



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101410530 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200480015877. 2

代理人 陈轶兰

(22) 申请日 2004. 04. 19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68(2006. 01)

60/463, 712 2003. 04. 18 US

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

US 2002/0064779 A1, 2002. 05. 30,

2005. 12. 07

WO 0184146 A2, 2001. 05. 04,

(86) PCT申请的申请数据

US 2002/0115088 A1, 2001. 10. 09,

PCT/US2004/011918 2004. 04. 19

US 2002/0051986 A1, 2002. 05. 02,

(87) PCT申请的公布数据

审查员 杨莹跃

W02004/094456 EN 2004. 11. 04

(73) 专利权人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·纳多 T·赫利尔 D·伯杰

W·努斯鲍默 R·罗森斯坦

A·库恩 S·S·王 K·桑顿

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 2 页 说明书 44 页 附图 84 页

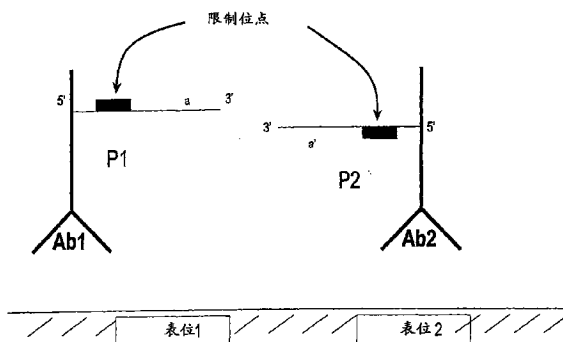
(54) 发明名称

免疫-扩增

(57) 摘要

本发明为临床上相关的样品(例如血液)提供了高度灵敏的、高通量的免疫-扩增测定。该测定包括使用2个邻近成员,后者包含缀合到寡核苷酸上的分析物特异性结合组分。结合分析物使邻近成员的寡核苷酸部分足够接近,以形成扩增子。然后,通过扩增扩增子和检测扩增的核酸,检测分析物的存在。通过防止未与分析物复合的邻近成员形成虚假的或非特异性的扩增子,提高了本发明的测定的灵敏度。在一个实施方案中,使用能结合未彼此杂交的寡核苷酸部分的杂交封闭剂寡核苷酸,防止了目标-非依赖性扩增子形成。通过提供能阻止扩增子形成、直到释放出被捕获的复合物的固相捕捉寡核苷酸,进一步降低了背景。

抗原与缀合寡核苷酸的抗体的混合



CN 101410530 B

1. 检测分析物的方法,包括:

(i) 组合:

(a) 分析物;

(b) 第 1 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 1 实体,后者能与分析物形成复合物,且缀合到第 1 寡核苷酸部分上,所述第 1 寡核苷酸部分包含第一部分;

(c) 第 2 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 2 实体,后者能与分析物形成复合物,且缀合到第 2 寡核苷酸部分上,所述第 2 寡核苷酸部分包含第一部分;

其中所述分析物是抗原且所述特异性结合分析物的第 1 实体和第 2 实体各自是抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段;或者,所述分析物是抗原特异性抗体,且所述特异性结合分析物的第 1 实体和第 2 实体各自是抗原;

(ii) 形成至少 1 个杂交体,其包含所述第 1 寡核苷酸部分的第一部分和所述第 2 寡核苷酸部分的第一部分,其中所述至少 1 个杂交体包含一个 3' 末端,后者能被延伸,以形成包含 5' 末端的第 1 寡核苷酸部分的第二部分的互补物;

(iii) 延伸该 3' 末端,以生成扩增子;

(iv) 扩增扩增子,以生成扩增产物;和

(v) 检测扩增产物;

其中对扩增产物的检测允许检测分析物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述至少 1 个杂交体包含所述第 1 和第 2 寡核苷酸的第一部分。

3. 权利要求 1 的方法,其中形成 2 个杂交体;第 1 杂交体包含所述第 1 寡核苷酸部分的第一部分和夹板寡核苷酸的第一部分,第 2 杂交体包含所述第 2 寡核苷酸部分的第一部分和夹板寡核苷酸的第二部分。

4. 检测分析物的方法,其包括:

(i) 组合:

(a) 分析物;

(b) 第 1 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 1 实体,后者能与分析物形成复合物且缀合到第 1 寡核苷酸部分上,所述第 1 寡核苷酸部分包含第一部分;

(c) 第 2 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 2 实体,后者能与分析物形成复合物且缀合到第 2 寡核苷酸部分上,所述第 2 寡核苷酸部分包含第一部分;

其中所述分析物是抗原且所述特异性结合分析物的第 1 实体和第 2 实体各自是抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段;或者,所述分析物是抗原特异性抗体,且所述特异性结合分析物的第 1 实体和第 2 实体各自是抗原;

(ii) 形成至少 1 个杂交体,其包含所述第 1 寡核苷酸部分的第一部分和所述第 2 寡核苷酸部分的第一部分,其中所述至少 1 个杂交体包含 3' 末端,后者能被延伸,以形成包含 5' 末端的第 1 寡核苷酸部分的第二部分的互补物;

(iii) 生成扩增子,其包括:(a) 形成第 1 寡核苷酸部分的第二部分与第 3 寡核苷酸之间的杂交体,和 (b) 将所述至少 1 个杂交体的 3' 末端连接到第 3 寡核苷酸的 5' 末端;

(iv) 扩增扩增子,以生成扩增产物;和

(v) 检测扩增产物;

其中对扩增产物的检测允许检测分析物。

5. 权利要求 1 或 4 的方法,其中所述分析物是抗原特异性抗体,并且所述特异性结合分析物的第 1 和第 2 实体包括所述抗体与之结合的抗原。

6. 权利要求 1 或 4 的方法,其中所述分析物是抗原,并且所述特异性结合分析物的第 1 和第 2 实体包括所述抗原与之结合的抗体。

7. 权利要求 1 或 4 的方法,其中所述的扩增是通过选自以下的方法完成的:聚合酶链式反应,链置换扩增,耐热的链置换扩增,自动维持序列扩增,基于核酸序列的扩增,Q $\beta$  复制酶系统,连接酶链式反应和转录介导的扩增。

8. 试剂盒,其包含:

(a) 第 1 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 1 实体和第 1 单链寡核苷酸,其中,所述特异性结合分析物的第 1 实体是抗原,抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段,并且所述第 1 单链寡核苷酸从 5' 到 3' 包含第一部分和第二部分,其中所述特异性结合分析物的第 1 实体能与分析物形成复合物,且缀合到第 1 寡核苷酸上;

(b) 第 2 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 2 实体和第 2 单链寡核苷酸,其中,所述特异性结合分析物的第 2 实体是抗原,抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段,并且所述第 2 单链寡核苷酸从 5' 到 3' 包含第一部分和第二部分,其中所述特异性结合分析物的第 2 实体能与分析物形成复合物,且缀合到第 2 寡核苷酸上,其中所述第 1 寡核苷酸的第二部分能与所述第 2 寡核苷酸的第二部分杂交。

9. 试剂盒,其包含:

(a) 第 1 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 1 实体和第 1 单链寡核苷酸,其中,所述特异性结合分析物的第 1 实体是抗原,抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段,并且所述第 1 单链寡核苷酸从 5' 到 3' 包含第一部分和第二部分,其中所述特异性结合分析物的第 1 实体能与分析物形成复合物,且缀合到第 1 寡核苷酸上;

(b) 第 2 邻近成员,其包含特异性结合分析物的第 2 实体和第 2 单链寡核苷酸,其中,所述特异性结合分析物的第 2 实体是抗原,抗原特异性抗体或所述抗体的功能片段,并且所述第 2 单链寡核苷酸从 5' 到 3' 包含第一部分和第二部分,其中所述特异性结合分析物的第 2 实体能与分析物形成复合物,且缀合到第 2 寡核苷酸上,其中所述第 1 寡核苷酸的第二部分能与所述第 2 寡核苷酸的第二部分杂交;和

(c) 第 3 单链寡核苷酸,其从 5' 到 3' 包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分能与所述第 1 寡核苷酸的第一部分杂交。

10. 权利要求 9 的试剂盒,其还包括用于将第 3 寡核苷酸的 5' 端连接到第 2 寡核苷酸的 3' 端的连接酶。

11. 权利要求 1 或 4 的方法,其中所述抗原是 IL-8。

## 免疫 - 扩增

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分析物特异性结合组分和核酸扩增的新应用, 以提供超灵敏的高通量测定, 来检测和定量溶液中的分析物。

### 背景技术

[0002] 在目标分析物的检测和定量领域的一个基本目标是, 开发高特异性且灵敏的测定系统, 其能检测复杂环境中的极少量的分析物, 所述的复杂环境例如血液、血清、血浆、尿或其它体液。因为与体液中的其它组分相比, 诊断上有重要意义的分子可能极少量地构成或存在, 因此可接受的测定形式必须能够将可能代表样品中的总生物材料的一小部分百分比的分析物区分开。常规方法使用分析物特异性抗体, 来提供需要的辨别, 但是抗体受到它们与其它非靶向分析物的交叉反应性的限制。如果分析物以极少量存在于环境中, 而该环境又富含以低亲和力结合抗体的分析物, 即使对于具有高特异性的抗体, 小程度的交叉反应性也会造成不可克服的问题。

[0003] 免疫 - 扩增已经用作提高免疫测定的灵敏度的手段。在该方法中, 使抗原接触与可以扩增的 DNA 标记分子缀合的抗体。不是通过常规方法检测抗体的存在, 例如用可检测地标记的抗 - 抗体标记抗体 - 抗原复合物, 而是通过聚合酶链式反应 (" PCR " ), 通过对 DNA 标记的扩增间接检测抗原 - 抗体 - 标记缀合物。然后通过常规方法检测扩增的 DNA, 例如使用当嵌入双链 DNA 中时会发荧光的染料。该方法称作 " 免疫 - PCR ", 已经用于提高免疫测定的理论灵敏度, 与使用抗 - 抗体进行检测的常规测定相比, 提高了超过 10, 000 倍; 但是, 在实践中, 免疫 - PCR 的灵敏度受到抗体 - 核酸缀合物与其它分析物或与用于容纳反应的支持物的表面的非特异性结合的限制。而且, 先前反应剩下的残余扩增标记 (" 扩增子 " ) 会污染样品。这对于将该技术应用于临床上可接受的高通量实验是成问题的。

[0004] 已经进行了一些努力来消除这些问题。例如, 研究人员已经采用固定化的抗体来将抗体 - 核酸 - 抗原复合物捕获到固体载体上, 这有利于在 DNA 扩增之前去除未复合的抗原和未结合的抗体 - 核酸缀合物。在另一种情况下, 通过结合抗原, 可以使 2 个对抗原的不同决定簇特异性的抗体邻近。每个抗体用单链寡核苷酸部分修饰, 所述的寡核苷酸部分可以与相邻的抗体 - 寡核苷酸缀合物中的寡核苷酸杂交, 形成双链区。当 2 个抗体结合到同一抗原上时, 它们的邻近会促进寡核苷酸部分的杂交。然后靶向 DNA 的双链区进行扩增, 生成可检测的信号, 它指示着抗原的存在。该技术有利地提高了检测的灵敏度, 因为每种抗体单独的非特异性结合不足以形成扩增子; 但是, 该方法的灵敏度可受到尤其是抗体部分彼此之间非特异性相互作用的限制, 这会导致虚假的、抗原 - 非依赖性的扩增子形成。

[0005] 因此, 本领域继续需要提供更灵敏的分析物检测和定量方法。在临床环境中使用的方法优选地是对需要的分析物非常有选择性的, 且能容易地适用于高通量的筛选方法。

### 发明内容

[0006] 通过提供高灵敏度、低背景的测定, 其能提供适用于高通量测定的流线型工作流,

本发明满足了这些需求。通过 2 个“分析物特异性结合实体”例如抗体（“邻近对”）与同一分析物的不同表位或紧邻的分析物的表位之间的相互作用，形成分析物特异性扩增子，本发明的测定能检测和定量分析物。邻近对的每个成员（“邻近成员”）都包含分析物特异性结合实体，其缀合到单链核酸、优选 DNA（“寡核苷酸部分”或“探针”）上。当邻近成员通过与目标或分析物（“目标”和“分析物”在全文中可互换地使用）的相互作用密切接触时，寡核苷酸部分会直接地或间接地形成扩增子。邻近成员与分析物的相互作用，使寡核苷酸部分紧密邻近，与未结合分析物的邻近成员的寡核苷酸部分的浓度相比，提高了它们的有效局部浓度。与未结合的邻近成员的寡核苷酸部分相比，该浓度效应极大地促进了 2 个寡核苷酸部分之间的相互作用，形成扩增子。然后使用本领域众所周知的 DNA 扩增技术，通过扩增扩增子，检测邻近对 - 分析物复合物。因此，扩增子的形成对目标的存在是非常灵敏的，因为没有与其它寡核苷酸部分相互作用的寡核苷酸部分不能被扩增，且邻近对 - 分析物复合物中的寡核苷酸部分的局部浓度的增加极大地促进了扩增子的形成。

[0007] 通过阻止溶液中未与分析物复合的邻近成员之间的虚假的和不要的扩增子形成，有利地提高了本发明的测定的灵敏度。通过提供一种或多种杂交封闭剂寡核苷酸（或“杂交封闭剂”），其能与邻近成员的一个或两个寡核苷酸部分杂交，本发明部分地实现了该目标。杂交封闭剂能有利地抑制溶液中未与分析物复合的邻近成员之间的扩增子形成。使用杂交封闭剂的方法包括：使分析物与反应混合物中的第 1 和第 2 邻近成员接触，其中至少 1 个邻近成员的寡核苷酸部分与杂交封闭剂杂交。加温混合物或降低离子强度，至足以造成杂交封闭剂解离，然后冷却混合物或提高混合物的离子强度，使分析物 - 结合的邻近成员之间形成扩增子。在一个实施方案中，大部分分析物 - 结合的邻近成员在加热步骤中仍然结合在分析物上。在另一个实施方案中，加入的杂交封闭剂相对于邻近成员的寡核苷酸部分而言摩尔过量。在另一个实施方案中，杂交封闭剂会与夹板寡核苷酸杂交，使夹板寡核苷酸不能与邻近成员的寡核苷酸部分杂交。在另一个实施方案中，通过与也称作“去封闭剂寡核苷酸”（或“去封闭剂”）的互补序列杂交，从邻近成员的寡核苷酸部分去除杂交封闭剂。也就是说，当加入过量时，去封闭剂会隔离双链体中的杂交封闭剂，使杂交封闭剂不能与寡核苷酸部分或夹板寡核苷酸杂交。因此，去封闭剂会减少杂交封闭剂寡核苷酸与其互补序列之间的杂交体的存在。

[0008] 杂交封闭剂可以在其一个末端含有发夹环，发夹结构在那里用作 DNA 聚合酶的双链“引物”。为了本发明的目的，将“引物”定义为可以与模板核酸的一条链杂交的一短段核苷酸、典型地为 DNA。引物和其互补序列之间的双链杂交体提供了 DNA 聚合酶或逆转录酶延伸引物或 RNA 聚合酶合成 RNA 分子的起始位点。杂交封闭剂可以与位于发夹结构下游区域的寡核苷酸部分杂交，使 DNA 聚合酶进行的延伸能通过链置换从寡核苷酸部分去除杂交封闭剂。该实施方案有利地允许杂交封闭剂从寡核苷酸部分或夹板寡核苷酸中去除，而无需加温反应混合物，由此避免或减少邻近成员与分析物的解离。在另一个实施方案中，在形成邻近对 - 分析物复合物和邻近对的寡核苷酸部分已经彼此杂交之后，加入杂交封闭剂。杂交封闭剂与仍然在溶液中的至少 1 个邻近成员的寡核苷酸部分杂交，由此阻止未与分析物结合的邻近对的分析物 - 非依赖性的扩增子形成。同样在该实施方案中，不需要加热反应混合物来减少背景信号。在别处也可以使用发夹结构。例如，邻近成员的 1 个或 2 个寡核苷酸部分可以包含会阻断扩增子形成的发夹结构。寡核苷酸部分通过发夹环中的或

邻近发夹的未配对碱基的杂交（或者，轻微加热），破坏发夹结构，由此允许扩增子形成和扩增。

[0009] 通过提供固相捕捉寡核苷酸，其能在提供特异性的释放寡核苷酸之前阻止扩增子形成，或者捕获邻近对 / 分析物复合物，以去除未结合的组分，可以有利地进一步减少背景信号。

[0010] 通过使用可以用于检测能被抗体结合的任意分析物的通用试剂，提供了其它优点。例如，可以将寡核苷酸部分偶联到抗-Fc 抗体或蛋白 A 或 G 上，后者能与抗体-分析物复合物的免疫球蛋白恒定区反应。在一些实施方案中，1 个或 2 个抗体被置换为任意合适的特异性分析物靶向实体，例如适体、对受体分析物特异性的配体或对配体分析物特异性的受体。这 1 个或 2 个抗体部分的置换会减少虚假的扩增子形成，后者否则会由抗体部分之间的非特异性相互作用产生。其它合适的特异性分析物靶向实体有抗体的功能片段，例如 Fc, Fv, Fab' 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。认为减小不参与抗原结合的抗体结构的大小，会减少抗体彼此之间的非特异性相互作用，而不减少与抗原或分析物的特异性相互作用。

[0011] 本发明提供的优点允许高通量的和非常灵敏的测定，其可以用于检测和定量临床相关样品例如血液和其它体液中的分析物。可以由本发明的方法检测和定量的分析物可以以空前微小的量存在于复杂混合物（例如体液）中。在一个实施方案中，本发明用于检测约 80fg/ml 的分析物，例如细胞因子。这意味着检测至少约 10fM 的摩尔浓度这样的小分子量分析物的能力。

[0012] 因此，本发明提供了检测和 / 或定量目标分析物的多种方法，以及可以用于实施本发明的方法的组合物。例如，任何合适的扩增方法都可以用于本发明的方法中。这样的方法包括但不限于：PCR（记载在美国专利号 4,683,195 ;4,683,202 ;4,800,159 ;和 4,965,188），链置换扩增（" SDA " ;见 Walker 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 89 :392(1992) ;Walker 等, Nucl. Acids Res. 20 :1691(1992) ;和美国专利号 5,270,184，其内容在这里整体引作参考），耐热的链置换扩增（" tSDA " ;见美国专利号 5,648,211 和 5,744,311，其内容在这里整体引作参考），自动维持序列扩增（" 3SR " ;见 Guatelli 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 87 :1874-78(1990)），基于核酸序列的扩增（" NASBA " ;见美国专利号 5,130,238），Q $\beta$  复制酶系统（见 Lizardi 等, BioTechnology 6 :1197(1988)）；连接酶链式反应（" LCR " ;见美国专利号 5,427,930）；转录介导的扩增（" TMA " ;Hirose 等, Clin. Chem. 44 :2446-2452(1998)）；和基于转录的扩增（见 Kwoh 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 86 :1173-77(1989)）。优选的扩增方法是 SDA。

[0013] 扩增子本身可以通过许多方法形成，包括邻近对的毗邻寡核苷酸部分的杂交。例如，毗邻的寡核苷酸部分可以以它们长度的全部或区段杂交。如果毗邻的寡核苷酸在各自末端的部分杂交，那么可以使用 DNA 聚合酶延伸所得到的双链体。当扩增反应包含 SDA 反应时，可以将限制性核酸内切酶识别位点整合到邻近成员的 1 个或 2 个寡核苷酸部分或它们的延伸产物上。

[0014] 通过使邻近对的寡核苷酸部分与能杂交寡核苷酸部分的各自末端的寡核苷酸" 夹板" 接触，也可以形成扩增子。寡核苷酸夹板还可以包含限制性核酸内切酶识别位点和与第 1 寡核苷酸探针互补的第 1 序列。第 1 邻近成员的寡核苷酸部分还可以包含与第 2 寡核苷酸探针互补的第 2 序列。夹板可以用于包括添加第 1 和第 2 探针和用 DNA 聚合酶延伸

与寡核苷酸部分互补的序列的方法中。置换第 2 邻近成员的寡核苷酸部分,使扩增子通过与第 1 邻近成员的寡核苷酸部分的缀合附着于第 1 邻近成员上。为了本发明的目的,将不被扩增的被置换的寡核苷酸部分称作“系绳(tether)寡核苷酸”。为了本发明的目的,通过诸如链置换或由具有 3' -5' 核酸外切酶活性的聚合酶催化的对被置换链的水解等方法,可以完成“置换”。该方法还包括通过任何众所周知的扩增方法例如 SDA 来扩增扩增子。

[0015] 在另一个实施方案中,有利地从邻近对和分析物的复合物中释放出扩增子,这能通过消除来自吸收到测定支持物表面的抗体-寡核苷酸缀合物的信号来减少背景。在该实施方案中,2 个寡核苷酸夹板用于形成扩增子,且邻近成员的 2 个寡核苷酸部分都是系绳寡核苷酸。第 1 桥连探针与第 1 邻近成员的寡核苷酸部分的 5' 端杂交,第 2 桥连探针与第 2 邻近成员的寡核苷酸部分的 5' 端杂交。第 1 和第 2 桥连探针彼此在它们各自的 3' 端杂交。经聚合酶延伸,置换了第 1 和第 2 邻近成员的寡核苷酸部分,并从邻近对-分析物复合物的残余组分中释放出扩增子。然后通过任何众所周知的扩增方法扩增扩增子。

[0016] 在一个替代实施方案中,将邻近对-分析物复合物固定在固体载体上。使用如上所述的方法,使扩增子从复合物释放到溶液中,而邻近对-分析物的残余组分保持结合在固体载体上。在该实施方案中,在扩增前,含有扩增子的溶液可以完全去除复合物的残余组分,这能进一步减少背景。

[0017] 以如上所述的方式使用 2 个夹板寡核苷酸,提供了目标介导的探针循环方法。该方法包括:使邻近对与第 1 和第 2 夹板寡核苷酸接触,用 DNA 聚合酶延伸寡核苷酸部分的互补物,由此从邻近对置换扩增子,扩增扩增子,和使邻近对与另外的第 1 和第 2 夹板寡核苷酸接触。夹板寡核苷酸可以任选地与第 1 邻近成员的寡核苷酸部分的 3' 端和第 2 邻近成员的寡核苷酸部分的 5' 端杂交。夹板寡核苷酸可以任选地与第 1 邻近成员的寡核苷酸部分的 3' 端和第 2 邻近成员的寡核苷酸部分的 3' 端杂交。2 个夹板寡核苷酸可以任选地与第 3 夹板寡核苷酸的互补序列杂交,所述的第 3 夹板寡核苷酸能在第 1 和第 2 夹板寡核苷酸之间形成桥。

[0018] 在另一个实施方案中,寡核苷酸夹板可以在不与寡核苷酸部分杂交、且位于与第 1 寡核苷酸探针互补的第 1 序列上游(即位于 5' 方向)的探针区域中包含编码 RNA 聚合酶启动子的序列。第 1 邻近成员的寡核苷酸部分另外可以包含与第 2 寡核苷酸探针互补的第 2 序列。夹板可以用于包括添加第 1 和第 2 探针和用 DNA 聚合酶延伸与寡核苷酸部分互补的序列的方法中。延伸链置换第 2 邻近成员的寡核苷酸部分,使扩增子附着于第 1 邻近成员上,其中扩增子包含现在完整的双链 RNA 聚合酶结合位点。该方法还包括通过使 RNA 聚合酶结合位点接触 RNA 聚合酶,转录单链 RNA。可以通过本领域众所周知的方法,包括与标记的探针杂交,检测 RNA。除了链置换外,还可以使用具有 5' -3' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶例如 Taq DNA 聚合酶,去除第 2 邻近成员的寡核苷酸部分。

[0019] 或者,使单链 RNA 转录物接触与 RNA 在某 3' 区杂交的引物,使逆转录酶转录 RNA,生成 DNA-RNA 杂交体。用核糖核酸酶 H 消化该 DNA-RNA 杂交体,生成互补的 DNA 链。使该 DNA 链接触包含 RNA 聚合酶结合位点的互补物的引物,再生完整的双链 RNA 聚合酶结合位点。使 DNA 链接触 RNA 聚合酶,后者能催化单链 RNA 转录物的合成。可以重复下述步骤:使转录物接触引物,使引物-转录物杂交体接触逆转录酶,消化 DNA-RNA 杂交体,和使得到的单链 DNA 接触重构 RNA 聚合酶结合位点的引物,导致扩增子的指数式扩增。

[0020] 本发明的扩增方法可以完全以“均相格式”在溶液中进行,或者其可以包括将反应组分以“多相格式”固定化到固体载体上。对于使用多相格式的扩增方法,将邻近成员、分析物或邻近成员或对与分析物之间的复合物固定化到固体载体上,例如颗粒或反应罐的表面。为此目的,邻近成员或分析物包含与缀合到支持物上的寡核苷酸(“捕捉寡核苷酸”)互补的寡核苷酸部分。邻近成员或分析物的寡核苷酸部分和捕捉寡核苷酸之间形成的杂交体可以包含限制性核酸内切酶识别位点。通过包括使识别位点接触适当的限制性核酸内切酶的方法,被捕获的邻近成员或分析物从固体载体释放出来。或者,释放结合的邻近成员或分析物的方法包括,通过诸如升高温度、降低离子强度、改变反应混合物的 pH 或加入能促进杂交体变性的整合剂等手段,使捕捉寡核苷酸和邻近成员或分析物的寡核苷酸部分之间的杂交体变性。在另一个实施方案中,捕捉寡核苷酸包含易切断的连接,后者对于例如物理的、酶的、化学的或光化学的手段裂解切割特别敏感。在另一个实施方案中,捕捉寡核苷酸或邻近成员或分析物的寡核苷酸部分包含引物的互补序列。该引物能与捕捉寡核苷酸和邻近成员或分析物的寡核苷酸部分之间形成的杂交体杂交。然后通过聚合酶链式延伸和链置换,从杂交体置换出邻近成员或分析物的寡核苷酸部分。在一个相关的实施方案中,捕捉寡核苷酸能形成发夹结构,后者形成聚合酶延伸的模板,造成通过链置换释放出被捕获的邻近成员或分析物。

[0021] 捕捉寡核苷酸和邻近成员或分析物的寡核苷酸部分之间的杂交体可以任选地包含 RNA 序列。通过使杂交体接触核糖核酸酶,例如核糖核酸酶 H,从表面释放出邻近成员或分析物。在一个实施方案中,与捕捉寡核苷酸杂交的邻近成员的寡核苷酸部分是参与形成扩增子的寡核苷酸部分。只要保持与捕捉寡核苷酸杂交,该寡核苷酸部分就不能形成扩增子,但是例如通过链置换从杂交体释放寡核苷酸部分,允许扩增子形成。

[0022] 使用多相格式的扩增可以包括:使分析物接触反应混合物中的第 1 邻近成员,在足以形成包含扩增子的邻近对-分析物复合物的条件下加入固定化到固体载体上的、或能固定化到固体载体上的第 2 邻近成员,洗涤结合的邻近对-分析物复合物,去除未固定化到固体载体上的邻近成员,扩增扩增子,和检测扩增产物。可以在第 1 邻近成员之前、之后或同时加入第 2 邻近成员。任选地,第 2 邻近成员可以通过易切断的连接固定化到固体载体上,该连接在洗涤之后、扩增之前切断。可以使用如上所述的将邻近成员固定化到固体载体上和从固体载体裂解邻近成员的方法。而且,在多相格式中,可以使用如上所述的用于形成扩增子的任何方法,例如包括加入夹板寡核苷酸的方法。

[0023] 本发明有利地提供了可以用于如上所述的任何扩增方法中的通用组分。在一个优选的实施方案中,使分析物接触能结合第 1 表位的第 1 抗体和能结合第 2 表位的第 2 抗体,其中第 1 和第 2 表位和抗体可以相同或不同。任选地,第 1 和第 2 抗体每个都可以各自标记有不同的半抗原部分(例如,生物素,荧光素,毛地黄毒苷配基,三硝基苯酚,二硝基苯酚等)。使抗体接触通用组分,后者包含一个或多个特异性结合第 1 和 / 或第 2 抗体的邻近成员以形成包含扩增子的邻近对。通用组分可以是,例如,缀合到寡核苷酸部分上的蛋白 A 或蛋白 G。或者,通用组分可以是缀合到寡核苷酸上的抗-免疫球蛋白恒定区抗体。如果第 1 和第 2 抗体标记了半抗原部分,那么通用组分可以是对特定的半抗原标记特异性的抗体(或其它试剂,例如链霉抗生物素蛋白)。使用通用组分可以有利地消除用寡核苷酸部分修饰每个分析物特异性分析物结合实体的必要性。



[0024] 邻近成员可以是缀合到 2 个不同寡核苷酸部分上的抗原。在该实施方案中的分析物是抗原特异性抗体,其可以是 IgG 或任何其它类型的抗体。当结合的抗原 - 寡核苷酸缀合物包含不同寡核苷酸部分时,抗体对抗原 - 寡核苷酸缀合物的结合会形成包含扩增子的邻近对。因此,该方法可以用于高灵敏度地检测特定抗体的存在。

[0025] 本发明还提供了试剂盒,其可以包含个别的或组合的用于实施本发明的方法的组分和试剂,例如缓冲剂、化学试剂、酶、寡核苷酸、邻近成员和这些组分或试剂的使用说明书。例如,试剂盒可以包含寡核苷酸扩增引物,其适用于实施本文所述的扩增和检测方法。试剂盒还可以包含用于检测扩增的核酸的试剂和溶液,例如放射标记、酶底物、抗体等。合适的溶液和试剂是众所周知的,且记载在例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(第 3 版,2001) 中。试剂盒的组分一起包装在共同容器中,其中典型地包含执行本文公开的方法的实施方案的说明书。

#### 附图说明

- [0026] 图 1A 显示了抗原和缀合寡核苷酸的抗体的混合。
- [0027] 图 1B 显示了邻近探针的杂交。
- [0028] 图 1C 显示了聚合酶延伸和限制酶切口产生。
- [0029] 图 1D 显示了延伸、置换和线性扩增。
- [0030] 图 1E 显示了杂交、聚合酶延伸,切口产生和指数式扩增。
- [0031] 图 1F 显示了抗原和缀合寡核苷酸的抗体的混合。
- [0032] 图 1G 显示了邻近探针的杂交。
- [0033] 图 1H 显示了用聚合酶延伸探针。
- [0034] 图 1I 显示了探针 - 延伸双链体的变性和 SDA 引物的结合。
- [0035] 图 1J 显示了从相对序列方向的杂交探针形成扩增子。
- [0036] 图 2A 显示了夹板寡核苷酸的杂交。
- [0037] 图 2B 显示了邻近探针的连接。
- [0038] 图 2C 显示了 DNA 聚合酶延伸和置换。
- [0039] 图 2D 显示了 2 个杂交的邻近探针用于连接第 3 探针。
- [0040] 图 2E 显示了 2 个相对序列方向的杂交的邻近探针用于连接第 3 探针。
- [0041] 图 3A 显示了单 - 系绳探针。
- [0042] 图 3B 显示了单 - 系绳探针的延伸和置换。
- [0043] 图 3C 和 D 显示了切口产生、延伸、置换和捕获。
- [0044] 图 3E 显示了具有 3' /3' 构型的夹板寡核苷酸。
- [0045] 图 3F 显示了夹板寡核苷酸的延伸 / 置换。
- [0046] 图 3G 显示了目标介导的探针循环。
- [0047] 图 3H 显示了具有 5' /3' 构型的夹板寡核苷酸。
- [0048] 图 3I 显示了具有 5' /5' 构型的夹板寡核苷酸。
- [0049] 图 3J 显示了具有 3' /3' 构型的夹板寡核苷酸。
- [0050] 图 3K 显示了具有 3' /3' 构型的夹板寡核苷酸。
- [0051] 图 3L 显示了从捕获的复合物置换夹板寡核苷酸。

- [0052] 图 4A 显示了简单的竞争性杂交封闭剂。
- [0053] 图 4B 显示了凹入的竞争性杂交封闭剂。
- [0054] 图 4C 显示了废用性杂交封闭剂。
- [0055] 图 4D 显示了可置换的杂交封闭剂。
- [0056] 图 4E 显示了自置换的杂交封闭剂。
- [0057] 图 4EE 显示了使用 3' 探针尾来稳定探针 - 封闭剂双链体。
- [0058] 图 4F 显示了二元免疫 -SDA 反应中的竞争性杂交封闭剂。
- [0059] 图 4G 显示了在二元免疫 -SDA 反应中的废用性杂交封闭剂。
- [0060] 图 4H 显示了二元免疫 -SDA 反应中的逐步封闭。
- [0061] 图 4I 显示了在二元免疫 -SDA 反应中, 在结合后加入杂交封闭剂。
- [0062] 图 5A 显示了夹板寡核苷酸杂交。
- [0063] 图 5B 显示了延伸和置换。
- [0064] 图 5C 显示了 RNA 聚合酶活性、杂交和延伸。
- [0065] 图 5D 显示了核糖核酸酶 H 活性、杂交和延伸。
- [0066] 图 6A-C 显示了限制性核酸内切酶 - 介导的附着的缀合物的释放。
- [0067] 图 6D 和 E 显示了聚合酶 - 和限制性核酸内切酶 - 介导的释放。
- [0068] 图 6F 显示了物理释放。
- [0069] 图 6G 和 6GG 显示了易切断的连接和化学切割。
- [0070] 图 6H 显示了寡核苷酸置换。
- [0071] 图 6I 和 J 显示了寡核苷酸延伸。
- [0072] 图 6K 和 L 显示了核糖核酸酶 H 释放。
- [0073] 图 6M 显示了自引发的捕捉 / 置换寡核苷酸。
- [0074] 图 6N 显示了置换的探针部分参与形成扩增子。
- [0075] 图 7A 显示了通过第 1 邻近成员的寡核苷酸部分与捕捉寡核苷酸的杂交, 固定化第 1 邻近成员。
- [0076] 图 7B 显示了目标分析物与固定化的第 1 邻近成员的结合。
- [0077] 图 7C 显示了通过第 2 邻近成员与目标分析物和第 1 邻近成员之间的固定化的复合物的结合, 形成固定化的两位点“夹心”。
- [0078] 图 7D 显示了可形成目标 - 非依赖性的扩增子的机理。
- [0079] 图 7E-H 显示了使用杂交封闭剂寡核苷酸来抑制会导致目标 - 非依赖性的扩增子形成的探针 - 探针相互作用。
- [0080] 图 7I 显示了使用低离子强度, 释放目标分析物和 2 个邻近成员之间的固定化的复合物。
- [0081] 图 7J 显示了捕捉寡核苷酸的应用和以多相的测定格式的释放。
- [0082] 图 8A-C 显示了多相的免疫 - 扩增。
- [0083] 图 8D 显示了使用易切断的连接的多相的免疫 - 扩增。
- [0084] 图 9 显示了使用夹板寡核苷酸的多相的免疫 - 扩增。
- [0085] 图 10 显示了通用的免疫 - 扩增系统。
- [0086] 图 11A 显示了发夹释放探针。

[0087] 图 11B 显示了发夹杂交封闭剂探针。

[0088] 图 11C 显示了发夹杂交封闭剂探针的置换。

[0089] 图 12 显示了抗原特异性免疫球蛋白的检测。

[0090] 图 13 显示了用于二元免疫-SDA 的代表性的探针、引物和系绳寡核苷酸的图。

[0091] 图 14A-E 显示了使用 3' 加帽的寡核苷酸部分形成扩增子,后者附着于第 1 邻近成员和第 2 邻近成员,但是不同时附着于 2 个邻近成员。

[0092] 图 15A 显示了用于免疫-SDA 检测 IL-8 的双色、实时荧光曲线。

[0093] 图 15B 显示了定量 IL-8 的校准线。

[0094] 优选实施方案的详细描述

[0095] 本发明可以以高灵敏度检测极少量的分析物。本发明提供了分析物特异性结合因子(例如抗体)的缀合物,所述的结合因子缀合到能形成扩增子的寡核苷酸部分。本领域已知抗体和其它蛋白与寡核苷酸之间的缀合,且教导在例如美国专利号 5,849,878 和 5,665,539 中,它们在这里整体引作参考。如果分析物特异性结合因子是核酸,例如适体,则可以使用本领域已知的化学合成方法,在 1 条连续链中合成分析物特异性结合因子和寡核苷酸或探针部分。术语“缀合物”仍然适用于这样的适体-探针实体。通过各自缀合到抗体上的毗邻寡核苷酸建立扩增子的条件也是已知的,且教导在例如美国专利号 6,511,809 中。用于扩增扩增子和检测它们的存在的方法和条件也是本领域已知的,如教导在美国专利号 6,511,809 和美国专利申请公开号 2002/006779,二者在这里整体引作参考。例如,用于检测扩增产物的标记探针的应用也教导在美国专利号 5,928,869 ; 5,919,630 ;5935,791 ;6,316,200 ;和 6,379,888 中,它们都在这里整体引作参考。美国专利号 5,840,487 教导了用于等温核酸扩增反应的内部对照的应用,其也在这里整体引作参考。

[0096] 根据本发明,图 1 详述了通过 SDA 扩增的优选方法。Ab1 和 Ab2 是能识别邻近表位 1 和 2 的抗体,且分别缀合到寡核苷酸探针 P1 和 P2(图 1A)。抗体是用于本发明的分析物特异性结合组分的代表性的、但不是限制性的实例。例如,本领域已知的有用的分析物特异性结合组分包括抗体的功能片段,例如 Fc, Fv, Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段。分析物特异性结合组分的其它实例包括适体、对受体分析物特异性的配体或对配体分析物特异性的受体。而且,技术人员能够明白,可以组合使用各种不同类型的分析物特异性结合组分。“寡核苷酸探针”和“寡核苷酸部分”同义地用于本发明的目的。术语“寡核苷酸”不应当理解为为用于本发明目的的核酸部分设定了大小上限;因此,如本文所使用的,“寡核苷酸”与“多核苷酸”同义。为了本发明的目的,寡核苷酸可以全部或部分地由 DNA、RNA 或其类似物或衍生物构成。在该实施方案中,P1 和 P2 包含互补的 3' 末端序列和上游 SDA 切口位点。切口位点在 SDA 中的应用和 SDA 的一般条件记载在美国专利号 5,919,630 ;5,846,726 ;和 6,054,729 中,它们在这里整体引作参考。当它们连接的 2 个抗体通过结合到其各自的表位而靠近时,P1 和 P2 的 3' 端彼此杂交(图 1B)。有助于核酸杂交的条件,包括在核酸的杂交部分的碱基对或错配的数目和发生杂交的缓冲液的温度和离子强度,是本领域众所周知的,且一般地记载在,例如,Sambrook 等,MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(第 3 版,2001)。与在抗原表面处的相比,Ab1 和 Ab2 的本体溶液浓度相对较低,使 P1 和 P2 的抗原-非依赖性的杂交最小化。然后使用 DNA 聚合酶填充 P1 : P2 杂交体的凹陷的 3' 端

(图 1C)。这用于生成能被 SDA 切口产生酶识别的双链限制位点。切口产生酶只催化双链 DNA 模板的一条链的切割。产生切口和以切口位点进行聚合酶延伸将下游 DNA 链置换进溶液中,并再生切口位点(图 1D)。可以重复循环切口产生和延伸/置换步骤,生成多个拷贝被置换的链。互补的 SDA 引物会捕获被置换的链(图 1E)。从被捕获的链和杂交的 SDA 引物的 3' 端延伸,生成双链 DNA 分子,后者可以通过一系列的中间体进行指数式扩增。在一个替代实施方案中,仅仅寡核苷酸探针 P1 和 P2 中的一个包含 SDA 切口位点。

[0097] 在另一个实施方案中(图 1F-I),探针 P1 和 P2 缺少 SDA 切口位点,但是取而代之包含序列 c 和 d',它们也分别存在于 SDA 引物 SP2 和 SP1 上(见图 1I)。P1 和 P2 的 3' 端的延伸,会建立在 P1 的延伸产物上含有互补序列 d 且在 P2 的延伸产物上含有互补序列 c' 的双链体(见图 1H)。然后通过例如加热,分离双链体化的延伸产物的链,由此使 SDA 引物 SP1 和 SP2 与延伸的探针的新合成的序列 d 和 c' 的互补物杂交。延伸的探针可以任选地包含位于 SDA 引物的结合位点的 3' 的序列,如延伸的 P1 的序列 e 和延伸的 P2 的序列 b' 所示。这些序列与缓冲器引物 SB1 和 SB2 杂交(见图 1I)。在 SDA 过程中,SDA 引物 SP1 和 SP2 由聚合酶延伸(未显示)。如果存在,缓冲器引物的延伸用于从探针链置换 SDA 引物延伸产物,然后通过 SDA 扩增被置换的链,如美国专利号 5,270,184;5,919,630;5,846,726;和 6,054,729 所述。在延伸的探针不含有在 SP1 和 SP2 结合位点 3' 的序列的情况下(未显示),通过聚合酶延伸与 SDA 引物杂交的探针的 3' 端,建立可切口的限制位点,后者允许随后的如上所述的切口产生和 SDA 链置换。

[0098] 在前面的实施方案中,寡核苷酸部分(P1 和 P2)通过位于或接近它们的 5' 末端的连接,缀合到它们各自的分析物结合实体(Ab1 和 Ab2)。在图 1J 所示的一个替代实施方案中,通过位于或邻近 P1 的 3' 末端的连接形成缀合物 Ab1-P1,通过位于或邻近 P2 的 5' 末端的连接形成缀合物 Ab2-P2。P1 包含序列(a b c d e f)(5' 至 3'),且 P2 包含序列(j' i' h' g' f' e')(5' 至 3')。Ab2-P2 还包含可延伸的 3' 端(即,3' 末端羟基)。如所示的,能与 P2 的序列(f' e')杂交的 P1 的序列(e f)位于 P1 缀合到 Ab1 的位点的 5',而(f' e')是位于 P2 缀合到 Ab2 的位点的 3'。因此,称探针 P1 和 P2 以相对序列方向连接到它们各自的分析物结合实体(Ab1 或 Ab2)。当 P1 和 P2 相互靠近时,例如,通过它们各自的邻近成员结合到相同的目标分析物分子上,P1 的序列(e f)会与 P2 的(f' e')杂交,如图 1J 的左侧所示。然后,可以用聚合酶延伸 P2 的 3' 端,建立含有新序列的延伸产物(即,扩增子)P2-ext,如所示的。然后通过本领域已知的方法,利用全部或部分新序列(d' c' b' a')来区分 P2-ext 和未转化的 P2,检测 P2-ext。例如,通过如上所述的核酸扩增方法,可以扩增 P2-ext。通过加热溶液,可以从 P1 中分离出 P2-ext,引物可以与位于 P2-ext 的 3' 端的新序列杂交,且可以被延伸,建立 P2-ext 的互补物。随后的扩增循环可以包含,从 P2-ext 分离互补物,和使由位于邻近 P2 的 5' 端的序列构成的不同引物与互补物杂交。在一个优选的实施方案中,序列 b 将含有 SDA-相容的限制酶的识别序列的单链组分。然后,P2-ext 的形成会建立双链识别序列,后者由限制酶切口。从切口的延伸会建立与 P2-ext 互补的新链,再生可切口的识别序列。可以扩增该产物,并通过如上所述的 SDA 方法检测。任选地,P2 的序列 i' 也可以包含 SDA 的识别序列的单链组分,如果确实如此,P2-ext 和它的全长互补链之间形成的双链体会含有 2 个可切口的限制酶识别序列。在另一个实施方案中,序列 b 可以是 RNA 聚合酶启动子位点的单链组分。然

后, P2-ext 的形成会建立双链 RNA 聚合酶启动子, 后者可以用于指导 RNA 聚合酶的活性, 合成与 P2-ext 的序列 (j' i' h' g' f' e' d' c' ) 互补的 RNA 分子。可以直接检测这些 RNA 分子, 或者可以通过例如 3SR、NASBA、TMA 或基于转录的扩增等方法进一步扩增它们。任选地, P2 的序列 i' 可以包含 RNA 聚合酶启动子的单链组分。在该情况下, 与 P2-ext 的 3' 端杂交的引物的延伸, 会建立可以用于指导 RNA 聚合酶的活性的双链启动子位点, 以合成包含序列 (h' g' f' e' d' c' b' a' ) 的 RNA 分子, 可以直接检测后者, 或者使用前述方法扩增它们。无论检测或扩增 P2-ext 的方法如何, 图 1J 所示的实施方案都包含探针部分 P1 和 P2, 后者以相对序列方向与它们各自的分析物结合元件 Ab1 和 Ab2 相连, 且 2 个探针在目标介导的过程中彼此杂交, 建立含有可延伸的 3' 端的双链体, 随后可以延伸该 3' 端来建立扩增子。在没有目标 - 分析物的情况下, P1 和 P2 不会邻近, 且不会形成 P2-ext, 除非通过下面所述的虚假的 (即, 目标 - 非依赖性的) 相互作用, 后者可以被杂交封闭寡核苷酸抑制, 也在下面描述。因此, P2-ext 的生成是存在目标分析物的结果, 且与存在的目标分析物的量成比例。因此, 确定生成的 P2-ext 的量可以用于确定在样品中存在的目标分析物的量。

[0099] 图 2A-C 详述了夹板寡核苷酸的代表性的应用。Ab1 和 Ab2 是能识别邻近表位 1 和 2 的抗体, 且分别缀合到寡核苷酸探针 P1 和 P2 上 (图 2A)。P1 是通过位于或邻近它的 5' 末端的连接缀合到 Ab1, 且其包含 3' 末端羟基和上游 SDA 切口位点。探针 P2 是在它的 3' 端缀合到 Ab1, 且其包含 SDA 引物结合位点和 5' 末端磷酸基团。夹板寡核苷酸 S 的序列与探针 P1 的 3' 端和探针 P2 的 5' 端互补, 这样, 当因抗体结合它们各自的表位而邻近时, 寡核苷酸 P1 和 P2 会与夹板 S 形成双链杂交体。当与夹板寡核苷酸 S 杂交时, P1 的 3' -OH 和 P2 的 5' -PO<sub>4</sub> 是邻近的, 且使用 DNA 连接酶来催化连接 P1 和 P2 序列的磷酸二酯键的形成 (图 2B)。SDA 引物 SP1 与夹板寡核苷酸 S 上游的探针 P2 杂交。能置换链的 DNA 聚合酶从引物 SP1 和夹板寡核苷酸 S 的 3' 端延伸。引物 SP1 的延伸会置换夹板寡核苷酸 S 的延伸产物 (图 2C), 并建立在任一末端含有 SDA 限制酶切口位点的双链 DNA 分子。该分子类似于图 1C 中所示的。切口产生、聚合酶从切口延伸和置换下游链, 会导致指数式扩增 (图 1D-E)。在一个实施方案中, 探针 P1 不包含 SDA 切口位点。在另一个实施方案中, 夹板寡核苷酸 S 包含 3' 帽, 以阻止夹板 S 的 3' 延伸。

[0100] 图 2D 和 2E 说明了使用一对邻近成员进行目标 - 介导的、连接酶 - 催化的扩增子形成的替代实施方案。探针 P1 和 P2 连接或缀合到它们各自的抗体 (或其它分析物结合实体) Ab1 和 Ab2。可以通过位于或邻近 2 个探针的 5' 末端的连接进行缀合, 如图 2D 所示, 或者 2 个探针中的一个 (P1) 可以通过位于或邻近探针的 3' 端的连接进行缀合。P1 包含序列 (a b c d e f) (5' 至 3' ), 且 P2 包含序列 (j' i' h' g' f' e' ) (5' 至 3' )。缀合物 Ab2-P2 还包含 3' 末端羟基。在图 2D 或 2E 所示的构型中, P1 的序列 (e f) 和 P2 的 (f' e' ) 能彼此杂交。第 3 探针 P3 包含序列 (d' c' b' x' y' ), 且还包含 5' 末端磷酸基团。P3 能与探针 P1 的序列 (b cd) (邻近 P1 的序列 (e f)) 杂交。在有目标分析物存在的情况下, P1 和 P2 靠近, 通过序列 (e f) 和 (f' e' ) 的杂交形成双链体。在 P1 和 P2 杂交之前或之后, 探针 P3 可以与 P1 杂交, 如所示的。在任一情况下, P3 的 5' 核苷酸位置邻近 P2 的 3' 核苷酸, 以该构型, P2 和 P3 可以通过 DNA 连接酶 (或其它连接机制) 共价地连接到一起, 形成扩增子 P2 : P3, 如所示的。然后可以通过各种方法, 包括扩增, 例如上

面关于在图 1J 中所示的实施方案所述的那些,检测 P2 : P3。但是,在该情况下,序列 x' 和 / 或 y' 将用作引物杂交的位点。在没有目标分析物的情况下,P1 和 P2 不会靠近,不会形成 P2 : P3,除非通过下面所述的 P1 和 P2 之间虚假的(即,目标-非依赖性的)相互作用,后者可以被杂交封闭寡核苷酸抑制,也在下面描述。因此,P2 : P3 的生成是存在目标分析物的结果,且与存在的目标分析物的量成比例。因此,确定生成的 P2 : P3 的量可以用于确定在样品中存在的目标分析物的量。在扩增通过连接邻近成员的寡核苷酸部分形成的扩增子的过程中,不需要杂交封闭剂,因为可以通过连接接合的探针典型地不会彼此形成杂交体,因此在涉及寡核苷酸的 3' 延伸的扩增中,不具有经历虚假的探针转化的潜在可能。

[0101] 图 3 显示了本发明的代表性的实施方案,其包含设计用于在邻近成员的 2 个寡核苷酸部分之间的缺口裂隙上架桥的夹板寡核苷酸。在一个实施方案(图 3A)中,邻近抗体中的一个 Ab1 通过位于或邻近系绳-寡核苷酸的 3' 端的连接进行缀合。下文中,“系绳寡核苷酸”表示从扩增子中置换的寡核苷酸部分,但是保持缀合到分析物特异性结合部分上。系绳寡核苷酸 T0 与夹板寡核苷酸 P1 的区段(优选地位于或邻近 5' 端)互补。夹板寡核苷酸 P1 还可以包含引物序列,以促进对转化的探针的扩增,和检测区,以促进对转化的探针的检测。P1 还可以包含限制识别序列,以促进 SDA 扩增。另外,夹板寡核苷酸的 3' 序列与探针 P2 的 3' 端互补,后者通过它的 5' 末端缀合到抗体 Ab2。如图 3A 所示,P1 的 5' 端与附着到 Ab1 上的系绳寡核苷酸 T0 互补。任选地,系绳寡核苷酸可以与不在 P1 的 5' 端的序列互补。当抗体 Ab1 和 Ab2 结合到它们各自的表位上时,夹板寡核苷酸 P1 能与 T0 和 P2 杂交(图 3A)。从探针 P2 和夹板寡核苷酸的 3' 端的延伸,会置换系绳寡核苷酸 T0,并建立连接到抗体 Ab2 上的双链 DNA 分子(图 3B)。该双链产物的切口产生、利用聚合酶的延伸和置换下游链,会生成单链寡核苷酸,后者可以与互补的 SDA 引物形成杂交体(图 3C)。这通过连续的中间体切口产生、延伸、置换和引发事件,导致指数式扩增(图 3D)。

[0102] 图 3E 描绘了在抗体之间的缺口间隙上架桥的第 2 实施方案。在该构型中,每个抗体(Ab1 和 Ab2)与不同的系绳寡核苷酸缀合,对于 Ab1 为 a'、对于 Ab2 为 j。典型地,抗体 Ab1 的系绳寡核苷酸与第 2 抗体 Ab2 的系绳寡核苷酸不同。在该情况下,a' 和 j 在序列方面不等同。夹板寡核苷酸 P1 和 P2 各自含有与寡核苷酸序列 a' 和 j 互补的序列(任选地邻近 5' 端)。例如,P1 含有序列 a,P2 含有序列 j'。探针 P1 的序列 a 与 Ab1 的序列 a' 杂交,Ab2 的序列 j 与 P2 的序列 j' 杂交。在该实施方案中,P1 和 P2 各自含有与另一探针互补的短 3' 序列;因此,P1 的序列(e f)与 P2 的(f' e')互补。只有当与结合到邻近表位上的抗体的系绳寡核苷酸(a' 和 j)杂交、造成探针 P1 和 P2 在空间上邻近时,P1 和 P2 的这些互补的 3' 序列才高效率地发生可观的杂交。P1 和 P2 的 3' 端的杂交,会建立具有凹陷的 3' 端的短双链体,然后可以用聚合酶延伸它。在一个实施方案中,3' 端的延伸用于从系绳寡核苷酸(和抗体)置换夹板寡核苷酸 P1 和 P2,而且同时生成由 2 个探针的延伸产物(P1-ext 和 P2-ext)构成的双链体(图 3F)。然后可以通过多种本领域已知的扩增方法,包括 PCR、SDA、连接酶链式反应、3SR、基于 Q $\beta$  复制酶的扩增、固相扩增和 NASBA,检测 P1 和 P2 延伸产物。可以使用包含在探针上的序列,例如,P1 的序列(b, c, d, e, f),和 P2 的(e', f', g', h', i', j'),或探针延伸产物,来促进扩增和检测探针。可以用于促进扩增的特殊序列包括引物结合位点、限制性核酸内切酶位点、能与杂交封闭剂寡核苷酸杂交的序列、RNA 启动子位点等。通过本领域众所周知的多相的或均相的方法,可以检测扩增产

物。或者,可以直接检测图 3F 的双链体 II,而不通过本领域众所周知的方法进行扩增。如果该方法采用具有 5' -3' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶,例如, Taq DNA 聚合酶,系绳寡核苷酸(a' 或 j)可以在延伸过程中降解,且可以检测降解产物作为存在目标抗原的指示。

[0103] 尽管图 3E 和 3F 描绘了缀合到系绳寡核苷酸的 3' 端的抗体,图 3H 描绘了替代构型,其中邻近对的 2 个抗体缀合到系绳寡核苷酸的 5' 端。同样地,图 3I 描绘了一个实施方案,其中一个系绳寡核苷酸通过 5' 连接缀合到抗体上,且另一寡核苷酸通过 3' 连接进行缀合。在这后 2 个构型的每一个中,探针序列 P1 和 P2 的 3' 延伸导致从系绳寡核苷酸置换探针,并建立与图 3F 中所示相同的双链双链体。

[0104] 如果在置换过程中没有降解系绳寡核苷酸,第 2 组探针分子 P1 和 P2 可与目标-结合的邻近成员的空出的系绳寡核苷酸杂交(图 3G)。如前所述,P1 和 P2 的 3' 端退火,且延伸再次导致探针的置换,并建立由 P1-ext 和 P2-ext 构成的双链体。空出的系绳寡核苷酸再次退火至一对新的未延伸的探针(P1 和 P2)(如果存在),3' 杂交、延伸、置换和随后结合未延伸的探针的循环继续,只要 Ab1 和 Ab2 保持结合到邻近表位上和存在 P1 和 P2 的供给。作为该循环过程的结果,从每个存在的目标形成了多个拷贝的可检测的探针延伸双链体。

[0105] 在图 3A-3L 所示的所有实施例中,根据使用的实验方案,探针与系绳寡核苷酸的初始杂交可以发生在抗体结合到目标分子上之前或之后。在一个实施方案中,抗体 Ab1 和 Ab2 中至少之一是或可以共价地或非共价地连接到顺磁颗粒(图 9)或其它固体表面(图 3L)上,例如,微孔的内壁。在至少一种抗体连接到珠子、固体表面或其它固体基质,且 2 个探针 P1 和 P2(图 3L)通过与系绳寡核苷酸杂交间接附着到抗体上的构型中,探针的延伸会建立从抗体-目标复合物中置换出来的双链体,而复合物自身保持附着于珠子、固体表面或其它固体基质上。如果需要,然后可以取出含有置换出的双链体的溶液,并在分开的孔或室中分析或扩增,留下复合物和非特异性地结合到基质表面上的任何物质。

[0106] 在本发明的另一个实施方案中,连接夹板寡核苷酸可以与例如在图 3J 中所示的 2 个夹板寡核苷酸 P1 和 P2 的一部分互补。当与连接夹板寡核苷酸杂交时,探针 P1 和 P2 可以如图 2 所示进行连接,使 P1 的 3' 端共价地连接到 P2 的 5' 端(图 3J),然后可以如图 2 所示进行扩增。

[0107] 在一个替代实施方案中,夹板寡核苷酸与系绳寡核苷酸(j') 和一个探针分子 P2 杂交,如图 3K 所例示。然后,夹板-结合的 P2 的 3' 端可以与空间上邻近的 P1 的互补的 3' 端杂交。探针的 3' 延伸会从夹板和系绳寡核苷酸中置换出探针,并形成全长的、可扩增的双链体,其类似于在图 3 所示的前面的实施例中生成的双链体。

[0108] 图 4 显示了杂交封闭剂寡核苷酸,其设计用于减少连接到未与邻近表位结合的抗体上的探针分子之间的杂交的普及优势。这样的目标-非依赖性的杂交是背景信号的来源,因为它会导致不能与真实的目标结合事件产物区分开的探针延伸产物,且背景信号会降低检测方法的总体灵敏度。本发明包含使用杂交封闭剂寡核苷酸(或"杂交封闭剂")来减少导致背景信号的虚假的、目标-非依赖性的探针相互作用。图 4A 描绘了在基于邻近的扩增方法中使用杂交封闭剂的基本原理。相互互补性的短序列(e f 和 f' e')(5' 至 3') 构成 P1 和 P2 的 3' 端。这些序列可以彼此杂交,如所示形成带 5' 突出端的双链体。构成双链体化相对于单链状态的探针分子的数目取决于总探针浓度和双链体的内在稳

定性,后者又与双链体的长度和组成有关。通过加入杂交封闭剂寡核苷酸,优选地比探针摩尔过量,其经与P1的杂交而竞争性地阻断2个探针之间的相互作用,可以减少或逆转P1和P2之间的相互作用。封闭剂无需跨越与P2相互作用的整个亚序列与P1互补。跨越该位点的部分互补性也会减少P1与P2的杂交。

[0109] 在一个实施方案中,杂交封闭剂寡核苷酸包含第1亚序列(e'或f'e'),其与P2的与P1互补的那部分(亚序列ef)的部分或全部等同。在第2个实施方案(图4B)中,杂交封闭剂寡核苷酸包含上面定义的第1亚序列,和第2亚序列(图4B中的d'),其与P1的一个区段互补,但是与P2的亚序列不相同。杂交封闭剂的第2亚序列会使封闭剂-P1相互作用相对于P1-P2相互作用稳定,由此提高阻断效率。在P2分子已经与P1杂交的情况下,第2亚序列还可以用作P1-封闭剂双链体的成核位点。随着成核,形成全P1-封闭剂双链体,然后从P1置换P2。该实施方案的P1亚序列d可以直接紧邻探针亚序列e,如图4B所示,或者它可以位于距亚序列e一些核苷酸的位置(未显示)。在后一种情况下,杂交封闭剂亚序列d'可以通过间隔间接地连接到杂交封闭剂亚序列e',所述的间隔包含另外的核苷酸和/或非核苷酸的连接物,例如四甘醇(TEG)部分。

[0110] 在第3个实施方案(图4C)中,杂交封闭剂寡核苷酸可以包含第1亚序列(如上定义)、任选地第2亚序列(如上定义)和第3亚序列(图4C中的t's'),后者位于第1亚序列的5',且其可以用作P1的3'延伸的模板。第3亚序列可以任选地含有本领域众所周知的合适的非核苷酸部分m'(即,"5'帽"),以阻止向P1的3'延伸产物添加非模板的核苷酸,阻碍聚合酶与P1延伸形成的平端双链体的结合(见图4C)。优选地,P1在封闭剂-模板上的3'延伸,会生成在它的与P2序列不互补的3'端含有新序列(st)的P1-延伸产物。因此,3'序列(st)的添加可以P1不能作为在P2模板上进行DNA合成的功能引物。序列(st)的添加还可以通过增加2个分子之间的互补碱基对的数目,稳定封闭剂-P1相互作用。任选地,在该实施方案中生成的新的3'序列(st)与P1的区段完全或部分地互补,从而,如果延伸的P1和杂交封闭剂解离,延伸的P1会折叠成茎-环(发夹)结构,减少与P2的任何相互作用。在该情况下,可以任选地延伸P1发夹的3'端,延长发夹的茎,且该延伸可以任选地在P1分子内建立可切口的或可切割的限制性核酸内切酶位点。

[0111] 在第4个实施方案中,可以在过程的特定阶段,理想地可逆地阻断P1和P2之间的相互作用。图4D描绘了允许可逆阻断的杂交封闭剂设计。在该实施方案中,杂交封闭剂包含与要封闭的探针(图4D中的P1)互补的亚序列(e'd')和一个或多个与该探针不互补的尾序列(t'和/或k')。杂交封闭剂与P1的杂交排除了P1-P2相互作用。在期望的时间,可以加入去封闭寡核苷酸来从P1置换杂交封闭剂寡核苷酸,释放后者,使其与P2相互作用。去封闭寡核苷酸包含一个或多个尾序列(t和/或k),其与杂交封闭剂的尾序列互补。尾序列用作封闭剂-去封闭剂杂交的成核位点。互补的尾序列的杂交一旦成核,会在杂交封闭剂和去封闭剂之间形成附加碱基对,直到从P1中置换出封闭剂。为了确保从探针置换出封闭剂,封闭剂-去封闭剂复合物的总热力学稳定性必须高于探针-封闭剂复合物。去封闭寡核苷酸无需与杂交封闭剂寡核苷酸完美互补,只要封闭剂-去封闭剂双链体的热力学稳定性高于探针-封闭剂双链体的稳定性即可。例如,去封闭剂可以理想地含有一个或多个与杂交封闭剂寡核苷酸形成错配的核苷酸,只要生成的封闭剂-去封闭剂双链体比探针-封闭剂双链体更稳定即可。更具体地,去封闭剂的序列e可以理想地含有一个或多



个与封闭剂的序列 e' 形成一个或多个错配的核苷酸。去封闭剂的这些错配核苷酸的基本功能是,使去封闭剂的序列 e 和 P2 的序列 e' 之间的潜在相互作用不稳定。在该实施方案的变体中,杂交封闭剂可以通过如图 4E 所示的聚合酶 - 催化的序列 k 的延伸置换。在该情况下,直接在封闭序列上合成去封闭序列,无需加入单独分开的去封闭剂寡核苷酸。在另一个实施方案中,探针可以包含位于或邻近它的 3' 端的 3' 茎 - 环结构,其用于阻断探针分子之间的相互作用(见图 11)。

[0112] 为了阻止聚合酶对封闭剂的 3' 延伸,上述的所有杂交封闭剂寡核苷酸,除了图 4E 所述的含有发夹结构的杂交封闭剂外,都可以在 3' 末端核苷酸上包含一个帽。含有 3' 帽的杂交封闭剂寡核苷酸称作“加帽的寡核苷酸”。这样的 3' 帽是本领域众所周知的,包括反向的核苷酸、2' -3' 二脱氧核糖核苷酸和 3' 脱氧核糖核苷酸。杂交封闭剂寡核苷酸可以含有 3' 尾序列,当杂交封闭剂与探针形成双链体时,其不与探针核苷酸形成互补的碱基对。当杂交封闭剂与探针形成双链体时,未碱基配对的 3' 尾也用于阻止封闭剂的 3' 延伸,因此也用作“3' 帽”。

[0113] 图 4EE 解释了使用探针 1(P1) 上的 3' 尾来促进 P1 封闭剂双链体的稳定。P1 的 3' 尾由序列 x y 构成,且位于序列 (e f) 的 3' ,后者能与探针 2(P2) 的序列 (f' e' ) 杂交。P1 的 3' 尾不与 P2 杂交。杂交封闭剂包含序列 (y' x' f) 和任选的 e' 。因此,杂交封闭剂能与 P1 杂交,形成包含 P1 的 3' 尾以及 P1 的序列 e f 的全部或部分的双链体。封闭剂 :P1 双链体的形成,会减少如上所述的 P1 : P2 杂交体的流行。P1 的 (x y) 和杂交封闭剂的 (y' x' ) 之间的碱基配对,可以使封闭剂 :P1 双链体稳定化。杂交封闭剂任选地包含位于序列 (y' x' ) 的 5' 的序列 z' 。序列 z' 在上述的方法中可以用作启动去封闭剂寡核苷酸的杂交的位点。

[0114] 图 4F 解释了杂交封闭剂寡核苷酸在二元免疫 - 扩增反应中的应用。P1 和 P2 分别直接缀合到抗体 Ab1 和 Ab2 上。无论探针是通过与系绳寡核苷酸的杂交间接结合到抗体上,或者分析物特异性结合组分是适体或除抗体以外的其它分析物特异性结合分子,都适用相同的原理。如所述的,杂交封闭剂寡核苷酸会与 P1 的 3' 端杂交,排除它与 P2 的相互作用。杂交封闭剂的杂交不会影响抗体与目标分析物的结合,且杂交封闭剂最初与 P1 链杂交,无论 Ab1 是否与分析物复合或游离在溶液中(状态 I)。典型地,游离 Ab1 和 Ab2(和缀合的探针)在本体溶液中的浓度是在 1fM 至 10nM 之间。因为杂交封闭剂浓度典型地比探针浓度高 10<sup>-</sup> 至 100,000<sup>-</sup> 倍,对于缀合到非目标 - 结合的抗体上的探针,封闭剂 -P1 相互作用比 P1-P2 相互作用占优势;但是,当目标分子的表位 1 和 2 分别与 Ab1 和 Ab2 结合时,在三元的目标 - 抗体复合物上的 P1 相对于 P2 的有效局部浓度变得比本体溶液中的探针和杂交封闭剂的浓度要高得多(典型地 1-100uM)。结果,对于连接到目标 - 结合的抗体上的探针,P1 : P2 双链体胜过 P1 : 封闭剂双链体(状态 II)。因此,聚合酶 - 催化的 P1 : P2 杂交体的 3' 端的延伸,会导致目标 -Ab1-Ab2 复合物上的可扩增的双链体(状态 III),而未连接到目标复合物上的探针保持被封闭、未延伸和不能被扩增。尽管图 4F 描绘了使用仅仅与探针中的一个杂交的单杂交封闭剂,可以与第 1 封闭剂联合使用能与另一探针杂交的第 2 杂交封闭剂。

[0115] 图 4G 描绘了类似的反应方案,其采用能通过起延伸模板作用而“废用(disabling)”P1 分子的杂交封闭剂(见上面的图 4C)。鉴于上述的理由,对于本体溶液

中的探针,封闭剂:P1双链体比P1:P2双链体占优势,而P1:P2双链体在三元的目标-抗体复合物上占优势。聚合酶-催化的封闭剂:P1双链体的延伸导致“失去能力的(disabled)”P1延伸产物(见图4C),而P1:P2双链体的延伸会导致可扩增的双链体,如图4F所示。

[0116] 图4H描绘了逐步封闭的过程,其中可置换的杂交封闭剂A与P2杂交,形成封闭剂A:P2双链体。任选地,杂交封闭剂A在该方案中可以具有足以使封闭剂A:P2双链体比P1:P2双链体更稳定(本体溶液中和三元的目标-Ab1-Ab2复合物上均如此)的长度或浓度。向该溶液中加入与P1的区段互补的第2杂交封闭剂B和与可置换的杂交封闭剂A互补的去封闭剂D,导致从P2置换A,在本体溶液中形成P1:封闭剂B双链体,在三元的目标-抗体复合物上形成P1:P2双链体。任选地,杂交封闭剂B可以包含“废用”序列,如上所述使P1失去能力(见图4C和4F)。如前所述,聚合酶-催化的探针-探针杂交体的延伸会生成可扩增的双链体,而任选的P1:封闭剂B双链体的延伸会生成“失去能力的”P1延伸产物。

[0117] 图4I描绘了一个反应方案,其中允许在本体溶液中和三元的目标-抗体复合物上形成P1:P2双链体。然后,杂交封闭剂的加入会与三元的目标复合物上的双链体相比优先地破坏本体溶液中的P1:P2双链体,因为在本体溶液中相对于三元复合物存在不同的有效探针浓度(见图4F)。

[0118] 在一个实施方案中,杂交封闭剂寡核苷酸可以共价地或非共价地连接到顺磁颗粒或其它固体表面上,且进一步可以用于将邻近成员可逆地结合到表面上(见图6)。在本发明的另一个实施方案中,抗体Ab1和Ab2中的至少一个是或可以共价地或非共价地连接到顺磁颗粒(见图9)或其它固体表面上。

[0119] 图5所述的本发明的实施方案包含夹板寡核苷酸,其设计用于在2个邻近成员之间的缺口间隙上成桥。在一个实施方案中,夹板寡核苷酸S包含RNA聚合酶启动子序列、下游引物结合序列和检测区(图5A)。夹板S的5'序列与P1的5'端互补,后者在它的3'末端缀合到抗体Ab1上。另外,夹板S的3'序列与P2的3'端互补,后者在它的5'末端缀合到抗体Ab2上。当抗体Ab1和Ab2结合到它们各自的表位上时,夹板寡核苷酸S能与P1和P2杂交(图5A)。从探针P2和夹板S的3'端的延伸,会置换探针P1和建立连接到抗体Ab2上的双链分子,后者具有功能性的RNA聚合酶启动子(图5B)。使用该双链启动子序列,RNA聚合酶会生成单链的RNA。在一个实施方案(未显示)中,通过本领域已知的任意的合适的方法,直接检测单链寡核苷酸。在第2个实施方案中,单链RNA分子与互补的引物杂交,后者又被延伸,生成DNA:RNA杂交体(图5C)。用核糖核酸酶消化这些杂交体的RNA链,会生成单链DNA分子,含有RNA聚合酶启动子的引物可以与其杂交(图5D)。从杂交的引物和它们的目标链的3'端的延伸,会生成双链RNA聚合酶启动子序列,导致指数式扩增。

[0120] 图6所示的本发明的另一个方面包括,通过寡核苷酸与直接附着到支持物(其可以是固体表面、聚合物、水凝胶或其它表面)上的捕捉寡核苷酸的杂交,使抗体、抗原或抗原-抗体复合物附着到固体表面上的不同方法。本领域熟知合适的用于本发明的支持物,例如颗粒或微量滴定孔表面。本领域还熟知使寡核苷酸稳定地缀合到各种支持物上的方法。捕捉寡核苷酸可以通过杂交与寡核苷酸部分相互作用,或者它可以与缀合到邻近成员

的分析物-结合部分上的另一种寡核苷酸相互作用。本发明还包括,通过各种化学的、物理的或酶的方法,从表面选择性地释放捕获的分子的方法。

[0121] 如图 6A 所示,可以使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含限制酶识别序列和任选的侧翼序列,且可以与互补的寡核苷酸 P2 杂交,后者通过它的 5' 末端附着到固体表面上。通过能切割由 P1 和 P2 的杂交形成的双链识别序列的限制酶的特异性活性,可以从固相释放复合物 C。在图 6 的所有小图中的 P1 可以是邻近成员的可扩增的寡核苷酸部分(见图 6N),或者它可以是缀合到分析物特异性结合部分上的另一种寡核苷酸。

[0122] 如图 6B 所示,抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 可以与 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含限制酶识别序列和任选的侧翼序列,且可以与互补的寡核苷酸 P2 杂交,后者通过它的 5' 末端附着到固体表面上。P2 包含寡核苷酸 P1 的互补物和 3' 非互补尾。通过能切割经寡核苷酸 P1 和 P2 的杂交形成的双链识别序列的限制酶的特异性活性,可以从固相释放复合物 C。通过置换寡核苷酸 D 的杂交,使切割的 P1 寡核苷酸变成单链。

[0123] 如图 6C 所示,抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 可以与 P1 通过它的 3' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含限制酶识别序列和任选的侧翼序列,且可以与互补的寡核苷酸 P2 杂交,后者通过它的 3' 末端附着到固体表面上。通过能切割经 P1 和 P2 的杂交形成的双链识别序列的限制酶的特异性活性,可以从固相释放复合物 C。

[0124] 如图 6D 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含与通过它的 5' 末端附着到固体表面上的寡核苷酸 P2 的 3' 端互补的序列。P2 包含限制酶识别序列和任选的侧翼序列。从 P1 的 3' 端的 DNA 聚合酶延伸,导致 P2 的互补物的合成和可以被选择性地切割以释放复合物 C 的双链限制酶识别序列的形成。在另一个实施方案中,寡核苷酸 P2 的 3' 端可以加帽,以阻止延伸。

[0125] 如图 6E 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含限制酶识别序列以及任选的侧翼 DNA 和与通过它的 5' 末端附着到固体表面上的寡核苷酸 P2 的 3' 端互补的序列。从 P2 的 3' 端的 DNA 聚合酶延伸,导致寡核苷酸 P1 的互补物的合成和可以被选择性地切割以释放复合物 C 的双链限制酶识别序列的形成。在另一个实施方案中,寡核苷酸 P1 的 3' 端可以加帽,以阻止延伸。

[0126] 如图 6F 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含与通过它的 5' 末端附着到固体表面上的另一种寡核苷酸 P2 互补的序列。通过物理环境的改变,例如减小离子强度、添加螯合剂、改变 pH 或升高温度或组合这些因素,可以从固相释放出复合物 C。在适当的条件下,复合物 C 的物理释放是可逆的。

[0127] 如图 6G 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含与通过它的 5' 末端附着到固体表面上的另一种寡核苷酸 P2 互补的序列。P2 的序列包含 P1 的至少部分互补物和易切断的连接,后者可以通过物理的、化学的或光化学的方法裂解切割,将复合物 C 释放到溶液中。易切断的连接的实例包括但不限于:二硫键(由例如 DTT 裂解切割)和顺式-羟基(由高碘酸盐裂解切割)。在图 6GG 中,携带抗体、抗原、抗体-抗原复合物的探针 P1 通过易切断的连接(例如二硫化物、顺式-乙二醇等)附着到固体表面上。可以使用对连接的物理的、酶的、化学的或光化学的裂

解切割,来从表面释放出携带 P1 的复合物。

[0128] 如图 6H 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含任选的 5' 序列和 3' 序列 a'。寡核苷酸 P2 通过它的 5' 末端附着到固体载体上,且包含序列 a 和上游序列 b。a 和 a' 的杂交使复合物 C 附着到支持物上。通过添加包含序列 a' 和 b' 的置换寡核苷酸 D,可以选择性地释放复合物 C。D 与 P2 的序列 a 和 b 的杂交,在热力学上优于单独的序列 a 和 a' 的杂交,导致 P1 的置换和复合物 C 释放进溶液中。在第 2 个实施方案中,置换探针可以与 P1 的全部或部分互补。在第 3 个实施方案中,抗体或抗体-抗原复合物可以通过夹板寡核苷酸(未显示)间接地连接到表面-结合的寡核苷酸 P2 上,所述的夹板寡核苷酸包含与表面-结合的寡核苷酸和 P1 两者互补的序列。在这后一种情况下,通过寡核苷酸 D 与 P1、P2 或夹板寡核苷酸的杂交,发生置换。

[0129] 如图 6I 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含任选的 3' 序列 a'。寡核苷酸 P2 通过它的 5' 末端附着到固体载体上,且 P2 包含序列 a 和下游序列 b。寡核苷酸 P2 的序列 a 和寡核苷酸 P1 的序列 a' 的杂交,使复合物 C 附着到表面上。通过包含序列 b' 的置换寡核苷酸 D 与 P2 的序列 b 的杂交和使用能置换链的 DNA 聚合酶从它的 3' 端延伸寡核苷酸 D,可以选择性地释放复合物 C。在另一个实施方案中,在延伸反应中使用的聚合酶可以具有 5' -3' 核酸外切酶活性,这能降解 P1 的序列 a' 和释放杂交的 P2 寡核苷酸。在一个替代实施方案中,P2 可以包含 3' 发夹结构(图 6M),所以聚合酶延伸发夹的 3' 端,会导致 P1 的置换。在该实施方案中,不需要置换寡核苷酸 D。任选地,夹板寡核苷酸可以用于图 6I 和 6M 描绘的实施方案中。

[0130] 如图 6J 所示,使抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 3' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含 3' 序列 b 和 5' 序列 a。寡核苷酸 P2 通过它的 3' 末端附着到固体载体上,且包含序列 a' 和任选的下游序列。寡核苷酸 P1 的 a 和寡核苷酸 P2 的 a' 的杂交,使复合物 C 附着到表面上。通过置换寡核苷酸 D 与 P1 的序列 b 的杂交和使用能置换链的 DNA 聚合酶从 3' 端延伸,可以选择性地释放复合物 C。在另一个实施方案中,在延伸反应中使用的聚合酶可以具有 5' -3' 核酸外切酶活性,这能降解 P2 的序列 a' 和释放杂交的 P1 寡核苷酸。

[0131] 在图 6K 中,抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸包含任选的 5' 序列 b 和 3' 序列 a。寡核苷酸 P2 由 RNA 组成,通过它的 5' 末端附着到固体载体上,且包含序列 a'。寡核苷酸 P1 的序列 a 和寡核苷酸 P2 的序列 a' 的杂交,使复合物 C 附着到表面上。通过添加能选择性地降解 DNA:RNA 杂交体的 RNA 链的核糖核酸酶,例如核糖核酸酶 H,实现复合物 C 的释放。在一个替代实施方案中,P1 向 Ab1 的缀合和 P2 向固体载体的附着,是通过各自的寡核苷酸的 3' 末端完成的。

[0132] 在图 6L 中,抗体、抗原或抗体-抗原复合物 C 与寡核苷酸 P1 通过它的 5' 末端缀合。缀合的寡核苷酸由 RNA 组成,且包含任选的 5' 序列 b 和 3' 序列 a。寡核苷酸 P2 通过它的 5' 末端附着到固体载体上,且包含序列 a'。寡核苷酸 P1 的序列 a 和寡核苷酸 P2 的序列 a' 的杂交,使复合物 C 附着到表面上。通过添加能选择性地降解 DNA:RNA 杂交体的 RNA 链的核糖核酸酶,例如核糖核酸酶 H,可以释放复合物 C。在一个替代实施方案中,P1 向 Ab1 的缀合和 P2 向固体载体的附着,是通过各自的寡核苷酸的 3' 末端完成的。

[0133] 在图 6N 所述的实施方案中,通过限制性核酸内切酶的切割,释放固定化的邻近成员。Ab1 缀合到包含序列 (a b c) 的寡核苷酸 P1 上。抗体 Ab2 缀合到包含序列 (a' b' c' d' e' ) 的寡核苷酸 P 2 上,其中区域 d 对应着限制性核酸内切酶识别位点。抗体 Ab2 结合到它的特异性表位,通过寡核苷酸 P2 与附着到表面上的互补的捕捉寡核苷酸 C 的杂交,将抗体-抗原复合物捕获到固体载体上。任选地洗涤支持物,以去除未结合的抗原和样品中的其它组分。然后加入抗体 Ab1,由此其结合到表位 1 上。寡核苷酸 P2 和捕捉探针 C 之间的互补程度大于 P2 和寡核苷酸 P1 之间的;因此,P1 和捕捉探针 C 之间的杂交在热力学上优于寡核苷酸 P1 和 P2 的杂交。经限制性核酸内切酶识别位点 d 的切割,释放出抗原-抗体复合物。附着到抗体 Ab2 上的寡核苷酸 P2 的残余片段包含序列 (a' b' c' ),且与抗体 Ab1 上的探针 P1 互补。(a' b' c' ) 与它的互补物的杂交在热力学上是有利的,且导致抗体 Ab1 和 Ab2 通过含有可延伸的 3' 端的寡核苷酸杂交体的连接。该复合物可以用于合适的扩增反应,例如图 1 所述的。

[0134] 图 7A 显示了通过寡核苷酸部分和捕捉寡核苷酸的相互作用,固定化邻近成员,其中当寡核苷酸部分从捕捉寡核苷酸释放出来时,寡核苷酸部分能形成扩增子。显示了包含区域 b、c 和 y 的捕捉寡核苷酸通过它的 5' 端缀合到固体载体上,尽管它也可以通过它的 3' 端附着。区域 b 和 c 通过杂交分别与寡核苷酸部分 P1 的区域 b' 和 c' 相互作用。区域 y 代表能促进通过上述任意方法的释放的位点,包括图 6A-6N 所述的方法。Ab2 可以在其结合到分析物 Ag 之前或之后固定化到固体载体上。图 7B 显示了一个实施方案,其中在 Ab2 结合分析物 Ag 之前固定化 Ab2。在一个实施方案中,在扩增之前,洗涤结合的邻近成员-分析物复合物,通过去除未结合的分子减少背景信号。Ab2、Ab1 和目标分析物之间的完全复合物如图 7C 所示。

[0135] 图 7D 例示了据信通过 2 个邻近成员之间的非特异性相互作用产生的目标-非依赖性的扩增的来源。如所示的,该非特异性相互作用发生在 Ab1 和 Ab2 之间,尽管非特异性相互作用的其它来源也是可能的。Ab1 和 Ab2 之间的相互作用会促进 P1 和 P2 通过用于形成扩增子的互补区(在该情况下,分别是区域 (d e) 和 (d' e' )) 的相互作用。同样地,P1 : P2 相互作用的形成可以促进 Ab1 和 Ab2 之间的继续结合;因此,P1 : P2 相互作用的去稳定,可降低总的目标-非依赖性的信号。通过提供例如能与 P1 的区域 (d e) 相互作用的杂交封闭剂寡核苷酸,阻止该区域与它在 P2 中的互补物 (d' e' ) 的相互作用,可以实现该目的。

[0136] 图 7E-7H 解释了杂交封闭剂寡核苷酸在通过扩增检测分析物的方法中的应用。在向反应混合物中加入 Ab1 之前或与加入 Ab1 同时,使 Ab2 结合到分析物的表位 2 上,且 Ab2 通过与捕捉寡核苷酸的相互作用固定化到表面上。在该实施方案中的捕捉寡核苷酸与 P2 的区域 (b' c' ) 杂交。任选地,在 Ab2 和分析物之间形成复合物之前或之后,洗涤结合的复合物,以去除未结合的分子。在有杂交封闭剂寡核苷酸存在的情况下,加入 Ab1,所述的杂交封闭剂寡核苷酸包含区域 (d' e' ),其与 P1 的区域 (d e) 杂交,抑制 Ab1 和 Ab2 的相互作用,如上所述。在 Ab1 已经与分析物的表位 1 形成复合物后,可以从反应罐洗出未结合的 Ab1。如图 7E-7H 所示,杂交封闭剂寡核苷酸不会影响目标特异性复合物的形成。P2 从捕捉寡核苷酸的释放,允许 P2 的区域 (d' e' ) 与 P1 的区域 (d e) 相互作用,形成双链起始位点用于扩增。通过上述的任意方法,可以使 P2 从捕捉寡核苷酸释放出来。例如,如图 7I 所

示,通过改变缓冲液的离子强度,释放 P2(见图 6F,它显示了从捕捉寡核苷酸的物理释放)。如图 7I 所示,一旦释放出 P2,它可以自由地与 P1 相互作用,形成可以扩增的双链序列。或者,可以使用置换寡核苷酸从捕捉寡核苷酸解离 P2,沿图 7J 中所示的线路(也见图 6H)。

[0137] 图 7I 解释了如何可利用离子强度的改变来选择性地释放 P2 和促进随后的 P1 和 P2 的相互作用。在图 7I 中,在缓冲液中,它可能具有对于形成三元复合物最佳的离子强度,形成 Ab1-P1、Ab2-P2 和目标分析物之间的复合物。可以在高离子强度缓冲液中洗去未结合的或非特异性结合的 Ab1-P1,该缓冲液会弱化非特异性相互作用,但是会维持 P2 的序列(b' c')和捕捉寡核苷酸之间形成的双链体以及 Ab1、Ab2 和目标分析物之间形成的复合物。使缓冲液的离子强度向低离子强度移动,具有熔解 P2 和捕捉寡核苷酸之间的双链体的效应。使用例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(第 3 版,2001)中所述的方法,可以对任意的核苷酸序列计算出通过降低离子强度造成的核酸双链体的去稳定程度。在复合物从捕捉寡核苷酸解离之后,将离子强度转变回高离子强度,会使 P1 和 P2 杂交,形成可扩增的序列。

[0138] 在图 8A 中,抗体 Ab1 和 Ab2 能识别邻近的抗原表位,且通过 5' 末端连接分别缀合到寡核苷酸 P1 和 P2 上。P1 和 P2 的 3' 端是互补的,抗体 Ab2 还共价地或非共价地连接到顺磁颗粒上。在加入包被了 Ab2 的顺磁颗粒之前,使抗体 Ab1 结合到它的特异性表位上。邻近 Ab1 的 Ab2 的结合,允许寡核苷酸 P1 和 P2 的 3' 端的杂交。溶液中的 Ab1 和 Ab2 的浓度相对低于结合到抗原表面上的,从而使 P1 和 P2 的抗原-非依赖性的杂交最小化。通过磁场的应用,捕获抗体-抗原复合物,并通过洗涤去除未结合的 Ab1 抗体。然后,可以将 P1 : P2 杂交体用于合适的扩增反应,例如图 1 所示的。

[0139] 在图 8B 中,抗体 Ab1 和 Ab2 能识别邻近的抗原表位,且通过 5' 末端连接分别缀合到寡核苷酸 P1 和 P2 上。P1 和 P2 的 3' 端是互补的,抗体 Ab1 还共价地或非共价地连接到顺磁颗粒上。在加入 Ab2 之前,使抗体 Ab1 结合到它的特异性表位上。邻近 Ab1 的 Ab2 的结合,允许寡核苷酸 P1 和 P2 的 3' 端的杂交。溶液中的 Ab1 和 Ab2 的浓度相对低于结合到抗原表面上的,从而使 P1 和 P2 的抗原-非依赖性的杂交最小化。通过磁场的应用,捕获抗体-抗原复合物,并通过洗涤去除未结合的 Ab2 抗体。然后,可以将 P1 : P2 杂交体用于扩增反应。

[0140] 在图 8C 中,抗体 Ab1 和 Ab2 能识别邻近的抗原表位,且通过 5' 末端连接分别缀合到寡核苷酸 P1 和 P2 上。P1 和 P2 的 3' 端是互补的,抗体 Ab1 还共价地或非共价地连接到顺磁颗粒上。使抗体 Ab1 和 Ab2 同时结合它们的特异性表位。邻近 Ab1 的 Ab2 的结合,允许寡核苷酸 P1 和 P2 的 3' 端的杂交。溶液中的 Ab1 和 Ab2 的浓度相对低于结合到抗原表面上的,从而使 P1 和 P2 的抗原-非依赖性的杂交最小化。通过磁场的应用,捕获抗体-抗原复合物,并通过洗涤去除未结合的 Ab2 抗体。然后,可以将 P1 : P2 杂交体用于扩增反应。

[0141] 在图 8D 中,携带探针 P2 的抗体 Ab2 通过易切断的连接附着或可附着到表面上,例如,珠子或微孔壁(见图 6GG)。携带 P1 的抗体 Ab1 结合到目标抗原的表位 1 上,通过表位 2 与表面-连接的 Ab1 的结合,固定化该复合物。洗去未结合的 Ab1,然后切割易切断的连接,从表面释放出三元复合物。然后将含有脱附的三元复合物的溶液相转入第 2 反应孔中进行扩增,留下非特异性地结合到原始表面上的任何 Ab1。

[0142] 图 9 解释了本发明的另一方面。抗体 Ab1 和 Ab2 能识别邻近的抗原表位。寡核苷

酸 P1 通过它的 3' 端缀合到抗体 Ab1 上。寡核苷酸 P2 通过它的 5' 末端缀合抗体 Ab2 上。抗体 Ab1 共价地或非共价地连接到顺磁颗粒上。使 2 个抗体与抗原一起混合, 结合它们各自的表位。通过磁场的应用, 捕获所得到的抗体 - 抗原复合物, 并通过洗涤去除未结合的 Ab2 抗体和样品基质中的其它组分。然后加入夹板寡核苷酸 S, 其与探针 P1 的 5' 端和探针 P2 的 3' 端互补。夹板寡核苷酸 S 与探针 P1 的 5' 端和探针 P2 的 3' 端之间的杂交, 在 2 个抗体之间的缺口间隙上架桥。然后, 可以将 P1 : L : P2 杂交体用于图 3 所示的扩增反应。还可以使用图 3 所述的其它连接物构型。另外, Ab1 可以通过如图 6A-6L 所示的可切割的连接附着到顺磁的或其它颗粒上。

[0143] 图 10 解释了本发明的另一方面。未标记的 Ab1 和 Ab2 能结合到目标抗原上的邻近表位。分别用包含相互互补的 3' 端的寡核苷酸探针 P1 和 P2 标记第二抗体 Sec1 和 Sec2, 例如, 抗 -Fc1 和抗 -Fc2。然后第二抗体结合到未标记的一抗 Ab1 和 Ab2, 使寡核苷酸探针靠近, 由此发生的 3' 端的杂交和延伸会将探针转化成可扩增的链。任选地, 可以用半抗原部分 (例如, 生物素, 荧光素, 毛地黄毒苷配基, 三硝基苯酚, 二硝基苯酚等) 标记 Ab1 和 Ab2。在该情况下, 探针 - 标记的第二抗体 Sec1 和 Sec2 具有对 Ab1 和 Ab2 各自的半抗原标记的结合特异性。

[0144] 在另一个实施方案中, 给第二抗体标记了探针, 后者可在与连接夹板寡核苷酸相互碱基配对时发生连接 (图 2)。当一对第二抗体与一对结合到邻近表位上的未标记的抗体相结合时, 探针与连接夹板寡核苷酸相互碱基配对, 并发生连接。

[0145] 在第 3 个实施方案中, 在与抗原温育之前或在温育过程中, 标记的第二抗体与一抗合并 (并可以结合)。在第 4 个实施方案中, 至少一个第二抗体连接到固体表面上, 例如, 微孔壁或磁珠。在第 5 个实施方案中, 第二抗体是可逆地连接到固体表面上 (图 6A-6L, 7A-7D, 和 8A-8D)。在第 6 个实施方案中, 表面 - 连接的抗体从固体表面释放, 对释放的抗体进行扩增反应。在第 7 个实施方案中, Ab1 和 / 或 Ab2 可以是适体、受体或其它表位结合实体, 且 Sec1 和 Sec2 是探针 - 标记的能结合 Ab1 和 Ab2 的识别分子。在第 8 个实施方案中, Sec1 和 / 或 Sec2 可以是 Fab' 片段、适体、针对抗体的抗体或能特异性地识别 Ab1 或 Ab2 的任何分子。

[0146] 蛋白 G 或蛋白 A 可以任选地替代 Sec1 和 Sec2, 如图 10 所示。蛋白 G 和蛋白 A 能结合大多数 IgG 分子和 Fc 区域, 每个 IgG 分子结合一个蛋白 G 或蛋白 A。更具体地, 可以用“通用的寡核苷酸”探针 (图 10 中标记的 P1 和 P2) 修饰蛋白 G 或蛋白 A。修饰的蛋白 G 分子, 例如, 可以预先结合到能识别表位 1 和表位 2 的抗体上。在该情况下, 用 P1 修饰的蛋白 G 或蛋白 A 将会预结合到 Ab1。同样地, 用 P2 修饰的蛋白 G 或蛋白 A 将会预结合到 Ab2。或者, 可以将探针 - 修饰的蛋白 G 或蛋白 A 分子混合到一起, 如图 10 所示使用。

[0147] 该方法具有某些优点。首先, 仅仅需要修饰一种试剂, 即蛋白 G 或蛋白 A。其次, 几乎任何检测一抗都可以用于附着到抗原, 例如大鼠、小鼠或兔抗体。第三, 修饰的蛋白 G 或蛋白 A 与一抗的预结合是对任何 Ab1 或 Ab2 通用的特异性标记的试剂。预期得到的测定组分的标准化, 会改善定量和再现性。

[0148] 在有些情况下, 可以有利地使用蛋白 A/ 蛋白 G 融合产物代替蛋白 A 或蛋白 G。还应明白, “蛋白 A” 或 “蛋白 G” 可以指天然的细菌产物或被设计用于最佳结合 IgG 分子的基因工程的或重组的形式, 例如, 通过消除蛋白 G 的白蛋白结合能力。

[0149] 图 11 显示了本发明的另一个方面,其中本发明包括用于免疫-扩增反应的寡核苷酸-标记的抗体,通过引入发夹结构,阻止了它们参与非特异性引物-引物相互作用。抗体 Ab1 缀合到寡核苷酸 P1 上,后者包含 SDA 限制酶切口位点和下游序列 (a b a' c),其中 a 和 a' 是可以杂交形成发夹结构的互补序列。发夹的  $T_m$  足够低,所以在扩增反应的条件下,一部分寡核苷酸标记以开放的、松弛的形式存在。通过本领域众所周知的方法,例如使用 Sambrook 等,MOLECULAR CLONING,ALABORATORY MANUAL(第 3 版,2001)中所述的一种方法,可以为在给定的温度和离子强度下的任意的核苷酸序列计算出核酸双链体的  $T_m$ 。3' 末端序列 c 不形成发夹结构的一部分,且设计用于阻止 DNA 聚合酶延伸的自引发。抗体 Ab2 缀合到寡核苷酸 P2 上,后者包含 SDA 限制酶切口位点和下游序列 (a b')。当抗体 Ab1 和 Ab2 结合到它们各自的表位上时,探针 P1 的发夹张开口 (breathing),允许 2 个寡核苷酸标记之间发生碱基配对。由序列 (b a') 和 (a b') 配对形成的 P1 : P2 杂交体的  $T_m$  大于 P1 发夹的;因此,P1 和 P2 的杂交是热力学上有利的。然后,DNA 聚合酶会延伸 P2 的 3' 端,生成能被切口的双链限制位点。切口产生、延伸和链置换导致在任一端含有可切口的限制位点的双链 DNA 分子的形成。该构建体可以用于指数式 SDA 反应。

[0150] 在另一个实施方案中,抗体 Ab1 可以缀合到寡核苷酸 P1 上,后者包含 SDA 限制酶切口位点和下游序列 (b' a b a' c),其中 a 和 a' 是可以杂交形成发夹结构的互补序列。序列 b 和 b' 也是互补的,但是它们形成的结构不如 a 和 a' 杂交形成的结构稳定。因此,有利于形成 a : a' 发夹。3' 末端序列 c 不形成发夹结构的一部分,且设计用于阻止 DNA 聚合酶延伸的自引发。抗体 Ab2 缀合到寡核苷酸 P2 上,后者包含序列 (b' a' b),其中 b 和 b' 是互补的,且形成发夹结构。探针 P2 缺少 SDA 切口位点。因此,从 3' 端发生 DNA 聚合酶延伸,会生成死端产物,其不能进行线性扩增。a : a' 和 b : b' 发夹的  $T_m$  足够低,所以在反应的条件下,每个寡核苷酸都有一部分以开放的、松弛的形式存在。当抗体 Ab1 和 Ab2 结合到它们各自的表位上时,探针 P1 和 P2 的发夹张开口,允许 2 个寡核苷酸标记之间发生碱基配对。由序列 (b' a b) 和 (b a' b') 配对形成的 P1 : P2 杂交体的  $T_m$  大于任一发夹结构的;因此,P1 和 P2 的杂交是热力学上有利的。然后,DNA 聚合酶会延伸 P2 的 3' 端,生成可切口的双链限制位点。切口产生、延伸和链置换导致双链 DNA 分子的形成,后者可以用于指数式 SDA 反应。

[0151] 图 11C 描绘了另一个实施方案。探针 P1 包含发夹序列 b, d, b', 序列 a,它在发夹序列的 5',和序列 c,它在发夹序列的 3',且任选地含有不可延伸的 3' 帽。序列 b 和 b' 是互补的,且杂交形成发夹结构的茎。序列 d 形成发夹的环。任选地,序列 d 的一部分可与其自身进行碱基配对,连同 b 和 b' 一起形成茎结构的一部分。探针 P2 包含序列 d',它与 P1 的序列 d 互补。发夹结构的存在,排除了 d 和 d' 的杂交。置换寡核苷酸 D 的添加,首先与 P1 的序列 a 杂交,随后置换茎的 b' 臂,而打开发夹。然后,P2 的序列 d' 与 P1 的未折叠的序列 d 杂交,由聚合酶延伸 P2,置换寡核苷酸 D,且在 P1 上建立可切口的双链限制位点。然后以与图 11B 所述的实施方案类似的方式进行扩增。

[0152] 图 12 描绘了检测测试样品中抗原特异性免疫球蛋白抗体的存在的方法。探针 P1 和 P2 缀合到抗原分子 Ag,从而使每个 Ag 分子被标记了 P1 或 P2,但不是二者。将标记的抗原与测试样品混合,其结合到 Ag 特异性免疫球蛋白上,如所示的。含有 P1 和 P2 两者的复合物将是可扩增的、可检测的,且指示着 Ag 特异性免疫球蛋白的存在。在没有 Ag 特异性免



疫球蛋白时,不会形成可检测的复合物。类似的方法可以用于检测包含 2 个或多个相同配体结合位点或与 2 个或多个不同配体的结合位点的任何配体 - 受体相互作用。在后一种情况下,每个配体被标记了不同的探针序列。例如,可以用 P1 标记能结合 IgG 的 Fc 区域的蛋白 G,可以用 P2 标记 Ag。标记的 Ag 和蛋白 G 与相同的 IgG 分子的结合,会建立可以通过本发明的方法扩增和检测的复合物。

[0153] 图 13 显示了可以用于二元免疫 -SDA 的代表性的探针、引物、接头 (adapter)、报道物和系绳寡核苷酸。在下面的实施例中描述了这些寡核苷酸的结构和它们的使用方法。下面的实施例绝不能限制本发明的范围。

[0154] 实施例 1 :用于二元免疫 -SDA 的探针、引物、接头、报道物的代表性的序列。

[0155] 图 13 描述了下面显示的一些探针、引物、接头和报道物的序列。

[0156] 探针 (P1, P2)

[0157] RHP-1 (右手探针 ;粗体的序列与以下引物 SRH-1 共有) :

[0158]

**5' CCA GTC TTG TCT TGT CTG TTC TCG GGA TGC ATT CAG TGA CGT  
GAT GAG CTA GAC AGA TGT ACA GT**

[0159] RHP-3 (右手探针 ;粗体的序列与以下引物 SRH-1 共有) :

[0160]

**5' CCA GTC TTG TCT TGT CTG TTC TCG GGA TGC ATT CAG TGA CGT  
GAT GAG CTA GAC AGA TGT AC**

[0161] RBD-3v3 (右手探针 ;X = 生物素 - 标记的 dT ;粗体的序列与以下引物 SRH-1 共有) :

[0162]

**5' CCA GTC TTG TCT TGT CTG TTC TCG GGA TGC ATT CAG TGA CGT  
GAT GAG CTA GAC AGA TGT AC TTT TXT**

[0163] LHP-1 (左手探针 ;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补) :

[0164] 5' ATT CAC GCT TCC ATT CCA TGT CTC GGG TTT ACT TCA TCT GCA ACTGTA C

[0165] LHP-2 (左手探针 ;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补) :

[0166] 5' ATT CAC GCT TCC ATT CCA TGT CTC GGG TTT ACT TCA TCT GCA ACTGTA CAT

[0167] LHP-3 (左手探针 ;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补) :

[0168] 5' ATT CAC GCT TCC ATT CCA TGTCTC GGG TTT ACT TCA TCT GCA ACTGTA CAT  
CTG T

[0169] LHP-4 (左手探针 ;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补) :

[0170] 5' ATT CAC GCT TCC ATT CCA TGTCTC GGG TTTACT TCA TCT GCA ACTGTA CAT CTG  
TCT

[0171] LHP-5 (左手探针 ;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补) :

[0172] 5' ATT CAC GCT TCC ATT CCA TGT CTC GGG TTT ACT TCA TCT GCA ACTGTA CAT  
CT

[0173] 引物

[0174] SRH-1 (右手引物 ;粗体的序列与 RHP-1 共有) :

[0175]

**5' CGA TTC AGC TGC AGA CGA TCT CGG GAT GCA TTC AGT GAC**

[0176] SLH-2(左手引物;粗体的序列与 LHP-1,2,3,4 和 5 共有;标有下划线的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补):

[0177]

**5' ACC GCA TCG AAT GAC TGT CTC GGG TTT ACT TCA TCT GCA AC**

[0178] 接头

[0179] ADR-2(标有下划线的碱基与 TBD10.2[D/R] 的 3' 端相同):

[0180] 5' ACG TTA GCC ACC ATA CGG ATA GTG ACG TGA TGA GCT AGA C

[0181] ADR-5(标有下划线的碱基与 TBD10.2[D/R] 的 3' 端相同):

[0182] 5' ACG TTA GCC ACC ATA CGG ATG ATG AGC TAG AC

[0183] ADR-8(标有下划线的碱基与 TBD10.2[D/R] 的 3' 端相同):

[0184] 5' ACG TTA GCC ACC ATA CGG ATG TGA CGT GAT GAG C

[0185] ADIQS-1(IQS 接头):

[0186] 5' ACG TTA GCC ACC ATA CGG ATG ATG AGC ATC TG

[0187] ADQS-2(IQS-2 的接头;标有下划线的碱基与 altD6.9(F/D) 的 3' 端相同):

[0188] 5' AGC TAT CCG CCA TAA GCC AT AC TCA GAG TGA TCA AGT

[0189] 报道物

[0190] TBD10.2(D/R)(标有下划线的碱基与 ADR-2 和 ADR-5 的 5' 端相同):

[0191] 5' (dabcy1)-TAG CGC CCG AGC GCT ACG TT(roxA)GCC ACC ATA CGG AT

[0192] altD6.9(F/D):

[0193] 5' (fam)-AGT TGC CCC GAG GCA ACT(dabcy1)AGC TAT CCG CCA TAA GCC

[0194] AT

[0195] 系绳寡核苷酸

[0196] RCP-1(系绳寡核苷酸;大写的碱基与 RHP-1 的 5' 端互补):

[0197] 5' CCGAGA ACA GAC AAG ACA AGA CTG Gat at

[0198] LCP-2(系绳寡核苷酸;大写的碱基与 LHP 1-5 的 5' 端互补):

[0199] 5' CGA GAC ATG GAA TGG AAG CGT GAA Ttt tt

[0200] LCP-4(系绳寡核苷酸;大写的碱基与 LHP 1-5 的 5' 端互补):

[0201] 5' t tta ttt tat CGA GAC ATG GAA TGG AAG CGT GAA T

[0202] 捕捉和置换寡物

[0203] RCP-13v1(捕捉寡核苷酸;大写的碱基与邻近 RHP-3 的 5' 端的序列互补;标有下划线的碱基与 DO-13v1 互补;X = 四甘醇;Z = 六甘醇;X 通过磷酸二酯部分连接到 Z;且 Z 通过磷酸二酯部分连接到寡核苷酸的 5' 端):

[0204] 5' 生物素-X-Z-cct ggt acg agt ttc tat cct AA TGC ATC aCG AGA ACA GAC AAGACA AGt

[0205] DO-13v1(置换寡核苷酸[帽] = 3' 脱氧尿苷):

[0206] 5' CTT GTC TTG TCT GTT CTC GTG ATG CAT TAG GAT AGA AAC TCG TACCAG G-[帽]3'

[0207] RCP-9v2.2(捕捉寡核苷酸;大写的碱基与邻近 RHP-3 的 5' 端的碱基互补;标有

下划线的碱基与置换寡物 CMPR-9v2 互补;X = 四甘醇;Z = 六甘醇;X 通过磷酸二酯部分连接到 Z;且 Z 通过磷酸二酯部分连接到寡核苷酸的 5' 端):

[0208] 5' 生物素-X-Z-t tta CAC TGA ATG CAT tCC tAG AAC AGA CAA GAC AAG ACTccg tgg cAg cgt

[0209] CMPR-9v2(捕捉寡核苷酸;大写的碱基与 RHP-3 的 5' 端互补;[帽] = 3' 脱氧尿苷):

[0210] 5' ACG CTG CCA CGG AGT CTT GTC TTG TCT GTT CTt GGA ATG CAT TCA

[0211] GT-[帽]3'

[0212] 封闭寡核苷酸([帽] = 2', 3' 双脱氧胞苷)

[0213] LBK-1(大写的碱基与 LHP-3 的 3' 端互补):

[0214] 5' ACA GAT GTA CAG Taa ttt-[帽]3'

[0215] RDB-3p5(大写的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补;标有下划线的碱基与 RHP-3 的 3' 端互补):

[0216] 5' cag ttc agc acA CTG TAC ATC TGT CTA GC aa-[帽]3'

[0217] RDB-3p8(大写的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补;标有下划线的碱基与 RHP-3 的 3' 端互补):

[0218] 5' cag ttc agc acA CTG TAC ATC TGT CTA GCT CA aa-[帽]3'

[0219] RDB-3p10(大写的碱基与 RHP-1 的 3' 端互补;标有下划线的碱基与 RHP-3 的 3' 端互补):

[0220] 5' cag ttc agc acA CTG TAC ATC TG T CTA GCT CAT Cta-[帽]3'

[0221] RDB-3z8(大写的碱基与 RHP-3 的 3' 端互补):

[0222] 5' cag ttc agc ac aa GTA CAT CTG TCT AGC TCA aac-[帽]3'

[0223] RDB-3z0(大写的碱基与 RHP-3 的 3' 端互补):

[0224] 5' cag ttc agc ac aa GTA CAT CTG T aac-[帽]3'

[0225] 定量标准和质量控制("QC")核苷酸

[0226] LTAR-1(QC 寡核苷酸来自 Epoch Biosciences(Bothell, WA);标有下划线的碱基与 IQS-1 不同):

[0227] 5' TTT TAC TTC ATC TGC AAC TGT ACA TCT GTC TAG CTC ATC ACG TCACTG AAT GCA T

[0228] IQS-1(内部定量标准;标有下划线的碱基与 LTAR-1 不同):

[0229] 5' TT TAC TTC ATC TGC AAC ACA TGA TCT CAG ATG CTC ATC ACG TCACTG AAT GCA TC

[0230] IQS-2(内部定量标准;小写的碱基与源自目标的扩增子不同):

[0231] 5' TTA CTT CAT CTG CAA C at ctg tca ctt gat cac tet ga G TCA CTG AAT GCA

[0232] TC

[0233] 实施例 2:实验示范均相的免疫-SDA。

[0234] 在下面的系列实验中,邻近成员的分析物特异性结合部分是生物素部分,选择的实验分析物是链霉抗生物素蛋白("SA")。生物素连接到寡核苷酸部分 P1(RHP-1) 和

P2(LHP-1 或 LHP-3) 的 5' 端 (见上面的实施例 1)。P1 和 P2 各为 1 $\mu$ M 浓度, 且与 10mM Tris-EDTA 缓冲液和牛血清白蛋白 (BSA) 和任选的 0.25 $\mu$ M 的 SA 混合。在室温 10 分钟后, 对混合物进行系列稀释, 使最终的探针浓度是在 pM 范围内。然后, 将稀释的混合物与 SDA 引物 (SRH1, SLH2)、接头 (ADR-5) 和报道探针 (TBD10.2) 混合, 将混合物加热至 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。将样品冷却至 52 $^{\circ}$ C, 并加入装有 SDA 组分 (包括 dNTP) 的干混合物的“扩增孔”中。最终的探针浓度是 1fM 或 10fM, 且最终的 SA 浓度是 0 或各探针浓度的一半。然后将 BsoBI 限制性核酸内切酶和 Bst DNA 聚合酶 (BDDiagnostic Systems, Baltimore, Maryland) 加入混合物中, 在 52 $^{\circ}$ C 进行等温扩增 1 小时。如美国专利号 6,316,200 所述, 通过观察与荧光素 - 标记的报道探针 TBD10.2 的转化相关联的荧光增加, 监测扩增。

[0235] MOTA 值 (在 1 小时反应过程中积分的荧光强度的量度) 记录在表 1 中。当 P2 是 LHP-3 时, 它与 P1 (RHP-1) 杂交后形成 13bp 双链体, 含有分析物 SA 的样品的 MOTA 值比不含 SA 的对照组高 100-1000 倍, 证实了该基于 SDA 的双探针系统检测亚 fM 浓度的 SA 蛋白的能力。

[0236]

表 1

链霉抗生物素蛋白												
RHP-1/ LHP-3, 各 (13 bp 重叠)			RHP-1/ LHP-1, 各 (7 bp 重叠)			RHP-1/ LHP-1, 各 (7 bp 重叠)			RHP-1/ LHP-1, 各 (7 bp 重叠)			
0	2.5 fM	0	0.25 fM	0	0.025 fM	0	0	0	2.5 fM	0	0	0.25 fM
10 fM	10 fM	1 fM	1 fM	0.1 fM	0.1 fM	0.1 fM	10 fM	10 fM	10 fM	1 fM	1 fM	1 fM
300	198090	0	161570	10	10	10	1830	170	170	80	80	10
320	136430	80	109990	0	32880	8680	0	0	0	990	990	70
0	166240	630	146010	0	86240	20	20	180	180	430	430	140
30	171020	890	157530	0	71780	110	110	120	120	5680	5680	0
0	154760	150	114840	330	350	100	100	320	320	990	990	10
150	143390	160	135800	160	0	12870	12870	10	10	140	140	10
<b>133</b>	<b>161655</b>	<b>318</b>	<b>137623</b>	<b>83</b>	<b>31877</b>	<b>3935</b>	<b>3935</b>	<b>133</b>	<b>133</b>	<b>1385</b>	<b>1385</b>	<b>40</b>
111%	14%	112%	16%	164%	122%	140%	140%	90%	90%	155%	155%	138%

MOTA

均值 %C

[0237] 实施例 3 :实验示范多相的免疫 -SDA。

[0238] 在该实验中,携带 5' 生物素或 5' 氨基连接物且无生物素的 RHP-1 用作 P1。携带 5' 生物素或 5' 氨基连接物且无生物素的 LHP-1 用作 P2。将 100nM 探针与 SA- 包被的珠

子 (Promega, Madison, Wisconsin) 混合, 在间断搅拌下, 在室温温育 45 分钟。然后将珠子收集到试管的侧面, 去除溶液。将珠子重新悬浮到 0.1mg/mL BSA 中, 然后将它们收集到试管侧面并抛弃溶液相。重复这些洗涤步骤 4 次, 最后将珠子重新悬浮到 SDA 反应缓冲液中。将得到的悬浮液加入含有 SDA 引物 (SLH-2, SRH-1)、接头 (ADR-5) 和报道物 (TBD. 10. 2) 的混合物中。珠子 - 结合的 SA 在这些混合物中的最终浓度是 40 或 400fM。如上面的实施例 2 所述进行 SDA。

[0239] 结果如表 2 所示。如预期的, 在含有生物素化的探针和 40 或 400fM 的 SA 的反应中, 观察到了强 MOTA 值, 这指示着 SA- 结合的探针转化成可扩增的延伸产物。相比之下, 在含有 SA 和标记了 5' 氨基连接基团 (而不是生物素) 的探针的对照反应中, MOTA 值非常低。如对这些对照反应预期的, 缺乏生物素的探针不能结合到珠子 - 连接的 SA 上, 结果在洗涤步骤期间被清除, 因此未转化成可扩增的延伸产物。在对照反应中出现的弱信号可能是由氨基连接的探针与珠子表面的非特异性结合造成的。

[0240]

表 2

SA 浓度	生物素探针		氨基连接的探针		无探针		无探针 No SA
	400 fM	40 fM	400 fM	40 fM	400 fM	40 fM	
	103,550	47,240	420	450	120	110	160
	115,900	970	0	0	0	310	540
	91,580	0	250	40	200	0	250
	105,410	8,890	0	90	120	410	0
	-47*	20,040	370	310	-45*	270	50
	91,310	49,910	8,510	0	230	380	1,430
<b>均值</b>	<b>101,550</b>	<b>21,175</b>	<b>1,592</b>	<b>148</b>	<b>134</b>	<b>247</b>	<b>405</b>

[0241] 实施例 4:实验示范使用单系绳寡核苷酸的免疫-SDA。

[0242] 在该实验中,未生物素化的 RHP-1(见上)用作 P1, LHP-3(携带 5' 生物素)用作 P2, RCP-1(携带 3' 生物素)用作系绳寡物 T0。以等摩尔比混合探针 P1 和 P2 和系绳

寡物 T0, 并加入含有或没有 SA 的试管中。将试管在室温简短地温育, 然后系列稀释试管的内容物, 生成 pM 范围内的探针浓度。然后将稀释的混合物与 SDA 引物 (SRH1, SLH2)、接头 (ADR-5) 和报道探针 (TBB10.2) 混合, SA 的最终浓度是 0 或 0.25fM, 且 P1、P2 和 T0 的浓度各为 1fM。然后, 使混合物经受“热峰”(72°C, 10 分钟) 或在 52°C 温育 10 分钟(“无热峰”)。P1 : T0 双链体具有 64°C 的估计  $T_m$ , 预期它在 52°C 是稳定的, 且在 72°C 温育会被破坏。破坏后, P1 : T0 双链体在稀释的 (1fM) 探针浓度将仅仅非常缓慢地重新形成 ( $t_{1/2} > 100$  小时)。通过加入 BsoBI 限制性核酸内切酶、Bst DNA 聚合酶和 dNTP 的干混合物, 随后在 ProbeTec™ET 装置中在 52°C 温育, 对样品进行 SDA。当探针 P1 和 P2 分别通过 T0 或生物素结合到共同的 SA 分子上时, 它们的互补的 3' 端杂交并延伸, 建立 SDA 引物 (SLH-2 和 SRH-1) 和接头 ADR-5 的杂交位点。这可以同时扩增和检测延伸的 P1 和 P2 分子。通过观察与荧光素 - 标记的报道探针 TBD10.2 的转化相关联的接头 - 介导的荧光增加, 监测扩增 (关于接头介导的报道探针转化的细节, 见美国专利号 6,316,200)。

[0243] 结果如表 3 所示。含有分析物 0.25fM SA 和 1fM 探针的“无热峰”样品表现出强荧光增加 (平均 MOTA = 166,000), 而没有 SA、但是含有 1fM 探针的对照样品表现出仅仅 3,000 的平均 MOTA 值, 其与从在 SDA 之前通过 72°C 热峰破坏 P1 : T0 双链体的样品得到的值相当。在没有 SA 的样品中, 因为在 1fM 探针浓度不能以可观的效率形成 P1-P2 双链体, MOTA 值保持较低。

[0244] 表 3

[0245]

		热峰		无热峰	
		无 SA	SA	无 SA	SA
MOTA		290	50	4740	177230
		22360	250	20	168210
		30	380	1660	175550
		190	210	8240	193620
		27730	8100	350	139080
		160	60	1500	145330
均值		<b>10120</b>	<b>1798</b>	<b>3002</b>	<b>166503</b>
%CV		<b>136%</b>	<b>196%</b>	<b>116%</b>	<b>12%</b>

[0246] 实施例 5 : 通过二元免疫 - SDA 进行分析物定量。

[0247] 通过包含与目标介导的探针延伸产物共同扩增的内部标准 (例如, 实施例 1 的 IQS-1), 可以定量地测定样品中的目标分析物的水平。通过共同的 SDA 引物对, 扩增了内部标准和目标 - 依赖性的探针 - 延伸产物, 但是通过不同的和可区别地标记的报道探针 (例如, 实施例 1 的 TBD10.2 和 AltD6.9) 检测。通过对比 2 个报道探针的相对信号, 可以推导出探针特异性延伸产物相对于已知量的内部标准的浓度。在确定分析物的绝对浓度时, 可以有利地制作背景 - 校正的目标 / 对照信号相对于目标分析物信号的比率的“标准曲线”。然后, 可以将对测试样品观察到的信号的比率与标准曲线相比较, 得到绝对分析



物浓度。本领域已知定量核酸靶水平的类似方法（参见，例如，Nadeau 等，" Real-time Sequence-specific Detection of Nucleic Acids during Strand Displacement Amplification, " Anal. Biochem. 276 :177-187(1999)）。

[0248] 实施例 6 :实验示范使用 2 个系绳寡核苷酸的免疫 -SDA。

[0249] 在该实验中，未生物素化的 RHP-1（见上）用作 P1，未生物素化的 LHP-3 用作 P2，而 RCP-1（携带 3' 生物素）和 LCP-4（携带 5' 生物素）用作系绳寡核苷酸。图 3H 图示了 P1、P2 和系绳寡核苷酸之间的相互作用。以等摩尔比混合探针 P1 和 P2 和系绳寡核苷酸（其中仅仅就邻近成员的系绳寡核苷酸部分确定摩尔浓度），并加入含有或没有 SA 的试管中。如实施例 4 所述进行反应，但是不进行 72°C " 热峰 " 实验。结果如表 4 所示。含有 SA 的样品表现出强荧光增加（平均 MOTA 值 = 136,000），而没有 SA 的样品表现出可忽略的增加（MOTA = 533）。

[0250]

表 4

	无 SA	SA
MOTA	680	156740
	470	138080
	260	133150
	200	137820
	1200	127070
	390	126840
均值	533	136617
%CV	69%	8%

[0251] 实施例 7 :实验示范以 IL-8 作为分析物的均相的免疫 -SDA。

[0252] 将针对人 IL-8 的 MAb G265-8 (Ab1 ;BD Bioscience Pharmingen) 共价地偶联到 SA 上，生成每个 IgG 含有一个 SA 部分的抗 -IL-8 IgG-SA 缀合物 (Ab1-SA)。使用本领域众所周知的方法，缀合 MAb G265-8 和 SA。制备了含有 20nM 5' 生物素 - 标记的探针 RHP-3 (P1)、10nM Ab1-SA 缀合物、10nM Tris-EDTA 缓冲液和 0.1mg/ml BSA 的混合物，在 4°C 温育过夜，使生物素化的寡核苷酸结合 Ab1-SA 缀合物，形成 Ab1-SA-P1。

[0253] 将能结合与 MAb G265-8 结合的表位不同的 IL-8 表位的 MAbG265-5 (Ab2 ;BD Bioscience Pharmingen) 直接共价地偶联到氨基修饰形式的探针 LHP-3 (P2) 上，生成每个 Ab2 平均具有 2.5 个 P2 部分的 Ab2-P2 缀合物。基本上如美国专利号 6,511,809B1 所述缀合 MAbG265-5 和 LHP-3，其中 LHP-3 包含脂族伯胺基团连接的 5' 末端。

[0254] 将各为 1nM 的 Ab- 探针缀合物浓度的 Ab1-SA-P1 和 Ab2-P2 与 10mM Tris-EDTA 缓冲液和 BSA 和任选的 0.01-1nM IL-8 混合。在室温 30 分钟后，系列稀释混合物，使最终的 Ab- 探针缀合物浓度在 fM 范围内。然后，将稀释的混合物与 SDA 引物 SRH-1 和 SLH-2、接头 ADR-5 和报道探针 TBD10.2 混合。将混合物加温至 37°C 10 分钟后，在 52°C 将每份样品的一部分加入扩增孔中，如实施例 2 所述，其中每个扩增反应含有 BsoBI 限制酶和 Bst DNA 聚合酶。最终的 Ab- 探针缀合物浓度是 1fM，最终的 IL-8 浓度是 0、0.01、0.1 或 1fM。其它组分

的浓度如实施例 2 所述。将样品立即转移到 ProbeTec™ ET 装置中,其中在 52℃ 进行等温扩增 1 小时。如实施例 2 所述,通过观察荧光增加,监测扩增。

[0255] 平均 MOTA 值记录在表 5 中。从没有 IL-8 的样品得到了低 MOTA 值,而高水平的 IL-8 产生了升高的 MOTA 值,确证了通过均相免疫-SDA 方法检测 IL-8。在该实验中,没有采用杂交封闭剂寡核苷酸,但是在形成邻近对-IL-8 复合物后,将样品稀释约 100 万倍,以减少目标-非依赖性的探针扩增的发生。

[0256] 表 5. 通过均相的免疫-SDA 检测 IL-8

[0257]

结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	平均 MOTA (n = 6)
0	492
10	3983
100	73883
1000	128847

[0258] 实施例 8 :实验示范使用杂交封闭剂寡核苷酸抑制背景。

[0259] 该实验解释了使用杂交封闭剂寡核苷酸来抑制由与目标分析物无关联的 P1 和 P2 分子之间的碱基配对造成的目标-非依赖性的扩增。在该实验中,探针 P1 是 5' 生物素化的 RHP-3,探针 P2 是 5' 生物素化的 LHP-3(见上)。包含 P1 和 P2 的 3' 端的 10 个核苷酸序列彼此互补。如在实施例 2 中,目标分析物是 SA,在它的四聚形式中含有 4 个生物素结合位点。杂交封闭剂寡核苷酸是 RDB-3p8(实施例 1),其包含与 RHP-3 的 3' 端互补的 18 个核苷酸的序列。因此,P1 和杂交封闭剂 RDB-3p8 之间形成的双链体会包括位于与 P2 互补的 P1 的 3' 端的 10 个核苷酸以及与 P2 不互补的 P1 的另外 8 个核苷酸。RDB-3p8 还包含 14 个核苷酸的 5' 尾序列(在实施例 1 中 RDB-3p8 的标有下划线的碱基 5' 的碱基),其用作废用模板,RHP-3 的 3' 端可以在其上延伸(如图 4C 所示)。本发明的杂交封闭剂的特征是,它们不会共价地附着或连接到邻近成员的寡核苷酸部分上。在本发明的依赖延伸寡核苷酸部分的 3' 端来生成分析物特异性扩增子的方法中,杂交封闭剂-探针双链体必需在聚合酶-催化的扩增方法(例如 SDA 和 PCR)期间保持稳定,该方法要求延伸 3' 端,且典型地在双链体变得不太稳定的升高温度下进行。在基于聚合酶的扩增方法(例如 PCR 和 SDA)中典型地采用的升高温度可以将探针-封闭剂杂交体的优势减少到不能有效地抑制虚假的探针转化的程度。通过选择能形成比探针之间形成的杂交体更稳定的探针-封闭剂杂交体的杂交封闭剂,通过使用能在升高温度下稳定探针-封闭剂模板的废用模板,本发明克服了该困难。

[0260] 如下通过免疫-SDA 分析含有 SA 的溶液。制备了含有 5' 生物素-标记的探针 RHP-3(P1) 和 5' 生物素-标记的 LHP-3(P2) 各 20pM、50nMRDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸、10mM Tris-EDTA 缓冲液和 0.1mg/mlBSA 的溶液。每种溶液还含有 0、0.1、1、10 或 100fM 的 SA。将溶液在 37℃ 温育 2 小时,将混合物在免疫-SDA 缓冲液中稀释 10 倍。然后,将 100uL 稀释的样品与 20uL 含有 1.5uM SRH-1SDA 引物、3.75uMSLH-2SDA 引物、2.25uM ADR-8 接头、

3.75 $\mu$ M TBD10.2 报道探针和 0.375 $\mu$ M RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸的引发溶液混合。将得到的混合物在 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。所有寡核苷酸的序列见实施例 1。为了启动免疫-SDA 反应,将 80 $\mu$ L 每种混合物转移到装有在 52 $^{\circ}$ C 预平衡、且由 Bst DNA 聚合酶、BsoBI 限制酶和其它 SDA 组分(包括磷酸钾、BSA 和 dNTP)组成的 20 $\mu$ L SDA 酶溶液的扩增微孔中。然后迅速密封微孔,置于 ProbeTec<sup>TM</sup> ET 装置中,并在 52 $^{\circ}$ C 维持 1 小时,监测每个微孔中的荧光。连同上述那些一起,制备了不含有 RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸的一系列对照反应,并在 ProbeTec<sup>TM</sup> ET 装置中同时监视。

[0261] 说明了原始结合混合物的稀释后,每种免疫-SDA 混合物包含 1.3 $\mu$ M P1 和 P2 和浓度为 0、0.6、6、66、666 或 6666 $\mu$ M 的 SA。免疫-SDA 反应还含有 30mM 磷酸钾 (pH 7.6), 75mM N-二甘氨酸, 50mM 氢氧化钾, 3.5% 二甲亚砜 (DMSO), 5mM 醋酸镁, 50 $\mu$ g/ml BSA, 500nM SLH-2, 200nM SRH-1, 50nM RDB-3p8, 300nM ADR-8, 500nM TBD10.2, 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dTTP, 0.5mM 2'-脱氧胞苷 5'-O-(1-硫代三磷酸)S-异构体 (dCTP $\alpha$ S), 约 8 单位的 Bst DNA 聚合酶和 18 单位的 BsoBI 限制酶。通过监测与通过如美国专利号 6,316,200 所述的接头-介导的方法 TBD10.2 报道寡核苷酸的扩增相关联的 ROX 荧光的增加,检测由 P1 和 P2 的相互杂交和延伸造成的产物扩增(见图 1)。对于每个孔,在反应过程中,每分钟进行一次 ROX 读数。将每个样品的 ROX 荧光读数相对于 60 分钟的时间段进行绘图。

[0262] MOTA 值记录在表 6 中。对于没有杂交封闭剂寡核苷酸的无目标的反应(即,0 $\mu$ M SA),得到了相对较高的平均 MOTA 值 49,382。该背景信号明显限制了免疫-扩增的灵敏度,且认为它是由 P1 和 P2 的目标-非依赖性的杂交和随后延伸它们的 3' 端造成的,即使在无目标分析物的情况下这也会将探针转化成可扩增的产物。但是,当反应混合物中包含杂交封闭剂寡核苷酸时,背景信号急剧降低,如从含有 RDB-3p8 的无目标的混合物得到的低平均 MOTA 值 376 所揭示的。在这些反应中,杂交封闭剂寡核苷酸竞争性地结合到 P1 的 3' 端,由此阻止 P2 与 P1 杂交,基本上消除探针向可扩增产物的目标-非依赖性的转化。

[0263] 含有目标分析物 SA 和 RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸的反应混合物表现出高 MOTA 值,指示着即使在有杂交封闭剂寡核苷酸存在的情况下,也会有效地扩增目标结合的探针。发明人估计,探针 P1 和 P2 向相同的 SA 分子的同时结合,会使 2 个探针的局部浓度相对于本体溶液中未结合的探针增加超过 1000 万倍。估计 SA 分子上 2 个探针的有效局部浓度大于 10 $\mu$ M,远远超过了本体溶液中杂交封闭剂寡核苷酸的 50nM 浓度。目标-结合的 P1 和 P2 的高局部浓度会促进探针的相互杂交和探针向可扩增产物的转化,尽管存在竞争的杂交封闭剂寡核苷酸。相比之下,未结合到目标上的探针 P1 和 P2 在本体溶液中的浓度是 1.3 $\mu$ M,这些未结合的探针的相互杂交受到杂交封闭剂寡核苷酸与 P1 的竞争性杂交的抑制。尽管似乎会对目标-结合的探针转化有一定抑制,如含有杂交封闭剂的 666 $\mu$ M SA 的 SDA 反应与在没有封闭剂的 666 $\mu$ M SA 的反应相比降低的 MOTA 分值所揭示的,但目标信号/背景信号的比率对于含有杂交封闭剂的反应几乎大 200 倍。

[0264] 表 6. 从含有或没有杂交封闭剂寡核苷酸的对 SA 的基于 SDA 的检测得到的 MOTA 值

[0265]

在 SDA 反应中的 SA 浓度 (aM)	含有 50nM 杂交封闭剂寡核苷酸 RDB-3p8 的 MOTA	无 RDB-3p8 的 MOTA
0	376	49382
0.6	1037	N. D.
6	6075	N. D.
66	38815	N. D.
666	73175	109142
6666	98790	N. D.

[0266] 通常,含有更高浓度的未结合的探针 P1 和 P2 的反应混合物会需要增加浓度的杂交封闭剂寡核苷酸,以提供与含有更低探针浓度的样品相同程度的背景抑制。可以经验性地调节杂交封闭剂寡核苷酸的浓度,以确定提供适当程度的背景抑制所需的浓度。因为高浓度的杂交封闭剂寡核苷酸也可将目标-结合的探针的扩增抑制到一定的程度,发现会产生适当背景抑制的最低浓度的杂交封闭剂寡核苷酸一般是最佳的。

[0267] 在该实施例中采用的杂交封闭剂寡核苷酸 RDB-3p8 含有与探针 P1 (RHP-3) 的 3' 端互补的 18 个核苷酸的序列,所以 RDB-3p8 与 RHP-3 的杂交会建立 18 个碱基对的双链体和每个寡核苷酸的 5' 端的未配对的单链尾。还可以采用具有比 RDB-3p8 更长或更短的互补序列的杂交封闭剂寡核苷酸(分别例如, RDB-3p10 或 RDB-3p5)。通常,对于给定的浓度,具有更短的探针互补区段的杂交封闭剂寡核苷酸会与 P1 形成双链体,其稳定性低于具有更长的探针互补区段的那些(更低的  $T_m$ )。通常需要以更高的浓度使用与特定探针形成较不稳定双链体的杂交封闭剂寡核苷酸,以提供与会与探针形成更稳定的双链体的杂交封闭剂寡核苷酸相同程度的背景抑制。P1 : P2 双链体的稳定性也会影响特定杂交封闭剂寡核苷酸的效力。通常,P1 : P2 双链体越稳定,必须使用越高浓度的特定杂交封闭剂寡核苷酸,来提供适当水平的背景抑制。同样地,P1 : P2 双链体越稳定,探针-封闭剂双链体必须越稳定,以对固定浓度的杂交封闭剂寡核苷酸提供相同程度的背景抑制。通过改变与探针互补的杂交封闭剂寡核苷酸序列的长度或序列组成,可以调节杂交封闭剂寡核苷酸和探针之间形成的双链体的稳定性。用于从参数例如寡核苷酸序列和浓度估计双链体的稳定性的软件是本领域众所周知的,例如 OLIGO® (Cambio, 英国) 和 Mfold (copyright 1996 Dr. M. Zuker) (见 <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>, 记载在这里引作参考的 Zuker, Nucl. Acids. Res. 31 :3406-15 (2003) 中)。

[0268] 可以同时使用 2 个杂交封闭剂寡核苷酸(每个对一个探针是特异性)来抑制背景信号。通常,需要较低浓度的杂交封闭剂寡核苷酸来提供与用单杂交封闭剂寡核苷酸所得到的相同程度的背景抑制。

[0269] 实施例 9 :通过免疫-SDA 均相检测亚皮摩尔的 IL-8 浓度。

[0270] 抗体-探针缀合物 Ab1-SA-P1 和 Ab2-P2 如实施例 7 所述。制备了 50uL 含有 10mM

Tris-EDTA 缓冲液, 20pM Ab1-SA-P1, 100pM Ab2-P2, 1mg/mL BSA, 0.1mg/mL 小鼠  $\gamma$  球蛋白, 50nM 杂交封闭剂寡核苷酸 RDB-3z8, 和 0, 0.005, 0.010, 或 0.025pM IL-8 的样品。在室温温育 3 小时后, 将每种样品的 5uL 等分试样以 1 : 10 (体积 / 体积) 稀释到含有 0.1mg/mL BSA 的 Tris-EDTA 缓冲液中, 然后进一步以 1 : 10 (体积 / 体积) 稀释到 100uL 含有 SDA 引物 SRH-1 (100nM) 和 SLH-2 (500nM), 300nM 接头引物 ADR-8, 500nM 报道探针 TBD10.2 (D/R), 和 50nM 杂交封闭剂 RDB-3z8 的溶液中。从每种原始样品, 制备了 4 份这样的稀释的混合物。然后, 将稀释的混合物在 37°C 温育约 10 分钟, 再将每份混合物的 80uL 等分试样转入装有 20uL 已经预热至 52°C 的 SDA 酶溶液的单孔微孔中。密封微孔, 置于 ProbeTec™ ET 装置中, 在 52°C 温育 1 小时。如这里引作参考的美国专利号 6,316,200 所述, 通过观察与荧光素 - 标记的报道探针 TBD10.2 的转化相关联的荧光增加, 监测扩增。得到的 MOTA 值记录在表 7 中。含有浓度低至 0.005pM 的 IL-8 的结合混合物的平均 MOTA 值明显高于从无 IL-8 的样品得到的值, 确证了本发明的均相方法用于检测低飞摩尔范围的分析物浓度的能力, 无需分开结合的和未结合的抗体。

[0271] 认为在无 IL-8 的样品中的由 MOTA 分值代表的背景信号是由通过未结合到目标的抗体之间的弱相互作用引起虚假的扩增子形成所造成的 (见实施例 16)。在该实施例中的背景水平高于实施例 7 中的, 因为在本实施例的 SDA 反应中的抗体浓度比之前的实施例中高至少 200 倍。

**表 7. 通过免疫-SDA 均相检测亚皮摩尔的 IL-8 浓度**

	结合混合物中的 [IL-8]	平均 MOTA (n=4) ± 标准误差
[0272]	0.000 pM	12800±3800
	0.005 pM	27300±4300
	0.010 pM	47600±12000
	0.025 pM	96500±2900

[0273] 实施例 10: 实验示范使用系绳寡核苷酸和桥连探针检测 IL-8 的免疫-SDA。

[0274] 将 10nM 实施例 9 的 Ab1-SA 缀合物与 20nM 3' - 生物素标记的 RCP-1 系绳寡核苷酸 (TO) 在含有 0.1mg/mL BSA 的 0.1M Tris-EDTA 缓冲液中混合。将该混合物在 4°C 温育过夜, 使生物素化的寡核苷酸结合 Ab1-SA 缀合物, 形成 Ab1-SA-TO。

[0275] 制备了含有 1nM Ab1-SA-TO, 1nM 无生物素标记的 RHP-3 (P1), 1nM Ab2-P2 (见实施例 8), 10mM Tris-EDTA 缓冲液, 0.1mg/mL BSA, 和 0, 10 或 100pM IL-8 的混合物。在室温温育 30 分钟后, 对混合物进行系列稀释, 使最终的 Ab- 探针缀合物浓度在 fM 范围内。然后, 将稀释的混合物与 SDA 引物 SRH-1 和 SLH-2、接头 ADR-5 和报道探针 TBD10.2 混合, 将混合物加温至 37°C 10 分钟。如实施例 2 所述, 在 52°C 将每份稀释的样品的一部分加入干扩增产孔中, 后者还含有 BsoBI 限制酶和 Bst DNA 聚合酶。Ab- 探针缀合物在得到的 SDA 混合物中的浓度是 1fM, IL-8 的浓度是 0, 0.01, 或 0.1fM。将样品立即转入 ProbeTec™ ET 装置, 在其中在 52°C 进行等温扩增 1 小时。如上面实施例 2 所述, 通过观察荧光增加, 监测扩增。

[0276] MOTA 值记录在表 8 中。从没有 IL-8 的样品得到了低 MOTA 值, 而高水平的 IL-8 产

生了增高的MOTA值,这确证了通过免疫-SDA方法检测IL-8,其中P1用作夹板寡核苷酸,其通过与系绳寡核苷酸T0的杂交,间接连接到分析物结合部分Ab1,如图3A所述。在该实验中,没有使用杂交封闭剂寡核苷酸,在形成邻近对-IL-8复合物后,将样品稀释了约100万倍,以减少目标-非依赖性的探针扩增的发生。

[0277] 表8. 通过使用系绳寡核苷酸的均相的免疫-SDA检测IL-8

[0278]

结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	平均 MOTA (n = 6)
0	345
10	505
100	32227

[0279] 实施例11:实验示范在检测IL-8时使用Fab'片段作为分析物结合部分的免疫-SDA。

[0280] 用胃蛋白酶消化了MAb G265-8(见实施例9),生成F(ab')<sub>2</sub>片段和Fc区的片段。纯化F(ab')<sub>2</sub>,并进一步用二硫苏糖醇(DTT)处理,以还原连接Fab'片段的二硫键。将得到的Fab'片段(Ab1)偶联到2个RHP-3寡核苷酸(P1)上,形成Ab1-P1缀合物。

[0281] 制备了含有0.1nM Ab1-P1,0.1nM Ab2-P2(见实施例8),10mM Tris-EDTA缓冲液,0.1mg/mL BSA,10nM杂交封闭剂寡核苷酸RDB-3p8(见实施例1),和0,0.1或1pM IL-8的混合物。在37°C温育3小时后,对混合物进行系列稀释,使得到的Ab-探针缀合物的浓度在fM范围内。然后将稀释的混合物与SDA引物SRH-1和SLH-2、接头ADR-5、额外的杂交封闭剂RDB-3p8(至最终浓度10nM),和报道探针TBD10.2混合。使得到的混合物在37°C维持10分钟。然后,如实施例2所述,在52°C将每份样品的一部分加入干的扩增孔中,后者还含有BsoBI限制酶和Bst DNA聚合酶。在得到的SDA混合物中,Ab-探针缀合物的浓度是100fM,IL-8的浓度是0,0.1或1fM(表9)。将样品立即转入ProbeTec™ ET装置,其中在52°C进行等温扩增1小时。如实施例2所述,通过观察荧光增加,监测扩增。

[0282] 表9. 通过使用Fab'-P1缀合物的均相的免疫-SDA检测IL-8

[0283]

结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	平均 MOTA (n = 6)
0	1920
0.1	4713
1	19710

[0284] 4次重复实验的平均MOTA值记录在表9中。对没有IL-8的样品得到了低MOTA值,而高水平的IL-8产生了升高的MOTA值,确证了通过使用Fab'作为Ab1-P1的分析物结合部分的免疫-SDA方法检测IL-8。

[0285] 实施例12:使用可逆地固定化的邻近成员的目标介导的扩增子形成,与使用杂交

封闭剂寡核苷酸进行背景抑制相结合。

[0286] 在该实施例中使用的缓冲液如下：

[0287] ● TBS :25mM Tris(pH 7.6),150mM NaCl；

[0288] ● 稀释剂 A :稀释剂 B+0.01% Tween-20,800uM D-生物素和 5mMEDTA；

[0289] ● 稀释剂 B :TBS,0.5%脱脂奶粉(Oxoid Ltd.,英国),0.1mg/mL分子生物学级的DNA(Roche Molecular Systems,Pleasanton,California)；

[0290] ● 封闭溶液 :TBS,4.5%脱脂奶粉,1mg/mL分子生物学级的DNA,2mg/mL叠氮化钠,5mM EDTA；

[0291] ● 洗涤缓冲液 :TBS,5mM EDTA,0.05% Tween-20；

[0292] ● SDA 反应缓冲液(浓缩的):90mM N-二甘氨酸,60mM KOH,12mM 磷酸钾,6.57%甘油,4.23% DMSO；

[0293] ● SDA 引物混合物 :在水中的 7.5uM SRH-1,37.5uM SLH-2,300uM ADR-5,37.5uM TBD10.2；和

[0294] ● SDA 酶混合物 :在 75mM N-二甘氨酸,50mM 氢氧化钾,10mM 磷酸钾(pH 7.6)中的 18 单位的 BsoBI 限制性核酸内切酶和 8 单位的 Bst 聚合酶(BD Diagnostic Systems)。

[0295] 选择的目标分析物是 IL-8,且 MAb G265-5 和 G265-8 是分析物结合部分。MAb G265-5 缀合到探针 LHP-3 上,生成 Ab1-P1。MAb G265-8 与 SA 缀合,将该缀合物与 5' 生物素化的探针 RHP-3 混合,其比率为 2 个探针 /Ab 分子,生成 Ab2-P2。

[0296] 根据下面的方法,将捕捉寡核苷酸固定化到固体载体上。将 SA- 包被的 96- 微孔板(Pierce 目录号 15121)在 TBS 中冲洗 3 次,并在封闭溶液中温育过夜,然后用洗涤缓冲液洗涤 4 次。将 100uL 含有 80nM5' -生物素化的 RCP-9v2.2 捕捉寡核苷酸的溶液加入每个孔中,在室温温育 1 小时。然后用含有 800uM D-生物素的洗涤缓冲液洗涤平板 4 次。

[0297] 如下进行 Ab2-P2 缀合物与固定化的捕捉寡核苷酸的杂交 :将 100uL 在稀释剂 A 中的 0.1nM Ab2-P2 加入每个微孔中,并在室温温育 1 小时。然后用洗涤缓冲液洗涤微孔 4 次。将 100uL 含有在稀释剂 B 中的 0 或 50pM IL-8 的样品溶液加入每个微孔中,并在室温温育 1 小时。然后用洗涤缓冲液洗涤微孔 4 次。这步导致在 IL-8 和固定化的 Ab2-P2 之间形成复合物。

[0298] 如下进行 Ab1-P1 向 IL-8 和固定化的 Ab2-P2 之间的复合物的结合 :将 100uL 0.1nM Ab1-P1 缀合物在稀释剂 A 中的溶液(含有 1uMLBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸或没有杂交封闭剂寡核苷酸)加入装有 IL-8 和 Ab2-P2 之间的复合物的微孔中,并在室温温育 1 小时。然后用含有 1uM LBK-1 的洗涤缓冲液洗涤装有 LBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸的微孔 5 次,随后用不含 LBK-1 的洗涤缓冲液洗涤 2 次。用洗涤缓冲液洗涤未暴露于杂交封闭剂寡核苷酸的微孔 7 次。对 2 组孔,使用 TBS 进行最后的 2 次洗涤。

[0299] 通过加入 120uL SDA 反应缓冲液(浓缩的),从支持物洗脱如上所述制备的被捕获的复合物,并在室温温育 20 分钟。将含有洗脱的复合物的 100uL 体积从每个微孔转移到含有 20uL SDA 引物混合物的新微孔中。将微孔在室温温育 20 分钟,然后置于 37°C 热 block 上 10 分钟。为了启动 SDA 扩增,从每个 37°C 微孔中取出 80uL,并转移到装有 20uL 已经预热至 52°C 的 SDA 酶混合物的单独分开的微孔中。然后将微孔迅速置于 BD ProbeTec™ ET 装置中,并在 52°C 维持 1 小时,同时在扩增过程中监测荧光强度。从反应过程中得到的动态荧

光图谱,确定了每个扩增反应的 MOTA 值。

[0300] 如图 7D 所示,抗体-探针缀合物 Ab1-P1 和 Ab2-P2 的探针部分 P1 和 P2 之间的碱基配对促进了 2 个抗体-探针缀合物之间的无目标的二元复合物的形成。在结合混合物中包含杂交封闭剂寡核苷酸 LBK-1,会通过阻止 P1 和 P2 之间的碱基配对来抑制无目标的复合物的形成。在没有杂交封闭剂寡核苷酸存在的情况下,无目标的二元复合物的存在,会在免疫-扩增反应过程中产生高水平的背景信号,如表 10 中与不含有 IL-8 和 LBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸的结合混合物相关的高平均 MOTA 值所揭示。相比之下,1 $\mu$ M LBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸的存在,会使“无 IL-8”的结合混合物的平均 MOTA 值降低 20 倍,指示着无目标的复合物的形成的大大减少。杂交封闭剂寡核苷酸的存在,会轻微减少 IL-8 特异性信号的强度(对比有和没有 LBK-1 的 50pM IL-8 混合物的 MOTA 值);但是,含有杂交封闭剂寡核苷酸的结合混合物的特异性信号与背景信号的比值比不含杂交封闭剂的那些高 12 倍。

[0301] 该结果还展示了固定化的邻近成员 (Ab2-P2) 在捕获或固定化目标抗原 (IL-8) 并形成固定化的包含目标抗原和邻近对的 2 个成员 (Ab1-P1 和 Ab2-P2) 的三元复合物中的应用,如图 7A-7G 所示。该实施例还揭示,在加入浓缩的 SDA 缓冲液后的 20 分钟室温洗脱期间,可检测数目的固定化的三元复合物从固相脱离,尽管固定化杂交体(在捕捉寡核苷酸和探针部分 P2 之间形成的双链体)的估计半衰期比 20 分钟洗脱时间长得多(许多天)。

[0302] 表 10. 有或没有杂交封闭剂寡核苷酸,使用固定化邻近成员,免疫-SDA 检测 IL-8 得到的平均 MOTA 值 (n = 6)

[0303]

在结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	有 1 $\mu$ M LBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸	没有杂交封闭剂寡核苷酸
0	1533	31829
50	66404	112451

[0304] 实施例 13 :使用可逆地固定化的邻近成员的目标介导的扩增子形成 :通过应用低离子强度溶液,释放固定化的复合物。

[0305] 在该实施例中使用的 MAb、分析物和缓冲液与在实施例 12 中描述的那些相同。以与实施例 12 所述相同的方式,将生物素化的 RCP-9v2.2 捕捉寡核苷酸固定化到支持物上。如实施例 12 所述,进行 Ab2-P2 缀合物向固定化的捕捉寡核苷酸的杂交。然后,将 100 $\mu$ L 含有 0 或 10pMIL-8 的稀释剂 B 加入每个微孔中,后者在室温温育 1 小时。然后用洗涤缓冲液洗涤微孔 4 次。然后,将含有 0.1nM Ab1-P1 缀合物和 1 $\mu$ MLBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸的稀释剂 A 加入每个微孔中,微孔在室温温育 1 小时。然后如实施例 12 所述洗涤微孔,只是最后 2 个洗涤步骤含有 10mM NaCl,而不是 TBS。

[0306] 为了释放得到的 IL-8 与 Ab1-P1 和 Ab2-P2 缀合物之间的固定化的复合物,用 75 $\mu$ L 水或非浓缩的 SDA 缓冲液处理每个微孔。在室温温育 20 分钟后,取出 70 $\mu$ L 该溶液并如实施例 12 所述通过 SDA 分析。

[0307] 该实施例展示了低离子强度溶液在释放完整的由同时结合到邻近对 Ab1-P1 和 Ab2-P2 的 IL-8 分子构成的固定化的三元复合物中的应用。该实施例的结果如表 11 所示。



对含有 10pM IL-8 的用水（低离子强度）洗脱的样品得到的平均 MOTA 值几乎比用 SDA 缓冲液（中等离子强度）洗脱的样品的平均 MOTA 值高 10 倍，这证实了如图 7I 所述的应用低离子强度溶液释放三元复合物。

[0308] 表 11. 使用固定化的邻近成员，免疫-SDA 检测 IL-8 得到的平均 MOTA 值 (n = 6) : 以低离子强度或以中等离子强度洗脱

[0309]

在结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	用水洗脱 (低离子强度)	用 SDA 缓冲液洗脱 (中等离子强度)
0	148	220
10	46584	4888

[0310] 实施例 14 :使用可逆地固定化的邻近成员的目标介导的扩增子形成 :应用置换寡核苷酸释放固定化的复合物。

[0311] MAb、分析物和缓冲液与在实施例 12 中描述的那些相同。以与实施例 12 所述相同的方式，将生物素化的 RCP-9v2. 2 捕捉寡核苷酸固定化到支持物上。如实施例 12 所述，进行 Ab2-P2 缀合物向固定化的捕捉寡核苷酸的杂交。然后，将 100uL 含有 0 或 10pM IL-8 的稀释剂 B 加入每个微孔中，后者在室温温育 1 小时。然后用洗涤缓冲液洗涤微孔 4 次。然后，将含有 0. 1nM Ab1-P1 缀合物和 1uM LBK-1 杂交封闭剂寡核苷酸的稀释剂 A 加入每个微孔中，微孔在室温温育 1 小时。然后如实施例 12 所述洗涤微孔。

[0312] 为了释放得到的 IL-8 与 Ab1-P1 和 Ab2-P2 缀合物之间的固定化的复合物，用 120uL 含有 0. 1uM CMPR-9v2 置换寡核苷酸或不含置换寡核苷酸的 SDA 缓冲液（浓缩的）处理每个微孔。在室温温育 20 分钟后，如实施例 12 所述通过 SDA 分析该溶液。

[0313] 该实施例展示了置换寡核苷酸在释放完整的由同时结合到邻近对 Ab1-P1 和 Ab2-P2 的 IL-8 分子构成的固定化的三元复合物中的应用。该实施例的结果如表 12 所示。对含有 10pM IL-8、并用置换寡核苷酸处理的样品得到的平均 MOTA 值比未用置换寡核苷酸处理的 10pMIL-8 样品的 MOTA 值高 10 倍，这证实了如图 7J 所述的释放机理。

[0314] 表 12. 有或没有置换寡核苷酸，使用固定化的邻近成员，免疫-SDA 检测 IL-8 得到的平均 MOTA 值 (n = 6)

[0315]

在结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	含有 0. 1uM CMPR-9v2 置换寡核苷酸	没有置换寡核苷酸
0pM	97	220
10pM	54702	4888

[0316] 实施例 15 :实验示范使用 3' - 加帽的邻近探针的免疫-SDA。

[0317] 该实施例提供了如图 14 所述的方法的实验展示，即 3' - 加帽的、不可延伸的邻近探针在通过免疫-扩增检测分析物中的应用。在该实施例中的目标分析物是 SA。3' - 加帽的邻近探针 P1 是 LHP-3[帽]（如实施例 1 所示）。LHP-3[帽] 包含 3' 脱氧尿苷部分，

后者在 LHP-3[帽] 与互补的模板链 P2 杂交时,会阻止探针的延伸。在该实施例中,分析物结合部分是附着到 LHP-3[帽] 的 5' 端的生物素部分。邻近对的第 2 探针 P2 是 RHP-3(如实施例 1 所示),其包含 5' 生物素部分和可延伸的 3' 端。不加帽的对照探针 LHP-3 包含 5' 生物素部分和可延伸的 3' 端。扩增引物、接头寡核苷酸、报道探针、杂交封闭剂寡核苷酸和其它反应组分与实施例 8 相同。

[0318] 制备了含有 20pM 5' 生物素 RHP-3, 20pM 5' 生物素 LHP-3[帽], 10mM Tris-EDTA 缓冲液, 5ug/mL BSA, 和 0 或 10fM SA 的溶液。结合混合物任选地含有 100nM RDB-3p5 杂交封闭剂寡核苷酸(见表 13)。将结合混合物在 37°C 温育 2 小时, 然后稀释 10 倍, 并如实施例 8 所述进行 SDA。还制备了对照混合物, 其中 LHP-3[帽] 替换为不加帽的 LHP-3, 并如上所述进行 SDA。从各 SDA 反应得到的平均 MOTA 值显示在表 13 中。

[0319] 表 13. 使用 3' - 加帽的或不加帽的 P1 探针, 免疫-SDA 检测 SA 得到的平均 MOTA 值 (n = 4)

[0320]

在结合混合物中的 SA 浓度 (fM)	RDB-3p5 杂交封闭剂寡核苷酸的浓度			
	0	100 nM	0	100 nM
	P1= LPH-3[帽]		P1= LPH-3(无帽)	
0	36355	2985	55588	4683
10	N/D	133325	N/D	115143

[0321] 如不含 SA 的样品的 MOTA 值所指示的, 其中邻近探针 P1 含有 3' - 延伸帽 (LHP-3[帽]) 的反应表现出比含有不加帽的探针 (LHP-3) 的反应显著更低的背景信号。对于加帽的和不加帽的探针, 杂交封闭剂寡核苷酸的存在均抑制了背景信号, 相对于不含杂交封闭剂寡核苷酸的相同反应混合物低约 12 倍。尽管含有加帽的探针时的背景信号较低, 在有 10fM SA 存在时, 对于加帽的探针的信号比不加帽的探针略高, 这指示着在有目标分析物存在的情况下, 加帽的 P1 和不加帽的 P2 探针向可扩增产物的有效转化。该实施例还证实, 当探针-探针杂交体形成的重叠 3' 端中仅仅一个含有 3' OH 基团时, 也会形成分析物特异性扩增子。

[0322] 实施例 16: 揭示抗体-抗体相互作用作为目标-非依赖性的扩增子形成的来源的实验。

[0323] 该实施例证实, 邻近成员的 Ab 部分之间的相互作用促成目标-非依赖性的扩增。如实施例 9 所述, 在 10mM Tris-EDTA 缓冲液和 0.1mg/mL BSA 的溶液中, 制备了含有下述组分的 4 种实验溶液:

[0324] ● 实验溶液 1: 1nM Ab1-P1 和 1nM Ab2-SA-P2;

[0325] ● 实验溶液 2: 1nM Ab1-P1, 1nM 未缀合的 Ab2 和 2nM 未缀合的 P2;

[0326] ● 实验溶液 3: 1nM 未缀合的 Ab1, 2nM 未缀合的 P1 和 1nM Ab2-P2; 和

[0327] ● 实验溶液 4: 2nM 未缀合的 -P1 和 2nM 未缀合的 P2。

[0328] 将实验溶液在 37°C 温育 30 分钟, 然后系列稀释, 使得到的抗体、探针和缀合物的浓度在 pM 范围内。然后, 将稀释的混合物与 SDA 引物和酶混合, 如实施例 9 所述进行 SDA,

只是 SDA 反应混合物任选地含有 50nM RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸。而且,以抗体-探针缀合物的摩尔比的 2 倍使用未缀合的探针,以反映缀合物中已知的探针:抗体比 2:1。在反应中没有目标分析物存在,所以生成的 MOTA 值只可归于目标-非依赖性的探针转化。

[0329] 从各实验溶液得到的平均 MOTA 值记录在表 14 中。在不含杂交封闭剂寡核苷酸的反应混合物中,所有实验溶液的平均 MOTA 值都超过 100,000。在含有 50nM RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸的实验溶液 4 中,平均 MOTA 值降至 20,000 以下,表明对背景信号的抑制大于 5 倍。相比之下,由于杂交封闭剂寡核苷酸的存在,实验溶液 1 的 MOTA 值仅仅降低了约 2 倍,至约 59,000。表明在有 2 个完整的抗体探针缀合物存在的情况下,RDB-3p8 提供的封闭效率低于未缀合的探针 P1 和 P2 存在的情况。实验溶液 1 比实验溶液 4 更高的 MOTA 值暗示着,在实验溶液 1 中发生了抗体-介导的扩增子形成,并进一步提示 Ab1 和 Ab2 的目标-非依赖性的彼此粘附,使附着的探针部分足够靠近,以促进虚假的扩增子形成。显然,因为相互粘附的抗体对中的局部探针浓度比本体溶液中的总探针浓度高得多,杂交封闭剂寡核苷酸不能象在实验溶液 4 中(其中不能形成粘附抗体对)一样有效地抑制实验溶液 1 中的目标-非依赖性的探针转化。这与实验溶液 2 和 3 的结果一致,它们表现出与实验溶液 4 的结果相当的 MOTA 值,表明邻近对的 2 个探针部分必须是抗体-缀合的,以生成在实验溶液 1 中观察到的归因于抗体-介导的探针转化的高 MOTA 值。

[0330] 表 14. 通过邻近组分的不同组合生成的背景信号(平均 MOTA 值,其中 n = 6)

[0331]

实验溶液	邻近组分	含有 50nM RDB-3p8 杂交封闭剂寡核苷酸	没有杂交封闭剂寡核苷酸
1	Ab1-P1+Ab2-P2	59309	133521
2	Ab1-P1+Ab2+P2	14444	110704
3	Ab1+P1+Ab2-P2	17185	121298
4	P1+P2	19674	103114

[0332] 实施例 17:通过使用具有反向的相对序列方向的探针的免疫-SDA 检测 IL-8。

[0333] 该实施例提供了如图 1J 所述的构思的实验示范。抗体缀合物 Ab1-SA 和 Ab2-P2 如实施例 7 所述。在 4°C,以 2:1 的探针:抗体比,将 Ab1-SA 与探针 RBD-3v3 一起温育过夜,形成 Ab1-SA-P1。如在实施例 1 中所指出的,RBD-3v3 在它的 3' 末端附近含有生物素-部分。制备了含有 10mM Tris-EDTA 缓冲液,20pM Ab1-SA-P1,100pM Ab2-P2,1mg/mL BSA,50nM 杂交封闭剂寡核苷酸 RDB-3z8,和 0,0.1,0.25,0.5 和 1.0pM IL-8 的样品。在室温温育 3 小时后,将每种标准样品的等分试样以 1:10(体积/体积)稀释到含有 0.1mg/mL BSA 的 Tris-EDTA 缓冲液中,再以 1:10(体积/体积)稀释到含有 SDA 引物(SRH-1 和 SLH-2)、接头引物(adr-8)、报道探针(TBD10.2(D/R))和 50nM 杂交封闭剂(RDB-3z8)的溶液中。在 SDA 反应中,引物、接头和报道物浓度如实施例 18 所述,杂交封闭剂 RDB-3z8 浓度

是 50nM。从每种原始样品制备了这些稀释的混合物的 4 份复制品。然后将稀释的混合物在 37°C 温育约 10 分钟,再将每份混合物的 80uL 等分试样转入装有 20uL 已经预热至 52°C 的 SDA 酶溶液的单孔微孔中。密封微孔,置于 ProbeTec™ ET 装置中,并在 52°C 温育 1 小时。如实施例 9 所述,通过观察荧光增加来监测扩增。

[0334] 平均 MOTA 值记录在表 15 中。对没有 IL-8 的样品得到了低 MOTA 值,而增加水平的 IL-8 导致逐渐升高的 MOTA 值,确证了通过免疫-SDA 方法检测 IL-8,其中一个探针通过在它的 3' 端附近的连接结合到抗体上,如图 1J 所述。结果还证实,包含仅仅一个可延伸的 3' OH 基团的探针-探针 (P1-P2) 双链体可以生成分析物特异性扩增子。

[0335] 表 15. 通过应用反向探针 (rbd-3v3) 的均相免疫-SDA 检测 IL-8

[0336]

结合混合物中的 IL-8 浓度 (pM)	平均 MOTA (n = 4)
0	3069
0.1	23098
0.25	81641
0.5	118338
1.0	128724

[0337] 实施例 18 :通过使用内部核酸对照品和邻近对的免疫-SDA 定量 IL-8。

[0338] 该实施例解释了使用分别由核酸对照品和从分析物-结合的邻近成员生成的目标扩增子的共扩增产生的 2 个荧光信号的比率,来绝对定量测试样品中的目标分析物 (在该情况下,是 IL-8)。根据本发明,最初形成多个标准样品和至少一个测试样品。多个标准样品各含有已知起始量的核酸对照序列、已知起始量的目标分析物和一定量的本发明的邻近对。典型地,多个标准样品的不同成员具有不同已知量的目标分析物。测试样品含有已知起始量的核酸对照序列、未知量的非核酸目标分析物和一定量的邻近对。要通过绝对定量方法测定的是该未知量的目标分析物。

[0339] 在标准样品和测试样品中,通过上述的本发明的任何方法,将同时结合到相同目标分析物分子上的邻近成员的寡核苷酸部分转化成扩增子。然后共扩增所得到的每种标准样品和测试样品中的扩增子和核酸对照序列。在每种样品内,扩增子和对照序列的扩增可以生成可单独分开检测的荧光发射,所以,在扩增过程中,可以在不同荧光发射波长独立地监测同一样品内的扩增子和对照核酸的扩增。

[0340] 可以将扩增过程中得到的荧光值展示为称作“实时荧光图”的二维图,将测量时间点指定为横坐标,荧光值指定为纵坐标。图 15A 显示了在下述的实验中共扩增目标和对照扩增子得到的样品的双色实时荧光图的实例。在本实施例中使用的检测波长是荧光染料罗丹明和荧光素特征性的波长,它们分别用于标记对目标扩增子和对照核酸特异性的报道寡核苷酸。

[0341] 对标准样品和测试样品中的每一种,在包含扩增间隔的许多 (n) 个时间点,在 2 个

独立的检测波长测量荧光强度。对于给定的样品  $i$ ，每个时间点 ( $t_p$ ) 具有 2 个相关的荧光值，一个对应着扩增的目标扩增子 ( $FT(t_p)_i$ )，另一个对应着扩增的对照核酸 ( $FC(t_p)_i$ )。将这 2 个在相同时间间隔从同一样品收集到的读数称作荧光值的“匹配对”。

[0342] 为了分析的目的，假定 2 个或多个不同样品的实时荧光图是时间上连贯的 (temporally coherent)；也就是说，2 个或多个不同样品的相同时间点对应着在各样品中启动扩增后经过时间的相同测量。来自不同样品的这些等同的时间点称为“一致的”。在不同样品的原始荧光图在时间上不连贯的情况下，可以使用本领域已知的方法从原始数据构建时间上连贯的“标准化的”图（见，例如，美国专利号 5,863,736 和 6,066,458，其内容在这里整体引作参考）。

[0343] 对于特定样品  $i$  的实时荧光图内的每个时间点 ( $t_p$ )，可以根据下述的关系（方程 1），使用每个匹配对的荧光值计算出信号比  $SR(t_p)_i$ ：

$$[0344] \quad SR(t_p)_i = [FT(t_p)_i - FT(\text{碱基})_i] / [FC(t_p)_i - FC(\text{碱基})_i] \quad \text{方程 1}$$

[0345] 其中，基线荧光测量值  $FT(\text{碱基})_i$  和  $FC(\text{碱基})_i$  对应着可检测地扩增目标和对照扩增子之前的各自的荧光强度。实际上， $FT(\text{碱基})_i$  是取在扩增样品  $i$  的过程中前几个时间点测得的目标扩增子荧光的平均值， $FC(\text{碱基})_i$  是取在那些相同的时间点测得的平均核酸对照荧光，尽管也可以使用基线荧光的其它近似值。

[0346] 因此，从扩增的样品得到的每对实时的目标和对照荧光图，会产生  $n$  个信号比，其中  $n$  是图中的时间点的数目。同样地，在许多 ( $k$ ) 个样品中一致的每个时间点，会产生  $k$  个“一致的”与其相关的信号比  $SR(t_p)_i$ ，其中每个信号比对应着在一致的时间点  $t_p$  时的样品  $i$ 。

[0347] 为了关联由样品产生的信号比和包含在样品中的分析物 (IL-8) 的量，如下分析了对含有不同已知量的 IL-8 的许多 ( $k$ ) 个标准样品测定的信号比。首先，根据方程 2，对每组一致的信号比（即，源自相同的时间点  $t_p$  的信号比，在所有  $k$  个标准样品中）针对已知分析物浓度进行线性回归，方程 2 定义了“校准”线，它联系量  $\log(SR(t_p)_i)$  和  $\log([IL-8]_i)$ ，且具有由回归程序确定的斜率  $m(t_p)$  和截距  $b(t_p)$  值：

$$[0348] \quad \log(SR(t_p)_i) = \{m(t_p) \times \log([IL-8]_i)\} + b(t_p) \quad \text{方程 2}$$

[0349] 对  $n$  组一致的信号比中的每一个重复该操作，生成由  $n$  对斜率和截距值定义的  $n$  条校准线，每一对值对应着许多 ( $k$ ) 个标准样品中的不同的一致的时间点。从该分析得到的  $n$  条校准线中的一条 ( $t_p = 8$  分钟) 显示在图 15B 中。

[0350] 然后，以拟合度标准为基础，选择与斜率和截距值的“最佳”对相对应的“最佳”测量时间点 ( $t_{p_{best}}$ )，并根据方程 1，从在与选择的“最佳”时间点一致的时间点得到的荧光测量值计算出测试样品的信号比。然后，借助于方程 3，可以从在最佳测量时间点的测试样品的信号比  $SR(t_{p_{best}})$ 、和“最佳”对的斜率  $m(t_{p_{best}})$  和截距  $b(t_{p_{best}})$  值，计算出测试样品  $j$  中的分析物 IL-8 的量：

$$[0351] \quad \log([IL-8]_j) = \{\log(SR(t_{p_{best}})) - b(t_{p_{best}})\} / m(t_{p_{best}}) \quad \text{方程 3}$$

[0352] 可以使用各种统计学标准来确定“最佳”校准线或对应的“最佳”测量时间  $t_{p_{best}}$ 。许多这样的统计学标准已经记载在美国专利号 5,863,736 和 6,066,458 中。还可以使用选择最佳时间的其它统计方法。

[0353] 如下进行实验操作。抗体-探针缀合物 Ab1-SA-P1 和 Ab2-P2 如实施例 7 所述。

制备了含有 10mM Tris-EDTA 缓冲液, 20pM Ab1-SA-P1, 100pM Ab2-P2, 1mg/mL BSA, 25nM 杂交封闭剂寡核苷酸 RDB-3p8, 和 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 和 100pM IL-8 的标准样品。在室温温育 3 小时后, 将每种样品的等分试样以 1 : 10 (体积 / 体积) 稀释到含有 0.1mg/mL BSA 的 Tris-EDTA 缓冲液中, 然后进一步以 1 : 100 (体积 / 体积) 稀释到含有 SDA 引物 (SRH-1 和 SLH-2), 接头引物 (adr-8 和 adqs-2), 报道探针 (TBD10.2 (D/R) 和 ALTD6.9 (F/D)), 50nM 杂交封闭剂 (RDB-3p8), 和 100,000 拷贝的对照核酸 (IQS-2) 的溶液中。从每种原始标准样品, 制备了 2 份这样的稀释的混合物。然后, 将稀释的标准混合物在 37°C 温育约 10 分钟, 再将每份混合物的 80uL 等分试样转入装有 20uL 已经预热至 52°C 的 SDA 酶溶液的单分开微孔中。然后密封微孔, 置于 ProbeTec™ ET 装置中, 在 52°C 温育 1 小时。在这 1 小时的温育过程中, 通过 2 个光通道记录每个微孔的荧光, 其中的一个对罗丹明荧光是特异性的, 另一个对荧光素荧光是特异性的。在 1 小时的反应过程中, 以每 1- 分钟的间隔记录一对荧光读数 (1 个为荧光素和 1 个为罗丹明), 对每个 SDA 反应得到 60 对荧光读数。

[0354] 制备了一组含有浓度为 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 和 100.0pM 的 IL-8 的测试样品, 并进行竞争性双色 SDA, 如上面关于标准样品所述。对照寡核苷酸 (IQS-2) 的量等同于标准样品中的那些。

[0355] 在本实施例中, 对于 5 份 IL-8 标准样品中的每一份, 使用从共 10 份 SDA 反应得到的双色荧光数据, 如下构建校准方程。对于 10 份扩增的标准样品中的每一份 (i), 根据方程 1, 对 60 个时间点中的每一个 (tp) 计算出信号比  $SR(tp)_i$ 。如上面方程 2 所述, 对从标准样品得到的每组一致的信号比针对已知的 IL-8 浓度进行线性回归, 对 60 个时间点中的每一个, 得到与不同的“校准”线相对应的斜率 ( $m(tp)$ ) 和截距 ( $b(tp)$ ) 值。将拟合度标准应用于校准线, 确定了该多个标准样品的最佳测量时间是  $tp = 8$  分钟。 $\log(SR(tp = 8 \text{ 分钟}))$  相对于  $\log([IL-8])$  的图和对应的校准线显示在图 15B 中, 它揭示了在分析物浓度的 10,000 倍范围内, 信号比和 IL-8 浓度之间的线性关系。

[0356] 对上述的各种测试样品, 从荧光数据计算出了信号比 ( $tp = 8$  分钟)。然后, 使用与源自标准曲线的  $tp = 8$  分钟的校准线相对应的最佳斜率和截距值, 用方程 3 计算测试样品的 IL-8 浓度。

[0357] 表 16 所示的结果揭示了计算的和实际的 IL-8 浓度之间的吻合, 这证实了本发明的方法对目标分析物的准确定量。

[0358]

测试样品	实际的 IL-8 浓度	计算的 IL-8 浓度
1	0.01 pM	0.02 pM
2	0.1 pM	0.09 pM
3	1.0 pM	0.9 pM
4	10 pM	6.8 pM
5	100 pM	92.0 pM

[0359] 现在,已经参考某些代表性的实施方案和细节完整地描述了本发明,对本领域的普通技术人员而言显而易见,可以对其进行改变和修正,而不背离如本文所述的本发明的精神或范围。本领域的普通技术人员能容易地实施本文所述的所有方法和操作。

图 1A  
抗原与缀合寡核苷酸的抗体的混合

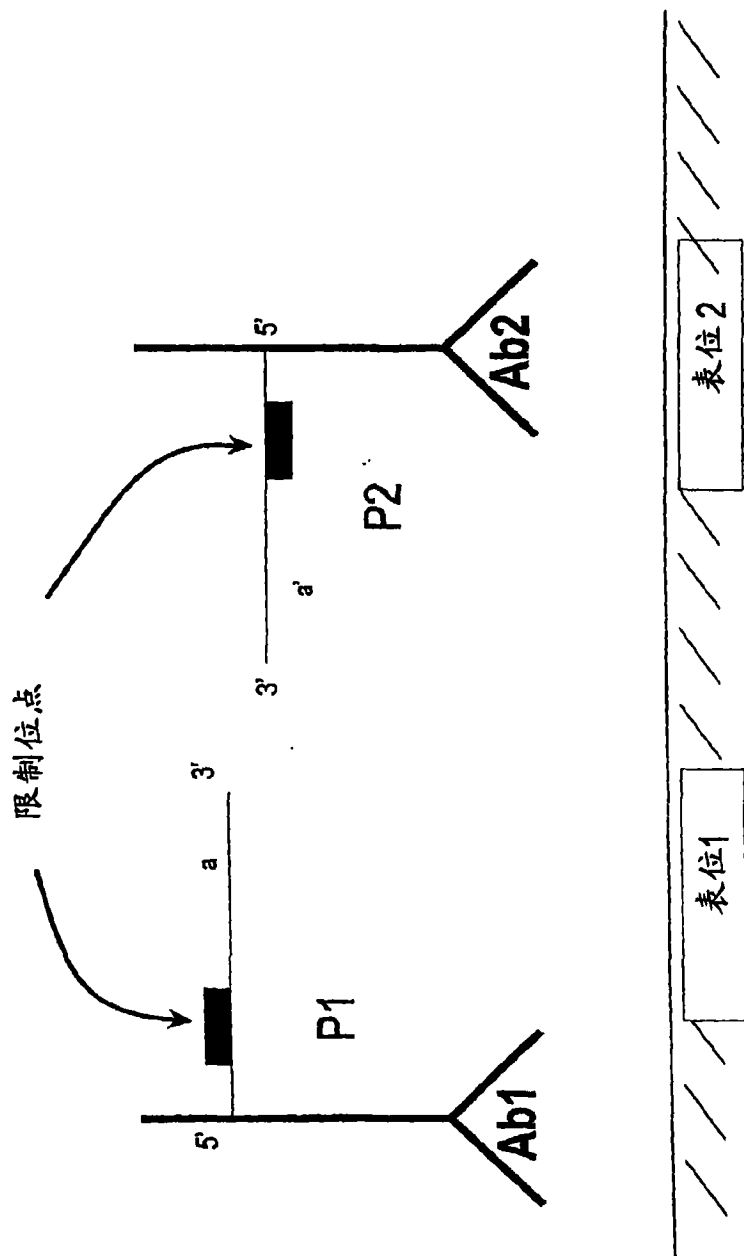




图 1B  
邻近寡核苷酸探针的杂交

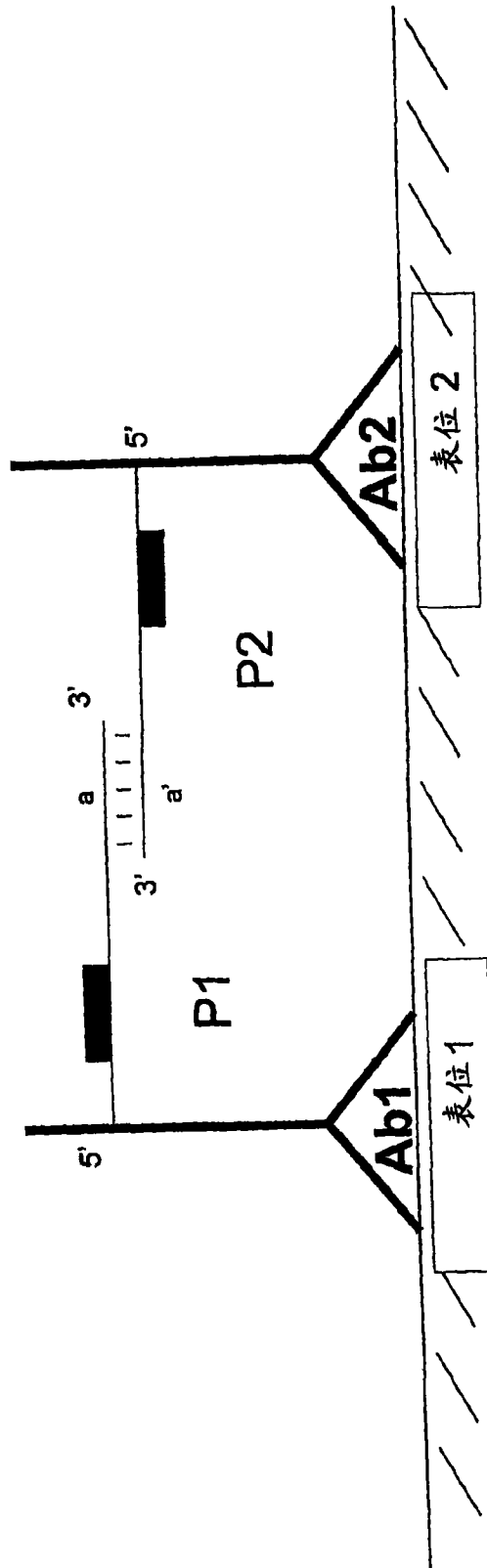


图 1C  
聚合酶延伸和限制酶产生切口

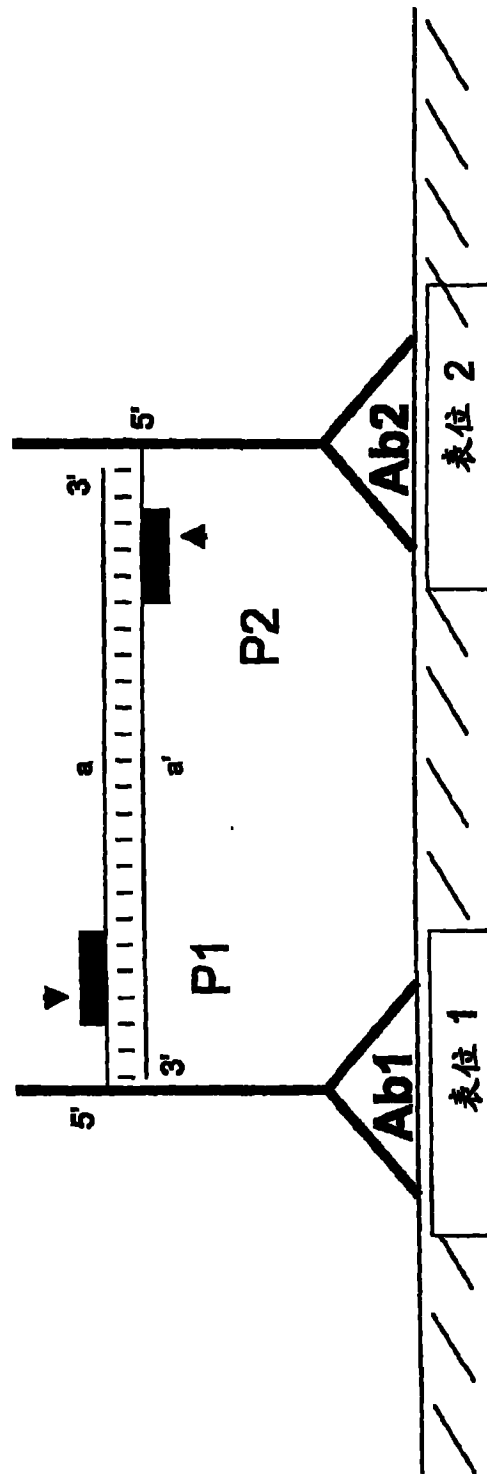


图 1D  
延伸, 置换和线性扩增

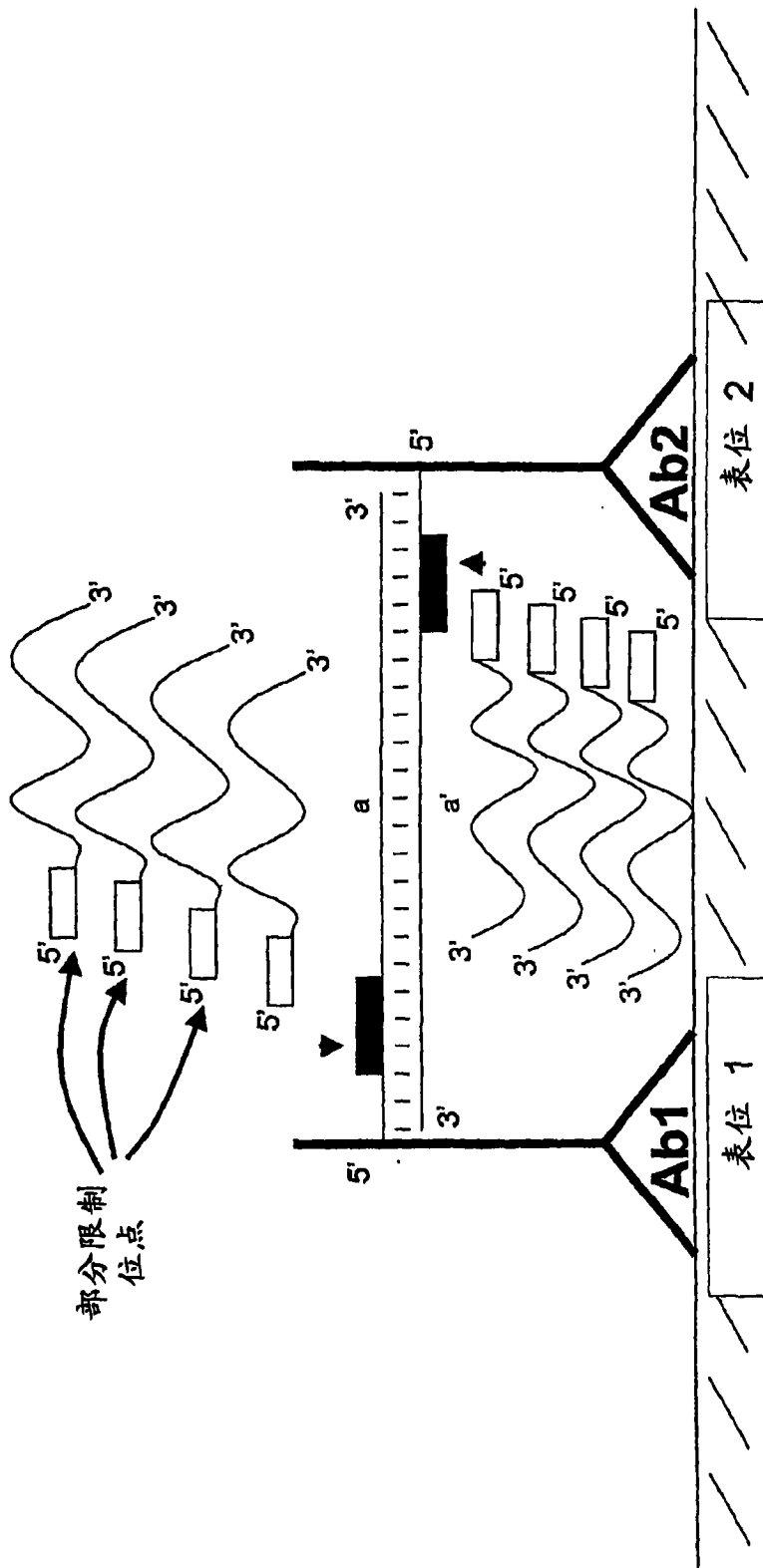


图 1E  
杂交, 聚合酶延伸, 切口产生和指数式扩增

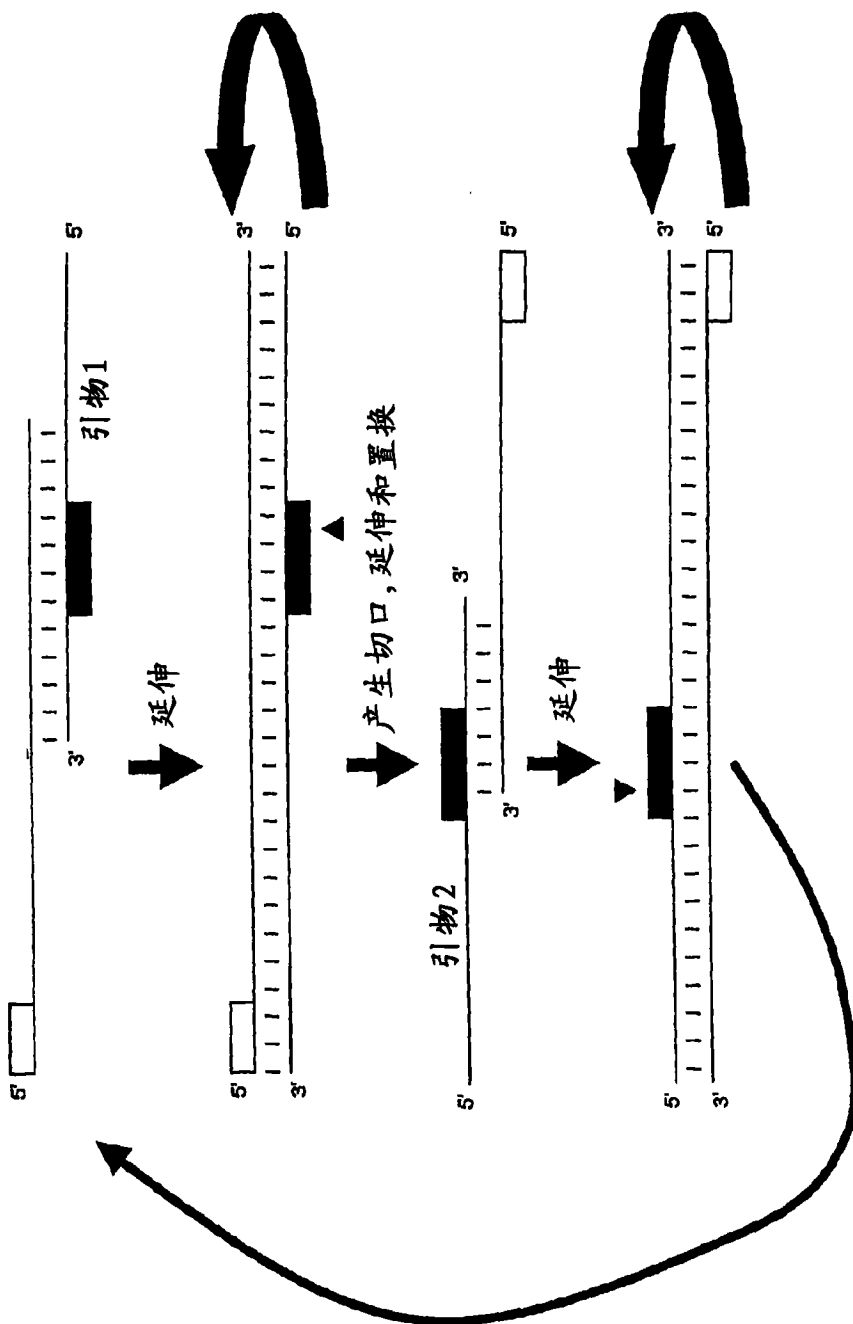


图 1F  
抗原与缓合寡核苷酸的抗体的混合

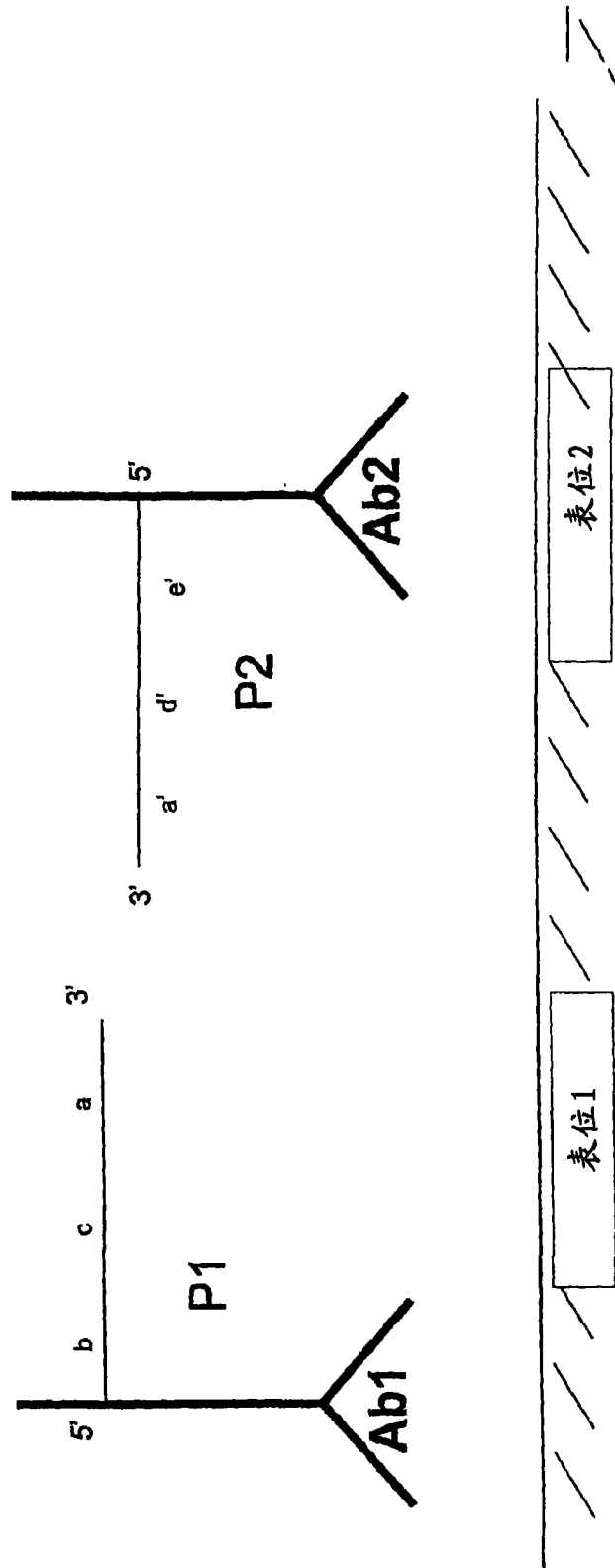


图 1G  
邻近寡核苷酸探针的杂交

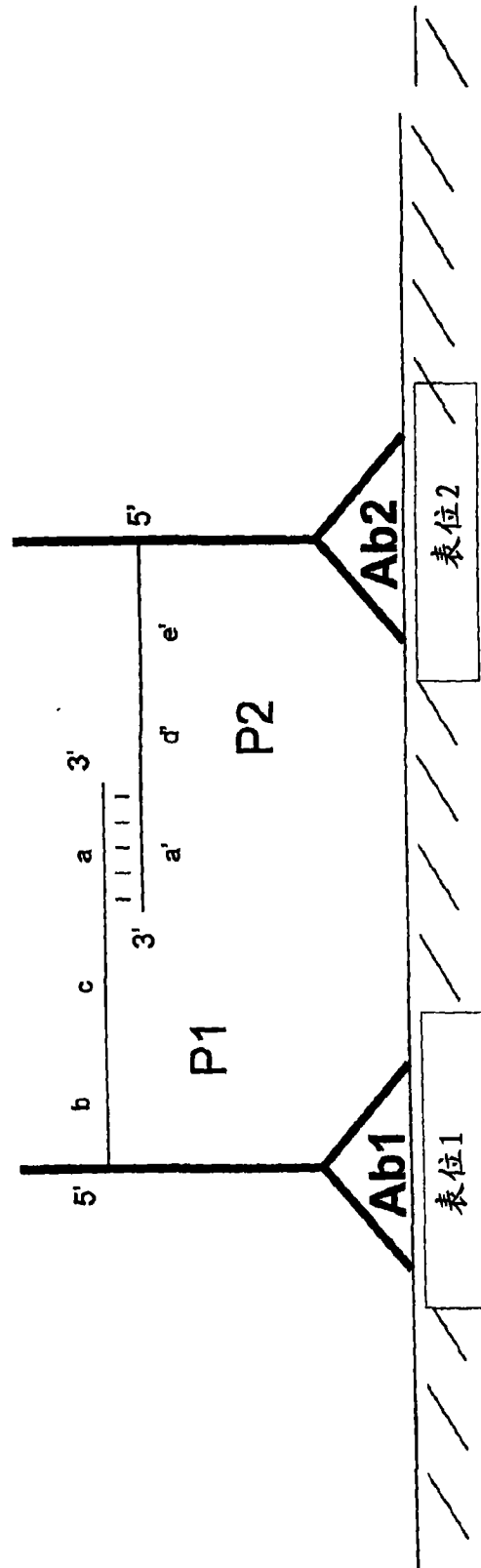


图 1H  
用聚合酶延伸寡核苷酸探针

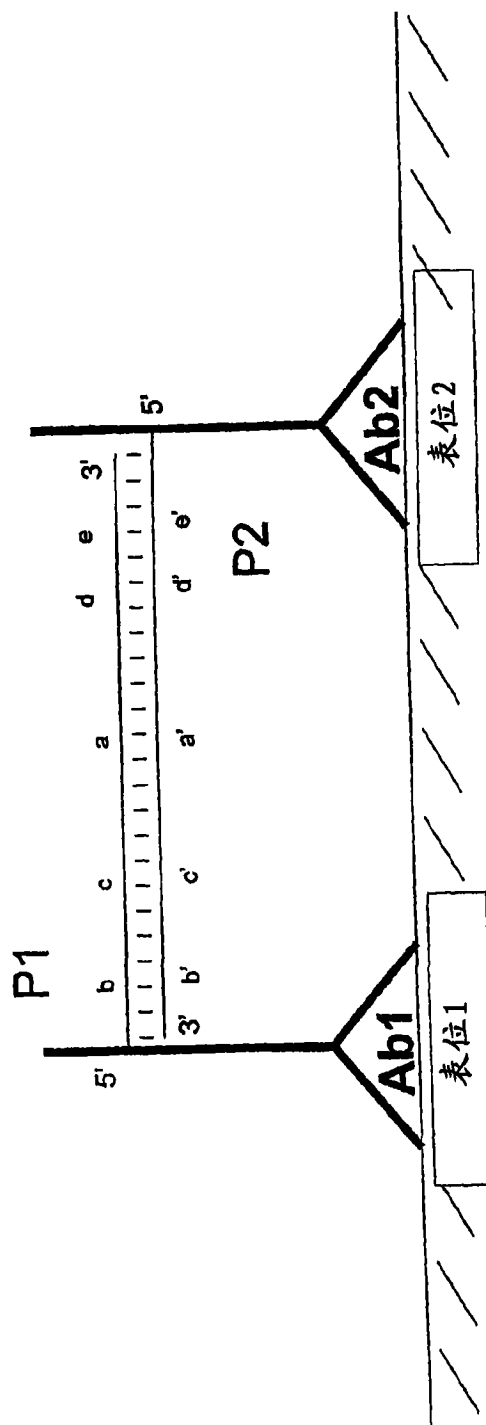


图 11  
探针-延伸双链体变性和结合SDA引物 (SP1, SP2)  
和缓冲器 (SB1, SB2)

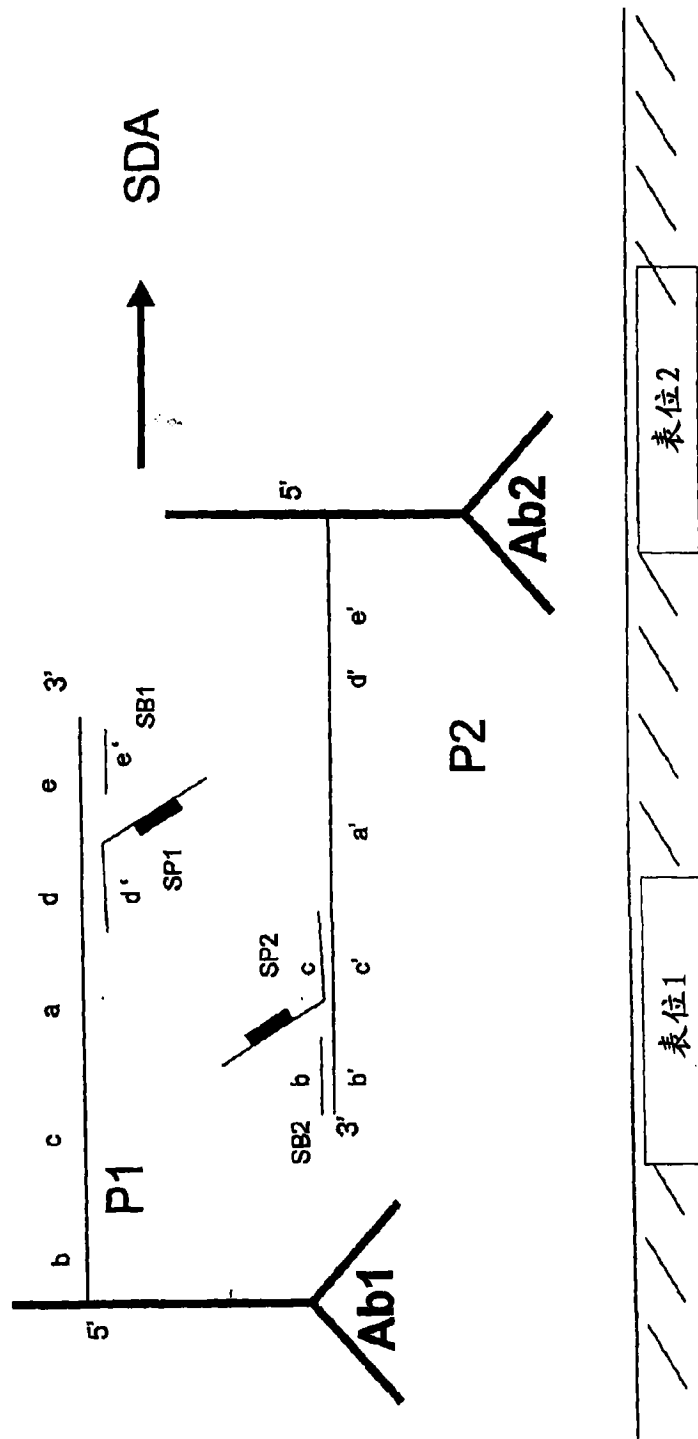




图 1J  
从相对序列方向的杂交探针形成扩增子

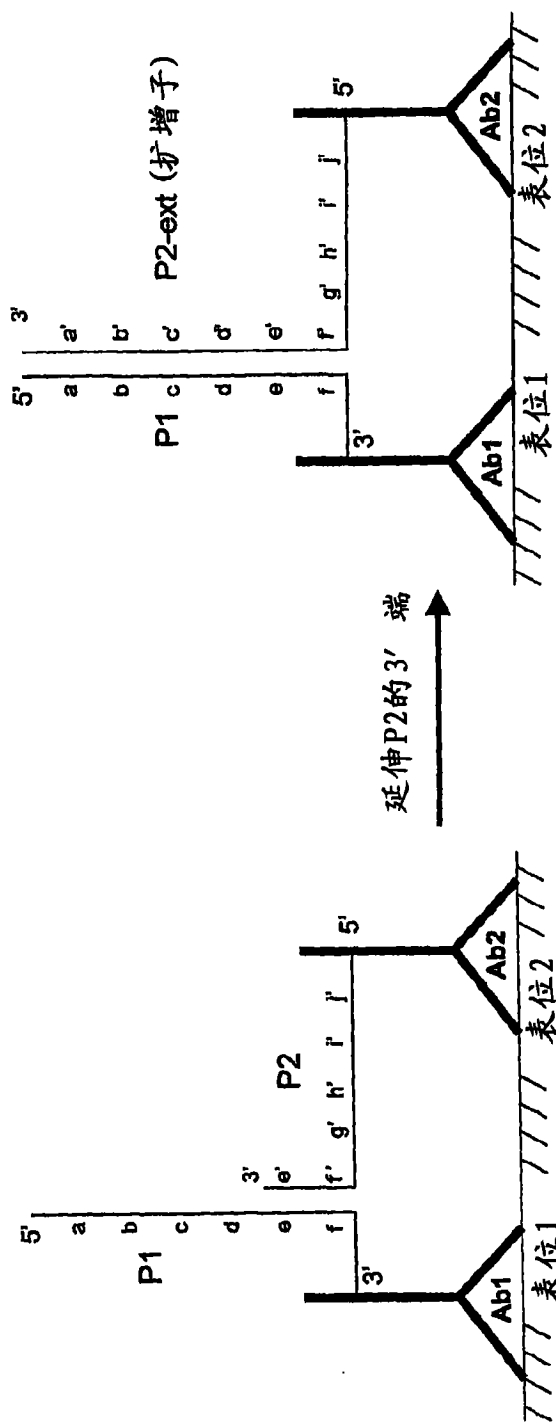


图 2A  
夹板寡核苷酸的杂交

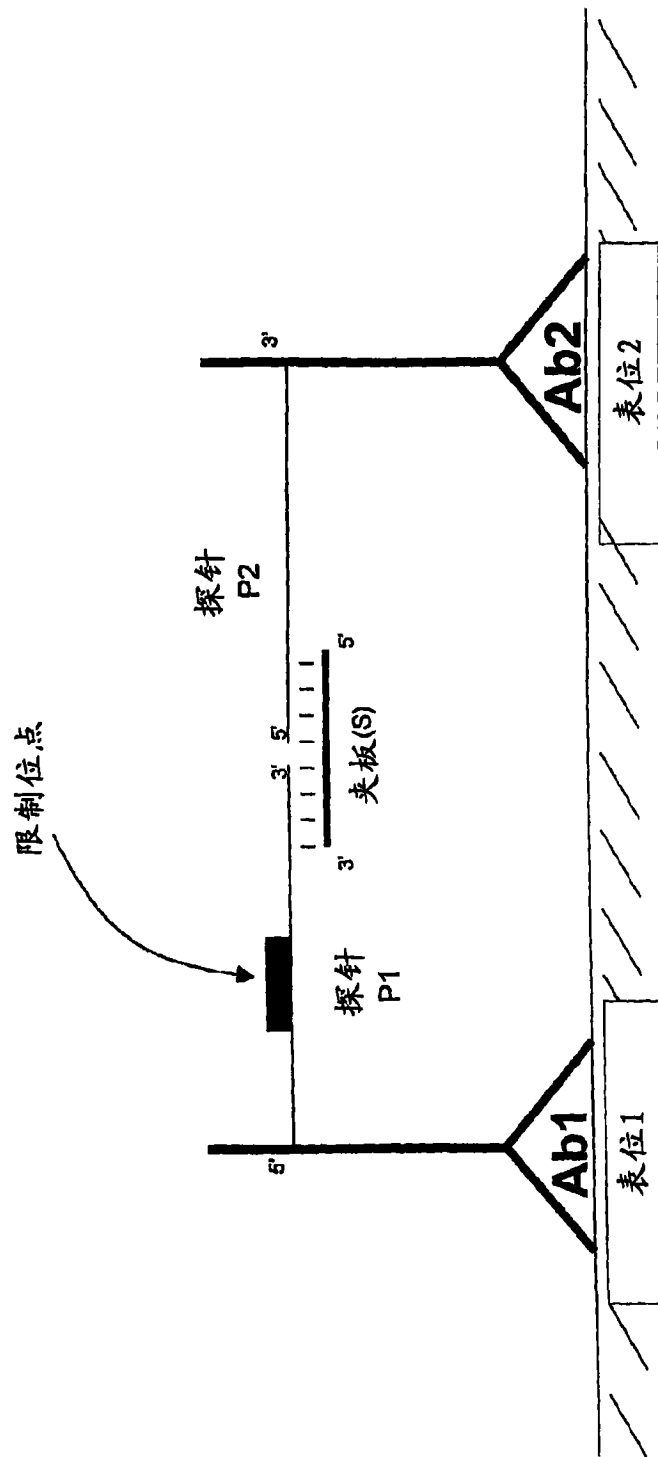


图 2B  
邻近寡核苷酸探针的连接

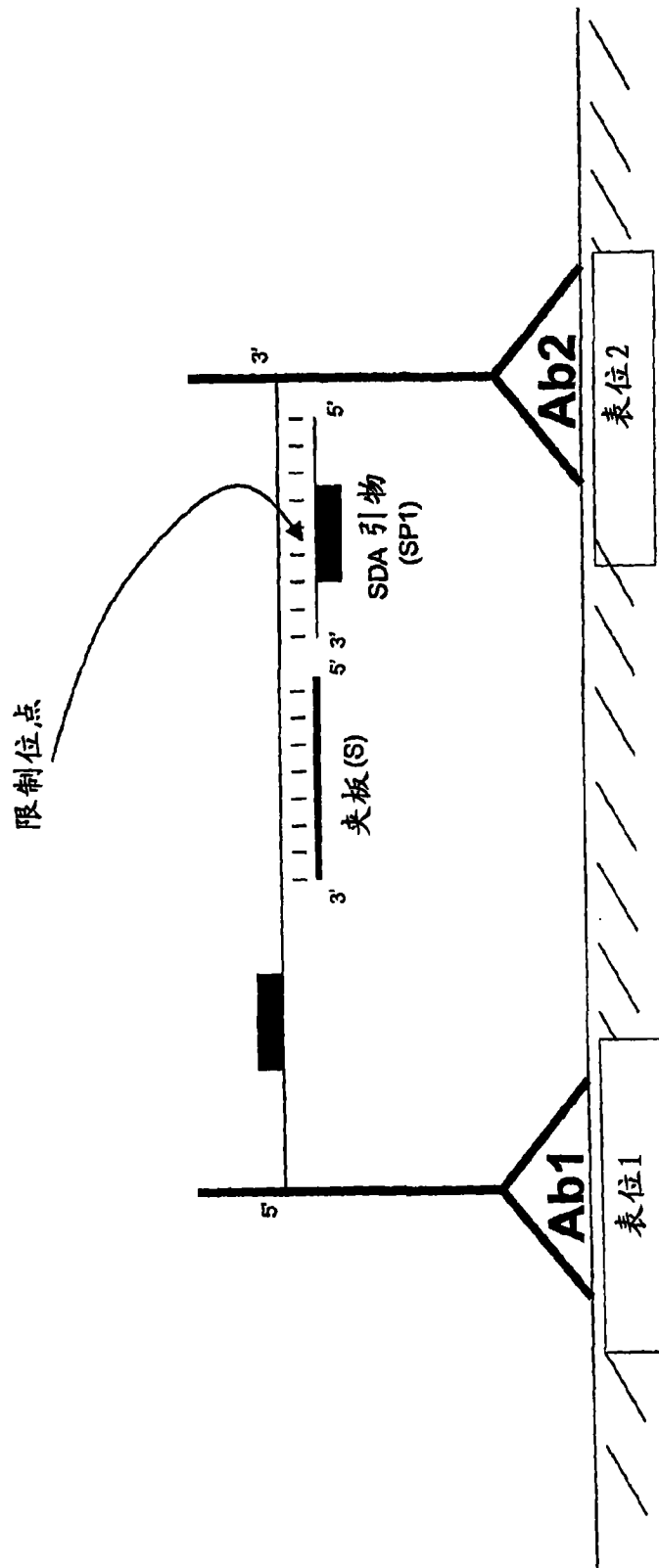


图 2C  
DNA聚合酶延伸和置换

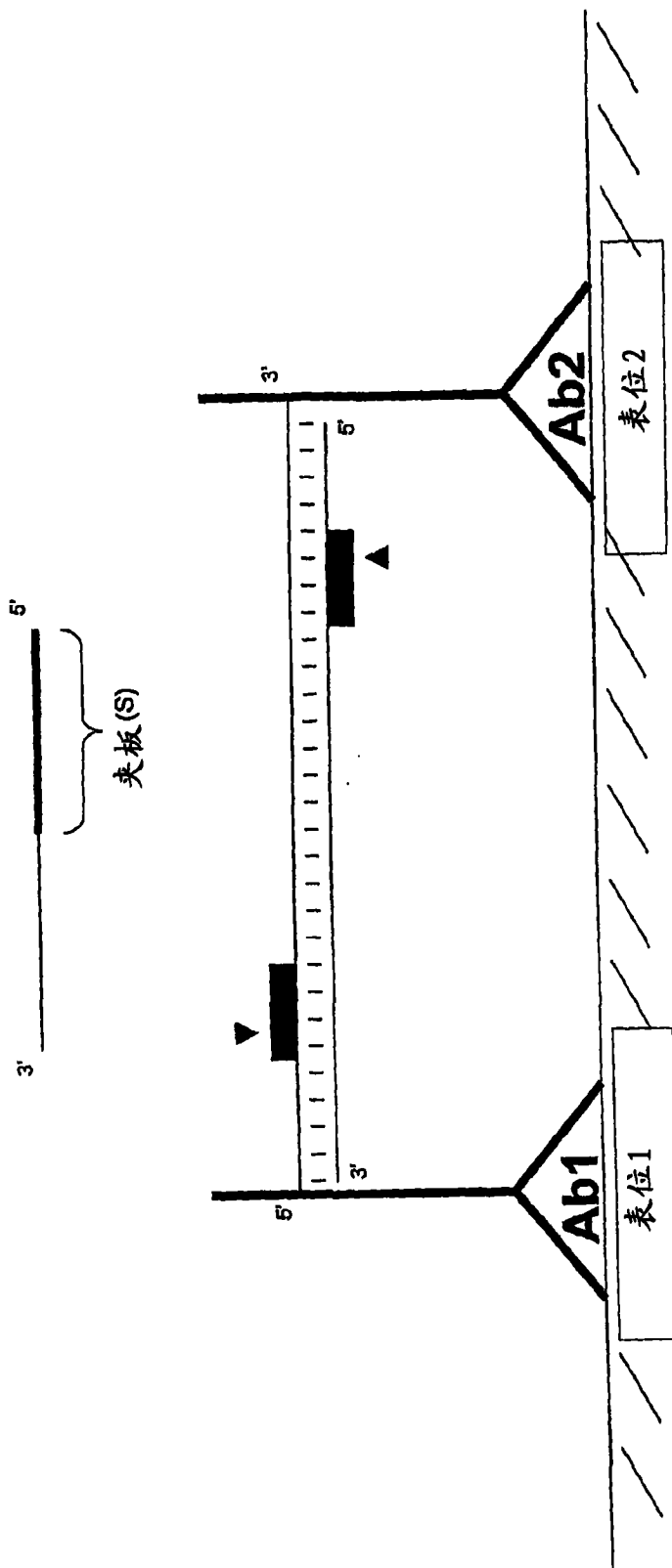


图 2D  
2个杂交的探针用于连接第3个探针

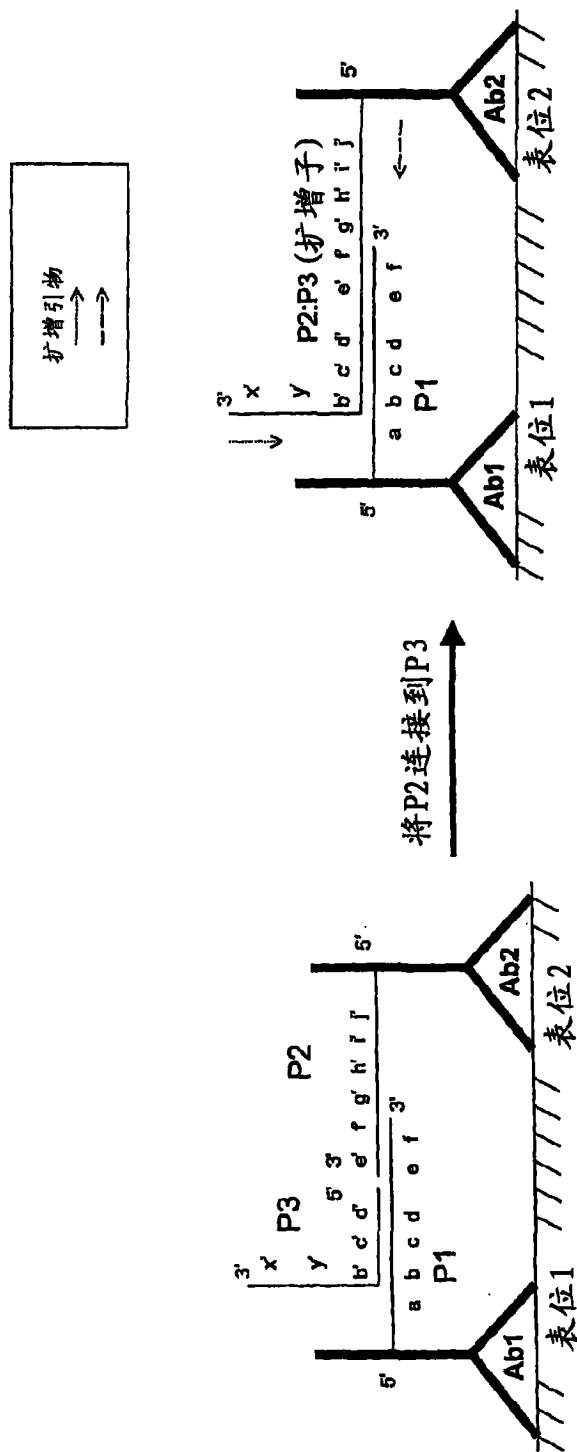


图 2E  
2个相对序列方向的杂交的探针用于连接第3个探针

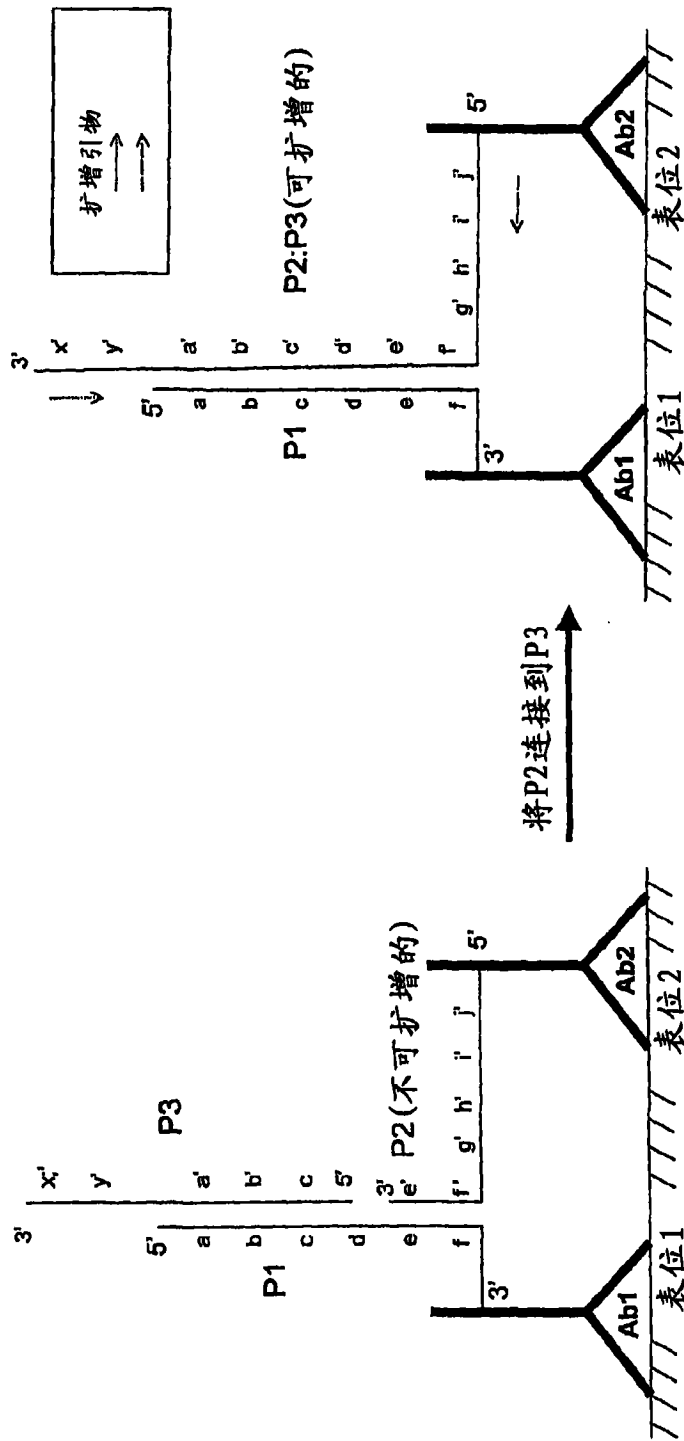


图 3A  
单系寡核苷酸

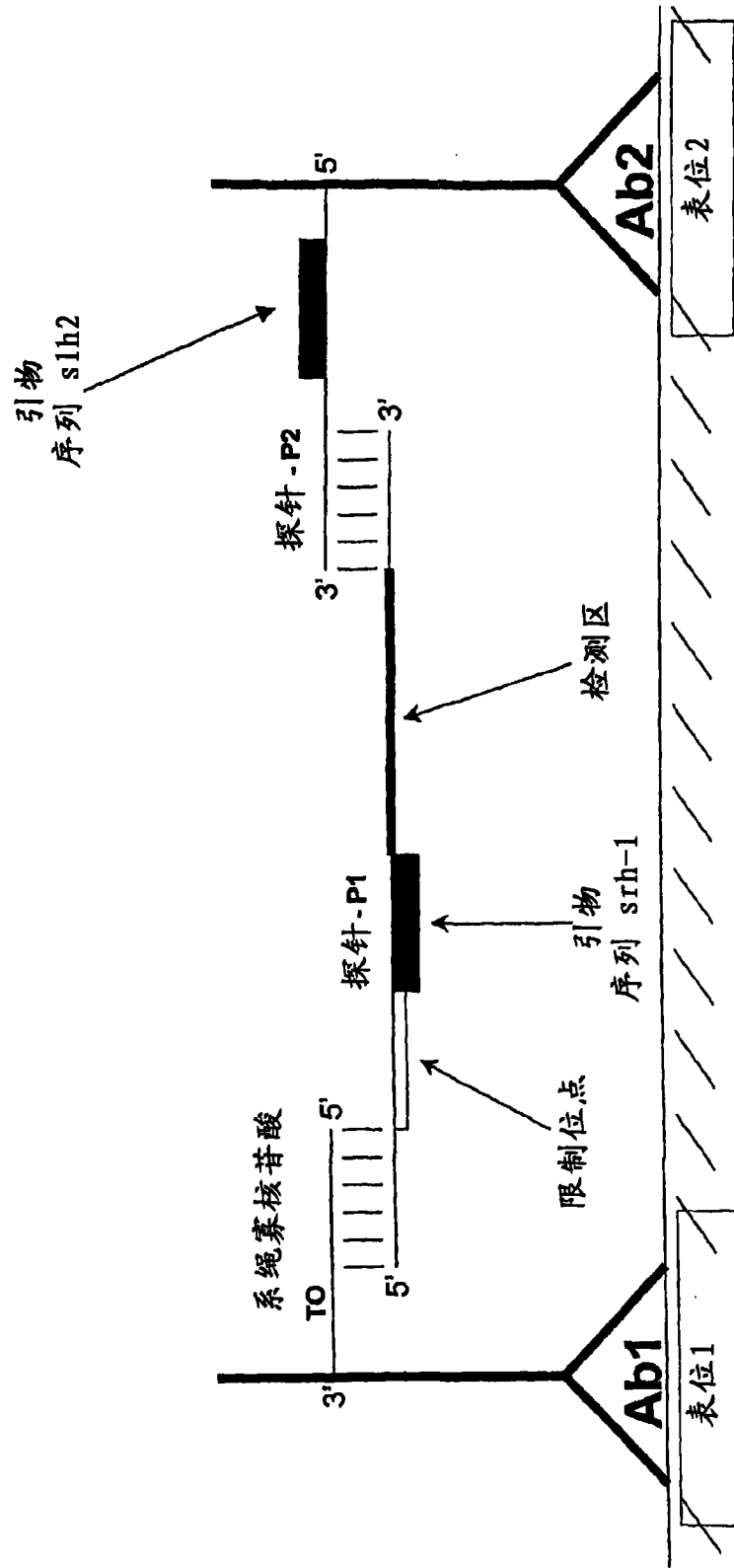


图 3B  
单系绳寡核苷酸: 延伸和置换

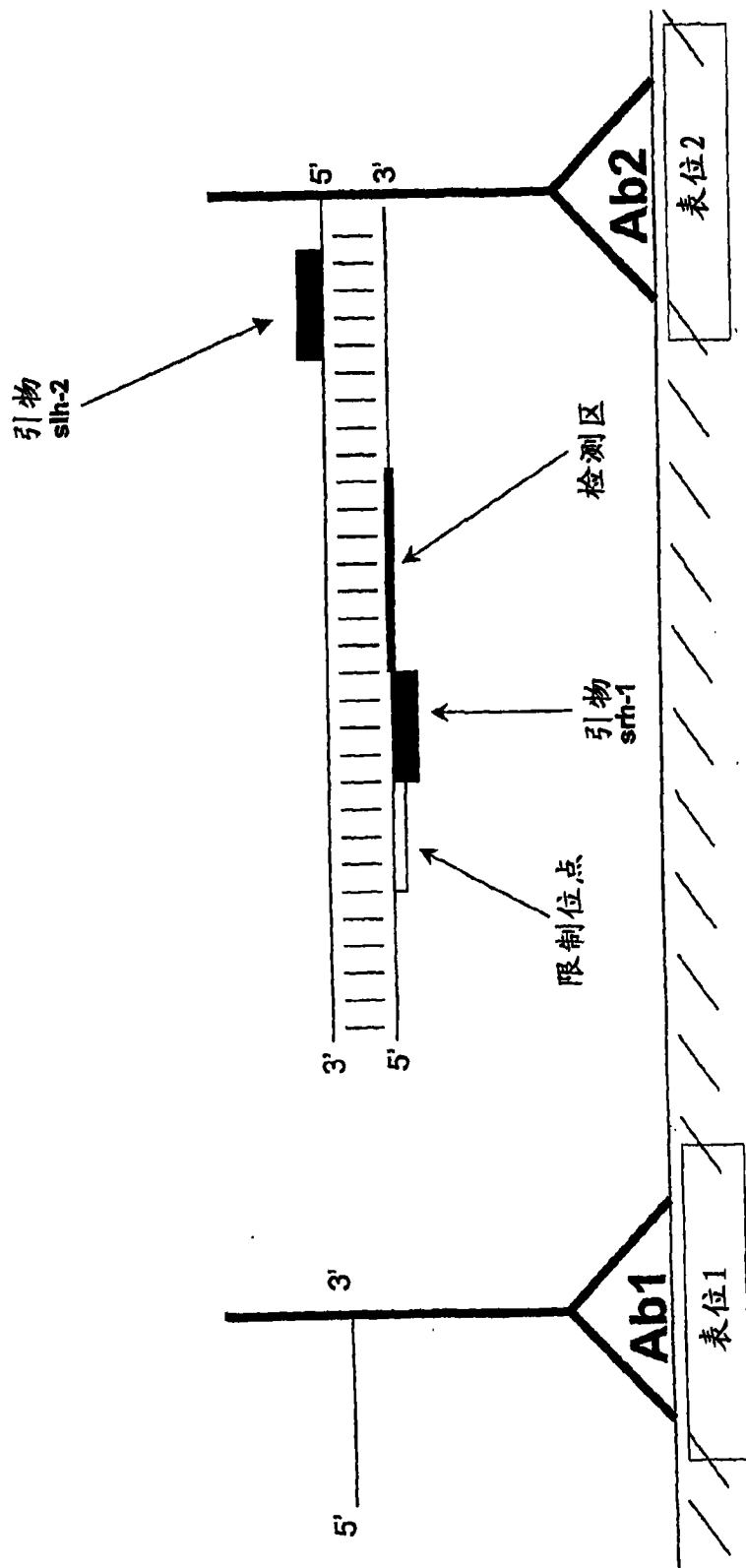
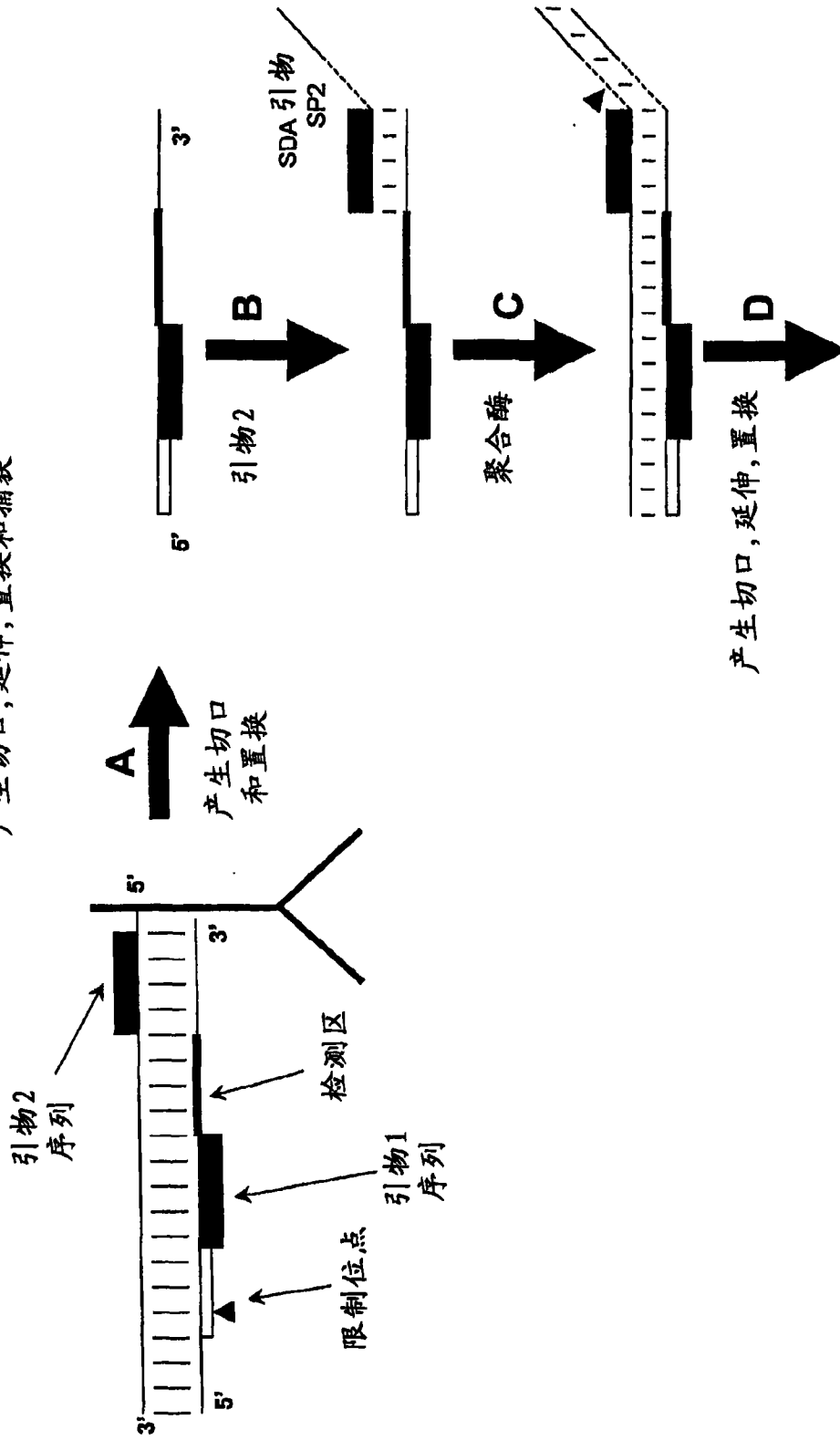




图 3C  
产生切口, 延伸, 置换和捕获



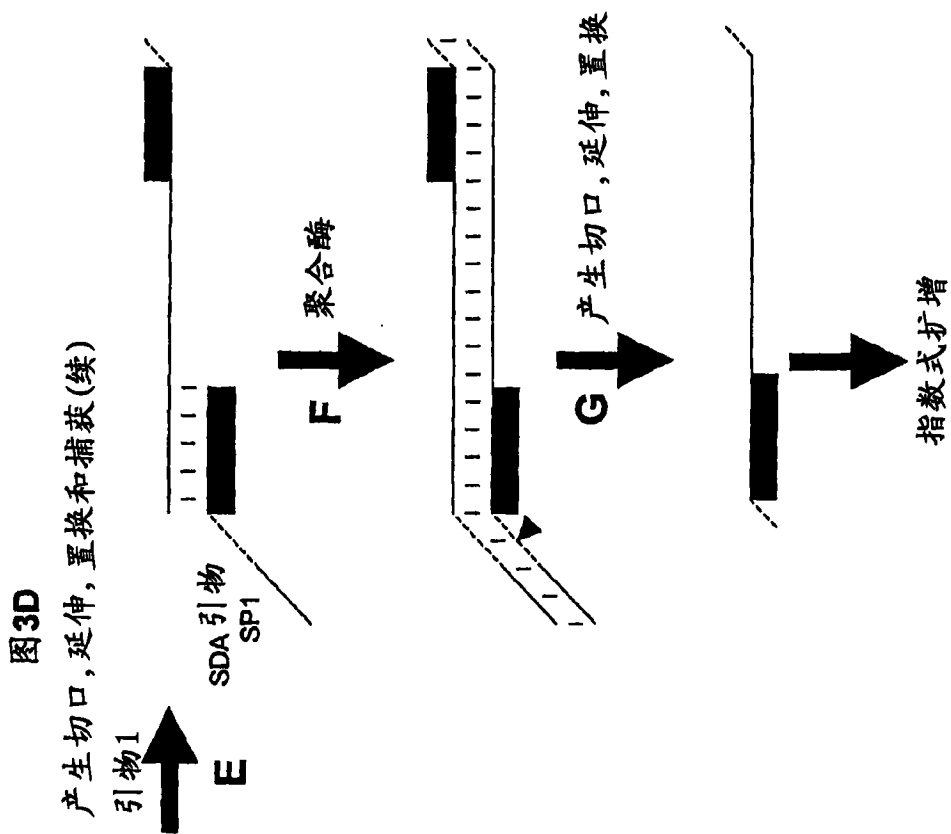


图 3E  
夹板探针(3' /3' 构型)

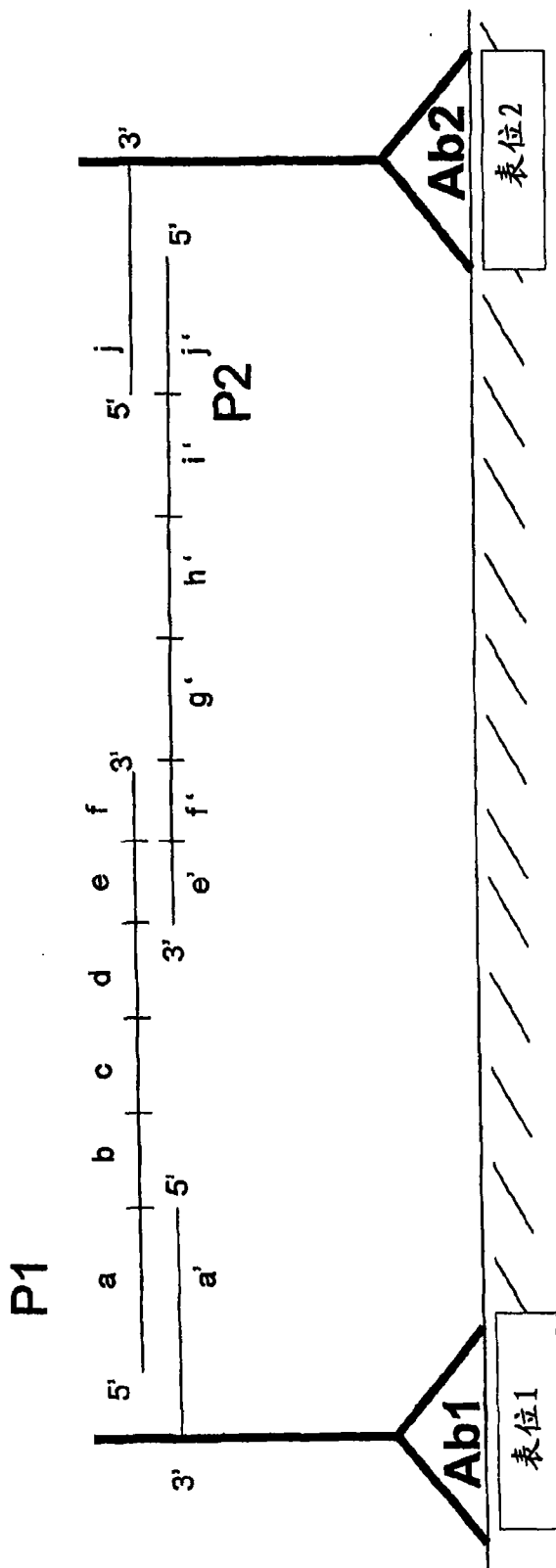


图 3F

夹板探针的延伸/置换

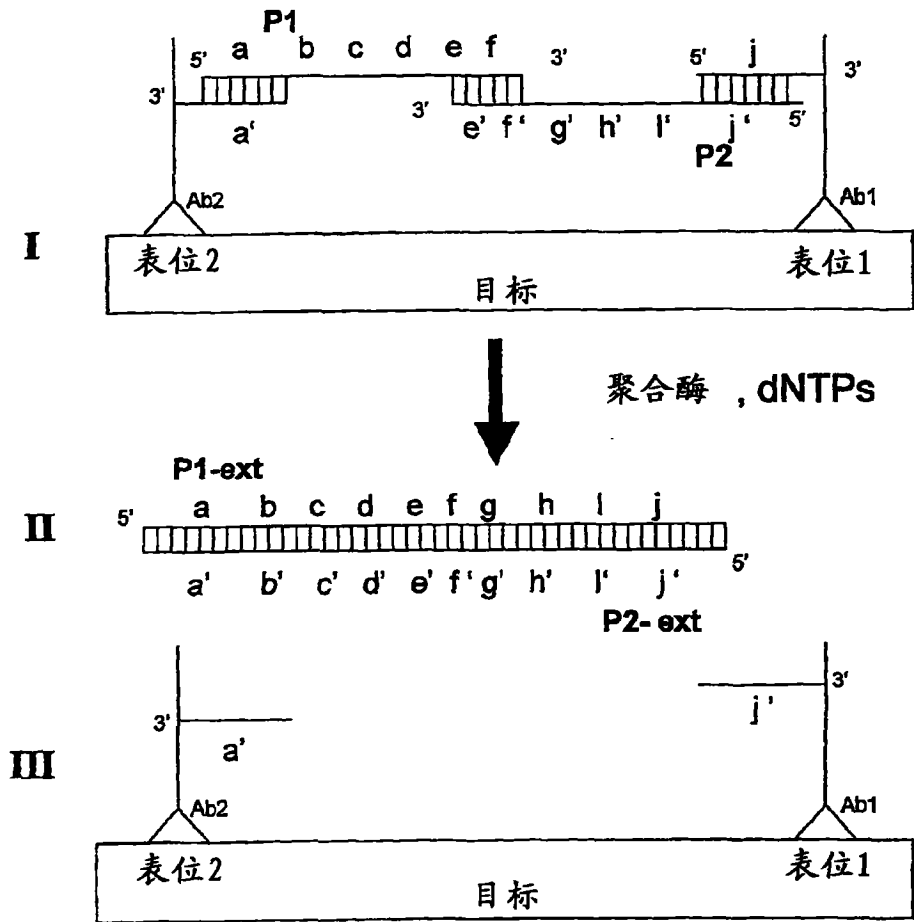


图 3G  
目标介导的探针循环

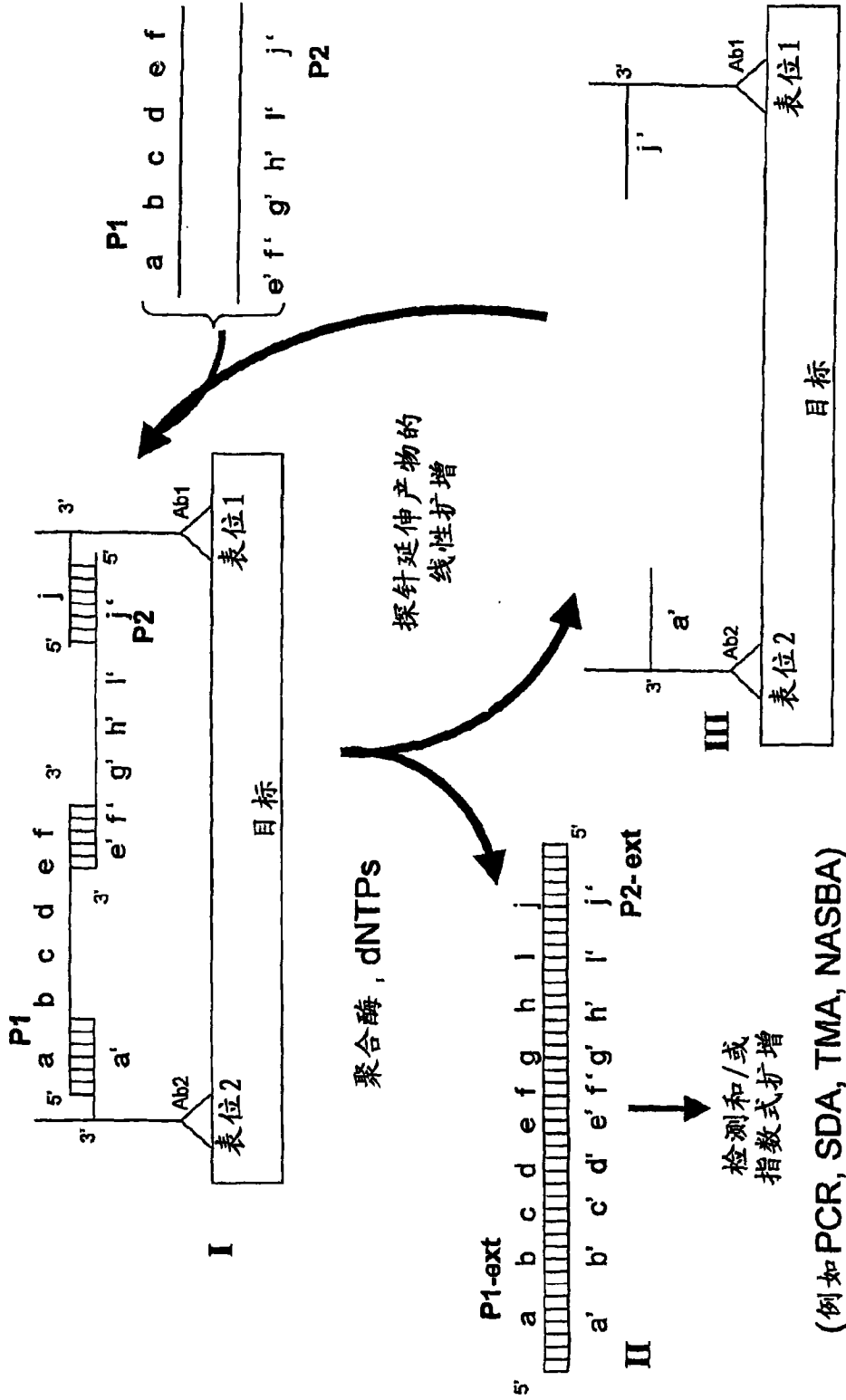


图 3H  
夹板探针 (5' / 3' 构型)

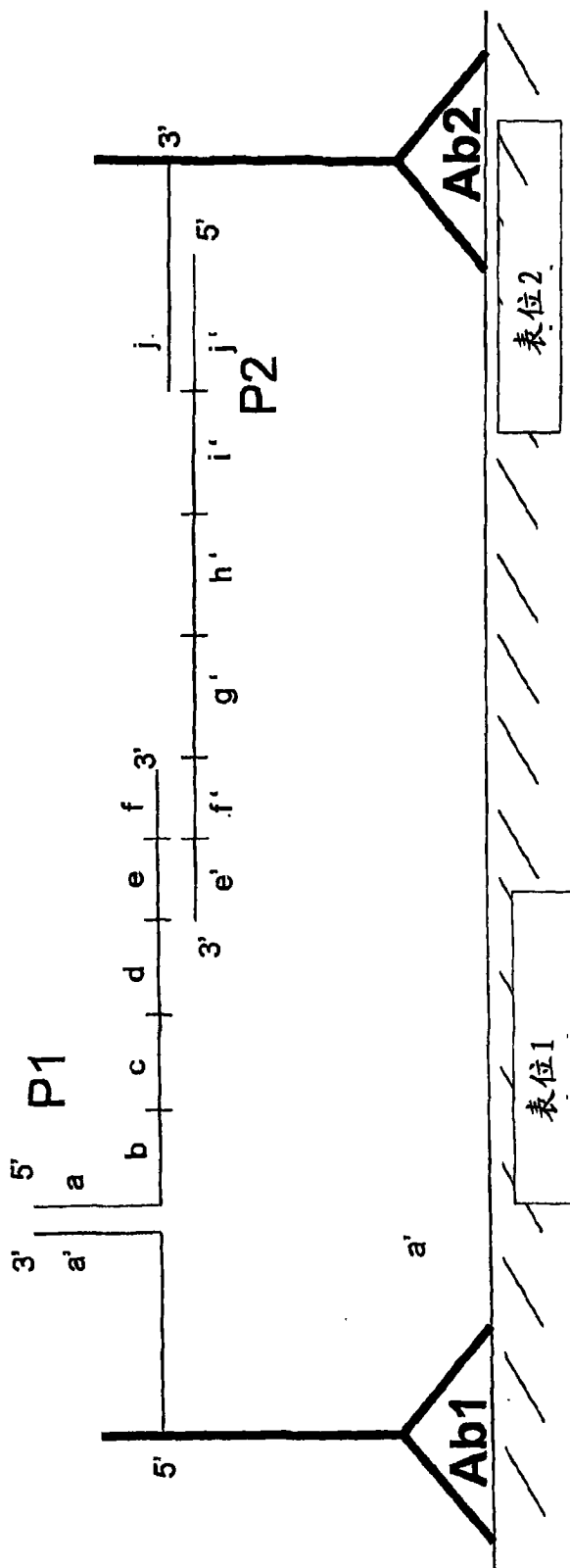


图 3I  
夹板探针 (5' / 5' 构型)

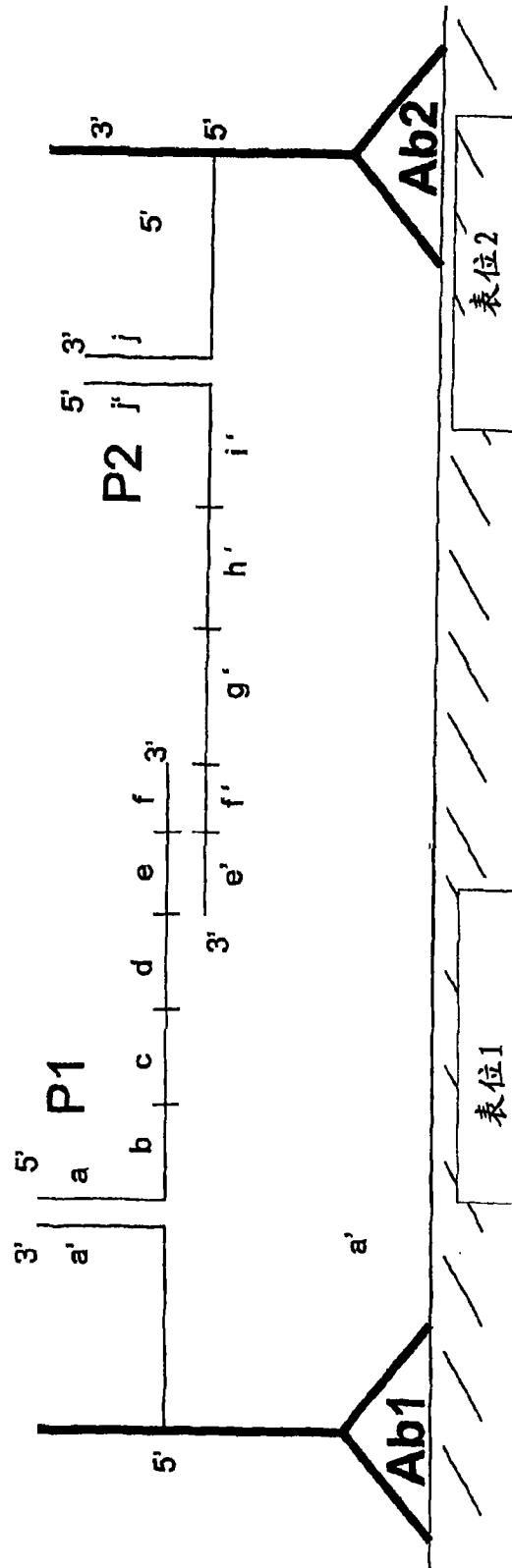


图 3J  
夹板探针(3' / 3' 构型)

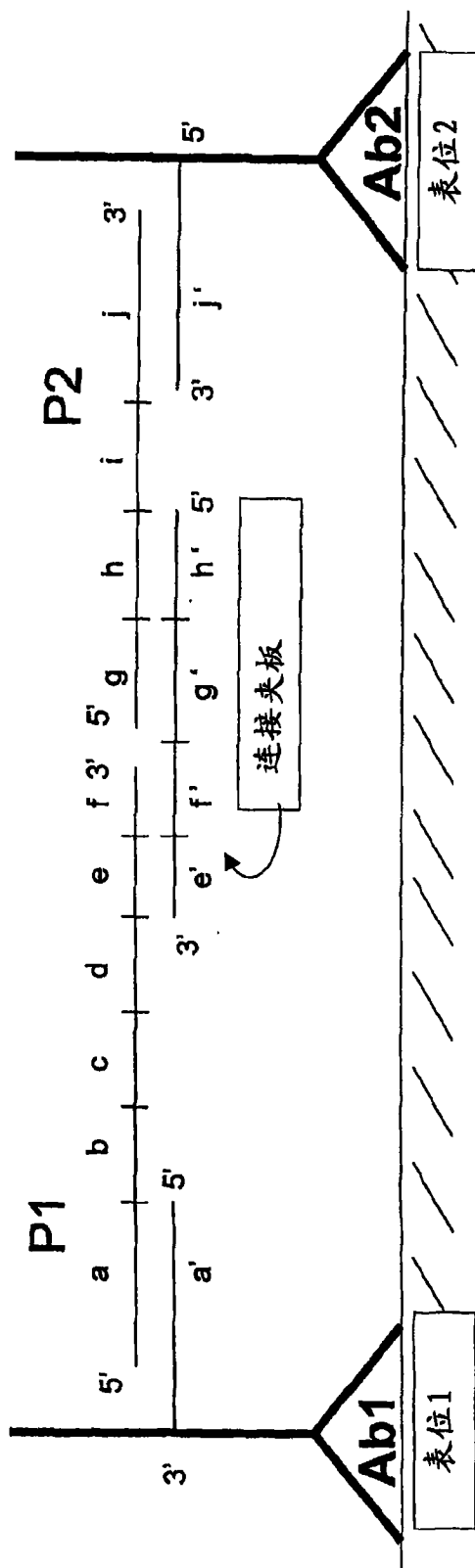




图 3K  
夹板探针(3' / 3' 构型)

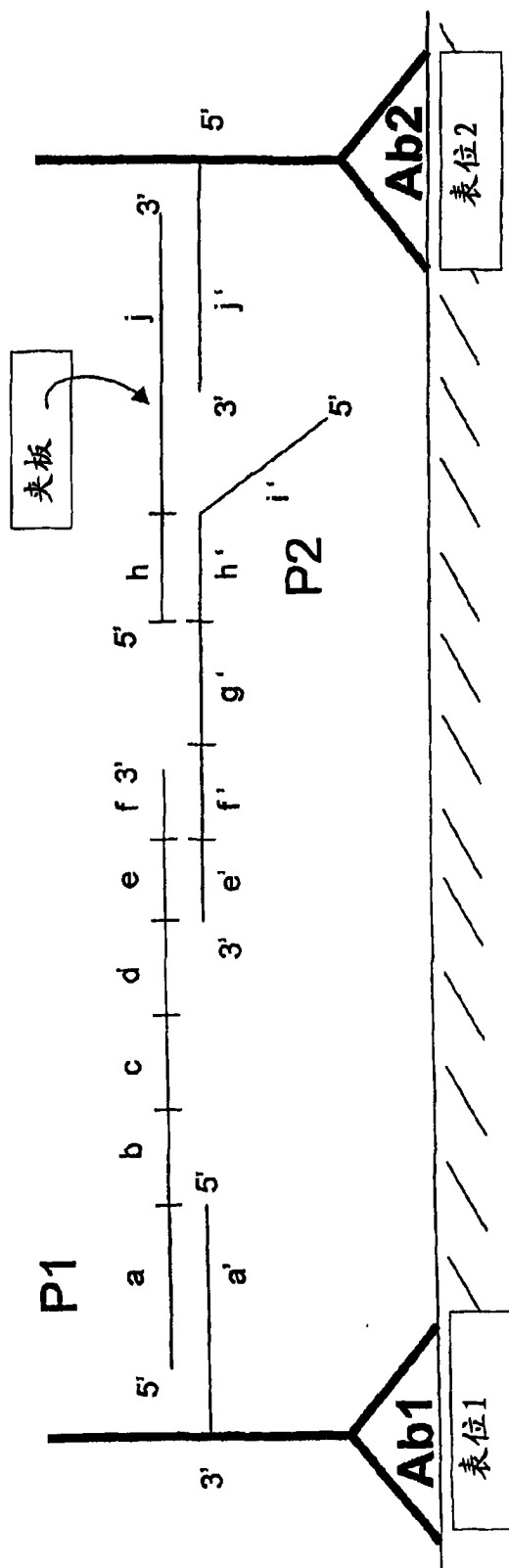


图 3L  
夹板探针的延伸/置换(续)

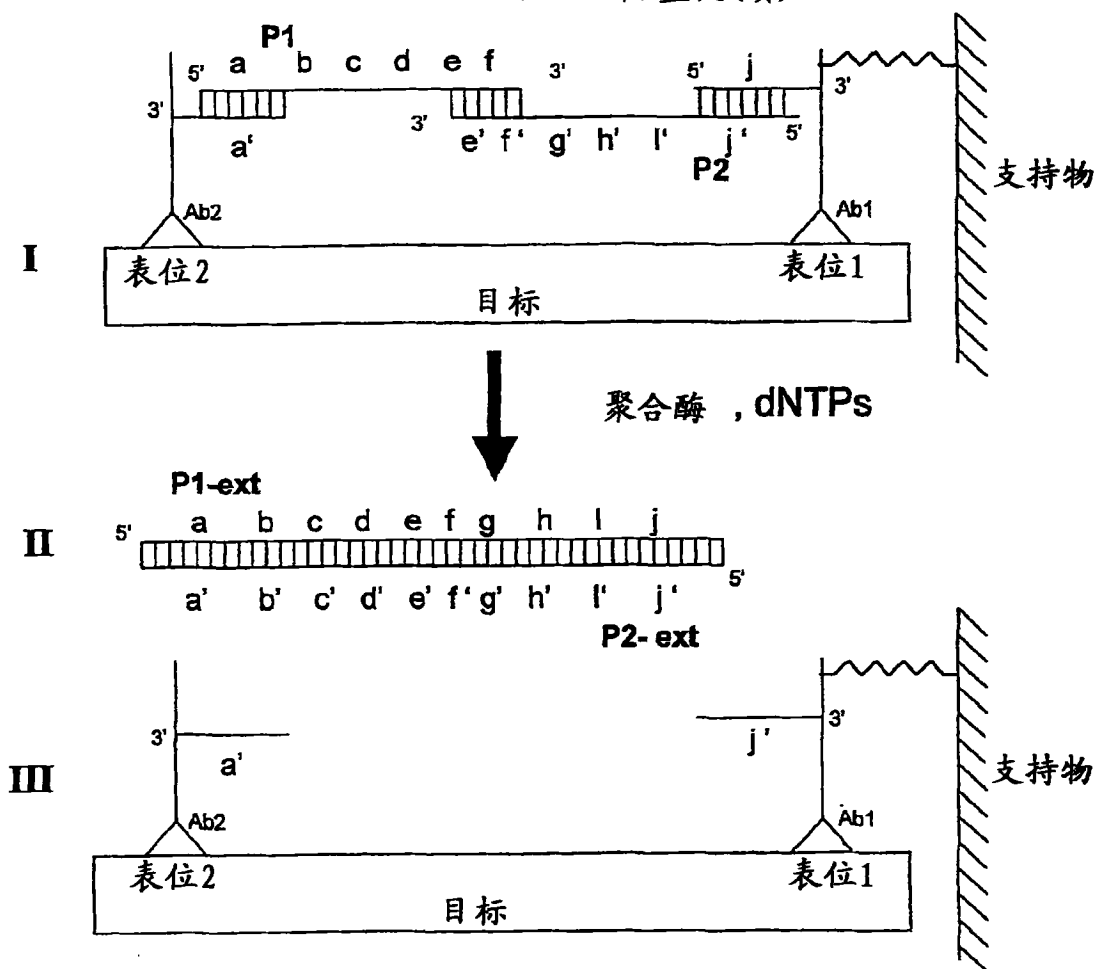


图 4A  
简单的竞争性封闭剂寡核苷酸

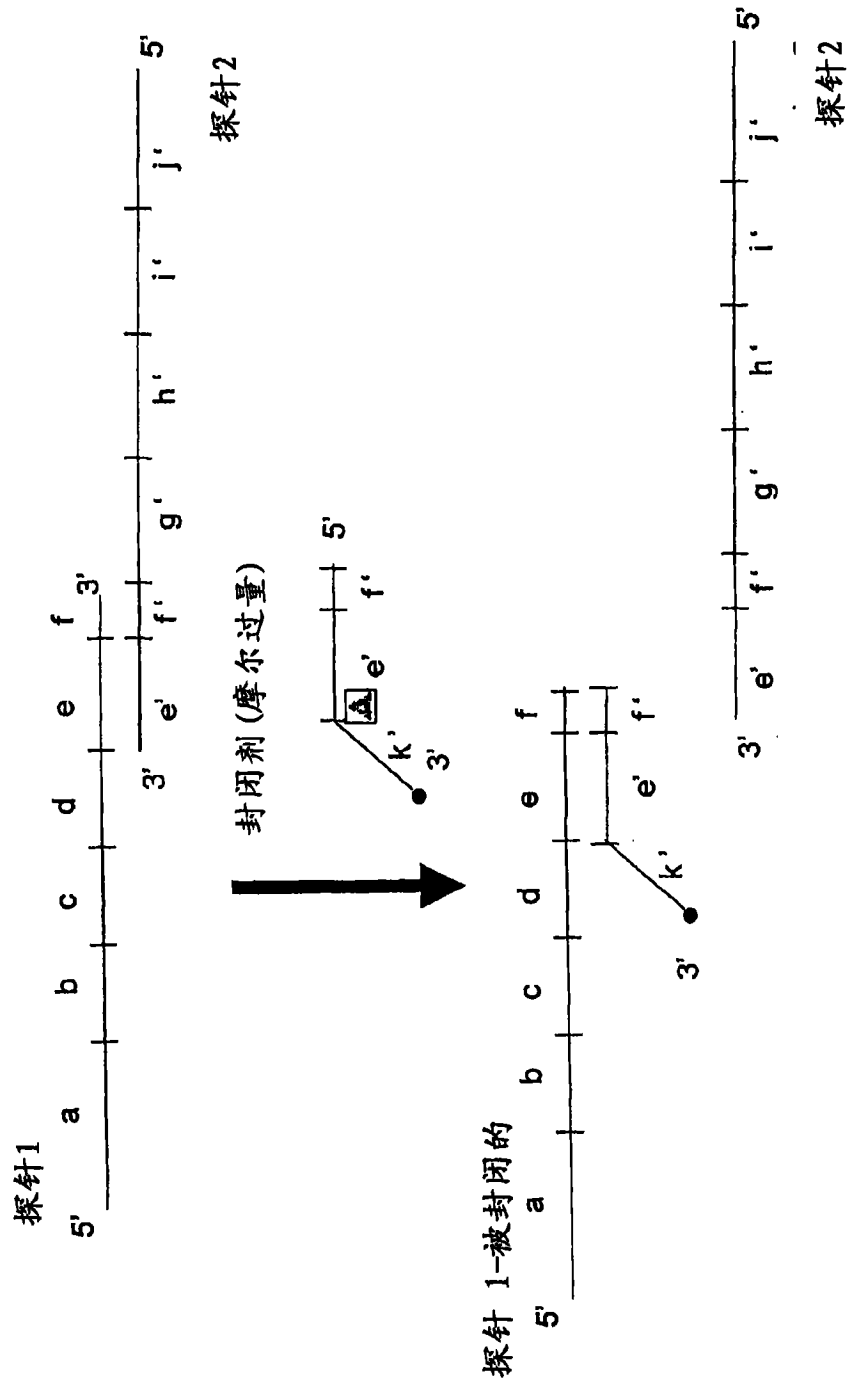


图 4B  
凹入的竞争性封闭剂寡核苷酸

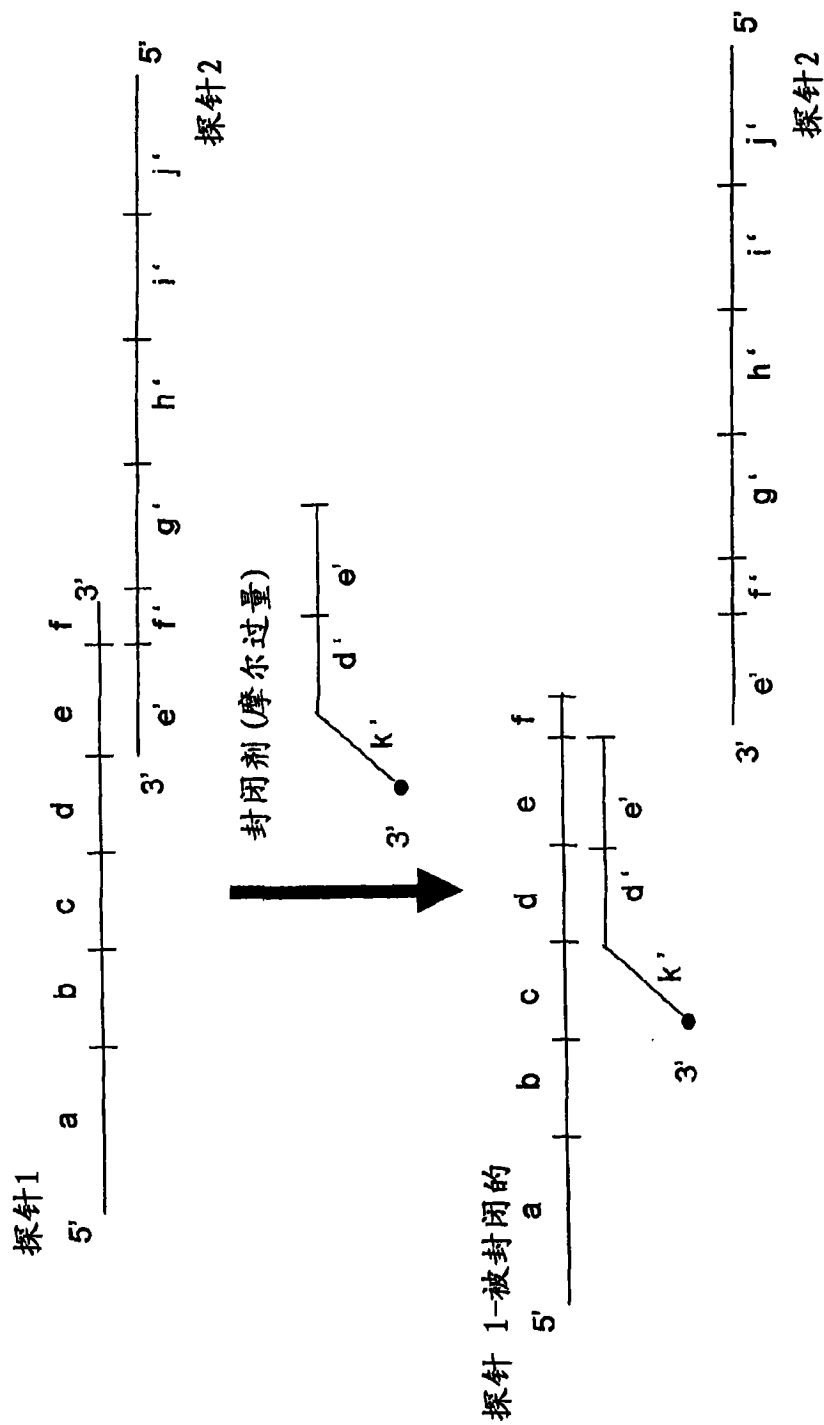


图 4C  
废用性封闭剂寡核苷酸

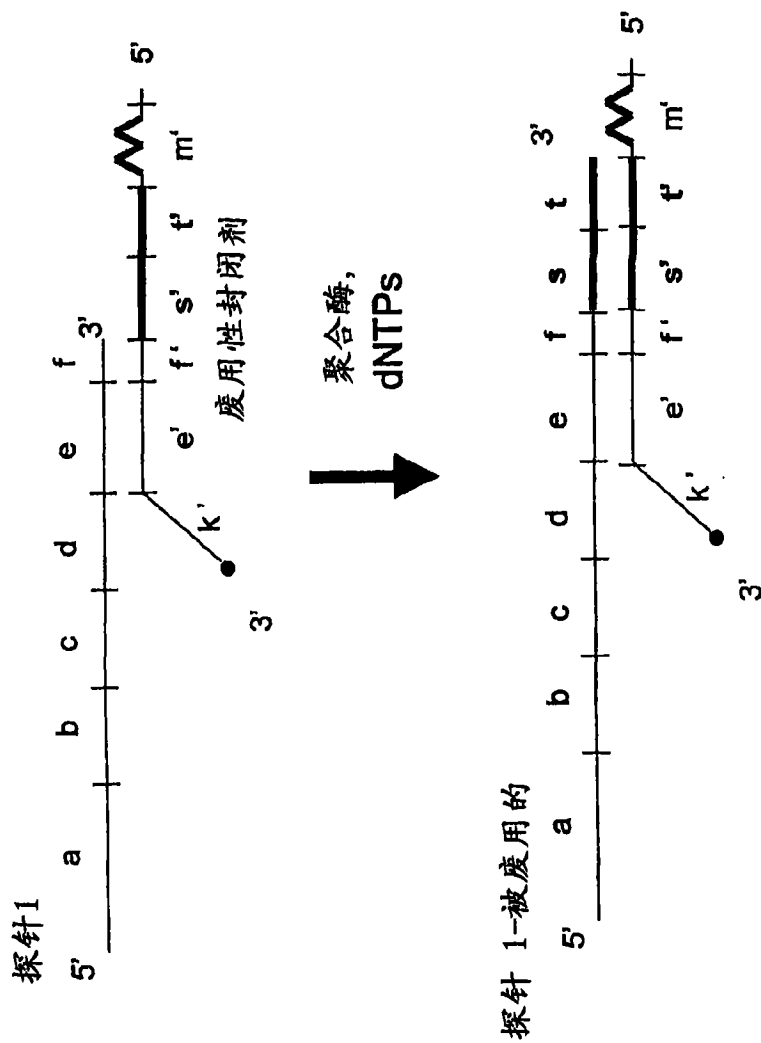


图 4D

可置换的封闭剂寡核苷酸

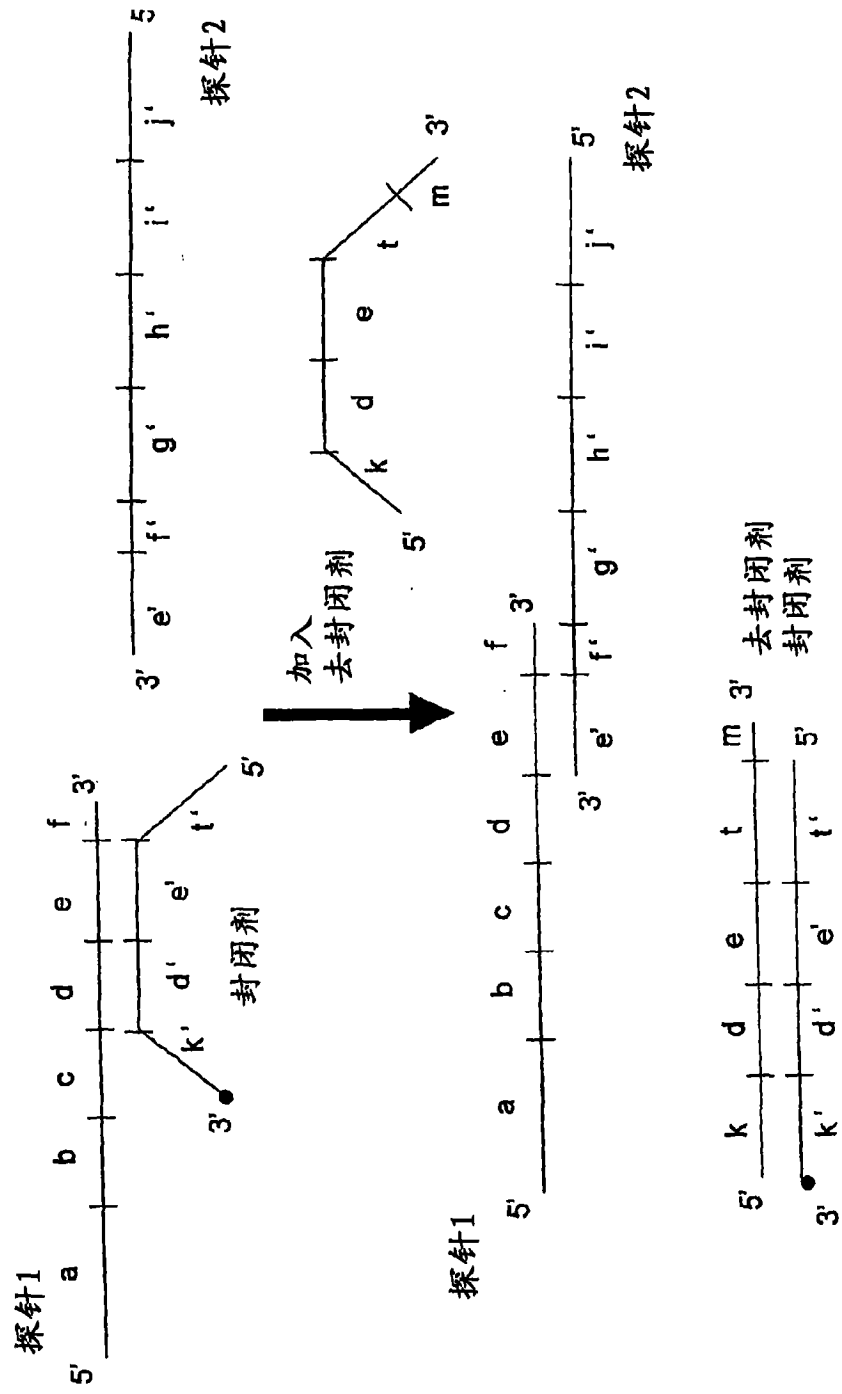


图 4E  
自置换的封闭剂寡核苷酸

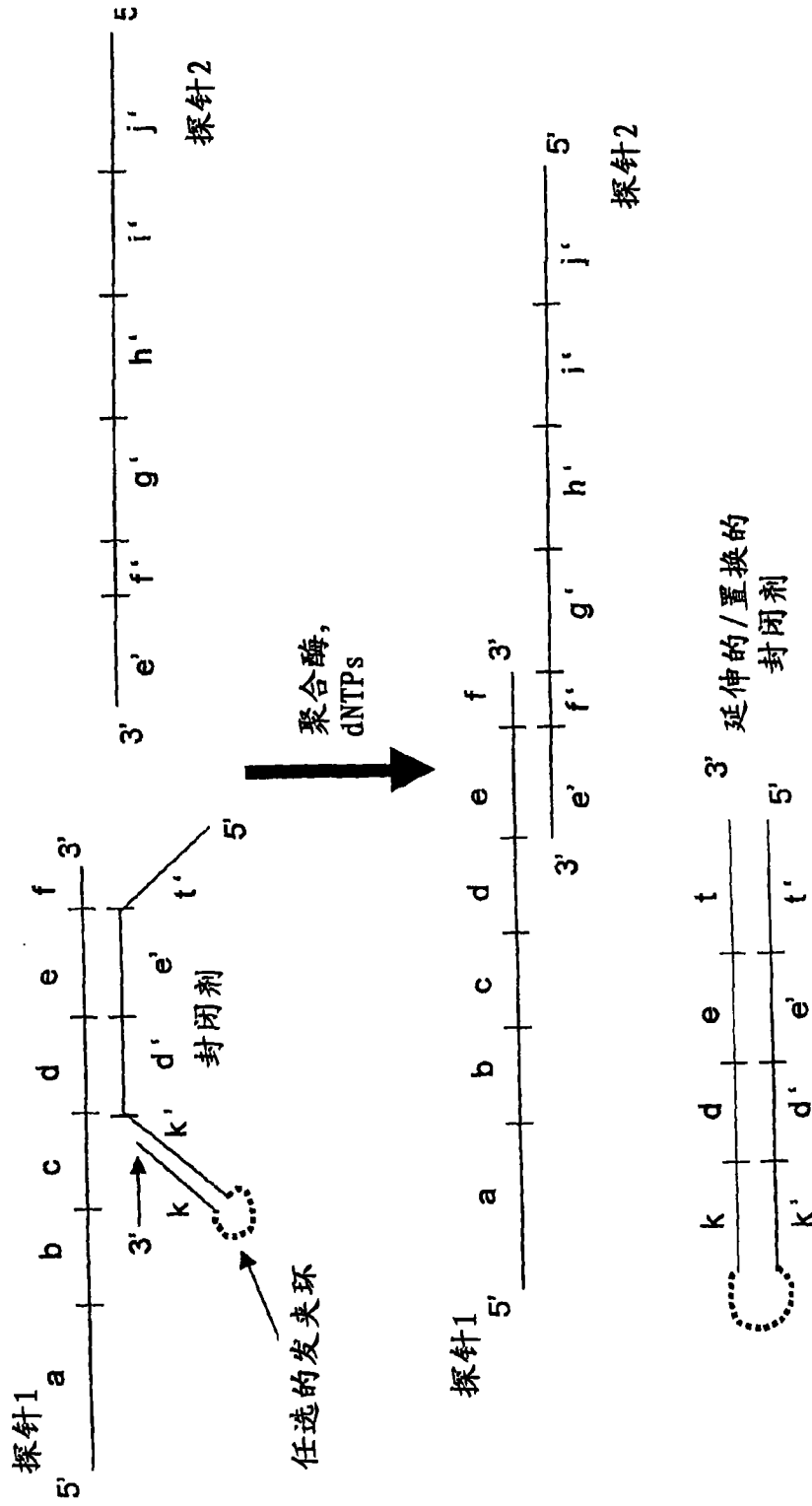


图 4EE

使用 3' 探针尾来稳定探针-封闭剂双链体

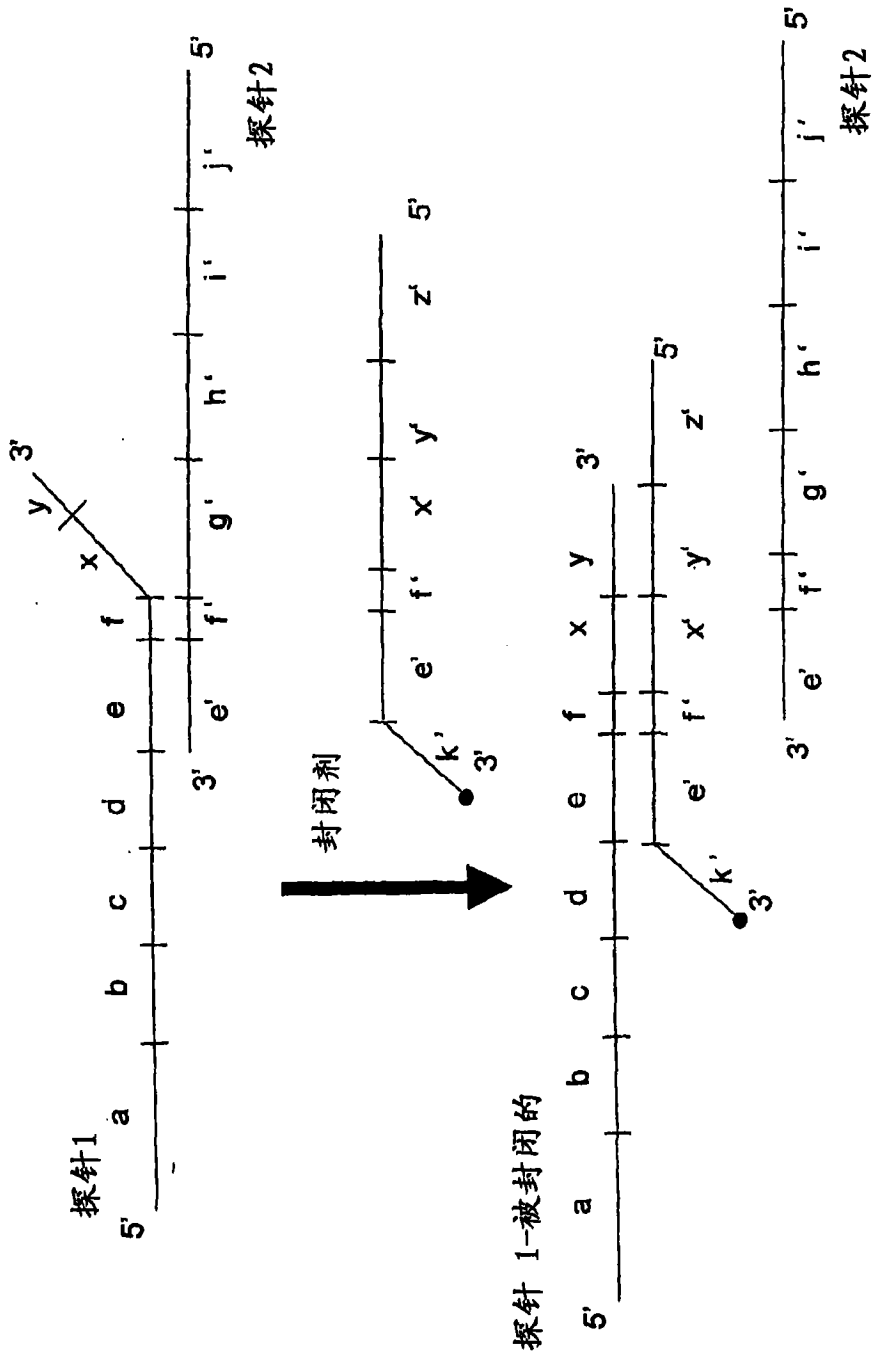




图 4F  
二元免疫-SDA中的竞争性封闭剂寡核苷酸

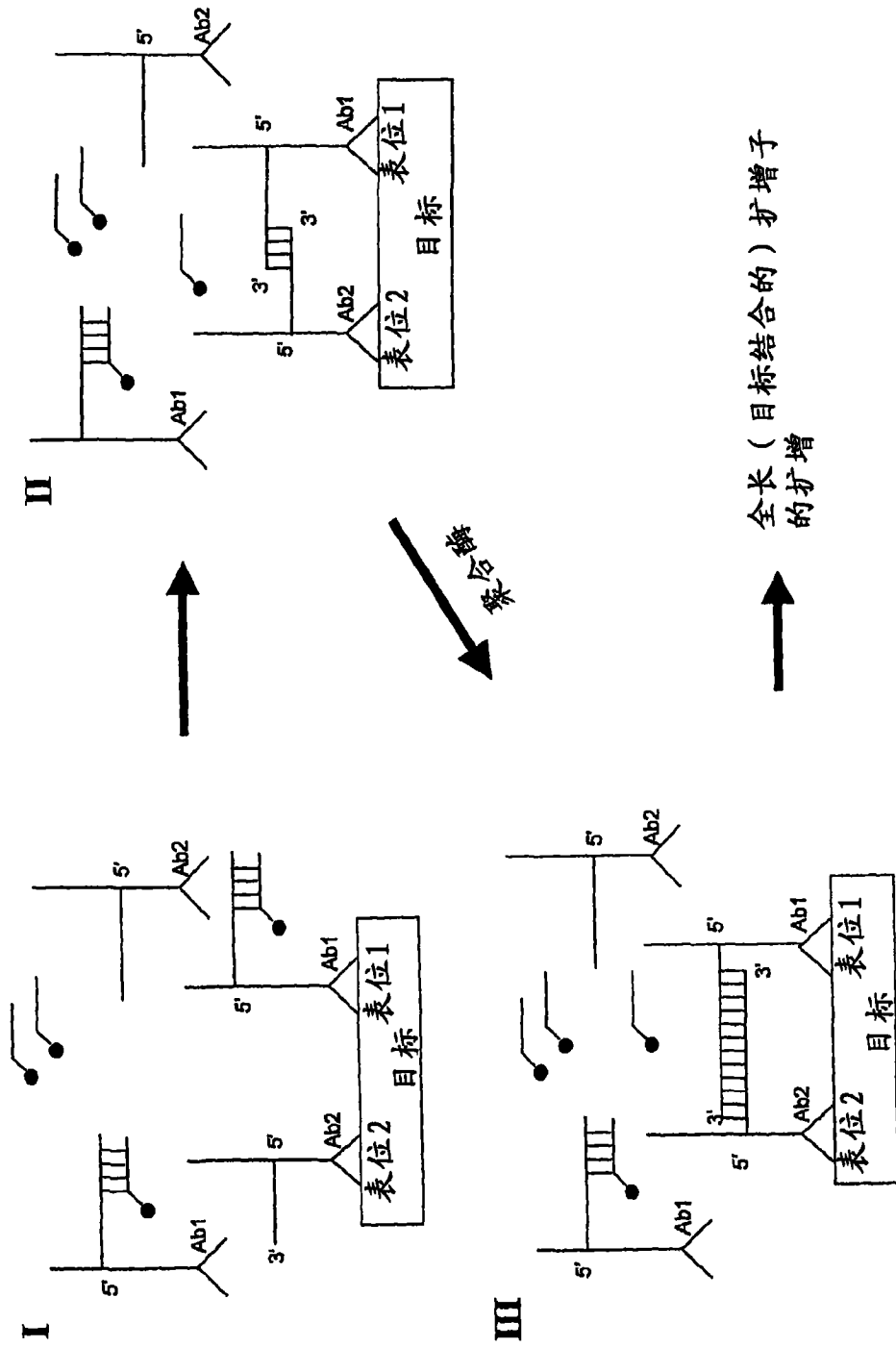


图 4G  
在二元免疫-SDA中的废用性封闭剂寡核苷酸

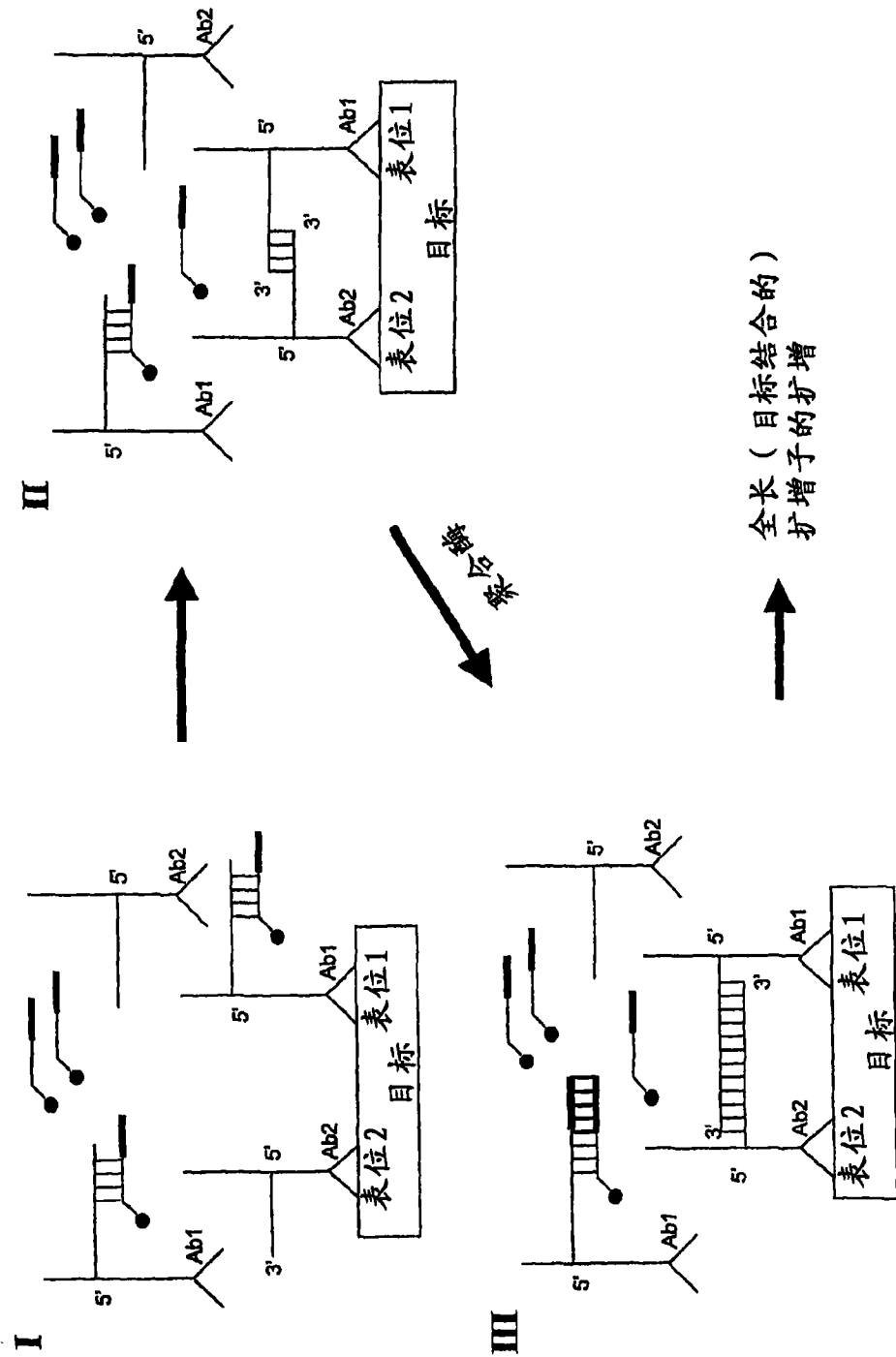


图 4H  
在二元免疫-SDA中逐步封闭

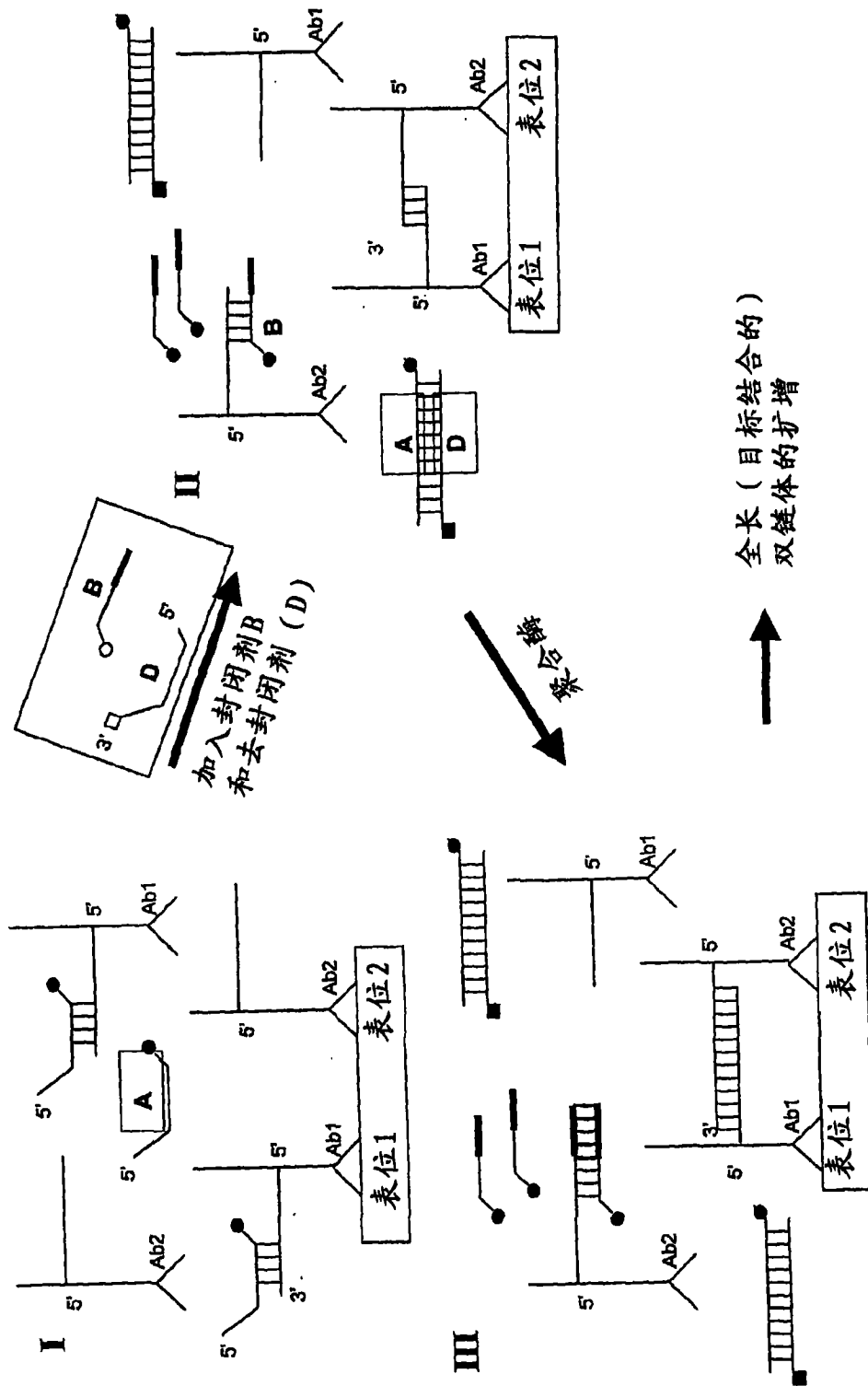


图 4I  
在二元免疫-SDA中, 在结合后加入封闭剂

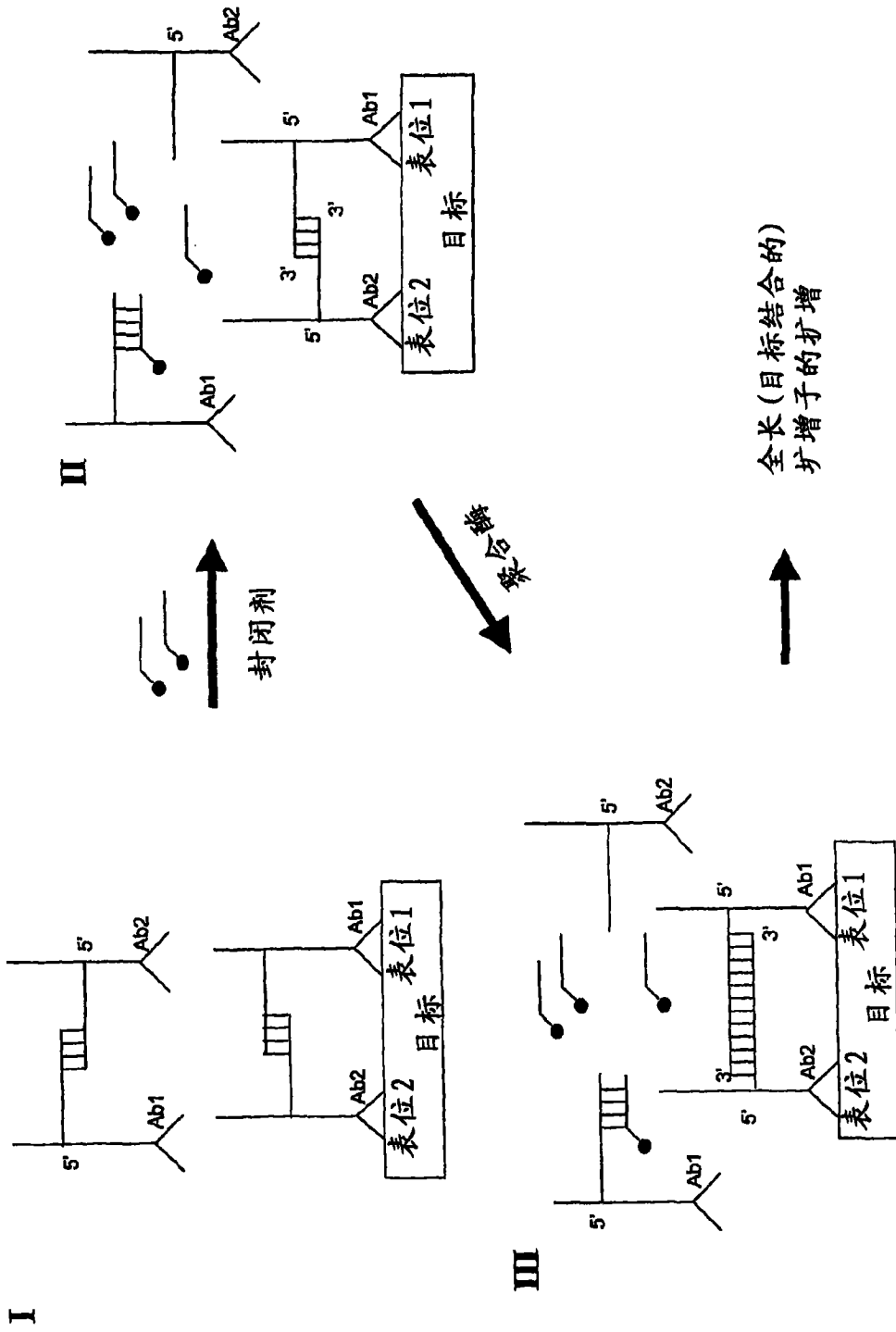


图 5A  
夹板寡核苷酸杂交

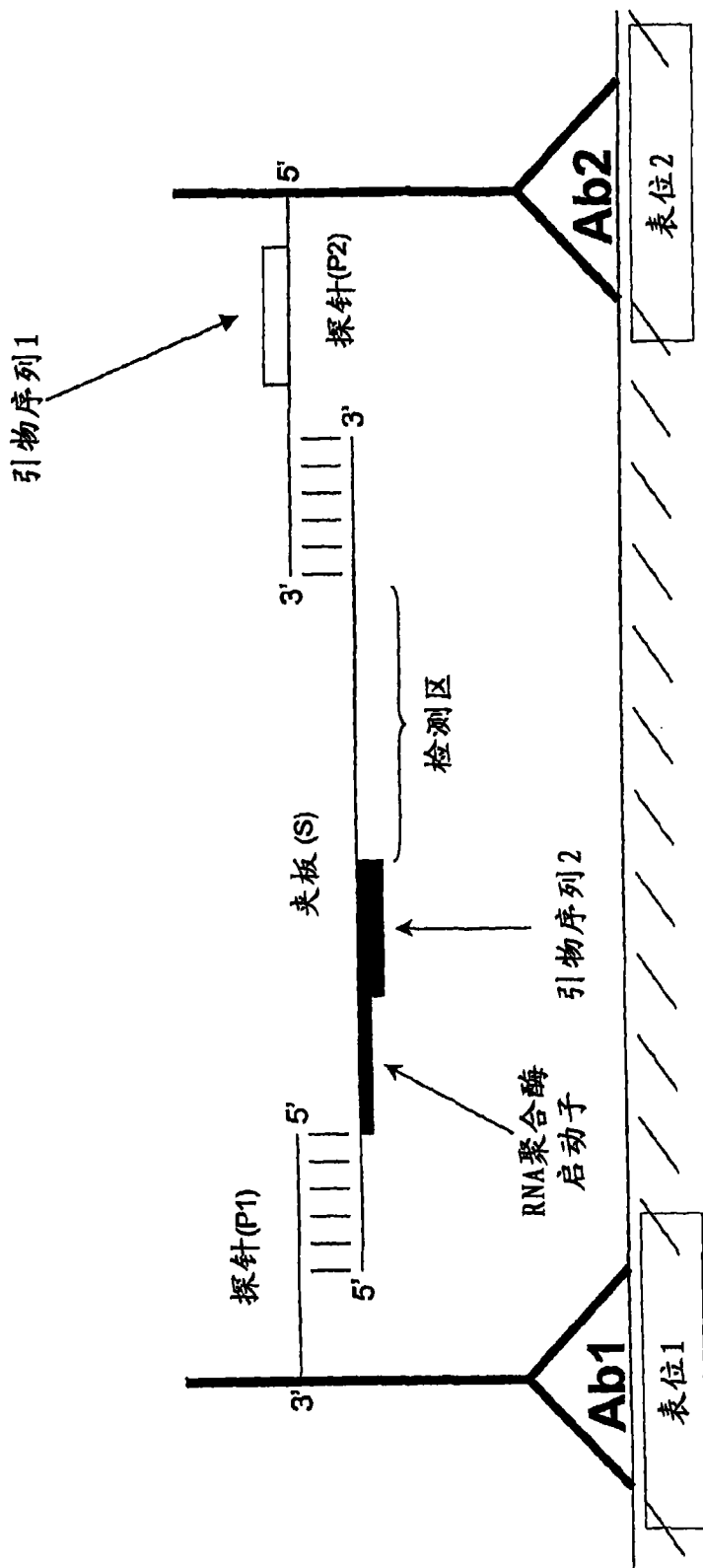


图 5B  
延伸和置换

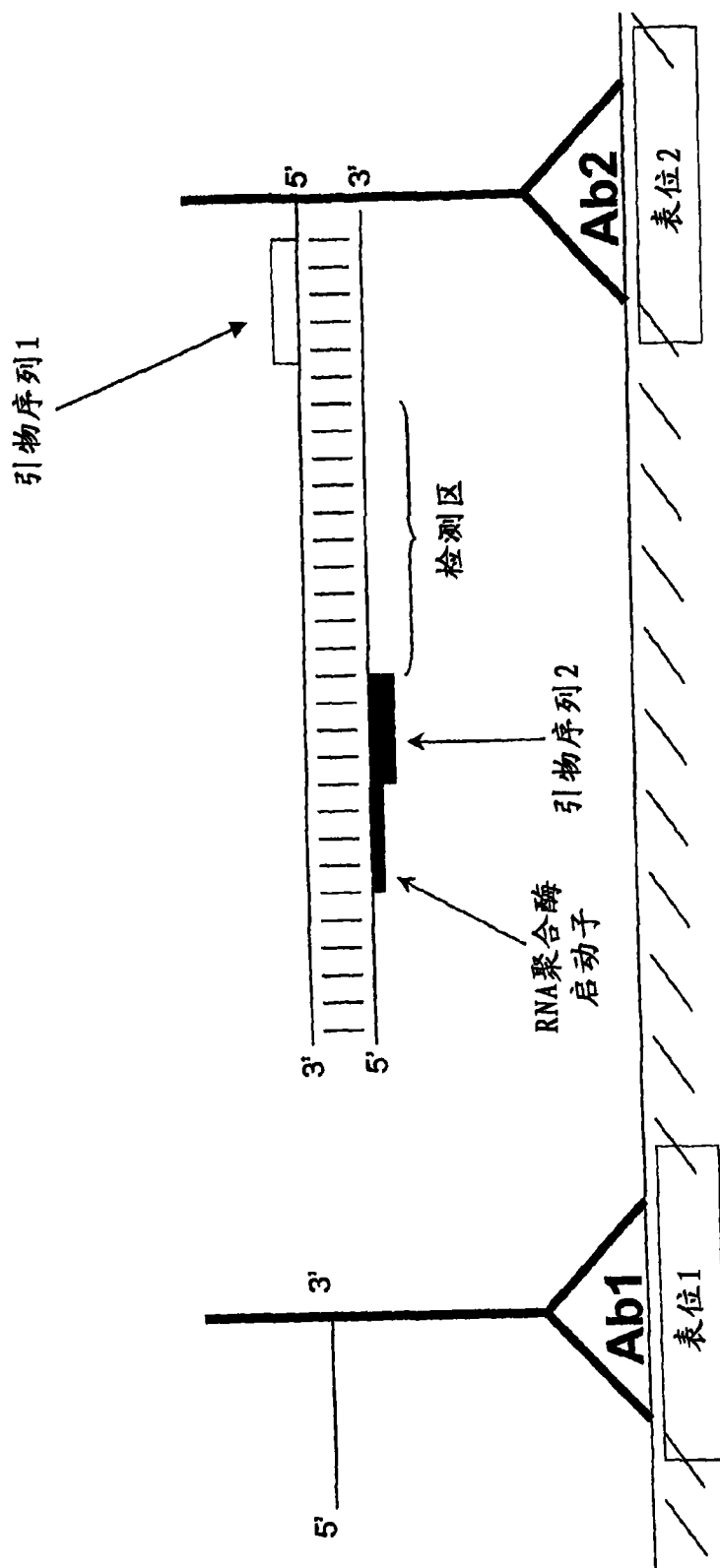


图 5C  
RNA聚合酶活性, 杂交和延伸

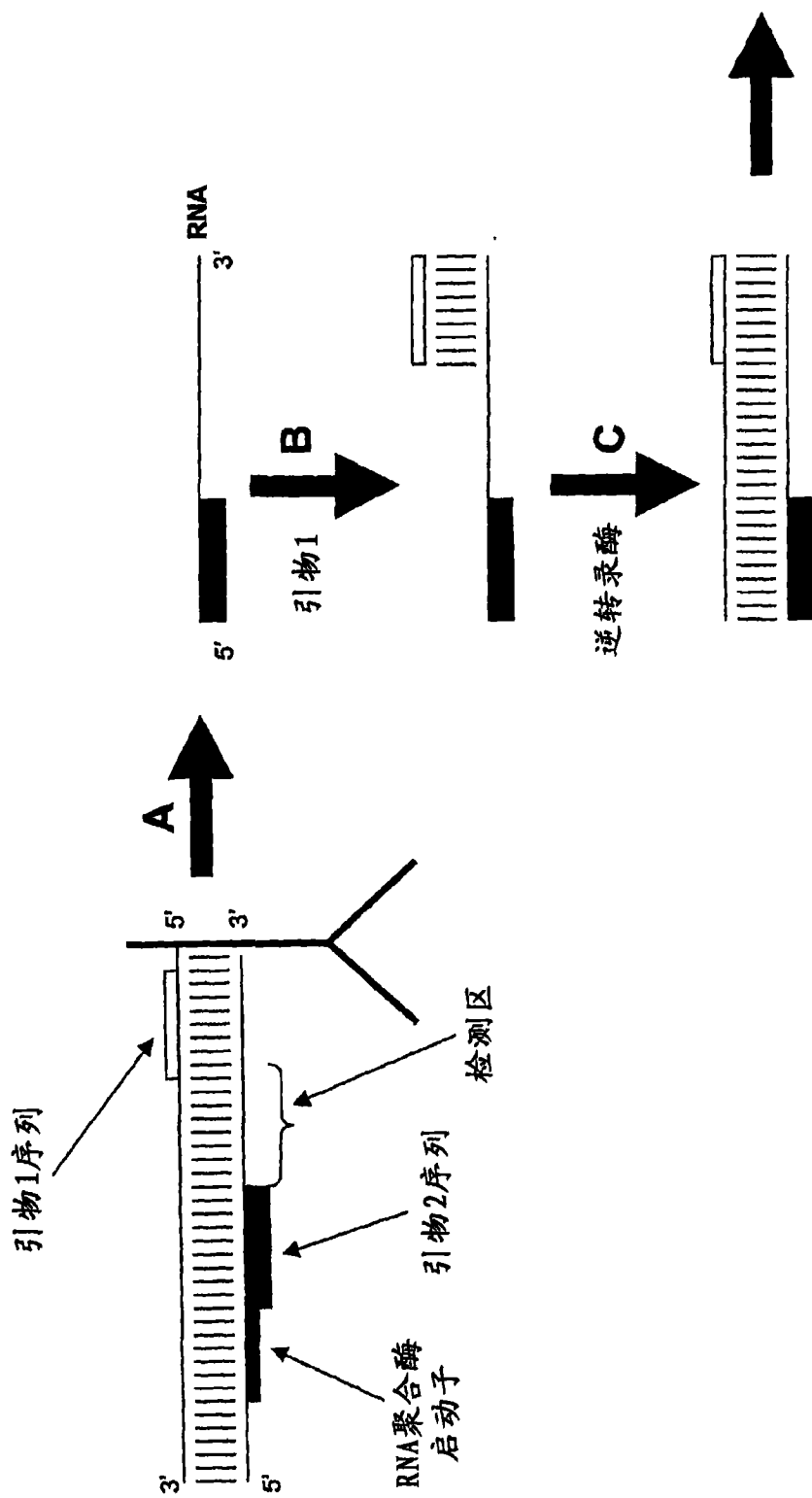
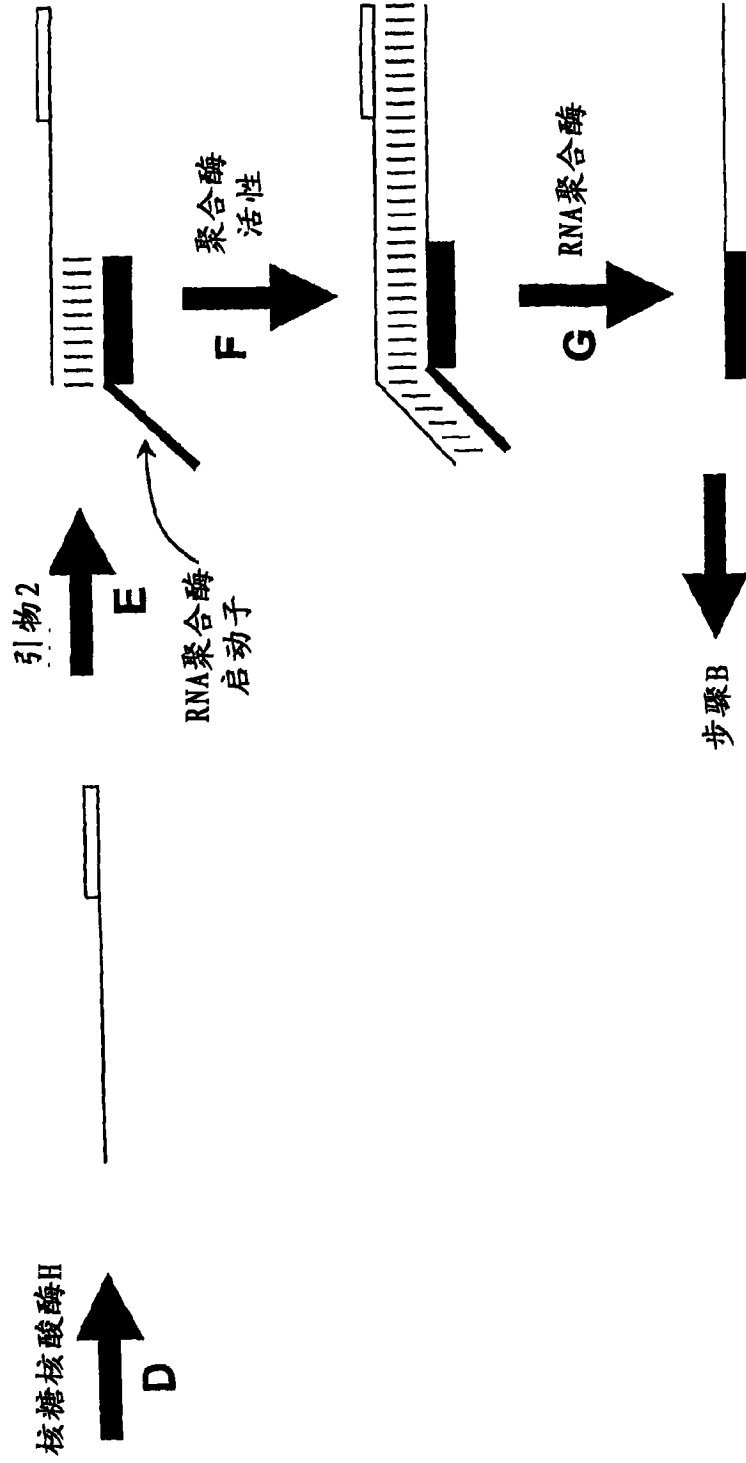


图 5D  
核糖核酸酶H活性, 杂交和延伸





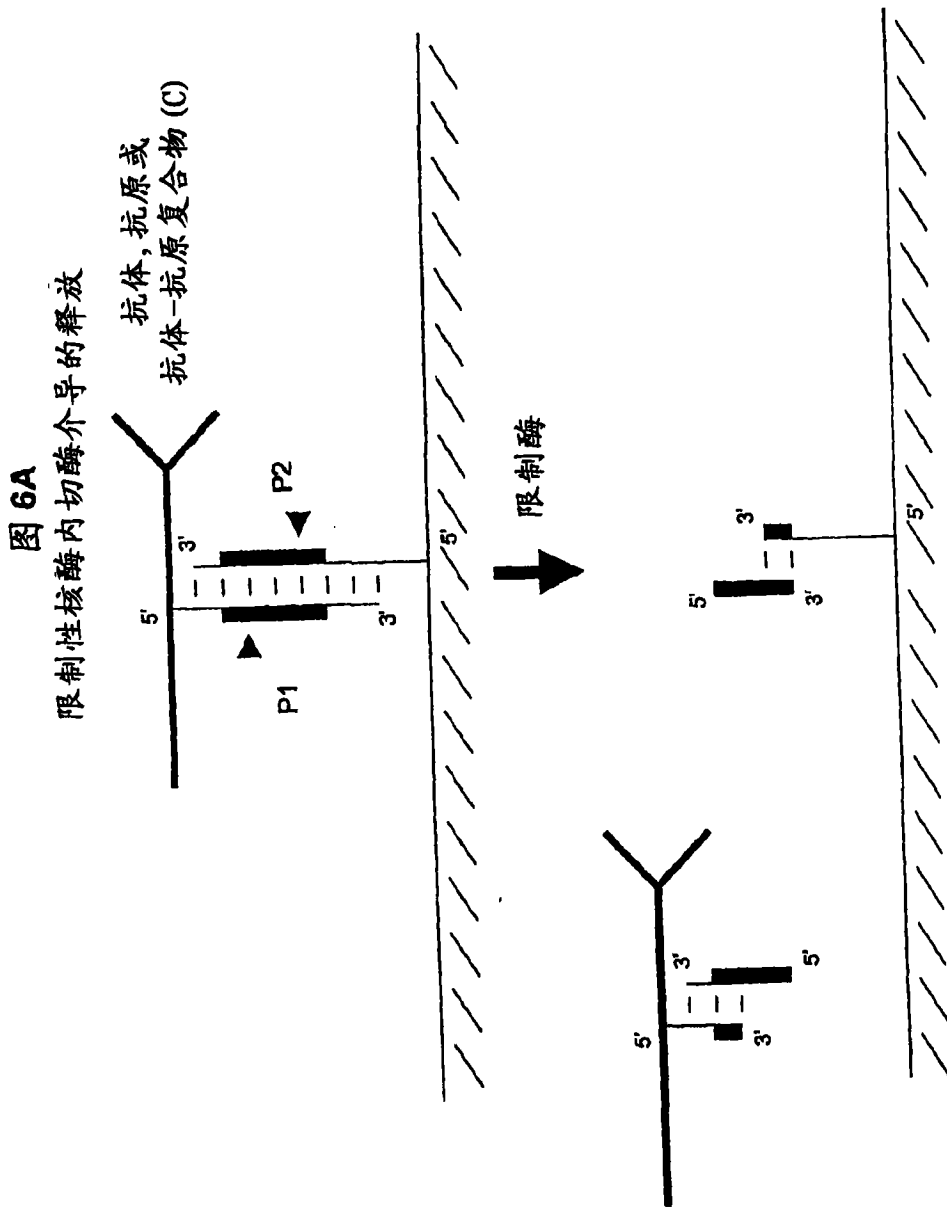


图 6B  
限制性核酶内切酶介导的释放

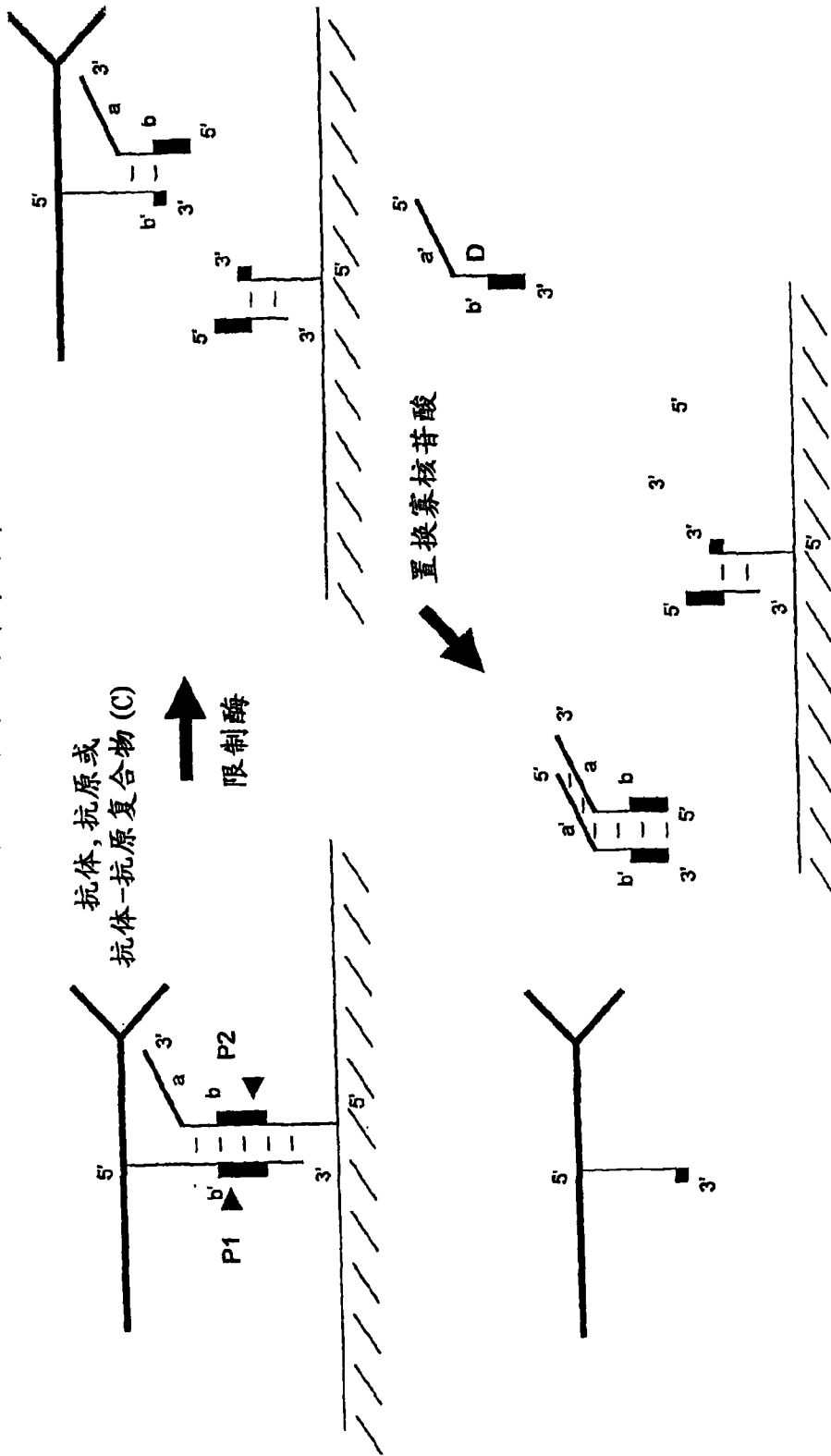


图 6C  
限制性核酶内切酶介导的释放

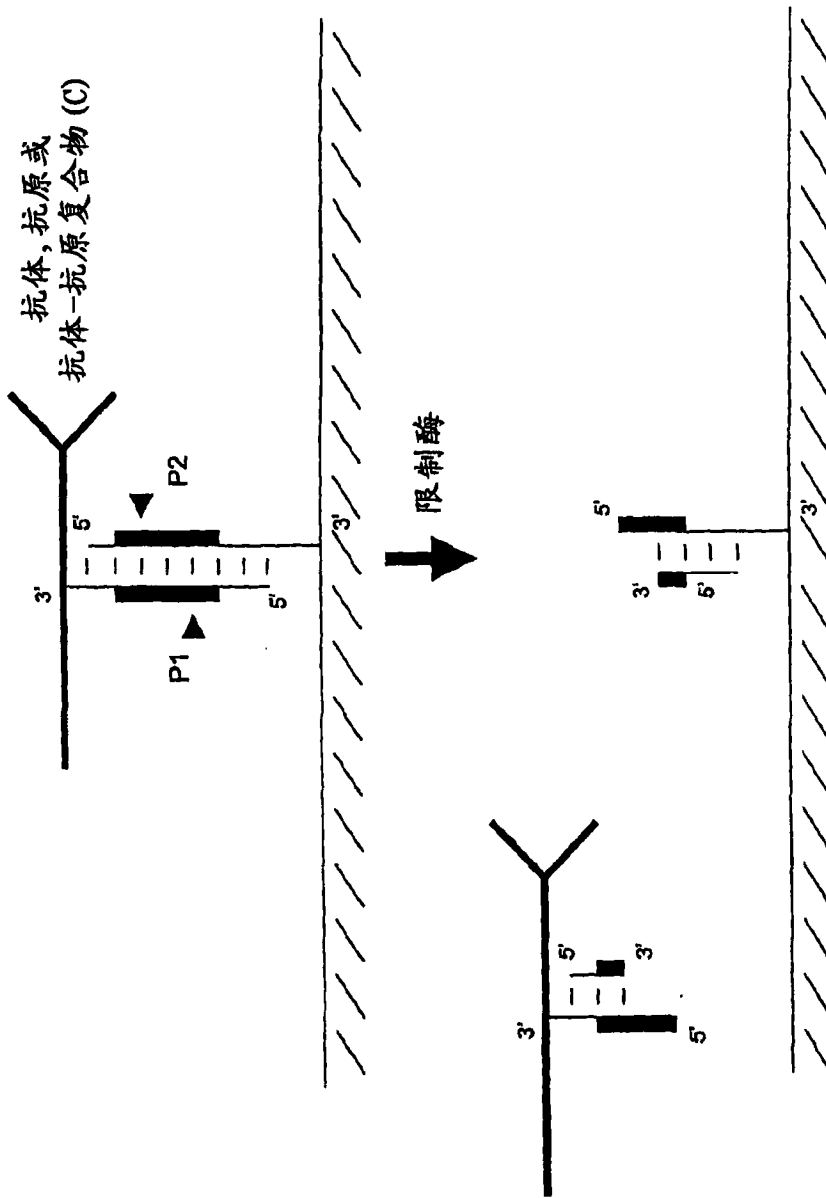


图 6D  
聚合酶和限制性核酸内切酶介导的释放

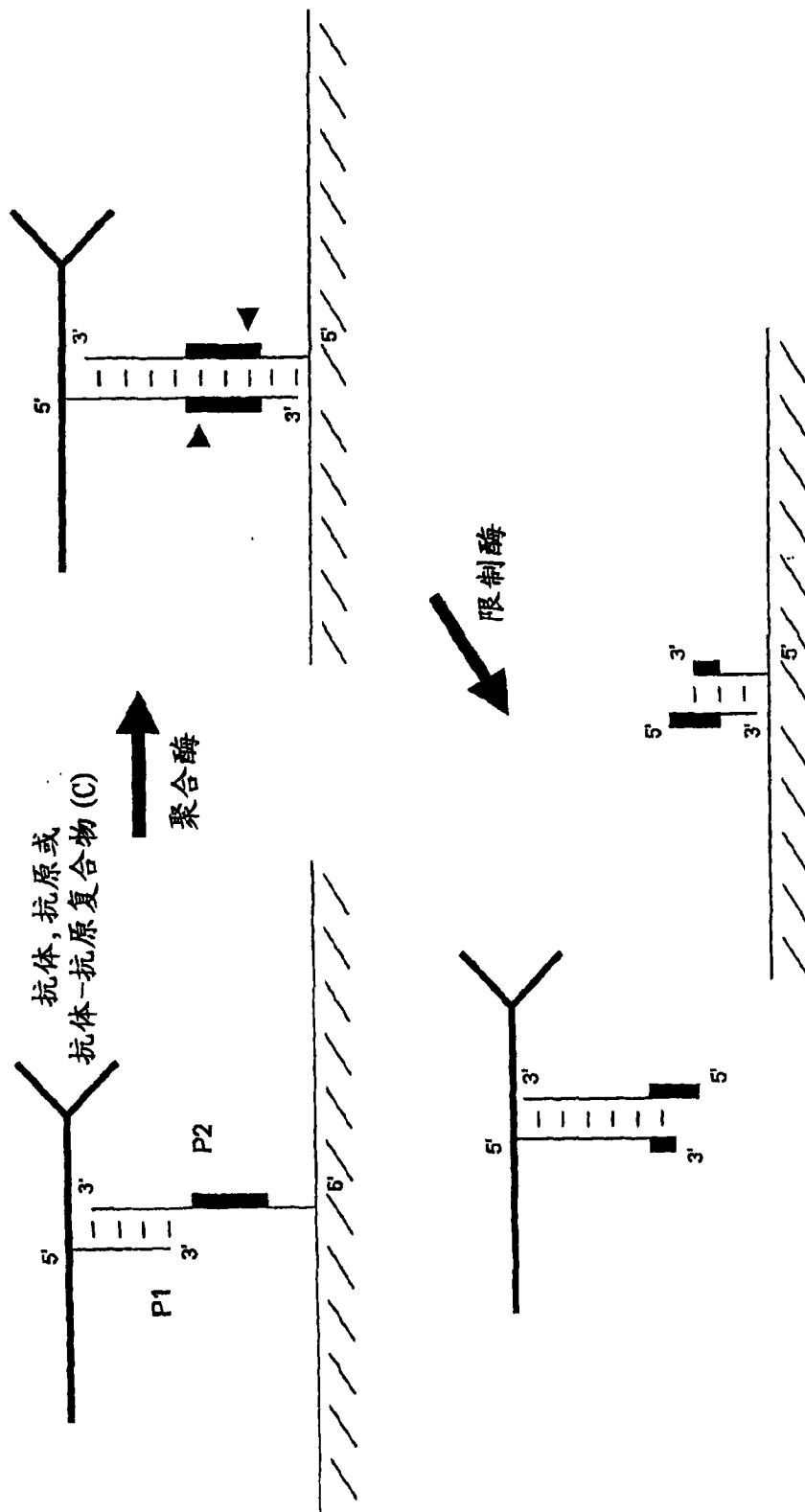


图 6E  
聚合酶和限制性核酸内切酶介导的释放

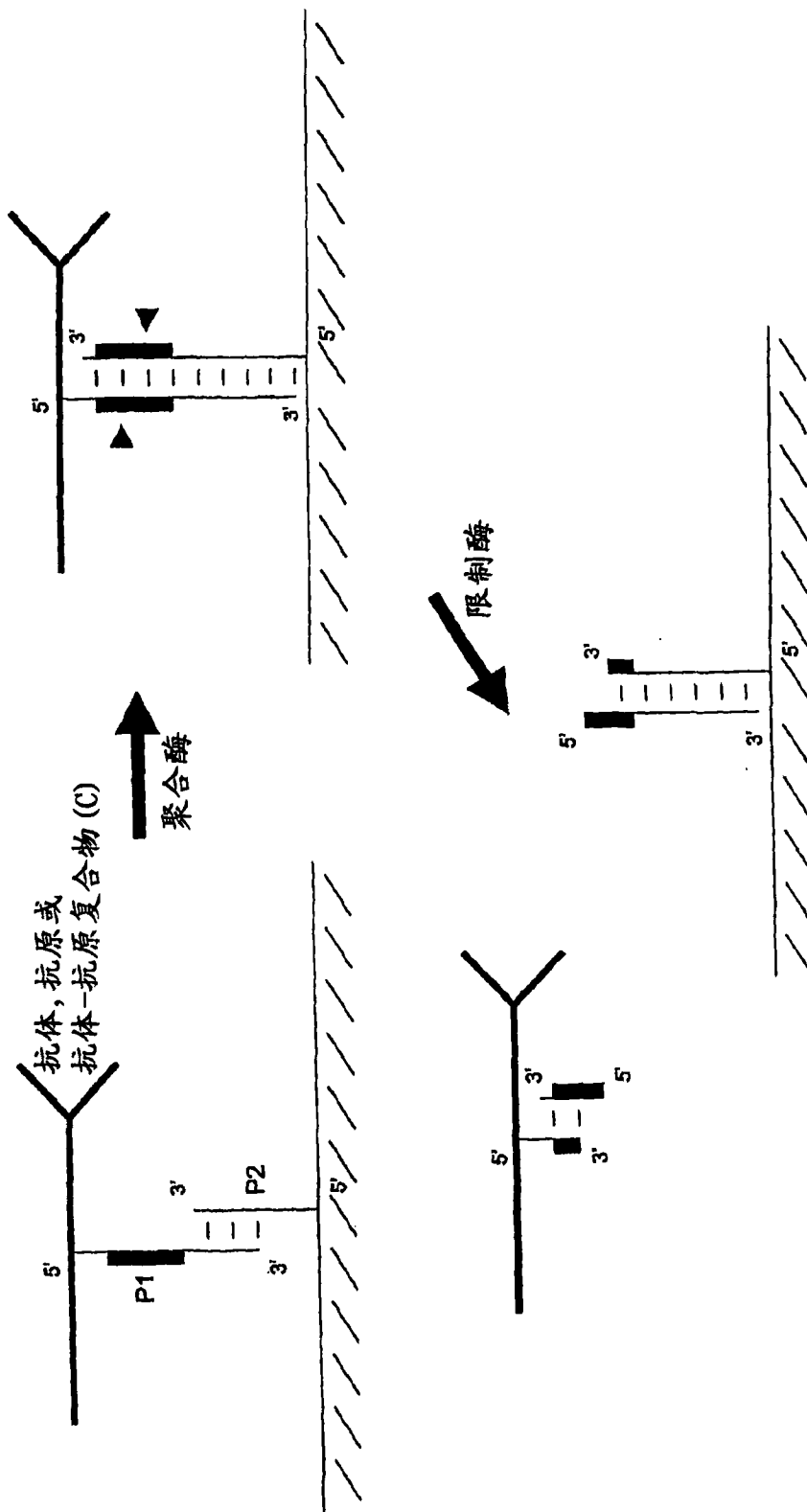


图 6F  
物理释放

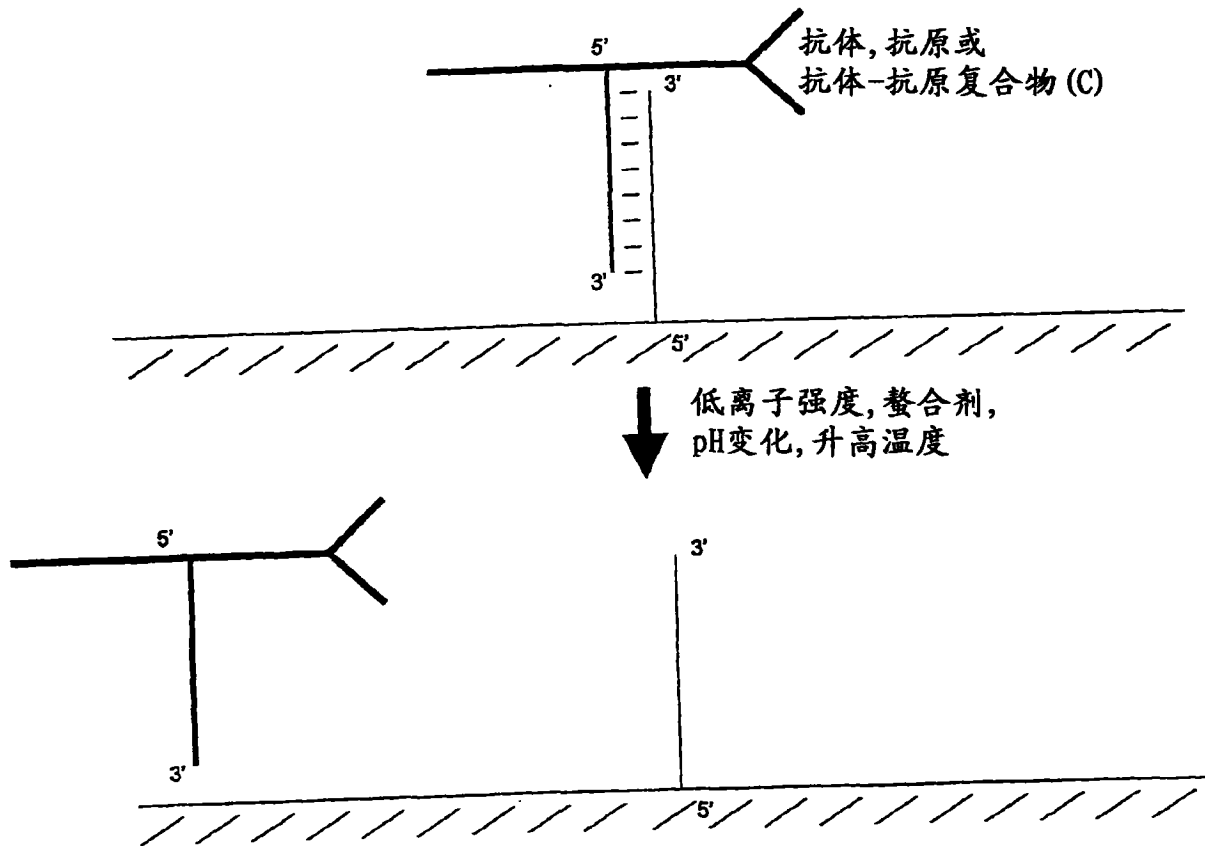
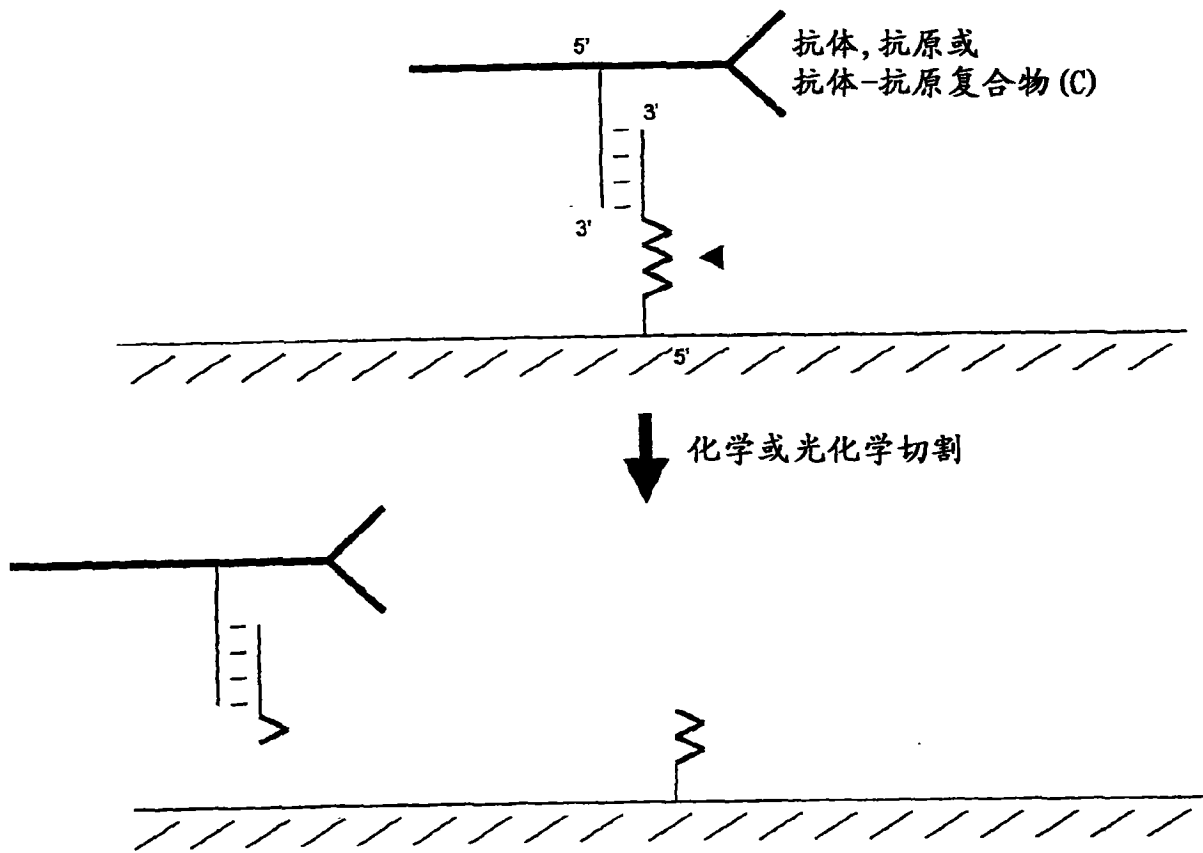
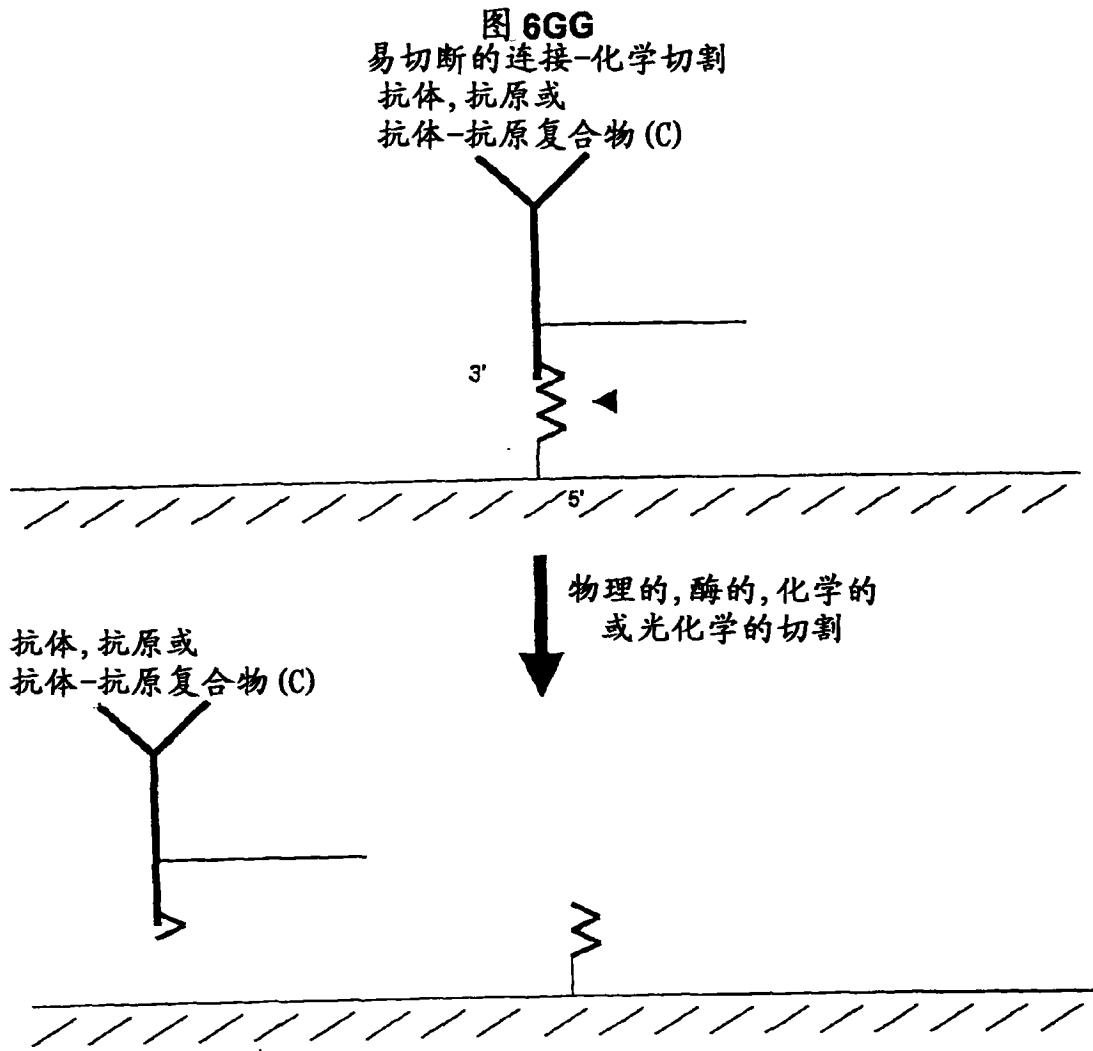


图 6G

易切断的连接-化学切割







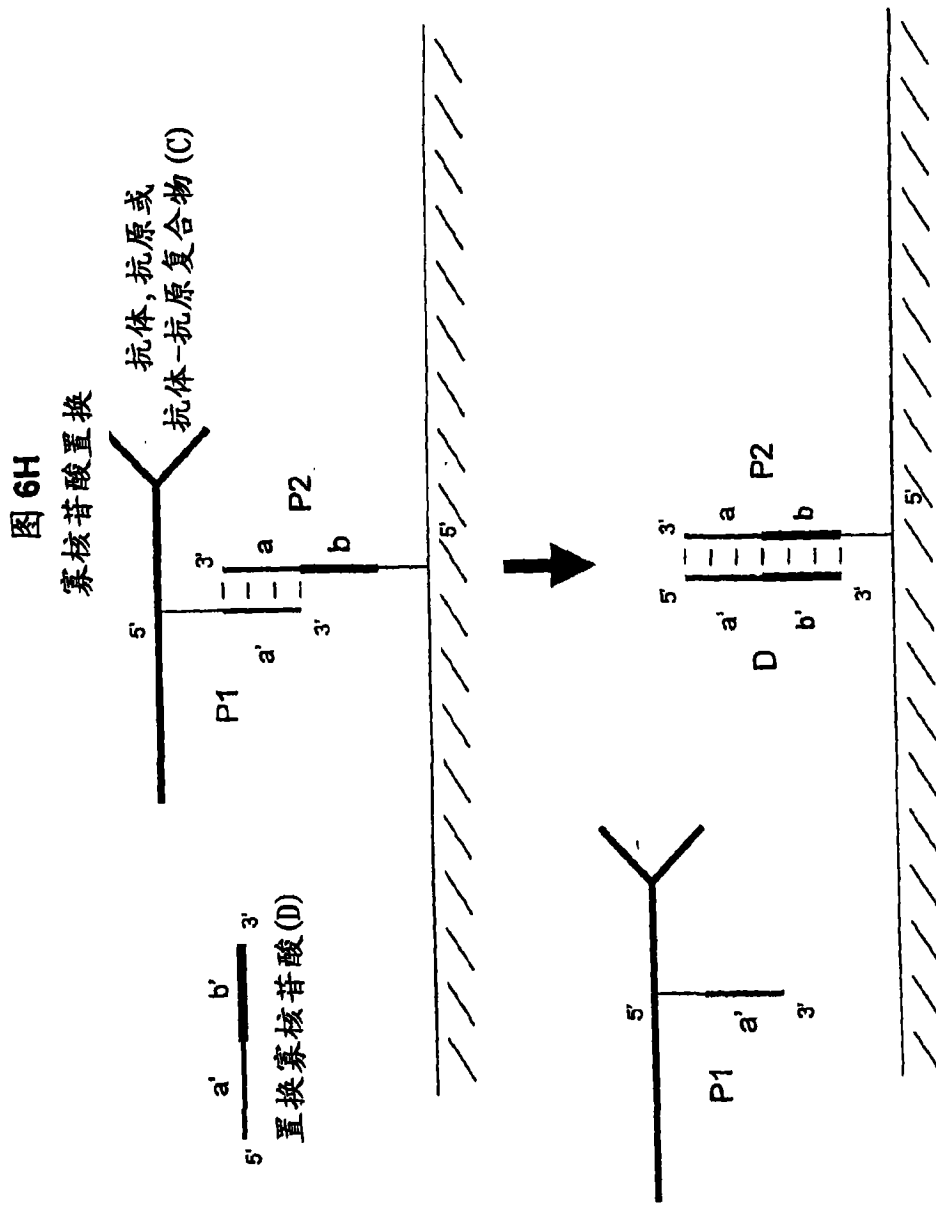
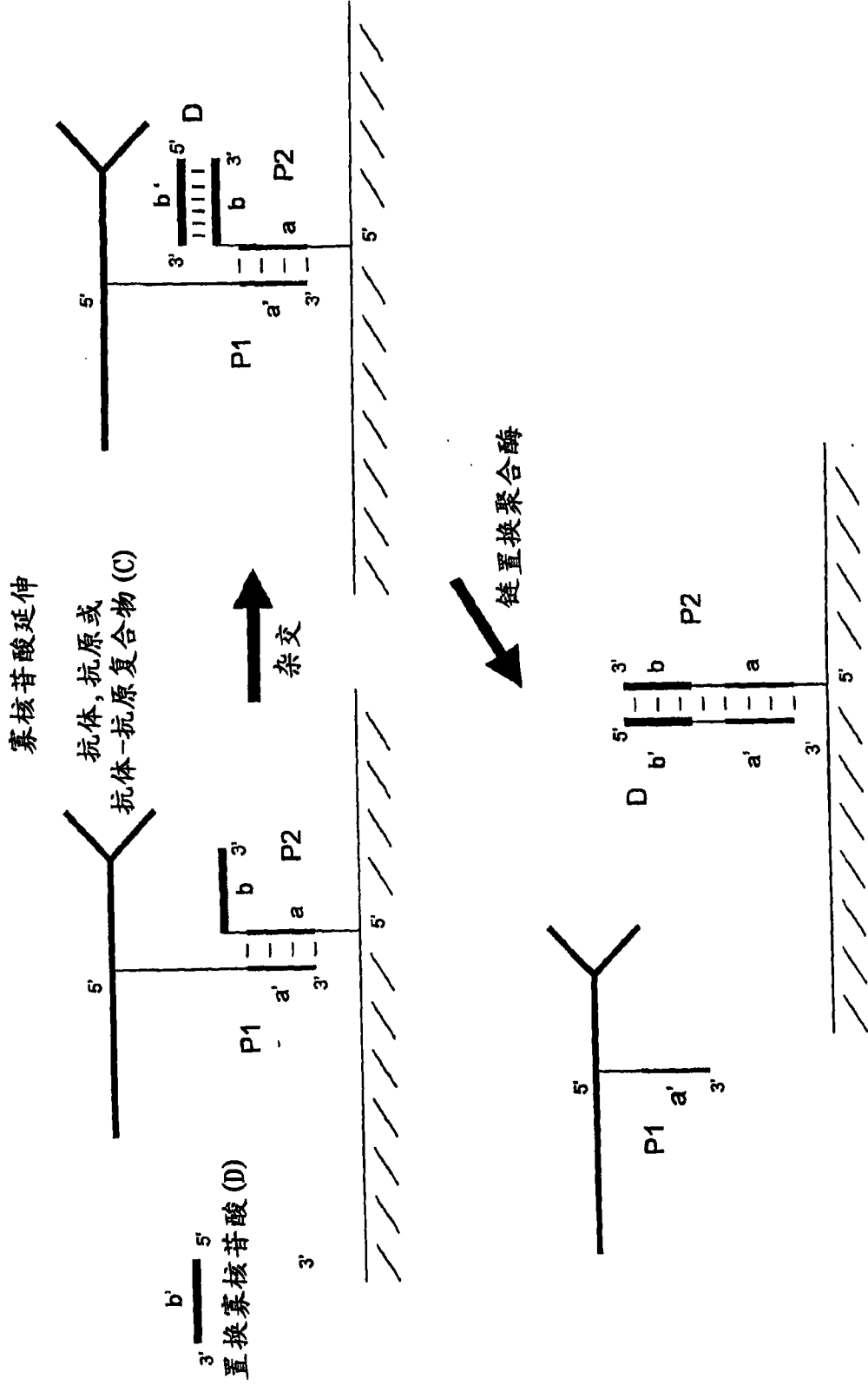


图 6I



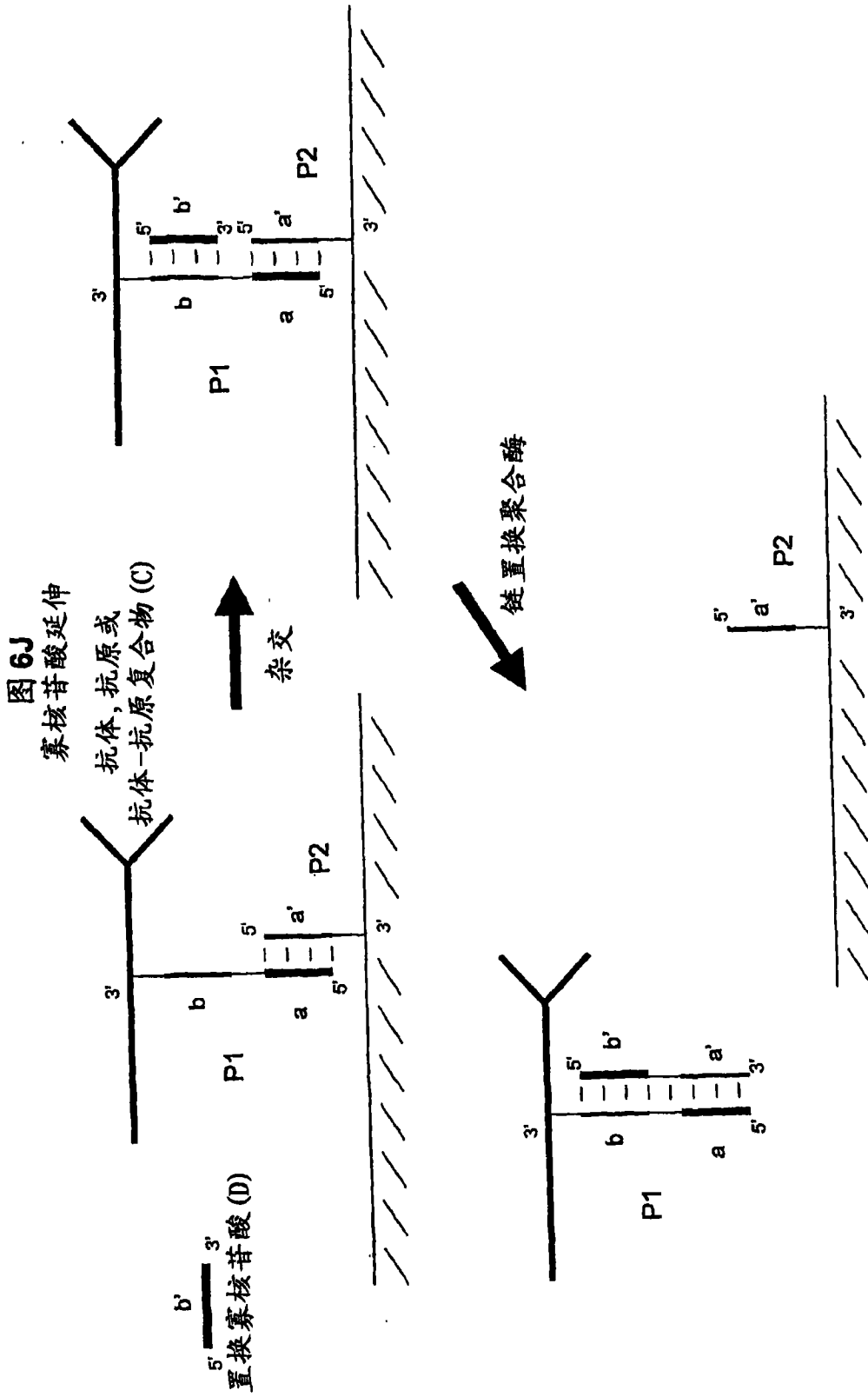


图 6K  
核糖核酸酶H释放

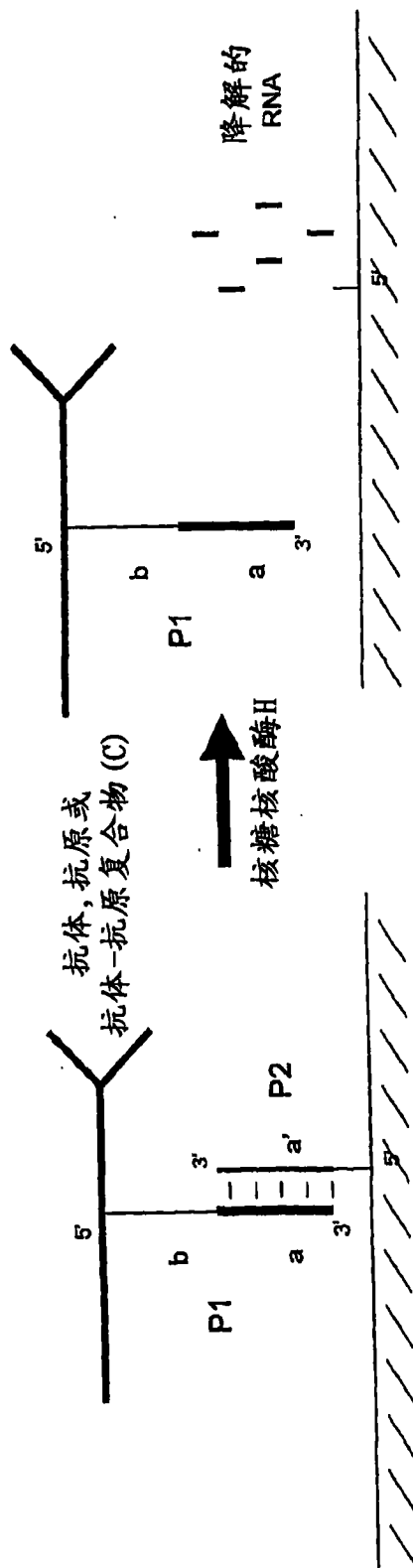
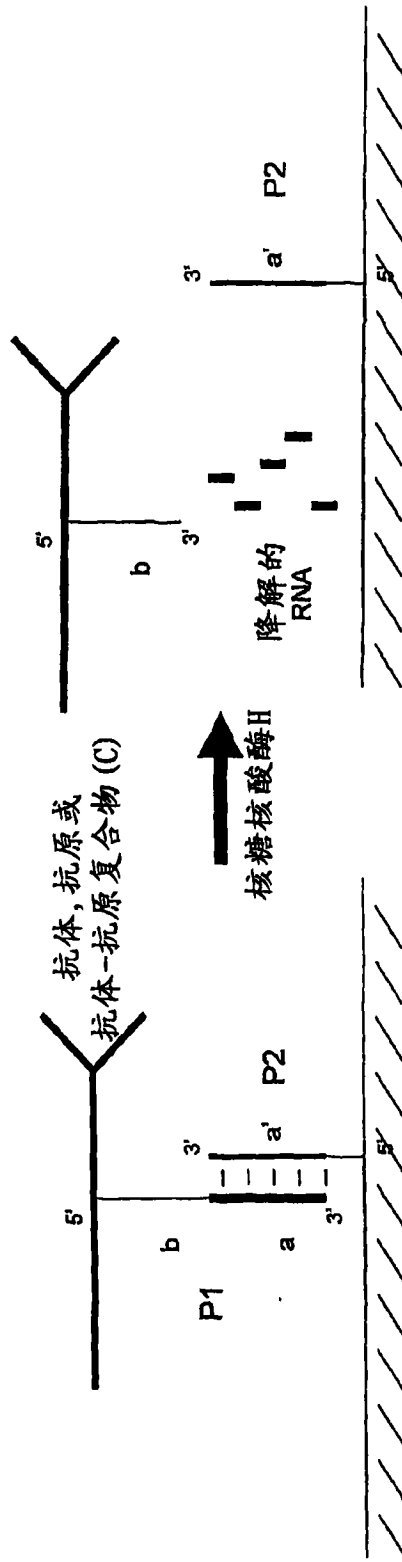


图 6L  
核糖核酸酶H释放



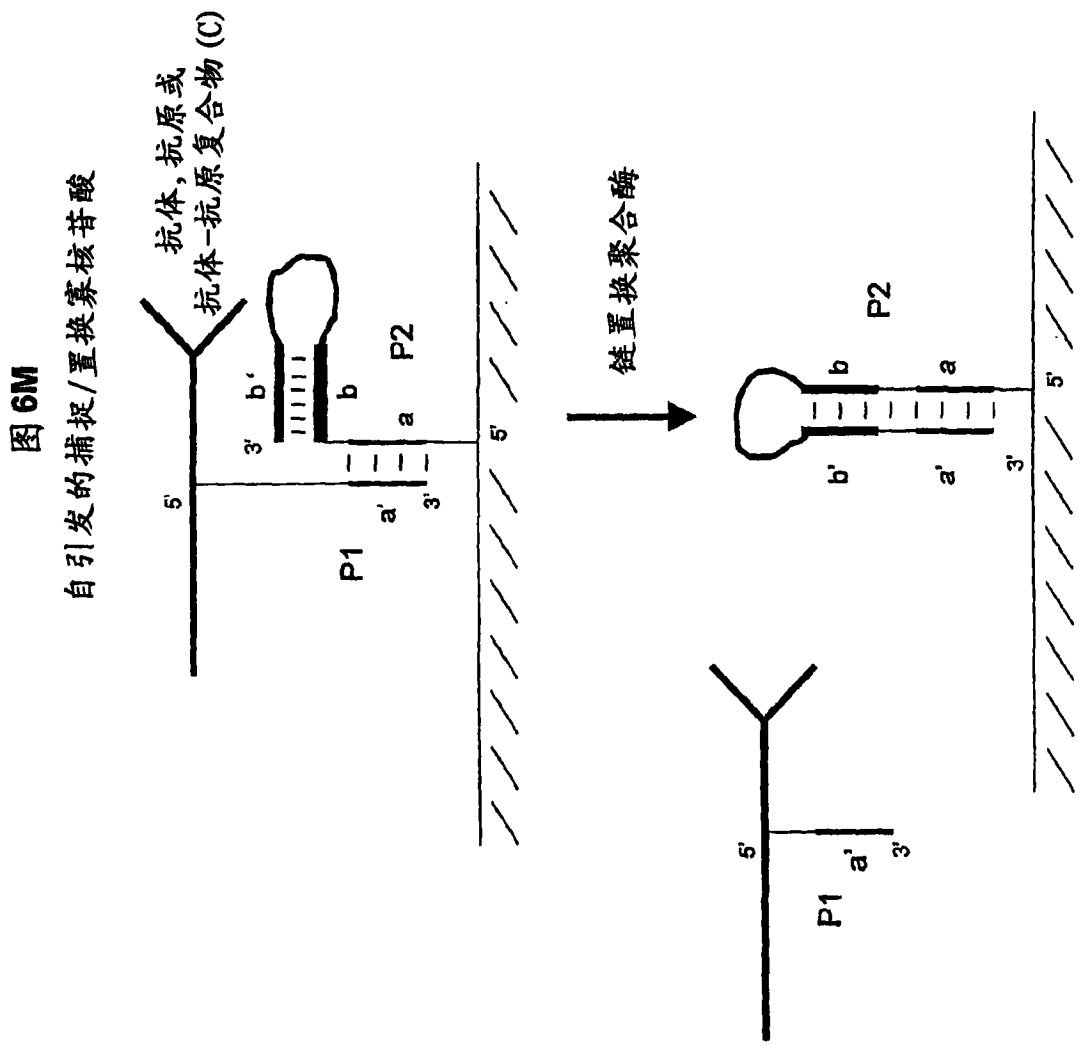


图 6N  
限制酶介导的释放和可扩增的目标的形成

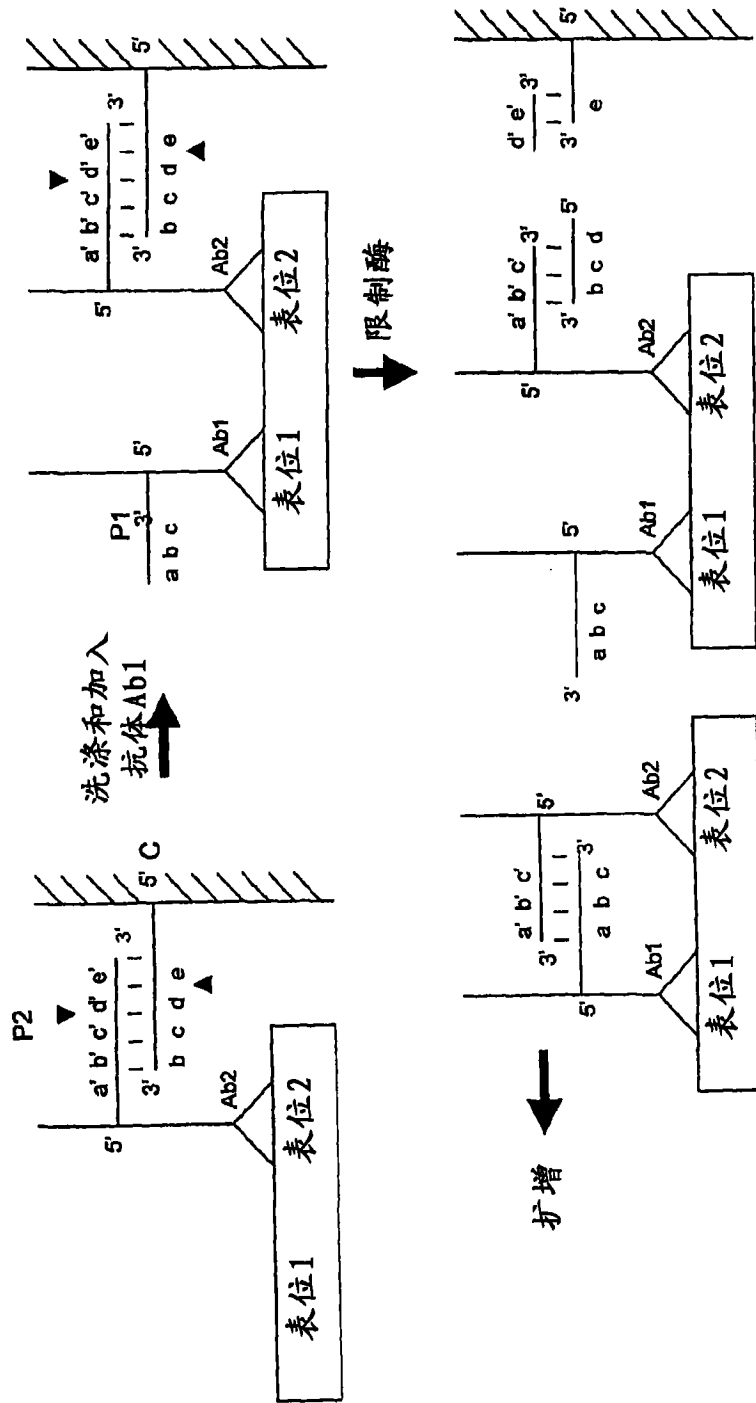


图 7A  
通过探针寡核苷酸与捕捉寡核苷酸的杂交，  
固定化抗体-探针复合物

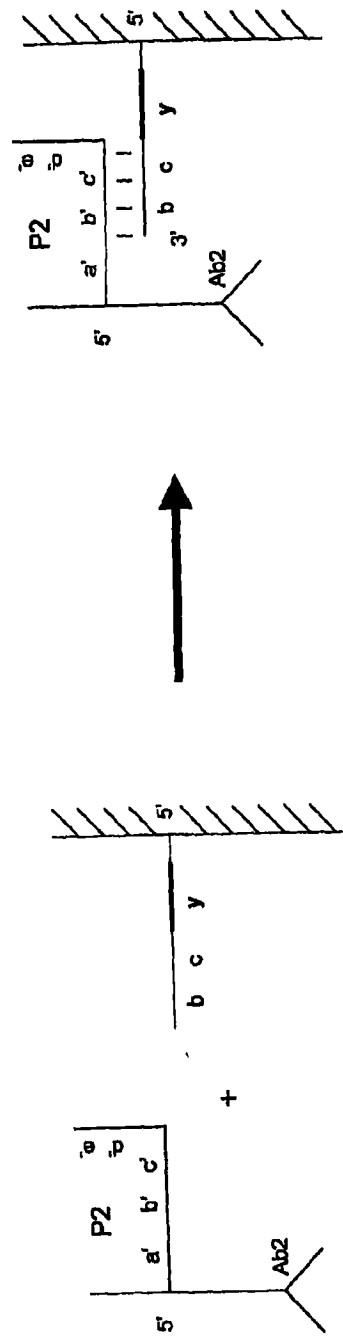




图 7B  
目标配体与被捕捉寡核苷酸固定化的  
抗体-探针复合物的结合

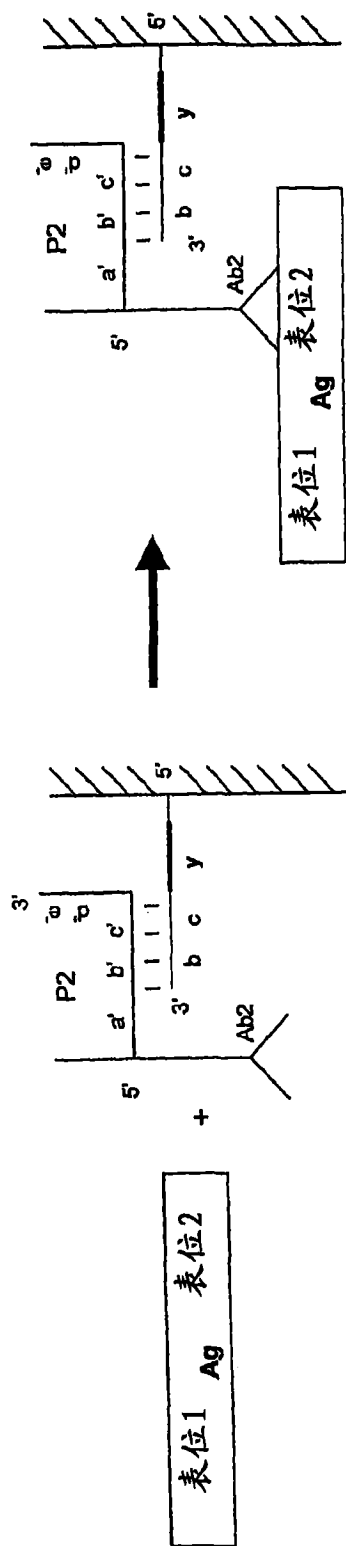


图 7C  
通过使二抗-探针缀合物结合到目标配体上，  
形成固定化的两位点"夹心"复合物

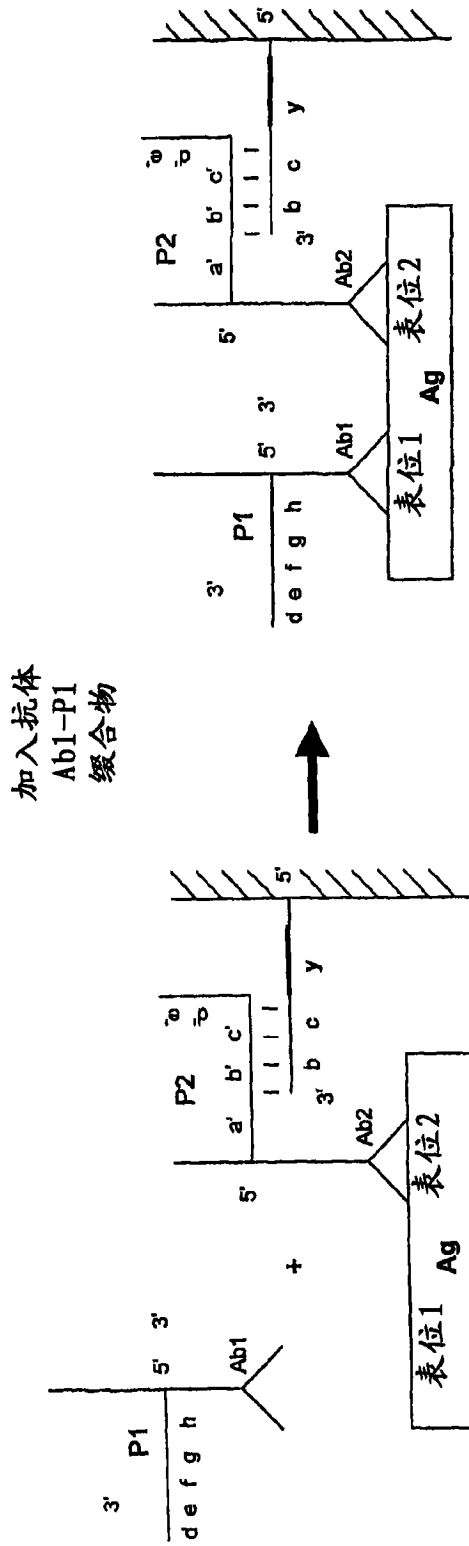


图 7D  
牵涉探针-探针 (P1-P2) 相互作用的 目标-非依赖性的复合物形成

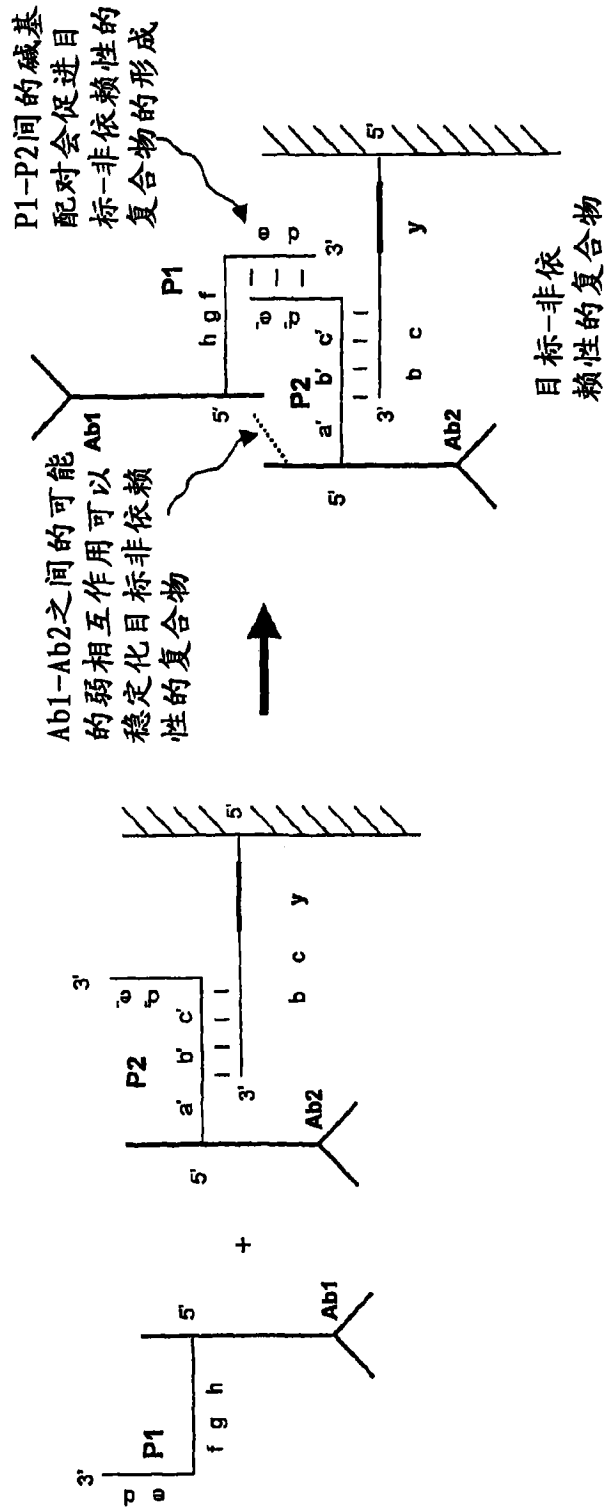


图 7E  
 使用封闭性寡核苷酸抑制会导致目标非依赖性的复合物形成的 P1-P2 相互作用

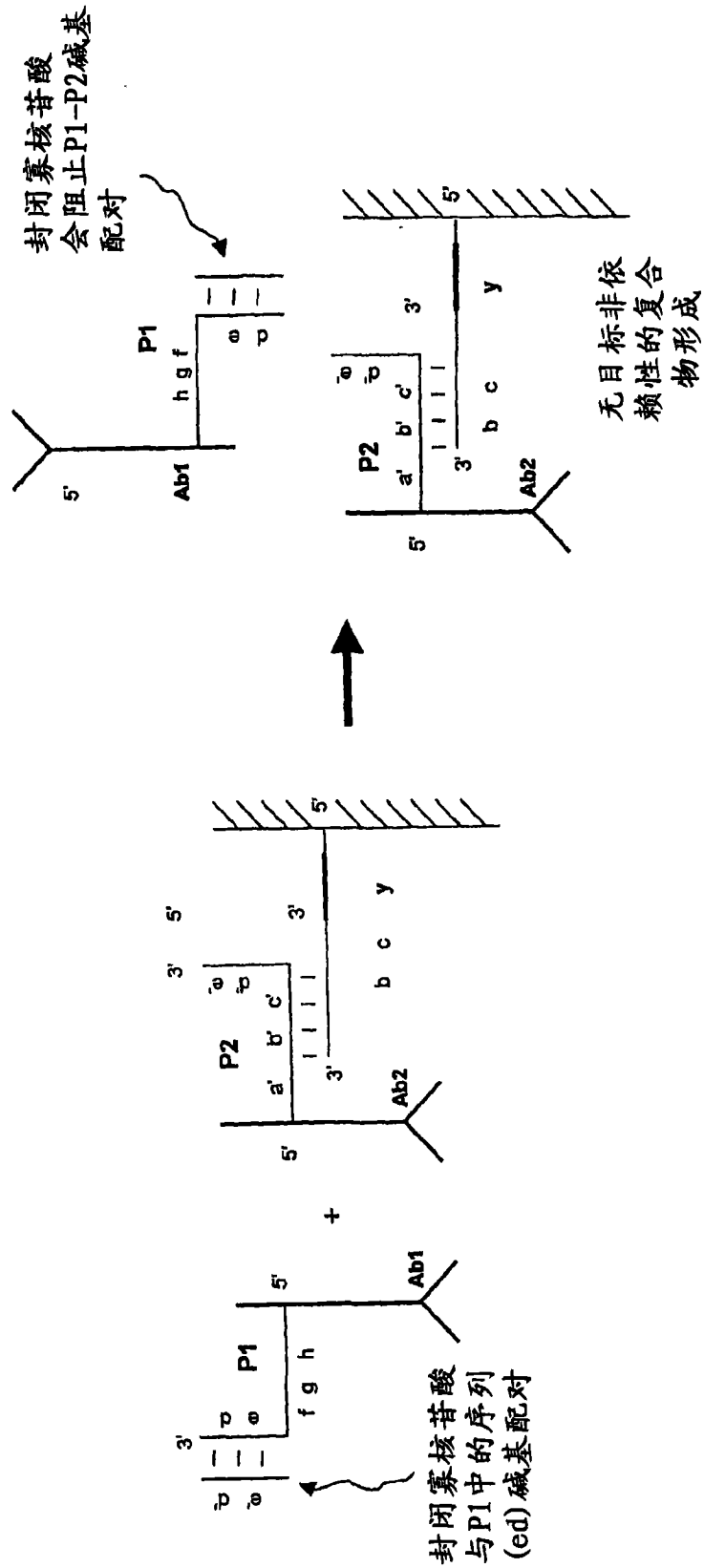


图 7F

使用封闭性寡核苷酸抑制P1-P2相互作用和阻止目标非依赖性的复合物形成

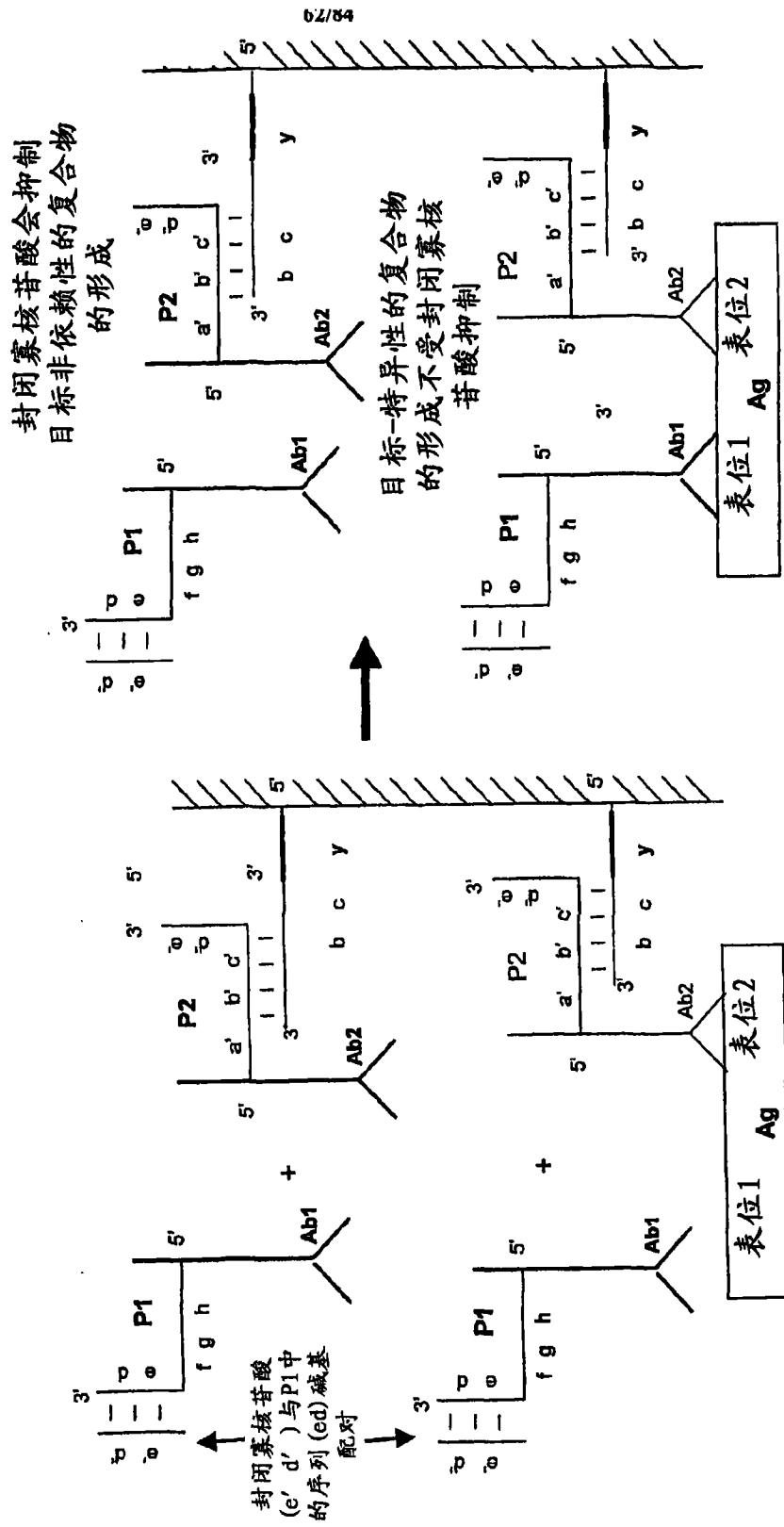


图 7G  
 使用封闭性寡核苷酸抑制 P1-P2 相互作用和阻止目标  
 非依赖性的复合物形成

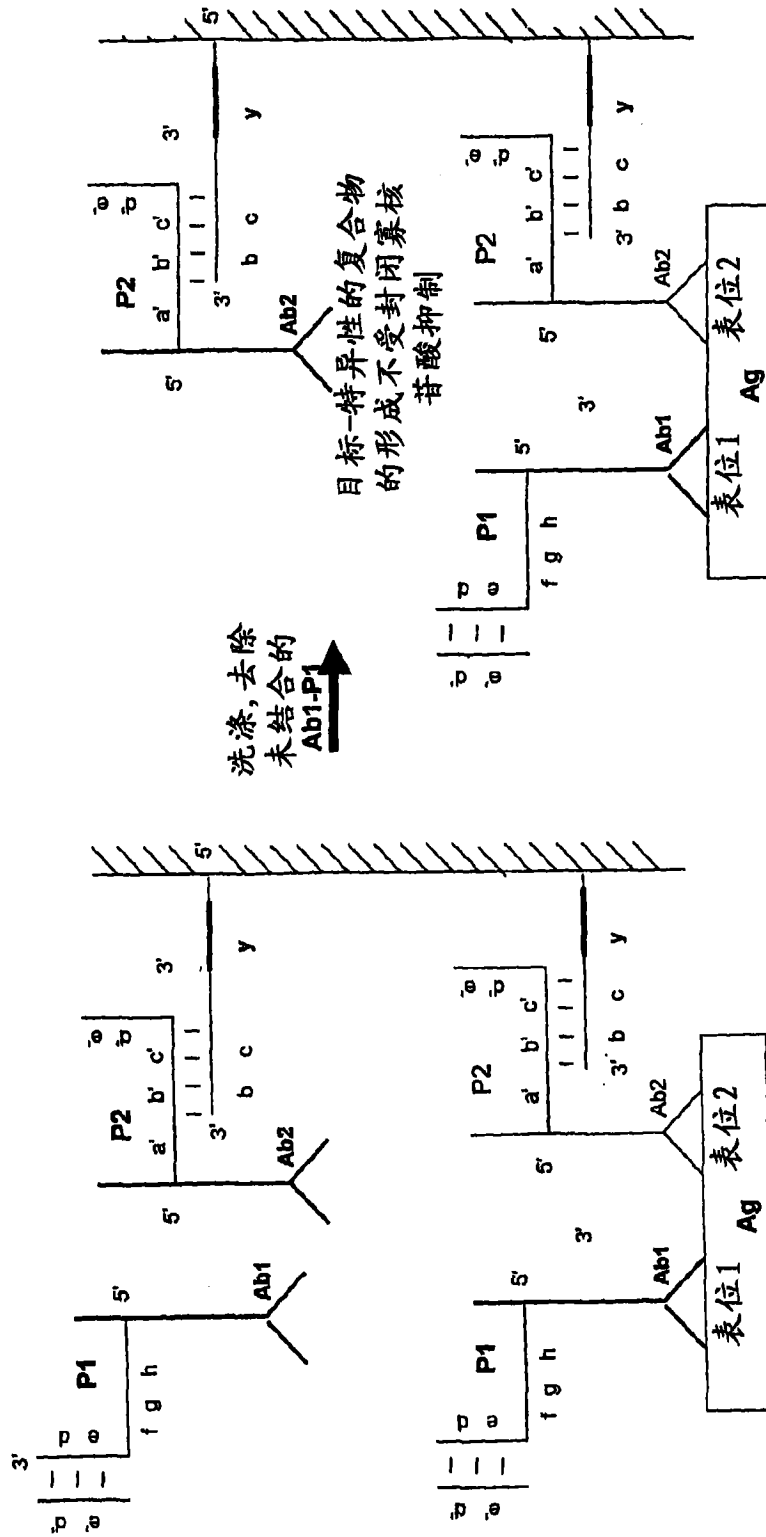


图 7H  
 使用封闭性寡核苷酸抑制 P1-P2 相互作用和阻止目标  
 非依赖性复合物的形成

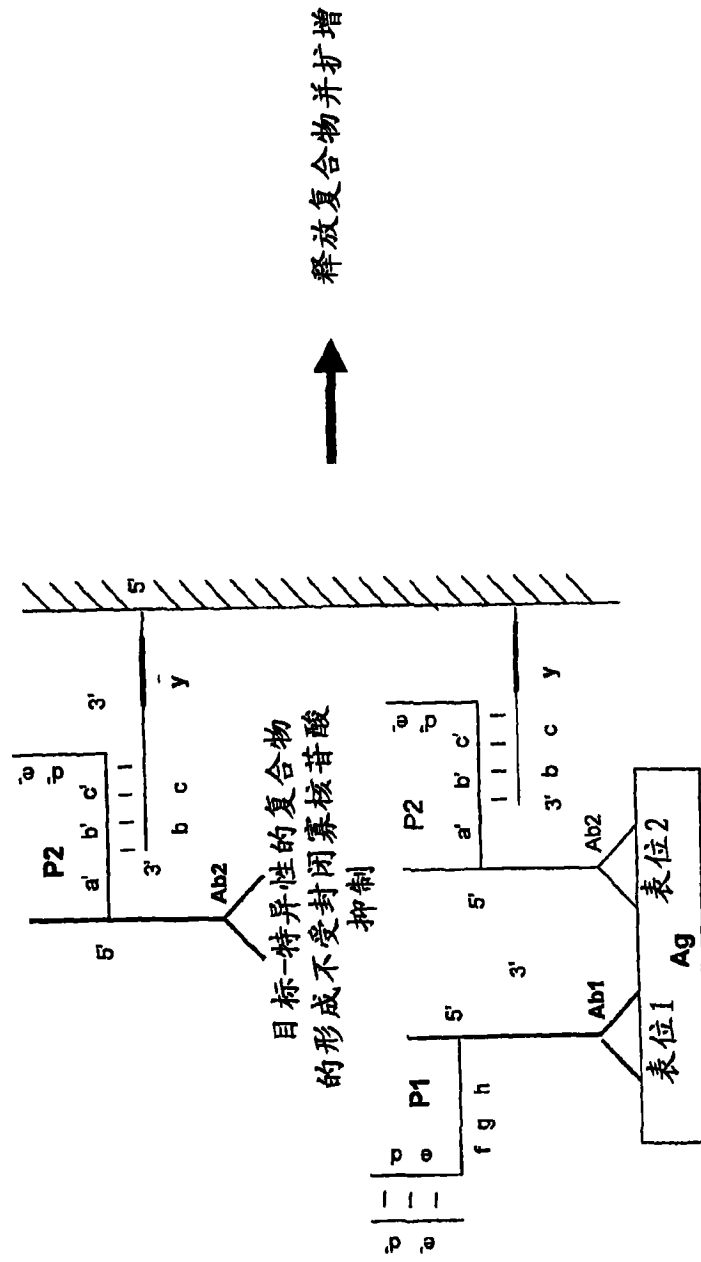


图 7I  
固定化：  
用低离子强度释放

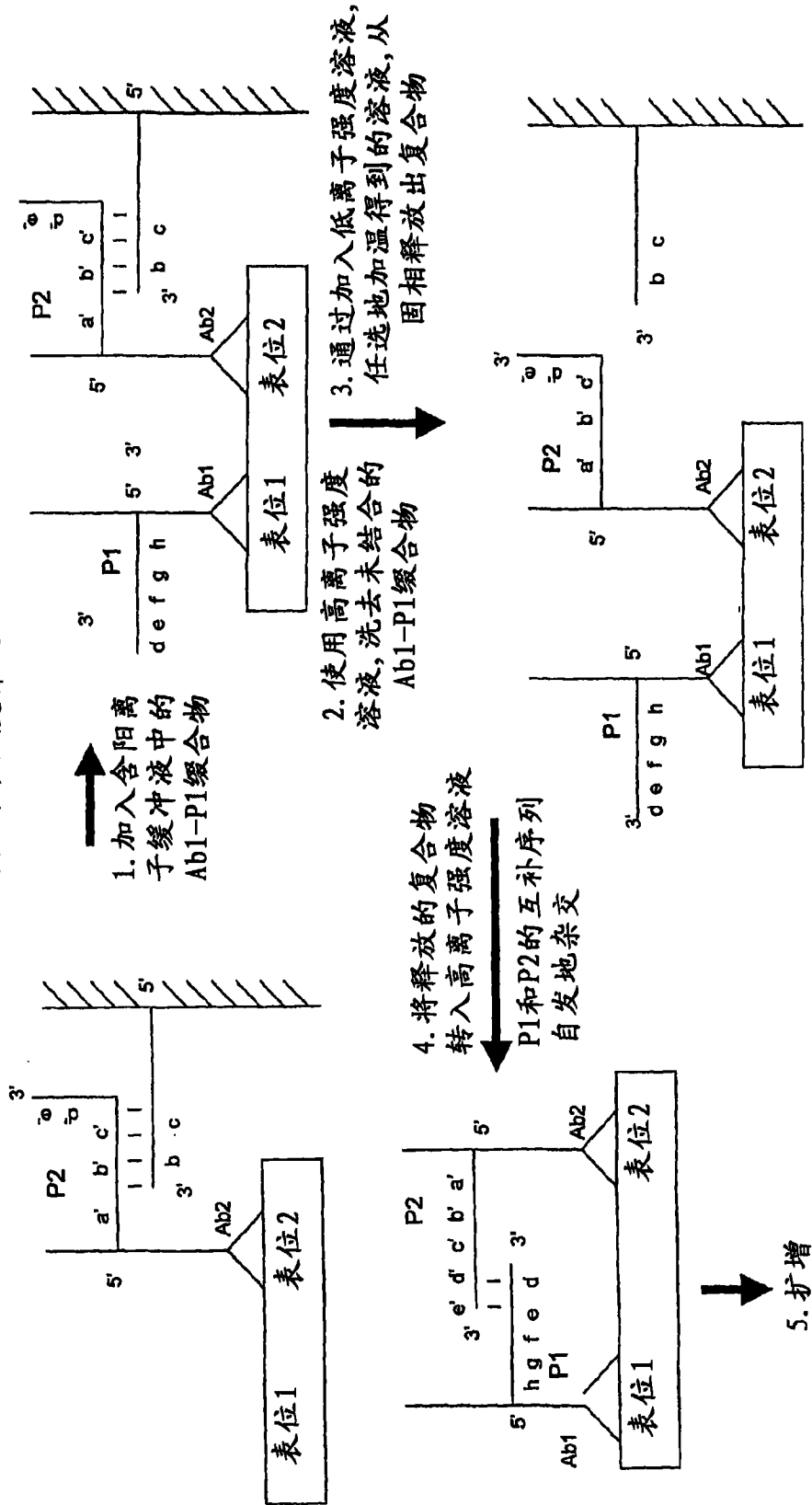




图 7J  
可扩增的复合物的多相形成和置换

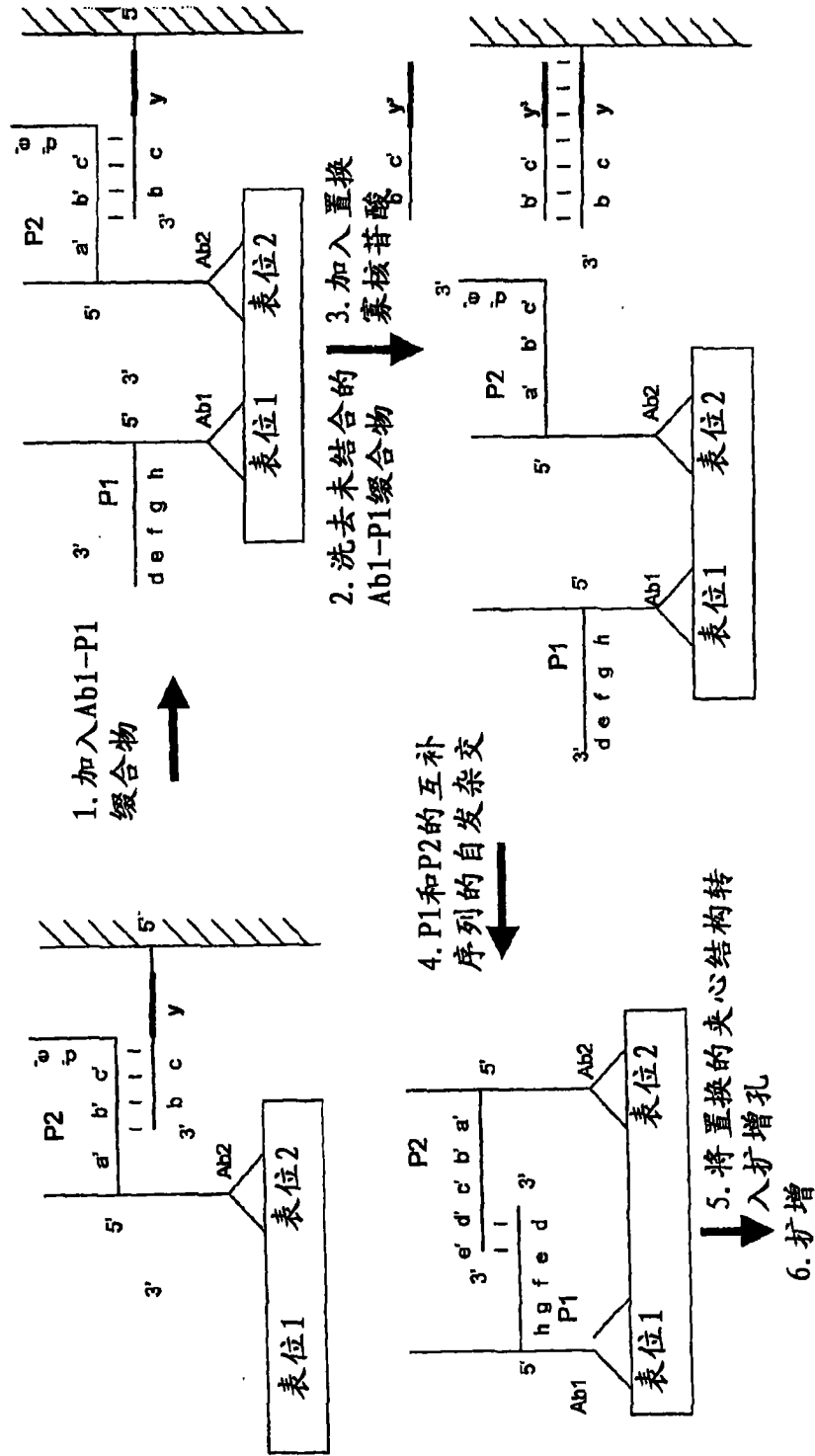


图 8A  
多相免疫扩增

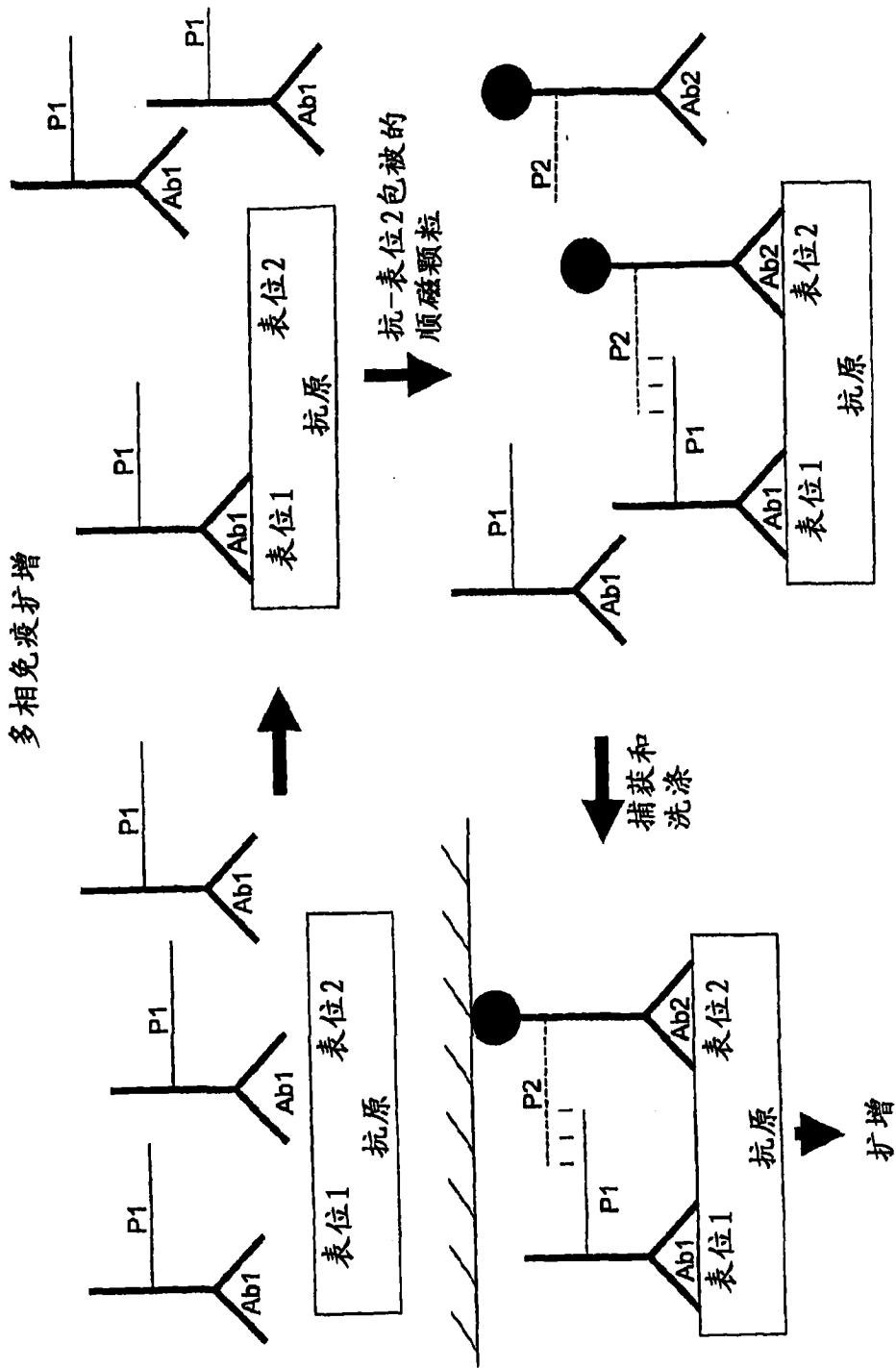


图 8B  
多相免疫扩增

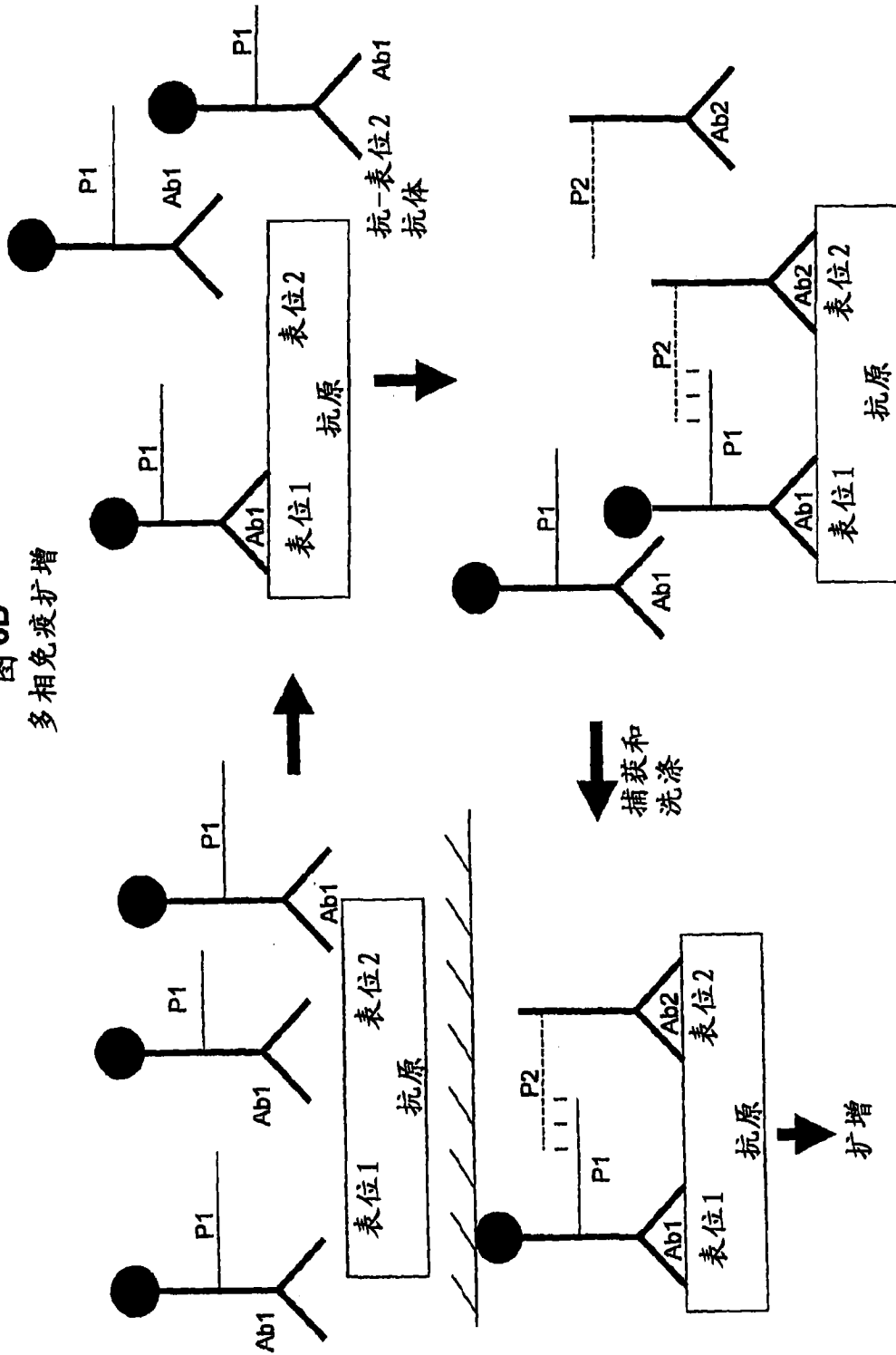


图 8C: 多相免疫扩增

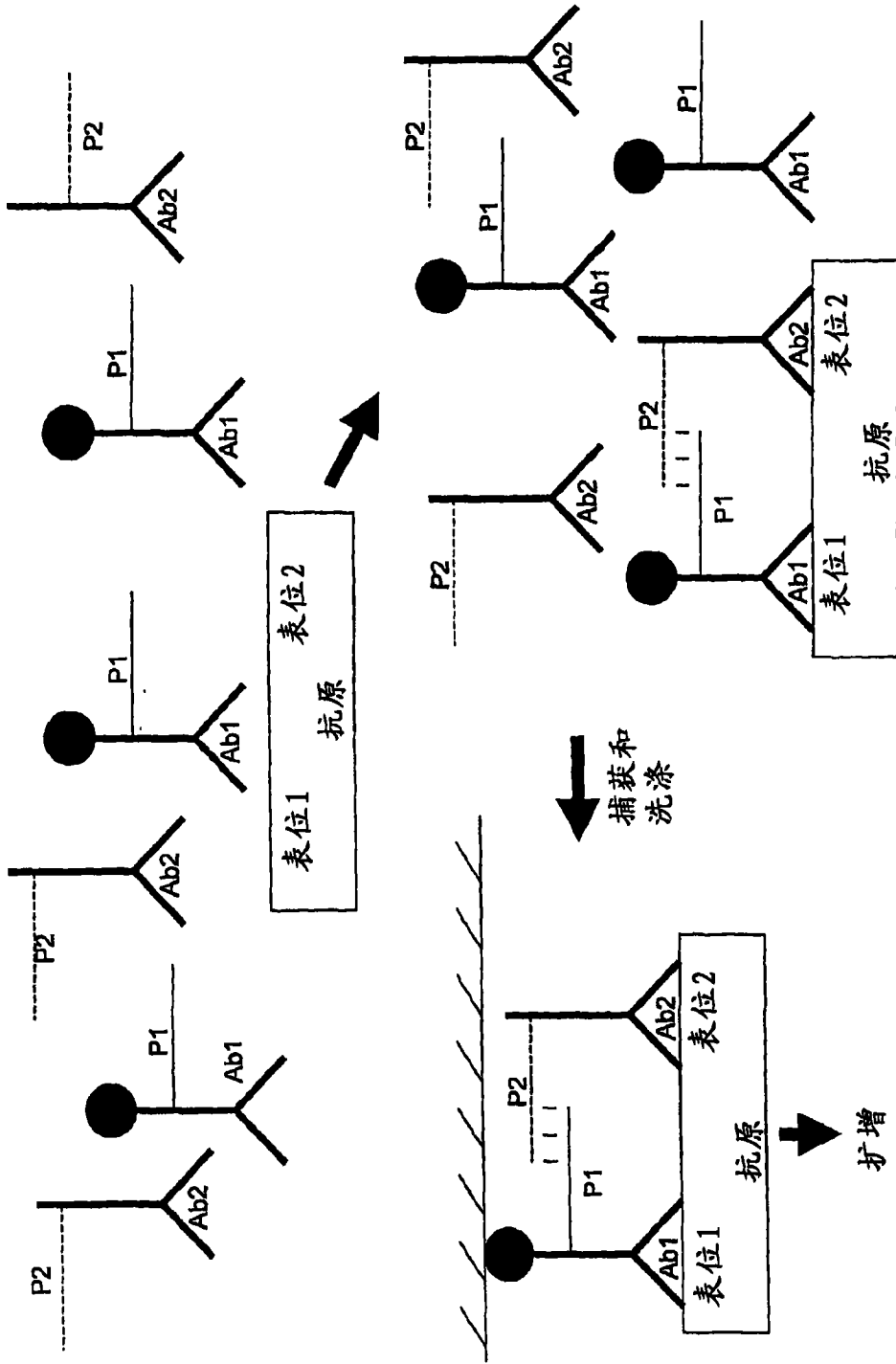


图 8D  
使用易切断的连接的多相免疫扩增

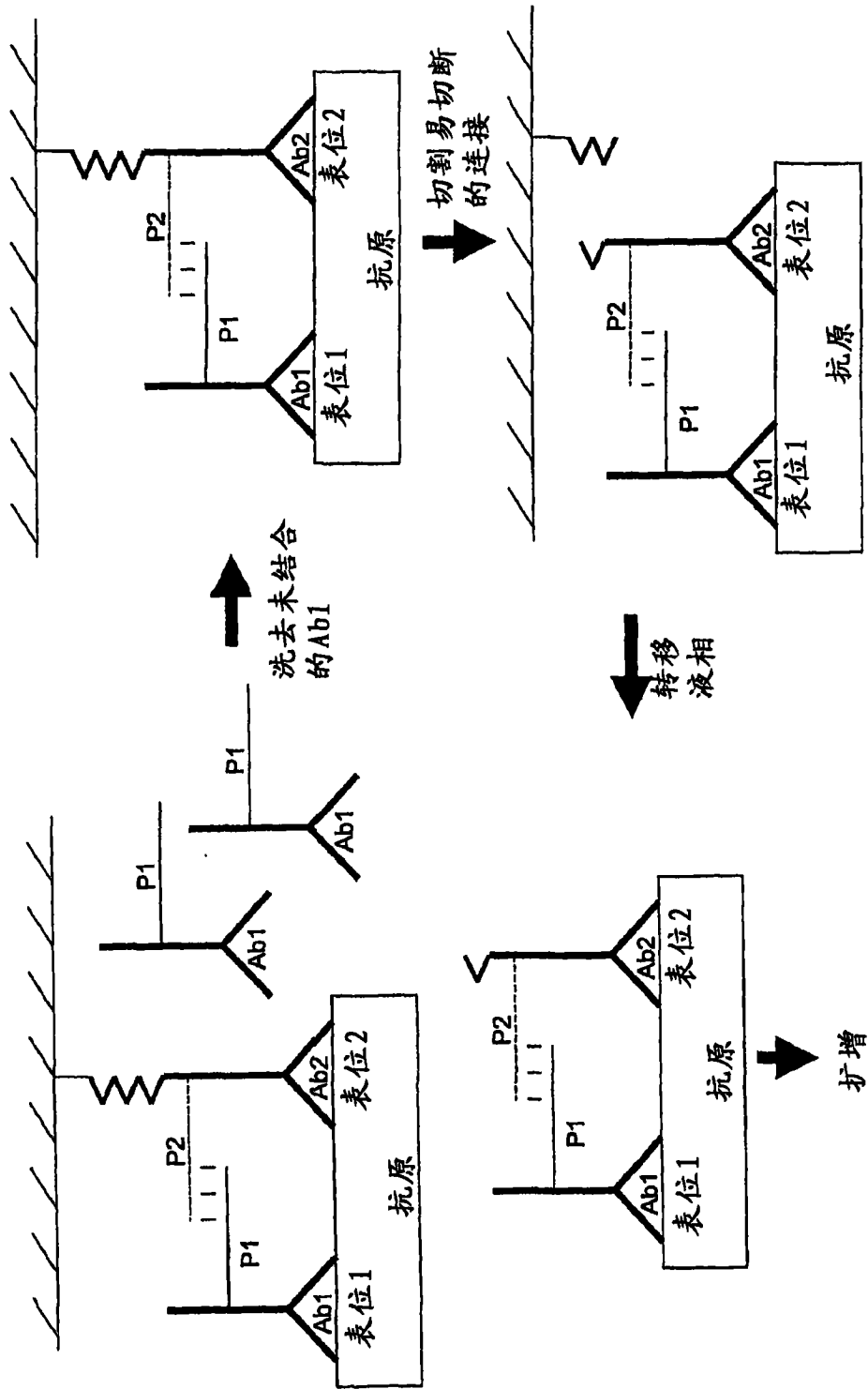


图9 使用连接物寡核苷酸的多相免疫扩增

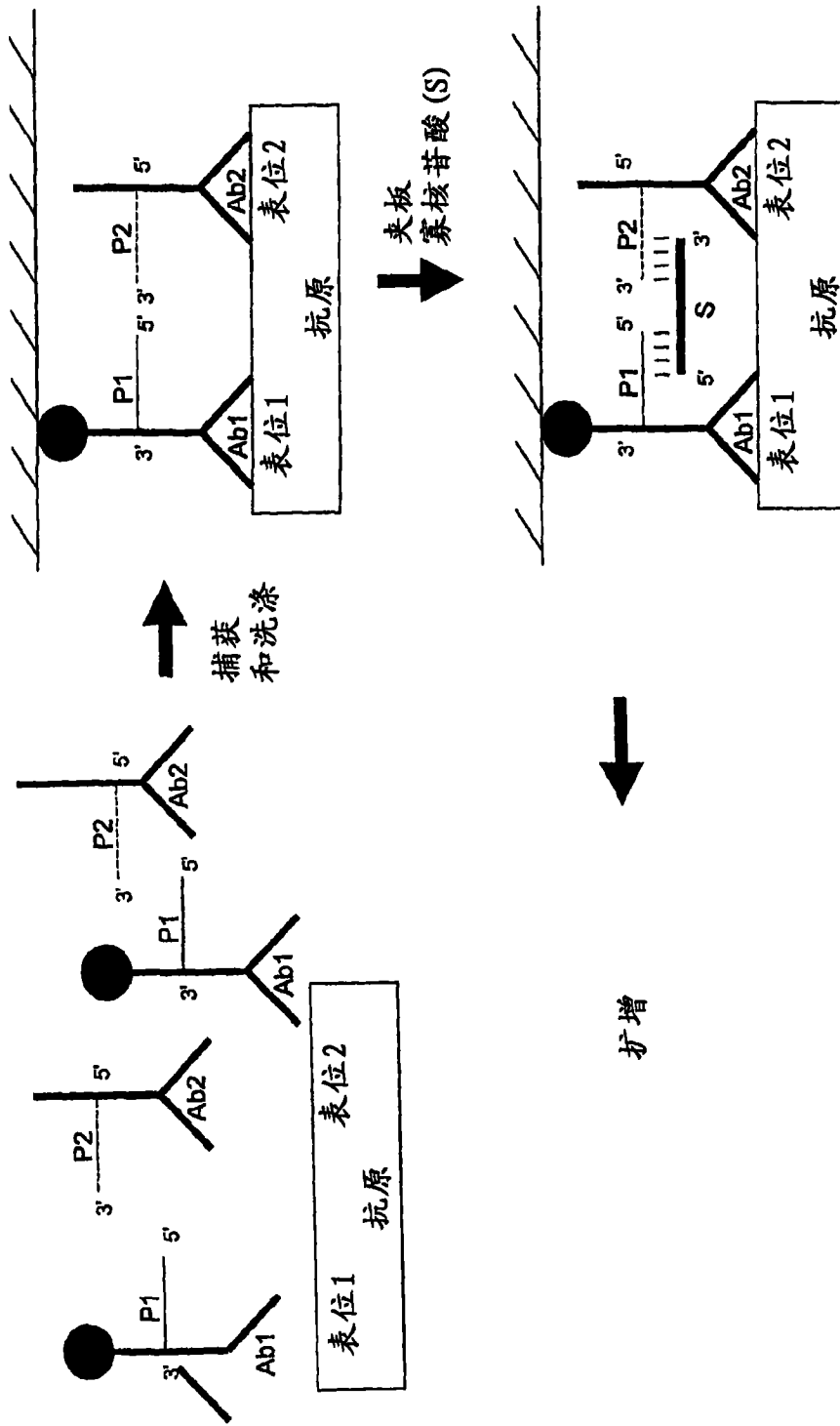


图 10

通用免疫扩增系统

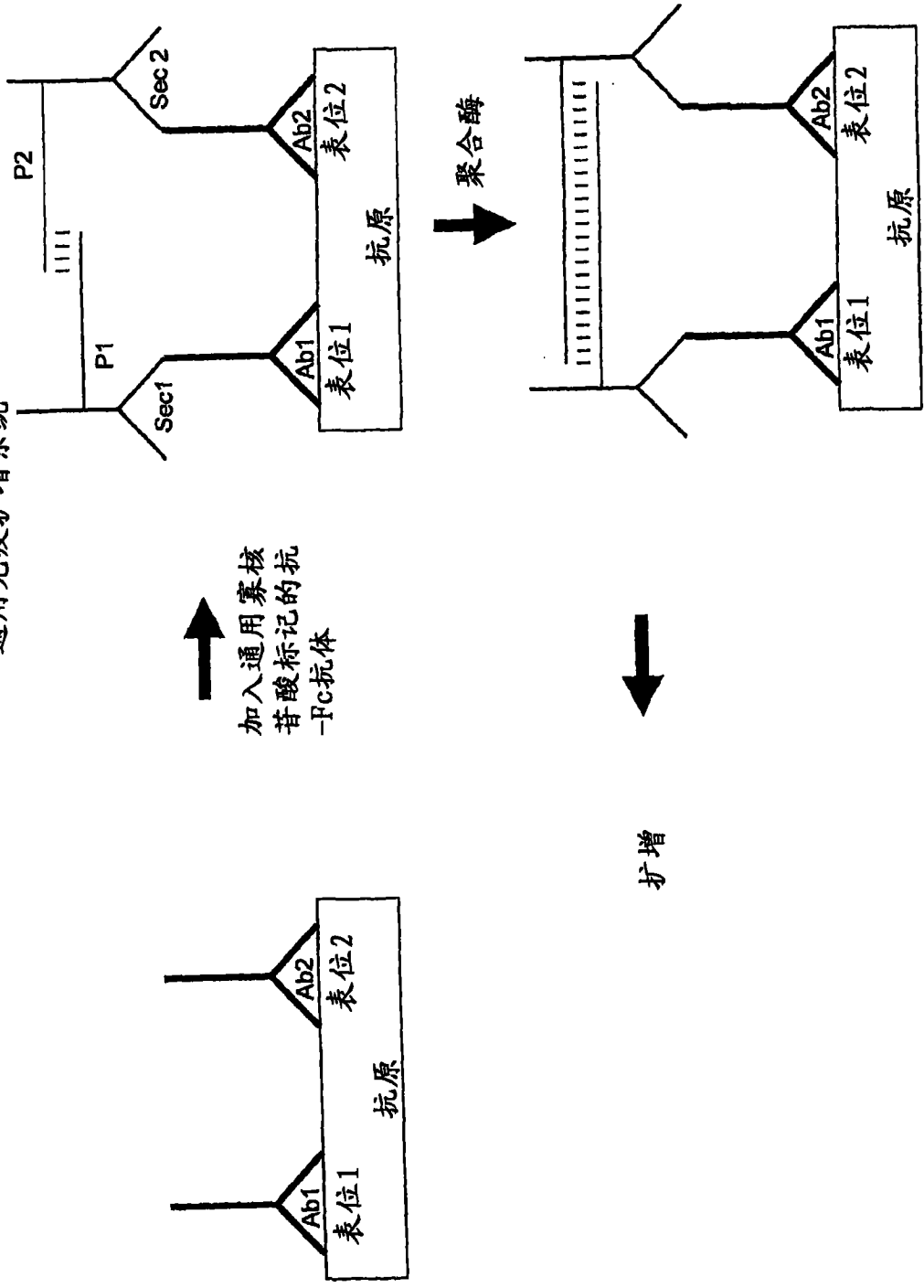


图 11A  
发夹封闭探针

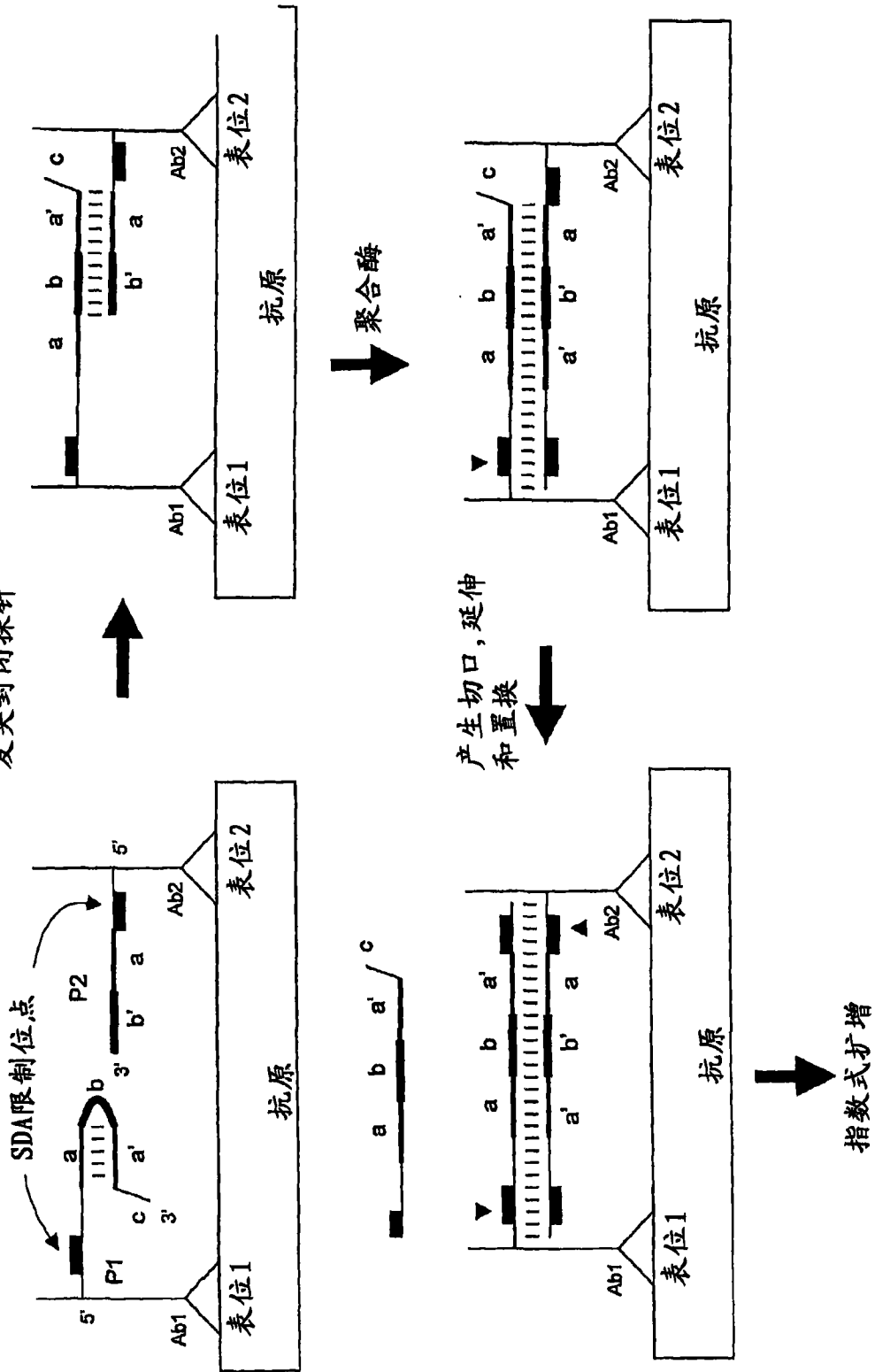




图11B  
发夹封闭探针

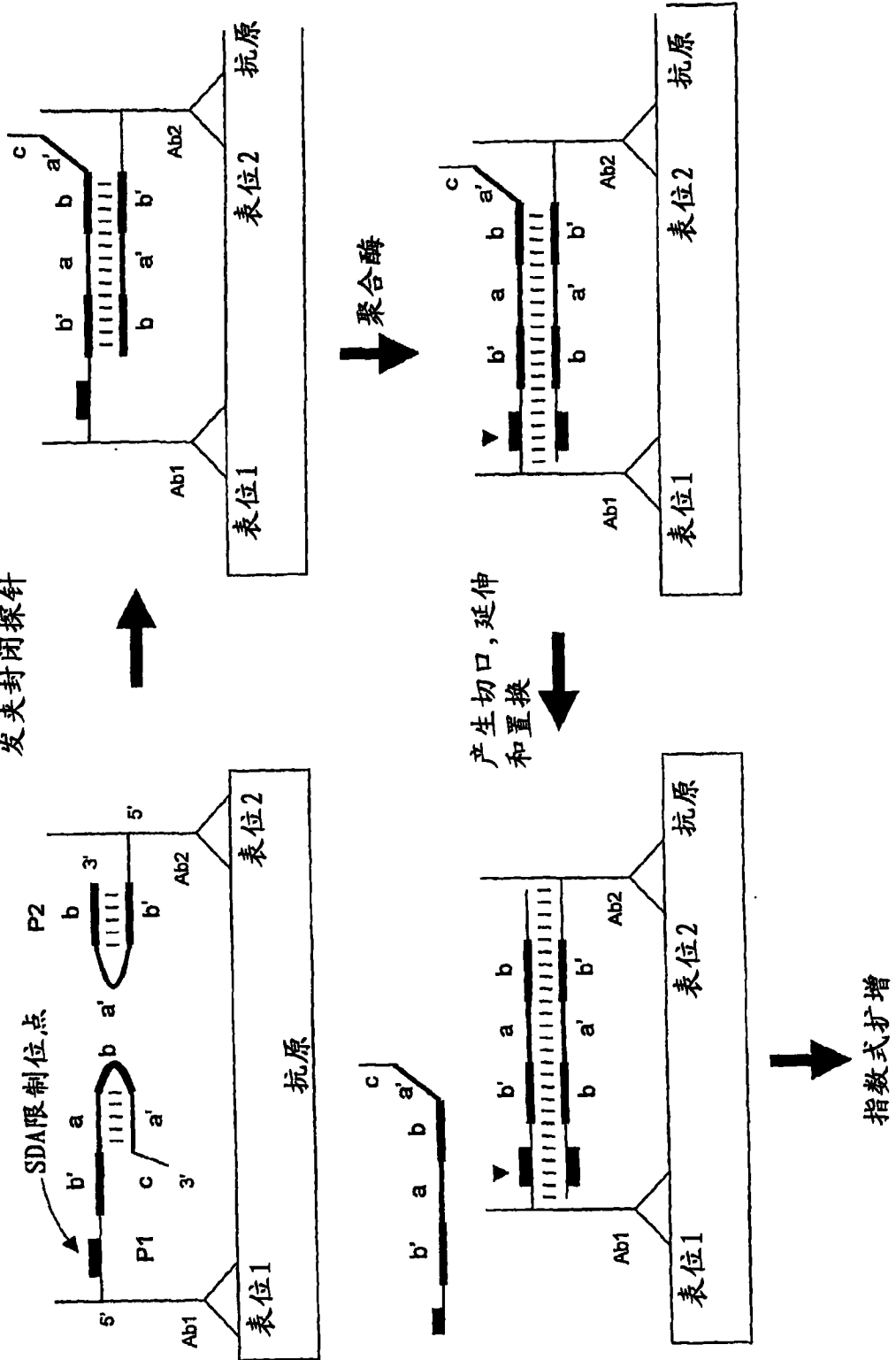


图 11C

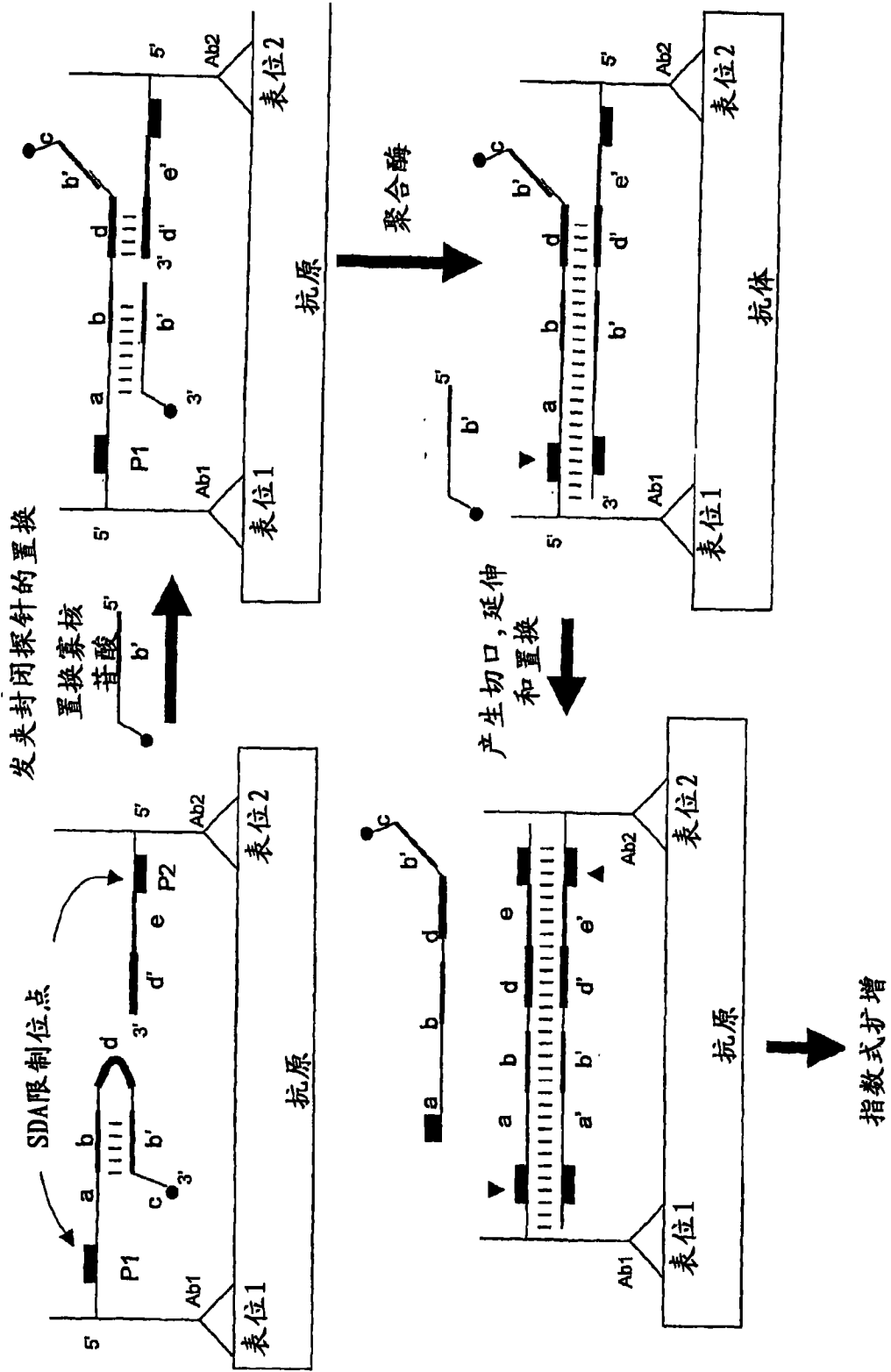


图 12  
抗原特异性 IgG 的检测

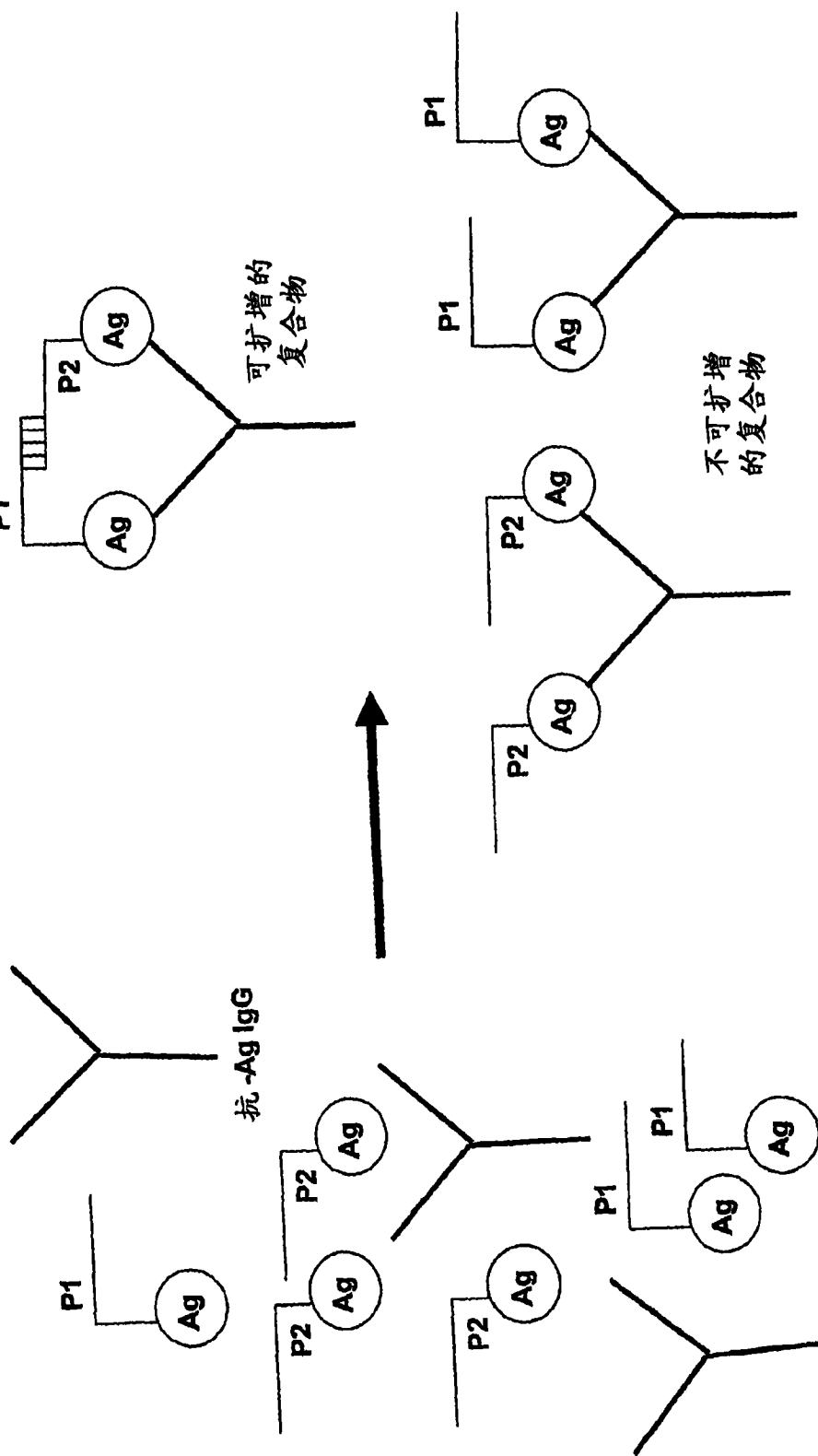


图 13  
用于二元免疫-SDA的探针，引物，系绳寡核苷酸的图

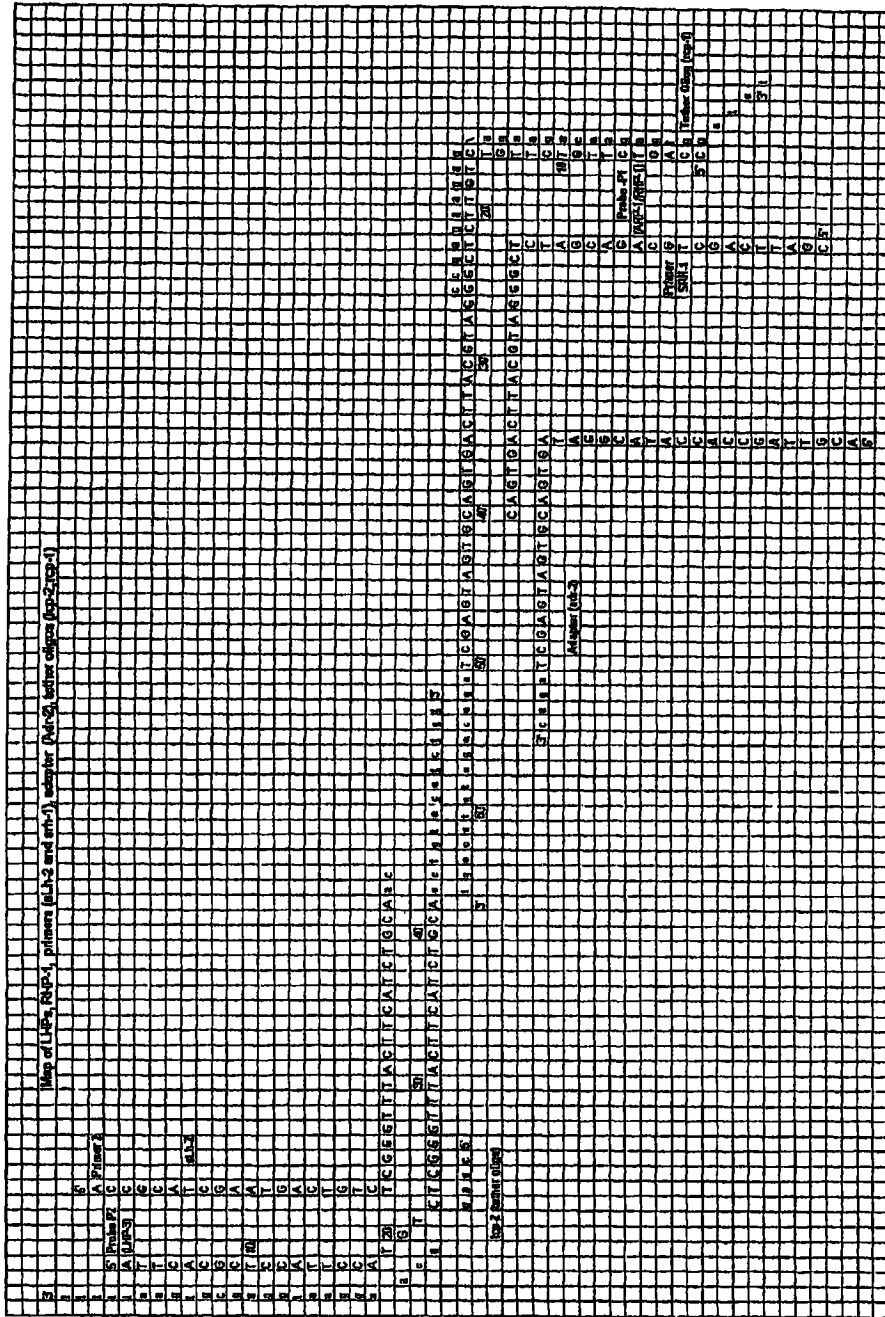


图 14A

使用加帽的寡核苷酸探针的免疫-SDA: 混合抗原和  
缓合寡核苷酸的抗体

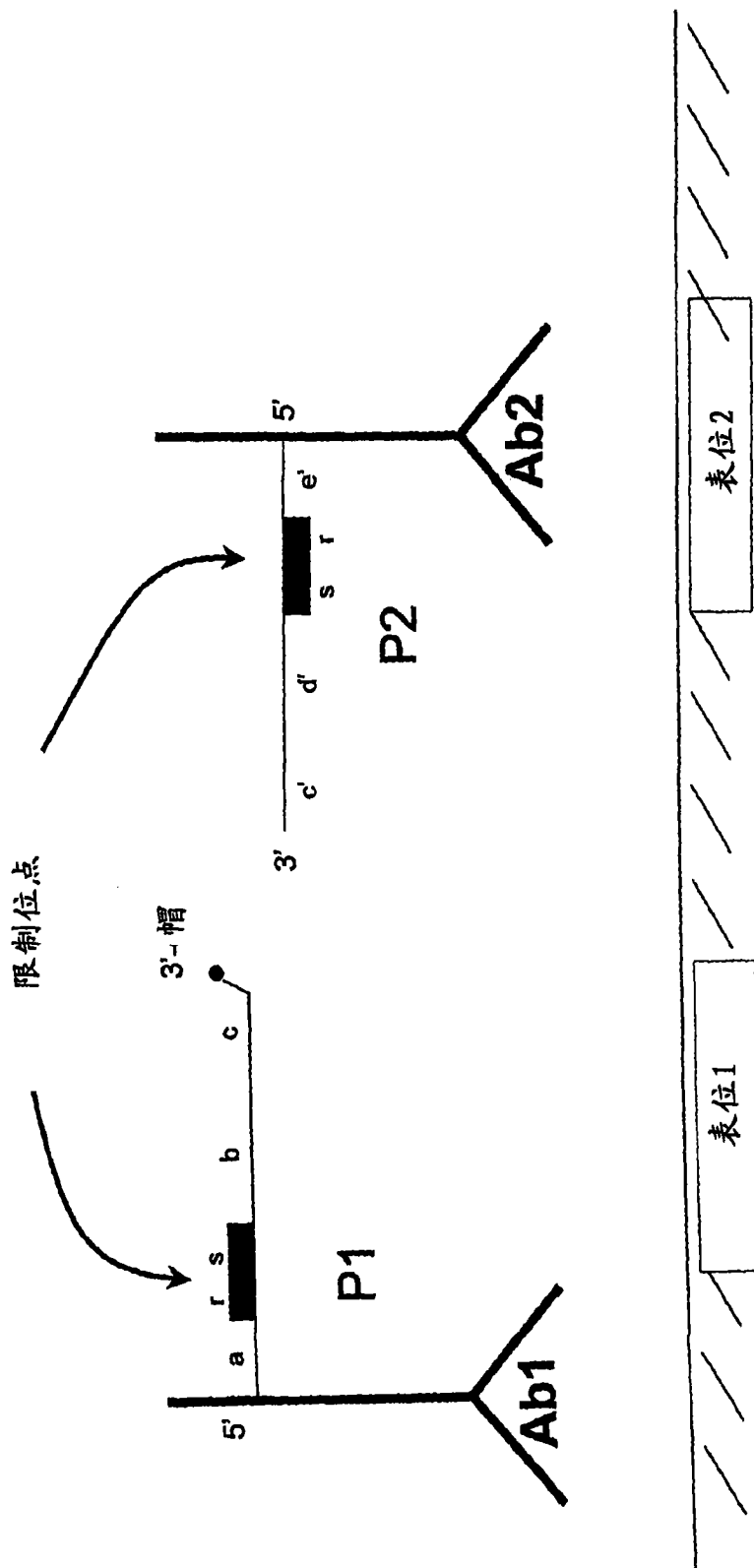


图 14B  
邻近探针的杂交

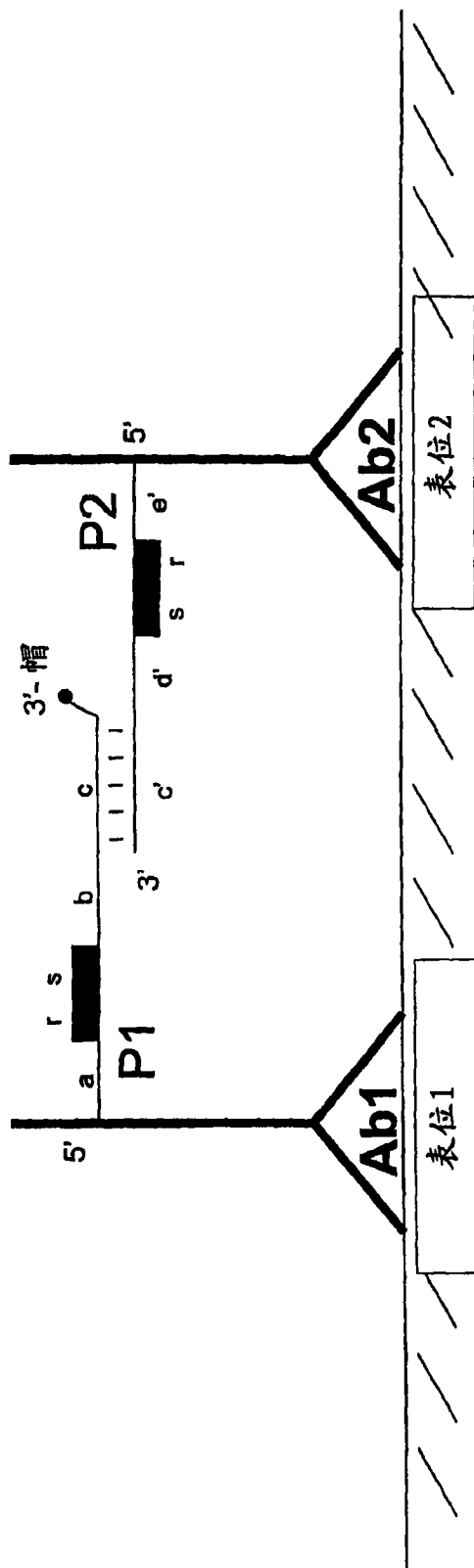


图 14C  
聚合酶延伸和限制酶切口产生

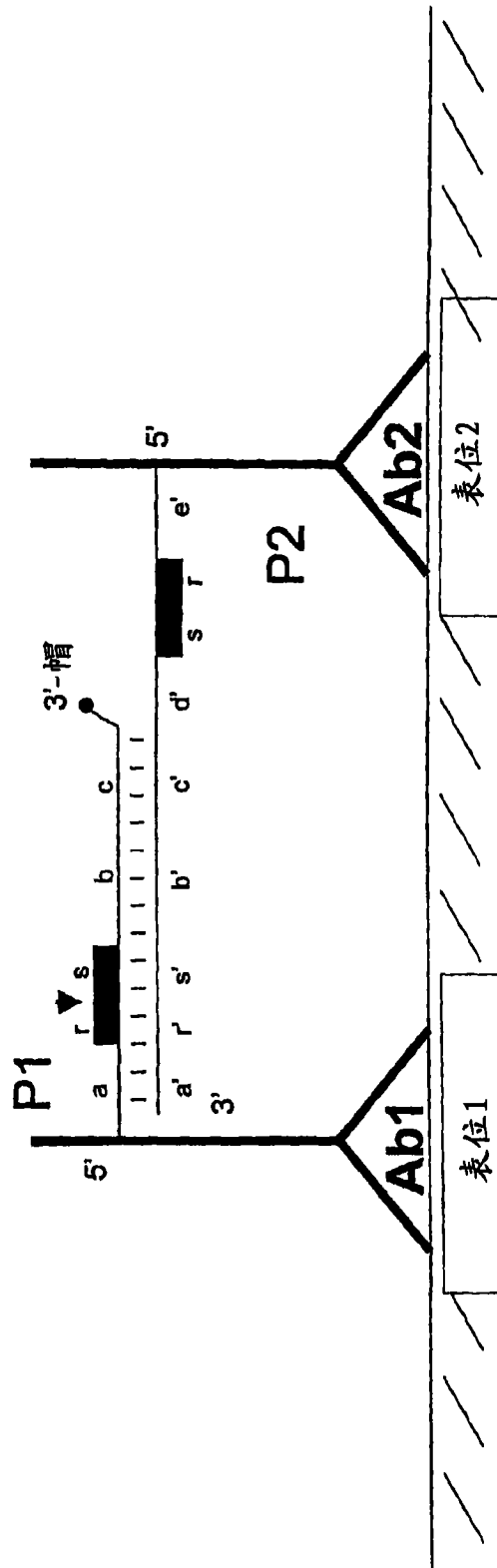


图14D  
从切口延伸和3'-加帽片段的置换

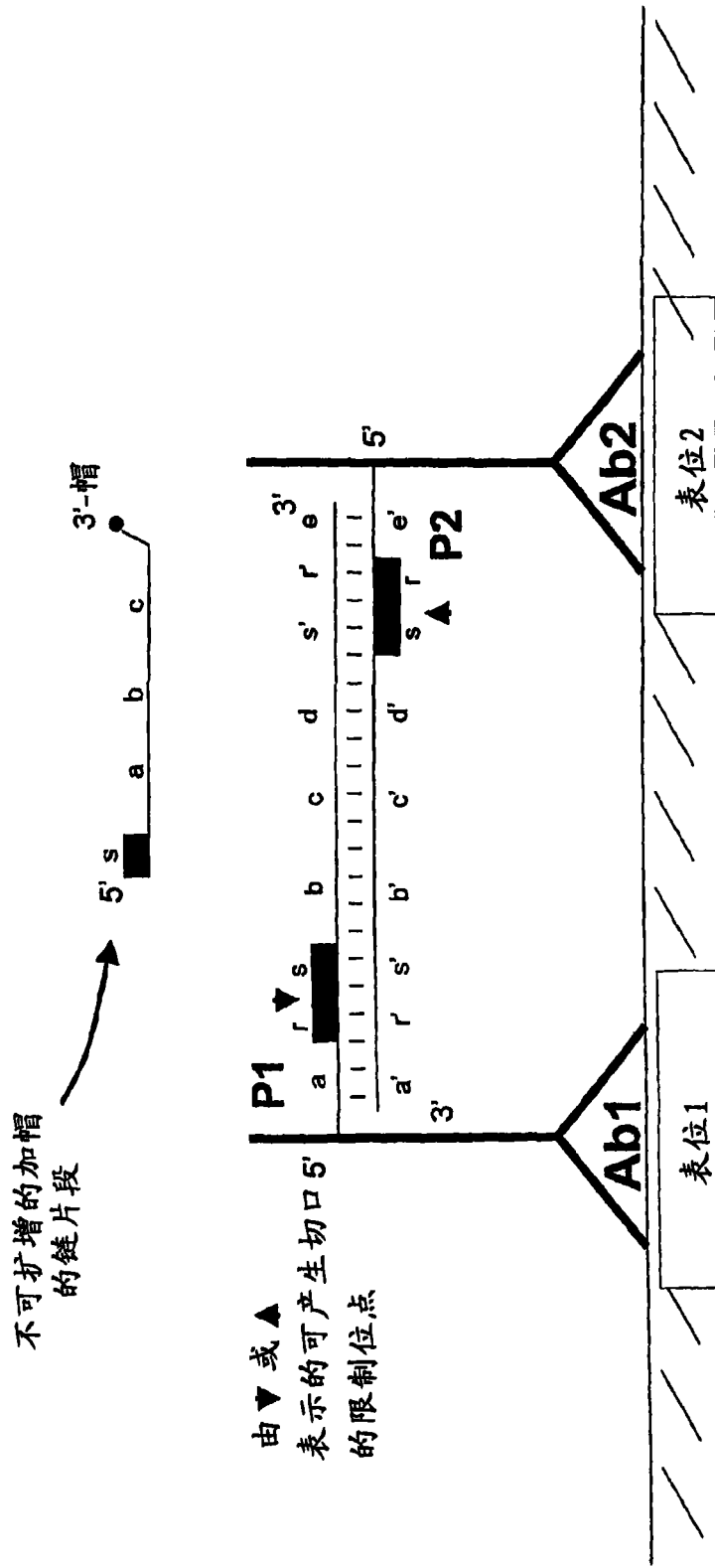




图 14E: 产生切口, 延伸和置换, 生成可扩增的链

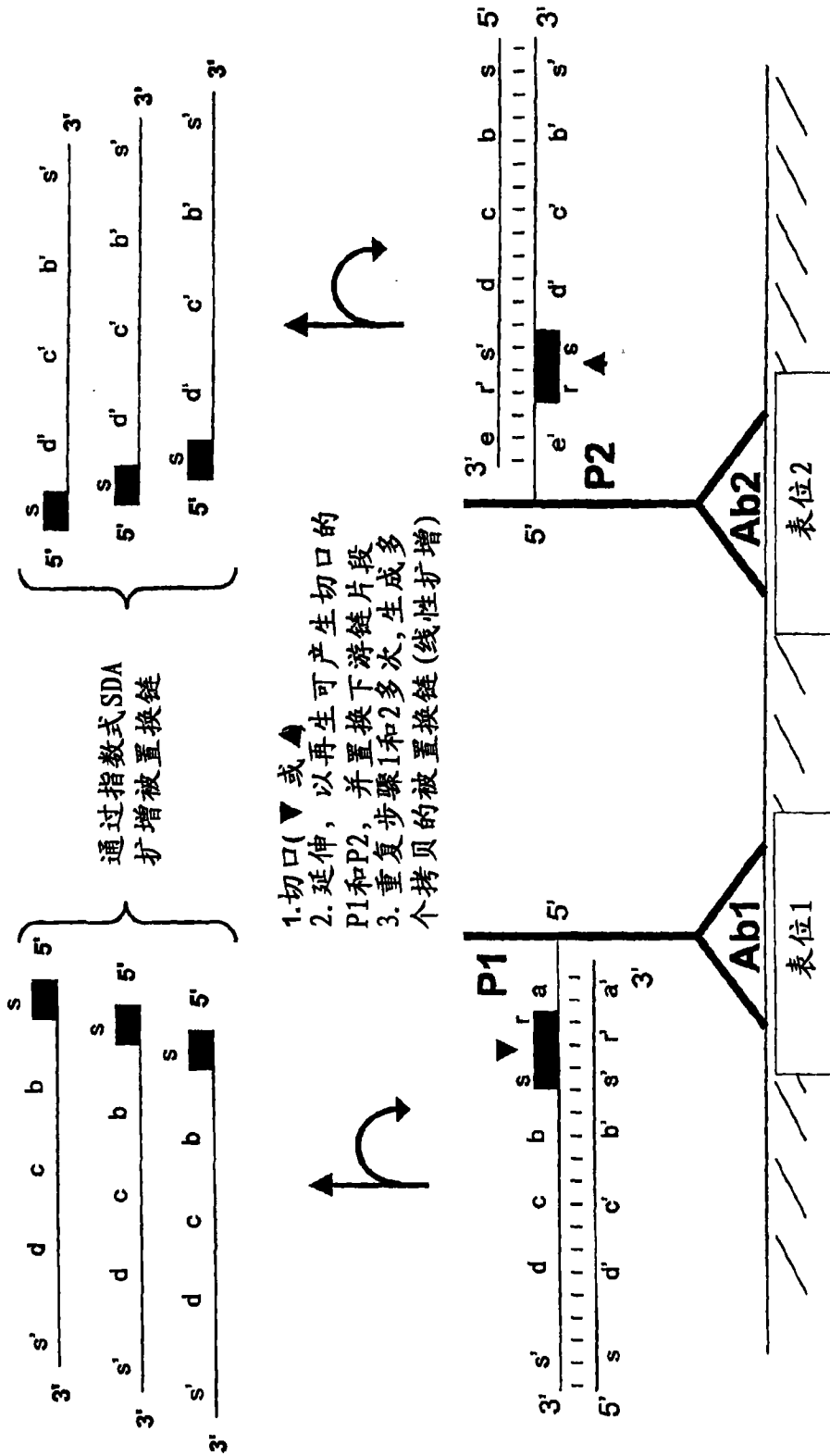


图 15A  
免疫-SDA检测IL-8的双色, 实时荧光曲线

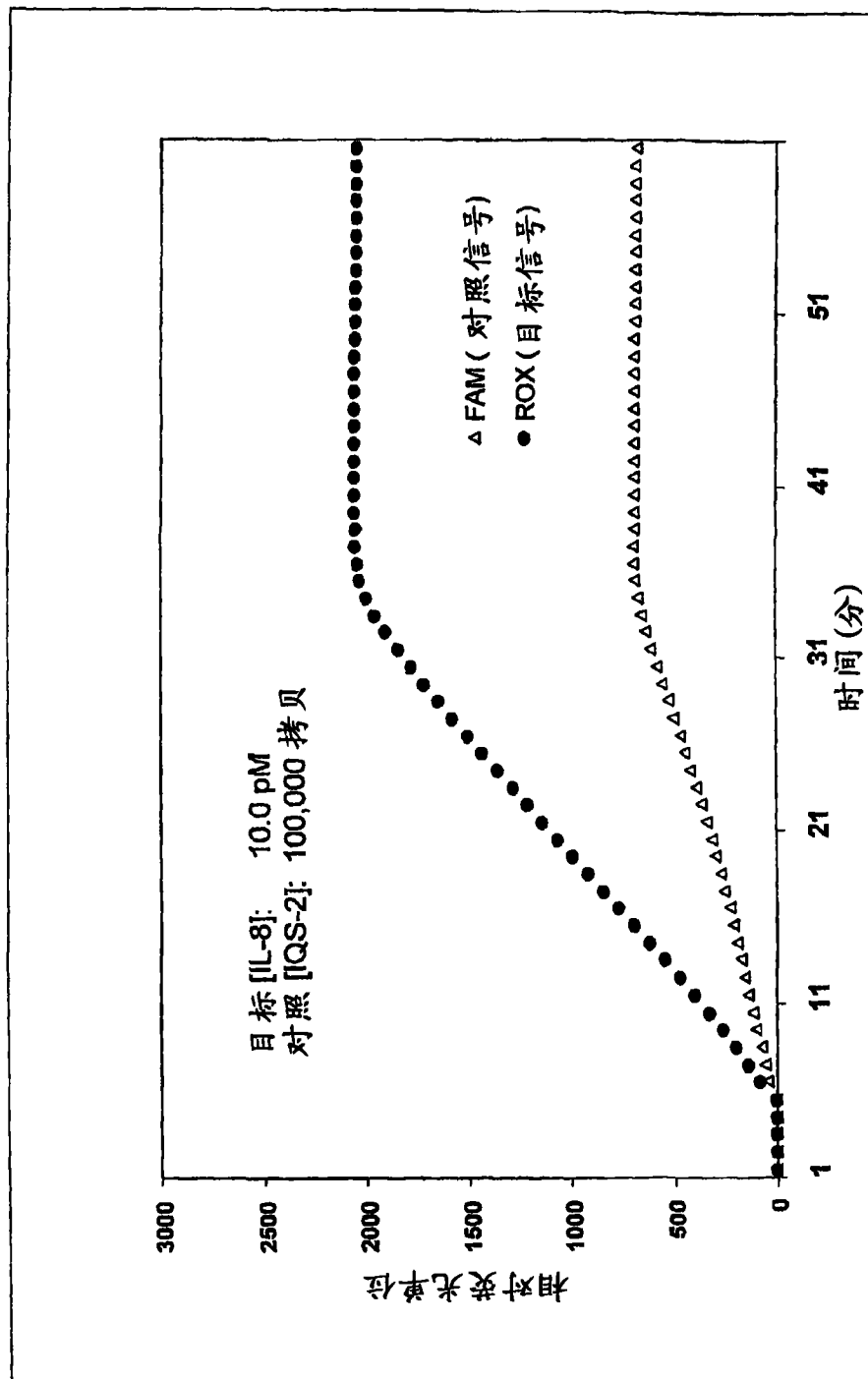


图15B  
IL-8定量的校准线

