(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112840022 A
(43)申请公布日 2021.05.25

(21)申请号 201980067842.X
(22)申请日 2019.08.14
(30)优先权数据
62/718,427 2018.08.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/046497 2019.08.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/037038 EN 2020.02.20
(71)申请人 哈佛大学校长及研究员协会
地址 美国马萨诸塞州
申请人 麻省理工学院
(72)发明人 威廉·杰里米·布莱克
卡尔·W·布朗三世
弗雷德里克·维格诺
詹姆斯·J·柯林斯
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
代理人 董世豪 张淑珍
(51)Int.Cl.
C12N 15/09(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12P 19/34(2006.01)

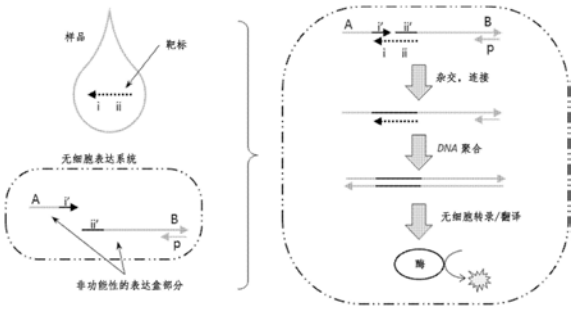
权利要求书6页 说明书57页
序列表10页 附图16页

(54)发明名称

核酸的体外检测

(57)摘要

本文描述了用于体外检测核酸的组合物和方法。基于靶核酸的存在,对核酸传感器进行活化以用于所编码的报告蛋白的无细胞表达。该系统被设计为以低成本的细胞提取物发挥作用,而无需仪器或严格的温度控制。这些特性对于消费者健康、宠物/动物健康、食品安全以及成本和便携性为关键因素的其它领域中的使用点(point-of-use)分子诊断应用而言是有利的。



CN 112840022 A

1.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分,当将所述第一单链DNA传感器部分和所述第二单链DNA传感器部分连接在一起时,所述第一单链DNA传感器部分和所述第二单链DNA传感器部分生成单个链的DNA表达盒,所述单个链的DNA表达盒包含:

i)启动子;

ii)核糖体结合位点(RBS);以及

iii)编码序列;

其中,靶核酸杂交序列位于所述第一单链DNA传感器部分和所述第二单链DNA传感器部分内。

2.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分,当将所述第一单链DNA传感器部分和所述第二单链DNA传感器部分连接在一起时,所述第一单链DNA传感器部分和所述第二单链DNA传感器部分生成单个链的DNA表达盒,所述单个链的DNA表达盒包含:

i)启动子;

ii)核糖体结合位点(RBS);

iii)编码序列,

其中,单个链包含:

iv)含有3'杂交区域和5'杂交区域的靶核酸杂交序列,其中,所述3'杂交区域包含在所述第一传感器部分中,并且所述5'杂交区域包含在所述第二传感器部分中,以使得当使与靶核酸序列杂交的所述传感器系统与包含所述靶核酸的样品接触时,与所述靶核酸的杂交使得能够将所述第一部分和第二部分连接以生成所述单个链。

3.如权利要求1-2中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA表达盒为非模板DNA表达盒。

4.如权利要求1-3中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述表达盒的所述第一传感器部分和所述第二传感器部分在所述表达盒内的任意给定位置处分开。

5.如权利要求4所述的核酸传感器系统,其中,所述分开发生在所述靶核酸杂交序列内。

6.如权利要求1-4中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸杂交序列位于所述表达盒内的任意给定位置处。

7.如权利要求1-6中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或所述第二传感器部分之一包含所述编码序列,其余的传感器部分包含所述启动子。

8.如权利要求1-7中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或所述第二传感器部分之一包含所述启动子和所述核糖体结合位点,其余的传感器部分包含所述编码序列。

9.如权利要求1-8中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或所述第二传感器部分之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述编码序列的起始密码子,其余的传感器部分包含其余的编码序列。

10.如权利要求9所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5'至3'包含:

i)所述启动子;

ii)所述核糖体结合位点(RBS)；

iii)所述编码序列的起始密码子;以及

iv)所述3’杂交区域,所述3’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；

并且,所述第二传感器部分从5’至3’包含：

i)所述5’杂交区域,所述5’杂交区域为与所述其余的编码序列处于框内的阅读框形式;以及

ii)其余的编码序列,所述其余的编码序列连结在所述5’杂交区域的下游并与所述5’杂交区域一起处于框内。

11.如权利要求1-10中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或所述第二传感器部分之一包含所述启动子,其余的传感器部分包含所述核糖体结合位点和所述编码序列。

12.如权利要求11所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5’至3’包含：

i)所述启动子;以及

ii)所述3’杂交区域；

并且,所述第二传感器部分从5’至3’包含：

i)所述5’杂交区域；

ii)所述核糖体结合序列;以及

iii)所述编码序列。

13.如权利要求1-12中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或所述第二传感器部分之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述编码序列的5’部分,其余的传感器部分包含其余的编码序列。

14.如权利要求13所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5’至3’包含：

i)所述启动子；

ii)所述RBS；

iii)所述编码序列的第一部分,所述编码序列的第一部分包含起始密码子和至少一个另外的密码子；

iv)所述3’杂交区域,所述3’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；

并且,所述第二传感器部分从5’至3’包含：

i)所述5’杂交区域,所述5’杂交区域处于阅读框形式,所述5’杂交区域与所述编码序列的第一部分一起处于框内,并与所述编码序列的第二部分一起处于框内;以及

ii)所述编码序列的第二部分,所述编码序列的第二部分连接在所述5’杂交区域的下游并与所述5’杂交区域一起处于框内。

15.如权利要求1-14中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

16.如权利要求1-15中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

17.如权利要求1-16中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内。

18.如权利要求1-17中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域为所述第

一传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’。

19.如权利要求1-18中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内。

20.如权利要求1-19中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域为所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

21.如权利要求1-20中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域的长度总共为至少12个核苷酸。

22.如权利要求1-21中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域的长度各自为至少6个核苷酸。

23.如权利要求1-22中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分和第二传感器部分在同一分子上。

24.如权利要求1-23中任一项所述的核酸传感器系统，其中，通过间插的ssDNA序列使所述第一传感器部分的5’末端与所述第二传感器部分的3’末端连结，使得所述第一传感器部分和所述第二传感器部分形成单个分子。

25.如权利要求1-24中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与非模板表达盒内的序列或间插的ssDNA序列互补的引物。

26.如权利要求1-22中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分和所述第二传感器部分在至少两个单独的分子上。

27.如权利要求1-22或26中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列。

28.如权利要求1-22或26-27中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与所述第二传感器部分的3’区域互补的引物。

29.如权利要求23-25中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与作为所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补的引物。

30.如权利要求23-25中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’区域互补的引物。

31.如权利要求1-22和26-30中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述第二传感器部分进一步在其3’末端包含核苷酸序列，所述核苷酸序列包含在末端发夹环中的引物。

32.如权利要求1-31中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述DNA表达盒的编码序列编码多肽。

33.如权利要求32所述的核酸传感器系统，其中，所述多肽为报告蛋白。

34.如权利要求13-14中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域位于所述编码序列中，并在编码所述报告蛋白的溶剂暴露环的区域内。

35.如权利要求13-14或34中任一项所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列中，并且基本上不影响报告基因的功能。

36.如权利要求33所述的核酸传感器系统，其中，所述报告蛋白包括：荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、补充并激

活截短的报告蛋白的肽、以及通过分析可检测到的多肽。

37.如权利要求1-36中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含无细胞表达系统。

38.如权利要求1-37中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶。

39.如权利要求1-38中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含逆转录酶。

40.如权利要求1-39中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。

41.如权利要求40所述的核酸传感器系统,其中,所述核糖核酸酶为RNAse H。

42.如权利要求1-41中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。

43.如权利要求37-42中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述无细胞表达系统为全细胞提取物。

44.如权利要求1-43中任一项所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含DNA聚合酶。

45.如权利要求44所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA聚合酶选自于由如下所组成的组:具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、来自枯草芽孢杆菌的聚合酶、Sequenase 2.0版、Bsu DNA聚合酶大片段、Bst 3.0DNA聚合酶、Phusion®高保真DNA聚合酶、不具有核酸外切酶部分的Vent® DNA聚合酶、Vent® DNA聚合酶、Q5®高保真DNA聚合酶和DNA聚合酶I大(Klenow)片段。

46.如权利要求1-45中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸的多态型与所述第二传感器部分杂交区域的5'和所述第一传感器部分杂交区域的3'末端处的序列杂交。

47.如权利要求1-46中任一项所述的核酸传感器系统,其中,将所述第一传感器部分的3'杂交区域或所述第二传感器部分的5'杂交区域配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

48.如权利要求1-47中任一项所述的核酸传感器系统,其中,将所述第一传感器部分的3'杂交区域的自由端或所述第二传感器部分的5'杂交区域的自由端配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

49.如权利要求1-48中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述多态型的杂交序列包含所述第一传感器部分杂交区域的最3'端碱基和所述第二传感器部分杂交的5'碱基中的一个或两个。

50.如权利要求1-49中任一项所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸杂交区域包含一种或多种多态型。

51.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

a)提供包含所述靶核酸的样品;

b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交的条件下,使包含所述靶核酸的样品在连接酶存在的情况下与如权利要求1-50中任一项所述的核酸传感器系统接触,从而生成反应

产物,所述反应产物包含与可操作地彼此连结的所述第一传感器部分和所述第二传感器部分杂交的所述靶核酸;

c)在有利于产生报告蛋白的条件下,在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下,使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触;

d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

e)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

52.如权利要求51所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞表达系统的一部分提供。

53.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

a)提供包含所述靶核酸的样品;

b)在有利于所述靶核酸序列与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸序列与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交的条件下,使包含所述靶核酸的样品在连接酶和任选的引物存在的情况下与如权利要求1-50中任一项所述的核酸传感器系统接触,从而生成反应产物,所述反应产物包含与可操作地彼此连结的所述第一传感器部分和所述第二传感器部分杂交的所述靶核酸;

c)在有利于产生报告蛋白的条件下,在链置换DNA聚合酶存在的情况下,使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触;

d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

e)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

54.如权利要求53所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞表达系统的一部分提供。

55.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

a)提供包含所述靶核酸的样品;

b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交、并有利于产生报告蛋白的条件下,使包含所述靶核酸的样品与以下物质接触:在连接酶存在的情况下的i)如权利要求1-50中任一项所述的核酸传感器系统,以及在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统;

c)使步骤b)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

d)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

56.如权利要求55所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞表达系统的一部分提供。

57.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

a)提供包含所述靶核酸序列的样品;

b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交、并有利于产生报告蛋白的条件下,使包

含所述靶核酸序列的样品与以下物质接触:在连接酶存在的情况下的i)如权利要求1-50中任一项所述的核酸传感器系统,在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统,以及iii)能够检测所述报告蛋白的表达的试剂;

c)测量步骤b)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

58.如权利要求57所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞表达系统的一部分提供。

59.一种试剂盒,所述试剂盒包含:

a)处于包装材料中的组合物,所述组合物含有如权利要求1-50中任一项所述的核酸传感器系统;

b)样品收集设备;

c)阳性对照;以及

d)使用说明。

核酸的体外检测

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2018年8月14日提交的美国临时申请No.62/718,427的权益,以引用的方式将其内容整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已经通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且在此处以引用的方式将其整体并入。所述ASCII副本创建于2019年7月29日,命名为002806-092060WOPT_SL.txt,大小为15,781字节。

技术领域

[0005] 本文描述了使用无细胞表达系统来检测核酸的系统和方法。

背景技术

[0006] 传统的核酸检测技术需要大量的基础设施和操作投入。特别地,标记和扩增系统需要庞大且昂贵的成像技术和热循环平台。此类系统也限制了现场部署的机会。在蛋白表达是检测读出的情况中,体内细胞表达系统增加更深层次的复杂性,并且没有可行的用于现场使用的部署。因此,本领域中迫切需要降低复杂性的系统和方法,以最少的基础设施提供灵活的部署。

发明内容

[0007] 本文提供了涉及用于检测靶核酸分子的存在的传感器系统的方法和组合物。在没有靶标的情况下,这些传感器作为非功能性部分而存在。在存在靶标的情况下,含有靶核酸结合序列的传感器系统的部分与靶标特异性结合,并在与靶标结合时位于彼此紧密接近的位置,从而使得能够形成功能性传感器系统。当处于功能性时,所述传感器系统可表达报告蛋白。因此,本文所述的传感器具有非常低的背景信号,并且容易适用于与现有技术一起使用以用于测量蛋白产出。

[0008] 本文描述了用于体外检测核酸的组合物和方法。基于靶核酸的存在,对核酸传感器进行活化以用于所编码的报告蛋白的无细胞表达。该系统被设计为以低成本的细胞提取物发挥作用,而无需仪器或严格的温度控制。这些特性对于消费者健康、宠物/动物健康、食品安全以及以成本和便携性为关键因素的其它领域中的使用点(point-of-use)分子诊断应用而言是有利的。

[0009] 本文描述的本发明的方面提供了核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分,当所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分连接在一起时,所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分产生单个链的DNA表达盒,所述单个链的DNA表达盒包含:i)启动子;ii)核糖体结合位点(RBS);以及iii)编码序列。在一些实施方式中,靶核酸杂交序列位于所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分内。

[0010] 本发明的方面描述了核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分，当所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分连接在一起时，所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分产生单个链的DNA表达盒，所述单个链的DNA表达盒包含：i)启动子；ii)核糖体结合位点(RBS)；iii)编码序列，其中，单个链包含含有3’杂交区域和5’杂交区域的靶核酸杂交序列，其中，所述3’杂交区域包含在所述第一传感器部分中，所述5’杂交区域包含在所述第二传感器部分中，以使得当使所述传感器系统与包含靶标核酸的样品接触并与所述靶核酸序列杂交时，与所述靶核酸的杂交使得能够将所述第一部分和第二部分连接。

[0011] 在一些实施方式中，DNA表达盒是非模板DNA表达盒。在一些实施方式中，表达盒的第一传感器部分和第二传感器部分在表达盒内的任意给定位置处分开。在一些实施方式中，分开发生在靶核酸杂交序列内。在一些实施方式中，靶核酸杂交序列位于表达盒内的任意给定位置。

[0012] 在一些实施方式中，第一传感器部分或第二传感器部分之一包含编码序列，其余的传感器部分包含启动子。在一些实施方式中，第一传感器部分或第二传感器部分之一包含启动子和核糖体结合位点，其余的传感器部分包含编码序列。在一些实施方式中，第一传感器部分或第二传感器部分之一包含启动子、核糖体结合位点和编码序列的起始密码子，其余的传感器部分包含其余的编码序列。在一些实施方式中，第一传感器部分从5’至3’包含：i)启动子；ii)核糖体结合位点(RBS)；iii)编码序列的起始密码子；以及iv)3’杂交区域，所述3’杂交区域为与所述起始密码子处于框内(in-frame)的阅读框形式；第二传感器部分从5’至3’包含：i)5’杂交区域，所述5’杂交区域为与其余的编码序列处于框内的阅读框形式；以及ii)其余的编码序列，所述其余的编码序列连结在5’杂交区域的下游并与5’杂交区域一起处于框内。

[0013] 在一些实施方式中，第一传感器部分或第二传感器部分之一包含启动子，其余的传感器部分包含核糖体结合位点和编码序列。在一些实施方式中，第一传感器部分从5’至3’包含：i)启动子；以及ii)3’杂交区域；第二传感器部分从5’至3’包含：i)5’杂交区域；ii)核糖体结合序列；以及iii)编码序列。

[0014] 在一些实施方式中，第一传感器部分或第二传感器部分之一包含启动子、核糖体结合位点和编码序列的5’部分，其余的传感器部分包含其余的编码序列。在一些实施方式中，第一传感器部分从5’至3’包含：i)启动子；ii)RBS；iii)编码序列的第一部分，所述编码序列的第一部分包含起始密码子和至少一个另外的密码子；iv)3’杂交区域，所述3’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；第二传感器部分从5’至3’包含：i)5’杂交区域，所述5’杂交区域处于阅读框形式，所述5’杂交区域与编码序列的第一部分一起处于框内，并与编码序列的第二部分一起处于框内；以及ii)编码序列的第二部分，所述编码序列的第二部分连结在所述5’杂交区域的下游并与所述5’杂交区域一起处于框内。

[0015] 在一些实施方式中，3’杂交区域的至少一部分在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在一些实施方式中，5’杂交区域的至少一部分在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在一些实施方式中，3’杂交区域不在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在一些实施方式中，3’杂交区域是第一传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’。在一些实施方式中，5’杂交区域不在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在一些

实施方式中,5’杂交区域是第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

[0016] 在一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域的长度总共为至少12个核苷酸。在一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域的长度各自为至少6个核苷酸。

[0017] 在一些实施方式中,第一传感器部分和第二传感器部分在同一分子上。在一些实施方式中,通过间插的ssDNA序列使第一传感器部分的5’末端与第二传感器部分的3’末端连接,使得第一传感器部分和第二传感器部分形成单个分子。在一些实施方式中,所述系统进一步包含与非模板表达盒内的序列或间插的ssDNA序列互补的引物。在一些实施方式中,第一传感器部分和第二传感器部分在至少两个单独的分子上。

[0018] 在一些实施方式中,第一传感器部分的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列。在一些实施方式中,所述系统进一步包含与第二传感器部分的3’区域互补的引物。在一些实施方式中,所述系统进一步包含与作为第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补的引物。在一些实施方式中,所述系统进一步包含与第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’区域互补的引物。在一些实施方式中,第二传感器部分进一步在其3’末端包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含在末端发夹环中的引物。

[0019] 在一些实施方式中,DNA表达盒的编码序列编码多肽。在一些实施方式中,所述多肽为报告蛋白。在一些实施方式中,所述3’杂交区域和5’杂交区域位于编码序列中,在编码所述报告蛋白的溶剂暴露环(solvent exposed loop)的区域内。在一些实施方式中,所述3’杂交区域和5’杂交区域位于报告蛋白的编码序列中,并且基本上不影响报告基因的功能。在一些实施方式中,报告蛋白包括荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、补充并激活截短的报告蛋白的肽、以及可通过测定来检测的多肽。

[0020] 在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含无细胞表达系统。在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶。在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含逆转录酶。在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。在一些实施方式中,所述核糖核酸酶是RNAse H。

[0021] 在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶(strand-displacing DNA polymerase)、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。在一些实施方式中,所述无细胞表达系统是全细胞提取物。在一些实施方式中,所述核酸传感器系统进一步包含DNA聚合酶。在一些实施方式中,所述DNA聚合酶选自于由如下所组成的组:具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌(Psychrobacillus)的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、来自枯草芽孢杆菌(B.subtilis)的聚合酶、Sequenase Version 2.0、Bsu DNA聚合酶大片段、Bst 3.0DNA聚合酶、Phusion®高保真DNA聚合酶、不具有核酸外切酶部分的Vent®DNA聚合酶、Vent®DNA聚合酶、Q5®高保真DNA聚合酶和DNA聚合酶I大(Klenow)片段。

[0022] 在一些实施方式中,靶核酸的多态型与第一传感器部分杂交区域的3’序列和第二

传感器部分杂交区域的5’序列杂交。在一些实施方式中，将第一传感器部分的3’杂交区域或第二传感器部分的5’杂交区域配置为与靶核酸的多态型杂交。在一些实施方式中，将第一传感器部分的3’杂交区域的自由端(free end)或第二传感器部分的5’杂交区域的自由端配置为与靶核酸的多态型杂交。在一些实施方式中，多态型的杂交序列包含第一传感器部分杂交区域的最3’碱基(the most 3’base)和第二传感器部分杂交区域的5’碱基中的一个或两个。在一些实施方式中，靶核酸杂交区域包含一个或多个多态型。

[0023] 本发明的方面描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供包含靶核酸的样品；b)在有利于靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3’杂交区域杂交以及靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5’杂交区域杂交的条件下，使包含靶核酸的样品在连接酶存在的情况下与本文所述的核酸传感器系统接触，从而生成反应产物，所述反应产物包含与彼此可操作地连结的第一传感器部分和第二传感器部分杂交的靶核酸；c)在有利于产生报告蛋白的条件下，在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下，使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触；d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测报告蛋白的表达的试剂接触；e)测量步骤d)中产生的报告蛋白的表达，以确定样品中靶核酸的存在和/或量。在一些实施方式中，所述连接酶作为无细胞系统的一部分提供。

[0024] 本发明的方面描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供包含靶核酸的样品；b)在有利于靶核酸序列与表达盒的第一传感器部分的3’杂交区域以及靶核酸序列与表达盒的第二传感器部分的5’杂交区域杂交的条件下，使包含靶核酸的样品在连接酶和任选的引物存在的情况下与本文所述的核酸传感器系统接触，从而生成反应产物，所述反应产物包含与彼此可操作地连结的第一传感器部分和第二传感器部分杂交的靶核酸；c)在有利于产生报告蛋白的条件下，在链置换DNA聚合酶存在的情况下，使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触；d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测报告蛋白的表达的试剂接触；e)测量步骤d)中产生的报告蛋白的表达，以确定样品中靶核酸的存在和/或量。

[0025] 本发明的方面描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供包含靶核酸的样品；b)在有利于靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3’杂交区域杂交以及靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5’杂交区域杂交、并有利于产生报告蛋白的条件下，使包含靶核酸的样品与以下物质接触：在连接酶存在的情况下的i)本文所述的核酸传感器系统，以及在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统；c)使步骤b)中产生的反应产物与能够检测报告蛋白的表达的试剂接触；d)测量步骤d)中产生的报告蛋白的表达，以确定样品中靶核酸的存在和/或量。在一些实施方式中，所述连接酶作为无细胞系统的一部分提供。在一些实施方式中，所述连接酶作为无细胞系统的一部分提供。

[0026] 本发明的方面描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供包含靶核酸序列的样品；b)在有利于靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3’杂交区域杂交以及靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5’杂交区域杂交、并有利于产生报告蛋白的条件下，使包含靶核酸序列的样品与以下物质接触：在连接酶存在的情况下的i)本文所述的核酸传感器系统，在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统，以及iii)能够检测所述报告蛋白的表达的试剂；c)测量步骤b)中产生的报告蛋白的表达，以确定样品中靶核酸的存在和/或量。在一些实施方式中，所述连接酶作为无细胞系统的一部分提

供。

[0027] 本发明的方面描述了试剂盒,所述试剂盒包含:处于包装材料中的含有核酸传感器系统的组合物;样品收集设备;阳性对照;以及使用说明。

附图说明

[0028] 图1:核酸检测技术的说明。将包含靶核酸的样品(虚线)与核酸传感器部分(A、B、p)在无细胞表达系统中的结合。传感器部分的接合点(junction)(i'、ii')设计为与能够通过连接酶将A和B连接成单个链的靶核酸(i、ii)杂交。DNA聚合酶使引物p延伸,以产生功能性双链表达盒,该表达盒通过无细胞表达系统转录并翻译成可检测的报告子(例如酶或易于检测的非催化性多肽)。

[0029] 图2A-图2B:示出了传感器系统的核酸组分的说明。(图2A)在编码序列的起始密码子之后具有非模板(有义)ssDNA链和拆分位点的传感器系统的实施方式。杂交区域和靶RNA画有阴影,并示出了B结构域上的5'磷酸酯(P)。A结构域包含启动子、核糖体结合位点(RBS)、ATG起始密码子和3'杂交区域(带阴影)。B结构域包含5'磷酸酯(P)、5'杂交结构域(带阴影)和编码序列。还示出了引物。(图2B)可选的传感器组分方案:(i)A结构域和B结构域分别在5'末端和3'末端连结;(ii)掺入ssDNA引物作为B结构域的末端发夹;或(iii)在A结构域的5'末端和B结构域的3'末端上均含有发夹。

[0030] 图3:示出了三个版本的传感器系统组分的说明。在版本1中,在编码序列的起始密码子(ATG)之后,将表达盒拆分为A部分和B部分。在版本2中,在启动子(P)和核糖体结合位点(RBS)之间,将表达盒拆分为A部分和B部分。在版本3中,在编码序列内,将表达盒拆分为A部分和B部分。对于版本1设计和版本2设计,插入的靶杂交区域以阴影框示出。版本3不包含插入的序列,而是具有与报告子编码序列(以接合位点作为侧翼)相匹配的靶序列。示出了与B部分的3'末端杂交的引物。

[0031] 图4A-图4C:针对每种设计版本,示出了完整dsDNA表达盒(AB)和个体dsDNA A部分或B部分(B_T1、B_T2、A_T3)的所测量的发光的柱状图。(图4A)仅针对版本1系统,对具有两种不同的插入杂交区域(AB_T1和AB_T2)的表达盒与B部分进行比较。(图4B)仅针对版本2系统,对具有两种不同的插入杂交区域(AB_T1和AB_T2)的表达盒与B部分进行比较。(图4C)对版本3的表达盒与相应的A部分进行比较。RLU=相对光单位。

[0032] 图5A-图5B:示出了通过版本1(v1)传感器系统检测不同量的靶RNA(T2)的柱状图。反应包括浓度为0pM至10.9nM的靶RNA。也以10.9nM对非互补RNA序列(脱靶,off-target)进行了测试。(图5A)使用Klenow片段+exo DNA聚合酶,使引物延伸通过所连接的接合点。(图5B)使用Sequenase DNA聚合酶,使引物延伸通过所连接的接合点。空白=空孔;RLU=相对光单位。

[0033] 图6:示出了通过v1传感器系统检测不同量的靶T1 RNA的柱状图。反应包括浓度为0至1.44pM的靶RNA。这些反应中的连接步骤为15分钟,并在1小时后测量发光。RLU=相对光单位。

[0034] 图7:示出了比较随着背景(bg)RNA的量增加(从0至2600ng),数种T1靶RNA浓度(0至50pM)下v1传感器的表现的柱状图。RLU=相对光单位。

[0035] 图8:示出了比较关于加入到水、RNA提取物(RNAex)和热裂解的全细胞提取物

(WCex)背景中的T1靶标的v1传感器的表现的柱状图。RLU＝相对光单位。

[0036] 图9:示出了通过直接由RNA提取物(RNAex)或热裂解的全细胞提取物(WCex)(对应于同等的细胞材料)进行的T2检测,对v1传感器的表现进行比较的柱状图。RLU＝相对光单位。

[0037] 图10:示出了通过在合并的人唾液增加(0至70.8%)的背景中进行的T1检测而来的v1传感器的表现的柱状图。RLU＝相对光单位。

[0038] 图11A-图11D:示出了在版本3传感器系统的RNA介导的活化过程中,不同的DNA聚合酶的表现的柱状图。与没有连接酶和靶标的反应(-LT)相比,(图11A)Klenow片段+exo、(图11B)Klenow片段-exo、(图11C)phi29聚合酶、和(图11D)Sequenase DNA聚合酶在连接酶和RNA T2靶标(+LT)存在的情况下在活化表达盒方面均有效。RLU＝相对光单位。

[0039] 图12:示出了v1的替代的传感器组分方案(其中A部分和B部分都在同一ssDNA序列上,使得B现在为A的5')的测试的柱状图。测试了两种构建体,其中一种使用T7终止子结构域终止RNA转录物(CSt),另一种包含三个重复终止密码子(CSs)。柱状图示出了不同浓度(0至200pM)下的T1靶RNA或T2靶RNA检测的表现比较。RLU＝相对光单位。

[0040] 图13:示出了对在v1的靶标的杂交区域内引入的单核苷酸变体(SNV)或单核苷酸多态型(SNP)的区分的柱状图。测试了四个不同的变体(例如SNP-UG、SNP-AA、SNP-GA、SNP-GG)。RLU＝相对光单位。

[0041] 图14A-图14C:示出了使用v1测试多种DNA聚合酶的柱状图。(图14A)靶向CT靶RNA序列(+RNA)的体外检测系统中和没有靶RNA序列(-RNA)的阴性对照中的聚合酶的表现(除非另有指定,每个反应4个单位)。IsoPol(来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶);IsoPol SD+(来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶);Bsu(来自枯草芽孢杆菌的聚合酶)。RLU＝相对光单位。(图14B)对于每种聚合酶,示出了基于这些测量结果的信噪比(S:B比)。(图14C)使用不同单位量的IsoPol SD+(从1.7U至4U)的S:B比。

[0042] 图15A-图15B:示出了测试将纳米荧光素酶(NLuc)的表达盒拆分并将靶杂交序列插入溶剂暴露环中的柱状图。(图15A)具有在所指示的溶剂暴露环区域处插入的杂交序列的Nluc的活性。(图15B)基于所述的靶CT序列和A中的拆分位置构建了ssDNA传感器部分,并对它们进行测试以检测100nM的靶CT RNA。RLU＝相对光单位。

[0043] 图16:用于测试来自拆分的荧光素酶构建体的独立转录/翻译的背景的构建体的示意图。每个PCR产物均具有T7启动子,接着是RBS和ATG起始密码子、纳米荧光素酶的片段和终止密码子。例如,对于拆分位点1,A部分将是编码序列1的氨基酸1-氨基酸17的DNA序列,B部分将是编码氨基酸18-氨基酸170的DNA序列。

[0044] 图17:示出了在无细胞表达系统中测试的分裂的荧光素酶构建体的发光信号的柱状图。全长构建体是包含T7驱动的PCR产物的完整荧光素酶,而阴性构建体是未添加PCR产物的反应。

具体实施方式

[0045] 本文描述了基于非功能性的非活性表达盒的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统被设计为在靶核酸的存在下活化。活化可例如通过使多个单独的盒分子与靶分子杂交从而使盒分子联合并提供功能性的完整的盒而发生。有活性的功能性表达盒在无细胞表达系

统中被转录和翻译为编码的蛋白质或多肽。无细胞表达系统包含在活细胞环境之外操作的细胞机构，且不受细胞膜限制。编码的蛋白质或多肽可直接或间接检测。

[0046] 无细胞表达系统是一种体外系统，所述系统包含从表达盒生产蛋白质(包括将DNA转录为RNA以及将RNA翻译为蛋白质)所必需的所有分子机构、构造块组分(building block components)和能量分子。从表达盒产生蛋白质所必需的分子机构包括但不限于RNA聚合酶、核糖体和tRNA。无细胞表达系统可以基于细胞提取物(其中通过膜破裂使整个细胞裂解以使得能够外部表达)，或者基于从细胞纯化的转录和翻译机构。在这两种情况下，这些系统都可以补充有构造块组分(例如dNTP和氨基酸)以及能量组分(例如ATP)。

[0047] 如本文所述，将表达盒的启动子、核糖体结合位点(RBS)和蛋白编码序列分开成两个单链DNA(ssDNA)核酸或结构域。将表达盒分成两部分(例如，第一核酸或结构域以及第二核酸或结构域)以及非模板(有义)ssDNA的使用使得表达盒对于报告蛋白的转录和翻译而言是非功能性的。如本文所使用的，“非模板(non-template)”是指与模板链互补的DNA链，可由所述模板链转录出mRNA;因此，非模板链不能直接转录成mRNA。如本文所使用的，“有义(sense)”是指DNA链是与编码的mRNA相同的链。“编码”特定单元或组分的核酸是包含转录(以及任选地翻译)指定单元或组分所必需的序列的核酸。合成模板链的中间步骤可能是发生此种转录所必需的，但是由于遗传信息是核酸序列或结构所固有的，因此仍然认为所述核酸编码了该单元或组分。如本文所使用的，“非功能性的(non-functional)”是指DNA链或分子不能转录成编码报告蛋白的mRNA，因为启动子、RBS和编码序列并非都存在于同一链和/或分子上。

[0048] 对核酸传感器系统的部分进行设计，以使得在杂交位点和/或接合位点处使靶核酸(RNA或ssDNA)能够与核酸或结构域进行杂交和桥接，从而使连接酶能够将所述两个核酸或结构域联接成单个链。通过DNA聚合酶使与结合/联接/连接的非模板(有义)链的3’区域互补的“引物”的随后的延伸引起功能性dsDNA表达盒的形成，其可由RNA聚合酶转录并翻译成报告蛋白(参见例如图1)。

[0049] 本文描述了核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含第一核酸和第二核酸。第一核酸和第二核酸可各自为分子或序列。第一核酸包含3’杂交区域。3’杂交区域位于第一核酸的3’末端。3’杂交区域与靶核酸的第一区域互补。第二核酸包含5’杂交区域。5’杂交区域位于第二核酸的5’末端。5’杂交区域与靶核酸的第二区域互补。在任何方面的一些实施方式中，靶核酸的第一区域和第二区域彼此邻近(adjacent)、相邻(contiguous)和/或连续(consecutive)。

[0050] 第一核酸和第二核酸可通过靶核酸桥接或者通过靶核酸紧密接近。靶核酸的第一区域与第一核酸的上游杂交区域(例如3’杂交区域)杂交。靶核酸的第二区域与第二核酸的下游杂交区域(例如5’杂交区域)杂交。由于靶核酸的第一区域和第二区域彼此邻近、相邻和/或连续，使得第一核酸的3’杂交区域与第二核酸的5’杂交区域紧密接近。3’杂交区域和5’杂交区域(在任何方面的一些实施方式中包含5’磷酸酯)可通过连接酶结合、联接或连接。连接的第一核酸和第二核酸形成非模板盒，所述非模板盒编码启动子、核糖体结合位点以及报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，通过连接酶连接在一起后，将第一核酸和第二核酸称为第一结构域和第二结构域。第一核酸和第二核酸可为单独的分子或序列，而在第一核酸和第二核酸杂交和连接后，第一结构域和第二结构域可位于同一分子

或序列上。

[0051] 在任何方面的一些实施方式中，第一核酸和第二核酸当连接在一起时被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，第一核酸和第二核酸当连接在一起并与靶核酸杂交(所述靶核酸杂交至3’杂交区域和5’杂交区域)时，被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，靶核酸杂交序列位于所述盒内，并且所述盒被分开成第一核酸和第二核酸，其中，所述分开发生在杂交区域内。

[0052] 在任何方面的一些实施方式中，第一核酸包含启动子，第二核酸包含报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，第一核酸包含启动子和核糖体结合位点，第二核酸包含报告蛋白的编码序列。

[0053] 在任何方面的一些实施方式中，所述系统进一步包含与第二核酸的3’区域互补的引物或者与作为第二核酸或结构域中的编码序列的3’的序列互补的引物。在任何方面的一些实施方式中，所述系统进一步包含与第二核酸的3’区域互补的引物或者与作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补的引物。在任何方面的一些实施方式中，所述第一核酸和所述第二核酸为DNA。在任何方面的一些实施方式中，所述第一核酸和所述第二核酸为ssDNA。

[0054] 本文进一步描述了核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：a)非功能性的、单链非模板形式的DNA表达盒，所述DNA表达盒含有：i)启动子，ii)RBS，iii)报告蛋白的编码序列，其中将靶核酸杂交序列插入所述盒中，并将所述盒分开成两个核酸或结构域，其中所述分开发生在杂交区域内；b)单链DNA引物，所述单链DNA引物与表达盒的3’区域互补或者与作为第二核酸或结构域中的编码序列的3’的序列互补；c)连接酶和无细胞表达系统。

[0055] 本文进一步描述了核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：a)非功能性的、单链非模板形式的DNA表达盒，所述DNA表达盒含有：i)启动子，ii)RBS，iii)报告蛋白的编码序列，其中将靶核酸杂交序列插入所述盒内，并将所述盒分开为两个分子、序列、核酸或结构域，其中所述分开发生在杂交区域内；b)单链DNA引物，所述单链DNA引物与所述表达盒的3’区域互补或者与作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补；c)连接酶和无细胞表达系统。

[0056] 本文描述了在一些方面或实施方式中称为版本1(v1)核酸系统的核酸传感器系统(参见例如图3)。在任何方面的一些实施方式中，第一核酸或结构域包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的起始密码子，第二核酸或结构域包含报告蛋白的其余的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，该核酸系统包含：a)第一ssDNA核酸或结构域，所述第一ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)启动子，ii)RBS，iii)起始密码子，以及iv)3’杂交区域，所述3’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；b)第二ssDNA核酸或结构域，所述第二ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)5’杂交区域，所述5’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式，以及ii)报告蛋白或多肽的编码序列，所述编码序列连结在所述杂交区域的下游并与所述起始密码子处于框内；以及c)与第二核酸或结构域的3’区域互补的ssDNA引物。

[0057] 在任何方面的一些实施方式中，第一核酸或结构域或者第二核酸或结构域之一包

含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的起始密码子，其余的核酸或结构域包含报告蛋白的其余的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，该核酸系统包含：a)第一ssDNA核酸或结构域，所述第一ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)启动子，ii)RBS，iii)起始密码子，以及iv)杂交区域的上游部分(例如3’杂交区域)，所述杂交区域的上游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；b)第二ssDNA核酸或结构域，所述第二ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)杂交区域的下游部分(例如5’杂交区域)，所述杂交区域的下游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式，以及ii)报告蛋白的编码序列，所述编码序列连接在所述杂交区域的下游并与所述起始密码子一起处于框内；以及c)与第二核酸或结构域的3’区域互补的ssDNA引物。

[0058] 本文进一步描述了在一些方面或实施方式中称为版本2(v2)核酸系统的核酸传感器系统(参见例如图3)。在任何方面的一些实施方式中，第一核酸或结构域包含启动子，第二核酸或结构域包含核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，该核酸系统包含：a)第一ssDNA核酸或结构域，所述第一ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)启动子，以及ii)3’杂交区域；b)第二ssDNA核酸或结构域，所述第二ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)5’杂交区域，ii)RBS，以及iii)起始密码子，所述起始密码子与报告蛋白的编码序列以框内的形式连结；以及c)ssDNA引物，所述ssDNA引物与所述第二核酸或结构域的3’区域互补或者与作为所述第二核酸或结构域中的编码序列的3’的序列互补。

[0059] 在任何方面的一些实施方式中，第一核酸或结构域或者第二核酸或结构域之一包含启动子，其余的核酸或结构域包含核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，该核酸系统包含：a)第一ssDNA核酸或结构域，所述第一ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)启动子，以及ii)杂交区域的上游部分(例如3’杂交区域)；b)第二ssDNA核酸或结构域，所述第二ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)杂交区域的下游部分(例如5’杂交区域)，ii)RBS，以及iii)起始密码子，所述起始密码子与报告蛋白的编码序列以框内的形式连结；以及c)ssDNA引物，所述ssDNA引物与第二核酸或结构域的3’区域互补或与作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补。

[0060] 本文描述了在一些方面或实施方式中称为版本3(v3)核酸系统的核酸传感器系统(参见例如图3)。在任何方面的一些实施方式中，第一核酸或结构域包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的5’部分，第二核酸或结构域包含报告蛋白的其余的编码序列。在任何方面的一些实施方式中，该核酸系统包含：a)第一ssDNA核酸或结构域，所述第一ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)启动子，ii)RBS，iii)起始密码子，所述起始密码子与报告蛋白的编码序列的上游部分以框内的形式连结(例如包含起始密码子和至少一个另外的密码子)，以及iv)3’杂交区域，所述3’杂交区域处于阅读框形式，连结在报告蛋白的编码序列的上游部分的下游并与报告蛋白的编码序列的上游部分一起处于框内；b)第二ssDNA核酸或结构域，所述第二ssDNA核酸或结构域从5’至3’含有如下物质的非模板(有义)链：i)5’杂交区域，所述5’杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式，以及ii)报告蛋白的编码序列的下游部分，所述报告蛋白的编码序列的下

游部分连结在杂交区域的下游部分的下游并与所述杂交区域的下游部分一起处于框内;以及c)ssDNA引物,所述ssDNA引物与第二核酸或结构域在其3'末端互补或者与作为第二核酸或结构域中的编码序列的3'的序列互补。

[0061] 在任何方面的一些实施方式中,第一核酸或结构域或者第二核酸或结构域之一包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的5'部分,其余的核酸或结构域包含报告蛋白的其余的编码序列。在任何方面的一些实施方式中,该核酸系统包含:a)第一ssDNA核酸或结构域,所述第一ssDNA核酸或结构域从5'至3'包含如下物质的非模板(有义)链:i)启动子,ii)RBS,iii)起始密码子,所述起始密码子与报告蛋白的编码序列的上游部分以框内的形式连结(例如包含起始密码子和至少一个另外的密码子),以及iv)杂交区域的上游部分(例如3'杂交区域),所述杂交区域的上游部分处于阅读框形式,连结在报告蛋白的编码序列的上游部分的下游并与报告蛋白的编码序列的上游部分一起处于框内,b)第二ssDNA核酸或结构域,所述第二ssDNA核酸或结构域从5'至3'包含如下物质的非模板(有义)链:i)杂交区域的下游部分(例如5'杂交区域),所述杂交区域的下游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式,以及ii)报告蛋白的编码序列的下游部分,所述报告蛋白的编码序列的下游部分连结在所述杂交区域的下游部分的下游并与所述杂交区域的下游部分一起处于框内;以及c)ssDNA引物,所述ssDNA引物与第二核酸或结构域在其3'末端互补或与作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列互补。

[0062] 在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域和5'杂交区域位于报告蛋白或多肽的编码序列中(例如,v3核酸传感器系统)。在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域和5'杂交区域位于报告蛋白的溶剂暴露环的编码区域内。如本文所使用的,"溶剂暴露环(solvent exposed loop)"是指处于蛋白质的外(溶剂)侧上的蛋白质的区域。溶剂暴露环可比蛋白质的其它区域在构象上更具柔性。溶剂暴露环可代表用于插入一个或多个外源核酸序列(例如3'杂交区域和5'杂交区域)的最佳位点。将外源核酸序列插入溶剂暴露环中更有可能不破坏蛋白质的正常结构和/或功能。作为非限制性实例,经测试或用于将3'杂交区域和5'杂交区域插入纳米荧光素酶中的具体的溶剂暴露环位点包括E50-N51、L66-S67、G123-K124、G135-N136或N145-P146(参见例如实施例17)。作为另一非限制性实例,经测试或用于将3'杂交区域和5'杂交区域插入纳米荧光素酶中的具体的溶剂暴露环位点包括Y17-N18、G26-G27、S29-S30、G36-G37、E50-N51、L66-S67、K79-V80、D86-H87、D101-G102、R113-P114、G123-K124、G135-N136、N145-P146和N157-G148(参见例如实施例18)。在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域和5'杂交区域位于报告蛋白的编码序列中,并且基本上不影响报告基因的功能,或者位于使得能够通过蛋白质-蛋白质或蛋白质-小分子相互作用进行检测的结构化区域中。

[0063] 在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域的至少一部分在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在任何方面的一些实施方式中,5'杂交区域的至少一部分在启动子、核糖体结合位点或编码序列中。在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域不在启动子、核糖体结合位点或编码序列内或者不与启动子、核糖体结合位点或编码序列共同延伸(co-extensive)。在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域是第一核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'。在任何方面的一些实施方式中,5'杂交区域不在启动子、核糖体结合位点或编码序列内或者不与启动子、核糖体结合位点或编码序列共同延

伸。在任何方面的一些实施方式中,5’杂交区域是第二核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

[0064] 在上述的各个实施方式中,第一ssDNA核酸或结构域和第二ssDNA核酸或结构域是单独的DNA片段,第二ssDNA核酸或结构域包含5’磷酸酯。在任何方面的一些实施方式中,第二ssDNA核酸或结构域在其3’末端进一步包含核苷酸序列或接头,所述核苷酸序列或接头包含在末端发夹环中的ssDNA引物(参见例如图2B(ii)或图2B(iii))。在任何方面的一些实施方式中,第一核酸或结构域的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列或接头(参见例如图2B(iii))。在任何方面的一些实施方式中,第一核酸或结构域的5’末端通过间插的ssDNA序列连结至第二核酸或结构域的3’末端,使得第一结构域和第二结构域存在于单个ssDNA序列上(参见例如图2B(i))。

[0065] 在任何方面的一些实施方式中,全杂交区域(例如3’杂交区域和5’杂交区域两者)为至少12个-60个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,全杂交区域为至少12个-40个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,全杂交区域为至少12个-36个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,全杂交区域为至少12个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,3’杂交区域(例如杂交区域的上游部分)和5’杂交区域(例如杂交区域的下游部分)各自为至少6个-20个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域各自为至少6个-18个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域各自为至少18个核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域各自为至少6个核苷酸。

[0066] 在任何方面的一些实施方式中,3’杂交区域和5’杂交区域与靶核酸的一部分互补,以便使靶核酸与3’杂交区域和5’杂交区域的杂交在第一核酸或结构域和第二核酸或结构域之间产生足以使生产性的(productive)连接发生的接合点。在任何方面的一些实施方式中,杂交区域与靶核酸的互补靶向部分以80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-99%或99%或更高百分比的同一性互补,其中,通过在两个n个核苷酸的序列之间选择比较窗口并且将比较中的互补碱基对的程度除以比较窗口中的n个核苷酸来确立同一性百分比,或者通过本领域普通技术人员容易获知的用于确定同一性百分比的任何其它技术来确立同一性百分比。核酸或结构域的接合点可以指两个分子或结构域物理接触或被定位以使得所述两个分子或结构域的连接能够在接合点处彼此连接的点。

[0067] 在任何方面的一些实施方式中,核酸传感器系统包含与第二核酸的3’区域互补的引物。在任何方面的一些实施方式中,所述引物与作为第二核酸或结构域中的编码序列的3’的序列互补。在任何方面的一些实施方式中,所述引物与作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补。在任何方面的一些实施方式中,所述引物是ssDNA。在任何方面的一些实施方式中,所述引物结合至第二核酸或结构域,并允许模板链的DNA聚合,所述模板链与非模板链互补。在任何方面的一些实施方式中,所述引物是SEQ ID NO:19。

[0068] 报告蛋白是提供可检测信号和/或具有产生可检测信号的能力的蛋白(例如通过催化将化合物转化为可检测产物的反应,或与能够检测的另一分子结合)。可检测信号可包括例如荧光或发光。可检测信号、检测它们的方法以及将它们掺入试剂(例如包含报告蛋白的多肽)中的方法在本领域中是众所周知的。在任何方面的一些实施方式中,可检测信号可包括能够通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电磁、放射化学或化学手段(如荧光、化

学荧光或化学发光)或任何其它适当的手段检测的信号。在任何方面的一些实施方式中,报告蛋白选自于由荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、补充并激活截短的报告蛋白的肽、激酶所组成的组。

[0069] 在任何方面的一些实施方式中,所述系统包含连接酶、RNA聚合酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。在任何方面的一些实施方式中,所述系统还可包含具有功能性RNaseH结构域的逆转录酶。在任何方面的一些实施方式中,所述系统可包含单独的逆转录酶和RNaseH活性。在任何方面的一些实施方式中,无细胞表达系统是全细胞提取物。

[0070] 如本文所述,所述核酸系统可包含:a)单链DNA(ssDNA)引物,所述单链DNA引物与如下互补:i)表达盒的3'区域、ii)第二核酸或结构域的3'区域、iii)作为第二核酸或结构域中的编码序列的3'的序列、或iv)作为表达盒中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列;b)连接酶;和/或c)无细胞表达系统。

[0071] 如本文所述,所述核酸系统可包含:a)单链DNA(ssDNA)引物,所述单链DNA引物与如下互补:i)表达盒的3'区域、ii)第二核酸或结构域的3'区域、iii)作为第二核酸或结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列、或iv)作为表达盒中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列;b)连接酶;和/或c)无细胞表达系统。

[0072] 如本文所使用的,"聚合酶"是指催化长核酸的合成的酶。如本文所使用的,"链置换聚合酶"是指具有置换或解除合成过程中遇到的下游DNA或RNA(例如与核酸传感器系统杂交的靶DNA或RNA)的能力的聚合酶。DNA聚合酶表现出不同程度的链置换活性。具有低链置换活性的DNA聚合酶通常不能经过下游DNA或RNA来合成DNA,从而可能导致不完全的DNA聚合。具有高链置换活性的DNA聚合酶通常能够经过下游DNA或RNA来合成DNA,从而产生完全的DNA聚合。在任何方面的一些实施方式中,链置换DNA聚合酶选自于由如下所组成的组:具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、以及来自枯草芽孢杆菌的聚合酶(参见例如实施例13、实施例16)。

[0073] 在任何方面的一些实施方式中,接合点(例如3'杂交区域或5'杂交区域)被配置为与靶核酸的多态型杂交。在任何方面的一些实施方式中,3'杂交区域或5'杂交区域或者接合点的自由端被配置为与靶核酸的多态型杂交。在任何方面的一些实施方式中,在上游或下游ssDNA传感器结构域中的一者或两者上,多态型位于杂交区域的接合点处的两个碱基中的一者或两者处。在任何方面的一些实施方式中,可将一个或多个多态型任选地引入杂交区域内。作为非限制性实例,测试了四个不同的示例性变体(多态型)(参见例如实施例15)。

[0074] 在任何方面的一些实施方式中,第一核酸和第二核酸可为单独的分子或序列。在任何方面的一些实施方式中,当连接在一起时、在连接在一起之后、或在通过连接酶连接在一起之后,将第一核酸和第二核酸称为第一结构域和第二结构域。第一核酸和第二核酸可为单独的分子或序列,而在第一核酸和第二核酸的杂交和连接后,第一结构域和第二结构域可位于相同的分子或序列上。

[0075] 在一些实施方式中,本文所述的核酸传感器系统的一个或多个组分可与固体基底

缀合。固体基底可选自于由如下所组成的组:珠子、磁性微珠、顺磁微珠、微孔膜、中空纤维、任何其它流体过滤膜、流动装置、微量滴定板、试管、细胞培养板、微阵列板、玻璃珠、乳胶珠、活细胞、生物组织或器官的细胞外基质、和吞噬细胞。在任何方面的一些实施方式中,固体基底可附着或缀合至第一核酸、第二核酸、第一结构域、第二结构域、引物和/或靶核酸。在任何方面的一些实施方式中,固体基底附着或缀合至第一核酸和/或第二核酸。

[0076] 如本文所使用的,"核酸传感器系统的组分"是指第一部分、第二部分,或第一核酸、第二核酸,或第一结构域、第二结构域,或A结构域、B结构域,或第一序列、第二序列,和/或引物,和/或靶核酸。不受限制地,可采用的示例性基底类型包括但不限于核酸支架、生物分子(例如活细胞)或固体表面。在任何方面的一些实施方式中,固体表面可用偶联分子(例如氨基基团)官能化,以促进核酸传感器系统的组分与固体表面的缀合。

[0077] 可通过多种方法来进行核酸传感器系统的组分与基底表面的附着,例如,通过使核酸传感器系统的组分与基底表面直接交联;经由核酸基质(例如,DNA基质或DNA/寡核苷酸折纸结构(DNA/oligonucleotide origami structure))使核酸传感器系统的组分与基底表面交联;经由树状(dendrimer-like)结构(例如,PEG/甲壳素结构)使核酸传感器系统的组分与基底表面交联;用施加至基底表面的聚焦磁场梯度,将涂覆有核酸传感器系统组分的磁性微珠吸引至基底表面;经由生物素-亲和素或生物素-亲和素样相互作用,将核酸传感器系统的组分附着至基底;或任何其它本领域公认的方法。

[0078] 核酸传感器系统的组分可适于将杂交区域定向为远离基底。核酸传感器系统的组分可包含与固体基底上的靶序列或结合伴侣结合的核酸序列或多肽序列。可选地或另外地,可将基底的表面官能化以包含本文所述的偶联分子。本文所使用的术语"偶联分子"是指能够与本文所述的核酸传感器系统的组分选择性结合的任何分子或任何官能团。偶联分子的代表性实例包括但不限于,抗体、抗原、凝集素、蛋白、肽、核酸(DNA、RNA、PNA和作为上述核酸的混合物的核酸,或包含核苷酸衍生物或类似物的核酸);受体分子,例如胰岛素受体;针对受体的配体(例如,针对胰岛素受体的胰岛素);以及对另一分子具有亲和力的生物分子、化学分子或其它分子,例如生物素和亲和素。所述偶联分子不需包含整个天然存在的分子,而可仅由天然存在的或非天然存在的分子的部分、片段或亚基组成,例如抗体的Fab片段。所述偶联分子可进一步包含可检测标记。所述偶联分子还可包含能够将基底与核酸传感器系统的组分偶联的各种官能团。这样的官能团的实例包括但不限于氨基基团、羧酸基团、环氧基基团和甲苯磺酰基基团。

[0079] 在任何方面的一些实施方式中,可通过共价或非共价相互作用将核酸传感器系统的组分缀合至基底表面。可使用本领域技术人员已知的任何方法,将核酸传感器系统的组分-和/或偶联分子共价或非共价缀合至固体基底的表面。例如,可通过例如硅烷偶联实现共价固定化。参见例如Weetall,15Adv.Mol.Cell Bio.161(2008);Weetall,44Meths.Enzymol.134(1976)。还可通过其它本领域公认的化学反应(例如NHS反应)或缀合剂来介导核酸传感器系统的组分和/或偶联分子与表面之间的共价相互作用。核酸传感器系统的组分和/或偶联分子与表面之间的非共价相互作用可基于离子相互作用、范德华相互作用、偶极-偶极相互作用、氢键、静电相互作用和/或形状识别(shape recognition)相互作用而形成。

[0080] 不受限制地,所述缀合可包括稳定或不稳定的(例如可裂解的)键或缀合剂。示例

性的缀合包括但不限于:共价键;酰胺键;加成至碳-碳重键;叠氮炔胡伊斯根环加成(Huisgen cycloaddition);Diels-Alder反应;二硫键;酯键;Micheal加成;硅烷键;尿烷;亲核开环反应:环氧化物、非羟醛羰基化学;环加成反应:1,3-偶极环加成;温度敏感、辐射(IR、近IR外、UV)敏感的键或缀合剂;pH敏感的键或缀合剂;非-共价键(例如,离子电荷复合物的形成、氢键、π-π相互作用、环糊精/金刚烷主客体相互作用)等。

[0081] 如本文所使用的术语"缀合剂"是指连接化合物两个部分的有机部分。接头通常包括:直接键(direct bond)或原子,例如氧或硫;单元,例如NR1、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH;或原子链,如取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环基烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,其中,一个或多个亚甲基可被O、S、S(O)、SO_2、NH、C(O)$N(R1)_2$、C(O)、可裂解连接基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环间隔或终止;其中,R1为氢、酰基、脂肪基或取代的脂肪基。

[0082] 不受限制地,在本领域中已知的用于缀合两个分子或将组合物的不同部分缀合在一起的任意缀合化学可用于将核酸传感器系统的至少一个组分连接至基底。用于将核酸传感器系统的至少一个组分缀合至基底的示例性偶联分子和/或官能团包括但不限于,聚乙二醇(PEG;可具有各种长度X的PEG间隔臂的NH_2-PEG_X-COOH,其中1<X<100,如PEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K等)、马来酰亚胺缀合剂、PASylation、HESylation、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯缀合剂、DNA缀合剂、肽缀合剂、硅烷缀合剂、多糖缀合剂、可水解的缀合剂,以及它们的任意组合。

[0083] 在可选的实施方式中,可通过偶联分子对将核酸传感器系统的组分缀合到固体基底的表面上。如本文中可互换使用的术语"偶联分子对"和"偶联对"是指彼此特异性结合的第一分子和第二分子。结合对的一个成员与固体基底缀合,而第二成员与核酸传感器系统的组分缀合。如本文所使用的短语"彼此特异性结合的第一分子和第二分子"是指相比其它分子,偶联对的第一成员与偶联对的第二成员以更高的亲和力和特异性结合。

[0084] 示例性的偶联分子对包括但不限于,任何半抗原化合物或抗原化合物与相应的抗体或其结合部分或片段的联合(例如,地高辛与抗地高辛;小鼠免疫球蛋白与羊抗小鼠免疫球蛋白)以及非免疫性结合对(例如,生物素-亲和素、生物素-链霉亲和素)、激素(例如,甲状腺素和皮质醇-激素结合蛋白)、受体-受体激动剂、受体-受体拮抗剂(例如,乙酰胆碱受体-乙酰胆碱或其类似物)、IgG-蛋白A、凝集素-碳水化合物、酶-酶辅因子、酶-酶抑制剂、以及能形成核酸双链体的互补寡核苷酸对。所述偶联分子对还可包括带负电的第一分子和带正电的第二分子。

[0085] 使用偶联对进行缀合的一个实例是生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素缀合。在这种方法中,所述偶联对的成员之一(例如,核酸传感器系统的组分的一部分(如5'末端)或

基底)被生物素化,另一成员(例如,基底或核酸传感器系统的组分)与亲和素或链霉亲和素缀合。许多可商购的试剂盒也可用于进行分子(例如核酸或蛋白质)的生物素化。例如,氨基氧基-生物素(AOB)可用于将生物素共价附着至具有醛或酮基团的分子。在一个实施方式中,将AOB附着至核酸传感器系统的组分的基底结合结构域(例如包含AKT寡肽)。

[0086] 使用偶联分子对进行缀合的一个非限制性实例是生物素夹心法。参见例如,Davis等,103PNAS 8155(2006)。使待缀合在一起的两种分子生物素化,然后使用四价链霉亲和素将它们缀合在一起。另外,可将肽偶联至受体肽的15-氨基酸序列以进行生物素化(称为AP;Chen等,2Nat.Methods 99(2005))。受体肽序列允许通过大肠杆菌(E.coli)酶生物素连接酶(BirA;同上文)进行位点特异性的生物素化。核酸传感器系统的组分可类似地被生物素化以与固体基底缀合。许多可商购的试剂盒也可用于进行核酸或蛋白质的生物素化。用于与固体表面缀合的另一实例将使用PLP介导的生物缀合。参见例如,Witus等,132JACS 16812(2010)。如前所述,与核酸传感器系统的组分的5'末端缀合的AKT序列能够允许基底结合结构域在单个位点被生物素化,并进一步与涂覆有链霉亲和素的固体表面缀合。

[0087] 使用偶联对进行缀合的又一实例是双链核酸缀合。在这种方法中,所述偶联对的成员之一(例如,核酸传感器系统的组分)可与双链核酸的第一链缀合,另一成员(例如,核酸传感器系统的组分或基底)与双链核酸的第二链缀合。核酸可不受限地包括确定的序列区段和序列(包括核苷酸;核糖核苷酸;脱氧核糖核苷酸;核苷酸类似物;经修饰的核苷酸;以及包含骨架修饰、分支点(branch points)和非核苷酸残基、基团或桥接(bridges)的核苷酸)。

[0088] 在任何方面的一些实施方式中,接头可包含至少一个可裂解的连接基团。可裂解的连接基团是在一组条件下足够稳定、但在另一组条件下裂解,从而释放出被接头保持在一起的两部分的基团。

[0089] 可裂解的连接基团易受裂解剂的影响,例如,水解、pH、氧化还原电位或降解分子的存在。此类降解剂的实例包括:存在于细胞中的氧化还原剂,对所述氧化还原剂进行选择用于特定底物或氧化还原剂无底物特异性,包括例如氧化或还原性的酶、或还原剂(例如硫醇,可通过还原对氧化还原可裂解的连接基团进行降解);酯酶;酰胺酶;核内体(endosomes)或可创建酸性环境的试剂,例如使pH为5以下的核内体或试剂;可通过充当广义酸来水解或降解酸性可裂解连接基团的酶,肽酶(可以是底物特异性的)和蛋白酶;以及磷酸酶。接头可包括可由特定酶裂解的可裂解连接基团。包含在接头中的可裂解连接基团的类型可取决于待靶向的细胞、器官或组织。

[0090] 示例性的可裂解连接基团包括但不限于:可水解的接头;氧化还原可裂解连接基团(例如,-S-S-和-C(R)$_2$-S-S-,其中,R为H或C_1-C_6烷基,并且至少一个R为C_1-C_6烷基,如CH_3或CH_2CH_3);基于磷酸酯的可裂解连接基团(例如,-O-P(O)(OR)-O-、-O-P(S)(OR)-O-、-O-P(S)(SR)-O-、-S-P(O)(OR)-O-、-O-P(O)(OR)-S-、-S-P(O)(OR)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(OR)-O-、-O-P(O)(R)-O-、-O-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-O-、-S-P(S)(R)-O-、-S-P(O)(R)-S-、-O-P(S)(R)-S-、-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-和-O-P(S)(H)-S-,其中,R为任选取代的直链或支链的C_1-C_{10}烷基);酸性可裂解连接基团(例如,腙、酯以及

氨基酸酯、-C＝NN-以及-OC(O)-)；基于酯的可裂解连接基团(例如，-C(O)O-)；基于肽的可裂解连接基团(例如，被细胞中的酶(如肽酶和蛋白酶)裂解的连接基团，例如，-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-，其中，RA和RB为两个相邻的氨基酸的R基团)。基于肽的可裂解连接基团包含两个以上氨基酸。在任何方面的一些实施方式中，所述基于肽的可裂解连接包含作为肽酶或蛋白酶的底物的氨基酸序列。在任何方面的一些实施方式中，所述酸性可裂解连接基团可在pH为约6.5以下(例如约6.5、6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境中裂解，或由例如可充当广义酸的试剂(例如酶)裂解。

[0091] 活化剂可用于活化待缀合在一起的组分(例如，基底的表面)。不受限制地，可使用在本领域中已知的用于缀合活化的任何方法和/或试剂。示例性的表面活化方法或试剂包括但不限于，1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC或EDAC)、羟基苯并三唑(HOBT)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐methanaminium(HATU)、硅烷化、通过等离子体处理进行的表面活化等。

[0092] 同样，不受限制地，任何本领域已知的反应基团可用于偶联。例如，可用于表面偶联的各种表面反应基团包括但不限于：卤代烷、醛、氨基、溴乙酰基或碘乙酰基、羧基、羟基、环氧基、酯、硅烷、硫醇等。

[0093] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的系统和/或条件可与阳性对照一起提供。如本文所使用的，阳性对照为已知产生结果或生成反应产物的反应。例如，阳性对照可为靶标1或T1(SEQ ID NO:20)和已知与T1杂交的核酸系统。已知与T1杂交的核酸系统包括但不限于v1_A_T1(SEQ ID NO:1)和v1_B_T1(SEQ ID NO:2)；v1_CSs_T1(SEQ ID NO:6)；v2_A_T1(SEQ ID NO:9)和v2_B_T1(SEQ ID NO:10)；v3_A_T1(SEQ ID NO:13)和v3_B_T1(SEQ ID NO:14)。作为另一实例，阳性对照可为靶标2或T2(SEQ ID NO:21)和已知与T2杂交的核酸系统。已知与T2杂交的核酸系统包括但不限于v1_A_T2(SEQ ID NO:3)和v1_B_T2(SEQ ID NO:5)；v1_A2_T2(SEQ ID NO:4)和v1_B_T2(SEQ ID NO:5)；v1_CSt_T2(SEQ ID NO:7)；v1_CSs_T2(SEQ ID NO:8)；v2_A_T2(SEQ ID NO:11)和v2_B_T2(SEQ ID NO:12)；v3_A_T2(SEQ ID NO:15)和v3_B_T2(SEQ ID NO:16)。作为另一实例，阳性对照可为靶标3或T3(SEQ ID NO:22)和已知与T3杂交的核酸系统。已知与T2杂交的核酸系统包括但不限于v3_A_T3(SEQ ID NO:17)和v3_B_T3(SEQ ID NO:18)。

[0094] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的系统或组合物可以以试剂盒提供。在多种实施方式中，所述试剂盒包含使用说明。所述试剂盒是材料或组分的集合，包含本文所述的核酸传感器系统中的至少一种。在本发明的试剂盒中配置的组分的确切性质取决于其预期目的。在一个实施方式中，将试剂盒特别地配置为用于人受试者。在进一步的实施方式中，将试剂盒配置用于兽医应用，以治疗受试者，所述受试者例如但不限于农场动物、家畜和实验室动物。在一些实施方式中，将试剂盒配置用于农业应用，以治疗例如农作物疾病，或检测性状。在一些实施方式中，将试剂盒配置用于工业应用。在一些实施方式中，将试剂盒配置用于消费者应用，例如家庭测试。

[0095] 在试剂盒中可包含使用说明。“使用说明”通常包括描述在使用试剂盒的组分以影响受试者的期望结果时所采用的技术的有形表现。仍然根据本发明，“使用说明”可包括描述以下的有形表现：用于预期目的通常而言的核酸传感器系统的制备和/或至少一个方法参数(例如核酸传感器系统的相对量、剂量要求和给予说明等)。任选地，所述试剂盒还包含

其它有用的组分，例如测量工具、稀释剂、缓冲剂、样品收集装置(例如拭子)、使用说明和/或将容易被本领域技术人员所认识到的其它有用的用具。

[0096] 组装在试剂盒中的材料或组分可提供给从业者，并以保持其可操作性和实用性的任何方便且合适的方式储存。例如，所述组分可处于溶解、脱水或冻干的形式；它们可以在室温、冷藏温度或冷冻温度下提供。所述组分通常包含在合适的包装材料中。如本文所使用的短语“包装材料”是指用于容纳试剂盒的内容物(例如本发明的组合物等)的一种或多种物理结构体。包装材料通过众所周知的方法构建，优选地提供无菌的、无污染物的环境。包装还优选可提供免受光、湿气和氧影响的环境。如本文所使用的术语“包装”是指能够将个体的试剂盒组分以适合使用的形式保持的合适的固体基质或材料，例如玻璃、塑料、纸、箔、聚酯(例如聚对苯二甲酸乙二酯或Mylar)等。因此，例如包装可为用于容纳适当量的组合物的玻璃小瓶、塑料小瓶或侧流条(lateral flow strip)，所述组合物包含一定体积的本文所述的核酸传感器系统。所述包装材料通常具有外部标签，该外部标签指示试剂盒和/或其组分的内容物和/或目的。

[0097] 本文描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供上述核酸传感器系统，其中，上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)与靶核酸的一部分互补，以便使靶核酸与上游杂交区域和下游杂交区域的杂交在第一核酸或结构域和第二核酸或结构域之间产生足以使生产性的连接发生的接合点，从而可操作地连结所有组分；b)在适合于靶核酸与上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)杂交、以及上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)连接的条件下，使核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与样品接触，从而产生反应产物；c)在适合于DNA聚合、转录和翻译的条件下，将步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统(所述无细胞表达系统包含链置换DNA聚合酶、dNTP和蛋白质生产所必需的其它构造块材料)以及ssDNA引物接触，从而产生反应产物，其中，所述反应产物为多肽或酶；d)与合适的对照相比，直接或间接地测量步骤c)的多肽或酶反应产物的存在，其中，明显的反应产物的存在表明样品中靶核酸的存在。

[0098] 本文描述了用于检测样品中的靶核酸的方法，所述方法包括：a)提供上述核酸传感器系统，其中，上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)与靶核酸的一部分互补，以便使靶核酸与上游杂交区域和下游杂交区域的杂交在第一核酸或结构域和第二核酸或结构域之间产生足以使生产性的连接发生的接合点，从而可操作地连结所有组分；b)在适合于靶核酸与上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)杂交、以及上游杂交区域(例如3’杂交区域)和下游杂交区域(例如5’杂交区域)连接的条件下，使核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与样品接触，从而产生反应产物；c)在适合于DNA聚合、转录和翻译的条件下，将步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统(所述无细胞表达系统包含链置换DNA聚合酶、dNTP和蛋白质生产所必需的其它构造块材料)以及ssDNA引物接触，从而产生可操作地连结的ssDNA反应产物；d)与合适的对照相比，测量步骤c)的反应产物中存在的报告蛋白，其中，明显的报告蛋白的存在说明样品中靶核酸的存在。

[0099] 如本文所使用的“合适的对照”可指可为阳性对照或阴性对照的参比样品。如本文所述，阳性对照为已知产生结果的反应。阴性对照为已知在靶序列不存在时不产生结果或

背景水平检测的反应。例如，阴性对照可包括不具有靶核酸、具有非靶核酸或缺少核酸传感器系统的一个或多个组分的反应。

[0100] 在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以约2nM至约500nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以约16nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以约2nM、约4nM、约6nM、约8nM、约10nM、约12nM、约14nM、约16nM、约18nM、约20nM、约22nM、约24nM、26nM、约28nM、约30nM、约32nM、约34nM、约36nM、约38nM、约40nM、约42nM、约44nM、46nM、约48nM或约50nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约110nM、约120nM、约130nM、约140nM、约150nM、约160nM、约170nM、约180nM、约190nM、约200nM、约210nM、约220nM、约230nM、约240nM、约250nM、约260nM、约270nM、约280nM、约290nM、约300nM、约310nM、约320nM、约330nM、约340nM、约350nM、约360nM、约370nM、约380nM、约390nM、约400nM、约410nM、约420nM、约430nM、约440nM、约450nM、约460nM、约470nM、约480nM、约490nM或约500nM存在。

[0101] 在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以2nM至500nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以16nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以2nM、4nM、6nM、8nM、10nM、12nM、14nM、16nM、18nM、20nM、22nM、24nM、26nM、28nM、30nM、32nM、34nM、36nM、38nM、40nM、42nM、44nM、46nM、48nM或50nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述核酸传感器系统组分各自以60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM、190nM、200nM、210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、270nM、280nM、290nM、300nM、310nM、320nM、330nM、340nM、350nM、360nM、370nM、380nM、390nM、400nM、410nM、420nM、430nM、440nM、450nM、460nM、470nM、480nM、490nM或500nM存在。

[0102] 在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以约10nM-1000nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以约100nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约110nM、约120nM、约130nM、约140nM、约150nM、约160nM、约170nM、约180nM、约190nM、约200nM、约210nM、约220nM、约230nM、约240nM、约250nM、约260nM、约270nM、约280nM、约290nM、约300nM、约310nM、约320nM、约330nM、约340nM、约350nM、约360nM、约370nM、约380nM、约390nM、约400nM、约410nM、约420nM、约430nM、约440nM、约450nM、约460nM、约470nM、约480nM、约490nM、约500nM、约510nM、约520nM、约530nM、约540nM、约550nM、约560nM、约570nM、约580nM、约590nM、约600nM、约610nM、约620nM、约630nM、约640nM、约650nM、约660nM、约670nM、约680nM、约690nM、约700nM、约710nM、约720nM、约730nM、约740nM、约750nM、约760nM、约770nM、约780nM、约790nM、约800nM、约810nM、约820nM、约830nM、约840nM、约850nM、约860nM、约870nM、约880nM、约890nM、约900nM、约910nM、约920nM、约930nM、约940nM、约950nM、约960nM、约970nM、约980nM、约990nM或约1000nM存在。

[0103] 在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以10nM-1000nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以100nM存在。在任何方面的一些实施方式中，所述连接酶以10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM、190nM、200nM、210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、

270nM、280nM、290nM、300nM、310nM、320nM、330nM、340nM、350nM、360nM、370nM、380nM、390nM、400nM、410nM、420nM、430nM、440nM、450nM、460nM、470nM、480nM、490nM、500nM、510nM、520nM、530nM、540nM、550nM、560nM、570nM、580nM、590nM、600nM、610nM、620nM、630nM、640nM、650nM、660nM、670nM、680nM、690nM、700nM、710nM、720nM、730nM、740nM、750nM、760nM、770nM、780nM、790nM、800nM、810nM、820nM、830nM、840nM、850nM、860nM、870nM、880nM、890nM、900nM、910nM、920nM、930nM、940nM、950nM、960nM、970nM、980nM、990nM或1000nM存在。

[0104] 在任何方面的一些实施方式中，包括在连接酶存在的情况下使核酸传感器系统与样品接触的步骤b)可以包括孵育或维持1分钟至60分钟的时段。在任何方面的一些实施方式中，使步骤b)的连接反应孵育或维持约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约16分钟、约17分钟、约18分钟、约19分钟、约20分钟、约21分钟、约22分钟、约23分钟、约24分钟、约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟、约30分钟、约31分钟、约32分钟、约33分钟、约34分钟、约35分钟、约36分钟、约37分钟、约38分钟、约39分钟、约40分钟、约41分钟、约42分钟、约43分钟、约44分钟、约45分钟、约46分钟、约47分钟、约48分钟、约49分钟、约50分钟、约51分钟、约52分钟、约53分钟、约54分钟、约55分钟、约56分钟、约57分钟、约58分钟、约59分钟、或约60分钟。任选地，步骤b)的反应可在约环境温度(例如24℃-26℃)下孵育。

[0105] 在任何方面的一些实施方式中，包括在连接酶存在的情况下使核酸传感器系统与样品接触的步骤b)可包括孵育或维持1分钟至60分钟的时段。在任何方面的一些实施方式中，使步骤b)的连接反应孵育或维持1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟、31分钟、32分钟、33分钟、34分钟、35分钟、36分钟、37分钟、38分钟、39分钟、40分钟、41分钟、42分钟、43分钟、44分钟、45分钟、46分钟、47分钟、48分钟、49分钟、50分钟、51分钟、52分钟、53分钟、54分钟、55分钟、56分钟、57分钟、58分钟、59分钟、或60分钟。任选地，步骤b)的反应可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育。

[0106] 在任何方面的一些实施方式中，包括使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触的步骤c)可包括孵育或维持15分钟至12小时的时间段。在任何方面的一些实施方式中，使步骤c)的反应孵育约15分钟、约30分钟、约45分钟、约60分钟。在一些实施方式中，使步骤c)的反应孵育约1.0小时、约1.5小时、约2.0小时、约2.5小时、约3.0小时、约3.5小时、约4.0小时、约4.5小时、约5.0小时、约5.5小时、约6.0小时、约6.5小时、约7.0小时、约7.5小时、约8.0小时、约8.5小时、约9.0小时、约9.5小时、约10.0小时、约10.5小时、约11.0小时、约11.5小时、或约12.0小时。任选地，步骤c)的反应可在约环境温度(例如24℃-26℃)下孵育。例如，步骤b)可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育5分钟至15分钟的时段，和/或步骤c)可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育60分钟至3小时的时间段。

[0107] 在任何方面的一些实施方式中，包括使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触的步骤c)可包括孵育或维持15分钟至12小时的时间段。在任何方面的一些实施方式中，使步骤c)的反应孵育15分钟、30分钟、45分钟、60分钟。在一些实施方式中，使步骤c)的

反应孵育1.0小时、1.5小时、2.0小时、2.5小时、3.0小时、3.5小时、4.0小时、4.5小时、5.0小时、5.5小时、6.0小时、6.5小时、7.0小时、7.5小时、8.0小时、8.5小时、9.0小时、9.5小时、10.0小时、10.5小时、11.0小时、11.5小时、或12.0小时。任选地，步骤c)的反应可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育。例如，步骤b)可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育5分钟至15分钟的时段，和/或步骤c)可在环境温度(例如24℃-26℃)下孵育60分钟至3小时的时间段。

[0108] 本领域技术人员将理解的是，在一些实施方式中，特定的步骤可以连续进行；在一些实施方式中，特定步骤可以平行或同时进行(例如，在“一锅法(one-pot)”反应中)。例如，在一些实施方式中，步骤b)和步骤c)可以连续进行；在一些实施方式中，这些步骤可以平行或同时进行(例如，在此种“一锅法”反应中)。在任何方面的一些实施方式中，无细胞表达系统进一步包含RNAse抑制剂。RNase抑制剂可抑制RNase A、RNase H、RNase III、RNase L、RNase P、RNase PhyM、RNase T1、Rnase T2、Rnase U2或Rnase V中的至少一种。在任何方面的一些实施方式中，无细胞表达系统进一步包含与第二核酸或结构域的3’末端互补的0.5nM至5μM的ssDNA引物。在任何方面的一些实施方式中，无细胞表达系统进一步包含与第二核酸或结构域的3’末端互补的约1.25μM的ssDNA引物。在任何方面的一些实施方式中，无细胞表达系统包含与第二核酸或结构域的3’末端互补的约0.5nM、约1nM、约5nM、约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约110nM、约125nM、约250nM、约375nM、约500nM、约625nM、约750nM、约875nM、约1.000μM、约1.125μM、约1.250μM、约1.375μM、约1.500μM、约1.625μM、约1.750μM、约1.875μM、约2.000μM、约2.125μM、约2.250μM、约2.375μM、约2.500μM、约2.625μM、约2.750μM、约2.875μM、约3.000μM、约3.125μM、约3.250μM、约3.375μM、约3.500μM、约3.625μM、约3.750μM、约3.875μM、约4.000μM、约4.125μM、约4.250μM、约4.375μM、约4.500μM、约4.625μM、约4.750μM、约4.875μM、或约5.000μM的ssDNA引物。

[0109] 本领域技术人员将理解的是，多种配置的无细胞表达系统可以是有用的。例如，在一些实施方式中，无细胞表达系统可包含与间插ssDNA序列或非模板表达盒内的序列互补的约1.25μM的ssDNA引物。在任何方面的一些实施方式中，无细胞表达系统包含与间插ssDNA序列或非模板表达盒内的序列互补的约0.5nM、约1nM、约5nM、约10nM、约20nM、约30nM、约40nM、约50nM、约60nM、约70nM、约80nM、约90nM、约100nM、约110nM、约125nM、约250nM、约375nM、约500nM、约625nM、约750nM、约875nM、约1.000μM、约1.125μM、约1.250μM、约1.375μM、约1.500μM、约1.625μM、约1.750μM、约1.875μM、约2.000μM、约2.125μM、约2.250μM、约2.375μM、约2.500μM、约2.625μM、约2.750μM、约2.875μM、约3.000μM、约3.125μM、约3.250μM、约3.375μM、约3.500μM、约3.625μM、约3.750μM、约3.875μM、约4.000μM、约4.125μM、约4.250μM、约4.375μM、约4.500μM、约4.625μM、约4.750μM、约4.875μM、或约5.000μM的ssDNA引物(例如图2B(i))。

[0110] 在任何方面的一些实施方式中，dNTP的浓度为约200μM-500μM。在任何方面的一些实施方式中，dNTP的浓度为约230μM。在任何方面的一些实施方式中，dNTP的浓度为约200μM、约210μM、约220μM、约230μM、约240μM、约250μM、约260μM、约270μM、约280μM、约290μM、约300μM、约310μM、约320μM、约330μM、约340μM、约350μM、约360μM、约370μM、约380μM、约390μM、约400μM、约410μM、约420μM、约430μM、约440μM、约450μM、约460μM、约470μM、约480μM、约490μM、或约500μM。

[0111] 在任何方面的一些实施方式中,dNTP的浓度为200μM-500μM。在任何方面的一些实施方式中,dNTP的浓度为230μM。在任何方面的一些实施方式中,dNTP的浓度为200μM、210μM、220μM、230μM、240μM、250μM、260μM、270μM、280μM、290μM、300μM、310μM、320μM、330μM、340μM、350μM、360μM、370μM、380μM、390μM、400μM、410μM、420μM、430μM、440μM、450μM、460μM、470μM、480μM、490μM、或500μM。

[0112] 在任何方面的一些实施方式中,DNA聚合酶选自于由如下所组成的组:具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、以及来自枯草芽孢杆菌的聚合酶。在各种实施方式中,各种上述所述组分处于适于进行上述方法的合并的混合物中。在任何方面的一些实施方式中,报告蛋白为荧光素酶,报告蛋白的底物为荧光素酶底物,并且通过检测无细胞表达系统中的发光来进行测量。

[0113] 在任何方面的一些实施方式中,所述方法进一步包括ssDNA引物与RNA转录物的杂交,使用逆转录酶的逆转录和内切裂解。例如,通过靶核酸介导的连接和引物延伸形成的表达盒的扩增可进一步改善检测系统的灵敏度。可在dsDNA产物转录为RNA后进行DNA引物(例如退火至表达盒3'末端的相同引物或不同的DNA引物)与RNA转录物的互补3'末端的杂交。逆转录酶可使DNA引物延伸以产生RNA/DNA杂合分子。RNaseH核酸内切酶活性可水解裂解DNA/RNA杂合体的RNA,以产生与上游或A传感器部分或A结构域或另一DNA引物互补的ssDNA分子(参见例如图2A)。本文所使用的"传感器部分"与第一传感器部分、第一核酸、A结构域、第一序列或第一结构域可互换使用,并且是指包含3'杂交区域的核酸杂交序列的部分。本文所使用的"B传感器部分"与第二传感器部分、第二核酸、B结构域、B序列或第二结构域可互换使用,并且是指包含5'杂交区域的核酸杂交序列的部分。A传感器部分与ssDNA分子的杂交能够经由DNA聚合酶进行延伸,从而产生完整的表达盒。表达盒转录为RNA使得能够进行随后几轮的表达盒扩增。在任何方面的一些实施方式中,所述系统可包括含有逆转录酶活性的酶和催化RNA/DNA杂合分子中RNA的水解裂解的非特异性核酸内切酶。在任何方面的一些实施方式中,逆转录酶可为HIV-1、RTx、Luna®(New England Biolabs)、具有降低的RNAse H活性或RNAse H活性完全去除(RNase H-)的重组莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney Murine Leukemia Virus)逆转录酶。在任何方面的一些实施方式中,核酸内切酶可为RNaseH。在任何方面的一些实施方式中,所述活性可以由单一酶催化,例如禽成髓细胞瘤病毒(Avian Myeloblastosis Virus,AMV)逆转录酶、莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶或它们的变体。

[0114] 本文所使用的"DNA表达盒"是指包含第一核酸和第二核酸或A结构域和B结构域的单链DNA(ssDNA),当将它们连接在一起时编码多肽。

[0115] 本文所使用的"靶标"或"靶核酸"或"靶序列"或"靶核酸序列"是指能够与第一核酸或A结构域的3'杂交区域、以及第二核酸或B结构域的5'杂交区域两者杂交的RNA或ssDNA。

[0116] 本文还描述了用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:a)提供上述所述的核酸传感器系统,其中,上游杂交区域和下游杂交区域与所述靶核酸的一部分互补,以使所述靶核酸与上游杂交区域和下游杂交区域的杂交在第一结构域和第二结构域之间产生足以使生产性的连接发生的接合点;b)在适合于所述靶核酸与上游杂交区域和下游杂交区

域杂交以及上游杂交区域和下游杂交区域的连接的条件下，使核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与样品接触，从而产生可操作地连结的ssDNA反应产物；c)在适合于DNA聚合、转录和翻译的条件下，使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统(所述无细胞表达系统包含置换链DNA聚合酶、dNTP和蛋白质生产所必需的其它构造块组分)以及ssDNA引物接触，从而产生报告蛋白；d)观测步骤c)的报告蛋白产物的活性，以说明样品中靶核酸的存在。

[0117] 在任何方面的一些实施方式中，本文所述的传感器系统及使用其的方法可用于检测与样品中的另一核酸相差一个碱基的靶核酸，从而能够区分单核苷酸多态型(SNP)。在任何方面的一些实施方式中，SNP在杂交区域内的位置位于上游ssDNA结构域或下游ssDNA结构域上的连接接合点的两个碱基中的一个上。在任何方面的一些实施方式中，可在杂交区域内额外地引入一个或多个错配的碱基。归因于SNP的存在的杂交区域的不稳定性会阻碍连接酶成功地连接上游和下游结构域的能力，从而导致差异信号输出。在各种实施方式中，接合点被配置为针对靶核酸的多态型进行杂交。作为实例，测试了四种不同的示例性变体(多态型)(参见例如实施例15)。

[0118] 在多种实施方式中，ssDNA A结构域在5'至3'方向上将包含(i)启动子，(ii)核糖体结合位点(RBS)，(iii)报告蛋白编码序列的起始密码子，以及(iv)与靶核酸的区域互补的杂交区域。ssDNA B结构域在5'至3'方向上将包含(i)与靶核酸的区域互补的杂交区域，以及(ii)报告蛋白的其余编码序列。第三核酸组分将为与B结构域的3'末端杂交的ssDNA‘引物’(参见例如图2A)。替代的传感器组分方案包括：(i)A结构域和B结构域，其中，A结构域的5'末端通过间插的ssDNA序列与B结构域的3'末端连结，(ii)引入ssDNA引物作为B结构域的末端发夹，或(iii)在A结构域的5'末端和B结构域的3'末端均包含发夹(参见例如图2B)。这些替代方案可通过减少组分的数量和/或减少对DNA核酸外切酶敏感的暴露的ssDNA末端的数量来提供优势。

[0119] 将传感器系统分子与含有靶核酸的样品以及含有对于转录和翻译而言必需的组分和构造块材料的无细胞表达系统一起孵育。要求保护的传感器可用于体外检测任何RNA或ssDNA(例如，ssDNA病毒或通过基因组dsDNA变性产生的ssDNA)、单核苷酸变体或SNP。这使得能够检测多种微生物和核酸，以指示感染或与人健康、动物健康和植物健康相关的其它因素。

[0120] RNA靶标包括信使RNA、微小RNA、病毒基因组RNA和核糖体RNA。用于细菌检测的特别有用的靶标是核糖体RNA(例如16S或23SrRNA)，这是因为它可以在每个个体细菌细胞中以许多拷贝存在，并且可以用于区分细菌属/种。感染性细菌目标有机体包括但不限于如下种类：链球菌(Streptococcus)、葡萄球菌(Staphylococcus)、芽孢杆菌(Bacillus)、弯曲杆菌(Campylobacter)、衣原体(Chlamydia)、梭菌(Clostridium)、肠球菌(Enterococcus)、埃希氏杆菌(Escherichia)、螺杆菌(Helicobacter)、李斯特菌(Listeria)、分枝杆菌(Mycobacterium)、沙门氏菌(Salmonella)、弧菌(Vibrio)、耶尔森氏鼠疫杆菌(Yersinia)。用于诊断病原细菌的多种16S核糖体RNA靶区域的描述进一步描述于例如J.Microbiol Methods 2007May 69(2):330-339中，以引用的方式将其整体并入本文。例如，可通过设计用于病毒RNA基因组区域的传感器来检测RNA病毒。示例性RNA病毒包括但不限于，人免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、寨卡病毒、埃博拉病毒、轮状病毒、脊髓灰质炎病毒、登革热病毒、黄热病病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒和狂犬病病毒。

[0121] 本文引用的所有参考文献都以引用的方式整体并入进行充分阐述。除非另有定义,本文使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第3版,修订,J.Wiley&Sons(New York,NY 2006);以及Sambrook和Russel,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor,NY 2012)为本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的通用指导。

[0122] 本文所使用的术语“核酸”或“核酸序列”是指包含核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的任何分子,优选聚合分子。所述核酸可为单链的或双链的。单链核酸可为变性双链DNA的一条链的核酸。或者,单链核酸可为不来源于任何双链DNA的单链核酸。在一方面,靶核酸为DNA。在另一方面,靶标为RNA。合适的核酸分子为DNA,包括基因组DNA或cDNA。其它合适的核酸分子为RNA,包括mRNA和核糖体RNA。

[0123] 本文所使用的术语“DNA”被定义为脱氧核糖核酸。本文所使用的术语“多核苷酸”可与“核酸”互换使用,以表示核苷的聚合物。通常,多核苷酸由通过磷酸二酯键链接的DNA或RNA中天然存在的核苷(例如腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)组成。然而,该术语涵盖包含核苷或核苷类似物(含有化学或生物修饰的碱基、修饰的骨架等)(无论是否存在于天然存在的核酸中)的分子,并且对于某些应用而言,此类分子可能是优选的。本文所使用的“多核苷酸序列”可以指多核苷酸材料本身和/或指以生物化学方式表征特定核酸的序列信息(即,连续的用作碱基缩写的字母)。除非另有说明,本文呈现的多核苷酸序列以5’至3’方向呈现。

[0124] 本文所使用的术语“单链DNA(ssDNA)”是指仅由一条核苷酸链组成的DNA,与形成DNA螺旋的两条DNA链相反。当本申请提及多核苷酸时,应理解的是,提供DNA、RNA二者,并且在每种情况下都提供了单链和双链形式(以及各单链分子的互补物)。

[0125] 本文所使用的“启动子”是指在其天然状态(即如在有机体的基因组中天然存在的)位于开放阅读框(或蛋白质编码区域)的翻译起始密码子的上游或5’的多核苷酸分子。在一些实施方式中,术语“启动子”在本文中可用于指修饰的多核苷酸分子,特别是设计以具有期望的性质(例如,改善的转录效率)。启动子可包含转录起始位点的5’和/或3’序列。启动子参与RNA聚合酶II或其它RNA聚合酶(例如T7 RNA聚合酶)和其它蛋白质(反式转录因子)的识别和结合以启动转录。启动子通常可为约20bp至约1000bp的长度,例如约20bp的长度、约30bp的长度、约40bp的长度、约50bp的长度、约60bp的长度、约70bp的长度、约80bp的长度、约90bp的长度、约100bp的长度、约150bp的长度、约200bp的长度、约250bp的长度、约300bp的长度、约350bp的长度、约400bp的长度、约450bp的长度、约500bp的长度、约550bp的长度、约600bp的长度、约650bp的长度、约700bp的长度、约750bp的长度、约800bp的长度、约850bp的长度、约900bp的长度、约950bp的长度、或约1000bp的长度。可使用本领域已知的计算机程序(例如ElDorado;Gene2 Promoter;GEMS Launcher;PromoterInspector;Promoter2.0;McPromoter;EP3;ProSOM和TRED)来预测给定启动子的序列和/或位置。

[0126] 本文所使用的术语“互补”涉及核苷酸碱基G、A、T、C和U之间的氢键碱基配对形成偏好的等级制度(hierarchy),以使得当两种给定的多核苷酸或多核苷酸序列彼此退火时,在DNA中A与T配对、G与C配对,在RNA中G与C配对、A与U配对。本文所使用的术语“基本上互

补”是指核酸分子或其部分(例如,引物)在所述分子或其部分的全长内与第二核苷酸序列具有至少90%的互补性,例如,90%互补性、95%互补性、98%互补性、99%互补性或100%互补性。本文所使用的“基本上相同”是指核酸分子或其部分在所述分子或其部分的全长内与第二核苷酸序列具有至少90%的同一性,例如,90%的同一性、95%的同一性、98%的同一性、99%的同一性或100%的同一性。

[0127] 本文所使用的“杂交”涉及优选地以如下程度参与物理碱基配对的两条核酸链:使链保持碱基配对以达到模板依赖性聚合酶可以在双链体上进行聚合的程度。使用靶核酸序列的序列信息,本领域普通技术人员可以设计用于本文所述的传感器的杂交区域或序列,所述杂交区域或序列与单个靶标互补(例如,完全互补),而不与样品中可能存在的其它核酸序列互补。可常规地将杂交条件优化至使背景信号最小化。

[0128] 本文所使用的术语“可操作地连结(operably linked)”是指第一多核苷酸分子(例如启动子或起始密码子)与第二可转录多核苷酸分子(例如报告蛋白的编码基因)联接,其中,所述多核苷酸分子被排列为使所述第一多核苷酸分子影响所述第二多核苷酸分子的功能。该两个多核苷酸分子可为或可不为单个连续多核苷酸分子的部分,并且可以邻近或可以不邻近。例如,如果启动子调控或介导细胞中感兴趣的基因的转录,则该启动子与所述感兴趣的基因可操作地连结。

[0129] 本文所使用的术语“核糖体结合位点(RBS)”是指位于mRNA转录物的起始密码子上游(例如,朝向5’末端)的核苷酸序列,其功能是在启动蛋白质翻译期间募集核糖体。真核生物中的核糖体募集通常由真核生物mRNA上存在的5’帽介导。

[0130] 本文所使用的术语“末端发夹环”是指当同一链的两个区域(当以相反的方向阅读时,通常在核苷酸序列方面是互补的)碱基配对形成以未配对的环结尾的双螺旋时所形成的结构。

[0131] 本文所使用的核酸分子的“部分(portion)”是指由该分子包含的连续核苷酸集(contiguous set of nucleotides)。部分可以包含由该分子包含的核苷酸的全部或仅子集。部分可为双链的或单链的。

[0132] 本文所使用的术语“包含/包括/含有(comprising或comprises)”用于指对方法或组合物必要的组合物、方法以及它们各自的组成部分,并且无论是否必要都仍然对未指明的要素保持开放。

[0133] 术语“由…组成”涉及本文所述的组合物、方法以及其各自的组成部分,排除在实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0134] 除非上下文另外明确指出,单数术语“一/一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”包括复数的指示对象。类似地,除非上下文另外明确指出,词语“或”旨在包括“和/以及”。尽管与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于本公开的实践或测试中,以下描述了合适的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”来源于拉丁文“例如(exempli gratia)”,并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0135] 细胞生物学和分子生物学中常用术语的定义可见于:“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”,第19版,Merck Research Laboratories出版,2006(ISBN 0-911910-19-0);Robert S.Porter等(编著),The Encyclopedia of Molecular Biology,

Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9)。分子生物学中常用术语的定义也可见于:Genes X,Jones&Bartlett Publishing出版,2009(ISBN-10:0763766321);Kendrew等(编著),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);以及Current Protocols in Protein Sciences 2009,Wiley Intersciences,Coligan等编著。

[0136] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的方法涉及测量、检测或确定至少一种标志物的水平。本文所使用的术语"检测"或"测量"涉及观测来自例如探针、标记或靶分子的信号,以说明样品中分析物的存在。可使用用于直接检测生物分子和/或检测特定标记部分的任何本领域已知的方法进行检测。示例性的检测方法包括但不限于光谱法、荧光法、光化学法、生物化学法、免疫化学法、电学法、光学法或化学法。在任何方面的一些实施方式中,测量可以是定量观测。

[0137] 在任何方面的一些实施方式中,可对本文所述的多肽、核酸或细胞进行工程化。本文所使用的"工程化的"是指通过人手工操纵的方面。例如,当多肽的至少一个方面(例如其序列)通过人手工操纵而不同于其在自然中存在的方面时,则认为该多肽为"工程化的"。本领域技术人员理解且通常实践的是,即使在现有实体(prior entity)上实施实际的操纵,工程化的细胞的子代通常仍称为"工程化的"。

[0138] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的核酸传感器系统的组分是外源的。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的核酸传感器系统的组分是异位的。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的核酸传感器系统的组分不是内源的。

[0139] 术语"外源的(exogenous)"是指存在于细胞中的非其天然来源的物质。当在本文中使用时,术语"外源的"可指通过涉及人手工的过程引入生物系统(如细胞、无细胞系统或有机体)的核酸(例如编码多肽的核酸)或多肽,所述核酸或多肽在所述生物系统中通常并不存在,并且人们希望将所述核酸或多肽引入此类细胞或有机体中。或者,"外源的"可指通过涉及人手工的过程引入生物系统(如细胞、无细胞系统或有机体)的核酸或多肽,所述核酸或多肽在所述生物系统中以相对低的量存在,并且人们希望增加细胞、无细胞系统或有机体中该核酸或多肽的量,从而例如产生异位表达或水平。相反,术语"内源的(endogenous)"是指生物系统、无细胞系统或细胞本身的物质。本文所使用的"异位的(ectopic)"是指在非寻常的位置中和/或以非寻常的量存在的物质。异位物质可为通常在给定细胞或无细胞系统中存在但是量低得多和/或在不同时间存在的物质。异位的还包括在给定细胞的自然环境中无法天然存在或表达的物质(例如多肽或核酸)。

[0140] 在任何方面的一些实施方式中,编码如本文所述的多肽(例如多肽)的核酸被包含在载体中。在本文所述的一些方面,将编码本文所述的给定多肽的核酸序列或其任何模块可操作地连结至载体。本文所使用的术语"载体"是指设计用于向宿主细胞递送或在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。本文所使用的载体可以是病毒载体或非病毒载体。术语"载体"涵盖当与适当的控制元件结合时能够复制以及能够将基因序列转移至细胞的任何基因元件。载体可包括但不限于克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒粒子等。

[0141] 在任何方面的一些实施方式中,载体是重组的,例如,载体包含源自至少两种不同来源的序列。在任何方面的一些实施方式中,载体包含源自至少两种不同物种的序列。在任

何方面的一些实施方式中，载体包含源自至少两种不同基因的序列，例如，载体包含与至少一个非天然(例如异源的)遗传控制元件(例如启动子、抑制子、活化因子、增强子、响应元件等)可操作地连结的编码表达产物的核酸或融合蛋白。

[0142] 在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体或核酸进行密码子优化，例如，已对核酸序列的天然或野生型序列进行改变或工程化以包含替代的密码子，使得经改变或工程化的核酸氨基酸编码与天然/野生型序列相同的多肽表达产物，但将以改善的效率在期望的表达系统中进行转录和/或翻译。在任何方面的一些实施方式中，表达系统是除天然/野生型序列的来源以外的有机体(或从此类有机体获得的细胞)。在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体和/或核酸序列进行密码子优化，以用于在哺乳动物或哺乳动物细胞(例如小鼠、鼠细胞或人细胞)中表达。在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体和/或核酸序列进行密码子优化，以用于在人细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体和/或核酸序列进行密码子优化，以用于在酵母或酵母细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体和/或核酸序列进行密码子优化，以用于在细菌细胞中表达。在任何方面的一些实施方式中，对本文所述的载体和/或核酸序列进行密码子优化，以用于在大肠杆菌细胞中表达。

[0143] 本文所使用的术语“表达载体”是指引导RNA或多肽由载体上的连结至转录调控序列的序列表达的载体。对细胞来说，所表达的序列通常是但不必须是异源的。表达载体可包含额外的元件，例如表达载体可具有两个复制系统，从而允许其能够在两种有机体中维持，例如在人细胞中用于表达，在原核宿主中用于克隆和扩增。

[0144] 本文所使用的术语“病毒载体”是指包含至少一个病毒源性元件并具有被包装进入病毒载体颗粒中的能力的核酸载体构建体。病毒载体可包含有对如本文所述的多肽进行编码的核酸，以代替非必需病毒基因。载体和/或颗粒可用于在体外或体内将核酸转移到细胞中的目的。许多形式的病毒载体是本领域已知的。

[0145] 应当理解的是，在任何方面的一些实施方式中，本文所述的载体可以与其它合适的组合物和疗法组合。在任何方面的一些实施方式中，载体是游离型的。合适的游离型载体的使用提供了在受试者中以高拷贝数的额外染色体DNA维持感兴趣的核苷酸的手段，从而消除了染色体整合的潜在影响。

[0146] 本文所使用的“接触(contacting)”是指用于将药剂递送或暴露至另一药剂、试剂、序列、细胞或无细胞表达系统的任何合适的方式。示例性的递送方法包括但不限于直接递送至细胞培养基、灌注、注射或本领域技术人员熟知的其它递送方法。在任何方面的一些实施方式中，接触包括人体活动，例如注射；分配、混合和/或倾倒的行为；和/或递送设备或机器的操作。

[0147] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计学显著性，并且通常指两个标准差(2SD)或更大的差异。

[0148] 除了在操作实施例中或另外指出，本文使用的表示成分的量或反应条件的所有数字均应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分比联合使用时，术语“约”可指±1％。

[0149] 本文所使用的术语“对应于/与…相对应(corresponding to)”是指第一多肽或核酸中列举的位置处的氨基酸或核苷酸，或等同于第二多肽或核酸中列举的氨基酸或核苷酸

的氨基酸或核苷酸。可使用本领域已知的同源性程度程序(例如BLAST)通过比对候选序列来确定等同的列举氨基酸或核苷酸。

[0150] 本文所使用的术语“特异性结合”是指两个分子、化合物、细胞和/或颗粒之间的化学相互作用,其中,与第一实体结合至非靶标的第三实体相比,第一实体以更高的特异性和亲和力与第二靶实体结合。在任何方面的一些实施方式中,特异性结合可以指与第一实体对第三非靶标实体的亲和力相比,第一实体对第二靶标实体的亲和力为至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或者更高。对给定靶标具有特异性的试剂是在使用的测定条件下对该靶标展现出特异性结合的试剂。

[0151] 本文公开的本发明的可替代要素或实施方式的分组不应被解释为限制性的。各组成员可被单独提及或要求保护,或可与本文出现的该组的其它成员或其它要素组合而被提及或要求保护。出于方便和/或专利性的原因,组的一个成员或多个成员可被包括在组中或从组中删除。当发生任何此类包括或删除时,认为申请文件在本文中包含经修饰的组,从而实现所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0152] 除非本文另有定义,否则与本申请联合使用的科学术语和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。应当理解的是,本发明不限于本文所述的具体的方法学、方案和试剂等,并且因此可以进行改变。本文所使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并且不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求书所定义。免疫学和分子生物学中常见的术语的定义可见于:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第20版,Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2018(ISBN 0911910190,978-0911910421);Robert S.Porter等(编著),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);Robert A.Meyers(编著),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,Elsevier出版,2006;Janeway’s Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编著),W.W.Norton&Company,2016(ISBN 0815345054,978-0815345053);Lewin’s Genes XI,Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编著),Elsevier,2013(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB),Frederick M.Ausubel(编著),John Wiley and Sons,2014(ISBN047150338X,9780471503385),Current Protocols in Protein Science(CPPS),John E.Coligan(编著),John Wiley and Sons,Inc.,2005;以及Current Protocols in Immunology(CPI)(John E.Coligan,ADA MKruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe(编著),John Wiley and Sons,Inc.,2003(ISBN 0471142735,9780471142737),以引用的方式将它们的内容整体全部并入本文。

[0153] 除非另有说明,否则本发明采用在以下文献中描述的标准程序来实施,例如:

Sambrook和Russel,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor,NY2012)和Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(1995),以引用的方式将其整体全部并入本文。

[0154] 本文在对本发明各个方面的描述中对其它术语进行了定义。

[0155] 本领域技术人员将认识到与本文所述的方法或材料类似或等同的许多方法和材料,这些方法和材料可用于本发明的实践中。实际上,本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0156] 出于描述和公开的目的,将本申请全文中引用的所有专利和其它出版物(包括文字出版物、发行的专利、公开的专利申请和同时待审的专利申请)以引用的方式明确地并入本文,例如,在此类出版物中描述的可与本文描述的技术关联使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面,不应当视作承认了本发明人没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将此类公开内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或关于这些文件的内容的表述是基于申请人可获得的信息,并不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0157] 对本公开的实施方式的描述并非旨在进行穷举或将本公开限制为所公开的明确的形式。尽管本文中出于说明性目的描述了本公开的具体实施方式和实施例,然而正如相关领域的技术人员将了解的,可在本公开的范围内进行各种等同修改。例如,尽管以给定顺序给出了方法步骤或功能,可替代实施方式能够以不同的顺序执行功能、或可以实质上同时执行功能。本文所提供的本公开的教导可以施用至其它合适的程序或方法。本文所述的各种实施方式可以组合以提供进一步的实施方式。如果需要的话,可对本公开的方面进行修改,以采用上述参考文献和应用的组合物、功能和构思,从而提供本公开更进一步的实施方式。此外,由于生物功能等价性考虑,可以对蛋白结构进行一些改变,而不在种类或数量上影响生物或化学作用。根据详细的描述,可以对本公开作出这些改变和其它改变。所有这些修改都旨在包含于所附权利要求的范围之内。

[0158] 可将任何上述实施方式中的特定要素与其它实施方式中的要素组合或置换为其它实施方式中的要素。此外,尽管在这些实施方式的上下文中已经描述了与本公开的某些实施方式相关的优点,然而其它实施方式也可以表现出此类优点,并且,并非所有的实施方式都必须表现出这样的优点才能落入本公开的范围之内。

[0159] 本文描述的各种方法和技术提供了多种方式来实施本发明。当然,应当理解的是,根据本文描述的任何具体实施方式并不非一定要能够实现所描述的所有目的或优点。因此,例如,本领域技术人员将认识到,可以以实现或优化本文所教导的一个优点或一组优点的方式完成所述方法,而不是必须实现本文所教导或暗示的其它目的或优点。本文提及了多种有利和不利的可替代方案。应当理解的是,一些优选实施方式具体包括一个有利特征、另一有利特征或数个有利特征,而另一些具体排除一个不利特征、另一不利特征或数个不利特征,还有一些通过包括一个有利特征、另一有利特征或数个有利特征来具体地缓解现有的不利特征。

[0160] 此外,本领域技术人员将认识到来自不同实施方式的各种特征的适用性。同样地,本领域普通技术人员可以将本文讨论的各种要素、特征和步骤以及对每个此类要素、特征

或步骤而言其它已知的等同物混合和匹配来完成根据本文描述的原理的方法。在各种要素、特征和步骤中，在不同的实施方式中，一些要素、特征和步骤将是特别包括的，而另一些要素、特征和步骤将是特别排除的。

[0161] 尽管已经在某些实施方式和实施例的上下文中公开了本发明，但本领域技术人员将理解的是，本发明的实施方式超出具体公开的实施方式并延伸至其它可替代实施方式和/或其用途和修改以及等同物。

[0162] 在本发明的实施方式中已经公开了许多变型和可替代要素。更进一步的变型和可替代要素对本领域技术人员而言将是显而易见的。在这些变型中，不受限地为核酸传感器系统组分，包括单链核酸结构域、核糖体结合位点、密码子(可操作地连结的和/或功能上组织的)，还包括其中使用的技术和组成以及溶液的用途、以及通过本发明的教导所产生的产品的具体用途。本发明的各种实施方式可具体包括或排除这些变型或要素中的任何一个。

[0163] 在任何方面的一些实施方式中，用于描述和要求保护本发明某些实施方式的表示成分的量、性质(如浓度)、反应条件等的数字应理解为在一些情况下由术语“约”修饰。因此，在任何方面的一些实施方式中，在书面说明和所附权利要求书中列出的数值参数是近似值，其可根据具体实施方式寻求获得的期望性质而变化。在任何方面的一些实施方式中，数值参数应当根据报告的有效位数的数字并通过应用普通的舍入技术来解释。尽管阐述本发明的一些实施方式的宽范围的数值范围和参数是近似值，但在具体实施例中列出的数值尽可能精确地进行报告。在本发明的一些实施方式中呈现的数值可能含有一定误差，这些误差是由它们各自的测试测量值中发现的标准偏差所必然引起的。

[0164] 在任何方面的一些实施方式中，在描述本发明的具体实施方式的上下文(尤其是在所附权利要求书的某项的上下文)中使用的术语“一/一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”以及类似的指代可被解释成包括单数和复数。本文中对数值范围的描述仅仅旨在用作分别提及落入该范围内的各单独值的速记(shorthand)方法。除非本文另有说明，将各单独值并入本说明书，就如同在本文中对其各自进行了描述。除非本文另有说明或与上下文明显相矛盾，本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。关于本文某些实施方式提供的任何和所有实例或示例性语言(例如，“例如/诸如/如(such as)”)的使用仅仅旨在更好地对本申请进行阐释，而不是对另外请求保护的本发明的范围作出限制。本说明书中的任何语言都不应被解释为是表示对本发明的实践必要的任何未请求保护的要素。

[0165] 本文公开的本发明的可替代要素或实施方式的分组不应被解释为限制性的。各组成员可被单独提及或要求保护，或可与本文出现的该组的其它成员或其它要素组合而被提及或要求保护。出于方便和/或专利性的原因，组中的一个成员或多个成员可被包括在组中或从组中删除。当发生任何此类包括或删除时，申请文件在本文中被认为包含经修饰的组，从而实现所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0166] 本文描述了本发明的优选实施方式，包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读前面的描述之后，那些优选实施方式的变型对本领域普通技术人员而言将是显而易见的。在考虑之列的是，技术人员可适当地采用这些变型，并且本发明能够以与本文具体描述的方式不同的方式实施。因此，本发明的许多实施方式包括可适用法律所允许的所附权利要求书中记载的主题的所有修改和等同物。此外，除非本文另有说明或上下文明显相矛盾，处于其任何可能变型的本文所述要素的任何组合均包括在本发明中。

[0167] 此外，在整个说明书中已经对专利和印刷出版物进行了大量的参考。所引用的参考文献和印刷出版物中的每一者均通过引用的方式将它们单独地整体并入本文。

[0168] 应理解的是，本文公开的本发明的实施方式是对本发明的原理的说明。可采用的其它修改可在本发明的范围内。因此，作为示例而非限制，可根据本文的教导利用本发明的可替代配置。因此，本发明的实施方式并不限制为精确示出示和描述的实施方式。

[0169] 本文所描述的技术通过以下实施例进行进一步说明，这些实施例绝不应被解释为进行了进一步的限制。

[0170] 本文所述的技术的一些实施方式可根据下列编号段落中的任何段落进行定义：

[0171] 1.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0172] a)第一核酸和第二核酸，所述第一核酸含有3’杂交区域，所述第二核酸含有5’杂交区域，

[0173] b)其中，当通过靶核酸(所述靶核酸与所述3’杂交区域和所述5’杂交区域杂交)将所述第一核酸和第二核酸进行桥接时，所述第一核酸和第二核酸被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0174] 2.如段落1所述的核酸传感器系统，其中，所述系统包含与所述第二核酸的3’区域互补的引物。

[0175] 3.如段落1所述的核酸传感器系统，其中，所述第一核酸和所述第二核酸为DNA。

[0176] 4.如段落1所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0177] 5.如段落1所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0178] 6.如段落1-5中任一段所述的核酸系统，所述系统包含无细胞表达系统。

[0179] 7.如段落1-6中任一段所述的核酸系统，所述系统包含连接酶。

[0180] 8.如段落1-7中任一段所述的核酸系统，所述系统包含逆转录酶。

[0181] 9.如段落1-8中任一段所述的核酸系统，所述系统包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。

[0182] 10.如段落9中任一段所述的核酸系统，其中，所述核糖核酸酶是RNAse H。

[0183] 11.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0184] a)非功能性、单链的、非模板形式的DNA表达盒，所述DNA表达盒含有：

[0185] i)启动子；

[0186] ii)RBS；

[0187] iii)报告蛋白的编码序列；

[0188] 其中，将靶核酸杂交序列插入所述盒内，并将所述盒分开为两个分子，其中，所述分开发生在杂交区域内；

[0189] b)与所述表达盒的3’区域互补的单链DNA引物；

[0190] c)连接酶；以及

[0191] d)无细胞表达系统。

[0192] 12.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0193] a)第一单链DNA(ssDNA)结构域，所述第一单链DNA结构域从5’至3’包含如下物质

的非模板链：

[0194] i)启动子；

[0195] ii)核糖体结合位点(RBS)；

[0196] iii)起始密码子;以及

[0197] iv)杂交区域的上游部分,所述杂交区域的上游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式；

[0198] b)第二ssDNA结构域,所述第二ssDNA结构域从5’至3’包含如下物质的非模板链：

[0199] i)杂交区域的下游部分,所述杂交区域的下游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;以及

[0200] ii)报告蛋白的编码序列,所述报告蛋白的编码序列连结在所述杂交区域的下游部分的下游并与所述杂交区域的下游部分一起处于框内;以及

[0201] c)与所述第二结构域的3’区域互补的ssDNA引物。

[0202] 13.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含：

[0203] a)第一单链DNA(ssDNA)结构域,所述第一单链DNA结构域从5’至3’包含如下物质的非模板链：

[0204] i)启动子;以及

[0205] ii)杂交区域的上游部分；

[0206] b)第二ssDNA结构域,所述第二ssDNA结构域从5’至3’包含如下物质的非模板链：

[0207] i)杂交区域的下游部分；

[0208] ii)核糖体结合位点(RBS);以及

[0209] iii)起始密码子,所述起始密码子与报告蛋白的编码序列以框内的形式连接；

[0210] 以及

[0211] c)与所述第二结构域的3’区域互补的ssDNA引物。

[0212] 14.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含：

[0213] a)第一单链DNA(ssDNA)结构域,所述第一单链DNA结构域从5’至3’包含如下物质的非模板链：

[0214] i)启动子；

[0215] ii)核糖体结合位点(RBS)；

[0216] iii)起始密码子,所述起始密码子与报告蛋白的编码序列的上游部分以框内的形式连接；

[0217] iv)杂交区域的上游部分,所述杂交区域的上游部分处于阅读框形式,所述杂交区域的上游部分连结在报告蛋白的编码序列的上游部分的下游并与所述报告蛋白的编码序列的上游部分一起处于框内；

[0218] b)第二ssDNA结构域,所述第二ssDNA结构域从5’至3’包含如下物质的非模板链：

[0219] i)杂交区域的下游部分,所述杂交区域的下游部分为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;以及

[0220] ii)报告蛋白的编码序列的其余部分,所述报告蛋白的编码序列的其余部分连结在杂交区域的下游部分的下游并与所述杂交区域的下游部分一起处于框内;以及

[0221] c)与第二结构域在其3’末端互补的ssDNA引物。

[0222] 15.如段落11-14中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一ssDNA结构域和第二ssDNA结构域是单独的DNA片段,并且所述第二ssDNA结构域包含5’磷酸酯。

[0223] 16.如段落15所述的核酸传感器系统,其中,所述第二ssDNA结构域在其3’末端进一步包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含在末端发夹环中的ssDNA引物。

[0224] 17.如段落16所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列。

[0225] 18.如段落12-15中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域的5’末端通过间插的ssDNA序列连结至所述第二结构域的3’末端,使得所述第一结构域和第二结构域存在于单个ssDNA序列上。

[0226] 19.如段落1-18中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述杂交区域为至少12个核苷酸。

[0227] 20.如段落19所述的核酸传感器系统,其中,所述杂交区域的上游部分和下游部分各自为至少6个核苷酸。

[0228] 21.如段落11-20中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述报告蛋白选自于由荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、补充并激活截短的报告蛋白的肽所组成的组。

[0229] 22.如段落12-21中任一段所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。

[0230] 23.如段落22所述的核酸传感器系统,其中,所述无细胞表达系统为全细胞提取物。

[0231] 24.如段落22或23所述的核酸传感器系统,其中,所述置换链DNA聚合酶选自于由具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶和修饰的T7 DNA聚合酶所组成的组。

[0232] 25.一种试剂盒,所述试剂盒包含:

[0233] 段落1-24中任一段所述的核酸传感器系统;以及

[0234] 阳性对照。

[0235] 26.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0236] a)提供段落1-24中任一段所述的核酸传感器系统,其中,上游杂交区域和下游杂交区域与所述靶核酸的一部分互补,以使得所述靶核酸与所述上游杂交区域和下游杂交区域的杂交在第一结构域和第二结构域之间产生接合点;

[0237] b)在适合于所述靶核酸与所述上游杂交区域和下游杂交区域杂交、以及所述上游杂交区域和下游杂交区域的连接的条件下,使所述核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与所述样品接触,从而产生可操作地连结的ssDNA反应产物;

[0238] c)在适合于DNA聚合、转录和翻译的条件下,使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统(所述无细胞表达系统包含置换链DNA聚合酶、dNTP和蛋白质生产所必需的其它构造块组分)以及ssDNA引物接触,从而产生报告蛋白;

[0239] d)测量报告蛋白的存在,以说明所述样品中靶核酸的存在。

[0240] 27.如段落26所述的方法,其中,所述核酸传感器系统的组分各自以约16nM存在。

[0241] 28.如段落26所述的方法,其中,连接酶以约100nM存在。

[0242] 29.如段落26所述的方法,其中,步骤b)在环境温度(24℃-26℃)下孵育5分钟至15分钟的时段,和/或步骤c)在环境温度下孵育60分钟至3小时的时间段。

[0243] 30.如段落26所述的方法,其中,所述无细胞表达系统进一步包含RNAse抑制剂。

[0244] 31.如段落26所述的方法,其中,所述无细胞表达系统进一步包含与第二结构域的3'末端互补的12.5μM的ssDNA引物。

[0245] 32.如段落26所述的方法,其中,dNTP的浓度为约230μM。

[0246] 33.如段落26所述的方法,其中,所述DNA聚合酶选自于由具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶和修饰的T7 DNA聚合酶所组成的组。

[0247] 34.如段落26所述的方法,其中,所述报告蛋白为荧光素酶,并且通过在所述无细胞表达系统中检测发光来进行测量。

[0248] 35.如段落26所述的方法,其中,转录进一步包括将ssDNA引物与RNA转录物杂交的杂交,使用逆转录酶的逆转录,和内切裂解。

[0249] 36.如段落26所述的方法,其中,所述接合点被配置为针对靶核酸的多态型进行杂交。

[0250] 本文所描述的技术的一些实施方式可以根据下列编号段落中的任何段落进行定义:

[0251] 1.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含:

[0252] a)第一核酸,所述第一核酸含有3'杂交区域;以及

[0253] b)第二核酸,所述第二核酸含有5'杂交区域;

[0254] 其中,当通过靶核酸(所述靶核酸与所述3'杂交区域和所述5'杂交区域杂交)将所述第一核酸和所述第二核酸桥接时,所述第一核酸和第二核酸被配置为编码非模板盒,所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0255] 2.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含:

[0256] a)第一核酸,所述第一核酸含有3'杂交区域;以及

[0257] b)第二核酸,所述第二核酸含有5'杂交区域;

[0258] 其中,当所述第一核酸和第二核酸连接在一起时,所述第一核酸和第二核酸被配置为编码非模板盒,所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0259] 3.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含:

[0260] a)第一核酸,所述第一核酸含有3'杂交区域;以及

[0261] b)第二核酸,所述第二核酸含有5'杂交区域;

[0262] 其中,当所述第一核酸和所述第二核酸连接在一起并与靶核酸(所述靶细胞与所述3'杂交区域和所述5'杂交区域杂交)进行杂交时,所述第一核酸和第二核酸被配置为编码非模板盒,所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0263] 4.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含非功能性、单链的、非模板形式的DNA表达盒,所述DNA表达盒含有:

[0264] i)启动子;

[0265] ii)核糖体结合位点(RBS);以及

[0266] iii)报告蛋白的编码序列;

[0267] 其中,靶核酸杂交序列位于所述盒内,并将所述盒分开成第一核酸和第二核酸,其中,所述分开发生在所述杂交区域内。

[0268] 5.如段落1-4中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸或第二核酸之一包含报告蛋白的编码序列,其余核酸包含启动子。

[0269] 6.如段落1-5中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸或第二核酸之一包含报告蛋白的编码序列,其余核酸包含启动子和核糖体结合位点。

[0270] 7.如段落1-6中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸或第二核酸之一包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的起始密码子,其余核酸包含报告蛋白的其余编码序列。

[0271] 8.如段落7所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸从5'至3'包含:

[0272] i)启动子;

[0273] ii)核糖体结合位点(RBS);

[0274] iii)报告蛋白的编码序列的起始密码子;以及

[0275] iv)3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0276] 并且所述第二核酸从5'至3'包含:

[0277] i)5'杂交区域,所述5'杂交区域为与报告蛋白的其余编码序列处于框内的阅读框形式;以及

[0278] ii)报告蛋白的其余编码序列,所述报告蛋白的其余编码序列连结在所述5'杂交区域的下游并与所述5'杂交区域一起处于框内。

[0279] 9.如段落1-8中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸或第二核酸之一包含启动子,其余核酸包含核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0280] 10.如段落9所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸从5'至3'包含:

[0281] i)启动子;以及

[0282] ii)3'杂交区域;

[0283] 并且所述第二核酸从5'至3'包含:

[0284] i)5'杂交区域;

[0285] ii)核糖体结合序列;以及

[0286] iii)报告蛋白的编码序列。

[0287] 11.如段落1-10中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸或第二核酸之一包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列的5'部分,其余核酸包含报告蛋白的其余编码序列。

[0288] 12.如段落11所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸从5'至3'包含:

[0289] i)启动子;

[0290] ii)RBS;

[0291] iii)报告蛋白的编码序列的第一部分,所述报告蛋白的编码序列的第一部分包含起始密码子和至少一个另外的密码子;以及

[0292] iv)3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0293] 并且所述第二核酸从5'至3'包含:

[0294] i)5’杂交区域,所述5’杂交区域处于阅读框的形式,所述所述5’杂交区域与所述报告蛋白的编码序列的第一部分一起处于框内,并且与所述报告蛋白的编码序列的第二部分一起处于框内;以及

[0295] ii)报告蛋白的编码序列的第二部分,所述报告蛋白的编码序列的第二部分连结在所述5’杂交区域的下游并与所述5’杂交区域一起处于框内。

[0296] 13.如段落11-12中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域和5’杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列内。

[0297] 14.如段落11-13中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域和5’杂交区域位于所述报告蛋白的溶剂暴露环的编码区域内。

[0298] 15.如段落11-14中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域和5’杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列内,并且基本上不影响报告基因的功能。

[0299] 16.如段落1-15中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸和第二核酸是DNA。

[0300] 17.如段落1-16中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第二核酸包含5’磷酸酯。

[0301] 18.如段落1-17中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0302] 19.如段落1-18中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0303] 20.如段落1-19中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内或者与所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列共同延伸。

[0304] 21.如段落1-20中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域为所述第一核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’。

[0305] 22.如段落1-21中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内或与所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列共同延伸。

[0306] 23.如段落1-22中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域为所述第二核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

[0307] 24.如段落1-23中任一段所述的核酸传感器系统,其中,两个杂交区域的长度总共为至少12个核苷酸。

[0308] 25.如段落1-24中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域和3’杂交区域的长度各自为至少6个核苷酸。

[0309] 26.如段落1-25中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸和第二核酸为单独的分子。

[0310] 27.如段落1-26中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸的5’末端通过间插的ssDNA序列连接至所述第二核酸的3’末端,使得所述第一核酸和第二核酸存在于单个DNA序列或单个DNA链上。

[0311] 28.如段落1-27中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一核酸的5’末端进

一步包含形成末端发夹环的序列。

[0312] 29.如段落1-28中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述系统进一步包含与所述第二核酸的3'区域互补的引物。

[0313] 30.如段落1-29中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述系统进一步包含与作为所述第二核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列互补的引物。

[0314] 31.如段落1-30中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第二核酸在其3'末端进一步包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含末端发夹环中的引物。

[0315] 32.如段落1-31中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述报告蛋白选自于由荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、和补充并激活截短的报告蛋白的肽所组成的组。

[0316] 33.如段落1-32中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含无细胞表达系统。

[0317] 34.如段落1-33中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含连接酶。

[0318] 35.如段落1-34中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含逆转录酶。

[0319] 36.如段落1-35中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。

[0320] 37.如段落1-36中任一段所述的核酸系统,其中,所述核糖核酸酶为RNAse H。

[0321] 38.如段落1-37中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含:

[0322] a)单链DNA(ssDNA)引物,所述单链DNA引物与如下互补:i)所述表达盒的3'区域,ii)所述第二核酸的3'区域,iii)作为所述第二核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列,或iv)作为所述表达盒中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列;

[0323] b)连接酶;以及

[0324] c)无细胞表达系统。

[0325] 39.如段落1-38中任一段所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。

[0326] 40.如段落33-39中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述无细胞表达系统为全细胞提取物。

[0327] 41.如段落1-40中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA聚合酶选自于由具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、以及来自枯草芽孢杆菌的聚合酶所组成的组。

[0328] 42.如段落1-41中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述接合点被配置为针对所述靶核酸的多态型进行杂交。

[0329] 43.如段落1-42中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0330] 44.如段落1-43中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域的自由端被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0331] 45.如段落1-44中任一段所述的核酸传感器系统,其中,在上游ssDNA传感器结构

域或下游ssDNA传感器结构域中的一者或两者上，所述多态型位于杂交区域的接合点处的两个碱基中的一者或两者处。

[0332] 46.如段落1-45中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述杂交区域包含一个或多个多态型。

[0333] 47.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0334] a)第一结构域，所述第一结构域含有3’杂交区域；以及

[0335] b)第二结构域，所述第二结构域含有5’杂交区域；

[0336] 其中，当通过靶核酸(所述靶核酸与所述3’杂交区域和所述5’杂交区域杂交)将所述第一结构域和第二结构域桥接时，所述第一结构域和第二结构域被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0337] 48.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0338] a)第一结构域，所述第一结构域含有3’杂交区域；以及

[0339] b)第二结构域，所述第二结构域含有5’杂交区域；

[0340] 其中，当所述第一结构域和第二结构域连接在一起时，所述第一结构域和第二结构域被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0341] 49.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含：

[0342] a)第一结构域，所述第一结构域含有3’杂交区域；以及

[0343] b)第二结构域，所述第二结构域含有5’杂交区域；

[0344] 其中，当所述第一结构域和第二结构域连接在一起并与靶核酸(所述靶核酸与所述3’杂交区域和所述5’杂交区域杂交)进行杂交时，所述第一结构域和第二结构域被配置为编码非模板盒，所述非模板盒包含启动子、核糖体结合位点和报告蛋白的编码序列。

[0345] 50.一种核酸传感器系统，所述核酸传感器系统包含单链非模板形式的DNA表达盒，所述DNA表达盒含有：

[0346] i)启动子；

[0347] ii)核糖体结合位点(RBS)；以及

[0348] iii)报告蛋白的编码序列；

[0349] 其中，靶核酸杂交序列位于所述盒中，并且所述盒分开成第一结构域和第二结构域，或者所述盒包含第一结构域和第二结构域，其中，结构域之间的分开或转变在所述杂交区域内发生。

[0350] 51.如段落47-50中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一结构域或第二结构域之一包含所述报告蛋白的编码序列，其余结构域包含所述启动子。

[0351] 52.如段落47-51中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一结构域或第二结构域之一包含所述报告蛋白的编码序列，其余的结构域包含所述启动子和所述核糖体结合位点。

[0352] 53.如段落47-52中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一结构域或第二结构域之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述报告蛋白的编码序列的起始密码子，其余的结构域包含所述报告蛋白的其余编码序列。

[0353] 54.如段落53所述的核酸传感器系统，其中，所述第一结构域从5’至3’包含：

[0354] i)启动子;

[0355] ii)核糖体结合位点(RBS);

[0356] iii)报告蛋白的编码序列的起始密码子;以及

[0357] iv)3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0358] 并且第二结构域从5'至3'包含:

[0359] i)5'杂交区域,所述5'杂交区域为与所述报告蛋白的其余编码序列处于框内的阅读框形式;以及

[0360] ii)所述报告蛋白的其余编码序列,所述报告蛋白的其余编码序列连结在所述5'杂交区域的下游并与所述5'杂交区域一起处于框内。

[0361] 55.如段落47-54中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域或第二结构域之一包含所述启动子,其余的结构域包含所述核糖体结合位点和所述报告蛋白的编码序列。

[0362] 56.如段落55的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域从5'至3'包含:

[0363] i)启动子;以及

[0364] ii)3'杂交区域;

[0365] 并且所述第二结构域从5'至3'包含:

[0366] i)5'杂交区域;

[0367] ii)核糖体结合序列;以及

[0368] iii)报告蛋白的编码序列。

[0369] 57.如段落47-56中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域或第二结构域之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述报告蛋白的编码序列的5'部分,其余的结构域包含所述报告蛋白的其余编码序列。

[0370] 58.如段落57所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域从5'至3'包含:

[0371] i)启动子;

[0372] ii)RBS;

[0373] iii)报告蛋白的编码序列的第一部分,所述报告蛋白的编码序列的第一部分包含起始密码子和至少一个另外的密码子;以及

[0374] iv)3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0375] 并且所述第二结构域从5'至3'包含:

[0376] i)5'杂交区域,所述5'杂交区域处于阅读框形式,所述5'杂交区域与所述报告蛋白的编码序列的第一部分一起处于框内,并与所述报告蛋白的编码序列的第二部分一起处于框内;以及

[0377] ii)报告蛋白的编码序列的第二部分,所述报告蛋白的编码序列的第二部分连结在所述5'杂交区域的下游并与所述5'杂交区域一起处于框内。

[0378] 59.如段落57-58中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域和5'杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列中,并位于编码所述报告蛋白的溶剂暴露环的区域内。

[0379] 60.如段落57-59中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域和5'杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列中,并且基本上不影响报告基因的功能。

[0380] 61.如段落47-60中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域和第二结构域为DNA。

[0381] 62.如段落47-61中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0382] 63.如段落47-62中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0383] 64.如段落47-63中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内或与所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列共同延伸。

[0384] 65.如段落47-64中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3’杂交区域为所述第一结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’。

[0385] 66.如段落47-65中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内或与所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列共同延伸。

[0386] 67.如段落47-66中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域为所述第二结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

[0387] 68.如段落47-67中的任一段所述的核酸传感器系统,其中,两个杂交区域的长度总共为至少12个核苷酸。

[0388] 69.如段落47-68中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述5’杂交区域和3’杂交区域的长度各自为至少6个核苷酸。

[0389] 70.如段落47-69中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域和第二结构域在同一分子上。

[0390] 71.如段落47-70中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域的5’末端通过间插的ssDNA序列连接至所述第二结构域的3’末端,使得所述第一结构域和第二结构域存在于单个DNA序列或单个DNA链上。

[0391] 72.如段落47-71中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一结构域的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列。

[0392] 73.如段落47-72中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述系统进一步包含与所述第二结构域的3’区域互补的引物。

[0393] 74.如段落47-73中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述系统进一步包含与作为所述第二结构域中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补的引物。

[0394] 75.如段落47-74中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第二结构域在其3’末端进一步包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含在末端发夹环中的引物。

[0395] 76.如段落47-75中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述报告蛋白选自于由荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、和补充并激活截短的报告蛋白的肽所组成的组。

[0396] 77.如段落47-76中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含无细胞表达系

统。

[0397] 78.如段落47-77中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含连接酶。

[0398] 79.如段落47-78中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含逆转录酶。

[0399] 80.如段落47-79中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。

[0400] 81.如段落47-80中任一段所述的核酸系统,其中,所述核糖核酸酶为RNAse H。

[0401] 82.如段落47-81中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含:

[0402] a)单链DNA引物,所述单链DNA引物与如下互补:i)所述表达盒的3'区域,ii)所述第二核酸的3'区域,iii)作为所述第二核酸中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列,或iv)作为所述表达盒中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3'的序列;

[0403] b)连接酶;以及

[0404] c)无细胞表达系统。

[0405] 83.如段落47-82中任一段所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。

[0406] 84.如段落77-83中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述无细胞表达系统为全细胞提取物。

[0407] 85.如段落47-84中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA聚合酶选自于由具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、以及来自枯草芽孢杆菌的聚合酶所组成的组。

[0408] 86.如段落47-85中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述接合点被配置为针对所述靶核酸的多态型进行杂交。

[0409] 87.如段落47-86中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0410] 88.如段落47-87中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域的自由端被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0411] 89.如段落47-88中任一段所述的核酸传感器系统,其中,在上游ssDNA传感器结构域或下游ssDNA传感器结构域中的一者或两者上,所述多态型位于所述杂交区域的接合点处的两个碱基中的一者或两者处。

[0412] 90.如段落47-89中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述杂交区域包含一个或多个多态型。

[0413] 91.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0414] a)提供段落1-90中任一段所述的核酸传感器系统,其中,上游杂交区域和下游杂交区域与所述靶核酸的一部分互补,以使所述靶核酸与所述上游杂交区域和下游杂交区域的杂交在第一核酸和第二核酸或第一结构域和第二结构域之间产生接合点;

[0415] b)在适合于所述靶核酸与所述上游杂交区域和下游杂交区域杂交以及所述上游杂交区域和下游杂交区域的连接的条件下,使所述核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与所述样品接触,从而产生可操作地连结的ssDNA反应产物;

[0416] c)在适合于DNA聚合、RNA转录和RNA翻译的条件下,将步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统(所述无细胞表达系统包含DNA聚合酶、dNTP、mRNA和蛋白质生产所必需的其它构造块组分)接触以及ssDNA引物,从而产生报告蛋白;

[0417] d)测量报告蛋白的存在,以说明所述样品中靶核酸的存在。

[0418] 92.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0419] a)提供段落1-90中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域和所述5'杂交区域与所述靶核酸的一部分互补,以使所述靶核酸与所述两个杂交区域的杂交在第一核酸和第二核酸之间产生接合点;

[0420] b)在适合于所述靶核酸与所述3'杂交区域和5'杂交区域杂交以及所述杂交区域的连接的条件下,使所述核酸传感器系统在连接酶存在的情况下与所述样品接触,从而产生包含靶核酸的链的反应产物,所述靶核酸的链杂交至包含可操作地连结的第一核酸和第二核酸的核酸链;

[0421] c)使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触,从而产生报告蛋白;

[0422] d)测量步骤c)中产生的报告蛋白,以确定所述样品中靶核酸的量。

[0423] 93.如段落91-92中任一段所述的方法,其中,所述核酸传感器系统的组分各自以约16nM存在。

[0424] 94.如段落91-93中任一段所述的方法,其中,连接酶以约100nM存在。

[0425] 95.如段落91-94中任一段所述的方法,其中,步骤b)在环境温度(24℃-26℃)下孵育5分钟至15分钟的时段,和/或步骤c)在环境温度下孵育60分钟至3小时的时间段。

[0426] 96.如段落91-95中任一段所述的方法,其中,所述无细胞表达系统进一步包含RNase抑制剂。

[0427] 97.如段落91-96中任一段所述的方法,其中,所述无细胞表达系统进一步包含与第二核酸或第二结构域的3'末端互补的12.5μM的ssDNA引物。

[0428] 98.如段落91-97中任一段所述的方法,其中,所述无细胞表达系统进一步包含报告蛋白的底物。

[0429] 99.如段落91-98中任一段所述的方法,其中,dNTP的浓度为约230μM。

[0430] 100.如段落91-99中任一段所述的方法,其中,所述DNA聚合酶选自于由具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、以及来自枯草芽孢杆菌的聚合酶所组成的组。

[0431] 101.如段落91-100中任一段所述的方法,其中,所述报告蛋白为荧光素酶,并且所述报告蛋白的底物为荧光素酶底物,通过检测所述无细胞表达系统中的发光来进行测量。

[0432] 102.如段落91-101中任一段所述的方法,其中,转录进一步包括ssDNA引物与RNA转录物的杂交,使用逆转录酶的逆转录和内切裂解。

[0433] 103.如段落91-102中任一段所述的方法,其中,所述接合点被配置为针对所述靶核酸的多态型进行杂交。

[0434] 104.如段落91-103中任一段所述的方法,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0435] 105.如段落91-104中任一段所述的方法,其中,所述3'杂交区域或5'杂交区域的

自由端被配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0436] 106.如段落91-105中任一段所述的方法,其中,在上游ssDNA传感器结构域或下游ssDNA传感器结构域中的一者或两者上,所述多态型位于所述杂交区域的接合点处的两个碱基中的一者或两者处。

[0437] 107.如段落91-106中任一段所述的方法,其中,任选地将一个或多个多态型引入所述杂交区域内。

[0438] 本文所描述的技术的一些实施方式可以根据下列编号段落中的任何段落进行定义:

[0439] 1.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分,当将第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分连接在一起时,所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分产生单个链的DNA表达盒,所述单个链的DNA表达盒包含:

[0440] i)启动子;

[0441] ii)核糖体结合位点(RBS);以及

[0442] iii)编码序列;

[0443] 其中,靶核酸杂交序列位于所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分内。

[0444] 2.一种核酸传感器系统,所述核酸传感器系统包含第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分,当第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分连接在一起时,所述第一单链DNA传感器部分和第二单链DNA传感器部分产生单个链的DNA表达盒,所述单个链的DNA表达盒包含:

[0445] i)启动子;

[0446] ii)核糖体结合位点(RBS);

[0447] iii)编码序列,

[0448] 其中,单个链包含:

[0449] iv)靶核酸杂交序列,所述靶核酸杂交序列含有3'杂交区域和5'杂交区域,其中,所述3'杂交区域包含在所述第一传感器部分中,所述5'杂交区域包含在所述第二传感器部分中,以使得当使所述传感器系统与包含靶核酸的样品接触时与所述靶核酸序列杂交,与所述靶核酸的杂交使得能够将所述第一部分和第二部分连接以产生所述单链。

[0450] 3.如段落1-2中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA表达盒为非模板DNA表达盒。

[0451] 4.如段落1-3中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述表达盒的所述第一传感器部分和第二传感器部分在所述表达盒内的任何给定位置处分开。

[0452] 5.如段落4所述的核酸传感器系统,其中,所述分开发生在所述靶核酸杂交序列内。

[0453] 6.如段落1-4中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸杂交序列位于所述表达盒内的任何给定位置。

[0454] 7.如段落1-6中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或第二传感器部分之一包含所述编码序列,其余的传感器部分包含所述启动子。

[0455] 8.如段落1-7中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或第二传感器部分之一包含所述启动子和所述核糖体结合位点,其余的传感器部分包含所述编码序列。

[0456] 9.如段落1-8中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或第二传感器部分之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述编码序列的起始密码子,其余的传感器部分包含其余的编码序列。

[0457] 10.如段落9所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5'至3'包含:

[0458] i)所述启动子;

[0459] ii)所述核糖体结合位点(RBS);

[0460] iii)所述编码序列的起始密码子;以及

[0461] iv)所述3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0462] 并且所述第二传感器部分从5'至3'包含:

[0463] i)所述5'杂交区域,所述5'杂交区域为与其余的编码序列处于框内的阅读框形式;以及

[0464] ii)其余的编码序列,所述其余的编码序列连结在所述5'杂交区域的下游并与所述5'杂交区域一起处于框内。

[0465] 11.如段落1-10中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或第二传感器部分之一包含所述启动子,其余的传感器部分包含所述核糖体结合位点和所述编码序列。

[0466] 12.如段落11所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5'至3'包含:

[0467] i)所述启动子;以及

[0468] ii)所述3'杂交区域;

[0469] 并且所述第二传感器部分从5'至3'包含:

[0470] i)所述5'杂交区域;

[0471] ii)所述核糖体结合序列;以及

[0472] iii)所述编码序列。

[0473] 13.如段落1-12中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分或第二传感器部分之一包含所述启动子、所述核糖体结合位点和所述编码序列的5'部分,其余的传感器部分包含所述其余的编码序列。

[0474] 14.如段落13所述的核酸传感器系统,其中,所述第一传感器部分从5'至3'包含:

[0475] i)所述启动子;

[0476] ii)所述RBS;

[0477] iii)所述编码序列的第一部分,所述编码序列的第一部分包含起始密码子和至少一个另外的密码子;

[0478] iv)所述3'杂交区域,所述3'杂交区域为与所述起始密码子处于框内的阅读框形式;

[0479] 并且所述第二传感器部分从5'至3'包含:

[0480] i)所述5'杂交区域,所述5'杂交区域处于阅读框形式,所述5'杂交区域与所述编

码序列的第一部分一起处于框内，并与所述编码序列的第二部分一起处于框内；以及

[0481] ii)所述编码序列的第二部分，所述编码序列的第二部分连结在所述5’杂交区域的下游并与所述5’杂交区域一起处于框内。

[0482] 15.如段落1-14中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0483] 16.如段落1-15中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域的至少一部分在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列中。

[0484] 17.如段落1-16中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内。

[0485] 18.如段落1-17中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域为所述第一传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’。

[0486] 19.如段落1-18中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域不在所述启动子、所述核糖体结合位点或所述编码序列内。

[0487] 20.如段落1-19中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述5’杂交区域为所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’。

[0488] 21.如段落1-20中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域的长度总共为至少12个核苷酸。

[0489] 22.如段落1-21中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述3’杂交区域和所述5’杂交区域的长度各自为至少6个核苷酸。

[0490] 23.如段落1-22中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分和第二传感器部分在同一分子上。

[0491] 24.如段落1-23中任一段所述的核酸传感器系统，其中，通过间插的ssDNA序列使所述第一传感器部分的5’末端与所述第二传感器部分的3’末端连结，使得所述第一传感器部分和第二传感器部分形成单个分子。

[0492] 25.如段落1-24中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与非模板表达盒内的序列或间插的ssDNA序列互补的引物。

[0493] 26.如段落1-22中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分和第二传感器部分在至少两个单独的分子上。

[0494] 27.如段落1-22或26中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第一传感器部分的5’末端进一步包含形成末端发夹环的序列。

[0495] 28.如段落1-22或26-27中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与所述第二传感器部分的3’区域互补的引物。

[0496] 29.如段落23-25中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与作为所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的3’的序列互补的引物。

[0497] 30.如段落23-25中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述系统进一步包含与所述第二传感器部分中的任意启动子、核糖体结合位点或编码序列的5’区域互补的引物。

[0498] 31.如段落1-22和26-30中任一段所述的核酸传感器系统，其中，所述第二传感器部分进一步在其3’末端包含核苷酸序列，所述核苷酸序列包含在末端发夹环中的引物。

[0499] 32.如段落1-31中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA表达盒的编码序列编码多肽。

[0500] 33.如段落32所述的核酸传感器系统,其中,所述多肽为报告蛋白。

[0501] 34.如段落13-14中任一段所述的核酸传感器系统,其中,在报告蛋白的溶剂暴露环的编码区域内,所述3'杂交区域和所述5'杂交区域位于所述编码序列中。

[0502] 35.如段落13-14或34中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述3'杂交区域和所述5'杂交区域位于所述报告蛋白的编码序列中,并且基本上不影响报告基因的功能。

[0503] 36.如段落33所述的核酸传感器系统,其中,所述报告蛋白包括荧光素酶、纳米荧光素酶、β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、碳酸酐酶、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、胰蛋白酶、蛋白酶、补充并激活截短的报告蛋白的肽、以及通过分析可检测出的多肽。

[0504] 37.如段落1-36中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含无细胞表达系统。

[0505] 38.如段落1-37中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含连接酶。

[0506] 39.如段落1-38中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含逆转录酶。

[0507] 40.如段落1-39中任一段所述的核酸系统,所述系统进一步包含水解与DNA杂交的RNA的核糖核酸酶。

[0508] 41.如段落40所述的核酸系统,其中,所述核糖核酸酶为RNAse H。

[0509] 42.如段落1-41中任一段所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含连接酶、链置换DNA聚合酶、dNTP、RNAse抑制剂和无细胞表达系统中的一种或多种。

[0510] 43.如段落37-42中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述无细胞表达系统为全细胞提取物。

[0511] 44.如段落1-43中任一段所述的核酸传感器系统,所述核酸传感器系统进一步包含DNA聚合酶。

[0512] 45.如段落44所述的核酸传感器系统,其中,所述DNA聚合酶选自于由如下所组成的组:具有核酸外切酶部分的Klenow片段、不具有核酸外切酶部分的Klenow片段、phi29聚合酶、修饰的T7 DNA聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶、来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶、来自枯草芽孢杆菌的聚合酶、Sequenase 2.0版、Bsu DNA聚合酶大片段、Bst 3.0DNA聚合酶、Phusion®高保真DNA聚合酶、不具有核酸外切酶部分的Vent®DNA聚合酶、Vent®DNA聚合酶、Q5®高保真DNA聚合酶和DNA聚合酶I大(Klenow)片段。

[0513] 46.如段落1-45中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸的多态型与所述第二传感器部分杂交区域的5'和所述第一传感器部分杂交区域的3'末端处的序列杂交。

[0514] 47.如段落1-46中任一段所述的核酸传感器系统,其中,将所述第一传感器部分的3'杂交区域或所述第二传感器部分的5'杂交区域配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0515] 48.如段落1-47中任一段所述的核酸传感器系统,其中,将所述第一传感器部分的3'杂交区域的自由端或所述第二传感器部分的5'杂交区域的自由端配置为与所述靶核酸的多态型杂交。

[0516] 49.如段落1-48中任一段所述的核酸传感器系统,其中,多态型的杂交序列包含所述第一传感器部分杂交区域的最3'碱基和所述第二传感器部分杂交区域的5'碱基中的一个或两个。

[0517] 50.如段落1-49中任一段所述的核酸传感器系统,其中,所述靶核酸杂交区域包含一个或多个多态型。

[0518] 51.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0519] a)提供包含所述靶核酸的样品;

[0520] b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交的条件下,使包含所述靶核酸的样品在连接酶存在的情况下与如段落1-50中任一段所述的核酸传感器系统接触,从而产生反应产物,所述反应产物包含与可操作地彼此连接的第一传感器部分和第二传感器部分杂交的靶核酸;

[0521] c)在有利于产生报告蛋白的条件下,在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下,使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触;

[0522] d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

[0523] e)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

[0524] 52.如段落51所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞系统的一部分提供。

[0525] 53.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0526] a)提供包含所述靶核酸的样品;

[0527] b)在有利于所述靶核酸序列与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸序列与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交的条件下,使包含所述靶核酸的样品在连接酶和任选的引物存在的情况下与如段落1-50中任一段所述的核酸传感器系统接触,从而产生反应产物,所述反应产物包含与可操作地彼此连结的第一传感器部分和第二传感器部分杂交的靶核酸;

[0528] c)在有利于产生报告蛋白的条件下,在链置换DNA聚合酶存在的情况下,使步骤b)中产生的反应产物与无细胞表达系统接触;

[0529] d)使步骤c)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

[0530] e)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

[0531] 54.如段落53所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞系统的一部分提供。

[0532] 55.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0533] a)提供包含所述靶核酸的样品;

[0534] b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交、有利于所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交、并有利于产生报告蛋白的条件下,使包含所述靶核酸的样品与如下物质接触:在连接酶存在的情况下的i)如段落1-50中任一段所述的核酸传感器系统,以及在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统;

[0535] c)使步骤b)中产生的反应产物与能够检测所述报告蛋白的表达的试剂接触;

[0536] d)测量步骤d)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

[0537] 56.如段落55所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞系统的一部分提供。

[0538] 57.一种用于检测样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:

[0539] a)提供包含所述靶核酸序列的样品;

[0540] b)在有利于所述靶核酸与表达盒的第一传感器部分的3'杂交区域杂交以及所述靶核酸与表达盒的第二传感器部分的5'杂交区域杂交、且有利于产生报告蛋白的条件下,使包含所述靶核酸序列的样品与如下物质接触:在连接酶存在的情况下的i)如段落1-50中任一段所述的核酸传感器系统,在链置换DNA聚合酶和引物存在的情况下的ii)无细胞表达系统,以及iii)能够检测所述报告蛋白的表达的试剂;

[0541] c)测量步骤b)中产生的所述报告蛋白的表达,以确定所述样品中的靶核酸的存在和/或量。

[0542] 58.如段落57所述的方法,其中,所述连接酶作为所述无细胞系统的一部分提供。

[0543] 59.一种试剂盒,所述试剂盒包含:

[0544] a)处于包装材料中的组合物,所述组合物含有如段落1-50中任一段所述的核酸传感器系统;

[0545] b)样品收集设备;

[0546] c)阳性对照;以及

[0547] d)使用说明。

[0548] 实施例

[0549] 实施例1

[0550] 核酸序列

[0551] 表1中包括所有核酸序列(示出的DNA序列)。短寡核苷酸(<200个核苷酸(nt))A部分购自Integrated DNA Technologies(IDT,Coralville,IA),并进行PAGE纯化。如下所述,较长(>200nt)的ssDNA组分和RNA靶序列从购自IDT的gBlock制备。

[0552] 实施例2

[0553] ssDNA传感器组分的制备

[0554] 使用引物和Q5 PCR试剂盒(New England Biolabs,NEB,Ipswich,MA)扩增gBlock。200μL PCR反应含有:100μL Q5预混液、97μL水、1μL gBlock(10ng/μL)、100μM未标记的正向引物和生物素化的反向引物各1μL。PCR反应按如下运行:98℃下热启动2min;98℃变性10s、68℃退火20s、72℃延伸30s,35个循环;然后72℃最终延伸2min。将PCR反应合并,并在来自Zymo Research(Irvine,CA)的DNA-25Clean and Concentrate柱上纯化,洗脱至50μL H_2O中,并在2%E-gel EX(Invitrogen,Carlsbad,CA)上运行以进行确认。在Nanodrop(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)上测定浓度。使用Dynabeads MyOne链霉亲和素C1磁珠(ThermoFisher Scientific)纯化ssDNA构建体。基于PCR浓度和20μg ds-DNA/1mg珠子的珠结合能力计算珠体积,使用～20%过量的珠子以确保完全结合。将珠子转移到2.0mL管中,并通过颗粒浓缩器架(particle concentrator rack)(MPC)进行沉淀。使用1×Binding and Wash缓冲液(B/W,5mM Tris-HCl,pH 7.5,0.5mM EDTA,1M NaCl)洗涤珠子两次。将一体积的2×B/W添加至一体积的PCR洗脱液中,并将PCR混合物添加至珠子中,在室温下旋转最低20min。将珠子浓缩并洗涤两次。用一体积的100mM冷NaOH将ssDNA洗脱两次。洗脱液用0.1体积的1M HCl和0.1体积的3M NaOAc(pH 5.0)中和,并使用Zymo Oligo Clean and Concentrate试剂盒(Zymo Research)纯化。

[0555] 实施例3

[0556] RNA靶标的制备

[0557] 编码靶RNA序列(具有5'T7启动子)的gBlock购自IDT,并将其添加到HiScribe体外转录系统(NEB)中,反应运行约4小时。使用Zymo RNA Clean and Concentrate试剂盒(Zymo Research)纯化RNA,并使用Nanodrop测定浓度。

[0558] 实施例4

[0559] 在大肠杆菌中表达靶RNA的质粒的构建

[0560] 含有基于pUC19的pgRNA-细菌质粒的DH5α大肠杆菌细胞购自Addgene(质粒#44251),在含有氨苄青霉素的LB中生长,并通过mini-prep(Zymo Research)纯化该质粒。使用Q5定点诱变(NEB)将编码靶RNA的DNA序列插入载体中,并用菌落PCR进行验证。

[0561] 实施例5

[0562] RNA提取物的制备

[0563] 使转化有表达RNA靶序列的质粒的DH5α大肠杆菌细胞在37℃下生长,直至OD_{600}为0.3。将0.75mL的TRIzol LS试剂(Thermo Fisher)添加到250μL细胞中,并通过移液进行混合。将该混合物在室温下孵育5min。加入0.2mL氯仿,将细胞静置3min。接下来,将反应在12000×g和4℃下离心15min。离心后,将水相(上层相)添加到Zymo RNA Clean and Concentrate(Zymo Research)纯化柱中,并以25μL洗脱。将纯化的RNA用DNase I处理,并添加到另一个RNA纯化柱中以生成RNA提取物。从大肠杆菌细胞获得全细胞提取物,所述大肠杆菌细胞生长至相同的0.30D,沉淀并在RNA储存缓冲液(Invitrogen,1mM柠檬酸钠,pH 6.4)中重悬期间浓缩10×。通过在95℃下孵育5min来热裂解细胞。

[0564] 实施例6

[0565] 标准检测分析条件

[0566] 将0.41单位的PBCV-1DNA连接酶、3μM反向引物、50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、1mM ATP和10mM DTT与处于1.2μL中各38nM的A部分和B部分传感器组分混合,如所说明的,在室温(24℃-26℃)下孵育5分钟-15分钟。传感器结合和连接反应后,加入1.6μL的无细胞表达和底物混合物(该混合物包含0.45v/v PURExpress溶液A(NEB)、0.34v/v PURExpress溶液B(NEB)、0.91单位的鼠RNase抑制剂(NEB)、228μM dNTP混合物(NEB)、0.02v/v Nano-Glo底物(Promega)和0.125单位的DNA聚合酶),并用光学透明膜将表达反应密封,在Biotek(Winooski,VT)Synergy NEO酶标仪上以100增益读取终点读数。任何修改均记录在了下面的实施例说明中。

[0567] 实施例7

[0568] 如图1所示,系统的关键组分包含:

[0569] 单链DNA'A'结构域,

[0570] 5'磷酸化的单链DNA'B'结构域,

[0571] 与B结构域的3'末端杂交的ssDNA引物,

[0572] 连接酶,

[0573] DNA聚合酶,以及

[0574] 无细胞表达系统。

[0575] 实施例8

[0576] 表达盒的分裂

[0577] 通过使表达盒拆分为两个单独的部分(上游(或A)部分和下游(或B)部分),对由T7启动子、核糖体结合位点(RBS)和荧光素酶报告蛋白的编码序列组成的双链DNA表达盒进行分裂(参见例如图2A)。拆分的表达盒的三种版本包括:

[0578] 版本1(v1)-在编码序列的起始密码子(ATG)之后拆分,

[0579] 版本2(v2)-在启动子和RBS之间拆分,以及

[0580] 版本3(v3)-嵌入报告蛋白的环或转弯(turn)内的拆分。

[0581] v1构建体和v2构建体在拆分位点处包括36个核苷酸的插入区域,该拆分位点被设计成与36个靶核苷酸RNA序列结合;插入的杂交区域的18个核苷酸在A部分的3'末端上,杂交区域的18个核苷酸在B部分的5'末端上。针对v1和v2设计分别创建了两个构建体,以靶向两个不同的RNA分子(T1和T2)。v3构建体不含插入的杂交区域,并且靶RNA被设计为与拆分位点的区域互补。上述每个版本的传感器ssDNA部分如图3所示。所有构建体和靶标的DNA序列均列于表1中。

[0582] 通过PCR生成v1、v2和v3的完整的全dsDNA表达盒,以及它们各自的dsDNA A部分或B部分。将线性产物添加到无细胞表达系统中,以通过测量发光来监测荧光素酶报告子的转录、翻译和活性(参见例如图4A-图4C)。将PCR产物(12.5nM)直接添加到补充有200μM dNTP、0.22mg/mL BSA和Nano-Glo底物(Promega)的无细胞表达系统(PURExpress,NEB)中,并在环境温度(24℃-26℃)下孵育一小时。使用酶标仪测量三个独立反应以及空白孔的发光。

[0583] 实施例9

[0584] 用版本1传感器系统灵敏检测靶RNA。

[0585] 基于对单独的ssDNA A部分和B部分进行桥接的同源RNA靶序列的存在,对v1传感器系统(图3)的活化进行了测试。还测试了与靶标杂交位点不互补的其它脱靶RNA序列。图5A-图5B示出了数据,该数据示出了通过5分钟的连接以及然后的1小时的表达反应进行的RNA靶标(T2)的v1传感器检测。测试了两种不同的DNA聚合酶(Klenow片段+exo(参见例如图5A)和Sequenase(参见例如图5B))的表现。

[0586] 还测试了v1传感器系统通过靶RNA T1的活化。除了连接时间从5分钟增加至15分钟,如上所述进行实验。T1 RNA的飞摩尔级检测示于图6中。

[0587] 实施例10

[0588] v1传感器在大肠杆菌RNA和全细胞提取物的背景中具有高度特异性

[0589] 在从2.6ng-2600ng的增加量的总大肠杆菌RNA(ThermoFisher Scientific)存在的情况中,评估了v1传感器的表现。为了适应来自RNA背景的额外体积,通过将母液ssDNA传感器A部分和B部分的初始浓度提高7.5×来修改标准检测分析,以使传感器的体积更小,从而实现相同的最终传感器浓度。这样就能够添加不同体积的背景RNA,而无需改变其它反应组分的浓度。非特异性大肠杆菌RNA的不同背景中的T1RNA的检测示于图7中。

[0590] 还用检测靶标T1的v1传感器系统,测试了作为背景组分的RNA(RNAex,通过trizol提取从大肠杆菌获得)和来自相当数量(4×10^6)细胞的粗全细胞提取物(WCex,通过在95℃下加热5min进行裂解)。数据示于图8中。

[0591] 实施例11

[0592] 在大肠杆菌中表达的靶RNA的检测

[0593] 收获含有表达T2靶标的质粒的大肠杆菌，并通过加热至95℃5min进行裂解(WCex)，或以通过trizol进行的RNA提取进行处理(RNAex)。如图9所示，使用v1传感器系统，以在室温下进行15分钟连接和1小时表达孵育的两个条件检测靶RNA。

[0594] 实施例12

[0595] 人唾液背景中靶RNA的检测

[0596] 使用v1传感器系统，以在增加浓度(v/v)的合并人唾液(Innovative Research Inc.，Novi，MI)中检测固定浓度(50pM)的T1靶RNA。数据示于图10中。

[0597] 实施例13

[0598] 替代的DNA聚合酶的表现。

[0599] 在编码链延伸步骤中使用不同的DNA聚合酶，对v3传感器系统(参见例如图3)的表现进行测试。DNA聚合酶的持续合成能力、核酸外切酶活性和杂泛性(promiscuity)都可能对其表现有影响。各自以12.5nM添加A部分组分和B部分组分，并与8.6nM的靶RNA一起孵育。在环境温度(24℃-26℃)下5分钟孵育后，将连接反应添加到无细胞表达系统(PurExpress，NEB)中，该系统补充有125nM DNA反向引物和如下DNA聚合酶(各0.15U)中的一种：Klenow片段+exo；Klenow片段-exo；phi29聚合酶；或Sequenase。将反应在环境温度下进一步孵育1小时。关于靶标2的表现示于图11A-图11D中。

[0600] 实施例14

[0601] 替代的传感器组分方案的表现。

[0602] 创建了图2B(i)中所示的v1的替代传感器组分方案，其中A部分和B部分都在同一ssDNA序列上，使得B现在为A的5’。测试了两种构建体，其中一种使用T7终止结构域终止RNA转录物(CSt)，另一种包含三个重复终止密码子(CSs)。显示这些替代方案表现的数据示于图12中。

[0603] 表1-核酸序列。列出了针对各传感器设计的A部分和B部分。全长(AB)对照是A部分和B部分的组合。小写字母表示插入的间隔结构域。

[0604]

名称	SEQ ID NO:	序列
v1_A_T1	1	GAATTAATACGACTCACTATAGGGATCTATCCACTACTCCTAAGGAG ACTTTTTATGAATTATCTATGCATTACT
v1_B_T1	2	AACCCTTCCGCCACTAAAGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGA CTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAG GGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCC GATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGAC ATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGG CCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATC ATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGTC ACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAAC GGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGC TTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCG AACGCATCCTGGCATAA
v1_A_T2	3	GAATTAATACGACTCACTATAGGGGTCCTCCCCCCCCAAAACTACAAT AAGGGGGTTTTTTATGTCCATTCCTGGCTTTAAT
v1_A2_T2	4	GAATTAATACGACTCACTATAGGGATCTATCCACTACTCCTAAGGAG ACTTTTTATGTCCATTCCTGGCTTTAAT
v1_B_T2	5	TTTACTGGTACAGTTTCAGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGA CTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAG GGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCC GATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGAC ATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGG CCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATC ATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGTC ACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAAC GGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGC TTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCG AACGCATCCTGGCATAA

[0605]

v1_CSs_T1	6	AACCCTTCCGCCACTAAAGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGA CTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAG GGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCC GATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGAC ATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGG CCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATC ATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGTC ACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAAC GGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGC TTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCG AACGCATCCTGGCATAATAATAAGAATTAATACGACTCACTATAGG GATCTATCCACTACTCCTAAGGAGACTTTTTATGAATTATCTATGCA TTACT
v1_CSt_T2	7	TTTACTGGTACAGTTTCAGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGA CTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAG GGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCC GATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGAC ATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGG CCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATC ATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGTC ACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAAC GGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGC TTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCG AACGCATCCTGGCATAACTAGCATAACCCCTCTCTAAACGGAGGGG TTTGAATTAATACGACTCACTATAGGGGTCCTCCCCCCCAAAACTAC AATAAGGGGGTTTTTTATGTCCATTCCTGGCTTTAAT
v1_CSs_T2	8	TTTACTGGTACAGTTTCAGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGA CTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAG GGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCC GATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGAC ATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGG CCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATC

[0606]

		ATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGTC ACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAAC GGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGC TTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCG AACGCATCCTGGCATAATGATAATAGTTTGGTTTGAATTAATACGAC TCACTATAGGGGTCCTCCCCCCCAAAACTACAATAAGGGGGTTTTTT ATGTCCATTCCTGGCTTTAAT
v2_A_T1	9	GAATTAATACGACTCACTATAGGAATTATCTATGCATTACT
v2_B_T1	10	AACCCTTCCGCCACTAAAGGGTCAATTAAGGAGGTATATATGGTGTT CACATTGGAGGACTTTGTAGGGGACTGGCGCCAGACAGCGGGCTAC AACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAGGGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCA GAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCCGATCCAACGTATCGTGCTTTCCG GAGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTTATTATTCCTTATGAA GGGCTTAGCGGAGATCAAATGGGCCAAATCGAAAAGATTTTCAAAG TGGTATATCCTGTTGACGACCATCATTTTAAGGTCATTCTGCATTAC GGAACTTTAGTCATCGACGGCGTCACACCTAACATGATTGACTATTT TGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGACGGAAAAAAAATC ACCGTGACAGGGACACTGTGGAACGGCAATAAGATTATCGACGAGC GCCTTATTAACCCAGATGGGTCGCTTTTATTCCGTGTCACTATTAATG GTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCGAACGCATCCTGGCATAA
v2_A_T2	11	GAATTAATACGACTCACTATAGGTCCATTCCTGGCTTTAAT
v2_B_T2	12	TTTACTGGTACAGTTTCAAAACTGTAAGCCCGTAGAAAGGACTTTCA AACAATAAGCGGGTAAGGAGGTATTAAATGGTGTTCACATTGGAGG ACTTTGTAGGGGACTGGCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCA GGTTCTGGAGCAGGGAGGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTG TGAGTGTCACCCCGATCCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGG CTGAAGATCGACATCCATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGG AGATCAAATGGGCCAAATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCT GTTGACGACCATCATTTTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGT CATCGACGGCGTCACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGT ATGAGGGCATCGCAGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGG GACACTGTGGAACGGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAAC

		CCAGATGGGTCGCTTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGG CTGGCGTTTGTGCGAACGCATCCTGGCATAA
	v3_A_T1	13	GAATTAATACGACTCACTATAGGTGAGTATATAGGTAGAAGAGGTA TTGGAGGTATTGATGGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGACTG GCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAGGGA GGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCCGAT CCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGACATC CATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGGCCA AATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATCATT TTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCggtggcggg AATTATCTATGCATTACT
	v3_B_T1	14	AACCCTTCCGCCACTAAAggcggtgggGTCACACCTAACATGATTGACTA TTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGACGGAAAAAAA ATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAACGGCAATAAGATTATCGACG AGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGCTTTTATTCCGTGTCACTATT AATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCGAACGCATCCTGGCATAA
[0607]	v3_A_T2	15	GAATTAATACGACTCACTATAGGTGAGTATATAGGTAGAAGAGGTA TTGGAGGTATTGATGGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGACTG GCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAGGGA GGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCCGAT CCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGACATC CATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGGCCA AATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATCATT TTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGCGGTGGC GGGTCCATTCCTGGCTTTAAT
	v3_B_T2	16	TTTACTGGTACAGTTTCAGGCGGTGGGGTCACACCTAACATGATTGA CTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGACGGAAAAA AAATCACCGTGACAGGGACACTGTGGAACGGCAATAAGATTATCGA CGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGTCGCTTTTATTCCGTGTCACTA TTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGTGCGAACGCATCCTGGCATAA
	v3_A_T3	17	GAATTAATACGACTCACTATAGGTGAGTATATAGGTAGAAGAGGTA TTGGAGGTATTGATGGTGTTCACATTGGAGGACTTTGTAGGGGACTG GCGCCAGACAGCGGGCTACAACCTTGATCAGGTTCTGGAGCAGGGA

[0608]

		GGTGTAAGTTCACTTTTCCAGAATTTGGGTGTGAGTGTCACCCCGAT CCAACGTATCGTGCTTTCCGGAGAAAATGGGCTGAAGATCGACATC CATGTTATTATTCCTTATGAAGGGCTTAGCGGAGATCAAATGGGCCA AATCGAAAAGATTTTCAAAGTGGTATATCCTGTTGACGACCATCATT TTAAGGTCATTCTGCATTACGGAACTTTAGTCATCGACGGC
v3_B_T3	18	GTCACACCTAACATGATTGACTATTTTGGCCGTCCGTATGAGGGCAT CGCAGTGTTTGACGGAAAAAAAATCACCGTGACAGGGACACTGTGG AACGGCAATAAGATTATCGACGAGCGCCTTATTAACCCAGATGGGT CGCTTTTATTCCGTGTCACTATTAATGGTGTCACTGGCTGGCGTTTGT GCGAACGCATCCTGGCATAA
Rev 引物	19	TTATGCCAGGATGCGTTCGC
T1	20	TTTAGTGGCGGAAGGGTTAGTAATGCATAGATAATT
T2	21	TGAAACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGA
T3	22	AATCATGTTAGGTGTGACGCCGTCGATGACTAAAGT

[0609] 实施例15

[0610] 单核苷酸变体(SNV)的区分。

[0611] 可通过将SNP或SNV的位置定位在上游或下游ssDNA传感器结构域上杂交区域的接合点的两个碱基之一处的位置,使用本文所述的方法和组合物来检测单核苷酸多态型或单核苷酸变体。在任何方面的一些实施方式中,可在杂交区域内额外地引入一个或多个错配的碱基。

[0612] 使用v1测试了四种不同的示例性变体。下表2中列出了代表SNP或SNV的靶序列和所测试的变体。反映SNV的碱基变化以粗体显示。

[0613] 表2-核酸序列。具有单核苷酸变体(SNV)的RNA变体。

[0614]

RNA 变体	**SEQ ID NO:**	**序列**
靶标 (UA)	23	UUUAGUGGCGGAAGGGUUAGUAAUGCAUAGAUAAUU
SNP-UG	24	UUUAGUGGCGGAAGGGUU**G**GUAAUGCAUAGAUAAUU
SNP-AA	25	UUUAGUGGCGGAAGGGU**A**AGUAAUGCAUAGAUAAUU
SNP-GA	26	UUUAGUGGCGGAAGGGU**G**AGUAAUGCAUAGAUAAUU
SNP-GG	27	UUUAGUGGCGGAAGGGU**GG**GUAAUGCAUAGAUAAUU

[0615] 如实施例6中所述,用传感器对以上列出的单链RNA序列进行检测。如图13所示,基于在杂交区域接合处的一端或两端存在不匹配的核苷酸,来观测到差异的反应。

[0616] 实施例16

[0617] 替代的DNA聚合酶的表现。

[0618] 用如实施例6和实施例13中所述的方法,使用v1测试多种DNA聚合酶的功能。还测试了以下列出的其它聚合酶和聚合酶制剂:IsoPol(来自嗜冷芽胞杆菌的聚合酶):每个反应4个单位;IsoPol SD$^+$(来自嗜冷芽胞杆菌的具有增强的链置换的聚合酶):每个反应4个单位(示出了使用较少单位的酶的其它实例);或Bsu(来自枯草芽孢杆菌的聚合酶):每个反应4个单位。

[0619] 在靶向CT靶RNA序列(+RNA)的体外检测系统和没有靶RNA序列(-RNA)的阴性对照中对这些聚合酶的表现进行了测试(参见例如图14A)。还针对每种聚合酶测试了基于这些测量值的信噪比(S:B比)(参见例如图14B)。

[0620] 另外,用检测方法测试了不同单位量的IsoPol SD+(参见例如图14C)。仅用1.7个单位的酶实现了有效检测。

[0621] 实施例17

[0622] 证明了在编码序列中将表达盒分开以设计ssDNA传感器部分的多种方式。

[0623] 本文描述了三个示例性位置,用于拆分表达盒和插入靶杂交序列(例如参见图3版本3)。本领域技术人员将理解,任何报告子或其它蛋白质的溶剂暴露环均是用于插入额外氨基酸的合适位置(例如,由在DNA序列中插入杂交区域而产生的额外氨基酸)。本文证明了在多个溶剂暴露环位点处拆分表达盒以从所得的ssDNA传感器部分产生功能性核酸传感系统的能力。表达盒包含编码纳米荧光素酶(NLuc)的基因。表3中示出了测试的Nluc内的溶剂暴露环区域(环1-环5)。给出了在拆分/插入位点的任一端的氨基酸单字母缩写和多肽序列内的编号。例如,E50-N51表示将杂交序列插入到介于编码第50位氨基酸处的谷氨酸和第51位氨基酸处的天冬酰胺的密码子之间的编码序列中。

[0624] 表3-Nluc内溶剂暴露环区域(环1-环5)的位置

[0625]

插入位点	NLuc位置
环1	E50-N51
环2	L66-S67
环3	G123-K124
环4	G135-N136
环5	N145-P146

[0626] 如图15A所示,对在所示溶剂暴露环区域处插入了杂交序列的Nluc的活性进行测试。由杂交序列的插入产生的Nluc内的额外氨基酸基本上不影响萤光素酶的功能。

[0627] 另外,如所描述的,基于这些拆分位置和靶CT序列构建了ssDNA传感器部分,并对其进行了测试以检测100nM靶CT RNA。所有表达盒拆分位置都能够有效地检测靶RNA(参见例如图15B)。

[0628] 实施例18

[0629] 拆分的纳米荧光素酶构建体。

[0630] 为了鉴别在测定中具有较低背景的A部分&B部分,在萤光素酶编码序列的中间选择了拆分位点(参见例如图3版本3)。通过将拆分位点移至荧光素酶编码序列中,来自各个部分的假转录和翻译的背景信号将仅产生荧光素酶蛋白的非功能性片段。

[0631] 萤光素酶蛋白的十四个不同区域被鉴别为能够适于容纳插入物。测试了这些区域内的十四个不同的拆分位点(参见例如SEQ ID NO:28和表4),以鉴别具有低背景酶信号(是否这两段在没有成功连接的情况下在体外无细胞表达系统中进行表达)的拆分位点。这些位点位于纳米荧光素酶蛋白的已知环中。通过T7启动子、最佳RBS位点和ATG起始密码子驱动的转录和翻译来构建A部分&B部分(参见例如图16)。

[0632] SEQ ID NO:28是在这些研究中使用的荧光素酶的序列,不包含起始密码子。

[0633] VFTLRDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVI IPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAV FDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA (SEQ ID NO: 28)

[0634] 表4.SEQ ID NO:28中测试的拆分位点的列表

[0635]

拆分位点	区域	拆分位置	拆分位点	区域	拆分位置	拆分位点	区域	拆分位置
1	G16-L19	Y17-N18	6	P62-G68	L66-S67	11	V120-K125	G123-K124
2	Q25-L32	G26-G27	7	F78-P83	K79-V80	12	T131-K137	G135-N136
3	Q25-L31	S29-S30	8	V84-F89	D86-H87	13	L141-L150	N145-P146
4	L35-I42	G36-G37	9	L98-N106	D101-G102	14	I156-V159	N157-G148
5	L47-L53	E50-N51	10	D109-Y115	R113-P114			

[0636] 当作为具有A部分和B部分的拆分构建体进行测试时(参见例如图16),拆分位点2、3、4、5、6、7、10、11、12、13为纳米荧光素酶中发光信号最低的位点(参见例如图17)。

[0637] 为了鉴别在成功连接步骤后将产生功能性全长荧光素酶基因的拆分位点,用T7启动子、RBS、起始密码子和具有触发序列的全长荧光素酶基因产生了PCR构建体。当两个部分分别表达时,将触发序列插入具有最低背景信号的拆分位点(参见例如图17)。

[0638] 用萤光素酶基因拆分位点中的感兴趣的特定衣原体-RNA传感器(触发)序列,对具有较低背景的位点(2、3、4、5、6、7、10、11、12、13)进行了测试,以使得翻译的蛋白包含以下序列IYALLTLPPLNN(SEQ ID NO:29),该序列在每一侧均以3个甘氨酸的短接头作为侧翼。

序列表

<110> 哈佛大学校长及研究员协会
麻省理工学院
<120> 核酸的体外检测
<130> 002806-092060WOPT
<140>
<141>
<150> 62/718,427
<151> 2018-08-14
<160> 29
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 1
gaattaatac gactcactat agggatctat ccactactcc taaggagact ttttatgaat 60
tatctatgca ttact 75
<210> 2
<211> 531
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 2
aacccttccg ccactaaagt gttcacattg gaggactttg taggggactg gcgccagaca 60
gcgggctaca accttgatca ggttctggag cagggaggtg taagttcact tttccagaat 120
ttgggtgtga gtgtcacccc gatccaacgt atcgtgcttt ccggagaaaa tgggctgaag 180
atcgacatcc atgttattat tccttatgaa gggcttagcg gagatcaaat gggccaaatc 240
gaaaagattt tcaaagtggt atatcctgtt gacgaccatc attttaaggt cattctgcat 300
tacggaactt tagtcatcga cggcgtcaca cctaacatga ttgactattt tggccgtccg 360
tatgagggca tcgcagtgtt tgacggaaaa aaaatcaccg tgacagggac actgtggaac 420
ggcaataaga ttatcgacga gcgccttatt aacccagatg ggtcgctttt attccgtgtc 480
actattaatg gtgtcactgg ctggcgtttg tgcgaacgca tcctggcata a 531

<210> 3
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 3
gaattaatac gactcactat aggggtcctc ccccccaaaa ctacaataag ggggtttttt 60
atgtccattc ctggctttaa t 81
<210> 4
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 4
gaattaatac gactcactat agggatctat ccactactcc taaggagact ttttatgtcc 60
attcctggct ttaat 75
<210> 5
<211> 531
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 5
tttactggta cagtttcagt gttcacattg gaggactttg taggggactg gcgccagaca 60
gcgggctaca accttgatca ggttctggag cagggaggtg taagttcact tttccagaat 120
ttgggtgtga gtgtcacccc gatccaacgt atcgtgcttt ccggagaaaa tgggctgaag 180
atcgacatcc atgttattat tccttatgaa gggcttagcg gagatcaaat gggccaaatc 240
gaaaagattt tcaaagtggt atatcctgtt gacgaccatc attttaaggt cattctgcat 300
tacggaactt tagtcatcga cggcgtcaca cctaacatga ttgactattt tggccgtccg 360
tatgagggca tcgcagtgtt tgacggaaaa aaaatcaccg tgacagggac actgtggaac 420
ggcaataaga ttatcgacga gcgccttatt aacccagatg ggtcgctttt attccgtgtc 480
actattaatg gtgtcactgg ctggcgtttg tgcgaacgca tcctggcata a 531
<210> 6
<211> 612

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 6
aacccttccg ccactaaagt gttcacattg gaggactttg taggggactg gcgccagaca 60
gcgggctaca accttgatca ggttctggag cagggaggtg taagttcact tttccagaat 120
ttgggtgtga gtgtcacccc gatccaacgt atcgtgcttt ccggagaaaa tgggctgaag 180
atcgacatcc atgttattat tccttatgaa gggcttagcg gagatcaaat gggccaaatc 240
gaaaagattt tcaaagtggt atatcctgtt gacgaccatc attttaaggt cattctgcat 300
tacggaactt tagtcatcga cggcgtcaca cctaacatga ttgactattt tggccgtccg 360
tatgagggca tcgcagtgtt tgacggaaaa aaaatcaccg tgacagggac actgtggaac 420
ggcaataaga ttatcgacga gcgccttatt aacccagatg ggtcgctttt attccgtgtc 480
actattaatg gtgtcactgg ctggcgtttg tgcgaacgca tcctggcata ataataagaa 540
ttaatacgac tcactatagg gatctatcca ctactcctaa ggagactttt tatgaattat 600
ctatgcatta ct 612
<210> 7
<211> 644
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 7
tttactggta cagtttcagt gttcacattg gaggactttg taggggactg gcgccagaca 60
gcgggctaca accttgatca ggttctggag cagggaggtg taagttcact tttccagaat 120
ttgggtgtga gtgtcacccc gatccaacgt atcgtgcttt ccggagaaaa tgggctgaag 180
atcgacatcc atgttattat tccttatgaa gggcttagcg gagatcaaat gggccaaatc 240
gaaaagattt tcaaagtggt atatcctgtt gacgaccatc attttaaggt cattctgcat 300
tacggaactt tagtcatcga cggcgtcaca cctaacatga ttgactattt tggccgtccg 360
tatgagggca tcgcagtgtt tgacggaaaa aaaatcaccg tgacagggac actgtggaac 420
ggcaataaga ttatcgacga gcgccttatt aacccagatg ggtcgctttt attccgtgtc 480
actattaatg gtgtcactgg ctggcgtttg tgcgaacgca tcctggcata actagcataa 540
cccctctcta aacggagggg tttgaattaa tacgactcac tataggggtc ctccccccca 600
aaactacaat aaggggttt tttatgtcca ttcctggctt taat 644
<210> 8
<211> 629
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 8
tttactggta cagtttcagt gttcacattg gaggactttg taggggactg gcgccagaca 60
gcgggctaca accttgatca ggttctggag cagggaggtg taagttcact tttccagaat 120
ttgggtgtga gtgtcacccc gatccaacgt atcgtgcttt ccggagaaaa tgggctgaag 180
atcgacatcc atgttattat tccttatgaa gggcttagcg gagatcaaat gggccaaatc 240
gaaaagattt tcaaagtggt atatcctgtt gacgaccatc attttaaggt cattctgcat 300
tacggaactt tagtcatcga cggcgtcaca cctaacatga ttgactattt tggccgtccg 360
tatgagggca tcgcagtgtt tgacggaaaa aaaatcaccg tgacagggac actgtggaac 420
ggcaataaga ttatcgacga gcgccttatt aacccagatg ggtcgctttt attccgtgtc 480
actattaatg gtgtcactgg ctggcgtttg tgcgaacgca tcctggcata atgataatag 540
tttggtttga attaatacga ctcactatag gggtcctccc ccccaaaact acaataaggg 600
ggtttttat gtccattcct ggctttaat 629
<210> 9
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 9
gaattaatac gactcactat aggaattatc tatgcattac t 41
<210> 10
<211> 555
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 10
aacccttccg ccactaaagg gtcaattaag gaggtatata tggtgttcac attggaggac 60
tttgtagggg actggcgcca gacagcgggc tacaaccttg atcaggttct ggagcaggga 120
ggtgtaagtt cacttttcca gaatttgggt gtgagtgtca ccccgatcca acgtatcgtg 180
ctttccggag aaaatgggct gaagatcgac atccatgtta ttattcctta tgaagggctt 240
agcggagatc aaatgggcca aatcgaaaag attttcaaag tggtatatcc tgttgacgac 300
catcatttta aggtcattct gcattacgga actttagtca tcgacggcgt cacacctaac 360

atgattgact attttggccg tccgtatgag ggcatcgcag tgtttgacgg aaaaaaaatc 420
accgtgacag ggacactgtg gaacggcaat aagattatcg acgagcgcct tattaaccca 480
gatgggtcgc ttttattccg tgtcactatt aatggtgtca ctggctggcg tttgtgcgaa 540
cgcatcctgg cataa 555

<210> 11
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 11
gaattaatac gactcactat aggtccattc ctggctttaa t 41

<210> 12
<211> 590
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 12
tttactggta cagtttcaaa actgtaagcc cgtagaaagg actttcaaac aataagcggg 60
taaggaggta ttaaatggtg ttcacattgg aggactttgt aggggactgg cgccagacag 120
cgggctacaa ccttgatcag gttctggagc agggaggtgt aagttcactt ttccagaatt 180
tgggtgtgag tgtcaccccg atccaacgta tcgtgctttc cggagaaaat gggctgaaga 240
tcgacatcca tgttattatt ccttatgaag ggcttagcgg agatcaaatg ggccaaatcg 300
aaaagatttt caaagtggta tatcctgttg acgaccatca ttttaaggtc attctgcatt 360
acggaacttt agtcatcgac ggcgtcacac ctaacatgat tgactatttt ggccgtccgt 420
atgagggcat cgcagtgttt gacggaaaaa aaatcaccgt gacagggaca ctgtggaacg 480
gcaataagat tatcgacgag cgccttatta acccagatgg gtcgctttta ttccgtgtca 540
ctattaatgg tgtcactggc tggcgtttgt gcgaacgcat cctggcataa 590

<210> 13
<211> 394
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 13

gaattaatac gactcactat aggtgagtat ataggtagaa gaggtattgg aggtattgat 60
ggtgttcaca ttggaggact ttgtagggga ctggcgccag acagcgggct acaaccttga 120
tcaggttctg gagcagggag gtgtaagttc acttttccag aatttgggtg tgagtgtcac 180
cccgatccaa cgtatcgtgc tttccggaga aaatgggctg aagatcgaca tccatgttat 240
tattccttat gaagggctta gcggagatca aatgggccaa atcgaaaaga ttttcaaagt 300
ggtatatcct gttgacgacc atcattttaa ggtcattctg cattacggaa ctttagtcat 360
cgacggcggt ggcgggaatt atctatgcat tact 394

<210> 14
<211> 234
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 14

aacccttccg ccactaaagg cggtggggtc acacctaaca tgattgacta ttttggccgt 60
ccgtatgagg gcatcgcagt gtttgacgga aaaaaaatca ccgtgacagg gacactgtgg 120
aacggcaata agattatcga cgagcgcctt attaacccag atgggtcgct tttattccgt 180
gtcactatta atggtgtcac tggctggcgt ttgtgcgaac gcatcctggc ataa 234

<210> 15
<211> 394
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 15

gaattaatac gactcactat aggtgagtat ataggtagaa gaggtattgg aggtattgat 60
ggtgttcaca ttggaggact ttgtagggga ctggcgccag acagcgggct acaaccttga 120
tcaggttctg gagcagggag gtgtaagttc acttttccag aatttgggtg tgagtgtcac 180
cccgatccaa cgtatcgtgc tttccggaga aaatgggctg aagatcgaca tccatgttat 240
tattccttat gaagggctta gcggagatca aatgggccaa atcgaaaaga ttttcaaagt 300
ggtatatcct gttgacgacc atcattttaa ggtcattctg cattacggaa ctttagtcat 360
cgacggcggt ggcgggtcca ttcctggctt taat 394

<210> 16
<211> 234
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 16
tttactggta cagtttcagg cggtggggtc acacctaaca tgattgacta ttttggccgt 60
ccgtatgagg gcatcgcagt gtttgacgga aaaaaaatca ccgtgacagg gacactgtgg 120
aacggcaata agattatcga cgagcgcctt attaacccag atgggtcgct tttattccgt 180
gtcactatta atggtgtcac tggctggcgt ttgtgcgaac gcatcctggc ataa 234
<210> 17
<211> 367
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 17
gaattaatac gactcactat aggtgagtat ataggtagaa gaggtattgg aggtattgat 60
ggtgttcaca ttggaggact ttgtagggga ctggcgccag acagcgggct acaaccttga 120
tcaggttctg gagcagggag gtgtaagttc acttttccag aatttgggtg tgagtgtcac 180
cccgatccaa cgtatcgtgc tttccggaga aaatgggctg aagatcgaca tccatgttat 240
tattccttat gaagggctta gcggagatca aatgggccaa atcgaaaaga ttttcaaagt 300
ggtatatcct gttgacgacc atcattttaa ggtcattctg cattacggaa ctttagtcat 360
cgacggc 367
<210> 18
<211> 207
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多核苷酸
<400> 18
gtcacaccta acatgattga ctattttggc cgtccgtatg agggcatcgc agtgtttgac 60
ggaaaaaaaa tcaccgtgac agggacactg tggaacggca ataagattat cgacgagcgc 120
cttattaacc cagatgggtc gcttttattc cgtgtcacta ttaatggtgt cactggctgg 180
cgtttgtgcg aacgcatcct ggcataa 207
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
引物
<400> 19
ttatgccagg atgcgttcgc 20
<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 20
tttagtggcg gaagggttag taatgcatag ataatt 36
<210> 21
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 21
tgaaactgta ccagtaaaat taaagccagg aatgga 36
<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 22
aatcatgtta ggtgtgacgc cgtcgatgac taaagt 36
<210> 23
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸
<400> 23

uuuaguggcg gaaggguuag uaaugcauag auaauu 36

<210> 24

<211> 36

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸

<400> 24

uuuaguggcg gaaggguugg uaaugcauag auaauu 36

<210> 25

<211> 36

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸

<400> 25

uuuaguggcg gaaggguaag uaaugcauag auaauu 36

<210> 26

<211> 36

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸

<400> 26

uuuaguggcg gaagggugag uaaugcauag auaauu 36

<210> 27

<211> 36

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
寡核苷酸

<400> 27

uuuaguggcg gaaggguggg uaaugcauag auaauu 36

<210> 28

<211> 170

<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 未知的描述:
荧光素酶序列
<400> 28

Val Phe Thr Leu Arg Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala Gly
1 5 10 15
Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu Phe
20 25 30
Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu Ser
35 40 45
Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr Glu
50 55 60
Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys Val
65 70 75 80
Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr Gly
85 90 95
Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly
100 105 110
Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr Val
115 120 125
Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu Ile
130 135 140
Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val Thr
145 150 155 160
Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala
165 170

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 未知的描述:
翻译的蛋白序列
<400> 29

Ile Tyr Ala Leu Leu Thr Leu Pro Pro Leu Asn Asn
1 5 10

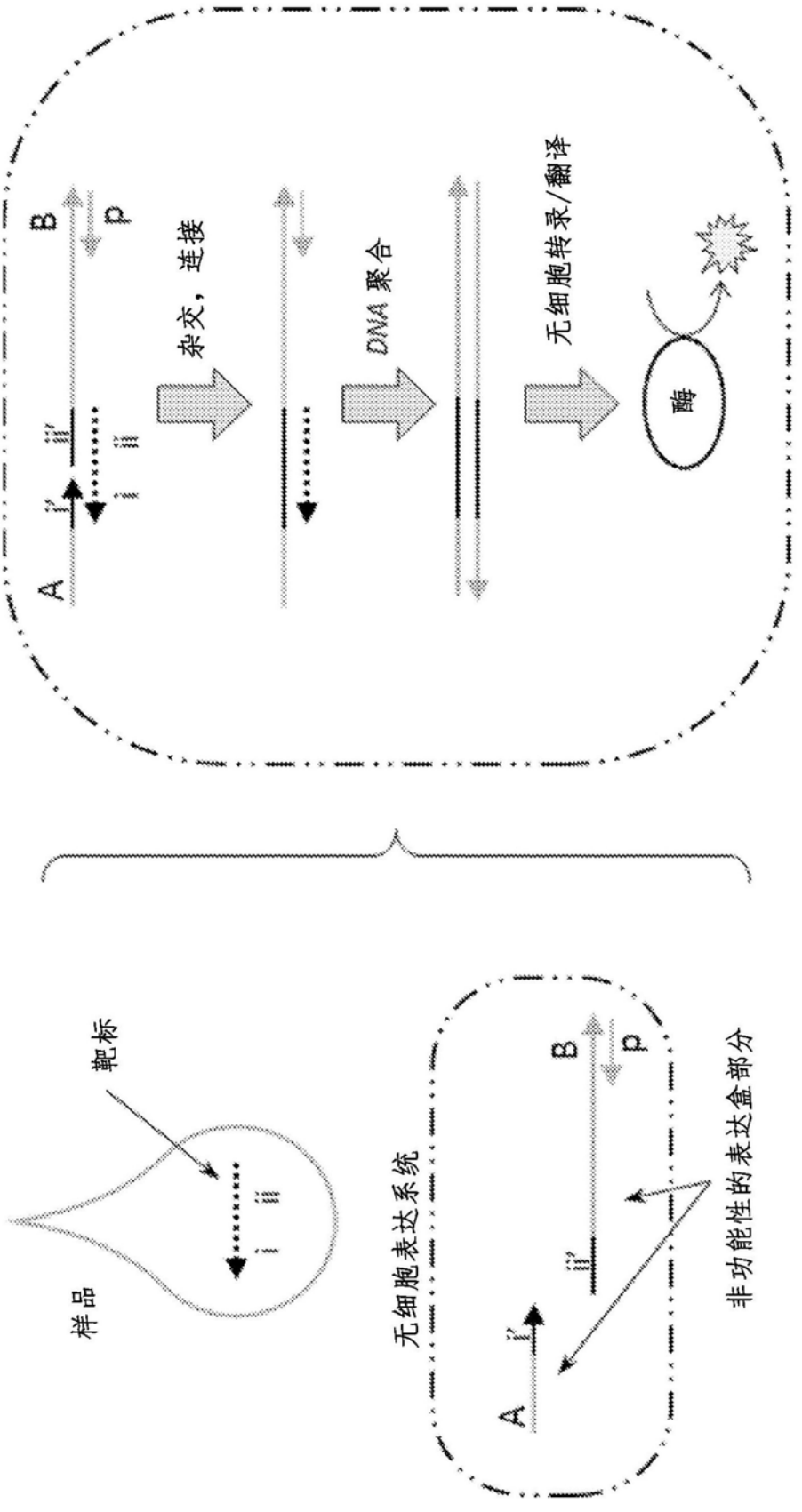


图1

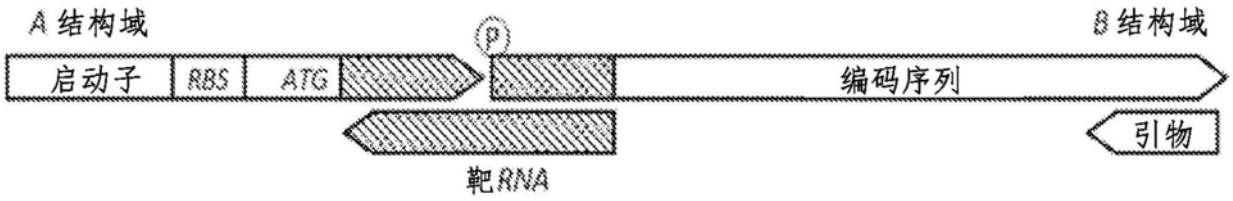


图2A

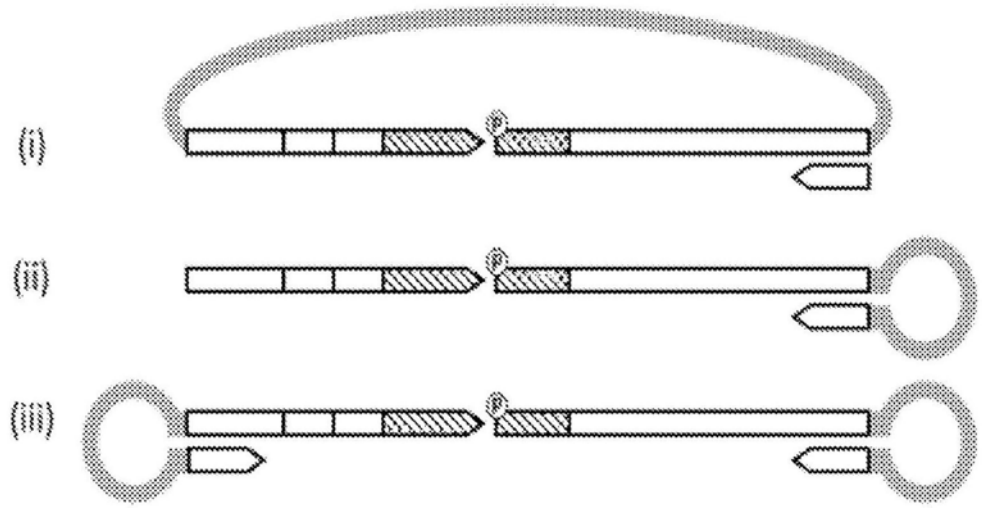


图2B

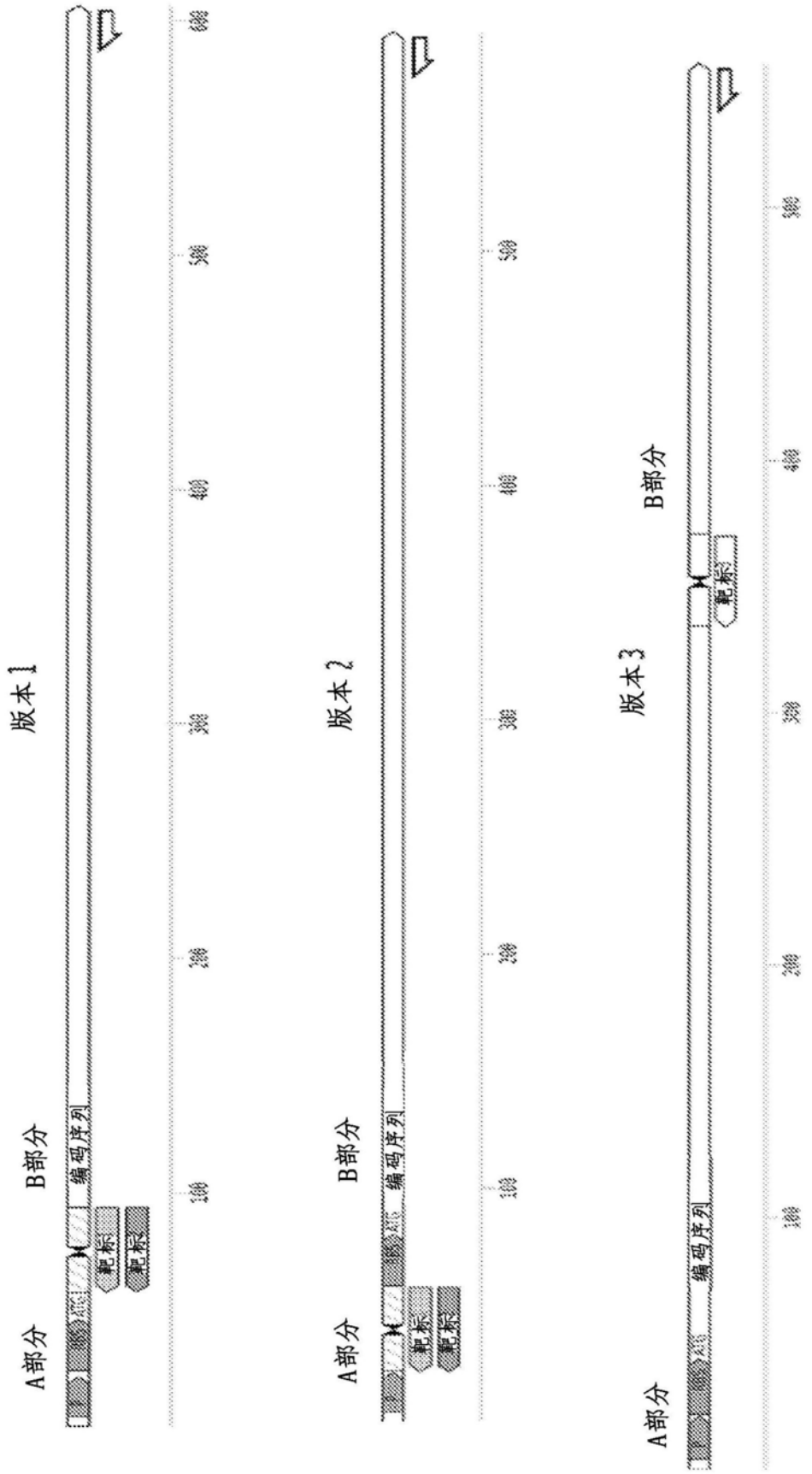

版本1
A部分
B部分
编码序列
起标
起标
100
200
300
400
版本2
A部分
B部分
编码序列
起标
起标
100
200
300
400
版本3
A部分
B部分
编码序列
起标
100
200
300
400

图3

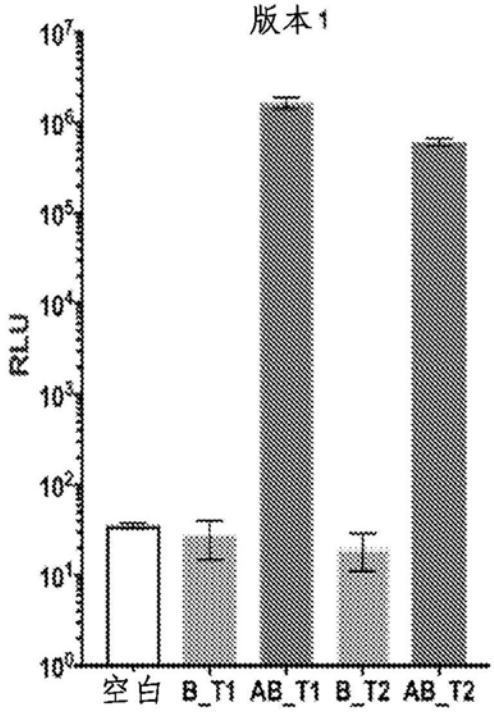

版本1
RLU
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
空白
B_T1
AB_T1
B_T2
AB_T2

图4A

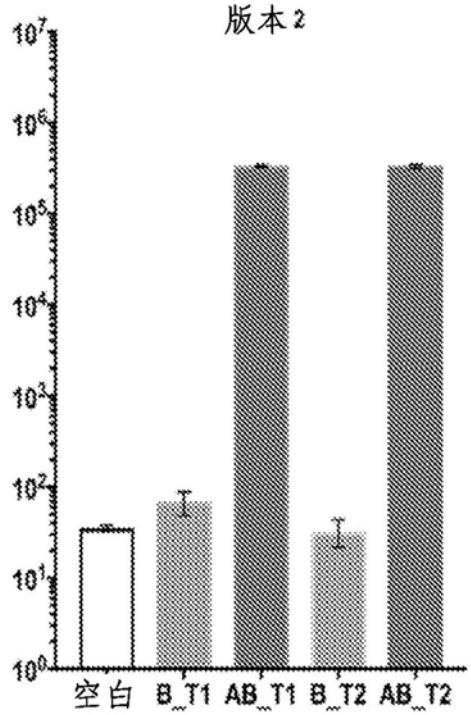

版本2
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
空白
B_T1
AB_T1
B_T2
AB_T2

图4B

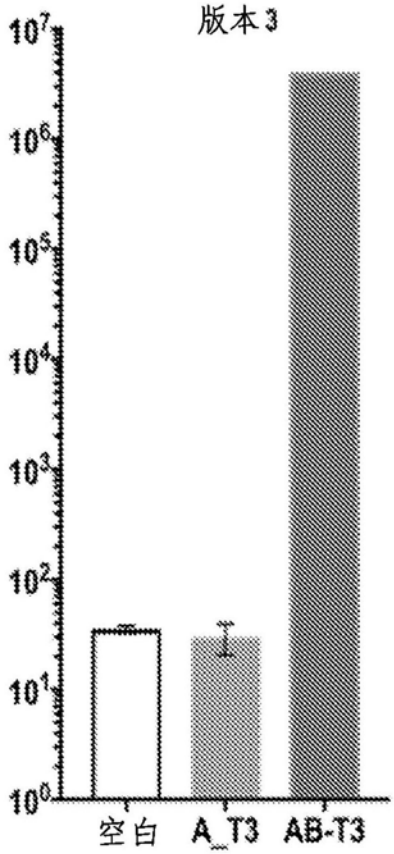


图4C

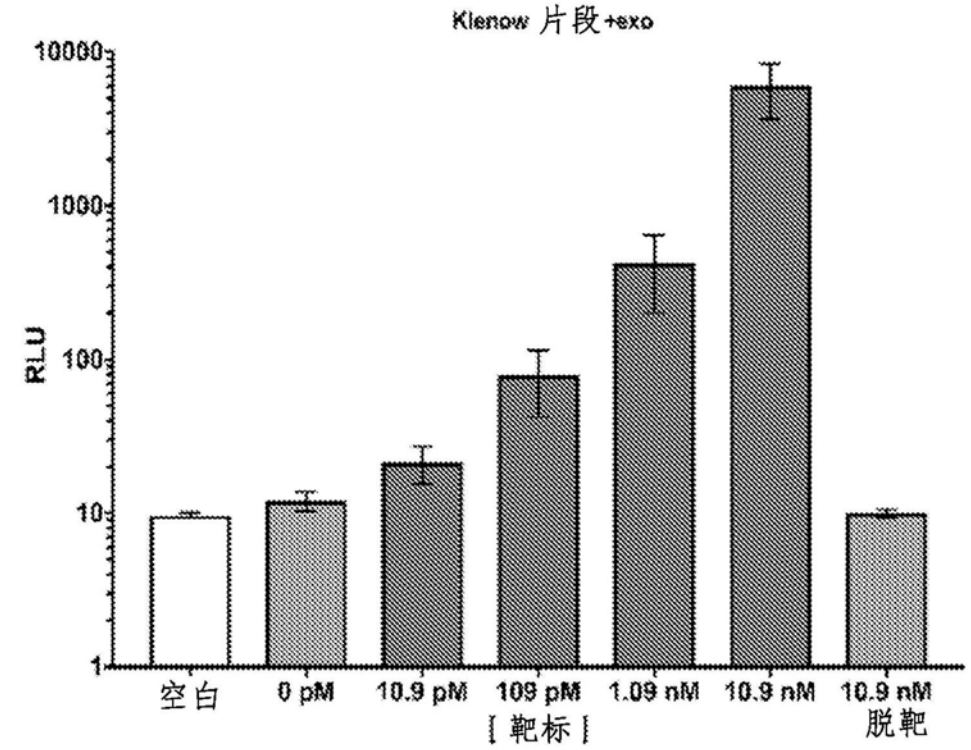

Klenow 片段+exo
RLU
10000
1000
100
10
1
空白
0 pM
10.9 pM
109 pM
1.09 nM
10.9 nM
10.9 nM
脱靶
[靶标]

图5A

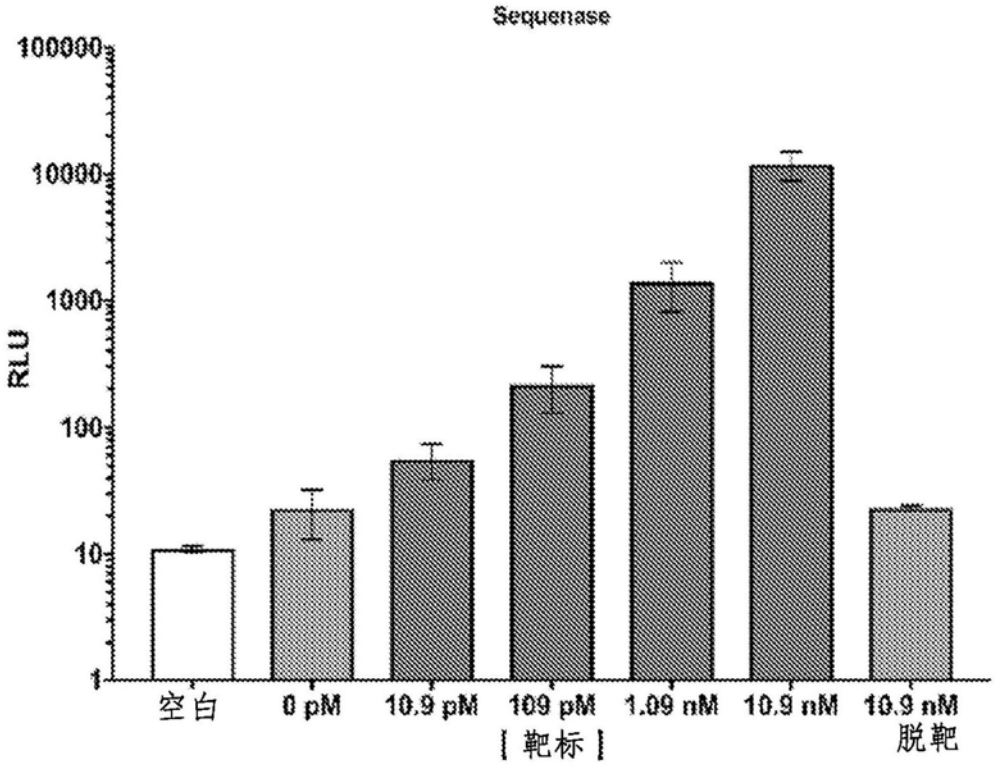

Sequenase
RLU
100000
10000
1000
100
10
1
空白
0 pM
10.9 pM
109 pM
1.09 nM
10.9 nM
10.9 nM
脱靶
[靶标]

图5B

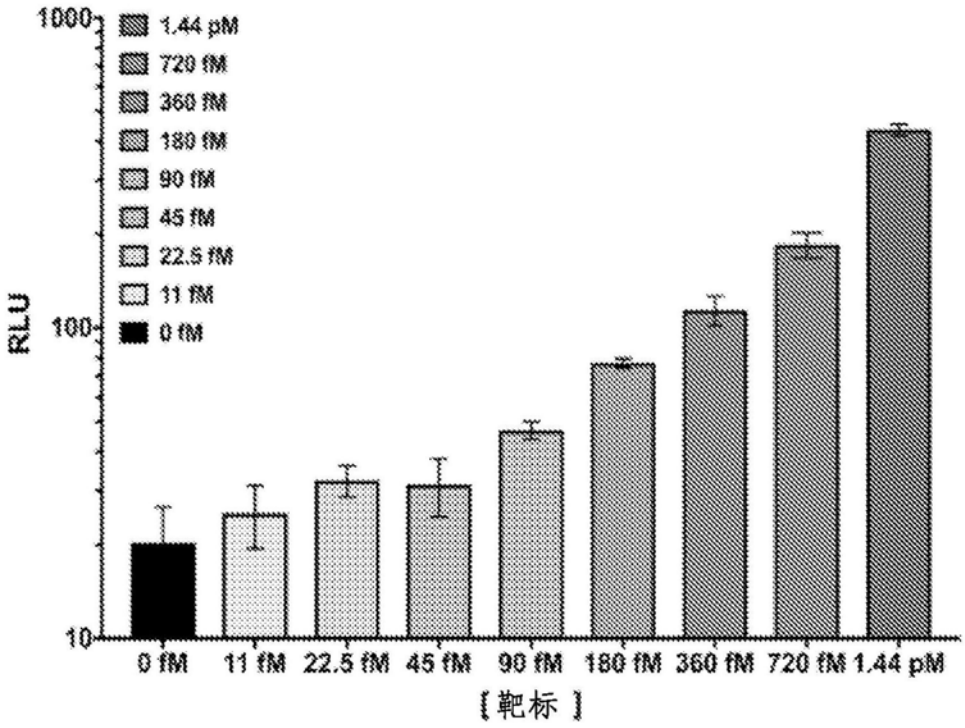

1000
100
10
RLU
1.44 pM
720 fM
360 fM
180 fM
90 fM
45 fM
22.5 fM
11 fM
0 fM
0 fM
11 fM
22.5 fM
45 fM
90 fM
180 fM
360 fM
720 fM
1.44 pM
[靶标]

图6

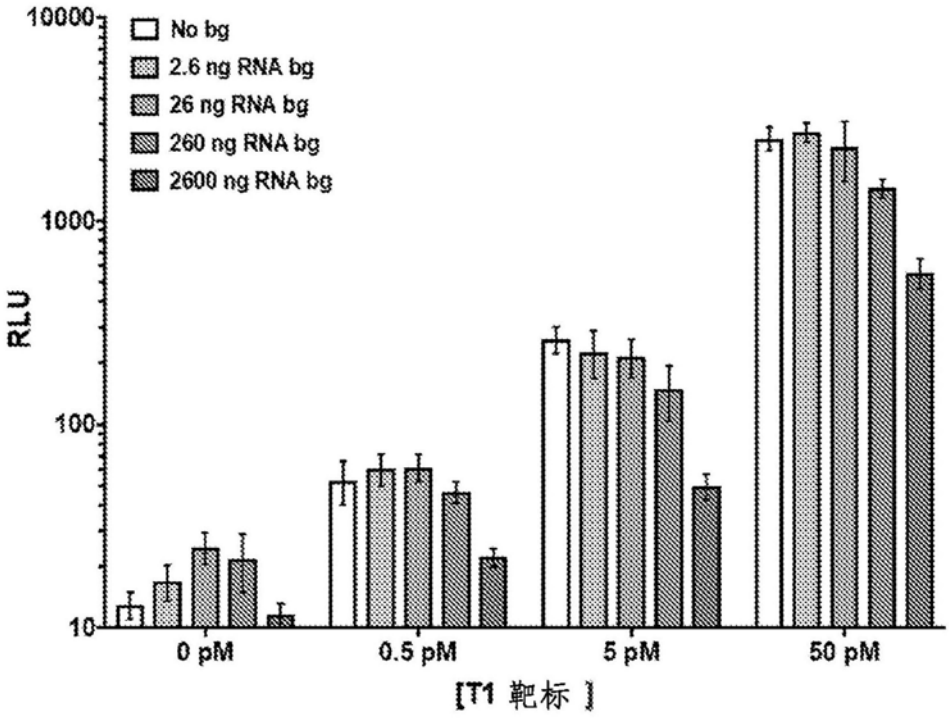

10000
1000
100
10
RLU
No bg
2.6 ng RNA bg
26 ng RNA bg
260 ng RNA bg
2600 ng RNA bg
0 pM
0.5 pM
5 pM
50 pM
[T1 靶标]

图7

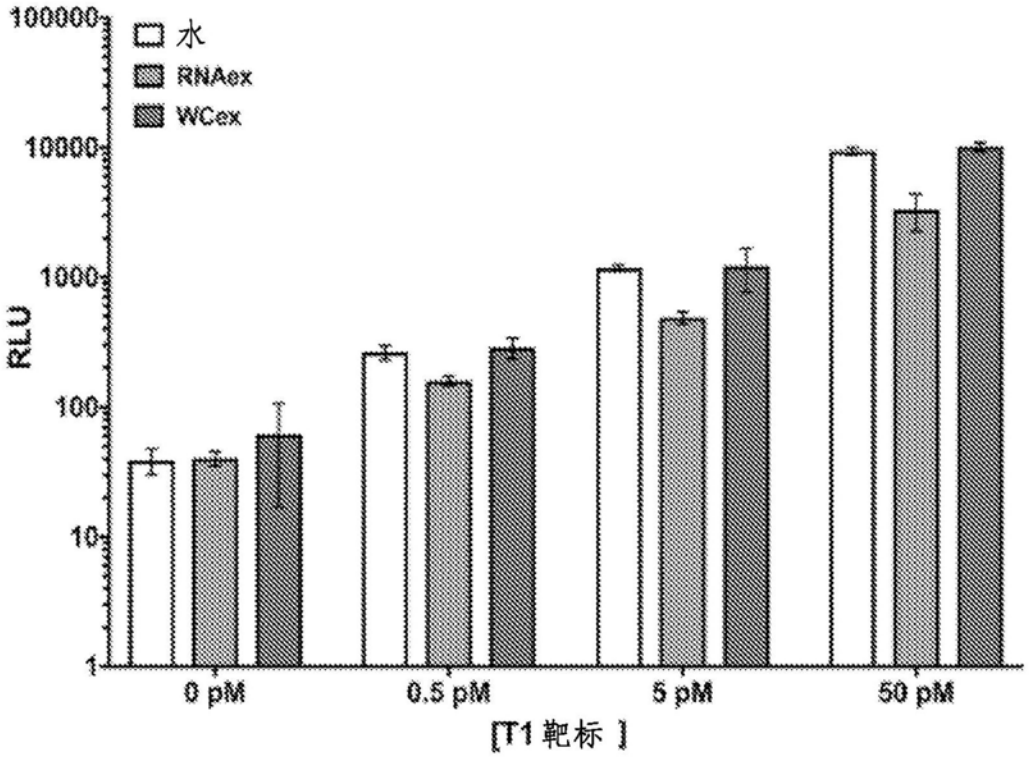

100000
10000
1000
100
10
1
RLU
水
RNAex
WCex
0 pM
0.5 pM
5 pM
50 pM
[T1 靶标]

图8

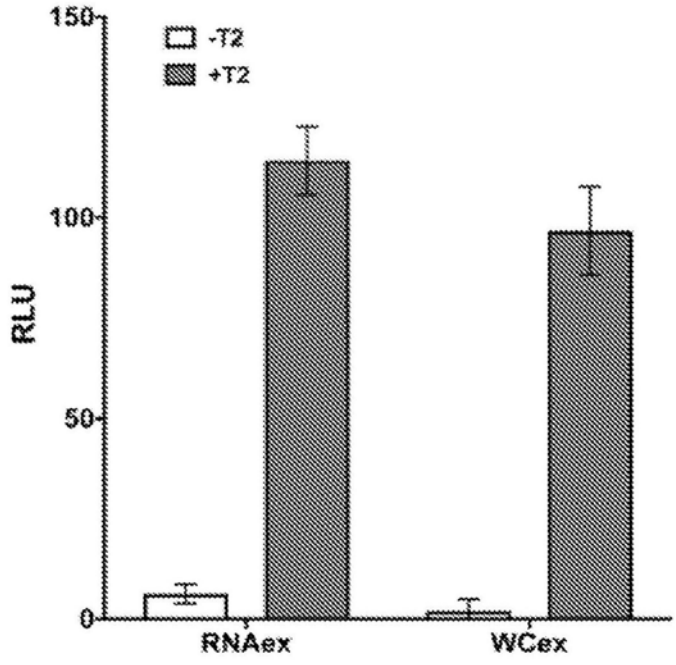

150
100
50
0
RLU
-T2
+T2
RNAex
WCex

图9

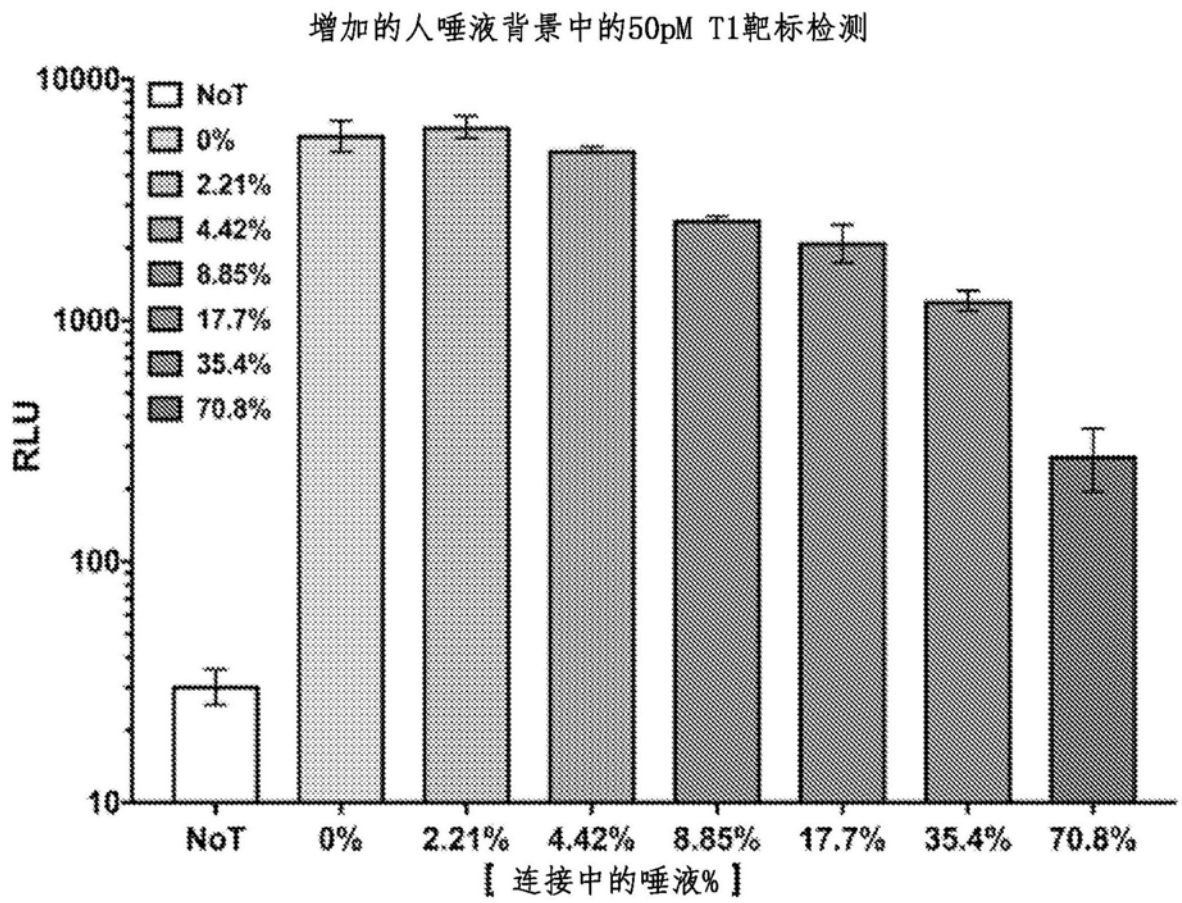

增加的人唾液背景中的50pM T1靶标检测
10000
1000
100
10
RLU
NoT
0%
2.21%
4.42%
8.85%
17.7%
35.4%
70.8%
NoT
0%
2.21%
4.42%
8.85%
17.7%
35.4%
70.8%
【连接中的唾液%】

图10

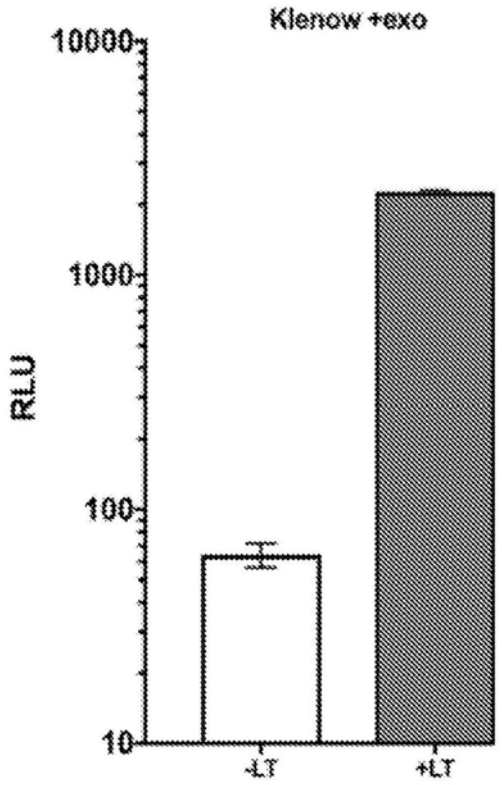

Klenow +exo
10000
1000
100
10
RLU
-LT
+LT

图11A

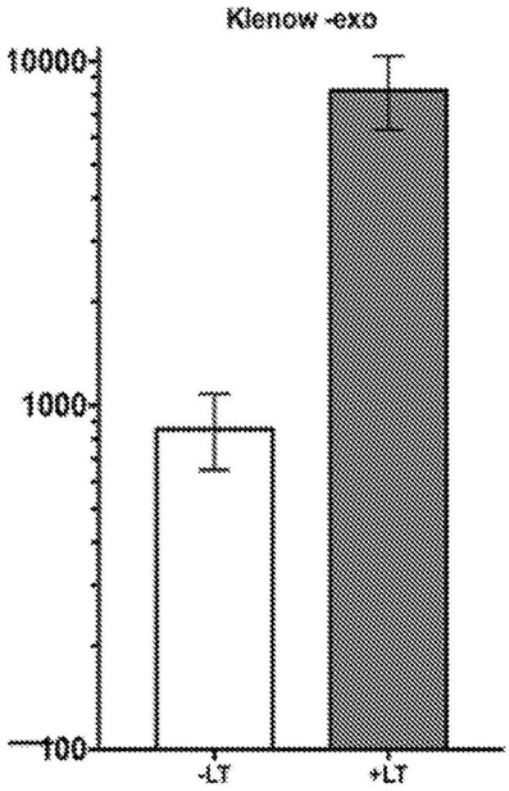

Klenow -exo
10000
1000
100
-LT
+LT

图11B

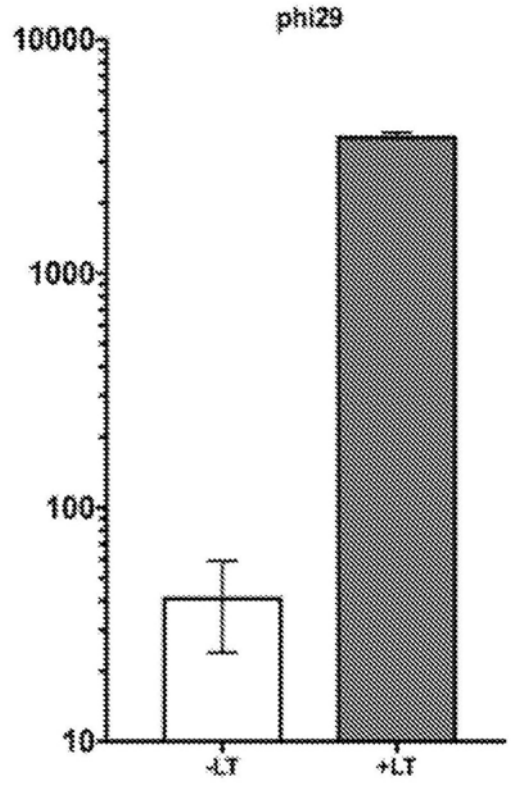

phi29
10000
1000
100
10
-LT
+LT

图11C

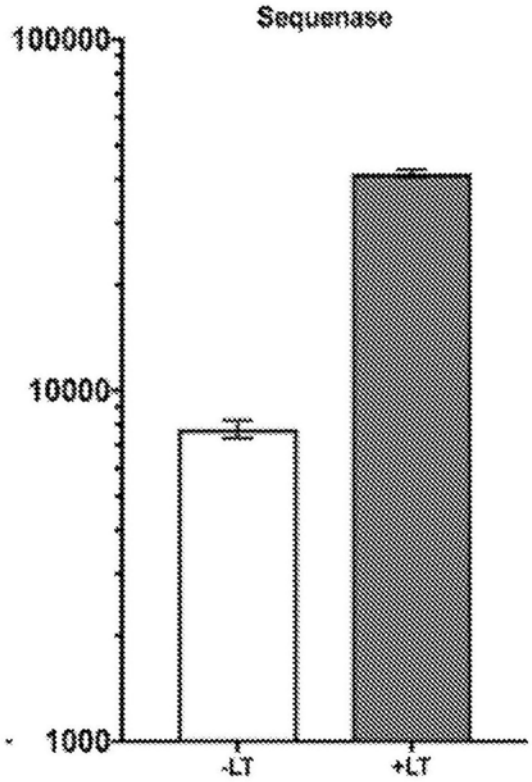

Sequenase
100000
10000
1000
-LT
+LT

图11D

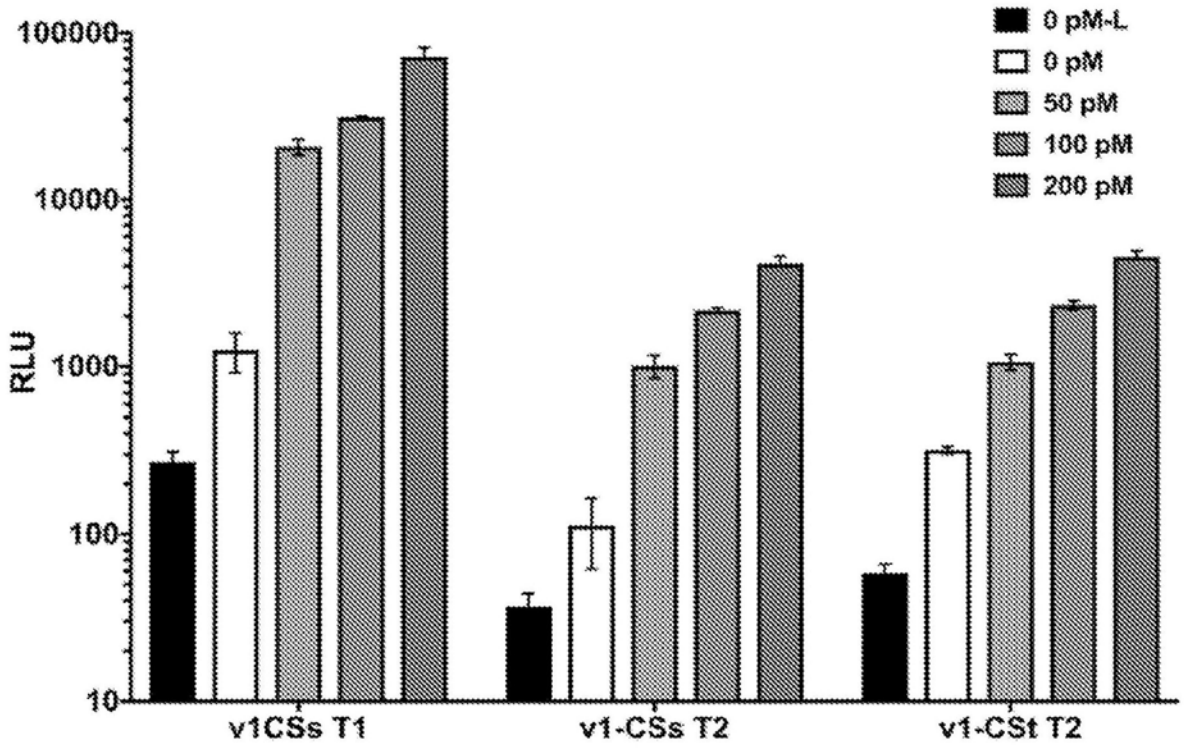

100000
10000
1000
100
10
RLU
0 pM-L
0 pM
50 pM
100 pM
200 pM
v1CSs T1
v1-CSs T2
v1-CSt T2

图12

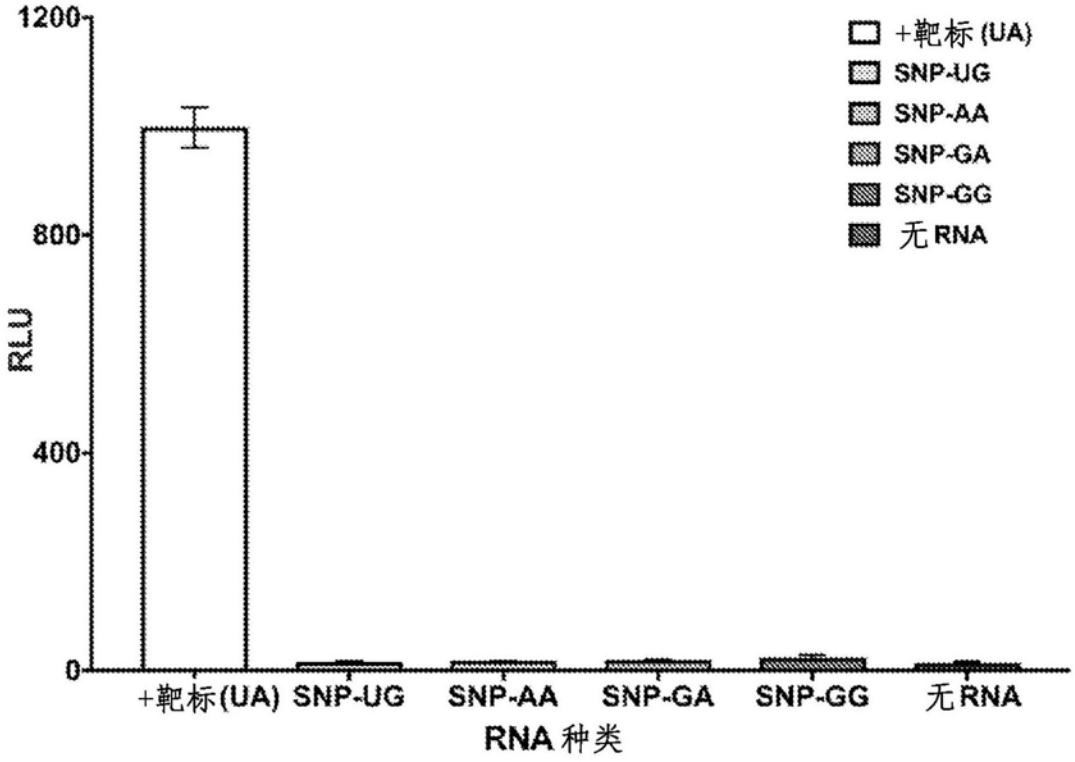

1200
800
400
0
RLU
+靶标 (UA)
SNP-UG
SNP-AA
SNP-GA
SNP-GG
无 RNA
+靶标(UA)
SNP-UG
SNP-AA
SNP-GA
SNP-GG
无RNA
RNA 种类

图13

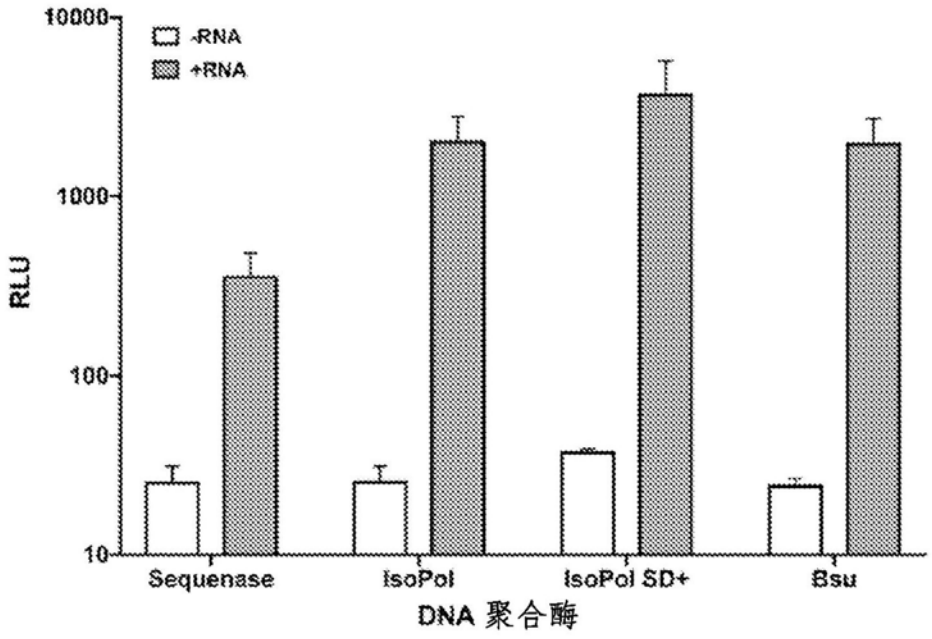

10000
1000
100
10
RLU
-RNA
+RNA
Sequenase
IsoPol
IsoPol SD+
Bsu
DNA 聚合酶

图14A

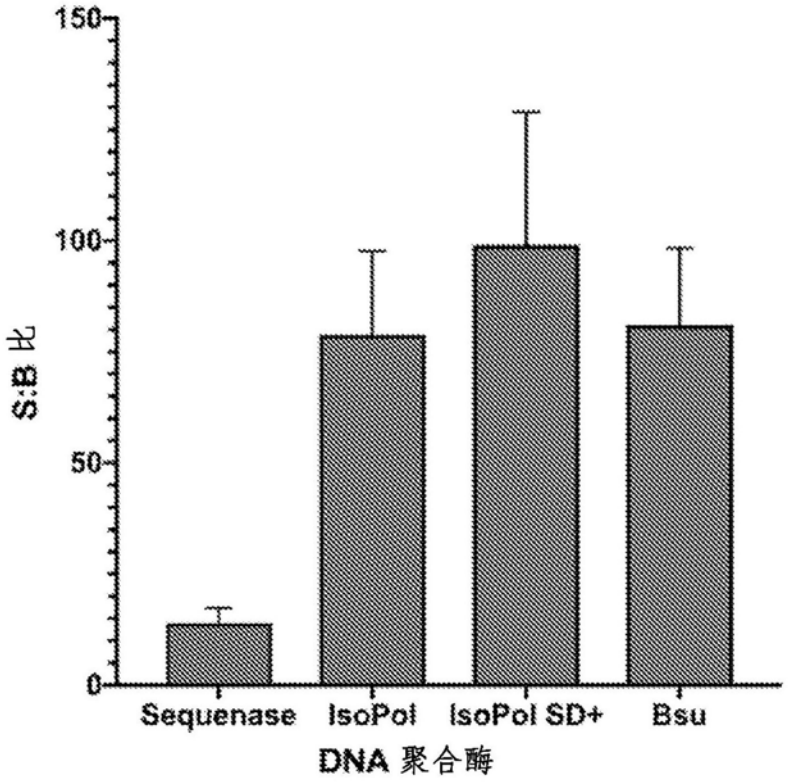

150
100
50
0
S:B 比
Sequenase
IsoPol
IsoPol SD+
Bsu
DNA 聚合酶

图14B

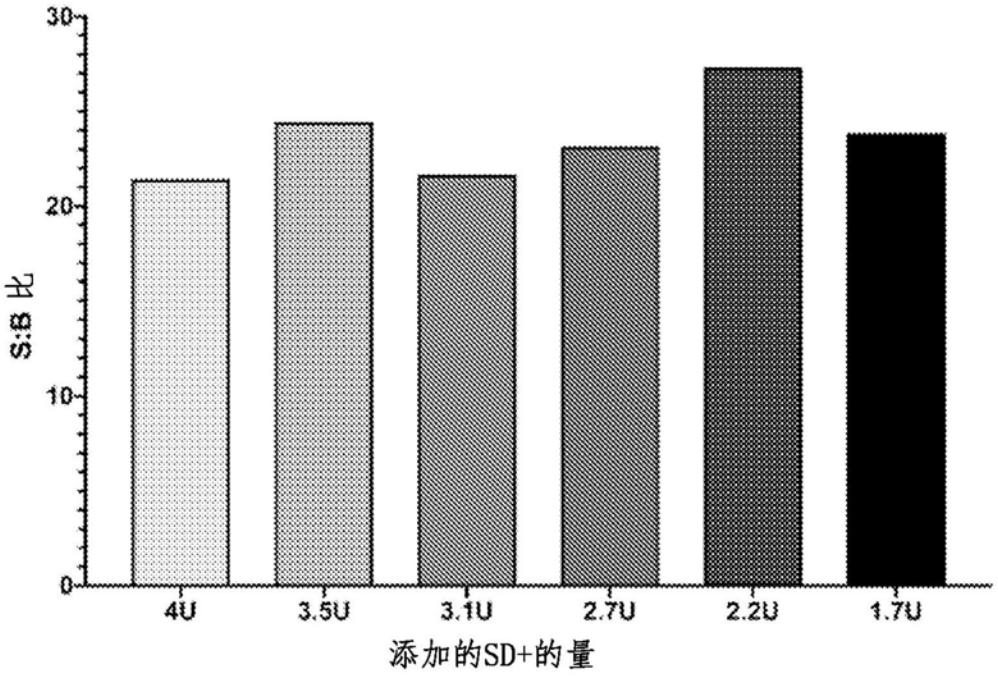

30
20
10
0
S:B 比
4U
3.5U
3.1U
2.7U
2.2U
1.7U
添加的SD+的量

图14C

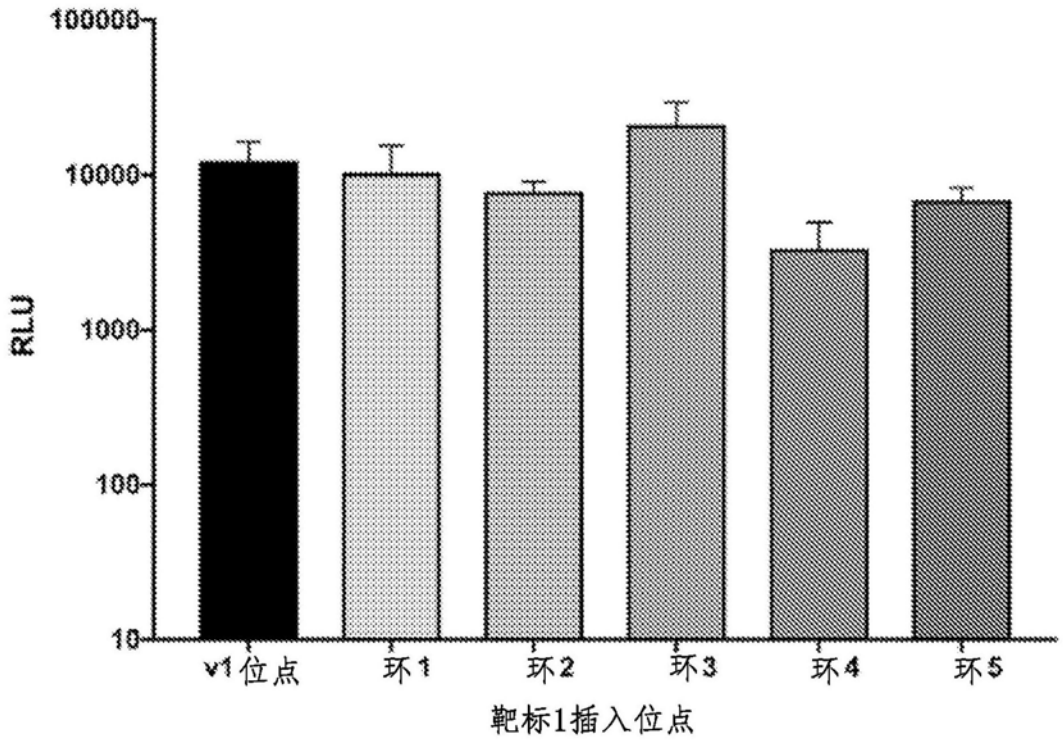

100000
10000
1000
100
10
RLU
v1位点
环1
环2
环3
环4
环5
靶标1插入位点

图15A

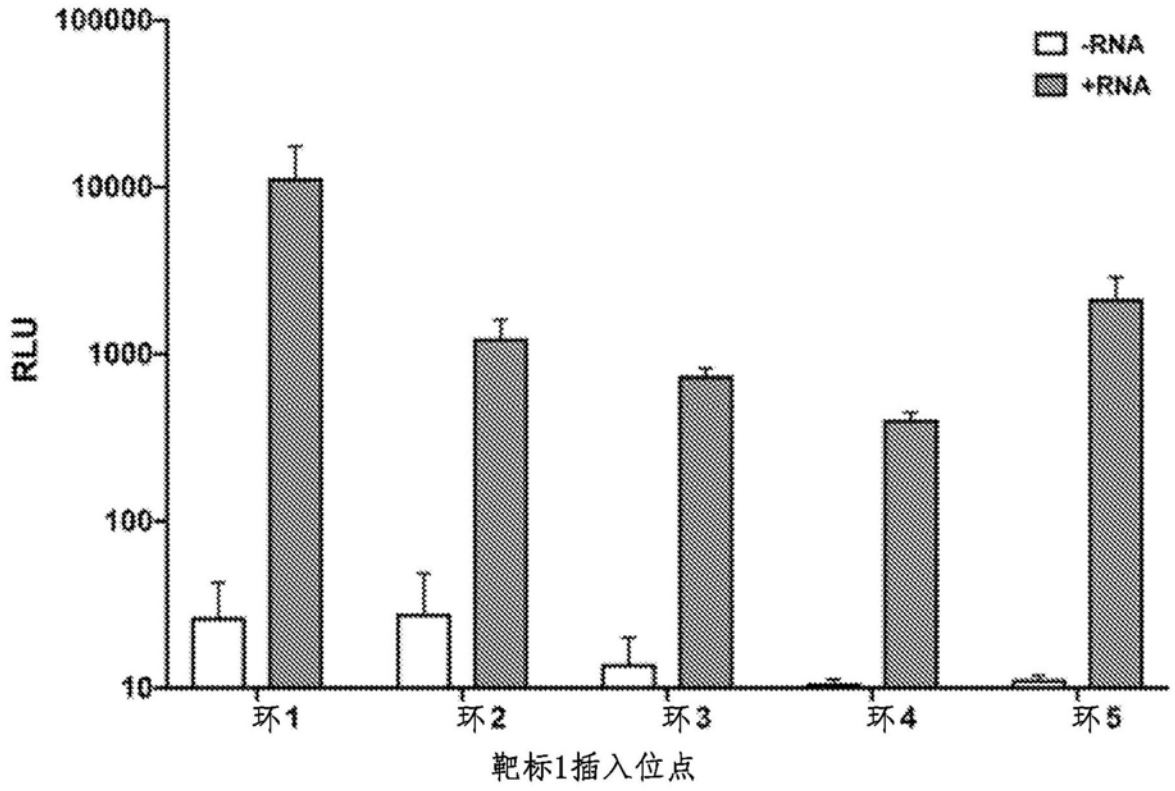

100000
10000
1000
100
10
RLU
-RNA
+RNA
环1
环2
环3
环4
环5
靶标1插入位点

图15B

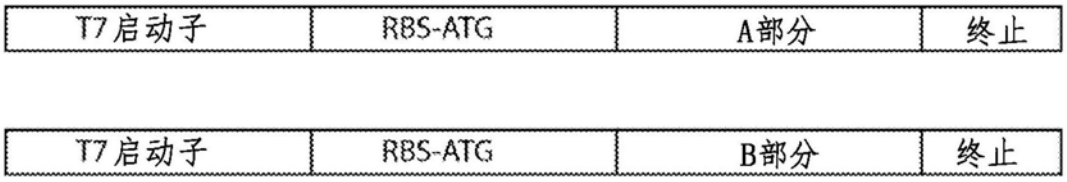

T7启动子
RBS-ATG
A部分
终止
T7启动子
RBS-ATG
B部分
终止

图16

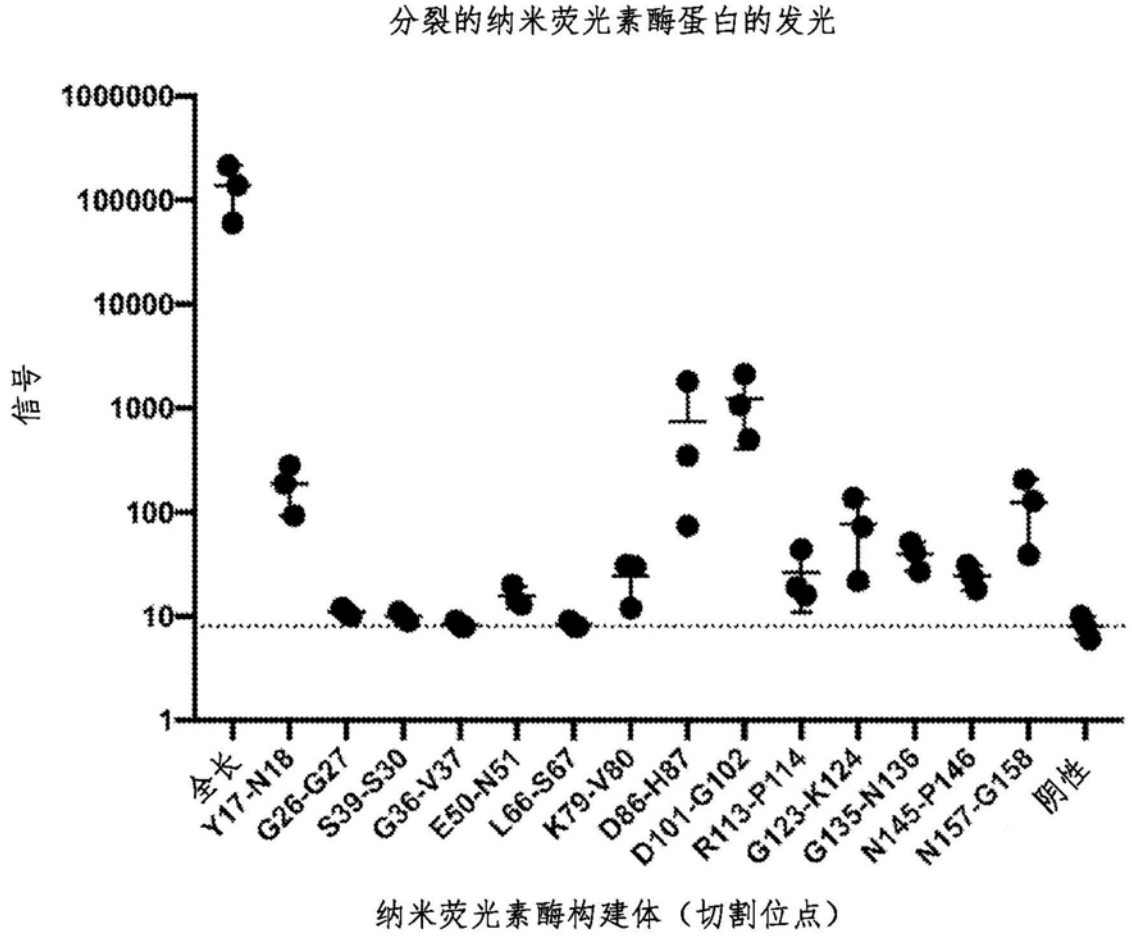

分裂的纳米荧光素酶蛋白的发光
信号
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
全长
Y17-N18
G26-G27
S39-S30
G36-V37
E50-N51
L66-S67
K79-V80
D86-H87
D101-G102
R113-P114
G123-K124
G135-N136
N145-P146
N157-G158
阴性
纳米荧光素酶构建体（切割位点）

图17