

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12P 19/34

C07H 21/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816770.8

[43] 公开日 2005 年 5 月 25 日

[11] 公开号 CN 1620513A

[22] 申请日 2002.6.26 [21] 申请号 02816770.8

[30] 优先权

[32] 2001.6.26 [33] US [31] 09/888,413

[86] 国际申请 PCT/US2002/020039 2002.6.26

[87] 国际公布 WO2003/002750 英 2003.1.9

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.26

[71] 申请人 高产基因组股份有限公司

地址 美国亚利桑那州

[72] 发明人 R·M·克里斯 S·费尔德

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 4 页 说明书 75 页

[54] 发明名称 高通量试验系统

[57] 摘要

本发明涉及用于同时进行多重高通量生物学和化学试验的,采用重复性探针阵列的组分,装置和方法。本发明的组合包括一表面,此表面含有多个测定区,其中至少两个,在一优选例中至少 20 个测定区是基本相同的,各测定区包括一通用的锚阵列,阵列中的锚与双功能接头分子结合,每个接头包括对至少一种锚特异的部分,和对感兴趣的靶分子特异的探针部分,所产生的探针阵列可用于分析能与探针特异性反应的一种或多种靶分子的存在或活性。优选实施例中,使待测样品先经历核酸酶保护步骤,然后再与本发明的组合接触。

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

1. 一种检测至少一种靶核酸分子的方法，其特征在于，所述方法包括：

- 5 a) 使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触，然后使该样品暴露于核酸酶的作用下以有效消化残存的单链核酸，然后使所得样品接触包括多个小管的组合，这些小管在其内部含有以线性阵列排布的至少两种不同的锚位点，所述小管至少有两个基本上相同，

各位点的锚与双功能接头结合，此双功能接头包含对锚特异的第一部分，和含有对所述核酸酶保护片段之一特异的探针的第二部分，

- 10 在所述核酸酶保护片段能有效结合所述组合的条件下进行此试验，和

b) 检测所述结合的保护片段。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述小管是毛细管，所述锚结合于所述毛细管表面。

- 15 3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述小管是毛细管，所述锚结合于所述毛细管中的一种物质。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中，所述物质是琼脂糖或聚丙烯酰胺。

5. 一种检测至少一种靶核酸分子的方法，其特征在于，所述方法包括：

- 20 a) 使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触，然后使该样品暴露于核酸酶的作用下以有效消化残存的单链核酸，然后使所得样品接触一组合，[在加入所述样品前]该组合含有

i) 含多个空间上相分离区域的表面，其中至少二个区域基本相同，各区域含有

ii) 至少二个不同的锚位点，各位点上的锚各与

- 25 iii) 一双功能接头结合，此双功能接头包含对锚特异的第一部分，和含有对所述核酸酶保护片段之一特异的探针的第二部分，

在所述核酸酶保护片段能有效结合所述组合的条件下进行此试验，

其中位于区域第一位点的两个或多个锚与具有不同靶特异性的不同的双功能接头结合，和

b) 检测所述结合的保护片段。

- 30 6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述第一位点上的至少二个不同的双功能接头对核酸酶保护片段特异，所述核酸酶保护片段对感兴趣的相同第一核酸的不

同部分特异。

7. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括使结合的保护片段与特异性检测接头和/或检测探针杂交, 从而产生对应于各所述核酸的信号。

8. 一种检测样品中含有 SNP 的核酸的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

5 a) 在 SNP 特异性保护片段能与待检核酸有效杂交的条件下培育样品和所述保护片段,

b) 用一种或多种核酸酶处理所述样品, 所述核酸酶可有效地基本上消化所有多核苷酸但不消化已与感兴趣的核酸杂交的保护片段和所述核酸已杂交的部分, 并切除错配位点上的核酸双链体,

10 c) 基本上除去所有的多核苷酸而不除去所述杂交的保护片段的至少一部分和, 任选地已杂交的核酸, 从而提供含有 SNP 特异性保护片段或其部分作为靶分子的样品,

d) 使含有所述靶分子的样品与一组合接触, 在加入所述样品前此组合含有:

15 i) 含多个空间上相分离区域的表面, 其中至少二个区域基本相同, 各区域含有

ii) 至少二个不同的寡核苷酸锚, 各与

iii) 一双功能接头结合, 此双功能接头包含对该寡核苷酸锚特异的第一部分, 和含有对所述靶分子特异的探针的第二部分,

在所述靶分子能有效结合所述组合的条件下进行此试验。

20 9. 一种检测至少两种靶核酸分子的方法, 其中第一靶分子是一种感兴趣的 mRNA, 第二靶分子是预计以基本恒定的量存在于样品中的一种核酸, 其特征在于, 所述方法包括:

a) 使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触, 然后使该样品暴露于核酸酶的作用下以有效消化残存的单链核
25 酸, 然后使含有所述核酸酶保护片段的样品接触一组合, 此组合含有

i) 含多个空间上相分离区域的表面, 其中至少二个区域基本相同, 各区域含有

ii) 至少二个不同的锚位点, 各位点上的锚各与

30 iii) 一双功能接头结合, 此双功能接头具有对该锚特异的第一部分, 和含有对所述核酸酶保护片段之一特异的探针的第二部分,

在所述核酸酶保护片段能有效结合所述组合的条件下进行此试验,

其中所述 mRNA 的特异性第一核酸酶保护片段和样品中预计以基本上恒定量存在的所述核酸的第二核酸酶保护片段结合于所述组合同一区域中不同位点, 和

b) 检测所述结合的核酸酶保护片段。

10. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 一种或多种所述接头含有对不同靶分子特异的多个探针。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 一种或多种所述接头含有对不同靶分子特异的多个探针。

12. 一种检测至少一种靶核酸分子的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

a) 使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触, 然后使该样品暴露于核酸酶的作用下以有效消化残存的单链核酸, 然后使所得样品接触一组合, 此组合含有

i) 多个相分离的区域, 其中至少二个区域基本上相同, 各区域含有

ii) 至少二个不同的锚位点, 各位点上的锚各与

iii) 一双功能接头结合, 此双功能接头含有对该锚的特异的第一部分, 和含有对所述核酸酶保护片段之一特异的探针的第二部分,

在所述核酸酶保护片段能有效结合所述组合的条件下进行此试验,

其中所述区域是小管, 所述锚位点在 2 在所述管中以线性阵列排布, 和

b) 检测所述结合的保护片段。

13. 如权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述物质是线性通道的空间填充基质。

14. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述样品是通过在含 10-30%甲酰胺和 75-110pM 一种或多种核酸酶保护片段的水溶液中培育感兴趣的细胞制备的。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中, 所述水溶液还含有 0.5-2×SSC 和 1-2μg tRNA, 并在 90-115℃进行培育。

16. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 至少一个所述区域的至少一个位点含有多个不同的锚, 每个锚对不同的双功能接头特异。

17. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 该组合的各区域含有:

ii) 至少二个不同的寡核苷酸锚, 各与

iii) 一双功能接头结合, 此双功能接头具有对该寡核苷酸锚特异的第一部分, 和对第二双功能接头特异的第二部分, 和

iv) 一个第二双功能接头, 此接头具有对第一双功能接头特异的第一部分, 和含有对所述靶分子特异的探针的第二部分。

18. 一种检测至少一种靶核酸分子的方法，其特征在于，所述方法包括：

使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触，

5 使该样品暴露于核酸酶的作用下以有效消化残存的单链核酸，并使所得样品接触一组合，此组合在加入所述样品前含有：

i) 多个相分离的区域，其中至少二个区域基本上相同，各区域含有

ii) 至少二个不同的寡核苷酸锚位点，各锚与

iii) 一双功能接头结合，此双功能接头具有对该寡核苷酸锚特异的第一部分，和含有对所述核酸酶保护片段特异的探针的第二部分，

10 在所述核酸酶保护片段能有效结合所述组合的条件下进行此试验，

其中至少一个所述区域的至少一个位点是一“混合位点”，含有约 2-4 种不同的锚，每个锚对不同的双功能接头具有特异性，

其中位于所述混合位点的两个或多个所述不同的锚各与约 2-4 种具有不同靶特异性的不同的双功能接头结合，

15 使所述结合的保护片段与特异性检测接头杂交，这些接头中至少一个是“封闭”检测接头，并且其中至少一个所述检测接头对与所述约 2-4 种不同的双功能接头的第一个结合的第一保护片段有特异性，

用含有能产生化学发光信号的酶的特异性报道试剂检测所述检测接头，

调节反应混合物的 PH 中止所述信号，

20 使所述结合的保护片段与特异性检测接头杂交，这些接头中至少一个是“封闭”检测接头，并且其中至少一个所述检测接头对与所述约 2-4 种不同的双功能接头的第二个结合的第二保护片段有特异性，以及

用含有能产生化学发光信号的酶的特异性报道试剂检测所述检测接头。

高通量试验系统

5 本申请是 1999 年 6 月 21 日提交的美国专利申请编号 09/337325 的后续部分，而 09/337325 是 1998 年 12 月 22 日提交的美国专利申请编号 09/218166 的后续部分，而 09/218166 是 1998 年 7 月 2 日提交的美国专利申请编号 09/190076 的后续部分。本申请要求 1997 年 12 月 19 日提交的先前专利申请 60/068291 的优先权。

10 **发明领域**

 本发明涉及采用重复的探针阵列同时进行多个生物学或化学试验的组合、装置和方法。多个区域各含有一个锚基因分子的阵列，该锚与双功能接头分子连接，此接头分子各含有对至少一种锚有特异性的部分，和对要探测的感兴趣的靶分子的特异性部分。可利用所产生的该探针阵列分析能与探针特异性反应的一种或多种靶分子的存在。本发明涉及可凭借分子相互作用性质而区别的多种领域，包括但不限于：发现治疗药物、分子生物学、生物化学、药物学和医学诊断技术。

发明背景

 在各种生物学和化学试验中已采用了排列在表面或“芯片”上的多种分子探针。进行这些试验以测定感兴趣的靶分子是否与任何探针相互反应。使探针在所选的条件下与靶分子接触后，检测装置会确定靶分子是否已与所述探针反应。该系统可用于各种筛检程序以获得关于探针或靶分子的信息。例如，可用于筛选能与某感兴趣受体结合的肽或潜在的药物；可筛选其它样品中是否存在基因突变，人群中的等位基因变异，或其它许多疾病中的具体病原体或病原株；研究基因表达，例如鉴定其表达与具体生理状态、发展阶段或疾病状态相关的 mRNA。

发明描述

 本发明提供同时进行多个生物学或化学试验的组合、装置和方法，使得能对多个样品进行高通量分析，例如，在一诊断试验中筛检多个病人样品或在一药物发现方法中测试多种潜在药物或治疗药物。提供了一种可用于检测样品中一种或多种靶分子的组合。此组合包括一含有多个空间上分离区域的表面，这些区域可称为测试

区和可能是一些孔，其中至少二个区域基本上相同。每一表面包含至少二个，优选至少 20 个或更多，例如至少约 25、50、96、864 或 1536 个等等这种基本上相同的区域。各测试区具有一可导入含(或可能含)一个或多个靶分子的样品的空间，并包含一生物学或化学阵列。(“含某靶分子的样品”或“检测样品中的某靶分子”等术语不意味着排除不含靶分子的样品或不测定(检测尝试)它们。从总体上说，本发明涉及到检测样品中是否含有某靶分子的阵列，而不论它是否能测到或不能测到。)此阵列包括多个各与一双功能接头分子连接的“锚”基因，而该接头分子的第一部分对此锚有特异性，第二部分包含对至少一个靶分子有特异性的探针。将本发明的组合物与含一个或多个靶分子的样品接触，使靶分子任选地与检测分子反应，然后接受检测装置的询问，检测靶分子与测试区中探针之间的反应，从而产生试验结果。

本发明提供具体用于高通量生物试验的方法和组合。在具体优选实施例中可采用本发明进行高通量筛选来发现药物。例如，此高通量试验可一次在多块(如 100 块)96 孔板上进行。可用一含有大约 36 对锚和接头的阵列在一块板的每个孔中进行 36 种不同的测试。这样，100 块板，每块板 96 个孔，每孔 36 种测试，就可进行总共 345000 个测试；例如每次可测试 9600 种不同的候选药物的 36 种不同参数或试验。高通量试验为各候选药物提供了比一次只能测试一种参数的试验高得多的信息。例如，可以在一次高通量初步筛选试验中测定某候选药物是否有选择性、特异性和/或无毒性。非高通量方法需要广泛的后续试验来测试每个感兴趣药物的这些参数。实施例 15-17 中描述了几种类型的高通量筛选试验。同时进行各种各样的试验和一次做非常多的试验是本发明的二个重要优点。

在一实施例中，例如采用聚苯乙烯制的带有供伯氨(如氨基酸或修饰的寡核苷酸)附着的衍生表面的 96 孔 DNA 结合板(Corning Costar)，可将 36 种不同寡核苷酸集合物点在每块板的每孔表面作为锚。可将这些锚共价结合于衍生的聚苯乙烯，同样的 36 种锚可用于所有的筛选试验。对于一具体试验，可用一组所述接头程序化各孔表面使其对多达 36 种不同感兴趣的靶分子或试验类型具有特异性，可将不同的测试样品加到每块板 96 孔的每孔中。同一组锚可多次用于重新程序化各孔表面，用于其它感兴趣的靶分子和试验，或同一组接头可重新多次应用。这种可行性和可重用性提供了本发明的另一优点。本发明一实施例是一种用于检测样品中一个或多个靶分子的组合，在加所述样品之前，此组合包含：

a) 一含有多个空间上分离区域的表面，这些区域至少有二个基本上相同，每区包含：

b) 至少 8 种不同的寡核苷酸锚，每个与

c) 一双功能接头相连接，此接头的第一部分对该寡核苷酸锚有特异性，其第二部分含有对所述靶分子特异的探针。

5 本发明另一实施例是一种用于检测样品中一个或多个靶分子的组合，在加所述样品之前，此组合包含：

a) 一含有多个空间上分离区域的表面，这些区域至少有二个基本上相同，每区包含：

b) 至少 8 种不同的锚，每个与

10 c) 一双功能接头相连接，此接头的第一部分对该锚有特异性，其第二部分含有对所述靶分子特异的探针。

本发明的另一实施例是检测至少一种靶分子的方法，此方法包括使可能含有所述靶分子的样品与对所述靶分子特异并结合所述靶分子的核酸酶保护片段接触。另一实施例是测定 RNA 表达模式的方法，此方法包括在有利于 RNA 靶分子与探针特异性杂交的条件下，培育含至少两种 RNA 靶分子的样品与上述组合，其中该组合的至少一个探针是核酸(如寡核苷酸)，其对于至少一个 RNA 靶分子有特异性(如选择性)。另一实施例是一种鉴定能调节 RNA 表达模式的药物或状况的方法，是确定 RNA 表达模式的上述方法，此方法还包括将存在所述药物(或状况)时产生的 RNA 表达模式与在不同条件下产生的 RNA 表达模式相比较。

通过实施例，图 1 和 2 说明本发明的组合和用它检测 RNA 靶分子的方法。图 2 显示的本发明表面含有 15 个相同的测试区；在本发明的一具体实施例中每一个这些测试区是微滴板中的一个孔。每一测试区含有 6 种不同的锚，表示为号码 1-6。图 1 说明了一种这种锚，锚 1，在本发明最优选实施例中，它是一种寡核苷酸。附着锚 1 的是一接头分子，接头 1，它包括两个部分：第一部分对该锚特异，在此说明中是一种能与该锚特异性杂交的寡核苷酸。第二部分是一种对感兴趣的靶分子(此地是靶 mRNA1)有特异性的探针，在此说明中是一种能与该靶分子杂交的寡核苷酸。虽然此图没有说明，其余五个锚每一个能通过其锚特异性部分与其自身接头杂交；每个接头可含有一探针部分，其对例如某 RNA 特异而不是(或相同于)mRNA1。所述组合物可同时用于测试多达 15 个不同样品中是否存在 mRNA1(或同时由阵列中其它五种探针所特异测定的 mRNA 靶分子)。为进行此试验，将每份样品(此样品可能是 RNA 抽提物)，即 15 种独立细胞系之一，小量加到一个区域或孔中，在有利于探针和靶分子杂交的条件下培育。为了确定 mRNA 是否存在于样品中，采用能识别

模式和/或查询各区域中特定部位是否存在信号的检测装置。如果此细胞系在其 mRNA 用一标记体内标记条件下培育, 以及如果样品中存在 mRNA, 检测仪将测出位于锚/探针复合物 1 所在部位标记 mRNA 发出的信号。或者, mRNA 可在加入区域(孔)之前或之后体外直接标记。或者, 如图 1 所述, mRNA 可在与探针杂交前或后, 通过 5 与标记的“检测”寡核苷酸(靶特异性报告寡核苷酸, 它与一序列而不是此探针所识别的序列互补)一起培育直接标记。在所述实例中, 可同时分析 15 个样品。因为用本发明可同时分析至少 20 个或更多个, 例如多至 1536 个或更多的样品, 这是一种非常高通量的试验系统。

如本文所用, “靶分子”是一种需要测定其存在、活性和/或数量并对所述探针 10 有亲和力的物质。靶分子可以是人造的或天然产生的物质。它们也可以其未变化状态或作为与其它物质凝聚物形式使用。靶分子可直接或通过一特异性结合底物共价或非共价结合于其结合伴侣。可用于本发明的靶分子例子包括但不限于: 受体(在运载体、脂质、细胞膜上的受体或各种其它受体); 配体; 能结合特异受体的激动剂或拮抗剂; 能与特异性抗原决定簇(如病毒、细胞或其它物质)反应的多克隆抗体、 15 单克隆抗体和抗血清; 药物; 核酸或多核苷酸(包括 mRNA、tRNA、rRNA、寡核苷酸、DNA、病毒 RNA 或 DNA、ESTs、cDNA、从 RNA 或 DNA 衍生的 PCR 扩增产物及它们的突变体、变种或修饰物); 蛋白质(包括酶, 如负责切割神经递质的酶、蛋白酶、激酶等); 酶的底物; 肽; 辅因子; 凝集素; 糖; 多糖; 细胞(可包括细胞表面抗原); 细胞膜; 细胞器等等, 以及可能以复合物、共价交联结合形式存在的其它分子或其它物质。如本文所用, 术语核酸、多核苷酸和多聚核酸可互换使用。靶分子也可称为反探针。

如本文所用, “探针”是一种物质, 即一种可被一特定靶分子特异性识别的分子。可能的探针/靶或靶/探针结合模式包括: DNA/DNA, DNA/RNA, PNA(肽核酸)/核酸; 酶, 其它催化剂, 或其它物质与底物、小分子或效应分子; 等等。本发明所 25 考虑到的探针例子包括但不限于: 有机或无机物或聚合物, 包括金属、塑料、细胞膜受体的激动剂或拮抗剂, 毒素和蛇毒, 病毒表位, 激素(如类鸦片活性肽、类固醇等), 激素受体, 脂质(包括磷脂), 肽, 酶(如蛋白酶、激酶), 酶底物, 辅酶, 药物, 凝集素, 糖, 核酸(包括寡核苷酸、DNA、RNA、PNA 或修饰的或替代的核酸), 寡糖, 蛋白质, 酶, 多克隆和单克隆抗体, 单链抗体或其片段。探针寡核苷酸可以 30 是线性或环形探针, 可凭借不同活性或不同结合性鉴别磷酸化与非磷酸化蛋白质。探针例如凝集素可鉴别糖基化蛋白质。如本文所用, 术语核酸、多核苷酸、多聚核

酸和寡核苷酸可互换使用。上述任何物质如探针也可作为“靶子”，反之亦然。

任何相容性表面都可用于本发明。该表面(常为固体)可以是各种有机或无机物质或它们的组合，只是举例，包括塑料如聚丙烯或聚苯乙烯；陶瓷；硅；(融合的)二氧化硅。石英或玻璃(它们的厚度显微镜载玻片或盖玻片)；纸，如滤纸；重氮化纤维素；硝酸纤维素滤膜；尼龙膜；或聚丙烯酰胺或其它类型凝胶垫，如气凝胶制成的气垫或气珠为多孔固体，包括用各种常规方法干燥湿凝胶制成的膜。当实施试验的方法涉及到光学检测时，可采用对光线透明的物质。此表面可以是与常规检测方法相容的任何厚度或不透光。例如，此表面可以是厚底、洁净板或不透明板。一优选实施例中，此表面是多孔塑料表面，即组织培养皿，例如 24-，96-，256-，384-，或 1536-孔板(一种修饰的板，如 Corning Costar DNA Bind Plate)。锚可以直接与表面结合，或与一种表面如玻璃结合，再与微滴板塑料“孔”中的第二表面结合。此表面的形状不是关键的。它可以是例如平表面，如正方形、长方形、或园形，曲线形表面/或三维表面如珠、颗粒、线串、沉淀、管状、球形；等等。

此表面含有许多空间上分离的和可寻址或可监定的区域。每个区域含有一组锚。这些区域如何相分离，它们的物理特征和它们彼此的相对朝向不重要。一实施例中，诸区域可通过一抵制液体流通的物理屏障隔开。例如，一优选实施例中，诸区域可以是多孔平皿(组织培养皿)，如 24-，96-，256-，284-，864-，或 1536-孔板中的孔。或者，一表面如玻璃表面可被蚀刻成具有例如 864 或 1536 个分开的窄孔。或者，一表面可以含有不分开区域或孔，例如一平面型塑料、玻璃或纸片，各区域可通过覆盖一刻划有分开区域的结构(如一塑料或玻璃片)而确定。任选的，在各区域被刻划出以前，一表面可能已经包含一个或多个锚，或结合了接头的锚的阵列。在另一实施例中，各区域中的锚阵列可通过表面上的空白区(无锚)彼此分开，或通过化学边界如蜡或硅胶彼此分开以防止液滴扩散。

另一实施例中，这些区域可以是小管或流体控制通道，如 Beattie 等，(1995) Clin. Chem. 4; 700-706，所述设计用于流通试验的小管。小管可以是任何大小，如毛细管或宽孔小管；可让液体流通；或可部分或完全装满凝胶如琼脂糖或聚丙烯酰胺，通过这些小管可输送化合物(用泵通过小管流体)，如电泳；或如 Albota 等 (1998) ， Science. 281 ; 1653-1656 ; Cumpston 等 (1998) ， Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 488; 217-225; 和/或 Cumpston 等(1999)，Nature. 398; 51-54，所述，采用空间装满基质的通道。在这种充满基质的小管中，流体和/或分子不仅可沿管壁垂直方向流动而且可侧向扩散。在一优选例中，小管中充满凝胶或

空间填充基质，激活凝胶或空间填充基质以结合锚，使不同的锚依次通过小管，让锚在凝胶中形成阵列(线性阵列)；使接头、靶分子等继续通过。此阵列可以是线性、二维或三维阵列。

可在一根小管中进行多个试验。例如在顺序试验中采用相同或不同样品，可重复使用一根小管中的一种锚阵列或锚与接头结合的阵列(剥下和重利用或重新程序化)另一实施例中一个试验采用多根小管，在含有不同阵列的多根小管中分析感兴趣的样品。锚和锚/接头组合可以是本文所述的任何类型。

表面中或上面的区域也可通过修饰表面本身来确定。例如一塑料表面可包含通过修饰或衍生的塑料制作的部分，它们可作为加入特殊类型聚合物的位点(如 PEG 可附着于聚苯乙烯表面，然后用羧基、氨基、双键、醛基等衍生)。或者，一个塑料表面可包含模式结构，如突出端或隆起，它们可作为加入锚的平台。另一实施例中，这些区域可以是凝胶垫，如聚丙烯酰胺凝胶垫或气垫，以所需模式在一表面如玻璃上形成阵列，或夹在两个表面如玻璃和石英板之间。可将锚、接头等固定在垫的表面，或可埋在垫中。凝胶垫表面上的其它各种安排是本领域技术人员熟习的，可按常规方法制作。测试区的相对朝向可采纳各种形式，包括但不限于平行阵列、正方或长方形或其它方形表面阵列、中间圆形或其它表面的放射形阵列、线性阵列等等。

本发明的空间上相分离的区域可以有多个拷贝，即至少二个，优选至少 20 个，至少约 24、50、96、356、384、864、1536、2025 个或更多个基本上相同的空间上相分离(分开)的区域。增加重复区域的数目可使试验具有更高的通量。如本文所用，基本上相同的区域指含有相同的或基本上相同的锚、和/或锚/接头复合物的区域。如本文所用，基本上相同指根据本发明，阵列或区域所起的作用与文中用于分析靶分子的阵列或区域基本上相同。基本上不影响功能，即检测靶分子能力的差异是沿线小核苷酸缺陷(删除/插入/替换)或寡核苷酸缺陷(表面结合差)等的差异，其在试验精确度范围内不会明显影响靶分子测定结果。

当然，本领域技术人员会明白此表面上不是所有区域都需要基本上彼此相同。例如，如果平行测试二组不同的阵列，将二组阵列包含在一个表面上可能是有益的。例如，可将二组不同的阵列以交替条纹模式安排以促进二者之间的比较。另一实施例中，实施者可能希望包括与该表面上其它区域相鉴别方式检测出的区域，从而可作为“注册区”。例如，注册区可含有显示不同荧光分子模式、能被扫描检测仪识别为“起始点”的寡核苷酸或肽，以排列对比表面上的区域。

不限制测试区域的大小和物理间隔。典型的区域面积约 $1-700\text{mm}^2$ ，优选 $1-40\text{mm}^2$ ，间隔约 $0.5-5\text{mm}$ ，常规选择取决于涉及的面积。一优选实施例中，区域间隔约 5mm 。例如，各区域可包括一长方形格栅，例如有 8 排 6 行大约圆形的锚附着点，这些点直径约 100 微米，间隔 500 微米；这样一个区域覆盖约 20 平方厘米面积。还包括较大和较小的区域面积和间隔。

这些区域也可进一步分成小的区域，这样，一区域内的某些或所有的锚可通过小坑或浅凹与相邻锚物理上分开。例如一个区域的亚区数范围从约 10 个到约 100 个或更多。一实施例中一区域是 1536 孔平皿中的一孔，可将其进一步分成更小的孔，例如约 4 至约 900 小孔，优选实施例中约 16-36 小孔，从而形成孔中孔阵列。见图 4。这种浅凹表面降低了物理放置一个(或一组)锚到各设计位置(基因座)的抵抗力，使含锚的区域大小更均匀，从而有利于与探针结合的靶分子的检测。

如本文所用，术语“锚”指任何实体或物质，如分子，其能与此表面(如固定于，或共价或非共价结合于)结合，或是此表面的一部分(如塑料表面的衍生部分)，其可与一接头或本文所述其它物质发生特异性反应或结合。具有接头分子的锚的此部分可直接与此表面结合，或锚可含有一中间“臂”部分。此臂可以是任何物质，如各种本领域常规使用的物质之一。在一实施例中，此臂是一种线形碳分子，具有约 5-20 个，优选约 12 个碳原子。另一实施例中，此臂是不与接头分子发生特异性反应或结合的核酸(本文所述任何类型的核酸)。

如本文所用，术语“锚”还指一组基本上相同的锚。见图 7，提供了一含有 3 个锚(A, B 和 C)的测试区，各锚以多个拷贝(一组)存在。各组锚的位置称为“位点”。如本领域所熟知，一位点中锚的数量只受到物理性如锚大小的限制。例如约 25-200 微米直径的一位点可含有数百万锚。

如本文所用，当一锚和一接头通过特定方式的分子连系结合时，产生了“锚/接头复合物”。与接头的相互反应可以是不可逆的，例如通过某种共价键；或可逆的，例如通过核酸杂交。

在一优选实施例中，此锚是一核酸，可以是任何长度(如寡核苷酸)或类型(如 DNA、RNA、PNA、或 RNA 或 DNA 分子的 PCR 产物)。核酸可被修饰或置换(如包含非天然产生的核苷酸，如肌苷，通过各种已知键连接，如氨基磺酸盐、硫酰胺、磷酸硫代硫酸酯、磷酸酯、氨基甲酸酯等；或半合成分子如 DNA-链霉亲合素交联物等)。优选单链核酸。

锚核酸可以是任何长短只要与本发明相容。例如锚可以是长约 8-15 个核苷酸

的寡核苷酸，优选约 10、15、20、25 或 30 个核苷酸。另一实施例中，锚可以长约 50-300 个核苷酸，或更长或更短，优选约 200-250 个核苷酸。例如一锚可含有约 150-200 个核苷酸的上述“臂”核酸，毗连此臂有一较短的约 10、15、20、25 或 30 个核苷酸的序列，设计其与一接头分子(“接头特异性序列”)相互反应。此臂
5 可以是任何长度或类型的核酸，可具有在本发明中有功能的碱基组成。一优选实施例中，某区域一位点各锚或不同位点锚的此种臂基本上相同；因此锚彼此不同主要在于它们的接头特异性序列。

臂可给于锚好处，改进其性能。例如使锚的接头特异性部分距离此表面更远，因而与它们靠近此表面相比，物理限制少，空间位障小。例如这有利于具有靶特异
10 性的多个不同接头(如约 2-10 个)与所述位点的锚结合。如以下更详细讨论的那样，一个锚可含有(除臂外)多个串联线性形式排列的接头特异性序列；这使得多个不同类型的锚得以结合。所述位点的该锚：在一“混合位点”上，二个或多个锚各与一具有不同靶特异性的不同接头结合。因为含有臂的锚物理上可屈曲，所述位点的锚可容易地与多个不同接头分子结合而不受毗邻锚的物理约束。使多个接头分子与所
15 述位点的锚结合的优点是，得以在一具体位点上检出更多数目的靶分子。一实施例中，结合于所述位点的多个接头具有针对同一感兴趣靶核酸不同部分(如此核酸内不同的寡核苷酸序列)的特异性探针。与用一个探针相比，这得以扩大靶分子的检测。另一实施例中，多个接头具有针对不同的无关靶分子的特异性探针，这得以检测一具体位点内多个不同的靶分子。含有臂的锚的另一优点是，它们可更容易地容
20 纳与大分子如蛋白质结合，和/或与大的靶分子如蛋白质、膜或细胞结合的接头。

锚的碱基组成无须受限。锚的任何碱基组分都可接受，只要此锚在本发明中有功能。例如，某区域一位点或不同位点上的单链锚核酸可含有部分或完全随机的序列(如随机产生的序列，如对 A，G，T 和 C 的相对量无限制)，即寡核苷酸具有相同量的 G，C，A 和 T，但以不同相对顺序排列。即该锚，例如在某区域的不同位点与
25 公式 $G_n C_n A_m T_m$ 不一致，其中 n 和 m 是整数。见实施例 1 所示锚，它不是随机序列的同分异构体。本发明的锚中 G 和 C 的量无须大约相同，A 和 T 的相对量也如此。另外 G，C，A 和 T 的净相对量无须受限制。例如，某区域中锚的碱基组成可以从 GC 较多(G+C 大于 50%)到 G，C，A 和 T 量相等到 AT 较多(A+T 大于 50%)。一实施例中锚以 G，C，A 和 T 相对量不受限方式随机产生。

30 含核酸臂和一个或多个接头特异性部分的锚不可能遵守碱基组成上的特定限制。例如，若位于某位点的锚具有基本上相同的臂，如基本上相同的 25-聚或 200-

聚臂,但各锚具有不同的接头特异性部分(如 25-聚),即使其接头特异性部分符合特定要求(如 As 和 Gs 数目大约相同;Ts 和 Cs 数目大约相同;寡核苷酸遵循公式 $G_nC_nA_mT_m$;和/或 G+C 成分符合特定要求),这些锚作为整体将不符合那些具体要求。类似地,即使某区域不同位点锚的接头特异性部分彼此基本上不同(如各接头特异性部分序列与该区域中各其它接头特异性部分至少约 20%或 50%,或 80%不同),从该核酸全长考虑,该锚的净序列相同性可能差别不大。例如各锚含有基本相同的 250-聚臂,和 25-聚接头特异性部分(其与该区域中各其它接头特异性部分 100%不同),这些锚彼此仅 10%不同。

锚也可以是肽或蛋白质。例如,它可以是能特异性结合一接头(一种抗原或抗体)部分的多克隆或单克隆抗体分子或其片段,或单链抗体或其片段;正面讲,锚可以是肽,与其结合的接头部分可以是抗体等。另一实施例中,锚可以是对特定糖类特异的凝集素(如伴刀豆球蛋白 A 或生物体如鲎、花生、绿豆、菜豆、麦芽等的凝集素)。另一实施例中,锚可以含有机分子,如修饰的或衍生的可塑性聚合物,其可在寡核苷酸化学合成的特定固相阶段起作用。此时,衍生的塑料中可分布不同的衍生阵列,在制造过程中整合入组合塑料表面而形成位点。另一实施例中,锚可利用其特异或优先结合于金属离子如 Ni、Zn、Ca、Mg 等和特殊蛋白质或螯合剂之间。例如,锚可以是聚组氨酸,而接头的锚特异性部分可以是镍,其可通过镍螯合剂与靶特异性探针结合。或者,螯合剂可以是锚,聚组氨酸是探针相关部分。或者,锚可含无机物质。例如,它可含金属如钙或镁,接头的锚特异性部分可以是优选的螯合剂,分别是如能与靶特异性探针结合的 EDTA 或 EGTA。本领域技术人员知道广大范围的其它类型分子也可作为锚,如能与探针和靶结合的那些一般类型。

锚也可是一种杂交体结构,如 DNA 双链体,或含有 DNA 和蛋白质(其以本文所述任何方式特异性相互反应)的双链体。例如,双链体锚的“碱基部分”(直接与表面接触的部分)可含有任选的修饰单链核酸,优选此碱基部分也含有一臂,如上述线性碳原子臂。一实施例中,第二单链核酸与此碱基部分结合(杂交),形成含有至少部分双链体核酸的锚。例如,该碱基部分可含有一端能结合表面的线性碳原子臂,另一端能结合约 10-100 个核苷酸,优选约 25 个核苷酸的单链 DNA 寡核苷酸;该双链体的第二部分可含有与该碱基部分(如与末端约 40 个核苷酸)至少一部分互补的序列,后有一任选臂(如约 5-15,优选约 10 个核苷酸),再后有一接头特异性序列(如长约 8-50 个核苷酸,优选约 15、20、25、或 30 个核苷酸,最优选约 25 个核苷酸)。

锚双链体互补部分和其接头特异性序列的碱基组成可以不同,以适合于采用本

领域常规最适方法的试验的需要。例如,可选择序列,使得接头在双链体锚本身保持完整的条件下,可从双链体锚中解离下来。此双链体锚的剩余阵列可再使用,若需要,与相同或不同接头分子杂交。或者,可选择序列,使锚/接头杂交体和双链体锚的二互补部分在相同条件下均解离,只留下与表面接触的碱基部分。一实施例中,某区域一特定位点或所有位点中的所有或基本上所有的碱基部分相同,或基本上相同。只有当双链体锚的互补部分先加回(一种需要知道参与双链体形成的碱基时的方法)时,解离后碱基部分剩余阵列可再使用(如与接头分子杂交)。不熟悉碱基部分序列的用户可能或不可能再利用锚操作阵列的能力,提供了利用这种杂交锚的优点。防止这种再利用也可预防因过度使用发生降解或偶然不稳定问题。

一实施例中,某区域一给定位点的一组锚基本相同(即只针对一种接头的“锚特异性部分,或一靶分子的特异性”)。见图7。另一实施例中,一给定位点可存在对多个不同接头和/或对多个不同靶分子有特异性的多个不同的锚,此位点称为“混合位点”,如含约2-100个不同的锚,例如至少约2个、至少约4个,或至少约10个。混合位点的好处是它们能在一具体位点上检测更多数目的不同靶分子。一实施例中,各个混合位点含有一个与每个或至少几个位点相同的锚。例如一个以上位点中相同的锚可用于质量保证和/或控制信号的标准化。

当然,“混合位点”对只有一个信号(无重复)区的表面也有益处。这种单区域各位点中的锚可与接头,或直接与感兴趣的靶分子相互反应。一测试区中的锚数量(即一位点有数组锚)可至少为2种,优选约8-900种(或多或少),更优选约8-300种,最优选约30-100(如约64种)。某些优选实施例中,一具有96个测试区(如小孔)的表面有约16、36、45、或100个锚/测试区,或一具有384个测试区(如小孔)的表面含有约9、16、或25个锚/测试区。在一最优选实施例中,一测试区中的各锚具有与阵列中各其它锚不同的特异性。然而,两个或多个锚可具有相同的特异性,所有的锚可以相同。一实施例中,本发明的组合含有大量的测试区(如约864、1536、或更多),可一次处理大量的测试样品。可能感兴趣的是只测试这些样品的有限数目参数(如约2、4、6或9种)。换言之,因为此组合含有非常大数量的区域,每区域可只含约2-9种锚也许是有益的。

不限制测试区域中或上的锚(即一位点中的数组锚)的物理间隔和相对朝向。通常锚之间的距离约0.003-5mm或更少,优选约0.03-1mm。包括较大和较小的锚间隔(或面积)。锚可以彼此和对区域的边界以任何朝向排列,例如,可以二维朝向,如正方形、长方形、六角形或其它阵列,或园形阵列(锚从中心以放射线或同心园

发射)排列。锚也可以一维线性阵列排列。例如,寡核苷酸可与沿 DNA 或 RNA 序列的具体部位杂交形成一超分子阵列,或在流通凝胶中线性排列,或在流通装置表面或流通装置内的结构表面排列。或者,锚可以“条码”样形式排列(见图 6)。例如,锚可沿着彼此平行的线排列,各长线的间隔或宽度可有规律的不同以产生一种很象条码的可识别模式,如第一和第三条线可是其它的二倍粗,也可删去一些线,等等。也可在最后的区分一测定区域的线后安置一额外的空白线,在后续测定区中可重复此条码模式。

锚模式不需要严格注册分离的测试孔(测定区)或分离测试滴的位置。术语“测定位置”用于指测定样品加入测试表面的位置。(例如,这些位置可由测试样品的分离液滴位置或多孔板上孔的位置或确定各测试孔的分隔来确定。)锚模式本身(如“条码”-样寡核苷酸锚模式)可通过模式识别精确定位各分离的锚,即通过其与其它线的相对位置识别条码的每条线。因此第一锚不必位于各测试位置的一边或一角。靠模式识别而非相对于该位置的位置找到该第一锚。只要各试验位置(例如液滴的面积或孔的面积)所用面积足够大,明确含有至少一整个锚重复模式单元,当此模式位于测定位置区域时,各测试点将测定对此(条码)模式特异的所有靶分子测定位置的样品。

每测定区域内锚不需要按严格的甚至固定的模式排列。例如,各锚可与一测定区域中随机位置的颗粒、珠等结合。各锚的位置可采用,例如一可检测标记来确定。例如,可用不同的荧光、发光标记物标记各种锚的特异性接头分子,含有特定的接头/锚对的颗粒的位置,可通过该接头发出信号的性质,例如激发或发射光谱来鉴定。本领域技术人员能制备携带有各种结合标记,各具有一可鉴别光谱的一系列接头。或者,可直接标记锚。例如,各种锚可用具有与其它类型锚不同的荧光标记来标记。或者,颗粒、珠等在大小或形状上可彼此不同。可采用本文所述的标记和方法。例如,可通过 CCD 摄影系统用扫描荧光显微镜或荧光激活细胞分选仪测定荧光。

锚可与接头分子的一部分—锚特异性部分反应或特异性结合。术语“相互反应”或“结合”,指两种物质或化合物(如锚和接头的锚特异性部分,探针和其靶分子,或靶分子和靶特异性报道剂)彼此充分结合(如附着、结合、杂交、连接、退火、共价连接或其它结合),从而可进行所述试验。术语“特异性”或“特异地”指两种成分(如锚和接头的锚特异性部分,探针和其靶分子,或靶分子和靶特异性报道剂)彼此选择性结合,在缺乏保护技术时,一般不结合能结合目标成分的不想要成分。实现特异性相互反应所需参数可用本领域常规方法确定。

对于核酸,例如本领域技术人员可凭经验确定在选择的严谨条件下,使核酸(如寡核苷酸锚)能与另一核酸(如接头的锚特异性部分)杂交,同时最大程度降低与其它物质或分子(如其它接头寡核苷酸)非特异性杂交。通常, DNA 或锚的其它核酸序列、接头部分或检测寡核苷酸将与其结合伙伴充分互补,使其能在所选的严谨杂交条件下杂交, T_m 将高于室温约 10-20°C (如约 37°C)。通常, 寡核苷酸锚可长约 8-50 个核苷酸, 优选约 15、20、25 或 30 个核苷酸。如本文所用, “高严谨杂交条件”指核酸之间核苷酸互补(相同性)杂交达到至少 95%, 优选约 97-100%的条件。然而, 根据所需目的, 可选择互补性要求较低, 如约 90%、85%、75%、50%等的杂交条件。杂交反应参数中可以不同的有: 盐浓度、缓冲液、PH、温度、培养时间、变性剂如甲酰胺的量和类型等。(见 Sambrook 等(1989), 分子克隆实验手册(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)第二版, 1-3 卷; Cold Spring Harbor 出版社, 纽约; Hames 等(1985), IL 出版社; Davis 等(1986), 分子生物学的基础方法(*Basic Methods in Molecular Biology*), Elsevir 科学出版公司, 纽约)。例如, 可将核酸(如接头寡核苷酸)加入一测定区(如多孔板的一孔, 一优选实例中用 96 或 384 孔板或更多孔板), 其体积为约 0.1-100 微升或更多(一实施例中约 1-50 微升, 最优选约 40 微升), 浓度约 0.01 - 约 5 微摩(一优选实施例中约 0.1 微摩), 缓冲液为例如, 6XSSPE-T(0.9M NaCl, 60mM NaH_2PO_4 , 6mM EDTA, 0.05% Triton X-100), 与结合伙伴(如表面上的寡核苷酸锚)杂交约 10 分钟至至少 3 小时(一优选实施例中至少 15 分钟), 温度约 4-37°C (一优选实施例中在大约室温中)。可选择能进行高通量的条件。在本发明的一实施例中, 此反应条件可接近生理条件。

可设计其它类型的物质或分子(如多肽、凝集素等)作为锚或接头部分, 确定实现与其结合伙伴特异性相互反应所需的反应条件是本领域的常规工作(如 Niemeyer 等(1994), Nucl. Acids Res. 22; 5530-5539 ; Fodor 等(1996), 美国专利号 5,510, 270 ; Pirrung 等(1992), 美国专利号 5,143, 854)。培养参数有: 缓冲液、盐浓度、PH、温度、培养时间、是否存在载体和/或试剂、降低非特异性相互反应的条件等。例如, 在一测定区(如多孔板的一孔中, 一优选实施例中, 采用 96 或 384 孔或更多孔板)中可含有抗体作为锚, 可在其中加入抗抗体(即抗原或抗体特异性第二抗体), 其体积为约 0.1-100 微升或更多(一优选实施例中约 1-50 微升, 最优选约 40 微升), 浓度约 10 皮摩至-约 10 纳摩(一优选实施例中约 10 纳摩), 缓冲液为例如, 6XSSPE-T、PBS、或生理盐水, 与表面上的锚培育约 10 分钟至至少 3 小时(一优选实施例中至少 15 分钟), 温度约 4-45°C (一优选实施例中约 4

°C)。对于肽锚优选长约 5-20 个氨基酸。

本发明某些实施例中，在选择反应条件下，阵列中的各锚以与阵列中其它锚基本上相同的程度，与接头的锚特异性部分反应。这可保证这些锚特异于基本上均一的接头和探针阵列。

5 测定区中的锚(各位点的锚组)可以是“通用的”，组中的各锚可与各接头反应，各接头具有针对此类锚的特异性部分，但有不同的“探针”部分；这样，一个通用锚的阵列可用于程序化或确定不同组探针。锚通用阵列的灵活性可参见图 1 和 2 的说明。图 2 描述一含 15 个测定区的表面，各区含有 6 种不同的锚(此例中为寡核苷酸)组成的阵列。图 1 说明这些锚(寡核苷酸)之一，锚 1，与接头 1 接触，接头 1
10 含有针对锚 1 的特异性部分，和针对靶 mRNA1 的特异性第二部分。或者，象接头 1，接头 2 含有针对锚 1 的特异性部分和针对靶 mRNA2 而非靶 mRNA1 的特异性第二部分。这样，锚 1 可用于对二个或多个不同靶 mRNA 之一的特异性探测。产生和附着高分辨率寡核苷酸或肽的模型(阵列)，可能是花费多、费时和/或费力的。能用预先形成的锚阵列来程序化各种各样的探针阵列是本发明的一个优点。

15 虽然图 2 所述通用锚确定了寡核苷酸探针的模式，但此相同的锚阵列也可用于程序化其它探针阵列，如受体蛋白质(见图 3)。对于锚/接头的类型，已知可能有许多排列，如甚至更复杂的“夹心”或“积木”式探针层。例如，一实施例中，一组通用锚可与一组接头结合(共价或非共价)形成一修饰的“交联”锚阵列，详述见以下。如此，含锚的表面本身就赋予了新的优点。

20 本发明的一实施例中，锚可反过来与接头反应，这样一组通用的锚重新用于程序化不同组探针。例如，一寡核苷酸锚可通过加热使两种寡核苷酸解离，而与一接头的寡核苷酸部分分离，然后可再与第二个接头分子结合。重新利用制备花费高、费时费力的锚阵列的能力，是本发明的另一优点。

25 锚不一定需要与接头相互反应。例如，可将锚偶联于(直接或间接)一检测分子，如荧光色素，因而可为测试表面和检测之间的登记起着在坐标方格内定位一个点的作用。或者，可用已知量的检测分子标记锚，可作为校准目的的内部定量标准。

30 术语“接头”如本文所用指一种双功能物质，其含有对所选锚或锚亚组有特异性(“锚-特异性”)的第一部分，和含有感兴趣的靶分子的特异性探针(“靶特异性”)的第二部分。接头的此二部分可通过共价或非共价键连接，或直接或通过一中间物(如臂)相连。

当然，接头的锚特异性部分的化学性质功能是与锚相互反应。例如，如果锚是

寡核苷酸，与其反应的接头部分可以是，例如一种能与该寡核苷酸特异结合的肽，或能在所选的严谨杂交条件下与其有效和特异性杂交的核酸。此核酸可以是寡核苷酸、DNA、RNA、PNA、PCR 产物，或取代的或修饰的核酸(如含有非天然产生的核苷酸如肌苷；通过各种已知的键连接，如氨基磺酸盐、硫酰胺、磷酸硫代硫酸酯、磷酸甲酯、氨基甲酸酯等；或半合成分子如 DNA-链霉亲和素交联物等)。优选单链核

5 酸。接头的寡核苷酸锚特异性部分长约 8-50 个，优选约 15、20、25 或 30 个核苷酸。如果锚是抗体，与其反应的接头部分可以是抗抗体或抗原，或这些分子的能与锚特异性反应的较小片段。本领域熟知能与上述其它类型锚特异性反应可作为接头的锚特异性部分的物质或分子，并可用常规方法设计(见上)。

- 10 当然，接头的靶特异性部分的化学性质功能是与要探测的靶分子相互反应。例如，如果靶是一具体 mRNA，接头的靶特异性部分可以是，例如一种能在所选杂交条件下与该靶而非干扰性 DNA 或 RNA 特异性结合的寡核苷酸。本领域技术人员可采用已知方法，靠经验确定将优先与该靶分子杂交，而非特异性干扰性 DNA 或 RNA(见上)最少杂交的寡核苷酸的特征。通常，用于鉴别靶 mRNA 与背景中大量过剩
- 15 的非靶 RNA 的寡核苷酸长度是约 8-50 个，优选 18、20、22 或 25 个核苷酸。用于无高背景竞争性靶分子生化试验的寡核苷酸探针可较短。用已知方法(如计算机程序 BLAST)，可选择此寡核苷酸的序列，使它们相互无关并与已知的基因数据库中的潜在干扰序列不相似。可按常规用已知的方法(见上)确定使寡核苷酸探针与 RNA 特异性杂交的杂交条件的选择。例如，可将从组织或容器中，如多孔微滴板(如 96
- 20 或 384 孔或更多孔)的孔中培养细胞提取的靶 RNA(即总 RNA 或 mRNA)加入含有寡核苷酸探针阵列(见上)的测定区中，缓冲液用例如 6XSSPE-T 或其它，任选地含有能降低非特异性结合的试剂(如约 0.5mg/ml 降解的鲑或鲑精 DNA，或酵母菌 RNA)，并在经验确定的温度下培养 19 分钟到至少 18 小时(一优选实施例中约 3 小时)，杂交的严谨性可能与此锚和接头的锚特异性部分结合所用严谨性相同或较低。其它类型
- 25 探针的设计和應用也如上述是本领域的常规。

- 一实施例中，某给定位点中所有或基本上所有的与锚结合的接头都含有相同(或基本上相同)的针对某一个特定感兴趣的靶分子的特异性探针。另一实施例中，某给定位点中与锚结合的一个或多个接头含有多个不同的探针，它们是针对多个不同靶分子的。这些探针可位于接头中分支结构部分，或优选可以线性关系排列，它们可以是同样的物质(如都是核酸或都是肽序列)，或各种物质的组合。事实上，每个
- 30 接头含多个探针增加了一特定定位点可检测的靶分子数。一实施例中，给定接头上

的多个探针均对感兴趣的特定靶分子有特异性(如对一个感兴趣 mRNA 的不同部分有特异性,或对相应于该 mRNA 不同部分的核酸酶保护片段有特异性),这得以提高靶分子试验(如样品中存在少量靶分子)的灵敏度。接头上探针的数目可为约 2-50,优选约 2、4 或 10 个。

- 5 当然,含有多个不同探针的接头也有利于只含一个(非重复)测定区的表面的应用。

接头的锚特异性和靶特异性部分可通过各种共价或非共价键连接,连接键的性质对本发明不重要。此二部分可直接或通过一中间分子连接。一实施例中,接头的二部分是寡核苷酸,它们可通过共价键如磷酸二酯键连接,形成一共线核酸。另一
10 实施例中,锚特异部分是寡核苷酸,而靶特异部分是一受体,例如一受体蛋白质,此二部分可通过生物素链霉亲和素分子的相互反应连接,例子见图 3 所述。已知这种连接的许多变化(见 Niemeyer 等(1994), NAR. 22; 5530-5539)。或此二部分可直接连接,例如寡核苷酸可酰胺化再通过酰胺键直接连接(如交联)于肽或蛋白质,或通过酰胺键或脂键连接于一膜成分。形成这种共价或非共价键的方法是本领域的常
15 规并且不难优化。接头的锚特异性和靶特异性部分也可存在空间臂序列(如核酸)。

两物质结合后(通过培育两种核酸、两种蛋白质、一蛋白加一核酸,或其它)形成一复合物(如锚/接头复合物),可任选项地处理(如洗涤)产生的复合物去掉未结合物(如接头),所用条件要能保留特异性相互反应完全,而去掉非特异性结合物质。例如,在达到复合(如锚/接头复合)所用条件相同或稍微更严谨的条件下,洗涤反
20 应混合物约 1-10 次或更多。

本领域技术人员将明白可产生各种类型的锚和接头夹心物。例如,可使第一组接头,每个接头具有锚特异性第一部分和针对第二组接头之一的特异性第二部分,结合于一锚阵列(如该锚具有基本上相同的序列),如此等等。事实上,夹心的这第二层使得第一组锚(如相同的寡核苷酸)转变成具有不同“偶联”锚特异性的不同阵
25 列。如需要,不同组的接头和锚可相互共价或非共价接合。

可用常规技术制造本发明的组合。

可用于本发明的某些表面不难从供货商处购得。一优选实施例中,此表面是 96-、384-或 1536-孔微滴板,如 Corning Costar 销售的修饰板。或者,含孔表面可进一步含有浅凹或“凹痕”,可通过显微加工铝或钢等物质制备一个模子,然后将塑料或类似物质显微注入此模子中,形成图 4 所述结构来形成这种浅凹或“凹
30 痕”。或者,图 4 所示含玻璃、塑料、陶瓷等的结构可从图 5 所述的三段材料组装:

第一段称为孔分隔(图 5a), 其将形成样品孔之间的分隔; 第二段称为亚区(图 5b), 其形成各测定孔内的亚区或浅凹; 第三段称为底(图 5c)将形成此板的底部, 测定孔的下表面。孔分隔可以是, 例如一片材料如硅酮, 间隔着一些洞, 当此三段材料组装时各洞将形成测定孔的壁。亚小区可以是一片材料如硅酮, 形状塑造成筛子或网状结构。底可以是一平片材料如玻璃, 是用于生化试验的典型微板下部的形状。如图 5 所示, 底的上表面可以是平的, 或可以形成浅凹, 按亚区形状排列以在各样品孔中提供完全的亚区或孔。可用标准方法, 如组装硅晶片所用的方法组装这三段材料。

可用常规技术, 如商品化寡核苷酸合成仪, 和/或将合成的亚片段连接在一起来合成锚、接头或检测寡核苷酸。太长而不易用此类方法合成的核酸可通过扩增方法, 如 PCR, 用常规程序产生。本发明一实施例中, 可用各种常规技术, 包括光蚀刻、丝网印刷化学结合、喷墨技术沉积、毛细管、筛网或液体通道芯片、采用电极阵列的电化学成膜、与钉或刺接触、或烘烤或 UV 照射滤器后变性, 在测定区的表面内或表面上设置锚核酸, 如寡核苷酸锚(见 Rava 等(1996), 美国专利号 5, 545, 531; Fodor 等(1996), 美国专利号 5, 510, 270; Zanzuchi 等(1997), 美国专利号 5, 643, 738; Brennan(1995), 美国专利号 5, 474, 796; PCT WO 92/10092; PCT WO 90/15070)。锚可置于测定区的表面顶部, 或当采用聚丙烯酰胺凝胶垫时, 可包埋在表面内, 其方式应使某些锚突出于表面而能与接头相互反应。一优选实施例中, 在寡核苷酸锚的 5' 端产生一游离氨基, 将其以经验确定的常规浓度(如约 1 微摩)溶于 PH 8.5, 50mM 磷酸缓冲液和 1mM EDTA 中, 并用 Pixus nanojet 分散器(Cartesian Technologies)以约 10.4 纳升液滴加在测定孔表面特定部位上, 此表面是新的干燥 DNA 结合板(Corning Costar)。。取决于寡核苷酸结合和蒸发量的相对速度, 必须控制制备时孔的湿度。另一实施例中, 可用常规方法, 如光激活脱保护生长的寡核苷酸链(如与利用位点指导“遮蔽罩”结合), 或用 nanojet 分散器模式化分散无活性化合物的纳升液滴, 在表面上直接合成寡核苷酸锚。可使所有生长中的序列脱保护以接受一个核苷酸, 将该核苷酸加入此表面。另一实施例中, 用常规技术使寡核苷酸锚通过其 3' 端结合于此表面。

也可常规产生肽、蛋白质、凝集素、螯合体、塑料和其它类型的锚或接头分子, 可用适合的现有技术将锚安置在表面内或表面上(见 Fodor 等(1996), 美国专利号 5, 510, 270; Pirrung 等(1992), 美国专利号 5, 143, 854; Zanzuchi 等(1997), 美国专利号 5, 643, 38; Lowe 等, 1985 美国专利号 4, 562, 157; Niemeyer 等(1994),

NAR. 22; 5530-5539)。

本发明某些实施例中，以上公开的组合可用于各种筛选程序，和/或获得关于探针或靶分子的水平、活性或结构的信息。这些试验称为多阵列平板筛选 (MAPS) 法或试验，用于此试验的含锚或锚加探针阵列的表面，称为 MAPS 阵列或 MAPS 板。

5 可以任何顺序组装反应混合物的成分、试验、或筛选程序。例如，可依次组装锚、接头和靶分子；或在有或没有报道剂时可在溶液中组装靶和接头分子，然后与锚接触。

本发明一实施例涉及检测至少一种靶分子的方法，此方法包括：

10 a) 使可能含有所述靶分子的样品与一双功能接头接触，该接头含有特异性针对一寡核苷酸锚的第一部分，和含有针对所述靶分子的特异性探针的第二部分，接触是在能有效获得所述靶分子和所述接头之间第一杂交产物的条件下进行

b) 在能有效获得所述第一杂交产物和组合之间第二杂交产物的条件下，使所述第一产物与所述组合接触，其中，所述组合在加入所述第一产物前含有：

15 1) 含多个空间上相分离区域的表面，其中至少二个区域基本相同，各区域含有

2) 至少 8 个不同的寡核苷酸锚

c) 使所述第一杂交产物或所述第二杂交产物与标记的检测探针接触，和

d) 检测所述检测探针。

20 可以高通量方式进行以下各种试验或程序，其中可在每块板或表面上快速和同时检测大量样品 (如多达约 864、1036、1536、2025 或更多样品，取决于此组合中测试区的数量)。还有，可一次测定多块板或表面。例如，在寻找药物的方法中，可将大量的样品 (各含一候选药物，如一组成性化学物文库的成员，如各种小分子、肽、寡核苷酸或其它物质) 加入到上述组合的分离的区域中，或可加入到生物或生化样品中，再将它们加入到所述组合的分离区域中，与区域中的探针阵列一起培育，

25 对各份样品进行测试。随着高密度微型板、产生和从密度更高的微型板收集数据的 DNA 点样的技术和方法如激光技术、机器人技术、改进的分散器、高级检测系统和数据处理软件最近的进展和不断发展，本发明的方法可用于每天筛选和分析数千或数万种化合物。

30 例如，一实施例中，探针是寡核苷酸，此试验可能是诊断大量样品中是否存在基因变异或缺陷 (如与疾病膀胱纤维病变有关的多态性或特定突变，见 Iitia 等 (1992)，分子和细胞探针 (Molecular and Cellular Probes)。6; 505-512)；病原

性微生物(如细菌、病毒、原虫、它们的宿主是动物,包括人,或植物)、或 mRNA 转录模式(用于诊断特定生理状态或疾病)的诊断性核酸或多核苷酸筛检试验(如结合或其它试验)。可利用含 EST(包括全长拷贝)部分的核酸探针阵列来评价 EST 衍生(或其它)细胞产生的转录模式。核酸探针也可以检测肽、蛋白质或蛋白质中能与特定核酸序列特异性结合的结构域。

类似地,一实施例中,此探针是抗原结合分子(如抗体),此试验可以筛检变体蛋白,或蛋白质表达模式以诊断特定生理状态或疾病。参见图 40 和 41,说明了可检测的分子类型。

另一实施例中,本发明的组合可用于监测生化反应,如蛋白质、核酸、小分子等的相互反应,例如,抗原和抗体、受体(如纯化的受体或与细胞膜结合的受体)和其配体、激动剂和拮抗剂、酶(如蛋白酶或激酶)和其底物之间的相互反应,底物转变成产物的量增加或减小,及其它等等。这类生化试验可用于特征分析探针或靶分子的性质,或作为筛选试验的基础。例如,为筛检样品中是否存在特定蛋白酶(如参与血液凝结的蛋白酶,如蛋白酶 Xa 和 VIIa),可在含有各感兴趣蛋白酶的特异性荧光底物的探针的此组合上测试这些样品。如某核酸蛋白酶能结合和切割某底物,而该底物会发荧光,通常由于两个能量转移对之间的切断和分离,可测到信号。在另一实施例中,为筛检样品中是否存在特定的激酶(如 Sre,酪氨酸激酶,或 ZAP70),可在含有能被感兴趣激酶之一选择性磷酸化的肽的探针组合上测试这些样品。采用本领域已知的常规测定条件,可将样品与底物阵列在适当的缓冲液和必须的协同因子中培育一段经验确定的时间。(在某些试验中,如研究感兴趣激酶活性调节因子的生化试验中,可调整各激酶的浓度,使各底物磷酸化的速率相似)。在经验确定的条件下处理各反应物去掉激酶和不要的反应成分(任选)后,将其与可检测试剂,如荧光素标记的抗磷酸酪氨酸或抗磷酸丝氨酸抗体(如浓度约 10nM 左右)一起培育,通过检测产生的信号来检测磷酸化底物。另一实施例中进行结合试验。例如,可在相应的磷酸化肽的探针阵列上检测 SH2 结构域如 GRB2 SH2 或 ZAP70 SH2;或在特定受体的探针阵列上筛检血清中的免疫缺陷。另外,可在这类阵列模式中进行酶联试验。本发明的组合也可用于检测活性比野生型酶高或低的突变酶,或筛选各种药物包括除草剂或杀虫剂。

当然,MAPS 试验可用于定量测定样品中活性靶分子的量,只要探针不完全被靶分子占据,即不超过约 90%的探针位点被靶分子占据(或反应或杂交)。在这些情况下可定量靶分子,因为靶分子越多与探针结合越多。另一方面,在 90%以上的探针

位点被结合时，更多的靶分子基本上不会提高结合于探针的靶分子量。上述任何类型的靶分子都可用此方式定量测定。例如，实施例 6 描述了靶寡核苷酸的定量测定。此外，已显示，即使存在过量的靶分子(如其量大到使 MAPS 探针阵列中的探针饱和)，可通过在该结合混合物中加入已知量的未标记靶分子，可转移此反应的灵敏度而得以定量检测如此大量的靶分子。

另一个实施例中，可用本发明的组合物筛选靶与所述探针相互反应的制剂。一制剂可直接或间接与探针，靶分子或靶加探针形成的复合物反应，而调节靶/探针相互反应。此种调节可采取各种方式，包括但不限于提高或降低靶对探针的亲合力，提高或降低靶和探针结合的速度，竞争或非竞争性抑制探针与靶的结合，提高或降低探针或靶分子的活性，此活性在某些情况上可增强或减弱探针/靶的相互反应。这些制剂可以是人造的或天然生成的物质。另外，可采用这些制剂的未改变状态或与其它物质的凝聚物；它们可直接或通过一特异性物质共价或非共价结合于一结合成员。例如，为了鉴定潜在的“血缓冲剂”，或能与蛋白酶级联反应之一的酶反应引起血凝的制剂，可测试感兴趣蛋白酶的混合物与多种候选制剂的反应，然后测定上述活性。可用于本发明的制剂的其它例子非常多种多样，包括除草剂和杀虫剂。实例 16 和 17 描述了选择性抑制特定激酶的制剂，或选择性抑制 SH2 结构域和磷酸化肽之间相互反应的抑制剂的高通量试验。

另一个实施例中，可用本发明的组合来筛选能调节基因表达模式的制剂。例如，可采用寡核酸阵列来鉴定 mRNA 种类，一组与特定生理状态或发育阶段相关，或与疾病相关的基因(相关基因、RNA、或表达模式)表达此种模式的 mRNA。术语“相关”或“相关性”指 RNA 的表达模式与细胞的生理状况相关，但不一定所述 RNA 的表达负责或引起该特定生理状况。例如，可鉴定到一个小亚组的 mRNA 被表达，上调或下调。在细胞起着具体疾病状态的模型作用时，与未显示病理表型的正常细胞相比，表达模式的这种改变可作为患病的指征(“指示”基因，RNA，或表达模式)。术语“相关性”和“指示物”可或互换使用。例如，用肿瘤促进剂如十四烷佛波醇处理的细胞可能显示模拟肿瘤生长早期阶段的基因表达模式。输在另一种癌症模型中，当用腺病毒感染小鼠胰岛瘤细胞(如细胞系 TGP61)时，其显示 c-Jun 和 MIP-2 表达提高，而管家基因如 GAPDH 和 L32 基本保持不受影响。

在与患病模型的细胞直接或间接，体内或体外(如组织培养)接触后，能调节指示物表达模式的制剂可作为患此病生物(如人或患病动物或植物)的治疗制剂或药物。这些制剂也可通过直接，如在体外(试管)表达系统接触此核酸来调节表达模式。

如本文所用,“调节”指引起参与检测反应的分子量和/或活性提高或降低。可用本发明的组合来筛选这些制剂。例如,可使一系列细胞(患病模型的)与一系列制剂接触(如约10分钟至48小时或更多)。采用常规的本领域已知的方法(如商品化试剂盒),可制备总RNA或mRNA提取物。如果需要扩增RNA的量,可采用标准方法如

5 RT-PCR扩增(见Innis等编(1996),PCR:扩增方法向导(*PCR Protocols: A Guide to Methods in Amplification*)。学院出版社,纽约)。可使此提取物(或它们的扩增产物)接触(或与其共培育)多个基本上相同的含有针对相应检测RNA的探针的阵列,可鉴定那些与该检测物表达模式变化有关的制剂。实施例15描述的高通量试验可筛选能改变疾病相关基因表达的化合物。

10 类似的,可鉴定能调节与特定生理状态或发育阶段相关表达模式的制剂,这种制剂可以是人造的或天然产生的物质,包括环境因子如参与胚胎发育或调节生理反应的物质,或农业工商业中重要的物质如除草剂或杀虫剂。另外,可采用这类制剂的改变状态或与其它物质的凝聚物,可使它们直接或通过一特异性结合物共价或非共价结合于一结合成员。

15 本发明另一实施例是用于检测样品中至少一种靶分子的试剂盒,该试剂盒包含有:

1) 含多个空间上相分离区域的表面,其中至少二个区域基本相同,各区域含至少8个不同的寡核苷酸锚,或本文所述其它类型之一,和

2) 一容器,该容器含有至少一个双功能分子,此分子具有针对至少一个所述锚

20 的特异性第一部分,和含有针对至少一个所述靶分子的探针的第二部分。

在一实施例中,提供上述1)的表面和使双功能接头分子结合至少一个所述锚,此双功能接头分子具有针对至少一个所述锚的特异性第一部分,和含有针对至少一个所述靶分子的探针的第二部分。此说明书可包括,例如(但不限于)此表面上各锚的描述,表明有多少种锚,它们位于表面何处,和使接头与锚附着(连接,结合等)

25 的方法。例如,如果锚是寡核苷酸,此说明书可包括各种锚的序列,根据此序列,试验者可设计出与这些锚特异性反应(杂交)的接头的互补性锚特异性部分。如果锚是肽,此说明书可提供关于能与这些肽特异性反应的抗体信息。此说明书还可包括使锚和接头结合的方法,如杂交(或其它结合类型)的条件,试剂,温度,培育时间,去掉未结合分子(如洗涤)的条件和试剂等。另外,该说明书可包括本文所述各类控制接头的结构和用法,和定量,标准化,“微调”,或校准所述组合进行试验的方法。

30 此说明书可包括本申请书所述的任何参数,条件或实施例,对于这些本领域技术人

员都可按常规方法进行。

如本申请书所述,实施者可使含所述锚阵列的本发明表面结合各种类型的接头,从而使各种各样的探针阵列程序化。而且,实施者可从本发明的表面去除某组接头,并在此表面加上另一组接头(与第一组相同或不同),使此表面可重复利用多次。这种灵活性和重复就用能力构成了本发明的另一优点。

另一实施例中,用本发明的组合绘制 EST(表达序列标记)图,即 MAP 试验可用于确定一种或一组 EST 是否产生于同一基因的不同部分,和是否是唯一的。图 18, 19, 20 和 21 说明了这些试验。在此实施例中,说明一种测定 16 种 EST 之一是否“连接”于一共同基因。此试验(见图 18)第一步是组装待绘制图谱的各 EST 的阵列,含有对应其的至少一个寡核苷酸探针,绘制数目等于(或多于)EST 的许多阵列并分布于一表面的分离区域(如孔)中。在所述实施例中,组合的此表面含有 16 孔,各孔含 16 种不同 EST 特异性寡核苷酸的阵列,编号 1-16。“对应于”一 EST 的寡核苷酸(EST 特异性)是与该 EST 充分互补的,在所选择的条件下,该寡核苷酸将与此 EST 特异性杂交,但不与其它无关 EST 杂交。此种类型的 EST 相应寡核苷酸(在优选条件下)可特异性结合从原先产生此 EST 的基因合成的 cDNA 的编码或非编码链。优化设计寡核苷酸要考虑的因素和杂交参数以实现特异性杂交在本文中有所讨论。为组装此阵列,制备接头分子,其各含有针对通用阵列锚之一的特异性部分,和含有对应于待绘制图谱 EST 之一的寡核苷酸探针部分;并使这些接头结合于本文所述的锚分。在后续步骤中,将含有核酸混合物(如 mRNA 或单链或变性 cDNA)(其可能性含有与这些寡核苷酸探针之一或多个互补的序列)加入含一探针阵列的各区(孔)。,然后在经验确定的常规优选条件下培育该混合物,使核酸结合于互补探针。如果有几个 EST 特异性探针与一核酸的不同部分互补,该核酸将结合于阵列中这些探针所处部位每一位点。

在后续步骤中,将不同的检测寡核苷酸(说明性实施例子中为检测寡核苷酸 #1-16)加入各区域(孔)中(见图 19)。为待绘制图谱的各 EST 设计了检测寡核苷酸,各 EST 特异性检测寡核苷酸对应于 EST 而非探针寡核苷酸的不同(至少部分不重叠)部分,这样探针和检测寡核苷酸相互不会干扰。考虑到,例如图 21 所示的 EST 对应于图 18-20 的 EST1,2 和 6。图 21 表明 EST#1 和#2 二者获自基因 X(它们是“连接”的),而 EST#6 获自一不同的无关基因。如果将一等分含有 mRNA 混合物,包括基因 X 产生的 mRNA 的样品与图 18-20 所示探针阵列一起培育,在优化条件下,基因 X 的 mRNA 将与探针 1 和 2 的位点杂交但不与探针 6 的杂交。(当然各 mRNA 必须以超

过其可能杂交的探针之和的摩尔量加入)。如果将检测寡核苷酸 1 加入区域(孔)1, 它将与已结合在该探针阵列位点 1 和 2 的 X_mRNA 杂交,但不与位点 6 杂交。类似的, 如果检测寡核苷酸 2 加入到另一孔, 比如孔#2, 它也结合于位点 1 和 2 而非位点 6。以这种方式可高通量确定那个 EST 连接该同一基因各部分的密码, 那个 EST 是独特的。对于图 20 推测的实施例, 同一基因的前 3 个编码部分, 另一基因的后 5 个 EST 编码部分和其它的 EST 看来不连接。本申请书中讨论了关于其它 MAPS 试验的杂交条件, 任选的洗涤步骤, 检测方法等。为了验证 MAPS 试验获得的连接资料, 可用 EST 特异性寡核苷酸对作为有义和反义引物进行 PCR 反应, 每对连接的 EST 应产生一 PCR 产物。注意到进行这种配对 PCR 试验可直接测定连接链无须采用连接酶 MAPS 试验; 然而可能需要许多反应物, 必须合成各 EST 引物作为有义和反义链。此实施例说明需要 180 种反应物。

一方面, 本发明涉及检测多个 EST 中那个与某给定核酸互补的方法, 此方法包括:

- a) 培育一固定的寡核苷酸探针阵列与测试样品, 此阵列中至少一个探针对应于一个所述 EST, 而测试样品可能含有所述给定的核酸, 以获得所述寡核苷酸和所述核酸的杂交产物
 - b) 培育所述杂交产物与一检测寡核苷酸, 该检测寡核苷酸对应于所述寡核苷酸探针之一所对应的 EST, 但针对该 EST 的不同部分而非所述寡核苷酸探针, 和
 - c) 检测所述阵列中那个寡核苷酸探针被所述检测寡核苷酸所标记
- 其中所述寡核苷酸探针阵列固定于一组合的某区域上, 所述组合含有:
- 1) 含多个基本上相同的空间上相分离区域的表面, 区域数目等于待测 EST 的区域, 各区域含:
 - 2) 数目等于待测 EST 的许多不同的锚, 各锚与
 - 3) 一双功能接头结合, 此双功能接头具有针对此锚的特异性第一部分, 和含有对应于至少一个所述 EST 的寡核苷酸探针的第二部分。

另一方面, 本发明涉及的上述方法, 其中所述 EST 可与所述核酸互补, 各所述 EST 含有两个不同的寡核苷酸序列, 第一个序列确定了对应于所述 EST 的寡核苷酸探针, 第二个序列确定了对应于所述 EST 的检测寡核苷酸, 此方法包括:

- a) 使含有所述核酸分子的样品与一组合中至少一个区域接触, 其中所述区域含一寡核苷酸探针阵列, 至少一个探针对于一个 EST
- b) 培育所述样品与所述区域, 从而使所述核酸分子结合于所述 EST 对应的

寡核苷酸探针, 该探针与所述核酸某部分互补

c) 将含有结合于一个或多个所述 EST 对应寡核苷酸探针的所述核酸分子, 与对应于一 EST 的检测寡核苷酸一起培育, 所述阵列寡核苷酸探针之一也对应于此 EST, 从而使检测寡核苷酸与已结合于所述给定寡核苷酸探针的核酸分子, 或与所述核酸互补的其它寡核苷酸探针结合

d) 检测所述检测寡核苷酸的存在, 从而鉴定所述阵列中那个 EST 对应寡核苷酸探针与此核酸的结合于所述给定寡核苷酸 EST 对应探针的部分互补, 从而鉴定那个 EST 与所述给定核酸互补, 其中所述寡核苷酸探针阵列固定在一组合的一区域上, 所述组合含有:

1) 包含多个空间上相分离区域的表面, 基本上相同的区域等于待测 EST, 各区域含有

2) 数目等于待测 EST 的许多不同的锚, 各锚与

3) 一双功能接头结合, 此双功能接头具有针对此锚的特异性第一部分, 和含有对应于至少一个所述 EST 的寡核苷酸探针的第二部分。

EST 绘图试验中的组分可以任何顺序组装. 例如, 可依次组装锚, 接头和 EST; 或在存在或缺乏报道剂时可在溶液中装配接头和 EST, 然后加入到锚中。

另一方面, 本发明涉及检测多个 EST 中那个与某给定核酸互补的方法, 所述方法包括:

a) 将一批双功能寡核苷酸接头分子与测试样品一起培育, 该接头分子各含有一作为探针的对应于至少一个所述 EST 的第一部分, 和针对一寡核苷酸锚的特异性第二部分, 而此样品可能含有所述给定的核酸, 以获得所述寡核苷酸探针和所述核酸之间的第一杂交产物

b) 培育所述第一杂交产物与一固定的寡核苷酸锚阵列, 此阵列中各寡核苷酸锚对应于至少一个所述接头分子的锚特异性部分, 从而形成含所述锚, 所述寡核苷酸探针和所述核酸的第二杂交产物, 和

c) 将所述第一或第二杂交产物与检测寡核苷酸一起培育, 该寡核苷酸对应于所述寡核苷酸探针对应的 EST, 但特异性针对此 EST 的不同部分而不是所述寡核苷酸探针, 和

d) 检测所述阵列中那个寡核苷酸探针被所述检测寡核苷酸所标记其中所述寡核苷酸锚阵列固定在一组合的一区域上, 所述组合含有:

1) 包含多个空间上相分离区域的表面, 基本上相同的区域等于待测 EST, 各区

域含有

2)数目与待测 EST 相等的不同的锚

当然,上述绘制 EST 图的方法可用于绘制对任何感兴趣的核酸的测定序列(如多核苷酸),例如,可确定对同一基因 DNA 的二个或多个克隆的 DNA 片段或 cDNA 5 图。这种方法有助于阐明复杂的长基因的结构。以类似方法,可确定对同一基因 DNA 的一个或多个剪接序列或编号序列。这种确定可用于鉴别正常与以不同剪接模式为特征的疾病的诊断试验。绘图法的其它许多用途是本领域技术人员所知道。

另一方面,本发明涉及检测多个多核苷酸中那一个与某给定核酸互补。

其中一个或多个所述多核苷酸可能与所述核酸互补和各所述多核苷酸含二个不同寡核苷酸序列,此方法第一步确定对应于所述多核苷酸的寡核苷酸探针,第二 10 步确定对应于所述多核苷酸的检测寡核苷酸,这二步包括:

a)使含所述核酸的分子与所述组合的至少一个区域接触,其中所述区域含寡核苷酸探针阵列,至少一种探针对应于各所述多核苷酸。

b)培育所述样品与所述区域,使所述核酸分子与所述多核苷酸对应的寡核苷酸 15 探针结合,该探针与所述核酸的一部分互补。

c)培育含有与一个或多个所述多核苷酸对应的寡核苷酸探针结合的所述核酸分子的区域与一检测寡核苷酸,该检测寡核苷酸对应于一多核苷酸,而所示阵列的一个寡核苷酸探针对应于此多核苷酸,因而使检测寡核苷酸与已结合于所述给定的寡核苷酸探针或与所述核酸互补的其它寡核苷酸探针的核酸分子结合。

20 d)检测是否存在所述检测寡核苷酸,从而鉴定所述阵列中那些多核苷酸相应的寡核苷酸探针与某核酸多部分互补,该核酸结合于所述给定的多多核苷酸相应的寡核苷酸探针,从而鉴定出那些多核苷酸与所述给定核酸互补。

其中,所述寡核苷酸探针阵列固定在一组合的一区域中,所述组合含有:

1)一表面,该表面含有空间上相分离的、基本上相同的数目与待测多核苷酸数 25 目相等的区域,各区域含有。

2)与待测多核苷酸数目相等的许多不同的锚,各锚与。

3)一双功能接头结合,该接头的第一部分特异性对此锚,第二部分含有对应于至少一个所述多核苷酸的寡核苷酸探针。

本发明另一方面,上述绘制 EST 或其它多核苷酸图的方法包括在一步或多步骤 30 之间除去样品中的未结合部分。

本发明另一实施例中,通过逆转录将感兴趣的一个或多个靶 RNA(如 mRNA 或其

它类型 RNA) 转变成 cDNA, 然后使这些 cDNA 与一探针阵列杂交。图 8 说明了这种试验。如本文所述制备细胞或组织的 RNA 提取物(或纯化的 mRNA), 然后在 RNA 样品中加入逆转录酶和感兴趣 RNA 的特异性寡核苷酸引物, 采用本领域已知的可用常规确定和优化的条件和程序, 产生 cDNA 的第一链。术语“特异性”引物, 指与感兴趣 mRNA 充分互补能在选定的严谨杂交条件下与其结合并被逆转录酶识别, 但不结合不需要的核酸的引物(见上述实现特异性杂交的适当反应条件的讨论)。

可用各种核糖核酸酶之一或化学方法如碱处理去除残余 RNA-RNA 提取物中该特异性引物不识别的 mRNA, 和/或其它类型的污染 RNA 如 tRNA 或 rRNA, 留下单链 cDNA, 然后使其与 MAPS 探针阵列接触。此方法中采用逆转录酶大大减少了对广泛处理 RNA 的需要, RNA 对核酸酶降解敏感而难以留存。另外, 特异性逆转录酶引物所到的额外特异性给此试验添加了一层特异性。

任选的可在与探针阵列杂交前扩增上述 cDNA 以提高信号强度。上述逆转录酶寡核苷酸引物 5'端可含有针对 RNA 聚合酶(如, T7, T3 或 SP2 聚合酶等)引发位点的特异性序列(可长约 22-27 个核苷酸)。在图 8 所示实施例中, 将 T7 启动子序列加入逆转录酶引物中。任选地, 可用 PCR 和适当的引物进一步扩增这样产生的 mRNA, 或可扩增 cDNA 本身。转录和 PCR 的方法是常规和本领域熟知的。

PCR 的灵活性使得可在本发明的方法中作许多改进变化。在一实施例中, 用于扩增靶分子的一个或二个 PCR 引物可含有使产生的 PCR 产物特异性或非特异性结合固相载体的化学修饰。这类化学修饰包括例如 5'酰胺化, 从而可结合于 Costar 的 DNA 结合板表面(如经 N-氧琥珀酰亚胺脂修饰的表面, 或马来酸酐包被的板如 Pierce 的 Reaci-Bind 板, Rockford, IL)。产生含这类化学修饰寡核苷酸的方法是本领域的常规方法。含这类修饰引物的 PCR 产物可结合于任何需要的载体, 包括固相载体如微滴孔的内壁、珠(如磁性或非磁性珠)或上述类型的表面。当然, 开始 PCR 反应之前 PCR 引物也可结合于载体, 可用过量的结合引物不洗涤重复几轮 PCR, 使产生的 PCR 产物保持与载体的结合。扩增的靶序列结合于载体有利于靶分子与含有锚和/或接头的表面接触(杂交)之前或其接触之后洗涤(或纯化)靶分子, 然后从此表面释放下来。

另一实施例中, 用于扩增靶分子的一个或二个 PCR 引物可含有一个或多个限制性酯切位点, 将此限制位点导入两端之一的毗邻部位或侧接感兴趣的靶序列。可在 PCR 扩增的靶分子接触(杂交)含锚和/或接头的表面前后在其中加入限制性位点。以此方式导入的限制性位点通过提供侧接靶序列的克隆位点而有利于扩增靶分子

的克隆。限制性位点也有利于扩增序列的纯化。例如，在 PCR 引物中在靶特异性序列和使其结合于载体的化学修饰之间可安置一个或多个限制性位点。当靶分子经 PCR 扩增后，利用该修饰的 PCR 引物通过此化学修饰结合于载体，可洗涤，然后在毗邻靶序列的限制性位点切断，从而释放出洗脱的靶分子。见图 23。

- 5 当然，上述方法也可利用切割位点而不是限制性酶位点，如可用特异性受体或检测接头的特异性序列(其不必存在于靶分子中)。

当然，上述引物修饰都可用于任何需要的组合中，可在试验的任何一阶段将其加入扩增产物。图 21 和 22 显示上述几种引物修饰加入扩增靶分子的方法。

- 10 可用在 MAPS 板上进行试验前用逆转录酶和/可 PCR 扩增将 mRNA 靶分子转变成 cDNA 的上述方法代替标准的 MAPS 试验程序来进行上述 RNA 为基础的任何试验。

本发明方法中手所用的核酸，如靶分子检测或核酸酶保护片段(本文有描述)的寡核苷酸，可用常规的各种酶促方法之一，包括 PCR 和连接酶反应来扩增。一种扩增方法是转录介导的扩增(见 Abe 等(1993)，J Clin.Microbiol, 31:3274)，也见图 32，36-39 和 42。

- 15 本发明另一实施例中，使感兴趣的一个或多个靶核酸与特异性多核苷酸保护片段杂交，并进行核酸酶保护程序，并在 MAPS 板上测定与感兴趣靶核酸杂交的那些保护片段。当然，此类“MAPS 板”可含有不与接头结合的锚(如直接与感兴趣的靶分子或核酸酶保护片段结合)。用于与任何一方类型探针阵列结合的核酸酶保护的优点，本领域技术从中央到地方将会从本说明书和其原始专利申请所需求的权利中
20 得以理解，如果感兴趣的靶分子是 RNA，保护片段是 DNA，核酸酶保护/MAPS 试验(NPA-MAPS)可减少广泛 RNA 的需要。(RNA 对污染的核酸酶的降解敏感而难以保存)。用核酸酶可信程序处理新品也得以降低样品的粘稠度。样品的核酸酶 保护可使试验的灵敏度和重现性更高。见图 30 说明用核酸酶保护程序处理样品的试验的灵敏度和重现性。本发明的一个优点是当靶扩增(如 PCR)不需要检测信号时这些试
25 验的灵敏度足够高。在 NPA-MAPS 试验中，探针阵列中的探针是与感兴趣靶核酸标准相同的寡核苷酸，而不是像标准 MAPS 试验中与其互补，NPA-MAPS 试验的一个例是见图 9。

- 30 在一 NPA-MAPS 试验中，感兴趣的靶分子可以是核酸，如基因组 DNA，cDNA，病毒 DNA 或 RNA、rRNA、tRNA、mRNA、寡核苷酸、核酸片段、修饰的核酸、合成的核酸等。本发明一优选实施例中，采用此方法测定组织或细胞 RNA 提取物中一种或多种靶的 RNA。在所选项严谨条件(见实现特异性杂交的相应反应条件讨论)下使含

有感兴趣的靶分子的样品先与过量的一种或多种特异性保护片段杂交。保护片段是针对感兴趣靶核酸某部分的特异性多核苷酸，可以是 RNA、DNA(包括 PCR 产物)、PNA 或修饰的或替代的核酸。“特异性”保护片段指与结合伙伴充分互补能在选定的严谨条件下与其结合但不与其它的核酸结合的多核苷酸。保护片段至少长 10 个核苷酸，宜长 50-100 个或为全长 cDNA。在一优选实施例中，此保护片段是单链 DNA 寡核苷酸。可在一杂交反应中包括多达 100 个或更多个靶分子的特异性保护片段。杂交后，用含一种或多种核酸酶的混合物处理样品以破坏核酸而不破坏已与感兴趣的核酸杂交的保护片段，和任选地在核酸酶保护程序中(在双链体杂交物中)，靶核酸的已杂交部分将受到保护不被核酸酶消化。例如，样品中含有细胞提取物，不需要的核酸如基因组 DNA，tRNA，rRNA 和不感兴趣的 mRNA 可在此步骤中基本上受到破坏。可制备各种核酸酶的任何一种，如胰腺 RNA 酶，绿豆核酸酶，S1 核酸酶，RNA 酶 A，核糖核酸酶 T1，外切核酸酶 III，外切核酸酶 VII，RNA 酶 CLB，RNA 酶 PhyM，RNA 酶 U2 等，取决于杂交复合和样品中不要的核酸的性质。RNA 酶 H 可部分用于消化已结合于 DNA 保护片段的剩余 RNA。这些酶的反应条件是本领域所熟知的可凭经验优化。另外也可用碱水解 RNA。如需要可起家一步用本领域熟知的方法处理样品去掉未杂交物质，和/或灭活或除去残存酶(如酚抽提，沉淀，柱渗滤等)。杂交后进行核酸酶消化和(任选的)化学降解称为核酸酶保护程序。已报道了各种核酸酶保护程序(见 Lee 等(1987)，Meth Enzymol. 152, 633-648; Zinn 等(1983)，Cell. 34, 865-879)。受核酸酶保护处理的样品(任选地)灭活核酸酶后，使样品与 MAPS 探针阵列接触，进行 MAPS 试验各步骤。可通过与本文所述用于标准 MAPS 试验的标记靶特异性报道物杂交，或者此保护片段本身可用一可检测分子共价或非共价标记，来检测结合的保护片段。

如需要，为标准化 NPA-MAPS 试验，可包含一个或多个对照。例如，可采用对应于预计以基本恒定数量存在于一系列样品的各样品中的某核酸(组成性产生的 mRNA，基因组 DNA 的一部分，tRNA 或 rRNA)的一个或多个保护片段。试验中，检测和定量内部标准化对照，如基因组 DNA，以测定存在的不同量核酸(mRNA)能力，是此试验采用保护片段的一个优点。

因为标准化用的标准品的量可能低于感兴趣 mRNA 的表达量，可能要调整该试验，使对应于所表达基因的信号不超过对应于标准品的信号。调整信号水平的方法是本领域常规为技术人员所知道。例如，可采用本文所述平衡信号强度(弱化信号，细调)的任何一种方法(如采用封闭性接头；标记比设计用于检测 mRNA 更高水平的

用于检测标准品的信号部分；置于设计用于检测标准品的位点上(此位点含有针对该标准化核酸不同部分或对应于该核酸不同部分的保护片段的)多个特异性接头)。可通过本文所述方法之一，同时或顺次检测标准化用的标准品和感兴趣的靶核酸(如 mRNA)。图 28 和 29 说明 mRNA 试验中采用内部 DNA 标准化标准品的典型实验。

- 5 在一优选实施例中，直接，例如不通过与靶特异性报道物杂交来标记此保护片段。例如，通过配体-抗配体相互反应，如链霉亲和素酶复合物加入到生物素化保护寡核苷酸中，使报道物与保护片段结合。在另一实施例中，用化学修饰此保护片段(如直接交联辣根过氧化物酶(HRP)或荧光染料)并用此保护片段的核酸部分或不用(如经酶或化学处理切除此修饰后)检测这种化学修饰。上述任一方法中保护片段
- 10 或在与相应接头分子杂交前后标记。

- 为了控制核酸酶保护程序适当地工作，即如希望的那样消化掉未杂交的核酸，可设计出含有应被核酸酶(若保护程序适当地工作)切除的突出(未杂交)端的一个或多个保护性片段。该突出端存在是否可通过与一互补的标记检测探针杂交测定，或将该保护片段突出端部分用一可检测分子共价或非共价标记。可在样品与探针阵
- 15 列接触之前进行这种控制，或作为 MAPS 试验本身的一部分。此控制试验的例子见实施例 15 所述。当然，由于不同的标记不难鉴别(如用不同的吸收光谱鉴别荧光)，可在一试验中包含几种不同标记的寡核苷酸。另外，凝胶电泳分析的标准核酸酶保护试验可用于试验开发期限间验证这些保护性片段是否如预期的那样被加工。

- 核酸酶正确消化的其它控制方法是本领域技术之一。例如，可在一试验中包括
- 20 已知对样品中的任何核酸酶没有特异性的核酸酶保护片段(如植物核酸试验中)，可包括已知植物中所没有的动物基因的特异性保护片段。

- 测到靶分子后，检测探针(如 HRP 标记的)信号可能消失(如变性、杀伤、淬灭、受抑制、被封用)，洗涤板去除产生的可能干扰下一步的试剂、药物或缓冲剂(变性试剂)，然后可用不同的检测探针(如 HRP 标记的)测定该突出端。可在试验的不同
- 25 阶段加入具有相同信号产生基因的不同检测探针后，利用变性的信号，可采用两种不同的荧光探针和双色测定而无须变性或阻断信号。

- 在本发明一实施例中，如上所述用一寡核苷酸针来筛选含有一种或多种多形性的核酸。在一优选实施例中，此核酸(如 DNA、基因组 DNA 或 RNA、mRNA)含有一种或多种 SNP，常规上可用专业识别程序进行此程序。例如筛检含已知 SNP 的 DNA 或
- 30 此 DNA 所表达的 mRNA，使“SNP-特异性”保护片段与含核酸(其可能含该 SNP)的样品杂交。“SNP-特异性”保护片段本文指含有 SNP 的已改变碱基的片段，或如果要

分析 mRNA 则含有此序列的逆互补片段。然后, 在适当的凭经验确定的条件下用能在错配位点(如单碱基错配)消化未杂交的单链核酸和切断双链(双链体)核酸(如 DNA-DNA 杂交体, DNA-RNA 杂交体等)的一种或多种适合的核酸酶处理样品。适合的核酸酶包括如 S1 或 RHA 酶 H。如果样品中存在含 SNP 的核酸并与 SNP-特异性保护片段杂交, 该保护片段可从消化程序中完整保存下来并可进行 MAPS 试验, 用对该保护片段某序列特异性的检测探针或检测寡核苷酸检测。不含 SNP 的核酸将在该核酸中 SNP 特异性保护片段和相应的野生型序列之间错配位点处被切断。如需要, 位于该切断点远端或近端的保护片段部分可用常规方法(如热变性、酶促切割等)去除。可设计一试验, 使该被切分子(或其一部分)不与接头结合, 或该被切分子即使其一部分与一接头结合仍不能被适当设计的检测探针或检测寡核苷酸所检测。实施例 29 和图 30 与 31 说明本发明的此试验可检测出被表达的 SNP 中的一个碱基的错配。实施例 32(图 41)说明一种检测 SNP 的试验, 可用于例如检测基因组 DNA 中的 SNP。

NPA-MAPS 试验可用于测定样品中靶分子的量。如果加入的保护片段摩尔量足够大超过靶分子而驱使杂交反应完成, 核酸酶保护步骤后剩下的保护片段量将反映出样品中存在多少靶分子。实施例 12 和 13 描述了这种定量反应的例子。

本发明一实施例中, 可用一探针阵列测定样品中不同类型的靶分子, 如 DNA、RNA、胞内蛋白质和分泌蛋白的各种组合。这类试验的例子见图 40 和 41。

NPA-MAPS 试验可用于实施上述采用标准 MAPS 试验的任何方法。

在一优选实施例中, 用质谱仪而不是在 MAPS 板上测试多核苷酸保护片段。在最优选实施例的杂交或核酸酶消化步骤中, 没有多核苷酸与固相表面结合(附着)。杂交后, 可用核酸酶或化学处理降解杂交的靶分子, 剩余的保护片段与有多少片段已知靶分子杂交成正比。或者可处理该样品, 留下靶分子的(单链)杂交部分, 或杂交靶分子和保护片段形成的双链体作进一步分析。将待分析的样品用(乙醇沉淀或通过吸附或亲和层析等)与其余的杂交和核酸酶混合物相分离、洗脱或溶解, 并通过高通量的环注射注入质谱仪。在一优选实施例中, 将待分析的样品(如保护片段)吸附于一表面, 并用激光解吸分析, 采用本领域熟知的方法。对于最高灵敏度, 可采用傅里叶变换质谱(FIMS)(或类似的其它先进方法), 可测出 10^{-15} 摩尔或更低的每种保护片段。

可设计出测定一份(或多份)样品的保护片段为所用质谱仪提供独特的信号。在一实施例中, 保护片段在杂交和核酸酶处理后各具有独特的分子量, 它们的分子量、

特征性电离和片段化模式足以衡量它们的浓度。为获得更高灵敏度或帮助分析复杂的混合物,可采用设计的能产生清晰独特信号的化学基团来修饰(或衍生)这些保护片段。例如,各保护片段的衍生可用不同的天然或非天然氨基酸,通过酰胺键在寡核苷酸链的杂交部分的一个或多个位置与该链结合。采用具有适当能量的质谱仪, 5 酰胺键产生的片段释放出特征性比例的氨基酸。此类方法中,采用中等大小的化学基团(分子量约 80-200)作为质谱标记是理想的,因为这种大小的分子通常不难检测。另一实施例中,此化学修饰是一种含有明确质谱信号,如四烷基铵基因(其可产生另一分子如氨基酸分子)的有机分子。另一实施细则例中,通过与众多试剂之一反应增强了阳离子或阴离子信号。例如为增强阳离子检测可使吡喃盐(如 2-4 二 10 乙基, 6-乙基吡喃四氟硼酸盐或许多其它化合物)与氨基反应形成吡啶盐:可采用许多其它增强剂之一来产生其它阳电荷功能基团(见 Quirke 等(1994), *Analytical Chemistry* 66; 1302-1315)。类似地,可使本领域已知的许多试剂之一反应形成阴离子增强基团。当然可在从核酸中切下后或与核酸结合时检测到这种化学修饰。通过区别性鉴定各保护片段,可以在一次试验中测定大量的不同靶分子(如 2、6、10、 15 16 个或更多的不同靶分子)。可快速容易地进行许多这种试验,因此可如本文所述,高通量地进行一种或一组这类试验。

不论寡核苷酸是直接通过其质量或采用独特的分子标记检测,可用已知浓度的纯品完整特征分析每一待测分子的信号,这得以精确定量分析此信号。对于质谱法检测的任何分子。其强度和图形不可能精确预测。分子离子化的倾向、分子片段化 20 时所有化学键的灵敏度、各片段带多个电荷或单个电荷的程度都太复杂而不能预测。然而,对于具有固定能量和样品处理特征的所述仪器、信号的强度和图形非常有重复性。因此,对于各个探针可用纯标准品的特征分析其信号和精确定量解释实验产生的信号。

一方面,本发明涉及到检测一个或多个感兴趣的核酸的方法,所述方法包括使 25 含有感兴趣的核酸的样品经受一种或多种保护片段的核酸酶保护,并用质谱法测定杂交后的双链体分子或被保护的核酸或保护片段。

用质谱分析核酸的方法是本领域熟知的。见 Alper 等(1998), *Science* 279, 2044-2045 和美国专利 5,605,798。

除了上述各种高通量试验外,本领域技术人员还知道许多其它方法。

30 采用多重探针试验的优点是能够在每个探针阵列(将经历与真实实验探针相同的反应条件)中包含许多“对照”探针。例如,该阵列的各区可含有阳性和/或阴性

对照。本文所用术语“阳性对照探针”，指已知能与靶分子起实质反应，或与之以已知的定量或定性方式起反应的对照探针，故可作为探针/靶分子相互反应的标准。例如，这类探针可控制杂交效率。术语“阴性对照探针”本文用以指已知不与靶分子起实质反应的对照探针。这类探针例如可控制杂交的特异性。这两类对照探针应用的例子，考虑为用寡核苷酸探针阵列试验来筛检能调节某疾病的一组相关基因表达的药物。作为变量如各样品中裂解细胞数，mRNA 回收率或杂交效率的内部标准化对照，一个探针阵列可包含的探针针对的有：预计其表达不会受到所测试药物调节的一个或多个碱基水平，或组成性管家基因(如肌动蛋白，微管蛋白或其它的结构基因)或 DNA 结合蛋白(如转录调控因子或其它)的特异性探针。另外，为了确定被测药物是否会导致不良副作用，如细胞死亡或毒性，探针阵列可含有针对已知受诱导后可引起凋亡(细胞程序性死亡)过程的基因，或在细胞创伤(如热激蛋白)或细胞中毒(如 P450 基因)条件下被诱导的基因的特异性探针。

可在一系列中包含其它对照探针以“精细调谐”试验的灵敏度。例如，考虑一种测试的药物能调节与某具体疾病相关的 mRNA 的产生时。如果先前分析已表明，此组基因中一种相关的 mRNA(称为 mRNA-A)产生的量比信号不佳的其它 mRNA 高，可调整接头而“精细调谐”此试验，使信号强度相等。“封闭性接头”含有针对 mRNA-A 靶分子的锚特异性寡核苷酸序列，但缺乏探针特异性序列，可将其加入以稀释靶特异性接头池，从而降低该试验对此 mRNA 的灵敏度。本领域技术人员可用常规方法确定封闭性和非封闭性接头的恰当比例。对于某具体靶分子的检测，用无活性元件稀释活性元件“精细调谐”，也可在该试验的其它步骤中进行。例如，可在检测水平上用“无活性”的靶特异性报导分子(如用靶特异性相同但无信号传递分子(如寡核苷酸序列)或用灭活的或无活性形式的信号传递分子)稀释标记的靶特异性报导分子。本文所用的术语“信号传递分子”，指标记分子，或任何能发射可检测信号，或能产生荧光分子，发冷光酶或各种本文所述信号的物质。在一特别优选的实施例中，在含靶分子复合物与检测接头(见实施例 23 和图 24 关于复合性夹心型检测方法章节)接触步骤中进行此“精细调谐”。可设计一组检测接头来精细调谐测试各靶分子的灵敏度。例如，如果已知样品中某具体靶分子水平很高，可用含靶特异性部分(如寡核苷酸序列)但不含报道试剂特异部分，或含靶特异性部分和报道试剂特异性部分(已预先结合于一无活性报道试剂)的“封闭性检测接头”(其量凭经验确定)来稀释针对靶分子的检测接头。也即可缺失针对报道试剂的特异性部分或阻止(封闭)其与报道试剂相互反应(杂交)。这种精细调谐本文有时称为信号“弱化”。图

28 说明进行这种信号弱化的实验。

本发明试验所测样品可能含有上述任何靶分子或其它分子。待测液体样品体积可相应于测试区域的大小，从约 100 纳升至 100 微升。一优选实施例中，将约 1 微升液滴加入到 1536 孔微滴板的各孔中，可采用适合高通量分析的各种方法之一，如移液器、喷墨分散或采用反复加样针夹，使样品与探针阵列接触。在探针和靶分子发生有效结合或其它稳定性相互反应的条件(盐浓度、PH、温度、培育时间等，见上)下培育样品。这些条件按常规确定。培育后，用凭经验确定的条件任选处理(如洗涤)样品以去除未结合的靶分子，此条件应能保留特异性反应物完整，但能去除非特异性结合物质。例如，可在实现探针/靶分子结合所用条件相同或更严谨的条件下洗涤样品一至十次。

可用各种方法之一制备含靶 RNA(如 mRNA、rRNA、tRNA、病毒 RNA 或总 RNA)的样品。例如，可将从体外细胞培养物提取到的 mRNA 接种于表面的诸区域中，如微滴板的各孔中。任选的，在达到所需细胞密度后，用感兴趣的制剂，如刺激剂或潜在的治疗剂处理这些细胞，可用各种方法之一，如反复加样针夹(获自 Beckman 的 96 或 384 头针夹)，通过移液或喷墨分散，将制剂加入细胞，与细胞一起培育适当时间如 15 分钟至 48 小时(取决于试验)。可用本领域已知的常规方法(通常可购试剂盒式)从体外或体内来源的组织或细胞抽取到总 RNA，mRNA 等。

在一实施例中，在存在或不存在核酸酶保护片段情况下裂解(或渗透破裂)细胞，直接利用粗制裂解液(例如在微滴板孔中)而不进一步纯化去除其它细胞成分。如果在没有核酸酶保护片段时裂解细胞，可任选地将这些保护片段依次加入裂解液。

在测定核酸酶保护片段的优选实施例中，使感兴趣的细胞(如微滴板孔表面上的细胞，组织中的细胞或整个微生物样品等)接触含有表面活性剂或洗涤剂(如 SDS 约 0.01-0.5% W/V)的水溶液(裂解液)接触来制备样品，制剂(如甲酰胺约 8-60%V/V)、盐酸胍(如约 0.1-6M)、异硫氰酸胍(如约 0.05-8M)或脲素(如约 40-46%w/v 或约 7M)单独或与一种或多种其它制备组合，可作为离液剂，这些水溶液可加入标准缓冲剂成为缓冲液，在一优选实施例中，该缓冲液是约 0.5-6XSSC，更优选给 3XSSC。任选地该水溶液还可含有适当浓度的 tRNA，如 0.1-2.0mg/ml，优选约 0.5mg/ml。也可将核酸酶保护片段加入此水溶液，然后将其加入细胞。各保护片段的最佳浓度可凭经验用常规方法确定一优选实施例中，各保护片段的浓度约 3-300pM，更佳为约 30pM。

细胞与该水溶液一起培育直至细胞因渗透而破裂和/或裂解, DNA 和/或 mRNA 从细胞释放入水溶液中。将细胞与该水溶液一起培育凭经验确定的时间(约 1-60 分钟), 培养的最适温度凭经验确定(约 37-115°C, 优选约 90-115°C)。

例如, 在一实施例中, 在约 90-115°C, 宜约 105°C 的水溶液中培育细胞约 1-60 分钟, 优选 5-20 分钟, 使 DNA 和 RNA 以变性形式从细胞中释放出来而能结合保护片段。若需要例如当需要在缺乏 RNA 时测定 DNA, 可在培养混合液中加入各种常规核糖核酸酶之一。选择适当的核糖核酸酶和优化消化条件是常规工作, 技术人员不难确定。

另一实施例中, 将细胞在 90-100°C, 优选 95°C 水溶液中培育约 5-20 分钟, 宜为 10 分钟来制备 mRNA, 任选存在一种或多种保护片段。此时, mRNA 基本上以能结合保护片段的变性形式从细胞中释放出来, 而 DNA 仍基本上留在细胞内或与细胞结合, 或因其双链性质不能得到, 或从细胞中释放出来但其形式不能结合保护片段(如未变性)。不希望受任何具体机制的束缚, 看来当核酸从裂解的/渗透破裂的细胞中释放出来时, 它已充分变性而能结合保护片段形成稳定的双链体, 从而抵抗内源性或外源性试剂或酶和细胞内蛋白质(如核酸酶)的降解, 并变性或/或灭活。

用上述方法制备好感兴趣的核酸后, 可稀释样品至适当体积, 使水溶液不能抑制外源加入的蛋白质如核酸酶(如 S1 核酸酶)、聚合酶(如 PCR 反应所需的聚合酶)或结合性蛋白(如链霉亲和素)的功能。上述稀释液的量、水溶液中所用化合物的成份和量可凭经验用常规方法确定。

对于本发明的任何方法, 可用本领域熟知的和/或本文所述的各种方法之一来标记靶分子(如用于检测核酸酶保护片段)。例如, 可将靶分子直接或间接与能提供检测信号的化学基团交联, 如化学发光分子或能催化产生化学发光分子的酶或荧光分子如荧光素或 Cy5, 或时间分辨荧光分子如一种整合性镧系金属, 或放射活性化合物。或者靶分子可在其与探针反应后用一个或多个标记的靶特异性报导子(如图 1 所示抗体, 寡核苷酸或上述与探针和靶结合的一般类型分子之一)标记。

一种荧光分子可能是“高转化磷光体”即一种吸收长波和在长波激发(红外), 然后发射较短波长(如可见光)的荧光剂。因为高转化磷光体吸收的波长比典型的待分析样品中存在的大多数潜在干扰物质更长, 与吸收较低波长的磷相比, 高转化磷光体可降低样品中物质所引起的干扰。大多数高转化磷光体的狭窄发射光谱也得以同时测定大量的不同高转化磷。本领域熟知和常见的高转化磷光体包括稀土金属离子, 如铈(Yb)、铽(Tm)和镨(Pr), 特别是氧硫化物盐的形式。已描述了多达 80 种

或以上的独立的可检测高转化磷光体(见《生物制剂检测和鉴定》(*Biological Agent Detection and Identification*), 1999年4月27-30日, DARPA, Biological Warfare Defense, Defense Sciences Office)可将这些磷任选地结合于一表面, 如微球或乳胶珠表面。象其它荧光标记, 可通过向充分靠近的接头、靶分子或报导子上的标记转移能量, 检测高转化磷光体。另外, 如本文所述其它信号传递分子, 可用高转化磷光体测定靶分子的量, 并可用于本文所述各种方法, 例如测定核酸酶保护片段。

当然, 高转化磷光体也可用于检测以任何其它方式在一表面上分布的靶分子, 如直接结合于表面, 直接结合于表面上不同寡核苷酸阵列或通过双功能接头结合于基本上均匀分布或以所需组织或模式分布在表面上的锚(不同或基本上相同)的靶分子(包括核酸酶保护片段)。可采用任何表面如流通系统或珠等固体表面。用于本发明任一试验的珠可以是任何材料、磁性和/或非磁性材料制成的任何类型的珠, 一种试验所用的珠可以在大小和/或形状上基本上相同或不同。

也可采用各种更复杂的夹心型检测方法。例如, 一靶分子可与一双功能分子杂交, 该双功能分子含有对该靶分子特异的第一部分和可被共同(即相同)报道试剂, 如标记的多核苷酸、抗体等识别的第二部分。

对于本发明的任何方法, 可采用各种复杂的夹心型检测方法标记靶分子。例如可使靶分子与一双功能(或多功能)分子(检测接头)相互反应, 如杂交, 该双功能分子含有对此靶分子特异的第一部分和对“报道试剂”特异的第二部分。本文所用术语“对XX特异”指探针和靶分子的相互反应。

本文所用术语“报道试剂”指标记的多核苷酸、抗体和本文所述与探针和靶分子相关的任何通用性分子。检测接头的这两部分可识别(相互反应或与其结合)上述任何方式与探针和靶分子相关的各自结合伙伴。检测接头也可包含其他序列, 如对某靶分子有特异性, 但与相应锚结合接头的靶特异性部分不同(不重叠)的序列。检测接头中的序列可起着检测探针或报道试剂的识别序列作用。一优选实施例中检测接头是多核苷酸。

可设计检测接头以至可在一试验中使用所需数量的常用报道试剂。例如, 可设计一组检测接头, 各检测接头对不同的靶分子是特异的, 但含有相同(共同)或有限数量报道试剂之一的结合位点。在一试验中使用有限数量(如一种)的报道试剂来标记各种靶分子的能力, 提供了减少成本和降低背景的优点。当然, 可利用检测接头/报道试剂的诸种组合来检测以任何形式分布在表面上的靶分子, 例如可用高转化

磷光体检测的上述类型的靶分子排列。

在一最佳实施例中，可设计检测接头来检测核酸酶保护片段，方法是优先标记核酸酶保护程序中(如实施例 15 中所述)已被核酸酶从控制性“突出端”序列切下的保护片段。此种检测方法见图 24 的图解说明。在此实施例中，检测接头含有的第一部分对靶分子特异，第二部分对共同的控制性突出端序列特异，该控制性突出端序列在一优选实施例试验开始时，存在于几乎所有的核酸酶保护片段上。若需要，在核酸酶保护反应时从核酸酶保护片段切下该控制性突出端序列，检测接头的靶特异性部分，将与切下的保护片段杂交，但检测接头的控制性突出端特异部分将不被结合并保留用于进一步杂交。另一方面，如果控制性突出端特异性序列没从保护片段切下，例如，由于核酸酶保护程序的核酸酶消化不完全，检测接头的靶特异性部分和控制性突出端特异性部分将与保护片段杂交，而不能用于进一步杂交。在一优选实施例中，含有核酸酶保护片段和结合的检测接头的复合物在下一步与含有信号分子(如荧光色素、半抗原、酶和任何携带有可检测信号或产生信号部分的其它分子)和对检测接头的控制性突出端特异部分有特异性的分子杂交。该报道试剂将优先结合并标记那些核酸酶保护片段中的控制性突出端序列被切下的复合物(即该复合物中检测接头的控制性突出端特异性部分可用于进一步与报道试剂杂交)。

夹心检测方法的其它许多变化是本领域技术人员所知道的。通过这些方法可在有利实现结合或其它稳定性相互反应的条件下，将靶分子与靶特异性报道分子一起培育，或将靶/检测接头复合物与报道试剂一起培育，并进行常规检测(见上)。例如，可在约 15℃ 至 45℃ (宜在室温上下)培育荧光寡核苷酸报道分子(浓度约 10nM-1μM 或以上，优选约 30nM 以 6XSSPE-T 或其它缓冲液配制)和结合的靶分子约 15 分钟至 2 小时或以上(优选约 30-60 分钟)。培育后，可任选地处理样品(如洗涤)去除未结合的靶特异性报道剂，所用的处理条件凭经验确定，应能保留特异性反应物完整，但去除非特异性结合物质。例如，可在与用于实现靶/报道物结合的条件相似或比其更严谨的条件下洗涤样品 1-10 次或以上。

用靶特异性报道剂寻靶对初步杂交反应可提供另一层特异性，例如，当靶特异性报道剂寻靶核酸酶序列的不同部位而非探针寡核苷酸时，或探针和报道剂抗体识别靶抗原的不同表位时。另外，用靶特异性报道剂寻靶可能能够“调谐”反应的灵敏度。例如，若某靶 mRNA 是低水平表达的相关表达模式的一部分，可通过使结合的靶与几个(约 2-5 个或以上)靶特异寡核苷酸报道剂杂交，每个与该靶 mRNA 的不同部分特异性杂交，来增强信号水平(信号放大)。

检测两种独立标记的能力得以在 MAPS 试验中增加控制类型。为具体锚位点(图 7 显示 3 个典型的锚位点, 每个含有多个基本相同的锚(A、B 和 C))设计的某些(约 10-100%)接头可具有附着于一端的一个标记(如荧光剂)。例如, 可将罗丹明或 Cy5 荧光剂连接在该接头的 5'端。这种修饰后的接头称为“对照接头”。接头和对照接头的混合物与锚结合后, 将含有靶分子的样品与产生的探针阵列一起培育, 可利用携带了不同荧光剂(如荧光素或另一可检测标记如化学发光剂)的靶特异性报道剂(或可用荧光剂或其它可检测标记直接标记靶分子)并可确定两种信号的比例。对照接头的存在允许校准测定区内和之间功能性(如能与接头反应)锚的数目(即测定此阵列各位点结合靶分子的容量, 目的是使信号标准化), 作为定量结合的靶分子的基础, 帮助定位锚位点和/或提供一阳性对照, 如当样品缺乏靶分子而致没有信号时。本发明一实施例中, 也可采用两种不同的标基(如荧光团)来检测两群不同的靶分子, 然而, 通过空间分辨信号识别靶分子存在的能力得以采用一种标记检测不同的靶分子。

独立检测标记(如能发射可鉴别波长的荧光素标记, 如荧光素、罗丹明或不同的高转化磷)能给本发明方法添加灵活性。例如, 可用其自身的独特可检测标记直接或间接标记两个或多个靶分子的每一个, 除鉴定表面上靶分子的定位或凭借靶分子所定位珠的大小鉴定靶分子外, 这得以根据对标记(如发射颜色)的特异性特征检测靶分子。本发明另一实施例中可分别测定某区域中一个位点的多个靶分子。例如可检测含一组(基本上相同的)锚的某位点中的两个或多个(如 2. 3. 4. 5. 6 或以上)靶分子, 即可采用一组接头, 各接头具有对相同锚特异的锚特异性部分和对不同靶分子特异的靶特异性部分。如果采用一组(例如 4 个)接头四个接头均可结合一位点上锚的成员, 则 4 个不同的靶分子得以在该位点上结合起来, 如果这些靶分子每一个都用一不同的可鉴别标记物(直接或间接)标记, 研究者可确定该位点中存在四个靶分子的每一个。因此, 一区域中的 5 个锚(一组锚)的阵列可用于上述情况来检测多达 20 个不同的靶分子。图 24 和 25 说明了些种试验。类似地, 在固体表面如珠或流通装置上一位点内均匀分布或以所需方式分布着一种锚时可分别检测多个, 例如 84 个或更多的靶分子, 珠的大小或分散情况等其它方面可用于提供关于靶分子身份或靶分子组的信息。

具有不同靶特异性的多个接头(约 2-50 个或以上)与所述位点中的锚(或是一组基本上相同的锚或一“混合位点”)的结合, 本文有时称为“混合接头”, 它形成了本发明其它实施例的基础, 将会为本领域技术人员所理解。例如在所述位点中锚可

结合于对多个不同保护片段有特异性的接头混合物,各接头对应于(特异于)感兴趣的核酸(如 mRNA)的不同部分。一位点存在多个不同的接头使得能大大提高检测样品中低含量感兴趣的靶分子(如 mRNA)的灵敏度。

可设计各位点使对应于 mRNA 不同部分的接头数目与样品中 mRNA 含量成反比(以经验确定方式)。例如,若在初步实验中发现样品中感兴趣 mRNA 的量大大超过第两种感兴趣 mRNA,可调整对应于此两种 mRNA 不同部分的接头相对数目,以使对应于各 mRNA 的信号相对强度基本上相同。即可调整信号强度使对应于第一种 mRNA 的信号不超过对应于第两种 mRNA 的信号。以上方式可调整试验使其能同时测定样品中含量大不相同的多种 mRNA,平衡对应于各 mRNA 的信号强度。

10 在本发明另一实施例中,如上所述的位点可含有多个无关或不同靶分子或保护片段的特异性接头,使得用一个锚阵列可检测数目大大增加的靶分子或保护片段。例如,350 个锚阵列的每个点含有 10 种不同靶分子的特异性接头,那么此阵列可用于检测多达 3500 种靶分子。实际上这种安排使我们可将能检测低密度靶分子的阵列转变成能检测高密度靶分子的阵列。

15 用本申请中所述的检测方法可顺次或同时检测一位点中结合的多个分子(如保护片段)“检测接头”和“报道试剂”的讨论见以上关于复合性夹心型检测方法章节。在一实施例中用第一套检测系统(如检测接头/报道试剂或其特异性检测探针)检测所述位点的第一靶分子(如保护片段),然后用常规方法(如提高 PH 以灭活含有新产生化学发生信号的酶的报道试剂)去除或灭活第一套检测接头/报道试剂或探
20 针,并用对同一位点第两种靶分子有特异性的第二套检测接头/报道试剂或检测探针检测第两种靶分子,按需要进行多轮检测。在另一实施例中,将第一套检测接头/报道试剂或检测探针加入以上组合物中,但不去除或灭活,然后加入第二套检测接头/报道试剂或检测探针。此例中,通过减去对应于第一靶分子的信号量可测出对应于第二靶分子的信号量。另一实施例中,将第一和第二套检测接头/报道试剂
25 或检测探针基本上同时加入以上组合物中,用本文所述区别性检测标记分别检测。本文所述任一检测方法中,检测接头可含有针对相同或不同报道试剂的特异性部分。例如,若 4 种靶分子结合于某所述位点中的诸接头,4 种靶分子各自的特异性检测接头可以各含有针对某特异性报道试剂的特异性部分。因而,如上所述用 4 种不同的报道试剂,当含有的 4 种检测接头与诸靶分子杂交后,诸靶分子即可依次
30 或同时检测出来。其它检测方法及上述方法的组合本领域技术人员将会明白。

当然“混合接头”对于含一个(非重复性)区域的表面也有其优点。

本发明另一实施例中，感兴趣的靶分子的特异性“锚”不与接头结合，直接与靶分子结合。该靶分子进而可任选地与检测接头或与检测探针反应。

靶分子不论标记的或未标记的可用本领域各种常规方法检测(例如见 Fodor 等(1996)，美国专利 5,605,798；Pirrung 等(1997)，美国专利 5,143,854；Koster(1997)，美国专利 5,605,798；Hollis 等(1997)，美国专利 5,653,939；Heller(1996)，美国专利 5,565,322；Eggers 等(1997)，美国专利 5,670,322；Lipshutz 等(1995)，*Biotechniques* 19: 442-447；Southern(1996)，*Trends in Genetics* 12: 110-115)。检测方法包括酶法检测、比色法、SPA 放射图象、质谱、电方法、吸光度或冷发光检测(包括化学发光或电发光)和采用显微颗粒作标记产生的光散射检测。另外，可采用电荷偶合装置(CCD)或荧光显微镜(如扫描或共聚焦荧光显微镜)或扫描系统 CCD 阵列或光电倍增管或用阵列为基础的检测技术(如可测出测定区每 10 微米的表面电势或如果分辨率足够高可采用表面等离子体共振)或者，一阵列可含有一标记(如一对能量转移探针如荧光素和罗丹明之一)，该标记可通过能量转移给接头、靶分子或报道剂上的标记(或受修饰)而检测出。在荧光检测体系中有荧光强度，荧光(Fp)时间分辨荧光、荧光共振能量转移和均匀性时间释放荧光(HTRF)等种类。通过模式识别(对于每种特异性标记的靶分子通过其相对于其它点或线的位置发现它的相应点或线)，然后标记物强度的定量检测可实现重复性棒状密码样模式的分析。可常规生产和/或商品化购得用于分析一维或二维阵列的棒状密码识别装置和计算机软件(例如见 Rava 等(1996)，美国专利 5,545,531)。

可用于检测的另一方法是 2-光子荧光，包括结合于阵列表面组分的内原性或偶联荧光色素产生的荧光，通过紧密结合于阵列表面，例如紧密并置于基上形成阵列的基质，或紧密并置于错分子或接头中包含的其它试剂或掺入该结合的复合体中而增强。其它荧光方法或利用包括终身荧光、偏振、能量转移等。例如，这类方法允许同时检测和区分同一位点内的多种靶分子在某些情况下区别结合标记物和未结合标记物，不需要洗去阵列中未结合的标记物，因而有利于测定此阵列的迅速可逆性或弱相互反应。

制备和使用本发明阵列的方法，包括制备本文所述的表面或区域合成或纯化及附加或装配例如本文所述锚、接头、探针和检测探针等物质，以及检测和分析本文所述被标记的物质，这是熟知和常规技术。除以上引用参数文献公开的方法外，可参见 Affymax、Affymetrix、Nanogen、Protogene、Spectragen、Millipore 和 Beckman 的专利(本发明所用的产品可从他们获得)分子生物学和蛋白质科学的标准教课书，

包括以上引用的和 cozette 等(1991), 美国专利 5,063,081; Southern(1996), 生物技术的目前观点(Current Opinion in Biotechnology), 7;85-88;Chee 等(1996), Science. 274; 610-614 和 Foder 等(1993), Nature. 364; 555-556。

5 附图简述

图 1 说明寡核苷酸的设计方案, 其中有接头 1 含有针对锚 1 的特异性部分和针对靶分子 mRNA1 的另一特异性部分, 其中标记的检测探针 1 特异性针对靶 mRNA1 的某序列, 此序列不同于此靶特异性部分的序列。

图 2 说明含有 15 个测定区的表面, 每个测定区含 6 种寡核苷酸锚组成的阵列。

10 图 3 说明受体结合试验接头的设计, 其中接头的锚特异性部分通过生物素链霉亲和素分子与探针部分(受体蛋白质)相连, 该受体的特异性配体用荧光标记分子标记。B 为生物素, SA 为链霉亲和素, Rec; 受体蛋白, 配体: 该受体的天然或合成配体。*结合于配体的荧光标记分子。

图 4 说明含有 21 个测定区的表面, 各区再细分为 16 个亚区

15 图 5a、5b 和 5c 说明图 4 所示表面所组装成的三片。

图 6 为二测定区, 每区含一线性探针阵列(或锚阵列)形式为棒状密码。

图 7 图解说明含 3 种锚(A、B 和 C)的一测定区, 每种锚有多个拷贝(“组”)每组锚的位置称为—“位点”。

图 8 说明在 MAPS 板上测定特异性逆转录酶产生的 cDNA 阵列。

20 图 9 说明采用核酸酶保护程序的试验(NPA-MAPS 试验)。制备细胞或组织的 RNA 样品为细波形线。在 RNA 样品中加入一组多核苷酸保护片段, 绘制成粗黑色和淡色线。保护片段的黑色 section 部分代表与特异性 RNA 靶分子互补并与其杂交的区段。淡色部分代表突出端部分二与该互补序列毗邻但不与靶 RNA 互补序列。过量加入该保护片段, 所有存在的靶分子与保护片段杂交后, 用适当的核酸酶混合物处理样品, 并用化学处理破坏不想要的未杂交 RNA 和未杂交多核苷酸。例如 S1 核酸酶可破坏
25 单链 DNA。因此过量的保护片段被水解因为是结合保护片段的突出端未杂交部分。加入核糖核酸酶(包括核糖核酸酶 H)或在碱液中加热样品可水解 RNA。剩下的是已切下的保护片段的集合物, 其反映了样品中曾经存在过多少各种靶 RNA。用 MAPS 杂交试验测定剩下的保护片段。

30 图 10 说明 MAPS 试验中的杂交特异性。

图 11 说明锚与接头结合的动力学。

图 12 说明两种寡核苷酸靶分子的 MAPS 试验。

图 13 说明灵敏度转移的定量测定。

图 14 说明 4 种接头/锚组合的解链温度测定。

图 15 说明采用 NPA-MAPS 的 mRNA 试验

5 图 16 说明采用 NPA-MAPS 的稀释曲线。

图 17 说明检测含磷酸酪氨酸残基肽的

图 18 说明绘制 EST 图谱试验的第一步：将对应于 EST 的接头装配绘制在 MAPS 板基因锚阵列上。附着在微滴板 16 孔各孔表面的接头会有 16 种不同的寡核苷酸探针排成 4×4 矩阵，第一位点有与第一 EST 序列某部分互补的寡核苷酸 1。对待测的
10 16 种 EST 也如此。

将从基因产生的 cDNA 或 mRNA 获得的 EST 加入所有 16 孔中，在适当条件下使之杂交。因此，含 16 种 EST 序列之一的 cDNA 或 mRNA 将在安置有其互补探针的位点装配。

图 19 说明绘制 EST 图试验的后续步骤：在 MAPS 板中加入探针寡核苷酸，此板
15 各孔接受对应于一种作图的 EST 的检测寡核苷酸。如用荧光成像作为检测方法，各检测寡核苷酸与检测所用分子如荧光素交联。各检测寡核苷酸与一种 EST 互补，但与 EST 一特异性探针不同，故与一种 EST 互补的探针和检测寡核苷酸二者可同时结合。洗涤后，按图中编号各孔加入一检测寡核苷酸，即将含有与第一种 EST 互补序列的检测寡核苷酸加入第一孔，如此等等。

20 图 20a 和 b 说明绘制图 18 和图 19 所示 EST 图试验的结果。检测寡核苷酸杂交后，用适当的严谨性条件洗涤，用 CCD-荧光摄影仪拍摄滴板的 16 孔。图 20a 显示程式化后的结果。预计各 EST-特异性检测寡核苷酸应标记受对应的 EST 特异性探针抑制的 mRNA 或 cDNA。例如探针 5 装配了该位点中含第五种 EST 序列的 cDNA 或 mRNA，故第 5 种检测寡核苷酸也应与同一位点中的 cDNA 或 mRNA 杂交。这是这些程
25 式化数据与各检测寡核苷酸标记相匹配探针的情况。此外，前三种检测寡核苷酸标记受前三种探针抑制的 cDNA 或 mRNA，显示这些序列位于同一基因。与此相似，最后 5 种 EST 看来是相连的，图 20b 提供了从这些数据分派的连接。

图 21 说明图 18-20 所示探针，检测寡核苷酸和 EST#1.2 和 6 的关系。

图 22 说明一高通量试验。

30 图 23 说明制备扩增靶分子的方法。

图 24 说明采用检测接头和报道试剂的试验。

图 25 说明多重荧光剂的用途。

图 26 说明一高通量试验

说明 THP-1 细胞基因与两个样品细胞的空间安排(选自图 26)。

图 28 说明采用信号弱化的试验。

- 5 图 29 说明在同一孔, 例如基因组 DNA 作为标准化对照的孔中, 测定相同样品的基因组 DNA 和表达的 RNA 试验。左图说明单测定 DNA, 右图说明同时测定 DNA 和 GAPDH、RNA(在阵列的各角落中测定)。

图 30 和 31 说明测定表达的 SNP。

图 32-35 说明试验的灵敏度和重复性。

- 10 图 36 说明本发明包括的一些试验构型的类型。

图 37 说明用 PCR 扩增核酸酶保护片段。

图 38 说明连接酶扩增核酸酶保护片段。

图 39 说明核酸酶保护扩增核酸酶保护片段。

图 40 和 41 描述同时测定同一样品中的蛋白质和 mRNA 的试验。

- 15 图 42 说明用聚合酶扩增核酸酶保护片段, 说明用于检测 SNP。

实施例

实施例 1 杂交的特异性(见图 10)

- 用喷墨分配器生产出通用 MAPS 板, Pixus 系统(Cartesian Technologies Inc
20 Irvine, CA)在微滴板各孔中形成相同的 DNA 坐标方格。所有寡核苷酸购自
Biosource International(Camarillo, CA)对于 MAPS 板, 以如 Key 所示的模式(图
左侧)在每孔中分配 7 种不同的寡核苷酸锚。各寡核苷酸以含 500mM 磷酸钠 PH8.5
和 1mMEDTA 的 2 μ M 溶液的 10 纳升液滴分配至二点到 DNA 结合板(Corning Costar)
孔中并使干燥。结合后, 用 50mM Tris PH8.1 封闭诸孔, 然后用含 0.1%SDS 的 5 \times
25 SSP 缓冲液洗去未共价结合于表面的寡核苷酸。

将荧光标记接头寡核苷酸加入洗涤的板中, 使其在含 0.1% Triton X-100 的 6 \times SSPE 中室温杂交 30 分钟。这是接头结合的一种优选方法, 接头寡核苷酸合成时
Cy5 衍生化处理, 有 25 对碱基的区段与特异性锚定寡核苷酸互补。七套锚和接头的
序列如下(均为 5'到 3'):

- 30 #1 锚*: SEQ ID:1
TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC

接头**: SEQ ID:2
GTCGTTTCCATCTTGGAGTCATAGGATACTGAGTGGACGCCGTCCGGTCCTCACGTGGA
RNA 模拟物(小鼠 C-juu): SEQ ID:3
CTATGACTGCAAAGATGGAAACGACGATACTGAGTTGGACCTAACATTTCGATCTCATTCA
5 检测寡核苷酸***: SEQ ID:4
TGAATGAGATCGAATGTTAGGTCCA

#2 锚*: SEQ ID:5
CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC
10 接头**: SEQ ID:6
CTAGGCTGAAGTGTGGCTGGAGTCTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTG
RNA 模拟物(小鼠 MIP-2): SEQ ID:7
AGACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGGATACTGAGTCTGAACAAAGGCAAGGCTAACTGAC
检测寡核苷酸***: SEQ ID:8
15 GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG

#3 锚*: SEQ ID:9
GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTTCAG
接头**: SEQ ID:10
20 ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG
RNA 模拟物(小鼠 GAPDH): SEQ ID:11
CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGATACTGAGTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC
检测寡核苷酸***: SEQ ID:12
GTCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC
25

#4 锚*: SEQ ID:13
GAACCGCTCGCGTGTCTACAGCCA
接头**: SEQ ID:14
CTACCGAGCAAACCTGGAAATGAAATTGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTC
30 RNA 模拟物(小鼠 L32 蛋白): SEQ ID:15
ATTTCAATTTCCAGTTTGCTCGGTAGGATACTGAGTGGAGTCACCAATCCCAACGCCAGGCT

检测寡核苷酸***: SEQ ID:16

AGCCTGGCGTTGGGATTGGTGACTC

#5 锚*: SEQ ID:17

5 CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG

接头**: SEQ ID:18

CTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG

#6 锚*: SEQ ID:19

10 CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC

接头**: SEQ ID:20

GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG

#7 锚*: SEQ ID:21

15 GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG

接头**: SEQ ID:22

CGAAGAGATGCATAACGCGGCGCCG

*合成的锚通过 C12 臂以酰胺键结合在 5'端。

20 **合成的接头通过 Cy5 结合在 5'端。

**合成的检测寡核苷酸通过生物素结合在 5'端。

25 将一接头或接头混合物(如图中所示)成堆加入各孔中(标为“a11”是将所有 7 种接头的混合物回到该孔中)。培育和用 5×SSP 洗 3 次后用 Tundra 摄象机(IRI, St.Catherines Ontario)摄取图左部分所示的荧光图片。可见接头通过与其互补的锚特异性结合, 自身组装至该表面。

重复此过程除了每孔分配 8 种不同的锚外, 并且接头随后优先与其结合, 在 24、96、384、864 或 1536 孔板的每孔中用 36, 64 种等不同的锚重复整个过程。

30 实施例 2 结合动力学(见图 11)

显示不同浓度 Cy5 衍生接头 1 号与其固定的互补锚的杂交率。如图 1 制备通用

MAPS 板, 除每孔有 4 个点结合锚 1 外。室温在含 0.1%吐温 20 的 5×SSP 中培育, 用 5×SSP 洗孔三次, 测定结合的荧光。用 Tundra 摄象机拍摄此板的荧光照片, 扣除背景计算出各孔中每个点的综合荧光强度。以一式二份二个孔每孔中 4 个点综合强度的平均值和标准差作图。

5

实施例 3 荧光接头

用一种寡核苷酸锚按照上述方法点在每孔中一个点(上两排孔), 4 个点(中间 4 排孔)或 16 个点(下两排孔)产生通用 MAPS 板。通过实施例 1 所述优选方法使每孔结合互补的荧光标记接头。清洗用 Tundra 拍摄的该板荧光照片后, 各点的荧光量
10 报告为有多少功能性接头已与靶分子杂交。重复点测到的信号量是高度重复性的。

实施例 4 结合曲线

在实施例 3 所述制备的板中加入不同浓度的靶寡核苷酸, 已结合的接头含有与该靶分子某部分互补的 25 聚序列。靶分子溶于含 0.05%SDS 的 5×SSC 中总体积为
15 30 或 100 微升。给此板加盖 50℃培育过夜。当靶分子与固定的接头杂交后, 用化学发光优选方法显影靶分子。加入 30nM 的含有与该靶分子不同部分(并非与接头相同部分互补)互补的 25 聚序列生物素化检测寡核苷酸, 可在洗去过量的未结合靶分子之后 30 分钟加入生物素化检测寡核苷酸, 或可与靶分子一起加入杂交过夜。检测寡核苷酸结合后用 5×SSC 洗表面二次, 用含 0.1%吐温 20 和 1%PEG(SSPTP)的 1
20 ×SSP 洗一次, 加入以 SSPTP 配的 1: 50.000 稀释的 250 μg/ml 辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素(HRP: SA 购自 Pierce. Rockford, Ill)室温 5 小时。用 SSPTP 洗各孔 4 次, 用 Super Signal Ultra reagent(Pierce)洗一次, 然后培育。5 分钟后用 Tundra 摄象机收集发光照片, 例如可积累 CCD 阵列中的图象 5 分钟, 某些孔内靶分子浓度低至 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 水平也可显现。靶浓度约 10^{-10}M 时信号量通常达到饱和。
25 重复点测得的信号量有高度重复性。

实施例 5 两种寡核苷酸试验(见图 12)

显示采用上述优选方案时两种不同靶寡核苷酸的 MAPS 杂交试验结合曲线用 4 种不同寡核苷酸锚在每孔中各点 4 处制备用 MAPS 板。对于第二和第四号锚, 将其
30 互补接头寡核苷酸自身装配到所述表面上。以所示浓度每孔 40 微升加入两种靶分子, 50℃培育过夜, 通过结合各靶分子特异性生物素化检测寡核苷酸, 然后加入

HRP: SA 并化学发光摄影显现各靶分子结合的量。下图中测定了显影强度。采用 Tundra Imager 包中软件扫描上图所示箭头之间线的显影强度。最低浓度 1.1pM 的靶分子, 扫描图象显示各点有很明确的高斯(gaussian)峰, 而最右侧样品靶浓度为零未见可辨别的背景峰。

5

实施例 6 灵敏度迁移(见图 13)

可采用 MAPS 杂交试验通过使一组寡核苷酸结合于表面并标记它们来测定其浓度。此试验对于中等或低浓度寡核苷酸工作良好, 此例中可鉴别两种样品, 因为如一样品含更多寡核苷酸将结合得更多。另一方面, 如果寻靶寡核苷酸浓度对该表面而言已饱和(如高到足以占据全部结合位点)那么浓度再高也不可结合得更多, 以至不能测定其含量。然而, 可通过加入未标记的竞争性配体来迁移靶分子的结合曲线。

获得的四种不同靶寡核苷酸结合数据均在 3nM 浓度时饱和了该表面(达到最高结合)。通过向所有孔加入未标记的竞争性靶分子, 标记的寡核苷酸结合曲线发生迁移, 以至浓度较高时结合较少, 从而提高达到饱和的水平。例如在靶分子 1 和 3 中, 但不在 2 和 4 中加入竞争性寡核苷酸, 只对靶分子 1 和 3 迁移了此试验的灵敏度。用这种方法可在一个试验孔中检测更广泛不同浓度的靶寡核苷酸, 如果已预知寡核苷酸的相对量。

可如上所述确定靶寡核苷酸之一的结合数据。图 13 显示该试验中加入竞争性寡核苷酸使结合曲线迁移可用于测定较高浓度的靶分子。

20

实施例 7 四种探针的解链温度(见图 14)

将随温度升高 MAPS 试验测定的 4 种不同荧光标记接头寡核苷酸与寡核苷酸锚特异性杂交的量绘制成图。先使 4 种寡核苷酸以 300nM 浓度 50℃杂交 1 小时, 然后用无探针的 SSC 洗涤诸孔, 如上所述通过荧光法(50℃点)测定结合量, 再 55℃培育此表面 30 分钟, 测定结合的荧光, 如此对所有温度进行测定。

25

实施例 8 检测方法

直接比较了两种检测方法。在含有 4 种寡核苷酸锚附着的每孔 4 个点的 MAPS 板中每孔加入两种寡核苷酸, 此两种寡核苷酸均含有共价结合的 Cy5 部分或含有生物素基团。按综述所述进行表面荧光测定和荧光接头测定。按 MAPS 试验所述利用随后加入的 HRP: SA 和化学发光底物进行化学发光测定。产生的信号数量级大约相

30

同。然后, 含有各孔分开的微滴板的几何形态, 偶尔产生的液体气泡或液体的混浊, 表面荧光摄像中的反射光都可能干扰数据的解释。

实施例 9 化学发光产品

- 5 作为 MAPS 试验的检测程序, 应比较可得到的作为辣根过氧化物酶化学发光底物的两种产品。按实施例 8 准备 MAPS 板与生物素化接头寡核苷酸一起培育, 加入碱性磷酸酶偶联的链霉亲和素(A/KPhos:SA)或 HRP: SA 洗涤后, 诸孔加入 CDP-Star(Tropix)和 A/KPhos:SA 或 ECL 和 HRP: SA。按制造商提议用 SA 衍生的酶和底物标记, 用于 Western 印迹的标记。这两种(及其它可得到的)底物均可用于评估与
- 10 MAPS 板杂交的寡核苷酸。

实施例 10 0.6mm 分辨率

- 准备每孔含有 4 种不同的寡核苷酸锚每孔各 1 个点, 节距(中心之间的距离)0.6mm 的 MAPS 板, 测定当前 MAPS 试验系统的分辨率。如上所述使 Cy5 衍生接
- 15 头或生物素化接头杂交并检测和扫描, 对于表面荧光测定分辨率较高(节距可能要减少)对于化学发光检测方法, 不能完全分开相邻的点。也许计算机去卷积可明确分辨这种相隔的单个峰。

实施例 11 测定核酸酶保护

- 20 在测定核酸酶保护方案的杂交和核酸酶处理最佳条件的试验中, 采用 Ambion(Austin Texas)的试剂盒提供条件, 缓冲剂和酶。以三种缓冲液之一制备 8 个样品。Hyb Buff1 是 100%杂交缓冲液(Ambion); Hyb Buff2 是 75%杂交缓冲液和 25%杂交稀释液(Ambion); Hyb Buff3 为各 50%; 合成含 60 个残基与测试 mRNA 互补的 70 寡核苷酸(Biosource International Camarillo CA)并按 Ambion 的
- 25 Psoralen-biotin 标记法提出的方案用 Psoralen 荧光素(Schleicher and Schuell Keane, NH)标记。简言之, 将保护片段以 TE 缓冲液(10mM Tris, 1mM EDTA PH8)稀释至 50 μ g/ml, 取 20 μ l 煮沸 10 分钟, 置冰水中快速冷却, 加入 4 微升用 DMF 配的 130 μ g/ml Psoralen 一荧光素, 用手持长波长 UV 光源照射样品 90°C45 分钟用饱和丁醇抽提去除游离的 Psoralen 一荧光素。所用 mRNA 是 GAPDH 反义 mRNA, 用
- 30 T7 启动子和 MaxiScript 试剂盒(Ambion)从反义质粒(pTR1-GAPPH-小鼠反义控制模板, Ambion)制备。分别合成 60 聚互补部分作为短保护片段并类似地标记。保护片

段的序列如下：

全长保护片段，SEQ ID:23

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTC
TAA

5 短保护片段，SEQ ID:24

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTT

混合 20nM 的保护片段和 60nM 的 GAPDHmRNA，最终体积 10 微升，22℃或 37℃
杂交二小时，杂交后按制造商说明加入 200 微升核酸酶混合物(Ambion 核酸酶保护
试剂盒 1: 200 核酸酶混合物稀释液)在相同温度下再培育 30 分钟，加入杂交抑制
10 液(Ambion)停止水解，乙醇沉淀寡核苷酸并洗涤。加入 10 微升 1X 凝胶加样缓冲
液(Ambion)，在 15%TEB 尿素凝胶上分离。使凝胶在流动缓冲液中转动 30 分钟。
放在塑料板上，用能选择激发和发射光波长的荧光滤板 Tundra 摄像机拍照。在 CCD
阵列上积累图象 2 分钟。最佳条件是 37℃在 Hyb Buff2 中或 22℃在 Hyb Buff3 中培
育样品。这些样品中没有残留可测到的全长保护片段，但可见数量明显的大小与短
15 保护片段看来相同的全长保护片段的一部分。

实施例 12 NPA-MAPSR mRNA 试验(见图 15)

采用完整的 NPA-MAPS 方案，杂交和核酸酶处理条件与实施例 11 所述相同，测
试了 10 份样品，均含有相同量的 70 聚寡核苷酸保护片段和不同量的 GAPDH mRNA。
20 将 10 微升以 50%杂交缓冲液在含 0.08mg/ml 酵母菌 RNA(Ambion)的 50%稀释缓冲液
配的杂交样品加热至 90℃6 分钟，简单离心后加热至 70℃5 分钟，让其冷却至 19
℃，培育 19 小时。取各样品 60 微升等份作 MAPS 试验。样品加入 2 微升 10NNaOH
和 2 微升 0.5MEDTA 加热至 90℃15℃分钟，37℃15 分钟，静置室温 20 分钟。然后
用 2 微升 10MHC1 和 12 微升含 2MHEPES PH7.5 的 20×SSC 中和样品，加入 20nM
25 该保护的特异性生物素化检测寡核苷酸与 1 微升 10%SDS。混合样品加热至 80℃5
分钟。向 MAPS 板二孔中移入各样的 35 微升二等份(每份样品分成二份在 MAPS 板上
一式二份测定)。按标准 MAPS 方案，采用针对已附着保护片段的特异性自身装配的
Cy5 衍生接头制备此板。给 MAPS 板加盖，50℃培育过夜，如前所述进行检测和发
光测定。最后一个样品试验期间不加核酸酶作为对照，以显示保护片段单独如何用
30 MAPS 检测。此图下部分提供了上排孔的扫描强度(通过图象分析)样品中存在的
GAPDH mRNA 量(各样品等份加入 MAPS 板后一式二份孔中的量)列于图中。

用于 MAPS 板测定的寡核苷酸如下：

锚*：SEQ ID:25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

接头**：SEQ ID:26

5 CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCCTCCACACGCTCGACCGGCG

保护片段(与 GAPDH 的小鼠反义的 mRNA 互补)：SEQ ID:27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTG

TAA

检测寡核苷酸***5'端标记为生物素：SEQ ID:28

10 AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

*合成的锚通过 C12 臂以酰胺键结合在 5'端。

**合成的接头通过 Cy5 结合在 5'端。

**合成的检测寡核苷酸通过生物素结合在 5'端。

15

实施例 13 稀释曲线 NPA-MAPS (见图 16)

以数量表示实施例 12 和图 15 中所示资料并绘制成稀释曲线。将每种 mRNA 浓度一式二份两孔的所有 8 个点的平均值和标准差绘成图。

$$\text{Fraction Bound} = \text{Max Bound} * 1 / (1 + \text{IC}_{50} / L)$$

20 其中 Max Bound 是饱和时的最大结合，Fraction Bound 是配体浓度时的结合时，L 和 IC_{50} 是 Fraction Bound 为 Max Bound 之一半时的配体浓度。图中以红点表示曲线， IC_{50} 的最佳拟合值见图中标记为 $\text{IC}_{50}=4.2$ 。

实施例 14 小鼠肝脏 RNA 总提取物中 GAPDH mRNA 的 NPA-MAPS 试验

25 用 NPA-MAPS 试验测定了小鼠 RNA 总提取物中的 GAPDH mRNA，并制作稀释曲线。用 Qiagen 试剂盒制备小鼠肝脏的总 RNA，以含 0.5M 醋酸镁的 70%EtOH 沉淀 RNA，并重悬于含 0.05%SDS 和 1-8nM 保护片段的 10 微升 $5 \times \text{SSC}$ 中，加入的保护片段是长 70 个碱基，其中 60 个碱基与小鼠 GAPDH 互补的寡核苷酸，采用与小鼠 GAPDH mRNA 互补的片段(保护片段)或用此序列的互补片段作为阴性对照(反义片段)。

30 加热含保护片段的 RNA 样品至 90°C 5 分钟，然后使样品至 70°C 并慢慢冷却至室温(Promega)，置 19°C 30 分钟，加入 1.6 微升 10N NaOH 和 2.7 微升 0.5M EDTA 中

- 止反应。加热样品至 90℃15 分钟，然后 37℃15 分钟，以变性破坏 RNA，用 1.6 微升 10M HCl 中和，在含 0.05%SDS 并加有 200mM HEPES PH7.5r 5×SSC(加入 30nM 生物素化检测寡核苷酸)中 MAPS 板上培育过夜。如上所述洗涤并用 SA-HRP 显色。信号量的减少与小鼠 RNA 量(各样品含 500. 170. 50. 5 或 0.5 μg 的小鼠总 RNA)的减少相平行。试验包括的两个对照品中没加 S1 核酸酶。只观察到互补性保护片段的信号。

所用寡核苷酸为：

反义对照(与实施例 12 相同)

锚*：SEQ ID:25

10 CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

接头**：SEQ ID:26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

保护片段(与 GAPDH 的小鼠反义的 mRNA 互补)：SEQ ID:27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTC

15 TAA

检测寡核苷酸***5'端标记为生物素：SEQ ID:28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

有义 GAPDH mRNA 样品

20 锚*：SEQ ID:25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

接头**：SEQ ID:29

ATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

保护片段(与 GAPDH 的小鼠反义 mRNA 互补)：SEQ ID:30

25 AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCATTGCTGACAATCTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGCTTGTC

TAA

检测寡核苷酸***：SEQ ID:31

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAG

30 *合成的锚通过 C12 臂以酰胺键结合在 5'端。

**合成的接头通过 Cy5 结合在 5'端。

**合成的检测寡核苷酸通过生物素结合在 5'端。

实施例 15 核酸保护 MAPS 试验与对照

提取小鼠肝脏 mRNA，按实施例 14 所述进行核酸酶保护，不同的是 GAPDH 特异性保护片段含有与小鼠 GAPDH 互补的 60 个核苷酸，该片段 3'端有 15 个“突出的”核苷酸与靶分子不互补。杂交和核酸酶消化后，剩下的保护片段如实施例 14 所示与 MAPS 板杂交，例外的是采用两种不同寡核苷酸检测片段检测固定的保护片段。一个检测片段与该保护片段的 GAPDH 特异性部分互补，另一对照片段与该保护片段的 15 个碱基突出部分互补。将各检测片段加到不同的重复样品(即不同孔中)上，两种检测片段可用相同的检测分子标记。在本实施例中两种片段用 HRP 标记。不加核酸酶，可观察到两种检测片段产生的信号。当核酸酶消化时，只能测到对应于 GAPDH 序列的信号。GAPDH 特异性信号的量比缺乏核酸酶消化时所见的量少，因为加入的保护片段相对于存在的 GAPDH mRNA 是过量的。这使得 GAPDH mRNA 的量被限制于保护性杂交，这样形成的双链杂交体量(因此保护片段的量受到保护不被核酸酶消化)可反映 mRNA 的量。当反应混合物中无 mRNA 时，加入核酸酶也不可能测到信号。以上发现证明如希望的那样该试验的杂交和消化步骤发生了。

当所述试验中加入了对应于各种靶分子的保护片段时，各保护片段可含有相同的 15 个碱基的突出部分，这得以用一种检测片段测定所有样品的残留突出物。

20 实施例 16 筛选能改变疾病状态相关基因表达的转录试验

采用人肿瘤衍生的细胞系，发现其此正常细胞以较高水平表达 30 种基因(即这 30 种基因比与正常细胞相比可表达更多 mRNA，然后表达更多该基因编码的蛋白质。转录试验通过测定每种基因产生多少 mRNA 而测定有多少基因被使用)。用 MAPS 板作核酸酶保护试验(NPA-MAPS)测定 8800 种化合物，观察在存在这些化合物时培养细胞能否降低 30 种相关基因中的某些基因表达而不影响 6 种正常(组成型“管家”)基因的表达。具有此作用的化合物可能用于进一步开发治疗这种肿瘤的药物。在 100 块 96 孔聚苯乙烯板的每一孔中加入 1 万-10 万个细胞，培养细胞 2 天直至细胞覆盖各孔表面。每块板有 8 孔不加化合物让细胞生长，其余 88 孔加入不同化合物测定其作用。一次用 100 块板，可测定或筛选 8800 种化合物。在存在化合物时培养细胞 24 小时，然后收获细胞用于试验。按照制备 96 孔板样品中 RNA(如按照 Qiagen RNeasy96 试剂盒)的说明书处理各板中的细胞。制得 RNA 后，用 NPA-MAPS

方法测定 36 种不同 mRNA 每一种的量, 包括 30 种相关基因和 6 种正常“管家”基因。各孔中加入 36 种 DNA 寡核苷酸保护片段, 各对应于一种感兴趣基因, 在选定的严谨条件下使其与它们的靶 mRNA 序列杂交。然后加入 S1 核酸酶以破坏过剩的未杂交 DNA, 并化学处理样品破坏 RNA。剩下的 36 种基因每一种的寡核苷酸保护片段与每份样品处理细胞中存在多少 mRNA 成比例。

通过每孔加入 36 种不同的接头寡核苷酸, 制备 100 块 96 也板, 每块板每孔中含有多个 36 种不同寡核苷酸锚组成的阵列。接头在每孔表面自身装配将该通用板转变成 MAPS 板, 其含有该 36 种寡核苷酸保护片段每一种的特异性探针。各接头具有针对 36 种锚之一的特异性部分和针对 36 种保护寡核苷酸之一某区段的特异性部分。将 100 块样品板每孔的寡核苷酸样品加入 100 块 MAPS 板的对应孔中。在选定的严谨条件下杂交后, 加入针对各靶分子结合有化学发光酶的检测寡核苷酸, 这样每孔各特异性点发出的光与样品中存在多少 mRNA 成比例。感兴趣的是显示相关基因数量减少但不影响 6 种管家基因的孔。对这些样品而言加入细胞的化合物可能是开发抗肿瘤药物的起点。

实施例 17 诱导型和组成型基因表达

基本上如实施例 14 所述, 制备未感染(对照)或感染腺病毒一小时后(感染的)的小鼠肝脏 RNA。每份样品用 60 微克肝 RNA, 一式二份准备。各试验孔含三套一式二份位点, 对应于上述三种基因, 各位点含有一寡核苷酸锚, 与一接头结合, 该接头含有与一保护片段互补的探针, 该保护片段对应于三种基因之一。基本上按图 12 所述进行核酸酶保护 MAPS 试验, 并收集图象和扫描。显示收集的原始图象资料和三种 mRNA 靶分子之一二孔的强度扫描。扫描线上的数字是每种情况的综合强度值和标准并(n=4)。未预料到管家基因 GAPDH 会改变, 显示感染样品中中等程序增加 1-3 倍, 但无统计学意义。M1P-2 和 C-jun 的转录分别提高了 4 和 6 倍。这些发现证明 M1-2P 和 C-jun 两种基因与对照组成型表达基因 GAPDH 相比较在对腺病毒感染的反应中表达增加。

实施例 18 筛选选择性抑制酪氨酸或丝氨酸激酶的化合物的酶试验(见图 17)

激酶是能使磷酸结合于蛋白质的酶。许多激酶已显示能刺激正常和肿瘤细胞的生长。因而可利用能抑制特异性激酶(但不是所有的激酶)的化合物来测试激酶是否参与了致病机制, 如果是, 该化合物可作为药物开发的起点。例如, 五种酪氨酸激

酶: src、Lck、fyn、Zap70 和 yes 参与了刺激细胞生长或调节炎症反应。各激酶的底物已部分得到鉴定如含有一个酪氨酸的短肽。某些激酶的底物特异性有所重叠, 因此, 不同激酶可能同等磷酸化某些肽, 但优先磷酸化其它肽。对于该项五种激酶, 选出的 36 种肽底物显示了特异性谱和特异性重叠。

- 5 采用 100 块 96 孔板, 每孔含 36 种通用性寡核苷酸锚。制备 36 种接头将该通用性寡核苷酸阵列(只有锚)转变成含肽底物的阵列。合成 36 种肽底物并将各肽通过酰胺键共价结合于含 5'氨基的一寡核苷酸。这些寡核苷酸含有能与锚特异性杂交的序列。将肽/寡核苷酸接头加和 MAPS 板的所有孔中使其身安装在孔表面上。

- 10 为了筛选, 各孔加入适当浓度的五种激酶(尽可能平衡底物磷酸化的速度)和 8800 种待测化合物之一。测定各化合物直接抑制分离的酶的能力。加入只结合酪氨酸已磷酸化的肽的标记的抗体来检测阵列中肽磷酸化的数量。感兴趣的是显示某些点但不是所有点上磷酸酪氨酸降低的孔。可进一步测定这些孔加入的化合物作为所测定的某些激酶的可能选择性抑制剂。

- 15 此试验方案见图 17 的上图。制备一种嵌合性接头分子, 该分子中与一种锚之一互补的 25 对碱基寡核苷酸与酪氨酸磷酸激酶的肽底物交联。该嵌合型寡核苷酸一肽底物可自身安装在寡核苷酸锚阵列上。用此激酶磷酸化该嵌合体的肽部分。使进行酶促反应后用结合了检测荧光团或酶的抗磷酸酪氨酸或抗磷酸丝氨酸抗体测定此肽磷酸化的量。

- 20 此试验的结果见下图, 采用同质双功能交联接头 DSS(Pierce)将寡核苷酸接头的 5'氨基结合于合成的含磷酸化酪氨酸的肽的 N 端。此肽序列的单字母为 TSEPQpYQPGENL(SEQ ID:32), 其中 pY 代表磷酸酪氨酸。直接用此嵌合体或先置于 PH14, 60 分钟以部分水解酪氨酸的磷酸基团。磷酸化或部分磷酸化的嵌合分子在所显示浓度自身安装在 MAPS 板中互补性锚上 1 小时。用含 0.3%BSA 的 SSPTP 洗涤和封闭诸孔后加入用 SSPTP 作 1:3000 稀释的偶联有 HRP 的抗磷酸酪氨酸抗体
- 25 (Upstate Biotechnology 的抗体 4G10.Lake Placid.NY)1 小时, 用化学发光底物 SuperSignal Blaze 检测结合抗体的量。将显示的图象在 CCD 阵列上积累 1 分钟。如预期那样, 发现结合于寡核苷酸一肽的磷酸量有差别。这种差别是测定用不同的可能抑制剂处理时如何活化一系列激酶的试验的基础。

- 30 **实施例 19 检测 SH2 功能域和磷酸肽之间相互反应的选择性抑制剂的结合试验**
SH2 功能域作用是某些生长调节蛋白质的停靠亚单位。此功能域能以不完全的

特异性结合含磷酸酪氨酸的蛋白质或肽。即某些磷酸酪氨酸肽能特异性结合一个或几个 SH2 蛋白,而其它能广泛结合多种 SH2 蛋白。

用于此试验的接头是共价结合于寡核苷酸的磷酸化肽。选择肽的能结合一组 SH2 蛋白的部分,此种接头可将通用 MAPS 板转变成含有该组 SH2 蛋白的特异性配体的板。制备含有这些配体的 100 块 96 孔 MAPS 板。分离这些蛋白质并用例如 Cy5 荧光分子标记。

为了筛选 SH2 功能域/磷酸肽相互反应的抑制剂在 100 块 96 孔 MAPS 板的每孔中加入该组标记的 SH2 蛋白,并且每孔中加入不同的待测化合物。检测每种化合物单独对 SH2 蛋白与其磷酸肽相互作用的影响。此试验是测定结合的 SH2 蛋白与结合于各表面的肽接头相结合时产生的荧光。对于显示某些点而不是所有点的荧光减少的孔,可进一步测试此孔中所加的化合物,是否可作为 SH2 停靠的推定选择性抑制剂。

实施例 20 高通量筛选(见图 22)

15 用高通量 MAPS 板显示了对一次实验 96 孔的信号检测,测定了 80 孔中 16 份重复样品与同一寡核苷酸的杂交。如图所示,1280 个杂交试验的重现性很高。最左和最右柜作为标准化该寡核苷酸不同浓度时所产生信号的对照。

以相似方式,每孔可检测 16 种不同的寡核苷酸并在此板的 80 个不同孔中重复此测定,当然每孔可测定更高数目的不同寡核苷酸或其它探针(如 100 种核苷酸探针),多块板可同时测定(如 100 块 96 孔微滴板)可对每份样品进行大量测定(如在后一情况时,约 100 种不同试验)可同时测定大量样品(如在后一情况时,约 96×100 或 9600 个不同样品)提供了非常高的处理量。

实施例 21 制备扩增的靶分子(见图 23)

25 通过在引物寡核苷酸的 5'端引入一化学修饰,使 PCR 引物(引物 1)结合于一固相载体(如珠或反应管)。此引物从 5'-3'含有该化学修饰,限制性酶切位点和与感兴趣的靶分子(如感兴趣 mRNA 的 cDNA 拷贝)互补的序列。作为 PCR 引物,采用结合的引物 1 加引物 2(从 5'-3'含有针对检测寡核苷酸的特异性序列和与靶分子而不是引物 1 的不同部分互补的序列)进行 PCR,扩增靶 DNA,PCR 扩增后洗涤扩增的靶 DNA 去除过量的反应物质,并用对引物 1 上限制性位点有特异性的限制性酶切割使靶 DNA 从固相载体上释放下来。扩增的引物也释放入液相中。可采用加热和/或化学

30

方法灭活限制性酶并使双链 DNA 产物变性。然后可使释放的单链 DNA 靶分子接触含有锚和/或接头的表面，并可用与引物 2 的特异性检测序列互补的检测寡核苷酸检测此靶分子

。

5 **实施例 22 制备扩增的靶分子**

通过在引物寡核苷酸的 5'端引入一化学修饰，使 PCR 引物(引物 1)结合于一固相载体(如珠或反应管)。此引物从 5'-3'含有该化学修饰，可被蛋白酶切断的肽序列和与感兴趣的靶分子(如感兴趣 mRNA 的 cDNA 拷贝)互补的序列。除了肽，任何其它可被特异性切断的元件也可使用。如实施例 21 所述，PCR 扩增后，变性和(任选)洗涤仍结合于固相载体的 PCR 产物，使其成为结合于载体上的单链分子。可切断此洗涤的结合分子并释放(如用适当的蛋白酶处理)下来，与含有锚和/或接头的表面接触。或者，使扩增的靶分子链释放，变性后，与含有锚和/或接头的表面接触。或者只扩增靶分子的一条链与接头接触(如杂交)，这样消除了与扩增靶分子的反向链竞争杂交，从而降低了本底。可设计出对扩增靶分子两条链之一或二者具有特异性的接头。

实施例 23 采用检测接头和报道试剂的试验(见图 24)

对含有感兴趣 mRNA 的样品进行核酸酶保护程序，用作保护片段的寡核苷酸含有靶特异部分和与该 mRNA 不互补的控制性突出端部分。核酸酶消化后，如需要可切下该控制性突出部分，见此图右侧说明，使产生的核酸酶保护片段与检测接头杂交，此接头含有靶特异部分和控制性突出端特异部分，此图左侧所示的试验中，检测接头的控制性突出端部分与保护片段剩余的控制性突出端序列杂交。在该试验以后的步骤中，一报道试剂(其含有能与该检测接头控制性突出端特异部分反应的部分)与此复合物相互反应。此图左侧所示试验中，此报道试剂与仍有的能进行杂交的检测接头控制性突出端特异部分杂交。依靠此报道试剂产生的信号可检测到此复合物。相反，此图右侧所示试验中，该报道试剂不能结合此复合物，因为基没有可杂交的互补序列，因此没有该复合物的相关信号。

本发明的许多试验中，报道试剂可与检测接头中的任何序列反应，不限于针对控制性突出端的特异性序列。

实施例 24 多重荧光团(见图 25)

图 25 显示含有五个位点 A-E 的某区域, 各位点含有基本上相同锚的 A-E 的不同组。与位点 A 处锚杂交的有 4 种不同类型的接头, 各含有对锚 A 的特异部分。然而, 各锚含有针对靶 1、2、3 或 4 的不同的靶特异部分。因此, 当靶分子与锚/接头复合物杂交后, 靶分子 1、2、3 或 4 就可能定位于位点 A 上。类似的, 四种不同的接头可与位点 B 杂交, 每接头含针对锚 B 的特异部分, 但其靶特异部分是针对靶分子 5、6、7 或 8 的以相似方式, 靶分子 9-12 可与位点 C 结合, 靶分子 13-16 与位点 D, 靶分子 17-20 与位点 E 结合。如用不同的独立的可检测荧光团, 如高转化磷直接或间接标记每种靶分子就可分别检测 5 个位点上的所有 20 种靶分子。

10 实施例 25 高通量方式的试验

此实施例中, 采用本发明的转录试验以为高通量筛选作准备的方式, 检测和定量基因表达模式的变化, 自动化进行该试验的所有步骤。不具体叙述常规洗涤步骤, 所有反应按本领域所知和/或本文所述常规程序进行。

在 96 孔 V 形底微滴孔板上培养, THP-1 单核细胞, 每孔 5 万或 15 万个细胞, 细胞不处理或用佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸(PMA)分化 48 小时, 然后用脂多糖(LPS)激活 4 小时。处理后以异硫氰酸胍裂解细胞, 冻存直至需要用结合生物素聚 dT 的链霉亲和素顺磁颗粒获得 mRNA。或者用三种试剂(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)抽提获得总 RNA。对含有 mRNA 或总 RNA 的样品进行核酸酶保护程序, 采用 13 种 60 聚单链寡核苷酸的混合物作为 DNA 保护片段, 这些单链寡核苷酸各自从 5'-3'含有: 针对感兴趣的 13 种靶分子(GAPDH, IL-1 TNF- α , 组织蛋白酶 G、COX-2、周期蛋白-2、波形蛋白、LD78- β 、HMG-17、骨桥蛋白、血小板球蛋白、血管紧张素或肌动蛋白)之一的特异性 25 聚体、-10 聚臂、针对共同寡核苷酸检测探针的特异性 25 聚体和 15 聚共同控制性突出端序列。mRNA 就此转变成此试验所测出的“对应的 DNA 保护片段”的化学计量, 对照实验中这些对应的 DNA 保护片段与针对控制性突出端序列的特异性探针一起培育, 显示基本上只有针对感兴趣 mRNA 分子的特异性序列存在于该对应的保护片段中, 如所预计的那样, 如果发现核酸酶消化时。

按本发明方法准备好表面, 96 孔 DNA 结合板的每孔中置有一 16 种不同 25 聚寡核苷酸锚的阵列。采用 14 种不同的锚, 一种锚用于此阵列四个角中的 3 个, 采用 13 种不同的锚, 各自位于此阵列的其余位置。然后使该锚以确定的正交模式与 60 聚寡核苷酸接头杂交, 每个接头从 5'-3'含对应于 13 种感兴趣的靶分子之一的 25 聚体、-10 聚体臂和针对锚之一的特异性 25 聚体。这样, 此多种重复的 16 点阵列

的各点在阵列中的确定位置(位点)定位了十三种靶特异性接头之一。见图 18 此正交阵列说明。对应于 GAPDH(一种组成性表达的管家基因, 用作内部标准化对照)的接头位于各阵列中的三个位点。对照实验表明, 此实验所用的接头以及保护片段和检测寡核苷酸显示了所需的特异性。

- 5 使上述含有制备的对应保护片段混合物的样品与此锚/接头阵列杂交。采用未处理或经诱导培养物产生的样品。然后, 通过与标记的检测寡核苷酸杂交检测各位点是否存在杂交的保护片段和数量。为了标准化各位点的信号量, 用适当量的本文所述阻断性寡聚物稀释检测寡核苷酸。加工各位点的信号量并按对照 GAPDH 的信号标准化。8 份重复样品以及三次不同日期的独立实验制备的样品所获数据有再现性。下表显示一次实验中 13 种转录物相对丰度的小结。

相对密度(10^5 细胞/孔)

基因	对照		诱导的		比率
	平均值	CV (n=16)	平均值	CV (n=16)	
GAPDH	10110	7%	9833	9%	0.97
IL-1	527	36%	8124	38%	15.40
TNF	229	35%	2249	36%	9.80
GAPDH	9591	11%	10031	17%	1.05
组织蛋白酶 G	10394	31%	19648	46%	1.89
COX-2	415	39%	3557	25%	8.58
周期蛋白-2	1729	23%	2960	25%	1.71
波形蛋白	25641	25%	71074	20%	2.77
LD78	1298	39%	13437	20%	10.35
HMG-17	8286	19%	2405	20%	0.29
骨桥蛋白	5604	42%	19053	46%	3.40
血小板球蛋白	-53	-	31761	23%	>100
GAPDH	10299	13%	10136	12%	0.98
血管紧张素	3575	28%	6561	31%	1.84
肌动蛋白	12741	27%	21802	23%	1.74
空白	108	-	234	-	

实施例 26 多重阵列板数据定量的计算机算法

一种优选的算法能找到 MAPS 板所有点的位置并自动计算出各数据点信号幅度的最佳拟合估计值。优选计算机程序执行此算法。

1—选择小部分图像数据 40×40 盒, 含该图像各像素(图像单元)的强度值, 此
5 图像包括被查的第一孔。

2—用 16 种未知物确定计算各像素位置预期强度的函数, 这些未知物是 13 个不同微阵列点每一点的幅度(即 DNA 阵列各位置真实信号有多亮)。对于每孔中 $4 \times 4 (=16)$ 点有 13 个点如此, 因为 16 个点中的某些是同一靶分子的重复点。

X 偏移和 Y 偏移确定此具体孔中 4×4 点阵列的确切位置。

10 此孔中图象的背景强度。

各像素位置的此函数计算出该像素和各点之间的距离, 通过点幅度乘以所述距离的脉冲反应函数, 增加了各点对该像素观察强度的贡献。对于所用图像, 通过高斯和相应(常量)半径的 Lorentzian 之和确定该脉冲反应函数。

3—通过快速猜测诸参数值开始对当前的孔进行拟合。为此计算此图像预计有
15 点子的 16 个区域的平均图像强度。减去这 16 个平均值的偏移, 用一常数换算此差异。凭经验确定此偏移和换算常数。重安排结果以使 16 点与 13 个幅度匹配。背景和偏移采用任何小号码。

4—通过曲线拟合优化拟合的值(对 16 种未知物)。具体采用带线性化拟合函数的 Marquadt 程序的线性最小平方算法, 拟合 16 种未知物为 $40 \times 40 = 1600$ 等式(当然不是所有等式都是线性独立的)。
20

5—利用 X、Y 偏移为当前孔拟合以提高的精确性估计何处坐标方格, 将会用是微板的下一孔。预计相对于下一毗邻孔(通过图像系统 60 放大系数变换为像素号码的距离)为 9 厘米偏移。因为孔间距离相对于此板尺寸较小, 利用位置的局部估计是最准确的。

25 6—随着位置估计的改进确定下一孔图像的较小, 移至 30×30 像素块。这使得拟合更快。

回到第二步并对每孔重复。

实施例 27 高通量筛选(见图 26 和 27)

30 图 26 说明了采用检测接头和一个报道试剂作为试验的原始图像数据, 该试验测定了 96 份不同的细胞样品中 13 种天然 mRNA 的表达。96 孔板每孔含 10^5 个未处

理(左半图)THP-1 细胞或用 PMA 和 LPS 诱导成为单核细胞(右半图)。

表达模式变化一致,诱导了 IL-1、TNF、COX-2、波形蛋白、LD78、骨桥蛋白和 β -血小板球蛋白。关闭了组织蛋白酶 G,周期蛋白-6, HMG-17 和血管紧张素, GAPDH 和肌动蛋白不变。

5 图 27 提供 THP-1 细胞基因的空间安排,和两个样品孔的资料(选自图 26)。

此实验用的寡核苷酸列于下表。对于某靶分子,用一含有 25 个与保护片段互补碱基,但不含报道试剂互补序列的不完全检测接头寡核苷酸稀释检测接头,降低了信号的强度。这些不完全寡核苷酸称为“弱化因子”。

10 表 1 提供了上述原始数据的数量限定,此筛选试验的高通量进行。在 96 孔板中培养和处理细胞,平均每孔 10^5 个细胞,这是微孔板常规操作的细胞数,以高通量形式测定了细胞小样品的 13 种基因表达模式。如表 1 小结,试验获得的结果证实和扩展了文献所报道的。此试验可检测到每个细胞低于一个拷贝的基因表达。参考文献反映了各种相关细胞类型如 U-937 细胞的积累观察资料。我们测定的背景信号很低,对照与诱导条件结合之间差异明显。采用检测接头,只用一种报道试剂就能降低试验背景,这是由于含 HRP 的报道试剂总浓度低得多。

表 1 相对丰度(每个细胞的 RNA 分子+)MAPS96-16 格式、 10^5 细胞/孔

基因	对照	诱导的	文献
GAPDH	30 \pm *7%	30 \pm 14%	无变化
IL-1 β	**nd	684 \pm 14%	升高
TNF	3.0 \pm 0%	214 \pm 23%	升高
组织蛋白酶 G	53 \pm 8%	nd	降低
COX-2	nd	8.3 \pm 23%	升高
周期蛋白-2	2.8 \pm 11%	0.5 \pm 46%	无变化
波形蛋白	nd	37 \pm 33%	升高
LD78-b	nd	3360 \pm 28%	升高
HMG-17	336 \pm 5%	33 \pm 23%	降低
骨桥蛋白	nd	18 \pm 23%	无报道
血小板球蛋白	nd	66 \pm 15%	升高
血管紧张素	0.5 \pm 18%	0.1 \pm 66%	无报道
肌动蛋白	79 \pm 7%	43 \pm 21%	无变化

+估计值, 假设 GAPDH 为 30/细胞 *%CV(Std Dev/Mean as a%)(n=48), **nd
未测。

实施例 27 中所用的寡核苷酸和检测接头及各探针是:

- 5 固定的探针: CACCTCCAAACAGTGAAGGAGAGCA (偶联于 HRP) (SEQ ID: 33)
 靶#1; ID: MI7851GAPDH9572-513)
 锚: 长度=25
 CGCCGGTCGAGGCGTTGTGGGAGCGC (SEQ ID: 34)
 靶: 长度=60
- 10 TGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTT (SEQ
 ID: 35)
 接头: 长度=60
 ATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG (SEQ
 ID: 36)
- 15 保护片段: 长度=75
 AAGCAGTTGGTGGTGCAGGAGGCATTGCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCTCAGCTTGTC
 TAAGTCTG (SEQ ID: 37)
 检测接头: 长度=60
 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACGTAGTTGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAG (SEQ
 ID: 38)
- 20 弱化因子: 长度=25
 TGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAG (SEQ ID: 39)
 靶#2; ID: MI5840 ILI- β (4392-4333)
 锚: 长度=25
- 25 TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC (SEQ ID: 40)
 靶: 长度=60
 CGACACATGGGATAACGAGGCTTATGTGCACGATGCACCTGTACGATCACTGAACTGCAC (SEQ
 ID: 41)
- 30 接头: 长度=60
 CACCTGTACGATCACTGAACTGCACGATACTGAGTGGACGCCGTCCGGTCCTCACGTGGA (SEQ

ID:42)

保护片段:长度=75

GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGGTGCATCGTGCACATAAGCCTCGTTATCCCATGTGTCGGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:43)

5 检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCGACACATGGGATAACGAGGCTTAT (SEQ

ID:44)

弱化因子:长度=25

CGACACATGGGATAACGAGGCTTAT (SEQ ID:45)

10

靶#3; ID:MI0988 TNF (780-721)

锚:长度=25

CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC (SEQ ID:46)

靶:长度=60

15 CGGAACCCAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCACTTCGAAACCTGGGATTCAGG (SEQ

ID:47)

接头:长度=60

ACCACTTCGAAACCTGGGATTCAGGGATACTGAGTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTG (SEQ

ID:48)

20 保护片段:长度=75

CCTGAATCCCAGGTTTCGAAGTGGTGGTCTTGTTGCTTAAAGTTCTAAGCTTGGGTTCGGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:49)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCGGAACCCAAGCTTAGAACTTTAAG (SEQ

25 ID:50)

弱化因子:长度=25

CGGAACCCAAGCTTAGAACTTTAAG (SEQ ID:51)

靶#4; ID:MI7851 GAPDH (572-513)

30 (与靶#1 相同)

靶#5; ID:MI6117 组织蛋白-G (373-314)

锚:长度=25

GAACCGCTCGCGTGTTCTACAGCCA (SEQ ID:52)

靶:长度=60

5 GCGGACCATCCAGAATGACATCATGTTATTGCAGCTGAGCAGAAGAGTCAGACGGAATCG (SEQ ID:53)

接头:长度=60

TGAGCAGAAGAGTCAGACGGAATCGGATACTGAGTTGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTC (SEQ ID:54)

10 保护片段:长度=75

CGATTCCGTCTGACTCTTCTGCTCAGCTGCAATAACATGATGTCATTCTGGATGGTCCGCGCTTGTC TAAGTCTG (SEQ ID:55)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGCGGACCATCCAGAATGACATCATG (SEQ ID:56)

弱化因子:长度=25

GCGGACCATCCAGAATGACATCATG (SEQ ID:57)

靶#6 ID:M90100 COX-2 (240-181)

20 锚:长度=25

CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG (SEQ ID:58)

靶:长度=60

CCGAGGTGTATGTATGAGTGTGGGATTTGACCAGTATAAGTGCGATTGTACCCGGACAGG (SEQ ID:59)

25 接头:长度=60

ATAAGTGCGATTGTACCCGGACAGGGATACTGAGTCTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG (SEQ ID:60)

保护片段:长度=75

CCTGTCCGGGTACAATCGCACTTATACTGGTCAAATCCCACACTCATACATACCTCGGGCTTGTC TAAGTCTG (SEQ ID:61)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCCGAGGTGTATGTATGAGTGTGGGA (SEQ ID:62)

弱化因子:长度=25

CCGAGGTGTATGTATGAGTGTGGGA (SEQ ID:63)

5

靶#7; ID:M74091 周期蛋白 (932-873)

锚:长度=25

CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC (SEQ ID:64)

靶:长度=60

10 CACCTCCAAACAGTGAAGGAGAGCAGGGTCCAAATGGAAGTCAGAACTCTAGCTACAGCC (SEQ ID:65)

接头:长度=60

GGAAGTCAGAACTCTAGCTACAGCCGATACTGAGTGCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG (SEQ ID:66)

15 保护片段:长度=75

GGCTGTAGCTAGAGTTCTGACTTCCATTTGGACCCCTGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:67)

检测接头:长度=60

20 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCACCTCCAAACAGTGAAGGAGAGCA (SEQ ID:68)

弱化因子:长度=25

CACCTCCAAACAGTGAAGGAGAGCA (SEQ ID:69)

靶#8 ID:MI4144 波形蛋白 (1338-1279)

25 锚:长度=25

GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG (SEQ ID:70)

靶:长度=60

GTGGATGCCCTTAAAGGAACCAATGAGTCCCTGGAACGCCAGATGCGTGAAATGGAAGAG (SEQ ID:71)

30 接头:长度=60

ACGCCAGATACGTGAAATGGAAGAGGATACTGAGTCGAAGAGATGCATAACGCGGCGCGC (SEQ

ID:72)

保护片段:长度=75

CTCTTCCATTTACGCATCTGGCGTTCAGGGACTCATTGGTTCCTTTAAGGGCATCCACGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:73)

5 检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGTGGATGCCCTTAAAGGAACCAATG (SEQ

ID:74)

弱化因子:长度=25

GTGGATGCCCTTAAAGGAACCAATG (SEQ ID:75)

10

靶#9; ID:D90145 LD78-b (2049-1990)

锚:长度=25

GTTAGCATACGTGTCACCACACCGG (SEQ ID:76)

靶:长度=60

15 CACCTCCCGACAGATTCCACAGAATTTATAGCTGACTACTTTGAGACGAGCAGCCAGTG (SEQ

ID:77)

接头:长度=60

ACTACTTTGAGACGAGCAGCCAGTGGATACTGAGTCCGGTGTGGTGACACGTATGCTAAC (SEQ

ID:78)

20 保护片段:长度=75

CACTGGCTGCTCGTCTCAAAGTAGTCAGCTATGAAATTCTGTGGAATCTGTCGGGAGGTGGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:79)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCACCTCCCGACAGATTCCACAGAAT (SEQ

25 ID:80)

弱化因子:长度=25

CACCTCCCGACAGATTCCACAGAAT (SEQ ID:81)

靶#10; ID:X13546 HMG-17 M12623-mRNA (191-132)

30 锚:长度=25

CGTCAGTCCGTCGGCCAGCTCTTCC (SEQ ID:82)

靶:长度=60

CAAAGGTGAAGGACGAACCACAGAGAAGATCCGCGAGGTTGTCTGCTAAACCTGCTCCTC (SEQ ID:83)

接头:长度=60

5 AGGTTGTCTGCTAAACCTGCTCCTCGATACTGAGTGGAAGAGCTGGCCGACGGACTGACG (SEQ ID:84)

保护片段:长度=75

GAGGAGCAGGTTTAGCAGACAACCTCGCGGATCTTCTCTGTGGTTCGTCCTTCACCTTTGGCTTGTC TAAGTCTG (SEQ ID:85)

10 检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCAAAGGTGAAGGACGAACCACAGAG (SEQ ID:86)

弱化因子:长度=25

CAAAGGTGAAGGACGAACCACAGAG (SEQ ID:87)

15

靶#11; ID:X13694 骨桥蛋白(783-724)

锚:长度=25

ATCCAGTTAACCACATGCTAGTACC (SEQ ID:88)

靶:长度=60

20 CCGTGGAAGGACAGTTATGAAACGAGTCAGCTGGATGACCAGAGTGCTGAAACCCACAG (SEQ ID:89)

接头:长度=60

ATGACCAGAGTGCTGAAACCCACAGGATACTGAGTGGTACTAGCATGTGGTTAACTGGAT (SEQ ID:90)

25 保护片段:长度=75

CTGTGGGTTTCAGCACTCTGGTCATCCAGCTGACTCGTTTCATAACTGTCCTTCCCACGGGCTTGTC TAAGTCTG (SEQ ID:91)

检测接头:长度=60

30 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCCGTGGAAGGACAGTTATGAAACG (SEQ ID:92)

弱化因子:长度=25

CCGTGGGAAGGACAGTTATGAAACG (SEQ ID:93)

靶#12; ID:MI7017b 血小板球蛋白(142-83)

锚:长度=25

5 TTAGCGTTGGCCGAGGTTCATAGCC (SEQ ID:94)

靶:长度=60

GTGTAAACATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTCCTGATTTCTGCAG (SEQ ID:95)

接头:长度=60

10 TTGGCAGCCTTCCTGATTTCTGCAGGATACTGAGTGGCTATGAACCTCGGCCAACGCTAA (SEQ ID:96)

保护片段:长度=75

CTGCAGAAATCAGGAAGGCTGCCAAGAGAGCCACGGCCAGCTTGGAAGTCATGTTTACACGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:97)

15 检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGTGTAAACATGACTTCCAAGCTGGC (SEQ ID:98)

弱化因子:长度=25

GTGTAAACATGACTTCCAAGCTGGC (SEQ ID:99)

20

靶#13; ID; MI7851 GAPDH9572-513) (与靶#1 相同)

靶#14; ID:K02215 血管紧张肽(805-746)

锚:长度=25

25 CATTACGAGTGCATTCGCATCAAGG (SEQ ID:100)

靶:长度=60

CACGCTCTCTGGACTTCACAGAACTGGATGTTGCTGCTGAGAAGATTGACAGGTTTCATGC (SEQ ID:101)

接头:长度=60

30 GCTGAGAAGATTGACAGGTTTCATGCGATACTGAGTCCTTGATGCGAATGCACTCGTAATG (SEQ ID:102)

保护片段:长度=75

GCATGAACCTGTCAATCTTCTCAGCAGCAACATCCAGTTCTGTGAAGTCCAGAGAGCGTGGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:103)

检测接头:长度=60

5 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCACGCTCTCTGGACTTCACAGAACT (SEQ
ID:104)

弱化因子:长度=25

CACGCTCTCTGGACTTCACAGAACT (SEQ ID:105)

10 靶#15; ID:MI0277 肌动蛋白 (2627-2568)

锚:长度=25

ATCATGTAAGTCTTCGGTCGGTGGC (SEQ ID:106)

靶:长度=60

GAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATC (SEQ
15 ID:107)

接头:长度=60

CATCATGAAGTGTGACGTGGACATCGATACTGAGTGCCACCGACCGAAGACTTACATGAT (SEQ
ID:108)

保护片段:长度=75

20 GATGTCCACGTCACACTTCATGATGGACTTGAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAGGACTCGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:109)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTA (SEQ
ID:110)

25 弱化因子:长度=25

GAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTA (SEQ ID:111)

靶#16; (此点不用)

30 **实施例 28 同时检测 DNA 和 RNA (见图 29)**

在 96 孔 V 形底微滴板中培养 THP-1 人单核细胞, 3 万-15 万细胞/每孔。对照

细胞不用 PMA 分化或不用 LPS 激活, 因为某些基因(如 IL-2、COX-2、LD78、骨桥蛋白和血小板球蛋白)的 RNA 这些细胞中不存在, 因而试验只测 DNA, 而 GAPDH 的 DNA 和 RNA 二者都存在可予以测定。在水(裂解)溶液中加热细胞至 105℃, 裂解中加入感兴趣的靶分子的特异性核酸酶保护片段。温度升高裂解物释放出测定形式的 DNA 和 RNA。为测定 DNA 加入的核酸酶保护片段为针对 IL-1、COX-2、LD78、骨桥蛋白和血小板球蛋白的保护片段。为同时测定 DNA 和 RNA, 加入上述核酸酶保护片段以及针对 GAPDH 的特异性保护片段, 如本文所述进行核酸酶保护反应。

基本上按实施例 27 所述形成阵列和进行保护片段的杂交。通过一系列检测接头的杂交检测 DNA 和 DNA+RNA。进行系列杂交是为了平衡 RNA 和 DNA 靶分子产生的信号(见 F)。当然, 系列杂交不是该试验同时检测 DNA 和 RNA 靶分子所要求。第一轮中加入 IL-2、COX-2、LD78、骨桥蛋白和血小板球蛋白的检测接头。第二轮加入 GAPDH 的检测接头。进行系列杂交以拍摄 DNA 信号, 此信号比 RNA 信号弱得多, 因为每份样品的拷贝低得多, 延长杂交时间以积累较高的信号强度。

图 29 提供了测定结果。左图说明只检测基因组 DNA 时, 待测的 IL-2、COX-2、LD78、骨桥蛋白和血小板球蛋白的基因组序列均可在相应位点测到数量几乎相同。表 1 为所测定的基因组 DNA, 显示在对照细胞中没有测到这些基因的 DNA。右图为测定的 DNA 和 RNA, 但收集的图像曝光时间短得多, 因而 DNA 信号较左图弱得多, 表明同时检测 DNA 和 RNA 时, 对照基因组序列可作为内部标准化参比品检测, 基因 GAPDH 表达水平比对照高得多。通过测定对照信号和表达的 GAPDHmRNA 的相对量, 可计算出每个细胞表达的 mRNA 量。

。 实施例 29 检测表达的 SNP(见图 30 和 31)

图 90 说明了检测表达的 SNP 的一种试验。其中, 设计的核酸酶保护片段, 当加入适当的酶(如 RNA 酶 H)时, 含 SNP 的 RNA 的该区域杂交, 如果该核酸酶保护片段与碱基错配的 RNA(此处为 SNP)杂交, 此酶将切割此核酸酶保护片段。此实施例中产生的切割片段不能与此阵列杂交(由于所用的杂交条件如温度的影响)。另一实施例中可发生与此阵列杂交但检测接头不能结合切割的保护片段(由于所用的杂交条件如温度影响)或切割的片段不能同时与此阵列和检测接头杂交时发生切割。

图 31 说明按本文常规方法进行此类试验的结果, 用野生型肌动蛋白作为内部对照, 含有经基因工程产生的 SNP 的 GAPDH 的保护片段, 与对应于野生型 GAPDH 的保护片段。图 31 说明含野生型 GAPDH 和野生型肌动蛋白(左侧和放大的左图)或

含 SNPGAPDH 和野生型肌动蛋白(右侧和放大的右图)的多个样品的测定结果,放大的中图说明该阵列设计。

实施例 30 高通量筛选(见图 32-35)

- 基本上按实施例 28 所述进行转录试验,不同的是寡核苷酸锚放置在放射性照射过的板上而非 DNA 结合板上。采用实施例 27 所述相同的寡核苷酸锚,但改变阵列中的某些靶分子,只有一种锚测定 GAPDH,并加入微管蛋白、肌动蛋白和 LDH。测定的其它靶分子是 IL-1、TNF- α 、组织蛋白酶 G、COX-2、G-CSF、GM-CSF、GST-Pil、HMG-17、b-血小板球蛋白、TIMP-1、MMP-9。图 32 说明此阵列、接头和核酸酶保护片段序列见下,每孔采用大约 3 万个细胞(在 PMA 和 LDH 处理受处理细胞时未对细胞的不断增殖作调整)。

序列:

靶#1: GAPDH(与实施例 27 靶#1 相同)

靶#2: IL-1b(与实施例 27 靶#2 相同)

- 15 靶#3 TNF- α (与实施例 27 靶#3 相同)

靶#4 微管蛋白质(AF141347)

靶#15: ID:MI0277 肌动蛋白(2627-2568)

锚:长度=25

TAAGCGTCTCTAGGAAGGGACGTGG (SEQ ID:112)

- 20 靶:长度=60

GACGTGGTTCCCAAAGATGTCAATGCTGCCATTGCCACCATCAAGACCAAGCGTACCATC (SEQ ID:113)

接头:长度=60

CACCATCAAGACCAAGCGTACCATCGATACTGAGTCCACGTCCCTTCCTAGAGACGCTTA (SEQ ID:114)

- 25 保护片段:长度=75

GATGGTACGCTTGGTCTTGATGGTGGCAATGGCAGCATTGACATCTTTGGGAACCACGTCGCTTGTC TAAGTCTG (SEQ ID:115)

检测接头:长度=60

- 30 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGACGTGGTTCCCAAAGATGTCAATG (SEQ ID:116)

弱化因子:长度=25

GACGTGGTTCCTCCAAAGATGTCAATG (SEQ ID:117)

靶#5 组织蛋白酶 G (与实施例 27 的靶#5 相同)

5 靶#6 Cox-2 (与实施例 27 的靶#6 相同)

靶#7; G-CSF (E01219)

锚:长度=25

CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC (SEQ ID:118)

靶:长度=60

10 GAGGGAGCAGCCAGGAGGAATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCAC (SEQ ID:119)

接头:长度=60

GTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACGATACTGAGTGCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG (SEQ ID:120)

15 保护片段:长度=75

GTGACAGTGGAGCTTCCTTTACACACAGGCCTGACATGATTCCTCCTCTCTGCTCCCTCGCTTGTC TAAAGTCTG (SEQ ID:121)

检测接头:长度=60

20 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATG (SEQ ID:122)

弱化因子:长度=25

GAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATG (SEQ ID:123)

靶#8; GM-CSF (E02975)

25 锚:长度=25

GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG (SEQ ID:124)

靶:长度=60

CACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACC (SEQ ID:125)

30 接头:长度=60

TTCTGTGCAACCCAGATTATCACCGATACTGAGTCGAAGAGATGCATAACGCGGCGCGC (SEQ

ID:126)

保护片段:长度=75

GGTGATAATCTGGGTTGCACAGGAAGTTTCCGGGGTTGGAGGGCAGTGCTGCTTGTAGTGGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:127)

5 检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAA (SEQ

ID:128)

弱化因子:长度=25

CACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAA (SEQ ID:129)

10

靶#9 ; GST-PI1 X06547

锚:长度=25

GTTAGCATACGTGTCACCACACCGG (SEQ ID:130)

靶:长度=60

15 CAGGGAGGCAAGACCTTCATTGTGGGAGACCAGATCTCCTTCGCTGACTACAACCTGCGT (SEQ

ID:131)

接头:长度=60

CTCCTTCGCTGACTACAACCTGCTGGATACTGAGTCCGGTGTGGTGACACGTATGCTAAC (SEQ

ID:132)

20 保护片段:长度=75

CAGCAGGTTGTAGTCAGCGAAGGAGATCTGGTCTCCACAATGAAGGTCTTGCTCCCTGGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:133)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCAGGGAGGCAAGACCTTCATTGTGG (SEQ

25 ID:134)

弱化因子:长度=25

CAGGGAGGCAAGACCTTCATTGTGG (SEQ ID:135)

靶#10 HMG-17(与实施例 27 的靶#10 相同)

30

靶#11; 亲环蛋白 X52851

锚:长度=25

ATCCAGTTAACCACATGCTAGTACC (SEQ ID:136)

靶:长度=60

GGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCACACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATC (SEQ

5 ID:137)

接头:长度=60

TAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCGATACTGAGTGGTACTAGCATGTGGTTAACTGGAT (SEQ

ID:138)

保护片段:长度=75

10 GATGGACTTGCCACCAGTGCCATTATGGCGTGTGAAGTCACCACCCTGACACATAAACCCGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:139)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACT (SEQ

ID:140)

15 弱化因子:长度=25

GGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACT (SEQ ID:141)

靶#12 血小板球蛋白-b (与实施例 27 的靶#12 相同)

20 靶#13; LDH X02152

锚:长度=25

TCTCGGTCTGGAACGCCCGGCAACT (SEQ ID:142)

靶:长度=60

GGTGGTTGAGAGTGCTTATGAGGTGATCAAACCTCAAAGGCTACACATCCTGGGCTATTGG (SEQ

25 ID:143)

接头:长度=60

AAGGCTACACATCCTGGGCTATTGGGATACTGAGTAGTTGCCGGGCCTTCCAGACCGAGA (SEQ

ID:144)

保护片段:长度=75

30 CCAATAGCCCAGGATGTGTAGCCTTTGAGTTTGATCACCTCATAAGCACTCTCAACCACCGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:145)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGGTGGTTGAGAGTGCTTATGAGGTG (SEQ
ID:146)

弱化因子:长度=25

5 GGTGGTTGAGAGTGCTTATGAGGTG (SEQ ID:147)

靶#14; TIMP-1 X03124

锚:长度=25

CATTACGAGTGCATTCGCATCAAGG (SEQ ID:148)

10 靶:长度=60

CACCAAGACCTACACTGTTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTGTTTATCCATCCC (SEQ
ID:149)

接头:长度=60

CAGTGTTCCTGTTTATCCATCCCGATACTGAGTCCTTGATGCGAATGCACTCGTAATG (SEQ
15 ID:150)

保护片段:长度=75

GGGATGGATAAACAGGGAACACTGTGCATTCTCACAGCCAACAGTGTAGGTCTTGGTGGCTTGTC
TAAGTCTG (SEQ ID:151)

检测接头:长度=60

20 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTCACCAAGACCTACACTGTTGGCTGT (SEQ
ID:152)

弱化因子:长度=25

CACCAAGACCTACACTGTTGGCTGT (SEQ ID:153)

25 靶#15; MMP-9 J05070

锚:长度=25

ATCATGTAAGTCTTCGGTCGGTGGC (SEQ ID:154)

靶:长度=60

GCAACGTGAACATCTTCGACGCCATCGCGGAGATTGGGAACCAGCTGTATTTGTTCAAGG (SEQ
30 ID:155)

接头:长度=60

GGGAACCAGCTGTATTTGTTCAAGGGATACTGAGTGCCACCGACCGAAGACTTACATGAT (SEQ
ID:156)

保护片段:长度=75

CCTTGAACAAATACAGCTGGTTCCCAATCTCGCGATGGCGTCGAAGATGTTACGTTGCGCTTGTCT

5 AAGTCTG (SEQ ID:157)

检测接头:长度=60

TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGCAACGTGAACATCTTCGACGCCAT (SEQ
ID:158)

弱化因子:长度=25

10 GCAACGTGAACATCTTCGACGCCAT (SEQ ID:159)

靶#16; 肌动蛋白 X10277

锚:长度=25

CTGAGTCCTCCGGTGCCTACGTGGC (SEQ ID:160)

15 靶:长度=60

GAGTCCTGTGGCATCCACGAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATC (SEQ
ID:161)

接头:长度=60

CATCATGAAGTGTGACGTGGACATCGATACTGAGTGCCACGTAGGCACCGGAGGACTCAG (SEQ

20 ID:162)

保护片段:长度=75

GATGTCCACGTCACACTTCATGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAGGACTCGCTTGTC

TAAGTCTG (SEQ ID:163)

检测接头:长度=60

25 TGCTCTCCTTCACTGTTTGGAGGTGGATACTGAGTGAGTCCTGTGGCATCCACGAACTA (SEQ
ID:164)

弱化因子:长度=25

GAGTCCTGTGGCATCCACGAACTA (SEQ ID:165)

30 图 33 显示该试验的再现性很高, 当分析 3 万个细胞时, CV 的范围约 3-13%。

图 34 显示该试验的灵敏度很高。当测试的样品所含细胞少至 1000 个时仍可测

到 GAPDH 的靶 mRNA。

图 35 基本上采用实施例 25 的方案和实施例 27 的阵列和靶分子进行，显示即使样品所含细胞不到 1000 个也能测出许多靶 mRNA，当 RNA 得自不到 1 万个细胞时可测到低浓度表达的所有靶分子。

5

实施例 31 任选的寡核苷酸试剂(见图 36)

图 36 显示可用于本发明方法的几种寡核苷酸试剂。此图说明试验方案是：使寡核苷酸锚通过其 5'或 3'(反向)端结合于一表面。此寡核苷酸锚有两个识别部分，彼此毗邻(缩短)或被核酸臂隔开，每部分有 5 个核苷酸。

10

实施例 32 核酸酶保护片段扩增方法(见图 37-39 和 42)

图 37 说明用 PCR 扩增核酸酶保护片段。

图 38 说明用连接酶扩增核酸酶保护片段。通过选择 a'作为 α 碱基序列，位于连接的 a'-之外的 25 个碱基结合于此阵列，可选择杂交条件只让 a'分子的连接的 25 个碱基序列结合。利用 a'和 a 接头结合区各部分中修饰的核苷酸可促进辨别，如果热解离循环破坏了连接酶，可在每次循环时再加入。

图 39 说明通过核酸酶保护使核酸酶保护片段得到扩增，与该(核酸酶保护片段 6)互补的(DNAa)链可含有修饰的碱基。其可在(DNAa)的温度下杂交，或在(DNAa)加入前可破坏(DNAa)。同样，(DNAa)的(接头 a)可含有修饰的核苷酸。允许在低于(核酸酶保护片段 6)的温度下杂交，即使(接头 a)/(DNAa)杂交体是 25 个碱基。(DNAa)/(核酸酶保护片段 6)是 50 个碱基的杂交体，尤其当从经验上考虑到溶液中的 DNA 链是稀的，可通过高度浓缩，基本上无限制性高度浓缩(接头 A)。流通装置可用含有捕俘阵列的板来替换。线性阵列可用 2-D 或 3-D 阵列替换。

图 42 说明用聚合酶扩增核酸酶保护片段。核酸酶保护反应完成后核酸酶保护片段从 RNA 上解离下来，加入含有 RNA 聚合酶(如 T7 聚合酶)双链启动子的一引物(a')和核酸酶保护片段模板延伸(如逆转录酶(RT)延伸以复制 RNA 或 DNA 或复制 DNA 的 Tag 聚合酶)将利用其作为模板形成双链 DNA 复合物，带有靠近该核酸酶保护片段序列末端的双链启动子区域。加入连接酶将使该启动子的第二链连接于核酸酶保护片段链，除非第一碱基是错配的 SNP。因此在核酸酶保护反应期间，S1 剪去了未受保护的碱基。由于此碱基被跳过，连接酶不会将启动子与核酸酶保护片段连接。用连接酶时，b 链被转变为延伸的 b''链，掺入聚合酶启动子中，可用聚合酶扩增

并在加入 RT 引物 b'后继续扩增。用启动子/核酸酶保护片段延伸端结合此阵列或检测接头或检测探针。为检测 SNP，安排此杂交使 SNP 位点大约处在用于与该阵列(检测接头或检测探针等)杂交的序列的中部。延伸核酸酶保护探针的阵列(检测接头或检测探针)，杂交区不必包括此末端的所有碱基(该延伸的核酸酶保护探针末端的某些碱基可能突出在接头中无互补性杂交序列)。变化中没有描述采用聚合酶(如 T7)之前不需要连接，因此通过选择能将 SNP 定位在与 a'杂交序列中部序列，进行 SNP 检测。采用本文所述的 SNP 检测方案。不需要延伸 a'链，但 RNA 聚合酶可能利用与单链核酸酶保护片段(删去所示的 RT 延伸或改变所述的 Tag 聚合酶延伸步骤)杂交的启动子来产生 RNA。

10 从以上描述，本领域技术人员可能不难确定本发明的基本特征。在不背离本发明的思路和范围下，可对本发明作修改以将其用于不同情况。

不必进一步详尽阐述，相信本领域技术人员通过以上描述，能以最充分程序应用本发明。因此以上优选的具体实施例应解释为只是说明性的，并不以任何方式限制本发明的其余内容。

15 以上所引用和图中引用的所有专利申请、专利和出版物的全部公开内容都纳入本文参考文献。

专利名称(译)	高通量试验系统		
公开(公告)号	CN1620513A	公开(公告)日	2005-05-25
申请号	CN02816770.8	申请日	2002-06-26
[标]发明人	RM克里斯 S费尔德		
发明人	R·M·克里斯 S·费尔德		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/42 C12Q1/68 C40B40/06 C40B60/14 C40B70/00 G01N21/76 G01N37/00 C12P19/34 C07H21/02		
CPC分类号	C12Q1/6816 B01J2219/00315 B01J2219/00527 B01J2219/00547 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/00608 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/00621 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00644 B01J2219/00659 B01J2219/00662 B01J2219/00702 B01J2219/00722 C12Q1/6837 C40B40/06 C40B60/14 C40B70/00 G16B25/00 C12Q2521/307 C12Q2565/513 C12Q2537/125 C12Q2561/108 C12Q2565/519 C12Q2527/119 C12Q2563/107		
代理人(译)	周承泽		
优先权	09/888413 2001-06-26 US		
其他公开文献	CN1620513B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于同时进行多重高通量生物学和化学试验的，采用重复性探针阵列的组分，装置和方法。本发明的组合包括一表面，此表面含有多个测定区，其中至少两个，在一优选例中至少20个测定区是基本相同的，各测定区包括一通用的锚阵列，阵列中的锚与双功能接头分子结合，每个接头包括对至少一种锚特异的部分，和对感兴趣的靶分子特异的探针部分，所产生的探针阵列可用于分析能与探针特异性反应的一种或多种靶分子的存在或活性。优选实施例，使待测样品先经历核酸酶保护步骤，然后再与本发明的组合接触。

基因	相对密度(10 ⁶ 细胞/孔)				
	对照		诱导的		比率
	平均值	CV (n=16)	平均值	CV (n=16)	
GAPDH	10110	7%	9833	9%	0. 97
IL-1	527	36%	8124	38%	15. 40
TNF	229	35%	2249	36%	9. 80
GAPDH	9591	11%	10031	17%	1. 05
组织蛋白酶 G	10394	31%	19648	46%	1. 89
COX-2	415	39%	3557	25%	8. 58
周期蛋白-2	1729	23%	2960	25%	1. 71
波形蛋白	25641	25%	71074	20%	2. 77
LD78	1298	39%	13437	20%	10. 35
HMG-17	8286	19%	2405	20%	0. 29
骨桥蛋白	5604	42%	19053	46%	3. 40
血小板球蛋白	-53	-	31761	23%	>100
GAPDH	10299	13%	10136	12%	0. 98
血管紧张素	3575	28%	6561	31%	1. 84
肌动蛋白	12741	27%	21802	23%	1. 74
空白	108	-	234	-	