



(10) 申请公布号 CN 117413183 A

(43) 申请公布日 2024.01.16

(21) 申请号 202280034599.3

(22) 申请日 2022.03.10

(30) 优先权数据

63/159,500 2021.03.11 US

63/256,761 2021.10.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/019831 2022.03.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/192591 EN 2022.09.15

(71) 申请人 诺迪勒思附属公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 图拉尔·阿克塞尔

马库斯·伯恩斯

斯蒂芬·亨德里克斯

埃尔维斯·伊克瓦

皮埃尔·尹德穆勒 萨迪·英格尔

克里斯蒂娜·英曼

帕拉格·马利克

托里·伊莉丝·林克 陈智明

郝鹏宇 钱虹吉

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 郑霞

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书13页 说明书171页 附图142页

(54) 发明名称

用于生物分子保留的系统和方法

(57) 摘要

描述了用于展示诸如生物分子的分析物的组合物、系统和方法。分析物的展示通过将分析物与展示分子偶联来实现的,所述展示分子被配置为与表面或界面缔合。分析物阵列可以由所描述的系统形成,用于在测定和其他方法中使用。

1. 一种纳米结构,其包含:

(a) 包含与第一多个订书钉寡核苷酸杂交的支架链的致密核酸结构,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由所述支架链的单链区域连接的相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束;

(b) 可透过结构,其中所述可透过结构包含与所述支架链杂交的第二多个订书钉寡核苷酸;和

(c) 包含表面连接的寡核苷酸的固体支持物,其中所述表面连接的寡核苷酸附接至所述固体支持物的表面,并且其中所述表面连接的寡核苷酸与所述可透过结构的订书钉寡核苷酸杂交。

2. 如权利要求1所述的纳米结构,其中所述致密核酸结构还包含展示部分,其中所述展示部分被配置为将所述纳米结构与目标分析物偶联。

3. 如权利要求1或2所述的纳米结构,其中所述第二多个订书钉寡核苷酸中的订书钉寡核苷酸包含悬垂单链核酸。

4. 如权利要求3所述的纳米结构,其中所述悬垂单链核酸相对于所述展示部分的取向在空间上以至少 90° 的角度偏移定向。

5. 如权利要求3或4所述的纳米结构,其中所述第二多个订书钉寡核苷酸中的每个订书钉寡核苷酸包含悬垂单链核酸。

6. 如权利要求3-5中任一项所述的纳米结构,其还包含:(d) 与所述致密核酸结构偶联的目标分析物。

7. 如权利要求6所述的纳米结构,其中所述目标分析物包含目标多肽。

8. 如权利要求6或7所述的纳米结构,其中所述目标多肽共价附接至所述致密核酸结构。

9. 如权利要求8所述的纳米结构,其中所述可透过结构相对于所述目标分析物的取向在空间上以至少 90° 的角度偏移定向。

10. 如权利要求8或9所述的纳米结构,其中所述可透过结构在位置上受到约束,以防止与所述目标分析物接触。

11. 如权利要求8-10中任一项所述的纳米结构,其还包含:(e) 与所述目标分析物偶联的亲试剂。

12. 如权利要求11所述的纳米结构,其中所述亲试剂与所述目标分析物的表位偶联。

13. 如权利要求11或12所述的纳米结构,其中所述纳米结构在位置上约束所述亲试剂以防止与所述固体支持物接触。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的纳米结构,其中所述固体支持物的表面包含凸起特征或凹陷特征。

15. 如权利要求14所述的纳米结构,其中所述凸起特征或凹陷特征包含的所述表面连接的寡核苷酸的量超过与所述表面连接的寡核苷酸杂交的所述第二多个订书钉寡核苷酸的量。

16. 如权利要求15所述的纳米结构,其中所述表面连接的寡核苷酸中的两个或更多个与所述第二多个订书钉寡核苷酸中的订书钉寡核苷酸杂交。

17. 如权利要求14-16中任一项所述的纳米结构,其中所述凸起特征或所述凹陷特征的表面积超过所述纳米结构的有效表面积。

18. 如权利要求14-17中任一项所述的纳米结构,其中所述凸起特征或所述凹陷特征的表面区域的形状不同于所述致密核酸结构的有效表面区域的形状。

19. 如权利要求1-148中任一项所述的纳米结构,其中所述固体支持物还包含间隙区域,其中所述间隙区域被配置为抑制所述纳米结构与所述间隙区域的偶联。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的纳米结构,其中所述多个三级结构中的第一三级结构包含具有第一长度的第一对称轴,其中所述多个三级结构中的第二三级结构包含具有第二长度的第二对称轴,并且其中在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的平均距离不超过20纳米,其中所述平均距离是在所述第一长度与所述第二长度中的较小者上计算的。

21. 如权利要求20所述的纳米结构,其中所述第一对称轴与所述第二对称轴基本上共面。

22. 如权利要求20或21所述的纳米结构,其中所述第一对称轴基本上平行于所述第二对称轴。

23. 如权利要求20或21所述的纳米结构,其中所述第一对称轴不平行于所述第二对称轴。

24. 如权利要求20所述的纳米结构,其中在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的平均距离在时间上变化不超过10%。

25. 如权利要求20所述的纳米结构,其中所述第一对称轴不与所述第二对称轴共面。

26. 如权利要求25所述的纳米结构,其中所述第一对称轴与所述第二对称轴偏斜。

27. 如权利要求26所述的纳米结构,其中在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的角度偏移为至少5°。

28. 如权利要求26或27所述的纳米结构,其中所述角度偏移在时间上变化不超过10%。

29. 一种包含多个位点的阵列,其中所述多个位点中的位点包含如权利要求1-28中任一项所述的纳米结构。

30. 如权利要求29所述的阵列,其中所述多个位点中至少40%的位点包含如权利要求1-28中任一项所述的纳米结构。

31. 一种将核酸纳米结构偶联至阵列的方法,其包括:

a. 将固体支持物与核酸纳米结构接触,其中所述固体支持物包含衔接至固体支持物的表面连接的寡核苷酸,并且其中所述核酸纳米结构包含:

i. 包含与第一多个订书钉寡核苷酸杂交的支架链的致密核酸结构,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交以形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由所述支架链的单链区域连接的相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束;

ii. 可透过结构,其中所述可透过结构包含与所述支架链杂交的第二多个订书钉寡核苷酸;以及

b. 将表面连接的寡核苷酸与所述第二多个订书钉寡核苷酸中的订书钉寡核苷酸杂交。

32. 一种制备分析物阵列的方法,其包括:

a. 提供包含多个位点的阵列,其中每个位点包含表面连接的寡核苷酸;

b. 将所述阵列与多个分析物接触,其中每个分析物与核酸纳米结构偶联,其中每个核酸纳米结构包含多个表面偶联寡核苷酸;以及

c. 将一个且仅一个核酸纳米结构偶联至所述多个位点中的位点,其中偶联所述核酸纳米结构包括将所述位点的表面连接的寡核苷酸与所述核酸纳米结构的表面偶联寡核苷酸杂交。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述多个位点中至少70%的位点包含与所述位点偶联的至少一个核酸纳米结构。

34. 如权利要求32或33所述的方法,其中所述多个位点中至少40%的位点包含不超过一个与所述位点偶联的核酸纳米结构。

35. 如权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述表面连接的寡核苷酸都中的每一个包含多核苷酸重复序列。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述表面偶联寡核苷酸中的每一个包含与所述表面连接的寡核苷酸的所述多核苷酸重复序列互补的多核苷酸重复序列。

37. 如权利要求32-36中任一项所述的方法,其中所述核酸纳米结构包含核酸折纸。

38. 如权利要求32-37中任一项所述的方法,其中所述位点中的每一个包含的表面连接的寡核苷酸的量超过与所述表面连接的寡核苷酸杂交的所述表面偶联寡核苷酸的量。

39. 如权利要求32-38中任一项所述的方法,其中将一个且仅一个核酸纳米结构偶联至所述多个位点中的位点包括将两个或更多个表面连接的寡核苷酸与所述多个表面偶联寡核苷酸中的表面偶联寡核苷酸杂交。

40. 如权利要求32-39中任一项所述的方法,其中将所述阵列与多种分析物接触包括将所述阵列与包含所述多种分析物的第一流体介质接触。

41. 如权利要求40所述的方法,其还包括:(d)改变所述第一流体介质的条件。

42. 如权利要求41所述的方法,其中改变所述流体介质的条件包括改变所述第一流体介质的温度。

43. 如权利要求41所述的方法,其中改变所述流体介质的条件包括改变所述第一流体介质的离子强度。

44. 如权利要求41所述的方法,其中改变所述流体介质的条件包括改变所述第一流体介质的pH。

45. 如权利要求41所述的方法,其中改变所述第一流体介质的条件包括改变表面活性剂、离液剂或变性剂的浓度。

46. 如权利要求32-45中任一项所述的方法,其还包括:(d)在第二流体介质中从所述固体支持物漂洗掉未结合的分析物。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述第二流体介质包含表面活性剂、离液剂或变性剂。

48. 如权利要求32-47中任一项所述的方法,所述方法还包括在步骤(b)之前将每个所述分析物与所述多个核酸纳米结构中的核酸纳米结构偶联。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述将每个所述分析物偶联至所述多个核酸纳米结构的核酸纳米结构包括将一个且仅一个分析物与一个且仅一个核酸纳米结构偶联。

50. 如权利要求32-49中任一项所述的方法,其中所述多个分析物包含多肽。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述多肽源自生物样品。
52. 如权利要求32-51中任一项所述的方法,其中所述多个分析物包含源自单一多肽的多个肽片段。
53. 如权利要求32-52中任一项所述的方法,所述方法还包括,在将一个且仅一个核酸纳米结构偶联至所述多个位点中的所述位点之后:(g) 将所述阵列与多种亲和试剂接触,和(h) 将所述多种亲和试剂中的亲和试剂与偶联至所述核酸纳米结构的分析物结合。
54. 如权利要求53所述的方法,其还包括:(i) 鉴定所述阵列上的地址,所述地址包含与所述分析物结合的亲和试剂。
55. 如权利要求32-54中任一项所述的方法,其中所述将一个且仅一个核酸纳米结构偶联至所述多个位点中的位点还包括将一个且仅一个核酸纳米结构偶联至所述多个位点中一定分数的位点。
56. 如权利要求55所述的方法,其还包括:(j) 以单分析物分辨率鉴定所述分数的位点中的每个位点的地址。
57. 如权利要求32-56中任一项所述的方法,其中所述固体支持物包含多个位点,其中所述多个位点中的每个位点可单独地以单分析物分辨率分辨出。
58. 如权利要求57所述的方法,其中所述多个位点中的每个位点包含表面连接的寡核苷酸。
59. 如权利要求57或58所述的方法,其中所述多个位点的平均间距不超过2微米。
60. 如权利要求57-59中任一项所述的方法,其中所述多个位点的平均尺寸不超过500nm。
61. 一种目标分析物的阵列,其包含:
- 包含多个位点的固体支持物,其中每个位点包含表面连接的寡核苷酸;
 - 多个核酸纳米结构,其中每个核酸纳米结构被配置为偶联分析物,其中每个核酸纳米结构包含多个表面偶联寡核苷酸,其中每个表面偶联寡核苷酸不包含自身互补性,并且其中所述多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构通过表面偶联寡核苷酸与表面连接的寡核苷酸的杂交而与所述多个位点中的位点偶联;以及
 - 多个目标分析物,其中每个目标分析物与所述多个核酸纳米结构中的核酸纳米结构偶联。
62. 一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含至少10个偶联的核酸,其中所述核酸纳米结构包含:
- 包含高内部互补性的致密区域,其中所述高内部互补性包含至少50%的双链核酸和至少1%的单链核酸,并且其中所述致密区域包含展示部分,其中所述展示部分与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;以及
 - 包含低内部互补性的可透过区域,其中所述低内部互补性包含至少约50%的单链核酸,并且其中所述可透过区域包含偶联部分,其中所述偶联部分形成或被配置为形成与固体支持物的偶联相互作用。
63. 如权利要求62所述的核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构包含至少50个偶联的寡核苷酸。
64. 如权利要求63所述的核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构包含至少100个偶联的

寡核苷酸。

65. 如权利要求62-64中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述高内部互补性包含至少80%的双链核酸。

66. 如权利要求65所述的核酸纳米结构,其中所述高内部互补性包含至少5%的单链核酸。

67. 如权利要求62-66中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述高内部互补性包含不超过20%的单链核酸。

68. 如权利要求62-67中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述低内部互补性包含至少90%的单链核酸。

69. 如权利要求68所述的核酸纳米结构,其中所述低内部互补性包含至少99%的单链核酸。

70. 如权利要求68或69所述的核酸纳米结构,其中所述低内部互补性不包含双链核酸。

71. 如权利要求62-70中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述可透过区域包含多个悬垂部分。

72. 如权利要求71所述的核酸纳米结构,其中所述多个悬垂部分中的悬垂部分包含未结合的末端残基。

73. 如权利要求71或72所述的核酸纳米结构,其中所述多个悬垂部分中的悬垂部分不包含自身互补性。

74. 如权利要求71-73中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述多个悬垂部分中的悬垂部分包含选自由聚T重复序列、聚A重复序列、聚G重复序列和聚C重复序列组成的多核苷酸重复序列。

75. 如权利要求71-74中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述多个悬垂部分中的悬垂部分包含至少1000个核苷酸。

76. 如权利要求71所述的核酸纳米结构,其中所述可透过区域包含至少10个悬垂部分。

77. 一种核酸纳米结构,其包含:

a. 致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交以形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包括由所述支架的单链核酸区域连接的相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构中的相邻三级结构的相对位置受到位置约束;以及

b. 可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与所述致密结构的支架链偶联,其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸,并且其中所述可透过结构在所述致密结构的至少一部分周围具有各向异性三维分布。

78. 如权利要求77所述的核酸纳米结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含小于10纳米的在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的平均分隔距离。

79. 如权利要求77所述的核酸纳米结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三

级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的 0° 平均角度偏移。

80. 如权利要求77所述的核酸纳米结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含在所述第一对称轴与所述第二对称轴之间的不超过 90° 的平均角度偏移。

81. 如权利要求77-80中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述致密结构包含核酸折纸。

82. 如权利要求81所述的核酸纳米结构,其中所述核酸折纸包含第一面和第二面,其中所述第一面从所述第二面偏移了 180° 的平均角度。

83. 如权利要求82所述的核酸纳米结构,其中所述第一面包含展示部分,其中所述展示部分被配置为偶联目标分析物。

84. 如权利要求83所述的核酸纳米结构,其中所述展示部分与所述目标分析物偶联。

85. 如权利要求82-84中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述第二面与所述可透过结构偶联。

86. 如权利要求77-85中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构包含多个悬垂部分。

87. 如权利要求86所述的核酸纳米结构,其中所述多个悬垂部分包含捕获部分,其中所述捕获部分被配置为将所述核酸纳米结构偶联至固体支持物。

88. 如权利要求77-87中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述各向异性体积分布包括在致密结构周围的半球体积的部分。

89. 如权利要求77-88中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述各向异性体积分布包含排除了包含与致密结构偶联的目标分析物的体积的、在致密结构周围的球形体积的部分。

90. 如权利要求77-89中任一项所述的核酸纳米结构,其中由所述致密结构所占据的体积大于由所述可透过结构所占据的体积。

91. 如权利要求77-89中任一项所述的核酸纳米结构,其中由所述可透过结构所占据的体积大于由所述致密结构所占据的体积。

92. 一种核酸纳米结构,其包含:

a. 致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包括由所述支架链的单链区域连接的相邻三级结构,其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束,并且其中所述致密结构包含有效表面积;以及

b. 可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与所述致密结构的支架链偶联,并且其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸;并且其中(i)所述核酸纳米结构的有效表面积大于所述致密结构的有效表面积,或者ii)所述核酸纳米结构的有效表面积与体积的比率大于所述致密结构的有效表面积与体积的比率。

93. 如权利要求92所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构包含有效表面积。

94. 如权利要求93所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构的有效表面积与所述核酸纳米结构的有效表面积相同。

95. 如权利要求93所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构的有效表面积小于所述核酸纳米结构的有效表面积。

96. 如权利要求93-95中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构的有效表面积小于所述致密结构的有效表面积。

97. 如权利要求93-96中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构的有效表面积大于所述致密结构的有效表面积。

98. 如权利要求92-97中任一项所述的核酸纳米结构,所述核酸纳米结构还包含固体支持物。

99. 如权利要求98所述的核酸纳米结构,其中所述可透过结构与所述固体支持物偶联。

100. 如权利要求99所述的核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构包含占用面积,其中所述核酸纳米结构的占用面积大于所述核酸纳米结构的有效表面积。

101. 如权利要求100所述的核酸纳米结构,其中所述致密结构的占用面积与所述致密结构的有效表面积相同。

102. 如权利要求99所述的核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构包含占用面积,其中所述核酸纳米结构的占用面积与所述核酸纳米结构的有效表面积相同。

103. 一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含多条核酸链,其中所述多条核酸链中的每条核酸链与所述多条核酸链中的另一条核酸链杂交形成多个三级结构,并且其中所述多条核酸链中的核酸链包含与所述多条核酸链中的第二核酸链杂交的第一核苷酸序列,其中所述多条核酸链中的核酸链还包含至少100个连续核苷酸的第二核苷酸序列,并且其中所述第二核苷酸序列的至少50个核苷酸是单链的。

104. 如权利要求103所述的核酸纳米结构,其中所述第一核苷酸序列包含至少5个核苷酸。

105. 如权利要求103或104所述的核酸纳米结构,其中所述第二核苷酸序列包含至少500个核苷酸。

106. 如权利要求105所述的核酸纳米结构,其中所述第二核苷酸序列包含至少1000个核苷酸。

107. 如权利要求105或106所述的核酸纳米结构,其中所述第二核苷酸序列包含选自由聚T重复序列、聚A重复序列、聚G重复序列和聚C重复序列组成的组的多核苷酸重复序列。

108. 如权利要求107所述的核酸纳米结构,其中所述多核苷酸重复序列包含至少50个核苷酸。

109. 如权利要求108所述的核酸纳米结构,其中所述多核苷酸重复序列包含至少500个核苷酸。

110. 如权利要求108或109所述的核酸纳米结构,其中所述多核苷酸重复序列的一个或多个残基被除了所述多核苷酸重复序列的核苷酸之外的核苷酸取代。

111. 如权利要求108-110中任一项所述的核酸纳米结构,其中所述第二核苷酸序列还包含第二多核苷酸重复序列。

112. 如权利要求111所述的核酸纳米结构,其中所述多核苷酸重复序列和所述第二多核苷酸重复序列被中间核苷酸序列分隔开。

113. 如权利要求103-112中任一项所述的核酸纳米结构,所述核酸纳米结构还包含固体支持物,其中所述固体支持物包含多个表面连接部分,其中所述多个表面连接部分中的每个表面连接部分包含互补多核苷酸重复序列,其中所述互补多核苷酸重复序列被配置为与所述多核苷酸重复序列偶联。

114. 如权利要求113所述的核酸纳米结构,其中所述固体支持物还包含互补中间核苷酸序列,其中所述中间核苷酸序列被配置为与所述中间核苷酸序列偶联。

115. 一种组合物,其包含:

a. 包含多个位点的固体支持物;以及

b. 多个结构化核酸颗粒 (SNAP), 其中每个SNAP与分析物偶联或被配置为与分析物偶联,并且其中所述多个SNAP中的每个SNAP与所述多个位点中的位点偶联;

其中所述多个位点包含含有第一数量的位点的第一子集和含有第二数量的位点的第二子集,其中所述第一子集中的每个位点包含两个或更多个偶联的SNAP,其中所述第二子集中的每个位点包含一个且仅一个偶联的SNAP,并且其中所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于由泊松分布预测的比率。

116. 如权利要求115所述的组合物,其中所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率不超过0.7。

117. 如权利要求116所述的组合物,其中所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率不超过0.1。

118. 如权利要求115-117中任一项所述的组合物,其中所述多个位点还包含第三子集,其中所述第三子集的每个位点包含没有偶联的SNAP的位点。

119. 如权利要求118所述的组合物,其中所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于由泊松分布预测的比率。

120. 如权利要求119所述的组合物,其中所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于1。

121. 如权利要求120所述的组合物,其中所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于0.5。

122. 如权利要求115-121中任一项所述的组合物,其中所述多个SNAP中的第一SNAP被配置为阻断所述多个SNAP中的第二SNAP与所述多个位点中的所述位点的结合。

123. 如权利要求122所述的组合物,其中所述位点包含SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含所述第一SNAP和与所述第一SNAP偶联的一个或多个另外的核酸纳米结构。

124. 如权利要求123所述的组合物,其中所述SNAP复合物包含占用面积,其中所述占用面积大于所述位点的表面积的至少一半。

125. 如权利要求124所述的组合物,其中所述SNAP包含占用面积,其中所述占用面积大于所述位点的表面积的至少一半。

126. 如权利要求124或125所述的组合物,其中所述SNAP包含可透过结构,其中所述可透过结构被配置为阻断所述多个位点的第二SNAP与所述多个位点的位点的结合。

127. 如权利要求126所述的组合物,其中所述可透过结构包含寡核苷酸。

128. 如权利要求127所述的组合物,其中所述寡核苷酸包含选自由聚T重复序列、聚A重复序列、聚G重复序列和聚C重复序列组成的组的多核苷酸重复序列。

129. 如权利要求126所述的组合物,其中所述可透过结构包含选自由线性聚合物链、支化聚合物链和树枝状聚合物链组成的组的聚合物链。

130. 一种分析物阵列,其包含:

a. 包含多个位点的固体支持物;

b. 多个核酸纳米结构,其中每个核酸纳米结构与目标分析物偶联,并且其中所述多个核酸纳米结构的每个核酸纳米结构与所述多个位点中的位点偶联,其中所述多个位点中至少40%的位点包含一个且仅一个目标分析物。

131. 如权利要求130所述的分析物阵列,其中所述多个位点中至少80%的位点包含目标分析物。

132. 如权利要求131所述的分析物阵列,其中所述多个位点中至少90%的位点包含目标分析物。

133. 如权利要求130-132中任一项所述的分析物阵列,其中所述多个位点中至少80%的位点包含不超过一个目标分析物。

134. 如权利要求133所述的分析物阵列,其中所述多个位点中至少90%的位点包含不超过一个目标分析物。

135. 一种组合物,其包含:

a. 固体支持物,所述固体支持物包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点;

b. 所述核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构与所述位点偶联,其中所述核酸纳米结构与目标分析物偶联;并且其中所述核酸纳米结构被配置为防止所述目标分析物与所述固体支持物之间的接触。

136. 如权利要求135所述的组合物,其中所述核酸纳米结构包含可透过结构,其中所述可透过结构被配置为防止所述目标分析物与所述固体支持物之间的接触。

137. 如权利要求136所述的组合物,其中所述可透过结构包含被配置为防止所述目标分析物与所述固体支持物之间接触的部分。

138. 如权利要求137所述的组合物,其中所述部分被配置为通过所述固体支持物的空间阻断来防止所述目标分析物与所述固体支持物之间的接触。

139. 如权利要求138所述的组合物,其中所述部分包含被配置为防止所述目标分析物与所述固体支持物之间接触的化学特性。

140. 如权利要求139所述的组合物,其中所述部分是电排斥部分、磁排斥部分、疏水部分、亲水部分、两亲部分或其组合。

141. 如权利要求135-140中任一项所述的组合物,其中所述核酸纳米结构与所述固体支持物的位点偶联。

142. 如权利要求141所述的组合物,其中所述目标分析物不与所述固体支持物的位点偶联。

143. 如权利要求135-142中任一项所述的组合物,其中所述核酸纳米结构不与所述固体支持物的位点偶联。

144. 如权利要求143所述的组合物,其中所述位点包含被配置为防止所述目标分析物

与所述位点偶联的部分。

145. 如权利要求144所述的组合物,其中所述部分包含寡核苷酸。

146. 如权利要求144所述的组合物,其中所述部分包含选自由线性聚合物链、支化聚合物链和树枝状聚合物链组成的组的聚合物链。

147. 如权利要求144所述的组合物,其中所述部分包含被配置为防止所述目标分析物与所述固体之间接触的化学特性。

148. 如权利要求147所述的组合物,其中所述部分是电排斥部分、磁排斥部分、疏水部分、亲水部分、两亲部分或其组合。

149. 如权利要求147或148所述的组合物,其中所述位点还包含第二部分,其中所述部分和所述第二部分包含不同的化学结构。

150. 如权利要求147或148所述的组合物,其中所述位点还包含第二部分,其中所述部分和所述第二部分包含不同的化学特性。

151. 一种组合物,其包含:

a. 包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点的固体支持物,其中所述位点包含表面积;以及

b. 所述核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构与所述位点偶联,其中所述核酸纳米结构与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;其中所述核酸纳米结构在未结合构型中包含总有效表面积,其中所述核酸纳米结构包含具有有效表面积的致密结构,其中在所述未结合构型中的所述致密结构的有效表面积小于所述位点的表面积的50%,并且其中所述未结合构型包含与所述位点解偶联的核酸纳米结构。

152. 如权利要求151所述的组合物,其中所述致密结构的有效表面积小于所述位点的表面积的25%。

153. 如权利要求151或152所述的组合物,其中所述核酸纳米结构包含可透过区域,其中所述可透过区域被配置为与所述固体支持物的位点偶联。

154. 如权利要求153所述的组合物,其中所述可透过区域包含有效表面积,所述有效表面积大于所述致密区域的有效表面积。

155. 如权利要求153所述的组合物,其中所述可透过区域包含有效表面积,所述有效表面积小于所述致密区域的有效表面积。

156. 如权利要求151-155中任一项所述的组合物,其中所述核酸纳米结构与所述固体支持物的位点偶联。

157. 如权利要求156所述的组合物,其中所述核酸纳米结构包含大于总有效表面积的总占用面积。

158. 如权利要求157所述的组合物,其中所述总占用面积为所述位点的表面积的至少50%。

159. 如权利要求158所述的组合物,其中所述总占用面积为所述位点的表面积的至少90%。

160. 如权利要求159所述的组合物,其中所述总占用面积为所述位点的表面积的大于100%。

161. 如权利要求151-160中任一项所述的组合物,其中所述位点包含第一形状,并且所

述致密结构包含第二形状。

162. 如权利要求161所述的组合物,其中所述第二形状是与所述第一形状基本上相同的形状。

163. 如权利要求161所述的组合物,其中所述第二形状不同于所述第一形状。

164. 一种将核酸纳米结构与阵列位点偶联的方法,其包括:

a. 将包含位点的阵列与核酸纳米结构接触,其中所述位点包含多个表面连接部分,并且其中所述核酸纳米结构包含多个捕获部分;

b. 将所述核酸纳米结构以初始构型偶联至所述位点,其中所述初始构型不包含稳定构型,并且其中所述核酸纳米结构通过将所述多个捕获部分中的捕获部分偶联至所述多个表面连接部分中的表面连接部分而偶联;

c. 解偶联所述多个捕获部分中的捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分偶联;以及

d. 将所述核酸纳米结构从所述初始构型改变为所述稳定构型,其中所述多个捕获部分中的每个捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分偶联。

165. 如权利要求164所述的方法,其中所述多个捕获部分中的捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分的偶联还包括加热所述固体支持物和所述核酸纳米结构。

166. 如权利要求164或165所述的方法,其中使包含所述位点的阵列与所述核酸纳米结构接触包括使所述阵列与包含所述核酸纳米结构的流体介质接触。

167. 如权利要求166所述的方法,其中将所述核酸纳米结构从所述初始构型转变为所述稳定构型还包括改变所述流体介质。

168. 如权利要求167所述的方法,其中改变所述流体介质包括改变所述流体介质的离子种类的浓度。

169. 如权利要求167或168所述的方法,其中改变所述流体介质包括改变所述流体介质的pH。

170. 如权利要求164-169中任一项所述的方法,其中所述捕获部分包含多核苷酸重复序列。

171. 如权利要求170所述的方法,其中所述多核苷酸重复序列的一个或多个残基被除了所述多核苷酸重复序列的核苷酸之外的核苷酸取代。

172. 如权利要求170或171所述的方法,其中所述捕获部分包含第一多核苷酸重复序列和第二多核苷酸重复序列,其中所述第一多核苷酸重复序列和所述第二多核苷酸重复序列被中间核苷酸序列偶联。

173. 如权利要求172所述的方法,其中所述多个表面连接部分包含与所述多核苷酸重复序列互补的第一表面连接部分和与所述中间核苷酸序列互补的第二表面连接部分。

174. 如权利要求164-173中任一项所述的方法,其中所述表面偶联部分包含自身互补性。

175. 如权利要求164-174中任一项所述的方法,其中所述初始构型包含捕获部分与表面连接部分的非最大化量的偶联。

176. 如权利要求175所述的方法,其中所述稳定构型包含捕获部分与表面连接部分的最大化量的偶联。

177. 如权利要求164-176中任一项所述的方法,其中所述初始构型包含所述核酸纳米结构在所述位点上的非最大化占用面积。

178. 如权利要求177所述的方法,其中所述稳定构型包含所述核酸纳米结构在所述位点上的最大化占用面积。

179. 如权利要求164-178中任一项所述的方法,其中所述初始构型包含所述核酸纳米结构在所述位点上的不对称排列。

180. 如权利要求179所述的方法,其中所述稳定构型包含所述核酸纳米结构在所述位点上的对称排列。

181. 一种形成多路复用分析物阵列的方法,其包括:

a. 使包含多个位点的阵列与第一多个核酸纳米结构接触,其中所述第一多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与第一多个目标分析物中的目标分析物偶联;

b. 使包含所述多个位点的阵列与第二多个核酸纳米结构接触,其中所述第二多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与第二多个目标分析物中的目标分析物偶联;

c. 在所述多个位点的第一位点子集沉积所述第一多个核酸纳米结构;以及

d. 在所述多个位点的第二位点子集沉积所述第二多个核酸纳米结构;

其中所述第一位点子集和所述第二位点子集包含随机空间分布。

182. 如权利要求181所述的方法,其中所述第一多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构包含第一功能性核酸,其中所述第一功能性核酸包含第一核苷酸序列,其中所述第二多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构包含第二功能性核酸,其中所述第二功能性核酸包含第二核苷酸序列,并且其中所述第一核苷酸序列不同于所述第二核苷酸序列。

183. 如权利要求181所述的方法,所述方法还包括使所述阵列与第一多个可检测核酸接触,其中所述第一多个可检测核酸中的每个第一可检测核酸包含第一互补核苷酸序列和可检测标记,其中所述第一互补核苷酸序列与所述第一核苷酸序列互补。

184. 如权利要求183所述的方法,所述方法还包括将第一可检测核酸与每个第一功能性核酸偶联。

185. 如权利要求184所述的方法,所述方法还包括检测包含所述第一可检测核酸的阵列的每个地址。

186. 如权利要求185所述的方法,所述方法还包括将所述核酸纳米结构加热到所述第一功能性核酸的至少解链温度,从而使所述第一可检测核酸与所述第一功能性核酸解偶联。

187. 如权利要求181-186中任一项所述的方法,所述方法还包括使所述阵列与第二多个可检测核酸接触,其中所述第二多个可检测核酸中的每个第二可检测核酸包含第二互补核苷酸序列和可检测标记,其中所述第二互补核苷酸序列与所述第二核苷酸序列互补。

188. 如权利要求187所述的方法,所述方法还包括使第二可检测核酸与每个第二功能性核酸偶联。

189. 如权利要求188所述的方法,所述方法还包括检测包含第二可检测核酸的阵列的每个地址。

190. 如权利要求189所述的方法,所述方法还包括将所述核酸纳米结构加热到所述第二功能性核酸的至少解链温度,从而使所述第二可检测核酸与所述第一功能性核酸解偶

联。

191. 如权利要求186或190所述的方法,其中在加热到至少所述解链温度之后,所述核酸纳米结构保持与位点偶联。

用于生物分子保留的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年3月11日提交的美国临时申请号63/159,500和2021年10月18日提交的美国临时申请号63/256,761的优先权,所述美国临时申请中的每一个以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 分析物和其他分子可以形成为结构化或有序的阵列用于各种目的,包括用于分析技术和其他化学目的。例如,出于诸如测序或分子鉴定等目的,生物分子可以被图案化成单分子阵列。在单分子阵列上分析物沉积的高效率可能受益于制备分析物和制备将要沉积分析物的表面或界面的方法。

发明内容

[0004] 在一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:结构化核酸颗粒(SNAP),所述结构化核酸颗粒包含(i)被配置为与分析物偶联的展示部分,(ii)被配置为与表面偶联的捕获部分,和(iii)包含第一官能团和第二官能团的多官能团部分,其中所述多官能团部分与所述结构化核酸颗粒偶联,并且其中所述第一官能团与所述展示部分偶联,并且其中所述第二官能团与所述捕获部分偶联。

[0005] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:结构化核酸颗粒和多官能团部分,其中所述多官能团部分与所述SNAP偶联,并且其中所述多官能团部分被配置为形成从表面到分析物的连续接头。

[0006] 在另一方面,本文提供了一种结构化核酸颗粒(SNAP)复合物,所述SNAP复合物包含两个或更多个SNAP,其中所述两个或更多个SNAP中的每个SNAP独立地选自自由展示SNAP、效用SNAP或其组合组成的组,其中所述展示SNAP包含被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述效用SNAP包含被配置为与表面偶联的捕获部分,并且其中所述两个或更多个SNAP被偶联以形成所述SNAP复合物。

[0007] 在另一方面,本文提供了一种结构化核酸颗粒(SNAP)组合物,所述SNAP复合物包含:含有表面的材料和两个或更多个SNAP,其中所述两个或更多个SNAP中的每个SNAP独立地选自自由展示SNAP、效用SNAP或其组合组成的组,其中所述展示SNAP包含被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述两个或更多个SNAP与表面偶联,并且其中所述两个或更多个SNAP中的第一SNAP与所述两个或更多个SNAP中的第二SNAP偶联,从而形成SNAP复合物。

[0008] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)分析物,b)展示SNAP,和c)选自自由展示SNAP、效用SNAP及其组合组成的组的一个或多个SNAP,其中所述展示SNAP包含被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述展示SNAP与所述分析物偶联,并且其中所述展示SNAP与所述一个或多个SNAP偶联,从而形成SNAP复合物。

[0009] 在另一方面,本文提供了一种结构化核酸颗粒组合物,所述结构化核酸颗粒组合物包含:a)包含表面的材料,b)分析物,c)展示SNAP以及选自自由展示SNAP、效用SNAP及其组

合组成的一个或多个SNAP,其中所述展示SNAP包含被配置为与所述分析物偶联的展示部分,其中所述展示SNAP与所述分析物偶联,其中所述展示SNAP与所述一个或多个SNAP偶联,从而形成SNAP复合物,并且其中所述SNAP复合物与所述表面偶联。

[0010] 在另一方面,本文提供了一种阵列,所述阵列包含:a)多个SNAP复合物,和b)包含表面的材料,其中所述SNAP复合物中的每个SNAP复合物与所述表面偶联,其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与所述多个SNAP复合物中的一个或多个其他SNAP复合物偶联,并且其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物包含独立地选自展示SNAP、效用SNAP及其组合的两个或更多个SNAP。

[0011] 在另一方面,本文提供了一种形成阵列的方法,所述方法包括:a)提供多个SNAP复合物,b)将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与来自所述多个SNAP复合物中的一个或多个另外的SNAP复合物偶联,和c)将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与表面偶联,其中每个SNAP复合物包含展示SNAP和一个或多个效用SNAP,并且其中每个SNAP复合物包含与所述表面偶联的偶联部分,从而形成阵列。

[0012] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)结构化核酸颗粒,其中所述结构化核酸颗粒包含:i)保持组分;ii)包含被配置为偶联分析物的偶联基团的展示部分,其中所述展示部分与所述保持组分偶联,和iii)被配置为与表面偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个第一表面相互作用寡核苷酸,并且其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的每个第一表面相互作用寡核苷酸包含与所述保持组分偶联的第一核酸链和第一表面相互作用部分,其中所述第一表面相互作用部分被配置为与表面连接部分形成偶联相互作用,其中所述捕获部分被所述保持组分制止接触所述展示部分,和b)包含互补偶联基团的分析物,所述互补偶联基团被配置为与所述结构化核酸颗粒的所述展示部分偶联。

[0013] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)结构化核酸颗粒,其中所述结构化核酸颗粒包含:i)保持组分;ii)与所述保持组分偶联的展示部分;和iii)与所述保持组分偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个寡核苷酸,并且其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分,和b)包含偶联表面的固体支持物,其中所述表面包含表面连接部分,并且其中所述多个表面相互作用部分中的表面相互作用部分与表面连接部分偶联,其中所述展示部分被所述保持组分制止接触所述表面。

[0014] 在另一方面,本文提供了一种鉴定多肽的方法,所述方法包括:a)提供如本文所阐述的SNAP组合物,其中所述多肽与所述展示部分偶联,b)将所述固体支持物与多种可检测亲和试剂接触,c)检测多种可检测亲和试剂中的可检测亲和试剂与所述多肽结合的存在或不存在,d)任选地用第二多种可检测亲和试剂重复步骤b)-c),和e)基于一种或多种亲和试剂的结合的存在或不存在,鉴定所述多肽。

[0015] 在另一方面,本文提供了一种对多肽测序的方法,所述方法包括:a)提供如本文所阐述的SNAP组合物,其中所述多肽与所述展示部分偶联,b)通过Edman型降解反应去除所述多肽的末端氨基酸残基,c)鉴定末端氨基酸残基,和d)重复步骤b)-c),直到已经为所述多肽鉴定出氨基酸残基序列。

[0016] 在另一方面,本文提供了一种单分析物阵列,所述单分析物阵列包含:a)包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址在单分析物分辨率下是可分辨的,其

中每个地址包含偶联表面,并且其中每个偶联表面包含一个或多个表面连接部分,b)多个结构化核酸颗粒,其中每个结构化核酸颗粒包含偶联部分,其中所述偶联部分包含多个寡核苷酸,其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分,其中所述多个结构化核酸颗粒中的每个结构化核酸颗粒通过多个寡核苷酸的表面相互作用部分与一个或多个互补寡核苷酸的表面连接部分的结合而与所述多个地址中的地址偶联,并且其中所述多个结构化核酸颗粒中的结构化核酸颗粒包含含有与分析物偶联的偶联位点的展示部分。

[0017] 在另一方面,本文提供了一个单分析物阵列,所述单分析物阵列包含:a)包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址可以单分析物分辨率与每个其他地址分辨出来,并且其中每个地址通过一个或多个空隙区域与每个相邻地址分隔开,和b)多个分析物,其中所述多个分析物中的单分析物与所述多个地址中的地址偶联,其中所述多个地址中的每个地址包含不超过一个单分析物,其中每个单分析物通过核酸结构与所述地址的偶联表面偶联,并且其中所述核酸结构阻断所述单分析物接触所述偶联表面。

[0018] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含至少10个偶联的核酸,其中所述核酸纳米结构包含:a)包含高的内部互补性的致密区域,其中所述高的内部互补性包含至少50%的双链核酸和至少1%的单链核酸,并且其中所述致密区域包含展示部分,其中所述展示部分与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;和b)包含低的内部互补性的可透过区域,其中所述低的内部互补性包含至少约50%的单链核酸,并且其中所述可透过区域包含偶联部分,其中所述偶联部分与固体支持物形成偶联相互作用或被配置为与固体支持物形成偶联相互作用。

[0019] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含:a)致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉(staple)寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由所述支架的单链核酸区域连接的多个相邻三级结构,并且其中所述多个相邻三级结构中的相邻三级结构的相对位置受到位置约束;和b)可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与所述致密结构的支架链偶联,其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸,并且其中所述可透过结构在所述致密结构的至少一部分周围具有各向异性三维分布。

[0020] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含:a)致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由所述支架链的单链区域连接的相邻三级结构,其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束,并且其中所述致密结构包含有效表面积;和b)可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与所述致密结构的所述支架链偶联,并且其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸;并且其中(i)所述核酸纳米结构的有效表面积大于所述致密结构的有效表面积,或ii)所述核酸纳米结构的有效表面积与体积的比率大于所述致密结构的有效表面积与体积的比率。

[0021] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含多条核酸链,其中所述多条核酸链中的每条核酸链与所述多条核酸链中的另一条核酸链杂交形成多个三级结构,并且其中所述多条核酸链中的核酸链包含与所述多条核酸链中的第二核酸链杂交的第一核苷酸序列,其中所述多条核酸链中的核酸链还包含至少100个连续核苷酸的第二核苷酸序列,并且其中所述第二核苷酸序列的至少50个核苷酸是单链的。

[0022] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a) 包含多个位点的固体支持物;和b) 多个结构化核酸颗粒(SNAP),其中每个SNAP与分析物偶联或被配置为与分析物偶联,并且其中所述多个SNAP中的每个SNAP与所述多个位点中的位点偶联,其中所述多个位点包含含有第一数量的位点的第一子集和含有第二数量的位点的第二子集,其中所述第一子集中的每个位点包含两个或更多个偶联的SNAP,其中所述第二子集中的每个位点包含一个且仅一个偶联的SNAP,并且其中所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于由泊松分布预测的比率。

[0023] 在另一方面,本文提供了一种分析物阵列,所述分析物阵列包含:a) 包含多个位点的固体支持物;和b) 多个核酸纳米结构,其中每个核酸纳米结构与目标分析物偶联,并且其中所述多个核酸纳米结构的每个核酸纳米结构与所述多个位点中的位点偶联,其中所述多个位点中至少40%的位点包含一个且仅一个目标分析物。

[0024] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a) 包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点的固体支持物;和b) 核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构与所述位点偶联,其中所述核酸纳米结构与目标分析物偶联;并且其中所述核酸纳米结构被配置为防止目标分析物与固体支持物之间的接触。

[0025] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a) 包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点的固体支持物,其中所述位点包含表面积;和b) 核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构与所述位点偶联,其中所述核酸纳米结构与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;其中所述核酸纳米结构在未结合构型中包含总有效表面积,其中所述核酸纳米结构包含具有有效表面积的致密结构,其中在所述未结合构型中的所述致密结构的有效表面积小于所述位点的表面积的50%,并且其中所述未结合构型包含与所述位点解偶联的核酸纳米结构。

[0026] 在另一方面,本文提供了一种将核酸纳米结构与阵列位点偶联的方法,所述方法包括:a) 将包含位点的阵列与核酸纳米结构接触,其中所述位点包含多个表面连接部分,并且其中所述核酸纳米结构包含多个捕获部分;b) 将所述核酸纳米结构在初始构型中与所述位点偶联,其中所述初始构型不包括稳定构型,并且其中所述核酸纳米结构通过将所述多个捕获部分中的捕获部分偶联至所述多个表面连接部分中的表面连接部分而偶联;c) 解偶联所述多个捕获部分中的捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分的偶联;和d) 将所述核酸纳米结构从初始构型改变为稳定构型,其中将所述多个捕获部分中的每个捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分偶联。

[0027] 在另一方面,本文提供了一种形成多路复用分析物阵列的方法,所述方法包括:a) 将包含多个位点的阵列与第一多个核酸纳米结构接触,其中所述第一多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与第一多个目标分析物中的一个目标分析物偶联;b) 将包含所述多个位点的阵列与第二多个核酸纳米结构接触,其中所述第二多个核酸纳米结构中的每个核酸

纳米结构与第二多个目标分析物中的一个目标分析物偶联;c) 在所述多个位点的第一位点子集沉积第一多种核酸纳米结构;和d) 在所述多个位点的第二位点子集沉积第二多个核酸纳米结构,其中所述第一位点子集和所述第二位点子集包含随机空间分布。

[0028] 在另一方面,本文提供了一种纳米结构,所述纳米结构包含:a) 包含与第一多个订书钉寡核苷酸杂交的支架链的致密核酸结构,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由支架链的单链区域连接的相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束;b) 可透过结构,其中所述可透过结构包含与所述所述支架链杂交的第二多个订书钉寡核苷酸;和c) 包含表面连接的寡核苷酸的固体支持物,其中所述表面连接的寡核苷酸附接至固体支持物的表面,并且其中所述表面连接的寡核苷酸与可透过结构的订书钉寡核苷酸杂交。

[0029] 在另一方面,本文提供了一种将核酸纳米结构与阵列偶联的方法,所述方法包括:a) 将固体支持物与核酸纳米结构接触,其中所述固体支持物包含附接至固体支持物表面连接的寡核苷酸,并且其中所述核酸纳米结构包含:i) 包含与第一多个订书钉寡核苷酸杂交的支架链的致密核酸结构,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与所述支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含由所述支架链的单链区域连接的相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束;和ii) 可透过结构,其中所述可透过结构包含与所述支架链杂交的第二多个订书钉寡核苷酸;和b) 将表面连接的寡核苷酸与所述第二多个订书钉寡核苷酸中的订书钉寡核苷酸杂交。

[0030] 在另一方面,本文提供了一种制备分析物阵列的方法,所述方法包括:a) 提供包含多个位点的阵列,其中每个位点包含表面连接的寡核苷酸;b) 使所述阵列与多个分析物接触,其中每个分析物与核酸纳米结构偶联,其中每个核酸纳米结构包含多个表面偶联的寡核苷酸;和c) 将一个且仅一个核酸纳米结构与多个位点中的位点偶联,其中偶联所述核酸纳米结构包括所述位点的表面连接的寡核苷酸与所述核酸纳米结构的表面偶联的寡核苷酸杂交。

[0031] 在另一方面,本文提供了一个目标分析物的阵列,所述阵列包含:a) 包含多个位点的固体支持物,其中每个位点包含表面连接的寡核苷酸;b) 多个核酸纳米结构,其中每个核酸纳米结构被配置为偶联分析物,其中每个核酸纳米结构包含多个表面偶联寡核苷酸,其中每个表面偶联寡核苷酸不包含自身互补性,并且其中所述多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构通过表面偶联寡核苷酸与表面连接的寡核苷酸的杂交而与所述多个位点中的位点偶联;和c) 多个目标分析物,其中每个目标分析物与所述多个核酸纳米结构中的一个核酸纳米结构偶联。

[0032] 以引用的方式并入

[0033] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式并入本文,就如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出以引用的方式并入的程度一样。

附图说明

[0034] 在所附权利要求中列出了本发明的新型特征。通过参考以下阐述说明性实施方案的详细描述和附图将获得对本发明的特征和优点的更好理解,在这些说明性实施方案中利

用了本发明的原理,并且在附图中:

[0035] 图1A示出了根据一些实施方案的结构化核酸颗粒(SNAP)的两个面的角度偏移。图1B示出了根据一些实施方案的SNAP的两个面的角度偏移。

[0036] 图2A描绘了根据一些实施方案在SNAP中的两组三级结构。图2B显示了根据一些实施方案的具有多个面的SNAP的横截面。图2C描绘了根据一些实施方案在SNAP中的两组三级结构。图2D显示了根据一些实施方案的具有多个面的SNAP的横截面。

[0037] 图3A显示了根据一些实施方案包含多官能团部分的SNAP。图3B显示了根据一些实施方案多官能团部分的连接部分。图3C显示了根据一些实施方案包含与固体支持物偶联的多官能团部分的SNAP。图3D显示了根据一些实施方案通过多官能团部分与固体支持物偶联的分析物。

[0038] 图4A、4B、4C、4D、4E、4F、4G和4H显示了根据一些实施方案偶联至表面的SNAP。

[0039] 图5A、5B、5C和5D示出了根据一些实施方案的具有不同捕获面构象的SNAP。

[0040] 图6描绘了根据一些实施方案的正方形形状的SNAP。

[0041] 图7A显示了根据一些实施方案的包含烷基基团的多官能团部分。图7B显示了根据一些实施方案的包含修饰的寡核苷酸的多官能团部分。

[0042] 图8A、8B、8C和8D示出了根据一些实施方案的包含多官能团部分的SNAP。

[0043] 图9A、9B、9C、9D、9E和9F示出了根据一些实施方案的将分析物与表面偶联的方法。

[0044] 图10A、10B、10C和10D描绘了根据一些实施方案的包含两个多官能团部分的SNAP。

[0045] 图11A、11B、11C和11D示出了根据一些实施方案的包含多官能团部分的SNAP。

[0046] 图12A、12B和12C显示了根据一些实施方案的包含瓦片形状的SNAP的SNAP复合物。

[0047] 图13A、13B、13C和13D描绘了根据一些实施方案的不同的SNAP对称性。

[0048] 图14A和14B示出了根据一些实施方案的三维SNAP构象。

[0049] 图15A和15B显示了根据一些实施方案,偶联的SNAP的不同取向。

[0050] 图16A和16B描绘了根据一些实施方案的三维SNAP复合物。

[0051] 图17A、17B和17C显示了根据一些实施方案的由SNAP复合物形成的阵列。

[0052] 图18A、18B和18C显示了根据一些实施方案的由SNAP复合物形成的阵列。

[0053] 图19A和19B描绘了根据一些实施方案的在界面处形成的SNAP复合物。

[0054] 图20描绘了根据一些实施方案的将分析物级分分离到不同SNAP种类上的方法。

[0055] 图21A和21B显示了在图案化阵列上的SNAP-蛋白质缀合物沉积。

[0056] 图22示出了根据一些实施方案的包含多个种类的SNAP的阵列。

[0057] 图23A和23B示出了根据一些实施方案的包含多个种类的SNAP的阵列。

[0058] 图24示出了根据一些实施方案的包含多个种类的SNAP的阵列。

[0059] 图25A、25B和25C描绘了根据一些实施方案在包含表面粗糙度的表面上的SNAP复合物。

[0060] 图26A、26B和26C描绘了根据一些实施方案在单个结合位点上的多个SNAP复合物。

[0061] 图27A和27B显示了根据一些实施方案含有图案化结合位点的阵列。

[0062] 图28A和28B示出了根据一些实施方案与图案化表面偶联的SNAP复合物。

[0063] 图29描绘了根据一些实施方案的三维SNAP复合物。

[0064] 图30A、30B、30C和30D显示了SNAP-蛋白质缀合物纯化的HPLC数据。

- [0065] 图31给出了根据一些实施方案的5瓦片DNA折纸SNAP的示意图。
- [0066] 图32A、32B、32C、32D、32E和32F显示了SNAP沉积的荧光共焦扫描显微镜图像数据。
- [0067] 图33绘制了不同溶剂条件下的SNAP沉积。
- [0068] 图34A、34B和34C显示了SNAP沉积的荧光共焦扫描显微镜图像数据。
- [0069] 图35绘制了不同溶剂条件下的SNAP沉积。
- [0070] 图36A和36B示出了根据一些实施方案用于产生SNAP的方案。
- [0071] 图37A和37B描绘了根据一些实施方案包含完全结构化和部分结构化的区域的SNAP。
- [0072] 图38A和38B描绘了根据一些实施方案在内部体积区域中包含多价部分的SNAP。
- [0073] 图39A和39B描绘了根据一些实施方案包含化学改性的内部体积区域的SNAP。
- [0074] 图40A、40B和40C示出了根据一些实施方案的SNAP的各种构型,所述SNAP含有与包含多个表面连接部分的偶联表面接触的多个表面相互作用部分。
- [0075] 图41A和41B显示了根据一些实施方案表面相互作用部分在SNAP的捕获部分上的不同分布。
- [0076] 图42描绘了根据一些实施方案出于促进与SNAP的结合相互作用的目的是用于向固体支持物提供多个表面连接部分的方案。
- [0077] 图43显示了His-12肽SNAP阵列通过B1适体探针对在寡核苷酸涂覆的表面上的双His-12 SNAP的检测。
- [0078] 图44显示了His-12肽SNAP阵列通过B1适体探针对在寡核苷酸涂覆的表面上的单His-12 SNAP的检测。
- [0079] 图45显示了通过B1适体探针对在APTMS涂覆的表面和含有寡核苷酸的表面上的SNAP的His-12检测的比较。
- [0080] 图46展示了在含有不同表面浓度的寡核苷酸和不同SNAP浓度的玻璃表面上形成的未图案化SNAP阵列的荧光成像数据。
- [0081] 图47展示了通过SNAP与含有叠氮化物的表面直接缀合而形成的未图案化SNAP阵列的荧光成像数据。
- [0082] 图48描绘了根据一些实施方案在核酸的有效表面积与占用面积(footprint)之间的差异。
- [0083] 图49A、49B、49C、49D和49E示出了根据一些实施方案的核酸结构和构象的多个方面。
- [0084] 图50A、50B、50C、50D、50E和50F显示了根据一些实施方案用于形成多路复用单分析物阵列的方法的步骤。
- [0085] 图51展示了根据一些实施方案包含支架链和多个订书钉寡核苷酸的核酸纳米结构。
- [0086] 图52A、52B、52C、52D、52E、52F、52G和52H描绘了根据一些实施方案包含致密结构和可透过结构的核酸纳米结构的各种构型。
- [0087] 图53A、53B、53C、53D和53E示出了根据一些实施方案的核酸纳米结构的各种构型,所述核酸纳米结构包含被配置为形成多价结合相互作用的可透过结构。
- [0088] 图54A、54B和54C显示了根据一些实施方案用于形成具有可透过结构的核酸纳米

结构的方法。

[0089] 图55A、55B、55C和55D展示了根据一些实施方案用于在核酸纳米结构与固体支持物之间形成多价结合相互作用的方法。

[0090] 图56A、56B和56C描绘了根据一些实施方案包含可透过结构的核酸纳米结构的各种构型,其中所述可透过结构与固体支持物形成多价结合相互作用。

[0091] 图57示出了根据一些实施方案由于表面结合相互作用引起的核酸纳米结构的构象变化。

[0092] 图58A、58B和58C显示了根据一些实施方案重新配置与阵列位点偶联的核酸纳米结构的结合构型的方法。

[0093] 图59A和59B展示了核酸纳米结构的原子力显微镜图像。图59C和59D绘制了核酸纳米结构收率和尺寸的各种测量。

[0094] 图60A、60B、60C和60D描绘了根据一些实施方案包含两种或更多种类型的偶联表面部分的阵列位点的各种构型。

[0095] 图61A、61B、61C、61D和61E展示了根据一些实施方案,利用未反应的官能团将核酸纳米结构偶联至固体支持物的方法的步骤。

[0096] 图62A、62B和62C示出了根据一些实施方案形成阵列的方法,该阵列被配置为产生多路复用分析物阵列。图62D和62E示出了根据一些实施方案沉积两种或更多种类型的分析物以形成多路复用阵列的方法。

[0097] 图63显示了根据一些实施方案包含各种缺陷或破坏的阵列的多个位点。

[0098] 图64描绘了根据一些实施方案通过非光刻方法形成的分析物阵列。

[0099] 图65显示了根据一些实施方案经由电荷介导的相互作用形成分析物阵列的方法。

[0100] 图66A、66B、66C和66D展示了根据一些实施方案形成的阵列特征的各种形状和形态。

[0101] 图67A示出了根据一些实施方案的官能化阵列位点的示意图。图67B展示了通过光刻图案化形成的阵列的荧光显微术表征。图67C展示了通过光刻图案化形成的阵列位点的表面粗糙度的原子力显微镜数据。图67D和67E绘制了通过光刻图案化形成的阵列的平均阵列位点直径和位点间距的数据。

[0102] 图68展示了从功能性核酸结合和剥离荧光标记的寡核苷酸的循环的荧光显微术图像。

[0103] 图69A、69B、69C和69D展示了在荧光标记的寡核苷酸与结构化核酸颗粒的功能性核酸结合和剥离期间多路复用阵列的荧光显微术图像。

[0104] 图70展示了在结合和剥离荧光标记的寡核苷酸期间包含不同核苷酸序列长度的功能性核酸的阵列的荧光显微术图像。

具体实施方式

[0105] 分子在纳米尺度上的有序化是许多技术的关键问题,包括分析和生物分析方法、催化和生物催化、微流体和纳米流体以及微电子学和纳米电子学。特别目标是在表面或界面处排列分子的方法,其中表面特征或表面不规则性的长度尺度通常接近将要在表面或界面处排列的分子的长度尺度。例如,单分子分析技术对于许多生物学应用都受到关注,所述

生物学应用包括基因组学、转录组学和蛋白质组学。单分析物生物分子阵列的形成可能受到纳米尺度和/或单分子效应的限制,所述纳米尺度和/或单分子效应可能交替地在单分析物阵列上的结合位点处引起有限的生物分子沉积或过量的生物分子沉积。例如,固体表面的纳米尺度制造中的缺陷可能产生具有异常结合特性的位点,从而在阵列图案化中产生局部缺陷。同样,给定足够大的分子样品,热力学效应(例如,熵)和/或动力学效应(例如,缓慢解离)可以在阵列位点处引起非预期的现象(例如,分子共定位)。因此,在形成单分析物阵列时,制备一致的表面或界面以及小心控制分子在表面或界面处的沉积的方法是重要的。

[0106] 对于许多单分析物、基于阵列的技术来说,优选的是形成基本上均匀的阵列,既包括基本上在单分析物阵列的所有阵列位点存在的单分析物(即,阵列位点占据值 >0 个分析物),也包括在单分析物阵列的每个阵列位点具有不超过一个单分析物(即,阵列位点占据值 $=1$ 个分析物)。单分析物阵列的均匀性可以随着类似泊松的概率分布在1个分析物的阵列位点占据值附近变窄而增加。因此,有助于在1个分析物的阵列位点占据值附近概率质量函数的这种变窄的阵列形成方法对于单分析物阵列的形成是优选的。

[0107] 中间颗粒为控制分子在表面或界面上的沉积提供了一种潜在的方法。特别有用的中间颗粒具有可调的特性,其允许中间颗粒选择性地与表面或界面相互作用,同时在表面或界面上有利地展示分析物和其他分子。使用纳米制造技术可以容易地对表面进行图案化,以产生被独特地配置为捕获本文所阐述的颗粒的位点或地址。这样,表面可以用配置为捕获多个颗粒的位点阵列来图案化。通过使用多个颗粒,其中每个颗粒附接至不同的分析物,不同分析物的阵列可以在表面上以预定的图案形成,所述图案适合于期望的分析测定方法,例如本文所阐述的分析方法。示例性的中间颗粒是结构化核酸颗粒(SNAP),诸如核酸折纸。此类颗粒的可调性来自于核酸三级结构的螺旋性质。在单个螺旋旋转的过程中,核酸螺旋可以将偶联的配体在方位(aspect)的全 360° 上定向到几乎任何方向。因此,结构化核酸颗粒可以被工程化为在颗粒上的特定位置和取向展示附接的分子,允许多个附接的分子被最佳地分隔开和定位以获得最佳效果。其他核酸纳米结构可以类似地用作中间颗粒,用于在表面上展示分析物。

[0108] 本文描述了结构化核酸颗粒及其系统,其可以用于促进分析物和其他分子的单分子阵列的形成。在特定的构型中,结构化核酸颗粒包含若干个结构特征,所述结构特征增加了表面或界面上偶联相互作用的特异性,或者降低了颗粒对表面或界面上的缺陷或不规则性的敏感性,从而允许形成更均匀的单分子阵列。具体而言,本文提供了包含结构化核酸颗粒和固体支持物的系统,其互补化学促进了单分析物阵列的受控沉积。每个结构化核酸颗粒可以与一个或多个目标分析物偶联,允许在表面或界面上形成均匀的分析物阵列。例如,目标分析物可以是核酸、蛋白质、代谢物或其他用于分析表征的目标目标。在另一个实例中,分析物可以是用于合成方法的试剂,所述合成方法诸如核酸、蛋白质、小分子、候选治疗剂、非生物聚合物等的合成。

[0109] 本文还描述了可通过多个结构化核酸颗粒的偶联形成的复合物。通过增加与表面结合位点的结合相互作用和/或减少不需要的分析物或分子在表面或阵列的单一位置共沉积的可能性,复合物可以增加分析物或分子在表面或界面处展示的效率和控制。在一些构型中,结构化核酸复合物可以被配置为形成用于展示分析物或其他分子的自组装或自图案化阵列。

[0110] 定义

[0111] 如本文所用,术语“核酸纳米结构”或“核酸纳米颗粒”同义地指包含致密三维结构的单链或多链多核苷酸分子。致密的三维结构可以任选地具有特征性三级结构。示例性核酸纳米结构是结构化核酸颗粒 (SNAP)。与处于随机卷曲或其他非结构化状态的相同核酸分子相比,SNAP可以被配置为具有在多核苷酸链的区域之间增加的相互作用数量、在所述区域之间更小的距离、在链中增加的弯曲数量和/或在链中更尖锐的弯曲。可替代地或另外地,核酸纳米结构的致密三维结构可以任选地具有特征性四级结构。例如,与处于随机卷曲或其他非结构化状态的相同核酸分子相比,核酸纳米结构可以被配置为具有在多核苷酸链之间增加的相互作用数量或在链之间更小的距离。在一些构型中,核酸纳米结构的三级结构(即多核苷酸链的螺旋扭曲或方向)可以被配置为比处于随机卷曲或其他非结构化状态的相同核酸分子具有更高密度。核酸纳米结构可以包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、肽核酸(PNA)、其他核酸类似物及其组合。核酸纳米结构可以具有天然产生的或工程化的二级、三级或四级结构。结构化核酸颗粒可以包含以下中的至少一种:i)被配置为将分析物与核酸纳米结构偶联的部分,ii)被配置为将核酸纳米结构与另一个物体诸如另一个SNAP、固体支持物或其表面偶联的部分,iii)被配置为向核酸纳米结构提供化学或物理特性或特征的部分,或iv)它们的组合。示例性的SNAP可以包括核酸纳米球(例如DNA纳米球)、核酸纳米管(例如DNA纳米管)和核酸折纸(例如DNA折纸)。SNAP可以被官能化以包括一个或多个反应性柄或其他部分。SNAP可以包含一个或多个掺入的残基,所述残基含有反应性柄或其他部分(例如,修饰的核苷酸)。

[0112] 如本文所用,术语“一级结构”,当用于指核酸时,是指单链核酸的残基序列。如本文所用,术语“二级结构”,当用于指核酸时,是指在单个核酸聚合物内或在两个聚合物之间的碱基配对相互作用。二级结构可以包括由单个寡核苷酸的自身互补形成的多链核酸,诸如茎、环、凸起和连接。如本文所用,术语“三级结构”,当用于指核酸时,是指核酸的三维构象,诸如单链核酸或多链核酸的整体三维形状。

[0113] 如本文所用,术语“前体”,当用于指核酸的结构时,是指含有两个或更多个结构元件的结构(例如,单链核酸、双链核酸、含有双链和单链核酸的核酸链、非核酸部分等)具有空间自由度(例如,平移、旋转、振动、弯曲等)以促进所述两个或更多个结构元件与另一个分子的接触。另一个分子可以是例如分子量大于0.5、1、5、10或更多千道尔顿的分子。任选地,所述两个或更多个结构元件中的每个结构元件可以与核酸的运动一致地运动。任选地,对于含有多个非相互作用悬垂部分的包含不透过结构的未结合核酸,如果核酸旋转,每个悬垂部分将旋转,但是每个悬垂部分的自由末端能够独立于其他悬垂部分的其他自由末端的运动而移动。可以针对核酸结构中的自然和/或随机空间变化来评估核酸结构元件的空间自由度(例如,空间自由度包括超出核酸结构的自然热运动或布朗运动的运动)。可透过结构的第一结构元件可以在一个空间维度、两个空间维度或三个空间维度上相对于第二结构元件具有空间自由度。如本文所阐述,可以将可透过结构表征为包含与核酸的致密结构不同的化学特征,诸如对小分子或大分子的更大或更小的质量扩散率、更大或更小的疏水性、更大或更小的亲水性、对另一个核酸的更大或更小的结合强度或特异性、结合另一个核酸的更大或更小的可能性、结合固体支持物的更大或更小的可能性、对固体支持物的更大或更小的结合强度或特异性、或其组合。当与另一个实体(例如,固体支持物、第二核酸)结

合时,可透过结构可以包含不同的特征或构型。在一些构型中,当与第二实体结合时,可透过结构可以满足以下各项中的一项或多项:i)所述两个或更多个结构元件中的每个结构元件与核酸的运动一致地运动,ii)所述两个或更多个结构元件中的每个结构元件相对于未结合构型具有降低的空间自由度,和iii)所述两个或更多个结构元件中的每个结构元件相对于所述两个或更多个结构元件中的每个其他结构元件具有至少一个空间自由度(例如,平移、旋转、振动、弯曲等)。例如,对于通过含有多个非相互作用悬垂部分的可透过结构与固体支持物偶联的核酸,每个悬垂部分可以与所述固体支持物上的互补部分偶联,从而使所述核酸及其可透过结构共同定位于固体支持物上,但是每个悬垂部分可以拥有独立的能力来破坏与互补表面部分的现有相互作用并与不同的互补表面部分形成新的相互作用。

[0114] 如本文所用,术语“残基”,当用于指聚合物时,是指聚合物结构的单体单元。当用于指核酸时,残基可以是指核苷酸、核苷或其合成的、修饰的或非天然的类似物。当用于指多肽时,残基可以是指氨基酸或其合成的、修饰的或非天然的类似物。

[0115] 如本文所用,术语“类型”或“种类”,当用于指分子时,是指具有独特的、可区分的化学结构的分子。如本文所用,术语“SNAP类型”是指例如与其他SNAP相比具有独特的、可区分的一级结构的SNAP。如果两个SNAP拥有相同的一级、二级或三级结构,则它们属于同一类别。SNAP变体是彼此不同的种类。例如,与缺乏独特的、可区分的结构的其他SNAP相比,“一种类型的SNAP”的成员可以具有各成员所共有的独特的、可区分的结构。可以例如通过共同的形状和/或构象、偶联位点的数量或偶联位点的类型来鉴定SNAP类型。

[0116] 如本文所用,术语“点击反应”、“点击型反应”或“生物正交反应”是指利用生物相容性试剂的单步骤、热力学有利的缀合反应。点击反应可以被配置为不利用有毒或生物不相容的试剂(例如,酸、碱、重金属)或者不产生有毒或生物不相容的副产物。点击反应可以利用水性溶剂或缓冲液(例如,磷酸盐缓冲溶液、Tris缓冲液、盐水缓冲液、MOPS等)。如果点击反应具有负的反应吉布斯自由能,例如反应的吉布斯自由能小于约-5千焦耳/摩尔(kJ/mol)、-10kJ/mol、-25kJ/mol、-50kJ/mol、-100kJ/mol、-200kJ/mol、-300kJ/mol、-400kJ/mol或小于-500kJ/mol,则所述点击反应可能在热力学上是有利的。示例性的生物正交反应和点击反应在WO 2019/195633A1(其以引用的方式整体并入本文)中有详细描述。示例性点击反应可以包括金属催化的叠氮化物-炔烃环加成反应、应变促进的叠氮化物-炔烃环加成反应、应变促进的叠氮化物-硝酮环加成反应、应变化烯炔反应、硫醇-烯反应、狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)、逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应、[3+2]环加成反应、[4+1]环加成反应、亲核取代反应、二羟基化反应、硫醇-炔反应、光点击反应、硝酮偶极环加成反应、降冰片烯环加成反应、氧杂降冰片二烯环加成反应、四嗪连接反应和四唑光点击反应。用于进行点击反应的示例性官能团或反应性柄可以包括烯炔、炔烃、叠氮化物、环氧氧化物、胺、硫醇、硝酮、异脒、异氰化物、氮丙啶、活性酯和四嗪。可以使用具有互补生物正交反应种类的其他熟知的点击缀合反应,例如,其中第一点击组分包含胍部分,并且第二点击组分包含醛基或酮基,并且其中这样的反应的产物包含脒官能团或等同物。

[0117] 如本文所用,术语“阵列”是指与独特标识符附接的分子或分析物群体,使得分析物可以彼此区分开。如本文所用,术语“独特的标识符”是指在过程的一个或多个步骤中,与分析物附接并且与其他标识符不同的固体支持物(例如,颗粒或珠)、阵列中的空间地址、标签、标记(例如,发光体)或条形码(例如,核酸条形码)。所述过程可以是分析过程,诸如用于

检测、鉴定、表征或定量分析物的方法。与独特标识符的附接可以是共价或非共价的(例如,离子键、氢键、范德华力等)。独特的标识符对于分析物而言可以是外源的,例如合成地与分析物附接。可替代地,独特的标识符对于分析物可以是内源的,例如,在分析物的天然环境中与分析物附接或缔合。阵列可以包括不同的分析物,每个分析物都附接至不同的独特标识符。例如,阵列可以包括不同的分子或分析物,它们各自位于固体支持物上的不同位置。可替代地,阵列可以包括单独的固体支持物,每个固体支持物作为携带不同分子或分析物的地址,其中所述不同的分子或分析物可以根据固体支持物在固体支持物所附接的表面上位置或者根据固体支持物在液体诸如液体流中的位置来鉴定。阵列的分子或分析物可以是例如核酸(诸如SNAP)、多肽、蛋白质、肽、寡肽、酶、配体或受体(诸如抗体)、抗体的功能片段或适体。阵列的地址可以任选地是可光学观察的,并且在一些构型中,当使用本文所阐述的方法或设备检测时,相邻的地址可以是可光学区分的。如本文所用,术语“地址”、“结合位点”和“位点”当用于指阵列时,意指在阵列中存在特定分子或分析物的位置。地址可以只含有一个分子或分析物,或者其可以含有同一种类的若干个分子或分析物的群体(即分子的集合)。可替代地,地址可以包括不同种类的分子或分析物的群体。阵列的地址通常是离散的。离散地址可以是连续的,或者它们彼此之间可以有间隙。本文有用的阵列可以具有例如分隔小于100微米、10微米、1微米、500nm、100nm、10nm或更小的地址。可替代地或另外地,阵列可以具有分隔至少10nm、100nm、500nm、1微米、5微米、10微米、50微米、100微米或更多的地址。地址各自可以具有小于1平方毫米、500平方微米、100平方微米、25平方微米、1平方微米或更小的面积。阵列可以包括至少约 1×10^4 个、 1×10^5 个、 1×10^6 个、 1×10^8 个、 1×10^{10} 个、 1×10^{12} 个或更多个地址。

[0118] 如本文所用,术语“固体支持物”是指不溶于水性液体的基底。任选地,基底可以是刚性的。基底可以是无孔的或多孔的。基底可以任选地能够吸收液体(例如,由于多孔性),但是通常(但不是必须)有足够刚性,使得基底在吸收液体时基本上不膨胀,并且当通过干燥去除液体时基本上不收缩。无孔固体支持物通常不可渗透液体或气体。示例性的固体支持物包括但不限于玻璃和改性或官能化的玻璃、塑料(包括丙烯酸树脂、聚苯乙烯以及苯乙烯和其他材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯、TeflonTM、环状烯烃、聚酰亚胺等)、尼龙、陶瓷、树脂、ZeonorTM、二氧化硅或基于二氧化硅的材料(包括硅和改性硅)、碳、金属、金属氧化物(例如,氧化锆、二氧化钛、氧化铝等)、无机玻璃、光纤束、凝胶和聚合物。

[0119] 如本文所用,术语“基团”和“部分”当用于指分子结构时意在是同义的。所述术语是指分子的组分或部分。除非另有指示,这些术语不一定表示组分或部分与分子其余部分相比的相对尺寸。基团或部分可以含有一个或多个原子。如本文所用,术语“展示部分”是指分子的组分或部分,其被配置为将分子偶联至分析物或者其将分子偶联至分析物。如本文所用,术语“捕获部分”是指分子的组分或部分,其被配置为将分子偶联至固体支持物、表面或界面或者其将分子偶联至固体支持物、表面或界面。如本文所用,术语“偶联部分”是指分子的组分或部分,其被配置为将分子偶联至第二分子或者其将分子偶联至第二分子。如本文所用,术语“效用部分”是指分子的组分或部分,其被配置为向分子提供功能性或结构或者其向分子提供功能性或结构。功能性或结构可以是分子的展示部分、捕获部分或偶联部分未提供的新功能或结构;或者其可以由分子的展示部分、捕获部分或偶联部分提供的结构或功能的修饰(例如,抑制或激活)。

[0120] 如本文所用,术语“面”是指分子、颗粒或复合物(例如,SNAP或SNAP复合物)的一部分,其含有具有基本相似的取向和/或功能的一个或多个部分。例如,基本上矩形或正方形的SNAP可以具有包含一个或多个偶联部分的偶联面,每个偶联部分具有与每个其他偶联部分基本上相似的取向(例如,被定向为与被配置为与分析物偶联的展示部分呈约 180°)。在另一个实例中,球形纳米颗粒可以具有偶联面,所述偶联面包含被限制于颗粒半球的偶联的多个偶联部分(即,具有相似功能但不同取向的多个偶联部分)。在一些情况下,面可以由假想平面限定,当所述平面与分子、颗粒或复合物的点或部分接触时,其部分或其一部分相对于该假想平面可以具有空间邻近性或角度取向。其部分或其一部分可以与限定分子、颗粒或复合物的面的假想平面具有不超过约100纳米(nm)、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、25nm、20nm、15nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.5nm、0.1nm或小于0.1nm的空间分隔。其部分或其一部分可以具有相对于假想平面的法向矢量不超过约 90° 、 85° 、 80° 、 75° 、 70° 、 65° 、 60° 、 55° 、 50° 、 45° 、 40° 、 35° 、 30° 、 25° 、 20° 、 15° 、 10° 、 5° 、 1° 或小于 1° 的角度取向。

[0121] 如本文所用,术语“分析物”和“目标分析物”,当用于指结构化核酸颗粒时,是指与结构化核酸颗粒的展示部分偶联的分子、颗粒、或者分子或颗粒的复合物。分析物可以包含分析方法(例如,测序、鉴定、定量等)的靶标或者可以包含功能要素,诸如结合配体或催化剂。分析物可以包含生物分子,诸如多肽、多糖、核酸、脂质、代谢物、酶辅因子或其组合。分析物可以包含非生物分子,诸如聚合物、金属、金属氧化物、陶瓷、半导体、矿物或其组合。如本文所用,术语“样品分析物”是指源自从生物或非生物系统收集的样品的分析物。样品分析物可以是纯化的或未纯化的。如本文所用,术语“对照分析物”是指作为阳性或阴性对照提供用于与样品分析物比较的分析物。对照分析物可以源自与样品分析物相同的来源,或者源自与样品分析物不同的来源。如本文所用,术语“标准品分析物”是指作为过程的物理或化学参考提供的已知或表征的分析物。标准品分析物可以包含与样品分析物相同类型的分析物,或者可以不同于样品分析物。例如,多肽分析物过程可以利用具有已知特征的多肽标准品分析物。在另一个实例中,多肽分析物过程可以利用具有已知特征的非多肽标准品分析物。如本文所用,术语“惰性分析物”是指在过程或系统中没有预期功能的分析物。

[0122] 如本文所用,术语“接头”、“连接基团”或“连接部分”是指被配置为将第一分子附接至第二分子的分子或分子链。接头、连接基团或连接部分可以被配置为向将第一分子与第二分子分隔开的区域提供化学或机械特性,诸如疏水性、亲水性、电荷、极性、刚性或柔性。接头、连接基团或连接部分可以包含两个或更多个官能团,所述官能团有助于接头、连接基团或连接部分与第一分子和第二分子的偶联。接头、连接基团或连接部分可以包括多功能接头,诸如同双功能接头、异双功能接头、同多功能接头和异多功能接头。分子链的特征可能在于最小尺寸,例如至少约100道尔顿(Da)、200Da、300Da、400Da、500Da、600Da、700Da、800Da、900Da、1千道尔顿(kDa)、2kDa、3kDa、4kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa或大于20kDa。可替代地或另外地,分子链的特征可能在于最大尺寸,诸如例如不超过约20kDa、15kDa、10kDa、5kDa、4kDa、3kDa、2kDa、1kDa、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、100Da或小于100Da。示例性的分子链可以包括聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)、烷烃链、氟化烷烃链、葡聚糖和多核苷酸。

[0123] 如本文所用,术语“可逆的”和“可逆性”用于指两个实体(例如,分子、分析物、官能

团或部分)的化学或物理偶联,其在一种或多种使用条件下具有解偶联的实质可能性。可逆性可以由热力学可逆性、动力学可逆性或其组合组成。第一实体与第二实体的可逆偶联的特征可能在于,当彼此偶联时,第一实体和/或第二实体的结构或功能的暂时变化。逆转偶联可以任选地将第一实体和/或第二实体的结构或功能恢复到暂时变化之前的相同状态。确定可逆性的背景可以包括给定两个偶联分子所处的特定空间、时间和物理环境,检测到反向偶联的可能性。例如,在一百万个链霉亲和素-生物素偶联对的群体中,可以从热力学上预测可检测到的反向偶联的数量,然而,如果检测时间尺度为秒或分钟的量级,则结合反应的缓慢动力学逆转可能使得此类解偶联在检测噪声之上不可检测。在这种背景下,链霉亲和素-生物素偶联将被描述为不可逆的。对于经历多个过程的系统,可逆性的背景可能是过程依赖性的。例如,偶联分子的可测量的解偶联可能在几个月的储存期间发生,但是利用偶联分子的后续过程可能在几分钟内发生。在这种背景下,偶联的分子可以在存储方面可逆地偶联,但在利用方面不可逆地偶联。可逆性的测量可以包括使用定量测量,诸如平衡常数或动力学结合速率和/或解离速率。可以通过平衡测定直接测量可逆性。可逆性可能随着化学系统的变化而变化,诸如温度或溶剂组成的变化。可逆偶联可以包括亚稳态偶联,其保持偶联的直到物理环境变化。例如,互补核酸可以在20°C下保持稳定偶联,但在75°C以上可以快速解偶联。可逆偶联可以保持偶联的,持续至少约1秒(s)、1分钟(min)、5min、10min、15min、30min、1小时(hr)、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、12hr、18hr、1天、1周、1个月、6个月、1年或超过1年的时间段。可替代地或另外地,可逆偶联可以在不超过约1年、6个月、1个月、1周、1天、18hr、12hr、6hr、5hr、4hr、3hr、2hr、1hr、30min、15min、10min、5min、1min、1s或少于1秒的时间段内变得解偶联。

[0124] 如本文所用,术语“不可逆的”和“不可逆性”用于指两个实体(例如,分子、分析物、官能团或部分)的化学或物理偶联,其在一种或多种使用条件下有保持偶联的可能性。如上文所述被确定为不可逆的系统可以被描述为不可逆的。例如,第一实体与第二实体的不可逆偶联的特征可能在于在彼此偶联之后第一实体和/或第二实体的结构或功能的永久改变。与偶联前的一个或两个实体的结构或功能相比,解偶联可能导致相应的一个或两个实体的结构或功能发生实质性变化。可逆偶联可以保持偶联的,持续至少约1秒(s)、1分钟(min)、5min、10min、15min、30min、1小时(hr)、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、12hr、18hr、1天、1周、1个月、6个月、1年或超过1年的时间段。

[0125] 如本文所用,术语“亲和试剂”是指能够特异性地或可再现地与结合配偶体或其他物质结合的分子或其他物质。结合可以任选地用于鉴定、跟踪、捕获、改变或影响结合配偶体。结合配偶体可以任选地大于、小于或等于亲和试剂的尺寸。亲和试剂可以与结合配偶体形成可逆或不可逆的相互作用。亲和试剂可能以共价或非共价方式与结合配偶体结合。亲和试剂可以被配置为执行化学修饰(例如,连接、裂解、连结等),所述化学修饰在较大分子中产生可检测的变化,从而允许观察到所发生的相互作用。亲和试剂可以包括化学反应性亲和试剂(例如,激酶、连接酶、蛋白酶、核酸酶等)和化学非反应性亲和试剂(例如,抗体、抗体片段、适体、DARPin、肽适体(peptamer)等)。亲和试剂可以包含一个或多个已知和/或表征的结合组分或结合位点(例如,互补性决定区),它们介导或促进与结合配偶体的结合。因此,亲和试剂可以是单价或多价的(例如,二价、三价、四价等)。亲和试剂通常是非反应性的和非催化的,因此不会永久改变其在本文所阐述的方法中结合的物质化学结构。

[0126] 如本文所用,术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指包含由肽键连接的两个或更多个氨基酸的分子或分析物。多肽可以是指肽(例如,具有少于约200个、150个、100个、75个、50个、40个、30个、20个、15个、10个或少于约10个连接的氨基酸的多肽)。多肽可以是指天然存在的分子,或者人工或合成的分子。多肽可以包括一个或多个非天然的、修饰的氨基酸或非氨基酸接头。多肽可以含有D-氨基酸对映异构体、L-氨基酸对映异构体或两者。多肽可以被天然或合成地修饰,诸如通过翻译后修饰。

[0127] 如本文所用,术语“可检测标记”是指提供可检测特征的亲和试剂或其他物质的部分。可检测特征可以是例如光信号,诸如辐射的吸收、发光或荧光发射、发光或荧光寿命、发光或荧光偏振等;瑞利和/或米氏散射;对配体或受体的结合亲和力;磁特性;电特性;电荷;质量;放射性等。标记组分可以是与另一种分子或物质缀合或能够与另一种分子或物质缀合的可检测的化学实体。可以与标记组分缀合的示例性分子包括亲和试剂或结合配偶体。标记组分可以产生实时检测的信号(例如,荧光、发光、放射性)。标记组分可以产生离线检测的信号(例如,核酸条形码)或以时间分辨方式检测的信号(例如,时间分辨荧光)。标记组分可以产生具有特征频率、强度、极性、持续时间、波长、序列或指纹的信号。示例性标记包括但不限于荧光团、发光体、发色团、纳米颗粒(例如,金、银、碳纳米管)、重原子、放射性同位素、质量标记、电荷标记、自旋标记、受体、配体、核酸条形码、多肽条形码、多糖条形码等。

[0128] 如本文所用,术语“核酸折纸”是指包含工程化的二级、三级或四级结构的核酸构建体。核酸折纸可以包括DNA、RNA、PNA、LNA、其他核酸类似物、修饰的或非天然核酸或其组合。核酸折纸可以包含多个寡核苷酸,它们通过序列互补性杂交以产生折纸颗粒的工程化结构。核酸折纸可以包含单链或双链核酸的区段或其组合。核酸折纸可以包含核酸的一种或多种三级结构,诸如A-DNA、B-DNA、C-DNA、L-DNA、M-DNA、Z-DNA等。核酸折纸可以包含单链核酸、双链核酸、多链核酸或其组合。示例性核酸折纸结构可以包括纳米管、纳米线、笼、瓦片、纳米球、块及其组合。

[0129] 如本文所用,术语“核酸纳米球”是指球状或球形核酸结构。核酸纳米球可以包含排列成球状结构的寡核苷酸多联体。核酸纳米球可以包含一种或多种寡核苷酸,包括包含自互补核酸序列的寡核苷酸。核酸纳米球可以包含回文核酸序列。核酸纳米球可以包括DNA、RNA、PNA、LNA、其他核酸类似物、修饰的或非天然核酸或其组合。

[0130] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指包含由磷酸二酯键或其类似物连接的两个或更多个核苷酸的分子。寡核苷酸可以包含DNA、RNA、PNA、LNA、其他核酸类似物、修饰的核苷酸、非天然核苷酸或其组合。寡核苷酸可以包括有限数量的结合核苷酸,诸如少于约200个、190个、180个、170个、160个、150个、140个、130个、120个、110个、100个、90个、80个、70个、60个、50个、40个、30个、25个、20个、15个、10个或少于5个核苷酸。寡核苷酸可以在末端或中间位置包含连接基团或连接部分。例如,寡核苷酸可以包含由中间PEG分子连接的两条核酸链。在另一个实例中,寡核苷酸可以包含连接寡核苷酸的两个部分的可裂解接头(例如,可光裂解的接头、可酶裂解的接头、限制性位点等)。术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中术语“寡核苷酸”同义使用。

[0131] 如本文所用,术语“支架”是指具有将两个或更多个实体彼此偶联的结构分子或分子复合物。支架可以形成用于将结合组分和/或标记组分与可检测探针偶联的结构基础。支架可以包含允许可检测探针组分与支架偶联或缀合的多个附接位点。支架附接位点可以

包括官能团、活性位点、结合配体、结合受体、核酸序列或能够与结合组分、标记组分或其他可检测探针组分形成共价或非共价附接的任何其他实体。支架可以包含充当核酸折纸的主要结构单元的寡核苷酸分子。支架可以包含单链核酸、双链核酸或其组合。支架可以是环状寡核苷酸或线性(即非环状)寡核苷酸。支架可以源自天然来源,诸如细菌或病毒基因组(例如,质粒DNA或噬菌体基因组)。可以通过非环状核酸的连接形成环状支架。支架可以包含特定数量的核苷酸,例如,至少约500个、1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个、5500个、6000个、6500个、7000个、7500个、8000个、8500个、9000个、9500个、10000个或超过10000个寡核苷酸。支架可以包含有机或无机颗粒或纳米颗粒。支架可以包含施加到颗粒或纳米颗粒上的涂层或层,其允许检测标记组分的附接。

[0132] 如本文所用,术语“二维投影”是指通过将三维结构投影到平面二维表面上所占据的区域或形状,而没有实质的几何或空间失真。例如,球体在平面二维表面上的二维投影将在表面上产生圆形区域,其直径等于球体的直径。二维投影可以由任何参考坐标系(frame of reference)形成,包括与三维结构的任何表面正交的参考坐标系。许多三维结构能够根据参考坐标系产生不同尺寸或形状的投影。因此,三维结构的最大二维投影是指从三维结构的所有参考坐标系产生的最大面积或形状;三维结构的最小二维投影是指从三维结构的所有参考坐标系产生的最小面积或形状;并且三维结构的平均二维投影是指从三维结构的所有参考坐标系产生的平均面积或形状。

[0133] 如本文所用,术语“有效表面积”,当用于指核酸时,是指当核酸不与表面结合(例如,溶解或悬浮于流体介质中)时,核酸或其一部分的二维投影的表面积。如本文所用,术语“占用面积”,当用于指核酸时,是指当核酸与表面结合(例如,与固体支持物偶联)时,核酸或其一部分的二维投影的表面积。图48描绘了核酸的有效表面积与占用面积之间的差异。在未结合构型中,核酸4810在表面4800上的二维投影将具有与长度 l_1 成比例的表面积,其与未结合的核酸4810的两个末端之间的距离基本上相同。在结合构型中,核酸4810与表面4800的偶联增加了核酸末端之间的距离,从而增加了核酸在表面4800上的二维投影的表面积。因此,核酸具有比其有效表面积更大的占用面积。

[0134] 如本文所用,术语“偏移”是指在两条线(二维)或表面(三维)之间取向的空间差异。偏移可以包括距离偏移和/或角度偏移。图1A和1B描绘了不同二维形状(其可以是三维结构的二维投影)的角度偏移的实例。图1A的等腰三角形100在第一面110与第二面120之间具有 120° 的角度偏移,所述第一面和所述第二面的相对取向由正交矢量A和A'描绘。图1B的矩形130在第一面110与第二面120之间具有 180° 的角度偏移,所述第一面和所述第二面的相对取向由正交矢量A和A'描绘。

[0135] 如本文所用,术语“结合特异性”是指相对于其他结合配偶体、亲和靶标或靶标部分,亲和试剂优先与结合配偶体、亲和靶标或靶标部分相互作用的趋势。亲和试剂可以对任何可能的结合配偶体、亲和靶标或靶标部分具有计算的、观察到的、已知的或预测的结合特异性。结合特异性可以是指对样品中单一结合配偶体、亲和靶标或靶标部分的选择性超过对样品中至少一种其他分析物的选择性。此外,结合特异性可以是指对样品中的结合配偶体、亲和靶标或靶标部分的子集的选择性超过对样品中至少一种其他分析物的选择性。

[0136] 如本文所用,术语“结合亲和力”或“亲和力”是指在亲和试剂与结合配偶体、亲和靶标或靶标部分之间的结合强度或程度。在一些情况下,亲和试剂对结合配偶体、亲和靶标

或靶标部分的结合亲和力可以小到几乎为零或实际上为零。亲和试剂对结合配偶体、亲和靶标或靶标部分的结合亲和力可以被限定为“高亲和力”、“中等亲和力”或“低亲和力”。如果相互作用具有小于约100nM的解离常数,则亲和试剂对结合配偶体、亲和靶标或靶标部分的结合亲和力可以被定量为“高亲和力”,如果相互作用具有在约100nM与1mM之间的解离常数,则被定量为“中等亲和力”,并且如果相互作用具有大于约1mM的解离常数,则被定量为“低亲和力”。结合亲和力可以用生物化学领域已知的术语来描述,所述术语诸如平衡解离常数(K_D)、平衡结合常数(K_A)、结合速率常数(k_{on})、解离速率常数(k_{off})等。参见例如Segel, *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons, New York (1975), 其以引用的方式整体并入本文。

[0137] 如本文所用,术语“混杂”,当用于指结合时,可以是指以下的亲和试剂特性:1) 由于特定亲和靶标或靶标部分的存在而与多个结合配偶体结合,而不管亲和靶标或靶标部分的结合背景;或2) 与相同或不同结合配偶体中的多个亲和靶标或靶标部分结合;或3) 两种特性的组合。关于结合混杂的第一种形式,“结合背景”可以是指围绕亲和靶标或靶标部分的局部化学环境,诸如侧翼、相邻或邻近的化学实体(例如,对于多肽表位,侧翼氨基酸序列、或相对于所述表位相邻或邻近的非连续氨基酸序列)。关于结合混杂的第二种形式,该定义可以是指与结构相关或化学相关的亲和靶标或靶标部分结合的亲和试剂或探针,尽管亲和靶标或靶标部分之间存在差异。例如,如果亲和试剂对具有WXK形式(其中W是色氨酸,K是赖氨酸,并且X是任何可能的氨基酸)的三聚体肽序列具有结合亲和力,则可以认为所述亲和试剂是混杂的。WO 2020106889A1中讨论了与结合混乱有关的另外的概念,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0138] 如本文所用,术语“结合概率”是指在特定结合背景下可以观察到亲和试剂与结合配偶体和/或亲和靶标相互作用的概率。结合概率可以表示为离散数字,诸如在 $0 \leq N \leq 1$ 范围内的值N(例如0.4)或百分比值(例如,40%)、离散数字的矩阵、或表示为数学模型(例如,理论或经验模型)。结合概率可以包括一个或多个因素,包括结合特异性、定位亲和靶标的可能性以及结合足够长时间以检测到结合相互作用的可能性。总体结合概率可以包括当所有因素已经相对于结合背景被加权时的结合概率。

[0139] 如本文所用,术语“结合背景”可以是指观察到亲和试剂-结合配偶体相互作用的环境条件。结合背景可以是恒定条件或在一定范围内变化的条件。环境条件可以包括可能影响亲和试剂与结合配偶体之间相互作用的任何因素,诸如温度、流体特性(例如,离子强度、极性、pH)、相对浓度、绝对浓度、流体组成、结合配偶体构象、亲和试剂构象及其组合。

[0140] 如本文所用,术语“可调的”,当用于指结构化核酸颗粒时,是指组分的特定的、精确的和/或合理的位置或者具有装配或结构的组分的衔接位点。可调的保持组分可以是指在保持组分结构的特定位点处或特定区域内偶联或缀合探针组分的能力,或者在保持组分结构的特定位点或特定区域处产生用于探针组分偶联或缀合的衔接位点的能力。如本文所用,“可调性”是指具有可调结构或构造的探针组分或保持组分的特性。

[0141] 如本文所用,术语“官能团”是指在分子中的一组原子,其在分子上赋予化学特性诸如反应性、极性、疏水性、亲水性、溶解性等。官能团可以包含有机部分或可以包含无机原子。示例性官能团可以包括烷基、烯基、炔基、苯基、卤化物、羟基、羰基、醛、酰卤、酯、羧酸酯、羧基、烷氧碳酰、甲氧基、3,2过氧羟基、醚、半缩醛、半缩酮、缩醛、缩酮、原酸酯、环氧化

物、羧酸酐、羧酰胺、胺、酮亚胺、醛亚胺、酰亚胺、叠氮化物、偶氮、氰酸酯、异氰酸酯、硝酸酯、腈、异腈、亚硝基氧基、硝基、亚硝基、肟、吡啶基、氨基甲酸酯、巯基、硫化物、二硫化物、亚磺酰基、磺酰基、亚磺基(sulfinom)、磺基、硫氰酸酯、异硫氰酸酯、硫代羰基、硫酯、硫氧酯、膦基、膦酰基、膦酸酯、磷酸酯、硼酰基、硼酸酯和硼化物官能团。

[0142] 如本文所用,术语“官能化的”是指已经被改性以包括官能团的任何材料或物质。官能化的材料或物质可以是天然或合成地官能化的。例如,多肽可以用磷酸酯、寡糖(例如,糖基、糖基磷脂酰肌醇或磷酸糖基)、亚硝酰基、甲基、乙酰基、脂质(例如,糖基磷脂酰肌醇、肉豆蔻酰基或异戊二烯基)、泛素或其他天然存在的翻译后修饰而天然地官能化。官能化的材料或物质可以为了任何给定的目的而被官能化,所述目的包括改变化学特性(例如,改变疏水性或改变表面电荷密度)或改变反应性(例如,能够与部分或试剂反应以形成与部分或试剂的共价键)。

[0143] 除了的操作实例中或者另有说明的情况之外,本文中使用的表示成分或反应条件的量的所有数字应该被理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。如本文所用,术语“约”当与百分比结合使用时,可以表示所参考的值的至多 $\pm 5\%$ 的变化。例如,约90%可以表示从85%到95%。在一些情况下,“约”可以表示所参考的值的至多 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或更少的变化。如本文所用,术语“基本上”,当用于指可测量的量或特性时,是指具有在参考值的 $\pm 10\%$ 以内的值的量或特性。例如,如果第一值在第二值的 $\pm 10\%$ 以内,则第一值可以与第二值基本上相同。在另一个实例中,如果矩形的边长比在0.90和1.10之间的范围内,则形状可以基本上是正方形。在一些情况下,“基本上”可以表示量或特性的值在参考值的至多 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或更小的范围内。

[0144] 如本文所用,术语“附接的”或“偶联的”是指两个物质彼此接合、紧固、粘附、连接或结合的状态。附接可以是共价或非共价的。例如,颗粒可以通过共价键或非共价键附接或偶联至蛋白质。类似地,第一核酸可以通过杂交或沃森-克里克碱基配对附接或偶联至第二核酸。共价键的特征在于原子之间电子对的共享。非共价键是不涉及电子对共享的化学键,并且可以包括例如氢键、离子键、范德华力、亲水相互作用、粘附、吸附和疏水相互作用。

[0145] 术语“包含”在本文旨在是开放式的,不仅包括所列举的要素,而且还包括任何另外的要素。

[0146] 如本文所用,术语“每个/各自(each)”当用于指项目集合时,旨在鉴定集合中的单独项目,但不一定是指集合中的每一个(every)项目。如果明确的公开内容或上下文清楚地另外指明,则可出现例外。

[0147] 核酸结构

[0148] 本文提供了可用于形成分析物阵列的核酸,所述分析物阵列允许以单分析物分辨率对阵列的分析物进行询问。本文所阐述的核酸的特征可能在于具有可调的二维或三维结构,所述结构有利于选自以下的一个或多个特征:i)以有利于以单分析物分辨率询问分析物的取向展示分析物;ii)在被配置为结合核酸的位点最大化与固体支持物或其表面偶联的可能性;iii)以可控和/或非随机的方式最大化与固体支持物或其表面上的位点偶联的可能性;iv)最小化在已经被另一个核酸占据的位点处偶联至固体支持物或其表面的可能性;和v)最小化在未被配置为结合核酸的地址处偶联至固体支持物或其表面的可能性。在

一些构型中,如本文所阐述,核酸可以具有所有上述特征。在其他构型中,两个或更多个核酸可以复合,其中所述核酸复合物具有所有上述特征。

[0149] 本文描述了可用于在单分析物系统中组织单独部分的核酸。如本文所阐述,核酸的特征可能在于以下的一个或多个特征:i) 包含展示部分,所述展示部分被配置为将分析物与核酸偶联或者将分析物与核酸偶联;ii) 包含捕获部分,所述捕获部分被配置为将核酸偶联至固体支持物或其表面,或者将核酸偶联至固体支持物或其表面;iii) 包含偶联部分,所述偶联部分被配置为将第二分子与核酸偶联,或者将第二分子与核酸偶联;和iv) 包含效用部分,所述效用部分修饰核酸的物理和/或化学特性。在一些情况下,核酸是核酸纳米结构或结构化核酸颗粒(SNAP)。

[0150] 如本文所阐述,核酸可以包含天然存在的核酸结构,诸如天然存在的一级结构(例如,天然存在的单链核苷酸序列、质粒的单链等)、天然存在的二级结构(例如,天然存在的A-DNA、B-DNA、Z-DNA或双链螺旋结构)、天然存在的三级结构(例如,包含折纸结构核小体、染色质等的核酸)。如本文所阐述,核酸可以包含合成的、人工的或工程化的核酸结构。在一些构型中,核酸可以包含核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构包含致密的三维结构。核酸纳米结构可以包含在天然存在的核酸中未知的一种或多种结构。核酸纳米结构可以包含一种或多种结构,所述一种或多种结构具有与天然存在的核酸的相同可表征特性不同的可表征特性(例如,在包含N个核苷酸的核酸链上更高或更低的平均持续长度、包含至少75%双链核酸的核酸链的更大或更小的曲率半径、在核酸链的两个不连续区域之间的更短或更长的距离、任何前述特性的时间变化等)。

[0151] 本文所阐述的组合物和方法通常将参考核酸纳米结构或SNAP来例示;然而,应当理解,所例示的方法和组合物可以扩展到其他核酸,诸如本文所阐述的那些。

[0152] 还应当理解,核酸结构是关于平均空间和/或时间构型来描述的。如本文所阐述,关于引起核酸构型的空间和/或时间变化的普通物理现象(例如,热运动、分子间碰撞、外部施加的力、分子内振动、分子内弯曲、分子内旋转等),核酸结构可以处于动态中。根据本领域所理解的分子结构的动态性质,核酸结构的定量描述可以包括空间和/或时间变化。

[0153] 核酸结构的方面:核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含产生更高有序结构或几何形状的各种结构或结构基序。例如,连环化滚环扩增(RCA)产物可以产生球状纳米球结构,其在单链连环化核酸形成几乎180°圈的外边界处具有尖峰状结构(即,纳米级海胆状结构)。在另一个实例中,SNAP可以包含DNA折纸颗粒,所述颗粒包含与多个寡核苷酸杂交的支架单链核酸,所述寡核苷酸将支架链成形为整体三级结构。三级结构的区域可以通过所述多个寡核苷酸中的某些寡核苷酸连接,以将支架图案化为规则或不规则的形状,诸如瓦片、圆盘、三角形、环面、立方体、棱锥体、圆柱形、管状和其他更复杂的二维或三维结构。

[0154] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含为核酸纳米结构提供结构特征和/或执行功能的一个或多个面。核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含以下中的一个或多个:1) 展示面;2) 捕获面;3) 偶联面;和4) 效用面。展示面可以包含捕获部分,所述捕获部分将核酸纳米结构与分析物偶联或被配置为将核酸纳米结构与分析物偶联。捕获面可以包含捕获部分,所述捕获部分将核酸纳米结构偶联至表面或界面或被配置为将核酸纳米结构偶联至表面或界面。偶联面可以包含偶联部分,所述偶联部分将第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构偶联或被配置为将第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构偶联。效用面可以包含效用部分,所述

效用部分为核酸纳米结构(例如, SNAP)提供另外的效用, 诸如提供结构、提供稳定性、改变在核酸纳米结构与另一个实体(例如, 第二核酸纳米结构、表面等)之间的相互作用(例如, 吸引或排斥、空间位阻等)、或改变核酸纳米结构的物理特性(例如, 效用部分可以包含电、磁或光材料等)。核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含具有超过一种功能的面。例如, 偶联面也可以包含效用面。在另一个实例中, 展示面也可以包含效用面或捕捉面。核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含由一个或多个其他类型的面构成的面。例如, 展示面可以包含如下的部分或区域, 所述部分或区域作为包含空间封闭(steric blocking)基团(例如, PEG、PEO、葡聚糖等)的效用面。在一些构型中, 多功能面可以算作单个面。例如, 立方体状SNAP可以包含约六个不同的面, 其中六个面中的每个面都包含一个或多个功能, 例如, 在六个侧面之一上的展示面和效用面。

[0155] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含为核酸纳米结构提供功能性的一个或多个面。面可以包含核酸纳米结构的侧面或部分, 其具有相似的取向或在假想平面表面上的二维投影。图2A-2D描绘了与在纳米结构(诸如SNAP)上可能遇到的那些结构类似的简化结构的面的实例。图2A显示了由第一转向接头215连接的两个较短的三级结构210和212(例如, DNA双螺旋)。两个较短的三级结构210和212与较长的三级结构220和222连接, 它们通过第三转向接头225连接。两个较短的三级结构210和212与两个较长的三级结构220和222通过第二转向接头230连接。两个较短的三级结构210和212以及两个较长的三级结构220和222被定向为共面。官能团 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 从三级结构向外以特定的取向扩展, 所述取向从定位所述三级结构的平面向外扩展。假想平面P与四个三级结构正交放置并且相交。图2B描绘了在平面P截取的三级结构的横截面视图。关于展示官能团的三级结构, 显示了官能团 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 的相对位置。图2A中所描绘的结构可以由四个面 S_1 、 S_2 、T和B定义, 如图2B所示。面代表三级结构在由面 S_1 、 S_2 、B和T所定义的假想平面上的投影。由于可以从三级结构扩展的官能团和/或部分的位置的一些自由度、以及官能团或部分的尺寸和长度, 所述面可以扩展超过三级结构在面 S_1 、 S_2 、B或T上的简单正交投影。在一些情况下, 从核酸纳米结构扩展的官能团或部分可以被认为位于核酸纳米结构的两个或更多个面中。在其他情况下, 从核酸纳米结构扩展的官能团或部分可以被认为位于核酸纳米结构的单个面内。分配有官能团或部分的面可以由官能团或部分的效用或目的来定义。例如, 具有位于两个不同面附近的刚性链的部分可以分配给单个面, 因为由刚性链引起的取向使得所述部分在功能上不能到达另一个面。由于三级结构的对齐和共面的几何形状, 如果扩展, 面 S_1 和 S_2 将与面B和T正交相会。在一些情况下(例如, 圆柱形或管状结构), 一个面可以包含至多 360° 的总方位或取向。

[0156] 图2C-2D描绘了不是共面的多个三级结构的核酸纳米结构面的位置。图2C显示了由第一转向接头215连接的两个较短的三级结构210和212(例如, DNA双螺旋)。两个较短的三级结构210和212与较长的三级结构220和222连接, 它们通过第三转向接头225连接。两个较短的三级结构210和212与两个较长的三级结构220和222通过第二转向接头230连接。两个较短的三级结构210和212被定位于较长的三级结构220和222之下。假想的参考平面P'大致定义了关于三级结构的镜像对称平面。图2D描绘了三级结构在平面P'上的投影。对于图2C中所描绘的核酸纳米结构, 可以定义两个面D和B。如果扩展, 所述面将相交, 尽管由于相对的几何形状, 相交将不会正交地发生。

[0157] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以具有特定数量的面。核酸纳米结构可以具有至少约

1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或超过20个面。另外地或可替代地,核酸纳米结构可以具有不超过约20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个面。可以选择核酸纳米结构的面的数量,以匹配核酸纳米结构的功能性。例如,被配置为将分析物偶联至固体支持物的SNAP可能需要至少2个面(展示面和偶联面),基于其他设计考虑增加另外的面(例如,效用面)。

[0158] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含两个或更多个面,其中每个面具有不同的效用。核酸纳米结构可以包含选自以下的一种或多种效用:1) 偶联或被配置为偶联分析物的展示面;2) 偶联或被配置为偶联至表面的捕获面;3) 将第一核酸纳米结构偶联至或被配置为将第一核酸纳米结构偶联至第二核酸纳米结构的偶联面;和4) 提供任何另外的效用(例如,空间封闭)的效用面。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含第一效用(例如,包含展示部分的展示面),并且第二面可以包含第二效用(例如,包含捕获部分的捕获面)。在其他构型中,两个或更多个面可以具有相同的效用(例如,两个或更多个展示面),但是所述两个或更多个面中的一个面可以包含不同的效用(例如,捕获面)。在一些构型中,核酸纳米结构可以在两个或更多个面(例如,用作展示面和捕获面的两个相反面)上包含相同的两个或更多个效用。

[0159] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含例如根据对称轴(即,旋转对称)或对称平面(即,反射对称)的结构对称。核酸纳米结构的三级结构可以包含例如根据对称轴(例如,与螺旋结构的中心线对齐)的结构对称。多个三级结构作为一个整体可以包含例如根据对称轴或对称平面的结构对称。核酸纳米结构的面可以关于核酸纳米结构或形成核酸纳米结构的多个三级结构中的一个三级结构的对称轴或对称平面取向。例如,对于图2B中所示的横截面,顶面T可以相对于与四个三级结构中的任何一个共轴的对称轴以 0° 取向,而面 S_1 、B和 S_2 可以分别以 90° 、 180° 和 270° 取向。对于包含第一三级结构和第二三级结构的核酸纳米结构(例如,SNAP),可以相对于第一三级结构的对称轴或第二三级结构的对称轴来定义第一面(例如,展示面、捕获面、偶联面或效用面)的取向或第二面(例如,展示面、捕获面、偶联面或效用面)的取向。在一些构型中,第一面的取向可以与第二面(例如,具有展示和捕获效用的面)的取向相同。基于垂直于定义第一面的平均空间位置的平面的第一矢量与垂直于定义第二面的平均空间位置的平面的第二矢量之间的角度偏移,可以关于第二面的取向确定第一面的取向。在其他构型中,第一面的取向可以从第二面的取向偏移至少约 90° 。在其他构型中,第一面的取向可以从第二面的取向偏移约 180° 。核酸纳米结构可以包含第一面和第二面,它们的角度偏移为至少约 10° 、 20° 、 30° 、 40° 、 50° 、 60° 、 70° 、 80° 、 90° 、 100° 、 110° 、 120° 、 130° 、 140° 、 150° 、 160° 、 170° 、 180° 、 190° 、 200° 、 210° 、 220° 、 230° 、 240° 、 250° 、 260° 、 270° 、 280° 、 290° 、 300° 、 310° 、 320° 、 330° 、 340° 、 350° 或超过 350° 。可替代地或另外地,核酸纳米结构可以包含第一面和第二面,它们的角度偏移为不超过约 360° 、 350° 、 340° 、 330° 、 320° 、 310° 、 300° 、 290° 、 280° 、 270° 、 260° 、 250° 、 240° 、 230° 、 220° 、 210° 、 200° 、 190° 、 180° 、 170° 、 160° 、 150° 、 140° 、 130° 、 120° 、 110° 、 100° 、 90° 、 80° 、 70° 、 60° 、 50° 、 40° 、 30° 、 20° 、 10° 或小于 10° 。

[0160] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含至少部分包围或基本上包围内部体积区域的多个三级或四级结构。核酸纳米结构可以具有三维结构,诸如包含内部体积区域的棱锥体、

贝壳形、圆柱形、圆盘、球体、立方体(例如,正方体或矩形立方体)或块体。内部体积区域可以是核酸纳米结构内的三维体积,其足够大以容纳本文所阐述的分析物或其他分子。核酸纳米结构可以被配置为包含内部体积区域,其中所述内部体积区域包含效用面,诸如展示面或捕获面。效用部分可以被展示在内部体积区域内。例如,展示部分可以被展示在SNAP的内部体积区域内,使得分析物至少部分地偶联在内部体积区域内。在另一个实例中,捕获部分可以被展示在SNAP的内部体积区域内,使得表面的互补部分必须至少部分地进入内部体积区域以与捕获部分偶联(参见图38A和38B)。

[0161] 在一些构型中,可以在核酸纳米结构(例如,SNAP)中创建内部体积区域,以控制在核酸纳米结构与其他实体之间的相互作用。内部体积区域可以包含一个或多个部分,所述部分改变内部体积区域的化学特性(例如,疏水性、亲水性、反应性、极性、溶解性等)以不同于周围核酸纳米结构的化学特性。图39A描绘了包含内部体积区域3920的SNAP 3910,所述内部体积区域含有捕获部分,所述捕获部分包含反应性基团3925和围绕反应性基团3925的多个疏水分子3928。SNAP可以与表面3930接触,所述表面包含多个以互补反应性基团3935封端的亲水基团3932和多个以互补反应性基团3935封端的疏水基团3938。如图39B所示,内部体积区域3920的疏水特性可以增加SNAP 3910将在包含多个疏水基团3938的区域沉积并偶联至表面3930的可能性。

[0162] 在一些构型中,可以在核酸纳米结构(例如,SNAP)中创建内部体积区域,以控制在内部体积区域内的部分可能参与的相互作用。可以控制在内部体积区域内的部分的取向,以增加、减少或以其他方式控制可能发生相互作用的取向。部分可能以限制或控制可以与所述部分相互作用的实体的尺寸的方式被展示在内部体积区域内。图38A描绘了SNAP 3810,其包含含有偶联的多价结合部分(例如,链霉亲和素、抗生物素蛋白)3830的内部体积区域3820。偶联的多价结合部分3830在内部体积区域3820内定向,使得只有一个结合位点3835可用于参与跟包含互补结合基团(例如,生物素)3845的实体3840的结合相互作用,所述互补结合基团被配置为与结合位点3835偶联。如图38B所示,偶联的多价结合部分3830由于其在内部体积区域3820内的取向而基本上是单价的,从而与实体3840仅形成一个结合相互作用。

[0163] 核酸纳米结构可以包含第一三级结构结构域和第二三级结构结构域,它们通过一条或多条核酸链关于彼此定向,所述一条或多条核酸链在第一三级结构结构域与第二三级结构结构域之间形成连接链(例如,订书钉寡核苷酸)。连接链可以包含单链、双链、部分双链或多链核酸。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含具有第一核酸序列和第二核酸序列的第一寡核苷酸,所述第一核酸序列和第二核酸序列与第二寡核苷酸的互补序列杂交以形成第一三级结构结构域和第二三级结构结构域,其中所述第一寡核苷酸的第一核酸序列和第二核酸序列被连接核酸序列分隔开,所述连接核酸序列包含在第一三级结构结构域与第二三级结构结构域之间的单链连接链。例如,第一寡核苷酸可以是与支架核酸杂交以在核酸折纸结构中形成第一三级结构结构域和第二三级结构结构域的订书钉。

[0164] 核酸纳米结构可以包含第一三级结构结构域和第二三级结构结构域,其中所述两个结构域的相对角度取向或空间分隔由一条或多条连接链控制。第一三级结构结构域和第二三级结构结构域的角度取向和/或空间分隔可以基于在所述结构域的螺旋结构内核苷酸的空间位置进行调节。每个完整的双链核酸螺旋通常含有10个至11个核苷酸碱基对。因

此,连接链伸出的初始角度可以通过螺旋结构内的核苷酸位置来调节。核酸纳米结构的结构可调性也可以通过改变连接链的长度和改变在连续连接链之间的分隔距离来获得。图49A-49E描绘了控制核酸纳米结构中三级结构的取向的方位。图49A描绘了包含第一寡核苷酸4910(例如,支架链)和第二寡核苷酸4920(例如,订书钉寡核苷酸)的核酸纳米结构的一部分的俯视图,其中所述第二寡核苷酸4920与所述第一寡核苷酸4910杂交以形成第一三级结构结构域4930和第二三级结构结构域4932,所述第一三级结构结构域和第二三级结构结构域通过包含所述第二寡核苷酸4920的单链核酸序列的连接链连接。图49B-49C描绘了如相对于第一三级结构结构域4930和第二三级结构结构域4932的螺旋轴所见的第二寡核苷酸4920的连接链的初始取向的差异,如通过一转螺旋结构内的核苷酸位置所确定。图49B描绘了连接链的初始取向不共面的构型,而图49C描绘了连接链的初始取向共面的构型。此外,对于固定长度的连接链,连接链的初始取向的差异可能影响两个相邻三级结构结构域之间的分隔距离或分隔距离变化量,例如,如图49B和49C所示。图49D-49E示出了基于连接链取向的三级结构结构域的可能相对位置,分别如图49B-49C所示。图49D描绘了在第一三级结构结构域4930与第二三级结构结构域4932之间的偏斜取向,而图49E描绘了在第一三级结构结构域4930与第二三级结构结构域4932之间的共面取向,所述两个三级结构结构域的每个取向都源于第二寡核苷酸4920从连接链的双链核酸的组分转变成单链核酸的核苷酸的定位。

[0165] 连接链的位置可能影响核酸纳米结构中第一三级结构结构域相对于第二三级结构结构域的构象。例如,为了将第一三级结构结构域和第二三级结构结构域配置成基本上共面的取向(即,在两个三级结构结构域之间的最小角度偏移),连续的连接链可以相隔约奇数个螺旋半转放置(例如,相隔约1个、3个、5个、7个、9个等半转或约6个、16个、27个、37个、48个等核苷酸)。可替代地,为了以偏斜取向(即,在两个三级结构之间的可测量角度偏移)配置第一三级结构结构域和第二三级结构结构域,连续的连接链可以放置在除螺旋半转以外的位置,或者可以放置在随机或变化的位置,包括螺旋半转和除螺旋半转以外的位置。例如,连续的连接链可以相隔约偶数个螺旋半转(例如,相隔约2个、4个、6个、8个、10个等半转或约11个、21个、31个、41个、52个等核苷酸)或除半转以外的分数螺旋半转(例如,3/4转、 $1^3/4$ 转、 $2^1/4$ 转等)放置。在一些构型中,可能优选产生包含基本平面的结构的核酸纳米结构,其中所述平面结构包含多个共面的三级结构。例如,核酸纳米结构可以包含捕获面,所述捕获面是基本平面的以增加捕获面与固体支持物的平面表面之间的静电相互作用。在其他构型中,可能优选产生包含非平面结构的核酸纳米结构,所述非平面结构包含多个三级结构,诸如弯曲表面或波纹状表面。例如,核酸纳米结构可以包含捕获面,所述捕获面包含波纹状纹理以增加捕获面与固体支持物的粗糙表面之间的静电相互作用。

[0166] 核酸纳米结构可以包含与天然存在的核酸的特征或构型偏离的一个或多个特征或构型。如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含一种或多种非天然核酸结构,所述非天然核酸结构增加纳米结构的可调性用于一种或多种目的,诸如分析物的偶联和/或展示以及纳米结构与固体支持物或其表面的偶联。核酸纳米结构的特征可能在于存在一种或多种非天然核酸结构,包括但不限于:i)与相同长度和序列的天然核酸链杂交的寡核苷酸数量相比,与给定核酸链杂交的寡核苷酸数量更多,ii)与具有相同或相似序列内容的天然核酸相比,纳米结构或其组分结构内的核苷酸堆积的体积和/或面积密度增加,iii)相对于具有相同

序列或长度的天然存在的核酸,核酸链弯曲的锐度增加,iv)与具有相同序列或长度的天然存在的核酸相比,纳米结构内核酸链的不连续区域之间的分隔距离减小,v)相对于在溶液中占据相似体积的天然存在的核酸中的序列互补性程度,纳米结构内的序列互补性程度低,vi)与具有相同序列或长度的天然存在的核酸的机械刚性相比纳米结构中核酸链的机械刚性更大,和vii)它们的组合。

[0167] 如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含比已知在天然核酸系统(诸如与核酸纳米结构具有相同质量的天然核酸系统)中存在的更多复合的寡核苷酸或核酸链。天然存在的核酸主要是具有部分或完全互补链的核酸链(例如,染色体DNA、质粒链)。天然存在的核酸可以通过杂交的核酸链的完全或接近完全的互补性来区分。天然存在的核酸可以通过相对少量的核酸链来进一步区分,所述核酸链通过核酸复合物中每条核酸链之间的杂交同时复合。例如,天然存在的霍利迪连接体(Holliday junction)结构将通常包括四条核酸链的杂交,连接体复合物的每条链与所述复合物的其他两条链具有高度的序列互补性。天然存在的核酸通常需要另外的蛋白质来复合多条核酸链(例如,染色体动粒,在基因转录期间由RNA聚合酶形成的3个核酸复合物、RNA链和两条互补的DNA链等)。相比之下,如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含比已知在天然核酸系统中存在的更大量的复合核酸寡核苷酸或核酸链。例如,核酸纳米结构可以包含至少10个、25个、50个、100个、150个、200个或超过200个复合的寡核苷酸或核酸链,其中每个寡核苷酸或核酸链与核酸纳米结构的至少一个其他寡核苷酸或核酸链杂交。在一些构型中,核酸纳米结构的特征可能还在于不存在被配置为将第一寡核苷酸或核酸链连接到第二寡核苷酸或核酸链的非核酸结构元件(例如,多肽、蛋白质、聚合物、纳米颗粒)。

[0168] 如本文所阐述,相对于天然存在的核酸,诸如具有与核酸纳米结构相同的质量、核苷酸序列或序列长度的天然存在的核酸,核酸纳米结构可以在纳米结构或其组分结构内包含核苷酸堆积的增加的体积和/或面积密度。天然存在的核酸通常通过双链核酸的螺旋卷曲和螺旋核酸超螺旋成致密结构来获得体积核苷酸密度。然而,为了实现链曲率超过双链核酸的持续长度的双链核酸的堆积,天然存在的核酸通常与将螺旋核酸浓缩成超螺旋结构的蛋白质(例如,组蛋白)复合。相比之下,核酸纳米结构可以包含体积核苷酸密度,其超过天然存在的核酸的体积核苷酸密度。核酸纳米结构可以通过增加的核酸结构弯曲和/或曲率和/或在核酸纳米结构内螺旋结构的更紧密接近来实现比天然存在的核酸更大的体积核苷酸密度。在一些构型中,核酸纳米结构可以实现比在不存在被配置为浓缩核酸结构的非核酸结构元件(例如,多肽、蛋白质、聚合物、纳米颗粒)的情况下的天然存在的核酸更大的体积核苷酸密度。

[0169] 如本文所阐述,相对于天然存在的核酸,诸如具有与核酸纳米结构相同的核苷酸序列或质量的天然存在的核酸,核酸纳米结构可以包含相对于序列长度和/或二级结构化程度增加的核酸弯曲锐度。天然存在的双链核酸具有大的持续长度,这使得在不存在结构改变基团(例如,组蛋白)的情况下,双链核酸的任何一部分都不可能接近例如任何其他部分的约10纳米范围内。即使单链核酸存在于天然存在的核酸中,由于带负电荷的多核苷酸骨架的静电排斥,三级结构的两个部分也不太可能在例如约10纳米内彼此接近。此外,在不存在统一元件(例如,组蛋白、连接核酸)的情况下,两个三级结构不可能在天然存在的核酸中以紧密构型保持稳定取向。相比之下,如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含尖锐弯曲的

核酸结构,其通过将双链核酸与单链核酸序列分段来增加螺旋结构的接近度。相邻的螺旋结构可以通过连接核酸链保持紧密接近,所述核酸链在空间和/或时间上稳定相邻螺旋结构相对于彼此的接近和取向。如本文所阐述,核酸纳米结构可以进一步与天然存在的核酸区分隔开,这是由于在包含螺旋结构的两个分段区域的核酸链中存在稳定的(即,在空间和/或时间上不变的)弯曲,例如相对于将螺旋结构的两个分段区域分隔开的核酸链的单链核酸区段长度(例如,不超过50个、40个、30个、25个、20个、15个或10个核苷酸)至少 90° 至 180° 的弯曲。可替代地或另外地,如本文所阐述,核酸纳米结构可以进一步与天然存在的核酸区分开,这是由于在包含螺旋结构的两个分段区域的核酸链中存在稳定的(即,在空间和/或时间上不变的)弯曲,例如相对于核酸纳米结构的二级结构化程度(例如,相对于总核苷酸含量包含至少约80%、85%、90%或95%的碱基配对核苷酸)至少 90° 至 180° 的弯曲。

[0170] 如本文所阐述,相对于天然存在的核酸,诸如具有与核酸纳米结构相同的质量、核苷酸序列或序列长度的天然存在的核酸,核酸纳米结构可以在纳米结构内包含减小的在相邻核酸结构之间的分隔距离。相邻的螺旋(例如,三级)结构可以在例如小于约10、9、8、7、6、5、4、3或2纳米的距离处保持在时间和/或空间稳定的构型。由于通过相邻多核苷酸链的静电排斥引入的结构应变,核酸纳米结构中相邻螺旋结构的紧密接近不可能发生。由于稳定核酸结构的一条或多条连接核酸链的存在,核酸纳米结构可能能够实现螺旋结构的紧密空间接近和核酸链的尖锐弯曲角。

[0171] 如本文所阐述,相对于天然存在的核酸,诸如具有与核酸纳米结构相同的质量、核苷酸序列或序列长度的天然存在的核酸,核酸纳米结构可以包含相对于核酸总量的低序列互补性程度。天然存在的核酸链通常将与具有相同序列长度的互补核酸链杂交。除了复制或校对错误之外,可以预期共杂交的链具有接近完全的序列互补性,导致稳定构型中几乎完全杂交的结构。相比之下,如本文所阐述,核酸纳米结构可以在纳米结构内包含多个单链核酸。核酸纳米结构内的单链核酸可以表征为在空间和/或时间上是稳定的,这与天然存在的核酸形成对比,在天然存在的核酸中,由于各种生物过程,单链核酸经常在核酸的整个结构中瞬时形成和未形成。如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含稳定分数的单链核酸,如通过纳米结构内不成对核苷酸的百分比所测量的。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含主要为双链核酸的致密区域和主要为单链核酸的可透过区域。在特定的构型中,核酸纳米结构可以包含主要为双链核酸的致密区域和主要为单链核酸的可透过区域,其中所述可透过区域比致密区域包含更大总量的核苷酸。核酸纳米结构可以包含在空间和/或时间上稳定分数的单链核酸,如通过不成对核苷酸所测量的,诸如至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或超过60%的单链核酸。

[0172] 如本文所阐述,当与天然存在的核酸(诸如具有与核酸纳米结构相同的质量、核苷酸序列或序列长度的天然存在的核酸)相比时,核酸纳米结构可以包含相对于纳米结构内的单链核酸的量更大的机械刚性。例如,线性双链核酸内的单链核酸链通常将在双链核酸内产生降低的刚性,如通过核酸末端之间相对运动的增加所证明的。线性双链核酸内单链核酸量的增加预期将进一步降低核酸的刚性的量。相比之下,相对于具有相同单链核酸含量的天然存在的核酸,如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含相对于总单链核酸含量在空间和/或时间基础上更大的刚性。增加的刚性可能是由于在核酸纳米结构内相对于彼此稳定核酸结构的连接链而产生的。

[0173] **核酸构型**:本文描述的是核酸纳米结构,诸如SNAP。核酸纳米结构可以用于多种目的,包括在表面或界面(诸如固体支持物或相界)展示分子或分析物。所描述的核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含各种一级、二级、三级或四级结构,所述结构产生向纳米结构添加效用性的具有各种几何形状的致密核酸颗粒。任何给定的核酸纳米结构都可以提供一种或多种功能,包括展示分子或分析物(展示SNAP)或执行其他纳米结构相关的效用(效用SNAP)。核酸纳米结构(诸如效用SNAP)可以执行如下功能:诸如将分子或分析物偶联至表面或界面(捕获SNAP)、将核酸纳米结构偶联至另一个核酸纳米结构(偶联SNAP)、为核酸纳米结构或其复合物提供其他结构效用(结构SNAP)、或其组合。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含展示SNAP、效用SNAP或其组合。例如,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以被配置为与分析物和固体支持物偶联,从而使核酸纳米结构既是展示纳米结构又是效用纳米结构。

[0174] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含含有展示部分的展示面。展示部分可以被配置为通过合适的相互作用,诸如共价键、非共价相互作用、静电相互作用或磁相互作用来偶联分析物。展示部分可以包含一个或多个官能团、配体或被配置为偶联分析物的其他部分。展示部分可以包含核酸的残基,或者可以包含与其偶联的官能团、配体或部分。展示部分还可以包含定位于展示面内的一个或多个二级、三级或四级结构。核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含含有捕获部分的捕获面。捕获部分可以被配置为通过合适的相互作用,诸如共价键、非共价相互作用、静电相互作用或磁相互作用来偶联至表面。捕获部分可以包含一个或多个官能团、配体或被配置为偶联至表面的其他部分。捕获部分还可以包含定位于捕获面内的一个或多个二级、三级或四级结构。

[0175] 展示部分可以包括多个三级结构中的两个或更多个展示三级结构。捕获部分可以包括多个三级结构中的两个或更多个捕获三级结构。在一些构型中,所述两个或更多个展示三级结构中的展示三级结构可以包含所述两个或更多个捕获三级结构中的捕获三级结构。例如,在图2B中,面T可以包含展示部分,并且面B可以包含捕获部分,其中所述四个三级结构属于这两个部分。在其他构型中,所述两个或更多个展示三级结构不包含所述两个或更多个捕获三级结构中的任何捕获三级结构。例如,在图2D中,展示部分可以包含与面D相关的两个三级结构,并且捕获部分可以包含与面B相关的两个三级结构。在一些构型中,所述两个或更多个捕获三级结构不包含所述两个或更多个展示三级结构中的任何展示三级结构。

[0176] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含多条核酸链,所述链是在不破坏共价键的情况下彼此分离的分子。例如,SNAP可以包含形成支架链的核酸分子和与支架链杂交的多个订书钉寡核苷酸分子。在一些构型中,支架链可以包含多种寡核苷酸中的一种寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与比所述多种寡核苷酸中的任何其他寡核苷酸更大量的在所述多种寡核苷酸中的寡核苷酸偶联。支架链可以包含线性、支化或环状多核苷酸。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含两条或更多条支架链,诸如约2条、3条、4条、5条、6条、7条、8条、9条、10条、15条、20条或更多条支架链,其中每条链任选地是与核酸纳米结构的其他链分离的分子。具有两条或更多条支架链的核酸纳米结构可以包含第一支架链,其通过与所述第一支架链和所述第二支架链杂交的多个寡核苷酸中的一个或多个寡核苷酸与第二支架链连接。第一支架链可以通过一定数量的多个寡核苷酸与第二支架链连接,例如所述多个寡核苷酸中的至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、

17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或超过50%的寡核苷酸。可替代地或另外地,第一支架链可以通过所述多个寡核苷酸中的至少约50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的寡核苷酸与第二支架链连接。

[0177] 核酸支架可以包含连续核酸链,所述连续核酸链有或没有互补的寡核苷酸,是环状或连接的链(即支架链没有5'或3'末端)。在一些构型中,支架链源自天然来源,诸如病毒基因组或细菌质粒。在其他构型中,支架链可以全部或部分为工程化的、合理设计的或合成的。支架链可以包含一个或多个修饰的核苷酸。修饰的核苷酸可以提供结合位点,用于附接另外的组分,诸如亲和试剂或可检测标记。在核酸纳米结构(诸如SNAP)组装之前、期间或之后,修饰的核苷酸可以用作另外组分(例如,结合组分或标记组分)的结合位点。修饰的核苷酸可以包括连接基团或反应性柄(例如,被配置为执行点击反应的官能团)。在一些构型中,核酸支架可以包含M13病毒基因组的单链。支架链的尺寸可以根据核酸纳米结构的所需尺寸而变化。支架链可以包含至少约1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个、5200个、5400个、5600个、5800个、6000个、6200个、6400个、6600个、6800个、7000个、7200个、7400个、7600个、7800个、8000个、8200个、8400个、8600个、8800个、9000个、9500个、10000个或超过10000个核苷酸的长度。可替代地或另外地,支架链可以包含至多约10000个、9500个、9000个、8800个、8600个、8400个、8200个、7800个、7600个、7400个、7200个、7000个、6800个、6600个、6400个、6200个、6000个、5800个、5600个、5400个、5200个、5000个、4500个、4000个、3500个、3000个、2500个、2000个、1500个、1000个或少于1000个核苷酸的长度。

[0178] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含多个订书钉寡核苷酸。订书钉寡核苷酸可以包含与核酸支架、其他订书钉或其组合杂交或被配置为与核酸支架、其他订书钉或其组合杂交的任何寡核苷酸。可以对订书钉寡核苷酸进行修饰,以包括另外的化学实体,诸如结合组分、标记组分、化学反应性基团或柄或其他基团(例如,聚乙二醇(PEG)部分)。订书钉寡核苷酸可以包含线性或环状核酸。订书钉寡核苷酸可以包含一个或多个单链区、双链区或其组合。例如,通过互补碱基对杂交(例如,沃森-克里克杂交),订书钉寡核苷酸可以与支架链或一个或多个其他订书钉杂交或被配置为与支架链或一个或多个其他订书钉杂交。订书钉寡核苷酸可以通过互补碱基对杂交或连接与其他核酸杂交。订书钉寡核苷酸可以被配置为充当互补核酸链的引物,并且例如使用支架、订书钉或其他链作为模板,可以通过酶(例如,聚合酶)延伸引物订书钉以形成双链核酸的延长区域。在一些情况下,在延伸时引物不需要与模板杂交。例如,可以通过以下方式来延伸引物:通过末端转移酶无模板添加一个或多个核苷酸、通过连接酶无模板添加一个或多个寡核苷酸或通过非酶化学反应无模板添加核苷酸或寡核苷酸。订书钉寡核苷酸可以包括一个或多个修饰的核苷酸。修饰的核苷酸可以包括连接基团或反应性柄(例如,被配置为执行点击型反应的官能团)。

[0179] 根据SNAP的设计,订书钉寡核苷酸可以是任何长度。可以通过软件包,诸如caDNAno²、ATHENA或DAEDALUS来设计订书钉寡核苷酸。订书钉寡核苷酸可以具有至少约10

个、25个、50个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个、1000个、1100个、1200个、1300个、1400个、1500个、1600个、1700个、1800个、1900个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个或超过5000个核苷酸的长度。可替代地或另外地,订书钉可以具有不超过约5000个、4500个、4000个、3500个、3000个、2500个、2000个、1900个、1800个、1700个、1600个、1500个、1400个、1300个、1200个、1100个、1000个、950个、900个、850个、800个、750个、700个、650个、600个、550个、500个、450个、400个、350个、300个、250个、200个、150个、100个、50个、25个、10个或少于10个核苷酸的长度。

[0180] 订书钉可以包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列与第一互补序列杂交,并且其中所述第二核苷酸序列与第二互补序列杂交。在一些构型中,订书钉可以包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列与第一互补序列杂交,其中所述第二核苷酸序列与第二互补序列杂交,并且其中所述第一核苷酸序列通过连接部分(例如,本文所阐述的接头、中间单链核苷酸序列、中间双链核苷酸序列、未被配置为与互补核苷酸序列偶联的中间核苷酸序列等)与第二核苷酸序列连接。在一些构型中,订书钉可以包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列与支架链的第一互补序列杂交,并且其中所述第二核苷酸序列与支架链的第二互补序列杂交。在特定的构型中,支架链的第一互补序列和第二互补序列可以是不连续的,使得两个互补序列区域被支架链的第三区域分隔开。订书钉可以包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列与第一互补序列杂交,并且其中所述第二核苷酸序列不与第二互补序列(例如,悬垂部分)杂交。订书钉寡核苷酸的第一核苷酸序列或第二核苷酸序列可以包含至少约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或超过30个核苷酸的序列长度。可替代地或另外地,订书钉寡核苷酸的第一核苷酸序列或第二核苷酸序列可以包含不超过约30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或少于3个核苷酸的序列长度。如本文所阐述,可以选择订书钉寡核苷酸的核苷酸序列的序列长度,以在特定解链温度下提供含有订书钉寡核苷酸的杂交核酸。

[0181] 订书钉寡核苷酸可以包括一个或多个修饰的核苷酸。修饰的核苷酸可以提供结合位点,用于附接另外的组分,诸如结合组分或标记组分。修饰的核苷酸可以增加寡核苷酸对化学降解的稳定性,例如锁定的核酸(LNA)。在核酸纳米结构(诸如SNAP)的组装之前、期间或之后,修饰的核苷酸可以用作另外组分的结合位点。订书钉寡核苷酸可以包括至少约0个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、75个、100个或超过100个修饰的核苷酸。可替代地或另外地,订书钉寡核苷酸可以包括不超过约100个、75个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个、或少于2个修饰的核苷酸。

[0182] 如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含多个核酸,其中所述多个核酸中的每个核酸与所述多个核酸中的一个或多个其他核酸杂交。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含至少5个核酸,其中所述至少5个核酸中的每个核酸与所述至少5个核酸中的一个或多个其

他核酸偶联。核酸纳米结构的多个核酸可以包含支架链,其中所述支架链的特征在于以下的一个或多个特征:i)包含所述多个核酸中的最长核苷酸序列,和ii)被配置为与所述多个核酸中更大量的其他核酸杂交。核酸纳米结构的多个核酸还可以包含一个或多个订书钉寡核苷酸,其中订书钉寡核苷酸的特征在于以下的一个或多个特征:i)包含被配置为与一个或多个其他核酸杂交的两个或更多个非连续核苷酸序列(例如,支架链的一个或多个区域、支架链和第二订书钉寡核苷酸、第二订书钉寡核苷酸和第三订书钉寡核苷酸等),ii)包含两个或更多个非连续核苷酸序列,其被配置为当与一个或多个其他核酸杂交时形成两个或更多个二级和/或三级结构,iii)包含不被配置为与其他核酸杂交的一个或多个核苷酸序列,和iiii)包含一个或多个核苷酸序列,其被配置为约束第一二级和/或三级核酸结构相对于第二二级和/或三级核酸结构的位置、取向和/或运动。

[0183] 图51示出了包含支架链5101和多个订书钉寡核苷酸的核酸纳米结构的示意图,其中所述订书钉寡核苷酸具有多种结构和/或功能作用。核酸纳米结构包含多个结构订书钉寡核苷酸,所述结构订书钉寡核苷酸各自具有以下中的一种或多种特性:i)与支架链5101结合以形成一个或多个三级结构,和ii)形成连接单链核酸,其关于彼此定位和定向核酸纳米结构的两个或更多个三级结构。结构订书钉寡核苷酸包括:1)核酸5104,其与支架链5101结合以形成三级结构区域,2)核酸5107,其在两个核苷酸序列处与支架链5101结合以在核酸纳米结构中形成基本上 180° 弯曲,并且连接通过包含核酸5107的单链核苷酸序列的连接链将核酸5107与支架链5101结合而形成的两个三级结构,3)核酸5108,其在三个非连续核苷酸序列处与支架链5101结合以在核酸纳米结构中形成至少3个三级结构和2个基本上 180° 弯曲,和4)核酸5109,其各自包含与支架链5101互补的第一序列和与另一个核酸5109互补的第二序列以在核酸纳米结构中形成3个三级结构和1个基本上 180° 弯曲。核酸纳米结构还可以包含非核酸结构元件5110,诸如核酸结合蛋白(例如,组蛋白)或纳米颗粒,其中所述非核酸结构元件5110形成或稳定核酸纳米结构的二维和/或三维结构的一部分。核酸纳米结构还包含多个功能性订书钉寡核苷酸,所述结构订书钉寡核苷酸各自具有以下中的一种或多种特性:i)与支架链5101结合以形成一个或多个三级结构,和ii)修饰核酸纳米结构以向核酸纳米结构提供另外的化学和/或物理特性。功能性订书钉寡核苷酸包括:1)核酸5102,其与支架链5101结合以形成三级结构并且包含部分5103(例如,末端配体、非末端配体、末端官能团、非末端官能团、修饰的核苷酸、非核酸聚合物等),2)核酸5105,其结合支架链5101以形成三级结构并且包含可检测标记5106(例如,荧光团、核酸条形码、肽条形码等),3)悬垂核酸5111,其与支架链5101结合以形成三级结构并且包含未偶联的末端残基或核苷酸序列,4)悬垂核酸5112,其包含两个未偶联的末端残基或核苷酸序列和一个中间核苷酸序列,所述中间核苷酸序列与支架链5101结合以形成三级结构,和5)悬垂核酸5113,其包含结合支架链5101以形成三级结构的两个末端核苷酸序列和一个从核酸纳米结构悬垂的中间单链核苷酸序列(包括一个或多个偶联的寡核苷酸5114,其为核酸5113的悬垂部分提供三级结构)。

[0184] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包括核酸折纸。因此,核酸纳米结构可以包括一个或多个核酸,其具有三级或四级结构,诸如球体、笼、管、盒、瓦片、块体、树形、棱锥体、轮状、它们的组合以及任何其他可能的结构。用DNA折纸形成的此类结构的实例在Zhao等人Nano Lett. 11, 2997-3002(2011)进行了阐述,所述文献以引用的方式并入本文。在一些构型中,

核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含支架链和多个订书钉寡核苷酸,其中所述支架链是单个连续核酸链,并且所述订书钉寡核苷酸被配置为全部或部分与支架链结合。在以下文献中阐述了使用连续支架链和几个订书钉链形成的DNA折纸结构的实例:Rothemund Nature 440:297-302(2006)以及美国专利号8,501,923和9,340,416,所述文献中每一篇都以引用的方式并入本文。包含一个或多个核酸的核酸纳米结构(例如,如在折纸或纳米球结构中发现的)可以包含单链核酸区域、双链核酸区域或其组合。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含核酸折纸和除核酸折纸以外的核酸结构。例如,核酸折纸可以与一个或多个单链核酸偶联,其中所述一个或多个单链核酸不形成任何二级和/或三级结构。在有利的构型中,核酸折纸可以包含瓦片结构。核酸折纸的瓦片结构可以是指平均厚度显著小于特征尺寸(例如,边长、边宽、最大直径、平均直径等)的结构。例如,核酸折纸的瓦片结构的特征尺寸与平均厚度之间的长宽比可以为至少约2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、20:1或超过20:1。可替代地或另外地,瓦片结构的特征尺寸与平均厚度之间的长宽比可以为不超过约20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或小于2:1。瓦片结构可以具有诸如基本上矩形瓦片、基本上正方形瓦片、基本上三角形瓦片、基本上圆形瓦片、基本上椭圆形瓦片或基本上多边形瓦片等形状。瓦片可以包含基本平面的一个或多个面。瓦片可以包含基本上非平面的(例如,弯曲的、波纹状的等)一个或多个面。

[0185] 核酸纳米结构(诸如SNAP)可以包含由支架链与多个订书钉寡核苷酸杂交形成的两个或更多个效用面。多个订书钉寡核苷酸与支架链的杂交可以在核酸纳米结构中形成多个三级核酸结构。在一些构型中,多个三级结构可以包含属于第一效用面(例如,展示面)的第一三级结构和属于第二效用面(例如,捕获面)的第二三级结构。核酸纳米结构(例如,SNAP)中的两个三级结构可以关于彼此相对于对称轴或对称平面定向。核酸纳米结构中的两个三级结构可以关于彼此相对于一个或两个三级结构的对称轴或对称平面(诸如核酸双螺旋的共轴对称轴)定向。在第一三级结构和第二三级结构属于不同效用面的一些构型中,第一三级结构的对称轴和第二三级结构的对称轴共面。对于第一三级结构和第二三级结构属于不同效用面的构型,第一三级结构的对称轴和第二三级结构的对称轴可以不共面。在第一三级结构和第二三级结构属于不同效用面的一些构型中,第一三级结构的对称轴和第二三级结构的对称轴可以相交。在第一三级结构和第二三级结构属于不同效用面的一些构型中,第一三级结构的对称轴和第二三级结构的对称轴可以不相交。核酸纳米结构(例如,SNAP)的对称特征可以在核酸纳米结构的平均尺寸、形状或构型方面来确定。特征定位的微小变化(例如,由于核酸纳米结构的螺旋结构和三级结构或者由于环境条件(例如,布朗运动、流体剪切、电磁力等)引起的时间变化)可能导致被设计成具有对称结构的核酸纳米结构的两个相对侧面之间的微小差异。如果两个对称特征相对于对称轴或对称平面位于预期位置的约10%以内,则核酸纳米结构可以被认为是对称的。

[0186] 核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物)还可以包含分子或分析物。任选地,分子或分析物分别是非核酸分子或分析物。在一些构型中,核酸纳米结构的展示部分可以与分子或分析物偶联。例如,在多个SNAP中的每个SNAP已经与分子或分析物偶联之后,所述多个SNAP可以被沉积在阵列上。在其他构型中,核酸纳米结构的展示部分不需要与分子或分析物偶联。例如,在多个SNAP中的每个SNAP已经与分子或分析物偶联之前,所述多个SNAP可以被沉积在阵列上。在一些构型中,分子或分析物可以包含生物分子,所述生物分子选自多

肽、多糖、核酸、脂质、代谢物、酶辅因子及其组合。在一些构型中,分子或分析物可以包含非生物颗粒,所述非生物颗粒选自聚合物、金属、金属氧化物、陶瓷、半导体、矿物及其组合组成的组。

[0187] 核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物)可以包含接头,所述接头被配置为将实体(例如,SNAP、分析物、偶联表面等)与部分(例如,表面相互作用部分、展示部分、捕获部分、表面连接部分等)偶联。接头可以具有至少约100Da、500Da、1kDa、5kDa、10kDa、20kDa、25kDa、50kDa、100kDa、250kDa、500kDa或超过500kDa的尺寸。可替代地或另外地,接头可以具有不超过约500kDa、250kDa、100kDa、50kDa、25kDa、20kDa、10kDa、5kDa、1kDa、500Da、100Da或小于约100Da的尺寸。接头可以包含介导由接头连接的实体与部分之间的相互作用的化学物理特性(例如,疏水性、亲水性、极性、空间尺寸、净电荷等)。例如,SNAP可以包含刚性接头,所述刚性接头将目标分析物与表面分隔开一个分隔距离和/或防止目标分析物与SNAP的表面之间的接触。

[0188] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含功能性核酸。功能性核酸可以给核酸纳米结构带来另外的效用。功能性核酸可以包含核酸条形码,其可以提供标签或信息编码功能,例如,以与功能性核酸共定位的分析物的鉴定序列的形式。如图10A-10D所示,效用部分1040可以包含核酸条形码序列,其可以被转录到与分析物1020相互作用的分子上,反之亦然。可以对效用部分1040或相互作用分子上所含的条形码序列进行测序,以确定分析物1020的特征或先前用途,诸如可能已经与分析物1020发生的任何相互作用。功能性核酸可以包含保留部分,其中所述保留部分包含杂交核酸序列,所述杂交核酸序列被配置为形成短期或弱的相互作用,所述相互作用将相互作用分子暂时共定位于分析物附近以增加观察到相互作用的可能性或降低相互作用分子从分析物解离的速率。杂交核酸序列可以包含与另一个寡核苷酸互补的短区域(例如,少于约20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、或5个核苷酸)、与另一个核酸不完全互补的核酸序列、粘性末端(toehold)序列或促进容易可逆的核酸杂交相互作用的任何其他构型。功能性核酸可以包含核酸序列,所述核酸序列被配置为结合标记的核酸(例如,荧光标记的寡核苷酸)用于诸如检测核酸纳米结构的地址(例如,在固体支持物的位点上)的目的。

[0189] 在另一方面,本文提供了一种形成多路复用分析物阵列的方法,所述方法包括:a)将包含多个位点的阵列与如本文所阐述的第一多个核酸纳米结构接触,其中所述第一多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与第一多个目标分析物中的一个目标分析物偶联;b)将包含所述多个位点的阵列与第二多个核酸纳米结构接触,其中所述第二多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与如本文所阐述的第二多个目标分析物中的一个目标分析物偶联;c)在所述多个位点的第一位点子集沉积第一多个核酸纳米结构;和d)在所述多个位点的第二位点子集沉积第二多个核酸纳米结构,其中所述第一位点子集和所述第二位点子集包含随机空间分布。在一些构型中,所述第一多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构可以包含第一功能性核酸,其中所述第一功能性核酸包含第一核苷酸序列,其中所述第二多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构可以包含第二功能性核酸,其中所述第二功能性核酸包含第二核苷酸序列,并且其中所述第一核苷酸序列不同于所述第二核苷酸序列。在一些构型中,形成多路复用阵列的方法可以包括将阵列同时与第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳米结构接触。例如,阵列可以与包含第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳

米结构的混合物的流体介质接触。在其他构型中,形成多路复用阵列的方法可以包括将阵列依次与第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳米结构接触。在一些构型中,形成多路复用阵列的方法可以包括在阵列上同时沉积第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳米结构。例如,阵列可以与含有第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳米结构的混合物的流体介质接触,然后与促进核酸纳米结构沉积到阵列位点上的第二流体介质接触。在其他构型中,形成多路复用阵列的方法可以包括在阵列上依次沉积第一多个核酸纳米结构和第二多个核酸纳米结构。

[0190] 形成多路复用分析物阵列的方法还可以包括将阵列与第一多种可检测核酸接触的步骤,其中所述第一多种可检测核酸中的每种第一可检测核酸包含第一互补核苷酸序列和可检测标记,其中所述第一互补核苷酸序列与所述第一多个核酸纳米结构中的一个核酸纳米结构的第一功能性核酸的第一核苷酸序列互补。在将阵列与所述第一多种可检测核酸接触之后,形成多路复用分析物阵列的方法还可以包括将第一可检测核酸与每个第一功能性核酸偶联。在将第一可检测核酸与每个第一功能性核酸偶联之后,所述方法还可以包括检测包含第一可检测核酸的阵列的每个地址的步骤,如本文所阐述。在将第一可检测核酸与每个第一功能性核酸偶联之后,所述方法还可以包括从第一功能性核酸中去除第一可检测核酸的步骤。在一些构型中,从第一功能性核酸中去除第一可检测核酸可以包括将第一多个核酸纳米结构中的一个核酸纳米结构加热到第一功能性核酸的至少解链温度,从而使第一可检测核酸与第一功能性核酸解偶联。在其他构型中,从第一功能性核酸中去除第一可检测核酸可以包括将固体支持物与流体介质接触,所述流体介质被配置为任选地在存在加热的情况下将第一可检测核酸与第一功能性核酸分隔开(例如,变性剂、离液剂等)。

[0191] 形成多路复用分析物阵列的方法可以包括将阵列与两个或更多个多种可检测核酸接触。例如,上文所例示的方法还可以包括将阵列与第二多种可检测核酸接触的步骤,其中所述第二多种可检测核酸中的每种第二可检测核酸包含第二互补核苷酸序列和可检测标记,其中所述第二互补核苷酸序列与第二多个核酸纳米结构中的一个核酸纳米结构的第二功能性核酸的第二核苷酸序列互补。在将阵列与所述第二多种可检测核酸接触之后,形成多路复用分析物阵列的方法还可以包括将第二可检测核酸与每个第二功能性核酸偶联。在将第二可检测核酸与每个第二功能性核酸偶联之后,所述方法还可以包括检测包含第二可检测核酸的阵列的每个地址的步骤,如本文所阐述。在将第二可检测核酸与每个第二功能性核酸偶联之后,所述方法还可以包括从第二功能性核酸中去除第二可检测核酸的步骤。在一些构型中,从第二功能性核酸中去除第二可检测核酸可以包括将第二多个核酸纳米结构中的一个核酸纳米结构加热到第二功能性核酸的至少解链温度,从而使第二可检测核酸与第二功能性核酸解偶联。在其他构型中,从第二功能性核酸中去除第二可检测核酸可以包括将固体支持物与流体介质接触,所述流体介质被配置为任选地在存在加热的情况下将第二可检测核酸与第二功能性核酸分隔开(例如,变性剂、离液剂等)。

[0192] 图50A-50F描绘了利用功能性核酸形成感兴趣分析物的多路复用阵列的方法。图50A示出了包含固体支持物5000的阵列,所述固体支持物包含多个位点5001,每个位点与SNAP 5010偶联。将固体支持物5000与多个SNAP 5010接触。多个SNAP 5010的第一子集包含与第一目标分析物5020(例如,来自第一样品的多肽)偶联的SNAP 5010,其中所述第一子集的每个SNAP 5010包含含有CGT核苷酸序列的第一功能性核酸5030。多个SNAP的第二子集包

含与第二目标分析物5025(例如,来自第二样品的多肽)偶联的SNAP 5010,其中所述第二子集每个SNAP 5010包含含有CCA核苷酸序列的第二功能性核酸5035。图50B示出了通过在固体支持物5010上的多个位点5001沉积多个SNAP 5010而形成的多路复用阵列。SNAP 5010的第一子集和SNAP 5010的第二子集包含在多个位点5001的随机空间分布,其中所述第一目标分析物5020和所述第二目标分析物5025在所述阵列上的地址在沉积之后最初是未知的。图50C描绘了将固体支持物5000与第一多种可检测核酸接触,其中每种可检测核酸包含可检测标记5045和具有GCA核苷酸序列的互补核酸5040。图50D描绘了SNAP 5010的多路复用阵列,其中SNAP 5010的第一子集已经通过在第一功能性核酸5030与互补核酸5040之间的碱基对键合偶联了第一多种可检测核酸中的一种可检测核酸。可通过在阵列上的地址处检测可检测标记5045以单分析物分辨率检测包含第一目标分析物5020的每个位点5001。图50E描绘了将固体支持物5000与第二多种可检测核酸接触,其中每种可检测核酸包含可检测标记5046和具有GGT核苷酸序列的互补核酸5041。图50F描绘了SNAP 5010的多路复用阵列,其中SNAP 5010的第二子集已经通过在第二功能性核酸5035与互补核酸5041之间的碱基对键合偶联了第二多种可检测核酸中的一种可检测核酸。可通过在阵列上的地址处检测可检测标记5046以单分析物分辨率检测包含第一目标分析物5025的每个位点5001。在一些构型中,例如通过使用具有不同检测特征(例如,激发波长、发射波长)的可检测标记5045和5046(例如,荧光团),可以同时检测第一目标分析物5020和第二目标分析物5025的地址。

[0193] 如本文所阐述,功能性核酸可以包含被配置为与偶联部分的互补核苷酸序列杂交的核苷酸序列(例如,可检测标记、核酸条形码、保留部分等)。功能性核酸可以包含被配置为与互补核酸形成双链核酸的核苷酸序列,其中所述双链核酸可通过所述双链核酸的解链而破坏。双链功能性核酸可以具有至少约50°C、55°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C或超过99°C的解链温度。可替代地或另外地,双链功能性核酸可以具有不超过约99°C、98°C、97°C、96°C、95°C、94°C、93°C、92°C、91°C、90°C、89°C、88°C、87°C、86°C、85°C、84°C、83°C、82°C、81°C、80°C、79°C、78°C、77°C、76°C、75°C、74°C、73°C、72°C、71°C、70°C、69°C、68°C、67°C、66°C、65°C、64°C、63°C、62°C、61°C、60°C、55°C、50°C或低于50°C的解链温度。在一些构型中,核酸纳米结构的双链功能性核酸的解链温度可以被设计成低于核酸纳米结构的一些或所有其他双链核酸的解链温度。在特定的构型中,核酸纳米结构的双链功能性核酸的解链温度可以被设计成低于核酸纳米结构的一些或所有双链核酸的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或超过95%的解链温度。例如,可以在不会导致含有功能性核酸的核酸纳米结构的组分寡核苷酸损失的解链温度下,将功能性核酸与互补核酸分隔开。在一些构型中,含有功能性核酸的双链核酸的解链温度可以被设计成低于与固体支持物偶联的核酸纳米结构或与固体支持物附接的偶联部分的解离温度(例如,核酸解链温度、配体-受体解离温度、共价键分解温度等)。例如,核酸纳米结构的双链功能性核酸的解链温度可以被设计成比与固体支持物偶联的核酸纳米结构或与固体支持物附接的核酸纳米结构偶联部分的解离温度低至少5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C或超过50°C。

[0194] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含捕获面或捕获部分,其包含改变核酸纳米结构与表面之间的相互作用的一个或多个修饰基团。核酸纳米结构与表面之间改变的相互作用可以包括:1)增加与表面所需区域偶联的速率或强度;2)降低与表面所需区域偶联的速率或强度;3)增强与表面偶联的特异性;4)减少与表面的非特异性偶联;5)降低两个或更多个核酸纳米结构之间的相互作用(例如,聚集、共结合)的强度,和6)它们的组合。在一些构型中,捕获部分可以包含修饰部分,其选自带电部分(例如,阳离子或阴离子部分)、极性部分、非极性部分、被受体识别的配体部分、被配体识别的受体部分、磁性部分、空间部分、两亲部分、疏水部分和亲水部分。在一些构型中,带电部分可以包含单链核酸或带电聚合物(例如,阳离子或阴离子聚合物)。在一些构型中,核酸纳米结构的捕获部分可以包含多个单链核酸,其中所述单链核酸是与核酸纳米结构杂交的较长寡核苷酸的区域(例如尾或环)。在其他构型中,核酸纳米结构的捕获部分可以包含多个单链核酸或带电聚合物,其中所述单链核酸例如通过共价接头(例如,点击型反应产物)或非共价接头(例如,链霉亲和素-生物素复合物)偶联至与核酸纳米结构杂交的寡核苷酸。

[0195] 本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)核酸纳米结构(例如结构化核酸颗粒),其中所述核酸纳米结构包含:i)展示部分,其包含与分析物偶联或被配置为与分析物偶联的偶联基团;和ii)与表面偶联或被配置为与表面偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个第一表面相互作用寡核苷酸,并且其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的每个第一表面相互作用寡核苷酸包含与结构化核酸颗粒偶联的第一核酸和第一表面相互作用部分,其中所述第一表面相互作用部分与表面连接部分偶联或被配置为与表面连接部分形成偶联相互作用,其中所述捕获部分和展示部分具有不同的取向;和b)包含互补偶联基团的分析物,所述互补偶联基团与所述结构化核酸颗粒的展示部分偶联或被配置为与所述结构化核酸颗粒的展示部分偶联。

[0196] 核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物)可以包含具有多个悬垂基团的捕获部分,所述多个悬垂基团介导与表面(例如,固体支持物的偶联表面)的偶联相互作用。如本文所阐述,悬垂基团的特征可能在于以下的一个或多个特征:i)包含未偶联的末端部分或残基,ii)包含其空间自由度不受与核酸纳米结构的第二部分的偶联相互作用约束的部分(例如,聚合物链),和iii)包含其相对于核酸纳米结构的位置的平均时间变化超过掺入核酸纳米结构内的部分的位置的平均时间变化的部分。不希望被理论所束缚,悬垂基团可以促进核酸纳米结构的多种特性,包括1)通过固体支持物上的捕获部分与表面连接部分之间的相互作用而增加的表面偶联特异性,2)由于核酸纳米结构与偶联表面之间的多重结合相互作用而增加的结合亲合力,3)基于添加到核酸纳米结构上的悬垂基团的可调结合动力学,4)基于捕获部分与偶联表面之间自由能最小化的可调结合热力学,5)由于核酸纳米结构捕获部分的结合不相容性而降低的在附带核酸纳米结构之间的相互作用,和6)它们的组合。

[0197] 图40A-40C示出了SNAP组合物,其包括在SNAP的捕获部分上的悬垂基团。图40A显示了SNAP 4010,其包含向上定向的展示面,所述展示面含有与分析物4020(例如,多肽)偶联的展示部分4015。SNAP 4010的向下定向的捕获面包含多个悬垂基团。每个悬垂基团包含任意的接头4017和表面相互作用部分,诸如表面相互作用寡核苷酸4018或表面相互作用偶联基团4019(例如,反应性基团、链霉亲和素等)。SNAP 4010可以与包含偶联表面4002和一个或多个4004的固体支持物4000接触。偶联表面4002可以包含多个表面连接的基团,其中

每个表面连接的基团含有任意的接头4030(例如,钝化分子诸如PEG)和表面连接部分(诸如互补寡核苷酸4038或互补偶联基团4039(例如,互补反应性基团、生物素等))。任性地,表面可以包含表面连接基团的混合物,其中第一多个表面连接基团包含钝化部分(例如,PEG链)而不包含偶联部分,并且第二多个表面连接基团包含偶联部分和钝化部分(例如,偶联至PEG链的寡核苷酸)。图40B显示了SNAP 4010与固体支持物4000的第一偶联构型。一个或多个表面相互作用寡核苷酸4018已经与表面连接的互补寡核苷酸4038杂交,但是一个或多个其他表面相互作用部分仍然未结合。这可能表明偶联的SNAP不处于能量有利的结合位置。图40C显示了SNAP 4010与固体支持物4000的第二偶联构型。每个表面相互作用部分已经与互补的表面连接部分形成偶联相互作用。对于在偶联表面4002上的SNAP 4010,这样的构型可能是能量最大和/或最稳定的位置。

[0198] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含捕获部分,所述捕获部分包含与核酸纳米结构偶联的多个寡核苷酸,并且提供多个悬垂基团,其中每个悬垂基团包含表面相互作用部分。表面相互作用部分可以与固体支持物上的表面连接部分形成偶联相互作用,从而将包含表面连接部分的核酸纳米结构偶联至固体支持物。核酸纳米结构可以包含多个寡核苷酸,其中所述多个寡核苷酸中的一个寡核苷酸包含:a)被配置为与核酸纳米结构的捕获部分偶联的第一核酸,和b)第一表面相互作用部分。在一些构型中,第一表面相互作用部分可以包含第二核酸。例如,多个寡核苷酸中的一个寡核苷酸可以包含第一核酸序列和第二核酸序列,所述第一核酸序列被配置为与SNAP偶联,所述第二核酸序列被配置为通过碱基对杂交与表面连接部分的互补的表面连接核酸链结合。在一些情况下,含有第一核酸序列和第二核酸序列的寡核苷酸还可以包含被配置为不与另一个核酸杂交的第三核酸序列,以便例如根据需要为悬垂基团提供柔性或刚性。在一些构型中,除了第二核酸之外或者代替第二核酸,第一表面相互作用部分可以包含捕获基团,所述捕获基团选自反应性基团、带电基团、磁性基团和结合对的组分。在一些构型中,结合对可以选自自由链霉素-生物素、SpyCatcher-Spytag、SnoopCatcher-Snooptag和SdyCatcher-Sdytag组成的组。在一些构型中,反应性基团可以被配置为与表面连接部分进行点击型反应。在一些构型中,第一表面相互作用部分可以包含被配置为与表面连接部分形成非共价相互作用的基团,其中所述相互作用选自静电相互作用、磁相互作用、氢键合、离子键合、范德华键合、疏水相互作用或亲水相互作用。在特定的构型中,第一表面相互作用部分可以包含选自无机纳米颗粒、碳纳米颗粒、聚合物纳米颗粒和生物聚合物的纳米颗粒。在一些构型中,第一表面相互作用部分还可以包含将表面相互作用部分与核酸纳米结构偶联的接头。在一些构型中,接头可以包含疏水接头、亲水接头或可裂解接头。

[0199] 包含表面相互作用部分的寡核苷酸可以形成核酸纳米结构(例如,SNAP结构)的一部分。核酸纳米结构可以包含a)支架核酸链;和b)与支架核酸链偶联的多条订书钉核酸链。在一些构型中,多条订书钉核酸链可以包含多个第一表面相互作用寡核苷酸中的第一表面相互作用寡核苷酸,其中所述第一表面相互作用寡核苷酸包含表面相互作用部分。第一表面相互作用寡核苷酸的偶联可以形成核酸纳米结构(例如,SNAP)的三级结构。在一些构型中,捕获部分可以包含通过第一表面相互作用寡核苷酸与核酸纳米结构(例如,SNAP)的偶联形成的三级结构。在其他构型中,展示部分可以包含通过第一表面相互作用寡核苷酸与核酸纳米结构的偶联形成的三级结构。

[0200] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含含有多个悬垂基团的捕获部分,其中所述多个悬垂基团中的悬垂基团包含核酸。在一些构型中,悬垂基团可以包含具有不包含自身互补性的核苷酸序列的核酸。这样,在本文所阐述的组合物或方法的条件下,可以抑制表面相互作用寡核苷酸或其他核酸形成自身杂交结构。例如,悬垂核酸的核苷酸序列可以包含具有不超过3个选自脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷的脱氧核糖核苷酸种类的DNA序列(例如,ACTACCTACAT)。在其他构型中,核酸诸如表面相互作用寡核苷酸或悬垂基团可以包含具有自身互补性的核苷酸序列。例如,在本文所阐述的组合物或方法的一些或所有条件下,核酸序列可以形成自身杂交结构,诸如双螺旋、茎环、假结、发夹或G-四链体。本文所阐述的方法可以被配置使得核酸在一个步骤中处于自身杂交形式,而在另一个步骤中不处于自身杂交形式。例如,在方法的第一步骤中,第一核酸可以处于自身杂交状态以抑制与第二核酸链的不需要的杂交,并且在第二步中,第一核酸可以处于单链状态或与第二核酸链杂交。在一些构型中,多个表面相互作用寡核苷酸中的表面相互作用寡核苷酸可以包含选自聚脱氧腺苷序列、聚脱氧胞苷序列、聚脱氧鸟苷序列或聚脱氧胸苷序列的均聚核苷酸序列。被配置为与核酸链的第二部分形成自身互补性的核酸链第一连续序列可以包含至少约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或超过50个连续核苷酸。可替代地或另外地,被配置为与核酸链的第二部分形成自身互补性的核酸链第一连续序列可以包含不超过约50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或少于3个连续核苷酸。被配置为与核酸链的第二部分形成自身互补性的核酸链第一连续序列可以与核酸链的第二部分分隔至少约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、200个、300个、400个、500个、750个、1000个或超过1000个核苷酸。可替代地或另外地,被配置为与核酸链的第二部分形成自身互补性的核酸链第一连续序列可以与核酸链的第二部分分隔不超过约1000个、750个、500个、400个、300个、200个、100个、95个、90个、85个、80个、75个、70个、65个、60个、55个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或少于3个连续核苷酸。

[0201] 表面相互作用部分的悬垂基团的悬垂核酸部分可以包含特定数量的连接核苷酸(例如,天然核苷酸、修饰的核苷酸等)。在一些情况下,表面相互作用部分的核酸部分可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个、60个、70个、80个、90个、100个或超过100个核苷酸。可替代地或另外地,表面相互作用部分的核酸部分可以包含不超过约100个、90个、80个、70个、60个、50个、45个、40个、35个、30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个核苷酸。

[0202] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含具有多个悬垂基团的捕获部分,所述悬垂基团含有表面相互作用部分。捕获部分可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、

9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或超过100个表面相互作用部分。可替代地或另外地,捕获部分可以包含不超过约100个、95个、90个、85个、80个、75个、70个、65个、60个、55个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个表面相互作用部分。核酸纳米结构(例如,SNAP)可以被配置为具有平均表面密度的包含表面相互作用部分(例如,表面相互作用寡核苷酸、表面相互作用反应性基团等)的悬垂基团。核酸纳米结构的表面相互作用部分的平均表面密度可以通过被配置为与固体支持物的偶联表面偶联的表面相互作用部分的数量相对于与偶联表面偶联的核酸纳米结构捕获部分的有效表面积或占用面积来确定。捕获部分的有效表面积可以包括捕获部分在有效平面表面上的二维投影,并且可以任选地包括由来自核酸纳米结构捕获部分的一个或多个悬垂基团的最大延伸引起的另外的表面积。当核酸纳米结构与表面偶联时,核酸纳米结构的占用面积可以包含核酸纳米结构或其捕获部分的最大横截面积。核酸纳米结构(例如,SNAP)的捕获部分可以具有至少0.0001个表面相互作用部分/平方纳米($/\text{nm}^2$)、0.005/ nm^2 、0.001/ nm^2 、0.05/ nm^2 、0.01/ nm^2 、0.05/ nm^2 、0.1/ nm^2 、0.5/ nm^2 、1/ nm^2 、5/ nm^2 、10/ nm^2 或超过10/ nm^2 的平均表面相互作用部分密度。可替代地或另外地,核酸纳米结构的捕获部分可以具有不超过约10/ nm^2 、5/ nm^2 、1/ nm^2 、0.5/ nm^2 、0.1/ nm^2 、0.05/ nm^2 、0.01/ nm^2 、0.005/ nm^2 、0.001/ nm^2 、0.0005/ nm^2 、0.0001/ nm^2 或小于0.0001/ nm^2 的平均表面相互作用部分密度。

[0203] 多个表面相互作用部分可以分布或间隔在核酸纳米结构(例如,SNAP)的捕获部分上。在一些构型中,表面相互作用部分的分布或密度在捕获部分的有效表面积或占用面积上是基本上均匀的(例如,在相邻表面相互作用部分之间几乎均匀的间隔和/或取向)。在其他构型中,表面相互作用部分的分布或密度在捕获部分的有效表面积或占用面积上是基本上均匀的。例如,多个表面相互作用部分的级分或全部可以位于捕获部分的中心区域附近。在另一种构型中,多个表面相互作用部分的级分或全部可以位于捕获部分的外部区域附近。图41A-41B描绘了具有不同SNAP分布的SNAP构型。图41A描绘了SNAP 4110,其与分析物4120偶联并且在捕获部分上含有多个表面相互作用部分4118,其中所述多个表面相互作用部分朝向捕获部分面的外边缘分布。图41B描绘了SNAP 4110,其与分析物4120偶联并且在捕获部分上含有多个表面相互作用部分4118,其中所述多个表面相互作用部分朝向捕获部分面的中心部分分布。

[0204] 在一些构型中,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含捕获部分,所述捕获部分包含超过一种类型的表面相互作用部分。捕获部分可以包含超过一种类型的表面相互作用部分,以增加核酸纳米结构的结合位置的特异性。例如,SNAP可以包含多个表面相互作用寡核苷酸和一个或多个表面相互作用反应性基团。在特定的实例中,这样的SNAP可以与包含高表面密度的互补寡核苷酸和低表面密度的互补反应性基团的偶联表面接触,其中在表面相互作用寡核苷酸与互补寡核苷酸之间的结合相互作用保持SNAP在偶联表面附近偶联,直到在表面相互作用反应性基团与相对稀有的表面连接的互补反应性基团之间形成共价结合相互作用。核酸纳米结构可以通过多种相互作用类型的组合(诸如通过两种不同的非共价相互作用(例如,核酸杂交和静电相互作用等)、两种不同的共价相互作用(例如,两种生物正交点击型反应)、或者共价相互作用和非共价相互作用的组合(例如,共价相互作用和核

酸杂交、共价相互作用和静电相互作用、共价相互作用与核酸杂交和静电相互作用等)与表面相互作用。

[0205] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)核酸纳米结构(例如,SNAP),其中所述核酸纳米结构包含:i)展示部分,其与分析物偶联或被配置为与分析物偶联;和ii)与偶联表面偶联或被配置为与偶联表面偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个寡核苷酸,并且其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分;b)与展示部分偶联的分析物;和c)包含偶联表面的固体支持物,其中所述表面包含一个或多个表面连接部分,并且其中所述多个表面相互作用部分中的表面相互作用部分与一个或多个表面连接部分中的表面连接部分偶联。

[0206] 如本文所阐述,核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物)还可以包含分隔基团。分隔基团可以包含分子、接头或核酸纳米结构(例如,展示SNAP或结构SNAP),其被配置为在分析物与核酸纳米结构的表面或一部分(例如,展示面或展示部分、捕获面或捕获部分)之间产生分隔或间隙。图29示出了包含分析物的SNAP复合物的轮廓图,其中标记了各种可能的分隔间隙。SNAP复合物可以包含捕获效用SNAP 2910、2911和2912,其将复合物偶联至固体支持物2900。展示SNAP 2930偶联至结构效用SNAP 2920,所述结构效用SNAP偶联至捕获效用SNAP 2911。分析物2940偶联至展示SNAP 2930。可以测量从分析物到表面或SNAP的分隔间隙。一些可能的分隔间隙可以包括从分析物2940的中心到固体支持物2900的间隙(g_1)、到捕获效用SNAP 2910的顶面的间隙(g_2)或到展示SNAP 2930的顶面的间隙(g_3);在分析物2940的外表面与固体支持物2900的表面之间的间隙(g_4);在分析物2940的外表面与捕获效用SNAP 2910的表面之间的间隙(g_5);或在分析物2940的外表面与展示SNAP 2930的表面之间的间隙(g_6)。图3A-3D示出了包含多价接头320的SNAP 300,所述接头在分析物310与SNAP300的上表面之间产生平均分隔间隙。如果SNAP300与固体支持物330偶联,分析物310也将与固体支持物330具有平均分隔间隙。在一些构型中,分隔基团可以包含选自下组的刚性分隔基团,所述组包含聚合物接头、核酸接头和纳米颗粒接头。在一些特定的构型中,核酸接头包含三级结构(例如,DNA双螺旋)。在其他构型中,分隔基团包含柔性接头。分隔间隙可以具有最小尺寸的特征性平均值、最大值。分隔间隙的平均尺寸、最大尺寸或最小尺寸可以为至少约1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm或超过100nm。可替代地或另外地,分隔间隙的平均尺寸、最大尺寸或最小尺寸可以为不超过约100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、19nm、18nm、17nm、16nm、15nm、14nm、13nm、12nm、11nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm或小于1nm。

[0207] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含通过互补碱基对结合形成稳定杂交结构的多个核酸(例如,支架链、多个寡核苷酸)。特定杂交结构的稳定性可以通过常规方法来表征,诸如通过互补程度或估计或测量的二级结构解链温度。稳定性(例如,解链温度)可以通过软件包(诸如CADNANO、ATHENA或DAEDALUS)预测。杂交核酸结构可以具有至少约50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C或超过90°C的特征性解链温度。可替代地

或另外地,杂交核酸结构可以具有不超过约90℃、89℃、88℃、87℃、86℃、85℃、84℃、83℃、82℃、81℃、80℃、79℃、78℃、77℃、76℃、75℃、74℃、73℃、72℃、71℃、70℃、69℃、68℃、67℃、66℃、65℃、64℃、63℃、62℃、61℃、60℃、59℃、58℃、57℃、56℃、55℃、54℃、53℃、52℃、51℃、50℃或低于50℃的特征性解链温度。

[0208] 核酸纳米结构(例如,SNAP)或核酸纳米结构的面(例如,展示面、捕获面)可以具有特征性尺寸(例如,长度、宽度、半径)。特征性尺寸可以包括与组或探针尺寸相关的任何特征测量,诸如长度、宽度、高度、半径、周长等。核酸纳米结构或核酸纳米结构的面可以具有至少约5nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、120nm、140nm、160nm、180nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1000nm或超过1000nm的特征性尺寸。可替代地或另外地,核酸纳米结构或核酸纳米结构的面可以具有不超过约1000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、450nm、400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、180nm、160nm、140nm、120nm、100nm、95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、10nm、5nm或小于5nm的特征性尺寸。

[0209] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以与一种或多种分析物偶联,或者被配置为与一种或多种分析物偶联。核酸纳米结构可以包含与一种或多种分析物偶联或被配置为与一种或多种分析物偶联的一个或多个展示面或展示部分。核酸纳米结构可以与一种或多种分析物偶联。核酸纳米结构可以包含与一种或多种分析物偶联的一个或多个展示面或展示部分。核酸纳米结构展示面或展示部分可以包含一个或多个被配置为与分析物偶联的官能团或部分。当存在多个官能团时,官能团可以是彼此相同的类型,或者可替代地,可以存在不同的官能团。核酸纳米结构可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或超过100个官能团或部分。可替代地或另外地,核酸纳米结构可以包含不超过约100个、95个、90个、85个、80个、75个、70个、65个、60个、55个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于约2个被配置为与分析物偶联的官能团或部分。

[0210] 多个核酸纳米结构(例如,SNAP)和多种分析物可以按固定的分子比偶联。分析物与核酸纳米结构的比率可以计算为平均比率。分析物:纳米结构比率可以遵循一些可定量的分布,诸如泊松分布、二项式分布、 β 二项式分布、超几何分布或双峰分布。在一些构型中,平均而言,可能有超过一个分析物与核酸纳米结构偶联。在一些构型中,平均而言,可能有超过一个核酸纳米结构与分析物偶联。多个分析物偶联的核酸纳米结构可以具有不超过约100:1、50:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1.5:1、1:1、1:1.5、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:50、1:100或小于1:100的平均分析物:纳米结构比率。可替代地或另外地,多个分析物偶联的核酸纳米结构可以具有至少约1:100、1:50、1:25、1:20、1:15、1:10、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1.5、1:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、50:1、100:1或超过100:1的平均分析物:纳米结构比率。

[0211] 多个核酸纳米结构(例如,SNAP)可以通过占据比率来表征。占据比率可以定义为具有至少一个偶联分析物的核酸纳米结构的分数。通过在分析物偶联期间增加分析物与核

酸纳米结构的相对比率,可以控制核酸纳米结构的占据比率,以提供所需的占据比率(诸如最大占据率)。可以控制核酸纳米结构的占据比率,以通过例如在分析物偶联期间降低分析物相对于核酸纳米结构的浓度来最小化具有超过一个分析物的核酸纳米结构的数量。例如,70% SNAP与一种或多种分析物偶联的SNAP组合物将具有0.7的占据比率。占据比率可以通过适当的分析技术(诸如荧光显微术或光谱分析)来确定。多个核酸纳米结构可以具有至少约0.01、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99或超过0.99的占据比率。可替代地或另外地,多个核酸纳米结构可以具有不超过约0.99、0.98、0.97、0.96、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.01或小于约0.01的占据比率。

[0212] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)还可以包含捕获面。捕获面可以被配置为促进表面或界面之间的相互作用,诸如结合相互作用或相分离相互作用。表面可以是任何固体和/或刚性边界,其中所述核酸纳米结构基本上被抑制或不能正交转移通过固体和/或刚性边界。界面可以是指非固体或可变形边界,其中所述核酸纳米结构可以正交转移通过非固体或可变形边界。表面可以包含固体材料(诸如金属、金属氧化物、陶瓷、玻璃、聚合物或半导体)的表面。界面可以包含空气/液体或液体/液体相边界。示例性界面可以包括空气/水界面,或水/油界面,诸如水包油或油包水乳液。捕获面或捕获部分可以被配置为与表面形成可逆或不可逆相互作用。例如,SNAP的捕获面可以包含一条或多条单链核酸链,其被配置为与展示在表面上的互补单链核酸杂交,从而将SNAP可逆地偶联至表面。在另一个实例中,SNAP的捕获面可以包含一个或多个点击型反应性基团,其被配置为共价结合至在表面上展示的互补点击型反应性基团,从而将SNAP不可逆地偶联至表面。在一些构型中,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含含有第一部分和第二部分的捕获面,其中所述第一部分被配置为可逆地偶联至表面,并且所述第二部分被配置为不可逆地偶联至表面。在一些情况下,核酸纳米结构可以被配置为提供与固体支持物的暂时缔合。例如,SNAP可以被配置为可逆地偶联分析物(例如,通过与SNAP结构杂交的寡核苷酸),然后暂时地结合到固体支持物的表面,从而允许分析物被转移到表面上的分析物偶联部分(例如,互补寡核苷酸、点击型反应性基团等)。在分析物已经转移到表面上之后,SNAP可以被解离并任选地重新用于将第二分析物转移到固体支持物上。

[0213] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以通过将核酸纳米结构与表面或界面缔合的相互作用来与表面或界面相互作用。核酸纳米结构可以通过结合相互作用,诸如静电相互作用、磁相互作用、共价键或非共价键(例如,氢键合、核酸碱基对结合)与表面或界面缔合。核酸纳米结构可以包含被配置为在相边界处实现相分离的一个或多个面。例如,SNAP可以包含含有多个疏水部分的第一面和含有多个亲水部分的第二面,其中所述SNAP被配置为通过将第一面分离成更疏水的相而与相边界缔合。

[0214] 图4A-4G显示了与表面或界面相互作用的SNAP的各种构型。图4A示出了与分析物420偶联的SNAP 410,其经由静电相互作用与表面430相互作用。SNAP可以包含带负电荷的捕获面412,其可以被吸引到带正电荷的表面430,例如用带正电荷的官能团432官能化的表面430。SNAP的负电荷可能是由于核酸的磷酸二酯骨架中存在的负电荷或与SNAP缀合的带负电荷部分中的一者或两者。图4B示出了与分析物420(例如,多肽)偶联的SNAP 410,其经

由磁相互作用与表面430相互作用。SNAP可以包含含有多个磁性基团(例如,与SNAP缀合的顺磁性颗粒)的捕获面412,所述磁性基团可以被吸引到表面430,例如包含多个相反极化的磁性基团438的表面430。图4C示出了与分析物420(例如,多肽)偶联的SNAP 410,其通过互补寡核苷酸之间的非共价结合相互作用与表面430相互作用。SNAP 410包含捕获面412,所述捕获面包含与偶联至表面430的多个互补寡核苷酸434杂交的多个寡核苷酸414。图4D示出了与分析物420(例如,多肽)偶联的SNAP 410,所述分析物共价缀合至表面430。在表面430和SNAP 410的捕获面412上的互补反应性基团之间可以形成共价键435,所述互补反应性基团诸如点击反应性基团(例如,甲基四嗪-反式环辛烯、叠氮化物-二苯并环辛炔等)。在一些构型中,SNAP 410可以包含在捕获面412上的多个反应性基团,其被配置为形成共价键430。

[0215] 图4E-4F描绘了与界面(例如,水/空气或水/油)相互作用的SNAP的构型。SNAP可以通过相分离相互作用与界面缔合。图4E描绘了与分析物420偶联的SNAP 410,其包含含有多个疏水基团417(例如,脂质)的捕获面412。疏水基团417的存在使SNAP 410与在非水相444与水相448之间形成的界面440缔合。疏水基团417可以优先迁移到非水相444中,而更亲水的SNAP 410和分析物420可以保留在水相448中。图4F描绘了界面缔合的SNAP 410的替代构型。图4F描绘了与分析物420偶联的SNAP 410,其包含含有多个疏水基团417的捕获面412。所述SNAP还被配置为使得所述捕获面412也是所述SNAP的展示面。疏水基团417的存在使SNAP 410与在非水相444与水相448之间形成的界面440缔合。疏水基团417和分析物420可以优先迁移到非水相444中,而更亲水的SNAP 410可以保留在水相448中。图4F的构型可能有利于展示疏水分析物(例如,膜蛋白、无机纳米颗粒)。

[0216] 图4G描绘了通过离子介导的偶联相互作用与表面430相互作用的与分析物420偶联的SNAP 410的构型。SNAP可以包含带负电荷的捕获面412,其可以被吸引到表面430,例如用带负电荷的官能团433官能化的表面430。在其他构型中,表面材料可以具有固有的负电荷。SNAP 410的负电荷可能是由于核酸的磷酸二酯骨架中存在的负电荷或由于与SNAP缀合的带负电荷部分。SNAP 410的捕获面412与带负电荷的官能团433之间的固有排斥可以通过将带正电荷的离子450复合或分层以在SNAP 410与表面430之间形成离子介导层来克服。技术人员将容易地认识到,离子介导的相互作用可以针对其他情况(诸如介导正-正电荷相互作用或改变正-负电荷相互作用的强度)进行修改。通过离子介导的电荷相互作用在表面沉积SNAP可以在以下物质的存在下发生:特定的单原子离子、多原子离子、单价离子、多价离子、金属离子或非金属离子,诸如 H^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 H^- 、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 O^{2-} 、 S^{2-} 、 N^{3-} 、 P^{3-} 、 $B(OH)_4^-$ 、 $C_2H_5O^-$ 、 CH_3COO^- 、 $C_6H_5COO^-$ 、 $C_6H_5O_7^{3-}$ 、 CO_3^{2-} 、 $C_2O_4^{2-}$ 、 CN^- 、 CrO_4^{2-} 、 $Cr_2O_7^{2-}$ 、 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} 、 $H_2PO_4^-$ 、 HSO_4^- 、 MnO_4^{2-} 、 MnO_4^- 、 NH_2^- 、 O_2^{2-} 、 OH^- 、 SH^- 、 SCN^- 、 SiO_4^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $C(NH_2)^{3+}$ 、 NH_4^+ 、 PH_4^+ 、 H_3O^+ 、 H_2F^+ 、 $C_5H_5O^+$ 、 Hg_2^{2+} 或其组合。图4H描绘了通过颗粒介导的偶联相互作用与表面430相互作用的与分析物420偶联的SNAP 410的构型。SNAP可以包含带正电荷的捕获面412(例如,包含一个或多个胺化的捕获部分),其可以被表面430固有地排斥,例如被带正电荷的官能团433(例如,胺化的硅烷)官能化的表面430。中间带负电荷的颗粒460可以通过钝化表面正电荷并提供静电偶联SNAP 410的带正电荷的捕获面412的负电荷来促进SNAP 410与表面430之间的相互作用。带负电荷的颗粒460可以包括羧基化无机纳米颗粒(例如,羧基化金纳米颗粒、羧基化银纳米颗粒等)或羧基化

有机纳米颗粒(例如,羧基化葡聚糖纳米颗粒、羧基化聚苯乙烯颗粒等)。

[0217] 在一些构型中,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以是结构化的以抑制或避免形成电荷介导的相互作用。由于电荷介导的相互作用,例如通过沉积缓冲液的离子组分,核酸纳米结构可以非特异性地被吸引到假定不发生沉积的表面区域。核酸纳米结构可以被配置为在捕获面或捕获部分上展示破坏不想要的相互作用的配体或其他基团。例如,SNAP可以包含一个或多个单链核酸(例如,与SNAP结构部分杂交的寡核苷酸的悬垂尾),其破坏电荷介导的相互作用的形成。在另一个实例中,SNAP可以包含含有一个或多个寡核苷酸的捕获部分,其中每个寡核苷酸包含被配置为破坏电荷介导的相互作用的形成的修饰的核苷酸。修饰的核苷酸可以是化学同质的(例如,相同的电荷、相同的结构、相同的极性等)或者可以是化学异质的。

[0218] 核酸纳米结构(例如,SNAP)的捕获面可以被配置为介导核酸纳米结构与表面或界面之间的关联缔合。核酸纳米结构的构型可以决定核酸纳米结构与表面或界面之间的缔合强度。核酸纳米结构可以与表面或界面具有可逆或不可逆的缔合。核酸纳米结构与表面或界面之间的不可逆缔合可以通过共价键合或非常强的非共价相互作用(例如,链霉亲和素-生物素)形成。核酸纳米结构与表面或界面之间的可逆缔合可以通过较弱的相互作用(诸如静电相互作用、磁相互作用或氢键合)形成。可逆缔合可以是稳定的,直到其被破坏,例如通过变性剂或盐的引入或光偶联剂的裂解。

[0219] 核酸纳米结构捕获面的尺寸和/或构象可能影响核酸纳米结构与表面或界面之间的缔合强度。捕获面与表面或界面之间较小的相互作用区域可以促进核酸纳米结构与表面或界面之间较弱的相互作用。捕获面或捕获部分可以包含一个或多个三级核酸结构,其与表面形成相互作用,诸如静电相互作用。捕获面或捕获部分中三级结构的尺寸或数量的增加可以增加与表面相互作用的强度。例如,捕获部分中核酸三级结构的尺寸增加、数量增加或局部密度增加可以增加捕获部分与表面之间的静电相互作用的强度,这是由于每个三级结构的核酸骨架中带负电荷的磷酸二酯基团的数量增加。图5A-5D描绘了具有不同捕获面尺寸和/或构象的SNAP的各种构型。图5A和5B描绘了在展示面与捕获面之间具有不同二维投影的锥形SNAP结构。图5A描绘了与表面530结合的SNAP 510。SNAP包含较大的展示面520,其包含展示部分522。SNAP还包含捕获面540,其面积小于展示面520的面积。捕获面540与表面530形成小的相互作用区域545,可能导致在SNAP 510与表面530之间较弱的缔合。图5B描绘了与表面530结合的SNAP 510。SNAP包含较小的展示面520,其包含分析物缀合位点522。SNAP还包含捕获面540,其面积大于展示面520的面积。捕获面540与表面530形成大的相互作用区域545,任性地导致SNAP 510与表面530之间较强的缔合。图5C描绘了包含将SNAP 510与表面530缔合的非平面捕获面540的SNAP 510。SNAP包含含有展示部分522的较大展示面520。由于非平面捕获面,SNAP与表面530形成更小的相互作用区域545,任性地导致在SNAP 510与表面530之间较弱的缔合。图5D描绘了包含将SNAP 510与非平面表面535缔合的非平面捕获面540的SNAP 510。SNAP包含含有捕获部分522的展示面520。由于捕获面540与非平面表面535之间的形状互补,SNAP与表面535形成较大的相互作用区域545,可能导致SNAP 510与表面535之间较强的缔合。因此,核酸纳米结构(例如,SNAP)捕获面的尺寸和/或形状可用于在表面上定向核酸纳米结构。表面可以用相互作用区域图案化,以提供对表面上核酸纳米结构的位置和/或取向的进一步控制。例如,核酸纳米结构的六边形阵列可以通

过将纳米结构附接到具有相互作用区域六边形图案的表面上来形成,其中所述相互作用区域被对结合纳米结构呈惰性的间隙区域分隔开。此外,对表面和多个核酸纳米结构中之一者或两者的尺寸和/或形状进行工程化可以提供对核酸纳米结构在阵列中的排列的控制。因此,用户可以实现阵列中核酸纳米结构的所需密度、阵列中核酸纳米结构的平均间隔、阵列中相邻核酸纳米结构之间的最小分隔或阵列中相邻核酸纳米结构之间的最大分隔。因此,也将相应地排列与核酸纳米结构缀合的分析物。

[0220] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含形成比其二维投影更小的相互作用区域的捕获面。图6描绘了矩形形状的SNAP 600的底表面和顶表面的视图。顶视图与底视图之间的边缘的对应由虚线表示。SNAP 600包含捕获面610,其被配置为仅接触SNAP 600周界周围的表面或界面(未示出)。SNAP还包含展示面620,其包含展示部分622。展示面620占据了SNAP 600的顶面的整个区域。图6中所描绘的构型将限制SNAP 600与表面或界面之间缔合的尺寸和/或强度,同时最大化用于分析物展示的可用区域。本领域技术人员将容易认识到,通过改变构成SNAP 600的结构化核酸组分,图6中所描绘的构型可以被重新配置以增加或减小捕获面610和展示表面620的尺寸。

[0221] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含含有一个或多个修饰部分的效用面或效用部分。在一些构型中,效用面可以包含另一个面(诸如展示面或捕获面)的全部或部分。可以将修饰部分添加到捕获面或捕获部分,以改变表面的特征,同时介导核酸纳米结构与表面之间、核酸纳米结构与界面之间、第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构之间、或核酸纳米结构与符合的分子(例如,亲和试剂、荧光团等)之间的缔合。修饰部分可以共价或非共价地附接。修饰部分可以在纳米结构组装之前、期间或之后与核酸纳米结构偶联。效用表面改性基团可以包括带电部分、磁性部分、空间部分、两亲部分、光学部分(例如,反射材料、吸收材料)、疏水部分和亲水部分。带电部分可以包括可以携带固有的正电荷或负电荷的官能团,或者可以在解离条件(例如,羧酸、硝酸盐、砷、磷酸盐、磷酸盐等)下携带电荷。磁性部分可以包括顺磁性、反磁性和铁磁性颗粒,诸如纳米颗粒(例如,钆、锰、氧化铁、铋、金、银、钴纳米颗粒等)。空间部分可以包括聚合物和生物聚合物(例如,PEG、PEO、葡聚糖、剪切的核酸)。两亲性部分可以包括磷脂(例如,磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰肌醇磷酸盐、磷脂酰肌醇磷酸氢盐、磷脂酰肌醇三磷酸盐、神经酰胺磷酸胆碱、神经酰胺磷酸乙醇胺、神经酰胺磷酸酯)、糖脂(例如,甘油糖脂、鞘糖脂、鼠李糖脂等)以及甾醇(例如,胆固醇、菜油甾醇、谷甾醇、豆甾醇、麦角固醇等)。疏水部分可以包括类固醇(例如,胆固醇)、饱和脂肪酸(例如,辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、木蜡酸、蜡酸等)以及不饱和脂肪酸(例如,肉豆蔻油酸、棕榈油酸、十六碳烯酸(sapienic acid)、油酸、反油酸、异油酸(vaccenic acid)、亚油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸等)。亲水化合物可以包括带电荷的分子和极性分子(例如,二醇、环糊精、纤维素、聚丙烯酰胺等)。

[0222] 在一些构型中,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含效用面或效用部分,其包含一个或多个可延伸的核酸(例如,核酸引物)或延伸的核酸(例如,延伸的核酸引物)。引物或其他可延伸的核酸末端可以与模板链杂交以指导基于聚合酶的延伸。然而,延伸不需要涉及例如通过模板指导的聚合酶添加核苷酸,而是涉及通过末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)添加核苷酸或通过连接酶添加寡核苷酸。任选地,除了待

延伸的给定引物之外,核酸纳米结构中的一些或所有核酸末端可以是不可延伸的,例如,由于5'或3'延伸封闭部分的存在。因此,延伸可以选择性地发生在给定的引物处而不是其他末端处。示例性的延伸封闭部分包括但不限于在核酸合成测序反应中使用的那些,诸如可逆终止子。可逆终止子部分可能特别有用,因为它们可以存在于第一核酸上以防止其在第二核酸末端延伸期间的延伸,然后从第一末端去除使其可延伸。

[0223] 延伸的核酸可以被配置为占据核酸纳米结构周围的体积和/或排除其他分子(例如,其他SNAP、分析物等)接近或接触核酸纳米结构。延伸的核酸可以包含单链核酸链、双链核酸链或其组合。延伸的核酸可以包含二级结构(例如,螺旋结构)。延伸的核酸可以包含随机或无序结构的区域。延伸的核酸链可以掺入修饰的或非天然的核苷酸、或其他连接部分。延伸的核酸可以通过诸如末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)聚合的方法形成。形成延伸的核酸的方法在Yang等人*Angewandte Chemie Int.Ed.*,10.1002/anie.202107829,(2021)(其以引用的方式整体并入本文)有所描述。延伸的核酸可以具有包含至少约100个、200个、300个、400个、500个、750个、1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、4000个、5000个、10000个、15000个、20000个或超过20000个核苷酸的序列。可替代地或另外地,延伸的核酸可以具有包含不超过约20000个、15000个、10000个、5000个、4000个、3000个、2500个、2000个、1500个、1000个、750个、500个、400个、300个、200个、100个、或少于100个核苷酸的序列。延伸的核酸在延伸或浓缩的状态(例如,卷曲、自身杂交等)下可以具有至少约10纳米(nm)、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、140nm、160nm、180nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm或超过500nm的长度。可替代地或另外地,延伸的核酸在延伸或浓缩的状态(例如,卷曲、自身杂交等)下可以具有不超过约500nm、450nm、400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、180nm、160nm、140nm、120nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm或小于10nm的长度。

[0224] 核酸纳米结构(例如,SNAP)的效用面或效用部分可以包含一个或多个修饰部分。核酸纳米结构的效用面可以包含至少约10个、50个、100个、500个、1000个、5000个、10000个、50000个、100000个、500000个、1000000个、或超过1000000个修饰基团。可替代地或另外地,核酸纳米结构的效用面可以包含不超过约1000000个、500000个、100000个、50000个、10000个、5000个、1000个、500个、100个、50个、10个、或少于10个修饰基团。

[0225] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含具有特征密度的修饰部分的效用面。修饰部分密度可以是指在核酸纳米结构效用面上的修饰部分的平均或局部区域密度。核酸纳米结构的效用面可以具有不超过约1个基团/nm²、1个基团/10nm²、1个基团/100nm²、1个基团/1000nm²、1个基团/10000nm²、1个基团/100000nm²、1个基团/1000000nm²或少于1个基团/1000000nm²的修饰部分密度。可替代地或另外地,核酸纳米结构的效用面可以具有至少约1个基团/1000000nm²、1个基团/100000nm²、1个基团/10000nm²、1个基团/1000nm²、1个基团/100nm²、1个基团/10nm²、1个基团/nm²或超过1个基团/nm²的修饰部分密度。

[0226] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个可检测标记,例如在纳米结构的效用面上。可检测标记可以包含被配置为提供或传递信号的基团。可检测标记可以实时(例如,荧光团、放射性标记)或在稍后的时间(例如,条形码)提供或传递信号。可检测标记可以包含选自荧光基团、发光基团、放射性标记、同位素和条形码的可检测标记。本领域已知的多种荧光标记中的任何一种都可以用于标记探针。在一些情况下,荧光标

记可以是小分子。在一些情况下,荧光标记可以是蛋白质。在一些情况下,荧光标记可以是纳米颗粒(例如,量子点、荧光标记的聚合物纳米颗粒等)。荧光标记可以包括发射紫外光谱、可见光谱或红外光谱的标记。在一些情况下,荧光分子可以选自由FITC、Alexa Fluor® 350、Alexa Fluor® 405、Alexa Fluor® 488、Alexa Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Alexa Fluor® 568、Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 647、Alexa Fluor® 680、Alexa Fluor® 750、太平洋蓝、香豆素、BODIPY FL、太平洋绿、俄勒冈绿、Cy3、Cy5、太平洋橙、TRITC、德克萨斯红、R-藻红蛋白和别藻蓝蛋白(APC)组成的组。在一些情况下,标记可以是Atto染料,例如Atto 390、Atto 425、Atto 430、Atto 465、Atto 488、Atto 490、Atto 495、Atto 514、Atto 520、Atto 532、Atto 540、Atto 550、Atto 565、Atto 580、Atto 590、Atto 594、Atto 610、Atto 611、Atto 612、Atto 620、Atto 633、Atto 635、Atto 647、Atto 655、Atto 680、Atto 700、Atto 725、Atto 740、Atto MB2、Atto Oxal2、Atto Rho101、Atto Rho12、Atto Rho13、Atto Rho14、Atto Rho3B、Atto Rho6G或Atto Thio12。多种有效的荧光标记基团可以从ThermoFisher Scientific的Molecular Probes部门商购获得,并且在Molecular Probes Handbook(第11版)(其以引用的方式并入本文)中有一般性描述。可检测标记也可以包括嵌入染料,诸如溴化乙锭、溴化丙锭、结晶紫、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、7-氨基放线菌素D(7-AAD)、Hoescht 33258、Hoescht 33342、Hoescht 34580、YOYO-1、DiYO-1、TOTO-1、DiTO-1或其组合。

[0227] 如本文所述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含三维结构。核酸纳米结构可以包含多个面,包括展示面、结合面和另外的效用面。在一些构型中,效用面可以位于构成核酸纳米结构的高度或深度的核酸纳米结构区域上。效用面可以用于多种目的中的任何一种,包括将核酸纳米结构与其他结构偶联或在核酸纳米结构和其他结构或分子之间提供间隔。效用面可以包含一个或多个修饰基团。效用面修饰基团可以共价或非共价附接。在组装核酸纳米结构之前、期间或之后,可以将效用面修饰基团偶联至核酸纳米结构。效用面修饰基团可以包括带电部分、磁性部分、空间部分、疏水部分、亲水部分和偶联基团。偶联基团可以包含被配置为将核酸纳米结构偶联至固体支持物或另一个分子(诸如另一个核酸纳米结构)上的任何基团。偶联基团可以包括共价偶联基团和非共价偶联基团。共价偶联基团可以包括化学活性物质,诸如点击反应基团和交联分子。交联分子可以包括化学交联分子和光引发的交联分子。非共价偶联基团可以包括结合对(例如,链霉亲和素-生物素)和被配置为与其他分子上的互补核酸碱基配对的核酸。核酸纳米结构(例如,SNAP)、要与核酸纳米结构缀合的分子或要与核酸纳米结构缀合的固体支持物可以包括多种偶联基团中的任何一种,所述多种偶联基团诸如美国专利申请序列号17/062,405或WO 2019/195633 A1(所述专利中的每一个均以引用的方式并入本文)中所述的那些。核酸纳米结构的效用面可以包含阻碍其他分子接近核酸纳米结构附近的一个或多个位阻基团,如由一个或多个位阻基团的尺寸所决定。

[0228] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个偶联面或偶联部分。效用面或效用部分可以包含一个或多个官能团或部分,其被配置为将第一核酸纳米结构偶联至第二核酸纳米结构。偶联部分可以包括本文所述的那些,例如在效用面的上下文中。在核酸纳米结构(例如,展示SNAP和间隔SNAP)之间或在核酸纳米结构复合物之间的偶联可以通过在每对形成核酸纳米结构上偶联部分的互补组的可逆或不可逆结合来形成。互补核酸纳米结构

的可逆结合可以经由非共价键(例如,核酸杂交、氢键合)或热力学可逆共价键(例如,过氧化物键、二硫键)发生。核酸纳米结构或其复合物可以包含一个或多个偶联基团,其被配置为与在第二核酸纳米结构或其复合物上的一个或多个互补偶联部分偶联。核酸纳米结构或其复合物可以包含含有一个或多个偶联部分的一个或多个面,所述一个或多个偶联部分被配置为与在第二核酸纳米结构或其复合物的面上的一个或多个互补偶联部分偶联。核酸纳米结构或其复合物可以包含多个偶联部分,其被配置为与在第二核酸纳米结构或其复合物上的多个互补偶联部分偶联。在一些构型中,核酸纳米结构或其复合物可以包含多个偶联部分,以确保与互补核酸纳米结构或其复合物形成至少一个偶联相互作用,但优选地超过一个偶联相互作用。

[0229] 核酸纳米结构可以包含多个偶联面或偶联部分,其被配置为将所述核酸纳米结构偶联至多个核酸纳米结构。例如,正方形或矩形形状的SNAP可以包含四个偶联面,每个偶联面沿着包含所述正方形或矩形的四条边之一配置。偶联面可以包含一个或多个官能团或部分,其被配置为将第一核酸纳米结构偶联至第二核酸纳米结构。例如,偶联面或偶联部分可以包含多个单链核酸,其被配置为与在第二偶联面或偶联部分上的多个互补单链核酸杂交,从而将第一偶联面偶联至第二偶联面。在另一个实例中,偶联面可以包含单个链霉亲和素分子,其被配置为结合第二偶联面上的生物素分子,从而将第一偶联面偶联至第二偶联面。在一些构型中,第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构的偶联可以包含介导第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构偶联的中间偶联基团。例如,多个SNAP可以被配置为在一个或多个偶联面上仅展示链霉亲和素分子,使得第一SNAP不能直接结合第二SNAP。仅包含表面展示生物素的中间偶联基团可以允许第一SNAP与第二SNAP偶联。中间偶联基团可以包含核酸纳米结构或非核酸颗粒或分子(例如,有机或无机纳米颗粒)。第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构的偶联可以是可逆的(例如,核酸杂交)或不可逆的(例如,点击反应)。

[0230] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含允许核酸纳米结构的受控降解的一个或多个位点。核酸纳米结构可以包含一个或多个可光裂解的接头。可光裂解的接头可以位于核酸纳米结构的任何部分内,包括支架链和可以在核酸纳米结构内偶联的多个寡核苷酸中的任何寡核苷酸。在一些情况下,核酸纳米结构可以包含多个可光裂解的接头。可光裂解的接头可以位于核酸纳米结构内,以允许核酸纳米结构的受控降解,例如用于SNAP的程序化去除或SNAP和分析物从表面的程序化释放。对于包含与核酸纳米结构的一部分杂交的多官能团部分的核酸纳米结构组合物,多官能团部分可以包含可光裂解的接头。在一些构型中,多官能团部分可以不包含可光裂解的接头。多官能团部分中可以包括可光裂解的接头,以允许分析物从与分析物偶联的核酸纳米结构或固体支持物中可编程释放。可光裂解的接头可以包括任何合适的可光裂解的接头,诸如硝基苄基、羰基或基于苄基的可光裂解的接头。可光裂解的接头可以被配置为在特定波长下或在特定频率范围(诸如远红外、近红外、可见光、近紫外、远紫外或其组合)内裂解。可以选择可光裂解的接头,因为其具有不干扰其他生物或化学过程的峰值切断波长,诸如荧光团的吸收或发射波长。核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个降解位点,所述降解位点是酶促降解(例如通过限制酶、蛋白酶、激酶或其他合适的酶)的底物。核酸纳米结构可以掺入部分,所述部分是酶促降解的底物,诸如被尿嘧啶DNA糖基化酶和核酸内切酶VIII(由New England Biolabs, Beverley MA以USER[®]酶市售)降解的尿嘧啶核苷酸、被DNA糖基化酶OGG1降解的8-氧代鸟

嘌呤核苷酸或被蛋白酶降解的肽。对于包含与核酸纳米结构的一部分杂交的多官能团部分的核酸纳米结构组合物,多官能团部分可以包含作为酶促降解的靶标的降解位点。在一些构型中,多官能团部分可以不包含作为酶促降解的靶标的降解位点。

[0231] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个位点或基团,所述位点或基团被掺入核酸纳米结构中以促进核酸纳米结构的稳定性。核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含对经由核酸内切酶或其他酶的降解有抗性的修饰的或非天然的核苷酸(例如,PNA、锁定的核酸等)。核酸纳米结构可以包含将核酸纳米结构组分彼此偶联(例如,将寡核苷酸与支架链的偶联)的一个或多个交联基团和/或将核酸纳米结构与另一个实体(例如,固体支持物、第二核酸纳米结构等)偶联的一个或多个交联基团。

[0232] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个接头。接头可以包含连接寡核苷酸的两个部分的分子链或部分,包括例如核酸纳米结构的任何核酸组分,诸如支架链、与支架链杂交的寡核苷酸或与核酸纳米结构杂交的多功能寡核苷酸。接头可以包含刚性接头或柔性接头。接头可以包含聚合物部分,诸如聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)部分或多核苷酸。接头可以引入所需的化学特性,诸如疏水性、亲水性、极性或电荷。接头可以包括被配置为将一个或多个另外的部分或分子连接在一起的部分,诸如多个多官能团部分。接头可以包含一个或多个修饰的核苷酸,诸如PNA、LNA和/或用被配置为进行点击型反应的官能团修饰的核苷酸。图3A-3D描绘了利用包含连接基团的多官能团部分将分析物偶联至固体支持物的方法。如图3A所示,通过多价接头320与分析物310偶联的SNAP 300与包含多个表面连接的偶联部分335。多价接头与多官能团部分的四个臂(321、322、323、324)偶联,所述四个臂与SNAP杂交并且包含官能团325,所述官能团被配置为与表面连接的偶联部分335偶联。图3B描绘了包含五个官能团(分别为 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5)的多价接头320的近视图。官能团 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 分别与多官能团部分的四个臂321、322、323和324偶联。官能团 R_5 与分析物310偶联。图3C描绘了通过官能团325与表面连接的偶联部分335的偶联而将SNAP 300和分析物310与固体支持物330偶联。图3D描绘了在SNAP 300结构已经降解之后的组合物,从而留下通过多官能团部分的四个臂(321、322、323、324)偶联至固体支持物330的分析物310。这种构型可能具有增加分析物偶联的化学稳定性的优点,因为多个偶联多官能团部分提供了抵抗任何单链解偶联的冗余。所述构型也可能是有利的,因为多个偶联多官能团部分可以稳定分析物的空间位置,其中只有单个偶联多官能团部分可能具有更多的平移自由度。

[0233] 如本文所阐述,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含一个或多个交联基团。交联基团可以包括化学、酶促和光化学交联基团。交联基团可以稳定或防止核酸纳米结构中的一个或多个核酸结构的解离。多个寡核苷酸中的一个寡核苷酸可以与核酸纳米结构的支架链交联。在核酸纳米结构中,多个寡核苷酸中的第一寡核苷酸可以与多个寡核苷酸中的第二寡核苷酸交联。包含重要结构特征的寡核苷酸,诸如效用部分(例如,展示部分、捕获部分)可以与核酸纳米结构交联以增强稳定性或防止寡核苷酸的解离。包含两个或更多个效用部分(例如,展示部分和捕获部分)的多官能团部分可以包含一个或多个与核酸纳米结构交联的基团。

[0234] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含完全结构化的部分和/或部分结构化的部分。核酸纳米结构的完全结构化部分可以被鉴定为在使用过程期间保持一级结构、二级结构和

三级结构的核酸纳米结构区域。核酸纳米结构的部分结构化部分可以被鉴定为包含一级结构但在使用过程期间不保持特定二级结构和/或三级结构的核酸纳米结构区域。在一些构型中,核酸纳米结构的部分结构化部分可以包含单链核酸。单链核酸可以位于双链核酸区域之间,或者可以包含核酸的悬垂结构或末端链。单链核酸可以具有特定的长度,例如至少约5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或超过50个核苷酸。可替代地或另外地,单链核酸可以具有不超过约50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、10个、5个或少于5个核苷酸的长度。在一些构型中,核酸纳米结构的部分结构化部分可以包含非核酸部分、分子基团或链,诸如PEG或聚合物链。在一些构型中,核酸纳米结构的部分结构化部分可以包含无定形结构,诸如球状结构(例如,纳米球、树枝状聚合物等)。图37A描绘了具有部分结构化区域3730(例如,单链核酸、聚合物、树枝状聚合物等)的SNAP 3710。SNAP 3710与分析物3720偶联。部分结构化区域3730可以位于多个SNAP面(例如,捕获面、展示面)上。部分结构化区域3730可以为SNAP 3710提供一种或多种功能,例如,增加与目标结合表面的结合强度、降低与非目标表面的结合强度以及防止其他分子与SNAP面或偶联的分析物的非特异性结合。

[0235] 多官能团部分:在一方面,本文描述了包含核酸纳米结构(例如,SNAP)和多官能团部分的组合物,其中所述多官能团部分可以被配置为与核酸纳米结构偶联,并且其中所述多官能团部分可以被配置为形成两个或更多个另外的相互作用。在一些构型中,多官能团部分可以被配置为与核酸纳米结构偶联,并且可以连续地将表面与分析物偶联。表面与分析物的连续偶联可以包含这样的偶联,其中所述表面通过多官能团部分与分析物直接偶联,没有任何其他插入基团或部分。例如,如果SNAP通过多官能团部分与表面偶联,并且分析物与SNAP偶联但不与多官能团部分偶联,则分析物将不通过多官能团部分与表面持续偶联。多官能团部分可以包含第一官能团和第二官能团。在一些构型中,第一官能团可以偶联至表面或被配置为偶联至表面,并且第二官能团可以与分析物偶联或被配置为与分析物偶联。在一些构型中,多官能团部分可以与核酸纳米结构偶联或被配置为与核酸纳米结构偶联,并且可以与表面形成两个或更多个偶联相互作用。多官能团部分可以包含展示部分和表面相互作用部分。

[0236] 如本文所阐述,多官能团部分可以包含多个官能团。多官能团部分可以包含至少约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或超过20个官能团。可替代地或另外地,多官能团部分可以包含不超过约20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或少于3个官能团。

[0237] 如本文所阐述,多官能团部分可以包含一个或多个分子链。分子链可以包含多聚体化合物,诸如寡核苷酸或聚合物链(例如,聚乙烯、聚丙烯、聚乙二醇、聚环氧乙烷等)。在其他构型中,多官能团部分可以不包含核酸。在一些构型中,多官能团部分可以包含多个分子链。多官能团部分可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或超过10个分子链。可替代地或另外地,多官能团部分可以包含不超过约10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个分子链。多官能团部分的两个或更多个分子链可以通过连接部分结合、偶联或连接。图7A-7B描绘了连接部分的示例性构型。图7A描绘了包含烷基连接部分的多官能团部分的形成。连接部分包含烷基连接基团710,其包含四个反应性官能团,包

括3个甲基四嗪 (mTz) 基团720和1个二苯并环辛烯 (DBCO) 基团730。连接部分可以与包含叠氮化物官能团的分子链740接触,从而通过叠氮化物-DBCO点击反应将叠氮化物官能化的分子链740与DBCO基团730连接。连接部分也可以与包含反式环辛烯 (TCO) 官能团的分子链750接触,从而通过mTz-TCO点击反应将TCO官能化的分子链750与mTz官能团720连接。图7B描绘了在较长的寡核苷酸分子链中包含一组修饰的核苷酸的多官能团部分。虚线框中显示了包含修饰核苷酸的连接部分。连接部分包含四个修饰的胸腺嘧啶核苷酸,包括两个mTz官能化的胸腺嘧啶760和两个DBCO官能化的胸腺嘧啶770。多官能团部分可以与叠氮化物官能化的分子链740和/或TCO官能化的分子链750接触,以通过点击反应偶联一个或多个分子链。

[0238] 多官能团部分可以被配置为与核酸纳米结构(例如,SNAP)偶联。核酸纳米结构的偶联可能取决于将如何利用核酸纳米结构。例如,在一些构型中,多官能团部分可能有助于在表面上定位和偶联SNAP。在其他构型中,SNAP可能有助于将多官能团部分定位和偶联至表面。图8A-8D描绘了与SNAP偶联的多官能团部分的各种构型。图8A显示了具有官能团 R_1 和 R_2 的多官能团部分810,其包含与SNAP 800偶联以形成杂交核酸830区域的寡核苷酸。官能团 R_1 和 R_2 分别通过顶面(例如,展示面)和底面(例如,捕获面)展示。图8B显示了具有官能团 R_1 和 R_2 的多官能团部分810,其包含与SNAP 800偶联以形成杂交核酸830区域的寡核苷酸。官能团 R_1 和 R_2 展示在底面(例如,捕获面)上。图8C描绘了具有官能团 R_1 和 R_2 的多官能团部分840,其包含通过与SNAP 800中的互补官能团或部分860偶联(例如,通过点击反应、通过核酸杂交)的官能团或部分850与SNAP 800偶联的分子链(例如,聚合物,寡核苷酸)。官能团 R_1 和 R_2 分别通过顶面(例如,展示面)和底面(例如,捕获面)展示。图8D描绘了具有官能团 R_1 和 R_2 的多官能团部分840,其包含通过与在SNAP 800外部面上的互补官能团或部分860偶联(例如,通过点击反应、通过核酸杂交)的官能团或部分850与SNAP 800偶联的分子链(例如,聚合物,寡核苷酸)。多官能团部分810与SNAP 800偶联,但被配置为完全在SNAP 800结构的外部。

[0239] 在一些构型中,核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物)可以包含核酸纳米结构和被配置为与核酸纳米结构偶联的多官能团部分。在其他构型中,核酸纳米结构组合物可以包含与核酸纳米结构偶联的多官能团部分。例如,SNAP组合物可以包含流体介质,其在第一构型中含有与多个多官能团部分接触的多个部分形成的SNAP并且在第二构型中含有多个完全形成的SNAP,其中所述多官能团部分与每个SNAP偶联。在一些构型中,核酸纳米结构组合物还可以包含被配置为与多官能团部分偶联的分析物。例如,SNAP组合物可以包含流体介质,其包含含有多官能团部分的多个SNAP和被配置为与多官能团部分偶联的多个分析物。在一些构型中,核酸纳米结构组合物还可以包含与多官能团部分偶联的分析物。例如,SNAP组合物可以包含与多个多官能团部分接触的多个部分形成的SNAP,其中每个多官能团部分与分析物偶联。在另一个实例中,SNAP组合物可以包含多个含有多官能团部分的SNAP,其中每个多官能团部分与分析物偶联。在一些构型中,核酸纳米结构组合物还可以包含被配置为与多官能团部分偶联的表面。例如,SNAP组合物可以包含含有多个表面连接部分的固体支持物,其中所述固体支持物与多个含有多官能团部分的SNAP接触,其中每个多官能团部分包含表面相互作用部分,所述表面相互作用部分被配置为与表面连接部分偶联。在一些构型中,核酸纳米结构组合物还可以包含与多官能团部分偶联的表面。例如,SNAP组合物可以包含含有多个表面连接部分的固体支持物,其中一个或多个表面连接部分与多个含

有多官能团部分的SNAP的表面相互作用部分偶联,并且其中所述固体支持物与含有多个分析物的流体介质接触,其中所述每个分析物被配置为与多官能团部分的展示部分偶联。本领域技术人员将容易地根据不同组分(例如,SNAP、多官能团部分、分析物、固体支持物等)被引入系统中的顺序识别出核酸纳米结构组合物的多种变化,如本文所阐述。

[0240] 在一些构型中,本文提供了包含核酸纳米结构(例如,SNAP)的组合物,所述核酸纳米结构包含被配置为与分析物偶联的展示部分和被配置为与表面偶联的捕获部分、以及包含第一官能团和第二官能团的多官能团部分,其中所述多官能团部分与纳米结构部分杂交,并且其中所述展示部分包含第一官能团并且所述捕获部分包含第二官能团。此类核酸纳米结构可以被配置为利用第一官能团与分析物偶联,并且利用第二官能团与表面或界面偶联。纳米结构部分可以被配置为占据表面的给定区域,以防止其他核酸纳米结构占据相同的区域。这可能例如由于空间排斥、电荷排斥或其他机制而发生。此类构型可以提供令人惊讶的优点,诸如通过多官能团部分在分析物与表面之间的连接结合(linking connection),并且防止超过一个分析物由于纳米结构部分的存在而占据表面的给定区域。纳米结构部分可以被有意或无意地去除(例如降解),使得分析物可以保持与表面偶联。因此,纳米结构部分可以有利地抑制在表面沉积期间分析物与其他分析物、试剂或物体的相互作用,然后可以去除纳米结构部分以促进分析物与对于分析物的表面上检测或表面上操作有用的其他分析物、试剂或物体的相互作用。

[0241] 图9A-9F描绘了利用具有多功能寡核苷酸的SNAP将分析物偶联至表面的方法。图9A描绘了包含寡核苷酸940的SNAP 910的示意图,所述寡核苷酸具有包含二苯并环辛炔(DBCO)的第一末端官能团920和包含甲基四嗪(mTz)的第二末端官能团930。寡核苷酸940被配置为与SNAP的一部分杂交,使得其形成二级结构或三级结构的局部区域945(例如,双螺旋),从而使在SNAP结构910内的寡核苷酸940稳定。使SNAP 910与固体支持物950接触,所述支持物包含非反应性区域952和含有反应性第三官能团955的区域,所述反应性第三官能团包含叠氮化物部分,所述叠氮化物部分被配置为与第一末端官能团920反应。如图9B所示,第一末端官能团920可以与第三官能团955反应以形成共价键,所述共价键在第三官能团955偶联至固体支持物950的位置附近处将SNAP 910偶联至固体支持物950。如图9C所示,偶联的SNAP可以与包含第四官能团970的分析物960接触,所述第四官能团包含反式环辛烯,所述第四官能团被配置为与第二末端官能团930反应。如图9D所示,第二末端官能团930可以与第四官能团970反应以形成共价键,所述共价键将分析物960偶联至固体支持物950。应当理解,官能团920、955、930和970是示例性的,并且可以用诸如本文所阐述或本领域已知的其他偶联部分替代。如图9E所示,SNAP-分析物组合物可以经受降解现象,诸如光源980,其破坏SNAP 910的结构,从而降解SNAP 910。可以使用其他手段进行降解,所述手段诸如SNAP中一条或多条核酸链的核酸内切酶消化、核酸链相互作用的热变性或化学变性或SNAP中易切断键的化学裂解。如图9F所示,在SNAP 910降解之后,分析物960可以通过寡核苷酸940保持与固体支持物950偶联。

[0242] 包含多官能团部分的核酸纳米结构(例如,SNAP)(诸如图9A-9F中所描绘的构型)可以被配置为与由多个核酸碱基对组成的多官能团部分形成杂交区域。在一些构型中,多官能团部分可以与包含至少约10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、125个、150个、200个或超过200个核苷酸的核酸纳米结构形成杂交区域。可替代地或另外

地,多官能团部分可以与包含不超过约200个、150个、125个、100个、90个、80个、70个、60个、50个、40个、30个、20个、10个或少于约10个核苷酸的核酸纳米结构形成杂交区域。在核酸纳米结构与多官能团部分之间形成的杂交区域可以通过特定数量的所形成的螺旋旋转(其中单个旋转通常包含10个与11个之间的碱基对)来表征。在一些构型中,多官能团部分可以形成包含至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或超过20个螺旋旋转的杂交区域。可替代地或另外地,多官能团部分可以形成包含不超过20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个、1个或少于1个螺旋旋转的杂交区域。

[0243] 核酸纳米结构(例如,SNAP)可以包含多个三级结构,所述三级结构在核酸纳米结构中共同形成四级或其他更高级的结构。特定的三级结构可以包含属于核酸纳米结构的特定面的部分或结构。核酸纳米结构可以包含多个三级结构,其中展示面包含所述多个三级结构中的第一三级结构,并且捕获面包含所述多个三级结构中的第二三级结构。在一些构型中,第一三级结构可以与第二三级结构相同。在其他构型中,第一三级结构与第二三级结构不同。在包含具有第一官能团和第二官能团的多官能团部分的核酸纳米结构构型中,多官能团部分可以与核酸纳米结构杂交,从而形成第一三级结构的一部分或第二三级结构的一部分。在其他构型中,多官能团部分可以与核酸纳米结构杂交,从而形成第一三级结构的一部分和第二三级结构的一部分。

[0244] 包含第一多官能团部分的核酸纳米结构(例如,SNAP)还可以包含含有第三官能团和第四官能团的第二多官能团部分。在一些构型中,效用部分(例如,展示部分)可以包含第三官能团,并且第二效用部分(例如,捕获部分)可以包含第四官能团。在一些构型中,第三官能团或第四官能团可以被配置为偶联至表面。在一些特定的构型中,第三官能团或第四官能团可以偶联至表面。在一些构型中,第三官能团或第四官能团可以被配置为与第二分析物偶联。在一些特定的构型中,第三官能团或第四官能团可以与第二分析物偶联。在一些构型中,第三官能团或第四官能团可以被配置为与第一多官能团部分所偶联的分析物偶联。在一些特定的构型中,第三官能团或第四官能团可以与第一多官能团部分所偶联的分析物偶联。

[0245] 图10A-10D示出了将包含两个多官能团部分的SNAP偶联至表面的方法。图10A显示了SNAP 1000,其包含与分析物1020偶联并且包含第一官能团1015的第一多官能团部分1010。SNAP 1000还包含第二多官能团部分1030,其与效用部分1040偶联并且包含第二官能团1035。SNAP 1000可以包含捕获面,其包含含有第一官能团和第二官能团的捕获部分。SNAP 1000可以与包含多个官能团或部分的固体支持物1050接触,所述多个官能团或部分包括表面连接的非偶联基团1060和表面连接的偶联基团1065,所述表面连接的偶联基团被配置为与一个捕获部分或多个捕获部分偶联。如图10B所示,第一官能团和/或第二官能团可以偶联至表面连接的偶联基团1065,从而通过包含捕获部分的两个官能团中的至少一个将SNAP 1010偶联至固体支持物1050。如图10C所示,与固体支持物1050偶联的SNAP 1000可能暴露于降解现象,诸如光源1070,这导致SNAP 1000结构的降解。可以使用其他手段进行降解,所述手段诸如SNAP中一条或多条核酸链的核酸内切酶消化、加热、pH变化、SNAP中易切断键的化学裂解或任何其他合适的降解方法。如图10D所示,在SNAP结构降解之后,与分析物1020偶联的第一多官能团部分1010和与效用部分1040偶联的第二多官能团部分1030

共定位在固体支持物1050上。

[0246] 与核酸纳米结构(例如,SNAP)杂交的多官能团部分可以被配置为将核酸纳米结构或其部分偶联至表面。在一些构型中,表面可以包含表面官能团,其被配置为与在多官能团部分上所含的官能团偶联。在一些构型中,表面官能团可以包含被配置为与在多官能团部分上所含的官能团形成共价键的官能团。在一些特定的构型中,表面官能团和在多官能团部分上所含的官能团可以形成共价键,例如通过点击型反应、取代反应、消除反应或任何其他合适的键合化学。

[0247] 包含多官能团部分的核酸纳米结构(例如,SNAP)可以在核酸纳米结构与表面偶联之前或之后形成。图11A-11D描绘了在SNAP已经偶联至表面之后使多官能团部分与SNAP杂交的方法。图11A显示了与表面1100接触的SNAP 1110,从而允许SNAP偶联至表面,例如通过静电相互作用、磁性相互作用或共价相互作用。图11B显示了偶联至分析物1130的多官能团部分1120与偶联至表面1100的SNAP 1110的接触。如图11C所示,多官能团部分1120与SNAP 1110杂交,形成三级结构1150的区域。多官能团部分1120可以进一步偶联至表面1100。图11D描绘了在任选地去除SNAP 1110之后,分析物1130与表面1100的连续连接。

[0248] **部分致密的核酸:**可用于形成分析物阵列的核酸可以包含具有以下的一个或多个特征的结构:i)在核酸表面上的可调和/或可控位置偶联分析物,ii)在不打算用于偶联的核酸部分处抑制不需要的分析物或其他部分偶联,iii)包含被配置为与固体支持物或其表面形成特异性结合相互作用的结构或面,iv)包含被配置为与固体支持物或其表面形成特异性结合相互作用的结构或面,所述特异性结合相互作用比在偶联至核酸的分析物与固体支持物或其表面之间的非特异性结合相互作用更可能发生,v)包含被配置为抑制偶联至核酸的分析物与固体支持物或其表面之间接触的结构或面,vi)抑制与其他核酸或与之偶联的分析物的不需要的结合相互作用(例如,聚集、共定位等)。

[0249] 核酸(诸如核酸纳米结构)的有用构型可以包含含有致密结构和可透过结构的核酸。核酸的致密结构可以为与核酸结构偶联或从核酸结构中出现的部分提供空间和取向可调性。例如,包含致密结构的核酸折纸可以被设计成与一个或多个捕获部分基本上呈 180° 取向来定向展示部分,从而增加核酸折纸宁可透过一个或多个捕获部分偶联至固体支持物上而不是通过偶联至展示部分的分析物偶联的可能性。致密结构的可调性可能源于核酸结构的几个方面,包括为与核酸偶联的部分的取向提供基本上 360° 旋转自由度的多个三级结构,和一个或多个连接链偶联核酸结构内的三级结构,从而为核酸结构提供一定程度的刚性并且固定核酸结构中三级结构相对于彼此的分隔距离和取向。核酸的可透过结构可以为核酸提供另外的化学和/或物理特性,这有助于与其他实体(例如,分析物、未结合部分、试剂、其他核酸、固体支持物、流体介质等)的所需相互作用或抑制与其他实体的不需要的相互作用。例如,核酸可以包含多个悬垂单链核酸部分,所述悬垂单链核酸部分包含均聚物重复(例如,聚T重复序列、聚A重复序列、聚C重复序列、聚G重复序列),其中所述悬垂单链核酸部分被配置为抑制两个或更多个核酸在固体支持物上(例如,在固体支持物上的地址阵列中的相同地址处)的共定位。通过将可透过结构与核酸的可调致密结构偶联,可透过结构的位置和取向可以被控制,以在核酸与其他实体之间产生更特异和局部的相互作用。

[0250] 如本文所述,核酸纳米结构可以包含至少一个致密区域或结构。核酸纳米结构的致密区域可以是指具有相对于单链核酸与多链核酸(例如,双链DNA、三链DNA等)的平均

特征更接近的平均特征的区域或结构。如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含至少一个可透过区域或结构。核酸纳米结构的可透过区域可以是指具有相对于多链核酸与单链核酸的平均特征更接近的平均特征的区域或结构。如本文所阐述,核酸纳米结构不需要包含可透过区域或结构。核酸纳米结构的致密区域或结构可以包含以下的一个或多个特征:i) 包含支架链,ii) 包含与支架链偶联的多个核酸,其中所述支架链的至少50%以及任选地至少60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的核苷酸与所述多个核酸的核苷酸碱基配对杂交,iii) 包含多个偶联的核酸,其中所述多个核酸的至少50%以及任选地至少60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的核苷酸与所述多个核酸的其他核苷酸碱基配对杂交,iv) 包含多个二级和/或三级核酸结构,其中第一二级和/或三级核酸结构相对于第二二级和/或三级核酸结构的位置、取向和/或运动受到约束,v) 包含第一螺旋核酸结构和第二螺旋核酸结构,其中所述第一螺旋核酸结构和第二螺旋核酸结构通过单链核酸连接,其中所述第一螺旋核酸结构和所述第二螺旋核酸结构各自包含相对于单链核酸在3'至5'方向上平行定向的螺旋对称轴,并且其中所述第一螺旋核酸结构的螺旋对称轴相对于所述第二螺旋核酸结构的螺旋对称轴的取向具有约90°与180°之间的角度,vi) 包含约束第一二级和/或三级核酸结构相对于第二二级和/或三级核酸结构的位置、取向和/或运动的单链核酸;vii) 包含约束第一二级和/或三级核酸结构相对于第二二级和/或三级核酸结构的位置、取向和/或运动的部分(例如,多肽、多糖、纳米颗粒等);viii) 包含包围致密区域或结构的每个核苷酸的体积,其中所述体积的特征性尺寸(例如,长度、深度、直径等)由于分子间或分子外运动(例如,布朗运动、流体剪切、电磁力等)或者由于分子内运动(例如,平移、振动、弯曲、旋转等)而变化不超过10%,并且任选地变化不超过5%或1%,ix) 包含具有第一可调位置的第一核苷酸和具有第二可调位置的第二核苷酸,其中所述第一可调位置包含距第二可调位置的距离和相对于第二可调位置的取向,x) 包含具有第一可调位置的第一核苷酸和具有第二可调位置的第二核苷酸,其中所述第一可调位置包含变化不超过10%的距第二可调位置的距离或相对于第二可调位置的取向,xi) 包含包围致密区域或结构的每个核苷酸的体积,其中当包含致密区域或结构的核酸纳米结构与分子、部分、结构或固体支持物形成结合相互作用时,所述体积的特征性尺寸(例如,长度、深度、直径等)变化不超过10%以及任选地不超过5%或1%,xii) 包含致密区域或结构的围绕致密区域或结构的每个核苷酸的区域的二维投影,其中当包含致密区域或结构的核酸纳米结构与分子、部分、结构或固体支持物形成结合相互作用时,所述二维投影变化不超过10%以及任选地不超过5%或1%,xiii) 包含多个单链核酸,其中每个单链核酸具有少于约20个核苷酸的长度以及任选地不超过约15个、10个或5个核苷酸的长度,xiv) 包含第一三级结构和第二三级结构,其中所述第二三级结构与第一三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构与所述第二三级结构之间的平均分隔距离不超过约20纳米(nm),以及任选地不超过约10nm或5nm,如通过第一三级结构的对称轴与第二三级结构的对称轴之间的平均分隔距离所测量的,xv) 包含第一三级结构和第二三级结构,其中所述第二三级结构与所述第一三级结构相邻,其中所述第一三级结构和所述第二三级结构各自包含共同核酸以及任选地两个共同核酸,并且其中所述共同核酸包含至少约90°的弯曲,其中所述弯曲的曲率半径不超过10纳米(nm)以及任选地不超过5nm或2.5nm,和xvi) 包含第一三级结构和第二三级结构,其中所述第二三级结构与所述第一三级结构相邻,其中所述第一三级结构和所述第二三级结构各自包含共同核酸以及任选地两个

共同核酸,其中所述共同核酸包含至少约90°的弯曲,其中所述弯曲的曲率半径不超过10纳米(nm)以及任选地不超过5nm或2.5nm,并且其中所述第一三级结构不通过核酸结合实体(例如,核酸结合蛋白、纳米颗粒等)与所述第二三级结构相邻定位。

[0251] 如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含至少一个可透过区域或结构。核酸纳米结构的可透过区域或结构可以包含以下的一个或多个特征:i)不包含支架链,ii)包含一个或多个核酸,其中所述一个或多个核酸中的每个核酸包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列,所述第一核苷酸序列被配置为与致密区域或结构的支架链杂交,所述第二核苷酸序列不被配置为与核酸纳米结构的核酸杂交,iii)包含一个或多个核酸,其中所述一个或多个核酸的每个核酸包含至少约20个核苷酸长度以及任选地至少约25个、50个、100个、500个、1000个或超过1000个核苷酸长度的单链核酸,iv)包含一个或多个核酸,其中所述一个或多个核酸中的每个核酸包含未偶联的末端核苷酸(例如,3'末端核苷酸,5'末端核苷酸),v)包含多个悬垂部分(例如,单链核酸、部分双链核酸、聚合物链等),其中每个悬垂部分包含不受分子内或结构内结合相互作用(例如,碱基对杂交、氢键合、范德华相互作用等)约束的位置、取向或运动,vi)包含多个悬垂部分,其中每个悬垂部分包含受非结合相互作用(例如,空间阻断(steric occlusion)、静电排斥、磁排斥、疏水性相互作用、亲水性相互作用约束的位置、取向或运动,vii)包含一个或多个偶联的核酸,其中所述多个核酸的少于50%以及任选地少于40%、30%、20%、10%、5%或1%的核苷酸与所述多个核酸的其他核苷酸碱基配对杂交,ix)包含一个或多个核酸,其中所述一个或多个核酸包含第一单链核酸和第二单链核酸,其中所述第一单链核酸不被配置为与所述第二单链核酸杂交,x)包含一个或多个核酸,其中所述一个或多个核酸包含含有多核苷酸重复序列(例如,聚A、聚C、聚G、聚T)的单链核酸,任选地其中所述多核苷酸重复序列包含至少约10个核苷酸或至少约20个、30个、40个、50个、100个、200个、500个、1000个或超过1000个核苷酸,xi)包含包围可透过区域或结构的每个核苷酸的体积,其中所述体积的特征性尺寸(例如,长度、深度、直径等)由于分子间或分子外运动(例如,布朗运动、流体剪切、电磁力等)或者由于分子内运动(例如,平移、振动、弯曲、旋转等)而变化超过10%以及任选地超过15%或20%,xii)包含包围可透过区域或结构的每个核苷酸的体积,其中当包含致密区域或结构的核酸纳米结构与分子、部分、结构或固体支持物形成结合相互作用时,所述体积的特征性尺寸(例如,长度、深度、直径等)变化超过10%以及任选地超过15%或20%,xiii)当核酸纳米结构未与分子、部分、结构或位置偶联时,包含可透过区域或结构的包围可透过区域或结构的最大范围的区域的二维投影,其中当包含可透过区域或结构的核酸纳米结构与分子、部分、结构或固体支持物形成结合相互作用时,所述二维投影变化超过10%,以及任选地不超过15%或20%,和xiv)包含核酸,其中所述核酸的第一核苷酸序列偶联至致密结构,其中所述核酸的第二核苷酸序列不偶联至致密结构,并且其中相对于所述第一核苷酸序列的核苷酸,所述第二核苷酸序列的核苷酸包含到致密结构的距离的标准偏差的更大的空间和/或时间变化。

[0252] 在一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含至少10个偶联的核酸,其中所述核酸纳米结构包含:a)包含高的内部互补性的致密区域,其中所述高的内部互补性包含至少50%的双链核酸和至少1%的单链核酸,并且其中所述致密区域包含展示部分,其中所述展示部分与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;和b)包含低的内部互补性的可透过区域,其中所述低的内部互补性包含至少约50%的单链核酸,并且

其中所述可透过区域包含偶联部分,其中所述偶联部分与固体支持物形成偶联相互作用或被配置为与固体支持物形成偶联相互作用。

[0253] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含:a)致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉(staple)寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包括由所述支架链的单链区域连接的多个相邻三级结构,并且其中所述多个相邻三级结构的相对位置受到位置约束;和b)可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与所述致密结构的支架链偶联,其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸,并且其中所述可透过结构在所述致密结构的至少一部分周围具有各向异性三维分布。

[0254] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含:a)致密结构,其中所述致密结构包含支架链和第一多个订书钉(staple)寡核苷酸,其中所述支架链的至少80%的核苷酸与所述第一多个订书钉寡核苷酸的核苷酸杂交,其中所述第一多个订书钉寡核苷酸与支架链杂交形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包括由所述支架链的单链区域连接的多个相邻三级结构,并且其中所述相邻三级结构的相对位置受到位置约束,并且其中所述致密结构包含有效表面积;和b)可透过结构,其中所述可透过结构包含第二多个订书钉寡核苷酸,其中所述订书钉寡核苷酸与致密结构的支架链偶联,其中所述可透过结构包含至少50%的单链核酸,并且其中(i)核酸纳米结构的有效表面积大于所述致密结构的有效表面积,或者(ii)核酸纳米结构的有效表面积与体积的比率大于所述致密结构的有效表面积与体积的比率。

[0255] 在另一方面,本文提供了一种核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含多条核酸链,其中所述多条链中的每条链与所述多条链中的另一条链杂交形成多个三级结构,并且其中所述多条链中的一条链包含与所述多条链中的第二链杂交的第一核苷酸序列,其中所述多条链中的所述链还包含至少100个连续核苷酸的第二核苷酸序列,并且其中所述第二核苷酸序列的至少50个核苷酸是单链的。

[0256] 图52A-52H示出了包含致密结构和可透过结构的核酸纳米结构的各种构型。图52A描绘了包含SNAP 5210(例如,核酸折纸)的核酸纳米结构的横截面图,所述SNAP通过SNAP 5210的展示面上的展示部分5215与分析物5220偶联。核酸纳米结构还包含捕获面,其与SNAP 5210的展示面相反(例如,在取向上约180°)。捕获面包含含有多个悬垂部分5212(例如,单链核酸、聚合物链等)的可透过结构,所述悬垂部分与SNAP 5210的捕获面偶联,其中所述悬垂部分5212包含未结合的末端。取决于所述多个悬垂部分5212的密度和SNAP 5210的致密结构的偶联点的刚性,所述多个悬垂部分可以以向外展开的构型排列。体积5230包围由包含多个悬垂部分的可透过结构占据的平均空间。体积5230内的悬垂部分5212相对于SNAP 5210的致密结构具有各向异性空间分布,这是由于悬垂部分在SNAP 5210的捕获面上的可调定位和取向所致。图52B示出了图52A中的核酸纳米结构的俯视图。线5241描画了SNAP 5210的致密结构的有效表面积,并且线5240描画了完整核酸纳米结构(即包括致密结构和可透过结构)的有效表面积,其由于悬垂部分5212向外展开而大于致密结构的有效表面积。

[0257] 图52C描绘了包含SNAP 5210(例如,核酸折纸)的核酸纳米结构的横截面图,所述

SNAP通过SNAP 5210的展示面上的展示部分5215与分析物5220偶联。核酸纳米结构还包含与SNAP 5210的展示面相邻并正交(例如,在取向上约 90°)的一个或多个效用面。每个效用面包含含有多个悬垂部分5212(例如,单链核酸、聚合物链等)的可透过结构,所述悬垂部分与SNAP 5210的效用面偶联。取决于多个悬垂部分5212的密度、悬垂部分5212的柔性和与SNAP 5210的致密结构的偶联点的刚性,多个悬垂部分5212可以以向外展开的构型排列。线5230和5231包围由包含多个悬垂部分的可透过结构占据的空间的平均横截面面积。由线5230和5231指示的空间内的悬垂部分5212包含相对于SNAP 5210的致密结构的中线的基本上各向同性的空间分布以及相对于分析物5220的各向异性的空间分布,这是由于悬垂部分在SNAP 5210的捕获面上的可调定位和取向所致。图52D示出了核酸纳米结构的俯视图。线5241描画了SNAP 5210的致密结构的有效表面积,并且线5240描画了完整核酸纳米结构(即包括致密结构和可透过结构)的有效表面积,其由于悬垂部分5212向外方向而大于致密结构的有效表面积。

[0258] 图52E描绘了包含SNAP 5210(例如,核酸折纸)的核酸纳米结构的横截面图,所述SNAP通过SNAP 5210的展示面上的展示部分5215与分析物5220偶联。核酸纳米结构还包含捕获面,其与SNAP 5210的展示面相反(例如,在取向上约 180°)。捕获面包含含有多个悬垂部分5213(例如,单链核酸、聚合物链等)的可透过结构,所述悬垂部分与SNAP 5210的捕获面偶联,其中所述悬垂部分5213的两个末端都与SNAP 5210的致密结构偶联。取决于所述多个悬垂部分5213的密度、它们的柔性和SNAP 5210的致密结构的偶联点的刚性,所述多个悬垂部分可以占据SNAP 5210的捕获面正下方的体积线5230包围由包含多个悬垂部分5213的可透过结构占据的空间的平均横截面面积。由线5230指示的空间内的悬垂部分5213包含相对于SNAP 5210的致密结构的各向异性空间分布,这是由于悬垂部分在SNAP 5210的捕获面上的可调定位和取向所致。图52F示出了核酸纳米结构的俯视图。线5241描画了SNAP 5210的致密结构的有效表面积,并且线5240描画了完整核酸纳米结构(即包括致密结构和可透过结构)的有效表面积,其小于SNAP 5210的致密结构的有效表面积。

[0259] 图52G描绘了包含SNAP 5210(例如,核酸折纸)的核酸纳米结构的横截面图,所述SNAP通过SNAP 5210的展示面上的展示部分5215与分析物5220偶联。核酸纳米结构还包含多个悬垂部分5212(例如,单链核酸、聚合物链等),所述悬垂部分偶联至SNAP 5210的几乎所有取向,不包括被分析物5220占据的体积。取决于所述多个悬垂部分5212的密度、它们的柔性和SNAP 5210的致密结构的偶联点的刚性,所述多个悬垂部分可以以向外展开的构型排列。线5230包围由包含多个悬垂部分5212的可透过结构占据的空间的平均横截面。由线5230指示的空间内的悬垂部分5212包含相对于SNAP 5210的致密结构的各向异性空间分布,尽管它可以是各向同性空间分布,不包括被分析物5220占据的体积。图52H示出了核酸纳米结构的俯视图。线5241描画了SNAP 5210的致密结构的有效表面积,并且线5240描画了完整核酸纳米结构(即包括致密结构和可透过结构)的有效表面积,其由于悬垂部分5212向外展开而大于致密结构的有效表面积。

[0260] 图53A-53E描绘了各种核酸纳米结构构型的横截面图,其中每个核酸纳米结构包含可透过结构,并且其中每个可透过结构包含多个悬垂部分,所述悬垂部分被配置为与其他实体(例如,分析物、其他核酸纳米结构、固体支持物、试剂等)具有不同的相互作用。图53A描绘了与包含多个悬垂寡核苷酸5320的可透过结构偶联的致密结构5310(例如,SNAP),

其中每个悬垂寡核苷酸包含均聚物。每个悬垂寡核苷酸5320的均聚物可以抑制与具有相同或相似悬垂寡核苷酸序列的其他核酸纳米结构的结合相互作用。图53B描绘了与包含多个悬垂寡核苷酸5321的可透过结构偶联的致密结构5310(例如,SNAP),其中每个悬垂寡核苷酸包含均聚物序列,并且其中一些均聚物被除了均聚物序列的核苷酸之外的核苷酸的随机取代所中断(例如,包含随机取代的A、C或G核苷酸的聚T序列)。图53C描绘了与包含多个悬垂寡核苷酸5320的可透过结构偶联的致密结构5310(例如,SNAP),其中每个悬垂寡核苷酸包含均聚物序列区域和与均聚物序列区域互补的序列区。如图所示,互补区域可以形成双链区域5322以形成环结构。图53D描绘了与包含多个悬垂寡核苷酸5323的可透过结构偶联的致密结构5310(例如,SNAP),其中每个悬垂寡核苷酸包含具有一定程度自身互补性(例如,形成茎、环、发夹或凸出结构)的核苷酸序列。图53E描绘了与包含多个悬垂寡核苷酸5324的可透过结构偶联的致密结构5310(例如,SNAP),其中每个悬垂寡核苷酸包含与悬垂寡核苷酸5324杂交的第二寡核苷酸5325。图53A-53E中所示的构型(例如,多核苷酸重复序列、随机核苷酸取代、自身互补性、间歇二级结构)可以促进核酸纳米结构在偶联表面上的取向的重新排列,从而促进核酸纳米结构在偶联表面上以稳定构型定位。

[0261] 图54A-54C示出了根据本文所阐述的一些实施方案产生核酸纳米结构的方法的示意图(例如,图53A-53E中所描绘的核酸纳米结构)。图54A描绘了形成核酸纳米结构的方法,所述核酸纳米结构包含多个含有多核苷酸重复序列的悬垂部分。在第一步中,支架链5410可以任选地在升高的温度下跟多个与支架链5410杂交形成致密结构的订书钉寡核苷酸5420和多个包含悬垂核苷酸序列5422的寡核苷酸5421组合。在冷却寡核苷酸混合物之后,形成核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含致密结构5430和多个包含悬垂核苷酸序列5422的悬垂部分。在第二步中,核酸纳米结构随后在同质的多个核苷酸(例如脱氧胸苷)的存在下与核酸延伸酶(例如,显示了末端脱氧核苷酸转移酶或TdT)接触,以产生多个悬垂的均聚物多核苷酸5423(例如,聚T重复序列)。任选地,给酶提供的核苷酸可以包含少量的其他核苷酸,以在多核苷酸重复序列中产生随机掺入的核苷酸。图54B描绘了形成包含多个含有均聚物多核苷酸的悬垂部分的核酸纳米结构的方法,其中每个悬垂部分的位置受到控制。在第一步中,支架链5410可以任选地在升高的温度下跟多个与支架链5410杂交形成致密结构的订书钉寡核苷酸5420和多个包含悬垂核苷酸序列5422的寡核苷酸5421、以及包含加帽部分5425(例如,二脱氧核苷酸、终止子核苷酸、磷酸化核苷酸、用于埋藏在致密结构5430内的末端残基等)的多个寡核苷酸5424组合,其中所述加帽部分被配置为抑制核酸延伸酶的活性。在冷却寡核苷酸混合物之后,形成核酸纳米结构,所述核酸纳米结构包含致密结构5430和多个包含悬垂核苷酸序列5422的悬垂部分,所述悬垂核苷酸序列中的至少一些包括加帽部分5425。在第二步中,核酸纳米结构随后在同质的多个核苷酸(例如脱氧胸苷)的存在下与核酸延伸酶(例如,末端脱氧核苷酸转移酶或TdT)接触,以在不包含加帽部分5425的任何悬垂寡核苷酸处产生多个悬垂多核苷酸重复序列5423(例如,聚T重复序列)。图54C描绘了形成包含多个悬垂部分的核酸纳米结构的方法,所述悬垂部分包含均聚物序列,其中所述均聚物序列被中间核苷酸序列中断。根据图54A中所描述的第一步形成核酸纳米结构。任选地,可以进行图54A中所描绘的第二步骤,以向每个悬垂部分添加均聚物序列。在第二步中,进行聚合酶延伸反应,由此悬垂引物5422与含有中间核苷酸序列5426的互补序列的模板核酸杂交。聚合酶延伸反应将产生悬垂寡核苷酸,包括引物序列5422和中间核苷酸序列

5426。在第三步中,使用TdT和核苷酸进行图54A的酶促延伸步骤,以形成具有多个悬垂部分的核酸纳米结构,其中每个悬垂部分包含中间核苷酸序列5426,其侧翼是悬垂引物序列5422和均聚物序列5427。

[0262] 如本文所阐述,核酸纳米结构或其组分结构可以包含内部互补性区域。内部互补性可以是指在核酸纳米结构或其组分结构内双链核酸的程度。内部互补性可以定量为在所形成的核酸纳米结构或其组分结构(例如,致密结构、可透过结构)中具有碱基对互补的核苷酸的百分比。可以相对于总核苷酸含量来计算内部互补性的程度。例如,核酸纳米结构可以在形成核酸纳米结构的至少200个寡核苷酸中包含总共10000个核苷酸,其中8500个核苷酸在双链区域中具有碱基对互补序列,给予核酸纳米结构85%的内部互补性。可以针对单个核酸(例如,支架链)或包含核酸纳米结构或其组分结构的寡核苷酸子集来计算内部互补性的程度。例如,核酸纳米结构的致密结构可以包含至少7000个核苷酸的支架链,其中所述支架链的至少90%的核苷酸在双链区域中具有碱基对互补序列。在另一个实例中,核酸纳米结构的可透过结构可以包含多个悬垂部分,其中每个悬垂部分包含没有内部互补性且与任何其他悬垂部分没有互补性的核苷酸序列,从而给予可透过结构基本上0%的内部互补性。

[0263] 核酸纳米结构或其组分结构(例如,致密结构、可透过结构)可以包含至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超过99%的内部互补性。可替代地或另外地,核酸纳米结构或其组分结构可以包含不超过约99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或小于1%的内部互补性。在一些构型中,如果内部互补性超过一个百分比,诸如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或超过99%,则核酸纳米结构或其组分结构可以被认为具有高内部互补性。在一些构型中,如果内部互补性低于一个百分比,诸如不超过20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或小于1%,则核酸纳米结构或其组分结构可以被认为具有低内部互补性。

[0264] 具有高内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以包含一些量的单链核酸。具有高内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以包含至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%或超过20%的单链核酸。在一些构型中,具有高内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以不包含单链核酸。具有低内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以包含一些量的双链核酸。具有低内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以包含不超过约20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或小于1%的双链核酸。在一些构型中,具有低内部互补性的核酸纳米结构或其组分结构可以不包含双链核酸。

[0265] 核酸纳米结构可以包含含有低内部互补性的区域(例如,可透过结构),其中所述包含低内部互补性的区域包含多个悬垂部分。如本文所阐述,悬垂部分可以包含捕获部分。悬垂部分不需要包含捕获部分。核酸纳米结构可以包含多个寡核苷酸,其中每个寡核苷酸包含第一核苷酸序列,其与互补核酸杂交形成具有高内部互补性的结构的一部分,并且其中每个寡核苷酸包含不与高内部互补性区域杂交的悬垂部分。在一些情况下,悬垂部分可以包含单链寡核苷酸或非核酸聚合物链(例如,聚乙二醇、聚乙烯、聚丙烯等)。悬垂部分可

以包含聚合物链(例如,核酸链、非核酸聚合物链),其中所述聚合物链包含直链、支链、树枝状链或其组合。在一些构型中,多个悬垂部分中的悬垂部分可以包含未结合的末端残基。在一些构型中,多个悬垂部分中的悬垂部分可以不包含自身互补性。在一些构型中,多个悬垂部分中的悬垂部分可以包含选自聚T、聚A、聚G和聚C的均聚物序列。例如,在同质的多个脱氧胸苷核苷酸的存在下,可以通过酶(例如,末端脱氧核苷酸转移酶)延伸寡核苷酸,以在寡核苷酸上形成聚T序列。多个悬垂部分可以包含同质的多个悬垂部分,其中每个悬垂部分包含与所述多个悬垂部分中的每个其他悬垂部分相同的化学结构。多个悬垂部分可以包含异质的多个悬垂部分,其中第一悬垂部分包含与所述多个悬垂部分的第二悬垂部分不同的化学结构。

[0266] 悬垂部分或其组分可以包含核苷酸序列(例如,均聚物、多核苷酸重复序列、没有自身互补性的寡核苷酸、具有自身互补性的寡核苷酸等)。悬垂部分或其组分的核苷酸序列可以具有本文针对订书钉寡核苷酸例示的序列长度或化学组成。

[0267] 核酸纳米结构可以包含含有低内部互补性的区域(例如,可透过结构),其中所述包含低内部互补性的区域包含一定量的悬垂部分。包含低内部互补性的区域可以包含至少1个、5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、50个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个或超过1000个悬垂部分。可替代地或另外地,包含低内部互补性的区域可以包含不超过约1000个、900个、800个、700个、600个、500个、400个、300个、200个、100个、50个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、10个、5个或少于5个悬垂部分。核酸纳米结构的悬垂部分的数量可以基于在核酸纳米结构的面(例如,捕获面、效用面)上可用位置的数量来确定。核酸纳米结构的悬垂部分的数量可以基于在核酸纳米结构的面上悬垂部分的所需表面密度来确定。例如,最大化SNAP的捕获面上的悬垂捕获部分的表面密度可能是有利的,其中所述悬垂捕获部分具有基本上均匀的表面密度。在这样的实例中,可以提供给SNAP的悬垂部分的最大数量可能受到合适位置的数量限制,所述合适位置包括捕获面中的取向和与最近的合适位置的距离,该距离在例如合适位置之间的平均距离的约20%、15%、10%、5%或小于5%的范围内。提供给核酸纳米结构的悬垂部分的数量可以基于与另一个实体(例如,分析物、核酸纳米结构、固体支持物、试剂等)的期望相互作用的强度来确定。例如,可以向核酸纳米结构中添加另外的悬垂捕获部分,以增加与固体支持物表面的偶联相互作用的强度。

[0268] 核酸纳米结构可以包含致密结构。致密结构可以包含多个三级结构(例如,螺旋双链核酸)。每个三级结构可以包含限定三级结构的角度取向的对称轴(例如,螺旋轴)。在相邻或非相邻的三级结构之间的距离可以测量为在三级结构的相应对称轴之间的距离。在相邻或非相邻的非平行三级结构之间的平均距离可以测量为在三级结构的相应对称轴之间的平均距离。致密结构可以包含多个三级结构,其中位置、取向和/或运动自由度被约束在第一三级结构和第二三级结构(例如,相邻的三级结构、非相邻的三级结构)之间。如本文所阐述,在第一三级结构与第二三级结构之间的位置、取向和/或运动自由度可以被一条或多条连接链约束。

[0269] 致密结构可以包含多个三级结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于第二三级结构的受约束位置包含小于约

50纳米 (nm)、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm或小于2nm的在第一对称轴与第二对称轴之间的平均分隔距离。可替代地或另外地,致密结构可以包含多个三级结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含至少约2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm或超过50nm的在第一对称轴与第二对称轴之间的平均分隔距离。

[0270] 致密结构可以包含多个三级结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含至少约0°、10°、20°、30°、40°、50°、60°、70°、80°、90°、100°、110°、120°、130°、140°、150°、160°、170°或180°的在第一对称轴与第二对称轴之间的平均角度偏移。可替代地或另外地,致密结构可以包含多个三级结构,其中所述多个三级结构包含含有第一对称轴的第一三级结构和含有第二对称轴的第二三级结构,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相邻,并且其中所述第一三级结构相对于所述第二三级结构的受约束位置包含不超过约180°、170°、160°、150°、140°、130°、120°、110°、100°、90°、80°、70°、60°、50°、40°、30°、20°、10°或0°的在第一对称轴与第二对称轴之间的平均角度偏移。

[0271] 如本文所阐述,核酸纳米结构可以包含致密结构,其中所述致密结构包含核酸折纸。核酸折纸可以包含一个或多个面,其中所述一个或多个面中的一个面包含部分(例如,展示部分、捕获部分、效用部分等),并且其中所述核酸折纸为所述部分提供可调的位置和/或取向。在一些构型中,核酸折纸可以包含第一面和第二面,其中所述第一面从所述第二面偏移了至少约30°、45°、60°、90°、120°、135°、150°、160°、170°或180°的平均角度。可替代地或另外地,核酸折纸可以包含第一面和第二面,其中所述第一面从所述第二面偏移了不超过约180°、170°、160°、150°、135°、120°、90°、60°、45°、30°或小于30°的平均角度。核酸折纸可以包含第一面和第二面,其中所述第一面包含展示部分,如本文所阐述,并且所述第二面与可透过结构相邻。核酸折纸可以包含第一面和第二面,其中所述第一面包含展示部分,如本文所阐述,并且所述第二面与可透过结构偶联。例如,具有瓦片结构的核酸折纸可以包含第一面和第二面,所述第一面包含被配置为偶联分析物的点击型反应基团,所述第二面包含含有多个悬垂部分的捕获部分,其中可透过结构包含多个悬垂部分,并且其中所述第一面与所述第二面在取向上基本上相反(例如,约180°偏移)。

[0272] 核酸纳米结构可以包含致密结构和可透过结构,其中所述可透过结构包含相对于致密结构的分布。空间分布可以包含各向同性分布或各向异性分布。空间分布可以是关于两个空间维度和/或三个空间维度。例如,可透过结构可以包含在两个空间维度上的各向同性空间分布,但是关于三个空间分布的各向异性空间分布。例如,图52A描绘了具有致密结构5210的核酸纳米结构的横截面图,所述致密结构与包含多个悬垂部分5212的可透过结构偶联。关于以致密结构5210的平均中线为中心的对称平面5250,多个悬垂部分5212被限制在完全低于对称平面5250(例如,关于对称平面5250各向异性)的体积5230。图52B描绘了图52A中所描绘的核酸纳米结构的俯视图。从俯视图来看,多个悬垂部分关于致密结构5210的中心点具有基本上各向同性空间分布。在一些构型中,可透过结构相对于致密结构

的空间分布可以关于假想体积(例如,球体、半球、立方体、圆柱体等)来确定,所述假想体积完全包围含有致密结构和可透过结构的核酸纳米结构。在特定的构型中,假想体积可以关于致密结构的排列(诸如致密结构的对称轴、对称平面或面)来定位。在一些构型中,各向异性体积分布可以包括不包含可透过结构的、在致密结构周围的半球体积的部分。在一些构型中,各向异性体积分布可以包含排除了包含与致密结构偶联的目标分析物的体积的、在致密结构周围的球形体积的部分。

[0273] 核酸纳米结构可以包含致密结构和可透过结构,其中所述致密结构和所述可透过结构各自占据特征性体积,其中所述特征性体积包含结构在空间和/或时间基础上占据的最小、平均或最大体积。致密结构和/或可透过结构的体积可以根据包含致密结构和/或可透过结构的核酸纳米结构的构型(例如,结合到固体支持物、未结合到固体支持物、偶联至分析物、偶联至试剂等)而变化。例如,包含致密结构和可透过结构的核酸纳米结构可以通过包含可透过结构的捕获部分与固体支持物结合,其中所述致密结构的体积不会因结合而改变,但可透过结构的体积会因结合而减少。在一些构型中,致密结构的平均体积不需要根据包含致密结构的核酸纳米结构的构型而变化。在一些构型中,由致密结构所占据的体积可以大于由可透过结构所占据的体积。在其他构型中,由可透过结构所占据的体积可以大于由致密结构所占据的体积。

[0274] 核酸纳米结构可以包含平均有效表面积(例如,溶液中的核酸纳米结构)和/或占用面积(例如,与固体支持物偶联的核酸纳米结构)。核酸纳米结构可以包含致密结构和/或可透过结构,其中所述致密结构和/或可透过结构包含平均有效表面积和/或占用面积。致密结构和/或可透过结构的平均有效表面积和/或占用面积可以被修改,例如,以调节与另一个实体(例如,分析物、核酸纳米结构、固体支持物、试剂等)的相互作用的强度。在一些构型中,可透过结构的有效表面积和/或占用面积可以与核酸纳米结构的有效表面积和/或占用面积基本上相同。在其他构型中,可透过结构的有效表面积可以小于核酸纳米结构的有效表面积。在一些构型中,可透过结构的有效表面积可以小于致密结构的有效表面积。在一些构型中,可透过结构的有效表面积可以大于致密结构的有效表面积。在一些构型中,核酸纳米结构的占用面积可以大于核酸纳米结构的有效表面积。在其他构型中,核酸纳米结构的占用面积可以小于或等于核酸纳米结构的有效表面积。在一些构型中,致密结构的占用面积可以小于或等于致密结构的有效表面积。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含占用面积,其中所述核酸纳米结构的占用面积大于、等于或小于核酸纳米结构的有效表面积。

[0275] 在固体支持物上的核酸

[0276] 如本文所阐述的核酸可以被配置为与如本文所阐述的固体支持物或其位点偶联。在一些构型中,可以将多个核酸偶联至固体支持物,其中每个核酸被配置为将目标分析物偶联至固体支持物,从而在固体支持物上形成目标分析物的阵列。核酸可以与固体支持物或其表面串联配置,以增加核酸/固体支持物相互作用的一种或多种结果的可能性,包括:1) 将核酸结合到固体支持物的被配置为结合核酸的地址,2) 抑制核酸结合到固体支持物的未被配置为结合核酸的地址,3) 抑制第二核酸与包含第一核酸的地址结合,其中所述地址未被配置为结合第二核酸;4) 抑制核酸的不正确结合取向,和5) 以对于基于阵列的过程(例如,表征测定、合成过程等)可及的方式展示目标分析物。

[0277] 核酸和固体支持物的系统可以被配置为产生分析物阵列,所述分析物阵列有基本

上均匀的感兴趣分析物表面密度。特别目标是核酸和固体支持物的系统,所述系统产生目标分析物的高密度阵列,例如,其中所述分析物阵列中的每个分析物在单分析物分辨率下是可单独分辨的。目标分析物的阵列可以包含以下中的一种或多种特性:i) 包含含有一个且仅一个目标分析物的最大数量、密度或间距的单独可分辨阵列地址,ii) 包含含有两个或更多个目标分析物的最小数量、密度或间距的单独可分辨阵列地址,iii) 包含不含有目标分析物的最小数量、密度或间距的单独可分辨阵列地址,和iv) 包含不含有目标分析物的最大数量、密度或间距的可单独分辨阵列地址。用于单分析物过程的有用的感兴趣分析物阵列可以包含在阵列地址处的单分析物的空间分布(例如间距或密度),其中参考统计分布,诸如泊松分布或正态分布,所述空间分布含有更大量的由一个且仅一个单分析物占据的位点。例如,给定含有N个分析物结合位点的固体支持物和偶联至与固体支持物接触的分析物的多个N个核酸的系统或制备这样的系统的方法,其中所述固体支持物和所述核酸都不偏向核酸结合至任何特定分析物结合位点的可能性,泊松分布将预测约37%的N个分析物结合位点不含有沉积的目标分析物,约37%的N个分析物结合位点含有一个且仅一个沉积的目标分析物,并且约26%的N个分析物结合位点含有两个或更多个沉积的目标分析物。因此,有利的是配置核酸和固体支持物的系统或制备此类系统的方法,它们提供在阵列位点中至少40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%或大于99%的单分析物占据。可替代地或另外地,有利的是配置核酸和固体支持物的系统,其提供:1) 最大的单分析物占据的位点:无分析物占据的位点的比率,和/或2) 最大的单分析物占据的位点:多个分析物占据的位点的比率。

[0278] 技术人员将容易地认识到如本文所阐述的固体支持物和如本文所阐述的核酸的无数组合,用于形成单分析物阵列。在一些构型中,阵列形成系统可以包含含有一个或多个捕获部分的核酸和含有一个或多个表面连接部分的固体支持物,其中所述核酸被配置为通过一个或多个捕获部分与一个或多个表面连接部分的偶联相互作用而结合到固体支持物上。可以根据以下中的一种或多种特性选择捕获部分:1) 与固体支持物的表面连接部分形成特异性相互作用,任选地以快速的方式(高动力学结合速率),2) 与固体支持物的表面连接部分形成持续时间长的特异性相互作用(低动力学解离速率),3) 不与系统中的其他实体(例如,其他核酸、与其他核酸偶联的分析物、阵列的非结合区域等)形成低特异性结合相互作用,和4) 提供抑制其他核酸在阵列位点处结合的物理和/或化学特性(例如,空间阻断、静电排斥、磁性排斥等)。可以根据以下中的一种或多种特性选择表面连接部分:1) 与核酸的捕获部分形成特异性相互作用,任选地以快速的方式(高动力学结合速率),2) 与核酸的捕获部分形成持续时间长的特异性相互作用(低动力学解离速率),3) 抑制与系统中其他实体(例如,分析物)的结合相互作用,4) 提供抑制其他核酸在阵列位点处结合的物理和/或化学特性(例如,空间阻断、静电排斥、磁性排斥等),和5) 促进核酸在特定位置和取向上的结合(例如,对称地集中在具有不与固体支持物接触的目标分析物的位点上)。

[0279] 令人惊讶的是,核酸和固体支持物的系统或制备这样的系统的方法可以被配置为通过在核酸的一个或多个捕获部分与固体支持物的一个或多个表面连接部分之间形成弱结合相互作用来获得对单分析物阵列上核酸结合位置的空间控制。通常,分子通过形成强结合相互作用(例如,点击型共价键、链霉素和素-生物素偶联等)与表面偶联。此类强结合相互作用有利于将分子永久偶联至表面;然而,如果分子最初结合到结合位点的边缘,则在

结合位点处可能存在足够的另外空间来偶联一个或多个另外的分子。相比之下,核酸和固体支持物的系统可以被配置为通过多价效应获得对单分析物阵列上核酸结合位置的空间控制,在所述多价效应中在一个或多个捕获部分与多个表面连接部分之间的多个弱结合相互作用提供了与单一强结合相互作用相当的结合强度,同时允许核酸在固体支持物上从初始结合构型空间重新排列到更稳定的最终结合构型。不希望被理论所束缚,包含一个或多个捕获部分的核酸的稳定结合构型可以在包含过量的表面连接部分的结合位点上获得,这是由于:1) 在一个或多个捕获部分与过量的表面连接部分之间的特异性结合相互作用的能量有利性,和2) 由在一个或多个捕获部分与过量的表面连接部分之间结合的许多可能构型引起的熵有利性。

[0280] 图58A-58C示出了通过多价结合相互作用在表面上实现核酸纳米结构的稳定构型的概念。图58A示出了包含具有多个表面连接部分5805的位点5801的固体支持物5800,所述表面连接部分被配置为与核酸纳米结构5830的互补捕获部分5835偶联。核酸纳米结构5830任选地与分析物5840偶联。图58B显示了核酸纳米结构5830在位点5801的随机位置处与固体支持物5800接触时的核酸纳米结构5830的初始构型。由于接触的位置,在表面连接部分5805与捕获部分5835之间仅发生了一个偶联相互作用。图58C描绘了在位点5801的表面上进行空间重排之后核酸纳米结构5830的更稳定的最终构型。由于在表面连接部分5805与捕获部分5835之间偶联相互作用的数量增加,最终构型可能比初始构型更稳定。最终构型也可以比初始构型更稳定,因为其具有在表面连接部分5805与捕获部分5835之间的偶联的其他可能组合,如果在表面连接部分5805与捕获部分5835之间的任何偶联被破坏,则该结构可以重新排列成这些组合。

[0281] 图52A-52H和53A-53D示出了可以与固体支持物或其表面形成多价结合相互作用的核酸纳米结构的构型。图53A-53D中所描绘的核酸纳米结构包含多个悬垂寡核苷酸,其被配置为与固体支持物的互补寡核苷酸形成杂交结合相互作用。图55A-55D中描绘了形成多价结合相互作用的核酸纳米结构的其他构型。图55A描绘了与分析物5540偶联的核酸纳米结构5530。核酸纳米结构包含第一内部单链核酸5532和第二内部单链核酸5534,它们被配置为与第一互补表面连接的寡核苷酸5520和第二表面连接的寡核苷酸5522偶联,所述第一互补表面连接的寡核苷酸和第二表面连接的寡核苷酸中的每一个都以相对于核酸纳米结构5530的可用结合位点的摩尔过量与固体支持物5500的位点5501偶联。图55B描绘了在固体支持物5500的位点5501处呈偶联构型的核酸纳米结构5530。第一互补表面连接的寡核苷酸5520和第二表面连接的寡核苷酸5522已经与第一内部单链核酸5532和第二内部单链核酸5534偶联。过量的表面连接的寡核苷酸5520和5522保留,从而如果有利的话通过结合相互作用的重新排列来促进核酸纳米结构5530的空间重新排列。图55C描绘了与分析物5540偶联的核酸纳米结构5530。核酸纳米结构包含多个捕获部分5550(例如,抗体、抗体片段、适体等),其被配置为与多个表面连接的结合配体5555偶联,所述多个表面连接的结合配体中的每一个相对于核酸纳米结构5530的可用捕获部分以摩尔过量与固体支持物5500的位点5501偶联。位点5501还可以包含多个非偶联部分5560(例如,阻止非特异性结合的钝化部分)。图55D描绘了在固体支持物5500的位点5501处呈偶联构型的核酸纳米结构5530。多个捕获部分5550已经与多个表面连接的结合配体5555偶联。过量的表面连接的结合配体5555保留,从而如果有利的话通过结合相互作用的重新排列来促进核酸纳米结构5530的空间重

新排列。图52A-52H和53A-53D中所描绘的构型含有捕获部分的各种化学结构和空间构型，所述捕获部分包含可透过结构(例如，多个悬垂部分)。有利的核酸纳米结构可以包含含有多个捕获部分的可透过结构，其中每个捕获部分被配置为与固体支持物的表面连接部分形成结合相互作用。有利的核酸纳米结构可以包含含有捕获部分的可透过结构，其中所述捕获部分被配置为与固体支持物的多个表面连接部分形成多个结合相互作用。

[0282] 图56A-56C描绘了与固体支持物偶联的核酸纳米结构的不同系统的实例。图56A显示了包含位点5601的固体支持物5600，其中所述位点包含多个含有聚A序列的表面连接的寡核苷酸5605。核酸纳米结构5630与分析物5640偶联，并且进一步通过包含多个含有聚T序列的悬垂寡核苷酸5635的可透过结构与位点5601偶联。每个悬垂寡核苷酸5635足够长，以与多个表面连接的寡核苷酸5605偶联，从而在位点5601与核酸纳米结构5630之间形成多价结合相互作用。任选地，多个悬垂寡核苷酸5635可以包含不同链长的寡核苷酸。图56B描绘了与图56A相似的组成，然而核酸纳米结构5630反而包含含有多个含有聚T序列的寡核苷酸环5637的可透过结构。每个悬垂寡核苷酸环5637足够长以与多个表面连接的寡核苷酸5605偶联，从而在位点5601与核酸纳米结构5630之间形成多价结合相互作用。图56C显示了包含位点5601的固体支持物5600，其中所述位点包含第一多个含有聚A序列的表面连接的寡核苷酸5605和第二多个包含与杂聚核苷酸序列5636的互补性的表面连接的寡核苷酸5606。核酸纳米结构5630与分析物5640偶联，并且通过包含多个悬垂寡核苷酸5635的可透过结构进一步与位点5601偶联，所述悬垂寡核苷酸含有聚T序列并且进一步含有包含非重复核苷酸序列5636的中间核苷酸序列。可以限制杂聚核苷酸序列5636或互补的表面连接的寡核苷酸5606的数量，以减少对偶联至固体支持物的核酸纳米结构可用的重新排列的构型的数量。

[0283] 核酸纳米结构与固体支持物或其表面的偶联可以导致核酸纳米结构的构象变化。在一些构型中，核酸纳米结构可以包含致密结构和可透过结构，其中所述核酸纳米结构与固体支持物或其表面的偶联不会对致密结构引起构象(例如，形状、体积、有效表面积、占用面积等)的实质性变化，并且其中所述核酸纳米结构与固体支持物或其表面的偶联对可透过结构引起构象(例如，形状、体积、有效表面积、占用面积等)的显著变化。图57描绘了当纳米结构结合到固体支持物5700的位点5701时与包含致密结构5710和可透过结构5720的核酸纳米结构的结合相关的构象变化。在初始的未结合构型中，致密结构5710包含宽度 $L_{C,i}$ 、厚度 $H_{C,i}$ 和体积 $V_{C,i}$ ，并且可透过结构5720包含宽度 $L_{N,i}$ 、厚度 $H_{N,i}$ 和体积 $V_{N,i}$ 。在与表面偶联之后，由于悬垂部分与位点5701的表面形成最大数量的结合相互作用，所以可透过结构可能变得致密和伸长。因此，在最终的结合构型中，致密结构5710可以包含宽度 $L_{C,f}$ 、厚度 $H_{C,f}$ 和体积 $V_{C,f}$ ，其中所述值与初始值相比基本上不变。相比之下，可透过结构5720可以包含宽度 $L_{N,f}$ 、厚度 $H_{N,f}$ 和体积 $V_{N,f}$ ，其中宽度的最终值相对于初始值增加，高度的最终值相对于初始值减少，并且体积的最终值取决于与位点5701的结合相互作用的性质可能改变或可能不改变。具有构象变化的核酸纳米结构可能有利于增加核酸纳米结构在结合位点表面积上的占用面积，从而减少用于结合其他核酸纳米结构或其他实体的可用表面积。

[0284] 在一方面，本文提供了一种组合物，所述组合物包含：a) 包含多个位点的固体支持物，和b) 多个核酸纳米结构(例如，SNAP)，其中每个核酸纳米结构与分析物偶联或被配置为与分析物偶联，并且其中所述多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构与所述多个位点中的位点偶联，其中所述多个位点包含含有第一数量的位点的第一子集和含有第二数量的位

点的第二子集,其中所述第一子集中的每个位点包含两个或更多个偶联的核酸纳米结构,其中所述第二子集中的每个位点包含一个且仅一个偶联的核酸纳米结构,并且其中所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率小于由泊松分布预测的比率。

[0285] 在另一方面,本文提供了一种分析物阵列,所述分析物阵列包含:a)包含多个位点的固体支持物;和b)多个核酸纳米结构(例如,SNAP),其中每个核酸纳米结构与目标分析物偶联,并且其中所述多个核酸纳米结构的每个核酸纳米结构与所述多个位点中的位点偶联,其中所述多个位点中至少40%的位点包含一个且仅一个目标分析物。

[0286] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点的固体支持物;和b)核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构偶联至所述位点,其中所述核酸纳米结构偶联至目标分析物;并且其中所述核酸纳米结构被配置为防止所述目标分析物与所述固体支持物之间的接触。

[0287] 在另一方面,本文提供了一种组合物,所述组合物包含:a)包含被配置为偶联核酸纳米结构的位点的固体支持物,其中所述位点包含表面积;和b)核酸纳米结构,其中所述核酸纳米结构偶联至所述位点,其中所述核酸纳米结构与目标分析物偶联或被配置为与目标分析物偶联;其中所述核酸纳米结构包含未结合构型中的总有效表面积,其中所述核酸纳米结构包含具有未结合构型中的有效表面积的致密结构,其中所述致密结构的有效表面积小于所述位点的表面积的50%,并且其中所述未结合构型包含未偶联至位点的核酸纳米结构。

[0288] 阵列可以包含多个位点,其中位点具有可确定的占据。当用于指阵列的位点时,占据可以是指实体(例如,核酸、分析物、核酸和分析物、与分析物偶联的核酸、核酸或分析物等)在阵列位点处的检测到或推断出的存在。在特定的情况下,占据还可以是指被检测到或推断出存在于阵列位点处的实体的特性(例如,化学特性、物理特性等)或特征(例如,空间取向、时间取向、结合状态、未结合状态等)。例如,当形成用于多肽测定的阵列时,包含与核酸纳米结构偶联的多肽的复合物可以通过将多肽偶联至阵列位点而不是将核酸偶联至阵列位点而沉积在阵列位点上,从而使得多肽在多肽测定期间不可询问。在这种情况下,由于复合物在阵列位点上的取向,可以认为所述位点没有被分析物占据。当用于涉及包含多个位点的阵列时,占据可以是指多个位点中包含实体(例如,核酸、分析物、核酸和分析物、与分析物偶联的核酸、核酸或分析物等)的检测到或推断出的存在的位点的百分比或分数。在特定的情况下,占据还可以是指多个位点中包含具有特性(例如,化学特性、物理特性等)或特征(例如,空间取向、时间取向、结合状态、未结合状态等)的实体的检测到或推断出的存在的位点的百分比或分数。例如,如果每10个位点中有9个位点含有可检测的分析物,则阵列可以具有0.9的可检测的分析物占据分数。在一些构型中,占据可以是指在一个位点的实体的数量,诸如在一个位点的约0个、1个、2个、3个、4个、5个或更多个实体。在一些构型中,占据可以是指在一个位点具有特定特性或特征的实体的数量,诸如在一个位点约0个、1个、2个、3个、4个、5个或更多个实体。

[0289] 因此,分析物的阵列可以通过两个或更多个占据量度的定量比较来表征。例如,将阵列的多个位点中不含有分析物的位点的占据与阵列的多个位点中含有至少一个分析物的位点的占据进行比较可能是有用的。在另一个实例中,将阵列的多个位点中含有一个且仅一个分析物的位点的占据与阵列的多个位点中含有两个或更多个分析物的位点的占

据进行比较可能是有用的。在一些构型中,在形成分析物阵列之后,两个或更多个占据量度的比较可以提供有用的质量控制特征。例如,如果占据两个或更多个分析物的位点与占据一个且仅一个位点的位点的比率超过阈值,诸如由泊松分布预测的比率,则分析物阵列可以被拒绝进一步使用。如本文所阐述,表I列出了占据量度对,其比率可用于表征阵列。

[0290] 表I

	第 1 个占据量度	第 2 个占据量度	第 1 个与第 2 个的临界比率
	占据的位点	未占据的位点	1.72
[0291]	只有 1 个分析物的位点	含有 2+个分析物的位点	> 1.40
	只有 1 个核酸纳米结构的位点	含有 2+个核酸纳米结构的位点	> 1.40
	含有 1+个分析物的位点	含有 0 个分析物的位点	1.72
[0292]	含有 1+个核酸纳米结构的位点	含有 0 个核酸纳米结构的位点	1.72
	含有 1+个可检测分析物的位点	含有 0 个可检测分析物的位点	1.72

[0293] 在另一方面,本文提供了一种表征分析物阵列的方法,所述方法包括:a)提供如本文所阐述的分析物阵列,b)确定如本文所阐述的分析物阵列的第一占据量度,c)确定如本文所阐述的分析物阵列的第二占据量度,和d)将第一占据量度与第二占据量度的比率与阵列标准进行比较。在一些构型中,对于具有符合统计或随机分布(例如,泊松分布、正态分布、二项式分布等)的占据分布的假设分析物阵列,阵列标准可以包含第一占据量度与第二占据量度的比率。例如,阵列标准可以包含表I中所列出的临界比率,或者任何其他可想到的占据量度比率。在一些构型中,第一占据量度与第二占据量度的比率可以满足或超过由统计或随机分布(例如,泊松分布)预测的阵列标准。在其他构型中,第一占据量度与第二占据量度的比率可能不满足或超过由统计或随机分布(例如,泊松分布)预测的阵列标准。表征分析物阵列的方法还可以包括基于将第一占据量度与第二占据量度的比率与阵列标准进行比较,废弃分析物阵列的步骤。例如,分析物占据水平低于阵列标准的分析物阵列可以被废弃。表征分析物阵列的方法还可以包括基于将第一占据量度与第二占据量度的比率与阵列标准进行比较,从分析物阵列中分离分析物的步骤。例如,在用新的多个分析物重新形成分析物阵列之前,可以将分析物占据低于阵列标准的分析物阵列与剥离介质(例如,变性剂、离液剂)接触,以去除偶联的分析物和/或核酸。表征分析物阵列的方法还可以包括基于将第一占据量度与第二占据量度的比率与阵列标准进行比较,向分析物阵列提供另外的分析物的步骤。例如,分析物占据水平低于阵列标准的分析物阵列可以与偶联至核酸的另外分析物接触,以增加分析物占据。表征分析物阵列的方法还可以包括基于将第一占据量度与第二占据量度的比率与阵列标准进行比较,在基于阵列的过程(例如,测定、合成等)中利用分析物阵列的步骤。

[0294] 在一些构型中,阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点包含第一位点子集,其中所述第一子集的每个位点包含第一占据量度(例如,与阵列位点偶联的实体的数量、实体的存在、可检测实体的存在等)、第二位点子集,其中所述第二子集的每个位点包含第二占据量度,以及任选地,第三位点子集,其中所述第三子集的每个位点包含第三占据量度。阵列的占据可以通过诸如荧光显微术、电子显微术、原子力显微术等方法来确定。阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点中的至少约10%、20%、30%、35%、37%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、99.99999%或超过99.99999%的位点包含至少一个分析物的占据。可替代地或另外地,阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点中不超过约99.99999%、99.9999%、99.999%、99.99%、99.9%、99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、37%、35%、30%、20%、10%或小于10%的位点包含至少一个分析物的占据。阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点中的至少约10%、20%、30%、35%、37%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、99.99999%或超过99.99999%的位点包含不超过一个分析物的占据。可替代地或另外地,阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点中不超过约99.99999%、99.9999%、99.999%、99.99%、99.9%、99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、37%、35%、30%、20%、10%或小于10%的位点包含不超过一个分析物的占据。

[0295] 继续包含含有两个或更多个分析物占据的第一位点子集、含有一个分析物占据的第二位点子集和含有零个分析物占据的第三位点子集的阵列的实例,所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率或者所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以基本上符合由概率或随机分布预测的比率,所述概率或随机分布诸如泊松分布、正态分布、二项式分布等。所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率或者所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以偏离由概率或随机分布预测的比率。所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以具有不大于约0.71、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0001、0.00001、0.000001或小于0.000001的值。可替代地或另外地,所述第一子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以具有至少约0.000001、0.00001、0.0001、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.71或大于0.71的值。所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以具有不大于约0.99、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0001、0.00001、0.000001或小于0.000001的值。可替代地或另外地,所述第三子集的位点数量与所述第二子集的位点数量的比率可以具有至少约0.000001、0.00001、0.0001、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、0.99或大于0.99的值。

[0296] 核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以通过在核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物阵列中的相邻核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物上的分析物偶联位点之间的间隔或分隔来表征。相对于相邻核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物,核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以具有至少约5nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、120nm、140nm、160nm、180nm、

200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1 μ m、2 μ m、3 μ m、4 μ m、5 μ m、10 μ m或大于10 μ m的最近邻分隔。相对于相邻核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物,核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以具有不大于约10 μ m、5 μ m、4 μ m、3 μ m、2 μ m、1 μ m、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、450nm、400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、180nm、160nm、140nm、120nm、100nm、95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm、50nm、45nm、40nm、35nm、30nm、25nm、20nm、15nm、10nm、5nm或小于5nm的最近邻分隔。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物最近邻分隔可以通过光学方法诸如荧光显微术来确定。在一些情况下,核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物最近邻分隔可以基于例如在固定图像区域上的总荧光计数计算为平均值,其中所述总荧光计数可以与观察到的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的数量相关。在其他情况下,光学检测系统可以具有足够的光学分辨率和传感器像素密度,以区分单独核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物并确定与所有最近邻核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的分隔。

[0297] 如本文所阐述,核酸纳米结构可以被配置为与阵列的位点偶联,从而阻断第二核酸纳米结构与所述位点的偶联。在一些构型中,阻断结合可以包括抑制第二核酸纳米结构通过第一核酸纳米结构向阵列位点的转运。例如,阻断结合可以包括在阵列位点沉积第一核酸纳米结构期间抑制第二核酸纳米结构在阵列位点的沉积。在一些构型中,阻断结合可以包括在第一核酸纳米结构已经与阵列位点偶联之后抑制第二核酸纳米结构在阵列位点的沉积。

[0298] 第一核酸纳米结构可以通过占据阵列位点的大部分表面积来阻断第二核酸纳米结构在阵列位点的结合。在一些构型中,核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以与阵列位点偶联,其中所述核酸纳米结构复合物包含偶联的多个核酸纳米结构,并且其中所述任选地,所述纳米结构复合物与单个目标分析物偶联或被配置为与单个目标分析物偶联。在其他构型中,包含可透过结构的核酸纳米结构可以与阵列位点偶联,其中所述可透过结构被配置为阻断第二核酸纳米结构与阵列位点的结合,并且其中任选地,所述纳米结构与单个目标分析物偶联或被配置为与单个目标分析物偶联。在一些构型中,可透过结构可以包含寡核苷酸,所述寡核苷酸被配置为阻断第二核酸纳米结构与阵列位点的结合。用于可透过结构的示例性组合在本文别处(例如,在捕获部分、悬垂部分和悬垂寡核苷酸的上下文中)进行阐述。

[0299] 偶联至固体支持物的核酸纳米结构可以被配置为抑制或防止目标分析物与固体支持物之间的接触。在一些构型中,核酸纳米结构可以被配置为在核酸纳米结构在固体支持物上的阵列位点处沉积期间抑制或防止目标分析物与固体支持物之间的接触。例如,核酸纳米结构可以防止分析物通过非特异性结合相互作用直接偶联至表面。在其他构型中,核酸纳米结构可以被配置为在核酸纳米结构在固体支持物上的阵列位点处沉积之后抑制或防止目标分析物与固体支持物之间的接触。例如,核酸纳米结构可以包含将分析物与核酸纳米结构偶联的连接部分,其中所述连接部分有助于分析物的增加的空间运动范围,并且其中所述核酸纳米结构还包含在阵列位点上的占用面积,该占用面积阻断了分析物由于其增加的运动范围而可以接近的阵列位点的任何表面区域。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含可透过结构,其中所述可透过结构包含被配置为防止目标分析物与固体支持物之间接触的部分。在一些构型中,可透过结构包含被配置为通过固体支持物的空间阻断来防

止目标分析物与固体支持物之间接触的部分。在特定的构型中,被配置为防止目标分析物与固体支持物之间接触的部分包含被配置为防止目标分析物与固体支持物之间接触的化学和/或物理特性。在特定的构型中,被配置为防止目标分析物与固体支持物之间接触的部分包括电排斥部分、磁排斥部分、疏水部分、亲水部分、两亲部分或它们的组合。

[0300] 固体支持物上的阵列位点可以被配置为防止分析物与阵列位点的结合,或防止超过一个核酸纳米结构沉积在阵列位点处。阵列位点可以包含被配置为防止目标分析物与所述位点偶联或防止超过一个核酸纳米结构在阵列位点处沉积的部分。在一些构型中,被配置为防止目标分析物与位点偶联或防止超过一个核酸纳米结构在阵列位点处沉积的部分可以包含(i)寡核苷酸,(ii)聚合物链,选自线性聚合物链、支化聚合物链和树枝状聚合物链,(iii)包含被配置为防止目标分析物与固体支持物之间的接触的接触的化学特性的部分,或(iv)包含电排斥部分、磁排斥部分、疏水部分、亲水部分、两亲部分或其组合的部分。在一些构型中,阵列位点可以包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分和所述第二部分被配置为防止目标分析物与位点偶联或防止超过一个核酸纳米结构在阵列位点处沉积,并且其中所述第一部分和所述第二部分包含不同的化学结构或不同的特性。例如,阵列位点可以包含多个聚合物链,其中所述多个链包含具有不同结构的聚合物链(诸如线性聚合物链(例如,线性PEG、线性葡聚糖)和支化聚合物链(例如,支化PEG、支化葡聚糖))的混合物。在另一个实例中,阵列位点可以包含具有不同物理特性的聚合物链的混合物,诸如极性链(例如,PEG链)和非极性链(例如,聚乙烯链)的混合物。

[0301] 核酸纳米结构可以包含致密结构(例如,核酸折纸),其包含比核酸纳米结构被配置为偶联的阵列位点的表面积更小的有效表面积。例如,正方形、瓦片形状的DNA折纸可以具有大约83纳米的边长,使得如果折纸在其正方形面之一上与阵列位点偶联,则DNA折纸将占据300纳米宽的圆形阵列位点表面积的小于10%。包含致密结构的核酸纳米结构可以被配置为占据比致密结构的有效表面积更大的阵列位点表面积。例如,核酸纳米结构可以与另外的核酸纳米结构偶联,以形成表面积增加的核酸纳米结构复合物。在另一个实例中,核酸纳米结构还可以包含被配置为增加核酸纳米结构的有效表面积的可透过结构(例如,多个悬垂寡核苷酸,诸如图57所示)。核酸纳米结构可以包含致密结构,其中所述致密结构包含阵列位点表面积的不超过约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或小于1%的有效表面积。可替代地或另外地,核酸纳米结构可以包含致密结构,其中所述致密结构包含阵列位点表面积的至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或超过90%的有效表面积。

[0302] 核酸纳米结构可以包含被配置为增加核酸纳米结构的有效表面积或占用面积的可透过区域。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含可透过结构,其中所述可透过结构被配置为与固体支持物的位点偶联(例如,包含捕获部分)。在一些构型中,可透过区域可以包含比致密区域的有效表面积或占用面积更大的有效表面积或占用面积。在其他构型中,可透过区域可以包含比致密区域的有效表面积或占用面积更小的有效表面积或占用面积。

[0303] 在一些构型中,当偶联至固体支持物时,核酸纳米结构可以包含如下总占用面积,其大于核酸纳米结构在未偶联至固体支持物时的总有效表面积。当偶联至固体支持物时,

核酸纳米结构可以包含为阵列位点表面积的至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、150%、200%或超过200%的总占用面积。可替代地或另外地,当偶联至固体支持物时,核酸纳米结构可以包含为阵列位点表面积的不超过约200%、150%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或小于1%的总占用面积。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含超过阵列位点表面积的占用面积。例如,图56A描绘了具有其在偶联构型中的长度延伸超过阵列位点5601的悬垂寡核苷酸5635(例如,从TdT延伸获得的多核苷酸重复序列)的核酸纳米结构5630。

[0304] 核酸纳米结构或其组分(例如,致密结构)可以包含具有特定形状(例如,正方形、矩形、三角形、圆形、多边形等)的面或轮廓。核酸纳米结构或其组分的形状或轮廓可以与阵列位点的形状或轮廓相同或相似,例如如由形状或轮廓的长宽比所确定的。例如,正方形形状的核酸折纸可以与正方形形状的阵列位点偶联。在特定的构型中,核酸纳米结构和阵列位点可以包含相同或相似的形状或轮廓,其中所述阵列位点的表面积与核酸纳米结构的占用面积基本上相同。在另一个特定的构型中,核酸纳米结构和阵列位点可以包含相同或相似的形状或轮廓,其中所述阵列位点的表面积不同于核酸纳米结构的占用面积(例如,更大的占用面积、更小的占用面积)。在其他构型中,核酸纳米结构或其组分的形状或轮廓可以包含与阵列位点不同的形状或轮廓,例如如由形状或轮廓的长宽比所确定的。例如,正方形形状的核酸折纸可以与圆形阵列位点偶联。在一些构型中,核酸纳米结构或其组分的形状或轮廓可以包含与阵列位点不同的形状或轮廓,其中所述核酸纳米结构包含比阵列位点的表面积更大的占用面积。在其他构型中,核酸纳米结构或其组分的形状或轮廓可以包含与阵列位点不同的形状或轮廓,其中所述核酸纳米结构包含比阵列位点的表面积更小的占用面积。在其他构型中,核酸纳米结构或其组分的形状或轮廓可以包含与阵列位点不同的形状或轮廓,其中所述核酸纳米结构包含与阵列位点表面积基本上相等的占用面积。

[0305] 如本文所阐述,多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以组合形成阵列。例如,多个SNAP可以形成随机阵列(例如,其中所述多个SNAP在表面或界面上以非重复图案出现)或有序阵列(例如,其中所述多个SNAP在表面或界面上以规则重复图案空间排列)。在一些构型中,可以将同质的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物组合,以在表面或界面上形成随机或有序阵列。在其他构型中,可以将异质的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物组合,以在表面或界面上形成随机或有序阵列。可以基于核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的形状、构象或结构来确定多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的同质性或异质性。例如,同质的多个核酸纳米结构复合物可以仅包含具有交叉构型的核酸纳米结构复合物。在另一个实例中,异质的多个核酸纳米结构复合物可以包含具有交叉或正方形构型的核酸纳米结构复合物的混合物。

[0306] 核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以以特征性分隔或间隔排列在表面或界面上。特征性分隔或间隔可以由不同核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物上的相邻分析物偶联位点之间的平均或局部距离来确定。特征性分隔或间隔可以由以下来确定:1)核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的尺寸;2)核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的结构或构象;3)表面上图案化特征的分隔或间隔;或4)它们的组合。对于结构化或图案化阵列,特征性分隔或间隔可以由结构化或图案化特征之间的分隔或间隔来确定。对于未结构化或未图

案化的阵列,特征性分隔或间隔可以由例如核酸纳米结构复合物的尺寸和/或复合物边缘附近的修饰基团(例如,位阻基团、偶联基团)的存在来确定,所述修饰基团将复合物结合在一起或产生复合物间的排斥。图17A-17C描绘了用于经由复合物的排列来改变多个核酸纳米结构复合物的特征性分隔或间隔的构型。图17A描绘了通过复合物的密集堆积排列的具有交叉构型的同质SNAP复合物1710的组装阵列。组装的阵列可以沿着偶联位点之间的对角线具有在最邻近分析物偶联位点之间的 Δg_1 的特征性间隔。图17B描绘了具有交叉构型的同质SNAP复合物1710的组装阵列,所述同质SNAP复合物排列有比图17A中所示的堆积更不密集的堆积结构。组装的阵列可以在任何两个相邻分析物偶联位点之间具有在最近的相邻分析物偶联位点之间的 Δg_2 的特征性间隔。图17C描绘了具有交叉构型的同质SNAP复合物1710的组装阵列,所述同质SNAP复合物与分隔SNAP 1720(例如,没有多肽偶联位点的SNAP或SNAP复合物)组合以形成分隔的阵列。分隔SNAP 1720增加了在相邻SNAP复合物上的分析物偶联位点之间的特征性间隔 Δg_3 。假设具有交叉构型的同质SNAP复合物1710的尺寸一致,特征性间隔分隔可以按照 $\Delta g_3 > \Delta g_2 > \Delta g_1$ 的顺序增加。

[0307] 在另一方面,本文提供了一种单分析物阵列,所述单分析物阵列包含:a)包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址可以单分析物分辨率与每个其他地址分辨开,并且其中每个地址通过一个或多个间隙区域与每个相邻地址分隔开;和b)多个分析物,其中所述多个分析物中的单分析物与所述多个地址中的一个地址偶联,其中所述多个地址中的每个地址包含单一目标分析物(即,一个且仅一个目标分析物),其中每个单分析物通过核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP等)与所述地址的偶联表面偶联,并且其中所述核酸抑制(例如阻断)单分析物接触偶联表面。

[0308] 在另一方面,本文提供了一种单分析物阵列,所述单分析物阵列包含:a)包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址都可以单分析物分辨率来分辨开,其中每个地址包含偶联表面,并且其中每个偶联表面包含一个或多个表面连接部分;和b)多个核酸纳米结构,其中每个结构化核酸颗粒包含偶联部分,其中所述偶联部分包含多个寡核苷酸,其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分,其中所述多个结构化核酸颗粒中的每个结构化核酸颗粒通过多个寡核苷酸的表面相互作用部分与一个或多个互补寡核苷酸的表面连接部分的结合而与所述多个地址中的一个地址偶联,并且其中所述多个结构化核酸颗粒中的结构化核酸颗粒包含展示部分,所述展示部分包含与分析物偶联的偶联位点。

[0309] 在一些构型中,单分析物阵列可以包含有序阵列。在特定的构型中,有序阵列的偶联表面可以通过光刻工艺形成。在其他特定的构型中,有序阵列的多个地址中的一个地址可以与一个或多个间隙区域相邻,其中所述一个或多个间隙区域中的间隙区域不包含偶联表面。如本文所阐述,一个或多个间隙区域中的间隙区域可以包含破坏部分,其中所述破坏部分被配置为降低、防止或抑制分子(例如,亲和试剂、荧光团等)偶联至间隙区域的可能性。在一些构型中,有序阵列可以包含偶联表面,其中所述偶联表面包含相对于一个或多个间隙区域中的间隙区域的凸起表面或凹陷表面。

[0310] 在其他构型中,单分析物阵列可以包含无序阵列。无序阵列可以包含固体支持物,所述固体支持物不包含通过图案化工艺(例如,光刻)形成的偶联表面。无序阵列可以包含例如基本平面的固体支持物,其包含含有多个表面连接部分的接近均匀的表面层。无序阵

列可以包含用于例如通过沉积被配置为防止多个核酸纳米结构在单个地址共定位的核酸纳米结构或者通过以抑制共定位的浓度沉积核酸纳米结构来进行核酸纳米结构定位的独特的可分辨的地址。

[0311] 在特定的构型中,阵列,无论有序还是无序,都可以进一步包含与固体支持物相邻的脂质层(例如,单层、双层、胶束或胶体)。例如,如果一个或多个表面连接部分中的表面连接部分与脂质层的脂质分子偶联,则核酸纳米结构(例如,SNAP)可以经由脂质双层锚定到阵列上。在特定的构型中,脂质层的脂质分子可以包含磷脂、甘油三酯或胆固醇。

[0312] 在一些构型中,如本文所阐述的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以组合以形成自组装或自图案化的阵列。在形成自组装或自图案化阵列以形成分析物阵列之前、期间或之后,分析物可以与核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物缀合。自组装或自图案化阵列的形成可以由在核酸纳米结构与表面或界面之间的相互作用、在核酸纳米结构复合物与表面或界面之间的相互作用、在两个或更多个核酸纳米结构之间的相互作用、在两个或更多个核酸纳米结构复合物之间的相互作用或它们的组合来驱动。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的自组装或自图案化阵列可以是稳定的、亚稳定的或不稳定的。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的自组装或自图案化阵列的稳定性和/或有序性可以通过共价、非共价、静电或磁相互作用来介导。例如,SNAP复合物的自组装阵列可以通过在组成SNAP与表面之间的静电相互作用以及在相邻SNAP之间的核酸偶联来稳定。这样的阵列可能会因温度过高或变性剂的存在而不稳定。在另一个实例中,自组装阵列可以通过与多相界面相关联的相邻SNAP复合物之间的共价交联来形成。共价交联的阵列可以具有基本的化学稳定性,但是可能被过量的机械应力破坏。

[0313] 核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的自图案化或自组装阵列可以在表面或界面处形成同质或异质阵列。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的自图案化或自组装阵列可以在整个表面或界面上是同质的或者在表面或界面的一部分上是同质的。图18A-18C示出了在自组装或自图案化阵列中核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的不同构型的阵列覆盖图案。图18A描绘了完全占据由框1810界定的区域的矩形SNAP或SNAP复合物1820的阵列。阵列的排序或图案化在整个区域1810上是近似均匀的。图18B描绘了部分占据由框1810界定的区域的矩形SNAP或SNAP复合物1820的阵列。所述阵列相对于区域1810在覆盖范围上是不均匀的,但是在由框1840界定的子区域中是近似均匀的。区域1810与子区域1840之间的剩余区域1830可以没有SNAP或SNAP复合物、具有无组织或无阵列的SNAP或SNAP复合物、或SNAP或SNAP复合物的更小阵列。图18C描绘了均匀分布在由框1810界定的区域内的矩形SNAP或SNAP复合物1820的阵列。SNAP或SNAP复合物1820的分散包括具有很少或没有SNAP或SNAP复合物1830的未被占据的子区域。具有未被占据的子区域的均匀分散可以通过例如在图案化阵列上沉积SNAP或SNAP复合物或者组合多个包含在空间上排斥其他SNAP或SNAP复合物的修饰基团的SNAP或SNAP复合物来形成。

[0314] 如本文所阐述,多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以组装成内聚和/或连续结构。例如,多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以形成单层或膜。内聚和/或连续结构可以在溶液中形成,然后由于沉降或其他沉积机制而沉积在表面上。包含多个组装的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的内聚和/或连续结构可以在表面上或在界面处形成。图19A-19B示出了由多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的组装形成的内聚或

连续结构。图19A描绘了多个SNAP 1930,其被配置为与在第一较高密度流体1960与第二较低密度流体1970之间形成的界面1950相关联。多个SNAP 1930通过核酸偶联1940被偶联到分析物阵列中。通过偶联1920(例如链霉素亲和素-生物素、通过点击反应形成的共价键等)进一步稳定分析物阵列,所述偶联将分析物阵列固定到容器1910上,所述容器含有第一较高密度流体1960和第二较低密度流体1970。图19B示出了通过核酸偶联1940被偶联到分析物阵列中的多个SNAP 1930。在沉积到含有流体1960的容器1910的表面上之前,分析物阵列可以在界面1950处或在流体1960内形成。不希望被理论所束缚,组装的分析物阵列在表面的沉积可能是由阵列尺寸、密度、重量或其他特性引起的流体动力学不稳定所驱动的。

[0315] 如本文所阐述,核酸纳米结构复合物的自图案化或自组装阵列可以包含多个种类或多种构型的核酸纳米结构复合物。核酸纳米结构复合物的种类可以通过形状、构型(例如,修饰基团的存在或不存在、偶联基团的存在或不存在等)、特定标签的存在或不存在或偶联特异性来区分。两个或更多个种类的核酸纳米结构复合物可以被配置为自组装成更大阵列的子区域。由于每个种类的核酸纳米结构复合物上的互补偶联基团(例如,核酸),两个或更多个种类的核酸纳米结构复合物可以自组装。

[0316] 如本文所阐述,出于区分不同类型的分析物的目的,可以形成不同类型的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物。在一些构型中,可以将分析物样品分成单独的部分(例如,按尺寸、按电荷、按质量、按极性、按细胞中的位置等),每个单独的部分被放置在不同种类的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物上。在其他构型中,样品分析物可以与一个种类的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物偶联,并且标准或对照分析物可以与不同种类的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物偶联。图20示出了通过将多肽样品中的多肽选择性地靶向到不同的SNAP或SNAP复合物上来形成不同类型的SNAP或SNAP复合物的方法。将包含胺反应性基团2020的正方形种类的SNAP或SNAP复合物和包含DBCO反应性基团2030的三角形种类的SNAP或SNAP复合物与包含差异标记的多肽的多肽样品接触,所述差异标记的多肽包括羧基化多肽2010、活化酯标记的多肽2011、叠氮化物标记的多肽2012和羟基标记的多肽2013。由于基于SNAP的反应性基团和基于多肽的反应性基团的相对反应性,将正方形种类的SNAP或SNAP复合物2020与活化酯标记的多肽2011共价缀合以形成多肽偶联的SNAP或SNAP复合物。同样,将三角形种类的SNAP或SNAP复合物2030与活化酯标记的多肽2012共价缀合以形成多肽偶联的SNAP或SNAP复合物。

[0317] 组装阵列中两种不同类型的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以通过不同类型的展示分析物来区分。不同的分析物可以基于任何分析物特性进行分类,所述分析物特性包括但不限于尺寸、重量、长度、细胞位置(例如,细胞外、膜、细胞质、细胞器、细胞核等)、起源生物体或系统(例如,无细胞合成)、等电点、流体动力学半径、翻译后修饰或任何其他可测量或可观察的多肽特征。例如,多肽阵列中的第一种类的SNAP或SNAP复合物可以包含来自含多肽样品的多肽,并且多肽阵列中的第二种类的SNAP或SNAP复合物可以包含来自标准或对照样品的多肽(即,质量控制标记多肽、阳性对照多肽、阴性对照多肽等)。在另一个实例中,可以将来自第一生物体的多肽置于第一种类的SNAP或SNAP复合物上,并且可以将来自第二生物体的多肽置于第二种类的SNAP或SNAP复合物上。

[0318] 两个或更多个不同类型的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以组装形成具有独特、合理、有序或分离排列的阵列。图22-24描绘了将SNAP复合物局部图案化以产生不

同阵列构象的实例。不同种类的SNAP或SNAP复合物可以自组装成有序或图案化的阵列。

[0319] 图22描绘了通过将在几何形状上匹配并配置为彼此结合以形成对称阵列的两个不同种类的SNAP或SNAP复合物组合而形成的SNAP或SNAP复合物阵列。正方形SNAP或SNAP复合物可以自排列成同质SNAP的区域,所述区域被分离SNAP或SNAP复合物2220的排列复合物分开。分离SNAP或SNAP复合物2220的排列复合物可以通过一些检测方法(例如,荧光显微术)容易地观察到或检测到,从而允许在分离的正方形SNAP或SNAP复合物2210或分离SNAP或SNAP复合物2220的阵列中位置的快速空间鉴定。自分离可以通过制造如下SNAP或SNAP复合物来促进,所述SNAP或SNAP复合物具有包含旨在与相同种类的SNAP或SNAP复合物偶联的偶联基团的某些效用面以及具有包含旨在与不同种类的SNAP或SNAP复合物偶联的偶联基团的其他效用面。有序阵列还可以包含不被配置为偶联分析物2230的SNAP或SNAP复合物的未被占据的区域。不被配置为偶联分析物2230的SNAP或SNAP复合物的未被占据的区域可以用于保持阵列稳定性和/或促进阵列图案化的形成。图24描绘了与图22中所描绘的阵列类似的利用若干个种类的SNAP或SNAP复合物的阵列。大正方形SNAP或SNAP复合物2410、小正方形SNAP或SNAP复合物2411、大直角三角形SNAP复合物2412和小直角三角形SNAP或SNAP复合物2413可以被配置为自分离成相似SNAP或SNAP复合物的同质区域。在一些构型中,分离SNAP或SNAP复合物2220或2420可以与标准或对照多肽(例如,质量对照多肽、阳性对照多肽、阴性对照多肽等)偶联,以产生图案化的基准或网格线,用于当检测SNAP阵列时的图像配准、利用SNAP阵列的过程的质量控制等等。

[0320] 图23A显示了通过将在几何形状上不匹配但被配置为彼此结合的两个不同种类的SNAP或SNAP复合物组合而形成的SNAP或SNAP复合物阵列。六边形SNAP或SNAP复合物2310与正方形SNAP或SNAP复合物2320的结合在排列的SNAP或SNAP复合物的排列图案中产生不匹配或不连续。通过一些检测方法(例如,荧光显微术)可以容易地观察到或检测到不匹配或不连续,从而允许正方形SNAP或SNAP复合物2320的阵列中位置的快速空间鉴定。这种类型的阵列在一种类型的SNAP或SNAP复合物相对于第二种类型的SNAP或SNAP复合物在总数上较少的情况下可能是有用的。图23B显示了通过将在几何形状上不匹配但被配置为彼此结合的两个不同种类的SNAP或SNAP复合物组合而形成的SNAP或SNAP复合物阵列。六边形SNAP或SNAP复合物2310与正方形SNAP或SNAP复合物2320的结合在排列的SNAP或SNAP复合物的排列图案中产生不匹配或不连续。在一些构型中(例如,每个种类的浓度大致相等),两个种类都可以选择性地自分离,导致两个种类之间的结合区域有限。不匹配或不连续的位置可以通过一些检测方法(例如,荧光显微术)容易地观察到或检测到,从而允许在分离的正方形SNAP或SNAP复合物2320或分离的六边形SNAP或SNAP复合物2310的阵列中位置的快速空间鉴定。

[0321] 如本文所阐述,包含多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的阵列可以在特定时间段内保持稳定。阵列的稳定性可以是保持偶联至阵列或与阵列偶联的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的阈值量的函数。例如,稳定的阵列可以包含至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超过99%的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物,其在一个设定的时间段(例如,至少约1秒、1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、1小时、3小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、1周、1个月、6个月、1年、5年或超过5年)之后保持偶联至阵列。

[0322] 在一些构型中,核酸纳米结构的捕获部分可以偶联至固体支持物的偶联表面。在其他构型中,核酸纳米结构的捕获部分不需要偶联至表面。例如,在SNAP沉积之前或者在SNAP已经从偶联表面选择性地释放(例如,经由可裂解接头的裂解)之后,SNAP可以从偶联表面上解偶联(例如,悬浮或溶解在流体介质中)。固体支持物可以包含任何可想到的材料或它们的组合,包括金属、金属氧化物、玻璃、陶瓷、半导体和聚合物。固体支持物可以包含凝胶,诸如水凝胶。固体支持物可以包含多个表面展示的官能团或部分(例如,胺、环氧化物、羧酸盐、聚合物链、寡核苷酸等)。官能团可以展示在固体支持物上,例如以钝化表面、提供偶联位点或阻碍分子与表面的结合。表面展示的官能团可以被配置为与核酸纳米结构(例如,SNAP)或其他分子或颗粒形成共价相互作用或非共价相互作用。固体支持物还可以包含相邻或偶联的层,例如脂质单层、脂质双层、多个胶体或胶束等。相邻或偶联的层可以包含改变固体支持物表面特性的多种分子,所述表面特性诸如表面张力、表面能、疏水性、亲水性或非特异性结合特定分子(例如,蛋白质)的趋势或可能性。相邻或偶联的层可以包含表面活性剂或洗涤剂物质。相邻或偶联的层可以包含脂质物质,诸如磷脂、甘油三酯或甾醇。

[0323] 固体支持物可以包含含有一个或多个表面连接部分的地址,其中所述地址可以在单分析物分辨率下分辨。在一些构型中,地址可以包含一个或多个表面,其中所述一个或多个表面可以包含偶联表面,并且其中所述偶联表面包含一个或多个表面连接部分。在特定的构型中,固体支持物上的地址的一个或多个表面可以在固体支持物上形成三维结构。例如,三维结构可以包含凸起结构(例如,柱、杆、圆柱、圆顶、棱锥体、凸圆区域等)或孔结构(例如,凹陷区域、通道或孔(诸如微微孔、纳米孔或微孔))。

[0324] 如本文所阐述,固体支持物的偶联表面可以包含多个表面连接部分(例如,表面连接的寡核苷酸、表面连接的反应性基团、表面连接的偶联基团等)。表面连接部分可以共价或非共价连接到固体支持物的偶联表面。在一些构型中,偶联表面上的表面连接部分分布或密度在偶联表面上可以是基本上均匀的。在其他构型中,偶联表面的表面连接部分密度不需要在偶联表面上是基本上均匀的。例如,一定分数的所述多个表面连接部分可以位于偶联表面的中心区域内。在另一个实例中,第二分数的所述多个表面连接部分可以位于偶联表面的外部区域内。多个表面连接部分在偶联表面的区域(例如,该区域可以是阵列的位点或地址)上可以具有至少约 0.001 皮摩尔/平方纳米(pmol/nm^2)、 $0.005\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.01\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.05\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.1\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.5\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $1\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $5\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $10\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $50\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $100\text{pmol}/\text{nm}^2$ 或超过 $100\text{pmol}/\text{nm}^2$ 的平均表面密度。可替代地或另外地,多个表面连接部分在偶联表面的区域上可以具有不超过约 $100\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $50\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $10\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $5\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $1\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.5\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.1\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.05\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.01\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.005\text{pmol}/\text{nm}^2$ 、 $0.001\text{pmol}/\text{nm}^2$ 或小于 $0.001\text{pmol}/\text{nm}^2$ 的平均表面密度。

[0325] 如本文所阐述,固体支持物可以包含含有多个表面连接部分的偶联表面,其中一定分数的所述表面连接部分与核酸纳米结构(例如,SNAP)的至少一个表面相互作用部分偶联。在一些构型中,核酸纳米结构中一定分数的表面相互作用部分与固体支持物上的多个表面连接部分中一定分数的表面连接部分偶联。与至少一个表面连接部分偶联的表面相互作用部分的分数可以是至少约 0.000001 、 0.00001 、 0.0001 、 0.0005 、 0.001 、 0.005 、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.25 、 0.3 、 0.35 、 0.4 、 0.45 、 0.5 、 0.55 、 0.6 、 0.65 、 0.7 、 0.75 、 0.8 、 0.85 、 0.9 、

0.95、0.99、0.999、0.9999、0.99999或大于0.99999。可替代地或另外地，与至少一个表面连接部分偶联的表面相互作用部分的分数可以是不大于约0.99999、0.9999、0.999、0.99、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00001、0.000001或小于0.000001。

[0326] 图40C示出了具有不同分数的偶联的表面相互作用部分和表面连接部分的SNAP组合物的构型。SNAP 4010通过其5个表面相互作用部分中的每一个表面相互作用部分的结合相互作用与偶联表面4002偶联。因此，与至少一个表面连接部分偶联的表面相互作用部分的总分数为1。偶联表面包含所描绘的15个表面连接部分，其中有5个参与形成与SNAP 4010的结合相互作用。因此，与至少一个表面相互作用部分偶联的表面连接部分的分数为0.26。同样，可以计算每种独特类型的表面连接的物质的分数（例如，表面连接的寡核苷酸4038的分数为0.22，以及表面连接的互补偶联基团4039的分数为1）。

[0327] 如本文所阐述，固体支持物可以包含钝化层。钝化层可以被配置为减少、抑制或防止特定分子（例如，亲和试剂、未偶联的分析物等）与固体支持物的非特异性结合。在一些构型中，钝化层可以包含多种分子，其被配置为防止分子与固体支持物的非特异性结合。在特定的构型中，多种分子可以包含多种表面连接的聚合物，其选自聚乙二醇、聚环氧乙烷、烷烃、核酸或葡聚糖。在一些构型中，构成钝化层的多种分子中的一种分子还可以包含表面连接部分。在一些构型中，钝化层可以包含多种分子中的一种分子，其还包含将表面连接部分偶联至偶联表面的接头。在一些构型中，连接基团可以包含与固体支持物形成共价键或配位键的基团，诸如硅烷、磷酸酯或膦酸酯。

[0328] 核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的随机或有序阵列可以由在表面或界面处的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物形成。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的随机或有序阵列可以由在结构化或图案化表面处的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物形成。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的随机或有序阵列可以由在未结构化或非图案化的表面处的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物形成，所述表面诸如具有用于核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的连续一小片（lawn）或整块的附接点的表面。

[0329] 可以通过任何合适的方法在固体支持物上形成结构化或图案化的表面，所述方法诸如光刻术、蘸笔纳米刻蚀术、纳米压印刻蚀术、纳米球体刻蚀术、纳米球刻蚀术、纳米柱阵列、纳米线刻蚀术、扫描探针刻蚀术、热化学刻蚀术、热扫描探针刻蚀术、化学或等离子体蚀刻、局部氧化纳米刻蚀术、分子自组装、模板刻蚀术或电子束刻蚀术。刻蚀方法可以促进在固体支持物表面上形成二维或三维特征。在一些构型中，可以形成包含原始表面的基本平面的固体支持物以提供多个位点，其中所述多个位点中的每个位点包含含有原始表面区域的面，并且其中所述多个位点中的每个位点与一个或多个间隙区域相邻，其中所述一个或多个间隙区域包含成形表面，其中所述成形表面包含通过成形工艺（例如，刻蚀术、沉积等）产生的表面。例如，可以利用光刻术从平面固体支持物上蚀刻材料，从而产生被蚀刻线包围的多个凸起位点，其中所述固体支持物在每个凸起位点的厚度基本上与固体支持物的原始厚度相同，并且固体支持物在间隙区域的厚度小于固体支持物的原始厚度。在另一个实例中，可以通过以下方式形成阵列：将固体材料（例如，金属、金属氧化物等）图案化到平面固体支持物的表面上以产生被沉积固体材料的凸起间隙区域包围的多个位点，其中每个位点处的阵列厚度基本上与固体支持物的原始厚度相同，并且间隙区域处的阵列厚度基本上

是固体支持物的原始厚度和沉积固体材料厚度的总和。如本文所阐述,固体支持物上的位点可以形成与核酸纳米结构的形状基本上相同的形状或形态。例如,基本上正方形的核酸纳米结构可以与基本上正方形的阵列位点偶联。如本文所阐述,固体支持物上的位点可以形成与核酸纳米结构的形状基本上不同的形状或形态。例如,基本上正方形的核酸纳米结构可以与基本上圆形的阵列位点偶联。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以经历两个或更多个表面成形工艺,以在表面上形成纳米级或微米级特征(例如凸起特征、锯齿状特征)。例如,可以通过光刻术随后蚀刻(例如,在氢氧化钾中)以产生规则有序的位点阵列来形成固体支持物,其中所述规则有序的位点阵列的每个位点包含三维孔特征(例如,棱锥体形孔、圆锥形孔、半球形孔等)。参见例如Hookway等人,Methods,101,2016,其以引用的方式整体并入。

[0330] 在一些构型中,多个位点中的位点可以包含三维形状或形态。成形工艺(例如,刻蚀术)可以产生具有三维形状或形态的位点或其特征(例如,凸起特征、凹陷特征)。图66A-66D示出了包含凸起位点的固体支持物的位点形态的特定方面,尽管很容易理解类似的考虑可以适用于锯齿状特征或位点。图66A-66D中所描绘的凸起特征可以通过从固体支持物中去除材料的工艺或通过第二固体支持物材料沉积到第一固体支持物材料上的工艺来形成。图66A描绘了包含凸起特征(例如,位点)的固体支持物的横截面图,所述凸起特征包含基本平面的顶表面6610和围绕凸起特征的下表面6612,其中表面6610和6612两者都基本上平行于固体支持物6613的底表面6613。凸起特征包含侧表面6611,其与基本平面的顶表面6610和下表面6612基本上正交,从而在凸起特征的顶部形成尖锐过渡6615。固体支持物6600的总厚度可以从在基本平面的顶表面6610与底表面6613之间的最大厚度 t_{\max} 变化到在下表面6612与底表面6613之间的最小厚度 t_{\min} 。图66B描绘了包含凸起特征(例如,位点)的固体支持物的横截面图,所述凸起特征包含基本平面的顶表面6610和围绕凸起特征的下表面6612,其中两个表面6610和6612都基本上平行于固体支持物6613的底表面6613。凸起特征包含侧表面6611,其与基本平面的顶表面6610和下表面6612基本上正交,但是在侧表面6611和基本平面的顶表面6610之间的过渡6616是发散的(例如,圆形的、弯曲的、倾斜的等)。固体支持物6600的总厚度可以从在基本平面的顶表面6610与底表面6613之间的最大厚度 t_{\max} 变化到在下表面6612与底表面6613之间的最小厚度 t_{\min} 。图66C描绘了包含凸起特征(例如,位点)的固体支持物的横截面图,所述凸起特征包含基本平面的顶表面6610和围绕凸起特征的下表面6612,其中两个表面6610和6612都基本上平行于固体支持物6613的底表面6613。凸起特征包含侧表面6611,其与基本平面的顶表面6610和下表面6612基本上正交。基本平面的顶表面6610包含一个或多个非平面表面特征6617。非平面表面特征6617可能由于固体支持材料的自然粗糙度而出现,或者可能是阵列形成过程(例如,各向异性刻蚀术、表面上层的各向异性沉积、处理中间物(诸如光致抗蚀剂)的各向异性去除等)的人工产物。固体支持物6600的总厚度可以从在非平面表面特征6617与底表面6613之间的最大厚度 t_{\max} 变化到在下表面6612与底表面6613之间的最小厚度 t_{\min} 。图66D描绘了凸起特征,诸如图66B的特征,其中多个部分6620(例如,表面连接部分)已偶联至凸起特征。由于表面的形态(例如,发散过渡6616),多个部分6620的部分的取向可以在凸起特征上变化。在一些构型中,表面偶联部分的不同取向,例如靠近位点的边缘,可以促进核酸纳米结构与位点或其特征的偶联。例如,靠近阵列位点边缘的表面连接部分可以偶联至与阵列位点(例如,间隙区

域)邻近的核酸纳米结构,从而允许核酸纳米结构的空間位置从邻近区域到阵列位点的重新排列。在一些构型中,表面偶联部分的不同取向,例如靠近位点的边缘,可以抑制实体与位点或其特征的非特异性偶联。例如,当核酸已经与阵列位点偶联时,位点边缘附近的PEG链可以抑制实体(例如,亲和试剂、其他核酸)与阵列位点的结合。

[0331] 任选地,可以通过非刻蚀方法将固体支持物形成为阵列,所述阵列被配置为偶联多个分析物,如本文所阐述。在一些情况下,阵列可以包含含有多个位点和分隔材料的固体支持物,其中所述分隔材料将多个位点中的每个位点与多个位点中的每个其他位点分隔开。分隔材料可以包含以下的一个或多个特征:i)被配置为偶联(例如,共价偶联、非共价偶联)至固体支持物或其表面,ii)在多个位点的每个位点之间提供空间分隔,iii)促进如本文所阐述的核酸纳米结构与固体支持物或其表面的接触,和iv)抑制核酸纳米结构与分隔材料的结合。图64描绘了通过非刻蚀方法形成的分析物阵列。固体支持物6400可以包含多个纳米颗粒或微粒6410,它们排列在固体支持物6400的表面上以产生固体支持物6400的表面的空间区域以及在纳米颗粒或微粒6410之间的孔,所述空间区域被阻断与核酸6420接触,所述孔足够大(例如,如通过体积所确定,如通过面积所确定)以促进核酸6420与固体支持物6400的表面的接触。任选地,固体支持物6400的表面可以包含促进纳米颗粒或微粒6410和/或核酸6420偶联的部分。任选地,核酸6420可以与分析物6430偶联。在一些构型中,分隔材料(例如,纳米颗粒或微粒)可以包含表面电荷(例如,羧基化微粒、胺化微粒),其被配置为与带电表面部分(例如,胺、羧酸盐等)形成静电相互作用。在特定的构型中,分隔材料还可以包含钝化部分,其被配置为抑制实体与分隔材料(例如,PEG部分、葡聚糖部分等)的结合。

[0332] 非结构化或非图案化表面可以通过任何合适的方法形成,所述方法诸如原子层沉积、化学气相沉积或化学液体沉积。如本文所阐述,表面可以包含多个官能团以促进与核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的相互作用,诸如形成共价、非共价或静电相互作用。表面结合的官能团可以包括胺、硫醇、羧酸、活化酯、硅烷、硅烷醇、硅氧烷、硅氧化物、甲硅烷基卤化物、硅碳烯(silene)、甲硅烷基氢化物、磷酸酯、磷酸酯、环氧化物、叠氮化物或巯基。例如,含硅表面(例如,玻璃、熔融石英、硅片等)可以包含硅烷化合物的单层涂层,所述硅烷化合物诸如(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)、(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、(3-缩水甘油基氧基丙基)三甲氧基硅烷(GOPMS)、另外的N-(3-三乙氧基甲硅烷基丙基)-4-羟基丁酰胺(HAPS)、11-乙酰氧基十一烷基三乙氧基硅烷、正癸基三乙氧基硅烷、3-碘-丙基三甲氧基硅烷、全氟辛基三氯硅烷、辛基氯硅烷、十八烷基三氯硅烷、(十三氟-1,1,2,2-四氢辛基)三氯硅烷或(十三氟-1,1,2,2-四氢辛基)三甲氧基硅烷。在另一个实例中,金属氧化物表面(例如,ZrO₂、TiO₂)可以包含单层磷酸盐或磷酸盐化合物。

[0333] 在一些构型中,官能团可以包含点击型反应基团。在一些情况下,官能团可以包含寡核苷酸。表面可以包含钝化层,诸如PEG、PEO、葡聚糖或核酸层。官能化或非官能化的表面可以包含正电荷、负电荷或中性电荷。

[0334] 如本文所阐述,可以将固体支持物或其表面图案化,以在固体支持物或其表面上形成图案化或有序的多个位点。固体支持物或其表面上的多个位点可以被认为是图案化的或有序的,例如,如果其包含以下的一个或多个特征:i)包含在相邻位点之间基本均匀的平均间距或平均间隔(例如,如从第一位点的中心点到第二位点的中心点所测量的;如从第一

位点的最近边缘到第二位点的最近边缘所测量的,等等), ii) 包含基本均匀的平均位点尺寸(例如,如通过位点直径、位点宽度、位点周长、位点表面积等所测量的), iii) 包含重复的位点图案,或iv) 包含至少最小分数的在包含最小位点尺寸与最大位点尺寸之间的平均位点尺寸的范围内的位点(例如,至少约0.8、0.85、0.9、0.95、0.99、0.999、0.9999、0.99999或大于0.99999等)(例如,包含0.9分数的直径范围在300nm与400nm之间的位点)。图案化或有序的网格可以包含网格几何形状,诸如矩形网格、放射状网格或六边形网格。在一些构型中,阵列可以包含多个位点,其中所述位点不符合网格或空间图案。在特定的构型中,多个位点可以不符合网格或空间图案,但是多个位点可以包含足以对与位点偶联的部分进行单分析物检测的平均间距和/或平均位点尺寸。固体支持物或其表面上的图案化或有序的多个位点可以包含破坏图案(包括有意破坏(例如,放置基准元件、在子阵列之间放置分隔空间等)和无意破坏(例如,制造缺陷、损坏等))的一个或多个位点或地址。

[0335] 多个位点可以被表征为具有平均破坏率或平均破坏密度。平均破坏率可以是指测量或预期的位点破坏数量/位点单位数量(例如,1/1000等)。平均破坏密度可以是指在固体支持物或其表面上的破坏的面积密度(例如,1个/平方厘米等)。如图63所示,破坏可以是指具有以下的一个或多个特征的位点6310:1) 相对于网格图案未对齐(6321), 2) 是相对于网格图案未对齐的位点子集的成员(6324), 3) 具有低于最小间距尺寸的间距(6328), 4) 具有超过最大间距尺寸的间距(6327), 5) 具有低于最小位点尺寸的位点尺寸(例如,宽度、长度、直径、面积等)(6326), 6) 具有超过最大位点尺寸的位点尺寸(6325), 7) 包含不适当的形态(例如,二维形状、三维形貌等)(6322), 和8) 缺乏促进部分沉积的结构(6320、6323)或化学。

[0336] 固体支持物或其表面可以包含至少约10纳米(nm)、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1微米(μm)、1.1 μm 、1.2 μm 、1.3 μm 、1.4 μm 、1.5 μm 、1.6 μm 、1.7 μm 、1.8 μm 、1.9 μm 、2 μm 、2.1 μm 、2.2 μm 、2.3 μm 、2.4 μm 、2.5 μm 、2.6 μm 、2.7 μm 、2.8 μm 、2.9 μm 、3 μm 、3.1 μm 、3.2 μm 、3.3 μm 、3.4 μm 、3.5 μm 、3.6 μm 、3.7 μm 、3.8 μm 、3.9 μm 、4 μm 、4.5 μm 、5 μm 、10 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 或超过50 μm 的平均、最小或最大位点间距。可替代地或另外地,固体支持物或其表面可以包含不超过约50 μm 、40 μm 、30 μm 、20 μm 、10 μm 、5 μm 、4.5 μm 、4.0 μm 、3.9 μm 、3.8 μm 、3.7 μm 、3.6 μm 、3.5 μm 、3.4 μm 、3.3 μm 、3.2 μm 、3.1 μm 、3.0 μm 、2.9 μm 、2.8 μm 、2.7 μm 、2.6 μm 、2.5 μm 、2.4 μm 、2.3 μm 、2.2 μm 、2.1 μm 、2 μm 、1.9 μm 、1.8 μm 、1.7 μm 、1.6 μm 、1.5 μm 、1.4 μm 、1.3 μm 、1.2 μm 、1.1 μm 、1 μm 、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、50nm、10nm或小于10nm的平均、最小或最大位点间距。可以基于用于形成固体支持物的方法(例如,光刻术)的空间分辨率、所需的阵列密度和/或在相邻位点之间的必要空间分隔以获得与每个位点结合的部分的单分析物分辨率来确定平均间距。

[0337] 固体支持物或其表面可以包含至少约10纳米(nm)、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1微米(μm)、1.1 μm 、1.2 μm 、1.3 μm 、1.4 μm 、1.5 μm 、1.6 μm 、1.7 μm 、1.8 μm 、1.9 μm 、2 μm 、2.1 μm 、2.2 μm 、2.3 μm 、2.4 μm 、2.5 μm 、2.6 μm 、2.7 μm 、2.8 μm 、2.9 μm 、3 μm 、3.1 μm 、3.2 μm 、3.3 μm 、3.4 μm 、3.5 μm 、3.6 μm 、3.7 μm 、3.8 μm 、3.9 μm 、4 μm 、4.5 μm 、5 μm 、10 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 或超过50 μm 的平均、最小或最大位点尺寸(例如,宽度、长度、直径等)。可替代地或另外地,固体支持物或其表面可以包含不超过50 μm 、40 μm 、30 μm 、20 μm 、10 μm 、5 μm 、4.5 μm 、4.0 μm 、3.9 μm 、3.8 μm 、3.7 μm 、3.6 μm 、3.5 μm 、3.4 μm 、3.3 μm 、3.2 μm 、3.1 μm 、3.0 μm 、2.9 μm 、2.8 μm 、2.7 μm 、2.6 μm 、2.5 μm 、2.4 μm 、2.3 μm 、2.2 μm 、2.1 μm 、2 μm 、1.9 μm 、1.8 μm 、

1.7 μm 、1.6 μm 、1.5 μm 、1.4 μm 、1.3 μm 、1.2 μm 、1.1 μm 、1 μm 、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、50nm、10nm或小于10nm的平均、最小或最大位点尺寸。可以基于用于形成固体支持物的方法(例如,光刻术)的空间分辨率和/或待沉积在位点上的分析物或核酸的尺寸来确定位点尺寸。

[0338] 结合位点或区域可以具有至少约25nm²、100nm²、500nm²、1000nm²、2000nm²、3000nm²、4000nm²、5000nm²、5500nm²、6000nm²、6500nm²、7000nm²、7500nm²、8000nm²、8500nm²、9000nm²、10000nm²、15000nm²、20000nm²、25000nm²、50000nm²、100000nm²、250000nm²、500000nm²或超过1000000nm²的表面积。可替代地或另外地,结合位点或区域可以具有不超过约1000000nm²、500000nm²、250000nm²、100000nm²、50000nm²、25000nm²、20000nm²、15000nm²、10000nm²、9000nm²、8500nm²、8000nm²、7500nm²、7000nm²、6500nm²、6000nm²、5500nm²、5000nm²、4000nm²、3000nm²、2000nm²、1000nm²、500nm²、100nm²、25nm²或小于25nm²的表面积。

[0339] 如本文所阐述,固体支持物或其表面可以包含多个位点,其中所述多个位点中的每个位点被配置为偶联实体(例如,分析物、核酸等)。固体支持物、其表面和/或其位点可以具有促进与实体(诸如核酸)的结合相互作用的一个或多个部分。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以具有促进与实体(诸如核酸)的结合相互作用的两个或更多个不同的部分。在一些构型中,两个或更多个部分的第一部分促进第一结合相互作用,并且两个或更多个部分的第二部分促进第二结合相互作用。在特定的构型中,第一结合相互作用是与第二结合相互作用相同类型的结合相互作用(例如,两者均为核酸碱基对杂交、两者均为共价键合、两者均为受体-配体结合等)。在另一个特定的构型中,第一结合相互作用是与第二结合相互作用不同类型的结合相互作用(例如,核酸碱基对杂交和共价键合、核酸碱基对杂交和受体-配体结合等)。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以具有两个或更多个不同的部分,其中所述两个或更多个部分中的第一部分促进以第一结合亲和力对第一结合补体的第一结合相互作用,并且所述两个或更多个部分中的第二部分促进以第二结合亲和力对第二结合补体的第二结合相互作用。在特定的构型中,第一部分对第一结合补体的第一结合亲和力可以强于第二部分对第二结合补体的第二结合亲和力。例如,表面可以包含寡核苷酸和链霉亲和素的混合物,其中所述链霉亲和素对生物素的亲和力明显强于寡核苷酸对其互补寡核苷酸的亲和力。在其他构型中,第一部分对第一结合补体的第一结合亲和力可以基本上等于第二部分对第二结合补体的第二结合亲和力。例如,表面可以包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的混合物,其中所述两者对它们各自的互补寡核苷酸具有基本相似的亲和力。在其他构型中,第一部分对第一结合补体的第一结合亲和力可以强于第二部分对第二结合补体的第二结合亲和力。例如,表面可以包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸的混合物,其中所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸的序列的差异在于单个核苷酸,并且其中由于单个核苷酸的未对齐,第二核苷酸对第一寡核苷酸的互补寡核苷酸的亲和力稍低。表面部分与补体或配体之间的结合亲和力可以通过定量量度来表征,所述定量量度诸如解离常数(K_D)、结合速率(k_{on})或解离速率(k_{off})。表面部分与补体或配体之间的结合亲和力可以具有不超过约1毫摩尔、100微摩尔(μM)、10 μM 、1 μM 、100纳摩尔(nM)、10nM、1nM、100皮摩尔(pM)、10pM、1pM、0.1pM、0.01pM或小于0.01pM的解离常数。可替代地或另外地,表面部分与补体或配体之间的结合亲和力可以具有至少约0.01pM、0.1pM、1pM、

10pM、100pM、1nM、10nM、100nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1mM或大于1mM的解离常数。在一些情况下,固体支持物、其表面和/或其位点可以包含第一部分和第二部分,其中第一部分及其结合补体的第一解离常数和第二部分及其结合补体的第二解离常数可以相差至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或超过10个数量级。在其他情况下,固体支持物、其表面和/或其位点可以包含第一部分和第二部分,其中第一部分及其结合补体的第一解离常数和第二部分及其结合补体的第二解离常数可以相差不超过约10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个、1个或小于1个数量级。

[0340] 图60A和60B描绘了包含两个或更多个不同部分的固体支持物的表面化学构型。图60A描绘了包含位点的固体支持物6000,其中所述位点6001包含多个寡核苷酸6010和多个聚合物链6020(例如,PEG链)。多个寡核苷酸6010和多个聚合物链6020在位点6001处包含基本上均匀的空间分布。任选地,多个寡核苷酸6010和多个聚合物链6020可以在位点6001处包含不均匀的空间分布。图60A的构型可以用于偶联核酸纳米结构(例如,SNAP),同时防止非核酸实体(例如,分析物)的非特异性结合。图60B示出了包含位点的固体支持物6000,其中所述位点6001包含多个寡核苷酸6010、多个聚合物链6020(例如,PEG链)和另外的偶联部分6030(例如,点击型试剂、链霉亲和素等)。在一些构型中,多个寡核苷酸6010中的寡核苷酸可以具有与另外的偶联部分6030显著不同的结合亲和力。图60B的构型可以用于将核酸纳米结构弱偶联至位点6001,然后一旦在位点6001上发现更稳定的构型,则更强地偶联核酸纳米结构。

[0341] 包含第一多个第一表面偶联部分(例如,偶联部分、更高亲和力的结合部分等)和第二多个第二表面偶联部分(例如,非偶联部分、较低亲和力的结合部分等)的固体支持物、其表面或其位点可以被配置为具有所述第一多个与所述第二多个的有利摩尔比。第一多个第一表面偶联部分和第二多个第二表面偶联部分可以具有至少约1:1、1.5:1、2:1、3:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1、1000:1、10000:1、100000:1、1000000:1或超过1000000:1的摩尔比。可替代地或另外地,第一多个第一表面偶联部分和第二多个第二表面偶联部分可以具有不超过约1000000:1、100000:1、10000:1、1000:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、3:1、2:1、1.5:1或小于1.5:1的摩尔比。

[0342] 固体支持物、其表面和/或其位点可以具有两个或更多个不同的部分。在一些构型中,两个或更多个部分的第一部分促进第一结合相互作用,并且两个或更多个部分的第二部分抑制结合相互作用。例如,位点的表面可以用被配置为结合核酸纳米结构的互补寡核苷酸的第一多个寡核苷酸和被配置为抑制非核酸实体与位点表面的非特异性结合的第二多个PEG部分来官能化。

[0343] 可以通过适当的方法(诸如化学气相沉积或化学液相沉积)向固体支持物、其表面和/或其位点提供表面化学或官能化。表面化学沉积方法可以包括在固体支持物、其表面和/或其位点上形成一层或多层的一个或多个步骤。例如,向表面提供多个表面连接的寡核苷酸的方法可以包括以下步骤:i)将多个胺化的硅烷分子偶联至表面,和ii)将叠氮化物封端的PEG分子偶联至每个硅烷分子,iii)将二苯并环辛烯(DBCO)封端的寡核苷酸偶联至每个叠氮化物基团。在一些构型中,来自表面合成的杂质可能预期存在于固体支持物、其表面和/或其位点上。例如,在前面提供寡核苷酸表面层的实例中,一些未反应的叠氮化物可能存在于表面上。在一些构型中,可以通过使钝化分子与表面杂质接触来钝化表面杂质。钝化

分子可以与表面杂质形成共价键以钝化杂质。钝化分子不需要与表面杂质形成共价键来钝化杂质(例如,静电相互作用)。在一些构型中,表面杂质可以促进实体(例如,核酸纳米结构)与固体支持物、其表面和/或其位点的结合。

[0344] 图61A-61E示出了将核酸纳米结构偶联至表面的方法。图61A显示了含硅表面6100与包含PEG链6110和末端叠氮化物基团6111的多个硅烷化分子的接触。图61B示出了通过共价键6112与具有末端叠氮化物基团6111的PEG链6110偶联的表面6100。表面与包含末端DBC0部分的多个聚A寡核苷酸6120接触,所述末端DBC0部分被配置为与叠氮化物基团6111形成共价键的。图61C展示了现在包含以聚A寡核苷酸6120为末端、排除了至少一个未反应的叠氮化物基团6111的PEG链6110的表面6100。表面由核酸纳米结构6130接触,所述核酸纳米结构包含多个互补的聚T寡核苷酸6135和DBC0部分6132。图61D显示由于聚A寡核苷酸6120与核酸纳米结构6130的聚T寡核苷酸6135的核酸杂交,核酸纳米结构6130与表面6100的偶联。图61E描绘了使核酸纳米结构6130的DBC0部分6132与未反应的叠氮化物基团6111反应以将核酸纳米结构6130共价结合至表面6100的后续步骤。

[0345] 固体支持物、其表面和/或其位点可以被配置为形成多路复用的分析物阵列。多路复用的分析物阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点的第一位点子集的每个位点包含第一多个分析物中的分析物,并且其中所述多个位点的第二位点子集的每个位点包含第二多个分析物中的分析物。多路复用阵列可以包含第一多个分析物和第二多个分析物,其中所述第一多个分析物和第二多个分析物在至少一个方面(例如,类型、来源、制备方法等)不同。多路复用阵列可以包含第一多个分析物和第二多个分析物,其中所述第一多个分析物和第二多个分析物在至少一个方面(例如,复制或重复样品等)没有不同。在一些构型中,被配置为形成多路复用阵列的固体支持物可以包含基本上均匀的表面化学(例如,固体支持物组成和/或在固体支持物或其位点上的表面偶联部分的组成)。例如,图50A-50B描绘了多路复用分析物阵列的形成,其中第一多个分析物5020和第二多个分析物5025与核酸纳米结构5010偶联,其中用于所述第一多个分析物5020的核酸纳米结构5010包含第一功能性核酸5030并且其中用于所述第二多个分析物5025的核酸纳米结构5010包含第二功能性核酸5035。在这样的实例中,与核酸纳米结构5010偶联的分析物的类型被配置为基于组分功能性核酸进行鉴定,从而便于使用在阵列的每个位点上基本均匀的表面化学以及每个核酸纳米结构5010的捕获面或捕获部分的基本均匀的结构。

[0346] 在其他构型中,多路复用阵列可以包含多个位点,其中所述多个位点的第一子集包含第一偶联部分,并且所述多个位点的第二子集包含第二偶联部分,其中所述第一偶联部分被配置为偶联第一实体(例如,核酸纳米结构、分析物等),并且其中所述第二偶联部分被配置为偶联第二实体。在特定的构型中,所述多个位点的第一子集包含空间邻接或空间连续的位点组(例如,位点簇),和/或其中所述多个位点的第二子集包含空间邻接或空间连续的位点组。在另一个特定的构型中,所述多个位点的第一子集不包含空间邻接或空间连续的位点组(例如,位点簇),和/或其中所述多个位点的第二子集不包含空间邻接或空间连续的位点组。

[0347] 图62A-62E描绘了形成位点阵列的方法,所述位点阵列被配置用于分析物的多路复用。图62A描绘了印刷阵列以形成具有不同结合特征的两个或更多个区域的方法。在第一步骤中,可以提供包含位点阵列6201的固体支持物6200。在第二步骤中,可以向固体支持物

6200的部分提供阻隔材料6210(例如,光致抗蚀剂),以将所述多个位点6201的第一邻接位点集与所述多个位点6201的第二邻接位点集分开。在第三步中,印刷装置6220(例如,基于墨水的印刷机)可以沉积包含第一种类的偶联部分6222的第一流体介质6221,所述第一种类的偶联部分与所述多个位点6201的第一邻接位点集接触,并且可以沉积包含第二种类的偶联部分6226的第二流体介质6225,所述第二种类的偶联部分与所述多个位点6201的第二邻接位点集接触。任选地,在将第一种类的偶联部分6222沉积在所述多个位点6201的第一邻接位点集上并且将第二种类的偶联部分6226沉积在所述多个位点6201的第二邻接位点集上之后,可以从固体支持物6200上去除或剥离阻隔材料6210。图62B描绘了光刻形成阵列的方法,所述阵列包含具有不同结合特征的两个或更多个区域。在第一步中,可以提供包含偶联的表面层6205(例如,钝化层)的固体支持物材料6200和任选的阻隔材料6210(例如,光致抗蚀剂)。在第二步中,可以将阻隔材料6210和偶联的表面层6205图案化以暴露固体支持物6200的区域。在第三步中,印刷装置6220(例如,基于墨水的印刷机)可以沉积包含第一种类的偶联部分6222的第一流体介质6221,所述第一种类的偶联部分与所述多个位点6201的第一邻接位点集接触,并且可以沉积包含第二种类的偶联部分6226的第二流体介质6225,所述第二种类的偶联部分与所述多个位点6201的第二邻接位点集接触。任选地,在将第一种类的偶联部分6222沉积在所述多个位点6201的第一邻接位点集上并且将第二种类的偶联部分6226沉积在所述多个位点6201的第二邻接位点集上之后,可以从固体支持物6200上去除或剥离屏障材料6210。图62C描绘了光刻形成包含随机分布的阵列的方法。在第一步中,可以提供包含偶联的表面层6205(例如,钝化层)的固体支持物材料6200和任选的阻隔材料6210(例如,光致抗蚀剂)。在第二步中,可以将阻隔材料6210和偶联的表面层6205图案化以暴露固体支持物6200的区域。在第三步中,印刷装置6220(例如,基于墨水的印刷机)可以沉积流体介质6223,所述流体介质包含第一种类的偶联部分6222和与所述多个位点6201接触的第二种类的偶联部分6226。任选地,在空间随机分布中的多个位点6201上沉积第一种类的偶联部分6222和第二种类的偶联部分6226之后,可以从固体支持物6200上去除或剥离阻隔材料6210。

[0348] 图62D-62E描绘了利用诸如图62A-62C中所描绘的阵列形成多路复用分析物阵列的方法。在第一步骤中,可以将包含第一位点集和第二位点集的固体支持物与第一多个核酸纳米结构6241和第二多个核酸纳米结构6242接触,其中所述第一位点集包含第一偶联部分6222并且所述第二位点集包含第二偶联部分6226,其中所述第一多个核酸纳米结构6241的每个核酸纳米结构被配置为与第一偶联部分6222偶联,并且其中所述第二多个核酸纳米结构6242的每个核酸纳米结构被配置为与第二偶联部分6226偶联。任选地,第一多个核酸纳米结构6241的每个核酸纳米结构可以与第一多个分析物6251的分析物偶联,并且第二多个核酸纳米结构6242的每个核酸纳米结构可以与第二多个分析物6252的分析物偶联。在第二步中,第一多个核酸纳米结构6241的单个核酸纳米结构可以沉积在包含第一偶联部分6222的位点,并且第二多个核酸纳米结构6242的单个核酸纳米结构可以沉积在包含第二偶联部分6226的位点。

[0349] 固体支持物、其表面和/或其位点可以被配置为通过电荷介导的相互作用偶联核酸纳米结构。电荷介导的相互作用可以是结合相互作用,其中带电中间体促进实体(例如,分析物、核酸纳米结构等)与固体支持物、其表面和/或其位点形成结合相互作用。在一些构

型中,电荷介导的相互作用可以包含离子介导的相互作用,其中离子种类(例如,阳离子、阴离子)促进实体与固体支持物、其表面或其位点之间的偶联相互作用。例如,阳离子物质(例如, Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)可以提供促进核酸与带电表面结合的静电桥接相互作用。在特定的构型中,离子介导的相互作用可以促进核酸纳米结构的带电捕获面或捕获部分与带电表面(例如,用胺或羧酸盐等官能化的表面)之间的偶联相互作用,其中所述核酸纳米结构的带电捕获面或捕获部分和所述带电表面包含相同极性的电荷(例如,两者都带正电荷、两者都带负电荷)。例如,镁离子可以在带负电荷的核酸与带负电荷的表面之间形成桥接相互作用。在另一个特定的构型中,离子介导的相互作用可以促进核酸纳米结构的带电捕获面或捕获部分与带电表面(例如,用胺或羧酸盐等官能化的表面)之间的偶联相互作用,其中所述核酸纳米结构的带电捕获面或捕获部分和所述带电表面包含不同极性的电荷(例如,一个带正电荷、一个带负电荷)。例如,可以改变阳离子物质或阴离子物质的浓度,以调节正电荷表面与负电荷核酸之间的相互作用强度。

[0350] 在一些构型中,可以利用电荷介导的相互作用来形成分析物阵列。图65描绘了在包含带电物质的未图案化表面上形成分析物阵列的方法。在第一步骤中,提供包含多个表面偶联的带正电荷的物质6510(例如,胺化硅烷)的固体支持物6500。将固体支持物6500与多个带负电荷的纳米颗粒或微粒6520(例如,羧基化葡聚糖、羧基化聚苯乙烯等)接触。由于静电相互作用,多个带负电荷的纳米颗粒或微粒6520可以与表面偶联的带正电荷的物质6510偶联。在第二步骤中,可以将包含多个带负电荷的纳米颗粒或微粒6520的形成层与多个核酸纳米结构6530接触,如本文所阐述。多个核酸纳米结构6530中的核酸纳米结构可以与分析物6534偶联。核酸纳米结构可以包含捕获面或捕获部分(例如,胺),其包含被配置为与带负电荷的纳米颗粒或微粒6520形成静电相互作用的正电荷部分。多个核酸纳米结构6530中的核酸纳米结构还可以包含效用面或效用部分,其包含被配置为抑制相邻核酸纳米结构6530之间接触的部分6532。在第三步中,可以将多个核酸纳米结构6530沉积在阵列上,其中每个核酸纳米结构6530与每个相邻核酸纳米结构6530任选地通过效用部分6532在空间上分隔开。在任选的最后步骤中,核酸纳米结构6530的静电偶联阵列和带负电荷的纳米颗粒或微粒6520可以通过交联剂(诸如磺基-N-羧基琥珀酰亚胺(磺基-NHS))共价偶联,从而永久地限制阵列中每个核酸和/或分析物的空间位置。

[0351] 固体支持物、其表面和/或其位点可以被配置为与实体(例如,分析物、核酸纳米结构、非核酸、试剂)形成弱结合相互作用。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以被配置为与初始构型中的核酸纳米结构形成多个弱结合相互作用,并且其中所述固体支持物、其表面和/或其位点被配置为促进核酸纳米结构从初始构型到更稳定的最终构型的重新排列。不希望被理论所束缚,弱结合相互作用可以包含第一部分(例如,表面偶联部分)与第二部分(例如,捕获部分)的偶联,其中所述弱结合相互作用弱偏向于缔合或解离(例如,平衡常数在约0.01与100之间、约0.05与50之间、约0.1与10之间、约0.5与5之间等),并且/或者其中所述弱结合相互作用在比基于阵列的过程的时间尺度更短的时间尺度上是动力学可逆的(例如,能够在核酸沉积过程的时间尺度内解离、能够在阵列漂洗过程期间解离,等等)。

[0352] 可以向固体支持物、其表面和/或其位点提供多个部分,其中所述多个部分的子集被配置为与核酸纳米结构的一个或多个表面偶联部分形成多个结合相互作用。在一些构型

中,多个部分的子集可以偶联至核酸纳米结构的一个或多个偶联部分,从而将核酸纳米结构偶联至固体支持物、其表面和/或其位点。在特定的构型中,可以向固体支持物、其表面和/或其位点提供多个部分,其中所述多个部分包含相对于核酸纳米结构的捕获部分的可用量而过量的偶联部分。例如,核酸纳米结构可以包含20个悬垂的表面偶联部分,每个悬垂的表面偶联部分包含10个20个核苷酸长度的分段的聚T重复序列(例如,200个总捕获部分),并且固体支持物上的位点可以包含1000个20个核苷酸长度的表面连接的聚A寡核苷酸,因此对于表面连接部分提供5:1的过量。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以包含多个部分,其中所述多个部分的子集不被配置为与实体偶联。例如,阵列位点可以包含第一多个部分和第二多个部分,所述第一多个部分包含被配置为与核酸纳米结构的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸,所述第二多个部分包含被配置为抑制实体与固体支持物、其表面和/或其位点之间的非特异性结合相互作用的聚合物链。

[0353] 图60A-60D呈现了阵列位点上多个部分的构型,所述构型促进多个弱结合相互作用的形成。图60A和60B包含不同结合和非结合部分的变型,如本文所述。图60C示出了包含含有偶联的多个部分的位点6001的固体支持物6000,所述偶联的多个部分包括与核酸纳米结构的表面偶联寡核苷酸互补的第一多个寡核苷酸6010、含有随机核苷酸取代从而提供对核酸纳米结构的互补表面偶联寡核苷酸具有较低结合亲和力的多个核苷酸序列的第二多个寡核苷酸6011、以及第三多个非结合部分6020(例如聚合物链)。这样的构型可以被修饰成包含例如受体-配体对的组分及其修饰形式。例如,可以向表面提供抗体片段及其一种或多种突变形式,其中所述突变形式对与核酸纳米结构的捕获面偶联的抗体片段的配体具有较低的结合亲和力。图60D包含对图60B的阵列位点的修饰,其中另外的偶联部分6030被有效地包埋或屏蔽在其他部分中,从而抑制其与核酸纳米结构的互补偶联部分形成结合相互作用的能力。这样的构型可以用于减缓高亲和力结合系统(例如,点击型反应、链霉亲和素-生物素等)的相互作用形成速率。可能有利的是在核酸纳米结构与固体支持物之间形成高亲和力相互作用,以防止核酸纳米结构从固体支持物上解离,但是以足够慢的速率以促进核酸纳米结构在固体支持物上重新排列为更稳定的构型,和/或促进在共定位的核酸纳米结构对通过高亲和力结合相互作用永久地偶联至表面之前从固体支持物的地址破坏共定位的核酸纳米结构对。例如,链霉亲和素部分可以包埋在多个聚合物链(例如,PEG、烷烃、葡聚糖等)中,从而需要将通过多个聚合物链与核酸纳米结构偶联的互补生物素部分(例如,经由聚合物连接部分)转移到链霉亲和素部分(例如,通过扩散机制或重复等)。

[0354] 如本文所阐述,表面或固体支持物可以包含具有所需特征的材料,所述特征诸如疏水性或亲水性、两亲性、特定化学或生物物质的低粘附性、以及特定的化学、光学、电学或机械特性。在一些情况下,可以针对其与检测技术或方法(例如,共聚焦荧光显微术)的兼容性来选择表面或固体支持物材料。例如,可能因为低自发荧光特征而选择材料。表面或固体支持物可以包含分子可以与之共价或非共价附接的固体表面。固体基底的非限制性实例包括载玻片、装置元件的表面、膜、流动池、孔、室和微流体或微流体室。本文所用的表面和/或固体支持物可以是平的或弯曲的,或者可以具有其他形状,并且可以是光滑的或有纹理的。在一些情况下,固体支持物表面可以含有微孔。在一些情况下,固体支持物表面可以含有纳米孔。此类孔可以被配置为阵列的位点或地址。在一些情况下,固体支持物表面可以含有一个或多个微孔组合一个或多个纳米孔,例如,每个微孔容纳一个纳米孔阵列。

[0355] 表面或固体支持物可以包含聚合物、玻璃、半导体(例如,硅、锗)、陶瓷、金属、矿物(例如,云母)或其他材料。在一些情况下,表面或固体支持物可以包含由玻璃诸如硼硅酸盐玻璃、熔融石英或石英制成的组分。在其他情况下,表面或固体支持物可以包含光学玻璃或光致变色玻璃。在一些情况下,可以选择具有高钠或钾含量的玻璃作为流体装置部件的材料。表面或固体支持物可以由聚合物或塑料制成,所述聚合物或塑料诸如聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷、聚苯乙烯丙烯酸树脂、乳胶等。表面或固体支持物可以包含金属、金属合金、金属氧化物、金属氮化物或其组合,诸如不锈钢、金、铬、钛、氧化钛、氧化锡、氧化锆或铝。表面或固体支持物可以包含碳水化合物,诸如葡聚糖或纤维素。在一些情况下,表面或固体支持物可以包含两种或更多种具有不同(例如塑料与玻璃)或差异(例如硼硅酸盐与石英玻璃)材料类型的组分。

[0356] 如本文所阐述,表面或固体支持物可以通过厚度或深度来表征。表面或固体支持物的厚度可以是均匀的,或者可以在表面或固体支持物的主体上变化。表面或固体支持物的厚度可以通过制造、成型或加工工艺来改变。在一些情况下,表面或固体支持物可以具有至少约1纳米(nm)、10nm、100nm、1微米(μm)、10 μm 、50 μm 、100 μm 、250 μm 、500 μm 、750 μm 、1毫米(mm)、5mm、1厘米(cm)、10cm或超过10cm的厚度。可替代地或另外地,表面或固体支持物可以具有不超过约10cm、1cm、5mm、1mm、750 μm 、500 μm 、250 μm 、100 μm 、50 μm 、10 μm 、1 μm 、100nm、10nm、1nm或小于1nm的厚度。

[0357] 如本文所阐述,表面或固体支持物可以包含一个或多个表面涂层。表面涂层可以有机的或无机的。在一些情况下,表面涂层可以通过合适的沉积工艺沉积,所述沉积工艺例如原子层沉积、化学气相沉积、化学液体沉积、旋涂、自组装单层。在一些情况下,表面涂层可以通过合适的图案化工艺形成图案,例如干法蚀刻、湿法蚀刻、剥离、深紫外光刻或其组合。在固体支持物表面上,沉积的表面涂层可以具有均匀的厚度或可变的厚度。在一些情况下,表面涂层可以包含原子或分子单层。在一些情况下,表面涂层可以包含自组装单层或亚单层。在一些情况下,表面涂层可以包含金属或金属氧化物层。在一些情况下,表面涂层可以包含硅烷层(例如,乙氧基-、甲氧基-或氯代-硅烷、硅烷醇、硅氧烷等)、膦酸盐层、羧酸盐层(例如,羧酸盐过渡金属氧化物)、硫醇层(例如,硫醇化金)或磷酸盐层。在一些情况下,表面涂层可以包含聚合物、矿物、陶瓷或油墨。表面或固体支持物可以包含含有官能团或部分的层或涂层,所述官能团或部分被配置为与SNAP或SNAP复合物上的互补官能团或部分偶联。表面或固体支持物可以具有凝胶涂层。

[0358] 如本文所阐述,表面或固体支持物上的表面涂层可以通过特定厚度来表征。表面涂层可以是至少约1埃(\AA)、5 \AA 、1纳米(nm)、5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、100nm、250nm、500nm、1微米(μm)、5 μm 、10 μm 、50 μm 、100 μm 或更厚。可替代地或另外地,表面涂层可以为不超过约100 μm 、50 μm 、10 μm 、5 μm 、1 μm 、500nm、250nm、100nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、5nm、1nm、5 \AA 、1 \AA 或更薄。

[0359] 如本文所阐述,表面或固体支持物的表面涂层可以通过表面粗糙度来表征。表面粗糙度可能是由于材料的固有特性或用于形成材料或表面的加工方法造成的。表面粗糙度可以计算为粗糙度特征(例如,凹陷、凸起等)的平均尺寸或者可以被提供为特征尺寸相对于平均或通常表面高度或水平的分布。表面可以具有涂层或层,以改变平均表面粗糙度或

粗糙度特征在表面上的分布。例如,表面可以被涂覆以降低材料的平均表面粗糙度。在其他情况下,可以对表面进行蚀刻、涂覆或其他处理,以增加表面粗糙度。

[0360] 在一些构型中,SNAP或SNAP复合物可以包含被配置为促进与具有表面粗糙度的表面偶联的捕获面或捕获部分。例如,SNAP可以包含捕获面,其包含可以与表面形成增加的相互作用面积的多个单链核酸或其他相互作用基团(例如,带电部分、磁性部分等)。图25A-25C示出了与包含表面粗糙度的表面形成相互作用的实例。图25A描绘了SNAP复合物2510与组分SNAP的接触,所述组分SNAP具有未修饰的捕获面,所述未修饰的捕获面具有包含表面粗糙度的表面2500。SNAP复合物2510只能在捕获面接触表面2500高点的地方与表面形成有限的相互作用。图25B描绘了SNAP复合物2510与组分SNAP的接触,所述组分SNAP具有用单链核酸2520(或其他相互作用基团)修饰的捕获面,所述捕获面具有包含表面粗糙度的表面2500。SNAP复合物2510可以在单链核酸2520接触表面2500高点的地方与表面形成增加的相互作用。图25C示出了将多个SNAP复合物2510与包含多个柱状结构2530的纳米结构化表面2500接触。SNAP复合物2510可以被配置为促进在表面2500的每个纳米结构化特征的顶部展示分析物。例如,SNAP复合物2510的效用SNAP可以包含在效用面上的效用部分(例如,疏水部分),所述效用部分可以与其他SNAP复合物2510的效用部分相互作用,从而增加相邻SNAP复合物2510的效用SNAP共定位于与柱状结构2530的顶部结合的每个SNAP复合物的凸起特征和展示SNAP之间的空隙区域中的可能性。

[0361] 表面诸如固体支持物可以包含表征的粗糙度。表面粗糙度可以通过方法诸如表面轮廓术、接触轮廓术、原子力显微术、光学显微术或任何其他合适的技术来表征。表面可以包含至少约0.1nm、0.2nm、0.3nm、0.4nm、0.5nm、0.6nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm或超过20nm的表征的平均粗糙度。表面可以包含不超过约20nm、19nm、18nm、17nm、16nm、15nm、14nm、13nm、12nm、11nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.9nm、0.8nm、0.7nm、0.6nm、0.5nm、0.4nm、0.3nm、0.2nm、0.1nm或小于0.1nm的表征的平均粗糙度。

[0362] 表面或固体支持物可以包含涂覆有金属或金属氧化物层的一个或多个表面。根据优选的化学性质,金属或金属氧化物层可以包含特定的物质。候选金属或金属氧化物可以包含氧化锆(ZrO_2)、铪(Hf)、金(Au)、二氧化钛(TiO_2)、铝(Al)、氧化铝(Al_2O_3)或其组合。

[0363] 在一些情况下,表面或固体支持物可以是光学不透明的。在一些情况下,固体表面或固体支持物的全部或部分可以在一种或多种波长(诸如红外光、可见光、红光、橙光、黄光、绿光、蓝光、紫光或紫外光)下是光学不透明的。在一些情况下,固体表面或固体支持物的全部或部分可以是光学透明的,或者可以在一种或多种波长(诸如红外光、可见光、红光、橙光、黄光、绿光、蓝光、紫光或紫外光)下是光学透明的。例如,固体表面或固体支持物在未官能化的区域可以是光学不透明的,而在官能化的区域可以是光学透明的。

[0364] 在固体支持物上偶联核酸的方法

[0365] 在另一方面,本文提供了一种将核酸纳米结构与阵列位点偶联的方法,所述方法包括:a)将包含位点的阵列与核酸纳米结构接触,其中所述位点包含多个表面连接部分,并且其中所述核酸纳米结构包含多个捕获部分,b)将所述核酸纳米结构在初始构型中与所述位点偶联,其中所述初始构型不包括稳定构型,并且其中所述核酸纳米结构通过将所述多个捕获部分中的捕获部分偶联至所述多个表面连接部分中的表面连接部分而偶联,c)解偶

联所述多个捕获部分中的捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分的偶联,和d) 将所述核酸纳米结构从初始构型改变为稳定构型,其中将所述多个捕获部分中的每个捕获部分与所述多个表面连接部分中的表面连接部分偶联。任选地,核酸纳米结构可以与目标分析物缀合或者被配置为与目标分析物缀合。核酸纳米结构的其他任选组成在本文别处进行阐述。

[0366] 在一些构型中,核酸纳米结构的捕获部分与阵列位点的表面连接部分的解偶联包括加热固体支持物和/或核酸纳米结构,和/或使固体支持物与流体介质接触,所述流体介质被配置为将表面连接部分与捕获部分解偶联。

[0367] 在一些构型中,将核酸纳米结构与阵列位点偶联的方法可以包含将阵列与流体介质接触,如本文所阐述,其中所述流体介质包含核酸纳米结构。任选地,流体介质可以包括多个核酸纳米结构,其至少一个子集单独偶联至阵列的各个位点。在特定的构型中,将核酸纳米结构从初始构型改变为稳定构型还可以包括改变与固体支持物接触的流体介质。在一些构型中,改变与固体支持物接触的流体介质可以包括引入化学物质(例如,表面活性剂、变性剂、离液剂、离子物质、酸、碱等)。在其他构型中,改变与固体支持物接触的流体介质可以包括改变流体介质中化学物质的浓度(例如,表面活性剂、变性剂、离液剂、离子物质、酸、碱等)。

[0368] 将核酸纳米结构偶联至阵列位点的方法可以利用包含一个或多个捕获部分的核酸纳米结构,所述一个或多个捕获部分被配置为形成多价结合相互作用(例如,偶联至超过一个表面连接部分)。核酸纳米结构的捕获部分可以包含促进多价结合相互作用形成的结构(例如,多核苷酸重复序列、由中间核苷酸序列分隔开的第一和第二多核苷酸重复序列等)。捕获部分可以任选地包含削弱多价结合相互作用的任何单个结合相互作用的结合强度或结合特异性的结构。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含捕获部分,所述捕获部分包含本文别处(例如,在悬垂寡核苷酸和订书钉寡核苷酸的上下文中)所阐述的均聚物序列或其他组成。核酸纳米结构可以偶联至包含第一表面连接部分的固体支持物,所述第一表面连接部分与表面偶联部分互补或具有反应性。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含捕获部分,所述捕获部分包含含有自身互补性的核苷酸序列。将核酸纳米结构偶联至表面的方法可以包括以下的一个或多个步骤:i) 破坏捕获部分的自身互补核苷酸序列,和ii) 将表面连接部分偶联至捕获部分的自身互补核苷酸序列(例如,经由粘性末端介导的链置换反应等)。

[0369] 将核酸纳米结构偶联至表面的方法可以包括:i) 将核酸纳米结构以初始构型偶联至表面,和ii) 将核酸纳米结构改变成最终构型,其中所述最终构型比初始构型更稳定(时间、空间、热力学、动力学等)。在一些情况下,初始构型可以包含核酸纳米结构在固体支持物的位点上的空间定位,其中所述初始构型包括捕获部分与表面连接部分的非最大化或部分量的偶联。例如,如果含有20个捕获部分的核酸纳米结构中有少于20个捕获部分与阵列位点的表面连接部分偶联,则所述核酸纳米结构可能具有非最大化或部分量的偶联。在另一个实例中,可以预期含有20个捕获部分的核酸纳米结构与至少10个表面连接部分(例如,利用至少50%的可用结合基团)形成偶联相互作用以实现最大化量的偶联。在其他情况下,初始构型可以包含核酸纳米结构在阵列位点上的非最大化占用面积。例如,如果只有一定分数的核酸纳米结构偶联至阵列位点的表面(参见图58B),那么核酸纳米结构没有最大化

其在阵列位点上的占用面积,并且可能形成了非最大化量的偶联相互作用。在其他情况下,初始构型可以包含核酸纳米结构在位点上的不对称排列。例如,基本上正方形的核酸纳米结构可能最初偶联至基本上正方形的阵列位点,其中所述核酸纳米结构的中心点不与阵列位点的中心点对齐。在一些构型中,更稳定的最终构型可以包含阵列位点上的位点,其中所述核酸纳米结构形成捕获部分与表面连接部分的最大化量的偶联。在其他构型中,更稳定的最终构型可以包含核酸纳米结构在位点上的最大化占用面积。在其他构型中,更稳定的最终构型可以包含核酸纳米结构在位点上的对称排列。

[0370] 通过将核酸纳米结构的一个或多个捕获部分偶联至阵列位点的多个表面连接部分,可以将核酸纳米结构偶联至阵列位点。阵列位点可以具有过剩量的表面连接部分,其中所述过剩量是关于一个或多个捕获部分上的可用结合基团的量和/或关于一个或多个捕获部分上的可用结合基团的空间密度来确定的。例如,核酸纳米结构可以包含20个包含聚T序列的捕获部分,其中每个捕获部分被配置为与表面连接的聚A寡核苷酸形成约10个结合相互作用。在这种情况下,含有超过200个表面连接的聚A寡核苷酸的阵列位点可以被认为含有过剩量的表面连接部分。在另一个实例中,核酸纳米结构可以包含多个捕获部分,其平均表面密度为约1个捕获部分/10平方纳米。在这种情况下,包含表面密度超过1个表面连接部分/10平方纳米的表面连接部分的阵列位点可能含有过剩量的表面连接部分。基于绝对或空间密度,相对于核酸纳米结构的可用捕获部分的量,阵列位点可以含有至少约1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍、100000倍、1000000倍或超过1000000倍摩尔过量的表面连接部分。可替代地或另外地,基于绝对或空间密度,相对于核酸纳米结构的可用捕获部分的量,阵列位点可以含有不超过约1000000倍、100000倍、10000倍、5000倍、1000倍、500倍、250倍、100倍、50倍、25倍、10倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1.5倍、1.2倍、1.1倍或小于1.1倍摩尔过量的表面连接部分。在其他构型中,相对于核酸纳米结构的可用捕获部分的数量,阵列位点可以包含摩尔不足的表面连接部分。

[0371] 本文提供了一种形成阵列的方法,所述方法包括提供如本文所阐述的多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物,将所述多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物中的每个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物与来自所述多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物中的一个或多个另外的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物偶联,以及将所述多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物中的每个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物与表面偶联,其中每个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物包含展示核酸纳米结构和一个或多个捕获核酸纳米结构或效用核酸纳米结构,并且其中每个核酸纳米结构复合物包含与表面偶联的偶联部分,从而形成阵列。

[0372] 在一些构型中,每个核酸纳米结构复合物在与其将偶联的另一个核酸纳米结构复合物接触之前被组装。在其他构型中,单独核酸纳米结构相互接触,以导致核酸纳米结构复合物与其他核酸纳米结构复合物缀合。因此,形成阵列的方法可以包括提供多个核酸纳米结构以产生多个核酸纳米结构复合物,每个核酸纳米结构复合物包含至少两个偶联在一起的核酸纳米结构复合物,以及将所述多个核酸纳米结构复合物与表面偶联,其中每个核酸纳米结构复合物包含展示核酸纳米结构和一个或多个效用核酸纳米结构,并且其中每个核酸纳米结构复合物包含与表面偶联的偶联部分,从而形成阵列。

[0373] 展示核酸纳米结构可以在掺入阵列之前或之后与分析物偶联。在一些构型中,方法还可以包括将分析物与展示部分偶联的步骤。在一些构型中,可以在将多个核酸纳米结构复合物中的每个核酸纳米结构复合物与表面偶联之后将分析物与展示部分偶联。在一些构型中,可以在将多个核酸纳米结构复合物中的每个核酸纳米结构复合物与表面偶联之前将分析物与展示部分偶联。在一些构型中,可以在将多个核酸纳米结构复合物的每个核酸纳米结构复合物与来自多个核酸纳米结构复合物的一个或多个另外的核酸纳米结构复合物偶联之后将分析物与展示部分偶联。在一些构型中,可以在将多个核酸纳米结构复合物的每个核酸纳米结构复合物与来自多个核酸纳米结构复合物的一个或多个另外的核酸纳米结构复合物偶联之前将分析物与展示部分偶联。在一些构型中,可以在提供多个核酸纳米结构复合物之后将分析物与展示部分偶联。在一些构型中,可以在提供多个核酸纳米结构复合物之前将分析物与展示部分偶联。

[0374] 可以在特定的形成条件下形成包含核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的阵列,如本文所阐述。条件可以包括特定的溶剂或缓冲条件。在一些构型中,可以在包含镁盐的pH缓冲液中提供多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物。在一些构型中,多个核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的偶联可以在表面活性剂的存在下发生。可以形成具有展示核酸纳米结构的阵列,所述展示核酸纳米结构可以在形成阵列之前或之后与分析物偶联。在一些构型中,分析物可以与展示部分共价偶联。

[0375] 可以在特定的温度配置下形成包含核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的阵列。例如,第一SNAP或SNAP复合物可以在第一温度下与第二SNAP或SNAP复合物组合,然后可以改变(例如,降低、升高)温度,从而将第一SNAP或SNAP复合物与第二SNAP或SNAP复合物偶联以形成阵列。阵列形成过程中的步骤可以在以下温度发生:至少约0°C、10°C、25°C、50°C、75°C、90°C、95°C或超过95°C。可替代地或另外地,阵列形成过程中的步骤可以在以下温度发生:不超过约95°C、90°C、75°C、50°C、25°C、10°C、0°C或低于0°C。在一些构型中,温度可以用于增加核酸纳米结构在表面上沉积的特异性。例如,可能有利的是将包含多个表面相互作用的寡核苷酸的核酸纳米结构与包含多个表面连接的互补寡核苷酸的偶联表面在较高温度下接触,然后当核酸纳米结构有足够的时间在偶联表面上获得最稳定的构型时降低温度。令人惊讶的是,核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物沉积的温度升高可以增加在偶联表面上仅沉积一个核酸纳米结构的可能性,这是由于可用于核酸纳米结构在偶联表面上找到最大数量的表面相互作用部分可以形成结合相互作用的位置的能量增加以及核酸纳米结构在偶联表面上的最佳沉积位置将阻碍其他核酸纳米结构在同一偶联表面上稳定地共沉积的可能性增加。

[0376] 如本文所阐述,核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)或其分析物偶联形式可以沉积在表面或固体支持物上。下面阐述的方法和组合物通常将参考SNAP或SNAP复合物来例示;然而,应该理解的是,所述实例可以扩展到任何核酸,如本文所阐述,包括具有相同种类的SNAP或SNAP复合物的群体、具有不同种类的SNAP或SNAP复合物的群体、具有相同种类的分析物偶联的SNAP或SNAP复合物的群体或具有不同种类的分析物偶联的SNAP或SNAP复合物的群体。

[0377] 在一方面,本文提供了一种方法,所述方法包括:a)将如本文所阐述的核酸与如本文所阐述的固体支持物接触;和b)将所述核酸偶联至所述固体支持物。在一些情况下,方法

可以包含以下步骤:a) 提供如本文所阐述的固体支持物,其中所述固体支持物包含位点和间隙区域,其中所述位点被配置为偶联如本文所阐述的核酸,并且其中所述间隙区域被配置为抑制核酸的结合,b) 使所述固体支持物与所述核酸接触,和c) 将所述核酸偶联至所述固体支持物的位点。在一些情况下,方法可以包含以下步骤:a) 提供如本文所阐述的固体支持物,其中所述固体支持物包含多个位点和一个或多个间隙区域,其中所述多个位点中的位点被配置为偶联如本文所阐述的核酸,并且其中所述间隙区域被配置为抑制核酸的结合,b) 使所述固体支持物与多个核酸接触,其中所述多个核酸包含所述核酸,和c) 将所述多个核酸中的核酸偶联至所述多个位点中的位点。

[0378] 可以在SNAP或SNAP复合物沉积在表面或固体支持物上之前、期间或之后将分析物与SNAP或SNAP复合物偶联。SNAP或SNAP复合物在表面或固体支持物上的沉积可以由物理现象所驱动,所述物理现象诸如重力、离心力、静电相互作用、磁相互作用、共价结合或非共价结合。在一些情况下,SNAP或SNAP复合物的沉积可能是由于带负电荷的SNAP或SNAP复合物与带正电荷的基底(或其他材料)之间的静电相互作用,反之亦然。在其他情况下,SNAP或SNAP复合物的沉积可能是由于SNAP上的多个表面相互作用部分与偶联表面上的多个表面连接部分之间的偶联相互作用。

[0379] 在SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式偶联至固体支持物之前,SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以被纯化。在一些情况下,纯化可以包括去除过量或不需要的试剂(例如,盐、未结合的寡核苷酸、未结合的分析物等)。在一些情况下,纯化过程可以包括去除不包含偶联分析物的SNAP或SNAP复合物。在一些情况下,纯化过程可以包括去除包含超过一个偶联分析物的SNAP或SNAP复合物。在一些情况下,纯化过程可以包括去除与超过一个SNAP或SNAP复合物偶联的分析物。SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以通过合适的纯化方法来纯化,所述合适的纯化方法诸如尺寸排阻色谱、高压液相色谱、超滤、切向流过滤、反渗透、亲和层析或其组合。可以基于纯度的统计或随机量度来表征多种分析物或SNAP分析物复合物。在一些情况下,如果纯度测量偏离统计或随机分布(例如,泊松分布、正态分布、二项式分布等)的预期纯度测量,则可以提供多个分析物用于分析物阵列的制备,其中针对单分析物与单个核酸偶联的情况计算统计或随机分布。例如,如果纯化级分含有少于36.8%的未与分析物偶联的核酸纳米结构(例如,比泊松分布预测的比率低),则与多个核酸纳米结构偶联的多个分析物可以用于如本文所阐述的方法。可以关于未被占据的核酸的分数、具有超过一个分析物的核酸的分数、与超过一个核酸偶联的分析物的分数或其组合来表征纯化的多个分析物。

[0380] SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以沉积在表面或固体支持物,以形成SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的图案化、有序或无序阵列。在一些情况下,可以对表面或固体支持物进行结构化、工程化或制造,以控制SNAP或SNAP复合物的沉积可能发生的位置。表面或固体支持物可以含有正或负表面电荷密度的局部或均匀区域,其促进与SNAP或SNAP复合物的静电相互作用。表面或固体支持物可以沉积有改变表面或材料的表面电荷密度的涂层、层或官能团,以促进与蛋白质缀合物的锚定基团的静电相互作用。表面或固体支持物可以用允许SNAP或SNAP复合物与表面或材料直接共价附接的化学物质来官能化。可能特别有用的示例性表面和固体支持物在本文别处进行阐述。

[0381] 可以控制如本文所阐述的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式在表面或固体支

持材料上的沉积,以确保相邻SNAP或SNAP复合物之间的充分分隔。对于分析物测定,SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以以足够的分隔沉积,以确保每个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式位于表面或固体支持物上的唯一的、光学可观察的地址或位置。相邻SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式之间的分隔可以由表面或固体支持物材料;SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式或由它们的组合控制。例如,特征可以存在于表面上,并且每个特征可以具有仅容纳单个SNAP或SNAP复合物的尺寸或化学官能化。可替代地或另外地,官能团可以以限制SNAP或SNAP复合物在与官能团有反应的表面上的排列的取向存在于SNAP或SNAP复合物上。可以对表面或固体支持物材料进行修饰,以介导SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式在结合位点处的沉积。结合位点之间的表面或固体支持物的区域可以被修饰以阻止或防止SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的沉积。SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的沉积可以通过表面基团或空间阻碍蛋白质缀合物沉积在表面上的材料(诸如栓系的葡聚糖、栓系的聚乙二醇(PEG)大分子或剪切的鲑鱼精子DNA)来防止。可以通过静电或磁性排斥SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的表面基团来防止SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式沉积到表面上的特定区域(诸如旨在分隔SNAP将要驻留的地址的间隙区域)。例如,带负电荷的SNAP或SNAP复合物可以与已经用带负电荷的基团诸如羧酸、有机磷酸酯、有机硫酸酯或其组合官能化的基底表面的区域排斥。在一些情况下,可以利用溶剂构型来促进和/或抑制在表面或固体支持物的区域处的SNAP沉积。例如,盐、表面活性剂或乳液可以用于更有利或不太有利的结合条件的区域。

[0382] 可以在如本文所阐述的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式与表面或固体支持物之间形成共价键。可以在SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式与表面或固体支持物之间直接形成共价键。可以在SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式上的官能团与表面或固体支持物之间形成共价键。例如,用有机硅烷基团官能化的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以通过配位键结合到硅表面或固体支持物上。可以在SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式上的官能团与表面或固体支持物上的官能团之间形成共价键。例如,含有活化酯官能团的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以结合到含有胺化官能团(例如,3-氨基-丙基三乙氧基硅烷、硅烷醇等)的表面或固体支持物上。在一些情况下,SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以通过由点击型反应形成的共价键偶联至固体支持物或表面。

[0383] 如本文所阐述的SNAP或SNAP复合物可以沉积在包含有序或无序表面的材料、表面或固体支持物上。有序表面可以包含图案化有多个由间隙区域分隔开的结合位点或区域的表面,其中每个结合位点可以被配置为结合SNAP复合物,并且其中所述间隙区域可以被配置为不结合SNAP复合物。在一些构型中,表面或固体支持物可以包含图案化阵列。有序表面可以通过限制SNAP或SNAP复合物可以沉积的区域或者通过提供促进SNAP或SNAP复合物沉积的有序特征来促进SNAP或SNAP复合物的沉积。在其他构型中,无序表面可以包含没有图案化或结构化特征的表面。例如,表面可以包含被配置为偶联SNAP或SNAP复合物的官能团或部分的均匀涂层或层。在一些构型中,无序表面可以包含两种流体之间的相边界,诸如气体/液体界面或液体/液体界面。在其他构型中,无序表面可以包含可移动层(例如,脂质单层或双层、栓系或粘附的胶束或胶体的层等)。SNAP或SNAP复合物可以被配置为在无序表面上自组装或自构图。例如,SNAP或SNAP复合物可以在一个或多个面上包含效用部分,所述效用部分在空间上阻碍其他SNAP或SNAP复合物的接近,从而限制两个SNAP在空间阻断或阻塞

的区域内共定位的能力。

[0384] 材料可以包含表面或固体支持物,其用结合位点或区域和间隙区域图案化或结构化以形成图案化的SNAP或SNAP复合物阵列。在一些构型中,单独结合位点还可以包含促进SNAP或SNAP复合物在结合位点或区域的沉积和/或限制或防止多个SNAP或SNAP复合物在结合位点或区域的共沉积的结构。可以被改变以促进SNAP或SNAP复合物沉积的表面特征可以包括结合位点或区域尺寸、结合位点或区域形态、以及结合位点或区域化学性质。在一些构型中,固体支持物、其表面和/或其位点可以包含有助于SNAP或SNAP复合物与表面的结合的二维和/或三维特征。在特定的构型中,二维和/或三维特征可以包含与SNAP和/或SNAP复合物的形状或形态基本上匹配的形状或形态。如果固体支持物、其表面和/或其位点的形状或形态具有与SNAP、SNAP复合物或其面的有效表面积或占用面积基本上相似的表面积,则固体支持物、其表面和/或其位点的形状或形态可能与SNAP的形状或形态匹配。如果固体支持物、其表面和/或其位点的形状或形态具有与SNAP、SNAP复合物或其面的轮廓基本上对齐的表面轮廓,则固体支持物、其表面和/或其位点的形状或形态可能与SNAP的形状或形态匹配。例如,可以将三角形SNAP沉积在三角形位点上。在另一个实例中,位点可以包含与SNAP结构的棱锥体形空隙空间偶联的棱锥体形三维凸起结构。在其他特定的构型中,二维和/或三维特征可以包含不与SNAP和/或SNAP复合物的形状或形态基本上匹配的形状或形态。

[0385] 在一些构型中,SNAP或SNAP复合物可以具有限制SNAP或SNAP复合物在结合位点或区域沉积的形状或构象。图26A描绘了包含2个静电结合的十字形SNAP复合物2610的结合位点2600。尽管两个SNAP复合物2610各自占据结合位点2600表面积的小于25%,但十字形构象限制了超过两个SNAP复合物以足够的表面接触沉积以形成稳定的静电结合相互作用的能力。图26B描绘了包含2个静电结合的星形SNAP复合物2620的结合位点2600。虽然2个SNAP复合物2620的组合占用面积小于结合位点2600的总占用面积,但是第一复合物的构象阻止了第二复合物完全占据结合位点,从而增加第二复合物可能从结合位点2600解离的可能性。因此,占据结合位点2600的第一SNAP复合物2610将在空间上阻碍第二SNAP复合物2610共同占据结合位点2600。在一些构型中,与结合位点或区域偶联的第一SNAP或SNAP复合物的构象可以防止第二SNAP或SNAP复合物与结合位点的偶联。图26C描绘了包含含有21个瓦片形状的SNAP的SNAP复合物2630的结合位点2600,所述SNAP复合物完全占据结合位点,使得没有其他SNAP复合物可以沉积在结合位点2600上。

[0386] 由于结合位点或区域的形态,结合位点或区域也可以被配置为促进SNAP或SNAP复合物沉积。结合位点或区域可以包含凸起的基座、孔或凹陷。由于能量效应,形成基座或孔的表面不连续(例如,边缘或边界)可能限制SNAP的沉积。不希望被理论所束缚,如果SNAP或SNAP复合物的部分可能不完全与结合表面接触,则SNAP或SNAP复合物可能不太可能沉积在边缘或不连续的附近。减小结合位点或区域的尺寸也可以增加只有单个SNAP或SNAP复合物可以有利地结合到结合位点或区域的可能性。结合位点或区域还可以包含促进结合位点或区域内的SNAP或SNAP复合物沉积的小尺度特征。图28A-28B描绘了与SNAP复合物2810上的捕获面2820的构象匹配的凸起的表面特征2800。此类特征可以通过刻蚀或沉积技术产生以形成更具体的特征,从而在结合位点结合SNAP或SNAP复合物。可以利用多种类型的图案化表面特征来分离表面上不同的SNAP或SNAP复杂类型。图27A描绘了包含6个结合位点2710的表面2700。两个结合位点用三角形表面特征2715图案化,并且4个结合位点用正方形表面特

征2718图案化。如图27B所示,在表面已经与三角形和正方形SNAP复合物的混合物接触之后,三角形SNAP复合物2725优先结合到三角形表面特征2715,并且正方形SNAP复合物2728优先结合到正方形表面特征2718。

[0387] 结合位点或结合区域的表面化学也可以被配置为促进SNAP或SNAP复合物沉积。结合位点或结合区域可以包括被配置为偶联SNAP或SNAP复合物(例如,点击反应性基团、寡核苷酸等)的官能团或部分的局部区域。结合位点或结合区域还可以包含封闭或钝化基团的区域,其阻碍SNAP或SNAP复合物与结合位点或区域的特定部分(例如,边缘、边界)的特异性或非特异性结合。局部表面化学可以通过任何合适的技术(包括沉积和剥离技术)产生。在PCT/US2020/058416中讨论了进一步的表面化学方法,该文献以引用的方式整体并入本文。在一些情况下,可以通过以产生每个相应种类的期望表面分布或表面密度的相对浓度沉积两个或更多个种类的混合物来控制两个或更多个种类的官能团或部分(例如,表面连接部分)的分布或密度。例如,可以通过从包含摩尔比为大约1:100的两个寡核苷酸的流体介质中共沉积寡核苷酸来形成包含摩尔比为1:100的两个表面连接寡核苷酸的偶联表面。在一些情况下,由于沉积中的动力学差异,可以调整种类的相对比率。

[0388] 多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以按已知或表征的效率沉积在表面或固体支持物上。在表面或基底上结合位点的可用数量超过多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的群体尺寸的某些情况下,可以基于沉积在表面或固体支持物上的多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的分数来测量沉积效率。在多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式超过表面或固体支持物上的可用结合位点数量的某些情况下,可以基于沉积后表面或固体支持物上被占据的可用结合位点的分数来测量沉积效率。

[0389] 基于沉积在表面或固体支持物上的多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的百分比或分数,可以定量多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式对表面或固体支持物的结合效率。多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合效率可以为基于所述多个中的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的可用数量的至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、99.99999%或超过99.99999%。可替代地或另外地,多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合效率可以为基于所述多个中的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的可用数量的不超过约99.99999%、99.99999%、99.9999%、99.999%、99.99%、99.9%、99.5%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或小于约1%。

[0390] 基于表面或固体支持物上被SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式占据的可用结合位点的百分比或分数,可以定量多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式对表面或固体支持物的结合效率。表面或固体支持物结合位点的占据比率可以为基于可用结合位点的总数量的至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、99.99999%或超过99.99999%。可替代地或另外地,表面或固体支持物结合位点的占据比率可以为基于可用

结合位点的总数量的不超过约99.999999%、99.99999%、99.9999%、99.999%、99.99%、99.9%、99.5%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或小于1%。

[0391] 在特定的构型中,超过一个如本文所阐述的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式可以在表面或固体支持物上的独特位置、地址或结合位点处沉积到表面或固体支持物上。在一些情况下,可以使具有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点的数量最小化,以适应分析物测定期间的单分子检测。在其他情况下,诸如在大量分析物测定期间,可以在多个、大多数或所有可用的结合位点处沉积超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式。可以表征或定量包含多个沉积的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的表面或固体支持物,以确定具有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点的数量。表面或固体支持物结合位点可以含有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式,例如约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、个或更多个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式。根据一些可定量的分布,诸如泊松分布、二项式分布、 β 二项式分布、超几何分布或双峰分布,可以存在具有超过一个沉积的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点。

[0392] 表面或固体支持物上具有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点的百分比可以基于在表面或固体支持物上每个独特位置处检测到的分子的数量来定量。可以通过检测过量的荧光、发光、闪光或尺寸(例如,如通过原子力显微术所表征)来定量表面或固体支持物上独特位置处的过量分子的数量。表面或固体支持物上具有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点的百分比可以为所有可用结合位点的不超过约50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%、0.0000001%或小于约0.0000001%。可替代地或另外地,表面或固体支持物上具有超过一个SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点的百分比可以为所有可用结合位点的至少约0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%或超过约50%。在一些情况下,可能没有观察到在表面或固体支持物上具有超过一个沉积的SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的结合位点。

[0393] 可以在促进SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式沉积在表面或固体支持物上的结合位点处的条件下使SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式沉积在表面或固体支持物上。沉积可以在外部施加的物理现象(诸如电场、磁场、加热、冷却或它们的组合)下发生。在一些情况下,可以在促进SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式沉积的条件下使SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式沉积在表面或固体支持物上。用于沉积的溶剂可以根据化学组成、离子强度、pH、电导率、磁导率、热容量、热导率、反应性、密度、粘度、极性以及它们的组合而变化。用于沉积SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的溶剂的化学组成可以根据溶剂类型和量、盐类型和量、金属类型和量、表面活性剂类型和量、成分pH、成分pKa和成分反应性而变化。在一些情况下,可以组成用于沉积SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的溶剂,以增强SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式与表面或固体支持物之间的相互作用,例

如SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的静电结合。不希望被理论所束缚，SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的沉积溶剂可以使SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的沉积自由能最小化。沉积溶剂可以包含在沉积之前减少或防止SNAP、SNAP复合物或其分析物偶联形式的聚集的分散剂，诸如表面活性剂或去污剂。在一些情况下，SNAP或SNAP复合物存储或制备溶剂组合物可以用作沉积溶剂。沉积溶剂可以被配置为增加SNAP和/或SNAP复合物在表面或固体支持物的优选位置处沉积的可能性。沉积溶剂可以被配置为降低SNAP和/或SNAP复合物在表面或固体支持物的非优选位置处沉积的可能性。

[0394] 可以通过调节核酸与固体支持物之间的结合相互作用的强度来促进如本文所阐述的在固体支持物上沉积核酸的方法。例如，核酸可以以初始构型沉积在固体支持物上，然后通过破坏核酸与固体支持物之间的一个或多个现有结合相互作用并且通过在固体支持物的第二地址处形成核酸与固体支持物之间的一个或多个新的结合相互作用，重新排列成更稳定的最终构型。在另一个实例中，被配置为与固体支持物形成共价相互作用和非共价相互作用的核酸可以首先在抑制共价相互作用和促进非共价相互作用的流体介质中沉积在固体支持物上。然后固体支持物和/或核酸可以与促进共价相互作用的第二流体介质接触。

[0395] 沉积核酸的方法可以包括通过改变与核酸和/或固体支持物接触的流体介质来调节核酸与固体支持物之间的结合相互作用的强度。可以通过改变流体参数来改变如本文所阐述的流体介质，其中所述流体参数可以包含任何可想到的参数，诸如化学组成（例如，溶剂类型、诸如离液剂或表面活性剂等物质的存在和浓度、等）、极性、密度、粘度、沸点、冰点、pH、离子强度、渗透压和流速。调节结合相互作用的强度可以包括以下的一个或多个步骤：a) 在如本文所阐述的包含第一流体参数的第一流体介质中，将如本文所阐述的核酸沉积在如本文所阐述的固体支持物上，b) 任选地在第一流体介质中温育核酸和/或固体支持物，c) 将核酸和/或固体支持物与包含第二流体参数的第二流体介质接触，其中所述第一流体参数和所述第二流体参数不同，d) 任选地在第二流体介质中温育核酸和/或固体支持物，和e) 任选地，从固体支持物和/或核酸中置换第二流体介质。在一些构型中，在将核酸沉积在第一流体介质中之前，可以使固体支持物与第二流体介质接触。例如，可以将固体支持物在活化固体支持物的表面以形成结合相互作用的第二流体介质中孵育，然后随后与包含核酸的第一流体介质接触，从而在核酸与表面之间形成结合相互作用。在一些构型中，从固体支持物置换第二流体介质可以包括用包含第一流体参数的第一流体介质置换包含第二流体参数的第二流体介质。例如，可以将固体支持物在活化固体支持物的表面以形成结合相互作用的第二流体介质中孵育，然后随后与包含核酸的第一流体介质接触，从而在核酸与表面之间形成结合相互作用。在另一个实例中，可以将包含沉积的核酸的固体支持物与第二流体介质接触，从而减弱核酸与固体支持物之间的结合相互作用的强度，然后第二流体介质可以被第一流体介质置换，从而增强核酸与固体支持物之间的结合相互作用的强度。在一些构型中，从固体支持物置换第二流体介质可以包括用包含第三流体参数的第三流体介质置换包含第二流体参数的第二流体介质。例如，第二流体介质可以被漂洗缓冲液置换，所述漂洗缓冲液被配置为从固体支持物或其表面去除任何未结合的实体（例如，核酸、分析物、亲和试剂、试剂等）。在另一个实例中，第二流体介质可以被包含交联剂的介质所置换，所述交联剂被配置为将核酸偶联至固体支持物或其表面。

[0396] 在一些构型中,调节结合相互作用的强度的方法可以包括通过逐步改变到第二流体介质来置换第一流体介质。例如,可以将第一流体介质从与固体支持物的接触中撤出,然后将第二流体介质与固体支持物接触。在其他构型中,调节结合相互作用的强度的方法可以包括通过梯度变化到第二流体介质来置换第一流体介质。例如,通过使流体介质流过固体支持物,可以将与固体支持物接触的溶液的离子强度从第一离子强度改变为第二离子强度,其中所述流体介质经历从第一离子强度到第二离子强度的线性或非线性浓度梯度。在一些构型中,调节结合相互作用的强度的方法可以包括改变流体介质、固体支持物和/或核酸的环境特性,诸如温度、剪切力、电场或磁场。例如,可以加热固体支持物或与其接触的流体介质,以减弱核酸与固体支持物之间的非共价结合相互作用(例如,核酸碱基对杂交)。

[0397] 如本文所阐述的方法可以包括形成多路复用阵列。多路复用阵列可以包含第一多个分析物和第二多个分析物,其中所述第一多个分析物在一个或多个方面(例如,样品类型、样品来源、分析物类型等)不同于第二多个分析物。在一些情况下,多路复用分析物阵列可以包含随机有序阵列,其包含:a)多个位点,其中每个位点包含固定地址,和b)第一多个分析物和第二多个分析物,其中所述多个位点的每个位点包含所述第一多个分析物或所述第二多个分析物中的一个且仅一个分析物,并且其中所述包含所述第一多个分析物中的一个分析物的位点的空间分布具有随机空间次序。在一些情况下,随机有序阵列可以通过以下步骤来形成:a)在如本文所阐述的固体支持物上沉积第一多个分析物,和b)在固体支持物上沉积第一多个分析物之后,在固体支持物上沉积第二多个分析物。在其他情况下,随机有序阵列可以通过以下步骤来形成:a)将第一多个分析物与第二多个分析物组合,和b)将组合的第一多个分析物和第二多个分析物沉积在如本文所阐述的固体支持物上。通过一个或多个特征,诸如不同的核酸纳米结构、不同的可检测标记、不同的功能性核酸或它们的组合,可以将第一多个分析物与第二多个分析物区分开。在其他情况下,多路复用阵列可以包含有序阵列,其包含:a)多个位点,其中每个位点包含固定地址,和b)第一多个分析物和第二多个分析物,其中所述多个位点的每个位点包含所述第一多个分析物或所述第二多个分析物中的一个且仅一个分析物,并且其中所述包含所述第一多个分析物中的一个分析物的位点的空间分布具有非随机空间次序。例如,可以制备具有第一连续多个位点和第二连续多个位点的阵列,其中所述第一连续多个位点中的每个位点与第一多个分析物中的一个分析物偶联,并且其中所述第二连续多个位点中的每个位点与第二多个分析物中的一个分析物偶联。在一些情况下,有序阵列可以通过以下步骤来形成:a)在如本文所阐述的固体支持物上沉积第一多个分析物,和b)在固体支持物上沉积第一多个分析物之后,在固体支持物上沉积第二多个分析物。例如,通过印刷方法,第一多个分析物可以沉积在阵列的第一连续区域上,并且第二多个分析物可以沉积在阵列的第二连续区域上。在其他情况下,有序阵列可以通过以下步骤来形成:a)将第一多个分析物与第二多个分析物组合,和b)将组合的第一多个分析物和第二多个分析物沉积在如本文所阐述的固体支持物上。例如,包含第一多个核酸纳米结构的第一多个分析物和包含第二多个核酸纳米结构的第二多个分析物可以同时沉积在包含第一多个位点和第二多个位点的阵列上,其中所述第一多个位点中的每个位点偶联第一多个核酸纳米结构中的核酸纳米结构,其中所述第二多个位点中的每个位点偶联第二多个核酸纳米结构中的核酸纳米结构,并且其中所述第一多个位点与所述第二多个位点在空间上分离。

[0398] 核酸复合物

[0399] 如本文所阐述,本文描述了包含两个或更多个核酸纳米结构的核酸纳米结构(例如,SNAP)复合物。核酸纳米结构复合物可以包含含有与第二核酸纳米结构偶联的第一核酸纳米结构的任何结构。核酸纳米结构复合物可以包含第一核酸纳米结构和第二核酸纳米结构,其中所述第一核酸纳米结构是展示核酸纳米结构或效用核酸纳米结构,并且其中所述第二核酸纳米结构独立地选自展示核酸纳米结构和效用核酸纳米结构。因此,核酸纳米结构复合物可以包含两个或更多个各自具有特定功能的核酸纳米结构。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以包含效用核酸纳米结构,其包含捕获核酸纳米结构、偶联核酸纳米结构、结构核酸纳米结构或它们的组合。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和一个或多个执行核酸纳米结构复合物功能的另外的核酸纳米结构,所述功能诸如:1)关于第二展示核酸纳米结构定位展示核酸纳米结构;2)关于非展示核酸纳米结构定位展示核酸纳米结构;3)改变与展示核酸纳米结构偶联的分析物的展示;4)增加核酸纳米结构复合物与表面的偶联强度;5)增加由核酸纳米结构复合物占据的表面的尺寸;6)向核酸纳米结构复合物添加另外的功能(例如,空间封闭、光学反射或吸收、磁偶联、条形码等);7)增加表面上展示的分析物的数量;或8)它们的组合。核酸纳米结构复合物可以包含一个或多个含有捕获面或捕获部分的核酸纳米结构,其中所述捕获面或捕获部分包含一个或多个表面相互作用部分,其被配置为与固体支持物的偶联表面形成偶联相互作用。

[0400] 核酸纳米结构复合物的第一核酸纳米结构(例如,SNAP)和第二核酸纳米结构可以通过一个或多个偶联部分偶联。包含第一偶联面的第一核酸纳米结构可以被配置为与包含第二偶联面的第二核酸纳米结构偶联,从而形成核酸纳米结构复合物。第一核酸纳米结构可以包含含有一个或多个官能团或部分的第一偶联部分,所述一个或多个官能团或部分被配置为通过与包含一个或多个互补官能团或部分的第二偶联部分反应而偶联至第二核酸纳米结构。通过任何合适的偶联相互作用(包括共价和非共价相互作用),可以在核酸纳米结构复合物中偶联两个或更多个核酸纳米结构。

[0401] 本文提供了一种包含两个或更多个核酸纳米结构的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物),其中所述两个或更多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构可以独立地选自展示核酸纳米结构、效用核酸纳米结构或它们的组合,其中所述展示核酸纳米结构可以包含可以被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述效用核酸纳米结构可以包含可以被配置为与表面偶联的捕获部分,并且其中所述两个或更多个核酸纳米结构可以被偶联以形成核酸纳米结构复合物。

[0402] 本文还提供了一种核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物),其包含含有表面的材料和两个或更多个核酸纳米结构,其中所述两个或更多个核酸纳米结构中的每个核酸纳米结构可以独立地选自展示核酸纳米结构、效用核酸纳米结构或它们的组合,其中所述展示核酸纳米结构可以包含可以被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述两个或更多个核酸纳米结构可以与表面偶联,并且其中所述两个或更多个核酸纳米结构中的第一核酸纳米结构可以与所述两个或更多个核酸纳米结构中的第二核酸纳米结构偶联,从而形成核酸纳米结构复合物。在特定的构型中,核酸纳米结构组合物是核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的阵列。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以附接至分析物或其他目标分子,从而提供目标分析物或分子的阵列。可以形成阵列的位点或地址的核酸纳米结构组合

物(例如,SNAP组合物)和核酸纳米结构复合物的进一步实例在以下段落中和在本文别处的各种阵列组合物的上下文中阐述。

[0403] 本文还提供了一种核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物),其包含分析物、展示核酸纳米结构和一个或多个效用核酸纳米结构,其中所述展示核酸纳米结构可以包含可以被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述效用核酸纳米结构可以包含可以与表面偶联或被配置为与表面偶联的捕获部分,其中所述展示核酸纳米结构可以与分析物偶联,并且其中所述展示核酸纳米结构可以与所述一个或多个核酸纳米结构偶联,从而形成核酸纳米结构复合物。

[0404] 本文还提供了一种核酸纳米结构组合物(例如,SNAP组合物),其包含含有表面的材料、分析物、展示核酸纳米结构和一个或多个效用核酸纳米结构,其中所述展示核酸纳米结构包含可以被配置为与分析物偶联的展示部分,其中所述捕获核酸纳米结构包含可以被配置为与表面偶联的捕获部分,其中所述展示核酸纳米结构可以与分析物偶联,其中所述展示核酸纳米结构可以与所述一个或多个核酸纳米结构偶联,从而形成核酸纳米结构复合物,并且其中所述核酸纳米结构复合物可以与表面偶联。

[0405] 如本文所阐述的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含展示核酸纳米结构和效用核酸纳米结构。效用核酸纳米结构可以包含选自捕获核酸纳米结构、偶联核酸纳米结构、结构核酸纳米结构或它们的组合的核酸纳米结构。核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和一个或多个捕获核酸纳米结构,所述捕获核酸纳米结构被配置为将核酸纳米结构复合物偶联至表面。核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和一个或多个偶联核酸纳米结构,所述偶联核酸纳米结构被配置为将核酸纳米结构复合物结合到第二核酸纳米结构或第二核酸纳米结构复合物。核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和一个或多个效用核酸纳米结构。

[0406] 如本文所阐述的核酸纳米结构(例如,SNAP复合物)可以包含与分析物偶联或被配置为与分析物偶联的展示核酸纳米结构。核酸纳米结构复合物可以包含被配置为与表面偶联的效用核酸纳米结构。在一些构型中,核酸纳米结构可以包含如通过本文所述的任何构型所述的核酸纳米结构,例如包含多官能团部分的SNAP。

[0407] 如本文所阐述的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含展示核酸纳米结构或包含可检测标记的效用核酸纳米结构。在一些构型中,展示核酸纳米结构或效用核酸纳米结构可以包含效用面,其中所述效用面包含捕获部分、可检测标记或空间封闭部分。多种可检测标记中的任何一种可以包含荧光标记、发光标记、核酸条形码、纳米颗粒标记、同位素或放射性标记。

[0408] 第一核酸纳米结构和第二核酸纳米结构可以通过一个或多个偶联部分偶联。在一些构型中,展示核酸纳米结构可以包含第一核酸纳米结构偶联部分,并且效用核酸纳米结构可以包含第二核酸纳米结构偶联部分,其中所述展示核酸纳米结构可以通过第一核酸纳米结构偶联部分与第二核酸纳米结构偶联部分的偶联而与捕获核酸纳米结构偶联。在一些构型中,第一核酸纳米结构偶联部分和第二核酸纳米结构偶联部分可以形成共价键,例如在点击型反应部分的互补对之间。在其他构型中,第一核酸纳米结构偶联部分和第二核酸纳米结构偶联部分可以形成非共价键,诸如氢键、核酸碱基对键或链霉亲和素-生物素键。

[0409] 如本文所阐述的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含特定量的两种

或更多种类型的核酸纳米结构。在一些构型中,核酸纳米结构复合物包含多个效用核酸纳米结构和单个展示核酸纳米结构。在一些情况下,核酸纳米结构复合物可以包含特定数量的一种类型的核酸纳米结构(例如,展示SNAP、效用SNAP)。核酸纳米结构复合物可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个或超过100个特定数量的一种类型的核酸纳米结构。可替代地或另外地,核酸纳米结构复合物可以包含不超过约100个、95个、90个、85个、80个、75个、70个、65个、60个、55个、50个、49个、48个、47个、46个、45个、44个、43个、42个、41个、40个、39个、38个、37个、36个、35个、34个、33个、32个、31个、30个、29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个特定数量的一种类型的核酸纳米结构。

[0410] 在一些情况下,核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含固定比率的第一类型的核酸纳米结构(例如,展示SNAP)和第二类型的SNAP(例如,效用SNAP)。核酸纳米结构复合物可以包含比率为至少约1:1、1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、46:1、47:1、48:1、49:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1或大于100:1的第一类型的核酸纳米结构和第二类型的核酸纳米结构。可替代地或另外地,核酸纳米结构复合物可以包含比率为至多约100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、49:1、48:1、47:1、46:1、45:1、44:1、43:1、42:1、41:1、40:1、39:1、38:1、37:1、36:1、35:1、34:1、33:1、32:1、31:1、30:1、29:1、28:1、27:1、26:1、25:1、24:1、23:1、22:1、21:1、20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2.5:1、2:1、1.75:1、1.5:1、1.25:1、1.1:1或小于1.1:1的第一类型的核酸纳米结构和第二类型的核酸纳米结构。

[0411] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含第一类型的核酸纳米结构(例如,展示SNAP)和第二类型的核酸纳米结构(例如,效用SNAP),其中所述第二类型的核酸纳米结构偶联至第一类型的核酸纳米结构的特定面(例如,偶联面)。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以包含第一类型的核酸纳米结构和与第一类型的核酸纳米结构的一个或多个面偶联的两个或更多个第二类型的核酸纳米结构。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和与展示核酸纳米结构的一个或多个面偶联的两个或更多个效用核酸纳米结构。在一些构型中,所述两个或更多个效用核酸纳米结构的第一效用核酸纳米结构可以偶联至展示核酸纳米结构的第一面,并且所述两个或更多个效用核酸纳米结构的第二效用核酸纳米结构可以偶联至展示核酸纳米结构的第二面。在一些构型中,第一效用核酸纳米结构的面与第二效用核酸纳米结构的面偶联。在一些构型中,第一效用核酸纳米结构不与第二效用核酸纳米结构偶联。在一些构型中,核酸纳米结构复合物还包含第三效用核酸纳米结构。在一些构型中,第三效用核酸纳米结构与展示核酸纳米结构的第三

面偶联。在一些构型中,第三效用核酸纳米结构与第一效用核酸纳米结构的面、第二效用核酸纳米结构的面或它们的组合偶联。

[0412] 如本文所阐述的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含两个或更多个具有不同尺寸或形状的核酸纳米结构,如基于最小、平均或最大量度所确定的,其中所述量度是例如长度、宽度、深度、周长、直径、有效表面积、占用面积、有效占据体积、结构形态的任何量度或它们的组合。核酸纳米结构复合物可以包含含有第一偶联面的第一核酸纳米结构(例如,展示SNAP或效用SNAP),所述第一偶联面与含有第二偶联面的第二核酸纳米结构(例如,展示SNAP或效用SNAP)偶联的,其中所述第一偶联面和所述第二偶联面具有不同的尺寸、维度或形态。在各种构型中,第一核酸纳米结构的偶联面的尺寸小于、大于或等于第二核酸纳米结构的偶联面的尺寸。核酸纳米结构复合物还可以包含第三核酸纳米结构(例如,展示SNAP、效用SNAP),其包含与第一核酸纳米结构偶联的第三偶联面。在一些构型中,第三核酸纳米结构的偶联面的尺寸小于、大于或等于第一核酸纳米结构的偶联面的尺寸。

[0413] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含含有第一偶联面的第一核酸纳米结构(例如,展示SNAP或效用SNAP)和含有第二偶联面的第二核酸纳米结构(例如,展示SNAP或效用SNAP),其中所述第一核酸纳米结构和/或所述第二核酸纳米结构包含展示部分和/或捕获部分。在一些构型中,第一偶联面和第二偶联面不包含捕获部分。在一些构型中,第一偶联面和第二偶联面不包含展示部分。在一些构型中,捕获部分可以包含多个表面相互作用部分。

[0414] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)中的核酸纳米结构可以包含被配置为将所述核酸纳米结构偶联至第二核酸纳米结构的一个或多个偶联面。核酸纳米结构复合物中的核酸纳米结构可以包含至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或超过20个偶联面。可替代地或另外地,SNAP复合物中的SNAP可以包含不超过约20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或少于2个偶联面。在一些构型中,核酸纳米结构复合物中的核酸纳米结构的每个偶联面可以与第二核酸纳米结构偶联。在一些构型中,核酸纳米结构复合物中的核酸纳米结构的至少一个偶联面与第二核酸纳米结构偶联。在一些构型中,核酸纳米结构复合物中的核酸纳米结构的至少一个偶联面不与第二核酸纳米结构偶联。

[0415] 如本文所阐述,含有两个或更多个核酸纳米结构的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以被配置为包含特定的对称性,诸如镜像对称或旋转对称。核酸纳米结构复合物的对称性可以关于核酸纳米结构复合物内的核酸纳米结构的平均尺寸、形状或构型来确定。例如,由于SNAP的螺旋结构和三级结构而导致的特征定位的变化可能导致被设计成具有对称结构的SNAP复合物的两个相对特征之间小的差异。对称的核酸纳米结构可以具有两个对称特征,它们相对于对称轴或对称平面位于预期位置的约10%以内。

[0416] 对称性可以促进核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)的一种或多种功能。对称性可以相对于参考平面来表征,所述参考平面是为了演示的目的而假想的构造。在一些方面,核酸纳米结构(例如,SNAP)可以被配置为相对于某些参考平面或旋转轴具有对称性,并且这种对称性可以任选地促进增加的柔性或分子运动。核酸纳米结构复合物可以进一步配置有一个或多个对齐平面。对齐平面可以包含一个或多个偶联面与之为对

齐的参考平面。对齐平面可以涵盖连续表面,其中第一核酸纳米结构相对于第二核酸纳米结构具有一定程度的弯曲、挠曲或变形。核酸纳米结构可以被设计成对称的,以允许组装成特定形状或构象的核酸纳米结构复合物。核酸纳米结构复合物可以具有特定的对称性,其有助于与表面上的位点偶联,所述位点被配置为与所述复合物偶联。

[0417] 如本文所阐述的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物通常或者相对于某些参考平面或旋转轴可以是不对称的。例如,SNAP或SNAP复合物可能在特定取向上不对称,或者可能没有对称平面或对称轴。不对称的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物可以提供比对称的核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物更刚性的优势,例如,由于不对称复合物中的单独核酸纳米结构的运动范围减小。核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物中的不对称性也可以促进核酸纳米结构或核酸纳米结构复合物的功能。例如,顶部和底部SNAP面的不对称结构可能有助于底面与表面和顶面与展示SNAP的差异偶联。

[0418] 图12A-12C示出了与对称性相关的SNAP和SNAP复合物构型的各个方面。图12A显示了由四个效用SNAP 1210偶联至中央展示SNAP 1220形成的SNAP复合物。通过将效用SNAP 1210上的偶联面偶联至展示SNAP 1220上的偶联面,每个效用SNAP 1210与展示SNAP 1220偶联。效用SNAP 1210和展示SNAP 1220两者的偶联面的有效表面积约为平均边长与平均SNAP厚度的乘积。通过将四个效用SNAP 1210偶联至展示SNAP 1220而形成的SNAP复合物具有由参考平面1230指示的两个对称平面。图12B显示了SNAP复合物的第一构型的横截面图。效用SNAP 1210以足够的刚性偶联至展示SNAP 1220,以在SNAP复合物中的SNAP的底面之间产生几乎共面的对齐。SNAP复合物在参考平面1230周围保持左右对称,但由于构型差别而缺乏上下对称。SNAP复合物还包含在效用SNAP 1210与展示SNAP 1220之间的偶联面处由参考平面1235指示的对齐平面。横截面侧面的箭头描绘了效用SNAP 1210相对于展示SNAP 1220的弯曲或挠曲的可能方向。效用SNAP 1210和展示SNAP 1220可以包含底部捕获面,所述底部捕获面包含被配置为促进SNAP复合物与表面偶联的多个单链核酸1240。效用SNAP 1210还可以包含顶部效用面,所述顶部效用面包含多个空间封闭基团1250,所述多个空间封闭基团被配置为防止除了与展示SNAP 1220偶联的分析物1260之外的其他分子粘附到SNAP复合物。图12C描绘了具有效用SNAP 1210的SNAP复合物的替代构型,所述效用SNAP以一定角度偶联至展示SNAP 1220使得所述效用SNAP 1210和展示SNAP 1220的捕获面不共面。在一些构型中,SNAP复合物中SNAP的偶联可以具有足够刚性,以最小化SNAP之间界面处的弯曲或变形。在其他情况下,SNAP复合物中SNAP的偶联可以具有足够柔性,以允许SNAP采用多种结构,诸如在图12B与图12C的结构之间的转换。

[0419] 图13A-13D显示了与核酸纳米结构复合物的形成相关的对称性和不对称性的另外方面。具体而言,图13A-13D中所示的构型包括具有效用SNAP的构型,所述效用SNAP与SNAP复合物中的其他效用SNAP偶联,从而降低了SNAP沿着SNAP复合物中的特定参考平面弯曲或变形的能力,所述参考平面包括例如定位于偶联的SNAP之间的参考平面。图13A描绘了具有不对称构型的基本上矩形的SNAP复合物。SNAP复合物包含含有展示部分1320的中心展示SNAP 1310。SNAP复合物还包含四个效用SNAP (1331、1332、1333、1334)。效用SNAP 1331、1332和1333各自经由偶联面与展示SNAP 1310的互补偶联面偶联。第四效用SNAP 1334不直接偶联至展示SNAP,而是偶联至第一效用SNAP 1331和第三效用SNAP 1333。由于复合物中每个SNAP的平均尺寸不同,效用SNAP 1331、1332和1333包含具有不同尺寸的偶联面。效用

SNAP 1334包含两个单独的偶联面,它们包含在侧面上与效用SNAP 1331和1333偶联的较大面,从而形成与所描绘的线1340正交的对齐平面。图13B描绘了具有不对称构型的基本上正方形的SNAP复合物。SNAP复合物包含含有展示部分1320的中心展示SNAP 1310。SNAP复合物还包含八个效用SNAP,包括3个小的效用SNAP 1351、2个中等效用SNAP 1352和3个大的效用SNAP 1353。效用SNAP的螺旋排列以及随着螺旋距离从展示SNAP 1310增加而效用SNAP的尺寸增加。该构型中的每个效用SNAP通过SNAP不同侧面上的至少2个偶联面与至少3个其他效用SNAP偶联。图13B的构型在跨越SNAP复合物全长的SNAP之间缺乏任何偶联面。这种构型有利地保持了SNAP的共面性(相对于图13B中所示取向的页面平面),因为SNAP复合物不包含不间断的对齐平面,两个相邻的SNAP会沿着该对齐平面相对于彼此弯曲或挠曲,从而偏离共面性。由于SNAP复合物中复杂的偶联模式,在复合物内SNAP的任何弯曲或挠曲都将受到抵抗。

[0420] 图13C-13D描绘了关于跟中央展示SNAP 1310的展示部分1320正交定向的轴具有旋转对称性的SNAP构型。图13C示出了基本上正方形的SNAP复合物,其包含展示SNAP 1310和8个效用SNAP(包括与展示SNAP 1310的偶联面偶联的4个效用SNAP 1360以及仅与展示偶联的效用SNAP 1360偶联的4个效用SNAP 1365)。图13D显示了包含中央展示SNAP 1310和4个三角形效用SNAP 1370的基本正方形的SNAP复合物。展示SNAP与4个效用SNAP 1370中的每一个偶联,并且除了展示SNAP 1310之外,每个效用SNAP 1370还偶联至两个其他效用SNAP 1370。图13C-13D中所描绘的构型具有旋转对称性,使得围绕展示部分旋转 90° 产生相同的构型。然而,所述构型在SNAP之间缺乏任何不间断的对齐平面,从而增加SNAP复合物结构对弯曲或变形的抗性(相对于图13C-13D中所示的取向的页面平面)。这种刚性可以用于增加包含多个偶联的核酸纳米结构复合物的较大阵列的稳定性。保持核酸纳米结构捕获面的平面性对于促进核酸纳米结构复合物经由捕获面附接至平面表面以及对于将核酸纳米结构复合物保持在焦平面中进行后续光学检测可能是特别有利的。当与包含核酸纳米结构复合物捕获面的互补形态的表面接触时,基本刚性的结构也可以具有增加的结合特异性和强度。图14A-14B描绘了三维的SNAP复合物结构,以展示对称性的另一个实例。图14A描绘了包含与包含顶部偶联面和底部偶联面的四个矩形效用SNAP 1410偶联的中央展示SNAP 1420的SNAP复合物。所述SNAP包含穿过展示SNAP 1420的中心的旋转对称轴,但是矩形SNAP的重叠可以抵抗SNAP复合物的弯曲或变形。图14B描绘了包含四个展示SNAP 1430的类似SNAP复合物,其具有旋转对称轴和在每个展示SNAP 1430上重叠的顶部偶联面和底部偶联面。

[0421] 如本文所阐述的核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含至少一个对称轴或一个对称平面。核酸纳米结构复合物还可以包含至少一个不间断的对齐平面。例如,不间断平面可以位于相邻的SNAP之间,并且不间断平面可以跨越SNAP复合物的长度。在一些构型中,对称轴可以包含旋转对称轴或反射轴或对称平面。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以包含旋转对称轴和反射轴或对称平面。在其他构型中,核酸纳米结构复合物可以不包含对称轴或对称平面。在一些构型中,核酸纳米结构复合物可以不包含不间断的对齐平面。同样,不间断平面可以位于相邻的核酸纳米结构之间,并且不间断平面可以跨越核酸纳米结构复合物的长度。

[0422] 可以控制核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)中第一核酸纳米结构相对于第

二核酸纳米结构的取向。在一些构型中,第一核酸纳米结构可以相对于核酸纳米结构复合物中的第二核酸纳米结构定向,使得第一核酸纳米结构的面(例如,捕获面、展示面、效用面)与第二核酸纳米结构的面(例如,捕获面、展示面、效用面)基本上平行或共面。在其他构型中,第一核酸纳米结构可以相对于核酸纳米结构复合物中的第二核酸纳米结构定向,使得第一核酸纳米结构的面与第二核酸纳米结构的面不平行或不共面。在两个核酸纳米结构之间的取向可以部分地通过将偶联部分定位在包含核酸纳米结构的一个或多个三级结构的特定核苷酸上的能力来控制。图15A-15B描绘了利用基于DNA的SNAP的螺旋结构的取向控制。图15A示出了被配置为与2个第二SNAP 1520偶联的第一SNAP 1510的横截面图。第一SNAP 1510包含多个螺旋三级结构,所述螺旋三级结构包含第一偶联基团1530和第二偶联基团1535。第一偶联基团1530在螺旋上的相对放置使第一偶联基团1530几乎与第一偶联面1540正交定向。第二偶联基团1535在螺旋上的相对放置使第二偶联基团1535相对于第二偶联面1540以非正交角度定向。第二SNAP 1520包含多个螺旋三级结构,所述螺旋三级结构包含互补偶联基团1550。图15B示出了通过将2个第二SNAP 1520与第一SNAP 1510偶联而形成的SNAP复合物的构象。由于第一偶联基团1530和第二偶联基团1535的相对取向,一个第二SNAP 1520的底面1560与第一SNAP的底面1562共面,而另一个第二SNAP 1520的底面1565与底面1560或1562不共面。

[0423] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含基于在表面上的二维投影的特定形状,诸如正方形、矩形、三角形、圆形、十字形、多边形或不规则形状。核酸纳米结构复合物可以依据三维结构来描述。核酸纳米结构复合物可以包含含有第一构象(例如,基本正方形的面)的第一核酸纳米结构和含有第二构象(例如,基本三角形的面、基本矩形的面等)的第二核酸纳米结构。核酸纳米结构复合物可以包含第一核酸纳米结构和第二核酸纳米结构,其中两个核酸纳米结构包含基本相似的构象(例如,基本正方形的面、基本三角形的面、基本矩形的面等)。核酸纳米结构复合物可以包含一种或多种核酸纳米结构构象。核酸纳米结构复合物可以包含至少约1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或超过10种核酸纳米结构构象。可替代地或另外地,核酸纳米结构复合物可以包含不超过约10种、9种、8种、7种、6种、5种、4种、3种、2或少于2种核酸纳米结构构象。

[0424] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以与一种或多种分析物偶联,或者被配置为与一种或多种分析物偶联。核酸纳米结构复合物可以包含与一种或多种分析物偶联或者被配置为与一种或多种分析物偶联的一个或多个展示部分。核酸纳米结构复合物可以包含与一种或多种分析物偶联或者被配置为与一种或多种分析物偶联的一个或多个展示核酸纳米结构。核酸纳米结构复合物可以偶联的分析物分子的数量比核酸纳米结构复合物中展示部分的数量少。例如,核酸纳米结构复合物可以仅与单分析物偶联,或者可以不与分析物偶联。在一些构型中,展示部分可以与两个或更多个分析物偶联。在一些构型中,两个或更多个展示部分可以与分析物偶联。

[0425] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以被配置为在表面上占据特定量的表面积。由核酸纳米结构复合物占据的表面积可以测量为由核酸纳米结构复合物在表面上的二维投影所产生的有效表面积或占用面积。在一些构型中,有效表面积或占用面积还可以包括由于核酸纳米结构复合物引起的效应(诸如空间排除或排斥)而被排除与其他分子(核酸纳米结构或非核酸分子)缔合的表面或界面的表面积。核酸纳米结构复合物可以具有至

少约 25nm^2 、 100nm^2 、 500nm^2 、 1000nm^2 、 2000nm^2 、 3000nm^2 、 4000nm^2 、 5000nm^2 、 5500nm^2 、 6000nm^2 、 6500nm^2 、 7000nm^2 、 7500nm^2 、 8000nm^2 、 8500nm^2 、 9000nm^2 、 10000nm^2 、 15000nm^2 、 20000nm^2 、 25000nm^2 、 50000nm^2 、 100000nm^2 、 250000nm^2 、 500000nm^2 或超过 1000000nm^2 的有效表面积或占用面积。可替代地或另外地,核酸纳米结构复合物可以具有不超过约 1000000nm^2 、 500000nm^2 、 250000nm^2 、 100000nm^2 、 50000nm^2 、 25000nm^2 、 20000nm^2 、 15000nm^2 、 10000nm^2 、 9000nm^2 、 8500nm^2 、 8000nm^2 、 7500nm^2 、 7000nm^2 、 6500nm^2 、 6000nm^2 、 5500nm^2 、 5000nm^2 、 4000nm^2 、 3000nm^2 、 2000nm^2 、 1000nm^2 、 500nm^2 、 100nm^2 、 25nm^2 或小于 25nm^2 的有效表面积或占用面积。

[0426] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含改善分析物展示的三维结构。通过增加分析物的检测和观察的可能性、增加分析物与探针或试剂的接触和/或减少分析物与其他分子之间的负面相互作用,可以改善分析物展示。图16A-16B描绘了各种三维核酸纳米结构复合物的横截面图。图16A描绘了在中心分析物周围形成孔状结构的三维SNAP复合物。孔状结构对于基于亲和力的测定可能是有利的,其中在分析物周围可用体积的减少可能降低亲和试剂从分析物移开的能力。此外,周围的效用SNAP可以包含光学材料,所述光学材料增加光收集或减少背景信号,从而改善光学检测方法的效率。图16B描绘了三维SNAP复合物,其形成将分析物提升到SNAP复合物所缔合的表面上方的杆。升高的分析物可能不太可能具有不需要的相互作用,例如与可能非特异性结合到核酸纳米结构复合物的分子的相互作用。升高的分析物也可能更容易接近受体,否则所述受体将经历与核酸纳米结构所附接的表面发生空间位阻、电荷排斥或其他抑制性相互作用。

[0427] 本文提供了一种形成核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)的方法,所述方法包括提供展示核酸纳米结构和一个或多个捕获核酸纳米结构或效用核酸纳米结构,其中所述展示核酸纳米结构包含一个或多个偶联部分,并且其中所述捕获核酸纳米结构或效用核酸纳米结构包含一个或多个互补偶联部分,其中所述一个或多个互补偶联部分被配置为与所述一个或多个偶联部分偶联,并且通过将所述一个或多个偶联部分与所述一个或多个互补偶联部分偶联而将展示核酸纳米结构偶联至所述一个或多个捕获核酸纳米结构或效用核酸纳米结构,从而形成核酸纳米结构复合物,其中所述核酸纳米结构复合物包含被配置为与分析物偶联的展示部分,并且其中所述核酸纳米结构复合物包含被配置为与表面缔合的捕获部分。核酸纳米结构复合物可以包含展示核酸纳米结构和/或效用核酸纳米结构,所述效用核酸纳米结构包含含有多个表面相互作用部分的捕获部分。

[0428] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)形成方法可以包括通过形成共价键将一个或多个偶联部分与一个或多个互补偶联部分偶联。在一些构型中,通过进行点击型反应形成共价键。然而,可以使用其他偶联反应和部分,诸如本文别处所阐述的那些。例如,核酸纳米结构复合物形成方法可以包括通过形成非共价键将一个或多个偶联部分与一个或多个互补偶联部分偶联。在一些构型中,形成非共价键包括形成核酸碱基对杂交。在一些构型中,所述一个或多个互补偶联部分包含一个或多个寡核苷酸,其具有与所述组的一个或多个寡核苷酸互补的序列。在一些构型中,形成非共价键包括形成受体-配体复合物,诸如链霉亲和素-生物素复合物。

[0429] 可以在特定的形成条件下形成核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)。可以在流体介质中形成核酸纳米结构复合物。条件可以包括特定的溶剂、极性、离子强度或pH缓冲条件。在一些构型中,可以在包含镁盐的溶液提供展示核酸纳米结构或效用核酸纳米结

构。在一些构型中,展示核酸纳米结构与一个或多个效用核酸纳米结构的偶联可以在表面活性剂的存在下发生。核酸纳米结构复合物可以与展示核酸纳米结构一起形成。展示核酸纳米结构可以在形成核酸纳米结构复合物之前或之后与分析物偶联。在一些构型中,分析物可以与展示部分共价偶联。

[0430] 可以在特定的温度分布下形成核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)。例如,可以将第一核酸纳米结构在第一温度下与第二核酸纳米结构组合,然后可以改变(例如,降低、升高)温度,从而将第一核酸纳米结构与第二核酸纳米结构偶联以形成核酸纳米结构复合物。核酸纳米结构复合物形成过程中的步骤可以在以下温度发生:至少约0°C、5°C、10°C、15°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C或超过95°C。可替代地或另外地,核酸纳米结构复合物形成过程中的步骤可以在以下温度发生:不超过约95°C、94°C、93°C、92°C、91°C、90°C、89°C、88°C、87°C、86°C、85°C、84°C、83°C、82°C、81°C、80°C、79°C、78°C、77°C、76°C、75°C、74°C、73°C、72°C、71°C、70°C、69°C、68°C、67°C、66°C、65°C、64°C、63°C、62°C、61°C、60°C、59°C、58°C、57°C、56°C、55°C、54°C、53°C、52°C、51°C、50°C、49°C、48°C、47°C、46°C、45°C、44°C、43°C、42°C、41°C、40°C、39°C、38°C、37°C、36°C、35°C、34°C、33°C、32°C、31°C、30°C、29°C、28°C、27°C、26°C、25°C、24°C、23°C、22°C、21°C、20°C、15°C、10°C、5°C、0°C、0°C或低于0°C。

[0431] 核酸纳米结构复合物(例如,SNAP复合物)可以包含完全结构化的部分和/或部分结构化的部分。核酸纳米结构复合物的完全结构化部分可以定义为在使用过程期间保持一级结构、二级结构和三级结构中的每一者的核酸纳米结构复合物区域。核酸纳米结构复合物的部分结构化部分可以定义为包含一级结构但在在使用过程期间不保持特定二级结构和/或三级结构的核酸纳米结构复合物区域。有用的部分结构化部分的实例是核酸纳米结构的可透过结构或区域。在一些构型中,核酸纳米结构复合物的部分结构化部分可以包含单链核酸。单链核酸可以位于双链核酸区域之间,或者可以包含核酸的悬垂结构或末端链。单链核酸可以包含本文针对悬垂核酸或悬垂部分所例示的序列、组成或长度。在一些构型中,核酸纳米结构复合物的部分结构化部分可以包含无定形结构,诸如球状结构(例如,纳米球、树枝状聚合物等)。图37B描绘了SNAP复合物,其包含与两个DNA纳米球SNAP 3735和分析物3720偶联的DNA折纸SNAP 3710。DNA纳米球3735由于其单链、球状和/或无定形结构可以被认为是部分结构化的。SNAP复合物的部分结构化区域可以为SNAP 3710提供一种或多种功能,例如,增加与目标结合表面的结合强度、降低与非目标表面的结合强度以及防止其他分子与SNAP面或偶联的分析物的非特异性结合。

[0432] 核酸组合物

[0433] 如本文所阐述,核酸(诸如核酸纳米结构、SNAP、核酸纳米结构复合物和/或其组分(例如,支架、订书钉、多官能团部分等))可以在合适的溶剂或缓冲液中储存、制备或使用。溶剂或缓冲液可以为促进核酸的稳定性提供有利的条件。溶剂或缓冲液可以促进过程,诸如将核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)与表面接触或将核酸(例如,核酸

纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)与分析物接触。在一些构型中,合适的DNA缓冲液可以包含镁盐和/或EDTA。可以将核酸置于溶剂或缓冲液中,所述溶剂或缓冲液被配置为促进所需的相互作用(例如,核酸与阵列位点的结合等)。可以将核酸置于溶剂或缓冲液中,所述溶剂或缓冲液被配置为抑制不需要的相互作用(例如,第一核酸与第二核酸的聚集等)。核酸的相互作用(例如,结合到固体支持物、保留在溶液中等等)可以通过如本文所阐述的化学物质的存在来促进。例如,核酸与固体支持物表面的结合可以由阳离子物质介导。在另一个实例中,可以在核酸组合物中包含表面活性剂物质,以防止不需要的核酸聚集,例如由于第一核酸粘附到与第二核酸偶联的分析物上。如本文所阐述的方法可以利用如本文所阐述的包含一种或多种化学物质的流体介质。如本文所阐述的方法可以包括例如通过从流体介质中引入或去除一种或多种化学物质改变如本文所阐述的流体介质的步骤。如本文所阐述的方法可以包括将如本文所阐述的第一流体介质更换为第二流体介质的步骤。

[0434] 与核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)接触的溶剂或缓冲液可以包含多种组分中的任何一种,诸如溶剂物质、pH缓冲物质、阳离子物质、阴离子物质、表面活性剂物质、变性物质或其组合。溶剂物质可以包括水、乙酸、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、甲酸、氨、碳酸丙烯酯、硝基甲烷、二甲亚砜、乙腈、二甲基甲酰胺、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、二甲醚、乙醚、1-4-二氧六环、甲苯、苯、环己烷、己烷、环戊烷、戊烷或其组合。溶剂或溶液可以包含缓冲物质,包括但不限于MES、Tris、Bis-tris、Bis-tris丙烷、ADA、ACES、PIPES、MOPSO、MOPS、BES、TES、HEPES、HEPBS、HEPPSO、DIPSO、MOBS、TAPSO、TAPS、TABS、POPSO、TEA、EPPS、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、Gly-Gly、N,N-二(羟乙基)甘氨酸(Bicine)、AMPD、AMPSO、AMP、CHES、CAPSO、CAPS和CABS。溶剂或溶液可以包含阳离子物质,诸如 Na^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Cu^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ge^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{3+} 、 Ni^{3+} 、 Ti^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Si^{4+} 、 V^{4+} 、 Ti^{4+} 、 Mn^{4+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 V^{5+} 、 Mn^{5+} 、 Mn^{6+} 、 Se^{6+} 及其组合。溶剂或溶液可以包含阴离子物质,诸如 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 ClO_3^- 、 H_2PO_4^- 、 HCO_3^- 、 HSO_4^- 、 OH^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 MnO_4^- 、 SCN^- 、 CO_3^{2-} 、 CrO_4^{2-} 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 、 HPO_4^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 SO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 及其组合。溶剂或溶液可以包含表面活性剂物质,包括但不限于硬脂酸、月桂酸、油酸、十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、十二烷基胺盐酸盐、十六烷基三甲基溴化铵、聚环氧乙烷、壬基苯基乙氧基化物、Triton X、五丙二醇单十二烷基醚、八丙二醇单十二烷基醚、五乙二醇单十二烷基醚、八乙二醇单十二烷基醚、月桂酰胺一乙胺、月桂酰胺二乙胺、辛基葡萄糖苷、癸基葡萄糖苷、月桂基葡萄糖苷、Tween 20、Tween 80、正十二烷基- β -D-麦芽糖苷、壬基醇醚9、单月桂酸甘油酯、乙氧化(牛脂烷基)胺、泊洛沙姆、洋地黄皂苷、zonyl FS0、2,5-二甲基-3-己炔-2,5-二醇、Igepal CA630、Aerosol-0T、盐酸三乙胺、西曲溴铵、苜蓿素氯铵、奥替尼啶二盐酸盐、西吡氯铵、甲基三烷基氯化铵(adogen)、二甲基双十八烷基氯化铵、CHAPS、CHAPSO、椰油酰胺丙基甜菜碱、氨基磺基甜菜碱-16、月桂基-N,N-(二甲基铵)丁酸酯、月桂基-N,N-(二甲基)-甘氨酸甜菜碱、十六烷基磷酸胆碱、月桂基二甲基胺N-氧化物、月桂基-N,N-(二甲基)-丙烷磺酸盐、3-(1-吡啶基)-1-丙烷磺酸内盐、3-(4-叔丁基-1-吡啶基)-1-丙烷磺酸内盐及其组合。溶剂或溶液可以包含变性物质,包括但不限于乙酸、三氯乙酸、磺基水杨酸、碳酸氢钠、乙醇、乙二胺四乙酸(EDTA)、尿素、氯化胍鎓、高氯酸锂、十二烷基硫酸钠、2-巯基乙醇、二硫苏糖醇以及三(2-羧乙基)膦(TCEP)。

[0435] pH缓冲物质、阳离子物质、阴离子物质、表面活性剂物质或变性物质可以以至少约

0.0001M、0.001M、0.01M、0.02M、0.03M、0.04M、0.05M、0.06M、0.07M、0.08M、0.09M、0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M、1.1M、1.2M、1.3M、1.4M、1.5M、1.6M、1.7M、1.8M、1.9M、2M、2.1M、2.2M、2.3M、2.4M、2.5M、2.6M、2.7M、2.8M、2.9M、3M、3.1M、3.2M、3.3M、3.4M、3.5M、3.6M、3.7M、3.8M、3.9M、4M、4.1M、4.2M、4.3M、4.4M、4.5M、4.6M、4.7M、4.8M、4.9M、5M、5.1M、5.2M、5.3M、5.4M、5.5M、5.6M、5.7M、5.8M、5.9M、6M、7M、8M、9M或超过10M的浓度存在于溶剂组合物中。可替代地或另外地，pH缓冲物质、阳离子物质、阴离子物质、表面活性剂物质或变性物质可以以不超过约10M、9M、8M、7M、6M、5.9M、5.8M、5.7M、5.6M、5.5M、5.4M、5.3M、5.2M、5.1M、5.0M、4.9M、4.8M、4.7M、4.6M、4.5M、4.4M、4.3M、4.2M、4.1M、4.0M、3.9M、3.8M、3.7M、3.6M、3.5M、3.4M、3.3M、3.2M、3.1M、3.0M、2.9M、2.8M、2.7M、2.6M、2.5M、2.4M、2.3M、2.2M、2.1M、2.0M、1.9M、1.8M、1.7M、1.6M、1.5M、1.4M、1.3M、1.2M、1.1M、1.0M、0.9M、0.8M、0.7M、0.6M、0.5M、0.4M、0.3M、0.2M、0.1M、0.09M、0.08M、0.07M、0.06M、0.05M、0.04M、0.03M、0.02M、0.01M、0.001M、0.001M或小于约0.001M的浓度存在于溶剂或溶液中。

[0436] pH缓冲物质、阳离子物质、阴离子物质、表面活性剂物质或变性物质可以以至少约0.0001重量百分比(重量%)、0.001重量%、0.002重量%、0.003重量%、0.004重量%、0.005重量%、0.006重量%、0.007重量%、0.008重量%、0.009重量%、0.01重量%、0.02重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.07重量%、0.08重量%、0.09重量%、0.1重量%、0.2重量%、0.3重量%、0.4重量%、0.5重量%、0.6重量%、0.7重量%、0.8重量%、0.9重量%、1.0重量%、1.1重量%、1.2重量%、1.3重量%、1.4重量%、1.5重量%、1.6重量%、1.7重量%、1.8重量%、1.9重量%、2重量%、2.1重量%、2.2重量%、2.3重量%、2.4重量%、2.5重量%、2.6重量%、2.7重量%、2.8重量%、2.9重量%、3重量%、3.1重量%、3.2重量%、3.3重量%、3.4重量%、3.5重量%、3.6重量%、3.7重量%、3.8重量%、3.9重量%、4重量%、4.1重量%、4.2重量%、4.3重量%、4.4重量%、4.5重量%、4.6重量%、4.7重量%、4.8重量%、4.9重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%或超过10重量%的重量百分比存在于溶剂组合物中。可替代地或另外地，pH缓冲物质、阳离子物质、阴离子物质、表面活性剂物质或变性物质可以以不超过约10重量%、9重量%、8重量%、7重量%、6重量%、5重量%、4.9重量%、4.8重量%、4.7重量%、4.6重量%、4.5重量%、4.4重量%、4.3重量%、4.2重量%、4.1重量%、4.0重量%、3.9重量%、3.8重量%、3.7重量%、3.6重量%、3.5重量%、3.4重量%、3.3重量%、3.2重量%、3.1重量%、3.0重量%、2.9重量%、2.8重量%、2.7重量%、2.6重量%、2.5重量%、2.4重量%、2.3重量%、2.2重量%、2.1重量%、2.0重量%、1.9重量%、1.8重量%、1.7重量%、1.6重量%、1.5重量%、1.4重量%、1.3重量%、1.2重量%、1.1重量%、1.0重量%、0.9重量%、0.8重量%、0.7重量%、0.6重量%、0.5重量%、0.4重量%、0.3重量%、0.2重量%、0.1重量%、0.09重量%、0.08重量%、0.07重量%、0.06重量%、0.05重量%、0.04重量%、0.03重量%、0.02重量%、0.01重量%、0.009重量%、0.008重量%、0.007重量%、0.006重量%、0.005重量%、0.004重量%、0.003重量%、0.002重量%、0.001重量%、0.0001重量%或小于0.0001重量%的重量百分比存在于溶剂或溶液中。

[0437] 可以将具有核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)或本文所阐述的其他组成的溶剂或溶液配制成具有某个值或在某个值范围内的pH。溶剂或溶液可以具有至

少约0.0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12.0、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6、12.7、12.8、12.9、13.0、13.1、13.2、13.3、13.4、13.5、13.6、13.7、13.8、13.9、14.0或超过约14.0的pH。可替代地或另外地,溶剂或溶液可以具有不超过约14.0、13.9、13.8、13.7、13.6、13.5、13.4、13.3、13.2、13.1、13.0、12.9、12.8、12.7、12.6、12.5、12.4、12.3、12.2、12.1、12.0、11.9、11.8、11.7、11.6、11.5、11.4、11.3、11.2、11.1、11.0、10.9、10.8、10.7、10.6、10.5、10.4、10.3、10.2、10.1、10.0、9.9、9.8、9.7、9.6、9.5、9.4、9.3、9.2、9.1、9.0、8.9、8.8、8.7、8.6、8.5、8.4、8.3、8.2、8.1、8.0、7.9、7.8、7.7、7.6、7.5、7.4、7.3、7.2、7.1、7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0或小于约0的pH。

[0438] 可以在特定的温度或温度范围下形成或修饰如本文所阐述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。形成或修饰核酸的温度可能取决于所用的组分。例如,向SNAP结构中添加寡核苷酸可能受到某些寡核苷酸的解链温度的限制。在另一个实例中,可以在良性温度(诸如室温)下添加通过点击反应缀合的SNAP组分。在一些构型中,可以在需要多次温度变化(例如,解链温度,随后是核酸退火温度,随后是缀合反应温度)的单步骤反应(即,组合所有必要的组分)中形成核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。在其他构型中,可以在多个步骤中形成核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分),每个步骤具有独特的温度分布。核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)形成过程可以在以下温度发生:至少约-100°C、-90°C、-80°C、-70°C、-60°C、-50°C、-40°C、-30°C、-20°C、-10°C、-5°C、0°C、4°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、90°C或超过90°C。可替代地或另外地,核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)形成过程可以在以下温度发生:不超过约90°C、80°C、75°C、70°C、65°C、60°C、55°C、50°C、45°C、40°C、35°C、30°C、25°C、20°C、15°C、10°C、4°C、0°C、-10°C、-20°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C、100°C或低于-100°C。

[0439] 可以在合适的存储介质(例如,存储缓冲液)中储存如本文所阐述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。可以在保持存储介质处于液态的温度下储存核酸。可以在导致存储介质冷冻成固态的温度下储存核酸。可以在已经将分析物(例如,多肽)与核酸偶联之前或之后储存核酸。可以在上文所阐述的用于形成核酸纳米结构的一个或多个范围内的温度下储存核酸。

[0440] 如本文所阐述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)可以在存储期间保持稳定。稳定性可以通过相对于存储前基线的存储后核酸活性(诸如偶联分析物(例

如,多肽)的能力、与另一个核酸偶联的能力或与表面或界面缔合的能力)来表示。通过表面活性剂或去污剂物质的存在,可以稳定核酸对抗聚集或沉淀。通过抗氧化剂或自由基清除剂的存在,可以稳定核酸对抗降解(诸如氧化)。在储存至少约1小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、9个月、1年、2年、3年、4年、5年、10年或超过10年的时间段时,SNAP可以是稳定的。可替代地或另外地,当储存不超过约10年、5年、4年、3年、2年、1年、9个月、6个月、5个月、4个月、3个月、2个月、1个月、4周、3周、2周、1周、3天、2天、1天、12小时、6小时、1小时或少于1小时时,核酸可以是稳定的。

[0441] 如本文所阐述的核酸可以作为试剂盒的组分提供。试剂盒可以包括如本文所阐述的核酸,其被配置为与目标分析物偶联。试剂盒可以提供如本文所阐述的核酸或其多个。收集试剂盒可以专用于对样品进行的特定测定。例如,用于多肽测定的收集试剂盒可以包括多肽特异性试剂,以保护和/或保存样品内的多肽。收集试剂盒可以包括一个或多个样品容器、一种或多种试剂、样品收集试剂盒和任选地中间样品容器的使用说明书、容器的密封剂、容器的标签(诸如条形码或射频识别装置(RFID))或用于运输和/或储存样品容器的包装。试剂盒可以包括用于各种目的中的任一种的一种或多种试剂,所述各种目的包括样品保存、样品稳定性、样品质量控制、加工和/或纯化以及样品存储。试剂盒可以包括试剂,诸如缓冲液、酸、碱、溶剂、变性剂、表面活性剂、去污剂、反应物、标记(例如,荧光团、放射性标记)、指示剂染料、酶、酶抑制剂、氧清除剂、水清除剂、湿润剂、亲和试剂(例如,抗体)或其他捕获剂(例如,生物素化颗粒)。试剂盒可以包括一种或多种呈液体或固体形式的试剂。试剂盒可以包括在样品制备之前或之后添加到样品容器中的一种或多种单独的试剂和/或内标。试剂盒可以包括在样品收集容器内提供的一种或多种试剂和/或内标。例如,试剂和/或内标可以以结晶或涂覆的形式在收集容器的表面上提供,或者可以在收集容器内的液体溶液中。在一些构型中,试剂盒还可以包括如本文所阐述的阵列或固体支持物。可以在试剂盒中提供阵列或固体支持物,其中一种或多种核酸存在于阵列或固体支持物中或沉积于其上。

[0442] 可以根据所提供的一套说明书来使用用于测定或其他方法的试剂盒。说明书可以根据本文所阐述的教导指导核酸的使用。试剂盒可以提供例如通过本文所阐述的方法将目标分析物与核酸偶联的说明书。试剂盒可以提供将如本文所阐述的核酸或与目标分析物偶联的核酸沉积到如本文所阐述的阵列或固体支持物上的说明书。技术人员或自身收集受试者可以使用试剂盒。使用试剂盒的技术人员可以在正确使用试剂盒方面接受专门培训。在样品制备完成之前,试剂盒方案可以采用一个或多个中间步骤。样品制备期间的中间步骤可以在容器中或在单独的培养基(与试剂盒一起提供或由收集者提供)中进行。例如,血液样品可以由抽血者分级分离,仅保存红细胞或血浆级分用于制备。试剂盒可以包括指示剂染料、石蕊试纸或其他确认成功样品收集和/或制备的方法。试剂盒可以包括密封剂(例如,粘合剂或粘着剂)以确保样品在存储或运输期间没有被篡改或损坏。试剂盒可以包括标签,用于收集者或分析设备进行样品追踪。容器的标签可以包括序列号、RFID、条形码或QR码。容器的标签可以预先印刷或预先施加到容器上,或者可以由收集者放置。

[0443] 核酸制造方法

[0444] 可以通过合适的方法制造如本公开所描述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。核酸的制造可以包括以下的一个或多个步骤:1)提供支架核酸链,其被

配置为偶联多个寡核苷酸;2) 提供多个寡核苷酸,其被配置为与支架链偶联;3) 提供一个或多个另外的寡核苷酸,其被配置为与支架核酸链或其他寡核苷酸偶联;4) 提供一个或多个寡核苷酸,其被配置为与支架核酸链偶联并且被进一步配置为与分析物偶联;5) 提供一个或多个寡核苷酸,其被配置为与支架核酸链偶联并且与分析物偶联;6) 提供一个或多个寡核苷酸,其被配置为与支架核酸链偶联,并且被进一步配置为与表面偶联;7) 将支架核酸链与多个寡核苷酸退火以形成SNAP;8) 将支架链与寡核苷酸退火,所述寡核苷酸被配置为与分析物偶联;9) 将支架链与寡核苷酸退火,所述寡核苷酸与分析物偶联;10) 将支架链与寡核苷酸退火,所述寡核苷酸被配置为与表面偶联;和11) 在核酸的两个或更多个寡核苷酸之间形成一个或多个偶联或交联。

[0445] 包含核酸保持组分(例如,DNA折纸、DNA纳米球)的可检测探针的制造可以通过常规技术形成。可以通过诸如滚环扩增等方法来制造DNA纳米球以产生支架链,所述支架链可以被进一步修饰以偶联或缀合多个结合组分和/或可检测标记。用于制造核酸纳米球的示例性方法描述于例如美国专利号8,445,194中,所述专利以引用的方式并入本文。包含双链DNA(例如,DNA折纸)区段的核酸保持组分可以例如使用以下文献中所描述的技术来制造:Rothemund,Nature440:297-302(2006)和美国专利号8,501,923和9,340,416,每一篇文献都以引用的方式并入本文。保持组分可以由与另外的寡核苷酸杂交的支架链形成。

[0446] 图36A显示了形成包含与多个分析物和多个可检测标记偶联的DNA折纸的SNAP的第一途径。在组装保持组分之前,制备具有偶联或缀合的分析物3620的寡核苷酸和具有缀合的可检测标记3630的寡核苷酸。具有缀合的结合组分3620的寡核苷酸和具有偶联或缀合的可检测标记3630的寡核苷酸与单链支架3610(例如,M13噬菌体DNA、单链质粒DNA)和另外的结构核酸3640接触。核酸在合适的DNA缓冲液中在升高的温度下(例如,至少约50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C或约95°C)接触,然后冷却。寡核苷酸将在适当的序列依赖性位置与支架链3610杂交,以形成SNAP-分析物缀合物3650。可以通过使用更少或更多数量的与分析物偶联或被配置为与分析物偶联的寡核苷酸或通过改变支架链的序列来控制与SNAP偶联的分析物的数量。

[0447] 图36B显示了形成具有多个偶联的分析物和多个可检测标记的SNAP的替代途径。在组装保持组分之前,制备具有被配置为偶联或缀合分析物3625的柄的寡核苷酸和具有被配置为偶联或缀合可检测标记3635的部分的寡核苷酸。具有被配置为缀合分析物3625的部分的寡核苷酸和具有被配置为偶联或缀合可检测标记3635的部分的寡核苷酸与单链支架3610(例如,M13噬菌体DNA、质粒DNA)和另外的结构核酸3640接触。核酸在合适的DNA缓冲液中在升高的温度下(例如,至少约50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C或约95°C)接触,然后冷却。冷却后,形成SNAP 3655,其被配置为结合多个分析物和/或标记组分。保持组分3655在合适的缀合缓冲液中与多个分析物3628和/或标记组分3638接触,所述分析物和标记组分具有与SNAP 3655上的部分互补的部分。在多个分析物3628和/或多个标记组分3638的偶联或缀合之后,形成SNAP-分析物缀合物3650。

[0448] 在一些构型中,如本文所阐述的可检测核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP)可以通过以下方式通过偶联或缀合分析物和/或标记组分来形成:被配置为与另一个分子或基团形成键的反应性基团的反应,例如生物正交反应或点击型化学(参见例如,美国专利号6,737,236和7,427,678,每一篇以引用的方式整体并入本文);使用铜催化剂的叠氮化物-炔烃

Huisgen环加成反应(参见例如,美国专利号7,375,234和7,763,736,每一篇以引用的方式整体并入本文);使用可以与醛部分连接的应变炔烃或三嗪-胍部分(参见例如,美国专利号7,259,258,其以引用的方式并入)、可以与胺部分连接的三嗪氯化物部分、使用偶联试剂诸如EDC可以与胺部分连接的羧酸部分、可以与硫醇部分连接的硫醇部分、可以与通过狄尔斯-阿尔德反应偶联的二烯烃部分连接的烯烃部分、以及可以与硫代磷酸酯部分连接的乙酰溴部分(参见例如WO 2005/065814,其以引用的方式并入)的无铜Huisgen反应(“无金属点击”)。反应性柄可以包含官能团,所述官能团被配置为通过点击反应(例如,金属催化的叠氮-炔烃环加成反应、应变促进的叠氮化物-炔烃环加成反应、应变促进的叠氮化物-硝酮环加成反应、应变化烯烃反应、硫醇-烯反应、狄尔斯-阿尔德反应、逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应、[3+2]环加成反应、[4+1]环加成反应、亲核取代反应、二羟基化反应、硫醇-炔反应、光点击反应、硝酮偶极环加成反应、降冰片烯环加成反应、氧杂降冰片二烯环加成反应、四嗪连接反应、四唑光点击反应)来反应。示例性的硅烷衍生的点击型反应物可以包括炔烃、炔烃、叠氮化物、环氧化物、胺、硫醇、硝酮、异脒、异氰化物、氮丙啶、活性酯和四嗪(例如,二苯并环辛炔-叠氮化物、甲基四嗪-反式环辛烯、环氧化物-硫醇等)。点击型反应可以提供在良性条件(例如,室温、水性溶剂)下快速形成键的有利方法。在一些构型中,SNAP可以包含形成键的交联分子,所述键将第一SNAP组分不可逆地偶联到第二SNAP组分。交联分子可以包括化学交联分子和光引发的交联分子。

[0449] 在一些构型中,核酸或核酸的其他组分可以包括不同种类的反应性基团。不同反应性基团的使用可以提供对将与核酸偶联或缀合的不同组分的数量和位置的一定程度的控制。在特定的构型中,不同的反应性基团表现出正交反应性,由此第一组分具有对探针上的第一反应性柄反应的部分(即反应性部分),但基本上不与探针上的第二反应性柄反应,并且由此第二组分具有对第二反应性柄反应但不与第一反应性柄反应的部分。因此,不同分析物的数量和它们的位置可以通过适当使用可检测探针上的正交反应性柄来调节,或者不同标记组分的数量和它们的位置可以通过适当使用可检测探针上的正交反应性柄来调节。此外,通过分别适当使用核酸上的正交反应性柄,分析物可以与核酸上的标记组分不同地定位。

[0450] 在合成如本文所阐述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)之后,可以通过一种或多种另外的方法纯化所形成的结构。核酸可以经历一个或多个分离过程以去除不需要的组分,诸如以下中的一种或多种:1)未偶联的寡核苷酸;2)未偶联的分析物;3)未偶联的修饰基团;4)缓冲液组分;5)部分形成的核酸;6)错误形成的核酸;和7)过量的核酸。核酸可以经历稀释或浓缩过程以调节含核酸溶液的浓度。可以通过任何合适的方法将核酸与不需要的组分分隔开,所述方法包括但不限于例如高压液相色谱(HPLC)、尺寸排阻色谱(SEC)、亲和层析、超速离心、渗透、反渗透和超滤。在一些构型中,可以在不针对核酸分离指定的分离介质(例如,色谱柱)上进行分离。在一些构型中,可以在不针对分离的核酸的预期流体动力学尺寸范围指定的分离介质(例如,色谱柱)上进行分离。

[0451] 多肽测定

[0452] 本公开提供了可用于形成对偶联单分析物有用的颗粒的系统、组合物和方法。本公开还提供了用于形成当进行各种单分析物测定时有用的单分析物阵列的系统、组合物和方法,所述单分析物测定包括生物分析物(例如,基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组

学等)和非生物分析物(例如,碳纳米颗粒、无机纳米颗粒等)的测定。在一些构型中,所提供的单分析物阵列对于单一多肽蛋白质组测定,例如基于亲和试剂的表征测定(例如,基于荧光或基于条形码的亲和结合表征)或肽测序测定(例如,Edman型降解荧光测序或基于亲和试剂的测定)可能特别有用。

[0453] 本公开还提供了用于检测一种或多种多肽(例如,样品多肽、标准多肽等)或多肽产物(例如,样品多肽复合物、标准多肽复合物等)的方法。可以使用对多肽具有已知结合亲和力和的一种或多种探针来检测多肽。探针和/或多肽可以结合以形成复合物,然后可以检测复合物的形成。例如由于在探针或多肽上存在的标记,可以直接检测复合物。在一些构型中,不需要直接检测复合物,例如以形成复合物,然后检测复合物中存在的探针、多肽或标签或标记组分的形式。

[0454] 在一些检测测定中,蛋白质可以被循环修饰,并且可以检测来自单独循环的修饰产物。在一些构型中,可以通过顺序过程对蛋白质进行测序,其中每个循环包括标记和去除蛋白质的氨基末端氨基酸以及检测标记的步骤。因此,检测蛋白质的方法可以包括以下步骤:(i)暴露蛋白质上的末端氨基酸;(ii)检测来自蛋白质的信号变化;和(iii)基于步骤(ii)中检测到的变化鉴定被去除的氨基酸的类型。例如通过从蛋白质的氨基末端或羧基末端去除一个或多个氨基酸可以暴露末端氨基酸。可以重复步骤(i)至(iii)以产生指示蛋白质序列的一系列信号变化。

[0455] 在上述方法的第一种构型中,蛋白质中的一种或多种类型的氨基酸可以附接到唯一鉴定氨基酸类型的标记上。在这种构型中,鉴定氨基酸的信号变化可以是来自相应标记的信号丢失。可以用于从蛋白质中去除氨基酸并且检测信号变化的示例性组合物和技术是在以下文献中所阐述的那些:Swaminathan等人,Nature Biotech.36:1076-1082(2018);或美国专利号9,625,469或10,545,153,所述文献的每一篇均以引用的方式并入本文。由Erisyon公司(Austin,TX)开发的方法和设备也可以用于检测蛋白质。

[0456] 在上述方法的第二种构型中,蛋白质的末端氨基酸可以被亲和试剂识别,所述亲和试剂对末端氨基酸具有特异性或对存在于末端氨基酸上的标记部分具有特异性。例如由于亲和试剂上的标记,可以在阵列上检测亲和试剂。任选地,标记是在形成复合物时添加到引物核酸上的核酸条形码序列。可以通过解码条形码序列来确定复合物的形成和末端氨基酸的身份。示例性的亲和试剂和检测方法在美国专利申请公开号2019/0145982A1、2020/0348308A1或2020/0348307A1中进行了阐述,所述文献的每一篇均以引用的方式并入本文。由Encodia公司(San Diego,CA)开发的方法和设备也可以用于检测蛋白质。

[0457] 可以使用Edman型测序反应进行从蛋白质中循环去除末端氨基酸,其中苯基异硫氰酸酯与N末端氨基基团在弱碱性条件(例如,约pH 8)下反应,以形成环状苯基硫代氨基甲酰基Edman复合衍生物。苯基异硫氰酸酯可以被一个或多个官能团、连接基团或含有官能团的连接基团取代或未被取代。Edman型测序反应可以包括试剂和条件的变化,其产生从蛋白质末端可检测的氨基酸去除,从而有助于确定蛋白质或其部分的氨基酸序列。例如,苯基基团可以被至少一个可以参与Edman型测序反应的芳族、杂芳族或脂族基团替代,所述芳族、杂芳族或脂族基团的非限制性实例包括:吡啶、嘧啶、吡嗪、吡啶唑啉(pyridazoline)、稠合芳族基团(诸如萘和喹啉)、甲基或其他烷基基团或烷基基团衍生物(例如,烯基、炔基、环烷基)。在某些条件(例如约pH 2的酸性条件)下,衍生的末端氨基酸可以被裂解为例如噻唑啉

酮衍生物。在酸性条件下噻唑啉酮氨基酸衍生物可以形成更稳定的乙内酰苯硫脲(PTH)或可以被检测到的类似氨基酸衍生物。可以对残余的蛋白质迭代地重复这一程序,以鉴定随后的N末端氨基酸。已经描述并且可以使用Edman型降解的许多变型,包括例如使用碱性条件一步去除N末端氨基酸(Chang, J. Y., FEBS LETTS., 1978, 91 (1), 63-68)。在一些情况下,Edman型反应可能被可以选择性地去除的N末端修饰(例如,N末端乙酰化或甲酰化)所阻碍(例如,参见Gheorghe M. T., Bergman T. (1995)于Methods in Protein Structure Analysis中,第8章:Deacetylation and internal cleavage of Proteins for N-terminal Sequence Analysis. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1031-8_8)。

[0458] 用于取代的苯基异硫氰酸酯的官能团的非限制性实例可以包括已知受体的配体(例如,生物素和生物素类似物)、标记诸如发光体或反应性基团诸如点击官能团(例如,具有叠氮化物或乙炔部分的组合物)。所述官能团可以是DNA、RNA、肽或小分子条形码或可以被进一步处理和/或检测的其他标签。

[0459] 使用Edman型方法去除氨基末端氨基酸利用了至少两个主要步骤,第一步骤包括使异硫氰酸酯或等同物与蛋白质N末端残基反应,以形成相对稳定的Edman复合物,例如苯基硫代氨基甲酰基复合物。第二步骤包括例如经由加热去除衍生的N末端氨基酸。现在已经缩短了一个氨基酸的蛋白质可以被检测,例如通过将蛋白质与标记的与氨基末端互补的亲试剂接触并检查蛋白质与所述试剂的结合,或者通过检测与被去除的氨基酸附接的标记的丢失。

[0460] Edman型方法可以以多路复用形式进行,以检测、表征或鉴定多种蛋白质。检测蛋白质的方法可以包括以下步骤:(i)在阵列的地址暴露蛋白质上的末端氨基酸;(ii)将亲和试剂与末端氨基酸结合,其中所述亲和试剂包含核酸标签,并且其中引物核酸存在于所述地址;(iii)延伸所述引物核酸,从而产生具有一个拷贝的标签的延伸引物;和(iv)检测延伸引物的标签。例如通过从蛋白质的氨基末端或羧基末端去除一个或多个氨基酸可以暴露末端氨基酸。可以重复步骤(i)至(iv)以产生一系列指示蛋白质序列的标签。所述方法可以平行地应用于阵列上的多种蛋白质。无论多么复杂,引物的延伸都可以使用核酸标签作为模板通过例如引物的基于聚合酶的延伸来进行。可替代地,引物的延伸可以通过例如引物与杂交至核酸标签的核酸的基于连接酶或基于化学的连接来进行。核酸标签可以通过以下方式来检测:与核酸探针的杂交(例如,在阵列中)、基于扩增的检测(例如基于PCR的检测或基于滚环扩增的检测)或核酸测序(例如循环可逆终止子方法、纳米孔方法或单分子实时检测方法)。可以用于使用核酸标签检测蛋白质的示例性方法在美国专利申请公开号2019/0145982 A1、2020/0348308 A1或2020/0348307 A1中进行了阐述,所述文献的每一篇均以引用的方式并入本文。

[0461] 也可以基于它们的酶活性或其他生物活性来检测多肽。例如,多肽可以与反应物接触,所述反应物通过多肽的酶活性转化为可检测的产物。在其他测定形式中,具有已知酶功能的第一多肽可以与第二多肽接触,以确定第二多肽是否改变第一多肽的酶功能。因此,第一多肽用作检测第二多肽的报告系统。可以观察到的示例性变化包括但不限于酶功能的激活、酶功能的抑制、第一多肽的降解或对第一多肽所使用的反应物或辅因子的竞争。

[0462] 翻译后修饰(PTM)的存在或不存在可以使用本文所阐述的组合物、设备或方法来

检测。可以使用识别PTM的亲试剂或基于PTM的化学特性来检测PTM。可以被检测、鉴定或表征的示例性PTM包括但不限于肉豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化(isoprenylation)、异戊烯化(prenylation)、法尼基化、香叶基香叶基化(geranylgeranylation)、脂酰化、黄素部分附接、血红素C附接、磷酸泛酰巯基乙胺化(phosphopantetheinylation)、亚视黄基(retinylidene)席夫碱形成、白喉酰胺(diphthamide)形成、乙醇胺磷酸甘油附接、8-羟基2,7,10-三氨基癸酸(hypusine)、 β 赖氨酸加成、酰化、乙酰化、脱乙酰化、甲酰化、烷基化、甲基化、C末端酰胺化、精氨酸化、聚谷氨酰化、聚甘氨酰化(polyglycylation)、丁酰化、 γ 羧基化、糖基化、糖化、多唾液酸化、丙二酰化、羟基化、碘化、核苷酸加成、磷酸酯形成、磷酰胺形成、磷酸化、腺苷酸化、尿苷酰化、丙酰化、焦谷氨酸酯形成、S-谷胱甘肽化、S-亚硝基化、S-亚磺酰化、S-磺酰化、琥珀酰化、硫酸化、糖化、氨甲酰化、羰基化、异肽键形成、生物素化、氨基甲酰化、氧化、还原、聚乙二醇化、ISG化、SUMO化、泛素化、类泛素化(neddylaton)、Pup化、瓜氨酸化、脱酰胺、elminylation、二硫桥形成、蛋白水解裂解、异天冬氨酸形成、外消旋化和蛋白质剪接。

[0463] PTM可能出现在蛋白质的特定氨基酸残基上。例如,特定蛋白形态(proteoform)的磷酸部分可以存在于蛋白质的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、组氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸残基上。在其他实例中,乙酰基部分可以存在于N末端或赖氨酸上;丝氨酸或苏氨酸残基可以具有O-连接的糖基部分;天冬酰胺残基可以具有N-连接的糖基部分;脯氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸或组氨酸氨基酸可以被羟基化;精氨酸或赖氨酸残基可以被甲基化;或者N末端甲硫氨酸或赖氨酸氨基酸可以被泛素化。

[0464] 还可以基于多肽与其他分子的结合相互作用来检测多肽,所述其他分子诸如多肽(例如,有或没有翻译后修饰)、核酸、核苷酸、代谢物、参与生物信号转导途径的小分子、生物受体等。例如,参与信号转导途径的多肽可以通过检测所述多肽与第二多肽的结合来鉴定,所述第二多肽已知是所述途径中的其结合配偶体。通常,靶多肽可以与SNAP或SNAP复合物缀合,然后与探针多肽或已知对所述多肽具有亲和力的其他探针分子接触。可以基于探针分子的观察到的结合或探针分子结合的缺乏来鉴定靶多肽。探针分子可以任选地使用本文所阐述或本领域已知的标记来进行标记。

[0465] 在本文所阐述的多肽检测方法的一些构型中,可以在固体支持物上检测多肽。例如,多肽可以附接至支持物,所述支持物可以与溶液中的探针接触,所述探针可以与所述多肽相互作用,从而产生可检测的信号,然后可以检测所述信号以确定多肽的存在。在该方法的多路复用版本中,不同的多肽可以附接至阵列中的不同地址,并且探测和检测步骤可以并行发生。在另一个实例中,探针可以附接至固体支持物,所述支持物可以与溶液中的多肽接触,所述多肽可以与所述探针相互作用,从而产生可检测的信号,然后可以检测所述信号以确定多肽的存在。该方法也可以通过将不同的探针附接至阵列的不同地址来进行复用。多肽可以通过与SNAP或SNAP复合物缀合而附接至支持物。例如,多个多肽可以与多个SNAP或SNAP复合物缀合,使得每个与多肽缀合的SNAP或SNAP复合物在阵列中形成一个地址。在又另一种方法中,可以使用质谱法检测多肽。几种示例性的检测方法在下文和本文别处进行了阐述。应当理解,也可以使用其他检测方法。

[0466] 典型的多肽检测方法(诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)),通过利用抗体、适体或其他结合试剂与多肽的高特异性结合并检测结合事件,同时忽略样品中的所有其他多肽,实

现了对样品中的一种或多种多肽的高置信度表征。ELISA通常在低复杂尺度(例如平行或连续检测一个到几百个不同的多肽)下进行,但可以在更高复杂程度下使用。一个或多个多肽可以与一个或多个SNAP或SNAP复合物缀合,并且可以使用ELISA检测缀合的多肽。

[0467] ELISA方法可以通过以下方式进行:检测多孔板中的固定结合试剂和/或多肽,检测阵列上的固定结合试剂和/或多肽,或者检测微流体装置中颗粒上的固定结合试剂和/或多肽。示例性的基于板的方法包括例如由MesoScale Diagnostics (Rockville, Maryland)商业化的MULTI-ARRAY技术或由Protein Simple(San Jose,CA)商业化的Simple Plex技术。示例性的基于阵列的方法包括但不限于由Quanterix (Billerica,MA)商业化的利用Simoa[®]平面阵列技术或Simoa[®]珠技术的那些方法。进一步示例性的基于阵列的方法在美国专利号9,678,068、9,395,359、8,415,171、8,236,574或8,222,047中进行了阐述,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。示例性的微流体检测方法包括商品名为xMAP[®]技术的由Luminex (Austin, Texas)商业化的方法、或者在被标识为MAGPIX[®]、LUMINEX[®] 100/200或FEXMAP 3D[®]的平台上使用的方法。微流体检测方法的基于板的方法可以被修改以使用如本文所阐述的SNAP或SNAP复合物。

[0468] 也可以使用的并且在低复杂尺度下特别有用的其他检测方法包括使用由Soma Logic (Boulder, CO)商业化的SOMAmer试剂和SOMAscan测定的程序。在一种构型中,将样品与适体接触,所述适体能够以对多肽的氨基酸序列的高特异性结合多肽。所得的适体-多肽复合物可以与其他样品组分分离,例如,通过将复合物附接至从样品中去除的珠、SNAP或SNAP复合物上。然后可以分离适体,并且因为适体是核酸,可以使用本领域已知的用于检测核酸的多种方法中的任何一种来检测适体,所述方法包括例如与核酸阵列杂交、基于PCR的检测或核酸测序。用于本文所阐述的基于适体或其他检测方法的示例性方法和组合物在美国专利号8,404,830、8,975,388、9,163,056、9,938,314、10,239,908、10,316,321或10,221,207中进行了阐述。另外的实例在美国专利号7,855,054、7,964,356、8,975,026、8,945,830、9,404,919、9,926,566、10,221,421、10,316,321或10,392,621中进行了阐述。上述专利以引用的方式并入本文。在上文或在上述参考文献中所阐述的适体或多肽可以附接至如本文所阐述的SNAP或SNAP复合物。

[0469] 也可以基于两个或更多个探针的接近来检测多肽。例如,两种探针可以各自包括受体组分和核酸组分。当例如由于各自受体的配体在单个多肽上或者由于配体存在于彼此缔合的两个多肽上而探针彼此邻近结合时,核酸可以相互作用以引起指示邻近的修饰。例如,一个核酸可以使用另一个核酸作为模板延伸,一个核酸可以形成定位另一个核酸以与另一个核酸连接的模板,等等。示例性方法由Olink Proteomics AB(Uppsala Sweden)商业化或在美国专利号7,306,904、7,351,528、8,013,134、8,268,554或9,777,315中进行了阐述,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。在上文或在上述参考文献中所阐述的多肽、探针、配体或受体可以附接至如本文所阐述的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。

[0470] 检测多肽的方法可以包括检测样品多肽(例如,样品多肽缀合物)和/或检测标准多肽(例如,标准多肽缀合物)的步骤。在一种构型中,检测可以包括以下步骤:(i)将第一组结合试剂与样品多肽和/或标准多肽接触,和(ii)检测样品多肽和/或标准多肽与第二组结

合试剂中的结合试剂的结合。所述方法可以任选地包括以下的一个或多个另外的步骤：(iii) 去除第一组结合试剂，(iv) 将第二组结合试剂与样品多肽和/或标准多肽结合，其中所述第二组中的结合试剂不同于所述第一组中的结合试剂，和(v) 检测样品多肽和/或标准多肽与第二组结合试剂中的结合试剂的结合。所述方法可以任选地对阵列中的一种或多种样品多肽或标准多肽进行。采用标准多肽的方法和设备在以下文献中进行了阐述：美国专利申请序列号63/139,818, 其以引用的方式并入本文。在上文或在上述参考文献中所阐述的样品多肽或标准多肽可以附接至如本文所阐述的核酸(例如, 核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)。

[0471] 高特异性结合试剂可以用于许多多肽检测方法。可替代地, 检测可以基于在样品上进行的多个低特异性检测循环, 使得单独循环可以检测多种多肽, 而不必在任何一个循环中将一种检测的多肽与另一种区分开来。然而, 使用本文所阐述的组合物和方法, 可以将来自多个循环的结果组合以实现样品中多种单独多肽的高置信度定量、鉴定或表征。在许多实施方案中, 关于区分产生可检测信号的多肽子集的身份, 一个或多个单独的循环产生模糊的结果; 然而, 表征多个循环中的信号允许单独且明确地鉴定单独多肽。所得组的经鉴定的多肽可能大于从任何单独循环产生信号的多肽的数量。

[0472] 基于多个低特异性检测循环的检测方法的一些构型在某种程度上可以通过类比儿童游戏“20个问题”来理解。该游戏的目的是在尽可能少的问题中鉴定出目标答案。一个有效的战术是关于在广泛特征(例如, “它是一个人、一个地方还是一件?”、“该人在这个房间吗?”)至狭窄特征(例如, “这个人叫‘Keith’吗?”)范围内的特征提出问题。一般而言, 通过提出比答案的可能数量(M)少得多的问题(N), 即 $N \ll M$, 鉴定游戏中的角色是可能的。通过类比, 在本文所阐述的检测方法的一些构型中使用的亲和试剂可以与多肽群体具有广泛的相互作用。例如, 亲和试剂可以被认为是‘混杂’亲和试剂, 因为其对样品中多种不同的多肽中存在的单个表位具有亲和力, 或者因为其对样品中一种或多种多肽中存在的多个不同表位具有亲和力。通过测试亲和试剂与多肽的相互作用, 无论是否观察到相互作用都可以获得信息。例如, 亲和试剂不能结合多肽指示多肽缺乏针对亲和试剂的表位。

[0473] 在上述20个问题的类比中, 结果基于询问和答案的清晰表达, 并且还基于准确和可靠的答案(例如, 类型、尺寸、属性等)。通过类比, 当测量容易出现一定程度的系统或随机误差或不确定性时, 通过测量亲和试剂相互作用来表征多肽可能更加困难。例如, 亲和试剂(例如, 抗体)与结合靶标(例如, 表位)相互作用的测量准确性可能受到许多因素的影响, 所述因素诸如系统检测极限或灵敏度、表位与亲和试剂之间的非特异性相互作用(假阳性)、或者相互作用的随机、时间依赖性逆转(假阴性)。

[0474] 多肽表征测量包含一定程度的不确定性并不罕见。通过组合概率解码方法利用多个低特异性检测循环, 可以实现高置信度表征。二元多肽相互作用数据的叠加或组合(例如, 未观察到与表位X相互作用的亲和试剂A1与未知多肽P相互作用, 因此, 多肽P不含有表位X)可能导致不正确的多肽表征, 这是由于包含或排除了测量误差导致的可能候选状态。相比之下, 叠加或组合概率多肽相互作用数据可以允许算法收敛到多肽身份的高置信度预测, 而不需要排除任何候选状态。例如, 如果已知亲和试剂A1至A6以相互作用概率与已知多肽P1相互作用, 并且观察到亲和试剂A2、A5和A6对未知多肽P的可测量的相互作用, 则可以推断多肽P可能不是多肽P1(未观察到3个可能相互作用中的2个; 观察到3个不可能相互作用)

用中的2个)。此外,可以对基于概率的表征赋予置信度,使得当置信度上升到阈值置信度以上时,可以对每个观察到的多肽进行预测。例如,在多肽P的上述观察中,六个所描述的观察不需要提供足够高的置信度来排除多肽P1作为可能的身份,但是在20个或更多个亲和试剂上的类似趋势可以提供足够的置信度来排除P1作为可能的身份。因此,多肽P1可以经历与一系列混杂的亲和试剂的结合反应,并且尽管从每个结合反应单独获得的观察结果对于鉴定多肽可能是不明确的,但是对来自一系列结合反应的观察结果进行解码可以以可接受的置信水平鉴定多肽P1。

[0475] 基于多个低特异性检测循环的多肽检测测定可以被配置为允许在单独分子或单分子水平上的多肽表征。可以在含有独特的、可检测可分辨的表征位点的固体支持物上提供待表征的多肽。例如,多肽可以通过与核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)缀合而附接至位点。此类表征位点可以间隔开、排列或以其他方式排序,以允许在检测它们与亲和试剂的相互作用时将单独位点彼此区分开来。固体支持物可以包含足够数量的独特的、光学可分辨的表征位点,以容纳来自样品的多个、大多数或所有多肽,诸如至少约 1×10^4 个、 1×10^5 个、 1×10^6 个、 1×10^7 个、 1×10^8 个、 1×10^9 个、 1×10^{10} 个、 1×10^{11} 个、 1×10^{12} 个或超过 1×10^{12} 个位点。每个位点可以含有已知数量的待表征的多肽。在一些情况下,表征位点可以含有待检测、鉴定或表征的单个多肽分子。在其他情况下,位点可以含有多个多肽分子,其中至少一个分子要被检测。例如,待检测的多肽分子可以是具有多个不同亚基的较大蛋白质中的一个亚基。

[0476] 在一些情况下,基于多个低特异性检测循环的多肽检测测定可以利用亲和试剂,诸如抗体(或其功能片段)、适体、小蛋白结合剂或任何其他合适的结合试剂。亲和试剂可以是混杂亲和试剂,其具有与样品中超过一种多肽相互作用(例如,结合)的可能性。在一些情况下,亲和试剂可能具有与样品中两种或更多种独特的、结构不同的蛋白质相互作用的可能性。例如,基于结构相似性的区域,亲和试剂可以以几乎相等的概率结合特定膜蛋白和特定细胞质蛋白。在一些情况下,结合亲和试剂可能具有与特定氨基酸表位或表位家族结合的可能性,而与序列背景(例如,表位上游和/或下游的氨基酸序列)无关。亲和试剂可以结合与核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)缀合的多肽。

[0477] 可以表征用于多个低特异性检测循环的亲和试剂,使得其具有鉴定的、确定的或评估的基于概率的结合谱。亲和试剂可以具有以大于约50%(例如,至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或大于约99.999%)的鉴定的、确定的或评估的结合概率结合第一多肽以及以小于约50%(例如,不超过约50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%或小于约0.001%)的鉴定的、确定的或评估的结合概率结合第二结构不相同的多肽的特性。在特定的情况下,亲和试剂与第一多肽和第二多肽的观察到的结合概率的差异可能是由于第一多肽或第二多肽中特定表位或表位家族的存在、不存在或不可接近所致。概率性亲和试剂结合谱可以通过体外测量或计算机模拟预测来确定或鉴定。

[0478] 基于多个低特异性检测循环的多肽检测方法可以进一步结合针对上述亲和试剂优化的计算解码方法。解码方法可以叠加或组合来自多轮检测亲和试剂与单独多肽相互作用的数据,并且可以对来自每个多肽的信号检测赋予置信度。例如,可以对位点阵列中的每个位点检测亲和试剂相互作用,并且可以对每个位点处的每个信号进行检测赋予一定的置信

度。类似地,可以对每个位点的一系列检测事件赋予一定的置信度。如果基于叠加或组合的亲试剂相互作用数据的预测的置信度超过阈值置信度,则可以认为多肽被鉴定或表征。多肽表征预测的阈值置信度可能取决于表征的性质。阈值置信度可以落在从约50%至约99.999%的范围内,诸如约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.99%或约99.999%。在一些情况下,阈值置信度可能该范围之外。在一些情况下,计算解码方法可以结合机器学习或训练算法,以利用增加的信息或在不断扩大的背景中更新或精修亲试剂或多肽的确定或鉴定的概率相互作用谱。

[0479] 可以用于采用多个低特异性检测循环的检测方法的特别有用的方法和算法在例如美国专利号10,473,654;或PCT公开号W0 2019/236749A2;或美国专利申请公开号2020/0082914A1或2020/0090785A1进行了阐述,其中所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。在上文和在前述参考文献中所阐述的方法可以被修改以使用本公开的SNAP或SNAP复合物,例如将多肽附接到固体支持物上。

[0480] 检测多肽的方法可以包括检测样品多肽的过程,所述过程包括以下步骤:(i)将第一结合试剂与阵列地址处的样品多肽结合,其中所述结合试剂包含核酸标签,并且其中引物核酸存在于所述地址处;(ii)延伸所述引物核酸,从而产生具有一个拷贝的标签的延伸引物;和(iii)检测所述延伸引物的标签。多肽可以通过与核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)缀合而附接在阵列的地址上。引物的延伸可以例如使用核酸标签作为模板通过引物的基于聚合酶的延伸来进行。可替代地,引物的延伸可以通过例如引物与杂交至核酸标签的核酸的基于连接酶或基于化学的连接来进行。可以通过以下方式来检测核酸标签:与核酸探针杂交(例如,在微阵列中)、基于扩增的检测(例如,基于PCR的检测或基于滚环扩增的检测)或核酸测序(例如,循环可逆终止子方法、纳米孔方法或单分子实时检测方法)。可以用于使用核酸标签检测多肽的示例性方法在以下文献中进行了阐述:美国专利申请公开号2019/0145982A1、2020/0348308A1或2020/0348307A1,所述文献中的每一篇均以引用的方式并入本文。

[0481] 检测多肽的方法可以包括检测样品多肽的过程,所述过程包括以下步骤:(i)暴露多肽上的末端氨基酸;(ii)检测来自多肽的信号变化;和(iii)基于步骤(ii)中检测到的变化鉴定被去除的氨基酸的类型。例如通过从多肽的氨基末端或羧基末端去除一个或多个氨基酸可以暴露末端氨基酸。可以重复步骤(i)至(iii)以产生指示多肽序列的一系列信号变化。任选地,一种或多种不同的多肽可以附接在多肽阵列的相应地址,例如,通过与地址处的核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)缀合。可以任选地在阵列上的一个或多个地址检测信号变化。

[0482] 在上述方法的第一种构型中,多肽中的一种或多种类型的氨基酸可以附接到唯一鉴定氨基酸类型的标记上。在这种构型中,鉴定氨基酸的信号变化可以是来自相应标记的信号丢失。可以用于从蛋白质中去除氨基酸并且检测信号变化的示例性组合物和技术在以下文献中进行了阐述:Swaminathan等人,Nature Biotech.36:1076-1082(2018);或美国专利号9,625,469或10,545,153,所述文献的每一篇均以引用的方式并入本文。多肽可以通过与SNAP或SNAP复合物缀合而附接至固体支持物。

[0483] 在上述方法的第二种构型中,多肽的末端氨基酸可以被结合试剂识别,所述结合试剂对末端氨基酸具有特异性或对存在于末端氨基酸上的标记部分具有特异性。例如由于

结合试剂上的标记,可以在阵列上检测结合试剂。示例性的结合试剂和检测方法在以下文献中进行了阐述:美国专利申请公开号2019/0145982A1、2020/0348308A1或2020/0348307A1,所述文献中的每一篇均以引用的方式并入本文。多肽可以通过与核酸(例如,核酸纳米结构、SNAP、其复合物或其组分)缀合而附接至固体支持物。

[0484] 检测多肽的方法可以包括检测多肽阵列的样品多肽的过程,所述过程包括以下步骤:(i)在阵列的地址处暴露多肽上的末端氨基酸;(ii)将结合试剂与末端氨基酸结合,其中所述结合试剂包含核酸标签,并且其中引物核酸存在于所述地址;(iii)延伸所述引物核酸,从而产生具有一个拷贝的标签的延伸引物;和(iv)检测延伸引物的标签。例如通过从多肽的氨基末端或羧基末端去除一个或多个氨基酸可以暴露末端氨基酸。可以重复步骤(i)至(iv)以产生指示多肽序列的一系列标签。引物的延伸可以例如使用核酸标签作为模板通过引物的基于聚合酶的延伸来进行。可替代地,引物的延伸可以通过例如引物与杂交于核酸标签的核酸的基于连接酶或基于化学的连接来进行。可以通过以下方式来检测核酸标签:与核酸探针杂交(例如,在微阵列中)、基于扩增的检测(例如,基于PCR的检测或基于滚环扩增的检测)或核酸测序(例如,循环可逆终止子方法、纳米孔方法或单分子实时检测方法)。可以用于使用核酸标签检测多肽的示例性方法在以下文献中进行了阐述:美国专利申请公开号2019/0145982A1、2020/0348308A1或2020/0348307A1,所述文献中的每一篇均以引用的方式并入本文。通过引物延伸复制的多肽、引物核酸或模板核酸可以附接至SNAP或SNAP复合物。

[0485] 检测方法可以包括确定检测的特性,诸如多肽序列、已知表位的存在、多肽尺寸、多肽等电点、多肽疏水性、多肽流体动力学半径、多肽pKa、翻译后修饰的存在、翻译后修饰的不存在、多肽电荷、非天然氨基酸或其他非天然氨基酸化学单位的存在、二级、三级或四级结构的存在、二级、三级或四级结构的不存在、结合分子的存在或结合分子的不存在。结合的非多肽分子可以包含螯合离子、结合的金属簇、结合的辅因子(例如,卟啉)、结合的配体、结合的底物或结合的生物分子(例如,多糖、核酸、蛋白质等)。

[0486] 本公开的方法或设备可以任选地被配置用于光学检测(例如,发光检测)。基于可测量的特征,诸如激发发光体的辐射的波长、由发光体发射的辐射的波长、由发光体发射的辐射的强度(例如,在特定的检测波长下)、发光寿命(例如,发光体保持在受激状态的时间)或发光极性,分析物或其他实体可以被检测到,并且任选地彼此区分开。可以检测并任选地用于区分分析物的其他光学特征包括例如辐射的吸收、共振拉曼、辐射散射等。发光体可以是待检测的蛋白质或其他分析物的固有部分,或者发光体可以是合成添加到蛋白质或其他分析物中的外源部分。

[0487] 本公开的方法或装置可以使用光感测装置,所述光感测装置适于检测本文所阐述或本领域已知的特征。光感测装置的特别有用的部件可以包括但不限于光学子系统或核酸测序系统中所使用的部件。有用的子系统及其部件的实例在以下文献中进行了阐述:美国专利申请公开号2010/0111768A1或美国专利号7,329,860、8,951,781或9,193,996,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。其他有用的光感测装置及其部件在以下文献中进行了阐述:美国专利号5,888,737、6,175,002、5,695,934、6,140,489或5,863,722;或者美国专利公开号2007/007991A1、2009/0247414A1、或2010/0111768、或W02007/123744,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。可以用于基于发光寿命检测发光体的光感测装

置和部件在例如以下文献中进行了描述:美国专利号9,678,012、9,921,157、10,605,730、10,712,274、10,775,305或10,895,534,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。

[0488] 可以使用具有光电探测区域的集成电路来检测发光寿命,所述光电探测区域被配置为接收入射光子并响应于入射光子产生多个电荷载流子。所述集成电路可以包括至少一个电荷载流子存储区域和电荷载流子分离结构,所述电荷载流子分离结构被配置为基于产生电荷载流子的时间选择性地将多个电荷载流子中的电荷载流子直接引导到电荷载流子存储区域中。参见例如美国专利号9,606,058、10,775,305和10,845,308,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。产生短光脉冲的光源可以用于发光寿命测量。例如,可以用双极波形驱动光源(诸如半导体激光器或LED)以产生FWHM持续时间短至大约85皮秒的光脉冲,所述光脉冲具有抑制的尾部发射。参见例如US 10,605,730,其以引用的方式并入本文。

[0489] 对于使用光学检测(例如,发光检测)的构型,一种或多种分析物(例如,蛋白质)可以固定在表面上,并且所述表面可以用显微镜扫描以检测来自固定的分析物的任何信号。显微镜本身可以包含数码相机或其他发光检测器,其被配置为记录、存储和分析扫描期间收集的数据。本公开的发光检测器可以被配置用于落射发光(epiluminescent)检测、全内反射(TIR)检测、波导辅助激发等。

[0490] 光感测装置可以基于任何合适的技术,并且可以是例如电荷耦合器件(CCD)传感器,其基于光子撞击装置中的位置来产生像素化图像数据。应当理解,也可以使用多种其他光感测装置中的任何一种,包括但不限于被配置用于时间延迟积分(TDI)操作的检测器阵列、互补金属氧化物半导体(CMOS)检测器、雪崩光电二极管(APD)检测器、盖革模式光子计数器、光电倍增管(PMT)、电荷注入装置(CID)传感器、JOT图像传感器(Quanta)或任何其他合适的检测器。光感测装置可以任选地与一个或多个激发源(例如激光器、发光二极管(LED)、弧光灯或本领域已知的其他能源)偶联。

[0491] 光学检测系统可以被配置用于单分子检测。例如,波导或光学限制物可以用于将激发辐射传递到分析物所在的固体支持物的位置。零模波导可能是特别有用的,其实例在美国专利号7,181,122、7,302,146或7,313,308中进行了阐述,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。分析物可以局限于表面特征,例如,以便于单分子解析。例如,分析物可以分布到具有纳米尺寸的孔中,所述纳米尺寸诸如美国专利号7,122,482或8,765,359或美国专利申请公开号2013/0116153A1中所阐述的那些,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。所述孔可以被配置用于选择性激发,例如,如美国专利号8,798,414或9,347,829中所阐述,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。分析物可以分布到纳米尺度的杆上,诸如高长宽比的杆,其可以任选地是延伸穿过金属层的介电柱以改善对与柱附接的分析物的检测。参见例如美国专利号8,148,264、9,410,887或9,987,609,所述专利中的每一篇均以引用的方式并入本文。可以用于检测分析物的纳米结构的另外的实例是响应于分析物浓度而改变状态使得分析物可以被定量的那些纳米结构,如WO 2020/176793 A1(其以引用的方式并入本文)中所阐述。

[0492] 本文所阐述的设备或方法不需要被配置用于光学检测。例如,电子检测器可以用于检测质子或带电荷的标记(参见例如,美国专利申请公开号2009/0026082A1;2009/0127589A1;2010/0137143A1;或2010/0282617A1,所述专利中的每一篇均以引用的方式整体并入本文)。场效应晶体管(FET)可以用于检测分析物或其他实体,例如,基于场干扰部分

与FET的接近度。场干扰部分可能是由于与分析物或亲和试剂附接的外来标记,或者所述部分可能是所使用的分析物或亲和试剂所固有的。表面等离子体共振可以用于检测分析物或亲和试剂在表面处或在表面附近的结合。用于将分子附接至传感器的示例性传感器和方法在美国专利申请公开号2017/0240962A1、2018/0051316A1、2018/0112265A1、2018/0155773A1或2018/0305727A1;或美国专利号9,164,053、9,829,456、10,036,064中进行了阐述,所述文献的每一篇均以引用的方式并入本文。

[0493] 本公开的组合物、设备或方法可以用于表征或鉴定蛋白质组中所有蛋白质种类的至少约0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、25%、50%、90%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%、99.99999%、99.999999%或更多。可替代地或另外地,蛋白质组表征方法可以表征或蛋白质组中所有蛋白质种类的不超过约99.999999%、99.99999%、99.9999%、99.999%、99.99%、99.9%、99%、90%、50%、25%、10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%、0.0000001%或更少。

[0494] 在本文所阐述的组合物、设备和方法的一些构型中,一种或多种蛋白质可以存在于固体支持物上,其中可以任选地检测所述蛋白质。例如,蛋白质可以附接至固体支持物,所述固体支持物可以与溶液中的检测试剂(例如,亲和试剂)接触,所述亲和试剂可以与蛋白质相互作用,从而产生可检测的信号,然后可以检测信号以确定蛋白质的存在、不存在、量、特征或身份。在该方法的多路复用版本中,不同的蛋白质可以附接至阵列中的不同地址,并且检测步骤可以平行进行,使得在每个地址的蛋白质被检测到、定量、表征或鉴定。在另一个实例中,检测试剂可以附接至固体支持物,所述支持物可以与溶液中的蛋白质接触,所述蛋白质可以与所述检测试剂相互作用,从而产生可检测的信号,然后可以检测所述信号以确定蛋白质的存在。该方法也可以通过将不同的探针附接至阵列的不同地址来进行复用。

[0495] 在多路复用构型中,不同的蛋白质可以附接至不同的独特标识符(例如,阵列中的地址),并且蛋白质可以被并行地操作和检测。例如,可以将含有一种或多种不同亲和试剂的流体递送至阵列,使得阵列的蛋白质同时与亲和试剂接触。此外,可以并行观察多个地址,从而允许结合事件的快速检测。多种不同的蛋白质可以具有至少5个、10个、100个、 1×10^3 个、 1×10^4 个、 1×10^5 个或更多个不同天然长度蛋白质一级序列的复杂性。可替代地或另外地,在本文所阐述的方法中分析的蛋白质组、蛋白质组亚级分或其他蛋白质样品可以具有至多 1×10^5 种、 1×10^4 种、 1×10^3 种、100种、10种、5个或更少个不同天然长度蛋白质一级序列的复杂性。被检测、表征或鉴定的样品中的蛋白质总数可能不同于样品中不同一级序列的数量,例如,由于至少一些蛋白质种类的多个拷贝的存在。此外,被检测、表征或鉴定的样品中的蛋白质总数可能不同于怀疑存在于样品中的候选蛋白质的数量,例如,由于至少一些蛋白质种类的多个拷贝的存在、样品来源中一些蛋白质的不存在或在分析前一些蛋白质的损失。

[0496] 特别有用的多路复用形式使用其中蛋白质和/或亲和试剂附接至独特的标识符(诸如表面上的地址)的阵列。可以使用多种方式中的任何一种将蛋白质附接至独特的标识符。附接可以是共价的或非共价的。示例性共价附接包括化学接头,诸如使用点击化学或本领域已知的或以下文献中所描述的其他键连获得的那些接头:美国专利申请序列号17/

062,405,其以引用的方式并入本文。非共价附接可以由受体-配体相互作用(例如(链霉)亲和素-生物素、抗体-抗原或互补核酸链)介导,例如其中所述受体附接至独特的标识符,并且所述配体附接至蛋白质,反之亦然。在特定的构型中,蛋白质通过结构化核酸颗粒(SNAP)附接至固体支持物(例如,阵列中的地址)。蛋白质可以附接至SNAP,并且所述SNAP可以与固体支持物相互作用,例如,通过DNA与支持物的非共价相互作用和/或通过SNAP与支持物的共价连接。核酸折纸或核酸纳米球是特别有用的。使用SNAP和其他部分将蛋白质附接至独特的标识符(诸如标签或阵列中的地址)在以下文献中进行了阐述:美国专利申请序列号17/062,405,其以引用的方式并入本文。

[0497] 本公开的方法、组合物和设备特别适合用于蛋白质。尽管在整个本公开中例示了蛋白质,但是应当理解,可以类似地使用其他分析物。示例性分析物包括但不限于生物分子、多糖、核酸、脂质、代谢物、激素、维生素、酶辅因子、治疗剂、候选治疗剂或其组合。分析物可以是非生物原子或分子,诸如合成聚合物、金属、金属氧化物、陶瓷、半导体、矿物或其组合。

[0498] 在本文的方法、组合物或设备中使用的一种或多种蛋白质可以源自天然或合成来源。示例性来源包括但不限于生物组织、流体、细胞或亚细胞区室(例如,细胞器)。例如,样品可以源自组织活检、生物流体(例如,血液、汗液、泪液、血浆、细胞外液、尿液、粘液、唾液、精液、阴道液、滑液、淋巴液、脑脊液、腹腔液、胸膜液、羊水、细胞内液、细胞外液等)、粪便样品、毛发样品、培养的细胞、培养基、固定的组织样品(例如,新鲜冷冻的或福尔马林固定的石蜡包埋的)或蛋白质合成反应的产物。蛋白质源可以包括其中蛋白质是天然或预期成分的任何样品。例如,癌症生物标记蛋白的主要来源可以是肿瘤活检样品或体液。其他来源包括环境样品或法医样品。

[0499] 蛋白质或其他分析物可以从其来源的示例性生物体包括例如哺乳动物,诸如啮齿类动物、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、有蹄类动物、马、绵羊、猪、山羊、牛、猫、狗、灵长类动物、非人灵长类动物或人类;植物,诸如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草、玉米、高粱、燕麦、小麦、稻、芸苔或大豆;藻类,诸如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*);线虫,诸如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*);昆虫,诸如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、蚊子、果蝇、蜜蜂或蜘蛛;鱼,诸如斑马鱼;爬行动物;两栖动物,诸如青蛙或非洲爪蟾(*Xenopus laevis*);盘基网柄菌(*dictyostelium discoideum*);真菌,诸如卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、酵母、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);或恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。蛋白质也可以来源于原核生物,诸如细菌、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、葡萄球菌(*staphylococci*)或肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*);古细菌(*archae*);病毒,诸如丙型肝炎病毒、流感病毒、冠状病毒或人免疫缺陷病毒;或类病毒。蛋白质可以来源于上述生物体的同质培养物或群体,或者可替代地来源于几种不同生物体的集合,例如在群落或生态系统中。

[0500] 在一些情况下,蛋白质或其他生物分子可以来源于从宿主生物体收集的生物体。例如,蛋白质可以来源于从宿主生物体收集的寄生、致病、共生或潜伏生物体。蛋白质可以来源于已知或怀疑与疾病状态或障碍(例如,癌症)相关的生物体、组织、细胞或生物液体。可替代地,蛋白质可以来源于已知或怀疑与特定的疾病状态或障碍相关的生物体、组织、细

胞或生物液体。例如,从这样的来源分离的蛋白质可以用作对照,用于与从已知或怀疑与特定疾病状态或障碍相关的来源获得的结果进行比较。样品可以包括微生物组或微生物组的主要部分。在一些情况下,本文所阐述的方法、组合物或设备中使用的一种或多种蛋白质可以从单一来源获得,并且不超过单一来源。单一来源可以是例如单一生物体(例如,个体人)、单一组织、单一细胞、单一细胞器(例如,内质网、高尔基体或细胞核)或单一含蛋白质的颗粒(例如,病毒颗粒或囊泡)。

[0501] 本公开的方法、组合物或设备可以使用或包括具有多种组合物中的任何一种的多种蛋白质,诸如由蛋白质组或其级分构成的多种蛋白质。例如,多种蛋白质可以包括液相蛋白质,诸如生物样品或其级分中的蛋白质,或者多种蛋白质可以包括被固定的蛋白质,诸如附接至颗粒或固体支持物的蛋白质。作为另外的实例,多种蛋白质可以包括结合本公开的方法、组合物或设备被检测、分析或鉴定的蛋白质。多种蛋白质的含量可以根据多种特征(诸如在下文或在本文别处所阐述的那些特征)中的任何一种来理解。

[0502] 多种蛋白质可以根据总蛋白质质量来表征。一升血浆中蛋白质的总质量估计为70克,并且人类细胞中蛋白质的总质量取决于细胞类型估计在100微微克(μg)与500 μg 之间。参见Wisniewski等人Molecular&Cellular Proteomics 13:10.1074/mcp.M113.037309, 3497-3506 (2014),其以引用的方式并入本文。在本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以包括至少1 μg 、10 μg 、100 μg 、1 ng 、10 ng 、100 ng 、1 mg 、10 mg 、100 mg 、1 mg 、10 mg 、100 mg 或更多质量的蛋白质。可替代地或另外地,多种蛋白质可以含有至多100 mg 、10 mg 、1 mg 、100 mg 、10 mg 、1 mg 、100 ng 、10 ng 、1 ng 、100 μg 、10 μg 、1 μg 或更少质量的蛋白质。

[0503] 可以根据相对于给定来源诸如生物来源(例如,细胞、组织或生物流体诸如血液)的质量百分比来表征多种蛋白质。例如,多种蛋白质可以含有所述多种蛋白质所来源的来源中存在的总蛋白质质量的至少60%、75%、90%、95%、99%、99.9%或更多。可替代地或另外地,多种蛋白质可以含有所述多种蛋白质所来源的来源中存在的总蛋白质质量的至多99.9%、99%、95%、90%、75%、60%或更少。

[0504] 多种蛋白质可以根据蛋白质分子的总数来表征。酿酒酵母细胞中的蛋白质分子总数估计为约4200万个蛋白质分子。参见Ho等人,Cell Systems (2018), DOI:10.1016/j.cels.2017.12.004,其以引用的方式并入本文。在本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以包括至少1个蛋白质分子、10个蛋白质分子、100个蛋白质分子、 1×10^4 个蛋白质分子、 1×10^6 个蛋白质分子、 1×10^8 个蛋白质分子、 1×10^{10} 个蛋白质分子、1摩尔($6.02214076 \times 10^{23}$ 个分子)的蛋白质、10摩尔蛋白质分子、100摩尔蛋白质分子或更多。可替代地或另外地,多种蛋白质可以含有至多100摩尔蛋白质分子、10摩尔蛋白质分子、1摩尔蛋白质分子、 1×10^{10} 个蛋白质分子、 1×10^8 个蛋白质分子、 1×10^6 个蛋白质分子、 1×10^4 个蛋白质分子、100个蛋白质分子、10个蛋白质分子、1个蛋白质分子或更少。

[0505] 多种蛋白质可以根据所述多种蛋白质中全长一级蛋白质结构的多样性来表征。例如,多种蛋白质中全长一级蛋白质结构的多样性可以等同于多种蛋白质来源中不同蛋白质编码基因的数量。无论蛋白质是否来源于已知基因组或任何基因组,全长一级蛋白质结构的多样性都可以独立于蛋白质中翻译后修饰的存在或不存在而进行计数。据估计人类蛋白质组具有约20,000种不同的蛋白质编码基因,使得源自人类的多种蛋白质可以包含多达约

20,000种不同的一级蛋白质结构。参见Aebersold等人, *Nat. Chem. Biol.* 14:206-214 (2018), 其以引用的方式并入本文。已知自然界中的其他基因组和蛋白质组更大或更小。本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以具有至少2种、5种、10种、100种、 1×10^3 种、 1×10^4 种、 2×10^4 种、 3×10^4 种或更多种不同的全长一级蛋白质结构的复杂性。可替代地或另外地, 多种蛋白质可以具有至多 3×10^4 种、 2×10^4 种、 1×10^4 种、 1×10^3 种、100种、10种、5种、2种或更少种不同的全长一级蛋白质结构的复杂性。

[0506] 相对而言, 在本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以含有至少一种代表由样品所来源的基因组编码的蛋白质的至少60%、75%、90%、95%、99%、99.9%或更多的蛋白质。可替代地或另外地, 多种蛋白质可以含有代表由样品所来源的基因组编码的蛋白质的至多99.9%、99%、95%、90%、75%、60%或更少的蛋白质。

[0507] 多种蛋白质可以根据包括转录剪接变体在内的多种蛋白质中的一级蛋白质结构的多样性来表征。当包括剪接变异体时, 据估计人类蛋白质组包括约70,000种不同的一级蛋白质结构。参见Aebersold等人, *Nat. Chem. Biol.* 14:206-214 (2018), 其以引用的方式并入本文。此外, 由于样品中发生的片段化, 部分长度的一级蛋白质结构的数量可能增加。本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以具有至少2种、5种、10种、100种、 1×10^3 种、 1×10^4 种、 7×10^4 种、 1×10^5 种、 1×10^6 种或更多种不同的一级蛋白质结构的复杂性。可替代地或另外地, 多种蛋白质可以具有至多 1×10^6 种、 1×10^5 种、 7×10^4 种、 1×10^4 种、 1×10^3 种、100种、10种、5种、2种或更少种不同的一级蛋白质结构的复杂性。

[0508] 多种蛋白质可以根据包括不同一级结构和一级结构中不同蛋白形态的所述多种蛋白质中的蛋白质结构来表征。从给定基因表达的蛋白质的不同分子形式被认为是不同的蛋白形态。蛋白形态可以不同, 例如, 由于一级结构的不同(例如, 更短或更长的氨基酸序列)、不同的结构域排列(例如, 转录剪接变体)或不同的翻译后修饰(例如, 磷酸基、糖基、乙酰基或泛素部分的存在或不存在)。当计数不同的一级结构和蛋白形态时, 据估计人类蛋白质组包括成千上万种蛋白质。参见Aebersold等人, *Nat. Chem. Biol.* 14:206-214 (2018), 其以引用的方式并入本文。本文所阐述的方法、组合物或设备中使用或包括的多种蛋白质可以具有至少2种、5种、10种、100种、 1×10^3 种、 1×10^4 种、 1×10^5 种、 1×10^6 种、 5×10^6 种、 1×10^7 种或更多种不同的蛋白质结构的复杂性。可替代地或另外地, 多种蛋白质可以具有至多 1×10^7 种、 5×10^6 种、 1×10^6 种、 1×10^5 种、 1×10^4 种、 1×10^3 种、100种、10种、5种、2种或更少种不同的蛋白质结构的复杂性。

[0509] 可以根据样品中不同蛋白质结构的动态范围来表征多种蛋白质。动态范围可以是以下的量度: 多种蛋白质中所有不同蛋白质结构的丰度范围、多种蛋白质中所有不同一级蛋白质结构的丰度范围、多种蛋白质中所有不同全长一级蛋白质结构的丰度范围、多种蛋白质中所有不同全长基因产物的丰度范围、从给定基因表达的所有不同蛋白形态的丰度范围或本文所阐述的任何其他组不同蛋白质的丰度范围。人类血浆中所有蛋白质的动态范围估计跨越从白蛋白(最丰富的蛋白质)到临床上测量的最稀少的蛋白质的超过10个数量级。参见Anderson和Anderson *Mol Cell Proteomics* 1:845-67 (2002), 其以引用的方式并入本文。本文所阐述的多种蛋白质的动态范围可以是至少10、100、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^6 、 1×10^8 、 1×10^{10} 或更大的因子。可替代地或另外地, 本文所阐述的多种蛋白质的动态范围可以

是至多 1×10^{10} 、 1×10^8 、 1×10^6 、 1×10^4 、 1×10^3 、100、10或更小的因子。

[0510] 实施例

[0511] 实施例1:蛋白质与SNAP的缀合

[0512] mTz-官能化的蛋白质与包含一个或多个TCO官能团的TCO官能化的DNA折纸SNAP复合物缀合。每个TCO官能化的DNA折纸SNAP复合物包含瓦片形状的展示SNAP,其包含与四个瓦片形状的效用SNAP偶联的TCO官能化的多肽结合基团。每个展示SNAP包含1个或4个TCO结合基团。TCO官能化的DNA折纸在pH 8.0的缓冲液中提供,所述缓冲液包含200mM NaCl、5mM Tris-HCl、11mM MgCl₂和1mM EDTA。基于缀合反应中使用的瓦片的量来计算mTz修饰的蛋白质的量。根据等式(1)计算向缀合反应中添加的蛋白质的体积:

$$[0513] \quad y = (xC_x wz) / C_y \quad (1)$$

[0514] 其中 y =mTz官能化蛋白质的总体积(μ l)

[0515] x =DNA折纸的总体积(μ l)

[0516] C_x =DNA折纸的浓度(μ M)

[0517] C_y =mTz官能化蛋白质的浓度(μ M)

[0518] w =蛋白质与TCO的摩尔当量

[0519] z =每个DNA折纸分子的TCO部分数量

[0520] 根据等式(1)中计算的量,组合mTz官能化蛋白质和TCO-DNA折纸的体积。如果反应混合物中mTz官能化蛋白质的体积超过总体积($x+y$)的10%,则必须添加另外的MgCl₂以维持反应混合物的镁浓度。如果需要,则在以根据等式(2)的浓度添加DNA折纸之前,应向蛋白质中添加1 μ l MgCl₂:

$$[0521] \quad C_M = 12.4y + 12.4 \quad (2)$$

[0522] 其中 C_M =MgCl₂的浓度(mM)

[0523] 将反应混合物轻轻混合,然后置于25°C的热混合仪或热循环仪上。将反应管加套以防止暴露在光下。将具有10倍或更高过量蛋白质的反应物孵育5小时或更长时间。将少于10倍蛋白质过量的反应物孵育16小时或更长时间,以确保mTz与TCO完全反应。

[0524] 在Agilent 1100HPLC上用Agilent Bio-SEC5 4.6x 300mm柱纯化蛋白质缀合物。HPLC溶剂是过滤的200mM NaCl、5mM Tris-HCl、11mM MgCl₂和1mM EDTA,pH 8.0。HPLC以0.3ml/min的等度流速运行25分钟。在运行的5min与13min之间以30s的间隔收集级分。含DNA级分的检测在260nm波长下进行,合并含DNA级分。将合并的含DNA级分浓缩至总体积约100 μ l。

[0525] 实施例2.蛋白质缀合物的分析

[0526] 通过mTz-TCO缀合化学形成蛋白质A、麦芽糖结合蛋白(MBP)和泛素的蛋白质缀合物。用含有单TCO部分的DNA折纸形成蛋白质缀合物。将单TCO DNA折纸与上述三种蛋白质的荧光标记版本缀合。用Alexa-Fluor 647荧光染料标记蛋白质A。用Alexa-Fluor 488荧光染料标记MBP。用四甲基罗丹明(约555nm波长)标记泛素。使用mTz官能化的蛋白质和不含TCO部分的DNA折纸进行对照反应。

[0527] 在Agilent 1100HPLC上用Agilent Bio-SEC5 4.6x 300mm柱运行荧光标记的蛋白质缀合物。HPLC溶剂是过滤的200mM NaCl、5mM Tris-HCl、11mM MgCl₂和1mM EDTA,pH 8.0。HPLC以0.3ml/min的等度流速运行25分钟。HPLC在190nm与800nm之间的波长范围内监测光

吸收。260nm波长用于确定DNA的存在。视情况而定,488nm、553nm和652nm波长用于确定荧光标记的蛋白质的存在。

[0528] 图30A显示了蛋白质A缀合物的HPLC数据。上面的色谱图描绘了260nm数据,显示在11min左右洗脱出DNA折纸。下面的色谱图描绘了652nm数据,显示在11min左右洗脱出蛋白质,在15min左右后有過量的未缀合的蛋白质。图30B中所示的阴性对照数据显示,由于完成缀合的可用TCO,在11min时没有与DNA折纸一起洗脱出蛋白质(下面的色谱图)。

[0529] 图30C显示了MBP蛋白质缀合物的HPLC数据。下面的色谱图描绘了260nm数据,显示在11min左右洗脱出DNA折纸。上面的色谱图描绘了488nm数据,显示在11min左右洗脱出蛋白质,在15min左右后有過量的未缀合的蛋白质。图30D显示了泛素蛋白质缀合物的HPLC数据。上面的色谱图描绘了260nm数据,显示在11min左右洗脱出DNA折纸。下面的色谱图描绘了553nm数据,显示在11min左右洗脱出蛋白质,在15min左右后有過量的未缀合的蛋白质。

[0530] 实施例3:SNAP的沉积

[0531] 将包含5个瓦片DNA折纸的锚定基团沉积在玻璃基底上。图31中显示了5个瓦片折纸的基本结构的示意图。折纸复合物包含四个边缘瓦片3110,它们在杂交区域3140处连接到中心瓦片3120。中心瓦片3120包含反应性柄3130,其被配置为缀合官能化蛋白质。将DNA折纸用Alexa-Fluor 488染料标记,使它们可光学检测。玻璃基底是Nexterion D263 170 μ m厚的载玻片,其已经涂覆有均匀的(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)单层。

[0532] 在沉积锚定基团之前,将玻璃基底在含有5mM Tris-HCl-pH8.0、205mM NaCl、1mM EDTA和12.5mM MgCl₂的沉积缓冲溶液中孵育1小时。在含有5mM Tris-HCl-pH 8.0、205mM NaCl、1mM EDTA和12.5mM MgCl₂的沉积缓冲液中,将10 μ l的2ng/ μ l (91pM) 5个瓦片DNA折纸施加到玻璃基底上。将DNA折纸缓慢施加到玻璃基底上以防止剪切。将DNA折纸在基底上孵育10分钟。孵育之后,通过用含有1x Neoventures缓冲液(10mM HEPES、120mM NaCl、5mM MgCl₂和5mM KCl, pH 7.4)、0.1% Tween-20和0.001% Lipidure CM5206的缓冲液进行0.5ml洗涤,从基底上去除过量的DNA折纸。将另外的MgCl₂添加到洗涤缓冲液中,使总的MgCl₂浓度达到10mM。可以通过用488nm光激发标记的DNA折纸来对沉积的DNA折纸进行成像。

[0533] 实施例4.SNAP沉积条件

[0534] 研究了在不同沉积溶剂下的锚定基团沉积。将5个瓦片DNA折纸沉积在玻璃基底上。所使用的沉积缓冲液是:1) DNA折纸缓冲液(5mM Tris-HCl-pH 8.0、205mM NaCl、1mM EDTA和12.5mM MgCl₂);2) 添加了另外2.5M NaCl的DNA折纸缓冲液;和3) 含有0.01% Tween-20的DNA折纸缓冲液。根据实施例3中所描述的方法,将DNA折纸沉积在玻璃基底上。每种缓冲液用于沉积前孵育和沉积步骤。通过用O₂等离子体清洁Nexterion D263 170 μ m厚的载玻片(没有APTMS涂层),然后按照实施例3的沉积方法制备对照基底。将每个Nexterion D263载玻片连接到具有面向内的PEG 3-6表面涂层的第二载玻片上,以形成在每个通道的玻璃基底上具有沉积区域的3通道流动池。每个流动池的每个通道对应于三种测试的沉积缓冲液之一。对3种不同的流动池测试了在APTMS涂覆的基底上的沉积。对3种不同的流动池测试了在未涂覆的基底上的沉积。

[0535] 通过共焦扫描激光显微术在488nm下在30个位置对所有玻璃基底成像。通过图像分析软件对每个图像进行像素强度计数。对每个载片的30个图像系列中的像素强度计数进

行平均,以提供平均荧光强度。

[0536] 图32A和32B显示了对于APTMS涂覆的基底(图32A)和未涂覆的基底(图32B)在DNA折纸缓冲液下的DNA折纸沉积的共焦扫描图像结果。在涂覆的基底表面上的离散位置可以看到单个DNA折纸。在未涂覆的基底上明显有最小的沉积。图32C和32D显示了对于APTMS涂覆的基底(图32C)和未涂覆的基底(图32D)在具有2.5M NaCl的DNA折纸缓冲液下的DNA折纸沉积的共焦扫描图像结果。虽然与没有2.5M NaCl的DNA折纸缓冲液相比似乎发生了较少的沉积,但是在涂覆的基底表面上的离散位置可以看到单个DNA折纸。在未涂覆的基底上明显有最小的沉积。图32E和32F显示了对于APTMS涂覆的基底(图32E)和未涂覆的基底(图32F)在具有0.01% Tween-20的DNA折纸缓冲液下的DNA折纸沉积的共焦扫描图像结果。在涂覆的基底表面上的离散位置可以看到单个DNA折纸。在未涂覆的基底上没有明显的沉积。图33显示了在每个测试流动池的每种缓冲液下收集的图像的平均总锚定基团计数。左边数据系列显示了涂覆有APTMS的基底的结果。右边数据系列显示了未涂覆的基底的结果。DNA折纸显示用标准DNA折纸缓冲液或在高盐浓度或表面活性剂的存在下沉积在涂覆的基底上。在未涂覆的基底上观察到最小的DNA折纸沉积。在不同缓冲液组合物之间在基底上的总沉积的差异表明,溶剂组合物可以影响锚定基团在基底表面上的数量和密度。

[0537] 实施例5. 蛋白质缀合物的沉积

[0538] 根据实施例4中所描述的方法,将蛋白质缀合物沉积在涂覆有APTMS层的玻璃基底上。蛋白质缀合物包含通过共价甲基四嗪-反式环辛烯键与麦芽糖结合蛋白(MBP)缀合的5个瓦片DNA折纸。用Alexa-Fluor 647荧光团标记MBP蛋白质缀合物,以允许对蛋白质缀合物沉积的检测。在与实施例4中所描述的相同缓冲条件下(有或没有2.5M NaCl或0.01% Tween-20的DNA折纸缓冲液),观察到每种MBP蛋白质缀合物的沉积。在两个独立的流动池中测试了在DNA折纸缓冲液下MBP蛋白质缀合物的沉积。在三个独立的流动池中测试了在2.5M NaCl或0.01% Tween-20的存在下MBP蛋白质缀合物的沉积。作为阴性对照,还观察了与不含蛋白质缀合物的缓冲液一起孵育的流动池。

[0539] 图34A-34C显示了对于APTMS涂覆的基底在不同DNA折纸缓冲液组合物下的DNA折纸沉积的共焦扫描图像结果。图34A显示了在DNA折纸缓冲液中沉积的单个MBP蛋白质缀合物。图34B显示了在含有2.5M NaCl的DNA折纸缓冲液中沉积的单个MBP蛋白质缀合物。图34C显示了在含有0.01% Tween-20的DNA折纸缓冲液中沉积的单个MBP蛋白质缀合物。在每个APTMS涂覆的基底表面上的离散位置可以看到单个DNA折纸。图35显示了对于每个测试的流动池在每种缓冲液下收集的平均总蛋白质缀合物计数。数据在用蛋白质缀合物测试的流动池和不用蛋白质缀合物测试的流动池之间交替。最左边四个计数仅针对DNA折纸缓冲液。中间六个计数针对含有2.5M NaCl的DNA折纸缓冲液。最右边六个计数针对含有0.01% Tween-20的DNA折纸缓冲液。对于所有基底,观察到蛋白质缀合物在APTMS涂覆的玻璃基底上的沉积,其中在2.5M NaCl的存在下观察到稍低的计数并且在0.01% Tween-20的存在下观察到稍高的计数。在蛋白质缀合物形成之后,观察到锚定基团有效地沉积在APTMS涂覆的基底上。

[0540] 实施例6. 蛋白质缀合物的沉积

[0541] 将蛋白质缀合物沉积在包含正方形结合位点图案的图案化Nexterion D263玻璃芯片上。每个玻璃芯片的图案化区域包含具有超过1.9亿个结合位点的多肽结合区域。多肽

结合区域由12544个子网格图案化,每个子网格含有123x 123个正方形构型的结合位点(每个子网格有总共15129个结合位点)。玻璃芯片表面涂覆有一层APTMS。蛋白质缀合物包含通过共价甲基四嗪-反式环辛烯键与His标记的泛素(Ubi-His)缀合的5个瓦片DNA折纸。用Alexa-Fluor 488荧光团标记Ubi-His蛋白质缀合物的DNA折纸,以允许检测蛋白质缀合物沉积。将15 μ l 0.3nM蛋白质缀合物在DNA折纸缓冲液中在芯片上孵育10分钟,然后用40 μ l含有200mM HEPES、2.4M NaCl、100mM MgCl₂、100mM KCl、0.1% Tween-20和0.001% Lipidure CM5206 (pH7.4)的漂洗缓冲液漂洗。在漂洗之后,通过共焦激光扫描显微术在488nm下对玻璃芯片成像,以检测图案化玻璃表面上沉积的蛋白质缀合物。在初始成像之后,将芯片与封闭缓冲液一起孵育,所述封闭缓冲液含有与具有100mg/ml硫酸葡聚糖的漂洗缓冲液相同的组分。将芯片与40 μ l封闭缓冲液一起孵育60分钟,然后再次用40 μ l漂洗缓冲液漂洗。随后将芯片与25 μ l的用Alexa-Fluor 647nm荧光染料标记的B1适体(his标签亲和靶标)一起孵育。使用Thorlabs共焦激光扫描显微镜在647nm下对芯片成像。

[0542] 图21A显示沉积在图案化玻璃阵列上的DNA折纸-Ubi-His缀合物在488nm下的荧光显微术结果。观察到DNA折纸已经沉积在阵列上,几乎完全占据了结合位点。图21B显示用B1适体成像的相同沉积的Ubi-His缀合物在647nm下的成像(阳性对照)。当用his标签特异性标记的亲试剂成像时,再次观察到网格沉积图案,证实了DNA折纸和缀合的蛋白质的共定位。

[0543] 实施例7.SNAP合成和纯化

[0544] 通过将M13噬菌体基因组支架链与多个218种不同寡核苷酸组合来形成多个瓦片形状的SNAP,所述寡核苷酸包括被配置为与分析物偶联的多个TCO封端的寡核苷酸。将寡核苷酸在包含100mM MgCl₂的DNA折纸缓冲液中合并,并加热至95 $^{\circ}$ C。在加热之后,允许寡核苷酸缓慢冷却至20 $^{\circ}$ C,从而允许寡核苷酸退火成SNAP结构。在SNAP形成之后,在含有尺寸排阻色谱柱的HPLC系统上从过量的寡核苷酸中纯化SNAP。令人惊讶的是,发现聚糖特异性柱有效地纯化了所形成的SNAP,具有最少的残余寡核苷酸或其他不需要的组分。

[0545] 实施例8.SNAP合成和纯化

[0546] 经由实施例7中所描述的方法合成SNAP。合成的SNAP基本上是正方形DNA折纸结构,具有大约83纳米(nm)的边长。每个正方形SNAP包含65个具有悬垂柄的寡核苷酸,所述悬垂柄用于通过与悬垂基团的互补寡核苷酸缀合将另外的组分结合到SNAP上:1个用于将分析物与上展示面偶联的悬垂单链DNA柄、20个用于将SNAP偶联至表面的悬垂单链DNA柄、以及44个用于将可检测的荧光标记与SNAP的4个边缘偶联的悬垂单链DNA柄(每边11个)。使用CADNANO2软件设计所有寡核苷酸序列。

[0547] 表I含有SNAP寡核苷酸偶联区域的序列列表。SEQ. ID 1是被配置为与缀合至分析物的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。SEQ. ID 2是被配置为与缀合至固体支持物的表面的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。SEQ. ID 3是被配置为与缀合至荧光Alexa-FluorTM 488染料分子的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。

[0548] 表II含有用于形成具有20个悬垂表面连接部分的SNAP的217种订书钉寡核苷酸的序列列表。65个偶联寡核苷酸的悬垂区域以粗体文本突出显示。将表III中所列出的所有订书钉寡核苷酸与M13mp18单链噬菌体基因组DNA合并,以折叠DNA折纸结构。

[0549] 表II

SEQ. ID	寡核苷酸类型	5'-3' DNA 序列表
[0550] 1	分析物偶联	TTTCACTCACCTCCATCTCCACTCCTACC CA TCCA ACTCCCAC
2	表面偶联	TTTTACCATCTTCCTCTCCAC
3	标记偶联	TTTAACTACTCCC ACTCTCACCCTCACCC TA CTCCA ACTCAAC

[0551] 表III

SEQ. ID	5'-3' DNA 序列表
[0552] 4	TCATTTGCTAATAGTAGTAGCATT
5	CAACTAAAGTACGGTGGGATGGCT
6	CATTATTAGCAAAGAAGTTTTGC
7	ACCCTCATT CAGGGATAGCAAGCC
8	TTAGGATTAGCGGGGTGGAACCTA
9	AGGCCGGAACCAGAGCCACCACCG

[0553]

10	AGAATATCAGACGACGACAATAAA
11	TCATATGCGTTATACAAAGGCGTT
12	CGGGAGAATTTAATGGAAACAGTA
13	GCGCGTACTTTCCTCGTTAGAATC
14	AAAGCCGGCGAACGTGTGCCGTAA
15	AATTCCACGTTTTCGTATTGGGCG
16	TTAAGAGGGTCCAATACTGCGGATAGCGAG
17	AGGCTTTTCAGGTAGAAAGATTCAATTACC
18	TTATGCGATTGACAAGAACCGGAGGTCAAT
19	CATAAGGGGACACTAAAACACTCACATTA
20	CGGGTAAAATTCGGTCGCTGAGGAATGACA
21	GTCTCTGACACCCTCAGAGCCACATCAAAA
22	TCACCGGAAACGTCACCAATGAATTATTCA
23	TTAAAGGTACATATAAAAGAAACAAACGCA
24	ATAATAACTCAGAGAGATAACCCGAAGCGC
25	ATTAGACGGAGCGTCTTCCAGAGCTACAA
26	TATATAACGTAAATCGTCGCTATATTTGAA
27	TTACCTTTACAATAACGGATTCGCAAAATT
28	ATTTGCACCATTTTTCGGGAACAAATTTGAG
29	GATTTAGATTGCTGAACCTCAAAGTATTAA
30	CACCGCCTGAAAGCGTAAGAATACATTCTG
31	TGAGTGTTTCAGCTGATTGCCCTTGCGCGGG
32	GAGAGGCGACAACATACGAGCCGCTGCAGG
33	TCGACTCTGAAGGGCGATCGGTGCGGCCTC
34	AGGAAGATCATTAAATGTGAGCGTTTTTAA
35	CCAATAGGAACTAGCATGTCAAGGAGCAA
36	TAGAGCTTCAGACCGGAAGCAAACCTATTATA
37	GTCAGAAGATTGAATCCCCCTCAACCTCGTTT
38	AAATATTCCAAAGCGGATTGCATCGAGCTTCA
39	ACCAGACGGAATACCACATTCAACGAGATGGT
40	AGATTTAGACGATAAAAACCAAAAATCGTCAT
41	AGTCAGGACATAGGCTGGCTGACCTTTGAAAG
42	TTAATTTCCAACGTAACAAAGCTGTCCATGTT
43	GAGTAATCTTTTAAGAACTGGCTCCGGAACAA
44	ACCAAATAACTTTAATCATTGTGATCAGTTG
45	ACTTAGCCATTATACCAAGCGCGAGAGGACTA
46	AAAAGAATAACCGAACTGACCAACTTCATCAA
47	AAGACTTTGGCCGCTTTTTCGGGATTAAACAG
48	GAGTTAAATTCATGAGGAAGTTTCTCTTTGAC

[0554]

49	CTTGATACTGAAAATCTCCAAAAAAGCGGAGT
50	TTTCACGTCGATAGTTGCGCCGACCTTGCAGG
51	TTATTCTGACTGGTAATAAGTTTTAACAAATA
52	AATCCTCAACCAGAACCACCACCAGCCCCCTT
53	GAGCCGCCTTAAAGCCAGAATGGAGATGATAC
54	ATTAGCGTCCGTAATCAGTAGCGAATTGAGGG
55	GCCATTTGCAAACGTAGAAAATACCTGGCATG
56	AGGGAAGGATAAGTTTATTTTGTTCAGCCGAAC
57	AGGTGGCAGAATTATCACCGTCACCATTAGCA
58	AAAGTTACGCCCAATAATAAGAGCAGCCTTTA
59	CGCTAATAGGAATACCCAAAAGAAATACATAA
60	CAGAGAGAACAAAATAAACAGCCATTAAATCA
61	AGATTAGTATATAGAAGGCTTATCCAAGCCGT
62	CAAATCAGTGCTATTTTGCACCCAGCCTAATT
63	AAATAAGAACTTTTTCAAATATATCTGAGAGA
64	CTACCTTTAGAATCCTTGAAAACAAGAAAACA
65	TTTCCCTTTTAACCTCCGGCTTAGCAAAGAAC
66	AAATTAATACCAAGTTACAAAATCCTGAATAA
67	CTTTGAATTACATTTAACAATTTCTAATTAAT
68	GTAGATTTGTTATTAATTTTAAAAACAATTC
69	TGGAAGGGAGCGGAATTATCATCAACTAATAG
70	AACATTATGTAAAACAGAAATAAATTTTACAT
71	CCAGAAGGTTAGAACCTACCATATCCTGATTG
72	ATTAGAGCAATATCTGGTCAGTTGCAGCAGAA
73	GCATCACCAGTATTAGACTTTACAGTTTGAGT
74	CCTCAATCCGTCAATAGATAATACAGAAACCA
75	GATAAACTTTTTGAATGGCTATTTTCACCAG
76	AGACAATAAGAGGTTGAGGCGGTCATATCAAAC
77	TCACACGATGCAACAGGAAAAACGGAAGAACT
78	CCAGCCATCCAGTAATAAAAGGGACGTGGCAC
79	AGCACTAAAAGGGCGAAAAACCGAAATCCCT
80	TATAAATCGAGAGTTGCAGCAAGCGTCGTGCC
81	GGCCCTGAAAAAGAATAGCCCGAGCGTGGACT
82	AGCTGCATAGCCTGGGGTGCCTAAGTAAAACG
83	AAGTGTAATAATGAATCGGCCAACCACCGCCT
84	GAATTCGTGCCATTCGCCATTCAGTTCCGGCA
85	ACGGCCAGTACGCCAGCTGGCGAACATCTGCC
86	ACTGTTGGAGAGGATCCCCGGGTACCGCTCAC
87	TTCGCTATTGCCAAGCTTGCATGCGAAGCATA

[0555]

88	AGTTTGAGATTCTCCGTGGGAACAATTCGCAT
89	TTCATCAACGCACTCCAGCCAGCTGCTGCGCA
90	CCCGTCGGGGGACGACGACAGTATCGGGCCTC
91	TAAATTTTTGATAATCAGAAAAGCACAAAGGC
92	ACCCCGGTTGTTAAATCAGCTCATAGTAACAA
93	TATCAGGTAAATCACCATCAATATCAATGCCT
94	AGACAGTCCATTGCCTGAGAGTCTTCATATGT
95	GACGGAAAACCATCGATAGCAGCATTGCCATCTTT CATAACCCTCA
96	TGCCAGTTATAACATAAAAACAGGACAAGAATTGA GTTAACAGAAGGA
97	TGCCACTACTTTTTTTGCCACCCTC
98	AACTGAACATTTTTTTTGAATAACC
99	GCCACGCTGTTTTTTTACCAGTGAG
100	CAAAAATAATTTTTTTTGTTTAGAC
101	GATACATTCGCTTTTTTGACCCTGTAAT
102	ACCGTACTCAGGTTTTTGATCTAAAGTTT
103	AACATGTAATTTTTTTTGAACCAATCAA
104	GCGTAACCACCATTTTTTGAGTAAAAGAGT
105	CAGAGGGGGTTTTGCCTTCCTGTAGCCAGCT
106	GAACCGCCTCTTACCTAAAACGAAAGAGGC
107	CATAAATCAATTTAGTCAGAGGGTAATTGAG
108	CCAGGGTGGTTTTGCAAATGAAAAATCTAAA
109	ACAACCATTTTTTCATACATGGCTTTTAAGCGCA
110	TTTTATCTTTTTATCCAATCGCAAGAGTTGGGT
111	GCCAACATTTTTTCCACTATTAAAGAAATAGGGT
112	ACAAGAGTTTTTTTCGCGTTTTAATTCAAAAAGA
113	TGGATAGCAAGCCCGATTTTTAATCGTAAACGCCAT
114	AGAACCGCATTACCGTTTTACCGATATATACGTAA
115	TTGCTTCTTATATGTATTTTACGCTAACGGAGAATT
116	ACGGGCAAGTTCAGTTTTTTCTGACCTGCAACAGT
117	GAGAATAGAAAGGAACA ACTATTTTCTCAAGAGAA GGA
118	TTTTATTTTCATCGTAGGAATTTTTAGCCTGTTTAGT A
119	CAAACATCGGCCTTGCTGGTTTTTTGAGCTTGACGG GG
120	GAGTAATGTGTAGGTAAAGATTTTTTTGTTTTAAATA TG
121	AGGACAGATGATTTTTTTCACCAGTAGCACCATTACC

[0556]

	GACTTGA
122	ATTAAGACTCCTTTTTTAATATACAGTAACAGTACCG AAATTGC
123	GACAACTCGTATTTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCC GAGCTC
124	CCGCTTCTGGTTTTTTCGTTAATAAAACGAACTAAA TTATAACC
125	TGTCGTCTCAGCCCTCATATTTTTTTCGCCACCCTCA GGTGTATC
126	TAATCGGCCATCCTAATTTTTTTTTTTTTTCGAGCCA ACAACGCC
127	CTGTCCATTTTTATAATCATTTTTTCTTAATGCGCC CACGCTGC
128	ACTTTTGCATCGGTTGTACTTTTTTTAACCTGTTTAG GACCATTA
129	AAGCGAACAATTGCTGAATATAATGCTGTATTTTTT TGTGAGAAAGGCCGG
130	AGGAGTGTAACATGAAAGTATTAAGAGGCTTTTTT TGCGAATAATAATTT
131	GCGAGAAAATAAACACCGGAATCATAATTATTTTTT TCGCCCAATAGCAAG
132	CCAACGTCATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCTTTTTT TGAACAATATTACCG
133	GGAATTAGAGCTTTTTTTTCAGACCAGGCGCGTTGG GAAGATTTTTTTCCAGGCAAAGC
134	AATCATGGTCATTTTTTTTTTTGCCCCGAACCTCAGGTT TAACTTTTTTTTCAGTATGTTAG
135	TTTCATTGAGTAGATTTAGTTTCTATATTT
136	AACAGTTAGGTCTTTACCCTGATCCAACAG
137	GTGAATATAGTAAATTGGGCTTTAATGCAG
138	CTCAGCAGGCTACAGAGGCTTTAACAAAGT
139	GTTAGTAACTTTCAACAGTTTCAAAGGCTC
140	GTACCAGGTATAGCCCGGAATAGAACCGCC
141	GCCAGCAGCCTTGATATTCACAAACGGGGT
142	TAGAAAAGGCGACATTCAACCGCAGAATCA
143	ATCCCAAAAAAATGAAAATAGCAAGAAACA
144	CTTATCACTCATCGAGAACAAGCGGTATTC
145	CCAGTATGAATCGCCATATTTAGTAATAAG
146	GCTTAGAATCAAATCATAGGTTTTAGTTA
147	ATTATCAGTTTGGATTATACTTGCGCAGAG

148	ATGCGCGTACCGAACGAACCACGCAAATCA
149	TTAACCGTCACTTGCCTGAGTACTCATGGA
150	GGAAGGGGGCAAGTGTAGCGGTGCTACAGG
151	CTGGTTTGTTCGAAATCGGCATCTATCAG
152	GTGCTGCCCCAGTCACGACGTTTGAGTGAG
153	CAGGAAGTAATATTTTGTAAAAACGGCGG
154	CCTTTATCATATATTTTAAATGGATATTCA
155	CCCAGCGGGAACGAGGCGCAGACTATTCATT
分析物结合寡核苷酸	
156	AACCGAGGGCAAAGACACCACGGATAAATATTTT CACTCACCTCCATCTCCACTCCTACCCATCCAAC TCCCAC
表面结合寡核苷酸	
157	GTCAGGAAGAGGTCAATTTTGCTCTGGAAGTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
158	ATACATAACAACACTATCATAACATGCTTTATTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
159	ACAACGGAAATCCGCGACCTGCCTCATTCAATTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
[0557] 160	CAAAGGTTTCGAGGTGAATTTCTCGTCACCTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
161	ATTTTCATGACCGTGTGATAAATAATTCTTATTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
162	GCGAATTATGAAACAAACATCATAGCGATATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
163	ACAGTTGTTAGGAGCACTAACATATTCCTGTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
164	AATACCTATTTACATTGGCAGAAGTCTTTATTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
165	CCATGTACCGTAACACTGTAGCATTCCACAGATTCC AGACTTTTACCATCTTCCTCTCCAC
166	CTAAACAGGAGGCCGATAATCCTGAGAAGTGTCAC GCAAATTTTACCATCTTCCTCTCCAC
167	CAGTGCCCCCTGCCTATTTCTTTGCTCATTTTACC ATCTTCCTCTCCAC
168	AGTTTGCGCATTTTTCGGTCATAGAGCCGCCTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
169	ATGAAATGAAAAGTAAGCAGATACAATCAATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC

[0558]

170	TAAGAACGGAGGTTTTGAAGCCTATTATTTTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
171	GGCGATGTTTTTGGGGTCGAGGGCGAGAAATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
172	CTAACTCCCAGTCGGGAAACCTGGTCCACGTTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
173	ATTGACCCGCATCGTAACCGTGAGGGGGATTTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
174	ACCGTTCATTTTTGAGAGATCTCCCAAAAATTTTAC CATCTTCCTCTCCAC
175	AGCTAATGCAGAACGCGAGAAAAATAATATCCTGT CTTTCTTTTACCATCTTCCTCTCCAC
176	AATCATACAGGCAAGGCAGAGCATAAAGCTAAGGG AGAAGTTTACCATCTTCCTCTCCAC
标记结合寡核苷酸	
177	TTTGGTGGCATCAATTCTAGGGCGCGAGCTGAAAAT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
178	TTTTCCAATTCTGCGAACCCATATAACAGTTGATT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
179	TTTATTGCTCCTTTTGATATTAGAGAGTACCTTTATT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA ACTCAAC
180	TTTCCATAAATCAAAAATCCAGAAAACGAGAATGA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTC CAACTCAAC
181	TTTCGAGGCATAGTAAGAGACGCCAAAAGGAATTA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTC CAACTCAAC
182	TTTGAAACACCAGAACGAGAGGCTTGCCCTGACGA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTC CAACTCAAC
183	TTTCTGATAAATTGTGTCGAGATTTGTATCATCGCTT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA ACTCAAC
184	TTTGAACGAGGGTAGCAACGCGAAAGACAGCATCG TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTC CAACTCAAC
185	TTTGGTTTATCAGCTTGCTAGCCTTTAATTGTATCTT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA

[0559]

	ACTCAAC
186	TTTGGGATTTTGCTAAACAAATGAATTTTCTGTATTT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCCA ACTCAAC
187	TTTACAAACTACAACGCCTGAGTTTCGTCACCAGTT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
188	TTTAGCCACCACCCTCATTGAACCGCCACCCTCAGT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
189	TTTGAGAGGGTTGATATAAGCGGATAAGTGCCGTCT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
190	TTTGTATAAACAGTTAATGTTGAGTAACAGTGCCCT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
191	TTTGCAGGTCAGACGATTGTTGACAGGAGGTTGAGT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
192	TTTTAGCGCGTTTTTCATCGCTTTAGCGTCAGACTGTT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCCA ACTCAAC
193	TTTGCGCCAAAGACAAAAGTTCATATGGTTTACCAT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
194	TTTCCGAAGCCCTTTTTAAAGCAATAGCTATCTTAT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
195	TTTTTTTTTTGTTTAAACGTCTCCAAATAAGAAACGATT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCCA ACTCAAC
196	TTTAACTCCCCTGACTTGCAGGCGAGGCGTTTTAGCGT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
197	TTTTAAACCAAGTACCGCATTCCAAGAACGGGTATT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC
198	TTTAGATAAGTCCTGAACACCTGTTTATCAACAATT TAACTACTCCCCTCTCACCTCACCTACTCC AACTCAAC

[0560]

199	TTTGTAAGTAATTCTGTCAAAGTACCGACAAAAGT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
200	TTTAGTAGGGCTTAATTGAAAAGCCAACGCTCAACT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
201	TTTAATGGTTTGAATACCCTTCTGACCTAAATTTT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA ACTCAAC
202	TTTAGTCAATAGTGAATTTTAAAGACGCTGAGAAGT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
203	TTTTGAGCAAAAAGAAGATGATTCATTTCAATTACCT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
204	TTTCAATATAATCCTGATTGATGATGGCAATTCATT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
205	TTTGTTATCTAAAATATCTAAAGGAATTGAGGAAGT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
206	TTTACATCGCCATTAAAAAAACTGATAGCCCTAAAT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
207	TTTTCGTCTGAAATGGATTACATTTTGACGCTCAAT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
208	TTTTTGATTAGTAATAACATTGTAGCAATACTTCTTT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA ACTCAAC
209	TTTAGGAACGGTACGCCAGTAAAGGGATTTTAGACT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
210	TTTGAGCACGTATAACGTGCTATGGTTGCTTTGACT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
211	TTTCGGGCGCTAGGGCGCTAAGAAAGCGAAAGGAG TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTC CAACTCAAC
212	TTTATCACCCAAATCAAGTGCCCACTACGTGAACCT TTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC

[0561]	213	TTTATCCTGTTTGATGGTGGCCCCAGCAGGCGAAAT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	214	TTTGCTCACTGCCCGCTTTACATTAATTGCGTTGCTT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCCA ACTCAAC
	215	TTTGTAACGCCAGGGTTTTAAGGCGATTAAGTTGGT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	216	TTTCGTTGGTGTAGATGGGGTAATGGGATAGGTCAT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	217	TTTTTTAAATTGTAAACGTATTGTATAAGCAAATAT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	218	TTTGCCGGAGAGGGTAGCTTAGCTGATAAATTAATT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	219	TTTAAATTTT TAGAACCTTTCAACGCAAGGATAAT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC
	220	TTTTAAGCAATAAAGCCTCAAAGAATTAGCAAATT TAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACTCC AACTCAAC

[0562] 实施例9. SNAP合成和纯化

[0563] 通过实施例7中所描述的方法合成SNAP。合成的SNAP被设计成具有大约83纳米(nm)边长的基本上正方形的DNA折纸结构。每个正方形SNAP包含109个具有悬垂柄的寡核苷酸,所述悬垂柄用于通过与悬垂基团的互补寡核苷酸缀合将另外的组分结合到SNAP上:1个用于将分析物与上展示面偶联的悬垂单链DNA柄、64个用于将SNAP偶联至表面的悬垂单链DNA柄、以及44个用于将可检测的荧光标记与SNAP的4个边缘偶联的离散的悬垂单链DNA柄(每边11个)。使用CADNAN02软件设计所有寡核苷酸序列。

[0564] 表I含有SNAP寡核苷酸偶联区域的序列列表。SEQ. ID 1是被配置为与缀合至分析物的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。SEQ. ID 2是被配置为与缀合至固体支持物的表面的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。SEQ. ID 3是被配置为与缀合至荧光Alexa-Fluor™ 488染料分子的互补寡核苷酸偶联的寡核苷酸的偶联区域的序列列表。表II中所列出的序列各自被设计为排除核苷酸鸟苷,从而避免自身互补性的可能性(即,形成二级结构)。预期如果不存在二级结构,在环境温度(例如,约20°)下,悬垂单链DNA表面相互作用部分(例如,SEQ ID 2)将更有可能与互补的表面连接的寡核苷酸结合。

[0565] 表III含有用于形成具有64个悬垂表面连接部分的SNAP的217种订书钉寡核苷酸的序列列表。65个偶联寡核苷酸的悬垂区域以粗体文本突出显示。将表IV中所列出的所有订书钉寡核苷酸与M13mp18单链噬菌体基因组DNA组合,以折叠DNA折纸结构。

[0566] 表IV

[0567]

SEQ. ID	5'-3' DNA 序列表
221	TCATTTGCTAATAGTAGTAGCATT
222	TTTCATTGAGTAGATTTAGTTTCTATATTT
223	AACAGTTAGGTCTTTACCCTGATCCAACAG
224	TAGAGCTTCAGACCGGAAGCAAACCTATTATA
225	AGATTTAGACGATAAAAACCAAAAATCGTCAT
226	CATTATTAGCAAAAGAAGTTTTGC
227	GTGAATATAGTAAATTGGGCTTTAATGCAG
228	AGGCTTTTCAGGTAGAAAGATTCAATTACC
229	ACCAGACGGAATACCACATTCAACGAGATGGT
230	AAAAGAATAACCGAACTGACCAACTTCATCAA
231	CCCCAGCGGGAACGAGGCGCAGACTATTCATT
232	CTCAGCAGGCTACAGAGGCTTTAACAAAGT
233	CATAAGGGACACTAAAACACTCACATTA
234	ACTTAGCCATTATACCAAGCGCGAGAGGACTA
235	TTTCACGTCGATAGTTGCGCCGACCTTGCAGG
236	CGGGTAAAATTCGGTCGCTGAGGAATGACA
237	GTTAGTAACTTTCAACAGTTTCAAAGGCTC
238	CTTGATACTGAAAATCTCCAAAAAAGCGGAGT
239	ACCCTCATTCAGGGATAGCAAGCC
240	GTACCAGGTATAGCCCGGAATAGAACCGCC

[0568]

241	GCCAGCAGCCTTGATATTCACAAACGGGGT
242	TTATTCTGACTGGTAATAAGTTTTAACAAATA
243	GACGGAAAACCATCGATAGCAGCATTGCCATCTT TTCATACACCCTCA
244	AGGCCGGAACCAGAGCCACCACCG
245	TAGAAAAGGCGACATTCAACCGCAGAATCA
246	TCACCGGAAACGTCACCAATGAATTATTCA
247	ATTAGCGTCCGTAATCAGTAGCGAATTGAGGG
248	CGCTAATAGGAATACCCAAAAGAAATACATAA
249	TGCCAGTTATAACATAAAAACAGGACAAGAATTG AGTTAACAGAAGGA
250	ATCCCAAAAAAATGAAAATAGCAAGAAACA
251	ATAATAACTCAGAGAGATAACCCGAAGCGC
252	AAAGTTACGCCAATAATAAGAGCAGCCTTTA
253	ATTAGACGGAGCGTCTTTCCAGAGCTACAA
254	CTTATCACTCATCGAGAACAAGCGGTATTC
255	AGATTAGTATATAGAAGGCTTATCCAAGCCGT
256	AGAATATCAGACGACGACAATAAA
257	CCAGTATGAATCGCCATATTTAGTAATAAG
258	GCTTAGAATCAAATCATAGGTTTTAGTTA
259	CTTTGAATTACATTTAACAATTTCTAATTAAT
260	CGGGAGAATTTAATGGAAACAGTA
261	CTACCTTTAGAATCCTTGAAAACAAGAAAACA
262	ATTATCAGTTTGGATTATACTTGCGCAGAG
263	TTACCTTTACAATAACGGATTCGCAAAATT
264	GCATCACCAGTATTAGACTTTACAGTTTGAGT
265	CCTCAATCCGTCAATAGATAATACAGAAACCA
266	TGGAAGGGAGCGGAATTATCATCAACTAATAG
267	AGACAATAAGAGGTGAGGCGGTCATATCAAAC
268	ATGCGCGTACCGAACGAACCACGCAAATCA
269	GATTTAGATTGCTGAACCTCAAAGTATTAA
270	CACCGCCTGAAAGCGTAAGAATACATTCTG
271	GATAAACTTTTTGAATGGCTATTTTCACCAG
272	TTAACCGTCACTTGCCCTGAGTACTCATGGA
273	GCGCGTACTTTCCTCGTTAGAATC
274	GGAAGGGGGCAAGTGTAGCGGTGCTACAGG
275	CTGGTTTGTTCGAAATCGGCATCTATCAG
276	AGCACTAAAAGGGCGAAAAACCGAAATCCCT
277	AAGTGTAATAATGAATCGGCCAACCACCGCCT
278	AATTCCACGTTTGCCTATTGGGCG
279	GTGCTGCCCCAGTCACGACGTTTGAGTGAG
280	GAGAGGCGACAACATACGAGCCGCTGCAGG

[0569]

281	AGCTGCATAGCCTGGGGTGCCTAAGTAAAACG
282	TTCATCAACGCACTCCAGCCAGCTGCTGCGCA
283	CCCGTCGGGGGACGACGACAGTATCGGGCCTC
284	CAGGAAGTAATATTTTGTAAAAACGGCGG
285	AGGAAGATCATTAAATGTGAGCGTTTTTAA
286	AGTTTGAGATTCTCCGTGGGAACAATTTCGCAT
287	AGACAGTCCATTGCCTGAGAGTCTTCATATGT
288	CCAATAGGAACTAGCATGTCAAGGAGCAA
289	CCTTTATCATATATTTTAAATGGATATTCA
290	TATCAGGTAAATCACCATCAATATCAATGCCT
291	ACTTTTGCATCGGTTGTACTTTTTTTAACCTGTTA GGACCATTA
292	GAGTAATGTGTAGGTAAAGATTTTTTGTTTTAAAT ATG
293	ACAAGAGTTTTTTTCGCGTTTTAATTCAAAAAGA
294	CAAAAATAATTTTTTTTGTTTAGAC
295	CCGCTTCTGGTTTTTTTCGTTAATAAAACGAACTAA ATTATACC
296	GAACCGCCTCTTACCTAAAACGAAAGAGGC
297	AGAACCGCATTTACCGTTTTACCGATATATACGTA A
298	AGGAGTGTAACATGAAAGTATTAAGAGGCTTTT TTTGCGAATAATAATTT
299	ACCGTACTCAGGTTTTTGTATCTAAAGTTT
300	TGTCGTCTCAGCCCTCATATTTTTTTTCGCCACCCTC AGGTGTATC
301	GAGAATAGAAAGGAACAACACTATTTTCTCAAGAGA AGGA
302	ACAACCATTTTTTCATACATGGCTTTTAAGCGCA
303	TGCCACTACTTTTTTTGCCACCCTC
304	AGGACAGATGATTTTTTTCACCAGTAGCACCATTA CCGACTTGA
305	AATCATGGTCATTTTTTTTTTTGCCCCGAACTCAGG TTAACTTTTTTTTCAGTATGTTAG
306	CATAAATCAATTTAGTCAGAGGGTAATTGAG
307	TTGCTTCTTATATGTATTTTACGCTAACGGAGAAT T
308	GCGAGAAAATAAACACCGGAATCATAATTATTTT TTTCGCCCAATAGCAAG
309	AACATGTAATTTTTTTTGAACCAATCAA
310	TAATCGGCCATCCTAATTTTTTTTTTTTTTCGAGCC ACAACGCC

[0570]

311	TTTTATTTTCATCGTAGGAATTTTGTAGCCTGTTTAG TA
312	TTTTATCTTTTTTATCCAATCGCAAGAGTTGGGT
313	AACTGAACATTTTTTTTTGAATAACC
314	ATTAAGACTCCTTTTTAATATACAGTAACAGTACC GAAATTGC
315	CCAGGGTGGTTTTTGCAAATGAAAAATCTAAA
316	ACGGGCAAGTTCAGTTTTTTCTGACCTGCAACAG T
317	CCAACGTCATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCTTTT TTTGAACAATATTACCG
318	GCGTAACCACCATTTTTTGAGTAAAAGAGT
319	CTGTCCATTTTTATAATCATTTTTTTCTTAATGCGC CCACGCTGC
320	CAAACATCGGCCTTGCTGGTTTTTTGAGCTTGACG GGG
321	GCCAACATTTTTTCCACTATTAAGAAATAGGGT
322	GCCACGCTGTTTTTTTACCAGTGAG
323	GACAACCTCGTATTTTTTCTGTGTGAAATTGTTAT CCGAGCTC
324	GGAATTAGAGCTTTTTTTTTCAGACCAGGCGCGTTG GGAAGATTTTTTTTCCAGGCAAAGC
325	CAGAGGGGGTTTTGCCTTCCTGTAGCCAGCT
326	TGGATAGCAAGCCCGATTTTTAATCGTAAACGCC AT
327	AAGCGAACAATTGCTGAATATAATGCTGTATTTTT TTGTGAGAAAGGCCGG
328	GATACATTCGCTTTTTTTGACCCTGTAAT
分析物结合寡核苷酸	
329	AACCGAGGGCAAAGACACCACGGATAAATATTTT TCACTCACCTCCATCTCCACTCCTACCCATCCA ACTCCCAC
表面结合寡核苷酸	
330	GTCAGGAAGAGGTCATTTTTTGCTCTGGAAGTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
331	CAACTAAAGTACGGTGGGATGGCTTTTTACCATC TTCCTCTCCAC
332	AAATATTCCAAAGCGGATTGCATCGAGCTTCATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
333	ATACATAACAACACTATCATAACATGCTTTATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
334	TTAAGAGGGTCCAATACTGCGGATAGCGAGTTTT

[0571]

	ACCATCTTCCTCTCCAC
335	GTCAGAAGATTGAATCCCCCTCAACCTCGTTTTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
336	GAGTAATCTTTTAAGAACTGGCTCCGGAACAATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
337	ACCCAAATAACTTTAATCATTGTGATCAGTTGTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
338	ACAACGGAAATCCGCGACCTGCCTCATTCATTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
339	AGTCAGGACATAGGCTGGCTGACCTTTGAAAGTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
340	TTATGCGATTGACAAGAACCGGAGGTCAATTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
341	TTAATTTCCAACGTAACAAAGCTGTCCATGTTTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
342	GAGTTAAATTCATGAGGAAGTTTCTCTTTGACTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
343	CAAAAGGTTTCGAGGTGAATTTCTCGTCACCTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
344	AAGACTTTGGCCGCTTTTGCGGGATTAAACAGTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
345	CCATGTACCGTAACACTGTAGCATTCCACAGATTC CAGACTTTTACCATCTTCCTCTCCAC
346	CAGTGCCCCCTGCCTATTTCTTTGCTCATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
347	TTAGGATTAGCGGGGTGGAACCTATTTTACCATC TTCTCTCCAC
348	GAGCCGCCTTAAAGCCAGAATGGAGATGATACTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
349	AGTTTGCGCATTTTTCGGTCATAGAGCCGCCTTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
350	GTCTCTGACACCCTCAGAGCCACATCAAATTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
351	AATCCTCAACCAGAACCACCACCAGCCCCCTTTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
352	AGGTGGCAGAATTATCACCGTCACCATTAGCATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
353	ATGAAATGAAAAGTAAGCAGATACAATCAATTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
354	GCCATTTGCAAACGTAGAAAATACCTGGCATGTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
355	TTAAAGGTACATATAAAAGAAACAAACGCATTTT

[0572]

	ACCATCTTCCTCTCCAC
356	AGGGAAGGATAAGTTTATTTTGTTCAGCCGAAGTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
357	CAAATCAGTGCTATTTTGCACCCAGCCTAATTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
358	TAAGAACGGAGGTTTTGAAGCCTATTATTTTTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
359	CAGAGAGAACAAAATAAACAGCCATTAAATCATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
360	AGCTAATGCAGAACGCGAGAAAAATAATATCCTG TCTTCTTTTACCATCTTCCTCTCCAC
361	ATTCATGACCGTGTGATAAATAATTCTTATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
362	TCATATGCGTTATACAAAGGCGTTTTTTACCATC TTCCTCTCCAC
363	TTCCCTTTTAACCTCCGGCTTAGCAAAGAACTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
364	AAATAAGAAGCTTTTTCAAATATATCTGAGAGATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
365	GCGAATTATGAAACAAACATCATAGCGATATTT ACCATCTTCCTCTCCAC
366	TATATAACGTAAATCGTCGCTATATTTGAATTTA CCATCTTCCTCTCCAC
367	AACATTATGTAAAACAGAAATAAATTTTACATTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
368	CCAGAAGGTTAGAACCTACCATATCCTGATTGTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
369	AAATTAATACCAAGTTACAAAATCCTGAATAATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
370	ACAGTTGTTAGGAGCACTAACATATTCCTGTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
371	GTAGATTTGTTATTAATTTTAAAAACAATTCTTT TACCATCTTCCTCTCCAC
372	ATTTGCACCATTTTGCAGGAAACAAATTTGAGTTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
373	ATTAGAGCAATATCTGGTCAGTTGCAGCAGAATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
374	CCAGCCATCCAGTAATAAAAAGGGACGTGGCACTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
375	AATACCTATTTACATTGGCAGAAGTCTTTATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
376	TCACACGATGCAACAGGAAAAACGGAAGAACTT

[0573]

	TTTACCATCTTCCTCTCCAC
377	CTAAACAGGAGGCCGATAATCCTGAGAAGTGTCA CGCAAATTTTACCATCTTCCTCTCCAC
378	GGCGATGTTTTTGGGGTCGAGGGCGAGAAATTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
379	AAAGCCGGCGAACGTGTGCCGTAATTTTACCATC TTCCTCTCCAC
380	GGCCCTGAAAAAGAATAGCCCGAGCGTGGACTTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
381	CTAACTCCCAGTCGGGAAACCTGGTCCACGTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
382	TGAGTGTTTACGCTGATTGCCCTTGCGCGGGTTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
383	TATAAATCGAGAGTTGCAGCAAGCGTCGTGCCTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
384	ACTGTTGGAGAGGATCCCCGGGTACCGCTCACTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
385	TTCGCTATTGCCAAGCTTGCATGCGAAGCATATTT TACCATCTTCCTCTCCAC
386	ATTGACCCGCATCGTAACCGTGAGGGGGATTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
387	GAATTCGTGCCATTCGCCATTCAGTTCCGGCATT TACCATCTTCCTCTCCAC
388	TCGACTCTGAAGGGCGATCGGTGCGGCCTTTTT ACCATCTTCCTCTCCAC
389	ACGGCCAGTACGCCAGCTGGCGAACATCTGCCTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
390	ACCCCGGTTGTTAAATCAGCTCATAGTAACAATT TTACCATCTTCCTCTCCAC
391	ACCGTTCATTTTTGAGAGATCTCCCAAAAATTTTA CCATCTTCCTCTCCAC
392	TAAATTTTTGATAATCAGAAAAGCACAAAGGCTT TTACCATCTTCCTCTCCAC
393	AATCATACAGGCAAGGCAGAGCATAAAGCTAAG GGAGAAGTTTTACCATCTTCCTCTCCAC
标记结合寡核苷酸	
394	TTTGGTGGCATCAATTCTAGGGCGCGAGCTGAAA ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
395	TTTTCCCAATTCTGCGAACCCATATAACAGTTGAT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC

[0574]

396	TTTATTGCTCCTTTTGATATTAGAGAGTACCTTTA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
397	TTTCCATAAATCAAAAATCCAGAAAACGAGAATG ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
398	TTTCGAGGCATAGTAAGAGACGCCAAAAGGAATT ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
399	TTTGAAACACCAGAACGAGAGGCTTGCCCTGACG ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
400	TTTCTGATAAATTGTGTCGAGATTTGTATCATCGC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
401	TTTGAACGAGGGTAGCAACGCGAAAGACAGCATC GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
402	TTTGGTTTATCAGCTTGCTAGCCTTTAATTGTATC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
403	TTTGGGATTTTGCTAAACAAATGAATTTTCTGTAT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
404	TTTACAAACTACAACGCCTGAGTTTCGTCACCAGT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
405	TTTAGCCACCACCCTCATTGAACCGCCACCCTCAG TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
406	TTTGAGAGGGTTGATATAAGCGGATAAGTGCCGT CTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
407	TTTGTATAAACAGTTAATGTTGAGTAACAGTGCCC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC
408	TTTGCAGGTCAGACGATTGTTGACAGGAGGTTGA GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACCTCAAC
409	TTTTAGCGCGTTTTTCATCGCTTTAGCGTCAGACTG TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACCTCAAC

[0575]

410	TTTGCGCCAAAGACAAAAGTTCATATGGTTTACC ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
411	TTTCCGAAGCCCTTTTTAAAGCAATAGCTATCTTA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
412	TTTTTTTTTGTTTAACGTCTCCAAATAAGAAACGA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
413	TTTAACTCTCCGACTTGCGGCGAGGCGTTTTAGCG TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
414	TTTTAAACCAAGTACCGCATTCCAAGAACGGGTA TTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
415	TTTAGATAAGTCCTGAACACCTGTTTATCAACAAT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
416	TTTGTAAGTAATTCTGTCAAAGTACCGACAAAA GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
417	TTTAGTAGGGCTTAATTGAAAAGCCAACGCTCAA CTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
418	TTTAATGGTTTGAAATACCCTTCTGACCTAAATTT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
419	TTTAGTCAATAGTGAATTTTTAAGACGCTGAGAA GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
420	TTTTGAGCAAAGAAGATGATTCATTTCAATTACC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
421	TTTCAATATAATCCTGATTGATGATGGCAATTCAT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTACT CCAACTCAAC
422	TTTGTTATCTAAAATATCTAAAGGAATTGAGGAA GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC
423	TTTACATCGCCATTAATAAAAACTGATAGCCCTAA ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCCTCACCCCTAC TCCAACTCAAC

424	TTTTCGTCTGAAATGGATTACATTTTGACGCTCAA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
425	TTTTTGATTAGTAATAACATTGTAGCAATACTTCT TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
426	TTTAGGAACGGTACGCCAGTAAAGGGATTTTAGA CTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
427	TTTGAGCACGTATAACGTGCTATGGTTGCTTTGAC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
428	TTTCGGGCGCTAGGGCGCTAAGAAAGCGAAAGGA GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
429	TTTATCACCCAAATCAAGTGCCCACTACGTGAAC CTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
430	TTTATCCTGTTTGATGGTGGCCCCAGCAGGCGAA ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
431	TTTGCTCACTGCCCGCTTTACATTAATTGCGTTGC TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
432	TTTGTAACGCCAGGGTTTTAAGGCGATTAAGTTG GTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
433	TTTCGTTGGTGTAGATGGGGTAATGGGATAGGTC ATTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
434	TTTTTTAAATTGTAAACGTATTGTATAAGCAAATA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
435	TTTGCCGGAGAGGGTAGCTTAGCTGATAAATTAA TTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC
436	TTTAAATTTTGAACCCCTTTCAACGCAAGGATAA TTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTACT CCAACCTCAAC
437	TTTTAAGCAATAAAGCCTCAAAGAATTAGCAAAA TTTTAACTACTCCCCTCTCACCCTCACCCTAC TCCAACCTCAAC

[0577] 实施例10. 在准备好的表面上沉积SNAP

[0578] 为无图案阵列的形成制备表面。在载玻片的表面上沉积一层(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)。APTMS涂覆的表面随后与叠氮化物-PEG-NHS酯反应,以在载玻片表面上共

价形成PEG钝化层。在形成PEG钝化层之后,表面连接的叠氮基团与含有二苄基环辛烯(DBCO)官能团的寡核苷酸缀合。每个寡核苷酸具有序列5'-DBCO-TGTGGAGAGGAAGATGGTA-3'(SEQ.ID 438)。用于制备玻璃表面的反应方案显示在图42中。通过改变与含叠氮化物表面接触的寡核苷酸的浓度,形成具有不同表面寡核苷酸密度的寡核苷酸阵列。0.01微摩尔(μ M)、0.1 μ M和1 μ M的寡核苷酸浓度用于表面制备。

[0579] 如实施例8中所述,将制备的玻璃表面与含有20个表面相互作用部分的DNA折纸接触。44个Alexa-Fluor 488荧光染料通过与标记结合寡核苷酸的悬垂区域的互补寡核苷酸结合至每个DNA折纸(参见SEQ.ID 3)。两种多肽经由与分析物结合寡核苷酸的悬垂区域的互补寡核苷酸结合至每个DNA折纸(例如,参见SEQ.ID 1)。每个多肽是12个氨基酸的组氨酸肽(SEQ.ID 439-HHHHHHHHHHHH),下文称为His-12。

[0580] 含有悬垂寡核苷酸的DNA折纸通过以下方式沉积在制备好的玻璃表面上:通过悬垂表面相互作用寡核苷酸(参见SEQ.ID 2)杂交至表面连接的寡核苷酸(参见SEQ.ID 438)。实施例3中描述了沉积缓冲液。对四个单独的阵列进行His-12 DNA折纸的沉积。用含有悬垂寡核苷酸但不含多肽的DNA折纸制备两个另外的阵列(对照SNAP)。使用寡核苷酸形成阵列。

[0581] 在阵列形成之后,通过在488nm下的荧光显微术成像来鉴定每个阵列上的SNAP位置。在确定每个阵列上沉积的SNAP的位置后,将阵列与组氨酸结合的可检测探针接触。每个可检测探针包含一个DNA折纸瓦片,其具有20个偶联的B1适体和44个缀合的Alexa-Fluor 647荧光染料。探针以30nM的浓度与每个阵列接触,并孵育30分钟。通过漂洗缓冲液从每个阵列中漂洗掉未结合的探针(参见实施例3)。在漂洗之后,对每个阵列进行成像,以鉴定B1探针结合的阵列地址。

[0582] 图43显示了B1探针相对于每个SNAP阵列的结合数据。对于至少20-25%的阵列地址,观察到B1探针的结合。相比之下,观察到B1探针与无多肽SNAP的结合接近零。图46显示了沉积在含有不同寡核苷酸表面密度的含寡核苷酸表面上的SNAP的荧光显微术图像数据。将SNAP与浓度为10皮摩尔(pM)或100pM的含寡核苷酸的表面接触。观察到沉积的SNAP密度随着寡核苷酸表面密度的增加和SNAP浓度的增加而增加。

[0583] 实施例11. SNAP上多肽的检测

[0584] 通过实施例10中所描述的方法制备两个SNAP阵列。用含有20个悬垂捕获寡核苷酸和单个多肽偶联寡核苷酸的SNAP制备每个阵列。每个SNAP都与单一His-12肽偶联。在阵列制备之后,如实施例10中所述,将每个阵列与B1探针一起孵育。将探针以10nM的浓度与每个阵列接触20分钟。通过荧光显微术在647nm下检测探针结合。图44描绘了具有检测到的B1探针结合的观察到的阵列地址的分数。观察到约10%的阵列地址结合B1探针。

[0585] 实施例12. SNAP上多肽的检测

[0586] 根据图42的方案制备含寡核苷酸的玻璃表面。制备仅含有APTMS表面连接部分的另外玻璃表面。如实施例9中所述,用20个悬垂捕获部分制备SNAP。每个SNAP被配置为具有两个多肽结合位点。将SNAP与链霉亲和素多肽缀合,每个链霉亲和素具有2个His-12标签。

[0587] 将SNAP与制备好的玻璃表面一起孵育以形成多肽阵列。对每种类型的表面(含APTMS和含寡核苷酸)的总共6个复制品进行测试,其中4个表面与链霉亲和素缀合的SNAP一起孵育,并且2个表面与不含多肽的SNAP一起孵育。

[0588] 在SNAP沉积之后,通过共焦荧光显微术对每个玻璃表面成像,以鉴定所沉积的

SNAP的阵列地址。通过检测每个SNAP上的Alexa-Fluor 488染料进行SNAP地址的成像。在鉴定占据的阵列地址之后,将SNAP与B1适体探针接触,如实施例10和11中所述。通过共焦荧光显微术通过检测在每个探针上的Alexa-Fluor 647染料来检测探针结合。将647nm数据与488nm数据进行比较,以确定观察到结合B1探针的占据的阵列地址的分数。图45展示了沉积在APTMS表面和含寡核苷酸表面上的SNAP的结合检测数据。观察到APTMS表面具有较低的含His-12多肽结合检测率,和较高的假阳性率(检测到不含多肽的SNAP)。观察到含寡核苷酸的表面具有更高的含His-12多肽结合检测率和更低的假阳性率。PEG钝化层的存在和在SNAP与含寡核苷酸表面之间的表面相互作用的特异性增加可能增加了真阳性检测的可能性并降低了假阳性检测的可能性。

[0589] 实施例13. 未图案化的SNAP阵列的形成

[0590] SNAP沉积在含有PEG-叠氮化物表面连接部分的未图案化的玻璃表面上。根据图42中所示的方案制备玻璃表面,排除了最终的寡核苷酸缀合步骤。通过以不同的比率混合NHS-PEG2K-叠氮化物分子和NHS-PEG5K分子来改变叠氮基团的表面浓度。NHS-PEG2K-叠氮化物与NHS-PEG5K分子的比率在5:95与100:0之间变化。在形成含叠氮化物的玻璃表面之后,含有表面偶联二苯并环辛烯(DBCO)部分的SNAP以1纳摩尔(nM)的浓度与表面接触。将SNAP孵育至少12小时,以促进在表面连接的叠氮化物与SNAP偶联的DBCO部分之间形成点击型相互作用。在20°C和4°C下进行孵育,以测试温度对沉积的影响。阴性对照阵列也通过将含叠氮化物的表面与不具有DBCO部分的SNAP接触来形成。图47显示了作为PEG2K-叠氮化物:PEG5K比率和沉积温度的函数的SNAP阵列的荧光显微术图像。看到未图案化阵列上沉积的SNAP浓度随着叠氮化物部分的表面密度增加和温度升高而增加。在不存在与SNAP偶联的DBCO部分的情况下,在玻璃表面上观察到最少的SNAP沉积。

[0591] 实施例14. 具有可透过结构的SNAP的合成与表征

[0592] 通过实施例7中所描述的方法制备包含单链DNA(ssDNA)的正方形、瓦片形状的DNA折纸。DNA折纸结构由ssDNA寡核苷酸和m13mp18支架ssDNA的混合物折叠而成。所有的寡核苷酸(包括具有TCO展示部分的寡核苷酸)都与支架DNA过量混合。将纯化的DNA折纸瓦片沉积在云母上用于AFM成像(图59A)。所测量的瓦片尺寸匹配预期的瓦片边缘长度(80-90nm)和瓦片高度(2nm)。

[0593] 在瓦片折纸合成之后,通过在过量脱氧胸苷核苷酸的存在下的TdT延伸(其延伸了DNA折纸瓦片种子结构周围的ssDNA突出端)在每个DNA折纸上形成可透过结构。预期可透过的聚T ssDNA延伸物基本上平放在固体支持物的带正电荷的表面上。在具有聚赖氨酸涂层的云母或胺(APTMS)覆盖的玻璃表面上成像具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片(图59B)。发现具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片具有600-700nm范围内的典型直径;大到足以排除在固体支持物上400nm尺寸的阵列位点上的第二刷状瓦片的沉积。

[0594] 根据AFM数据,95%的具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片颗粒是完整的(图59C)。根据实施例1的方法,将具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片偶联至mTz修饰的蛋白质上。分析型HPLC结果显示,具有功能性TCO基团的聚T延伸的DNA折纸瓦片的分数为95%,并且具有缀合蛋白质的分数为90%(图59C)。图59D绘制了各种构型(包括仅折纸、在溶液中具有聚T延伸物以及在表面上具有聚T延伸物)的DNA折纸的尺寸数据。致密的DNA折纸瓦片的平均边长为90nm。动态光散射测量显示溶液中聚T延伸的DNA折纸的平均直径为500nm。基于AFM测量,表

面上聚T延伸的DNA折纸的平均直径为650nm。总之,聚T延伸的DNA折纸以高效率缀合至蛋白质,并且它们的大尺寸被配置为防止在固体支持物上的每个位点沉积超过一个的聚T延伸的DNA折纸。

[0595] 实施例15. 单分子阵列制备

[0596] 通过玻璃基底的光刻图案化形成图案化的固体支持物。在光刻图案化之后,用APTMS将固体支持物官能化以提供带正电荷的表面涂层。在APTMS沉积之后,从芯片上剥离光刻光致抗蚀剂,以提供结合位点的图案化阵列(如图67A所示)。玻璃表面的图案化与预期的特征周期性和间隔相匹配,并且证实只有图案化的特征具有带正电荷的胺涂层(图67B)。图案化区域的均匀强度表明APTMS涂层在特征内部和特征之间是一致的。高分辨率AFM表征显示玻璃/硅表面粗糙度在预期和可操作的范围内($<2\text{nm}^2$) (图67C)。测量的特征直径(图67D)和间距(图67E)分别与大约400纳米和1.4微米的预期值匹配。

[0597] 实施例16. 含有可透过结构的SNAP的非泊松阵列加载

[0598] 为了评估单个分子在芯片上的占据,产生了两个版本的具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片用于混合实验。通过实施例14的方法产生具有聚T延伸物的DNA折纸瓦片,其中第一个版本用Alexa-Fluor 488染料标记,并且第二个版本用Alexa-Fluor 647染料标记。如实施例15中所述,将两种类型的SNAP的等摩尔混合物沉积在图案化的玻璃阵列上。通过计数由单一波长照亮的特征(表示只有一个沉积的瓦片)和由两个波长照亮的特征(表示超过一个沉积的瓦片),可以估计单分子占据。对于96%被占据的阵列(即4%的位点不包含观察到的SNAP),在5%的阵列位点观察到双重双占据。在没有排除(泊松沉积)的情况下,将预期观察到近25%的斑点具有双色。原子力显微术(AFM)也用于以高分辨率展示阵列位点的单分子占据。AFM结果表明,90%的斑点具有单一的刷状DNA折纸瓦片。

[0599] 为了估计由利用部分结构化SNAP的上述阵列所提供的动态范围,使用了稀释实验和488/647混合实验。在不同的稀释度和488与647的刷状DNA折纸瓦片比率下,确定了在 10^5 个斑点中观察到的488刷状瓦片的数量。通过外推数据点,证明在 10^7 个斑点中可以观察到单一DNA折纸瓦片。

[0600] 实施例17. SNAP上的功能性核酸

[0601] 制备SNAP阵列,以确定是否可以在多个结合和去除循环中从阵列上的每个SNAP上施加和去除可检测的标记。制备包含具有(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)覆盖层的玻璃表面的芯片。在含有1X Neoventures缓冲液、0.1% Tween20、0.001% lipidure和10mM MgCl_2 的溶液中,以4.5皮摩尔的浓度将SNAP与芯片的APTMS涂覆的表面接触。每个SNAP包含功能性核酸,其包含与瓦片形状的DNA折纸偶联的悬垂单链DNA。该功能性核酸具有核苷酸序列ATTATACTACATACACC (SEQ. ID 440)。将含有SNAP的缓冲液在APTMS涂覆的表面上孵育10分钟,然后用包含1X Neoventures缓冲液、0.1% Tween20、0.001% lipidure和10mM MgCl_2 的缓冲液漂洗表面。

[0602] 在APTMS涂覆的表面上制备随机沉积的SNAP阵列之后,所述阵列经历14个检测循环。每个检测循环包括1) 将阵列与流体介质接触,所述流体介质包含具有核苷酸序列TAATATGATGTATGTGG (SEQ. ID 441)的荧光标记的寡核苷酸和5种Alexa-Fluor染料,2) 将荧光标记的寡核苷酸与阵列一起孵育1分钟,3) 用含有1X Neoventures缓冲液、0.1% Tween20、0.001% lipidure和10mM MgCl_2 的溶液漂洗阵列,4) 对阵列进行荧光成像以检测

偶联的荧光标记的寡核苷酸的空间位置,5)施加含有6M盐酸胍和10mM MgCl₂的剥离缓冲液,和6)用含有1X Neoventures缓冲液、0.1% Tween20、0.001% lipidure和10mM MgCl₂的溶液漂洗阵列。奇数编号的循环(例如,1、3、5、……、等)利用包含Alexa-Fluor 488荧光团的荧光标记的寡核苷酸,并且偶数编号的循环(例如,2、4、6、……、等)利用包含Alexa-Fluor 647荧光团的荧光标记的寡核苷酸。

[0603] 图68展示每个循环的荧光成像数据。显示奇数编号的循环在荧光显微镜的488-nm通道中的阵列地址处检测到荧光,但是在荧光显微镜的647-nm通道中实际上没有检测到。显示偶数编号的循环在荧光显微镜的488-nm通道中的阵列地址处几乎没有检测到荧光,但是在荧光显微镜的647-nm通道中检测到荧光。结果表明,有可能1)使用离液剂(例如,盐酸胍)从SNAP的功能性核酸上剥离寡核苷酸可检测标记,和2)当SNAP与离液剂接触时,不破坏SNAP与电荷表面之间的静电相互作用。

[0604] 进行另外的实验以评估在剥离条件下较长的核苷酸序列对寡核苷酸去除的影响。通过上述方法制备两个阵列。第一个阵列包含具有功能性核酸的沉积的SNAP,所述功能性核酸被配置为偶联荧光标记的寡核苷酸,其具有核苷酸序列ACAACCTCAACCTCATCCCCTCC CACTCTCACCTCATCAA (SEQ. ID 442)。第二个阵列包含如上所述的具有功能性核酸的SNAP,所述功能性核酸具有核苷酸序列TA ATATGATGTATGTGG (SEQ. ID 441)。将阵列与它们相应的荧光标记的互补寡核苷酸(每个互补寡核苷酸含有5种Alexa-Fluor 488染料)接触,荧光成像,与6M氯化胍一起孵育,然后再与它们相应的互补寡核苷酸接触。图70展示了两个阵列的荧光成像数据,描绘了功能性核酸的荧光标记以及每个相应阵列的剥离结果。在氯化胍孵育之后,在许多位点中仍然可检测到较长的碱基对寡核苷酸,表明可以调节功能性核酸序列的长度以有助于根据需要保留或去除功能性核酸中的互补寡核苷酸。

[0605] 实施例18. 利用功能性核酸的多路复用阵列

[0606] 通过实施例17的方法制备SNAP阵列。所沉积的SNAP的混合物包含具有第一功能性核酸的多个第一瓦片形状SNAP和具有第二功能性核酸的多个第二瓦片形状SNAP的等摩尔混合物。第一功能性核酸的核苷酸序列是ATTATACTACATACACC (SEQ. ID 440),并且第二功能性核酸的核苷酸序列是GTTTGTTGTTTGGGTTG (SEQ. ID 443)。

[0607] 检测含有第一瓦片形状SNAP和第二瓦片形状SNAP的多路复用阵列2个检测循环,其中第一个循环利用具有与第一功能性核酸互补的序列的Alexa-Fluor 488标记的寡核苷酸,并且其中第二个循环利用具有与第二功能性核酸互补的序列的Alexa-Fluor 488标记的寡核苷酸。每个互补寡核苷酸包含5种Alexa-Fluor 488染料。图69A和69C分别展示第一互补寡核苷酸和第二互补寡核苷酸结合的荧光显微术图像。图69B和69D分别展示第一互补寡核苷酸和第二互补寡核苷酸在盐酸胍中的施加后剥离的荧光显微术图像。如所示,基于互补寡核苷酸与SNAP的功能性核酸结合的检测,可以将第一多个SNAP的SNAP所占据的地址与第二多个SNAP所占据的地址区分开。

[0608] 虽然本发明的优选实施方案已在本文显示和描述,此类实施方案仅以举例的方式提供,这对本领域的技术人员将是显而易见的。这并不意味着本发明受限于说明书中提供的具体实施例。虽然已经参考前述说明书描述了本发明,但是本文实施方案的描述和图示并不意味着以限制的意义来解释。在不偏离本发明的情况下本领域技术人员将进行各种变型、变化和替换。此外,应当理解的是,本发明的所有方面不限于本文所阐述的具体描述、

构型或相对比例,这些取决于各种条件和变量。应理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。因此,预期本发明还将涵盖任何此类替代物、修改、变化或等效物。这意味着以下权利要求书限定本发明的范围并且这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构因此被涵盖。

[0609] 尽管有所附的权利要求,本文所阐述的公开内容也由以下如条款限定:

[0610] 1.一种组合物,其包含:

[0611] 结构化核酸颗粒,所述结构化核酸颗粒包含 (i) 被配置为与分析物偶联的展示部分, (ii) 被配置为与表面偶联的捕获部分;和

[0612] (iii) 包含第一官能团和第二官能团的多官能团部分;

[0613] 其中所述多官能团部分与所述结构化核酸颗粒偶联;并且

[0614] 其中所述第一官能团与所述展示部分偶联,并且其中所述第二官能团与所述捕获部分偶联。

[0615] 2.如条款1所述的组合物,其中所述多官能团部分包含核酸链。

[0616] 3.如条款1或2所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含含有所述展示部分的展示面和含有所述捕获部分的捕获面。

[0617] 4.如条款3所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含多个三级结构,其中所述展示面包含所述多个三级结构中的第一三级结构,并且所述捕获面包含所述多个三级结构中的第二三级结构。

[0618] 5.如条款4所述的组合物,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构相同。

[0619] 6.如条款4所述的组合物,其中所述第一三级结构与所述第二三级结构不同。

[0620] 7.如条款4-6中任一项所述的组合物,其中所述核酸链与所述结构化核酸颗粒杂交,从而形成所述第一三级结构的一部分或所述第二三级结构的一部分。

[0621] 8.如条款7所述的组合物,其中所述多官能团部分与所述结构化核酸颗粒杂交,从而形成所述第一三级结构的一部分和所述第二三级结构的一部分。

[0622] 9.如条款4-8中任一项所述的组合物,其中所述展示面的取向或所述捕获面的取向相对于所述第一三级结构的对称轴或所述第二三级结构的对称轴来定义。

[0623] 10.如条款9所述的组合物,其中所述展示面的取向与所述捕获面的取向相同。

[0624] 11.如条款9所述的组合物,其中所述展示面的取向从所述捕获面的取向偏移至少约 90° 。

[0625] 12.如条款11所述的组合物,其中所述展示面的取向从所述捕获面的取向偏移约 180° 。

[0626] 13.如条款4-12中任一项所述的组合物,其中所述展示部分包含所述多个三级结构中的两个或更多个展示三级结构。

[0627] 14.如条款4-13中任一项所述的组合物,其中所述捕获部分包含所述多个三级结构中的两个或更多个捕获三级结构。

[0628] 15.如条款14所述的组合物,其中所述两个或更多个展示三级结构中的展示三级结构包含所述两个或更多个捕获三级结构中的捕获三级结构。

[0629] 16.如条款14所述的组合物,其中所述两个或更多个展示三级结构不包含所述两个或更多个捕获三级结构中的任何捕获三级结构。

- [0630] 17. 如条款14所述的组合物,其中所述两个或更多个捕获三级结构不包含所述两个或更多个展示三级结构中的任何展示三级结构。
- [0631] 18. 如条款2-17中任一项所述的组合物,其中所述核酸链与所述结构化核酸颗粒形成杂交区域,所述杂交区域包含至少约10个核苷酸。
- [0632] 19. 如条款18所述的组合物,其中所述杂交区域包含至少约20个核苷酸。
- [0633] 20. 如条款2-19中任一项所述的组合物,其中所述核酸链形成包含至少一个螺旋旋转的杂交区域。
- [0634] 21. 如条款20所述的组合物,其中所述杂交区域包含至少两个螺旋旋转。
- [0635] 22. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含支架链和与所述支架链杂交的多个寡核苷酸。
- [0636] 23. 如条款22所述的组合物,其中与所述多个寡核苷酸杂交的支架链形成多个三级结构,其中所述多个三级结构包含所述第一三级结构和所述第二三级结构。
- [0637] 24. 如条款23所述的组合物,其中所述第一三级结构的对称轴和所述第二三级结构的对称轴共面。
- [0638] 25. 如条款23所述的组合物,其中所述第一三级结构的对称轴和所述第二三级结构的对称轴不共面。
- [0639] 26. 如条款23所述的组合物,其中所述第一三级结构的对称轴和所述第二三级结构的对称轴相交。
- [0640] 27. 如条款23所述的组合物,其中所述第一三级结构的对称轴和所述第二三级结构的对称轴不相交。
- [0641] 28. 如条款23-27中任一项所述的组合物,其中所述多个三级结构围绕所述结构化核酸颗粒的内部体积区域。
- [0642] 29. 如条款28所述的组合物,其中所述内部体积区域包含所述展示面或所述捕获面。
- [0643] 30. 如前述条款中任一项所述的组合物,所述组合物还包含所述分析物。
- [0644] 31. 如条款30所述的组合物,其中所述展示部分与所述分析物偶联。
- [0645] 32. 如前述条款中任一项所述的组合物,所述组合物还包含所述表面。
- [0646] 33. 如条款32所述的组合物,其中所述捕获部分与所述表面偶联。
- [0647] 34. 如条款30-33中任一项所述的组合物,其中所述分析物包含选自多肽、多糖、核酸、脂质及其组合的生物分子。
- [0648] 35. 如条款1-33中任一项所述的组合物,其中所述分析物包含选自聚合物、金属、金属氧化物、陶瓷、半导体、矿物及其组合的非生物颗粒。
- [0649] 36. 如前述条款中任一项所述的组合物,所述组合物还包含含有第三官能团和第四官能团的第二多官能团部分。
- [0650] 37. 如条款36所述的组合物,其中所述展示部分包含所述第三官能团,并且所述捕获部分包含所述第四官能团。
- [0651] 38. 如条款36所述的组合物,其中所述展示部分不包含所述第三官能团或所述第四官能团。
- [0652] 39. 如条款36或37所述的组合物,其中所述第四官能团被配置为与所述表面偶联。

- [0653] 40. 如条款39所述的组合物,其中所述第四官能团与所述表面偶联。
- [0654] 41. 如条款36-40中任一项所述的组合物,其中所述第三官能团被配置为与第二分析物偶联。
- [0655] 42. 如条款41所述的组合物,其中所述第三官能团与所述第二分析物偶联。
- [0656] 43. 如条款36-40中任一项所述的组合物,其中所述第三官能团被配置为与所述分析物偶联。
- [0657] 44. 如条款43所述的组合物,其中所述第三官能团与所述分析物偶联。
- [0658] 45. 如条款36-40中任一项所述的组合物,其中所述第三官能团被配置为与功能性核酸链偶联。
- [0659] 46. 如条款45所述的组合物,其中所述功能性核酸链包含杂交序列、引发序列或核酸条形码。
- [0660] 47. 如条款45或46所述的组合物,其中所述第三官能团与所述功能性核酸链偶联。
- [0661] 48. 如条款32-47中任一项所述的组合物,其中所述表面包含被配置为与所述第二官能团偶联的表面官能团。
- [0662] 49. 如条款48所述的组合物,其中所述表面官能团和所述第二官能团形成共价键。
- [0663] 50. 如条款49所述的组合物,其中所述共价键通过点击反应形成。
- [0664] 51. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含一个或多个可光裂解的接头。
- [0665] 52. 如条款51所述的组合物,其中所述多官能团部分不包含可光裂解的接头。
- [0666] 53. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含一个或多个限制性位点。
- [0667] 54. 如条款53所述的组合物,其中所述多官能团部分不包含所述一个或多个限制性位点中的限制性位点。
- [0668] 55. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述多官能团部分包含接头。
- [0669] 56. 如条款55所述的组合物,其中所述接头包含修饰的核苷酸。
- [0670] 57. 如条款55或56所述的组合物,其中所述接头包含连接部分,所述连接部分被配置为将一个或多个另外的分子与所述多官能团部分偶联。
- [0671] 58. 如条款57所述的组合物,其中所述一个或多个另外的分子包含第三多官能团部分,其中所述第三多官能团部分包含第五官能团和第六官能团。
- [0672] 59. 如条款58所述的组合物,其中所述第六官能团与所述连接部分偶联。
- [0673] 60. 如条款58或59所述的组合物,其中所述第三多官能团部分与所述结构化核酸颗粒杂交,其中所述捕获部分包含所述第五官能团。
- [0674] 61. 如条款58-60中任一项所述的组合物,其中所述第五官能团被配置为与所述表面偶联。
- [0675] 62. 如条款61所述的组合物,其中所述第五官能团与所述表面偶联。
- [0676] 63. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述捕获部分包含修饰部分,其选自带电部分、磁性部分、空间部分、两亲部分、疏水部分和亲水部分。
- [0677] 64. 如条款63所述的组合物,其中所述带电部分包含单链核酸。
- [0678] 65. 如条款64所述的组合物,其中所述捕获部分包含多个单链核酸。

- [0679] 66. 如前述条款中任一项所述的组合物,所述组合物还包含分隔基团,其中所述分隔基团被配置为将所述分析物与所述展示部分偶联,从而在所述分析物与所述结构化核酸颗粒之间产生分隔间隙。
- [0680] 67. 如条款66所述的组合物,其中所述分隔基团包含选自下组的刚性分隔基团,所述组包含聚合物接头、核酸接头和纳米颗粒接头。
- [0681] 68. 如条款67所述的组合物,其中所述核酸接头包含三级结构。
- [0682] 69. 如条款67或68所述的组合物,其中所述分隔基团包含柔性接头。
- [0683] 70. 如条款66至69中任一项所述的组合物,其中所述分隔间隙包含在所述分析物与所述捕获部分之间的间隙。
- [0684] 71. 如条款66-70中任一项所述的组合物,其中所述分隔间隙包含在所述分析物与所述结构化核酸颗粒的最近点之间的间隙。
- [0685] 72. 如条款66-71中任一项所述的组合物,其中所述分隔间隙为至少约5纳米。
- [0686] 73. 如条款72所述的组合物,其中所述分隔间隙不超过约100纳米。
- [0687] 74. 如条款22-74中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含两条或更多条支架链。
- [0688] 75. 如条款74所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸中的寡核苷酸与所述两条或更多条支架链中的至少两条支架链杂交。
- [0689] 76. 如条款75所述的组合物,其中所述多个寡核苷酸的至少10%与所述两条或更多条支架链中的至少两条支架链杂交。
- [0690] 77. 如前述条款中任一项所述的组合物,其中所述多官能团部分与所述结构化核酸颗粒共价交联。
- [0691] 78. 如条款2-77中任一项所述的组合物,其中所述核酸链以至少70摄氏度(°C)的特征性解链温度与所述结构化核酸颗粒杂交。
- [0692] 79. 一种组合物,其包含:
- [0693] 结构化核酸颗粒(SNAP);和
- [0694] 多官能团部分;
- [0695] 其中所述多官能团部分与所述SNAP偶联,并且其中所述多官能团部分被配置为形成从表面到分析物的连续接头。
- [0696] 80. 如条款79所述的组合物,其中所述多官能团部分包含第一官能团和第二官能团。
- [0697] 81. 如条款79或80所述的组合物,其中所述多官能团部分包含被配置为与所述SNAP偶联的核酸链。
- [0698] 82. 如条款79或80所述的组合物,其中所述多官能团部分不包含核酸。
- [0699] 83. 如条款82所述的组合物,其中所述多官能团部分还包含被配置为与所述SNAP偶联的第三官能团。
- [0700] 84. 如条款83所述的组合物,其中所述第三官能团被配置为与所述SNAP的互补官能团形成共价键。
- [0701] 85. 如条款83所述的组合物,其中所述第三官能团被配置为与所述SNAP非共价偶联。

- [0702] 86. 如条款80-85中任一项所述的组合物,其中所述第一官能团被配置为与所述表面偶联,并且所述第二官能团被配置为与所述分析物偶联。
- [0703] 87. 如条款79-86中任一项所述的组合物,其中所述多官能团部分与所述SNAP偶联。
- [0704] 88. 一种结构化核酸颗粒(SNAP)复合物,所述SNAP复合物包含两个或更多个SNAP,其中所述两个或更多个SNAP中的每个SNAP独立地选自展示SNAP、效用SNAP或其组合;
- [0705] 其中所述展示SNAP包含被配置为与分析物偶联的展示部分;
- [0706] 其中所述效用SNAP包含被配置为与表面偶联的捕获部分;并且
- [0707] 其中所述两个或更多个SNAP被偶联以形成所述SNAP复合物。
- [0708] 89. 如条款88所述的SNAP复合物,其中所述效用SNAP包含捕获SNAP、联接SNAP、结构SNAP或其组合。
- [0709] 90. 如条款89所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含展示SNAP和捕获SNAP。
- [0710] 91. 如条款90所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP或所述捕获SNAP包含DNA纳米球或DNA折纸。
- [0711] 92. 如条款91所述的SNAP复合物,其中所述DNA折纸包含支架核酸链和与所述支架核酸链偶联的多个寡核苷酸。
- [0712] 93. 如条款92所述的SNAP复合物,其中所述支架链包含长度为至少1000个核苷酸的环状链或非环状链。
- [0713] 94. 如条款92或93所述的SNAP复合物,其中所述多个寡核苷酸中的寡核苷酸包含捕获部分。
- [0714] 95. 如条款88至94中任一项所述的SNAP复合物,其中所述捕获部分选自反应性部分、带电部分、磁性部分、链霉亲和素和生物素。
- [0715] 96. 如条款95所述的SNAP复合物,其中所述反应性部分包含点击反应试剂。
- [0716] 97. 如条款92-96中任一项所述的SNAP复合物,其中所述多个寡核苷酸中的寡核苷酸还包含展示部分。
- [0717] 98. 如条款92-97所述的SNAP复合物,其中所述多个寡核苷酸中的寡核苷酸包含捕获部分。
- [0718] 99. 如条款88-98中任一项所述的SNAP复合物,其中所述捕获部分选自反应性部分、带电部分、磁性部分、链霉亲和素和生物素。
- [0719] 100. 如条款99所述的SNAP复合物,其中所述反应性部分包含点击反应试剂。
- [0720] 101. 如条款88-100中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示部分与所述展示SNAP的面附接,所述面与所述捕获部分所附接的所述展示SNAP的面偏移了约 180° 的角度。
- [0721] 102. 如条款88-101中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示部分与所述展示SNAP的面附接,所述面与所述捕获部分所附接的所述SNAP的面偏移了小于约 180° 的角度。
- [0722] 103. 如条款90-102中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP包含效用面,其中所述效用面包含捕获部分、可检测标记或空间封闭部分。
- [0723] 104. 如条款103所述的SNAP复合物,其中所述可检测标记包括荧光标记、发光标记、核酸条形码、同位素或放射性标记。
- [0724] 105. 如条款90-104中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP包含第一SNAP

偶联部分,并且所述捕获SNAP包含第二SNAP偶联部分,其中所述展示SNAP通过将所述第一SNAP偶联部分偶联至所述第二SNAP偶联部分而偶联至所述捕获SNAP。

[0725] 106.如条款105所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP偶联部分和所述第二SNAP偶联部分形成共价键。

[0726] 107.如条款105或106所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP偶联部分和所述第二SNAP偶联部分包含互补的点击反应试剂对。

[0727] 108.如条款105所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP偶联部分和所述第二SNAP偶联部分形成非共价键。

[0728] 109.如条款108所述的SNAP复合物,其中所述非共价键包括氢键、核酸碱基对键或链霉亲和素-生物素键。

[0729] 110.如条款88-109中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含多个捕获SNAP和单个展示SNAP。

[0730] 111.如条款110所述的SNAP复合物,其中所述多个SNAP包含至少约4个捕获SNAP。

[0731] 112.如条款88-111中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含每个展示SNAP超过一个捕获SNAP的比率。

[0732] 113.如条款112所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含每个展示SNAP至少两个捕获SNAP。

[0733] 114.如条款113所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含每个展示SNAP至少四个捕获SNAP。

[0734] 115.如条款88-114中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含展示SNAP和与所述展示SNAP的一个或多个面偶联的两个或更多个捕获SNAP。

[0735] 116.如条款115所述的SNAP复合物,其中所述两个或更多个捕获SNAP中的第一捕获SNAP与所述展示SNAP的第一面偶联,并且其中所述两个或更多个捕获SNAP中的第二捕获SNAP与所述展示SNAP的第二面偶联。

[0736] 117.如条款116所述的SNAP复合物,其中所述第一捕获SNAP的面与所述第二捕获SNAP的面偶联。

[0737] 118.如条款116所述的SNAP复合物,其中所述第一捕获SNAP不与所述第二捕获SNAP偶联。

[0738] 119.如条款116-118中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物还包含第三捕获SNAP。

[0739] 120.如条款119所述的SNAP复合物,其中所述第三捕获SNAP与所述展示SNAP的第三面偶联。

[0740] 121.如条款119或120所述的SNAP复合物,其中所述第三捕获SNAP偶联至所述第一捕获SNAP的面、所述第二捕获SNAP的面或其组合。

[0741] 122.如条款119-121中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第一捕获SNAP的面大于所述展示SNAP的第一面。

[0742] 123.如条款119-121中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第一捕获SNAP的面与所述展示SNAP的第一面的尺寸大致相同。

[0743] 124.如条款119-121中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第一捕获SNAP的面小

于所述展示SNAP的第一面。

[0744] 125. 如条款119-124中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第二捕获SNAP的面大于所述展示SNAP的第一面。

[0745] 126. 如条款119-124中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第二捕获SNAP的面与所述展示SNAP的第一面的尺寸大致相同。

[0746] 127. 如条款119-124中任一项所述的SNAP复合物,其中所述第二捕获SNAP的面小于所述展示SNAP的第一面。

[0747] 128. 如条款115-127中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的所述一个或多个面不包含所述捕获部分。

[0748] 129. 如条款115-127中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的所述一个或多个面包含至少约两个面。

[0749] 130. 如条款129所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的所述一个或多个面包含至少约四个面。

[0750] 131. 如条款128-130中任一项所述的SNAP复合物,其中所述一个或多个面中的每个面与捕获SNAP偶联。

[0751] 132. 如条款128-130中任一项所述的SNAP复合物,其中所述一个或多个面中的至少一个面不与捕获SNAP偶联。

[0752] 133. 如条款88-132中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含至少一个对称轴。

[0753] 134. 如条款133所述的方法,其中所述对称轴包括旋转对称轴或反射对称轴。

[0754] 135. 如条款134所述的方法,其中所述SNAP复合物包含旋转对称轴和反射对称轴。

[0755] 136. 如条款88-132中的任何条款所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物没有对称轴。

[0756] 137. 如条款88-136中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物具有正方形、矩形、三角形、十字形或多边形构象。

[0757] 138. 如条款89-137中任一项所述的SNAP复合物,其中所述捕获SNAP包含含有空间封闭部分或SNAP复合物偶联部分的效用面。

[0758] 139. 如条款138所述的SNAP复合物,其中所述空间封闭部分选自由以下组成的部分:聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)或葡聚糖。

[0759] 140. 如条款138所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物偶联部分被配置为将所述SNAP复合物与第二SNAP复合物偶联。

[0760] 141. 如条款138或140所述的SNAP复合物,其中所述复合物偶联部分被配置为形成共价键或非共价键。

[0761] 142. 如条款89-141中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP包含捕获部分。

[0762] 143. 如条款142所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的捕获部分或所述捕获SNAP的捕获部分包含修饰部分,所述修饰部分选自由以下组成的部分:带电部分、磁性部分、空间部分、两亲部分、疏水部分和亲水部分。

[0763] 144. 如条款142或143中任一项所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的捕获部分

与所述捕获SNAP的捕获部分不同。

[0764] 145. 如条款142或143所述的SNAP复合物,其中所述展示SNAP的捕获部分与所述捕获SNAP的捕获部分相同。

[0765] 146. 如条款88-145中任一项所述的SNAP复合物,其中所述分析物与所述展示SNAP偶联。

[0766] 147. 如条款146所述的SNAP复合物,其中单分析物与所述展示SNAP偶联。

[0767] 148. 如条款146所述的SNAP复合物,其中多个多肽与所述展示SNAP偶联。

[0768] 149. 如条款88-148中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含多个展示SNAP。

[0769] 150. 如条款149所述的SNAP复合物,其中所述多个展示SNAP中的展示SNAP与所述分析物偶联。

[0770] 151. 如条款88-150中任一项所述的SNAP复合物,其中包含所述两个或更多个SNAP中的第一捕获面的第一SNAP和包含所述两个或更多个SNAP中的第二捕获面的第二SNAP刚性地偶联。

[0771] 152. 如条款151所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP的捕获面和所述第二SNAP的捕获面基本上共面。

[0772] 153. 如条款151所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP的捕获面和所述第二SNAP的捕获面不共面。

[0773] 154. 如条款153所述的SNAP复合物,其中所述第一SNAP的捕获面相对于所述第二SNAP的捕获面以至少约 10° 的角度定向。

[0774] 155. 如条款88-154中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物包含一个或多个结构SNAP。

[0775] 156. 如条款155所述的SNAP复合物,其中所述一个或多个结构SNAP包含分隔SNAP、支持SNAP或修饰SNAP。

[0776] 157. 如条款156所述的SNAP复合物,其中所述分隔SNAP被配置为在所述分析物与所述表面之间形成分隔间隙。

[0777] 158. 如条款157所述的SNAP复合物,其中所述分隔间隙为至少约5nm。

[0778] 159. 如条款157或158所述的SNAP复合物,其中所述分隔间隙不超过约100nm。

[0779] 160. 如条款156所述的SNAP复合物,其中所述支持SNAP或所述修饰SNAP偶联所述两个或更多个SNAP中的至少一个SNAP。

[0780] 161. 一种结构化核酸颗粒(SNAP)组合物,其包含:

[0781] 包含表面的材料;和

[0782] 两个或更多个SNAP,其中所述两个或更多个SNAP中的每个SNAP独立地选自展示SNAP、效用SNAP或其组合;

[0783] 其中所述展示SNAP包含被配置为与分析物偶联的展示部分,

[0784] 其中所述两个或更多个SNAP与所述表面偶联;并且

[0785] 其中所述两个或更多个SNAP中的第一SNAP与所述两个或更多个SNAP中的第二SNAP偶联,从而形成SNAP复合物。

[0786] 162. 如条款161所述的组合物,其中所述效用SNAP包含捕获SNAP、偶联SNAP、结构

SNAP或其组合。

[0787] 163. 如条款161或162所述的组合物,其中所述材料包含固体支持物。

[0788] 164. 如条款161-163中任一项所述的组合物,其中所述材料包含硅、熔融石英、石英、云母或玻璃。

[0789] 165. 如条款163或164所述的组合物,其中所述表面包含选自金属、金属氧化物或聚合物的层。

[0790] 166. 如条款161-165中任一项所述的组合物,其中所述表面还包含与所述两个或更多个SNAP中的第一SNAP偶联的官能团。

[0791] 167. 如条款166所述的组合物,其中所述两个或更多个SNAP中的第一SNAP包含与所述材料的官能团偶联的捕获部分。

[0792] 168. 如条款166或167所述的组合物,其中所述官能团与展示SNAP或捕获SNAP偶联。

[0793] 169. 如条款166-168中任一项所述的组合物,其中所述官能团被配置为与所述SNAP复合物形成静电、磁性、共价或非共价相互作用。

[0794] 170. 如条款161所述的组合物,其中所述两个或更多个SNAP中的第一SNAP包含与所述材料直接偶联的捕获部分。

[0795] 171. 如条款170所述的组合物,其中所述材料包含金属氧化物。

[0796] 172. 如条款161-171中任一项所述的组合物,其中所述表面图案化有由间隙区域分隔开的多个结合位点,其中每个结合位点被配置为结合所述SNAP复合物,其中所述间隙区域被配置为不结合所述SNAP复合物。

[0797] 173. 如条款161或162所述的组合物,其中所述表面包含在两种流体之间的相边界。

[0798] 174. 如条款173所述的组合物,其中所述相边界包含气体/液体界面或液体/液体界面。

[0799] 175. 如条款161-174中任一项所述的组合物,其中所述分析物与所述SNAP复合物偶联。

[0800] 176. 如条款161至175中任一项所述的组合物,其中所述SNAP复合物包含至少5000平方纳米(nm^2)的有效表面积。

[0801] 177. 如条款176所述的组合物,其中所述SNAP复合物包含至少10000 nm^2 的有效表面积。

[0802] 178. 如条款177所述的组合物,其中所述SNAP复合物包含至少100000 nm^2 的有效表面积。

[0803] 179. 如条款161至178中任一项所述的组合物,其中所述SNAP复合物的有效表面积包含所述材料的结合位点的有效表面积的至少25%,所述材料被配置为与所述SNAP复合物偶联。

[0804] 180. 如条款179所述的组合物,其中所述SNAP复合物的有效表面积包含所述材料的结合位点的有效表面积的至少50%,所述材料被配置为与所述SNAP复合物偶联。

[0805] 181. 如条款179或180中任一项所述的组合物,其中与所述结合位点偶联的所述SNAP复合物的构象防止第二SNAP复合物与所述结合位点偶联。

[0806] 182. 如条款161-181中任一项所述的SNAP复合物,其中所述SNAP复合物具有正方形、矩形、三角形、十字形或多边形构象。

[0807] 183. 如条款161-182中任一项所述的SNAP复合物,其中所述表面包含符合所述SNAP复合物的构象的结合结构。

[0808] 184. 如条款183所述的SNAP复合物,其中所述结合结构包含二维或三维几何形状。

[0809] 185. 如条款183或184所述的SNAP复合物,其中所述表面图案化有由间隙区域分隔开的多个结合位点,其中每个结合位点包含所述结合结构,其中每个结合结构被配置为结合所述SNAP复合物,其中所述间隙区域被配置为不结合所述SNAP复合物。

[0810] 186. 一种结构化核酸颗粒 (SNAP) 组合物,其包含:

[0811] 分析物;

[0812] 展示SNAP;和

[0813] 选自展示SNAP、效用SNAP及其组合的一个或多个SNAP;

[0814] 其中所述展示SNAP包含被配置为与所述分析物偶联的展示部分;

[0815] 其中所述展示SNAP与所述分析物偶联;并且

[0816] 其中所述展示SNAP与所述一个或多个SNAP偶联,从而形成SNAP复合物。

[0817] 187. 一种结构化核酸颗粒 (SNAP) 组合物,其包含:

[0818] 包含表面的材料;

[0819] 分析物;

[0820] 展示SNAP;和

[0821] 选自展示SNAP、效用SNAP及其组合的一个或多个SNAP;

[0822] 其中所述展示SNAP包含被配置为与所述分析物偶联的展示部分;

[0823] 其中所述展示SNAP与所述分析物偶联;

[0824] 其中所述展示SNAP与所述一个或多个SNAP偶联,从而形成SNAP复合物;并且

[0825] 其中所述SNAP复合物与所述表面偶联。

[0826] 188. 一种阵列,其包含:

[0827] 多个SNAP复合物;和

[0828] 包含表面的材料;

[0829] 其中每个所述SNAP复合物都与所述表面偶联;并且

[0830] 其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与所述多个SNAP复合物中的一个或多个其他SNAP复合物偶联;

[0831] 其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物包含独立地选自展示SNAP、效用SNAP及其组合的两个或更多个SNAP。

[0832] 189. 如条款188所述的阵列,其中所述效用SNAP包含捕获SNAP、偶联SNAP、结构SNAP或其组合。

[0833] 190. 如条款188或189所述的阵列,其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与一个或多个其他SNAP复合物可逆地偶联。

[0834] 191. 如条款190所述的阵列,其中所述多个SNAP复合物中的第一SNAP复合物保持与所述多个SNAP复合物中的第二SNAP复合物可逆地偶联至少约1天。

[0835] 192. 如条款188或189所述的阵列,其中所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物

与一个或多个其他SNAP复合物不可逆地偶联。

[0836] 193. 如条款188-192中任一项所述的阵列,其中所述阵列的每个展示SNAP包含展示部分。

[0837] 194. 如条款193所述的阵列,其中每个展示部分与相邻的展示部分分隔了至少约50纳米(nm)的距离。

[0838] 195. 如条款194所述的阵列,其中每个展示部分与相邻的展示部分分隔了至少约100nm的距离。

[0839] 196. 如条款195所述的阵列,其中每个展示部分与相邻的展示部分分隔了至少约300nm的距离。

[0840] 197. 如条款188-196中任一项所述的阵列,其中所述表面图案化有由间隙区域分隔开的多个结合位点,其中每个结合位点被配置为结合多个SNAP复合物,其中所述间隙区域被配置为不结合所述SNAP复合物。

[0841] 198. 如条款197所述的阵列,其中每个结合位点被配置为结合两个或更多个偶联的SNAP复合物。

[0842] 199. 如条款188-198中任一项所述的阵列,其中多个SNAP复合物与多个分析物偶联。

[0843] 200. 如条款188-199中任一项所述的阵列,其中所述阵列包含两个或更多个种类的SNAP复合物,其中所述两个或更多个种类的SNAP复合物中的每个种类在化学上或构象上是不同的。

[0844] 201. 如条款200所述的阵列,其中多个第一种类的SNAP复合物与多个第二种类的SNAP复合物分离。

[0845] 202. 如条款200或201所述的阵列,其中所述阵列包含所述两个或更多个种类的SNAP复合物的同质或异质混合物。

[0846] 203. 如条款200-202中任一项所述的方法,其中所述两个或更多个种类的SNAP复合物中的每个种类被配置为与多个种类的分析物中的单一种类的分析物偶联。

[0847] 204. 如条款203所述的阵列,其中所述单一种类的分析物选自样品分析物、对照分析物、标准分析物和惰性分析物。

[0848] 205. 一种形成阵列的方法,其包括:

[0849] 提供多个SNAP复合物;

[0850] 将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与来自所述多个SNAP复合物的一个或多个另外的SNAP复合物偶联;以及

[0851] 将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与表面偶联;

[0852] 其中每个SNAP复合物包含展示SNAP和一个或多个效用SNAP,并且其中每个SNAP复合物包含与所述表面偶联的偶联部分,从而形成阵列。

[0853] 206. 如条款205所述的方法,其中所述效用SNAP包含捕获SNAP、偶联SNAP、结构SNAP或其组合。

[0854] 207. 如条款205或206所述的方法,其中缔合所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物发生在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物偶联至一个或多个另外的SNAP复合物之前。

[0855] 208. 如条款205或206所述的方法,其中缔合所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物发生在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物偶联至一个或多个另外的SNAP复合物之后。

[0856] 209. 如条款205-207中任一项所述的方法,其中所述展示SNAP包含展示部分。

[0857] 210. 如条款209所述的方法,所述方法还包括将分析物与所述展示部分偶联的步骤。

[0858] 211. 如条款210所述的方法,其中在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与所述表面偶联之后,将所述分析物与所述展示部分偶联。

[0859] 212. 如条款210所述的方法,其中在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与所述表面偶联之前,将所述分析物与所述展示部分偶联。

[0860] 213. 如条款210所述的方法,其中在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物偶联至来自所述多个SNAP复合物的一个或多个另外的SNAP复合物之后,将所述分析物与所述展示部分偶联。

[0861] 214. 如条款210所述的方法,其中在将所述多个SNAP复合物中的每个SNAP复合物与来自所述多个SNAP复合物的一个或多个另外的SNAP复合物偶联之前,将所述分析物与所述展示部分偶联。

[0862] 215. 如条款210所述的方法,其中在提供所述多个SNAP复合物之后,将所述多肽与所述展示部分偶联。

[0863] 216. 如条款210所述的方法,其中在提供所述多个SNAP复合物之前,将所述分析物与所述展示部分偶联。

[0864] 217. 如条款210-216中任一项所述的方法,其中将所述分析物与所述展示部分共价偶联。

[0865] 218. 如条款217所述的方法,其中将所述分析物通过点击反应与所述展示部分共价偶联。

[0866] 219. 如条款217或218所述的方法,其中所述偶联在表面活性剂的存在下发生。

[0867] 220. 一种组合物,其包含:

[0868] a. 结构化核酸颗粒,其中所述结构化核酸颗粒包含:

[0869] i. 保持组分;

[0870] ii. 展示部分,所述展示部分包含被配置为偶联分析物的偶联基团,其中所述展示部分与所述保持组分偶联;和

[0871] iii. 被配置为与表面偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个第一表面相互作用寡核苷酸,并且其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的每个第一表面相互作用寡核苷酸包含与所述保留组分偶联的第一核酸链和第一表面相互作用部分,其中所述第一表面相互作用部分被配置为与表面连接部分形成偶联相互作用;

[0872] 其中所述捕获部分被所述保留组分制止接触所述展示部分,以及

[0873] b. 包含互补偶联基团的分析物,所述互补偶联基团被配置为与所述结构化核酸颗粒的所述展示部分偶联。

[0874] 221. 如条款220所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含第二核酸链。

[0875] 222. 如条款221所述的组合物,其中所述第二核酸链被配置为与所述表面连接部

分的互补核酸链杂交。

[0876] 223. 如条款220-222中任一项所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含捕获基团,所述捕获基团选自反应性基团、带电基团、磁性基团和结合对组分。

[0877] 224. 如条款223所述的组合物,其中所述结合对选自链霉亲和素-生物素、SpyCatcher-Spytag、SnoopCatcher-Snooptag和SdyCatcher-Sdytag。

[0878] 225. 如条款220-224中任一项所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含接头。

[0879] 226. 如条款225所述的组合物,其中所述接头包含疏水接头、亲水接头或可裂解接头。

[0880] 227. 如条款223所述的组合物,其中所述反应性基团被配置为经由点击型反应与所述表面连接部分缀合。

[0881] 228. 如条款223所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含被配置为形成非共价相互作用的基团,所述非共价相互作用选自静电相互作用、磁相互作用、氢键、离子键、范德华键、疏水相互作用或亲水相互作用。

[0882] 229. 如条款223或228所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含选自无机纳米颗粒、碳纳米颗粒、聚合物纳米颗粒和生物聚合物的纳米颗粒。

[0883] 230. 如条款220-229中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒包含:

[0884] a. 支架核酸链;和

[0885] b. 多个订书钉核酸链,其中每个订书钉核酸链与所述支架核酸链的不连续区域杂交。

[0886] 231. 如条款230所述的组合物,其中所述多条订书钉核酸链包含所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的第一表面相互作用寡核苷酸。

[0887] 232. 如条款231所述的组合物,其中所述第一表面相互作用寡核苷酸的偶联形成所述结构化核酸颗粒的三级结构。

[0888] 233. 如条款232所述的组合物,其中所述捕获部分包含所述三级结构。

[0889] 234. 如条款232或233所述的组合物,其中所述展示部分包含三级结构。

[0890] 235. 如条款220-234中任一项所述的组合物,其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的第一表面相互作用寡核苷酸包含被配置为与所述结构化核酸颗粒偶联的第一核苷酸序列和被配置为与表面连接部分的互补寡核苷酸偶联的第二核苷酸序列。

[0891] 236. 如条款235所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含不具有超过三个连续核苷酸的自身互补性的核苷酸序列。

[0892] 237. 如条款235所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含不超过3个选自脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷的脱氧核糖核苷酸种类。

[0893] 238. 如条款235所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含具有至少四个连续核苷酸的自身互补性的核苷酸序列。

[0894] 239. 如条款238所述的组合物,其中所述自身互补性包含选自双螺旋、茎环、假结和G-四链体的核酸二级结构。

[0895] 240. 如条款235-239中任一项所述的组合物,其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的第一表面相互作用寡核苷酸包含选自聚脱氧腺苷序列、聚脱氧胞苷序列、聚脱

氧鸟苷序列或聚脱氧胸苷序列的至少四个核苷酸的均聚核苷酸序列。

[0896] 241. 如条款235-240中任一项所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含至少5个核苷酸。

[0897] 242. 如条款241所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含至少10个核苷酸。

[0898] 243. 如条款242所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含至少15个核苷酸。

[0899] 244. 如条款241-243中任一项所述的组合物,其中所述第二核苷酸序列包含不超过100个核苷酸。

[0900] 245. 如条款220-244中任一项所述的组合物,其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸中的第一表面相互作用寡核苷酸还包含偶联基团。

[0901] 246. 如条款245所述的组合物,其中所述第一表面相互作用寡核苷酸与所述分析物偶联。

[0902] 247. 如条款220-246中任一项所述的组合物,其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸包含至少5个第一表面相互作用寡核苷酸。

[0903] 248. 如条款247所述的组合物,其中所述多个第一表面相互作用寡核苷酸包含至少10个第一表面相互作用寡核苷酸。

[0904] 249. 如条款248所述的组合物,所述多个第一表面相互作用寡核苷酸包含至少20个第一表面相互作用寡核苷酸。

[0905] 250. 如条款247-249中任一项所述的组合物,其中所述捕获部分包含至少0.0001个单链寡核苷酸/平方纳米有效表面积的平均第一表面相互作用寡核苷酸密度。

[0906] 251. 如条款250所述的组合物,其中所述捕获部分包含至少0.001单链寡核苷酸/平方纳米有效表面积的平均第一表面相互作用寡核苷酸密度。

[0907] 252. 如条款251所述的组合物,其中所述捕获部分包含至少0.01单链寡核苷酸/平方纳米有效表面积的平均第一表面相互作用寡核苷酸密度。

[0908] 253. 如条款247-252中任一项所述的组合物,其中所述第一表面相互作用寡核苷酸密度在所述捕获部分的所述有效面积上是基本上均匀的。

[0909] 254. 如条款247-252中任一项所述的组合物,其中所述第一表面相互作用寡核苷酸密度在所述捕获部分的所述有效面积上不是基本上均匀的。

[0910] 255. 如条款254所述的组合物,其中一定分数的所述多个第一表面相互作用寡核苷酸位于所述捕获部分的中心区域附近。

[0911] 256. 如条款254或255所述的组合物,其中一定分数的所述多个第一表面相互作用寡核苷酸集中在所述捕获部分的外部区域附近。

[0912] 257. 如条款220-256中任一项所述的组合物,其中所述捕获部分还包含第二表面相互作用寡核苷酸,其中所述第二表面相互作用寡核苷酸包含第一核苷酸序列和第二表面相互作用部分,所述第一核苷酸序列被配置为与所述结构化核酸颗粒偶联,其中所述第二表面相互作用寡核苷酸的所述第二表面相互作用部分不同于所述多个第一表面相互作用寡核苷酸的第一表面相互作用寡核苷酸的所述第一表面相互作用部分。

[0913] 258. 如条款257所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含具有第一核酸序列的核酸,并且所述第二表面相互作用部分包含具有第二核酸序列的核酸,其中所述第一核酸序列不同于所述第二核酸序列。

[0914] 259. 如条款257所述的组合物,其中所述第一表面相互作用部分包含具有第一核酸序列的核酸,并且所述第二表面相互作用部分包含被配置为与偶联表面形成共价键的反应性基团或者被配置为与偶联表面形成非共价相互作用的非核酸基团。

[0915] 260. 一种组合物,其包含:

[0916] a. 结构化核酸颗粒,其中所述结构化核酸颗粒包含:

[0917] i. 保持组分;

[0918] ii. 与所述保持组分偶联的展示部分;和

[0919] iii. 与所述保持组分偶联的捕获部分,其中所述捕获部分包含多个寡核苷酸,并且其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分;和

[0920] b. 包含偶联表面的固体支持物,其中所述表面包含表面连接部分,并且其中所述多个表面相互作用部分中的表面相互作用部分与所述表面连接部分偶联,其中所述展示部分被所述保持组分制止接触所述表面。

[0921] 261. 如条款260所述的组合物,所述组合物还包含与所述展示部分偶联的分析物。

[0922] 262. 如条款261所述的组合物,其中所述分析物被所述保持组分制止接触所述表面。

[0923] 263. 如条款260所述的组合物,其中所述固体支持物包含有所述一个或多个表面连接部分的地址,其中所述地址在单分析物分辨率下是可分辨的。

[0924] 264. 如条款261所述的组合物,其中所述地址包含一个或多个表面,其中所述一个或多个表面包含所述偶联表面,并且其中所述偶联表面包含所述一个或多个表面连接部分。

[0925] 265. 如条款262所述的组合物,其中所述一个或多个表面形成所述固体支持物的三维结构。

[0926] 266. 如条款263所述的组合物,其中所述三维结构包含凸起结构或孔结构。

[0927] 267. 如条款260-264中任一项所述的组合物,其中所述结构化核酸颗粒与所述固体支持物的偶联阻断了所述展示部分接触所述偶联表面。

[0928] 268. 如条款260-265中任一项所述的组合物,其中所述偶联表面包含的面积大于所述结构化核酸颗粒的所述捕获部分的有效表面积。

[0929] 269. 如条款260-265中任一项所述的组合物,其中所述偶联表面包含的面积小于所述结构化核酸颗粒的所述捕获部分的有效表面积。

[0930] 270. 如条款260-267中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个表面连接部分包含一个或多个互补寡核苷酸,其中所述多个互补寡核苷酸中的互补寡核苷酸被配置为与所述表面相互作用部分偶联,并且其中所述表面相互作用部分包含具有被配置为与所述互补寡核苷酸杂交的核苷酸序列的核酸链。

[0931] 271. 如条款260-268中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个表面连接部分包含一个或多个互补反应性基团,其中所述一个或多个互补反应性基团中的互补反应性基团被配置为与所述表面相互作用部分偶联,并且其中所述表面相互作用部分包含被配置为与所述互补反应性基团偶联的反应性基团。

[0932] 272. 如条款260-269中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个表面连接部分包含一个或多个表面基团,其中所述一个或多个互补反应性基团的表面基团被配置为与所

述表面相互作用部分形成偶联相互作用,并且其中所述偶联相互作用包括静电相互作用、磁相互作用、氢键、离子键、范德华键、疏水相互作用或亲水相互作用。

[0933] 273. 如条款260-270中任一项所述的组合物,其中所述偶联表面包含多个表面连接部分。

[0934] 274. 如条款271所述的组合物,其中所述偶联表面的所述表面连接部分密度在所述偶联表面上是基本上均匀的。

[0935] 275. 如条款271所述的组合物,其中所述偶联表面的所述表面连接部分密度在所述偶联表面上不是基本上均匀的。

[0936] 276. 如条款273所述的组合物,其中一定分数的所述多个表面连接部分位于所述偶联表面的中心区域内。

[0937] 277. 如条款273或274所述的组合物,其中第二分数的所述多个表面连接部分位于所述偶联表面的外部区域内。

[0938] 278. 如条款271-275中任一项所述的组合物,其中一定分数的所述多个寡核苷酸的表面相互作用部分与所述多个表面连接部分中一定分数的表面连接部分偶联。

[0939] 279. 如条款276所述的组合物,其中所述表面相互作用部分的分数包含至少0.1。

[0940] 280. 如条款277所述的组合物,其中所述表面相互作用部分的分数包含至少0.5。

[0941] 281. 如条款277或278所述的组合物,其中所述表面相互作用部分的分数小于1.0。

[0942] 282. 如条款277-279中任一项所述的组合物,其中所述表面连接部分的分数包含至少0.01。

[0943] 283. 如条款280所述的组合物,其中所述表面连接部分的分数包含至少0.1。

[0944] 284. 如条款281所述的组合物,其中所述表面连接部分的分数包含小于1.0。

[0945] 285. 如条款260-284中任一项所述的组合物,其中所述固体支持物还包含钝化层。

[0946] 286. 如条款285所述的组合物,其中所述钝化层包含多个分子,所述多个分子被配置为防止分子与所述固体支持物的非特异性结合。

[0947] 287. 如条款286所述的组合物,其中所述多个分子包含多个表面连接分子链,其选自聚乙二醇、聚环氧乙烷、烷烃、核酸或葡聚糖。

[0948] 288. 如条款286或287所述的组合物,其中所述多个分子中的每个分子包含所述一个或多个表面连接部分中的表面连接部分。

[0949] 289. 如条款286-288中任一项所述的组合物,其中所述多个分子中的每个分子还包含将所述一个或多个表面连接部分中的表面连接部分与偶联表面偶联的连接基团。

[0950] 290. 如条款289所述的组合物,其中所述连接基团包含硅烷、磷酸酯或膦酸酯。

[0951] 291. 一种鉴定多肽的方法,所述方法包括:

[0952] a. 提供如条款260-290中任一项所述的组合物,其中所述多肽与所述展示部分偶联;

[0953] b. 将所述固体支持物与多种可检测亲和试剂接触;

[0954] c. 检测所述多种可检测亲和试剂中的可检测亲和试剂与所述多肽结合的存在或不存在;

[0955] d. 任选地用第二多种可检测亲和试剂重复步骤b) -c); 以及

[0956] e. 基于所述亲和试剂中的一种或多种的结合的存在或不存在, 鉴定所述多肽。

[0957] 292. 如条款291所述的方法,其中对所述结合的存在或不存在的所述检测包括检测来自所述多种可检测亲和试剂中的可检测亲和试剂的信号。

[0958] 293. 如条款292所述的方法,其中所述可检测信号包括荧光、发光、发光寿命或信号编码。

[0959] 294. 如条款293所述的方法,其中所述信号编码包括将核酸条形码或肽条形码从所述可检测亲和试剂转移至记录核酸或肽。

[0960] 295. 一种对多肽测序的方法,所述方法包括:

[0961] a. 提供如条款260-290中任一项所述的组合物,其中所述多肽与所述展示部分偶联;

[0962] b. 通过Edman型降解反应去除所述多肽的末端氨基酸残基;

[0963] c. 鉴定所述末端氨基酸残基;以及

[0964] d. 重复步骤b-c),直到鉴定出所述多肽的氨基酸残基序列。

[0965] 296. 如条款295所述的方法,其中对所述末端氨基酸残基的所述鉴定包括:

[0966] a. 将所述多肽与对所述末端氨基酸残基具有结合特异性的亲和试剂接触;以及

[0967] b. 检测所述亲和试剂的存在或不存在,其中所述亲和试剂被配置为产生与所述末端氨基酸残基对应的可区分信号,其中所述可区分信号可通过荧光、发光或发光寿命来检测。

[0968] 297. 如条款296所述的方法,其中所述可区分信号可通过荧光、发光或发光寿命来检测。

[0969] 298. 如条款296所述的方法,其中对所述末端氨基酸残基的所述鉴定包括对所述多肽进行荧光测序反应。

[0970] 299. 一种单分析物阵列,其包含:

[0971] a. 包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址都可以单分析物分辨率来分辨开,其中每个地址包含偶联表面,并且其中每个偶联表面包含一个或多个表面连接部分;

[0972] b. 多个结构化核酸颗粒,其中每个结构化核酸颗粒包含偶联部分,其中所述偶联部分包含多个寡核苷酸,其中所述多个寡核苷酸中的每个寡核苷酸包含表面相互作用部分,其中所述多个结构化核酸颗粒中的每个结构化核酸颗粒通过所述多个寡核苷酸的所述表面相互作用部分与一个或多个互补寡核苷酸的表面连接部分的结合而与所述多个地址中的地址偶联,并且其中所述多个结构化核酸颗粒中的结构化核酸颗粒包含含有与分析物偶联的偶联位点的展示部分。

[0973] 300. 如条款299所述的单分析物阵列,其中所述阵列包含有序阵列。

[0974] 301. 如条款300所述的单分析物阵列,其中每个偶联表面通过光刻工艺形成。

[0975] 302. 如条款300或301所述的单分析物阵列,其中所述多个地址中的每个地址与一个或多个间隙区域相邻,其中所述一个或多个间隙区域中的每个间隙区域不包含偶联表面。

[0976] 303. 如条款302所述的单分析物阵列,其中所述一个或多个间隙区域中的间隙区域包含破坏部分,其中所述破坏部分被配置为降低分子与所述间隙区域偶联的可能性。

[0977] 304. 如条款302或303所述的单分析物阵列,其中所述偶联表面包含相对于所述一

个或多个间隙区域中的间隙区域的凸起表面或凹陷表面。

[0978] 305. 如条款299所述的单分析物阵列,其中所述阵列包含无序阵列。

[0979] 306. 如条款305所述的单分析物阵列,其中所述无序阵列还包含与所述固体支持物相邻的脂质双层。

[0980] 307. 如条款306所述的方法,其中所述一个或多个表面连接部分中的表面连接部分与所述脂质双层的脂质分子偶联。

[0981] 308. 如条款307所述的方法,其中所述脂质分子包含磷脂或胆固醇。

[0982] 309. 如条款299-308中任一项所述的单分析物阵列,其中所述多个地址的SNAP占据分数包含至少0.5。

[0983] 310. 如条款309所述的单分析物阵列,其中所述多个地址的SNAP占据分数包含至少0.9。

[0984] 311. 如条款309或310所述的单分析物阵列,其中所述多个地址中包含两个或更多个SNAP的地址分数不超过约0.1。

[0985] 312. 如条款311所述的单分析物阵列,其中所述多个地址中包含两个或更多个SNAP的地址分数不超过约0.01。

[0986] 313. 如条款309-312中任一项所述的单分析物阵列,其中具有可检测分析物的地址的分数为至少0.5。

[0987] 314. 如条款313所述的单分析物阵列,其中具有可检测分析物的地址的分数为至少0.9。

[0988] 315. 一种单分析物阵列,其包含:

[0989] a. 包含多个地址的固体支持物,其中所述多个地址中的每个地址可以单分析物分辨率与每个其他地址分辨开,并且其中每个地址通过一个或多个间隙区域与每个相邻地址分隔开;以及

[0990] b. 多个分析物,其中所述多个分析物中的单分析物与所述多个地址中的地址偶联,其中所述多个地址中的每个地址包含不超过一个单分析物,其中每个单分析物通过核酸结构与所述地址的偶联表面偶联,并且其中所述核酸结构阻断所述单分析物接触所述偶联表面。

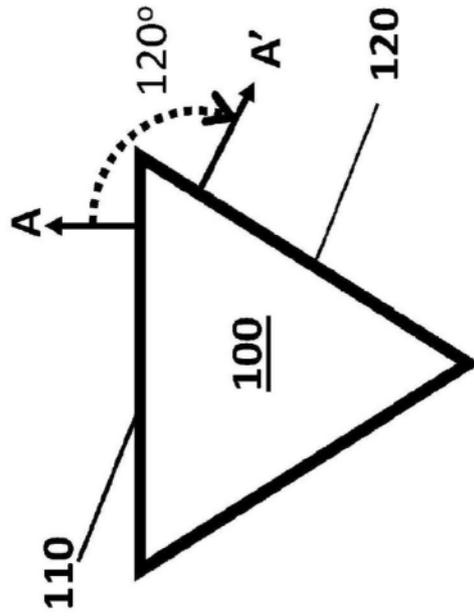


图1A

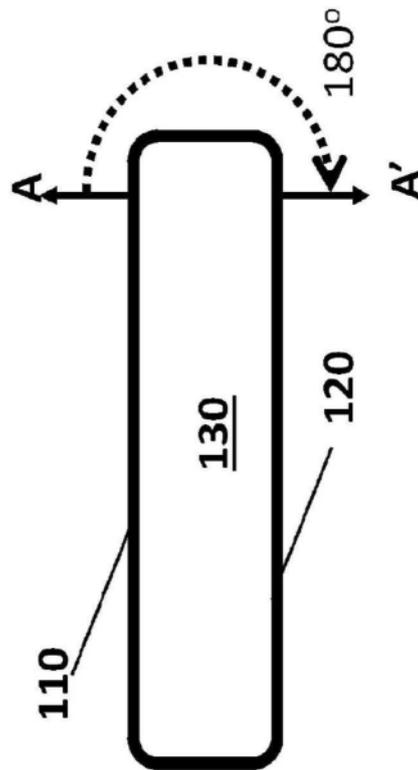


图1B

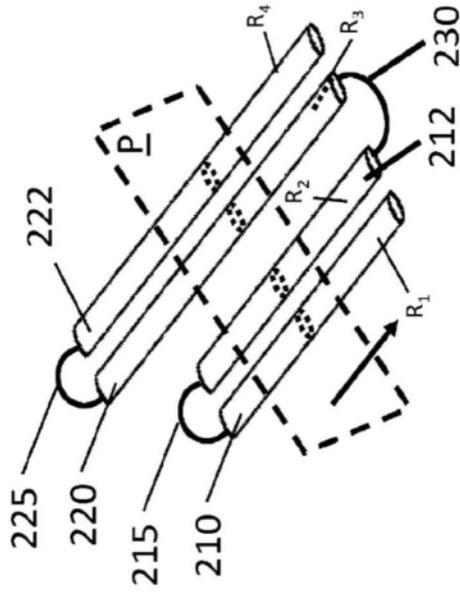


图2A

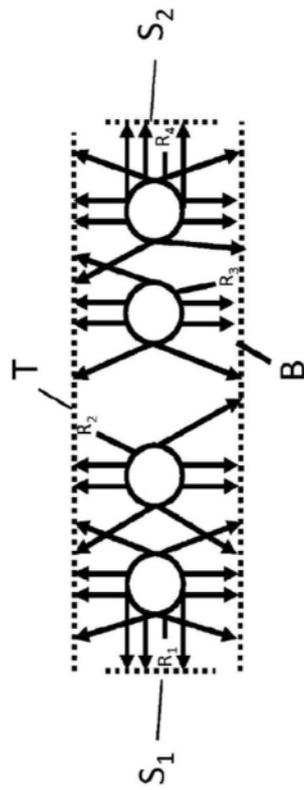


图2B

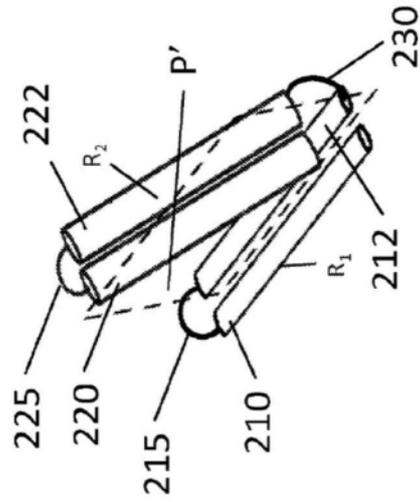


图2C

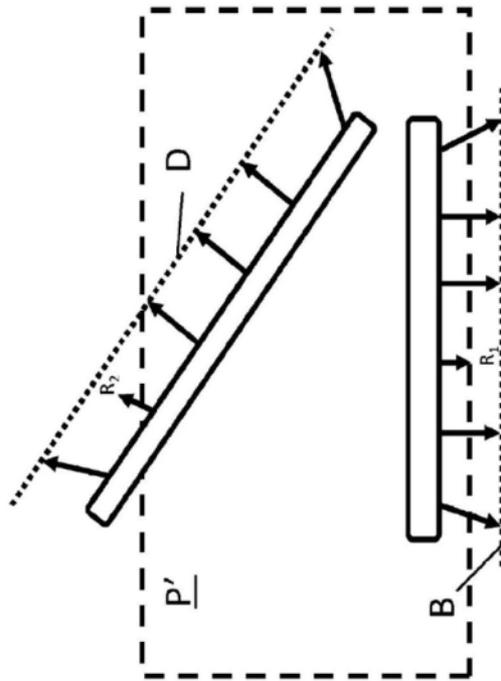


图2D

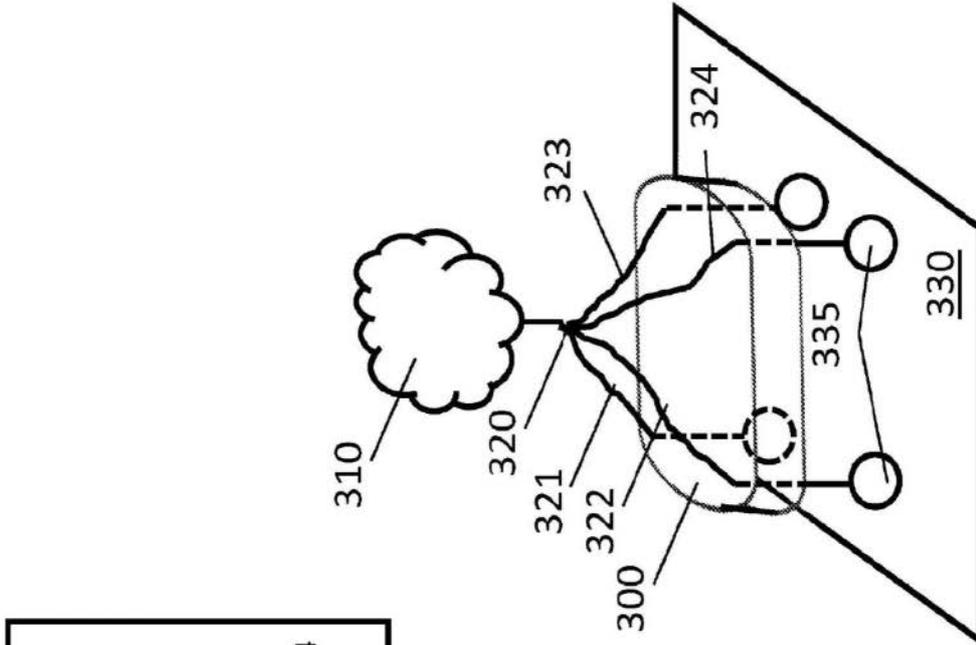


图 3A

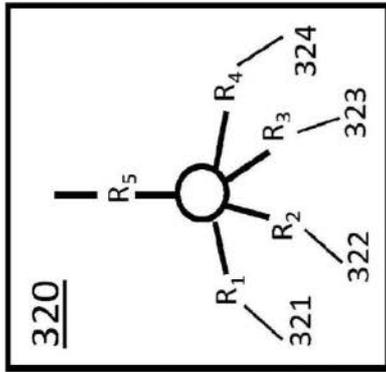


图 3B

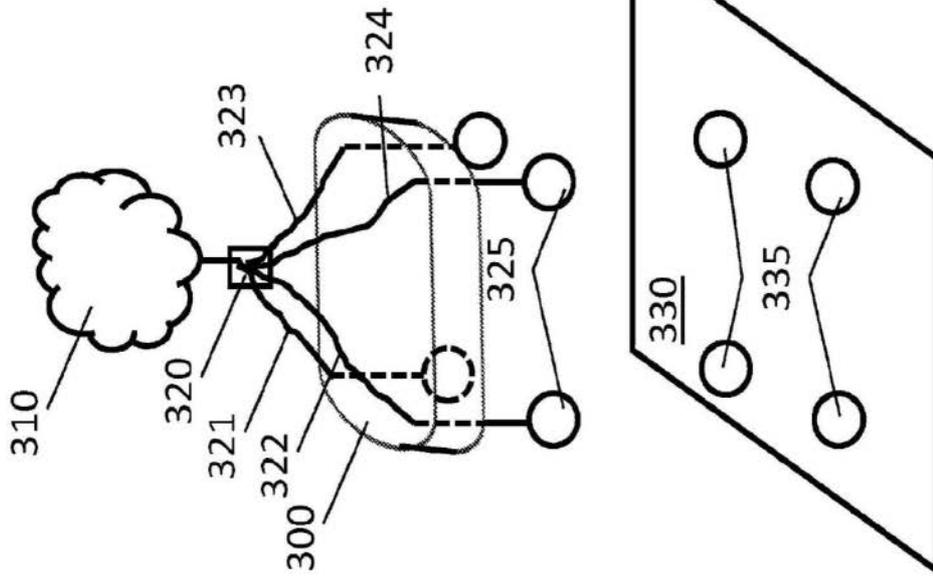


图 3C

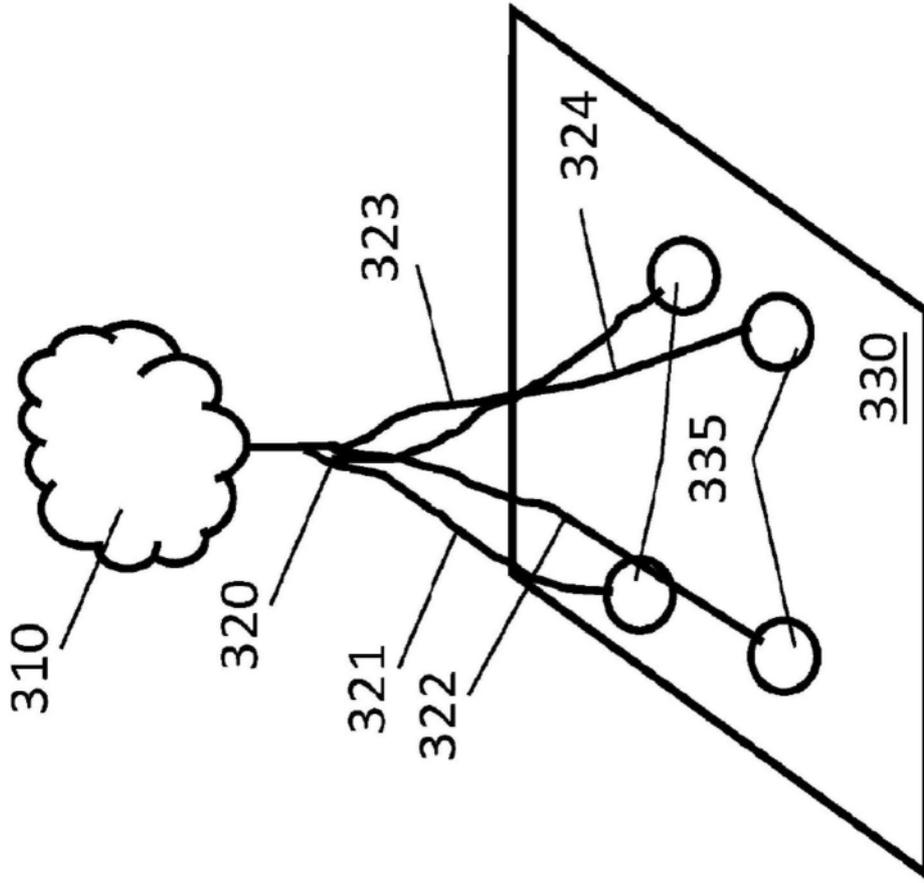


图3D

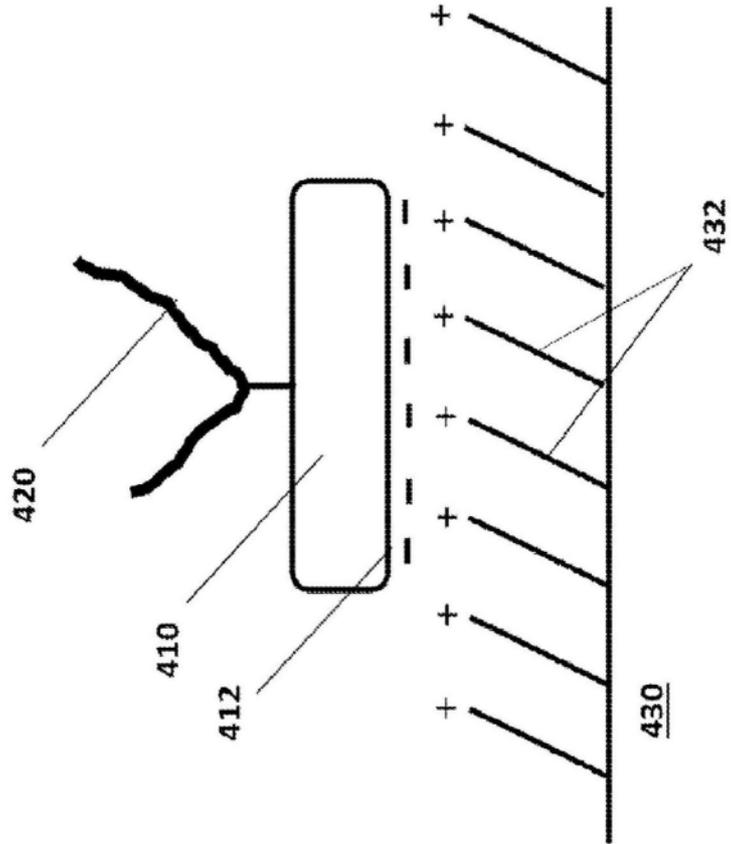


图4A

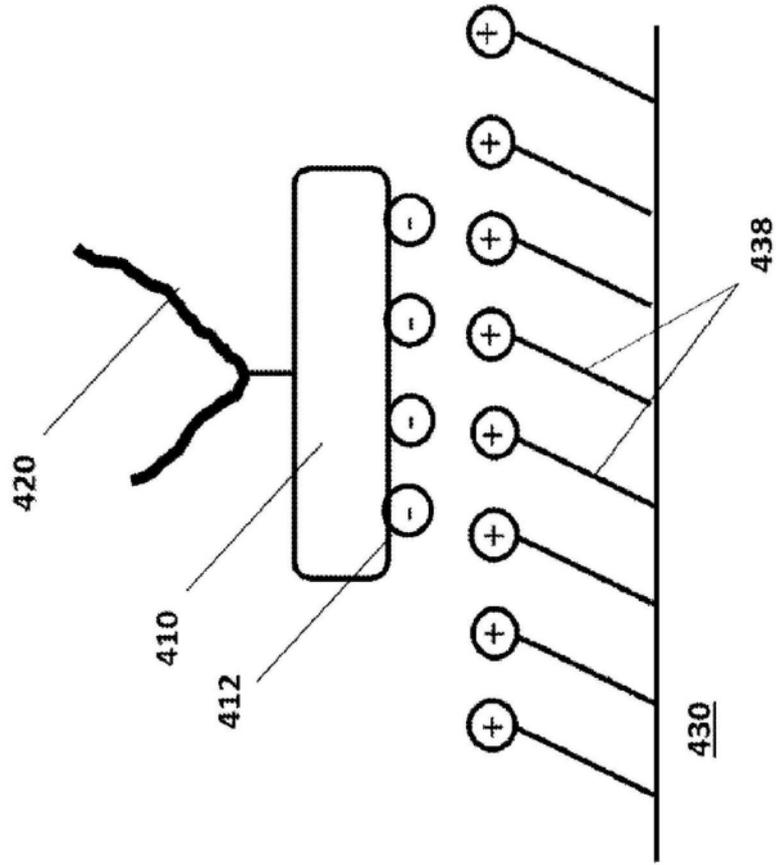


图4B

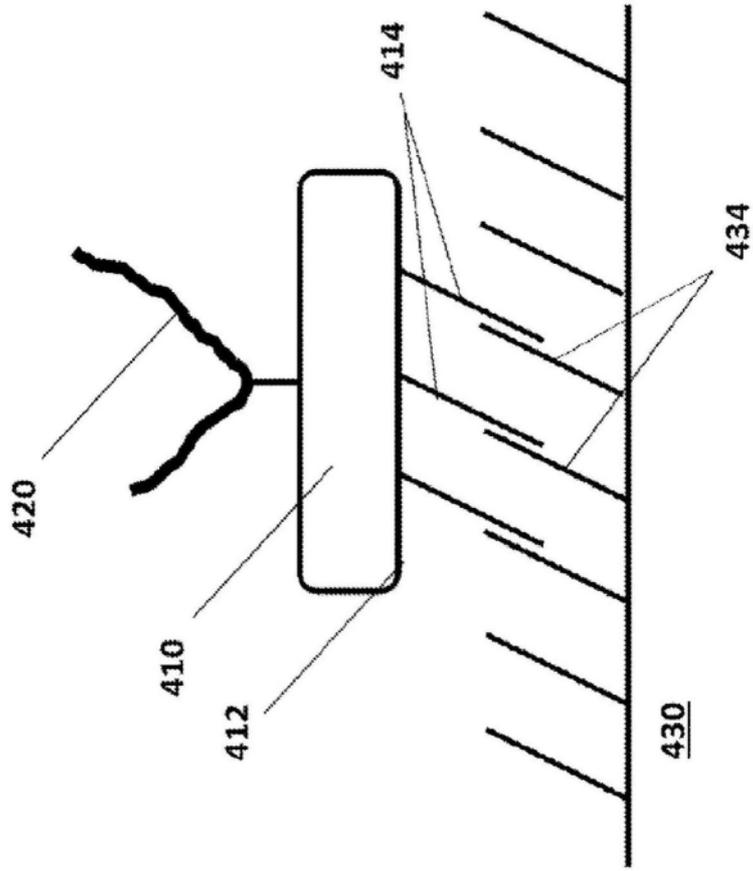


图4C

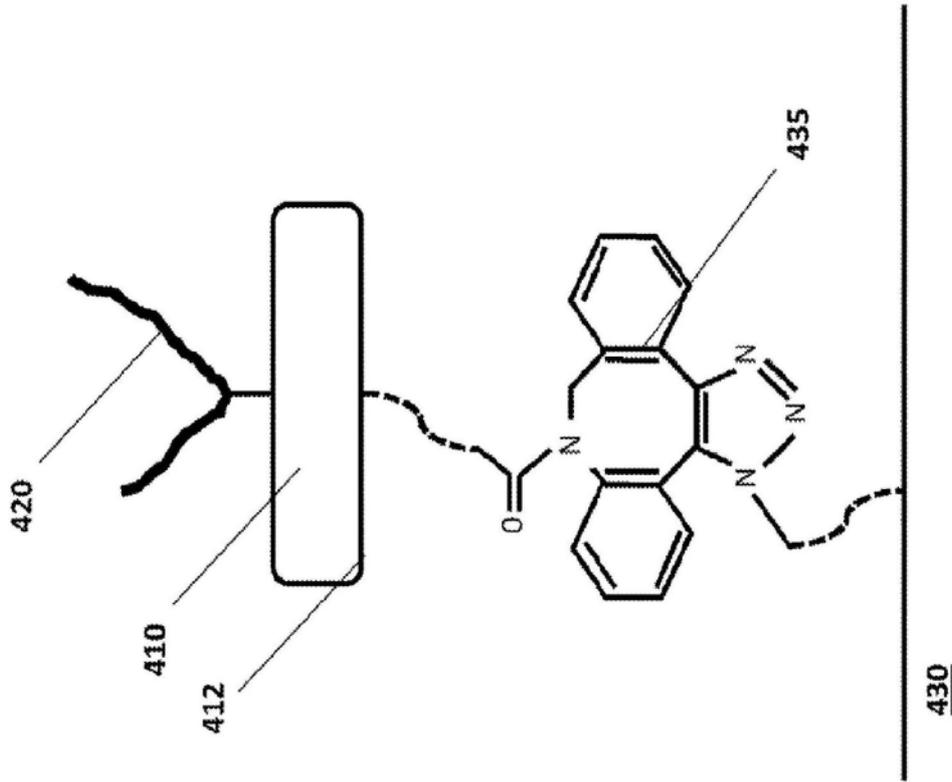


图4D

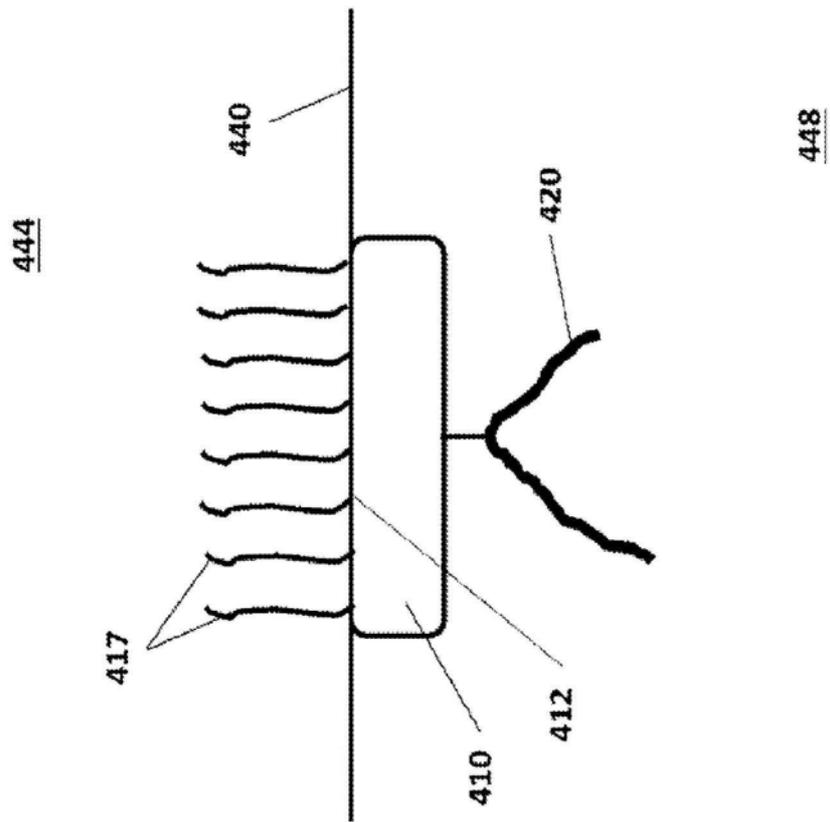


图4E

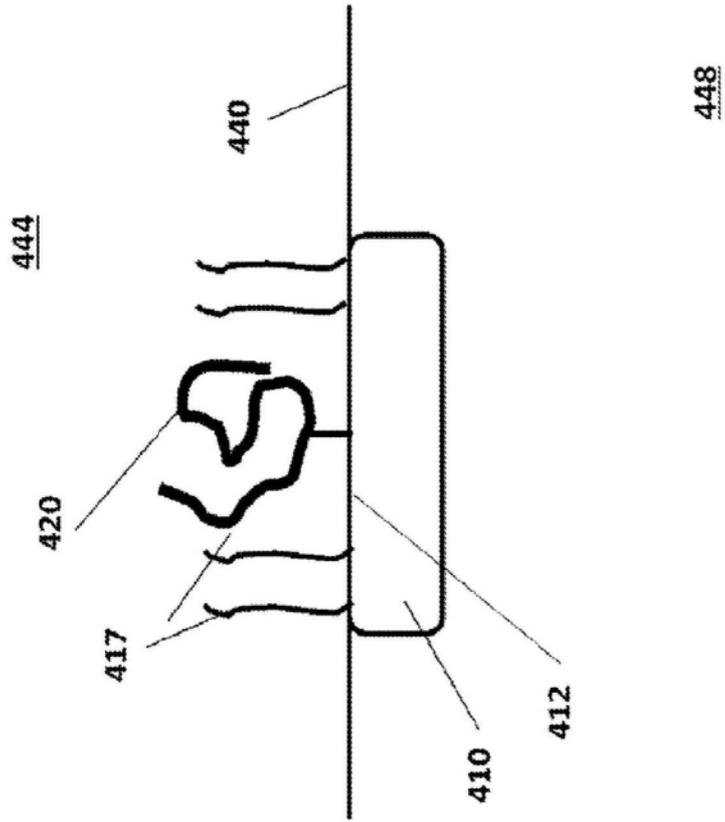


图4F

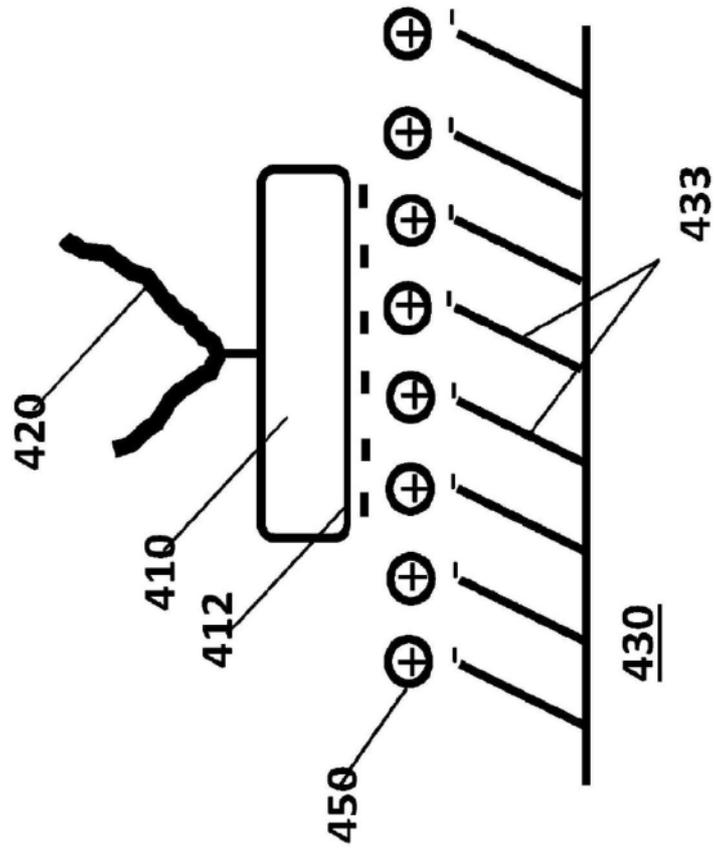


图4G

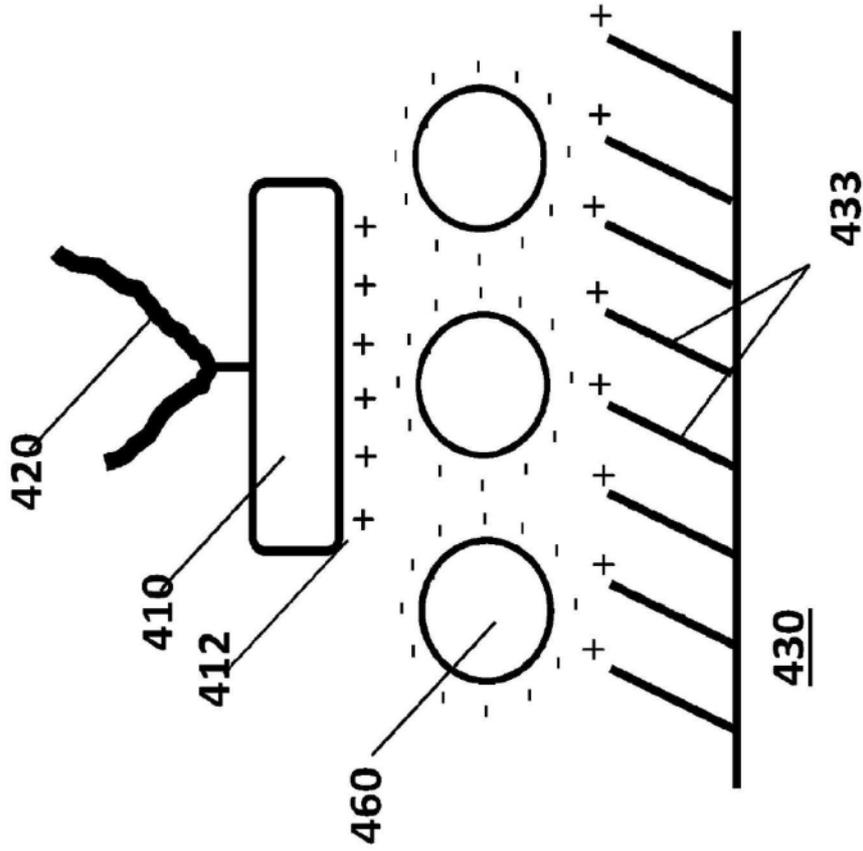


图4H

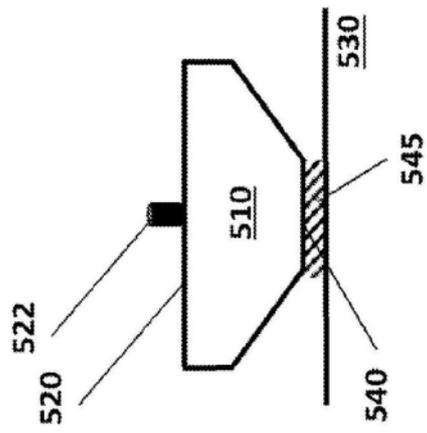


图5A

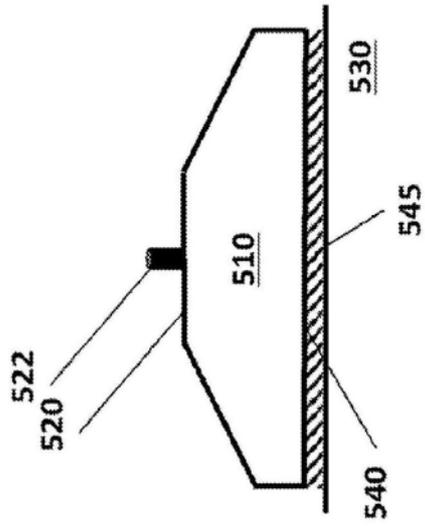


图5B

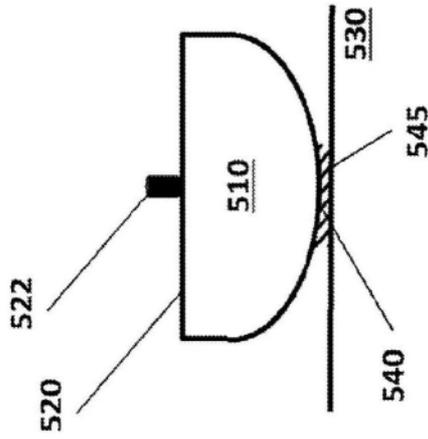


图5C

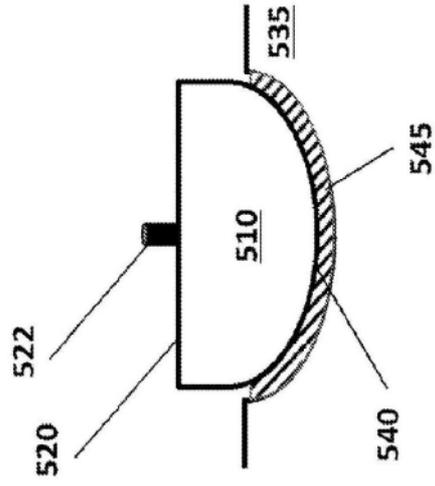


图5D

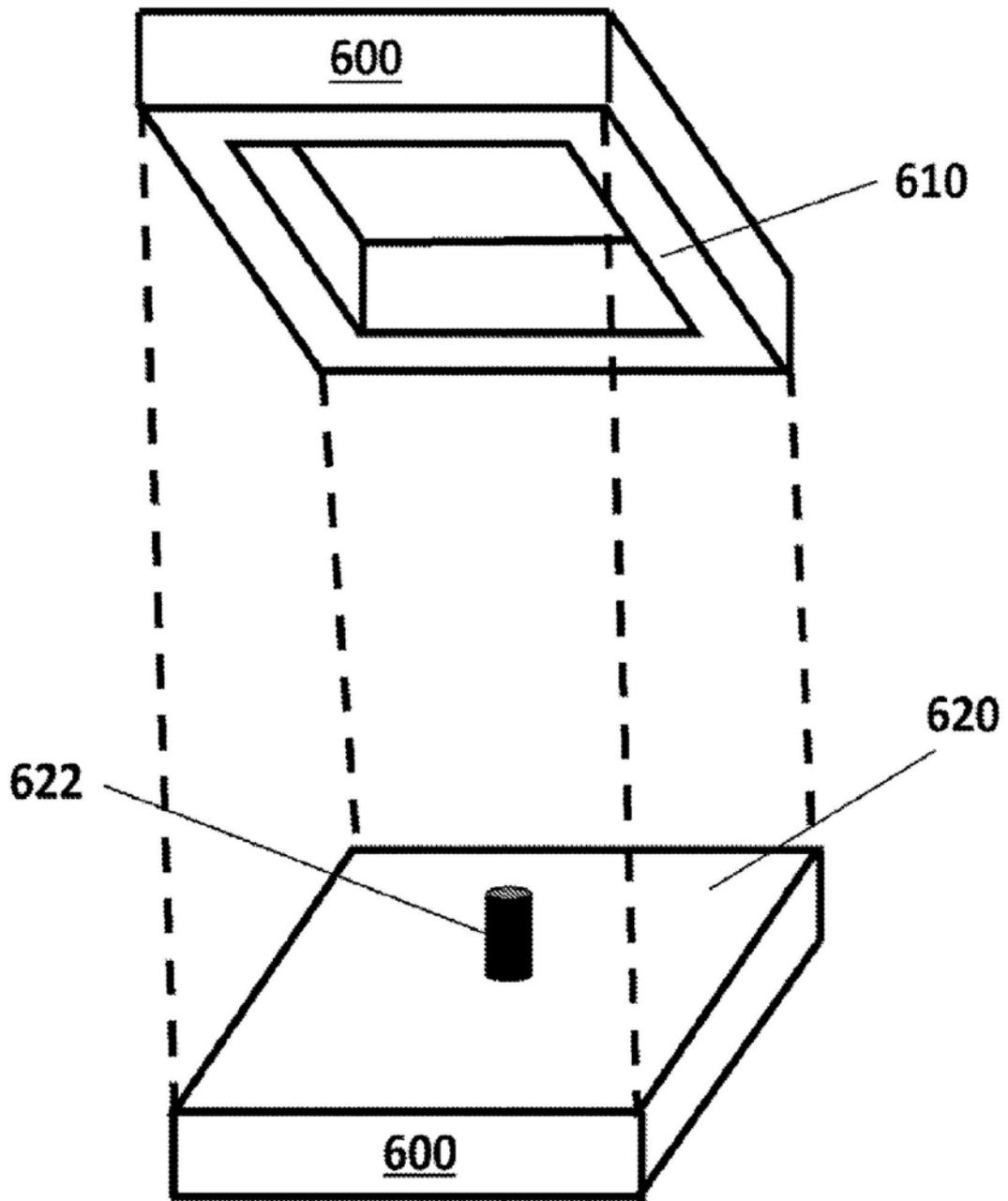


图6

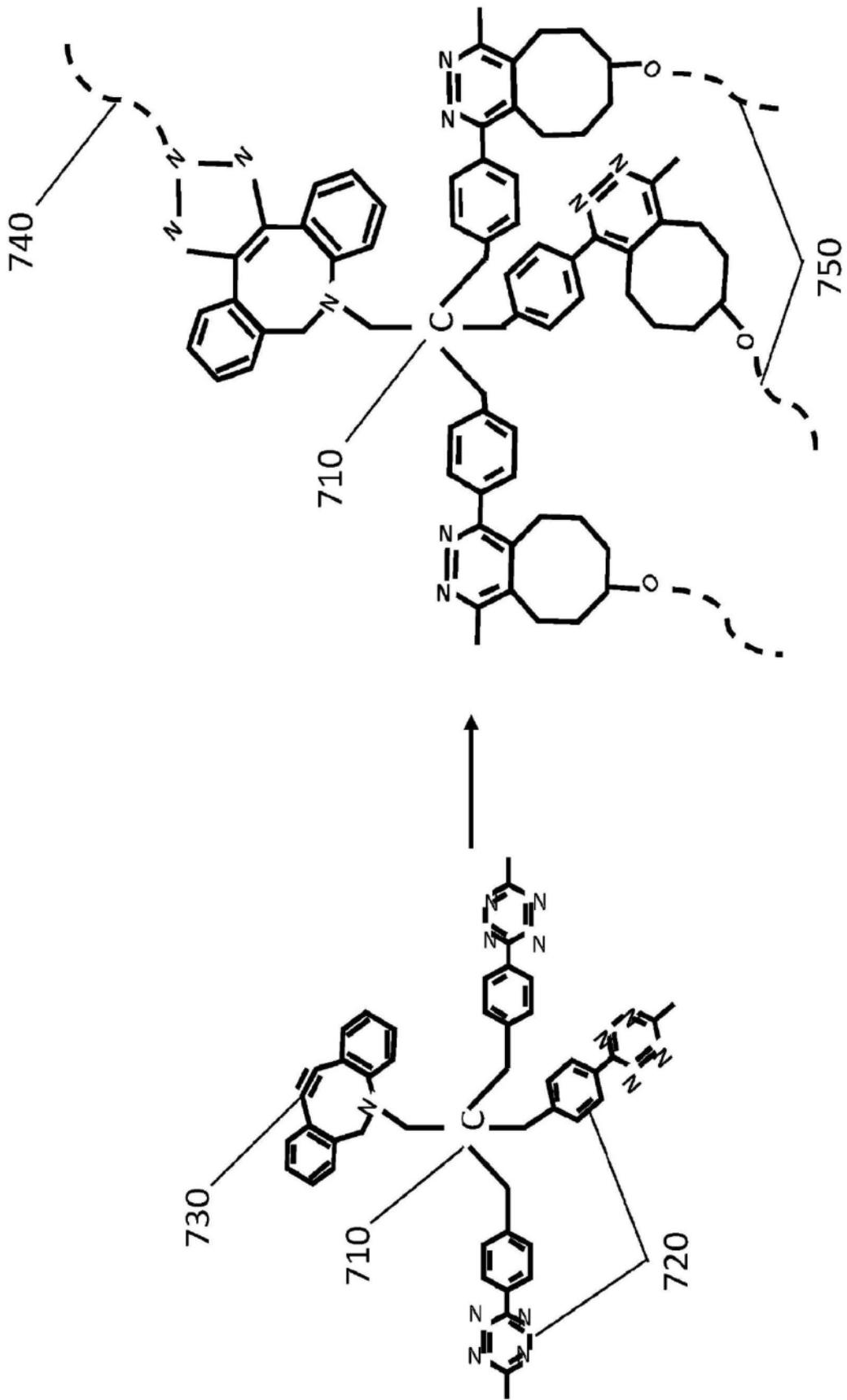


图7A

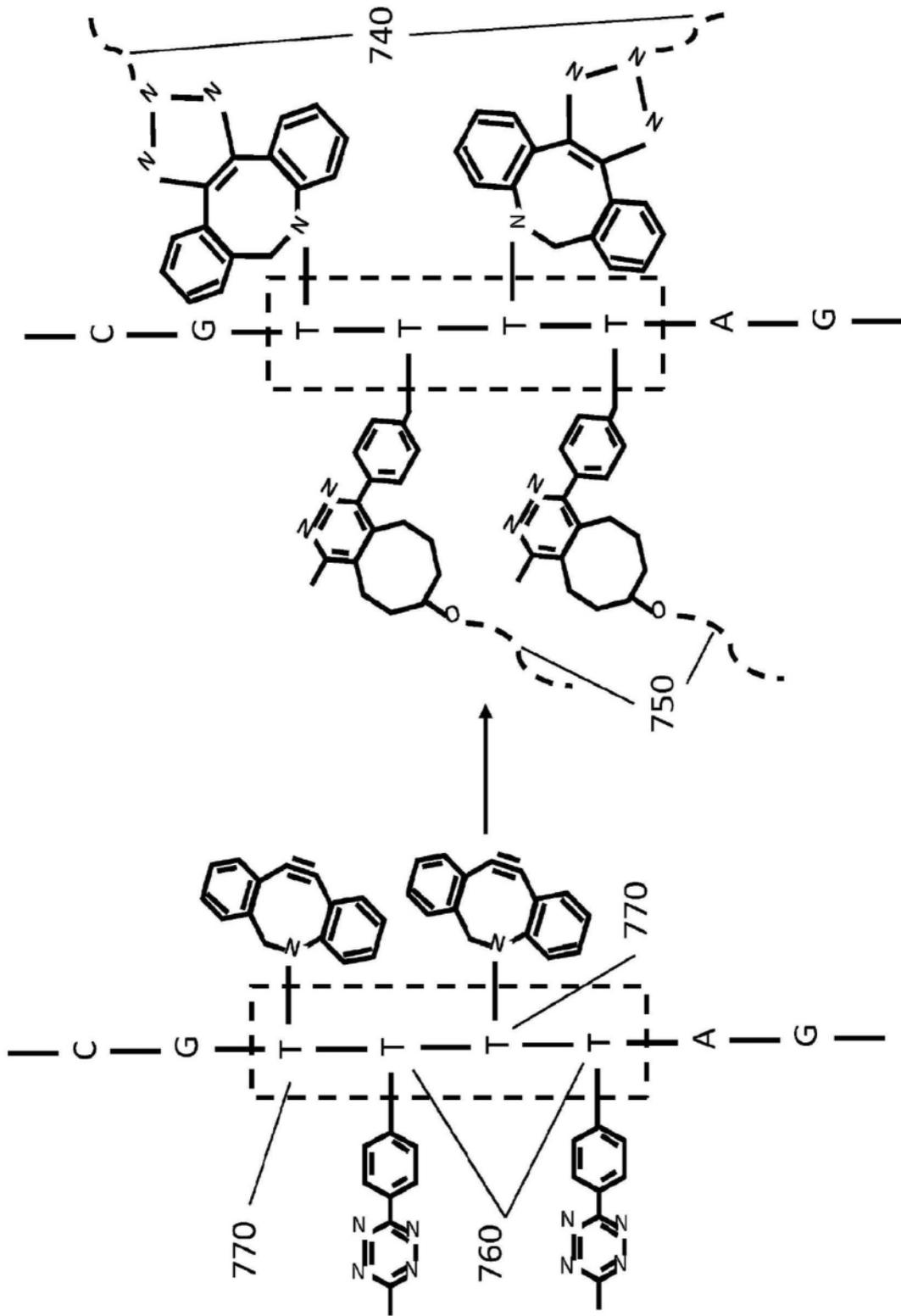


图7B

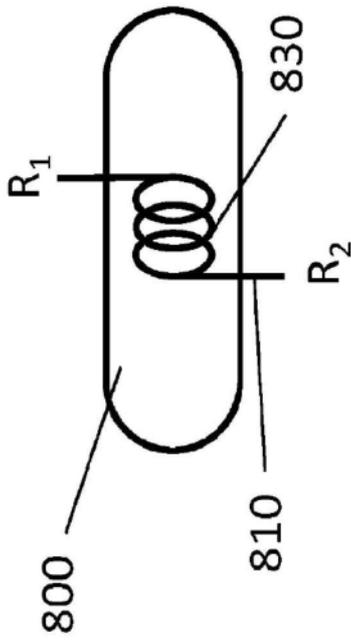


图8A

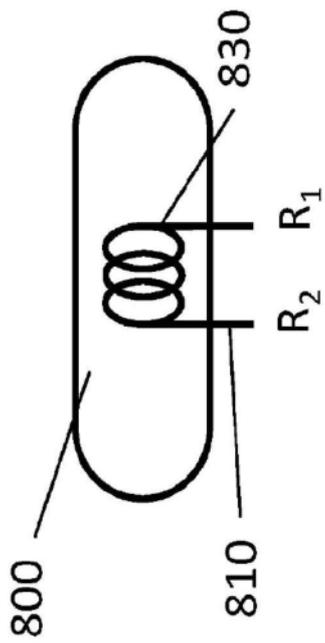


图8B

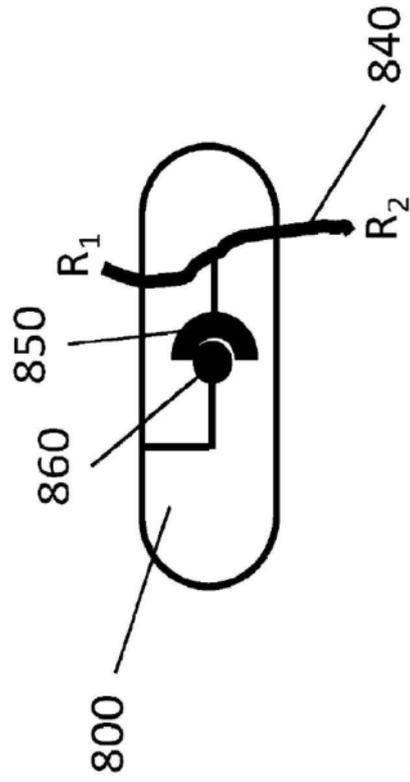


图8C

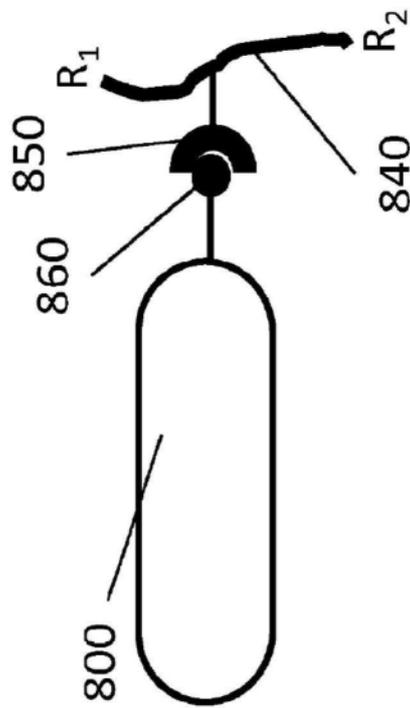


图8D

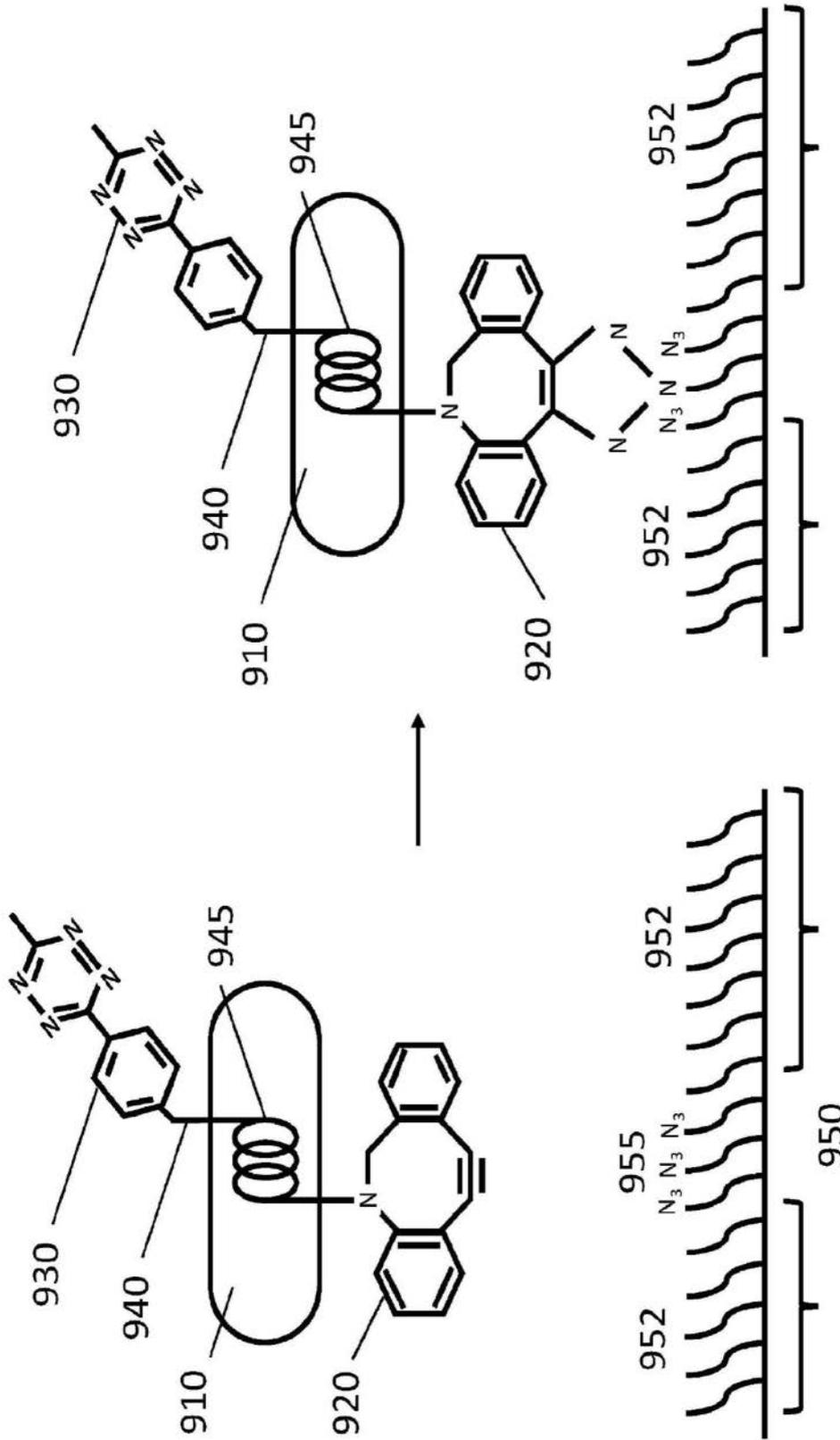


图 9B

图 9A

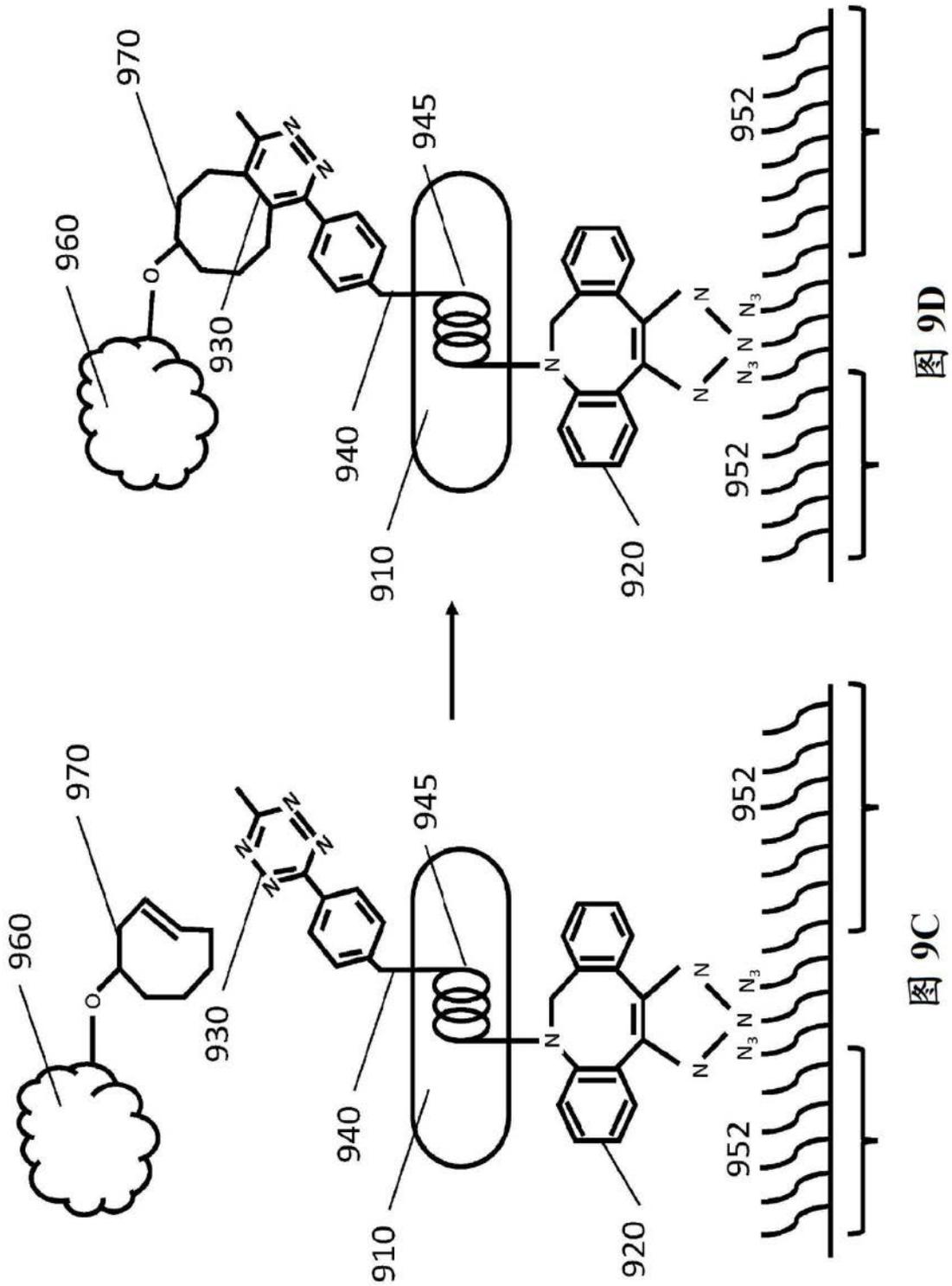


图 9C

图 9D

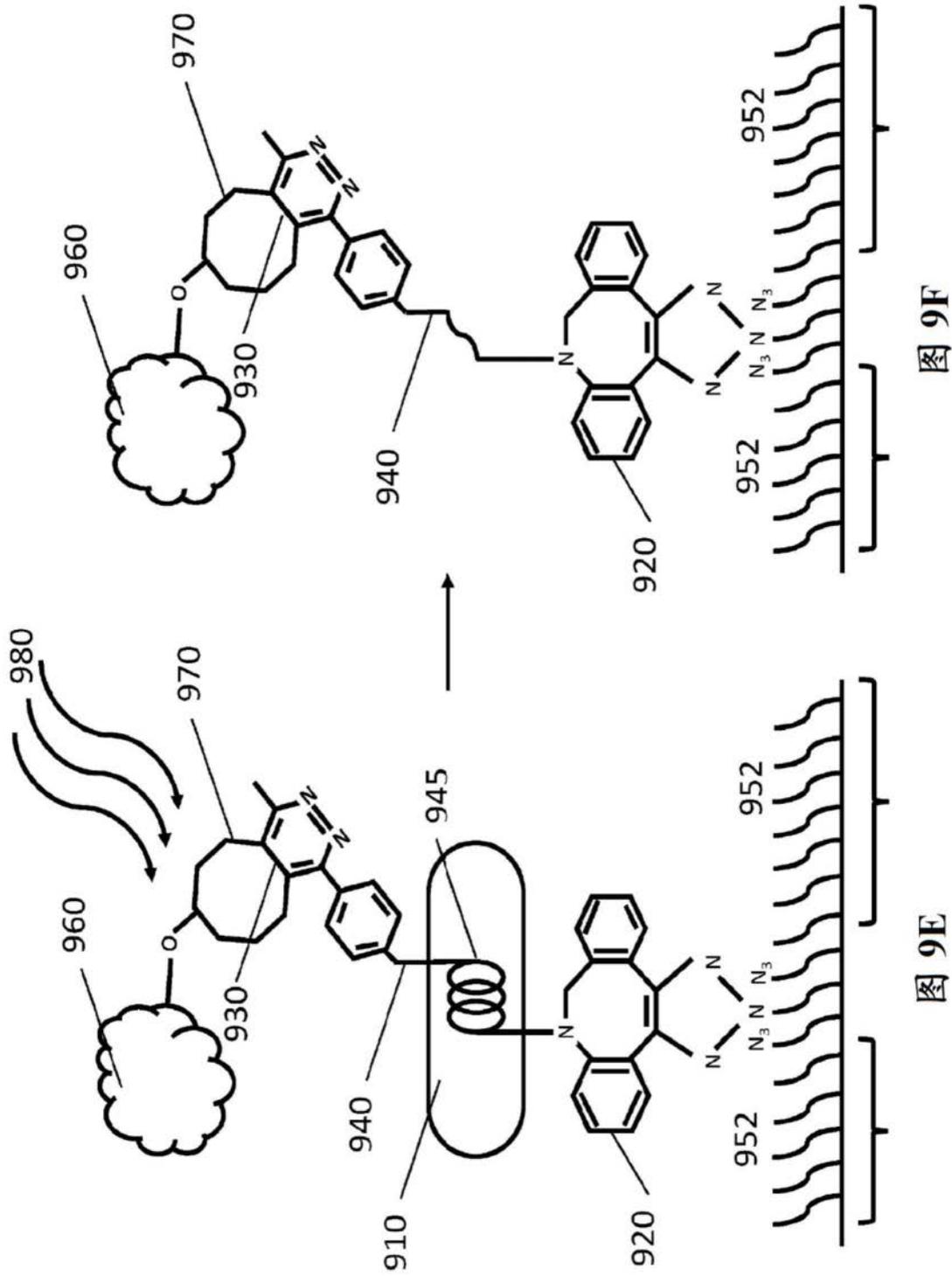


图 9F

图 9E

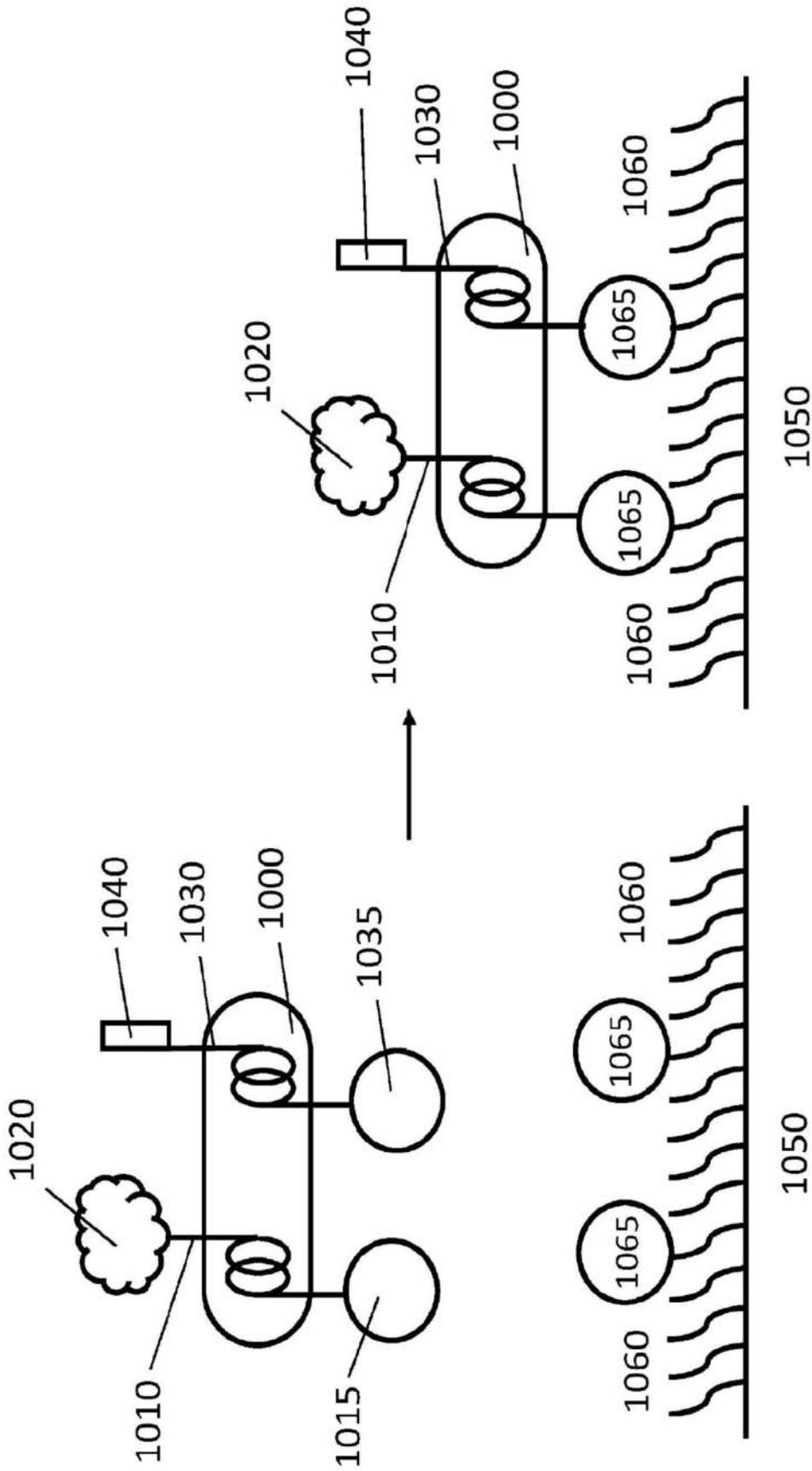


图 10B

图 10A

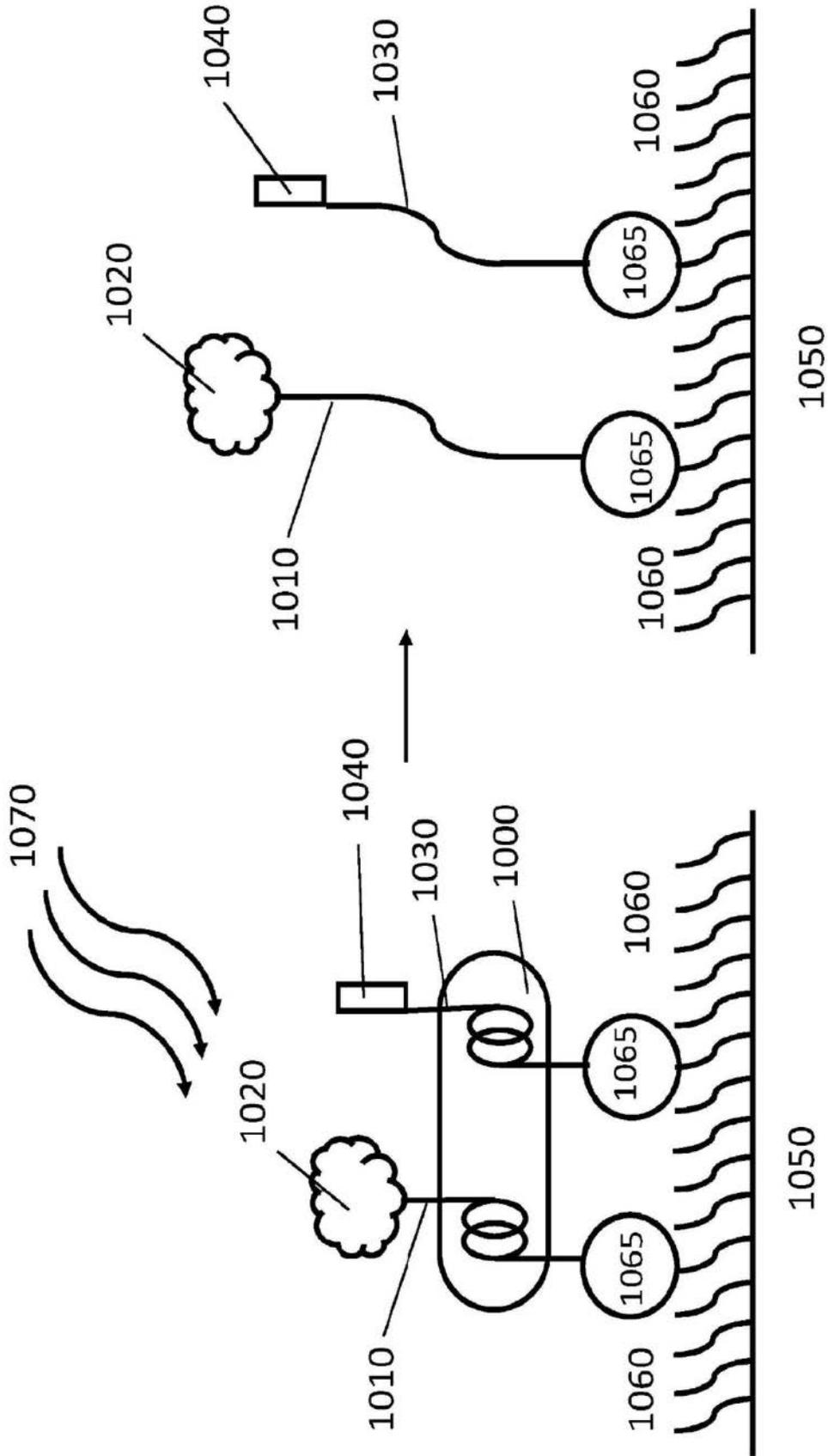


图 10C

图 10D

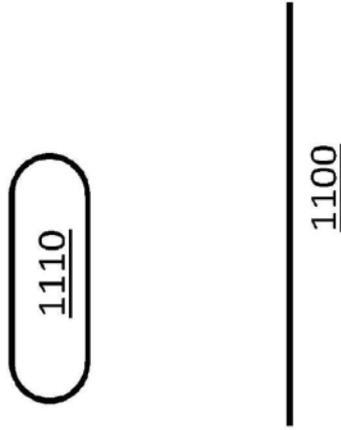


图11A

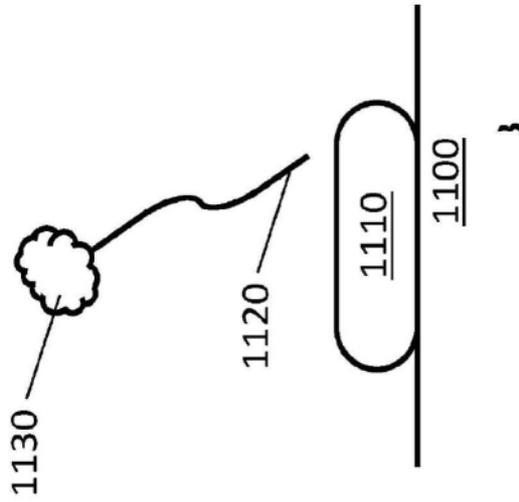


图11B

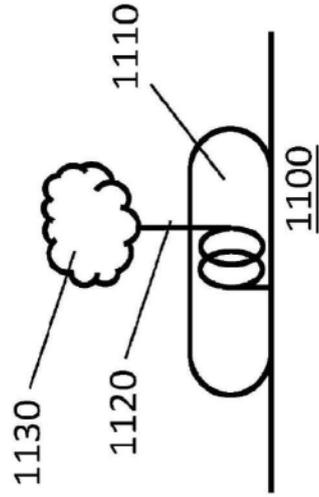


图11C

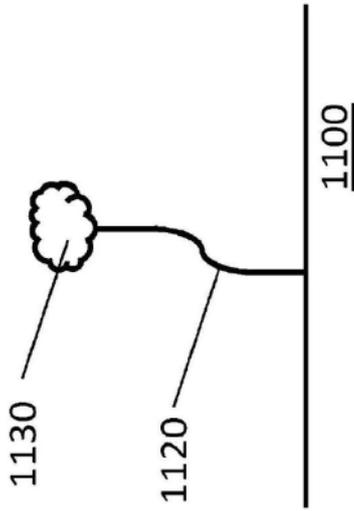


图11D

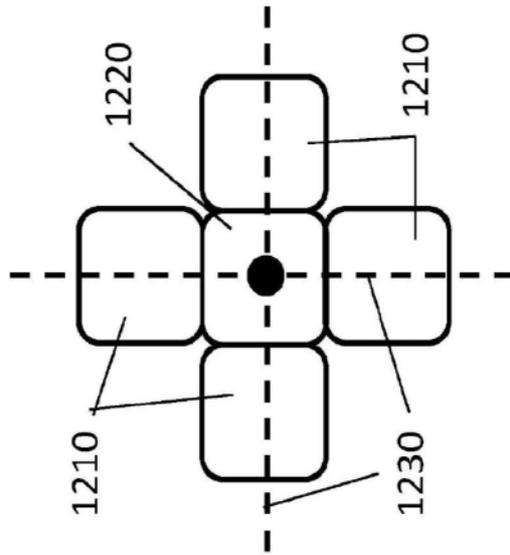


图12A

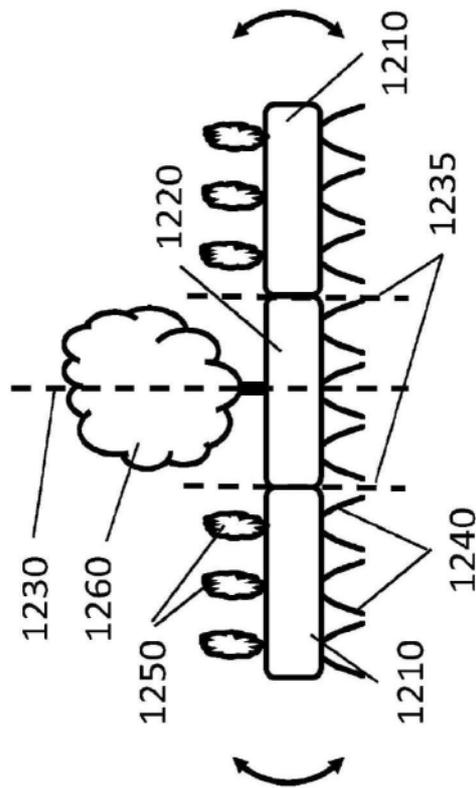


图12B

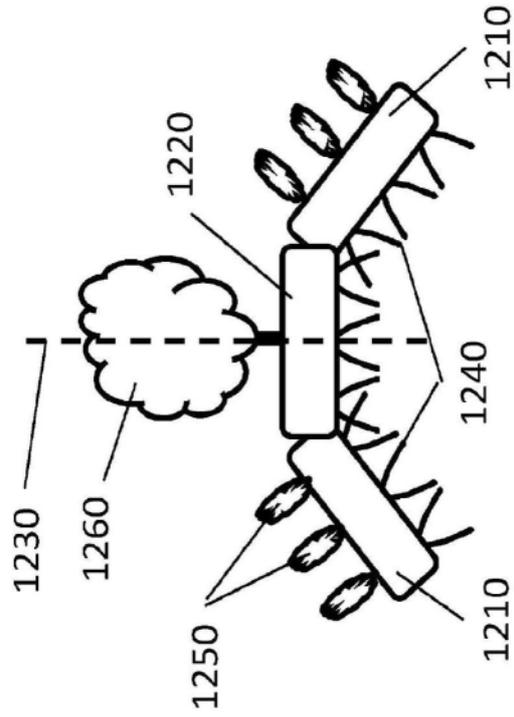


图12C

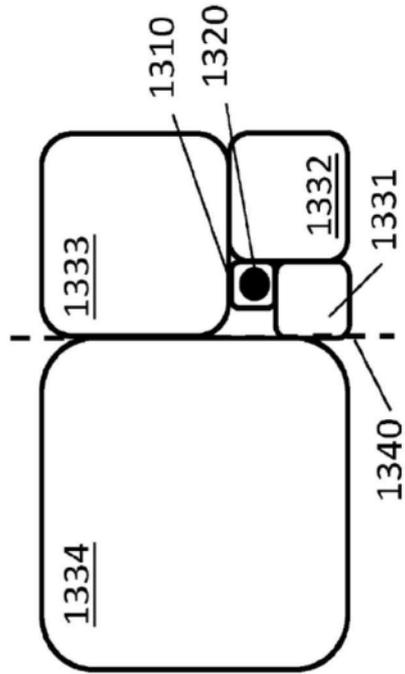


图13A

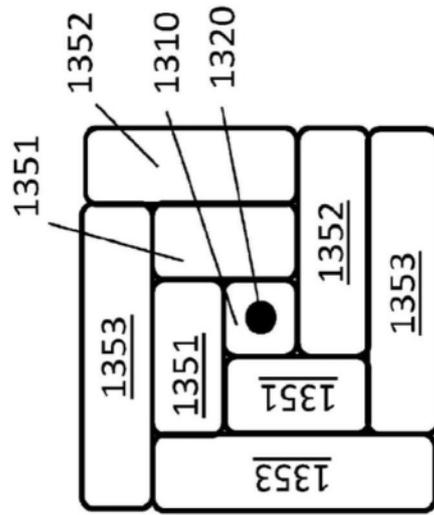


图13B

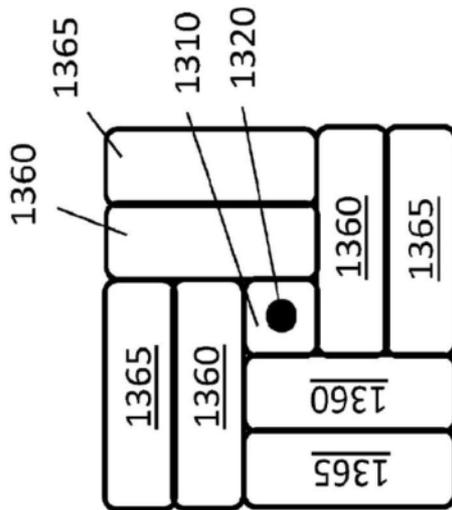


图13C

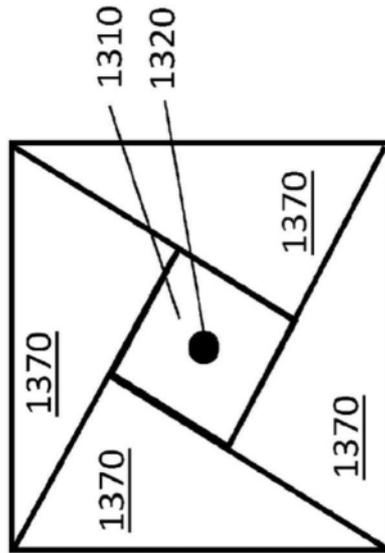


图13D

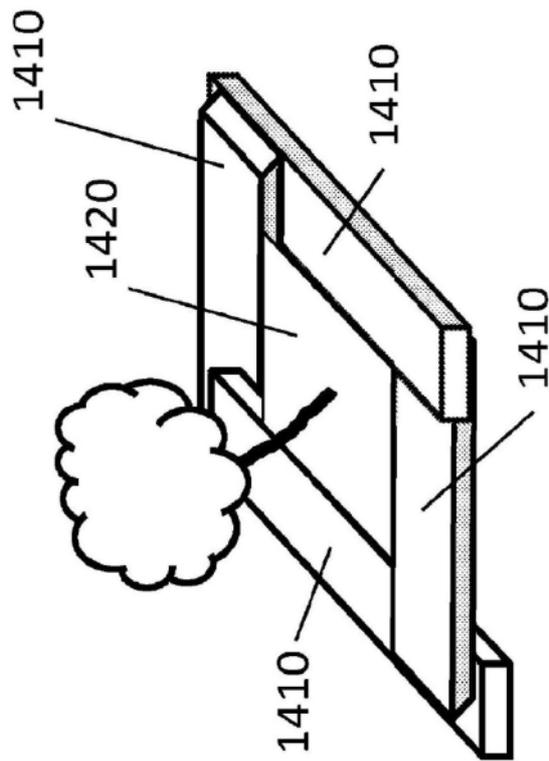


图14A

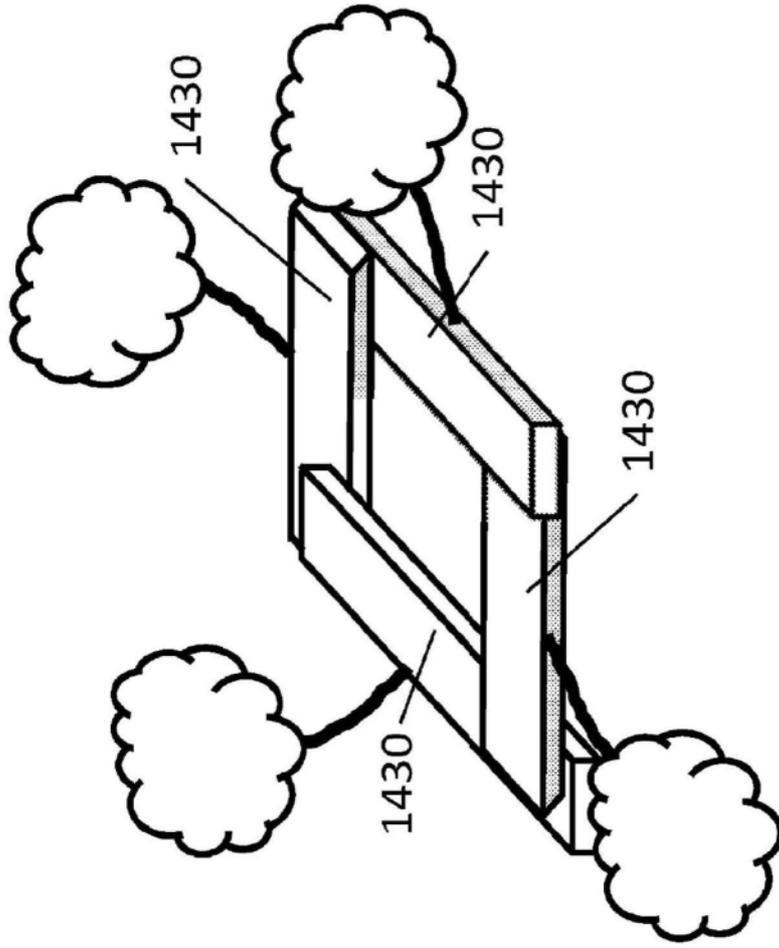


图14B

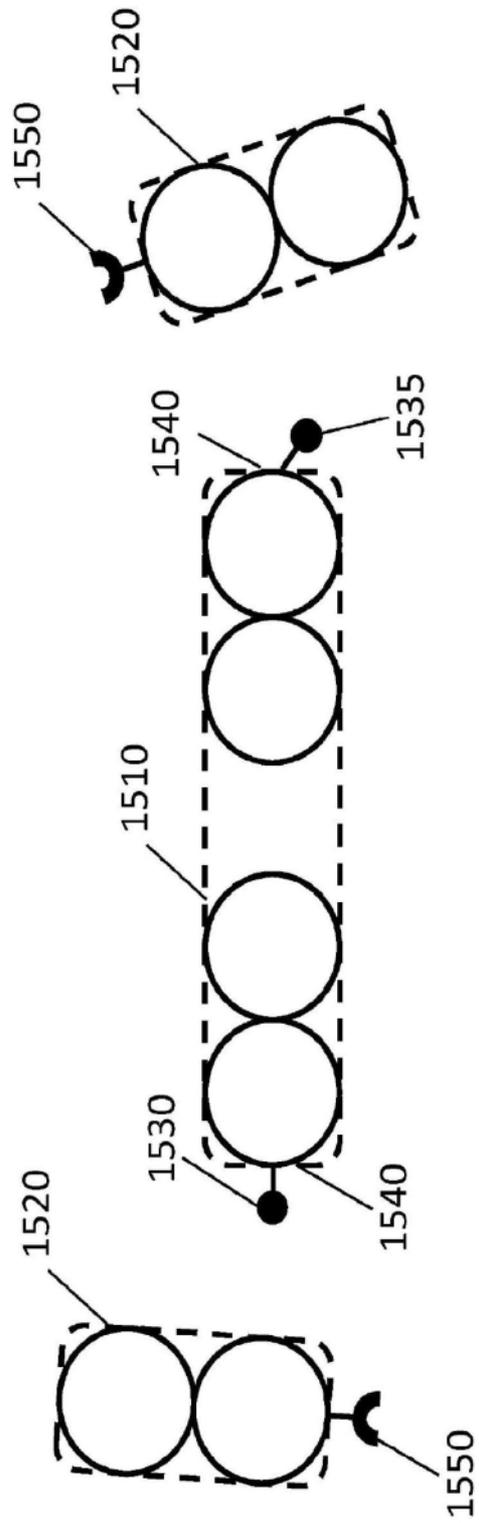


图15A

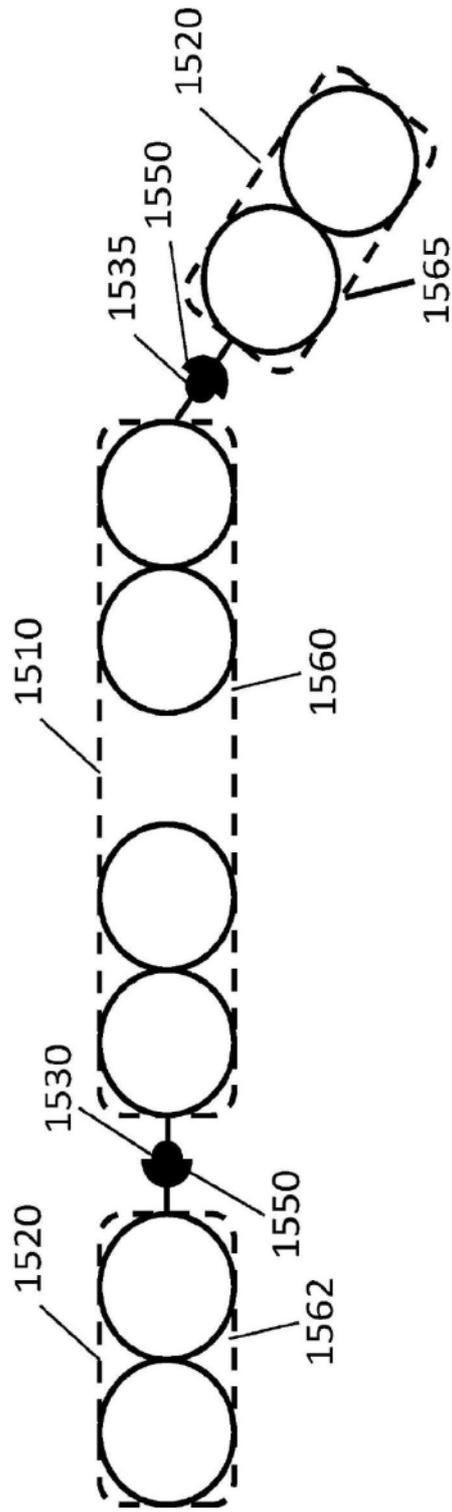


图15B

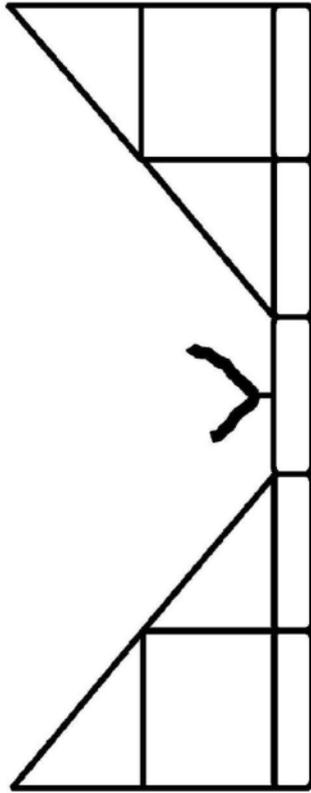


图16A

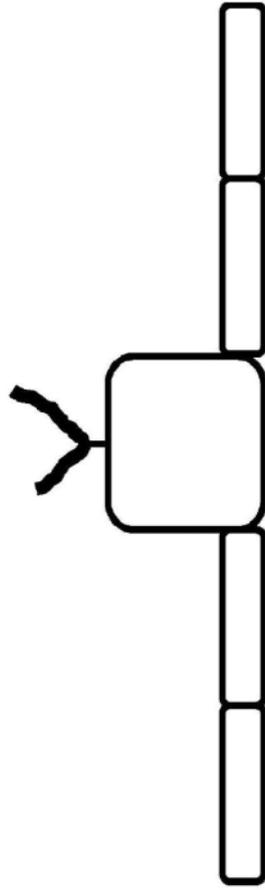


图16B

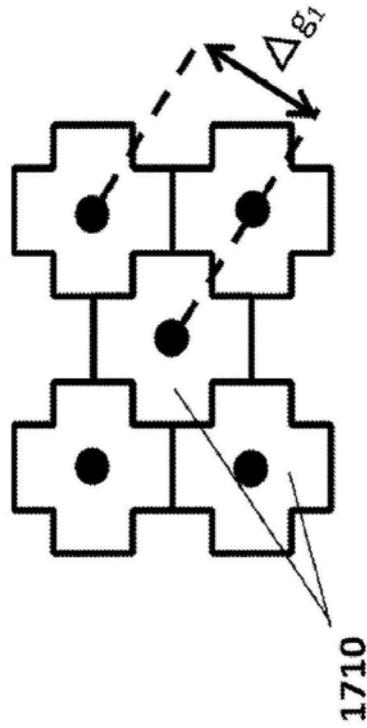


图17A

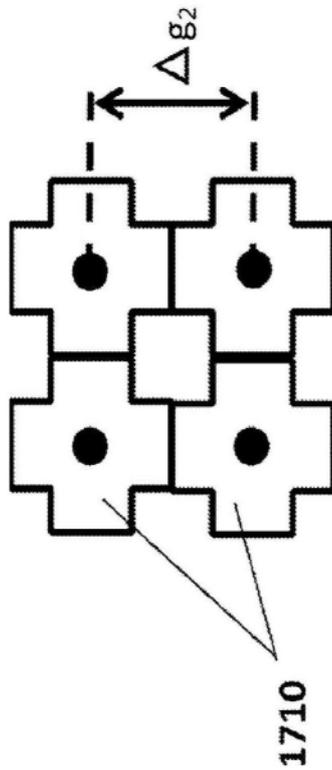


图17B

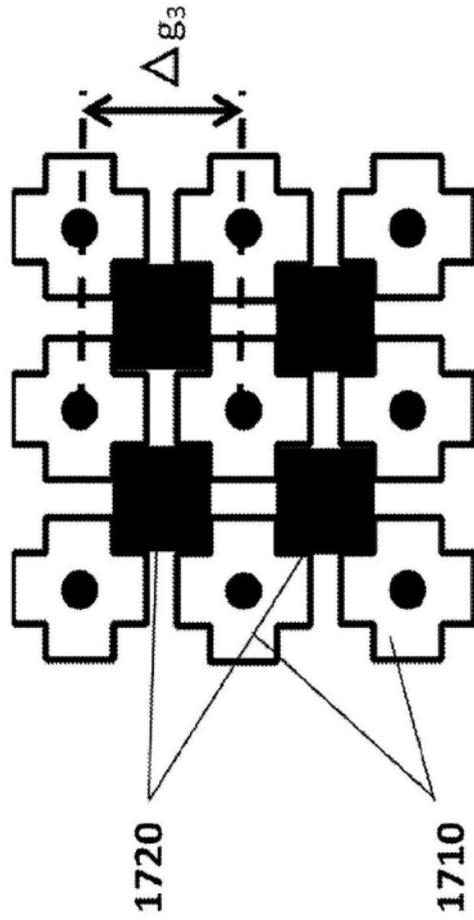


图17C

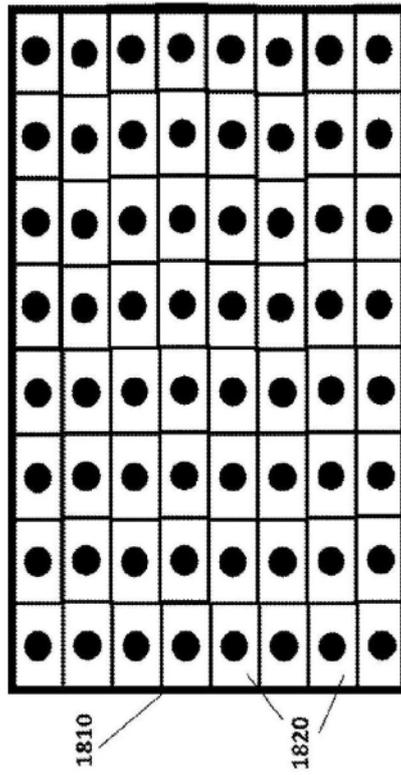


图18A

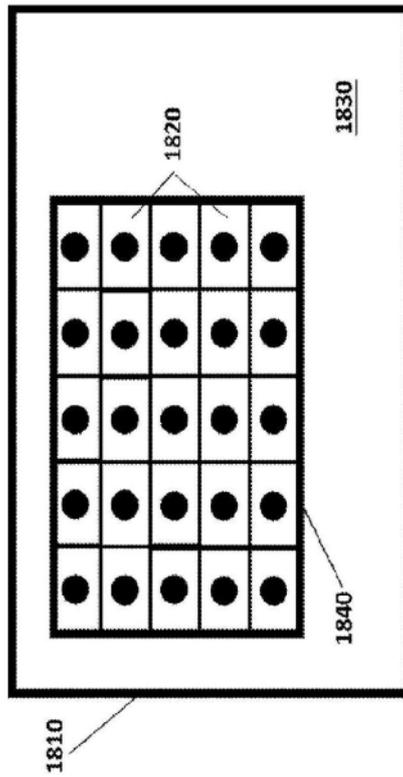


图18B

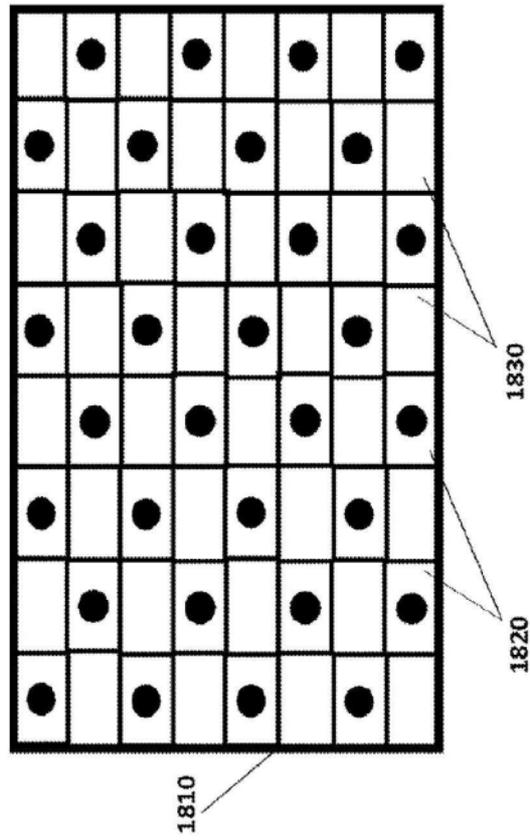


图18C

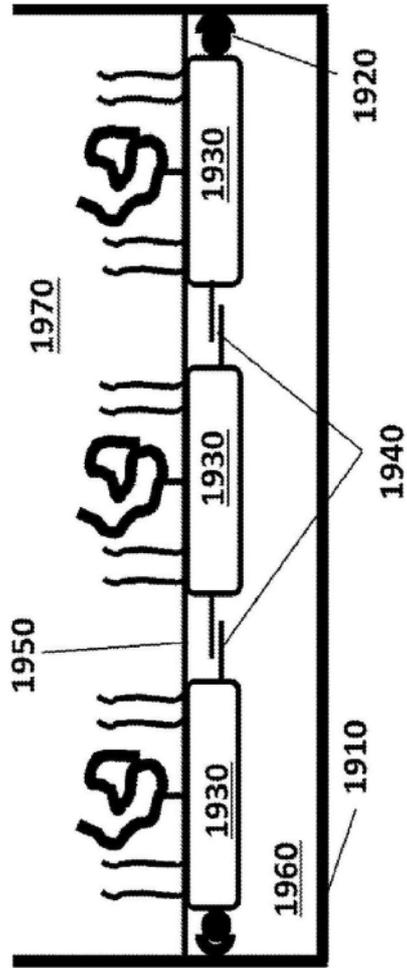


图19A

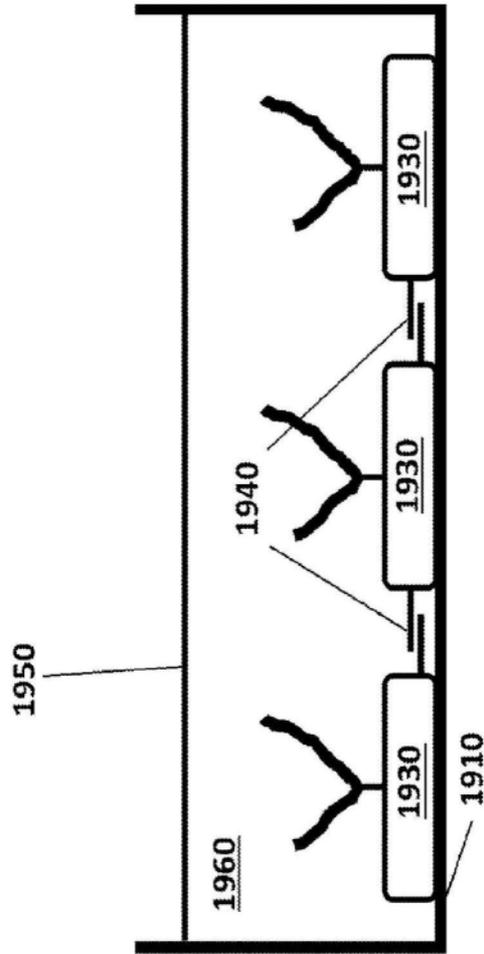


图19B

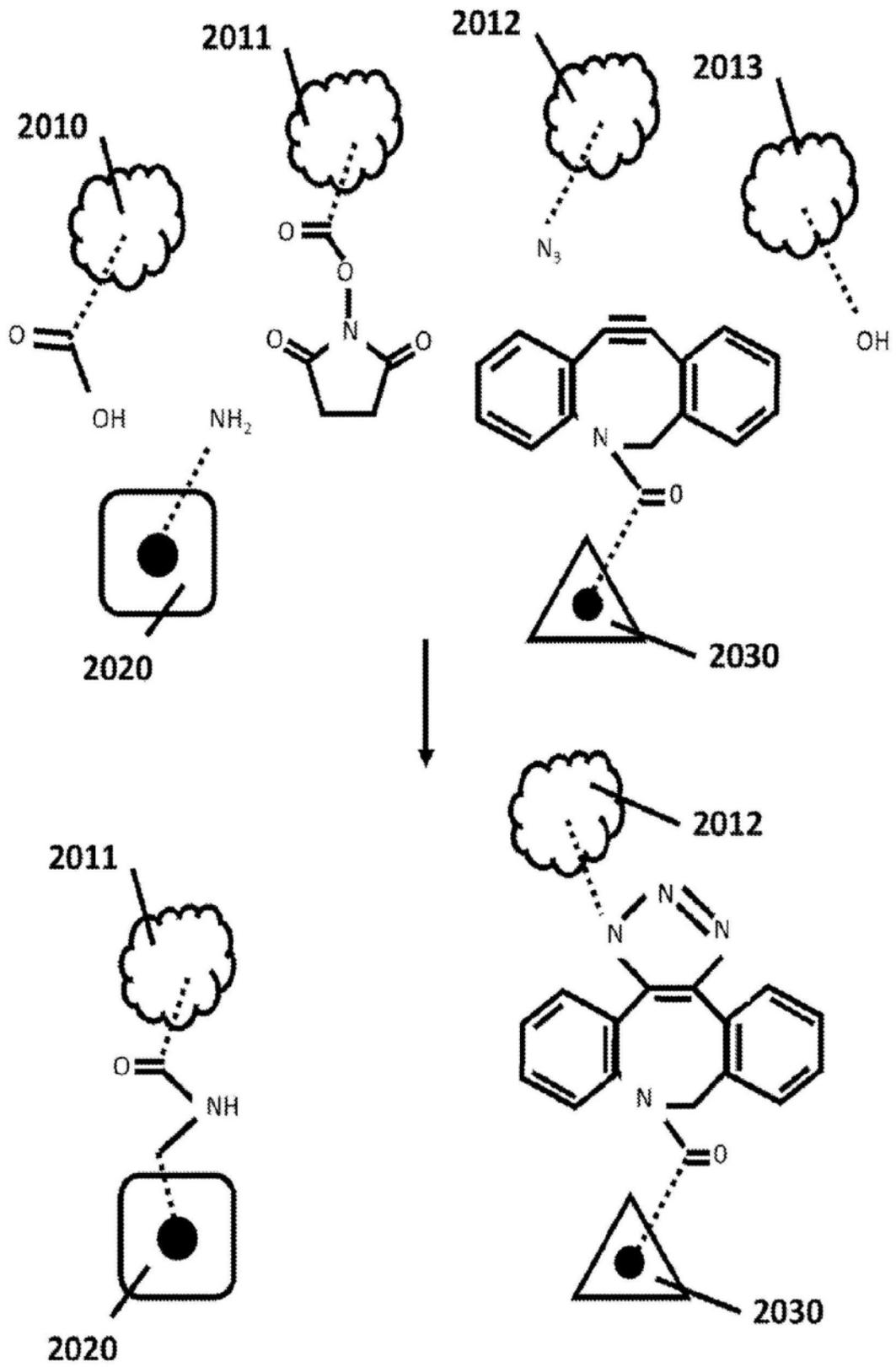


图20

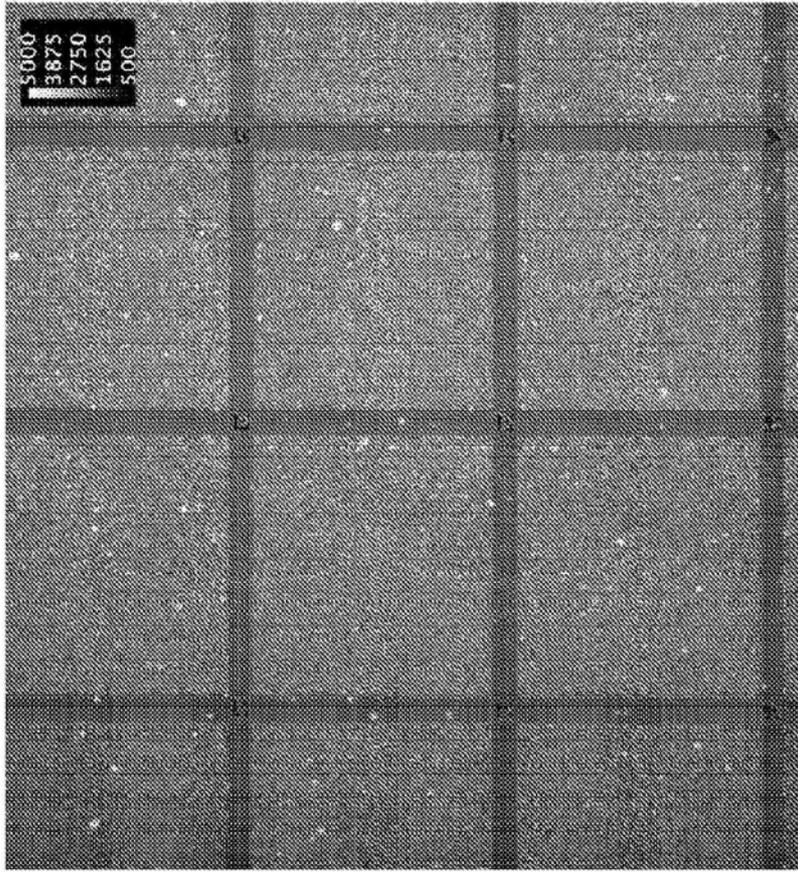


图21A

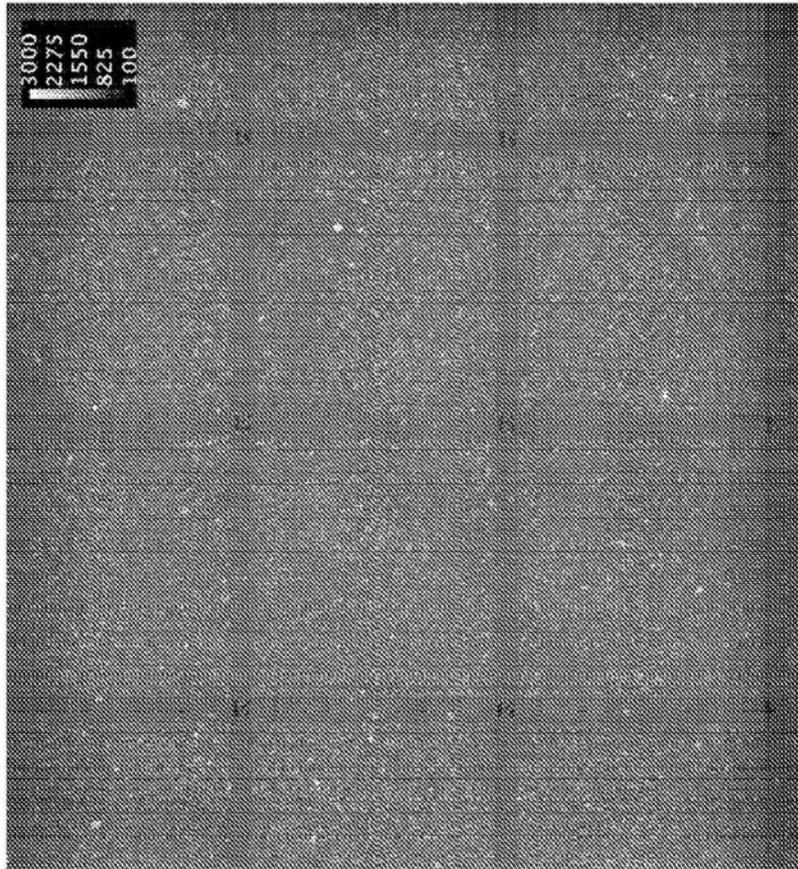


图21B

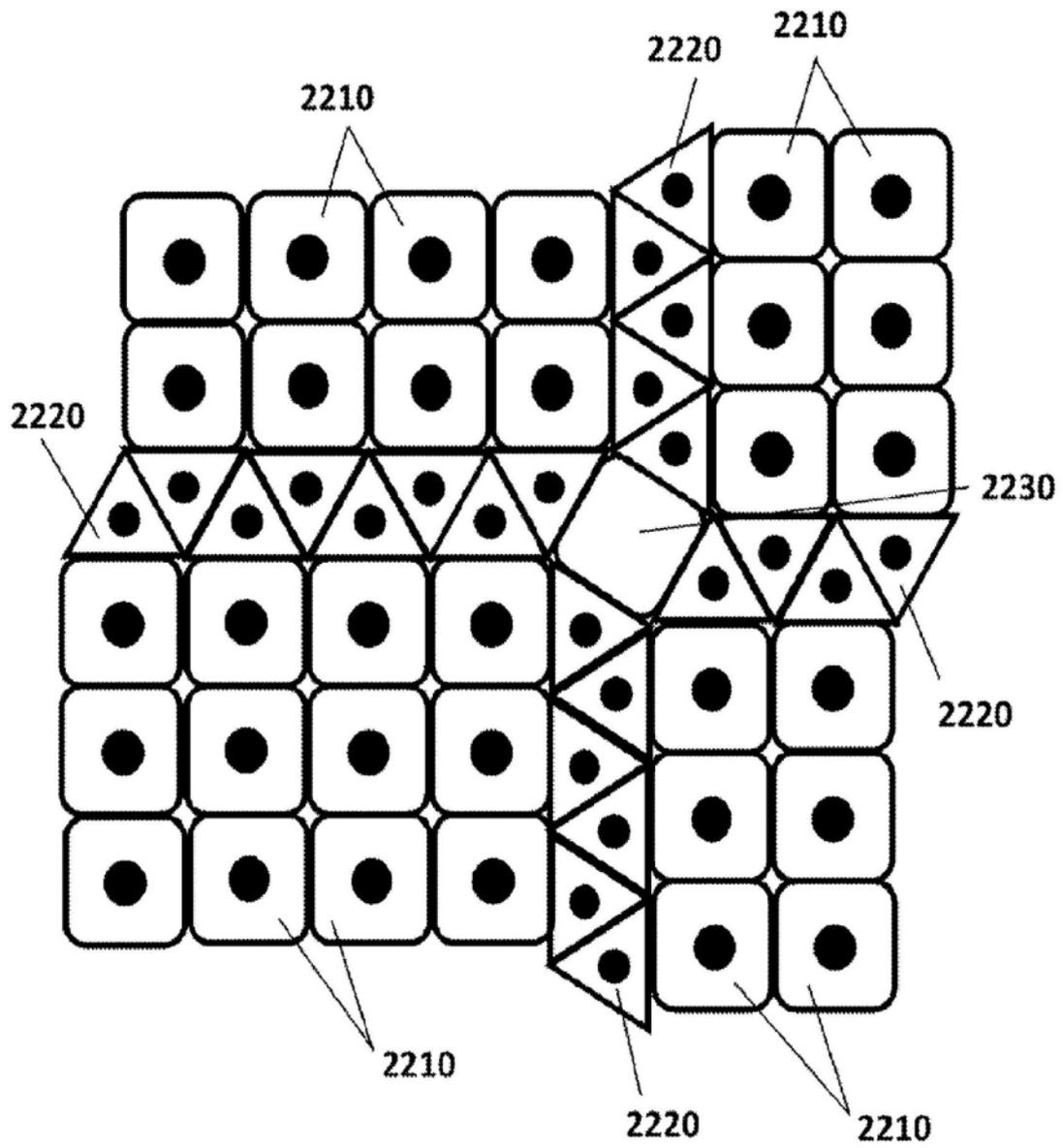


图22

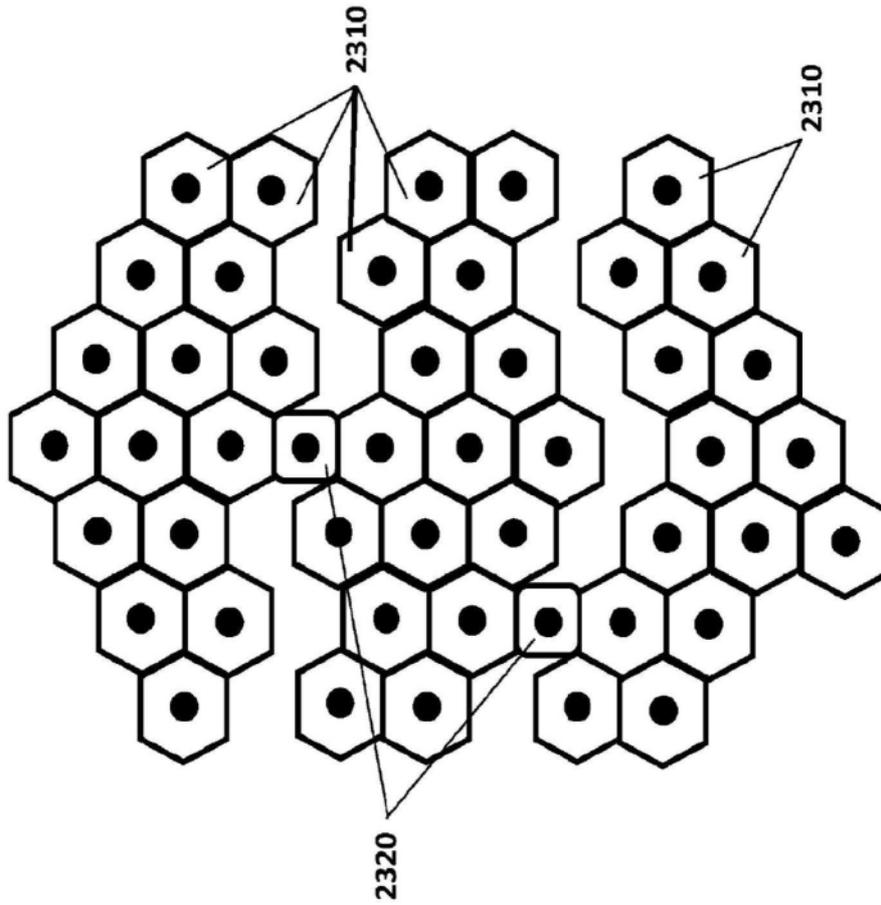


图23A

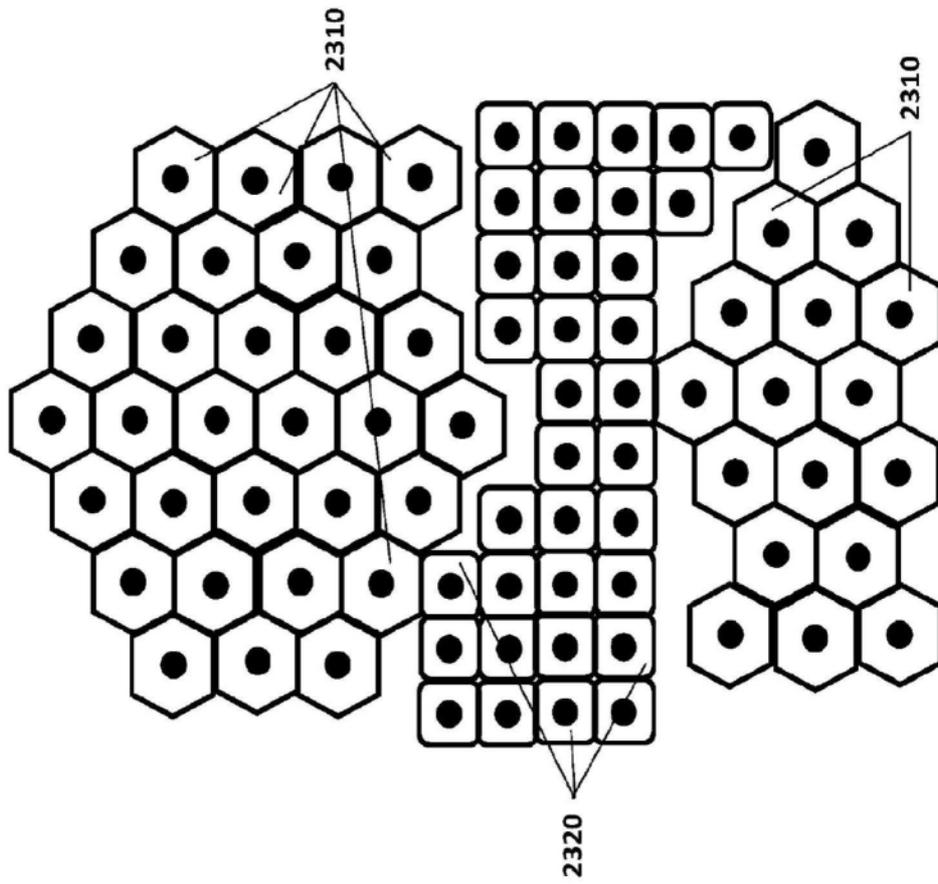


图23B

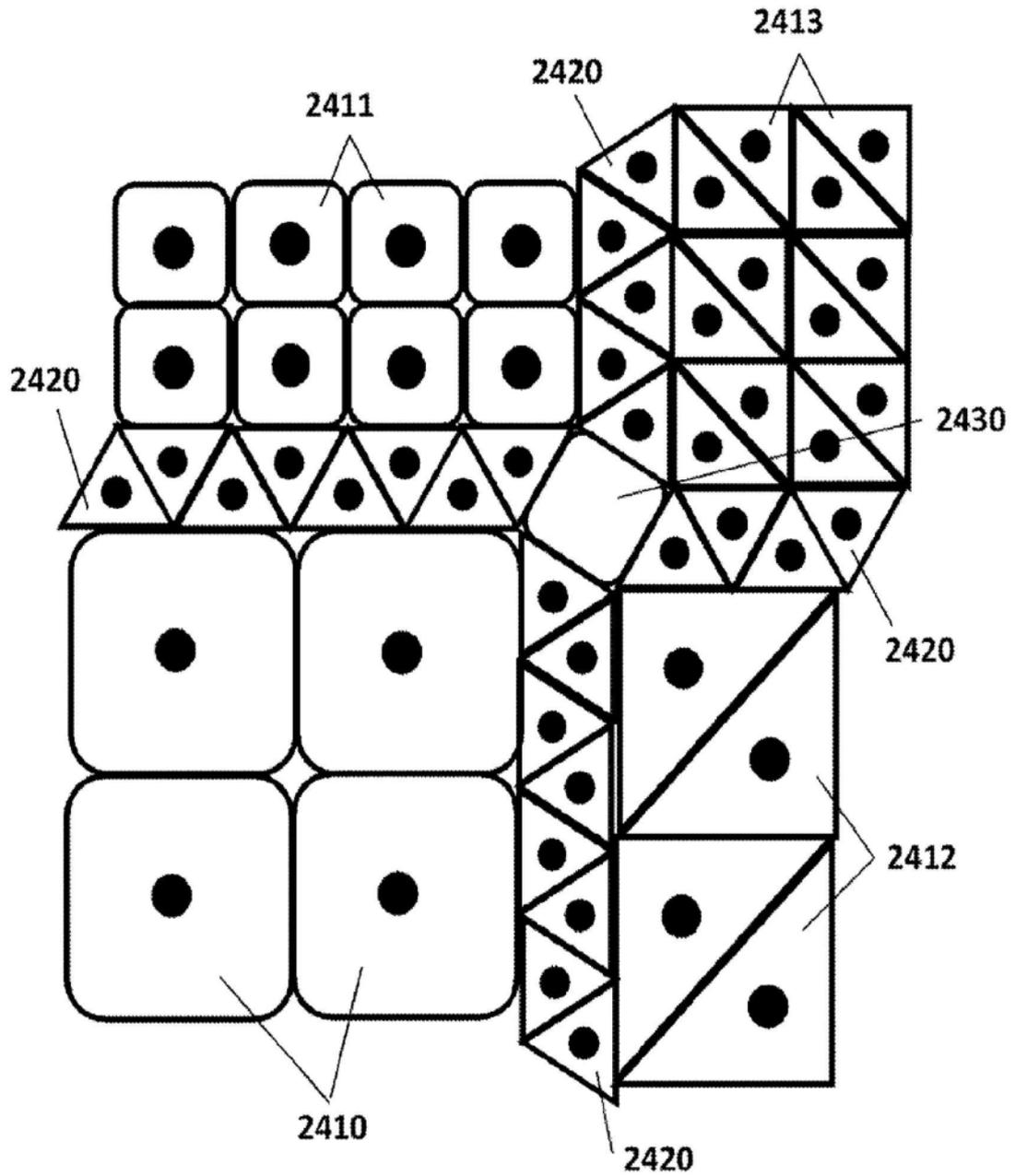


图24

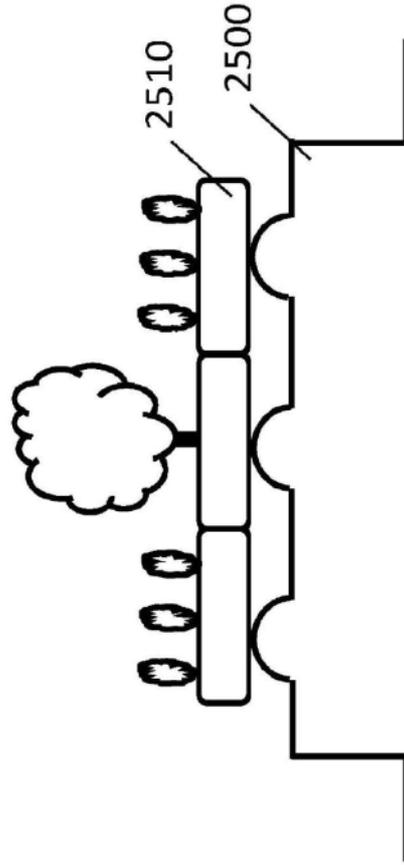


图25A

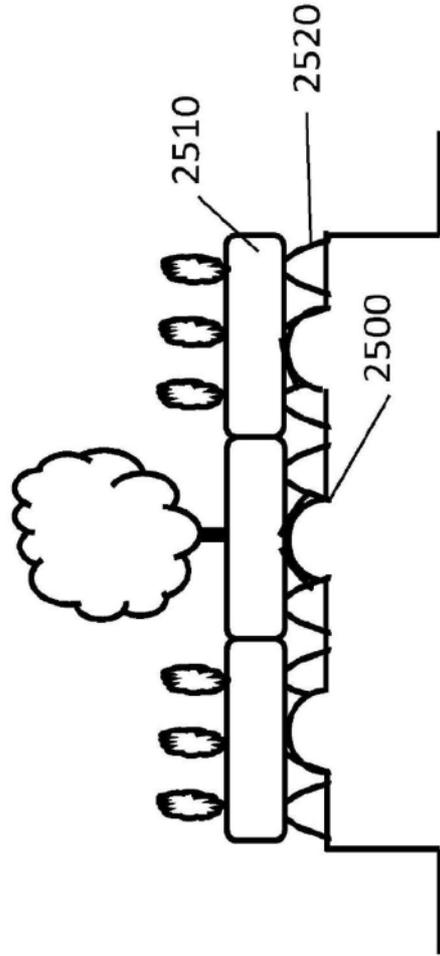


图25B

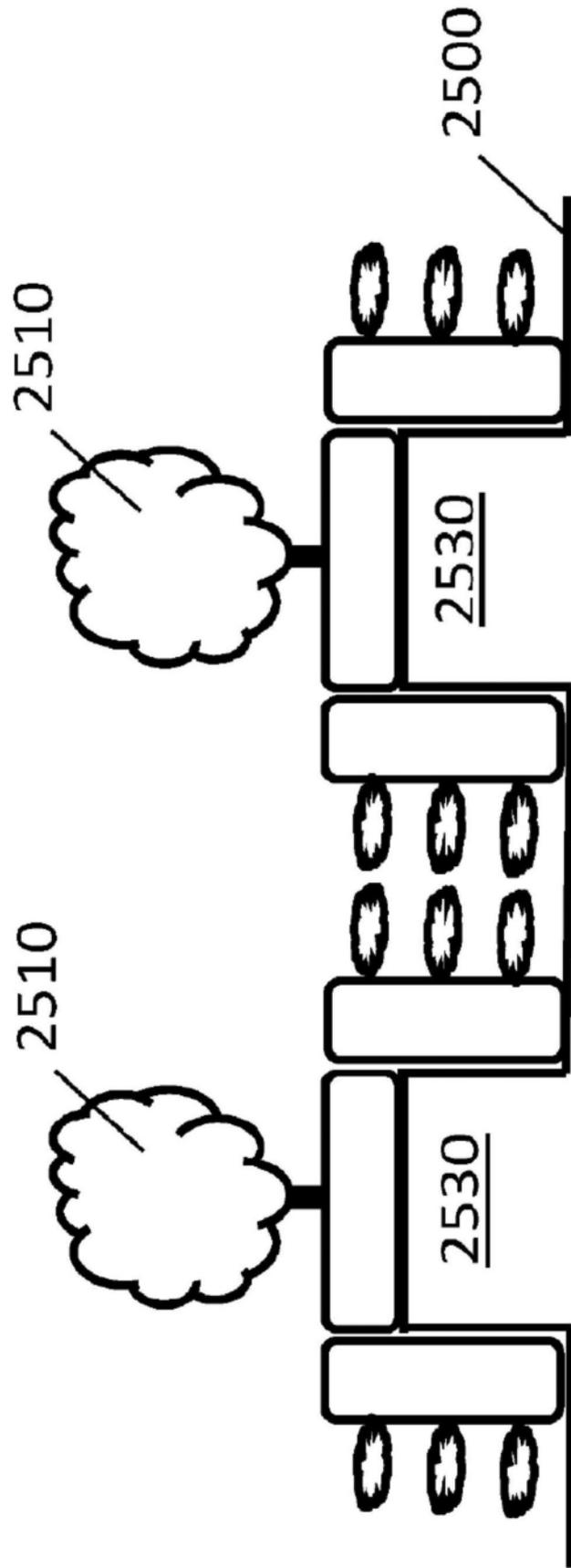


图25C

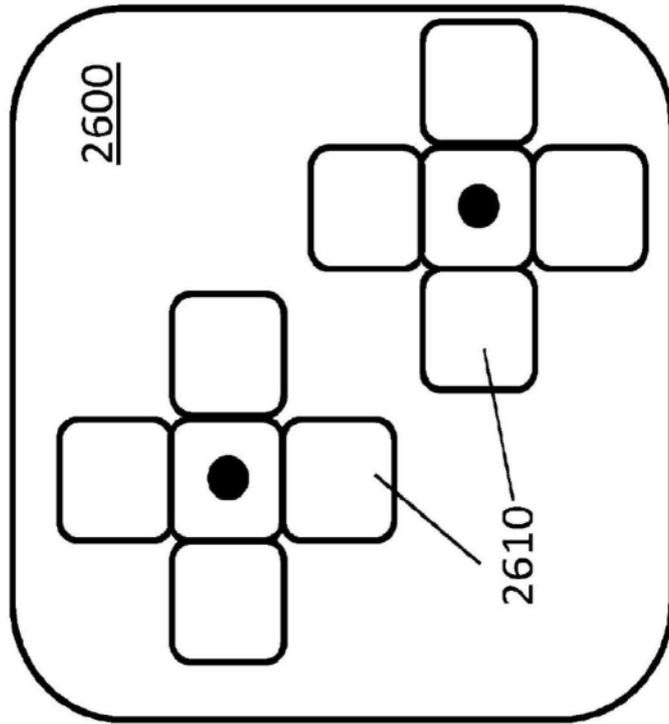


图26A

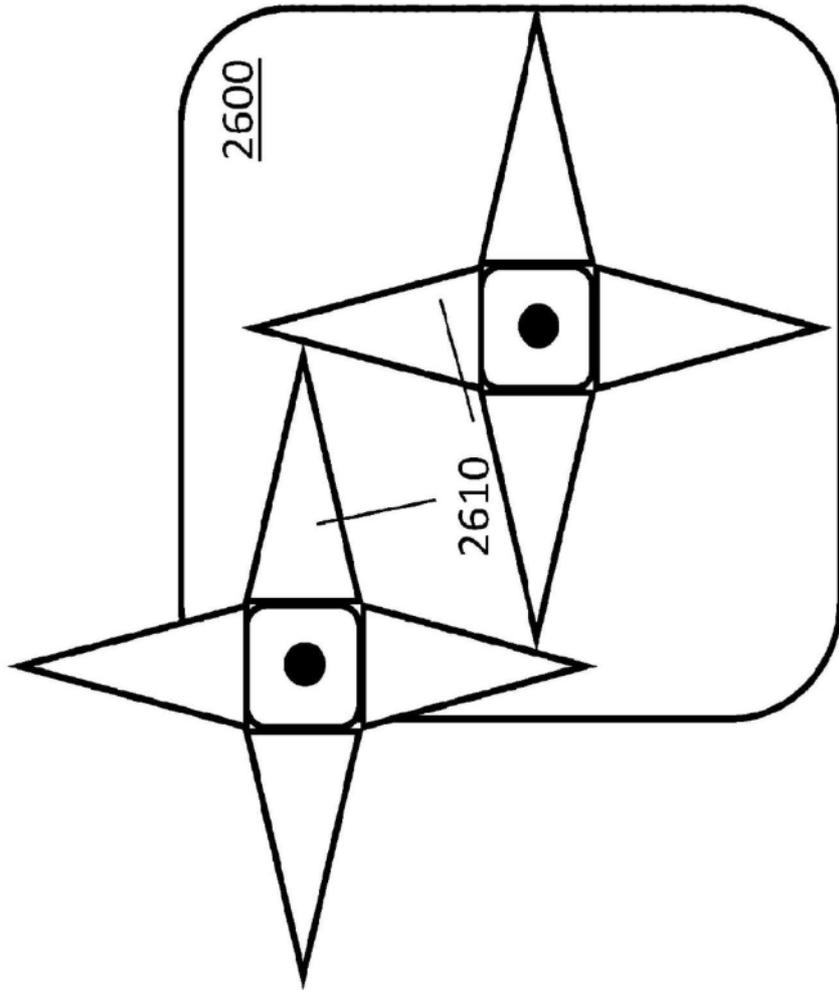


图26B

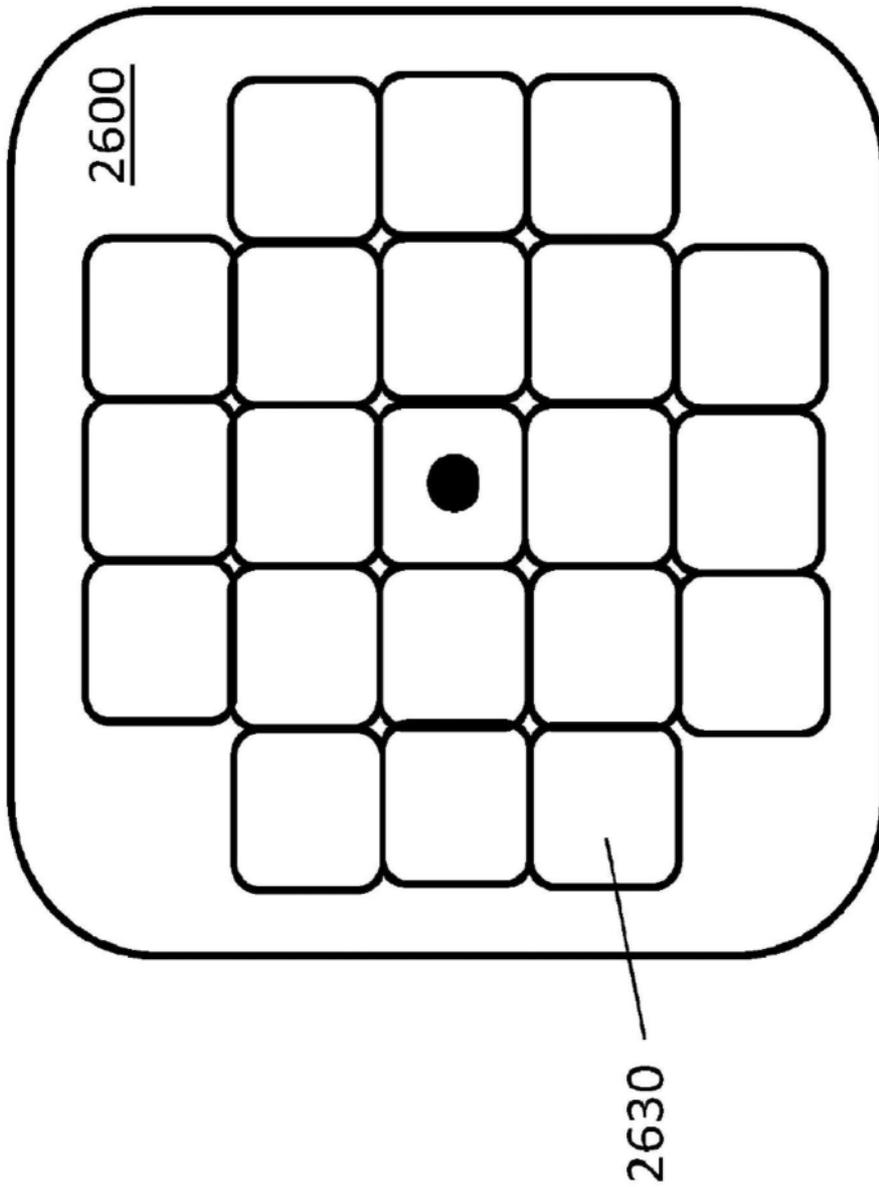


图26C

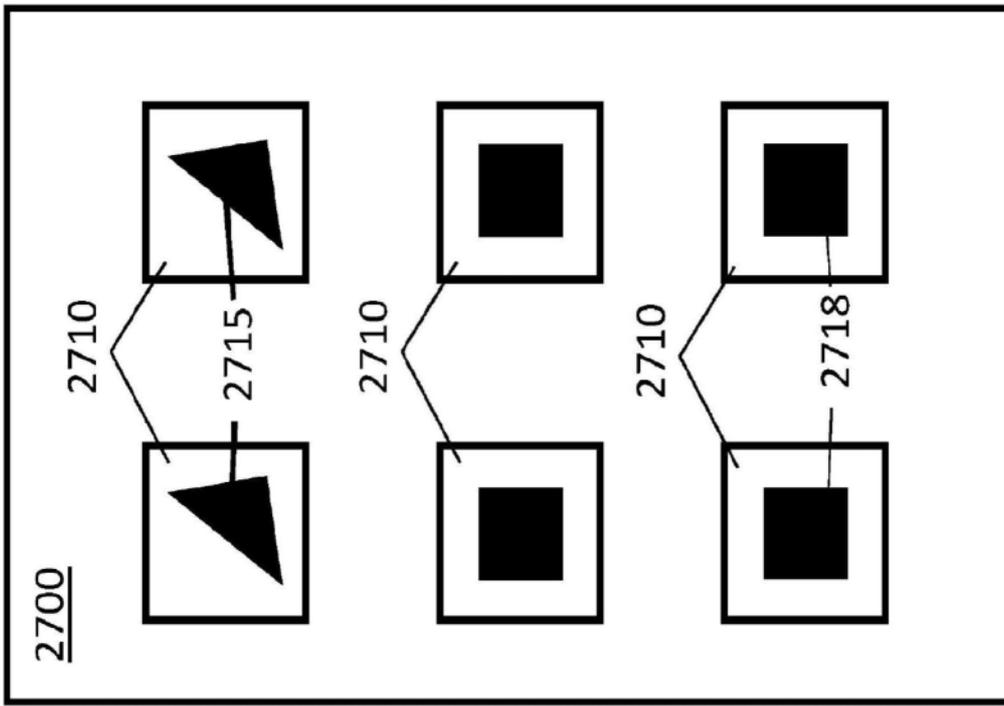


图27A

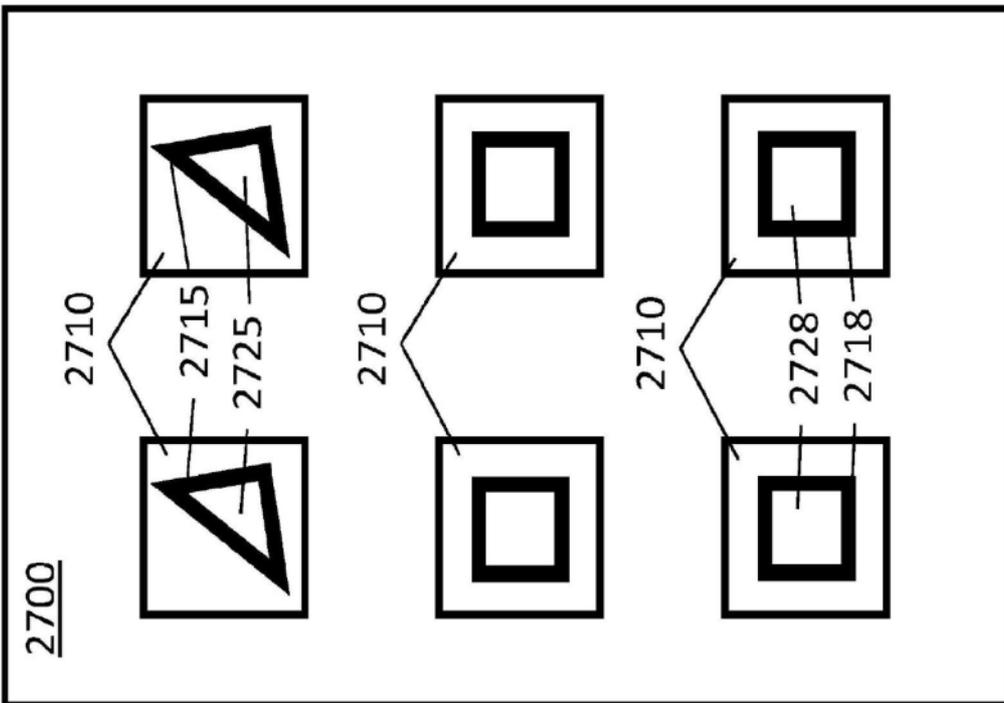


图27B

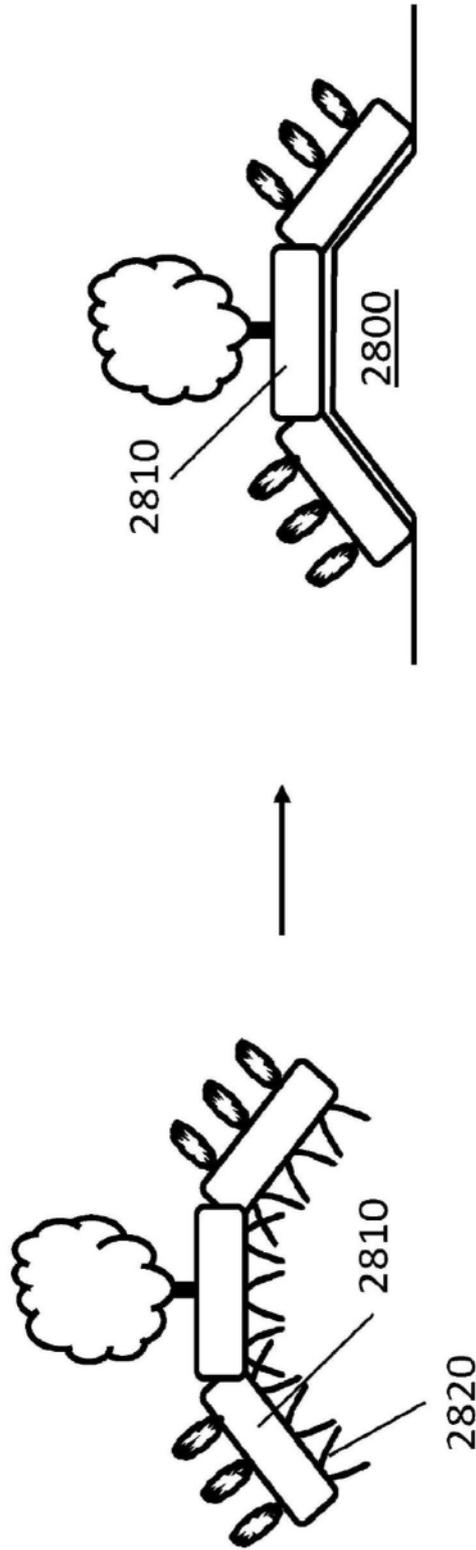


图28A

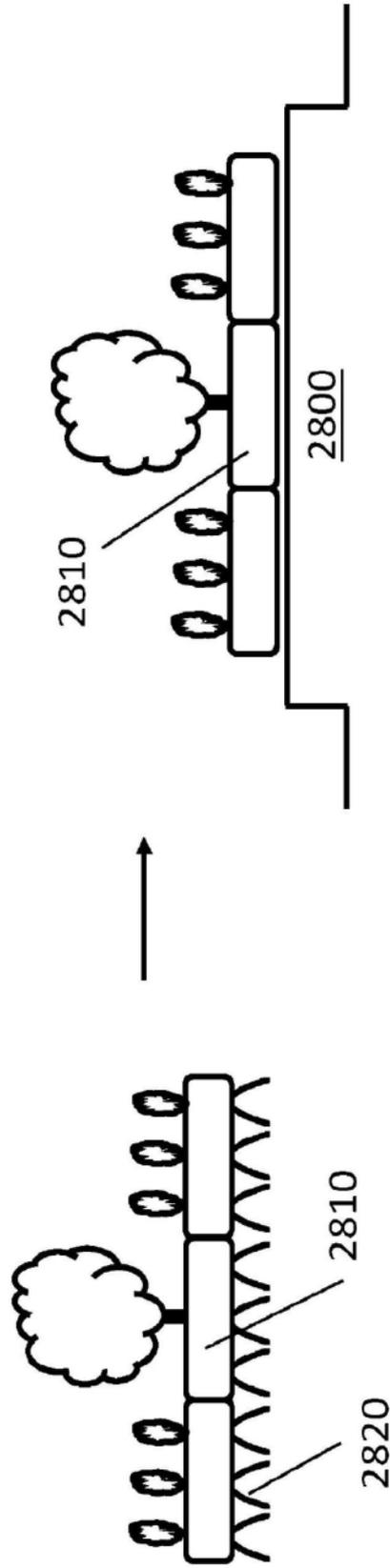


图28B

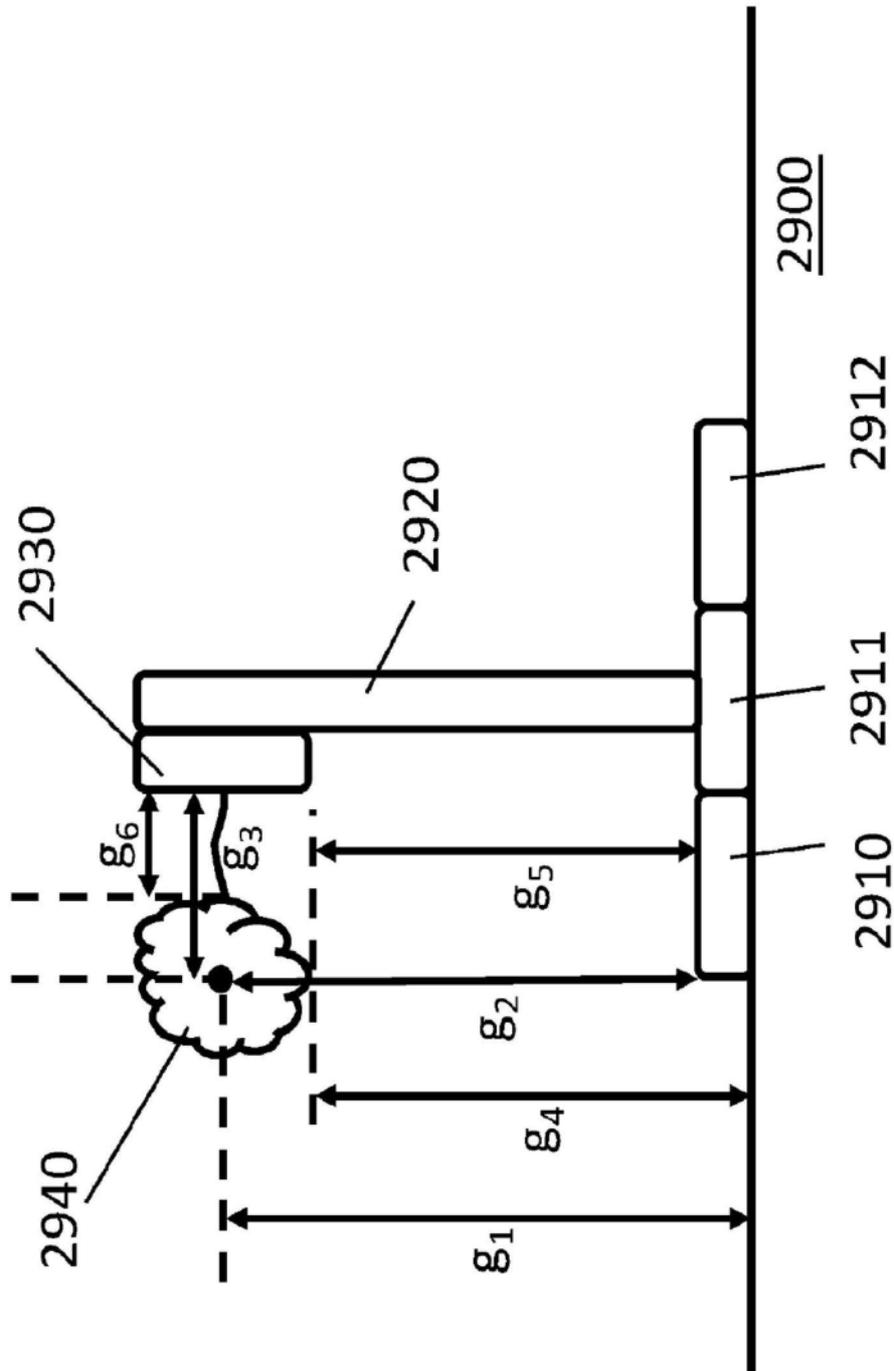


图29

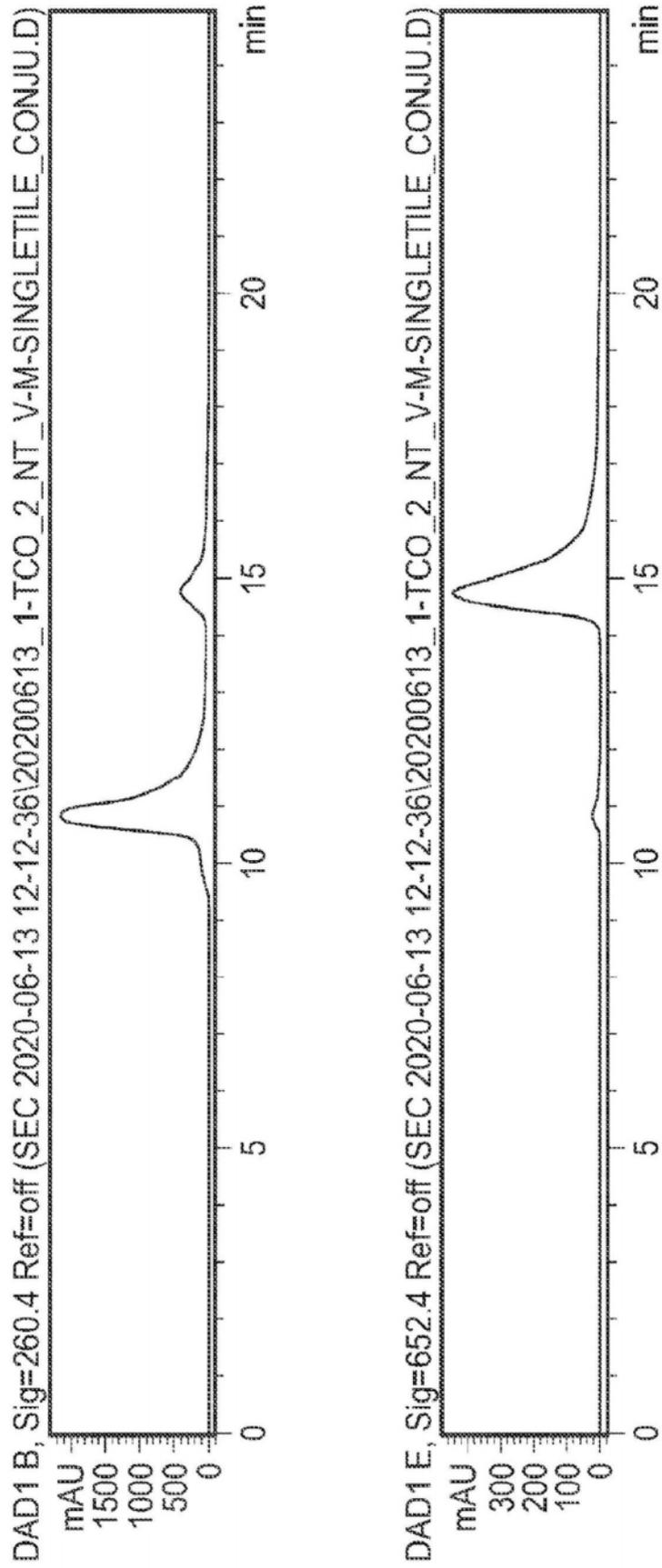


图30A

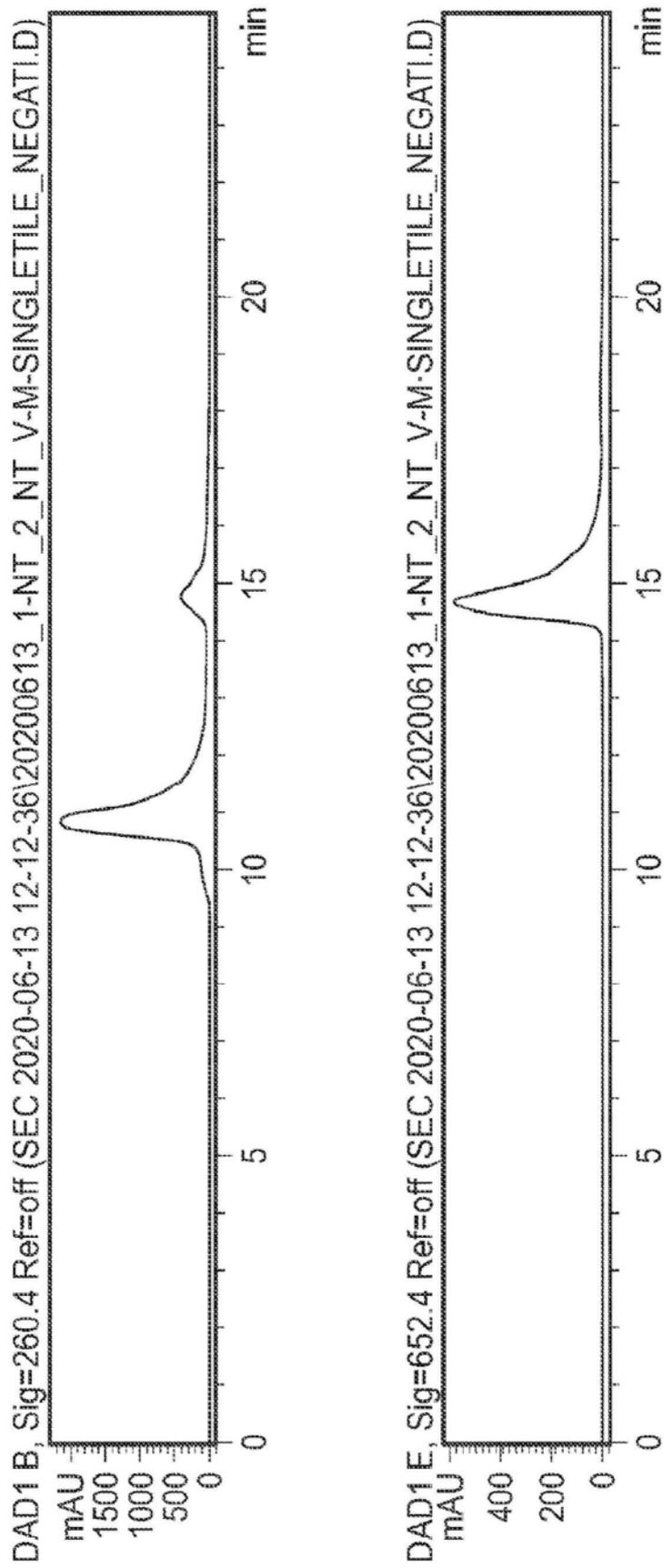


图30B

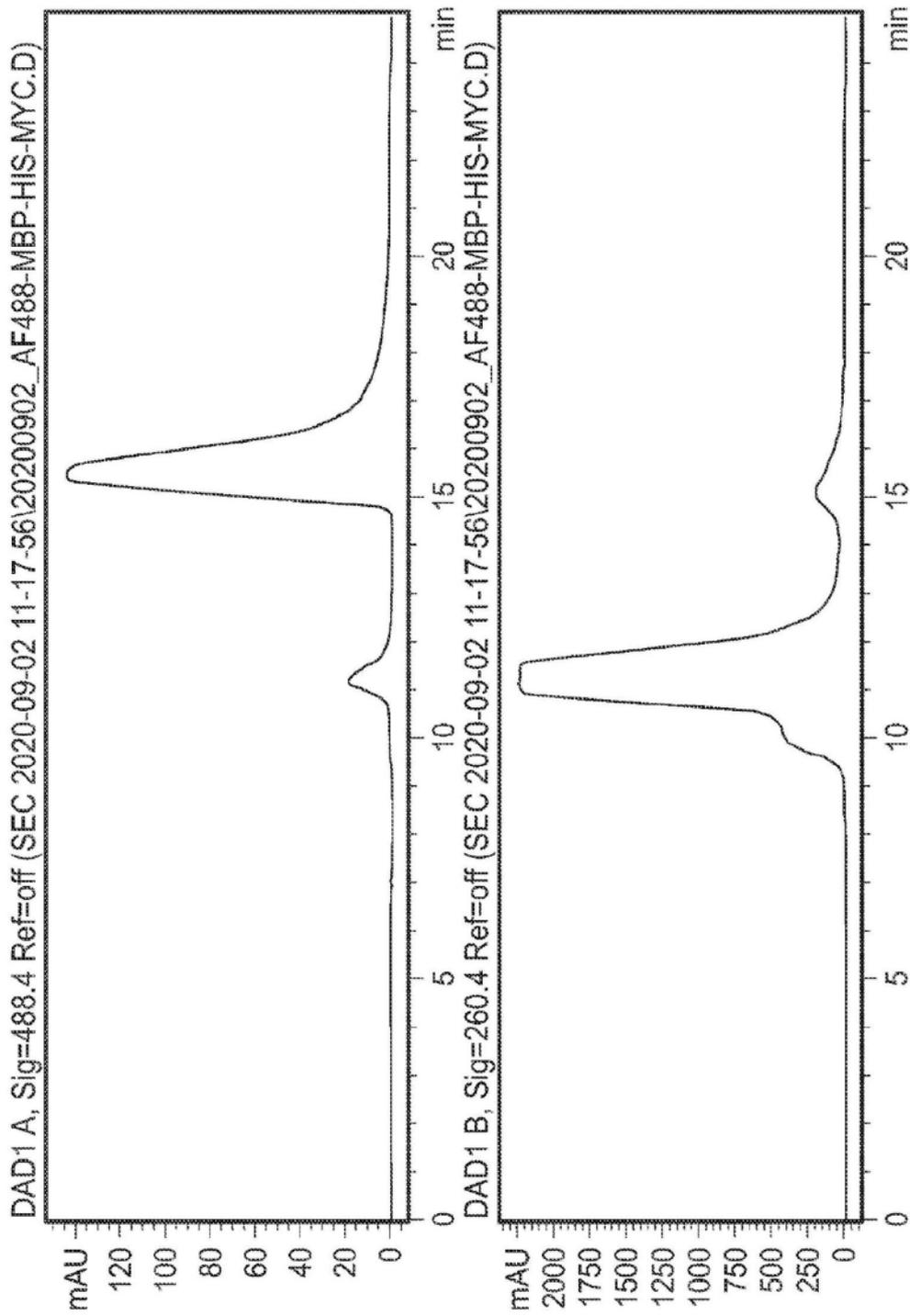


图30C

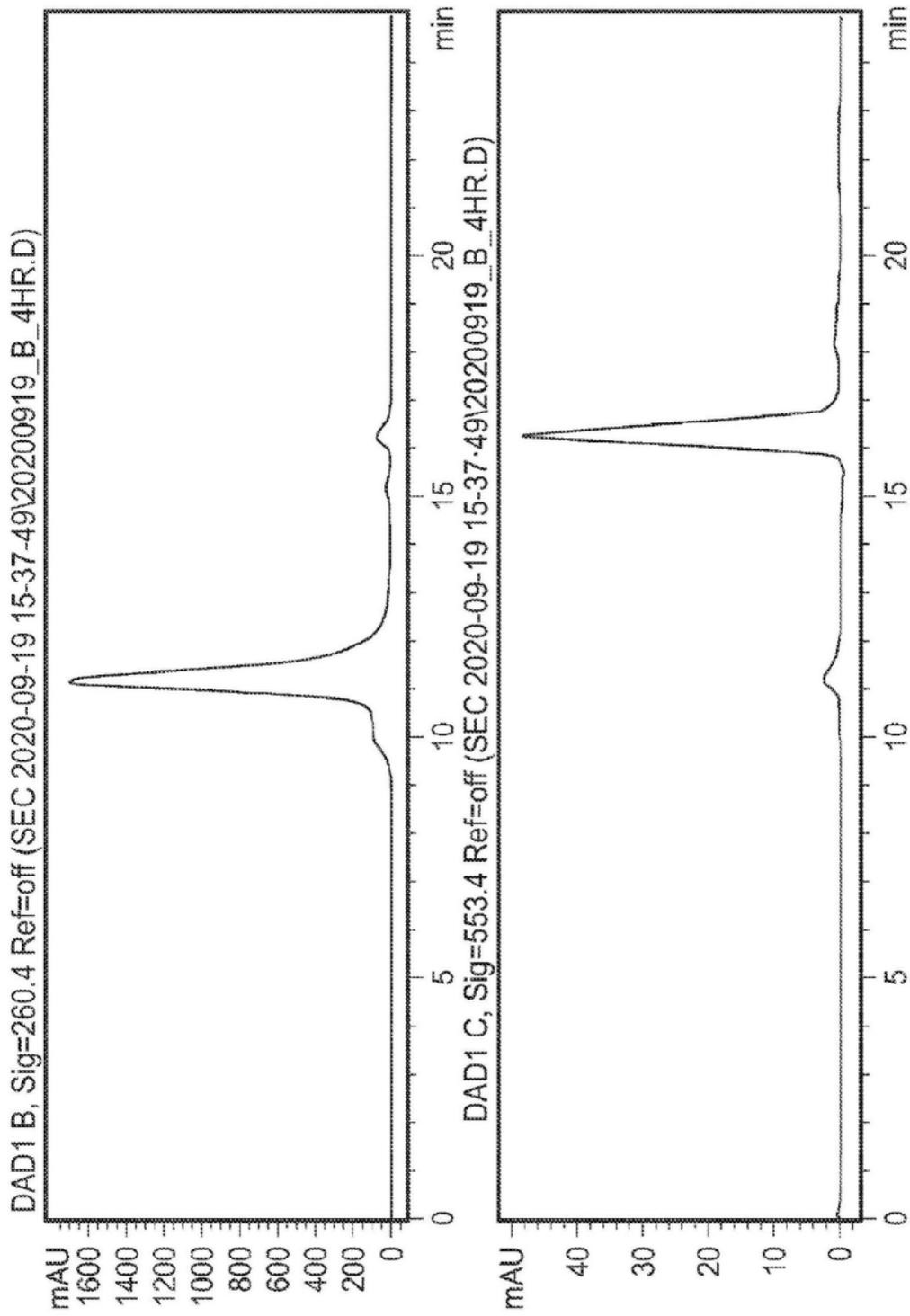


图30D

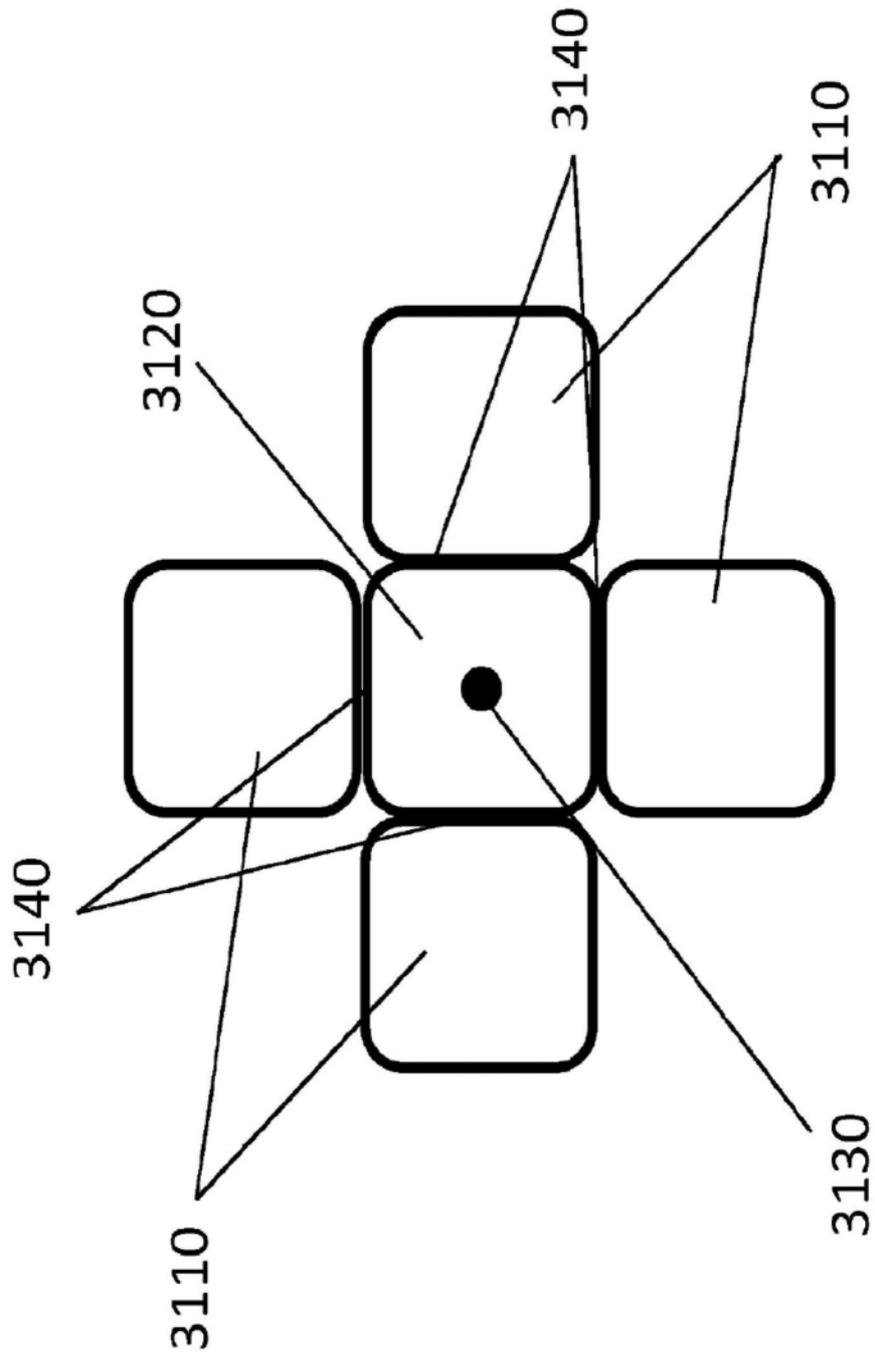


图31

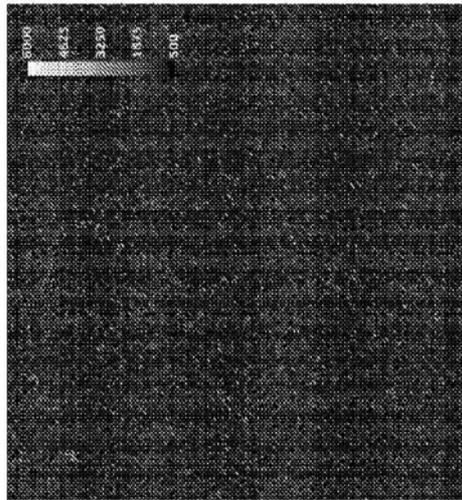


图32A

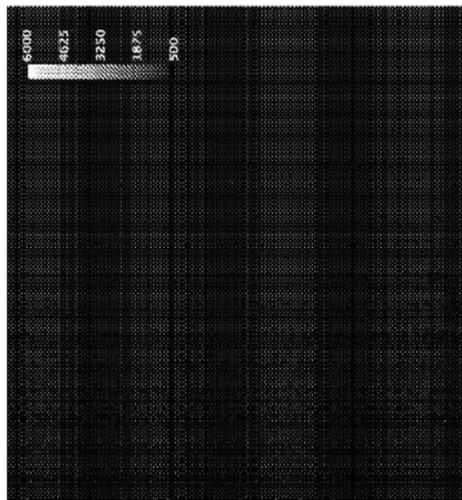


图32B

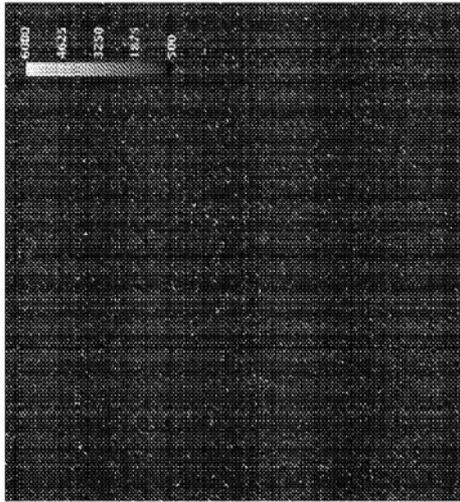


图32C

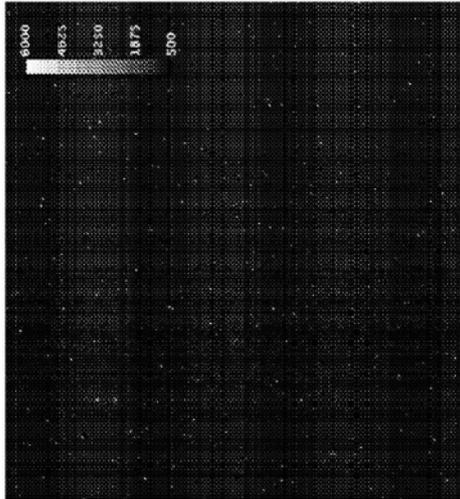


图32D

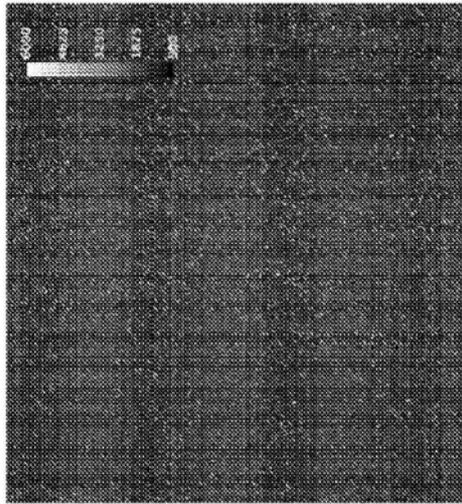


图32E

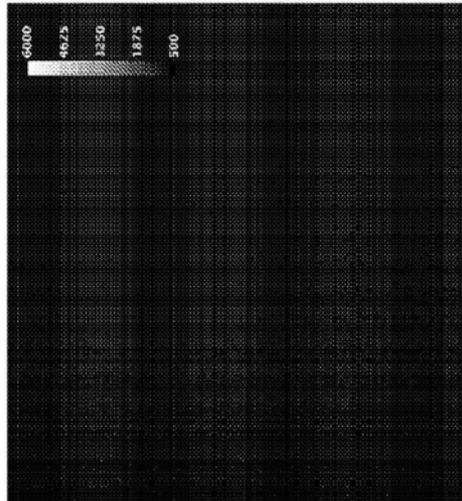


图32F

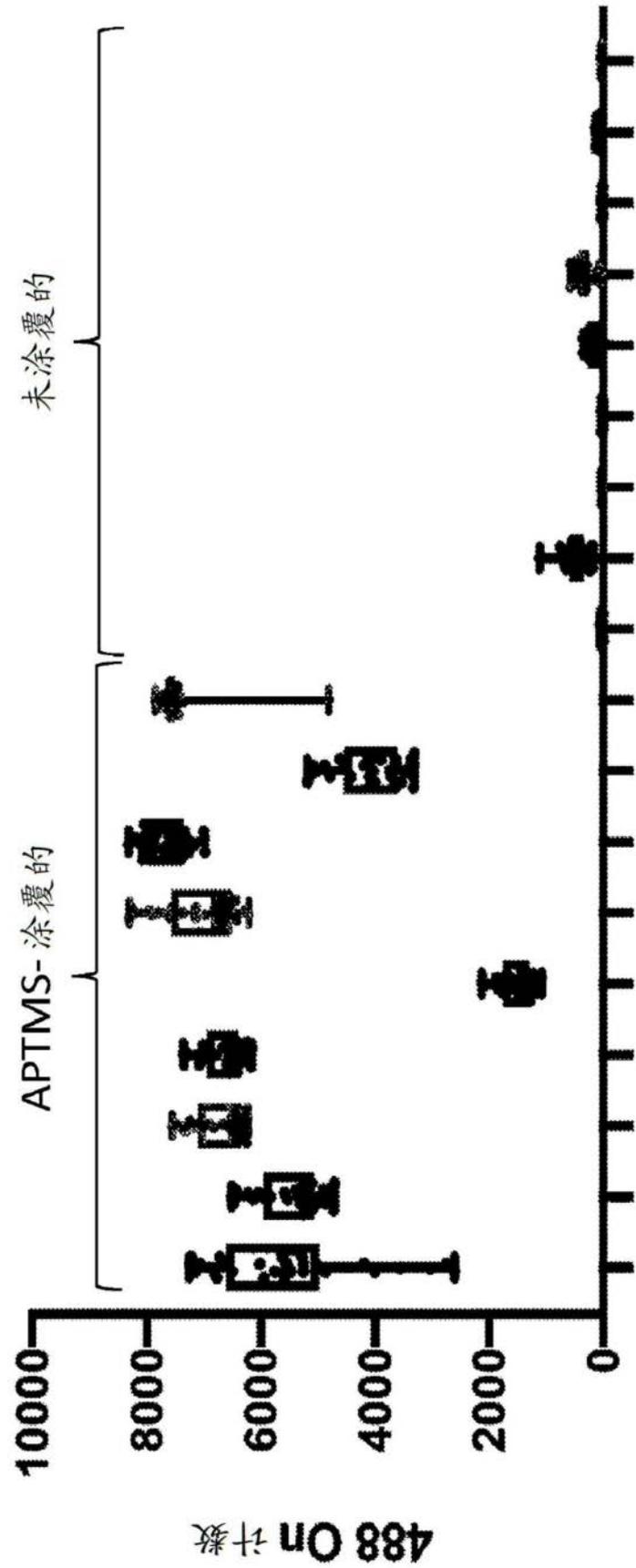


图33

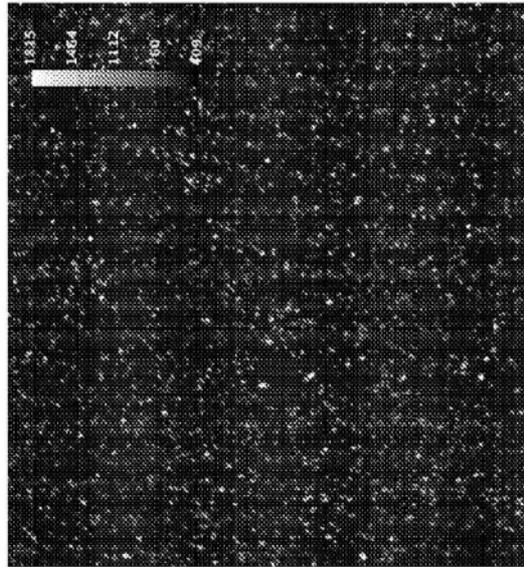


图34A

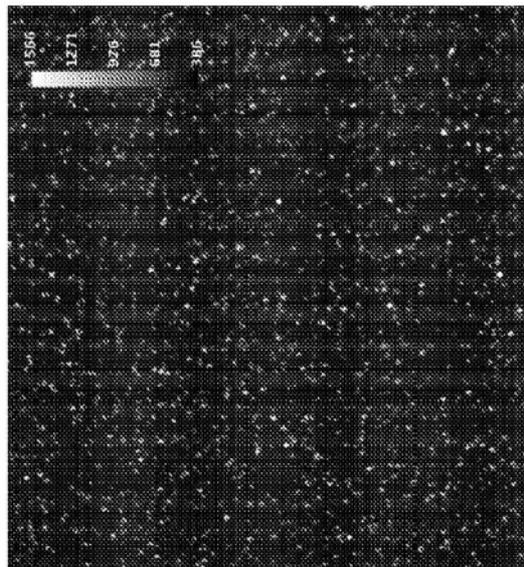


图34B

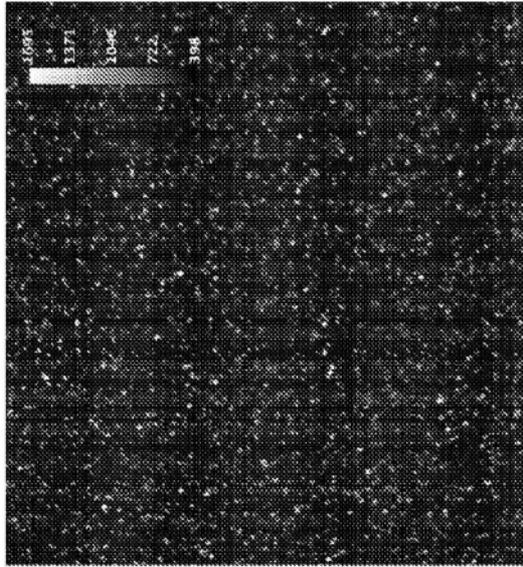


图34C

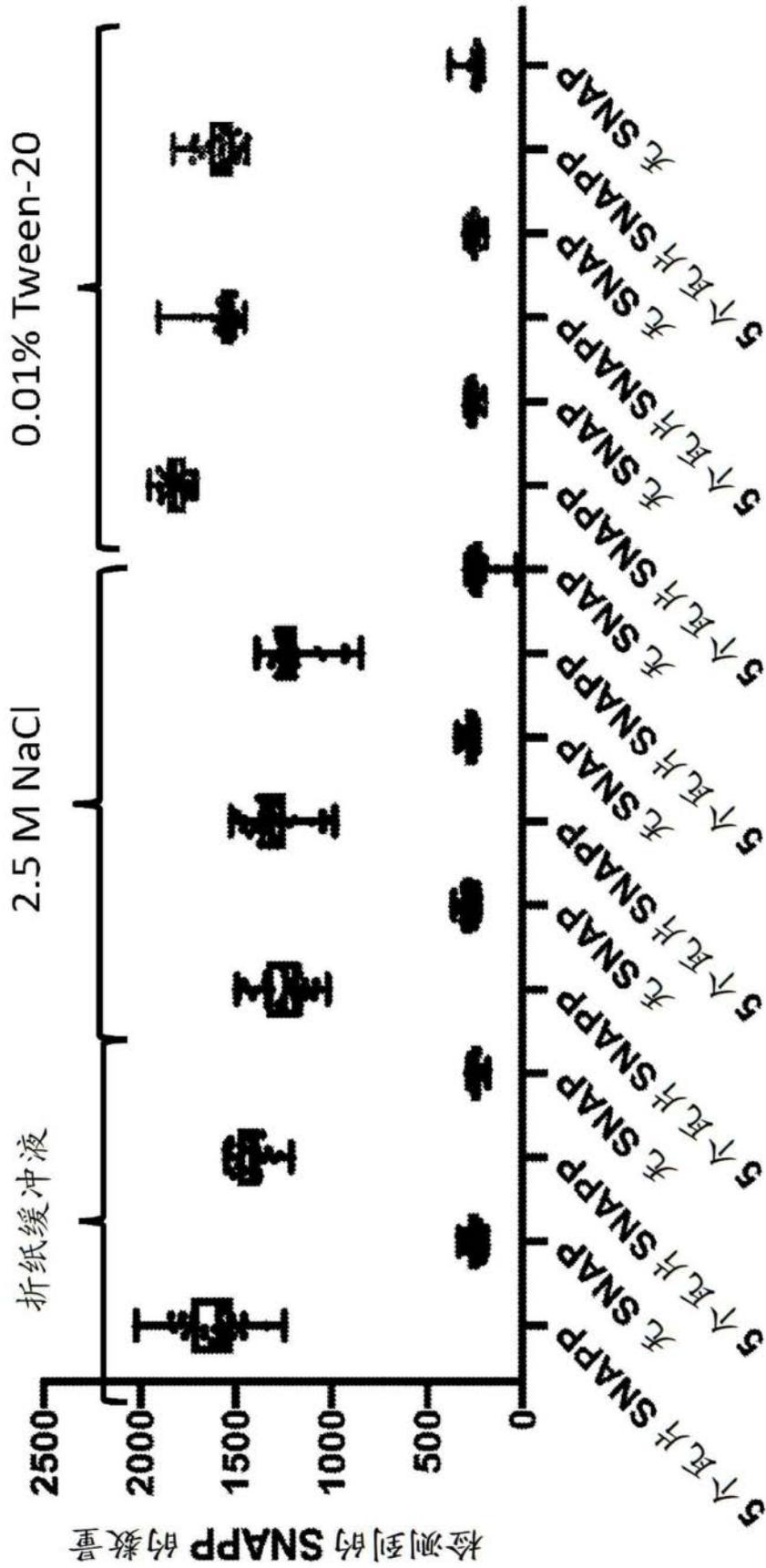


图35

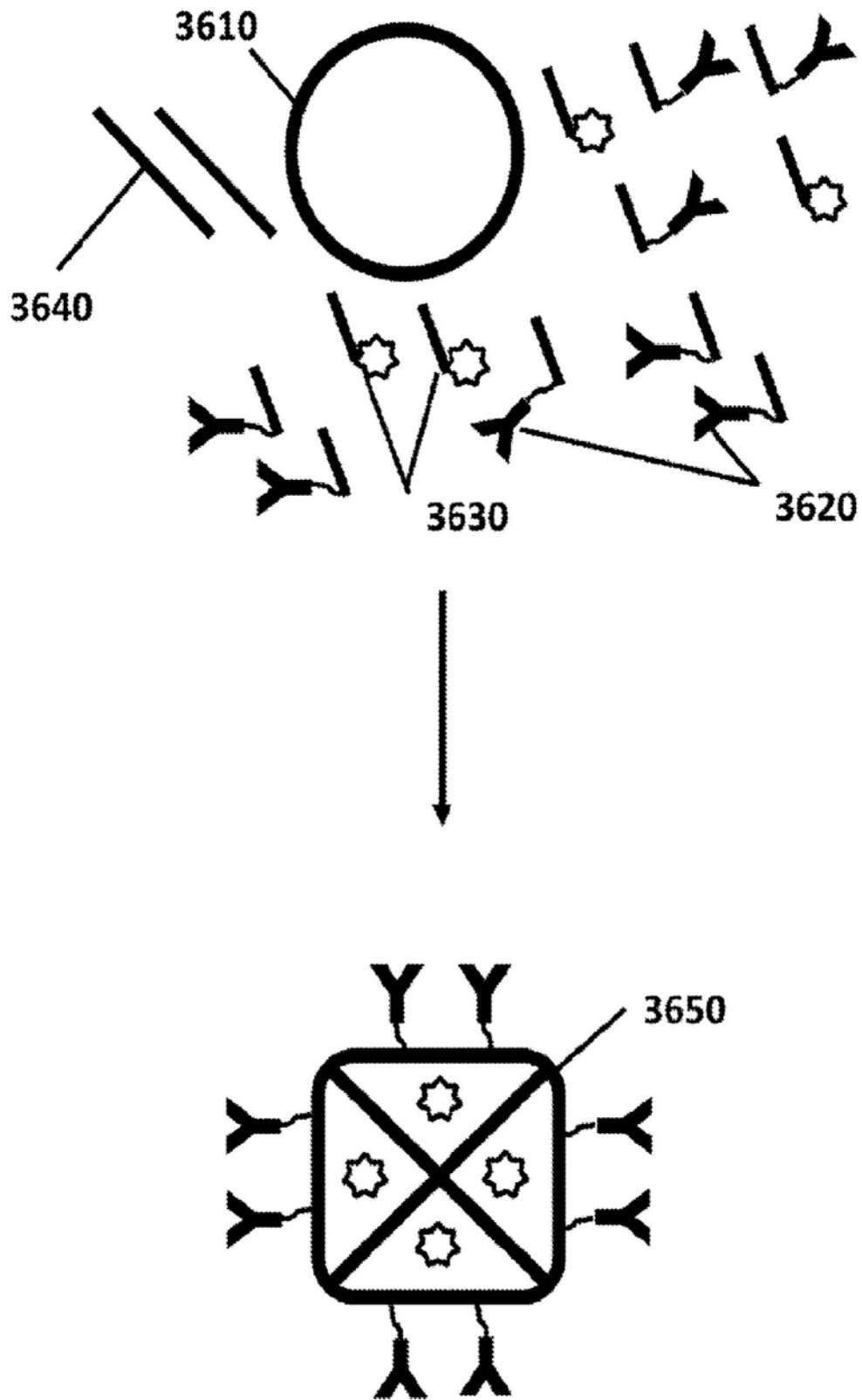


图36A

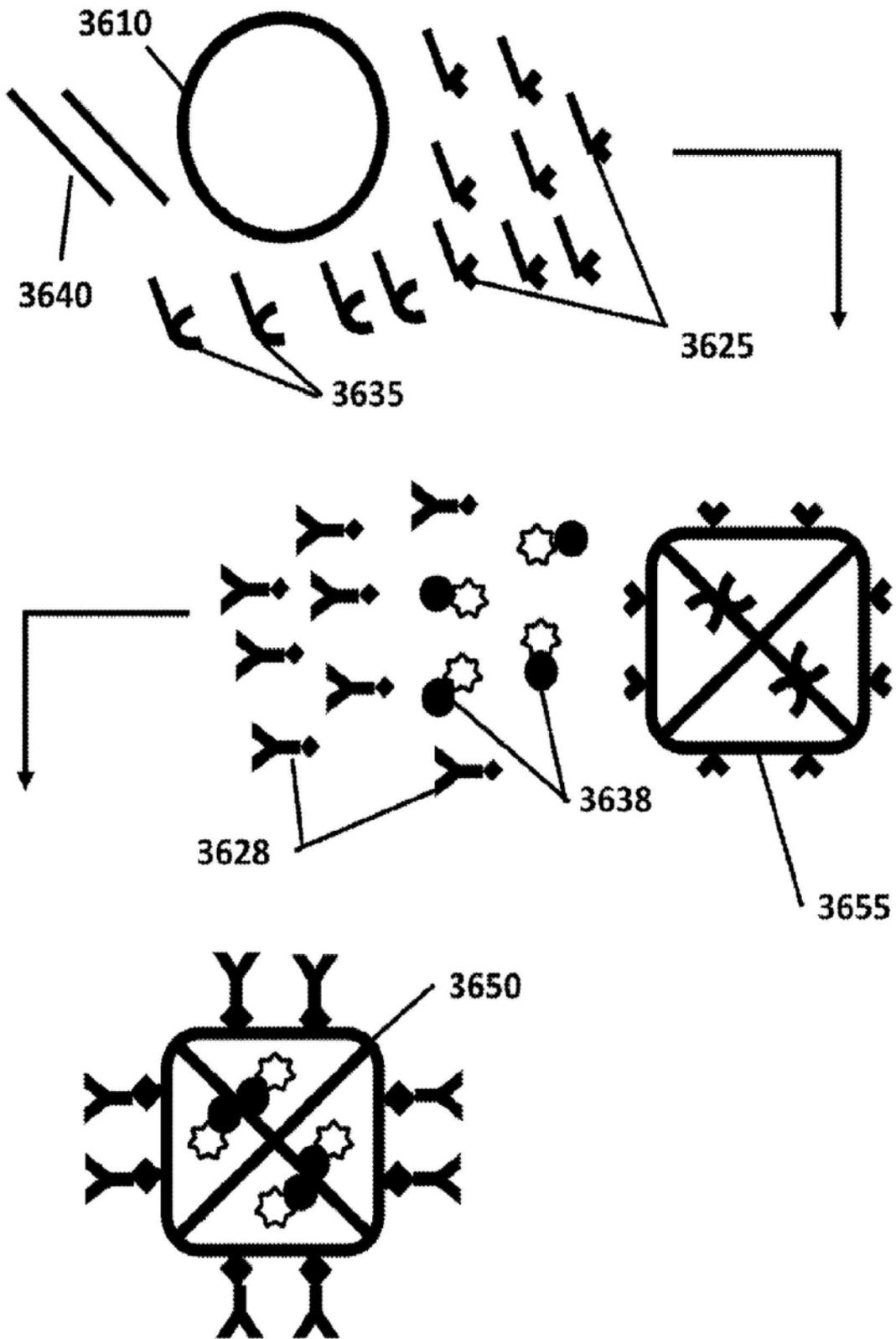


图36B

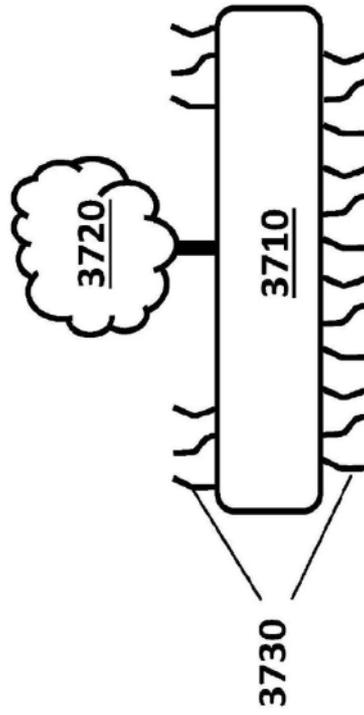


图37A

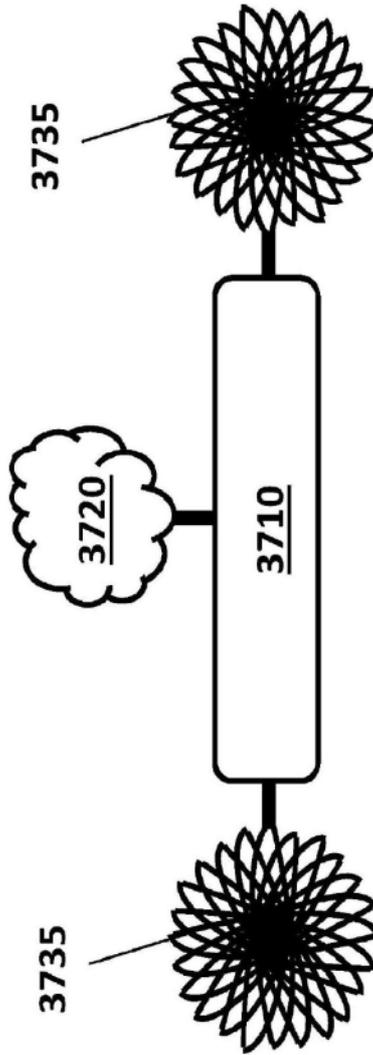


图37B

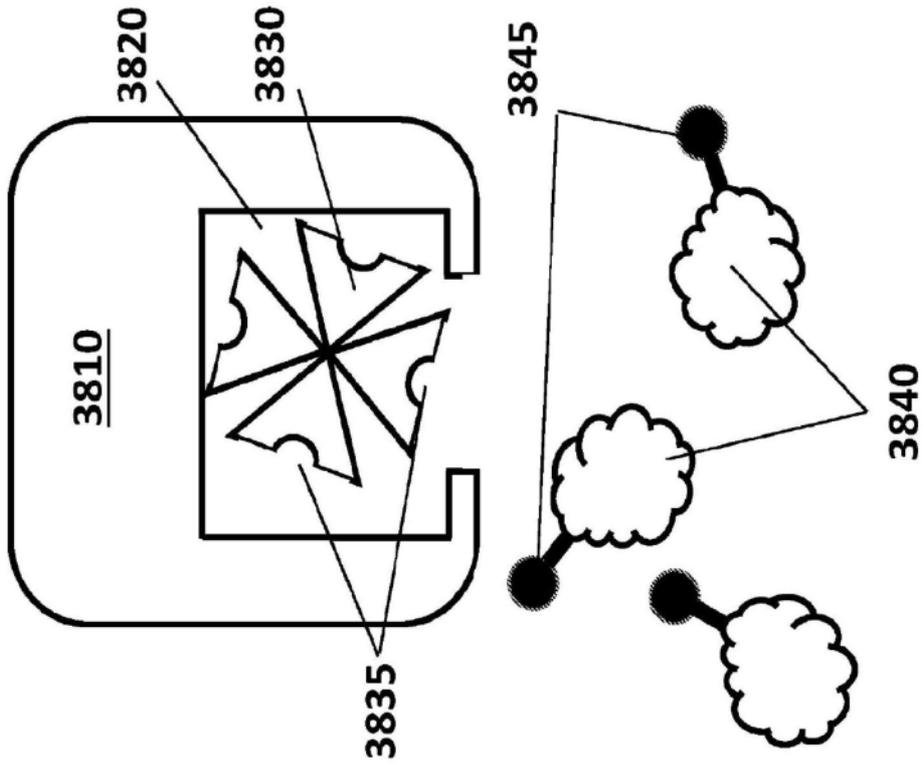


图38A

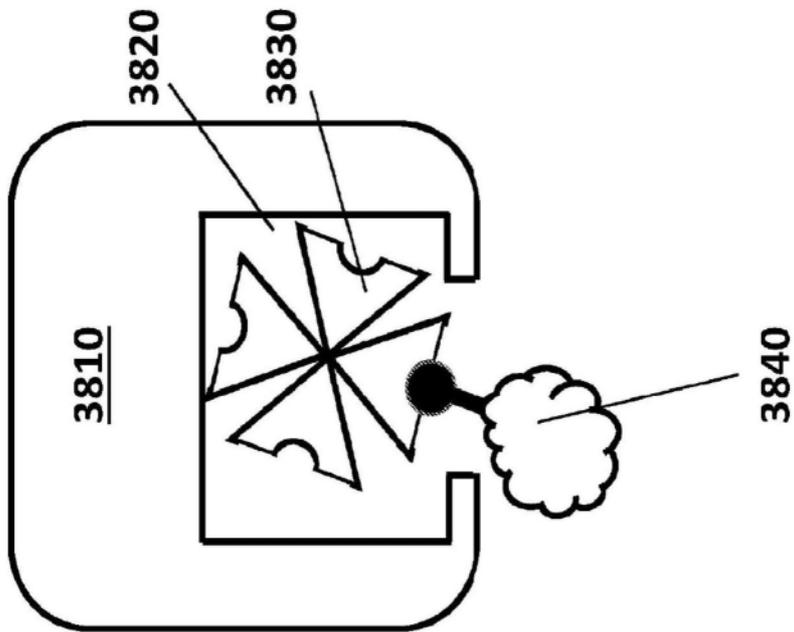


图38B

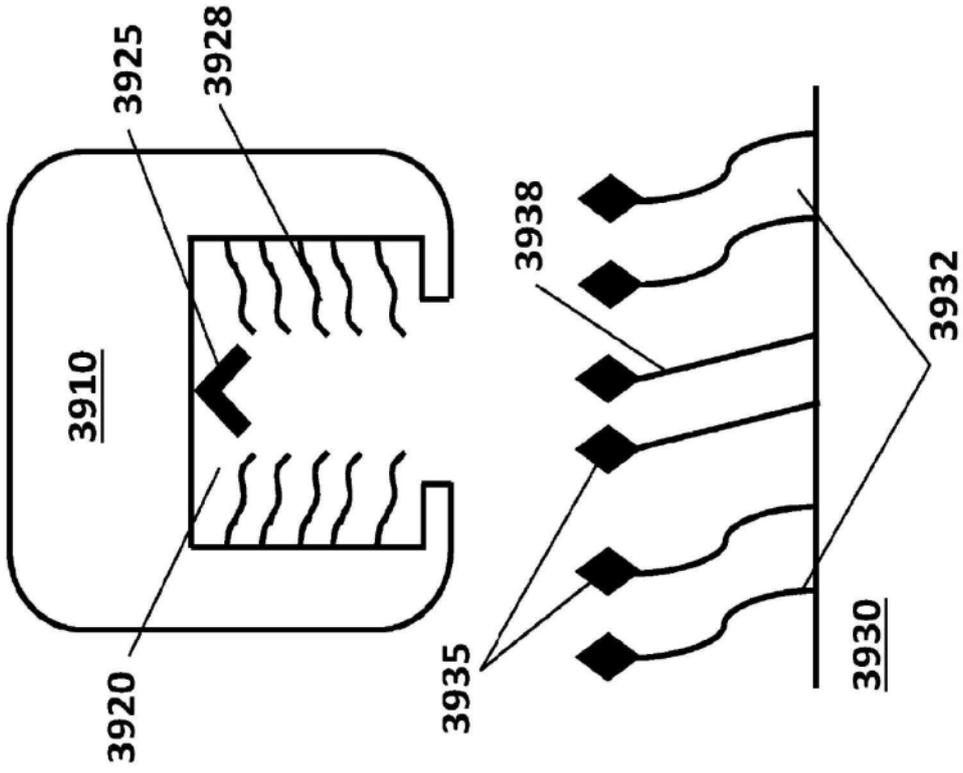


图39A

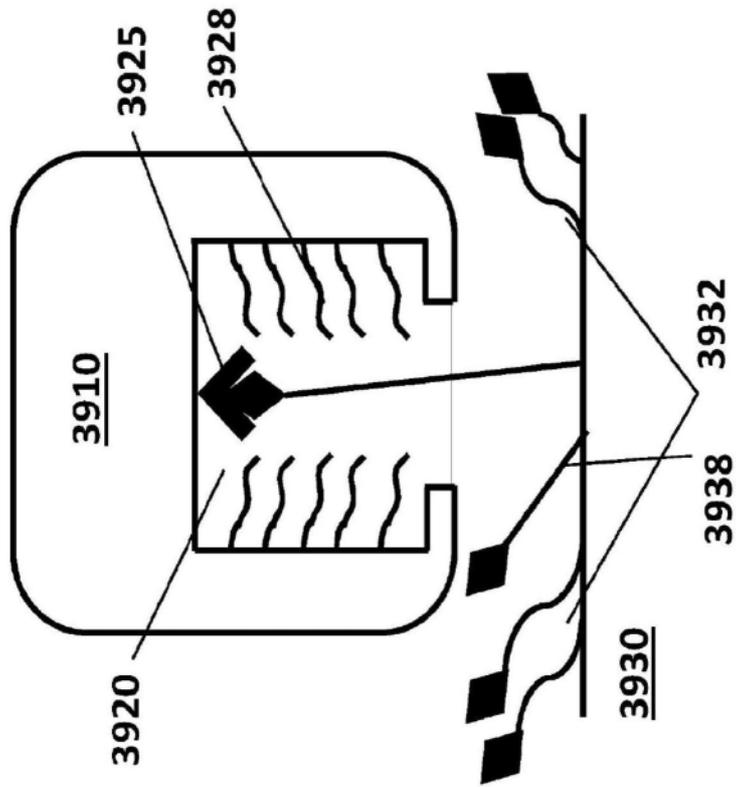


图39B

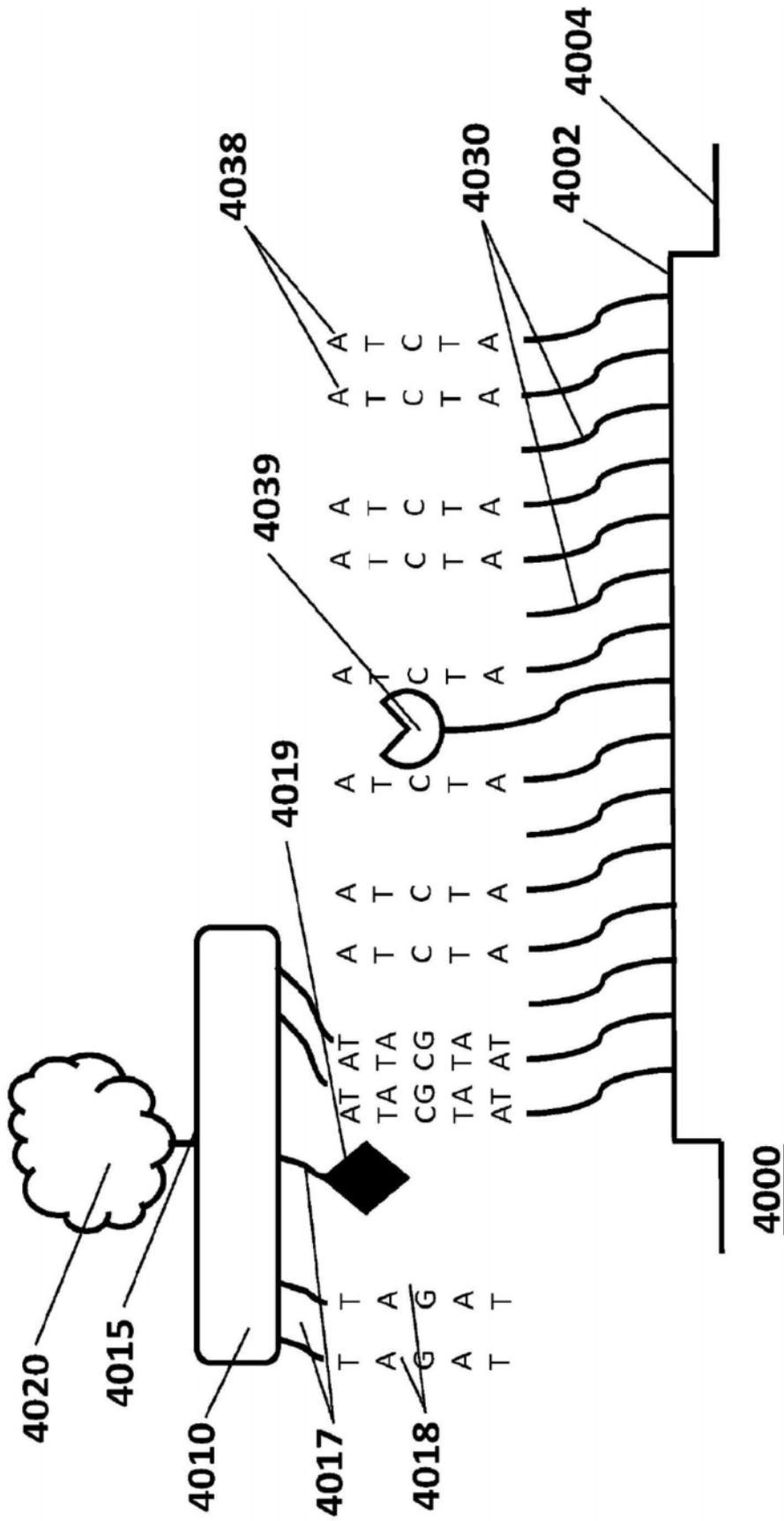


图40B

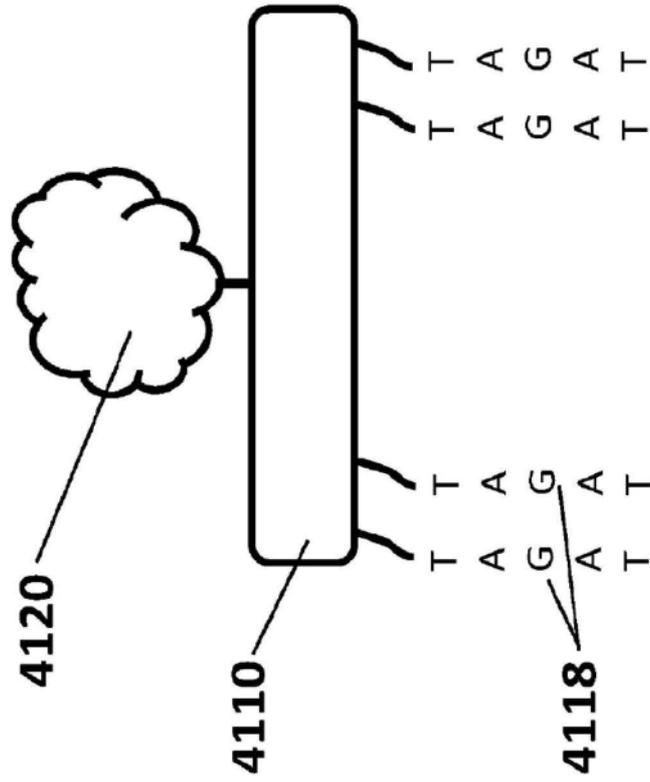


图41A

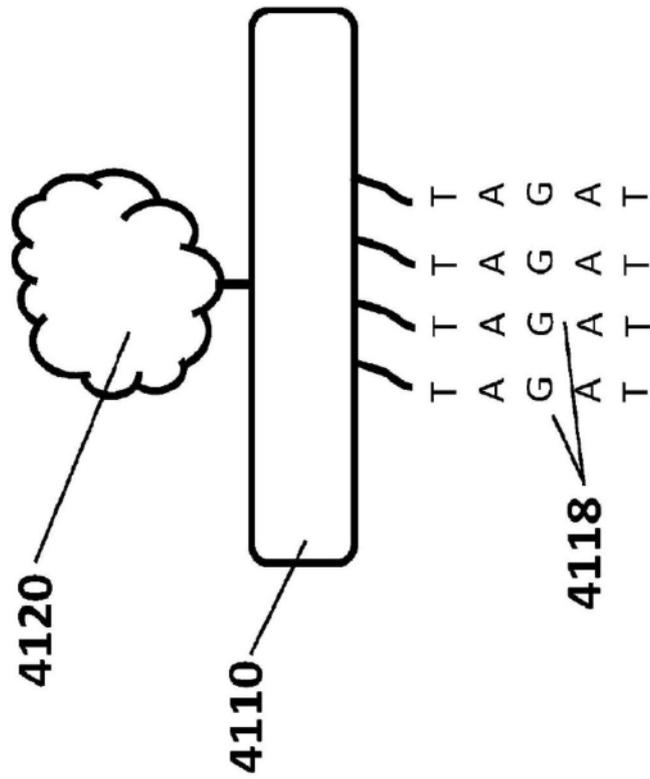


图41B

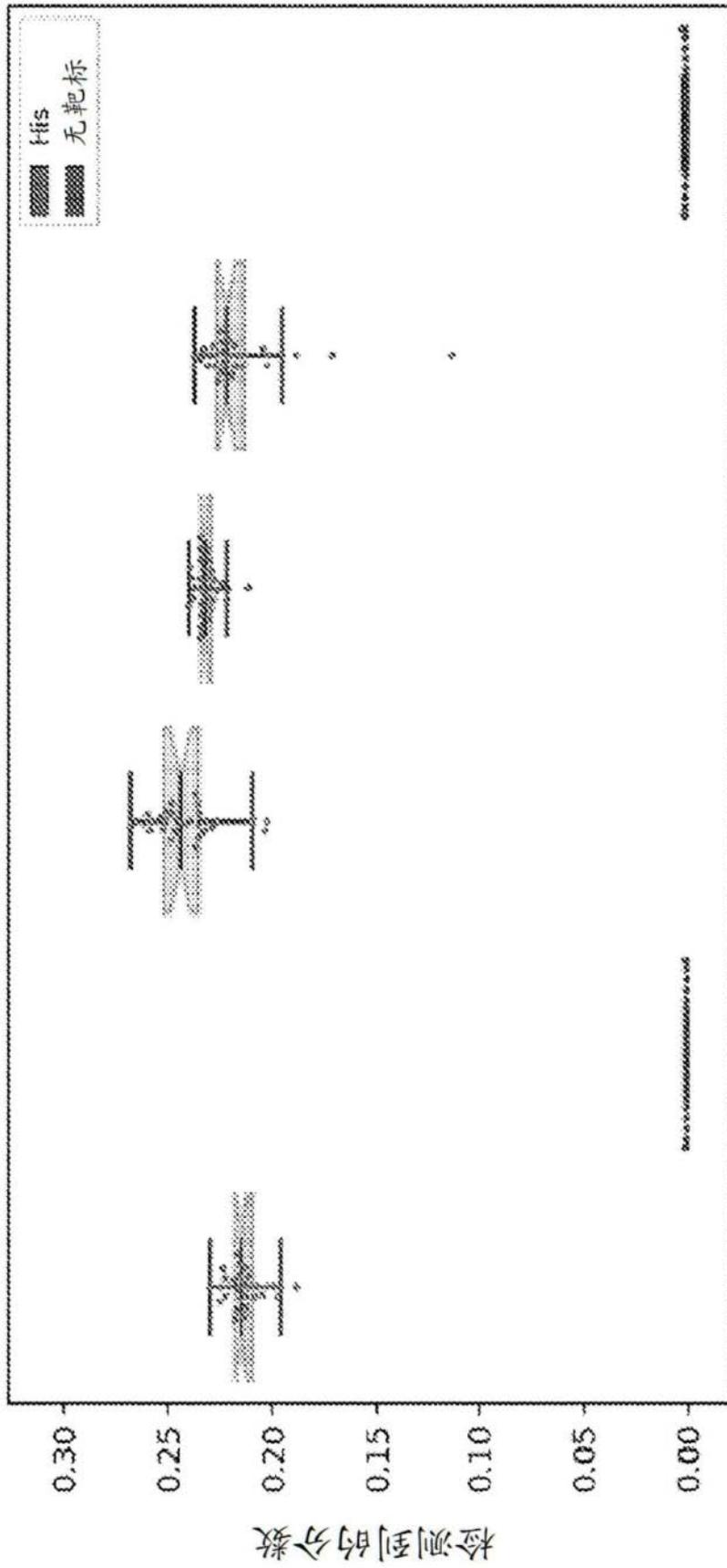


图43

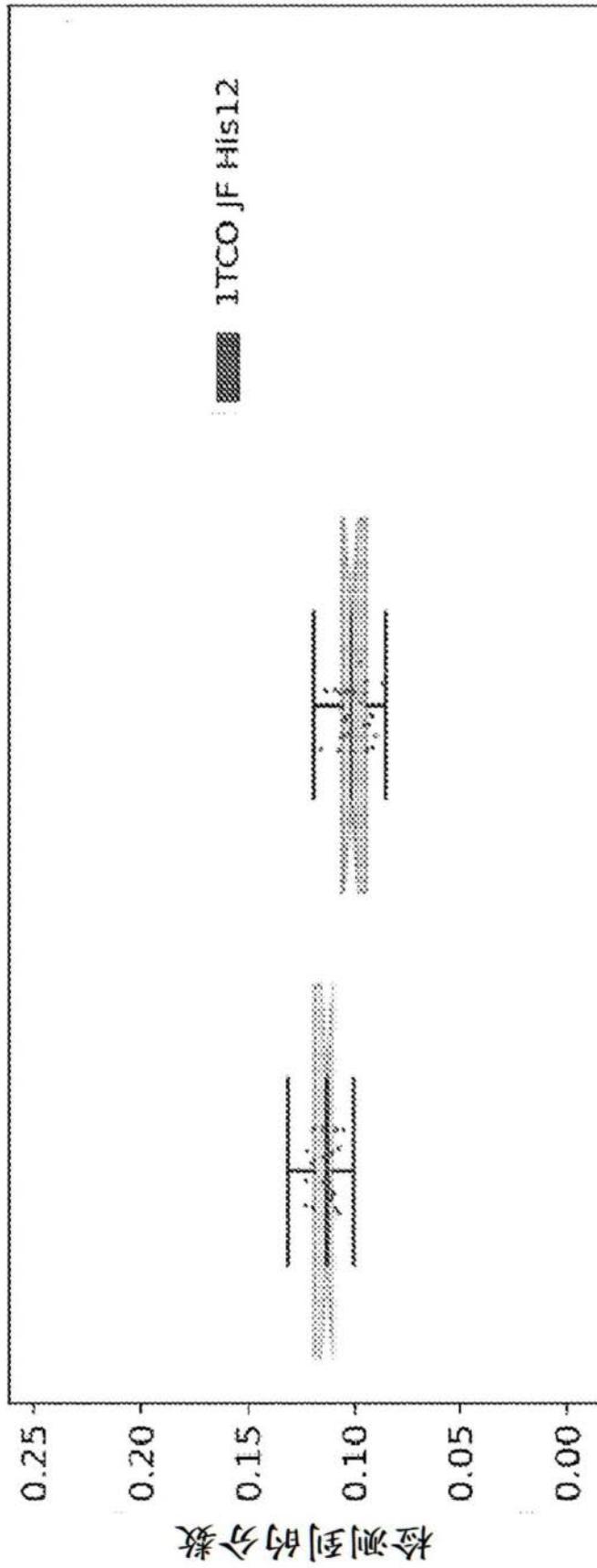
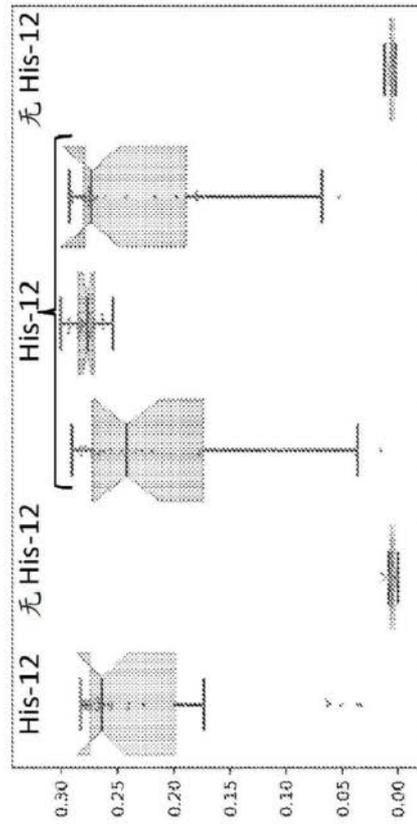


图44

寡核苷酸



APTMS

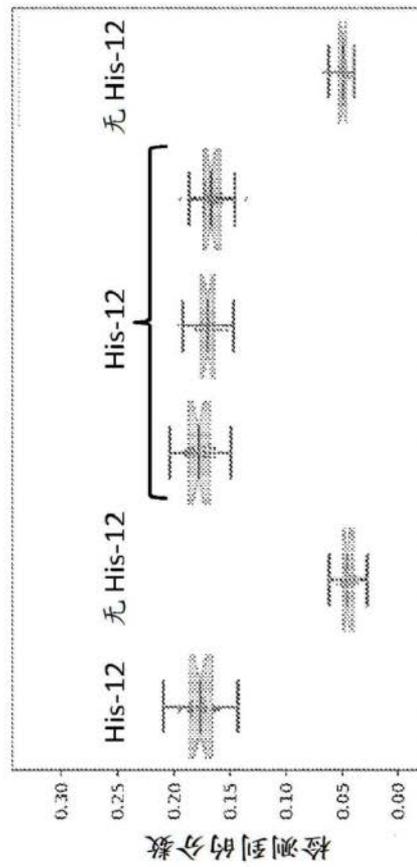


图45

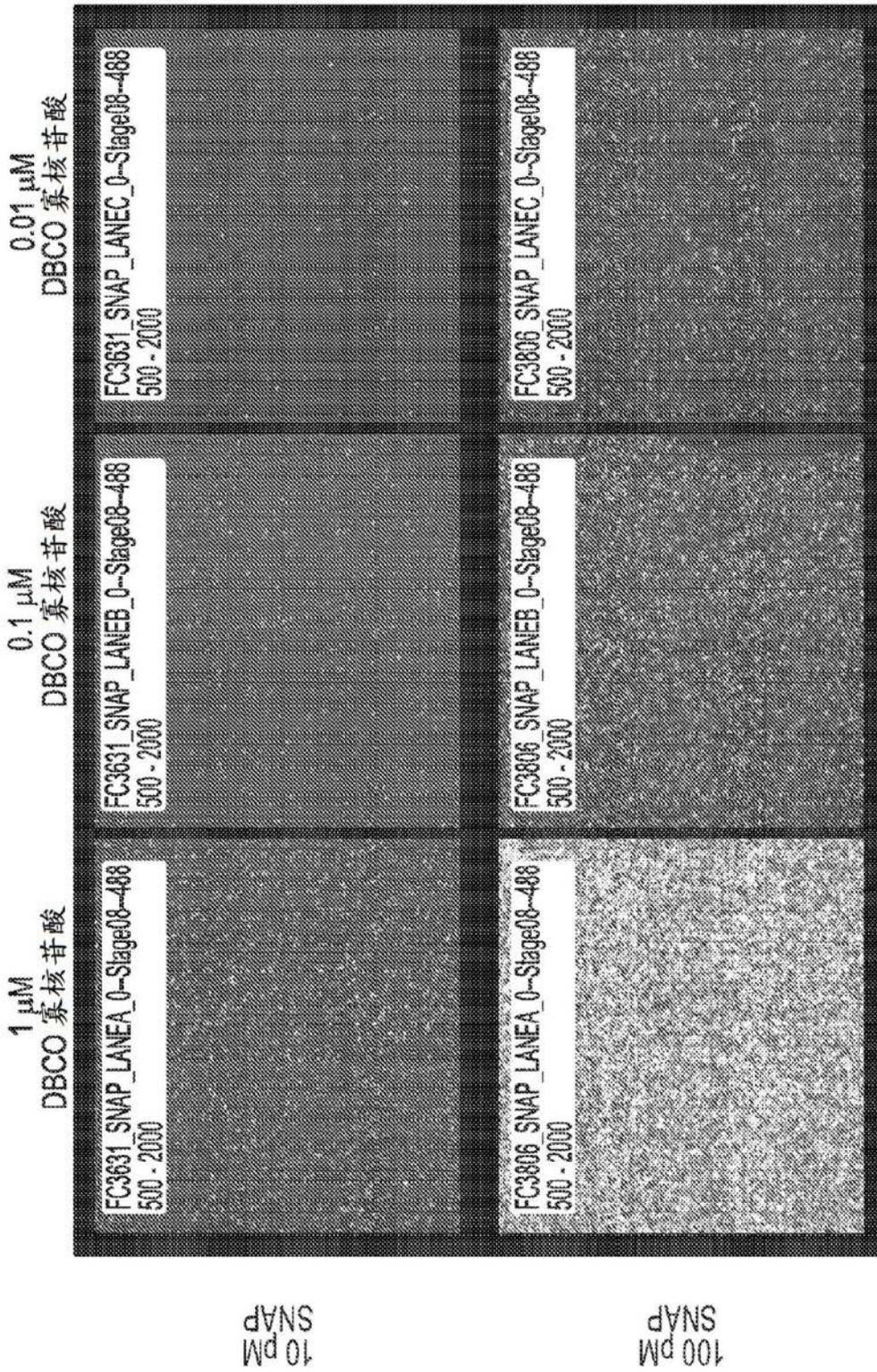


图46

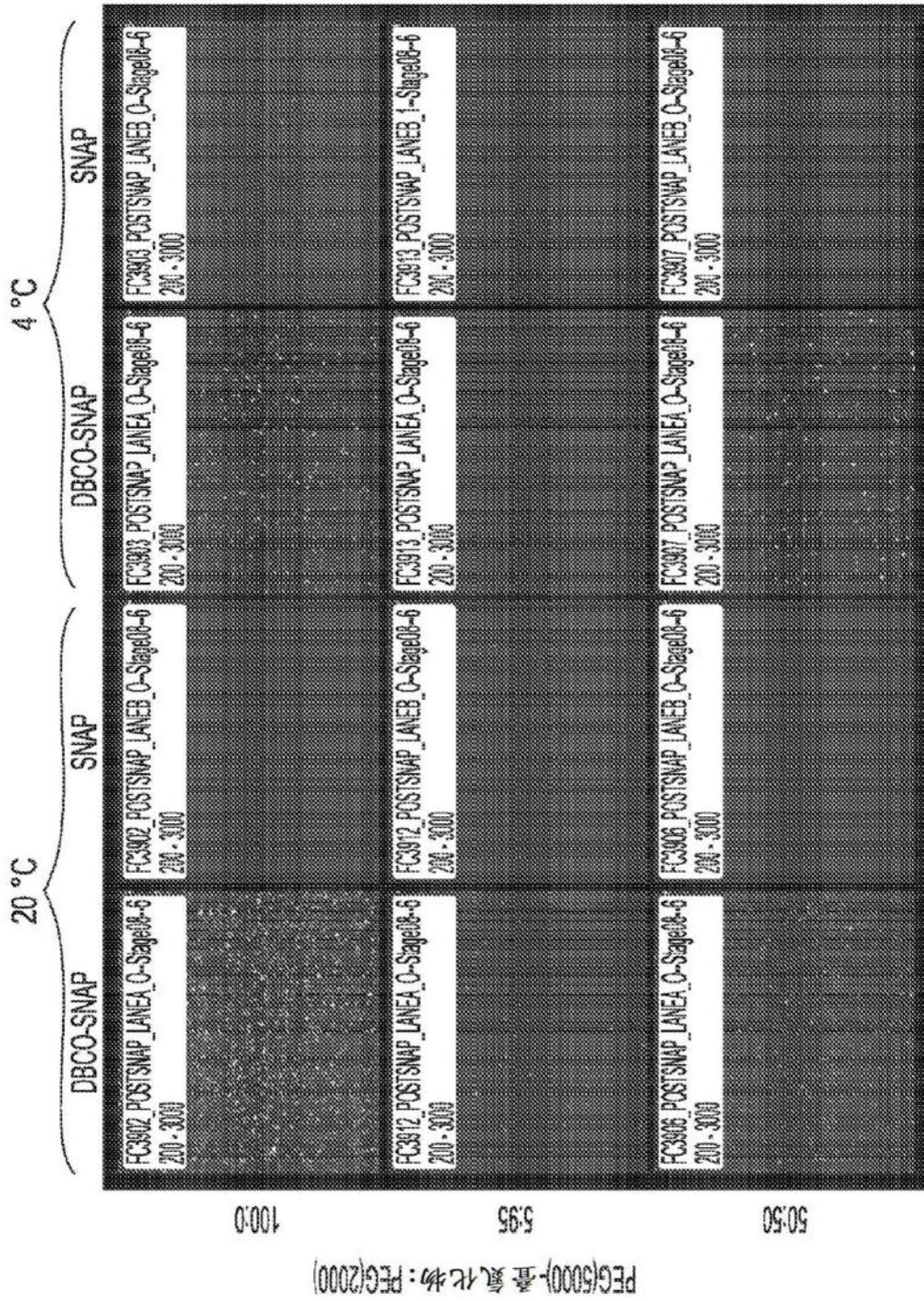


图47

$$\text{假设 } A \propto l \therefore \frac{A_1}{A_2} \propto \frac{l_1}{l_2}$$

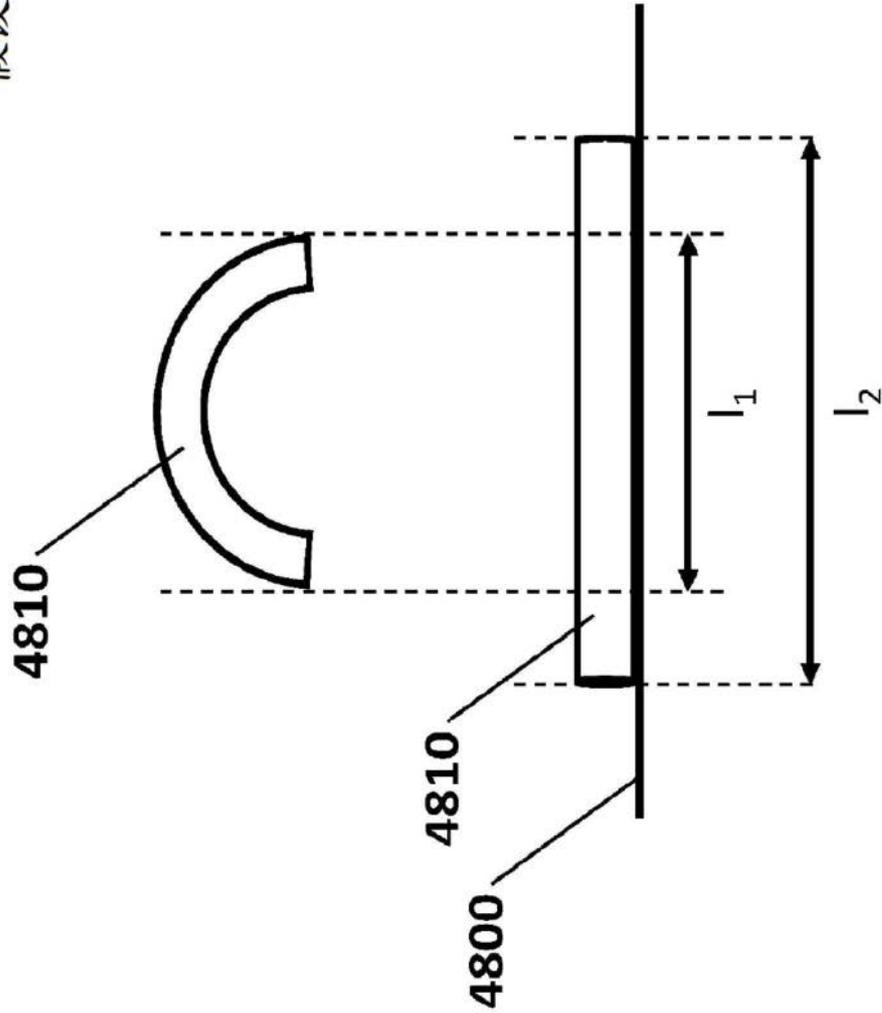


图48

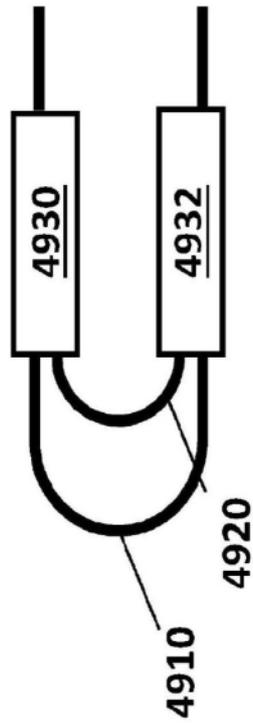


图49A

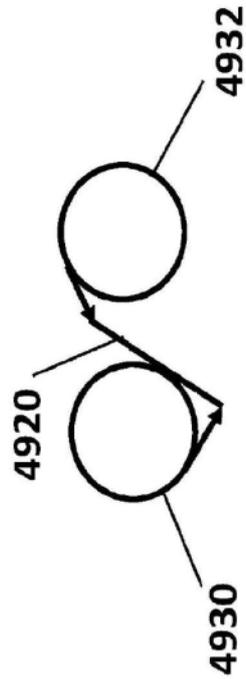


图49B

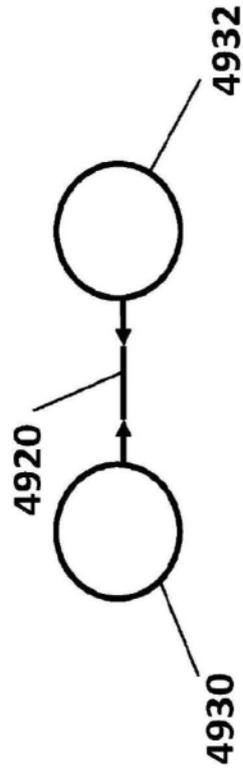


图49C

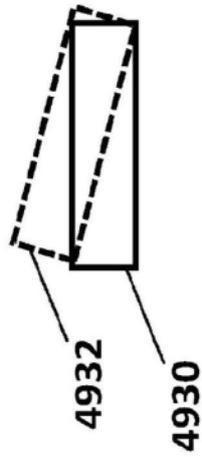


图49D

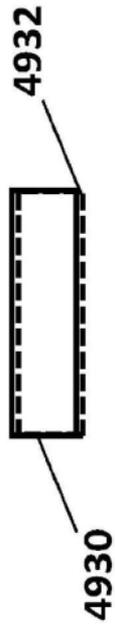


图49E

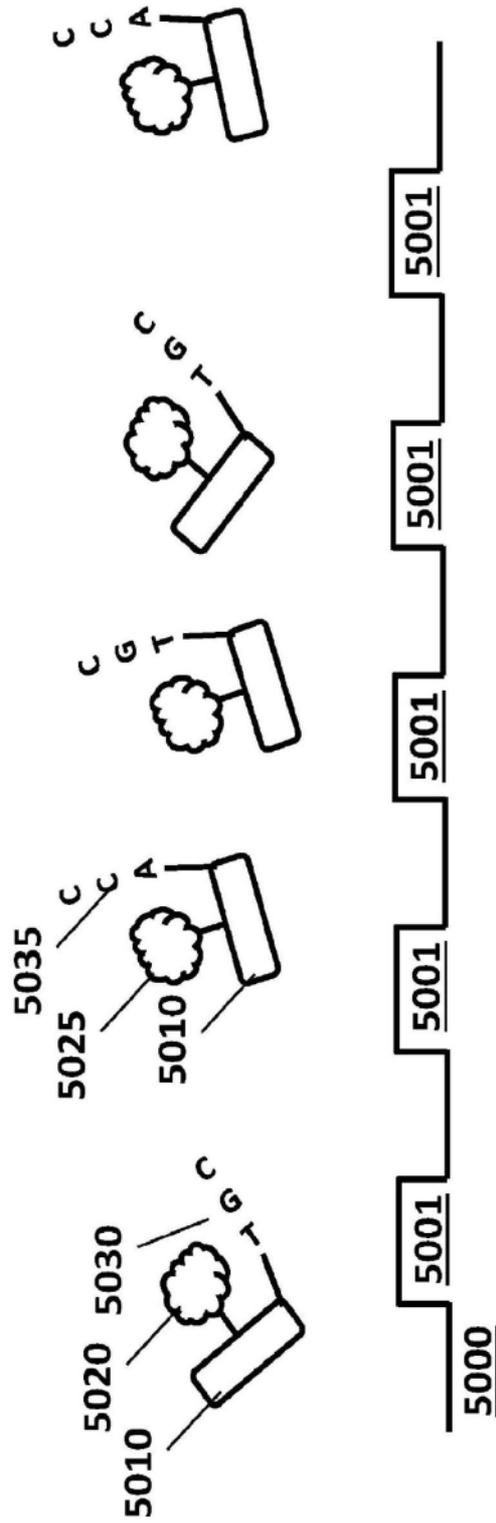


图50A

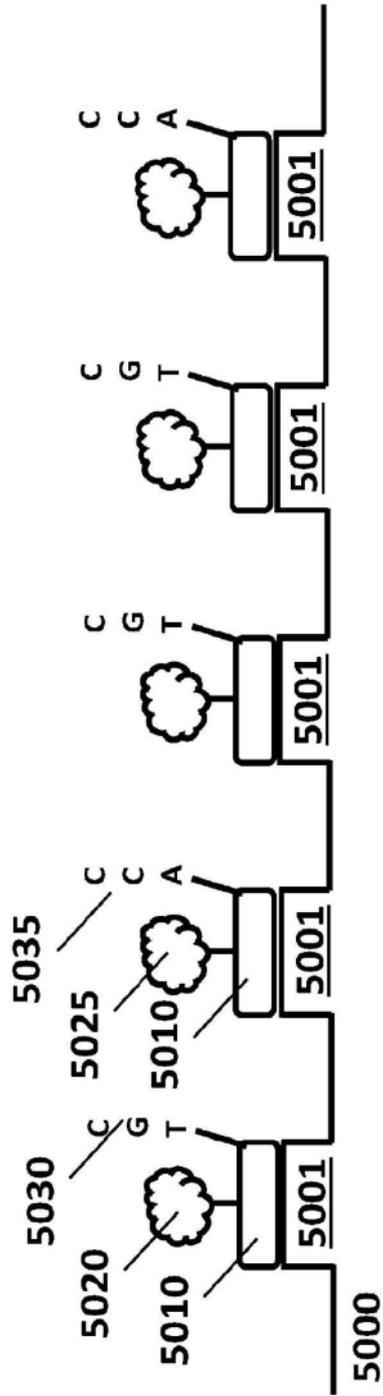


图50B

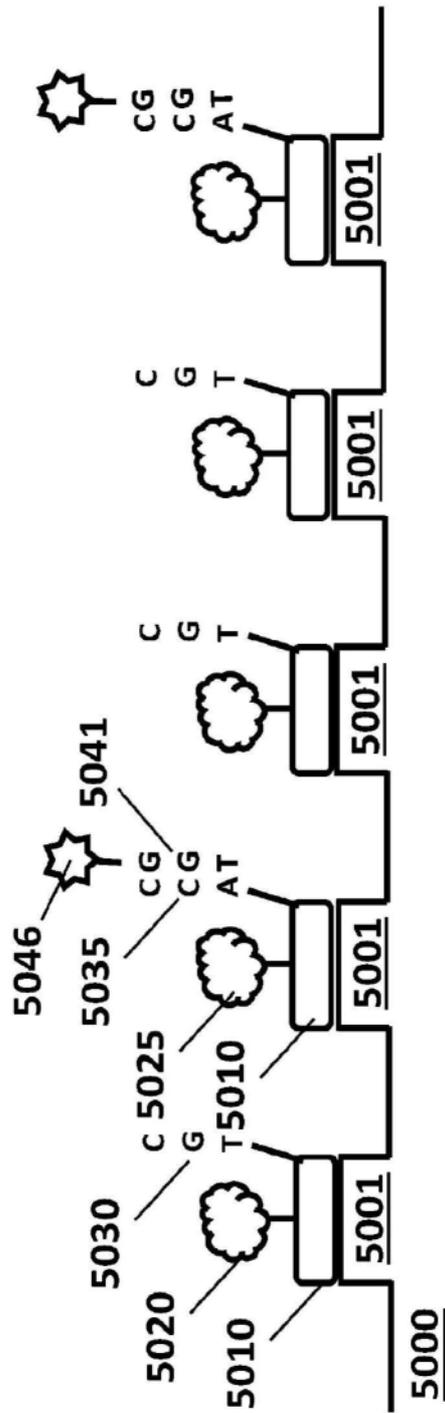


图50F

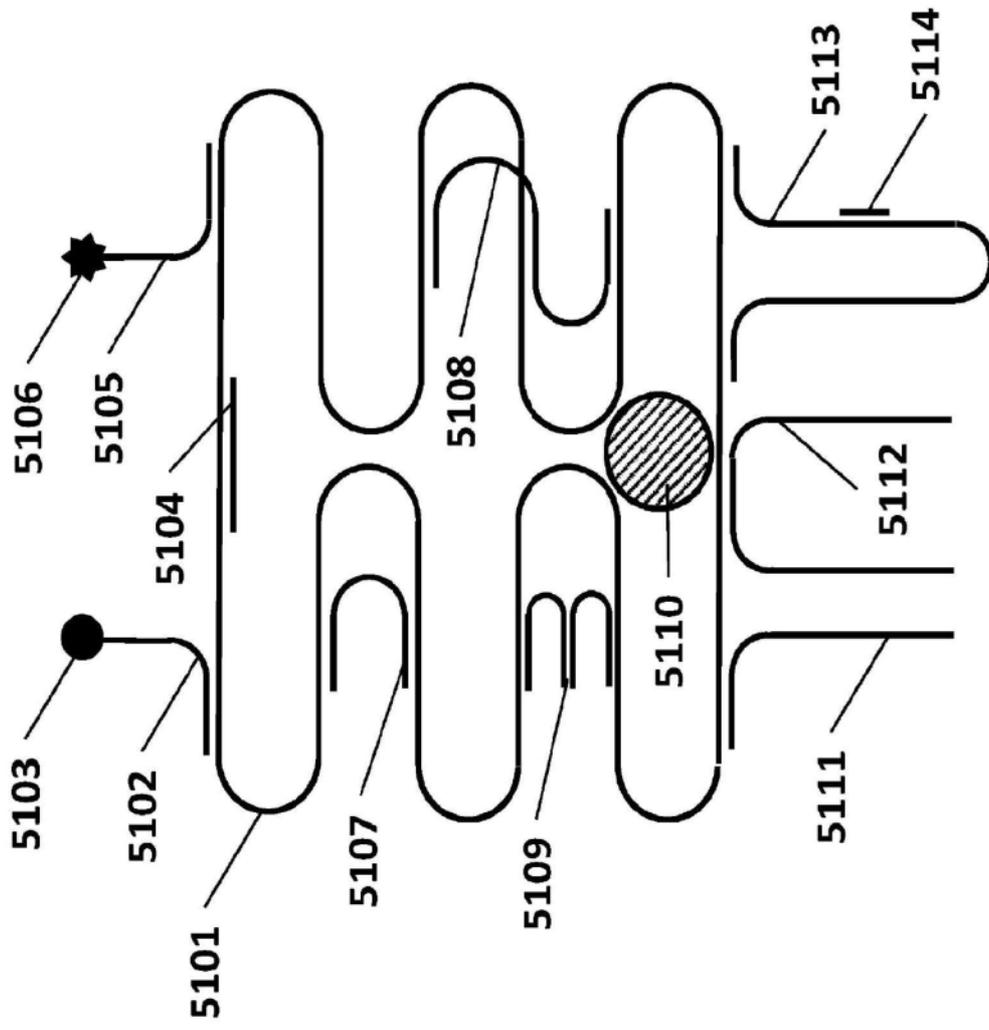


图51

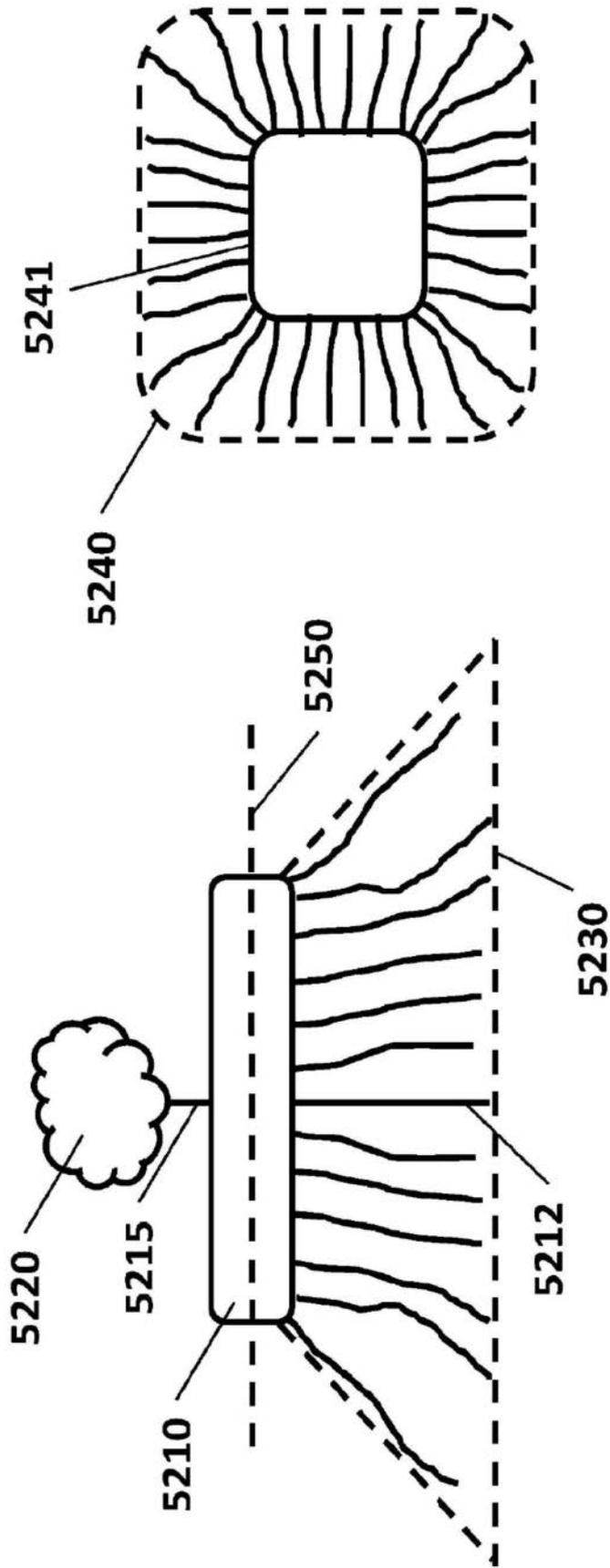


图 52A

图 52B

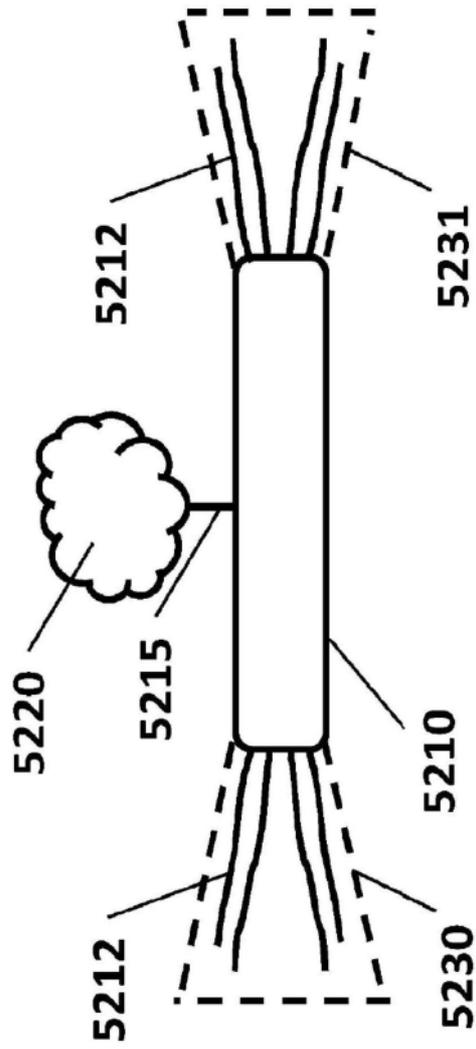


图52C

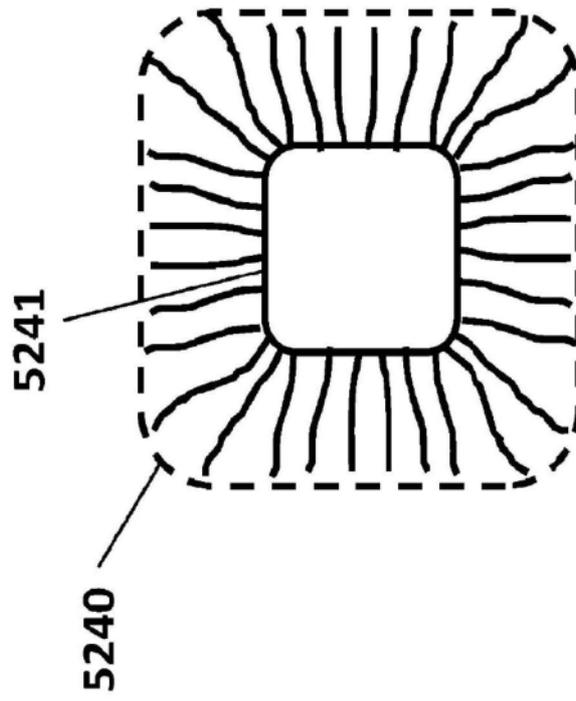


图52D

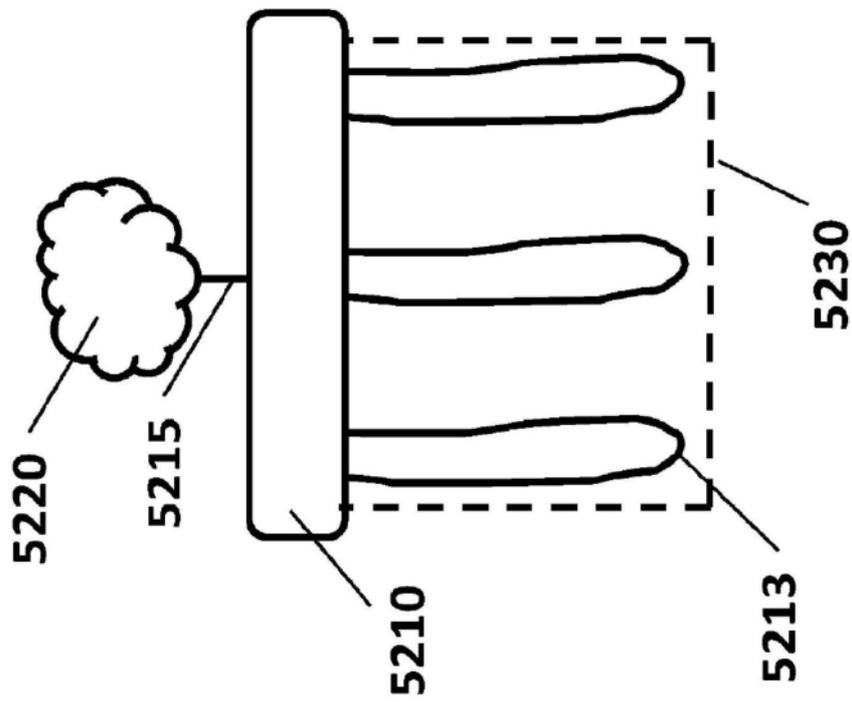


图52E

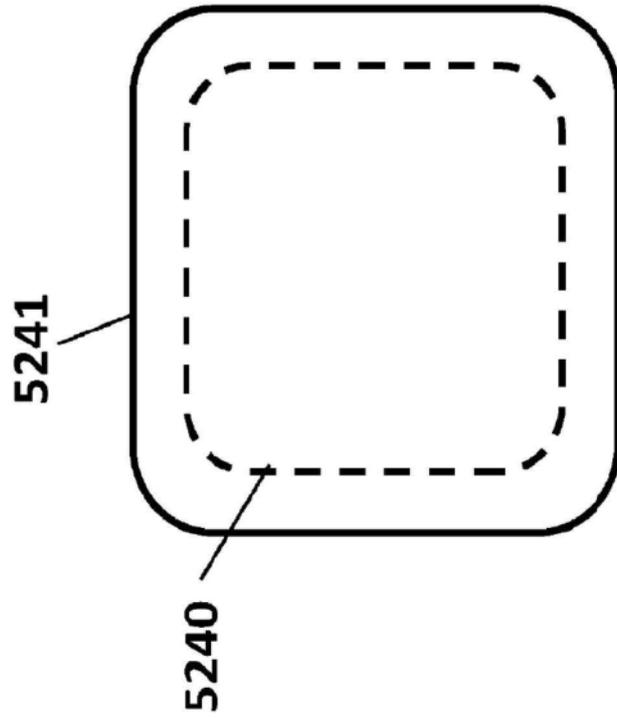


图52F

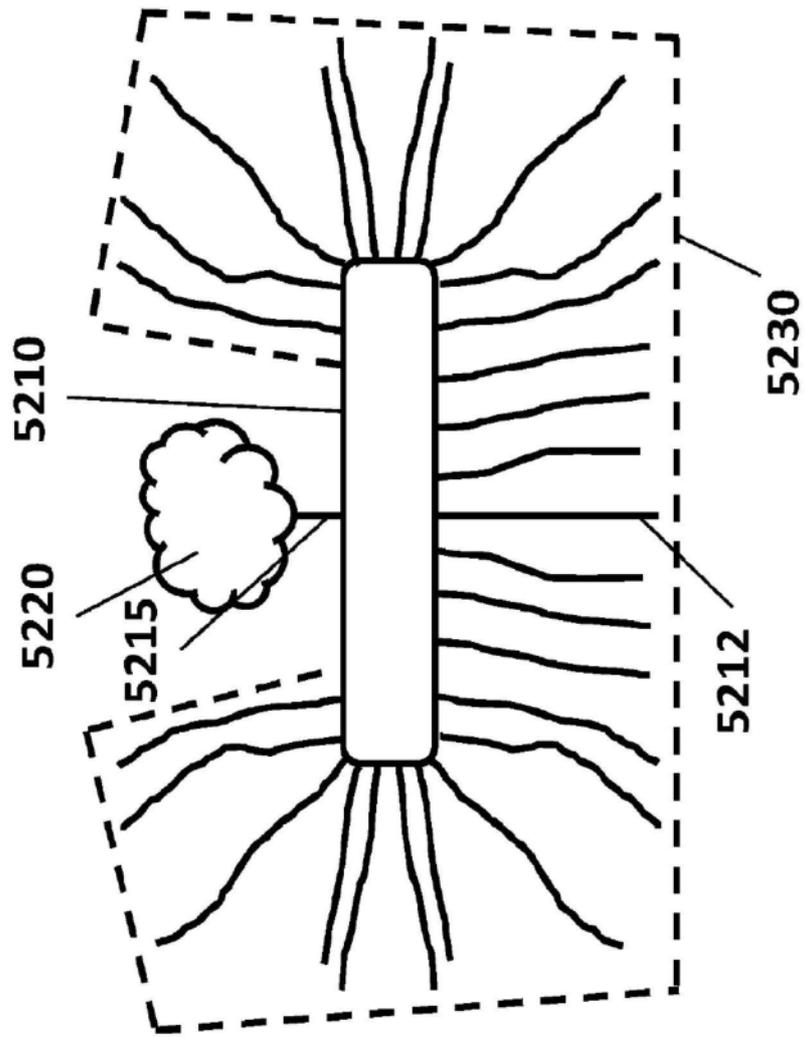


图52G

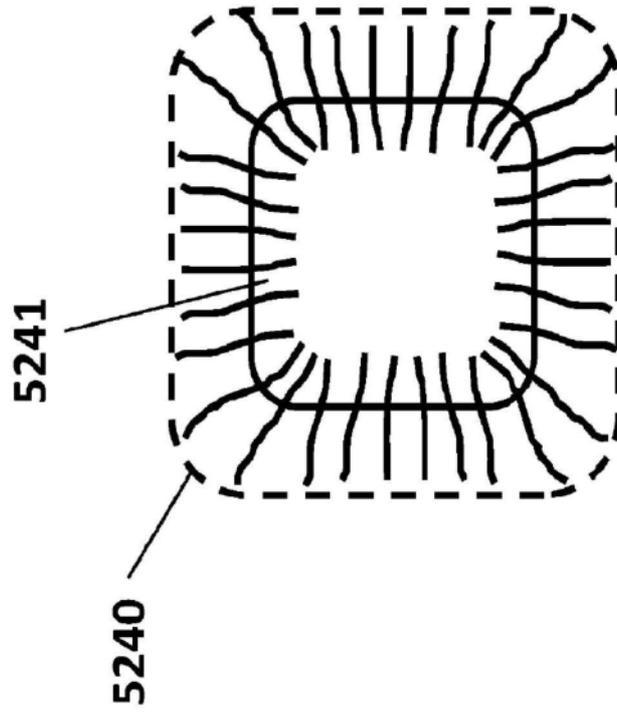


图52H

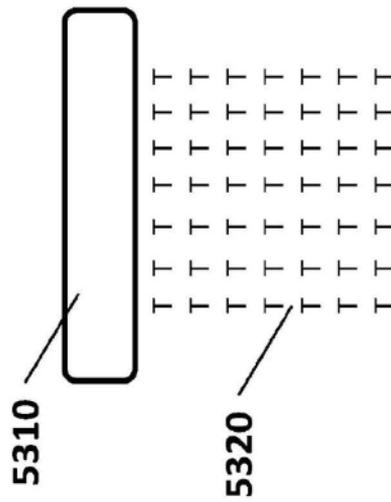


图53A

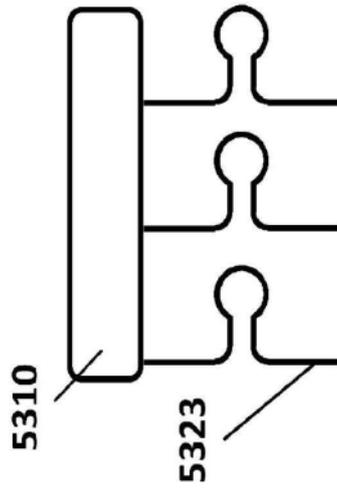


图53D

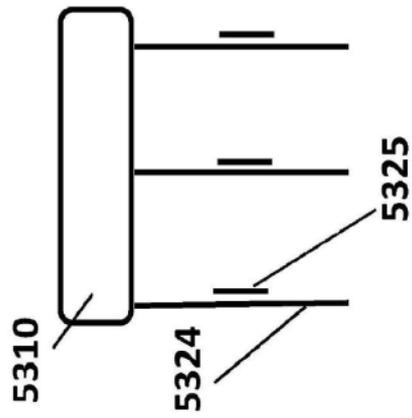


图53E

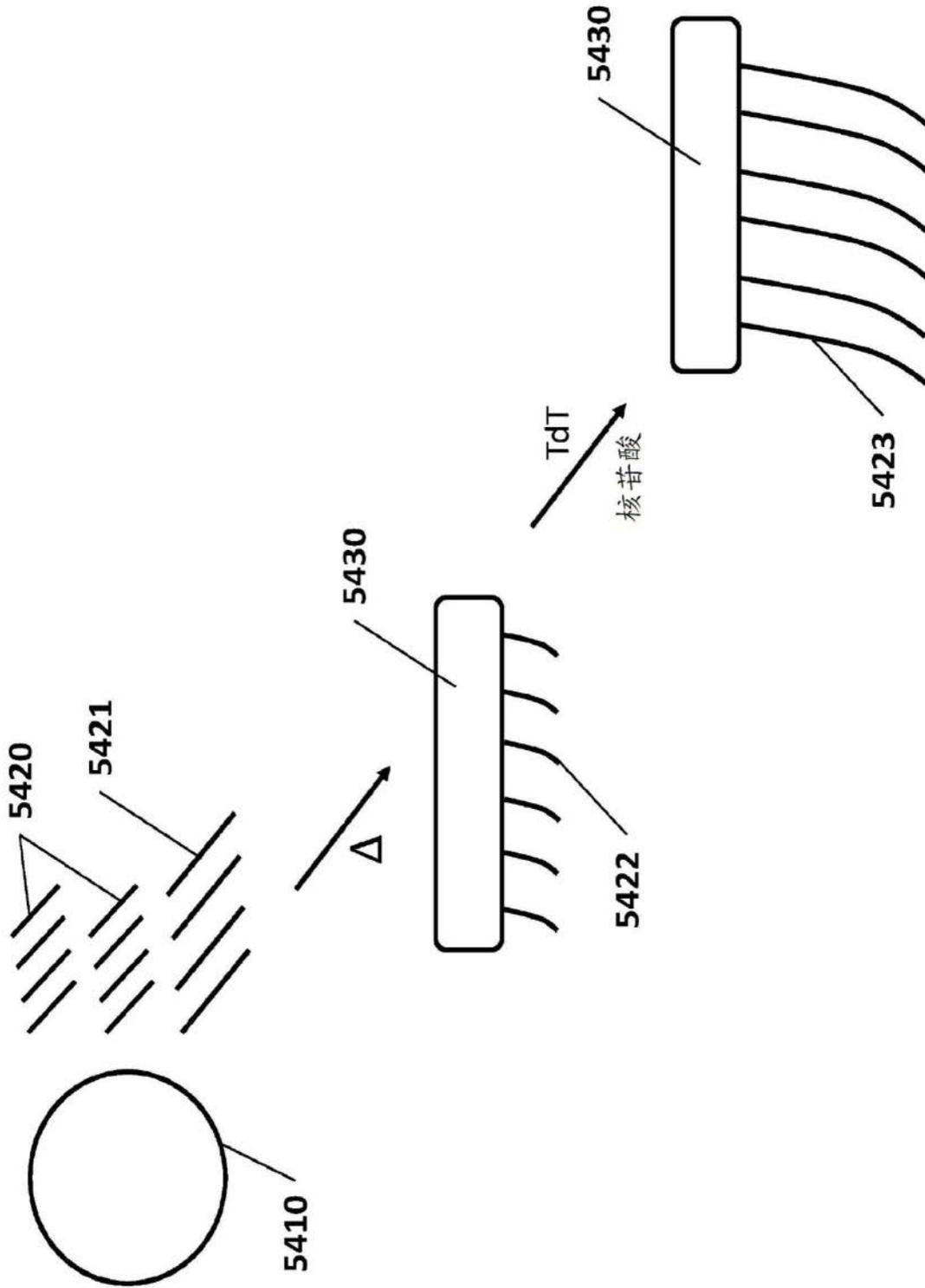


图54A

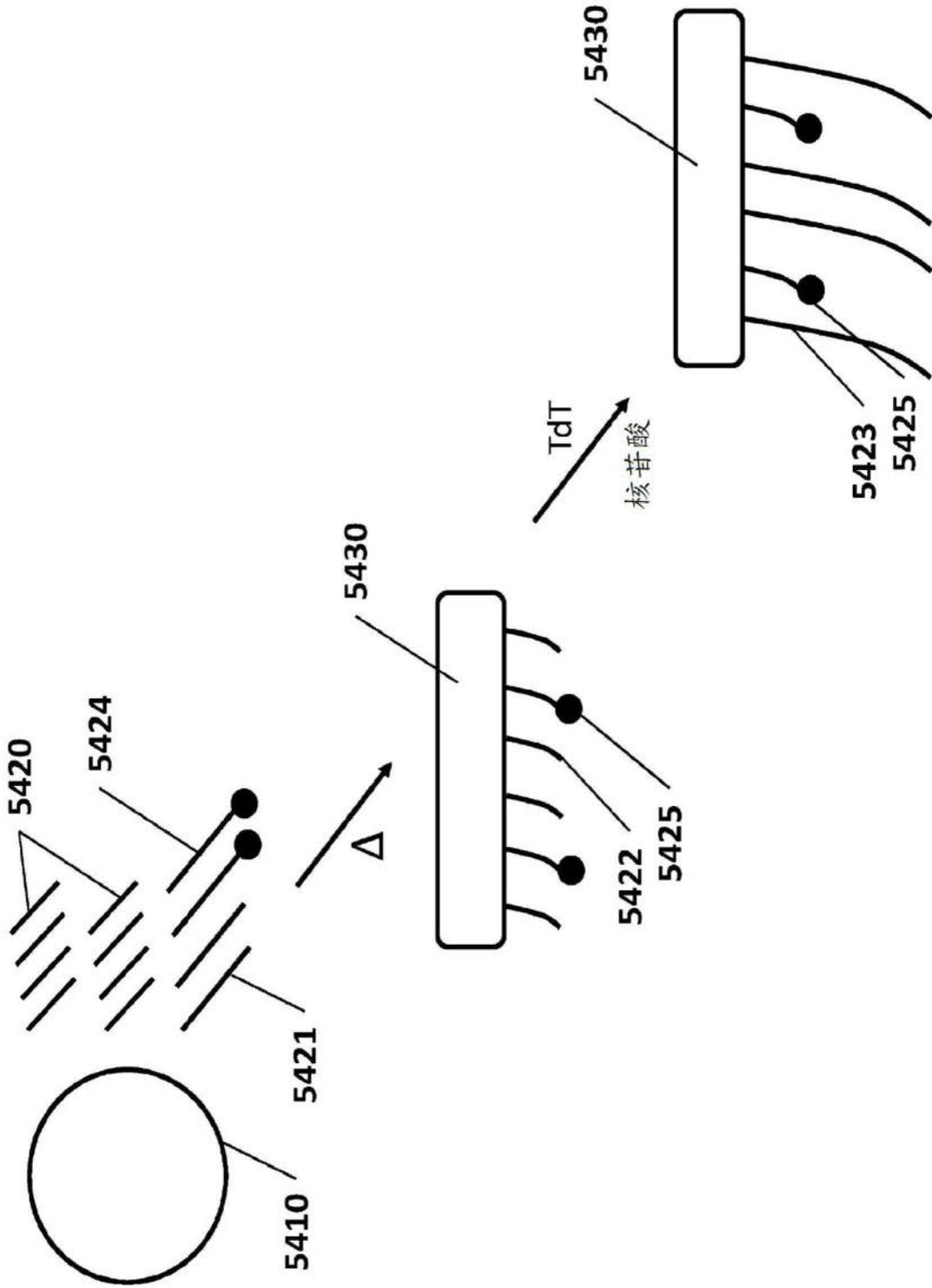


图54B

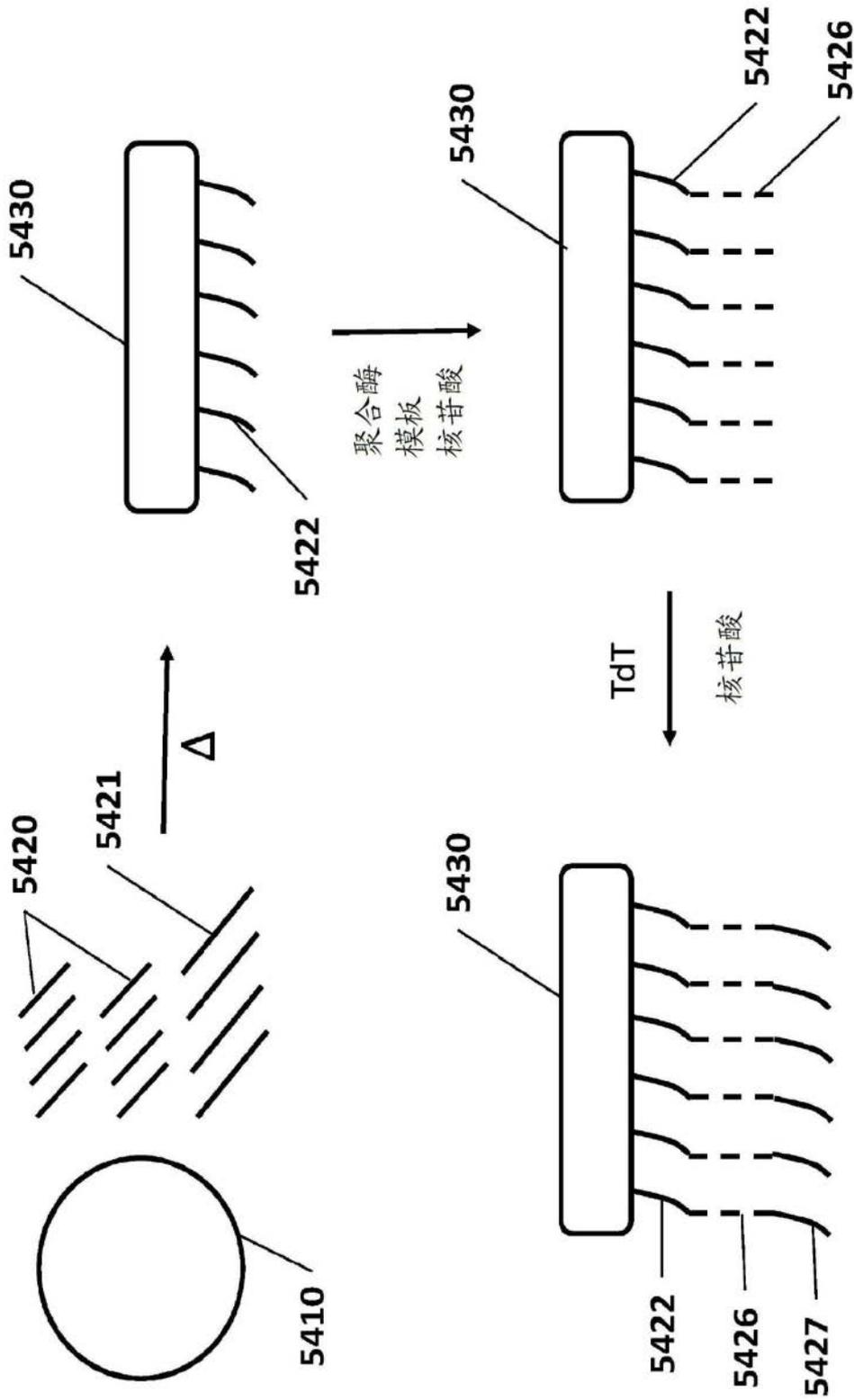


图54C

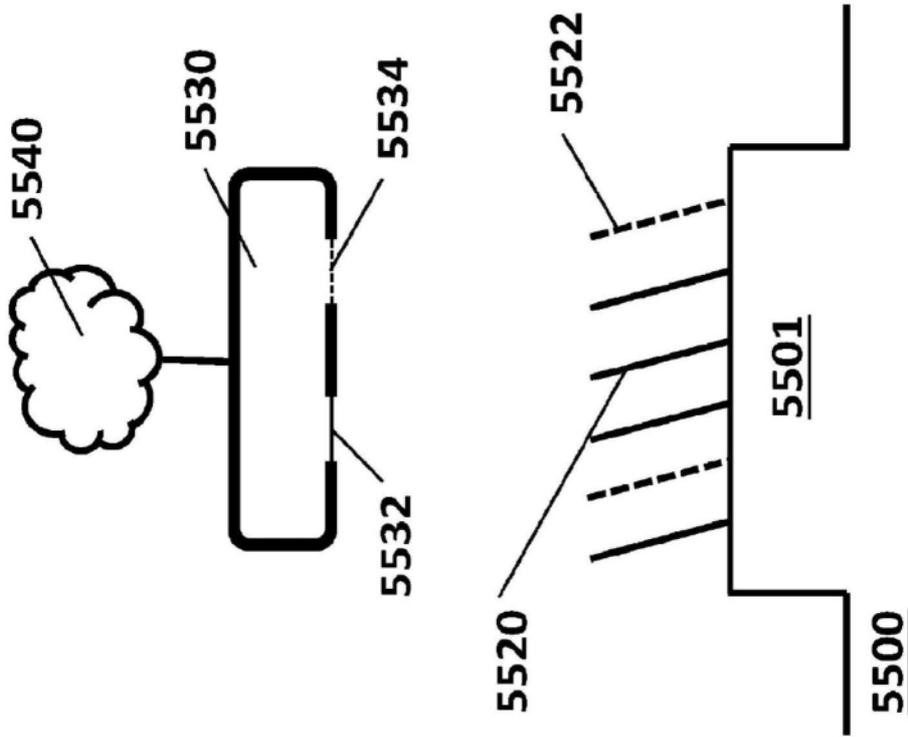


图55A

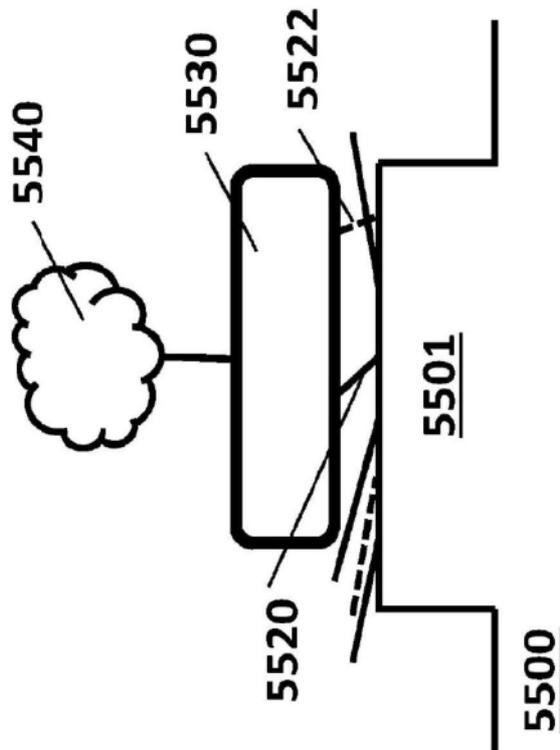


图55B

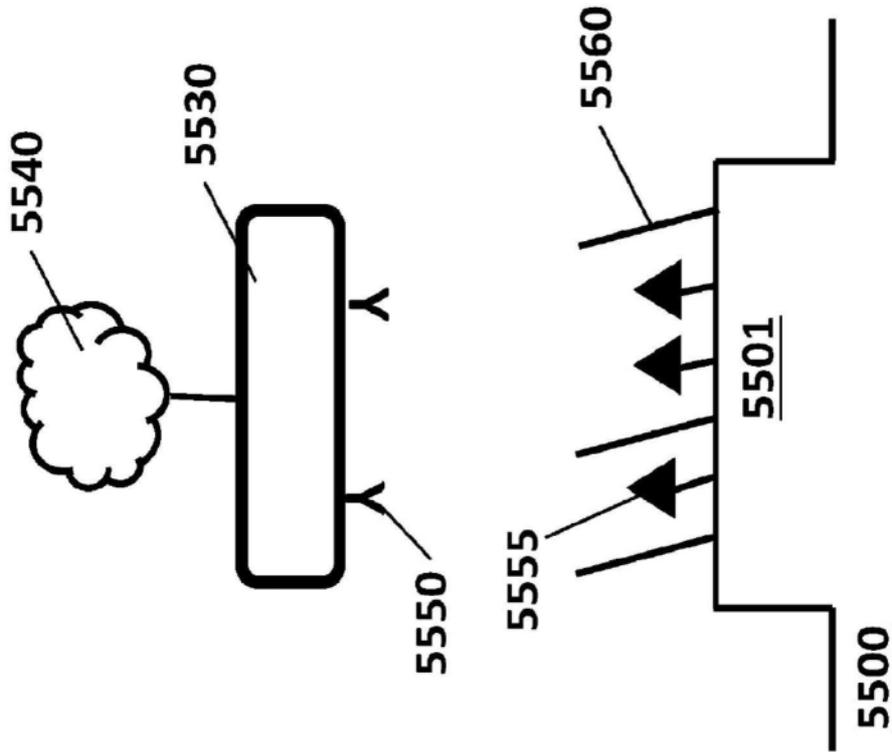


图55C

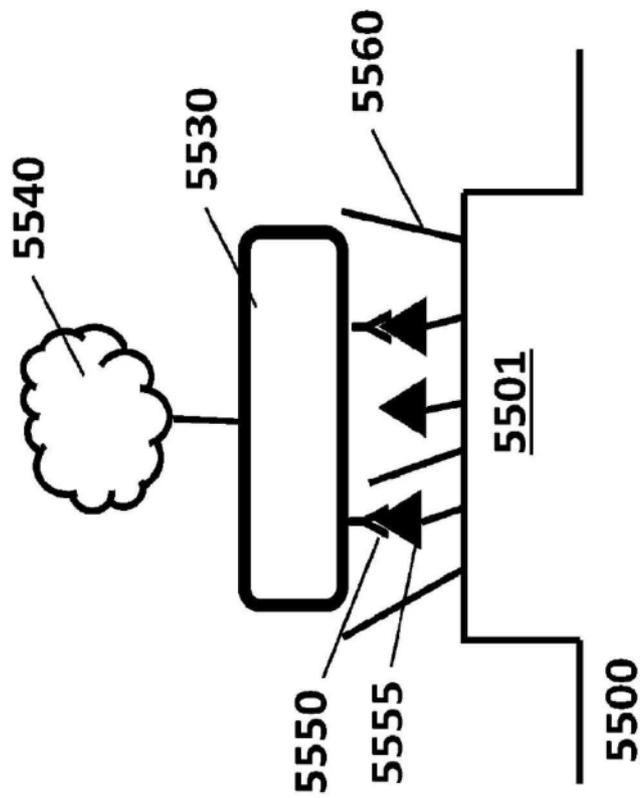


图55D

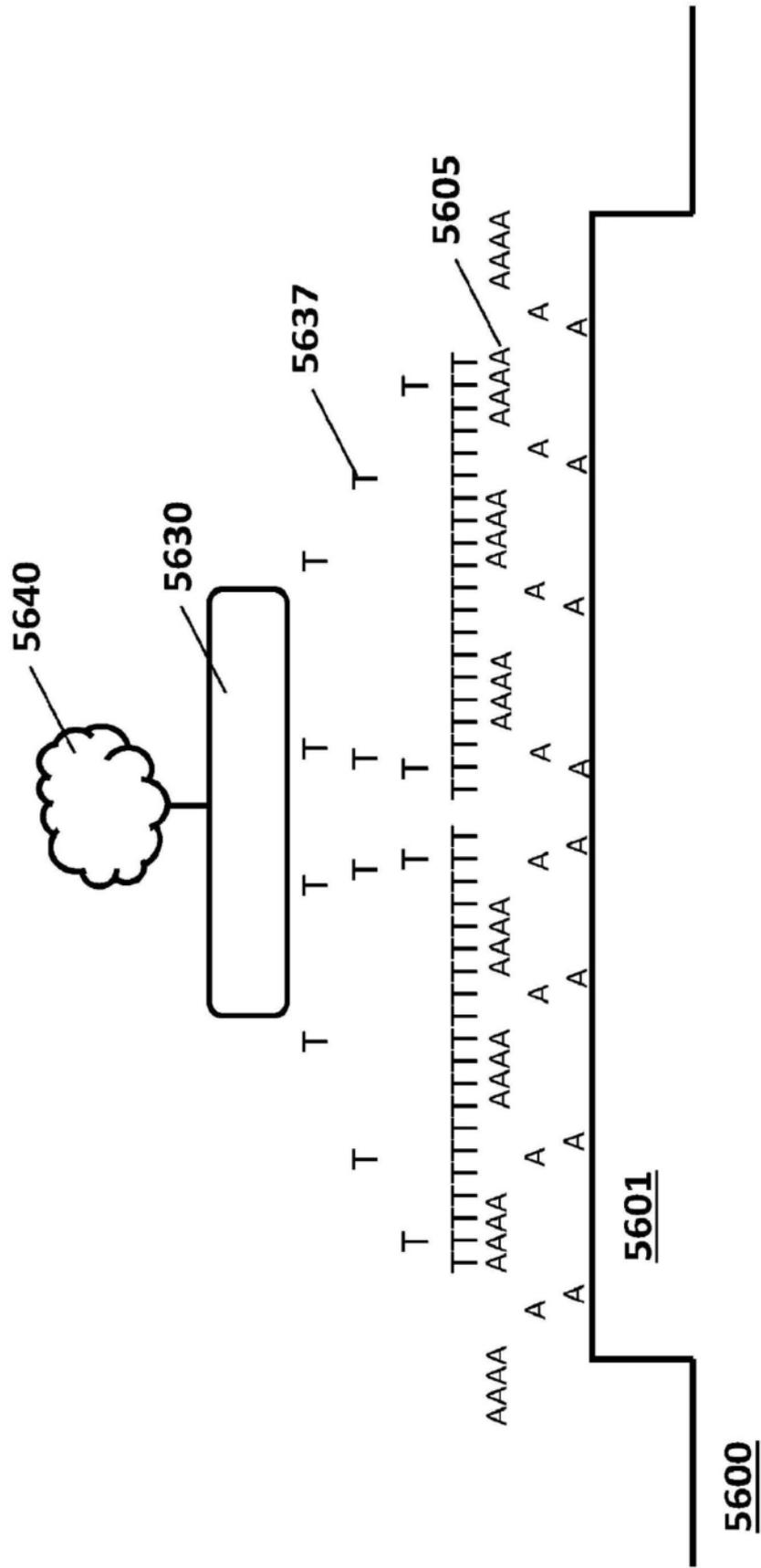


图56B

$$\frac{L_{C,i}}{H_{C,i}} \approx \frac{L_{C,f}}{H_{C,f}}$$

$$\frac{L_{N,i}}{H_{N,i}} < \frac{L_{N,f}}{H_{N,f}}$$

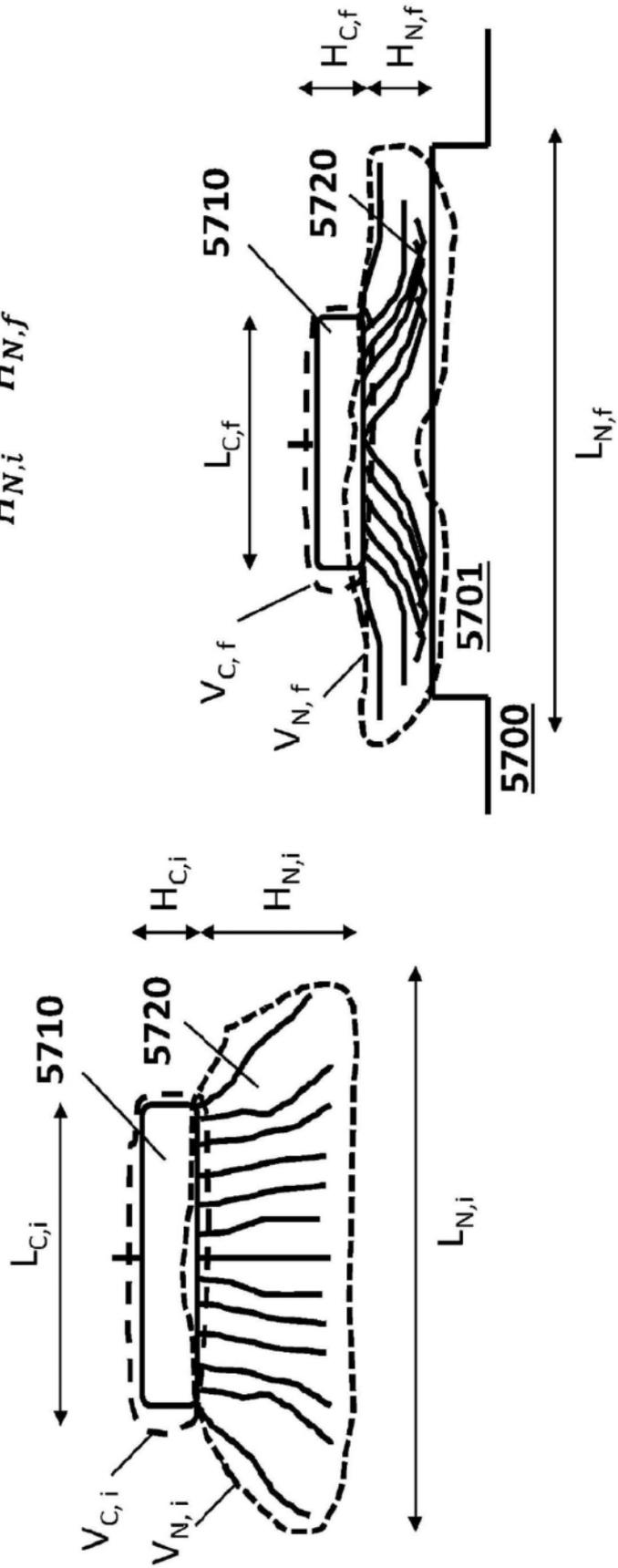


图57

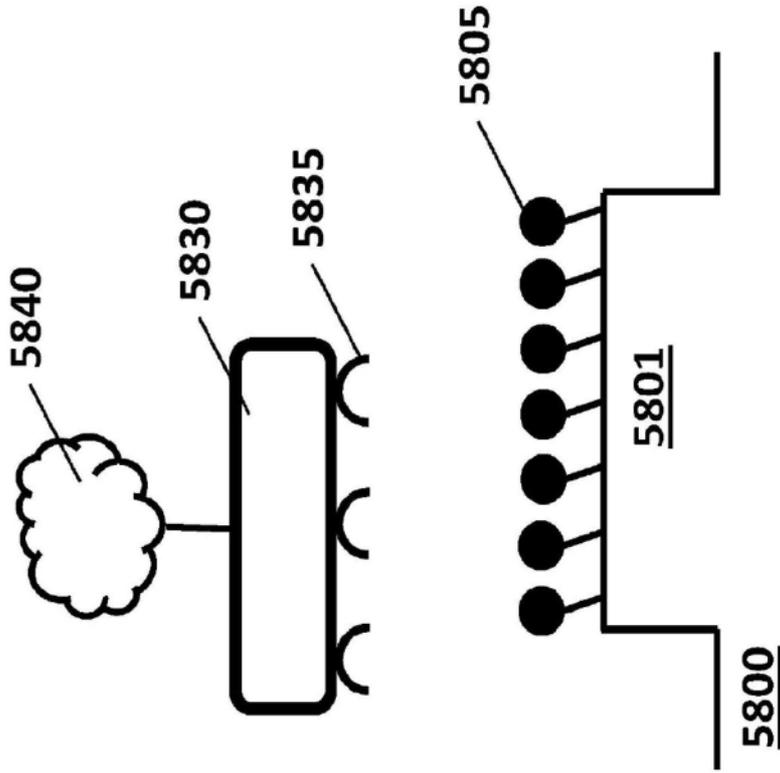


图58A

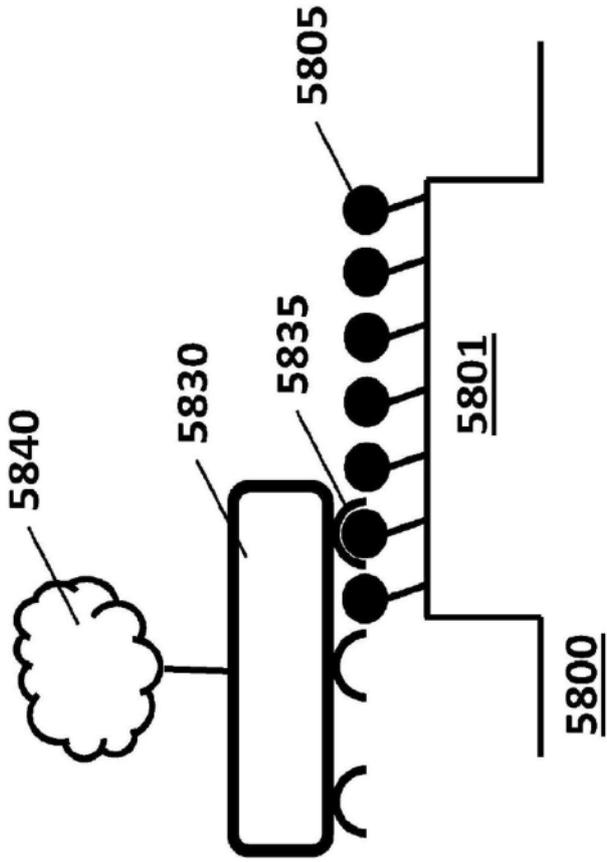


图58B

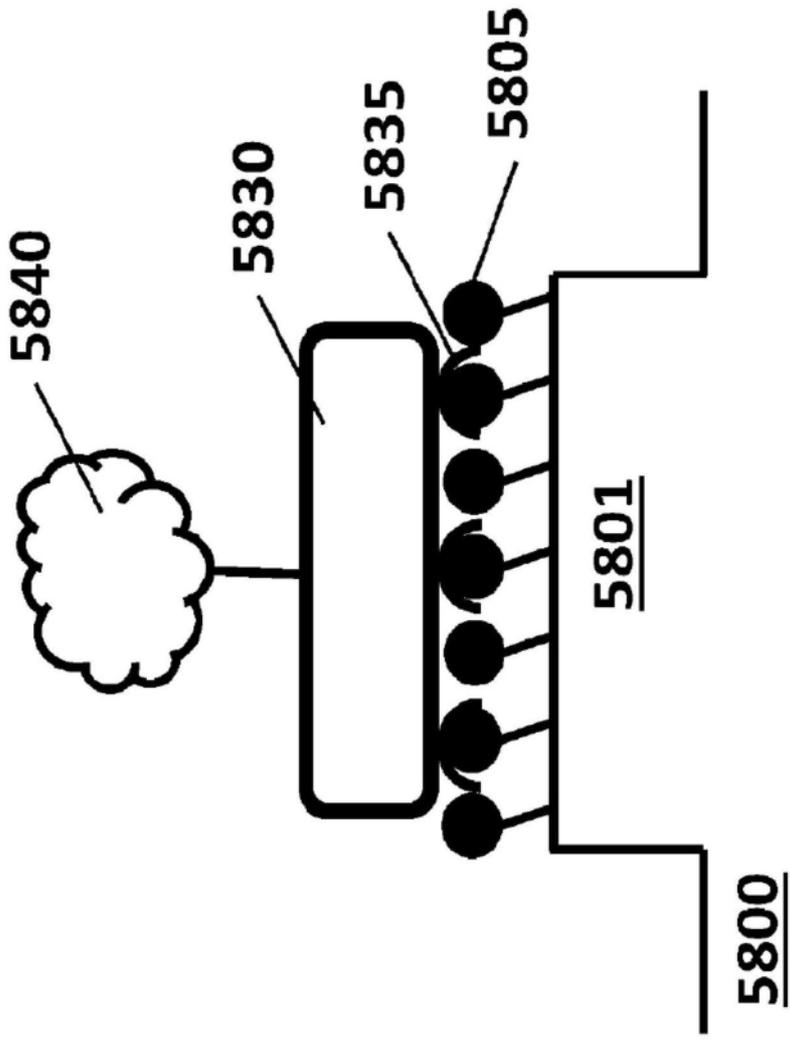


图58C

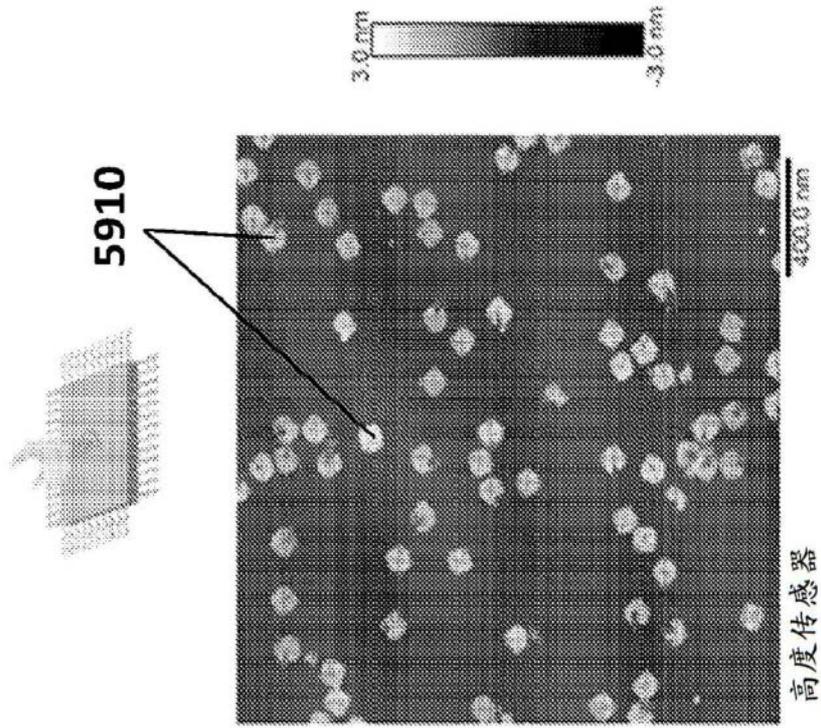


图59A

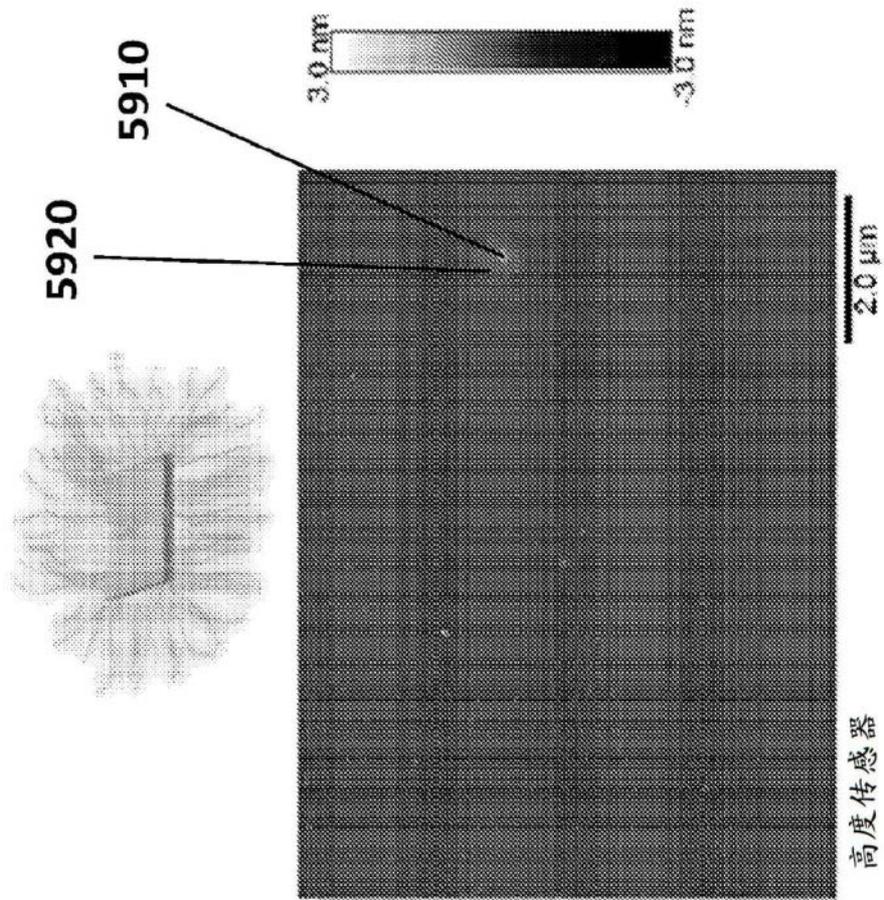


图59B

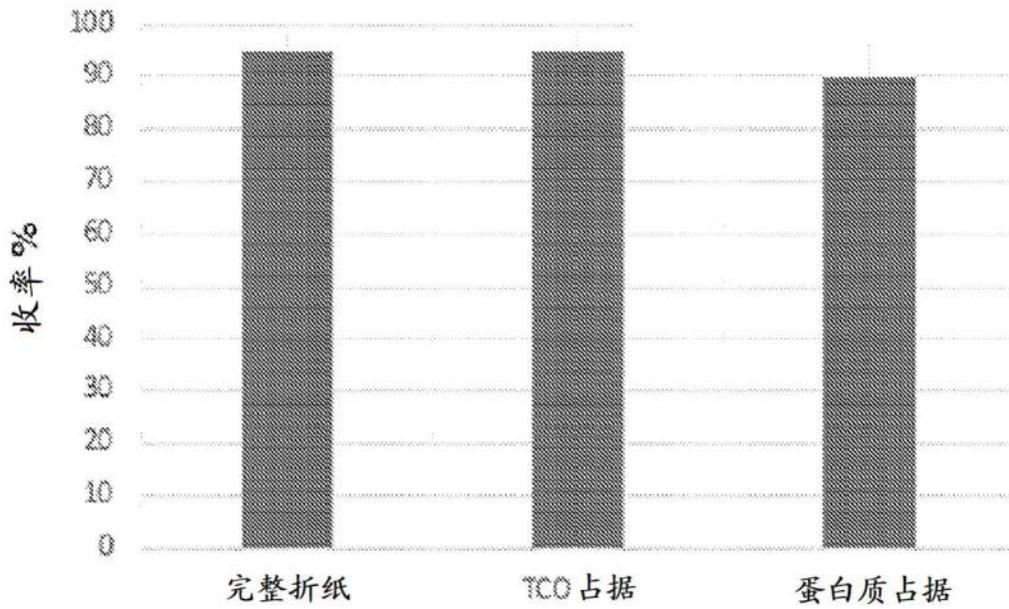


图59C

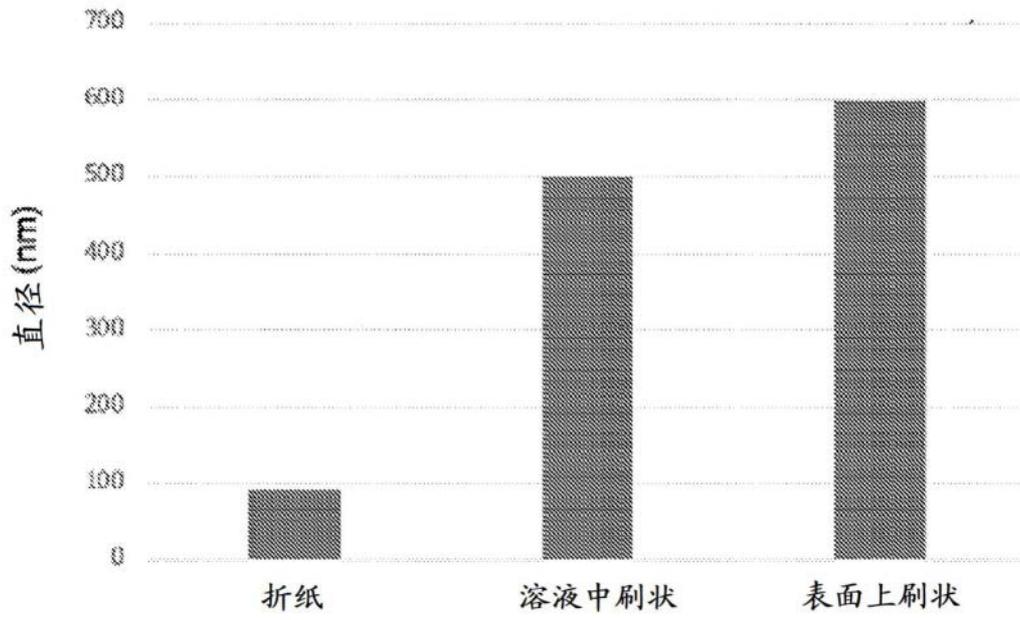


图59D

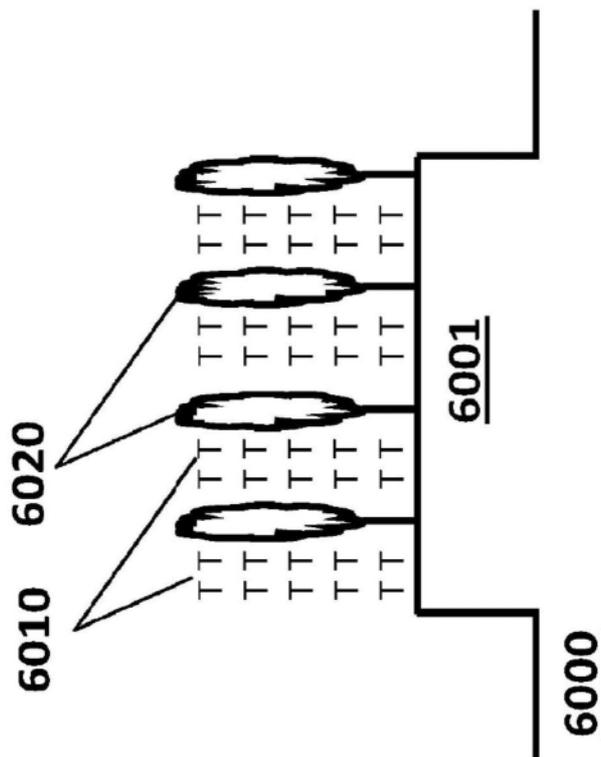


图60A

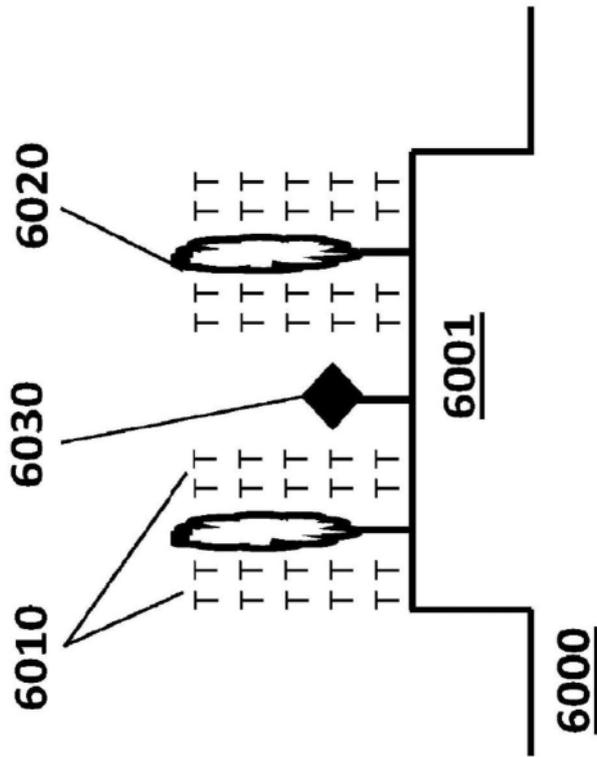


图60B

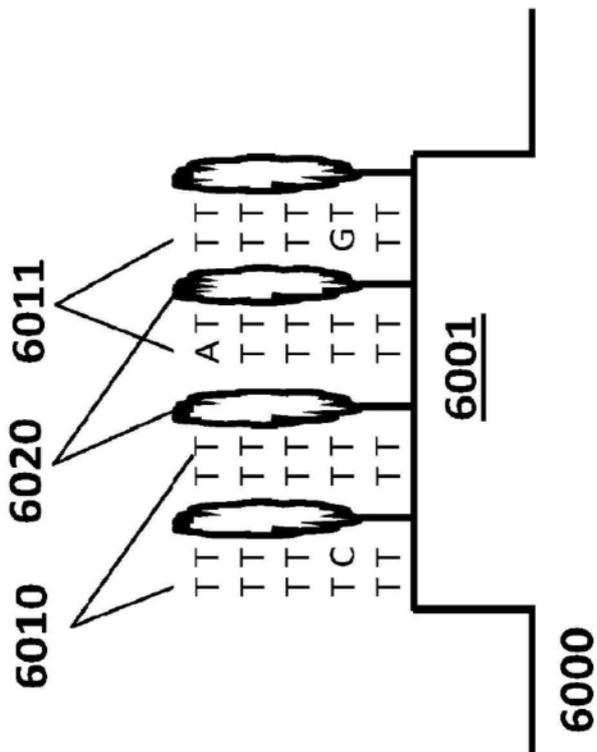


图60C

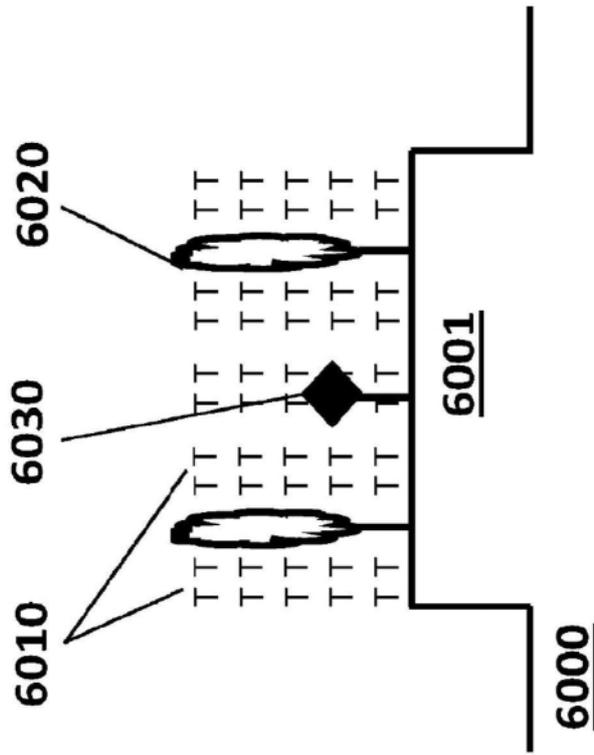


图60D

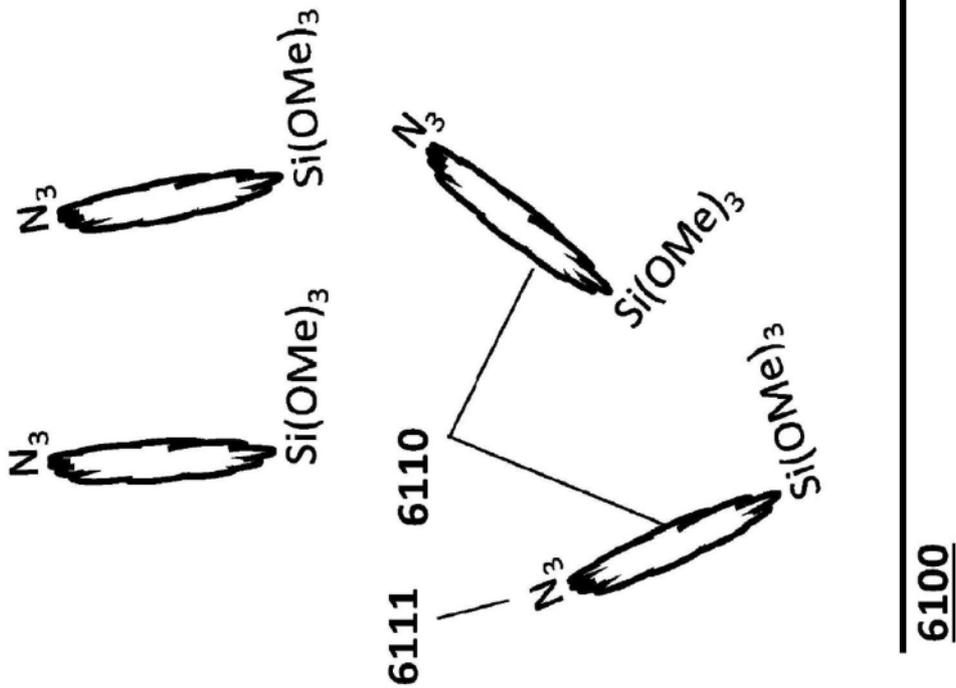


图61A

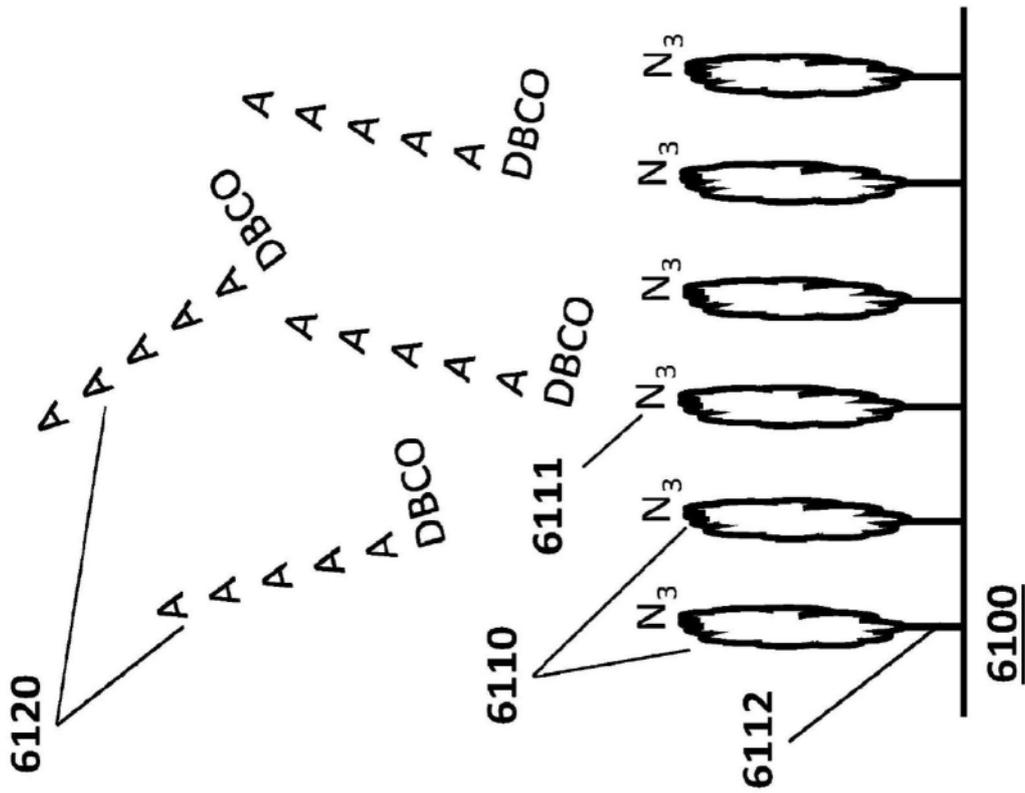


图61B

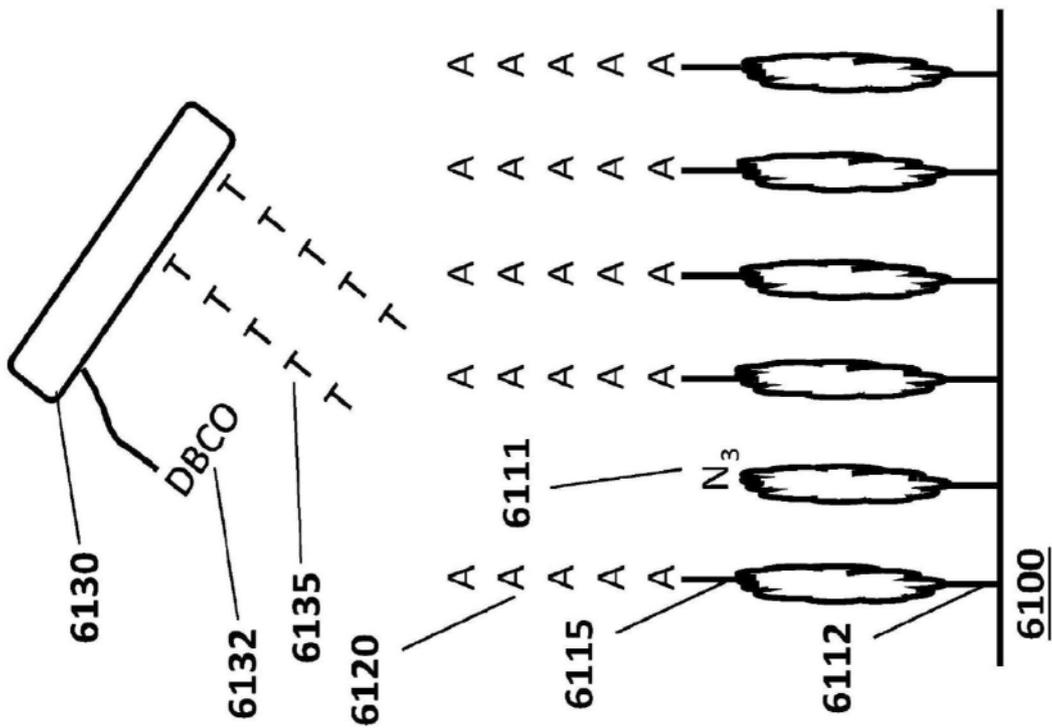


图61C

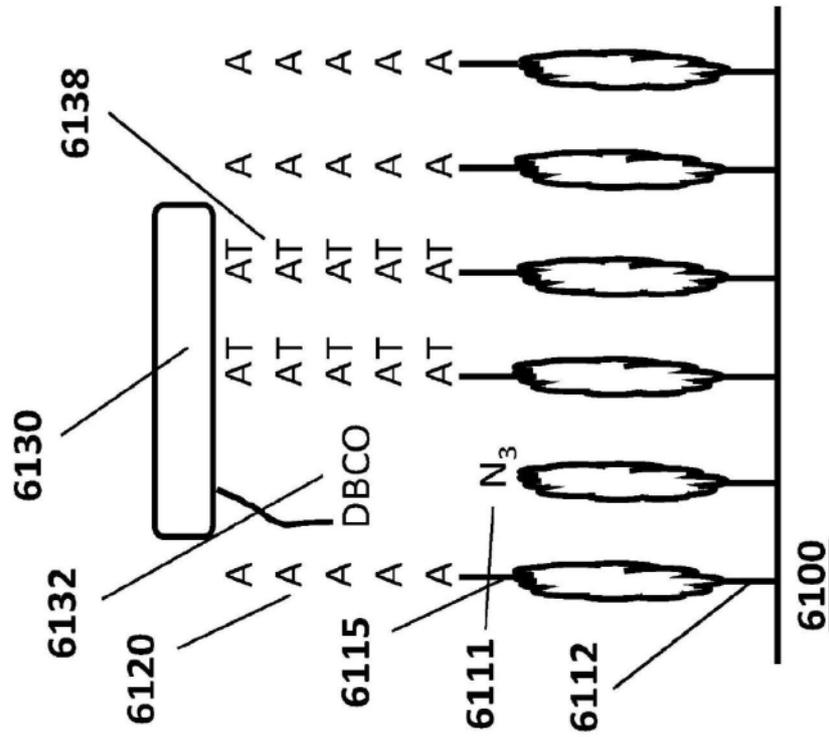


图61D

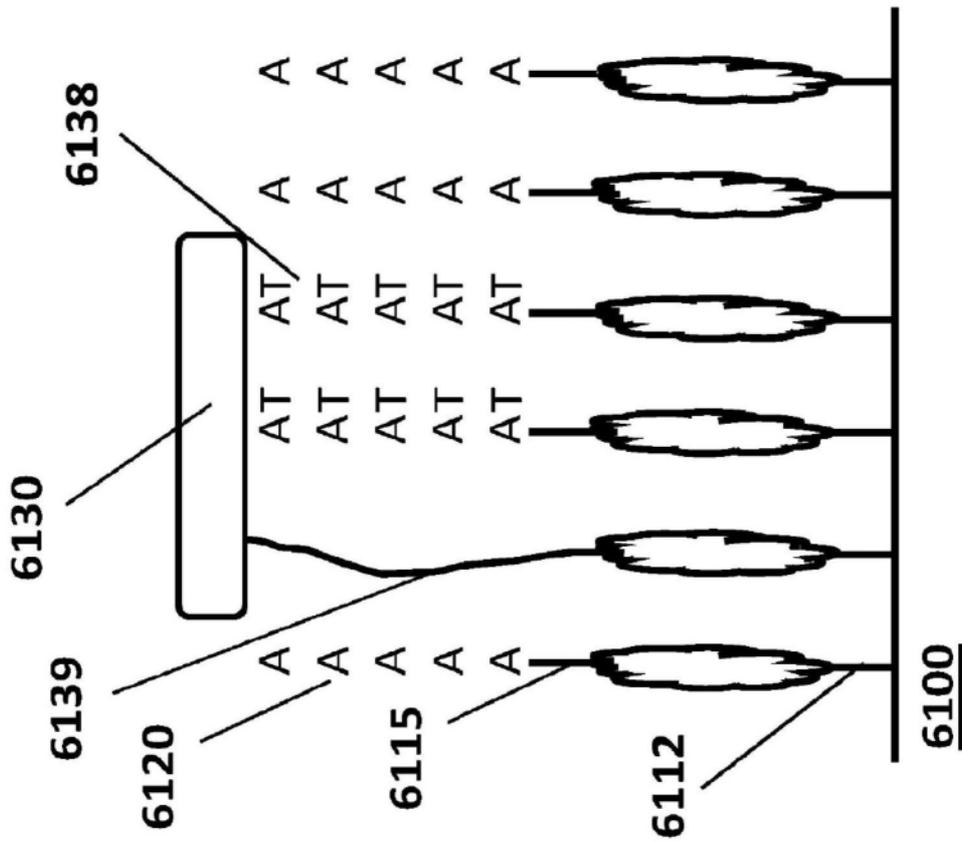


图61E

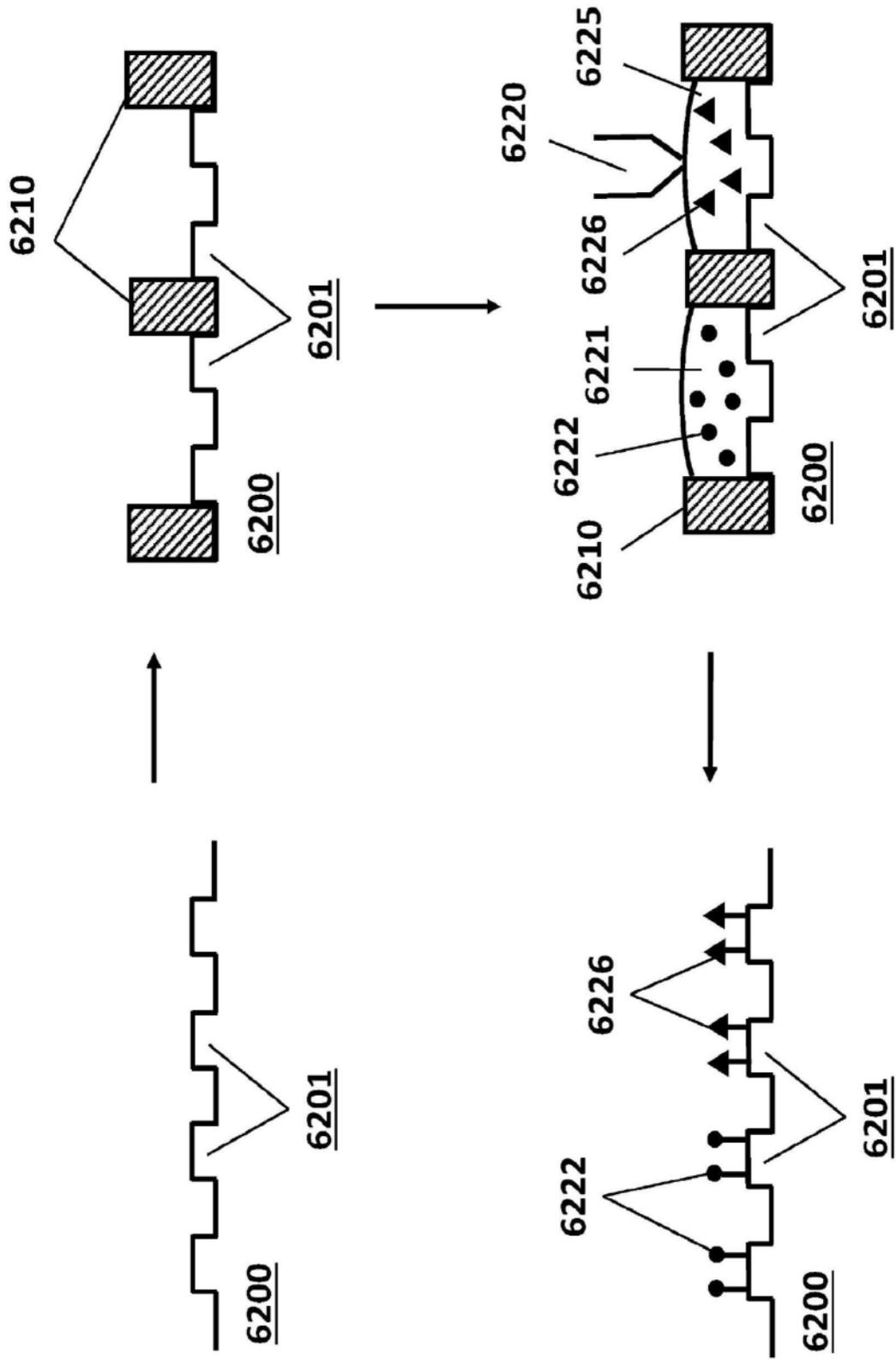


图62A

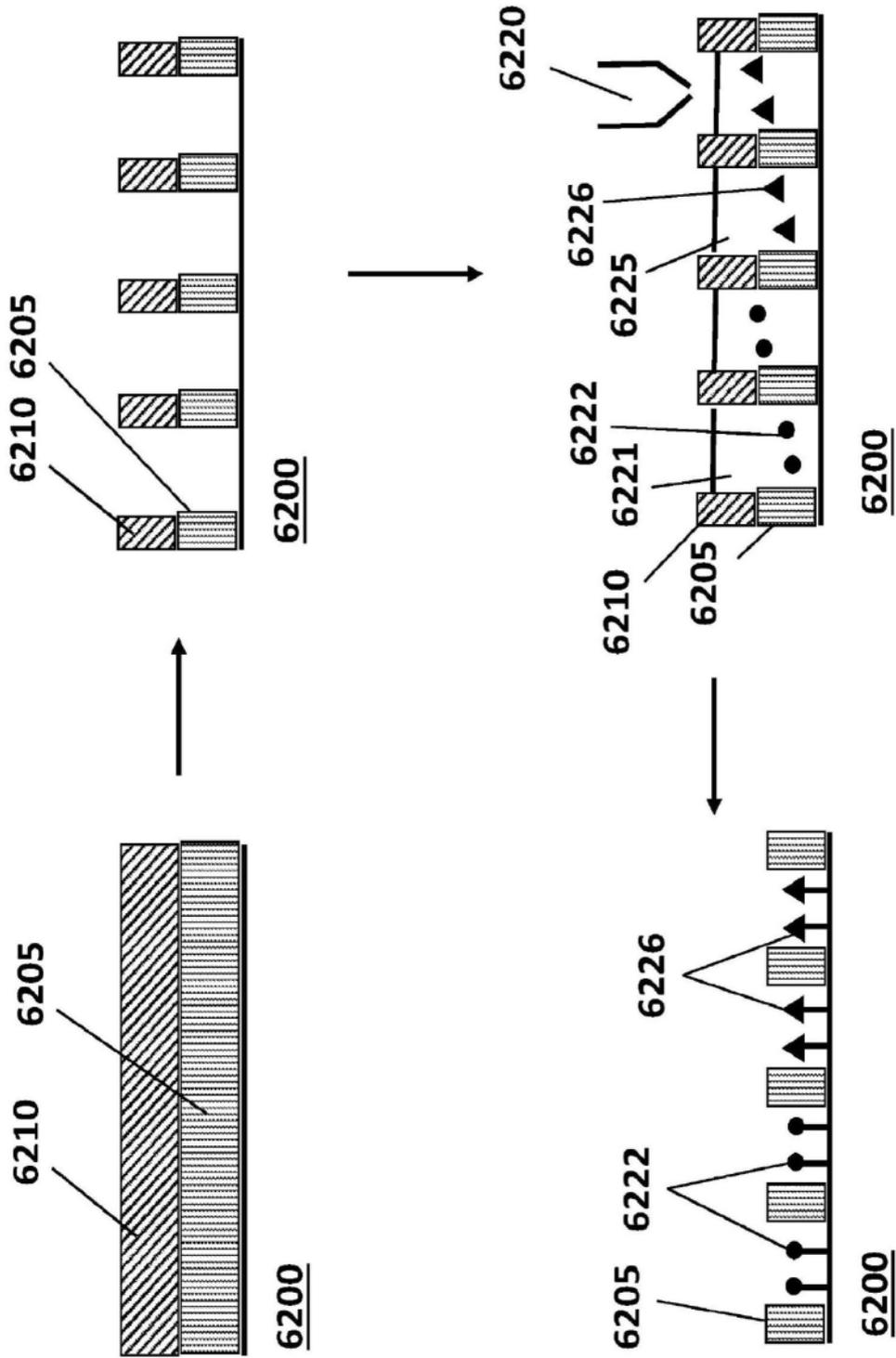


图62B

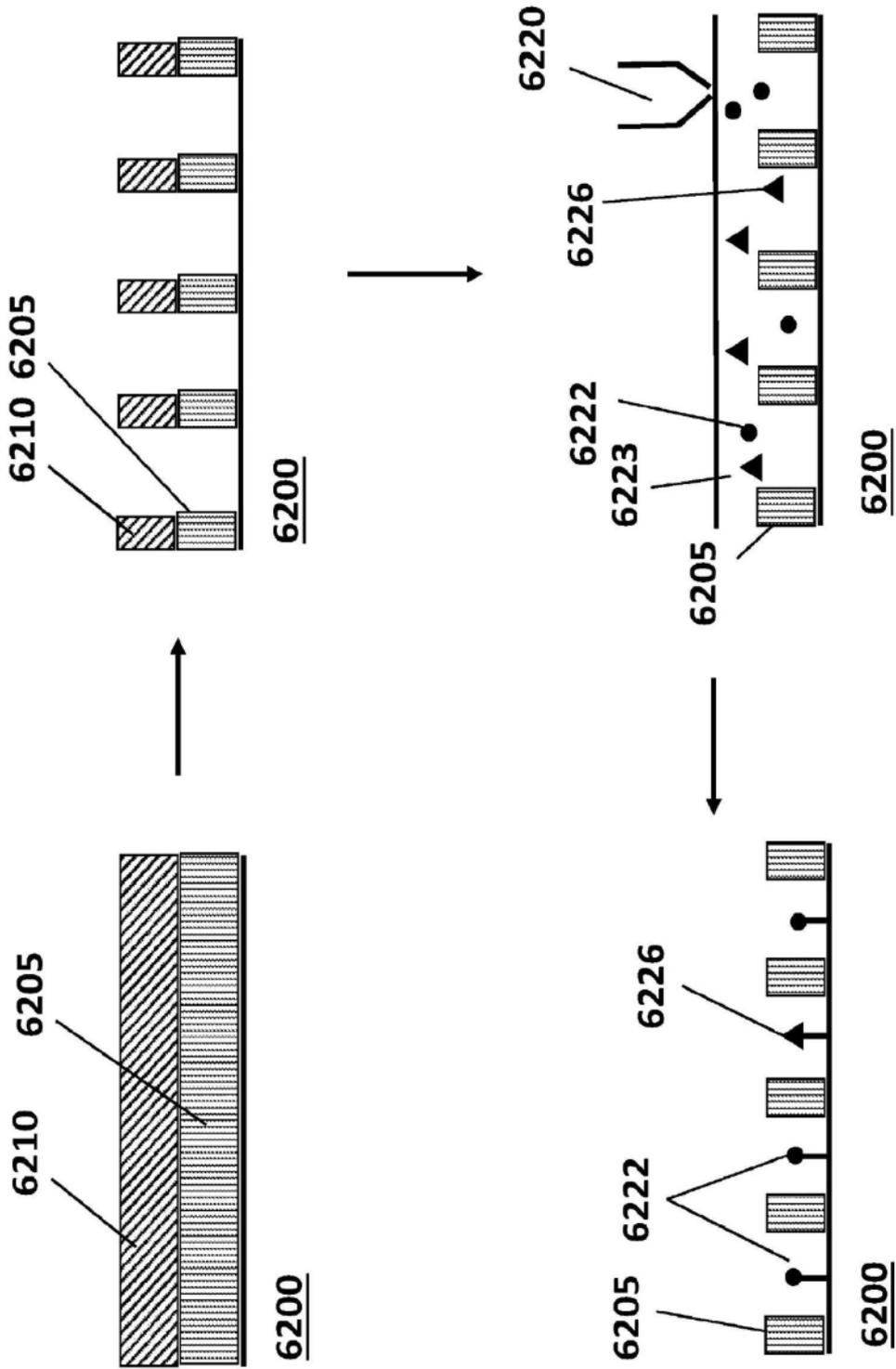


图62C

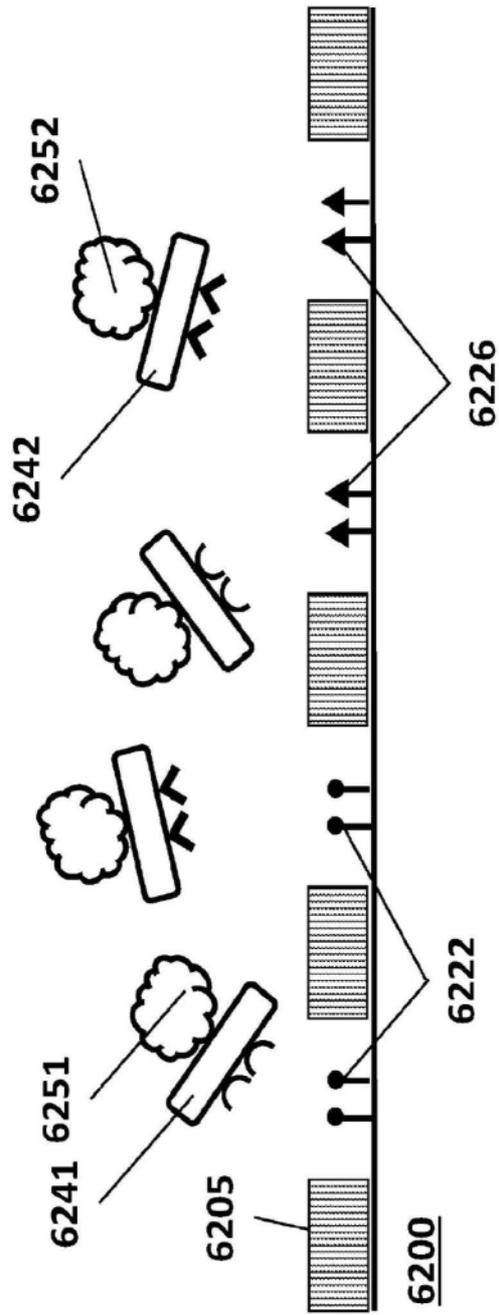


图62D

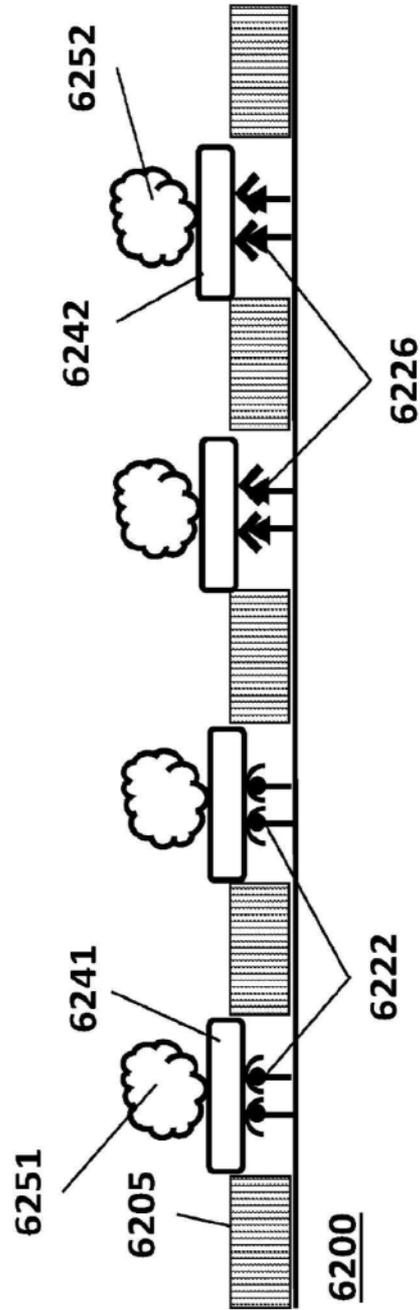


图62E

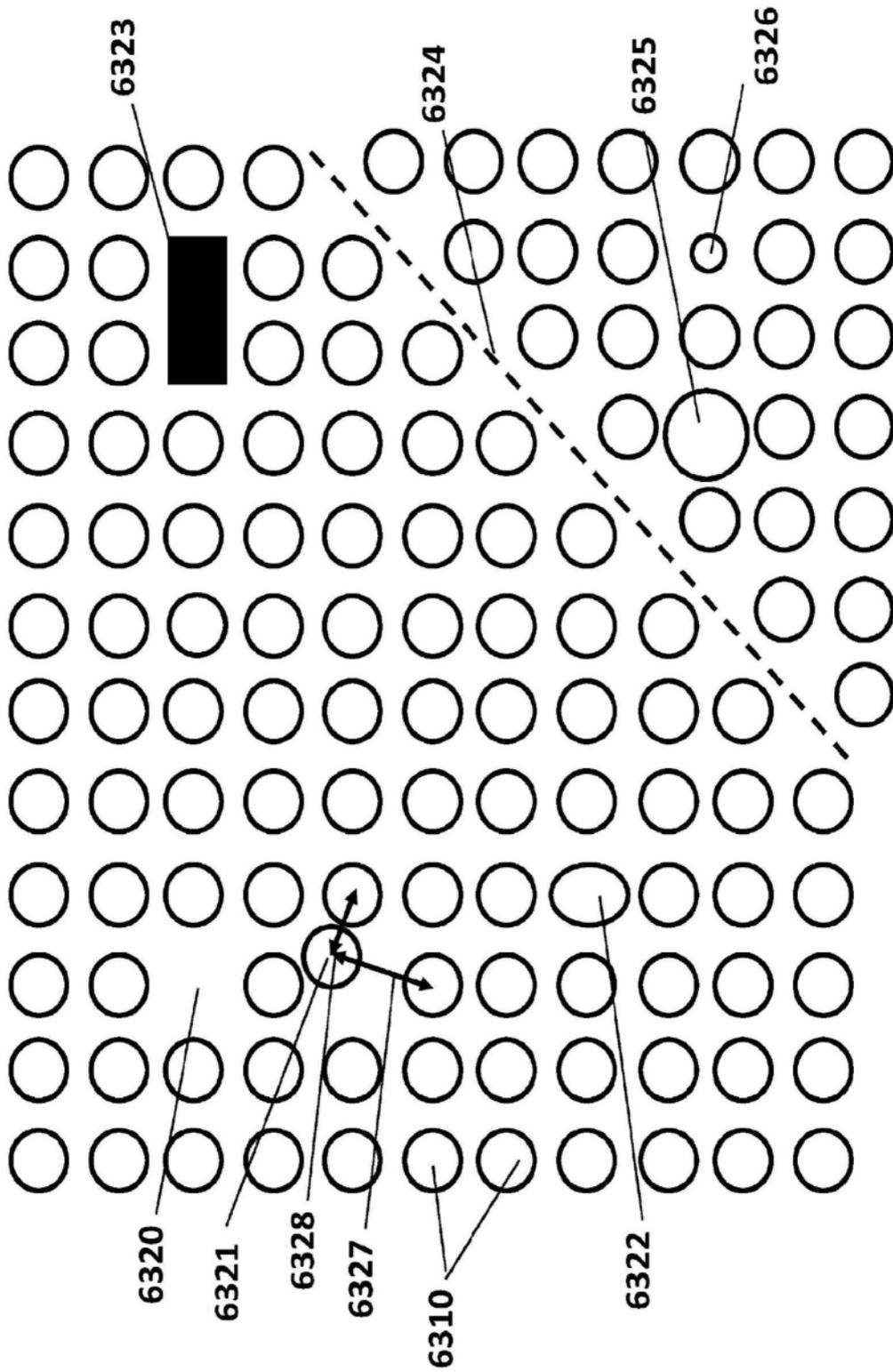


图63

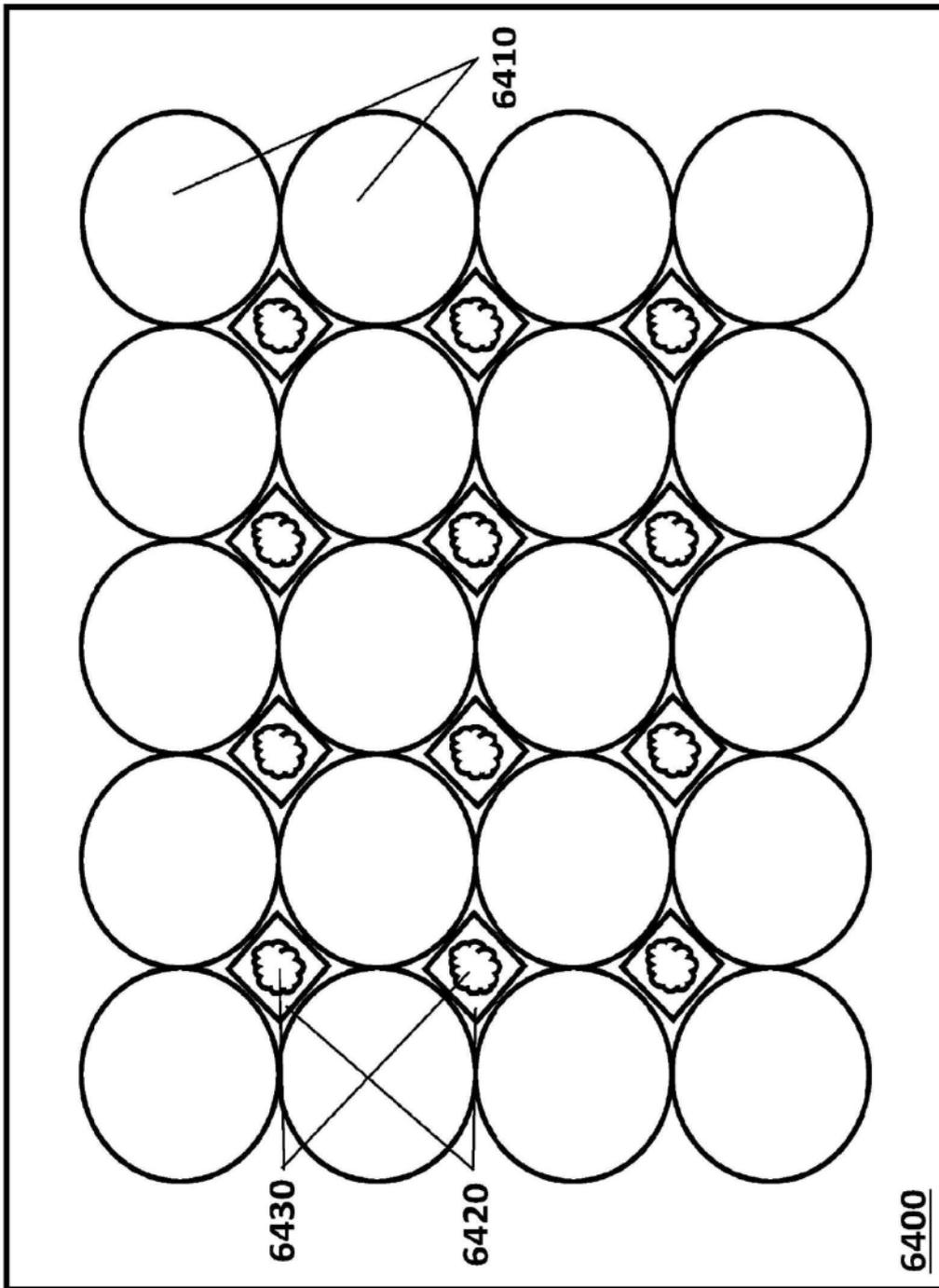


图64

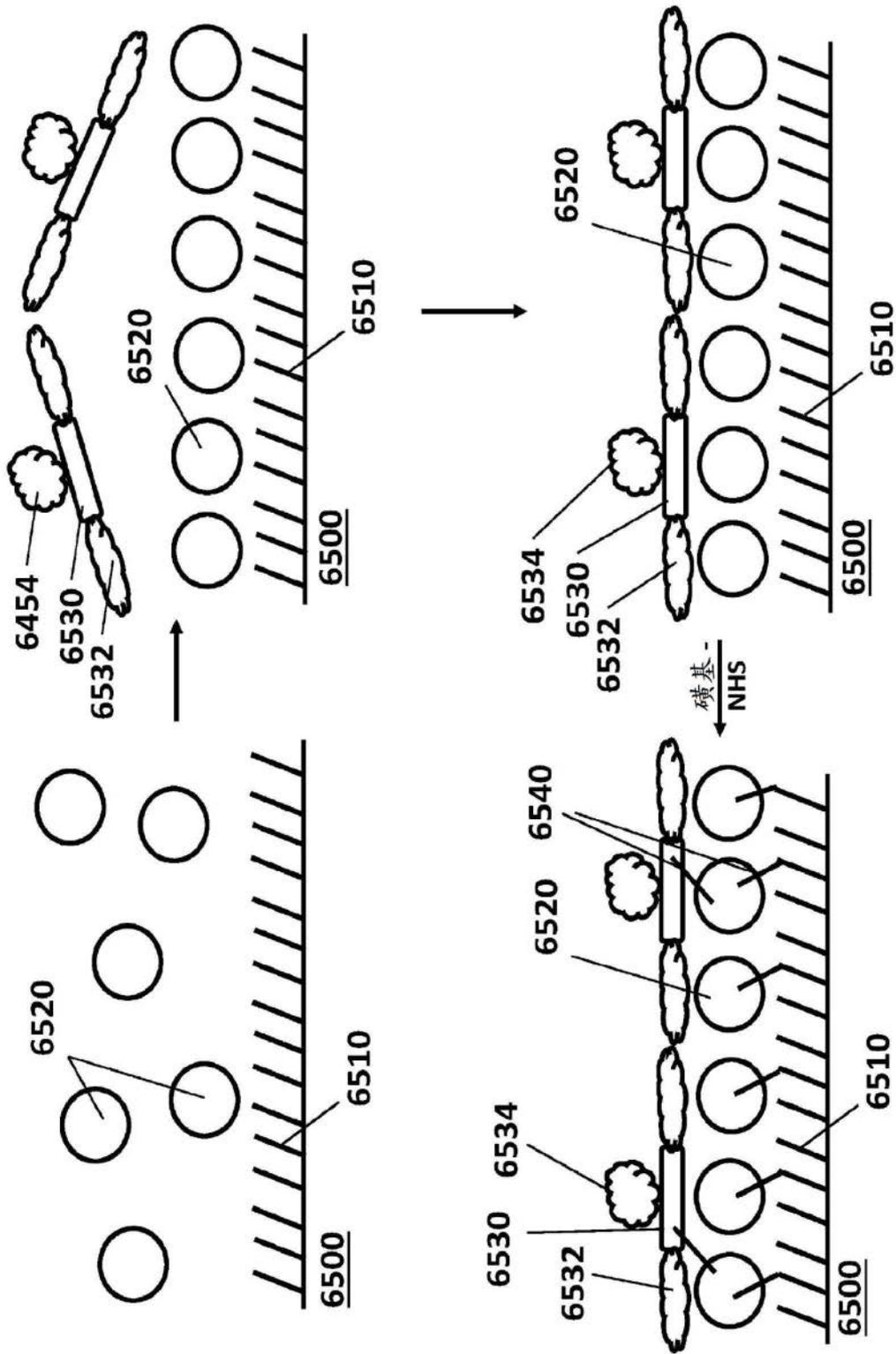


图65

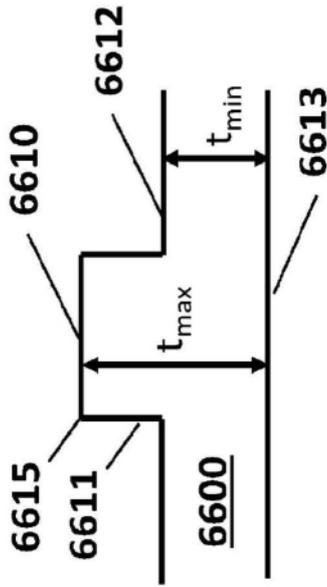


图66A

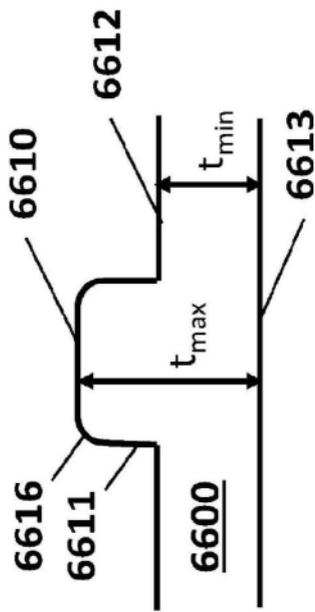


图66B

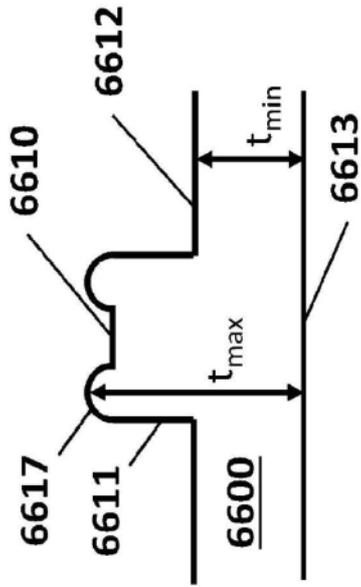


图66C

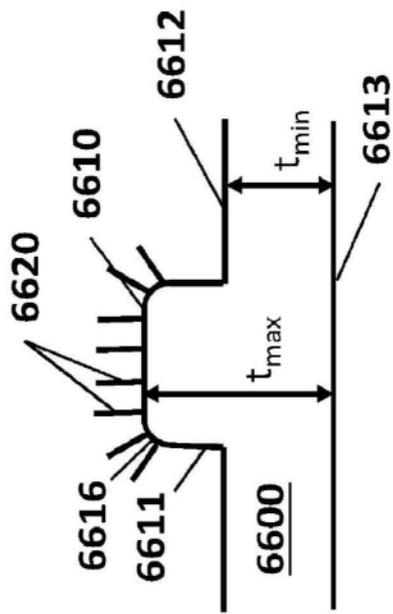


图66D

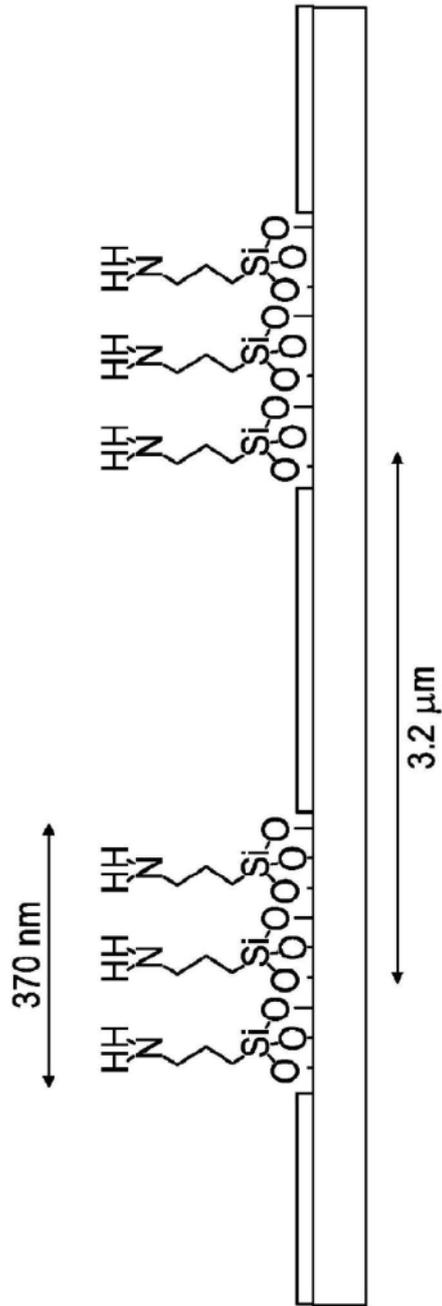


图67A

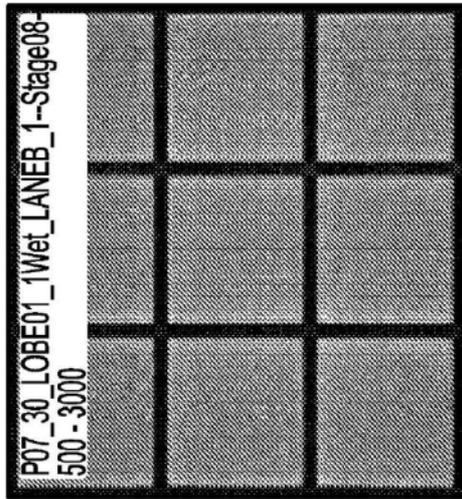
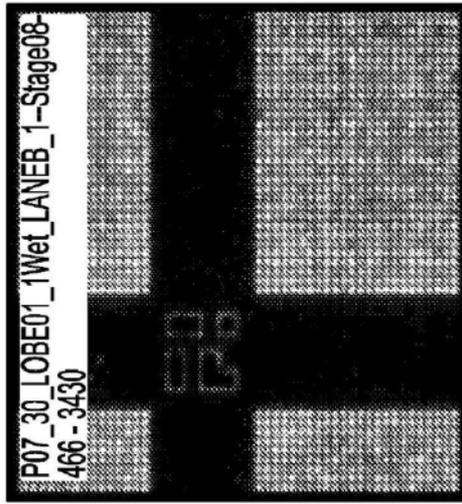


图67B

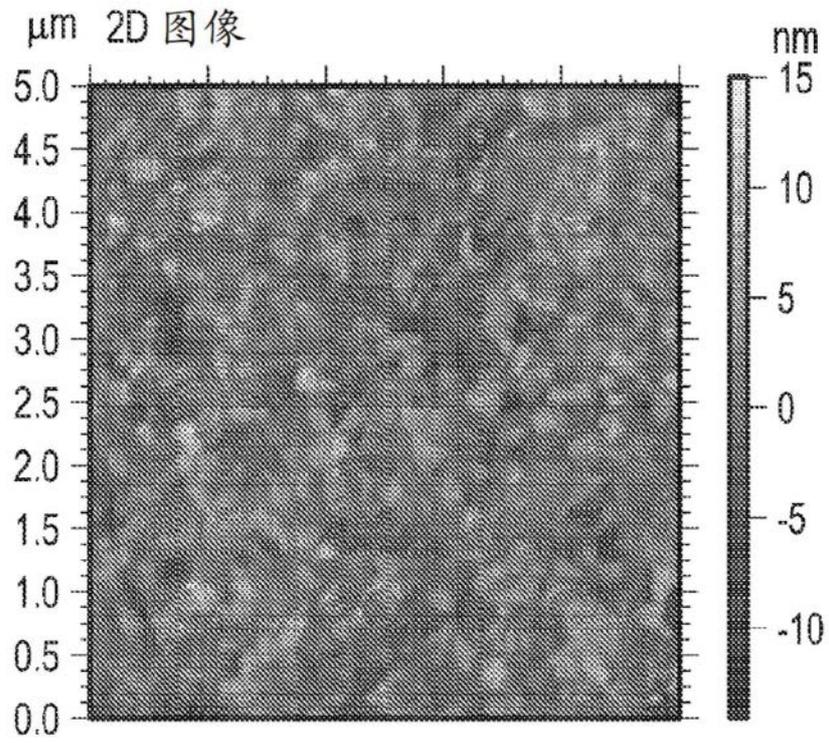


图67C

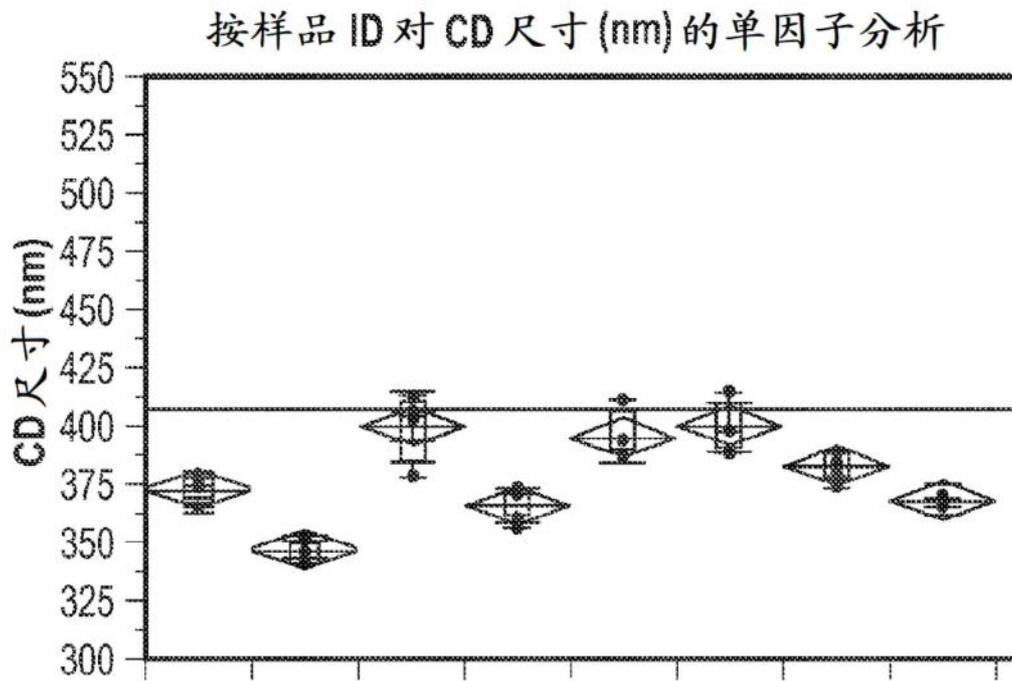


图67D

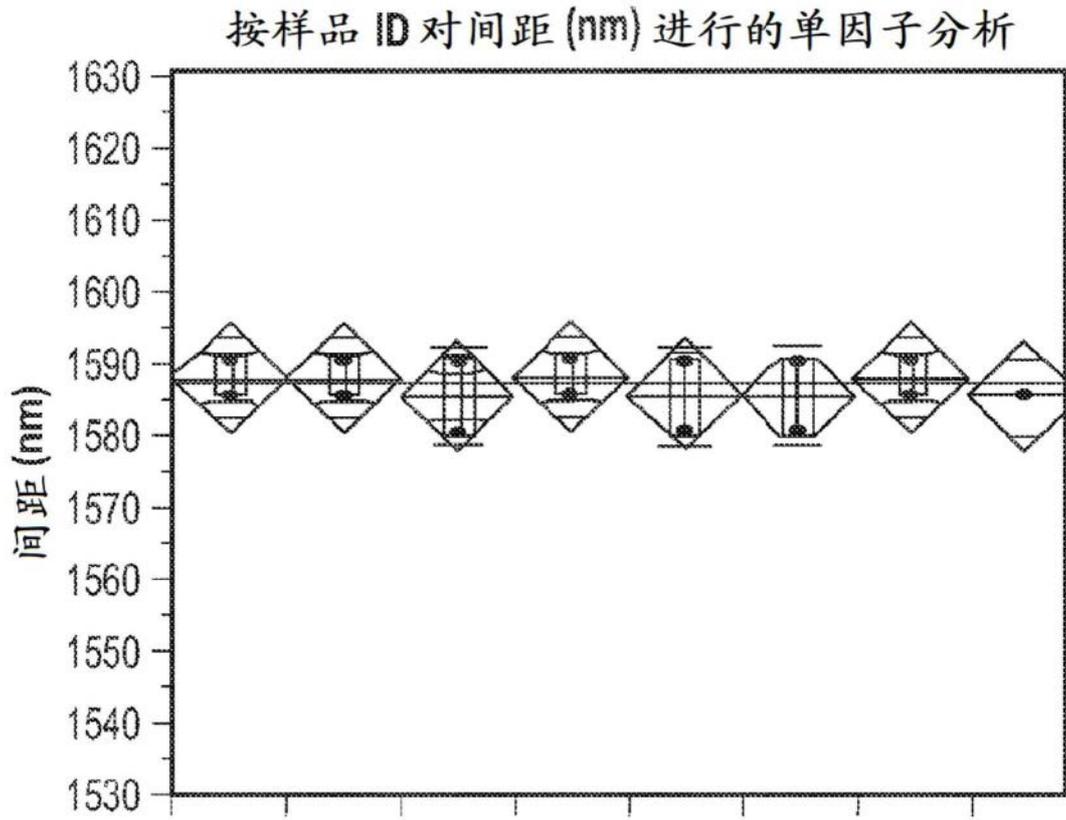


图67E

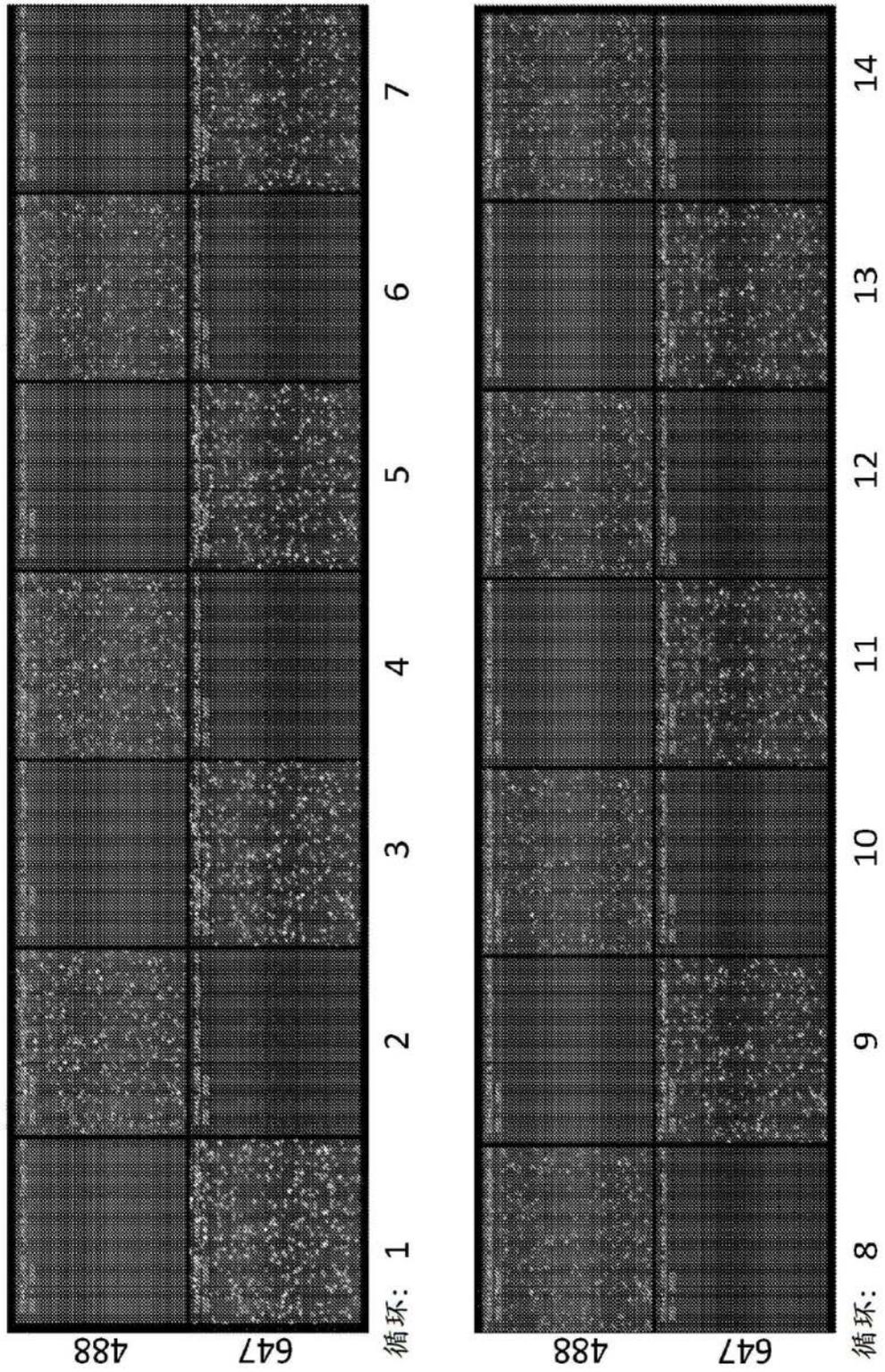


图89

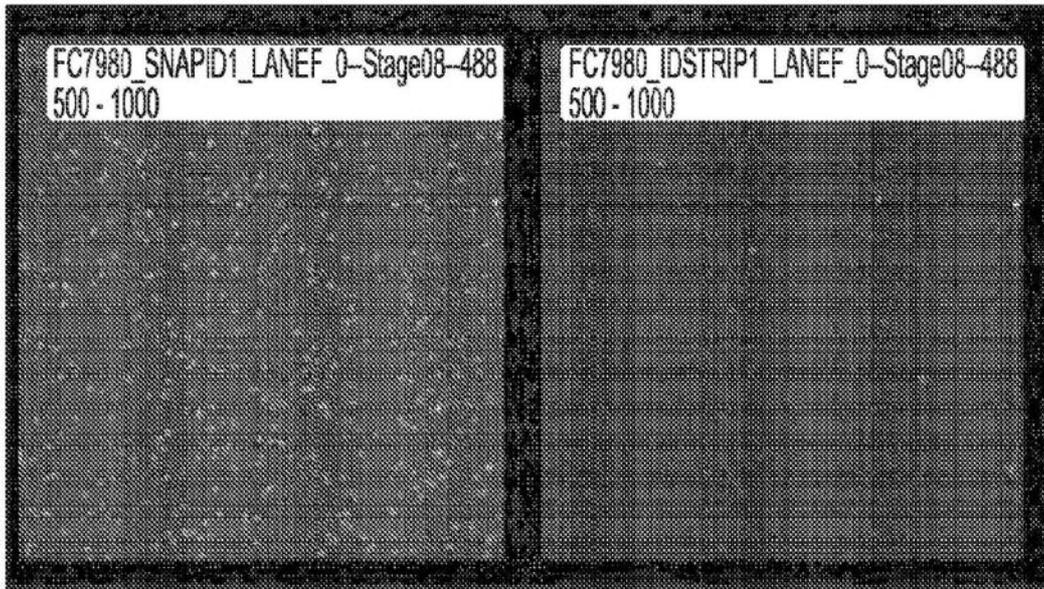


图 69A

图 69B

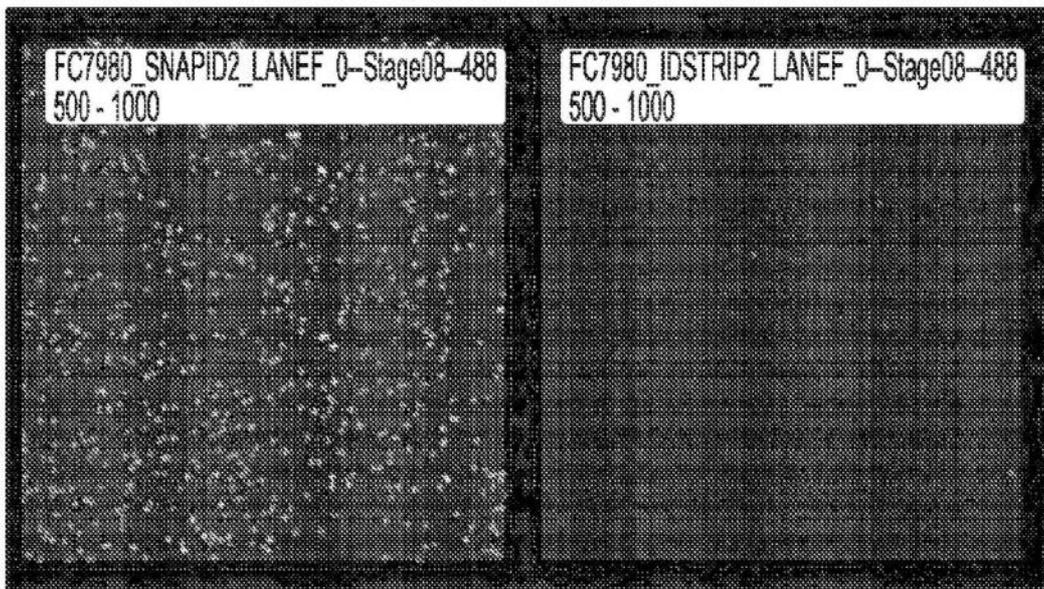


图 69C

图 69D

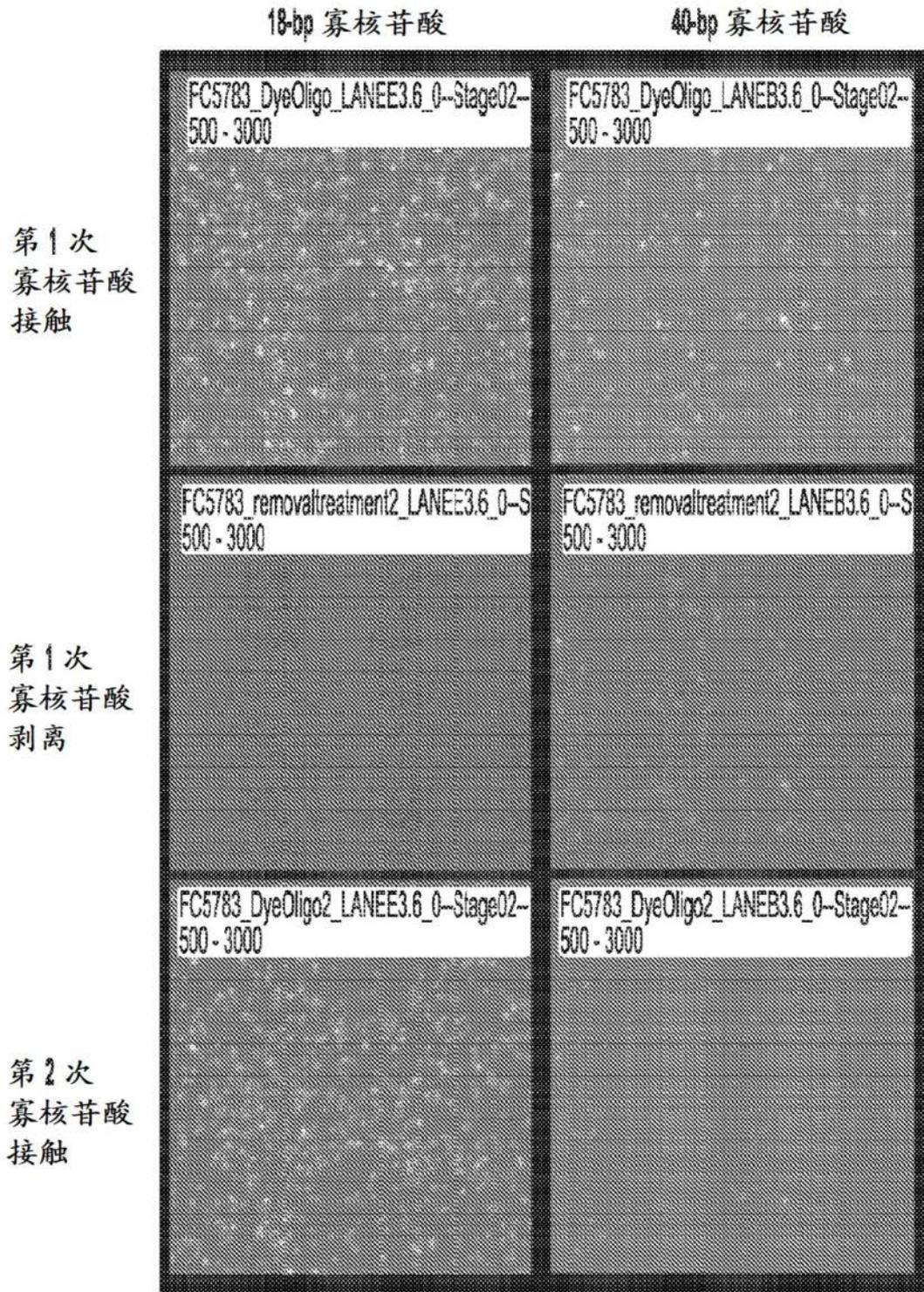


图70