



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107429292 B
(45) 授权公告日 2021.12.17

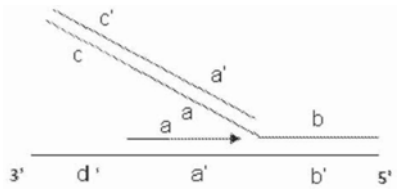
(21) 申请号 201580076131.0
(22) 申请日 2015.12.15
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107429292 A
(43) 申请公布日 2017.12.01
(30) 优先权数据
62/092,102 2014.12.15 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.14
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/065890 2015.12.15
(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/100388 EN 2016.06.23
(73) 专利权人 塞弗德公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 R·希古奇
(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 冯冲
(51) Int.Cl.
C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 1420928 A, 2003.05.28
WO 2004044240 A2, 2004.05.27
WO 02090538 A1, 2002.11.14
KR 20130107881 A, 2013.10.02
Gaolian Xu等. Cross Priming Amplification: Mechanism and Optimization for Isothermal DNA Amplification. 《SCIENTIFIC REPORTS》. 2012, 第2卷 (第246期), 第1-7页.
Cheulhee Jung等. Real-time colorimetric detection of target DNA using isothermal target and signaling probe amplification and gold nanoparticle cross-linking assay. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2011, 第26卷 (第5期), 第1953-1958页.
Claire L. Harris. Polymerase chain displacement reaction. 《BioTechniques》. 2013, 第54卷 (第2期), 第93-97页.
审查员 颜泉梅

权利要求书6页 说明书21页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称
底数大于2的指数核酸扩增

(57) 摘要
本文描述了提供高效核酸扩增的方法和组合物。在一些实施方案中，这允许每个扩增循环的扩增产物的大于2倍的增加，并因此相对于常规PCR提高了灵敏度和速度。



1. 一个用于扩增样品中靶核酸的核酸引物组, 其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链, 其中所述第二模板链与所述第一模板链互补, 所述引物组包括至少两种第一引物形式的或能够形成至少两种第一引物的寡核苷酸, 所述第一引物能够与所述第一模板链杂交, 其中所述至少两种第一引物包括第一外引物和第一内引物, 所述第一外引物是单链, 且包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a; 并且所述第一内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分, 单链部分为与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b, 其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链部分的第一链, 该第一链包含引物序列a, 其邻近于并且是单链引物序列b的5'; 和夹序列c, 其邻近于并且是引物序列a的5', 其中夹序列c不与第一链模板序列d' 互补, 所述序列d' 邻近于并且是第一链模板序列a' 的3', 并且其中所述第一内引物中结合序列c和a片段的双链形式的 T_m 大于结合序列a和b片段的双链形式的 T_m , 并且夹序列c不能在扩增过程中被复制, 其中所述引物组额外地包括至少一种第二引物, 所述第二引物能够与所述第二模板链特异性杂交, 并且其中所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为正向引物和至少一种反向引物, 或所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为反向引物和至少一种正向引物。

2. 权利要求1的引物组, 其中所述第一内引物中结合序列c和a片段比结合序列a和b片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

3. 权利要求1的引物组, 其中所述第一内引物中结合序列a和b片段比结合序列c和a片段包含更多不稳定的碱基。

4. 权利要求1至3中任一项的引物组, 其中所述第二引物包括至少两种第二引物形式的或能够形成至少两种第二引物的寡核苷酸, 所述第二引物能够与所述第二模板链杂交, 其中所述至少两种第二引物包括第二外引物和第二内引物, 所述第二外引物是单链, 且包含与第二模板链序列e' 特异性杂交的引物序列e; 并且所述第二内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分, 单链部分为与第二模板链序列f' 特异性杂交的单链引物序列f, 其中f' 邻近于并且是e' 的5', 并且其中单链引物序列f在其5' 端连接至双链部分的第一链, 该第一链包含引物序列e, 其邻近于并且是单链引物序列f的5'; 和夹序列g, 其邻近于并且是引物序列e的5', 其中夹序列g不与第二链模板序列h' 互补, 所述序列h' 邻近于并且是第二链模板序列e' 的3', 其中所述第二内引物中结合序列g和e片段的双链形式的 T_m 大于结合序列e和f片段的双链形式的 T_m 。

5. 权利要求4的引物组, 其中所述第二内引物中结合序列g和e片段比结合序列e和f片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

6. 权利要求4的引物组, 其中所述第二内引物中结合序列e和f片段比结合序列g和e片段包含更多不稳定的碱基。

7. 权利要求4的引物组, 其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $6^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

8. 权利要求4的引物组, 其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的检测所需的扩增循环少36%-66%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

9. 权利要求4的引物组, 其中夹序列g不能在扩增过程中被复制。

10. 权利要求9的引物组, 其中夹序列c和/或g包含2'-O-甲基RNA。

11. 权利要求4的引物组, 其中所述第一内引物和/或所述第二内引物的双链部分不包

含发夹序列。

12. 权利要求4的引物组,其中所述第一内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列c连接至互补序列c',和/或所述第二内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列g连接至互补序列g'。

13. 一种扩增样品中靶核酸的方法,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述方法包括:

(a) 使所述样品与以下接触:

(i) 至少两种能够与所述第一模板链杂交的第一引物,其中所述至少两种第一引物包括第一外引物和第一内引物,所述第一外引物是单链,且包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a;并且所述第一内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';和夹序列c,其邻近于并且是引物序列a的5', 其中夹序列c不与第一链模板序列d' 互补,所述序列d' 邻近于并且是第一链模板序列a' 的3';并且其中所述第一内引物中结合序列c和a片段的双链形式的 T_m 大于结合序列a和b片段的双链形式的 T_m ,并且夹序列c不能在扩增过程中被复制;和

(ii) 至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物,

其中,所述接触在其中引物退火至它们的模板链的条件下进行;以及

(b) 使用缺少5' -3' 外切核酸酶活性但包含链置换活性的DNA聚合酶扩增靶核酸以产生扩增子,所述扩增子包含从模板序列a' 延伸至所述第二引物结合位点的序列,其中所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为正向引物和至少一种反向引物,或所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为反向引物和至少一种正向引物。

14. 权利要求13的方法,其中所述第一内引物中结合序列c和a片段比结合序列a和b片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

15. 权利要求13的方法,其中所述第一内引物中结合序列a和b片段比结合序列c和a片段包含更多不稳定的碱基。

16. 权利要求13-15中任一项的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $3^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

17. 权利要求13-15中任一项的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的检测所需的扩增循环少12%-42%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

18. 权利要求13-15中任一项的方法,其中所述第二引物包括至少两种第二引物形式的或能够形成至少两种第二引物的寡核苷酸,所述第二引物能够与所述第二模板链杂交,其中所述至少两种第二引物包括第二外引物和第二内引物,所述第二外引物是单链,且包含与第二模板链序列e' 特异性杂交的引物序列e;并且所述第二内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第二模板链序列f' 特异性杂交的单链引物序列f,其中f' 邻近于并且是e' 的5', 并且其中单链引物序列f在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含引物序列e,其邻近于并且是单链引物序列f的5';和夹序列g,其邻近于并且是引物序列e的5', 其中夹序列g不与第二链模板序列h' 互补,所述序列h' 邻近于并且是第二链

模板序列e'的3',其中所述第二内引物中结合序列g和e片段的双链形式的 T_m 大于结合序列e和f片段的双链形式的 T_m 。

19.权利要求18的方法,其中所述第二内引物中结合序列g和e片段比结合序列e和f片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

20.权利要求18的方法,其中所述第二内引物中结合序列e和f片段比结合序列g和e片段包含更多不稳定的碱基。

21.权利要求18的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $6^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

22.权利要求18的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的检测所需的扩增循环少36%-66%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

23.权利要求18的方法,其中夹序列g不能在扩增过程中被复制。

24.权利要求23的方法,其中夹序列c和/或g包含2'-O-甲基RNA。

25.权利要求18的方法,其中所述第一内引物和/或所述第二内引物的双链部分不包含发夹序列。

26.权利要求18的方法,其中所述第一内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列c连接至互补序列c',和/或所述第二内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列g连接至互补序列g'。

27.一个用于扩增样品中靶核酸的核酸引物组,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述引物组包括至少三种第一引物形式的或能够形成至少三种第一引物的寡核苷酸,所述第一引物能够与所述第一模板链杂交,其中所述至少三种第一引物包括第一外引物、第一中间引物和第一内引物,所述第一外引物是单链,且包含与第一模板链序列d'特异性杂交的引物序列d;所述第一中间引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列a'特异性杂交的引物序列a,其中a'邻近于并且是d'的5',并且其中单链引物序列a在其5'端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列d,其邻近于并且是单链引物序列a的5';和夹序列c1,其邻近于并且是引物序列d的5',其中夹序列c1不与第一链模板序列i'互补,该模板序列i'邻近于并且是第一链模板序列d'的3';并且所述第一内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列b'特异性杂交的单链引物序列b,其中b'邻近于并且是a'的5',并且其中单链引物序列b在其5'端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';引物序列d,其邻近于并且是引物序列a的5';和夹序列c2,其邻近于并且是引物序列d的5',其中夹序列c2不与第一链模板序列i'互补,并且其中所述第一中间引物中结合序列c1和d片段的双链形式的 T_m 大于结合序列d和a片段的双链形式的 T_m ,并且所述第一内引物中结合序列c2、d和a片段的双链形式的 T_m 大于结合序列d、a和b片段的双链形式的 T_m ,并且夹序列c1和c2不能在扩增期间被复制,其中所述引物组还包括至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物,并且其中所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为正向引物和至少一种反向引物,或所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为反向引物和至少一种正向引物。

28.权利要求27的引物组,其中c1具有与c2不同的序列。

29.权利要求27或28的引物组,其中所述第一中间引物中结合序列c1和d片段比结合序

列d和a片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基,并且所述第一内引物中结合序列c2、d和a片段比结合序列d、a和b片段更富含GC和/或比结合序列d、a和b片段包含更多稳定的碱基。

30. 权利要求27或28的引物组,其中所述第一中间引物中结合序列d和a片段比结合序列c1和d片段包含更多不稳定的碱基,和/或所述第一内引物中结合序列d、a和b片段比结合序列c2、d和a片段包含更多不稳定的碱基。

31. 权利要求27或28的引物组,其中所述第二引物包含至少三种所述第二引物形式的或能够形成至少三种所述第二引物的寡核苷酸,所述第二引物能够与所述第二模板链杂交,其中所述至少三种第二引物包括第二外引物、第二中间引物和第二内引物,所述第二外引物是单链,且包含与第二模板链序列h' 特异性杂交的引物序列h;所述第二中间引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第二模板链序列e' 特异性杂交的单链引物序列e,其中e' 邻近于并且是h' 的5', 并且其中单链引物序列e在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列h,其邻近于并且是单链引物序列e的5';和夹序列g1,其邻近于并且是引物序列h的5', 其中夹序列g1不与第二链模板序列j' 互补,该序列j' 邻近于并且是第二链模板序列h' 的3';并且所述第二内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列f' 特异性杂交的单链引物序列f,其中f' 邻近于并且是e' 的5', 并且其中单链引物序列f在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列e,其邻近于并且是单链引物序列f的5';引物序列h,其邻近于并且是引物序列e的5';和夹序列g2,其邻近于并且是引物序列h的5', 其中夹序列g2不与第二链模板序列j' 互补,其中所述第二中间引物中结合序列g1和h片段的双链形式的 T_m 大于结合序列h和e片段的双链形式的 T_m ,并且所述第二内引物中结合序列g2、h和e片段的双链形式的 T_m 大于结合序列h、e和f片段的双链形式的 T_m 。

32. 权利要求31的引物组,其中所述第二中间引物中结合序列g1和h片段比结合序列h和e片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基,并且所述第二内引物中结合序列g2、h和e片段比结合序列h、e和f片段更富含GC和/或比结合序列h、e和f片段包含更多稳定的碱基。

33. 权利要求31的引物组,其中所述第二中间引物中结合序列h和e片段比结合序列g1和h片段包含更多不稳定的碱基,和/或所述第二内引物中结合序列h、e和f片段比结合序列g2、h和e片段包含更多不稳定的碱基。

34. 权利要求31的引物组,其中夹序列g1和g2不能在扩增期间被复制。

35. 权利要求34的引物组,其中夹序列c1和c2以及g1和g2包含2'-O-甲基RNA。

36. 权利要求31的引物组,其中:所述第一内引物和所述第一中间引物和/或所述第二内引物和所述第二中间引物的双链部分不包含发夹序列。

37. 权利要求31的引物组,其中:所述第一内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列c2连接至互补序列c2';和/或所述第一中间引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列c1连接至互补序列c1';和/或所述第二内引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列g2连接至互补序列g2';和/或所述第二中间引物的双链部分包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列g1连接至互补序列g1'。

38. 一种扩增样品中靶核酸的方法,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述方法包括:

(a) 使所述样品与以下接触:

(i) 至少三种能够与所述第一模板链杂交的第一引物,其中所述至少三种第一引物包括第一外引物、第一中间引物和第一内引物,所述第一外引物是单链,且包含与第一模板链序列d' 特异性杂交的引物序列d;所述第一中间引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a,其中a' 邻近于并且是d' 的5', 并且其中单链引物序列a在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列d,其邻近于并且是单链引物序列a的5';和夹序列c1,其邻近于并且是引物序列d的5', 其中夹序列c1不与第一链模板序列i' 互补,该序列i' 邻近于并且是第一链模板序列d' 的3';并且所述第一内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';引物序列d,其邻近于并且是引物序列a的5';和夹序列c2,其邻近于并且是引物序列d的5', 其中夹序列c2不与第一链模板序列i' 互补;并且其中所述第一中间引物中结合序列c1和d片段的双链形式的 T_m 大于结合序列d和a片段的双链形式的 T_m ,并且所述第一内引物中结合序列c2、d和a片段的双链形式的 T_m 大于结合序列d、a和b片段的双链形式的 T_m ,并且夹序列c1和c2不能在扩增期间被复制;和

(ii) 至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物,

其中,所述接触在其中引物退火至它们的模板链的条件下进行;以及

(b) 使用缺少5' -3' 外切核酸酶活性但包含链置换活性的DNA聚合酶扩增所述靶核酸以产生扩增子,所述扩增子包含从模板序列a' 延伸到所述第二引物结合位点的序列,并且其中所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为正向引物和至少一种反向引物,或所述第一引物和所述至少一种第二引物分别为反向引物和至少一种正向引物。

39. 权利要求38的方法,其中c1具有与c2不同的序列。

40. 权利要求38或39的方法,其中所述第一中间引物中结合序列c1和d片段比结合序列d和a片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基,并且所述第一内引物中结合序列c2、d和a片段比结合序列d、a和b片段更富含GC和/或比结合序列d、a和b片段包含更多稳定的碱基。

41. 权利要求38或39的方法,其中所述第一中间引物中结合序列d和a片段比结合序列c1和d片段包含更多不稳定的碱基,和/或所述第一内引物中结合序列d、a和b片段比结合序列c2、d和a片段包含更多不稳定的碱基。

42. 权利要求38或39的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $4^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

43. 权利要求38或39的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的检测所需的扩增循环少25%-55%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

44. 权利要求38或39的方法,其中所述第二引物包含至少三种所述第二引物形式的或能够形成至少三种所述第二引物的寡核苷酸,所述第二引物能够与所述第二模板链杂交,其中所述至少三种第二引物包括第二外引物、第二中间引物和第二内引物,所述第二外引物是单链,且包含与第二模板链序列h' 特异性杂交的引物序列h;所述第二中间引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分,单链部分为与第二模板链序列e' 特异性杂交的单链引物序列e,其中e' 邻近于并且是h' 的5', 并且其中单链引物序列e在其5' 端连接至双链部分的第一链,该第一链包含:引物序列h,其邻近于并且是单链引物序列e的5';和夹序列g1,其

邻近于并且是引物序列h的5'，其中夹序列g1不与第二链模板序列j'互补，该序列j'邻近于并且是第二链模板序列h'的3'；并且所述第二内引物具有单链部分和碱基互补配对的双链部分，单链部分为与第一模板链序列f'特异性杂交的单链引物序列f，其中f'邻近于并且是e'的5'，并且其中单链引物序列f在其5'端连接至双链部分的第一链，该第一链包含：引物序列e，其邻近于并且是单链引物序列f的5'；引物序列h，其邻近于并且是引物序列e的5'；和夹序列g2，其邻近于并且是引物序列h的5'，其中夹序列g2不与第二链模板序列j'互补，其中所述第二中间引物中结合序列g1和h片段的双链形式的 T_m 大于结合序列h和e片段的双链形式的 T_m ，并且所述第二内引物中结合序列g2、h和e片段的双链形式的 T_m 大于结合序列h、e和f片段的双链形式的 T_m 。

45. 权利要求44的方法，其中所述第二中间引物中结合序列g1和h片段比结合序列h和e片段更富含GC和/或包含更多稳定的碱基，并且所述第二内引物中结合序列g2、h和e片段比结合序列h、e和f片段更富含GC和/或比结合序列h、e和f片段包含更多稳定的碱基。

46. 权利要求44的方法，其中所述第二中间引物中结合序列h和e片段比结合序列g1和h片段包含更多不稳定的碱基，和/或所述第二内引物中结合序列h、e和f片段比结合序列g2、h和e片段包含更多不稳定的碱基。

47. 权利要求44的方法，其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $8^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

48. 权利要求44的方法，其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的检测所需的扩增循环少42%-72%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

49. 权利要求44的方法，其中夹序列g1和g2不能在扩增期间被复制。

50. 权利要求49的方法，其中夹序列c1和c2以及g1和g2包含2'-O-甲基RNA。

51. 权利要求44的方法，其中：所述第一内引物和所述第一中间引物和/或所述第二内引物和所述第二中间引物的双链部分不包含发夹序列。

52. 权利要求44的方法，其中：所述第一内引物的双链部分包含发夹序列，在该发夹序列中夹序列c2连接至互补序列c2'；和/或所述第一中间引物的双链部分包含发夹序列，在该发夹序列中夹序列c1连接至互补序列c1'；和/或所述第二内引物的双链部分包含发夹序列，在该发夹序列中夹序列g2连接至互补序列g2'；和/或所述第二中间引物的双链部分包含发夹序列，在该发夹序列中夹序列g1连接至互补序列g1'。

53. 权利要求13或38的方法，其中所述扩增包括PCR。

54. 权利要求13或38的方法，其中所述DNA聚合酶包含链置换活性并且是热稳定的。

55. 权利要求13或38的方法，其中所述方法包括检测和任选地定量所述靶核酸。

56. 权利要求13或38的方法，其中所述样品由来自单个细胞的核酸组成。

底数大于2的指数核酸扩增

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年12月15日提交的美国临时申请No.62/092,102的权益,所述临时申请以引用的方式全文纳入本文。

[0003] 在联邦资助的研究和开发下做出的关于发明权利的声明

[0004] 不适用。

技术领域

[0005] 本文所述的方法和组合物通常涉及核酸扩增领域。特别地,本文所述为用于增大扩增效率的方法和组合物。

背景技术

[0006] 多种核酸扩增方法是可获得的,并且许多方法已用于实现基于核酸检测的灵敏诊断测定。聚合酶链式反应(PCR)仍然是最广泛使用的DNA扩增和定量方法。巢式PCR、两步PCR用于增大PCR的特异性和灵敏度(美国专利No.4,683,195)。用于PCR扩增的巢式引物为具有与靶序列上反向引物和正向引物靶向位点之间的区域互补的序列的寡核苷酸。然而,PCR通常具有若干限制。PCR扩增在每个循环仅能够实现靶序列量的少于两倍的增加。这仍然是相对较低的。此外,该方法的灵敏度通常受限,使其难以在单个反应中检测仅以少数分子存在的靶标。

发明内容

[0007] 本文描述了基于使用新引物(例如,新的内引物)的方法和组合物,所述新引物被设计以使在扩增后产生的扩增子中维持外引物结合位点。

[0008] 本文提供了以下实施方案:实施方案1:用于扩增样品中靶核酸的核酸引物组,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述引物组包括至少两种第一引物形式的或能够形成至少两种第一引物的寡核苷酸,所述第一引物能够与所述第一模板链杂交,其中所述至少两种第一引物包括第一外引物和第一内引物,所述第一外引物包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a;并且所述第一内引物包含与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5',并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';和夹(clamp)序列c,其邻近于并且是引物序列a的5',其中夹序列c不与第一链模板序列d' 互补,所述序列d' 邻近于并且是第一链模板序列a' 的3'。

[0009] 实施方案2:实施方案1的引物组,其中所述引物组任选地包括至少一种第二引物,其能够与所述第二模板链特异性杂交。

[0010] 实施方案3:扩增样品中靶核酸的方法,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述方法包括:

[0011] (a) 使所述样品与以下接触:

[0012] (i) 至少两种能够与所述第一模板链杂交的第一引物,其中所述至少两种第一引物包括第一外引物和第一内引物,所述第一外引物包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a;并且所述第一内引物包含与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';和夹序列c,其邻近于并且是引物序列a的5', 其中夹序列c不与第一链模板序列d' 互补,所述序列d' 邻近于并且是第一链模板序列a' 的3';和

[0013] (ii) 至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物,

[0014] 其中,如果存在,所述接触在其中引物退火至它们的模板链的条件下进行;以及

[0015] (b) 在发生链置换的条件下,如果存在,使用缺少5' -3' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶扩增靶核酸以产生扩增子,所述扩增子包含从模板序列a' 延伸至所述第二引物结合位点的序列。

[0016] 实施方案4:任一前述实施方案的引物组或方法,其中所述DNA聚合酶包含链置换活性。

[0017] 实施方案5:任一前述实施方案的引物组或方法,其中双链形式的结合序列c-a的 T_m 大于双链形式的结合序列a-b的 T_m 。

[0018] 实施方案6:任一前述实施方案的引物组或方法,其中结合序列c-a比结合序列a-b更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

[0019] 实施方案7:实施方案3-6的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $3^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

[0020] 实施方案8:实施方案3-7的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的所述检测所需的扩增循环少约12%-42%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0021] 实施方案9:实施方案1、2、5或6的引物组或实施方案3-8的方法,其中所述第二引物包括至少两种第二引物形式的或能够形成至少两种第二引物的寡核苷酸,所述第二引物能够与所述第二模板链杂交,其中所述至少两种第二引物包括第二外引物和第二内引物,所述第二外引物包含与第二模板链序列e' 特异性杂交的引物序列e;并且所述第二内引物包含与第二模板链序列f' 特异性杂交的单链引物序列f,其中f' 邻近于并且是e' 的5', 并且其中单链引物序列f在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含引物序列e,其邻近于并且是单链引物序列f的5';和夹序列g,其邻近于并且是引物序列e的5', 其中夹序列g不与第二链模板序列h' 互补,所述序列h' 邻近于并且是第二链模板序列e' 的3'。

[0022] 实施方案10:实施方案9的引物组或方法,其中双链形式的结合序列g-e的 T_m 大于双链形式的结合序列e-f的 T_m 。

[0023] 实施方案11:实施方案9或10的引物组或方法,其中结合序列g-e比结合序列e-f更富含GC和/或包含更多稳定的碱基。

[0024] 实施方案12:实施方案9-11的引物组或方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达 $6^{\text{循环数}}$ 的速率扩增靶核酸。

[0025] 实施方案13:实施方案9-12的引物组或方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一

正向引物和单一反向引物的所述检测所需的扩增循环少约36%-66%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0026] 实施方案14:任一前述实施方案的引物组或方法,其中夹序列c和g,如果存在,不能在扩增过程中被复制。

[0027] 实施方案15:实施方案14的引物组或方法,其中夹序列c和/或g,如果存在,包含2'-O-甲基RNA。

[0028] 实施方案16:任一前述实施方案的引物组或方法,其中所述第一内引物和/或如果存在,所述第二内引物,其双链引物序列不包含发夹序列。

[0029] 实施方案17:实施方案3-15的引物组或方法,其中所述第一内引物的双链引物序列包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列c连接至互补序列c',和/或所述第二内引物,如果存在,其双链引物序列包含发夹序列,在该发夹序列中夹序列g连接至互补序列g'。

[0030] 实施方案18:用于扩增样品中靶核酸的核酸引物组,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述引物组包括至少三种第一引物形式的或能够形成至少三种第一引物的寡核苷酸,所述第一引物能够与所述第一模板链杂交,其中所述至少三种第一引物包括第一外引物、第一中间引物和第一内引物,所述第一外引物包含与第一模板链序列d' 特异性杂交的引物序列d;所述第一中间引物包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a,其中a' 邻近于并且是d' 的5', 并且其中单链引物序列a在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列d,其邻近于并且是单链引物序列a的5';和夹序列c1,其邻近于并且是引物序列d的5', 其中夹序列c1不与第一链模板序列i' 互补,该模板序列i' 邻近于并且是第一链模板序列d' 的3';并且所述第一内引物包含与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';引物序列d,其邻近于并且是引物序列a的5';和夹序列c2,其邻近于并且是引物序列d的5', 其中夹序列c2不与第一链模板序列i' 互补。

[0031] 实施方案19:实施方案18的引物组,其中所述引物组还包括至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物。

[0032] 实施方案20:扩增样品中靶核酸的方法,其中所述靶核酸包括第一模板链和任选的第二模板链,其中所述第二模板链与所述第一模板链互补,所述方法包括:

[0033] (a) 使所述样品与以下接触:

[0034] (i) 至少三种能够与所述第一模板链杂交的第一引物,其中所述至少三种第一引物包括第一外引物、第一中间引物和第一内引物,所述第一外引物包含与第一模板链序列d' 特异性杂交的引物序列d;所述第一中间引物包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的引物序列a,其中a' 邻近于并且是d' 的5', 并且其中单链引物序列a在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列d,其邻近于并且是单链引物序列a的5';和夹序列c1,其邻近于并且是引物序列d的5', 其中夹序列c1不与第一链模板序列i' 互补,该序列i' 邻近于并且是第一链模板序列d' 的3';并且所述第一内引物包含与第一模板链序列b' 特异性杂交的单链引物序列b,其中b' 邻近于并且是a' 的5', 并且其中单链引物序列b在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b

的5' ;引物序列d,其邻近于并且是引物序列a的5' ;夹序列c2,其邻近于并且是引物序列d的5' ,其中夹序列c2不与第一链模板序列i' 互补;以及

[0035] (ii) 至少一种能够与所述第二模板链特异性杂交的第二引物,

[0036] 其中,如果存在,所述接触在其中引物退火至它们的模板链的条件下进行;和

[0037] (b) 在发生链置换的条件下,如果存在,使用缺少5' -3' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶扩增所述靶核酸以产生扩增子,所述扩增子包含从模板序列a' 延伸到所述第二引物结合位点的序列。

[0038] 实施方案21:实施方案18-20的引物组或方法,其中所述DNA聚合酶包含链置换活性。

[0039] 实施方案22:实施方案18-21的引物组或方法,其中g1具有与g2不同的序列。

[0040] 实施方案23:实施方案18-22的引物组或方法,其中双链形式的结合序列c1-d的 T_m 大于双链形式的结合序列d-a的 T_m ,并且双链形式的结合序列c2-d-a的 T_m 大于双链形式的结合序列d-a-b的 T_m 。

[0041] 实施方案24:实施方案18-23的引物组或方法,其中结合序列c1-d比结合序列d-a更富含GC和/或包含更多稳定的碱基,结合序列c2-d-a比结合序列d-a-b更富含GC和/或比结合序列d-a-b包含更多稳定的碱基。

[0042] 实施方案25:实施方案20-24的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达4循环^{循环数}的速率扩增靶核酸。

[0043] 实施方案26:实施方案20-25的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的所述检测所需的扩增循环少约25%-55%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0044] 实施方案27:实施方案18-26的引物组或方法,其中所述第二引物包含至少三种所述第二引物形式的或能够形成至少三种所述第二引物的寡核苷酸,所述第二引物能够与所述第二模板链杂交,其中所述至少三种第二引物包括第二外引物、第二中间引物和第二内引物,所述第二外引物包含与第二模板链序列h' 特异性杂交的引物序列h;所述第二中间引物包含与第二模板链序列e' 特异性杂交的单链引物序列e,其中e' 邻近于并且是h' 的5' ,并且其中单链引物序列e在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列h,其邻近于并且是单链引物序列e的5' ;和夹序列g1,其邻近于并且是引物序列h的5' ,其中夹序列g1不与第二链模板序列j' 互补,该序列j' 邻近于并且是第二链模板序列h' 的3' ;所述第二内引物包含与第一模板链序列f' 特异性杂交的单链引物序列f,其中f' 邻近于并且是e' 的5' ,并且其中单链引物序列f在其5' 端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列e,其邻近于并且是单链引物序列f的5' ;引物序列h,其邻近于并且是引物序列e的5' ;和夹序列g2,其邻近于并且是引物序列h的5' ,其中夹序列c2不与第一链模板序列j' 互补。

[0045] 实施方案28:实施方案27的引物组或方法,其中双链形式的结合序列g1-h的 T_m 大于双链形式的结合序列h-e的 T_m ,并且双链形式的结合序列g2-h-e的 T_m 大于双链形式的结合序列h-e-f的 T_m 。

[0046] 实施方案29:实施方案27或28的引物组或方法,其中结合序列g1-h比结合序列h-e更富含GC和/或包含更多稳定的碱基,结合序列g2-h-e比结合序列h-e-f更富含GC和/或比

结合序列h-e-f包含更多稳定的碱基。

[0047] 实施方案30:实施方案27-29的方法,其中所述扩增在PCR的指数期中以最高达8循环^{指数}的速率扩增靶核酸。

[0048] 实施方案31:实施方案27-30的方法,其中所述扩增允许在比仅使用单一正向引物和单一反向引物的所述检测所需的扩增循环少约42%-72%的扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0049] 实施方案32:实施方案18-31的引物组或方法,其中夹序列c1和c2以及g1和g2,如果存在,不能在扩增期间被复制。

[0050] 实施方案33:实施方案32的引物组或方法,其中夹序列c1和c2以及g1和g2,如果存在,包含2'-O-甲基RNA。

[0051] 实施方案34:实施方案20-33的引物组或方法,其中所述第一内引物和所述第一中间引物和/或如果存在,所述第二内引物和所述第二中间引物,其双链引物序列不包含发夹序列。

[0052] 实施方案35:实施方案20-33的引物组或方法,其中:所述第一内引物的双链引物序列包含发夹序列,在该发卡序列中夹序列c2连接至互补序列c2';和/或所述第一中间引物的双链引物序列包含发夹序列,在该发卡序列中夹序列c1连接至互补序列c1';和/或所述第二内引物,如果存在,其双链引物序列包含发夹序列,在该发卡序列中夹序列g2连接至互补序列g2';和/或所述第二中间引物,如果存在,其双链引物序列包含发夹序列,在该发卡序列中夹序列g1连接至互补序列g1'。

[0053] 实施方案36:实施方案3-17或20-35的方法,其中所述扩增包括PCR。

[0054] 实施方案37:实施方案3-17或20-36的方法,其中所述DNA聚合酶包含链置换活性并且是热稳定的。

[0055] 实施方案38:实施方案3-17或20-37的方法,其中所述方法包括检测和任选地定量所述靶核酸。

[0056] 实施方案39:实施方案3-17或20-38的方法,其中所述样品由来自单个细胞的核酸组成。

[0057] 实施方案40:实施方案1-6中任一项的引物组或方法,其中结合序列a-b比结合序列c-a包含更多不稳定的碱基。

[0058] 实施方案41:实施方案9-11的引物组或方法,其中结合序列e-f比结合序列g-e包含更多不稳定的碱基。

[0059] 实施方案42:实施方案18-24的引物组或方法,其中结合序列d-a比结合序列c1-d包含更多不稳定的碱基,和/或结合序列d-a-b比结合序列c2-d-a包含更多不稳定的碱基。

[0060] 实施方案43:实施方案27-29的引物组或方法,其中结合序列h-e比结合序列g1-h包含更多不稳定的碱基,和/或结合序列h-e-f比结合序列g2-h-e包含更多不稳定的碱基。

附图说明

[0061] 图1:示意性地示出了对双链DNA模板进行的完全巢式PCR。侧翼引物如图2和图3所示。

[0062] 图2:示意性地示出了与靶核苷酸序列的一端杂交的示例性的双引物组。该组可以

是,例如正向引物组。引物序列的不同片段表示为(a,b,c);互补序列表示为(a',b',c')。模板序列3'-5'表示为d'、a'和b'。外引物(a)是单链的。内引物具有单链部分(b)和双链部分(a-c)。

[0063] 图3:示意性地示出了与图2中所示的靶核苷酸序列的相反端杂交的示例性的双引物组。该引物组可以是,例如反向引物组。引物序列的不同片段表示为(e,f,g);互补序列表示为(e',f',g')。模板序列3'-5'表示为h'、e'和f'。外引物(e)是单链的。内引物具有单链部分(f)和双链部分(a-g)。

[0064] 图4:示意性地示出了与靶核苷酸序列的一端杂交的示例性的三引物组。该引物组可以是,例如正向引物组。引物序列的不同片段表示为(a,b,c1,c2,d);互补序列表示为(a',b',c1',c2',d')。模板序列3'-5'表示为i'、d'、a'和b'。外引物(d)是单链的。中间引物具有单链部分(a)和双链部分(d-c1)。内引物具有单链部分(b)和双链部分(a-d-c2)。

[0065] 图5:示意性地示出了与图4中所示的靶核苷酸序列的相反端杂交的示例性的三引物组。该引物组可以是,例如反向引物组。引物序列的不同片段表示为(e,f,g1,g2,h);互补序列表示为(e',f',g1',g2',h')。模板序列3'-5'表示为j'、h'、e'和f'。外引物(d)是单链的。中间引物具有单链部分(e)和双链部分(h-g1)。内引物具有单链部分(f)和双链部分(e-h-g2)。

[0066] 图6A-B:示意性地示出了当具有夹序列的说明性的引物与模板杂交时,该引物的两种可选的结构。荧光猝灭剂(Q)存在于引物中的一个位置,在该位置它使模板链中对应的荧光标记(F)猝灭。在实施例1中,进行实验来测量存在或不存在夹的情况下引物和互补靶序列的 T_m 。(A)在双链形式的结合序列c-a的 T_m 大于双链形式的结合序列a-b的 T_m 时形成的结构。(B)在双链形式的结合序列c-a的 T_m 小于双链形式的结合序列a-b的 T_m 时形成的结构。

[0067] 图7A-B: (A)示意性地示出了示例性的双引物组,其中荧光猝灭剂(Q)存在于内引物中的一个位置,在该位置它使模板链中对应的荧光标记(F)猝灭。(B)在实施例2的引物延伸反应中,荧光强度作为时间的函数。三条上升迹线是具有稍微不同的夹的独立的反应;水平迹线没有外(侧翼)置换引物存在。

具体实施方式

[0068] 定义

[0069] 除非另有说明,权利要求书和说明书中使用的术语如以下所述来定义。

[0070] 术语“核酸”是指核苷酸聚合物,除非另外限定,其包含已知的天然核苷酸的类似物,所述类似物能够以与天然存在的核苷酸类似的方式发挥作用(例如杂交)。

[0071] 术语核酸包括任何形式的DNA或RNA,包括例如基因组DNA;互补DNA(cDNA),其为mRNA的DNA表现形式,通常通过信使RNA(mRNA)的逆转录或通过扩增而获得;通过合成或通过扩增产生的DNA分子;mRNA;和非编码RNA。

[0072] 术语核酸包括双链或三链核酸复合物,以及单链分子。在双链或三链核酸复合物中,核酸链不需要是共同延伸的(即双链核酸不需要在两条链的整个长度上都是双链的)。

[0073] 术语核酸也包括其任何化学修饰,例如通过甲基化和/或通过加帽。核酸修饰可包括添加向单独的核酸碱基或向作为整体的核酸引入额外的电荷、极性、氢键、静电作用和官能性的化学基团。这样的修饰可包括碱基修饰,例如2'位的糖修饰、5位的嘧啶修饰、8位的

嘌呤修饰、在胞嘧啶环外胺处的修饰、5-溴-尿嘧啶的置换、糖磷酸骨架修饰、稀有甲基配对组合例如异碱基异胞苷和异胍等。

[0074] 更具体地,在一些实施方案中,核酸可包括聚脱氧核糖核苷酸(包含2-脱氧-D-核糖)、聚核糖核苷酸(包括D-核糖)和任何其他类型的嘌呤或嘧啶碱基的N-或C-糖苷的核酸,以及包含非核苷酸骨架的其他聚合物,例如聚酰胺(例如肽核酸(PNA))和聚吗啉代聚合物(可商购自Anti-Virals公司(Corvallis,Oregon),商品为Neugene),以及其他合成的序列特异性核酸聚合物,条件是所述聚合物包含以允许碱基配对和碱基堆积的构型存在的核苷碱基,例如存在于DNA和RNA中的。术语核酸还包括锁核酸(LNA),其记载于美国专利No.6,794,499,6,670,461,6,262,490和6,770,748中,所述专利因公开了LNA而以引用的方式全文纳入本文。

[0075] 核酸可获自完全化学合成过程,例如固相介导的化学合成;可获自生物来源,例如通过从产生核酸的任何物种中分离;或可获自涉及通过分子生物学工具来操作核酸的过程,例如DNA复制、PCR扩增、逆转录;或可获自这些方法的组合。

[0076] 本文使用的术语“互补”是指两个核苷酸之间准确配对的能力;即,如果核酸给定位置处的核苷酸能够与另一核酸的核苷酸发生氢键合以形成标准碱基对,则这两种核酸被认为是在该位置彼此互补。两个单链核酸分子之间的互补可以是“部分的”,其中仅有一些核苷酸结合,或者当两个单链分子之间存在完全互补时可以是完全的。核酸链之间的互补程度对核酸链之间杂交的效率和强度具有显著影响。

[0077] “特异性杂交”是指在确定的严格条件下,在不与杂交混合物中存在的其他核苷酸序列大量结合的情况下核酸与靶核苷酸序列的结合。本领域技术人员了解,放宽杂交条件的严格度将容许序列错配。

[0078] 在一些实施方案中,在严格杂交条件下进行杂交。词语“严格杂交条件”通常是指在确定的离子强度和pH下,低于特定序列的熔解温度(T_m)约5°C至约20°C或25°C的温度范围。本文使用的 T_m 是双链核酸分子群体一半解离成单链的温度。计算核酸的 T_m 的方法是本领域公知的(参见,例如Berger and Kimmel(1987)METHODS IN ENZYMOLOGY,VOL.152:GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, San Diego:Academic Press, Inc.和Sambrook et al.(1989)MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,2ND ED.,VOLS.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory,两者因对严格杂交条件的描述而均以引用的方式纳入本文)。如标准参考文献所述,当核酸在1M NaCl水溶液中时, T_m 值的简单估算可通过以下方程式来计算: $T_m = 81.5 + 0.41(\%G+C)$ (参见例如Anderson and Young,Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION(1985))。杂交体的熔解温度(以及严格杂交的条件)受到多种因素的影响,例如引物或探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)和靶核酸的性质(DNA、RNA、碱基组成、存在于溶液中或固定的等),以及盐和其他组分的浓度(例如,存在或不存在甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇)。这些因素的影响是公知的并且在本领域的标准参考文献中被讨论。适于实现大多数序列的特异性杂交的示例性严格条件为:温度为至少约60°C,pH7下的盐浓度约0.2摩尔。根据最近邻热力学可计算寡核苷酸序列的 T_m ,如“A unified view of polymer,dumbbell,and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics”John SantaLucia,Jr.,PNAS February 17,1998vol.95no.4 1460-1465(其因该描述而以引用的方式纳入本文)中所述。

[0079] 术语“寡核苷酸”用于指相对短的核酸,其通常短于200个核苷酸,更具体地,短于100个核苷酸,最具体地,短于50个核苷酸。通常,寡核苷酸为单链DNA分子。

[0080] 术语“引物”是指在适合的条件(即在存在四种不同的三磷酸核苷和聚合试剂(例如DNA或RNA聚合酶或逆转录酶)的情况下),在适合的缓冲液中和适合的温度下,能够与核酸杂交(也称为“退火”)并且作为核苷酸(RNA或DNA)聚合反应的起始位点的寡核苷酸。引物的适合长度取决于引物的预期用途,但是引物的长度通常为至少7个核苷酸,在一些实施方案中,引物长度为10至30个核苷酸,或在一些实施方案中,引物长度为10至60个核苷酸。在一些实施方案中,引物长度可以为例如15至50个核苷酸。短引物分子通常需要更低的温度以与模板形成足够稳定的杂交复合物。引物不需要反映模板的准确序列,但是必须充分互补以与模板杂交。

[0081] 如果引物或其部分在核酸内与核苷酸序列杂交,则称引物退火至另一核酸。引物与特定核苷酸序列杂交的陈述并不意欲暗示引物完全地或排他地与该核苷酸序列杂交。例如,在一些实施方案中,本文使用的扩增引物被称为“退火至”或“特异性针对”核苷酸序列。该描述包括全部退火至核苷酸序列的引物,以及部分退火至核苷酸序列的引物。

[0082] 术语“引物对”是指一组引物,其包括与待扩增的DNA序列的5'端的互补序列杂交的5'“上游引物”或“正向引物”,以及与待扩增的序列的3'端杂交的3'“下游引物”或“反向引物”。本领域技术人员将了解,术语“上游”和“下游”或“正向”和“反向”不意欲成为限制,而是在一些实施方案中提供示例性的方向。

[0083] “探针”是这样的核酸,其能够通过一种或多种类型的化学键,一般通过互补碱基配对,通常通过氢键形成而结合至互补序列的靶核酸,从而形成双链结构。探针可用可检测标记物进行标记以使探针易于检测,特别是探针一旦与其互补靶标杂交时。或者,然而,探针可以是未标记的,但是可通过与被标记的配体直接或间接地特异性结合来检测。探针的大小可显著不同。通常,探针长度为至少7至15个核苷酸。其他探针长度为至少20、30或40个核苷酸。其他探针更长,长度为至少50、60、70、80或90个核苷酸。其他探针仍然更长,长度为至少100、150、200或更多个核苷酸。探针也可以是任意上述数值所界定的任意范围内的任何长度(例如长度为15-20个核苷酸)。

[0084] 引物或探针可与靶核苷酸序列完全互补或尚未完全互补。在一些实施方案中,引物在至少7个核苷酸的序列上,更典型地在10-30个核苷酸的序列上,以及在一些实施方案中在至少14-25个核苷酸的序列上与靶核苷酸序列的互补序列具有至少65%的同一性,在一些实施方案中具有至少75%的同一性、至少85%的同一性、至少90%的同一性、或至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性。应理解,通常希望某些碱基(例如引物的3'碱基)与靶核苷酸序列的相应碱基完全互补。在严格杂交条件下,引物和探针通常退火至靶序列。

[0085] 如本文所使用的关于引物的一部分或引物内的核苷酸序列,术语“特异性针对”核酸是指在适当的退火条件下能够特异性地退火至靶核酸的引物或核苷酸序列。

[0086] 本发明教导的扩增包括通常以模板依赖性方式使至少一种靶核酸的至少一部分复制的任何方法,包括但不限于多种用于线性地或指数地扩增核酸序列的技术。用于进行扩增步骤的示例性的方法包括PCR、基于核酸链的扩增(NASBA)、两步多重扩增、滚环扩增(RCA)等,包括其多个版本和组合,例如但不限于OLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(也称为结合链反应——CCR)、解旋酶依赖性的扩增(HDA)等。这

类技术的描述可参见Ausbel et al.;PCR Primer:A Laboratory Manual,Diffenbach, Ed.,Cold Spring Harbor Press(1995);The Electronic Protocol Book,Chang Bioscience(2002);Msuih et al.,J.Clin.Micro.34:501-07(1996);The Nucleic Acid Protocols Handbook,R.Rapley,ed.,Humana Press,Totowa,N.J.(2002);Abramson et al.,Curr Opin Biotechnol.1993Feb.;4(1):41-7,美国专利No.6,027,998;美国专利No.6,605,451,Barany et al.,PCT公开No.WO 97/31256;Wenz et al.,PCT公开No.WO 01/92579;Day et al.,Genomics,29(1):152-162(1995),Ehrlich et al.,Science 252:1643-50(1991);Innis et al.,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications, Academic Press(1990);Favis et al.,Nature Biotechnology 18:561-64(2000);and Rabenau et al.,Infection 28:97-102(2000);Belgrader,Barany,and Lubin, Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay,Sixth International Symposium on Human Identification,1995(可在万维网:promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html上获得);LCR Kit Instruction Manual, Cat.#200520,Rev.#050002,Stratagene,2002;Barany,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:188-93(1991);Bi and Sambrook,Nucl.Acids Res.25:2924-2951(1997);Zirvi et al., Nucl.Acid Res.27:e40i-viii(1999);Dean et al.,Proc Natl Acad Sci USA 99:5261-66(2002);Barany and Gelfand,Gene 109:1-11(1991);Walker et al.,Nucl.Acid Res.20:1691-96(1992);Polstra et al.,BMC Inf.Dis.2:18-(2002);Lage et al., Genome Res.2003Feb.;13(2):294-307,and Landegren et al.,Science 241:1077-80 (1988),Demidov,V.,Expert Rev Mol Diagn.2002Nov.;2(6):542-8.,Cook et al.,J Microbiol Methods.2003May;53(2):165-74,Schweitzer et al.,Curr Opin Biotechnol.2001Feb.;12(1):21-7,美国专利No.5,830,711,美国专利No.6,027,889,美国专利No.5,686,243,PCT公开No.W00056927A3和PCT公开No.W09803673A1,以及其他来源。

[0087] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个循环的以下连续步骤:使至少一种引物与至少一种靶核酸中的互补序列或基本上互补的序列退火;使用聚合酶,以模板依赖性方式合成至少一条核苷酸链;使新形成的核酸双链变性以使链分开。可重复或可不重复所述循环。扩增可包括热循环或可在等温下进行。

[0088] “巢式扩增”是指使用多于两种引物来扩增靶核酸。

[0089] “半巢式扩增”是指使用多于一种(例如两种或三种)在靶核苷酸序列的一端退火的引物。

[0090] “完全巢式扩增”是指使用多于一种在靶核苷酸序列的每一端退火的引物。

[0091] 关于巢式扩增,通过使用术语“内”、“外”和“中间”来区分在复制子的一端退火的多种引物。

[0092] “外引物”是指这样的引物,其比另一种退火到靶核苷酸序列的相同末端的引物退火到更靠近所述靶核苷酸序列的末端的序列。在一些实施方案中,外引物序列定义了从靶核酸产生的复制子的末端。在本文中,“外引物”也被称为“侧翼引物”。

[0093] “内引物”是指这样的引物,其比另一种退火到靶核苷酸序列的相同末端的引物退火到更靠近所述靶核苷酸序列的中间的序列。

[0094] 关于巢式扩增,本文使用术语“中间引物”,在所述巢式扩增中,使用至少三种退火

到靶核苷酸序列一端的引物。中间引物是退火到内引物和外引物之间的序列的引物。

[0095] 本文使用的术语“邻近于”用于指对于操作方法而言足够靠近的序列。在一些实施方案中,彼此邻近的序列是直接邻近的,没有插入的核苷酸。

[0096] “多重扩增反应”是其中同时扩增两种或多种可通过序列区分的核酸的反应。

[0097] 本文使用术语“qPCR”以指定量实时聚合酶链式反应(PCR),其还已知为“实时PCR”或“动力学聚合酶链式反应”;所有术语是指具有实时信号检测的PCR。

[0098] “试剂”广泛指除分析物(例如被分析的核酸)以外用于反应中的任何试剂。用于核酸扩增反应的示例性试剂包括但不限于缓冲液、金属离子、聚合酶、逆转录酶、引物、模板核酸、核苷酸、标记物、染料、核酸酶、dNTP等。用于酶反应的试剂包括例如底物、辅因子、缓冲液、金属离子、抑制剂和激活剂。

[0099] 本文使用的术语“标记物”是指可用于提供可检测和/或可定量信号的任何原子或分子。具体地,标记物可直接或间接连接至核酸或蛋白。可连接至探针的适合的标记物包括但不限于放射性同位素、荧光团、生色团、质量标记物、电子致密颗粒、磁性颗粒、自旋标记物、发出化学发光的分子、电化学活性分子、酶、辅因子和酶底物。

[0100] 本文使用的术语“染料”通常指吸收电磁辐射的任何有机或无机分子。

[0101] 本文使用的术语“荧光染料”通常指在被电磁辐射源(例如灯、光电二极管、激光或另一种荧光染料)辐照之后通过荧光机制发出更长波长的电磁辐射的任何染料。

[0102] 用于提高扩增效率的一般方法

[0103] 美国专利No.8,252,558和Harris et al.,BioTechniques 54:93-97(2013年2月)教导了巢式PCR形式,称为“聚合酶链置换反应”(PCDR)(这两篇文件因该描述而均以引用的方式纳入本文)。在PCDR中,当延伸从外引物发生时,外引物置换从内引物产生的延伸链,因为反应使用了具有链置换活性的聚合酶。理论上,这使得每个扩增循环的扩增产物的增加大于2倍,因此灵敏度和速度相对常规PCR提高。实际上,从巢式引物产生的每个扩增子都不再包含外引物的引物退火位点。因此,PCDR无法在非常多的循环中维持每个扩增循环的扩增产物的大于2倍的增加。为此,PCDR仅提供检测靶核酸所需要的扩增循环数(例如从约23至约20)的适度减少。相比之下,下表1表明每个循环的持续四倍化($4^{\text{循环数}}$)应将使相同扩增每个循环加倍所需的循环数减半。每个循环持续的6倍复制应在15个循环中实现,这在正常PCR中需要进行40个循环。

[0104] 表1——具有不同“碱基”的扩增程度

循环	碱基					
	2	3	4	5	6	
0	1	1	1	1	1	
1	2	3	4	5	6	
2	4	9	16	25	36	
3	8	27	64	125	216	
4	16	81	256	625	1296	
5	32	243	1024	3125	7776	
6	64	729	4096	15625	46656	
7	128	2187	16384	78125	279936	
8	256	6561	65536	390625	1679616	
9	512	19683	262144	1953125	10077696	
10	1024	59049	1048576	9765625	60466176	
11	2048	177147	4194304	48828125	3.63E+08	
12	4096	531441	16777216	2.44E+08	2.18E+09	
13	8192	1594323	67108864	1.22E+09	1.31E+10	
14	16384	4782969	2.68E+08	6.1E+09	7.84E+10	
15	32768	14348907	1.07E+09	3.05E+10	4.7E+11	
16	65536	43046721	4.29E+09	1.53E+11	2.82E+12	
17	131072	1.29E+08	1.72E+10	7.63E+11	1.69E+13	
18	262144	3.87E+08	6.87E+10	3.81E+12	1.02E+14	
19	524288	1.16E+09	2.75E+11	1.91E+13	6.09E+14	
20	1048576	3.49E+09	1.1E+12	9.54E+13	3.66E+15	
21	2097152	1.05E+10	4.4E+12	4.77E+14	2.19E+16	
22	4194304	3.14E+10	1.76E+13	2.38E+15	1.32E+17	
23	8388608	9.41E+10	7.04E+13	1.19E+16	7.9E+17	
24	16777216	2.82E+11	2.81E+14	5.96E+16	4.74E+18	
25	33554432	8.47E+11	1.13E+15	2.98E+17	2.84E+19	
26	67108864	2.54E+12	4.5E+15	1.49E+18	1.71E+20	
27	1.34E+08	7.63E+12	1.8E+16	7.45E+18	1.02E+21	
28	2.68E+08	2.29E+13	7.21E+16	3.73E+19	6.14E+21	
29	5.37E+08	6.86E+13	2.88E+17	1.86E+20	3.68E+22	
30	1.07E+09	2.06E+14	1.15E+18	9.31E+20	2.21E+23	
31	2.15E+09	6.18E+14	4.61E+18	4.66E+21	1.33E+24	
32	4.29E+09	1.85E+15	1.84E+19	2.33E+22	7.96E+24	
33	8.59E+09	5.56E+15	7.38E+19	1.16E+23	4.78E+25	
34	1.72E+10	1.67E+16	2.95E+20	5.82E+23	2.87E+26	
35	3.44E+10	5E+16	1.18E+21	2.91E+24	1.72E+27	
36	6.87E+10	1.5E+17	4.72E+21	1.46E+25	1.03E+28	
37	1.37E+11	4.5E+17	1.89E+22	7.28E+25	6.19E+28	
38	2.75E+11	1.35E+18	7.56E+22	3.64E+26	3.71E+29	
39	5.5E+11	4.05E+18	3.02E+23	1.82E+27	2.23E+30	
40	1.1E+12	1.22E+19	1.21E+24	9.09E+27	1.34E+31	

[0105] 维持每个扩增循环大于2倍的扩增产物增加的关键是设计内(巢式)引物,以使内(巢式)引物的延伸产物包含外(侧翼)引物序列。图1示出了使用正向内引物和外引物以及反向内引物和外引物进行的完全巢式PCR的方案。在内引物退火到模板时形成的“垂翼(flap)”包含外引物序列,以使从两条模板链产生的四条新链的每一条从任一正向外引物序列(或其互补序列)延伸(并包含),通过(并包含)反向外引物序列。然而,需要的不只是将外引物序列添加到内引物的5'端,因为当内引物退火时,所添加的序列也将立即退火并阻止外引物退火。这个问题的解决方案是使用额外的内引物的5'添加物(即除外引物序列以外的序列),以及与这两个序列互补的寡核苷酸,其在本文中称为“夹”。为了便于讨论,添加的序列被称为“夹序列”。该构型如图2所示。

[0107] 夹序列c与模板(d'区域)不同源。在此处,c-a/c'-a'比a-b/a'-b'更稳定。在一些实施方案中,这可通过使用序列c来实现,该序列c相对于a更长、富含GC(即比a更富含GC)、或包含一个或多个稳定碱基(当a不包含这类碱基时)或比a中更多的稳定碱基。在一些实施方案中,这可通过使用序列c来实现,该序列c相对于b更长、富含GC(即比b更富含GC)、或包含一个或多个稳定碱基(当b不包含这类碱基时)或比b中更多的稳定碱基。在一些实施方案中,稳定碱基可被包含在c-a-b的a区,以及在c'-a'的a'区以增加c-a/c'-a'相对于a-b/a'-b'。

b' 的稳定性。可选地或另外地, b可包含一个或多个不稳定的碱基, 例如肌昔。外引物保留序列a。在这种情况下, 模板中的序列a' 对外引物而言仍然是可得到的。在更高温度下, 内引物的c' -a' 夹和5' 端将比任何其他序列更快地退火, 因此c' -a' 夹不必连接至内引物以形成发夹结构。然而, 在一些实施方案中, 使用具有这种类型的发夹结构的内引物可增加反应速度。

[0108] 在一些实施方案中, 内引物中的c序列(以红色突出显示) 优选不在PCR过程中复制。如果它在PCR过程中复制, 则这些新模板将具有c' -a' 尾, 其将与内引物c-a-b/c' -a' -b' 双链体一起产生, 所述双链体会在与其他可能的结构的链置换竞争中“胜出”并且再次阻止侧翼引物序列a退火。为了阻止这种复制, 可从DNA聚合酶不能很好复制的RNA(或2' -0-甲基RNA, 其相对易于通过合成来制备) 制备红色序列。该红色序列可从能够进行碱基配对、但不能被复制的任何碱基来制备。

[0109] 在一些实施方案中, 夹寡核苷酸(a' -c') 在3' 端被阻止延伸, 例如由于缺少3' 羟基或使用化学阻断基团, 这可提高扩增的特异性。

[0110] 样品

[0111] 使用本领域已知的常规方法可从生物来源获得并制备包含核酸的样品。特别地, 可用于本文所述方法的核酸可从任何来源获得, 包括单细胞生物和高等生物如植物或非人动物, 例如犬、猫、马、灵长类动物和其他非人哺乳动物, 以及人。在一些实施方案中, 可从疑似或已知感染了病原体的个体, 疑似患有或已知患有疾病(例如癌症) 的个体, 或妊娠个体获得样品。

[0112] 通过多种标准技术的任一种, 可从细胞、体液(例如血液、血液组分、尿等) 或组织样品获得核酸。在一些实施方案中, 所述方法利用血浆、血清、脊髓液、淋巴液、腹膜液、胸膜液、口腔液和皮肤的外切片的样品; 来自呼吸道、肠道、生殖道或尿道的样品; 眼泪、唾液、血细胞、干细胞或肿瘤的样品。样品可获自活生物体或死生物体, 或来自体外培养物。示例性的样品可包括单细胞、石蜡包埋的组织样品和针穿刺活检组织。在一些实施方案中, 被分析的核酸获自单细胞。

[0113] 使用本领域公知的方法可分离目的核酸。样品核酸不需要为纯的形式, 但是通常足够纯以允许进行本文所述方法的步骤。

[0114] 靶核酸

[0115] 使用本文所述的方法可检测可通过核酸扩增检测的任何靶核酸。在典型的实施方案中, 靶核酸的至少一些核苷酸序列信息是已知的。例如, 如果使用的扩增反应是PCR, 通常可获得充分的给定靶核酸的各端的序列信息以允许设计适合的扩增引物。

[0116] 靶标可包括例如与病原体(例如病毒、细菌、原生动物或真菌) 相关的核酸; RNA, 例如那些过表达或低表达指示出疾病的RNA, 那些以组织特异性方式或发育特异性方式表达的RNA; 或由特定刺激物诱导的那些; 基因组DNA, 可分析其特异性的多态性(例如SNP)、等位基因或单倍型, 例如在基因分型中。特别感兴趣的是在遗传病或其他病理中改变(例如扩增、缺失和/或突变) 的基因组DNA; 与想要或不想要的性状相关的序列; 和/或独特地鉴定个体的序列(例如在法医学中或亲子鉴定中)。

[0117] 引物设计

[0118] 适于核酸扩增的引物足够长以在适合的核酸聚合酶存在下启动延伸产物的合成。

引物的准确长度和组成将取决于许多因素,包括例如退火反应的温度、引物的来源和组成,以及在使用探针的情况下,探针退火位点与引物退火位点的邻近度,以及引物:探针浓度比。例如,根据靶核酸序列的复杂性,寡核苷酸引物通常包含约10至约60个核苷酸,尽管它可包含更多或更少的核苷酸。引物应当充分互补以选择性地退火到它们各自的链并形成稳定的双链体。

[0119] 通常,本领域技术人员知晓如何设计能够扩增目的靶核酸的适合的引物。例如,可通过使用任何市售可得的软件或开源软件如Primer3(参见例如Rozen and Skaletsky (2000) *Meth.Mol.Biol.*, 132:365-386; www.broad.mit.edu/node/1060等)或通过访问Roche UPL网站来设计PCR引物。将扩增子序列输入到Primer3程序中,其中UPL探针序列在括号中以保证Primer3程序将在括号中的探针序列的任一侧上设计引物。

[0120] 将通过任何适合的方法来制备引物,所述方法包括例如,通过例如以下方法的直接化学合成:Narang et al. (1979) *Meth.Enzymol.* 68:90-99的磷酸三酯法;Brown et al. (1979) *Meth.Enzymol.* 68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage et al. (1981) *Tetra.Lett.*, 22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法;美国专利No.4,458,066的固体载体法等,或者可由商业来源提供引物。通过使用Sephadex柱(Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ)或本领域技术人员已知的其他方法来纯化引物。引物纯化可提高本文所述的方法的灵敏度。

[0121] 外引物

[0122] 图2示出了双引物组如何退火到靶核苷酸序列一端的第一模板链。为了便于讨论,该引物组可被认为是“正向”引物组。外引物包含与第一模板链序列a' 特异性杂交的序列a。图3示出了双引物组如何退火到靶核苷酸序列相反端的第二模板链。为了便于讨论,该引物组可被认为是“反向”引物组。在此处,外引物包含与第一模板链序列e' 特异性杂交的序列e。图4和5示出了示例性的“正向”和“反向”三引物组。在图4中,正向外引物包含与第一模板链序列d' 特异性杂交的序列d。在图5中,正向外引物包含与第一模板链序列d' 特异性杂交的序列d。通常,设计适合的外引物的考虑与设计用于常规巢式PCR的外引物的那些并无差异。值得注意的是,在一些实施方案中,相对于另一引物序列(例如内引物序列或中间引物序列)在“外”的任何引物序列的 T_m 优选比内(或中间)引物序列的 T_m 更低。因此,例如,在PCR的温度的斜线下降过程中,内引物可退火并将在外引物之前开始延伸;或者外引物的提前延伸将阻断内引物的靶位点并阻止内引物退火。更具体地,在图2所示的实施方案中,引物序列a的 T_m 低于引物序列b的 T_m 。类似地,在图3所示的实施方案中,引物序列e的 T_m 比引物序列f的 T_m 更低。在一些实施方案中, T_m 差异为至少约4°C,通常范围为约4°C至约20°C。在一些实施方案中, T_m 差异范围为约4°C至约15°C。然而,外引物的 T_m 通常足够高以保持高效PCR,例如在一些实施方案中,外引物的 T_m 为至少40°C。可通过调节序列长度、G-C含量和/或通过包含稳定或不稳定的碱基来调节 T_m 。

[0123] “稳定的碱基”包括,例如可被掺入到DNA寡核苷酸中以增加双链体稳定性的肽核酸(PNA)区段(stretch)。锁核酸(LNA)和非锁核酸(UNA)是在固相寡核苷酸合成中可容易地被掺入到DNA寡核苷酸中的RNA类似物,并且分别提高和降低双链体稳定性。适合的稳定碱基也包括提高碱基对(和因此作为整体的双链体)稳定性的经修饰的DNA碱基。这些经修饰的碱基可在固相合成过程中被掺入到寡核苷酸中,并且提供更可预测的增加DNA双链体稳定性的方法。实例包括AP-dC(G-夹)和2-氨基腺嘌呤以及5-甲基胞嘧啶和C(5)-丙炔基胞嘧

啶(置换胞嘧啶)和C(5)-丙炔基尿嘧啶(置换胸腺嘧啶)。

[0124] “不稳定的碱基”为由于形成比典型的A-T和/或G-C碱基对更不稳定的碱基对而使双链DNA不稳定的那些碱基。肌苷(I)是不稳定碱基,因为它与胞嘧啶(C)成对,但是I-C碱基对比G-C碱基对更不稳定。这种更低的稳定性是由于与G-C碱基对的三个氢键相比,肌苷是仅能够形成两个氢键的嘌呤。其他不稳定的碱基是本领域技术人员已知或易于鉴定的。

[0125] 双引物组的内引物

[0126] 对于图2,正向双引物组中的内引物包含单链引物序列b,其与第一模板链序列b'特异性杂交,其中b'邻近于并且是a'的5',并且其中单链引物序列b在其5'端连接至双链引物序列的第一链。该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';和夹序列c,其邻近于并且是引物序列a的5',其中夹序列c不与第一链模板序列d'互补,该序列d'邻近于并且是第一链模板序列a'的3'。在一些实施方案中,双链形式的结合序列c-a(本文中用连字符来表示由序列c和a组成的结合核酸序列)(即c-a/c'-a')的 T_m 大于双链形式的结合序列a-b(即a-b/a'-b')的 T_m 。这易于实现,例如通过制备比结合序列a-b更长和/或更富含GC的结合序列c-a,和/或设计结合序列c-a以比结合序列a-b包含更多稳定的碱基(“更多”的需求包括序列a-b不包含G-C碱基对和/或不包含稳定的碱基的情况)。可选地或另外地,可设计结合序列a-b以比结合序列c-a包含更多不稳定的碱基(“更多”的需求包括序列c-a不包含不稳定的碱基的情况)。在一些实施方案中,在a'-c'的3'端阻止其延伸。

[0127] 正向双引物组可与单一常规反向引物一起用于半巢式扩增,或与反向双引物组一起使用。

[0128] 对于图3,反向双引物组中的内引物包含单链引物序列f,其与第一模板链序列f'特异性杂交,其中f'邻近于并且是e'的5',并且其中单链引物序列f在其5'端连接至双链引物序列的第一链。该第一链包含:引物序列e,其邻近于并且是单链引物序列f的5';和夹序列g,其邻近于并且是引物序列e的5',其中夹序列g不与第一链模板序列h'互补,该序列h'邻近于并且是第一链模板序列e'的3'。在一些实施方案中,双链形式的结合序列g-e(即g-e/g'-e')的 T_m 大于双链形式的结合序列e-f(即e-f/e'-f')的 T_m 。这易于实现,例如通过制备比结合序列e-f更长和/或更富含GC的结合序列g-e,和/或设计(双链形式的结合序列g-e的 T_m 大于双链形式的结合序列e-f的 T_m)结合序列g-e以比结合序列e-f包含更多稳定的碱基(“更多”的需求包括序列e-f不包含G-C碱基对和/或不包含稳定的碱基的情况)。可选地或另外地,可设计结合序列e-f以比结合序列g-e包含更多不稳定的碱基(“更多”的需求包括序列g-e不包含不稳定的碱基的情况)。在一些实施方案中,在e'-g'的3'端阻止其延伸。

[0129] 在一些实施方案中,夹序列c和g,如果存在,不能在扩增期间被复制。RNA或RNA类似物(例如抗水解的RNA类似物)可用于提供所需的碱基配对以形成双链夹序列,而不在扩增期间被DNA依赖性聚合酶复制。最常见的RNA类似物是2'-O-甲基取代的RNA。其他可特异性地进行碱基配对但是无法被复制的核酸类似物包括锁核酸(LNA)或BNA(桥接核酸)、吗啉代和肽核酸(PNA)。尽管这些寡核苷酸具有不同的骨架糖,或在PNA的情况下,替代磷酸核糖的氨基酸残基,它们仍然按照Watson和Crick配对结合至RNA或DNA,但是不受核酸酶活性的影响。它们无法通过酶法来合成,只能使用亚磷酰胺策略通过合成获得,或对于PNA,通过肽合成法获得。

[0130] 如果需要,夹序列c可共价连接至互补序列c',以使从发夹结构形成a-c/a-c';然

而,这对于高效形成引物的双链夹部分而言并不是必需的。类似地,夹序列g能够但不需要共价连接至互补序列g'以使从发夹结构形成e-g/e'-g'。

[0131] 三引物组的引物

[0132] 在一些实施方案中,可在靶核酸序列的一端或两端使用第三引物以进一步增加在扩增的每个循环中产生的拷贝数。图4和图5示出了示例性的“正向”和“反向”三引物组。三引物组包括如上文所讨论的外引物和在结构上与上文讨论的内引物基本上相同的中间引物。另外的引物是内引物,其被设计以与中间引物5'的模板链杂交。

[0133] 正向三引物组中的内引物包含与第一模板链序列b'特异性杂交的单链引物序列b,其中b'邻近于并且是a'的5'。单链引物序列b在其5'端连接至双链引物序列的第一链,该第一链包含:引物序列a,其邻近于并且是单链引物序列b的5';引物序列d,其邻近于并且是引物序列a的5';和夹序列c2,其邻近于并且是引物序列d的5',其中夹序列c2不与第一链模板序列i'互补。夹序列c2可以与用于内引物的夹序列(c1)相同或不同。在优选的实施方案中,c1和c2是不同的序列。类似的考虑适用于三引物组中的内引物的设计,如上文讨论的关于双引物组中的内引物,反向三引物组(图5中所示)的内引物具有与正向三引物组中的内引物相同的结构。可在一种或多种(或全部)夹寡核苷酸(图4中的d'-c1'和a'-d'-c2',以及图5中的h'-g1'和e'-h'-g2')的3'端阻止其延伸。正向三引物组可与单一常规反向引物一起用于半巢式扩增,与反向双引物组一起使用,或与反向三引物组一起使用。

[0134] 在一些实施方案中,根据引物序列的 T_m 来控制引物退火和延伸的次序,以使相对于另一引物在“内”的任何引物在该另一引物之前退火并开始延伸。因此,例如,在双引物组中,内引物在外引物之前退火并开始延伸,在三引物组中,内引物在中间引物之前退火并开始延伸,中间引物在外引物之前退火并开始延伸。例如,在图4中所示的实施方案中,引物序列的 T_m 具有以下关系: d 的 $T_m < a$ 的 $T_m < b$ 的 T_m 。在图5中所示的实施方案中,引物序列的 T_m 具有以下关系: h 的 $T_m < e$ 的 $T_m < f$ 的 T_m 。如上文指出, T_m 是序列长度、C-G含量和任选存在的稳定和/或不稳定的碱基的函数。

[0135] 其他巢式引物可根据以上讨论的原则来设计。

[0136] 聚合酶

[0137] 公开的方法使用聚合酶进行扩增。在一些实施方案中,聚合酶是缺少5'至3'外切核酸酶活性的DNA聚合酶。在这样的条件下使用所述聚合酶,即从第一引物延伸的链可通过从第二引物延伸的正在形成的链的聚合而被置换,所述第二引物在第一引物之“外”。便利地,聚合酶能够置换与模板链互补的链,该特性被称为“链置换”。链置换导致每个模板分子合成多拷贝的靶序列。在一些实施方案中,用于公开的方法中的DNA聚合酶是高度推进性的(processive)。示例性的DNA聚合酶包括缺少5'至3'外切核酸酶活性的Taq DNA聚合酶的变体,例如Taq DNA聚合酶的Stoffel片段(ABI)、SD聚合酶(Bioron)、USPN 5474920中所述的缺少5'至3'外切核酸酶活性的突变Taq、Bca聚合酶(Takara)、Pfx50聚合酶(Invitrogen)、Tfu DNA聚合酶(Qbiogene)。如果将进行热循环(如在PCR中),则DNA聚合酶优选为热稳定的DNA聚合酶。下表2列出了可获自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)的聚合酶,其不具有5'至3'外切核酸酶活性,但是具有伴随热稳定性的链置换活性。

[0138] 表2——缺少5'至3'外切核酸酶活性的热稳定的链置换聚合酶

[0139]

聚合酶	5'→3'外切核酸酶	链置换	热稳定性
<u>Bst DNA 聚合酶, 大片段</u>	—	++++	+
<u>Bsu DNA 聚合酶, 大片段</u>	—	++	—
<u>DEEP VENT_RTM DNA 聚合酶</u>	—	++	++++

[0140]

聚合酶	5'→3'外切核酸酶	链置换	热稳定性
<u>DEEP VENT_RTM (外切-) DNA 聚合酶</u>	—	+++	++++
<u>Klenow 片段(3'→5'外切-)</u>	—	+++	—
<u>DNA 聚合酶 I, 大(Klenow)片段</u>	—	++	—
<u>M-MuLV 逆转录酶</u>	—	+++	—
<u>phi29 DNA 聚合酶</u>	—	+++++	—
<u>THERMINATORTM DNA 聚合酶</u>	—	+	++++
<u>VENT_R[®] DNA 聚合酶</u>	—	++ ^e	+++
<u>VENT_R[®] (外切-) DNA 聚合酶</u>	—	+++ ^e	+++

[0141] 在一些实施方案中,DNA聚合酶包含Taq聚合酶和拓扑异构酶的一部分之间的融合物,例如TOPOTAQTM(Fidelity Systems,Inc.)。

[0142] 也可通过使用链置换因子(例如解旋酶)来促进链置换。在存在链置换因子的情况下能够进行链置换的任何DNA聚合酶适用于所公开的方法,即使DNA聚合酶在不存在这样的因子的情况下不进行链置换。适用于本文所述方法的链置换因子包括BMRF1聚合酶辅助亚基(Tsurumi et al.,J.Virology 67(12):7648-7653(1993))、腺病毒DNA结合蛋白(Zijderveld and van der Vliet,J.Virology 68(2):1158-1164(1994))、单纯疱疹病毒蛋白ICP8(Boehmer and Lehman,J.Virology 67(2):711-715(1993);Skaliter and Lehman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(22):10665-10669(1994))、单链DNA结合蛋白(SSB; Rigler and Romano,J.Biol.Chem.270:8910-8919(1995))和小牛胸腺解旋酶(Siegel et al.,J.Biol.Chem.267:13629-13635(1992))。解旋酶和SSB的热稳定形式是可获得的,因此适用于PCR。

[0143] 扩增

[0144] 如果存在,将上述引物组与样品核酸在其中引物退火到它们的模板链的情况下接触。使用能够在所用的反应条件下进行链置换的缺少5' -3' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶来进行所需的核酸扩增方法。该扩增产生扩增子,所述扩增子包含扩增反应中所用的全部引物的序列。可将引物组以单独的寡核苷酸的形式便利地添加到扩增混合物中。例如,双引物组可由三种寡核苷酸组成(假定内引物不包含发夹结构),三引物组可由五种寡核苷酸组成

(假定内引物和中间引物都不包含发夹结构)。

[0145] 对于如上所述使用双引物组的半巢式扩增,在PCR的指数期可实现最高达 $3^{\text{循环数}}$ 的速率。使用半巢式双引物组的扩增能够将检测单拷贝核酸所需的扩增循环数减少约12%至约42%(例如减少37%)。这有助于在约23-27个扩增循环内(使用其他方法可能需要40个或更多个循环)检测生物样品中的单拷贝核酸。在一些实施方案中,半巢式双引物组PCR有助于在23、24、25、26或27个扩增循环中检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0146] 下表3示出了使用本文所述的不同实施方案来扩增单拷贝核酸至 10^{12} 拷贝所需的循环数。对于如上所述使用双引物组的完全巢式扩增,在PCR的指数期可实现最高达 $6^{\text{循环数}}$ 的速率。使用完全巢式双引物组的扩增能够将检测单拷贝核酸所需的扩增循环数减少约36%至约66%(例如减少61%)。这有助于在约13-17个扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。在一些实施方案中,完全巢式双引物组PCR有助于在13、14、15、16或17个扩增循环中检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0147] 表3——作为PCR基数(base)的函数的扩增所需的循环数的减少

PCR 基数	达到 10^{12} 拷贝所需的循环数	所需循环的减少%	减少上限 (+5%)	减少下限 (-25%)
2	39.86	na	na	na
[0148] 3	25.15	37%	42%	12%
4	19.93	50%	55%	25%
6	15.42	61%	66%	36%
8	13.29	67%	72%	42%

[0149] 对于如上所述使用三引物组的半巢式扩增,在PCR的指数期可实现最高达 $4^{\text{循环数}}$ 的速率。使用半巢式三引物组的扩增能够将检测单拷贝核酸所需的扩增循环数减少约25%至约55%(例如减少50%)。这有助于在约20个扩增循环内(使用其他方法可能需要40个或更多个循环)检测生物样品中的单拷贝核酸。在一些实施方案中,半巢式三引物组PCR有助于在18、19、20、21或22个扩增循环中检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0150] 对于如上所述使用三引物组的完全巢式扩增,在PCR的指数期可实现最高达 $8^{\text{循环数}}$ 的速率。使用完全巢式三引物组的扩增能够将检测单拷贝核酸所需的扩增循环数减少约42%至约72%(例如减少67%)。这有助于在约11-15个扩增循环内检测生物样品中的单拷贝核酸。在一些实施方案中,完全巢式三引物组PCR有助于在9、10、11、12或13个扩增循环中检测生物样品中的单拷贝核酸。

[0151] 在一些实施方案中,使用PCR来进行扩增步骤。对于运行实时PCR反应,反应混合物通常包含适合的缓冲液、范围约1至约10mM(例如范围约2至约8mM)的镁离子(Mg^{2+})来源、核苷酸、以及任选的洗涤剂 and 缓冲剂。一种适合的缓冲液的实例为浓度为约5mM至约85mM的TRIS缓冲液,优选浓度为10mM至30mM。在一个实施方案中,在反应混合物双倍强度(2X)形式下,TRIS缓冲液浓度为20mM。反应混合物的pH范围可以为约7.5至约9.0,典型pH范围为约8.0至约8.5。核苷酸的浓度范围为约25mM至约1000mM,典型的浓度范围为约100mM至约800mM。dNTP浓度的实例为100、200、300、400、500、600、700和800mM。洗涤剂如Tween 20、Triton X 100和Nonidet P40也可包含于反应混合物中。还可包含稳定剂如二硫苏糖醇(DTT,Cleland's reagent)或巯基乙醇。此外,反应混合物(master mix)可任选地包含dUTP以及尿嘧啶DNA糖基化酶(尿嘧啶-N-糖基化酶,UNG)。反应混合物可商购自美国加州福斯特市Applied Biosystems(**TaqMan®** Universal Master Mix,目录号4304437、4318157和

4326708)。

[0152] 标记策略

[0153] 在本文所述方法中可使用任何适合的标记策略。当分析反应中存在的单一扩增产物时,在扩增混合物中可使用通用检测探针。在特定的实施方案中,使用通用qPCR探针来进行实时PCR检测。适合的通用qPCR探针包括双链DNA染料,例如SYBR绿、Pico绿 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、Eva绿 (Biotinum)、溴化乙锭等 (参见Zhu et al., 1994, Anal. Chem. 66:1941-48)。

[0154] 在一些实施方案中,在扩增混合物中使用一种或多种靶特异性qPCR探针 (即特异性针对待检测的靶核苷酸序列的探针) 以检测扩增产物。通过谨慎地选择标记物,可进行分析,其中在单一反应中不同的标记物被激发和/或在不同波长下被检测 (“多重检测”)。参见例如Fluorescence Spectroscopy (Pesce et al., Eds.) Marcel Dekker, New York, (1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker, New York, (1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd ed., Academic Press, New York, (1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, New York, (1976); Indicators (Bishop, Ed.) . Pergamon Press, Oxford, 19723; 和Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Eugene (1992)。

[0155] 在一些实施方案中,在扩增混合物中使用的一种或多种引物上包含标记物可能是便利的。

[0156] 示例性的自动化和系统

[0157] 在一些实施方案中,使用自动样品处理和/或分析平台来检测靶核酸。在一些实施方案中,利用市售可得的自动分析平台。例如,在一些实施方案中,利用 **GeneXpert®** 系统 (Cepheid, Sunnyvale, CA)。

[0158] 使用GeneXpert系统来说明本文所述的方法。示例性的样品制备和分析方法如下文所述。然而,本发明不限于特定的检测方法或分析平台。本领域技术人员了解,可利用任何数量的平台和方法。

[0159] **GeneXpert®** 利用独立的单一用途的筒 (cartridge)。样品提取、扩增和检测可全部在该独立的 “筒内实验室” 内部进行 (参见, 例如美国专利5,958,349、6,403,037、6,440,725、6,783,736、6,818,185, 其中每一个都因该描述而以引用的方式全文纳入本文)。

[0160] 所述筒的部件包括但不限于包含试剂的处理室、滤器和可用于提取、纯化和扩增靶核酸的捕获工艺。阀使得液体从一个室转移到另一个室,并包含核酸裂解和过滤部件。光学窗口使得能够进行实时光学检测。反应管使得能够进行非常快的热循环。

[0161] 在一些实施方案中, **GenXpert®** 系统包括多个可扩展模块。每个模块包括多个筒, 以及样品处理和分析部件。

[0162] 在将样品添加到筒之后,样品与裂解缓冲液接触,释放的核酸结合至核酸结合基质 (substrate) (例如二氧化硅或玻璃基质)。然后除去样品上清液并在洗脱缓冲液 (例如 Tris/EDTA缓冲液) 中洗脱核酸。然后可在筒中处理洗脱物以检测本文所述的靶基因。在一些实施方案中,洗脱物用于使至少一些试剂复原,所述试剂作为冻干颗粒存在于筒中。

[0163] 在一些实施方案中,PCR用于扩增并检测存在的一种或多种靶核酸。在一些实施方案中,PCR使用具有热启动功能的Taq聚合酶,例如AptaTaq (Roche)。

[0164] 在一些实施方案中,脱机(off-line)离心用于改善使用具有低细胞内含物的样品的测定结果。将添加或不添加缓冲液的样品离心并除去上清液。然后将沉淀物重新悬浮于更少量的上清液、缓冲液或其他液体中。然后将重新悬浮的沉淀物添加到之前所述的GeneXpert[®]筒。

[0165] 试剂盒

[0166] 还考虑用于进行本文所述的方法的试剂盒。这样的试剂盒包括一种或多种可用于实施任意这些方法的试剂。试剂盒通常包括具有一种或多种盛放试剂的容器的包装,所述试剂为一种或多种分开的组合物,或任选地在试剂相容性允许的情况下为混合物。所述试剂盒也可包括其他从使用者角度而言需要的材料,例如缓冲液、稀释剂、标准品和/或任何其他可用于样品处理、清洗或进行测定的任何其他步骤的材料。

[0167] 试剂盒优选包括实施一种或多种本文所述的筛选方法的说明书。试剂盒中包含的说明书可附于包装材料上或可作为包装插入物包括在内。尽管说明书通常为书面或打印材料,但不限于此。任何能够存储这样的说明书并将其传播到终端使用者的介质都能够被利用。这样的介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、卡带、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。本文使用的术语“说明书”可包括提供说明书的互联网地址。

[0168] 实施例

[0169] 实施例1:确定“夹”寡核苷酸对引物/靶结构的影响

[0170] 进行实验,在实验中测量引物寡核苷酸(尽管被称为“引物”,它在本实验中并非如此使用)以及存在和不存在“夹”寡核苷酸的互补靶序列的 T_m 。合成的靶寡核苷酸具有5' 荧光标签(荧光素),并且引物掺入荧光猝灭基团(参见图6)。红色表明存在2' O-甲基骨架。所测试的寡核苷酸序列列于下表4。通过追踪随着温度升高和随着荧光团和猝灭剂被图6的结构中所示的最右侧双螺旋区的熔解分开而产生的荧光增加,来测量该双螺旋区的 T_m 。

[0171] 如果如图6A所示的引物结合于靶标的区域被所述夹限于b/b' 结合,则预测该区域的 T_m 比图6B中具有ab/a' b' 结合的情况下的 T_m 低得多。在下表4中列出了用于本实验和以下实验的寡核苷酸。表5中为在存在或不存在夹寡核苷酸的情况下预测和实测的引物和靶寡核苷酸的 T_m 。

[0172] 表4——使用的寡核苷酸

寡核苷酸编号	序列	类别
16140	5'ggcgcuccggaccggcgTAGGCTGGTAACCAACCGCTGAAGGCA(U01)ACGG3' (注: 小写字母= 2'-O-甲基; U01 = dabcyI 猝灭剂标记的尿嘧啶)	引物
16141	ggcgcuccggaccggcgTAGGCTGGTAACCAACCGCTGAAGGCA(U01)A-3'	引物
16142	5'TGGTTACCAGCCTACGCCGGTCCGGAGCGCC3'阻断物*	夹
16145	5'荧光素-CCGTATGCCTTCAGCGGTTGGTTACCAGCCTACGCATT3'	靶标
16146	5'荧光素-TATGCCTTCAGCGGTTGGTTACCAGCCTACGCATT3'	靶标
16147	5'CGTAGGCTGGTAACC3'	侧翼引物
16148	5'GCGTAGGCTGGTAACC3'	侧翼引物
16149	5'GCGT(A01)GGCTGGT(A01)ACC3' (A01 = 2-氨基嘌呤)	侧翼引物

[0174] *阻断物=阻断延伸的基团

[0175] 表5—— T_m 测量

引物	靶标	夹	预测的 T_m (°C)	实测的 T_m (°C)
16140	16145	无	76.4 (ab/a'b')	78.5
16141	16146	无	74.6 (ab/a'b')	78.0
16140	16145	16142	68.3 (b/b')	67.0
16141	16146	16142	62.0 (b/b')	66.5

[0178] 所有杂交体熔解分析的条件为:0.01M tris-HCl、0.05M KCl和0.006M MgCl₂。所有的寡核苷酸为1 μ M。将表4中的寡核苷酸混合物加热到95°C并缓慢冷却至45°C,使用Cepheid SmartCyclerTM监测荧光素荧光。 T_m 被测定为荧光变化率最大时的温度。

[0179] 使用软件(www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer)预测b/b'和ab/a'b'的 T_m 。实测的 T_m 与这样的结构一致:其中在夹寡核苷酸存在的情况下,靶标中的d'-a'区保持单链并可用于杂交。

[0180] 如图7A所示,也以1 μ M存在的侧翼引物(16147至16149)引起测量的 T_m 的很小差异。

[0181] 实施例II:外(侧翼)引物的延伸性

[0182] 在表6中所示的条件下,在PCR反应中测试图7A中示意性地示出的外(侧翼)引物的延伸性。

[0183] 表6

反应	侧翼引物
1	16147

2	16148
3	16149
4	无

[0185] 所有的反应包含10mM Tris-HCl, 0.125mM各dATP、dTTP、dCTP和dGTP, 0.15μM来自上表1的引物寡核苷酸16140, 0.125μM来自表1的靶寡核苷酸16145, 0.125μM来自表1的夹寡核苷酸16142, 45mM KCl, 3.5mM MgCl₂, 14单位的Ampli TaqCS, 该酶具有DNA聚合酶活性但是不具有5'至3'和3'至5'外切核酸酶活性, 以及15单位的Taq聚合酶抗体, 其提供掺入反应的温度激活的“热启动”。

[0186] 按照上表6添加0.125mM或不添加侧翼引物; 使用SmartCycler随时间监测反应, 将温度升至95℃以分开寡核苷酸, 同时激活聚合酶, 然后降低温度至60℃以使寡核苷酸退火并使任何引物延伸发生。结果示于图7B。三条上升迹线是具有稍微不同的夹的独立的反应; 水平迹线没有外(侧翼)置换引物存在。这些结果表明, 当存在外(侧翼)引物时, 发生置换猝灭剂的链置换反应。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 塞弗德公司
- [0003] Higuchi, Russell
- [0004] <120> 底数大于2的指数核酸扩增
- [0005] <130> CPHDP007W0
- [0006] <140> PCT/US2015/065890
- [0007] <141> 2015-12-15
- [0008] <150> 62/092,102
- [0009] <151> 2014-12-15
- [0010] <160> 8
- [0011] <170> PatentIn version 3.5
- [0012] <210> 1
- [0013] <211> 49
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工
- [0016] <220>
- [0017] <223> 引物
- [0018] <220>
- [0019] <221> 修饰的碱基
- [0020] <222> (1) .. (17)
- [0021] <223> 2'-O-甲基
- [0022] <220>
- [0023] <221> 修饰的碱基
- [0024] <222> (6) .. (6)
- [0025] <223> 尿嘧啶
- [0026] <220>
- [0027] <221> 修饰的碱基
- [0028] <222> (45) .. (45)
- [0029] <223> dabcy1猝灭剂标记的尿嘧啶
- [0030] <400> 1
- [0031] ggcgctccgg accggcgtag gctggtacc aaccgctgaa ggcatacgg 49
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 46
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 人工
- [0036] <220>
- [0037] <223> 引物
- [0038] <220>

[0039]	<221> 修饰的碱基
[0040]	<222> (1) .. (17)
[0041]	<223> 2'-O-甲基
[0042]	<220>
[0043]	<221> 修饰的碱基
[0044]	<222> (6) .. (6)
[0045]	<223> 尿嘧啶
[0046]	<220>
[0047]	<221> 修饰的碱基
[0048]	<222> (45) .. (45)
[0049]	<223> dabcy1猝灭剂标记的尿嘧啶
[0050]	<400> 2
[0051]	ggcgctccgg accggcgtag gctggtaacc aaccgctgaa ggcata 46
[0052]	<210> 3
[0053]	<211> 31
[0054]	<212> DNA
[0055]	<213> 人工
[0056]	<220>
[0057]	<223> 夹
[0058]	<400> 3
[0059]	tggttaccag cctacgccgg tccggagcgc c 31
[0060]	<210> 4
[0061]	<211> 38
[0062]	<212> DNA
[0063]	<213> 人工
[0064]	<220>
[0065]	<223> 靶标
[0066]	<400> 4
[0067]	ccgtatgcct tcagcggttg gttaccagcc tacgcatt 38
[0068]	<210> 5
[0069]	<211> 35
[0070]	<212> DNA
[0071]	<213> 人工
[0072]	<220>
[0073]	<223> 靶标
[0074]	<400> 5
[0075]	tatgccttca gcggttggtt accagcctac gcatt 35
[0076]	<210> 6
[0077]	<211> 15

[0078]	<212> DNA
[0079]	<213> 人工
[0080]	<220>
[0081]	<223> 侧翼引物
[0082]	<400> 6
[0083]	cgtaggctgg taacc 15
[0084]	<210> 7
[0085]	<211> 16
[0086]	<212> DNA
[0087]	<213> 人工
[0088]	<220>
[0089]	<223> 侧翼引物
[0090]	<400> 7
[0091]	gcgtaggctg gtaacc 16
[0092]	<210> 8
[0093]	<211> 16
[0094]	<212> DNA
[0095]	<213> 人工
[0096]	<220>
[0097]	<223> 侧翼引物
[0098]	<220>
[0099]	<221> 修饰的碱基
[0100]	<222> (5) .. (5)
[0101]	<223> 2-氨基嘌呤
[0102]	<220>
[0103]	<221> 修饰的碱基
[0104]	<222> (13) .. (13)
[0105]	<223> 2-氨基嘌呤
[0106]	<400> 8
[0107]	gcgtaggctg gtaacc 16

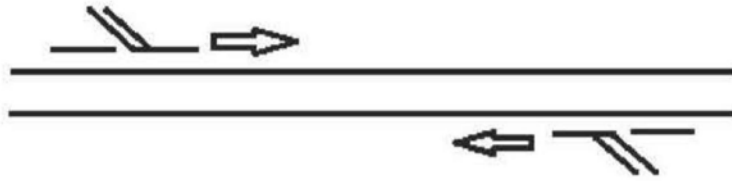


图1

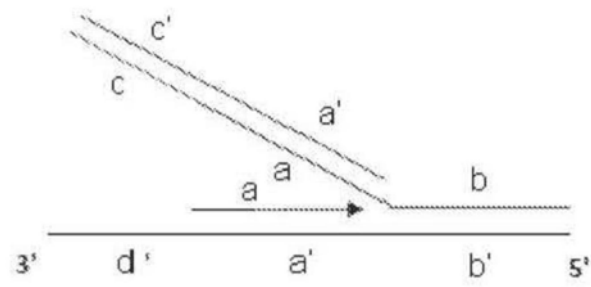


图2

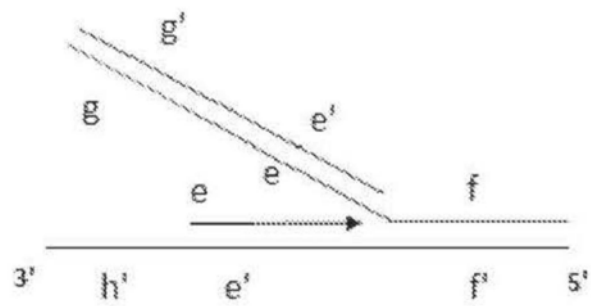


图3

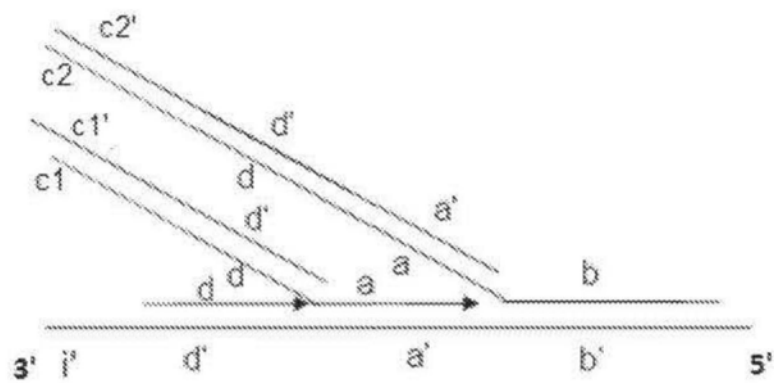


图4

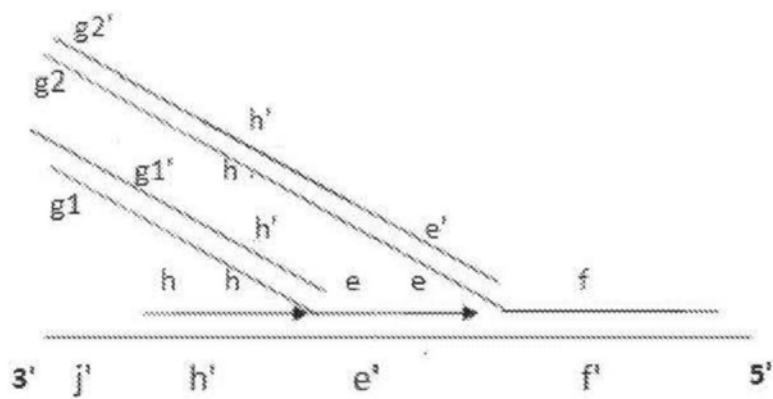


图5

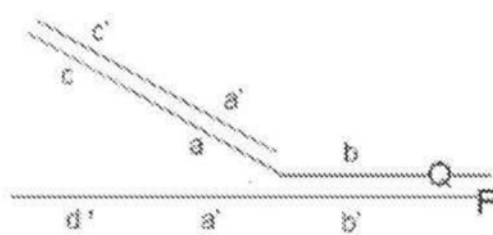


图6A

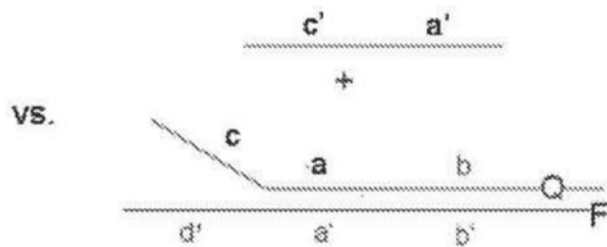


图6B

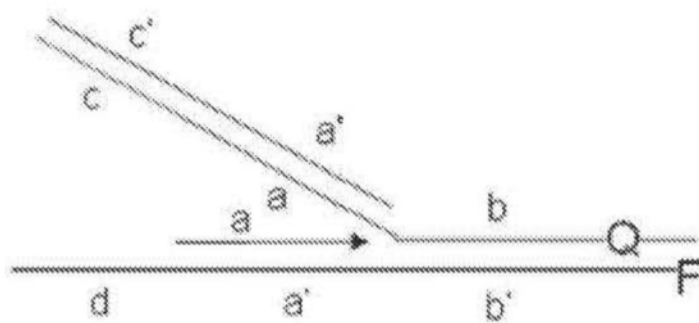


图7A

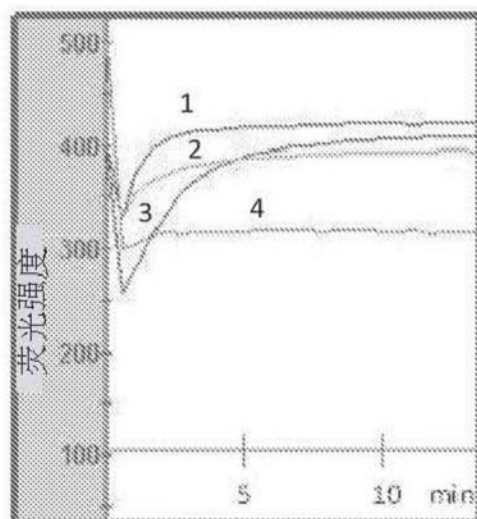


图7B