



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104812915 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201380061190. 1

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(22) 申请日 2013. 10. 22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68(2006. 01)

1218909. 8 2012. 10. 22 GB

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000455 2013. 10. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/065756 EN 2014. 05. 01

(71) 申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 王林发 黄英勇

奥克托布尔·迈克尔·塞申斯

达尼埃尔·伊丽莎白·安德森

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

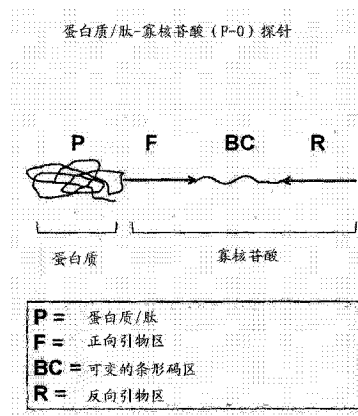
权利要求书3页 说明书11页 附图10页

(54) 发明名称

基于 PCR 用于平行检测生物材料的测定

(57) 摘要

本发明涉及用于检测样品中的生物材料特别是肽或蛋白质的新平行方法,用于所述方法的至少一种探针,用于所述方法的多种所述探针或所述探针的文库,以及用于实施所述方法的试剂盒,其中所述探针包含对所述肽或蛋白质具有特异性的结合伴侣,以及与所述结合伴侣连接的寡核苷酸,所述寡核苷酸包含 i) 与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补的第一序列, ii) 与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补的第二序列和 iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码。



1. 用于检测和 / 或量化样品中至少一种靶分子的探针, 其包含:
 - a) 对所述靶分子之一具有特异性的至少一种结合伴侣; 以及与其连接的
 - b) 寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含:
 - i) 第一序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;
 - ii) 第二序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;和
 - iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的是核苷酸鉴定序列或条形码, 其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成, 并且进一步, 其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目。
2. 根据权利要求 1 所述的探针, 其中所述结合伴侣具有对所述靶分子具有特异性的多种表位。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的探针, 其中所述结合伴侣本身包含至少一种肽和 / 或蛋白质, 所述肽和 / 或蛋白质包含至少一种对待检测的所述靶分子具有特异性的表位。
4. 根据权利要求 3 所述的探针, 其中所述结合伴侣包含多种表位。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的探针, 其中所述核苷酸鉴定序列或条形码包含若干个核苷酸, 所述若干个核苷酸选自 18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6 和 5 个核苷酸。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的探针, 其中所述核苷酸鉴定序列或条形码包括或包含至少一个用于切割所述核苷酸鉴定序列或条形码的限制性酶切位点。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的探针, 其中所述探针还具有有助于在多重测定中鉴定所述靶分子的至少一种另外的标签或标记。
8. 根据权利要求 7 所述的探针, 其中所述标签或标记可通过 PCR 扩增并且因此包含短 DNA 序列。
9. 根据权利要求 7 或 8 所述的探针, 其中所述标签或标记在远离所述结合伴侣的位点处与所述探针连接。
10. 根据权利要求 9 所述的探针, 其中将所述标签或标记并入寡核苷酸 b) 的所述引物序列 i) 或 ii) 的至少之一中。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的探针, 其中所述靶分子选自: 肽、蛋白质、脂质或碳水化合物。
12. 用于在多重测定中检测至少一个样品中的至少一种靶分子的多种探针, 其中每种探针包含:
 - a) 对至少一种所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣; 以及与其连接的
 - b) 寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含:
 - i) 第一序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;
 - ii) 第二序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;和
 - iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码, 其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成, 并且进一

步,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;以及

c) 有助于在多重测定中鉴定所述靶分子的标签或标记。

13. 根据权利要求 12 所述的多种探针,其中所述第一序列和所述第二序列是多种探针共有的。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的多种探针,其中至少两种所述探针具有不同结合伴侣,从而可鉴定至少一个样品中的多种不同靶分子。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的多种探针,其中用于检测特定类型或组的靶分子的探针具有第一共有所述标签或标记;或者用于检测另一特定类型或组的靶分子的探针具有第二共有所述标签或标记;或者用于鉴定特定样品的探针具有另一共有所述标签或标记。

16. 根据权利要求 15 所述的多种探针,其中所述标签或标记是在寡核苷酸 b) 的引物区 i) 或 ii) 的至少之一或两者中提供的短核苷酸序列。

17. 根据权利要求 12 至 16 中任一项所述的多种探针,其中所述靶分子选自:肽、蛋白质、脂质或碳水化合物。

18. 用于检测样品中至少一种靶分子的方法,其包括:

1) 使受试样品暴露于至少一种探针,所述探针包含:

a) 对所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣;以及与其连接的

b) 寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

i) 第一序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

ii) 第二序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码,其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成,并且,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;

在使得所述探针能够与待检测的所述靶分子结合以形成至少一种探针-靶分子缀合物的条件下进行所述暴露;

2) 从所述样品分离所述缀合物;

3) 使所述分离的缀合物暴露于至少一种正向引物和反向引物对以及适合于进行 PCR 的试剂,其中所述对中的一个与所述第一序列互补,而所述对中的另一个与所述第二序列互补;

4) 使用 PCR 扩增所述寡核苷酸;以及

5) 通过确定所述扩增的寡核苷酸的存在来检测所述样品中的所述靶分子。

19. 用于检测至少一个样品中的至少一种靶分子的多重性方法,其包括:

1) 使至少一个受试样品暴露于多种探针,其中每种探针包含:

a) 对至少一种所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣;以及与其连接的

b) 寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

i) 第一序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

ii) 第二序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码,其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成,并且进一步,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;

c) 有助于在多重测定中鉴定所述靶分子的标签或标记;

在使得所述探针能够与待检测的所述靶分子结合以形成探针-靶分子缀合物的条件下进行所述暴露;

2) 从所述样品分离所述缀合物;

3) 使所述分离的缀合物暴露于至少一种或多种正向引物和反向引物对以及适合于进行 PCR 的试剂,其中每对的一个成员与所述探针之一中的所述第一序列互补,而每对中的另一个成员与所述同一探针中的所述第二序列互补;

4) 使用 PCR 扩增所述寡核苷酸;以及

5) 通过确定所述扩增的寡核苷酸和/或所述标签的存在来检测所述样品中的所述靶分子。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的方法,其中可使用选自以下的至少一种技术分离所述缀合物:过滤、迁移、沉淀、免疫沉淀和离心。

21. 根据权利要求 18 至 20 中任一项所述的方法,其中通过对所述核苷酸鉴定序列或条形码测序和/或对所述标签测序来检测所述样品中的所述肽或蛋白质。

22. 根据权利要求 18 至 21 中任一项所述的方法,其中所述样品选自:血液、血清、精液、淋巴液、脑脊髓液、泪液、唾液、尿、组织、汗、水、土壤和油。

23. 根据权利要求 18 至 22 中任一项所述的方法,其中所述靶分子选自:肽、蛋白质、脂质或碳水化合物。

24. 用于检测至少一个样品中的至少一种靶分子的试剂盒,其包含:

i) 至少一种根据权利要求 1 至 11 的探针或根据权利要求 12 至 17 的探针的文库;

ii) 任选地,用于 PCR 扩增所述探针和/或对所述探针进行测序的引物对;和

iii) 相关的试剂和/或说明书。

25. 用于检测和/或量化样品中至少一种靶分子的探针,用于检测和/或量化样品中至少一种靶分子的多种探针,用于检测和/或量化样品中至少一种靶分子的方法,用于检测和/或量化至少一个样品中的至少一种靶分子的多重性方法,或者用于检测和/或量化至少一个样品中的至少一种靶分子的试剂盒,基本上如本文参照附图所述。

基于 PCR 用于平行检测生物材料的测定

[0001] 本发明涉及用于检测样品中至少一种靶分子特别是用于检测样品中的肽、蛋白质、脂质或碳水化合物化合物的新方法；用于所述方法的至少一种探针；用于所述方法的多种所述探针或所述探针的文库，以及用于实施所述方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 涉及例如肽或蛋白质的分子相互作用（例如，抗体-抗原相互作用、激素-受体相互作用、病毒-受体相互作用、酶-底物相互作用等）代表了任何生物系统中最复杂和重要的过程。其检测可提供关于系统状态的有价值信息，并因此可提供具有诊断、治疗或商业价值的重要信息。例如，以下是可通过监测肽或蛋白质相互作用得到的信息类别的非穷列举表。

[0003] a) 诊断未知原因的呼吸道感染性疾病

[0004] b) 研究未知病因的 CNS 感染

[0005] c) 研究自身免疫病

[0006] d) 研究与感染原 (infectious agent) 具有潜在联系的癌症

[0007] e) 研究主要的慢性疾病，例如多发性硬化症、糖尿病、肥胖和其他代谢综合征、克隆病 (Crohn's disease) 和溃疡性结肠炎等

[0008] f) 用于任何人类医疗状况 (medical condition) 的生物标志物的发现。

[0009] 然而，与基于核酸的检测不同，目前没有用于放大生物系统中的基于肽、蛋白质、脂质或碳水化合物之相互作用的有效方法。这意味着，特别是在量低的情况下，许多相互作用未识别或未检测。需要对这种相互作用或信号进行特异性放大以提供适当的灵敏方法。这种方法将对生物和医学研究的所有领域具有重大影响。后者包括但不限于：表征抗体介导的免疫应答，以用于诊断和疫苗相关用途；筛选生物过程或细胞信号转导中的蛋白质-蛋白质相互作用；筛选药物-蛋白质结合或相互作用，例如可能导致副作用的脱靶或非特异性结合；筛选蛋白质-糖蛋白结合，例如鉴定用于进入细胞的病毒-受体结合；表征蛋白质上的翻译后聚糖和寡糖修饰，以用于表征和开发生物药物；以及筛选生物过程中的蛋白质-磷脂相互作用，例如确定凝血蛋白如何与细胞膜结合。

[0010] 在监测抗体介导的免疫应答的领域，能够监测生物系统中的基于肽或蛋白质的信号将具有很大价值。例如，涉及感染原的任何疾病将很可能产生针对该病原的特异性宿主应答。这包括这样的病症，例如由目前难以诊断的感染原引起的脑炎。此外，来自非感染性疾病（例如癌症、自身免疫病和慢性疲劳综合症）的抗体介导的免疫应答也代表了可能从监测生物系统中之基于肽或蛋白质的信号而受益的领域。

[0011] 尽管目前可以监测响应于抗体介导之免疫应答的肽或蛋白质，但是大部分用于基于肽或蛋白质检测的当前技术仅允许检查针对单个或少量目标病原的免疫应答。这使得系统因重复、费力、耗时和昂贵受到质疑。如果可以提供用于抗体监测的高通量基于肽或蛋白质的筛选方法或微阵列，则这些缺点可以被克服。尽管已经报道了用于抗体监测的高通量基于肽的微阵列，但是由于低灵敏度和缺少再现性，其并未被广泛使用 (H. Andresen

和 C. **Grötzinger** (2009) Deciphering the antibodyome-peptide arrays for serum antibody biomarker diagnostics. *Current Proteomics*, 2009, 6, 1-12)。

[0012] 因此, 本文描述的本发明旨在克服与现有技术相关的缺点。

发明内容

[0013] 根据本发明的第一个方面, 提供了用于检测和 / 或量化样品中至少一种靶分子的探针, 其包含:

[0014] a) 对所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣 (binding partner); 以及与其连接的

[0015] b) 寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含:

[0016] i) 第一序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

[0017] ii) 第二序列, 其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

[0018] iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码, 其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成, 并且进一步, 其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目。

[0019] 本文提到的对所述靶分子具有特异性的结合伴侣意指这样的结合伴侣, 其能够与所述靶分子结合以排斥与不同或类似性质的其他靶分子的结合, 并且在一些情况下, 确实不能与任何其他靶分子结合。

[0020] 在本发明的一个优选实施方案中, 可提供多种探针作为探针文库, 一旦开发了新探针, 则可以扩展该文库, 并且额外地或可选地, 所述文库还可进行定制以用于特定目的, 例如但不限于, 基于医院的诊断 (例如, 诊断急性呼吸道感染, 其中可能需要约 100 种探针)。然而, 扩展的文库可包含 10^5 或 10^6 种探针, 并且当具有这个大小时, 期望得到模拟表位 (mimitope) (模拟原始天然表位的表位), 这将使文库极为强大并可用于某些应用, 例如研究自身免疫病的交叉反应抗原和生物标志物的发现。

[0021] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述结合伴侣具有至少一种对所述靶分子具有特异性的表位, 但是理想地, 其具有多种对所述靶分子具有特异性的表位。

[0022] 最优选地, 所述结合伴侣包含至少一种并且理想地包含多种肽和 / 或蛋白质, 其单独地或共同地包含至少一种并且优选地包含多种对待检测之所述肽或蛋白质具有特异性的表位。

[0023] 在本发明的另一个优选实施方案中, 所述探针还具有有助于在多重测定 (multiplex assay) 中鉴定靶分子的标签或标记。这种标签或标记的特征在于可通过 PCR 扩增, 因此理想地包含不同性质 (优选容易阅读) 的另外的短 DNA 序列。

[0024] 在实施本发明的时候, 用于检测特定类型或种类的靶分子的一组探针可具有共有标签, 从而在使用独特条形码检测所述种类中的个体成员之前或者也许之后使用所述标签可确定这类或这种靶分子的存在或量。或者, 可向特定类型的样品提供共有标签, 从而可将在测定中检测的特定靶分子与特定样品联系起来, 例如并且不限于, 可使用特定标签来指定特定患者样品, 并且可使用与不同探针相关的条形码检测在该患者样品中发现或与该患者样品相关的不同靶分子。

[0025] 在一些方面,可以将此标签或标记看作第二条形码系统。使用第一核苷酸鉴定序列或条形码区(通常为 18 至 5 个核苷酸)鉴定特异性靶分子,而使用第二条形码系统鉴定特异性样品或靶分子的组/类型。例如,当监测特定样品时,如果在一项研究中研究 10 份不同血清样品,则可将所有 PCR 产物组合到单个下一代测序运行中(通常降低成本),并且第二条形码将允许在序列分析期间鉴定每一种特定靶分子所来自的特定样品。

[0026] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述标签或标记在远离所述结合伴侣的位点处与所述探针连接,以免干扰结合伴侣的结合功能。理想地,将所述标签或标记并入本发明探针的寡核苷酸 b) 的引物序列 i) 或 ii) 的至少之一中。更优选地,将所述标签或标记并入本发明探针的寡核苷酸 b) 的引物序列 i) 或 ii) 二者中。

[0027] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述第一序列位于距离所述结合伴侣最近的位置,而所述第二序列位于距离所述结合伴侣最远的位置。或者,所述第二序列位于距离所述结合伴侣最近的位置,而所述第一序列位于距离所述结合伴侣最远的位置。

[0028] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述核苷酸鉴定序列或条形码包含以下组核苷酸或由其组成:18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6 或 5 个核苷酸,并且在任何情况下,足以提供实施测定所需的序列组合数的核苷酸数目。例如,10 个核苷酸提供 1,048,576 种组合,而 15 个核苷酸提供 1,073,741,824 种组合。我们目前优选的设计包含 16 个核苷酸,4,294,967,296 种组合。

[0029] 在本发明的另一个优选实施方案中,对于低通量应用,所述条形码区可包括或包含至少一个用于酶促切割所述条形码区的限制性酶切位点(例如 BamH1 或 HindIII 位点),但是可使用本领域技术人员已知的任何其他合适的限制性酶切位点。

[0030] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述探针包含单链 DNA,但是可使用双链 DNA 以提供稳定性、减少非特异性相互作用并减少潜在的空间位阻。

[0031] 根据本发明的第二个方面,提供了用于在多重测定中检测至少一个样品中的至少一种靶分子的多种探针,其中每种探针包含:

[0032] a) 对至少一种所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣;以及与其连接的

[0033] b) 寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

[0034] i) 第一序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

[0035] ii) 第二序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

[0036] iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码,其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成,并且进一步,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;以及

[0037] c) 有助于在多重测定中鉴定所述靶分子的标签或标记。

[0038] 在本发明的一个优选实施方案中,所述第一序列和所述第二序列是一些并且理想地全部探针共有的,以有助于在本文描述的本发明方法中扩增所述寡核苷酸。

[0039] 在本发明的另一个优选实施方案中,至少两种并且理想地更多种所述探针具有不同结合伴侣,从而可鉴定至少一个样品中的多种不同靶分子。

[0040] 更优选地,用于检测特定类型或组的靶分子的探针具有第一共有标签或标记,而用于检测另一特定类型或组的靶分子的探针具有第二共有标签或标记。额外地或可选地,

用于鉴定特定样品的探针具有另一共有标签或标记。理想地,这些标签或标记是在本发明探针的寡核苷酸 b) 的引物区 i) 或 ii) 中的至少之一或两者中提供的短核苷酸序列。在这样的情形下,短意指 3-15 个核苷酸长,理想地 9-11 个核苷酸长,包括 9、10 或 11 个核苷酸中的任意之一。在我们的设计中目前优选的标签 / 标记为 10 个核苷酸长。

[0041] 根据本发明的第三个方面,提供了用于检测样品中至少一种靶分子的方法,其包括:

[0042] 1) 使受试样品暴露于至少一种探针,所述探针包含:

[0043] a) 对所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣;以及与其连接的

[0044] b) 寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

[0045] i) 第一序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

[0046] ii) 第二序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

[0047] iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码,其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成,并且进一步,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;

[0048] 在使得所述探针能够与待检测的所述靶分子结合以形成至少一种探针-靶分子缀合物的条件下进行所述暴露;

[0049] 2) 从所述样品分离所述缀合物;

[0050] 3) 使所述分离的缀合物暴露于至少一种正向引物和反向引物对以及适合于进行聚合酶链式反应 (PCR) 的试剂,其中每对的一个成员与一个所述探针的所述第一序列互补,而每对的另一个成员与所述同一探针的所述第二序列互补;

[0051] 4) 使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增所述寡核苷酸;以及

[0052] 5) 通过确定所述扩增的寡核苷酸的存在来检测所述样品中的所述靶分子。

[0053] 根据本发明的第四个方面,提供了用于检测至少一个样品中的至少一种靶分子的多重性方法,其包括:

[0054] 1) 使至少一种受试样品暴露于多种探针,其中每种探针包含:

[0055] a) 对至少一种所述靶分子具有特异性的至少一种结合伴侣;以及与其连接的

[0056] b) 寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含:

[0057] i) 第一序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补;

[0058] ii) 第二序列,其与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补;

[0059] iii) 位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码,其中所述条形码充当所述靶分子的指示物并且由一定数目的以独特顺序排列的核苷酸组成,并且进一步,其中由所述核苷酸的数目和性质提供的所述核苷酸的独特排列的数目大于所述样品中靶分子的数目;

[0060] c) 有助于在多重测定中鉴定所述靶分子的标签或标记;

[0061] 在使得所述探针能够与待检测的所述靶分子结合以形成探针-肽缀合物的条件下进行所述暴露;

[0062] 2) 从所述样品分离所述缀合物;

[0063] 3) 使所述分离的缀合物暴露于至少一种或多种正向引物和反向引物对以及适合

于进行聚合酶链式反应 (PCR) 的试剂,其中每对的一个成员与一种所述探针中的所述第一序列互补,而每对中的另一个成员与所述同一探针中的所述第二序列互补;

[0064] 4) 使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增所述寡核苷酸;以及

[0065] 5) 通过确定所述扩增的寡核苷酸和 / 或所述标签的存在来检测所述样品中的所述靶分子。

[0066] 在本发明的一个优选方法中,可使用任何优选的实验室技术分离所述缀合物,例如洗涤、过滤、迁移、沉淀、免疫沉淀或离心。

[0067] 理想地,实施免疫沉淀,其中使用探针的结合伴侣或者待检测肽或蛋白质的抗体选择性地从样品除去缀合物,理想地,抗体是单克隆抗体,但是也可使用多克隆抗体。

[0068] 在本发明的另一个优选方法中,可通过对所述核苷酸鉴定序列或条形码测序来进行对所述样品中所述靶分子的检测;此外,在本发明的第四个方面中,额外地或可选地,可通过对所述标签测序来进行该检测。

[0069] 在本发明的另一个优选方法中,所述样品选自包含以下样品的组:血液、血清、精液、淋巴液、脑脊髓液、泪液、唾液、尿、排泄物、组织和汗。或者,样品可以是环境样品,例如水、土壤或油。

[0070] 本领域技术人员将知道如何进行聚合酶链式反应 (PCR) 以扩增所述寡核苷酸。

[0071] 本领域技术人员还将理解,结合伴侣对于其对应物的特异性确保了测定的特异性,并且因此消除了非特异性结合或背景噪声,此外,这还确保了低浓度下以及分子信号的尺寸很小时的特异性结合。这种与 PCR 扩增步骤偶联的特征确保了可检测小信号,并因此显著提高了测定的灵敏度。更有利地,每种探针与标签的偶联确保了可迅速地实现测定的结果,因此增加系统的效率并使其以高通量筛选。此外,在测定方法中使用多种探针使得能够进行多重研究,并因此使得能够确定多个样品中是否存在一个特定信号和 / 或单个样品或多个样品中是否存在多种信号。

[0072] 根据本发明的另一个方面,提供了用于检测至少一个样品中的至少一种靶分子的试剂盒,其包含:根据本发明的至少一种探针或探针的文库,任选地,用于聚合酶链式反应 (PCR) 扩增所述探针和 / 或对所述探针测序的至少一种引物对,和 / 或所述试剂盒相关的试剂或说明书。

[0073] 本领域技术人员将理解,对于所涉及的探针,本发明包括:

[0074] 1) 连接不能扩增的特异性结合伴侣 (P = 肽或蛋白质) 与可扩增的分子 (O = 寡核苷酸);

[0075] 2) 在 O 中特异性并入独特的鉴定物或条形码 (BC) 区,使得可在单个测定 / 管中使用大量 P-O 探针;并且理想地

[0076] 3) 在所述寡核苷酸的一个或全部两个扩增引物区中并入鉴定标签,其允许在单个高通量大规模平行测序反应中进行多个样品的处理。

[0077] 本领域技术人员还将理解,可通过建立对特定查询或研究系具有特异性的探针文库来有利地进行本发明。因此,例如,可建立包含被设计为检测所选病原体(例如细菌和病毒)之探针的文库,更有利地建立包含被设计为检测所述病原体免疫显性表位之探针的文库。更特别地,可建立探针文库以检测已知引起特定疾病的病原体,例如但不限于人脑炎或呼吸道疾病。事实上,可建立包含例如覆盖大部分呼吸道疾病的 100-150 种 P-O 探针的探

针文库。另外,可建立探针文库以进行血清学检测,从而确定例如肠道病毒的存在。

[0078] 在所附权利要求和前文对本发明的描述中,除非由于表达语言或必需暗示使得上下文需要另外说明,否则词语“包括”或其变化形式如“包含”或“含有”以包含含义使用,即,指存在所陈述的特征,但是不排除在本发明的多个实施方案中存在或添加另外的特征。

[0079] 本说明书引用的所有参考文献(包括任何专利和专利申请)通过引用并入本文。并未承认任何参考文献构成现有技术。另外,并未承认任何现有技术构成本领域公知常识的一部分。

[0080] 本发明每一个方面的优选特征可联系任何其他方面来描述。

[0081] 通过以下实施例,本发明的其他特征将变得明显。一般来说,本发明延伸至本说明书(包括所附权利要求和附图)中公开的任何新的一个特征或特征的任何新组合。因此,结合本发明的特定方面、实施方案或实施例描述的特征、整体、特性、化合物或化学部分应理解为适用于本文描述的任何其他方面、实施方案或实施例,除非与其相矛盾。

[0082] 此外,除非另有说明,否则本文公开的任何特征可以被用于相同或类似目的的可选特征代替。

[0083] 现在通过仅参考以下附图的实例描述本发明:

[0084] 图 1. 示出一般 P-0 探针的设计的原理图;

[0085] 图 2. 可并入到这种新平台中的不同形式的 P(肽或蛋白质);

[0086] 图 3. 理论计算的条形码容量和寡核苷酸长度;

[0087] 图 4. 并入鉴定标签使得能够处理多个样品从而降低成本并增加输出的原理;

[0088] 图 5. 示出了 P-0 探针和引物的设计,在该实例中,使用限制性位点作为条形码区;

[0089] 图 6. 示出了不同 PCR 产物的消化模式;

[0090] 图 7. 示出了不同 PCR 产物的测序迹线文件(sequencing trace file);

[0091] 图 8. 示意性地示出了 MOST 捕获/检测程序。用于检测血清中特异性抗体的 MOST 程序被分为两部分,捕获和检测。步骤 1- 捕获:将磁珠放入具有待测试血清样品的 eppendorf 管中并在结合缓冲液中孵育以使抗体与蛋白质 A/G 磁珠结合。孵育后,洗涤磁珠以除去任何未结合的抗体。然后将同样在结合缓冲液中的 P-0 缀合物添加至含有所述磁珠的 eppendorf 管。P-0 缀合物的肽区在该孵育过程中与其特异性抗体结合。在孵育之后,洗涤磁珠以除去未结合的 P-0 缀合物。步骤 2- 检测:将所述磁珠直接收集到含有 Ion Torrent 特异性引物的 PCR mastermix 中。Ion Torrent 引物的 P-0 特异性区与位于 P-0 条形码外部的寡核苷酸(oligo)的序列结合。除了接头(adaptor)序列外,每个 Ion Torrent 引物组还含有独特的样品条形码。通过 PCR 扩增捕获的寡核苷酸,然后通过柱纯化以除去 PCR 试剂和磁珠。然后通过 Ion Torrent NGS 分析该样品。尽管在检测程序的这个实例中利用了 Ion Torrent 平台,但是本申请整体上不以任何方式依赖于使用 Ion Torrent 平台以解析下一代测序的结果;其他平台同样有效,并可根据各个平台的说明书自由使用。还通过 Taqman 定量 PCR 监测样品,其中 Taqman 探针是对于 P-0 条形码特异的。

[0092] 图 9 示出了 MOST 富集的深度测序结果。在用 MOST 处理之后,对样品进行深度测序以确定富集的特异性水平。为了量化富集,从富集后样品反应中每一条形码化靶标特异的读数百分比减去富集前样品反应中每一条形码化靶标特异的读数百分比(A)。该计算

作为正值突出了相对于输入在样品中富集的靶标,而作为负值显示了相对于输入减少的靶标。当向人血清掺加 1 μ l 抗 Flag 抗体并进行 MOST 时,特异性 Flag 信号相对于输入增加超过 21%,而来自反应中存在的其他 P-O 缀合物的信号相对于输入不受影响或降低 (B)。当使用 5 μ l 抗 HA 抗体模拟流感感染引起的免疫应答时,特异性 HA 信号相对于输入增加超过 65%,而来自反应中存在的其他 P-O 缀合物的信号相对于输入不受影响或降低 (C);以及

[0093] 图 10 示出了寡核苷酸:链霉亲和素:聚糖复合物的逐步构建。将寡核苷酸 A、聚糖 A 和链霉亲和素混合到一个样品中,而将寡核苷酸 B、聚糖 B 和链霉亲和素混合到另一个样品中(步骤 1)。在简短孵育期之后,将这两个样品混合并向混合物中添加仅对一种聚糖具有特异性的凝集素-琼脂糖珠以结合特定的寡核苷酸复合物(步骤 2)。进行多次洗涤步骤以除去过量寡核苷酸 A、寡核苷酸 B、聚糖 A 和聚糖 B(步骤 3),之后,对琼脂糖珠-凝集素:聚糖:链霉亲和素:寡核苷酸复合物进行 PCR 和检测(步骤 4)。(结果)富集倍数。反应输入是由寡核苷酸 A(A) 或寡核苷酸 B(B) 或者二者复合物的混合物寡核苷酸 A/寡核苷酸 B(A/B) 形成的最终聚糖:链霉亲和素:寡核苷酸复合物。每一种凝集素特异性与每一种聚糖结合;凝集素 (a) 应仅与聚糖 A 结合,而凝集素 (b) 应仅与聚糖 B 结合。然后,输入 Aa 是用凝集素 (a) 提取的聚糖 A:链霉亲和素:寡核苷酸 A 复合物。A(b) 是用凝集素 (b) 提取的聚糖 A:链霉亲和素:寡核苷酸 A 复合物,这是对于该聚糖错误的凝集素。因此,A/B(a) 是聚糖 A:链霉亲和素:寡核苷酸 A 和聚糖 B:链霉亲和素:寡核苷酸 B 的混合物,然后使用对于聚糖 A 具有特异性的凝集素凝集素 (a) 仅提取出含有聚糖 A:链霉亲和素:寡核苷酸 A 的复合物,而聚糖 B:链霉亲和素:寡核苷酸 B 复合物保留在溶液中并且被冲洗掉。B(b) 是使用凝集素 (b) 提取聚糖 B:链霉亲和素:寡核苷酸 B 复合物,而 B(a) 是使用错误的凝集素 (a) 试图提取聚糖 B:链霉亲和素:寡核苷酸 B 复合物。A/B(b) 还为两种复合物的混合物,并且使用凝集素 (b) 仅捕获聚糖 B:链霉亲和素:寡核苷酸 B 复合物。在通过凝集素-琼脂糖珠特异性捕获后,通过 TaqMan qPCR 检测琼脂糖-凝集素:聚糖:链霉亲和素:寡核苷酸复合物上的寡核苷酸,并且相对于背景计算 ΔCt 或富集倍数。PCR_a 使用设计为仅检测寡核苷酸 A 的 TaqMan qPCR 探针,而 PCR_b 是设计为仅检测寡核苷酸 B 的特异性 TaqMan qPCR 探针。一旦进行了 PCR 并且获得了 Ct 值,使用 $2^{(\text{阴性对照 Ct}-\text{输出 Ct})}$ 计算相对于背景的 ΔCt 或富集倍数。

[0094] 方法

[0095] 尽管本发明可应用于生物学研究和开发的所有领域,但是我们将使用对免疫应答(抗体)的监测来说明实践模式。

[0096] **概要:**如图 1 所示,使靶标特异性的每种结合伴侣 P(肽或蛋白质)与寡核苷酸(O)共价连接以形成 P-O 探针。可将无限数目的 P-O 探针以等摩尔比混合,从而形成 P-O 探针的文库。当用靶肽或靶蛋白(例如抗体(例如,患者血清))检查该文库时,将在抗体及其特异性结合伴侣 P 之间发生特异性结合。在捕获和洗涤之后,应用 PCR 扩增 BC 区,然后通过高通量大规模平行测序鉴定和量化每个 BC。

[0097] **实践的具体步骤:**

[0098] 1) 设计/选择结合伴侣 P:如图 2 中概括的,多种形式的结合伴侣(即,肽或蛋白质)可用于该平台。可使用多表位(polytope)P(即包含多种肽或蛋白质并因此包含多种表位的结合伴侣)来节省成本,但是可能降低特异性,仅应在成本是主要关注点时使用。我

们设想包含一种或更多种表位的单一肽或蛋白质 P 结合伴侣 (如图 1 示意性示出的) 将是大规模使用的最可能形式, 因为其提供了最好的灵敏度、表位分辨率和质量保证。

[0099] 2) 设计 O: 任何序列均可用于正向位点和反向位点, 一些优化保证了通过最佳 F/R 组合实现最均一扩增。条形码区的尺寸取决于设想的最大多重数 (maximal multiplex) (图 3)。我们认为 10 个核苷酸的区 (容纳超过 100 万个单独 P-O 探针) 应该是足够的, 但是可使用更短的条形码区 (例如, 5 个核苷酸) 或更长的条形码区 (例如, 15 个核苷酸)。相对于较长的 15 个核苷酸的 BC 区, 这种较短的 10 个核苷酸的 BC 区还可通过 F/R 引物有利地无偏扩增 (unbiased amplification)。

[0100] 3) 向 PCR 引物区中并入鉴定 (ID) 标签: 向至少一个引物区 (或可能两个以增加可靠性) 中并入鉴定标签 (通常 4-6nt 长), 从而可在同一测序反应中处理多个样品 (如下) 以降低成本, 图 4。

[0101] 4) 通过抗体捕获特异性 P-O- 肽或蛋白质缀合物: 尽管可使用不同方法捕获特异性肽或蛋白质以及结合伴侣 -P 的结合, 但是优选在液相中进行该捕获以提高特异性 (即, 降低背景结合)。首先将包被有例如特异性抗体 (例如, 抗人 IgG 或抗人 IgM) 的磁珠与人血清孵育, 随后充分洗涤。然后在合适的缓冲系统中向抗体-珠混合物添加 P-O 探针文库。孵育后, 将所述珠充分洗涤以除去任何未结合的 P-O 探针。

[0102] 5) PCR 扩增: 将 PCR 反应混合物 (包含引物、dNTP 和酶) 不进行任何进一步处理直接添加至经洗涤的珠。PCR 扩增的循环数可变化, 但是通常应保持最少以保持肽量化的精确度。

[0103] 6) 读出条形码: 可使用多种本领域技术人员已知的现有技术实现条形码的鉴定和量化。当同时研究超过 100 种靶标时, 在“发现”型应用中可使用高通量大规模平行测序 (例如, Ion Torrent 平台)。对于 10-100 种靶标, 可使用 Droplet Digital PCR (例如, BioRad 系统), 而对于少于 10 种靶标的样品, 可应用 Luminex 或 qPCR 进行鉴定。

具体实施例

[0104] 本文使用两种示例的探针 /P-O 和对于各自具有特异性的阳性抗体证明了本发明的可行。在此例子中的靶蛋白是流感病毒和登革病毒 (denuge virus) 特异性的表位。

[0105] P-O 缀合物和引物设计 (参见图 5):

[0106] 1) 选择两种特异性肽表位 (YPYDVPDYA 和 YKQPLWPNQISW, 在图 5 部分 A 的左手边示出): 一种来自流感病毒, 而另一种来自登革病毒。

[0107] 2) 在此具体实施例中, 对于寡核苷酸设计, 向每个不同条形码区中并入特定限制性酶切位点, 即, 每个条形码区中并入不同限制性位点, 以便可以使用酶消化来确认测序结果。将 BamH1 并入到流感特异性探针的条形码区中, 而将 HindIII 并入到登革特异性探针的条形码区中。

[0108] 3) 在此具体实施例中, 在此试验中使用 8nt 的条形码区。用于寡核苷酸扩增的 PCR 扩增引物 (B) 和用于独特条形码区测序的测序引物 (C) 在图 5 中示出。值得注意的是, 这些引物被设计用于此具体试验, 而且本发明不限于此, 这些引物是对本发明的示例。本领域技术人员可设计用于不同应用的其他引物。

[0109] 实验程序

[0110] 本研究中使用的抗体

[0111] 1). 抗流感 (i) 单克隆抗体:HA- 标签 (c29F4) 兔 mAb(Cell Signaling Technology 货号 #3724S)。

[0112] 2) 抗登革 (d) 人血清:来自已知被登革病毒感染两次的个体。

[0113] 免疫捕获

[0114] 1) 制备图 5A 的稀释的流感和登革 (I :D)P-0 探针 (各约 30,000 分子 / μ l) 的混合物。

[0115] 2) 将 10 μ l I :D P-0 探针混合物添加至 5 μ l 血清样品和 85 μ l IP 缓冲液 (25mM Tris、150mM NaCl、pH 7.2), 并且将混合物在室温搅拌孵育 30 分钟。

[0116] 3) 在孵育期间, 如下制备蛋白质 G 珠 (Pierce), 即用于免疫球蛋白的分离和纯化的亲和基质: 将 1ml IP 缓冲液添加至珠。然后将珠在 2500 \times g 下离心 2 分钟, 除去上清液。将这个步骤重复两次, 然后使珠重悬在 500 μ l IP 缓冲液中。

[0117] 4) 在孵育之后, 将 50 μ l 珠添加至血清 /P-0 混合物。将血清 /P-0/ 珠溶液再在室温下搅拌孵育 30 分钟。

[0118] 5) 孵育后, 添加 500 μ l IP 缓冲液并将珠在 2500 \times g 下离心 2 分钟。除去上清液并且向珠添加 1ml IP 缓冲液。将这个步骤重复 3 次。

[0119] 6) 使珠重悬在 39 μ l 水中并转移到 PCR 管以在 PCR 中直接使用。

[0120] PCR 反应

[0121] 1) 在含有来自免疫捕获的珠的管中直接建立 50 μ l PCR 反应。所述 50 μ l PCR 反应包含 5 μ l 10 \times 缓冲液、4 μ l 2.5mM dNTP、1 μ l 各引物 (BS-M13F 和 BS-M13R) 和 0.2 μ l Atlas Taq 聚合酶。

[0122] 2) 40 个循环的 PCR 循环条件如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 10 秒, 54 $^{\circ}$ C 退火 10 秒并且 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 秒。

[0123] 3) 在 2% 琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。

[0124] 限制性酶消化

[0125] 1) 使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明书来纯化 PCR 产物。用 30 μ l TE 缓冲液洗脱纯化的 PCR 产物。

[0126] 2) 用 BamHI 或 HindIII 建立 30 μ l 消化混合物。消化反应包含 3 μ l 纯化的 PCR 产物、3 μ l 10 \times 缓冲液、3 μ l 10 \times BSA、0.5 μ l 限制性酶和 20.5 μ l H₂O。

[0127] 3) 将消化反应在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, 然后在 2% 琼脂糖凝胶上分离。

[0128] 测序:

[0129] 1) 对于 Sanger 测序, 将纯化的 PCR 产物发送至外部服务提供者以使用图 5 中列出的引物 BS1F 和 BS2R 进行 Sanger 测序。

[0130] 深度测序:

[0131] 我们还设计了 P-0 缀合物的寡核苷酸部分以使得 PCR 富集步骤的产物可立即准备用于通过深度测序量化。另外, 我们还已经开发了能够区分并检测本发明探针之条形码区的 qPCR 测定。深度测序分析通常主要用于高通量筛选样品, 而 qPCR 更可能成为本发明技术的低通量应用所选择的平台。这些新方法在图 8 中概括, 并且在此详细描述:

[0132] 步骤 1- 捕获: 将磁性蛋白质 A/G 珠放入 eppendorf 管, 所述管含有 200 μ l 封闭 /

结合缓冲液 (1×TBS-T[0.05% Tween] 中的 1% 封闭试剂 [Roche#11 096 176 001]、0.1mg/ml BSA、100 μg/ml 终浓度的 tRNA)。虽然在这个捕获程序的实例中使用来自 Roche 的封闭缓冲液,但是本申请整体上不以任何方式依赖于 Roche 封闭缓冲液的使用,尤其是对于构建体与其特异性靶标的结合来说;其他封闭缓冲液可能同样有效,可根据各试剂说明书自由使用。添加血清样品(或者在先导性实验的单克隆抗体)并且孵育以使存在的抗体与磁珠结合。孵育后,将磁珠用 500 μl 1×TBS-T(0.05% Tween) 洗涤以除去未结合的抗体。然后将同样在 200 μl 结合缓冲液中的 P-0 缀合物 (P-0 缀合物探针的混合物,即探针 1-6) 添加至含有磁珠;抗体复合物的 eppendorf 管。P-0 缀合物的肽区域在该孵育过程中与其特异性抗体结合。孵育后,将磁珠在 500 μl 1×TBS-T(0.05% Tween) 中洗涤以除去未结合的 P-0 探针。

[0133] 步骤 2- 检测:将所述磁珠直接收集到含有 Ion Torrent 特异性引物的 50 μl PCR mastermix 中。用 Pfu 校正聚合酶进行 PCR。Ion Torrent 引物的 P-0 特异性区与位于 P-0 条形码外部的探针的 18nt 引物互补序列结合。在 P-0 条形码任意侧的该 18nt 序列在所有 P-0 缀合物中通常是相同的,允许多重 Ion Torrent PCR。最优选地,除了接头序列外,每个 Ion Torrent 引物组还含有独特的标签或标记序列。通过 PCR 扩增捕获的寡核苷酸,然后通过柱纯化以除去 PCR 试剂和磁珠。将纯化的 PCR 产物在 10 μl 中洗脱并且在生物分析仪 DNA 1000 Chip 上探询 DNA 的质量和数量。然后通过 Ion Torrent NGS 分析该样品。还可通过 Taqman 定量 PCR 监测所述样品,其中 Taqman 探针是 P-0 条形码特异性的。

[0134] 示例性探针

[0135] 除了图 5 中示出的探针外,还产生了另外 6 种构建体用于实施所述技术。这些构建体的肽和寡核苷酸序列在下表中示出。

[0136]

P-0名称	寡核苷酸序列5'-3' (条形码为大写字母)	肽
寡核苷酸-001 (Flag)	gagatagactcaagaccgACTCTACCGTCTACTActcatcaacttcgcatgg	DYKDDDDK
寡核苷酸-002 (HA)	gagatagactcaagaccgACCAGATTCTGAAGTGctcatcaacttcgcatgg	YPYDVPDYA

[0137]

寡核苷酸-003 (YFV)	gagatagactcaagaccgCCAACGTCCCATCTGActcatcaacttcgcatgg	IIVGRGDSRLTY
寡核苷酸-004 (破伤风)	gagatagactcaagaccgTCAGTACTTTTCAGAATtctcatcaacttcgcatgg	QYIKANSKFIGITEL
寡核苷酸-005 (SARS)	gagatagactcaagaccgTTCGGGCGGTCTCAATtctcatcaacttcgcatgg	LTPAWR
寡核苷酸-006 (MeV)	gagatagactcaagaccgCTGACACGTACACCTTctcatcaacttcgcatgg	AEPLLSC

[0138] 结果 (参见图 6 和 7)

[0139] 1) 验证条形码序列和 P-0 探针的功能:使用限制性消化和直接测序这两种不同方

法来确认两种 P-0 探针各自条形码区的正确序列。如图 6 和 7 所示, P-0 探针包含预期的序列, 并且可分别使用 BamHI 和 HindII 切割。

[0140] 3) 通过同源抗体特异性捕获: 为了测试通过抗体特异性捕获的概念, 用两种不同抗体孵育 I :D P-0 探针的 1 : 1 混合物。抗流感 (i) 单克隆抗体 :HA- 标签 (c29F4) 兔 mAb 和抗登革 (d) 人血清。

[0141] 在每种情况下, 均观察到了特异性富集, 因此说明了 P-0 探针设计的功能。

[0142] 结果 (参见图 9 和 10)

[0143] 通过深度测序进行量化的结果在图 9 中示出。这些结果表明, 在上述条件下, 能够分别使 Flag 表位 P-0 缀合物和流感 HA 表位缀合物分别富集超过 21% 和 65%。

[0144] 尽管上述信息示例了使用样品中蛋白质或肽以及因此具有对样品中所述蛋白质或肽有特异性之蛋白质或肽结合伴侣的探针的技术, 我们还使用样品中的聚糖 / 碳水化合物以及因此具有对样品中所述聚糖 / 碳水化合物有特异性之结合伴侣的探针实施了本发明。在图 10 中, 示出了使用利用生物素 - 链霉亲和素结合的改进间接缀合方法之聚糖 - 寡核苷酸概念的数据。这些数据表明, 使用这种方法, 可使特异性聚糖富集, 并检测到相对于阴性对照高达 14 倍。

[0145] 结论

[0146] 1) P-0 探针的功能: 本试验证实, 可使肽或蛋白质结合伴侣 P 与寡核苷酸 O 缀合并保持二者实体的功能。

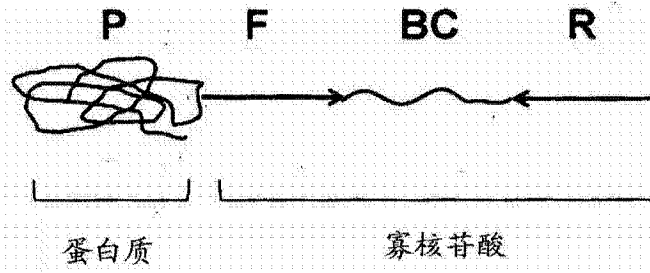
[0147] 2) 条形码的功能: 证实条形码的概念是有效的, 因为可以容易地鉴定流感或登革特异性结合。

[0148] 3) 结合的量化: 从消化模式和测序迹线文件, 明显可获得富集因子的估计 (图 6 或 7, 比较 I :D vs I :D/I 并且在图 9 和 10 中实际示出)。基于这些数据, 预期可使用 NGS 容易地实现精确量化。

[0149] 4) 优化: 单克隆抗体比多克隆人血清表现得更好, 但是预期优化引物设计、PCR 条件或免疫捕获可增强表现。

[0150] 5) 第二条形码: 提供了进一步改善所述技术的方式。

蛋白质/肽-寡核苷酸 (P-O) 探针



- P =** 蛋白质/肽
- F =** 正向引物区
- BC =** 可变的条形码区
- R =** 反向引物区

图 1

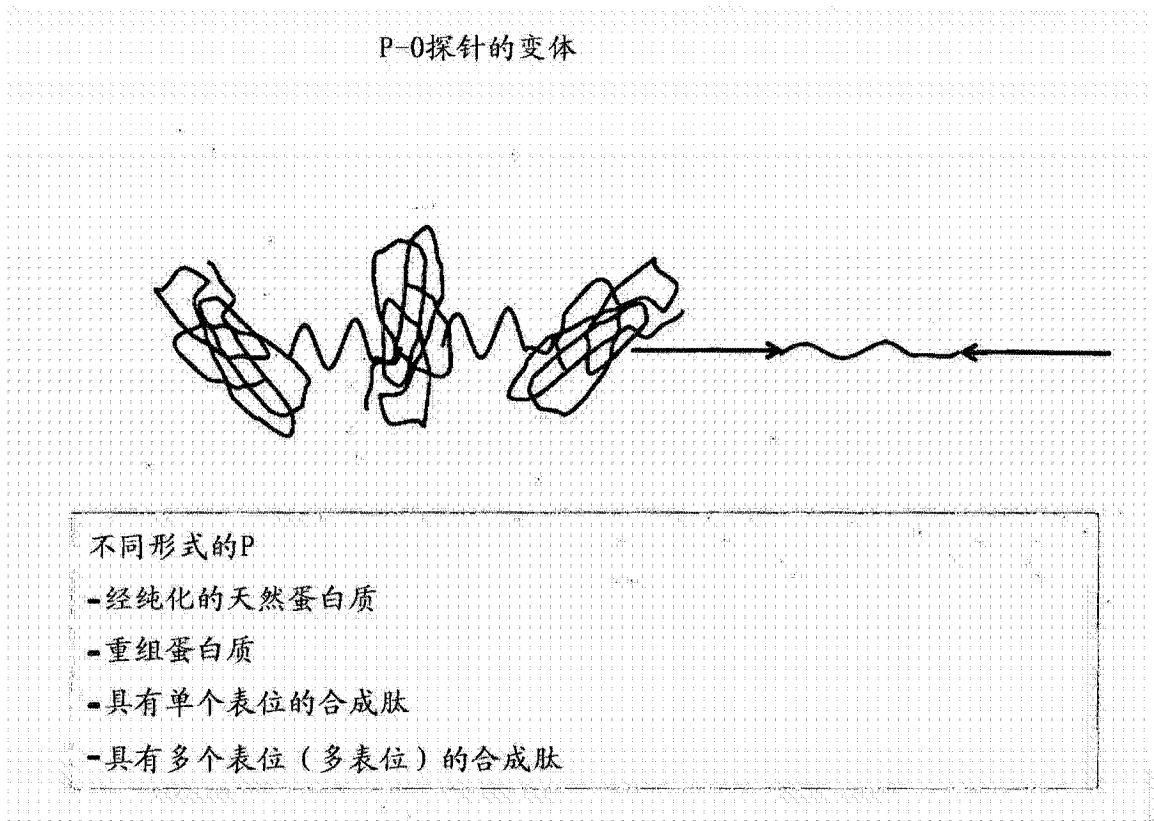


图 2

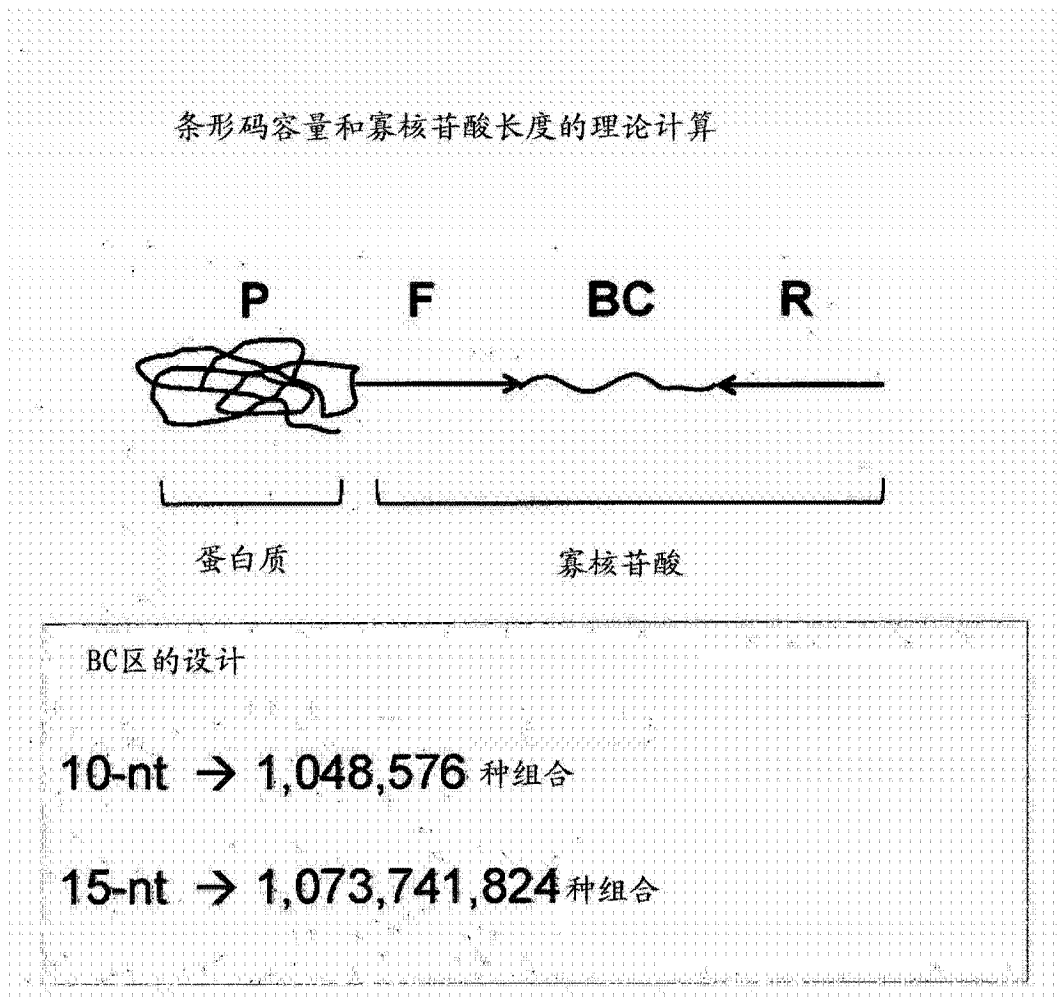
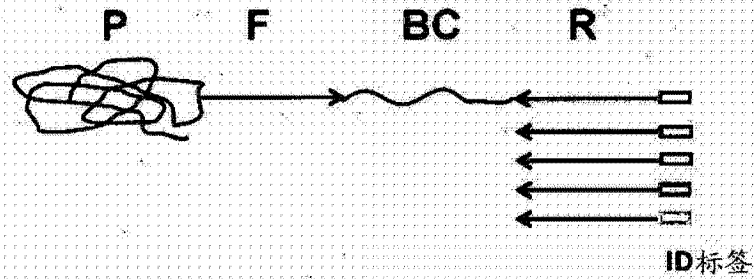


图 3

引入鉴定 (ID) 标签用于样品多重化



ID 标签 (以有色框示出) 由可添加至反向引物 (R) 末端的短 DNA 序列 (通常 4-6 个核苷酸) 组成, 使得能够处理多个样品以降低测序成本

图 4

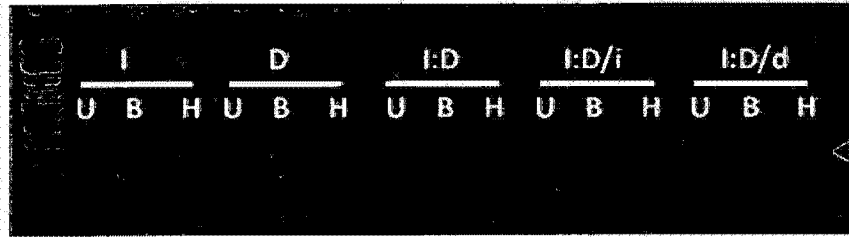
P-0探针和引物的设计

- A.** 流感 P-O (I)
 YPYDVPDYA---GTAAAACGACGGCCAGTGGATCCTCATGGTCATAGCTGTT
 BamHI
- 登革 P-O (D)
 YKQPLWPNQISW---GTAAAACGACGGCCAGGAAGCTTGCATGGTCATAGCTGTT
 HindIII
- B.** BS1-M13-F
 ctgacgcgccctgtagcggcgccattaagcgcggcGTAAAACGACGGCCAG
- BS2-M13-R
 gtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactAACAGCTATGACCATG
- C.** BS1F-seq
 CTGACGCGCCCTGTAG
- BS2R-seq
 GTGTGGTGGTTACGCG

A = P-O 探针; B = PCR 引物; C = 测序引物

图 5

不同PCR产物的消化模式



- 箭头指出了预期尺寸的PCR项目。
- P-0探针和捕获： I=未捕获的流感P-0； D=未捕获的登革P-0；
I: D =流感和登革P-0探针的1: 1混合物；
I: D/i=用流感抗体捕获的I: D混合物；
用登革抗体捕获的I: D混合物。
- PCR项目的消化： U=未消化的； B=BamHI（对流感P-0有特异性）；
H=HindIII（对登革P-0有特异性）。

图 6

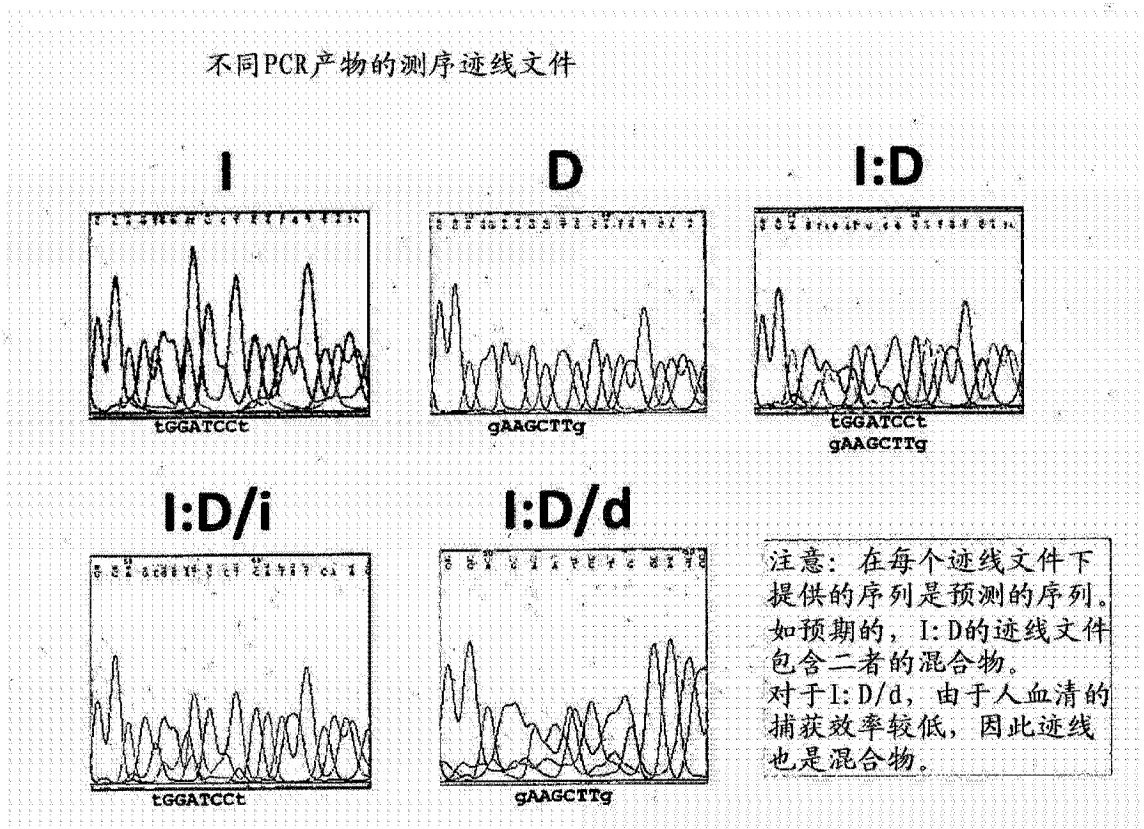


图 7

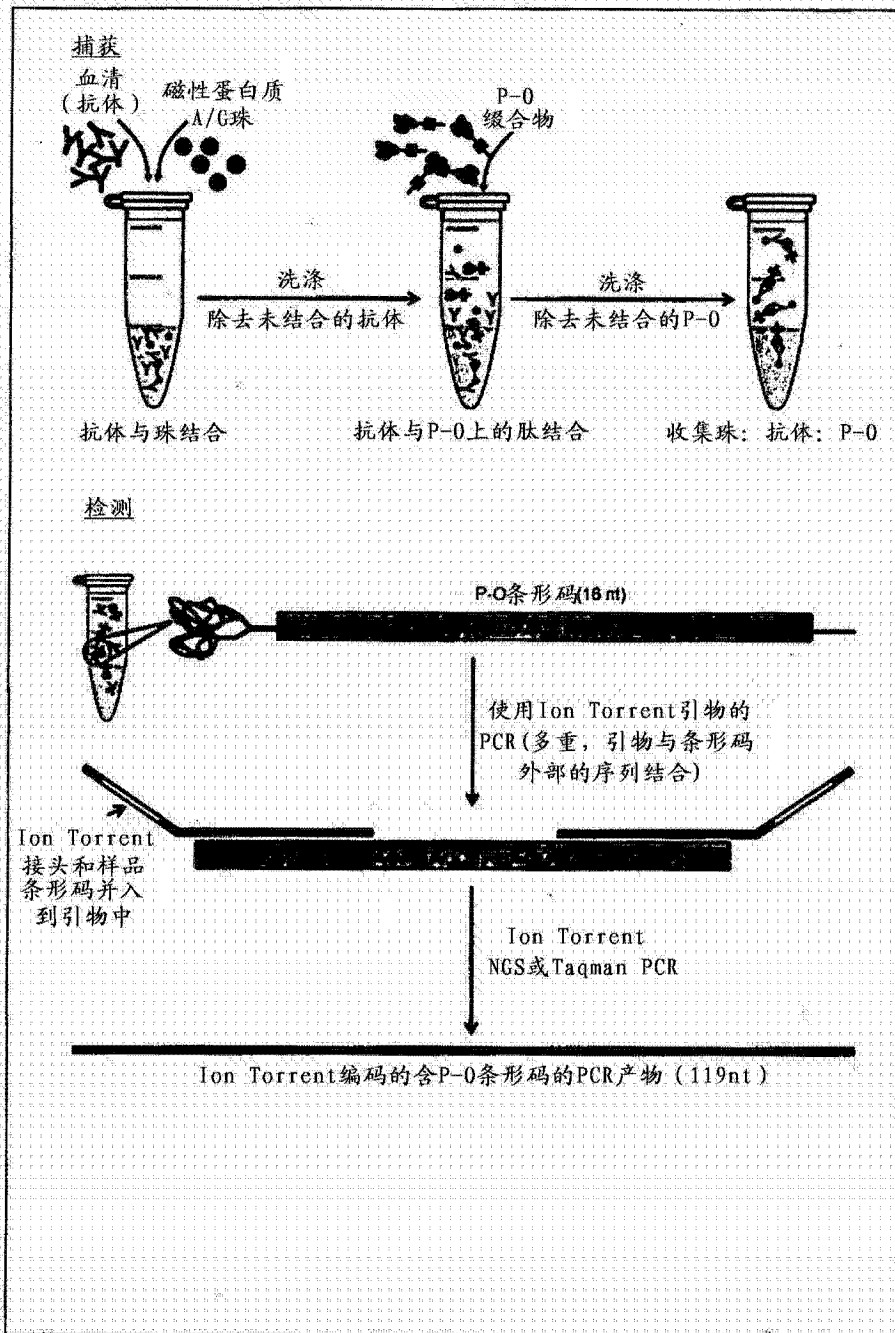


图 8

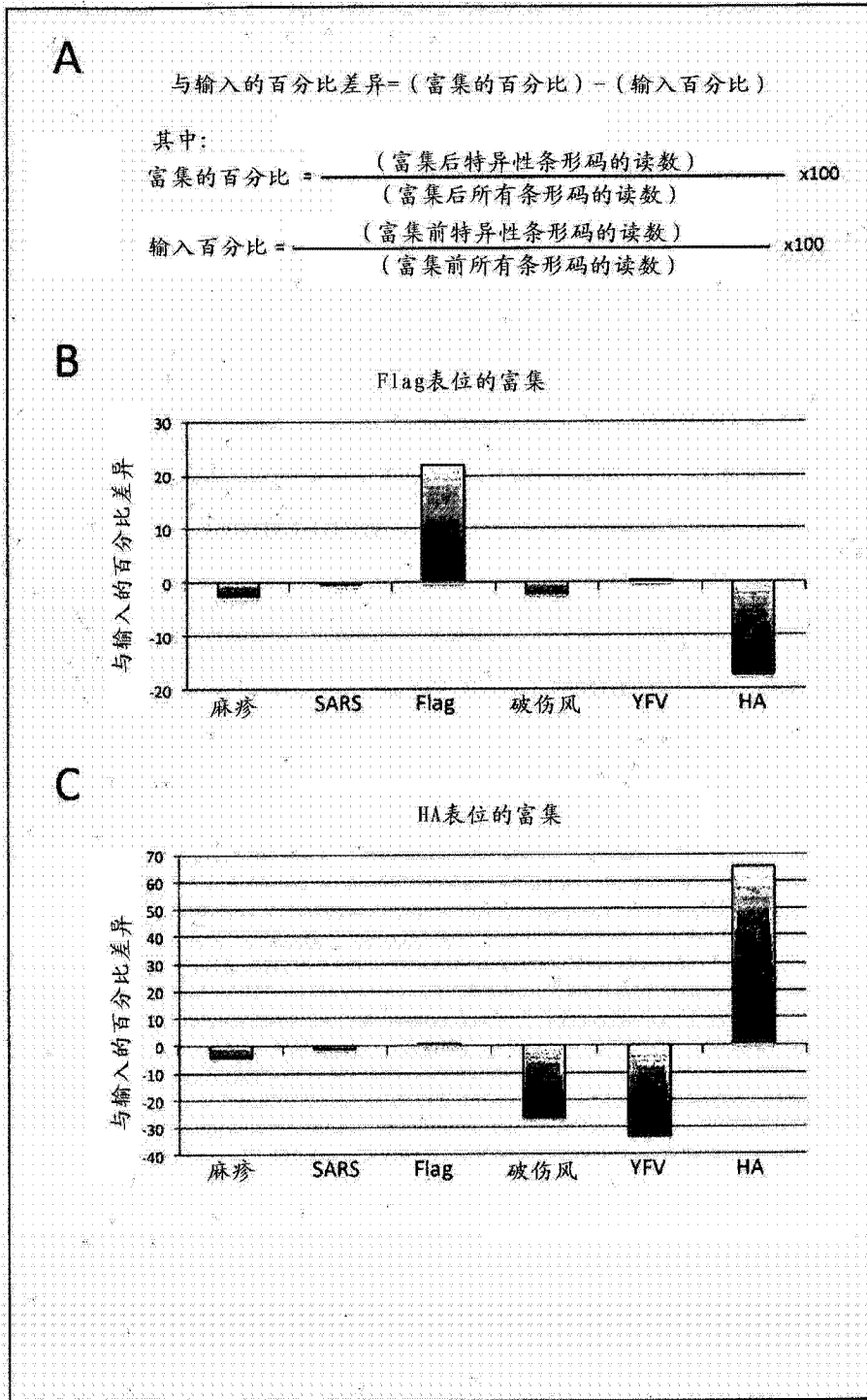


图 9

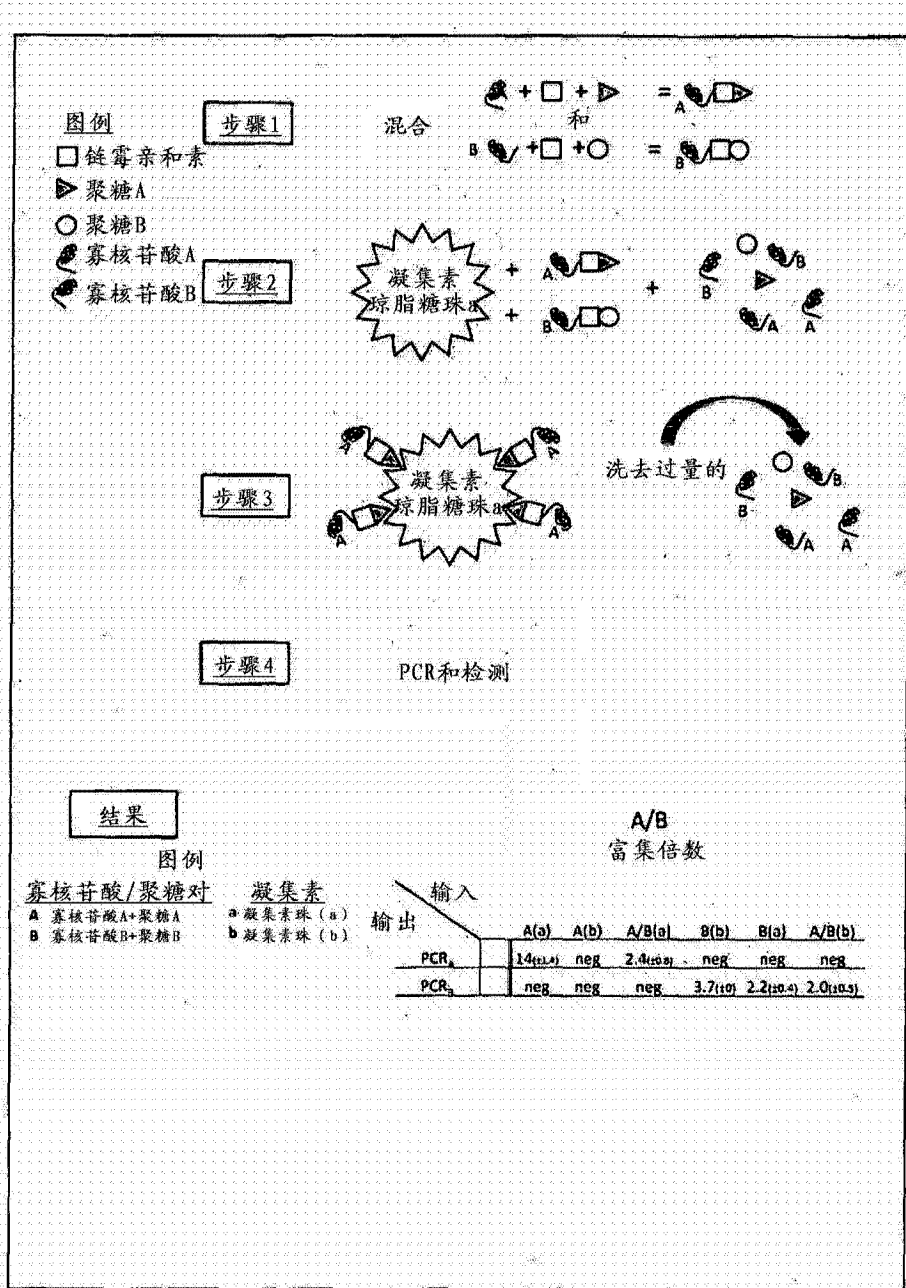


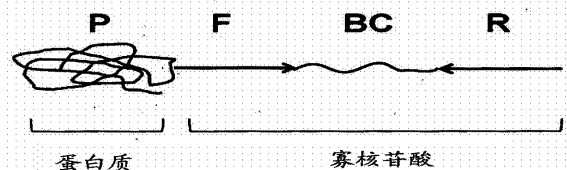
图 10

专利名称(译)	基于PCR用于平行检测生物材料的测定		
公开(公告)号	CN104812915A	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201380061190.1	申请日	2013-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
[标]发明人	王林发 黄英勇 奥克托布尔·迈克尔·塞申斯 达尼埃尔·伊丽莎白·安德森		
发明人	王林发 黄英勇 奥克托布尔·迈克尔·塞申斯 达尼埃尔·伊丽莎白·安德森		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C07K19/00		
CPC分类号	C12Q1/686 C07K19/00 G01N33/531 G01N33/58 G01N33/537 C12Q1/6876 C12Q2600/16 C12Q2537/143 C12Q2563/185 C12Q1/6844 G01N33/53		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2012018909 2012-10-22 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测样品中的生物材料特别是肽或蛋白质的新平行方法，用于所述方法的至少一种探针，用于所述方法的多种所述探针或所述探针的文库，以及用于实施所述方法的试剂盒，其中所述探针包含对所述肽或蛋白质具有特异性的结合伴侣，以及与所述结合伴侣连接的寡核苷酸，所述寡核苷酸包含i)与用于扩增所述寡核苷酸的正向引物序列互补的第一序列，ii)与用于扩增所述寡核苷酸的反向引物序列互补的第二序列和iii)位于所述第一序列和所述第二序列之间的核苷酸鉴定序列或条形码。

蛋白质/肽-寡核苷酸 (P-O) 探针



- P =** 蛋白质/肽
- F =** 正向引物区
- BC =** 可变的条形码区
- R =** 反向引物区