[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01822537.3

[43] 公开日 2004 年 4 月 14 日

[11] 公开号 CN 1489632A

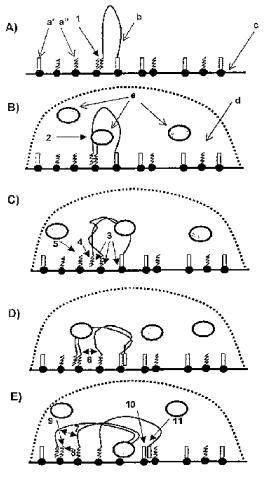
[22] 申请日 2001.12.7 [21] 申请号 01822537.3
[30] 优先权
[32] 2000.12.8 [33] EP [31] 00127011.5
[86] 国际申请 PCT/EP01/14369 2001.12.7
[87] 国际公布 WO02/46456 英 2002.6.13
[85] 进入国家阶段日期 2003.8.7
[71] 申请人 应用研究系统 ARS 股份公司
地址 荷属安的列斯群岛库拉索市
[72] 发明人 P·迈耶
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 周承泽

权利要求书 4 页 说明书 28 页 序列表 5 页
附图 10 页

[54] 发明名称 固相支持物上的核酸等温扩增

[57] 摘要

本发明揭示了一些通过固相支持物等温扩增核酸的方法。这些方法对需要高通量的应用是有用的，特别是核酸的序列测定。



ISSN1008-4274

1. 一种等温扩增至少一种含有高达 1000 个核苷酸的核酸节段的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

   a) 形成至少一种含待扩增核酸的核酸模板，其中所述的核酸在 5'端含有一寡核苷酸序列 Y，在 3'端含有一寡核苷酸序列 Z，另外该核酸在 5'端带有将所述的核酸固定于固相支持物的装置；

   b) 形成一种或多种集落引物 X，此集落引物 X 能与该寡核苷酸序列 Z 杂交，其 5'端带有将所述集落引物固定于固相支持物的装置；

   c) 将所述核酸模板和集落引物与溶液混合，此溶液在所述固相支持物存在下可通过 5'端将其固定于固相支持物上，以致核酸模板和集落引物的 5'端与所述固相支持物结合；

   d) 将含有至少一种核酸聚合酶和核苷酸前体的扩增溶液加在所述的固相支持物，以便产生和等温固定核酸，其序列与固定的核酸模板的序列相同或互补。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：将两种不同集落引物 X'和 X"与核酸模板混合，集落引物 X'和 X"的序列使得该寡核苷酸序列 Z 能与集落引物 X'中的一种杂交，该寡核苷酸序列 Y 与集落引物 X"中的一种相同。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述寡核苷酸序列 Z 与寡核苷酸序列 Y 互补，且集落引物 X 的序列与寡核苷酸序列 Y 相同。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述一种或多种集落引物 X 可包含简并引物序列，所述核酸模板包含待扩增的核酸，并且在 5'和 3'端分别不含有寡核苷酸序列 Y 或 Z。

5. 如权利要求 1 至 4 所述的方法，其特征在于：所述的核酸模板是基因组 DNA、互补 DNA、重组 DNA 或任何形式的合成或经修饰的 DNA、RNA、mRNA 或任何形式的合成或经修饰的 RNA。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述核酸模板含有的碱基为 68 与 605 个之间。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：在所述固定溶液中该核酸模板

的浓度为 1 纳摩尔和 0.01 纳摩尔之间。

8. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：所述固定溶液中该集落引物的浓度为 1000 纳摩尔和 50 纳摩尔之间。

9. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：所述核酸聚合酶是依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶或依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶。

10. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述的核酸聚合酶是 DNA 聚合酶，其活性温度在 70℃与 85℃之间。

11. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述扩增在 77℃与 81℃之间的温度进行。

12. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：所述扩增溶液的核苷酸前体是脱氧核糖核苷酸三磷酸。

13. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：将该核酸模板和该集落引物的 5'端固定的装置是可化学修饰的官能团，其可在所述分子和固相支持物之间形成共价结合。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于：该核酸模板和集落引物在 5'端的修饰用硫醇、磷酸基团或氨基修饰，并用含 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)的固定溶液固定。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于：所述固相支持物可用单或双官能团交联剂通过官能作用使核酸共价结合。

16. 如权利要求 1 至 12 所述的方法，其特征在于：将该核酸模板和该集落引物的 5'端固定的装置是通过亲和力与固定于固相支持物的分子结合的化学基团。

17. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：所述扩增溶液含有的二甲基亚砜(DMSO)在 6%与 14%之间。

18. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于：所述方法用于在固相支持物上等温产生 DNA 集落。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于：产生的核酸集落的密度在 $1000/mm^2$ 与 $100000/mm^2$ 之间。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法，其特征在于：所述方法还包括显现扩

增的核酸的额外步骤。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于：所述方法使用双链 DNA 嵌入试剂、标记核苷酸或标记寡核苷酸。

22. 如权利要求 18 至 21 所述的方法，其特征在于：所述方法还包括用化学、光学、物理学或酶学方法释放出属于一个或多个核酸集落的一条或多条固定核酸链的额外步骤。

23. 如权利要求 18 至 22 所述的方法，其特征在于：所述方法还包括进行至少一步测定一个或多个核酸集落的序列的额外步骤。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于：所述序列测定通过掺入标记核苷酸来进行。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于：利用集落引物掺入所述的标记核苷酸。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于：除了集落引物外，利用引物并通过与一个或多个扩增的核酸杂交来掺入所述的标记核苷酸。

27. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于：所述序列测定是以与属于一个或多个核酸集落的一条或两条核酸链的标记寡核苷酸杂交作为结果的。

28. 如权利要求 23 至 27 所述的方法，其特征在于：所述标记是放射性或荧光基团。

29. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于：所述序列测定是以释放权利要求 22 所述的一条或两条核酸链作为结果的。

30. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于：所述方法测定至少一个核酸集落所含的该扩增核酸模板的全部或部分序列。

31. 如权利要求 19 至 29 所述的方法，其特征在于：所述作用于一个或多个核酸集落的其它一些步骤是同时进行的。

32. 如权利要求 1 至 31 中任何一项所述方法的应用，其特征在于：所述应用用于提供以下领域进行核酸测序和重测序所用的核酸分子：基因组学、药物基因组学、药物开发、食品特性分析、基因分型、诊断、基因表达的监测、遗传多样性分布图、全基因组测序和多态性的发现或其它任何涉及核酸扩增的应用。

33.一种用于核酸等温扩增的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒包括如权利要求 1 至 31 中任何一项所述方法，用于提供以下领域进行核酸测序和重测序所用的核酸分子：基因组学、药物基因组学、药物开发、食品特性分析、基因分型、诊断、基因表达的监测、遗传多样性分布图、全基因组测序和多态性的发现或其它任何涉及核酸扩增的应用。

固相支持物上的核酸等温扩增

技术领域

本发明涉及核酸扩增领域。更具体地说，本发明涉及一种基于使用固相表面等温扩增核酸的方法及装置和试剂盒，其用于需要高通量的应用中，特别是核酸的序列测定。

发明背景

核酸测序分析已成为生物学、生物技术和医药学中许多（研究）活动的基础。测定核酸序列的能力随着开始检测人或其它高等生物大基因组序列以及例如单个核苷酸多态性(SNPs)的测定和筛选以及基因表达的监测而变得日益重要。核酸测序提供的遗传信息有着广泛应用，如药靶的发现和确认、疾病的诊断、风险评价、以及生物体鉴定和特性分析。

由于对涉及生物体、疾病或个体群的遗传信息的可靠数据的需求快速增长，因此提高测序方法的流通量变得越来越重要。这些应用的基本目的是确定属于细胞型、生物体或个体群的感兴趣核酸中包含的四种碱基腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)的序列。大多数核酸测序方法(参见 YanH 等人的评论，Science 2000，289(5486)：1890-2)可以直接(采用引物驱动的核苷酸延伸或杂交技术)或间接(通过电泳分析和/或裂解分析)确定核酸序列。然而，任何一种使用核酸序列分析的应用其科学和经济价值很大程度上取决于该方法的实际通量。

当评估测序方法的流通量时，获得分离的核酸所必须的努力构成要考虑的一个主要问题，而所得到的核酸在数量和质量上都是获得可靠结果所能接受的。含有待测序的核酸的原始样本通常不能提供作这种分析的足够材料，除非原材料的量相对高和/或加入大量的人为干预。这在以下一种情况尤为重要：当测序方法需要数百纳克分离的 DNA 序列时，法医的或存档的 DNA 标本，或者由特定细胞类型获得的 mRNA 样本必须要用纳克或更少的总基因组 DNA 为原材料来进行。

为了解决这一问题，采用的主要方案是通过只产生感兴趣核酸片段的几个拷贝来扩增 DNA 序列。一般来说，核酸的扩增需要重复一系列动作：

a) 提供第一核酸(模板)，其含有感兴趣的序列；

b) 提供第二核酸(引物)，至少在其 3'端含有与第一核酸所含的序列互补并毗邻于感兴趣的序列 3'端或在其内部的一个序列；

c) 提供使模板和引物可在至少这两个核酸互补区内转换为单链分子的条件；

d) 提供位于模板和引物内的互补序列之间可以进行杂交的条件；

e) 提供一核酸聚合酶，其能够按照 Watson 和 Crick 碱基配对原则(A-T、或 A-U 和 C-G)从杂交引物 3'端开始合成模板区互补链；

f) 使所得的双链核酸(一条链属于原来的模板，另一条链含有融合于该核苷酸可延伸的该模板区互补的序列的引物)的分离，以致每条链都可成为另一次杂交和聚合的模板。

通常，还在扩增反应中加入第二引物，使它与毗邻或在感兴趣序列内部的部分新合成的链杂交来引发聚合反应。如果使用的两种引物各自对一条互补链具有特异性，则重复这些循环可以合成多个模板序列的双链拷贝，所述模板位于用来与引物杂交的序列之间。另外，如果只提供一种引物，就会产生多个单链拷贝。

关键一点是要连续恢复可使原始和新合成的链去杂交（dehybridization）以及它们与游离引物分子杂交以重新引发聚合反应并快速产生所需量的特异性核酸序列的条件。引物分子的浓度通常比模板分子高得多，故可支持扩增过程的指数动力学。

通常，核酸分子单链和双链形式之间的转换通过升高或降低进行扩增过程的系统的温度来实现。在这一范围内，扩增所需的元件(模板、引物、核酸聚合酶、核苷酸、盐)要经受外部装置产生的一系列加热和冷却阶段。

这样一种方法通常称为热循环，用于公知技术聚合酶链式反应(PCR，Taylor GR，“PCR：a Practical approach”中的“Polymerase chain reaction：basic principles and automation”，Mcpherson MJ 等人编辑，牛津大学出版社，1991)，聚合酶链式反应按准确次序和预定时间实施下列步骤：

a) 变性(90℃-95℃ 30-60 秒)。外部装置（以热的形式）提供所需要的

能量，这一能量使核酸分子运动水平上升到足以打破稳定双链构型的非共价键相互作用。如果模板和引物已经以单链形式存在，在第一次循环中可省略这一步，但后面的全部循环绝对需要该步骤。

b) 杂交(35℃-80℃ 30-90 秒)。一旦温度下降，引物和模板分子所含的互补序列就可以进行杂交。此温度必须小心控制，以避免只有有限同源性的分子杂交，每一次杂交都要计算这一温度，因为它是进入引物和模板互补区的核酸序列长度和 C/G 含量的函数。

c) 延伸(60℃-85℃ 60-180 秒)。实际产生新核酸分子只有这一步。进行延伸的温度是所选聚合酶的函数，除了少数情况外，它与杂交温度不同。常用的聚合酶一般一分钟或数分钟内就可以使新合成的链完成延伸，这取决于待扩增的核酸的长度。直到这样的延伸链至少部分不再由于延伸从而导致双链分子释放出单链分子，才会发生新引发事件。

为了有足够的核酸量作进一步分析，通常会重复这些步骤 15-40 次，之后，PCR 扩增由于聚合酶耗尽一般会达到一平台。

即使根据 PCR 的基本方案研究了许多不同的技术、策略和反应条件，但由于 PCR 有以下一系列具体的要求而使其使用受到严重限制：

a) 一加热和冷却装置；

b) 一聚合酶，即使在核酸变性所要求的高温下进行多次循环后，它仍然要保留高进行性和准确性；

c) 扩增过程分成多次循环，使得聚合没有连续性，而与热循环过程同步进行。核酸聚合反应无法以连续的方式实现，因为它规则地被中断来重建游离引物和模板分子之间杂交所需的条件，从而减慢了整个过程。

现有技术公开了各种解决方案，克服了经典的 PCR 的这样一些限制，特别是提供了一些可供选择的方法，无需热循环就可以在等温条件下进行链的分离和杂交。

链置换扩增(Strand Diplacement Amplification，SDA)是一种等温核酸扩增和检测方法，该方法利用聚合酶与内切核酸酶共轭，内切核酸酶只切割聚合的链，使聚合酶置换这条链而产生一条新的聚合链(EP 497272；walker GT，

PCR methods Appl. 1993，3(1)：1-6)。这种技术基于重复单链的切割、延伸和置换步骤，已被广泛采用(WO/96/23904；Westin L 等人，Nat Biotechnol 2000，18(2)：199-204)，但这种方法的应用也有限制。内切核酸酶必须与聚合酶一起加入，所以整个过程可进行的许可温度范围就会限制在两种酶都可保持活性的温度。就内切核酸酶而言，这样一个温度范围(通常为 25℃-50℃)通常太低，以致无法避免引物与模板的非特异性杂交，导致大部分反应是非生产性的，或者产生不希望的产物。而且，作为引物和/或模板的核酸可能必须被再次修饰，因为强制要求待扩增的模板区必须不存在内切核酸酶解识别位点，而引物序列则必须始终有该识别位点。

另一种技术是滚环扩增(Rolling Circle Amplification，RCA)，其利用 DNA 聚合酶在等温条件下以线性或几何动力学延伸循环寡核苷酸探针，作为链置换事件的复合型式的结果产生 DNA 分子的串联连接拷贝来进行扩增(Walter NG 和 StrunkG，Proc Natl Acad Sci USA 1994，91(17)：7937-41；WO 94/03624)。在此情况下，即使该技术已有不同的应用(WO 97/19193，Isaksson A 和 Landegren U，Curr Opin Biotechnol 1999，10（1)：11-5)，但这样一些技术同样存在着一些限制，例如，循环分子的使用和扩增分子的产生，并非作为单个实体而是作为一系列分子，其含有可变数目的原序列拷贝，相互间串联连接。

也有人开发了其它技术，通过在含有 RNA 聚合酶、核糖核酸酶、和逆转录酶的多种酶等温反应产生中间 DNA-RNA 杂交体来解决该问题(WO 91/04340，WO 92/08800，WO 97/04126；Gebinoga M 和 Oehlenschlager F，Eur J Biochem 1996，235(1-2)：256-61)。显然，采用这些方法可能遇到某些问题，既涉及 RNA 快速降解，又涉及寻找使所有组分在反应中正确运作，同时保持扩增过程的特异性和速度的条件的复杂性。

即使这些扩增技术有助分析极少量的核酸序列，但核酸测序方法的流通量不仅与有足够的可利用来进行处理和获得可靠信息的核酸量有关，而且与能否快速处理多个样本以及加入有限的人为干预有关。现在，大部分遗传信息仍然使用诸如凝胶电泳等技术来获得，这些技术繁重、费力、不容易自动化以及需要相当大的装置。而且，这些方法通常只能单独处理每一个待测序的核酸实体。所以人们开发了许多技术提供具体的解决方案，以便可以平行

分析多个不同的核酸。

在现有技术中，增加通量的常用方法是用固相支持物平行处理许多样本，一般称作“DNA 微阵列”或“DNA 芯片”，将核酸固定在微阵列或芯片上，然后用不同方法包括标记的单核苷酸或标记的核酸加以分析(Southern E 等人，Nat Genet. 1999，21(1 Suppl)：5-9；Lockhart DJ 和 Winzeler EA，Nature 2000，405(6788)：827-36)。大分子(例如长度超过 500 个核苷酸的分子)和较小分子如寡核苷酸引物，可通过物理和化学方式非特异性或者在一端用特异性化学基团以共价方式有效地连接于固相支持物(Adessi C 等人，Nucleic Acids Res 2000，28(20)：E87；Okamoto T 等人，Nat Biotechnol 2000，18(4)：438-41)。将合适的机器人技术、基于微机械的系统与显微镜技术结合，使得每平方厘米支持物有高达数百万个核酸有序沉积并加以分析在技术上是可行的。

采用类似的方法通过将引物或模板分子固定可进行引物延伸反应(WO 91/13075，WO 00/47767)。另外，可将引物移植到一表面，与溶液中的游离引物共轭，从而使 PCR 产物扩增并附着于该表面(Andreadis JD 和 Chrisey LA，Nucleic Acids Res 2000，28(2)：e5)。引物还可以固定在一基质上，而模板分子可在一温度范围(58℃-74℃)内保持在液相中，这样可以很随机和不受控的方式在单/双链形式之间作出平衡以及使单个碱基延伸(Dubiley S 等人，Nucleic Acids Res 1999，27(18)：e19)。

这些技术的主要缺点是每一种应用都必须先设计和制造 DNA 芯片，其操作相当冗长、复杂和昂贵，所以只有当芯片需求量很大时才担负得起。还有，这些芯片通常只用于杂交和/或单个碱基延伸，不能重复使用，每个芯片每次只能处理一个核酸样本(Cheung VG 等人，Nat Genet. 1999，21(1 Suppl)：15-9；Bowtell DD，Nat Genet. 1999，21(1 Suppl)：25-32)。

最近开发的其它技术通过将扩增和测序两个过程更有效地结合起来在一定程度上至少部分解决了涉及扩增与测序流通量的问题。

WO 96/04404(Mosaic Technologies Inc.)公开了样本中可能含有的靶核酸的检测方法。这种方法包括只在测试样本中存在靶核酸时，才诱发靶核酸的 PCR 扩增。特异性引物附着于固相支持物，从而使扩增的靶核酸序列也附着于该固相支持物。对常规 PCR 而言，两条链的特异性引物是特异性设计的，

以使它们可杂交侧接于或在待扩增的靶序列内的序列，并驱动标准热循环过程。

PCR 扩增过程的第一步是靶核酸与附着于支持物的第一特异性引物(“引物 1”)杂交。然后通过延伸引物 1 的序列，形成与靶核酸互补的第一延伸产物。使支持物加热到链的去杂交所需的高温，释放出该靶核酸，其可与附着于支持物的引物 1 的其它序列参加进一步的杂交反应。随后，第一附着延伸产物可与也附着该在支持物上的第二特异性引物(“引物 2”)杂交，通过延伸引物 2 的序列可形成与该第一延伸产物互补的第二延伸产物，它也附着于该支持物。所以，靶核酸、第一和第二延伸引物是模板分子，能够参与多个杂交和延伸过程，仅受最初存在的靶核酸和最初存在的引物 1 和引物 2 序列的数量的限制。最后结果是附着于该表面的靶序列产生大量的拷贝。

该文献所公开的该扩增技术一般称为“桥式扩增”，由于当模板在溶液时进行第一次循环后，模板和引物分子通过其 5’端固定在支持物上，故它们杂交时形成典型的桥式结构。

因为这种扩增方法只可以固定靶核酸，所以在设计引物时通常监测该支持物就可以定量评估由操纵子预先确定的特异性靶序列是否存在。因此，如果将不同组的第一和第二引物阵列安排在该固相支持物的不同区域上，而如果不需要对靶序列作逐个碱基分析，则桥式扩增可用作高通量序列分析的方法。而且，这样一种技术基本上可改善不同序列和/或样本的系列分析，只要每种不同靶序列的特异性引物是已知的，而且扩增靶序列的扩增条件相似。

其它技术试图更有效地利用桥式扩增的机制。WO 98/44151(Glaxo)公开了如何在两端加入与固定引物互补的连接序列来改造所有待分析的核酸模板，溶液中的每个模板分子可作随机阵列安排和扩增，与它们的实际序列无关。以此方式，相同的 PCR 扩增产物以很高密度在固相支持物不连续区域上固定，称为“DNA 集落”，这是因为它们在板上观察时与细菌集落很相似。每个 DNA 集落都可单独显现和分析，例如通过与标记参考序列杂交或利用基于引物延伸的方法。WO 00/18957(Appl. Res. Syst.)公开了通过在实际开始扩增之前如何将引物和模板分子同时固定在固相支持物上来提高桥式扩增技术的效率。

桥式扩增技术的实质性限制在于，无论选择何种引物序列的特异性或固

定策略，都没有启示如何在等温条件(即无需热循环过程)下进行该过程，所以，它们同样存在与 PCR 相关的同样限制。即使进行循环的次数可减少，但由于分析和显现系统的灵敏度而仍然遇到另一个难题，即去杂交温度可能会影响固相支持物的均匀性以及核酸与该表面结合的稳定性。然而，现有技术所公开的等温扩增系统中也没有一个可同时获得进行扩增和分析的不同模板分子的密度，而且这些技术本身也没有充分公开桥式扩增技术的特点。

所以本领域需要设计一种新方法，采用桥式扩增技术的原理以连续方式恒温进行引物杂交、链的延伸和链的分离。事实上，更为关键的一点是获得链的分离，因为现有技术只公开了复合和特异性技术的温度或使用方法来解决该问题。WO 97/47767(Sarnoff Corp.)提出使用基于化学或静电的变性步骤来用于扩增过程。然而，这些步骤需要很专门的材料，如电场发生装置，或与常规扩增步骤兼容性很低的化学品，如氢氧化钠，因而需要特定的另外一些步骤(即延伸重新开始之前要修饰引物、洗净化学品)。

如果桥式扩增技术可以在等温条件下简单地触发链的分离，它还具有其它优点，可使链的分离只在延伸完成后才能进行，或者即使链的分离未完成但不会干扰核酸聚合酶完成延伸。

发明内容

业已发现，双链核酸通过两条链的 5'端固定在相同的固相支持物上，如果核酸的长度限制了可能的弯曲，则较容易在等温条件下实现链的分离。本发明通过桥式扩增成功地利用了这种生物物理学特征来等温产生 DNA 集落。

附图说明

图 1 所示为在固相支持物上等温扩增机制的示意图。字母和数字指的是本发明说明书所限定的动作和组分。

图 2 所示为模板 T1 质粒插入的序列。下划线为实施例所用来与不同引物杂交并扩增待测试的特异性模板的该序列。上划线标出引物名称和延伸的方向。

图 3 所示为用荧光染色的、在固相支持物上等温扩增的核酸的数码倒立

图像的萤幕拷贝，它们用配有 CCD 摄影机的落射荧光显微镜观察。图像比例标在图的左上角。

图 4 所示为固定不同浓度的模板进行等温扩增后，以 PicoGreen™ 染色的孔底所观察到的 DNA 集落密度而绘制的对数-对数关系图。每一点是 3 个观察结果的平均值。直线的斜率是 1。

图 5 所示为等温扩增不同长度的模板时所得到的总荧光的变化。全部曲线使用同一个任意单位(arbitrary unit)。

图 6 所示为比较模板 T_{386} 固定在孔中或在溶液中，或模板 T_{386} 没有经过扩增过程时所得的总荧光。

图 7 所示为 2%琼脂糖凝胶的数码图像，所述凝胶装有通过 PCR 或通过液相等温扩增所得的扩增产物并经过 10 伏/厘米的电场 30 分钟。泳道 1、5、9、13：2.5 微升分子量标记物(Superladder low，100 个碱基对序列梯（ladder；Gensura)，相关的碱基数标在左边。泳道 2、3 和 4：6 微升在热循环 PCR 后(泳道 2)，或在 72℃(泳道 3)和 78℃(泳道 4)等温条件下所产生的扩增和纯化的模板 T90。泳道 6、7 和 8：2.5 微升在热循环 PCR 后(泳道 6)，或在 72℃(泳道 7)和 78℃(泳道 8)等温条件下所产生的扩增和纯化的模板 T386。泳道 10、11 和 12：2.5 微升在热循环 PCR 后(泳道 10)，或在 72℃(泳道 11)和 78℃(泳道 12)等温条件下所产生的扩增和纯化的阴性对照(只有引物)。凝胶染上 SybrGreen™(Molecular Probes，Eugene OR)。

图 8 所示为两个计数实验的平均值，其显示用不同的酶通过等温扩增掺入的 ^{32}P-dCTP 的量：Dynazyme(Dyn.)、Pfu 聚合酶(Pfu.)、Taq 聚合酶(Taq.)、Vent™(Vent)。

图 9 所示为采用不同长度的模板以不同温度(A)或不同 DMSO 百分比(B)进行等温扩增所得的荧光量的变化。每条曲线相对其最高值标准化。

图 10 所示为琼脂糖凝胶的数码图像，所述凝胶经过 10 伏/厘米的电场 30 分钟，并装有用不同原材料所获得的 PCR 产物。泳道 1 和 8 是 100bp DNA ladder(Superladder low，Gensura)，相关的碱基数标在左边。PCR 原材料是 0.1 纳克 T386(泳道 2)，没有原材料(泳道 3)，固定了 T386(泳道 4 和 6)或无固定 T386(泳道 5 和 7)的等分孔，进行了等温扩增(泳道 4 和 5)或未进行事先等温扩增(泳道 6 和 7)。凝胶染上 SybrGreen™(Molecular Probes，Eugene OR)。凝

胶底部较暗淡的谱带是 PCR 扩增所用的引物。

具体实施方式

一般测量大分子的易曲性(flexibility)作为持续长度，这就是说，大分子必须有最小尺寸以便无需对其局部结构作大量修饰就可以使它弯曲。在与核酸聚合酶活性相容的盐浓度中，每个单链 DNA 的这样一个长度大约相当于 5 纳米(或 15 个碱基)，每个双链 DNA 的这样一个长度大约相当于 50 纳米(或 150 个碱基)(Tinland B 等人，Macromolecules 1997，30(19)：5763-5765；Willlams LD 和 Maher LJ， Annu Rev Biophys Biomol Struct 2000，29，497-521)。换句话说，双链 DNA 由于有大量使其结构稳定的非共价键，所以它比单链 DNA 刚硬得多。在 RNA 也有类似的发现，即使所估计的双链 RNA 的持续长度不同于文献所述的 35 至 72 纳米(Zacharias M，Biopolymers 2000，54(7)：547-60；Kebbekus P 等人，Biochemistry 1995. 4；34(13)：4354-7)。因此，当外界条件强迫弯曲时，双链分子所承受的机械应力将比单链分子高得多。

有许多生物物理学研究尝试定量测定和预测机械应力所产生的能量对双链 DNA 的非共价键相互作用的失稳效应，这种机械应力可以是转录、超螺旋或相邻 5'/3'末端的机械分离而产生的结果(Strick TR 等人的评论，Annu Rev Biophy Biomol Struct. 2000，29，523-43)。业已发现，当双链分子接触的温度接近变性温度时，这些单/双链核酸的转换会自然发生，是一种不受控的现象(Dubiley S 等人，Nucleic Acids Res. 1999，27(18)：e19)。然而，从来没有人论证过如果将(部分或全部)双链 DNA 分子的两个 5'端同时固定在一固相支持物上可诱发和有效利用这样一种现象。而且，上述文献和叙述桥式扩增相关技术的文献都没有一个提出，积极诱发这样一种能量可避免进行桥式扩增时的热循环。

图 1 简单概括了本发明的分子机制。

当属于通过 5'端固定在固相支持物(c)上的单链引物(a'和 a")与模板(b)的互补序列接近到足以进行杂交(1)时，每种引物/模板杂交产物或多或少被强力弯曲，取决于被固定的 5'端之间的距离(图 1A)。

在扩增溶液(d)存在下，核酸聚合酶分子(e)可以从杂交引物(2)的 3'端引发新链的延伸，而新链是固定模板的一个拷贝。结果，双链区自初始杂交区

开始延伸，复合物含有的人工弯曲双链核酸的量逐渐增多(图 1B)。

在延伸过程中，由于双链构象的硬度与两条链(3) 5'端的固定位置强加的弯曲之间形成反差诱发机械应力作用，其结果可使远离聚合酶的双链节段自发变性。如果模板的长度不足以在弯曲构象内接纳如此刚硬的结构，使双链核酸稳定的非共价键相互作用可能会产生一种连贯的机械应力。随着分子内的非共价键相互作用的数量增加，分子的双链部分接纳强加的弯曲也越来越少，只有减少双链构象内的模板部分才可消除这种机械应力。此时，模板部分远离进行性核酸聚合酶的模板分子的 3'端，可成为单链，该部分关联性越弱，这种应力的吸收也越容易。结果，由弯曲诱发的应力减少，聚合酶可继续进行，直到应力再次变得太强而无法被吸收。所以，当这个过程正在进行时，双链核酸分子逐渐“展开”，留下 3'端与另一种引物(4)杂交，第二个 DNA 聚合酶分子可引发模板(5)的第二个拷贝。这一过程甚至可以一个碱基接一个碱基发生。机械应力激活的链在模板 3'端打开 1-2 个以上碱基，可能伴随着通过聚合酶在新合成链的 3'端掺入 1-2 个碱基(图 1C)。

一旦模板的第一个拷贝完成或将近完成，合成第二个拷贝的 DNA 聚合酶就能够诱导机械应力作用于共用链，共用链可逐渐分离，离开第一合成链(6，图 1D)。

接着，反应可继续进行直到完成，即模板的双链均可被固定，并有可能如上所述引发扩增。一旦模板的第二个拷贝也完成或将近完成，可释放出模板的 5'单链端(7)，其与邻近的另一种固定引物杂交(8)，而另一个核酸聚合酶分子可重新开始合成(9)。同时，第一个单链拷贝可与另一种引物杂交(10)，并引发新的复制事件(11)。该过程如图 1E 所示，通过机械应力驱动链的分离和置换可使新合成的拷贝连续转为单链核酸，这可以通过任何一个固定模板分子与一固定引物杂交而再现，并无任何外部产生的循环活动。

本发明显示，如果核酸单链或双链形式的易曲性特征差别很大，当聚合反应仍在进行时，这些特征可使模板部分释放成为单链分子。令人惊奇的是，本发明还显示，这一事件不会影响聚合酶的活性，但它可用来驱动模板分子等温扩增生成新合成的分子，所述分子全部固定在固相表面的不连续区域上。

本发明中揭示了改进的桥式扩增方法，该方法可以在固相支持物不连续

区域上指数式产生具有混合单/双链构型的互补序列，至于 WO 98/44151 和 WO 00/18957 所公开的 DNA 集落，是等温扩增和以连续方式进行的。当认为有足够数量的相同的扩增分子时，那些专利申请所述的测序与其它分析方法同样可适用于 DNA 集落，所述的 DNA 集落是采用现有技术所公开的方法在支持物本身上等温产生，或者在 DNA 集落释放进入溶液的分子上等温产生。

将本发明揭示的扩增过程的连续性与等温条件结合，得到了在形式和数量上可适用高通量测序方法的核酸，与现有技术相比在时间和劳力节省方面有明显的优势。还需要指出的是，本发明揭示的固相支持物的用途不仅作为扩增分子平行后分析的工具(已为本领域公知)，而且是等温条件下连续进行核酸扩增所必需的组分。

即使双链 DNA 的持续长度相当于 150 个碱基对，但已证实本发明的方法在 DNA 或 RNA 模板长度的较宽范围内即大约几百个核苷酸范围内也是可行的。由此可推断，采用借助本专利申请中含有 68 至 605 个核苷酸的 DNA 分子的实施例中公开的经验方法所确定的条件，可进一步将此范围扩展至含有高达 1000 个核苷酸的模板。

本发明的主要目的是提供一种方法等温扩增至少一种含高达 1000 个核苷酸的核酸节段，所述方法包括以下步骤：

a) 形成至少一种含待扩增核酸的核酸模板，其中所述的核酸在 5'端含有寡核苷酸序列 Y，在 3'端含有寡核苷酸序列 Z，另外该核酸在 5'端带有将所述核酸固定于固相支持物的装置；

b) 形成一种或多种集落引物 X，此集落引物 X 可与寡核苷酸序列 Z 或寡核苷酸序列 Y 杂交，其 5'端带有将所述集落引物固定于固相支持物的装置；

c) 将所述核酸模板和集落引物与溶液混合，此溶液在所述固相支持物存在下使它们通过 5'端固定于固相支持物，以致核酸模板和集落引物的 5'端与所述固相支持物结合；

d) 将含有至少一种核酸聚合酶和核苷酸前体的扩增溶液施加于所述的固相支持物，以产生和等温固定序列与固定的核酸模板的序列相同或互补的核酸。

本发明的方法已经成功用于在固相支持物上等温扩增含有 68 至 605 个碱基的单链 DNA 分子。

步骤 c)中固定的核酸数量决定了每表面单位 DNA 集落的平均数量，这可通过本发明的方法来确定。待固定的 DNA 分子的优选浓度范围已在实施例中测定，模板分子为 1 纳摩尔与 0.01 纳摩尔之间，集落引物为 50 纳摩尔与 1000 纳摩尔之间。核酸的这些浓度可产生密度为 1000-100000/mm^2 的 DNA 集落。

本发明所述的扩增方法采用恒温，该温度是所选核酸聚合酶具有最佳活性的温度。实施例将显示，本领域已知的核酸扩增系统常用的核酸聚合酶也可用来实行本发明的方法，温度在 70℃与 85℃之间，或者更优选为 77℃与 81℃之间。这一范围同样适用于杂交温度，因为此温度下非特异性引物-模板杂交事件通常会减少。

本文所用的“等温”相当于“基本上相同的温度”，意味着与用特异性核酸聚合酶实行本发明方法的初选温度的任何偏差均在市售恒温装置的偏差范围内。

本文所用的“固相支持物”指核酸可附着的任何固体表面，例如乳胶珠、葡萄糖珠、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面、玻璃表面和硅片。优选的固相支持物是玻璃或聚苯乙烯表面。

本文所用的“核酸模板”指含有待扩增的核酸(DNA 或 RNA)的实体，它以单链、双链或混合的单-双链核酸形式存在于反应场中。组成核酸模板的核苷酸可以是天然存在的或非天然存在的核苷酸。

本文所用的“集落引物”指含有能用其 5’端固定于固相表面并能用其 3’端与互补序列杂交引发特异性聚合酶反应的寡核苷酸引物的实体。

本文所用的“简并引物序列”指能与任何独立于所述核酸片段序列的核酸片段杂交的短寡核苷酸序列。

本文所用的“将核酸固定于固相支持物的装置”指任何化学或非化学附着方法，包括化学修饰的官能团。“附着”指通过共价附着或非共价附着将核酸固定在固相支持物上。

本文所用的“化学修饰的官能团”指诸如磷酸基团、羧基或醛基、硫醇或氨基等基团。

本文所用的“核酸集落”指含两个互补核酸链多个拷贝的不连续区域。

本文所用的“衍生化表面”指被化学反应性基团，例如氨基、硫醇或丙烯酸基团修饰的表面。

本文所用的“功能化表面”指已被特异性官能团，例如马来酸或琥珀酸功能部分修饰的衍生化表面。

可用本发明的方法扩增的核酸包括 DNA，例如基因组 DNA、互补 DNA、重组 DNA 或任何形式的合成或修饰 DNA。它们的长度可以随同时固定于同一种固相支持物的模板分子而变化，它们可以是片段或具有已知或未知序列的较大核酸分子的较小部分。待扩增的核酸可以来自任何一种来源(例如，由有限的限制性内切酶消化所得的基因组 DNA 片段)。然而，它们在用于本发明的方法前可能需要用标准遗传工程技术作进一步处理，WO 00/18957 对此进行了概述，特别是加入与集落引物杂交所需的 Y 和 Z 序列。对于 mRNA，采用本发明的方法之前可用逆转录酶使分离的 mRNA 转为 cDNA，并最终转化为双链 DNA。

另外，无论模板是天然的、合成的或者是修饰的 RNA 分子，它都可以通过本发明的方法用本领域公知的特异性酶直接扩增，从单链 RNA 生成双链 RNA。

本发明的核酸模板不仅包括待扩增的核酸，而且包括具有已知的序列且长度是可变的寡核苷酸序列 Y 和 Z。本发明方法中所用的寡核苷酸序列 Y 和 Z 长度以至少 5 个核苷酸为宜，优选长 5 和 100 个核苷酸之间，更优选长约 20 个核苷酸。

本发明的寡核苷酸序列 Y 和 Z 可用本领域的标准或常规技术制备，或者可从商业途径购得。如果有多个待扩增的核酸序列，寡核苷酸序列 Y 和 Z 的附着可在相同或不同反应中进行。

分别在核酸模板 5’和 3’两端的寡核苷酸序列 Y 和 Z 不必位于模板的极端。例如，虽然寡核苷酸序列 Y 和 Z 最好分别位于或者毗邻核酸模板(如距离 5’和 3’端 0 至 100 个核苷酸以内)的 5’和 3’两端，但它们也可以远离(如多于 100 个核苷酸)核酸模板的 5’和 3’两端，只要序列 Y 和 Z 侧接长度不超过 1000 个碱基的待扩增核酸序列。

一旦制备好核酸模板，它可在用于本发明的方法之前进行扩增。扩增可

用本领域熟知和发表的方法进行，例如将模板核酸插入到表达载体中，并在适当的生物宿主中扩增，或用 PCR 扩增。然而这种扩增步骤不是必需的，因为本发明的方法能在由核酸模板单个拷贝产生的核酸集落中产生该核酸模板的多个拷贝，它也可以只引入 5'化学修饰的固定基团来进行，如实施例所示。

最后，将核酸模板作为双链分子固定于固相支持物上，但它可用本领域熟知和发表的方法制成单链形式，例如加热到大约 94℃，冰上迅速冷却至 0℃或用 0.1-0.5 M 氢氧化钠洗涤。

选择集落引物包含的并与模板所含的寡核苷酸序列互补的序列，使它们具有与其互补序列杂交的最高活性，而与其它任何序列非特异性杂交的活性非常低。集落引物的长度可以是 5 至 100 个碱基，但最好长 15 至 25 个碱基。引物可含有天然存在或非天然存在的核苷酸。

在本发明的方法中，可用一种或两种不同的集落引物产生核酸集落。在一基本实施例中，步骤 c)将两种不同集落引物 X'和 X"与核酸模板混合，集落引物 X'和 X"的序列使得寡核苷酸序列 Z 能与集落引物 X'中的一种杂交，寡核苷酸序列 Y 与集落引物 X"中的一种相同。此外，寡核苷酸序列 Z 与寡核苷酸序列 Y 互补，集落引物 X 的序列与寡核苷酸序列 Y 相同。

当产生本发明的核酸模板和引物时，也可用本领域熟知和发表的方法引入其它所需的序列。这些其它序列包括，例如限制性内切酶位点、修饰的核苷酸、或其它核酸标记物，从而可以鉴定和/或分离含给定核酸模板序列的扩增产物。其它所需的序列包括折回 DNA 序列(当变成单链时形成发夹环或其它二级结构)、指导蛋白质/DNA 相互作用的“调控”DNA 序列，如启动子、增强子、复制起点、或操纵子 DNA 序列，它们由特异性 DNA 结合蛋白识别。

本发明的集落引物也可包括简并引物序列。因此这些简并引物不要求核酸模板有寡核苷酸序列 Y 或 Z 来与模板杂交，虽然不排除使用简并引物与含寡核苷酸序列 X 或 Y 的模板杂交。不过，本发明扩增方法使用的简并引物必须与模板中位于两侧位点上或侧接于待扩增核酸序列的核酸序列杂交。

修饰如上所述制得的核酸模板和引物的 5'端，以携带使该核酸模板和集落引物的 5'端固定的装置。用 5'端将核酸固定，使 3'端远离支持物，以使模

板和引物 3'区可进行杂交，并驱动新链的合成。

固定方案应该避免在等温扩增过程中从固相表面释放出模板和引物。所以，固定装置最好是化学修饰的官能团，其可使所述分子和具有衍生化表面的固相支持物之间形成共价结合，随后用双官能交联基团修饰以提供功能化表面。另外，还可通过不可逆被动吸收或利用特异性分子之间的亲和力来进行固定(例如，通过生物素化分子固定在涂有亲和素的表面上)。

加在待固定的核酸 5'端的化学修饰的官能团的例子是硫醇、羟基、二甲氧基三苯甲基(DMT)、氨基或磷酸基团、以及羧基或醛基。用来使固相支持物衍生化的交联剂的例子是 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)、琥珀酰酐、二异硫氰酸苯酯或马来酸酐、或异双官能团交联剂，如间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、 [4-碘乙酰基]氨基苯甲酸 N-琥珀酰亚胺(SIAB)、[4-N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺(SMCC)、N-y-马来酰亚胺基丁酰氧基-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、丁酸琥珀酰亚胺基-4-对-马来酰亚胺基苯酯(SMPB)和相应的硫代化合物(水溶性的)。更优选的核酸模板和引物在 5'端的修饰用硫醇、磷酸基团或氨基进行修饰，并用含 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)作为交联剂的固定溶液进行固定。

虽然固相支持物可以是能固定核酸的任何固相表面，例如乳胶珠或葡萄糖珠、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面、玻璃表面和硅片，但是优选的固相支持物应具有足够的硬度，不受延伸过程展开的力影响，并用单或双官能团交联剂通过功能化作用使核酸共价附着，如前所述和 WO 00/18957 所公开的。本发明的核酸模板和集落引物一旦合成，或者从样本纯化，并如前所述进行了修饰，就可将它们以考虑本专利申请所示数据及所希望的 DNA 集落密度而计算出的浓度混合在一起。模板的优选浓度为亚纳摩尔，集落引物的优选浓度高 50-100000 倍。

一旦集落引物和核酸模板固定在固相支持物上，可通过进行等温扩增反应产生本发明的 DNA 集落，如图 1 所示，从而每个集落含有初始固定的核酸模板及其互补序列的多个拷贝。形成的核酸集落的边界被限于相对于初始核酸模板被固定区域的局部区域内。显然，一旦通过进行本发明的扩增方法合成了模板分子及其互补物的多个拷贝，则生成的核酸集落的边界能进一步

延伸，虽然形成的集落的边界仍被限于核酸被固定的小部分固相支持物上。

通过调节固相支持物进行等温扩增的时间可控制 DNA 集落的大小和数量。因此固相支持物表面形成的核酸集落的数量取决于初始固定在支持物上的核酸模板的数量，只要在可与模板分子杂交的距离有足够量固定的集落引物。控制核酸模板和引物的初始密度可达到最佳状况，即在大小是以对它们进行分析且含有足够多数量扩增序列的固相支持物上可等温产生高密度的单个核酸集落。

本专利申请揭示的等温扩增可用依赖于 DNA 或 RNA 的 DNA 聚合酶，加上供给核苷三磷酸分子或其它任何的核苷酸前体分子（例如修饰的核苷三磷酸分子）来进行。

可用于本发明的核酸聚合酶的例子是 DNA 聚合酶(克列诺片段，T4 DNA 聚合酶)、各种耐热细菌识别和克隆的热稳定 DNA 聚合酶(Perler F.B.等人，Adv. Protein Chem. 1996，48：377-435)(如 Taq、VENT、Pfu、Tfl DNA 聚合酶)以及它们基因修饰的衍生物(TaqGold、VENTexo、Pfuexo)。优选的用于集落引物延伸的核酸聚合酶在引物和模板杂交的温度下是稳定的，而杂交的结果导致有足够特异性，避免模板的不完全扩增或假扩增。

扩增溶液最好含有作为核苷酸前体的脱氧核糖核苷三磷酸，如 dATP、dTTP、dCTP、dGTP，天然或非天然形成，例如用荧光或放射性基团修饰的。现已研制了大量不同的合成修饰的核酸用于化学和生物学方法，以增加核酸的可检测性和/或功能多样性。这些功能化/修饰的分子可完全与天然的聚合酶兼容，保持天然对应物的碱基对和复制性质，参见最近的评论(Thum O 等人，Angew. Chem. Int. Ed. 2001，40(21)：3990-3993)。

当模板是 RNA 或 DNA 分子并希望获得双链 RNA 形式的扩增产物时，核酸聚合酶可以是依赖于 RNA 或 DNA 的 RNA 聚合酶，例如病毒性 RNA 复制酶或核酶(Johnston WK 等人，Science 2001，292(5520)：1319-25；Tayon R Jr 等人，Nucleic Acids Res 2001，29(17)：3576-82)。所以扩增溶液将会含有作为核苷酸前体的核糖核苷三磷酸。

因此，根据所选的核酸聚合酶加入扩增溶液的其它组分，它们基本上对应于本领域已知的有效支持各种聚合酶活性的化合物。诸如二甲基亚砜(DMSO)、牛血清白蛋白(BSA)、Triton X-100、或氯化镁等化合物的浓度因

其对获得最佳扩增有重要作用而为本领域公知，所以操作人员在下文提供的实施例基础上可轻易地调整本发明方法采用的浓度。

组成集落的核酸链多个拷贝通常固定于固相支持物上，它们可以是单链、双链或混合的单-双链构型，同时全部以属于单个 DNA 集落的扩增分子的群体表示。所以，如果一种方法需要对特定构型(或者全部或者感兴趣的节段)的全部核酸分子进行分析和/或测序，可对等温扩增产物作进一步处理，以使它们全部(或至少大部分)处于这样的状态。例如，可用温度、化学或电荷驱动的变性来将所有扩增产物转化为单链 DNA。这样一些分子现在可更有效地与加入液相或附着于支持物而且其序列与一条扩增链的内部序列互补的引物进行杂交。取决于所采用的测序方法，该“辅助”寡核苷酸可用不同方式检测序列。它可带上标记，或者可利用标记/修饰的核苷酸引发延伸。此外，它还可使用核酸内切酶识别杂交步骤或延伸步骤后形成的特异性序列或结构。

取决于所用的条件，本发明产生的核酸集落的大小和密度可各不相同。集落优选的大小为 0.2 微米到 6 微米。本发明方法所用的核酸集落的密度通常为 1000/mm^2 到 100000/mm^2。用本发明的方法同样可获得较高的密度，例如 100000/mm^2 到 10000000/mm^2。只是现有图像分析技术(显微镜、CCD 摄影机、软件)局限了清晰分辨如此高密度的单个 DNA 集落，这可能会在将来得到解决。

一旦等温产生了核酸集落，就可以用各种技术同时显现和/或表征一个或多个 DNA 集落，例如，确认等温产生的 DNA 集落的密度和大小是否是所希望得到的。根据所用的具体技术，通过监测进行等温扩增的固相支持物或者从固相支持物释放到液相的物质，可获得分析方法结果。较佳的是与等温扩增所用的核酸分子不同的核酸分子用于特异性分析方法以及根据最佳杂交条件与进入液相的扩增产物杂交，而每个核酸序列的最佳杂交条件可用现有技术熟知的方法凭经验轻易地确定。

WO 00/18957 叙述了可用于 DNA 集落所用的集落显现或序列测定的方法。一个不完全表列出了这些方法，其包括与标记寡核苷酸杂交、掺入标记核苷酸、用特异性探针重新扩增、使用 DNA 结合染料、用序列或结构特异性内切核酸酶消化、使用其它 DNA 修饰酶(如连接酶、甲基化酶、外切核酸

酶)及其它 DNA 结合蛋白。

序列分析前用本领域技术人员公知的荧光检测方法可计算等温产生的核酸集落的密度和大小。例如，人们可以用嵌入染料，如溴化乙锭或 PicoGreen™(Molecular Probes， Eugene，OR)或其它化学 DNA 染色方法，如用 Ulisys™(Molecular Probes)给固定在表面上的等温扩增双链分子染色，用落射荧光显微镜观察染色结果，如图 3 所示。任何可以检测和定量测定适当的标记如荧光或放射性的装置都可用于序列测定，如 WO 00/18957 所概括的。代替显微镜的其它装置已为本领域技术人员所熟知，如扫描装置。

通过测定一个以上 DNA 集落所含的扩增核酸模板的全部或部分序列可测定一个或多个核酸的全部或部分序列。扩增核酸的这些外加步骤可在固相支持物上进行，或者在释放出属于一个或多个 DNA 集落的一条或两条核酸链后进行。最好同时测定多个序列。

具体地说，当需要直接标记扩增产物或测定扩增产物的序列时，可在反应进行到足以检测分离的 DNA 集落后，将标记核苷酸加在扩增溶液中。标记基团可以是放射性的或发荧光的，如 Texas Red，最后它可以合适的浓度(通常为无标记 dATP 浓度的 1/10 到 1/1000)和与扩增模板分子所用引物不同的引物一起加入扩增溶液中。然而，本领域技术人员都知道高浓度标记核苷酸可能抑制扩增过程，因为其它扩增技术如液相 PCR 也有这一现象。

所以，本发明的方法还包括一步，即进行至少一步一个或多个等温扩增 DNA 集落的序列测定。利用固定于固相支持物上或在液相中的集落引物或其它引物，序列测定可以是掺入标记核苷酸的结果。此外，序列测定也可以是与寡核苷酸杂交，或者释放出属于一个或多个核酸集落的一条或两条核酸链的结果。

本发明的另一方面内容是提供一种方法，该方法还包括释放属于一个或多个等温产生的 DNA 集落的一条或两条核酸链，以致它们可以在溶液中回收再供进一步使用的外加步骤。用化学、光学、物理学或酶学方法切断引物与表面，或与扩增核酸所含的特异性序列、结构或核苷酸之间的连接来释放该核酸。例如，WO 00/58329(Goldsborough A)提供了一种方法，通过选择性切断非常规的核苷酸来使核酸分子与固相支持物分离。另外，通过使用任一种已知的扩增方法，如 PCR，可使固定的 DNA 集落所含的序列在浸没集落

的液相中再扩增。

任何一种 DNA 集落检测系统最好与分析系统结合使用，以便例如在每一步引物延伸后立即测定每个集落掺入的核苷酸的数量和性质，或者以后用记录的数据测定一待测的给定集落内的核酸模板的序列。

本发明的方法可用来在等温条件下产生核酸集落。从本发明的单个固定的核酸模板可产生本发明的一个核酸集落。本发明的方法可以同时产生许多这样的核酸集落，每一个集落都可能含有不同的固定的序列。

本发明提供另一种方案，通过提供一些装置使核酸在固相支持物上进行等温扩增所需的步骤大为简化，以解决加快核酸扩增和测序的问题。本发明尽管用于具有有限长度(最多有 1000 个碱基)的核酸序列，但它可满足高通量方法日益增多的需要。

在基因组和相关研究(药物基因组学、药物开发、食品特性分析、基因分型、诊断、基因表达的监测、遗传多样性分布图、全基因组测序和多态性的发现)领域中，待测定和比较的核酸序列往往与几百种不同基因组的、重组的、或逆转录的 DNA 片段有关，这些片段中每一个的长度不超过 1000 个碱基。所以，本发明的方法特别适用于但不限于：必须同时测定许多个体(例如 500 个)的许多基因或 mRNAs(例如 500 个)的序列的情况下识别 DNA 序列，或者同时给大量(例如几百万种)多态性评分，或者同时监测大量(例如 100，000 个)基因的表达。

例如，各种综合性基因表达分析方法可以对通常是细胞亚群或微解剖结构基因表达进行特性分析。这些灵敏度高的技术一般利用在 10-20 个碱基对的短节段(“尾”,“tag”)中分裂的互补 DNA，这是足以鉴定单个 mRNA 物种的基础，从而通过计算与这一 mRNA 相关的样本中所含的“尾”的数量可粗略计算或比较这些样本中编码蛋白质的 mRNA 的量。通常，这些节段是串联连接的，以便用 IIs 型限制性内切酶在例如 SAGE 的情况下(基因表达 d 串联分析；Velculescu VE 等人，Trends Genet 2000；16(10)：423-5)或其它始终基于产生尾的系统中(WO 00/53806)测定序列。本发明的方法有助于鉴定和计算尾的数量。将适当的连接序列与每个尾连接后，可以在固相表面上固定并进行等温扩增，对应给定的尾的单个 DNA 集落可被显现、直接或间接测序以及用图象分析软件评分。以此方式可计算 cDNA 群中的每一个尾的

频率，而无需与克隆到质粒的连接体中的全部尾连接。

类似的方法也可施用于 ESTs 或基因组 DNA，以鉴定与疾病或其它表型相关的单元型或特异性 SNPs，因为这种情形下，它对于快速鉴定数以千计小的单核酸节段的序列也具有重大意义。

所以，本发明的另一方面内容是在固相支持物上核酸等温扩增方法的应用，用于提供基因组、药物基因组学、药物开发、食品特性分析、基因分型、诊断、基因表达的监测、遗传多样性分布图、全基因组测序和多态性的发现或其它任何涉及核酸扩增的应用等领域中核酸测序和重测序所用的核酸分子。

本发明的又一方面内容是提供一种在固相支持物上等温扩增核酸的试剂盒，用于提供基因组、药物基因组学、药物开发、食品特性分析、基因分型、诊断、基因表达的监测、遗传多样性分布图、全基因组测序和多态性的发现或其它任何涉及核酸扩增的应用等领域中核酸测序和重测序所用的核酸分子。

对用本发明方法获得并基于标记核苷酸的扩增产物进行鉴定和特性分析的方法的一个例子可以是：

1a) 用本专利申请前述的方法产生和显现固相表面上扩增的核酸，记录结果；

1b) 处理扩增的核酸，以去除用来显现核酸的嵌入染料；

1c) 将扩增的核酸至少部分转化为单链分子；

1d) 提供液相或固相的寡核苷酸，其中用来等温扩增的相和/或寡核苷酸可以是相同或不同的，而寡核苷酸应该包括能够与至少一种扩增产物所含的序列杂交的 3'端序列；

1e) 提供寡核苷酸与扩增的分子之间杂交的条件；

1f) 在可使引物延伸的条件下在液相中提供核酸聚合酶和至少一种标记核苷酸，以及适当的缓冲液。

1g) 借助这种标记或借助该标记与扩增产物的相互作用来检测掺有该标记核苷酸的扩增的核酸，记录结果；

1h) 可任选地去除液相，用带有与上一轮延伸所用的标记不同的标记重复步骤 1f)和 1g)，记录结果；

1i) 可任选地与上一轮延伸所用的寡核苷酸和/或标记核苷酸不同的寡核苷酸和/或标记核苷酸重复步骤 1c)到 1f)，记录结果。

如 WO 00/18957 所述，当将结果的相对变化转为信号并比较以证明标记核苷酸的掺入，上述方法特别适合逐个碱基地对本发明的扩增产物进行测序。

用本发明方法获得并基于标记寡核苷酸的扩增产物的鉴定和特性分析方法的一个例子可以是：

2a) 用本专利申请前述的方法产生和显现固相表面上扩增的核酸，记录结果；

2b) 处理扩增的核酸，以去除用来显现核酸的嵌入染料；

2c) 将扩增的核酸至少部分转化为单链分子；

2d) 提供液相或固相的寡核苷酸，其中用来等温扩增的相和/或寡核苷酸可以是相同或不同的，而寡核苷酸应该包括能够与至少一种扩增产物所含的序列杂交的 3'端序列；

2e) 提供寡核苷酸与扩增的分子之间杂交的条件；

2f) 借助一种标记或借助该标记与扩增产物的相互作用来检测与带该标记的寡核苷酸杂交的扩增核酸，记录结果；

2g) 可任选地用含有不同序列和/或不同标记的寡核苷酸重复步骤 2c)到 2f)，或 2e)到 2f)，记录结果。

用本发明方法获得并基于限制酶的扩增产物进行鉴定和特性分析方法的一个例子可以是：

3a) 用本专利申请前述的方法产生和显现固相表面上扩增的核酸，记录结果；

3b) 处理扩增的核酸，以去除用来显现核酸的嵌入染料；

3c) 用含有至少一种限制性内切核酸酶及适当的缓冲液的溶液在使该酶具有活性的条件下，处理扩增的核酸，所述核酸可能分裂为本发明至少一种扩增产物所含的双链核酸分子，和/或实施步骤 b)后所得的双链核酸分子；

3d) 回收释放出来的核酸；

3e) 重复步骤 3a)，记录结果，比较消化前后的显现结果；

3f) 可任选地用不同的限制性内切核酸酶重复步骤 3b)到 3e)，记录结果。

一旦理解了本申请公开的扩增方法和产物的特点，参照现有技术及以下叙述本发明基本情况和某些应用的非限制性附图和实施例，就可轻易推导出作这种特异性分析的其它一些步骤的需要和性质。

实施例

实施例 1：固定在固相表面上的模板 DNA 的等温扩增

方法

DNA 序列

引物 P1(24-mer，SEQ ID NO：1)、P2(24-mer，SEQ ID NO：2)、P3(40-mer，SEQ ID NO：3)是在 5'极端携带 C6 氨基连接基的合成寡核苷酸。这种化学基团用来将引物和模板固定在固相表面上，以便用于本发明的方法中。

模板 T3(SEQ ID NO：9)和 T4(SEQ ID NO：10)长 68 mer，5'端具有对应 P1 的序列，3'端具有与 P2 互补的序列，而 T90(90-mer，5'端具有对应 P1 的序列，3'端具有与 P2 互补的序列，SEQ ID NO：11)是在 5'端携带 C6 氨基连接基(T90)或 5'磷酸基团(T3 和 T4)的合成寡核苷酸。

模板 T155(155-mer，SEQ ID NO：12)、T203(203-mer，SEQ ID NO：13)、T386(386-mer，SEQ ID NO：14)和 T605(605-mer，SEQ ID NO：15)在 5'端具有对应 P3 的序列，3 端具有与 P2 互补的序列。它们是通过扩增 T1(SEQ ID NO:8)的嵌套片段而构建的，所述 T1 是 pBSk 质粒(Stratagene)所含的一个 823 个碱基对的序列，如图 2 所示。直接引物 P3(40-mer，在 5'端具有对应 P1 的序列，在 3'端具有与长 16 个核苷酸的 T1 序列互补的序列，SEQ ID NO：3)携带一个 5'氨基连接基。反向引物 P155r(SEQ ID NO：4)、P203r(SEQ ID NO：5)、P386r(SEQ ID NO：6)和 P605r(SEQ ID NO：7)是 44-mer 的合成寡核苷酸，在 5'端具有对应 P2 的序列，在 3'端具有与长 16 个不同核苷酸的 T1 序列互补的序列。这些模板用 100 微升溶液扩增，所述溶液含 5 单位 Taq 聚合酶(Perkin-Elmer)、1×Taq 缓冲液(Perkin-Elmer)、200 微摩尔 dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP， Pharmacia)、5 纳克/微升 pBSk 质粒、1 微摩尔引物 P3 和 1 微摩尔相应的反向引物。进行 20 次 PCR 循环(94℃ 30 秒，62℃ 30 秒，72℃ 60 秒)，按照制造商的说明将所得产物用 QiaQuick 试剂盒(Qiagen)纯化。用来回收纯化的核酸的溶液含有 10 毫摩尔硼酸钠(pH 7.5)。

所有合成的寡核苷酸均购自 Microsynth(瑞士)。

引物和模板核酸固定于固相表面的方案

用来证明本发明方法的可行性的固相表面是平底孔的里面，由称为 Nucleolink™ 的功能性合成材料(Nunc，丹麦)制成，并装配在总体形状适合 96 孔 PCR 扩增仪的板中。当装入一定体积实施例所用的固定和扩增溶液(15-20 微升)时，每个孔与这些溶液实际接触的面积大约相当于 30 mm^2。

将引物和模板附着于 Nucleolink™ 板，将这些板置于冰上，用含 10 纳摩尔咪唑和 10 毫摩尔 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)的固定溶液稀释核酸并加入孔内。全部孔都装满后，立即于 50℃下培养这些板 10 分钟。进行等温扩增前这些孔再用含 0.4 摩尔氢氧化钠和 0.1% Tween-20 的溶液室温洗 2 次，最后用 TNT 溶液洗 3 次，TNT 是一种含 100 毫摩尔 Tris-HCl(pH 7.5)、150 毫摩尔氯化钠、0.1% Tween-20 的溶液。

扩增的核酸的显现方案

等温扩增后，这些孔用 20 毫摩尔 Tris-HCl(pH 7.5)洗 3 次，然后将孔与 PicoGreen™(Molecular Probes)一起培养，显现 DNA 集落，PicoGreen™ 是一种当与双链 DNA 结合时会发荧光的分子，通常用 20 毫摩尔 Tris-HCl(pH 7.5)稀释 2000 倍。每个孔与 50 微升 PicoGreen™ 稀释液一起室温培养 10 分钟。

用配有由 Winview 软件(Princeton instruments，Trenton，NJ)控制的冷却式 CCD 摄影机(Micomax 512x768，Princeton instruments，Trenton，NJ)的落射荧光显微镜(Axiovert 100TV，Zeiss，Germany)观察固定在孔底的 DNA 集落。曝光 2 秒后得到图像，用 analySIS 软件(Soft Imaging System GmBH，德国)或其它相当的软件加以分析。

结果

按上述方法将引物 P1 和 P2 及核酸模板 T90 和 T386 附着于 Nucleolink™ 孔。模板含有大量约为持续长度 0.6 和 2.5 倍的核苷酸，用来鉴定适用于本发明方法的第一模板长度范围。

这些孔中装入 20 微升含引物 P1 和 P2(各 250 纳摩尔)的固定溶液，每个

孔的模板类型和浓度各不相同，见表Ⅰ：

表Ⅰ

孔的编号	模板名称	模板浓度(纳摩尔)
A1	T90	3.1
B1	T90	1
C1	T90	0.3
D1	T90	0.1
E1	T90	0.03
F1	T90	0.01
G1	T90	0.003
H1	-	0
A2	T386	3.1
B2	T386	1
C2	T386	0.3
D2	T386	0.1
E2	T386	0.03
F2	T386	0.01
G2	T386	0.003
H2	-	0

于 78℃将这些孔与 15 微升扩增溶液培养 1 小时来进行等温扩增，所述扩增溶液含 1 单位 Pfu 聚合酶(Stratagene)、10%二甲基亚砜(DMSO)、80 微摩尔 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP，Pharmacia)、200 毫摩尔 Tris-HCl(pH 8.8)、10 毫摩尔氯化钾、10 毫摩尔硫酸铵、2 毫摩尔硫酸镁、0.1% Triton X-100 和 0.1 毫克/毫升牛血清白蛋白。用标准 96 孔 PCR 扩增仪(MJ-Research PTC-200)进行等温培养，用加热盖设定恒温于 78℃。

所得到的图像如图 3 所示。由于采用了 DNA 染色步骤，所以因为有(至少部分)双链 DNA 扩增和固定于 Nucleolink™ 孔底的集落而产生信号。转换图像以便得到更好的打印效果。小于或等于 130 AU(任意单位，由控制 CCD 摄影机的软件计算而得到)的信号呈白色，大于或等于 350 AU 的信号呈黑色。

图 3 显示，当只有附着引物时(H1 和 H2)图像是完全白色的，这证明检测不到自发性扩增。当模板的浓度为最高时(A1/2、B1/2)扩增产物覆盖整个表面，填满了图像，在孔 C1/2、D1/2 和 E1/2 中得到不同的 DNA 集落，两种模板的浓度都是亚纳摩尔。这些“斑点”的数目(每个斑点的面积为 1 至 5

平方微米)随附着步骤所用的模板浓度大致呈线性递增。在固定步骤中用两种不同长度的模板和不同的模板/引物比率来进行扩增。

图 4 显示根据 DNA 集落数更精确地定量分析等温扩增的效果。在测试实验条件(咪唑/EDC 核酸固定溶液、Nucleolink™ 孔、50℃培养 10 分钟、两种引物各 250 毫摩尔)下，固定溶液加入了 90-386 个核苷酸范围的模板，模板浓度为亚纳摩尔浓度，这些模板在固相表面上等温扩增为 DNA 集落，每平方毫米得到数以万计个 DNA 集落。

等温扩增步骤也可使用其它模板长度和不同的引物浓度。8 个 Nucleolink™ 孔组成一组，每一组的孔都装入 20 微升固定溶液，所述固定溶液含有恒定的亚纳摩尔浓度的一种模板：A 组(T155，0.14 纳摩尔)、B 组(T203，0.2 纳摩尔)、C 组(T386，0.08 纳摩尔)。根据每个模板所得到的曲线而确定这些浓度，图 4 示出其中两个模板的曲线。

8 个孔所含 P1 和 P2 的浓度见表 II。

表 II

孔的编号	P1(纳摩尔)	P2(纳摩尔)
1	250.0	250.0
2	75.0	75.0
3	55.0	55.0
4	37.5	37.5
5	22.5	22.5
6	6.8	6.8
7	2.0	2.0
8	0.6	0.6

按上述方法进行等温扩增后，根据不同引物浓度的荧光信号测定本发明方法的效果，荧光信号按模板长度标准化(图 5)。因为模板越长，掺入的 DNA 染色化合物越多，所以标准化是必需的，将原来的荧光信号减去背景后除以模板长度(以千碱基表示)。

这个实验显示，引物 P1 和 P2 的量是在上述设定的固定和扩增条件下用本发明的方法获得可检测扩增水平所必需的，这个数量部分取决于模板长度。对于长度接近持续长度的较小模板(T90 和 T155，分别是持续长度的 0.6

和1倍)，当引物的总浓度小于100纳摩尔时信号已足够强，但较长的模板(T386和T605，分别是持续长度的2.5和4倍)仍要扩增，引物的总浓度要高于100纳摩尔。这些结果提示，较长的固定核酸可诱导的机械应力较少，这也许可假定为可选择的另一种三维构型吸收了部分需要用来驱动等温链的分离和置换的机械应力。

为了证实扩增产物真的是通过将引物和模板适当固定在固相支持物上而获得的，进行了下列对照实验。

在第一个实验中，使用或不使用固定引物(P1 和 P2，各 250 纳摩尔)，以及用固定的□溶液中的模板(T386，0.08 纳摩尔)，进行上述的等温扩增和显现方案。如图 6 所示，当模板在溶液中或不存在时，即使固定了大量的引物，总荧光仍然非常弱。这个信号可能是由于边缘的自我扩增而产生的。显然，只有引物和模板都被固定才能以 DNA 集落形式等温扩增双链 DNA。

第二个对照实验采用 PCR 条件或加在固相支持物上的等温条件相同，液相同样使用前面的实验所用的核酸。

扩增实验所用的扩增溶液含有 0.05 单位/微升 Pfu 聚合酶(Stratagene)、80 微摩尔 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP，Pharmacia)、200 毫摩尔 Tris-HCl(pH 8.8)、10 毫摩尔氯化钾、10 毫摩尔硫酸铵、2 毫摩尔硫酸镁、0.1% Triton X-100 和 0.1 毫克/毫升牛血清白蛋白、1 微摩尔引物 P1、1 微摩尔引物 P2，不含模板或含有模板(T386 0.13 纳摩尔，或 T90 0.33 纳摩尔)。扩增溶液分成 3 等分，每等分的扩增条件不同：热循环 PCR 20 次(94℃ 30 秒，60℃ 30 秒，72℃ 1 分钟)，72℃ 1 小时，或 78℃ 1 小时。扩增产物在 Qiaquick 柱(Qiagen)上装在 2%琼脂糖凝胶上纯化。。

如图 7 所示，当采用热循环条件时，即使引物可在液相扩增同一个模板，但等温条件下却得不到扩增产物。

通过测定放射性核苷酸的掺入来测试本发明方法所用的不同市售 DNA 聚合酶的效率。等温扩增选用 P1 和 P2 作为引物(各 250 纳摩尔)，在没有 T3 和 T4 或者有 T3 和 T4 的情况下进行，过量加入(各 5 纳摩尔)很短的模板 T3 和 T4 (68-mer)。等温扩增用 20 微升扩增溶液在 80℃进行 90 分钟，所述扩增溶液含有 0.5 单位 DNA 聚合酶、5%二甲基亚砜(DMSO)、80 微摩尔 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP， Pharmacia)、200 毫摩尔 Tris-HCl(pH 8.8)、

10 毫摩尔氯化钾、10 毫摩尔硫酸铵、2 毫摩尔硫酸镁、0.1% Triton X-100、0.1 毫克/毫升牛血清白蛋白及 0.128 微摩尔α^{32}P-dCTP。所用的 DNA 聚合酶是 Dynazyme™(Finzyme，芬兰)、Pfu 聚合酶(Promega)、Taq 聚合酶(Perkin Elmer)、Vent™ 聚合酶(New England Biolabs)。

等温扩增后，Nucleolink™ 孔用 20 毫摩尔 Tris-HCl(pH 7.5)洗 5 次，置于闪烁液(Ultima gold；Packard)中，用 Beckmann 闪烁计数器计数，以计算掺入的标记核苷酸的量。

如图 8 所示，所有测试聚合酶都可用本发明的方法进行等温扩增，但产率不同，背景扩增水平也各异。Pfu 和 Vent™ 聚合酶对非特异性信号的特异性比率最佳。

从温度和 DMSO 浓度两方面测试用于本发明等温扩增的其它可替换的条件，与用不同长度的模板所得到的结果进行比较。

将每种模板(T155 0.14 纳摩尔、T203 0.2 纳摩尔、T386 0.08 纳摩尔和 T606 0.04 纳摩尔)与引物 P1 和 P2(各 250 纳摩尔)固定在不同组的 Nucleolink™ 孔中。然后在下列两种情况下进行等温扩增：DMSO 的浓度为 10%，在各组的孔有温度梯度的 PCR 扩增仪中；或者温度为 78℃但改变 DMSO 的含量。

等温扩增、洗涤和显现后，用图像分析软件定量测定图像上所有斑点的强度来测定 DNA 集落的总荧光。如图 9A 和 9B 所示，扩增产物的量与所采用的扩增条件密切相关。温度在 77℃与 81℃之间，DMSO 的浓度在 8%与 14%之间，所有模板的等温扩增的效率特别高。

实施例 2 扩增的核酸的分析

一旦等温得到 DNA 集落，进行一些实验以评估扩增的核酸的某些特征。

以 Pfu 聚合酶及图 8 表示的实验所用的固定、扩增、显现和计数条件，采用 DNA 染色和放射性标记的核苷酸来评估每个斑点含有的核酸链的平均数量。

各组的孔加入了不同浓度(1 纳摩尔、0.31 纳摩尔)的模板 T386，或不加入模板 T386。考虑到扩增溶液体积覆盖的孔的表面积(当使用 15 微升体积而且孔的直径为 4 微米时该面积约为 27.56 mm^2)、每个待分析的图像的大小(大约 0.08 mm^2)以及标记特异性活性，将计数转换为每个 DNA 集落的分子数。

所得的结果见表III。

表III

	含 1 纳摩尔 T386 的孔						含 0.3 纳摩尔 T386 的孔						没有 T386
计数	8304	8536	6754	8615	6427	4867	3687	4787	4988	2902	3693	4072	843
集落的数量	3846	3831	3149	3788	2844	2349	1808	2087	2408	1218	1638	1935	0
每个集落的	3007	3103	2987	3167	3147	2885	2840	3194	2885	3318	3140	2931	N.A.
平均链数	3049±109						3051±193						

N.A.：表示不适用

这个实验显示，本发明的方法可以将单个模板分子等温扩增为固定在不连续区域的数千条链。而且，当 DNA 集落的数量明显取决于模板的浓度时，本发明方法的效率与操作条件下模板的浓度 (即纳摩尔范围内) 无关，以每个 DNA 集落含有扩增链的数量来衡量。

还可以从表面回收等温扩增的产物。选 4 个孔采用上述的固定方案，全部 4 个孔都选用 P1 和 P2，只有 2 个孔用 T386，但 2 个孔中一个孔的 T386 固定，另一个孔的 T386 不固定，这 4 个孔均实施上述等温扩增方案。所有孔再装入 60 微升 PCR 溶液，所述 PCR 溶液含有 5 单位 Pfu 聚合酶(Stratagene)、10%二甲基亚砜(DMSO)、100 微摩尔 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP，Pharmacia)、200 毫摩尔(pH 8.8)Tris-HCl、10 毫摩尔氯化钾、10 毫摩尔硫酸铵、2 毫摩尔硫酸镁、0.1% Triton X-100 和 0.1 毫克/毫升牛血清白蛋白及引物 P3 和 P386r(各 1 微摩尔)。使该孔进行 1 次 PCR 循环(94℃ 30 秒，60℃ 30 秒，72℃ 60 秒)，然后将 30 微升 PCR 溶液转移到 PCR 管中。作为对照，另一支 PCR 管装 30 微升同一种 PCR 溶液，其中加入了 0.1 纳克 T386。接着进行 10 次 PCR 循环(94℃ 30 秒，60℃ 30 秒，72℃ 60 秒)，每个样本取 4 微升装在 2%琼脂糖凝胶上。所得结果见图 10。等温扩增产物得到的 PCR 产物可比得上当溶液有 T386 时所得到的 PCR 产物，如果 DNA 附着没有经过等温扩增的管时，该产物几乎是看不见的。对照实验结果显示，既不在等温扩增过程内，又不在 PCR 扩增过程内都没有人工产物产生，如引物-二聚体。

<110> 应用研究系统ARS股份公司（Applied Research Systems ARS Holding N.V.）

<120> 固相支持物上的核酸等温扩增

<130> WO464

<160> 15

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 1
caccaaccca aaccaaccca aacc 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 2
gaggaaaggg aagggaaagg aagg 24

<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 3
caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgcctgtaat 40

<210> 4
<211> 44
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 4
gaggaaaggg aagggaaagg aaggatccgc ctcccaggta gaat 44

<210> 5
<211> 44
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 5
gaggaaaggg aagggaaagg aaggatccgc ctcctgggtt caag 44

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 6
gaggaaaggg aagggaaagg aaggatccga tctgcctggt tctg 44

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 7
gaggaaaggg aagggaaagg aaggatccgt gagcgcaacg caat 44

<210> 8
<211> 823
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 8
gggccccccc tcgagaagcc gtgctgtcag catcagcatc atcggtgaga cctctcccca 60
agccctacag accctgggac tagggtgcag gacagcacag gctctaattt cctgccccat 120
tctggcctta tccctaacag ccaccccacc tctccctcca tgcacccaca cccaagcctc 180
ccctacccca cccaaattct gccaagagag cagccaagcc tctcccttct tccctctgag 240
ctaaaaaaag gaacagacgg ctgggcgcgg tggctcacgc ctgtaatccc aacactccat 300
gcatctggtg atgcgagctc gactctgggg aaaacactgg gttttcccag agtcgagcat 360
tctacctggg aggccagcta cttgagaggc tgaggcagga gaattgcttg aacccaggag 420

gcatagattg tgatgagcca agatcgcacc attgcatgcc agcctcggca acaaaagtga 480
aactccatct caaaaaaaaa agaaagggaa agactccact ggggctccca ctaaataacc 540
ctctctcaac ccgaagtctt cctttctgac tggatccaac tttgtcttcc agaaccaggc 600
agatccacta gttctagagc ggccgccacc gcggtggagc tccagctttt gttcccttta 660
gtgagggtta attccgagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg 720
ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg 780
tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tca 823

<210> 9
<211> 68
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 9
caccaaccca aaccaaccca aaccatgccg atgacctgca gaagccttcc tttcccttcc 60

ctttcctc 68

<210> 10
<211> 68
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 10
caccaaccca aaccaaccca aaccgtactg caccaggcgg ccgcccttcc tttcccttcc 60
ctttcctc 68

<210> 11
<211> 90
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 11
caccaaccca aaccaaccca aacccctggg gaggcatgcc gatgacctgc agaagccatg 60
ggatggcctt cctttccctt ccctttcctc 90

<210> 12
<211> 155
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 12
caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgcctgtaat cccaacactc catgcatctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggcgga tccttccttt cccttccctt tcctc 155

<210> 13
<211> 203
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 13
caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgcctgtaat cccaacactc catacgtctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggccag ctacttgaga ggctgaggca ggagaattgc ttgaacccag gaggcggatc 180
cttcctttcc cttccctttc ctc 203

<210> 14
<211> 386
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 14
caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgcctgtaat cccaacactc catgcatctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggccag ctacttgaga ggctgaggca ggagaattgc ttgaacccag gaggcataga 180
ttgtgatgag ccaagatcgc accattgcat gccagcctcg gcaacaaaag tgaaactcca 240
tctcaaaaaa aaaagaaagg gaaagactcc actggggctc ccactaaata accctctctc 300
aacccgaagt cttcctttct gactggatcc aactttgtct tccagaacca ggcagatcgg 360
atccttcctt tcccttccct ttcctc 386

<210> 15
<211> 605
<212> DNA
<213> 合成构建物

<400> 15
caccaaccca aaccaaccca aaccggctca cgcctgtaat cccaacactc catacgtctg 60
gtgatgcgag ctcgactctg gggaaaacac tgggttttcc cagagtcgag cattctacct 120
gggaggccag ctacttgaga ggctgaggca ggagaattgc ttgaacccag gaggcataga 180
ttgtgatgag ccaagatcgc accattgcat gccagcctcg gcaacaaaag tgaaactcca 240

tctcaaaaaa aaaagaaagg gaaagactcc actggggctc ccactaaata accctctctc 300
aacccgaagt cttcctttct gactggatcc aactttgtct tccagaacca ggcagatcca 360
ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg 420
ttaattccga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg 480
ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggtgcctaa 540
tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcacgga tccttccttt cccttcccct 600
tcctc 605

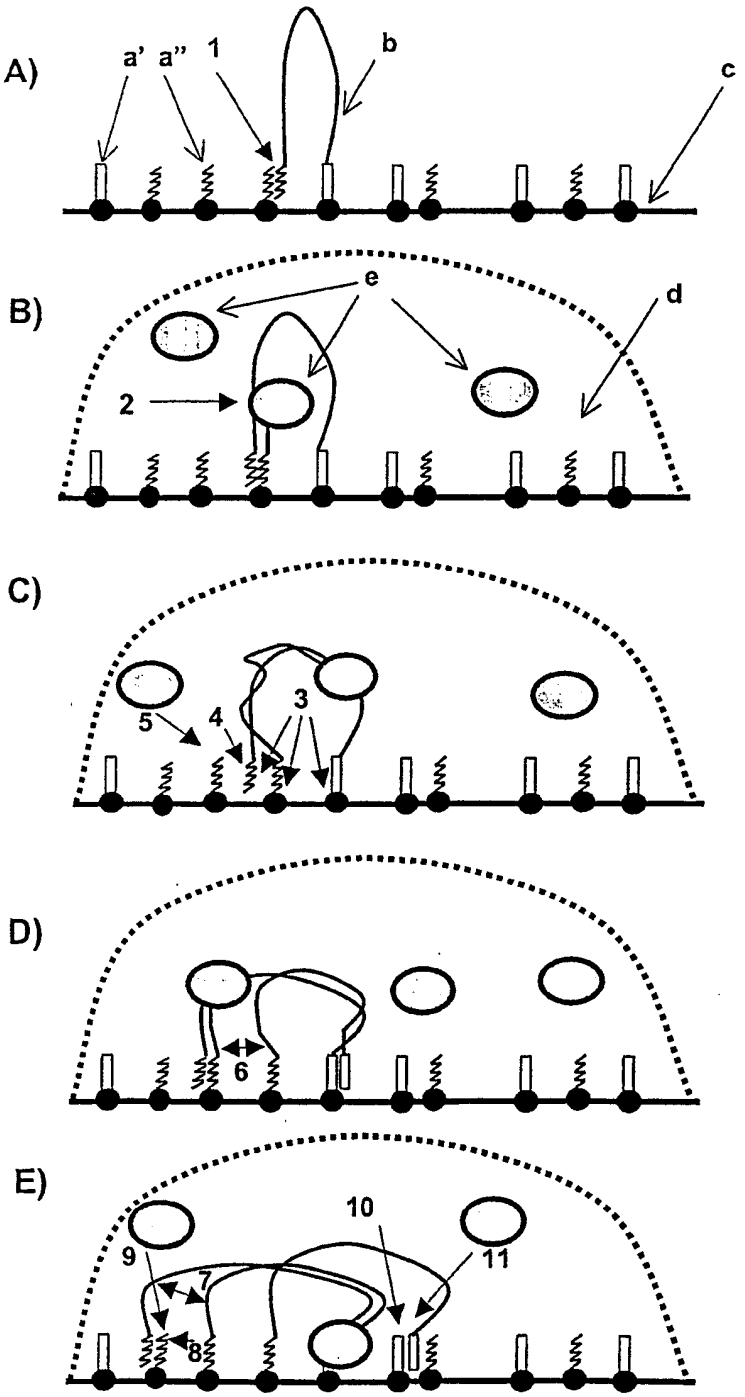


图 1

```
   1 GGGCCCCCCCCTCGAGAAGCCGTGCTGTCAGCATCAGCATCATCGGTGAGACCTCTCCCCA  60

  61 AGCCCTACAGACCCTGGGACTAGGGTGCAGGACAGCACAGGCTCTAATTTCCTGCCCCAT 120

 121 TCTGGCCTTATCCCTAACAGCCACCCCACCTCTCCCTCCATGCACCCACACCCAAGCCTC 180

 181 CCCTACCCCACCCAAATTCTGCCAAGAGAGCAGCCAAGCCTCTCCCTTCTTCCCTCTGAG 240

                                      ------P3------->
 241 CTAAAAAAAGGAACAGACGGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAACACTCCAT 300

                                                                <-
 301 GCATCTGGTGATGCGAGCTCGACTCTGGGGAAAACACTGGGTTTTCCCAGAGTCGAGCAT 360

     ---P155r-----                                  <----P203r----
 361 TCTACCTGGGAGGCCAGCTACTTGAGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGGAG 420

     --
 421 GCATAGATTGTGATGAGCCAAGATCGCACCATTGCATGCCAGCCTCGGCAACAAAAGTGA 480

 481 AACTCCATCTCAAAAAAAAAAGAAAGGGAAAGACTCCACTGGGGCTCCCACTAAATAACC 540

                                                      <---P386r--
 541 CTCTCTCAACCCGAAGTCTTCCTTTCTGACTGGATCCAACTTTGTCTTCCAGAACCAGGC 600

     -----
 601 AGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTA 660

 661 GTGAGGGTTAATTCCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG 720

 721 TTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGG 780

                                    <----P605r-----
 781 TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA
```

图 2

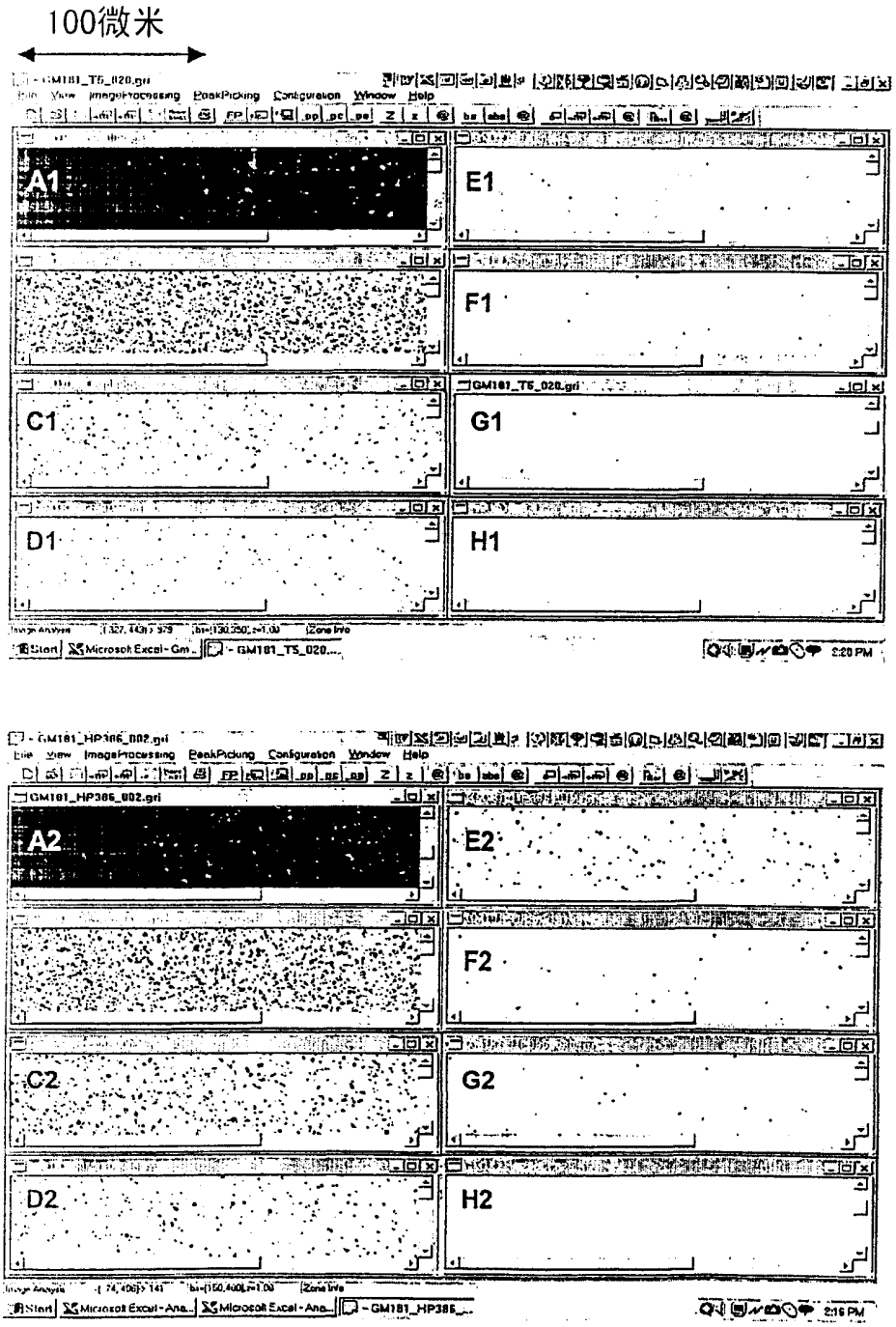


图 3

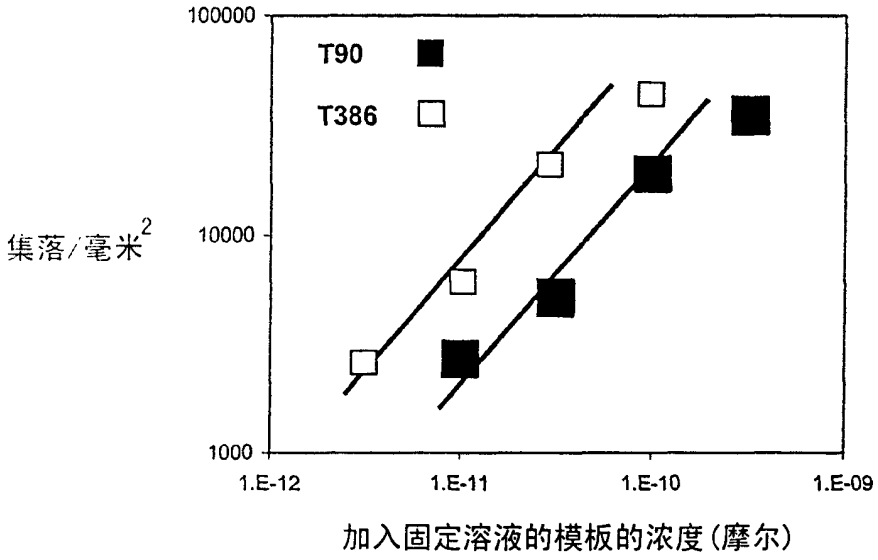

100000
10000
1000
T90
T386
集落/毫米^2
1.E-12
1.E-11
1.E-10
1.E-09
加入固定溶液的模板的浓度(摩尔)

图 4

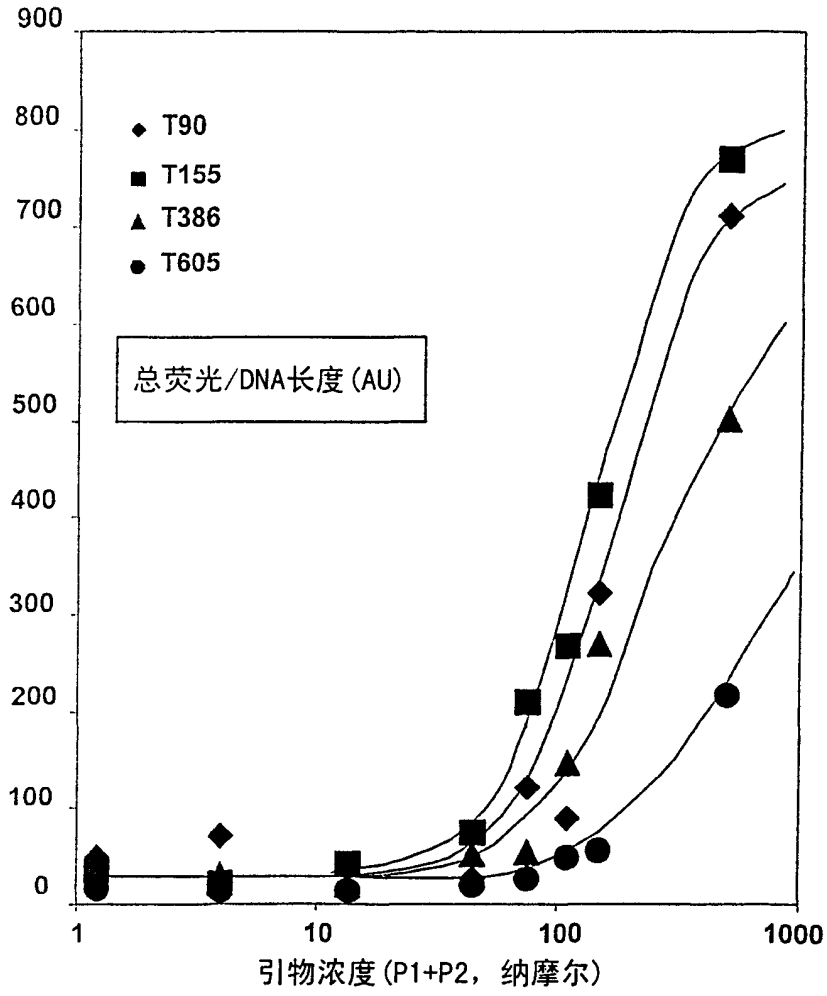

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
T90
T155
T386
T605
总荧光/DNA长度(AU)
1
10
100
1000
引物浓度(P1+P2，纳摩尔)

图 5

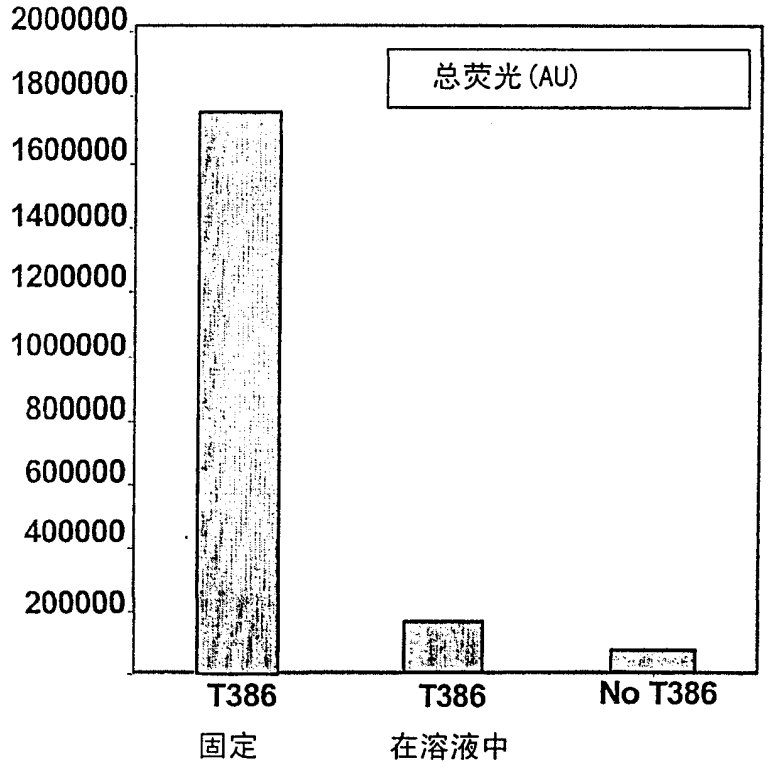

2000000
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
总荧光(AU)
T386
固定
T386
在溶液中
No T386

图 6

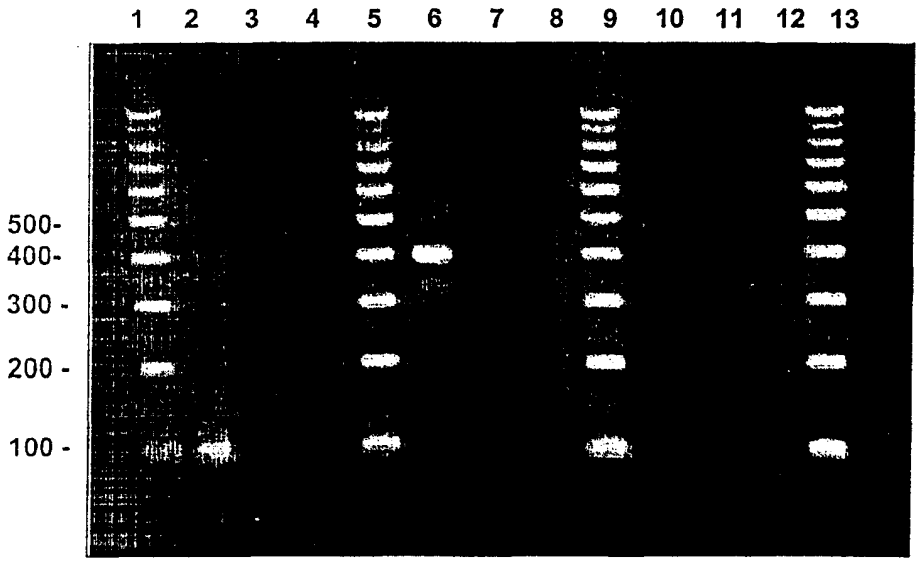


图 7

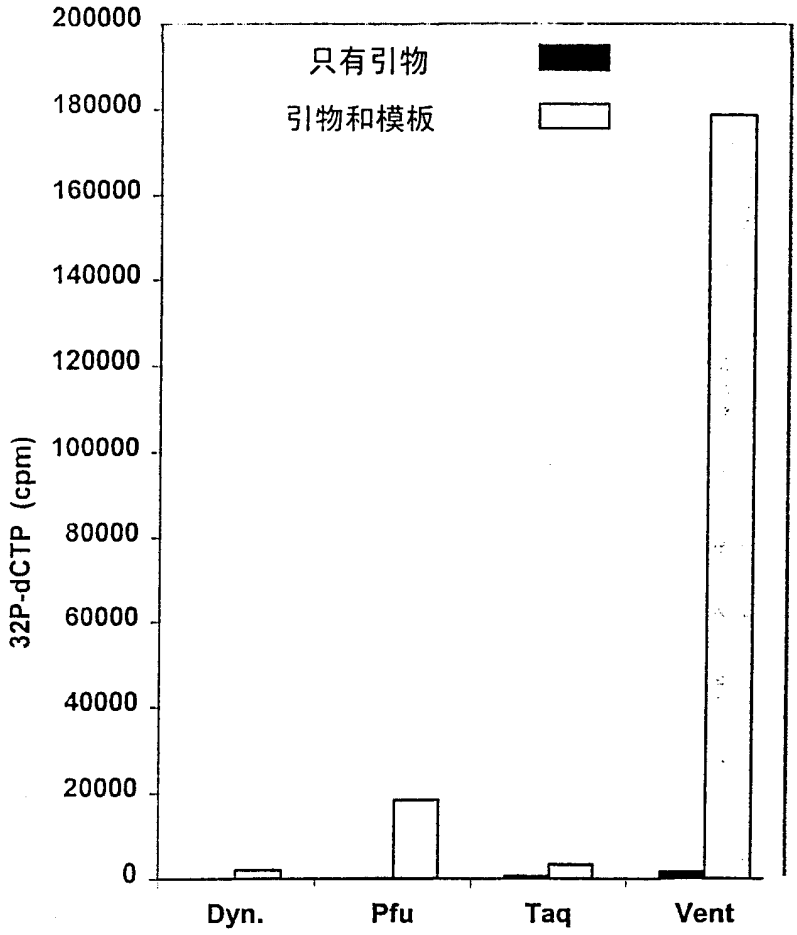
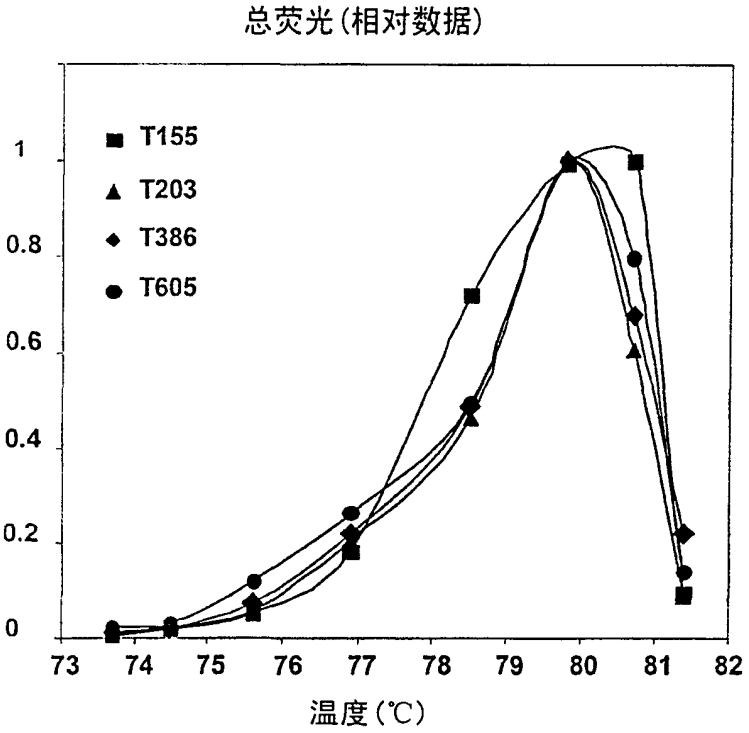

200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
32P-dCTP (cpm)
只有引物
引物和模板
Dyn.
Pfu
Taq
Vent

图 8

A)


总荧光(相对数据)
T155
T203
T386
T605
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
温度(℃)

B)

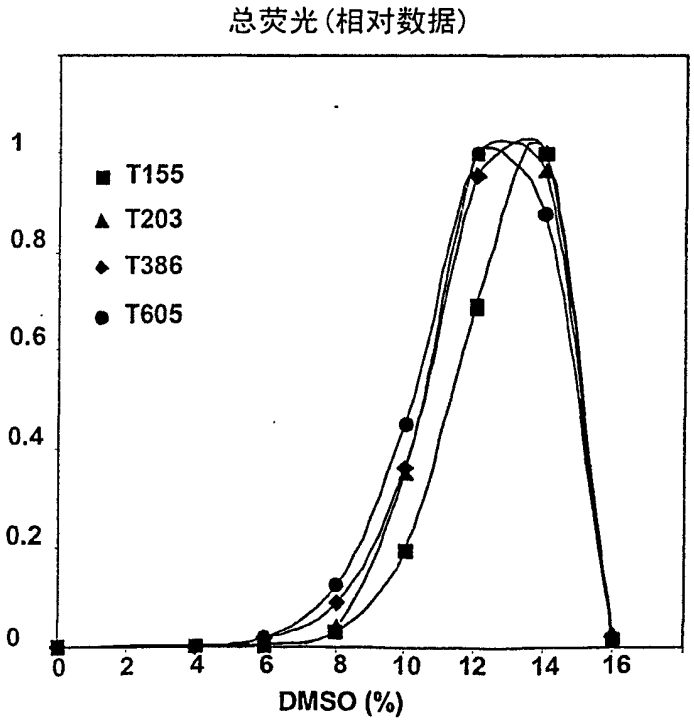

总荧光(相对数据)
T155
T203
T386
T605
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
DMSO (%)

图 9

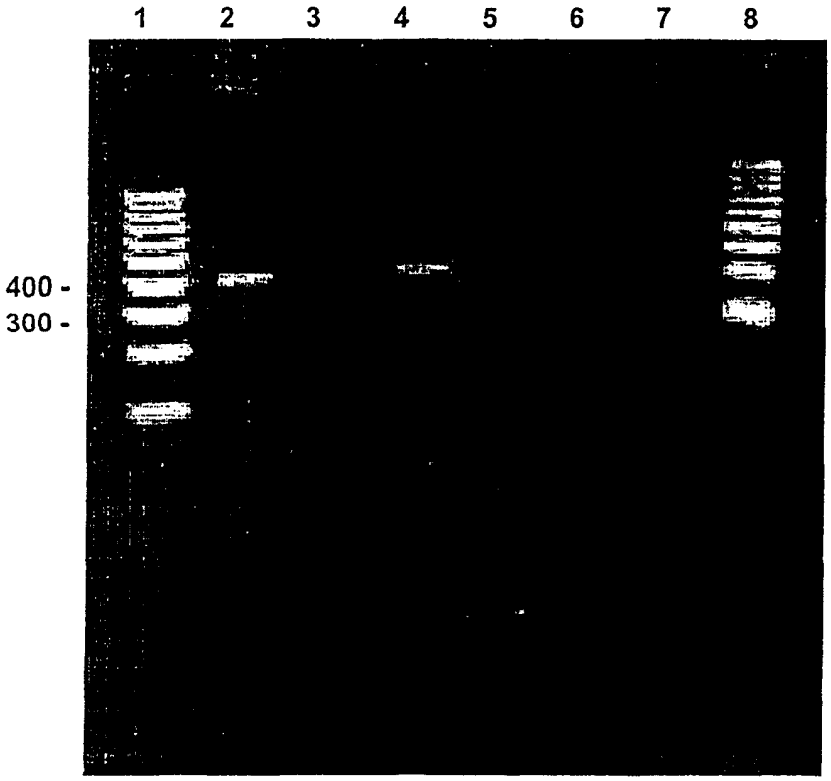


图 10