

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/68

C12Q 1/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03129124.4

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1553188A

[22] 申请日 2003.6.6 [21] 申请号 03129124.4

[71] 申请人 宋 克

地址 201824 上海市丰庄路 301 弄 69 号 301 室

[72] 发明人 宋 克

权利要求书 7 页 说明书 23 页

[54] 发明名称 微阵列信号放大方法

[57] 摘要

本发明提供了一套多用的微阵列信号放大方法。其原理是通过将各种不同形式的高荷信号载体 [HSC] 应用于微阵列的信号放大标记和检测过程,从而大大地提高了微阵列的信号检测灵敏度和信噪比。在一些实施例中,各种 HSC 如高分子荧光微球、量子点 [QD]、树形分子 [Dendrimers]、多聚二茂铁、量子点微球 [QD - tagged Beads] 等被应用于诸如基因芯片、蛋白质芯片、微流体电泳芯片等生物芯片的检测中。利用 SAAA 技术标记之后的微阵列,在激光共聚焦扫描仪、CCD、荧光显微镜和等离子体共振激发技术等条件下,可以检测到在微阵列上发生的单个标记事件,因而是一种微阵列超灵敏检测技术。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种微阵列信号放大标记技术，这种微阵列由基底及其表面的镀层或涂层和固定在基底[缩写为 S]或镀层[缩写为 C]表面的不少于两个阵列式排列的探针组成，用于检测样品中的生物或化学靶物质，

基底和/或镀层或涂层的材料可以由但不限于如下材料中任意一种或一种以上不同材料组合制成：

- (1) 无机物片状材料类如玻璃、石英、云母，透明导电材料如透明导电氧化物类[TCO]，如氧化铟锡[indium tin oxide, ITO, 或写为  $\text{In}_2\text{O}_3: \text{Sn}$ ]、 $\text{SnO}_2:\text{F}$ 、砷化镓[GaAs]、氧化镁等镀层，氧化锡[tin oxide,  $\text{SnO}$ ]， $\text{ZnO}$  □  $\text{CdO}$  □  $\text{CdIn}_2\text{O}_4$  □  $\text{Cd}_2\text{SnO}_4$  □  $\text{Zn}_2\text{SnO}_4$  □  $\text{In}_2\text{O}_3\text{-ZnO}$  □，以及碳/陶复合导电陶瓷，各种半导体材料等，
- (2) 单质类：铂、金、银、铝、铬[Au, Ag, Pt, Cu, Rh, Pd, Al, Cr]等金属以及硅非金属等，
- (3) 有机物类：各种有机分子及其由此制成的自组装单分子膜或自组装多分子膜，
- (4) 高分子类：尼龙膜、醋酸纤维素膜、各种塑料、橡胶、树脂，

基底的结构可以是但不限于如下种类：

- (1) 薄片式：如玻璃片、硅片、尼龙膜、塑料片、微孔板、微滴板式等，
- (2) 电极式：在薄片式微阵列上以一定规律排列而成的各种电极阵列，如在半导体、绝缘体等基底上制成的铂电极、金电极等，
- (3) 微管式：由毛细管或有毛细管管状内腔结构特点的其它材料，按预先设定的位置对应规则排列而成的各种矩阵式毛细管微阵列[二维平面排列]、线形毛细管微阵列[一维线形排列]、以及在基片式结构中制作出的各种不少于一个微管道式空腔结构的矩阵式并行排列[即微流体电泳芯片等]，
- (4) 微粒式：以微小颗粒为固相载体，生物分子或化学分子被固定在其表面，通过微小颗粒的大小、[发光]颜色、表面电势、表面电荷密度等性质元素进行分类组合从而产生出大量不同组合的微粒，分别用某一特定组参数的组合 [某一尺寸和某发光波长等的特殊组合--编码]的微小颗粒作为某生物或化学分子的载体，从而可以用大量不同且特殊编码微小颗粒制成微阵列，

探针或靶可以是，但不限于如下种类之一或不同种类的组合：

- (1) 生物分子如单链或互补杂交的双链核酸[含寡核苷酸]及其相似物[DNA, RNA, DNA-DNA, RNA-RNA, RNA-DNA or RNA-DNA mimic duplexes, triplexes or quadropexes, PNA-DNA, PNA-RNA, PNA-RNA-PNA, PNA-DNA-PNA 等]、蛋白质[包括各种天然蛋白质、重组蛋白质[recombinant proteins]、酶及其底物、辅酶、抗体或抗体的片段、抗原、各种受体、

配体)、多肽、激素、多聚糖、核糖体、(单)抗原决定簇[epitope]、蛋白聚糖或蛋白多糖 [proteoglycans], 糖蛋白类 [glycoproteins], 酯脂类 [glycolipids], 低聚糖或寡糖 [oligosaccharides], 或细胞器官类[organelle], [天然的或人工合成的]脂质体类[lipids]及其荧光类似物, 亲脂性有机染料分子[lipophilic organic dyes], 各种膜[质膜或细胞器膜(plasma or intracellular membranes)], 人工膜[如脂质体[liposomes]膜], 各种离子通道[ion channels]等,

- (2) 细胞如各种动植物细胞、微生物细胞如各种细菌、病毒、衣原体和支原体等, 以及细胞裂解物[cell lysate],
- (3) 各种生物组织、生物活检或切片、血液、唾液、体液、精液、各种体细胞等,
- (4) 化学分子如无机分子、药物分子、各种有机分子、高分子等,

微阵列的检测原理可以是, 但不限于如下种类之一或不同原理的结合:

- (1) 通过对固相表面定位在不同位置的探针-靶特异性亲合反应结合体或杂交体进行光学信号 [如荧光分子、化学发光等]标记, 然后经激发产生荧光、化学或生物发光并进行检测,
- (2) 通过对标记的或未标记的探针或靶在施加了电压的液相中的移动速度或迁移率进行检测, 即电泳技术或由电泳技术与其他技术结合而产生的其他技术, 如毛细管电泳[capillary electrophoresis, CE]、毛细管区带电泳[capillary zone electrophoresis, CZE]、毛细管凝胶电泳[CGE]、高效毛细管电泳[HPCE]、毛细管等电聚焦[capillary isoelectric focusing (CIEF)]、等速电泳 [isotachopheresis (ITP)]、动电色谱 [electrokinetic chromatography (EKC)]、胶束动电毛细管色谱[micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC OR MEKC)]、毛细管电色谱法 [capillary electrochromatography (CEC)]、非水相毛细管电泳 [non-aqueous capillary electrophoresis (NACE)]等,
- (3) 通过探针、靶或探针-靶络合物以及它们的标记物不同的亲和力, 进行色谱技术分析, 如亲和层析[affinity chromatography], SEC[size exclusion chromatography], GPC[gel permeation chromatography], MCC[metal chelate chromatography]等,
- (4) 利用具有氧化还原性质的分子或分子的部分结构[即化学基团或功能团]、金属络合物或(核酸)嵌入剂与被定位并固定在固相表面不同位置或电极上的探针、靶或探针-靶络合物结合并在外加适当方式或适当大小的电压(或电势差)作用(直流电压或交变电流或脉冲电场或电压)下, 发生氧化还原反应, 致使从还原性分子或基团(电子授体, electron donor)的电子转移到氧化性分子或基团(电子受体, electron acceptor), 形成电子流, 通过电极传送到检测系统进行测量, 所测得的电流强度大小与杂交并被标记的双链核酸的量成正比,
- (5) 利用双链核酸和单链核酸的导电性能差异, 或利用由序列完全互补配对的核酸杂交所形

成的双链核酸分子与有错配碱基对 (Mismatches) 存在的双链核酸 (nucleic acids duplexes) 分子之间在导电性能差异, 通过对经由核酸分子传导的电子流大小的测量而对核酸分子由此所反映的其他方面所进行的各种鉴别、检测和考察, 如在基因突变、基因多态性、基因测序、基因表达谱研究、疾病机理分析和疾病诊断等方面的应用,

- (6) 将发生在核酸分子上或由具有氧化还原性质的物质 (包括但不限于, 具有氧化还原性质的金属络合物以及由金属络合物或金属络合物的衍生物为单体聚合而成的聚合物、荧光分子、核酸嵌入剂等) 所发生的电子或电荷转移反应或电子流转换成其他可检测或可考察形式的检测技术, 如通过电致发光 [Electroluminescence] 原理, 利用电致发光分子将电子流转换为光信号所进行的检测,
- (7) 直接或间接以具有氧化还原性物质 (如二茂铁基) 对探针或靶分子标记物, 通过标记后可以使标记物接近电极表面而发生电子转移反应从而实现发生在电极表面的生物或化学反应的检测,

这种信号放大技术, 是在固定于微阵列基底上的探针 [P] 与靶 [T] 杂交或结合过程之前, 利用通式 (I) 的化合物与微阵列上的探针进行特异性杂交或结合, 或在杂交或特异性结合过程之后, 利用通式 (II) 的化合物与微阵列上已经杂交或特异性结合的探针-靶络合物 [P-T Complexes] 进行特异性标示性结合或第一步标记, 而利用通式 (II) 的化合物作为高荷信号载体对第一步标记进行信号放大标记, 形成如通式 (III) 所示的在微阵列上由探针-靶相互作用 [如杂交] 并特异性结合与标记之后的最终结构,

通式 (I) 的化合物结构特征为:  $X-L_1-A$ , 或  $X-A$ , 或  $X-L_1$ , 或  $X$ ,

通式 (II) 的化合物结构特征为:  $F(-L_2-A')_n$ , 或  $F(-A')_n$ , 或  $F(-L_2)_n$ , 或  $F$ ,

通式 (III) 特征结构为但不限于:  $P:T-X-L_1-A-(A'-L_2)_n-F$ , 或  $P:T-X-A-(A')_n-F$ , 或  $P:T-X-A-F$ , 或  $P:T-X-(A')_n-F$ , 或  $P:T-X-F$ , 或  $P:T-A-F$ , 或  $P:T-(A')_n-F$ , 或  $P:T-L_1-A-(A'-L_2)_n-F$ , 或  $P:T-A-(A')_n-F$  等,

当探针、靶或探针-靶络合物仅为核酸或互补杂交的核酸双链时, X-是与双链核酸通过静电吸引力、次键力 [如范德华力、氢键等]、与双螺旋结构中的大沟或小沟的亲和力 [Groove binders]、嵌入双链碱基对的亲和力 [intercalators]、与双螺旋结构形成三螺旋结构或四螺旋结构等方式相结合的功能团, 与核酸双螺旋结构通过化学反应形成共价键结合的功能团或分子, 可以特异性识别核酸双链结构并为之结合的生物分子, 可与核酸双链络合或结合的各种生物或化学分子, 它可以包括但不限于下列化合物以及以下列化合物为结构基础或特征的各种衍生物和生物或化学修饰后所形成的化合物: X-的结构特征根据其是否为杂交单链核酸或与已经互补杂交的核酸双螺旋结构发生相互作用性质可以分为如下几种类型: (1) 静电吸引力、次键力 [如范德华力、氢键等], 与核酸双螺旋结构中的大沟或小沟的亲和力 [Groove binders]。属于这种情况的 X-可以是, 但不限于如下几类物质: (1) 以双螺旋大沟 [major grooves] 为作用机理的嵌入剂放射菌素类, 如 7-氨基-放射菌素 D [7-amino-Actinomycin D]; 与双螺旋小沟 [minor grooves] 形成络合物的唑啉

类[如 3,6-carbazole, 2,7-carbazole]和二苯基呋喃二胺类[diphenylfuran diamine], 聚胺类[polyamines]DNA 嵌入剂, 吲醌类嵌入剂[6H-indoloquinoline core], 烷基氨基烷基链[alkylaminoalkyl chain, DNA 小沟嵌入剂], (2) 可以嵌入杂交核酸双螺旋碱基对的亲和力[intercalators], 属于这种情况的 X-可以是: (a) 在一定条件下, 可以形成链间共价交联的一类化合物, 如补骨脂素 (Psoralen)、异补骨脂素以及它们的任何衍生物形式, 如 4'-羟甲基-4,5',8-三甲基补骨脂素 (4'-hydroxymethyl-4,5',8-trioxalen, 简写 HMT) 等, 光激发嵌入剂[Ru(phen)2dppz<sup>2+</sup>; phen=1,10-phenanthroline; dppz=dipyridophenazine], 顺氯氨铂[cisplatin], 兼具 DNA 光损伤性质的嵌入剂吲哚基喹啉正离子盐类或喹啉衍生物正离子盐类[indolo[2,3-b]-quinolizinium bromide]; (b) 作为双链嵌入剂的 EDTA 过渡金属络合物类[如 methinidiumpropyl EDTA Fe(II)], 2,7-diazapyrene (DAP), DAPI [4'-6-diamidino-2-phenylindole], N-甲基化正离子[N-methylated cations DAP<sup>+</sup> and DAP<sup>2+</sup>], 吡啶类化合物{Acridine orange [3,6-bis(dimethylamino) acridine, HCl]}, 双齿状吡啶类嵌入剂[bis-dentate acridine intercalators]、氨基氮蒽或氨基吡啶[9-aminoacridine (9AA)], 碘基或碘代吡啶类[2-iodine-125-iodoacridine]; (c) 可切断 DNA 链结构的嵌入剂亚德里亚霉素或阿霉素[Adriamycin, 或 Doxorubicin], elsamicin, Nogalamycin, Sanguinarine, Cherethyrine, anthracycline drug, leinamycin, Echinomycine, 正定霉素或道诺霉素类[Daunomycin], [Rebeccamycin]; (d) 兼具核酸碱基嵌入功能和双螺旋沟槽嵌入功能的偏端霉素类化合物[distamycin]和纺锤菌素类化合物[netropsin]以及 Hoechst 33258 和 Hoechst33342 等; (e) 以次键力为主与双螺旋结构中的堆积碱基相互作用的亚甲基蓝 [methylene blue (MB, MB<sup>+</sup>), 溴乙非啶或溴化二氨乙苯啡啶 [ethidium bromide]和二溴乙锭正离子[diethidium cation], (3)与双螺旋结构形成三螺旋结构或四螺旋结构等方式相结合的功能团, 与核酸双螺旋结构通过化学反应形成共价键结合的功能团或分子, 可以特异性识别核酸双链结构并为之结合的生物分子, 可与核酸双链络合或结合的各种生物或化学分子, 它可以包括但不限于下列化合物以及以下列化合物为结构基础或特征的各种衍生物: 所有可以嵌入核酸双链结构或核酸双链的大沟或小沟中的嵌入物、多聚嵌入物、线性或环状嵌入物等, (4) 可与 RNA 形成各种络合物的核仁素类[如 Nucleolin RBD12], (5) 可以在双螺旋结构中的多个位点进行嵌入的多重嵌入剂, 比如将棘皮霉素类[Echinomycine, DNA 双重嵌入剂]通过共价键偶联起来, 或串联起来, 可以形成四重嵌入的四重嵌入剂; (6) 重氮氨苯胍乙酰甘氨酸盐[berenil], 细胞毒素类[如 cytotoxin NLCQ-1], 三骨菌素[trioistin], 黄连素类[如 protoberberine-8], 口腔 M[Gilvocarcin M], 呋喃萘基吡喃酮类[furonaphthopyrone], 卟啉或金属卟啉类化合物[porphyrins or metalloporphyrins], 卟啉类化合物[如 beta-carbolines], 原黄素[proflavin (Acr-NH<sub>2</sub>)], 3,7-bis(dimethylamino) phenothiazin-5-ium chloride], 苯基巯基吡喃[benzothiopyranoindazole], [水溶性]亚丙基碘化物[propidium iodide], (7) 以芳香环结构堆积为特征的线状多聚 DNA 嵌入物[the stacked aedamer core, 具有两个或若干个 1, 4, 5, 8-四羧酸二酰亚胺(1,4,5,8-tetracarboxylic diimide)等特征结构单元多聚嵌入物], (8) 可以产生电化学信号的嵌入物二茂铁基萘二酰亚胺类线状嵌入剂[threading ferrocenyl naphthalene diimide]; (9) 蒽类[anthryl compounds 如 AMAC[9-氨基-6-氯-2-甲氧基嘞啶 (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine)], anthracycline, APAC, N-Et-AMAC 等], 蒽醌类[anthraquinones], 萘二酰亚胺类嵌入剂[naphthalene diimide intercalators], 菲离子类嵌入剂

[phenanthridinium intercalators], (10) 金属类嵌入剂, 如八面体 DNA 钌嵌入剂[rhodium intercalator, bis(2-2' bipyridyl) chrysenone quinone diimine, D-[Rh(R,R)- Me<sub>2</sub> trien]phi<sup>3+</sup>, Ru(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>], 有手性络合物结构的金属钌嵌入剂[ruthenium intercalators, [Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> (phen = 1,10-phenanthroline; dppz = dipyrro [3,2-a :2',3'-c]phenazine)], terpyridine platinum compound (TPH), mitoxantrone, 镧系金属化合物 DNA 嵌入剂[lanthanide], 二吡啶基(乙二胺)铂盐或三吡啶基铂盐类[bipyridyl (ethylenediamine) Pt(II)<sup>2+</sup>, 4-picoline-2,2':6',2''-terpyridine-platinum], (11) 可改变双螺旋沟槽结构的萘二酰亚胺类化合物[双嵌入剂, 如 naphthalene diimides, N,N'-disubstituted naphthalene diimide derivatives, 用多肽链作为嵌入双螺旋小沟的连接臂的萘四羧酸二酰亚胺双嵌入剂(1,4,5,8-Naphthalene Tetracarboxylic Diimide Bis-Intercalator with the Linker (-Ala)<sub>3</sub>-Lys in the Minor Groove), 用胺基烷基将 DNA 嵌入功能团线性连接起来所形成的双嵌入剂, 三嵌入剂, 多聚嵌入剂和有环双链状嵌入剂等], (12) 荷包牡丹碱类[dicentrine], 三环大那霉素类[tricyclic dynemicin A], 硝基胺类[nitracrine, 亲电子性 DNA 嵌入剂], 环磷酸胺类[cyclophosphamide], amsacrine, 丹参酮类[如 Dihydrotanshinone, I], octahydroxanthene, 吡唑类[indazoles, 如 benzothiopyranindazole DNA 嵌入剂], 咪唑类[imidazole], N-[4-(9-吡啶基氨基)-3-甲氧基-苯基]甲烷-磺胺类化合物[N-[4-(9-acrydinylamino)-3-methoxy-phenyl]methane-sulphonamide, m-AMSA], 大环内酰胺类[macrocylic lactam], 喹啉衍生物类嵌入剂[如 indolo[2,3-b]quinolines, 6H-indoloquinoline core, quinoxalines], Amsacrine, (夹) 氧杂蒽类[Xanthenes, 如 1, 8-二氧代-9-(o-硝基苯基)-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 八氢氧杂蒽(1,8-dioxo-9-(o-nitrophenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroxanthene)], luzopeptin, 甘菊环类[6a,7-diazanaphth[3,2,1-cd]azulene 和 7H-1,7-diazaindole[1,2e]azulene system], Ditercalinium, 4,6-diamidino-2-phenylene[DAPI], 戊烷脒类[pentamidine], (13) Pixantrone, 基于吡啶结构的玫瑰树碱类[indole-based intercalator ellipticine], 奎吖因类[quinacrine], 重氮化合物类[4,9-diazapyrenium], 雌甾二醇类[estradiol], 双苯基酰亚胺类[bisbenzimidazole], 噻唑类[如 thiazole orange], (14) 光活性生物素或光生物素[photoactivable biotin, photobiotin]、光生物素与生物分子或化学分子的偶联体、及光生物素的衍生物, 可断链的光生物素[如 photoactivable cleavable biotin], (15) 所有可以对核酸进行染色的染料分子, 如荧光染料 bisbenzimidazole H fluorochrome [TriHCl], 色霉素[chromomycin] A3, 荧光性嵌入剂[如 TOTO, YOYO, SYBR Green], (16) 所有可以与基因芯片上的已互补杂交的核酸双螺旋结构形成三重(倍)[triplex]螺旋或四重(倍)[quadruplex]螺旋结构的化合物或生物分子或生物分子结构类似物以及此结构与其他分子共价偶联所形成的复杂分子结构, 如 PNA [peptide nucleic acids], 寡聚核苷酸, 多肽[如[N-MeCys<sup>3</sup>, N-MeCys<sup>7</sup>]TANDEM]等; (17) 可与核酸双链发生化学反应或光化学反应从而形成共价键连接的功能团或分子, 如叠氮类化合物, 结构中含有苯甲酮功能团的化合物及其衍生物。可以与核酸探针或靶基因发生共价交联的各种化学交联剂或化学反应功能团如可以通过与靶基因上的羟基发生缩水反应的碳二亚胺, 或光化学反应活性的交联剂, 如芳香基叠氮化合物[aryl azides, 如 N-((2-pyridylthio)ethyl)-4-azidosalicylamide [PEAS]等]、氟代芳香基叠氮化合物[fluorinated aryl azides], 苯甲酮类光反应试剂[benzophenone-based photoreactive reagents, 如苯甲酮马来酰亚胺[benzophenone maleimide]]等; (18) 可以序列特异性或非序列特异性地识别核酸双链结构

并与之结合或以双链核酸的双螺旋结构为底物的蛋白质或酶等生物分子；如 HMGB 蛋白，可与经顺氯铂修饰的 dsDNA 结合的 NHP6A 蛋白，参与 DNA 复制的酶、凝血酶[thrombin]、RNA 转录的酶丝裂霉素[Mitomycin C]、可以与核酸双螺旋结构的双链间形成共价桥形键的博来霉素或争光霉素类[Bleomycin]、双链核酸抗体、双链核酸的特异性结合酶，DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶，(19) 可以与待测靶基因或基因芯片上探针核酸分子的某个或某些特异性序列进行特异性互补并结合形成互补双链结构的寡聚核苷酸分子，反义核酸[anti-sense nucleic acid sequences]序列等，该类化合物可以同时适用于杂交前标记和杂交后标记两种方案，(20) 具有氧化还原[redox]性质，可以发生电子授受反应[Electron Donor-Acceptor Reaction]或电子转移反应[Electron-Transfer Reaction]的核酸结合物以及以这些化合物为单体聚合而成的聚合物和低聚物、寡聚物，如[a]可以嵌入核酸双链中的荧光分子有但不限于，亚甲基蓝[Methylene Blue, MB<sup>+</sup>]和 Hoechst33258 等荧光分子等，或[b]金属络合物，如钌金属络合物[Ruthenium tris(2,2'-bipyridine)]等，或[c]通过共价键连接或非共价键结合与上述任何一种核酸嵌入剂发生共价交联或非共价键结合的具有氧化还原性质的高荷信号载体[HSC]，包括但不限于，多聚二茂铁基团[polyferrocenyl]、多聚二茂锆基团、多聚二茂钕基团等多聚二茂金属类物质，

当探针、靶或探针-靶络合物不仅限于核酸，还包括其他种类的物质时，通式 (1) 中的

X-除包含上面已述及的各种情景之外，还可以是但不限于如下情景之一或不同情景之组合，

(1) 各种核酸、蛋白质[含酶]、多肽、糖蛋白、抗原、半抗原、抗体、细胞、微生物、生物素、受体配体、受体、抗原决定基[epitope]、或各种细胞或表面抗原的抗体，第二抗体，(2) 各种有机分子、聚合物、药物分子、染料分子、农药、有毒有机物质等的抗体或第二抗体，(3) 药物、多聚糖[polysaccharide]，多聚核苷酸[polynucleotide]等，

A-和 A'-是指任何一对具有某种化学反应或相互作用特异性探针分子接头，它们具有，但不限于下列生物或化学结构特征之一：(1) 化学反应特异性功能团对如[各种生物分子或化学分子结构中的]伯胺基[-NH<sub>2</sub>]与琥珀酰亚胺基[succinimidyl esters]、异硫脲胺酯或异硫氰酸盐[isothiocyanate]、磺酰(基)氯或磺酰氯[sulfonyl chloride]等，巯基[-SH]与马来酰亚胺基[maleimide ester]等，以及光化学反应基团如芳香基叠氮化合物[或基团]，氟代芳香基叠氮化合物[或基团]，乙锭叠氮化合物及其衍生物或基团[如 ethidium monoazide]，含苯甲酮结构的光化学反应功能团或化合物或苯甲酮衍生物与亲核基团等[如生物分子或化学分子结构中所含有的胺基，亚胺基，甲基，亚甲基等]；(2) 生物分子特异性相互作用对，如免疫或抗体-抗原，生物素-抗生物素蛋白 (biotin-avidin) 或抗生物素抗体、抗生蛋白链菌素 (streptavidin) 反应对、凝集素[lectin]或其他多糖[carbohydrates]结合蛋白、半抗原[hapten，如地高辛及其衍生物等]与抗半抗原抗体等；(3) 其它形式的特异性分子识别相互作用对，如各种配体或药物分子和其对应的受体、序列互补的单链核酸、可以形成三螺旋或四倍螺旋结构的核酸结构的寡聚核苷酸、各种蛋白质或酶与其底物等，(4) 上述各种情景内部各特异性反应对之结构组合而成的化合物或生物分子结合体，

-L<sub>1</sub>-和-L<sub>2</sub>-可以是但不限于如下各种结构或分子：(1) 溶剂相容性连接臂，即当溶剂为疏水体系

时, 连接臂亦为疏水连接臂; 当溶剂为亲水体系时, 连接臂亦为亲水连接臂, 可以是 PEG、合成多肽等, 长度不限, (2) 分子导线[molecular wires, 如双链 DNA 分子, 亲水性连接臂, 珠链型富勒烯线型聚合物(富勒烯被导入有机高分子主链的珠链型高分子) 或将富勒烯[巴基球, fullerene]用 R 基连接起来的巴基球项链等], (3) 分子绝缘体[molecular insulators, 如疏水性连接臂, 长链烷烃等], (4) 结合有分子磁体的连接臂, (5) 在化学或光学等因素作用下, 分子链可以断链的连接臂等, 如双硫键[-SS-]等,

F 表示以各种微小颗粒形式存在的高载荷光学、磁性、电子学或电化学信号载体, 它可以是高聚物或共聚物荧光微球、表面修饰有荧光染料的硅氧磁珠[silica beads]、半导体纳米晶量子点[quantum dots, QDs]、高分子微球与量子点相结合的产物量子点微球[QD-tagged nanobeads or microspheres]、蛋白质包裹的半导体纳米颗粒或微颗粒或量子点[如 Chaperonin mediated semiconductor nanoparticles]、树枝状高分子或树形分子[dendrimers]、星形树枝状高分子[dendrimeric stars]、胶束[micelles]、分子磁体[molecular magnets]、胶囊式微球[encapsulated spheres]、胶体纳米金[colloidal gold nanoparticles]、电致发光分子[electroluminescent molecules]、二茂金属共聚合物微球[polymetallocene block copolymers, 如二茂铁基聚合物[polyferrocene block copolymers, PFC, 或 polyferrocenylsilanes, PFS]微球, 多聚二茂锆[polyzirconocene, PZC]、多聚二茂金属基修饰或接枝的树枝状高分子[包括但不限于, 聚二茂铁基接枝的树枝状高分子 (polyferrocenyl-branched dendrimers) ]、二茂金属基或多聚二茂金属基修饰或接枝的纳米金胶体[包括但不限于, 胺基二茂铁基功能化的纳米金胶体 (Gold colloids functionalized with amidoferrocenyl structures) 等]、共聚物微球或纳米球、含有富勒烯结构的或以富勒烯为单体之一的高聚物或共聚物、其它含荧光染料或化学发光[chemiluminescence]、生物发光[bioluminescence]材料的载体, 藻胆蛋白类[phycobiliproteins]及其各种衍生物或生物或化学修饰物, 以及上述每一种载体中不同参数[如大小、光学发射光波长、电磁学性质、表面生物或化学功能团修饰等物理或化学性质]载体的组合, 或各种不同载体之间的相互组合, 其表面修饰有可以与通式 (I) 化合物中的探针分子接头 A'- 特异性反应的功能团或作用对 A'-,

n 是从零到无穷大的自然数: 0, 1, 2, 3...

在通式 (I) 和通式 (II) 中的所出现的多种可供选择的特征结构之间可以随意搭配, 或省去不需要的特征结构。

2. 一种根据权利要求 1 制作的生物芯片[生物微阵列]或化学芯片[化学微阵列]信号标记和放大试剂盒, 即 BAT 试剂盒, 包含了生物或化学微阵列处理各过程所需要全部生化试剂, 含有但不限于如下通式所表示的核心组分:

通式 (I) 化合物, 通式 (II) 化合物。

## 微阵列信号放大方法

本发明专利申请是下面相关专利申请技术内容的扩展和补充:

中国发明专利申请:

基因芯片联合处理系统及相关技术, 申请号: 01126990.1。申请日: 2001年10月11日;

基因芯片分子探针及相关技术, 申请号: 01142654.3。申请日: 2001年12月14日。

国际专利申请:

基因芯片分子探针及相关技术, 国际申请号: PCT/CN02/00887。申请日: 2002年12月13日。

引用的学术及专利文献

Dimitri Ossipov 等人的 "Synthesis of the DNA-[Ru(tpy)(dppz)(CH<sub>3</sub>CN)]<sub>2</sub><sup>+</sup> Conjugates and Their Photo Cross-Linking Studies with the Complementary DNA Strand", J. Am. Chem. Soc., VOL. 124, NO. 45, 2002, **13433**

Harlow, E.和 Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Fliss 等人, 1993, App. Environ. Microb. 59(8):2698-2705

Stollar 等人, 1987, Anal. Biochem. 161:387-394

Coutlee 等人, 1989, Anal. Biochem. 181:96-105.

Morrison, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855

Stollar 等人, Anal. Biochem. 161:387-94,1987

Neuberger, et al., 1984, Nature 312, 604-608

Takeda, et al., 1985, Nature, 314, 452-454

Bird, 1988, Science 242, 423-426

Huston, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883

Ward, et al., 1989, Nature 334, 544-546

Huse, et al., 1989, Science, 246, 1275-1281

Lockhart等人, Nature Biotechnol. (1996) 14: 1675-1680, EP 0 328 829 B1

Maniatis等人, 《分子克隆, 实验室手册》(冷泉港出版社出版, 冷泉港, 纽约, (1989)

Hames, B. D.,和Higgins, S. J等人的《核酸杂交, 一种实用方法》, IRL Press, Oxford (1985)

Ellen R. Goldman等人, Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates. J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 6378-6382

E.M. Boon等人, "Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes," *Nature Biotechnology*, 18:1096-1100, 2000

R.M. Umek 等人, "Electronic detection of nucleic acids: A versatile platform for molecular diagnostics," *Journal of Molecular Diagnostics*, 3:74-84, May 2001.

Agne's Labande等人在 "Supramolecular Gold Nanoparticles for the Redox

**Recognition of Oxoanions: Syntheses, Titrations, Stereoelectronic Effects, and Selectivity”**

1782-1789 VOL. 124, NO. 8, 2002 9 J. AM. CHEM. SOC.

Wagner 等人的美国专利, US Pat. 6,475,808. July 14, 1999

Chin; Guorong 等人的美国专利, US Pat. 6,197,599. July 30, 1998

Bawendi 等人的美国专利: US.Pat 6,306,610, 2001 年 10 月 23 日

Chenchik 等人的美国专利: US.Pat 6,489,159 December 3, 2002

Kaufman 等人的美国专利: US PAT 6,383,754. May 7, 2002

Linsley 等人的美国专利 US Pat 6,232,068. May 15, 2001

Carrico 美国专利 U.S. Pat. No. 4,833,084, May 23, 1989

Stuart 等人, U.S. Pat. No. 4,732,847, Mar. 22, 1988

U.S. Pat. No. 4,946,778

Queen, U.S. Pat. No. 5,585,089

Winter, U.S. Pat. No. 5,225,539

U.S. Pat. No. 5,449,603 & 5,547,843

Thorp等人的美国专利US Pat. No.6,361,951, March 26, 2002

所属领域本发明属于生物或化学微阵列即微阵列或化学芯片[以下简称微阵列]应用技术领域,特别是涉及到微阵列的杂交,标记,洗脱,信号检测及数据分析技术。下面以基因芯片为例来说明目前固相核酸检测技术所存在的局限性。

**本发明技术背景** 基因芯片是近几年来刚刚兴起的基因分析技术,它是利用平行分析原理将大量不同序列的核酸分子,作为分析样品中靶基因的基因探针,以高密度阵列的方式固化在硅片,玻璃,尼龙膜等基质上,从而制作成通常意义上的基因芯片,或称为基因微阵列,微方阵<sup>(1-2)</sup>。经过几年的迅猛发展,基因芯片已衍生出如寡聚核苷酸芯片<sup>(4)</sup>,玻璃基因芯片<sup>(8)</sup>和实验室芯片和微流体芯片等形式。然而,基因芯片在实用方面仍然存在着某个或若干方面的暴露出缺陷:

- (1) 基因芯片生化操作步骤繁杂,对操作人员的实验技术要求高;
- (2) 仪器和运行(指试剂盒,基因芯片等耗材价格)成本高;
- (3) 检测灵敏度低,不能满足检测微量病毒和低丰度基因的要求等;
- (4) 系统集成化,自动化程度低,多以单个功能产品形式出现,如检测仪,判读仪,杂交仪等,难以提高用户的时效和方便程度;

上述情况在蛋白质芯片、细胞芯片、多肽芯片和化学芯片等微阵列中也存在。

本发明的目的从技术上讲,就是形式多样的微阵列产品提供一套大幅度提升检测灵敏度,经济实用性和可实现自动化运行的技术方法系统,并在最后提供一种实现上述功能的设备及试剂盒。其宗旨就在于提供微阵列在社会各领域普及应用所需要的基础生物或化学处理,信号检测及结果分析系统,配套试剂盒及实用的微阵列杂交室。

**本发明与背景技术相比所产生的积极效果** 本发明中所提供的方法不仅极大提高了微阵列检测灵敏度,处理时效,降低成本,同时还使非专业技术人员经过简短操作培训或指导,可以利用这种高度自动化的设备进行高水平和高效率的生物或化学分析。这一切都为微阵列的普及化应用提供了技术推动力。

另外, 作为一般性方法, 无论是被应用于固相[如玻片式基因芯片、蛋白芯片等]还是液相溶液条件下[微流体芯片, 毛细管电泳芯片, 实验室芯片等], 该信号放大技术, 有着 PCR[聚合酶链式反应, 基因扩增技术]技术和用于其他生物或化学检测中所用到的信号放大技术所不具备的诸多优点。由于该技术不依赖基因扩增, 通过简单的生物或化学标记, 所以, 该技术可以准确定量、不易造成污染、可以避免假阳性检测结果、试剂盒成本低廉、容易实现自动化等优点, 而且样品制备简易。这一切是 PCR 技术所达不到的。因此, 它可以作为一般性的信号放大方法应用在其他形式的核酸检测中。归纳起来, 本发明所带来的有益效果有如下几个方面:

- 1、为一般的微阵列技术产品提供了超灵敏检测的技术基础, 同时由此信号放大技术支持的处理仪器也可以产生很高的信噪比, 满足科研和实用领域对超灵敏微阵列的需求, 有利于推动微阵列技术在临床诊断、工商检疫和环境检测等方面的普及应用,
- 2、本发明所提供的信号放大技术有利于实现自动化, 使处理系统的集成化程度进一步提高, 系统处理过程进一步简化, 使专业技术人员的处理效率提高, 同时也降低了对非专业技术人员的专业技术要求, 提高了微阵列使用中结果的重复性和稳定性,
- 3、本发明也为降低微阵列处理系统的成本及运行成本提供了技术支持, 有利于微阵列的普及应用。

**本发明的技术原理** 本发明提出一种微阵列信号放大标记技术, 这种微阵列由基底及其表面的镀层或涂层和固定在基底[缩写为 S]或镀层[缩写为 C]表面的不少于两个阵列式排列的探针组成, 用于检测样品中的生物或化学靶物质。基底和/或镀层或涂层的材料可以由但不限于如下材料中任意一种或一种以上不同材料组合制成:

- (1) 无机片状或平板状材料类如玻璃、石英、云母, 透明导电材料如透明导电氧化物类[TCO], 如氧化铟锡[indium tin oxide, ITO, 或写为  $\text{In}_2\text{O}_3: \text{Sn}$ ], InAs,  $\text{SnO}_2: \text{F}$ 、砷化镓[GaAs]、氧化镁等镀层, 氧化锡[tin oxide, SnO],  $\text{ZnO}$  □  $\text{CdO}$  □  $\text{CdIn}_2\text{O}_4$  □  $\text{Cd}_2\text{SnO}_4$  □  $\text{Zn}_2\text{SnO}_4$  □  $\text{In}_2\text{O}_3\text{-ZnO}$  □, 以及碳/陶复合导电陶瓷, 各种半导体材料等, 以及多孔板模式, 如微孔板、微滴板,
- (2) 单质类: 铂、金、银、铝、铬[Au, Ag, Pt, Cu, Rh, Pd, Al, Cr]等金属以及硅等非金属,
- (3) 有机物类: 各种有机分子及其由此制成的自组装单分子膜或自组装多分子膜,
- (4) 高分子类: 尼龙膜、塑料、橡胶、树脂, 硝酸纤维素膜。

基底的结构可以是但不限于如下种类:

- (1) 薄片/平板式: 如玻璃片、硅片、尼龙膜、塑料片、
- (2) 多孔板式: 如微孔板, 微滴板式等,
- (3) 电极式: 在薄片式微阵列上以一定规律排列而成的各种电极阵列, 如在半导体、绝缘体等基底上制成的铂电极、金电极等,
- (4) 微管式: 由毛细管或有毛细管管状内腔结构特点的其他材料, 按预先设定的位置对应规则排列而成的各种矩阵式毛细管微阵列[二维平面排列]、线形毛细管微阵列[一维线形排列]、以及在基片式结构中制作出的各种不少于一个微管道式空腔结构的矩阵式并行排列[即微流体电泳芯片等],

本发明所说的微阵列上用来检测的探针或靶可以是, 但不限于如下种类之一或不同种类的组合或下

面种类的某种成分, 提取物:

- (1) 生物分子如单链或互补杂交的双链核酸[含寡核苷酸]及其类似物[DNA, RNA, DNA-DNA, RNA-RNA or RNA-DNA mimic duplexes, triplexes or quadroples, PNA-DNA, PNA-RNA, PNA-RNA-PNA, PNA-DNA-PNA 等]、缩氨酸[peptide]、低聚肽[oligopeptide]、多肽[polypeptide]、核酸[nucleic acid]、核糖核酸["ribonucleic acid" and "RNA"]、DNA、寡核苷酸[oligonucleotide]、多聚核苷酸[polynucleotide]、蛋白质[包括各种天然蛋白、重组蛋白、酶及其底物、辅酶、抗体或抗体的片段[单链 Fvs (scFvs)、双 scFvs [Diabodies dimeric scFvs]、"Fv" 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fab 片段等]、抗原、各种受体、配体、蛋白质片段、蛋白质捕获基[protein-capture agent]、多肽及合成多肽、激素、多聚糖、核糖体、(单) 抗原决定簇[epitope]、蛋白聚糖或蛋白多糖[proteoglycans], 糖蛋白类[glycoproteins], 脂类[glycolipids], 低聚糖或寡糖[oligosaccharides], 或细胞器官类[organelle], [天然的或人工合成的]脂质体类[lipids]及其荧光类似物, 亲脂性有机染料分子[lipophilic organic dyes], 各种膜[质膜或细胞器膜(plasma or intracellular membranes)], 人工膜[如脂质体[liposomes]膜], 各种离子通道[ion channels]等,
- (2) 细胞如各种动植物细胞、微生物细胞如各种细菌、病毒、衣原体和支原体等, 以及细胞裂解物[cell lysate],
- (3) 各种生物组织, 切片,
- (4) 化学分子如无机分子、药物分子、各种有机分子、高分子等。

本发明在微阵列处理技术中采用高荷信号载体(高分子荧光微球或含有大量荧光染料、半导体纳米晶量子点、电致发光分子等的高分子颗粒, 通过有机合成技术将大量信号分子聚合为一体的各种形式的巨型信号分子, 硅氧光学磁珠[silica beads], 胶体金[或纳米金颗粒, colloidal gold nanoparticles], 或通过任何其他手段将荧光染料, 非荧光染料, 半导体量子点、电致发光、化学发光或生物发光物质信号分子等固定于微粒的表面或包埋于其内部等多种形式的高荷信号载体)作为标记物进行分子信号放大。总之, 作为一个特例, 这里首先介绍一个基因芯片信号放大技术, 可以概括说明如下:

本发明所要介绍的微阵列信号放大标记技术, 是以各种形式的高荷信号载体或信号体应用于标记各种形式的微阵列探针、靶或探针-靶络合物或结合体。

这里所说的微阵列包括但不限于如下类型: 基因芯片[包括各种 DNA 芯片, 如玻璃基因芯片, 膜芯片, 实验室芯片, 微流体芯片等]、蛋白芯片[包括抗体芯片或免疫芯片], 多肽芯片, 细胞芯片和组织芯片, 化学芯片、以电化学原理或生物电子学原理为基础的各种生物传感器等。

本发明所使用微阵列的检测原理可以是, 但不限于如下种类之一或不同原理的结合:

- (1) 通过对固相表面定位在不同位置的探针-靶特异性亲合反应结合体或杂交体进行光学信号[如荧光分子、化学发光等]标记, 然后经激发产生荧光、化学或生物发光并进行检测。以玻璃、硅片、尼龙膜等为材质的基因芯片、蛋白芯片、免疫芯片多采取这种模式;
- (2) 通过对标记的或未标记的探针或靶在施加了电压的液相中的移动速度或迁移率进行检测, 即电泳技术或由电泳技术与其他技术结合而产生的其他技术, 如毛细管电泳[capillary electrophoresis, CE]、毛细管区带电泳[capillary zone electrophoresis, CZE]、毛细管凝胶电

泳[CGE]、高效毛细管电泳[HPCE]、毛细管等电聚焦[capillary isoelectric focusing (CIEF)]、等速电泳 [isotachopheresis (ITP)]、动电色谱 [electrokinetic chromatography (EKC)]、胶束动电毛细管色谱[micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC OR MEKC)]、毛细管电色谱法 [capillary electrochromatography (CEC)]、非水相毛细管电泳 [non-aqueous capillary electrophoresis (NACE)]等,

- (3) 通过探针、靶或探针-靶络合物以及它们的标记物不同的亲和力, 进行色谱技术分析, 如亲和层析[affinity chromatography], SEC[size exclusion chromatography], GPC[gel permeation chromatography], MCC[metal chelate chromatography]等,
- (4) 利用具有氧化还原性质的分子或分子的部分结构[即化学基团或功能团]、金属络合物或(核酸) 嵌入剂与被定位并固定在固相表面不同位置或电极上的探针、靶或探针-靶络合物结合并在外加适当方式或适当大小的电压(或电势差)作用(直流电压或交变电流或脉冲电场或电压)下, 发生氧化还原反应, 致使从还原性分子或基团(电子授体, electron donor)的电子转移到氧化性分子或基团(电子受体, electron acceptor), 形成电子流, 通过电极传送到检测系统进行测量, 所测得的电流强度大小与杂交并被标记的双链核酸的量成正比,
- (5) 利用双链核酸和单链核酸的导电性能差异, 或利用由序列完全互补配对的核酸杂交所形成的双链核酸分子与有错配碱基对(Mismatches)存在的双链核酸(nucleic acids duplexes)分子之间在导电性能差异, 通过对经由核酸分子传导的电子流大小的测量而对核酸分子由此所反映的其他方面所进行的各种鉴别、检测和考察, 如在基因突变、基因多态性、基因测序、基因表达谱研究、疾病机理分析和疾病诊断等方面的应用,
- (6) 将发生在核酸分子上或由具有氧化还原性质的物质(包括但不限于, 具有氧化还原性质的金属络合物以及由金属络合物或金属络合物的衍生物为单体聚合而成的聚合物、荧光分子、核酸嵌入剂等)所发生的电子或电荷转移反应或电子流转换成其他可检测或可考察形式的检测技术, 如通过电致发光[Electroluminescence]原理, 利用电致发光分子将电子流转换为光信号所进行的检测,
- (7) 直接或间接以具有氧化还原性物质(如二茂铁基)对探针或靶分子标记物, 通过标记后可以使标记物接近电极表面而发生电子转移反应从而实现发生在电极表面的生物或化学反应的检测。如摩托罗拉公司的 eSensor Chips。
- (8) 通过探针、靶或探针-靶络合物以及它们的标记物不同的亲和力, 进行色谱技术分析, 如亲和层析[affinity chromatography], SEC[size exclusion chromatography], GPC[gel permeation chromatography], MCC[metal chelate chromatography]、动电色谱 [electrokinetic chromatography (EKC)]、胶束动电毛细管色谱[micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC OR MEKC)]、毛细管电色谱法 [capillary electrochromatography (CEC)]等。

上述各种微阵列的探针或靶概括起来包括但不限于如下类型: 探针或靶可以是, 但不限于如下种

类之一或不同种类的组合:

- (1) 生物分子如核酸[含寡核苷酸]、蛋白质[包括各种酶及其底物、辅酶、抗体或抗体的片段、抗原、各种受体、配体]、多肽、激素、多聚糖、核糖体、(单)抗原决定簇[epitope]、蛋白聚糖或蛋白多糖[proteoglycans]、糖蛋白类[glycoproteins]、甾脂类[glycolipids]、低聚糖或寡糖[oligosaccharides]、或细胞器官类[organelle]、[天然的或人工合成的]脂质体类[lipids]及其荧光类似物、亲脂性有机染料分子[lipophilic organic dyes]、各种膜[质膜或细胞器膜(plasma or intracellular membranes)]、人工膜[如脂质体[liposomes]膜]、各种离子通道[jon channels]等,
- (2) 细胞如各种动植物细胞、微生物细胞如各种细菌、病毒、衣原体和支原体等,
- (3) 各种生物组织,切片,
- (4) 化学分子如无机分子、药物分子、各种有机分子、高分子等。

这里所说微阵列的高荷信号载体[HSC]包括但不限于如下类型,以各种微小颗粒形式存在的高负荷光学、磁性、电子学或电化学信号载体,它可以是量子点微球[QD-tagged Microbeads]、高聚物荧光微球或高分子荧光微球[polymer microspheres]或胶体微珠[latex beads]、表面修饰有荧光染料的硅氧磁珠[silica beads]、胶体发光半导体纳米晶量子点[colloidal fluorescent semiconductor nanocrystal quantum dots]、树枝状高聚物纳米球[dendrimers]、星形树枝状高分子或树形分子[star dendrimers, dendrimeric stars or dendrimers]、蛋白质包裹的半导体纳米颗粒或微小颗粒或量子点[如 Chaperonin mediated semiconductor nanoparticles. Chaperonin 中以 Chaperonin GroEL 蛋白和 T. th cpn 蛋白包裹效果最佳]、胶束[micelles]、分子磁体[molecular magnets]、胶囊式微球[encapsulated spheres]、胶体纳米金[colloidal gold nanoparticles]、电致发光分子[electroluminescent molecules]、二茂金属基共聚物微球[polymetalcene block copolymers,如二茂铁基聚合物[polyferrocene block copolymers, PFC, 或 polyferrocenylsilanes, PFS]微球,多聚二茂锆[polyzirconocene, PZC]、多聚二茂金属基修饰或接枝的树枝状高分子[包括但不限于,聚二茂铁基接枝的树枝状高分子(polyferrocenyl-branched dendrimers)]、二茂金属基或多聚二茂金属基修饰或接枝的纳米金胶体[包括但不限于,胺基二茂铁基功能化的纳米金胶体(Gold colloids functionalized with amidoferrocenyl structures)等]、共聚物微球或纳米球、含有富勒烯结构的或以富勒烯为单体之一的高聚物或共聚物、其它含荧光染料或化学发光[chemiluminescence]、生物发光[bioluminescence]材料的载体,藻胆蛋白类[phycobiliproteins]及其各种衍生物或生物或化学修饰物,以及上述每一种载体中不同参数[如大小、光学发射光波长、电磁学性质、表面生物或化学功能团修饰等物理或化学性质]载体的组合,或各种不同载体之间的相互组合。其表面修饰有可以与下面通式(I)化合物中的探针接头 A'-特异性反应的功能团或作用对 A'。

这里特别提一下量子点微球 [QD-tagged Microbeads,或 QD-tagged Polymeric Microspheres, QD-Beads]。这是一种将量子点包埋在高分子微球中的一种 HSC。由于 QD 可以被大量地包埋到高分子微球中,因而也是一种信号极强的 HSC。鉴于一方面 QD 在发光波长上可以通过半导体纳米晶粒径的调节轻易地实现调节,另一方面高分子微球在包埋 QD 方面可以根据包埋的比例不同改变量子点微球的光信号强度水平,因此,量子点微球[QD-Beads]在荧光发射的波长与强度方面可以很理想地实现多元化和层次化。另外,在有利的制备条件下,量子点微球可以达到高度的均一,在电泳等方面有着极

为有价值的意义。

本发明所要介绍的信号放大技术，是在固定于微阵列基底上的探针 [P]与靶 [T]杂交或结合过程之前，利用通式 (I) 的化合物与微阵列上的探针进行特异性杂交或结合，或在杂交或特异性结合过程之后，利用通式 (II) 的化合物与微阵列上已经杂交或特异性结合的探针-靶络合物[P-T Complexes]进行特异性标示性结合或第一步标记，而利用通式 (II) 的化合物作为高荷信号载体对第一步标记进行信号放大标记，形成如通式 (III) 所示的微阵列在杂交或特异性结合与标记之后的最终结构，

通式 (I) 的化合物结构特征为：X-L<sub>1</sub>-A，或 X-A，或 X-L<sub>1</sub>，或 X，

通式 (II) 的化合物结构特征为：F(-L<sub>2</sub>-A')<sub>n</sub>，或 F(-A')<sub>n</sub>，或 F(-L<sub>2</sub>)<sub>n</sub>，或 F，

通式 (III) 特征结构为但不限于：P:T-X-L<sub>1</sub>-A-(A'-L<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-F，或 P:T-X-A-(A')<sub>n</sub>-F，或 P:T-X-A-F，或 P:T-X-(A')<sub>n</sub>-F，或 P:T-X-F，或 P:T-A-F，或 P:T-(A')<sub>n</sub>-F，或 P:T-L<sub>1</sub>-A-(A'-L<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-F，或 P:T-A-(A')<sub>n</sub>-F 等。

n 是从零到无穷大的自然数：0, 1, 2, 3...

在通式 (I) 和通式 (II) 中的所出现的多种可供选择的特征结构之间可以随意搭配，或省去不需要的特征结构。

根据微阵列所要检测的探针和靶的特性，上述通式可以作如下不同情况分析。

当探针、靶或探针-靶络合物仅为核酸或互补杂交的核酸双链时，其中，X-是与双链核酸通过静电吸引力、次键力[如范德华力、氢键等]、与双螺旋结构中的大沟或小沟的亲和力[Groove binders]、嵌入双链碱基对的亲和力[intercalators]、与双螺旋结构形成三螺旋结构或四螺旋结构等方式相结合的功能团，与核酸双螺旋结构通过化学反应形成共价键结合的功能团或分子，可以特异性识别核酸双链结构并与其结合的生物分子，可与核酸双链络合或结合的各种生物或化学分子，它可以包括但不限于下列化合物以及以下列化合物为结构基础或特征的各种衍生物和生物或化学修饰后所形成的化合物：

X-的结构特征根据其是否为杂交单链核酸或与已经互补杂交的核酸双螺旋结构发生相互作用性质可以分为如下几种类型：

1. 静电吸引力、次键力[如范德华力、氢键等]，与核酸双螺旋结构中的大沟或小沟的亲和力[Groove binders]。属于这种情况的 X-可以是，但不限于如下几种化合物：(1) 以双螺旋大沟[major grooves]为作用机理的嵌入剂放射菌素类，如 7-氨基-放射菌素 D [7-amino-Actinomycin D]；(2) 与双螺旋小沟[minor grooves]形成络合物的咪唑类[如 3,6-carbazole, 2,7-carbazole]和二苯基咪喃二胺类[diphenylfuran diamindine]，聚胺类[polyamines]DNA 嵌入剂，吲哚类嵌入剂[6H-indoloquinoline core]，烷基氨基烷基链[alkylaminoalkyl chain, DNA 小沟嵌入剂]，
2. 可以嵌入杂交核酸双螺旋碱基对的亲和力[intercalators]。属于这种情况的 X-可以是：(1) 在一定条件下，可以形成链间共价交联的一类化合物，如补骨脂素 (Psoralen, relatively weak ( $K_d 10^{-4}$  M))、异补骨脂素以及它们的任何衍生物形式，如 4'-羟甲基-4,5',8-三甲基补骨脂素 (4'-hydroxymethyl-4,5',8-trioxalen, 简写 HMT)、4'-胺甲基-4,5',8-三甲基补骨脂素 (4'-aminomethyl-4,5',8-trioxalen, 简写 AMT)、三甲基补骨脂素 (trimethylpsoralen, 简写 TMP)、8-甲氧基补骨脂素 (8-methoxypsoralen, 缩写为 8-MOP)、4,7,4'-和 4,7,5'-三甲基异补骨脂素 (4,7,4'- and 4,7,5'-trimethylallopsoralen) 以及补骨脂素本身。光激发嵌入剂[Ru(phen)2dppz<sup>2+</sup>; phen=1,10-phenanthroline;

- dppz=dipyridophenazine], 顺铂[*cisplatin*] 兼具 DNA 光损伤性质的嵌入剂吖啶基喹啉正离子盐类或喹啉衍生物正离子盐类[indolo[2,3-b]-quinolizinium bromide]; (2) 作为双链嵌入剂的 EDTA 过渡金属络合物类[如 methinidiumpropyl EDTA Fe(II)], 2,7-diazapyrene (DAP), DAPI [4'-6-diamidino-2-phenylindole], N-甲基化正离子[N-methylated cations DAP<sup>+</sup> and DAP<sup>2+</sup>], 吖啶类化合物 {Acridine orange [3,6-bis(dimethylamino) acridine, HCl]}, 双齿状吖啶类嵌入剂[bis-dentate acridine intercalators]、氨基蒽或氨基吖啶[9-aminoacridine (9AA)], 碘基或碘代吖啶类[2-iodine-125-iodoacridine]; (3) 可切断 DNA 链结构的嵌入剂亚德里亚霉素或阿霉素[Adriamycin, 或 Doxorubicin], elsamicin, Nogalamycin, Sanguinarine, Cherethyrine, anthracycline drug, leinamycin, Echinomycine, 正定霉素或道诺霉素类[Daunomycin], [Rebeccamycin]; (4) 兼具核酸碱基嵌入功能和双螺旋沟槽嵌入功能的偏端霉素类化合物[distamycin]和纺锤菌素类化合物[netropsin]以及 Hoechst 33258 和 Hoechst33342 等; (5) 以次键力为主与双螺旋结构中的堆积碱基相互作用的亚甲基蓝 [methylene blue (MB, MB<sup>+</sup>), 溴乙非啶或溴化二氨乙苯啡啶 [ethidium bromide]和二溴乙锭正离子[diethidium cation],
3. 与双螺旋结构形成三螺旋结构或四螺旋结构等方式相结合的功能团, 与核酸双螺旋结构通过化学反应形成共价键结合的功能团或分子, 可以特异性识别核酸双链结构并与之结合的生物分子, 可与核酸双链络合或结合的各种生物或化学分子, 它可以包括但不限于下列化合物以及以下列化合物为结构基础或特征的各种衍生物: (1)所有可以嵌入核酸双链结构或核酸双链的大沟或小沟中的嵌入物、多聚嵌入物、线性或环状嵌入物等,
  4. 可与 RNA 形成各种络合物的核仁素类[如 Nucleolin RBD12],
  5. 可以在双螺旋结构中的多个位点进行嵌入的多重嵌入剂, 比如将棘皮霉素类[Echinomycine, DNA 双重嵌入剂]通过共价键偶联起来, 或串联起来, 可以形成四重嵌入的四重嵌入剂;
  6. 重氮氨苯脒乙酰甘氨酸盐[berenil], 细胞毒素类[如 cytotoxin NLCQ-1], 三骨菌素[trioestin], 黄连素类[如 protoberberine-8], 口腔 M[Gilvocarcin M], 呋喃萘基吡喃酮类[furonaphthopyrone], 卟啉或金属卟啉类化合物[porphyrins or metalloporphyrins], 卟啉类化合物[如 *beta-carbolines*], 原黄素[proflavin (Acr-NH<sub>2</sub>)] , 3,7-bis(dimethylamino) phenothiazin-5-ium chloride], 苯基 巯基 吡 喃 [benzothiopyranoindazole], [水溶性]亚丙基碘化物[propidium iodide],
  7. 以芳香环结构堆积为特征的线状多聚 DNA 嵌入物[the stacked aedamer core, 具有两个或若干个 1, 4, 5, 8-四羧酸二酰亚胺(1,4,5,8-tetracarboxylic diimide)等特征结构单元多聚嵌入物],
  8. 可以产生电化学信号的嵌入物二茂铁基萘二酰亚胺类线状嵌入剂[threading ferrocenyl naphthalene diimide];
  9. 蒽类 [anthryl compands 如 AMAC[9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶 (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine)], anthracycline, APAC, N-Et-AMAC 等], 蒽醌类[anthraquinones], 萘二酰亚胺类嵌入剂[naphthalene diimide intercalators], 菲离子类嵌入剂[phenanthridinium intercalators],
  10. 金属类嵌入剂, 如八面体 DNA 铑嵌入剂[rhodium intercalator, bis(2-2' bipyridyl) chrysene quinone diimine, D-[Rh((R,R)- Me 2 trien)phi] 3+, Ru(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>], 有手性络合物结构的金属钌嵌入剂[ruthenium intercalators, [Ru(phen) 2 dppz] 2+ (phen = 1,10-phenantroline; dppz = dipyrido [3,2- a :2',3'-

- c [phenazine], terpyridine platinum compound (TPH), mitoxantrone, 钇系金属化合物 DNA 嵌入剂 [lanthanide], 二吡啶基 (乙二胺) 铂盐或三吡啶基铂盐类 [bipyridyl (ethylenediamine) Pt(II)<sup>2+</sup>, 4-picoline-2,2':6',2''-terpyridine-platinum],
11. 可改变双螺旋沟槽结构的萘二酰亚胺类化合物[双嵌入剂, 如 naphthalene diimides, N,N'-disubstituted naphthalene diimide derivatives, 用多肽链作为嵌入双螺旋小沟的连接臂的萘四羧酸二酰亚胺双嵌入剂 (1,4,5,8-Naphthalene Tetracarboxylic Diimide Bis-Intercalator with the Linker (-Ala)3-Lys in the Minor Groove), 用胺基烷基将 DNA 嵌入功能团线性连接起来所形成的双嵌入剂, 三嵌入剂, 多聚嵌入剂和有环双线状嵌入剂等],
  12. 荷包牡丹碱类[dicentrine], 三环大那霉素类[tricyclic dynemicin A], 硝基胺类[nitracrine, 亲电子性 DNA 嵌入剂], 环磷酰胺类[cyclophosphamide], amsacrine, 丹参酮类[如 Dihydrotanshinone, I], octahydroxanthene, 吡唑类[indazoles, 如 benzothioapyranoidazole DNA 嵌入剂], 咪唑类[imidazole], N-[4-(9-吡啶基氨基)-3-甲氧基-苯基]甲烷-磺胺类化合物[N-[4-(9-acrydinylamino)-3-methoxyphenyl]methane-sulphonamide, m-AMSA], 大环内酰胺类[macrocylic lactam], 喹啉衍生物类嵌入剂{如 indolo[2,3-b]quinolines, 6H-indoloquinoline core, quinoxalines}, Amsacrine, (夹)氧杂蒽类[Xanthenes, 如 1,8-二氧代-9-(o-硝基苯基)-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢氧杂蒽 (1,8-dioxo-9-(o-nitrophenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroxanthene)], luzopeptin, 甘菊环类[6a,7-diazaphth[3,2,1-cd]azulene 和 7H-1,7-diazaindolen[1,2e]azulene system], Ditercalinium, 4,6-diamidino-2-phenylene[DAPI], 戊烷脒类[pentamidine],
  13. Pixantrone, 基于吡啶结构的玫瑰树碱类[indole-based intercalator ellipticine], 奎吡因类[quinacrine], 重氮化合物类[4,9-diazapyrenium], 雌甾二醇类[estradiol], 双苯基酰亚胺类[bisbenzimidazole], 噻唑类[如 thiazole orange],
  14. 光活性生物素或光生物素[photoactivable biotin, photobiotin]、光生物素与生物分子或化学分子的偶联体、及光生物素的衍生物,
  15. 所有可以对核酸进行染色的染料分子, 如荧光染料 bisbenzimidazole H fluorochrome [TriHCl], 色霉素[chromomycin] A3, 荧光性嵌入剂[如 TOTO, YOYO, SYBR Green],
  16. 所有可以与基因芯片上的已互补杂交的核酸双螺旋结构形成三重(倍) [triplex]螺旋或四重(倍) [quadruplex]螺旋结构的化合物或生物分子或生物分子结构类似物以及此结构与其他分子共价偶联所形成的复杂分子结构, 如 PNA [peptide nucleic acids], 寡聚核苷酸, 多肽[如[N-MeCys<sup>3</sup>,N-MeCys<sup>7</sup>]TANDEM]等;
  17. 可与核酸双链发生化学反应或光化学反应从而形成共价键连接的功能团或分子, 如叠氮类化合物, 结构中含有苯甲酮功能团的化合物及其衍生物。可以与核酸探针或靶基因发生共价交联的各种化学交联剂或化学反应功能团如可以通过与靶基因上的羟基发生缩水反应的碳二亚胺, 或光化学反应活性的交联剂, 如芳香基叠氮化合物[aryl azides, 如 N-((2-pyridyl)dithio)ethyl]-4-azidosalicylamide [PEAS]等]、氟代芳香基叠氮化合物[fluorinated aryl azides], 苯甲酮类光反应试剂 [benzophenone-based photoreactive reagents, 如苯甲酮马来酰亚胺[benzophenone maleimide]]等;
  18. 可以序列特异性地或非序列特异性地识别核酸双链结构并与其结合或以双链核酸的双螺旋结构

为底物的蛋白质或酶等生物分子：如 BMBQB 蛋白，可与经顺铂铂修饰的 dsDNA 结合的 NHP6A 蛋白，参与 DNA 复制的酶、凝血酶[thrombin]、RNA 转录的酶丝裂霉素[Mitomycin C]、可以与核酸双螺旋结构的双链间形成共价桥形键的博来霉素或争光霉素类[Bleomycin]、双链核酸抗体、双链核酸的特异性结合酶，DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶，

19. 可以与待测靶基因或基因芯片上探针核酸分子的某个或某些特异性序列进行特异性互补并结合形成互补双链结构的寡聚核苷酸分子，反义核酸[anti-sense nucleic acid sequences]序列等。该类化合物可以同时适用于杂交前标记和杂交后标记两种方案。
20. 上述各种嵌入剂或结合物组合或通过共价键结合起来的分子结构，或通过化学修饰从而实现在与核酸探针、靶或探针-靶杂交双链发生相互作用并形成共价键连接或交联的上述化合物的衍生物，或单独与多肽、线性或链状生物或化学合成高分子偶联形成的高级嵌入剂或核酸结合分子。
21. 具有氧化还原[redox]性质，可以发生电子授受反应[Electron Donor-Acceptor Reaction]或电子转移反应[Electron-Transfer Reaction]的核酸结合物以及以这些化合物为单体聚合而成的聚合物和低聚物、寡聚物，如[a]可以嵌入核酸双链中的荧光分子有但不限于，亚甲基蓝[Methylene Blue, MB<sup>+</sup>]和 Hoechst33258 等荧光分子等，或[b]金属络合物，如钌金属络合物[Ruthenium tris(2,2'-bipyridine)]等，或[c]通过共价键连接或非共价键结合与上述任何一种核酸嵌入剂发生共价交联或非共价键结合的具有氧化还原性质的高荷信号载体[HSC]，包括但不限于，多聚二茂铁基团[polyferrocenyl]、多聚二茂钴基团、多聚二茂钌基团等多聚二茂金属类物质。

当探针、靶或探针-靶络合物不仅限于核酸，还包括其他种类的物质时，通式(1)中的 X-除包含上面已述及的各种情景之外，还可以是但不限于如下情景之一或下述不同情景之组合，

(1) 各种核酸、蛋白质[含酶]、多肽、糖蛋白、抗原、半抗原、抗体、细胞、微生物、生物素、受体配体、受体、抗原决定基[epitope]、或各种细胞或表面抗原的抗体，第二抗体，(2) 各种有机分子、聚合物、药物分子、染料分子、农药、有毒有机物质等的抗体或第二抗体，(3) 药物、多聚糖[polysaccharide]，多聚核苷酸[polynucleotide]等。

A-和 A'-是指任何一对具有某种化学反应或相互作用特异性探针分子接头，它们具有，但不限于下列生物或化学结构特征之一：(1) 化学反应特异性功能团对如[各种生物分子或化学分子结构中的]伯胺基[-NH<sub>2</sub>]与琥珀酰亚胺基[succinimidyl esters]、异硫脲胺酯或异硫氰酸盐[isothiocyanate]、磺酰(基)氯或磺酰氯[sulfonyl chloride]等，巯基[-SH]与马来酰亚胺基[maleimide ester]等，以及光化学反应基团如芳香基叠氮化合物[或基团]，氟代芳香基叠氮化合物[或基团]，乙锭叠氮化合物及其衍生物或基团[如 ethidium monoazide]，含苯甲酮结构的光化学反应功能团或化合物或苯甲酮衍生物与亲核基团等[如生物分子或化学分子结构中所含有的胺基，亚胺基，甲基，亚甲基等]；(2) 生物分子特异性相互作用对，如免疫或抗体-抗原，生物素-抗生物素蛋白(biotin-avidin)或抗生物素抗体、抗生蛋白链菌素(streptavidin)反应对、凝血素[lectin]或其他多糖[carbohydrates]结合蛋白、半抗原[hapten，如地高辛及其衍生物等]与抗半抗原抗体等；(3) 其它形式的特异性分子识别相互作用对，如各种配体或药物分子和其对应的受体、序列互补的单链核酸、可以形成三螺旋或四倍螺旋结构的核酸结构的寡聚核苷酸、各种蛋白质或酶与其底物等，(4) 上述各种情景内部各特异性反应对之结构组合而成的化合物或生物分子结合体。

-L<sub>1</sub>-和-L<sub>2</sub>-可以是但不限于如下各种结构或分子：<sup>1</sup>(1) 溶剂相容性连接臂，即当溶剂为疏水体系时，连接臂亦为疏水连接臂；当溶剂为亲水体系时，连接臂亦为亲水连接臂，可以是 PEG、合成多肽等，长度不限，(2) 分子导线[molecular wires,如双链 DNA 分子，亲水性连接臂，珠链型富勒烯线型聚合物（富勒烯被导入有机高分子主链的珠链型高分子）或将富勒烯[巴基球，fullerene]用 R 基连接起来的巴基球项链等]，(3) 分子绝缘体[molecular insulators，如疏水性连接臂，长链烷烃等]，(4) 结合有分子磁体的连接臂等，(5)在化学或光学等因素作用下，分子链可以断链的连接臂等，如双硫键[-SS-]等。

F 表示以各种微小颗粒形式存在的高负荷光学、磁性、电子学或电化学信号载体，它可以是高聚物或共聚物荧光微球、表面修饰有荧光染料的硅氧磁珠[silica beads]、半导体等无机物的量子点[quantum dots]、半导体等无机物纳米晶[nanocrystal particles]、树枝状高聚物纳米球[dendrimers]、星形树枝状高聚物纳米球[dendrimeric stars]、胶束[micelles]、分子磁体[molecular magnets]、胶囊式微球[encapsulated spheres]、胶体纳米金[colloidal gold nanoparticles]、电致发光分子[electroluminescent molecules]、多聚二茂金属共聚物微球[polymetallocene block copolymers,如多聚二茂铁共聚物[polyferrocene block copolymers, PFC]微球，多聚二茂锆[polyzirconocene, PZC]共聚物微球或纳米球、含有富勒烯结构的或以富勒烯为单体之一的高聚物或共聚物、其它含荧光染料或化学发光[chemiluminescence]、生物发光[bioluminescence]材料的载体，以及上述每一种载体中不同参数[如大小、光学发射光波长、电磁学性质、表面生物或化学功能团修饰等物理或化学性质]载体的组合，或各种不同载体之间的相互组合，其表面修饰有可以与通式 (I) 化合物中的探针分子接头 A-特异性反应的功能团或作用对 A'-。

本发明还在微阵列的杂交或探针-靶特异性结合过程，标记，洗脱等过程中全面引入了程序化交变电场作用，用于加快上述过程的效率，缩短过程所需时间。

#### 本发明所涉及技术术语的定义

阵列或微阵列本发明所述的[微]阵列泛指生物或者化学实体[这些实体包括，但不限于本发明说明书关于“本发明的技术原理”中探针和靶的所有种类的实体]按照一定模式在某些固相材料[基底]上按一定方式所进行的排列。阵列、微阵列、各种生物或化学芯片都是不同种类的实体的微阵列的具体体现。它包括生物芯片[基因芯片、蛋白质芯片、多肽芯片、细胞芯片、组织芯片等]和化学芯片，还包括芯片的各种表现形式，如毛细管电泳芯片等。

本发明以下术语与 Wagner 等人的美国专利[US Pat No. 6,475,808]相同：蛋白质、蛋白质片段、抗体、抗体片段、单链 Fvs (scFvs)、Diabodies dimeric scFvs、“Fv”片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab 片段、蛋白质捕获基[protein-capture agent]、底物、自组装单分子膜[self-assembled monolayer]、蛋白质芯片[array of proteins]等。

本发明以下术语与 Chenchik 等人的美国专利[US.Pat 6,489,159]相同：缩氨酸[peptide]、低聚肽[oligopeptide]、多肽[polypeptide]、核酸[nucleic acid]、核糖核酸["ribonucleic acid" and "RNA"]、DNA、寡核苷酸[oligonucleotide]、多聚核苷酸[polynucleotide]等。

高荷信号载体[HSC]

本发明如下定义 靶和探针、高聚物荧光微球或高分子荧光微球[polymer microspheres]或胶体微珠[latex beads]、量子点微球[QD-tagged Microbeads]、硅氧磁珠[silica beads]、胶体发光半导体纳米晶量子点[colloidal

fluorescent semiconductor nanocrystal quantum dots]等术语采用被普遍认可的命名标准。

实例一 本实施例用于基因芯片在探针和靶基因杂交后进行标记的实施例，当通式(I)中的X-选用补骨脂素[Psoralen]及其衍生物时的技术解决方案[包括试剂盒、基因芯片杂交室、HCL 仪和 SPR-CCD 信号检测与数据处理系统]，可以参见在先专利申请[国际专利申请：基因芯片分子探针及相关技术。国际申请号，PCT/CN02/00887]。这些方法对于以玻璃、石英、硅、塑料和膜等薄片式基因芯片是适用的。

另外，通式(II)中的F-也可以选择诸如量子点[QDs]、量子点微球[QD-tagged Microbeads,或 QD-tagged Polymeric Microspheres, QD-Beads (这是一种将量子点包埋在高分子微球中的一种 HSC。由于 QD 可以被大量地包埋到高分子微球中，因而也是一种信号极强的 HSC。鉴于一方面 QD 在发光波长上可以通过半导体纳米晶粒径的调节轻易地实现调节，另一方面高分子微球在包埋 QD 方面可以根据包埋的比例不同改变量子点微球的光信号强度水平，因此，量子点微球[QD-Beads]在荧光发射的波长与强度方面可以很理想地实现多元化和层次化。另外，在有利的制备条件下，量子点微球可以达到高度的均一，在电泳等方面有着极为有价值的意义)]、荧光树枝状高分子 [dendrimers, 简称 DD]、星形树枝状高聚物 [dendrimeric stars, 或 star dendrimers, 以下简称 SD]、分子磁体[molecular magnets] 电致发光分子 [electroluminescent molecules]、多聚二茂金属共聚物微球[polymetalcene block copolymers,如多聚二茂铁共聚物[polyferrocene block copolymers, PFC]微球, 多聚二茂锆[polyzirconocene, PZC]共聚物微球或纳米球等。

高荷信号载体 SD 的制备, 可以选用 Ronald C Hedden 等人的方法, 先制成聚 PAMAM [poly(amidoamine)] SD 核。在此 SD 核中生长出金属[如金, 铂, 钯等]或半导体[如 CdS 纳米晶, 通常控制在 2-10 纳米]。在 PAMAM SD 核表面有大量的胺基, 在加入可以接上 PEG[即聚乙二醇, poly(ethylene glycol), 5,000 g/mol]臂的同时, 按照一定的比例[MAL-PEG-NHS 和 PEG-NHS 的比例为, 1: 10]掺入马来酰亚胺-PEG-N-羟基-琥珀酰亚胺酯 [Maleimide PEG NHS ester, 简写: MAL-PEG-NHS, 有市售。Apollo Scientific Ltd, [http://www.apolloscientific.co.uk/otherProducts\\_Lifesciences\\_PEGcross.htm](http://www.apolloscientific.co.uk/otherProducts_Lifesciences_PEGcross.htm) ], 从而制成马来酰亚胺基修饰的 SD [SD (PEG-MAL) n], 作为通式(II)中的 F (L-A') n。

实例二 本实施例用于基因芯片在探针和靶基因杂交后进行标记的实施例，当通式(I)中的X-选用顺氯氨铂[cisplatin,即(cis-diamminedichloroplatinum(II))]及其衍生物[无须光化学交联]，或光激发嵌入剂钌络合物 [Ru(phen)2dppz<sup>2+</sup>; phen=1,10-phenanthroline; dppz=dipyridophenazine], 或烷基化物质氮芥[即二氯甲基二乙胺 [mechlorethamine (ME) ], 或称 nitrogen mustard, 无须光激发交联]等。以钌络合物为 X-为例, 须合成钌络合物琥珀酸酯作为通式(I) X-L-A 化合物的体现。为此, 可以采用 Dimitri Ossipov 等人的合成技术) 固相合成技术合成钌络合物琥珀酸酯[succinate 3'-[Ru(tpy)(dppz) Cl]<sup>+</sup>。其中, 琥珀酸酯基作为与高荷信号载体表面大量修饰的伯胺基[-NH<sub>2</sub>, A'-]可以特异性反应对中反应基团[A-]进行特异性共价键标记反应。

其他部分技术解决方案可参见在先专利申请[国际专利申请：基因芯片分子探针及相关技术]。

实例三 本实施例用于基因芯片在探针和靶基因杂交前进行标记的实施例，当通式(I)中的X-选用聚乙二醇-生物素[dPEG4-biotin acid. Quanta BioDesign, Ltd. <http://www.quantabiodesign.com/products.html> ]等。在标记前, 须先对样品中靶寡聚核苷酸[oligonucleotides, (ODNs)]或靶核酸[nucleic acids, NAs]在水溶性碳二亚胺[EDAC]存在下进行共价偶联, 形成生物素标记的寡聚核苷酸或核酸[biotin-ODN 或 biotin-DNA]。该 Biotin-DNA 可以作为功能化的 ODN 或 DNA 特异性地与基因芯片上与其序列互补的探针进行杂交

并形成双链核酸。借助 DNA 双螺旋结构上的生物素[特异性反应基因, A-], 可以进一步与下一步表面修饰有抗生物素蛋白[avidin, streptavidin]的高荷信号载体进行反应, 从而实现信号放大标记。

**实例四** 基因表达谱的研究对了解细胞和机体的过程发展和差异、动态平衡、应对外界因素的干扰、细胞周期性调节、老化、凋亡等过程非常重要。细胞基因表达水平的变化也决定着细胞正常过程的发展或疾病状态的表现, 比如癌症。因此, 鉴别出差异常表达的基因就成为动植物和人类各种疾病的诊断、预后、治疗的关键。

一种用来检测差异表达基因的方法是首先分别从处于健康和疾病状态的细胞、组织或器官用特异性的引物[通常为合成的长度为8~30个, 一般不超过50个碱基的基因序列]从样本中通过PCR扩增制备靶基因, 或cDNA靶。在制备靶基因的合成中掺入了核苷单体dNTP及一部分与同位素[<sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I]或荧光基团[如香豆素(coumarin)及其衍生物; 青色染料[cyanine dyes]Cy3和Cy5]共价偶联的核苷单体dNTP。从而合成带有各种信号标记并被扩增的cDNA靶基因。来自不同的组织标本的靶基因扩增选用不同发射光波长的信号标记物。然后将带有标记物来自不同细胞组织标本的cDNA靶杂交到基因芯片上固定的探针片段上。杂交结果将被检测并比较用来与相应的疾病相关联。目前的荧光标记大多费时而且过程烦琐, 最重要的是还存在着灵敏度不足和形成靶-探针的二级结构的问题。

有关改进靶基因与固相表面探针杂交的, 请参阅:

EP 0 318 245 B1;

Lockhart等人, *Nature Biotechnol.* (1996) 14: 1675-1680;

EP 0 328 829 B1 (预放大靶DNA/RNA);

Maniatis 等人, 分子克隆, *A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach* (Hames, B. D., and Higgins, S. J. eds. IRL Press, Oxford) (1985)。

本实施例为双色法基因芯片杂交前信号放大标记。双色法标记的目的主要是为了用一张基因芯片同时检测来自不同细胞或组织样品来源的靶基因, 并在同一张基因芯片上通过竞争性杂交进行比较, 根据最终所显示出来的颜色来判断两种来源的靶基因丰度或含量或表达比例等相对值。这种方法尤其在分析基因差异表达谱中经常使用。目前, 通常采用分别被Cy3和Cy5标记的碱基在对样品DNA或RNA PCR扩增时掺入到PCR产品中, 并被混合在一起用来标记基因芯片。本发明中所揭示的HSC信号放大技术同样可以用双色法标记来自不同来源[比如来自同一器官正常组织和癌组织、男性和女性、人类和小鼠、唾液和血液等] DNA或RNA样品中靶基因及其表达比例, 或同一来源的基因在不同条件下的不同的表达比例, 并在基因芯片上进行检测。

标记步骤: 先用如实例三所述的聚乙二醇-生物素在水溶性碳二亚胺作用下与各种细胞总RNA或DNA反应生成生物素化的RNA或DNA。然后, 选用不同荧光发射波长的HSC[如不同荧光颜色的高分子荧光微球、QD、SD等]分别标记来自不同样本的DNA或RNA样本。并直接用于基因芯片的标记。

**实例五** 本实施例为不同种类不同大小的高荷信号载体[HSC]对基因芯片杂交前或杂交后进行的联合标记。由于本发明所介绍的信号放大技术是依靠不同大小和种类的HSC可以携带不同量的信号分子进行信号放大的, 尺寸越大的HSC可以携带的信号分子越多, 在信号检测中可以发出越强的信号, 其信号放大能力就越强。但是, 随着HSC尺寸的增大, 它们在被标记到基因芯片上之后所占据的空间就会越大。以

下是由美国Molecular Probes公司提供的荧光高分子微球的尺寸和所携带的信号分子[荧光素当量]之间的关系\*。

荧光微球直径[微米]	每个荧光微球的荧光素当量
0.02	$1.8 \times 10^2$
0.04	$3.5 \times 10^2$
0.1	$7.4 \times 10^3$
0.2	$1.1 \times 10^5$
0.5	$2.0 \times 10^6$
1.0	$1.3 \times 10^7$
2.0	$3.1 \times 10^7$
10	$1.1 \times 10^{10}$
15	$3.7 \times 10^{10}$

\*注：本表摘自《Handbook of Fluorescent Probes and Research Products》第九版，第177页。by Richard P.Haugland。

根据这些数据可以计算出每种尺寸的荧光微球可以占据的基因芯片空间面积，并继而计算出通过使用该尺寸的荧光微球在基因芯片上的基因点的直径为200微米[所占据基因芯片面积为 $10^4 \pi$ 微米<sup>2</sup>]时可以达到的理论灵敏度检测线性范围[见下表]。表中还附带了一些关于胶体半导体[CdSe]纳米晶量子点[QDs]的直径尺寸[一般在2-5纳米。此处取值4纳米。根据报道其信号强度是一般荧光信号分子，如荧光素强度的20倍]。借助于激光共聚焦基因芯片检测仪[根据Affymetrix公司的介绍，他们依靠此技术检测灵敏度下限为30万个分子。即只有在待测标本中有30万个DNA分子时，才可以检测得到]所能达到的灵敏度下限[可检测分子数]。

每个荧光微球的荧光素当量	荧光微球在基因芯片上占据的面积[微米 <sup>2</sup> ]	每个基因点上可以标记的最大荧光微球数目[灵敏度线性检测上限]	激光共聚焦基因芯片扫描仪可以达到的灵敏度下限
$1.8 \times 10^2$	$1 \times 10^{-4} \pi$	$1 \times 10^8$	1667
$3.5 \times 10^2$	$4 \times 10^{-4} \pi$	$2.5 \times 10^7$	857
$7.4 \times 10^3$	$25 \times 10^{-4} \pi$	$4 \times 10^6$	40
$1.1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-2} \pi$	$1 \times 10^6$	3
$2.0 \times 10^6$	$0.0625 \pi$	$1.6 \times 10^5$	0.15
$1.3 \times 10^7$	$0.25 \pi$	$4 \times 10^4$	-
$3.1 \times 10^7$	$\pi$	$1 \times 10^4$	-
$1.1 \times 10^{10}$	$25 \pi$	$4 \times 10^2$	-
$3.7 \times 10^{10}$	$56.25 \pi$	$1.7 \times 10^2$	-
QD的荧光素当量	QD在基因芯片上占据的面积[微米 <sup>2</sup> ]	每个基因点上可以标记的最大QD数目[灵敏度线性检测上限]	激光共聚焦基因芯片扫描仪可以达到的灵敏度下限
20	$1.6 \times 10^{-5} \pi$	$6.25 \times 10^8$	$1.5 \times 10^4$

从上表可以看出在灵敏度提高的同时，检测的线性范围数量级大致不变，而线性检测的上限开始下移。因此，在灵敏度下限和上限之间存在着一定的矛盾。随着灵敏度提高，灵敏度的检测范围的上限会下降。

为了克服这个矛盾，本实施例采用不同信号放大能力的HSC联合使用的技术。即，采用不同尺寸[即不同信号放大能力]的同一种颜色或不同颜色的高分子荧光微球，或者较大尺寸的荧光高分子微球和QD的组合使用。选材时，尽量力求不同品种、规格或颜色的HSC的灵敏度上限和下限的衔接，以确保低信号放大能力的HSC的高的线性检测上限与高信号放大能力HSC的低的线性检测下线衔接起来，从而优势互补。比如，采用200纳米直径的高分子荧光微球[灵敏度线性检测范围为 $3 \sim 10^6$ 个分子]与4纳米直径的半导体纳米晶QD[灵敏度线性检测范围为 $1.5 \times 10^4 \sim 6.25 \times 10^8$ 个分子]联合使用，可以将实际测量的线性

范围扩大到 $3\sim 6.25\times 10^8$ 个分子。当然,也可以选择 $20$ 纳米直径的高分子荧光微球联合使用,从而将线性检测范围扩展到 $3\sim 1\times 10^9$ 个分子。

不同粒径、不同发射光颜色[不同的荧光波长]和不同表面化学功能团修饰[用以连接不同的连接臂]的荧光高分子微球可直接购买[Molecular Probes, Merck, Bangs Laboratories 公司, Brookhaven 仪器有限公司或Duke 科学公司等]。

QD的表面化学修饰和共价偶联技术可以参照Bawendi等人的美国专利: US.Pat 6,306,610, 2001年10月23日。

HSC诸如不同发光波长和信号强度的量子点微球、高分子微球、量子点等都是非常好的选材。

**实例六** 本实施例用特异性抗RNA-DNA杂交双链或RNA-DNA杂交双链类似物的抗体[anti-heteronucleic acid antibodies]来标记DNA芯片的信号放大技术,属于杂交后信号放大标记技术。该方法可用于检测各种来源的RNA,十分重要,尤其是研究细胞总RNA与监控基因表达水平。当前这个方面的方法仍然昂贵、准确性差、耗时还费力,这些都主要是因为必须实现知道所要研究的基因序列、把混合物中单个的基因序列进行克隆或扩增,并制备成一个个单独序列的基因样品。由于每个人类的单个细胞可以表达1万-3万基因,而且其中的大多数序列是不清楚的。因此,这种把样品中的基因一个一个克隆然后去检测的方法将麻烦的不可思议,而且极其耗时。在许多传统的方法里都是采用电泳技术进行分离,可能还有克隆[扩增靶基因]或测序,而后再去检测,这些方法对具有大量未知基因的复杂混合物的分析都不合适。

对于表达谱芯片的检测,需要准备标记好的DNA。这样就需要将总RNA中的mRNA逆转录成cDNA。最后再用酶或化学方法标记cDNA。这样,为了获得足够的mRNA,就必须有大量的细胞样本做准备。再说,这样做也会影响被标记了的寡聚核苷酸的杂交能力。因此,目前的基因表达谱检测方法不能够快捷、准确、经济地观测一些单独基因或整个基因组的表达和存在。这些方法的特点是,要事先知道基因序列、从样品的复杂混合物中大量扩增或克隆出并制成所要检测的单纯序列的基因样品,或标本成分中的重复序列,或进行电泳分离等。重要的是,这些方法没有充分准确而且经济地利用已经做成微阵列、而且序列清楚的基因芯片的潜力。因此,能够克服这些缺点的方法将是极有价值的。

抗杂合核酸双链抗体[anti-heteronucleic acid antibody, 简称为anti-HNA] 一般而言,用RNA-DNA和RNA-RNA杂交双螺旋结构的A型螺旋构型免疫动物可以得到对这些杂交结构的磷酸酯主链[phosphate backbones]显示特异性的抗体,而对其碱基序列几乎没有特异性。由于双链DNA属于B型构型,抗RNA-DNA抗体不能识别它们[参阅Stollar等人,1987, Anal. Biochem. 161:387-94]。在Carrico的专利[U.S. Pat. No. 4,833,084, May 23, 1989]中介绍了一种可以特异性识别DNA-RNA杂交双链的单克隆抗体。Stuart等人[U.S. Pat. No. 4,732,847, Mar. 22, 1988]也介绍了使用一种小鼠抗体可以检测出DNA或RNA杂交到被固定与固相表面上另外一种核酸[即分别是RNA或DNA]所形成的杂交双链DNA-RNA。

本实施例将提供一些对杂交到DNA芯片上的RNA或RNA类似物[本发明统称为靶RNA]进行检测的合成试剂和检测方法。这些RNA无须逆转录而直接将总RNA杂交到DNA芯片上。而且每次可以检测的靶RNA基因种数不受限制,只要DNA芯片上有其互补的DNA序列。本方法包括提供一个靶RNA集,它包括但不限于,细胞总RNA, poly(A)<sup>+</sup> mRNA及其片段,或从cDNA转录过来的RNA;然后将这个靶RNA集杂交到DNA芯片或DNA类似物[DNA mimics]芯片[即DNA或DNA类似物被固定于固相表面上]上从而形成RNA-DNA杂合体;使抗HNA抗体[即抗RNA-DNA杂合体抗体, anti-HNA]在适合条件下与杂合体接触

并特异性结合。

这里所说的抗HNA抗体的标记过程可以选在与RNA-DNA杂合体接触之前、接触过程当中或接触之后。作为最佳实施例，抗HNA抗体的标记发生在接触之前，而且用荧光高分子微球、QDs、SDs和表面经化学发光分子或生物发光分子包被的硅氧光学磁珠[silica beads]。作为最佳实施例，抗HNA抗体是单克隆抗体。

对结合到基因芯片上RNA-DNA杂合体的抗HNA抗体的检测可以利用激光共聚焦基因芯片扫描仪、CCD摄像仪或SPR[表面等离子共振]激发荧光进行实时检测。

抗HNA抗体可以包括，但不限于，多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs)、humanized or chimeric antibodies, 单链抗体, Fab 片段, F(ab')<sub>2</sub>片段,由一个Fab 表达文库产生的片段, anti-idiotypic (anti-Id) 抗体, 及上述所有种类的抗原决定基结合片段[epitope-binding fragments]。最佳实施例是高特异性和亲和力[avidity]的单克隆抗体。

特别要提到的是,本发明所要选择的抗HNA抗体将是但不限于在下面得到描述的产品: Fliss等人, 1993, App. Environ. Microb. 59(8):2698-2705; Stollar 等人, 1987, Anal. Biochem. 161:387-394; Carrico, U.S. Pat. No. 4,833,084, May 23, 1989; Coutlee等人, 1989, Anal. Biochem. 181:96-105。

抗HNA抗体-高荷信号载体偶联体[anti-HNA-HSC]的合成。偶联方法可以采用Harlow, E和Lane, D在["Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]中所描述的方法进行。高荷信号载体可以从本发明所列举的所有种类中任选一种。

也可以选择MAL-PEG-NHS作为偶联剂, 偶联条件可参照本发明的其它实施例。

具体步骤如下: 用Poly(A)<sup>+</sup> RNA与玻璃基因组DNA芯片杂交, 或被ZnCl<sub>2</sub>片段化的RNA与此基因组基因芯片杂交。杂交之后, 基因芯片与抗HNA单克隆抗体-HSC偶联体和RNase 混合溶液一起进行温育。最后再经洗脱, 并用激光共聚焦扫描仪或CCD进行检测。

DNA或RNA的类似物或衍生物, 是指含有一些亚结构单元的高分子, 可以与DNA或RNA 发生特异性杂交并形成类似于Watson-Crick结构。这些类似物或衍生物可以是核酸在碱基、糖基或磷酸酯主链被修饰而成的核酸产物。

有关生产chimeric antibodies, 参见Morrison, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger, et al., 1984, Nature 312, 604-608; Takeda, et al., 1985, Nature, 314, 452-454); 生产humanized antibodies. 见Queen, U.S. Pat. No. 5,585,089 and Winter, U.S. Pat. No. 5,225,539; 生产单链抗体, 详见U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; and Ward, et al., 1989, Nature 334, 544-546; specific epitopes 参见Huse, et al., 1989, Science, 246, 1275-1281

杂交: Poly(A)<sup>+</sup> RNA (2 微克) 与DNA芯片在60摄氏度杂交16小时。在另外一例中RNA在60摄氏度与1 mM ZnCl<sub>2</sub>一起温育30分钟后被断裂成小于150 bp 的小片段。此后, 加入10 mM的EDTA溶液, 则RNA片段即可与DNA芯片杂交。

抗HNA抗体-HSC偶联体[简称偶联体]与基因芯片上RNA-DNA杂合体[简称杂合体]的结合: 这种HSC偶联体结合条件通常在pH 7-9的生理盐水含有0.1% BSA和RNase存在下进行。

实例七 本实施例用探针固定于固相表面的蛋白质芯片[protein arrays, 含免疫芯片即抗体芯片]的信号放大标记。因为蛋白质芯片多以抗体、重组蛋白质或多肽等小生物或化学分子[当然作为固定于蛋白质芯

片表面的探针还同时不包括,但不限于蛋白质[和各种酶]、蛋白质片段、抗体片段[如单链Fvs(scFvs)、Diabodies dimeric scFvs、“Fv”片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、Fab片段、蛋白质捕获基[protein-capture agent]等]、蛋白质的底物以及微生物如病毒、细菌、衣原体和支原体等病原体为固定于固相表面的探针[见Wagner等人和Guorong Chin等人的美国专利。本发明所述的蛋白芯片与该专利中的定义相同]。

用于检测或捕获某一特定蛋白质并被用作固定于固相表面的探针的抗体是通过用特定抗原[蛋白质、多肽、失活病原体]使动物接受免疫而产生。通过这种方法可以大量生产所需要的抗体。DNA重组技术是大量获取重组蛋白质的有效途径。小分子量的化学物质[包括但不限于合成多肽、药物及药物先导化合物[drugs and lead compounds]、有机分子和高分子等]也可以固定于固相表面用于捕获并鉴别特定蛋白质。

本实施例的最佳实施方案将针对但不限于,以抗体[Ab<sub>p</sub>]、重组蛋白质[P<sub>REC</sub>]、蛋白质或酶的底物、受体配体、受体、各种蛋白质[含抗体和酶等]及其片段和小分子量化学物质[C]为探针[P]以检测样品中蛋白质[T]的蛋白质芯片。对于蛋白质芯片的固相支持物[基底]可以是,但不限于平板类[玻璃、塑料等]或膜类[硝酸纤维素膜(nitrocellulose),尼龙[nylon],或聚偏二乙烯二氟化物[polyvinylidene difluoride (PVDF)]等]。

进行检测时,待测样本[如血液、细胞裂解液、唾液等]中的蛋白质[靶,T][如细胞蛋白、各种抗原等]或病原体等将被蛋白芯片的探针[P]捕获。随后,用于检测被捕获蛋白质的各种特性或代谢状态的各种抗体[相当于通式(1)中X的角色,这里称之为第一抗体,或一抗]被施加到蛋白质芯片上,被用作特异性探头[X-]对蛋白质芯片的靶进行初步标记,形成通式(1)结构特征[P::T::X]的杂合体:Ab<sub>p</sub>::Protein::Ab<sub>1</sub>,或P<sub>REC</sub>::Protein::Ab<sub>1</sub>,或C::Protein::Ab<sub>1</sub>。统一表示为,P::Protein::Ab<sub>1</sub>。其中,符号::表示一种非共价键络合。接着,采取标准的免疫分析路线,即用共价键偶联了高荷信号载体[F]的抗前一步所有用于标记蛋白质的第一抗体的第二抗体[Ab<sub>2</sub>],或称二抗,对一抗进行信号放大标记,形成结构特征如下的杂合体:P::Protein::Ab<sub>1</sub>::Ab<sub>2</sub>-L-F。

合成Ab<sub>2</sub>-L-F:高荷信号载体[High-loaded Signal Carriers, HSCs]可以是,但不限于如下表面修饰有胺基或巯基的荧光高分子微球、发光半导体纳米晶[如CdSe-ZnS等]核壳结构、星形树枝状高分子、表面包被着大量化学或生物发光分子或荧光分子的硅氧磁珠等。连接臂[L]可以但不限于,聚乙二醇分子、多肽链和各种有机分子和高分子等。为此,我们可以购买可以将蛋白质、抗体等表面含有大量巯基或胺基的二抗和表面修饰有胺基或巯基的高荷信号载体通过共价键交联起来的水溶性双功能团交联剂,马来酰亚胺-聚乙二醇-N-羟基琥珀酰亚胺酯[Maleimide PEG NHS ester, Apollo Scientific Ltd]。高荷信号载体选用表面修饰有胺基的荧光高聚物微球[Molecular Probes Inc和Bangs Laboratory Inc等公司有售]。合成Ab<sub>2</sub>-L-F时,须先将适量的交联剂与胺基修饰的高分子荧光微球在水溶液环境和常温条件下反应,生成表面-PEG-MAL修饰的荧光微球。然后,在用后者与二抗反应生成Ab<sub>2</sub>-L-F。

Ab<sub>2</sub>-L-F与蛋白质芯片的信号放大标记可以按照标准免疫反应过程处理。相关技术操作可参见Maniatis等人的《分子克隆,实验室手册》。

另外,也可以采用Ellen R. Goldman等人利用亲合素[avidin]作为桥将抗体与QD偶联起来的办法[方法详见Ellen R. Goldman等人, Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot- Antibody Conjugates. J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 6378-6382]。由于生物素化的生物分子[如核酸、寡核苷酸、多肽、蛋白质、抗体等],或化学分子[如高分子微球、交联剂等]很普遍,而且有市售,因此,可以通过这种方法利用合成

的QD-亲合素[QD-Av]将QD偶联到很多这样的生物或化学分子上。

**实例八** 本实施例用于微流体[microfluidic]电泳芯片核酸检测中的信号放大标记。以毛细管区带电泳[capillary zone electrophoresis, CZE]为例。

由于电泳技术本身灵敏度低，而且无法提供DNA序列方面的信息，目前微流体芯片检测核酸时，多采用PCR技术首先对待检测的靶基因进行序列扩增，同时借此步骤保障检测的序列特异性。然后再开始进行毛细管电泳。本实施例所提出的技术方案为：[1]先将探针与高荷信号载体[HSC]进行共价偶联，然后将被HSC标记了的核酸探针与待测靶基因进行杂交；[2]将杂交后的溶液进行毛细管区带电泳。

- (1) **探针合成** 首先在待测基因的探针序列设计好之后，通过DNA合成仪合成末端[3'-端或5'-端]带有伯胺基、巯基或生物素等功能团的DNA或RNA或通过多肽合成仪合成带有上述功能团末端修饰的DNA、RNA结构类似物如PNA。用通式XNA-X[XNA代表DNA、RNA、或核酸相似物(nucleic acid mimics)如PNA等; X-代表伯胺基、巯基、生物素、亲合素等]。
- (2) **HSC制备** 各种HSC通过直接购买[如Molecular Probes公司等有售]或合成表面有与合成XNA末端功能团可特异性形成共价键或以非共价键结合[如络合或[亲合素和生物素的]亲合]的HSC，如荧光高分子微球[FMs]、胶体半导体CdSe-ZnS等核壳结构纳米晶量子点[QDs]、具有荧光分子、金属、半导体纳米晶核的星形树枝状高分子[SDs，如有CdSe Core PAMAM Dendrimers。PAMAM是poly-(amidoamine)的缩写]。比如用实例一中的方法可以用MAL-PEG-NHS制备马来酰亚胺基修饰的带有CdSe纳米晶核、PEG外层和-PEG-MAL臂的PAMAM SD：[CdSe Core PAMAM SD (PEG-MAL)<sub>n</sub>]。合成巯基末端修饰的单链XNA(ssXNA) (3'-HS-XNA-5')为探针。或用Ellen R. Goldman等人的方法合成的亲合素-QD偶联体[avidin]-QD与我们所感兴趣的生物或化学分子偶联起来，形成有信号放大功能的各种生物探针[如与生物素化的核酸[或核酸相似物]XNA-Biotin形成XNA-Biotin-Avidin-QD，与生物素化的蛋白质[包括抗体、抗原、半抗原、受体的配体、配体等]形成Protein-Biotin-Avidin-QD等]，用于相关检测。
- (3) **探针与HSC偶联** 经与制备的MAL修饰的SD [即SD (MAL) n]共价偶联后[最佳实施方案是在共价偶联反应中应保持SD (MAL) n相对于3'-HS-XNA-5'适当比例。从而形成每个SD (MAL) n上可以偶联一个到若干个探针基因]，形成 [CdSe Core PAMAM SD(PEG-MAL)<sub>n,m</sub>][PEG-3'-XNA-5']<sub>m</sub>，缩写为SD[ssXNA]<sub>m</sub>的结构。

对于亲合素-QD偶联体 ([avidin]-QD) 类，与生物素化的XNA[biotinylated nucleic acids or nucleic acid mimics]反应生成XNA-Biotin-Avidin-QD，简称为XNA-QD。

- (4) **靶基因制备** 样品中纯化出来的基因溶液[经超声波打碎或限制性内切酶酶切。最佳实施例为采用断裂为等长的靶基因(采用Kaufman等人的Binary encoded sequence tags技术，美国专利US PAT 6,383,754)制备方法制备出长度相等的靶基因。
- (5) **杂交** 将SD [ssXNA]<sub>m</sub>或XNA-QD探针与从样品中制备的靶基因杂交过程参阅《分子克隆，实验室手册》(Maniatis等人,冷泉港出版社出版,冷泉港,纽约,(1989))等相关书籍。杂交之后，形成dsXNA-SD[结合在SD上的双螺旋结构核酸或核酸与其互补相似物杂交双链]，或tpXNA-SD[结合在SD上的三螺旋核酸(或含其互补核酸相似物的)结构]或nsXNA-QD[ns表示双链、三链或四链]。该结构包括但不限于如下结构，该化合物包括但不限于，dsDNA，dsRNA，DNA-RNA，

PNA-DNA、PNA-RNA、PNA-DNA:PNA和PNA-RNA-DNA等]

- (6) 用于偶联末端修饰DNA的SD，如果是荧光高分子微球等，最好是经过CZE分离过的，而且要取其窄分。即要确保所选用的SD是在淌度[mobility]、荷质比[charge-to-mass ratio]或Zeta电势[zeta-potential]、分子大小[size]和分子量等性质均一性。
- (7) 电泳 杂交后，推荐CZE电泳条件，缓冲溶液:pH 2.0~12.0, 20 mM -200 mM 磷酸钠。仪器和实验条件以安捷伦公司[Agilent Technologies Inc]的Bioanalyzer 2100型LabChip毛细管电泳芯片为基础。有关电泳操作技术流程，请参阅安捷伦公司关于DNA芯片在Bioanalyzer2100进行电泳的用户操作手册。

另外，该信号放大技术也适合于毛细管凝胶电泳[CGE]里的核酸及其相似物的检测。适合于标记核酸及其相似物的HSC包括上述所涉及的所有品种。最佳实施例以颗粒直径、分子形状、Zeta电势、表面修饰物的性质、密度等性质均一或十分接近的情况下。作为核酸检测用CGE仪器，选用安捷伦公司的生物分析仪2100进行实验。HSC最好采用量子点微球、QD、SD等产品性质比较均一。电泳用凝胶可选择但不限于，琼脂糖凝胶等。

**实例九** 本实施例用于微流体电泳芯片核酸检测中的信号放大标记。以双HSC法标记DNA更准确。本方法对每一个待测的靶基因设计双[或两个以上]探针序列以加强靶基因检测中的特异性和准确性。对每个探针序列都合成一个探针，并分别用一个HSC与之共价键偶联，形成对应于该靶基因的两个独立的探针。杂交用探针-HSC共价偶联等技术过程与实例八中的各步相同。由于在基因片段化的过程中，存在将一个完整待测基因打碎成两个独立的片段，因此，在峰的识别上每个待测基因将会出现至多三个特征峰。例如，用发射光波长不同的半导体CdSe-ZnS核壳纳米晶的QD[520纳米（粒径1.4纳米）和590纳米（粒径2.15纳米）]分别偶联两个不同的探针序列[A和B]，产生QD<sub>520</sub>-XNA<sub>A</sub>和QD<sub>590</sub>-XNA<sub>B</sub>两个杂交用的探针，则由于可能在基因纯化，标记或杂交过程中完整基因受到破坏而断裂，那么，最终电泳结果可能存在最多三个特征峰。即，靶基因与探针QD<sub>520</sub>-XNA<sub>A</sub>杂交而成的红色QD<sub>520</sub>-XNA<sub>A</sub> | cXNA、靶基因与探针QD<sub>520</sub>-XNA<sub>A</sub>杂交而成的绿色QD<sub>590</sub>-XNA<sub>B</sub> | cXNA以及靶基因与探针QD<sub>590</sub>-XNA<sub>A</sub>和探针QD<sub>590</sub>-XNA<sub>B</sub>同时杂交而成的黄色QD<sub>590</sub>-XNA<sub>A</sub> | cXNA | XNA<sub>B</sub>-QD<sub>590</sub>。“|”表示杂交符号。

这种双探针标记技术的好处在于，可用两个或多个峰来同时确定一个靶基因，提高了检测的准确性。

**实例十** 本实施例用于微流体电泳芯片多基因核酸检测中的信号放大标记。为了对样本中的多种靶基因进行检测，本实施例将选取多种发射光颜色的HSC。比如，多重发射光波长和信号强度的量子点微球、选取以不同直径的半导体量子点[包括但不限于TeSe, CdSe, ZnS等上述各种半导体材料所制备的QD]可以在激发光[以激光、紫外灯等光源]激发下产生不同波长的荧光[如粒径分别为1.4纳米、1.9纳米和2.15纳米的CdSe-ZnS核-壳QD在310纳米波长的激发光激发下分别发出520纳米、570纳米和590纳米的光]。以半导体QD-PAMAM核壳结构的SD或其他结构为外围结构[制备方法见实例一]制成包含不同QD粒径、外径均一的SD [SD (PEG-MAL) <sub>n</sub>]。再分别用含有不同QD粒径的SD [SD (PEG-MAL) <sub>n</sub>]标记不同的探针基因序列，制备出若干种用于与样本靶基因进行杂交的SD[ssXNA]<sub>m</sub>。由于SD的粒径、Zeta电势、表面电荷密度等因素上很均一，而且，基因的片段长度可以得到较好的均一性，因而在进行毛细管电泳时，SD [ssXNA]<sub>m</sub>的淌度取决于XNA自身的长短、电荷等因素，条件容易控制。

在毛细管电泳条件一致的情况下，多基因毛细管电泳是以单基因毛细管电泳的淌度结果为参照。对

多毛细管电泳的结果, 要根据颜色的不同单独判读每一种基因序列的电泳情况。

其它技术过程的描述参阅实例八的相关介绍。

**实例十一** 本实施例用于微流体毛细管电泳芯片蛋白质检测中的信号放大标记。本实施例采用首先购买所要检测的蛋白质的特异性抗体[Ab<sub>0</sub>]或抗体片段[F<sub>Ab0</sub>], 然后对这种抗体生物素化。可以购买生物素-聚乙二醇-N-羟基-琥珀酰亚胺酯[Biotin PEG NHS Ester, Apollo Scientific Ltd]与Ab<sub>0</sub>进行生物素化标记。标记条件如下:

- (1) Ab<sub>0</sub>生物素化: 在pH 8.3条件下, 将Ab<sub>0</sub> (5 mg) 溶解于1ml 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>。将0.5 mg Biotin PEG NHS Ester[溶解在200 μl 的DMF中]加入到这个溶液中。该溶液在室温条件下振荡1小时。之后, 用1.0 x 10 cm Sepharose CL-6B柱在pH 7.5和平衡了的HBS缓冲溶液中纯化Ab<sub>0</sub>-Biotin。Ab<sub>0</sub>-Biotin在-20°C存储。
- (2) 制备QD-亲合素偶联体: 详细步骤可以按照Ellen R. Goldman等人的方法制备[avidin]-QD。
- (3) 制备QD-Ab<sub>0</sub>: 将Ab<sub>0</sub>-Biotin溶液与[avidin]-QD溶液混合并一起温育2小时。此后, 用亲和层析技术[affinity chromatography]分离QD-Ab<sub>0</sub>。用amylose树脂柱 (New England Biolabs) 进行分离。用1 mL的PBS(120 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM磷酸缓冲溶液pH 7.4洗脱树脂。Ab<sub>0</sub>-Biotin流入树脂柱, 然后停住1小时进行温育。多余Ab<sub>0</sub>-Biotin用2 mL的PBS从树脂柱中洗脱。在PBS加入10 mM 麦芽糖[maltose]溶液之后, QD-Ab<sub>0</sub>将会从树脂柱上得以解析出来。
- (4) QD-Ab<sub>0</sub>与靶蛋白结合: QD-Ab<sub>0</sub>与靶蛋白一起温育1-2小时, 并在室温下轻微振荡。反应混合液不加分离, 直接用于毛细管电泳。
- (5) 毛细管电泳: 无论是毛细管区带电泳[CZE]还是毛细管凝胶电泳, 都用Caliper公司的LabChip和安捷伦公司的Bioanalyzer2100技术平台进行。具体操作步骤请参阅其使用手册。

本实施例所述的方法可以适用于任何可以通过抗体-抗原反应的一种或更多种蛋白质[包括但不限于各种酶、免疫球蛋白、受体配体及配体等]、多肽以及任何可以通过抗体反应进行检测的生物或化学分子的毛细管分析。同时, 在本实施例中所使用的HSC也可以是, 但不限于任何前面所述及的HSC种类。

**实例十二** 本实例用于蛋白质-DNA相互作用芯片[Protein - DNA Interaction Arrays]的信号放大标记。由于研究蛋白质与DNA相互作用的芯片大都以基因芯片为检测平台, 研究各种以DNA为底物的蛋白质。因而可以将DNA作为探针, 蛋白质为靶分子看待。标记靶蛋白基本上可以以蛋白质芯片的信号放大路线[如实例七和实例十四]为参照。

**实例十三** 本实施例用光生物素对基因芯片检测进行杂交前信号放大标记。在此方法中将使用光生物素为EZ-Link™光生物素[EZ-Link™ Photoactivatable Biotin, 本文简称为EZ, Pierce Ltd]。EZ是一个非特异性标记试剂, 可以和蛋白质和核酸在常温下用可见光[最佳波长350 nm]。要制备生物素化的核酸, 只要简单地将EZ和核酸探针混合, 用可见光[350纳米紫外光最佳]即可将生物素偶联到核酸探针上去。光生物素EZ较之于酶法生物素化, 是一个操作简单、廉价方法。EZ可用来标记双链DNA, 单链DNA和RNA。单链DNA在标记过程中不会被降解或交联。标记了的核酸也很容易从未被标记的试剂中纯化出来。EZ标记后, 平均每100-400个碱基中会有一个被标记上。来自样品中的靶基因生物素化在按标准杂交过程杂交时也很稳定。

一、用于基因芯片杂交的核酸靶基因的生物素化、

- (1) 在水溶液或0.1 mM EDTA, pH 8.0中, 制备浓度约为1.µg/µl的核酸样品[靶基因],
- (2) 将等量的核酸样品溶液与EZ光生物素溶液混合,
- (3) 将反应混合液[可放置于离心管中]放在一距在太阳灯[一般240-250V的275瓦电灯即可; 或照相用闪光灯闪光5-10次]下10厘米处的冰浴中15分钟。

## 二、生物素化核酸的纯化:

- 1、在反应混合物中加入0.1 M Tris·HCl, pH 9.0使其样品溶液的体积达到100微升,
- 2、将100微升的2-丁醇[或n-丁醇]加入反应溶液。混合并离心,
- 3、弃去上层溶液;
- 4、重复2-3步操作,
- 5、加10-50微克序列无关的载体DNA或RNA, 和7.5微升4.0 M NaCl溶液, 混合,
- 6、如果是DNA, 加入100微升乙醇; 如果是RNA, 加入125微升的乙醇,
- 7、在干冰中冷凝样品15分钟, 或在-20°C下过夜。通过离心收集沉淀物, 干燥, 溶解在0.1 mM EDTA, pH 8.0的溶液中存储。

三、生物素化的核酸样品与基因芯片的杂交过程可以按照标准的杂交过程进行。参见Maniatis等人, 《分子克隆, 实验室手册》。

四、信号放大标记: 这方面可以购买亲和素[抗生物素蛋白, avidin]表面包被或修饰的HSC, 如高分子荧光微球[Molecular Probes Ltd等]、量子点微球等直接与基因芯片在常温下反应、洗脱、晾干并用于荧光检测。

实例十四 本实施例用光生物素对蛋白质芯片检测进行信号放大标记。整体技术方案参见实例七。本实例将通过光生物素合成实例七中的Ab<sub>2</sub>-L-F, 其他技术方案同实例七。通过如下步骤进行。

1. 在装有PBS (Phosphate Buffered Saline, 10 mM 磷酸钠溶液, 150 mM NaCl, pH 7.4, 产品号. 28374) 缓冲溶液的Eppendorf试管中制备4 mg/ml的样本。
2. 在PBS的样本溶液中加入EZ-Link™ 光生物素。摩尔比例为 5:1 (生物素: 蛋白质)。
3. 在冰浴中用Vortex仪振荡。
4. 打开Eppendorf试管, 在垂直距离20厘米的上方照射20分钟[详细照射条件见实施例十四]。
5. 生物素化抗体[Ab<sub>2</sub>-Biotin]可供使用。
6. 用包被有抗生物素抗体[anti-biotin]或抗生物素结合蛋白[avidin]的HSC[所有但不限于上述HSC之一]在冰浴下混合, 振荡。
7. 制备好的Ab<sub>2</sub>-HSC可供蛋白质芯片信号放大标记使用[后续步骤见实例七]。

实例十五 本实例用于以电化学[Electrochemical]或生物电子学[bioelectronic]原理为基础的生物芯片或生物传感器[biosensors]的信号放大检测。根据上述原理开发的这类生物芯片或生物传感器都是将人工合成的生物分子, 如单链核酸探针[根据某一点基因(如基因突变的突变位点、某种病原体的特异性基因序列)的序列的互补序列]固定于由铂、金或石墨等材料制作的电极材料的表面, 用于与来自病人样本的靶基因进行杂交。杂交后通过加入可以嵌入互补杂交双链的氧化还原活性的嵌入剂在外界施加一定电压时产生氧化还原反应, 从而可以从电极上检测出电子流感知发生在电极上的杂交反应。

尽管从已经商业化的技术表现形式各有不同, 但大多数产品表现出如下技术特点:

- (1) 通过检测固定有单链核酸探针的电极上的电子流信号变化来确定在电极上固定的核酸探针上发生的杂交情况。这主要是利用了双链核酸优良的导电性能[参见Xanthon Inc的Xanthon Xpression Analysis System™, Thorp等人的美国专利US Pat. No.6,361,951, March 26, 2002]。几乎所有公司都用到了单链核酸和双链核酸的导电性差异,有的还用到了含有错配碱基对的双链核酸的导电性较差的性质[GeneOhm Science Inc]用于检测单碱基突变多态性[SNP](参见E.M. Boon et al., "Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes," *Nature Biotechnology*, 18:1096-1100, 2000)。
- (2) 利用有氧化还原活性的标记物在外界施加的一定电压时通过检测氧化还原反应产生的电子流变化考察被固定于电极表面上的单链核酸探针上发生的杂交反应情况:(a) 过渡金属络合物类,如二茂铁[如Motorola公司的eSensor Chip产品和Xanthon公司的钌金属络合物[如Ruthenium tris(2,2'-bipyridine)], (b)具有氧化还原性质的双链核酸嵌入剂[如Toshiba公司的SNP Typing Chips产品中使用了具有氧化还原性质的染料、双螺旋小沟嵌入剂Hoechst33258。GeneOhm Science Inc的Hybrid DNA Biosensors中使用了同样容易被氧化的双链核酸嵌入剂兼荧光染料亚甲基蓝[Methylene Blue,缩写为MB]]。

本实施例将一种具有氧化还原性质的HSC应用于上述技术的信号放大。以Motorola公司的eSensor Chip产品为例。该公司的eSensor™ DNA 检测系统利用了两个单链DNA探针:一个固定于电极表面的捕获探针,一个生物电子学信号探针[参见R.M. Umek et al., "Electronic detection of nucleic acids: A versatile platform for molecular diagnostics," *Journal of Molecular Diagnostics*, 3:74-84, May 2001]。捕获探针与信号探针与靶基因[DNA或RNA序列]上两个相邻但分立的序列互补。

在电子印制线路板[Printed Circuit Board, PCB]上的金电极表面有一层自组装单分子膜[Self-Assembled Monolayer (SAM)]。在这个SAM上固定有未标记的捕获探针。信号探针游离于溶液中,而且含有作为电子标记物的经二茂铁修饰的核苷。靶基因与两个探针的结合将会导致二茂铁基团与电极表面的接近。此时,如果外界施加有合适的电压,已经杂交的信号探针将随着把它们的电子通过SAM转移到电极上而被氧化,从二价铁氧化为三价铁。由此所产生的电流强度与通过杂交而被固定于电极表面的二茂铁基团成正比例。

根据其原理,本实施例采用多聚二茂铁代替原技术中的二茂铁用来标记信号探针并按照其上述原理应用于其DNA检测技术。具体步骤如下:

用Agne's Labande等人在 "Supramolecular Gold Nanoparticles for the Redox Recognition of Oxoanions: Syntheses, Titrations, Stereoelectronic Effects, and Selectivity" 1782-1789 VOL. 124, NO. 8, 2002 9 J. AM. CHEM. SOC.所阐述的方法合成多二茂铁基表面修饰的纳米金胶体。在加入二茂铁基化合物时,按适当的比例掺入羟基和巯基双异功能团耦联的PEG, HO-POE-NH-CO-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-SH [Rapp Polymere GmbH, Tübingen, Germany],生成自由端为羟基的多二茂铁基修饰的纳米金胶体。在水溶性碳二亚胺的帮助下,与末端为羧基的核酸[通过DNA合成仪合成]形成末端连接多二茂铁基表面修饰的纳米金胶体颗粒。可直接用于在eSensor Chip上的靶基因杂交。其他过程与原

技术相同或相似。

**实例十六** 本实施例将以GeneOhm Science Inc的Hybrid DNA Biosensors产品为例进行信号放大。本实施例选用具有氧化还原活性的多二茂铁基树枝状高分子[polyferrocenyl dendrimers]为HSC。制备该HSC的方法可以用Alexander Salmon等人在Water soluble ferrocenyl and polyferrocenyl compounds: synthesis and electrochemistry. Journal of Organometallic Chemistry 637-639 (2001) 595-608所介绍的方法合成水溶性多二茂铁基树枝状高分子，溶解于反应水溶液体系中，代替原先的铁氰化合物[Fe(III),  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ]。其他技术部分沿用原来的技术方法。

**实例十七** 本实施例将以Toshiba公司的SNP Typing Chips产品的信号放大。本实施例选用多二茂铁基纳米金胶体为HSC。首先，用实例十五中的方法合成外层自由端为羟基的多二茂铁基修饰的纳米金胶体。然后，用琥珀酰亚胺基-PEG-羧基[NHS-PEG-COOH]双异功能团交联剂在水溶性碳二亚胺的作用下，与羟基多二茂铁基纳米金胶体反应合成自由端为NHS-的多二茂铁基纳米金胶体。后者可以直接与被Hoechst 33258标记[特异性的嵌入杂交双链核酸分子中]了的核酸-Hoechst33258络合物发生共价交联反应，生成核酸-Hoechst33258-多二茂铁基纳米金胶体颗粒的络合物。在施加一定电压，Hoechst33258被氧化而失去一个电子时，多二茂铁基纳米金胶体颗粒可以作为电子授体予以补充，从而起到电子信号放大作用。其他技术部分与Toshiba公司SNP Typing Chips产品的技术处理方法相同或稍作调整。

**实例十八** 本实施例用于微流体毛细管电泳细胞芯片检测中的信号放大标记。用于细胞检测的标记中，采用首先购买所要检测细胞表面蛋白质或表面抗原的特异性抗体[Ab<sub>0</sub>]或抗体片段[F<sub>Ab0</sub>]，然后对这种抗体生物素化。关于抗体的生物素化标记、如何制备HSC-抗生物素抗体或生物素结合蛋白共价键偶联体以及制备HSC-抗体共价键偶联体、抗体与细胞结合和电泳等方法参照实例十一。

本实施例所述的方法可以适用于任何可以通过抗体-抗原反应的一种或更多种蛋白质[包括但不限于各种酶、免疫球蛋白、受体配体及配体等]、多肽以及任何可以通过抗体反应进行检测的生物[细胞、病毒、衣原体和支原体等]或化学分子的毛细管分析。同时，在本实施例中所使用的HSC也可以是，但不限于任何前面所述及的HSC种类。

专利名称(译)	微阵列信号放大方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1553188A</a>	公开(公告)日	2004-12-08
申请号	CN03129124.4	申请日	2003-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	宋克		
申请(专利权)人(译)	宋克		
当前申请(专利权)人(译)	宋克		
[标]发明人	宋克		
发明人	宋克		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一套多用的微阵列信号放大方法。其原理是通过将各种不同形式的高荷信号载体[HSC]应用于微阵列的信号放大标记和检测过程，从而大大地提高了微阵列的信号检测灵敏度和信噪比。在一些实施例中，各种HSC如高分子荧光微球、量子点[QD]、树形分子[Dendrimers]、多聚二茂铁、量子点微球[QD - tagged Beads]等被应用于诸如基因芯片、蛋白质芯片、微流体电泳芯片等生物芯片的检测中。利用SAAA技术标记之后的微阵列，在激光共聚焦扫描仪、CCD、荧光显微镜和等离子体共振激发技术等条件下，可以检测到在微阵列上发生的单个标记事件，因而是一种微阵列超灵敏检测技术。