

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95115026. X

[45] 授权公告日 2001 年 10 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1073160C

[22] 申请日 1995. 7. 14 [21] 申请号 95115026. X [30] 优先权 [32]1994. 7. 16 [33]DE [31]P4425264. 1 [32]1994. 9. 2 [33]DE [31]P4431269. 5 [73] 专利权人 罗赫诊断器材股份有限公司 地址 联邦德国曼海姆 [72] 发明人 R · 塞布尔 V · 罗泽迈尔 [56] 参考文献 <table><tr><td>US 5200314</td><td>1993. 4. 6</td><td>C12Q1/68</td></tr><tr><td>US 5422253</td><td>1995. 6. 6</td><td>C12Q1/68</td></tr></table> 审查员 刘素萍	US 5200314	1993. 4. 6	C12Q1/68	US 5422253	1995. 6. 6	C12Q1/68	[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 代理人 王景朝 权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图页数 8 页
US 5200314	1993. 4. 6	C12Q1/68					
US 5422253	1995. 6. 6	C12Q1/68					

[54] 发明名称 灵敏检测核酸的方法

[57] 摘要

本发明涉及通过与探针核酸杂交来灵敏检测靶核酸的方法。探针核酸含有能与靶核酸杂交的部分及不与靶核酸杂交的核酸特异性部分。本发明方法进一步包括探针核酸的裂解、含有不与靶核酸杂交的探针核酸的裂解产物与基质核酸杂交,基质核酸含有能与裂解产物杂交的部分和不能与探针核酸杂交的部分。本发明方法也包括检测由裂解产物与基质核酸组成的杂合体及适用于该目的的试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 灵敏检测靶核酸 A 的方法, 包括:

(a) 靶核酸 A 与探针核酸 B 杂交, 所述的探针核酸 B 具有 5' - 末端和 3' - 末端, 和其中所述的探针核酸 B 含有能与靶核酸 A 的至少部分杂交的 B1 部分和不与靶核酸 A 杂交的 B2 部分;

(b) 裂解所述的杂交探针核酸 B 以产生裂解产物 B', 其中所述的裂解产物 B' 具有 5' - 末端和 3' - 末端, 和其中所述的裂解产物 B' 含有所述的 B2 部分;

(c) 使所述的裂解产物 B' 与基质核酸 C 杂交, 其中所述的基质核酸 C 具有 5' - 末端和 3' - 末端, 和其中所述的基质核酸 C 含有与所述的裂解产物 B' 的至少部分杂交的 C2 部分和不与所述的探针核酸 B 的所述的 B1 部分杂交的 C1 部分; 和

(d) 测定步骤(c)中形成的杂合体的存在以检测所述的靶核酸 A。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述的测定步骤(d)含有延伸的所述的裂解产物 B' 形成的核酸, 其是与所述的基质核酸 C 的 C1 部分互补的。

3. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于基质核酸 C 在 C1 部分含有启动子序列。

4. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于延伸是利用非放射性标记的单核苷酸进行。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于 C1 部分位于 C2 部分的 5' - 方向。

6. 根据权利要求 2 的方法, 其特征在于通过用非延伸性单核苷酸保护基质核酸 3' - 末端以避免其延伸。

7. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述的裂解产物 B' 的 5' - 末

端与所述的探针核酸 B 的 5' - 末端相同, 在杂交复合体中所述的裂解产物 B' 的 5' - 末端不伸展超过所述的基质核酸 C 的 3' - 末端。

8. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于裂解探针核酸后, 释放出的靶核酸再与其他的探针核酸分子杂交。

9. 检测靶核酸的试剂盒, 包括:

- 探针核酸 B, 它含有能与靶核酸杂交 B1 部分和不与靶核酸杂交的核酸特异性 B2 部分,

- 基质核酸 C, 它含有与探针核酸在 B2 部分杂交的 C2 部分,

- 不与探针核酸 B1 部分杂交的 C1 部分,

- 酶, 它包括用于消化探针核酸中 B1 部分的裂解酶和用于核酸的基质依赖性合成的聚合酶,

- 适宜的缓冲液。

10. 根据权利要求 9 的试剂盒, 其特征在于它含有作为裂解酶的 RNase H 和作为用于核酸的基质依赖性合成的酶的 DNA 聚合酶。

11. 根据权利要求 10 的试剂盒, 进一步含有 RNA 聚合酶。

灵敏检测核酸的方法

本发明的主题是灵敏检测核酸的方法，包括探针核酸与靶核酸杂交、消化被杂交的探针核酸部分和检测裂解产物。本发明还提出了一套适合于上述目的的试剂。

核酸杂交因其特异性而成为分子分析方法中的常用工具。为了检测探针分子，已开发了许多不同的扩增方法以提高常规检测法通常不足的灵敏度。用于该方法的方法是基于实际靶序列的扩增或基于靶序列特异性信号扩增。这类扩增靶序列的例子如EP-A-0200362中所述的聚合酶链反应，其中，靶核酸的两条链在体外的复制反应中得以扩增。该反应的温度在各循环中是变化的，以完成双链靶核酸的变性、与起始分子杂交，随后进行DNA合成，然后重复上述步骤。

但是，也可以借助体外转录完成靶序列的扩增。这类反应的例子如WO88/10315中所述。在该扩增反应中用了两条引物，其中之一含有启动子序列。引物分别与待扩增序列的不同链互补。EPA329822描述改良的方法，其中作为中间产物的双链核酸产物被转录，生成核糖核酸，后者以杂合体形式被消化以使新合成的DNA与含启动子的引物分子杂交。经消化最初形成的转录子，有可能由每一如此产生的RNA形成另一种双链、含启动子的核酸。这些核酸分子然后可被用于启动另一次转录。

与上述方法相反，靶特异性序列信号扩增并不扩增靶序列，但代之以用于其特异性鉴定。为此，信号依赖于靶序列的存在而被扩增。这类方法在WO 89/09284和WO 89/10415中有描述。该循环探针反应(CPR)利用了被标记的、嵌合DNA-RNA-DNA探针分子，该分子与靶DNA分子杂交。杂交的结果形成了充当RNase H底物的RNA-DNA杂合体。由于RNase H特异地消化RNA-DNA杂合体中的RNA部分，因此探针分子被裂解，且所得的片段也因较低的熔点温度而自靶序列中分离出来。随后，靶分子可与另外的探针分子杂交，循环得以重复。经标记物的附着检测探针分子片段。

本发明的目的是提高检测方法的灵敏度，包括靶核酸与探针分子杂交，然后用探针分子的消化产物检测靶核酸。

因此，本发明的主题是灵敏检测靶核酸A的方法和实施该方法的试剂盒，所说方法包括：

- 靶核酸A与探针核酸B杂交，该探针核酸B含有至少一部分与靶核酸杂交的B1部分和不与核酸杂交的核酸特异性部分B2，
- 裂解B1部分的探针核酸B，
- 含不与靶核酸杂交的B2部分的核酸B的裂解产物B'与基质核酸C杂交，该基质核酸C含有能与B2部分裂解产物杂交的C2部分和不能与探针核酸的B1部分杂交的C1部分，
- 检测裂解产物B'和基质核酸C的杂合体。

本发明的方法是检测靶核酸A。所说的靶核酸可以是任何所需的来源，如病毒、细菌或细胞的核酸。它们可存在于溶液、悬浮液中，也可以固定在固相支持物上，或者存在于含细胞的培养基、cytosmear、固定细胞、组织切片或固定生物体中。在优选的方法

中，核酸存在于溶液中。

通常，检测方法的第一步是用相应的试剂得到靶核酸。这包括改变PH值(碱性)、加热、重复极端温度的变化(冷冻/解冻)、改变生理性生长条件(渗透压)、去污剂的作用，离液序列高的盐或酶(例如蛋白酶、脂酶)，这些方法可以单独使用或结合应用，以释放核酸。因为本发明的方法非常灵敏并具有很好的选择性，所以不仅可检测存在于其它物质如蛋白质、细胞、细胞碎片中的微量核酸，而且还可以检测存在非靶核酸中的微量核酸。

例如，适宜的靶核酸为核糖核酸或脱氧核糖核酸。所说核酸可在例如处理步骤前中被修饰。这类处理步骤包括如利用限制性酶消化核酸。特别优选的靶核酸是脱氧核糖核酸(DNA)。

本发明的方法是以杂交结果，尤其是靶序列特异性信号扩增基础上的具体的检测实施方案。以杂交为基础的检测的基本原理是核酸诊断领域中的专家已知的。除非下文对实验细节进行描述。参考文献是“Nucleic acid hybridization”，(edited by B. D. Hames and S.J. Higgins, IRL Press, 1986, 例如第一章(杂交策略)、第三章(溶液杂交的定量分析)和第四章(定量过滤杂交)); Current Protocols in Molecular Biology, (Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987; Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989)的全文。其它已知方法包括制备标记的三磷酸核苷(如EP-A-0324474所述)、化学合成被修饰和未修饰的寡核苷酸、用限制性酶裂解核酸、选择杂交条件以达到某种既依赖于待杂交核酸间互补程度又依赖GC含量及长度的特异性，以及借助聚合酶并且也可以利用所谓的引物由三磷酸核

苷合成核酸。

本发明所理解的标记包括直接或间接可检测的L基团。直接可检测的基团例如有放射性活性(^{32}P)，生色或荧光基团，或者金属原子。间接可检测的基团例如有免疫或酶活性化合物，如抗体、抗原、半抗原或酶，或酶活性不完全酶。它们在后续反应或反应序列中被检测。特别优选的是半抗原。当半抗原用作三磷酸核苷上的标记物时，它们特别适合作为聚合酶的底物，并用于具有针对半抗原或半抗原化核苷的标记抗体的后续反应中。这类三磷酸核苷例如可以是bromium 三磷酸核苷或异羟基毛地黄毒一、异羟基毛地黄毒苷一、生物素一或荧光素一偶联的三磷酸核苷。特别合适的是已在EP-A-D324474中介绍的一类固醇类及其检测。有关核酸结合的更详细情况参见EP-A-0324474。

可能的三磷酸核苷(NTP)是三磷酸核糖核苷(rNTP)或三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)。

可用作探针核酸B的分子是含有彼此相连的B1和B2两部分的那些分子。B1部分的特征在于它能与靶核酸或至少其一部分杂交。为此，该部分具有足够互补性的。然而，B1部分在与靶核酸以杂交形式存在时必须能被裂解。裂解在本文中理解为将B1部分分成不再彼此相连的二个或多个片段，而与此同时靶核酸并不被裂解。B1部分因此可含有核糖核酸或abasic序列。在优选的情况下，B1部分含有二个或多个以常规方式彼此相连的单核糖核酸单位，而与其互补的靶核酸部分是脱氧核糖核酸。在这种情况下，裂解探针核酸B的B1部分可以在所形成的杂合体与RNase H接触下完成。如果存在abasic序列，就可借助AP核酸内切酶进行消化。

至少有一部分可杂交的B1部分被消化。这就产生裂解产物B'，它含有不与靶核酸杂交的核酶选择性B2部分，并可能含有最初已与靶核酸杂交的B1部分的一部分。

最好选择靶核酸与探针核酸杂交的条件，以正好进行探针核酸与靶核酸的特异性杂交而防止探针核酸与非检测的其它样品核酸发生非特异性杂交。裂解探针核酸所产生的包括裂解产物B'的片段比原始探针核酸短，并将不能再与靶核酸在所选择的杂交条件下形成稳定的杂合体。因此，它们在所选择的条件下将释放出靶核酸A。

裂解探针核酸也可导致仅含B2部分或还保留B1部分的不同B'片段，这取决于所用条件。

核酸的核酸特异性部分理解为能够与除靶核酸外的其它序列杂交的序列，它是通过在所选条件下发生的特异性杂交，即不存在和与该方法有关的反应混合物中的更多的核酸杂交。典型的核酸特异性部分是探针核酸的B2部分和基质核酸的C2部分。

探针核酸的核酸特异性B2部分不与靶核酸杂交，它还必须保证在进行B1部分的靶序列特异性消化条件下自身不被消化。此外，它还必须能够与基质寡核苷酸(将在下文定义)杂交。B2部分的序列主要是按需选择。必须考虑的是，在与靶核酸存在互补性的情况下裂解产物B'与基质核酸的杂交就变得更加困难了。这将非常可能降低与最理想情况相比的灵敏度。另外，应避免探针分子趋于形成双链。B2也可以是核糖核酸、脱氧核糖核酸或被修饰的核酸。假使可杂交的B1部分含有核糖核酸，可用RNase进行裂解，B2部分最好不是在优选方法中的这些条件下可以被裂解的核糖核酸，

它应是脱氧核糖核酸。但是，B2也可以是修饰后不再被RNase裂解的核糖核酸。另一种选择是利用核酸类似物，它仍然表现出核酸的杂交特性，但不再具有磷酸—糖链部分。特别适合于这一目的登WO 92/20702或WO 86/05518中描述的PNA分子。该部分不与靶核酸杂交的条件尤其涉及到用于探针核酸与靶核酸杂交的条件。在优选的方法中，选择B2部分以使它不与非检测样品的核酸杂交。然而，B2部分应含有能与基质核酸杂交的序列。可以按需选择靶核酸与探针核酸杂交及基质核酸与裂解产物B'杂交的条件。

本发明的基质核酸C含有C2部分，该部分能够与裂解产物B'，并且尤其是其核酸特异性B2部分或其部分及与可能存在的B1 残留物杂交。对于基质核酸C而言，适合的分子是那些容许进行这类杂交的所有分子，即由天然核苷酸成分组成的核酸；但也有可能是由并非天然存在成分组成或含有这类成分的核酸类似物。另外，基质核酸在所选择的条件下对于消化作用应是稳定的。假使用RNase裂解探针核酸，那么特别优选的基质核酸是脱氧核糖核酸。除了C2部分，基质核酸也含有不与B1部分杂交的C1 部分或探针核酸B1部分的残留物，在特别优选的方法中，该C1 部分在所选择的条件下与非检测样品核酸或与靶核酸本身不形成稳定的杂合体。优选的是C1部分位于从C2部分开始的5'方向。

如果在后续反应中将检测脱氧核糖核酸的掺入，则优先选择基质核酸和核酸特异性B2部分以使裂解产物B'或探针核酸的5'末端在其杂交条件不延伸到基质核酸的3'末端。这将防止基质核酸的酶性伸展。通过保护基质核酸的3'末端以防止酶性伸展(例如利用非延伸性单核苷酸)可以达到同样的效果。

在任何情况下都应该保证一个或数个裂解产物B'能与基质核酸杂交,这样使B'也能与基质核酸在裂解所形成的末端杂交,并且使基质核酸的C1部分在杂交时仍能延伸超过裂解所产生的裂解产物B'的末端。

在紧接的步骤中测定由裂解产物B'和基质核酸C组成的杂合体。进行这一测定是使得可能形成的、由非裂解的探针核酸B和基质核酸C组成的杂合体不被检测。

这些选择之一是基于一个事实,即裂解产物B'借助基质核酸C被延伸而未裂解的探针核酸B不被延伸。这是由于上述的结构特点,即基质核酸不与探针核酸的B1部分杂交,而裂解产物B'与基质核酸杂交。裂解产物B'特别是在裂解位点(B'的3'末端)与C杂交。因为基质核酸的末端延伸过裂解产物的末端。所以与基质核酸C的相应部分互补的核酸可以在延伸反应中连接。这类延伸反应存在几种变体。一种变体是借助DNA聚合酶的单核苷酸连接。在优选的情况下,所用三磷酸单核苷酸是被标记的(例如EP-A-0324474)。如果三磷酸单核苷酸未被标记,延伸产物的形成可经凝胶电泳分离进行检测。在一个具体的实施方案中,也有可能掺入两种不同的标记。在这种情况下,一种标记可用于固定所形成的延伸产物,而另一种标记用于检测。在例如EP-A-0437774中所述的条件下是可能的。

在另一实施方案中,裂解产物B'在聚合酶链反应中充当引物。在未裂解时,探针核酸B不能作为引物。此时,PCR的模板是基质核酸C。当使用两种不同的探针核酸B时,即当它们与彼此互补的靶核酸不同区域杂交时,在PCR中可产生两种引物。

延伸裂解产物B'的另一种可能性是连接酶反应。在这种情况下，加入与基质核酸杂交的寡核苷酸，这就使得在杂交的裂解产物B'和该寡核苷酸之间留有一个缺口。然后用连接酶闭合缺口。

在另一优选实施方案中，基质核酸的C1部分含有转录或复制起始序列。C1最好含启动子序列。在基质控制的裂解产物B1的延伸过程中形成了一个功能性全启动子。在延伸的确发生时才能出现的转录启动后，可以检测裂解产物的产生并因此检测靶核酸的存在。为此，向反应混合物中加入转录所需的所有试剂，包括启动子特异性RNA聚合酶，如T7 RNA聚合酶，以及携带了标记的三磷酸核糖核苷。然后用存在的转录本检测靶核酸。例如，在EP-A-0329822中描述了体外转录所需的条件和试剂。与第一实施方案相比，灵敏度在随后进行转录时是较高的。

选择本发明方法的温度以使所用酶的活性尽可能理想，与此同时选择杂交条件，以使容许产生足够的特异性。应当用非热稳定性RNase时，有益的温度范围是30°C-60°C，优选温度42°C。当应用热稳定性RNase时，还有可能选择更高的温度。用于延伸反应的温度也取决于用于延伸反应的酶。对于应用热稳性酶而言，如Taq-DNA聚合酶，优选温度为50°C-80°C，特别优选的温度为60°C-70°C。当用转录酶时，理想的温度也取决于酶的活性，例如，对于T3、T7和SP6聚合酶的温度为25°C-45°C，特别优选的是37°C。

通过增加酶存在于反应位点的机会，有可能提高基因转变率，这反过来又减少了所需的反应时间或提高了灵敏度。

基质核酸也可以是环形分子。在种情况下，优选使用具有链置换活性的延伸酶。

高度灵活性和可能的双标记使得在试验条板上应用本发明方法，或通过偶连到珠上进行检测及通过流式细胞仪或毛细作用电泳进行后续检测。

在可能的实施方案中，基质核酸部分含有充当合成可复制RNA(例如MDV1RNA或更短的序列)基质的序列。

首要地，探针核酸和基质核酸一经被测序就可根据已知方法制备。如果在优选的情况下使用长度小于100单核苷酸的寡核苷酸，则优选的按普通化学方法(例如固相合成法，Merrifield)合成。这也使得很容易合成混合的寡核苷酸(RNA/DNA嵌合体)。对于较长的核酸，遗传工程或化学/酶学方法(如EP-A-325970中所述的)是优选的。B1部分具有12-35核苷酸的优选长度，B2部分优选15-50核苷酸，C1部分优选10-100核苷酸，C2部分优选15-50核苷酸。

图1表示本发明的第一实施方案，它是基于借助DNA聚合酶掺入非放射性标记的三磷酸脱氧核糖核酸。

图2图示一个实施方案，其中基质寡核苷酸含有转变成随后转录的、功能性启动子的启动子序列。该启动子序列用影线表示。

图3表示图1方法的灵敏度有赖于探针核酸与用于各反应混合物中的10pmol基质核酸的量。

图4-6说明用图1的方法检测DNA序列的特异性有赖于杂交和消化反应的保温温度(42°C、50°C和56°C)。

图7表示根据图2的方法进行检测的灵敏度。

图8图示一个实施方案，其中探针核酸与基质核酸彼此相连。

当加入各个所需试剂时，图中所示步骤可相继进行。给出了成分的相应设计后，也可在反应的开始加入所有必需的成分，以

同时发生反应过程。

在第一优选的实施方案中(图1), 嵌合的RNA-DNA或DNA-RNA-DNA 探针分子被加入到含有靶DNA 的样本中以使之杂交。由于RNase H的作用, 探针的靶序列特异性RNA部分被消化。继而, 设置适宜的杂交条件, 同时加入基质寡核苷酸和DNA聚合酶以及标记和非标记的三磷酸脱氧核苷。用例如从未反应的标记三磷酸脱氧核苷中分离核酸的方法来检测标记单核苷酸的掺入。当用两种不同的标记核苷酸时, 就可能用直接的、固相基检测。若样本中不含靶DNA, 基质寡核苷酸仅与嵌合的RNA-DNA探针分子杂交。因为探针分子的3'末端不与基质寡核苷酸杂交, 所以它的延伸是不可能的。

在第二个优选的实施方案中(图2), 样本中所含的靶DNA 也可以与嵌合的RNA-DNA探针分子或DNA-RNA-DNA 探针分子杂交。由RNase H的作用消化靶序列特异性RNA部分后, 裂解产物可与一寡核苷酸杂交, 该寡核苷酸在其5'末端延伸过裂解产物的末端, 并含有单链启动子序列。经加入DNA聚合酶和三磷酸脱氧核糖核苷酸, 裂解产物的3'末端得以延伸, 形成功能性启动子。所得的双链核酸借助RNA聚合酶和三磷酸核苷进行转录。各种聚合酶的启动子序列是专业人员已知的(如Nucl. Acids Res. 12,7035-7056(1984))。

在第三个实施方案中(图8), 探针核酸和基质核酸不是分开的分子, 而是彼此相连。为此, 基质核酸的一端与对面相隔的B1 的探针核酸的B2末端相连, 以使C2部分和B2 部分能杂交形成发夹结构, 与此同时B1部分和C1部分变成该发夹分子的末端。B2 部分和C2部分可以任何所需方式连接, 例如共价连接, 此时最好用单核

核苷酸单位(如 oligo-dA)。为形成发夹结构,推荐在可杂交的C2部分和B2部分之间提供一个3-20核苷酸或长度等同物的连接子。假如B2位于探针分子5'末端,则提供的B2的5'末端与C2的3'末端间的连接。该实施方案的优点在于探针核酸与基质核酸杂交部分的空间邻近提高了反应速度。

对图8实施方案的描述也可以类似地用于图2(启动子的形成)。

本发明方法的优点是探针核酸B不需要带有标记。这使得易于合成探针核酸,但也有因这些标记的背景信号不可能在以后的检测反应中出来的后果。在本发明的方法中,靶序列不被扩增。因此而排除了以前的实验中因扩增的分子而带来污染的危险。在本发明的方法中,终反应的产物并不用作下一个第一反应步骤中的底物。反应因此而易于被控制。由于扩增反应基本上是线性的这一事实,而使得定量测定容易起来。另一方面,获得假阳性结果的危险也降低了,所说的假阳性是由于原始阴性样本与对指数扩增系统而言少量的实际阳性样本的交叉污染。本发明方法不要求保温温度循环变化的技术设备。本发明的方法也有很大的灵活性,应用根据EP-A-0437774 的两种不同的放射性标记使得可与固相结合并检测产物。因为本发明方法中反应步骤的连续性完全依赖于探针分子与靶序列的特异性杂交,所以不产生因存在非特异性结合或有未杂交的探针分子,例如在可复制性核糖核酸序列(QB复制)扩增过程而产生的背景信号。与使两种或多个不同序列的寡核苷酸在一个混合物中反应的方法相反,本发明的方法中几乎完全排除了寡核苷酸的非特异性反应(例如PCR中的引物二聚体)。本发明方法可在非严紧性条件下完成。这也使得可以检测相关的序列。

当在非常严紧的条件下进行检测时，还有可能检测点突变。由于本发明除了最初所用的标记探针分子外不需要检测标记的、截短的探针分子，所以不使用凝胶电泳法分离分子。因此本方法是自动化的，可用于常规分析过程。

本发明另一个主题是进行上述检测反应的试剂盒。该盒含探针核酸分子B和分开或合装的基质核酸C。在优选的方法中，试剂盒还含有用于杂交和消化反应和/或延伸反应的缓冲液。在特别优选的方法中，试剂盒含有可检测的标记三磷酸单核苷。如果试剂以两个不同的容器提供，第一容器最好含有探针核酸、进行消化反应的酶和适宜的缓冲液。在第二容器中，有基质核酸、至少一种用三磷酸单核苷进行延伸反应的酶和适宜的缓冲液。

下面的实施例更详细地解释了本发明。

实施例1

掺入标记单核苷酸的方法

在下面的描述中，用在寡核苷酸中的大写字母表示脱氧核糖核苷酸单位，小写字母表示核糖核苷酸单位。

方法：

将1pmol、10pmol或100pmol 的RNA-DNA探针分子LPR03-19R: 5' GATCGGACTGGAAGTAATACGACTCACcgccgcgucgcagaagauc-3' (SEQ. ID.NO.1) 或 LPR03-25R: 5'- GATCGGACTGGAAGTAATACGACTCACcgccgcgucgcagaagaucucaauc-3' (SEQ. ID NO.2) 与各种含量的待测DNA (DHBV1: 5'-GATTGAGATCTTCTGCGACGCGCGGT-3' (SEQ. ID.NO.3)) 以10 μ l体积在加入3 μ g BSA, 20U RNasin 和4U RNase H的P2缓

冲液(10mM Hepes, 1mM $MgCl_2$, pH8.0)中于42°C保温3小时。然后加入10pmol基质寡核苷酸TAQ(5'-ATTCCATGATTCATTGATTATTGTCGCGGCGGTGAGTCGTATTACTTCCAGTCCGATC-3' (SEQ. ID. NO.4)。混合物加热至100°C 1分钟, 立即置冰上冷却。对于聚合酶反应, 加入2 μ lTaq缓冲液(10mM Tris pH 8.3, 50mM $MgCl_2$, 1.5mM $MgCl_2$, 0.1mg/ml白明胶)、核苷酸混合物1-3(各1 μ M dATP、dGTP、dCTP、DIG-dUTP(Boehringer Mannheim) 和 BIO- DUTP(Boehringer Mannheim))、20U RNasin、1U Taq-DNA聚合酶和水至终体积20 μ l。60°C保温15分钟。

为了检测, 用缓冲液D(10mM HEPES (pH8.0), 30mM NaCl, 1mM $MnCl_2$)稀释反应混合物至210 μ l。通过吸移100 μ l缓冲液D稀释的反应混合物至预行用洗涤缓冲液(0.5%V/V吐温20于PBS中)洗过的SA-MTP的S孔中将BIO-DIG 反应合成产物固定在链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板上(TRSA-SA-MTP, MicroCoat生产的)。MTP于37°C振动保温1小时(Well-Warml, Denley Instruments GmbH生产的)。

带有固定的核酸分子的MTP用200 μ l洗涤缓冲液洗5次。然后, 加入100 μ l连接稀释液[polyclonal<DIG> -S-Fab-PODpoly连接物(Boehringer Mannheim GmbH), 以200mU/ml溶于连接缓冲液中(100mM磷酸钠(pH7.5)、0.9%(w/v)NaCl, 1%(W/V)Ralufon F4J 或 BSA Fraction V; 连接缓冲液用DEPC消毒处理、过滤(0.2 μ m滤器, Nalgene生产的)并于4°C贮存)], 在同等条件下保温(1小时, 37°C)。

未结合的连接分子通过洗涤5次去除。现在每孔加入100 μ l底物液(2, 2'-叠氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉硫酸(6)], ABTS)。在

摇动下于37°C发生颜色反应。简短振荡微滴定相后，在405nm测量转变ABTS的O.D.，然后对492nm的参考滤纸用ELISA阅读仪(SLT)测量。减去零值后(仅ABTS)得到两次结果的平均值(SLT Easy- Base Version 4.01)。

灵敏度

为了检测本发明方法的灵敏度，在上述的反应混合物中应用浓度为10pmol的基质核酸。结果如图3所示。图3的曲线表示在所用的反应条件下(10pmol基质寡核苷酸，RNase H的量、保温体积、保温温度等)，用10pmol 探针分子得到了最灵敏的检测。仅用1pmol 探针核酸可能限制了第一步反应，杂交和消化。当应用100pmol探针核酸时，并非所有消化的探针分子均能与基质寡核苷酸杂交并因此得以延伸。因此可以认为，在所选用的条件下，每个混合物用10pmol探针核酸得到最高灵敏度，并且在该条件下可以检测出10amol的靶核酸。这一检测极限比WO89/10415的方法在同等条件下检测0.1fmol核酸要低大约10倍。

温度依赖性

为了描述实施例1中本发明方法的温度依赖性，将10pmol探针核酸用于每次检测，并在0.01-100amol靶核酸与RNase H存在下于42°C(图4)、50°C(图5)和56°C(图6)保温。所有后续的结合酶反应均在60°C进行。与ABTS一起保温30分钟后进行分析。所用探针分子是HBV1或MM1 DHBV1(5'-GATTGAGATCTTATGCGACGCGCGGT-3', SEQ. ID. NO. 7)(一个碱基错配)或MM3DHBV1(5'-GATTGAGATCTCACGCGACGCGCGGT-3', SEQ. ID. NO. 8)(三个碱基错配)。在进行消化反应的42°C保温温度，实验产生几乎相同的曲线，并因此导致本发明

方法弱的序列特异性。当将保温温度升至50°C来提高严紧性时，良好互补的寡核苷酸HBV1 和形成一个碱基错配的寡核苷酸产生类似的用于检测的曲线。但是，与42°C的保温温度相比，灵敏度已经降低，原因是RNA部分的不完全消化。形成三个碱基错配的寡核苷酸产生极低的信号，这是由于在更严紧的条件下杂交率较低。得到最高的特异性是在56°C的保温温度。100amol DHBV1产生清晰的信号，100amol MM1 DHBV1导致较低的OD值，而 100amol MM3 DHBV1不能检测到。这表明本发明方法容许进行核酸序列特异性检测。在3×3系列中，应用了 10pmol 探针核酸与不同量（0.01-100amol）的、良好互补的靶核酸DHBV1、产生一个中心碱基错配的靶核酸MM1 HBV1和产生三个中心碱基错配的靶核酸MM3 DHBV1。第一组3个系列物在42°C保温，第二组3个系列物在50°C保温，第三组3个系列物在56°C保温。每一系列物的阴性对照是无靶核酸的反应混合物。所有的聚合酶反应均在60°C进行。在用链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板中进行的后续检测反应中测得的数值示于图4-6中。

实施例2

形成功能性启动子的方法

方法：

将10pmol RDCPTAQ

(5'-ATGATAGTTGATGATAGTTGGATATcgccgccuggcagaagauc- 3'
(SEQ. ID. NO. 5))与不同含量(0.01amol-10fmol)的DHBV1 (5'-GATTGAGATCTTCTGCGACGCGCGGT-3' (SEQ. ID. NO. 5))以10μl体

积在加入3 μ g BSA、20U RNasin 和4U RNase H的P2缓冲液(10mM Hepes, 1mM $MgCl_2$, pH8.0)中与RNase H于42°C一起保温1 小时。用作阴性对照的反应混合物不含DHBV1。然后向每一混合物中加入10pmolQAT2(5'-GATCGGACTGGAAGTAATACGACTCACTATAGGGCGGCGATATCCAATATCATCAACTATCAT-3'(SEQ. ID. NO. 6))、2 μ l Taq缓冲液(10mM Tris PH8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.1mg/ml白明胶)和1mM dATG、dGTP、dCTP和dTTP。由Taq-DNA聚合酶催化的聚合酶反应在增至20 μ l的反应体积中于60°C进行15分钟。继而加入3 μ l 转录缓冲液(40mM Tris pH7.9, 6mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 2mM 亚精胺)、20U RNasin, 0.5 μ l 1% Triton x-100和500U T7-RNA 聚合酶及有DIG-UTP 和BIO-UTP的核苷酸混合物CP1(9.84 μ M ATP, 4.92 μ M GTP, 2.46 μ MCTP, 3.28 μ M UTP, 820nM DIG-UTP和 820nM BIO-UTP)。现在的总体积为30 μ l。在37°C保温2小时。为了进行检测反应, 所有的混合物用缓冲液D稀释至210 μ l, 吸移100 μ l至SA-MTP的一个孔中。如实施例1所述, 用<DIG>-PODpoly 和 ABTS(Boehringer Mannheim)进行检测, 结果如图7所示。

如由曲线所收集的结果看, 在所选择的反应条件下可检测1amol靶序列DHBV1。该检测极限比掺入标记的脱氧核糖核酸方法(实施例1)(其中在同等条件下检测出10amol靶核酸)要低约10倍。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

(A) 姓名: Boehringer Mannheim GmbH

(B) 街道: Sandhoferstr. 116

(C) 城市: Mannheim

(E) 国家: DE

(F) 邮编 (ZIP): 68305

(G) 电话: 06217594348

(H) 电传: 06217594457

(ii) 发明名称: 灵敏检测核酸的方法

(iii) 序列数: 8

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软磁盘

(B) 计算机: IBM PC兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 46bp

(B) 类型: 核酸

(C) 键型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词:

(B) 位置: 1...46

(D) 其它信息:/注释= "Nukleotide 28-46 sind
Ribonukleotide, Nukleotide 1- 27 sind
Deoxyribonukleotide"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

GATCGGACTG GAAGTAATAC GACTCACCGC CGCGUCGAG AAGAUC 46

(2) SEQ ID NO: 2的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 52bp

(B) 类似: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: misc_fcature

(B) 位置: 1...52

(D) 其它信息:/注释= " Nukleotide 28- 52 sind
Ribonukleotide, Nukleotide 1-27 sind
Deoxyribonukleotide"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

GATCGGACTG GAAGTAATAC GACTCACCGC CGCGUCGCAG AAGAUCUCAA UC 52

(2) SEQ ID NO: 3的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

GATTGAGATC TTCTGCGACG CGGCGGT

27

(2) SEQ ID NO: 4的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 58bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

ATTCCATGAT TCATTGATTA TTGTCGCGGC GGTGAGTCGT ATTACTTCCA
GTCCGATC

58

(2) SEQ ID NO: 5的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 45bp

(B) 类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc_feature

(B)位置: 1.45

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc_feature

(B)位置: 1.45

(D)其它信息: /注释= “ Nukleotide 27- 45 sind
Ribonukleotide, Nukleotide 1-26 sind
Deoxyribonukleotide”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

ATGATAGTTG ATGATAGTTG GATATACGCC GCCUGGCAGA AGAUC

(2)SEQ ID NO: 6的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 64bp

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 启动子

(B) 位置: 15..31

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

GATCGGACTG GAAGTAATAC GACTCACTAT AGGGCGGCGA TATCCAAC
TCATCAACTA TCAT

64

(2) SEQ ID NO: 7的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型(基因组)

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 突变

(B) 位置: 取代(13, " ")

(D) 其它信息: /注释= "Unterschied zu SEQ. ID. NO.3"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

GATTGAGATC TTATGCGACG CGGCGGT

27

(2) SEQ ID NO: 8的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27bp

(B) 类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 突变

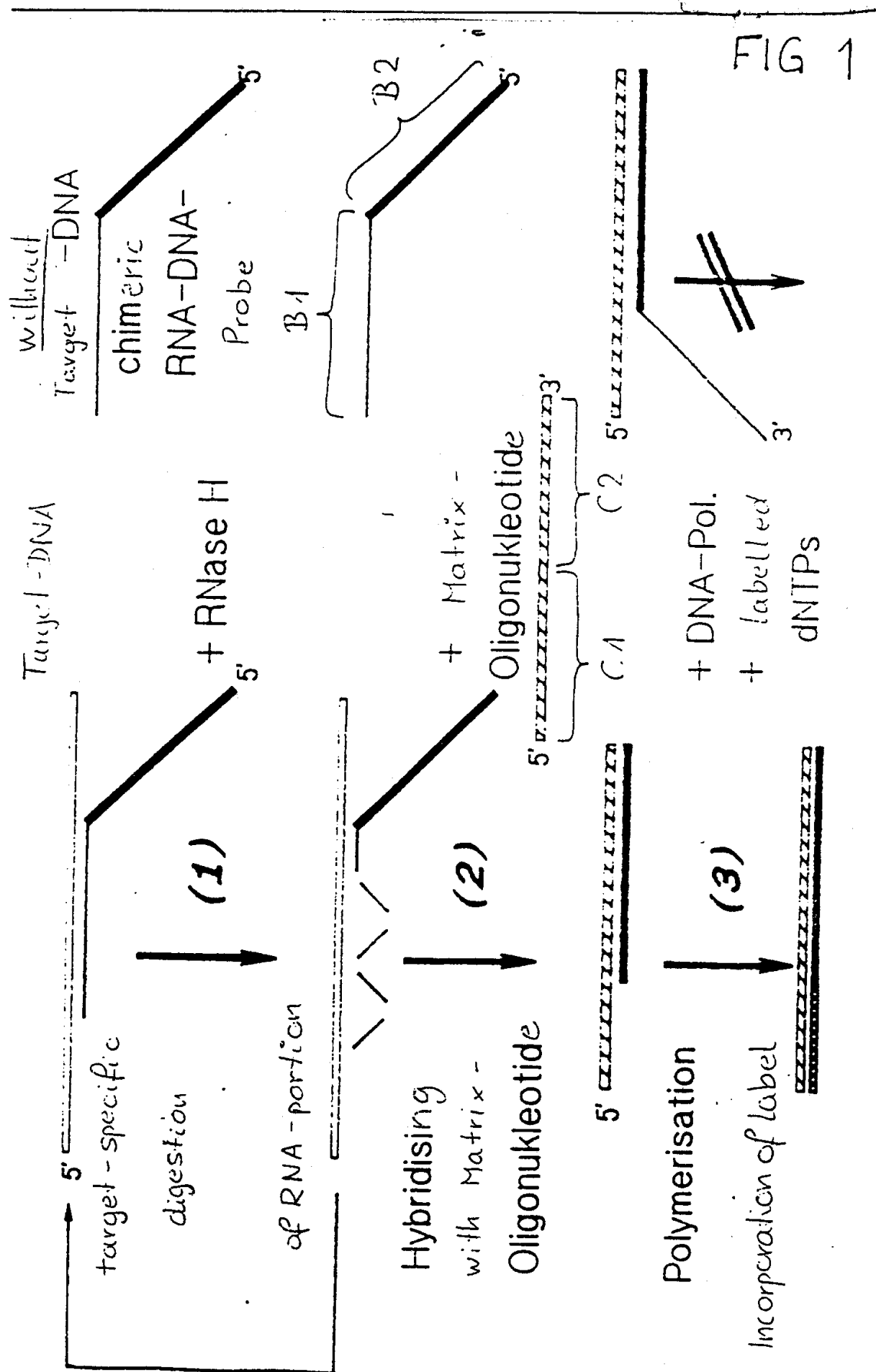
(B)位置: replace (12..14," ")

(D)其它信息: /注释= "Unterschiede zu SEQ. ID.NO. 3"

(xi)序列描述: SEQ ID NO:8:

GATTGAGATC TCACGCGACG CGGCGGT

27



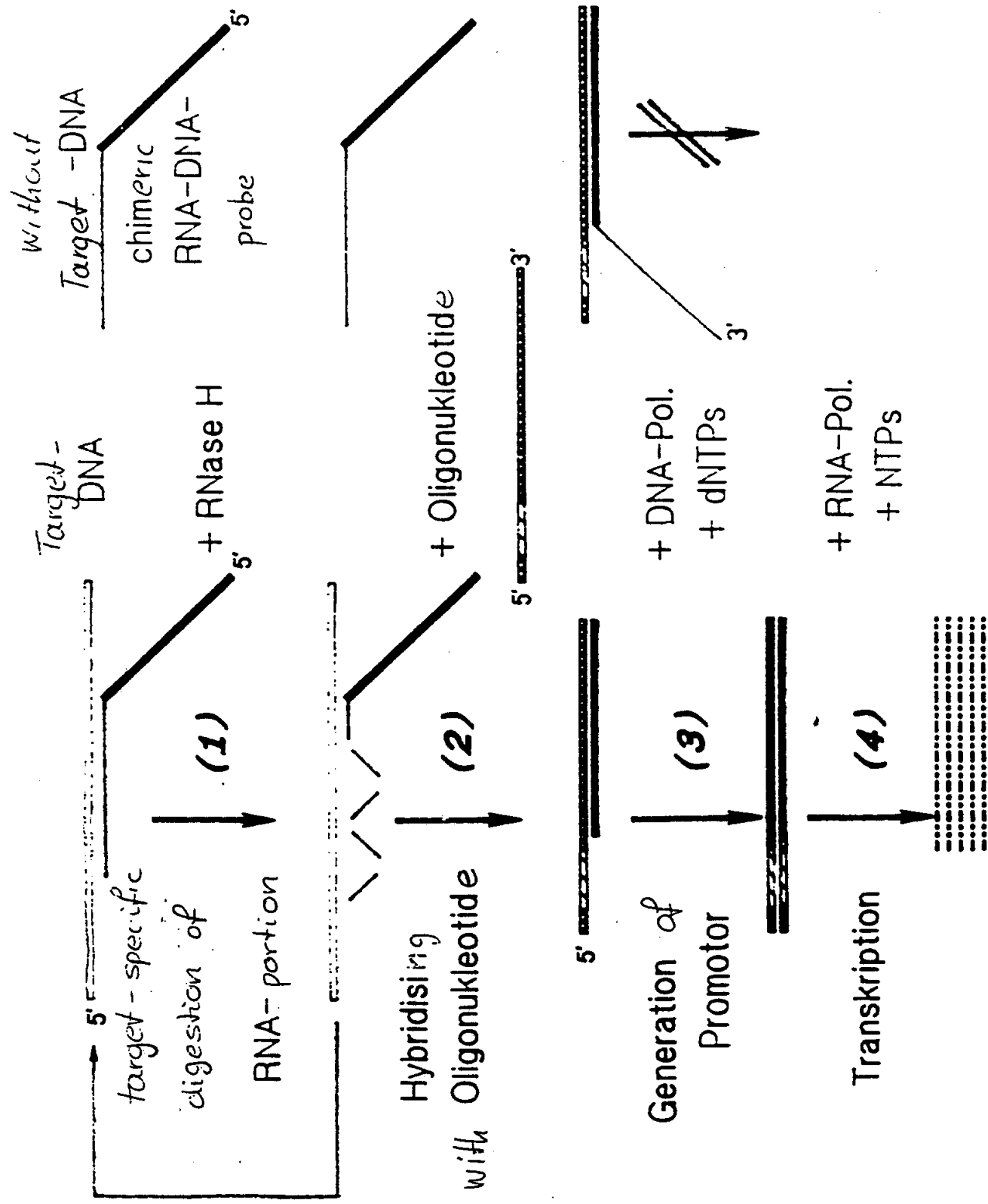
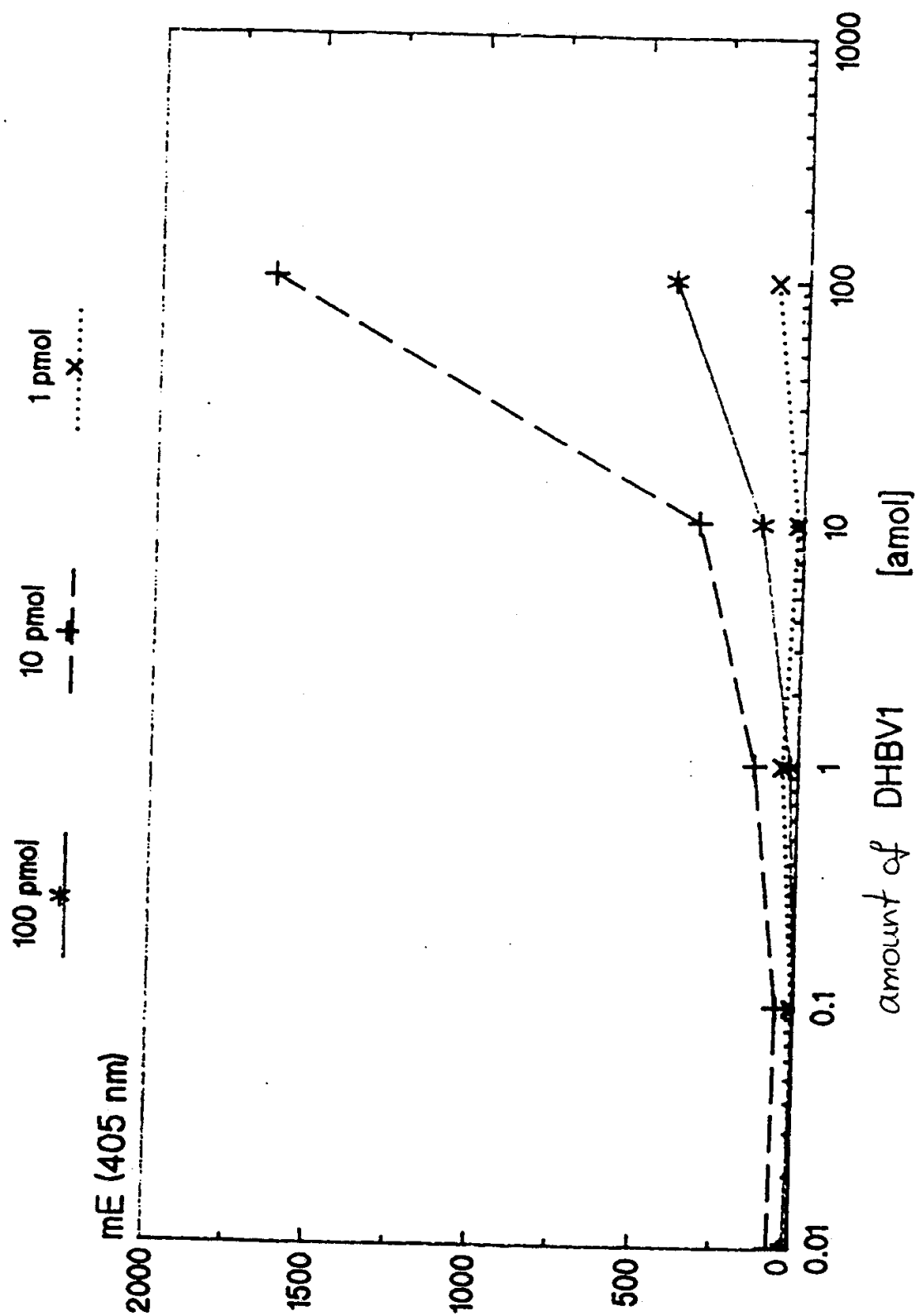


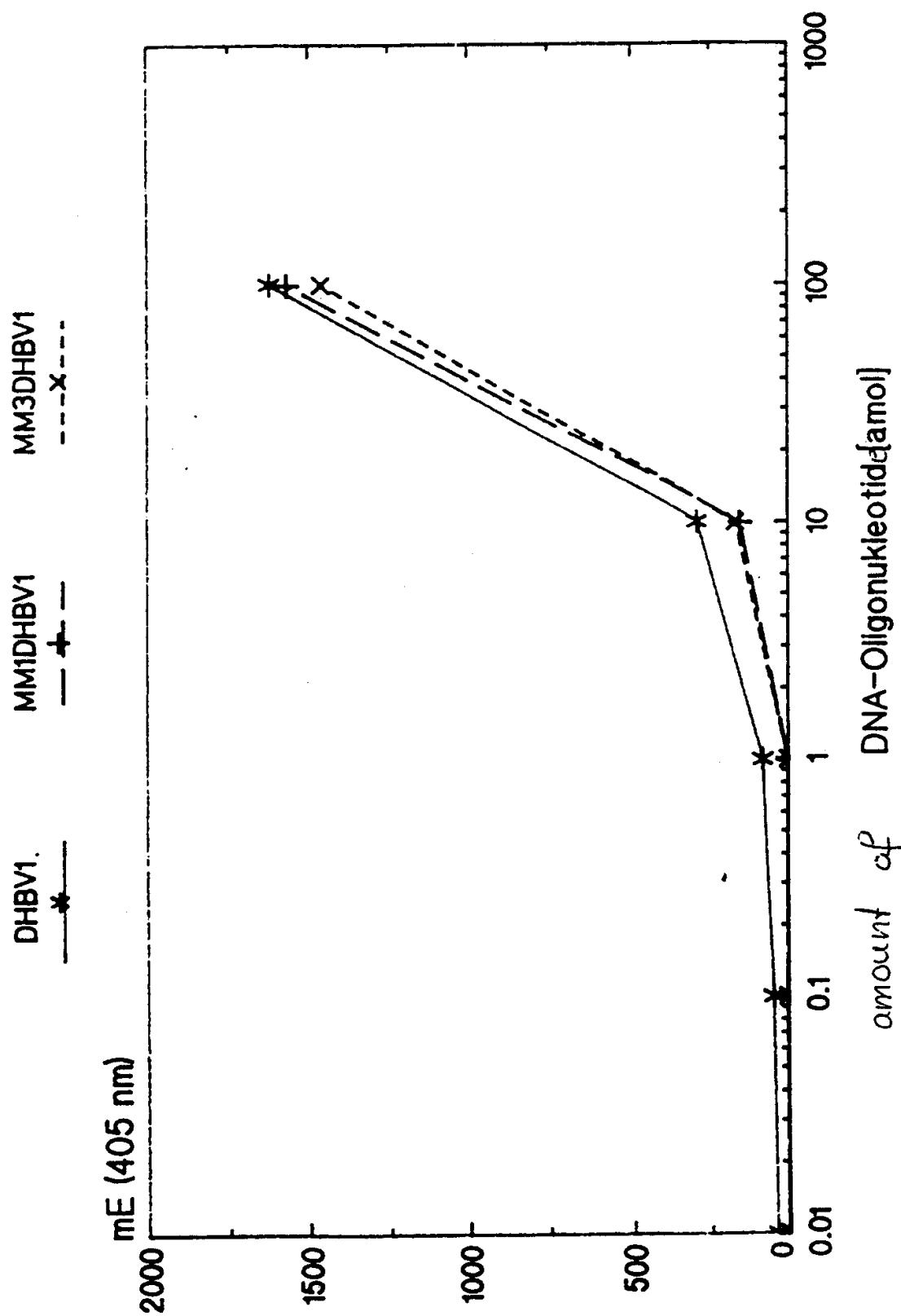
FIG 2

FIG 3

A



42°C



50°C

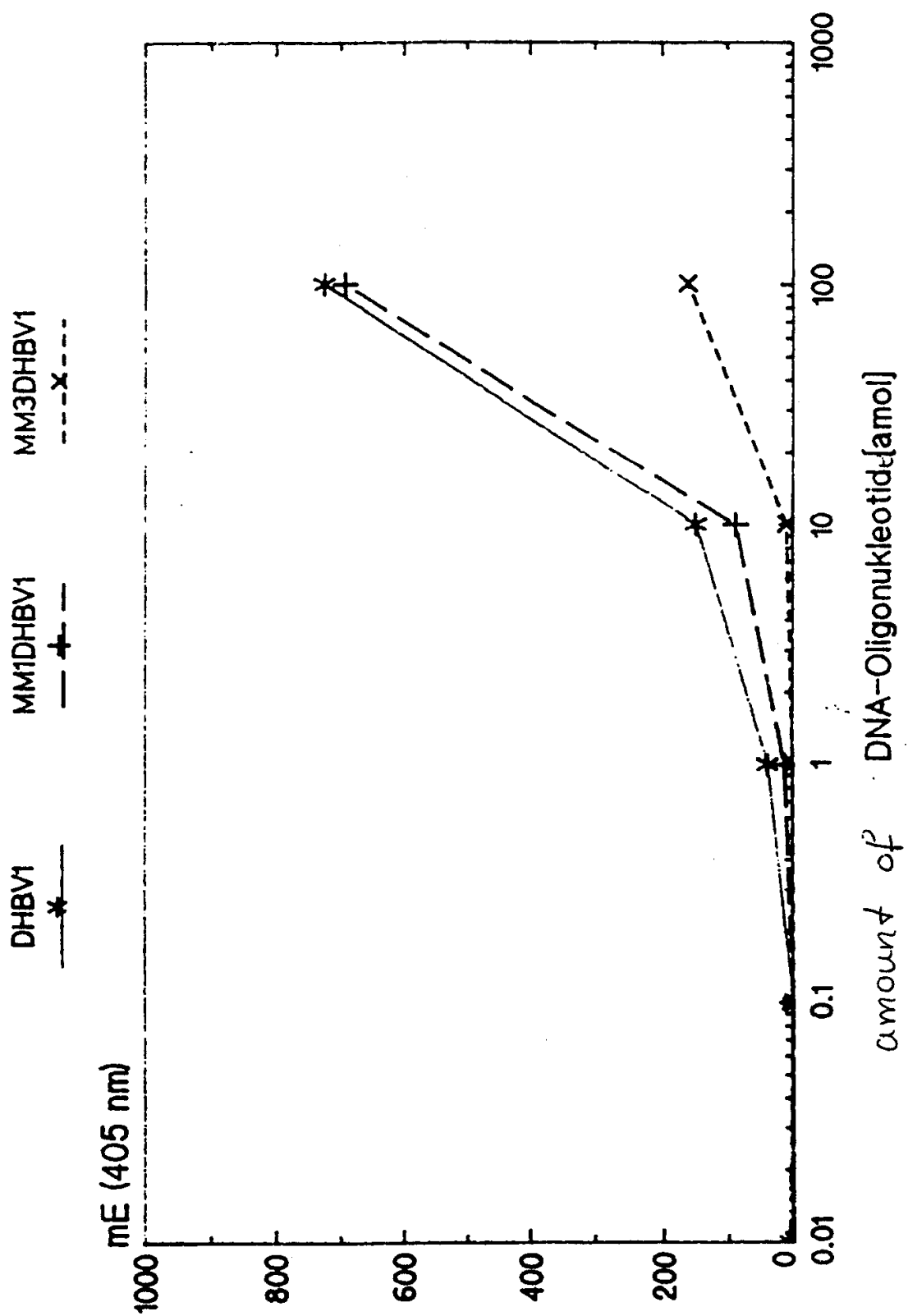


FIG 6

56°C

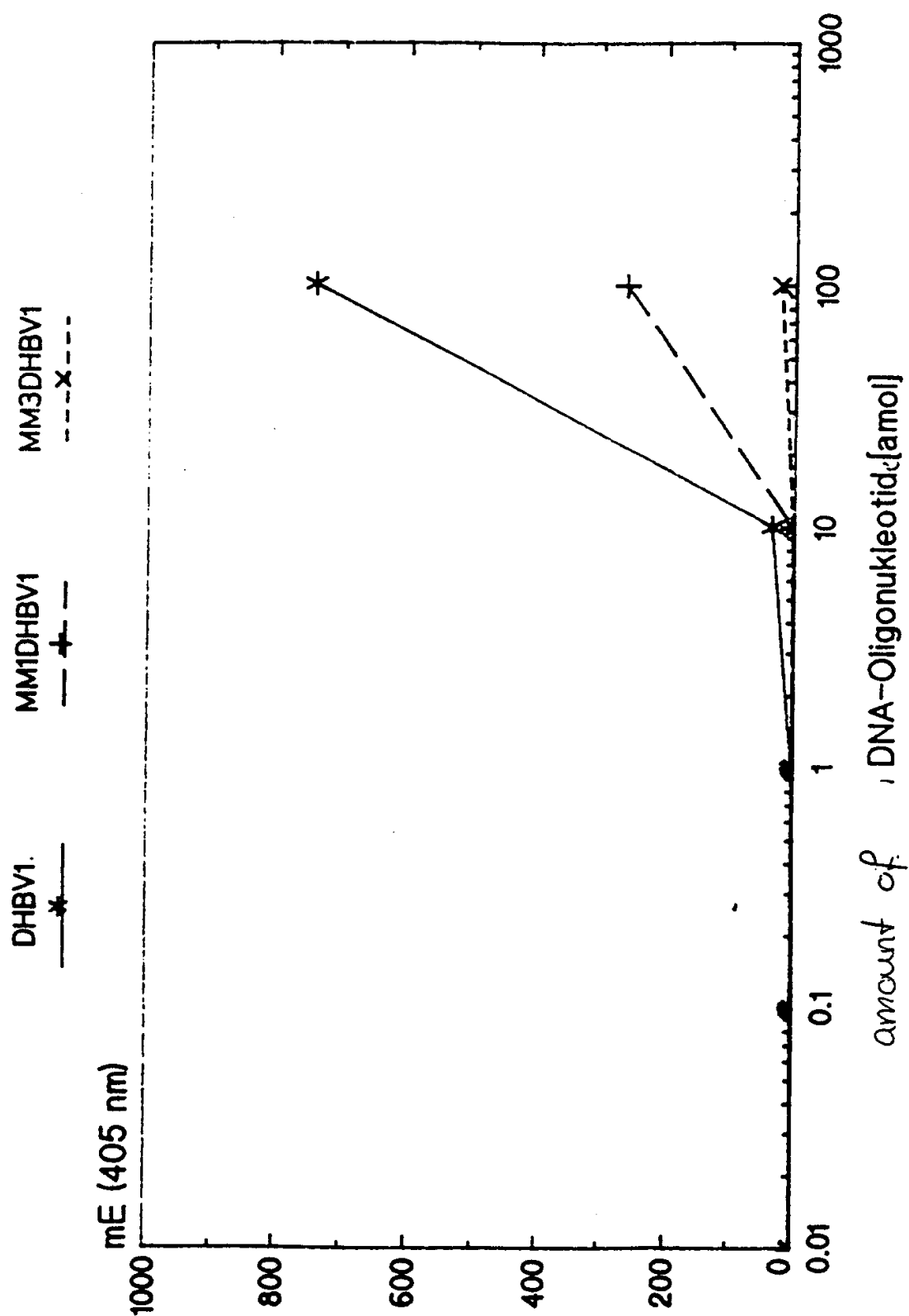


FIG 7

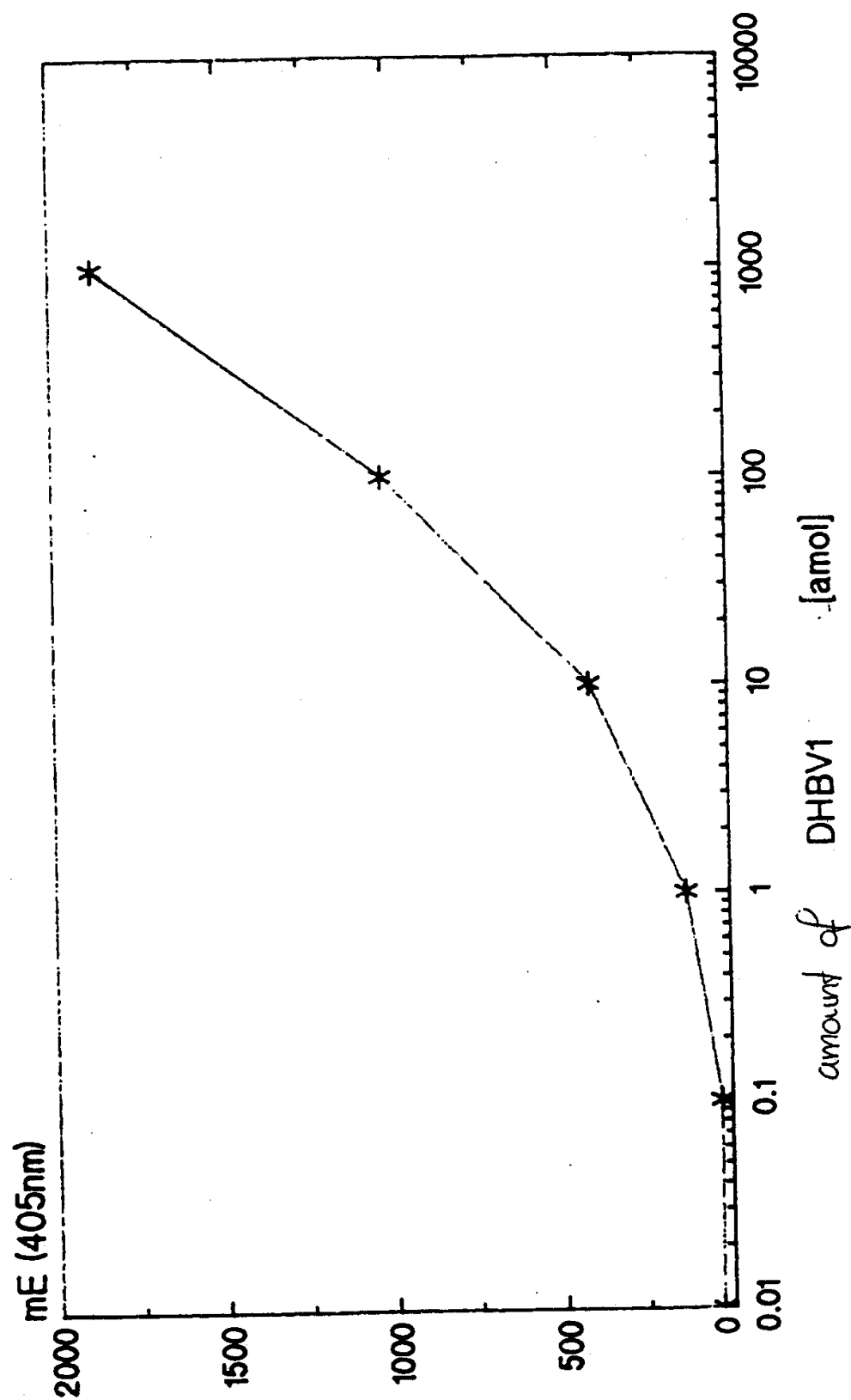


FIG 8

