



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103154266 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201180034921.4

G01N 33/536 (2006.01)

(22) 申请日 2011.07.13

(30) 优先权数据

1011971.7 2010.07.15 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.01.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/061969 2011.07.13

(87) PCT申请的公布数据

W02012/007511 EN 2012.01.19

(71) 申请人 欧凌科公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 S·弗雷德里克松 B·特兰

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页 附图4页

(54) 发明名称

阻断试剂及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于探针的检测试验中作为阻断试剂的用途,其中使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的探针检测样品中的分析物。

1. 与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于探针的检测试验中作为阻断试剂的用途,所述的检测试验使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的探针来检测样品中的分析物。

2. 检测样品中分析物的方法,所述方法包括使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的探针,其中将与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物用作阻断试剂。

3. 根据权利要求1所述的用途,所述的用途为与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于邻位探针的检测试验中作为阻断试剂的用途,所述的检测试验使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的邻位探针来检测样品中的分析物。

4. 根据权利要求2所述的方法,所述的方法为检测样品中分析物的方法,所述方法包括使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的邻位探针,其中将与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物用作阻断试剂。

5. 根据权利要求1或2所述的用途或方法,其中所述检测试验或检测方法为免疫-PCR或免疫-RCA。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂过量于探针使用。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的非分析物特异性结合蛋白成分为血清蛋白或链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白,或其修饰物、衍生物或变体,或其组合。

8. 根据权利要求7所述的用途或方法,其中所述血清蛋白成分可以为单一特异性类型的血清蛋白,或可以包括多种不同的血清蛋白。

9. 根据权利要求7或8所述的用途或方法,其中所述血清蛋白成分为球蛋白和/或白蛋白。

10. 根据权利要求9所述的用途或方法,其中所述球蛋白为血清球蛋白。

11. 根据权利要求10所述的用途或方法,其中所述血清球蛋白包括至少70%的 $\gamma$ -球蛋白。

12. 根据权利要求11所述的用途或方法,其中所述的 $\gamma$ -球蛋白为免疫球蛋白,优选为IgG。

13. 根据权利要求12所述的用途或方法,其中所述IgG为大批的IgG。

14. 根据权利要求9所述的用途或方法,其中所述白蛋白为血清白蛋白。

15. 根据权利要求14所述的用途或方法,其中所述血清白蛋白为不同血清白蛋白的组合。

16. 根据权利要求7至15中任一项所述的用途或方法,其中所述血清蛋白与邻位探针的蛋白质靶分析物结合结构域来自相同的物种。

17. 根据权利要求7所述的用途或方法,其中所述链酶亲和素样蛋白为与链酶亲和素或其修饰物、衍生物或变体具有相似结构和/或功能特性的蛋白。

18. 根据权利要求7或17所述的用途或方法,其中所述链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白,或其修饰物、衍生物或变体选自链酶亲和素、NeutrAvidin®、Extravidin®、和NeutraLite®。

19. 根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域为自体的。

20. 根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域为异体的。

21. 根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域与探针、夹板的核酸结构域或试验中使用的其它寡核苷酸或与用于检测邻位探针之间的相互作用的任意核酸的序列同源性小于 80%。

22. 根据权利要求 1 至 21 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域包括一个或多个随机生成的核酸序列。

23. 根据权利要求 1 至 22 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域包括至少 8 个核苷酸。

24. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的用途或方法,其中所述阻断试剂的核酸结构域包括单链 DNA。

25. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的用途或方法,其中所述非分析物特异性结合蛋白通过共价键与核酸偶联。

26. 根据权利要求 25 所述的用途或方法,其中所述共价键为化学交联。

27. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的用途或方法,其中所述非分析物特异性结合蛋白通过非共价缔合与核酸偶联。

28. 根据权利要求 27 所述的用途或方法,其中所述非共价缔合是通过基于链酶亲和素-生物素的偶联的。

29. 根据权利要求 1 至 28 中任一项所述的用途或方法,其中用于偶联非分析物特异性结合蛋白成分和阻断试剂的核酸结构域的连接子与偶联探针或多种探针的核酸结构域和蛋白质分析物结合结构域的连接子相同。

30. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述方法包括:

(a) 将所述样品与权利要求 4 至 29 中任一项所定义的阻断试剂接触;

(b) 进一步将所述样品与至少一组至少第一和第二邻位探针接触,其中所述探针分别包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域,并且能够同时结合于分析物;

(c) 当所述邻位探针与所述分析物结合后,允许邻位探针的核酸结构域彼此相互作用,其中所述相互作用包括连接反应或延伸反应;和

(d) 检测所述连接或延伸。

31. 用于检测样品中分析物的方法的试剂盒,所述试剂盒包括:

(a) 阻断试剂,其包括与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白;和

(b) 至少一组探针,其中组中的每个探针包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域。

32. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述试剂盒包括:

(a) 阻断试剂,其包括与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白;

(b) 至少一组的至少第一和第二邻位探针,其中每组中的至少一个探针,更优选的其中每个探针均包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域,其中每个探针组中的每个探针能够同时结合于分析物;

(c) 任选地,用于介导所述第一和第二邻位探针的核酸之间的相互作用的部件;和

(d) 任选地,检测所述相互作用的部件。

33. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括:

(c) 用于使所述探针的核酸结构域相互作用以产生可检测的信号的部分,优选地,其中所述可检测的信号为核酸分子;和

(d) 任选地,用于检测所述可检测的信号的部分。

34. 根据权利要求 31 至 33 中任一项所述的试剂盒,其中所述阻断试剂为权利要求 6 至 29 中任一项所定义的。

35. 制备阻断试剂的方法,包括:

(a) 从血液中提取血清蛋白;

(b) 制备核酸;和

(c) 将(a)中的蛋白与(b)中的核酸偶联,

其中所述血清蛋白包括多种不同的血清蛋白,并且对基于探针检测试验的靶分析物具有较低的结合亲和力或无结合亲和力。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中步骤(a)的血清蛋白为如权利要求 9 至 16 中任一项所定义的,步骤(b)的核酸为如权利要求 19 至 24 中任一项所定义的,以及步骤(c)的偶联为如权利要求 25 至 29 中任一项所定义的。

37. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述血清蛋白为大批的 IgG。

38. 通过权利要求 35 至 37 中任一项所述的方法获得的或通过权利要求 35 至 37 中任一项所述的方法可获得的阻断试剂。

## 阻断试剂及其使用方法

[0001] 本发明涉及用于样品中分析物的基于邻位探针的检测试验(“邻位试验”),特别涉及该方法的改进以降低复杂的生物样品中出现的非特异性“背景”信号。所述改进包括提供用于该试验的新阻断试剂。设计阻断试剂使其紧密类似(“模拟”)邻位探针的结构。将过量阻断试剂加入样品中以占据该样品中能够非特异性地结合邻位探针的所有或几乎所有结合位点。因此,在本发明中,所述阻断试剂的可观察到的效果相当于实现样品的复杂性降低而不显著降低存在于样品中的分析物的浓度或量,从而提高试验的特异性和灵敏度。本发明还提供了阻断试剂,包括所述阻断试剂的试剂盒和用于制备所述阻断试剂的方法。

[0002] 邻位试验依赖“邻位探测”的原理,其中通过结合多个(即两个或多个,通常两个或三个)探针来检测分析物,所述的探针当通过结合分析物到达邻位(因此为“邻位探针”)时,使得信号生成。一般地,邻位探针的至少一个包括核酸结构域(或者部分),所述的核酸结构域(或者部分)连接于该探针的分析物结合结构域(或部分),并且信号的生成涉及该核酸部分和/或其它探针(或多个探针)携带的另一个功能部分之间的相互作用。因此信号生成依赖探针之间的相互作用(更具体地通过所述的核酸或其所携带的其它功能部分/结构域),因此所述的信号仅当必要的两个(或多个)探针都结合于分析物时才会出现,从而使检测系统的特异性提高。近年来发展了邻位探测的概念,并且现在基于该原理的许多试验在本领域是熟知的。例如,邻位连接试验(PLA)依赖邻位探针与分析物的邻位结合,从而从连接反应产生信号,所述的连接反应涉及到邻位试验的核酸结构域或者由所述邻位试验的核酸结构域介导(例如,在其之间和/或通过其作为模板)。

[0003] 因此,在邻位试验中可以使用邻位探针,所述的邻位探针结合于分析物并具有核酸结构域或部分,所述核酸结构域或部分在所述分析物结合后以邻位依赖方式相互作用,以形成可检测的、优选可扩增的核酸检测产物,可以借助所述核酸检测产物检测所述分析物,所述的相互作用通常通过连接进行。

[0004] 基于检测试验的邻位探针,特别是邻位连接试验通过将该分析物的存在转化为容易地可检测的或可定量的基于核酸的信号,从而允许灵敏地、快速地和便利地检测或定量样品中的一种或多种分析物,并且能够均质的或异质的形式进行。

[0005] 本领域的邻位探针通常成对地使用,并且分别由对靶分析物具有特异性的分析物结合结构域和与其偶联的功能结构域构成,所述的功能结构域例如为核酸结构域。所述的分析物结合结构域可以是例如核酸“适体”(Fredriksson 等人 (2002) *Nat Biotech* 20:473-477) 或可以是蛋白质的,如单克隆或多克隆抗体(Gullberg 等人 (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8420-8424)。每个邻位探针对的各自的分析物结合结构域可以对分析物上的不同结合位点具有特异性,所述分析物可以由单个的分子或相互作用的分子的复合物构成,或例如在靶分析物作为多聚体存在的情况下可以具有相同的特异性。当邻位探针对彼此紧密相邻时,这主要当两者结合于相同的分析物上的其各自的位点时发生,功能结构域(例如核酸结构域)能够相互作用,例如,核酸结构域通常可以通过连接反应连接,从而形成新的核酸序列,其中所述的新的核酸序列可以被加入反应中的夹板(splint)寡核苷酸作为模板,所述夹板寡核苷酸含有与邻位探针对的各自核酸结构域末端

互补的区域。借此生成的新核酸序列用于报告样品中分析物的存在或量，并可以定性地或定量地对其进行检测，例如通过实时、定量 PCR (q-PCR)。

[0006] 另外，当邻近时，邻位探针的核酸结构域可以在一个或多个加入的寡核苷酸的相互连接时作为模板而不是彼此连接，所述的相互连接包括使加入的线性寡核苷酸成圆形的分子内连接，例如基于所谓的锁式 (padlock) 探针原理，其中类似于锁式探针的是，加入的线性寡核苷酸的末端通过杂交至模板而并列，以进行连接，在本文中为邻位探针的核酸结构域(在锁式探针的情况下为探针的靶核酸)。各种该试验的形式描述于 W001/61037 中。

[0007] W097/00446 和 US6, 511, 809 公开了邻位连接试验的不同形式，即首先借助特异性分析物结合试剂将分析物固定于固体基质。

[0008] 相同的邻位连接试验(即，在溶液中的)公开于 W001/61037、W003/044231、W02005/123963、Fredriksson 等人 (2002) Nat Biotech20:473-477 和 Gullberg 等人 (2004) Proc Natl Acad Sci USA101:8420-8424 中。

[0009] 虽然通常使用邻位探针对，但在例如 W001/61037 和 W02005/12963 中描述了邻位探针检测试验的改变，其中使用三个邻位探针检测单个分析物分子，第三探针的核酸结构域具有两个游离末端，所述游离末端可以结合(连接)于第一和第二探针的核酸结构域各自的游离末端，从而夹在其间。在该实施方案中，需要两种夹板寡核苷酸对第一和第二探针的每个核酸结构域与第三探针的核酸结构域的连接进行模板化。

[0010] 在 W02007/107743 描述的其它改变中，为两个邻位探针的核酸结构域的连接作为模板的夹板寡核苷酸携带于第三邻位探针上。

[0011] 不是所有邻位试验均基于连接。W02007/044903 公开了用于检测分析物的基于邻位探针的试验，所述的试验依赖于释放的核酸切割产物的形成和检测。某些描述的实施方案涉及包括分析物结合部分和连接的酶的探针，所述酶作用于连接于第二探针的分析物结合部分的核酸部分，导致释放可检测的核酸切割产物。

[0012] 分析物检测试验，在某些实施方案中包括邻位探针样试剂，其中连接于一个探针的分析物结合部分的聚合酶作用于连接于第二探针的分析物结合部分的核酸部分，如 W02009/012220 所描述的。在这些试验中，作为探针对的一个探针的部分的“锚定的 (tethered)”聚合酶的作用导致游离在溶液中的模板的生成，所述模板通过加入的聚合酶而易于扩增。与锚定的聚合酶不同，加入的聚合酶仅能够作用于由所述的锚定聚合酶生成的模板，并且不直接作用于探针对的不含聚合酶的探针的核酸部分。根据邻位探测原理，加入的聚合酶的作用导致所生成模板的扩增，扩增的拷贝是可检测的并指示样品中分析物的存在。

[0013] 除了邻位探针检测试验的变化，还描述了邻位探针自身的结构的变化，例如在 W003/044231 中使用了多价邻位探针。该多价邻位探针包括至少两个，最多 100 个分析物结合结构域，所述分析物结合结构域缀合于至少一个，优选地多于一个核酸(或多个核酸)。

[0014] 在许多不同的应用中，已证明基于邻位探针的检测试验，特别是邻位连接试验在特异性和灵敏地检测蛋白，例如弱表达或低丰度蛋白的检测中非常有用。然而，该试验在试验的灵敏度和特异性方面并非没有问题，并且存在改进空间。

[0015] 如上所述的，传统邻位试验，例如邻位连接试验的灵敏度受限于两个主要因素：(i) 分析物结合结构域对靶分析物的亲和力和(ii) 由未结合的探针特别是探针对的随机

邻位产生的非特异性背景信号。使用具有对分析物亲和力高的结合结构域的探针,灵敏度限于检测约 6000 个分子。习惯上,为了实现低水平的背景,必须使用浓度非常低的邻位探针。这排除了通过使用浓度更高的探针来补偿包含低亲和分析物结合结构域的探针的任何尝试。因此发现这可以限制试验的灵敏度和能够得到定量结果的范围。

[0016] 提出了其它用于降低非特异性背景信号的方法,如将夹板寡核苷酸偶联于第三邻位探针和 / 或使用阻断寡核苷酸,所述阻断寡核苷酸结合于邻位探针上的核酸结构域的游离末端,直到被夹板寡核苷酸置换。仅当邻位探针结合于靶分析物时才容易发生置换 (W02007/107743)。其它降低背景信号的方法集中于改进对连接的核酸的检测。

[0017] 然而,仍然有空间来改进背景信号的水平,并且为了克服邻位试验的限制,特别是如上所述的本领域已知的邻位连接试验,目前已发现使用类似邻位探针结构的阻断试剂可显著提高试验的灵敏度和特异性。优选地,本发明的阻断试剂在加入邻位探针之前与样品接触。通过占据样品中能够非特异性结合于试验中使用的邻位探针、分析物或其它成分的一些或所有位点,可能降低存在于试验中的非特异性背景信号。

[0018] 虽然使用试剂占据非特异性结合位点在用于检测样品中的分析物的方法中是熟知的,但是与上述阻断试剂相比,本发明的阻断试剂的性质提供独特且出乎意料的优势。

[0019] 通常,阻断试剂是基于相对惰性和稳定的分子进行选择的,所述分子不干扰上述讨论的检测试验的机制,但该分子会非特异性地和均一地结合于试验样品中的位点,所述的位点否则会结合结合分析物或探针。标准阻断试剂,如免疫试验中所使用那些,从丰富的到普通的蛋白,例如 BSA、奶粉、酪蛋白、明胶,和中性去污剂,例如 CHAPS、Triton X-100、Tween-20,到中性聚合物,例如聚乙烯醇。在涉及核酸的试验中,通常使用片段化的核酸阻断非特异性结合位点,所述的片段化的核酸例如经声处理的鲑鱼精 DNA、聚 -A RNA。此外,已知这些分子的组合可以用于降低试验中的非特异性背景信号。

[0020] 然而,本发明的阻断试剂依赖于当阻断蛋白缀合或偶联于核酸时所见的优良的阻断作用。特别地,所述阻断试剂的蛋白成分是对分析物具有非常低的或优选地无特异性结合亲和力的蛋白,即非分析物特异性结合蛋白或非分析物特异性蛋白。在本发明的优选方面中,选择阻断试剂的蛋白成分以模拟邻位探针的蛋白质分析物结合结构域或使其与邻位探针的蛋白质分析物结合结构域类似。作为选择地或此外地,阻断蛋白可以与存在于邻位探针中的另一种蛋白或蛋白部分类似,例如链酶亲和素或邻位探针中使用的类似蛋白以使探针的分析物结合结构域与核酸结构域结合。因此,可以看出阻断试剂为蛋白-核酸缀合物,并且其以该方式模拟或与邻位探针类似,所述阻断试剂自身为蛋白缀合物(或蛋白质分子)(例如分析物结合结构域)和核酸。这两个试剂的偶联导致了在基于邻位探针的试验中非特异性背景信号更好地降低。如实施例更加详细地显示的,本发明与本领域已知的其它阻断试剂的应用相比代表了显著的进步。特别地,在基于邻位探针的检测试验中,已显示单独使用阻断试剂的非分析物特异性结合蛋白成分或阻断试剂的核酸成分在降低非特异性背景信号上是无效的。令人惊讶地,仅当以缀合形式使用非分析物特异性结合蛋白成分和核酸成分的组合时才能观察到阻断效果明显提高。使用单个未缀合成分的组合未重现缀合阻断试剂的效果。因此,是这两个成分缀合从而形成单一的阻断试剂导致了非特异性背景信号显著并完全出乎意料地降低。此外,本发明的阻断试剂优于先前在基于邻位探针的检测试验中使用的阻断试剂。如此的背景信号降低的结果是邻位探针检测试验的特异性和

灵敏度升高。此外,本发明所述的阻断试剂可以与其它步骤组合使用以进一步降低非特异性背景信号。

[0021] 因此,可以看出本发明提供了与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于探针的检测试验中作为阻断试剂的用途,所述的试验中使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的探针检测样品中的分析物。

[0022] 另外来看,本发明的该方面提供了检测样品中分析物的方法,所述方法包括使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的邻位探针,其中使用偶联到核酸的非分析物特异性结合蛋白的缀合物作为阻断试剂。

[0023] 从再另一个方面来看,本发明提供了在基于邻位探针的对样品分析物检测的试验中,降低邻位探针对样品中分析物的非特异性结合的方法,所述邻位探针包括与偶联到核酸结构域的蛋白质分析物结合配偶体,所述方法包括将阻断试剂加入所述样品中,所述阻断试剂包括偶联于核酸的非分析物特异性结合蛋白的缀合物。

[0024] 然而,本发明所述阻断试剂的应用无需仅限于使用邻位探针的方法。鉴于邻位探针试验中获得的有利结果(见实施例),设想阻断试剂可以在使用相似探针(即,包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域)的任何试验中都有着同样好的效果,所述的试验包括探针作为单一试剂,例如免疫试验,如免疫 PCR 和免疫 RCA。

[0025] 因此,从最宽的意义上来说,可看出本发明提供了偶联于核酸的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于探针的检测试验中作为阻断试剂的用途,其中使用与核酸结构域偶联的包括蛋白质分析物结合配偶体的探针以检测样品中的分析物。

[0026] 另外来看,本发明的该方面提供了检测样品中分析物的方法,所述方法包括使用与核酸结构域偶联的包括蛋白质分析物结合配偶体的探针,其中偶联于核酸的非分析物特异性结合蛋白的缀合物用作阻断试剂。

[0027] 从再另一个方面中来看,本发明在基于邻位探针的对样品分析物检测的试验中,提供了降低探针对样品中分析物的非特异性结合的方法,所述探针包括偶联于核酸结构域的蛋白质分析物结合配偶体,所述方法包括将阻断试剂加入所述样品中,所述阻断试剂包括偶联于核酸的非分析物特异性结合蛋白的缀合物。

[0028] 在本发明的一个方面中,本发明所述方法用于免疫试验,并且阻断试剂用于免疫试验中,优选地,其中所述免疫试验为免疫 PCR。此免疫试验可以为本领域已知的任何试验,所述试验利用包括偶联于核酸结构域的蛋白质分析物结合配偶体的探针以检测分析物。本发明所述阻断试剂在免疫 PCR 试验中,例如在第 5,665,539 号美国专利所描述的试验中尤其地有用,其中使用了本文之前所定义的单一探针来检测已固定的分析物。通过与分析物的相互作用将探针捕获于固相上,探针的核酸结构域可通过扩增反应检测。

[0029] 在本发明的另一个方面中,本发明所述方法为基于邻位探针的试验,并且阻断试剂用于基于邻位探针的试验,并且所述探针为邻位探针。基于邻位探针的检测试验(邻位试验)可以是本领域已知的任何试验,例如前文所述的使用邻位探针检测样品中的分析物试验。有利地,本发明可用于这样试验的环境下,其中试验中的至少两个(或所有)邻位探针是基于蛋白-核酸缀合物的(即,包括偶联于核酸结构域的蛋白分析物结合结构域)。显著地,该试验是邻位连接试验,尽管本发明不限于检测基于连接的邻位探针的核酸结构域之间的相互作用(例如核酸结构域之间的相互作用可是基于杂化或杂交和延伸的,例如在

W097/00446 或 W001/61037 中所公开的)。

[0030] 因此,在本发明的一个优选方面中提供了检测样品中分析物的方法,包括:

[0031] (a) 将所述样品与阻断试剂接触,所述阻断试剂包括偶联于核酸的非分析物特异性结合蛋白;

[0032] (b) 将所述样品进一步与至少一组的,至少第一和第二邻位探针接触,所述探针各自包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域,并能够同时结合于分析物;

[0033] (c) 当所述邻位探针与所述分析物结合时,使得邻位探针的核酸结构域彼此相互作用,其中所述相互作用包括连接反应;和

[0034] (d) 检测所述连接。

[0035] 不希望被理论束缚,认为本发明所述方法依赖阻断试剂在样品内部占据位点,而不是结合于探针或试验中的其它组分,从而干扰分析物的检测。

[0036] 因此本发明的阻断试剂和用于本发明所述方法的阻断试剂的使用通常比各自的探针过量,优选地摩尔过量,例如过量 2-100000 倍,例如 20-50000 倍,50-30000 倍,100-50000 倍,100-30000 倍,1000-20000 倍,5000-10000 倍,例如 5、10、100、200、500、1500、3000、6000 或 12500 倍。

[0037] 所述的检测自身依赖于样品中分析物的存在,和检测两个(或多个)邻位探针与分析物结合时之间的相互作用。因此探针之间的相互作用(或更具体地,在其各自核酸(或其它功能性的)结构域之间的(例如核酸结构域和酶结构域之间的相互作用)为邻位依赖性的;邻位探针共同结合到分析物使它们变得邻近,以使它们(或更特别地,其核酸结构域)可相互作用。因此,通过检测相互作用,例如连接反应(例如通过检测相互作用产物,例如连接反应的产物),可以检测分析物。因此,在通常情况下邻位探针的核酸/功能域之间的相互作用(例如,邻位探针的核酸结构域之间的或邻位探针上核酸结构域与另一个功能结构域之间的)可导致产物的生成,所述的产物通常为核酸产物,可以对所述的产物进行检测以检测分析物。因此在上述方法的步骤(d)中,通过检测所述连接(例如通过检测所述连接反应的产物),可检测所述分析物。

[0038] 如上所述,基于连接的依赖邻位的试验代表了本发明的优选实施方案(即,其中用于检测方法中的至少第一和第二邻位探针包括核酸结构域,并且其间的相互作用涉及连接反应)。一般来看,探针的核酸结构域可以介导(例如直接或间接参与连接反应)。该连接反应可以涉及邻位探针的核酸结构域的连接,和/或核酸结构域可以作为连接反应的模板。

[0039] 通过更具体的实例,在本发明所述方法的一个实施方案中,可以通过互相结合(join)使邻位探针相互作用,例如通过连接(ligation)。所述的相互作用可以通过检测连接产物来进行检测(相互作用产物,连接产物)。在该方法的一种形式中,所述核酸结构域的相互作用需要一个或多个夹板寡核苷酸与结构域结合并介导其相互作用(具体地在连接的情况下,所述夹板寡核苷酸杂交到所述的结构域,并充当连接反应的模板)并且所述夹板促进或介导该相互作用。从上述各种邻位试验的描述中可认识到,在其它形式/实施方案中,所述夹板可以作为第三邻位探针的核酸结构域提供,和/或核酸结构域的连接可以是直接的(即,核酸结构域可直接互相连接),或间接的,即,它们可以间接地连接,例如通过间隔(gap)寡核苷酸的中介(intermediacy);在一个这样的实施方案中,核酸结构域可杂交域夹板寡核苷酸上,在它们各自的末端留下间隔—可通过间隔寡核苷酸或通过使用聚合酶延

伸核酸结构域之一的末端(游离的 3' 端)填充该间隔。邻位试验的该“间隔填充”的实施方案在文献中有充分描述,例如在 W001/61037 或在 W02007/107743 中。

[0040] 在一个更加具体的实例中,邻位探针的一个或多个核酸结构域可在一个或多个所加入的寡核苷酸的连接中起到模板的作用。在一个这样的实施方案中,首先加入的寡核苷酸可杂交到两个核酸结构域,可加入一个或多个其它的仅与结构域之一杂交的寡核苷酸,例如可以与每个核酸结构域结合的寡核苷酸,每个寡核苷酸邻近第一寡核苷酸的每个末端,所述加入的寡核苷酸可以在核酸结构域作为模板的反应中与第一寡核苷酸连接。

[0041] 在另外的实施方案中,所加入的寡核苷酸(或多种寡核苷酸)可通过连接反应环化(即,类似上述的锁式探针)。因此,通过举例的方式,连接于各自探针的分析物特异性结合部分的邻位探针对核酸结构域可分别与所加入的线性寡核苷酸(类似与“锁式探针”)的(i) 5' 和 3' 端,和(ii)所述末端之间的区域具有互补性。当邻位探针对的两个探针均由于结合于相同分析物而邻近时,各自探针的核酸结构域能够与所加入寡核苷酸的各自部分进行杂交。对所加入的寡核苷酸的 5' 和 3' 端具有互补性的核酸结构域可以作为并列杂交和所述末端的连接的模板(加入合适的连接酶后),导致所加入的寡核苷酸的环化。然后使用其它核酸结构域作为引物,通过滚环扩增(RCA)检测该环化的寡核苷酸;此对中的另一个探针的核酸结构域具有 3' 游离末端,所述的核算结构域杂交到所加入的寡核苷酸的连接末端之间。在加入合适的聚合酶后,可通过环化寡核苷酸的滚环扩增(RCA)来检测样品中的分析物的存在。仅当邻位探针邻位结合时才能够形成的多联体 RCA 产物为分析物的检测提供了“替代”标志物。

[0042] 应当认识到单一的加入的寡核苷酸能够被两个寡核苷酸取代,所述两个寡核苷酸可连接到一起形成圆形(该连接可由一个或两个核酸结构域作为模板,但是所述结构域中的一个应具有游离的 3' 端以充当引物)。

[0043] 邻位探测反应也可通过利用两个游离的 3' 端来进行,一个在每个邻位探针上并具有弱的互补性,当邻近时,DNA 聚合酶可以通过加入 dNTP 延伸这些末端,从而形成可检测的 DNA 模板,例如在第 7,306,904 号和第 6,511,809 号美国专利所述的。其它杂交和延伸形式也是可能的,例如其中一个核酸结构域具有游离的 3' 端,另一个具有游离的 5' 端,其中核酸结构域(或核酸结构域的更特定的部分)可以互相杂交或杂交到共同的杂交模板,或具有游离的 3' 端的两个核酸结构域(或其更特定的部分)与共同杂交模板杂交,在每种情况下在杂交之后有至少一个游离的 3' 端可用,所述游离的 3' 端可进行延伸以形成可检测的延伸产物。邻位延伸试验的各种实例描述于 GB1101621.9 中。

[0044] 在本发明最广泛的实施方案中,本发明所述的阻断试剂和用于本发明的方法的阻断试剂包括偶联于核酸结构域的非分析物特异性结合蛋白成分。

[0045] 阻断试剂的非分析物特异性结合蛋白成分可广泛地定义为蛋白,所述蛋白对基于邻位探针试验的靶分析物具有非常低或低的,即可忽略的,不可检测的或不显著的结合亲和力,或无特异性结合亲和力。换言之,可以将其看作与分析物特异性结合蛋白的反义词,而所述的与分析物特异性结合蛋白可定义为能够特异结合于,但不需要专一地结合于分析物的蛋白质,并且该蛋白质可优先结合于包括非分析物成分的环境中的分析物。因此非分析物特异性结合蛋白不能特异性结合于分析物,并且在包括其它成分的环境中不能优先结合于分析物。然而,所述的非分析物特异性结合蛋白能够特异结合于其它分子,例如非分析

物(其可以是邻位探针试验中不存在的分子),尽管优选地,阻断试剂的非分析物特异性结合蛋白成分对基于邻位探针试验中的任何一种或多种成分不具有特异的结合亲和力,即,其仅能够非特异性或一致地地结合于试验样品中的位点而不是结合于分析物或探针。

[0046] 因此所述的阻断试剂,特别是所述的阻断试剂中的蛋白成分,必须不能特异性结合于靶分析物。因此,阻断试剂的蛋白成分必须不能以比样品中其它成分更高的亲和力和/或特异性结合于靶标(例如分析物),即,任何与靶分析物的结合不能区别于与非靶分析物的结合;阻断试剂的蛋白成分不结合于靶分析物或可忽略地结合或不可检测地结合以使任何该非特异性结合,如果发生的话,不会区别于与其它非靶分析物的结合。阻断试剂和样品中任意靶分析物或非靶分析物之间的结合通常是非共价的。

[0047] 特别地,如果阻断试剂的蛋白成分能够结合于靶分析物,该结合必须是短暂的,并且其结合亲和力必须小于邻位探针对靶分析物的结合亲和力。因此,阻断试剂的蛋白成分对靶分析物的结合亲和力应至少比邻位探针的分析物靶向结合位点小一个量级。优选地,阻断试剂的蛋白成分的结合亲和力应至少比邻位探针的分析物靶向结合位点小 2、3、4、5 或 6 个量级。

[0048] 因此,对分析物的特异性结合亲和力非常低、低或没有是指阻断试剂的蛋白成分对分析物的解离常数为至少  $10^{-2}$ M。“至少”是指阻断试剂的蛋白成分的浓度必须更高以导致 50% 的蛋白成分的“结合位点”被分析物占据。在本发明所述试验的情况下,在上述范围内的  $K_d$  会导致仅有小部分的分析物结合于阻断试剂。例如,如果阻断试剂以  $10^{-4}$ M 的浓度存在,并且分析物以  $10^{-9}$ M 的浓度存在,并且阻断试剂对分析物的  $K_d$  为  $10^{-2}$ M,那么可预期阻断试剂分析物复合物的浓度在任意时间为  $10^{-11}$ M,即总分析物仅有 1% 会结合于阻断试剂。在一个优选的实施方案中,阻断试剂的蛋白成分对分析物的解离常数为至少  $10^{-2}$ M、 $10^{-1}$ M、0.1M、1M、2M、5M 或 10M。因此,无特异结合亲和力是指阻断试剂的蛋白成分的解离常数是那样,使得在用于邻位探针反应的浓度下仅在分析物和非分析物特异性结合蛋白之间发生非特异性短暂的相互作用。

[0049] 另外,当用于本发明的方法时,小于 10% 的分析物将结合于阻断试剂的蛋白成分。更优选地,小于 5%、4%、3%、2% 或 1% 的分析物将结合。最优选地,小于 0.5%、0.1%、0.01% 或 0.001% 的分析物将结合于阻断试剂的蛋白成分。

[0050] 非分析物特异性结合蛋白可以是单一蛋白物种或类型,或可以是不同蛋白的混合物,例如不同蛋白类型或相同类型的不同物种(在这里使用的术语“物种”不具有分类学意义,而是旨在表示特定特异性类型的蛋白)。例如,当蛋白对特定(非分析物)靶标具有结合特异性时,可使用不同特异性的蛋白混合物。优选地在该情况下蛋白混合物不包括对靶分析物具有特异性的蛋白,或另外地,混合物中的任何蛋白对靶分析物均不具有特异结合活性或对靶分析物的任意结合活性都非常低,例如以上定义的可忽略或微不足道或无法检测。

[0051] 阻断试剂的非分析物特异结合蛋白成分优选为血清蛋白或链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白,或其修饰物、衍生物或变体,或其组合。当阻断试剂的非分析物特异性结合蛋白成分包括一种或多种以下进一步定义的优选的蛋白时,应理解这些蛋白对靶分析物不可能具有任何特异结合亲和力。

[0052] 血清蛋白成分可以是单一特定类型的血清蛋白,或可以包括多个不同类型和结构

的蛋白。特别地,血清蛋白成分可以是球蛋白和 / 或白蛋白。

[0053] 链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白成分可以是单一特定类型的链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白或其修饰物、衍生物或变体,或可以包括多个所述蛋白。链酶亲和素样蛋白可定义为具有与链酶亲和素或其修饰物、衍生物或变体相似的结构和 / 或功能特征的蛋白。例如,在鸟类、爬行动物和两栖动物的卵白中发现的抗生物素蛋白,仅显示与链酶亲和素具有 30% 的序列同源性,但与链酶亲和素具有几乎相同的二级、三级和四级结构,并且被认为是链酶亲和素样蛋白。抗生物素蛋白也与链酶亲和素具有共同的功能特性,能够以高度的亲和力或特异性结合于生物素。

[0054] 因此,本发明也考虑链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白的修饰体、衍生物或变体,例如,片段或截短的蛋白、化学修饰的蛋白或多肽,或通过基因工程获得的变体,例如基于天然存在的链酶亲和素或抗生物素蛋白的氨基酸序列但包括一个或多个氨基酸替换、添加和 / 或缺失等的多肽。也包括等价的或相应的蛋白,所述蛋白不必须是天然存在的,但结构或功能上是等价的。优选地,该修饰体包括抗生物素蛋白的去糖基化和 / 或中性形式。本发明所述的链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白可以来自单一来源或多个来源,即,来自单一类型的有机体,例如细菌或动物,或来自多个类型的有机体,例如细菌的不同株或动物的不同物种。可考虑合成得到的或获得的,例如重组的链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白形式。优选地,本发明所述的链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白选自链酶亲和素、**NeutrAvidin®**、**Extravidin®**和**NeutraLite®**。在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述的阻断试剂的蛋白成分包括链酶亲和素。

[0055] 血清蛋白包括球蛋白和白蛋白两者,并来自血浆,所述的血浆可以定义为当除去细胞和血小板后剩余的血液部分。更具体而言,血清可以定义为不包含细胞、纤维蛋白原或任何其它凝血因子的血浆的部分。因此,血清蛋白是可以从血清中获得的(或可获得的)或存在于血清中的任何蛋白。其可以是存在于血清中或从血清中获得的单一蛋白,或该蛋白的混合物,或其可以是来自血清的蛋白部分或蛋白成分。本发明所述阻断试剂的蛋白成分通常可以包括血清蛋白,也就是说其通常可由血清的血清蛋白成分代表,而不需分离特定蛋白成分。换言之,其可为存在于血清中的蛋白的混合物,并且可从其中分离。因此,在本发明所述阻断试剂中的血清蛋白可以包括球蛋白和白蛋白,优选地  $\gamma$ -球蛋白(免疫球蛋白)和 / 或血清白蛋白。所述血清蛋白可以来自单一血液来源或多个血液来源,即,来自不同动物个体和 / 或来自不同类型的动物。因此可使用不同物种的或来自不同物种的血清蛋白,例如来自任意哺乳动物物种的。虽然血清蛋白的天然来源是便利的,但可通过合成得到或获得血清蛋白,例如通过重组表达或通过天然存在的蛋白进行衍生化。因此,包括在术语“血清蛋白”中的不仅是天然存在于血清中的任意蛋白,而且还包括其变体和衍生物,例如片段或截短蛋白、化学修饰的蛋白或多肽、或通过基因工程获得的变体,例如基于天然存在的血清蛋白的氨基酸序列但包括一种或多种氨基酸替换、添加和 / 或缺失等的多肽。也包括等价体或相应蛋白,所述蛋白不必存在于血清中,但是在结构或功能上是等价的。

[0056] 球蛋白、假球蛋白和优球蛋白广泛存在于动物和植物界,通过其物理性质如溶解度和电泳迁移对其进行表征,例如假球蛋白在水和稀盐溶液中都可溶,而优球蛋白不溶于水但溶于稀盐溶液中。两种球蛋白子类均可通过热凝固。本发明可使用任意该球蛋白。因此,一般说来,本发明所述的阻断试剂可以包括任意的球蛋白。如以下更加详细地描述的,

也可使用白蛋白,因此本发明所述阻断试剂可以包括任意白蛋白。

[0057] 球蛋白的主要来源为血浆和血清、乳汁、肌肉和植物种子。特别地,术语“球蛋白”包括在血清中发现的异体蛋白群体,所述蛋白群体分类为具有高分子量,溶解度和电泳迁移速率低于白蛋白,所述白蛋白为组成血清的主要成分的另一类蛋白。

[0058] 因此,用于本发明所述阻断试剂的优选的血清蛋白是血清球蛋白,其可以包括四种主要蛋白: $\alpha$ -1 球蛋白、 $\alpha$ -2 球蛋白、 $\beta$ -球蛋白和  $\gamma$ -球蛋白。然而,本领域技术人员应认识到当处理血清以除去纤维蛋白原和其它凝血因子时,血清蛋白仅包括球蛋白亚种,主要为  $\gamma$ -球蛋白。优选的阻断试剂的血清蛋白为血清蛋白的球蛋白部分包括至少 70% 的  $\gamma$ -球蛋白,优选 80% 和最优选至少 90% 的  $\gamma$ -球蛋白。

[0059]  $\alpha$ -球蛋白的特征在于其在碱性的或带电荷的溶液中高度移动的能力,并且包括  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶和血清淀粉样蛋白 A ( $\alpha$ -1 球蛋白)和触珠蛋白和血浆铜蓝蛋白( $\alpha$ -2 球蛋白)。 $\beta$ -球蛋白的特征在于其在碱性的或带电荷的溶液中比  $\alpha$ -球蛋白的移动性较低,但高于  $\gamma$ -球蛋白,并且包括血纤维蛋白溶酶原和转铁蛋白。因此, $\gamma$ -球蛋白在碱性的或带电荷的溶液中比  $\alpha$ -和  $\beta$ -球蛋白的移动性低,并且包括作为蛋白的主导类型的免疫球蛋白(抗体)。本领域很好地描述了抗体,抗体被分为多个组,通常为 IgG、IgE、IgD (所有单体)、IgA (二聚体)和 IgM (五聚体)。

[0060] 在本发明的一个优选实施方案中,阻断试剂的蛋白成分包括  $\gamma$ -球蛋白,特别是免疫球蛋白。优选的阻断试剂的免疫球蛋白物种为 IgG。在一个特别优选的实施方案中,阻断试剂的蛋白成分为大批的 IgG,即由包括具有一系列结合特异性和亲和力的多种免疫球蛋白(IgG)的血清纯化得到的免疫球蛋白。因此大批的 IgG 包括具有不同特异性的不同 IgG 蛋白,即,具有不同特异性的 IgG 蛋白的混合物。优选地,所述的不同特异性为非靶分析物特异的结合特异性。虽然考虑阻断试剂的蛋白成分可以包括具有特异性结构,即具有结合特征的免疫球蛋白(或如下所述的白蛋白),仅当该免疫球蛋白的结合性质不干扰分析物的检测时该特征才具有实用性,即阻断试剂的蛋白成分必须不能够特异和亲和结合于分析物,如上所述的和以下详细描述。因此优选地,阻断试剂的 IgG 成分,特别是大批的 IgG 对靶分析物不具有特异结合活性,或已发生的对靶分析物的任何结合都较低,例如如上所述的微不足道、可忽略或不可检测。重点是阻断试剂与靶分析物的任何结合不干扰试验的性能。因此免疫球蛋白成分,例如 IgG 或大批的 IgG 对靶分析物不具有结合活性,或具有低的(或非常低的)结合活性。

[0061] 特别感兴趣的是阻断试剂的血清蛋白成分为抗体,以及其结合片段和衍生物或模拟物,所述的抗体优选为 IgG 抗体。同样地,阻断试剂的蛋白成分可为单克隆或多克隆抗体。在再另一个实施方案中,阻断试剂的蛋白成分是抗体的结合片段或其衍生物或模拟物,其中这些片段、衍生物和模拟物对靶分析物不具有结合亲和力。例如,可通过切割完整蛋白来制备抗体片段如 Fv、F(ab)<sub>2</sub> 和 Fab,例如通过蛋白酶或化学切割。还感兴趣的是重组性或合成性制备的抗体片段或衍生物,如单链抗体或 scFv,或其它抗体衍生物如嵌合抗体或 CDR 嫁接(graft)抗体,其中该重组或合成制备的抗体片段保留上述抗体的结合特征,即它们不能够特异性结合于靶分析物。该抗体片段或衍生物通常包括题述抗体的至少 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域,以保持题述抗体的结合特征。在阻断试剂的蛋白成分的情况下,结合特征是这样的以至于它们不结合于靶分析物。可以使用任何方便的方法容易地制备题述发明所述的该抗

体片段、衍生物或模拟物,如第 5,851,829 号和第 5,965,371 号美国专利中所公开的方法,将其公开引入本文作为参考。

[0062] 上述抗体、其片段、衍生物和模拟物可以由商业来源获得和 / 或使用任意便利的技术制备而成,其中本领域技术人员已知制备多克隆抗体、单克隆抗体、其片段、衍生物和模拟物的方法,包括其重组衍生物。

[0063] 如上所述的,白蛋白构成血浆和血清的另一个主要成分,并且该种类的蛋白由于其在水中的溶解度以及热处理后凝固的倾向而值得注意。因此,在另一个实施方案中,阻断试剂的蛋白成分可以包括血清白蛋白。值得注意的是血清白蛋白显示与免疫球蛋白( $\gamma$ -球蛋白)具有显著的结构相似性。用于本发明所述的阻断试剂中的血清白蛋白可以来自单一来源,例如牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)等,或可以是不同血清白蛋白的组合。

[0064] 在一个优选的实施方案中,其中阻断试剂的蛋白成分来自上述的血清蛋白,所述血清蛋白来自与邻位探针的蛋白质靶分析物结合结构域相同的种类。因此,例如,当邻位探针的分析物结合结构域包括或基于免疫球蛋白例如 IgG 时,阻断试剂的蛋白成分由来自相同物种的 IgG 构成,优选大批的 IgG。

[0065] 阻断试剂的核酸结构域可以包括同种结构域,即偶联于阻断试剂的蛋白成分的单一序列,或异体的结构域,即多个不同序列,其中一个不同序列存在于阻断试剂的蛋白成分的蛋白上。

[0066] 阻断试剂的核酸结构域的选择基于其不干扰发明所述方法中的分析物的检测来进行。换言之,阻断试剂的核酸结构域必须不能与试验中使用的邻位探针的核酸结构域具有显著的序列同源性。此外,当任何其它核酸分子(例如寡核苷酸)加入或用于试验方法中时,例如其中一个或多个夹板寡核苷酸和 / 或间隔 / 盒式寡核苷酸(例如,如下所述)和 / 或加入的用于连接的寡核苷酸(“可连接的寡核苷酸”或“连接底物”)和 / 或阻断寡核苷酸(如下所述)用于介导(或促进)邻位探针的核酸结构域之间的相互作用,阻断试剂的核酸结构域必须不能与那些寡核苷酸(或多种寡核苷酸)具有显著的序列同源性。此外,阻断试剂的核酸结构域必须不能杂交于分析物或干扰第一和第二邻位探针的核酸相互作用的检测方法,即,必须不能与扩增例如 PCR 等使用的引物具有序列同源性。

[0067] 因此,只要不与试验中使用的邻位探针的核酸结构域、或任意其它寡核苷酸(或多种寡核苷酸)(例如,加入反应混合物中的夹板寡核苷酸和 / 或连接底物(即,可连接的寡核苷酸),即不存在于原始样品中的)或分析物杂交,那么阻断试剂的核酸结构域的序列就不是关键的,特别是当靶分析物为核酸时。通常,应选择阻断试剂的核酸序列以避免除了在样品中存在并且不是本方法的靶分析物的核酸之间以外发生的杂交事件。一旦选择或确定了序列,可使用任何便利的方法合成核酸结构域。

[0068] 所谓缺乏显著的序列同源性是指阻断试剂的核酸结构域必须与试验中使用的邻位探针的核酸结构域、夹板或其它寡核苷酸(例如,介导或促进邻位探针的核酸之间的相互作用的寡核苷酸)或用于检测邻位探针之间的相互作用的核酸具有小于 80% 的序列同源性。优选地,阻断试剂的核酸结构域必须与所考虑的核酸的大部分具有小于 70%、60%、50% 或小于 40% 的序列同源性。在本发明的一个特别优选的实施方案中,阻断试剂的核酸结构域包括一个或多个随机生成的核酸序列。可以通过本领域已知的任何合适的方法测定序列同源

性,例如使用 BLAST 比对算法。

[0069] 因此,阻断试剂的核酸可为单链核酸分子(例如,寡核苷酸),部分双链和部分单链的分子,或双链分子,所述双链分子包括双链区域以及两条核酸链不互补而成为单链的区域。同样,在某些实施方案中,核酸结构域由单链核酸构成。在其它实施方案中,核酸结构域可由两条部分互补的核酸链构成,其中两条链包括杂交区域和非杂交区域。

[0070] 阻断试剂的核酸结构域的长度通常为约 8 至约 1000 个核苷酸,其中在某些实施方案中它们的长度为约 8 至约 500 个核苷酸,包括长度为约 8 至约 250 个核苷酸,例如长度为约 8 个至约 160 个核苷酸,如长度为约 12 至约 150 个核苷酸,长度为约 14 至约 130 个核苷酸,长度为约 16 至约 110 个核苷酸,长度为约 8 至约 90 个核苷酸,长度为约 12 至约 80 个核苷酸,长度为约 14 至约 75 个核苷酸,长度为约 16 至约 70 个核苷酸,长度为约 16 至约 60 个核苷酸等。在某些代表性的实施方案中,核酸结构域的长度可为约 10 至约 80 个核苷酸,长度可为约 12 至约 75 个核苷酸,长度可为约 14 至约 70 个核苷酸,长度可为约 34 至约 60 个核苷酸,以及在所述范围之间的任意长度。在某些实施方案中,核酸结构域的长度通常不多于约 28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、44、46、50、55、60、65 或 70 个核苷酸。

[0071] 阻断试剂的核酸结构域可由核糖核苷酸和 / 或脱氧核糖核苷酸以及合成核苷酸残基构成,所述的合成核苷酸碱基是能够参与沃森 - 克里克类型或类似的碱基对相互作用的。因此,核酸结构域可以是 DNA 或 RNA 或其任意修饰物,例如 PNA 或含有非核苷酸骨架的其它衍生物。

[0072] 因此,在极端情况下,本发明所述的阻断试剂可以包括多种偶联于多种核酸的蛋白,或如前所述的偶联于核酸的单一类型的蛋白,或其组合,所述的单一类型的蛋白均由相同的序列构成。

[0073] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,阻断试剂包括偶联于任意寡核苷酸的大批的 IgG,其中所述寡核苷酸为单链 DNA。进一步优选地,寡核苷酸的长度至少为 40 个核苷酸。

[0074] 核酸结构域偶联于阻断试剂的蛋白成分,并且该“偶联”或连接可以是本领域已知的任意手段,可能是需要的或便利的,直接或间接的,例如通过连接基团。例如结构域可以通过共价键(例如化学交联)或通过非共价连接来互相连接,所述的非共价连接例如通过基于链酶亲和素 - 生物素的偶联(在一个结构域上提供生物素,在另一个上提供链酶亲和素)。在阻断试剂的蛋白成分为链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白或其修饰物、衍生物或变体的情况下,在寡核苷酸分子上提供生物素分子。然而,考虑到链酶亲和素或链酶亲和素样蛋白或其修饰物、衍生物或变体可以直接偶联于阻断试剂的寡核苷酸上,即通过共价键以及在生物素不存在的情况下。如上所讨论的,在该方面中,与成分未发生偶联的单独或组合使用的成分相比,阻断试剂的两种成分的偶联会导致阻断试剂的优良作用。

[0075] 阻断试剂的两种成分通过键直接连接或通过连接基团间接连接。当采用连接基团时,可以选择该基团以提供核酸结构域和蛋白成分通过连接基团的共价连接。感兴趣的连接基团根据蛋白成分的本质可以有很大的变化。当连接基团存在时,其在许多实施方案中是生物惰性的。本领域技术人员已知多种连接基团,并且已发现其应用于题述的阻断试剂中。在代表性的实施方案中,连接基团通常至少约为 50 道尔顿,通常至少约 100 道尔顿,可

以高达 1000 道尔顿或更大,例如如果连接基团含有间隔子时可高达 1000000 道尔顿,但通常不会超过约 500 道尔顿,通常不会超过 300 道尔顿。一般而言,该连接子可包括在任一端由反应性官能团封端的间隔基团,所述的反应性官能团能够共价结合于核酸结构域或蛋白成分。感兴趣的间隔基团可以包括脂肪族的和不饱和的烃链、含有杂原子如氧(醚如聚乙二醇)或氮(多胺)、肽、碳水化合物、可能含有杂原子的环状或非环状系统。间隔基团也可由结合于金属的配体构成,以使存在的金属离子与两种或多种配体进行配位以形成复合物。具体的间隔元件包括:1,4-二氨基己烷、二甲苯二胺、对苯二甲酸、3,6-二氧杂辛二酸、乙二胺-N,N-二乙酸、1,1'-乙烯双(5-氧-3-吡咯烷羧酸)、4,4'-乙烯二哌啶。可能的反应性官能团包括亲核官能团(胺、醇、硫醇、酰胺),亲电官能团(醛、酯、乙烯酮、环氧化合物、异氰酸酯、马来酰亚胺),能够发生环加成反应、能够形成二硫键或能够结合于金属的官能团。具体实例包括一级和二级胺、异羟肟酸、N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基琥珀酰亚胺碳酸酯、氧羰基咪唑、硝基苯基酯、三氟乙酯、缩水甘油醚、乙烯砜和马来酰亚胺。可用于题述阻断试剂的特定连接基团包括杂官能团化合物,如叠氮基苯甲酰基酰胺、N-[4-(对叠氮基水杨基氨基)丁基]-3'-[2'-吡啶基二硫]丙酰胺)、双-磺基琥珀酰亚胺辛二酸酯、己二亚胺二甲酯(dimethyladipimidate)、双琥珀酰亚胺酒石酸酯、N-马来酰亚胺丁酰基氧基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-叠氮基苯基]-1,3'-二硫代丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯、戊二醛、和琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯、3-(2-吡啶基二硫代)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(SMCC)等。

[0076] 在本发明的一个优选实施方案中,用于偶联非分析物特异性结合蛋白成分和阻断试剂的核酸结构域的连接子与将邻位探针(或多个探针)的核酸结构域偶联于蛋白质分析物结合结构域的连接子相同。

[0077] 可以使用任何便利的方法制备在题述方法中采用的阻断试剂。然而,在本发明的一个方面中也提供了用于制备阻断试剂的方法,其包括:

[0078] (a) 从血液中提取血清蛋白;

[0079] (b) 制备核酸;和

[0080] (c) 将(a)所述的蛋白与(b)所述的核酸偶联。

[0081] 所述的血清蛋白、核酸和偶联如上所定义。在本发明的一个优选方面中,血清蛋白为大批的 IgG。

[0082] 因此,在一个优选的方面中,本发明提供了包括偶联于核酸结构域的大批的 IgG 的阻断试剂。更一般而言,可以看出本发明的该方面提供了包括偶联于核酸分子(或供选择地,核酸结构域)的大批的 IgG 的缀合物。

[0083] 在进一步优选的方面中,本发明提供了包括偶联于核酸结构域的大批的白蛋白的阻断试剂。更一般而言,可以看出本发明的该方面提供了包括偶联于核酸分子(或供选择地,核酸结构域)的大批的白蛋白的缀合物。优选地,所述的白蛋白为血清白蛋白(例如 BSA 或 HSA 等)。

[0084] 在本发明的这些方面中,所述的核酸结构域/分子如上所定义。

[0085] 在优选的实施方案中(特别地包括上述的本发明的方面),核酸包括一个或多个随机序列的寡核苷酸,即单一随机生成的寡核苷酸或各自具有不同随机序列的多个寡核苷酸。

酸。

[0086] 因此,本发明也提供了可通过上述方法已获得的或可获得的阻断试剂,和包括本发明所述阻断试剂的且用于检测样品中分析物的试剂盒。所述试剂盒可以进一步包括一个或多个邻位探针,一个或多个用于该方法中的其它寡核苷酸(例如,夹板寡核苷酸、间隔寡核苷酸、和/或可连接的寡核苷酸)和用于影响和/或检测邻位探针的相互作用的手段,并且详细定义如下。

[0087] 术语“检测”在本文广泛地使用,以包括测定分析物存在的任何手段(即,其是否存在),或测量分析物的任意形式。因此“检测”可以包括以各种方式测定、测量、评估或分析分析物的存在或不存在或量或位置。包括定量和定性测定、测量或评估,包括半定量。该测定、测量或评估可以是相对的,例如当对样品中两种或多种不同的分析物进行检测时,或绝对的。同样的,当用于定量样品中靶分析物(或多种分析物)的情况下时,术语“定量”可以指绝对或相对定量。绝对定量可通过包含已知浓度(或多个已知浓度)的一种或多种对照分析物和/或将检测到的靶分析物水平与已知对照分析物进行对比(例如通过生成标准曲线)来实现。供选择地,相对定量可通过比较两种或多种不同靶分析物之间的检测水平或量来实现,以提供两个或多个不同分析物各自的相对定量,即相对于彼此。

[0088] “分析物”可以是想要通过本发明所述方法检测的任意物质(例如分子)或实体。所述分析物为本发明所述试验方法的“靶标”。因此分析物可以是想要检测的任意生物分子或化学化合物,例如肽或蛋白,或核酸分子或小分子,包括有机和无机分子。所述分析物可以是细胞或微生物,包括病毒或其片段或产物。因此可看出分析物可以是任何物质或实体,其中可以形成特异结合配偶体(例如亲和结合配偶体)。在基于邻位探针试验的情况下,所需要的是分析物能够同时结合于至少两个结合配偶体(更具体而言,至少两个邻位探针的分析物结合结构域)。在其它基于探针的检测试验的情况下,例如免疫 PCR、免疫 RCA 等,分析物能够结合于至少一个结合配偶体就已足够。基于探针的检测试验,例如基于邻位探针的试验,如本发明所述试验,已经发现在蛋白或多肽的检测中有着特定的应用。因此特别感兴趣的分析物可以包括蛋白质分子如肽、多肽、蛋白或朊病毒或包括蛋白或多肽成分等的任何分子,或其片段。所述分析物可以为单一分子或含有两个或多个分子亚单元的复合物,所述分子亚单元可以是或不是彼此共价结合的,并且可以为相同或不同。因此除了细胞或微生物之外,该复合分析物也可作为蛋白复合物或蛋白相互作用。因此该复合物或相互作用为同或异多聚体。分子聚集物,例如蛋白也可以是靶分析物,例如相同蛋白或不同蛋白的聚集物。所述分析物也可以是蛋白或肽和核酸分子如 DNA 或 RNA 之间的复合物。特别感兴趣的是蛋白和核酸之间的相互作用,例如,调节因子,如转录因子和 DNA 或 RNA。

[0089] 包括所有生物和临床样品,例如,有机体的任意细胞或组织样品,或来自其的任意体液或标本,以及样品如细胞培养物、细胞标本、细胞裂解物等。也包括环境样品,例如土壤和水样品或食物样品。可以新鲜制备样品或可以以任何便利的方式对样品提前处理以用于例如储存。

[0090] 因此代表性样品包括任意可以包含生物分子,或者可以包含任意其他想要的或者靶分析物的材料,其包括例如食物和关联产物、临床和环境样品。样品可以是生物样品,其可以包含任意病毒或细胞材料,包括所有原核或真核细胞、病毒、噬菌体、支原体、原生质体和细胞器。因此该生物材料可以包括所有类型的哺乳动物和非哺乳动物细胞、植物细胞、藻

类,所述的藻类包括蓝绿藻、真菌、细菌、原生动物等。因此代表性样品包括全血和血得到的产物如血浆、血清和血沉棕黄色层、血细胞、尿液、粪便、脑脊液或任何其它体液(例如,呼吸系统分泌物、唾液、乳汁等)、组织、活检切片、细胞培养物、细胞混悬液、条件培养基或细胞培养成分的其它样品等。可以以任何便利或需要的方式预处理样品以准备用于本发明所述方法中,例如通过细胞裂解或纯化,分离分析物等。

[0091] 用于本发明所述检测方法中的探针,例如邻位探针包括蛋白质分析物结合结构域和功能结构域,所述功能结构域优选为核酸结构域,但如上所述,在邻位试验中使用的一个或多个邻位探针可以包括不同的官能团如酶。邻位探针实际上是结合于分析物(通过分析物结合结构域)的检测探针,可以借助对该结合发生后在功能(例如核酸)结构域之间发生的相互作用的检测来检测所述结合(以检测分析物)。其它探针例如免疫 PCR 或免疫 RCA 探针可充当检测探针,检测其与分析物的结合以检测分析物的存在。因此,当功能结构域为核酸分子时,探针可视为分析物的核酸标记的亲合配体或结合配偶体,其中分析物结合结构域为亲合结合配偶体,核酸结构域为核酸标签。核酸结构域偶联于分析物结合结构域并且如上所述的,该“偶联”或连接可通过本领域已知的任意手段,可以是需要的或便利的,可以是直接的或间接的,例如通过连接基团。蛋白偶联至核酸的方式的实例在上文中有详细描述。优选地,用于偶联分析物结合结构域和探针(例如邻位探针)的核酸结构域的连接子或方式与阻断试剂的连接子或方式相同。

[0092] 分析物结合结构域可以是靶分析物的任何结合配偶体,并且其可以是直接或间接结合配偶体。因此其可以直接结合于靶分析物,或通过中间分子或结合于靶分析物的结合配偶体间接结合,所述分析物结合结构域结合于所述中间分子(结合配偶体)。特别地,分析物结合结构域或中间结合配偶体为分析物的特异性结合配偶体。结合配偶体为能够结合于其靶标例如靶分析物的任意分子或实体,以及特异性结合配偶体为能够特异性结合于其靶标(例如靶分析物)的配偶体,即结合配偶体以比样品中的其它成分更高的亲和力和/或特异性结合于靶标(例如分析物)。因此与靶分析物的结合可以区别于非靶分析物;特异性结合配偶体不与非靶分析物结合或以可忽略的或不可检测的或任意该非特异性结合的方式结合,如果发生了则可以区分。靶分析物及其结合配偶体之间的结合通常是非共价的。

[0093] 可以选择分析物结合结构域以对靶分析物具有较高的结合亲和力。较高的结合亲和力是指结合亲和力至少为约  $10^{-4}$ M,通常至少约  $10^{-6}$ M 或更高,例如  $10^{-9}$ M 或更高。当作为邻位探针的一部分存在时,分析物结合结构域可以是任意多种不同类型的分子,只要其对靶蛋白显示所需的结合亲和力。在其它实施方案中,分析物结合结构域可以是配体,所述配体对其靶分析物具有中等或甚至较低的亲和力,例如低于约  $10^{-4}$ M。

[0094] 在本发明的检测方法中,至少一种探针例如邻位探针(但是优选至少两个,更优选所有邻位探针)的分析物结合结构域为蛋白质分子。因此,分析物结合结构域可以是小肽分子或较大的多肽或蛋白。肽的大小可以例如为约 5 至约 100 个氨基酸残基,通常为约 5 至约 50 个残基,更通常为约 10 个至约 30 个残基。大的多肽或蛋白是指大小为约 100 个氨基酸残基或更大的分子。作为分析物结合结构域而受到特别关注的是抗体,以及其结合片段和衍生物或模拟物。当抗体为分析物结合结构域时,它们可以来自多克隆成分以使通过特异性区分的抗体的异种群体均“标记”相同的标记核酸(核酸结构域),或来自单克隆成分,其中对靶分析物具有相同特异性的相同抗体的同种群体均标记相同的核酸。同样地,分析物

结合结构域可以是单克隆或多克隆抗体。在其它实施方案中,亲和结合结构域为抗体片段或其衍生物或模拟物,其中这些片段、衍生物和模拟物对靶分析物具有所需的结合亲和力。抗体、抗体片段、其模拟物和衍生物的实例如上所述,并且本发明考虑所述亲和结合结构域可以是任意类型的这些分子,只要它们对靶分析物具有所需的结合亲和力。

[0095] 重要的,分析物结合结构域可以是一种结构域,其包括能够共价连接于核酸结构域而不实质消除分析物结合结构域对其靶分析物的结合亲和力的部分。

[0096] 在本发明所述方法的一个实施方式中,探针(例如邻位探针)可以是多价(邻位)探针。该多价(邻位)探针包括至少两个,但多至 100 个分析物结合结构域,所述分析物结合结构域与至少一个,以及优选地多于一个核酸(或多个核酸)缀合。

[0097] 在部件中针对各自邻位探针的分析物结合结构域的分析物上的结合位点可以是相同或不同的。因此,例如在包含两个或多个相同亚单元或蛋白成分的同数蛋白复合物或聚集物的情况下,两个或多个探针的分析物结合结构域可以是相同的。当分析物为单一分子或包括不同亚单元或成分时(例如不同蛋白的同数复合物或聚集物),分析物结合结构域可以是不同的。

[0098] 由于可以构建邻位探针的核酸结构域的长度以跨越不同分子距离,因此针对分析物结合结构域的分析物上的结合位点不需在相同的分子上。它们可以在独立的但紧密放置的分子上。例如可以通过本发明所述方法靶向有机体如细菌或细胞或病毒的,或蛋白复合物的或相互作用的多个结合结构域。

[0099] 如上所述,分析物结合结构域可以直接或间接地结合于分析物。在直接结合的情况下,靶分析物可以首先被特异性结合配偶体(或亲和配体)结合,并且探针例如邻位探针的分析物结合结构域可以结合于特异结合配偶体。这使得能够设计作为通用试剂的探针(例如邻位探针)。例如分析物特异性结合配偶体可以是抗体和通用探针,例如邻位探针,可以通过部件结合于各种不同分析物特异性抗体的 Fc 区域,使用部件来检测不同分析物。

[0100] 探针例如邻位探针的核酸结构域可以被认为是核酸“标签”,所述核酸“标签”可以被检测,或在邻位探针相互作用形成可检测产物的情况下可以检测到以报告分析物的检测。因此核酸结构域可以被认为是反应性核酸官能团,所述官能团可以直接或间接提供,或所述官能团可以相互作用而提供信号,借助所述信号来检测分析物(例如形成产生信号的产物(例如它们可以连接到一起从而形成连接产物,或可以允许延伸产物,例如如上详述的延伸产物的形成)或介导产生信号的产物的形成或促进其形成,例如作为连接或延伸模板和/或引物,例如作为 RCA 引物)。换言之,可以认为核酸结构域是“检测标签”,所述“检测标签”可以被检测到或可相互作用而形成“可检测的”标签或产物。当两个或多个分析物存在于相同样品中时,可以使用两个或多个探针或邻位探针组同时检测,其中设计每组邻位探针以通过相互作用形成独特的核酸序列“可检测的标签”。可以使用文献中熟知的方法对这些独特的“可检测的标签”分别进行检测和定量(任选地在扩增之后),包括液相色谱法、电泳法、质谱法、DNA 阵列技术和多色实时 PCR。

[0101] 如上所述,现有技术很好地描述了基于检测试验的邻位探针,例如 W097/00446、W001/61037、W003/044231、W02005/123963 和 W02007/107743,将其引入本文作为参考。本领域也已知并描述了其它邻位试验,例如在 W02007/044903 和 W02009/012220 中,也将其引入本文作为参考。因此明显的是,只要那些方法延伸至利用蛋白质邻位探针的基于邻位探

针的检测试验,那么技术人员就能够使用本领域公开的方法来修改本文所述的检测方法。然而,本发明所述检测方法的特别优选的方面详细解释如下。

[0102] 在一个优选的本发明所述的检测方法中,第一和第二邻位探针的核酸结构域可以互相接合,例如通过连接。该“结合”(或“缀合”)可以是直接的,即各核酸结构域可以直接互相结合,或其可以是间接的,即各核酸结构域可以间接接合,例如通过分别与另一个中间核酸分子(例如,“间隔”寡核苷酸,在本领域也称为“盒式”寡核苷酸)的两端接合。该“缀合”或“相互作用”(通常为连接)可以通过一个或多个夹板寡核苷酸介导。同样地,可以将夹板或间隔/盒式寡核苷酸以独立核酸的形式加入样品中,或可作为如下进一步解释的第三邻位探针的核酸结构域提供。在新核酸分子或序列形成时的相互作用(通过连接)结果可以检测到。

[0103] 如上所述以及以下进一步讨论,夹板寡核苷酸可以杂交于第一和第二邻位探针的核酸结构域,从而使其能够连接。

[0104] 邻位探针的核酸结构域可以是单链核酸分子(例如寡核苷酸)、部分双链和部分单链分子、或双链分子,所述双链分子包括双链区域以及两条核酸链不互补而成为单链的区域。同样,在某些实施方案中,核酸结构域由单链核酸构成。在其它实施方案中,核酸结构域可由两条部分互补的核酸链构成,其中两条链包括杂交区域和非杂交区域。

[0105] 当与靶分析物结合时,邻位探针的核酸结构域的长度通常足够允许发生与另一个邻位探针的核酸结构域的夹板介导的相互作用。核酸结构域的长度通常为约 8 至高达约 1000 个核苷酸,其中在某些实施方案中它们的长度为约 8 至约 500 个核苷酸,包括长度为约 8 至约 250 个核苷酸,例如长度为约 8 个至约 160 个核苷酸,如长度为约 12 至约 150 个核苷酸,长度为约 14 至约 130 个核苷酸,长度为约 16 至约 110 个核苷酸,长度为约 8 至约 90 个核苷酸,长度为约 12 至约 80 个核苷酸,长度为约 14 至约 75 个核苷酸,长度为约 16 至约 70 个核苷酸,长度为约 16 至约 60 个核苷酸等。在某些代表性实施方案中,核酸结构域的长度可为约 10 至约 80 个核苷酸,长度可为约 12 至约 75 个核苷酸,长度可为约 14 至约 70 个核苷酸,长度可为约 34 至约 60 个核苷酸,以及在所述范围之间的任意长度。在某些实施方案中,核酸结构域的长度通常不多于约 28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、44、46、50、55、60、65 或 70 个核苷酸。

[0106] 邻位探针的核酸结构域可以由核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸以及合成核苷酸残基构成,所述的合成核苷酸残基是能够参与沃森-克里克类型或类似碱基对相互作用的。因此,核酸结构域可以是 DNA 或 RNA 或其任意修饰物,例如 PNA 或含有非核苷酸骨架的其它衍生物。

[0107] 可以根据夹板挑选或选择第一和第二邻位探针的核酸结构域的序列(即,“检测”核酸结构域),所述夹板提供于第三邻位探针上。因此,该序列不是关键的,只要第一和第二结构域可以杂交于第三结构域(夹板)。然而,应选择序列以避免除了在第一和第二邻位探针的核酸结构域和夹板(或多个夹板)的核酸结构域之间以外发生的杂交事件。例如,邻位探针的核酸应该不能杂交于阻断试剂的核酸结构域,或如果存在,间隔/盒式寡核苷酸的核酸结构域。一旦选择或确定了核酸结构域的序列,可使用任何便利的方法合成该核酸结构域。

[0108] 探针例如邻位探针的两种成分通过键连接到一起,或通过连接基团间接连接。可

以使用如上述用于偶联阻断试剂的核酸结构域和蛋白成分的,上文所描述的方法和连接子,将核酸结构域偶联于探针,例如邻位探针。在本发明的一个优选实施方式中,使用相同的连接子作为阻断试剂将探针例如邻位探针的核酸结构域偶联于分析物结合结构域。

[0109] 在题述方法中采用的探针例如邻位探针和阻断试剂可以使用任何便利的方法制备。在代表性实施方案中,核酸结构域可以缀合于分析物结合结构域,所述的缀合是直接的或通过连接基团的。如本领域已知的,成分可以通过官能团互相共价结合,其中该官能团可以存在于成分上或使用一个或多个步骤引入成分中,例如氧化反应、还原反应、裂解反应等。用于共价键合成分以制备探针例如邻位探针的官能团包括:羟基、巯基、氨基等。可以选择经过修饰以提供共价键的不同成分的特定部分以便于不实质性地不利地干扰成分对靶分析物的结合亲和力。换言之,共价键不应抑制探针例如邻位探针与分析物的结合,并且不应促进阻断试剂结合于靶分析物。必要和/或需要时,可以使用本领域已知的阻断基团保护成分上的某些部分,参见例如 Green&Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley&Sons) (1991)。本领域技术人员熟知用于制备核酸/抗体缀合物的方法。参见例如第 5,733,523 号美国专利,将其公开的内容引入本文作为参考。

[0110] 在其它实施方案中,可以使用体外方案制备探针例如邻位探针和阻断试剂,产生核酸-蛋白缀合物,即分子具有共价结合于蛋白的核酸例如编码序列,即其中由编码探针例如邻位探针的载体在体外制备分析物结合结构域或蛋白成分。感兴趣的该体外方案的实例包括:基于 RepA 的方案(参见例如, Fitzgerald, *Drug Discov. Today* (2000) 5:253-258 和 W098/37186), 基于核糖体呈现(display) 的方案(参见例如 Hanes 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1997) 94:4937-42; Roberts, *Curr Opin Chem Biol* (1999) Jun;3:268-73; Schaffitzel 等人, *J Immunol Methods* (1999) Dec10;231:119-35; 和 W098/54312) 等。

[0111] 夹板可视为“连接子”寡核苷酸,其用于连接或将第一和第二邻位探针的核酸结构域“保持在一起”以使其可以相互作用,例如可以连接在一起。

[0112] 特别地,夹板可以与第一和第二邻位探针的核酸结构域杂交。更特别地,夹板与至少第一和第二邻位探针的核酸结构域同时杂交(退火)。当夹板为第三邻位探针的核酸结构域的形式时,所有邻位探针组的核酸结构域的互相杂交在结合于靶分析物后提高探针-靶标复合物的活动性。该活动性作用通过支持产生信号的邻位探针-靶分析物复合物的形成而有助于试验的灵敏度。

[0113] 本文所使用的术语“杂交(hybridisation)”或“杂交(hybridises)”是指在核苷酸序列之间双链的形成,其足够互补以通过沃森-克里克碱基配对形成双链。当分子具有碱基对组织的相似性时,两个核苷酸序列互相“互补”。“互补的”核苷酸序列可以特异性地结合以在适当的杂交条件下形成稳定的双链。例如,当第一序列的一部分能够以反向平行的方向结合于第二序列的一部分时,两个序列是互补的,其中每个序列的 3' 端结合于其它序列的 5' 端,并且一个序列的每个 A、T (U)、G 和 C 分别与另一个序列的 T (U)、A、C 和 G 对准。RNA 序列也可包括互补的 G=U 或 U=G 碱基对。因此在本发明中,两个序列不需要具有完美的“互补性”。通常当至少约 85% (优选至少约 90%, 最优选至少约 95%) 的核苷酸在确定长度的分子内共享碱基配对结构时,两个序列具有足够的互补性。因此第一和第二邻位探针的核酸结构域含有对夹板寡核苷酸互补的区域,相反地,夹板寡核苷酸的核酸结构域

包含对第一和第二邻位探针的每个核酸结构域互补的区域。

[0114] 互补的区域(即,杂交区域)的长度可以为4-30bp,例如6-20、6-18、7-15或8-12bp。

[0115] 夹板核酸结构域的长度通常足以提供上述第一和第二探针的核酸结构域的同时结合。在代表性实施方案中,夹板寡核苷酸的长度为约6至约500个核苷酸,包括约20至约40个寡核苷酸,例如约25至约30个寡核苷酸。

[0116] 如上所述,在上述的优选的代表性实施方案中,第一和第二邻位探针的核酸结构域之间的相互作用为各自结构域的连接。该连接可以优选为连接,特别是模板引导的连接。在该情况下,应明确理解连接模板由夹板提供。可以使用连接酶进行该连接。

[0117] 因此,在本发明的方法的优选的实施方案中,第一和第二探针的核酸结构域可借助杂交夹板作为模板的反应来连接,其中所述核酸结构域连接并且可检测到连接产物。因此在该实施方案中,夹板可视为“夹板模板”或“连接模板”或“模板寡核苷酸”。

[0118] 为了使相互作用,或更具体地连接发生,第一和第二邻位探针的核酸结构域之一通常可通过其5'端偶联于蛋白质分析物结合结构域(留下游离的3'羟基端),而另一个结构域可以通过其3'端偶联(留下游离的5'磷酸酯端)。因此第一和第二邻位探针之一可以是具有游离3'羟基端的5'探针,所述游离3'羟基端能够与另一个3'探针的5'磷酸酯端相互作用。

[0119] 为了能够连接,第一和第二核酸结构域分别杂交于夹板,一个的3'端对准另一个的5'磷酸酯端。然而,如上所述并且如以下更加详细的描述的是,各自结构域的连接不需要是直接的,它们可借助中间寡核苷酸连接在一起,或可以使用聚合酶延伸第一或第二邻位探针中的携带游离3'核酸结构域末端的任一个以填充间隔,直到第一和第二核酸结构域可以通过连接反应连接。因此,夹板(模板)上的各自的3'端和5'端不需互相紧邻地杂交,但可以杂交于夹板并在其中留下空间(或一段核苷酸)。

[0120] 夹板同时与第一和第二邻位的杂交产生稳定的双链结构,所述双链结构含有所有三个核酸结构域。该双链结构使第一邻位探针的核酸结构域的3'羟基游离端和第二邻位探针的核酸结构域的5'磷酸基游离端结合在一起(虽然如上所述,但这些不需要紧邻地并列放置)。

[0121] 因此,可以包括对5'游离邻位探针的核酸结构域具有互补性的第一3'区域和对3'游离邻位探针的核酸结构域具有互补性的第二5'区域。夹板的第一和第二区域长度可以为3至20、6至17、6至15或6至12或8至12个核苷酸,例如长度为约13至17、12至16、11至15、或12至14个核苷酸或长度为约6至12、7至11或8至10个核苷酸。

[0122] 如以下更加详细的描述的,相互作用(例如连接)产物的扩增可用作检测过程的一部分。因此,在某些实施方案中需要设计夹板以便于将在该步骤中可能发生的任何错误扩增最小化,例如夹板充当扩增中使用的聚合酶的模板的可能性。因此例如夹板可以作为RNA寡核苷酸或DNA/RNA杂交体来提供;通常用于扩增反应中的Taq聚合酶不能使用RNA模板。供选择地,使用具有两个端杂交区域的DNA夹板可以达到相似效果;由于杂交较弱,该夹板不能在PCR使用的高温下为DNA聚合作为模板。

[0123] 如上所述的,在一个实施方案中,第一和第二探针的核酸结构域可以杂交于互不紧邻的夹板,而在其间留出间隔。为了使其能够缀合于(例如连接)本文称为“间隔”或

“盒式”寡核苷酸的另一个寡核苷酸,可以杂交于该间隔中的夹板,更具体地,跨过该间隔。该间隔/合适寡核苷酸可以直接杂交于其每个末端,所述末端与每个各自结构域的末端邻近,以使每个该结构域末端可以连接于间隔/盒式寡核苷酸以形成单一的新核酸产物。这需要两个连接事件,所述两个连接事件以夹板作为模板。间隔/盒式寡核苷酸的5'和3'端以适当的方式接合(连接)于第一和第二探针的核酸结构域的游离末端。因此通过间隔/盒式寡核苷酸连接或接合第一和第二结构域。该排列使探针的核酸结构域的柔软度增加。间隔/盒式寡核苷酸的长度(当杂交于夹板时第一和第二结构域的末端之间的间隔)可以不同,例如为4至50,例如6-30、6-25、6-22、8-22、10-22、6-20、8-20、10-20个核苷酸。

[0124] 间隔/盒式寡核苷酸在第一和第二核酸结构域的连接中充当中间寡核苷酸,在探针与样品接触后可以将所述间隔/盒式寡核苷酸加入。供选择地,可以在相同时间将其加入,或可以将其预杂交至夹板寡核苷酸。

[0125] 也可以使用聚合酶,通过延伸携带3'端的第一或第二邻位探针的任何一个游离核酸结构域来填充间隔。一旦填充了间隔,就通过连接步骤连接末端。

[0126] 为了实施本发明所述的方法,优选地在与至少一组探针接触之前将样品与阻断试剂接触。

[0127] 在某些实施方案中,可以针对两种或多种不同的靶分析物对样品进行试验。在该实施方案中,将样品与一组探针接触,一个探针针对一个靶分析物,或更优选地一组邻位探针针对一个靶分析物,以使接触样品的探针或探针组的数量可以为两个或多个,例如三个或多个、四个或多个等。该方法在多重和高通量应用中有着特别的用途。

[0128] 可以选择加入样品中的邻位探针的量以在反应混合物中提供足够低浓度的邻位探针,从而确保邻位探针在未结合于靶分析物时不会随机地互相紧密邻近,至少不以任何较大或很大的程度。同样地,希望的是仅当邻位探针通过邻位探针的分析物结合结构域之间的结合相互作用和分析物的结合位点结合于分析物时,邻位探针才会互相紧密邻近。在代表性实施方案中,在与样品组合后的反应混合物中的邻位探针的浓度为约1fM至1 $\mu$ M,如约1pM至约1nM,包括约1pM至约100nM。

[0129] 在与样品组合后,阻断试剂和探针组(或多个探针组),例如邻位探针,可以将反应混合物孵育一段时间,如果存在于样品中,所述时间足够使探针例如邻位探针结合于靶分析物。优选地在加入探针例如邻位探针之前将样品与阻断试剂接触。在代表性的实施方案中,阻断试剂和样品可以在加入探针如邻位探针之前预孵育一段时间,所述时间为5分钟至约24小时。优选地,在温度为4至约50 $^{\circ}$ C下,优选地在室温下例如18-30 $^{\circ}$ C下,所述预孵育为约20分钟至约12小时。在预孵育后,如果包括该步骤,产物混合物可以在约4至约50 $^{\circ}$ C下,包括约20至约37 $^{\circ}$ C下孵育一段时间,所述时间为约5分钟至约48小时,包括约30分钟至约12小时。应优化维持的反应混合物以促进探针例如邻位探针特异性结合于分析物,同时抑制非特异性相互作用。条件也应允许在上述核酸结构域之间的有效的和特异性杂交。

[0130] 在某些实施方案中,孵育混合物的有效体积至少在孵育步骤的部分降低,在此步骤中探针例如邻位探针结合于靶分析物,如果靶分析物存在于样品中的话。在这些实施方案中,孵育混合物的有效体积由于许多不同原因而降低。在某些实施方案中,降低孵育混合物的有效体积以使得能使用中等和低亲和性的分析物结合结构域和/或提高试验的灵敏

度。例如,在孵育混合物的有效量降低的某些实施方案中,分析物结合结构域可以是中等或低亲和性的结合物,所述中等或低亲和性的结合物是指分析物结合结构域对其靶分析物的结合亲和力小于约  $10^{-4}$ M, 如约  $1\text{mM}K_d$ 。在某些实施方案中,可以升高试验灵敏度以使试验能够在  $1\ \mu\text{l}$  样品中检测到低至约 100 个或更少的靶分析物,包括在  $1\ \mu\text{l}$  样品中低至约 75 个或更少的靶分析物,包括在  $1\ \mu\text{l}$  样品中低至约 50 个或更少的靶分析物。

[0131] 在某些实施方案中,在上述孵育步骤过程中在混合物中包括“聚集剂(crowding agent)”或“体积排斥剂(volume excluder)”,例如在邻位探针与其靶分析物结合的过程中降低孵育混合物的有效体积。通常,“聚集剂”是水溶性大分子材料。合适的大分子材料广泛地包括平均分子量为约 1500 至数百万的生物相容的天然或合成聚合物,所述聚合物不与混合物中的其它试剂或产物发生特异性相互作用。本领域将该聚合物称为“体积排斥剂”,由于其主要功能是在体外反应介质中占据体积,并为生物化学反应提供高浓度的环境,例如,接近体内条件。体积排斥剂聚合物当然必须足够可溶以提供所需浓度。合适的典型聚合物包括但不限于:市售聚乙二醇(PEG)聚合物,例如平均分子量高于约 2000 的;FICOLL 聚合物,如平均分子量为约 70,000 的那些;牛血浆白蛋白;糖原;聚乙烯吡咯烷酮;葡聚糖等。在代表性实施方案中采用更高分子量的 PEG 聚合物,尤其是分子量分别为约 1450、3000-3700、6000-7500 和 15,000-20,000 的 PEG1450、PEG3350、PEG6000 (也作为 PEG8000 出售),和 PEG20,000。在代表性实施方案中采用 PEG6000 和 PEG8000。根据聚合物类型及其分子量,在代表性实施方式中的孵育反应中体积排斥剂聚合物的浓度落入约 5%w/v 至约 45%w/v。通常,预期给定类型的更高分子量的聚合物需要以比更低分子量的聚合物类型更低的浓度存在,以实现与酶活性相同的效果。

[0132] 在采用体积排斥剂的那些实施方案中,在方法的下一步之前,由于解释体积排斥剂的存在可以根据所存在的体积排斥剂的量、稀释流体的性质等稀释孵育混合物,例如稀释至少约 2 倍或更多,如至少约 5 倍或更多,包括至少约 10 倍或更多,其中在代表性实施方案中所述的稀释流体为水或某些其它合适的水和一种或多种溶质例如盐、缓冲剂等的水性流体。

[0133] 替代地或除了使用体积排斥剂外,通过例如蒸发从孵育混合物中除去部分水,可以降低孵育过程中的孵育混合物的体积。在这些实施方式中,流体体积可以依照所需降低至少约 2 倍或更多,如至少约 5 倍或更多,包括至少约 10 倍或更多。重要的,在这些实施方案中不是将所有水从孵育混合物中除去。可以采用任何便利的方案通过从中除去一部分水来降低孵育混合物的体积。可以采用通过监测和调整湿度和温度的用于控制蒸发速率的工具,其中在某些实施方案中例如通过持续测量孵育混合物的体积来监测孵育混合物的体积,其中当适当蒸发后,可以如上所述加入连接和 PCR 混合物。根据需要,可以使用加热器来加快蒸发。供选择地,孵化混合物的体积可以通过滤出水来降低。在代表性实施方案中,体积排阻滤器用于选择性地保留尺寸大于临界值的分子,同时通过使小分子和水通过滤器而将其除去。可以通过离心或真空抽吸对溶液施加力而使其通过滤器移动。

[0134] 当邻位探针的结合结构域与分析物结合后,邻位探针的合适结构域互相紧密邻近。因此,如果使用夹板寡核苷酸,则能够结合(杂交)于第一和第二探针的核酸结构域。

[0135] 在样品与阻断试剂和邻位探针组合后,如果使用的话,可以加入间隔/盒式寡核苷酸并使其杂交。可以杂交于夹板的第一和第二探针的核酸结构域随后可以通过第一和第

二邻位探针的核酸结构域的游离 3' 羟基和 5' 磷酸酯末端的核酸连接相互连接。然后检测反应混合物中相互作用的存在。因此,通常通过检测其连接产物来检测第一和第二核酸结构域的连接。

[0136] 通常,可以采用任何能够检测邻位依赖性相互作用的存在便利方案。检测方案可以需要或不需要分离步骤。

[0137] 在这些代表性实施方案中,通过与例如由合适的核酸连接酶提供的具有核酸连接活性的反应混合物接触来实现稳定第一和第二邻位探针的核酸结构域的夹板的连接,并将混合物维持在足以发生核酸结构域的连接条件下。

[0138] 如本领域已知的,当两个紧邻的核酸退火并杂交于与其互补的第三核酸序列(即,模板)时,连接酶催化该两个紧邻的核酸的并列 3' - 羟基和 5' - 磷酸末端之间的二酯键的形成。可以采用任何便利的连接酶,其中感兴趣的代表性连接酶包括但不限于:温度敏感性的和热稳定连接酶。温度敏感性的连接酶包括但不限于噬菌体 T4DNA 连接酶、噬菌体 T7DNA 连接酶和大肠杆菌(*E. coli*)连接酶。热稳定性连接酶包括但不限于 Taq 连接酶、Tth 连接酶和 Pfu 连接酶。热稳定性连接酶可以由嗜热性或极端嗜热性有机体获得,所述有机体包括但不限于原核、真核或古微生物。在本发明所述方法中也可采用某些 RNA 连接酶。

[0139] 在该连接步骤中,必要和 / 或所需的合适的连接酶和任何试剂与反应混合物组合,并保持在足够发生杂交的连接寡核苷酸的连接条件下。本领域技术人员熟知连接反应条件。在连接过程中,在某些实施方案中将反应混合物保持在约 4° C 至约 50° C 的温度下,如约 20° C 至约 37° C 下一段时间,所述时间为约 5 秒至约 16 小时,如约 1 分钟至约 1 小时。在又一个实施方案中,可以将反应混合物维持在约 35° C 至约 45° C 的温度下,例如在或约 37° C 至约 42° C,例如在或约 38° C、39° C、40° C 或 41° C 下一段时间,所述时间为约 5 秒至约 16 小时,如约 1 分钟至约 1 小时,包括约 2 分钟至约 8 小时。在一个代表性实施方案中,连接反应混合物包括 50mM Tris pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP、25mg/ml BSA、0.25 单位 /ml RNA 酶抑制剂、和 0.125 单位 /ml 的 T4DNA 连接酶。在又一个代表性实施方案中,采用 2.125mM 镁离子、0.2 单位 /ml RNA 酶抑制剂;和 0.125 单位 /ml DNA 连接酶。

[0140] 连接后,检测连接产物(第一和第二探针的连接核酸结构域)作为样品中分析物存在的指示,或作为量和任选的位置的测量。在这些实施方案中,连接产物包括在分析物结合结构域的每个末端处终止的单链核酸分子(其为第一和第二探针的两个邻近核酸结构域的连接产物,以及任意中间间隔 / 盒式寡核苷酸,如果使用的)。

[0141] 连接步骤之后此方法的下一个步骤是测定连接产物在反应混合物中的存在以检测样品中的靶分析物。换言之,针对任何所产生的连接产物的存在对反应混合物进行筛选等(即,试验、评估、评价、测试等)以检测所试验的样品中靶分析物的存在。

[0142] 如上所述,在邻位试验的供选择的实施方案中,邻位探针的核酸结构域的相互作用的产物可以是延伸产物,例如其中至少一个邻位探针的核酸结构域发生延伸(例如使用其它核酸结构域作为延伸模板),或其中探针的核酸结构域杂交到普通的加入的寡核苷酸(例如加入的杂交模板,所述杂交模板可以预杂交于核酸结构域之一),并且分别使用所加入的寡核苷酸或核酸结构域作为延伸模板,可以延伸至少一个核酸结构域和 / 或所加入的寡核苷酸。可以检测该延伸,所述检测类似于本文所述的连接产物的检测。

[0143] 在最广泛的意义上,可以使用任何便利的方案检测由上述方法产生的相互作用产物例如连接产物或延伸产物。特定的检测方案可以根据所需的灵敏度和实施方法的应用而有所不同。在某些实施方案中,可以直接检测核酸连接或延伸产物而不进行任何扩增,而在其它实施方案中检测方案可以包括扩增部分,其中连接或延伸产物核酸的拷贝数增加,以例如提高特定试验的灵敏度。当可以不扩增进行检测时,可以按照许多不同的方式检测核酸连接或延伸产物。例如,可以直接标记一个或多个邻位探针的核酸结构域,所述的标记例如荧光标记、或分光光度标记、或放射性同位素标记或使用任何产生信号的标记物,以使连接产物直接标记。在这些实施方案中,可以按照大小将直接标记连接产物从剩余的反应混合物中分离,包括未连接的直接标记的连接寡核苷酸(即,核酸结构域寡核苷酸或盒式寡核苷酸),以检测连接核酸。供选择地,构象选择性探针,例如可以采用分子信标(beacon)(如以下更加详细的描述的)检测连接产物的出现,其中这些探针连接于跨过连接的核酸的序列,因此仅以其整体存在于连接产物中。可以类似地检测延伸产物,例如使用设计用于结合于延伸产物的探针,或通过掺入标记的核苷酸的探针等。

[0144] 如上所述,在题述方法的某些实施方案中,检测步骤包括扩增步骤,其中连接或延伸核酸的拷贝数增加,例如为了提高实验的灵敏度。根据需要,扩增可以是线性的或指数的,其中感兴趣的代表性扩增方案包括但不限于:聚合酶链反应(PCR);恒温扩增等。

[0145] 当检测步骤包括扩增步骤时(更具体地缀合产物的体外扩增步骤),可以检测到扩增产物(或扩增产物)以检测分析物。本领域熟知聚合酶链反应(PCR),在第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号、第4,965,188号和第5,512,462号美国专利中有所描述,将其公开引入本文作为参考。在代表性的PCR扩增反应中,将包括上述连接核酸或连接产物或延伸产物(也将其视为扩增反应中的模板核酸)的反应混合物与在引物延伸反应例如PCR引物中采用的一种或多种引物组合(如在几何(或指数)扩增中采用的正向和反向引物,或在线性扩增中采用的单一引物)。模板核酸(为了方便以下称为模板DNA)所接触的寡核苷酸引物应具有足够的长度以在退火条件下(以下更加详细地描述)提供与互补模板DNA的杂交。引物的长度通常为至少10bp,长度通常为至少15bp,长度更通常为至少16bp,长度可以长至30bp或更长,其中引物的长度通常为18至50bp,长度通常为约20至35bp。模板DNA可以接触单一引物或一组两个引物(正向和反向引物),想要模板DNA的线性或指数扩增,取决于引物是否扩增。

[0146] 除了上述成分,题述方法中制备的反应混合物通常包括聚合酶和三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)。所需聚合酶活性可通过一种或多种不同的聚合酶提供。在许多实施方案中,反应混合物包括至少家族A聚合酶,其中感兴趣的代表性家族A聚合酶包括但不限于:栖热水生菌(*Thermus aquaticus*)聚合酶,其包括天然存在的聚合酶(Taq)及其衍生物和同源物,如Klentaq(如Barnes等,Proc.Natl.Acad.SciUSA(1994)91:2216-2220所描述);嗜热菌(*Thermus thermophilus*)聚合酶,其包括天然存在的聚合酶(Tth)及其衍生物和同源物等。在高保真反应中实施扩增反应的某些实施方案中,反应混合物可以进一步包括具有3'-5'外切酶活性的聚合酶,例如由家族B聚合酶所提供的,其中感兴趣的家族B聚合酶包括但不限于:嗜热高温球菌(*Thermococcus litoralis*)DNA聚合酶(Vent),如Perler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89:5577-5581所描述的,火球菌属(*Pyrococcus*)物种GB-D(Deep Vent);强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)DNA聚合酶(Pfu),如Lundberg

等人, Gene (1991) 108: 1-6 所描述的, 焦酚热球菌 (*Pyrococcus woesei*) (Pwo) 等。其中反应混合物包括家族 A 和家族 B 聚合酶, 家族 A 聚合酶可以按照多于家族 B 聚合酶的量存在于反应混合物中, 其中活性的差异通常为至少 10 倍, 更通常为至少约 100 倍。通常反应混合物会包括四种不同类型的 dNTP, 其对应于四种天然存在的碱基, 即 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP。在题述方法中, 每种 dNTP 通常以约 10 至 5000  $\mu$ M 的量存在, 通常为约 20 至 1000  $\mu$ M。

[0147] 在题述方法的该检测步骤中制备的反应混合物可以进一步包括水性缓冲介质, 所述缓冲介质包括单价离子源、二价阳离子源和缓冲剂。可采用单价离子的任何便利的来源, 如 KCl、K- 醋酸盐、 $\text{NH}_4$ - 醋酸盐、K- 谷氨酸盐、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、硫酸铵等。二价阳离子可以是镁、锰、锌等, 其中阳离子通常为镁。可采用镁离子的任何便利来源, 包括  $\text{MgCl}_2$ 、Mg- 醋酸盐等。存在于缓冲液中的  $\text{Mg}^{2+}$  的量可以为 0.5 至 10mM, 但优选地为约 3 至 6mM, 理想地为约 5mM。存在于缓冲液中的代表性的缓冲剂或盐包括 Tris、Tricine、HEPES、MOPS 等, 其中缓冲剂的量通常为约 5 至 150mM, 通常为约 10 至 100mM, 更通常为约 20 至 50mM, 其中在某些优选的实施方案中缓冲剂存在的量足以提供约 6.0 至 9.5 的 pH, 其中最优选的是在 72° C 下 pH 为 7.3。存在于缓冲介质中的其它试剂包括螯合剂, 如 EDTA、EGTA 等。

[0148] 在制备题述方法的该步骤的反应混合物时, 各种组成成分可以以任何便利的顺序组合。例如, 缓冲液可以与引物、聚合酶、然后与模板 DNA 组合, 或所有的各种组成成分可以同时组合以产生反应混合物。

[0149] 可以使用任何便利的方案检测扩增反应的扩增产物, 只要其中所采用的特定方案可以非特异性地或特异性地检测扩增产物, 如下文更加详细地描述的。感兴趣的代表性的非特异性检测方案包括采用信号生成系统的方案, 所述信号生成系统例如通过相互作用选择性地检测双链 DNA 产物。在该实施方案中使用的代表性的可检测分子包括荧光核酸染色剂, 如溴乙吡啶染料, 包括其单体或同或异二聚体, 当与核酸复合时荧光增强。溴乙吡啶染料的实例包括乙吡啶同二聚体、溴化乙锭、碘化丙啶、和其它烷基取代的溴乙吡啶染料。在本发明的另一个实施方案中, 核酸染色剂为或包含了吡啶染料、或其同或异二聚体, 如吡啶橙、吡啶同二聚体、乙吡啶 - 吡啶异二聚体、或 9- 氨基 -6- 氯 -2- 甲氧基吡啶。在本发明的另一个实施方案中, 核酸染色剂为吡啶或咪唑染料, 如 Hoechst33258、Hoechst33342、Hoechst34580 (BIOPROBES34, Molecular Probes, Inc. Eugene, Oreg., (May2000)) DAPI (4', 6- 二脒基 -2- 苯基咪唑) 或 DIPI (4', 6-( 二咪唑啉 -2- 基 )-2- 苯基咪唑)。其它允许使用的合适染色剂包括但不限于 7- 氨基放线菌素 D、羟基二脒替、LDS751、选择的补骨脂素 (呋喃香豆素)、苯乙烯基染料、金属复合物如钆复合物、和过渡金属复合物 (例如掺入  $\text{Tb}^{3+}$  和  $\text{Eu}^{3+}$ )。在本发明的某些实施方案中, 核酸染色剂为青色素染料或青色素染料的同或异二聚体, 当与核酸连接时荧光增强。可以使用 Lee 的第 4, 883, 867 号 (1989)、Yue 等人的第 5, 582, 977 号 (1996)、Yue 等人的第 5, 321, 130 号 (1994)、和 Yue 等人的第 5, 410, 030 号 (1995) 美国专利申请中所述的任意染料, 将所有四篇专利引入本文作为参考, 包括来自 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg 的商标为 TOTO、BOBO、POPO、YOYO、TO-PRO、BO-PRO、PO-PRO 和 YO-PRO 的市售核酸染色剂。可以使用 Haugland 等人的第 5, 436, 134 号 (1995)、Yue 等人的第 5, 658, 751 号 (1997)、和 Haugland 等人的第 5, 863, 753 号 (1999) 美国专利申请中所述的任意染料 (将所有三篇专利引入本文作为参考), 包括来自 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg 的商标为 SYBR、SYTO、SYTOX、PICOGREEN、OLIGREEN、

和 RIBOGREEN 的市售核酸染色剂。在本发明的其它实施方案中,核酸染色剂为掺入氮杂或多聚氮杂苯唑啉(polyazabenzazolium)杂环的单体、同二聚体、或异二聚体青色素染料,如氮杂苯并噻唑、氮杂苯并咪唑、或氮杂苯并噻唑,当与核酸相连时荧光增强,包括来自 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg 的商标为 SYTO、SYTOX、JOJO、JO-PRO、LOLO、LO-PRO 的市售核酸染色剂。

[0150] 在又一个其它实施方案中,与通常双链分子相反的是,可以采用对扩增产物具有特异性的信号生成系统来检测扩增。在这些实施方案中,信号生成系统可以包括特异性结合于扩增产物中存在的序列的探针核酸,其中可以使用直接或间接可检测的标记物对所述探针核酸进行标记。直接可检测的标记物是能够直接检测而无需使用其它试剂的标记物,而间接可检测的标记物是通过采用一种或多种其它试剂而可检测的标记物,例如,其中标记物为两个或多个成分构成的信号生成系统。在许多实施方案中,标记物为直接可检测的标记物,其中感兴趣的直接可检测的标记物包括但不限于:荧光标记物、放射性同位素标记物、化学发光标记物等。在许多实施方案中,标记物为荧光标记物,其中在该实施方案中所采用的标记试剂为荧光标记的核苷酸(或多种核苷酸),例如荧光标记的 CTP (如 Cy3-CTP、Cy5-CTP) 等。可用于标记核苷酸以制备标记探针核酸的荧光部分包括但不限于:荧光素、青色素染料如 Cy3、Cy5、Alexa555、Bodipy630/650 等。本领域已知也可采用其它标记物,例如上文所述的那些。

[0151] 在某些实施方案中,使用“能量转移”标记物对特异性标记的探针核酸进行标记。如本文所使用的,“能量转移”是指一个过程,荧光修饰基团借助所述过程改变荧光基团的荧光发射。如果荧光修饰基团是淬灭基团,那么来自荧光基团的荧光发射会减弱(淬灭)。能量转移可以通过荧光共振能量转移或通过直接能量转移来发生。在这两种情况下,能量的具体转移机制是不同的。应懂得在本申请中对能量转移的任何提及包括所有这些机制不同的现象。如本文所使用,“能量转移对”是指参与能量转移的任意两个分子。通常一个分子充当荧光基团,另一个充当荧光修饰基团。“能量转移对”用来指形成单一复合物的一组分子,在其中发生能量转移。该复合物可以包括例如彼此不同的两个荧光基团,和一个淬灭基团,两个淬灭基团和一个荧光基团,或多个荧光基团和多个淬灭基团。在有多个荧光基团和/或多个淬灭基团的情况下,单个基团可以彼此不同。如本文所使用的,“荧光共振能量转移”或“FRET”是指能量转移现象,其中激发的荧光基团所发射的光至少部分被荧光修饰基团吸收。如果荧光修饰基团为淬灭基团,那么该基团能够将所吸收的光辐射为不同波长的光,或其可以由于加热而消散。FRET 依赖荧光基团的发射光谱和淬灭基团的吸收光谱之间的重叠。FRET 也取决于淬灭基团和荧光基团之间的距离。在某些临界距离以上时,淬灭基团不能够吸收由荧光基团发射的光,或仅能够微弱地吸收。如本文所使用的“直接能量转移”是指能量转移机制,其中荧光基团和荧光修饰基团之间不存在光子的通过。不被单一机制所束缚,认为在直接能量转移中,荧光基团和荧光修饰基团干扰彼此的电子结构。如果荧光修饰基团为淬灭基团,这甚至可导致淬灭基团防止荧光基团发射光。

[0152] 可以以多种不同方式构造能量转移标记探针核酸,所述的核酸例如寡核苷酸,只要其包括供体、受体和靶核酸结合结构域。同样地,在这些实施方案中采用的能量转移标记寡核苷酸为核酸检测子,所述检测子包括荧光能量供体即供体所处的荧光团结构域,和荧光能量受体即受体所处的受体结构域。如上所述,所述的供体结构域包括供体荧光团。所

述的供体荧光团可处于核酸检测子中的任何位置,但是通常存在于检测子的 5' 末端。受体结构域包括荧光能量受体。受体可以位于受体结构域的任何位置,但通常存在于核酸检测子或探针的 3' 末端。

[0153] 除了荧光团和受体结构域,能量转移标记探针寡核苷酸也包括靶核酸结合结构域,所述靶核酸结合结构域结合于感兴趣(如上所述)的扩增产物中存在的靶核酸序列,例如在(如上所定义的)严格的杂交条件下。该靶结合结构域的长度通常为约 10 至约 60 个核苷酸,通常为约 15 至约 30nt。根据寡核苷酸和试验本身的性质,靶结合结构域可以杂交于模板核酸区域或引物延伸产物区域。例如,当试验为 5' 核酸酶试验时,例如当采用 **TaqMan®** 类型的寡核苷酸探针时,靶结合结构域在严格的条件下杂交于模板核酸的靶结合位点,所述位点为引物结合位点的下游或 3' 端。在一个供选择的实施方案中,例如在分子信标类型试验中,靶结合结构域杂交于引物延伸产物的结构域。在这些实施方案中采用的包括所有上述三个结构域的能量转移标记寡核苷酸的总长度通常为约 10 至约 60 个核苷酸,通常为约 15 至约 30 个核苷酸。

[0154] 在某些实施方案中,当能量转移标记寡核苷酸不杂交于靶核酸时,对能量转移标记寡核苷酸进行构造以在荧光团激发后,能量转移标记寡核苷酸探针的荧光团和受体之间发生能量转移。

[0155] 在某些实施方案中,寡核苷酸为单链分子,其中不形成分子内结构并且由于供体和受体的间隔提供单链线性形式的能量转移而在其中发生能量转移。在这些实施方案中,当标记寡核苷酸探针杂交于靶核酸时,在荧光团激发后,标记寡核苷酸探针的荧光团和受体之间也发生能量转移。该标记寡核苷酸探针的具体实例包括 **TaqMan®** 类型探针,如第 6, 248, 526 号美国专利所描述,将其公开引入本文作为参考(以及 Held 等人, *Genome Res.* (1996) 6:986-994; Holland 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1991) 88:7276-7280; 和 Lee 等人, *Nuc. Acids Res.* (1993) 21:3761-3766)。在许多这些实施方案中,靶核酸结合结构域为杂交于即互补于模板核酸序列的结构域,即靶核酸结合结构域的靶核酸为存在于模板核酸中的序列(即,伪目标或替代核酸)。

[0156] 在其它实施方案中,当能量转移标记寡核苷酸探针杂交于靶核酸时,对探针寡核苷酸进行构建以使在荧光团激发后在能量转移标记寡核苷酸探针的荧光团和受体之间不发生能量转移。这些类型的探针结构的实例包括: **Scorpion** 探针(如 Whitcombe 等人, *Nature Biotechnology* (1999) 17:804-807; 第 6, 326, 145 号美国专利所描述的,将其公开引入本文作为参考), **Sunrise** 探针(如 Nazarenko 等人, *Nuc. Acids Res.* (1997) 25:2516-2521; 第 6, 117, 635 号美国专利所描述的,将其公开引入本文作为参考), 分子信标(Tyagi 等人, *Nature Biotechnology* (1996) 14:303-308; 第 5, 989, 823 号美国专利,将其公开引入本文作为参考), 和构象辅助探针(如 WO2000/75378 所描述的,将其公开引入本文作为参考)。在许多该实施方案中,靶结合序列或结构域包括与扩增反应的引物延伸产物的序列互补并且不与伪靶核酸中存在的序列互补的杂交结构域。

[0157] 在题述方法中的下一步为检测来自感兴趣的标记扩增产物的信号,其中信号检测可以根据所采用的特定信号生成系统而有所不同。在某些实施方案中,仅测定了可检测信号例如荧光的存在或不存在,并且用于题述试验中,例如通过检测伪靶核酸和 / 或其扩增产物来测定或确定靶核酸的存在或不存在。根据所采用的特定标记,信号的检测可以表明

靶核酸的存在或不存在。

[0158] 在信号生成系统为荧光信号生成系统的那些实施方案中,信号检测通常包括检测来自反应混合物的荧光信号的改变以获得试验结果。换言之,评估反应混合物所生成的荧光信号的任意调整。根据所采用的标记的性质,改变可以是荧光增强或减弱,但是在某些实施方案中是荧光增强。可以使用任何便利的手段筛选荧光增强的样品,例如合适的荧光计,如热稳定电池或读板式荧光计。使用已知的荧光计对荧光进行合适的监测。来自这些部件的信号,例如以光电倍增电压的形式发送到数据处理面板并转化为与各样品管相关的光谱。可以同时评估多管,如 96 管。

[0159] 当检测方案为实时方案,例如,当在实时 PCR 反应方案中采用时,在整个反应中可以按照该方式在频繁的间隔下收集数据,例如每 3 分钟。通过监测每个循环中来自样品的反应性分子的荧光,能够以各种方式监测扩增反应进程。例如可以分析熔融峰提供的数据,例如通过计算熔融峰下的面积和根据将这些数据对循环数作图。

[0160] 可以例如使用预选择的荧光部分如染料的“拟合”来分辨以该方式生成的光谱,以形成代表每个发出信号的部分(即,荧光团)的峰。可以测定峰下的面积,此面积代表每个信号的强度值,如果需要,将其表达为彼此的商。信号强度和 / 或比例的微分使得能够通过反应或在不同反应条件下如不同温度下记录标记的探针变化。所述的改变与寡核苷酸探针和靶序列之间的结合现象或结合于靶序列的寡核苷酸探针的降解相关。在微分峰下的面积的积分使得能够计算标记效果的强度值。

[0161] 针对荧光改变筛选混合物提供一个或多个试验结果,这取决于是否在引物延伸反应末筛选样品一次或多次,例如在扩增反应的每个循环后(例如,如在实时 PCR 监测中所进行的)。

[0162] 可以以各种方式解释上述生成的数据。在其最简单的形式中,在扩增反应的过程中或末期来自样品的荧光增强或降低表示存在于样品中的靶分析物的量升高,例如,与在反应混合物中检测到的扩增产物的量相关,表明扩增反应进行的事实,因此靶分析物实际上存在于初始样品中。也可以通过监测整个扩增过程的扩增反应来定量。如上所述,定量也可包括在反应混合物中测试一种或多种核酸对照。

[0163] 以这种方式可容易地针对靶分析物(或多种靶分析物)的存在筛选(或评估或测试等)反应混合物。此方法适合检测单一靶分析物以及多重分析,在所述的多重分析中测试样品中的两种或多种靶分析物。在这些后面的多重情况下,可以采用的不同探针组的数量通常为约 2 个至约 20 个或更高,例如高达 100 个或更高,1000 个或更高,等等。

[0164] 当使用本发明所述的阻断试剂时,使用若干不同的邻位探针组(多重)同时以及在单一反应中对许多分析物进行的分析通过所获得的升高的特异性和灵敏度而得到提高,并且可进一步通过使用结合夹板方法将其提高。可以设计每个探针组以产生独特的相互作用(例如连接)产物,所述产物可用于测定探针组所寻找的分析物的存在或不存在、数量和 / 或位置。可直接或在扩增后使用任何由文献中已知的已建立的核酸分子的分析方法检测相互作用产物,包括液相色谱法、电泳法、质谱法、显微镜法、实时 PCR、荧光探针等。特别感兴趣的是结合夹板方法与具有“DNA 阵列”读出格式的组合。来自多重邻位试验的若干独特的相互作用产物可以杂交于标准化的 DNA 阵列,所述标准化的 DNA 阵列携带许多与连接产物序列互补的寡核苷酸序列(标签)。可通过在 DNA 阵列上的位置识别每种杂交于阵列的相互作

用产物,并且在给定杂交地点的检测强度将表示特异性相互作用产物的量,因此表示导致该相互作用产物的分析物的量。相互作用产物的检测可通过光谱测定、荧光、放射性同位素等实现。在扩增反应(PCR)中,可以使用荧光标记的引物或荧光标记的核苷酸将荧光部分便利地引入相互作用产物中。DNA 阵列可以是膜上的简单的斑点印迹阵列,其含有少量斑点或携带成百上千个斑点的高密度的阵列。

[0165] 可以对本发明所述方法的检测步骤进行改变以进一步降低与非特异性核酸杂交事件相关的背景。该改变包括调整为能够降低任何非特异性核酸杂交事件的方法。在某些实施方案中,可以将蛋白加入含有样品和邻位探针的混合物中以降低较弱的和非特异性的 DNA 杂交事件。例如,大肠杆菌单链 DNA 结合蛋白已用于提高引物延伸反应和 PCR 反应的产率和特异性(第 5,449,603 号和第 5,534,407 号美国专利)。噬菌体 T4 的基因 32 蛋白(单链 DNA 结合蛋白)可以明显提高扩增较大 DNA 片段的能力(Schwartz 等人, *Nucl. Acids Res.* 18:1079(1990)) 并提高 DNA 聚合酶的保真度(Huang, *DNA Cell Biol.* 15:589-594(1996))。当采用时,该蛋白可用于使反应混合物中的浓度达到约 0.01ng/ $\mu$ L 至约 1  $\mu$ g/ $\mu$ L;如约 0.1ng/ $\mu$ L 至约 100ng/ $\mu$ L;包括约 1ng/ $\mu$ L 至约 10ng/ $\mu$ L。

[0166] 在其它实施方案中,双链核酸可用作第一和第二邻位探针的核酸结构域以降低较弱的和非特异性的 DNA 杂交事件。

[0167] 如上所述,如此设计本发明所述方法以使第一和第二探针的核酸结构域之间的相互作用(例如连接)仅在邻位探针与分析物结合时发生。然而,在所有该类型的试验的情况下,不能总是保证这样,并且可能有一些背景相互作用,例如,核酸结构域的连接;如果探针与在溶液中随机邻近(通过借助夹板要求所有探针的核酸结构域互相杂交可降低其可能性,以使该相互作用发生)。因此,为了进一步使得由于未反应的(即未结合的)探针导致背景的可能性降低或者最小化,除上述阻断试剂外,可以使用阻断寡核苷酸。

[0168] 阻断寡核苷酸与第一和第二邻位探针的核酸结构域的游离末端结合(即杂交或退火)。因此阻断寡核苷酸可以结合于 5' 邻位探针的核酸结构域的游离 3' OH 末端和 3' 邻位探针的核酸结构域的游离 5' 磷酸酯末端。阻断寡核苷酸的结合在局部高浓度夹板的存在下可以胜出,如当所有探针一起结合于分析物上时会发生的那样。阻断寡核苷酸可以按照这种方式防止第一和第二结构域在分析物结合不存在时杂交到夹板。因此可以在与分析物的结合不存在时防止 5' 和 3' 探针的游离末端相互作用。当所有探针结合于分析物时,夹板的局部浓度,尤其是当夹板形成了第三邻位探针的核酸结构域时,足以超过阻断寡核苷酸;第一和第二结构域杂交于夹板并且取代阻断寡核苷酸。

[0169] 因此阻断寡核苷酸允许使用基于竞争的策略来降低背景并进一步提高试验的灵敏度。

[0170] 阻断寡核苷酸的长度可以为约 4-100 个核苷酸,例如 6-75 或 10-50 个。它们可以杂交于第一或第二探针的核酸结构域的游离末端处或附近(“附近”是指在游离 3' 或 5' 末端的 1-20 或 1-10 个以内,例如 1-6 个核苷酸以内)。杂交区域可以是 3-15 个核苷酸长度,例如 3-12、3-10、3-8、4-8、3-6、4-6 个。

[0171] 可以便利地设计阻断寡核苷酸以具有发夹结构以使阻断寡核苷酸可以连接于不能杂交于夹板的邻位探针的末端。

[0172] 通常以超过各自探针的量使用阻断寡核苷酸,例如过量 2-1000 倍,例如 20-500、

50-300、100-500 或 100-300 倍,例如 20、200 或 300 倍。

[0173] 在使用低亲和力和慢结合动力学的邻位探针检测分析物的情况下,邻位探针可以与样品接触并在足够高以促进邻位探针与分析物结合的浓度下孵育。该孵育步骤可以迅速稀释成大批的冷缓冲液(例如,不包括分析物或邻位探针的缓冲液),并且随后将一部分该稀释液加入连接反应混合物中。该连接反应混合物可以含有盒式寡核苷酸(如果使用)、ATP 和连接酶。低温,例如约 0° C 至约 20° C,包括约 4° C 至约 10° C,使已存在的邻位探针分析物复合物的解离最小化,而大量的稀释导致未结合的邻位探针浓度下降,从而降低其反应性并使背景信号最小化。

[0174] 在该实施方案中,通过使用较小的样品孵育体积进行试验,所述较小的孵育体积为约 1  $\mu$  l 至约 20  $\mu$  l,如约 1  $\mu$  l、或约 2  $\mu$  l、或约 3  $\mu$  l、或约 4  $\mu$  l、或约 5  $\mu$  l 或约 6  $\mu$  l 的样品,然后将较大的孵育体积加入阻断试剂和邻位探针加入盒中,所述较大的孵育体积为 8  $\mu$  l 至约 1.5ml 或更多,如约 20  $\mu$  l 至约 1.3ml,如约 50  $\mu$  l 至约 1ml,如约 75  $\mu$  l 至约 800  $\mu$  l,如约 100  $\mu$  l 至约 500  $\mu$  l,如约 200  $\mu$  l 至约 300  $\mu$  l。由于探针和分析物之间的结合在第一和第二核酸结构域连接或杂交和延伸之前没有时间解离,因此在最终孵育体积中的邻位探针的有效浓度得到稀释,在保持信号的同时降低了背景。只要能够从较大如超过 100  $\mu$  l 或更多的体积中浓缩连接或延伸产物,然后检测邻位依赖性相互作用,该方法就能够实现极高的灵敏度。在该实施方案中,可以通过使用单链结合蛋白降低探针-探针相互作用。

[0175] 与复杂样品相关的问题可以进一步通过在分析前稀释复杂样品来解决。然而,本发明所述检测方法的一个优势是阻断试剂通过占据潜在的非靶向特异性结合位点而有效地降低样品的复杂度。然而,复杂样品的稀释可以与本发明所述阻断试剂组合而进一步降低背景信号。实际上,稀释样品的步骤会大大降低探针非特异性结合的蛋白的量,从而降低所需探针的浓度。虽然也稀释分析物,但是邻位探测的高灵敏度将提供良好的检测和定量。

[0176] 可均质地(即在溶液中)采用上述本发明的方法,或供选择地异质地进行,使用固相,例如其中分析物固定于固相上,允许使用洗涤步骤。固相试验的使用带来了优势,特别是对于检测困难的样品而言:洗涤步骤可以辅助抑制性成分的去除,并且可以从不想要的大样品体积中浓缩分析物。由于未结合的分析物和探针可以通过洗涤除去,因此可以使用更高浓度和更大量的邻位探针。通过洗涤除去未结合探针或未相互作用的探针的能力也意味着固相试验与均质试验相比可以耐受更低纯度的邻位探针。

[0177] 可以以多种方式将分析物固定于固相上。因此,考虑固相试验的若干实施方案,例如固相结合夹板试验。在一个这样的实施方案中,可以将一个(或多个)第一或第二(或第三,如果使用)邻位探针(或可能能够)固定于固相(或固体支持物)上。分析物能够首先被一个(或多个)固定的(或可固定的)探针捕获,其次被随后加入的探针(或多个探针)结合。在该方案中,前述活动性作用可以不存在于结合步骤中但与洗涤步骤相关。优选地,含有分析物的样品在与固相结合(即固定化的,或可固定的)探针(或多个探针)接触之前与阻断试剂接触,优选地与非固定化的/不可固定的探针(或多个探针)同时加入反应混合物中,以使活动性作用也有助于检测(结合)步骤。

[0178] 固定化的邻位探针可以以任意便利的方式固定于,即结合于支持物上。因此固定化的方式或手段和固体支持物可以根据选择选自任意数量的如本领域广泛已知的和文献

中所描述的固定手段和固体支持物。因此,探针可以直接结合于支持物,例如通过分析物结合结构域(例如化学交联的),可以借助连接基团,或通过中间结合基团(或多个基团)(例如,借助生物素-链酶亲和素相互作用的方式)间接结合。因此,可以将邻位探针以及支持物上提供的固定手段一起提供(例如,亲和结合配偶体,例如能够结合其结合配偶体的生物素或半抗原,即同源结合配偶体,例如链酶亲和素或抗体)。可以在结合于分析物之前或之后对探针进行固定。此外,该“可固定的”探针可以与样品和支持物一起接触。

[0179] 固体支持物可以为任意熟知的目前广泛用于或提议用于固定、分离等的支持物或基质。这些可采用颗粒(例如,磁性或非磁性珠子)、片状物、凝胶、滤膜、膜、纤维、毛细管或微滴定条、管、板或孔等的形式。

[0180] 所述的支持物可以由玻璃、二氧化硅、乳胶或聚合物材料制成。合适的是具有用于结合分析物的高表面积的材料。这样的支持物可以具有不规则表面并且可以是例如多孔的或微粒状的,例如颗粒、纤维、网、烧结物或筛。微粒材料例如珠子由于其更大的结合能力而有用,特别是聚合珠子。

[0181] 便利地,根据本发明使用的微粒固体支持物可以包括球形珠子。珠子的大小不是关键的,但是它们的直径的级数例如可以为至少 1,以及优选至少  $2\ \mu\text{m}$ ,最大直径优选地不大于 10,以及例如不大于  $6\ \mu\text{m}$ 。

[0182] 单分散颗粒,即大小基本均匀的颗粒(例如直径标准偏差小于 5% 的尺寸)的优势在于其提供非常均匀的反应重现性。可以通过如 US-A-4336173 中所述的技术制备典型的单分散聚合物颗粒。

[0183] 然而,为了有助于操纵和分离,磁珠是有利的。如本文所使用的术语“磁性”是指当置于磁场中是支持物能够具有赋予的磁矩,因此在磁场作用下可移动。换言之,包括磁性颗粒的支持物可以容易地通过磁聚集来除去,其在分析物结合步骤之后提供快速、简单和有效的分离颗粒的方式。

[0184] 在另一个实施方案中,除了均质结合夹板试验的非固定化的邻位探针外,可以使用仅包括结合结构域的固定化的(或可固定的)分析物特异性探针(即分析物捕获探针)。因此在该实施方案中分析物首先被固定化的或可固定的捕获探针捕获,所述的捕获探针仅用于将分析物固定于固相上,随后将固定的分析物与阻断试剂和邻位探针进行孵育。在该实施方案中,捕获探针可以为任意能够直接或间接结合分析物的结合配偶体(例如,如以上所讨论的关于邻位探针的分析物结合结构域)。更特别地,该捕获探针特异性地结合于分析物上。由于方法的该实施方案需要至少三个探针(结合结构域)同时结合于分析物或分析物复合物,因此可能找到至少三个不同的表位,这赋予试验较高的特异性。

[0185] 在又一个实施方案中,分析物可以自身固定(或可固定)于固相,例如通过非特异性吸附。在一个特定的实施方案中,分析物可以存在于任选地固定和/或透化的细胞内,所述分析物(能够)连接于固体支持物。

[0186] 上述方法导致对存在于反应混合物中的邻位依赖性相互作用的检测,转而对所试验的样品中的靶分析物的量提供测量。测量可以是定性的或定量的。

[0187] 显然的是,上述实施方案关于但不限于邻位探针连接试验。因此,上述特征可应用于利用本文所述阻断试剂的其它基于探针和基于邻位探针的试验中。

[0188] 因此,上述检测复杂样品中的一种或多种靶分析物的存在的方法可用于多种不同

应用中。

[0189] 题述方法可以用于针对样品中一种或多种靶分析物的存在或不存在来筛选样品。如上所述,本发明提供了检测样品中一种或多种靶分析物的存在或定量的方法。

[0190] 可以采用题述方法来检测多个不同类型样品中一种或多种靶分析物的存在,包括具有大量非靶向实体的复杂样品,其中与未利用本发明所述的阻断试剂的等价方法相比,题述方法的阻断试剂允许更加优越地检测靶分析物(或多种靶分析物)。同样地,题述方法为高度灵敏的检测简单或复杂样品中的一种或多种靶分析物的方法。在题述方法中试验的样品在许多实施方案中来自生理来源,如以上更加详细地讨论的。

[0191] 除了检测多种分析物,题述方法也可用于筛选化合物,所述化合物调节邻位探针的分析物结合结构域与分析物的结合区域之间的相互作用,即分析物结合结构域与分析物的结合。术语调节包括降低(例如抑制)和提高两个分子之间的相互作用。所述的筛选方法可以是体外或体内形式,其中本领域技术人员可以容易地开发出两种形式。

[0192] 可以通过上述方法筛选多种不同的候选试剂。候选试剂包括多种化学物种,但它们通常为有机分子,优选分子量大于 50 并且小于约 2,500 道尔顿的小型有机化合物。候选试剂包括与蛋白质结构相互作用所必需的官能团,特别是氢键,并且其通常包括至少一种氨基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个化学官能团。候选试剂通常包括取代一种或多种以上官能团的碳环或杂环结构和 / 或芳香或多芳香结构。候选试剂也存在于生物分子中,包括肽、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。

[0193] 从广泛的来源中获得候选试剂,包括合成或天然化合物库。例如,可用多种方式来随机和定向合成多种有机化合物和生物分子,包括随机寡核苷酸和寡肽的表达。供选择地,以细菌、真菌、植物和动物提取物形式存在的天然化合物库是可用的或容易制备的。此外,可以容易地将天然或合成制备的库和化合物通过传统的化学、物理和生物化学手段进行修饰,并可以用于制备组合库。已知的药理试剂可以经受定向或随机化学修饰,如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等以产生结构类似物。

[0194] 在上述筛选试验中确定的试剂可用于各种方法中,包括调节靶分析物活性的方法,和用于与其出现和 / 或活性相关的条件中。

[0195] 如上所述的,也提供了用于实施题述方法的试剂盒。例如,在某些实施方案中,用于实施题述方法的试剂盒包括阻断试剂,所述阻断试剂包括如上所述的如核酸成分偶联的分析物特异性结合蛋白。所述试剂盒可以进一步包括至少一组邻位探针,其中组中的至少一个邻位探针,但优选至少两个和更优选每个邻位探针包括如上所述的蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域。如上所述,某些方案可以采用两个或多个不同组的该探针以同时检测样品中的两种或多种靶分析物,例如,以多重和 / 或高通量形式。同样地,在某些实施方案中,试剂盒将包括不同两个或多个组的邻位探针。此外,试剂盒成分所实施的方案中要求或需要的其它试剂是可以存在的,其中所述的其它试剂包括但不限于以下物质的一种或多种:连接酶、间隔 / 盒式寡核苷酸、可连接的寡核苷酸,聚合酶,普通杂交模板(或“延伸模板”),阻断寡核苷酸,用于固定探针、结合结构域或分析物的固体支持物,用于固定探针、结合结构域或分析物的部件,检测部件例如荧光标记的核苷酸或寡核苷酸,互补核酸对,单链结合蛋白和 PCR 扩增试剂(例如,核苷酸、缓冲液、阳离子等)等。在某些实施方案中,所述的试剂盒可以包括如上所述的为降低孵育混合物有效体积而采用的成分,例如体积排斥剂。

试剂盒成分可以存在于独立的容器中,或一种或多种成分可以存在于相同容器中,其中所述容器用于设计试剂盒的试验,并且所述容器可以是储存容器和/或在试验过程中采用的容器。

[0196] 除了上述成分,题述试剂盒可以进一步包括实施题述方法的说明书。这些说明书可以以各种形式存在于题述试剂盒中,其中一种或多种可以存在于试剂盒中。这些说明书可以存在的一种形式是在合适介质或基质上印刷的信息,所述的介质或基质是例如印刷了信息的一张或多张纸、在试剂盒的包装中、在包装内含物上等。另一个部件可以是计算机可读的介质,例如软磁盘、CD等,其中将信息记录在其上。可以存在的另一个部件是网站地址,其中可以通过因特网使用所述网站地址得到远端的站点的信息。任何便利的手段都可以存在于试剂盒中。

[0197] 因此,在进一步的方面中,本发明提供了用于检测样品中分析物的方法的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0198] (a) 阻断试剂,其包括与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白;和

[0199] (b) 至少一组探针,其中组中的每个探针包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域。

[0200] 在一个特别优选的实施方案中,本发明提供了用于检测样品中分析物的方法的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0201] (a) 阻断试剂,其包括与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白;

[0202] (b) 至少一组至少第一和第二邻位探针,其中每组中的至少一个探针,更优选的每个探针包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域,其中每个探针组中的每个探针能够同时结合于分析物;

[0203] (c) 任选地,用于介导所述第一和第二邻位探针的核酸之间的相互作用的部件(例如,夹板寡核苷酸和/或连接酶,或聚合酶和/或普通杂交模板);和

[0204] (d) 任选地,检测所述相互作用的部件。

[0205] 如上所述,用于介导核酸之间的相互作用的部件可以包括一个或多个夹板寡核苷酸和/或连接酶,并且该部件可以任选地进一步包括连接反应必须的其它试剂。供选择地,当试验为邻位延伸试验时,用于介导相互作用的部件可以包括聚合酶和/或普通杂交模板,并且任选地进一步包括用于延伸反应中的试剂。用于检测相互作用的部件可以是在以上试验方法的上下文中所述的任意部件,例如在第一和第二探针的核酸结构域上提供的标记物,或可以是扩增部件和用于检测其扩增产物的部件,例如用于PCR反应的试剂(例如,扩增引物,以及任选地聚合酶和/或核苷酸等)和用于检测PCR扩增子等的试剂(例如,Taqman®探针等)。在一个供选择的实施方案中,本发明提供用于检测样品中分析物的方法的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0206] (a) 阻断试剂,其包括与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白;

[0207] (b) 至少一组探针,其中每组中的至少一个探针包括蛋白质分析物结合结构域和核酸结构域;

[0208] (c) 任选地,用于使所述探针的核酸结构域相互作用以产生可检测的信号部件(例如,能够杂交于所述探针的核酸结构域的环形的或可环化的核酸分子,和连接酶和/或聚合酶),优选地,其中所述可检测的信号为核酸分子;和

[0209] (d) 任选地,检测所述可检测的信号的部分。

[0210] 用于使所述探针的核酸结构域相互作用以产生可检测的信号的部分可以包括能够与核酸结构域特异性相互作用以产生可检测的核酸分子的任意核酸分子。例如,所述的部分可以是核酸引物和聚合酶,所述的核酸引物例如引物对,以及所述的聚合酶例如在 PCR 中能够扩增至少一部分探针的核酸结构域的聚合酶。在特别优选的实施方案中,所述的部分包括能够杂交于探针的核酸结构域的环形或可环化的核酸分子(类似于锁式探针)。核酸结构域可以充当连接可环化的核酸分子的模板和 / 或充当滚环扩增(RCA)的引物。因此,所述的部分也可包括连接酶和 / 或聚合酶并且该部分可以任选地进一步包括其它连接酶和 / 或聚合酶反应必须的其它试剂,例如用于 RCA 的引物,其中所述探针的核酸结构域不充当引物。用于检测相互作用的部分可以是在以上试验方法的上下文中所述的任意部分,例如在探针的核酸结构域上提供的标记物或相互作用的核酸(或多个核酸),或可以是扩增部分和用于检测其扩增产物的部分,例如用于 PCR 反应的试剂(例如,扩增引物,任选地聚合酶和 / 或核苷酸等)和用于检测 PCR 扩增子等的试剂(例如, Taqman® 探针等)。

[0211] 所述的试剂盒可以进一步任选地包括用于第一探针和如果存在,用于第二探针的间隔 / 盒式寡核苷酸和 / 或阻断寡核苷酸。

[0212] 所述的试剂盒可以进一步任选地包括针对分析物的固定化的捕获探针,或用于固定的部分所提供的捕获探针。供选择地,所述的试剂盒可包括用于捕获或结合于分析物的固相,或一个或多个所述第一、第二或第三邻位探针可以按照固定或由用于固定的部分提供。

[0213] 将参照以下非限定性实施例、参照以下附图进一步描述本发明,其中:

[0214] 图 1 显示了邻位连接试验反应中非特异性背景信号的降低,所述的试验使用人血浆样品和纯缓冲液样品上的错配 PLA- 探针对 (NGF 和 IL-2)。其中“GP”为山羊阻断探针,“P. D.”为血浆稀释液。

[0215] 图 2 显示了 PLA 反应中单个成分对非特异性背景信号的影响,所述的 PLA 反应使用人血浆样品或血清样品、稀释的人血浆或血清样品 (50/50) 和纯缓冲液样品上的错配 PLA- 探针对 (NGF 和 IL-2) 的。其中“N40”为长度为 40 个核苷酸的随机化的寡核苷酸的样品,“IgG”为来自山羊的大批的 IgG。阻断试剂为缀合于大批的 IgG 的 N40 寡核苷酸。

[0216] 图 3 显示了 PLA- 反应中非特异性背景信号的评价,所述的 PLA 反应在三种人血浆样品 7P、8P、11P, 和含有和不含有阻断试剂的缓冲液中进行,所述阻断试剂由山羊(山羊探针)制成,以及错配靶向特异性抗体来自兔和兔(A)、小鼠和兔(B)和绵羊和小鼠(C)。

[0217] 图 4 显示当使用与阻断探针(“4 步 innova”)不同的针对靶探针的缀合化学(“1 步 innova”)时,在五种人血浆样品 (3P、4P、7P、8P 和 11P) 和缓冲液中的阻断试剂(山羊探针)的作用。PLA 反应使用错配的探针对 51\_7 (A) 和 7\_51 (B), 其中序列号 51 对应于 ICAM, 序列号 7 对应于 TIMP-1。

[0218] 实施例 1

[0219] 材料和方法:

[0220] 抗体的缀合

[0221] 抗体的共价 SMCC 缀合: 对于靶向特异性探针, 多克隆或单克隆抗体为根据制造商 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 的方案缀合于 3' 和 5' 寡核苷酸的硫代 -SMCC

(硫代琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)的。为了产生阻断探针,将随机的 N40 寡核苷酸缀合到使用相同的缀合方案制成的多克隆 IgG 抗体。

[0222] 抗体的共价 Innova 缀合:根据制造商(Innova Biosciences, Cambridge, United Kingdom)的方案将 10  $\mu$ g (1mg/mL) 的抗体缀合于 3' 和 5' 寡核苷酸。为了产生阻断探针,将随机的 N40 寡核苷酸缀合到使用相同的程序制成的多克隆 IgG 抗体。

[0223] 样品

[0224] 人 EDTA 血浆和血清样品由来自 Olink Bioscience 的 8 名健康志愿者友好地提供。K3-EDTA 抗凝管(Hettich Labinstrument, Sollentuna, Sweden)用于血浆样品,将含有凝结激活剂的管(Hettich Labinstrument, Sollentuna, Sweden)用于血清样品。所有样品在 RT 下孵育 1-2 小时并在等分前进一步在 3000rpm 下离心 10 分钟,并储存于  $-20^{\circ}$  C。

[0225] 样品制备

[0226] 将血浆和血清样品,以及缓冲液以 1:2 稀释于 Olink 血浆稀释缓冲液、PBS pH7.4、5mM EDTA、0.13mg/mL 鲑鱼精 DNA、0.1%BSA、0.25mg/mL IgG、0.02% 叠氮钠中,其中含有或不含 2.5  $\mu$ M 的阻断试剂,并在室温下孵育 20 分钟。

[0227] 探针孵育

[0228] 通过在 FBB (PBS pH7.4、25mM Tris pH8、0.1% 鱼胶、4mM EDTA、1mM 生物素、0.016mg/mL 鲑鱼精 DNA、0.02% 叠氮钠)、0.1%TritonX-100/1%BSA 中将探针稀释至浓度为 50-200pM 来制备混合物。将 2  $\mu$ L 的探针混合物转移至每个聚丙烯盖中(Sarstedt, Nümbrecht, Germany),接着加入 2  $\mu$ L 的合适稀释的样品中。将盖放在聚丙烯管上,短暂离心后在  $+4^{\circ}$  C 下孵育过夜。

[0229] 连接和实时 PCR

[0230] 将 100  $\mu$ L 的连接混合物加入每 4  $\mu$ L 的孵育样品中,在  $37^{\circ}$  C 下孵育 10 分钟并在  $65^{\circ}$  C 下热灭活 10 分钟,所述的连接混合物含有 25mM KCl、2.5mM  $MgCl_2$ 、20mM Tris-HCl (pH8)、0.004 Weiss 单位的 T4DNA 连接酶 (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)、100nM 连接寡核苷酸、2mM DTT 和 80  $\mu$ M ATP。实时 PCR 的总反应体积为 20  $\mu$ L,含有 11  $\mu$ L 的 200nM TaqMan 探针,500nM 通用引物、1XTE pH8.0、2X Fast Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 9  $\mu$ L 的连接产物。一式四份运行样品,循环条件为  $95^{\circ}$  C 下 2 分钟,接着在  $95^{\circ}$  C 下进行 15s 和在  $60^{\circ}$  C 下 60s 的 45 个循环。使用 ABI PRISM7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行扩增和检测。

[0231] 数据分析

[0232] 将 Excel 用作来自 q-PCR 仪器的原始数据 (SDS 文件) 的计算和分析。

[0233] 实验原理

[0234] 使用对两种不同蛋白分析物具有特异性的两种 PLA 探针进行以下实验,所述两种不同蛋白分析物不相互作用,如 NGF 和 IL-2。当血清或血浆样品加入该检测反应中时,不应检测到比“缓冲液”背景更高的信号,除非 PLA 探针有非特异性结合事件,使探针邻近从而形成假阳性信号。邻位连接试验将蛋白分析物转化为在以下实验中由实时 PCR 读取的 DNA 扩增子。平均 Cts 与标准偏差共同报告。

[0235] 实施例 2

[0236] PLA 在阻断试剂存在或不存在下的特异性

[0237] 通过使用非匹配探针对在人血浆样品中进行邻位连接试验,从而监测非特异性信号。该非匹配或错配探针对不应产生高于噪声(来自纯缓冲液)任何信号(来自血浆)。第一探针靶向 NGF, 以及其它探针靶向 IL-2。血浆信号来自该错配检测,其中通过使用阻断试剂显著降低,并将其包括在试验程序中(图 1)。

[0238] 也在非缀合大批的 IgG 和非缀合随机寡核苷酸分别和同时存在下进行试验。这些反应不显著提高试验特异性,即,试剂的这些反应必须缀合以获得非特异性背景信号的降低。

#### [0239] 实施例 3

[0240] 证明特异性提高作用(阻断作用)来自特异性阻断试剂(缀合于随机寡核苷酸的抗体)而不是来自该试剂的单个成分的试验

[0241] 为了证明仅当随机 N40 寡核苷酸连接于大批的 IgG 抗体时才获得阻断作用,分别研究了单个成分的作用,并与所述阻断试剂的作用进行比较。仅加入 N40 寡核苷酸(7.5  $\mu$ M, 在血浆或者血清的预孵化过程中,血浆或血清稀释液(50:50, 血浆或血清和缓冲液)或仅有缓冲液在 RT 下 20 分钟的过程中未使非特异性信号产生任何差异。加入 IgG 抗体(2.5  $\mu$ M) 轻微降低非特异性信号但在血浆和血清样品中仍有显著的交叉反应性。然而,加入阻断探针(2.5  $\mu$ M 的抗体与 3- 倍缀合过量的 N40 寡核苷酸)完全消除了交叉反应性(图 2)。

#### [0242] 实施例 4

[0243] 由 IgG 制备的阻断试剂的阻断作用,所述 IgG 来自不同于获得靶抗体的物种

[0244] 为了进一步评价阻断试剂的作用,我们研究了使用由山羊 IgG 制成的探针的作用是否对由来自除山羊外的物种制成的错配探针具有相同的阻断作用。我们测试了三种不同的错配探针对的组合:兔+兔(图 3A)、小鼠+兔(图 3B)和绵羊+小鼠(图 3C)并研究了在三种不同人血浆样品 7P、8P 和 11P 中的交叉反应性。当使用组合兔+兔(图 3A)和绵羊+小鼠(图 3C)时,在错配探针之间显示任何交叉反应性的唯一样品为 11P,其中在血浆稀释剂或缓冲液中都不存在阻断试剂。该交叉反应性表明了需要阻断试剂以除去在某些特定样品中能出现的非特异性信号。因此,当在血浆稀释剂或缓冲液中孵育阻断试剂时,非特异性信号的交叉反应性被消除。该实验证明了阻断试剂的蛋白成分不需要与靶向特异性结合结构域来自相同的物种。

#### [0245] 实施例 5

[0246] 使用针对阻断试剂的一种缀合化学和针对靶向特异性探针的不同缀合化学的阻断试剂的阻断作用

[0247] 在以下试验中一种连接类型(“4 步 Innova”)用于阻断试剂,以及另一种连接类型(“1 步 Innova”)用于靶向特异性探针。试验中包括了五种不同的血浆样品(3P、4P、7P、8P 和 11P),并且使用了两种错配探针组合(51\_7 和 7\_51;序列号 51 对应于抗-ICAM 抗体,以及序列号 7 对应于 TIMP-1)。当使用阻断试剂(山羊探针)用于探针组合时,血浆样品中的非特异性结合显著降低(图 4A-B)。因此,用于缀合/ 偶合阻断试剂的核酸结构域的方法和连接子不需要与用于缀合邻位探针的核酸结构域和分析物结合结构域的连接子相同。

[0248] 该试验还证明了虽然仅有某些血浆样品显示非特异性信号,但都可以使用阻断试剂除去。

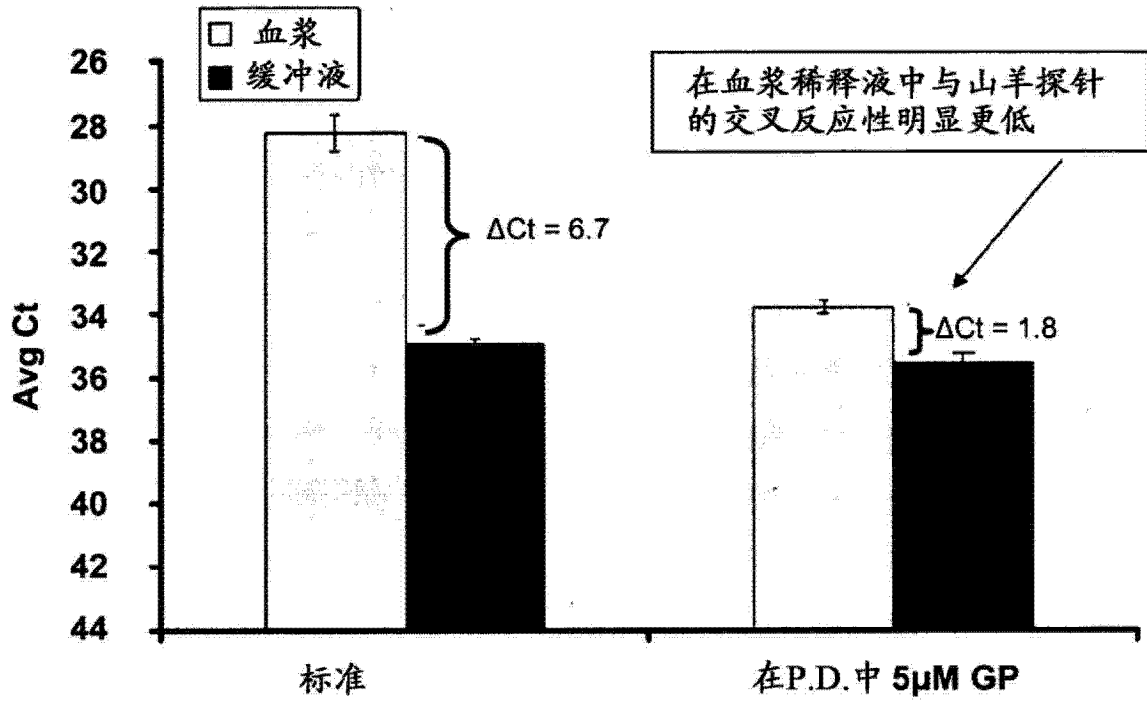


图 1

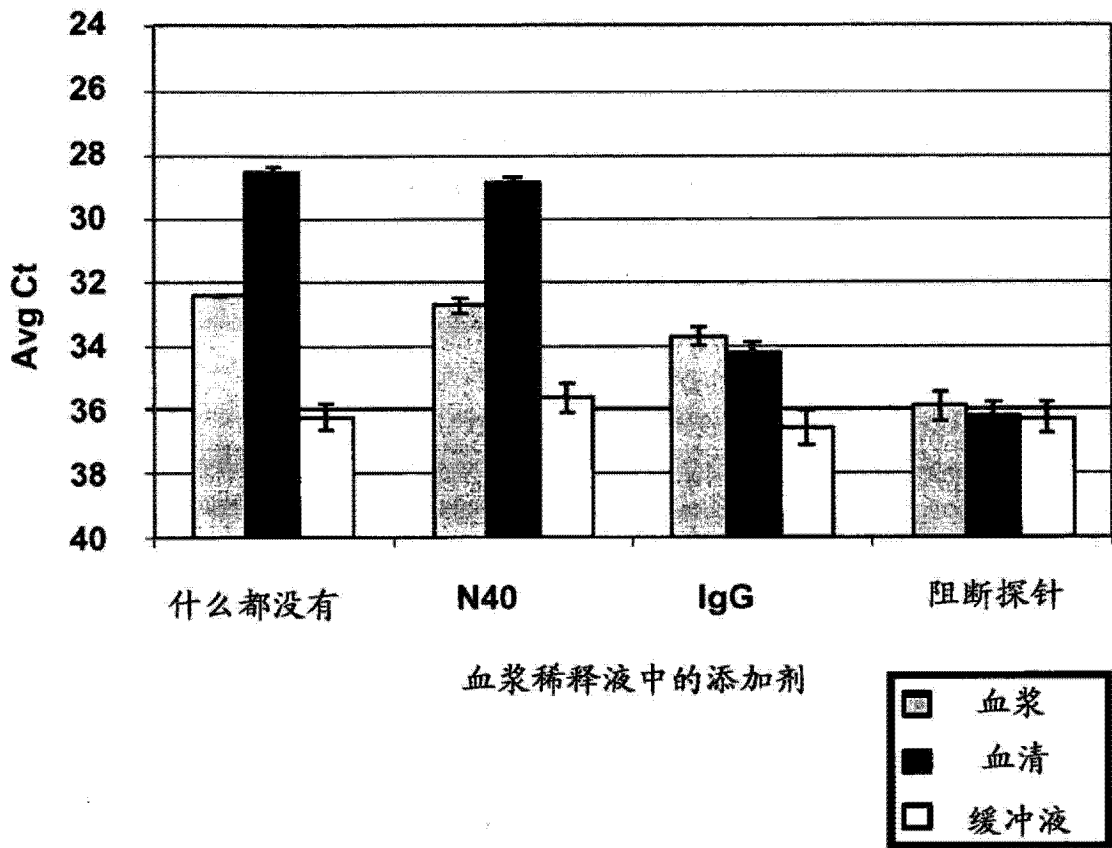


图 2

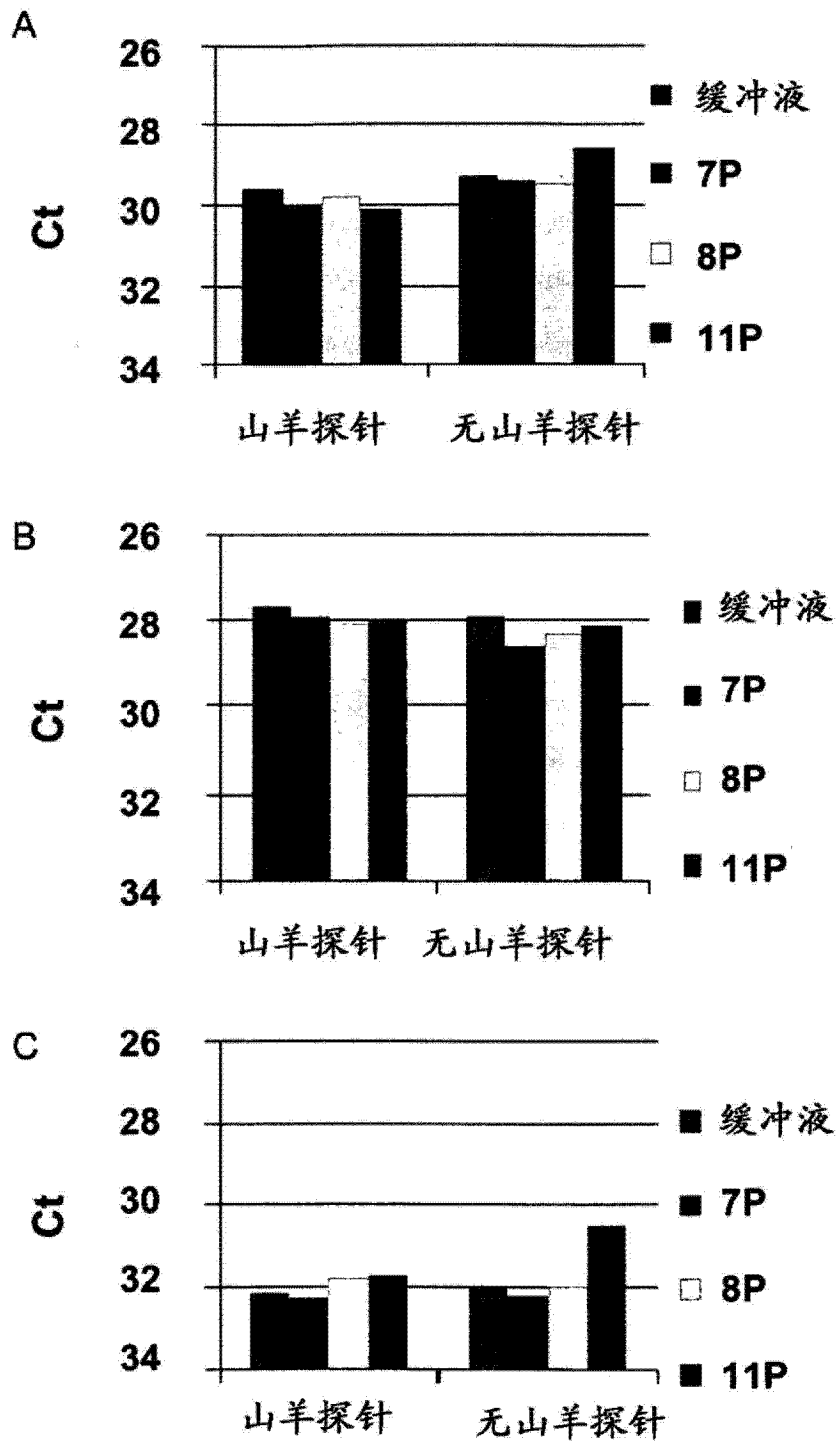


图 3

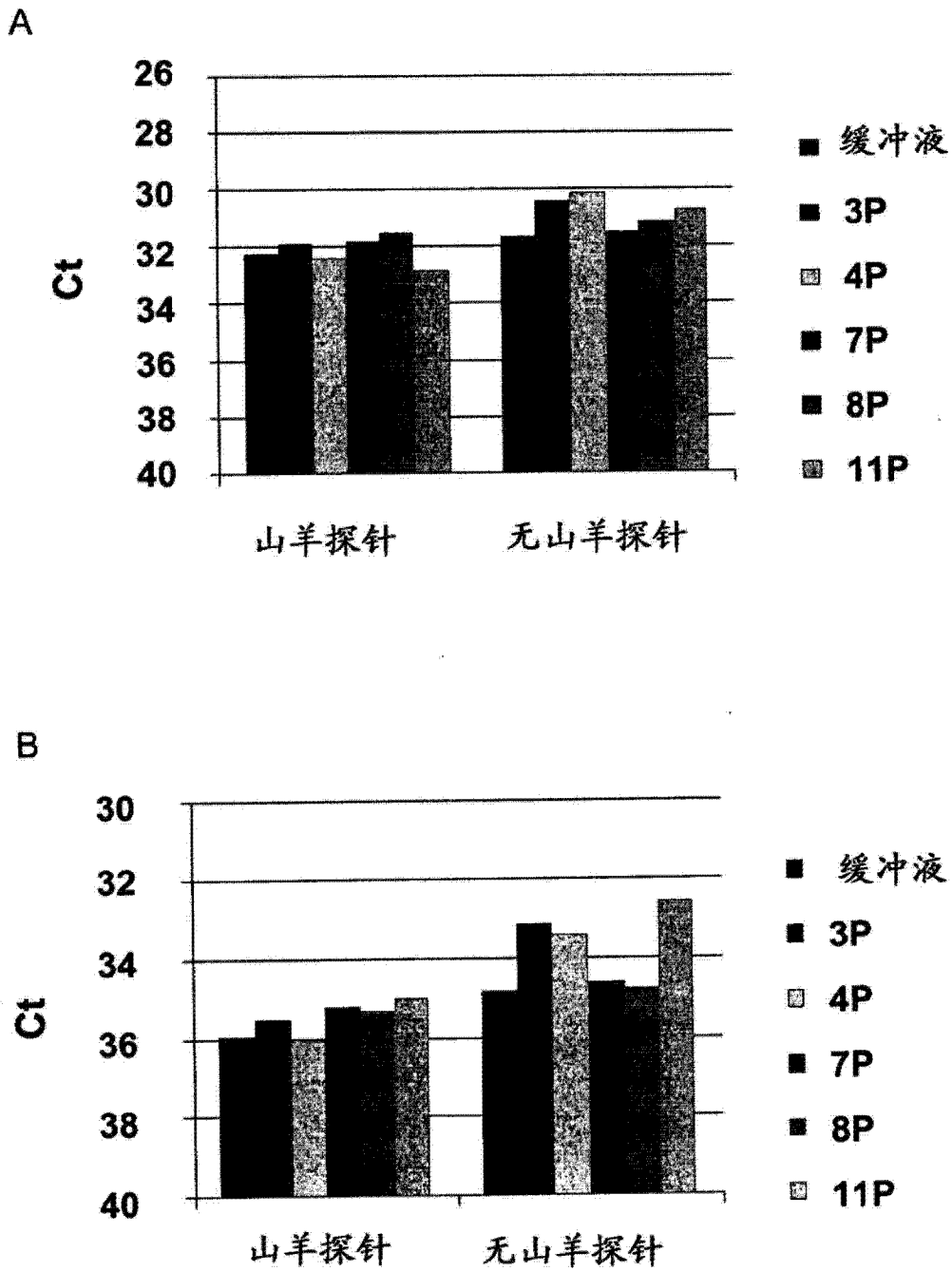


图 4

专利名称(译)	阻断试剂及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103154266A</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201180034921.4	申请日	2011-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	欧凌科公司		
申请(专利权)人(译)	欧凌科公司		
[标]发明人	S弗雷德里克松 B特兰		
发明人	S·弗雷德里克松 B·特兰		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/536		
CPC分类号	C12Q1/686 C12Q1/6804 G01N33/542 G01N33/54393 C12Q2537/163 C12Q2533/107		
代理人(译)	刘丹妮		
优先权	2010011971 2010-07-15 GB		
其他公开文献	CN103154266B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及与核酸偶联的非分析物特异性结合蛋白的缀合物在基于探针的检测试验中作为阻断试剂的用途，其中使用包含与核酸结构域偶联的蛋白质分析物结合配偶体的探针检测样品中的分析物。

