



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109642253 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780048426.6

(22)申请日 2017.07.26

(30)优先权数据

62/370049 2016.08.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/068839 2017.07.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/024562 EN 2018.02.08

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 R.梅塔

(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 1/6851(2018.01)

C12Q 1/70(2006.01)

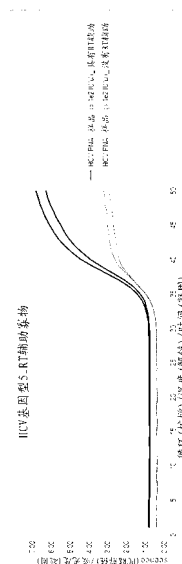
权利要求书4页 说明书18页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

用于提高核酸的扩增和检测/定量的效率的
辅助寡核苷酸

(57)摘要

描述了使用非延伸辅助寡核苷酸检测和定量样品中的靶核酸的改进的方法。所述方法包括使样品中的核酸与扩增试剂接触,所述扩增试剂包括一种或多种引物、一种或多种非延伸辅助寡核苷酸和一种或多种探针。所述非延伸辅助寡核苷酸促进和增加一种或多种引物的靶核酸可达性,导致扩增子生产的更大积累,由此增加扩增测定的效率和灵敏度,包括用于丙型肝炎病毒(HCV)(例如,HCV基因型5)的扩增测定。还提供了试剂盒、制品和反应混合物。



1. 一种用于检测和/或定量样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:
 - (a) 使所述样品中的核酸与扩增试剂接触,所述扩增试剂包含:
 - 至少一种包含DNA聚合酶活性的酶;
 - 至少核苷三磷酸单体或其它核苷单体;
 - 至少一种对所述靶核酸特异性的正向引物,或至少一种对所述靶核酸特异性的反向引物,或它们的组合,其用于产生至少一种扩增子;
 - 至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和
 - 至少一种对所述扩增子特异性的可检测探针或至少一种DNA结合染料;
 - (b) 在足以使扩增反应发生的条件下将所述核酸与所述扩增试剂一起温育一段时间;
 - 和
 - (c) 用所述至少一种可检测探针或所述至少一种DNA结合染料检测所述扩增子。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶核酸是微生物核酸。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述微生物核酸是细菌核酸或病毒核酸。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述病毒核酸是人乳头瘤病毒(HPV)、西尼罗河病毒(WNV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)的核酸。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述病毒核酸是HCV的核酸。
6. 根据权利要求1-5中的任一项所述的方法,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度。
8. 根据权利要求1-7中的任一项所述的方法,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。
9. 根据权利要求1-8中的任一项所述的方法,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。
10. 根据权利要求1-9中的任一项所述的方法,其中所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。
11. 根据权利要求1-10中的任一项所述的方法,其中所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。
12. 根据权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。
13. 一种用于检测和/或定量样品中的HCV核酸的方法,所述方法包括:
 - (a) 使所述样品中的核酸与扩增试剂接触,所述扩增试剂包含:
 - 至少一种包含DNA聚合酶活性的酶;
 - 至少核苷三磷酸单体或其它核苷单体;
 - 至少一种对所述靶核酸特异性的正向引物,或至少一种对所述靶核酸特异性的反向引

物,或它们的组合,其用于产生至少一种扩增子;

至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和

至少一种对所述扩增子特异性的可检测探针或至少一种DNA结合染料;

(b) 在足以使扩增反应发生的条件下将所述核酸与所述扩增试剂一起温育一段时间;和

(c) 用所述至少一种可检测探针或所述至少一种DNA结合染料检测所述扩增子。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度。

16. 根据权利要求13-15中的任一项所述的方法,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。

17. 根据权利要求13-16中的任一项所述的方法,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。

18. 根据权利要求13-17中的任一项所述的方法,其中所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。

19. 根据权利要求13-18中的任一项所述的方法,其中所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

20. 根据权利要求13-19中的任一项所述的方法,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和/或3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

21. 一种用于扩增和检测和/或定量样品中的靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包含扩增试剂,所述扩增试剂包含:

(a) 包含DNA聚合酶活性的酶;

(b) 核苷三磷酸单体或其它核苷单体;

(c) 对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或至少一种反向引物,或它们的组合;

(d) 至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和

(e) 所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。

22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述靶核酸是微生物核酸。

23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中所述微生物核酸是细菌核酸或病毒核酸。

24. 根据权利要求23所述的试剂盒,其中所述病毒核酸是HPV、WNV、HIV、HAV、HBV或HCV的核酸。

25. 根据权利要求21-24中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。

26. 根据权利要求21-25中的任一项所述的试剂盒,其中所述聚腺苷酸序列具有在4-12

个核苷酸之间的长度。

27. 根据权利要求1-26中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。

28. 根据权利要求21-27中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。

29. 根据权利要求21-28中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。

30. 根据权利要求21-29中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

31. 根据权利要求21-30中的任一项所述的试剂盒,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

32. 一种有效地扩增和检测和/或定量样品中的靶核酸的反应混合物,所述反应混合物包含扩增试剂,其包含:

- (a) 样品;
- (b) 包含DNA聚合酶活性的酶;
- (c) 核苷三磷酸单体或其它核苷单体;
- (d) 对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或至少一种反向引物,或它们的组合;
- (e) 至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和
- (f) 所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。

33. 根据权利要求32所述的反应混合物,其中所述靶核酸是微生物核酸。

34. 根据权利要求33所述的反应混合物,其中所述微生物核酸是细菌核酸或病毒核酸。

35. 根据权利要求34所述的反应混合物,其中所述病毒核酸是HPV、WNV、HIV、HAV、HBV或HCV的核酸。

36. 根据权利要求32-35中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。

37. 根据权利要求32-36中的任一项所述的反应混合物,其中所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度。

38. 根据权利要求32-37中的任一项所述的反应混合物,其中所述聚腺苷酸序列是约8个核苷酸的长度。

39. 根据权利要求32-38中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。

40. 根据权利要求32-39中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。

41. 根据权利要求32-40中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。

42. 根据权利要求32-41中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种探针包含

SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

43. 根据权利要求32-42中的任一项所述的反应混合物,其中所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

用于提高核酸的扩增和检测/定量的效率的辅助寡核苷酸

发明领域

[0001] 本发明涉及体外诊断的领域。在该领域中,本发明涉及改进的用于检测可能存在于样品(例如,生物学或非生物学样品)中的靶核酸的方法。具体地,本发明涉及在增强引物活性的非延伸辅助寡核苷酸的辅助或帮助下对靶核酸的检测和定量。通过增强引物的活性,非延伸辅助寡核苷酸会提高扩增效率,这导致更大的和增强的扩增子生产。因此,所述改进会实现更有效的且更灵敏的检测和定量方法。本发明进一步提供了含有非延伸辅助寡核苷酸、引物和探针的反应混合物和试剂盒,其用于检测和定量可能存在于样品中的靶核酸。本发明对于例如检测和定量样品中的病毒或细菌核酸而言是有用的。

[0002] 发明背景

在分子诊断领域中,核酸的扩增和检测/定量具有显著的意义和重要性。关于核酸扩增和检测的诊断应用的实例是用于检测和扩增微生物核酸。这样的微生物核酸可以包括细菌核酸和/或病毒核酸。所述扩增和检测/定量技术适合用于病毒核酸靶标,诸如人乳头瘤病毒(HPV)或西尼罗河病毒(WNV),或针对人免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)的存在的常规献血筛查。所述扩增和检测/定量技术也适合用于细菌核酸靶标或肿瘤学标志物等的分析。

[0003] 最卓越的和广泛使用的用于扩增(和检测/定量)核酸靶标的方法是聚合酶链式反应(PCR)。其它扩增技术包括连接酶链式反应、聚合酶连接酶链式反应、Gap-LCR、修复链式反应、3SR、NASBA、链置换扩增(SDA)、转录介导的扩增(TMA)和Q β -扩增。

[0004] 用于基于PCR的分析的自动化系统经常利用在同一个反应容器中PCR过程中的产物扩增的实时检测。这样的方法的关键是使用携带报告基团或标记的经修饰的寡核苷酸。PCR利用聚合酶(美国专利号4,683,195和4,683,202)。有关的重要改进是,例如,在利用经修饰的寡核苷酸的PCR过程中扩增产物的实时检测,所述经修饰的寡核苷酸携带被称作水解或5'-核酸酶探针的报告基团或标记,诸如用在COBAS[®] TaqMan[®]上的商业测定中(美国专利号5,210,015和5,487,972)。其它改进的扩增和检测方法被称作分子信标(Molecular Beacons)技术(国际专利公开号WO 95/13399)或利用包含小沟结合剂(MGB)部分的寡核苷酸的方法(国际专利公开号WO 03/062445和WO 2006/135765)。进一步已知,含有添加的寡核苷酸的引物(在这些引物中的至少一种的5'末端处具有高GC含量)的应用表现出扩增效率的提高(Liu, 等人, Genome Research 7:389-398 (1997);国际专利公开号WO 01/94638;和美国专利公开号US 2004/0110182)。在大约12-40个PCR循环以后扩增产物的最终量对于例如已经在5'末端添加GGAC单元的引物而言显著高于未修饰的引物。

[0005] Afonina, 等人, BioTechniques 43(3):1-3 (2007);国际专利公开号WO 2006/135765描述了实时PCR荧光信号的增加,且由此通过使用具有随机地分散在5'末端处的短的富含腺嘌呤和胸腺嘧啶的翼(flap)的引物和小沟结合剂(MGB)荧光杂交探针得到提高的扩增效率。

[0006] 类似地,Babiel, 等人(美国专利公开号US 2014/0113279)描述了聚N向引物的添加如何可以导致不希望的高分子量产物的形成的减少或抑制,由此避免假阴性或假阳性结

果。

[0007] 因而,本领域中总是需要对现有方法的改进。例如,本领域中需要提供一种用于简单地和可靠地检测和定量核酸靶标的方法。特别需要提高DNA扩增和检测/定量的效率。

[0008] 发明概述

在本发明中的某些实施方案涉及用于扩增、检测和定量样品(例如,生物学或非生物学样品)中的靶核酸的新方法和用途。例如,本发明的某些实施方案涉及在单个试管或反应容器中通过实时聚合酶链式反应(PCR)对微生物诸如病毒(例如,HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的单路或多路检测和定量。所述改进是基于非延伸辅助寡核苷酸在扩增反应(诸如PCR)中的应用。据信,所述非延伸辅助寡核苷酸充当一种辅助寡核苷酸或辅助引物,因为它会促进和增强由(延伸)引物介导的扩增。还据信,所述非延伸辅助寡核苷酸的存在会减小或降低靶核酸的靶区域的二级结构的吉布斯自由能。在某些情况下,据信所述非延伸辅助寡核苷酸会减小/降低靶核酸的引物结合区域的二级结构的吉布斯自由能。所述非延伸辅助寡核苷酸可以在与所述引物中的一种或多种相同的区域内退火。但是,与所述一种或多种引物不同,所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸。也就是说,所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸以产生扩增子。作为延伸的替代,所述非延伸辅助寡核苷酸促进和增强所述一种或多种延伸和产生扩增子的引物的靶标可达性。也就是说,象延伸引物一样,所述非延伸辅助寡核苷酸与靶核酸退火,但是不同于延伸引物,所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸。有许多阻止寡核苷酸延伸的方式,它们是或将是本领域普通技术人员众所周知的。例如,聚腺苷酸序列向寡核苷酸的3'-端的添加会阻止延伸。还据信,聚腺苷酸序列不可能与靶核酸的任何部分退火,其由此使非延伸辅助寡核苷酸和靶核酸之间的相互作用失稳,这又会打开二级结构和允许(延伸)引物对非延伸辅助寡核苷酸的置换。另外,用磷酸酯基团替换3'-OH基团(即,磷酸化)也会阻止延伸。据信,所述非延伸辅助寡核苷酸如下辅助扩增:降低靶核酸的引物结合区域中的二级结构的吉布斯自由能,由此提高延伸的一种或多种引物的可达性(参见,图2和4)。这导致PCR扩增的改善,使得与在没有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下相比在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下积累更多的PCR产物(即,扩增子)(参见,图1和3)。也就是说,所述非延伸辅助寡核苷酸提高和/或增强PCR测定的总效率。因为提高了PCR测定的效率,可能在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下成功地扩增至少量的起始原料(即,低拷贝数)。因而,所述非延伸辅助寡核苷酸也会增加测定的灵敏度。

[0009] 实施方案包括检测和定量靶核酸的方法,包括执行至少一个循环步骤,其可以包括扩增步骤和杂交步骤。此外,实施方案包括引物、探针和一种或多种非延伸辅助寡核苷酸以及被设计成用于在单个反应容器或试管中检测和定量靶核酸的试剂盒。

[0010] 本发明也提供了检测靶核酸在来自个体的生物样品中的存在或不存在的方法。这些方法可以用于检测靶核酸在血浆中的存在或不存在,用于血液筛查和诊断测试。另外,本领域的技术人员可以使用相同测试来评估尿和其它样品类型以检测和/或定量靶核酸。这样的方法通常包括执行至少一个循环步骤,其包括扩增步骤和染料结合步骤。通常,所述扩增步骤包括使所述样品与多个寡核苷酸引物对和在该情况下一种或多种非延伸辅助寡核苷酸接触,以产生一种或多种扩增产物(如果核酸分子存在于所述样品中),且所述染料结合步骤包括使所述扩增产物与双链DNA结合染料接触。这样的方法也包括检测双链DNA结合染料在所述扩增产物中的结合的存在或不存在,其中所述结合的存在指示靶核酸在所述样

品中的存在,且其中所述结合的不存在指示靶核酸在所述样品中的不存在。一种代表性的双链DNA结合染料是溴化乙锭。其它核酸结合染料包括DAPI、Hoechst染料、PicoGreen®、RiboGreen®、OliGreen®和花青染料诸如YO-YO®和SYBR® Green。另外,这样的方法也可以包括确定扩增产物和双链DNA结合染料之间的解链温度,其中所述解链温度证实核酸核酸的存在或不存在。

[0011] 在另一个实施方案中,提供了用于检测和/或定量一种或多种靶核酸的试剂盒。所述试剂盒可以包括一个或多个对所述靶核酸的扩增特异性的引物的集合;一种或多种非延伸辅助寡核苷酸;和一种或多种对扩增产物的检测特异性的可检测的寡核苷酸探针。

[0012] 在一个方面,所述试剂盒可以包括已经用供体和对应受体部分(例如,另一个荧光部分或暗猝灭剂)标记的探针,或可以包括用于标记所述探针的荧光团部分。所述试剂盒还可以包括核苷三磷酸、核酸聚合酶和所述核酸聚合酶的功能所必需的缓冲液。所述试剂盒还可以包括关于使用所述引物、非延伸辅助寡核苷酸、探针和荧光团部分来检测扩增产物/靶核酸在样品中的存在或不存在的包装插页和说明书。

[0013] 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相同含义。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。

[0014] 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。

[0015] 附图简述

图1显示了实验的实时PCR生长曲线,其显示了引物、探针和非延伸辅助寡核苷酸以及对靶核酸(HCV的靶核酸)特异性的探针。

[0016] 图2显示了在有非延伸辅助寡核苷酸存在下(HCV)靶区域的预测二级结构,其显示-107.2 kcal/mol的 ΔG 。

[0017] 图3显示了实验的实时PCR生长曲线,其显示了引物、探针和非延伸辅助寡核苷酸以及对靶核酸(HCV的靶核酸)特异性的探针。

[0018] 图4显示了在有非延伸辅助寡核苷酸存在下(HCV)靶区域的预测二级结构,其显示-98.6 kcal/mol的 ΔG 。

[0019] 发明详述

本发明涉及新的和改进的扩增、检测和定量可能存在于样品(例如,生物样品)中的核酸靶标的方法和用途,其至少包括用于产生扩增子的引物对、对所述扩增子特异性的可检测探针和非延伸辅助寡核苷酸。所述改进具体地基于以下事实:在有非延伸辅助寡核苷酸存在下增强和增加扩增(即,扩增子的产生)。也就是说,所述非延伸辅助寡核苷酸增强和提高一种或多种其延伸的引物的活性和效率,由此提高和增加PCR反应的效率。这具有增加测定的灵敏度的效果。本发明可以用于任何数目的应用,包括、但不限于微生物核酸(例如,病毒或细菌核酸)的扩增和检测/定量。用于与本发明一起使用的病毒的实例包括HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV。

[0020] 通过核酸扩增对微生物(例如,病毒或细菌)感染的诊断提供了一种用于快速地、准确地、可靠地,特异性地和灵敏地检测和/或定量感染的方法。本文描述了用于检测和/或定量非生物学或生物学样品中的微生物核酸的实时逆转录酶PCR测定。提供了用于检测和/

或定量靶核酸(诸如微生物核酸,如病毒或细菌核酸)的引物和探针,也提供了含有这样的引物和探针的制品或试剂盒。与其它方法相比用于检测靶核酸的实时PCR的增加了的特异性和灵敏度,以及实时PCR的改进的特征(包括样品围堵以及扩增的产物的实时检测和定量),使得该技术在临床实验室中用于微生物感染(例如,病毒或细菌感染)的常规诊断的实现成为可行。另外,该技术可以用于血液筛查以及用于预后。这样的检测测定也可以平行地与用于检测其它靶核酸(例如,其它微生物核酸,或相同微生物的其它/不同基因型)的其它测定一起多路化。

[0021] 作为实例,本发明包括寡核苷酸引物、非延伸辅助寡核苷酸和与HCV基因组杂交的荧光标记的水解探针,以便使用例如TaqMan[®]检测技术特异性地鉴别HCV。

[0022] 本文中使用的术语“引物”或“延伸引物”是本领域技术人员已知的,且表示寡聚体化合物,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'-端提供游离的3'-OH基团,其中另外的“核苷酸”可以通过模板依赖性的DNA聚合酶连接从而建立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。

[0023] 具体地,公开的方法可以包括执行至少一个循环步骤,其包括使用一个或多个引物对从样品扩增核酸分子基因靶标的一个或多个部分。本文中使用的“引物”或“延伸引物”表示这样的寡核苷酸引物:其与在样品的靶区域中存在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。所述扩增产物应当含有与对靶核酸特异性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”或“可检测探针”表示这样的寡核苷酸探针:其与在样品的靶区域中存在的核酸序列特异性地退火。每个循环步骤包括扩增步骤、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靶核酸在样品的靶区域中的存在或不存在。

[0024] 本文中使用的术语“扩增”表示合成与模板核酸分子(例如,来自微生物诸如病毒或细菌的核酸分子)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)和适当缓冲液和/或聚合酶的最佳活性所需的辅因子(例如,MgCl₂和/或KCl)的存在。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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,只要在必要时补充所述酶即可。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 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,叔丁基苄基、磷酸酯、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'-O-甲基ribo-U、2'-O-甲基ribo-C、N4-乙基-dC、N6-甲基-dA、5-丙炔基dU、5-丙炔基dC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。其它经修饰的核苷酸置换可能改变寡核苷酸的稳定性,或提供其它合乎需要的特征。

[0032] 靶核酸的检测

本发明提供了通过扩增靶核酸序列的一部分来检测和定量样品中的靶核酸的方法。作为实例,提供了通过扩增HCV核酸序列的一部分来检测和定量样品中的HCV的方法。具体地,本发明的实施方案提供了用于扩增和检测/定量HCV核酸分子靶标的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针。

[0033] 为了扩增、检测和定量HCV,提供了引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针。除了本文中举例说明的那些以外的HCV核酸也可以用于检测样品中的HCV。例如,本领域技术人员使用常规方法可以针对特异性和/或灵敏度来评价功能变体。代表性的功能变体可以包括,例如,本文中公开的HCV核酸中的一个或多个缺失、插入和/或置换。

[0034] 更具体地,寡核苷酸的实施方案各自包括具有选自SEQ ID NO:1-5的序列的核酸,其基本上等同的变体,其中所述变体与SEQ ID NO:1-5之一、或SEQ ID NO:1-5的互补物及其变体具有至少例如80%、90%或95%序列同一性。正向引物、反向引物和可检测探针 (SEQ ID NO:1-4) 来自商购可得的HCV基因分型测定 (cobas® HCV GT, 用于与Roche的cobas® 4800系统一起使用)。

[0035] 表1: HCV寡核苷酸

寡物类型	寡物名称	SEQ ID NO:	序列	修饰
正向引物	AYHCV5001TBB	1	TGGGCAGGGTGG TTGCTK	K: 叔丁基苄基-dC
反向引物	AYHCV5002TBB	2	GTTGCATAGTTTA CCCCGTCCTCAJ	J: 叔丁基苄基-dA
反向引物	AYHCV5012TBB	3	GTTGCATAGTTTA TCCCGTCCTCAJ	J: 叔丁基苄基-dA
可检测探针	AYHCV5012HBH6	4	EATCCCGQCTCG TAGGCGGCCCCG TTGP	Q: BHQ-2 P: 磷酸酯 E: 苏式-HEX
非延伸辅助寡物	RM_111	5	GTTGCATAGTTTA TCCCGTCTTCAAG AACCTTCACACC GTGTGCGAAAA AAA	

[0036] 在一个实施方案中,使用上述的HCV引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的集合,以便提供疑似含有HCV的生物样品中的HCV的检测(表1)。所述引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的集合可以包含对HCV核酸序列特异性的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针或由其组成,所述HCV核酸序列包含SEQ ID NO:1-5的核酸序列或由其组成。在另一个实施方案中,HCV靶标的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针包含SEQ ID NO:1-5的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针中的任一种的功能活性变体或由其组成。

[0037] 使用在公开的方法中的引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针,可以鉴别SEQ ID NO:1-5的引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针中的任一种的功能活性变体。SEQ ID NO:1-5中的任一个的引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针的功能活性变体是指这样的引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针:与SEQ ID NO:1-5的各个序列相比,其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。

[0038] 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SEQ ID NO:1-5的各个序列的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SEQ ID NO:1-5的序列变化。如上面详述的,可以对引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针进行化学修饰,即,引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针可以包含修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。引物、非延伸辅助寡核苷酸和/或探针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。

[0039] 寡核苷酸包括扩增与靶区域对应的核酸分子的经修饰的寡核苷酸和寡核苷酸类似物。使用例如计算机程序诸如OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.),可以设计例如与靶标的替代部分对应的寡核苷酸。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)。

[0040] 本发明的寡核苷酸包括“辅助寡核苷酸”或“非延伸辅助寡核苷酸”。在某些情况下,所述非延伸辅助寡核苷酸将与靶核酸内的一部分部分地退火。因为据信所述非延伸辅助寡核苷酸会促进延伸引物或引物向靶核酸的接近,所述非延伸辅助寡核苷酸可以作用于与延伸引物将退火的地方相同的地方或附近。因此,在某些情况下,所述非延伸辅助寡核苷酸将部分地或完全地退火的靶核酸内的区域与延伸引物相同。也就是说,在某些情况下,所述非延伸辅助寡核苷酸和所述延伸引物将与靶核酸内的部分地或完全地相同的部分退火。因而,在某些情况下,所述非延伸辅助寡核苷酸和所述延伸引物可以共享部分地或完全地相同的序列。据信,所述非延伸辅助寡核苷酸会降低靶核酸的二级结构的吉布斯自由能。这然后促进一种或多种延伸引物与靶标的退火,其然后通过DNA聚合酶开始延伸 (即,核酸合成)。因而,所述非延伸辅助寡核苷酸

为了防止辅助寡核苷酸本身延伸,可以对所述辅助寡核苷酸做出任意数目的修饰。这样的修饰是本领域普通技术人员众所周知的。这样的修饰的实例包括:将聚腺苷酸核苷酸添加至辅助寡核苷酸的3' -端,和/或用磷酸酯基团替换3' -OH基团 (即,磷酸化)。据信,聚腺苷酸序列 (其不可能与靶核酸退火) 的添加会使非延伸辅助寡核苷酸和靶核酸之间的相互作用失稳,由此打开二级结构,这会促进靶核酸区域向 (延伸) 引物的接近。

[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,所述核酸序列包含SEQ ID NO:4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

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,每种载体含有引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针核酸分子之一。例如,构建体可以包括载体,每种载体含有微生物靶引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针核酸分子(例如,对于HCV,SEQ ID NO:1、2、3、4和5)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的和/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、从靶区域直接克隆或通过核酸扩增得到核酸分子。

[0045] 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)

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。这两种寡核苷酸引物通常是正向引物和反向引物。在某些实施方案中有用的引物包括能够在所述的HCV核酸序列(例如,SEQ ID NO:1, 2, 和3)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。

[0048] 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)。

[0049] 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)。

[0050] 逆转录病毒或RNA病毒(例如,HCV以及其它黄病毒)的基因组包含核糖核酸,即,RNA。在这样的情况下,必须首先通过酶逆转录酶的作用将模板核酸RNA转录成互补的DNA(cDNA)。逆转录酶使用RNA模板和与所述RNA的3'末端互补的短引物以指导第一链cDNA的合成,其然后可以直接用作聚合酶链式反应的模板。

[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微生物靶核酸。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微生物核酸分子,诸如来自病毒,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV。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(例如,对于HCV,SEQ ID NO:1-3)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、0.5-1.0μg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)

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)。

[0055] 在一个实例中,寡核苷酸探针可以含有供体荧光部分(例如,FAM)和对应的猝灭剂(例如,BlackHole Quenchers™(BHQ)(诸如BHQ2)),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) (诸如BHQ2) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.)、Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa)、BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.)。

[0056] 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。

[0057] 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、氙灯、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。

[0058] 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。

[0059] 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Foerster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,氦-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。

[0060] 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.)。

[0061] 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。接头臂可以属于在国际专利公开号W0 84/03285中描述的种类。国际专利公开号W0 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。

[0062] 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。

[0063] 扩增的靶核酸产物(扩增子)的检测

本发明提供了用于检测和定量生物学或非生物学样品中的靶核酸(包括微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)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靶引物对、非延伸辅助寡核苷酸从样品(例如,HPV、WNV、HAV、HBV、HCV或HIV)扩增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。可以使用靶引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针执行所述方法以检测靶核酸(例如,HPV、WNV、HAV、HBV、HCV或HIV)的存在。靶核酸的检测(通过,例如,探针)指示靶核酸(例如,HPV、WNV、HAV、HBV、HCV或HIV)在所述样品中的存在。

[0064] 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HCV病毒的存在或不存在。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(例如,HEX)和一种猝灭剂(例如,BHQ或BHQ-2,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/扩增产物在所述样品中的存在或不存在的方法。

[0065] 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。

[0066] 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,HCV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。

[0067] 通常,FRET的存在指示靶核酸在所述样品中的存在,且FRET的不存在指示靶核酸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。

[0068] 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、尿、粪便样本、血液样本、血浆、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(微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV),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。

[0069] 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。来自靶核酸扩增产物的靶核酸探针的解链温度可以证实靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)在所述样品中的存在或不存在。

[0070] 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和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。

[0071] 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。

[0072] 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:国际专利公开号WO 97/46707、WO 97/46714和WO 97/46712。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 本领域技术人员会明白,也可以采用其它核酸-或信号-扩增方法。这样的方法的实例包括、但不限于,分支DNA信号扩增、环介导的等温扩增(LAMP)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、自我持续序列复制(3SR)、链置换扩增(SDA)或智能扩增方法第2版(SMAP 2)。

[0076] 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。

[0077] 制品/试剂盒

本发明的实施方案还提供了用于检测和定量靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的制品或试剂盒。制品可以包括用于检测基因靶标(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针以及合适的包装材料。用于检测和定量靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的代表性引物和探针能够与靶核酸分子杂交。代表性的非延伸辅助寡核苷酸能够部分地或完全地与靶核酸分子退火/杂交。在某些情况下,所述非延伸辅助寡核苷酸和所述(延伸)引物与靶核酸的部分地或完全地相同的部分退火/杂交。也就是说,可以将所述非延伸辅助寡核苷酸设计在所述引物结合区域中。可替换地,所述非延伸辅助寡核苷酸和所述(延伸)引物不与靶核酸的相同部分退火/杂交。另外,所述试剂盒还可以包括DNA固定化、杂交、检测、定量所需的适当地包装的试剂和材料,诸如固体支持物、缓冲液、酶和DNA标准品。本文中公开了设计引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的方法,并提供了扩增靶核酸分子和与靶核酸分子杂交的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的代表性实例。

[0078] 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靶核酸探针(例如,对微生物靶核酸诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV特异性的探针)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。

[0079] 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、非延伸辅助寡核苷酸和探针检测和定量样品中的靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)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(例如,DNA聚合酶)、核苷三磷酸单体或其它核苷单体、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。

[0080] 本发明的实施方案也提供了用于检测样品中的靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的一组引物、一种或多种非延伸辅助寡核苷酸、以及一种或多种可检测探针。

[0081] 反应混合物

本发明的实施方案还提供了用于扩增、检测和定量靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的反应混合物。反应混合物可以包括用于检测基因靶标(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针以及合适的包装材料。用于检测和定量靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的代表性引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针能够与靶核酸分子杂交。另外,所述试剂盒还可以包括DNA固定化、杂交、检测、定量所需的适当地包装的试剂和材料,诸如

固体支持物、缓冲液、酶和DNA标准品。本文中公开了设计引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的方法,并提供了扩增靶核酸分子和与靶核酸分子杂交的引物、非延伸辅助寡核苷酸和探针的代表性实例。

[0082] 反应混合物还可以包括一个或多个用于标记探针的荧光部分,或者可替换地,可以标记与所述试剂盒一起供给的探针。例如,反应混合物可以包括用于标记靶核酸探针(例如,对微生物靶核酸诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV特异性的探针)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。

[0083] 反应混合物可以额外包括用于实现本文中公开的方法的试剂(例如,缓冲液、聚合酶(例如,DNA聚合酶)、核苷三磷酸单体或其它核苷单体、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。

[0084] 本发明的实施方案也提供了用于检测样品中的靶核酸(例如,微生物靶核酸,诸如HPV、WNV、HAV、HBV、HCV和HIV)的一组引物、一种或多种非延伸辅助寡核苷酸和一种或多种可检测探针。

[0085] 本发明的一个实施方案涉及一种用于检测和/或定量样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:(a)使所述样品中的核酸与扩增试剂接触,所述扩增试剂包含:至少一种包含DNA聚合酶活性的酶;至少核苷三磷酸单体或其它核苷单体;至少一种对所述靶核酸特异性的正向引物,或至少一种对所述靶核酸特异性的反向引物,或它们的组合,其用于产生至少一种扩增子;至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和至少一种对所述扩增子特异性的可检测探针或至少一种DNA结合染料;(b)在足以使扩增反应发生的条件下将所述核酸与所述扩增试剂一起温育一段时间;和(c)用所述至少一种可检测探针或所述至少一种DNA结合染料检测所述扩增子。在另一个实施方案中,所述靶核酸是微生物核酸(诸如病毒核酸和/或细菌核酸)。在某些实施方案中,所述病毒核酸是人乳头瘤病毒(HPV)、西尼罗河病毒(WNV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)的核酸。在一个有关的实施方案中,所述病毒核酸是丙型肝炎病毒(HCV)(包括,例如,HCV基因型5)的核酸。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在一个有关的实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,诸如约8个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0086] 本发明的另一个实施方案涉及一种用于检测和/或定量样品中的HCV核酸的方法,所述方法包括:(a)使所述样品中的核酸与扩增试剂接触,所述扩增试剂包含:至少一种包含DNA聚合酶活性的酶;至少核苷三磷酸单体或其它核苷单体;至少一种对所述靶核酸特异

性的正向引物,或至少一种对所述靶核酸特异性的反向引物,或它们的组合,其用于产生至少一种扩增子;至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和至少一种对所述扩增子特异性的可检测探针或至少一种DNA结合染料;(b)在足以使扩增反应发生的条件下将所述核酸与所述扩增试剂一起温育一段时间;和(c)用所述至少一种可检测探针或所述至少一种DNA结合染料检测所述扩增子。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,例如,约8个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,所述HCV是HCV基因型5。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在一个有关的实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和/或3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0087] 本发明的另一个实施方案涉及一种用于扩增和检测和/或定量样品中的靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包含扩增试剂,所述扩增试剂包含:(a)包含DNA聚合酶活性的酶;(b)核苷三磷酸单体或其它核苷单体;(c)对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或至少一种反向引物,或它们的组合;(d)至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和(e)所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。在另一个实施方案中,所述靶核酸是微生物核酸(诸如病毒核酸或细菌核酸)。在一个有关的实施方案中,所述病毒核酸是HPV、WNV、HIV、HAV、HBV或HCV的核酸。在一个更具体的实施方案中,所述病毒核酸是HCV(包括,例如,HCV基因型5)的核酸。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,例如,约8个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0088] 本发明的一个有关的实施方案涉及一种用于扩增和检测和/或定量样品中的HCV核酸的试剂盒,所述试剂盒包含扩增试剂,所述扩增试剂包含:(a)包含DNA聚合酶活性的酶;(b)核苷三磷酸单体或其它核苷单体;(c)对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或

至少一种反向引物,或它们的组合;(d)至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和(e)所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,例如,约8个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,所述HCV是HCV基因型5。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在一个有关的实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0089] 本发明的另一个实施方案涉及一种有效地扩增和检测和/或定量样品中的靶核酸的反应混合物,所述反应混合物包含扩增试剂,其包含:(a)样品;(b)包含DNA聚合酶活性的酶;(c)核苷三磷酸单体或其它核苷单体;(d)对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或至少一种反向引物,或它们的组合;(e)至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和(f)所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。在另一个实施方案中,所述靶核酸是微生物核酸。在另一个实施方案中,所述微生物核酸是病毒核酸。在另一个实施方案中,所述微生物核酸是细菌核酸。在另一个实施方案中,所述病毒核酸是HPV、WNV、HIV、HAV、HBV或HCV的核酸。在一个特定实施方案中,所述病毒核酸是HCV(包括,例如,HCV基因型5)的核酸。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,例如,约8个核苷酸的长度。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0090] 本发明的一个有关的实施方案涉及一种有效地扩增和检测和/或定量样品中的HCV核酸的反应混合物,所述反应混合物包含扩增试剂,其包含:(a)样品;(b)包含DNA聚合酶活性的酶;(c)核苷三磷酸单体或其它核苷单体;(d)对所述靶核酸特异性的至少一种正向引物或至少一种反向引物,或它们的组合;(e)至少一种非延伸辅助寡核苷酸,其中:(i)所述非延伸辅助寡核苷酸不会延伸,(ii)所述非延伸辅助寡核苷酸与所述引物中的至少一

种对所述靶核酸的相同部分的一部分退火,和(iii)所述非延伸辅助寡核苷酸增强所述引物中的至少一种的活性;和(f)所述靶核酸的至少一种可检测探针或DNA结合染料。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含在所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸的3'-端处的聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述聚腺苷酸序列具有在4-12个核苷酸之间的长度,例如约8个核苷酸的长度。在一个实施方案中,所述HCV是HCV基因型5。在另一个实施方案中,所述至少一种非延伸辅助寡核苷酸包含SEQ ID NO:5的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。在另一个实施方案中,所述至少一种正向引物包含SEQ ID NO:1的序列或其互补序列;所述至少一种反向引物包含选自SEQ ID NO:2和3的序列或其互补序列;和所述至少一种探针包含SEQ ID NO:4的序列或其互补序列。

[0091] 将在以下实施例中进行进一步描述本发明的实施方案。

实施例

[0092] 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,可以在不脱离本发明的精神的情况下对所述程序进行修改。

[0093] 实施例1:通过实时PCR检测HCV

从HCV-阳性的人血浆样品提取用于实时PCR测定的RNA样品。使用的试剂包括cobas® 6800/8800通用PCR Master Mix,采用与cobas® 6800/8800一起使用的方案和条件,并使用TaqMan® 检测和定量技术。在50 μ l PCR反应中,终浓度如下:正向引物和反向引物在0.2-0.5 μ M的范围内;非延伸辅助寡核苷酸为0.20 μ M;且探针为0.12 μ M。据信,在0.10 μ M-0.50 μ M范围内的浓度的正向引物、反向引物和非延伸辅助寡核苷酸将是有效的。

[0094] 为了证实非延伸辅助寡核苷酸的作用,用以下两种实验条件一式两份地进行了使用HCV-阳性的人血浆样品的实时PCR测定:(1)仅具有引物对和探针的实时PCR(即,没有非延伸辅助寡核苷酸);和(2)具有引物对、非延伸辅助寡核苷酸和探针的实时PCR。用于实时PCR测定的对HCV基因型5特异性的寡核苷酸是SEQ ID NO:1(对于正向引物)、SEQ ID NO:2和3(对于反向引物)、SEQ ID NO:5(对于非延伸辅助寡核苷酸)和SEQ ID NO:4(对于探针)。所述非延伸辅助寡核苷酸(SEQ ID NO:5)是53碱基对的未标记的寡核苷酸,其具有在它的3'-端处的聚腺苷酸尾巴,且被设计在结合HCV基因组的核区的反向引物中。

[0095] 对于这些HCV-阳性的人血浆样品,在图2中描绘了在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下HCV靶区域的预测二级结构,显示了-107.2 kcal/mol的 ΔG (CLC Genomics Workbench 6, Qiagen),且将结果显示在图1中,该图显示了实时PCR生长曲线。如在图1中所见,所述PCR反应在有非延伸辅助寡核苷酸存在下比不存在时更有效。

[0096] 这些结果证实,在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下,PCR反应是更稳健的和更有效的。也就是说,在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下的PCR产物的积累比不存在时提高。

[0097] 实施例2:通过实时PCR检测HCV基因型5

如在实施例1中,从与在实施例1中所用的样品不同的HCV-阳性的人血浆样品提取用于实时PCR测定的RNA样品。如在实施例1中,使用的试剂包括cobas® 6800/8800通用PCR

Master Mix,采用与cobas[®] 6800/8800一起使用的方案和条件,并使用TaqMan[®] 检测和定量技术。在50 μ l PCR反应中,终浓度如下:正向引物和反向引物在0.2-0.5 μ M的范围内;非延伸辅助寡核苷酸为0.20 μ M;且探针为0.12 μ M。据信,在0.10 μ M-0.50 μ M范围内的浓度的正向引物、反向引物和非延伸辅助寡核苷酸将是有效的。

[0098] 为了证实非延伸辅助寡核苷酸的作用,用以下两种实验条件一式两份地进行了使用HCV-阳性的人血浆样品(不同于在实施例1中采用的样品)的实时PCR测定:(1) 仅具有引物对和探针的实时PCR(即,没有非延伸辅助寡核苷酸);和(2) 具有引物对、非延伸辅助寡核苷酸和探针的实时PCR。用于实时PCR测定的对HCV基因型5特异性的寡核苷酸是SEQ ID NO:1(对于正向引物)、SEQ ID NO:2和3(对于反向引物)、SEQ ID NO:5(对于非延伸辅助寡核苷酸)和SEQ ID NO:4(对于探针)。如在实施例1中,所述非延伸辅助寡核苷酸(SEQ ID NO:5)是53碱基对的未标记的寡核苷酸,其具有在它的3'-端处的聚腺苷酸尾巴,且被设计在结合HCV基因组的反向引物中。

[0099] 对于该特定HCV-阳性的人血浆样品,在图4中描绘了在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下HCV靶区域的预测二级结构,显示了-98.6 kcal/mol的 Δ G,且将结果显示在图3中,该图显示了实时PCR生长曲线。如在图3中所见,所述PCR反应在有非延伸辅助寡核苷酸存在下比不存在时更有效。

[0100] 这些结果证实,在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下,PCR反应是更稳健的和更有效的。也就是说,在有所述非延伸辅助寡核苷酸存在下的PCR产物的积累比不存在时提高。

[0101] 总之,这两个实施例证实,在不同的样品中,本发明的非延伸辅助寡核苷酸表现出会降低靶核酸的二级结构的吉布斯自由能,这会促进靶核酸向引物的接近。这导致扩增效率的提高。因而,所述非延伸辅助寡核苷酸会增加扩增测定的灵敏度。

[0102] 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,而不脱离本发明的真实范围。例如,上述的所有技术和设备可以用在不同的组合中。

[0001]

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
Roche Molecular Systems, Inc.

<120> 用于提高核酸的扩增和检测/定量的效率的辅助寡核苷酸

<130> P33737-WO-KOE

<150> 62/370,049

<151> 2016-08-02

<160> 5

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<220>

<221> 经修饰的碱基

<222> (18)..(18)

<223> 叔丁基苄基-dC

<400> 1

tgggcagggt ggttgctc

18

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<220>

<221> 经修饰的碱基

<222> (25)..(25)

<223> 叔丁基苄基-dA

<400> 2

gttgcatagt ttaccccgtc ctcaa

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

[0002]

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<220>

<221> 经修饰的碱基

<222> (25)..(25)

<223> 叔丁基苄基-dA

<400> 3

gttgcatagt ttatcccgtc ctcaa

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 4

atcccgtctg taggcggccc cgttg

25

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 非延伸辅助寡核苷酸

<400> 5

gttgcatagt ttatcccgtc ttcaagaacc ttcacaccgt gtgcgaaaaa aaa

53

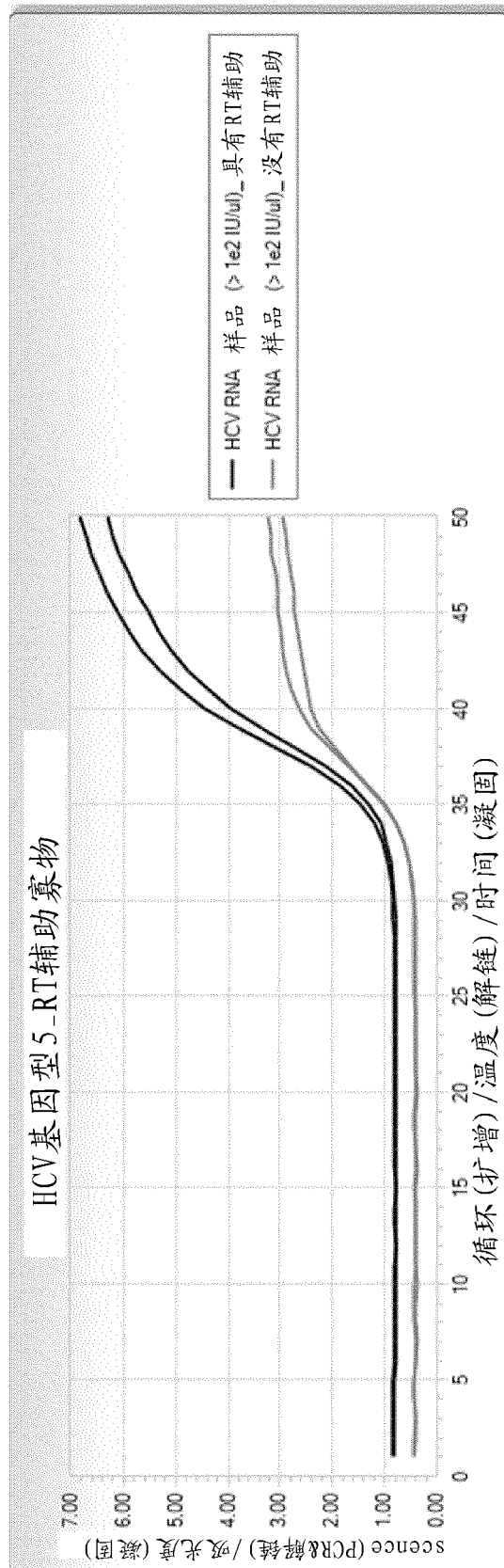


图 1

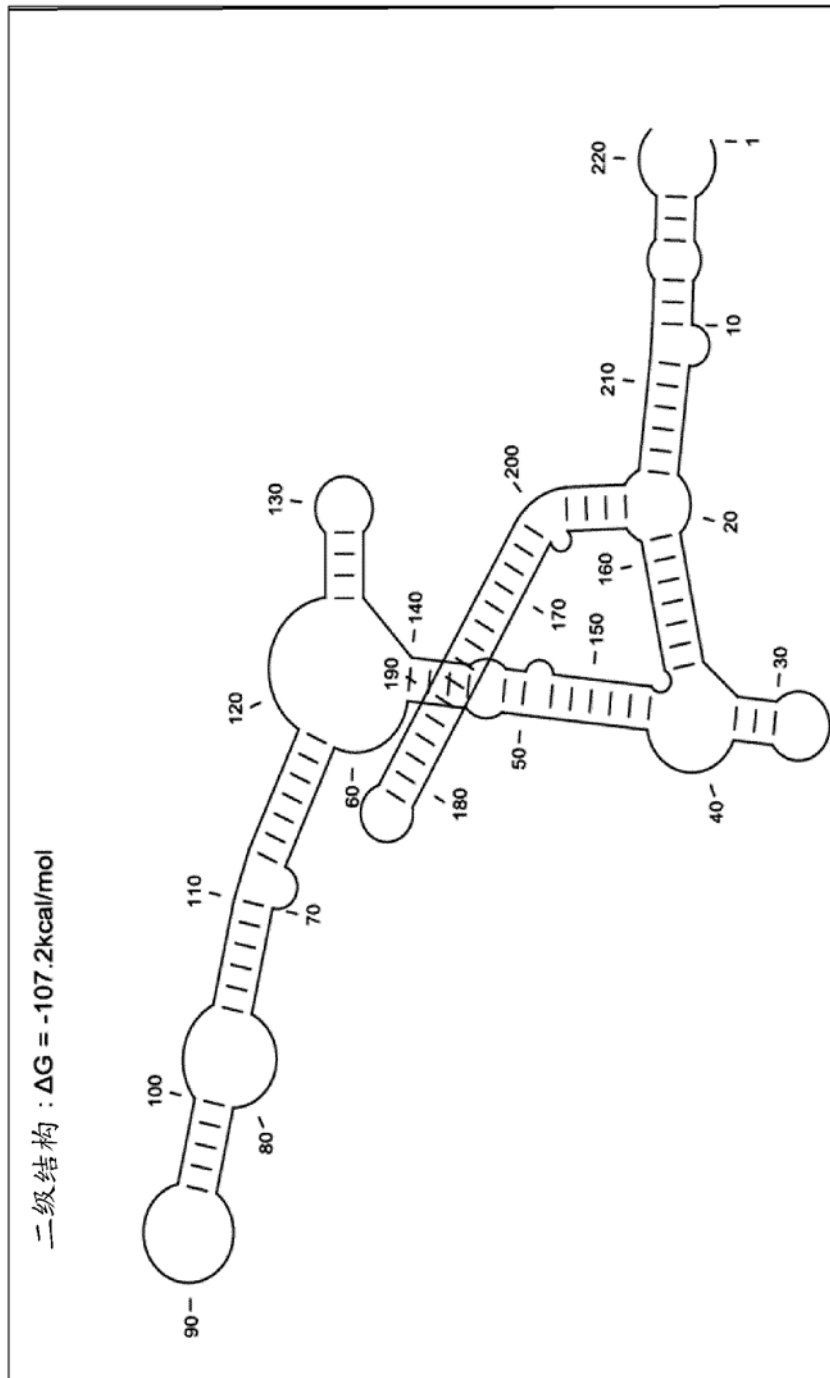


图 2

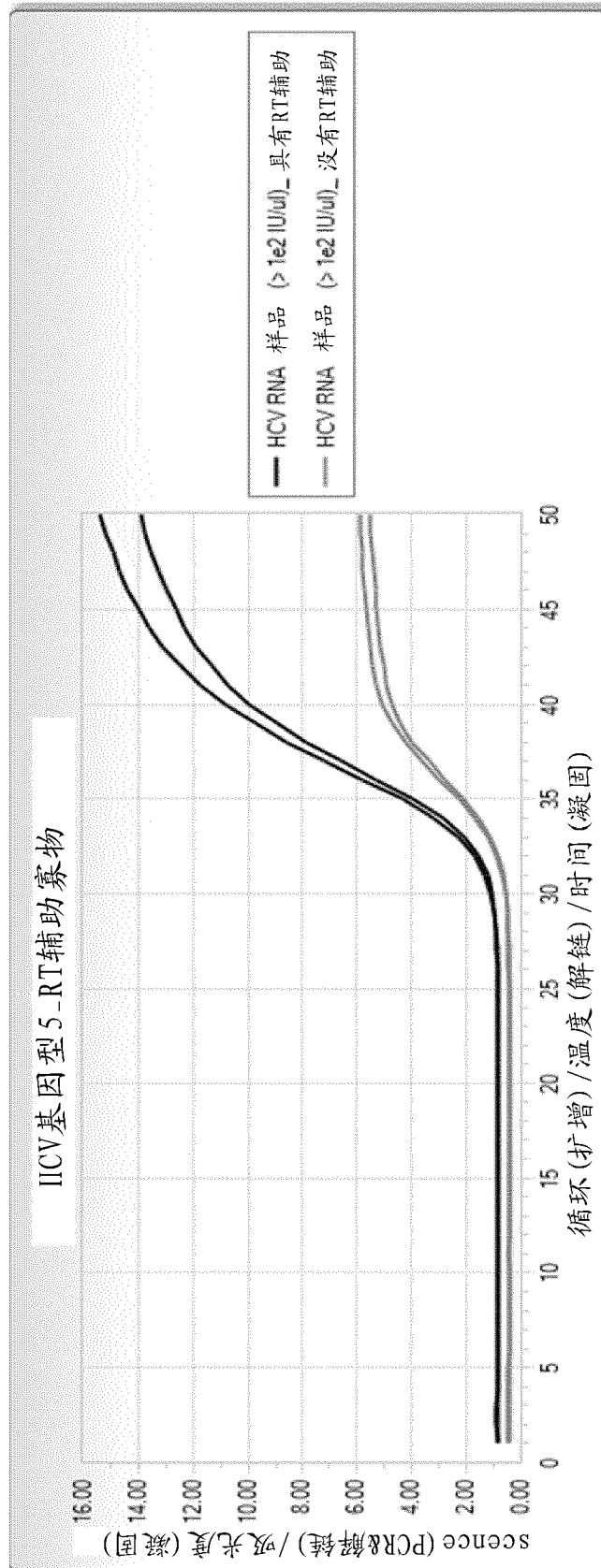


图 3

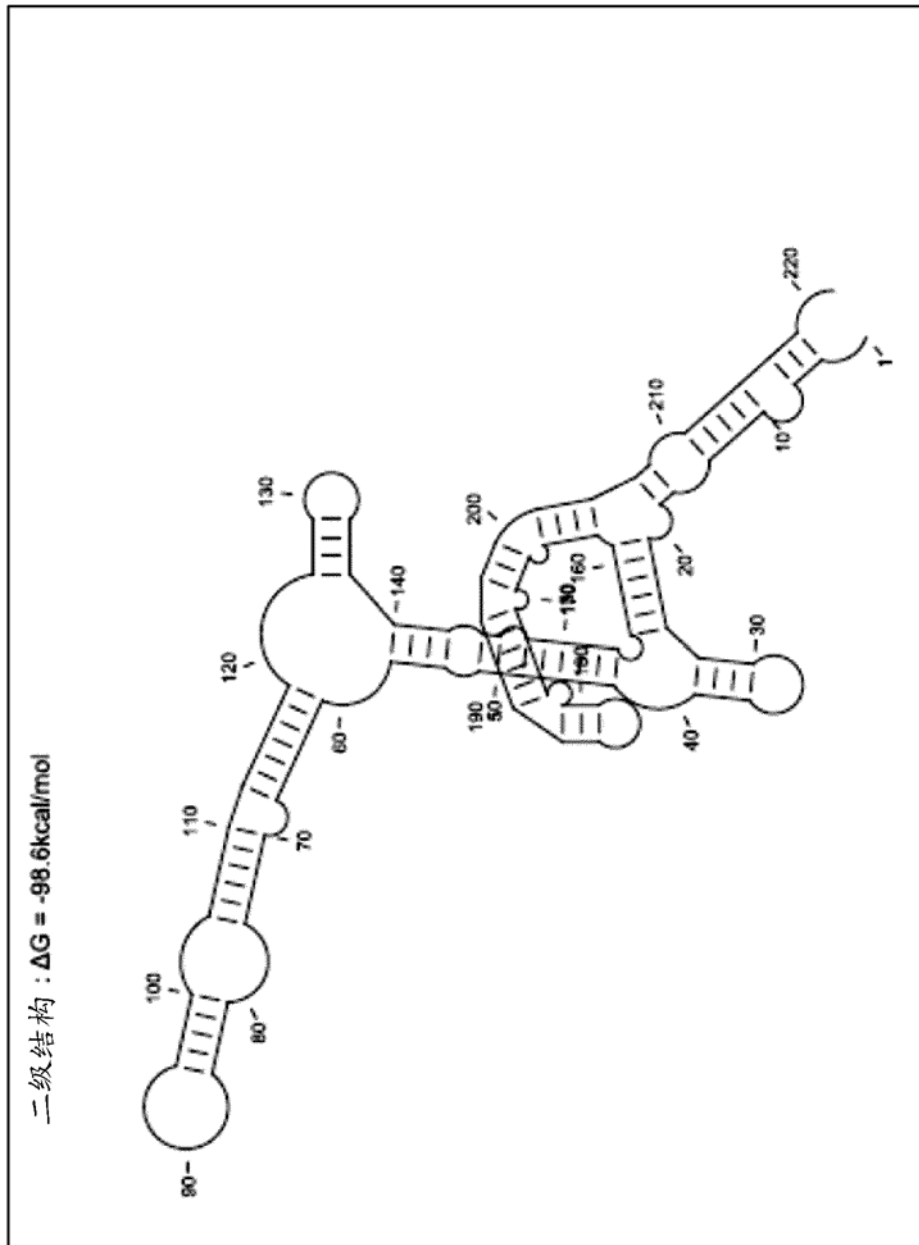


图 4