

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/00



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/53 G01N 33/553

G01N 33/566 G01N 33/68

G01N 21/55 G01N 21/35

G01N 21/76 C12Q 1/68

[21] 申请号 03147205.2

[43] 公开日 2004年3月10日

[11] 公开号 CN 1480729A

[22] 申请日 2003.4.9 [21] 申请号 03147205.2

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 9 [33] AU [31] PS1597

[32] 2002. 11. 12 [33] US [31] 10/291,986

[71] 申请人 唐舜荣

地址 香港九龙

[72] 发明人 唐舜荣

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书7页 说明书30页 附图24页

[54] 发明名称 改进的通过颗粒结合来检测靶分子的方法

[57] 摘要

一种利用靶分子、小珠结合探针以及支持物结合探针之间的分子间相互作用来检测或定量样品中靶分子的方法。在相互作用后可采用激光或磁传感器检测小珠。小珠的检出结果代表样品中靶分子的存在。

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

- 1、一种检测样品中靶分子的方法，该样品怀疑含有靶分子，该方法包括：
- 5 将能与靶分子的一部分连接的第一探针分子连接到小珠上，从而形成小珠结合探针；
- 将能与靶分子的第二部分连接的第二探针分子连接到支持物的预定区域上，从而形成支持物结合探针；
- 使样品与小珠结合探针和支持物结合探针接触，并使靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针相结合，以便使靶分子在夹在支持物和小珠之间，并使小珠连接到支持物上；
- 10 为支持物提供转动；
- 检测旋转支持物预定区域上小珠的存在情况，其中支持物上小珠的检测结果代表了样品中靶分子的存在情况。
- 15 2、根据权利要求1所述方法，其中在样本中检测出至少两种不同的靶分子。
- 3、根据权利要求1所述方法，其中一个靶分子至少被检测两次。
- 4、根据权利要求1所述方法，其中进一步包括在检测支持物上小珠的存在情况之前将未结合的小珠去除的步骤。
- 20 5、根据权利要求1所述方法，其中小珠结合探针的数量多于样品中靶分子的数量。
- 6、根据权利要求1所述方法，其中进一步包括将未结合到支持物上的小珠聚集到连接到支持物上的小珠周围的步骤。
- 7、根据权利要求6所述方法，其中聚集小珠的步骤包括：
- 25 选择消磁的黑色非反射性小珠用来制备所述小珠结合探针；
- 在所述靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针结合之后采用磁场磁化所述小珠；
- 开始聚集所述磁化小珠；并且
- 将没有连接到所述支持物上的小珠去除。
- 30 8、根据权利要求7所述方法，其中检测聚集磁化小珠存在情况的步骤包括：

- 给所述小珠聚集体施加波动磁场；
检测由所述小珠聚集体产生的声学信号。
- 9、根据权利要求6所述方法，其中所述聚集步骤包括：
在小珠上结合化学成分；
- 5 在所述靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针发生所述结合之后，加入带有多个同样的与所述化学成分具有高度亲合力并特异性结合的结合位点的化学试剂，以便使支持物上的小珠进行化学结合并聚集起来。
- 10、根据权利要求9所述方法，其中化学成分是生物素，化学试剂是亲和素或链亲和素。
- 10 11、根据权利要求9所述方法，其中化学成分是生物素，化学试剂是IgM抗生物素抗体。
- 12、根据权利要求9所述方法，其中化学成分是葡萄球菌A蛋白或链球菌G蛋白，化学试剂是免疫球蛋白二聚体或多聚体。
- 15 13、根据权利要求1所述方法，其中检测支持物上小珠存在情况的步骤包括：
使支持物具有光反射性表面；
将激光直射到反射性支持物上；
监控激光的反射情况，以便检测由于支持物反射性区域上存在非反射性小珠而引起的激光减弱并以此检测支持物上小珠的存在情况。
- 20 14、根据权利要求7所述方法，其中检测支持物上小珠存在情况的步骤包括：
提供具有光反射性表面的支持物；
将激光直射到反射性支持物上；
25 监控激光的反射情况，以便检测由于支持物反射性区域上存在非反射性小珠而引起的激光减弱并以此检测支持物上小珠的存在情况。
- 15、根据权利要求1所述方法，其中小珠含有金属成分，并且所述支持物上小珠存在情况的检测步骤包括：
给小珠施加外部磁场，以便诱导小珠产生对抗的磁场；
30 检测诱导磁场的存在，以便检测支持物上小珠的存在情况。

16、根据权利要求 1 所述方法，其中小珠含有铁磁成分，并且所述支持物上小珠存在情况的检测步骤包括：

磁诱导支持物上的小珠发热；并且

5 检测由发热的小珠所发出的红外线辐射，以便检测支持物上小珠的存在情况。

17、根据权利要求 16 所述方法，其中辐射通过红外线传感器来检测。

18、根据权利要求 16 所述方法，其中小珠通过快速变化的磁场而被加热。

19、根据权利要求 16 所述方法，其中将热发光剂加入到支持物上的小珠上，由发热的小珠发出的辐射使热发光剂发出可以由光敏二极管检测的光。

20、根据权利要求 16 所述方法，其中将化学发光或生物发光剂加入到支持物上小珠的周围，由发热的小珠产生的热能使化学反应速度加快以及发出的光增强，该光可以由光敏二极管检测。

21、根据权利要求 19 所述方法，其中发出的光用于泵击激光，从而放大了发出的光信号。

22、根据权利要求 20 所述方法，其中发出的光用于泵击激光，从而放大了发出的光信号。

23、根据权利要求 1 所述方法，其中支持物含有与至少第二探针分子相关的机可读的信息，该信息被包含在连接有第二探针分子的支持物表面上的离散区域中。

24、根据权利要求 23 所述方法，其中机可读的信息包含连接到支持物上的至少一个探针分子的特性。

25、根据权利要求 23 所述方法，其中机可读的信息包含与多个探针分子连接到支持物表面的过程相关的信息。

26、根据权利要求 23 所述方法，其中机可读的信息包含与采用多个探针分子相应实验条件相关的信息。

27、根据权利要求 23 所述方法，其中机可读的信息包含与采用多个探针分子实验结果相关的信息。

28、根据权利要求 23 所述方法，其中机可读的信息是数字的。

29、根据权利要求 1 所述方法，其中进一步包括确定样品中靶分子浓度的步骤：基于在至少两种不同浓度的靶分子存在的情况下，在支持物上存在的可检测小珠数量差异的基础上，。

5 30、一种用于检测样品中的靶分子的仪器，该样品怀疑含有靶分子，该仪器包括：

小珠结合探针，含有与能够和靶分子的一部分相连的第一探针分子相连接的小珠；

位于支持物预定区域的支持物结合探针，含有与能够和靶分子的另一部分相连的第二探针分子相连接的支持物；

10 用于使样品与小珠结合探针和支持物结合探针接触并使靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针相结合的装置，以便使靶分子夹在支持物和小珠之间，并使小珠连接到支持物上；

为支持物提供旋转运动的装置；以及

15 用于检测旋转支持物上小珠的存在情况的装置，其中支持物上小珠的检测结果代表了样品中靶分子的存在情况。

31、根据权利要求 30 所述仪器，其中用于检测支持物上小珠存在情况的装置是，能直射到支持物上的激光和检测来自支持物激光的反射或缺失的传感器。

20 32、根据权利要求 30 所述仪器，其中用于检测支持物上小珠存在情况的装置是，用来施加磁场从而诱导支持物上小珠产生对抗磁场的装置和检测从小珠诱导而来的磁场的传感器。

25 33、根据权利要求 30 所述仪器，其中用于检测支持物上小珠存在情况的装置是，用来提供快速变化的磁场以使支持物上铁磁小珠发热从而导致结合到小珠表面的热发光材料或加入到小珠周围的化学发光或生物发光材料所发出的光增强的装置，和检测所发出的光的传感器或用于使发出的检测光放大的激光器。

34、根据权利要求 30 所述仪器，其中用于检测支持物上小珠存在情况的装置是，提供变化的磁场以诱导支持物上的小珠产生声学信号的装置和检测声学信号的传感器。

30 35、根据权利要求 30 所述仪器，其中支持物含有与至少第二探针分子相关的机可读信息。

36、一种检测样品中分析物浓度的方法，包括：

提供带有多个限定位点的微阵列，每个限定位点带有连接到表面上的小珠结合的分析物，其中这些限定位点带有不同量的所述小珠结合的分析物；使含有未知浓度分析物的样品与微阵列接触，由此样品中的分析物竞争性地取代小珠结合的分析物，检测限定位点中的小珠结合的分析物的存在情况，以便确定样品中分析物的浓度。

37、根据权利要求 36 所述方法，其中进一步包括通过使微阵列与至少一种已知分析物浓度的溶液接触而校准微阵列的步骤。

38、一种用于确定样品中分析物数量的竞争性结合检测方法，该样品含有未知浓度的已知分析物，该方法包括以下步骤：

(a)通过在介质中使以下物质聚在一起而形成反应混合物：(1)包含所述分析物的所述样品，(2)能与所述分析物的一部分结合以形成第一复合物的小珠结合的第一探针分子，以及(3)能与所述分析物的第二部分结合的支持物结合的第二探针分子，所述分析物的浓度即为：由于所述分析物和所述第一复合物之间在与所述底物结合的第二探针分子结合时相互竞争而导致结合到所述底物结合的第二探针分子上的所述小珠结合的第一探针分子的变化量；

(b)在相同浓度的所述小珠结合的第一探针分子存在的情况下，在至少两种不同浓度的所述分析物时，检测结合到所述支持物结合的第二探针分子上的所述小珠结合的第一探针分子的数量，并且

(c)通过比较步骤(b)中的测定结果而确定所述样品中分析物的数量。

39、根据权利要求 38 所述方法，其中用于步骤(b)中的分析物浓度是样品中分析物的浓度和样品的预定稀释液中的分析物浓度。

40、一种将靶核酸与包含预定核苷酸序列的参比序列相比较的方法，该方法包括：

(a)将包含靶核酸的样品与固定在固相支持物预定区域上的核酸探针阵列互补配对，该阵列含有包含了多个探针的第一探针系列，每个探针含有与参比序列的亚序列完全互补的核苷酸片段，该片段包括至少一个与参比序列中的相应核苷酸互补的探测位点；

(b)使配对样品与含有第二探针系列的溶液接触，其中第二探针系列包含针对第一探针系列中每一个探针的相应探针，第二探针系列中的每一个

相应探针都结合到小珠上，并且当与参比序列互补配对时对于第一系列探针是连续的；

(c)检测支持物预定区域上的小珠的存在情况；

(d)使固相支持物与含有 DNA 连接酶的溶液接触；

5 (e)使第一和来自支持物上的第二探针系列的靶核酸变性；并且

(f)在变性完成之后检测固相支持物预定区域上的小珠的存在情况，小珠的存在表示靶核酸序列与参比序列的亚序列相同，也即该序列和预定区域中固定的第一探针系列以及它们相应的探针完全互补。

41、根据权利要求 40 所述方法，其中参比序列为未突变的基因序列。

10 42、根据权利要求 40 所述方法，其中参比序列为来自未突变基因的带有至少一个核苷酸错配的基因序列。

43、根据权利要求 40 所述方法，其中参比序列为包含重复元件的基因序列。

15 44、根据权利要求 40 所述方法，其中参比序列与包含至少一个的重复单元的基因序列相同。

45、一种检测两种蛋白质之间的相互作用的方法，包括：

在小珠上连接第一蛋白质以形成小珠结合的蛋白质；

在支持物预定区域连接第二蛋白质以形成支持物结合的蛋白质；

使含有小珠结合的蛋白质的溶液与支持物结合的蛋白质接触。

20 为支持物提供旋转运动；

在旋转支持物上的预定区域检测小珠的存在情况，其中小珠的检测结果代表第一和第二蛋白质之间的相互作用。

46、一种检测蛋白质和药物之间的相互作用的方法，包括：

在小珠上连接药物以形成小珠结合的药物复合物；

25 在支持物预定区域连接蛋白质以形成支持物结合的蛋白质；

使含有小珠结合的药物复合物的溶液与支持物结合的蛋白质接触。

为支持物提供旋转运动；

在旋转支持物上的预定区域检测小珠的存在情况，其中小珠的检测结果代表药物和蛋白质之间的相互作用。

30 47、一种检测多种蛋白质和多种药物之间相互作用的方法，包括：

将多种蛋白质中的每一种与小珠连接，以形成小珠结合的蛋白质复合物；

将多种药物中的每一种连接在支持物预定区域，以形成支持物结合的药物；

- 5 使含有小珠结合的蛋白质复合物的溶液与支持物结合的药物接触。
为支持物提供旋转运动；

在旋转支持物上的预定区域检测小珠的存在情况，其中小珠的检测结果代表多种药物和多种蛋白质之间的相互作用。

- 48、根据权利要求 1 所述方法，其中检测支持物上小珠存在情况的步骤包括：

提供具有光反射性表面的支持物；

将激光直射到反射性支持物上；并且

监控激光的反射情况，从而检测由于支持物非反射性区域上存在反射性小珠而引起的激光反射并以此检测支持物上小珠的存在情况。

- 15 49、根据权利要求 7 所述方法，其中检测支持物上小珠存在情况的步骤包括：

提供具有光反射性表面的支持物；

将激光直射到反射性支持物上；并且

- 20 性小珠而引起的激光反射并以此检测支持物上小珠的存在情况。

改进的通过颗粒结合来检测靶分子的方法

5 相关申请

本申请要求的优先权源自 2002 年 4 月 9 日提交的澳大利亚临时申请 PS1597, 在此将其内容全部引入作为参考。

技术领域

10 本发明涉及通过利用小珠(优选易于检测的聚集小珠)以及各种物理化学方法来对特异的分子间相互作用, 例如核酸杂交、抗原-抗体反应、受体-配体相互作用以及其它特异分子间相互作用进行检测和定量。本发明广泛应用于医药、军用和民用工业、环境监测以及科学研究。

背景技术

15 核酸杂交、抗原-抗体反应和受体-配体结合是分子间相互作用的实例, 由于相互作用的特异性, 使其在鉴别或检测这些物质时具有重要的价值。这些特异的分子间相互作用可以通过具有不同灵敏度和特异性的涉及靶分子或信号扩增的各种方法来检测。抗原-抗体反应的扩增基于信号放大, 例如通过酶反应。核酸既可以通过信号放大也可以通过聚合酶链式反应(PCR)的靶扩增来进行检测。虽然 PCR 非常灵敏, 但其费力而且无法稳定地保持
20 准确性。此外, 由于 PCR 要求变性、退火和延伸的多次循环, 至少需要一个小时。近来, 实时 PCR 改进了终点检测, 从而减少了完成整个过程的时间。然而, 仍然需要进行循环。除此之外, 在等温环境中引入了增强靶核苷酸扩增的灵敏度和特异性的技术。

25 因此, 理想的情况是开发出一种无需靶扩增并能提高靶分子检测速度的简单和廉价方法和仪器。

发明概述

本发明提供了检测或鉴定微量靶分子以及测定溶液中生物分子浓度的方法。这些方法是基于大分子相互之间的特异亲合力, 例如互补核酸分子之间的 Watson-Crick 结合以及抗原-抗体结合。

根据本发明，合成一对与靶分子具有高亲合力和特异性的探针。其中一个探针结合到固相表面上，另一个探针结合到由各种材料制成的颗粒(“小珠”)上，优选的是铁磁和金属颗粒。这些小珠既可以是可溶性的也可以是不溶性的。在靶分子存在的情况下，连接到一个探针上的小珠进一步与靶分子的一部分结合。连接到固相表面上的另一个探针则与靶分子的其它部分结合。这样，靶分子就夹在功能化小珠和功能化固相表面之间。

根据本发明的一个技术方案，检测怀疑含有靶分子的样品中的靶分子的方法包括：

10 将能与靶分子的一部分相连的第一种探针分子连接到小珠上，从而形成小珠结合探针；

将能与靶分子其他部分相连的第二种探针分子连接到支持物上，从而形成支持物结合探针；

15 使样品与小珠结合探针和支持物结合探针接触，并使靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针结合，以便使靶分子夹在支持物和小珠之间，并使小珠附着到支持物上；

检测支持物上小珠的存在情况，其中支持物上小珠的检测结果表明了样品中靶分子的存在情况。

20 根据本发明，小珠可以利用它对光的作用来进行光学检测。当一束激光照射到反射表面例如支持物上时，它会被完全反射回来，而反射激光可以通过沿预定的反射光路经过适当设置的传感器来进行检测。在暗材料例如黑色非反射小珠聚集体存在时，仅有少量的激光被反射回去—由于光分散到不同方向上而使反射光减弱。相反的效应也可以类似地应用于小珠的检测，例如在非反射表面上存在反射小珠的情况下，会产生一些反射至传感器的光。因此，表面上小珠的存在或缺失可以通过将一束激光发射至表面上并考察反射激光强度的变化来进行判断。在该方法中，二进制输出信号0，在小珠存在时变成二进制信号1，反之亦然。为了使检测小珠变得更方便，在检测之前小珠可以被聚集起来。在靶分子和探针相互作用后，可以将未结合的小珠以及其它试剂和样品去除以便消除噪音。

30 本发明进一步提供了一种利用靶分子与一对分子探针之间的特异性相互作用来检测或鉴定痕量靶分子的仪器，其中该对分子探针中的一个探针与小珠相连。该仪器包括：

小珠结合探针，其含有与能够和靶分子的一部分相连的第一种探针分子相连接的小珠；

支持物结合探针，其含有与能够和靶分子的另一部分相连的第二种探针分子相连接的支持物；

- 5 用于使样品与小珠结合探针和支持物结合探针接触并使靶分子与所述小珠结合探针和所述支持物结合探针结合的装置，以便使靶分子被夹在支持物和小珠之间，并使小珠连接到支持物上；以及

用于检测支持物上小珠的存在情况的装置，其中支持物上小珠的检测结果代表了样品中靶分子的存在情况。

- 10 该仪器的优选技术方案是将本发明中生物芯片微阵列沿着小型化常规光盘的轨迹排布，用常规技术将生物芯片的内容和地址信息烙制(burn into)在光盘表面上。

- 常规光盘通过沿着起始自光盘中心的连续螺旋形轨迹嵌入一系列的反射性和非反射性元件来存贮二进制数据。当光盘沿着它的中心轴旋转时，
15 随着激光对嵌入的元件进行扫描时，聚焦在轨迹上的激光束就会被反射或散射。适当放置的光敏二极管接收反射激光或减弱了的反射光，从而阅读出光盘上的二进制数据。烙制常规光盘的过程一般包括利用比阅读激光强且不同的激光发出的热能来改变嵌入介质的反射性。

- 根据本发明，仪器可以有结合了不同探针的多个孔，以便检测或鉴定
20 不同的分子。为了对同一分子的不同数量进行定量，仪器可以带有结合了不同数量的同种探针的多个所述孔。为了保证质量，仪器至少带有两个具有等量的同类型结合探针的孔，以用于质量控制，例如在同样的支持物上可以制造两个或多个同样的生物芯片。当多个相同的生物芯片上进行多次阅读对比，这一措施可以弥补制造缺陷、灰尘污染和其它不可预见的技术故障，进一步确保了统计计算结果的“可信程度”。为了进一步使检测更
25 方便，仪器还可以带有用于聚集结合在支持物上小珠的装置。例如，产生磁场的物体可以使未磁化的铁磁小珠磁化，从而使它们聚集在一起。

- 本发明进一步提供了一些提高在生物芯片表面上结合的小珠数量的方法，以便在靶分子极少的情况下提供另一层次的信号扩增。这些方法包括
30 磁链反应(Magnetic Chain Reaction)新方法和其它可能的方法，例如通过添加连接的 DNA 双链来聚集用寡核苷探针功能化的金微粒(美国专利文献

6261944)、通过添加亲和素或链亲和素来聚集生物素化的小珠或反之亦然、通过添加免疫球蛋白二聚体或多聚体来聚集连接了葡萄球菌 A 蛋白或链球菌 G 蛋白的小珠、通过多价抗生物素抗体来聚集生物素化的小珠以及其它来自免疫分析的方法。一分子的链亲和素具有 4 个生物素结合位点。将链亲和素加入到表面连接了生物素的小珠的悬浮液或溶液中会导致小珠之间的交联,从而引起聚集。同样地,多价免疫球蛋白分子在与小珠表面上的特异分子(例如生物素)结合时会使小珠连接,从而导致小珠聚集。

磁链反应是磁体在其磁场影响下自发聚集的现象。在本发明中,如果采用未磁化的铁磁材料构建小珠,那么小珠磁化将会导致小珠自然聚集。该过程可以要求或不要求微扰以帮助溶解性小珠的沉淀。对于不溶性的小珠,仅仅需要轻微的搅动就可以使小珠聚集。一旦小珠在磁力的影响下聚集起来,检测它们就变得容易多了。

根据本发明,固体表面上小珠的存在情况可以利用小珠的物理特性用各种方法进行检测。相应地,如果小珠是金属的,可通过外部磁场在其中感应可检测的磁场(金属检测)。如果小珠是铁磁材料制成的,可以通过首先被磁化然后再检测小珠的磁场而得到检测。铁磁小珠也可以通过施加快速变化的外部磁场而被加热,同时机器的非铁磁金属和非金属元件则不被加热。这样加热的小珠产生的红外线会增加,然后通过灵敏的红外线传感器或以下任意一种方法进行检测:

1、化学发光或生物发光增强。化学反应可通过提高温度而加速。酶反应也可以通过不使酶变性的一定温度范围内增加热能而加速。引起发光的化学反应例如化学发光和生物发光反应可通过提高温度来加速,从而导致光输出强度的增加。这种光输出的增加可以用光敏二极管检测。

2、如果采用热发光材料包被小珠,那么加热小珠就可以散发出能被检测的光。

3、上述反应产生的光可被用来“泵击(pump)”激光,从而通过光放大的方式产生出更大的、更易于检测的光信号。

生物芯片表面上铁磁小珠的存在情况也可以通过先磁化它们,然后采用灵敏的声学设备在变化的外部磁场来回晃动(flip)它们时倾听其声学变化从而进行检测。这类似于巴克豪森(Barkhausen)效应,其不同之处在于小珠的聚集体是多个独立磁体而不是一个磁体。

本发明提供了这些方法在检测或鉴定任何靶分子中的多种应用。这些应用包括(但不限于)分子浓度的测定、遗传应用例如突变检测、单核苷酸多态性(SNP)分布、重复核酸序列的计数及其应用、肿瘤的诊断和分子分类、基因表达分析、蛋白组和药物筛选。

5 本发明的其它目的和特性将在结合相应附图的详细说明中变得清楚了。可以理解的是,附图仅仅是为了说明而不是限制本发明,本发明的保护范围通过权利要求来限定。进一步应当理解的是附图不一定严格按尺寸要求,除非另有说明,它们仅仅是用来概念性地说明本文所要描述的结构和过程。

10 附图说明

现在结合实施例并参考相应的附图将对本发明优选的形式进行描述,其中:

图 1 是两个生物芯片的示意图,通过将靶分子特异的探针(核酸在左,抗体在右)结合到反应孔上而被功能化。

15 图 2 简要示意了两个连接了小珠的生物芯片,由于功能化生物芯片、靶分子和功能化小珠(带有靶分子特异的区域的不同区域的探针)之间的特异性结合而使小珠结合到生物芯片上。

图 3 示意性地描绘了在有核酸探针的生物芯片中加入连接步骤。

图 4 描绘了磁链反应及其对结合到生物芯片上的小珠数量的放大效应。

20 图 5 示意性表示生物芯片的螺旋-线性微阵列以及通过在小珠存在时激光散射而小珠不存在时激光反射来检测生物芯片上聚集的非反射性小珠的存在情况的优选方案。支持物介质必须对激光具有反射性。

图 6 概念性地示意了生物芯片编址和数字坐标布置的方案。

图 7 描绘了 POC 便携式设备的设计方案。

25 图 8 描绘了采用优选的螺旋-线性微阵列的便携式设备的优选设计方案。

图 9 示意性地描绘了一种竞争性测定方法的原理,以及如何在许多生物芯片的微阵列中应用它来进行分析物浓度的检测。

30 图 10 示意性地描绘了第二种竞争性检测方法的原理。图 10A 描绘了存在的分析物的量少于小珠的情况。图 10B 描绘了存在的分析物过量于小珠的情况。

图 11 简要示意了用于辅助判断儿童出疹热的诊断用生物芯片微阵列。

图 12 简要示意了生物芯片另一项在以基因转位为特点的各种肿瘤，这里为软组织肉瘤的诊断和分子分类中的应用。

图 13 描述了生物芯片微阵列和等位基因特异的寡核苷酸杂交用于测量 (本例中为 Huntington 病)基因组 DNA 中的重复单元数量的思想。

图 13A 简要示意了针对 Huntingtin 基因重复区域的两个探针(SEQ ID NO 1 和 2)的设计。探针中重复单元的合并数目与给定患者的基因组 DNA 相匹配。杂交后能够形成连接。

图 13B 简要示意了合并的重复单元数目少于给定患者中的真实重复单元数目的另一组探针(SEQ ID NO 3 和 2)。探针的两个末端没有发生连接。

图 13C 简要示意了合并的重复单元数目多于给定患者中的重复单元的真实数目的另一组探针(SEQ ID NO 4 和 2)，结果出现有突出端的探针而且连接失败。

图 14 例举了相似设计方案在单核苷酸多态性(SNP)的确定或突变检测中的应用(SEQ ID NO 5~7)。

图 15 描绘了应用竞争性结合检测的第二种方法测定 mRNA 水平和蛋白质浓度。

图 16 示意性地描绘了采用连接了不同蛋白质的蛋白质微阵列和小珠文库来进行蛋白质间相互作用的研究。

图 17 描绘了微阵列在药物筛选中的应用。能够鉴定出对特定蛋白质具有高亲合力的药物。

优选实施方案详述

定义

在本文中采用的下列术语一般具有以下含义：

“核酸”指的是单链或双链以及任何化学修饰的 DNA、RNA。修饰包括(但不限于)那些具有其它化学基团的成分。

“配体”指的是特异地与受体相结合并借此在细胞中产生信号的分子，例如激素就是一种配体，当它与受体结合时触发细胞级联反应，导致细胞生长或其它反应。

在本文中所采用的“杂交”指的是两个互补 DNA 单链的结合(DNA/DNA 杂交)或互补的 DNA 和 RNA 链之间的结合(DNA/RNA 杂交)。

“分析物”指的是存在于患者血液或体液中的物质。分析物的浓度一般随新陈代谢或疾病的状态而改变，是临床医生掌握特定患者健康状况的信息。

“抗原”指的是其分子表面结构能触发免疫应答例如抗体的产生，和/或与其特异性抗体发生反应(抗原-抗体反应)的物质。

“抗体”是能识别并结合某种抗原而成为免疫应答的一部分的蛋白质(免疫球蛋白)。

“探针分子”指的是具有与同类或不同类的另一种分子特异性结合特性的任何核酸、蛋白质或其它分子。一般来说，核酸与序列互补核酸特异结合。也就是说，带有如下序列 A-G-G-C-G-T-A(从 5'至 3'端)的探针(在本例中是核酸分子)将特异性地与含有下列序列区 T-A-C-G-C-C-T(从 5'至 3'端)的另一条 DNA 链结合，其中 A, T, G, C 分别代表腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶。针对某抗原的抗体能作为该抗原的探针分子。

“表位”指的是抗原分子结合到抗体上的部分。抗原可以带有许多不同的表位，这些表位与不同的抗体结合。

“铁磁小珠”指的是由具有能感应产生磁性的任何物质组成的小珠，铁磁小珠在迅速变化的磁场中由于内部会产生涡流从而产生热。

“微卫星”指的是一小段非常简单的 DNA 序列(通常为 1-4bp)的串联重复 DNA 链(通常小于 0.1kb)，例如(CA)_n。

“微卫星的不稳定性”指的是某些肿瘤细胞所特有的现象，即在 DNA 复制期间微卫星重复单元的拷贝数量发生随机变化。

“聚合酶链式反应(PCR)”指的是在试管中制造一条 DNA 链的许多拷贝的技术。它采用由双链 DNA 的变性、合适的寡核苷酸探针的退火以及通过聚合酶进行引物延伸所组成的重复热循环过程。

“反转录酶”指的是存在于 RNA 病毒中、能由 RNA 模板合成 DNA 的酶复合物。

“反转录 PCR(RT-PCR)”指的是 RNA 的扩增技术，包括先利用反转录酶从靶 RNA 合成互补 DNA(cDNA)，然后对 cDNA 进行 PCR。

生物芯片的结构

生物芯片包括由任何种类材料制成的固相支持物上的小斑点(孔)组成,但优选地采用包被了反射性惰性材料例如金的硬质透明聚碳酸酯聚合物。在生物芯片的表面上结合有假定的靶分子特异的一对探针分子中的一种。

图 1 是生物芯片[1]的示意图,包括带有中心小孔[2]的固相支持物,小孔[2]与核酸探针[3](左)、特异性抗体[3](右)或其它分子共价结合。

另一成分是与小而黑的非反射性可溶或不可溶的(沉底的)小珠结合的第二种特异性探针,小珠可以由导电性、半导性或非导电材料(优选铁磁材料例如铁、铁氧化物,单独地、电镀地或以各种混合物或合金形式)制成。

生物芯片的原理

采用这种生物芯片以及特异探针结合的生物芯片和小珠的结构,当靶分子存在并处于合适的条件下时,它会被结合并夹在探针之间。图 2 表示出了该种思想。在这里,一些靶分子[4]被特异性探针[6]功能化的小珠[5]和孔结合探针[3]所捕获。其它的靶分子则结合到功能化小珠或孔上,但不会与两者都结合。通过孔结合探针[3]的定位性能,结合到靶分子[4]的功能化小珠[5]被固定在生物芯片[1]的孔[2]中。左侧图描绘的是核酸探针和靶分子,右侧图描绘的是特异性抗体探针和抗原靶分子。反应之后,未结合的小珠以及其它试剂和样品可以被去除以消除噪音,小珠的检测可以通过各种方式进行。

靶分子浓度的检测范围非常宽,从一个分子到与小珠结合探针同样多的分子都可以检测,这反映了设计方案的稳固性。然而,灵敏度并没有下降。该装置理论上可以检测单一靶分子的存在。此外,当它用于检测特定的核酸序列时,无需进行预先的扩增。本方法用途广泛,可以用于检测 DNA、RNA、蛋白质以及其它大分子。

探针分子的制备

首先制备一对特异性探针分子。

核酸探针可以依据靶序列的信息来制备。这些序列信息经常可以在数据库中找到,例如 Entrez 基因组(国家生物技术信息中心,国家医学图书馆,美国国立卫生研究院)。与靶分子的两个末端序列互补的探针序列可以用商业途径合成。此外,探针可以依照这样的思路来设计:即,在与靶分子杂交以后,探针的两个末端尽可能靠近,以便 DNA 连接酶(使相互靠近的 DNA 链共价结合的酶)能够将两个末端连接在一起从而加强了“孔”和小珠之间

的结合。抗体可以从暴露于抗原的实验动物身上制备。由于上述原因，要保证抗原的来源。

反应

5 将足量制备的样品加到芯片上。含有假定靶分子的空气可以起泡通过合适的溶质(solute)。固体或液体可以溶解在溶液中。完整的细胞和组织需要经过化学或物理或其它方式进行裂解，从而释放出被检测的分子。

加入相对于靶分子过量的功能化小珠(在样品加入之前、之中或之后进行)。如果靶分子是双链 DNA，需要在特定温度下加热一段预定的时间，从而使 DNA 变性成为单链 DNA。这样反应才能进行。

10 在本优选技术方案中解释了应对微流体性的解决方案，其中小珠由消磁的磁性材料制成，并在微阵列下面的可移动磁场的控制下，在旋转的生物芯片微阵列的表面上保持固定的位置，以便能够系统而有序地在通过的生物芯片上检测被捕获的靶分子。由于固定的小珠相对于溶液中的靶分子和通过的生物芯片而移动，这就使反应动力学向有利的方向发展。控制小珠的磁场不应该太强以免过程中的小珠被永久磁化。

15 为了增强靶核酸与核酸探针之间的杂交反应的特异性，可以包括任选的使两个探针连接起来的步骤。这一点如图 3 所示。寡核苷酸探针[3 与 6]被设计与靶序列[4]的相邻片段杂交从而使探针末端相接触。加入 DNA 连接酶[7]导致寡核苷酸探针间的糖-磷酸酯骨架共价相连。除了增强反应的特异性之外，这一步骤也增强了小珠与生物芯片的连接。因而使仅靠单一核苷酸分子与生物芯片相连的小珠或围绕着特异性结合小珠而聚集的小珠(下一节一小珠的聚集)不会因为冲洗期间施加的水压或生物芯片微阵列旋转而产生的轻微离心力而中断。

小珠的聚集

25 在优选的技术方案中，小珠的聚集是通过在反应的最后向生物芯片上加入与小珠上的化学分以高亲和力并特异结合的分子来进行的。这些化学相互作用包括但不限于：

1、亲和素/生物素或链亲和素/生物素—每一个亲和素和链亲和素有 4 个生物素结合位点。因此，当把亲和素或链亲和素加入到表面上结合有生物素的小珠的悬浮液(或溶液)中时，小珠就会聚集起来，这是由于亲和素(或链亲和素)使两个或多个小珠交联在一起，而小珠表面上的其它生物素分子

30

则可以自由地连接更多的亲和素(或链亲和素)分子,因而连接上了其它的小珠。

2、蛋白 A/IgG 或蛋白 G/IgG—葡萄球菌 A 蛋白和链球菌 G 蛋白对于免疫球蛋白分子 Fc 片段(结晶片段)具有强亲合力。由于每一个免疫球蛋白 G(IgG)分子只有一个 Fc 片段,因此带有两个或更多同样表位的普通抗原与免疫球蛋白二聚物例如 IgG 的两个分子相结合,从而导致表面上含有蛋白 A 或蛋白 G 的小珠进行交联。

3、抗体/抗原对—针对生物素的抗生物素抗体可以使表面结合了生物素分子的小珠聚集。多价抗体例如 IgA 和 IgM 对于使小珠聚集更为有效,这是由于它们分别是二价和五价的。

4、DNA/DNA, DNA/RNA—当加入具有互补序列的连接双链 DNA 时,会导致结合了核酸分子的经适当处理过的小珠聚集(Mirkin, 美国专利文献 6261944)。

5、可以利用的其它特异性分子间相互作用。例如,酶结合到底物上以催化反应。如果采用与天然底物结构类似但不能被酶分开的小分子(例如药物)替代天然底物而加入到溶液中,它就会通过亲合力与酶结合。如果酶被结合到小珠表面,带有多于两个酶结合位点的小分子就会引起小珠的聚集。由 HIV 病毒产生的蛋白质 Gp120 特异性地与人类 T 细胞产生的 CD₄ 分子结合。因此如果 T 细胞加入到溶液中,就会使含有 Gp120 的小珠聚集。

20 利用磁链反应聚集小珠

在特别的优选技术方案中,此处指磁链反应,用铁磁材料制作小珠。小珠最初是消磁的。当与靶分子的反应结束后,生物芯片或整个生物芯片微阵列受到足够强的磁场作用而使小珠磁化。之前的小珠是溶解的、悬浮的或沉于生物芯片底部,而且彼此之间无相互作用。在将磁能转移给小珠之后,由于材料的剩磁性导致净磁场的存在,它们开始彼此相互作用。小珠系统相互作用的目的是要寻求达到可能最低能量状态。而这种最低能量状态就是小珠排列成行,聚集起来。由于未结合的小珠聚集成一大团,该反应被称为“磁链反应”。特异性地与生物芯片结合的磁化小珠也会聚集,但在不结合小珠的生物芯片上就不会发生聚集。铁磁小珠的磁化很容易通过采用例如在普通用户型的录音机上就可以找到的电磁体所产生的磁场来进行。

虽然生物芯片上单个结合的小珠很难检测，但是大量的聚集体就很容易检测，甚至可以用肉眼看到，这使得采用多种方法检测聚集体成为可能。

图 4 示意性地描绘了在小珠磁化后引起铁磁小珠聚集体形成的各个阶段，这被称为磁链反应。

5 检测小珠的方法

1、通过激光的散射检测小珠

在特定的优选技术方案中，在结合小珠存在时反射激光的减弱被用作靶分子与孔结合和珠结合探针特异性反应的检测手段。

如果生物芯片采用反射性介质作为支持物，那么聚焦在没有结合小珠的生物芯片上的激光将被反射回去。预先放置好的光敏二极管(传感器)对反射光进行检测。

被聚集小珠所覆盖的生物芯片会散射激光，结果，反射到传感器上的激光强度就会减弱。

通过这种方式，生物芯片上的特异性反应就非常方便地被检测并产生二进制信号。

图 5A 显示出在生物芯片[1]上存在非反射性小珠聚集体时，扫描激光束[8]的散射情况。所述生物芯片[1]在微小压缩光盘样微阵列[9]上沿螺旋形轨迹排列，所述微阵列叠置在轨迹上并且与轨迹的反射性和非反射性(数字)元件完全整合。为了清楚起见，仅显示出了中间的两条螺旋线。在小珠聚集体不存在(图 5B)以及如果生物芯片是由反射性材料制成时，激光束将被反射回传感器[10]。这种二进制信号(小珠存在时为(1)，小珠不存在时为(0))与有关生物芯上存在的信息一起被转送给嵌入的微处理器，从而提供分析结果。除了单个螺旋形轨迹，也可以采用多个同心的轨迹或一些其它形式。

或者，小珠也可以由反射性材料制成，而生物芯片定位在轨迹的非反射性元件上。小珠在生物芯片表面上的结合实现了将编码信号从非反射性(二进制 1)转换为反射性(二进制 0)的相同目标。

在另一种技术方案中，微阵列利用了光盘的两个表面(透明微阵列)，其中编码的数字信息(反射性或非反射性的)位于透明支持介质中的插入层内。生物芯片位于光盘的上表面。利用在光盘下面的激光和两个传感器(光盘一面一个)，与激光同面的传感器(轨道传感器)作为与普通光盘中一样的编码数字信息的阅读器，而位于激光相反面的传感器(生物芯片传感器)作为小珠

存在情况的检测器, 因为小珠的存在将减弱传导给生物芯片传感器的激光。在小珠结合到生物芯片表面的情况下, 轨道传感器起到闸门的作用, 从而忽略了来自生物芯片下表面的微弱背面散射激光。与之相类似, 规划生物芯片传感器以忽略那些来自生物芯片之外的所有信号。

- 5 在另一种技术方案中, 采用了同样的透明微阵列。数字信息被编码成不透明的和透明的节段。探测激光位于生物芯片的反面(在其之下), 位于生物芯片同一面上的单个检测器既作为轨道传感器又作为生物芯片传感器。本种技术方案检测的是由对于激光不透明的位点上小珠传导激光的减弱。

图 6 描绘了用数字编码整合生物芯片的方案以及使用纠错 EFM(8-14 调制), 因而把激光正在扫描的微阵列部分、生物芯片的地址以及生物芯片的内容等信息反馈给微处理器。在图 6A 和图 6B 中, 三排读数作为一个连续字符, 中间无间隔(图中画出的间隔是为了清楚起见)。每个由 14 个二进制数字组成的块编码一个键盘输入符(此处代表任意的)。通过在合适的位置沉积探针, 介质变成生物芯片。这里例举了炭疽生物芯片[11], 它携带有针对炭疽致死因子的寡核酸探针。在从炭疽孢子样本中提取的编码炭疽致死因子的 DNA 序列存在的情况下, 它们将既与生物芯片结合又与携带了针对炭疽致死因子不同区域的特异性寡核苷酸探针的功能化小珠结合。通过激光扫描来检测生物芯片上连接的小珠的存在情况, 同时可以伴随或不需要磁链反应。在示意图中(图 6A), 当生物芯片含有激光散射小珠时, 数字块(11011011010100)读作“Y”, 表示小珠存在; 而小珠不存在时, 数字块(11001011000100)读作“N”, 表示小珠不存在。在图 6B 中, 例举了编码的“简并性”, 其中 10011011010100 和 10111011111100 都代表炭疽阳性鉴定结果。由于大的小珠聚集体可能溢过生物芯片的边界而进入邻近的区域(每个“0”或“1”是一个数字区域), 因此不同的编码就编制成代表相同的结果。这种编码的“简并性”类似于天然氨基酸的多个编码子。例如, CCA, CCG, CCC 和 CCU 全都编码脯氨酸。

2、金属检测

金属检测可以应用于金属小珠或含有相当金属数量的小珠。金属检测的原理已经在别处描述过了。其要点是, 当金属物体受外部磁场微扰时, 其内部会产生涡流, 从而产生相反的磁场。诱生的磁场随后可通过灵敏的电磁体进行检测。

3、磁化后磁场的检测

采用灵敏的高斯测量仪(gaussmeter)或其它仪器可以检测聚集小珠的磁场。事实上,可以采用在普通磁带、数字磁带和计算机硬盘上微小磁体磁场的检测作为贮存和检索类似物和数字型数据的方法。

5 4、声音的检测

Barkhausen 效应描述了受到波动性磁场干扰的永磁体所产生的干扰(crackling)噪音。所述噪音是由外部磁场强大的调整力而导致的磁体内相邻磁力区域之间的相互作用而产生的。

Barkhausen 效应可以用来检测磁性颗粒的聚集体。

10 5、对受外场(能源)例如变化磁场和电磁波激发后小珠产生的热/红外线的检测

施加外部电磁场的情况下,金属微粒吸收能量,导致微粒被加热。热量随后以红外线形式向外辐射。

a、散发的红外线可以通过单独地或结合有激光束(激光温度计)的灵敏
15 红外线光敏二极管来检测。

b、如果生物芯片事先包括热加速化学反应,那么散发到小珠紧邻环境中的热量就可以增强其周围化学发光混合物的化学发光。化学发光产生的光强度足以利用光敏二极管来检测,并且其与结合的小珠数量、受外场激发的程度以及外场作用的持续时间成正比。

20 c、按照同样的原理使周围生物发光混合物的生物发光增强。发出的光也可以用来检测和定量小珠。

d、诱发提前包被到小珠上热发光材料发光。热发光材料将过量热能以可见光形式辐射出来。发出的光可以用光敏二极管进行检测。

25 e、利用从 a-d 发出的光进行固有激光器的原位光扩增。从小珠或其邻近环境所发出的光用来“泵击”小激光器中的激光器产生激光束,其原理是散发辐射刺激光扩增(Light Amplification by Stimulation of Emission Radiation)。这样所产生的激光可以作为代表生物芯片特异性反应的信号,因此就可以鉴别要检测的靶分子存在与否。采用光电倍增管也可以达到同样的目的。

30 微阵列和 POC(point-of-care)设备的装配

在优选技术方案中，将多个单芯片装配成二维或三维的格状微阵列。在图 7 中，示意性地描绘了这样一个安装到 POC 便携式设备中的微阵列 [12]。为清楚起见，将激光扫描仪和其它电子元件省略。单个生物芯片制成检测不同的分子或进行不同的定量分析。在相同微阵列上可包含两个或三个同样的芯片以保证质量。

在特别优选的技术方案中，如同在光盘一样在圆形反射性表面上，生物芯片的螺旋形线性微阵列还设置“平地(land)”和“沟槽(pit)”形式的数字坐标。

“平地”和“沟槽”分别散射或反射一束紧密聚焦的激光束，并随后被传感器解释为相应的二进制“ON”或“OFF”；这样就编码关于激光束扫描位置的信息以及有关生物芯片的信息。

激光对生物芯片的扫描揭示了聚集体存在与否，而其存在与否则分别与加入生物芯片之间数字坐标中的“平地”和“沟槽”相对应。

图 8 例举了微阵列的特别优选技术方案，很多方面与光盘类似。微阵列由塑料制成并包被有反射性材料，呈圆形或其它能围绕中心轴旋转的任何形状。“沟槽”和“平地”通过常规压缩光盘烧制技术就可以烧制或印刷于其上，从而为微处理器(数字坐标)、生物芯片地址以及生物芯片内容(数字条形码)提供反馈信息。在预先编制的位置(生物芯片地址)中，没有印刷“平地”。替代的是，一对探针其中之一(核苷酸、抗体、蛋白质或其它大分子)通过由激光束引导的特殊合适的喷印型分配设备而沉淀和连接(印刷)到生物芯片上。另一种探针用单独的方法连接到小珠上。上面定位有数字坐标和生物芯片的轨迹为螺旋形的，并象在常规光盘中那样起始自微阵列的中心。

用于 POC 的便携式设备制备成带有接收卡盒的狭槽。卡盒包含微阵列并将试剂和样品限制在微阵列的表面。它包含加入样本和试剂的孔、用于在反应结束时利用离心力来收集未结合小珠和试剂的沟槽以及其它被认为适于有效执行微阵列功能的部件。卡盒的顶部是透明的，从而可以用激光和传感器来探测微阵列表面上的生物芯片和数字信息。插入卡盒，要保证微阵列的位置与机械齿轮、电磁体、激光、传感器以及便携式设备的其它元件相匹配。传感器对微阵列进行鉴别，进行电自检并在反应结束后显示

出作为被检测的“生物剂”、分析物的“浓度”的结果或其它利用惯用微阵列进行的科研成果。

定量(分子检测)

5 已知的体液中的生物分子经常需要进行浓度检测。例如在甲亢或甲低时检测甲状腺素。本发明只需体液或血液的微量样本就可以进行住院或临床 POC 检测各种待分析物即时浓度。

a、方法 1

10 利用在一系列生物芯片(每一个芯片不同之处在于具有依次略微减少的结合分析物分子和随后功能化的小珠)中预先固定的小珠可以测定未知样品中分析物的浓度(图 9A 与图 9B)。加入待测样品[13]产生竞争性结合以及小珠结合探针的替代。只有那些带有足量结合小珠的生物芯片,才有能用任何检测小珠的方法进行检测的信号。小珠被替代偏离检测阈值的生物芯片将指示阴性信号。一系列信号 - 产生和信号 - 缺失的生物芯片的转换点就与分析物的浓度相关联。用已知标准进行的预校准保证了测试样品的精
15 确定量。

在图 9A 中,描绘了加入样本导致的竞争性结合以及预先结合的小珠和夹心分析物的被替代的过程。给定样本中分析物的浓度越高,被替换的预先结合的小珠就越多。

20 图 9B 描绘了带有数量减少的结合小珠的一系列生物芯片的微阵列。加入含未知浓度分析物[13]的样本导致特定的生物芯片上的小珠在通过激光散射或由外场诱导的生物芯片发出的信号被检测时位于检测阈值之外。所述临界点的定位给出有关分析物浓度的信息。

b、方法 2:

25 另一种利用竞争性结合原理定量分析物的方法(图 10A)不要求预先用固定的小珠和分析物装配生物芯片的阵列。其优点是无需预先制造、分离和纯化分析物分子。将制备的未稀释样品(图 10A, 右上)加到生物芯片中,平行地将稀释样品加到另一生物芯片中(图 10A, 右下)。

30 在一种优选的技术方案中,至少采用一或两个生物芯片。将分析物和功能化小珠加到生物芯片上,发生两个探针与分析物之间的结合,导致以下产物的比例变化:结合到功能化小珠上的分析物、结合到生物芯片上的

分析物、既与生物芯片结合又与功能化小珠结合的分析物以及游离的分析物。

5 如果分析物的绝对数量少于结合到小珠上的探针绝对数量，那么所有的分析物分子均被功能化小珠捕获。稀释样本将导致能被捕获的分析物数量更少，因此结合到生物芯片上的小珠数量也更少。当分析物的数量少于结合探针的功能化小珠数量时，信号强度与分析物的浓度直接成正比。

10 如果分析物的绝对数量多于结合到小珠上的探针的绝对数量，那么分析物的加入量相对于功能化小珠过量导致除了结合到生物芯片上的分析物之外还有游离的分析物。由于生物芯片结合探针的数量有限，因此游离分析物与分析物结合的小珠之间发生竞争。稀释样品以及在带有同等数量功能化小珠的相同生物芯片中进行测试，其结果是较少的游离分析物与分析物结合的小珠发生竞争。这自相矛盾地说明较大量的结合小珠时，分析物浓度与生物芯片结合的小珠数量之间的关系相反。因此在分析物的数量比带有结合探针的小珠数量多时，信号的强度与分析物的浓度成反比。

15 通过对含未知数量分析物的稀释样和未稀释样品的进行平行检测，就有可能通过采用适合于如上述阐述情况的方程式和常数来测定分析物的浓度。微处理器采用运算法则来选择合适的用于计算分析物浓度的方程式。对于绝大多数分析物，其浓度范围通常落入上述特定情况其中之一，但不会两者兼有。需要预先的校准和常数。由于该方法对给定的分析物只需几个生物芯片，因此多个重复芯片能进一步确保质量。POC 设备具有足够的容量，使用一个微阵列立刻进行许多不同分析物多重的检测。

其它应用

1、传染病因子的鉴定

25 许多传染性疾病具有相似的症状。例如炭疽、流感、登革热、天花、单纯性感冒、红疹等最初的症状都包括有不舒服(比平常状况差)、发热、肌肉疼痛和非特定皮疹。

30 为了使初诊医生能准确鉴定这么多症状相似但后果完全不同的疾病，可以采用本发明对全部这些临床传染性因子经济而快速地进行微量测定(并且在早期)。许多患者无需住院观察，一旦致病原因被准确鉴定就可以回家，从而为患者节约了金钱并减小了风险(如果他们需要在医院中进行监护的话，可能会染上有害的微生物)。

在图 11 中, 通过一块能进行疾病判断的微阵列平板例举了本发明作为传染病临床辅助诊断的实用性。这里描绘的微阵列, 是用于鉴定儿童中共同起始症状为发热和皮疹的一组传染因子。虽然这些病的起始症状相似, 但如果未经改变和治疗, 其发展和最终结果有很大不同。其中婴儿红疹传染对于免疫力活跃的儿童来说无关紧要, 而传染性脑膜炎则是病程进展快而且发病率和致死率都很高的疾病。利用生物芯片的微阵列[11A], 其中每一块芯片连接了不同传染因子的探针, 加入与待寻找的传染因子相对应的功能化小珠的文库[图 11B]以及临床样本, 结果只有功能化小珠与相对应的特定传染因子生物芯片形成了连接。在假定情形中, 麻疹通过功能化小珠与麻疹生物芯片的结合而被鉴别出来(图 11C, 左), 没有小珠结合到风疹生物芯片上(图 11C, 右), 对于风疹的读取结果为阴性。

2、肿瘤的分子分类

许多癌症是由于部分基因在基因内或基因间转座(嵌合基因)而造成的。这些例子太多无法一一例举, 包括有甲状腺滤泡癌、某些急性骨髓性白血病、许多软组织肉瘤例如滑液(synovial)肉瘤和骨外粘液样软骨肉瘤。

虽然这些嵌合基因的 mRNA 转录本(嵌合转录本)的鉴定可以很容易通过常用的 RT-PCR 来进行, 但该方法很慢而且很费力。

采用本发明(图 12), 可以制备出能与嵌合转录本的两个部分杂交的一对探针。一个探针结合到孔上而另一个探针与小珠结合。如果肿瘤是白血病或一种在其早期或晚期容易进入血液循环的类型, 那么用锐利的针头从肿瘤或血液循环中抽取微量样品就可以得到肯定鉴定结果。采用此方法可以立刻筛选出许多不同的癌症。

在图 12 中, 描绘了本发明作为分子诊断工具, 用来探测许多瘤(在这里例举的是滑液软组织肉瘤)独特的核酸嵌合链的两个或多个部分。滑液肉瘤的分子特征是 SYT 转座到 SSX1(或 SSX2 或 SSX3)。在此, 采用锐利针头吸出适当地制备肿瘤细胞, 并将其 mRNA[14]加载到生物芯片微阵列上。[图 12A 与图 12B]左侧的生物芯片连接的是针对 ATF1 转录本链的特异探针(在本例中, 是针对软组织透明细胞肉瘤), 而在[图 12A 与图 12B]右侧的生物芯片则针对 SSX1。在同一微阵列上的其它生物芯片(未示出)上, 连接用于临床区分诊断的其它软组织肉瘤的特异性探针。还显示出了加入小珠文库, 所述文库被连接软组织肉瘤中(例如 EWS 和 SYT)存在的核酸链特异互

补的探针功能化。为了清楚起见，没有表示出被待寻找的其它肉瘤的特异探针功能化的小珠。通过小珠与 SYT 特异探针的连接鉴定出嵌合转录靶分子(SYT/SSX-1)[14]与包含 SSX-1 结合探针的生物芯片的特异性杂交(图 12B, 右)。对包含结合 SSX-1 探针的生物芯片上的小珠的检测表明待定的
5 软组织肉瘤是含有 SYT/SSX-1 嵌合转录本的滑液肉瘤。在该例中，包含连接 ATF-1 特异(软组织透明细胞肉瘤)探针的生物芯片[图 12B, 左]上没有连接小珠，这是因为软组织透明细胞肉瘤特异的嵌合转录本(EWS/ATF-1)不存在。

3、重复 DNA 中重复片段的计数

10 许多遗传疾病是由于含重复序列的特定区域过度延长而引起的。例如，一种致死性疾病—Huntington 氏病就是由于位于 4 号染色体的 Huntingtin 基因中重复序列“CAG”出现 36 次之多引起的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=143100>)。

15 为了检测人体中 Huntingtin 基因中重复片段的数量，常规方法采用 PCR。

本发明简化了对重复序列数目的测定[图 13]。设计出跨越与重复序列相邻的基因不变序列的探针(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&List-uids=450395&dopt=GenBank>)。“孔”结合探针之间的区别在于除了它们携带的不变序列外其携带的重复序列的
20 数目不同。小珠结合探针则携带位于重复序列另一侧的不变序列以及固定数目的重复序列。如果孔结合探针包含 4 个重复序列而小珠结合探针包含 1 个重复序列，那么一个带有给定数目重复序列例如 5 个“CAG”重复体的人中的样品与这两个探针杂交时，使之完全首尾相连。在其它包含测定值
25 大于 4(例如 5 或更多)或小于 4(例如 3 或更少)的孔结合探针的孔中，也将发生杂交，但不会产生末端完全排列的杂交。利用 DNA 连接酶(使结合于同一条互补链上并且末端靠近的两条 DNA 链共价相连的酶)，这两个探针可以共价连接起来。而带有重复序列合并以后数目大于 5 的探针对则会带有末端突出链，不能与另一条链连接而同样带有合并以后重复序列数目小于 5 的探针则会在两个探针末端之间形成缺口。在杂交和连接反应之后，改变
30 反应条件使探针和靶分子分离(融化)，将导致带有不是正好 4 个 CAG 重复序列孔结合探针的生物芯片的信号缺失。

在杂合体中，两个生物芯片将产生确定信号，分别给出两个等位基因重复序列的长度。因此本发明就能快速而准确地测定人体 Huntingtin 基因中 CAG 重复序列的数目。

5 这项用途可应用于任何种类的带有重复序列数量可变的遗传病以及测量微卫星 DNA 中重复序列的数量和在遗传或获得性条件下微卫星不稳定性中重复序列数目的不稳定性。

采用本方法测定微卫星分布可以用于亲了鉴定和法医中对尸骸的鉴定。

10 图 13 描绘了上述介绍的原理在测定 DNA 重复序列中的应用。在本例中采用的假定 Huntingtin 基因包含 4 个 CAG 重复序列。图 13A 显示了设计的小珠结合探针[15]带有如下探针序列：CTGGAAGGA，而“孔”结合探针[16]带有如下序列：GGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTG(SEQ ID NO 1)。如图所示，上部链[17]是该特定患者中具有 4 个“CAG”重复序列的靶基因。仅仅描绘了与探针互补区域的实际核苷酸序列。其它末端(5'[18]和 3'[19])用箭头表示。杂交的小珠结合探针[15]和孔结合探针[16]采用同样的惯例来描绘。探针的下划线部分(在图上)代表位于重复序列区域边上的非重复部分。图中所示的是带有与靶分子相匹配合并数目的重复序列(正好 4 个)的两个探

15 针。这样，这些探针的 5'和 3'端就可以在酶(DNA 连接酶)的作用下连接起来。在图 13B 中仅描绘了不同的“孔”结合探针[20]序列，而小珠结合探针是相同的。所述“孔”结合探针[20]位于同一微阵列中的另一块生物芯片上。这里例举出的“孔”结合探针仅有 2 个重复序列，导致两个探针与靶分子杂交后存在一个缺口。两个探针不能被连接起来。

而在图 13C 中则显示出了带有太多重复序列(数量为 5)的“孔”结合探针[21]。因此杂交后多余部分形成“突出端”[22]。也不能形成连接。

25 4、突变检测与 SNP 描绘

突变检测是发现生殖细胞中给定疾病遗传(遗传性)的手段。

基因(有时非常大)中单点突变的常规检测方法是基于将基因的区域扩增，其缺点在于大片段无法扩增，因此在经济而系统地研究给定人基因的点突变时能力有限。

30 本发明所用的探针对(“孔”结合的和小珠结合的)可以根据非突变的基因序列的资料(可在公开的数据库中找到)而被设计出来。探针对被设计成与

连续的序列链互补。需要许多探针对覆盖要研究基因的全长，不同的“孔”结合探针连接到各自的生物芯片，而它们所针对的区域被贮存在卡盒独特标识符中。

5 通过这样的方式以及使之能重复使用的特殊设备结构，就能快速、经济而系统地进行基因突变的研究。

同样的方法可以用来确定单核苷酸多态性。首先要确定基因的序列。由于需要设计许多对探针跨越基因序列的全长，因此一对探针中的一个探针与一条 DNA 链杂交而另一个探针则与其相邻的序列杂交，杂交采用下述方式，当两者都与 DNA 杂交时一个探针的 5'端就会遇到另一个探针的 3'端。探针对中的一个探针连接到有特定位点的生物芯片上，而另一个探针则与小珠相连。在能辨别单核苷酸错配的环境中，例如最佳的氯化钠浓度和/或退火温度中在杂交和连接后出现小珠与生物芯片的连接。为了提高单个核苷酸错配的分辩能力，可以加入断裂酶、错配修复酶或其它酶用来检测或断裂带有错配的双链 DNA。探针对是这样设计的，即当与研究的基因杂交时，它们在其上前后地排列，相邻探针对之间有一定程度的重叠，这样就可以探测基因的全部序列而不会遗漏任何区域，如内含子和外显子。如果两个探针之中的任一个与靶基因之间均没有错配(这样导致两个探针都与之杂交)，那么 DNA 连接酶加入后就会使每一对探针连接起来。相邻探针对由于序列的重叠而不会连接。采用这样的方式，反应之后不连接小珠的生物芯片给出了任意 SNP 的定位。这种“生物芯片标记的”DNA 链随后可以通过一种核苷酸扩增方法而被扩增并且通过测序揭示 SNP 的类型。

25 为了识别杂合体中的等位基因，采用了“数字截短测试(digital truncation test)”的改进方法(Traverso 等)。利用 96 孔微量滴定板，基因组 DNA 经稀释等分到每个孔中。稀释程度为在一个孔中仅存在一或两个待测基因。每个孔都进行多重 PCR 扩增，使扩增长度片段可以涵盖全部基因，因此在反应结束后，每一个基因片段都有许多拷贝。随后随机选择一些产物作为靶分子，用 SNP 或突变的生物芯片微阵列进行分别检测。

由于在一些“靶分子”中只有一个等位基因，因此可以实现等位基因的识别。

30 对于基因组 DNA 的变换形式，基因的 mRNA 可采用相似方式进行探测。

通过进一步改变方法,也可以方便地用生物芯片微阵列来鉴定 LOH 和染色体的非整倍性。可以在正常组织和肿瘤组织的杂交反应中利用针对某一染色体区域的已知微卫星标记,来比较其存在或缺失,如果两个杂合等位基因中有一个缺失就可以标识为 LOH。这一点结合突变检测就可以成为公认的肿瘤抑制基因进行研究的有力工具。通过微卫星标记可方便地检测肿瘤中染色体的非整倍性,并结合先有应用形式,形成了以及基于几个从脱落的上皮细胞(例如尿、宫颈)或经皮针头抽吸出来的肿瘤细胞进行基因分布以及肿瘤诊断的一组重要工具。

图 14 描绘了本发明在鉴定 SNP 定位或点突变/缺失/插入中的应用。设计了许多足以覆盖给定基因全长的探针对(连接到生物芯片和小珠上)。如果探针对中的两个探针在与基因组 DNA 杂交后彼此 5'和 3'端相邻排列,那么由 DNA 连接酶介导的连接就会使小珠连接到生物芯片上(图 14A)。如果 SNP 存在于连接位点上,则没有连接发生(图 14B)。如果其中一个探针在其它地方带有单核苷酸错配(图 14C),那么在特定温度(T_m)或盐浓度视窗的严格环境中就没有杂交发生。加入识别和裂解带有单个错配的双链 DNA 的酶[23]例如裂解酶或错配修复酶,将使带错配的探针裂解并防止两个探针结合。其结果是生物芯片上小珠的缺失代表了包含 SNP 的 DNA 序列片段(图 14D, 14E 以及 14F)。图 14F 示出了这样一个微阵列上的最后结果,即不带有结合小珠的生物芯片显示核酸链存在 SNP 或突变。随后该链(“生物芯片标记的”)可以在另一反应中被扩增,并被测序从而确定 SNP。

5、定量基因表达

在科研中,科学家们经常需要研究基因表达。在多细胞有机体中,携带相同一组基因的细胞经过特化(specialize)而执行多种的生理功能,例如覆盖机体表面(外壳或皮肤)、吸收体液和电解质(肠)以及与外界相互作用(神经系统)。结果,细胞需要一些仅在特化的细胞中表达而不在其它分化细胞中表达的工具。到目前为止,基因表达的研究是采用荧光探针或其它方式单个或利用微阵列进行,在微阵列上印刷或连接了与信使 RNA(或 cDNA)杂交的探针分子,并产生了靶分子是否存在的定性结果。不用说,这些微阵列不具有定量以低水平表达 mRNA 的能力。低水平表达也可能很重要,这是因为既然细胞中蛋白质浓度是动态的,我们就无法知道低水平表达是否等同于少量蛋白质的合成,以及是否代表产生和消耗的平衡。

正如以上“定量(分子检测)”中所述,采用本发明来定量 mRNA 和相应蛋白质是很简单的。

图 15 描绘了利用微阵列和竞争性结合原理来分别检测 mRNA(图 15A)和蛋白质(图 15B)。检测方法已经在图 10 和正文中描述过了。

5 6、蛋白组

单细胞有机体的蛋白组或多细胞有机体各种细胞的蛋白组中含有成千上万的蛋白质。要研究这些蛋白质之间以及它们与其它分子间的相互作用是很困难的。本发明提供了通过利用分子之间的特异物理相互作用而快速、经济地研究蛋白质与蛋白质以及蛋白质与其它分子之间相互作用的方法。

10 在图 16 中,描绘了微阵列用于研究蛋白质与蛋白质之间的相互作用。首先将细胞或有机体的各种蛋白质分离出来并沉积在生物芯片微阵列的特定位点上。接着,将这些各种蛋白质中的每一个分别结合到铁磁小珠的表面。当小珠在合适的条件下通过适当的流体载体被依次引入到生物芯片中时,就可以快速研究蛋白质与蛋白质之间的相互作用。可以相当快的速度建立起来这种相互作用数据库。与功能已知的给定蛋白质相互作用的蛋白质很可能参与相同和相似的细胞功能(关联作用)。通过加入或耗尽特定小分子而改变反应环境能令人信服地增加蛋白质与蛋白质之间相互作用复杂性的信息。

20 在另一技术方案中,针对全部蛋白组(例如血浆的)的特异性抗体被培育出来,并特异地定位在生物芯片微阵列上。另一组针对蛋白组其他表型的特异性抗体也被培育出来。然后可以根据上述竞争性结合原理利用生物芯片来检测蛋白组中蛋白质的浓度。

7、药物发现与筛选

25 如果将药物分子而不是蛋白连接到小珠上,前面的模式也可以用来研究药物与蛋白组之间的相互作用。这是因为具有药理或毒理活性的药物与特定蛋白质经常显示出物理相互作用或结合力。药物在机体各部分的分布也受与各种蛋白结合的影响,这种结合不仅决定药物分布也决定其药物动力学。通过将带有特异性药物的小珠依次放到生物芯片微阵列上,可以很方便地鉴定与药物有亲合力的蛋白质。能够快速进行药物的药理活性和毒性筛选。在图 17 中,描绘了与图 16 中结构相似的微阵列,而此次是用药物与蛋白质之间相互作用作为药物筛选的基础。替代结合到小珠上的各个

蛋白质文库的是，用待筛选以确定可能药理学数据或毒理学结论的药物分子取代蛋白质。

更多应用

本发明还有许多可能应用。不可能一一列举。下面再给出几个例子。

5 实施例 1

结核传染的早期诊断

结核分支杆菌(导致人结核病)的核糖核酸(rRNA)是 AMPLIFIED™ 结核分支杆菌直接测试中的检测靶分子(参考文献 9-18)。

在上述测试中需要进行扩增(转录介导的扩增(TMA))，而本发明仅需破坏细菌细胞壁的简单过程。本发明可以检测少至细菌 rRNA 的几个拷贝，并且无需预先的扩增。

10 实施例 2

急性心肌梗塞的早期诊断

急性心肌梗塞(心梗)及时的实验诊断可能拯救生命，这是因为可以开始治疗干预。这些干预并不是没有本身危险性，需要准确的测试。

到目前为止，测试既不够灵敏也不特异。例如，急性心肌梗塞的最早症状是血清肌红蛋白的浓度升高，它在心梗后 6 小时才能检测到(参考文献 12 - 15)。然而，肌红蛋白也存在于骨骼肌中，并且其浓度升高对于心肌伤害并非特异的，它需要通过第二个针对血清肌钙蛋白 T 的检测来证实(20 <http://www.roche.com/diagnostics/news/1998/981127a.html>)。肌钙蛋白 T 为在肌血球素增加之后升高的标志物。

在急性心肌梗塞的早期进行心脏肌钙蛋白 T 的微量定量方法既要特异又要灵敏。用本发明可以实现这种可能。

在这种应用中，采用了以上“定量”中描述的竞争性结合原理。分析物是心脏肌钙蛋白 T，而两个探针是针对肌钙蛋白的抗体。两个抗体应该与心脏肌钙蛋白 T 的两个不同表位具有结合亲和力，这两个表位彼此之间无相互影响(与两个抗体结合的表位彼此不能太靠近以免干扰结合)。除了能够检测在急性心肌梗塞的发作早期(可能在心肌梗塞后 6 小时之内)、以前不能检测的循环心脏肌钙蛋白 T 的数量，本应用还可以对血清中这种蛋白质的水平进行定量(通过对已知浓度的肌钙蛋白 T 进行连续稀释很容易实现仪器的校准)。

实施例 3

病毒载量(load)的测定

许多疾病是由病毒引起的，例如 HIV(由人免疫缺陷病毒感染)。虽然该病可以通过抗病毒剂控制，但费用很贵。因为病毒易于变异，不是所有患者在不同时期对相同药物都敏感。监控病毒载量是决定药物疗效和疾病状况的一种手段。

采用本方法可以高度准确、简单快速而经济地确定病毒载量。

检测原理如上所述。

基因序列已知的任何病毒均可采用本方法。

10 因此，虽然采用优选技术方案对本发明的基本特征加入展示、描述和指出，但可以理解的是例举的设备和其操作的形式和细节的各种遗漏、替代和变化是本领域技术人员在不脱离本发明的精神下就可以进行的。例如显然可以想到，实际上采取基本相同手段执行功能相同获得相同结果的所有这些元件和/或方法步骤的结合方式均在本发明范围之内。而且，应该认识到在本发明中结合任一公开形式或技术方案，描述和/或显示的结构和/或
15 元件和/或方法步骤都可以以一般的设计选择方式合并任选其它公开或描述的或建议形式或技术方案中。因此本发明的保护范围仅由权利要求的范围限定。

参考文献:

1. Immink KAS (1998). The compact disc story. *Journal of the audio engineering society* 46, 458-465.
5
2. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TCH, Li Hongbo. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene* 211 (1998) 277-285.
3. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih T, Li HB. Ramification amplification: a novel isothermal DNA amplification method. *Molecular Diagnosis* 6 (2001):141-150.
10
4. Zhang DY, Zhang W, Li X, Konomi Y. Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification. *Gene* 274 (2001) 209-216.
5. Umek RM, Lin SW, Vielmetter J, Terbrueggen RH, Irvine B, Yu CJ, Kayyem JF, Yowanto H, Blackburn GF, Farkas DH, Chen Y. Electronic detection of nucleic acids: a versatile platform for molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2002;3:74-84.
15
6. Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science* 2002 Feb 22;295(5559):1503-6.
20
7. Baselt DR, Lee GU, Natesan M, Metzger SW, Sheehan PE, Colton RJ. A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosensors & Bioelectronics* 13,731-739(1998).
8. Baselt DR, Lee GU, Hansen KM, Chrisey LA, Colton RJ. A High-Sensitivity Micromachined Biosensor. *Proc. IEEE* 85(4), 672-680 (1997).
25
9. Behr, M.A., S.A. Warren, H. Salamon, P.C. Hopewell, A. Ponce de Leon, C.L. Daley, and P.M. Small. 1999. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 353:444-449.
30
10. Bermann, J.S., G. Yuoh, G. Fish and G.L. Woods. 1999. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J. Clin. Microbiol.* 37:1419-1425.
35
11. Bermann, J.S. and G.L. Woods. 1999. Enhanced mycobacterium tuberculosis direct test for detection of M. tuberculosis complex in positive ESP II broth cultures of nonrespiratory specimens *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 245-248.

- 5
12. Chedore, P. and F.B. Jamieson. 1999. Routine use of the Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 185-191.
- 10
13. Della-Latta, P. and S. Whittier. 1998. Comprehensive evaluation of performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Am. J. Clin. Pathol.* 110:301-310.
- 15
14. Della-Latta, P. and Vivian Jonas. 1999. Inhibitory effect of Alpha-Tec XPR-Plus Phosphate Buffer on the enhanced Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. *J. Clin. Microbiol.* 37:1234-1235.
- 20
15. Gamboa, F., G. Fernandez, E. Padilla, J.M. Manterola, J. Ionca, P. J. Cardona, L. Matas, and V. Ausina. 1998. Comparative Evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36:684-689.
- 25
16. Moore, D.F. and Curry, J.I. 1999. Reduction in turnaround time for detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary specimens using nucleic acid amplification tests. Presented at the 99th General Meeting of the American Society of Microbiology. Chicago, Illinois.
- 30
17. Piersimoni, C., A. Callegaro, C. Scarparo, V. Penati, D. Nista, S. Bornigia, C. Lacchini, M. Scagnelli, G. Santini, and G. De Sio. 1998. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36:3601-3604.
- 35
18. Wang, S.X. and L.Tay. 1999. Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 37:1932-1934.
- 40
19. Bakker AJ, Loelemey MJ, Gorgels JP, von Vlies B, Smits R, Tijssen JG, Haagen FD: Troponin T and myoglobin at admission: value of early diagnosis of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1994.

20. De Winter RJ, Koster RW, Sturk A, Sanders GT: Value of myoglobin, troponin T, and CK-MB Mass in ruling out an acute myocardial infarction in the emergency room. *Circulation*. 1995; 92: 3401 - 3407.
- 5 21. Hamm CW, Katus HA: New biochemical markers for myocardial cell injury. *Current Opinion in Cardiology*, 1995; 10: 355 - 360.
22. Tucker JF, Collins RA, Anderson AJ, Hess M, Farley IM, Hagemann DA, Harkins HJ, Zwicke D: Value of serial myoglobin levels in the early diagnosis of patients admitted for acute myocardial infarction. *Ann Emerg Med* 1994; 24: 704 - 708.
- 10 23. P. Brown et al., "Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns," *Emerging Infectious Diseases*, 7[1]:6-16, January-February 2001.
- 15 24. J. Bieschke et al., "Ultra-sensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets," *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 97:5468-73, 2000.
- 20 25. M.R. Scott et al., "Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy to transgenic mice," *PNAS*, 94:14279-84, 1997.
- 25 26. "The Evaluation of Tests for the Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines," European Commission, Directorate General XXIV, Consumer Policy and Consumer Health Protection, July 8, 1999
27. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. "Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations," *Nature Medicine*, 4:1157-65, 1998.
- 30 28. BSE Surveillance, U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Internet publication link: <http://www.aphis.usda.gov/oa/bse/bsesurvey.html>.
- 35 29. Traverso G., Shuber A., Levin B., Johnson C., Olsson L., Schoetz D. J. Jr., Hamilton S. R., Boynton K., Kinzler K. W., Vogelstein B. Detection of APC Mutations in Fecal DNA from Patients with Colorectal Tumors. *N Engl J Med* 2002; 346:311-320, Jan 31, 2002.

美国专利文献:

	08/505,628	Jul., 1995	Lee, et.al.
	09/997,059	Nov., 2001	Tong, Sun-wing
5	3,742,174	Jun., 1973	Harnden, Jr.
	3,742,178	Jun., 1973	Harnden, Jr.
	3,742,179	Jun., 1973	Harnden, Jr.
	4,315,150	Feb., 1982	Darringer, et al.
	4,965,188	Oct., 1990	Mullis, et. al.
10	5,445,970	Aug., 1995	Rohr, Thomas E.
	5,445,971	Aug., 1995	Rohr, Thomas E.
	5,876,924	Mar., 1999	Zhang, et. al.
	5,942,391	Aug., 1999	Zhang, et. al.
	6,320,169	Nov., 2001	Clothier
15	3,833,769	Sep., 1974	Compaan, Klass
	3,397,364	Aug., 1968	Crandall, CL

序列表

<110> 唐舜荣 (Sun-WING TONG)

<120> 改进的通过颗粒结合来检测靶分子的方法

<130> 5321-3

<140> 10/291,986

<141> 2002-11-12

<150> AU PS1597

<151> 2002-04-09

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成探针

<400> 1

ggtggcggct gttgctgctg ctg

23

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成探针

<400> 2

tccttccagc agcagcagca acagccgcca cc

32

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成探针

<400> 3

ggtggcggct gttgctgctg

20

<210> 4	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成探针	
<400> 4	
ggtggcggct gttgctgctg ctgctgctg	29
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成探针	
<400> 5	
gttacgctta gcttagatcc ta	22
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成探针	
<400> 6	
gttacgctta gtctagatcc ta	22
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成探针	
<400> 7	
taggatgtag actaagcgta ac	22

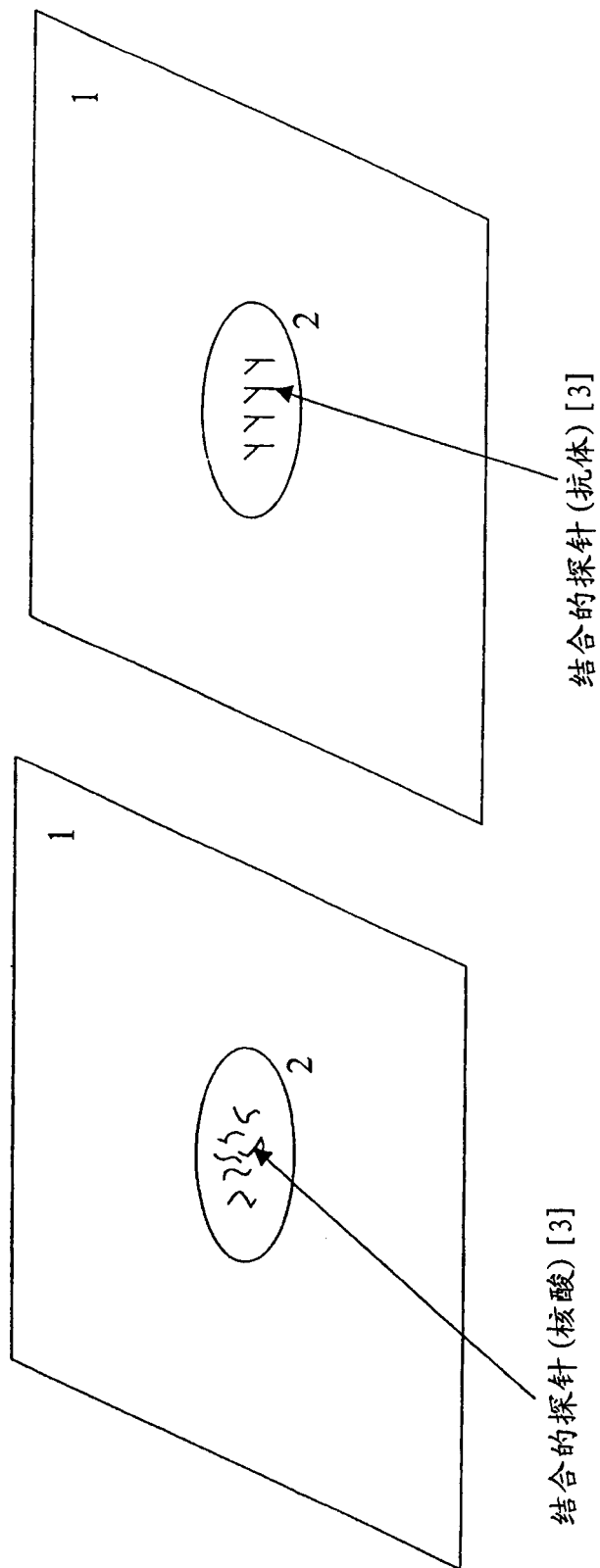
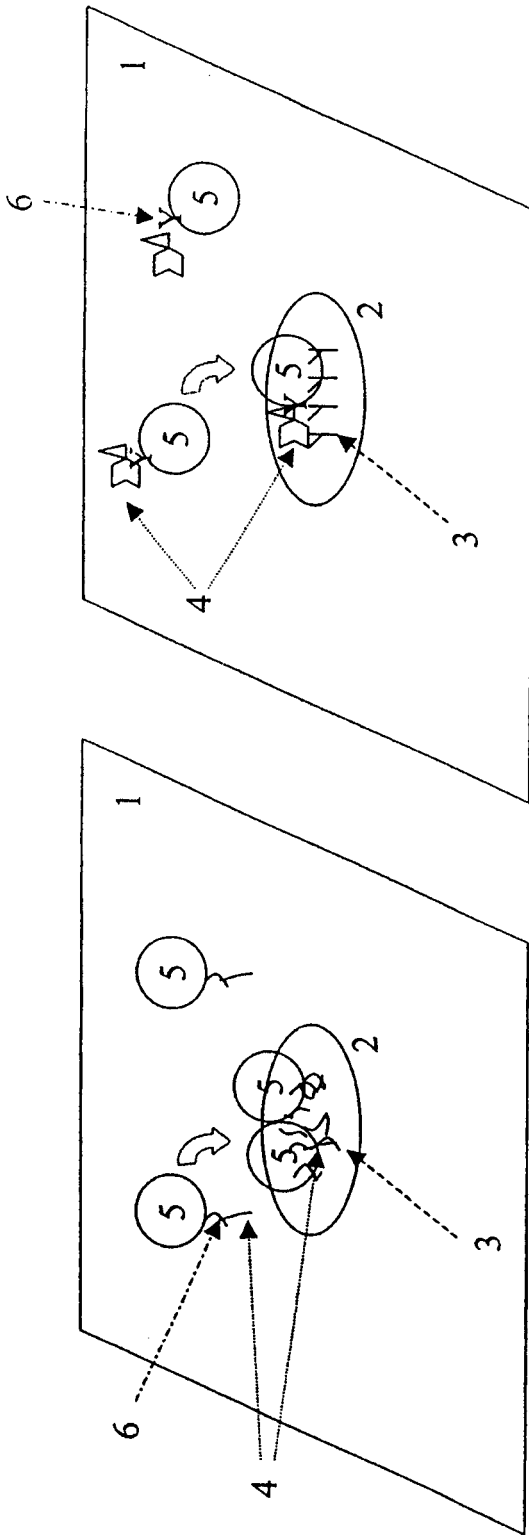


图 1



5 连接第二探针(抗体) [6] 的铁珠

5 连接第二探针(核酸) [6] 的铁珠

4 有两个表位的靶分析物

4 靶核酸

3 孔结合的第一探针(抗体)

3 孔结合的第一探针(核酸)

图 2

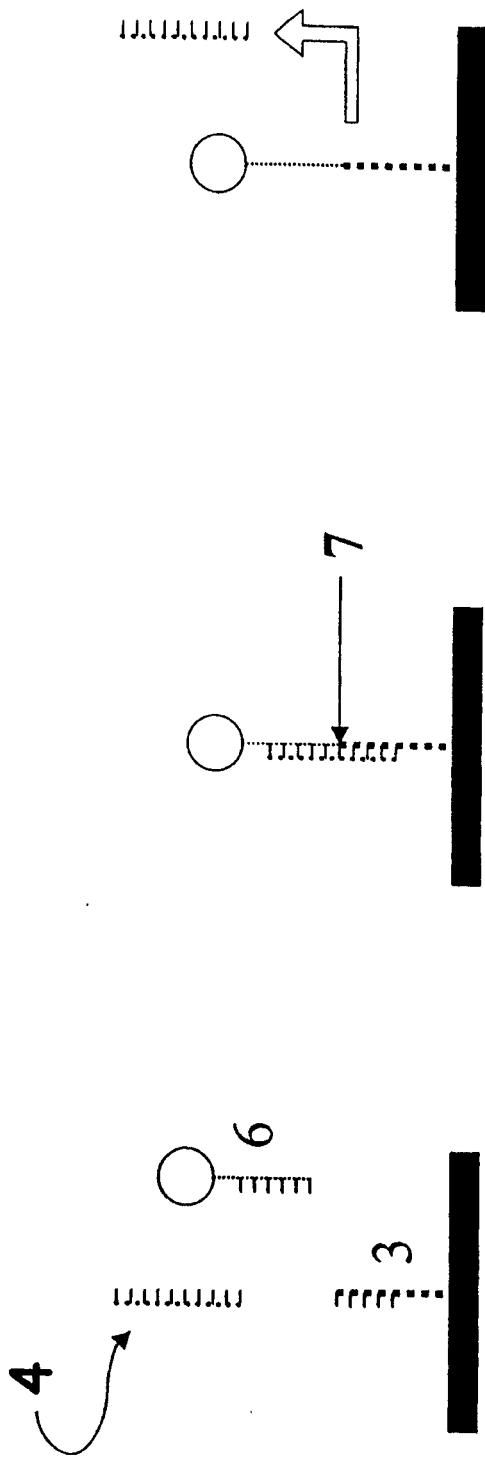


图 3

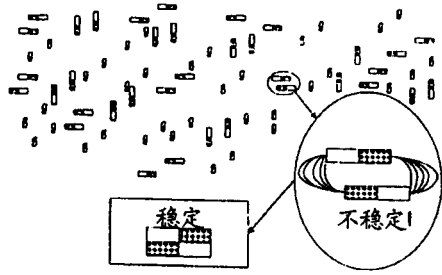


图 4A



图 4B

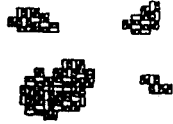


图 4C



图 4D

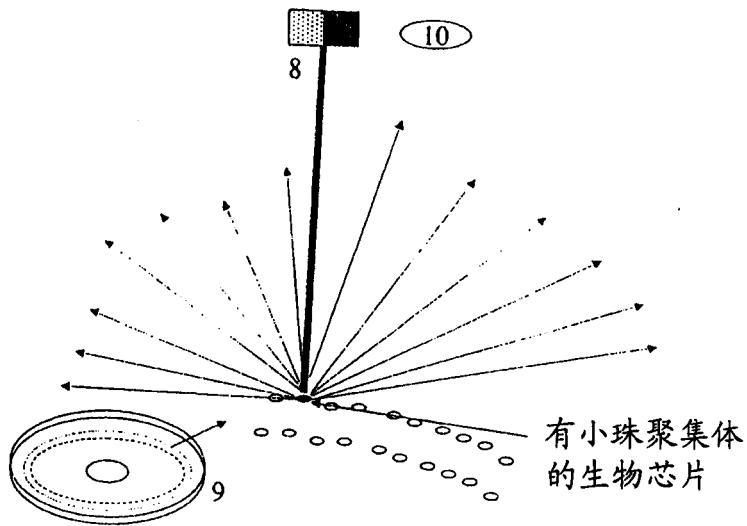


图 5A

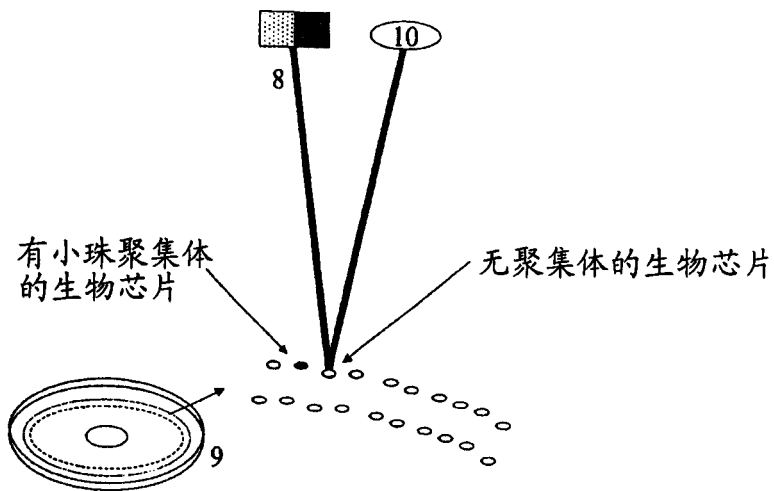


图 5B

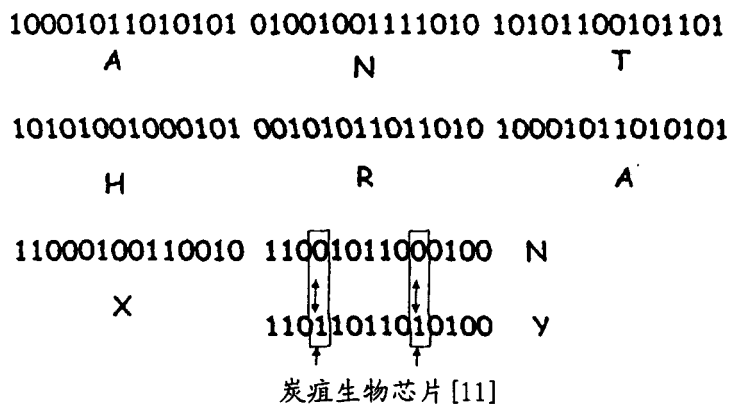


图 6A

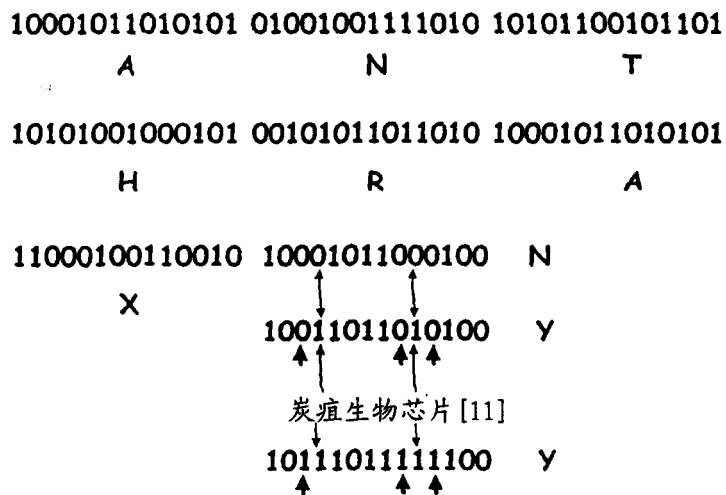


图 6B

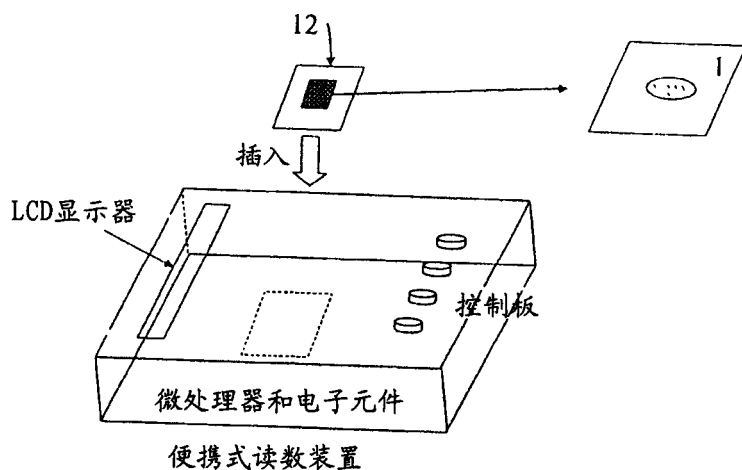


图 7

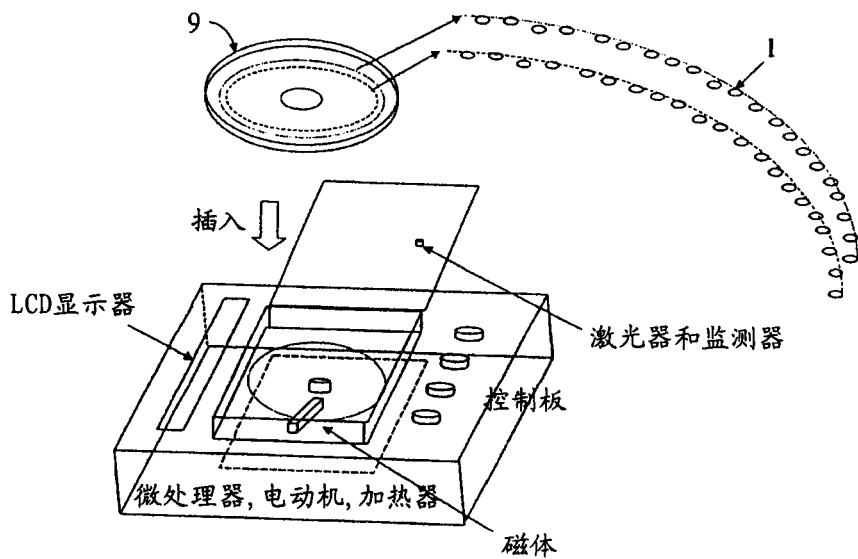


图 8

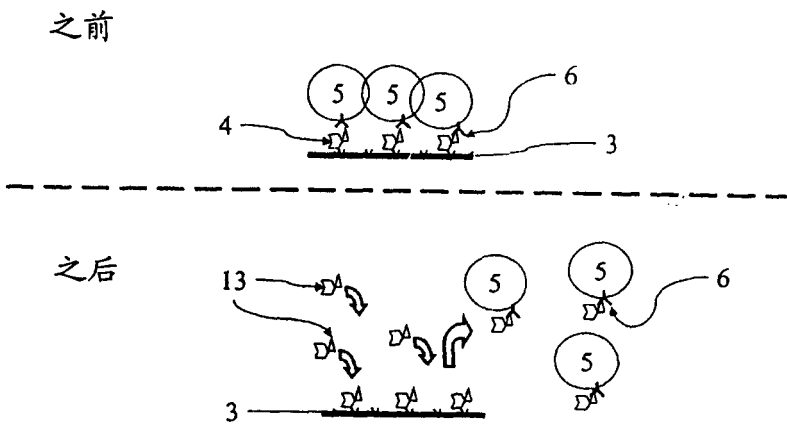


图 9A

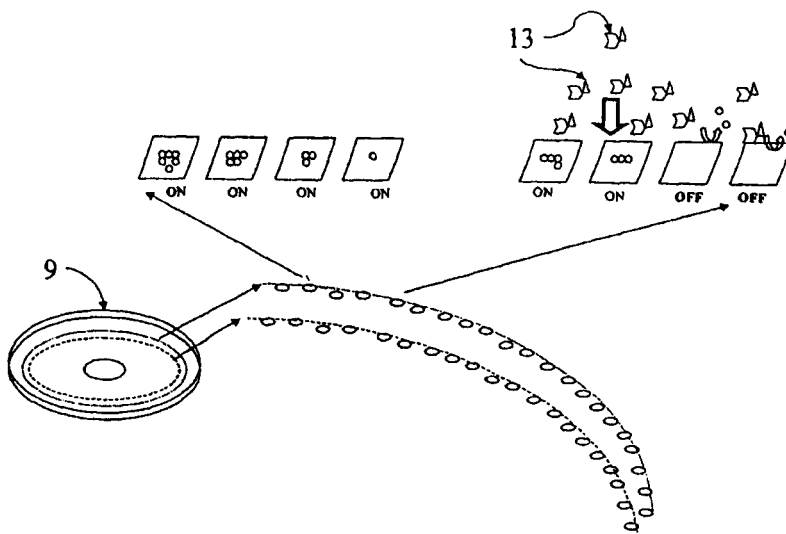


图 9B

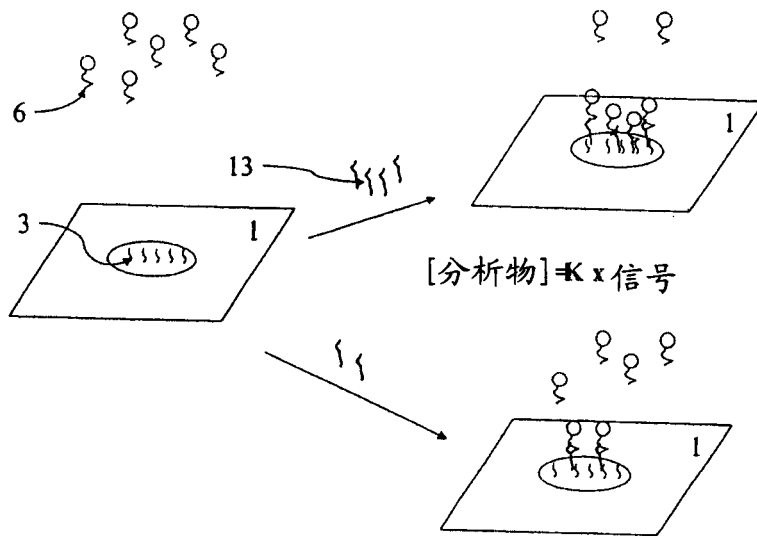


图 10A

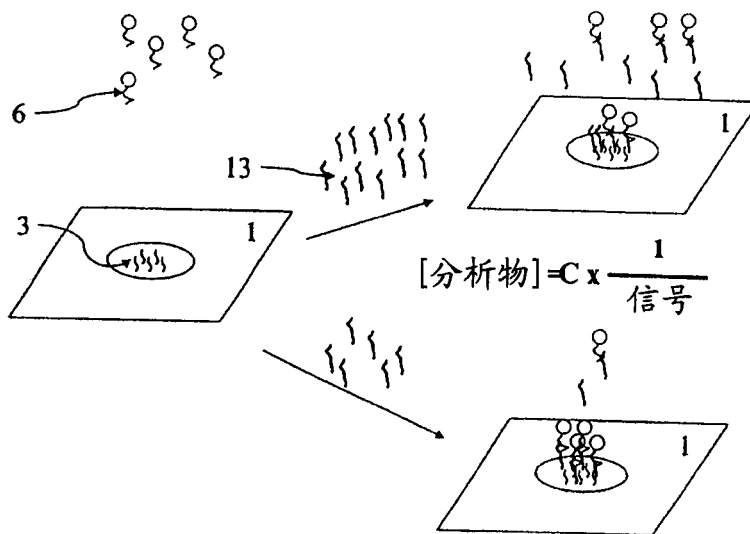


图 10B

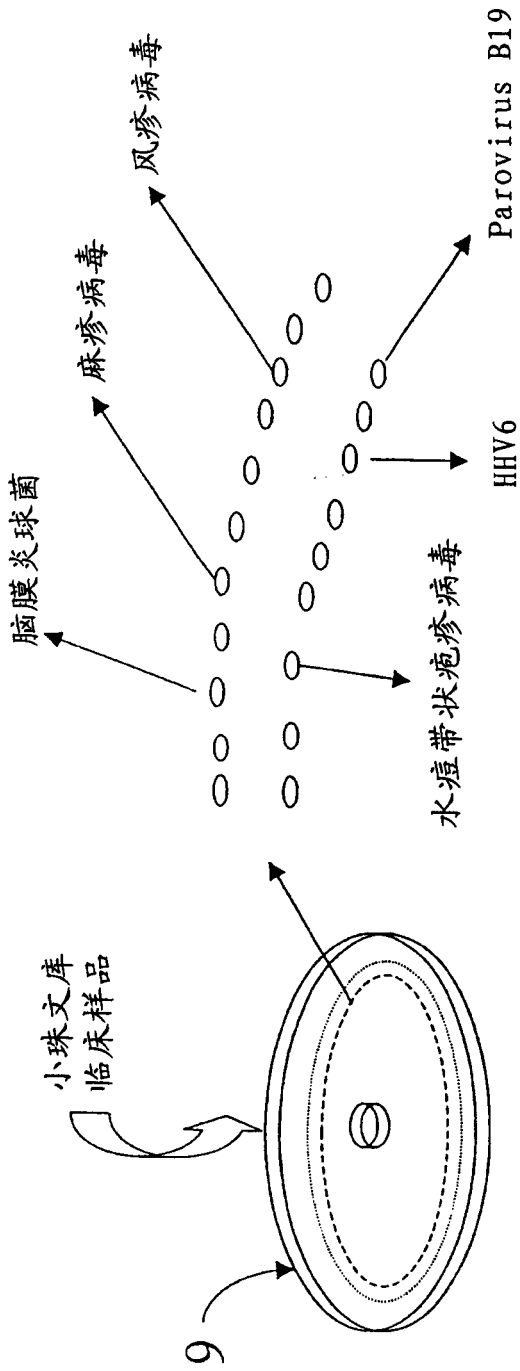


图 11A

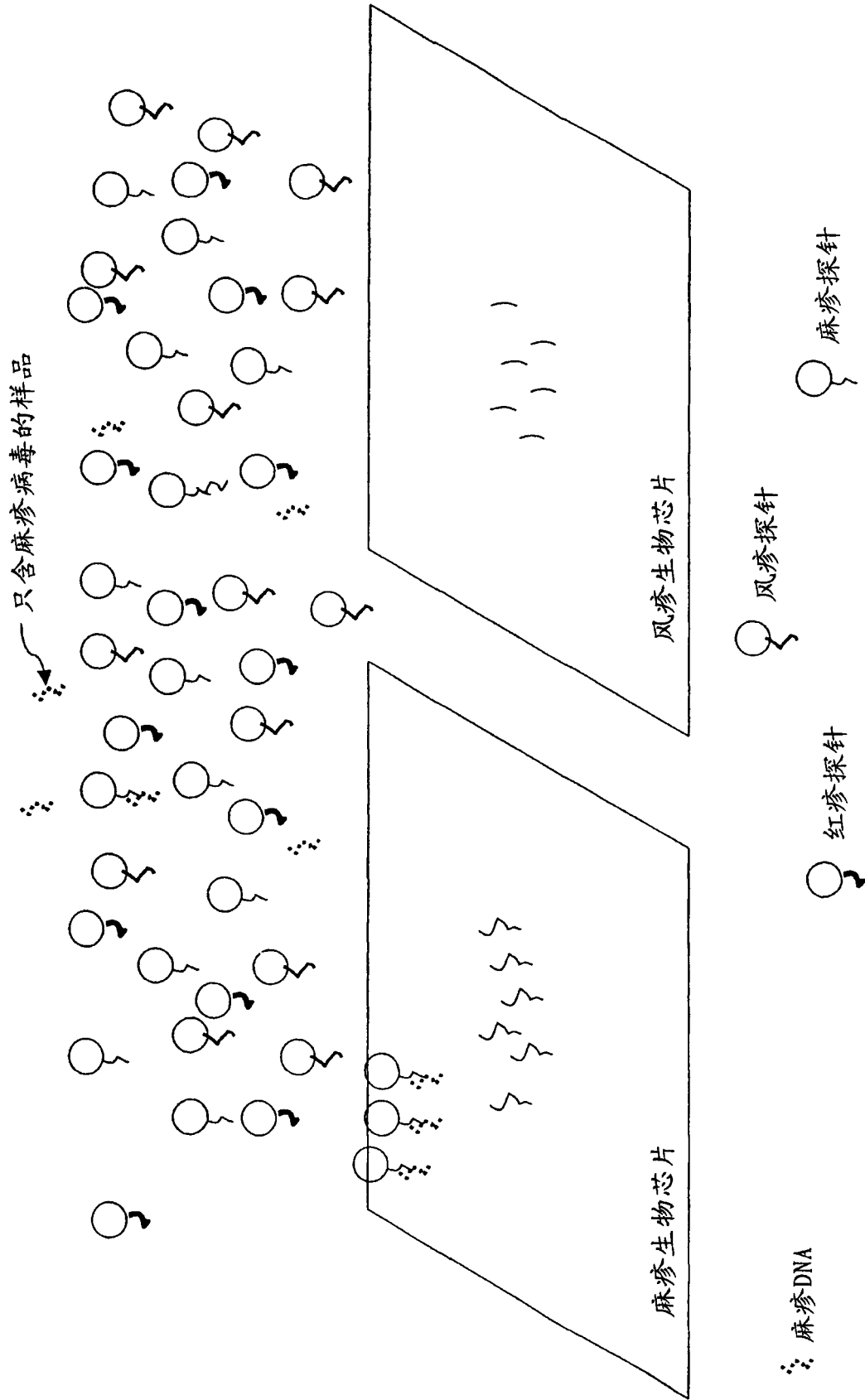


图 11B

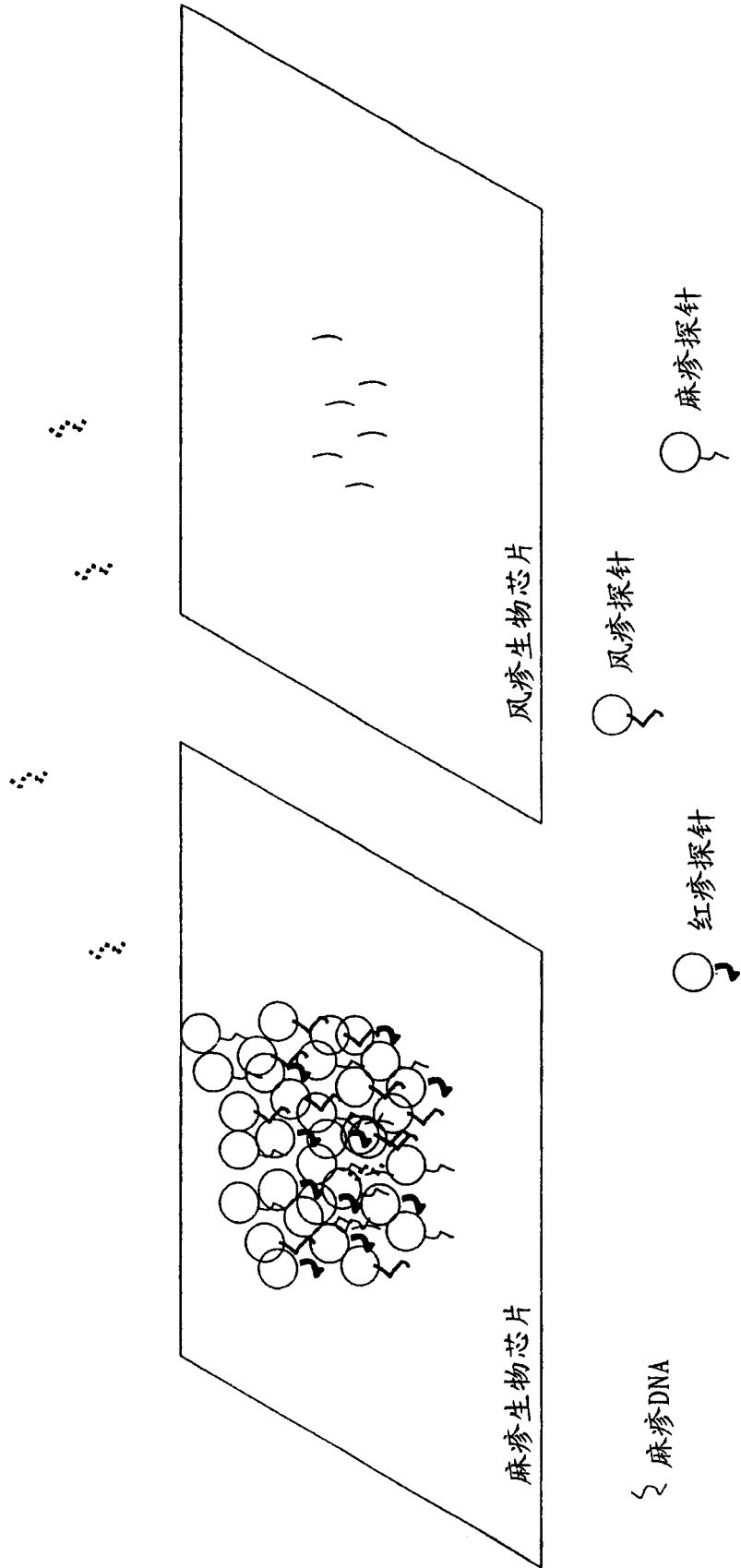
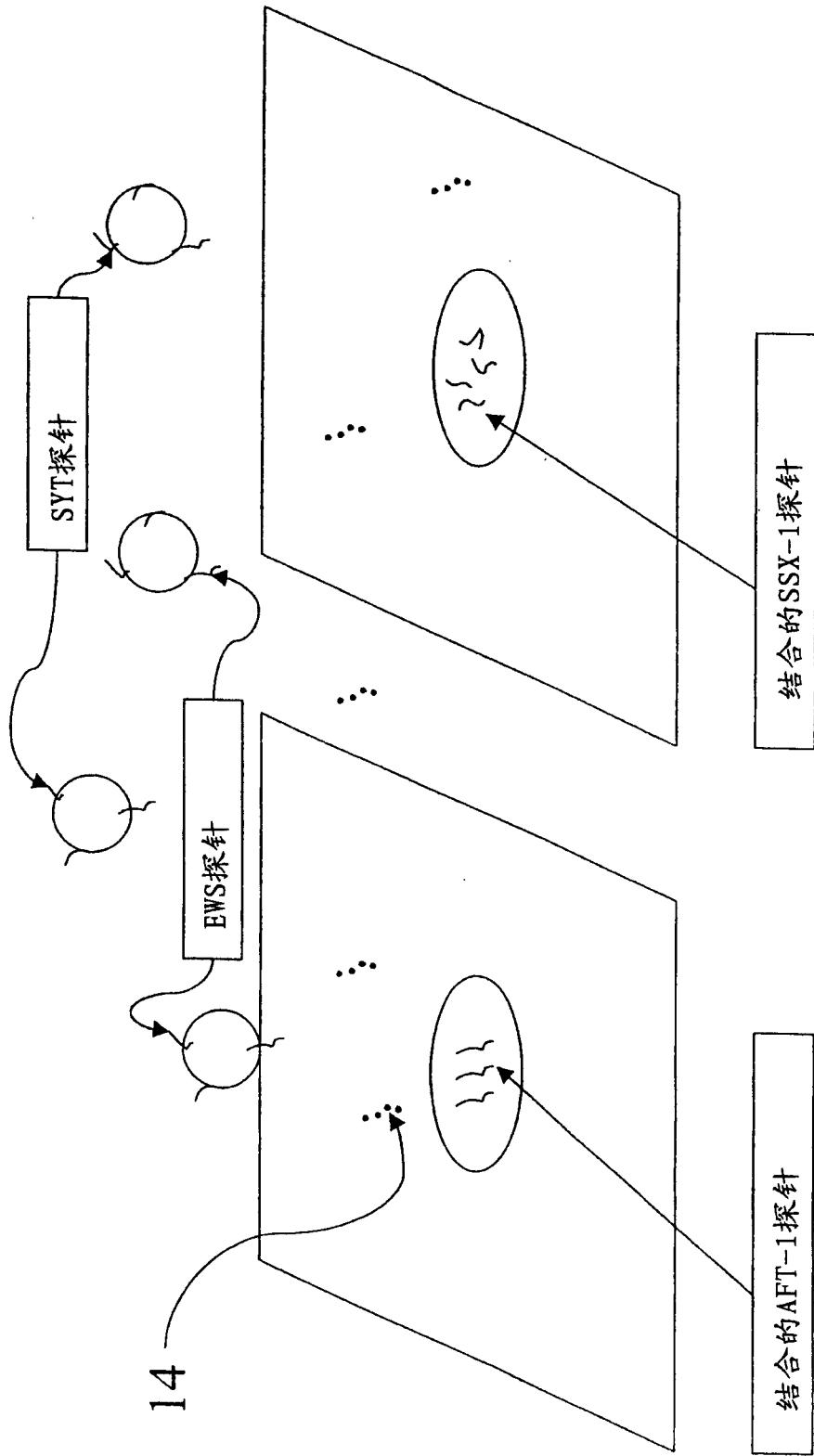


图 11C



· · · 滑液肉瘤的SYT/SSX嵌合转录体 [14]

图 12A

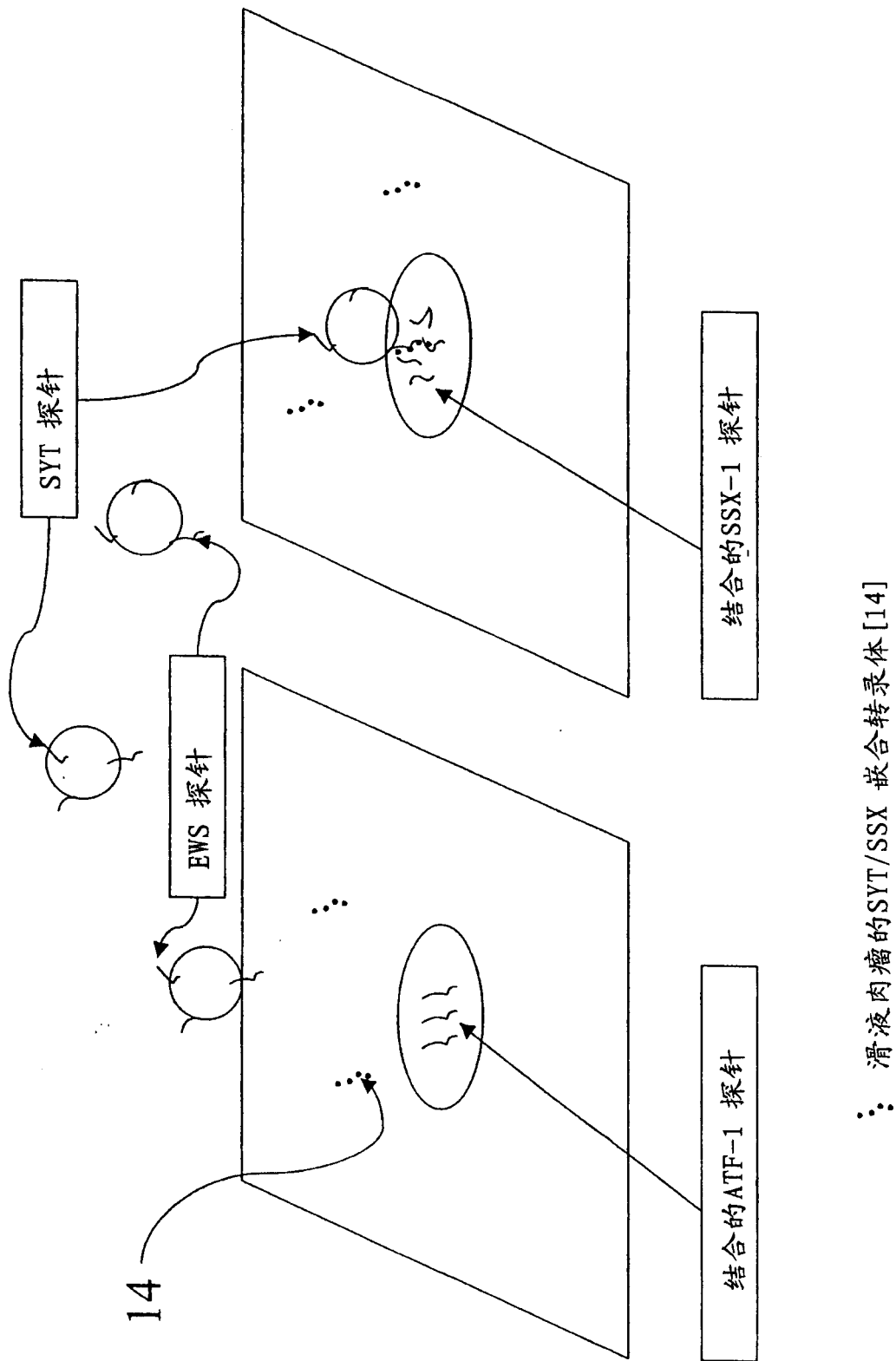


图 12B

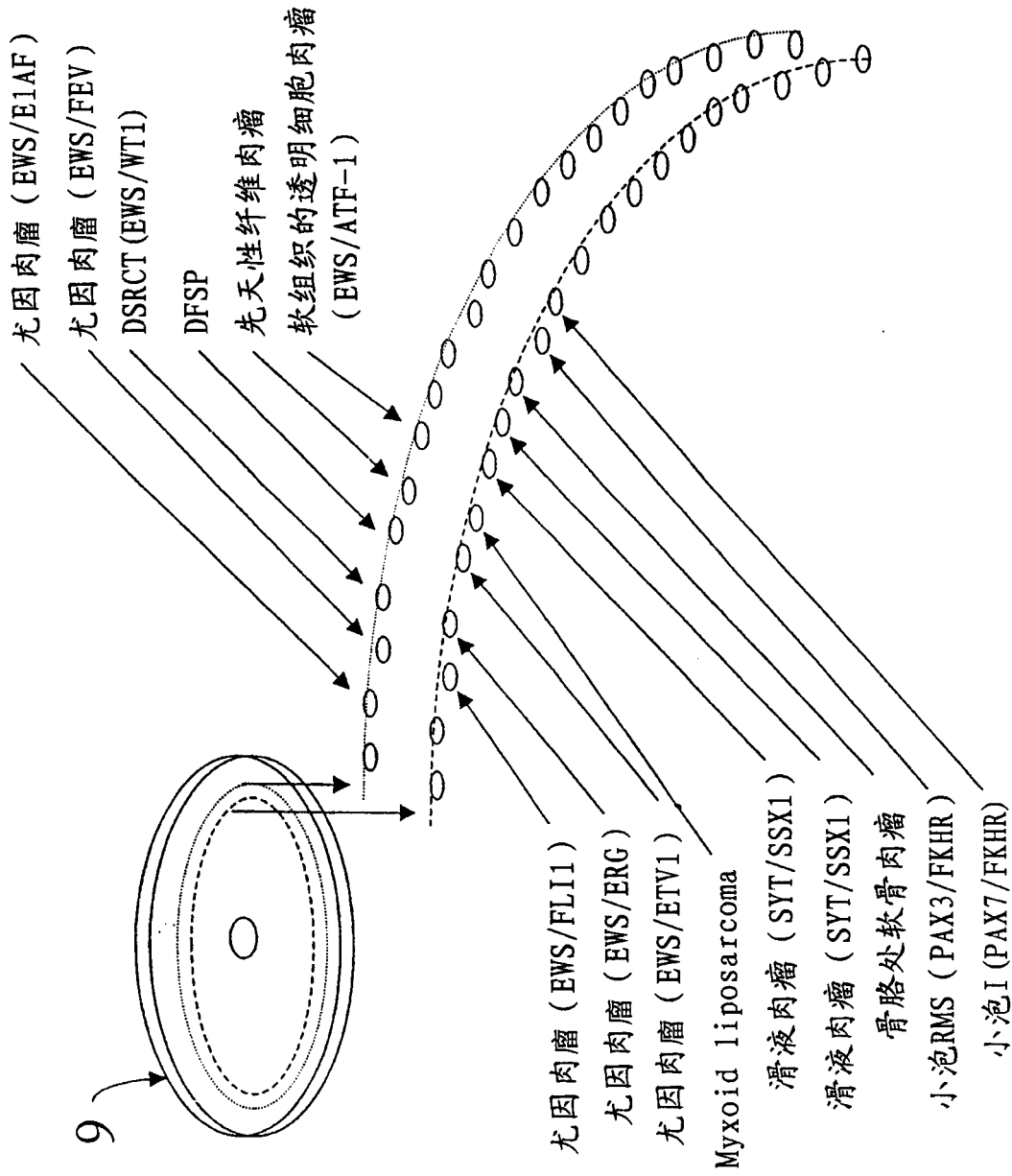


图 12C

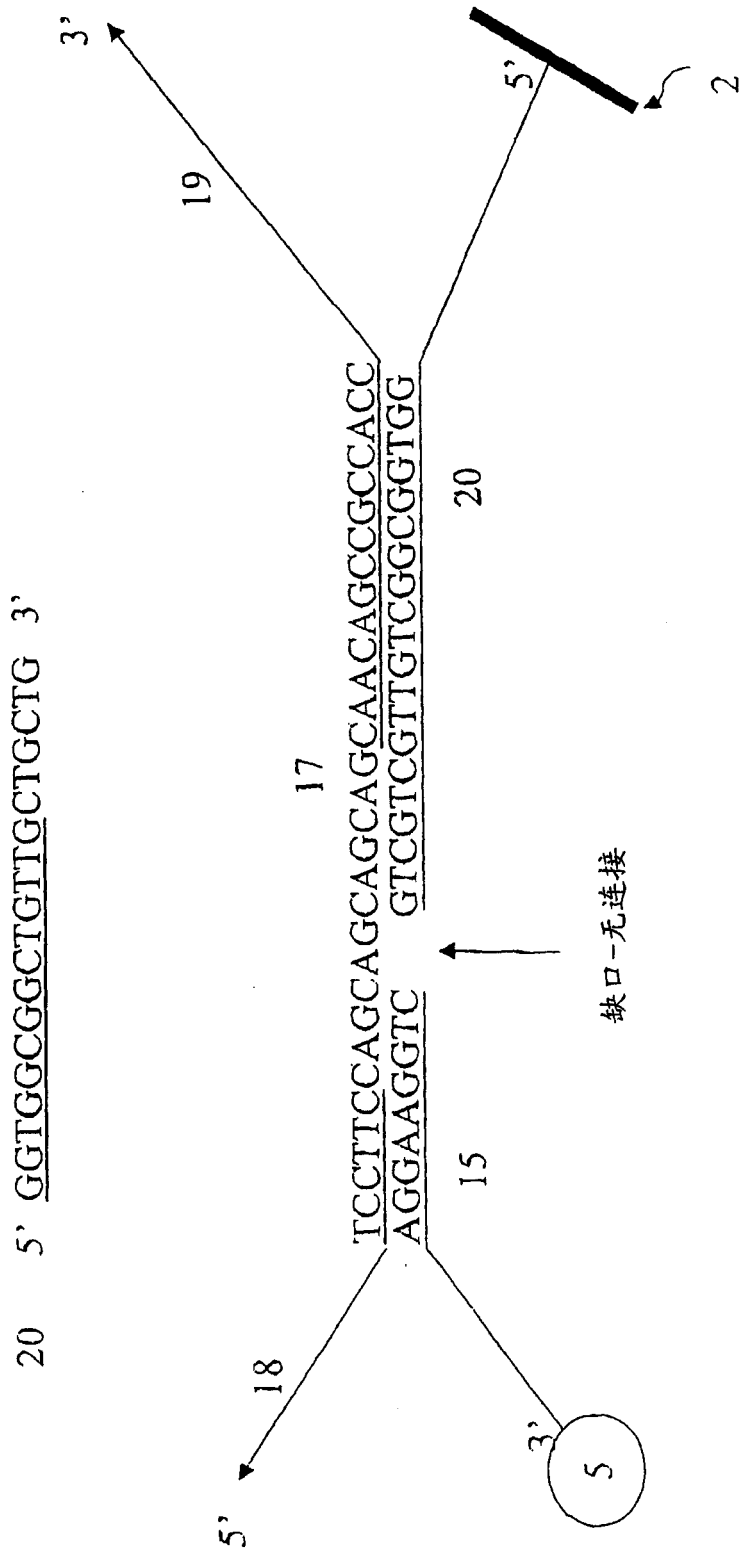


图 13B

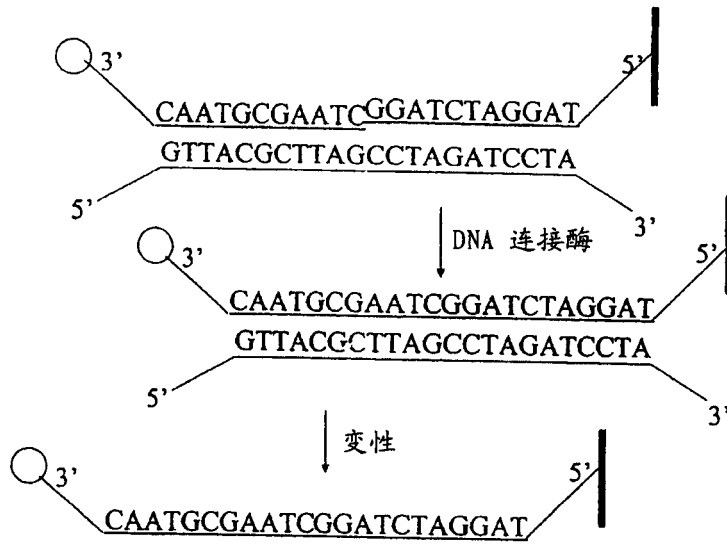


图 14A

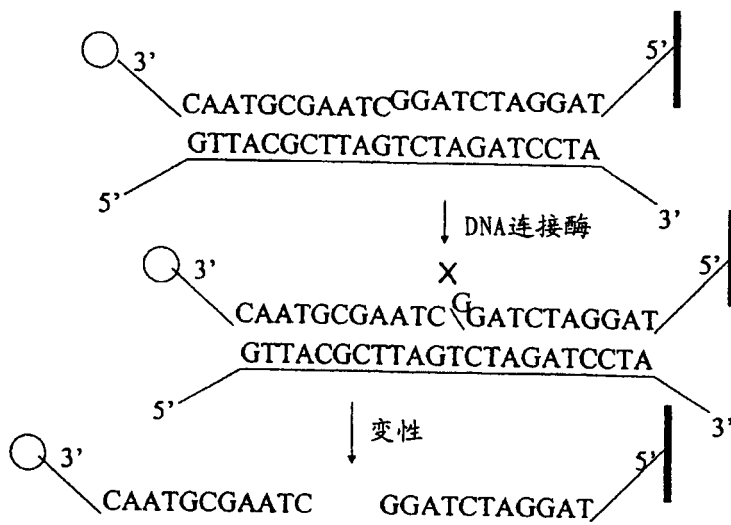


图 14B

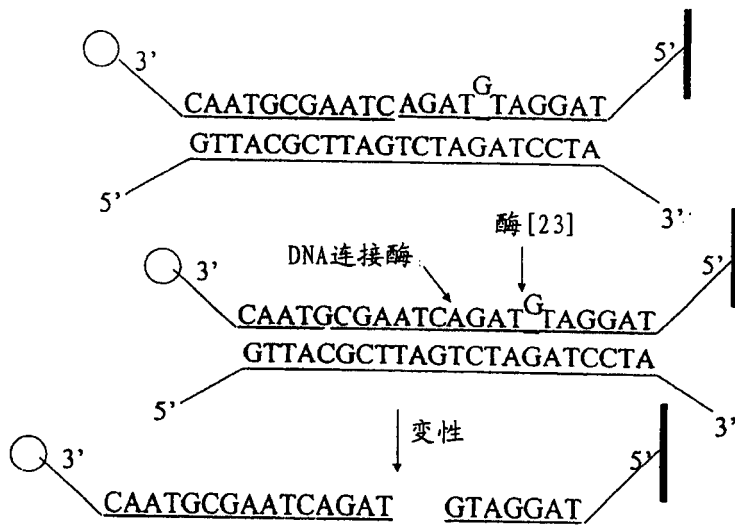


图 14C

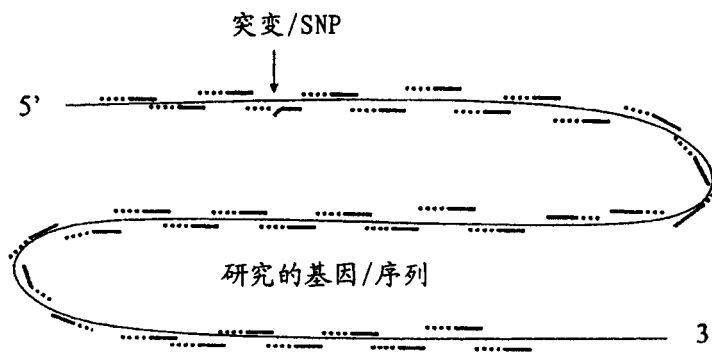


图 14D

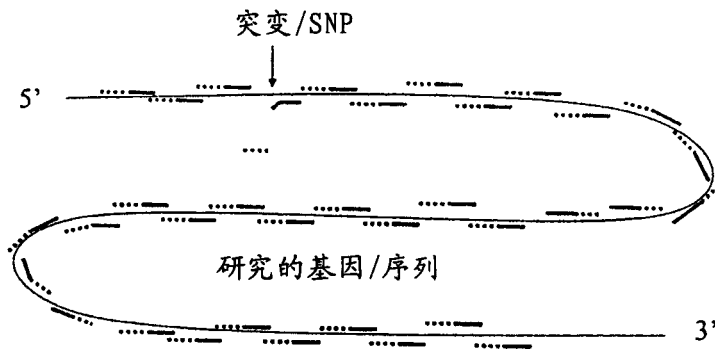


图 14E

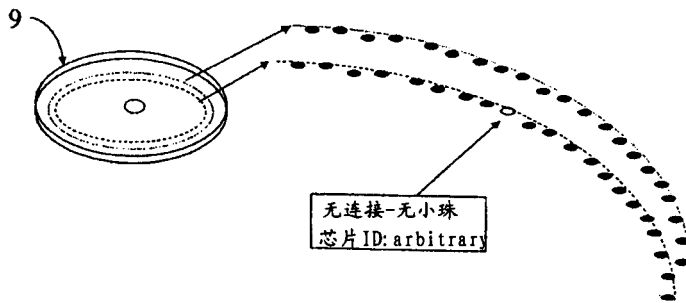


图 14F

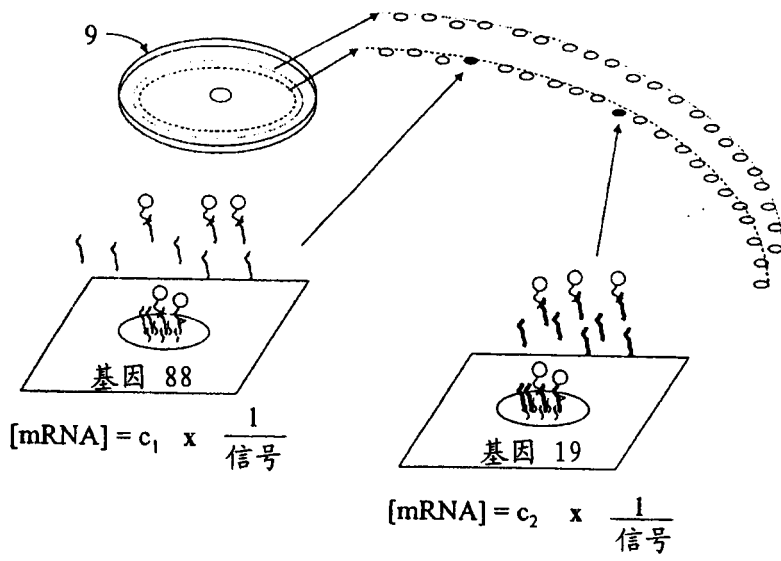


图 15A

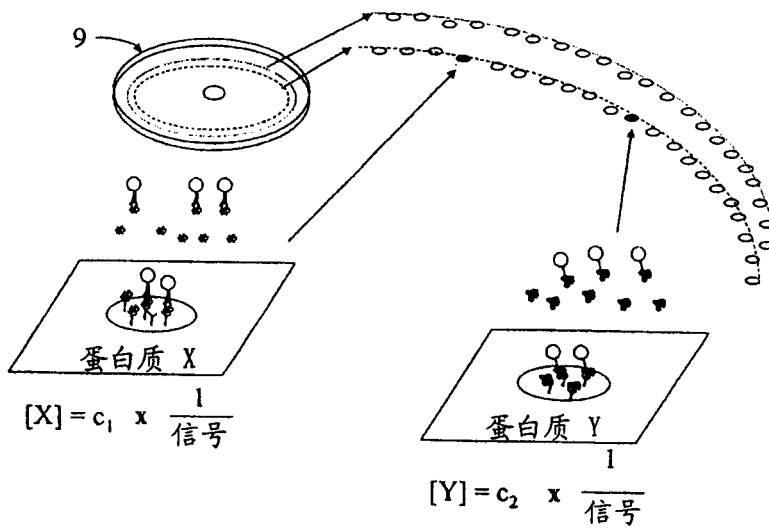


图 15B

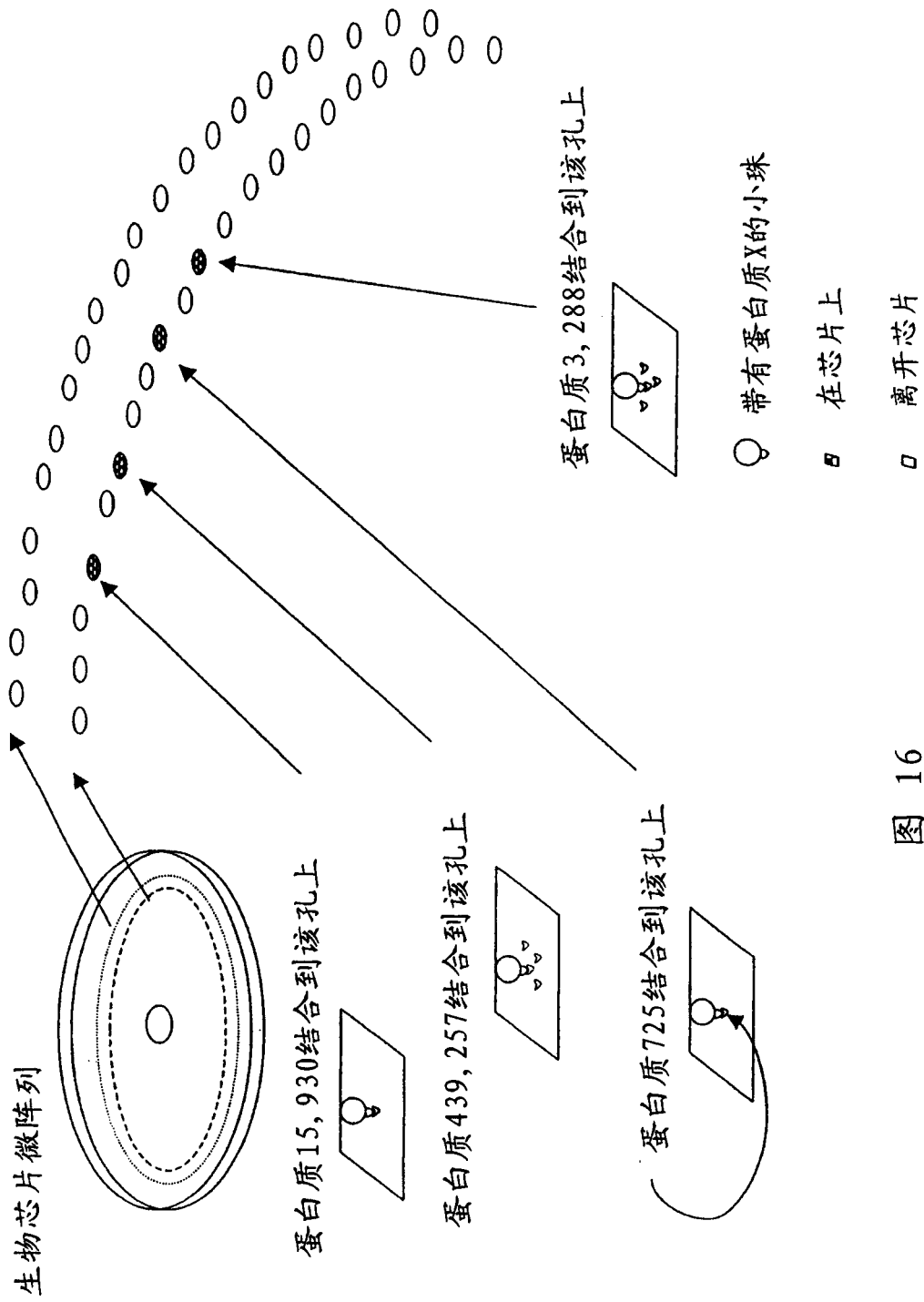


图 16

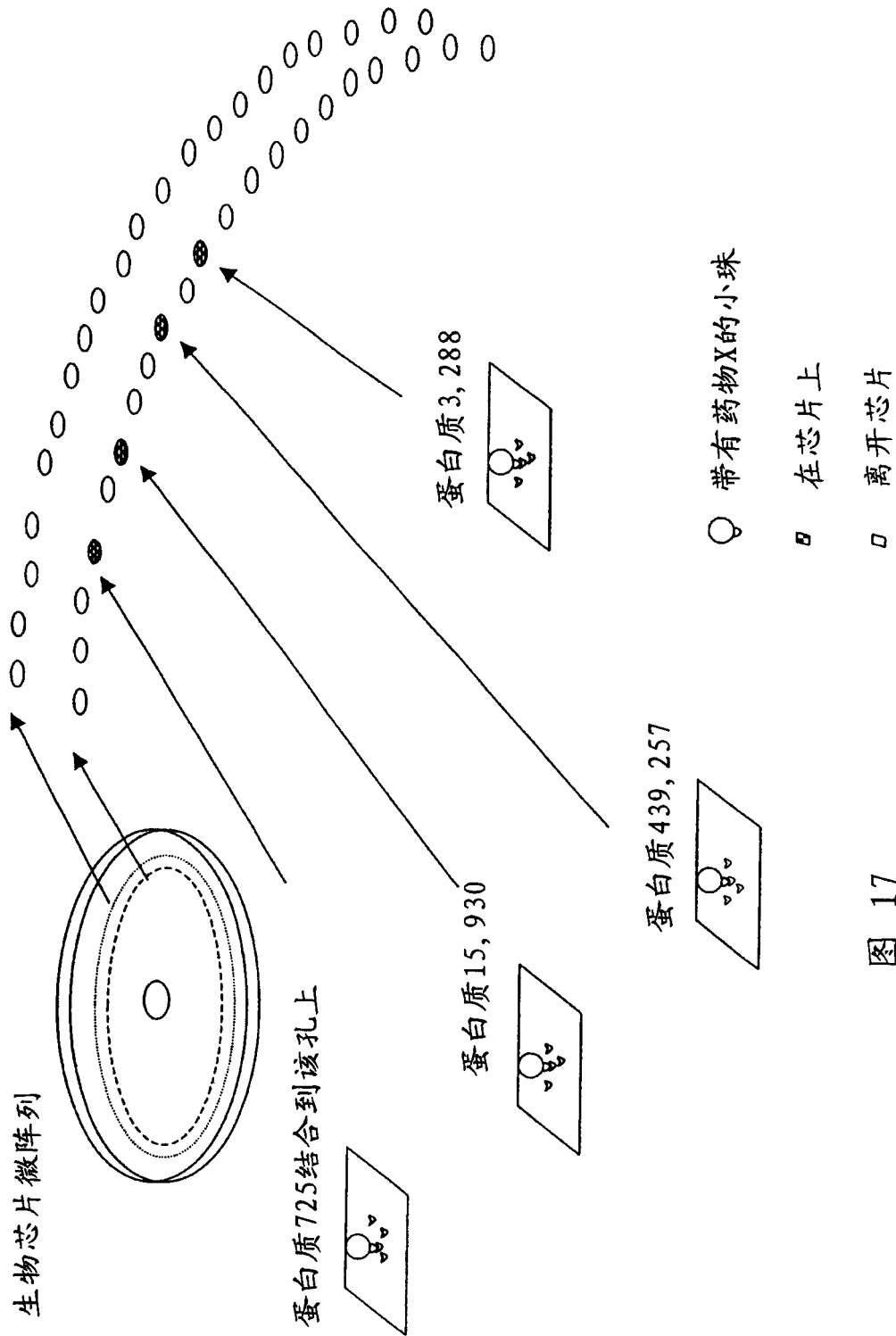


图 17

专利名称(译)	改进的通过颗粒结合来检测靶分子的方法		
公开(公告)号	CN1480729A	公开(公告)日	2004-03-10
申请号	CN03147205.2	申请日	2003-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	唐舜荣		
申请(专利权)人(译)	唐舜荣		
当前申请(专利权)人(译)	唐舜荣		
[标]发明人	唐舜荣		
发明人	唐舜荣		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/3577 G01N21/55 G01N21/76 G01N33/00 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/566 G01N33/68 G01N21/35		
优先权	10/291986 2002-11-12 US 2002PS1597 2002-04-09 AU		
其他公开文献	CN100507564C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种利用靶分子、小珠结合探针以及支持物结合探针之间的分子间相互作用来检测或定量样品中靶分子的方法。在相互作用后可采用激光或磁传感器检测小珠。小珠的检出结果代表样品中靶分子的存在。

