



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970677 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200980102090.2

(22) 申请日 2009.01.08

(30) 优先权数据

61/019,809 2008.01.08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/006280 2009.01.08

(87) PCT申请的公布数据

W02009/133473 EN 2009.11.05

(71) 申请人 赛进有限公司

地址 新西兰汉密尔顿市

(72) 发明人 D·J·索罗 L·S·佩恩

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 邓琪

(51) Int. Cl.

C12P 19/34 (2006.01)

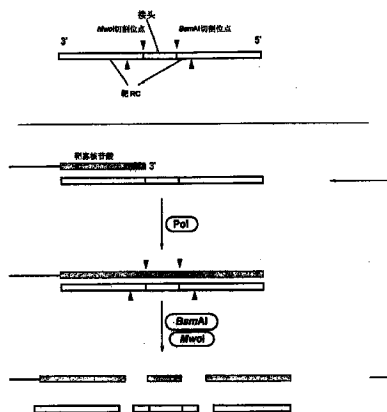
权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 5 页

(54) 发明名称

等温检测方法及其应用

(57) 摘要

本公开涉及快速、单一温度（等温）检测特定核酸序列的方法和探针。所述方法和探针提供检测生物制剂（包括细菌和病毒）和检测任何核酸序列的特定基因标志的简便方法。



1. 一种检测样品中的靶核酸的方法,该方法包括下列步骤:
 - a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸具有游离的 3' 末端;
 - b) 提供单体多核苷酸探针,包含:
 - i) 至少两个靶结合域,其中所述结合域被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,或
 - ii) 靶结合域和至少一部分所述靶核酸的拷贝,其中所述靶结合域和所述靶核酸被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开;
 - c) 使所述样品和所述单体多核苷酸探针的多于一种拷贝接触;
 - d) 使所述样品和合成所述单体探针的反向互补的聚合酶接触;
 - e) 使所述样品和至少一种核酸酶接触以裂解所述核酸酶裂解元件或降解所述易受核酸酶降解影响的域;以及
 - f) 检测所述探针的裂解或降解。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述单体探针的反向互补包含靶核酸的至少一种拷贝和靶结合域的至少一种拷贝。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述切割位点的几何形状为使得裂解产物中成对核苷酸的数量减少。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解通过荧光法检测。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解通过比色法检测。
6. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解通过免疫法检测。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解通过电泳法检测。
8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解通过杂交法检测。
9. 权利要求 1 所述的方法,其中所述探针的裂解或降解使用纳米孔道技术来检测。

等温检测方法及其应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 1 月 8 日提交的美国临时申请 No. 61/019,809 的优先权。

技术领域

[0003] 该公开涉及核酸化学和分子遗传学领域。更具体而言,本发明涉及联合使用酶的多元件 (multi-element) 多核苷酸探针在检测生物样品中的特定核酸序列中的应用。

背景技术

[0004] 存在多种这样的情况,其中期望检测复杂混合物背景中的低水平的特定核酸序列。例子包括(但不限于)检测医学或环境病原体,或检测特定基因的等位基因以鉴定基因异常。在所有情况下,旨在用于此目的的方法必须具有高特异性和高敏感性。优选的方法还应该耐用的、在应用中相对简单的和廉价的。使用 DNA 或 RNA 检测,检测体系可能是必需的,其足够敏感来检测单一分子(或至多一些分子),原因在于一种靶序列可表示具有引起广泛疾病潜力的单一传染剂。

[0005] 目前不存在这样的简便方法,其可直接检测特定序列的单一核酸分子,并且所有目前使用的方法都包括一个或多个放大信号的步骤。由于 DNA 具有制备其本身拷贝的固有能力,因此可以使用模拟细胞复制的体内过程的靶序列的体外复制,从而扩增复杂混合物中靶多核苷酸的数量,使得它们可在具有需要的敏感度的情况下被识别。

[0006] 大多数 DNA 合成(除了短链 DNA(例如寡核苷酸)的合成之外)通过酶法来进行,其中使用 DNA 聚合酶。用于实现该目标的最常用的方法是聚合酶链式反应(PCR;如美国专利 No. 4,683,195、4,683,202 和 4,800,159 中详细描述)。该方法通过使用热循环和耐热性 DNA 聚合酶而提供靶分子的几何扩增。使用高温将两个互补 DNA 链变性(分开),然后使用低温促进通过引发和通过聚合酶的链合成。因此,PCR 合成法使用这样的反应来进行,所述反应包括三个步骤,每个步骤在不连续温度下发生。PCR 产物的检测可通过下列方式实时监控: Taq DNA 聚合酶(具有 5'-3'核酸外切酶活性)介导的下游寡核苷酸的降解(Gelfand, 1993),或者使用荧光嵌入染料,所述染料在结合至双链 DNA 时发出更大强度的荧光。允许 RNA 靶的扩增和检测的 PCR 反应方案的改进是逆转录-PCR(RT-PCR)法,其是 PCR 和逆转录反应的组合,这在 Trends in Biotechnology, 10:146-152(1992) 中有所描述。

[0007] 通常应用于分子诊断学领域的 PCR 方法的基础是其借助于扩增靶核酸而获得期望的信号水平,进而检测这些扩增产物。相反,连接酶链式反应(LCR)通过探针本身构象的几何级数增加而实现信号放大(Barany, 1991)。在该方法中, DNA 连接酶在存在靶互补链的情况下结合两个寡核苷酸。所得连接的形式成为用于第二对引物的互补寡核苷酸。LCR 的一个示例性应用是在性传播疾病 Chlamydia 的检测中。其以试剂盒的形式出售(Roche Cobas, Roche Amplicor 板式试剂盒)。

[0008] 上述方法中的固有不足在于需要反应在高温和低温之间反复循环-例如,在 PCR 的情况下在促进各轮模板变性和引物退火/延伸的温度的循环之间循环。因此,反应体系

使用不连续相或循环来进行,原因在于反应受到上述温度的限制。因此,所述方法花费更长时间来进行,因为在各相要求的时间是不清楚的,并且还因为设备需要重复改变孵育温度。在调节温度方面损失的时间和循环数成比例增加。另外,所述方法需要使用昂贵的可在时间内精确地调节至较宽温度范围的热循环机。其是难以小型化的专门设备,并且需要不间断的电源供应。因此,这些要求极大地妨碍了 PCR 基分子诊断在使用点测试中的应用。

[0009] 针对这些限制,人们花费很多努力来开发等同于 PCR 的单一温度(等温)法。等温法通常通过使用聚合酶而消除了部分热循环问题,所述聚合酶同时实现链置换和链合成,进而除去高温变性步骤的需要。这种等温核酸扩增法的例子包括链置换扩增(SDA)法(如 JP-B 7-114718 中所述)、和各种改进 SDA 法(如美国专利 No. 5,824,517、以及 PCT 国际专利申请公开 WO 99/09211、WO 95/25180 和 WO 99/49081 中所述)。用于特定核酸扩增的其他等温反应包括自主序列复制(3SR)法、核酸序列基扩增(NASBA)法(如日本专利 No. 2650159 中所述)、转录介导的扩增(TMA)法、和 Q. beta. 复制酶法(如日本专利 No. 2710159 中所述)。寡核苷酸的等温酶合成法在美国专利 No. 5,916,777 中有所描述。

[0010] 在这些方法的反应中,多核苷酸合成(通常包括从引物延伸的步骤、和/或引物退火至单链延伸产物或初始靶序列、接下来从引物延伸的步骤)在于恒温下孵育的反应混合物中平行发生,从而简化了应用并减少了反应时间。各种方法在它们如何解决引物入侵的困难和常规 PCR 要求的退火方面存在较大的区别。在等温核酸扩增法中,SDA 法是这样的体系的例子,其中靶 DNA 最后被扩增。在 SDA 的初始描述中,样品中的靶核酸序列(及其互补链)通过使用 DNA 聚合酶和限制性核酸内切酶的双链置换而扩增。所述方法要求四种引物扩增,其中两种应该被设计成含有限制性核酸内切酶的识别位点。所述方法要求使用大量改性脱氧核糖核苷酸三磷酸酯作为大量 DNA 合成中的底物。这些方法中使用的改性脱氧核糖核苷酸三磷酸酯的例子是(α -S)脱氧核糖核苷酸三磷酸酯,其中 α -位的磷酸酯基团的氧原子被硫原子(S)取代。(α-S)脱氧核糖核苷酸引入含有限制性核酸内切酶的识别位点的引物新合成的互补链中会产生在核酸内切酶的裂解点处的半硫代磷酸酯。

[0011] 因此,限制性核酸内切酶只攻击未改性的链,从而促进攻击位点的序列 5' 的延伸和攻击位点的 3' 侧链的置换。然而,如果反应常规进行的话(例如基因测试),和使用改性脱氧核糖核苷酸三磷酸酯有关的费用变得较高。此外,改性核苷酸(例如(α -S)脱氧核糖核苷酸)引入扩增的 DNA 片段中可停止使用限制性核酸内切酶对扩增的 DNA 片段的裂解性,例如在经历限制性核酸内切酶片段长度多态性(RFLP)分析时就是这样。

[0012] 改进 SDA 法(如美国专利 No. 5,824,517 中所述)是 DNA 扩增法,该方法使用嵌合引物,所述嵌合引物包含 RNA 和 DNA,并且具有基本元件结构(其中 DNA 位于至少 3' - 末端)。美国专利 No. 7,056,671 和美国专利申请公开 No. 2003/0073081 涉及嵌合 DNA/RNA 寡核苷酸引物在 SDA 反应方案中的另一种应用。改进 SDA 法(如 PCT 国际专利申请公开 WO 99/09211 中所述)需要使用产生 3' 突出端的限制酶。改进 SDA 法(如 PCT 国际专利申请公开 WO 95/25180 中所述)要求使用至少两对引物。改进 SDA 法(如 PCT 国际专利申请公开 WO 99/49081 中所述)要求使用至少两对引物和至少一种改性脱氧核糖核苷酸三磷酸酯。改进 SDA 法(如美国专利申请公开 No. 2005/0136417 中所述)使用尿嘧啶 DNA 转葡糖基酶和脱嘌呤核酸内切酶来攻击双链 DNA 部分的一个链的作用,所述链在存在 dUTP 的条件下合成。这在已经引入尿嘧啶的位置处有效地产生随即引发位点。在该方案下,dUTP 与

dTTP 的比例的调节可用于调整攻击事件的频率。这些方法可被认为在操作上类似于 PCR, 只要通过靶扩增实现靶核酸的敏感性检测即可。

[0013] SDA 的涉及 DNA 靶的等温扩增的另外一种应用是 LAMP 法, 如 PCT 国际专利申请公开 WO 00/28082 中所述。该方法采用了四引物识别 6 个序列以便形成一个循环结束, 能够将扩增中间一个链 - 没有一个中间的攻击步骤需要置换聚合酶。在这个原始靶序列是在不同长度 concatemeric 产品异构混合物形式扩增计划。

[0014] 该可环化扩增, 或“锁”探针等温下的“滚环扩增条件”(RCA) 的反应计划是另一个 SDA 的应用 (Molecular Diagnosis, 6 :141-150)。通过使用与互补的圆形探针, 支化产物序列的多重引物组成的引物通过结合到流离失所的聚合酶链所产生的。在这个“分枝”反应计划, 对 DNA 产生量以几何级数倍增。RCA 的不同作为反应的产物是一个具有 DNA 的序列或互补的圆形探针延伸 concatemeric 阵列, 而不是靶 DNA 的其他上述 SDA。

[0015] 作者对这些例子包括商业化 SDA 的战略, Eiken Chemical Co. (Japan) 提供使用 LAMP 技术来检测细菌和病毒的各种病原体的诊断检测。此外, Becton-Dickson 提供沙眼衣原体和淋球菌, SDA 的技术为基础的一个限制性核酸内切酶诊断的分子诊断平台介导的循环策略。

[0016] 另一个攻击以方便员工在等温扩增应用循环的方法是 National Academy of Sciences, 100 :4504-4509 (2002)、美国专利 No. 7, 112, 423 和 6, 884, 586 以及 PCT 国际专利申请 PCT/US02/22657 (公开为 W003/008622)。在这种情况下, 攻击 (即只有复式的核酸链裂解) 是通过突变限制性核酸内切酶, 它能够减少只有从最初的引物延伸步骤形成了产品链使用。在一个实施方案中, 随后各轮的攻击, 并延伸在中短寡核苷酸线性扩增的结果。在另一个实施方案中 (被称为指数扩增反应 /EXPAR), 模板的初始阶段使用的引物延伸包含的引物序列串联重复, 这样从模板链产生的产物能够约束进一步模板链, 并作为引起进一步延伸和攻击反应物, 从而产生存在的寡核苷酸数量几何级数增加。

[0017] 与 SDA 的法相反, 该反应是完成的温度是相当高的产品从攻击反应生成的模板链游离而不一的 DNA 聚合酶链置换的需要。然而, 在 National Academy of Sciences, 100 : 4504-4509 (2002) 的 DNA 聚合酶是使用具有链置换活动。

[0018] 另一个已被应用到消灭聚合酶链反应热循环问题的方法是各种 DNA 的结合蛋白利用, 使引物结合和延伸不热变性的模板的 DNA。解螺旋酶蛋白, 在存在和单链结合蛋白都没有, 都被用来单独的双链的 DNA 链, 使引物结合, 和随后的延伸。这种方法被命名为解螺旋酶依赖性扩增 (HDA) 法 (美国专利申请公开号 2004/0058378 和 2006/0154286)。重组酶蛋白也被用于其他地方, 使连续几轮的引物结合到靶双链核酸 (PLOS Biology, 4 : 1115-1121 和美国专利申请公开号 2007/0054296、2005/0112631 和 2003/0219792)。

[0019] HAD 技术是市售 IsoAmp II Universal HAD 试剂盒 (得自 New England Biolabs (USA)) 的基础。目前这项技术只适用于靶在 70-120 核苷酸长度合理范围。

[0020] 另一种方法来实现等温扩增的靶核酸是利用了 RNA 聚合酶, 它能够生成多个 RNA 转录活动给定适当的启动子序列的双链 DNA 的模板出席。这是自主序列复制 (3SR) 方法, 核酸序列的扩增 (NASBA) 法 (如日本专利 No. 2650159 中所述), 以及转录介导扩增 (TMA) 的法。Q β 复制酶法在日本专利 No. 2710159 也是类似的概念, 但它利用的 RNA 聚合酶活性的 Q β 复制酶蛋白, 有一种 RNA 聚合酶 / 链置换活动。虽然这些方法可以用来生产特定的靶

序列的多个拷贝,它们也可以用于生产的报道子成绩单是无关系的靶核酸,如 *Nucleic Acids Research*, 29 :54-61 (2001) 中的改进方法所述。

[0021] 上述方法产生的扩增的靶,让感兴趣的核酸检测足够的金额。一旦有足够靶可用,若干战略可以用来产生一个检测信号。在这以前,这是最常见的使用放射或免疫标记、免疫荧光标记或凝胶电泳实现。发展是更优雅的荧光共振能量转移 (FRET ;Kidwell1994)。荧光共振能量转移使量子效应,即荧光分子淬灭时使用分子在接近第二个 - 作为淬灭剂已知的。荧光共振能量转移的一个早期的执行与分子信标 (Tyagi and Kramer,1996reviewed Broude 2005)。在这里,茎环型寡核苷酸所使用的地方的荧光团和淬灭剂对分子的两端是,但带来的碱基对,整个发夹干配对在一起。在存在特定的靶序列的条件下,茎是打乱了优惠的碱基对和构象变化的荧光团分离和淬灭剂,从而增加荧光。

[0022] 目前最常用的应用是 TaqMan 荧光共振能量转移系统 (Livak,1998) 这是一个对实时扩增增强 / 的盖尔范德检测方法。在此方法中,或俗称的实时定量 PCR,绑定,双标记探针领导知道的是裂解由核酸外切酶活性的 Taq DNA 聚合酶 (或同等物) 期间的 PCR 延伸阶段。这项规定限制了 TaqMan 荧光技术适用于非等温扩增系统。等温法使用聚合酶具有置换活动,而不是核酸外切酶活性 (参见上文)。结果,这些聚合酶不会裂解的 TaqMan 探针,所以不会产生检测信号。然而,主要利用荧光共振能量转移的等温核酸检测的若干战略已记录在案。

[0023] 通常用于实时 PCR 检测仪器结合常数或定期荧光热循环监测。在这样的一种反应,释放每延伸一步一个荧光单元和该方法的主要优点是它可用于定量。然而,这种仪器价格昂贵复杂的。

[0024] 这些方法的共同点是它们通过使用荧光的检测和靶扩增组合信号是否足够的水平。两种不同的方法在概念上的方法体现了描述。第一种方法放大靶序列的扩增,然后检测 DNA 和第二个使用触发启动的靶产生的事件是由独立于扩增残余分子靶设置离散信号序列。

[0025] *Analytical Biochemistry*, 333 :246-255 (2004) 以及美国专利 No. 4, 876, 187 和 5, 011, 769 描述探针嵌合的 DNA/RNA 的应用程序通过杂交与核酸循环探针技术检测荧光团和淬灭剂标记的靶。这个过程通过使用 RNase H 实现。探针与靶的结合在嵌合残基处产生 RNA/DNA 复式结构,其是 RNase H 的底物。探针的 RNA 部分被 RNase H 水解导致产生荧光信号,并允许探针脱离靶,从而能够第二探针退火,并引发新一轮信号产生。结果是源自反应中的探针降解 (其由存在特定核酸靶催化) 的线性信号放大。类似的策略也被用来作为后基因分型 PCR 技术战略,如 *Clinical Chemistry*, 52 :1855-1863 (2006) 中所述。在此反应中,特定靶核酸序列的存在导致三路交界结构 (包括靶核酸、含有硫代磷酸酯 - 改性限制酶识别位点的寡核苷酸和报道子寡核苷酸) 的形成,部分互补于限制性核酸内切酶识别位点区域中的锚寡核苷酸,并具有荧光团和淬灭剂。报道子和锚与靶的关联允许互补区域的结合,继而这使限制酶识别位点双链化,允许报道子寡核苷酸被合适的限制性核酸内切酶裂解。然后裂解的报道子寡核苷酸能够从络合物中脱离,从而允许新报道子寡核苷酸的结合。

[0026] 美国专利申请公开 No. 2004/0101893 使用脱嘌呤核酸内切酶来裂解来自荧光探针一端的荧光报道子,这通过从两个寡核苷酸产生类似脱碱基位点的结构而实现,所述寡核苷酸退火靶核苷酸的临近区域。在该方案中,探针的裂解不产生实质上更短的片段,因此

不伴随着探针从靶的解离,如本文其他反应方案中所发生的。另一种检测特定核酸序列存在的 FRET 基等温信号放大方法在 Nature Protocols, 1 :554-558 (2006) 中有所描述。这种方法使用“传感”寡核苷酸,其在两端形成发夹。靶核酸的存在改变了这种寡核苷酸的构象,从而允许一端被限制酶 FokI 裂解。然后所得产物能够催化一部分第二“燃料”寡核苷酸的消化,这将荧光团和淬灭剂分开(导致信号增加),并允许该寡核苷酸结合 FokI 和催化另一“燃料”寡核苷酸的降解(因此传递反应)。

[0027] 两个另外的方法涉及“可见核酸传感”的策略,并记录在 Angewandte Chemie International Edition, 45 :2879-2883 (2006) 以及 Organic and Biomolecular Chemistry, 5 :223-225 (2007) 中。在这种情况下,发光或比色反应由存在的靶寡核苷酸引起,而不是采用 FRET 基体系来产生荧光信号。在第一种方法中,使用“分子信标”型发夹 mRNA 寡核苷酸(其在 3' 位有荧光素酶或 β -半乳糖苷酶开放阅读核酸框)、在茎部分中的核糖体结合位点、和互补于靶核酸是环部分。在存在靶时,发夹被打开,从互补链释放核糖体结合位点,并允许荧光素酶基因翻译,从而产生发光或比色信号。RNase H 用来在存在靶核酸的条件下降解部分发夹。该水解导致组成上游游离的核糖体结合位点,并允许靶核酸循环。在第二种方法中,靶核酸的存在引发圆形探针的滚环扩增(RCA)反应,所述圆形探针含有具有过氧化物酶活性的脱氧核酶的反向互补的多个拷贝。因此,靶的存在产生脱氧核酶的多个拷贝,其继而催化比色反应。

[0028] 虽然多种等温核酸扩增/检测策略已被描述,但 DNA 诊断领域占主导地位的仍然是聚合酶链式反应。一种原因是因为多数等温替换方案无法给出期望的灵敏性和特异性。其他方法在概念上复杂,可能需要长时间优化,以及在某些情况下采用不易从标准来源获得的酶。

[0029] 仍然需要这样的检测体系,其能够在单一等温反应中提供信号放大和检测,而无需靶核酸扩增。

[0030] 本发明的实施方案的目的是在一定程度上满足上述一种或多种需要,或克服或改善至少一种固有或目前技术中存在的不足,或至少提供比现有方案更有用的选择。

[0031] 发明概述

[0032] 所述方法发挥作用以在恒温下在溶液中介导裂解的多核苷酸探针的量成几何级数增加。该裂解由存在的特定靶核苷酸序列所引发。随带还实现探针的反向互补的片段拷贝数量的增加。因而,所述方法可用于通过监控探针裂解或监控反向互补多核苷酸的片段的积累而在等温条件下检测所述靶序列的目的。

[0033] 因此,在本发明的实施方案的第一方面,提供一种检测样品中的靶核酸的方法,该方法包括下列步骤:

[0034] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸具有游离的 3' 末端;

[0035] b) 提供单体多核苷酸探针,包含:

[0036] i) 至少两个靶结合域,其中所述结合域被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,或

[0037] ii) 靶结合域和至少一部分所述靶核酸的拷贝,它们被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开;

[0038] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触;

[0039] d) 使所述样品和使靶核酸结合至单体探针并合成单体探针的反向互补的聚合酶接触；

[0040] e) 使所述样品和至少一种核酸酶接触以在目前复式结构的探针中裂解所述核酸酶裂解元件或降解所述易受核酸酶降解影响的域, 以及

[0041] f) 检测所述探针的裂解或降解。

[0042] 提供另外的实施方案, 其中单体探针的反向互补包含靶核酸的至少一种拷贝和靶结合域的至少一种拷贝。

[0043] 提供另外的实施方案, 其中所述切割位点的几何形状为使得裂解产物中成对核苷酸的数量减少。

[0044] 提供另外的实施方案, 其中所述探针的裂解或降解通过荧光法、比色法、免疫法、电泳法或杂交法来检测。

[0045] 提供另外的实施方案, 所述探针的裂解或降解使用纳米孔道技术来检测。

[0046] 下列实施方案中的任一种可适用于所述方法的任一方面。

[0047] 在优选的实施方案中, 所述探针的裂解或降解导致可检测标记或标记产生的信号的改变。可选择地, 所述探针的裂解或降解允许通过任意其他方式来检测构象改变, 例如电泳法或纳米孔道技术。在任一情况下, 该信号的变化或检测到的存在构象变化是样品中存在靶核酸的指示。

[0048] 在一个实施方案中, 单体探针带有可检测标记和一个或多个掩蔽基团, 其中当单体探针完整时, 可检测标记的信号通过掩蔽基团而减少或降低到检测不到。换句话说, 当单体探针裂解时, 可检测标记的信号通过一个或多个掩蔽基团与标记分开而加强。

[0049] 在另一个实施方案中, 单体探针带有可检测标记和另外一种或多种基团, 其中当单体探针裂解时, 可检测标记的信号通过另外的一种或多种基团而降低。

[0050] 在另一个实施方案中, 单体探针带有两种或多种可检测标记, 其中当单体探针裂解时, 信号组合改变。

[0051] 在另一个实施方案中, 单体探针被按照这种方式双标记, 该方式为探针裂解通过其他可检测的化学方式来改变探针特性, 包括 (但不限于) 酶标记、免疫标记、免疫荧光标记。

[0052] 在另一个实施方案中, 单体探针的裂解通常产生报道子寡核苷酸而检测, 所述报道子寡核苷酸通过上述方式检测。

[0053] 在另一个实施方案中, 单体探针的裂解通过方法直接检测, 例如但不限于凝胶电泳法、核酸杂交法或纳米孔道技术。

[0054] 在另一个实施方案中, 反应过程可通过监控对应于反应中产生的探针的反向互补的片段的寡核苷酸的积累而跟踪, 并且该监控可通过多种可选择的方法和化学方式来实现。

[0055] 在一个实施方案中, 单链靶核酸加入样品中。

[0056] 在一个实施方案中, 单链靶核酸在存在第二靶核酸的条件下产生。在一个实施方案中, 靶核酸和第二靶核酸的序列是相同的。在可选择的实施方案中, 靶核酸和第二靶核酸的序列是不同的。

[0057] 优选地, 单链靶核酸通过将引物结合到第二靶核酸而产生。

[0058] 优选地,引物在结合至第二靶核酸时易受裂解影响。

[0059] 在优选的实施方案中,靶核酸或第二靶核酸存在于待检测或分析的生物体中,核苷酸序列是被检测或分析的内容的指示,其中所述内容包括有机体、多态性或隔离或在其他序列混合物中存在的任何特定序列。在优选的实施方案中,该样品可包括任何生物材料,包括(但不限于)含有血液、尿液、粪便、唾液、淋巴液、土壤、水、细菌、病毒、寄生虫、或食物的样品。靶核酸可能是内源性样品(例如人血样品中的人类基因组 DNA) 或外源性样品(例如血液、土壤、水或食物样品中的细菌或病毒 DNA)。

[0060] 在一个实施方案中,靶结合域包含至少部分靶核酸序列的反向互补。

[0061] 应该理解,只要方法中发生反应,所述方法就包括:

[0062] a) 提供包含单链靶核酸分子的样品,其中所述单链靶核酸分子包含靶核酸序列,靶核酸分子具有游离的 3' 末端或裂解位点,使得当在步骤 (b) 中接触探针时,核酸可被核酸内切酶裂解以产生游离的 3' 末端,

[0063] b) 提供单体多核苷酸探针,包含:

[0064] i) 至少两个靶结合域,其中所述结合域被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,或

[0065] ii) 靶结合域和至少一部分所述靶核酸的拷贝,它们被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开;

[0066] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触,使得靶结合域结合单链靶核酸序列,

[0067] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,从而从靶核酸分子的 3' 端合成单体探针的反向互补,

[0068] e) 使样品和至少一种核酸酶接触以在目前复式结构的探针中裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,其中单体探针和合成的反向互补被分开以暴露靶结合域的至少两个拷贝和靶核酸序列的至少两个拷贝,

[0069] f) 使靶结合域结合靶核酸序列,

[0070] g) 保持样品以允许重复步骤 d) 和 e), 从而暴露靶结合域和靶核酸序列另外的拷贝,并根据需要重复步骤 f) 和 g) 以产生可检测的信号,

[0071] h) 通过该过程连续地或该过程结束后测量或检测裂解。

[0072] 应该理解,取决于上述段落 b) 中指定的探针的设计,步骤 e) 暴露裂解的单体探针的靶结合域的至少两个拷贝和裂解的单体探针的反向互补的靶核酸序列的至少两个拷贝(例如参见图 1),或可选择地,步骤 e) 暴露靶结合域的一个拷贝和裂解的单体探针的内源性靶的一个拷贝(例如参见图 6)。

[0073] 在各种实施方案中,步骤 a) 至 h) 依次或同时进行。

[0074] 明显的是,核酸酶裂解元件的裂解或所述域易受降解的影响导致探针的构象改变,这可通过多种方法来检测。

[0075] 在一个实施方案中,核酸酶裂解元件包含限制性核酸内切酶识别位点的一个链(单体核酸序列组分),并且核酸酶是限制性核酸内切酶。

[0076] 在另一个实施方案中,核酸酶裂解元件含有两个限制性核酸内切酶识别位点的一个链(单体核酸序列组分),核酸酶是一种或多种限制性核酸内切酶。更优选地,一个或多

个识别位点位于靶结合域和核酸酶裂解域的一个或两个结合处。更优选地,限制性核酸内切酶切割位点悬垂布置为降低裂解的多核苷酸的熔融温度,使得两个链的分解率增强。

[0077] 在另一个方面,提供增加样品中靶核酸的拷贝数量的方法,该方法包括下列步骤:

[0078] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有游离的 3' 末端,

[0079] b) 提供上述单体多核苷酸探针,

[0080] c) 使样品和单体探针接触,使得靶结合域结合单链靶核酸序列,

[0081] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,从而从靶核酸分子的 3' 末端合成单体探针的反向互补,

[0082] e) 使样品和至少一种核酸酶接触以在目前复式结构的探针中裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,

[0083] f) 保持样品以允许重复步骤 d) 和 e), 暴露靶结合域和靶核酸序列另外的拷贝,从而暴露所需量的靶核酸序列。

[0084] 在一个实施方案中,单体探针是圆形的。

[0085] 在另一个实施方案中,单体探针是线性的。优选地,一个靶结合域位于 5' 末端或 3' 末端,更优选一个靶结合域位于 5' 末端,并且一个靶结合域位于 3' 末端。

[0086] 在一个实施方案中,核酸酶裂解元件是限制性核酸内切酶识别位点的一个链(单体核酸序列组分),从而当结合至其互补部分时,核酸酶裂解元件形成限制性核酸内切酶识别位点。

[0087] 在一个实施方案中,当所述靶核酸是 DNA 时,所述核酸酶裂解元件含有 RNA。

[0088] 在一个实施方案中,可检测标记是荧光团,所述掩蔽基团是当在相当接近时能淬灭荧光团荧光的淬灭剂。

[0089] 在其他实施方案中,可检测标记使用免疫标记、免疫荧光标记或凝胶电泳,尽管明显的是可以使用任何用于检测裂解的方法。

[0090] 在其他实施方案中,裂解利用接方法检测,例如凝胶电泳或纳米孔道技术、或任何能够可视化这种分子改变的方法。

[0091] 在特别优选的实施方案中,该方法提供了单体多核苷酸探针,含有至少两个靶结合域,它们被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,单体探针带有荧光团和淬灭剂。

[0092] 优选地,所述荧光团的位置 5' 是裂解元件或易受核酸酶降解影响的域,淬灭剂的位置 3' 是裂解元件或易受核酸酶降解影响的域,或反之亦然。

[0093] 在另一个方面,提供用于检测样品中的靶核酸的方法,该方法包括下列步骤:

[0094] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有游离的 3' 末端,

[0095] b) 提供上述单体多核苷酸探针,

[0096] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触,

[0097] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,聚合酶能够从靶核酸分子的 3' 末端合成单体探针的反向互补,反向互补含有靶序列域的至少一种拷贝和靶结合域的至少一种拷贝,

[0098] e) 使样品和至少一种核酸酶接触以裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解

影响的域,以及

[0099] f) 通过该过程连续地或该过程结束后测量或检测裂解。

[0100] 优选地,靶结合域含有至少部分靶核酸序列的反向互补。

[0101] 靶序列域包含至少部分靶核酸序列。

[0102] 在另一个方面,提供增加样品中靶核酸的拷贝数量的方法,该方法包括下列步骤:

[0103] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有游离的 3' 末端,

[0104] b) 提供单体多核苷酸探针,其含有至少一个靶结合域,所述靶结合域被核酸酶裂解元件或至少一个靶序列域的易受核酸酶降解影响的域分开,单体探针带有可检测标记和掩蔽基团,其中当单体探针完整时,可检测标记的信号通过掩蔽基团而减少或降低到检测不到,

[0105] c) 使样品和单体探针接触,使得靶结合域结合单链靶核酸序列,

[0106] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,从而从靶核酸分子的 3' 末端合成单体探针的反向互补,反向互补含有靶序列域的至少一种拷贝和靶结合域的至少一种拷贝,

[0107] e) 使样品和至少一种核酸酶接触以裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,

[0108] f) 保持样品以允许重复步骤 d) 和 e), 暴露靶结合域和靶核酸序列另外的拷贝,从而暴露所需量的靶核酸序列。

[0109] 在又一方面,所述方法提供单体多核苷酸探针,含有至少一个靶结合域,其被核酸酶裂解元件或至少一个靶序列域的易受核酸酶降解影响的域分开,单体探针带有可检测标记和掩蔽基团。

[0110] 在另一个方面,所述方法提供上述单体多核苷酸探针在检测靶核酸中的应用。

[0111] 在又一方面,本发明的方法提供组合物,其含有探针以及一种或多种添加剂、缓冲剂、赋形剂或稳定剂。

[0112] 优选地,所述组合物还含有一种或多种下列物质,包括:

[0113] 核酸酶;

[0114] 核酸外切酶;

[0115] 具有链置换活性的聚合酶;

[0116] 活化或增强核酸酶活性的化合物、辅助因子或辅酶;

[0117] 活化或增强核酸外切酶活性的化合物、辅助因子或辅酶;

[0118] 活化或增强聚合酶活性的底物、化合物、辅助因子或辅酶。

[0119] 在另一个方面,本发明的方法提供用于检测样品中的靶核酸的试剂盒,所述试剂盒含有一定量的单体探针、一定量的核酸酶和一定量的链分开活性剂、以及使探针、核酸酶和链分开活性剂与样品接触的说明书。

[0120] 在一个实施方案中,试剂盒还含有引物,优选地引物是本文所述的二聚物寡核苷酸引物。

[0121] 在这方面的资料参考规范的地方已经取得了专利说明书,其他外部文件,或其他来源,这是一般方法为目的,提供一个功能的范围内讨论。除非特别说明,否则这种外部参

考文件不被理解为承认这些文件或资料,例如来源管辖权,任何现有技术或技术形式的一部分,在共同的一般知识。

[0122] 附图简要说明

[0123] 可参照附图,其中:

[0124] 图 1 是示出未标记的 Tandem Repeat 限制酶促进的 (TR-REF) 探针和示例性限制性核酸内切酶位点的主要元件的图。使用该探针的方法依靠至少一种限制性核酸内切酶和聚合酶来催化反应。示出链式反应的单独嵌入步骤。

[0125] 图 2 是示出标记的 Tandem Repeat 限制酶促进的 (TR-REF) 探针和示例性限制性核酸内切酶位点的主要元件的图。使用该探针的方法依靠至少一种限制性核酸内切酶和聚合酶来催化反应。示出链式反应的单独嵌入步骤。

[0126] 图 3 是示出示例性 Tandem Repeat 限制酶促进的 (TR-REF) 探针的序列分布和在反应过程中由靶核酸产生的反向互补序列。

[0127] 图 4 是示出在实施例 1 中所述的 TR-REF 反应中 FAM 荧光信号的产生对时间的图。

[0128] 图 5 是示出在存在外源性人基因组 DNA 的条件下在实施例 1 中所述的 TR-REF 反应中 FAM 荧光信号的产生对时间的图。

[0129] 图 6 是示出未标记的 Inverted 反向互补限制酶 Facilitated (IRC-REF) 探针的主要元件的图。使用该探针的方法依靠至少一种限制性核酸内切酶和聚合酶来催化反应。示出链式反应的单独嵌入步骤。

[0130] 图 7 是示出标记的 Inverted 反向互补限制酶 Facilitated (IRC-REF) 探针的主要元件的图。使用该探针的方法依靠至少一种限制性核酸内切酶和聚合酶来催化反应。示出链式反应的单独嵌入步骤。

[0131] 虽然方法大致如上所述,但本领域技术人员明白所述方法不限于此,并且还包括下列给出例子的实施方案。

[0132] 发明详述

[0133] 如上所述,在一个方面,本发明的方法涉及检测靶核酸的等温检测法,其中所述方法依靠来自与核酸探针结合的可检测标记的信号靶核酸依赖性放大。此处,信号放大是由于存在靶核酸而发生的。

[0134] 总而言之,信号放大通过使用单体标记的探针而实现,至少一部分探针能够与靶核酸杂交。这在本文中称为靶结合区域或靶结合域。探针和靶核酸序列的杂交形成能引起单体探针的反向互补合成的复式结构,继而产生能够被核酸酶裂解的核酸酶裂解元件。核酸酶裂解元件最终导致可检测标记从掩蔽基团分开,所述掩蔽基团能够使来自可检测标记的信号降低或不可检测。

[0135] 在一些实施方案中,裂解元件的裂解最终也揭示探针内存在的至少一种额外靶核酸序列或合成的反向互补,其本身能够和另外的探针分子杂交,从而导致形成另外的探针:靶核酸序列复式结构。这些另外的复式结构中的每一个都能够引起含有核酸酶裂解元件(其能够被核酸酶裂解)反向互补的合成。再次,裂解导致标记进一步从掩蔽基团分开,信号发射,进一步暴露另外的探针分子内存在的靶核酸序列等,使得实现信号的几何级别增加。

[0136] 从根本上以后,靶核酸可以被看作是信号催化剂的分离标记和掩蔽基团及相应的

排放。

[0137] 在一个实施方案中,方法的探针包含能够核酸结合的序列的至少两个拷贝,优选至少一部分靶核酸序列的反向互补。本领域技术人员将意识到,当用作合成模板时,这样产生的反向互补包括至少一部分靶核酸序列,或能够与靶结合域结合的序列。该优选的实施方案在本文中称为 Tandem Repeat 限制酶促进的 (TR-REF) 链式反应,并在实施例 1 中详细描述。

[0138] 在另一个实施方案中,方法的探针包含靶核酸序列或能够杂交探针的靶-结合区域的序列的一个或多个拷贝,其以下也称为固有靶。当探针是完整的时,这些固有靶不能引起引物延伸,并且只对核酸酶裂解的裂解或易受降解影响的域的降解可以这样做。在一个实施方案中,使用至少一种限制性核酸内切酶。第二优选的实施方案在本文中称为 Inverted 反向互补限制酶促进的 (IRC-REF) 链式反应,并在实施例 2 中详细描述。

[0139] 在由于存在待检测的靶核酸(其可被认为是“外在”靶序列以将其和 IRC-REF 探针或 IRC-REF 探针的反向互补中存在的固有拷贝相区别)而被引发后,单体探针的反向互补的合成在核酸酶裂解域中产生至少一种核酸酶位点(例如限制性核酸内切酶位点),或使所述域易于受到降解影响。通过设计单体探针以含有固有靶或其反向互补的至少两个拷贝,在每次反复反应时都可以实现信号的几何级别扩大(两倍或三倍)。

[0140] 链式反应的引发可概念化为靶的形成:探针靶-结合域的和靶 DNA 之间探针杂交,从而产生引物以通过聚合酶延伸。

[0141] 在各种实施方案中,导致可检测信号的构象变化可由于核酸酶活性的裂解事件而直接发生,或由于(例如)能够被裂解事件裂解的单体探针的变性而间接发生。例如,这种间接分离可包括部分探针通过核酸外切酶的外核降解。无论分离是直接或间接,其将主要是裂解元件的相对位置、掩蔽基团和探针内标记的函数。

[0142] 在优选的实施方案中,超过一种限制性核酸内切酶位点被安排在裂解元件内,使得裂解导致裂解产物的成对区域缩短,并因此降低其熔点温度(T_m),从而协助单链多核苷酸的再生,所述单链多核苷酸然后可用于下一循环。

[0143] 在其他实施方案中,裂解可导致产生报道子寡核苷酸,其可不依赖于单体探针通过各种方式来检测。

[0144] 靶 DNA 在检测前应该是单链,从而应主要保护避免受到存在任何核酸酶的作用。然而,在靶染色体其他位点上的核酸内切酶活性不损害该方法。核酸外切酶活性可通过靶侧翼的互补 PNA 阻断剂而最小化。PNA 的这种方式使用具有双重功能,因为已知 PNA 会导致复式结构 DNA 的链的入侵,从而产生和稳定 DNA 的单链区域 (Peffer et al, 1993)。

[0145] 使用本发明的方法的线性探针,在一些实施方案中阻断剂可用于抑制核酸外切酶活性或未引发的探针上的其他降解。这些可以是 DNA 的任何修饰形式,包括氨基酸连接、硫醇连接、3' -3' 连接、5' -5' 连接、核苷酸类似物、间隔剂或 5' 或 3' 端修饰(包括去磷酸化)。此外,末端可以被修饰的 DNA 的短互补链阻断或被结合蛋白阻断。当然应意识到,用于延伸的末端不应以任何抑制聚合酶活性的方法阻断。

[0146] 因此,在第一方面,提供一种检测样品中的靶核酸的方法,该方法包括下列步骤:

[0147] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有游离的 3' 末端,

[0148] b) 提供单体多核苷酸探针,其含有至少两个靶结合域,所述靶结合域被核酸酶裂

解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,单体探针带有可检测标记和掩蔽基团,其中当单体探针完整时,可检测标记的信号通过掩蔽基团而减少或降低到检测不到,

[0149] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触,

[0150] d) 使样品和聚合酶接触,

[0151] e) 使样品和至少一种核酸酶接触,以裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,

[0152] f) 检测或测定可检测标记的信号,

[0153] 其中信号增加表示样品中存在靶核酸。

[0154] 更具体地,检测样品中靶核酸的方法包括下列步骤:

[0155] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有游离的 3' 末端,

[0156] b) 提供单体多核苷酸探针,其含有至少两个靶结合域,所述靶结合域被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域分开,

[0157] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触,使得靶结合域结合单链靶核酸序列,

[0158] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,从而从靶核酸分子的 3' 末端合成单体探针的反向互补,反向互补含有靶序列域的至少两种拷贝,

[0159] e) 使样品和至少一种核酸酶接触,以裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,

[0160] f) 通过该过程连续地或该过程结束后测量或检测裂解。

[0161] 其中信号增加表示样品中存在靶核酸。

[0162] 在另一个方面,本发明的方法提供检测样品中的靶核酸,该方法包括下列步骤:

[0163] a) 提供包含单链靶核酸的样品,其中所述单链靶核酸分子具有 5' 或 3' 末端,

[0164] b) 提供单体多核苷酸探针,其含有至少一个靶结合域,所述靶结合域被核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域从至少一个靶序列域分开,

[0165] c) 使所述样品和所述单体探针的多于一种拷贝接触,

[0166] d) 使样品和聚合酶接触,所述聚合酶结合与单体探针结合的靶核酸分子,聚合酶能够从靶核酸分子的 3' 末端合成单体探针的反向互补,反向互补含有靶序列域的至少一种拷贝和靶结合域的至少一种拷贝,

[0167] e) 使样品和至少一种核酸酶接触以裂解核酸酶裂解元件或降解易受核酸酶降解影响的域,以及

[0168] f) 通过该过程连续地或该过程结束后测量或检测裂解。

[0169] 其中信号增加表示样品中存在靶核酸。

[0170] 在一个实施方案中,荧光团和淬灭剂包括在分子中以能够进行 FRET- 基检测 (Livak et al, 1998)。这些元件可置于多种可能位置处,只要所述两种物质由于核酸内切酶的作用而彼此分开。

[0171] 可选择地,可用其他标记系统,例如免疫标记、免疫荧光标记,或可选择地通过凝胶电泳或纳米孔道技术可直接检测探针的裂解。

[0172] 该方法识别靶序列或、靶结合序列、或两者的额外拷贝可使用聚合酶生成其中单链靶核苷酸是延伸引物,单体探针的核酸分子是模板。在这里,在靶序列结合和 / 或核酸酶

裂解区域裂解或降解后,分子的其余的 5' 片段可杂交第二单体探针,并引发单体探针的反向互补的合成。通过适当的配置模板分子的序列,聚合酶产生的反向互补可包含一个或多个靶序列的额外拷贝,从而使更多的引物分子结合,并引发进一步的聚合反应,或一个或多个靶结合序列的拷贝,或两者。

[0173] 使用的聚合酶将是一种能够再生核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的区域,从而使探针接触的靶序列,或靶结合序列,或两者兼而有之,这取决于单体的配置。例如,核酸酶裂解元件易受 RNase H 裂解,可对 DNA 的 RNA 聚合酶再生或修改,以纳入核糖核酸聚合酶基团。在这样的实施方案,同样的核酸酶可催化核酸分子初始裂解第一:靶序列,以及元件裂解的核酸酶裂解后形成的合成第二核酸分子的反向互补。

[0174] 合成的互补的反向最终导致模板裂解的单体探针:反向互补全双工的裂解分离分子的序列上曝光更多拷贝的靶,在一个或靶结合序列,或者两者兼而有之。

[0175] 例如,在不同的实施方案中,该方法包括联系核酸酶的样品与一秒钟裂解或降低核酸酶裂解元件时,单体探针必将其反向互补。核酸酶应意识到的使用酶可以方便地让元件使用第二个限制性核酸内切酶位点在裂解边界的核酸酶能需要由于核苷酸序列的要求。

[0176] 在优选的实施方案中,单体探针带有可检测标记。最好的标记信号的可检测是减少或无法检测时提供足够接近掩蔽基团,和单体探针带有掩蔽基团标记能够减少或使无法察觉的信号时,在充分的接近到可检测标记。

[0177] 在这个实施方案,当单体探针是完整的可检测标记和掩蔽基团在足够接近的掩蔽基团会减少或者呈现无法察觉的标记信号的可检测。该元件裂解的核酸酶裂解导致基分离的可检测标记和掩蔽基团足以减少或防止团掩蔽的掩蔽基的信号。

[0178] 优选地,该序列的步骤检测靶核酸是由检测或测定的增加,该标记的信号相比,信号其中的,完整的单体探针的检测或测定团分离的标记和掩蔽基增加信号是指示性的存在上述靶核酸的样品。

[0179] 在另一个实施方案中,该序列的步骤检测核酸的数额的靶是向一个额外步骤接触它的反向互补杂交与第二探针的检测序列存在于单体探针或检测顺序,第二探针含有可检测标记。在第二探针也称为此处为“报道子”探针。

[0180] 在一个实施方案中,检测探针序列存在于单体是会产生反向互补序列的能够绑定到一个模板探针检测,其中合成核酸序列使用这种检测能够作为核酸绑定到一个检测探针。在这个实施方案,步骤的序列检测核酸的数量是由合成的靶序列的反向互补,检测的,并联系了一个第二反向互补序列与检测探针的杂交,以检测序列反向互补。

[0181] 优选地,在第二探针它还包含掩蔽基团的减少或者呈现无法察觉的标记信号的可检测时,第二探针不绑定到探测序列,其中的探针结合的第二对检测顺序导致基分离的可检测标记和掩蔽基团足以减少或防止团掩蔽的掩蔽基的信号,其中一个标记增加检测的信号是在可指示在场的说第二探针靶核酸的样品。更优选的是此处所述单链 RMD 探针。

[0182] 优选地,方法包括额外步骤:

[0183] h-i) 使样品和第二探针接触,所述第二探针结合检测序列,所述第二探针带有可检测标记,

[0184] i-ii) 检测或测定可检测标记的信号,

[0185] 其中信号增加表示样品中存在靶核酸。

[0186] 优选地,第二探针是单链 RNA 探针,其含有荧光团、淬灭剂和检测序列结合域,更优选第二探针是本文所述 RMD 探针。

[0187] 在一个实施方案中,核酸酶裂解元件包含限制性核酸内切酶识别位点的单链(单体核酸序列组分),第一核酸酶是限制性核酸内切酶。

[0188] 在一个实施方案中,核酸酶裂解元件含有 RNA,第一核酸酶是 RNAase,更优选地是 RNAse H。

[0189] 本领域技术人员明显的是在各种实施方案中,该方法的步骤,有秩序进行的任何顺序或同时进行。在链式反应和信号放大时,才触发反应部件-靶核酸的单体探针,至少一种核酸酶,而聚合酶-都存在。在一个实施方案中,可能的靶核酸联络与聚合酶的组成包含单体探针至少一种核酸酶。有利地,这最大限度地减少封闭系统引入污染的机会时,一个方法是进行研究。

[0190] 应意识到的方法可以进行定性或定量分析。例如,该方法可以使一个二进制(是/否的样品)指示一个或多个物种是否靶在核酸存在。在另一个例子,说明可能是半定量,例如,提供三个层次的信号-高,低和无信号。根据不同的标记,这些级别可以例如是色调相同,其中一个深色阴影表示高度中等色调的靶核酸,表示一个靶核酸水平低,与浅色或无色显示没有靶核酸目前。该方法也为 PCR 方法定量分析靶实时核酸,例如通过测量,包括实时的测量,生产的信号的方式类似于。一个例子的靶核酸定量测量等,提出了在这里的例子(见图 2)。

[0191] 明显的是在单体探针,当所使用的引物和/或检测探针,最好是目前靶核酸序列的摩尔过多的被检测到。在大多数实施方案的将得到优先考虑有限制的探针在非本不是限速过剩量,使摩尔浓度或探针。然而,在一些实施方案中可能都认为,在数量或浓度是一个或两个探针或本引物速率限制,例如在需要的情况下一个定性的结果。适当的方法来计算(第适量探针)或引物获得的等额或条件浓度靶核酸或其他反应是本领域技术人员众所周知的。

[0192] 术语“核酸”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“多核苷酸序列”和等价物其中可能包括作为此处使用的单一或双链脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸长度的聚合物,也可能包括作为非限制的例子,编码和非编码序列的核酶基因,正义和反义序列,外显子,内含子,基因组 DNA,基因, mRNA 前体, mRNA 和 rRNA 基因,小干扰 RNA, miRNA 的, tRNA 基因,重组多核苷酸,分离和纯化天然 DNA 或 RNA 序列,合成 RNA 和 DNA 序列,核酸探针,引物,片段,基因结构,载体和修改多核苷酸。没有任何区别的条款,长度打算“核酸”,“寡核苷酸”和“多核苷酸”,这些条款将被交替使用。

[0193] 术语“靶区域”,“靶序列”,“靶核酸”,“靶核酸序列”,“靶多核苷酸”和“靶多核苷酸序列”和语法及其等值,可指一个地区是其中的一个核酸被检测到。因此,本文中使用的术语“靶核酸”或“靶核酸序列”包括的靶核酸被检测到,例如,目前在样品或者物存在于一个引所述外,并在拷贝的靶核酸序列或一本内所产生的探针第例如,拷贝的至少一种反向互补的例子,该单体探针是包括合成的聚合酶以下约束力的单体探针靶核酸序列。

[0194] 术语“第二靶核酸”或“第二靶核酸序列”这里所用的同样可以包含一个核苷酸序列被发现,并且这个序列可能是相同或不同的“靶核酸”。

[0195] 优选地,将靶核酸单链的对外债务,从而促进靶:探针杂交形成。方法使靶核酸单

链不但有著名的艺术,将最常见的是双链核酸热变性的影响。化学剂,防止或减少对形成良好的碱基也是最先进的核酸已知的使用呈现单链版。这将是明显的熟练技工,这些人员必须谨慎使用的方法,这些方法都依赖于杂交形成的,例如,通过杂交靶:探头。

[0196] 它也将是被理解的存在,一些核酸拥有“链侵略”性质,无论这种入侵的互补链置换的结果核酸链的靶和靶形成:探针全双工,或靶形成:探针三重靶,第一次是没有序列的单链版。肽核酸(美国国家科学院院刊)及其衍生物可能是核酸链入侵的能力,即含有靶探针结合区域包括巴民族权力机构可以用来检测靶核酸还没有提供充分的单链版。使用的靶-结合区域包括巴民族权力机构是特别有助于模板版的圆形探针,其中,前形成的靶:探针杂交,在靶的-结合区域探针可能大幅双链。

[0197] 所谓“探针”,可指一个多核苷酸检测用在杂交为基础,以检测靶多核苷酸序列是互补,以至至少探针部分。该探针可包括靶结合域的杂交,以一序列的靶核酸地区。在各种实施方案中,本发明的方法是标记探针与领导,即必然,可检测标记,以便检测。该探针可以组成一个“片段多”所界定的核苷酸此处。

[0198] “相应”,可指一个核酸是相同或核酸杂交能够向指定的反向互补的。

[0199] 本文使用的术语的“暴露”,“暴露”,“揭露”,以及“发现”及其语法等同可能意味着该元素(被使用过)这些方面的条件是/是访问或/呈现访问。例如,元件暴露了核酸酶裂解可能表明核酸酶裂解元件呈现访问裂解由核酸酶。又如检测序列,曝光的可能暗示,该检测序列呈现例如简易的检测,获得用于绑定到一个检测探针。

[0200] 相反,条款“隐藏”或“掩盖”,其语法等同可能意味着该元素(被使用过)这些方面的条件是/是不可访问。例如,一个检测序列可能被隐藏或屏蔽时势必核酸分子探针探测除外。

[0201] 术语“杂交”和语法等值可参考互补形成一个多聚结构,通常一个复式结构的全面,由绑定之间的两个或更多的单链核酸之正当基础,以互补配对。杂交可能发生核酸链之间或核酸链包含错配的小区域。两个单链核酸的是不匹配的互补,除了轻微的地区被称为大幅互补。互补序列的稳定双链大幅下可以实现较宽松的杂交条件。本领域技术人员的核酸技术可以凭经验判断双工稳定考虑离子强度的变数,包括数字,例如,长度核苷酸和碱基对浓度的多以及对不匹配的发病基础。杂交条件的可以进行适当修订,例如只允许那些单链的互补程度高的地区,足以与杂交。高度互补严格的条件为杂交核酸是此处所述。

[0202] 由于此处使用的“复式形成区域”是指核酸序列或现在在一个多核苷酸是充分互补,以核酸多序列,以目前在另一个核苷酸多让杂交的核苷酸,特别是组模板选更多的地区目前在核酸分子包含二聚物引物的方法的二聚物形成双链区域的完整。

[0203] 由于此处使用的“靶-结合域”,其相当于“靶结合域”是指核酸序列和目前在核酸分子是充分互补,以核酸靶序列的核酸存在于允许的杂交的靶-结合区域的靶核酸等,形成一个靶:探针杂交。

[0204] 由于此处使用的“核酸酶裂解元件”是指核酸序列探针在一本核酸分子,构成了一个地区的行动延伸受裂解由核酸酶杂交时与靶核酸序列或序列所对应的靶核酸。可选择地的“核酸酶裂解双链元件”提供可能由一种 DNA 聚合酶。优选地,一个或多个裂解元探针目前在显着不易被裂解的因素,仍然只要任何一方单链不被绑定到靶核酸,或者未将变得双链版由一种 DNA 聚合酶。更优选地,存在任何裂解元件靶的探针结合区域的不容易裂解只

要探针不一定靶核酸,或在第一和第二核酸分子探针是完整的探针的杂交。

[0205] 由于此处使用,核酸酶可包括分子,化合物,或酶,酶的专一性最好能够选择性切割核酸。优选地,该核酸酶裂解高选择性地将特定核酸序列。首选核酸酶将裂解都核酸链的双链。核酸内切酶是优选的核酸酶的例子。许多核酸内切酶,包括限制性核酸内切酶,存在并受到良好的艺术特点和已知的。任何特定网站核酸内切酶可用于的方法,并且可以根据选择与探针设计的。如上所述,这可能是核酸序列测定靶的。不过,首选核酸内切酶将有减少识别位点的频率,尽量减少片段核酸款的靶,例如染色体上的靶核酸序列的谎言。核酸的酶的选择将取决于检测到的核酸是由提供适当的潜在的靶序列的地区内。在本例子中描述的限制性核酸内切酶所用的 BsmAI, MwoI, BsaXI, BsiHKAI, BsoBI, 但应意识到其他核酸内切酶可用于取决于反应温度和所需的几何形状的切割位点。

[0206] 所谓“聚合酶”这里所用的可能是指任何活动,能够合成了一个模板反向互补的核酸分子。许多例子聚合酶,最好的 DNA 聚合酶,合适的使用方法在本发明是已知的。首选的例子包括 Taq 酶聚合酶和斯托费尔片段为单位。DNA 的聚合酶我和偶合片段。

[0207] 靶核酸的检测方法是测定依赖于检测或信号从一个标记,最好是一个发光的探针标记导致了发光标记。

[0208] 术语“标记”,因为此处使用的,可以指任何原子,分子,化合物或基团,可连接到核酸,而且可以使用,也可以提供检测信号或标记互动与第二修改探测信号标记提供的第二位。首选标记是或发光化合物的化学发光,产生荧光信号检测。还有更多的首选标记是发光化合物对信号是减少或无法检测时提供足够接近掩蔽基团,例如,淬灭生色。替代标记系统也可以用于矩阵裂解,演示了标记固体从基团可以绑定到。例子是生物素标记,可以绑定到固定化亲和,因此非探针裂解随之而来的将绑定标记的探针的另一端中学目前在。这种方法将检测试纸申请为基础的。然而,更多的检测系统可以使用技术标记,可以区分的纳米孔道。

[0209] 该方法适用于探针检测的标记率领单一的,虽然多个标记可受聘。探针检测时发生的裂解的标记,例如荧光团,有足够的团删除从掩蔽基,例如变性过程中的裂解事件淬灭剂,经裂解事件或允许探针。这削弱了标记相互作用的掩蔽基团和等允许排放量的信号。

[0210] 本文使用的术语“掩蔽基团”是指任何原子,分子,化合物或基团,可以标记与互动,以降低发射信号的标记。标记的基分离和掩蔽基团探针产生的裂解事件或变性过程中裂解事件允许附加的标记,从而导致发射信号的探测增长的需要。根据不同的标记,信号发射可能包括发光,颗粒排放,外观或失踪的复合色,等。首选发光标记和掩蔽基团可以交互修改的标记发光的说明如下。

[0211] 所谓“色”是指非放射性化合物,在吸收光能的形式。有的色体,可兴奋发光或者通过化学反应,产生化学发光,或由光吸收,产生荧光。

[0212] 术语“荧光团”是指它是一个复合的荧光频率可在,即吸收频率和发光另外,普遍较低。

[0213] 术语“发光”是指化学发光形式,其中发光化合物是生物体是生活中找到。化合物发光的例子包括细菌荧光素酶和萤火虫荧光素酶。

[0214] 所谓“淬灭”是指一种化合物减少造成的第二个化合物荧光第一,无论机制。淬灭通常要求该化合物在靠近。由于此处使用的,无论是化合物或化合物的荧光据说是淬灭,并

据了解,这两种用法指的是同样的现象。

[0215] 该机制的化合物能发光的淬灭通过第二个化合物莫里森介绍,1992 13,在非同位素的 DNA 探针技术 (Kricka ed., Academic Press, Inc. San Diego, Calif.)。机制是一个众所周知的荧光能量转移(场效应管),也称为转移到能源的文学作为荧光共振能量转移(FRET),无辐射,远程能量转移,偶极耦合的能量转移,能量转移和福斯特。对于场效应管的主要要求是这种化合物发射光谱,能源供体,必须与其他复合重叠的吸收光谱,能量受体。Styer and Haugland,1967, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 :719 引入本所引用,表明灭剂对能量传递效率的一些常见的发射极淬可达到 100%时的间隔距离小于 10 埃。能量的传输速率下降的比例间距第六权力之间的距离的能量供体和受体分子的能量增加英寸因此,大大减少能量的传输速率,捐助者造成的能源增加荧光,如果该淬灭剂发色也是一个荧光团,一个能受体荧光的下降。

[0216] 该方法的标记信号发射,最好是荧光标记,必将对探针检测。许多荧光团和艺术的发色团介绍了适合的方法是使用英寸合适的荧光团和淬灭生色团对的选择,要的发色团的发射光谱的荧光团的吸收光谱重叠的。理想情况下,荧光团应具有较高的 Stokes 位移(一大差异最大发射波长之间的最大吸收波长和),以尽量减少光的干涉零星激励。

[0217] 合适的标记是众所周知的艺术包括(但不限于),fluorescein 和衍生工具,例如 FAM,HEX,TET 和 JOE;罗丹明及其衍生物例如得克萨斯红,罗红霉素,和坦拉;路西法黄色和香豆素衍生物例如 7-我 2 的 N-香豆素-4-醋酸,7-羟基-4-CH 的。3 香豆素-3-醋酸和 7 新罕布什尔州 2-4-CH 的 3 香豆素-3-醋酸(孙家正)。FAM,HEX,四环素,JOE,罗红霉素和坦拉是销售的珀金埃尔默,应用生物系统公司分部(福斯特城,加利福尼亚州)。得克萨斯红和许多其他合适的化合物分子探针销售秒(尤金,厄赖格)。化合物的化学发光和发光的例子可能是合适的捐赠者作为能源的利用,包括鲁米诺(aminophthalhydrazide)和衍生物,荧光素酶。

[0218] 虽然在大多数实施方案的将是首选的可检测标记是一个发光标记和掩蔽基团是淬灭剂,例如一个淬灭生色,其他可检测标记和掩蔽基团是可能的。例如,该标记可能是一种酶和掩蔽基团的酶抑制剂说。当酶抑制剂在相当接近的密切互动,该抑制剂能够抑制这种酶的活性。对裂解或抑制变性的探针,酶和分离,不再能够互动,使得这种酶呈现活跃。抑制剂 A 和多种产品的酶能够探测催化反应产生一个在生产酶的活性等是众所周知的熟练技工,例如 β -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶。

[0219] 在另一个方面本发明的方法提供了一个单体多可检测核苷酸探针,包括至少 2 运载靶结合域隔开,核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解的单体探针影响的域,标记和掩蔽基团。

[0220] 在另一个方面,该方法提供了一个单体多单体探核苷酸探针,包括至少一对,靶结合域隔开,核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域由至少 1 靶序列针携带一个可检测标记和掩蔽基团。

[0221] 优选地,可检测标记和掩蔽基团的位置,使标记信号的可检测是减少或使之因无法察觉的掩蔽基在单体探针是完整的。

[0222] 在一个实施方案中,单体探针是循环的。

[0223] 在另一个实施方案中,单体探针是线性。优选地,域之一靶结合位于 5' 末端或

3' 末端,更优选之一靶结合域是位于 5' 末端和域靶结合位于 3' 末端。

[0224] 在一个实施方案中,核酸酶裂解元件是一个链的限制性核酸内切酶(即单体核酸序列的组成部分)识别位点,即在一定的补充,该核酸酶裂解元件构成了限制性核酸内切酶识别位点。

[0225] 在一个实施方案中,当所述靶核酸是基因时,所述核酸酶裂解元件包含核糖核酸。

[0226] 最好是可检测标记是一个荧光团,并表示掩蔽基团是淬灭剂的荧光能够淬灭时表示荧光团在充分接近。

[0227] 在特别优选的实施方案中,该方法提供了一个单体多携带一个核苷酸探针,包括至少两个探针单体靶结合域隔开,核酸酶裂解元件或易受核酸酶降解影响的域时,荧光团和淬灭剂。

[0228] 优选地,所述荧光团的位置 5' 的裂解元件或易受核酸酶降解影响的域和淬灭剂被定位 3' 的裂解元件或易受核酸酶降解影响的域,或反之亦然。

[0229] 单体探针不同配置的允许变化的方法来检测靶核酸被聘用。

[0230] 本发明的方法还可以使用一个方法检测探针在此统称为核糖核酸酶介导检测(RMD),可用于检测 DNA 的靶是几何扩增足够高的数字是这样的靶分子不需要。可选择地,它可以用于任何方法结合 DNA 的扩增与方法,除了本文所述的检测。

[0231] 该方法利用荧光共振能量转移再次产生歧视性的荧光信号,但标记不同于双重领导的 TaqMan 探针是它使用一种 RNA 探针和核糖核酸酶阁下

[0232] 对核糖核酸酶 H 非破坏性的酶的 DNA 杂交的 DNA 链的 RNA/ 意味着使用 RNA 探针将离开靶 DNA 的完整性。此外,这种酶完全水解行动的退火探针等能让新的探针结合。从本质上讲,在 DNA 链只是作为一个探针介导的裂解催化剂的酶。

[0233] 因此,有足够的探针,信号强度会随时间增加线性的方式。该方法灵敏度高。这样一个系统可以检测少至 320 德阿莫莱斯 (3.2×10^{-16}) 的靶序列(约 2.0 亿分子)。这样的水平是非常好的灵敏度为等温检测方法,当温结合等扩增提供了强大的检测系统。

[0234] 因此,该方法提供了一种检测 DNA 方法的一个靶所述者外,其中包括额外的单体探针,检测序列互补或相应的至少部分链核糖核酸序列的单探针携带一个可检测标记和掩蔽基团,探针方法此外包括单链的步骤与样品接触。

[0235] 优选地,可检测标记是荧光团,和掩蔽基团是淬灭剂。

[0236] 优选地,核酸酶是核糖核酸酶的 H(核糖核酸酶 H) 或代理人有核糖核酸酶 H 活性。由于此处使用的,一个“代理人有核糖核酸酶 H 活性”包括核糖核酸酶小时,变体及其功能和现金等价物,即同等功能在任何化合物,基团或酶具有一种 RNA 溶核 RNA 组分活性反对 :DNA 的杂交,但仍然核糖核酸 :DNA 的杂交无溶的 DNA 核活性成分的一对。

[0237] 应意识到,RMD 方法可以采用的方法是在联同述。在一些实施方案中,这样的组合标记允许联合国主导的(从而降低成本)探针的是制造和使用。有了这个办法的实施方案,产生的信号由 RMD 探针可以保持通用的,不论靶序列被检测到。

[0238] 明显的是,在这种合并实施方案秒,当探针存在于单体的检测次序,此处使用的是一个序列能够向 RMD 探针杂交。

[0239] 另外提供的方法和探针作为上文所述及本数字,参照实例。

[0240] 在另一个方面,本发明的方法提供了一个组成包含探针,稳定与一个或一个以上

的添加剂,缓冲器,辅料。

[0241] 优选地,所述组合物还含有一种或多种下列物质,包括:

[0242] 核酸酶;

[0243] 链分开活性剂;

[0244] 活化或增强具有核酸酶活性的试剂的化合物、辅助因子或辅酶;

[0245] 活化或增强链分开活性的试剂的化合物、辅助因子或辅酶。

[0246] 在另一个方面,本发明的方法提供了样品试剂靶核酸盒检测,说含有活性试剂盒数量单体探针,核酸数量的酶,并分离数量的链,探针与指示一起接触时,核酸酶和活性与样品链分离。

[0247] 在一个实施方案中,试剂盒额外含有引物,优选地引物是本文所述的二聚物寡核苷酸引物。

[0248] 工具箱包含的材料的方法进行必要的可组装方便和促进标准化处理。通常情况下,试剂盒将包括单体探针,对至少一种核酸酶,聚合酶和必要的缓冲液,以及或更多的标准。该标准可靶核酸,核酸酶或聚合酶底物,或进行数据的方法(经验)以印刷或电子形式校准需要必要的。材料是包含在套件,以及以何种形式试剂盒组件提供的,可能取决于最终的目的。例如,在使用固相技术(例如但不限于著名的“量尺”技术),其中反应的单体探针成分例如在核酸酶和聚合酶活动存放在一个坚实的底物是那么多样品接触的是核酸为靶分析存在的,例如轻易让场分析的样品在实验室设施的情况下不使用。

[0249] 应意识到一个试剂盒可能含有单一品种的探针,并从而能够显示核酸存在种靶单一的,或者可能包含探针,多物种如核酸存在的靶多个品种,可表示。在后者的实施方案可能是可取的种探针标记的不同导致的差异,因此,目前的身份更多种靶核酸的一个或可确定。但是,在其他情况下物种鉴定的具体靶核酸不是必需的,其中便没有必要差异标记的探针各物种。在优选的实施方案中,试剂盒可以包括多个品种,最好的引物二聚物引物作为本网站所介绍。应意识到单一的种(普遍)单体探针,单体探针,从而可以被用于引物各种。

[0250] 它也将是被理解的,这些材料目前在该试剂盒可以选择,使定性,半定量或定量盒评价靶的核酸存在于样品。例如,该试剂可以给二元(是/否)样品说明或更多种靶是否存在核酸的研究。在另一个例子,说明可能是半定量,例如,提供三个层次的信号-高,低和无信号。根据不同的标记,这些级别可以例如是色调相同,其中一个深色阴影表示高度中等色调的靶核酸,表示一个靶核酸水平低,与浅色或无色显示没有靶核酸目前。该试剂盒还可以提供用于信号的定量分析靶生产核酸,例如通过测量,包括实时测量。一个例子的靶核酸定量测量等提出了在这里的例子。

[0251] 方法和探针在所有情况下具有宽广的应用,其中特定核酸的存在或量杯确定。本文所述的方法应用的非限制性例子包括:

[0252] 检测微生物剂,包括病原体细菌和病毒,在这两个领域的医药和生物恐怖主义检测剂;

[0253] ii. 利什曼原虫检测的寄生虫病,例如疟疾,锥虫;

[0254] iii. 检测,歧视的目的,或量化的人类 DNA 或农业为法医或检测,歧视,或量化兽医动物或植物的 DNA

[0255] iv. 微生物检测,植物或生物虫害;

[0256] v. 生物体的转基因检测；

[0257] vi. 在第检测特定遗传等位基因或多态性。

[0258] 其目的是,提及一个数字范围的披露者外(例如1到10)也纳入参考范围内,7所有相关号码范围(例如,1,1.1,2,3,3.9,4,5,6,6.5,8,9和10),并有合理数量范围内的范围(例如2至8,1.5至5.5和3.1到4.7),因此,所有分全范围的范围明确披露均为明确披露。这些只是具体的例子是什么目的和价值列举所有可能的组合数值之间的最低值和最高将被认为是明确地说,这在类似的应用在。

[0259] 应意识到变异体的核酸,例如,对靶核酸或本单体探针,可以通过利用中的方法。

[0260] 本文使用的术语“变体”是指多核苷酸序列的残留物或多肽的具体确定不同的序列,其中一个或多个核苷酸或者氨基酸被删除,替换或补充。变异体可能是自然发生的等位基因变异体或非自然发生的变异体。变异体可能来自同一个或其他物种,可能涵盖同源,paralogues 和 orthologues。在某些实施方案中,变异体的多肽和多核苷酸发明是具有生物活性相同或相似的核苷酸这些多肽的发明或者多。术语“变种”的提述,以多核苷酸和多肽的多核苷酸包括一切形式的定义和多肽此处。

[0261] 变异多核苷酸序列最好展出至少50%,更优选至少70%,更优选至少80%,更优选至少90%,更优选至少95%,更优选至少98%,而且大多数最好至少99%的同源序列的方法,以一本发明的。身份是发现了一个核苷酸的立场比较窗口至少5,最好是至少10个核苷酸位置,最好是至少20个核苷酸的立场,最好是至少50个核苷酸的立场,更优选至少100个核苷酸位置,最最好的多核苷酸对整个长度。

[0262] 多核苷酸序列的身份可以按以下方式确定。这个题目多核苷酸序列进行比较候选人多核苷酸序列使用方案BLASTN程序(高炉组曲版本,2.2.5[2002年11月]bl2seq)在(塔蒂亚娜答Tatusova,托马斯属马登(1999),“高炉2序列-1核苷酸序列比较新的工具和S蛋白”,FEMS观测微生物莱特。174:247-250),这是可以从公开的ncbi(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)。参数bl2seq默认可以使用。

[0263] 多核苷酸序列的身份也可以计算在核苷酸序列的整个长度多的候选人之间的重叠和主体的使用全局序列比对程序(例如尼德尔曼,SB和文施,光盘(1970)j的分子。诱导法。48,443-453)。一个比对算法全面实施的Needleman-Wunsch全球被发现在该方案2000年6月使用EMBOSS针包(水稻,第朗登,和布莱斯比,甲使用EMBOSS:欧洲分子生物学开放式软件套件,遗传学趋势,第16,第6。pp.276-277),它可以从获得<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>。欧洲生物信息研究所服务器还提供了设施,以执行与浮针两个序列之间的全球路线上<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>线的。

[0264] 可选择地的GAP方案可用于计算的两个终端的差距没有惩罚的最优序列全局比对。间隙中介绍了以下文件:黄,十(1994),全球序列比对。227-235 计算机应用生物科学十。

[0265] BLASTN程序使用上述作为核苷酸多是首选的身份使用序列测定变异体根据本发明的方法。

[0266] 可选择地,变异多核苷酸对本发明的方法杂交的多核苷酸序列披露者外,或补充条件及其严格的。

[0267] 所谓“条件下杂交”严格和语法等值段,是指分子能力的多核苷酸进行杂交,以一

靶多核苷酸分子（例如一靶多核苷酸例如，固定在一个 DNA 分子或 RNA 印迹 Southern 杂交或 Northern 杂交）规定的条件下盐的浓度和温度。杂交的能力受到严格的杂交条件可以决定由最初较宽松的条件下杂交然后增加至所需的严谨。

[0268] 关于多核苷酸分子条件大于长度约 100 基地，是典型的严格的杂交不超过 25 至 30 摄氏度（例如，10℃），低于熔点温度本土双工 (T_m)（见一般，萨姆布鲁克等人。主编，1987，分子克隆，实验室手册，第二版。冷泉港出版社奥苏贝尔等人。，1987 年，出版，当前的协议在分子生物学，格林）。基地的 T_m 为 100 多核苷酸分子大于大约可以计算公式的 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G+C \text{ 的日志 (钠)})$ 。（萨姆布鲁克等人。主编，1987，分子克隆，实验室手册，第二版。冷泉港出版社博尔顿和麦卡锡，1962 年，美国国家科学院院刊 84 :1390）。典型核苷酸分子严格的条件，多长度大于 100 个基地，将杂交条件例如 prewashing SDS 溶液在南南合作的 6 倍，0.2%，直径在 65 μ 杂交，6 倍南南合作，0.2% 的 SDS 一夜之间，其次的两个洗 30 分钟在 1X 南南合作特别职务队在 65，0.1% 的 SDS 在 65 摄氏度和 0.1% 两个洗 300. 2X 南南合作，每分钟在 C

[0269] 关于多核苷酸分子有一个长度小于 100 基地，示例性严格的杂交条件的 T_m 5 至 10 度 C 以下。平均而言，长度的 T_m 一个多核苷酸分子小于 100bp 的是减少了约 (500/ 寡核苷酸长度) 摄氏度

[0270] 变异多核苷酸对本发明的方法还包括阿多核苷多核苷酸的序列不同于的方法，但指出，作为一个举足轻重的遗传密码的简并，编码一个多肽有类似活动，由编码的多肽酸的本发明的方法。一个序列改变，不改变氨基酸序列的多肽是一种“无声的变化”。除 ATG 的（蛋氨酸）和 TGG（色氨酸），其他氨基酸的密码子为同一可能会更改公认的艺术技巧，例如，密码子优化表达宿主生物体在特定。

[0271] 多核苷酸序列改变方法而产生的保守氨基酸替换在一个或几个编码的多肽氨基酸序列没有显着改变其生物活性也列入。一个熟练的工匠将制作方法知道沉默的表型氨基酸替换（见，例如，鲍伊等，1990 年，科学 247, 1306）。

[0272] 由于变异多核苷酸和多肽序列变异沉默保守换人的编码可能会决定使用（版本 2.2.5 [11 月的公开程序从现有 blast2seq 的爆破方案套件 2002]）从 NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/ 爆炸 /) 通过 tblastx 算法如前面所述。

[0273] 该变异多核苷酸序列的方法也可确定由本领域技术人员计算机为基础的方法众所周知的，使用公共域序列比对算法和序列相似性搜索工具来搜索序列数据库（GenBank 中公共领域的数据库包括，欧洲分子生物研究室，瑞士普罗特，红外等）。例如，见核酸不动产的。29 :1-10 和 11-16, 2001 例如序列的 S 网上资源。检索和相似性检索调整靶 s 评分 1 矩阵分配一个序列的比较进行分析（例如，一个查询序列）。使用序列比较算法总体评分为路线的每个。

[0274] 一个示例性的方案数据库家庭有用的顺序确定变异体是爆破方案套件（版本 2.2.5 [2002 年 11 月]），包括 BLASTN 程序，经 BLASTp, BLASTX 的，tblastn 和 tblastx，这是公开的，从 (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/ 爆炸 /) 或从美国国家生物技术信息中心 (NCBI)，国家医师医学图书馆，大厦 38A 条，室 8N805，贝塞斯达，20894 美国。NCBI 的服务器还提供了设备使用屏幕上的方案，许多数据库的公开序列。BLASTN 程序比较 1 核苷酸序列数据库查询核苷酸序列反对。经 BLASTp 比较蛋白质序列数据库。BLASTX 的查询序列的氨基酸对一

个比较一个核苷酸序列数据库查询翻译的蛋白质序列在所有阅读框反对。tBLASTN 比较阅读框。tBLASTX 蛋白质序列查询所有针对动态 1 核苷酸序列数据库翻译比较了核苷酸序列数据库中的 6 张翻译, 查询序列对 6 帧翻译的核苷酸。该方案可用于高炉使用默认参数或参数可以根据需要改变屏幕改进。

[0275] 该算法使用家庭爆炸, 包括 BLASTN 程序, 经 BLASTp 和 BLASTX 的, 是描述在 a1 出版阿尔特舒尔等., 核酸不动产的。25 :3389-3402, 1997。

[0276] 在“点击”, 以一个或多个算法, 数据库, 或 tBLASTX 序列上的同源性产生质疑序列, 经 BLASTp, BLASTX 的, tBLASTN, 类似的调整和确定序列相似部分。相似的点击率是按顺序排列的程度与序列长度的重叠。点击到一个数据库序列通常代表一个序列重叠多只质疑一小部分序列的长度。

[0277] 该 BLASTN 程序, 经 BLASTp, BLASTX 的, tBLASTN 和 tBLASTX 算法也产生“期望”的路线, 值。在期待值 (五) 表明点击数可以“预期”来搜索时偶然看到一个连续的序列数据库大小相同的含随机的。确定的期待值作为阈值的意义数据库是否击中一说明真正的相似性。例如, 一个 0.1E 值分配给一个多核苷酸击中放映解释为这意味着在一个数据库, 该数据库的大小, 人们可能会看到 0.1 匹配一致部份的序列比类似的评分只是偶然的部份。匹配的序列一致, 并有一 E 的值为 0.01 或以下, 该数据库的概率在这找到一个匹配的机会是 1% 或更少使用 BLASTN 程序, 经 BLASTp, BLASTX 的, tBLASTN 或 tBLASTX 算法。

[0278] 为了找出多核苷酸变异体最有可能被披露同等功能的序列, 进一步以电脑为基础的方法几个已知本领域技术人员。

[0279] 相关序列的多序列比对的一组可以进行与中 Clustalw (汤普森, 法学博士, 希金斯, DG 和吉布森的 TJ (1994) 中 Clustalw : 比重逐步提高, 通过多序列比对序列的敏感性, 职位的具体差距和处罚权重矩阵的选择。核酸的研究, 22 :4673-4680, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) 或 T-咖啡 (塞德里克 Notredame, 德斯蒙德克希金斯, 夏侯 Heringa, T 型咖啡 : 一个序列比对方法快速, 准确的多, j 的分子。诱导法。(2000)302 :205-217) 或堆积, 使用向上, 强成对路线 (丰和杜利特尔, 1987. 分子. Evol. 25, 351)。

[0280] 模式识别软件应用是可序列寻找图案或签名。例如, 模因 (多为启发式电磁母题) 发现一组序列的图案和签名序列, 桅 (母题比对和搜索工具) 使用这些图案, 以识别类似或在查询序列的相同图案。肥大的结果, 由于本主题的一系列路线, 以适当的统计数据可视化概述和资料。与肥大的 MEME 制定了在加州大学圣地亚哥分校。

[0281] 对于 PROSITE (贝罗奇和布赫尔, 1994 年, 核酸不动产的。22, 3583 ; 霍夫曼等人., 1999 年, 核酸不动产的。27, 215) 是一序列的 cDNA 的方法确定蛋白质的功能, 或为下一步的基因组翻译。这对于 PROSITE 数据库 (www.expasy.org/ 对于 PROSITE) 包含重要的模式生物, 是设计和配置文件, 以便它可以使用适当的计算工具, 分配一个新的序列已知的蛋白质, 以确定哪些家庭或已知的域名 (第) 的人目前在序列 (法尔凯等., 2002 年, 核酸不动产的。30, 235)。Prosearch 是一个工具, 可以搜索一个给定的序列模式或签名瑞士 PROT 和 EMBL 的数据库的。

[0282] 一个“片段序列”提供的多核苷酸此处可能指的是连续的核苷酸序列的长度是至少在 5 核苷酸。该片段可能包括至少 5 个核苷酸, 最好是至少 10 个核苷酸, 最好至少 15 个

核苷酸,最好是至少 20 个核苷酸,更优选至少 30 个核苷酸,更优选至少 50 个核苷酸,更优选至少 50 个核苷酸,最最好至少 60 个核苷酸的方法连续多核苷酸核苷酸的。

[0283] 所谓“引物”可能是指短多核苷酸,通常有一个游离的 3' OH 组,这是一个模板杂交和核苷酸用于多聚合一吸互补的靶。

[0284] 装配方法和操纵遗传结构和载体,再加上利用生物酶分子酶普遍采用的技术,包括核酸例如核糖核酸酶,核酸外切酶和限制性核酸内切酶,聚合酶,连接酶等,是众所周知的在艺术和描述人一般在萨姆布鲁克等。分子克隆:一个实验室手册,第二版。冷泉港出版社,1987;奥苏贝尔等人。1987 年当前的协议在分子生物学,格林出版)。

[0285] 该方法的各个方面,现在便显示了一个非限制的方法参照下面的例子。下面的例子描述了荧光使用标记和淬灭剂秒不过,这主要是为方便起见和不打算限制的方式在任何应用程序。如上所述,明显的是其他标记和掩蔽基团也可使用的方法。

实施例

[0286] 实施例 1- 线性单体 NCR 探针

[0287] 这个例子说明所附的数字的元素之一实施方案的方法步骤,并在链式反应,导致信号放大。应该注意的元素的顺序可以不同,它描述了本文及图 1 所示。

[0288] 该线性配置,单链多核苷酸探针显示在图 1。本实施方案是在此统称为一串联重复限制酶链式反应提供便利(的 TR-REF 的)探针。

[0289] 这个例子描述了特定的反应核酸序列。成分的使用其在的 TR-REF 的探针扩增法检测包括的 TR-REF 的探针,包括靶核酸串联重复的反向互补;一靶核酸;一种 DNA 聚合酶和至少限制性核酸内切酶。

[0290] 这将是感谢本领域技术人员,一个聚合酶的数量和组合的限制性核酸内切酶可以替代这个例子为那些使用。也将是本领域技术人员赞赏的各种方法可用于在核酸或对降解灭剂的 TR-REF 的探针在淬除了荧光团/产生一个荧光信号通过分离检测靶无论是积累多拷贝作为实施说明,在当前方案。

[0291] 例如在探针的 TR-REF 的这一实施方案描绘在图 1,包括一个靶核酸串联重复的反向互补,酶分离,接头,该内切核酸编码序列承认的限制性人工智能的 BSM 和接头的一部分这一设计的网站承认的限制性核酸内切酶最低工资条例的,就是这样,唯一的限制放在核酸序列的靶的选择是一个核苷酸的要求为地方选区期余下的适当距离,从最低工资条例余识别位点接头在目前,以生成完整的最低工资条例限制我的网站。其他限制酶的意志其他地方的探针设计上的限制。

[0292] 靶核酸应具有相应的 TR-REF 的探针互补的结合位点上,和一个游离的 3' 羟基,可以用 DNA 聚合酶延伸。核酸适当靶的例子包括(但不限于)引物秒,包括短寡核苷酸,只在靶产生的核酸存在的第二和单链靶 DNA 的裂解的一个核酸酶,这样的 3' 端可以用 DNA 聚合酶延伸。

[0293] 例如,在使用这些引物的实施方案中,靶核酸产生(直接或间接)专门在分析了存在的第二靶核酸,它是第二靶核酸是最终被检测或核酸。

[0294] 一旦产生,靶核酸是能够绑定的 TR-REF 的探针,并用 DNA 聚合酶延伸。核酸延伸了用 DNA 聚合酶靶(使用的 TR-REF 的探针作为模板)生成一个第二拷贝对靶核酸。互补

裂解的所得双链探针 / 反向的限制酶秒 (在这个例子中的 BSM 人工智能, 我和最低工资条例) 探针在的结果是降解的 TR-REF, 和两个分离的序列拷贝的靶核酸。分隔拷贝的靶核酸的游离的探针对其余片段的 TR-REF。每个拷贝, 然后可以绑定一个新的 (完整) 探针拷贝的 TR-REF 的, 并开始随后的一个回合的反应。

[0295] 在每次迭代的反应, 双打人数靶, 从而导致信号的几何扩增。

[0296] 从的 TR-REF 的反应中获得的结果示于图 4 和 5 中。反应包括 0.25 微米的 FAM/BHQ- 标记的 TR-REF 的探针 [5' -FAM 的 -GCATCGCAAAGCGGTTGCGAGACGCATGCATCGCAAAGCGGTTG-3' -BHQ- 参见图 3, 如 SEQID 号 1]; 1.25U 型的 BSM 人工智能; 1.25 我 u 的最低工资条例; 5 聚合酶 u 对 TaqDNA 片段的斯托费尔; 10mM 的氯化镁 2, 50mM 的盐; 2% 二甲基亚砷, 1mM 的数码地面电视和 200 μ M 的 dNTP 浓度, pH 值在 7.5 最后的量, 20 μ l 的 10mM 的磷酸三。0.1 罗红霉素 μ M 的加入对反应的正常化之间的荧光。如图 4 中所示, 0 摩尔, 5attomole, 50attomole、500attomole 和 5femtomole 的量的靶寡核苷酸被添加到不同的反应孵化之前在 59°C 的反应进度监测是通过测量孵化期间的票价调整机制荧光增加对课程的影响。图 5 显示了一个反复试验的地方基因组 DNA, 添加到样品。

[0297] 实施例 2- 线性单体 IRC-REF 探针

[0298] 这个例子说明的探针元素的 TR-REF 另一种形态的, 和链式反应的步骤, 从而导致信号放大也有所说明。同样应该注意的元素的顺序的不同可以从此处所述和数字显示在陪同。

[0299] 这个例子说明了特定核酸扩增检测系统替代了序列的基础上重排反应, 的该元素的 TRREF, 并在此统称为倒反向互补限制酶易化系统 (IRC-REF 的) 链式反应。该中心 -REF 的探针包括, 在 3' 端, 在核酸序列反向互补的靶, 并在 5' 端序列拷贝的靶核酸。附加组件的反应是: 靶核酸; 一种 DNA 聚合酶和至少一种限制性核酸内切酶。

[0300] 应该感谢本领域技术人员, 一个聚合酶的数量和组合的限制性核酸内切酶可以替代的例子说明了那些用于。还应人员赞赏本领域技术, 各种方法可用为探针检测 REF 的任何一方的体育馆, 积累了多个拷贝的靶核酸或降解的。

[0301] 例如在 6 描绘在图方案的实施, 在 IRC-REF 的探针包括核酸序列反向互补的靶, 以及序列拷贝的靶核酸如上所述, 点位分隔包含识别一个接头对限制性核酸内切酶 BSAXI。

[0302] 靶核酸应具有相应的 IRC-REF 的探针互补的结合位点上, 和一个游离的 3' 羟基, 可以用 DNA 聚合酶延伸。核酸适当靶的例子包括 (但不限于) 引物秒, 包括短寡核苷酸, 只在靶产生的核酸存在的第二和单链靶 DNA 的裂解的一个核酸酶, 这样的 3' 端可以用 DNA 聚合酶延伸。

[0303] 例如, 在实施方案利用这些引物时, 靶核酸产生 (直接或间接) 专门在分析了存在的第二靶核酸, 它是第二靶核酸或是最终被检测的核酸。

[0304] 一旦产生, 靶核酸是能够绑定的 IRC-REF 的探针, 并用 DNA 聚合酶延伸。核酸延伸的靶用 DNA 聚合酶模板 (的探针作为使用 IRC-REF) 呈现识别位酶点对 BSA XI 双面链, 允许有效的新合成的 DNA 裂解这一限制性核酸内切。这项结果发表在核酸的原始拷贝的靶和靶的释放核酸编码的 IRC-REF 的探针。每个拷贝, 然后可以绑定一个新的 (完整) 探针拷贝的 TR-REF 的, 并开始了随后的一轮反应。

[0305] 应意识到上述介绍的方法提供了榜样和人员的变化只在这两个领域技术和材料

所使用的技术是众所周知的。

[0306] 公开文献

[0307] Mullis.1987, United States Patent 4,683,202.Process For Amplifying Nucleic Acid Sequences.Livak et al.1998, United States Patent 5,723,591. Self-Quenching Fluorescence Probe.Gelfand et al.1993United States Patent 5,210,015.Homogenous Assay System Using The Nuclease Activity Of A Nucleic Acid Polymerase.

[0308] Barany et al.2006, United States Patent 7,014,994.Coupled Polymerase Chain Reaction-Restriction-Endonuclease Digestion-Ligase Detection Reaction Process

[0309] Fisher et al.1996, United States Patent 5,491,063.Methods For In-Solution Quenching Of Fluorescently-Labelled Oligonucleotide Probes

[0310] Kidwell.(1994), United States Patent 5,332,659.Light Emission Or Absorbance-Based Binding Assays For Polynucleic Acids

[0311] Matsumoto et al., United States Patent 6,830,889.Method Of Detecting Dna By Dna Hybridization Method With The Use Of Fluorescent Resonance Energy Transfer

[0312] Coull et al.2005, United States Patent 6,949,343 :Methods, Kits And Compositions Pertaining To Pna Molecular Beacons

[0313] Barany et al.1996, United States Patent 5,494,810 :Thermostable Ligase-Mediated Dna Amplifications System For The Detection Of Genetic Disease

[0314] Tyagi S.and Kramer F.(1996)Molecular Beacons :Probes That Fluoresce Upon Hybridization. Nat. Biotechnology. 14 :303-308.

[0315] Barany F.(1991)The Ligase Chain Reaction In A Pcr World.PCR Methods and Applications, vol. 1pp. 5-16.

[0316] Broude N.(2005)Molecular Beacons And Other Hairpin Probes.Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics.Marcel Dekker Inc.

[0317] Peffer N.,Hanvey J.,Bisi J.,Thomson S.,Hassman,F.,Noble,S. and Babiss, L.(1993)Strand Invasion Of Duplex Dna By Peptide Nucleic Acid Oligomers.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 :10648-10652

[0318] Slaitas A., Ander C., **Földes** -Papp Z, Rigler R. and Yeheskiely E. (2003) Suppression Of Exonucleolytic Degradation Of Double-Stranded Dna And Inhibition Of Exonuclease Iii By Pna.Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 22 : 1603-1605.

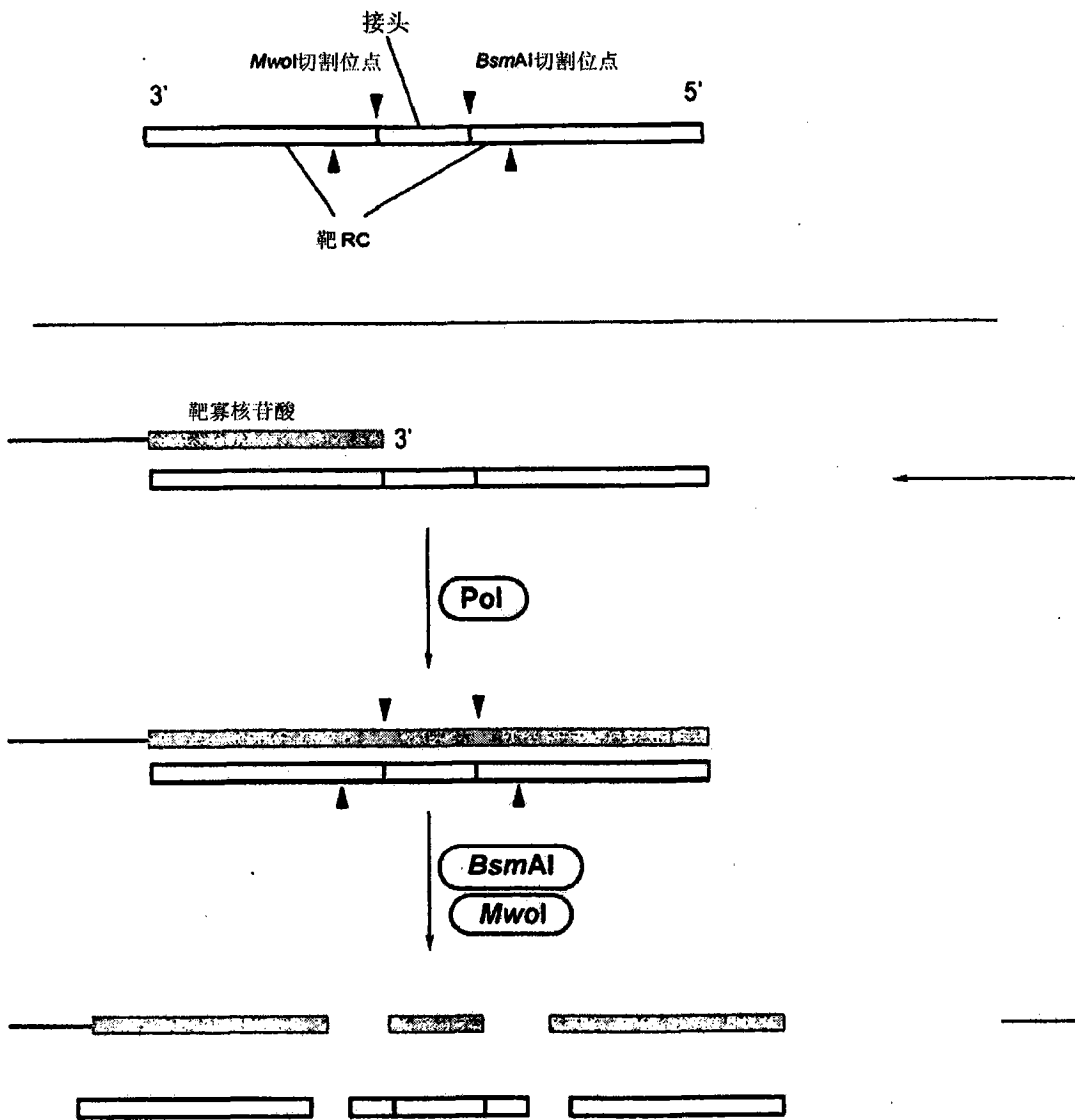


图 1

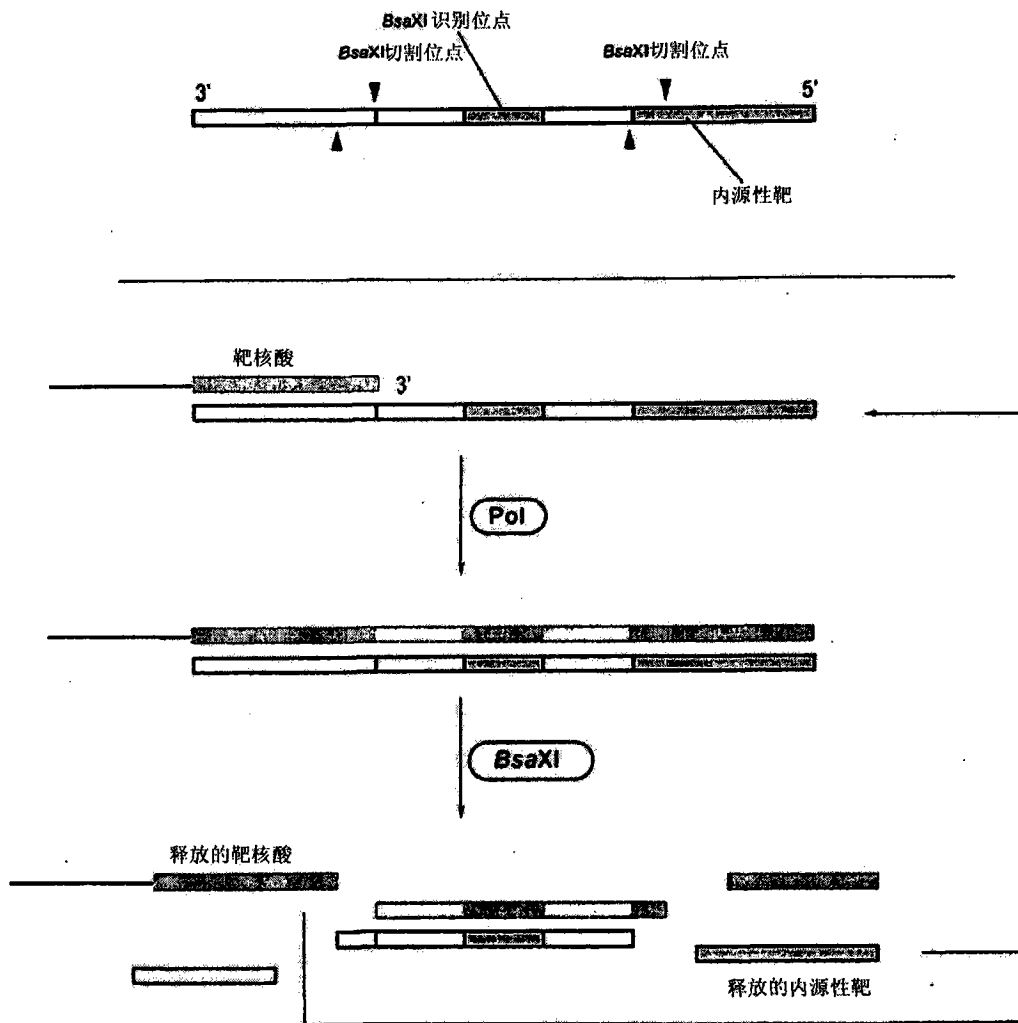


图 6

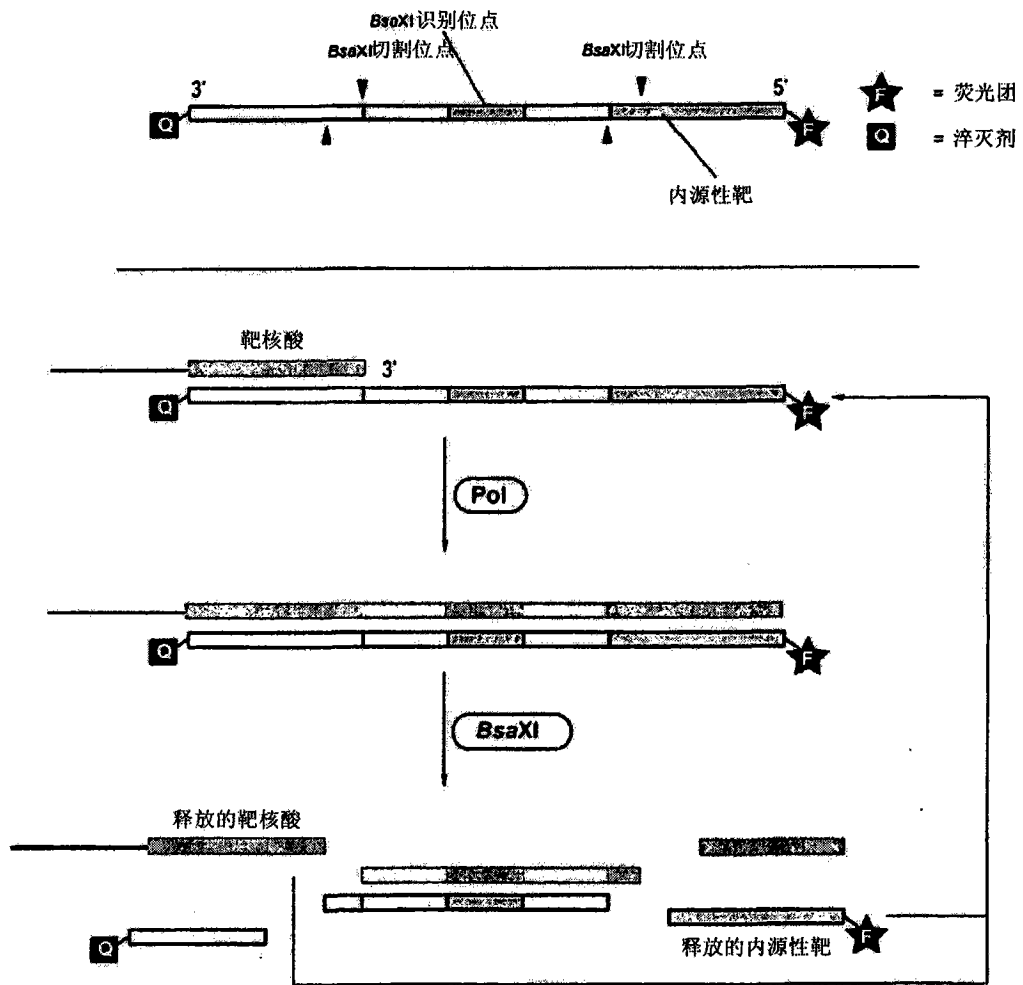


图 7