

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091646** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.17

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6837* (2018.01)
C12Q 1/6853 (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

(54) ПЛАТФОРМА НА ОСНОВЕ САМОСОБИРАЮЩЕГОСЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАССИВА

(31) 62/614,313

(32) 2018.01.05

(33) US

(86) PCT/EP2018/085945

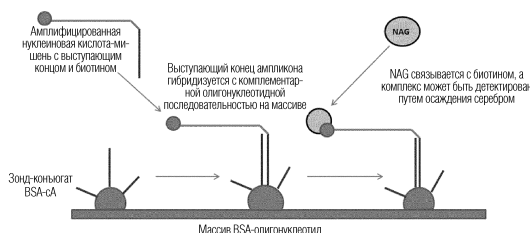
(87) WO 2019/134835 2019.07.11

(71) Заявитель:
КВОШЕНТ СЮИСС СА (CH)

(72) Изобретатель:
Боухеннон Роберт, Стюарт Марк
(US), Робсон Дэвид, Фаррелл Эдвард,
Хендерсон Линда (CH), Макауэн
Натан, Боухеннон Северн (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам и наборам для детектирования нуклеиновой кислоты или антигена в образце с использованием платформы на основе универсального массива. Так, например, нуклеиновая кислота может быть детектирована путем амплификации по меньшей мере части нуклеиновой кислоты из образца с использованием пары праймеров, включающей первый праймер, содержащий метку, и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты; контактирование ампликона, если он присутствует, со множеством одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители; промывку твердых носителей промывочным раствором и детектирование коллоидного детектирующего реагента. Настоящее изобретение также относится к специфическим олигонуклеотидным последовательностям для захвата и связывания.



A1

202091646

202091646

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563584EA/042

ПЛАТФОРМА НА ОСНОВЕ САМОСОБИРАЮЩЕГОСЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАССИВА

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки на патент США, рег. № 62/614313, поданной 5 января 2018, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, поданный в виде текстового файла ASCII

[0002] Содержание нижеследующего рассмотренного документа, поданного в виде текстового файла ASCII, включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме: электронная форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 709252000140SEQLIST.txt, дата регистрации: 14 декабря 2018 года, размер: 7 кБ).

Область изобретения

[0003] Настоящее раскрытие относится к способам и наборам для детектирования нуклеиновых кислот, антигенов или того и другого в образце с использованием платформы на основе универсального массива, а также к устройству и к способам амплификации нуклеиновых кислот, включающим по меньшей мере три стационарные температурные зоны.

Предпосылки создания изобретения

[0004] Технология микромассивов была адаптирована для детектирования широкого спектра нуклеиновых кислот, белков и других антигенов, а в частности, при тестировании нуклеиновых кислот (NAT). Существующий формат микромассивов требует получения копий различных реагентов для захвата (например, антител или одноцепочечных олигонуклеотидов) против мишеней на активированном предметном стекле, обычно в двух или трех экземплярах, вместе с контрольными пятнами. При тестировании образца на присутствие представляющего интерес антигена, образец подвергают реакции взаимодействия с массивом, в результате чего происходит захват мишени, а затем образец смывают, меченое антитело используют для детектирования захваченных мишеней и осуществляют способы амплификации/детектирования для визуализации реакции, и результаты регистрируют с использованием ридера. Этот многостадийный процесс занимает много времени, и затраты на печать множества различных пятен захвата резко возрастают при тестировании различных панелей. Кроме того, каждый созданный массив должен быть изготовлен и проверен на качество для каждой группы-мишени и мишени каждого типа (например, антитела, антигена, нуклеиновой кислоты и т.п.), что требует изготовления и создания списка массивов множества типов, что еще больше повышает затраты.

[0005] Микромассивы создают посредством присоединения захватывающих лигандов к твердой поверхности. По мере увеличения возможностей более точного

определения все более мелких пятен, эти микромассивы позволяют детектировать от нескольких до миллионов мишеней в зависимости от плотности, размера пятна и т.п. На обычном массиве, каждое пятно или серия пятен содержат захватывающий олигонуклеотид, комплементарный мишени, и антиген, посредством которого антитело в образце связывается с присоединенной мишенью, либо антитело отпечатывают на массиве (связывают с массивом) для связывания мишеней в образце, которые впоследствии помечают и детектируют, хотя в некоторых массивах также используются немеченные мишени. Создание этих массивов является очень трудоемкой и дорогостоящей процедурой, поскольку все пятна представляют собой различные материалы, и для получения одного массива могут потребоваться сотни, тысячи или даже миллионы различных лигандов для захвата.

[0006] Детектирование инфекционных агентов, биомаркеров, токсинов и клеток в клинических образцах, взятых у человека, имеет первостепенное значение для безболезненных переливаний и трансплантаций, а также для различных диагностических целей. Однако, как описано выше, время и стоимость изготовления различных предметных стекол с микромассивами для различных агентов, биомаркеров, полинуклеотидов, антигенов и т.п. могут быть чрезмерно высокими. Следовательно, существует потребность в разработке технологии платформы на основе микромассивов, которая обеспечивала бы надежное и точное детектирование различных нуклеиновых кислот или антигенов в образце при одновременном снижении связанных с этим производственных затрат.

Краткое описание сущности изобретения

[0007] Для удовлетворения этих и других потребностей был разработан описанный здесь способ «универсального массива», применяемый в технологии платформы на основе микромассивов. Такие «микромассивы» включают любую платформу, способную к детектированию мультиплекса, включая, но не ограничиваясь ими, плоские микромассивы, полосы, нити, сферы и луночные массивы. С применением такого способа можно напечатать массив одного типа, например, массив олигонуклеотидных пятен, каждое из которых конъюгировано с твердым носителем (например, посредством спейсерного реагента, такого как альбумин бычьей сыворотки, BSA). Этот универсальный массив может быть адаптирован для детектирования широкого спектра нуклеиновых кислот в образце путем амплификации с использованием праймера с последовательностью олигонуклеотидного адаптера, что позволяет полученному ПЦР-продукту гибридизоваться с олигонуклеотидной последовательностью, представленной в виде пятна на массиве. Каждая пара праймеров для представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну из этих уникальных адаптерных последовательностей, что позволяет каждому ампликону гибридизоваться с различными пятнами на массиве. Таким образом, предметное стекло с обычным или «универсальным микромассивом» может быть адаптировано для детектирования множества различных нуклеиновых кислот. Кроме того, способ с применением

универсального массива может быть также адаптирован к антигенам, таким как полипептиды, с использованием специфических антител, конъюгированных с олигонуклеотидной последовательностью адаптера, которая гибридизуется с соответствующей олигонуклеотидной последовательностью, представленной в виде пятна на массиве. Таким образом, производственные затраты значительно снижаются, так как один микромассив может быть изготовлен и адаптирован для множества анализов на различные нуклеиновые кислоты или антигены.

[0008] В соответствии с этим, в некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам детектирования нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: а) амплификацию по меньшей мере части нуклеиновой кислоты из образца с использованием пары праймеров в условиях, подходящих для амплификации ампликона, включающего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где пара праймеров включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность; б) после стадии (а), контактирование ампликона, если он присутствует, с множеством одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, и где ампликон, если он присутствует, гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе посредством третьей олигонуклеотидной последовательности или комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности; с) после стадии (а), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; d) после стадии (с), промывку твердых носителей промывочным раствором; и е) после стадий (а)-(d), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на твердом носителе указывает на присутствие гибридизованного ампликона, что позволяет детектировать нуклеиновую кислоту в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители расположены в виде микромассива, массива в виде мультиплексных сфер или луночного массива. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает детектирование коллоидного металла. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает: 1) нанесение проявляющего реагента на твердые носители, где проявляющий реагент является подходящим для образования осадка в

присутствии коллоидного металла; и 2) детектирование коллоидного детектирующего реагента путем детектирования образования осадка на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют на механическом ридере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проявляющий реагент содержит серебро. В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка содержит биотин, а третья олигонуклеотидная последовательность гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждую одноцепочечную олигонуклеотидную последовательность для захвата присоединяют к спейсерному реагенту, а спейсерный реагент присоединяют к соответствующему твердому носителю. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает промывку твердых носителей промывочным раствором после стадии (b). В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а второй праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а первый праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер содержит: вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3'; и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению от 5' до 3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер дополнительно

содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием избытка первого праймера по сравнению со вторым праймером, и где ампликон, если он присутствует, представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на стадии (b) посредством комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием отношения первого праймера ко второму праймеру приблизительно от 12,5:1 до приблизительно 100:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка первого праймера содержит биотин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, стрептавидин или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота. В некоторых вариантах осуществления изобретения, коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (с) в конечном разведении от 0,00001 OD до 20 OD. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота, где коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (с) в конечной разведении от 0,05 OD до 0,2 OD. В некоторых вариантах осуществления изобретения, от 1 пл до 1000 мкл коллоидного детектирующего реагента наносят на твердые носители на стадии (с) на мкл ампликона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (а), обработку образца буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 0,5% или более и 4% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 1% или более и 2% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец : буфер для лизиса» от 1:50 до 50:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец : буфер для лизиса» приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит от $0,1\times$ до $5\times$ буфера на основе забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или буфера Трис-EDTA (TE). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит $1\times$ PBS. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, ампликон гибридизуется с твердыми носителями на стадии (b) в буфере для гибридизации, содержащем от $0,1\times$ до $10\times$ буфера на основе физиологического раствора с цитратом натрия (SSC), от 0,001% до 30% блокирующего агента и от 0,01% до 30% концентрирующего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент включает альбумин бычьей сыворотки (BSA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), казеин или поливиниловый спирт (PVA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент содержит BSA, который присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрирующий агент представляет собой сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1 до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для гибридизации содержит от $2\times$ до $5\times$ буфера SSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (b), блокирование твердых носителей с использованием раствора, содержащего BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители блокируют в течение 1 часа при 37°C с использованием 2% раствора BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает промывку твердых носителей промывочным раствором после блокирования твердых носителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c), промывку твердых носителей промывочным буфером, содержащим от $0,1\times$ до $10\times$ SSC-буфера и от 0,01% до 30% детергента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детергент содержит 0,05% - 5% натриевой соли N-лауроилсаркозина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывочный буфер содержит от $1\times$ до $5\times$ буфера SSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более буферов для лизиса, промывочных буферов и буферов для гибридизации также содержат контрольный олигонуклеотид, который гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (a): (i) контактирование образца с олигонуклеотидом, связанным с твердым субстратом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце; (ii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но с сохранением нуклеиновой кислоты, гибридизованной с олигонуклеотидом, если она присутствует в образце; и (iii) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (a). В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (a): (i) контактирование образца с олигонуклеотидом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце, (ii) одновременно со стадией или после стадии (i), контактирование образца с твердым

субстратом, где твердый субстрат связан с первой связывающей молекулой, где олигонуклеотид связан со второй связывающей молекулой, которая связывается с первой связывающей молекулой, и где образец подвергают контактированию с твердым субстратом в условиях, подходящих для связывания второй связывающей молекулы с первой связывающей молекулой; (iii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но с сохранением олигонуклеотида и нуклеиновой кислоты, гибридной с олигонуклеотидом, если она присутствует в образце; и (iv) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством взаимодействия авидин:биотин или стрептавидин:биотин, где первая связывающая молекула включает авидин, нейтравидин, стрептавидин или их производное, а вторая связывающая молекула содержит биотин или его производное. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердый субстрат находится на кончике пипетки, где стадия (i) включает пипетирование образца кончиком пипетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердый субстрат содержит матрицу или множество сфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (а), инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для продуцирования кДНК, синтезированной из нуклеиновой кислоты, где часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием кДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, праймеры, используемые до проведения стадии (а), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные для части нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии ингибитора РНКазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии бетаина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, бетаин присутствует в концентрации приблизительно от 0,2М до приблизительно 1,5М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов,

растений или животных.

[0009] В других своих аспектах, настоящее изобретение относится к наборам или промышленным изделиям для детектирования нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к набору, включающему: множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества содержит первый праймер, связанный с меткой, где первый праймер гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты, а второй праймер содержит: 1) первую олигонуклеотидную последовательность, которая обеспечивает удлинение праймера в направлении 5' - 3' и гибридизуется со второй цепью нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи; 2) вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению 5' - 3', по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности; и 3) один или более линкеров между 5'-концом первой олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка, связанная с первым праймером, содержит биотин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор также содержит множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых связана с твердым носителем, и где по меньшей мере одна одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность на твердом носителе гибридизуется со второй олигонуклеотидной последовательностью второго праймера из множества пар праймеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение относится к набору, содержащему: а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из такого множества содержит: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров из множества пар праймеров гибридизуется с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью для захвата на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров такого множества позволяет удлинять праймеры в направлении от 5' до 3', где третья последовательность олигонуклеотидов каждой пары праймеров такого множества ориентирована в направлении, противоположном направлению 5'-3', по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности, и где второй праймер каждой пары

праймеров такого множества также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров такого множества содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая одноцепочечая олигонуклеотидная последовательность для захвата на носителе связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример.

[0010] Некоторые другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам амплификации и детектирования нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: а) инкубирование по меньшей мере части образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров, где пара праймеров содержит первый праймер, включающий метку, и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и второй праймер, включающий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с первой молекулой для захвата; б) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации ампликона, содержащего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где каждый цикл из множества циклов включает: 1) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей нуклеиновой кислоты, если они присутствуют в образце, 2) после стадии (b)(1), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига первого и второго праймеров с соответствующими цепями нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, и 3) после стадии (b)(2), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, если она присутствует в образце, посредством полимеразы и пары праймеров; в) после проведения множества циклов, связывание ампликона, если он присутствует в образце, с первой молекулой для захвата, присоединенной к твердому носителю; и d) детектирование связывания

ампликона, если он присутствует в образце, с твердым носителем, где связывание ампликона с одним или более твердыми носителями указывает на присутствие нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула для захвата содержит третью олигонуклеотидную последовательность, а вторая молекула для захвата содержит одноцепочечную олигонуклеотидную последовательность для захвата, которая гибридизуется с третьей олигонуклеотидной последовательностью или с комплементом третьей олигонуклеотидной последовательности на стадии (с). В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование связывания ампликона, если он присутствует, с твердым носителем включает: i) нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердый носитель, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; и (ii) детектирование коллоидного детектирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (d)(ii) включает детектирование коллоидного металла. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (d)(ii) включает: а) нанесение проявляющего реагента на твердый носитель, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и б) детектирование коллоидного детектирующего реагента посредством детектирования образования осадка на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют на механическом ридере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проявляющий реагент содержит серебро. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка содержит биотин или его производное, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, стрептавидин или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота. В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через непрерывную систему капиллярных трубок с использованием перистальтического насоса, насоса для высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ), шприцевого насоса для точно дозируемого введения или вакуумного насоса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (b): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону предварительного нагревания при температуре приблизительно от 20°C до приблизительно 55°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, зона предварительного нагревания составляет в пределах приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение периода времени до 30 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение приблизительно 15 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (b): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону активации при температуре приблизительно от 80°C до приблизительно 100°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, зона активации имеет температуру приблизительно от 90°C до приблизительно 95°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени до 20 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени приблизительно от 5 минут до приблизительно 10 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону удлинения при температуре приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c): i) смешивание по меньшей мере части второго образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и вторую пару праймеров, где вторая пара праймеров содержит третий праймер, содержащий метку и четвертую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части второй нуклеиновой кислоты, и четвертый праймер, содержащий пятую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части второй нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с третьей молекулой для захвата; ii) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации части второй нуклеиновой кислоты если она присутствует в образце, где каждый цикл второго множества включает: 1) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого

периода времени, подходящего для денатурации цепей второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце; 2) после стадии (ii)(1), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига третьего и четвертого праймеров с соответствующими цепями второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце; и 3) после стадии (ii)(2), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце, посредством полимеразы и второй пары праймеров; где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует во втором образце, связана одновременно с амплифицированной первой нуклеиновой кислотой-мишенью, если она присутствует в первом образце, с четвертой молекулой для захвата, которая связывается с третьей молекулой для захвата, где четвертая молекула для захвата связана с твердым носителем; и где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце, с твердым носителем детектируется одновременно с гибридизацией амплифицированной первой нуклеиновой кислоты, если она присутствует в первом образце, и где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты-мишени с твердым носителем указывает на присутствие второй нуклеиновой кислоты-мишени во втором образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй образцы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая и вторая нуклеиновые кислоты являются различными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания части первого образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения части первого образца в смеси со смесью для амплификации, и части второго образца в смеси со смесью для амплификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после подачи объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: пропускание раствора, содержащего гипохлорит натрия в концентрации приблизительно от 0,1% до приблизительно 10%, через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раствор содержит гипохлорит натрия в концентрации приблизительно 1,6%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания отбеливающего раствора через непрерывную систему капиллярных трубок и

перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второй множество циклов: пропускание раствора, содержащего тиосульфат в концентрации приблизительно от 5 мМ до приблизительно 500 мМ через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раствор содержит тиосульфат в концентрации приблизительно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания раствора тиосульфата через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: пропускание воды через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания воды через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов, подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения воды и части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадия (а) включает введение части образца в непрерывную систему капиллярных трубок и смешивание части образца со смесью для амплификации с использованием роботизированного манипулятора или системы клапанов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает перед стадией (а): инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для продуцирования кДНК, синтезированной из РНК, где кДНК смешивают со смесью для амплификации на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения, праймеры, используемые перед стадией (а), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные к части РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, с праймерами и дезоксирибонуклеотидами при пропускании через зону синтеза кДНК при температуре приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C через непрерывную систему капиллярных трубок в течение времени, достаточного для образования кДНК, синтезированной из РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону синтеза кДНК, и перед стадией (б): пропускание части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону активации при температуре приблизительно 95°C и через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со

смесью для амплификации пропускают через первую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 80°C до приблизительно 100°C в течение периода времени от 1 секунды до приблизительно 10 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C до приблизительно 65°C в течение периода времени от 2 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 57°C до приблизительно 74°C в течение периода времени от 3 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону и третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C до приблизительно 80°C в течение периода времени от 0,5 секунды до приблизительно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, множество циклов включает 2 цикла или более или 100 циклов или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (а), инкубирование части образца с буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец также смешивают с бетаином на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец также смешивают на стадии (а) с флуоресцентным красителем или красителем для окрашивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер содержит: вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3' и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению 5'-3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула для захвата связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови,

сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных.

[0011] Некоторые другие аспекты настоящего изобретения относятся к устройствам для амплификации нуклеиновой кислоты из образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство включает: систему капиллярных трубок, расположенную вокруг опоры со множеством контуров, где каждый контур такого множества включает первую, вторую и третью стационарные температурные зоны, и где систему капиллярных трубок нагревают до первой температуры в первой стационарной температурной зоне, второй температуры во второй стационарной температурной зоне и третьей температуры в третьей стационарной температурной зоне; роботизированный манипулятор, имеющий конфигурацию, подходящую для введения в систему капиллярных трубок образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров; и насос или вакуумный насос, имеющий конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, через множество контуров внутри системы капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также содержит один или более процессоров, память, одну или более программ, где одна или более программ хранятся в памяти и имеют конфигурацию, подходящую для реализации одним или более процессорами, где одна или более программ включают инструкции по регуляции температуры первой, второй и третьей стационарных температурных зон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также включает инкубатор для зоны синтеза кДНК, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C, перед множеством контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также включает инкубатор для зоны активации, где систему капиллярных трубок нагревают приблизительно до 95°C перед множеством контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система капиллярных трубок имеет коническую, цилиндрическую или спиральную форму в каждом контуре такого множества. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система капиллярных трубок содержит политетрафторэтилен (ПТФЭ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, множество контуров системы капиллярных трубок включает приблизительно от 25 до приблизительно 44 контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, роботизированный манипулятор включает перистальтический насос или ВЭЖХ-насос, имеющий конфигурацию, подходящую для введения образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень в смеси со смесью для

амплификации, в систему капиллярных трубок, где такое устройство также содержит второй насос, имеющий конфигурацию, подходящую для проталкивания образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень в смеси со смесью для амплификации, через систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также включает инкубатор для зоны ПЦР-удлинения, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C ниже множества контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вакуумный насос, имеющий конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси с смесью для амплификации, через множество контуров, представляет собой перистальтический насос, насос для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или шприцевой насос для точного дозирования.

[0012] Некоторые другие аспекты раскрытия изобретения относятся к способам детектирования антигена в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: а) получение множества одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; б) после стадии (а), контактирование твердых носителей с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывается с антигеном, где антигенсвязывающий домен связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердых носителях, и где микромассив подвергают контактированию с антигенсвязывающим доменом в условиях, подходящих для гибридизации одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности антигенсвязывающего домена по меньшей мере с одной одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью для захвата на твердых носителях; в) после стадии (а), контактирование твердых носителей по меньшей мере с частью образца в условиях, подходящих для связывания антигенсвязывающего домена с антигеном, если он присутствует в образце; г) после стадии (а), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая специфически связывается с антигеном, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; д) после стадии (г), промывку твердых носителей промывочным раствором; и е) после стадий (а)-(г), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента указывает на присутствие антигена в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает детектирование коллоидного металла. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного

детектирующего реагента на стадии (f) включает: 1) нанесение проявляющего реагента на твердые носители, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и 2) детектирование коллоидного детектирующего реагента посредством детектирования образования осадка. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют на механическом ридере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проявляющий реагент содержит серебро. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном, где второй антигенсвязывающий домен связан с биотином или с его производным, и где коллоидная суспензия связана с авидином, нейтравидином, стрептавидином или его производным, связанными с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, коллоидный металл представляет собой золото, платину, палладий или рутений. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата олигонуклеотида в каждом из множества пятен связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (c), обработку образца буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 0,5% или более и 4% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 1% или более и 2% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» от 1:50 до 50:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит от $0,1\times$ до $5\times$ буфера на основе забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или буфера Трис-EDTA (TE). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит $1\times$ PBS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители подвергают контактированию с антигенсвязывающим доменом на стадии (b) в присутствии буфера для гибридизации, содержащего от $0,1\times$ до $10\times$ буфера на основе физиологического раствора с цитратом натрия (SSC), от 0,001% до 30% блокирующего агента и от 0,01% до 30% концентрирующего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент включает альбумин бычьей сыворотки (BSA), полиэтиленгликоль

(ПЭГ), казеин или поливиниловый спирт (PVA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент содержит BSA, который присутствует в буфере в количестве от 1% до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрирующий агент представляет собой сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для гибридизации содержит от 2× до 5× буфера SSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадиями (b) и (c), блокирование твердых носителей с использованием раствора, содержащего BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители блокируют в течение 1 часа при 37°C с использованием 2% раствора BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает промывку твердых носителей промывочным раствором после блокирования твердых носителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадий (b) и (c) и перед стадией (d), промывку твердых носителей промывочным буфером, содержащим от 0,1× до 10× SSC-буфера и от 0,01% до 30% детергента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детергент содержит 0,05-5% натриевой соли N-лауроилсаркозина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывочный буфер содержит от 1× до 5× буфера SSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более буферов для лизиса, промывочных буферов и буферов для гибридизации также содержат контрольный олигонуклеотид, который гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигеном является вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный антиген происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген представляет собой антиген бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови, сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды.

[0013] Настоящее изобретение также относится к наборам для детектирования антигена в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор включает: а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен такого множества специфически связывается с антигеном, и где каждый антигенсвязывающий домен такого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая, по существу, комплементарна одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности, присоединенной к твердым носителям. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, набор также включает: с) второй антигенсвязывающий домен, связанный с коллоидным детектирующим реагентом, где второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с антигеном, который также специфически связан с антигенсвязывающим доменом множества антигенсвязывающих доменов в (b).

[0014] Настоящее изобретение также относится к множеству одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на каждом твердом носителе связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, включающему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов, и б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен из этого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30. Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов; и б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты; и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30.

[0015] Настоящее изобретение также относится к множеству одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на каждом твердом носителе связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, включающему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов, и б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен из этого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью,

независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15. Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов; и б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты; и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

[0016] В некоторых вариантах любых из множества последовательностей, описанных выше, твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива. В некоторых вариантах любых из множества последовательностей, описанных выше, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель. В некоторых вариантах любых наборов, описанных выше, твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива. В некоторых вариантах любых наборов, описанных выше, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

[0017] Следует отметить, что одно, несколько или все свойства различных описанных здесь вариантов осуществления изобретения могут быть объединены с получением других вариантов осуществления изобретения. Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидными для специалиста в данной области. Эти и другие варианты осуществления изобретения также приводятся в нижеследующем подробном описании.

Краткое описание чертежей

[0018] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации патентной заявки с цветным(и) чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[0019] На фиг. 1А представлена диаграмма универсального массива для детектирования антигена в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. BSA: альбумин бычьей сыворотки.

[0020] На фиг. 1В показано детектирование биомаркера гепатита В (HBsAg) с использованием универсального массива в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0021] На фиг. 2А представлена диаграмма праймера для амплификации, используемого в универсальном массиве для тестирования нуклеиновых кислот (NAT) в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения (последовательность tC: SEQ ID NO: 34; последовательность-мишень ВИЧ: SEQ ID NO: 35). На фиг. 2В

представлена диаграмма амплификации последовательности-мишени с использованием праймера, представленного на фиг. 2А.

[0022] На фиг. 2С представлена диаграмма универсального массива для тестирования нуклеиновых кислот (NAT) в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0023] На фиг. 2D и 2E показано детектирование нуклеиновой кислоты вируса гепатита С (HCV) с использованием универсального массива для тестирования нуклеиновых кислот (NAT) в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. Показаны также результаты, полученные с использованием образца, в котором отсутствует нуклеиновая кислота HCV (фиг. 2D), или образца, который содержит нуклеиновую кислоту HCV (фиг. 2E).

[0024] На фиг. 3А показаны 15 отдельных зондов в универсальном массиве для NAT в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0025] На фиг. 3В показано влияние различных концентраций Empigen BB при приготовлении образца для его использования с универсальным массивом для NAT в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0026] На фиг. 3С показано влияние различных составов буфера для гибридизации, используемых с универсальным массивом для NAT в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. Указанные составы буферов представлены в виде $x/y/z$, где x - сила буфера SSC (то есть «3» обозначает буфер $3 \times \text{SSC}$), y - процент BSA, а z - процент ПЭГ-С.

[0027] На фиг. 3D показано влияние различных концентраций NaOH на эффективность элюирования для обогащения представляющей интерес нуклеиновой кислоты из образца в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0028] На фиг. 3E показано влияние различных концентраций NaOH в комбинации с количеством представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты, используемой для амплификации, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0029] На фиг. 3F показано влияние различных стратегий элюирования в комбинации с количеством представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты, используемой для амплификации, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0030] На фиг. 3G показано влияние различных концентраций праймеров в протоколах обогащения нуклеиновых кислот в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0031] На фиг. 4А показано обогащение представляющей интерес нуклеиновой кислоты из образца в кончике пипетки в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0032] На фиг. 4В и 4С показано влияние отношения меченого биотином олигонуклеотида к меченому нейтравидином коллоидному золоту в соответствии с

некоторыми вариантами осуществления изобретения. Указанные отношения представляют собой «меченный биотином зонд:меченное нейтравидином коллоидное золото». Пунктирными прямоугольниками показаны результаты экспериментов, а сплошными прямоугольниками показан контроль «BSA-золото», детектируемый с помощью 2-стадийного детектирующего анализа.

[0033] На фиг. 5А представлена диаграмма системы непрерывной амплификации в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0034] На фиг. 5В и 5С показаны репрезентативные варианты систем непрерывной амплификации в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На фиг. 5В показан роботизированный манипулятор для получения образцов, система насосов, дополнительные зоны предварительного нагревания и активации, три стационарные температурные зоны, блок для сбора отходов, регулятор температурной зоны и источник питания. На фиг. 5С показаны три зоны, программируемые для обеспечения различных температур, модуль контроля температуры, необязательный пульт управления вентиляторами, источник питания, модуль насоса и дополнительные зоны предварительного нагревания и активации.

[0035] На фиг. 6А представлена диаграмма асимметричной амплификации для NAT в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

[0036] На фиг. 6В показывает отношения обратных и прямых праймеров при асимметричной амплификации для NAT в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения.

Подробное описание изобретения

Общие методы

[0037] Описанные или упомянутые здесь методы и процедуры, по существу, хорошо известны специалистам и обычно применяются в соответствии со стандартной методикой, такой как, например, широко применяемые методологии, описанные в литературе, см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серии публикаций *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual and Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology*

(Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Микромассивы

[0038] Описанная здесь платформа на основе универсального массива может быть использована для детектирования различных представляющих интерес нуклеиновых кислот или антигенов.

Детектирование нуклеиновых кислот

[0039] Некоторые аспекты раскрытия настоящего изобретения относятся к способам детектирования нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы включают: а) амплификацию по меньшей мере части нуклеиновой кислоты из образца с использованием пары праймеров в условиях, подходящих для амплификации ампликона, включающего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где пара праймеров включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность; б) после стадии (а), контактирование ампликона, если он присутствует, с множеством одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, и где ампликон, если он присутствует, гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе посредством третьей олигонуклеотидной последовательности или комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности; в) после стадии (а), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; д) после стадии (с), промывку твердых носителей промывочным раствором; и е) после стадий (а)-(д), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на твердом носителе указывает на присутствие гибридизованного ампликона, что позволяет детектировать нуклеиновую кислоту в образце.

[0040] Платформа на основе универсального массива обеспечивает адаптируемый и универсальный подход, например, для диагностического тестирования. В качестве примера, олигонуклеотид длиной в 18 оснований с известной последовательностью

ковалентно присоединяют к активированному предметному стеклу или к другой поверхности в виде небольшого пятна. После связывания и блокирования избыточных сайтов связывания, комплементарную олигонуклеотидную последовательность ковалентно присоединяют к антигену, такому как иммунодоминантная область gp41 ВИЧ-1. Если клинический образец, такой как кровь, содержит антитела против gp41 ВИЧ-1 и смешан с пептидом gp41 ВИЧ, меченным комплементарным олигонуклеотидом, а антитело связывается с пептидом gp41, то, при нанесении на вышеописанный микромассив, комплементарный олигонуклеотид связывается со своим партнером-лигандом, представленным в виде пятна на массиве. Несвязанные вещества смывают и массив подвергают зондированию антиантителом, меченным биотином (то есть моноклональным антителом против человеческого Ig или белка A/G). Молекулу против биотина (то есть, стрептавидин), меченую золотом, используют для мечения антител, связанных с gp41, который связан с конкретным пятном на микромассиве посредством описанного выше связывания с комплементарным олигонуклеотидом. Избыточные вещества смывают, и микропятно, меченное золотом, непосредственно детектируют, либо частицы золота используют для катализа осаждения серебром, что может быть легко обнаружено и указывает на присутствие/отсутствие антител против gp41 ВИЧ в образце, и исходя из детектируемого количества антител против gp41 ВИЧ-1, присутствующих в образце, пользователь узнает о том, что человек является ВИЧ-инфицированным.

[0041] Важно отметить, что одна и та же олигонуклеотидная последовательность может быть использована для мечения различных реагентов для захвата, которые будут связываться с комплементарной олигонуклеотидной последовательностью на массиве. Следовательно, нижеследующий анализ может быть проведен для детектирования HBV, HCV, токсина, гормона или нуклеиновой кислоты, которые могут связываться с одним и тем же пятном. Реагент для захвата будет связываться только с одним и тем же пятном исходя из его олигонуклеотидной метки. Следовательно, известный набор олигонуклеотидов может быть использован для создания универсального микромассива для захвата, и тот же набор комплементарных олигонуклеотидов может быть использован для мечения любых реагентов для захвата. Так, например, микромассив 16×16 будет иметь 256 пятен, каждое с соответствующей олигонуклеотидной последовательностью. Каждая из этих олигонуклеотидных последовательностей может быть уникальной, либо массив может включать избыточные пятна, используемые для подтверждения результатов. Если предположить, что каждое пятно является дубликатом, то имеется возможность дифференцировать 128 различных результатов анализов одновременно. Этот массив может затем стать стандартной общей платформой и использоваться для детектирования миллионов различных мишеней путем простого мечения различных реагентов для захвата 128 различными комплементарными олигонуклеотидными последовательностями, которые могут быть предоставлены в виде универсального набора. Кроме того, один и тот же образец может быть смешан с различными детектирующими растворами, которые содержат различные тест-вещества и/или перекрывающиеся тест-

вещества. Так, например, образец может быть скринирован на инфекционные заболевания путем его смешивания с раствором А, а затем он может быть протестирован на рак путем смешивания другой части образца с раствором В, а после этого на токсины путем смешивания другой части с раствором С, с последующим детектированием нуклеиновых кислот для любых представляющих интерес мишеней путем смешивания с раствором D для прямого детектирования нуклеиновых кислот или после стадии амплификации. Микромассив не изменяется, то есть, он остается фиксированным, но различные детектирующие растворы могут быть использованы для тестирования на множество различных мишеней. Это поможет снизить стоимость изготовления микромассивов и значительно расширить их возможности для обнаружения практически любой мишени. Репрезентативные особенности и аспекты платформы на основе универсального массива более подробно описаны ниже.

[0042] Если это не оговорено особо, то используемый здесь термин «нуклеиновые кислоты и/или олигонуклеотиды» в широком смысле означают полимеры нуклеиновых кислот (например, ДНК или РНК) и охватывают их одноцепочечные и двухцепочечные варианты, а также варианты, содержащие один или более обычно встречающихся в природе и/или модифицированных нуклеозидов/нуклеотидов (например, блокированные нуклеиновые кислоты, пептид-содержащие нуклеиновые кислоты или PNA и т.п.).

[0043] Если это не оговорено особо, то используемый здесь термин «ампликон» означает продукт любой описанной здесь амплификации нуклеиновой кислоты различных типов, включая, но не ограничиваясь ими, продукт, полученный с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа на рекомбиназу-полимеразу (RPA), анализа цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту.

[0044] Используемый здесь термин «твердый носитель» означает любую твердую или полутвердую структуру, подходящую для присоединения к ней биологических молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Твердые носители не обязательно должны быть плоскими или иметь единую структуру, то есть, они могут иметь форму (формы) любого типа, включая сферические формы (например, сферы). Твердые носители могут быть расположены в любом формате. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители расположены в виде микромассива (например, плоского предметного стекла), массива из мультиплексных сфер или луночного массива. Кроме того, твердые носители могут быть изготовлены из любого подходящего материала, включая, но не ограничиваясь ими, кремний, пластик, стекло, полимер, керамику, фоторезист, нитроцеллюлозу и гидрогель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или

гидрогель.

[0045] Коллоидные суспензии наночастиц, таких как коллоидное золото, могут быть присоединены к биологическим зондам, таким как антитела, которые могут быть использованы в качестве реагентов для быстрого и чувствительного детектирования при иммунологическом окрашивании. Способы приготовления и использования коллоидных детектирующих реагентов хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Hostetler et al., *Langmuir* 14: 17-30, 1998; Wang et al., *Langmuir* 17 (19): 5739-41, 2001). Коллоидный детектирующий реагент может быть изготовлен из любого материала. В некоторых вариантах осуществления изобретения, коллоидный детектирующий реагент содержит металл. Примерами коллоидных металлов являются, но не ограничиваются ими, золото (Au), серебро (Ag), платина (Pt), палладий (Pd), медь (Cu), никель (Ni), рутений (Ru) и их смеси. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает детектирование (например, прямое детектирование) коллоидного металла. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает: 1) нанесение проявляющего реагента на твердые носители, где проявляющий реагент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и 2) детектирование коллоидного детектирующего реагента путем обнаружения образования осадка на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование детектируют на механическом ридере. В некоторых описанных выше вариантах, проявляющий реагент содержит серебро. В некоторых описанных выше вариантах используют нитрат серебра и восстановитель (например, гидрохинон). В некоторых описанных выше вариантах, для визуализации результатов коллоидного окрашивания используют камеру (например, камеру с зарядовой связью).

[0046] В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка содержит биотин, а третья олигонуклеотидная последовательность гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата.

[0047] В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с соответствующим твердым носителем. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина (например, BSA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает промывку твердых носителей промывочным раствором после стадии (b).

[0048] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а второй праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а первый праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер содержит: вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3'; и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению от 5' до 3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер дополнительно содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности.

[0049] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка первого праймера содержит биотин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин или его производные, стрептавидин или его производные, авидин или его производные, или антигенсвязывающий домен (например, антитело или его фрагмент), который специфически связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота. В некоторых вариантах осуществления изобретения, коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (c) в конечном разведении от 0,00001 OD до 20 OD. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота, где коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (c) в конечном разведении от 0,05 OD до 0,2 OD. При этом могут быть использованы

различные количества коллоидного детектирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, от 1 пл до 1000 мкл коллоидного детектирующего реагента наносят на твердые носители на стадии (с) на мкл ампликона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 100 мкл коллоидного детектирующего реагента наносят на твердые носители на стадии (с) на 1,5 мкл ампликона.

[0050] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед проведением стадии (а), обработку образца буфером для лизиса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит N, N-диметил-N-додецилглицинбетаин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 0,5% или более и 4% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса содержит 1% или более и 2% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об).

[0051] В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец: буфер для лизиса» от 1:50 до 50:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит от $0,1\times$ до $5\times$ буфера на основе забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или буфера Трис-EDTA (TE). В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для лизиса также содержит $1\times$ PBS.

[0052] В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон гибридизуется с твердыми носителями в присутствии буфера для гибридизации. Различные буферы для гибридизации известны специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон гибридизуется с твердыми носителями на стадии (b) в буфере для гибридизации, содержащем от $0,1\times$ до $10\times$ буфера на основе физиологического раствора с цитратаом натрия (SSC), от 0,001% до 30% блокирующего агента и от 0,01% до 30% концентрирующего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент включает альбумин бычьей сыворотки (BSA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), казеин или поливиниловый спирт (PVA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, блокирующий агент содержит BSA, который присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрирующий агент представляет собой сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1 до 3%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, буфер для гибридизации содержит от $2\times$ до $5\times$ буфера SSC.

[0053] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает,

перед стадией (b), блокирование твердых носителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители блокируют с использованием раствора, содержащего BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердые носители блокируют в течение 1 часа при 37°C с использованием 2% раствора BSA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает промывку твердых носителей промывочным раствором после блокирования твердых носителей.

[0054] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c), промывку твердых носителей промывочным буфером. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывочный буфер содержит от $0,1\times$ до $10\times$ SSC-буфера и от 0,01% до 30% детергента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детергент содержит 0,05% - 5% натриевой соли N-лауроилсаркозина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывочный буфер содержит от $1\times$ до $5X$ буфера SSC.

[0055] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (a): (i) контактирование образца с олигонуклеотидом, связанным с твердым субстратом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце; (ii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но с сохранением нуклеиновой кислоты, гибридизованной с олигонуклеотидом, если она присутствует в образце; и (iii) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (a). В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (a): (i) контактирование образца с олигонуклеотидом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце, (ii) одновременно со стадией или после стадии (i), контактирование образца с твердым субстратом, где твердый субстрат связан с первой связывающей молекулой, где олигонуклеотид связан со второй связывающей молекулой, которая связывается с первой связывающей молекулой, и где образец контактирует с твердым субстратом в условиях, подходящих для связывания второй связывающей молекулы с первой связывающей молекулой; (iii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но с сохранением олигонуклеотида и нуклеиновой кислоты, гибридизованной с олигонуклеотидом, если она присутствует в образце; и (iv) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (a). В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством взаимодействия авидин:биотин или стрептавидин:биотин, где первая связывающая молекула включает авидин, нейтралавидин, стрептавидин или их производное, а вторая связывающая молекула содержит биотин или его производное. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, твердый субстрат находится на кончике пипетки, где стадия (i) включает пипетирование образца кончиком пипетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, твердый субстрат содержит матрицу или множество сфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает РНК.

[0056] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает, перед стадией (a): инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для продуцирования кДНК, синтезированной из нуклеиновой кислоты, где часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (a) с использованием кДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, праймеры, используемые до проведения стадии (a), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные для части нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии ингибитора РНКазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии бетаина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, бетаин присутствует в концентрации приблизительно от 0,2М до приблизительно 1,5М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови, сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды (например, содержащий воду, почву и т.п.).

[0057] В некоторых вариантах осуществления изобретения, любой из описанных здесь реагентов (например, буфер для лизиса или для гибридизации) может содержать олигонуклеотид в качестве позитивного контроля, который, например, гибридизуется с олигонуклеотидом для захвата на массиве. Преимущественно, он может быть использован в качестве позитивного контроля для гарантии того, что были использованы правильные реагенты. Так, например, множество олигонуклеотидов для захвата может быть использовано для представления различных реагентов (например, буфера для лизиса, буфера для гибридизации и т.п.), а специфический позитивный контроль в каждом реагенте может быть использован для «подтверждения» того, что был использован соответствующий реагент. Если рассматривать их в совокупности, то такое множество может указывать на то, что некоторые или все стадии приготовления/анализа микромассивов были осуществлены с использованием реагентов, в которые добавляли

олигонуклеотид(ы) в качестве позитивного контроля, что указывает на использование правильных реагентов.

[0058] В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматривается корректировка отношения первого праймера ко второму праймеру, используемому на стадии амплификации нуклеиновой кислоты в образце. Отношение праймеров может быть изменено так, чтобы можно было амплифицировать преимущественно одну цепь нуклеиновой кислоты, а не другую, и такой метод называется асимметричной амплификацией (см., например, McCabe, PCR Protocols: Guide to Methods and Applications, 76-83, 1990). Преимущественно, измененное отношение праймеров при асимметричной амплификации позволяет получить преимущественно однородный продукт, что может способствовать увеличению силы сигнала гибридизации, детектируемого на универсальном массиве согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть нуклеиновой кислоты амплифицируют с использованием избытка первого праймера по сравнению со вторым праймером, где ампликон, если он присутствует, представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата посредством комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть нуклеиновой кислоты амплифицируют с использованием отношения первого праймера ко второму праймеру приблизительно от 12,5:1 до приблизительно 100:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение первого праймера ко второму праймеру составляет по меньшей мере приблизительно 2:1, по меньшей мере приблизительно 5:1, по меньшей мере приблизительно 10:1, по меньшей мере приблизительно 15:1, по меньшей мере приблизительно 20:1, по меньшей мере приблизительно 25:1, по меньшей мере приблизительно 30:1, по меньшей мере приблизительно 35:1, по меньшей мере приблизительно 40:1, по меньшей мере приблизительно 45:1, по меньшей мере приблизительно 50:1, по меньшей мере приблизительно 55:1, по меньшей мере приблизительно 60:1, по меньшей мере приблизительно 65:1, по меньшей мере приблизительно 70:1, по меньшей мере приблизительно 75:1, по меньшей мере приблизительно 80:1, по меньшей мере приблизительно 85:1, по меньшей мере приблизительно 90:1, по меньшей мере приблизительно 95:1, по меньшей мере приблизительно 100:1, по меньшей мере приблизительно 150:1 или по меньшей мере приблизительно 200:1.

Детектирование антигена

[0059] Помимо нуклеиновых кислот, для детектирования различных представляющих интерес антигенов, может быть использована описанная здесь платформа на основе универсального массива. В соответствии с этим, в некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам детектирования антигена в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: а) получение множества одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для

захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; b) после стадии (a), контактирование твердых носителей с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывается с антигеном, где антигенсвязывающий домен связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердых носителях, и где микромассив подвергают контактированию с антигенсвязывающим доменом в условиях, подходящих для гибридизации одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности антигенсвязывающего домена по меньшей мере с одной одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью для захвата на твердых носителях; c) после стадии (a), контактирование твердых носителей по меньшей мере с частью образца в условиях, подходящих для связывания антигенсвязывающего домена с антигеном, если он присутствует в образце; d) после стадии (a), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая специфически связывается с антигеном, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; e) после стадии (d), промывку твердых носителей промывочным раствором; и f) после стадий (a)-(e), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента указывает на присутствие антигена в образце.

[0060] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген содержит полипептид, липид или углевод. В определенных вариантах осуществления изобретения, антиген представляет собой полипептидный антиген.

[0061] Любые описанные здесь композиции и способы применительно к детектированию нуклеиновой кислоты также могут быть использованы для детектирования антигена, включая, но не ограничиваясь ими, твердые носители, коллоидный детектирующий реагент и способ их детектирования, проявляющий реагент, спейсерный реагент, буфер для лизиса, блокирующий агент, концентрирующий агент, буфер для гибридизации и промывочный буфер.

[0062] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном, где второй антигенсвязывающий домен связан с биотином или с его производным, и где коллоидная суспензия связана с авидином, нейтравидином, стрептавидином или его производным, связанными с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, коллоидный металл представляет собой золото, платину, палладий или рутений. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата олигонуклеотида в каждом из множества пятен связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед проведением стадии (с), обработку образца буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигеном является вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный антиген происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген представляет собой антиген бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови, сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды (например, содержащий воду, почву и т.п.).

Устройства

[0063] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к устройству или прибору для амплификации нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство или прибор включает: систему капиллярных трубок, расположенную вокруг опоры со множеством контуров, где каждый контур такого множества включает первую, вторую и третью стационарные температурные зоны, и где систему капиллярных трубок нагревают до первой температуры в первой стационарной температурной зоне; второй температуры во второй стационарной температурной зоне; и третьей температуры в третьей стационарной температурной зоне; роботизированный манипулятор, имеющий конфигурацию, подходящую для введения в систему капиллярных трубок образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров; и насос или вакуумный насос, имеющий конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, через множество контуров внутри системы капиллярных трубок.

[0064] Для детектирования нуклеиновой кислоты в образце с применением описанных здесь способов, амплификация по меньшей мере части нуклеиновой кислоты может быть использована для гибридизации с массивом. Таким образом, в некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к устройствам, которые могут быть подходящими для амплификации представляющих интерес нуклеиновых кислот. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к устройству для амплификации нуклеиновых кислот, имеющему систему капиллярных трубок, роботизированный манипулятор и насос или вакуумный насос.

[0065] Амплификацию нуклеиновой кислоты осуществляют в системе капиллярных трубок. Система капиллярных трубок расположена вокруг опоры со множеством контуров, где каждый контур такого множества включает первую, вторую и третью стационарную температурную зону, и где систему капиллярных трубок нагревают до первой температуры в первой стационарной температурной зоне, второй температуры во второй стационарной температурной зоне и третьей температуры в третьей

стационарной температурной зоне. Каждая из этих зон может соответствовать одной части стандартной реакции ПЦР или другой реакции амплификации, а именно, денатурации, отжига и ПЦР-удлинения. Для изотермической амплификации, каждую зону можно нагревать до одинаковой температуры (например, 37°C). Преимущественно, система капиллярных трубок обеспечивает повышенную скорость теплопроводности, что означает, что нужные температуры реакции могут быть быстро достигнуты, и время реакции может быть сокращено. Система капиллярных трубок в каждом контуре такого множества может иметь любую форму, включая, например, но не ограничиваясь ими, коническую форму, цилиндрическую форму или спиральную форму. Система капиллярных трубок может быть изготовлена из любого материала, включая, например, но не ограничиваясь им, политетрафторэтилен (ПТФЭ). Множество контуров системы капиллярных трубок может содержать любое число контуров, включая, например, но не ограничиваясь ими, приблизительно от 25 до приблизительно 44 контуров (например, соответствующих числу циклов амплификации).

[0066] Насос или вакуумный насос устройства могут иметь конфигурацию, позволяющую пропускать образец, содержащий нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, через множество контуров внутри системы капиллярных трубок. В этих устройствах могут быть использованы различные насосы и вакуумные насосы, хорошо известные специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, насос или вакуумный насос представляет собой перистальтический насос. В некоторых вариантах осуществления изобретения, насос или вакуумный насос представляет собой насос для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, насос или вакуумный насос представляет собой шприцевой насос для точного дозирования.

[0067] Роботизированный манипулятор устройства может иметь конфигурацию, подходящую для введения в систему капиллярных трубок образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, роботизированный манипулятор содержит перистальтический или ВЭЖХ-насос, имеющий конфигурацию, подходящую для введения образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень в смеси со смесью для амплификации, в систему капиллярных трубок, где такое устройство также включает второй насос, имеющий конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень в смеси со смесью для амплификации, через систему капиллярных трубок.

[0068] В устройство могут быть добавлены и дополнительные компоненты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также содержит один или более процессоров, память, одну или более программ, где одна или более программ хранятся в памяти и имеют конфигурацию, подходящую для реализации одним или более процессорами, где одна или более программ включают инструкции по регуляции

температуры первой, второй и третьей стационарных температурных зон. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также включает инкубатор для зоны синтеза кДНК (например, если образцом является РНК), где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C, перед множеством контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, инкубатор представляет собой температурную баню, устройство Пелтье или резистивный нагреватель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец в смеси со смесью для амплификации удерживают в зоне синтеза кДНК от 15 секунд до 30 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также содержит инкубатор для зоны активации, в котором систему капиллярных трубок нагревают приблизительно до 95°C перед множеством контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство также содержит инкубатор для зоны ПЦР-удлинения, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C выше множества контуров.

[0069] Насос, роботизированный манипулятор и различные температурные зоны могут регулироваться панелью управления системы, которая позволяет изменять каждый из компонентов, например, температуру в различных зонах. Кроме того, панель управления может быть использована для изменения скорости накачки, и тем самым, изменения продолжительности времени, затраченного на каждую температурную зону основной зоны амплификации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство может также включать один или более процессоров, память, одну или более программ, где одна или более программ хранятся в памяти и имеют конфигурацию, подходящую для реализации одним или более процессорами, где одна или более программ включают инструкции по регуляции температуры первой, второй и третьей стационарных температурных зон.

[0070] Температура системы капиллярных трубок может поддерживаться на желаемом уровне в различных температурных зонах в соответствии со стандартными методами, известными специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, температуру одной или более температурных зон поддерживают с помощью нагревателя Пелтье или резистивного нагревателя. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для изоляции одной или более температурных зон используется полиимидная лента (например, внутри системы медных трубок).

[0071] В некоторых вариантах осуществления изобретения, роботизированный манипулятор используется для нанесения ампликона на микромассив (например, на твердые носители согласно изобретению) после завершения работы контуров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для визуализации пятен жидкости на микромассиве добавляют, например, краситель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон собирают в контейнер с буфером для гибридизации после завершения работы контуров, а затем добавляют на микромассив (например, вручную с помощью пипетки или с помощью роботизированного манипулятора).

[0072] Описанные здесь устройства могут быть применены в любом из способов согласно изобретению. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает: а) инкубирование по меньшей мере части образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров, где пара праймеров содержит первый праймер, включающий метку, и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и второй праймер, включающий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с первой молекулой для захвата; б) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации ампликона, содержащего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где каждый цикл из множества циклов включает: 1) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей нуклеиновой кислоты, если они присутствуют в образце, 2) после стадии (b)(1), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига первого и второго праймеров с соответствующими цепями нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, и 3) после стадии (b)(2), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, если она присутствует в образце, посредством полимеразы и пары праймеров; в) после проведения множества циклов, связывание ампликона, если он присутствует в образце, с первой молекулой для захвата, присоединенной к твердому носителю; и г) детектирование связывания ампликона, если он присутствует в образце, с твердым носителем, где связывание ампликона с одним или более твердыми носителями указывает на присутствие нуклеиновой кислоты в образце.

[0073] Общие стадии использования вышеописанных устройств для амплификации и детектирования нуклеиновой кислоты в образце описаны ниже и могут быть проведены с использованием любых реагентов или методик, описанных выше.

[0074] Способы могут включать инкубирование в первом контейнере по меньшей мере части образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров, где пара праймеров включает первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и второй праймер,

содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с первой молекулой для захвата.

[0075] Затем используют насос и роботизированный манипулятор для пропускания части образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов через непрерывную систему капиллярных в условиях, подходящих для амплификации ампликона, содержащего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где каждый цикл такого множества включает: 1) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей нуклеиновой кислоты, если они присутствуют в образце, 2) после стадии (b)(1), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига первого и второго праймеров с соответствующими цепями нуклеиновой кислоты, если они присутствуют в образце, и 3) после стадии (b)(2), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, если она присутствует в образце, посредством полимеразы и пары праймеров.

[0076] Затем, после множества циклов, ампликон, если он присутствует в образце, может быть связан с первой молекулой для захвата, присоединенной к твердому носителю.

[0077] И наконец, может быть детектировано связывание ампликона, если он присутствует в образце, с твердым носителем, где связывание ампликона с одним или более твердыми носителями указывает на присутствие нуклеиновой кислоты в образце.

[0078] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекула для захвата содержит третью олигонуклеотидную последовательность, а вторая молекула для захвата содержит одноцепочечную олигонуклеотидную последовательность для захвата, которая гибридизуется с третьей олигонуклеотидной последовательностью или с комплементом третьей олигонуклеотидной последовательности на стадии (c). В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование связывания ампликона, если он присутствует, с твердым носителем включает: i) нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердый носитель, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; и (ii) детектирование коллоидного детектирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на

стадии (d)(ii) включает детектирование коллоидного металла. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (d)(ii) включает: а) нанесение проявляющего реагента на твердый носитель, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и б) детектирование коллоидного детектирующего реагента посредством детектирования образования осадка на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образование осадка детектируют на механическом ридере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проявляющий реагент содержит серебро. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка содержит биотин или его производное, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, стрептавидин или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая молекулы коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота. В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через непрерывную систему капиллярных трубок с использованием перистальтического насоса, насоса для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), шприцевого насоса для точно дозируемого введения или вакуумного насоса. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, способ также включает перед проведением стадии (b): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону предварительного нагревания при температуре приблизительно от 20°C до приблизительно 55°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, зона предварительного нагревания имеет температуру в пределах приблизительно от 37°C и до приблизительно 42°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение периода времени до 30 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение приблизительно 15 минут. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, способ также включает, перед стадией (b): пропускание части образца в смеси со смесью для

амплификации через зону активации при температуре приблизительно от 80°C до приблизительно 100°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, зона активации имеет температуру в диапазоне приблизительно от 90°C до приблизительно 95°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени до 20 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени приблизительно от 5 минут до приблизительно 10 минут. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону удлинения при температуре приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после стадии (b) и перед стадией (c): i) смешивание по меньшей мере части второго образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и вторую пару праймеров, где вторая пара праймеров содержит третий праймер, содержащий метку и четвертую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части второй нуклеиновой кислоты, и четвертый праймер, содержащий пятую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части второй нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с третьей молекулой для захвата; ii) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации части второй нуклеиновой кислоты если она присутствует в образце, где каждый цикл второго множества включает: 1) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце; 2) после стадии (ii)(1), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига третьего и четвертого праймеров с соответствующими цепями второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце; и 3) после стадии (ii)(2), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце, посредством полимеразы и второй пары праймеров; где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует во втором

образце, связана одновременно с амплифицированной первой нуклеиновой кислотой-мишенью, если она присутствует в первом образце, с четвертой молекулой для захвата, которая связывается с третьей молекулой для захвата, где четвертая молекула для захвата связана с твердым носителем; и где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце, с твердым носителем детектируют одновременно с гибридизацией амплифицированной первой нуклеиновой кислоты, если она присутствует в первом образце, и где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты-мишени с твердым носителем указывает на присутствие второй нуклеиновой кислоты-мишени во втором образце.

[0079] Первый и второй образцы могут быть, а могут и не быть, одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй образцы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй образцы являются различными. Первая и вторая нуклеиновые кислоты могут быть, а могут и не быть, одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая и вторая нуклеиновые кислоты являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая и вторая нуклеиновые кислоты являются различными. Следует отметить, что можно детектировать одну и ту же нуклеиновую кислоту из различных образцов с применением описанных здесь устройств и способов.

[0080] В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания части первого образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения части первого образца в смеси со смесью для амплификации, и части второго образца в смеси со смесью для амплификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после подачи объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: пропускание раствора, содержащего гипохлорит натрия в концентрации приблизительно от 0,1% до приблизительно 10%, через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раствор содержит гипохлорит натрия в концентрации приблизительно 1,6%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ может также включать, после пропускания отбеливающего раствора через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: пропускание раствора, содержащего тиосульфат в концентрации приблизительно от 5 мМ до приблизительно 500 мМ через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, раствор содержит тиосульфат в концентрации приблизительно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ может также включать, после пропускания раствора тиосульфата через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второй множество циклов: пропускание воды через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ может также включать, после пропускания воды через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения воды и части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, схема прохождения воды и воздуха включает подачу четырех водных импульсов по 20 секунд каждый, разделенных 20-секундными воздушными импульсами, между образцами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, стадия (а) включает введение части образца в непрерывную систему капиллярных трубок и смешивание части образца со смесью для амплификации с использованием роботизированного манипулятора или системы клапанов.

[0081] В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ может также включать, перед стадией (а): инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для продуцирования кДНК, синтезированной из РНК, где кДНК смешивают со смесью для амплификации на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения, праймеры, используемые перед стадией (а), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные к части РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами при пропускании через зону синтеза кДНК при температуре приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C через непрерывную систему капиллярных трубок в течение периода времени, достаточного для образования кДНК, синтезированной из РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает, после пропускания части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону синтеза кДНК, и перед стадией (б): пропускание части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону активации при температуре приблизительно 95°C и

через непрерывную систему капиллярных трубок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через первую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 80°C до приблизительно 100°C в течение периода времени от 1 секунды до приблизительно 10 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через первую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 90°C до приблизительно 97°C в течение периода времени от 2 секунд до приблизительно 20 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через первую стационарную температурную зону при температуре приблизительно 95°C в течение периода времени от 10 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C до приблизительно 65°C в течение периода времени от 2 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону при температуре 55°C в течение по меньшей мере 15 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 50°C до приблизительно 57°C в течение периода времени от 2 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 57°C до приблизительно 74°C в течение периода времени от 3 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 65°C до приблизительно 72°C в течение периода времени от 3 секунд до приблизительно 60 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 65°C до приблизительно 72°C в течение по меньшей мере 15 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если используется изотермическая амплификация или LAMP-амплификация, то все три стационарные температурные зоны могут иметь одинаковую температуру, например, 37°C. Кроме того, для всех стационарных температурных зон, скорость подачи через насос или вакуумный насос можно

регулировать для изменения продолжительности времени, за которое образец в смеси со смесью для амплификации проходит каждую стационарную температурную зону.

[0082] В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, во время каждого цикла из множества циклов, часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону и третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C до приблизительно 80°C в течение периода времени от 0,5 секунды до приблизительно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, множество циклов включает 2 цикла или более и 100 циклов или менее. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, способ может также включать, перед стадией (а), инкубирование части образца с буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об). В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, образец также смешивают с бетаином на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, образец также смешивают на стадии (а) с флуоресцентным красителем или красителем для окрашивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, второй праймер содержит: вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3' и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению 5'-3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй праймер также содержит один или несколько линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, первая молекула для захвата связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из

предшествующих вариантов осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови, сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, нуклеиновая кислота содержит вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, нуклеиновая кислота включает нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец включает образец цельной крови, сыворотки, слюны, мочи, почвы, ткани или образец окружающей среды (например, содержащий воду, почву и т.п.)

Наборы и промышленные изделия

[0083] Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к наборам или промышленным изделиям для детектирования нуклеиновой кислоты или антигена в образце.

[0084] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к набору, имеющему: множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества содержит первый праймер, связанный с меткой, где первый праймер гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты, а второй праймер содержит: 1) первую олигонуклеотидную последовательность, которая обеспечивает удлинение праймера в направлении 5'-3' и гибридизуется со второй цепью нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи; 2) вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению 5'-3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности; и 3) один или более линкеров между 5'-концом первой олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка, связанная с первым праймером, содержит биотин. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, набор может также включать множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых связана с твердым носителем, и где по меньшей мере одна одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность на твердом носителе гибридизуется со второй олигонуклеотидной последовательностью второго праймера из множества пар праймеров.

[0085] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к набору, содержащему: а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей

для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и b) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из такого множества включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров из этого множества пар праймеров гибридизуется с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью на твердом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров такого множества позволяет удлинять праймеры в направлении 5'-3', где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров такого множества ориентирована в направлении, противоположном направлению 5'-3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности, и где второй праймер каждой пары праймеров такого множества также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров такого множества включает модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера. В некоторых вышеописанных вариантах осуществления изобретения, каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на носителе связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример.

[0086] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к набору, имеющему: а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и b) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен такого множества специфически связывается с антигеном, и где каждый антигенсвязывающий домен такого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая, по существу, комплементарна одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности, присоединенной к твердым носителям. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор также включает: c) второй антигенсвязывающий домен, связанный с коллоидным детектирующим реагентом, где второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с антигеном, который также специфически связан с антигенсвязывающим доменом множества антигенсвязывающих доменов в (b).

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор согласно изобретению также включает последовательности праймеров. Так, например, для

детектирования HBV, набор согласно изобретению может дополнительно включать праймеры для амплификации в целях детектирования нуклеиновой кислоты HBV, например sAg HBV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ампликон, содержащий последовательность TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GG (SEQ ID NO: 33), является амплифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, праймеры для амплификации содержат первый праймер, содержащий последовательность CCC CCT AGA AAA TTG AGA GAA GTC CAC CAC G (SEQ ID NO: 32), и второй праймер, содержащий последовательность ATT CCT AGG ACC CCT GCT CGT GTT A (SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый праймер содержит биотин, связанный с 5'-концом.

Олигонуклеотиды

[0088] В других своих аспектах, настоящее изобретение относится к одноцепочечным олигонуклеотидам, например, для связывания последовательностей или их захвата. Эти последовательности могут также называться последовательностями для присоединения или захвата. Так, например, в настоящем изобретении описано множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, где каждая последовательность такого множества независимо выбрана из SEQ ID NO: 1-15. В настоящем изобретении также описано множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, где каждая последовательность такого множества независимо выбрана из SEQ ID NO: 16-30. Предпочтительно, чтобы эти последовательности были идентифицированы среди тысяч потенциальных последовательностей как последовательности для надежной и правильной гибридизации, последовательности с отсутствием вторичной структуры и отсутствием гомологии с природными последовательностями, например, гомологии с геномом человека.

[0089] Настоящее изобретение также относится к множеству одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на каждом твердом носителе связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, включающему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов, и б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен из этого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30. Настоящее

изобретение также относится к набору, содержащему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов; и б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты; и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30.

[0090] Настоящее изобретение также относится к множеству одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одноцепочечная олигонуклеотидная последовательностей для захвата на каждом твердом носителе связана с спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерный реагент содержит дендример. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, включающему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов, и б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен из этого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15. Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему: а) множество любых из вышеприведенных вариантов; и б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества включает: 1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты; и 2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

[0091] В некоторых вариантах, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива. В некоторых вариантах, которые могут быть объединены с любыми из предшествующих вариантов, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, которые могут быть объединены с любым из предшествующих вариантов осуществления изобретения, твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или

луночного массива. В некоторых вариантах, которые могут быть объединены с любыми из предшествующих вариантов, твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

[0092] Настоящее изобретение будет лучше понято со ссылкой на нижеследующие примеры. Однако, эти примеры никоим образом не должны рассматриваться как ограничение какого-либо аспекта или объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0093] Настоящее изобретение будет лучше понято со ссылкой на нижеследующие примеры. Однако, эти примеры не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Следует отметить, что описанные здесь примеры и варианты приводятся лишь в иллюстративных целях, и специалисту в данной области очевидно, что в него могут быть внесены различные модификации или замены, не выходящие за рамки сущности и объема настоящей заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Технология «универсального массива» для детектирования биомаркеров белков и нуклеиновых кислот.

[0094] Концепция универсального массива включает использование массива с олигонуклеотидными последовательностями ДНК-зонда, отпечатанными на поверхности массива. ДНК-олигонуклеотиды-мишени, комплементарные олигонуклеотидами-зондам, гибридизуются с отпечатанными зондами. К олигонуклеотидным последовательностям ДНК-мишени также присоединены реагенты, позволяющие детектировать специфические макромолекулы. Так, например, антитело, которое специфически связывается с биомаркером, ассоциированным с заболеванием или раком, может быть конъюгировано с олигонуклеотидной последовательностью ДНК, комплементарной одной из последовательностей, отпечатанных на массиве, для обеспечения специфического детектирования биомаркера. Поскольку часть ДНК-олигонуклеотидов-мишеней гибридизуется с зондами, то различные ДНК-олигонуклеотидов-мишени могут быть использованы в различных анализах, что позволяет создавать один и тот же массив (например, «универсальный» массив), имеющий конфигурацию, подходящую для проведения множества различных анализов в целях детектирования представляющих интерес биомаркеров, белков, антител и/или нуклеиновых кислот.

[0095] Эта концепция проиллюстрирована на фиг. 1А. На фиг. 1А показан одноцепочечный олигонуклеотидный зонд («сА»), конъюгированный с BSA, с получением конъюгата «зонд BSA-сА», который затем отпечатывается на массиве. Для детектирования биомаркера (в этом примере, белка HBsAg), первое антитело, которое специфически связывается с HBsAg, было конъюгировано с олигонуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности зонда («конъюгат tA»), что позволяет конъюгату tA гибридизоваться с зондом на массиве в положении, на котором отпечатывается конъюгат «зонд BSA-сА». Для детектирования присутствия биомаркера в определенном положении на массиве могут быть использованы метки различных типов. В этом примере, меченное золотом второе антитело, которое связывается с биомаркером,

было использовано для детектирования присутствия биомаркера в определенном положении на массиве после осаждения серебра на золоте, которое можно визуализировать как пятно с помощью колориметрического детектирования с использованием камеры с зарядовой связью (см., например, Alexandre, I. et al. (2001) *Anal. Biochem.* 295: 1-8).

[0096] На фиг. 1B показаны результаты репрезентативного анализа. Как показано на фиг. 1B, белок HBsAg детектировался только в виде пятен на массиве, если был использован специфический олигонуклеотид, который связывается с этим зондом в указанных пятнах.

[0097] Аналогичным образом, концепция универсального массива может быть также применена для тестирования нуклеиновых кислот (НАТ), как показано на фиг. 2A-2E. В этом примере, представляющую интерес нуклеиновую кислоту амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймером для амплификации, который имеет 3 компонента: последовательность, комплементарную зонду на универсальном массиве («последовательность tC») и ориентированную в направлении 3'-5'; спейсер (например, 2 не-нуклеотидных линкера), который предотвращает ПЦР-удлинение в последовательности tC, и олигонуклеотидный праймер, специфичный к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, ориентированный в направлении 5'-3' (фиг. 2A). Таким образом, после амплификации с использованием праймера, последовательность-мишень вводят в продукт ампликона, что позволяет осуществлять гибридизацию с зондом, отпечатанным на массиве (фиг. 2B). Реакция ПЦР также включает другой праймер, специфичный к представляющей интерес нуклеиновой кислоте с детектируемой меткой (в данном случае, биотином), позволяющей детектировать ампликон, гибридизованный с массивом.

[0098] Диаграмма универсального массива показана на фиг. 2C. Ампликон содержит часть нуклеиновой кислоты-мишени, амплифицированной двумя праймерами, что приводит к образованию ампликонов с биотиновой меткой на одном конце и выступом (последовательностью tC), который гибридизуется с массивом, на другом конце. После гибридизации с отпечатанным зондом, ампликон может быть детектирован различными способами. В этом примере, конъюгированный с золотом нейтравидин («NAG») детектируют путем осаждения серебра, например, как описано выше.

[0099] Репрезентативные результаты этого анализа показаны на фиг. 2D и 2E. В этом примере не была детектирована никакая-либо гибридизация с использованием олигонуклеотида, специфичного к HCV в образце, в котором отсутствует нуклеиновая кислота HCV («HCV-негативном», фиг. 2D). Однако, в образце, который содержит нуклеиновую кислоту HCV, гибридизация была детектирована только когда был использован специфический олигонуклеотид, который гибридизуется с определенными пятнами на массиве, а неспецифические олигонуклеотиды не давали никакого сигнала (фиг. 2E).

[00100] Адаптация концепции универсального массива для детектирования

белковых биомаркеров и NAT более подробно описана в Примерах, представленных ниже.

Пример 2. Олигонуклеотидные последовательности ДНК-зонда

[00101] Концепция универсального массива, описанная в Примере 1, была протестирована путем создания массивов, содержащих 15 различных олигонуклеотидных последовательностей ДНК-зонда («15 элементных массивов»).

Методы

[0100] Для получения массивов, набор олигонуклеотидных последовательностей ДНК-зонда конъюгируют с белком-носителем и размещают в ряд на предметном стекле. Затем набор ДНК-олигонуклеотидов-мишеней, комплементарных олигонуклеотидным зондам, используют для амплификации образца (например, в форме праймера для амплификации с тремя компонентами), что позволяет ДНК-мишени гибридизоваться с отпечатанными зондами.

[0101] Последовательности зондов и комплементарные последовательности, используемые в массивах из 15 элементов, представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности зондов и комплементарные последовательности, используемые в массивах из 15 элементов.

	Последовательность зонда	Комплементарная последовательность
NS1	GTAAAGAGCGTCTTCCTTGTTAG (SEQ ID NO:1)	CTAAACAAGGAAGACGCTCTTAAC (SEQ ID NO:16)
NS2	GTGACGACTTAAATGTGGAGTATC (SEQ ID NO:2)	GATACTCCACATTTAAGTCGTCAC (SEQ ID NO:17)
NS3	ATGGTCATTACGACGAGGATAAGC (SEQ ID NO:3)	GCTTATCCTCGTCGTAATGACCAT (SEQ ID NO:18)
NS4	GTCAATGACTAGTTTCGAGTATAG (SEQ ID NO:4)	CTATACTCGAACTAGTCATTGAC (SEQ ID NO:19)
NS5	GCGGCAACGAGCAAATATGCGTA T (SEQ ID NO:5)	ATACGCATATTTGCTCGTTGCCGC (SEQ ID NO:20)
NS6	GGGACGATCCAAGACTCATCAGA G (SEQ ID NO:6)	CTCTGATGAGTCTTGGATCGTCCC (SEQ ID NO:21)
NS7	TTGTTTCATCGAGGTAAGGTCAGGC (SEQ ID NO:7)	GCCTGACCTTACCTCGATGAACAA (SEQ ID NO:22)
NS8	CGCAGCTAAGATCGGAGAGACGT A (SEQ ID NO:8)	TACGTCTCTCCGATCTTAGCTGCG (SEQ ID NO:23)
NS9	AACCCGAGATCGTAGTATACTCAA (SEQ ID NO:9)	TTGAGTATACTACGATCTCGGGTT (SEQ ID NO:24)
NS10	TCACCAAAGCTCGGTCACTTGTTG	CAACAAGTGACCGAGCTTTGGTGA

	(SEQ ID NO:10)	(SEQ ID NO:25)
NS11	GCGATCGCGTTTAGTTGTATTTCT (SEQ ID NO:11)	AGAAATACAACATAACGCGATCG C (SEQ ID NO:26)
NS12	TTTATCGAATAAGTCTAATGCTCT (SEQ ID NO:12)	AGAGCATTAGACTTATTCGATAAA (SEQ ID NO:27)
NS13	TACCTCTATCCCCAACGTGCAACA (SEQ ID NO:13)	TGTTGCACGTTGGGGATAGAGGTA (SEQ ID NO:28)
NS14	ATGTCCATCCGTTTGGCATATGA (SEQ ID NO:14)	TCATATGGCAAAACGGATGGACAT (SEQ ID NO:29)
NS15	CTATAGCCTCCGTGGATAAACTGG (SEQ ID NO:15)	CCAGTTTATCCACGGAGGCTATAG (SEQ ID NO:30)

[0102] Массивы из 15 элементов были протестированы с использованием ДНК HBV (5 мкг в лизате плазмы 1:1). Праймеры HBV содержали последовательности АТТ CCT AGG ACC CCT GCT CGT GTT А (SEQ ID NO: 31; прямой праймер) и CCC CCT AGA AAA TTG AGA GAA GTC CAC CAC G (SEQ ID NO: 32; обратный праймер). Последовательности зондов были синтезированы и конъюгированы с прямым праймером HBV. Комплементарной последовательностью является олигонуклеотид, конъюгированный с массивом. Биотин был конъюгирован с 5'-концом обратного праймера, и эти праймеры были использованы в концентрации 200 нМ. Ампликоны-мишени получали с использованием одностадийной ОТ-кол.ПЦР-системы Promega GoTaq® (одностадийной системой реагентов, подвергнутых кол.ОТ-ПЦР с обратной транскриптазой) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

[0101] Результаты представлены на фиг. 3А. Каждая панель представляет различные комплементарные последовательности, используемые в одном и том же массиве из 15 элементов. Темные пятна, видимые во всех четырех углах каждой панели, представляют собой позитивный контроль для конъюгатов «BSA-золото» (обозначены угловыми прямоугольниками на фиг. 3А), которые были визуализированы как темные пятна после осаждения серебра (см. Пример 1). Вкратце, каждая комплементарная последовательность специфически детектировала правильную последовательность зонда на массиве из 15 элементов (обозначенных не-угловыми прямоугольниками на фиг. 3А). В некоторых случаях, перекрестная реактивность наблюдалась в комплементарных последовательностях, таких как NS1-NS5 или NS3-NS7 (обозначены пунктирными прямоугольниками на фиг. 3А).

[0104] Этот тест, проведенный с использованием массива из 15 элементов, продемонстрировал концепцию универсального массива с компонентами зонда. В данном случае было использовано 15 последовательностей зондов, а также 15 комплементарных последовательностей, конъюгированных с праймерами HBV (то есть, с одной

последовательностью-мишенью), но каждая комплементарная последовательность могла быть конъюгирована с другим праймером-мишенью. Таким образом, универсальные зонды могут быть использованы для эффективной дифференциации ряда последовательностей-мишеней. Таким образом, использование универсальных зондов отменяет потребность в разработке новых зондов для массивов для каждого эксперимента/мишени.

Пример 3: Реагенты универсального массива

[0105] Концепция универсального массива, описанная в Примере 1, рассматривает использование специфических реагентов для приготовления образцов и гибридизации образцов с массивом. В этом примере были протестированы концентрации специфических реагентов.

Методы

[0106] В первой части приготовления образца использовали буфер для лизиса в отношении «образец:буфер» 1:1. Буфер для лизиса (Таблица 3) включал забуференный фосфатом физиологический раствор (Таблица 2).

Таблица 2. 10× забуференный фосфатом физиологический раствор.

Ингредиент	Количество
Фосфатный буфер	100 мМ
Хлорид калия	27 мМ
Хлорид натрия	1,37 М
Доведение pH до конечного значения 7,4	

Таблица 3. Буфер для лизиса.

Ингредиент	Количество
10× забуференный фосфатом физиологический раствор	1×
Empigen BB	0,5% - 1%

[00107] Во второй части приготовления образца проводили ПЦР для амплификации образца. Это было осуществлено с использованием либо трехкомпонентной системы праймеров, описанной в Примере 1, либо асимметричной системы амплификации, описанной в Примере 10. При применении системы трехкомпонентных праймеров использовали от 100 нМ до 200 нМ праймера. При применении асимметричной системы амплификации использовали от 40 до 80 нМ прямого праймера и от 1 до 8 мкМ обратного праймера. Если в качестве исходного образца служила РНК, то использовали смесь обратной транскриптазы в пределах от 0,1× до 5×.

[0108] В первой части гибридизации образцов с массивом использовали буфер для гибридизации (Таблица 5), который в основном состоит из физиологического раствора с цитратом натрия (SSC) (Таблица 4).

Таблица 4. 20× Физиологический раствор с цитратом натрия.

Ингредиент	Количество
Хлорид натрия	3М
Тринатриевая соль лимонной кислоты	0,3М

Таблица 5. Буфер для гибридизации.

Ингредиент	Количество
20× физиологический раствор с цитратом натрия (SSC)	2× - 5×
Альбумин бычьей сыворотки (BSA)	1% - 3%
Сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина (ПЭГ-С)	1% - 3%

[0109] После приготовления буфера для гибридизации, к этому буферу добавляли конъюгированный с золотом нейтринидин («NAG») и разводили до конечного значения от 0,05 до 0,2 OD. Ампликон, полученный с помощью ПЦР (как описано выше), добавляли к смеси для гибридизации, содержащей меченный золотом нейтринидин, так, чтобы в каждом 210 мкл смеси содержалось от 1 до 5 мкл ампликона.

[0110] После гибридизации образцов с массивом (см. Пример 4), массив промывали промывочным буфером для гибридизации (Таблица 6), который также включал буфер SSC (Таблица 4). Этот промывочный буфер содержал детергент в количестве, достаточном для уменьшения фонового сигнала на массиве.

Таблица 6. Промывочный буфер для гибридизации.

Ингредиент	Количество
20× SSC	1× - 5×
Натриевая соль N-лауроилсаркозина	0,05% - 2%

Результаты

[0111] Тест с использованием различных концентраций Empigen BB в буфере для лизиса проиллюстрирован на фиг. 3В. В этом тесте, мишенью была часть ВИЧ, который представляет собой РНК-вирус. Empigen BB стимулировал лизис вируса, что приводило к высвобождению РНК, а это означает, что продукт лизиса (лизат) может быть непосредственно использован в ОТ-ПЦР или ПЦР. Асимметричная система амплификации была использована для амплификации ВИЧ-мишени. Была использована одна комплементарная последовательность, и один зонд был несколько раз нанесен пятнами на массив (пунктирные прямоугольники указывают на положение зонда на массиве на фиг. 3В) вместе с позитивным контролем BSA-золото (обозначен сплошными прямоугольниками на правой стороне на фиг. 3В). Концентрации Empigen BB от 0% до 1% допускали амплификацию мишени, в то время как концентрации от 2,5% до 10% ингибировали амплификацию мишени.

Пример 4: 10-минутная одностадийная гибридизация и обработка массива

[0112] Концепция универсального массива, описанная в Примере 1, была протестирована с использованием нижеследующих протоколов обработки. Эти протоколы позволяют осуществлять непосредственную гибридизацию продуктов ПЦР- или ОТ-ПЦР-амплификации с массивами (то есть, без дополнительной стадии очистки).

Методы

[0113] Перед гибридизацией, массив блокировали с использованием 150 мкл 2% BSA в $1 \times$ PBS. Затем массив помещали на 60 минут в термошейкер при 37°C и 250 об/мин. После блокирования, массив три раза промывали 150 мкл H₂O Ultrapure для удаления избытка несвязанных реагентов. Конечную промывку оставляли в лунках до тех пор, пока образцы не были приготовлены, для того, чтобы предотвратить высыхание массива.

[0114] В целях приготовления образцов для гибридизации получали 2 мл смеси буфера для гибридизации/NAG (Hyb/NAG) на предметном стекле путем добавления 20 мкл 10 OD NAG к 2 мл буфера для гибридизации (подробное описание см. в Примере 3). Затем подготавливали микроцентрифужные 0,5 мл-пробирки с 210 мкл Hyb/NAG для каждого ампликона, так, чтобы каждый ампликон был загружен в две лунки, и каждая лунка содержала 100 мкл. После приготовления пробирок, в каждую пробирку добавляли 2,1 мкл ампликона и быстро встряхивали, после чего все пробирки сразу центрифугировали.

[0115] Для гибридизации, конечную промывку удаляли из лунок и в каждую лунку добавляли 100 мкл смеси Hyb/NAG/ампликона. Затем массив помещали на 10 минут в термошейкер при 37°C и 250 об/мин.

[0116] После гибридизации, смесь брали пипеткой из лунок. Затем массив три раза промывали 100 мкл промывочного буфера для гибридизации (см. Пример 3) для удаления несвязанных реагентов. Сразу после третьей промывки, массив три раза промывали 150 мкл H₂O Ultrapure. Конечную промывку оставляли в лунках до тех пор, пока не было готово серебряное пятно в целях предотвращения высыхания массива.

[0117] Использованное серебряное пятно входило в набор, изготовленный Intuitive Biosciences. Предметные стекла были визуализированы с использованием GenePix Pro 7.

Результаты

[0118] Влияние различных составов буфера для гибридизации на жесткость показано на фиг. 3С. В данном случае, асимметричная система амплификации была использована для амплификации мишени HCV. Была использована одна комплементарная последовательность, и один зонд был несколько раз нанесен пятнами на массив вместе с позитивным контролем BSA-золото (обозначен сплошными прямоугольниками на фиг. 3С). В этом тесте, для приготовления образцов для гибридизации использовались два различных состава буфера для гибридизации. Первый состав, который использовался для приготовления образцов в верхнем ряду панелей, включал $3 \times$ SSC, 1% BSA и 3% ПЭГ-С (буфер для гибридизации 3/1/3). Второй состав, который использовали для приготовления образцов в нижнем ряду панелей, включал $2 \times$ SSC, 1% BSA и 2% ПЭГ-С (буфер для

гибридизации 2/1/2). При сравнении двух составов видно, что буфер для гибридизации 3/1/3 является менее жестким, чем буфер для гибридизации 2/1/2, поскольку сигнал наблюдался в отсутствие лизата (ср. пунктирные прямоугольники на верхних и нижних панелях слева), а неспецифические сигналы наблюдались при различных количествах лизата.

Пример 5. Двухстадийный метод обогащения сфер для приготовления образцов.

[0119] Перед проведением стадий, описанных в Примере 1 для тестирования нуклеиновых кислот с использованием концепции универсального массива, могут быть использованы магнитные сферы для обогащения представляющих интерес нуклеиновых кислот из образца. В этом примере, магнитные сферы, покрытые стрептавидином, были помечены олигонуклеотидами, меченными биотином и комплементарными представляющей интерес нуклеиновой кислоте. Затем, эти сферы добавляли к смеси образца/буфера для лизиса для связывания представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Представляющую интерес нуклеиновую кислоту затем удаляли из сфер с использованием гидроксида натрия, и элюированную мишень нейтрализовали с использованием Триса.

Методы

Для связывания меченных биотином олигонуклеотидов с магнитными сферами использовали нижеследующий протокол.

1. Добавление 400 мкл покрытых стрептавидином магнитных сфер (здесь: сферы Bangs Lab (Cat # BM568)) в 1,5 мл-пробирку.
2. Магнитное разделение сфер в течение 30 секунд для их выделения с последующим осторожным удалением супернатанта с помощью пипетки и его отбрасыванием.
3. Ресуспендирование сфер в 200 мкл буфера для связывания (20 mM Трис, pH 8,0/0,5 M NaCl).
4. Добавление 2 мкл меченого биотином олигонуклеотида (здесь: биотинилированный обратный праймер ВИЧ), а затем инкубирование раствора при покачивании в течение 15 минут при комнатной температуре.
5. Магнитное разделение сфер в течение 30 секунд с последующим осторожным удалением супернатанта с помощью пипетки и его отбрасыванием.
6. Промывка сфер с использованием 200 мкл буфера для связывания пока еще на магнитном устройстве. Отбрасывание супернатанта буфера.
7. Повторная промывка с использованием 200 мкл буфера для связывания. Отбрасывание супернатанта буфера.
8. Ресуспендирование магнитных сфер с праймером, связанным с биотином в 200 мкл буфера для связывания.

[0121] Нижеследующий протокол использовали для обогащения представляющей интерес нуклеиновой кислоты из образца.

1. Смешивание образца (здесь: образца сыворотки с РНК ВИЧ) 1:1 с буфером для

лизиса (эта смесь называется лизатом образца). Как было рекомендовано, общий объем лизата образца составлял 200 мкл.

2. Добавление 5 мкл покрытых стрептавидином магнитных сфер, которые были помечены олигонуклеотидами, меченными биотином, к образцу лизата.

3. Смешивание пипеткой и инкубирование в течение 10 минут при комнатной температуре.

4. Магнитное разделение сфер в течение 60 секунд.

5. Осторожное удаление супернатанта пипеткой и его отбрасывание.

6. Промывка сфер с использованием 100 мкл буфера для связывания.

7. Осторожное удаление супернатанта буфера для связывания и его отбрасывание.

8. Ресуспендирование магнитных сфер в 5 мкл 0,1М гидроксида натрия (NaOH).

9. Инкубирование при комнатной температуре в течение 30 секунд.

10. Магнитное разделение сфер в течение 15 секунд.

11. Осторожное удаление супернатанта (≈5 мкл) и его перенос в новую 1,5 мл-пробирку, содержащую 5 мкл 100 мМ Триса, и перемешивание пипеткой (элюирование 1).

12. Ресуспендирование сфер, оставшихся в исходной пробирке, в 10 мкл 100 мМ Триса (элюирование 2).

Результаты

[0122] Эффект использования различных концентраций NaOH для удаления представляющей интерес нуклеиновой кислоты из магнитных сфер проиллюстрирован на фиг. 3D. В данном случае, образец лизата, используемый в качестве исходного материала, представляет собой образец сыворотки с РНК ВИЧ, разведенный до 10^5 копий на мл, а затем смешанный 1:1 с буфером для лизиса. Использование концентраций, которые представляют собой NaOH 0,05н и выше, позволяет эффективно удалять представляющую интерес нуклеиновую кислоту из сфер (ср. сигнал в прямоугольниках нижнего набора панелей, помеченных «элюирование 1» с сигналом в прямоугольниках верхнего набора панелей, обозначенных «сферы после элюирования» на фиг. 3D). В противоположность этому, если NaOH не использовали, то представляющая интерес нуклеиновая кислота оставалась связанной со сферами (ср. сигналы в прямоугольниках верхних и нижних крайних правых панелей на фиг. 3D).

[0123] Влияние использования различных концентраций NaOH на уровень сигнала последующей ОТ-ПЦР проиллюстрировано на фиг. 3Е. В данном случае, образец лизата, используемый в качестве исходного материала, представляет собой образец сыворотки с РНК ВИЧ, разведенный до 10^5 копий на мл, а затем смешанный 1:1 с буфером для лизиса. Менее, чем 0,1 н NaOH можно использовать в том случае, если 5 мкл представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты используется в качестве исходного ОТ-ПЦР-продукта, но если в качестве исходного ОТ-ПЦР-продукта используется 3 мкл представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты, то требуется по меньшей мере 0,1 н NaOH. (ср. сигнал в прямоугольниках верхних и нижних сериях панелей на фиг. 3Е).

[0124] Сравнение различных способов элюирования представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты показано на фиг. 3F. В данном случае, образец лизата, используемый в качестве исходного материала, представляет собой образец сыворотки с РНК ВИЧ, разведенный до 10^5 копий на мл, а затем смешанный 1:1 с буфером для лизиса. Использование 100 мМ Триса для элюирования представляющей интерес обогащенной нуклеиновой кислоты из магнитных сфер давало более сильный выходной сигнал, чем при использовании 10 мМ ТЕ, независимо от того, были ли использованы 3 мкл или 5 мкл в последующей ОТ-ПЦР (ср. сигнал в синих прямоугольниках верхней и нижней серии панелей на фиг. 3F).

Пример 6: Одностадийный метод обогащения сфер для приготовления образцов

[0125] Перед тестированием нуклеиновых кислот с использованием концепции универсального массива, описанной в Примере 1, магнитные сферы могут быть использованы для обогащения представляющих интерес нуклеиновых кислот. В этом примере, магнитные сферы, покрытые стрептавидином, смешивают с мечеными биотином олигонуклеотидами, комплементарными представляющей интерес нуклеиновой кислоте, а также с лизатом образца. Таким образом, гибридизация олигонуклеотида с представляющей интерес нуклеиновой кислотой происходит на той же стадии, на которой происходит связывание меченного биотином олигонуклеотида с магнитными сферами.

Метод

[0126] В одностадийном способе обогащения сфер использовали нижеследующий протокол.

1. Добавление 40 мкл магнитных сфер (здесь: сферы Nvigen (Cat # K61002)) в 1,5 мл-пробирку.

2. Магнитное разделение сфер, проводимое с использованием магнитного устройства, в течение 30 секунд для выделения сфер с последующим осторожным удалением супернатанта пипеткой и его отбрасыванием.

3. Промывка сфер, пока пробирка все еще находится на магнитном устройстве, с использованием 200 мкл буфера для связывания с последующим отбрасыванием супернатанта буфера.

4. Удаление пробирки из магнитного устройства и ресуспендирование немеченых магнитных сфер в 200 мкл буфера для связывания (20 мМ Трис/0,5 М NaCl).

5. Приготовление $1\times$ буфера для лизиса ($1\times$ PBS/1% Empigen BB) с олигонуклеотидом, меченным биотином (здесь: праймером ВИЧ-R3, меченным биотином).

- а. Рекомендуемые концентрации: 5 пикомоль (пМ), 25 пМ или 125 пМ праймера на 100 мкл буфера для лизиса А.

6. Разведение образца (здесь: ВИЧ-сыворотки) до предпочтительной концентрации в плазме здорового индивидуума или в буфере для разведения (10 мМ Трис/0,1 мМ EDTA) в 1,5 мл-пробирке. Рекомендуемый конечный объем разведенного образца составляет 100

мкл.

7. Добавление буфера для лизиса, который содержит праймер в отношении 1:1 к разведенному образцу в стадии 6 с получением лизата образца. Рекомендуемый конечный объем лизата образца составляет 200 мкл.

8. Инкубирование смеси при комнатной температуре в течение 10 минут для связывания праймера с представляющий интерес нуклеиновой кислотой в лизированном образце.

9. Добавление 5 мкл немеченых магнитных сфер (в стадии 4) к смеси стадии 8.

10. Смешивание пипеткой, а затем инкубирование в течение 5 минут при комнатной температуре.

11. Смешивание пипеткой во второй раз, а затем инкубирование еще в течение 5 минут при комнатной температуре.

12. магнитное разделение сфер, проводимое с использованием магнитного устройства, в течение 60 секунд с последующим осторожным удалением супернатанта пипеткой и его отбрасыванием.

13. Промывка сфер с использованием 100 мкл буфера для связывания с последующим осторожным удалением супернатанта буфера для связывания и его отбрасыванием.

14. Удаление пробирки из магнитного устройства и ресуспендирование сфер в 5 мкл 0,1 М гидроксида натрия (NaOH).

15. Инкубирование при комнатной температуре в течение 30 секунд.

16. Магнитное разделение сфер в течение 15 секунд на магнитном устройстве.

17. Осторожное удаление супернатанта (≈ 5 мкл) и его перенос в новую 1,5 мл-пробирку, содержащую 5 мкл 100 мМ Трис, и перемешивание пипеткой (элюирование 1).

18. Ресуспендирование сфер, оставшихся в исходной пробирке, в 10 мкл 100 мМ Триса (элюирование 2).

Результаты

[0127] Эффект использования различных концентраций меченного биотином олигонуклеотида (праймера) при одностадийном обогащении показан на фиг. 3G. В данном случае, исходный образец представляет собой образец сыворотки с РНК ВИЧ, разведенный до 10^5 копий на мл, который сравнивали с негативным контролем. Концентрации праймеров в пределах от 5 пМ до 125 пМ были эффективными при проведении одностадийного обогащения (ср. сигнал в прямоугольниках нижней серии панелей с сигналом в прямоугольниках верхней серии панелей на фиг. 3G). Кроме того, одностадийное обогащение было более эффективным, чем двухстадийное обогащение (ср. сигналы в прямоугольнике самой нижней правой панели с другими панелями в нижней части на фиг. 3G).

Пример 7: Заякоренные фильтры в кончиках пипеток

[0128] Обогащение образца на кончике пипетки показано на фиг. 4A. В данном случае, заякоренный фильтр удерживает магнитные сферы или матрицу с ковалентного

связанной химической группой (например, стрептавидином) внутри кончика. Кроме того, кончик содержит олигонуклеотид, который может быть присоединен к сферам или к матрице (например, посредством биотина), которые комплементарны представляющий интерес нуклеиновой кислоте (см. Примеры 5 и 6 для репрезентативных вариантов обогащения образца).

[0129] Сначала образец пипетируют сверху вниз кончиком пипетки, в результате чего представляющая интерес нуклеиновая кислота захватывается олигонуклеотидом. Затем промывочные буферы пипетируют сверху вниз кончиком пипетки для удаления любых избыточных реагентов или образца. И наконец, элюирующий буфер пипетируют сверху вниз кончиком пипетки для элюирования представляющей интерес нуклеиновой кислоты.

[0130] Представляющая интерес нуклеиновая кислота может быть затем использована в концепции универсального массива, описанной в Примере 1.

Пример 8: Отношение биотина к нейтравидину, меченному золотом

[0131] Отношение меченого биотином олигонуклеотида и нейтравидина, меченного коллоидным золотом, имеет важное значение для детектирования сигнала при использовании универсального массива, как описано в Примере 1. Эта концепция проиллюстрирована на фиг. 4В и 4С. Как и в предыдущих экспериментах (см. Пример 4) была использована одна комплементарная последовательность, и один зонд был несколько раз нанесен на массив в виде пятен вместе с позитивным контролем BSA-золото (обозначены сплошными прямоугольниками). На фиг. 4В использовали 1× концентрацию мишени, а на фиг. 4С использовали в два раза большее количество мишени, как это показано на фиг. 4В. Мишень, комплементарную зонду, нанесенному пятнами, инкубировали, а затем промывали, после чего смесь меченого биотином зонда, комплементарного противоположному концу мишени, связанной с массивом и с нейтравидином, меченым коллоидным золотом (NAG), в различных интервалах отношений (биотиновый зонд:NAG) добавляли на предметное стекло, инкубировали, промывали и активировали серебром. На фиг. 4В и 4С, уменьшение отношения меченого биотином зонда к NAG приводило к усилению сигнала в одностадийном детектирующем анализе (пунктирные прямоугольники). Позитивный контроль представляет собой 2-стадийный детектирующий анализ, где мишень инкубировали с массивом, промывали, а затем добавляли меченный биотином зонд, комплементарный мишени, и перед добавлением NAG, избыток вымывали.

Пример 9: Система непрерывной амплификации

[0132] Система непрерывной амплификации с использованием капиллярных трубок может быть применена для амплификации представляющих интерес нуклеиновых кислот. Эта концепция проиллюстрирована на фиг. 5А. Сначала, перистальтический насос используют для перемещения образца, смешанного с смесью для амплификации (например, ПЦР-смесью), из исходного контейнера в систему капиллярных трубок. Затем, образец пропускают через необязательную зону RT (это необходимо, если образец

представляет собой РНК), которая поддерживается при постоянной температуре (например, 37°C или 42°C). Образец обычно хранят в этой зоне в течение 15 минут (например, 15 петель капиллярных трубок, если используется циркулярная нагревательная система).

[0133] Затем образец пропускают через необязательную зону активации ПЦР, которая поддерживается при постоянной температуре (например, 95°C). Образец обычно выдерживают в этой зоне в течение 10 минут для активации компонентов ПЦР-реакции (например, 10 петель капиллярных трубок, если используется циркулярная нагревательная система). После этих двух необязательных областей, образец достигает основной зоны амплификации, которая представляет собой цилиндр, вертикально разделенный (см. вид сверху на фиг. 5А) на три зоны с постоянной температурой (например, 95°C, 55°C, 65°C). Каждая из этих зон соответствует одной части стандартной ПЦР-реакции, а именно, денатурации, отжигу и удлинению. Капиллярные трубки несколько раз оборачиваются вокруг главного цилиндра для амплификации (например, 44 витка), так что, когда образец проходит через петлю, он повторно проходит через каждую из трех зон последовательно. Отделения распределены так, чтобы образец находился приблизительно 15 секунд в первой зоне, 15 секунд во второй зоне и 30 секунд в третьей зоне.

[0134] И, наконец, образец выходит из системы амплификации и поступает в систему сбора, где он детектируется (например, на чипах для детектирования MosaicQ). Индикаторные красители в смеси для амплификации используются для запуска процедур сбора.

[0135] Насос, зона RT, зона ПЦР-активации и основная зона амплификации регулируется панелью управления системы. Это позволяет изменять каждый из компонентов, например, температуру в различных зонах. Кроме того, панель управления может быть использована для изменения скорости накачки, и тем самым для изменения продолжительности времени, проведенного в каждой температурной зоне основной зоны амплификации.

[0136] Один из примеров системы непрерывной амплификации показан на фиг. 5В. В этом устройстве используется роботизированный манипулятор и перистальтический (или ВЭЖХ) насос для отбора образца, который уже был экстрагирован и добавлен в смесь для ОТ-ПЦР, и для перемещения образца в систему капиллярных трубок. Затем насос доставляет образец через систему капиллярных трубок в необязательную зону предварительного нагревания (настраиваемую, но установленную на 37°C) в течение 10-15 минут, и после этого, образец доставляется в необязательную зону активации ПЦР (настраиваемую, но установленную на 95°C) на 10 минут. Затем образец доставляется в модуль для ПЦР-амплификации, где он циклически проходит приблизительно в течение одной минуты на каждый виток через систему капиллярных трубок вокруг трех стационарных, но регулируемых температурных зон. Эти зоны позволяют нагревать образец до 95°C в течение приблизительно 15 секунд, а затем приблизительно до 55°C, что обеспечивает отжиг праймеров в течение примерно 15 секунд, после чего он

послупает в зону амплификации/удлинения при 65-72°C, где происходит амплификация, а затем он возвращается в зону денатурации при 95°C для следующего цикла. Это продолжается в течение 40-50 петель (циклов) системы капиллярных трубок до тех пор, пока образец не выйдет из модуля амплификации и не пройдет через необязательную зону удлинения при 72°C в течение 5 минут и не попадет в приемный лоток, в котором амплифицированный продукт будет детектироваться по содержанию красителя (например, синего или ФИТЦ).

[0137] Второй репрезентативный вариант системы непрерывной амплификации показан на фиг. 5С. Этот пример включал «систему спиралей Q» (показанную в верхнем правом углу изображения, и заключенную в вентилируемую прозрачную пластиковую оболочку, которая содержит 3 температурные зоны в спирали) вместе с источником питания (не показан, внутренний), корпусный вентилятор с аналоговым управлением для более точного контроля температуры в отличие от ситуации с отсутствием вентилятора (например, Q1000, как показано на фиг. 5В) и 3 цифровых программируемых дисплея (внизу слева). Непрерывная система трубок, которая накачивается снаружи (здесь не показано) перистальтическим насосом (или другим насосным механизмом, таким как ВЭЖХ-насос) из роботизированного манипулятора для сбора планшетов с образцами (не показано), подсоединена к задней части корпуса Q1144 через корпус системы Q-спирали (который содержит 3 температурные зоны $Z1=95^{\circ}\text{C}$, $Z2=55^{\circ}\text{C}$ и $Z3=65^{\circ}\text{C}$), и наконец, заканчивается корпусом Q114 для окончательного распределения и сбора в пробирку для образцов. Эта система наиболее стабильно удерживает 3 температурные зоны и дает соответствующие результаты до 10^4 копий/мл серопозитивного образца (1 мкл смеси образца/реакционную пробирку = □ 10 копий ДНК ВИЧ).

Методы

[0138] Реакционная смесь и протоколы, используемые для детектирования ВИЧ в системе непрерывной амплификации (см. Фиг. 5А-5С), представлены ниже.

На основную реакционную смесь (24 мкл/реакционную смесь):

- 7 мкл воды без нуклеазы
- 12,5 мкл смеси BIOTIUM (с зеленым Эвансом)
- 1,5 мкл 5М бетаинового буфера
- 1 мкл 0,2% синего красителя
- 0,75 мкл прямого праймера (Q-HIV-F1-tc, 300 нМ)
- 0,75 мкл обратного праймера (биотин-ВИЧ-R3, 300 нМ)
- 0,5 мкл смеси ОТ Promega
- 24 мкл основной смеси на пробирку+1 мкл образца.

[0139] Образцы экстрагировали разведением 1:1 в буфере для лизиса «X1». Состав буфера для лизиса X1 представляет собой [2% Тритон X100+1× PBS]. Альтернативным буфером для лизиса является «A1» = [2% Empigen BB+1× PBS], который хорошо работает как в системе ПЦР, так и в системе Q, однако буфер для лизиса X1 работает несколько лучше в системе Q и использовался для конечного тестирования прототипа. Образцы

экстрагировали за 10 минут до использования.

[0140] Праймеры использовали в количестве 10 мкМ (свежеразведенные из 100 мкМ маточного раствора перед использованием).

Для загрузки образцов:

[0141] Роботизированный манипулятор погружает клапан перистальтического насоса в различные лунки или колонки. Каждая колонка соответствовала одному тесту, и в каждом испытании использовалось различное количество водных промывок, отбеливателей и нейтрализующих химических веществ. В этой системе, между стадиями дезинфекции и промывки были проведены небольшие стадии подачи воздуха. Были проведены нижеследующие стадии подачи воздуха, отбеливателя и промывки:

I. Приготовление 25 мкл образца и загрузка каждого образца в планшет в ряду 1 (Примечание: в колонки 1 и 12 загружали только воду, а 200 мкл были загружены в каждую лунку для обеих колонок). Вся используемая вода не содержала нуклеазу.

II. Приготовление 100 мкл для каждого из остальных рядов следующим образом:

20% отбеливатель (конечный объем 1,6%) в ряду 3, колонки 2-11.

20 мМ тиосульфата в ряду 5, колонки 2-11.

Вода в рядах 6, 7, 8 ... колонки 2-11 каждая.

[0104] Программа загрузки образцов:

1. Сбор образца из ряда 1 в течение 60 сек. Подача воздуха в течение 30 секунд.
2. 2 импульса отбеливателя в течение 20 секунд каждого из ряда 3 (приблизительно 15 мкл каждого), а в перерывах - 20-секундная подача воздуха.
3. 2 импульса тиосульфата в течение 20 секунд каждого из ряда 5 (приблизительно 15 мкл каждого), а в перерывах - 20-секундная подача воздуха.
4. 1 импульс воды из ряда 6 в течение 15 секунд, 15-секундная подача воздуха.
5. 1 импульс воды из ряда 7 в течение 15 секунд, 15-секундная подача воздуха.
6. 2 импульса воды из ряда 8 в течение 15 секунд, 15-секундная подача воздуха.
7. 30-секундная задержка (подача воздуха) перед следующим сбором образцов.

[0143] Отбеливатель использовали для удаления ампликонов из линий перед введением следующего образца. Поскольку перенос отбеливателя может инактивировать следующую реакцию, то были протестированы различные методы инактивации отбеливателя. К ним относятся: разведение водой, воздушные карманы, метабисульфит натрия, натрий и тиосульфат калия. При применении этих методов, система не требует тщательной промывки перед сбором образцов. Таким образом, стало возможным последовательное осуществление множества амплификаций (например, различных мишеней). Было использовано и опробовано много повторных промывок, однако, одной промывки водой было недостаточно для удаления предыдущих образцов за короткий промежуток времени (для предотвращения переноса потребовалось более 10 минут водных импульсов), в то время как один отбеливатель был слишком сильным без достаточного количества воды (и в конечном итоге было обнаружено, что тиосульфат действует лучше всего с точки зрения быстрой нейтрализации отбеливателя), при этом,

оптимальные промывки были отмечены в разделе 140. Используемый отбеливатель составлял 20% от 8,2% маточного раствора гипохлорита (приблизительно 1,6% конечного объема), в то время как тиосульфат имеет конечный объем 20 мМ для промывок, перечисленных в вышеуказанной программе.

Пример 10: Асимметричная амплификация

[0144] В концепции асимметричной амплификации рассматривается смещенное отношение праймеров для получения преимущественно однородного продукта. Асимметричная амплификация является вторым из двух методов, описанных в настоящей заявке, которые могут быть применены для приготовления образцов для гибридизации с универсальным массивом (см. Пример 1). Асимметричная амплификация может быть применена в методах термоциклической амплификации, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), или в методах изотермической амплификации, таких как амплификация рекомбиназы-полимеразы (RPA).

[0145] В асимметричной амплификации используются два праймера, а именно, прямой праймер (также известный как 5'-праймер или смысловой праймер) и обратный праймер (также известный как 3'-праймер или антисмысловой праймер). Прямой праймер имеет такую же последовательность, как и последовательность для захвата на универсальном массиве, а также короткую часть 5'-конца представляющий интерес нуклеиновой кислоты. Обратный праймер является специфичным к представляющий интерес нуклеиновой кислоте (в данном случае, к 3'-концу представляющей интерес нуклеиновой кислоты) и имеет детектируемую метку (в данном случае, биотин у 5'-конца), что позволяет детектировать ампликон, гибридизованный с массивом. Обратный праймер используется в количестве, которое превышает количество прямого праймера. Так, например, могут быть использованы 15-20 нМ обратного праймера и 5-10 нМ прямого праймера в отношениях 2:1 или 3:1. Может быть также использовано и более высокое отношение, например, отношение обратного праймера к прямому праймеру от 12,5:1 до 100:1, например 20:1. Такое смещенное отношение праймеров позволяет использовать прямой праймер перед использованием обратного праймера в процессе амплификации. Таким образом, основным продуктом в конечном растворе является продукт, полученный с использованием обратного праймера.

[0146] Диаграмма, иллюстрирующая стадии асимметричного процесса RPA, показана на фиг. 6А. RPA позволяет использовать ДНК- или РНК-матрицу путем включения обратной транскриптазы для непосредственного продуцирования цепи ДНК из РНК-матрицы (первая стадия, показанная на фиг.6А). Если используется ДНК-матрица, то обратная цепь уже присутствует, а поэтому ее не нужно синтезировать. Процесс асимметричной амплификации начинается с этой обратной цепи.

[0147] Когда присутствует обратная цепь, то прямой праймер связывается с этой цепью, и синтезируется прямая цепь (вторая стадия, показанная на фиг. 6А). Поскольку прямой праймер содержит последовательность универсального массива для захвата, то синтезированная прямая цепь уже содержит последовательность универсального массива

для захвата у 5'-конца последовательности матрицы.

[0148] На следующем этапе, обратный праймер связывается с синтезированной прямой цепью, и синтезируется обратная цепь (третья стадия, показанная на фиг. 6А). На 3'-конце синтезируется последовательность для захвата, которая является комплементарной последовательности универсального массива для захвата. Таким образом, синтезированная обратная цепь содержит (от 3' до 5') последовательность для захвата, копию обратной цепи матрицы и биотиновую метку (продукт, показанный на фиг. 6А). Поскольку обратный праймер используется в избыточном количестве, то результатом асимметричной ПЦР является преимущественно такая синтезированная обратная цепь. Синтезированная обратная цепь затем может быть гибридизована с универсальным массивом (с использованием последовательности для захвата) и детектирована (с использованием биотина).

[0149] Тест с различными отношениями обратных праймеров к прямым праймерам показан на фиг. 6В. В этом примере, праймеры конструируют так, чтобы HCV-мишень была конъюгирована с одной комплементарной последовательностью. Один зонд был несколько раз нанесен пятнами на массив (пунктирные прямоугольники указывают на положение зонда на массиве на фиг. 6В) вместе с позитивным контролем «BSA-золото» (обозначен сплошными прямоугольниками на фиг. 6В). Сила сигнала, видимого на матрице, увеличивается по мере увеличения количества избыточного обратного праймера.

[0150] Хотя вышеприведенное раскрытие изобретения подробно описано для иллюстрации и, например, для более ясного его понимания, однако, такое описание и примеры не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Описание всей цитируемой здесь патентной и научной литературы точно и в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ детектирования нуклеиновой кислоты в образце, включающий:

а) амплификацию по меньшей мере части нуклеиновой кислоты из образца с использованием пары праймеров в условиях, подходящих для амплификации ампликона, включающего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где пара праймеров включает:

1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и

2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность;

б) после стадии (а), контактирование ампликона, если он присутствует, со множеством одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где ампликон, если он присутствует, гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе посредством третьей олигонуклеотидной последовательности или комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности;

с) после стадии (а), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл;

д) после стадии (с), промывку твердых носителей промывочным раствором; и

е) после стадий (а)-(д), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на твердом носителе указывает на присутствие гибридизованного ампликона, и тем самым, детектирует нуклеиновую кислоту в образце.

2. Способ по п. 1, где твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива.

3. Способ по п. 1, где твердые носители представляют собой нитроцеллюлозу, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

4. Способ по п. 1, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает детектирование коллоидного металла.

5. Способ по п. 1, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (е) включает:

1) нанесение проявляющего реагента на твердые носители, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и

2) детектирование коллоидного детектирующего реагента путем детектирования образования осадка на твердом носителе.

6. Способ по п. 5, где образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом.

7. Способ по п. 5 или 6, где образование осадка детектируют на механическом ридере.

8. Способ по любому из п.п. 5-7, где проявляющий реагент содержит серебро.

9. Способ по любому из п.п. 1-8, где условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

10. Способ по любому из п.п. 1-8, где условия на стадии (а) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями.

11. Способ по любому из п.п. 1-10, где метка содержит биотин, а третья олигонуклеотидная последовательность гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата.

12. Способ по любому из п.п. 1-11, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с соответствующим твердым носителем.

13. Способ по п. 12, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

14. Способ по п. 12, где спейсерный реагент содержит дендример.

15. Способ по любому из п.п. 1-14, также включающий промывку твердых носителей промывочным раствором после стадии (b).

16. Способ по любому из п.п. 1-15, где первый праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а второй праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты.

17. Способ по любому из п.п. 1-15, где второй праймер представляет собой прямой праймер, который амплифицируется в смысловой ориентации нуклеиновой кислоты, а первый праймер представляет собой обратный праймер, который амплифицируется в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислоты.

18. Способ по любому из п.п. 1-17, где второй праймер содержит:
вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении 5' - 3'; и

третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению 5' - 3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности.

19. Способ по п. 18, где третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера.

20. Способ по п. 18 или 19, где второй праймер также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности.

21. Способ по любому из п.п. 1-17, где часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием избытка первого праймера относительно второго праймера, и где ампликон, если он присутствует, представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на стадии (b) посредством комплемента третьей олигонуклеотидной последовательности.

22. Способ по п. 21, где часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием отношения первого праймера ко второму праймеру приблизительно от 12,5:1 до приблизительно 100:1.

23. Способ по любому из п.п. 1-22, где метка первого праймера содержит биотин.

24. Способ по п. 23, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, стрептавидин или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с биотином.

25. Способ по п. 24, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, а вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота.

26. Способ по любому из п.п. 1-25, где коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (с) в конечном разведении от 0,00001 OD до 20 OD.

27. Способ по п. 26, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота, и где коллоидный детектирующий реагент наносят на твердые носители на стадии (с) в конечном разведении от 0,05 OD до 0,2 OD.

28. Способ по п. 27, где от 1 пл до 1000 мкл коллоидного детектирующего реагента наносят на твердые носители на стадии (с) на мкл ампликона.

29. Способ по любому из п.п. 1-28, также включающий, перед стадией (а), обработку образца буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

30. Способ по п. 29, где буфер для лизиса содержит 0,5% или более и 4% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

31. Способ по п. 29, где буфер для лизиса содержит 1% или более и 2% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

32. Способ по любому из п.п. 29-31, где образец обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» от 1:50 до 50:1.

33. Способ по п. 32, где часть образца обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» приблизительно 1:1.

34. Способ по любому из п.п. 29-33, где буфер для лизиса также содержит от $0,1 \times$

до 5× забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или буфера Трис-EDTA (TE).

35. Способ по п. 34, где буфер для лизиса также содержит 1× PBS.

36. Способ по любому из п.п. 1-35, где ампликон гибридизуется с твердыми носителями на стадии (b) в буфере для гибридизации, содержащем от 0,1× до 10× физиологического раствора с цитратом натрия (SSC), от 0,001% до 30% блокирующего агента и от 0,01% до 30% концентрирующего агента.

37. Способ по п. 36, где блокирующий агент включает альбумин бычьей сыворотки (BSA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), казеин или поливиниловый спирт (PVA).

38. Способ по п. 37, где блокирующий агент содержит BSA, и где BSA присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%.

39. Способ по любому из п.п. 36-38, где концентрирующим агентом является сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина.

40. Способ по п. 39, где сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%.

41. Способ по любому из п.п. 36-40, где буфер для гибридизации содержит от 2× до 5× буфера SSC.

42. Способ по любому из п.п. 1-41, также включающий, перед стадией (b), блокирование твердых носителей с использованием раствора, содержащего BSA.

43. Способ по п. 41, где твердые носители блокируют в течение 1 часа при 37°C с использованием 2% раствора BSA.

44. Способ по п. 41 или 43, также включающий промывку твердых носителей промывочным раствором после блокирования твердых носителей.

45. Способ по любому из п.п. 1-44, также включающий, после стадии (b) и перед стадией (c), промывку твердых носителей промывочным буфером, содержащим от 0,1× до 10× буфера SSC и от 0,01 до 30% детергента.

46. Способ по п. 45, где детергент содержит от 0,05% до 5% натриевой соли N-лауроилсаркозина.

47. Способ по п. 45 или 46, где промывочный буфер содержит от 1× до 5× буфера SSC.

48. Способ по любому из п.п. 29-47, где один или более буферов для лизиса, промывочных буферов и буферов для гибридизации также содержат контрольный олигонуклеотид, который гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе.

49. Способ по любому из п.п. 1-48, также включающий, перед стадией (a):

(i) контактирование образца с олигонуклеотидом, связанным с твердым субстратом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце;

(ii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но сохранения нуклеиновой

кислоты, гибридизованной с олигонуклеотидом, если он присутствует в образце; и

(iii) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (а).

50. Способ по любому из п.п. 1-48, также включающий, перед стадией (а):

(i) контактирование образца с олигонуклеотидом, где олигонуклеотид гибридизуется с нуклеиновой кислотой, если она присутствует в образце,

(ii) одновременно со стадией (i) или после нее, контактирование образца с твердым субстратом, где твердый субстрат связан с первой связывающей молекулой, где олигонуклеотид связан со второй связывающей молекулой, которая связывается с первой связывающей молекулой, и где образец контактирует с твердым субстратом в условиях, подходящих для связывания второй связывающей молекулы с первой связывающей молекулой;

(iii) промывку твердого субстрата в условиях, подходящих для удаления неспецифических взаимодействий с твердым субстратом, но сохранения олигонуклеотида и нуклеиновой кислоты, гибридизованной с олигонуклеотидом, если он присутствует в образце; и

(iv) элюирование нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, из олигонуклеотида, где элюированную нуклеиновую кислоту подвергают ПЦР-амплификации на стадии (а).

51. Способ по п. 49, где олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством ковалентного взаимодействия.

52. Способ по п. 49 или 50, где олигонуклеотид связан с твердым субстратом посредством взаимодействия авидин:биотин или стрептавидин:биотин, или где первая связывающая молекула включает авидин, нейтравидин, стрептавидин или их производное, а вторая связывающая молекула содержит биотин или его производное.

53. Способ по любому из п.п. 48-52, где твердый субстрат расположен на кончике пипетки, и где стадия (i) включает пипетирование образца кончиком пипетки.

54. Способ по любому из п.п. 48-53, где твердый субстрат содержит матрицу или множество сфер.

55. Способ по любому из п.п. 1-54, где нуклеиновая кислота содержит ДНК.

56. Способ по любому из п.п. 1-54, где нуклеиновая кислота содержит РНК.

57. Способ по п. 56, также включающий, перед стадией (а), инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для получения кДНК, синтезированной из нуклеиновой кислоты, где часть нуклеиновой кислоты амплифицируют на стадии (а) с использованием кДНК.

58. Способ по п. 57, где праймеры, используемые перед стадией (а), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные к части нуклеиновой кислоты.

59. Способ по п. 57 или 58, где часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии ингибитора РНКазы.

60. Способ по любому из п.п. 57-59, где часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в присутствии бетаина.

61. Способ по п. 60, где бетаин присутствует в концентрации приблизительно от 0,2М до приблизительно 1,5 М.

62. Способ по любому из п.п. 1-61, где нуклеиновая кислота содержит вирусную нуклеиновую кислоту.

63. Способ по п. 62, где вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса.

64. Способ по любому из п.п. 1-61, где нуклеиновая кислота содержит нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных.

65. Набор, содержащий множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из такого множества содержит первый праймер, связанный с меткой, где первый праймер гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты, и второй праймер, содержащий:

1) первую олигонуклеотидную последовательность, которая обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3' и гибридизуется со второй цепью нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи;

2) вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению от 5' до 3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности; и

3) один или более линкеров между 5'-концом первой олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности.

66. Набор по п. 65, где вторая олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конце, который блокирует удлинение праймера.

67. Набор по п. 65 или 66, где метка, связанная с первым праймером, содержит биотин.

68. Набор по любому из п.п. 65-67, также содержащий множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, и где по меньшей мере одна одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность на твердом носителе гибридизуется со второй олигонуклеотидной последовательностью второго праймера из множества пар праймеров.

69. Набор, включающий:

а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и

б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества

содержит:

1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и

2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров из этого множества гибридизуется с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью для захвата на твердом носителе.

70. Набор по п. 69, где вторая олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров этого множества позволяет удлинять праймеры в направлении от 5' до 3', где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров этого множества ориентирована в направлении, противоположном направлению от 5' до 3', по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности; и где второй праймер каждой пары праймеров этого множества также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности.

71. Набор по п. 70, где третья олигонуклеотидная последовательность каждой пары праймеров этого множества содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера.

72. Набор по любому из п.п. 69-71, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на носителе связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем.

73. Набор по п. 72, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

74. Набор по п. 72, где спейсерный реагент содержит дендример.

75. Способ амплификации и детектирования нуклеиновой кислоты в образце, где указанный способ включает:

а) инкубирование по меньшей мере части образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров, где пара праймеров содержит первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части нуклеиновой кислоты, и второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с первой молекулой для захвата;

б) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации ампликона, содержащего часть нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце,

где каждый цикл из множества циклов включает:

1) пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей нуклеиновой кислоты, если они присутствуют в образце,

2) после стадии (b)(1), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига первого и второго праймеров с соответствующими цепями нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, и

3) после стадии (b)(2), пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, если она присутствует в образце, посредством полимеразы и пары праймеров;

с) после проведения множества циклов, связывание ампликона, если он присутствует в образце, с первой молекулой для захвата, присоединенной к твердому носителю; и

d) детектирование связывания ампликона, если он присутствует в образце, с твердым носителем, где связывание ампликона с одним или более твердыми носителями указывает на присутствие нуклеиновой кислоты в образце.

76. Способ по п. 75, где первая молекула для захвата содержит третью олигонуклеотидную последовательность, и где вторая молекула для захвата содержит одноцепочечную олигонуклеотидную последовательность для захвата, которая гибридизуется с третьей олигонуклеотидной последовательностью или с комплементом третьей олигонуклеотидной последовательности на стадии (с).

77. Способ по п. 75 или 76, где детектирование связывания ампликона, если он присутствует, с твердым носителем включает:

i) нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердый носитель, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая связывается с меткой ампликона, если он присутствует, и вторую молекулу, которая содержит коллоидный металл; и

(ii) детектирование коллоидного детектирующего реагента.

78. Способ по п. 77, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (d)(ii) включает детектирование коллоидного металла.

79. Способ по п. 77, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (d)(ii) включает:

a) нанесение проявляющего реагента на твердый носитель, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и

b) детектирование коллоидного детектирующего реагента путем детектирования

образования осадка на твердом носителе.

80. Способ по п. 79, где образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом.

81. Способ по п. 79 или 80, где образование осадка детектируют на механическом ридере.

82. Способ по любому из п.п. 79-81, где проявляющий реагент содержит серебро.

83. Способ по любому из п.п. 77-82, где метка содержит биотин или его производное, и где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, стрептавидин или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с биотином.

84. Способ по п. 83, где первая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит нейтравидин, и где вторая молекула коллоидного детектирующего реагента содержит ион коллоидного золота.

85. Способ по любому из п.п. 75-84, где условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

86. Способ по любому из п.п. 75-84, где условия на стадии (b) являются подходящими для амплификации при анализе на рекомбиназу-полимеразу (RPA) и анализе цепи на основе секвенированных нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу «катящегося кольца», амплификации с разветвленной цепью, амплификации посредством лигирования или изотермической амплификации, опосредованной петлями.

87. Способ по любому из п.п. 75-86, где часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через непрерывную систему капиллярных трубок с использованием перистальтического насоса, насоса для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), шприцевого насоса для точно дозируемого введения или вакуумного насоса.

88. Способ по любому из п.п. 75-87, также включающий, перед стадией (b): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону предварительного нагревания при температуре приблизительно от 20°C до приблизительно 55°C через непрерывную систему капиллярных трубок.

89. Способ по п. 88, где зона предварительного нагревания имеет температуру в пределах приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C.

90. Способ по п. 88 или 89, где часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение периода времени до 30 минут.

91. Способ по п. 90, где часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону предварительного нагревания в течение приблизительно 15 минут.

92. Способ по любому из п.п. 75-91, также включающий, перед стадией (b): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону активации при температуре приблизительно от 80°C до приблизительно 100°C через непрерывную систему капиллярных трубок.

93. Способ по п.92, где зона активации находится в температурном интервале приблизительно от 90°C до приблизительно 95°C.

94. Способ по п. 92 или 93, где часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени до 20 минут.

95. Способ по п. 94, где часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через зону активации в течение периода времени приблизительно от 5 минут до приблизительно 10 минут.

96. Способ по любому из п.п. 75-95, также включающий, после стадии (b) и перед стадией (c): пропускание части образца в смеси со смесью для амплификации через зону удлинения при температуре приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C через непрерывную систему капиллярных трубок.

97. Способ по любому из п.п. 75-96, также включающий, после стадии (b) и перед стадией (c):

i) смешивание по меньшей мере части второго образца со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и вторую пару праймеров, где вторая пара праймеров содержит третий праймер, содержащий метку и четвертую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью части второй нуклеиновой кислоты, и четвертый праймер, содержащий пятую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части второй нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и с третьей молекулой для захвата;

ii) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов через непрерывную систему капиллярных трубок в условиях, подходящих для амплификации части второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует в образце, где каждый цикл второго множества включает:

1) пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при первой температуре и в течение первого периода времени, подходящего для денатурации цепей второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце;

2) после стадии (ii)(1), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через вторую стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при второй температуре и в течение второго периода времени, подходящего для отжига третьего и четвертого праймеров с соответствующими цепями второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце; и

3) после стадии (ii)(2), пропускание части второго образца в смеси со смесью для амплификации через третью стационарную температурную зону и через непрерывную систему капиллярных трубок при третьей температуре и в течение третьего периода времени, подходящего для амплификации второй нуклеиновой кислоты, если она

присутствует во втором образце, посредством полимеразы и второй пары праймеров;

где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует во втором образце, связана одновременно с амплифицированной первой нуклеиновой кислотой-мишенью, если она присутствует в первом образце, с четвертой молекулой для захвата, которая связывается с третьей молекулой для захвата, где четвертая молекула для захвата связана с твердым носителем; и

где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты, если она присутствует во втором образце, с твердым носителем детектируется одновременно с гибридизацией амплифицированной первой нуклеиновой кислоты, если она присутствует в первом образце, и где связывание амплифицированной второй нуклеиновой кислоты-мишени с твердым носителем указывает на присутствие второй нуклеиновой кислоты-мишени во втором образце.

98. Способ по п. 97, где первый и второй образцы являются одинаковыми.

99. Способ по п. 97 или 98, где первая и вторая нуклеиновые кислоты являются различными.

100. Способ по любому из п.п. 97-99, также включающий, после пропуска части первого образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для множества циклов и перед пропуском части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов:

подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения части первого образца в смеси со смесью для амплификации, и части второго образца в смеси со смесью для амплификации.

101. Способ по п. 100, также включающий, после подачи объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропуском части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов:

пропускание раствора, содержащего гипохлорит натрия в концентрации приблизительно от 0,1% до приблизительно 10%, через непрерывную систему капиллярных трубок.

102. Способ по п. 101, где раствор содержит гипохлорит натрия в концентрации приблизительно 1,6%.

103. Способ по п. 101 или 102, также включающий, после пропуска отбеливающего раствора через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропуском части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов:

пропускание раствора, содержащего тиосульфат в концентрации приблизительно от 5 мМ до приблизительно 500 мМ через непрерывную систему капиллярных трубок.

104. Способ по п. 103, где раствор содержит тиосульфат в концентрации приблизительно 20 мМ.

105. Способ по п. 103 или 104, также включающий, после пропускания раствора тиосульфата через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов: пропускание воды через непрерывную систему капиллярных трубок.

106. Способ по п. 105, также включающий, после пропускания воды через непрерывную систему капиллярных трубок и перед пропусканием части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации через первую, вторую и третью стационарные температурные зоны для второго множества циклов:

подачу объема воздуха через непрерывную систему капиллярных трубок, достаточного для отделения воды и части второго образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации.

107. Способ по любому из п.п. 75-106, где стадия (а) включает введение части образца в непрерывную систему капиллярных трубок и смешивание части образца со смесью для амплификации с использованием роботизированного манипулятора или системы клапанов.

108. Способ по любому из п.п. 75-107, где нуклеиновая кислота включает ДНК.

109. Способ по любому из п.п. 75-107, где нуклеиновая кислота включает РНК.

110. Способ по п. 109, также включающий, перед стадией (а):

инкубирование по меньшей мере части образца с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами в условиях, подходящих для продуцирования кДНК, синтезированной из РНК, где кДНК смешивают со смесью для амплификации на стадии (а).

111. Способ по п. 110, где праймеры, используемые перед стадией (а), представляют собой рандомизированные праймеры, поли-dT-праймеры или праймеры, специфичные к части РНК.

112. Способ по п. 110 или 111, где часть образца инкубируют с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами при пропускании через зону синтеза кДНК при температуре приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C через непрерывную систему капиллярных трубок в течение периода времени, достаточного для продуцирования кДНК, синтезированной из РНК.

113. Способ по п. 112, также включающий, после пропускания части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону синтеза кДНК и перед стадией (b):

пропускание части образца в смеси с обратной транскриптазой, праймерами и дезоксирибонуклеотидами через зону активации при температуре приблизительно 95°C через непрерывную систему капиллярных трубок.

114. Способ по любому из п.п. 75-113, где во время каждого цикла этого множества, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через первую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 80°C и до

приблизительно 100°C в течение периода времени от 1 секунды до приблизительно 10 минут.

115. Способ по любому из п.п. 75-114, где во время каждого цикла этого множества, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C и до приблизительно 65°C в течение периода времени от 2 секунд до приблизительно 60 секунд.

116. Способ по любому из п.п. 75-115, где во время каждого цикла этого множества, часть образца в смеси со смесью для амплификации пропускают через третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 57°C и до приблизительно 74°C в течение периода времени от 3 секунд до приблизительно 60 секунд.

117. Способ по любому из п.п. 75-114, где во время каждого цикла этого множества, часть образца в смеси со смесью для ПЦР-амплификации пропускают через вторую стационарную температурную зону и третью стационарную температурную зону при температуре приблизительно от 45°C и до приблизительно 80°C в течение периода времени от 0,5 секунды до приблизительно 5 минут.

118. Способ по любому из п.п. 75-117, где множество циклов включает 2 цикла или более и 100 циклов или менее.

119. Способ по любому из п.п. 75-118, также включающий, перед стадией (а), инкубирование части образца с буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс/об).

120. Способ по любому из п.п. 75-119, где образец также смешивают на стадии (а) с бетаином.

121. Способ по любому из п.п. 75-120, где образец также смешивают на стадии (а) с флуоресцентным красителем или красителем для окрашивания.

122. Способ по любому из п.п. 76-121, где второй праймер содержит:
вторую олигонуклеотидную последовательность, где вторая олигонуклеотидная последовательность обеспечивает удлинение праймера в направлении от 5' до 3'; и
третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность ориентирована в направлении, противоположном направлению от 5' до 3' по сравнению с направлением удлинения праймера от второй олигонуклеотидной последовательности.

123. Способ по п. 122, где третья олигонуклеотидная последовательность содержит модифицированный нуклеотид у 3'-конца, который блокирует удлинение праймера.

124. Способ по п. 122 или 123, где второй праймер также содержит один или более линкеров между 5'-концом третьей олигонуклеотидной последовательности и 5'-концом второй олигонуклеотидной последовательности.

125. Способ по любому из п.п. 75-124, где первая молекула для захвата связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердым носителем.

126. Способ по п. 125, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

127. Способ по п. 125, где спейсерный реагент содержит дендример.

128. Способ по любому из п.п. 75-127, где образец содержит цельную кровь, сыворотку, слюну, мочу, почву, ткань или образец окружающей среды.

129. Способ по любому из п.п. 75-128, где нуклеиновая кислота содержит вирусную нуклеиновую кислоту.

130. Способ по п. 129, где вирусная нуклеиновая кислота происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса.

131. Способ по любому из п.п. 75-128, где нуклеиновая кислота содержит нуклеиновую кислоту бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных.

132. Устройство для амплификации нуклеиновой кислоты из образца, содержащее: систему капиллярных трубок, расположенную вокруг опоры со множеством контуров, где каждый контур такого множества включает первую, вторую и третью стационарную температурную зону, и где систему капиллярных трубок нагревают до первой температуры в первой стационарной температурной зоне, второй температуры во второй стационарной температурной зоне и третьей температуры в третьей стационарной температурной зоне;

роботизированный манипулятор, имеющий конфигурацию, подходящую для введения в систему капиллярных трубок образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, содержащей дезоксирибонуклеотиды, полимеразу и пару праймеров; и

насос или вакуумный насос, имеющий конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, через множество контуров внутри системы капиллярных трубок.

133. Устройство по п. 132, также содержащее один или более процессоров, память, одну или более программ, где одна или более программ хранятся в памяти и имеют конфигурацию, подходящую для реализации одним или более процессорами, где одна или более программ включают инструкции по регуляции температуры первой, второй и третьей стационарных температурных зон.

134. Устройство по п. 132 или 133, также содержащее:

инкубатор для зоны синтеза кДНК, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 37°C до приблизительно до 42°C перед множеством контуров.

135. Устройство по любому из п.п. 132-134, также содержащее:

инкубатор для зоны активации, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно 95°C перед множеством контуров.

136. Устройство по любому из п.п. 132-135, где система капиллярных трубок имеет

коническую, цилиндрическую или спиральную форму в каждом контуре такого множества.

137. Устройство по любому из п.п. 132-136, где система капиллярных трубок содержит политетрафторэтилен (ПТФЭ).

138. Устройство по любому из п.п. 132-137, где множество контуров системы капиллярных трубок включает приблизительно от 25 и приблизительно до 44 контуров.

139. Устройство по любому из п.п. 132-138, где роботизированный манипулятор содержит перистальтический или ВЭЖХ-насос, имеющий конфигурацию, подходящую для введения образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень, в смеси со смесью для амплификации, в систему капиллярных трубок, и где устройство также содержит второй насос, имеющий конфигурацию, подходящую для проталкивания образца, содержащего нуклеиновую кислоту-мишень, в смеси со смесью для амплификации, через систему капиллярных трубок.

140. Устройство по любому из п.п. 132-139, также содержащее:

инкубатор для зоны ПЦР-удлинения, где систему капиллярных трубок нагревают до температуры приблизительно от 55°C до приблизительно 72°C ниже множества контуров.

141. Устройство по любому из п.п. 132-140, где вакуумный насос имеет конфигурацию, подходящую для пропускания образца, содержащего нуклеиновую кислоту в смеси со смесью для амплификации, через множество контуров, и представляет собой перистальтический насос, насос для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или шприцевой насос для точно дозируемого введения.

142. Способ детектирования антигена в образце, включающий:

a) получение множества одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю;

b) после стадии (a), контактирование твердых носителей с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывается с антигеном, где антигенсвязывающий домен связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердых носителях, и где микромассив подвергают контактированию с антигенсвязывающим доменом в условиях, подходящих для гибридизации одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности антигенсвязывающего домена по меньшей мере с одной одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью для захвата на твердых носителях;

c) после стадии (a), контактирование твердых носителей по меньшей мере с частью образца в условиях, подходящих для связывания антигенсвязывающего домена с антигеном, если он присутствует в образце;

d) после стадии (a), нанесение коллоидного детектирующего реагента на твердые носители, где коллоидный детектирующий реагент содержит первую молекулу, которая специфически связывается с антигеном, если он присутствует, и вторую молекулу,

которая содержит коллоидный металл;

е) после стадии (d), промывку твердых носителей промывочным раствором; и

f) после стадий (a)-(e), детектирование коллоидного детектирующего реагента, где детектирование коллоидного детектирующего реагента указывает на присутствие антигена в образце.

143. Способ по п. 142, где твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива.

144. Способ по п. 142, где твердые носители представляют собой нитроцеллюлозу, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

145. Способ по п. 142, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (f) включает детектирование коллоидного металла.

146. Способ по п. 142, где детектирование коллоидного детектирующего реагента на стадии (f) включает:

1) нанесение проявляющего реагента на твердые носители, где проявляющий агент является подходящим для образования осадка в присутствии коллоидного металла; и

2) детектирование коллоидного детектирующего реагента путем детектирования образования осадка.

147. Способ по п. 146, где образование осадка детектируют визуальным, электронным или магнитным способом.

148. Способ по п. 146 или 147, где образование осадка детектируют на механическом ридере.

149. Способ по любому из п.п. 146-148, где проявляющий реагент содержит серебро.

150. Способ по любому из п.п. 142-149, где первая молекула содержит второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном, где второй антигенсвязывающий домен связан с биотином или его производным, и где коллоидная суспензия связана с авидином, нейтравидином, стрептавидином или их производным, связанным с биотином.

151. Способ по любому из п.п. 142-150, где коллоидный металл представляет собой золото, платину, палладий или рутений.

152. Способ по любому из п.п. 142-151, где одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата в каждом пятне такого множества связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями.

153. Способ по п. 152, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

154. Способ по п. 152, где спейсерный реагент содержит дендример.

155. Способ по любому из п.п. 142-154, также включающий, перед стадией (c), обработку образца буфером для лизиса, содержащим 0,1% или более и 10% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

156. Способ по п. 155, где буфер для лизиса содержит 0,5% или более и 4% или

менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

157. Способ по п. 155, где буфер для лизиса содержит 1% или более и 2% или менее N, N-диметил-N-додецилглицинбетаина (масс./об.).

158. Способ по любому из п.п. 155-157, где образец обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» от 1:50 до 50:1.

159. Способ по п. 158, где часть образца обрабатывают буфером для лизиса в отношении «образец:буфер для лизиса» приблизительно 1:1.

160. Способ по любому из п.п. 155-159, где буфер для лизиса также содержит от $0,1\times$ до $5\times$ забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или буфера Трис-EDTA (TE).

161. Способ по п. 160, где буфер для лизиса также содержит $1\times$ PBS.

162. Способ по любому из п.п. 142-161, где твердые носители подвергают контактированию с антигенсвязывающим доменом на стадии (b) в присутствии буфера для гибридизации, содержащего от $0,1\times$ до $10\times$ физиологического раствора с цитратом натрия (SSC), от 0,001% до 30% блокирующего агента и от 0,01% до 30% концентрирующего агента.

163. Способ по п. 162, где блокирующий агент включает альбумин бычьей сыворотки (BSA), полиэтиленгликоль (ПЭГ), казеин или поливиниловый спирт (PVA).

164. Способ по п. 163, где блокирующий агент содержит BSA, и где BSA присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%.

165. Способ по любому из п.п. 162-164, где концентрирующим агентом является сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина.

166. Способ по п. 165, где сополимер полиэтиленгликоля, бисфенола А и эпихлоргидрина присутствует в буфере для гибридизации в количестве от 1% до 3%.

167. Способ по любому из п.п. 162-166, где буфер для гибридизации содержит от $2\times$ до $5\times$ буфера SSC.

168. Способ по любому из п.п. 142-167, также включающий, перед стадиями (b) и (c), блокирование твердых носителей с использованием раствора, содержащего BSA.

169. Способ по п. 169, где твердые носители блокируют в течение 1 часа при 37°C с использованием 2% раствора BSA.

170. Способ по п. 168 или 169, также включающий промывку твердых носителей промывочным раствором после блокирования твердых носителей.

171. Способ по любому из п.п. 142-170, также включающий, после стадий (b) и (c) и перед стадией (d), промывку твердых носителей промывочным буфером, содержащим от $0,1\times$ до $10\times$ буфера SSC и от 0,01 до 30% детергента.

172. Способ по п. 171, где детергент содержит от 0,05% до 5% натриевой соли N-лауроилсаркозина.

173. Способ по п. 171 или 172, где промывочный буфер содержит от $1\times$ до $5\times$ буфера SSC.

174. Способ по любому из п.п. 155-173, где один или более буферов для лизиса,

промывочных буферов и буферов для гибридизации также содержат контрольный олигонуклеотид, который гибридизуется по меньшей мере с одной из одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата на твердом носителе.

175. Способ по любому из п.п. 142-174, где антиген представляет собой вирусный антиген.

176. Способ по п. 175, где вирусный антиген происходит от вируса, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, HBV, HCV, вируса Западного Нила, вируса Зика и парвовируса.

177. Способ по любому из п.п. 142-174, где антиген представляет собой антиген бактерий, археобактерий, простейших, грибов, растений или животных.

178. Способ по любому из п.п. 1-177, где образец содержит цельную кровь, сыворотку, слюну, мочу, почву, ткань или образец окружающей среды.

179. Набор, включающий:

а) множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю; и

б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен такого множества специфически связывается с антигеном, и где каждый антигенсвязывающий домен такого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, которая, по существу, комплементарна одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности, присоединенной к твердым носителям.

180. Набор по п. 179, также содержащий:

с) второй антигенсвязывающий домен, связанный с коллоидным детектирующим реагентом, где второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с антигеном, который также специфически связан с антигенсвязывающим доменом множества антигенсвязывающих доменов в (b).

181. Множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

182. Множество последовательностей по п. 181, где одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на каждом твердом носителе связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями.

183. Множество последовательностей по п. 182, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

184. Множество последовательностей по п. 182, где спейсерный реагент содержит дендример.

185. Набор, включающий:

а) множество по любому из п.п. 181-184; и

б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий

домен такого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30.

186. Набор, включающий:

а) множество по любому из п.п. 181-184; и

б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из такого множества включает:

1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты, и

2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30.

187. Множество одноцепочечных олигонуклеотидных последовательностей для захвата, каждая из которых присоединена к твердому носителю, где каждая одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-30.

188. Множество последовательностей по п. 187, где одноцепочечная олигонуклеотидная последовательность для захвата на каждом твердом носителе связана со спейсерным реагентом, а спейсерный реагент связан с твердыми носителями.

189. Множество последовательностей по п. 188, где спейсерный реагент содержит белок сывороточного альбумина.

190. Множество последовательностей по п. 188, где спейсерный реагент содержит дендример.

191. Набор, включающий:

а) множество последовательностей по любому из п.п. 187-190; и

б) множество антигенсвязывающих доменов, где каждый антигенсвязывающий домен из этого множества связан с одноцепочечной олигонуклеотидной последовательностью, независимо выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

192. Набор, включающий:

а) множество последовательностей по любому из п.п. 187-190; и

б) множество пар праймеров, где каждая пара праймеров из этого множества включает:

1) первый праймер, содержащий метку и первую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с первой цепью нуклеиновой кислоты; и

2) второй праймер, содержащий вторую олигонуклеотидную последовательность, которая гибридизуется со второй цепью части нуклеиновой кислоты, противоположной первой цепи, и третью олигонуклеотидную последовательность, где третья олигонуклеотидная последовательность каждого первого праймера независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

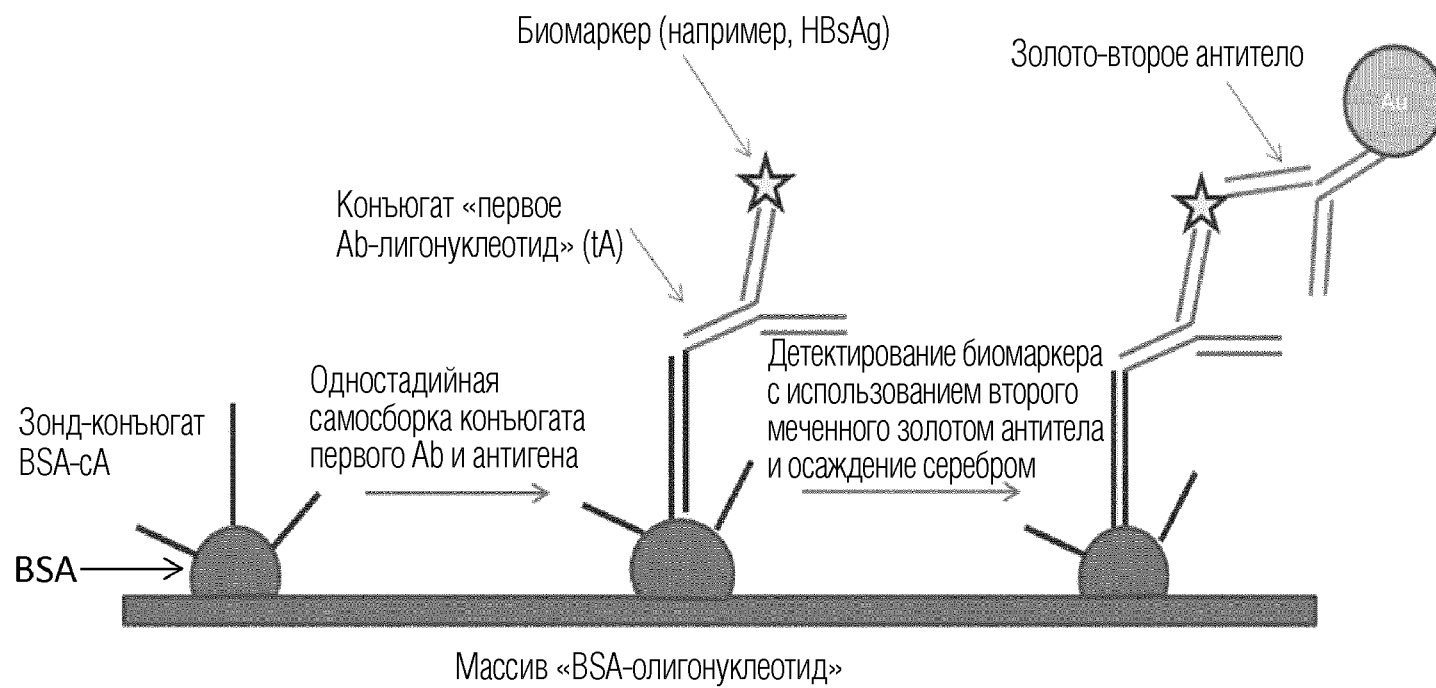
193. Множество последовательностей по любому из п.п. 181-184 и 187-190, где твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива.

194. Множество последовательностей по любому из п.п. 181-184 и 187-190, где твердые носители представляют собой нитроцеллюлозу, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

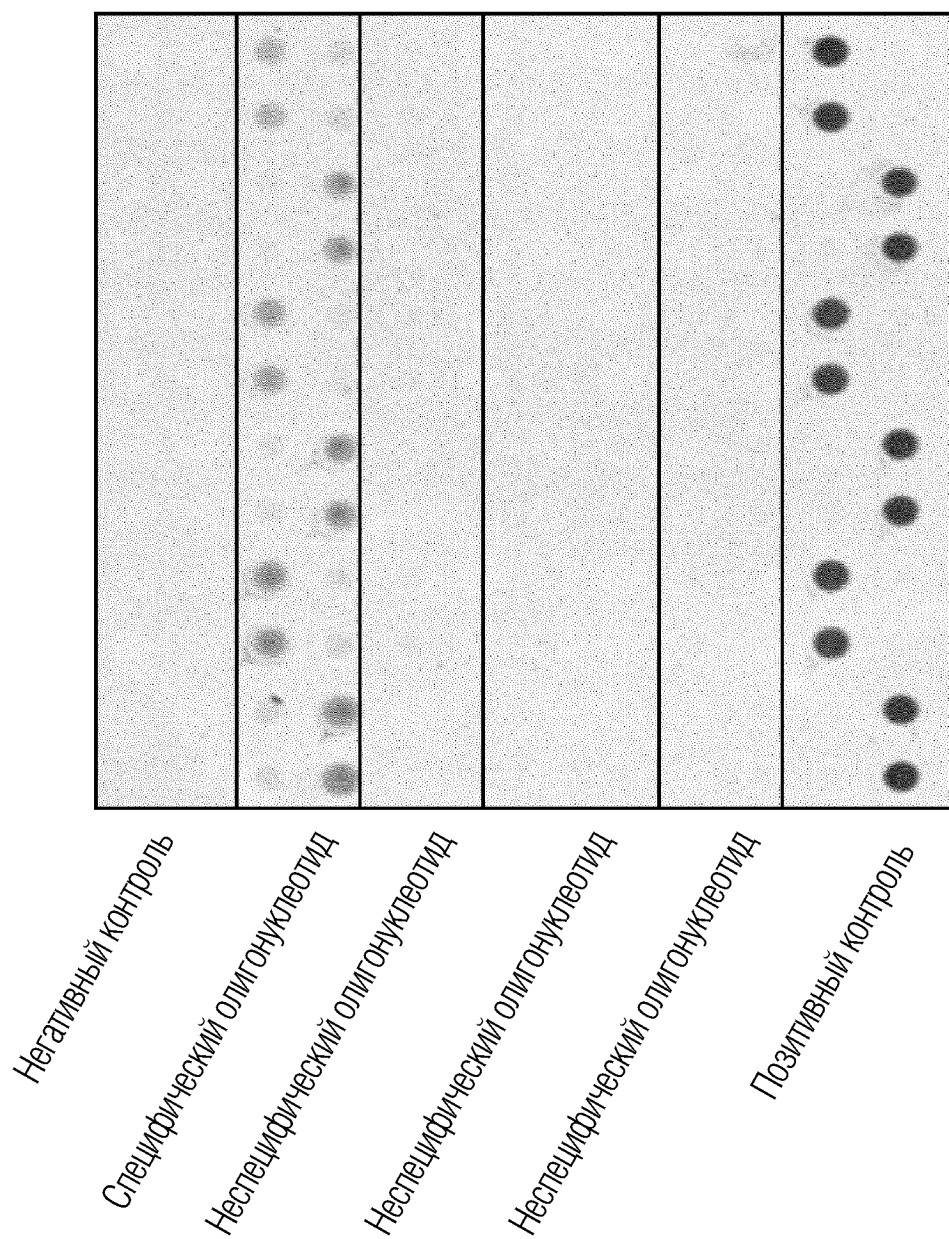
195. Набор по любому из п.п. 179, 180, 185, 186, 191 и 192, где твердые носители расположены в виде микромассива, массива мультиплексных сфер или луночного массива.

196. Набор по любому из п.п. 179, 180, 185, 186, 191 и 192, где твердыми носителями являются нитроцеллюлоза, диоксид кремния, пластик или гидрогель.

По доверенности



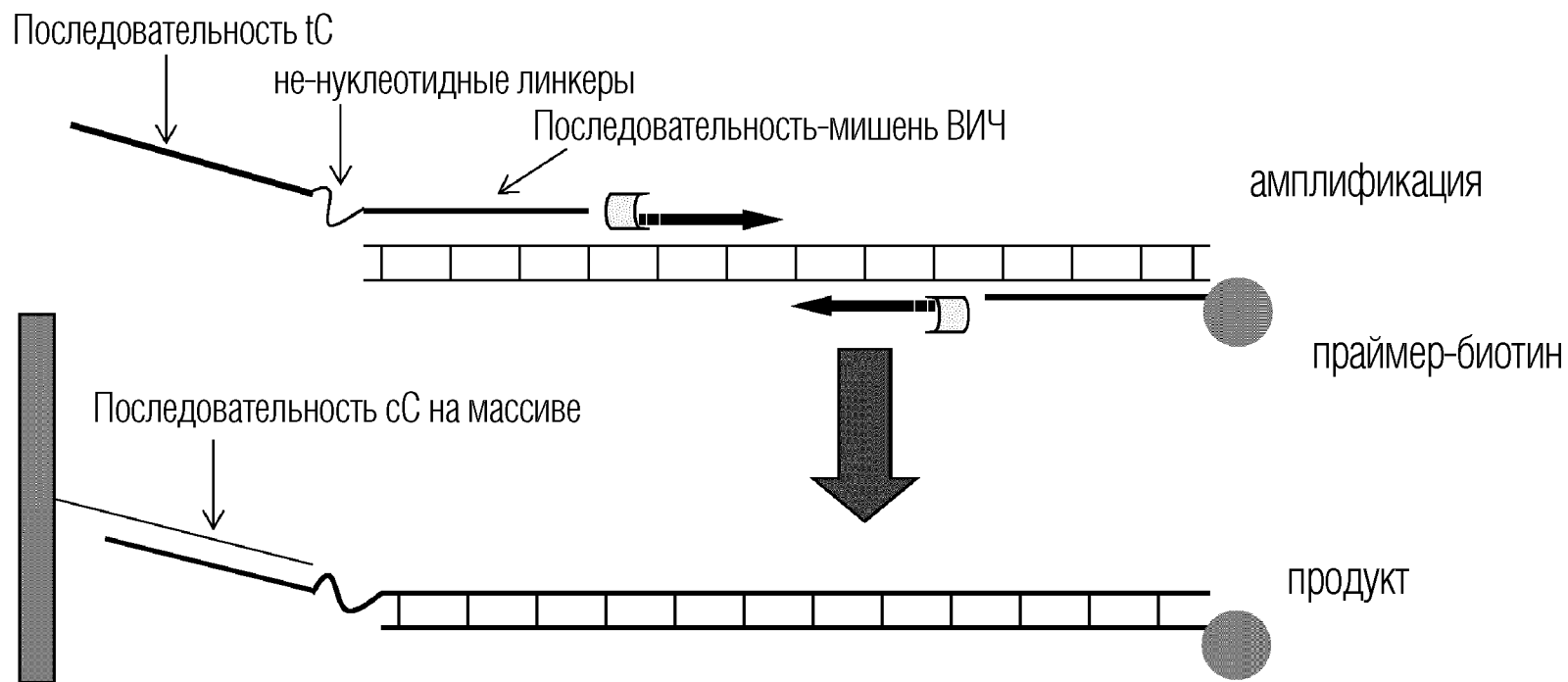
ФИГ. 1А



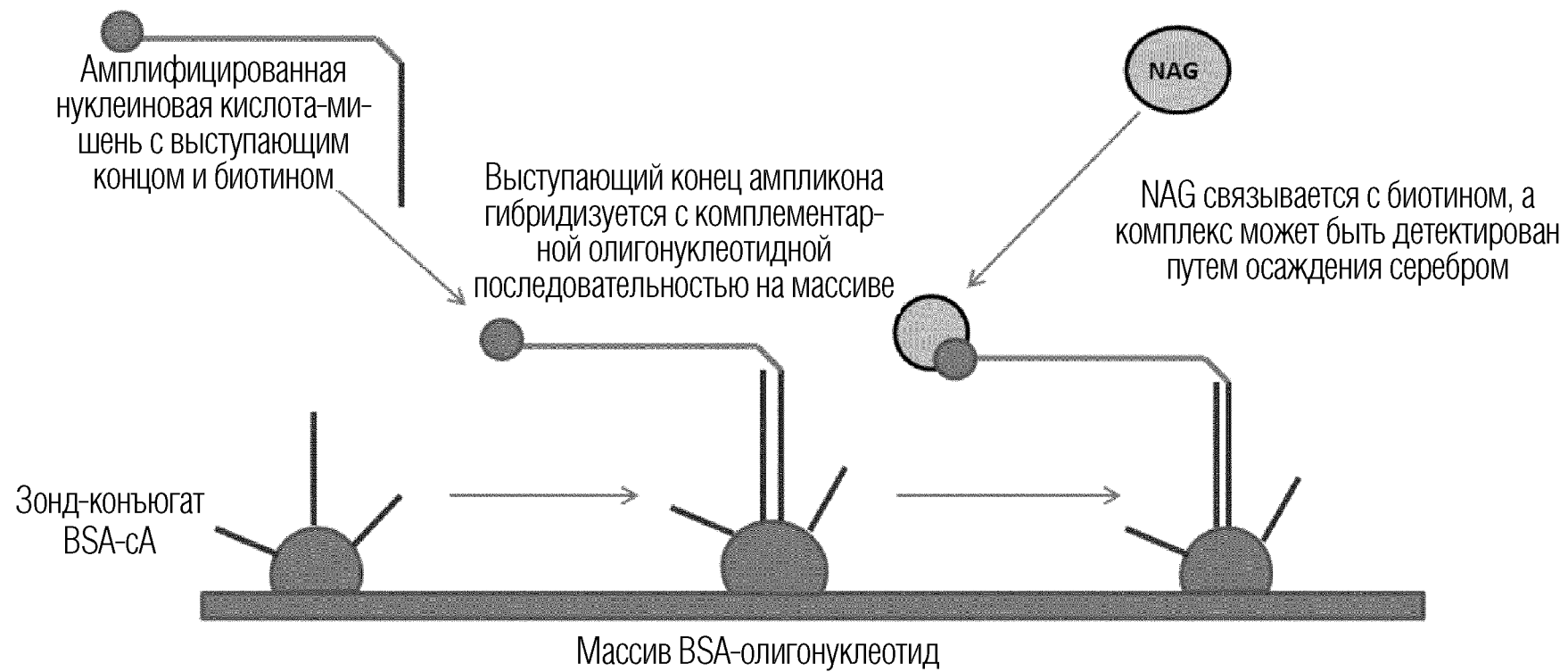
ФИГ. 1В



ФИГ. 2А

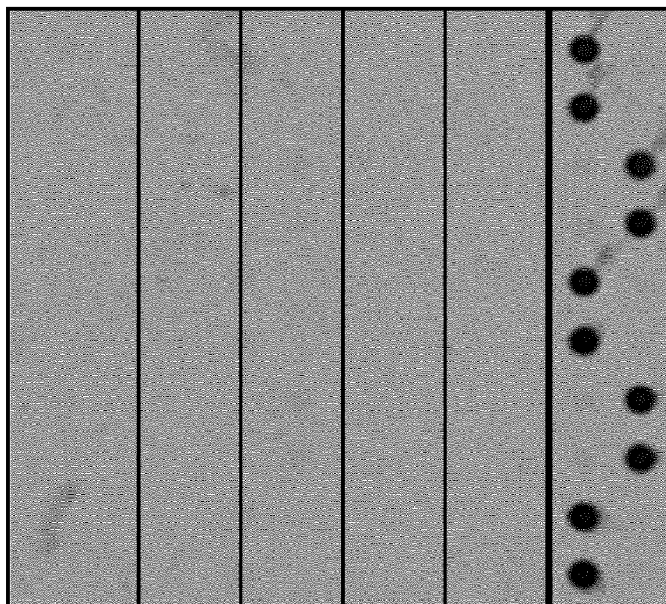


ФИГ. 2В



ФИГ. 2С

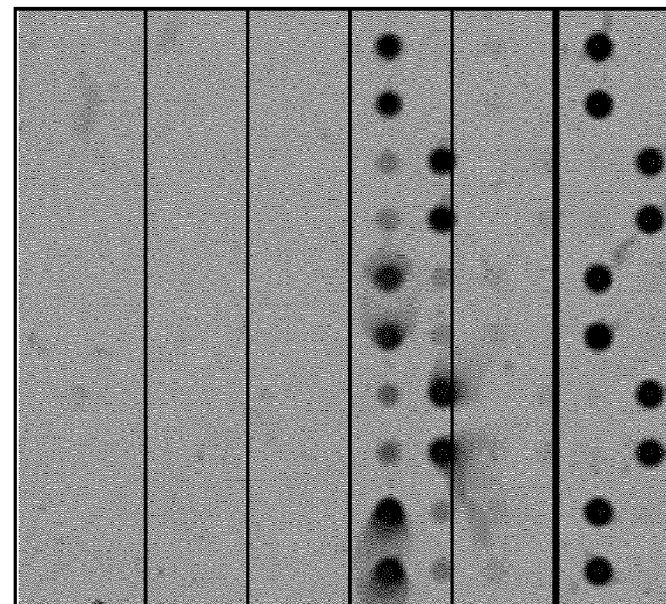
HSV-негативный



Негативный контроль
Неспецифический
олигонуклеотид
Неспецифический
олигонуклеотид
Специфический
олигонуклеотид
Неспецифический
олигонуклеотид
Позитивный контроль

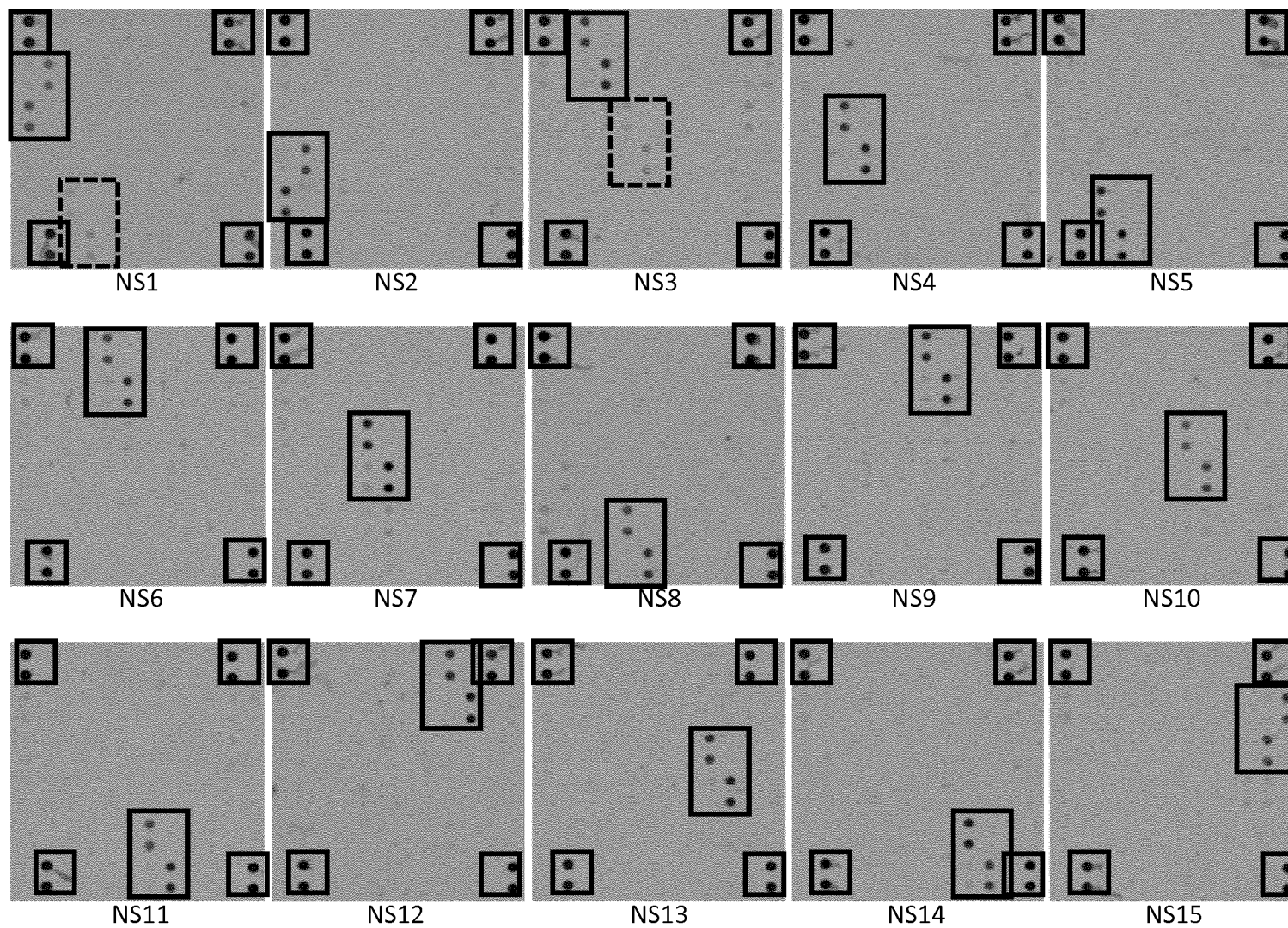
ФИГ. 2D

HSV-позитивный



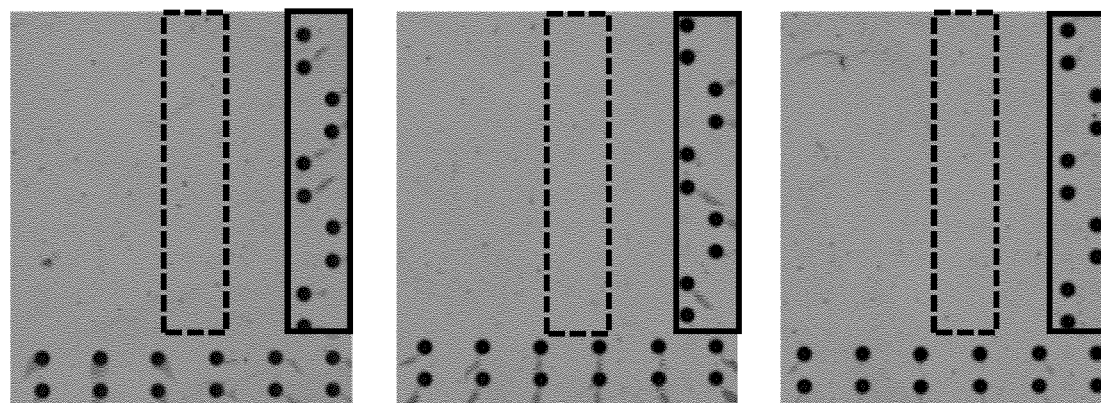
Негативный контроль
Неспецифический
олигонуклеотид
Неспецифический
олигонуклеотид
Специфический
олигонуклеотид
Неспецифический
олигонуклеотид
Позитивный контроль

ФИГ. 2E



6/20

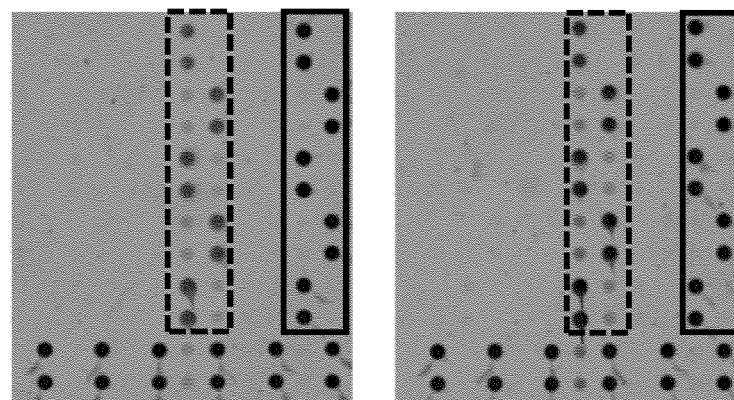
ФИГ. 3А



10% Empigen BB

5% Empigen BB

2.5% Empigen BB

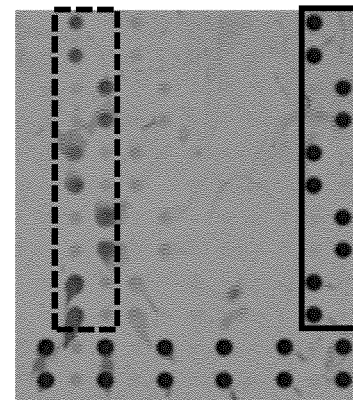
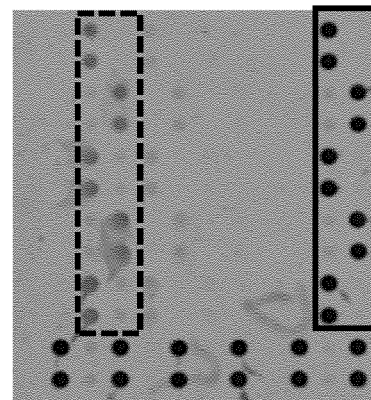
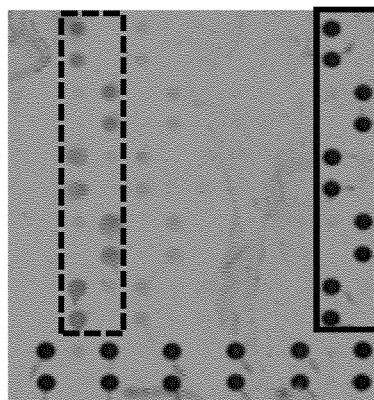
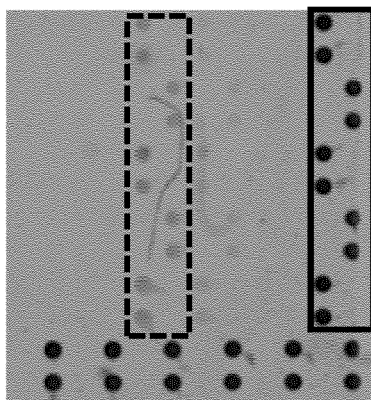


1% Empigen BB

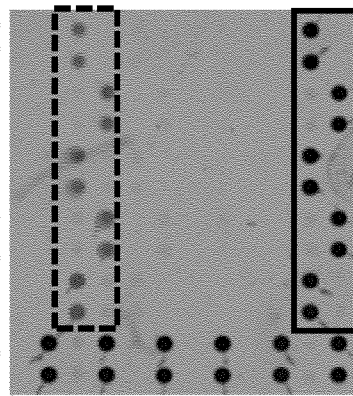
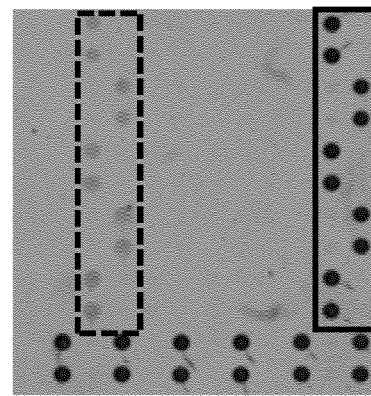
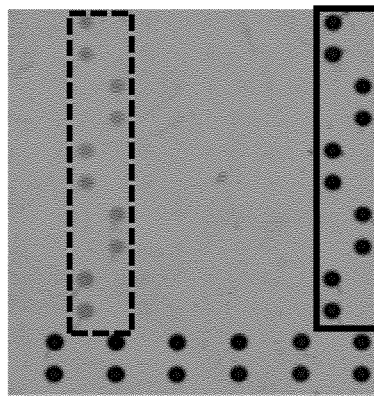
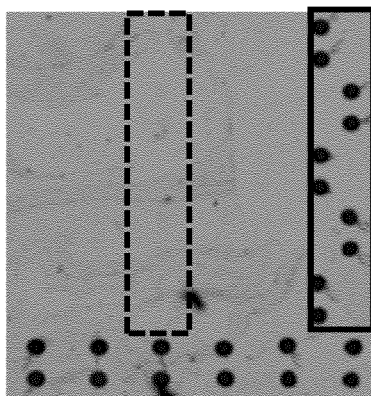
0% Empigen BB

ФИГ. 3В

Буфер для
гибридизации 3/1/3



Буфер для
гибридизации 2/1/2



Негативный лизат

Лизат антигена 100

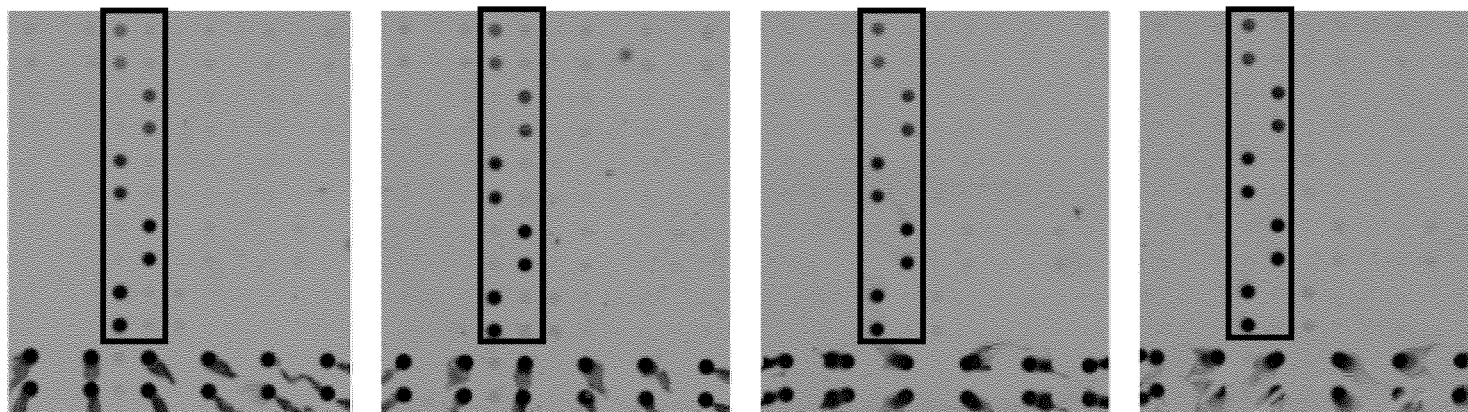
Лизат фрагмента 1

Лизат фрагмента 100

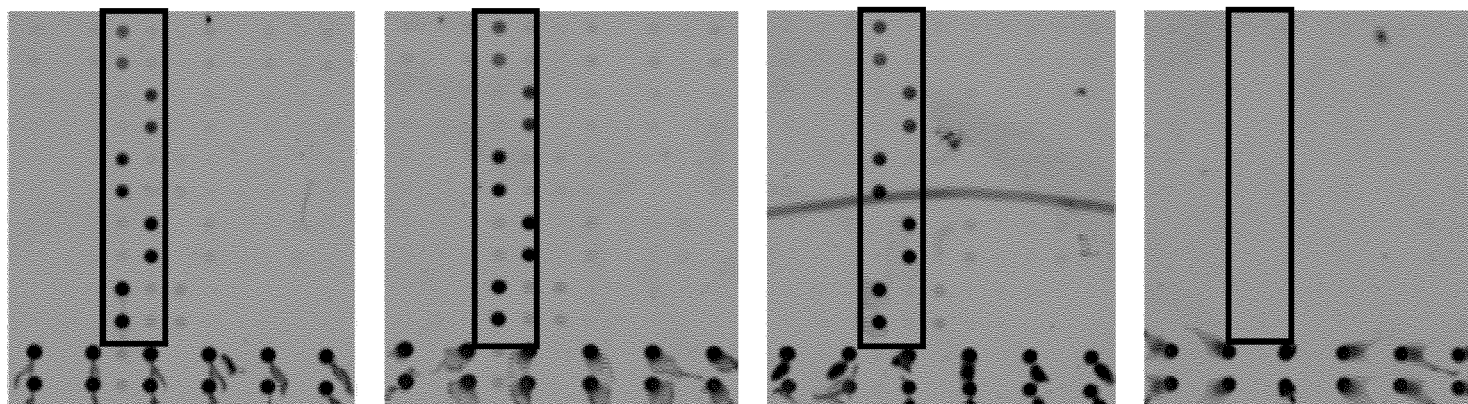
8/20

ФИГ. 3С

Сферы после
элюирования



Элюирование 1



0,2 н NaOH

0,1 н NaOH

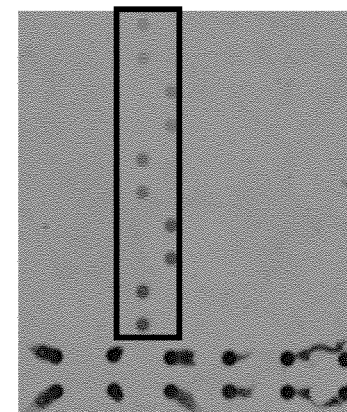
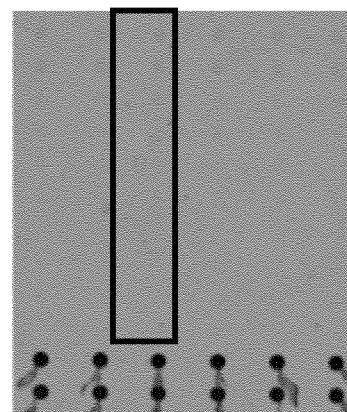
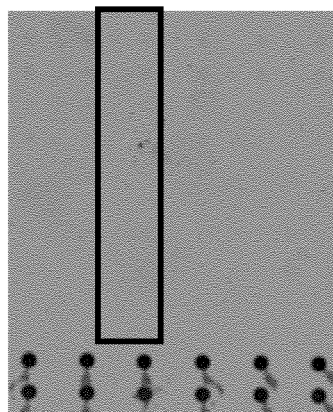
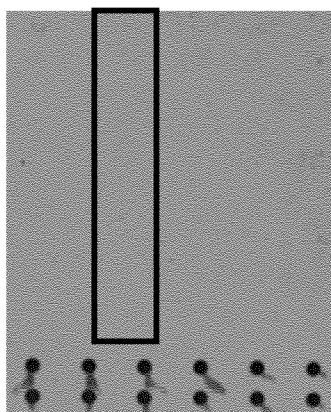
0,05 н NaOH

без NaOH

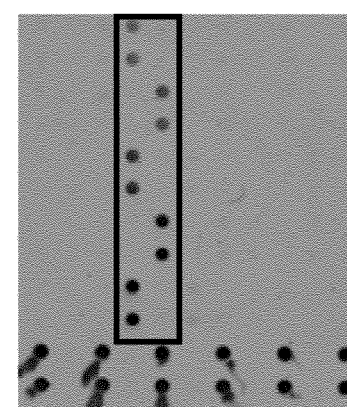
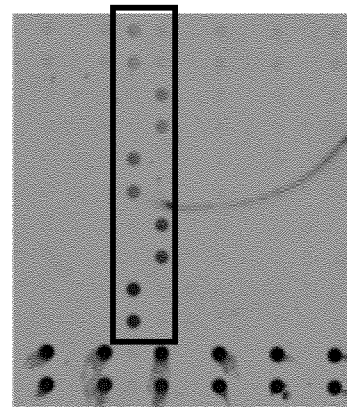
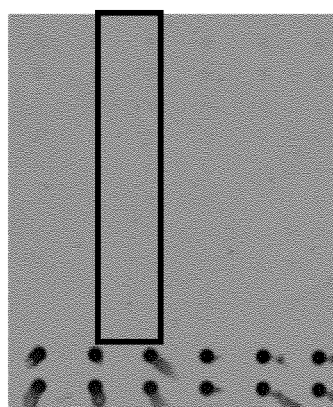
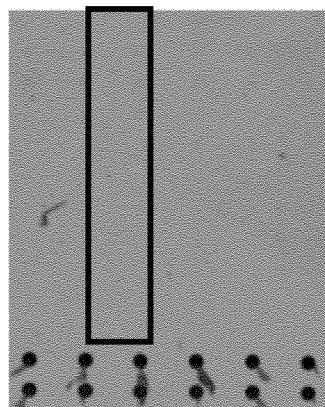
9/20

ФИГ. 3D

3 мкл обогащенной
представляющей
интерес нуклеиновой
кислоты,
используемой
в ОТ-ПЦР



5 мкл обогащенной
представляющей
интерес нуклеиновой
кислоты,
используемой
в ОТ-ПЦР



0,01 н NaOH

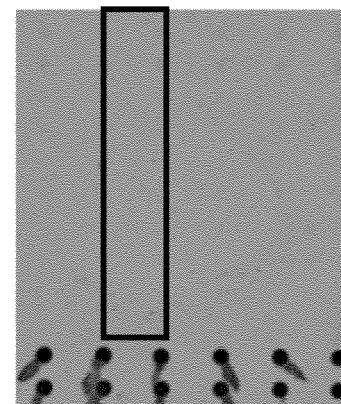
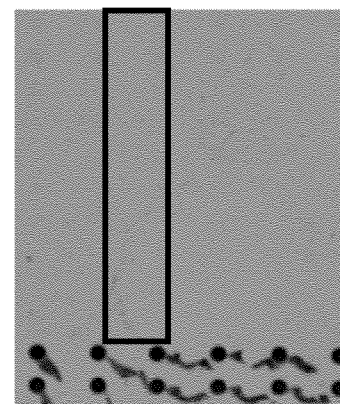
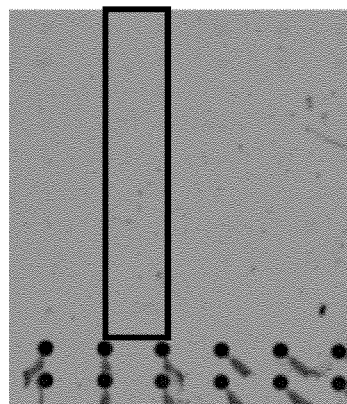
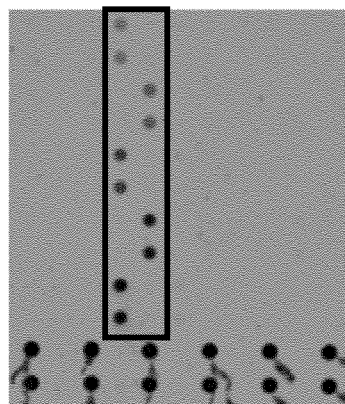
0,02 н NaOH

0,05 н NaOH

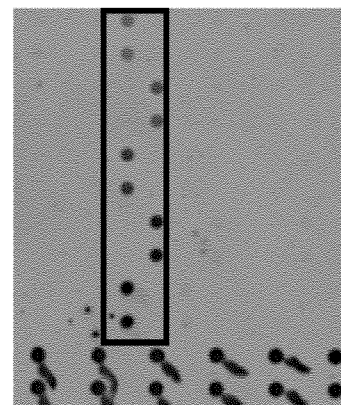
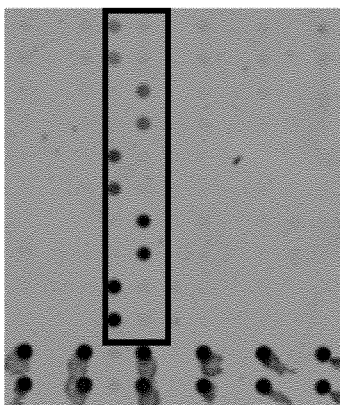
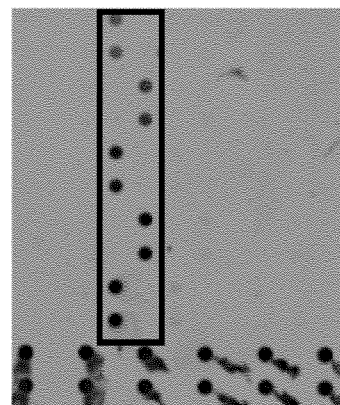
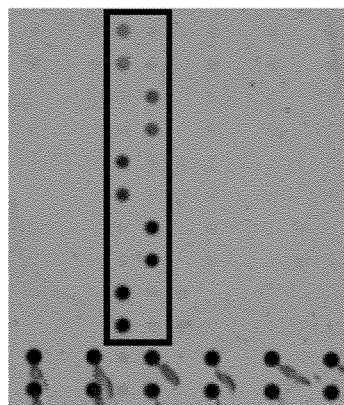
0,1 н NaOH

ФИГ. 3Е

10 mM
TE



100 mM
Триса
(pH 8)



Реплика́т 1

Реплика́т 2

Реплика́т 1

Реплика́т 2

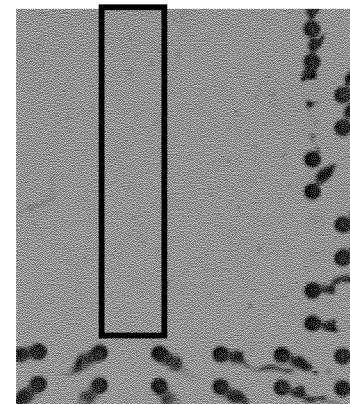
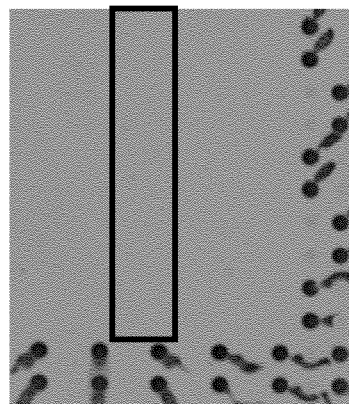
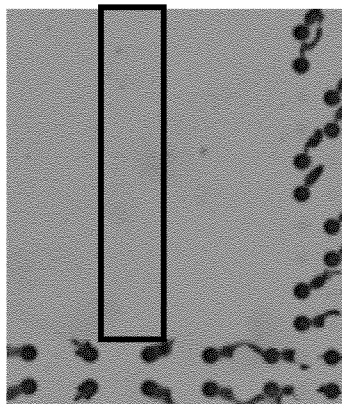
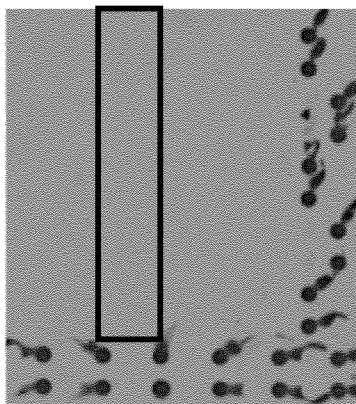
3 мкл, используемые в ПЦР

5 мкл, используемые в ПЦР

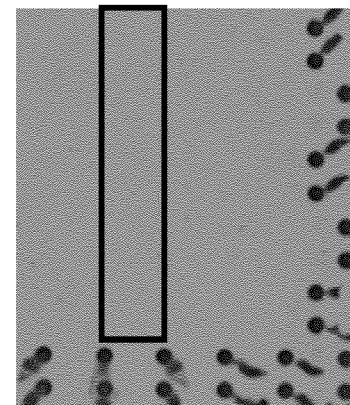
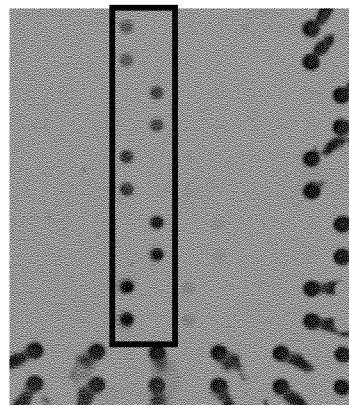
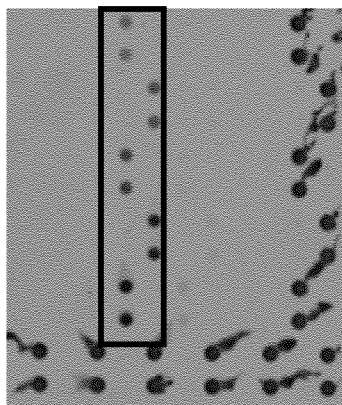
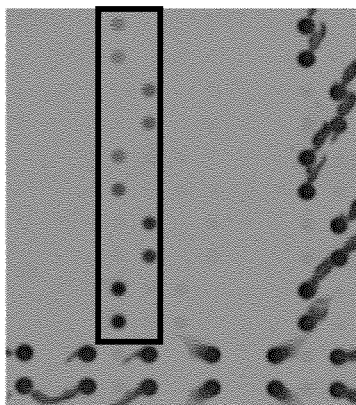
11/20

ФИГ. 3F

Негативный
контроль



Образец
сыворотки
с РНК ВИЧ,
разведенной
до 10⁵ копий
на мл



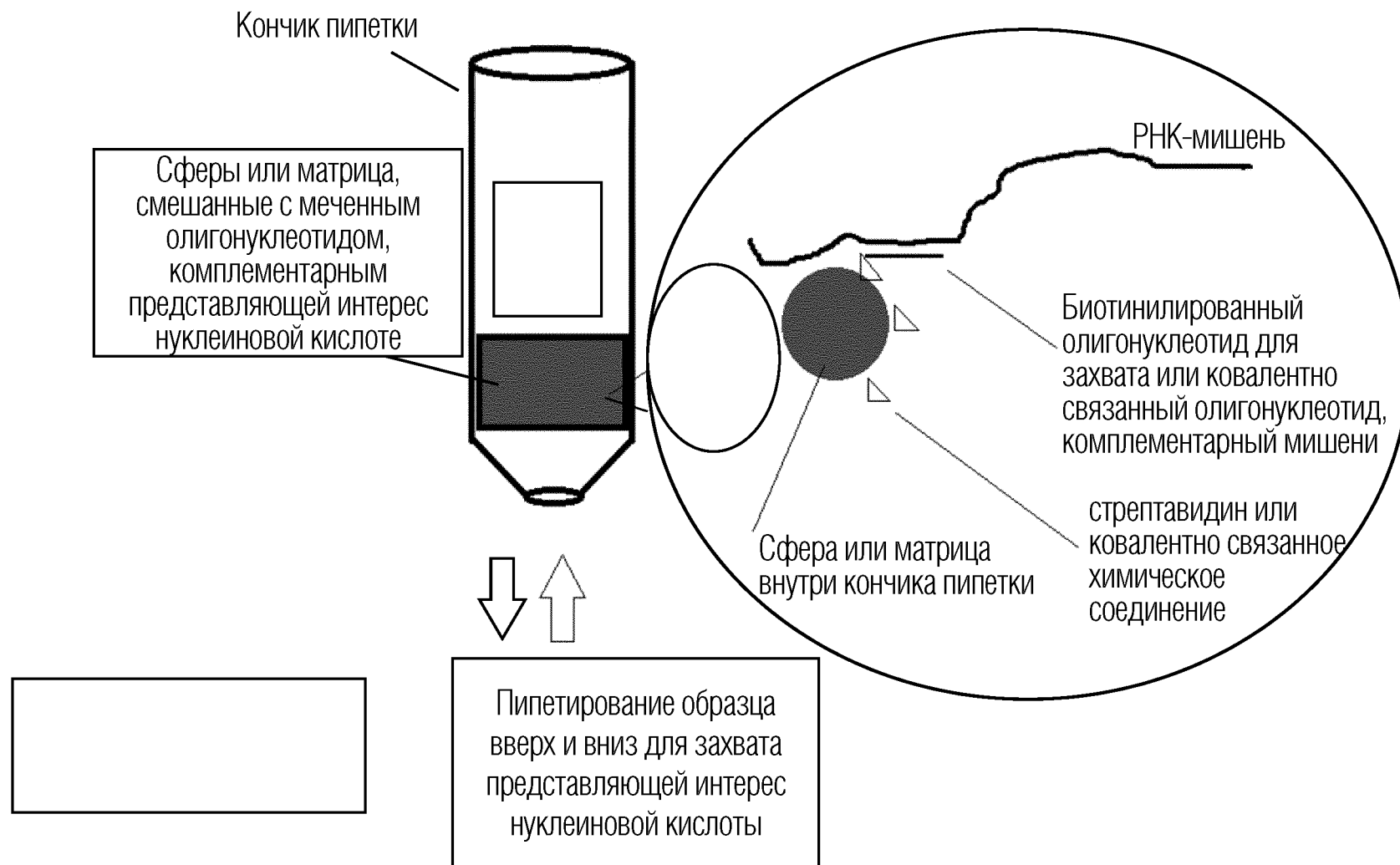
5 пМ праймера

25 пМ праймера

125 пМ праймера

Двухстадийное
обогащение

ФИГ. 3G

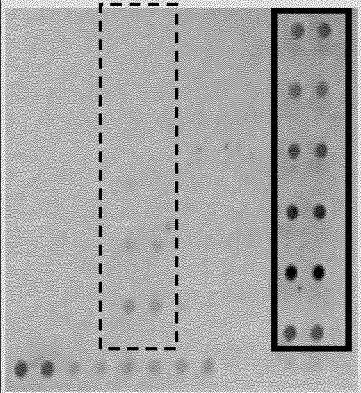
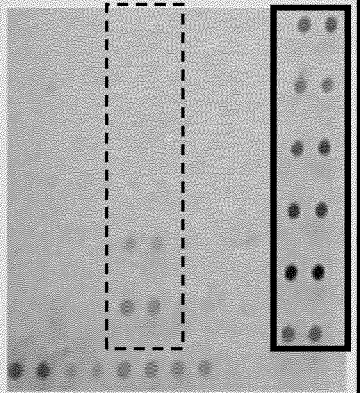
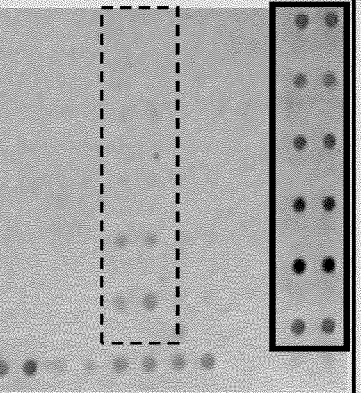
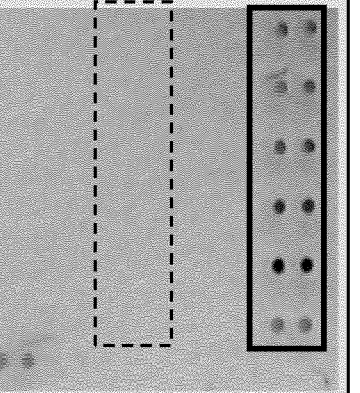
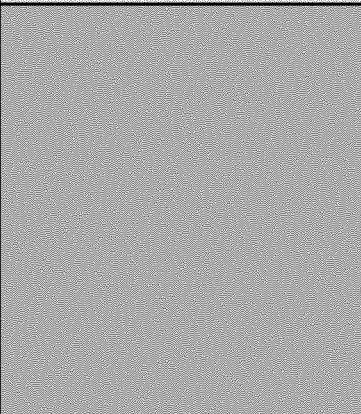
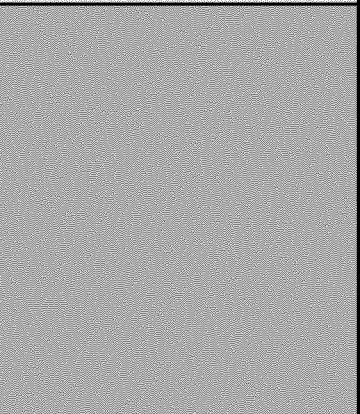
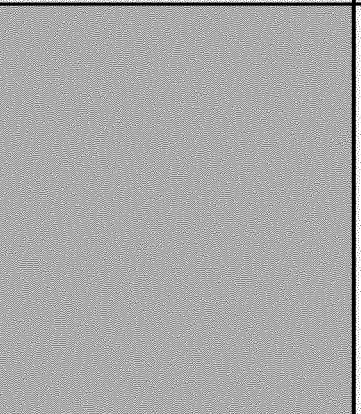
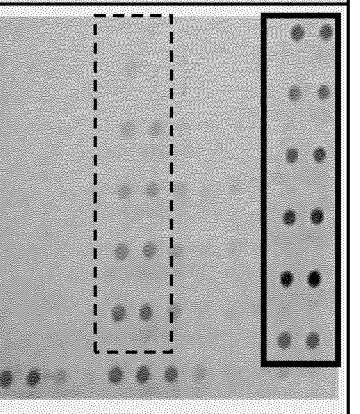


ФИГ. 4А

Верхний ряд Нижний ряд	*10:1 1:5	5:1 1:10	2:1 +Позитивный контроль	1:2 Негативный контроль
Верхний ряд				
Нижний ряд				

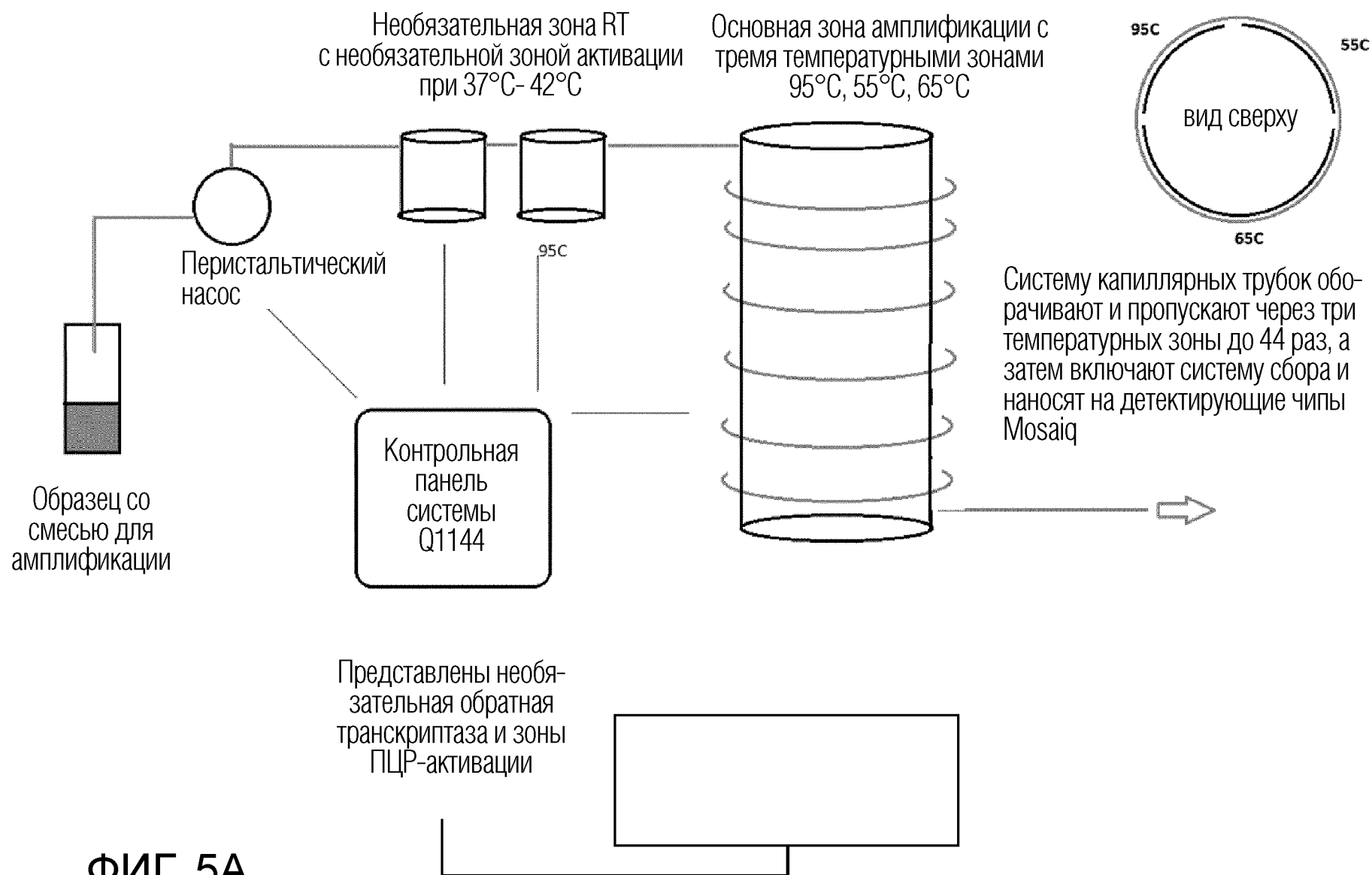
14/20

ФИГ. 4В

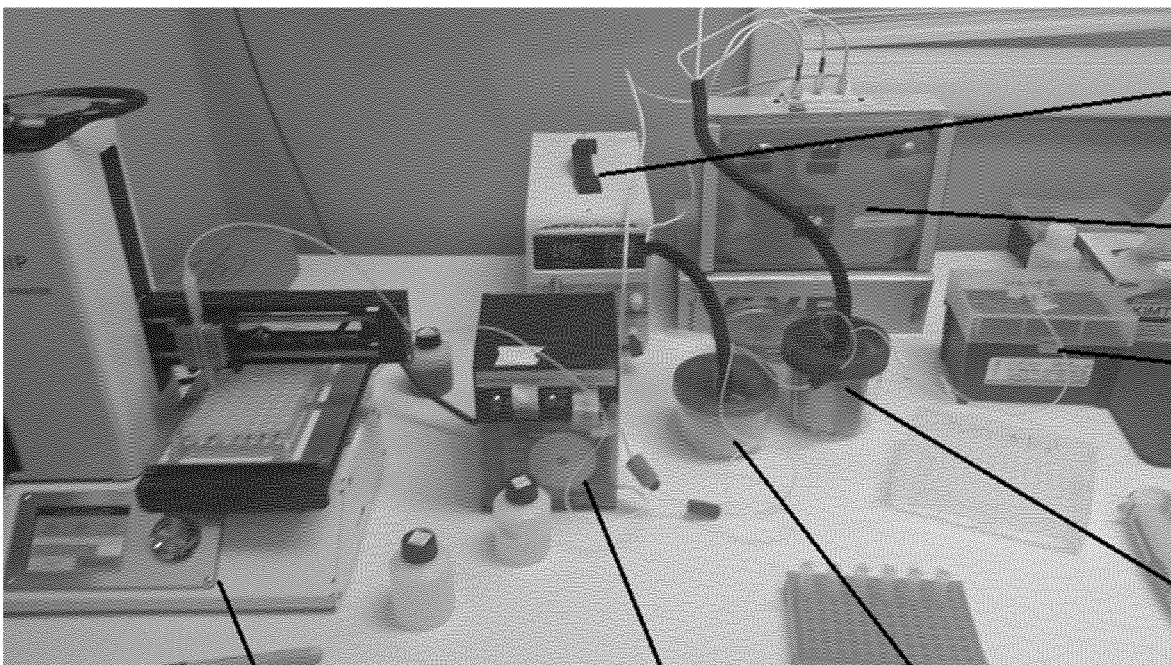
	*1:10	1:20	1:40	+Негативный контроль Позитивный контроль
2х мишень				
Позитивный контроль				

15/20

ФИГ. 4С



ФИГ. 5А



Источник питания

регулятор
температурных зон

сбор отходов
Сбор образца после
перемещения красителя

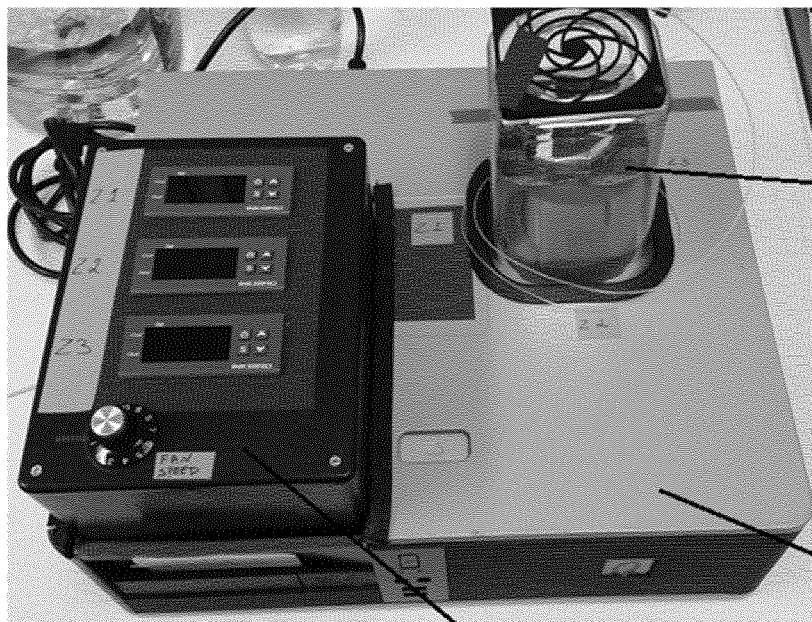
Основной модуль
амплификации для
трех температур

Необязательные зоны
предварительного нагрева
для ОТ и активации

Система насосов

Роботизированная
система для сбора
образца

ФИГ. 5В



Вариант 2 системы
амплификации Q

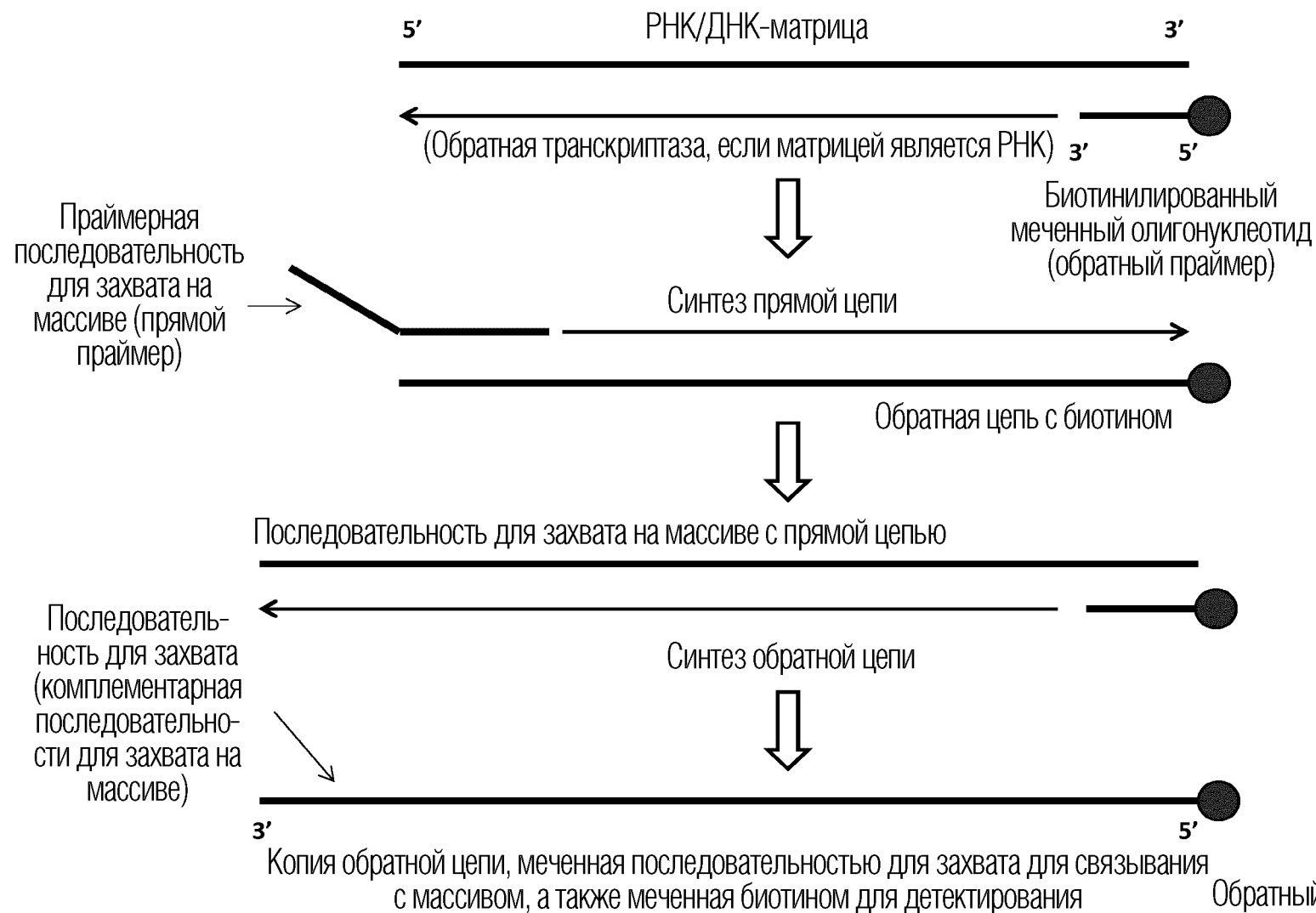
Основной модуль амплификации
для трех температур

источник питания, насосный модуль, и две
необязательных температурных зоны
при 37°C и 95°C для ОТ- и ПЦР-активации

Модуль регуляции температуры для
трех основных зон в необязательной
корректировкой регуляции работы
вентиляторов

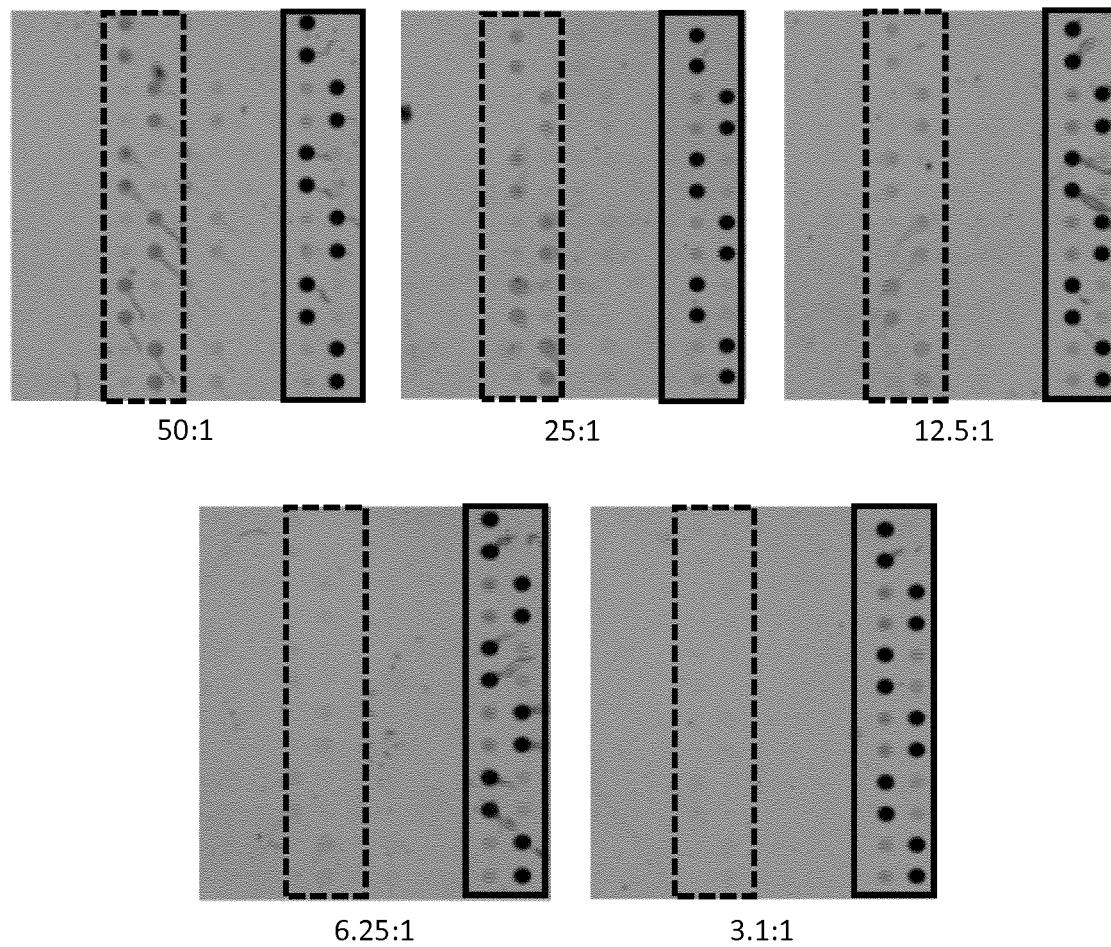


ФИГ. 5С



ФИГ. 6А

Обратный праймер, используемый вместе с избыточным количеством прямого праймера (например, 20:1) для получения преимущественно меченных и маркированных копий обратной цепи



ФИГ. 6В