



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103270174 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201180059463.X

(22)申请日 2011.10.28

(30)优先权数据

61/407,899 2010.10.28 US

61/408,553 2010.10.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.06.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/058474 2011.10.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/058647 EN 2012.05.03

(73)专利权人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 L·李 S·L·吴 P·马

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009/100080 A1,2009.08.13,

WO 2009/100080 A1,2009.08.13,

CN 101443458 A,2009.05.27,

RICHARDSON PL ET AL.Tethered

oligonucleotide probes. A strategy for the recognition of structured RNA.

《JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY》.1991,第113卷(第13期),5109-5111.

BANNWARTH W ET AL.Short Optimally Capped Duplex DNA as Conformationally Restricted Analogue of B-DNA.《HELVETICA CHIMICA ACTA, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA》.1994,第77卷(第1期),182-193.

审查员 朱宁

权利要求书3页 说明书19页

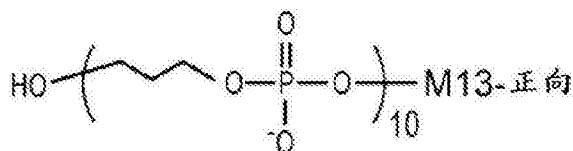
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

化学增强型引物组合物、方法和试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种组合物,其包含带负电荷基团、寡核苷酸序列和至少无或一个耐核酸酶键基团以形成化学增强型引物。所述化学增强型引物可用于测序和片段分析。也提供了用于合成所述引物的方法、以及制备测序用DNA的方法和对DNA测序的方法以及含有所述化学增强型引物的试剂盒。对DNA测序的方法可包括在过量扩增引物被所述核酸酶降解而所述化学增强型引物基本上不被降解的条件下,使扩增反应产物与所述组合物接触。



(C3)<sub>10</sub> M13-正向

1. 一种引物,其包含:具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自(Cn)间隔区或分支(Cn)间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含(C3)<sub>x</sub>间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的[(C3)<sub>x</sub>]<sub>z</sub>,其中z等于2或3,其中所述分支(C3)<sub>x</sub>为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列。

2. 根据权利要求1所述的引物,其中所述通用引物序列选自M13、US1、T7、SP6和T3。

3. 根据权利要求1所述的引物,其中所述引物耐核酸酶消化。

4. 根据权利要求1所述的引物,其中所述NCM为[C3]和[C6]间隔区的组合。

5. 根据权利要求1所述的引物,其还包含染料-标记。

6. 根据权利要求5所述的引物,其中将所述染料-标记连接到所述NCM或所述寡核苷酸序列。

7. 根据权利要求6所述的引物,其中所述染料-标记是荧光染料-标记。

8. 根据权利要求3所述的引物,其中所述核酸酶选自核酸外切酶I、外切酶III、Pfu和DNA聚合酶I。

9. 一种用于对核酸测序的组合物,其包含:含有具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列的引物,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自(Cn)间隔区或分支(Cn)间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含(C3)<sub>x</sub>间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的[(C3)<sub>x</sub>]<sub>z</sub>,其中z等于2或3,其中所述分支(C3)<sub>x</sub>为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述通用引物选自M13、US1、T7、SP6和T3。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述引物包含一个耐核酸酶键。

12. 根据权利要求9所述的组合物,其还包含聚合酶、核酸酶、脱氧三磷酸核苷、双脱氧三磷酸核苷和染料-标记。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述双脱氧三磷酸核苷包括染料-标记的双脱氧三磷酸核苷。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述染料-标记连接到所述NCM或所述寡核苷酸序列。

15. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述核酸酶选自核酸外切酶I、外切酶III、Pfu和DNA聚合酶I。

16. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述染料-标记的双脱氧三磷酸核苷包括荧光染料-标记的双脱氧三磷酸核苷。

17. 根据权利要求9所述的组合物,其还包含含有非耐核酸酶的扩增引物的PCR扩增反应产物。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述PCR扩增反应产物还包含扩增的DNA靶序列。

19. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述聚合酶是Taq聚合酶。

20. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述通用引物是M13。

21. 一种制备测序用DNA的方法,包括以下步骤:在一定条件下,使所述DNA扩增以产生扩增反应产物,所述扩增反应产物包含过量扩增引物;以及在使所述过量扩增引物被核酸酶降解而使测序引物不被降解的条件下,使所述扩增反应产物与包含核酸酶和测序引物的反应混合物接触,其中所述测序引物包含具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自(Cn)间隔区或分支(Cn)间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含(C3)x间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的[(C3)x]z,其中z等于2或3,其中所述分支(C3)x为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述扩增反应产物还包含靶扩增子。

23. 一种用于对DNA测序的方法,其包括以下步骤:

a. 使包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的DNA扩增以形成扩增DNA;

b. 在所述核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增步骤中的所述的第一反应混合物与包含核酸酶和测序引物的第二反应混合物接触,其中所述测序引物包含具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自(Cn)间隔区或分支(Cn)间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含(C3)x间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的[(C3)x]z,其中z等于2或3,其中所述分支(C3)x为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列;

c. 使所述核酸酶失活,并在所述测序引物引发所述测序反应的条件下,使所述扩增DNA在测序反应中反应。

24. 根据权利要求23所述的方法,其还包括:

d. 基于所述测序反应获得测序结果;以及

e. 基于所述结果确定所述扩增DNA的核苷酸碱基序列。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中扩增DNA包括聚合酶链式反应扩增。

26. 根据权利要求23所述的方法,其中所述核酸酶选自核酸外切酶I、外切酶III、Pfu和DNA聚合酶I。

27. 根据权利要求23所述的方法,其中所述测序反应包括循环测序。

28. 根据权利要求23所述的方法,其中所述第二反应混合物还包含聚合酶、脱氧三磷酸核苷、双脱氧三磷酸核苷和染料-标记。

29. 一种用于解决测序不明确的方法,包括以下步骤:

a. 使包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中怀疑包含不明确性的DNA扩增以形成扩增DNA;

b. 在所述核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增步骤中的所述第一反应混合物与包含核酸酶和测序引物的第二反应混合物接触,其中所述测序引物包含具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自(Cn)间隔区或分支(Cn)间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含(C3)x间

隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的 $[(C3)_x]_z$ ,其中z等于2或3,其中所述分支 $(C3)_x$ 为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列;以及

c.使所述核酸酶失活,并在所述测序引物引发所述测序反应的条件,使所述扩增DNA在测序反应中反应。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述DNA是HLA基因、HLA等位基因、致癌基因或包含多态性的序列。

31.一种用于对DNA测序的系统,其包括:

a.使包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的DNA扩增以形成扩增DNA;

b.在所述核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增步骤中的所述第一反应混合物与包含核酸酶和测序引物的第二反应混合物接触,其中所述测序引物包含具有至少一个耐核酸酶键和多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自 $(Cn)$ 间隔区或分支 $(Cn)$ 间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含 $(C3)_x$ 间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的 $[(C3)_x]_z$ ,其中z等于2或3,其中所述分支 $(C3)_x$ 为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列;

c.使所述核酸酶失活,并在所述测序引物引发所述测序反应的条件,使所述扩增DNA在测序反应中反应;

d.通过测序反应产物的流动性依赖性分离来识别所述扩增DNA的核苷酸碱基序列。

32.根据权利要求31所述的系统,其中所述流动性依赖性分离选自通过电荷分离和通过尺寸分离。

33.根据权利要求31所述的系统,其中通过尺寸和电荷分离选自凝胶电泳和毛细管电泳。

34.根据权利要求31所述的系统,其中通过尺寸分离选自液体梯度和变性梯度。

35.一种试剂盒,其包含:引物,所述引物包含具有至少一个耐核酸酶键和一个或多个带负电荷部分(NCM)的寡核苷酸序列,其中所述NCM连接至末端5'端,并且所述NCM选自 $(Cn)$ 间隔区或分支 $(Cn)$ 间隔区,其中n为1至9的任意整数,其中所述至少一个耐核酸酶键位于所述寡核苷酸序列的末端3'端,其中当n等于3时,NCM包含 $(C3)_x$ 间隔区,其中x等于至少5个线性排列的C3间隔区或分支排列的 $[(C3)_x]_z$ ,其中z等于2或3,其中所述分支 $(C3)_x$ 为二倍体或三倍体,并且其中所述寡核苷酸序列包括通用引物序列或基因特异性引物序列。

36.根据权利要求35所述的试剂盒,其还包含使用说明书、核酸酶、用于测序反应或片段分析反应的足量酶、利于测序反应或片段分析反应的缓冲液、在测序反应或片段分析反应期间用于链延伸的dNTP、修饰dNTP、dNTP类似物和7-脱氮-dGTP、ddNTP、染料-标记、用于制备电泳用的测序物质或片段分析物质的上样溶液、作为模板对照的基因组DNA、确保物质在分离介质中按预期迁移的分子量标准和指导使用者并限制使用错误的协议手册中的至少一种。

## 化学增强型引物组合物、方法和试剂盒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e)要求2010年10月28日提交的美国专利申请号61/407,899和2010年10月29日提交的专利申请号61/408,553的优先权权益,上述专利申请以引用的方式并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明教义涉及化学修饰的寡核苷酸序列引物组合物和用于对DNA测序和片段分析的方法。本教义也涉及用于核酸(例如cDNA和DNA)的制备、片段分析和测序的组合物。

[0005] 背景

[0006] 标准聚合酶链式反应(PCR)/测序流程一般包括需添加试剂的五个步骤:初始PCR步骤、PCR清除步骤、测序步骤、测序清除步骤和电泳。PCR步骤涉及使用扩增引物和热稳定性DNA聚合酶扩增模板多核苷酸。PCR清除步骤常通过添加核酸外切酶I和碱性磷酸酶,然后孵育,随后热失活以使酶失活来进行。图1A中示出了标准PCR/测序流程。

[0007] 典型PCR反应使用过量扩增引物,一些引物在PCR反应完成后仍未并入。这就需要先移除过量引物,然后进行测序反应,因为过量扩增引物将干扰随后的测序反应。PCR反应另外含有可干扰随后测序反应的过量dNTP。降解PCR混合物中存在的单链DNA的核酸外切酶I的水解性使扩增产物(扩增子)更有效地用于随后的测序应用。碱性磷酸酶的酶活性使PCR反应后所留下的游离dNTP脱磷酸。适当的孵育期后,使核酸外切酶I和碱性磷酸酶热失活,然后添加测序引物、dNTP和染料-标记的ddNTP;否则这些酶将降解这些试剂和测序反应产物。

[0008] 没有足量核酸外切酶I的处理来移除过量PCR扩增引物,可产生异常的序列梯。过量dNTP可产生微弱的测序信号和/或短序列读数。需要由测序引物获得一个碱基的高质量序列结果通常也是困难的。从扩增到有效测序的过度得到了高质量5'序列分辨率并提前清除了未并入的dNTP和扩增引物以获得清晰的测序结果。

[0009] 不牺牲使用POP7<sup>TM</sup>聚合物的电泳过程中的通量停留时间(throughput residence time),难以分辨测序引物附近的核酸序列。调整流动体系的类型,例如,使用POP6<sup>TM</sup>聚合物基质,调整变性条件和温度可改善分辨率,但常以增加电泳时间为代价,因为POP6聚合物需要更长的电泳时间。移除未并入的反应物的困难以及进行尺寸依赖性流动性分离(size-dependent mobility separation)时的长停留时间导致核酸测序的无效。存在对用于PCR/测序和PCR/片段分析流程以及PCR扩增后序列分辨率的改善方法的需求。

### 发明概要

[0010] 根据多个实施方案,本发明教义提供了一种化学增强型引物的组合物。根据多个实施方案,所述引物可包含带负电荷部分、寡核苷酸序列和耐核酸酶键。在多个实施方案中,所述引物可用于片段分析、对核酸测序和改善分辨率、通过使用POP-7<sup>TM</sup>聚合物在毛细管电泳仪器(例如,由Applied Biosystems(Foster City,CA)制造的那些仪器)上进行的测序流程的PCR。

[0011] 根据多个实施方案,本发明教义提供了一种用于对核酸测序的组合物。根据多个实施方案,所述组合物可包括一种组合物,其包含含有寡核苷酸序列、带负电荷部分(NCM)和至少一个耐核酸酶键的化学增强型引物。在多个实施方案中,组合物可另外包含聚合酶、核酸酶、脱氧三磷酸核苷(dNTP)和双脱氧三磷酸核苷(ddNTP)以及至少一种染料-标记。在本方法的多个实施方案中,可一步式将组合物直接加入PCR反应产物中,而无需先首先从PCR反应产物中移除过量PCR扩增引物。

[0012] 根据多个实施方案,本发明教义涉及制备用于测序的DNA的方法,对DNA测序的方法,以及用于对DNA测序的组合物。本发明教义提供了一种PCR/测序(包括循环测序)的方法,该方法与传统方法相比,可以更快且更简易,并且需要更少的步骤。本发明教义的方法利用化学增强型引物结合核酸酶,可降低序列噪声并移除非所需的序列引发(sequence priming)。本发明教义另外提供了一种所述方法可使用的用于DNA测序的组合物。

[0013] 根据多个实施方案,本发明教义公开了一种制备用于测序的DNA的方法。在一些实施方案中,该DNA制备方法可免去常规PCR/循环测序中使用的至少一个试剂添加步骤,因此减少了处理步骤的数量。

[0014] 根据多个实施方案,提供了一种制备用于测序的DNA的方法,其可包括在一定条件下扩增DNA以产生扩增反应产物,所述扩增反应产物包含过量扩增引物,及在使过量扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增反应产物与包含核酸酶和化学增强型测序引物的反应混合物接触。根据多个实施方案,在此类条件下,化学增强型引物基本上不降解。在一些实施方案中,过量扩增引物可包含易发生核酸酶裂解的核苷酸间磷酸二酯键。在一些实施方案中,化学增强型引物可包含至少一个核苷酸间耐核酸酶键,包括但不限于至少一个不易发生核酸酶裂解的硫代磷酸酯键。

[0015] 本发明教义还提供了一种对DNA测序的方法,其通过比常规方法更简易的流程产生整齐、清晰和精确的测序数据,并需要较少时间。根据多个实施方案,提供了DNA测序方法,其可包括将测序反应混合物直接加入完全PCR扩增反应中,而不用首先进行单独的清除步骤;也就是说,不用通过加入核酸酶来首先移除过量的PCR扩增引物和完成核酸酶失活步骤,然后再添加测序引物和试剂。

[0016] 根据多个实施方案,提供了一种对DNA测序的方法,其可包括扩增包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的DNA以形成扩增DNA,在使核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使第一反应混合物与包含核酸酶和化学增强型引物的第二反应混合物接触,使核酸酶失活,以及在化学增强型引物引发测序反应的条件下,使扩增DNA作为测序反应中的模板。

[0017] 本发明教义还提供了一种对DNA测序的系统,其可包括扩增包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的DNA以形成扩增DNA,在使核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增步骤中的所述第一反应混合物与包含核酸酶和化学增强型引物的第二反应混合物接触;使核酸酶失活,以及在化学增强型引物引发所述测序反应的条件下,使扩增DNA在测序反应中反应;以及通过测序反应产物的流动性依赖性分离(mobility-dependent separation)来识别扩增DNA的核苷酸碱基序列。

[0018] 本发明教义还提供了一种试剂盒。在多个实施方案中,所述试剂盒包含化学增强型引物,其含有带负电荷基团、寡核苷酸序列和耐核酸酶部分。在其他实施方案中,试剂盒

可含有使用说明书、核酸酶、用于测序或片段分析的足量酶、利于测序或片段分析的缓冲液、在测序或片段分析期间用于链延伸的dNTP、修饰dNTP、dNTP类似物和7-脱氮-dGTP、ddNTP、染料-标记、用于制备电泳用的测序或片段分析物质的上样溶液、作为模板对照的基因组DNA、确保物质在分离介质中按预期迁移的分子量标准和指导使用者并限制使用错误的协议手册中的至少一种。

[0019] 在本文引用多个专利、专利申请和其它出版物,其全部以引用的方式全文并入本文。此外,以下标准参考文献以引用的方式并入本文:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2007年10月版; Sambrook, Russell, 和 Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001。在本发明书与任何通过引用并入的文献冲突时,以本发明书为准,应了解,是否存在冲突或不一致的决定在发明者判断范围内并可在任何时候确定。

[0020] 本发明教义的其他特征和优点将通过以下说明变得明显,并且部分可通过所述说明显而易见,或可通过实施本发明教义来了解。应了解,以上概述和以下详细说明仅是示例性和解释性的,并旨在在不限制本发明教义的情况下提供本发明教义的进一步解释。

[0021] 附图简述

[0022] 并入并构成本说明书的一部分的附图例证了所公开的实施方案,并且与说明书一起来用于解释并阐述所公开实施方案的原理。具体如下:

[0023] 图1是标准PCR/循环测序流程的图示;其中图1A中采用5个步骤,图1B中采用4个步骤,其是公开的改良流程。

[0024] 图2示出根据多个实施方案,末端3'端具有耐核酸酶键的耐核酸外切酶I的寡核苷酸。

[0025] 图3A示出由(C3)<sub>10</sub>-M13\*(正向)组成的化学增强型引物。

[0026] 图3B示出由(C3)<sub>8</sub>-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0027] 图3C示出由(C3)<sub>9</sub>-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0028] 图3D示出由(C3)<sub>5</sub>-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0029] 图3E示出由(C3)<sub>6</sub>-三倍体(treble)-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0030] 图3F示出由(C3)<sub>3</sub>-长三倍体-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0031] 图3G示出由(C<sub>3</sub>)<sub>8</sub>-三倍体-M13(正向)组成的化学增强型引物。

[0032] 图3H示出由(C3)<sub>15</sub>-M13\*(正向)组成的化学增强型引物,\*表示硫代磷酸酯键。

[0033] 图3I示出由(C3)<sub>15</sub>-M13\*(正向)组成的化学增强型引物,\*表示硫代磷酸酯键。

[0034] 图3J示出由(C3)<sub>15</sub>-M13\*(正向)组成的化学增强型引物,\*表示硫代磷酸酯键。

[0035] 图4A-4B示出分别由(C3)<sub>15</sub>-基因特异性引物寡核苷酸序列\*(正向)或通用引物寡核苷酸序列\*(正向)组成的化学增强型引物,表示硫代磷酸酯键。

[0036] 图4C示出由(C3)<sub>15</sub>-寡核苷酸序列(正向)组成的化学增强型引物。

## 具体实施方式

[0037] 为便于理解本发明教义,提供以下定义。应理解,一般而言,不另外定义的术语被赋予其普通含义或本领域普遍认可的含意。

[0038] 如文中所用,术语“PCR/循环测序”指通过PCR扩增DNA,然后多次重复(循环)测序反应来确定DNA的核苷酸序列的方法。此循环类似于PCR,因为测序反应可在42°C-55°C下进行,在95°C下终止,并再在42°C-55°C下开始,并使用热稳定性DNA聚合酶。

[0039] 如文中所用,术语“硫代磷酸酯键”指在糖磷酸骨架的磷酸酯键中含有替代非桥接氧原子的硫原子的核苷酸间键。术语硫代磷酸酯键指硫代磷酸酯核苷酸内键和二硫代磷酸酯核苷酸间键。“末端3'端的硫代磷酸酯键”指3'末端的硫代磷酸酯键,也就是说,糖磷酸骨架的最后一个磷酸酯键位于3'末端。图2中示出了末端3'端的硫代磷酸酯键。

[0040] 如文中所用,术语“磷酸二酯键”指键-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>,其可用于连接核苷酸单体。文中预期的磷酸二酯键是天然DNA中所见的键。

[0041] 如文中所用,术语“耐核酸酶键”指寡核苷酸序列,例如引物,其耐核酸酶在3'至5'方向上的消化。硫代磷酸酯和硼磷酸酯键是耐核酸酶键的两个实例。这些实例不应被解释为仅限于这些实例。

[0042] 如文中所用,术语“引物”指寡核苷酸,长度通常为约10至100个核苷酸,能够通过模板杂交而选择性地结合到特定靶核酸或“模板”。引物可提供与模板互补的多核苷酸的经模板指导的合成的起始点,所述经模板指导的合成可在适当酶、辅因子、底物(例如核苷酸和寡核苷酸)等存在下进行。

[0043] 如文中所用,术语“化学增强型引物”指可在引物的末端5'端或引物内具有带负电荷部分的引物。引物也可包括在糖磷酸骨架的3'末端最后一个磷酸酯键的耐核酸酶键。

[0044] 如文中所用,术语“测序引物”指用于起始对核酸进行的测序反应的寡核苷酸引物。术语“测序引物”指正向测序引物和反向测序引物。

[0045] 如文中所用,术语“延伸引物”指一种这样的寡核苷酸,其能够与邻近靶序列的核酸区域退火,并在本领域熟知的适宜条件下,通过使用靶序列作为核苷酸延伸的互补模板来作为延长寡核苷酸的起始引物。通常,测序反应采用至少一种延伸引物或一对延伸引物。一对可包括“上游”或“正向”引物和“下游”或“反向”引物,其界定待测序的核酸靶序列的区域。

[0046] 如文中所用,术语“扩增引物”指一种这样的寡核苷酸,其能够与邻近靶序列的RNA或DNA区域退火,并在本领域熟知的适宜条件下,作为核酸合成的起始引物。通常,PCR反应采用一对扩增引物,其包括“上游”或“正向”引物和“下游”或“反向”引物,其界定待扩增的RNA或DNA的区域。

[0047] 如文中所用,术语“加尾引物”或“加尾扩增引物”指一种这样的引物,在其3'端包括能够与邻近靶序列的RNA或DNA区域退火并在本领域熟知的适宜条件下,作为DNA合成的起始引物的序列。该引物在其5'端包括能够与测序引物退火的序列,例如,寡核苷酸序列、通用测序引物、基因特异性引物、引物等。

[0048] 如文中所用,术语“扩增”指一部分核酸藉以复制的过程。除非明确指出,否则“扩增”指单一复制或指算术、对数或指数扩增。

[0049] 如文中所用,术语“靶扩增子”指具有所关注靶序列并因扩增反应(例如,聚合酶链式反应(PCR))产生的扩增产物。

[0050] 如文中所用,术语“延伸(extend)”、“延伸(extension)”和“延伸(extending)”交换使用并且指根据模板靶核酸序列,寡核苷酸长度在3'端藉以增长的过程。除非明确说明,



否则“延伸”指一个靶或多个靶核酸靶序列的单一膨胀(expansion)或指多个平行或多级膨胀。

[0051] 如文中所用,术语“确定核苷酸碱基序列”或术语“确定关于序列的信息”涵盖“序列确定”并且也涵盖其它水平的信息,例如消除序列的一种或多种可能性。应注意,进行多核苷酸的序列确定通常得到关于完全互补(100%互补)的多核苷酸的序列的等效信息,并且因此相当于对完全互补的多核苷酸直接进行的序列确定。

[0052] 如文中所用,术语“核酸序列”可以指核酸物质本身并不限于生化上表征特定核酸(例如,DNA或RNA分子)的序列信息(即,连续在五个碱基字母A、C、G、T或U之间选择字母)。本文所示核酸是以5'→3'方向呈示,除非另外说明。

[0053] 如文中所用,术语“流动性依赖性分离”可以指由于与片段相关的电荷和尺寸而对核酸片段进行的分离。

[0054] 如文中所用,术语“荧光染料”指在确定的激发波长下吸收光能量而在不同波长下发射光能量的部分。优选地,所选用的荧光染料在光谱上可分辨。如文中所用,“光谱上可分辨”意指在操作条件下,染料可根据其光谱特征进行区别,特别是荧光发射波长。例如,一种或多种末端核苷酸的身份可与最大光发射强度的显著波长相关,或可能与在不同波长下的强度比例相关。

[0055] 如文中所用,术语“多核苷酸”、“核酸”、或“寡核苷酸”指通过核苷间键连接的核苷的线性聚合物(包括脱氧核糖核苷、核糖核苷或其类似物)。当多核苷酸(例如寡核苷酸)是由字母序列(例如“ATGCCTG”)表示时,应理解,核苷酸按照从左到右5'→3'的顺序,并且“A”表示脱氧腺苷,“C”表示脱氧胞苷,“G”表示脱氧鸟苷,并且“T”表示脱氧胸苷,除非另外说明。字母A、C、G和T可用于指碱基本身、指核苷、或指包括碱基的核苷酸,如本领域的标准。在天然多核苷酸中,核苷间键通常为磷酸二酯键,并且将亚基称为“核苷酸”。包含其它核苷间键(例如,硫代磷酸酯键)的寡核苷酸引物可用于本发明教义的某些实施方案中。应了解,组成具有非磷酸二酯键的这种寡核苷酸引物的一种或多种亚基可不包含磷酸酯基团。核苷酸的这些类似物被视为属于文中所用术语“核苷酸”范围内,并且包含一个或多个并非磷酸二酯键的核苷间键的核酸仍被称为“多核苷酸”、“寡核苷酸”等。

[0056] 如文中所用,“序列确定”、“确定核苷酸碱基序列”、“测序”以及类似术语包括确定部分以及全部序列信息。也就是说,该术语包括序列比较、指纹识别和关于靶多核苷酸的类似水平的信息、以及在所关注区域内靶多核苷酸的每个核苷的表达识别和定序。在某些实施方案中,“序列确定”包括识别单个核苷酸,而在其它实施方案中,识别一个以上的核苷酸。文中将核苷、核苷酸和/或碱基的识别视为等同的。应注意,对多核苷酸进行序列确定通常得到关于完全互补的多核苷酸序列的等效信息,并且因此相当于对完全互补的多核苷酸直接进行的序列确定。

[0057] 如文中所用,术语“试剂盒”指用于递送物质的任何递送系统。在反应测定的情况中,这种递送系统包括允许从一个位置到另一个位置储存、运输或递送反应试剂(例如,寡核苷酸、酶、引物组等,在适宜容器中)和/或支持材料(例如,缓冲液、进行测定的书面说明书等)的系统。例如,试剂盒可包括一个或多个含有相关反应试剂和/或支持材料的闭合体(enclosure)(例如,盒子)。如文中所用,术语“分段试剂盒(fragmented kit)”指包括两个或多个单独容器的递送系统,每个容器含有全部试剂盒组分中的一小部分。可将容器一起

或分开地递送到预期的接受器。例如,第一容器可含有用于测定的酶,而第二容器含有寡核苷酸。实际上,包括两个或多个单独容器并且每个容器含有全部试剂盒组分中的一小部分的任何递送系统被涵盖在术语“分段试剂盒”。相反,“组合试剂盒”指在单个容器中含有反应测定的所有组分的递送系统(例如,单个盒子容置每种所需组分)。术语“试剂盒”包括分段和组合试剂盒。

[0058] 如本领域普通技术人员所了解,关于模板、寡核苷酸、引物等的引述一般意指在相关区域内基本上相同的核酸分子群或库而非单个分子。例如,“模板”一般意指多个基本上相同的模板分子;“引物”一般意指多个基本上相同的引物分子,等。

[0059] 循环测序涉及将测序引物、脱氧三磷酸核苷(dNTP)、染料-标记的链终止核苷酸(例如,双脱氧三磷酸核苷(ddNTP-染料))和DNA聚合酶加入靶核酸或其扩增产物中,然后进行热循环测序。明确了标准循环测序程序。例如,在美国专利号5,741,676和美国专利号5,756,285中更加详细地描述了循环测序程序,每个专利全文以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,如本领域技术人员已知,“循环测序”包括dNTP、测序引物(标记或未标记)、ddNTP(标记或未标记)和DNA聚合酶。应注意,标记的测序引物可提供片段分析信息和/或确定靶核酸或其扩增产物的序列。

[0060] 根据本发明教义的多个实施方案,提供了一种化学增强型引物,其包含寡核苷酸序列、带负电荷部分(NCM)和至少一个耐核酸酶键。在一些实施方案中,至少一个耐核酸酶键包括但不限于至少一个硫代磷酸酯键(PS)或至少一个硼磷酸酯键。在其它实施方案中,耐核酸酶键不存在于化学增强型引物中。引物可用于在测序反应中引发靶核酸,在文中称为化学增强型测序引物,或用于片段分析,在文中称为化学增强型延伸引物。寡核苷酸序列可为通用引物或基因特异性核苷酸序列。通用引物实例包括但不限于M13(P/N402071和402072,Applied Biosystems)、US1(UNISEQ,PLoS Medicine3(10)e431(2006))、T7(P/N402126,但不含染料,Applied Biosystems)、SP6(P/N402128,但不含染料,Applied Biosystems)和T3(P/N402127,但不含染料,Applied Biosystems)。参见用于引物序列的ABI PRIMS<sup>®</sup> 377DNA序列96-泳道升级版用户手册(ABI PRIMS<sup>®</sup> 377Sequence96-Lane Upgrade User's Manual)。寡核苷酸序列也可含有染料-标记,例如荧光标记。在本发明教义的几个实施方案中,NCM可位于寡核苷酸序列的末端5'端或在寡核苷酸序列内。NCM的实例包括但不限于亚磷酰胺;(C)<sub>n</sub>间隔区,其中n可为1-9(获自Glen Research);氨基酸天冬氨酸和谷氨酸以及核苷酸和核苷酸类似物(dATP、dCTP、dGTP和dTTP)。NCM可仅含有一个带负电荷单体或多个带负电荷部分,例如,至少5、10、12、15、18、20、24或更多个间隔区重复单元,例如,(C<sub>n</sub>)<sub>x</sub>,其中x是介于1与至少11、至少12、至少15、至少18、至少20、至少24或更多个C<sub>n</sub>间隔区之间的任意整数,其中“n”是3或6,例如,按照线性排列或分支排列的C3间隔区,C6间隔区或C3与C6间隔区的组合。单独或组合的C3和C6间隔区也可通过形成二倍体(doubler)或三倍体(例如,(C3)<sub>3</sub>-三倍体-M13或[(C3)<sub>2</sub>-三倍体]-三倍体-M13)而形成分支NCM,其中NCM由(C3)<sub>3</sub>-三倍体或[(C3)<sub>2</sub>-三倍体]-三倍体表示,并且M13表示寡核苷酸序列,如本领域技术人员所已知的。NCM也可含有染料-标记,例如,荧光标记。在多个实施方案中,至少没有、至少一个、至少两个或更多个硫代磷酸酯键可位于寡核苷酸序列的末端3'端。至少一个耐核酸酶键的存在提供对3'-5'核酸酶消化的抗性,例如,核酸外切酶I(P/N M0293S New England Biolabs,Ipswich,MA)、外切酶III(P/N M0206S,New England Biolabs,

Ipswich, MA)、Pfu(Promega, P/N M7741, Madison, WI)和DNA聚合酶I(P/N M0209S, New England Biolabs, Ipswich, MA)。化学增强型引物对核酸酶消化的抗性利于消除PCR-测序方案中的PCR清除步骤。可移除测序反应混合物中PCR步骤后留下来的额外的非耐核酸酶扩增引物。将PCR扩增反应简单暴露于测序反应混合物中的核酸酶使非耐核酸酶的扩增引物降解,然后使核酸酶失活。测序反应仍可使用化学增强型引物,而非耐核酸酶的扩增引物和核酸酶已分别地移除和失活。

[0061] 利用化学增强型测序引物,已发现对于PCR-测序结果流程而言,使用POP7<sup>TM</sup>聚合物,在3130、3730或3500任意毛细管电泳平台(Applied Biosystems, Foster City, CA)上,在大约不到50%的总时间内得到高质量和高准确率核酸序列,并且结果与较缓慢的POP6<sup>TM</sup>聚合物相当。具体地说,由化学增强型测序引物将5'序列分辨率改善到1个碱基。在本发明教义之前,利用BigDye<sup>®</sup> Terminator试剂盒v3.1(Applied Biosystems)和POP-7<sup>TM</sup>聚合物的标准测序引物不能在测序引物后的头20-30个碱基内提供可解释的数据,但利用POP-6<sup>TM</sup>聚合物和BigDye<sup>®</sup> Terminator试剂盒v1.1能够通过毛细管电泳在测序引物的5个碱基内得到可读取的序列,但POP-6聚合物的通量时间(throughput time)更长(数据未显示)。本发明教义提供一种NCM测序引物,其利用POP-7<sup>TM</sup>聚合物,通过毛细管电泳提供测序引物后的高质量碱基,并且分辨率质量通常等于或优于利用POP-6<sup>TM</sup>聚合物的BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1(参见2011年10月28日提交的USSN61/407,899和2011年10月29日提交的USSN61/408,553的图3)。化学增强型测序引物能够利用POP-7聚合物运行,电泳运行时间短达65分钟,从而利用3500基因分析仪(Applied Biosystems)产生从第一个碱基开始的700个高质量碱基。相反,使用POP-6聚合物要花费135分钟,仅得到600个高质量碱基。与使用POP-6聚合物的电泳时间相比,本发明教义的引物连同POP-7聚合物提供52%通量增加。通过去除起始测序反应前单独的PCR清除步骤,通量增加,以及交付时间(hands-on-time)减少。(图1A和图1B)。

[0062] 如图13-16所示(显示于2011年10月28日提交的USSN61/407,899和2011年10月29日提交的USSN61/408,553),将化学增强型测序引物和流程用于研究人白细胞抗原(HLA)的多态性。将HLA用于组织和器官分类以及组织和器官交叉匹配以用于移植匹配和评价排斥。对34个DNA样本使用SeCore<sup>®</sup> HLA-DRB1(Invitrogen, Carlsbad, CA)引物组和组特异性测序引物(GSSP)。使用传统测序引物和使用化学增强型测序引物进行测序反应。在Applied Biosystems 3500x1<sup>TM</sup>基因分析仪上,利用POP7聚合物(Applied Biosystems),使测序反应产物电泳。在两种引物之间进行5'分辨率和碱基读取精确度和质量的比较。平均而言,使用POP7聚合物的传统测序引物得到测序引物后25个碱基的高质量可读碱基,而在许多情况中,化学增强型测序引物得到5个碱基和1个碱基的高质量碱基,并且也使碱基读取精确度增加,并使整个流程时间减少40%。表1提供了使用化学增强型引物得到的改善的测序质量的实例。

[0063] 表1:

[0064]

	样本号	等位基因1DNA	等位基因2DNA	编辑数 BigDye® Direct	编辑数 SeCore
1	D062	DRB1*030101	DRB1*0404	0	0
2	D075	DRB1*030101	DRB1*100101	0	0
3	D111	DRB1*010101	DRB1*080101	0	0
4	D115	DRB1*030101	DRB1*1503	2	0
5	D125	DRB1*010101	DRB1*070101	0	0
6	D140	DRB1*070101	DRB1*1311	0	0
7	D165	DRB1*110101	DRB1*1504	0	2
8	D205	DRB1*010201	DRB1*1202	0	0
9	D218	DRB1*1001	DRB1*1320	1	0
1	D099	DQB1*030101	DQB1*050101	4	8
2	D108	DQB1*050101	DQB1*0202	0	0
3	D113	DQB1*0201	DQB1*050101	2	1
4	D116	DQB1*030301	DQB1*060101	0	0
5	D130	DQB1*030302	DQB1*0502	2	2
6	D130	DQB1*030302	DQB1*0502	0	0
7	D135	DQB1*0202	DQB1*030101	0	0
8	D150	DQB1*050201	DQB1*030201	1	0
9	D154	DQB1*040102	DQB1*060101	0	1
10	D161	DQB1*0201	DQB1*0302	0	0
11	D168	DQB1*030101	DQB1*050101	2	3
12	D181	DQB1*0301	DQB1*0501	2	3
13	F2150	DQB1*040102	DQB1*060101	0	0
14	F2160	DQB1*040102	DQB1*060101-17	0	1
15	F2297	DQB1*020101-04	DQB1*060101	0	2
16	U415	DQB1*0402	DQB1*0601	0	0
17	U415	DQB1*0402	DQB1*0601	1	1
1	D049	DPB1*010101	DPB1*040101	0	0
2	D105	DPB1*110101	DPB1*1701	0	0
3	D149	DPB1*1001	DPB1*200101	0	0
4	D157	DPB1*010101	DPB1*040101	0	0
5	D181	DPB1*040101	DPB1*0601	0	0
6	D164	DPB1*020102	DPB1*0601	0	0
7	D219	DPB1*040101	DPB1*0501	0	0
8	U514	DPB1*0201	DPB1*0401	0	0
			总共编辑	17	24

[0065] 表1中的结果说明了当沿34个不同样本中HLA-DRB1、DQB1和DPB1的外显子2的两个方向测序时，SeCore® HLA序列与化学增强型测序引物之间的相对碱基读取精确度。uTYPE® HLA测序软件(Invitrogen)使正反向轨迹与参照序列和HLA库对齐。通过多少碱基位置需要手动编辑以解决正、反向与参照序列之间的差异来评价碱基读取精确度。化学增强型测序引物通过需要几次手动编辑(17)等于或略好于现有方法，并且与使用传统引物、方法和流程的24次编辑相比，提供简化的流程和较短的电泳时间。化学增强型测序引物也改善了5'流动性，如DPB1中5'C/A和A/G所见，解决了HLA-DQB1中的肩部问题(shoulder problem)，并且降低了HLA-DRB1序列中常见的C核苷酸压缩以基本上改善最初混合的碱基读取(未显示数据)。化学增强型测序引物和改善的流程改善了多态性检测以及使等位基因

特异性测序引物更有效地用于杂合性不明确分离(heterozygous ambiguity resolution),从而导致明显节约获得质量优于现有方法的数据的时间。

[0066] 根据本发明教义的一个实施方案,用于对核酸测序的组合物可包含聚合酶、核酸酶、化学增强型测序引物、dNTP和链终止剂(例如,ddNTP)。在一些实施方案中,聚合酶可包括Taq聚合酶,例如AmpliTaq Gold聚合酶。在一些实施方案中,核酸酶可包括核酸外切酶I。在一些实施方案中,化学增强型测序引物可包含至少一个硫代磷酸酯键。在其它实施方案中,化学增强型测序引物可包含末端3'端硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,ddNTP可包括ddNTP-染料,例如,荧光染料-标记的ddNTP。在一些实施方案中,化学增强型测序引物可包括染料,例如荧光染料-标记的寡核苷酸和/或在NCM化合物中至少一个荧光染料-标记的NCM部分。

[0067] 根据多个实施方案,用于对核酸测序的组合物可包含聚合酶,例如DNA聚合酶,量为约0.01个单位至约20个单位,例如,约0.1个单位至约1.0个单位,或约0.8个单位。组合物可包含量在约10个单位至约20个单位的上限与约0.01个单位至约0.05个单位的下限范围内的聚合酶。根据多个实施方案,组合物可包含核酸酶,例如核酸外切酶I,其量为约1个单位至约40个单位,例如,约2个单位至约15个单位,或约10个单位。组合物可包含量在约10个单位至约40个单位的上限与约1个单位至约2个单位的下限范围内的核酸酶。

[0068] 根据多个实施方案,用于对核酸测序的组合物可包含化学增强型测序引物,其量为约0.1 $\mu$ M至约20 $\mu$ M,例如约1.0 $\mu$ M。组合物可包含量在约10 $\mu$ M至约20 $\mu$ M的上限与约0.05 $\mu$ M至约0.1 $\mu$ M的下限范围内的化学增强型测序引物。根据多个实施方案,组合物可包含dNTP,其量为约20 $\mu$ M至约5000 $\mu$ M,例如,约500 $\mu$ M。组合物可包含量在约2000 $\mu$ M至约5000 $\mu$ M的上限与约20 $\mu$ M至约50 $\mu$ M的下限范围内的dNTP。根据多个实施方案,组合物可包含ddNTP,其量为约0.03 $\mu$ M至约10 $\mu$ M,例如约3 $\mu$ M。组合物可包含量在约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M的上限与约0.01 $\mu$ M至约0.05 $\mu$ M的下限范围内的ddNTP。所有摩尔量是基于最终体积的最终浓度。

[0069] 根据多个实施方案,组合物可包含非耐核酸酶的扩增引物,其量为约0.1 $\mu$ M至约20 $\mu$ M,例如约1.0 $\mu$ M。组合物可包含量在约10 $\mu$ M至约20 $\mu$ M的上限与约0.05 $\mu$ M至约0.1 $\mu$ M的下限范围内的非耐核酸酶的扩增引物。所有摩尔量是基于最终体积的最终浓度。

[0070] 根据多个实施方案,用于对核酸测序的组合物可另外包含PCR扩增产物。在一些实施方案中,PCR扩增产物可包含扩增的DNA靶序列。在一些实施方案中,PCR扩增产物可包含非耐核酸酶的扩增引物。非耐核酸酶的扩增引物可包含,例如,对核酸外切酶降解敏感的磷酸二酯键。在一些实施方案中,PCR扩增产物可包括靶特异性扩增子,其并入能够与通用引物退火的核酸序列。

[0071] 根据本发明教义的一个实施方案,一种制备测序用核酸的方法可包括在一定条件下,使核酸扩增以得到扩增反应产物的步骤。可利用例如,聚合酶链式反应(PCR)扩增核酸。也可利用其它方法扩增核酸,例如,多链置换扩增、解旋酶置换扩增、切口平移、 $\phi$ 29复制酶扩增、滚环扩增和其它等温扩增法。

[0072] 根据多个实施方案,待扩增核酸可包括,例如,RNA、DNA、cDNA、基因组DNA、病毒DNA、质粒DNA、重组DNA、扩增子DNA、合成DNA等。模板分子可获自多种来源中的任何一种。例如,作为模板分子的DNA可从样本中分离出,所述样本可获自或衍生自受试者。词语“样本”可广义使用以表示在其上进行序列确定的任何来源的模板。短语“衍生自”用于表示可对样

本和/或直接从含有核酸的受试者的样本中的核酸进一步加工以获得模板分子。

[0073] 样本来源可为任何病毒、原核、原始细菌或真核物种或合成物种。在某些实施方案中,来源可为人。样本可包括,例如,胚胎培养细胞、组织或器官、骨骼、牙齿、器官、组织、保存的(例如,福尔马林固定石蜡包埋(PFPE)器官或组织、降解、木乃伊化),或组织,包括血液或含有细胞的其它体液,例如精子、活组织检查样本等。可将来自不同样本和/或受试者的核酸的混合物组合。可以多种方式中的任何一种来加工样本。可使用已知方法,从样本中分离、纯化和/或扩增核酸。

[0074] 扩增核酸通常可得到包含过量扩增引物和包含靶核酸的扩增子(也称为扩增产物)的反应产物。根据多个实施方案,制备测序用核酸的方法可包括将过量扩增引物从反应产物中移除。在一些实施方案中,可(例如)通过添加核酸酶并提供对于核酸酶的适当条件以降解扩增引物来移除扩增引物。在一些实施方案中,可通过使扩增反应产物与包含核酸酶的反应混合物接触来移除扩增引物。适用于本发明方法的核酸酶优先降解单链多核苷酸,而非双链多核苷酸,因此破坏了过量的引物,而留下在随后步骤中可用于测序的完整双链扩增子。在多个实施方案中,核酸酶可包括,例如,核酸外切酶I。核酸外切酶I可获自多个供应商,例如获自USB Corp., Cleveland, Ohio。适当反应条件可包括,例如,最佳时间、温度和缓冲液参数以提供核酸酶活性。在一些实施方案中,例如,过量扩增引物可通过将核酸外切酶I加入扩增反应产物中并在约37°C下孵育约10至约30分钟来降解。核酸外切酶I可按照3'→5'方向水解单链DNA。

[0075] 根据用于制备核酸的方法的多个实施方案,反应混合物可另外包含化学增强型测序引物。在过量扩增引物可被核酸酶降解的反应条件下,化学增强型测序引物基本上不被包含核酸酶(例如,核酸外切酶I)的反应混合物降解。所谓“基本上不降解”意指化学增强型测序引物所发生的任何降解不为明显干扰在随后的测序反应或片段分析反应中以产生测序和/或片段分析数据所采用的方法的水平。

[0076] 根据多个实施方案,化学增强型测序引物可包含寡核苷酸序列。在一些实施方案中,化学增强型测序引物可包含一个或多个耐核酸酶的核苷酸间键。例如,核苷酸间键可为硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,化学增强型测序引物可在末端3'端、在末端5'端、和/或在一个或多个内部键点包含耐核酸酶的核苷酸间键。在一些实施方案中,耐核酸酶的核苷酸间键为至少一个硫代磷酸酯键。合成了在末端3'端具有一个或两个硫代磷酸酯键以保护化学增强型测序引物免遭核酸外切酶I消化的化学增强型测序引物。Sp立体异构体可保护引物免遭核酸外切酶I消化但发现Rp立体异构体不能保护免遭核酸外切酶I消化(数据未显示)。

[0077] 在对两个模板#30和#122测序时,评价具有构型(C3)<sub>8</sub>-三倍体-M13(反向)及一个或两个硫代磷酸酯键的化学增强型测序引物的用途。发现在两个模板中,对于具有一个硫代磷酸酯键的引物,第一个碱基(A)被分成两个峰,而对于具有两个硫代磷酸酯键的引物,头两个碱基(A和T)分开,因为立体异构体流动性差异不大。对于具有一个硫代磷酸酯键的引物,存在寡-Sp或寡-Rp。在引物的末端3'端具有两个硫代磷酸酯键的情况下,具有两个硫代磷酸酯键的引物存在四种可能的异构体(寡-Sp-Sp、寡-Rp-Sp、寡-Rp-Rp和寡-Sp-Rp)。发现质粒测序时,Sp和Rp立体异构体引起流动性差异,导致头两个峰分开。

[0078] 在一些实施方案中,化学增强型引物可包括带负电荷基团/化合物/分子(NCM)。例

如, NCM可位于寡核苷酸序列的末端5'端或位于寡核苷酸序列内部。以上公开了NCM的实例(图3A-3J, 4A-4C)。可将NCM连接到用作引物序列的非染料标记的寡核苷酸序列以及用作引物序列的染料标记的寡核苷酸序列。在一些实施方案中, 如本领域技术人员已知的, 可将染料连接到寡核苷酸序列的核苷酸或核苷酸类似物或连接到NCM。

[0079] DNA片段在电场下的运动取决于电荷与质量比。通过添加NCM可使DNA片段运动不同。评价多种连接到测序引物的NCM构型和组成在电场下改变扩增的测序片段移动性的能力。图3A-3J, 4A-4C示出了具有不同NCM的示例性M13寡核苷酸序列引物和基因特异性引物。示出采用示例性NCM+寡核苷酸序列引物结构和多种模板的测序反应的结果的色谱图可在2011年10月28日提交的USSN61/407, 899和2011年10月29日提交的USSN61/408, 553中的图3-12和16中找到。

[0080] 在多个实施方案中, 关于核苷/核苷酸和/或多核苷酸的“类似物”包括具有修饰的核碱基部分、修饰的戊糖部分和/或修饰的磷酸酯部分, 并且在多核苷酸的情况中, 修饰的核苷酸间键的合成类似物, 如其它地方一般描述(例如, Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, (1980); Englisch, *Angew. Chem. Int. ed. Engl.* 30:613-29(1991); Agrawal, *Protocols for Polynucleotides and Analogs*, Humana Press(1994))。一般来说, 修饰的磷酸酯部分包括磷酸酯的类似物, 其中磷原子呈+5氧化态, 并且一个或多个氧原子被非氧部分例如硫取代。示例性磷酸酯类似物包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate、氨基磷酸酯、硼磷酸酯, 包括相关的平衡离子, 例如,  $H^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Na^+$ , 假设存在这些平衡离子。示例性修饰的核碱基部分包括但不限于2, 6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤、假尿苷、C-5-丙炔、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、2-硫代嘧啶和其它类似物。特别优选的核碱基类似物是异-C和异-G核碱基类似物, 获自 Sulfonics, Inc., Alachua, Fla. (例如, Benner, 等, 美国专利号5, 432, 272)。示例性修饰的戊糖部分包括但不限于2'-或3'-修饰, 其中2'-或3'-位置是氢、羟基、烷氧基(例如, 甲氧基、乙氧基、烯丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基和苯氧基)、叠氮基、氨基或烷氨基、氟、氯、溴等。修饰的核苷酸间键包括磷酸酯类似物、具有非手性和不带电荷的亚基间键的类似物(例如, Sterchak, E.P., 等, *Organic Chem.* 52:4202(1987))、和具有非手性亚基间键的不带电荷的吗啉基聚合物(例如, 美国专利号5, 034, 506)。其中常规糖和核苷酸间键已被2-氨基乙基甘氨酸酰胺骨架聚合物替代的一类特别优选的多核苷酸类似物是肽核酸(PNA)(例如, Nielsen等, *Science*, 254:1497-1500(1991); Egholm等, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:1895-1897(1992))。

[0081] 根据多个实施方案, 化学增强型引物可包括通用引物, 其选自US1、M13、T7、SP6、T3或如本领域技术人员已知的其它测序引物。例如, M13通用正向引物、M13通用反向引物等。在其它实施方案中, 化学增强型引物可包含寡核苷酸序列或对待确定核酸序列的靶核酸序列具有特异性的基因特异性寡核苷酸序列。寡核苷酸引物序列可为与用于产生具有扩增核酸靶序列和/或DNA靶序列的PCR扩增产物的扩增引物的序列相同的引物序列。

[0082] 虽然制备测序用的核酸的方法的实施方案可包括使用硫代磷酸化测序引物, 并且本文公开的教义示例了使用在寡核苷酸序列的末端5'端和硫代磷酸酯化末端3'端或附近具有NCM的序列引物, 但可在本发明教义的范围使用其它类型的化学增强型引物。例如, 耐核酸酶测序引物可包含烷基磷酸酯单体,  $RO-P(=O)(-Me)(-OR)$ , 例如dA-Me-亚磷酰胺,

和/或三酯单体,  $RO-P(=O)(-OR')(-OR)$ , 例如dA-Me-亚磷酰胺(获自Glen Research, Sterling, VA), 和/或锁核酸单体(获自Exiqon, Woburn, MA), 和/或硼磷酸酯单体,  $RO-P(-BH_3)(=O)(-OR)$ , 如Shaw, Barbara Ramsey等在“Synthesis of Boron-Containing ADP and GDP Analogues: Nucleoside 5'-(P-Boranodisphosphates)”, *Perspectives in Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry*, 125-130页, (2000)中所述, 等。

[0083] 根据多个实施方案, 扩增反应产物可包括靶扩增子。在一些实施方案中, 靶扩增子可包括扩增引物的PCR扩增的结果。在一些实施方案中, 靶扩增子可包括双链DNA。在一些实施方案中, 靶扩增子可包括单链DNA。

[0084] 根据多个实施方案, 扩增引物可包括加尾引物。加尾引物可用于, 例如, 产生并入能够与通用引物或基因特异性引物退火的核酸序列的靶特异性扩增子。

[0085] 根据多个实施方案, 制备测序用的核酸的方法可包括在过量引物被核酸酶降解后, 使核酸酶失活。在一些实施方案中, 可通过加热使核酸酶失活。例如, 核酸酶可通过加热到约80°C至约90°C的温度持续约15分钟来进行热失活。在多个实施方案中, 核酸酶的失活可在小泡内并在与循环测序步骤中图1B所示的测序反应相同的反应步骤中进行。

[0086] 根据本发明的多个实施方案, 待测序的模板可在单独的水性乳液区室(也称为“反应器”)中通过PCR合成。在一些实施方案中, 每个区室可含有具有附着于其上的适宜的第一扩增引物的微粒支撑体(例如珠)、模板的第一拷贝、第二扩增引物以及PCR反应所需的组分(例如核苷酸、聚合酶、辅因子等)。制备乳液的方法描述在, 例如, 美国专利号6,489,103B1、美国专利号5,830,663和美国专利申请公开号US2004/0253731中。在单独的乳液区室中进行PCR以产生附着于微粒的模板克隆群的方法描述在, 例如, Dressman, D. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 100(15):8817-8822; 2003, 和PCT公开W02005010145中。文中所述的所有专利、申请、出版物和文章的全文以引用的方式并入。

[0087] 根据多个实施方案, 用于对核酸测序的方法可包括使包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的核酸扩增以形成扩增的核酸, 在核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下, 使第一反应混合物与包含核酸酶和化学增强型引物的第二反应混合物接触, 以及使核酸酶失活, 并且在化学增强型引物引发测序反应的条件下, 使扩增的核酸在测序反应中反应。根据多个实施方案, 可根据测序反应得到结果, 并且可根据结果确定扩增的核酸的核苷酸碱基序列。根据多个实施方案, 可通过测序反应产物的流动性依赖性分离确定核苷酸碱基序列。根据多个实施方案, 可通过聚合酶链式反应扩增来进行扩增。

[0088] 根据多个实施方案, 第二反应混合物可另外包含dNTP、ddNTP、染料-标记和热稳定性DNA聚合酶。在一些实施方案中, 每个ddNTP可用不同的荧光染料标记(ddNTP-染料)。例如, ddNTP可包括BigDye ddNTP, 其获自Applied Biosystems, Foster City, California。在一些实施方案中, 化学增强型引物可用荧光染料标记。可将标记连接到化学增强型引物的寡核苷酸序列和/或NCM区域。热稳定性DNA聚合酶可包括, 例如, 本领域技术人员已知的DNA聚合酶。在一些实施方案中, 测序反应可包括热循环测序反应。

[0089] 可将多种核酸聚合酶用于文中所述的方法。例如, 核酸聚合酶可为热稳定性聚合酶或热降解性聚合酶。适宜的热稳定性聚合酶包括但不限于, 分离自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)、极端嗜热菌(*Thermus thermophilus*)、沃斯氏热球菌(*Pyrococcus woesei*)、激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)、海滨嗜热球菌(*Thermococcus litoralis*)和海栖热



袍菌(*Thermotoga maritima*)的聚合酶。适宜的热降解性聚合酶包括但不限于,大肠杆菌DNA聚合酶I、大肠杆菌DNA聚合酶I的克列诺(Klenow)片段、T4DNA聚合酶、T5DNA聚合酶、T7DNA聚合酶等。可用于文中所述方法的其它聚合酶的实例包括T7、T3、SP6RNA聚合酶和AMV、M-MLV和HIV反转录酶。

[0090] 可用于文中所述方法的可商购的聚合酶的非限制实例包括但不限于, **TaqFS®**、**AmpliTaq® CS**(Applied Biosystems)、**AmpliTaq FS**(Applied Biosystems)、**AmpliTaq Gold®**(Applied Biosystems)、**Kentaql**(AB Peptide, St. Louis, Missouri)、**Taqenase**(ScienTech Corp., St. Louis, Missouri)、**ThermoSequenase**(Amersham)、**Bst聚合酶**、**Ventr(exo-)**DNA聚合酶、**Reader™Taq DNA聚合酶**、**VENT™DNA聚合酶**(New England Biolabs)、**DEEPVENT™DNA聚合酶**(New England Biolabs)、**PFUTurbo™DNA聚合酶**(Stratagene)、**Tth DNA聚合酶**、**KlenTaq-1聚合酶**、**SEQUENASE™1.0DNA聚合酶**(Amersham Biosciences)和**SEQUENASE2.0DNA聚合酶**(United States Biochemicals)。

[0091] 根据用于对核酸测序的方法的多个实施方案,核酸酶可包括核酸外切酶I。核酸外切酶I可对热失活敏感,并且通过加热可基本上100%失活,例如,在约80℃下加热约15分钟。可将其它热失活核酸酶用于本发明方法和组合物,包括但不限于外切酶III、Pfu和DNA聚合酶I。

[0092] 根据多个实施方案,化学增强型引物包含至少一个硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,化学增强型引物包含至少一个末端3'端硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,如上所述,化学增强型引物包含NCM和5'具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸序列。

[0093] 可在筛选或非筛选介质上分析测序反应产物。在本发明教义的一些实施方案中,例如,PCR产物可通过电泳分析,例如,毛细管电泳,如H. Wenz等(1998), *GENOME RES.* 8:69-80(同样参见E. Buel等.(1998), *J. FORENSIC SCI.* 43:(1);164-170页)所述,或平板凝胶电泳,如M. Christensen等.(1999), *SCAND. J. CLIN. LAB. INVEST.* 59(3):167-177所述,或变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(参见,例如, J. Sambrook等.(1989), *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 13.45-13.57页)。电泳分离DNA片段主要根据片段尺寸差异。测序反应产物也可通过色谱法进行分析,例如,尺寸排阻色谱(SEC)。同样,片段分析可以如技术人员已知的方式进行。

[0094] 根据多个实施方案,用于对DNA测序的系统可包括使包含核酸酶敏感性扩增引物的第一反应混合物中的DNA扩增以形成扩增DNA;在核酸酶敏感性扩增引物被核酸酶降解的条件下,使扩增步骤中的第一反应混合物与包含核酸酶和化学增强型引物的第二反应混合物接触;使核酸酶失活,并且在化学增强型引物引发测序反应的条件下,使扩增DNA在测序反应中反应;以及通过测序反应产物的流动性依赖性分离来识别扩增DNA的核苷酸碱基序列。在多个实施方案中,用于对DNA测序的系统,流动性依赖性分离选自通过电荷分离和通过尺寸分离,其中通过尺寸和电荷分离选自凝胶电泳和毛细管电泳,并且通过尺寸分离是通过液体梯度和变性梯度介质。

[0095] 本发明教义也涉及利用以上所述的化学增强型引物组合物和方法的试剂盒。在一些实施方案中,基础试剂盒可包括含有一个或多个化学增强型引物的容器。试剂盒也可任

选地包括使用说明书。试剂盒也可包括其它任选的试剂盒组分,例如,一种或多种核酸酶、用于测序或片段分析的足量酶、利于测序反应或片段分析反应的缓冲液、在测序反应或片段分析反应期间用于链延伸的dNTP、修饰dNTP、dNTP类似物和7-脱氮-dGTP、ddNTP、染料-标记、用于制备电泳用的测序或片段分析物质的上样溶液、作为模板对照的基因组DNA、确保物质在分离介质中按预期迁移的分子量标准和指导使用者并限制使用错误的协议手册。试剂盒中多种试剂的量也可因多种因素变化,例如,方法的最佳灵敏性。提供用于手动应用的测试试剂盒或与自动检测器或分析仪一起使用的测试试剂盒在这些教义范围内。

[0096] 以下示出本发明教义的组合和方法的实施例。这些实施例不是本发明的限制,并且本领域普通技术人员将了解反应中所用的组分可用本领域已知的等效试剂容易地替代。

[0097] 以下实施例说明了化学增强型引物提供较高测序反应分辨率的能力,利用POP7聚合物及其变体花费较少时间,化学增强型引物对核酸外切酶I的稳定性,化学增强型引物作为DNA聚合酶底物的并入,核酸外切酶I与测序试剂的兼容性、以及非硫代磷酸酯引物对核酸外切酶I消化的敏感性。实施例另外说明了加尾扩增引物与用于测序的通用硫代磷酸酯引物一起使用。

#### [0098] 实施例1

[0099] C6间隔区+寡核苷酸序列合成,不含硫代磷酸酯基团:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得在5'位置用一个或多个C6间隔区标记的18碱基寡核苷酸。C6间隔区亚磷酰胺获自Chem Genes Corp.(P/N CLP-1120,Wilmington,MA)。从一微摩尔柱用三苯甲基完整制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物(support)裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-8)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化,移除三苯甲基,并通过乙醇沉淀分离出产物。

[0100] C3间隔区+寡核苷酸序列合成,不含硫代磷酸酯基团:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得在5'位置用一个或多个C3间隔区(P/N10-1913-90,Glen Research)标记的18碱基寡核苷酸。从一微摩尔柱用三苯甲基完整制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-8)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化,移除三苯甲基,并通过乙醇沉淀分离出产物。

[0101] 用于用5'磷酸酯标记的寡核苷酸的方案:在5'位置用磷酸酯基团标记的18碱基寡核苷酸。这使用标准亚磷酰胺化学在ABI型号394DNA合成仪上制得。使用获自Glen Research(P/N10-1922-90)的亚磷酰胺产生磷酸酯基团。从一微摩尔柱制得标记18mer,并且在合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,并且溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化。然后通过乙醇沉淀分离出产物。

[0102] 用于用标记有一个或多个C3间隔区的双倍分支(二倍体)连接子标记的寡核苷酸的方案:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得在5'位置用之后为一个或多个C3间隔区的分分支键标记的18碱基寡核苷酸。双(二倍体)分支(P/N10-1920-90)和C3间隔区(P/N10-1913-90)亚磷酰胺获自Glen Research。使用一微摩尔合成柱用三苯甲基完整制得制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300

(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,并且溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化,移除三苯甲基,并通过乙醇沉淀分离出产物。

[0103] 用于用标记有一个或多个C3间隔区的三倍分支(三倍体)连接子标记的寡核苷酸的方案:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得在5'位置用之后为一个或多个C3间隔区的三倍分支键标记的18碱基寡核苷酸。三倍体亚磷酰胺(P/N10-1922-90)和C-3间隔区(P/N10-1913-90)亚磷酰胺获自Glen Research。使用一微摩尔合成柱用三苯甲基完整制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化,移除三苯甲基,并通过乙醇沉淀分离出产物。

[0104] 用于用标记有磷酸酯(总共3个磷酸酯)的三倍分支连接子标记的寡核苷酸的方案:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得磷酸化后在5'位置用三倍分支键标记的18碱基寡核苷酸。三倍分支(P/N10-1922-90)和磷酸化(P/N10-1900-90)亚磷酰胺获自Glen Research。说用一微摩尔合成柱制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化。通过乙醇沉淀分离出产物。

[0105] 用于用标记有磷酸酯(总共9个磷酸酯)的2次产生三倍分支连接子端标记的寡核苷酸的方案:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得磷酸化后在5'位置用2次添加三倍分支键标记的18碱基寡核苷酸。三倍分支(P/N10-1922-90)和磷酸化(P/N10-1900-90)亚磷酰胺获自Glen Research。使用一微摩尔合成柱制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化。通过乙醇沉淀分离出产物。

[0106] 用于用一个或多个含有3'硫代磷酸酯键的C-3间隔区标记的寡核苷酸的方案:使用标准亚磷酰胺化学,在ABI型号394DNA合成仪上制得在5'位置用一个或多个C-3间隔区标记的18碱基寡核苷酸。用硫化试剂(TETD P/N401267(Applied Biosystems,Foster Csty, CA)),使用标准方法制得3'硫代磷酸酯键。C3间隔区亚磷酰胺获自Glen Research(P/N10-1913-90)。从一微摩尔合成柱用三苯甲基完整制得标记18mer。合成完成后,用NH<sub>4</sub>OH从支撑物裂解出寡核苷酸,并使用ABI RP-300(C-18)柱(4.6x220mm),流速为1.5ml/min,并且溶剂梯度为0.1M三乙基醋酸铵-水(pH7.0)和乙腈通过HPLC纯化,移除三苯甲基,并通过乙醇沉淀分离出产物。注意:为合成一个以上的硫代磷酸酯键或将此键放在18-mer寡核苷酸链的任何位置,在这些位置使用硫化试剂氧化。

[0107] 实施例2

[0108] PCR和测序反应:

[0109] 使用具有末端3'硫代磷酸酯(PS)键的化学增强型引物的PCR和测序反应

[0110] PCR扩增

[0111] 在以下10μL溶液中进行PCR反应:为了对扩增子RSA000013703测序,1μL4ng/μL gDNA,M13-标记的引物(每个0.8μM):1.5μLTGTAAAACGACGGCCAGTTTGTGGCTCAGCAACAGGT (SEQ IDNO:1;gn1|探针|1292199b)和CAGGAAACAGCTATGACCCCACTGCTTGCCTTCTTCCTG (SEQ ID NO:2;gn1|探针|1292199c),5μL BigDye Direct PCR Master Mix(P/N4458699,

Applied Biosystems)和2.5 $\mu$ L水。在Veriti™96-孔热循环仪(P/N4375786, Applied Biosystems)上进行PCR。采用以下热循环条件:95 $^{\circ}$ C下10分钟,然后使以下循环35次:96 $^{\circ}$ C下3秒,62 $^{\circ}$ C下15秒,以及68 $^{\circ}$ C下30秒,然后72 $^{\circ}$ C下2分钟,保持在4 $^{\circ}$ C下。为证实扩增,在琼脂糖凝胶上对10 $\mu$ L样本进行分析。观察到与预期的626bp扩增子一致的带。

[0112] 以下显示扩增子RSA000013703 SEQ ID NO:3,模板ZC,其中下划线标出PCR正向引物和PCR反向引物(反向互补)的引物结合位点。  
CAGGAAACAGCTATGACCCACTGCTTGCCTTTCTTCCTGTTTAAATCCCCTTCAATGAAGTGTGATTTGAAAT  
 AAATGGCTCATGAGTTAATCACATCTTTATATATCCTAAGATGTATTACAAAGGCTTCCATAACACTTGTCTATAGT  
 AAGCCACTCATTTCTATAATTTTTCTTTCAATAAACTCAATCTTTGTAATACAGAAATTAACCTTCTGGGTTGTTTT  
 TGTTCAAGATCTTCAGTTTGATTTGCCCTTGGTTGATCTGTTTTCCCATCGCTGAACTGGTCCCATAATCACAC  
 ACCTTTGCTTTTCATTTCCACAGATCAAGGAATCAACATTTACCGAAAGCCACCCATCTACAAACAGCATGGTAAAA  
 CCCGCTTTCCTCCGCTAGCTTTTAAATAGCAAAGTCAGCTGAACTTCTCCTTGCTGTCCTCTGAAAGGCTTTTCCT  
 GCTGCTGCTTTTGAGAGTAAAAGTGGGGCATCCAGCATATTATGCCTTTCTGGTCTACTAAGATGTAAATATTGTAA  
 AATTGATTCTCCTGGATGGAGAGACTTAGCTTGATTAGAAAGCTTCTAACCTCTTGCTGAGCCCATCAAACTGGCCG  
TCGTTTTACA。

[0113] 使用具有硫代磷酸酯(PS)键的化学增强型引物的测序流程

[0114] 用BigDye直接循环测序试剂盒(24个反应,P/N4458689, Applied Biosystems)制备的测序反应:将10 $\mu$ L PCR扩增反应物与2 $\mu$ L BigDye® Direct Sequencing Master Mix (P/N4458701, Applied Biosystems)和1 $\mu$ L BigDye Direct M13正向引物(P/N4458692 Applied Biosystems)或BigDye Direct M13反向引物(4458695, Applied Biosystems)混合。BigDye Direct引物具有末端5' NCM和末端3' PS。在37 $^{\circ}$ C下在Verti96-孔热循环仪上使循环测序反应进行15分钟,此时,过量PCR扩增引物被核酸外切酶I(包含在BigDye Direct Sequencing Master Mix中)消化,然后80 $^{\circ}$ C下2分钟,96 $^{\circ}$ C下1分钟,然后使以下循环25次:96 $^{\circ}$ C下10秒,50 $^{\circ}$ C下5秒,以及60 $^{\circ}$ C下1分钟15秒,并保持在4 $^{\circ}$ C下。测序引物含有末端5'带负电荷部分(NCM)和末端3'由星号表示的硫代磷酸酯基团:M13正向引物(1 $\mu$ M)(NCM-TGTAAAACGACGGCCAG\*T)(SEQ ID NO:4)或M13反向引物(1 $\mu$ M)(NCM-CAGGAAACAGCTATGAC\*C)(SEQ ID NO:5)。图3H提供了NCM的结构。图11是具有末端3' PS键的化学增强型引物(图3H)并且ZC作为模板的电泳图(参见2011年10月28日提交的USSN61/407,899和2011年10月29日提交的USSN61/408,553)。ZC的序列显示出引物中1个碱基的高分辨率。

[0115] 实施例3

[0116] 在以下10 $\mu$ L溶液中进行PCR反应:为对扩增子RSA000317141(模板序列01,545bp)测序,1 $\mu$ L 4 ng/ $\mu$ L gDNA, M13-标记的引物(每个0.8 $\mu$ M):1.5 $\mu$ L TGTA AAAACGACGGCCAGTGCTGCCTCTGATGGCGGAC(SEQ ID NO:6,正向,gn1|探针|1204459b)和CAGGAAACAGCTATGACCGCCACTCTGGAGCTGGACA(SEQ ID NO:7,反向,gn1|探针|1204459c),5 $\mu$ L BigDye Direct Sequencing PCR Master Mix(P/N4458699, Applied Biosystems)和2.5 $\mu$ L水。在Veriti™96-孔热循环仪(P/N4375786, Applied Biosystems)上进行PCR,采用以下热循环条件:95 $^{\circ}$ C下10分钟,然后使以下循环35次:96 $^{\circ}$ C下3秒,62 $^{\circ}$ C下15秒,以及68 $^{\circ}$ C下30秒,然后72 $^{\circ}$ C下2分钟,并保持在4 $^{\circ}$ C下。为证实扩增,在琼脂糖凝胶上对10 $\mu$ L样本进行分

析。观察到与预期的545bp扩增子一致的带。

[0117] 以下显示了扩增子RSA000317141SEQ ID NO:8,模板序列01(图3I),其中下划线标出PCR正向引物和PCR反向引物(反向互补)的引物结合位点。  
TGTA AACGACG GCCAGTGCTGCCTCTGATGGCGGACGGGGTGTGGTCTGGACTCGTGGTCAGGGCTGGTCTGT  
 GTGGAATGCTGATCCTTCTCTTCCCAATCTACCTGTGTCAGTCCCTCTTTCTATTTCTCTTCCCTGCAGATG  
 TCAAGCCCTCCAACATCCTAGTCAACTCCCGTGGGGAGATCAAGCTCTGTGACTTTGGGGTCAGCGGGCAGCTCATC  
 GACTCCATGGCCAACCTTCGTGGGCACAAGTCCATCATGTCCGGTATGAACAGAAGTTCCATTGCTTGAGCTTC  
 TTGTACGGTCAGGGAGAGAGCCAGTGGGTGCCTTTCCTGTGGAGCCAGAGTCTTGTGCTGGGTAGGGGACAAGAA  
 GTGAGGGAGGAGGCACAGTGTCTGCCCTGAGGAGATGAAGTTGAATGGGAAGATGGTCTTGGTCTTTCTTAGGCCT  
 TGGAGCATAACTGGGATATTGGGGCCTTGACTCACTGAAAGGACTGTCCAGCTCCAGAGTGTGGCGGTCATAGCTGT  
TTCCTG.

[0118] 使用具有硫代磷酸酯(PS)键的化学增强型引物的测序流程

[0119] 用BigDye直接循环测序试剂盒(24个反应,P/N4458689,Applied Biosystems)制备的测序反应:将10 $\mu$ L PCR扩增反应物与2 $\mu$ L BigDye<sup>®</sup> Direct Sequencing Master Mix (P/N4458701,Applied Biosystems)和1 $\mu$ L BigDye Direct M13正向引物(P/N4458692Applied Biosystems)或BigDye Direct M13反向引物(4458695,Applied Biosystems)混合。BigDye Direct引物具有末端5' NCM和末端3' PS。在37 $^{\circ}$ C下在Verti96-孔热循环仪上使循环测序反应进行15分钟,此时,过量PCR扩增引物被核酸外切酶I(包含在BigDye Direct Sequencing Master Mix中)消化,然后80 $^{\circ}$ C下2分钟,96 $^{\circ}$ C下1分钟,然后使以下循环25次:96 $^{\circ}$ C下10秒,50 $^{\circ}$ C下5秒,以及60 $^{\circ}$ C下1分钟15秒,并保持在4 $^{\circ}$ C下。测序引物含有末端5'带负电荷部分(NCM)和末端3'由星号表示的硫代磷酸酯基团:M13正向引物(1 $\mu$ M)(NCM-TGTA AACGACG GCCAG\*T)(SEQ ID NO:4)或M13反向引物(1 $\mu$ M)(NCM-CAGGAAACAGCTATGAC\*C)(SEQ ID NO:5)。图16(参见2011年10月29日提交的USSN 61/408,553)提供了具有末端3' PS键的化学增强型引物并且RSA000317141作为模板的电泳图(图3J)。RSA000317141的序列显示出引物中1个碱基的高分辨率。

[0120] 实施例4

[0121] 在具有或不具有PS键的PCR和测序反应:标准PCR扩增:在以下10 $\mu$ L溶液中进行PCR反应:例如为对扩增子RSA000317667测序,1 $\mu$ L 10ng/ $\mu$ L gDNA,引物(每个0.8 $\mu$ M):1.5 $\mu$ L TGTA AACGACG GCCAGTGGCTCCTGGCACAAAGCTGG(gn1|探针|1172813b,正向,SEQ ID NO:9)和CAGGAAACAGCTATGACCTGCATCTCATTCTCCAGGCTTC(gn1|探针|1172813c,反向,SEQ ID NO:10),5 $\mu$ L AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix(P/N4318739,Applied Biosystems)、1.6 $\mu$ L 50%甘油和0.9 $\mu$ L水。使用镀金的96-孔 GeneAmp<sup>®</sup> PCR系统9700(P/N4314878,Applied Biosystems)进行PCR。热循环条件:96 $^{\circ}$ C下5分钟,然后使以下循环40次:94 $^{\circ}$ C下30秒,60 $^{\circ}$ C下45秒,以及72 $^{\circ}$ C下45秒,然后72 $^{\circ}$ C下2分钟,并保持在4 $^{\circ}$ C下。在琼脂糖凝胶上对5 $\mu$ L等份样进行分析。观察到与预期的630bp扩增子一致的带。

[0122] PCR清除:使10 $\mu$ L PCR扩增反应物与2 $\mu$ L ExoSAP-IT<sup>®</sup>核酸酶(P/N78250,Affymetrix,Santa Clara,CA)混合,并在镀金96-孔 GeneAmp<sup>®</sup> PCR系统9700(P/

N4314878, Applied Biosystems) 上于 37°C 下孵育 30 分钟, 然后在 80°C 下孵育 15 分钟(使核酸酶失活)。

[0123] 使用不含有硫代磷酸酯键的化学增强型引物的测序流程

[0124] 用 BigDye® Terminator v3.1 循环测序试剂盒(24 个反应, P/N4337454, Applied Biosystems) 制备测序反应: 将 2μL 经 ExoSAP-IT 处理的 PCR 扩增反应物与 4μL BigDye® Terminator v3.1 循环测序试剂盒 Master Mix (P/N4337454, Applied Biosystems)、1μL 具有末端 5' NCM 并具有或不具有末端 3' 硫代磷酸酯键的化学增强型测序引物 (NCM-M13 正向和 NCM-M13 反向引物) 和 3μL 水混合。循环测序反应是在 96°C 下进行 1 分钟, 然后使以下循环 25 次: 96°C 下 10 秒, 50°C 下 5 秒, 60°C 下 1 分钟 15 秒, 然后保持在 4°C 下。例如, 测序引物是含有由星号表示的末端 3' 硫代磷酸酯 (PS) 基团的 M13 正向引物 (1μM) (NGM-TGTAACGACGGCCAG\*T) (SEQ ID NO:4)、M13 反向引物 (1μM) (NGM-CAGGAAACAGCTATGAC\*C) (SEQ ID NO:5) 或不含有 PS、M13 正向引物 (1μM) (NGM-TGTAACGACGGCCAGT) (SEQ ID NO:11)、M13 反向引物 (1μM) (NGM-CAGGAAACAGCTATGACC) (SEQ ID NO:12)。图 4 和 8 提供了含有末端 5' 端带负电荷部分而不含有 PS 的化学增强型测序引物 (分别为图 3A 和 3F) 并且 RSA000317667 作为模板的电泳图 (参见 2011 年 10 月 28 日提交的 USSN61/407, 899 和 2011 年 10 月 29 日提交的 USSN61/408, 553)。RSA000317667 的序列显示出引物中 1 个碱基的高分辨率。

[0125] 实施例 5

[0126] 毛细管电泳样本分离和检测

[0127] 通过如本领域技术人员所已知的分析核苷碱基序列的方法分析扩增样本。例如, 可按照仪器制造说明使用毛细管电泳。可在循环测序清除中使用 BigDye X Terminator 纯化试剂盒 (Applied Biosystems, P/N4376486) 以防止未并入的染料标记的终止剂、dNTP 和盐与染料标记的延伸产物共同注入毛细管电泳 DNA 分析仪中。简单地讲, 将 13μL 测序反应混合物与 45μL SAM 溶液和 10μL X Terminator 溶液组合。在 1800rpm 下使样本板涡旋 20 分钟后, 在 1000x g 下使板旋转 2 分钟。向每个孔加入 30μL 70% 乙醇, 并在 1650x g 下使板离心 15 分钟。通过将板倒置在纸巾上并在 180x g 下离心 1 分钟以移除溶液。然后, 将沉淀的测序反应物溶于 10μL 50μM EDTA 中, 并加样在装备有 50cm 毛细管阵列的 AB3500xL 基因分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, California) 上。

[0128] 实施例 6

[0129] 毛细管电泳方法和分析

[0130] 使用仪器用户指南所述的染料组 Z, 在当前的 Applied Biosystems 仪器例如 Applied Biosystems 3500x1 基因分析仪上进行毛细管电泳 (CE)。存在 ShortReadSeq\_BDX\_POP7、RapidSeq\_BDX\_POP7、FastSeq\_BDX\_POP7、StdSeq\_BDX\_POP7 运行模块。例如, BDXFastSeq50\_POP7x1\_1 参数为: 烘箱温度: 60C, 在 1.6kV 下注射样本 5 秒, 并且在性能最佳聚合物 (POP-7™ 聚合物) 中, 在 13.4kV 下电泳 2520 秒, 运行温度为 60°C。其它 CE 仪器 (例如, 3500 或 3730x1 基因分析仪) 的仪器参数 (例如, 注射条件) 的变化不同。使用对不同仪器特定的 Applied Biosystems 数据收集软件版本收集数据, 例如, 3500 数据收集软件 v1.0。通过 Applied Biosystems KB™ 碱基读取软件 v1.4.1 和 KB\_3500\_POP7\_BDTv3direct.bcc 与 KB\_3500\_POP7\_BDTv3direct.mob 分析序列痕迹以确定正确的碱基读出。

[0131] 实施例7

[0132] 质粒DNA或PCR扩增的经Exo/SAP处理的DNA的测序

[0133] 使与BigDye Terminator v3.1即反应试剂和具有NCM组成而不含PS的测序引物混合的200ng pGem质粒DNA或10ng经Exo/SAP处理的PCR产物在循环测序反应中反应:95C/1分钟,循环25次(96C/1分钟,50C/5秒,60C/1分钟15秒)。使用BigDye XTerminator试剂盒(Applied Biosystems)清除反应,并利用POP7聚合物在3500上进行电泳。使用在5'具有NCM的测序引物所测序的测序pGEM质粒的电泳图表明引物的5个碱基对中的清晰序列(数据未显示)。使用在5'具有NCM和在3'具有耐核酸酶键的测序引物质粒所测序的测序pGEM质粒的电泳图表明引物后5个碱基对的清晰序列(数据未显示)。使用在5'具有NCM和在3'具有耐核酸酶键的测序引物所测序的经Exo/SAP处理的PCR产物的电泳图表明引物后6个碱基的清晰序列读数(数据未显示)。

[0134] 本领域的技术人员了解所采用的检测技术通常不具有限制性。而相反,多种检测手段属于所公开的方法和试剂盒的范围内,条件是可确定扩增子的存在或不存在。

[0135] 虽然已结合特定实施方案描述了本发明的原理,但应清楚了解这些说明仅以实例的方式给出而非旨在限制本发明的范围。已将文中所公开的内容用于阐述和说明的目的。无意详尽说明或将所公开内容限制成所描述的确切形式。许多修改和改变对本领域技术人员将是显而易见的。对公开内容进行选择并加以描述以最好地解释所描述技术中所公开实施方案的原理和实际应用,从而使本领域技术人员了解适于所预期的具体用途的多种实施方案和多种修改。希望所公开内容的范围受以下权利要求和其等效内容限定。

序列表

	<110> 美国生物技术公司	
	<120> 化学增强型引物组合物、方法和试剂盒	
	<130> LT00318 PCT	
	<140> PCT/US2011/058474	
	<141> 2011-10-28	
	<150> 61/407,899	
	<151> 2010-10-28	
	<150> 61/408,553	
	<151> 2010-10-29	
	<160> 12	
	<170> PatentIn 3.5 版	
	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 1	
	tgtaaaacga cggccagttt gatgggetca gcaacaggt	39
	<210> 2	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 2	
	caggaaacag ctatgacccc acigtctgcg tttcttctcg	40
	<210> 3	
	<211> 626	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 模板	
	<400> 3	
	caggaaacag ctatgacccc acigtctgcg tttcttctcg ttttaacccc accttcaatg	60
	aagtgtgtat ttgaaataaa tggctctatga gttaateaca tctttatata tccetaagatg	120
	tattacaag gcttccataa cacttctcta tagtaagcca ctcaattcta taattttct	180
	ttcaataaac tcaatcttgg taatacagaa ataaaccttc tgggttggtt ttgttcaaga	240
	tcttcagttt gatttgcctc ttggttgate tgtttttccc atcgetgaac tggttccat	300
	aatcacacac ctttgccttt catttccaca gatcaaggaa tcaacaitta cggaaagcca	360
	cccctctaca aacagcatgg taaaacecgc tttctctcgc gtagcttita aatagcaaaag	420
	teagetgaac ttctctctgc tgtctctctga aaggtcttct ctgetctgct tttttagagt	480
	aaaactgggg cctccagcat attatgcctt tctggctctac taagatgtaa atattgtaaa	540
	attgattctc ctggatggag agacttagct tgattagaaa gcttctaac tgttctgag	600
	cccatcaaac tggccctcgt ttaca	626

[0001]



	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 4	
	tgtaaaaega cggccagt	18
	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 5	
	caggaaacag ctatgacc	18
	<210> 6	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 6	
	tgtaaaaega cggccagtgc tgcctctgat ggccggac	37
[0002]	<210> 7	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 7	
	caggaaacag ctatgaccgc cacactcigg agctggaca	39
	<210> 8	
	<211> 545	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成DNA	
	<400> 8	
	tgtaaaaega cggccagtgc tgcctctgat ggccggacggs ggtgtggttc tggactcgt	60
	ggtcaggset ggtctgtgtg gaatctgat ccttctcttc cccaatctac ctgtgtcagt	120
	tccctecttt tetattttct ctcccttcca gatgcaage cctccaacat cctagtcaac	180
	tcctgtgggg agatcaaget ctgtgacttt ggggtcagcg ggcagctcat cgactccatg	240
	gccaaactct tegtgggcac aaggctctac atgtcggtaf gaacagaagi ttccaitget	300
	tgagcttctt gtaeaggcag ggagaggagc ccagtgggtg cctttctgti ggagccagag	360
	tcctgtctctg ggtaggggac aagaagttag ggagaggca cagtgtcttg cectgaggag	420
	atgaagttag atgggaagat ggtcttggtc tttcttaggc ctggagcat aactgggata	480
	ttggggcctt gactcactga aaggactgtc cagctccaga gtgtggcggc catagctgtt	540

	tectg	545
	<210> 9	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 9	
	tgtaaaacga eggccagtgg ctctggcac aaagctgg	38
	<210> 10	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 10	
[0003]	caggaacag ctatgacctg catctcattc tccaggettc	40
	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> M13 正向引物	
	<400> 11	
	tgtaaaacga eggccagt	18
	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> M13 反向引物	
	<400> 12	
	caggaacag ctatgacc	18

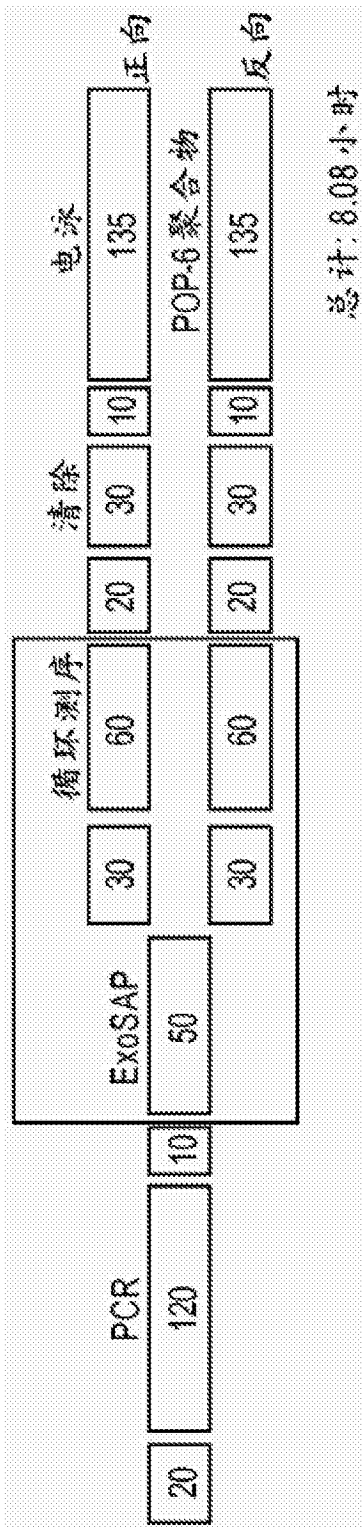


图1A

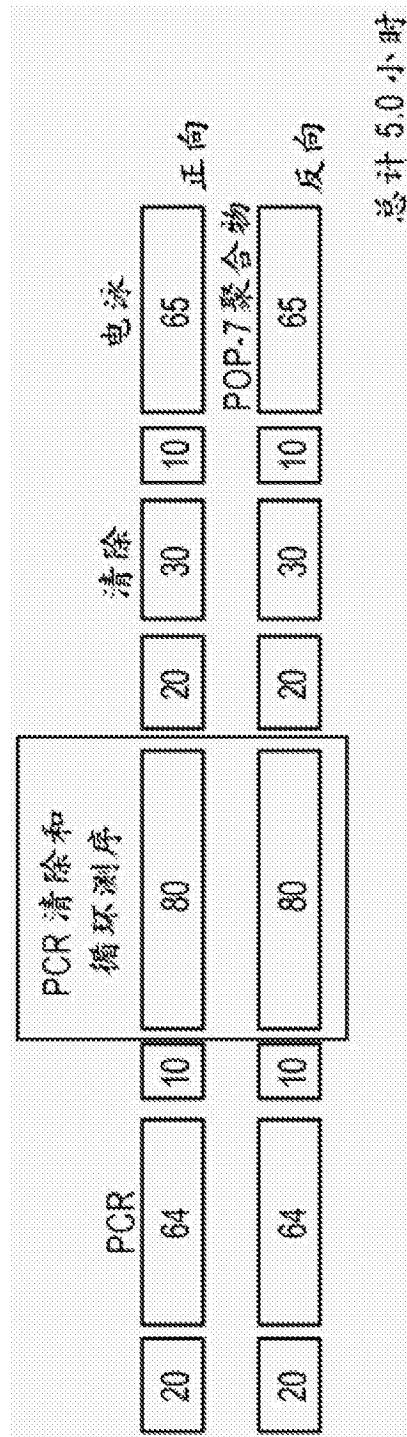


图1B

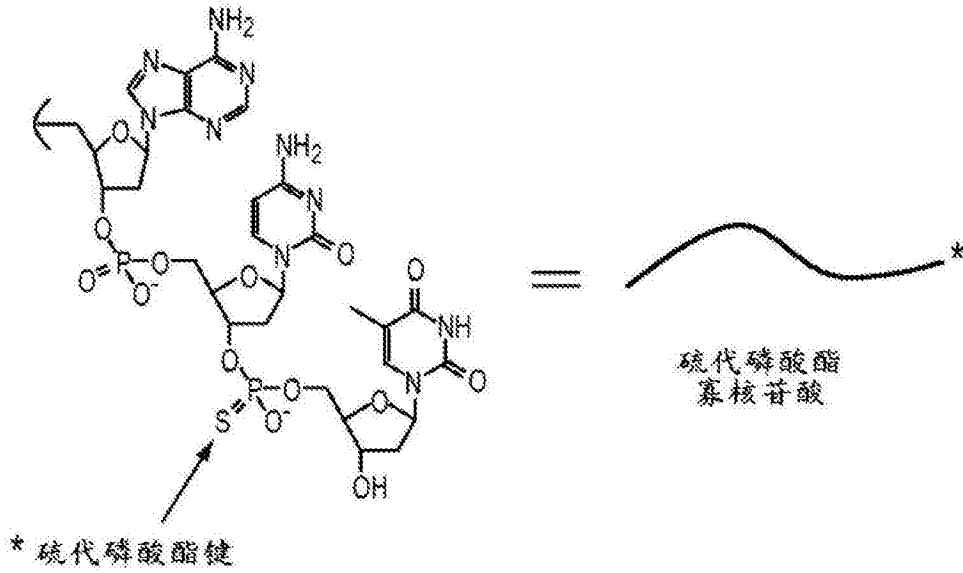


图2

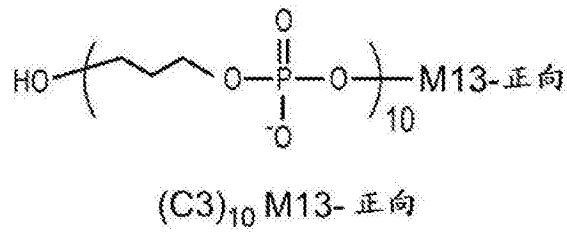


图3A

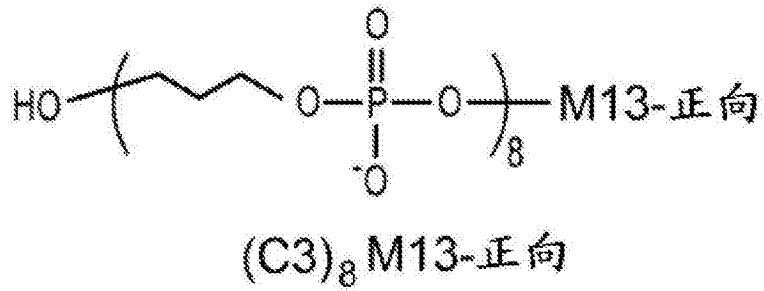
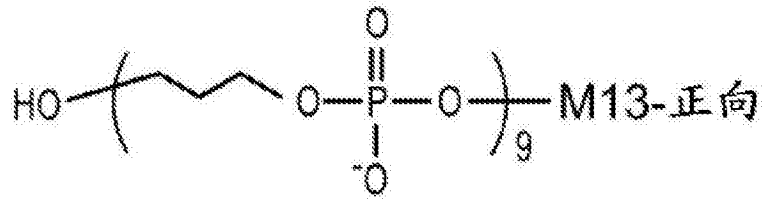
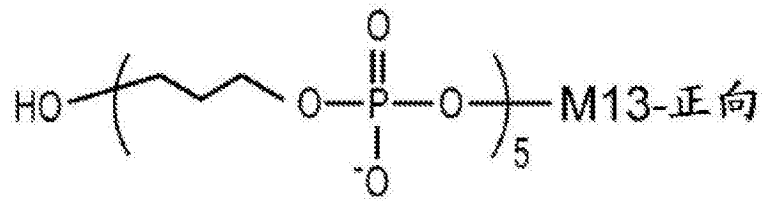


图3B



(C3)<sub>9</sub> M13-正向

图3C



(C3)<sub>5</sub> M13-正向

图3D

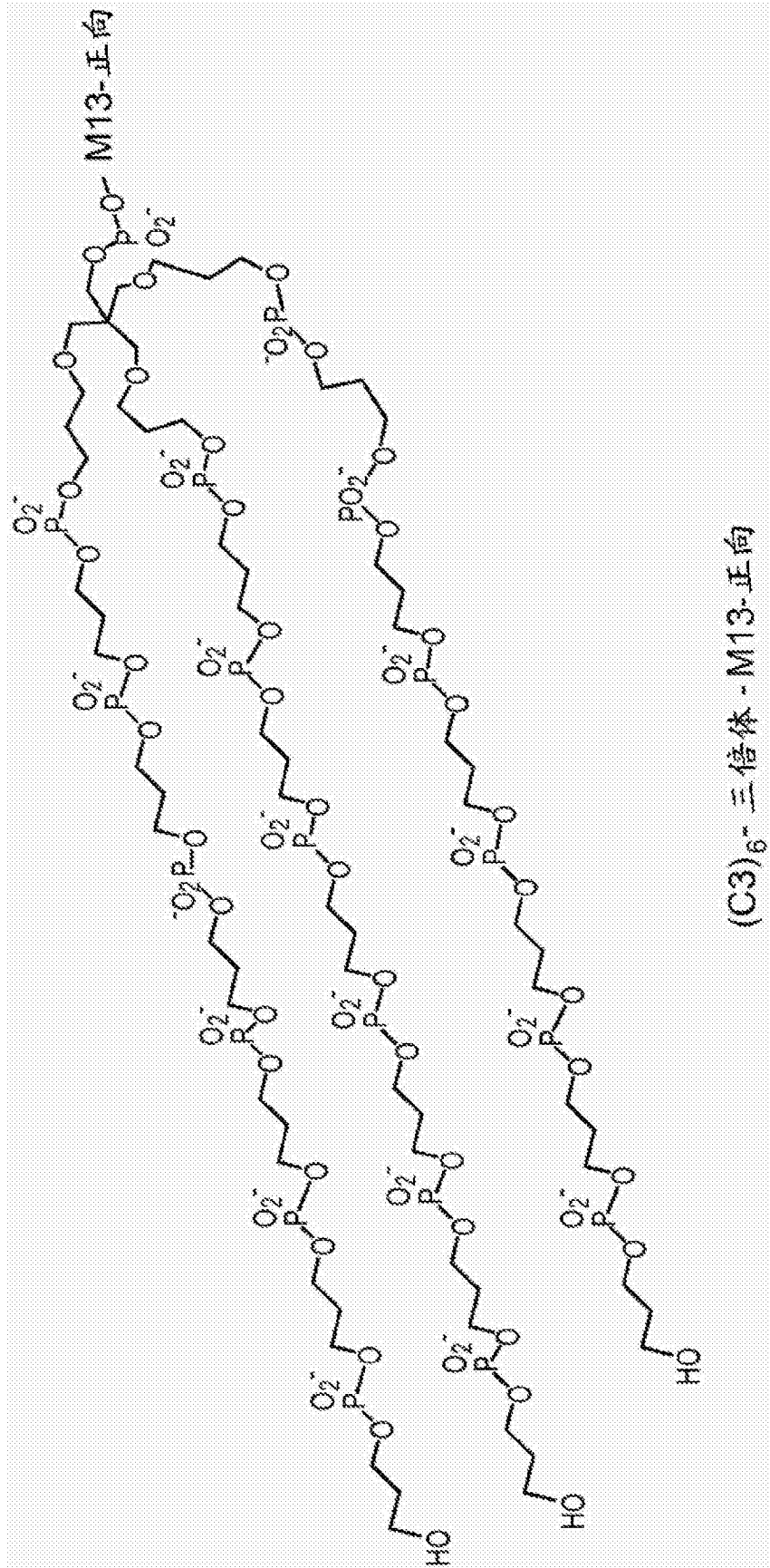


图3E

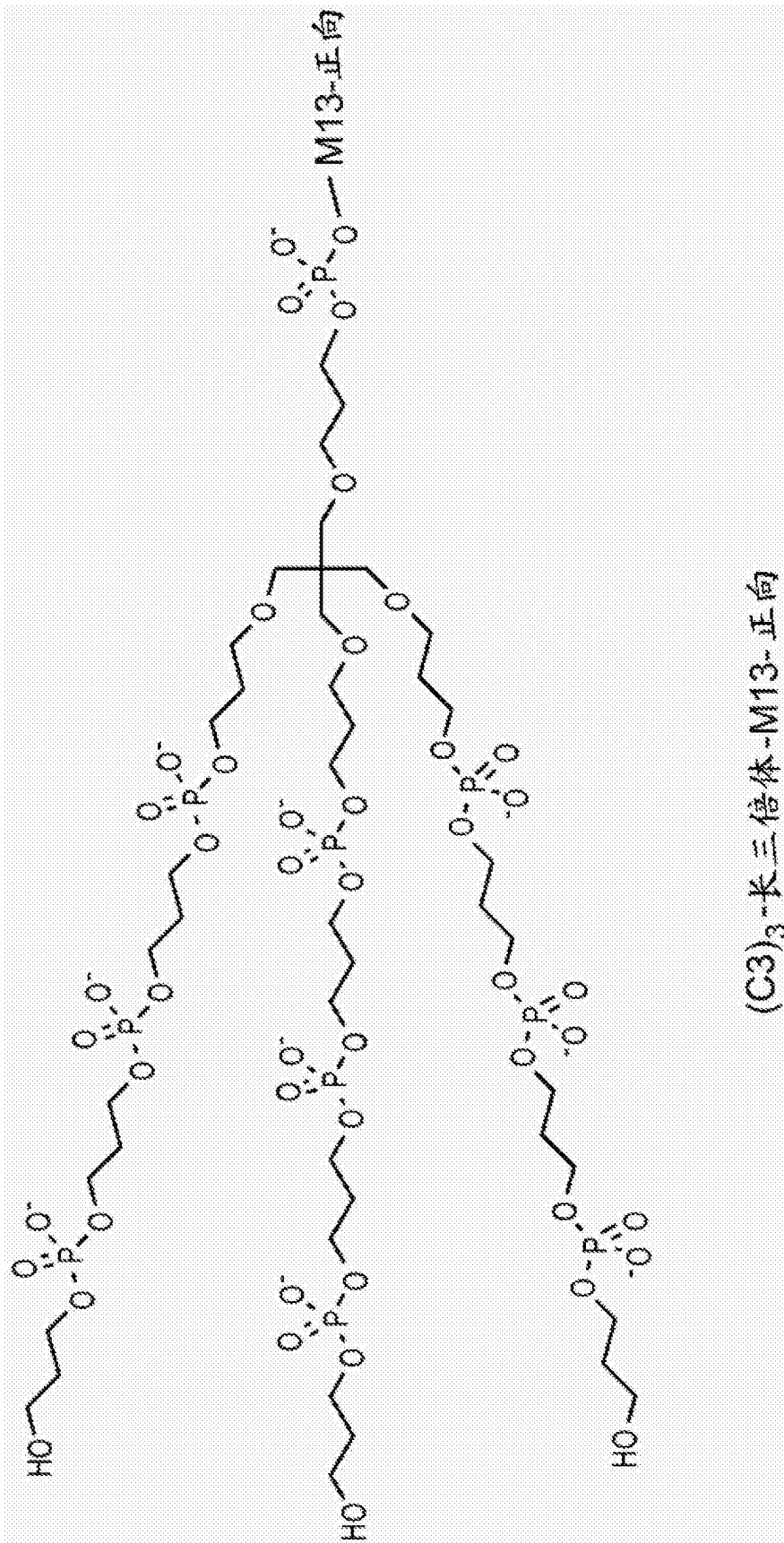
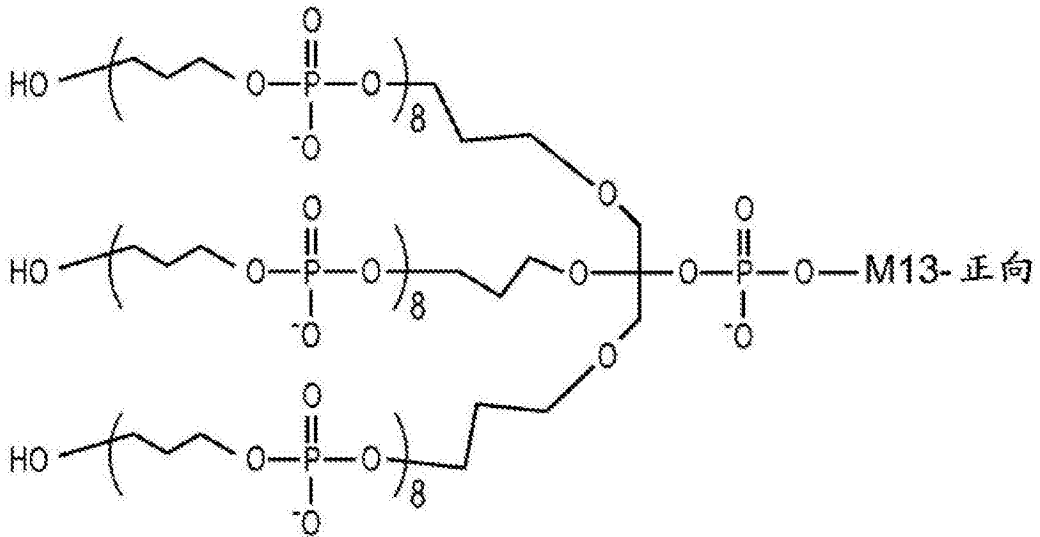
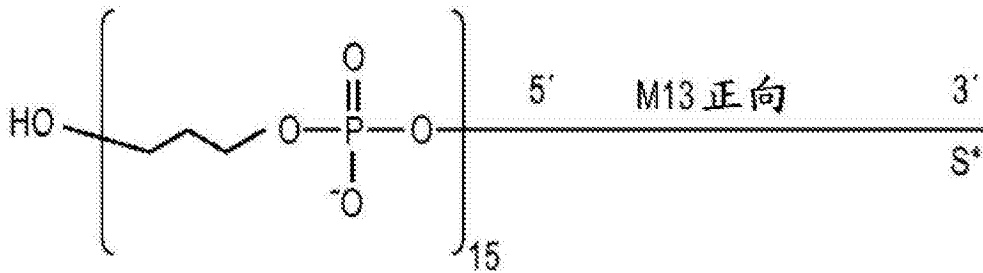


图3F



$(\text{C}_3)_8$ -三倍体 -M13-正向

图3G



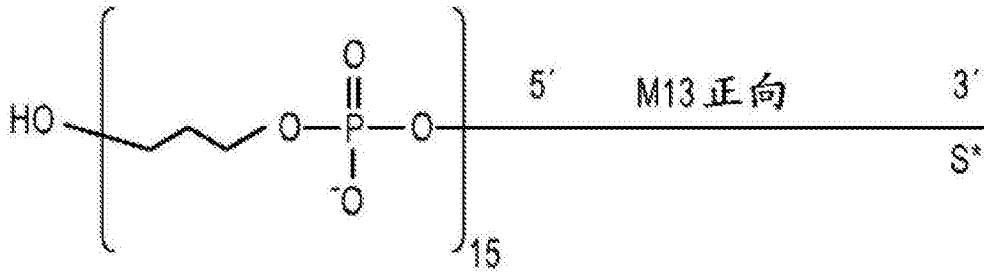
$(\text{C}_3)_{15}$  -M13\*(正向)

模板 ZC

\*: 硫代磷酸酯

图3H



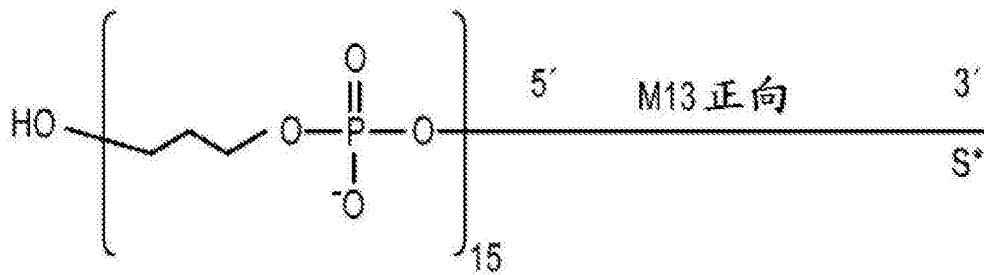


(C3)<sub>15</sub>-M13\*(正向)

模板序列01

\*: 硫代磷酸酯

图3I

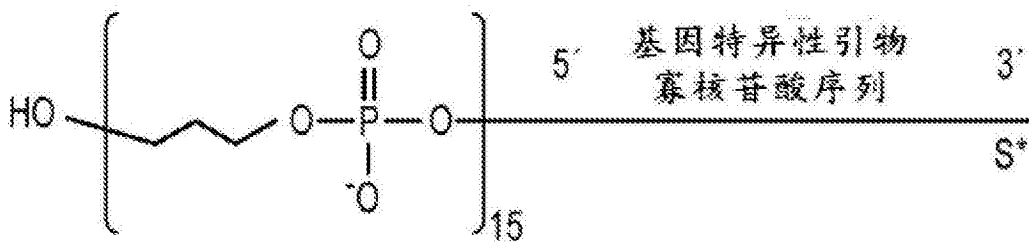


(C3)<sub>15</sub>-M13\*(正向)

模板RSA000317141

\*: 硫代磷酸酯

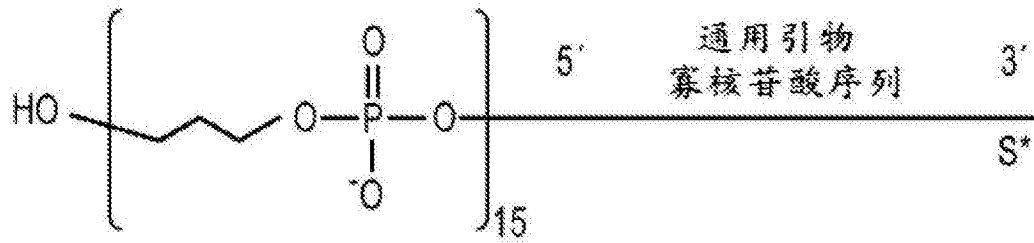
图3J



(C3)<sub>15</sub>-基因特异性引物寡核苷酸序列\*(正向)

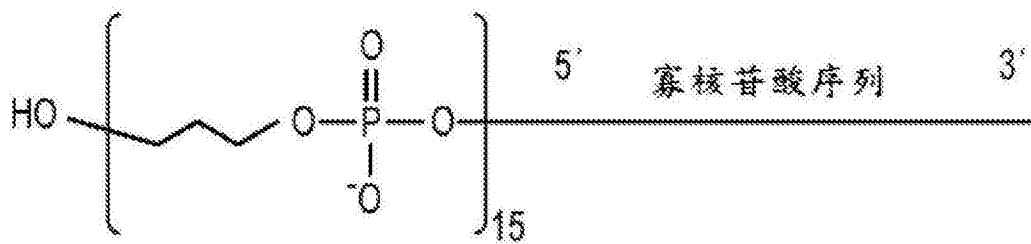
\*: 硫代磷酸酯

图4A



(C3)<sub>15</sub> - 通用引物寡核苷酸序列\* (正向)  
\*: 硫代磷酸酯

图4B



(C3)<sub>15</sub> - 寡核苷酸序列 - 正向

图4C