



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108291255 B

(45) 授权公告日 2022.03.11

(21) 申请号 201680069953.0

(22) 申请日 2016.12.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108291255 A

(43) 申请公布日 2018.07.17

(30) 优先权数据
14/965343 2015.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/080225 2016.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/097887 EN 2017.06.15

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 S.G.威尔 Y.王

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 梁谋 黄希贵

(51) Int.Cl.
C12Q 1/686 (2018.01)

审查员 温婧

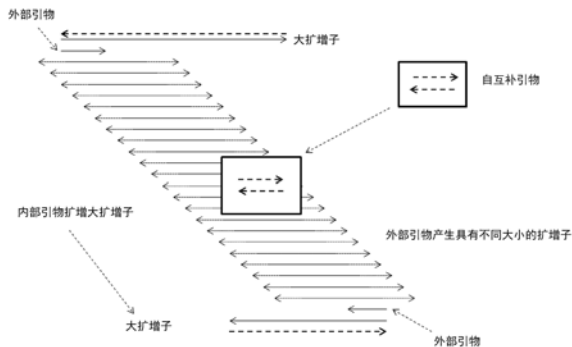
权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54) 发明名称

用于将片段化的核酸连接在一起的方法和试剂盒

(57) 摘要

提供了用于将片段化的核酸序列连接在一起的方法和试剂盒,其包括执行扩增步骤,所述扩增步骤包括使疑似包括片段化的靶核酸的样品与一对外部引物和一对自互补的内部引物接触,和产生全长靶核酸。所述方法可以包括执行扩增步骤、杂交步骤和检测步骤。此外,提供了试剂盒,其被设计成用于检测靶核酸序列。



1. 一种用于将片段化的核酸连接在一起的均匀方法,所述方法包括下述步骤:

-执行扩增步骤,该扩增步骤包括使疑似包含片段化的靶核酸的样品与以下物质接触:

-一对外部引物,其包含第一核酸序列和第二核酸序列,如果任何靶核酸存在于所述样品中,则产生包含第一有义链和第一反义链的第一扩增产物;和

-一对彼此互补的内部引物,其包含第三核酸序列和第四核酸序列,所述第三核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一反义链杂交以产生第二扩增产物的第二有义链,且所述第四核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一有义链杂交以产生所述第二扩增产物的第二反义链;和

-如下产生全长靶核酸:

-使所述第一有义链的第一个3'末端区域与所述第一反义链的第二个3'末端区域退火,其中所述第一有义链的第一个3'末端区域引发所述第一有义链在所述第一反义链上面的延伸,且所述第一反义链的第二个3'末端区域引发所述第一反义链在所述第一有义链上面的延伸,

其中所有步骤都以均匀方式执行。

2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括:

-执行杂交步骤,其包括使全长扩增产物与一种或多种可检测探针接触;和

-检测所述全长扩增产物的存在或不存在,其中所述全长扩增产物的存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在,且其中所述全长扩增产物的不存在指示所述靶核酸在所述样品中的不存在。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中:

-所述杂交步骤包括使所述全长扩增产物与包含第五核酸序列的一种或多种可检测探针之一接触,所述第五核酸序列用供体荧光部分和对应的受体部分标记;和

-所述检测步骤包括检测所述探针的供体荧光部分和受体部分之间的荧光共振能量转移(FRET)的存在或不存在,其中荧光的存在或不存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在或不存在。

4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的方法,其中所述扩增步骤采用具有5'至3'核酸酶活性的聚合酶。

5. 根据权利要求2-3中的任一项所述的方法,其中所述供体荧光部分和对应的受体部分是在所述探针上彼此的不超过8个核苷酸内。

6. 根据权利要求3中的任一项所述的方法,其中所述受体部分是猝灭剂。

7. 根据权利要求2中的任一项所述的方法,其中所述杂交步骤包括使所述全长扩增产物与一种或多种可检测探针之一接触,所述可检测探针包含含有双链DNA结合染料的分子探针,所述双链DNA结合染料在与所述全长扩增产物的双链核酸相互作用后发射荧光信号;和

所述检测步骤包括通过解链曲线分析来检测荧光共振的存在或不存在,其中荧光的存在或不存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在或不存在。

8. 根据权利要求1-3、6和7中的任一项所述的方法,其中彼此互补的内部引物对的相对浓度等于或低于外部引物对的浓度。

9. 根据权利要求1-3、6和7中的任一项所述的方法,其中所述扩增步骤进一步包括使所

述疑似包含片段化的靶核酸的样品与第二对彼此互补的内部引物接触。

10. 根据权利要求1-3、6和7中的任一项所述的方法,其中所述疑似包含片段化的靶核酸的样品是生物样品。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述生物样品选自呼吸道样本、粪便样本、血液样本、皮肤拭子、鼻拭子、创伤拭子、血液培养物、皮肤或软组织感染物。

12. 根据权利要求1-3、6和7中的任一项所述的方法,其中所述疑似包含片段化的靶核酸的样品是临床样品。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述临床样品选自福尔马林固定的和石蜡包埋的组织或血浆。

用于将片段化的核酸连接在一起的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸扩增的领域,且具体地,涉及连接片段化的核酸碎片。

背景技术

[0002] 因为甲醛(福尔马林的有效组分)导致核酸和蛋白之间的交联的产生,并因为固定工艺条件(例如,极低的pH)另外造成核酸片段化,从福尔马林固定的和石蜡包埋的(FFPE)组织提取DNA仍然是一项挑战(Lin等人, Anal Biochem., 395(2): 265-267 (2009))。此外,人血液中循环的无细胞DNA(cfDNA)和RNA的检测(就其在所谓的液体活组织检查方案中的应用而言,其已经产生了大量兴趣)具有某些限制,包括这样的DNA的片段化性质,其中平均大小为约160-180 bp(Suzuki等人, Clinica Chimica Acta, 387, 55-58 (2008))。

[0003] 对于基于PCR的癌症诊断测定,片段化的DNA的大小限制对于突变热点如BRAF V600、KRAS G12/G13或PIK3CA E542/E545/E546(其中突变簇集在少数附近密码子中)而言可能不是问题,但是它对于其它如EGFR外显子20(其中突变跨越25个密码子)而言是挑战。任何样品中完整DNA的丰度对于多个突变位点的准确且灵敏检测而言也可能是不足够的,所以在突变检测之前的靶标预富集方法是合乎需要的。靶核酸的预富集方法是已知的,但是这些方法包括多个试剂添加步骤,或者是靶标链的线性扩增方法。本发明以指数和均匀方式实现了这样的靶标预富集方法,不需要多个分散的步骤和试剂。因此,可以使重叠的短核酸片段连在一起并因而充当下游PCR检测的模板的方法是合乎需要的,本发明解决了这一点。

发明内容

[0004] 在一个方面,提供了一种用于将片段化的核酸连接在一起的方法,所述方法包括执行扩增步骤,所述扩增步骤包括使疑似包括片段化的靶核酸的样品与以下物质接触:一对外部引物,其包括第一核酸序列和第二核酸序列,如果任何靶核酸存在于所述样品中,则产生包括第一有义链和第一反义链的第一扩增产物;和一对自互补的内部引物,其包括第三核酸序列和第四核酸序列,所述第三核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一反义链杂交以产生第二扩增产物的第二有义链,且所述第四核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一有义链杂交以产生所述第二扩增产物的第二反义链;和如下产生全长靶核酸:使所述第一有义链的第一个3'末端区域与所述第一反义链的第二个3'末端区域退火,其中所述第一有义链的第一个3'末端区域引发所述第一有义链在所述第一反义链上面的延伸,且所述第一反义链的第二个3'末端区域引发所述第一反义链在所述第一有义链上面的延伸;和使所述第二有义链的第三个3'末端区域与所述第二反义链的第四个3'末端区域退火,其中所述第二有义链的第三个3'末端区域引发所述第二有义链在所述第二反义链上面的延伸,且所述第二反义链的第四个3'末端区域引发所述第二反义链在所述第二有义链上面的延伸。在某些实施方案中,所述方法还包括执行杂交步骤,该杂交步骤包括使所述全长扩增产物与一种或多种可检测探针接触和检测所述全长扩增产物的存在或不存在,其中所

述全长扩增产物的存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在,且其中所述全长扩增产物的不存在指示所述靶核酸在所述样品中的不存在。在某些实施方案中,所述杂交步骤包括使所述全长扩增产物与包含第五核酸序列的可检测探针接触,所述第五核酸序列用供体荧光部分和对应的受体部分标记,且所述检测步骤包括检测所述探针的供体荧光部分和受体部分之间的荧光共振能量转移(FRET)的存在或不存在,其中荧光的存在或不存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在或不存在。在某些实施方案中,所述扩增步骤采用具有5'至3'核酸酶活性的聚合酶。在某些实施方案中,所述供体荧光部分和对应的受体部分是在所述探针上彼此的不超过8个核苷酸内。在某些实施方案中,所述受体部分是猝灭剂。在某些实施方案中,所述杂交步骤包括使所述全长扩增产物与可检测探针接触,所述可检测探针包含含有双链DNA结合染料的分子探针,所述双链DNA结合染料在与所述全长扩增产物的双链核酸相互作用后发射荧光信号,且所述检测步骤包括通过解链曲线分析来检测荧光共振的存在或不存在,其中荧光的存在或不存在指示所述靶核酸在所述样品中的存在或不存在。在某些实施方案中,自互补的内部引物对的相对浓度等于或低于外部引物对的浓度。在某些实施方案中,所述方法还包括第二对自互补的内部引物。在某些实施方案中,所述方法还包括至少第二对自互补的内部引物(例如第二、第三、第四对自互补的内部引物)。

[0005] 在另一个方面,提供了用于将片段化的靶核酸连接在一起的试剂盒。所述试剂盒可以包括一对外部引物,其包括第一核酸序列和第二核酸序列,其被构造成与所述靶核酸的有义链和反义链杂交,且如果任意靶核酸存在于所述样品中,产生所述靶核酸的包括第一有义链和第一反义链的第一扩增产物;和一对内部自互补引物,其包括第三核酸序列和第四核酸序列,所述第三核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一反义链杂交以产生第二扩增产物的第二有义链,且所述第四核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一有义链杂交以产生所述第二扩增产物的第二反义链。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含第五种可检测地标记的核酸序列,其包含供体荧光部分和对应的受体部分。在某些实施方案中,所述受体部分是猝灭剂。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含核酸聚合酶(例如DNA聚合酶)。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含核苷三磷酸、核酸聚合酶和所述核酸聚合酶的功能所必需的缓冲液。在某些实施方案中,所述第一、第二、第三、第四和第五寡核苷酸中的至少一种包含至少一个经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,所述第一、第二和第三寡核苷酸具有40个或更少的核苷酸。在某些实施方案中,所述外部引物对和所述内部自互补引物对各自提供在容器中。在某些实施方案中,所述外部引物对和所述内部自互补引物对共同提供在一个容器中。在本文中,在某些实施方案中,所述自互补的内部引物对的相对浓度等于或低于所述外部引物对的浓度。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含第二对自互补的内部引物。在某些实施方案中,所述试剂盒还包含至少第二对自互补的内部引物(例如第二、第三、第四对自互补的内部引物)。在本文中,在某些实施方案中,所述自互补的内部引物对的相对浓度等于或低于所述外部引物对的浓度。

[0006] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明的主题,下面描述了合适的方法和材料。另外,所述材料、方法和实施例仅仅是示例性的,无意成为限制性的。

[0007] 在附图和下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。从附图和详

细描述以及从权利要求会明白本发明的其它特征、目的和优点。

附图说明

[0008] 图1显示了利用一对外部引物和一自互补的内部引物产生各种中间产物的示意图。

[0009] 图2显示了利用一对外部引物和一自互补的内部引物产生各种中间产物的示意图。

[0010] 图3显示了利用由所述外部引物对和所述自互补的内部引物对产生的扩增产物通过来自PCR反应的两种中间产物产生全长(缝合)产物的示意图。

[0011] 图4显示了在实施例I中使用的EGFR外显子20和试剂的示意图。

[0012] 图5显示了与各种量的外部引物混合的各种量的模板的实验设计的表。

[0013] 图6显示了宽范围的自互补的内部引物(缝合引物)和外部引物的滴定的实验设计表。

[0014] 图7显示了包括各种PCR反应的琼脂糖凝胶,所述PCR反应基于如在图4-6中所示的实验。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供了用于将片段化的核酸碎片连接在一起(其在本文中也被称作将片段化的核酸碎片“缝合”在一起)的方法和试剂盒。公开的方法和试剂盒产生核酸片段的较大碎片,例如,通过使两个重叠的短片段连接在一起以形成较大的片段,并且也预先扩增所述连接的片段以产生更多模板用于PCR扩增和检测。

[0017] 公开的方法包括将片段化的核酸碎片连接或缝合在一起以形成全长期望靶核酸靶序列的步骤。公开的方法包括执行至少一个循环步骤,其包括使用一对外部引物和一自互补的或基本上自互补的内部引物扩增疑似存在于样品中的片段化的靶核酸的一个或多个部分。更具体地,在一对自互补的内部引物的实施方案中,每种引物包括具有被选择成完美地匹配互补引物和/或靶核酸的序列的核酸,而在一对基本上自互补的引物的实施方案中,所述引物中的至少一种可以包括具有特定序列的核酸,所述特定序列是互补引物和/或靶序列的基本上相同的变体,其中所述变体具有至少例如80%、90%或95%序列同一性。所述外部引物对与自互补的内部引物对一起产生全长靶核酸。所述外部引物对可以包括第一核酸序列和第二核酸序列,如果任何靶核酸存在于所述样品中,则产生包括第一有义链和第一反义链的第一扩增产物。如果靶核酸被基本上片段化或损坏,所述外部引物可以能够但是不足以产生全长扩增子。在其中存在片段化的核酸靶标的样品中,如果所述靶DNA是完整的,所述外部引物对的任一种引物可以以这样的方式产生从用它的配偶外部引物的扩增衍生出的第一扩增产物:引物结合位点存在于来自样品的DNA的连续区段内。在所述样品中存在不足以支持仅通过外部引物扩增的DNA的连续区段的情况下,如果在外部和内部引物结合位点之间存在足够的连续DNA,每种外部引物可以通过所述内部引物之一的掺入而参与更短的第二扩增产物的产生,所述内部引物本身与期望的第一全长扩增产物的内部区域互补。通过正常PCR热变性可以变性从两组外部引物和对应的内部引物产生的两种双链第二扩增产物,且通过所述外部引物的延伸而衍生出的两种扩增子单链可以以这样的方式彼此杂交:可以延长这些延伸产物的3'-末端以产生全长靶核酸序列(图1、2和3)。

[0018] 所述自互补的内部引物对包括第三核酸序列和第四核酸序列,其中所述第三核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一反义链杂交以产生第二扩增产物的第二有义链,且所述第四核酸序列被构造成与所述第一扩增产物的第一有义链杂交以产生所述第二扩增产物的第二反义链。所述自互补的内部引物对结合并延伸现有的(截短的)模板序列和由所述外部引物产生的扩增子。在其中存在片段化的核酸靶标的样品中,所述自互补的内部引物对扩增在上面讨论的可以彼此引发的较长扩增产物,因而增加较长扩增产物的产生,所述较长扩增产物具有足够长度以彼此杂交并彼此引发以产生全长靶核酸序列(图1、2和3)。在一个实施方案中,所述自互补的内部引物对的相对浓度等于所述外部引物对的浓度。在另一个实施方案中,所述自互补的内部引物对的相对浓度低于所述外部引物对的浓度。

[0019] 在某些实施方案中,公开的方法可以包括第二对、第三对或更多对的自互补的内部引物。在每种情况下,所述另外的自互补的内部引物对可以与外部引物或邻近的自互补的内部引物对一起工作以产生一种或多种扩增产物。

[0020] 公开的方法包括产生全长靶核酸的步骤,这可以发生在当所述外部引物已经产生第一扩增产物时,所述第一扩增产物包括足够大小的那些,其中所述第一扩增产物和第二扩增产物的有义链和反义链包括这样的区域:其可以杂交在一起,由此各自作为互补链的引物起作用(图2和3)。以此方式,通过使所述第一有义链的第一个3'末端区域与所述第一反义链的第二个3'末端区域退火,可以生产和扩增全长靶核酸分子,其中所述第一有义链的第一个3'末端区域引发所述第一有义链在所述第一反义链上面的延伸,且所述第一反义链的第二个3'末端区域引发所述第一反义链在所述第一有义链上面的延伸。另外,当所述自互补的内部引物已经产生足够大小的第二扩增产物时,也可以产生全长靶核酸,其中所述第二扩增产物的第二有义链和第二反义链包括可以杂交在一起的区域,其可以是由自互补的内部引物表示的区域,且每条链在5'方向延伸至由外部引物表示的区域,由此各自作为互补链的引物起作用(图2和3)。以此方式,通过使所述第二有义链的第三个3'末端区域与所述第二反义链的第四个3'末端区域退火,可以生产和扩增全长靶核酸分子,其中所述第二反义链的第三个3'末端区域引发所述第二有义链在所述第二反义链上面的延伸,且所述第二反义链的第四个3'末端区域引发所述第二反义链在所述第二有义链上面的延伸。在本文中,所述第三个和第四个3'末端区域可以是由自互补的内部引物表示的区域。随着扩增过程继续和产生更多的较大片段,导致越来越大的量的全长靶核酸分子的产生。

[0021] 本文中使用的术语“有义链”表示具有与mRNA相同的序列的DNA链,其在转录过程中利用反义链作为它的模板。在本领域中与“有义链”同义的其他术语是“编码链”、“正(+)链”和“非模板链”。

[0022] 本文中使用的术语“反义链”表示具有与DNA有义链互补的碱基且用作mRNA的模板的基因的非编码DNA链。在本领域中与“反义链”同义的其他术语是“非编码链”、“负(-)链”和“模板链”。

[0023] 本文中使用的“引物”表示这样的寡核苷酸引物:其与编码目标靶标的核酸序列特异性地退火,并在适当的条件下从其开始DNA合成,从而产生各种扩增产物。每种讨论的引物可以与在各种靶核酸分子内或附近的靶标退火,使得每种扩增产物的至少一部分含有与所述靶标对应的核酸序列。所述扩增产物应当含有与目标靶标的一种或多种可检测探针互补的核酸序列。本文中使用的“探针”表示这样的寡核苷酸探针:其与编码目标靶标的核酸

序列特异性地退火。

[0024] 每个循环步骤可以包括扩增步骤、杂交步骤和检测步骤,其中使所述样品与一种或多种可检测探针接触,所述可检测探针用于检测目标靶标在所述样品中的存在或不存在。

[0025] 本文中使用的术语“扩增”表示合成与目标模板核酸分子的一条或两条链互补的核酸分子的过程。扩增核酸分子通常包括使模板核酸变性,在低于引物的解链温度的温度使引物与模板核酸退火,和酶促地从引物延伸以产生扩增产物。扩增通常需要脱氧核糖核苷三磷酸、DNA聚合酶(例如,Platinum[®] Taq)和对于所述聚合酶的最佳活性而言适当的缓冲液和/或辅因子(例如,MgCl₂和/或KCl)的存在。

[0026] 本文中使用的术语“引物”是本领域技术人员已知的,且表示寡聚化合物,主要表示寡核苷酸,但是也表示能够通过模板依赖性的DNA聚合酶“引发”DNA合成的经修饰的寡核苷酸,即,例如寡核苷酸的3'-末端提供游离3'-OH基团,模板依赖性的DNA聚合酶可以与其连接其它“核苷酸”,从而建立3'至5'磷酸二酯键,其中使用脱氧核苷三磷酸且其中释放焦磷酸盐。因此,除了对于预期的功能而言可能以外,在“引物”、“寡核苷酸”或“探针”之间不存在根本差异。

[0027] 术语“杂交”表示一个或多个探针与扩增产物的退火。杂交条件通常包括低于探针的解链温度、但是避免了探针的非特异性杂交的温度。

[0028] 术语“5'至3'核酸酶活性”表示核酸聚合酶的活性,通常与核酸链合成有关,其中从核酸链的5'末端除去核苷酸。

[0029] 术语“热稳定的聚合酶”表示热稳定的聚合酶,即,所述酶催化与模板互补的引物延伸产物的形成,并且当遭受升高的温度持续实现双链模板核酸的变性所需的时间时不会不可逆地变性。通常,合成在每种引物的3'末端处开始,并且沿着模板链在5'至3'方向前进。热稳定的聚合酶已经分离自黄栖热菌(*Thermus flavus*)、红栖热菌(*T. ruber*)、嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)、水生栖热菌(*T. aquaticus*)、乳栖热菌(*T. lacteus*)、红色栖热菌(*T. rubens*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和炽热甲烷嗜热菌(*Methanothermobacter fervidus*)。尽管如此,非热稳定的聚合酶也可以用在PCR测定中,只要补充所述酶即可。

[0030] 术语“其互补物”表示与给定的核酸具有相同长度且刚好互补的核酸。

[0031] 术语“延伸”或“伸长”当关于核酸使用时表示,此时另外的核苷酸(或其它类似的分子)掺入核酸中。例如,任选地用掺入核苷酸的生物催化剂(诸如通常在核酸的3'末端端部添加核苷酸的聚合酶)延伸核酸。

[0032] 在两个或更多个核酸序列的背景下,术语“相同”或百分比“同一性”表示,当为了最大对应对比和比对时,两个或更多个序列或子序列是相同的或指定百分比的核苷酸是相同的,例如,如使用技术人员可得到的序列对比算法之一或通过目检所测量的。适合用于确定序列同一性百分比和序列相似性的示例性算法是BLAST程序,其描述在,例如,Altschul等人(1990)“Basic local alignment search tool”, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish等人(1993)“Identification of protein coding regions by database similarity search”, *Nature Genet.* 3:266-272, Madden等人(1996)“Applications of network BLAST server”, *Meth. Enzymol.* 266:131-141, Altschul等人(1997)“Gapped

BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 和Zhang等人(1997) “PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation”, *Genome Res.* 7:649-656中。

[0033] 在寡核苷酸的背景下,“修饰的核苷酸”表示一种改变,其中寡核苷酸序列的至少一个核苷酸被不同核苷酸替代,所述不同核苷酸给所述寡核苷酸提供期望的性质。在本文描述的寡核苷酸中可以被置换的示例性的修饰的核苷酸包括,例如,C5-甲基-dC、C5-乙基-dC、C5-甲基-dU、C5-乙基-dU、2,6-二氨基嘌呤、C5-丙炔基-dC、C5-丙炔基-dU、C7-丙炔基-dA、C7-丙炔基-dG、C5-炔丙基氨基-dC、C5-炔丙基氨基-dU、C7-炔丙基氨基-dA、C7-炔丙基氨基-dG、7-脱氮-2-脱氧黄苷、吡唑并嘧啶类似物、假-dU、硝基吡咯、硝基咪唑、2'-0-甲基Ribo-U、2'-0-甲基Ribo-C、N4-乙基-dC、N6-甲基-dA等。在寡核苷酸中可以被置换的许多其它修饰的核苷酸在本文中被提及或是本领域中以其它方式已知的。在某些实施方案中,相对于对应的未修饰的寡核苷酸的解链温度,修饰的核苷酸置换会改变寡核苷酸的解链温度(T_m)。为了进一步举例说明,在一些实施方案中,某些修饰的核苷酸置换可以减少非特异性的核酸扩增(例如,使引物二聚体形成最小化等),增加预期的靶扩增子的收率和/或等等。这些类型的核酸修饰的实例描述在例如美国专利号6,001,611中。

[0034] 靶核酸序列的检测

[0035] 本发明提供了通过扩增例如靶核酸序列的一部分来检测靶核酸序列的方法。应当以特异性知道靶核酸的核酸序列。具体地,本发明中的实施方案提供了用于扩增和检测靶核酸分子靶标的引物和探针。

[0036] 为了检测靶核酸序列,可以提供用于扩增的引物和探针,另外,本领域技术人员可以使用常规方法针对特异性和/或灵敏度评价功能变体。代表性的功能变体可以包括,例如,在靶核酸中的一个或多个缺失、插入和/或置换。更具体地,寡核苷酸的实施方案各自包括具有被选择成完美匹配靶标的序列的核酸,或它可以包括其基本上相同的变体或所述变体的互补物,其中所述变体具有至少例如80%、90%或95%序列同一性。

[0037] 在一个实施方案中,使用上述的引物和探针集合以便提供疑似含有靶标的生物样品中的靶核酸序列的检测。所述引物和探针集合可以包含对靶核酸序列特异性的引物和探针或由其组成,或者,在另一个实施方案中,所述靶核酸序列的引物和探针可以包含所述引物和探针中的任一种的功能活性变体或由其组成。

[0038] 通过使用公开的方法中的引物和/或探针,可以鉴别所述引物和/或探针中的任一种的功能活性变体。引物和/或探针的功能活性变体涉及与各个序列相比在所述的方法或试剂盒中提供类似的或更高的特异性和灵敏度的引物和/或探针。

[0039] 所述变体可以例如通过一个或多个核苷酸添加、缺失或置换(诸如在各个序列的5'末端和/或3'末端处的一个或多个核苷酸添加、缺失或置换)从所述序列变化。如上面详述的,可以对引物(和/或探针)进行化学修饰,即,引物和/或探针可以包含修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。探针(或引物)则是修饰的寡核苷酸。“修饰的核苷酸”(或“核苷酸类似物”)与天然的“核苷酸”差别在于某种修饰,但是仍然由碱基或碱基样化合物、呋喃型戊糖基糖或呋喃型戊糖基糖-样化合物、磷酸酯部分或磷酸酯样部分或它们的组合组成。例如,“标记”可以连接至“核苷酸”的碱基部分,由此得到“修饰的核苷酸”。“核苷酸”中的天然碱

基也可以被例如7-脱氮杂(desaza)嘌呤替代,由此也得到“修饰的核苷酸”。术语“修饰的核苷酸”或“核苷酸类似物”在本申请中互换使用。“修饰的核苷” (或“核苷类似物”)与天然的核苷差别在于如上面关于“修饰的核苷酸” (或“核苷酸类似物”)所概述的方式进行的某种修饰。

[0040] 使用例如计算机程序诸如OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.),可以设计扩增编码靶标的核酸分子(例如,编码靶核酸序列的替代部分的核酸)的寡核苷酸(包括修饰的寡核苷酸和寡核苷酸类似物)。当设计要用作扩增引物的寡核苷酸时重要的特征包括、但不限于:适当大小的扩增产物以促进检测(例如,通过电泳),对于一对引物的成员而言类似的解链温度,和每种引物的长度(即,引物需要足够长以序列特异性地退火和开始合成,但是不会长得使得在寡核苷酸合成过程中降低保真度)。通常,寡核苷酸引物是8-50个核苷酸的长度(例如,8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48或50个核苷酸的长度)。

[0041] 除了一组引物以外,所述方法可以使用一种或多种探针以便检测靶核酸序列的存在或不存在。术语“探针”表示合成地或生物地产生的核酸(DNA或RNA),其通过设计或选择而含有特异性的核苷酸序列,所述核苷酸序列允许它们在限定的预定严格性下与“靶核酸”特异性地(即,优先地)杂交。“探针”可以被称作“检测探针”,这意味着它检测靶核酸。

[0042] 在某些实施方案中,所述探针可以用至少一种荧光标记进行标记。在一个实施方案中,所述探针可以用供体荧光部分(例如,荧光染料)和对应的受体部分(例如,猝灭剂)标记。在一个实施方案中,所述探针包含荧光部分和核酸序列或者由其组成。

[0043] 设计要用作探针的寡核苷酸可以以与引物设计类似的方式进行。实施方案可以使用单个探针或探针对,用于检测扩增产物。取决于实施方案,探针应用可以包含至少一个标记和/或至少一个猝灭剂部分。与引物一样,探针经常具有类似的解链温度,且每个探针的长度必须足以发生序列特异性的杂交,但是不会长得使得在合成过程中降低保真度。寡核苷酸探针通常是15-40(例如,16、18、20、21、22、23、24或25)个核苷酸的长度。

[0044] 构建体可以包括载体,每个载体含有引物和探针核酸分子之一。可以使用构建体例如作为对照模板核酸分子。适合使用的载体是商购可得和/或通过本领域的常规重组核酸技术方法生产。可以例如通过化学合成、从靶标直接克隆或通过PCR扩增得到核酸分子。

[0045] 除了靶核酸分子以外,适合用在所述方法中的构建体通常包括编码用于选择期望的构建体和/或转化体的可选择标记物(例如,抗生素抗性基因)的序列和复制起点。载体系统的选择经常取决于几个因素,包括、但不限于,宿主细胞的选择、复制效率、可选择性、可诱导性和回收容易性。

[0046] 可以在宿主细胞中繁殖含有靶核酸分子的构建体。本文中使用的术语宿主细胞意在包括原核生物和真核生物诸如酵母、植物和动物细胞。原核宿主可以包括大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。真核宿主包括酵母诸如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、哺乳动物细胞诸如COS细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、昆虫细胞和植物细胞诸如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)。使用本领域普通技术人员通常已知的任意技术,

可以将构建体引入宿主细胞中。例如,磷酸钙沉淀、电穿孔、热激、脂转染、显微注射和病毒介导的核酸转移是用于将核酸引入宿主细胞中的常见方法。另外,可以将裸露DNA直接递送至细胞(参见,例如,美国专利号5,580,859和5,589,466)。

[0047] 聚合酶链式反应(PCR)

[0048] 美国专利号4,683,202、4,683,195、4,800,159和4,965,188公开了常规PCR技术。PCR通常采用两种结合选定的核酸模板(例如,DNA或RNA)的寡核苷酸引物。在某些实施方案中有用的引物包括能够在所述的靶核酸序列内充当核酸合成的起始点的寡核苷酸。可以通过常规方法从限制性消化物纯化引物,或可以合成地产生它。为了在扩增中的最大效率,所述引物优选地是单链的,但是所述引物可以是双链的。首先将双链引物变性,即,处理以分离所述链。一种使双链核酸变性的方法是通过加热。

[0049] 如果模板核酸是双链的,在可以将它用作PCR中的模板之前需要分离两条链。链分离可以通过任意合适的变性方法完成,所述方法包括物理方式、化学方式或酶促方式。一种分离核酸链的方法包括加热核酸直到它显著地变性(例如,大于50%、60%、70%、80%、90%或95%发生变性)。使模板核酸变性所需的加热条件将取决于例如缓冲盐浓度以及正在变性的核酸的长度和核苷酸组成,但是通常在约90°C至约105°C的范围内持续一段时间,所述时间取决于反应的特征诸如温度和核酸长度。变性通常执行约30秒至4分钟(例如,1分钟至2分钟30秒或1.5分钟)。

[0050] 如果通过热使双链模板核酸变性,允许反应混合物冷却至促进每种引物与它在所述靶核酸分子上的靶序列退火的温度。用于退火的温度经常是约35°C至约65°C(例如,约40°C至约60°C;约45°C至约50°C)。退火时间可以是约10秒至约1分钟(例如,约20秒至约50秒;约30秒至约40秒)。然后将反应混合物调至促进或优化聚合酶活性的温度,即,足以使延伸从退火的引物发生以产生与模板核酸互补的产物的温度。所述温度应当足以从每个与核酸模板退火的引物合成延伸产物,但是不应当高至使来自它的互补模板的延伸产物变性(例如,用于延伸的温度通常范围为约40°C至约80°C(例如,约50°C至约70°C;约60°C)。延伸时间可以是约10秒至约5分钟(例如,约30秒至约4分钟;约1分钟至约3分钟;约1分钟30秒至约2分钟)。

[0051] PCR测定可以采用靶核酸诸如RNA或DNA(cDNA)。模板核酸不需要纯化;它可以是复杂混合物的次要级分,诸如在人细胞中所含的靶核酸。通过常规技术诸如在*Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*(Persing等人(编),1993,American Society for Microbiology,Washington D.C.)中描述的那些,可以从生物样品提取靶核酸分子。核酸可以得自任意多种来源,诸如质粒或天然来源,包括细菌、酵母、病毒、细胞器或高等生物诸如植物或动物。

[0052] 在诱导引物延伸的反应条件下将寡核苷酸引物与PCR试剂组合。例如,链延伸反应通常包括50 mM KCl、10 mM Tris-HCl(pH 8.3)、15 mM MgCl₂、0.001%(w/v)明胶、1.0 ng-1.0 μg变性的模板DNA、50 pmol的每种寡核苷酸引物、2.5 U的Taq聚合酶和10%DMSO)。所述反应经常含有150-320μM的dATP、dCTP、dTTP、dGTP中的每一种或它们的一种或多种类似物。

[0053] 新合成的链形成了可以在反应的后续步骤中使用的双链分子。可以根据需要经常重复链分离、退火和延伸的步骤以产生期望的量的与靶核酸分子对应的扩增产物。在反应中的限制因素是存在于反应中的引物、热稳定的酶和核苷三磷酸的量。优选地将循环步骤

(即,变性、退火、和延伸)重复至少一次。对于在检测中的应用,循环步骤的数目将取决于例如样品的性质。如果样品是核酸的复杂混合物,将需要更多的循环步骤来扩增足够用于检测的靶序列。通常,将循环步骤重复至少约20次,但是可以重复多达40、60或甚至100次。

[0054] 荧光共振能量转移(FRET)

[0055] FRET技术(参见,例如,美国专利号4,996,143、5,565,322、5,849,489和6,162,603)是基于这样的概念:当供体荧光部分和对应的受体荧光部分被置于彼此的特定距离之内时,两个荧光部分之间发生能量转移,其可以被可视化或以其它方式检测和/或定量。当供体被具有适当波长的光辐射激发时,供体通常向受体转移能量。受体通常将转移的能量以具有不同波长的光辐射的形式重新发射。在某些系统中,通过包括基本上非荧光的供体部分的生物分子的方式,可以在供体和受体部分之间转移非荧光能量(参见,例如,美国专利号7,741,467)。

[0056] 在一个实例中,寡核苷酸探针可以含有供体荧光部分和对应的猝灭剂,所述猝灭剂可以是荧光的或不是荧光的,且将转移的能量以光以外的形式消散。当探针完整时,能量转移通常发生在供体和受体部分之间,使得来自供体荧光部分的荧光发射被受体部分猝灭。在聚合酶链式反应的延伸步骤过程中,与扩增产物结合的探针通过例如Taq聚合酶的5'至3'核酸酶活性切割,使得供体荧光部分的荧光发射不再被猝灭。用于此目的的示例性探针描述在例如美国专利号5,210,015、5,994,056和6,171,785中。常用的供体-受体对包括FAM-TAMRA对。常用的猝灭剂是DABCYL和TAMRA。常用的黑暗猝灭剂包括BlackHole Quenchers™(BHQ)(Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.)、Iowa Black™(Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa)、BlackBerry™ Quencher 650(BBQ-650)(Berry & Assoc., Dexter, Mich.)。

[0057] 在另一个实例中,两种寡核苷酸探针(各自含有荧光部分)可以在特定位置处与扩增产物杂交,所述特定位置由寡核苷酸探针与靶核酸序列的互补性决定。寡核苷酸探针与扩增产物核酸在适当位置杂交后,产生FRET信号。杂交温度可以在约35°C至约65°C范围内持续约10秒至约1分钟。

[0058] 可以使用例如光子计数落射荧光显微镜系统(含有用于监测在特定范围的荧光发射的适当分色镜和滤光片)、光子计数光电倍增系统或荧光计进行荧光分析。用氩离子激光器、高强度汞(Hg)弧光灯、导光纤光源或针对在期望范围内的激发适当地过滤的其它高强度光源,可以进行激发以引发能量转移或允许直接检测荧光团。

[0059] 如本文中关于供体和对应的受体部分使用的,“对应”表示受体荧光部分或黑暗猝灭剂具有与供体荧光部分的发射光谱重叠的吸收光谱。受体荧光部分的发射光谱的波长最大值应当比供体荧光部分的激发光谱的波长最大值大至少100 nm。因此,它们之间可以产生有效的非辐射能量转移。

[0060] 通常为了以下目的选择荧光供体和对应的受体部分:(a)高效率Forster能量转移;(b)大的最终斯托克斯位移(>100 nm);(c)向可见光谱的红色部分(>600 nm)尽可能远的发射位移;和(d)向比由供体激发波长处的激发所产生的拉曼水荧光发射更高的波长的发射位移。例如,可以选择这样的供体荧光部分:其具有它在激光线(例如,氩-镉442 nm或氩488 nm)附近的激发最大值、高消光系数、高量子产率以及其荧光发射与对应的受体荧光部分的激发光谱的良好重叠。可以选择这样的对应的受体荧光部分:其具有高消光系数、高

量子产率、其激发与供体荧光部分的发射的良好重叠以及可见光谱的红色部分 (>600 nm) 中的发射。

[0061] 可以在FRET技术中与各种受体荧光部分一起使用的代表性供体荧光部分包括荧光素、萤光黄、B-藻红蛋白、9-吡啶异硫氰酸酯、萤光黄VS、4-乙酰氨基-4'-异硫氰酰基均二苯乙烯-2,2'-二磺酸、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酰基苯基)-4-甲基香豆素、1-茈丁酸琥珀酰亚胺酯和4-乙酰氨基-4'-异硫氰酰基均二苯乙烯-2,2'-二磺酸衍生物。取决于所用的供体荧光部分,代表性的受体荧光部分包括LC Red 640、LC Red 705、Cy5、Cy5.5、丽丝胺罗丹明B磺酰氯、异硫氰酸四甲基罗丹明、罗丹明x异硫氰酸酯、异硫氰酸赤藓红、荧光素、二亚乙基三胺五乙酸酯或镧系元素离子(例如,铕或铽)的其它螯合物。供体和受体荧光部分可以得自例如Molecular Probes (Junction City, Oreg.)或Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)。

[0062] 可以将供体和受体荧光部分通过接头臂连接至适当的探针寡核苷酸。每个接头臂的长度是重要的,因为接头臂将影响供体和受体荧光部分之间的距离。接头臂的长度可以是以埃(Å)计的从核苷酸碱基到荧光部分的距离。一般而言,接头臂是约10Å至约25Å。接头臂可以属于在WO 84/03285中描述的种类。WO 84/03285也公开了用于将接头臂连接至特定核苷酸碱基以及还用于将荧光部分连接至接头臂的方法。

[0063] 可以将受体荧光部分(诸如LC Red 640)与含有氨基接头(例如,C6-氨基氨基亚磷酸酯,可得自ABI (Foster City, Calif.)或Glen Research (Sterling, VA))的寡核苷酸结合以产生例如LC Red 640-标记的寡核苷酸。经常使用的将供体荧光部分(诸如荧光素)与寡核苷酸偶联的接头包括硫脲接头(FITC衍生的,例如,来自Glen Research或ChemGene (Ashland, Mass.)的荧光素-CPG)、酰胺接头(荧光素-NHS-酯衍生的,诸如来自BioGenex (San Ramon, Calif.)的CX-荧光素-CPG),或3'-氨基-CPG,其需要在寡核苷酸合成后偶联荧光素-NHS-酯。

[0064] 靶核酸分子的检测

[0065] 本发明提供了用于检测靶核酸分子在生物或非生物样品中的存在或不存在的方法。提供的方法避免了样品污染、假阴性和假阳性的问题。所述方法包括执行至少一个循环步骤和一个FRET检测步骤,所述循环步骤包括使用一个或多个引物对扩增来自样品的靶核酸分子的一部分。优选地在热循环仪中执行多个循环步骤。可以使用引物和探针执行所述方法以检测靶标的存在,且靶标的检测指示靶标在所述样品中的存在。

[0066] 如本文中所述,使用利用FRET技术的经标记的杂交探针,可以检测扩增产物。一种FRET形式利用TaqMan[®]技术来检测扩增产物的存在或不存在,并因此检测靶核酸分子的存在或不存在。TaqMan[®]技术利用一种单链杂交探针,所述探针用例如一种荧光染料和一种猝灭剂(其可以是或不是荧光的)标记。当第一荧光部分用合适波长的光激发时,所吸收的能量根据FRET原理被转移至第二荧光部分或黑暗猝灭剂。第二部分通常是猝灭剂分子。在PCR反应的退火步骤过程中,经标记的杂交探针结合至靶DNA(即,扩增产物)并在随后的延伸阶段过程中通过例如Taq聚合酶的5'至3'核酸酶活性降解。所以,荧光部分和猝灭剂部分变得在空间上彼此分离。结果,在没有猝灭剂存在下激发第一荧光部分后,可以检测到来自第一荧光部分的荧光发射。作为实例,ABI PRISM[®] 7700序列检测系统(Applied Biosystems)使用TaqMan[®]技术,并且适合用于执行本文中所述的用于检测靶核酸分子在所述样品中的存

在或不存在的方法。

[0067] 与FRET结合的分子信标也可以用于使用实时PCR方法检测扩增产物的存在。分子信标技术使用第一荧光部分和第二荧光部分标记的杂交探针。所述第二荧光部分通常是猝灭剂,且所述荧光标记通常位于探针的每个末端处。分子信标技术使用具有允许二级结构形成(例如,发夹)的序列的探针寡核苷酸。由于在探针内的二级结构形成,当探针在溶液中时,两个荧光部分处于空间接近。在与靶核酸(即,扩增产物)杂交后,探针的二级结构被破坏,并且荧光部分变得彼此分离,使得在用合适波长的光激发后,可以检测第一荧光部分的发射。

[0068] FRET技术的另一种常见形式利用两种杂交探针。每种探针可以用不同的荧光部分标记,并且通常设计为在靶DNA分子(例如,扩增产物)中彼此紧密接近地杂交。供体荧光部分(例如,荧光素)在470 nm处被LightCycler®仪器的光源激发。在FRET过程中,荧光素将其能量转移给受体荧光部分诸如LightCycler®-Red 640 (LC Red 640)或LightCycler®-Red 705 (LC Red 705)。受体荧光部分随后发射更长波长的光,其通过LightCycler®仪器的光学检测系统检测。只有当荧光部分处于直接局部接近时,并且当供体荧光部分的发射光谱与受体荧光部分的吸收光谱重叠时,有效的FRET才发生。发射信号的强度可以与原始靶DNA分子的数目(例如,靶基因组的数目)关联。如果发生靶核酸的扩增并且产生扩增产物,则杂交步骤导致基于探针对的成员之间的FRET的可检测信号。

[0069] 通常,FRET的存在指示靶核酸分子在所述样品中的存在,且FRET的不存在指示靶核酸分子在所述样品中的不存在。但是,样本采集不足、运输延迟、不恰当的运输条件或某些采集拭子(藻酸钙或铝杆)的应用都是可以影响测试结果的成功和/或准确度的条件。使用本文所公开的方法,在例如45个循环步骤内FRET的检测指示靶核酸分子的存在。

[0070] 可以用于实践所述方法的代表性生物样品包括、但不限于呼吸道样本、粪便样本、血液样本、皮肤拭子、鼻拭子、创伤拭子、血液培养物、皮肤和软组织感染物。生物样品的采集和保存方法是本领域技术人员已知的。可以处理生物样品(例如,通过本领域已知的核酸提取方法和/或试剂盒)以释放靶核酸,或在一些情况下,可以使生物样品与PCR反应组分和适当的寡核苷酸直接接触。

[0071] 解链曲线分析是可以被包括在循环概况中的另外步骤。解链曲线分析是基于DNA在被称为解链温度(T_m)的特征温度解链的事实,所述解链温度被定义为一半DNA双链体已经分离成单链时的温度。DNA的解链温度主要取决于它的核苷酸组成。因而,富含G和C核苷酸的DNA分子具有比具有丰富A和T核苷酸的那些更高的 T_m 。通过检测丧失信号时的温度,可以确定探针的解链温度。类似地,通过检测产生信号时的温度,可以确定探针的退火温度。来自靶扩增产物的探针的解链温度可以证实所述靶标在所述样品中的存在或不存在。

[0072] 在每次热循环仪运行中,同样使对照样品循环。阳性对照样品可以使用例如对照引物 and 对照探针来扩增靶核酸对照模板(而非所述的靶基因的扩增产物)。阳性对照样品还可以扩增例如含有靶核酸分子的质粒构建体。使用与用于检测预期靶标相同的引物和探针,这样的质粒对照可以在内部(例如,在样品内)扩增或在与患者的样品并排运行的单独的样品中扩增。这样的对照指示扩增、杂交和/或FRET反应的成功与否。每次热循环仪运行还可以包含阴性对照,例如,其缺乏靶模板DNA。阴性对照可以测量污染。这确保所述系统和试剂不会产生假阳性信号。因此,对照反应可以容易地确定,例如,引物以序列特异性退火

和开始延伸的能力以及探针以序列特异性杂交和使FRET发生的能力。

[0073] 在一个实施方案中,所述方法包括避免污染的步骤。例如,在美国专利号5,035,996、5,683,896和5,945,313中描述了利用尿嘧啶-DNA糖基化酶的酶促方法以减少或消除一次热循环仪运行与下一次之间的污染。

[0074] 与FRET技术结合的常规PCR方法可以用于实践所述方法。在一个实施方案中,使用LightCycler[®]仪器。下述专利申请描述了如在LightCycler[®]技术中所用的实时PCR:WO 97/46707、WO 97/46714和WO 97/46712。

[0075] LightCycler[®]可以使用PC工作站运行并且可以利用Windows NT操作系统。当机器将毛细管依次置于光学单元上方时,获得来自样品的信号。软件可以在每次测量后立即实时显示荧光信号。荧光采集时间是10-100毫秒(msec)。在每个循环步骤之后,可以为所有样品不断地更新相对于循环次数的荧光定量显示。可以存储生成的数据用于进一步分析。

[0076] 作为FRET的替代,可以使用双链DNA结合染料诸如荧光DNA结合染料(例如,SYBR[®] Green或SYBR[®] Gold (Molecular Probes))检测扩增产物。在与双链核酸相互作用后,这样的荧光DNA结合染料在用合适波长的光激发后发射荧光信号。还可以使用双链DNA结合染料诸如核酸嵌入染料。当使用双链DNA结合染料时,通常执行解链曲线分析用于证实扩增产物的存在。

[0077] 应当理解,本发明的实施方案不被一种或多种商购可得的仪器的配置限制。

[0078] 制品/试剂盒

[0079] 本发明的实施方案还提供了用于检测靶核酸序列的制品或试剂盒。制品可以包括用于检测基因靶标的引物和探针以及合适的包装材料。用于检测靶核酸序列的代表性引物和探针能够与靶核酸分子杂交。此外,试剂盒还可以包括DNA固定化、杂交和检测所需的适当包装的试剂和材料,如固体支持物、缓冲液、酶和DNA标准品。本文中公开了设计引物和探针的方法,并提供了扩增靶核酸分子和与靶核酸分子杂交的引物和探针的代表性实例。

[0080] 制品还可以包括用于标记探针的一种或多种荧光部分,或可替换地,可以标记试剂盒所提供的探针。例如,制品可以包括用于标记探针的供体和/或受体荧光部分。上面提供了合适的FRET供体荧光部分和对应的受体荧光部分的实例。

[0081] 制品还可以含有包装插页或包装标签,其具有在其上面的关于使用引物和探针检测样品中的靶核酸序列的指导。制品可以额外包括用于实施本文所公开的方法的试剂(例如,缓冲液、聚合酶、辅因子或防止污染的试剂)。这样的试剂可以专用于本文所述的商购可得的仪器之一。

[0082] 将在以下实施例中进一步描述本发明的实施方案,以下实施例不会限制在权利要求中描述的本发明的范围。

实施例

[0083] 提供以下实施例和附图以帮助理解主题,其真实范围阐述在所附权利要求中。应当理解,可以在所述程序中进行修改。

[0084] 实施例I

[0085] 参考图4,存在EGFR外显子20的三个主要突变。在非小细胞肺癌(NSCLC)中,T790M是显性抗性突变,其在使用酪氨酸激酶抑制剂的第一线治疗以后是可检测的。在许多原初

NSCLC患者中发现了S768I和小插入。

[0086] 这3个突变是在EGFR外显子20中的约200-300 bp的区域内。由于全长靶序列的关联或低天然丰度,从来自血浆 (cfDNA) 或来自FFPET的临床样品得到的核酸通常对于扩增和检测而言是挑战性的。为了富集该全长靶标,最初与产生成功结果的500 bp微基因一起使用两个侧接(外部)引物EX20I_F和EX20_R01。但是,由于在该样品类型中的DNA的尺寸分布,该扩增子的大小225bp不存在于无细胞DNA (cfDNA) 样品中。因此,将片段化的DNA的连接(缝合)技术应用于该必须具有的靶标作为概念验证 (proof-of-concept)。

[0087] 将两种180bp微基因pEGFR_S768S和pEGFR_T790T设计成模仿片段化的cfDNA,将两种自互补的内部引物(缝合引物) R11FOR1和R11设计成匹配所述两种微基因中的每一种的共有序列基序。使用凝胶分析,分析使用这些引物的简单PCR。另外,使用TaqMan[®] 探针P5构建qPCR测定,将EX20I_F和EX20_R01用作侧接(外部)引物,该qPCR测定使用灵敏方法通过实时PCR生长曲线分析来在225bp检测期望的全长缝合产物。

[0088] 实施例II

[0089] 参考图5,该表显示了将各种量的模板与各种量的侧接(外部)引物混合。目标是成功的且最佳的与两种中间大扩增子的反应(参见图3)。存在许多尝试和不同的组合,其经测试发现最佳地产生全长产物。

[0090] 检测方法是qPCR TaqMan[®]测定,其递送灵敏的且定量的读出。将1 μL在图5中描述的反应物用作qPCR的输入。

[0091] 在四种测试条件中,仅#6产生好的Ct。它们对于35个循环是17.7,且对于50个循环是10.1。在具有10 μL产物负载的4%琼脂糖凝胶上,可以看到具有在约225bp的正确大小的模糊带,尽管仅仅对于50个循环的反应(数据未显示)。该阳性结果充当下一个实验的基础。

[0092] 实施例III

[0093] 参考图6,该表显示了被设计成滴定宽范围的自互补的内部引物(缝合引物)的实验。

[0094] #1与图5描述的条件#6相同,用作阳性对照。

[0095] #2和#3具有一种缝合引物R11,分别以两种浓度添加。一种低至40nM,且另一种是在100nM的常规浓度。

[0096] #4和#5具有其它缝合引物R11FOR1,分别以两种浓度添加。一种低至40nM,且另一种是在100nM的常规浓度。

[0097] #6至#9具有两种缝合引物,其与侧接引物一起以不同浓度组合添加。在#7中,所有四种引物具有相同的在100nM的常规浓度,而#8和#9具有用于侧接对的更高浓度。

[0098] 不同组合的原因是测试该新方法的边界。连接(缝合)DNA的片段需要在同一个试管中发生三种不同的PCR反应,以便产生最终的全长产物。

[0099] 实施例IV

[0100] 参考图7和下面的表1和表2,使用两种检测方法,qPCR和4%琼脂糖凝胶。在图6中描述的反应的1 μL 1:10稀释物是qPCR的输入物。Ct值显示在下面表1中。

[0101] 表1

[0102]

#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
26.4	21.3	20.4	19.5	20.1	8*	7*	6*	6*

[0103] *归因于早期Ct调用的估计。

[0104] #6至#9清楚地产生了与使用一种缝合引物条件(#2至#5)相比多得多的全长产物。但是qPCR在该情况下不可区分不同大小的产物,而琼脂糖凝胶可以(参见图7和表2)。

[0105] 表2

孔	缝合引物	浓度	凝胶带
3	无		未看到
4	R11	低	弱157bp
5	R11	正常	强157bp
6	R11FOR1	低	弱88bp
7	R11FOR1	正常	强88bp
8	R11+R11FOR1	低	弱225bp
9	R11+R11FOR1	正常	弱+ 225bp
10	R11+R11FOR1	高2:1	中等225bp
11	R11+R11FOR1	高4:1	中等225bp
12			25bp标志物

[0107] 图7显示了包括各种缝合反应的琼脂糖凝胶。将10 μL在图6中描述的反应物+ 10 μL加载染料加载到每个孔中。孔2: 157bp大小阳性对照;孔3-11分别是在图6中描述的反应#1 - #9;孔12是Invitrogen制造的25bp标志物。结果总结在下面:

[0108] 存在缝合反应的清楚地定量和动态方面,如在图7中所示。在反应#1/孔3中,Ct = 26.4,所以显然存在全长产物。但是浓度比反应#2低约32倍(Ct = 21.3),这是为什么未看到该带的原因。

[0109] 反应#2和#3(孔4和5):存在两种浓度的R11的情况下,清楚地看到157bp产物的剂量效应。但是在凝胶上没有看到在225bp的全长产物(Ct=21.3和20.4)。没有产生大量全长225bp产物,推测是由于两种要求的中间大扩增子的浓度是偏离的,并且没有在最佳边界内。

[0110] 反应#4和#5(孔6和7):存在两种浓度的R11FOR1的情况下,清楚地看到88bp产物的剂量效应。但是在所述凝胶上没有看到全长产物(Ct=19.5和20.1)。它可以是与上面相同的原因。

[0111] 反应# 6至#9(孔8-11):在同一个反应中存在两种缝合引物的情况下,清楚地看到225bp的全长产物的剂量效应。对于固定的侧接引物浓度,缝合引物越多,全长产物越多(孔8相对于孔9)。对于固定的缝合引物浓度,较多的侧接引物似乎不会进一步增加全长产物(孔10相对于孔11),从而提示它达到平台。

[0112] 尽管为了清楚和理解的目的已经比较详细地描述了前述发明,但是本领域技术人员通过阅读本发明将清楚,可以在形式和细节上做出各种变化。例如,上述的所有技术和设备可以用在不同的组合中。

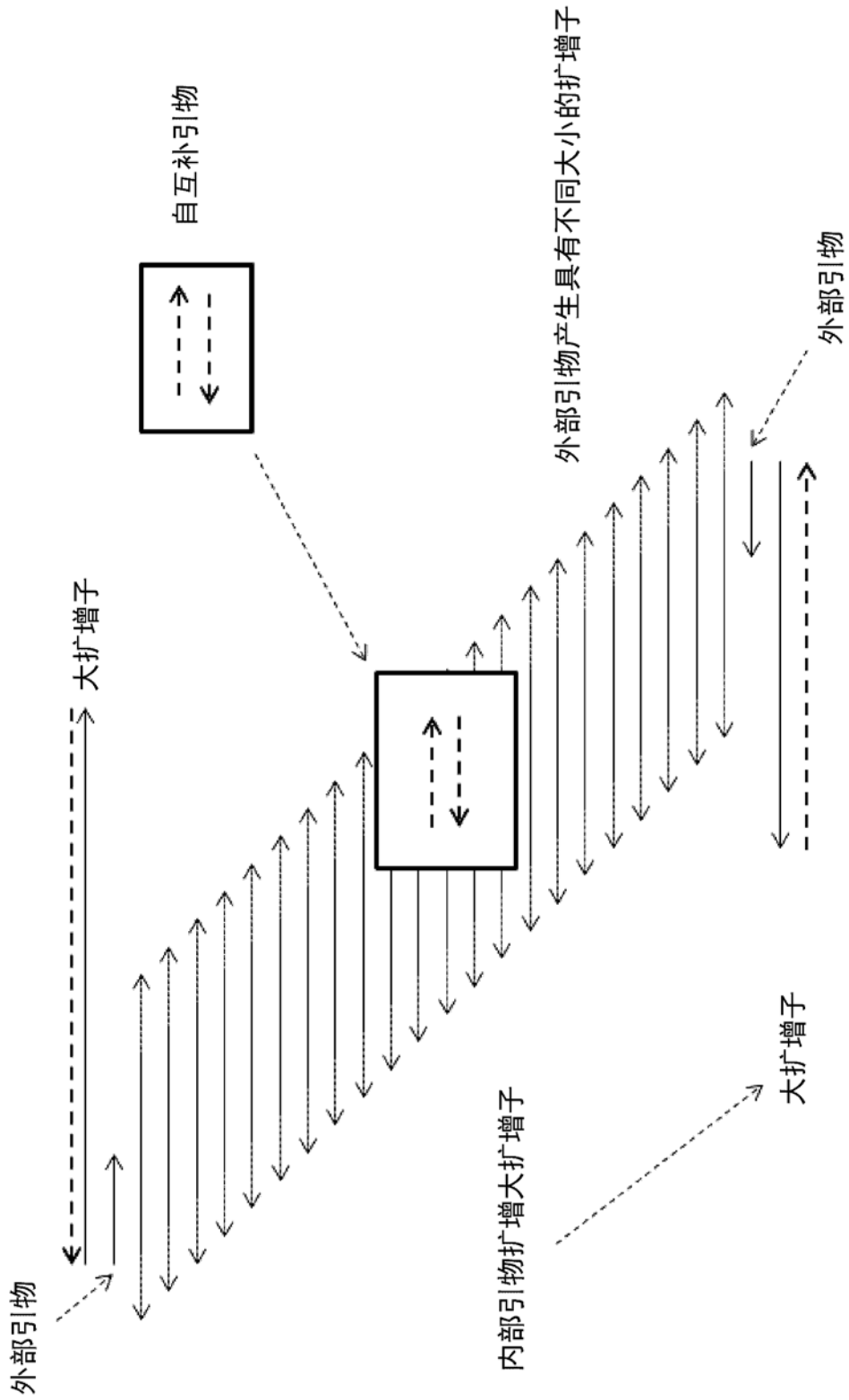


图 1

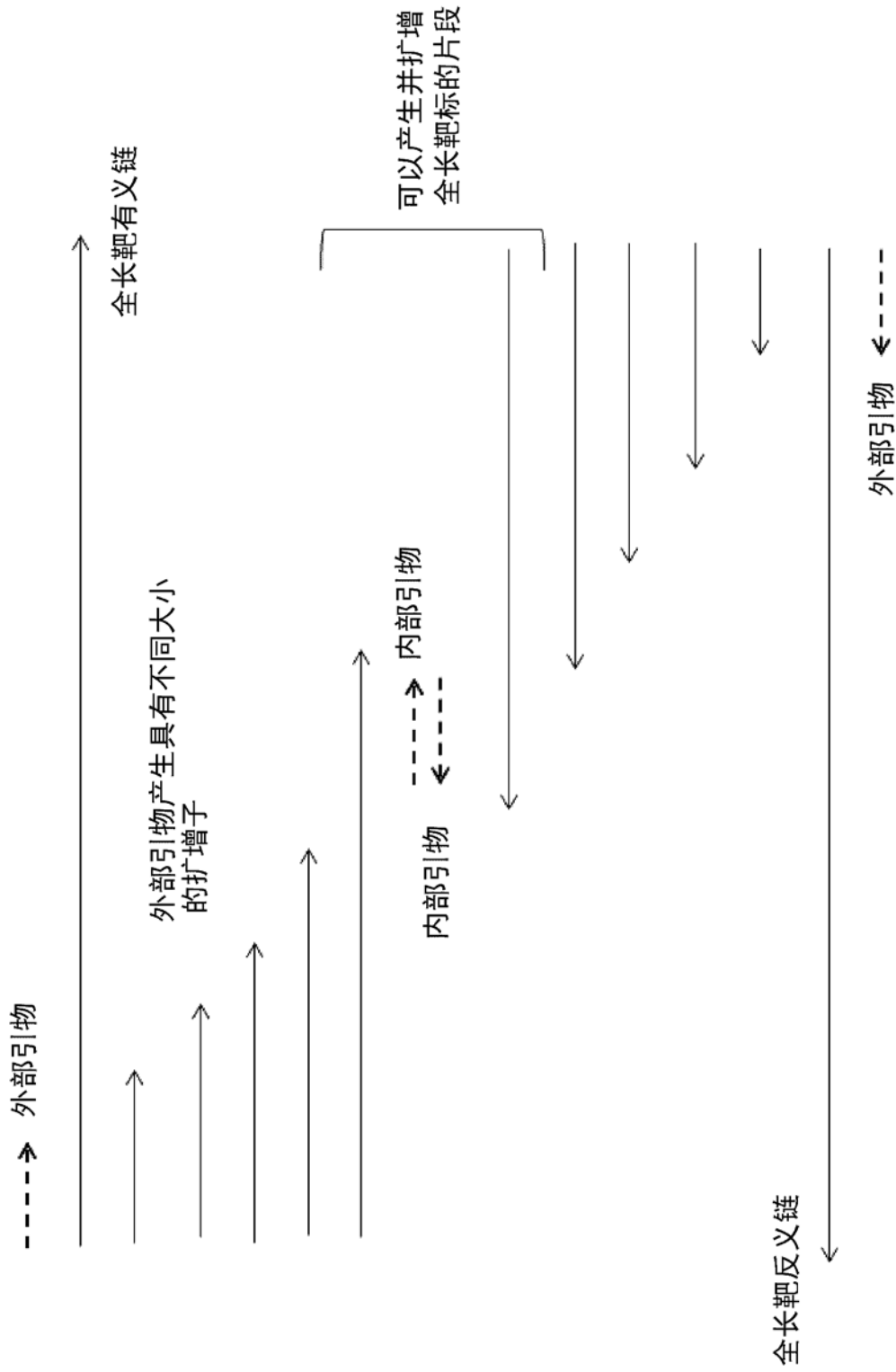


图 2

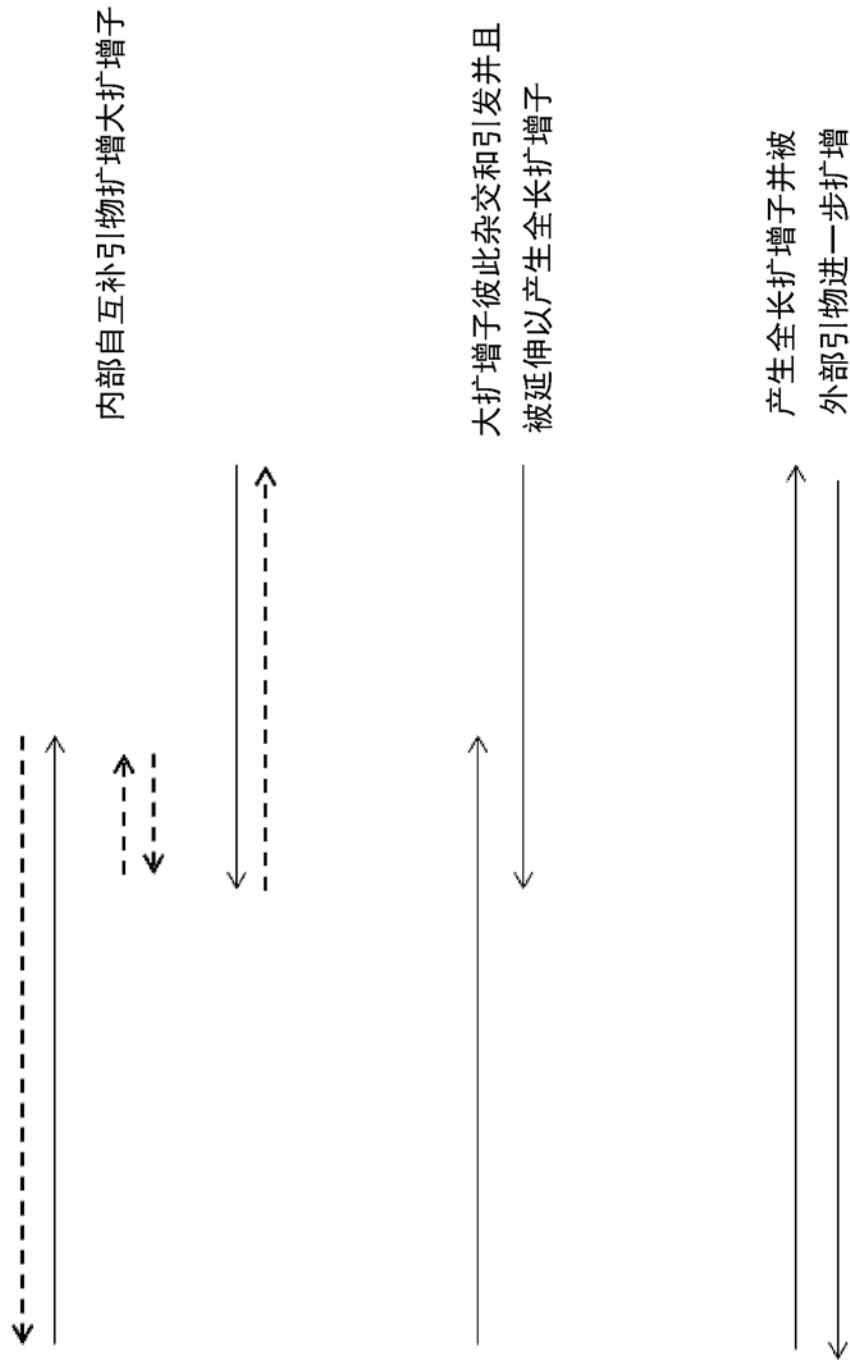


图 3

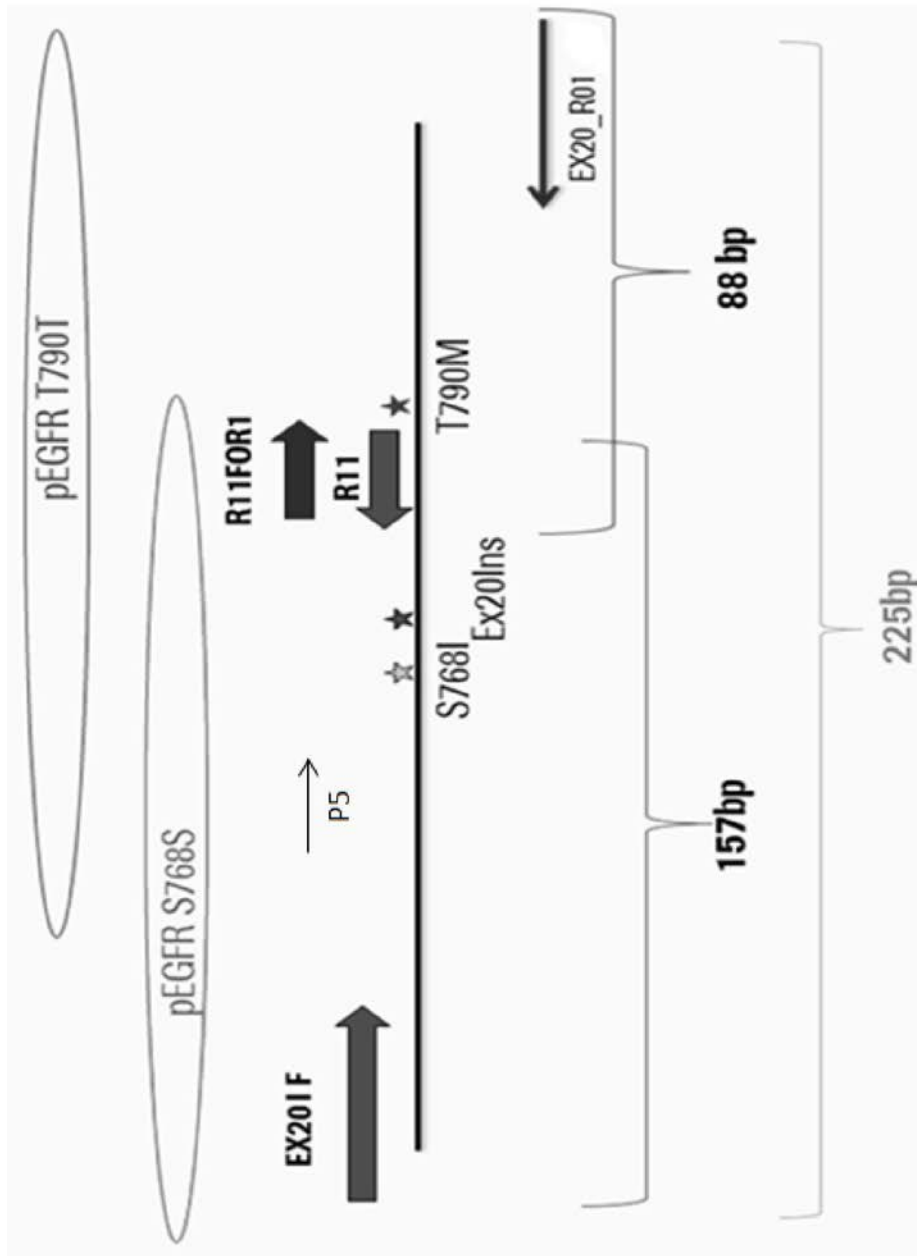


图 4

	缝合PCR方案	#1	#2		#5	#6	最终
MMix	5X V11 MMix	10	10	1x	10	10	1x
Mg	MgOAc 25mM	6	6	3mM	6	6	3mM
引物	EX201F (1uM)		5	100nM		5	100nM
引物	EX20_R01 (1uM)		5	100nM		5	100nM
模板	pEGFR S768S (e4 c/ul each)	1	1	e4c	1	1	e5c
模板	pEGFR T790T (e4c/ul each)	1	1	e4c	1	1	e5c
	无						
S0	样品稀释	32	22		32	22	
	总计	50	50		50	50	
注		仅模板	模板+ 侧接引物		多10倍的 模板	10倍模板+ 侧接引物	

图 5

缝合PCR方案		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	最终
MMx		10	10	10	10	10	10	10	10	10	1x
Mg		6	6	6	6	6	6	6	6	6	3mM
侧接引物		5	5	5	5	5	5	5	10	2	100/200/400mM
		5	5	5	5	5	5	5	10	2	100/200/400mM
缝合引物			2	5			2	5	5	5	40/100mM
					2	5	2	5	5	5	
模板		1	1	1	1	1	1	1	1	1	e5拷贝
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	e5拷贝
	无										
SD	样品稀释	22	20	17	20	17	18	12	2	18	
	总计*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
注		PC	1缝合引物	1缝合引物	1缝合引物	1缝合引物	2缝合引物	2缝合引物	2缝合引物	2缝合引物	2缝合引物
			低浓度	常规浓度	低浓度	常规浓度	低浓度	常规浓度	高浓度	高浓度	4:1比率

图 6

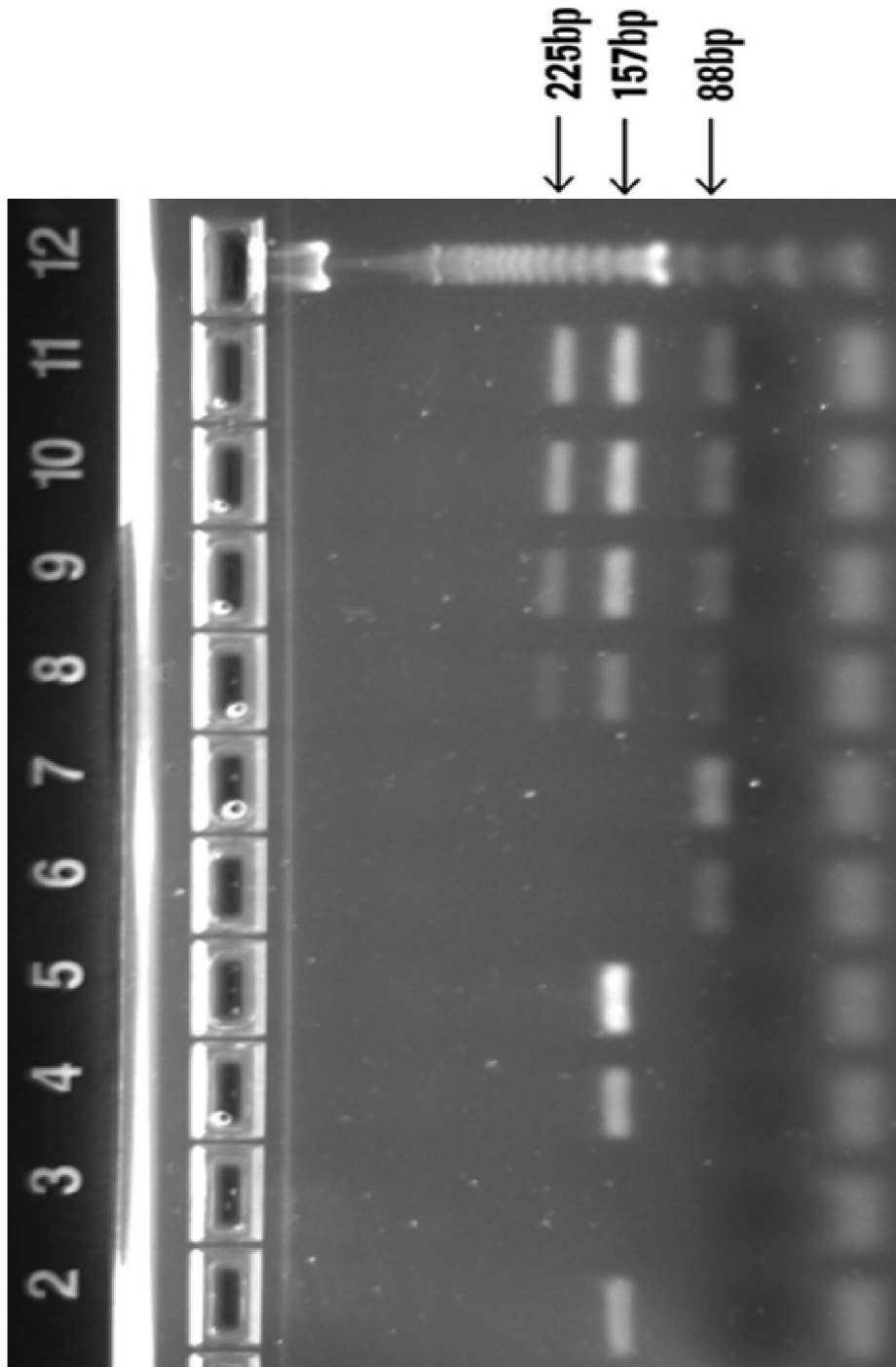


图 7