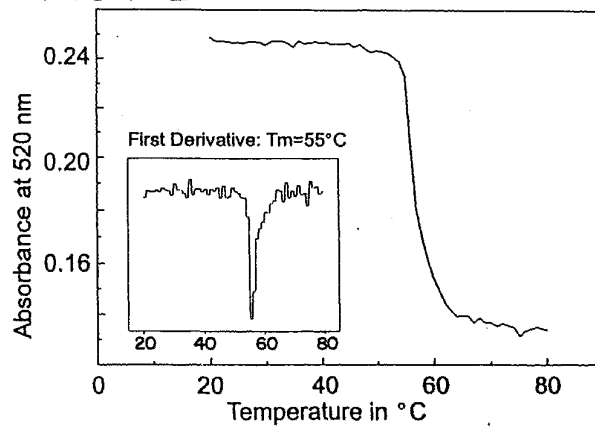


FIG. 19B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

22/63

FIG. 20A

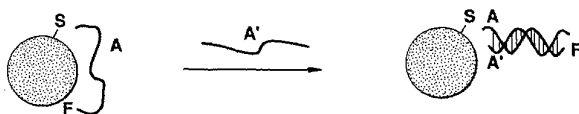
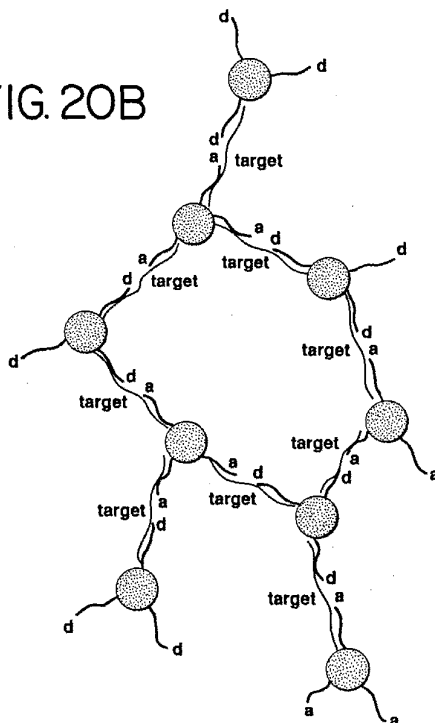


FIG. 20B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

23/63

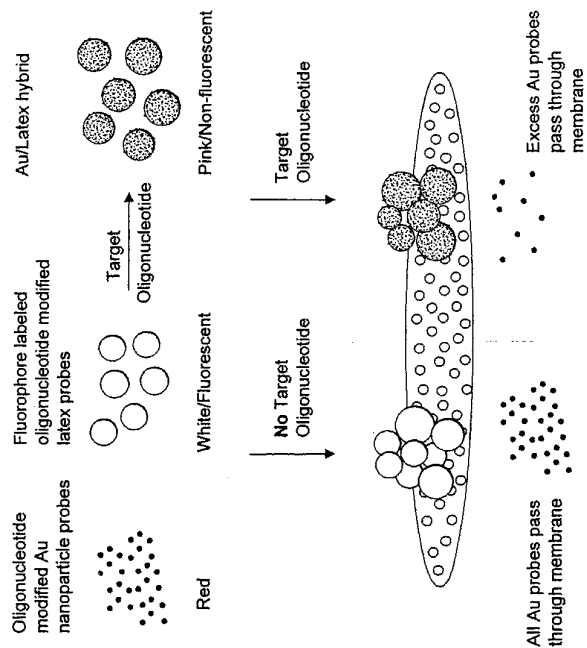
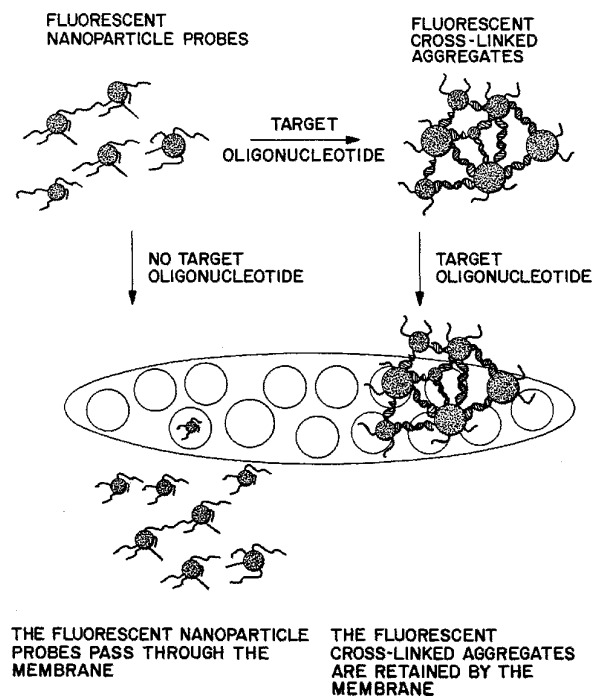


FIG. 2I

FIG. 22



WO 01/73123

PCT/US01/10071

25/63

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

3' A TCT CTT CAT TAA TTA AGC AGT TGT

3' TAT TCT TTT TAT AAT AGG TCC CAA TAT

3' AAC ATC TTT AAC TTC TAT GAC TTC CCG AA

[SEQ ID NO:39]

[SEQ ID NO:40]

[SEQ ID NO:41]

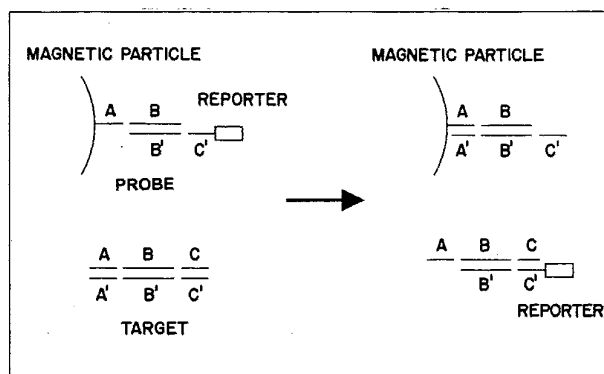
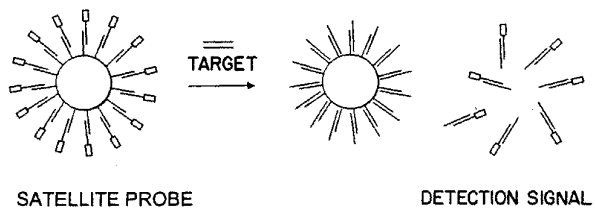
[SEQ ID NO:42]

WO 01/73123

PCT/US01/10071

26/63

FIG. 24



27/63

FIG. 25A

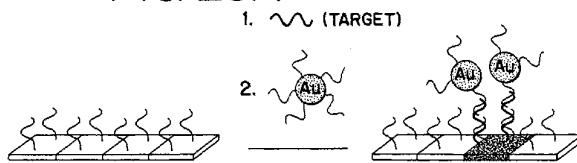
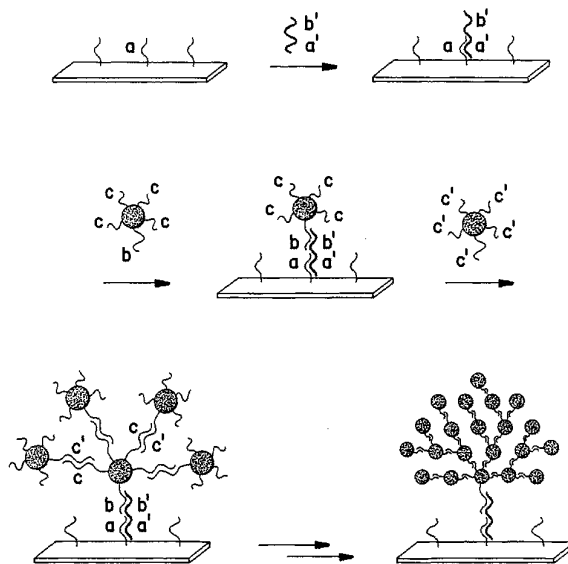


FIG. 25B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

28/63

FIG. 26A

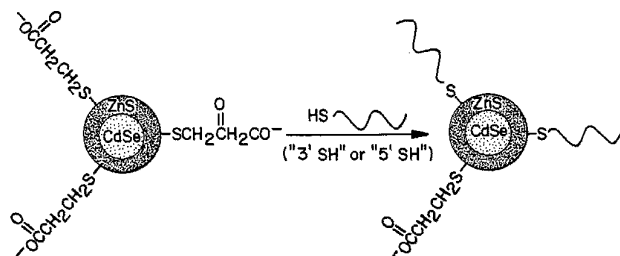
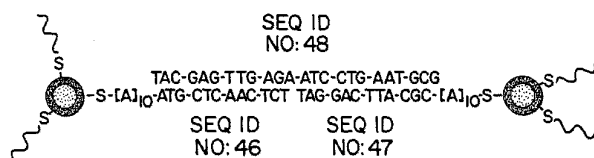


FIG. 26B



WO 01/73123

PCT/US01/10071

29/63

FIG. 27A

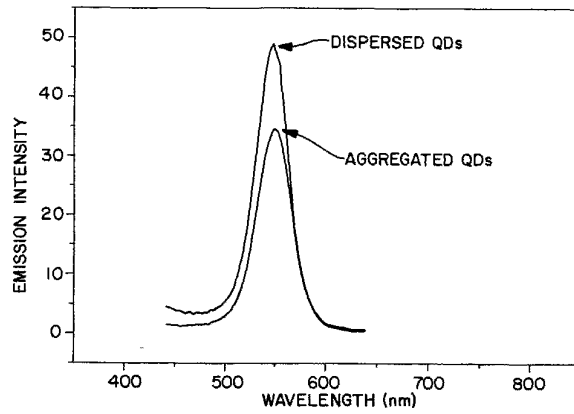
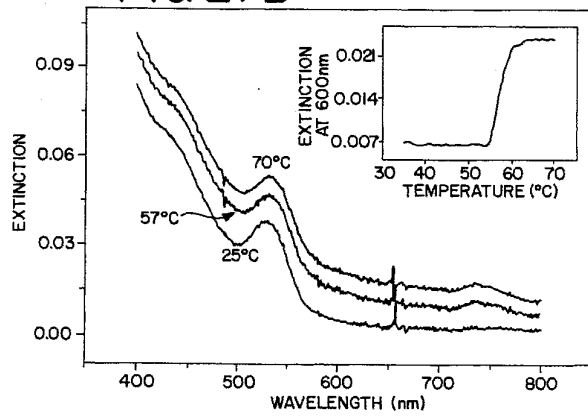


FIG. 27B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

30/63

FIG. 27C

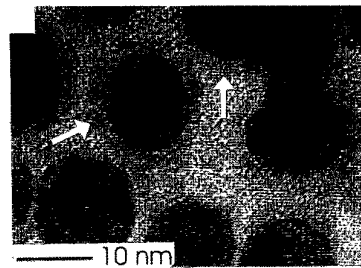
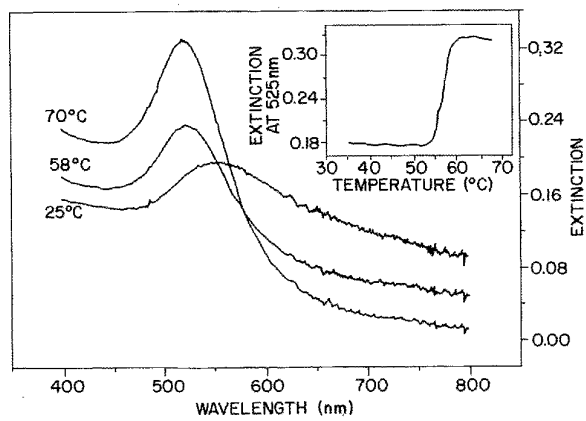
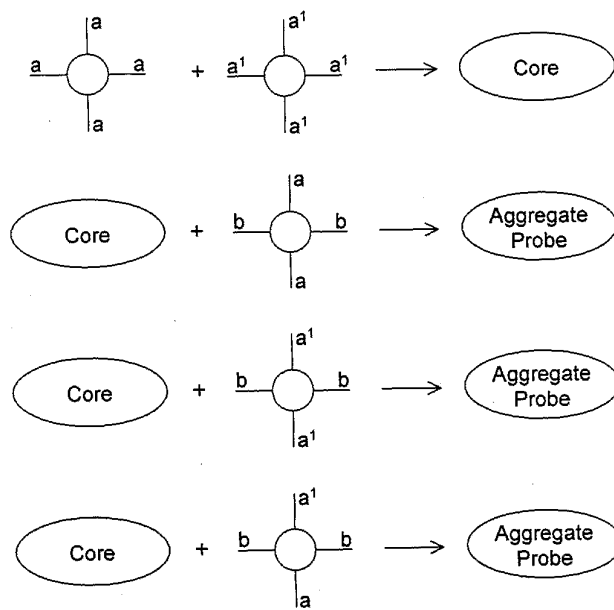


FIG. 27D



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 28A



WO 01/73123

PCT/US01/10071

32/63

FIG. 28B

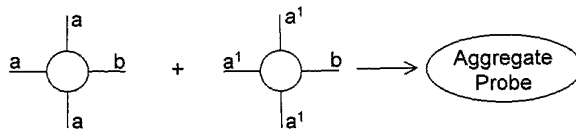
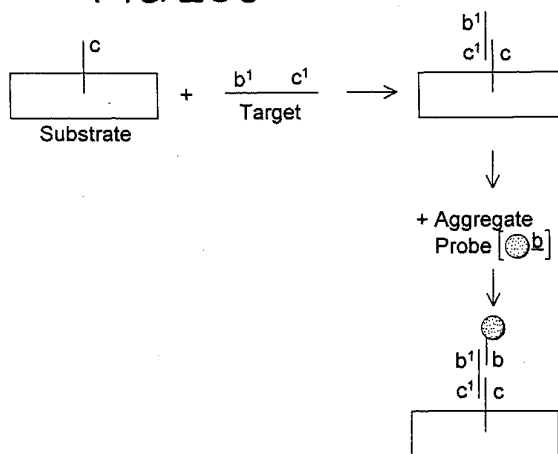
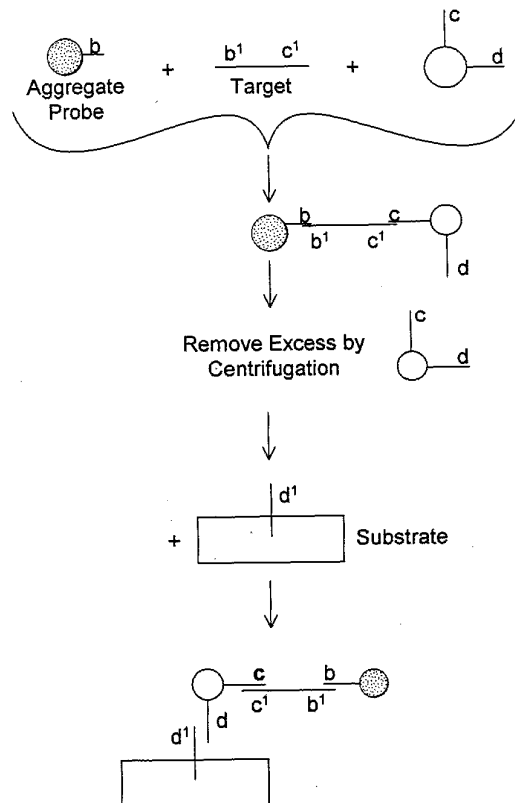


FIG. 28C



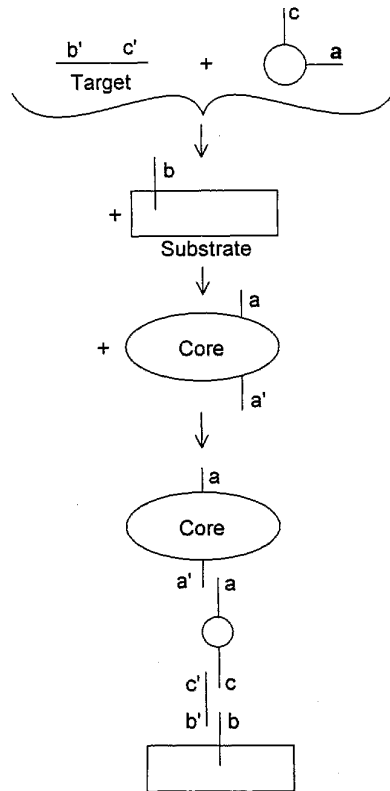
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 28D

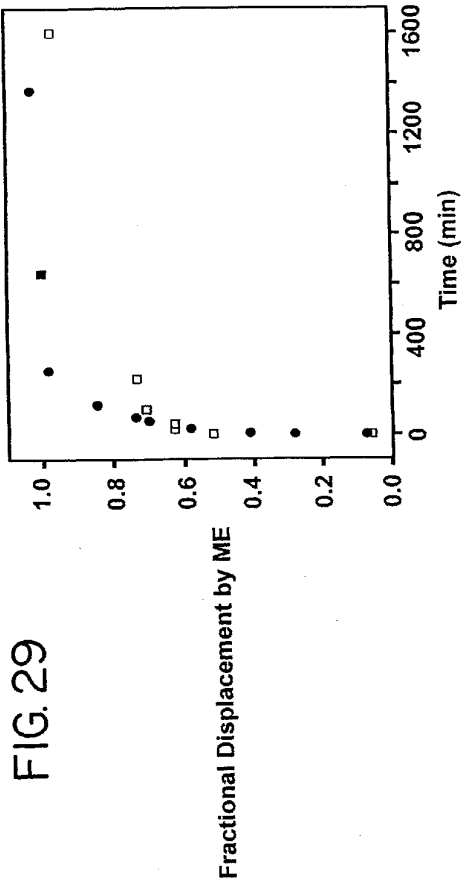


34/63

FIG. 28E



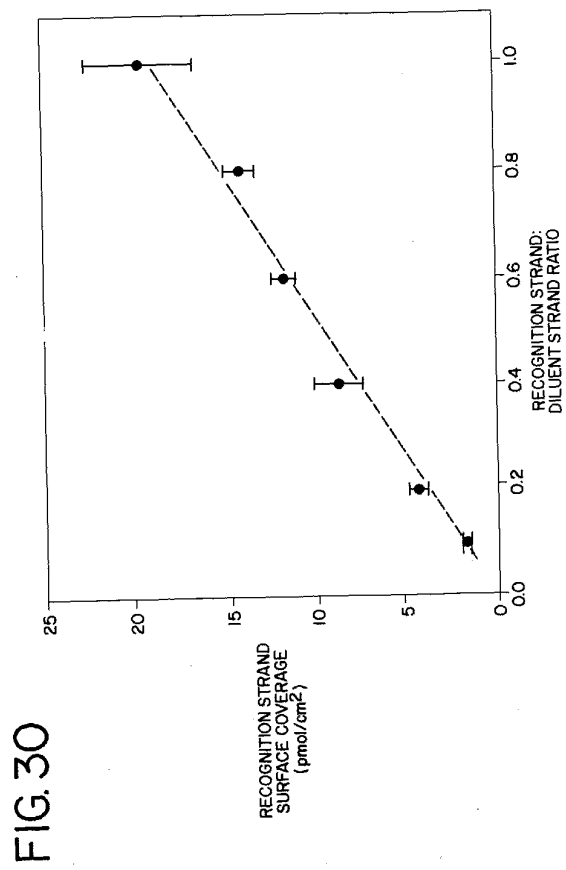
35/63



WO 01/73123

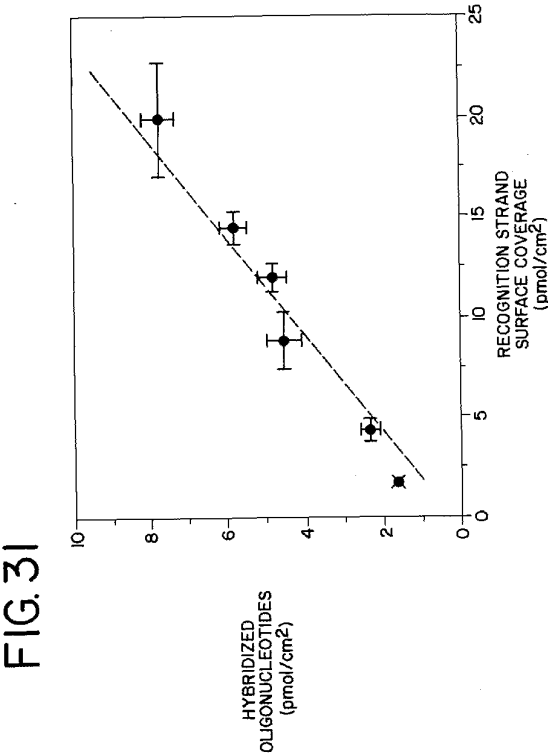
PCT/US01/10071

36/63



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

37/63

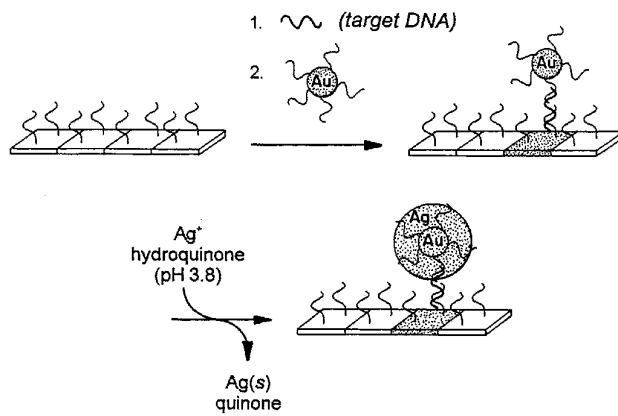
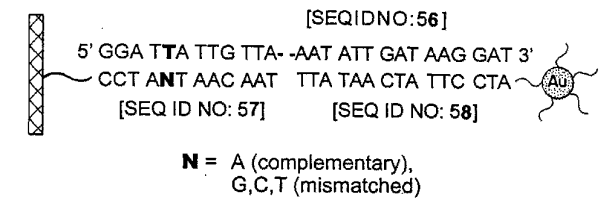


WO 01/73123

PCT/US01/10071

38/63

FIG. 32

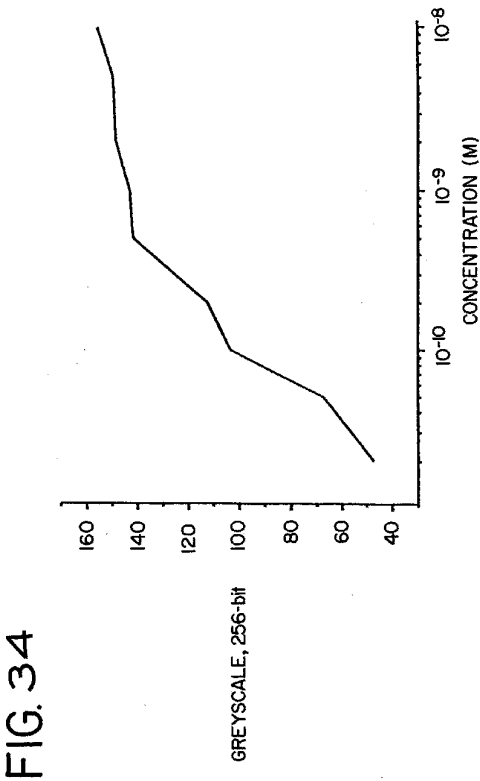


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

40/63



WO 01/73123

PCT/US01/10071

41/63

FIG.35A

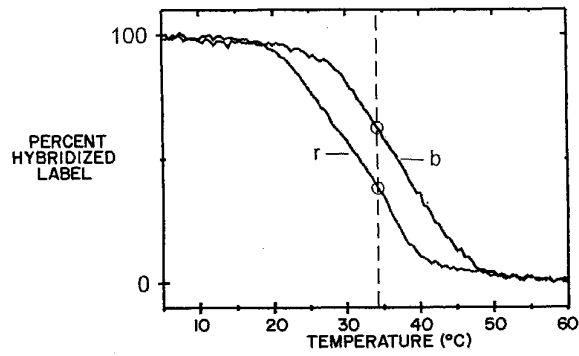
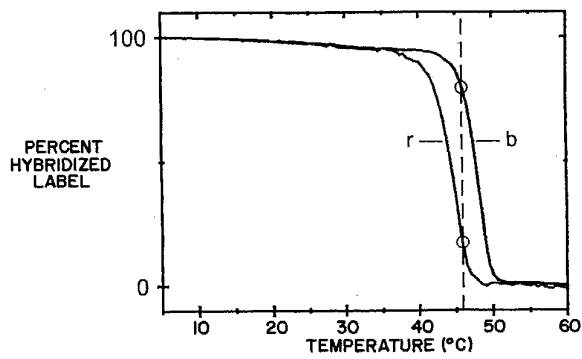


FIG.35B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

42/63

FIG. 36A

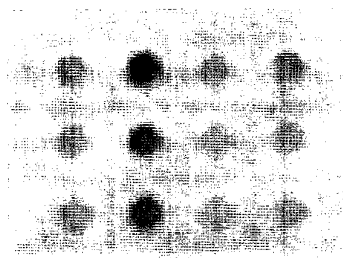
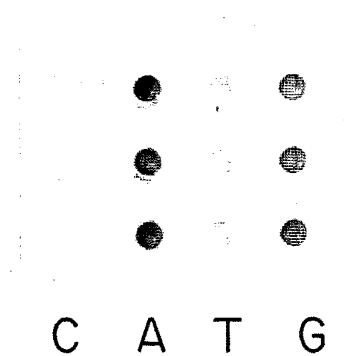


FIG. 36B



WO 01/73123

PCT/US01/10071

43/63

FIG.37A

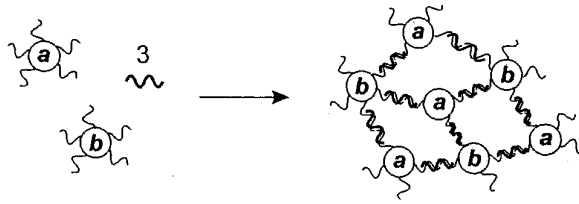
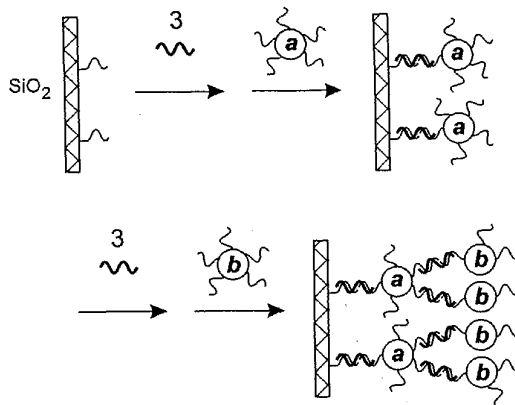


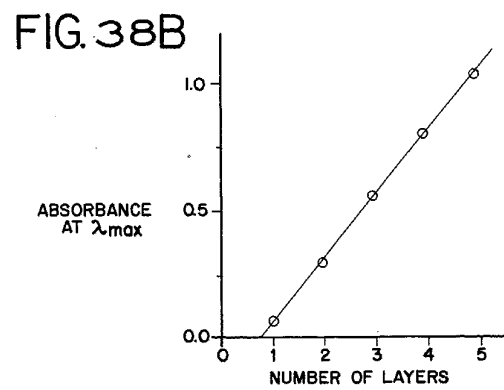
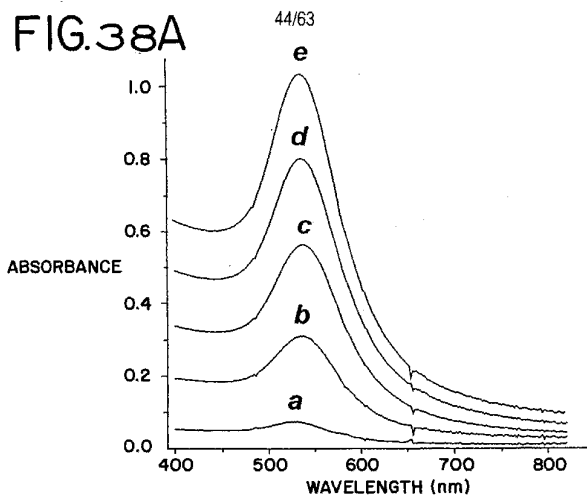
FIG.37B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071



WO 01/73123

PCT/US01/10071

45/63

FIG. 39A

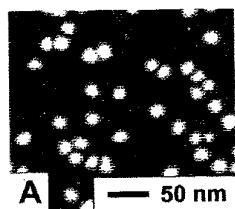
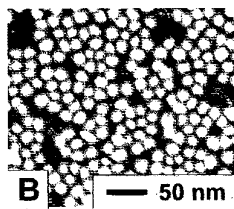


FIG. 39B



WO 01/73123

PCT/US01/10071

46/63

FIG.39C

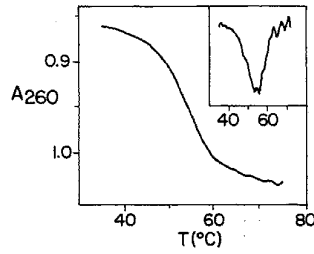


FIG.39D

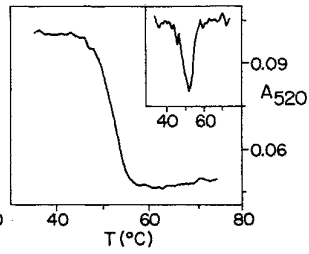


FIG.39E

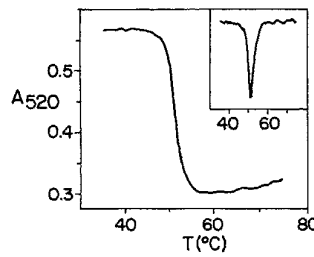
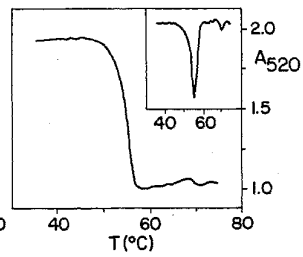


FIG.39F

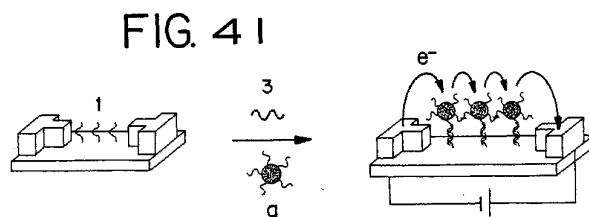
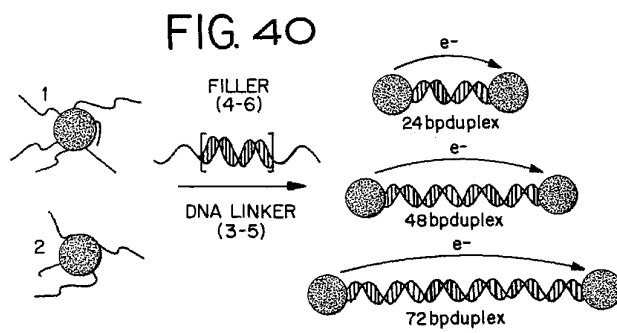


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

47/63



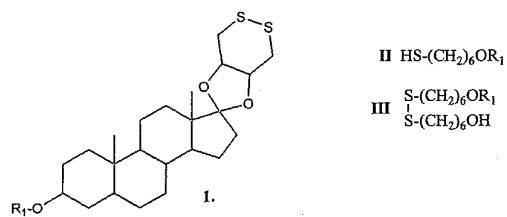
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

48/63

FIG. 42

R₁

a = H

b = (iPr)₂NP(OCH₂CH₂CN)-c1 = 5'-p(A₂₀)-TATCGTTCCATCAGCT [SEQ ID NO: 65]c2 = 5'-p(A₂₀)-TTGATCTTCCGTTCT [SEQ ID NO: 66]

Target I = 79-mer oligonucleotide with target region:

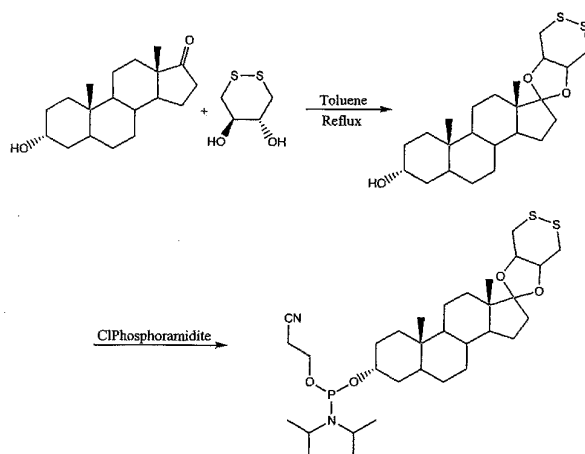
3'-.....ATAGCAAGGTAGTCGAGCAACTAGAAAGGCAAGA.....5'
[SEQ ID NO: 67]

WO 01/73123

PCT/US01/10071

49/63

FIG. 43



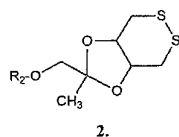
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

50/63

FIG. 44

R₂

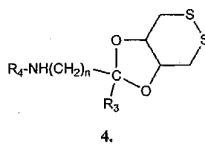
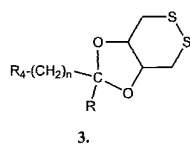
a = H

b = (iPr)₂NP(OCH₂CH₂CN)-c1 = 5'-p(A₂₀)-GCAGACCTCA [SEQ ID NO: 68]c2 = 5'-p(A₂₀)-CCTATGTGTCG [SEQ ID NO: 69]D = 5'-p(A₂₀) [SEQ ID NO: 70]

Target I = 63-mer oligonucleotide with target region:

3'-.....CGTCTGGAGTGGATACACAGC.....5'

[SEQ ID NO: 71]

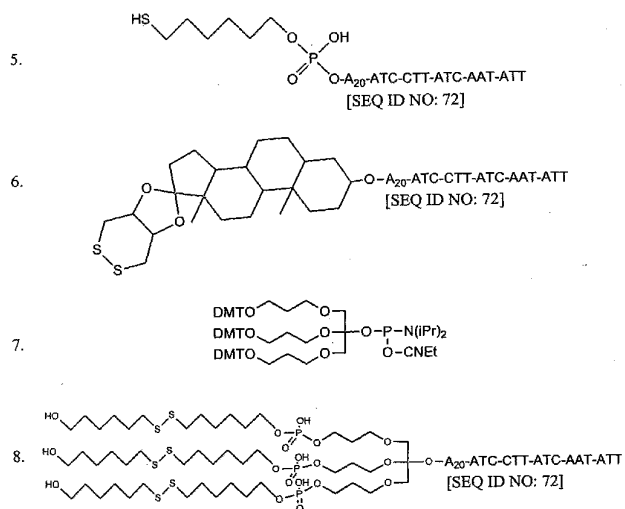
R₃ = hydrogen, an alkyl group, an aryl group, or a substituted alkyl or aryl groupR₄ = an attached oligonucleotide or modified oligonucleotide

WO 01/73123

PCT/US01/10071

51/63

FIG. 45

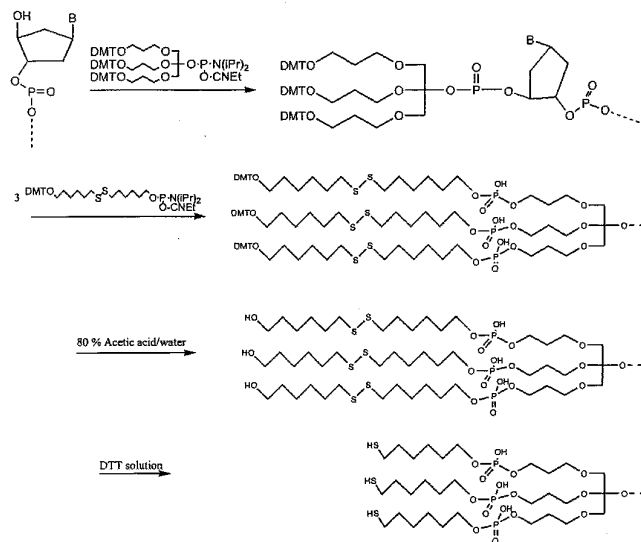


WO 01/73123

PCT/US01/10071

52/63

FIG. 46



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

53/63

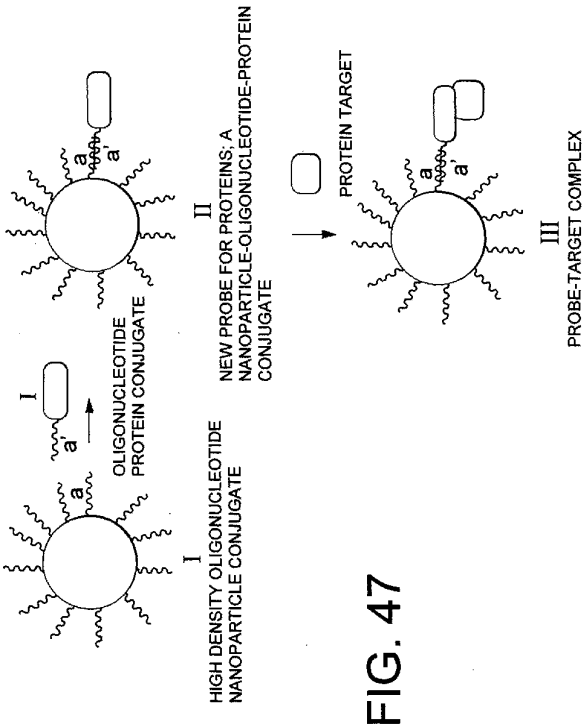


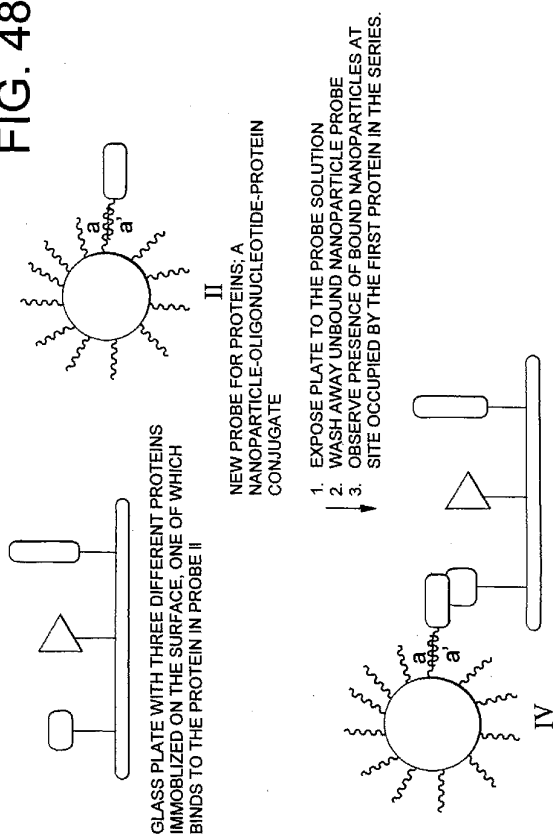
FIG. 47

WO 01/73123

PCT/US01/10071

54/63

FIG. 48



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

55/63

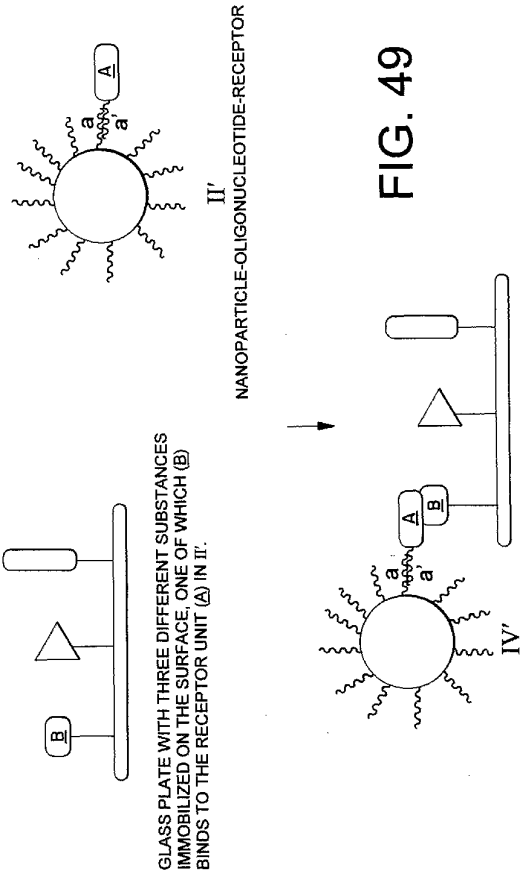
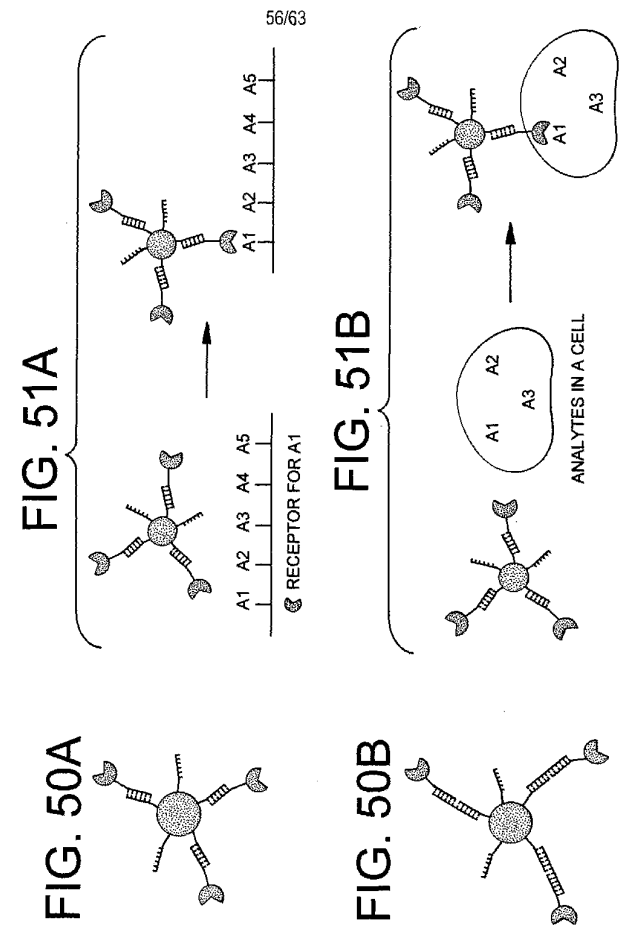


FIG. 49

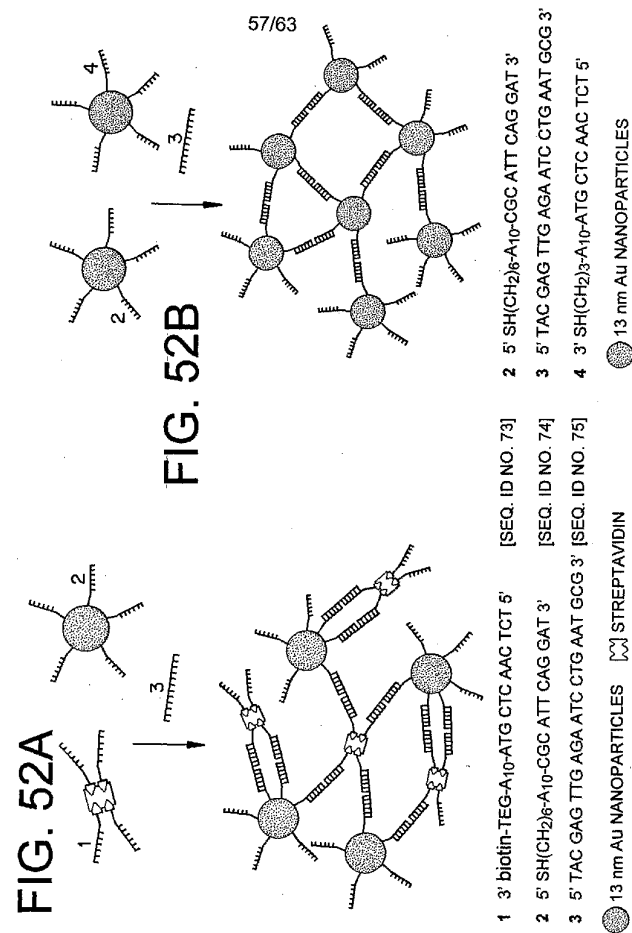
WO 01/73123

PCT/US01/10071



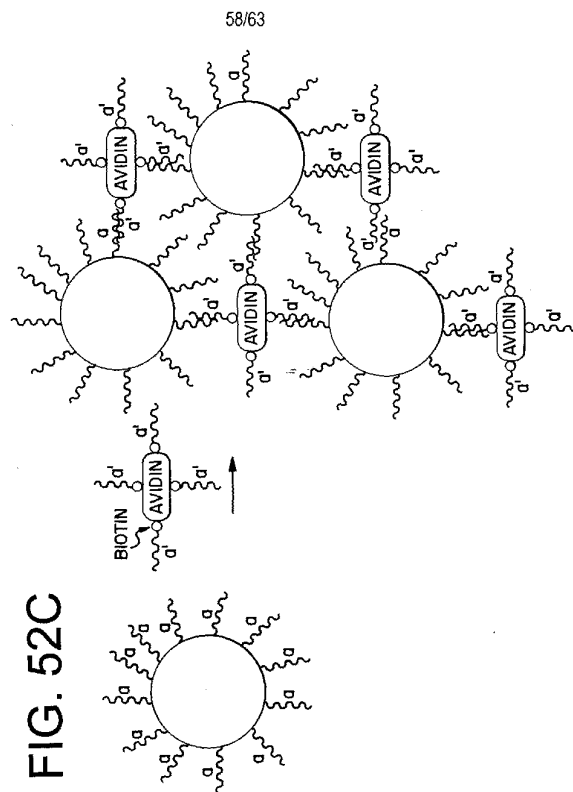
WO 01/73123

PCT/US01/10071



WO 01/73123

PCT/US01/10071



WO 01/73123

PCT/US01/10071

59/63

FIG. 53

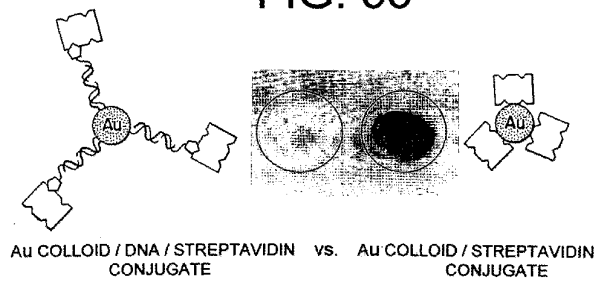
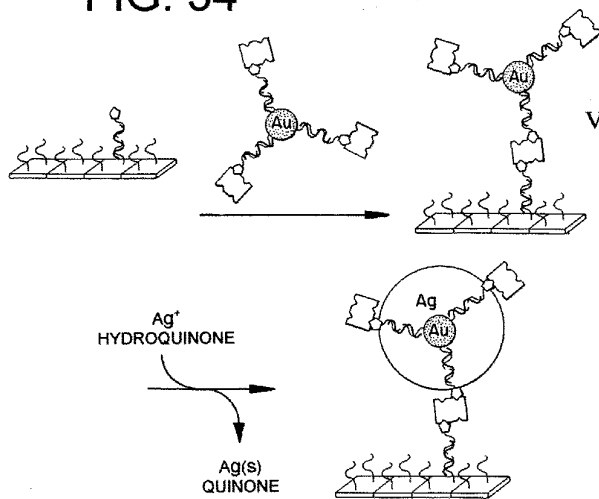


FIG. 54



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

60/63

FIG. 55

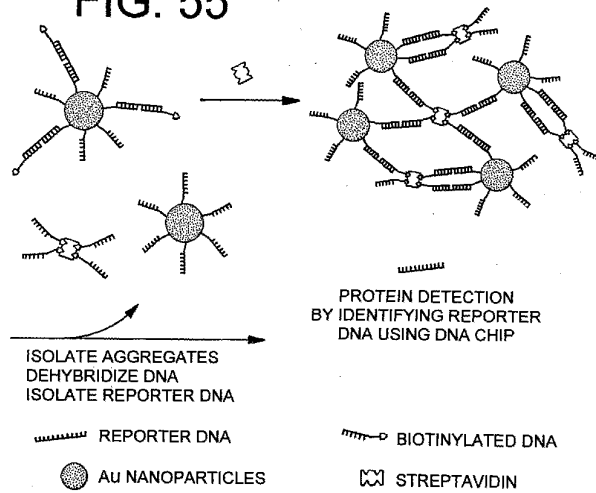
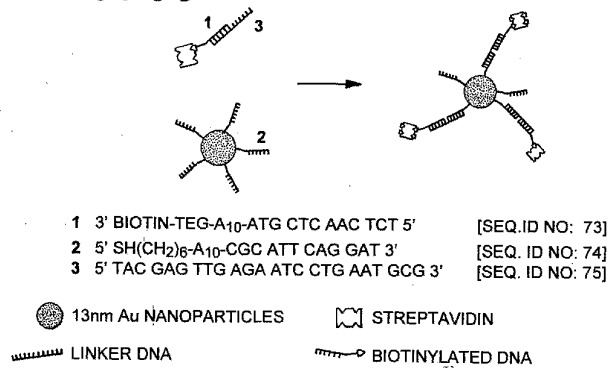


FIG. 56



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

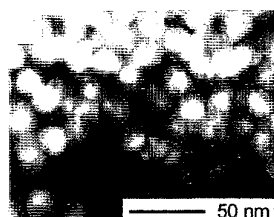
PCT/US01/10071

61/63

FIG. 57A



FIG. 57B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

62/63

FIG. 58A

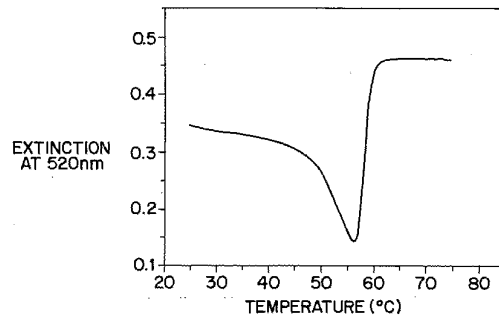
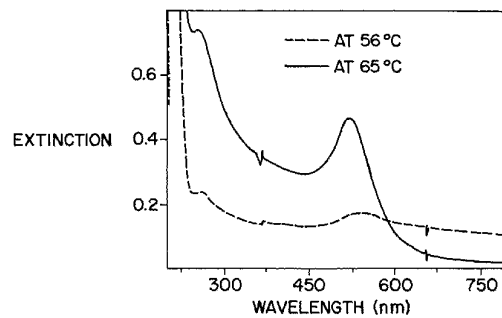


FIG. 58B



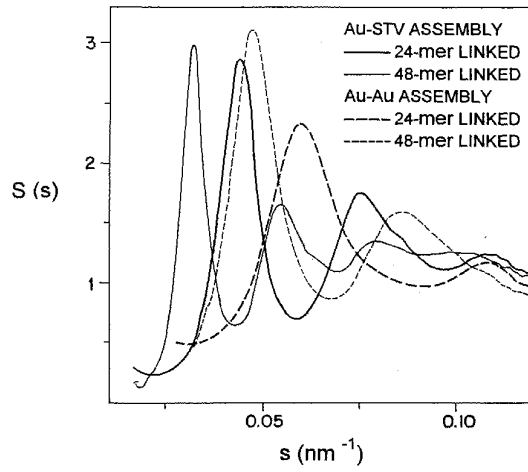
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/73123

PCT/US01/10071

63/63

FIG. 59



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【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
4 October 2001 (04.10.2001)

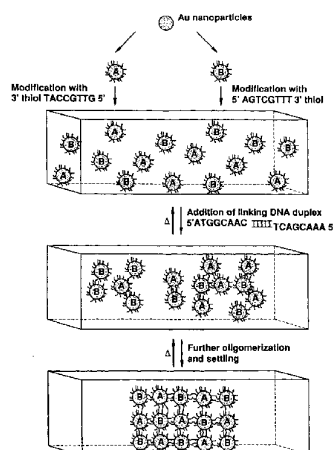
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/073123 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C07H 21/00 (71) Applicant: NANOSPHERE INC. [US/US]; 1818 Skokie Boulevard, Northbrook, IL 60062 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/10071 (72) Inventors: MIRKIN, Chad, A.; 111 16th Street, Wilmette, IL 60091 (US); LETSINGER, Robert, L.; 316 Third Street, Wilmette, IL 60091 (US); MUCIC, Robert, C.; 1600 Bel Aire Drive, Glendale, CA 91201 (US); STORHOFF, James, J.; Apartment 2f, 2121 Ridge Avenue, Evanston, IL 60201 (US); ELGHANIAN, Robert; Apartment 602, 8503 West Catherine Avenue, Chicago, IL 60656 (US); TATON, Thomas, Andrew; 1368 West Greenleaf Avenue, Apartment 1S, Chicago, IL 60626 (US); PARK, So-Jung; 800 Custer Avenue, Apartment #311, Evanston, IL 60202 (US); LI, Zhi; 911 Sherman Avenue, Apartment 307, Evanston, IL 60202 (US); GARIMELLA, Viswanadham; 1915 Maple, Evanston, IL 60201 (US).
- (22) International Filing Date: 28 March 2001 (28.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/192,699 28 March 2000 (28.03.2000) US
60/200,161 26 April 2000 (26.04.2000) US
09/503,830 26 June 2000 (26.06.2000) US
60/213,906 26 June 2000 (26.06.2000) US
60/254,392 8 December 2000 (08.12.2000) US
60/255,235 11 December 2000 (11.12.2000) US
09/760,500 12 January 2001 (12.01.2001) US
09/820,279 28 March 2001 (28.03.2001) US
- (74) Agent: MIAO, Emily; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

[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 01/073123 A3

WO 01/073123 A3



(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, 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.

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CJ, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:

6 February 2003

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, 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,

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.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(L)60300531544



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 October 2001 (04.10.2001)

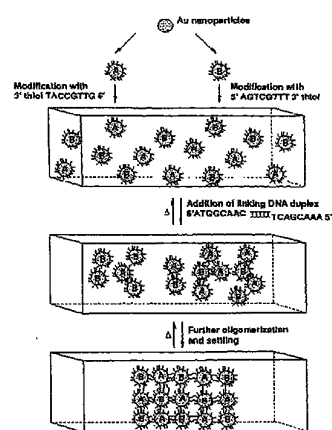
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/073123 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, (71) Applicant: NANOSPHERE INC. [US/US]; 1818 Skokie Boulevard, Northbrook, IL 60062 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/10071 (72) Inventors: MIRKIN, Chad, A.; 111 16th Street, Wilmette, IL 60091 (US). LETSINGER, Robert, L.; 316 Third Street, Wilmette, IL 60091 (US). MUCIC, Robert, C.; 1600 Bel Aire Drive, Glendale, CA 91201 (US). STORHOFF, James, J.; Apartment 21, 2121 Ridge Avenue, Evanston, IL 60201 (US). ELGHANTAN, Robert; Apartment 602, 8503 West Catharine Avenue, Chicago, IL 60656 (US). TATON, Thomas, Andrew; 1368 West Greenleaf Avenue, Apartment 1S, Chicago, IL 60626 (US). PARK, Se-Jung; 800 Custer Avenue, Apartment #3H, Evanston, IL 60202 (US). LI, Zhi; 911 Sherman Avenue, Apartment 307, Evanston, IL 60202 (US). GARIMELLA, Viswanadham; 1915 Maple, Evanston, IL 60201 (US).
- (22) International Filing Date: 28 March 2001 (28.03.2001)
- (23) Filing Language: English
- (24) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|------------|-------------------------------|----|
| 00/192,699 | 28 March 2000 (28.03.2000) | US |
| 00/200,161 | 26 April 2000 (26.04.2000) | US |
| 00/603,830 | 26 June 2000 (26.06.2000) | US |
| 00/213,906 | 26 June 2000 (26.06.2000) | US |
| 00/254,392 | 8 December 2000 (08.12.2000) | US |
| 00/255,235 | 11 December 2000 (11.12.2000) | US |
| 00/760,500 | 12 January 2001 (12.01.2001) | US |
| 00/820,279 | 28 March 2001 (28.03.2001) | US |
- (74) Agent: MIAO, Emily; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

[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 01/073123 A3



2

WO 01/073123 A3



(81) Designated States (national): AK, 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, GR, GM, HN, 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.

IL, LU, MC, NL, PT, SI, TR, OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
6 February 2003

(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,

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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/10071
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 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI 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	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	
A	WO 98 04740 A (UNIV NORTHWESTERN ; 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)	
	-/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of box 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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "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 application 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 when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being 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 12 July 2002		Date of mailing of the international search report 19.07.2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-5016		Authorized officer Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US 01/10071
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 25799 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) ---	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 132, no. 4, 24 January 2000 (2000-01-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 31330, LETSINGER, ROBERT L. ET AL: "Chemistry of oligonucleotide -gold nanoparticle conjugates" XP002205941 abstract & PHOSPHORUS, SULFUR AND SILICON AND THE RELATED ELEMENTS (1999), 144-146, 359-362 , ---	
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		International application No. PCT/US 01/10071
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.: 1-571 (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 effort justifying 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 01/10071

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1-571 (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 56, line 18 to page 57, 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

 International application No
 PCT/US 01/10071

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	20-02-1998 02-06-1999 12-12-2000 05-02-1998 26-03-2002
WO 9960169	A	25-11-1999	US 6287765 B1 AU 4194799 A CA 2328599 A1 EP 1080231 A1 WO 9960169 A1 US 2002034757 A1	11-09-2001 06-12-1999 25-11-1999 07-03-2001 25-11-1999 21-03-2002
WO 9817317	A	30-04-1998	AU 6810898 A DE 19746362 A1 WO 9817317 A2 EP 0934082 A2 JP 2001503041 T	15-05-1998 30-04-1998 30-04-1998 11-08-1999 06-03-2001
WO 9325709	A	23-12-1993	AU 4343993 A AU 4344093 A WO 9325912 A2 WO 9325709 A1	04-01-1994 04-01-1994 23-12-1993 23-12-1993
US 5900481	A	04-05-1999	AT 204290 T AU 735416 B2 AU 5106998 A AU 746737 B2 AU 5247298 A DE 19782095 T0 DE 19782097 T0 DE 69706187 D1 DE 69706187 T2 EP 1164203 A2 EP 0954612 A2 EP 0937097 A1 JP 2001501967 T NO 992167 A NO 992168 A WO 9820019 A1 WO 9820166 A2 US 2002042112 A1 US 6133436 A	15-09-2001 05-07-2001 29-05-1998 02-05-2002 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

(L)60300531521



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US 01/10071

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 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Relevant to claim No.
A	LETISINGER 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
A	WO 98 04740 A (UNIV NORTHWESTERN ;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); NA) 30 April 1998 (1998-04-30)
-/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of relevant documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "1" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application 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 when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "R" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 12 July 2002	Date of mailing of the international search report 19.07.2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patankaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-9018	Authorized officer Molina Galan, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992



2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internation application No PCT/US 01/10071
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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) -----	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 132, no. 4, 24 January 2000 (2000-01-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 31330, IETSINGER, ROBERT L. ET AL: "Chemistry of oligonucleotide -gold nanoparticle conjugates" XP002205941 abstract 8 PHOSPHORUS, SULFUR AND SILICON AND THE RELATED ELEMENTS (1999), 144-146, 359-362 ,	
T	LI ZHI ET AL: "Multiple thiol-anchor capped DNA -gold nanoparticle conjugates." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (2002 APR 1) 30 (7) 1558-62. , XP002205940 -----	

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 81/10671
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.: 1-571 (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 8.4(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 effort justifying 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.

4

International Application No. PCT/US 01/18871

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1-571 (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 56, line 18 to page 57, 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.

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 01/10071

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	20-02-1998 02-06-1999 12-12-2000 05-02-1998 26-03-2002
WO 9960169	A	25-11-1999	US 6287765 B1 AU 4194799 A CA 2328599 A1 EP 1080231 A1 WO 9960169 A1 US 2002034757 A1	11-09-2001 06-12-1999 25-11-1999 07-03-2001 25-11-1999 21-03-2002
WO 9817317	A	30-04-1998	AU 6810898 A DE 19746362 A1 WO 9817317 A2 EP 0934082 A2 JP 2001503041 T	15-05-1998 30-04-1998 30-04-1998 11-08-1999 06-03-2001
WO 9325709	A	23-12-1993	AU 4343993 A AU 4344093 A WO 9325912 A2 WO 9325709 A1	04-01-1994 04-01-1994 23-12-1993 23-12-1993
US 5900481	A	04-05-1999	AT 204290 T AU 735416 B2 AU 5106998 A AU 745737 B2 AU 5247298 A DE 19782095 T0 DE 19782097 T0 DE 69706187 D1 DE 69706187 T2 EP 1164203 A2 EP 0954612 A2 EP 0937097 A1 JP 2001501967 T NO 992167 A NO 992168 A WO 9820019 A1 WO 9820166 A2 US 2002042112 A1 US 6133436 A	15-09-2001 05-07-2001 29-05-1998 02-05-2002 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 33/48	G O 1 N 33/48	Z 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/483	G O 1 N 33/483	C
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
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	F

- (31)優先権主張番号 60/213,906
 (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)
 (31)優先権主張番号 60/254,392
 (32)優先日 平成12年12月8日(2000.12.8)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/255,235
 (32)優先日 平成12年12月11日(2000.12.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (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)
 (31)優先権主張番号 09/820,279
 (32)優先日 平成13年3月28日(2001.3.28)
 (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 6 イリノイ州 シカゴ ウェスト グリーンリーフ アベニュー 1
 3 6 8 アパートメント 1 エス
 (72)発明者 パク、ソウーユン
 アメリカ合衆国 6 0 2 0 2 イリノイ州 エヴァンストン カスター アベニュー 8 0 0 ア
 パートメント ナンバー3エイチ

(72)発明者 リー、ツイ

アメリカ合衆国 60202 イリノイ州 エバンストン シャーマン アベニュー 911 ア
パートメント 307

(72)発明者 ガリメラ、ヴィズワナダム

アメリカ合衆国 60201 イリノイ州 エバンストン メープル 1915

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB01 BB10 BB14 BB24 BB41 BB51 DA13 FA29 FB02

FB06 FB12 GC10 GC15 GC16

2G054 BB04 BB05 BB08 CA22 CE02 EA03 EA04 GA04 GB04 GE03

2G060 AD06 AE20 AF08 AG11 GA04 HC08 HC13 HC19 HC22 KA10

4B024 AA11 AA20 CA04 CA05 HA14 HA19

4B029 AA23 BB20 CC03 CC08

4B063 QA12 QA13 QQ42 QR32 QR55 QS03 QS34