

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03809391. X

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100516234C

[22] 申请日 2003.2.26 [21] 申请号 03809391. X
[30] 优先权

[32] 2002. 2. 26 [33] AU [31] PS0768

[86] 国际申请 PCT/AU2003/000244 2003.2.26

[87] 国际公布 WO2003/072810 英 2003.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.26

[73] 专利权人 联邦科学技术研究组织

地址 澳大利亚澳大利亚首都地区

[72] 发明人 基思·兰德 彼得·劳伦斯·莫洛伊

[56] 参考文献

US5565340A 1996.10.15

WO9955905A1 1999.11.4

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 12 页

[54] 发明名称

Headloop DNA 扩增

[57] 摘要

本发明提供了一种选择性扩增包含靶核酸及至少一种非靶核酸的样品中所述靶核酸的方法，所述方法包括通过至少一种寡核苷酸引物扩增所述核酸，所述引物包含：一个引物区，其可以在靶核酸和非靶核酸上引发并延伸的一个引物区；以及一个区域，其是所述至少一种非靶核酸的扩增子的一种内在序列的反向重复，而如果所述靶核酸的扩增子存在相应的内在序列，则所述区域与所述靶核酸的扩增子的相应的内在序列之间存在至少一个错配。

1. 一种选择性扩增包含靶核酸及至少一种非靶核酸的样品中所述靶核酸的方法, 所述方法包含利用至少一种寡核苷酸引物扩增所述核酸, 所述引物包含:

一个引物区, 其能在所述靶核酸及非靶核酸上引发及延伸; 以及

一个区域, 其是所述至少一种非靶核酸的扩增子的一种内在序列的反向重复, 而如果所述靶核酸的扩增子存在相应的内在序列, 则所述区域与所述靶核酸的扩增子的相应的内在序列之间存在至少一个错配, 所述反向重复区位于所述引物区的 5'。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述扩增步骤使用至少一种包含所述引物区和反向重复区的正向引物。

3. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述扩增步骤使用至少一种包含所述引物区和反向重复区的反向引物。

4. 前述权利要求中任一项的方法, 其中使用正向和反向引物, 其中每个引物均包含所述引物区和反向重复区。

5. 前述权利要求中任一项的方法, 其中通过 PCR 进行扩增。

6. 权利要求 5 的方法, 其中所述扩增技术是实时 PCR 等。

7. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述引物除了所述反向重复部分之外的长度为 15—35 个碱基单位。

8. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述引物的反向重复序列的长度为 5—30 个碱基单位。

9. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述引物的反向重复部分包含足够的核苷酸以在扩增的退火和延伸条件下在一匹配的序列上进行引发。

10. 前述权利要求中任一项的方法, 其中扩增的选择性通过在预选的游离 Mg^{2+} 浓度进行扩增而加以控制。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述扩增在游离 Mg^{2+} 浓度低于 0.7 mM 的情况下进行。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述游离 Mg^{2+} 浓度为 0.5 mM 或更低。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述游离 Mg^{2+} 浓度为 0.3 mM。

14. 前述权利要求中任一项的方法，其中所述扩增在存在甜菜碱的情况下进行。

15. 权利要求 14 的方法，其中存在的所述甜菜碱的量为 400 mM 到 1.2M。

16. 一种物种选择方法，所述方法包括如下步骤：

a) 在存在至少一种引物的情况下选择性扩增一个分离的核酸样品，所述分离的核酸样品包含分离自一或多个物种的混合物的核酸，其中所述引物包含：

一个区域，其在在一系列物种或亚种中是基本保守的核酸上能引发及延伸；和

一个区域，其是一预选的物种或亚种所特有的内在非保守的序列的扩增子的反向重复；和

b) 确定扩增产物的存在情况。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述物种选自动物、细菌、真菌或植物。

18. 权利要求 16 或 17 的方法，用于在物种群体中选择一或多个物种。

19. 权利要求 18 的方法，用于选择性扩增分离的核酸，所述核酸是来自次要物种和优势物种的核酸的混合物，其中所述引物的反向重复区是所述优势物种的核酸的扩增子的非保守的内在区域的反向重复。

20. 权利要求 16—19 中任一项的方法，其中所述核酸是 DNA。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述 DNA 是编码核糖体 RNA 的基因的一部分。

22. 权利要求 16—21 中任一项的方法，其中所述物种是细菌。

23. 权利要求 21 或 22 的方法，其中所述引物的反向重复部分是一预选物种的 16S 核糖体 DNA 的扩增子内的一个区域的反向重复。

24. 权利要求 16—24 中任一项的方法，其包括权利要求 1—15 中任一项的方法。

25. 权利要求 1—15 中任一项的方法，用于辨别一个基因家族的成员之间的等位基因变体或突变。

26. 前述权利要求中任一项的方法，其中所述至少一种靶核酸或至少一种非靶核酸含有甲基化的核酸。

27. 前述权利要求中任一项的方法，其中进行甲基化核酸或非甲基化核酸的选择性扩增。

28. 权利要求 27 的方法，其中进行甲基化核酸的选择性扩增。

29. 前述权利要求中任一项的方法，其中在扩增之前对所述至少一种靶核酸或至少一种非靶核酸进行一个修饰步骤。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述非靶核酸在所述修饰步骤期间被修饰。

31. 权利要求 29 或 30 的方法，其中所述修饰步骤是化学修饰。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述修饰步骤将非甲基化的胞嘧啶变换为能与腺嘌呤形成碱基对的另一核苷酸，而甲基化的胞嘧啶未改变或被变换为能与鸟嘌呤形成碱基对的一核苷酸。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述修饰步骤将非甲基化的胞嘧啶变换为尿嘧啶。

34. 权利要求 31—33 中任一项的方法，其中所述化学修饰步骤是进行亚硫酸氢盐处理。

35. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述引物的反向重复部分包含足够数目的核苷酸以允许在所述修饰的非靶核酸的匹配序列上退火和延伸, 并包含足够的错配以便不允许在所述未修饰的靶核酸上退火和/或延伸。

36. 一种检测在谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) Pi 基因和/或其调节侧翼序列内的一或多个位点的胞嘧啶的异常甲基化的分析方法, 其中所述分析方法包括将分离的 DNA 暴露于用于扩增所述 *GSTP1* 基因和/或其调节侧翼序列内一靶区域内的反应物和条件下, 所述靶区域是发生胞嘧啶异常甲基化的一或多个位点, 所述扩增使用至少一种寡核苷酸引物进行, 所述引物包含:

一个引物区, 其在所述分离的 DNA 内的甲基化的靶区域和非甲基化的非靶区域上均能引发和延伸; 和

一个区域, 其是所述非靶区域的扩增子的内在序列的反向重复, 但其与所述靶区域的相应的内在序列之间存在至少一个错配; 以及
确定扩增的 DNA 的存在情况。

37. 权利要求 36 的分析方法, 其中所述靶区域位于由 CpG 位点 -43 至 +55 所限定的 GST-Pi 基因和/或其调节侧翼序列的区域内。

38. 权利要求 36 或 37 的分析方法, 其中对所述分离的 DNA 进行化学修饰以在扩增之前将非甲基化的胞嘧啶变换为尿嘧啶。

39. 权利要求 38 的分析方法, 其中所述化学修饰通过亚硫酸氢盐处理而实现。

40. 用于核酸扩增的一种寡核苷酸引物, 所述引物包括一个区域, 其是非靶扩增子内的一核酸序列的反向重复, 但其与靶核酸的相应的序列之间存在至少一个错配; 以及

一个引物区, 其可以在靶核酸和非靶核酸上引发和延伸。

41. 一个 PCR 试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求 40 的寡核苷酸。

Headloop DNA 扩增

发明领域

本发明涉及模板分子尤其是核酸的选择性扩增。在一个特别的方面，本发明涉及但非限于一种 DNA 扩增的方法及用于该方法中的新引物。本发明还涉及本发明方法的特别应用

发明背景

聚合酶链反应 (PCR) 是基于重复进行双链 DNA 的变性，随后的寡核苷酸引物与 DNA 模板退火，并通过 DNA 聚合酶进行引物延伸这一循环 (例如见 Mullis 等美国专利 No.4,683,195、4,683,202 和 4,800,159 所述)。将 PCR 中使用的寡核苷酸引物设计为与所述 DNA 的相反链退火并加以定位以便一个引物的 DNA 聚合酶催化的延伸产物可以作为其它引物的模板链。PCR 扩增可以导致分散的 DNA 的指数增加，所述 DNA 长度由所述寡核苷酸引物的 5' 末端限定。

在并入参考的 2003 年 2 月 25 日提请的题目为“核酸扩增”的共同未决国际申请中，我们描述了使用一种引物选择性扩增核酸的方法，所述引物包括是非靶核酸中一个序列的反向重复的一个区域。

DNA 的 PCR 扩增中的特异性主要通过引物的序列并结合进行退火步骤的温度而确定。针对密切相关的序列，已经结合额外的方案以提供选择性扩增。在序列差异相应于限制酶位点之处，可以使用限制酶消化以切割不必要的序列并防止其扩增。抑制扩增的另一方法是使用寡核苷酸或 PNA (肽核酸) 分子，其与所述 DNA 链之一在待扩增的和/或与引物之一的结合位点重叠的区域内退火，并防止 DNA 合成的开始或延长。将这种寡核苷酸设计为优先与两个相关序列之一退火并抑制其扩增。

我们在下文描述了使用 PCR 引物选择性抑制一或多个密切相关的序列扩增的一种新方法，所述引物可以在靶序列和抑制的序列上均可引发（prime）及延伸。

发明揭示

第一方面，本发明提供了一种选择性扩增样品中靶核酸的方法，所述样品包含所述靶核酸及至少一种非靶核酸，所述方法包括利用至少一种寡核苷酸引物扩增所述核酸，所述引物包含：

一个引物区，其可以在靶核酸及非靶核酸上引发及延伸；

一个区域，其是所述至少一个非靶核酸的扩增子的一种内在序列的反向重复，而如果所述靶核酸的扩增子存在相应的内在序列，则所述区域与所述靶核酸的扩增子的相应的内在序列之间存在至少一个错配。

优选地，所述反向重复是在所述引物的 5'末端的延伸。

本发明第一方面的引物也称为“headloop 引物”。

发明详述

本发明的方法同时可包含一个单一引物的应用，优选所述“扩增”是“指数性的”，并因此利用通常称为“正向”和“反向”引物的一对引物，其一与一条核酸链互补，另一与该链的互补链互补。在使用一对扩增引物之处，两引物之一或两者均可以包含一条反向重复序列。

所述扩增可以通过任何适当的扩增技术例如 PCR 进行。所述 PCR 可以是实时 PCR。

所述引物除外所述反向重复部分的长度可以是适于扩增方法的任何长度，典型为大约 15—35 碱基之间。

所述引物的反向重复部分（或者在此称为头（head））可以包含许多核苷酸，足以在扩增的退火及延伸条件下在匹配的序列上实现引发，且典型为大约 5—30 个碱基。

本发明的方法特别可应用于在从两或多个密切相关的序列中选择性扩增一靶序列。

因此，在第二方面，本发明提供了一种选择性扩增样品中靶核酸的方法，所述样品包含所述靶核酸及至少一种密切相关的非靶核酸，所述方法包含利用至少一种寡核苷酸引物扩增所述核酸，所述寡核苷酸引物包含：

一个引物区，其可以在靶核酸及非靶核酸上引发及延伸；

一个区域，其是所述至少一种非靶核酸的扩增子的一种内在序列的反向重复，而如果所述靶核酸的扩增子存在相应的内在序列，则所述区域与所述靶核酸的扩增子的相应的内在序列之间存在至少一个错配。

在本发明的一个实施方案中，所述核酸可以是甲基化的核酸。因此本发明的方法可用于实现选择性扩增甲基化或非甲基化的 DNA。

因此，在第三方面，本发明提供了一种根据第一或第二方面的方法，其中所述靶核酸和非靶核酸是核酸在扩增之前通过化学修饰而形成的。

例如，所述方法可应用于用亚硫酸氢钠化学修饰的 DNA，以使得可以选择性扩增甲基化的 DNA，同时抑制非甲基化的序列。所述甲基化的 DNA 可以是人基因例如 *GSTP1* 基因的序列。在国际专利申请出版物 WO 99/55905 (在此以其全文并入参考) 中，我们揭示了一种诊断或判断预后的分析方法，该分析方法可以检测特征在于在谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) Pi 基因和/或其调节侧翼序列内的一或多个位点的胞嘧啶的异常甲基化的疾病或病变（例如前列腺癌、肝癌和乳腺癌）。

WO 99/55905 所描述的分析基于使用甲基化特异性引物，所述引物特异于在 *GSTP1* 基因和/或其调节侧翼序列内的位点的甲基化胞嘧啶。相反，本发明的方法基于这样的引物，其能引发靶核酸和非靶核酸，但其扩增靶核酸的选择性归功于使用的引物包含这样的区域，该区域是所述非靶核酸的扩增子的一种内在序列的反向重复。本发明的方法因此提供了 WO/9955905 中描述的甲基化特异性引物方法学的另一种方式。

因此,第四方面,本发明提供一种检测在谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) Pi 基因和/或其调节侧翼序列内的一或多个位点的胞嘧啶的异常甲基化的分析方法,其中所述分析方法包括将分离的 DNA 暴露于用于扩增 *GSTPI* 基因和/或其调节侧翼序列内一靶区域的反应物及条件下,所述靶区域是发生胞嘧啶异常甲基化的一或多个位点,所述扩增使用至少一种寡核苷酸引物进行,所述引物包含:

· 一个引物区,其可以在分离的 DNA 内的靶区域及非甲基化的非靶区域上引发及延伸; 以及

· 一个区域,其是所述非靶区域的扩增子的一种内在序列的反向重复,但其与所述靶区域的相应内在序列之间存在至少一个错配;

(iii) 确定扩增的 DNA 的存在情况。

所述靶区域可以是由 CpG 位点 -43 至+55 (并包含其在内) 所限定的 *GSTPI* 基因和/或其调节侧翼序列的区域内的一段核酸序列。

本发明第四方面的分离的 DNA 可以进行化学修饰以将非甲基化的胞嘧啶变换为尿嘧啶,所述化学修饰可以通过亚硫酸氢盐处理而实现。

本发明第四方面的分析方法可用作检测受试对象中疾病或病变的诊断分析方法或判断预后分析方法,所述疾病或病变特征在于胞嘧啶的异常甲基化。所述疾病或病变可以例如是前列腺癌、肝癌或乳腺癌。

在下文描述的一特殊实施例中,本发明的方法用于选择性扩增大量非甲基化的序列中存在的甲基化的 DNA。在用亚硫酸氢钠处理之后,胞嘧啶(C)变换为尿嘧啶(U),而甲基胞嘧啶保持不变。在这种情况下,所述头设计为下游序列的反向重复,预期得自非甲基化的 DNA 片段经亚硫酸氢盐处理后的变换。在其已经拷贝之后,加入的序列在衍生自非甲基化的 DNA 的片段上自身引发,导致非甲基化的片段的扩增被抑制。由于所述下游序列是加以选择的以便含有几个 CpG 位点 (且亚硫酸氢盐变换在甲基化的 DNA 的情况中不发生), 因此不足以互补以进行自身引发,并因此对甲基化的 DNA 片段的扩增抑制较小或不抑制。

本发明的方法还可以用于其它方面，例如辨别等位基因变体或突变及基因家族的成员。可以扩增含有短序列区域内的突变的 DNA 同时抑制野生型序列（例如肿瘤抑制基因）的扩增。

本发明还可用于通过抑制优势物种的序列扩增而实现选择性扩增环境中次要物种（例如细菌）的 DNA。

在第五方面，本发明包括进行模板扩增的寡核苷酸引物，所述引物包含非靶扩增子内的一种核酸序列的一个反向重复，但其与靶核酸的相应序列错配。

本发明进一步包括一试剂盒，所述试剂盒包含至少一种根据本发明的寡核苷酸引物。

本发明还包括利用这种引物的扩增方法及分析方法，以及进行这种分析方法的试剂盒。

术语

本申请书中所用术语“引物”及“引物区”是指一种寡核苷酸，其在存在核苷酸和聚合剂的情况下能作为合成的始发点。所述引物优选是单链的，但也可以是双链的。如果引物是双链的，在扩增反应之前所述的两条链是分离的。对本发明中使用的引物加以选择以便它们与被扩增的序列的不同链充分互补，以便所述引物在扩增反应条件下能与所述序列的链杂交。因此所述引物中可以包含非互补的碱基或序列，条件是所述引物与感兴趣的序列充分互补以与该序列杂交。

所述寡核苷酸引物可以通过本领域熟知的方法制备，或者可以从一生物学来源中分离。在固体支持物上合成寡核苷酸引物的方法见美国专利 No. 4,458,068 所揭示，其内容在此并入参考。

术语“PCR”是指一种聚合酶链反应，其是热循环的、聚合酶介导的 DNA 扩增反应。PCR 典型包括核酸、与所述核酸的每个链互补的寡核苷酸引物、一种热稳定 DNA 聚合酶及脱氧核糖核苷酸，并包括三种独特

方法，多次重复进行所述方法以扩增所述原始核酸。所述三种方法（变性、杂交和引物延伸）通常在独特温度及在独特时间步骤进行。然而在许多实施方案中，所述杂交及引物延伸程序可以同时进行。

术语“核酸”是指在合成互补分子中可作为模板的具有特定的相同性的一种分子。所述“核酸”可以是 DNA 或 RNA，例如双链或单链 DNA 或 RNA 或者双链的 DNA-RNA 杂种和/或其类似物和衍生物。特别地，“核酸”是指两个引物之间及包含所述引物的序列。特异的序列的核酸可以衍生自多种来源，包括人、哺乳动物、脊椎动物、昆虫、细菌、真菌、植物和病毒。在某些实施方案中，所述靶核酸是这样的一种核酸，即其存在与否可用于但非限于某些医学或法医领域如疾病或癌症的判断预后/诊断、选择性物种分离、DNA 指纹法等。使用本发明可以扩增任何核酸，只要已知所述序列两端足够数量的碱基，以便可以制备寡核苷酸引物，所述引物将与被扩增的序列的不同链杂交。在 PCR 中，“靶核酸”可以代表加入反应中的核酸的片段或一部分。“非靶核酸”是来自另外物种的核酸的相当区域，相同物种或者任何其它相关来源中的另外基因。

术语“脱氧核苷三磷酸”是指 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 及其类似物。

本发明申请中所用术语“聚合剂”是指任何化合物和系统，其可以用于合成一种引物延伸产物。合适的化合物包括但非限于热稳定聚合酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、T4 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、*T. litoralis* DNA 聚合酶及逆转录酶。

“热稳定聚合酶”是指一种 DNA 和 RNA 聚合酶，其能经受住非常高的温度，如接近 100°C。通常热稳定聚合酶衍生自生活在极端温度中的生物体，如衍生自水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)。热稳定聚合酶例如包括 Taq、Tth、Pfu、Vent、deep vent、UITma 及其变体和衍生物。

“大肠杆菌聚合酶 I”是指大肠杆菌的 DNA 聚合酶 I 全酶。

所述“Klenow 片段”是指 DNA 聚合酶 I 全酶的两个蛋白酶解片段中较大的那个，该片段保留聚合酶活性但丧失与完整酶相关的 5'外切核酸酶活性。

“T7 DNA 聚合酶”是指来自噬菌体 T7 的一种 DNA 聚合酶。

“扩增子”是在扩增反应中产生的一种多核苷酸产物。

本发明文中提及的“错配 (mismatch)”包括这样的情况，即所述引物的反向重复区 (头) 中的一个核苷酸不能与衍生自相应于非靶核酸的内在序列 (反向重复区衍生自其中) 的靶核酸的一部分的靶扩增子中的相应核苷酸通过 Watson-Crick 碱基配对。例如反向重复区中的腺嘌呤与靶扩增子中相应序列中的腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤形成错配。另外，当第一个核苷酸由于缺少第二个核苷酸 (即不相配的核苷酸) 或者由于存在额外的核苷酸而不能与第二个核苷酸配对时，发生错配。所述反向重复区可含有一个以上的错配。所述缺少的或额外的核苷酸可以在所述引物的头部或在靶核酸的内在序列中。

为了使本发明更易于理解，我们提供了以下非限制性实施例。

为了更好地理解本发明但不以任何方式限制本发明，本发明的优选实施方案的一般原则概括示于图 1。给 PCR 中使用的两条引物之一或两者加入 5'延伸物 (头)。所述头的序列是扩增子内的内在序列的反向重复，将其设计为与扩增被抑制的序列匹配，但与希望扩增的序列充分错配。

当拷贝时，所述头产生 3'末端序列，该序列由于其与下游序列的互补性而能自身引发。这样将产生长的发夹环结构，其不能有效用作进一步扩增循环的模板，导致不希望的片段的扩增抑制。

如果一种引物含有这种头延伸物，则所述 PCR 反应包括确定扩增特异性的三个区域，即正向和反向引发位点及头引发位点。通过在正向和反向引物时均包含一头，可以将 4 个选择性区域掺入一个单一的 PCR 反应中。

先前已经观测到导致出乎意料地高分子量的片段合成的发夹结构的形成 (V Potaman BioTechniques 27 1110-1114 (1999)), 发夹结构已经不用于提供选择性扩增。一种发夹引发的不同应用 (其中引物内发生引发) 已经用于抑制 PCR 步行 (walking) 中引发的假“末端修复” (Devon *et al*, Nucleic Acids Res. 23:1644 (1995))。这包括靶序列内的 headloop 引发。

附图简述

图 1 是使用本发明方法的一个实施方案扩增一种靶序列的示意图。

图 2 示出来自大肠杆菌、*S. acidophilus* 和热氧化硫化杆菌 (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*) 的 16S 核糖体 RNA 基因的扩增的区域的序列对比。在所有这三个物种中均相同的碱基用黑色标示, 在三个物种的两个中相同的碱基用灰色标示。图中指出了相应于引物及相应于 headloop 靶区域的序列。

图 3: EHL48 Headloop 引发的图表。

图 4: 大肠杆菌 DNA 与 *S. acidophilus* 或热氧化硫化杆菌 rDNA 扩增子的混合物以上述所示量制备。扩增使用如实验组所示的反向引物 NR-R1i 及非选择性的正向引物 NR-F1i 或 headloop 引物 EHL48、EHL64 或 SAHL。在 A 组中, $MgCl_2$ 为 1.7mM, 引物为 200nM。在 B 组中, $MgCl_2$ 为 1.3mM, 引物为 400nM, 在 C 组中, $MgCl_2$ 为 1.5 mM, 引物为 400nM。在 PCR 反应结束时, 通过监测 SyberGreen 荧光随着温度提高而发生的变化进行解链曲线分析(在 ABI Prism 7700 实时 PCR 设备中)。

图 5: 使用 400nM 的引物 SAHL 和 NR-R1i 进行所有 PCR, 输入 rDNA 扩增子的比率如上述实验组所示。A 组示出其中 $MgCl_2$ 浓度为 1.3mM 或 1.5mM 的反应中 PCR 产物的解链图。在 B 组和 C 组中, 使用 1.3 mM 的最佳 $MgCl_2$ 浓度。D 组示出在无或有 0.6M 甜菜碱的条件下进行的反应, $MgCl_2$ 为 1.5mM。在存在甜菜碱的条件下解链温度的降低是显而易见的。

图 6: 示出使用不同的 headloop 引物扩增甲基化或非甲基化的质粒 DNA。

图 7: 示出使用对照引物 CLUR-F2 得自甲基化、非甲基化的 DNA 及 DNA 混合物的 PCR 产物的解离曲线。

图 8: 示出使用 headloop 引物 CLUH-F2 得自甲基化、非甲基化的 DNA 及 DNA 混合物的 PCR 产物的解离曲线。

图 9: 是通过对照及 headloop 引物从质粒 DNA 混合物中扩增的对比, 使用 Taqman 检测非甲基化的 PCR 产物而进行。

图 10: 是通过对照及 headloop 引物从质粒 DNA 混合物中扩增的对比, 使用 Taqman 检测甲基化的 PCR 产物而进行。

图 11: 是通过对照及 headloop 引物从基因组 DNA 混合物中扩增的对比, 使用 Taqman 检测非甲基化的 PCR 产物而进行。

图 12: 是通过对照及 headloop 引物从基因组 DNA 混合物中扩增的对比, 使用 Taqman 检测非甲基化的 PCR 产物而进行。

图 13: 是 GSTP1 基因从转录起始位点的 64 个碱基上游至 96 个碱基下游的序列, 其是未经修饰的 (上) 或者随后经亚硫酸氢盐变换及 PCR 扩增, 假定 CpG 位点是甲基化的 (下, B-M)。CpG 位点的 -7 至 +10 的位置在序列上示出。图中示出了正向引物 F52A 的位置(注意在 CpG 位点-3 的碱基错配)。Headloops Hlint5-10Ni (GSTintR11i) 和 Hlint5-10 和 5-10X (GSTintR1) 的碱基引物的位置在其靶序列的下方示出。引物的头区在其靶序列的下方示出。就每个 headloop 引物而言, 用箭头示出了与其引物部分结合的头序列。

图 14: 以 1000 个非甲基化分子: 1 个甲基化分子的比率制备涵盖被扩增的及衍生自甲基化和非甲基化的亚硫酸氢盐处理的 DNA 的区域两个质粒的混合物。使用 F52A 及所示 headloop 引物进行扩增, 循环条件如文中所述, $MgCl_2$ 为 1.1 mM。图中示出了解链曲线图, 相应于甲基化序列的峰在右侧。

图 15: 对代表 10^6 非甲基化分子: 10^3 甲基化分子的质粒混合物进行 PCR 扩增。使用 F52A 及 headloop 引物 Hlint5-10 和 Hlint5-10Ni 进行扩增。 $MgCl_2$ 的浓度在实验组中示出。

图 16: 使用 F52A 及 headloop 引物 Hlint5-10 对代表 10^6 非甲基化分子: 10^3 甲基化分子的质粒混合物进行 PCR 扩增。在 Eppendorf Mastercycler 温度梯度 PCR 仪器中进行扩增, PCR 产物的变性图示在 Applied Biosystems ABI 7700 设备中分析。图中示出了在指定温度及在无或有 800mM 甜菜碱的条件下进行反应的 PCR 产物的变性图示。

图 17: 是在反向链合成期间在引物 LUH-F2 拷贝之后在“非甲基化”DNA 上 loopback 引发的示意图。

实施例

实施例 1: 针对不同细菌 16S 核糖体 RNA 基因的选择性 headloop PCR

16S 核糖体 DNA 的扩增通常用于鉴别细菌物种及已经确定了大量物种的序列。某些高度保守的区域的存在使得可以设计扩增基本上所有细菌核糖体 DNA 的引物对。图 2 示出细菌物种的 16S 核糖体 RNA 的靶区域及“通用”引物 NR-R1i 和 NR-F1i 结合的区域, 所述细菌物种是大肠杆菌、*Sulfolobulus acidophilus* 及 *Sulfolobulus thermosulfidooxidans*。正向引物 NR-L1i 用作设计抑制大肠杆菌 (EHL 前缀) 或 *S. acidophilus* rDNA 的 DNA 扩增的 headloop 引物的基础 (见表)。图 3 示出了 EHL48 引物的 headloop 引发的实例。在开始引发循环之后, 在随后的循环中反向引物的延伸导致掺入与在合成的链 3'末端的 EHL48 “头”互补的序列。这些头序列可以折回形成环状 (loop back) 并与其在扩增子内的互补靶序列退火。所述头形成了与大肠杆菌靶序列的完美匹配并因此能引发及延伸形成一延伸的发夹环结构。期望这种结构在进一步扩增中是难以恢复的。就 *S. acidophilus* 扩增子而言, 所述头序列与互补区域有 4 个错配, 这样防止引发并使得链在进一步的 PCR 循环中可被利用。

引物	HEAD	引发区
NR-R1i		GAG CTG ICG ACI ICC ATG CA
NR-F1i		GTA GTC CII GCI ITA AAC GAT
EHL 48	GACTTAACGCGTTAGCTC	GTA GTC CII GCI ITA AAC GAT
EHL 64	GACTTAACGCGTTAG CTCCGGA	GTA GTC CII GCI ITA AAC GAT
EHL2a	ACAACCTCCAAGTCGACAT	GTA GTC CII GCI ITA AAC GAT
SAHL	CGACACCTCGTATCCAT	GTA GTC CII GCI ITA AAC GAT
		I = 次黄嘌呤核苷

(在上表中分别示出了头及引发区，然而应清楚所述头位于所述引物区的5’并与其是连续的)。

在含有以下物质的 25µl 溶液中进行标准 PCR：

2×PCR 主 Mix (Promega)	12.5 µl
正向引物 (终浓度 400 nM)	1.0 µl
反向引物 (终浓度 400 nM)	1.0 µl
DNA	1.0 µl
SyberGreen (原液的 1:1000 稀释液)	0.2 µl
水	9.5 µl

在 Applied Biosystems ABI Prism 7700 设备上使用如下循环条件进行反应：

95°	1 分钟	
95°	30 秒	} 循环 40 次
58°	30 秒	
72°	30 秒	

在扩增循环之后，反应产物的解链图通过测定随着温度在 20 分钟从 60°C 升至 100°C 而发生的 SyberGreen 荧光中的变化而确定。

大肠杆菌 rDNA 扩增的抑制

大肠杆菌 DNA 与 *S. acidophilus* 或热氧化硫化杆菌的 DNA 的混合物使用非选择性引物 NR-F1i 和 NR-R1i，或者使用 headloop 引物 EHL48 或 EHL68 及反向引物 NR-R1i 进行扩增 (图 4)。扩增产物通过确定其解链图而分析——大肠杆菌 rDNA 产物在大约 77—78°C 解链，而 *S. acidophilus* 和热氧化硫化杆菌扩增子在大约 91°C 解链。注意对照 PCR 产物比 headloop PCR 产物短，因此在略低温度解链，还观测到了由于模块中管位置 (tube position) 所致的略微不同。

从 1:1 的 DNA 混合物开始，当使用非选择性引物时，大肠杆菌与 *S. acidophilus* 的 PCR 产物的比率为大约 1:2。EHL48 和 EHL64 headloop 引物有效抑制大肠杆菌扩增子的扩增，因为产物的解链曲线示出仅存在 *S. acidophilus* rDNA (A 组)。另外 EHL48 在存在等量热氧化硫化杆菌 DNA 的条件下有效抑制大肠杆菌的扩增(B 组)。当 DNA 的比率提高至 50:1 时 (C 组)，见到热氧化硫化杆菌扩增子的实际富集。另一种 headloop 引物 EHL2a，其定向与 PCR 引发位点邻近的序列，示出较高水平的热氧化硫化杆菌 DNA 富集；大肠杆菌 DNA 的区域中的解链图表明异常 DNA 结构形成。

对与 EHL48 和 EHL64 定向的相同区域，但被设计为与 *S. acidophilus* 序列退火并在其上引发的 Headloop 引物 SAHL 也测试其抑制 *S. acidophilus* rDNA 扩增的能力(D 组)。从 50:1 的 *S. acidophilus* 与大肠杆菌 rDNA 的混合物开始，*S. acidophilus* DNA 的扩增明显抑制而且产物示出略微过量的大肠杆菌扩增子。

镁的浓度及甜菜碱对 headloop 抑制 PCR 的作用

在许多 headloop PCR 中,我们注意到如果游离 Mg^{2+} 终浓度降低则扩增的选择性得以提高。在图 5 所示实施例中,在存在超过 50 倍的 *S. acidophilus* DNA 的情况下,使用 SAHL headloop 引物,当 Mg^{2+} 浓度从 1.5 mM 降低至 1.3 mM 时,大肠杆菌 DNA 扩增的选择性显著提高。反应中 dNTPs 的浓度总和为 0.8 mM,剩余游离 Mg^{2+} 浓度为 0.5 mM。就此扩增而言,将游离 Mg^{2+} 浓度降低至 0.3 mM 抑制任何扩增。在 B 和 C 组中,示出在存在超过 250 和 500 倍 *S. acidophilus* rDNA 的情况中大肠杆菌 rDNA 的检测。

甜菜碱先前已经示出可提高 G+C 丰富的 DNA 的扩增。还发现加入甜菜碱可提高 headloop PCR 的选择性。在图 3 中, D 组在含有 0.6M 甜菜碱的反应中大肠杆菌扩增子的比例显著提高。

这些实施例表明 headloop PCR 引物抑制选择的靶 DNA, 大肠杆菌或 *S. acidophilus* 16S rDNA 的扩增的功能, 并表明 headloop 抑制与 PCR 引发位点邻近及至多相隔 40 个碱基的靶区域的效力。

实施例 2: 甲基化 DNA 的选择性 headloop PCR

为分析或检测 DNA 的甲基化, 首先将其用亚硫酸氢盐处理, 该程序使 C 变换为 U (并因此在拷贝后最终变换为 T)。然而, 甲基化的任何 C (通常在 CpG 位置) 对这种变换有抗性。因为甲基化和非甲基化形式的 DNA 片段具有不同的序列, 因此可能设计特异性扩增甲基化形式的引物。

在此所用的负责引发的引物的节段设计为对甲基化和非甲基化的 DNA 形式均同样起作用, 没有偏向。为达到此目的, 选择没有 CpG 的靶 DNA 片段区域。在这种区域中, 不管片段的全部甲基化状况如何, 得自亚硫酸氢盐变换的 DNA 序列是相同的。

选择性富集甲基化形式通过在 PCR 中使用的两种引物之一或两者中引入一 5'延伸物而实现。所述头的序列是选择的 DNA 片段下游序列的反向重复。当拷贝该头时产生 3'末端序列，其由于与下游序列互补而能自身引发。这样产生了长发夹环结构，不期望其有效用作进一步扩增循环的模板，导致不希望的片段扩增的抑制。所述头序列设计为是期望得自经亚硫酸氢盐变换的非甲基化的 DNA 的下游序列的反向重复。在掺入后，加入的序列使衍生自非甲基化的 DNA 的片段自身引发，引起非甲基化的片段扩增抑制。因为选择的下游序列含有几个 CpG 位点 (在甲基化的 DNA 的情况中在此不发生亚硫酸氢盐变换)，因此不足以互补并使得自身引发，并因此对“甲基化”的 DNA 片段的扩增产生较小或不抑制。

这些实验中使用的质粒：

在这项研究中使用质粒#77 和#58。它们得自衍生自经亚硫酸氢盐处理的人 GST 片段的扩增 PCR 产物的 pGEM-T (Promega)中的插入体。这些质粒中的插入体的序列如下所示：

#77 “甲基化的 GST 片段” 或 “M”

```

CGGGATCGTAGC GGTtTTA:GGGAATTTttttt CGCGATGTtt
CGGCGCGttAGTT CGtTGCGtAAtAtTT CGtTGCGGTttTTt
tTGtTGTtTGTTTA tTtttTAGGttttCG tTGGGGAtTGGGA
AAGAGGGAAAGGtTTttttCGGttAGtTGCGCGGCGAtTtCGG
GGA tTttAGGG CGttttTtTGCGGtCGACGttCGGGGTGtAGC
GGt CGtCGGGGtTGGGGtCGGCGGGAGTtCGCGGGAtttTttA
GAAGAGCGGtCGGCGtCGTGAtTtAGtAtTGGGGCGGAGCGGG
GCGGGAttA tttTTATAAGGtT CGGAGGtCGCGGAGttTT CGt
TGGAGTTT CGtCGtCGtAGTtTT CGttAttAGTGAGTACGCGC
GGtt CGCGTttttC

```

当所述 DNA 在 CpG 位置是甲基化的，这个序列相应于期望得自亚硫酸氢盐处理的人 GST 片段的扩增的序列。简便起见将其称为“甲基化 DNA”。

本发明示出了所述插入体的全部序列。所述 DNA 片段中第一个 CpG 是-41，最后一个（在图中大多数是 3'）是 CpG +10。

#58 “非甲基化的 GST 片段”或“U”

-39

t GGTtTTAGGGAATTTttttt tGtGATGTtttGGtGtGtT

引物 F2

LUHF2 Head AAAACACTACAAAACCCACA<

CLUHF2 Head AAAACACTACAAAACCCACAC<

FTF2 Head AAAACACTACAAAACCCACACAA

AGTTtGtTGtGtAtAtTTtGtTGtGGTtttTtTTttTGtTG

-29

TtTGTTTAtTttttTAGGtttttG tTGGGGGATtTGGGAAAGA

引物 R1T

当所述 DNA 在 CpG 位置是非甲基化的时，这个序列相应于期望得自亚硫酸氢盐处理的人 GST 片段的扩增的序列。简便起见将其称为“非甲基化 DNA”。本发明示出了在扩增的区域内的所述插入体的序列，从 CpG 位点-39 至-29。正向引物 F2 和反向引物 R1T 靶区域的序列在框中标示。在其反向互补序列下方示出了 headloop 引物 LUHF2、CLUHF2 和 FTF2 的头部分。序列中所用符号意义如下：

T：原始序列中的 T 残基

t：期望自原始序列中 C 残基经亚硫酸氢盐变换而得的 T 残基

c: 甲基化的 C 残基（由于部分 CpG 序列）并因此对亚硫酸氢盐处理的变换具有抗性

t: 得自经变换的 C 的 T 残基，尽管该 C 在 CpG 序列中但却是非甲基化的。

使用的引物:

变换特异性引物

将变换特异性引物设计为包含几个 t（从 C 变换而来），以便其将选择性扩增已通过亚硫酸氢盐处理而成功变换的 DNA 片段。通过消除含有 CpG 位点的区域，这些引物应能扩增 DNA 片段而不管其在 CpG 残基的甲基化状态如何，即甲基化和非甲基化形式的片段均应同样好地被扩增。

F2: 5' GGTtTTAGGGAATTTttttt

R1T: 5' CACCTTTCCCAaaTCCCCAa

在后一情况中的碱基 (a & t) 相应于原始序列中变换的 C。

这些引物与靶片段杂交的区域在上图表中以方框标示。引物结合的区域在 DNA 片段的甲基化和非甲基化形式中相同。

Headloop 引物:

通过在两种引物之一或两者中引入一特殊的 5'延伸物而实现针对非甲基化形式的片段的选择。为清晰示出所述原理的证据，仅产生一种具有特殊 5'延伸物的引物。显而易见，如果两个引物均被修饰则在此所报道的任何作用均预期是显著放大的。选择 F2 作为引物以针对这些测试加以修饰。如下所示在 F2 引物中加入 5'延伸物（框中所示）。

LUHF2

aCaCCaaaACATCaCaGGTTtTAGGGAATTTttttt

CLUHF2

CaCaCCaaaACATCaCaGGTTtTAGGGAATTTttttt

CLUR F2

CCATCAACAAAAACACACAGGTTtTAGGGAATTTttttt

FT F2

AACaCaCCaaaACATCaCa aaaGGTTtTAGGGAATTTttttt

LUH F2、CLUH F2 和 FT F2 均具有 5'延伸物，所述延伸物是非甲基化的 DNA 片段内的序列的反向重复。因此就 LUH F2 而言，

aCaCCaaaACATCaCa aaa 的 5'延伸物定向于 F2 引发位点下游的 tttt**tGtG**ATGTtt**tGGtGt** 序列。所述碱基如下：

A: 与原始序列中 T 互补的 A

a: 与原始序列中变换的 C (U) 互补的 A，非 CpG 位点部分

a: 与原始序列中变换的 C (U)互补的 A，CpG 位点部分

CLUR F2 引物是对照引物。其与 CLUH F2 在其 5'延伸物具有相同数目的 A、C 和 T，但顺序与 GST 基因的相关区域内的任何序列均不匹配。

方法

使用 Applied Biosystems 7700 设备进行实时 PCR。整个过程中使用相同的“反向”引物 R1T。使用 Sybergreen 监测扩增。

使用的反向引物 R1T 为 1 μ M。使用的 F2 为 200 nM。使用的所有其它引物均为 40 nM。使用基于 Platinum Taq Polymerase (Invitrogen)及补给缓冲液的热启动系统。

DNA 输入:

M = 10^6 的 #77 分子，甲基化的质粒

U = 10^8 的 #58 分子，非甲基化的质粒

M*U 10^4 #77 加上 10^8 #58 的混合物 (混合物，超出 10,000x的非甲基化的质粒)。

结果

甲基化的(10^6 个分子)或非甲基化的 (10^8 个分子)质粒与三种不同的 headloop 引物 LUH-F2、CLUH-F2 和 FT-F2 组合反向引物 R1T 用于 PCR 中, 使用 Sybergreen 检测扩增 (图 6)。所有这三个引物均相似效力扩增甲基化的质粒。就非甲基化的质粒而言, 尽管在反应中使用多 100 倍的质粒, 但 PCR 产物的仍出现明显延时。引物 LUH-F2 和 FT-F2 在甲基化和非甲基化 DNA 之间的扩增中显著不同。当使用短亚硫酸氢盐变换的特异性引物 F2 或者含有不相关的 5' 延伸序列引物 CLUR-F2 并与组合 R1T 作为反向引物时, 甲基化和非甲基化的引物均被扩增。使用引物 CLUR-F2 和 R1T 获得的扩增产物通过解链曲线分析加以评估, 其解离曲线示于图 7。

将所述样品加热并监测当 DNA 链分离时发生的 Sybergreen 荧光的降低。由于解链温度不同而可以区分这两种形式的扩增的 DNA, 非甲基化的片段的 GC 较少, 因此在较低温度约 76°C 解链, 而甲基化 DNA 解链温度为大约 80°C 。所述质粒的混合物 (非甲基化质粒的 10000 倍) 产生一种 PCR 产物, 其与非甲基化质粒提供的产物相似, 这表明正如所期望的“非甲基化”产物占优势。注意 Applied Biosystems 7700 模块中样品的位置略微影响结果, 因此解链曲线峰的位置即使在一式两份的样品中也不期望是相同的。

使用 headloop 引物 CLUH-F2 重复相同的实验, 因为所述引物与 CLUR-F2 具有相同长度的延伸物 (图 8)。单独扩增甲基化和非甲基化的质粒产生具有期望的解链曲线的 PCR 产物。 $10,000:1$ 的非甲基化及甲基化质粒的混合物的扩增产物与表示甲基化和非甲基化的 DNA 的混合物的解链曲线解离, 甲基化的 DNA 占优势。

因此, 甲基化的形式成功扩增, 尽管最初存在超出 10,000 倍的非甲基化的质粒。

使用 Taqman 探针证实 headloop 引物效力

Taqman 探针可以在扩增期间监测 PCR 产物。制备选择性检测甲基化和非甲基化的 *GSTP1* 序列的探针。

探针 PRB M

5' FAM  TAMRA

这是一种 Taqman 探针, 将其设计为如果其能与扩增的产物杂交则在 PCR 期间裂解。裂解导致 FAM 染料的荧光增强。

FAM = 羧基荧光素, TAMRA = 羧基四甲基罗丹明

探针 PRB U

5' TET  TAMRA

这是一种 Taqman 探针, 将其设计为如果其能与扩增的产物杂交则在 PCR 期间裂解。裂解导致 TET 染料的荧光增强。

TET = 四氯荧光素, TAMRA = 羧基四甲基罗丹明

结果

使用对照的变换特异性引物 F2 和 CLUR-F2 或者两种 headloop 引物 LUH-F2 和 FT-F2 组合反向引物 R1T 扩增非甲基化和甲基化的质粒的混合物。使用 PRB-U 和 PRB-M 探针监测非甲基化的和甲基化的产物的扩增 (图 9 和 10)。与对照引物相比, 非甲基化的 DNA 的扩增基本上 (FT-F2) 或几乎完全 (LUH-F2) 被抑制。

如图 10 所示, 当使用 PRB M 检测甲基化 DNA 的扩增时, 显然甲基化的 DNA 由受试引物 LUH F2 和 FT F2 选择性扩增, 甚至在原始输入 DNA 含有超出 10,000 倍的非甲基化的形式时结果也如此。使用对照引物因为其形成如此小比例的产物以致检测不到甲基化的 DNA。

实施例 3：从亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 中扩增

从其中 *GSTP1* 基因是甲基化的 LNCaP 前列腺癌细胞中及从期望 *GSTP1* 基因是非甲基化的胎盘中分离 DNA。

将来自 LNCaP 和胎盘的经亚硫酸氢盐处理的通过位于感兴趣的区域之外的引物扩增。将所述引物 GSATA56 (GTTTTGTGAAGAGGGTGTGTAAGTTT) 和 R4 (AAAACCTTTCCCTCTTTCCCAA) 设计为不管甲基化状况如何而扩增亚硫酸氢盐处理的 DNA，并位于 headloop 引物和 R1T 扩增的区域之外。

这两种引物的混合物可用于模拟这样的情况，即尽管存在超量的正常（非甲基化的 *GSTP1*）DNA 但仍需要检测少量肿瘤衍生的 DNA（甲基化的 *GSTP1*）的情况。以下实验中使用的混合物是指“LP(1:100)”: 1/10,000 稀释的使用 GSTAS56 和 R4 自亚硫酸氢盐处理的 LNCaP DNA 扩增得到的 PCR 第一次循环产物加上 1/100 稀释的使用 GSTAS56 和 R4 自亚硫酸氢盐处理的胎盘 DNA 扩增得到的 PCR 第一次循环产物。

这个混合物用作实时 PCR 实验的输入物，以示出所述新引物怎样富集足够的甲基化 DNA 以进行检测，尽管所述起始物具有大量的非甲基化的 DNA。结果示于图 11 和 12。

当使用对照引物 F2 时，几乎所有的产物均衍生自非甲基化的 DNA（如通过 PRB U 检测的那样）。然而，当使用具有 5' 延伸物的 headloop 引物时，甲基化的 DNA 被选择性扩增并仅产生低水平的非甲基化的 DNA。

实施例 4：对 *GSTP1* 基因的第二个区域的 headloop 抑制 PCR

将 Headloop 引物设计为 *GSTP1* 基因的转录序列内的一区域的亚硫酸氢盐处理的 DNA。引物的序列示于下表。引物 GSTR11i 和 GSTHLint5-10Ni 中在相应于 CpG 位点的位置包含次黄嘌呤核苷，在 CpG 位点亚硫酸氢盐变换的 DNA 根据甲基化状况可以是 C 或 U。相似地，

F52A 引物在 CpG 位点中 C 的位置含有一有意错配(A)，免得偏离甲基化或非甲基化 DNA 的扩增不均。

引物	ω HEAD	ω 引发区
F52A		GGGATTATTTTATAAGGTTAGGAGGT
GSTintR1		CCCATACTAAAACTCTAAACCCCAT
HLint5-10	TGTGTGGTTTGTGTTTTTG	CCCATACTAAAACTCTAAACCCCAT
HLint5-10X	TGTGTGGTTTGTGTTTTTG GGGATG	CCCATACTAAAACTCTAAACCCCAT
GSTintR11i		CTCTAAACCCCATCCCCIAAA
HLint5-10Ni	TGTGTGGTTTGTGTTTTTG	CTCTAAACCCCATCCCCIAAA
		I = 次黄嘌呤核苷

所有 PCR 均使用 F52A 作为正向引物。Headloop 引物使用 GSTintR1 (HLint5-10 和 HLint5-10X) 或 GSTintR11i (HLint5-10Ni)。引物的位置在图 13 中 GSTP1 基因的该区域的序列上示出。使用这些引物的 PCR 用于鉴别有助于使用 haedloop 引物优化选择性扩增的因子。引物终浓度为 200 nM，其它反应成分如上所述。除非特别说明则 PCR 循环条件如下：

95° 2 分钟

95° 15 秒

60° 1 分钟

} 循环 50 次

随后进行在 60°C—95°C 温度范围 20 分钟的解离曲线分析。

三种 headloop 引物的效力使用质粒 DNA 进行对比，所述质粒 DNA 衍生自扩增的亚硫酸氢盐处理的 DNA 的克隆并相应于甲基化或非甲基化的 *GSTP1* 序列。将质粒 DNA 以 10⁷ 非甲基化分子:10⁴ 甲基化分子的比率混合，并使用不同的 headloop 引物组合 F52A 正向引物进行扩增 (图 14)。使用这三种 headloop 引物观测到富集 1000 或更多倍的甲基化序列，

而使用 HLint5-10X 示出非甲基化序列的扩增最大程度抑制。

Mg²⁺浓度变化的作用示于图 15。在存在 1.1, 1.3 或 1.5 mM MgCl₂ 的情况下使用 HLint5-10Ni 或 HLint5-10X 进行扩增。在这两种情况中, 随着 MgCl₂ 水平降低均出现选择性呈浓度依赖性提高。这种作用使用许多不同的 headloop 引物均可观测到。最佳 headloop 选择性在允许靶序列进行 PCR 扩增所使用的最低 Mg²⁺水平一致性观测到。在大多数情况中, 这相应于游离 Mg²⁺为 0.3 mM 的水平。

本发明示出甜菜碱提高 16S 核糖体 RNA 基因序列的 headloop 扩增的选择性。甜菜碱及退火/延伸温度的变化对来自亚硫酸氢盐处理的 DNA 的甲基化和非甲基化序列的选择性扩增的作用示于图 16。0.8M 的甜菜碱充分地提高 headloop PCR 的选择性; 甜菜碱的最佳作用在 0.6—1.2 M 范围可见。还观测到 HLint5-10 headloop 的效果依赖于退火/延长温度。

讨论:

通过 headloop 引发的 PCR 扩增抑制的原理在图 1 中以图表形式示出及在图 3 和 17 中示出了特异性序列的实例。正如所示出的, 在 5'延伸物掺入及随后拷贝之后, 3'末端产生, 其能与相同 DNA 链中的下游区域碱基配对。这种碱基配对及引发的效力期望依赖于头区域的长度和序列成分及其与扩增子内的内在序列匹配的精确度。就 EHL48 headloop 引物而言, 大肠杆菌序列(正确匹配)及 *S. acidophilus* 扩增子(4 个错配)之间互补性中的差异足以进行选择性地扩增 *S. acidophilus* rDNA。就 LUHF2 headloop 引物而言(图 17), 下游区域中下划线的那些碱基相应于原始片段中 CpG 序列中潜在甲基化的 C。在 CpG-甲基化的 DNA 的情况中, 下游区域中下划线的位置含有 G 而不是 A, 期望无分子内双链体发生。

如果图 3 和 17 中以图表示出的结构能在 PCR 期间形成, 则可设想延伸将从碱基配对的 3'末端发生, 产生具有长反向重复的单链的片段。这种片段很可能在变性后通过“snapback”形成发夹环, 之后引物能与其

杂交，因此防止新拷贝合成及该片段扩增。由于发夹结构的形成依赖于有效 headloop 退火及引发，因此享有相同碱基引物但与掺入的头序列未充分匹配的序列将持续扩增。为如上述试验所示选择性扩增甲基化的 DNA，扩增的有效 headloop 引发及抑制仅针对非甲基化的形式发生。未选择性扩增甲基化的 DNA，所述 headloop 引物方法可以独立使用或者可与其它选择性扩增方法组合使用，例如与“甲基化特异性 PCR” (Herman 等，美国科学院院报 93: 9821-6 (1996)) 组合使用。

在实施例中示出扩增子内的靶序列的位置根据其头形成延伸的引物位置而改变。在 EHL48 和 EHL64 headloop 引物的情况中，headloop 引发的靶区域是所述碱基引物下游的 40 个碱基。就其它 headloop 引物而言，靶序列在所述碱基引物的引发末端附近(Hlint5-10)，或者覆盖所述引物 3—5 个碱基 (EHL2a、SAHL、LUHF2、CLUHF2、FTF2、Hlint5-10Ni 和 Hlint5-10X)。

就许多 headloop 引物而言，我们已经鉴别了扩增的选择性在游离 Mg^{2+} 浓度较低时或者在存在甜菜碱的情况中得以提高。选择性也可以通过降低 headloop 引物的浓度而得以改良。其它反应条件如退火温度(图 16)、循环时间及缓冲液成分也可以改变 headloop PCR 的效力。

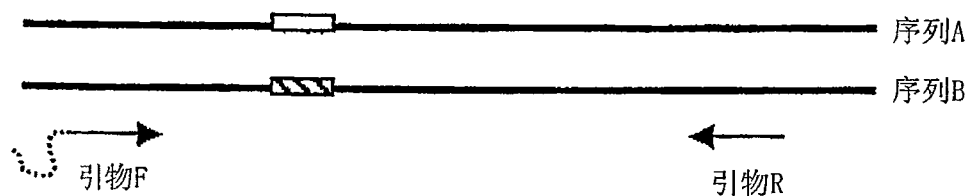
所述实验包括将 5' 头延伸物加入仅一个引物对中，在 PCR 中产生 3 点特异性。可以将头掺入正向和反向这两种引物上，提供 4 点特异性，进一步提高选择性。

在本说明书中，术语“包含”是指包含一指定的元件、整数或步骤，或者元件、整数或步骤组合，但不除外任何其它元件、整数或步骤，或者元件、整数或步骤组合。

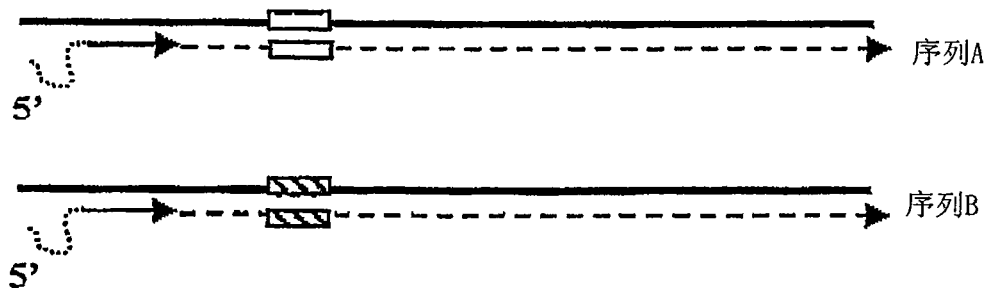
另外，本说明书中包含的对任何文献、法案、材料、设备、文章等的讨论其目的仅用于交待本发明的背景。不能认为这些事件的任何或全部构成了现有技术基础的一部分，或是在本申请的每一个权利要求的优先权日之前既已存在于澳大利亚的与本发明相关的领域的一般知识。

最后，本领域技术人员应意识到在不偏离广泛阐述的本发明的精神或范围的前提下，对本发明可以做如特异的实施方案所示的许多改变和/或修改。因此本发明的实施方案仅是加以例证而无限制之意。

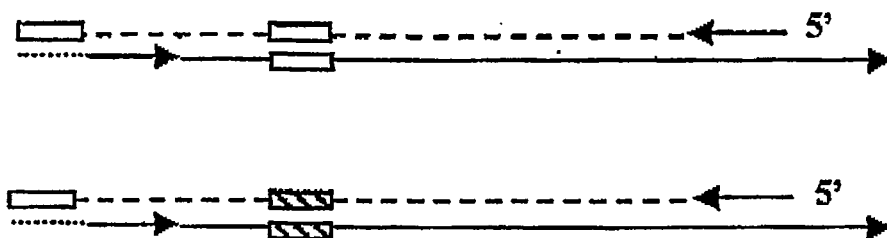
图1 Headloop抑制PCR的原理



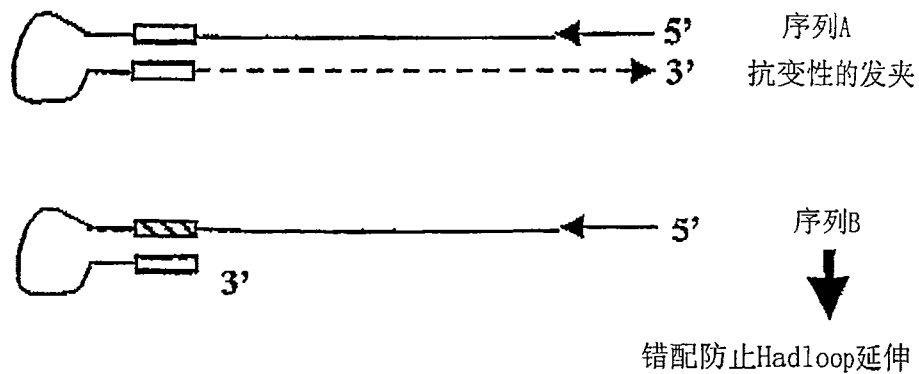
第一条链（下部）的合成



第二条链（上部）的合成



上部链的Headloop延伸



<i>E. coli</i>	T C G T A G T C C A C G C C G T A A C G A T G T C C A C T T G G A G G T T T C C C T T G A G T T T G C T T G G
<i>S. thermosulfido.</i>	G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G A C T T G G G G C C C T T A A T T G G
<i>S. acidophilus</i>	G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G A T A C G G T G C G T T A A T T T C

<i>E. coli</i>	C T C C G G A G C T A A C G C G T T A A G T C G A C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A A C T
<i>S. thermosulfido.</i>	T C C G G A G C T A A C G C G T T A A G T C C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A C T
<i>S. acidophilus</i>	T C C G G A G C T A A C G C G T T A A G T C C C G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A C T

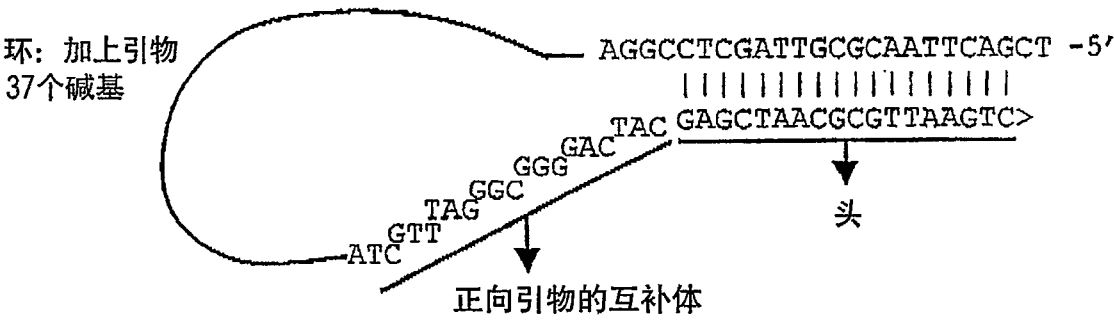
<i>E. coli</i>	C A A A T G A A T T G C G G G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T A A T T C G A T G C A A C G
<i>S. thermosulfido.</i>	C A A A G A A T T C G G G G G C C C G C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T A A T T C G A G C A A C G
<i>S. acidophilus</i>	C A A A G A A T T G C G G G G C C C G C A C A A G C A G T G G A G C A T G T G G T T A A T T C G A G C A A G G

<i>E. coli</i>	G G A A G A A C C T T A C C T G G T C T T G A C T C A C G G A A G T T T T C A G A G A T G A A A T G G C G
<i>S. thermosulfido.</i>	C G G A G A A C C T T A C C G G A C T G G A C C T C G T A G G C G A A C C G A A C C G C C G C C
<i>S. acidophilus</i>	C G C A G A A C C T T A C C G G G C T A G A C G G A C C G A A G C C G G A A C C G G T G C

<i>E. coli</i>	T T G G A A C C G T A G A C A G G T G C T G C A T G G C T G T C G T C A G C T C G T G T T G
<i>S. thermosulfido.</i>	T T G G A A C C G A G C A G G T G C T G C A T G G C T G T C G T C A G C T C G T G T T G
<i>S. acidophilus</i>	T T G G C A A C C G T G T C A G G T G C T G C A T G G T T G T C G T C A G C T C G T G T T G

2

引发大肠杆菌(E.coli) 序列的EHL48 headloop



引发S.acidophilus DNA 的 EHL48 headloop

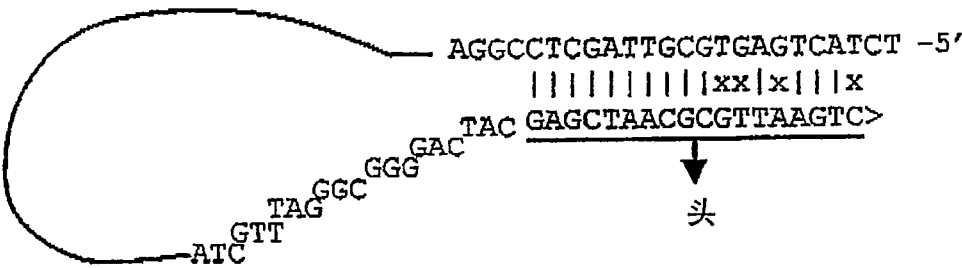


图3

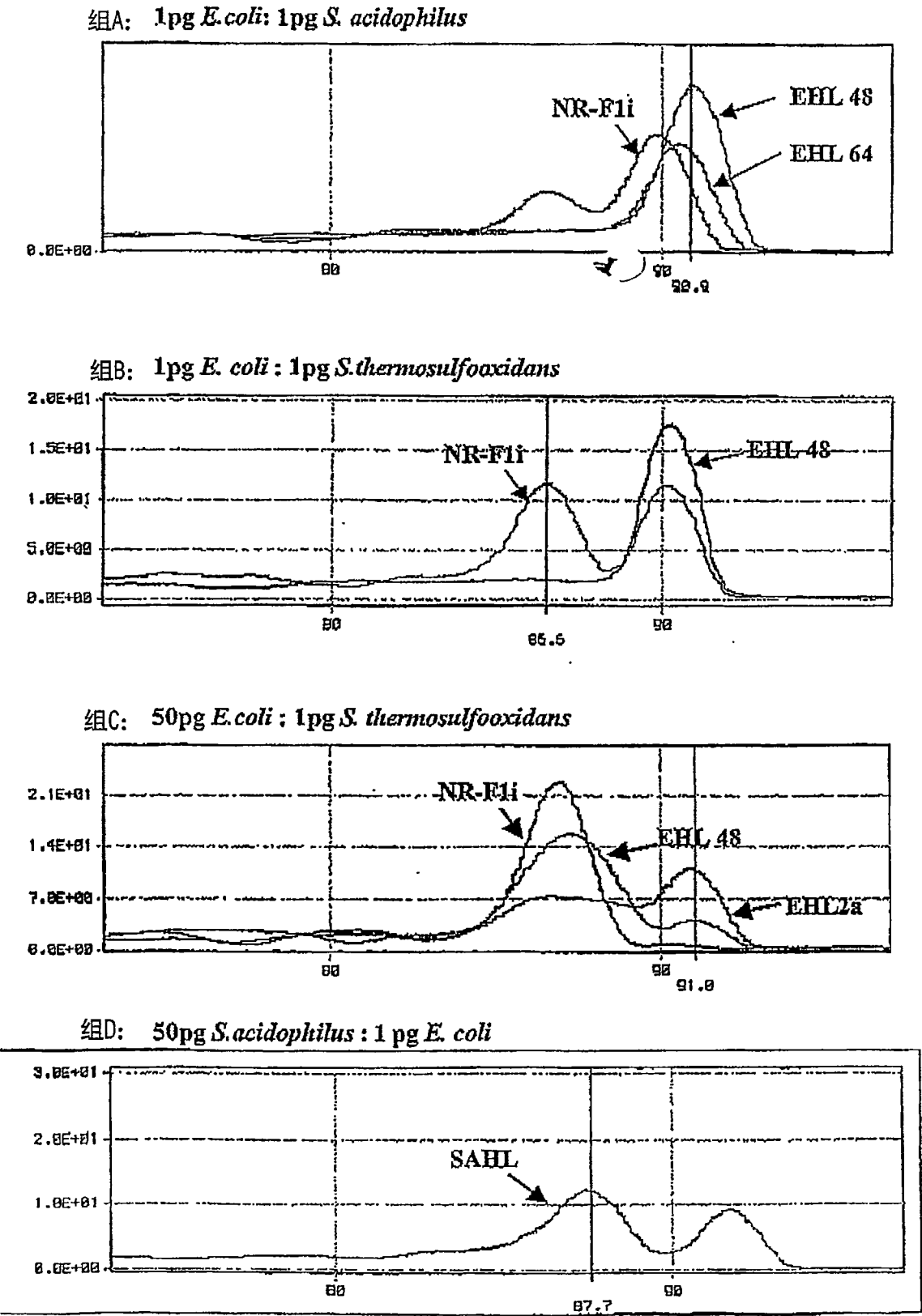


图4

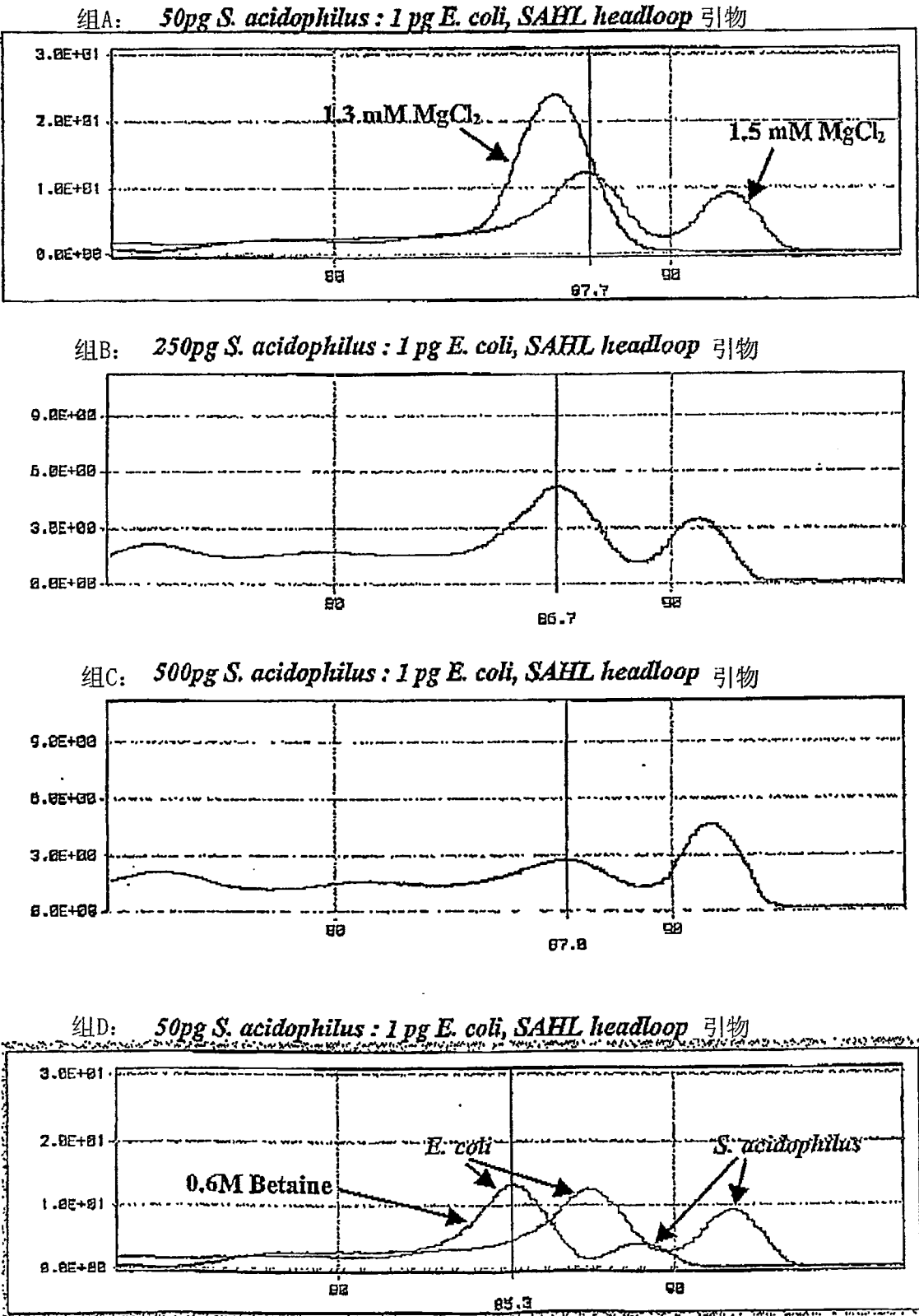


图5

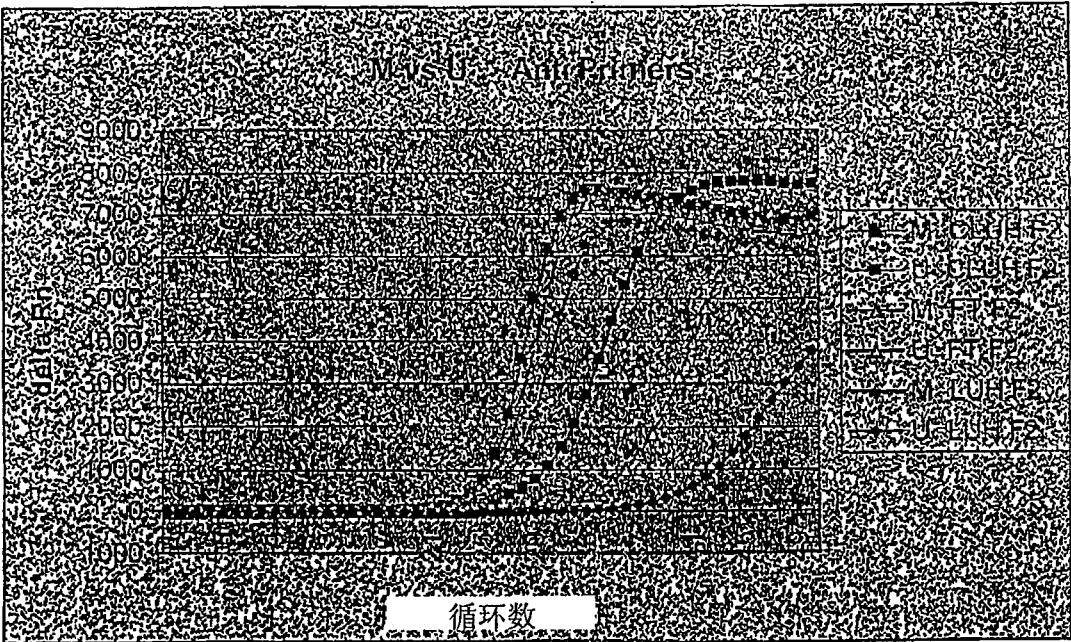


图6

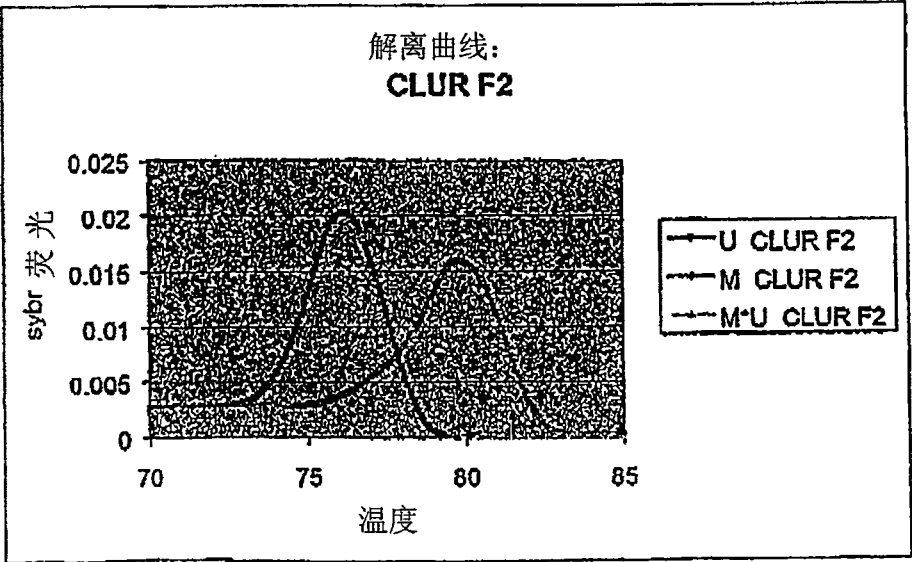


图7

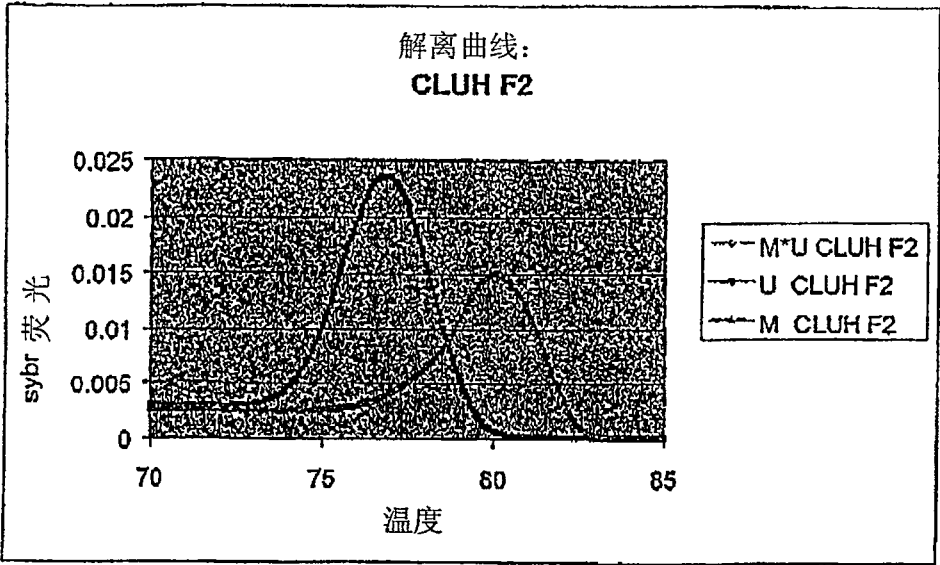


图8

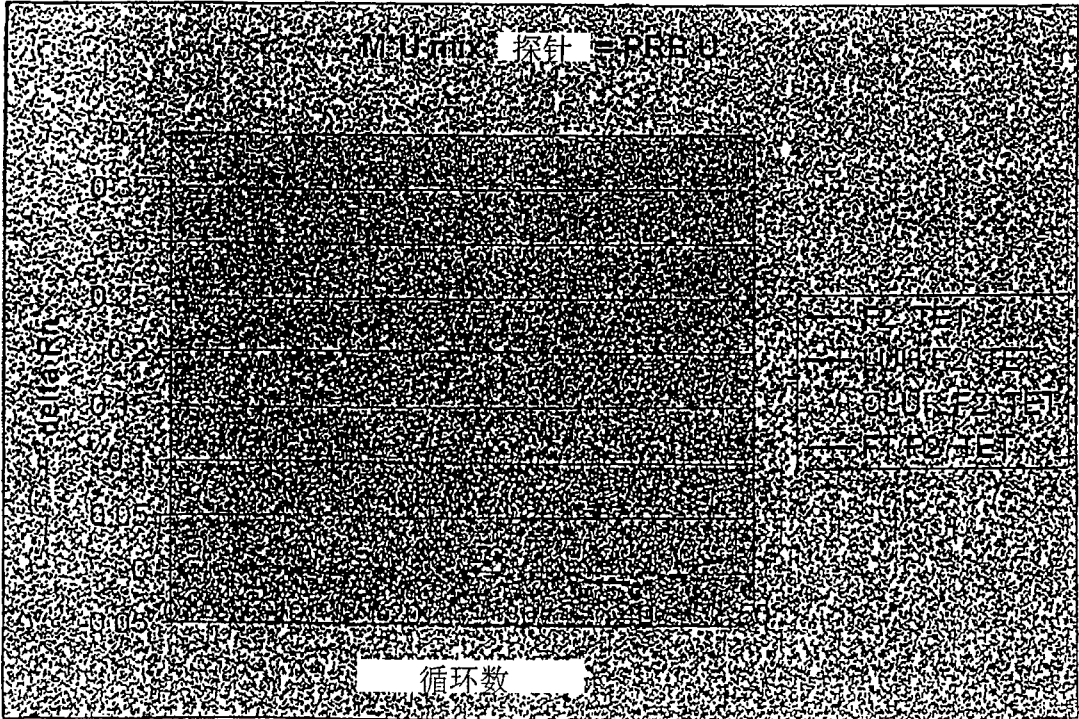


图9

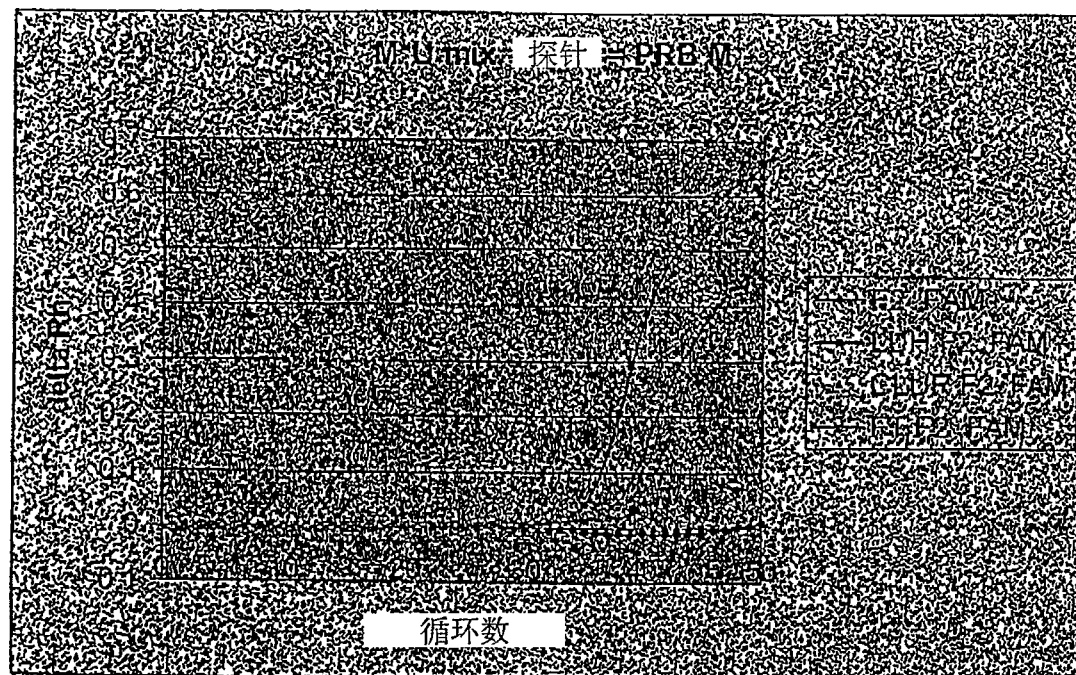


图 10

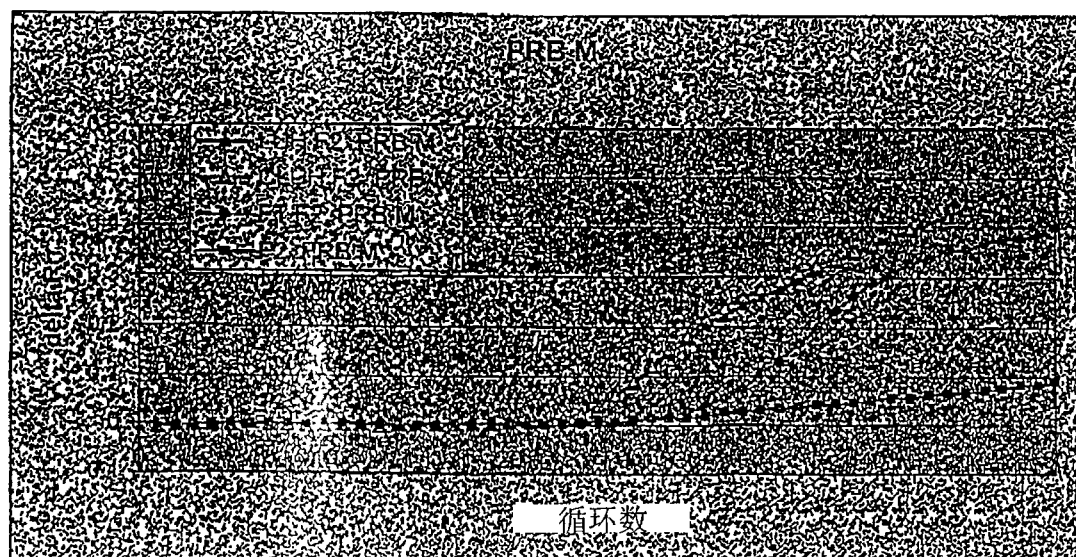


图 11

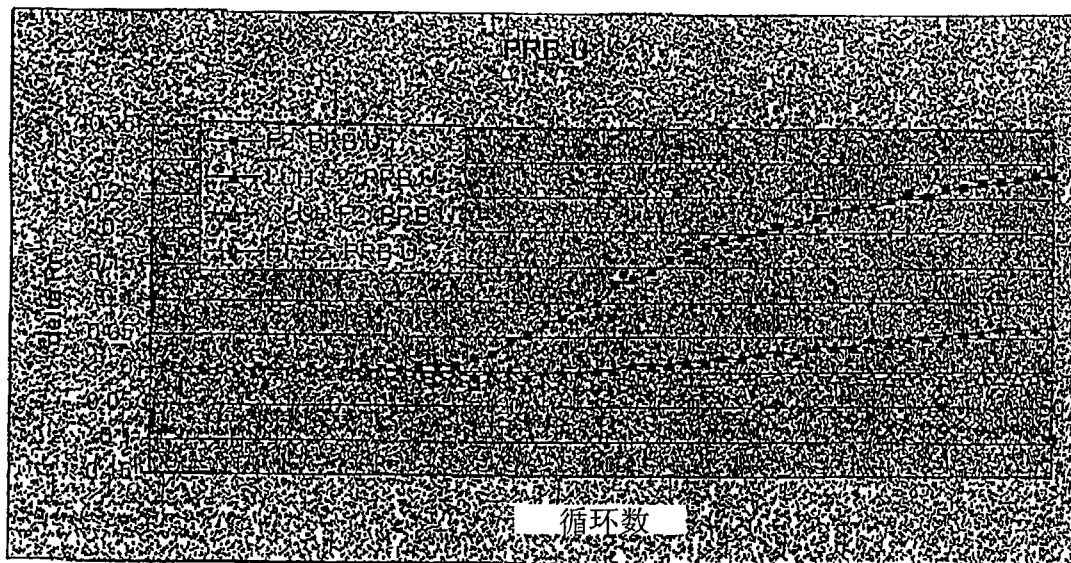


图12

GSTP1 基因内区域引物

```

      -7      -6      -5      -4      -3
CAGCACTGGG GCGGAGCGGG GCGGGACCAC CCTTATAAGG CTCGGAGGCC
TAGTATTGGG GCGGAGCGGG GCGGGATTAT TTTTATAAGG TTCGGAGGTC B-M
      GST F52A      GGGATTAT TTTTATAAGG TTAGGAGGT>

-2      -1 >      1 2 3      4
GCGAGGCCTT CGCTGGAGTT TCGCCGCCGC AGTCTTCGCC ACCAGTGAGT
GCGAGGTTTT CGTTGGAGTT TCGTCGTCGT AGTTTTCGTT ATTAGTGAGT B-M

5 6 7      8 9      10
ACGCGCGGCC CGCGTCCCCG GGGATGGGGC TCAGAGCTCC CAGCATGGGG
ACGCGCGGTT TGTGTTTTTG GGGATGGGGT TTAGAGTTTT TAGTATGGGG B-M
      <AAAIC CCCATCCCCA AATCTC ← 5-10Ni base pr

TGTGTGGTT TGTGTTTTTG ————— 5-10Ni & 5-10 head
TGTGTGGTT TGTGTTTTTG GGGATG ————— 5-10x head
      <TACCCCA AATCTCAAAA ATCATACCC ←
      5-10 & 5-10x base pr

```

图13

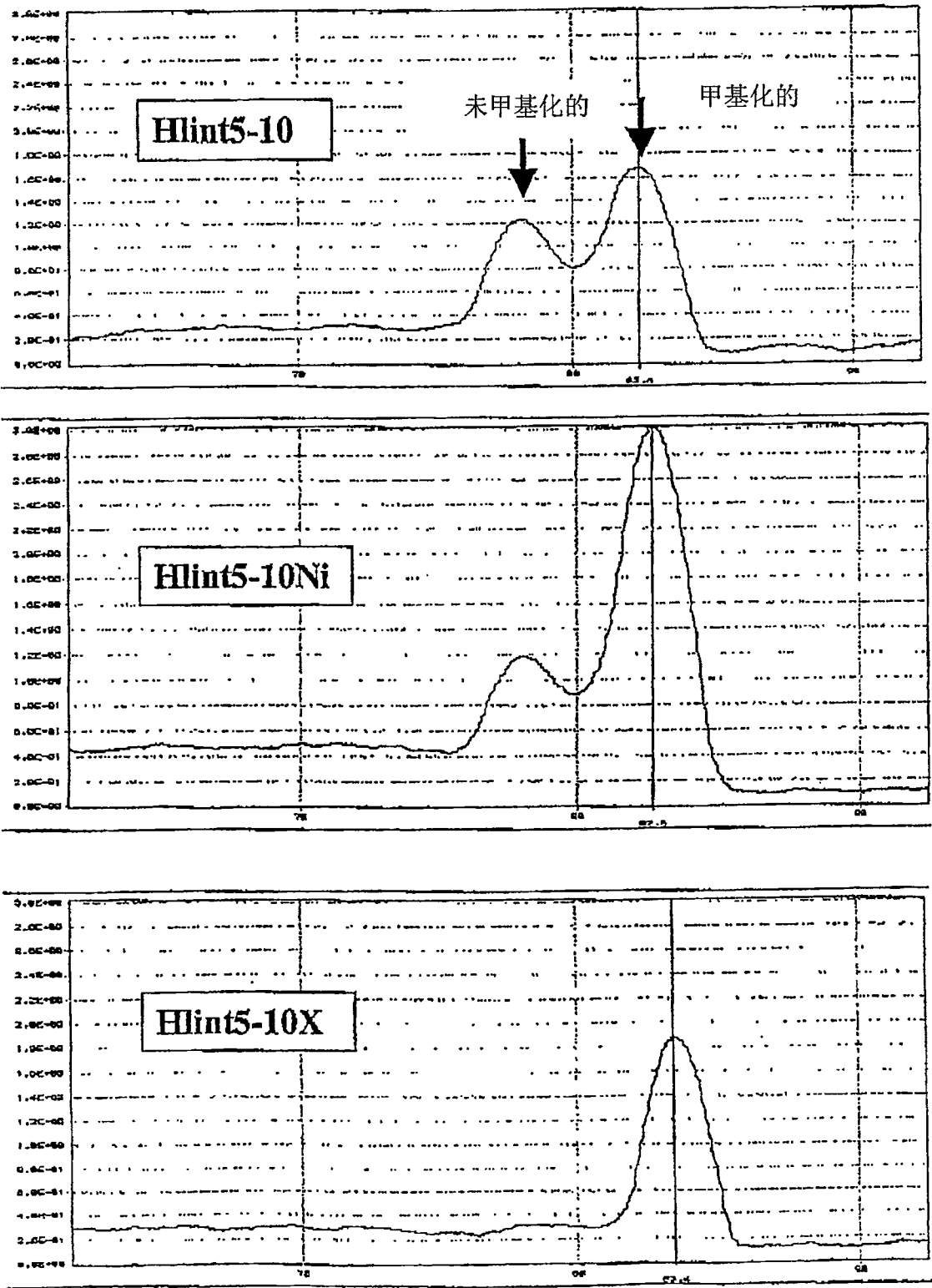
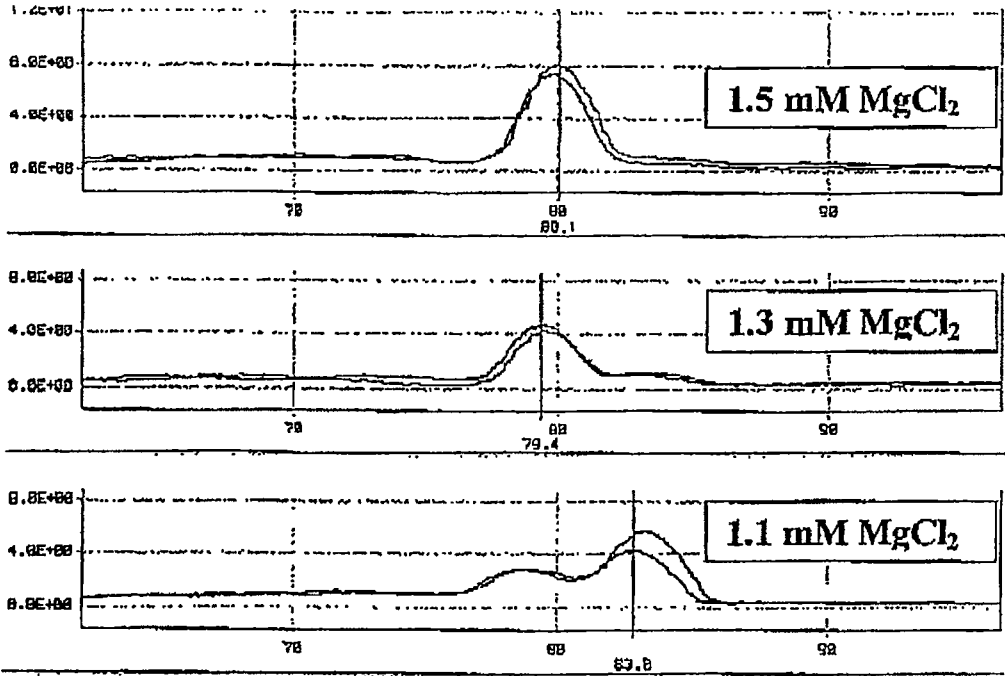


图14

Headloop 引物 HLINT5-10



Headloop 引物 HLINT5-10Ni

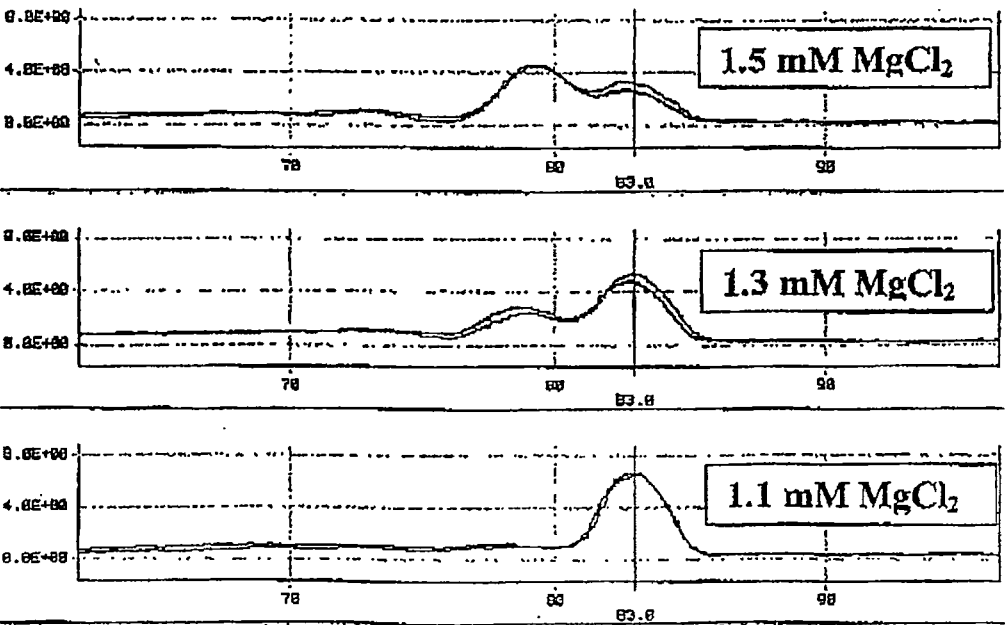


图15

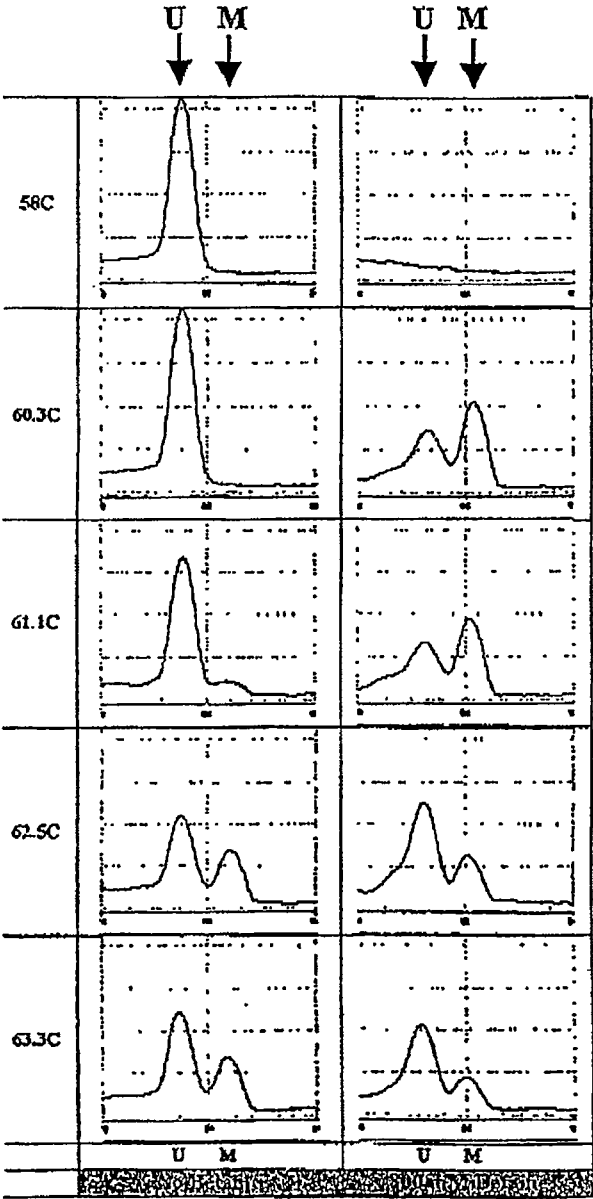


图16

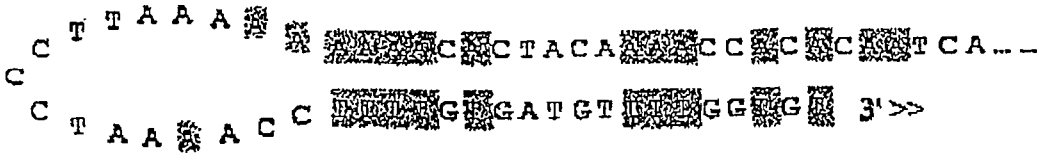


图17