

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C07H 21/04



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99811114.7

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1167811C

[22] 申请日 1999.2.22 [21] 申请号 99811114.7

[30] 优先权

[32] 1998. 3. 5 [33] US [31] 60/076,899

[86] 国际申请 PCT/IB1999/000754 1999.2.22

[87] 国际公布 WO1999/045146 英 1999.9.10

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.4

[71] 专利权人 约翰逊及约翰逊研究有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 A·托德 C·J·富尔里

M·凯恩斯

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

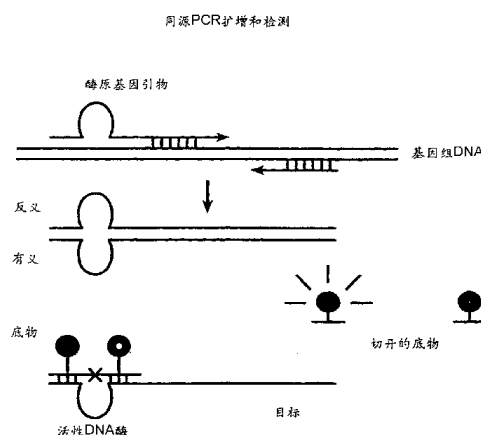
代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称 酶原性核酸的检测方法,以及相关分子和试剂盒

[57] 摘要

本申请提供了对样品中的目标核酸序列的检测和定量的方法,包括用引物和编码的,但本身是一催化性核酸序列的反义序列的酶原基因和样品接触,从而当目标存在时,产生单一扩增的核酸分子,其含有目标和催化分子的序列。本发明进一步提供了同时检测在样品中的多种目标核酸序列的存在与否的方法。最后,本发明还提供了实现上述方法的分子和试剂盒。



1. 一种检测分离的样品中目标核酸序列存在的方法，其特征在于，包括：
- (a)在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸具有活性的条件下，和样品
- 5 接触，使用
- (i)适合起始目标扩增的 DNA 引物，和
- (ii)编码催化性核酸分子，但本身是反义序列的 DNA 酶原，其中引物和酶原相互关联定位，从而在目标存在时，产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及
- 10 (b)测定催化性核酸活性，从而测定样品中的目标核酸序列的存在。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括步骤：定量测定从步骤(a)得到的样品中催化性核酸活性量，并将由此得到的活性量和已知标准比较，从而对目标核酸序列进行定量。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，引物和酶原基因在不同的 DNA
- 15 分子上，而引物起始的核酸扩增是滚环扩增。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，样品和两个 DNA 分子接触，每个分子都含有引物，至少一个分子含有酶原基因，其中引物在酶原基因的 3'端。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，在步骤(a)(ii)产生的单扩
- 20 增核酸分子进一步含有被共同位于扩增分子上的酶原基因编码的催化性核酸识别并顺式切开的核苷酸序列。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，酶原基因编码的催化性核酸是 10-23 DNA 酶，而在步骤(a)(i)中使用的 DNA 引物含有至少一个嘌呤核糖核苷酸残基，该残基作为被 10-23 DNA 酶识别并顺式切开的位点的 5'端。
- 25 7. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，至少有两个 DNA 分子同时含有引物和酶原基因。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目标核酸序列是 DNA 分子。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目标核酸序列是 RNA 分子，而步骤(a)进一步包括在用引物和酶原基因接触样品前，将目标核酸序列，若

存在，反转录成 DNA 的步骤。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，催化性核酸分子是核酶。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，催化性核酸分子是 DNA 酶。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，催化性核酸活性包括可检测的化学底物的修饰，该修饰选自磷酸二酯键的形成和切开，核酸连接和切开，卟啉金属化，和碳-碳、酯和胺键的形成。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，可检测的化学底物修饰是荧光标记的核酸分子的切开。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，荧光标记的核酸分子是 DNA/RNA 嵌合体。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，目标核酸序列来自选自人类、细菌、支原体和病毒的有机体。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，目标核酸序列来自人类。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，样品中的目标核酸序列的存在是遗传疾病。

18. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，样品是法医学样品。

19. 一种同时检测样品中多种目标核酸序列存在与否的方法，其特征在于，包括

(a) 在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸具有活性的条件下，和样品接触，使用

(i) 多个引物，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个适合起始该目标扩增的引物，和

(ii) 多个酶原基因，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子，但本身是反义序列的酶原基因，引物和酶原基因相互关联定位，从而当相应目标存在时，产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(b) 同时测定每个催化性核酸活性的存在与否，从而测定样品中的每个相应的目标核酸序列的存在。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，进一步包括步骤：定量测

定从步骤(a)得到的样品中每个催化性核酸活性,并将由此得到的每个活性量和已知标准比较,从而对每个目标核酸序列进行定量。

21. 一种 DNA 分子,其特征在于,含有引物和酶原基因,其中引物位于酶原基因的 3'端。

5 22. 如权利要求 1 或 19 所述的方法,其特征在于,核酸扩增可通过选自 PCR, SDA, 和 TMA 的方法进行。

23. 一种测定样品中目标核酸序列存在中使用的试剂盒,其特征在於,包括

(a) 适合起始目标扩增的引物;

10 (b) 编码催化性核酸序列,但本身是反义序列的酶原基因,其中引物和酶原基因相互关联定位,从而当目标存在时,产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子;以及

(c) 允许引物起始核酸扩增和催化性核酸具有活性的试剂。

24. 一种在测定样品中多种目标核酸序列存在与否中使用的试剂盒,其
15 特征在于,包括

(a) 多个引物,其中对于每一个被检测的目标,至少存在一个适合起始该目标扩增的引物;

(b) 多个酶原基因,其中对于每个要检测的目标,存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子,但本身是反义序列的酶原基因,其
20 中引物和酶原基因相互关联定位,从而当相应目标存在时,产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子;以及

(c) 允许引物起始核酸扩增和催化性核酸具有活性的试剂。

25. 如权利要求 23 或 24 所述的试剂盒,其特征在於,核酸扩增可通过选自 PCR, SDA, 和 TMA 的方法进行。

酶原性核酸的检测方法，以及相关分子和试剂盒

- 5 在本申请中引用了不同的出版物。这些出版物的内容在此申请中引用以供参考，以描述本发明涉及的更全面的技术领域。

发明领域

- 本发明涉及通过核酸扩增来检测和定量样品中的目标核酸分子的方法。在本方法中，产生一条含有催化性核酸和目标序列的单扩增子。催化性核酸
10 仅在目标存在时从它的反义的酶原性的前体中合成。

发明背景

- 体外核酸扩增的方法在遗传学、疾病诊断和法医学中有广泛应用。在过去的十年中，许多扩增已知核酸序列（“目标序列”）的技术已被描述。这些包括多聚酶链式反应（“PCR”）（1—7，41），链置换扩增法（“SDA”）（8）和转
15 录调节扩增（“TMA”）（9，10）（也作为自动维持序列复制（“SSR”）为人所知）。PCR 和 SDA 产生的扩增产物（“扩增子”）为 DNA，而 RNA 扩增子由 TMA 产生。这些方法产生的 DNA 或 RNA 扩增子可被用作和遗传疾病有关的核酸序列的标记物。

- 几个方法都可在封闭系统中，亦即，在单一的同源反应系统中同时扩增
20 和检测核酸序列。这些方法包括 Sunrise™ 引物（11），分子标记（12）和 Taqman™ 系统（13）。使用同源封闭试管形式比在扩增反应后，分别分析扩增子有几个优点。由于需要更少的操纵步骤，封闭系统方法更快、更简便。封闭系统减少了和从其它反应得到的扩增子的污染有关的假阳性的可能性。同源反应可以实时监控，而 0 时的信号可测量系统的背景信号。因此不需要另外的减少
25 背景信号的对照反应。信号强度的改变指示在样品中存在特异性的核酸序列的扩增。

 替换策略包括扩增报道基因的信号，而不是扩增目标核酸。分枝 DNA 测定法（14）通过使用二级报道分子（例如，碱性磷酸酶）扩增信号，而荧光相关光谱学（FCS）使用信号的电放大（15）。

采用其它的扩增技术，催化性核酸已在近年来被深入研究。作为治疗剂，用催化性核酸抑制基因功能的可能性在文献中被广泛讨论(16—22)。催化性RNA分子(“核酶”)已被显示能催化磷酸二酯键的形成和切开(16, 23)。用体外进化技术已发现其它能催化范围广泛得多的反应的核酸，包括核酸的切开
5 (21, 22, 24)和连接(25)，卟啉金属化(26)，和碳—碳(27)、酯(28)和胺(29)键的形成。

核酶已显示能切开RNA(16)和DNA(21)的分子。相似的，催化性DNA分子(“DNA酶”)也显示能切开RNA(17, 24)和DNA(22, 30)分子。催化性核酸能切开目标核酸底物，使该底物符合严紧序列要求。目标底物要和催化性核酸
10 的杂交区域互补，并在切割位点含有特异性的序列。切割位点的序列要求的例子包括：对一类DNA酶的嘌呤：嘧啶序列要求(“10—23”模型或“10—23 DNA酶”)(24)，和对锤头核酶的U：X序列要求，其中X可以是A，C或U，但不能是G(16)。

除了有治疗潜力外，催化性核酸分子还能用作基因诊断方法中的分子工
15 具。例如，核酶已在二阶段方法中用于促进信号放大(31—33)。在第一阶段中，测试样品和非活性的寡聚核苷酸接触。接触导致在样品含有目标序列时，“触发”RNA寡聚核苷酸的产生。在第二阶段中，触发RNA寡聚核苷酸诱导放大级联。该级联导致大量催化活性的报道核酶的产生，当它们被检测到时，指示在测试样品中存在目标序列。在过程中，目标序列本身不被扩增。更确切的，
20 仅报道信号被扩增。

总之，目标核酸扩增和允许的反应条件都是已知的。催化性核酸分子，和它们的活性的允许反应条件也是已知的。

然而，允许核酸扩增的同时过程和在单一反应内部环境中的催化性核酸活性的方法不存在。而且，目标扩增方法，其中扩增产物是含有目标和催化
25 性核酸分子序列的单核酸分子，不曾被施行过。最后，没有目标扩增方法曾使用催化性核酸分子的反义酶原性序列，它仅在目标序列存在时，才以它的“有义”，催化性形式扩增。

发明简介

本发明提供了检测样品中目标核酸序列存在的方法，其中包括

(a)在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸活性的条件下，和样品接触，使用

(i)适合起始目标扩增的 DNA 引物，和

(ii)编码催化性核酸分子，但本身是反义序列的 DNA 酶原，其中引物和酶原相互关联定位，从而在目标存在时，产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(b)测定催化性核酸活性，从而测定样品中的目标核酸序列的存在。

本发明还提供同时检测样品中多种目标核酸序列存在与否的方法，其中包括

(a) 在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸活性的条件下，和样品接触，使用

(i)多个引物，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个适合起始该目标扩增的引物，和

(ii)多个酶原基因，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子，但本身是反义序列的酶原基因，引物和酶原基因相互关联定位，从而当相应目标存在时，产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(b)同时测定每个催化性核酸活性的存在与否，从而测定样品中的每个相应的目标核酸序列的存在。

本发明还提供含有引物和酶原基因，其中引物位于酶原基因的 3'端的 DNA 分子。

本发明还进一步提供在测定样品中目标核酸序列存在中使用的试剂盒，其中包括

(a)适合起始目标扩增的引物；

(b)编码催化性核酸序列，但本身是反义序列的酶原基因，其中引物和酶原基因相互关联定位，从而当目标存在时，产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(c)允许引物起始核酸扩增和催化性核酸活性的试剂。

最后, 本发明提供在测定样品中多种目标核酸序列存在与否中使用的试剂盒, 其中包括

(a) 多个引物, 其中对于每一个被检测的目标, 至少存在一个适合起始该目标扩增的引物;

- 5 (b) 多个酶原基因, 其中对于每个要检测的目标, 存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子, 但本身是反义序列的酶原基因, 其中引物和酶原基因相互关联定位, 从而当相应目标存在时, 产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子; 以及

(c) 允许引物起始核酸扩增和催化性核酸活性的试剂。

10

附图简述

图 1 表示上述方法的流程。在此, 含有引物和酶原基因的核酸分子和含有目标序列的基因组 DNA 片段接触。这引起含有催化性核酸和目标的第二核酸分子产生。催化性核酸依次切开可检测的底物。

15

发明详述

定义

在本发明中, 某些术语被频繁使用, 因此有必要先如下定义。“催化性核酸分子”、“催化性核酸”和“催化性核酸序列”是相同的, 每个都表示 DNA 分子或含 DNA 的分子(也以“DNA 酶”在领域中公知), 或 RNA 或含 RNA 的分子
20 (也以“核酶”在领域中公知), 特异性识别不同底物和催化该底物的化学变化。DNA 酶和核酶中的核酸碱基可能是 A, C, G, T 和 U, 也可能是它们的衍生物。这些碱基的衍生物在领域内熟知, 并在参考文献 40 中列举。

目标核酸序列的“扩增”表示它的指数扩增(相对于线性扩增), 其中每个
25 个扩增循环使目标扩增子存在数比前一循环的增加一倍。指数扩增的方法包括, 但不限于, PCR, SDA 和 TMA。指数扩增和线性扩增不同, 在线性扩增中, 每个扩增循环以固定的数量相对于前一循环存在的目标扩增子的数目增长。

“报道底物”、“化学底物”和“底物”是相同的, 每个都表示任何可被催化性核酸分子识别并改造的任何分子。“目标”和“目标核酸序列”是

相同的，每个都表示需要注意的被本发明检测或测定的核酸序列，其中包括在本方法中当与之接触时和引物杂交的序列，可以是它的整个分子或它的部分。“引物”表示一段 DNA 或含 DNA 的核酸分子的短片断，它(i)在扩增条件下和要扩增的 DNA 或 RNA 序列退火，而(ii)通过多聚酶调节合成起始并自身物理延伸。最后，“酶原基因”可表示核酸序列，其包括有可被检测活性的催化性核酸分子的反义(亦即，互补)序列，而它的转录产物是催化性核酸分子。

本发明实施例

10 本发明提供了在样品中检测和定量所需的目标核酸序列迅速的和程序可变的方法。本方法的特别之处在于它同时进行在单一反应容器中的目标扩增和催化性核酸活性检测。而且，其独特之处在于扩增产物是含有目标和催化性核酸分子的序列的单核酸分子。最后，本方法是首次使用催化性核酸分子的反义、酶原性序列，其仅在目标序列存在的情况下，扩增它的“有义”、
15 催化性形式。

更特别的是，本发明提供检测样品中目标核酸序列存在的方法，其中包括

(a)在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸活性的条件下，和样品接触，使用

20 (i)适合起始目标扩增的 DNA 引物，和

(ii)编码催化性核酸分子，但本身是反义序列的 DNA 酶原基因，其中引物和酶原基因相互关联定位，从而在目标存在时，产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(b)测定催化性核酸活性，从而测定样品中的目标核酸序列的存在。

25 在一实施例中，本方法还包括步骤：定量测定从步骤(a)得到的样品中催化性核酸活性，并将由此得到的活性量和已知标准比较，从而对目标核酸序列进行定量。已知标准可以是任何用来定量的标准或对照。这些标准的例子包括(i)，已知反应动力学信息，以及(ii)用不含催化活性的样品获得的信号测量值，或预先测定的催化剂活性量。

在一实施例中，引物和酶原基因在不同的 DNA 分子上，而引物起始的核酸扩增是滚环扩增(已知的扩增方法)。在另一实施例中，至少两个 DNA 分子同时含引物和酶原基因。

在另一实施例中，样品和两个 DNA 分子接触，每个分子都含有引物，至少一个分子含有酶原基因，其中引物在酶原基因的 3'端。

在该实施例的一个形式中，该酶原基因编码的 DNA 酶识别并切开确实位于扩增核酸分子本身上的序列(亦即，顺式切开，相对于 DNA 酶切开在不同分子上的底物的反式切开)。更特别的是，单扩增核酸分子还含有一核苷酸序列，该核苷酸序列被共同位于扩增分子上的酶原基因编码的催化性核酸 DNA 酶识别并顺式切开。

在本方法的使用顺式 DNA 酶催化的切开的优选例中，酶原基因编码的 DNA 酶是 10-23 DNA 酶，而在本方法步骤(a)(i)中使用的 DNA 引物(亦即，“嵌合”引物)含有至少一个嘌呤核糖核苷酸残基，该残基作为在 10-23 DNA 酶识别并顺式切开的位点的 5'端。在嵌合引物中的该嘌呤核糖核苷酸残基是 10-23 DNA 酶切开所需的。因此，用该嵌合引物使 10-23 DNA 酶切割位点在 PCR 反应中产生。嵌合引物也包括，例如，作为 10-23 DNA 酶识别并顺式切开的位点的 3'端的核糖核苷酸残基。

在本发明中，包括引物和/或酶原基因的核酸分子也可包括另外的序列，例如和目标互补的序列。

在本发明中检测或定量的目标序列可以是任何核酸序列。在一实施例中，目标核酸序列是 DNA 分子。在另一实施例中，目标核酸序列是 RNA 分子，而步骤(a)进一步包括在用引物和酶原基因接触样品前，将目标 RNA 序列首先反转录成 DNA 的必须的步骤。

酶原基因编码的催化性核酸分子可以是核酶或 DNA 酶。在一实施例中，催化性核酸分子是核酶。在另一实施例中，催化性核酸分子是 DNA 酶。

在本方法中测量的催化性核酸活性可以是任何能同时(而且，可任选的，被测量的)，并在相同的核酸扩增反应环境中发生的活性。催化性核酸活性可包括，例如，可检测的化学底物的修饰，该修饰包括磷酸二酯键的形成和切开，核酸连接和切开，卟啉金属化，和碳-碳、酯和胺键的形成。在一实施

例中，可检测的化学底物修饰是荧光标记的核酸分子的切开，尤其是 DNA/RNA 嵌合体。

在优选例中，报道底物被切开，测量该切开是测量催化活性的手段。例如，切开底物的存在可在报道底物放射性标记的情况下，通过凝胶电泳后的
5 磷光显像监控。切开底物的存在也可通过在底物中掺入切割位点的相对侧的荧光/淬灭染色分子的分离导致的荧光的变化来监控。这些系统提供了可被实时监控的同类方法的机会。监控荧光变化的方法在本领域中是公知的。这些方法包括，例如，目视观察和用光谱荧光计监控。

目标核酸序列可来自任何有机体，样品可以是任何含有，或希望含有核
10 酸分子的组合物。在一实施例中，目标来自植物，或来自动物，例如，小鼠、鼠、狗、豚鼠、鼬、兔和灵长类。在另一实施例中，目标在从例如水或土的来源得到的样品中。在另一个实施例中，目标来自含有细菌、病毒或支原体的样品。

在优选例中，目标来自人类。本方法可用于各种目的，包括诊断，公共
15 卫生和法医学。

在一实施例中，本方法用于诊断目的。特别是，本发明能够用于诊断在一个体内的疾病，其特征是至少一条当没有疾病时不存在的目标核酸序列的存在。这样的疾病在本领域中公知，例如，癌症、囊性纤维变性，以及各种血红蛋白病。本发明也可用于诊断和感染因子有关的疾病，这样的疾病包括，
20 例如，AIDS、丙型肝炎和结核病。在优选例中，被诊断的个体是人类，疾病是癌症。

在另一实施例中，测试目标核酸分子存在或数量的样品是为公共卫生目的取得的样品。这样的样品的例子包括水、食物和土壤，可能含有有害的病原体，例如细菌、病毒和支原体。

25 在进一步的实施例中，测试目标核酸分子存在或数量的样品是法医学样品。这样的样品包括体液、组织和细胞，它们可从任何例如犯罪现场的任何来源获得。

本发明还提供同时检测样品中多种目标核酸序列的存在的方法，其中包括

(a) 在允许引物起始的核酸扩增和催化性核酸活性的条件下，和样品接触，使用

(i) 多个引物，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个适合起始该目标扩增的引物，和

- 5 (ii) 多个酶原基因，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子，但本身是反义序列的酶原基因，引物和酶原基因相互关联定位，从而当相应目标存在时，产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

- 10 (b) 同时测定每个催化性核酸活性的存在与否，从而测定样品中的每个相应的目标核酸序列的存在。

在一实施例中，同时检测多种目标的存在与否的方法还进一步包括定量测定从步骤(a)得到的样品中每个催化性核酸活性，并将由此得到的每个活性和已知标准比较，从而对每个目标核酸序列进行定量。可用本方法同时检测的多重目标的例子包括在参考文献 39 中。

- 15 本发明进一步提供含有引物和酶原基因的 DNA 分子，其中引物位于酶原基因的 3'端。该分子可依照本方法使用。

本发明还进一步提供在测定样品中目标核酸序列存在中使用的试剂盒，其中包括

- 20 (a) 适合起始目标扩增的引物；
(b) 编码催化性核酸序列，但本身是反义序列的酶原基因，其中引物和酶原基因相互关联定位，从而当目标存在时，产生含有目标和催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(c) 允许引物起始核酸扩增和催化性核酸活性的试剂。

- 25 最后，本发明提供在测定样品中多种目标核酸序列存在与否中使用的试剂盒，其中包括

(a) 多个引物，其中对于每一个被检测的目标，至少存在一个适合起始该目标扩增的引物；

(b) 多个酶原基因，其中对于每个要检测的目标，存在至少一个编码具有明显的可测定的活性的催化性核酸分子，但本身是反义序列的酶原基因，其

中引物和酶原基因相互关联定位，从而当相应目标存在时，产生含有目标和相应的催化性核酸分子序列的单扩增核酸分子；以及

(c) 允许引物起始核酸扩增和催化性核酸活性的试剂。

在一实施例中，本试剂盒进一步含有对分离从个体或样品得到的核酸分子样品有用的试剂。在本试剂盒中的组分可以从商业获得或参照本领域中公知的方法制备，如在下面的实验细节部分中例证的。另外，本试剂盒的组分可以是溶液的或适当冷冻干燥。在一实施例中，组分在一个盒，而在另一个实施例中，组分在不同的盒中。在优选例中，试剂盒进一步包括使用说明。

在本方法和试剂盒中，核酸扩增可通过本领域所知的任何适合的方法进行，尤其是从 PCR，SDA，和 TMA 中选择。

许多和本发明相关的方法是本领域的常规技术。这些包括：分离核酸分子的技术，包括例如，苯酚氯仿抽提、柱上的快裂解和捕获(34-38)；核酸分子检测和定量的方法；催化性核酸活性的检测和定量的方法；扩增核酸序列的方法；包括例如，PCR，SDA 和 TMA(也称为(SSR))(1-10, 41)；为扩增特定目标序列设计和制造引物的方法；以及测定是否催化性核酸分子切开扩增的核酸片断的方法，包括例如，聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光共振能量转移(FRET)(25, 31)。

本发明可通过参考下面的实验详述更好的理解，但那些本领域的熟练人员可容易的理解，特别详述的实验只是在其后的权利要求中更全面的叙述的本发明的例证。

实验详述

实施例 1

25 肿瘤细胞 DNA 中 K-*ras* 的检测

A. PCR 引物

三种 PCR 引物(5KID, 3K2Dz3 和 3K2)由 Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR, USA) 合成。5'PCR 引物(5KID)和人类 K-*ras* 基因互补。3'引物 3K2Dz3 是酶原基因 PCR 引物，其含有(a)含有和活性的 DNA 酶互补的催化性的无活性反义序

列的 5'区域, 以及(b)和人类 K-*ras* 基因互补的 3'区域。在用 5KID 和 3K2Dz3 进行 PCR 扩增时, 通过 5KID 延伸产生的扩增子含有掺入它们的 3'区域的 K-*ras* 序列和 DNA 酶的催化活性的有义拷贝。活性的 DNA 酶被设计用来切开 RNA/DNA 报道底物(Sub 1)。引物 3K2 是含有相同的掺入 3K2Dz3 的 K-*ras*-特异性序
5 列的对照引物。然而该引物不含酶原基因序列。PCR 引物的序列列于下文。下划线的序列和人类 K-*ras* 互补, 而斜体的序列是和活性 DNA 酶互补的非活性(反义)的序列。

5KID(5' K-*ras* 引物)

GGCCTGCTGAAAATGACTGAATA

10

3K2Dz3(3'K-*ras* 酶原基因引物)

GAGAACTGCAATTCGTTGTAGCTAGCCTTTCAGGACCCACGTCACAAAATGATTCTGA

3K2(3'K-*ras* 引物用于对照反应)

CGTCACAAAATGATTCTGA

15 B. 报道底物

报道底物(Sub 1)由 Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR, USA) 合成。Sub 1 是含有 RNA(粗体, 下划线)和 DNA 碱基的嵌合分子。它具有 3'磷酸基团, 防止在 PCR 中被 DNA 多聚酶延伸。Sub 1 通过标准技术(34)用 ³²P 在 5'末端标记。Sub 1 的序列在下列出。

20

Sub 1

GAGAACTGCAAUGUUTCAGGACCCA

C. 对照切开反应的 DNA 酶

DNA 酶 Dz3a 由 Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR, USA) 合成。该 DNA 酶被设计用来在用酶原基因引物 3K2Dz3 进行 PCR 扩增时, 在与产生的活性的 DNA
25 酶切开的相同序列处切开 Sub 1。Dz3a 的序列在下列出。

Dz3a

TCCTGAAAGGCTAGCTACAACGAATTGCAGT

D. 肿瘤细胞株的基因组 DNA 的制备

人类细胞株 K562 从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD) 获得。K562

是含有野生型 *K-ras* 序列的白血病细胞株。基因组 DNA 通过阳离子聚合物抽提制备(38)。

E. *K-ras* 基因的 PCR 扩增

从 K562 分离到的基因组 DNA 用 PCR 扩增。反应(A1 和 A2)含有基因组 DNA(500 纳克)、50pmole 的 5KID、1pmole 的 3K2Dz3、50fmole 的 ^{32}P 标记的 Sub 1、每种 dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP)以 100 μM 溶于 100mM 的 NaCl, 50mM 的 Tris(pH8.3, 25 $^{\circ}\text{C}$)和 8mM 的 MgCl_2 。将 6 单位的 *Taq* DNA 多聚酶(5 单位/微升; AmpliTaq, Perkin Elmer)和溶于 1.8 微升抗体稀释缓冲液(Clontech)的 2 微升 TaqStartTM 抗体(1.1 mg/ml, Clontech)混合。将 *Taq* DNA 多聚酶: TaqStartTM 抗体混合物室温培养 15 分钟, 然后加到 PCR 混合物中。总反应体积是 50 微升。负对照反应(B)含有所有的除基因组 DNA 以外的反应组分。第二个负对照反应(C)含有除 3K2Dz3, (用 1pmole 的 3K2 代替)以外的所有组分。正对照切开反应(D)含有 30pmole 的 Dz3a 加上所有的在反应 C 中存在的反应组分。反应被放在 GeneAmp PCR 系统 9600 (Perkin Elmer)中, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 分钟, 然后进行 92 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒和 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒的 20 个循环, 再进行 92 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒, 74 $^{\circ}\text{C}$ 1 秒和 40 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒的 20 个循环。

F. 切开的报道底物 Sub 1 的检测

每个反应的 3 微升份量不经后随操纵步骤, 在 16% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析。凝胶在磷光显像仪: 445 S1(Molecular Dynamics)上通过磷光显像观测。放射性标记的 25 碱基的 Sub 1 报道底物被切开, 从而在正对照切开反应 D 中产生一 13 碱基的放射性标记的片段。存在于 PCR 反应 A1 和 A2 的 13-碱基的片段含有基因组 DNA 和酶原基因引物 3K2Dz3, 表示用 PCR 对 *K-ras* 基因的成功扩增。在负对照反应 B(不含基因组 DNA)中, 只有 25 碱基片段是明显的, 表示在不存在目标 DNA 时未发生底物的切开。最后, 在负对照反应 C 中, 其中酶原基因引物被只含 *K-ras* 序列的引物所代替, 由于在该反应中未产生活性 DNA 酶, 底物不被切开。

实施例 2

荧光报道底物的切开

A. 报道底物

报道底物, SubCz2, 由 Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR, USA) 合成。SubCz2 的序列在下列出。SubCz2 是含有 RNA(在下用小写表示)和 DNA 核苷酸的嵌合分子。它具有 3'磷酸基团, 防止在 PCR 中被 DNA 多聚酶延伸。SubCz2 用一个和 5'核苷酸(粗体, 下划线)结合的 6-羧基氢化荧光素(“6-FAM”)部分以及一个和 RNA 碱基的 3'端的第一个“T”脱氧核糖核苷酸(粗体, 下划线)N, N, N', N'-四甲基-6-羧基罗丹明(“TAMRA”)部分合成。报道底物的切开可用 485 纳米(FAM 激发波长)激发, 在 530 纳米(FAM 放射波长)监控。

SubCz2

5'CCACTCGuATTAGCTGTATCGTCAAGCCACTC 3'

10 B. PCR 引物

两种 PCR 引物由 Bresatec Pty. Ltd. (Adelaide, SA, Australia) 或 Pacific Oligos Pty. Ltd. (Lismore, NSW, Australia) 合成。5'PCR 引物(5K49)和人类 K-ras 基因互补。3'引物(3K45Zc2)是含有(a) 含有和活性的 DNA 酶互补的催化性的无活性反义序列的 5'区域, 以及(b) 和人类 K-ras 基因互补的 3'区域。在用 5K49 和 3K45Zc2 进行 PCR 扩增时, 通过 5K49 延伸产生的扩增子含有掺入它们的 3'区域的 K-ras 序列和 DNA 酶的催化活性的有义拷贝。活性的 DNA 酶被设计用来切开 RNA/DNA 报道底物 SubCz2。PCR 引物的序列在下列出。下划线的部分和人类 K-ras 基因互补, 而粗体所示的序列是和活性 DNA 酶互补的非活性(反义)序列。

20 5K49(5'K-ras 引物)

5'CCTGCTGAAAATGACTGAATATAAA 3'

3K45Zc2(3'K-ras 酶原基因引物)

5'CCACTCTCGTTGTAGCTAGCCTATTAGCTGTATCGTCAAGCCACTCTTGC 3'

25 C. 肿瘤细胞株的基因组 DNA 的制备

人类细胞株 K562 从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)获得。K562 是含有野生型 K-ras 序列的白血病细胞株。基因组 DNA 通过阳离子聚合物抽提制备(38)。

D. K-ras 基因的 PCR 扩增

从 K562 分离到的基因组 DNA 用 PCR 扩增。反应含有 20pmole 的 5K49、3pmole 的 3K45Zc2、10pmole 的 SubCz2、8mM 的 $MgCl_2$ ，每种 100 μ M 的 dATP, dCTP, dTTP 和 dGTP, 以及 1x 缓冲液 (75mM 含 10mMTris pH8.3, 25 $^{\circ}$ C 的 KCl)。所有 PCR 用的溶液用 DEPC 处理的水配制。3 单位的 *Taq* DNA 多聚酶 (5 单位/微升 AmpliTaq, Perkin Elmer) 和 TaqStartTM 抗体 (Clontech) 混合，得到最终的 *Taq* DNA 多聚酶：TaqStartTM 抗体的摩尔比率为 1: 10。*Taq* DNA 多聚酶：TaqStartTM 抗体混合物室温下培养 15 分钟，然后加入 PCR 混合物到。使总反应体积是 50 微升。建立复制反应，其中含 500 纳克的 K562 基因组 DNA。对照反应含有除基因组 DNA 以外的反应组分。反应被放在 ABI Prism7700 序列检测系统，并在 40 $^{\circ}$ C 培养 1 分钟 (提供阅读的基线)，94 $^{\circ}$ C 变性 3 分钟，然后进行 70 $^{\circ}$ C 1 分钟，每循环降低 1 $^{\circ}$ C，再在 94 $^{\circ}$ C 培养 5 秒的 20 个循环。然后再进行 40 $^{\circ}$ C 1 分钟，94 $^{\circ}$ C 培养 5 秒钟的 50 个循环。

荧光通过 ABI Prism7700 序列检测系统在 PCR 退火/延伸阶段测量。有基因组 DNA 的反应显示 530 纳米处的 FAM 荧光比在对照反应中观察到的荧光增加。该荧光增加用于监控 PCR 中 K-*ras* 扩增子的聚集。这些结果肯定了酶原基因 PCR 可被用来促进同类扩增和简单荧光形式的实时检测。

实施例 3

使用酶原基因来辨别变异等位基因：K-*ras* 密码子 12 上的变异的检测

20 A. 策略

PCR 用的酶原基因引物也可用来分析点突变。在本实施例中，酶原基因引物在 PCR 中促进活性 DNA 酶的合成。这些 DNA 酶被设计成仅在它们的杂交臂和 K-*ras* 中的密码子 12 的位点 1 完全互补的适合才顺式切开 PCR 扩增子。Walder, 等 (41) 已指出 *Taq* DNA 多聚酶能延伸含有一或二个 3' 末端核糖残基的 DNA/RNA 嵌合引物。这些嵌合引物在此用于产生作为 10-23 DNA 酶的底物的 PCR 扩增子。

PCR 用 5'DNA/RNA 嵌合引物 (5K42r) 和 3'酶原基因引物 (3K42Dz2) 扩增一段 K-*ras* 区域。5K42r 和与密码子 12 相邻的 K-*ras* 序列杂交，并含有形成 DNA 酶切开区域的嘌呤：嘧啶残基。酶原基因引物 3K42Dz2 有和 K-*ras* 互补的 3'

区域, 以及含有 DNA 酶反义的 5'区域。酶原基因引物本身无固有的催化活性, 但当和 5K42r 一起使用时, 它促进含有 (a) 靠近它们的 5'末端的 DNA 酶切开位点和 (b) 3'末端的活性 (有义) DNA 酶的扩增子的产生。该 DNA 酶被设计成顺式切开扩增子的 5'末端。DNA 酶的 5'臂和密码子 12 的野生型序列完全互补。K-*ras* 密码子 12 的突变, 导致 5'DNA 酶臂的错配。该突变可用 DNA 酶切开的效率的显著减少来预测。

B. 引物序列

5'嵌合引物 5K42r

(大写—脱氧核糖核苷酸残基; 小写—核糖核苷酸残基)

10 5' TATAAACTTGTGGTAGTTGGAgcT 3'

3'酶原基因引物 3K42Dz2

(粗体部分和 10: 23 催化核心互补)

15 5' ACTTGTGGTAGTTGGATCGTTGTAGCTAGCCCTGGTGGCAGCTGTATCGTCAAGGCACTC 3'
引物由 Pacific Oligos Pty. Ltd. (Lismore, NSW, Australia) 或 Oligos Etc., Inc. (Wilsonville, OR, USA) 合成。5'引物, 5K42r, 用 $g^{-32}P$ 在 5'末端标记, 通过将 25 微升的 20 μ M 引物和 2.5 微升多核苷酸激酶 (10x10³U/ml, 无 3'磷酸酶, Boehringer Mannheim), 2.5 μ l 的 rRNasin (40 U/ μ l 重组 rRNasin®, 核糖核酸酶抑制子, Promega), 5 μ l 多核苷酸激酶缓冲液 (Boehringer Mannheim), 10 μ l $g^{-32}P$ 5'-三磷酸腺苷 (2.5 μ M, Stable Lable GoldTM, Bresatec) 和 5 微升 DEPC 水一起在 37°C 培养 30 分钟。

C. K-*ras* DNA 模板

含有 K-*ras* 外显子 1 序列的 pUC 18 质粒载体, 可以是野生型 (GGT) 或密码子 12 突变 (CGT 或 AGT), 用作 PCR 的 DNA 模板。

25 D. 酶原基因 PCR 扩增和反应合成的 DNA 酶切开

PCR 混合物含有 0.2pg/ μ l 的 K-*ras* 质粒 DNA, 10pmole 的 $g^{-32}P$ —标记的 5K42r, 2pmole 的 3K42Dz2, 1mM DTT, 8mM 的 $MgCl_2$, 100 μ M 的每种 dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.4U/ μ l rRNasin®, 和 1x 缓冲液 (100mM NaCl 和 50mM Tris pH8.3, 25°C)。为每个 DNA 模板建立复制反应。将 6 个单位的 *Taq* DNA 多聚酶 (5 单位/ μ l AmpliTaq, Perkin-Elmer) 和 TaqStartTM 抗体 (Clontech) 混合, 以

得到 *Taq* DNA 多聚酶: *TaqStart*[™] 抗体最终摩尔比率 1: 5。将 *Taq* DNA 多聚酶: *TaqStart*[™] 抗体混合物室温培养 15 分钟, 加入到 PCR 混合物中。总反应体积是 50 微升。反应置于 GeneAmp PCR 9600(Perkin-Elmer) 中, 96°C 变性 2 分钟, 然后进行 60°C 1 分钟, 94°C 处理 20 秒的 30 个循环。然后反应进一步

5 进行 50°C 1 分钟, 94°C 处理 20 秒的 10 个循环。

将每个反应的 2.5 微升份和 2.5 微升的加样染料 (97.5% 甲酰胺, 0.1% 二甲苯胺, 0.1% 溴酚蓝和 0.01M EDTA) 混合。75°C 培养 2 分钟, 然后立刻加入预温的 16% 变性 (尿素) 丙烯酰胺凝胶中。凝胶电泳大约 1 小时。PCR 产物和切开的片段用分子动态荧光显像仪 445 S1 扫描凝胶显像。

10 在凝胶上可见数条条带 (数据未显示)。片段从迁移最慢到最快 (亦即, 从胶起始端到底部) 依次为 (a) PCR 扩增子 (成双移动), (b) 未结合的引物和 (c) 切开的 PCR 扩增子。由在 5' 引物中的核糖核苷酸残基的背景水解产生的少量的两种片段, 也在引物和切开的扩增子间可见, 和切开的扩增子平行移动。在所有的反应中, PCR 产物和未结合的引物都可见。含有密码子 12 野生型 (亦即, 那些和 DNA 酶完全互补者) 的模板 DNA 的反应含有切开的扩增子。含有密码子 12

15 突变的模板 DNA (亦即, 那些和 DNA 酶错配者) 的反应不含切开的扩增子。在这些反应的凝胶中只有该位置的低水平的背景水解产物可见。

下列的序列是密码子 12 位点 1 (下划线) 的野生型扩增子的一个构型的显示, 其中 DNA 酶 (粗体) 顺式杂交。

20

5' TATAAACTTGTGGTAGTTGGAgcTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGC

C

3' TGAACACCATCAACCT GACCACCGTCGACATAGCAGTT

A G

25

G G

C C

A T

A A

C G

30

A T C

以本发明为基础, 使用引物设计的常规方法, 导致 DNA 酶的产生的酶原基因引物可容易的被设计, 用于特异性的切开突变的 K-ras 序列。

参考文献

1. 美国专利号 4, 683, 202。
2. 美国专利号 4, 683, 195。
3. 美国专利号 4, 000, 159。
- 5 4. 美国专利号 4, 965, 188。
5. 美国专利号 5, 176, 995。
6. F.F.Chehab,等。(1987) *自然科学杂志* 329: 293—294。
7. R.K.Saiki,等。(1985) *科学杂志* 230: 1350—1354。
8. Walker,G.T.等。(1992)链置换扩增——等温体外 DNA 扩增技术。 *核酸*
- 10 *研究* 20: 1691。
9. Jonas,V.,等。(1993)通过 rRNA 扩增直接从痰液沉淀物检测和识别结核(分枝)杆菌。 *临床微生物学杂志* 31: 2410—2416。
10. Fahy,E.,等。(1991)自动维持序列复制(3SR): PCR 替代的等温、转录基础的扩增。 *PCR 方法应用* 1:25-33。
- 15 11. Nazarenko,I.A.,等。(1997)能量传递为基础的扩增和检测 DNA 的密封试管形式。 *核酸研究* 25: 2516—2521。
12. Tyagi,S.和 Kramer,F.R.(1996) 分子标记: 杂交荧光探针 *自然科学杂志* 生物技术 14:303-308。
13. Lee,L.G.,Connell,C.R.和 Bloch,W.(1993)用荧光探针通过切口平移 PCR
- 20 进行等位基因识别。 *核酸研究* 21: 3761—3766。
14. Urdea,M.(1993)用于直接和定量检测 CMV, HBV, HCV 和 HIV 的分枝 DNA(bDNA)的合成和鉴定。 *临床化学* 39:725-726。
15. Eigen,M.和 Rigler,R.(1994)单分子分类: 诊断和进化生物技术的应用。 *PNAS* 91: 5740—5747。
- 25 16. Perriman,R.和 Gerlach,W.L.(1992)对锤头核酶的延伸目标位点的特异性。 *基因杂志* 113: 157—163。
17. Breaker,R.R.和 Joyce,G.(1994)切开 RNA 的 DNA 酶。 *化学和生物学* 1: 223—229。
18. Koizumi,M.,等.(1989) 识别 RNA 中单一碱基突变的 RNA 酶的设计。
- 30 *核酸研究* 17: 7059—7069。
19. E.Otsuka 和 M.Koizumi,日本专利号 4, 235, 919。
20. Kashani-Sabet,M,等(1992)通过抗-ras 核酶逆转恶性肿瘤 *反义研究和*

进展 2: 3—15。

21. Raillard, S. A. 和 Joyce, G. F. (1996) 用 DNA 切开核酶定位 HIV-1 cDNA 中的目标位点。 *生物化学* 35:11693-11701。

22. Carmi, N., 等. (1996) 自切开的 DNA 的体外筛选。 *化学和生物学* 3: 1039
5 —1049。

23. Komatsu, Y., Koizumi, M., Sekiguchi, A. 和 Ohtsuka, E. (1993) 由发夹核酶催化的交叉连接和交换反应。 *核酸研究* 21: 185—190。

24. Santoro, S. W. 和 Joyce, G. (1997) 通用的目的 RNA-一切开 DNA 酶。 *PNAS* 94: 4262—4266。

10 25. Cuenoud, B. 和 Szostak, J. W. (1995) 具有 DNA 连接酶活性的 DNA 金属酶。 *自然科学杂志* 375:611-614。

26. Li, Y. 和 Sen, D. A. (1996) 卟啉金属化的催化 DNA。 *Nature Struct. Biol.* 3:734-747。

27. Tarasow, T. M., Tarasow, S. L. 和 Eaton, B. E. (1997) RNA-催化的碳-碳
15 键形成。 *自然科学杂志* 389: 54—57。

28. Illangasekare, M., Sanchez, Nickles, T., 和 Yarus, M. (1995) RNA 催化的
的酰胺基-RNA 合成。 *科学杂志* 267:643-647。

29. Lohse, P. A. 和 Szostak, J. W. (1996) 核酶催化的氨基酸转移反应。 *自然科学杂志* 381:442-444。

20 30. Breaker, R. R. DNA 酶 (1997) *自然科学杂志 生物技术* 15:427431。

31. PCT 国际出版号 WO 94/29481。

32. PCT 国际出版号 WO 96/17087。

33. PCT 国际出版号 WO 96/27026。

34. *Promega 流程和应用指南*。 Titus, D. E. (Ed) Promega 公司 (1991)。

25 35. Kramvis, A., Bukofzer, S. 和 Kew (1996) 用 QIAamp 血液试剂盒, Genereleaser, 和酚-氯仿方法从血清中得到的乙型肝炎病毒 DNA 抽提物的比较。 *临床微生物学杂志* 34: 2731—2733。

36. Yong, S. L., Thomas, R. J. S. 和 Phillips, W. A. (1995) 从固体组织中单步骤直接 PCR 扩增。 *核酸研究* 23:1640。

30 37. Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. (1989) *分子克隆: 实验室手册*。第二版, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press

38. 美国专利号 5, 582, 988。

-
39. PCT 国际出版号 WO 96/32500。
 40. PCR 系统, 试剂和耗材。Perkin Elmer 目录 1996—1997。Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA。
 41. Walder, R. Y., Hayes, J. R. 和 Walder J. A. (1993) 使用含有 3'-末端核糖残基的 PCR 引物防止扩增序列的交叉污染。核酸研究 21(18):4339-4343。

图 1

