



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101978071 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200880122761. 7

(72) 发明人 N·勒纳 P·埃尔巴彻

(22) 申请日 2008. 09. 12

(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

(30) 优先权数据

代理人 罗菊华

07025148. 3 2007. 12. 27 EP

61/009, 145 2007. 12. 27 US

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/002789 2008. 09. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/083763 EN 2009. 07. 09

(71) 申请人 聚加转染公司

地址 法国伊尔基希

申请人 国家科研中心

斯特拉斯堡大学

权利要求书 2 页 说明书 13 页 序列表 6 页

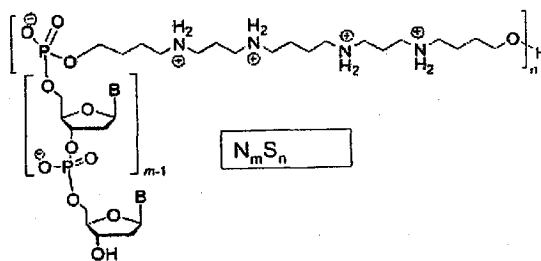
附图 8 页 按照条约第19条的修改 2 页

(54) 发明名称

用于杂交核酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过与寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物杂交来操作、分离、检测或扩增样品中的靶核酸的方法,其包括使所述核酸与寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物反应,所述缀合物包含至少直接地或通过连接体连接在一起的  $A_i$  和  $B_j$ , 其中,  $A_i$  是  $i$  聚体寡核苷酸,  $i = 3$  至  $50$ , 其中  $A_i$  是具有天然或非天然发生的核碱基和 / 或戊呋喃糖基和 / 或天然磷酸二酯键的寡聚体, 其任选地包含标记物基团。  $B_j$  是  $j$  聚体有机寡聚阳离子部分,  $j = 1$  至  $50$ , 其中  $B$  是  $-HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$ , 其中  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  是相同或不同的低级亚烃基, 当  $n$  大于  $1$  时,  $NH-R_2$  部分是相同的或不同的;  $HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$ , 其中  $R_1$  和  $R_3$  是相同或不同的低级亚烃基,  $X$  是腐胺、亚精胺或精胺残基。



1. 通过与寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物杂交来操作、分离、检测或扩增样品中的靶核酸的方法,其包括让所述核酸与寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物反应,所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物包含至少直接地或通过连接体基团连接在一起的  $A_i$  和  $B_j$  部分

其中

.  $A_i$  是  $i$  聚体寡核苷酸,  $i = 3$  至  $50$ , 其中  $A_i$  是具有天然或非天然发生的核碱基和 / 或戊呋喃糖基和 / 或天然磷酸二酯键的寡聚体, 其任选地包含标记物基团

.  $B_j$  是  $j$  聚体有机寡聚阳离子部分,  $j = 1$  至  $50$ , 其中  $B$  是

$-HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$ , 其中  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  是相同的或不同的低级亚烷基, 当  $n$  大于  $1$  时,  $NH-R_2$  部分是相同的或不同的;

$-HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$ , 其中  $R_1$  和  $R_3$  是相同或不同的低级亚烷基, 并且  $X$  是腐胺、亚精胺或精胺残基。

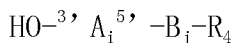
2. 权利要求 1 的方法, 其中  $A_i$  选自脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和非天然发生的核碱基例如锁 (LNA) 核苷酸、PNA 以及它们的化学修饰物或取代物例如硫代磷酸酯、 $2'$  - 氟或  $2'$  - 烷氧基。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中  $A_i$  包含选自生色团 / 荧光团和 / 或猝灭基团的标记物基团, 或选自氨基或巯基修饰剂、间隔子基团、生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、磷酸基团或糖的化学部分。

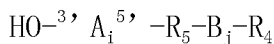
4. 权利要求 1 至 3 的任一项的方法, 其中游离  $-OH$  基团存在于  $A_i$  的位点  $3'$  上。

5. 权利要求 4 的方法, 其中所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物具有

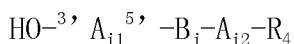
结构 I



或结构 II



或结构 III



其中

$-A_{i1}$  和  $A_{i2}$  是相同的或不同的, 且如上文中对于  $A_i$  所定义;  $A_{i2}$  以  $3'$  至  $5'$  或  $5'$  至  $3'$  方向排列;

$-R_4$  是 H 或连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、糖或磷酸基团;

$-R_5$ , 与 H、 $A_i$  和  $B_j$  不同, 是  $A_i$  与  $B_j$  之间的化学上稳定的或可切割的连接体。

6. 权利要求 4 或 5 的方法, 其中所述分子结合靶核酸并且是 DNA 或 RNA 聚合酶的底物。

7. 权利要求 5 或 6 的方法, 其还包括步骤:

- 将结构 I、II 或 III 的分子例如上文权利要求 5 中定义分子与靶核酸分子在允许所述分子与所述靶核酸分子杂交的条件下一同温育, 和

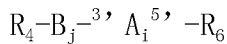
- 以所述靶核酸分子作为模板延伸所述分子。

8. 权利要求 5 至 7 的任一项的方法, 其通过使用至少一个结构 I、II 或 III 的分子允许进行核酸扩增。

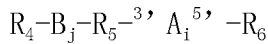
9. 权利要求 4 至 8 的任一项的方法, 其中所述分子用于逆转录。

10. 权利要求 1 至 3 的任一项的方法,其中  $A_i$  的位点 3' 上的 -OH 基团被封闭。

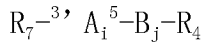
11. 权利要求 10 的方法,其中所述寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物具有结构IV



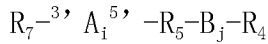
或结构V



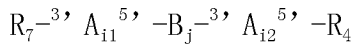
或结构VI



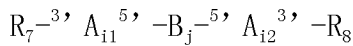
或结构VII



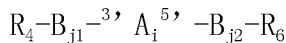
或结构VIII



或结构IX



或结构X



其中

- $A_{i1}$  和  $A_{i2}$  相同或不同,且如上文中对于  $A_i$  所定义;

- $B_{j1}$  和  $B_{j2}$  相同或不同,且如上文中对于  $B_j$  所定义;

- $R_4$  和  $R_6$  是相同的或不同的,  $R_4$  如上文中所定义,且  $R_6$  例如上文中对于  $R_4$  所定义,和

- $R_7$  和  $R_8$  是相同的或不同的,它们与 H 不同,并且选自连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、磷酸基团或糖。

12. 权利要求 10 或 11 的方法,其中所述分子用于在包含 DNA 或 RNA 聚合酶的测定中检测靶核酸。

13. 权利要求 10 至 12 的任一项的方法,其用于检测靶核酸,包括步骤:

- 将所述靶核酸与结构IV至X的探针例如上文中定义的探针在 RNA 或 DNA 聚合酶存在的情况下,在允许所述探针与所述靶核酸分子杂交的条件下一同温育;和

- 检测所述杂交。

14. 权利要求 10 至 13 的任一项的方法,其中所述分子在扩增测定例如实时 PCR 中用作探针。

15. 权利要求 10 或 11 的方法,其中所述分子用作夹钳以抑制靶核酸的检测或扩增。

16. 权利要求 1 至 5、10 或 11 的任一项的方法,其通过使用至少一个结构 I 至 X 的分子允许进行靶核酸操作,例如纯化、捕获和修饰所述靶核酸。

17. 权利要求 1 至 5、10 或 11 的任一项的方法,其中至少一个结构 I 至 X 的分子用于检测靶核酸。

18. 权利要求 1 至 5、10 或 11 的任一项的方法,其中至少一个结构 I 至 X 的分子用于区分野生型和突变型靶核酸。

## 用于杂交核酸的方法

[0001] 本发明涉及核酸与用于操作、分离、检测或扩增核酸的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物 (oligonucleotide-oligocation conjugate) 的杂交, 以及其在分子生物学和诊断领域中的应用。

[0002] 基于核酸的技术广泛用于细胞和分子研究以及用于诊断。该技术依赖于合成的寡核苷酸与其互补核酸链之间的序列识别。亲和力和特异性是确定任何基于核酸杂交的测定的效率的两个主要特征。

[0003] 已开发了不同的方法来改进核酸杂交。其中, 一个方法是减少带负电荷的核酸链之间的静电排斥。最近, 包括将阳离子基团接枝至寡核苷酸且完全基于用于寡核苷酸合成的亚磷酰胺化学的自动化固相合成公开于 WO 2007/069092 中。所得的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物经显示通过减少链间磷酸排斥来稳定与短互补序列的杂交 (Pons 等人, 2006)。

[0004] 如同海底捞针一样, 提高复杂核酸生物样品例如总基因组中的独特序列的特异性检测是更加困难的挑战。在这样的情况下, 预期寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物的阳离子部分非特异性结合基因组 DNA 的磷酸基团, 从而减少对靶向的序列的特异性识别。当聚阳离子是聚胺时, 该问题可变得更加尖锐, 如 WO 2007/069092 和 (Pons 等人, 2006) 中所举例说明的。事实上, 聚胺例如精胺或亚精胺天然地与原核和真核细胞中的基因组 DNA 相互作用 (综述于 Tabor 和 Tabor, 1984; Pegg 等人, 1986)。此外, 已确定, 由于控制核酸碱基配对相互作用的机制, 结合亲和力与序列特异性通常负相关 (Demidov 和 Frank-Kamenetskii, 2004)。因此, 预期用于靶向整个基因组中的特定序列的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物耐受错配, 从而导致特异性的降低。

[0005] 本发明公开了预料之外的发现, 即从 WO 2007/069092 中描述的分子中特异性选择的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物对于它们的靶序列显示了非常高的亲和力和令人惊讶的严格特异性, 从而导致基于杂交的方法的总体改进。特别地显示, 所述寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物改善了聚合酶链式反应。

[0006] 有利地, 与标准寡核苷酸相比, 所述寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物作为引物和探针特别有效。“标准寡核苷酸”是指包含天然核碱基 (nucleobase) 的未修饰的寡核苷酸。

[0007] 因此, 本发明的目的是提供杂交方法, 其基于靶向性核酸使用特定寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物。

[0008] 本发明的另一个目的涉及寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物作为引物或探针的用途。

[0009] 根据另一个目的, 本发明涉及所述缀合物的生物学应用。

[0010] 通过与寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物杂交来检测、分离、扩增或操作样品中的靶核酸的方法包括使所述核酸与寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物反应, 所述缀合物包含至少直接地或通过连接体连接在一起的  $A_i$  和  $B_j$  部分,

[0011] 其中

[0012]  $A_i$  是  $i$  聚体寡核苷酸,  $i = 3$  至  $50$ , 其中  $A_i$  是具有天然发生的或非天然发生的核碱基和 / 或戊呋喃糖基 (pentafuranosyl) 和 / 或天然磷酸二酯键的寡聚体, 其任选地包含标记物基团

[0013]  $B_j$  是  $j$  聚体有机寡聚阳离子部分,  $j = 1$  至 50, 其中  $B$  是

[0014]  $-HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$ , 其中  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  是相同或不同的低级亚烷基 (alkylene), 当  $n$  大于 1 时,  $NH-R_2$  部分是相同的或不同的;

[0015]  $-HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$ , 其中  $R_1$  和  $R_3$  是相同或不同的低级亚烷基,  $X$  是腐胺、亚精胺或精胺残基;

[0016] “低级亚烷基”, 如说明书和权利要求中所使用的, 是指任选地经取代的 C1-C6 线性、分支或环状亚烷基。

[0017]  $A_i$  选自脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和非天然发生的核碱基例如锁 (LNA) 核苷酸、PNA 以及它们的化学修饰物或取代物例如硫代磷酸酯 (phosphorothioate) (也称为硫代磷酸酯 (thiophosphate))、2' - 氟或 2' - O- 烷基。

[0018]  $A_i$  可包含生色团 / 荧光团和 / 或猝灭基团, 或化学部分例如氨基或巯基修饰剂、间隔子基团 (spacer group)、生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、磷酸基团或糖。

[0019] 在第一实施方案中, 游离 -OH 存在于  $A_i$  的位点 3' 上。寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物从而可用作 DNA 或 RNA 聚合酶的底物。

[0020] 在该第一实施方案中, 寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物因而可用作核酸合成的引物。

[0021] 根据所述第一实施方案的混合的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物具有

[0022] 结构 I

[0023]  $HO-3', A_i^{5'}, -B_j-R_4$

[0024] 或结构 II

[0025]  $HO-3', A_i^{5'}, -R_5-B_j-R_4$

[0026] 或结构 III

[0027]  $HO-3', A_{i1}^{5'}, -B_j-A_{i2}-R_4$

[0028] 其中

[0029]  $-A_{i1}$  和  $A_{i2}$  是相同的或不同的, 且如上文中对于  $A_i$  所定义的;  $A_{i2}$  以 3' 至 5' 或 5' 至 3' 方向排列,

[0030]  $-R_4$  是 H 或连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、糖或磷酸基团;

[0031]  $-R_5$ , 与 H、 $A_i$  和  $B_j$  不同, 是  $A_i$  与  $B_j$  之间的连接体, 并且由化学上稳定的或可切割的连接体组成。

[0032] 本发明因而涉及方法例如上述方法, 其中结构 I、II 或 III 的分子在结合靶核酸后用作引物。

[0033] 这样的方法有利地包括步骤:

[0034] - 将引物例如上文中定义的引物与所述靶核酸分子在允许所述引物分子结合所述靶核酸分子的条件下一同温育和

[0035] - 以所述靶核酸分子作为模板延伸所述引物。

[0036] 在所述实施方案中, 所述分子是催化核酸合成的 DNA 或 RNA 聚合酶的底物。

[0037] 如实施例中所显示的, 与包含天然核碱基的标准未修饰的寡核苷酸相比, 相应于

所述分子的引物能够以预料之外的高序列特异性显著提高对它们的靶核酸的亲合力。

[0038] 特别地,所述分子因而是用于逆转录和核酸扩增法例如聚合酶链式反应的强有力的工具。

[0039] 所述引物确实使得能够进行高效、特异和灵敏的扩增反应例如 PCR。

[0040] 由于对它们的靶的优异的亲合力,当与标准引物(未修饰的寡核苷酸)相比时,本发明的引物可在减少多至 10 倍的极低浓度上使用。此外,可在低盐浓度,更特别地低  $MgCl_2$  浓度下高效地使用它们。

[0041] 与标准引物相比较,杂交温度可增加数度。其可根据寡聚阳离子的长度来进行调整。

[0042] 因此,可以免除对杂交温度和盐浓度,更特别地  $MgCl_2$  浓度的限制性调整。

[0043] 所述引物可用于应用例如多重 PCR 或高通量 PCR。

[0044] 所述引物还允许改善已知难以通过 PCR 扩增的富含 AT 的区域的扩增。

[0045] 特别地,本发明的分子使得能够设计用于特殊应用例如具有高度变异性的基因组的保守区域中的扩增的短引物。

[0046] 如实施例中所显示的,所述引物还可在应用例如逆转录中用作 oligo(dT)、六聚物或特异性引物。由于它们的优异的亲合力,它们对于检测低表达的基因可以是特别有价值的。

[0047] 所述引物还可用于 DNA 测序。

[0048] 在一些情况下,使用在寡核苷酸和寡聚阳离子部分之间具有可切割的连接体的本发明的分子可以是有利的。在其中需要电泳分离扩增产物的方法中,聚阳离子在分离之前的扩增后切割可以是有价值的。

[0049] 在第二实施方案中, $A_i$  的位点 3' 上的 -OH 被封闭,从而  $A_i$  在聚合酶存在的情况下不能进行延伸。

[0050] 所述第二组的分子具有

[0051] 结构IV

[0052]  $R_4-B_j^{-3}, A_i^{5'}, -R_6$

[0053] 或结构V

[0054]  $R_4-B_j-R_5^{-3}, A_i^{5'}, -R_6$

[0055] 或结构VI

[0056]  $R_7^{-3}, A_i^{5'}, B_j-R_4$

[0057] 或结构VII

[0058]  $R_7^{-3}, A_i^{5'}, -R_5-B_j-R_4$

[0059] 或结构VIII

[0060]  $R_7^{-3}, A_{i1}^{5'}, -B_j^{-3}, A_{i2}^{5'}, -R_4$

[0061] 或结构IX

[0062]  $R_7^{-3}, A_{i1}^{5'}, -B_j^{-5}, A_{i2}^{3'}, -R_8$

[0063] 或结构X

[0064]  $R_4-B_{j1}^{-3}, A_i^{5'}, -B_{j2}-R_6$

[0065] 其中

- [0066]  $-A_{i1}$  和  $A_{i2}$  相同或不同,且如上文中对于  $A_i$  所定义;
- [0067]  $-B_{j1}$  和  $B_{j2}$  相同或不同,且如上文中对于  $B_j$  所定义;
- [0068]  $-R_4$  和  $R_6$  是相同的或不同的,  $R_4$  如上文中所定义,且  $R_6$  例如上文中对于  $R_4$  所定义的,和
- [0069]  $-R_7$  和  $R_8$  是相同的或不同的,它们与 H 不同,并且选自连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、磷酸基团或糖。
- [0070] 所述第二实施方案的分子用于在包含 DNA 或 RNA 聚合酶的测定中检测靶核酸。它们更特别地可用作探针来检测通过体外核酸扩增法例如 PCR 产生的互补核酸。
- [0071] 所述第二实施方案的分子更特别地用作监控实时核酸扩增的探针。
- [0072] 本发明涉及用于检测靶核酸的方法,其中结构 IV 至 X 的分子可用作与靶核酸杂交的探针。
- [0073] 本发明因而涉及用于检测靶核酸的方法例如上文中定义的方法,其包括步骤:
- [0074] - 在 RNA 或 DNA 聚合酶存在的情况下,将所述靶核酸与探针例如上文中定义的探针允许所述探针与所述靶核酸分子杂交的条件下一起温育;和
- [0075] - 检测所述杂交。
- [0076] 有利地,所述分子是有价值的杂交探针和双重标记的探针(用于实时 PCR)。如实施例中所示,本发明的探针减少荧光背景,从而提高扩增子检测的性能。
- [0077] 特别地,与标准探针(含有天然核碱基的双重标记的探针)相比,本发明的双重标记的探针在扩增不存在的情况下显示更大的荧光发射的猝灭。此外,如实施例中所示,缀合的探针以更高的灵敏性检测靶。
- [0078] 本发明因而涉及用于区分野生型和突变型靶核酸的方法,例如上文中定义的方法。
- [0079] 有利地,所述分子允许设计可用于扩增法例如 PCR 的更短的探针(通过促进引物/探针组的设计)。
- [0080] 短探针具有更大的区分能力。特别地,所述分子从而是用于等位基因区分的强有力的工具。
- [0081] 如实施例中所示的,与标准寡核苷酸相比较,相应于本发明的分子的探针特别适用于检测和分析突变例如 SNP(单核苷酸多态性)。
- [0082] 在另一个方面,所述第二实施方案的分子有利地用作夹钳(cclamp),从而提供了用于抑制靶核酸的扩增和/或检测的方法。
- [0083] 在第三实施方案中,本发明的分子更常见地用于基于杂交的测定(其中靶核酸不是聚合酶的模板)。
- [0084] 本发明涉及用于核酸操作的方法,其中结构 I 至 X 的分子例如上文中定义的分子在结合靶核酸后用作一个或多个酶的底物。
- [0085] 本发明涉及用于核酸操作的方法,其中结构 I 至 X 的分子例如上文中定义的分子在一个或多个酶存在的情况下,在允许所述酶修饰所述靶核酸的条件下结合靶核酸。
- [0086] 本发明涉及用于操作、检测、捕获靶核酸的方法,其包括使结构 I 至 X 的分子例如上文中定义的分子与靶核酸杂交。

- [0087] 本发明因而涉及用于检测靶核酸的方法例如上文中定义的方法,其包括步骤:
- [0088] - 将所述靶核酸与本发明的探针例如上文中定义的探针在允许所述探针与所述靶核酸分子杂交的条件下一起温育;和
- [0089] - 检测所述杂交。
- [0090] 所述第三实施方案的分子更特别地用作用于检测固定的靶核酸例如固体支持物上的或固定的组织上的靶核酸的探针。所述探针可用于原位杂交方法。
- [0091] 如实施例中所显示的,本发明的短探针可在不容许标准探针的严格条件下以高特异性检测固定在支持物上的靶核酸。
- [0092] 考虑到它们的生物学应用,具有含有修饰的核苷酸例如硫代磷酸酯核苷酸的  $A_1$  的分子是特别有利的,因为硫代磷酸酯寡核苷酸在细胞裂解物或生物学液体中不被水解。
- [0093] 按照 WO 2007/069092 的方法通过亚磷酸胺途径,有利地在寡核苷酸合成仪上逐步合成上文定义的混合的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物。
- [0094] 通过保护聚胺的氨基,然后进行  $\alpha$ ,  $\omega$ -双羟基烷基化产生与寡核苷酸合成相容的二元醇来有利地获得活化的且被保护的寡聚阳离子 B。
- [0095] 使用碱不稳定的 (base-labile) TFA 保护基团有利地一起进行经典的 DMT 和亚磷酸胺延伸化学。
- [0096] 在下列实施例 (其中参考图 1 至 9) 中提供本发明的其他特征和有利方面,所述图 1 至 9 分别表示:
- [0097] - 图 1,寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物的结构;
- [0098] - 图 2,在常规梯度 PCR 中使用本发明的引物获得的结果;
- [0099] - 图 3,在实时 PCR 实验中在高退火温度和低盐 ( $MgCl_2$ ) 下使用本发明的引物获得的结果;
- [0100] - 图 4,在实时 PCR 实验中以低浓度使用所述引物获得的结果;
- [0101] - 图 5,在实时 PCR 实验中在富含 AT 的背景中使用所述引物获得的结果;
- [0102] - 图 6,在 RT-qPCR 中获得的关于用本发明的引物引发的 cDNA 的结果;
- [0103] - 图 7,在 5' 核酸酶测定中使用本发明的双重标记的荧光探针获得的荧光特征和结果;
- [0104] - 图 8,在实时 PCR 中使用本发明的荧光杂交探针获得的结果;
- [0105] - 图 9,使用用于检测固定在固体支持物上的靶核酸的本发明的荧光探针获得的结果。
- [0106] 在下列实施例中,“S”表示下列结构的精胺残基:
- [0107]  $-HPO_3-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-O-$ , Sn 表示精胺残基的数量,  $n = 1$  至 50。
- [0108] - “Nm”表示 m 聚体寡核苷酸。
- [0109] 实施例 1:本发明的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物的结构
- [0110] 按照 WO 2007/069092 进行合成,并在图 1 中举例说明寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物的结构。
- [0111] 实施例 2:寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物作为 PCR 引物的用途
- [0112] 将特异于人乳头瘤病毒 16 型 (HPV 16) 的基因 E7 和 L1 的两对寡核苷酸-寡聚阳

离子引物与它们的标准对应物（非缀合的寡核苷酸）相比较。还将本发明的分子与锁核酸（LNA）修饰的引物相比较。

[0113] E7 引物的序列来自 Hesselink 等人, 2005。L1 引物的序列改编自 de Roda Husman 等人, 1995。

[0114] E7 引物对 (46% 和 48% GC) 和 L1 引物对 (30% 和 20% GC) 举例说明了两个不同的 GC 含量。

[0115] 含有 1 至 2 个拷贝的整合的 HPV16 的 SiHa 细胞（宫颈癌, ATCCHTB35）的基因组 DNA 用作靶基因组 DNA。不包含病毒的 A549 细胞（肺癌, ATCC CCL185）的基因组 DNA 用作阴性对照。

[0116] 本发明的引物是结构 I 的实例。

[0117] • 标准寡核苷酸的序列 (E7 引物)

[0118] SEQ ID N° 1 的正向引物 (E7F) :5' -GAG GAG GAG GAT GAA ATA GATGGT-3'

[0119] SEQ ID N° 2 的反向引物 (E7R) :5' -GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA-3'

[0120] • 根据本发明的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物的序列 (S4-E7 引物)

[0121] SEQ ID N° 3 的正向引物 (S4-E7F) :5' -S<sub>4</sub>-GAG GAG GAG GAT GAAATA GATGGT-3'

[0122] SEQ ID N° 4 的反向引物 (S 4-E7R) :5' -S<sub>4</sub>-GCC CAT TAA CAG GTCTTC CAA-3'

[0123] • 含有 LNA 的寡核苷酸的序列 (LNA-E7 引物)

[0124] SEQ ID N° 5 的正向引物 (LNA-E 7F) :5' -G<sub>a</sub>G G<sub>a</sub>G GAG GAT GAA ATAGATGGT-3'

[0125] SEQ ID N° 6 的反向引物 (LNA-E7R) :5' -GC<sub>c</sub> CAT tAA CAG GTC TTCCAA-3'

[0126] LNA 核苷酸以下划线和小写字母标示

[0127] S<sub>4</sub> = 4 个精胺部分

[0128] • 标准寡核苷酸的序列 (L1 引物)

[0129] SEQ ID N° 7 的正向引物 (L1F) :5' -TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACTAC-3'

[0130] SEQ ID N° 8 的反向引物 (L1R) :5' -GAA AAA TAA ACT GTA AAT CATATT C-3'

[0131] • 根据本发明的引物的序列 (S<sub>n</sub>-L1 引物)

[0132] SEQ ID N° 9 的正向引物 (S<sub>n</sub>-L1F) :5' -S<sub>n</sub>-TTT GTT ACT GTT GTT GATACT AC-3'

[0133] SEQ ID N° 10 的反向引物 (S<sub>n</sub>-L1R) :5' -S<sub>n</sub>-GAA AAA TAA ACT GTAAAT CAT ATT C-3'

[0134] S<sub>n</sub> = n 个精胺部分 ;n = 4 和 5

[0135] • 含有 LNA 的寡核苷酸的序列 (LNA-L1 引物)

[0136] SEQ ID N° 11 的正向引物 (L1F) :5' -TT<sub>t</sub> GTT aCT GTT GTT GAT ACTAC-3'

[0137] SEQ ID N° 12 的反向引物 (L1R) :5' -GA<sub>a</sub> AAA tAA ACT GTA AAT CATATT C-3'

[0138] LNA 核苷酸以下划线和小写字母标示

[0139] 图 2 描述了本发明的引物在常规 PCR 中的用途。使用梯度 PCR 法在 PCR 的终点将扩增性能评估为退火温度的函数。

[0140] 在 25 μl 的反应体积中扩增靶和对照基因组 DNA。在 0.4mM DNA, 10mM Tris-HCl (pH9), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 200 μM dNTP (各个), 0.04U/

$\mu$ l 的 EconoTaq DNA 聚合酶 (Lucigen) 和下列引物对存在的情况下扩增各样品 :

[0141] -100nM 的 E7 标准引物 (图 2a :上图) 或 S4-E7 引物 (图 2a :下图) 或

[0142] -500nM 的 L1 标准引物 (图 2b :上图) ;LNA-L1 引物 (图 2b :中图) ;和具有 5 个精胺部分的 S5-L1 引物 (图 2b :下图) ,

[0143] -500nM 的 L1 标准引物 (图 2c :上面部分) ;具有 4 个精胺部分的 S4-L1 引物 (图 2c :中间部分) ;和具有 5 个精胺部分的 S5-L1 引物 (图 2c :下面部分) 。

[0144] 如下在 iCycler 热循环仪 (Biorad) 中进行梯度扩增 :初始变性 :在 95°C 下进行 3 分钟,循环 :35 个 (a, c) 和 30 个 (b) 循环 :在 94°C 下进行 20 秒,在 60°C -69°C (a) 下进行 20 秒或在 52°C -61°C (b, c) 下进行 20 秒,在 72°C 下进行 15 秒 ;终延伸 :在 72°C 下进行 5 分钟。在 4% 的琼脂糖凝胶上分析终 PCR 反应物。E7 和 L1 的产物大小分别是 159bp 和 142bp。

[0145] 如图 2a 中所示,根据本发明选择的在 5' 末端上具有 4 个精胺残基的缀合物特异性扩增它们的靶。与标准引物一样,它们确实从靶 SiHa 细胞的基因组 DNA 扩增具有预期的 159bp 大小的病毒序列片段。相反地,在相同的扩增条件下从 A549 细胞的基因组 DNA 没有获得扩增。

[0146] 有利地,通过使用本发明的寡核苷酸缀合物,可在更高的温度 (4 至 7°C,取决于引物对) 下进行杂交反应 (图 2a 和 2b) 。

[0147] 有利地,通过使用本发明的寡核苷酸缀合物,可在比含有 LNA 的引物更高的温度 (4-5°C,参见图 2b) 下进行杂交反应。

[0148] 图 2c 中给出的结果显示可利用缀合至寡核苷酸的精胺的数目调控温度的增加。

[0149] 就它们在实时 PCR 实验中作为引物的用途来评估本发明的分子。将引物缀合物与它们的未修饰的标准对应物以及与含有 LNA 的引物相比较。

[0150] 在 Rotor-gene 6000 仪 (Corbett) 中于 10  $\mu$ l 的终体积中进行所有反应。使用 Sensimix NoRef DNA 试剂盒 (Quantace) 在 0.5X 的终浓度下进行反应。

[0151] 通过扩增掺杂 (spiked) 在 10ng 的对照基因组 DNA,即 HPV 阴性细胞 (A549 细胞) 的 3000 个基因组中的靶 HPV16 阳性细胞 (SiHa 细胞) 的基因组 DNA 的系列稀释物来评估效率和灵敏性。

[0152] 使用用于检测的 SYBR Green I 在不同的杂交温度、MgCl<sub>2</sub> 浓度或引物浓度的条件下扩增样品。

[0153] 图 3 :MgCl<sub>2</sub> 浓度和退火温度对实时扩增的影响。

[0154] 使用 100nM 的各引物对 10ng 靶基因组 DNA 进行反应。终 MgCl<sub>2</sub> 浓度是 1.5mM 或 3mM,如所标示的。在 95°C 下进行 10 分钟的热起动,然后进行 45 个循环 :在 94°C 下进行 20 秒,在 63°C (a) 或 66°C (b) 下进行 20 秒,和在 72°C 下进行 15 秒。

[0155] 如图 3a 中所示,当在 1.5mM MgCl<sub>2</sub> 中于 63°C 下退火时,本发明的分子 (S4-E7) 是最佳的。相比之下,标准引物和含有 LNA 的引物是低效的,如循环阈值的增加 (16 个,对于本发明的缀合物 ;33 个,对于标准引物 ;24 个,对于含有 LNA 的引物) 所显示的。增加 MgCl<sub>2</sub> 浓度提高了标准引物和含有 LNA 的引物的性能。还可从图 3 得出,标准引物和含有 LNA 的引物需要较低的退火温度,而所述 S4-E7 缀合物在 63°C 下高效地运行。

[0156] 如图 3b 和 3c 中所示,在固定的引物浓度 (100nM) 和低 MgCl<sub>2</sub> 浓度 (1.5mM) 下,使

用所述 S4-E7 缀合物,在 66°C 的杂交温度下可以以高重现性、特异性和效率检测到直至 3 个拷贝的靶。

[0157] 使用本发明的引物缀合物,在对于标准引物和含有 LNA 的引物通常不是最适宜的温度或  $MgCl_2$  条件下获得特异性、有效且灵敏的扩增。

[0158] 引物浓度的影响通过图 4 举例说明。

[0159] 图 4a :在 1.5mM  $MgCl_2$  中使用 10nM 的本发明的引物缀合物扩增靶基因组 DNA 的 10 倍系列稀释物。

[0160] 图 4b :使用可变量的引物 :10、20 和 30nM 的本发明的引物缀合物 (上图);10、25 和 50nM 的标准引物 (中图) 和含有 LNA 的引物 (下图),扩增 2ng 的掺杂在 10ng 的对照基因组 DNA 中的靶基因组 DNA。对于本发明的缀合物,  $MgCl_2$  的浓度是 1.5mM ;对于标准引物和含有 LNA 的引物,  $MgCl_2$  的浓度为 3mM。

[0161] 如下进行扩增 :在 95°C 下进行 10 分钟,然后进行 45 个循环的在 95°C 下 10 秒、在 60°C 下 1 分钟。

[0162] 图 4a 显示 10nM 的本发明的引物分子在两步 PCR 反应中驱动有效且灵敏的扩增。事实上可定量检测到 3 个拷贝的靶。如图 4b 中所示,引物浓度的减少不引起 Ct 值的增加。只有反应终点处的扩增子的最终量减少。相比之下,在 3mM  $MgCl_2$  中 50nM 的标准寡核苷酸或含有 LNA 的引物不足以与缀合的引物所进行的一样的最佳方式扩增靶。

[0163] 有利地,与标准寡核苷酸和含有 LNA 的引物相比较,本发明的引物缀合物显示更大的对它们的靶的亲合力,从而允许在低  $MgCl_2$  浓度下进行使用。与标准寡核苷酸和含有 LNA 的引物相比较,所述分子允许引物浓度减少多至 10 倍,而不丧失灵敏性、效率、特异性或重现性。

[0164] 如图 5 中所示,本发明的引物分子改善了富含 AT 的序列中的 PCR。有利地,所述分子允许在标准化条件 (1.5mM  $MgCl_2$ , 在 60°C 下退火) 中进行有效反应。

[0165] 在图 5a 中,使用 100nM 的本发明的缀合物扩增靶基因组 DNA 的 5 倍系列稀释物。终  $MgCl_2$  浓度是 1.5mM。将反应物在 95°C 下温育 10 分钟,然后进行 45 个循环 :在 94°C 下进行 20 秒,在 60°C 下进行 20 秒和在 72°C 下进行 15 秒。在这些条件下,本发明的缀合物驱动有效 (参见标准曲线 ( $E = 0.89 ; R^2 = 0.992$ )) 且灵敏的扩增,如由 1 个拷贝的靶的检测所显示的。

[0166] 相比之下 (图 5b),标准引物和含有 LNA 的引物低效地扩增 600 个拷贝的靶。条件如下 :使用 150nM 的本发明的缀合物 (具有 4 或 5 个精胺) (上图);150nM、500nM 和 1  $\mu$  M 的标准引物 (中图) 和含有 LNA 的引物 (下图),利用两步扩增方案 (在 95°C 下进行 10 分钟,然后进行 45 个循环 :在 95°C 下进行 10 秒,在 60°C 下进行 1 分钟) 扩增 2ng 的掺杂在 10ng 的对照基因组 DNA 中的靶基因组 DNA (代表 600 个拷贝的靶)。对于本发明的缀合物,  $MgCl_2$  浓度为 1.5mM,对于标准引物和含有 LNA 的引物,  $MgCl_2$  浓度为 3mM。

[0167] 实施例 3 :寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用作用于逆转录的引物的用途

[0168] 就它们用作用于逆转录的引物的用途评估本发明的分子。使用含有 20 个残基的缀合有 4 个精胺部分的多聚脱氧核糖胸苷 (S4-oligo(dT)<sub>20</sub>) 或其未缀合的对应物 (oligo(dT)<sub>20</sub>) 从总 RNA 合成 cDNA。随后进行用于扩增细胞周期蛋白 B1 转录物的 RT-qPCR 反应来比较逆转录效率。

[0169] • 引物序列

[0170] SEQ ID N° 13 的 oligo(dT)<sub>20</sub>:5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。

[0171] SEQ ID N° 14 的 S<sub>4</sub>-oligo(dT)<sub>20</sub>:5' -S<sub>4</sub>-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。

[0172] S<sub>4</sub> = 4 个精胺部分。

[0173] SEQ ID N° 15 的细胞周期蛋白 B1 正向引物:5' -TCTGGATAATGGTGAATGGACA-3'

[0174] SEQ ID N° 16 的细胞周期蛋白 B1 反向引物:5' -CGATGTGGCATACTTGTCTTG-3'。

[0175] 使用 SV Total RNA Isolation 试剂盒 (Promega) 从细胞 HCT 116 (来自 ATCC CCL-247) 提取总 RNA。如提供商所述,使用 SuperscriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) 逆转录 1 μg 总 RNA。使用 50 μM 的本发明的分子 (S<sub>4</sub>-oligo(dT)<sub>20</sub>) 或其未缀合的对应物 (oligo(dT)<sub>20</sub>) 引发反应 (RT+)。不使用逆转录酶 (RT-) 的反应作为对照。

[0176] 图 6 显示使用相应于 5ng 的总 RNA 的 cDNA 合成反应物 (RT+ 和 RT-) 进行的细胞周期蛋白 B1 转录物的 RT-qPCR 扩增。在 Rotor-gene 6000 仪 (Corbett) 上于 10 μl 的终体积中进行 PCR 反应。终反应混合物包含 2.5 μl Sensimix NoRef PCR 试剂盒 (Quantace)、SYBR Green 0.5x、100nM 的各细胞周期蛋白 B1 特异性引物和 3mM MgCl<sub>2</sub>。

[0177] 将反应物在 95°C 下温育 10 分钟,然后进行 45 个循环:在 95°C 下进行 10 秒,在 60°C 下进行 1 分钟。

[0178] 通过在 4% 的琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳来分析 PCR 产物 (图 6b)。

[0179] 图 6a 显示来自用本发明的分子或其标准对应物引发的 cDNA 样品的相同的细胞周期蛋白 B1 的扩增曲线。已合成预期大小 (157bp) 的相同 PCR 产物 (图 6b)。在所有样品中在逆转录酶不存在的情况下,产生晚期脱靶产物。

[0180] 本发明的缀合的 oligo(dT)-OH 分子,当作用于逆转录的引物时,使得能够进行有效的 cDNA 合成。

[0181] 实施例 4:寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物在实时 PCR 中用作双重标记的 PCR 探针的用途。

[0182] 双重标记的探针是最广泛使用的探针,其用于在实时 PCR 中监控扩增。也称为 TaqMan™ 探针,它们由在内部与扩增子杂交的在 5' 末端具有荧光团并且在 3' 末端具有猝灭剂的寡核苷酸序列组成 (Livak 等人, -1995)。如果两个标记在溶液中足够靠近,则由激发荧光团发射的能量通过 FRET (荧光能量转移) 被猝灭剂吸收,从而导致低荧光信号。在基于 5' 核酸酶法的 PCR 反应 (Holland 等人, 1991) 中,探针在各退火步骤中结合扩增子。当引物之一由 Taq DNA 聚合酶延伸时,探针从模板链置换出来,且被聚合酶的 5' -3' 外切核酸酶活性水解。切割导致荧光报告分子的释放,从而引起与产生的 PCR 产物的量成正比的荧光强度的增加。

[0183] 就它们在设计用于扩增人因子 V 基因的 5' 核酸酶测定中用作实时 PCR 检测探针的用途评估本发明的寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物。人因子 V 基因中的 Leiden G1691A 突变用作模型以评估所述探针用于 SNP (单核苷酸多态性) 基因分型的能力。

[0184] 探针和引物序列改编自 Luderer 等人, 2004。

[0185] 含有 17 和 22 个核苷酸残基的两个寡核苷酸在它们的 3' 末端上缀合有 4 个

精胺部分。用 6-羧基荧光素 (6-FAM, Sigma) 5' 标记所述缀合物且将 Black Hole Quencher™ (BHQ-1™, Glen Research) 连接至寡聚阳离子。将本发明的此类双重标记的荧光探针与它们的非寡聚阳离子缀合的对应物相比较。

[0186] 所有探针经设计用于检测野生型等位基因。分别从细胞系 A549 (ATCC CCL-185) 和 GM14899 (Coriell Institute) 提取因子 V 的野生型 DNA 和 Leiden DNA。

[0187] 本发明的双重标记的探针是结构 IV 的实例。

[0188] • 引物序列

[0189] SEQ ID N° 15 的正向引物 :5' -GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT-3'

[0190] SEQ ID N° 16 的反向引物 :5' -TT CTG AAA GGT TAC TTC AAG GACAA-3'

[0191] • 探针的序列

[0192] - 根据本发明的探针的序列 :

[0193] SEQ ID N° 15 (F-N17S4) :5' 6-FAM-ACC TGT ATT CCT CGC CT-S4BHQ-1

[0194] S<sub>4</sub> = 4 个精胺部分

[0195] - 标准探针的序列

[0196] SEQ ID N° 17 (F-N17) :5' 6-FAM-ACC TGT ATT CCT CGC CT-BHQ-1

[0197] SEQ ID N° 18 (F-N22) :5' 6-FAM-ACC TGT ATT CCT CGC CTG TCCA-BHQ-1

[0198] SNP 位点以下划线标示。

[0199] 在 Rotor-gene 6000 仪 (Corbett) 上于 10 μl 的终体积中进行 PCR 反应。10ng 野生型基因组 DNA (b)、掺杂在 10ng 对照 DNA 中的野生型基因组 DNA 的 10 倍系列稀释物 (c) 和 10ng 野生型或突变型基因组 DNA (d) 用作模板。终反应混合物包含 2.5 μl Sensimix NoRef PCR 试剂盒 (Quantace)、200nM 各引物和 200nM 探针。终 MgCl<sub>2</sub> 浓度是 3mM。鲑精 DNA 用作阴性对照 (非靶 DNA)。

[0200] 在 PCR 反应开始时利用仪器测量的原始背景荧光表示双重标记的探针的自猝灭效率。如图 7a 中所示, 本发明的缀合探针 (F-N22S4) 展示比其标准对应物 (F-N22) 更好的荧光猝灭 (背景荧光值 4.8 个单位对 24 个单位)。猝灭取决于两个染料的物理接近度。通过寡核苷酸上的折叠 (由于静电相互作用), 多聚阳离子使末端连接的荧光团 / 猝灭剂对接近。本发明的分子是有价值的双重标记探针, 其具有改善的猝灭特征。

[0201] 图 7b 显示根据本发明的探针与其标准对应物在 5' 核酸酶测定中的性能的比较。缀合的探针展示更高的信噪比, 从而导致更早的检测 (2.5 个循环) 和更大的终末荧光。

[0202] 因此, 根据本发明的探针对于检测它们的靶展示更高的灵敏性。然后将短缀合探针 (17 聚体, F-N<sub>17</sub>) 与长标准探针 (22 聚体, F-N<sub>22</sub>) 相比较。如图 7c 中所示, 本发明的短探针 (F-N<sub>17</sub>S<sub>4</sub>) 以与长标准探针 (F-N<sub>22</sub>) 相同的效率和灵敏性检测野生型扩增子。事实上, 循环阈值和终荧光值是相当的。在相同的条件下, 短标准探针 (F-N<sub>17</sub>) 表现较差 (图 7d)。

[0203] 图 7d 解决了等位基因区分的问题。在含有因子 V Leiden DNA 作为模板的样品中, 使用长野生型标准探针仍然检测到突变的扩增子, 然而使用缀合和标准短探针观察不到信号。

[0204] 因此, 根据本发明的短探针展示与更长的常规标准探针相同的性能。此外, 它们具有更大的区分能力。

[0205] 实施例 5: 寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物在实时 PCR 中作为荧光杂交探针的用途。

[0206] 就它们在实时 PCR 中作为相邻荧光探针的用途评估本发明的分子 (Bernard 等人, 1998)。检测的模式依赖于彼此相邻的两个探针在扩增子上的杂交。一个探针具有 3' 供体标记, 而另一个探针具有 5' 受体标记。当两个探针都结合至特定的扩增子时, 激发的 3' 供体标记通过 FRET 机制将其能量转移至受体标记, 从而该受体标记发射荧光。供体发射的荧光的增加与 PCR 产物的增加成正比。

[0207] 设计两个相邻探针以在 qPCR 的退火步骤中结合之前描述的人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16)E7 扩增子。用 6-FAM 在 3' 末端标记供体探针, 用 ROX 染料 (羧基-x-罗丹明) 在 5' 末端标记受体探针。

[0208] 将标准供体探针与本发明的分子相比较。

[0209] 供体探针是结构 VII 的实例。

[0210] 在 Rotor-gene 6000 仪 (Corbett) 中于 10  $\mu$  l 的终体积中扩增掺杂在 10ng 对照基因组 DNA (来自 A549 细胞) 中的靶基因组 DNA (来自 SiHa 细胞) 的 300 个拷贝 (a) 或系列稀释物 (3000 至 30 个拷贝) (b)。终反应混合物包含 2.5  $\mu$  l Sensimix NoRef PCR 试剂盒 (Quantace), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 200nM 正向引物, 300nM 反向引物, 200nM 探针 E7-ROX 探针 (Eurogentec)。探针 E7-N<sub>25</sub>F、E7-S<sub>4</sub>N<sub>25</sub>F 和 E7-S<sub>4</sub>N<sub>20</sub>F 为 200nM (a) 和 50nM (b)。

[0211] 在 95°C 下温育反应物 10 分钟, 然后进行 45 个循环: 在 95°C 下进行 5 秒, 在 55°C 下进行 10 秒, 在 72°C 下进行 10 秒。

[0212] 如图 8a 中所示, 缀合的探针使得能够有效地检测扩增子。

[0213] 由于两个标记的光谱重叠, 因此在扩增子不存在的情况下观察到高背景信号。由于它们的高亲和力, 寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物预期通过在低浓度下驱动有效检测来减少荧光背景水平。此外, 预期寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物允许设计有效的短探针, 从而导致错配区分能力的提高。如图 8b 中所描述的, 本发明的较短的探针 (E7-S<sub>4</sub>N<sub>20</sub>F) 的确在低浓度上显示比标准探针 (E7-N<sub>25</sub>F) 更好的性能。

[0214] 本发明的分子是有价值的用于实时 PCR 的杂交探针。

[0215] • E7 引物的序列

[0216] SEQ ID N° 1 的正向引物 (E7F): 5' -GAG GAG GAG GAT GAA ATA GATGGT-3'

[0217] SEQ ID N° 2 的反向引物 (E7R): 5' -GCC CAT TAA CAG GTC TTCCAA-3'

[0218] • 探针的序列

[0219] SEQ ID N° 19 (E7-ROX): 5' -ROX-TGCGTACAAAGCACACACGTAGACAT 3'

[0220] SEQ ID N° 20 (E7N<sub>25</sub>F): 5' -GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

[0221] SEQ ID N° 21 (E7N<sub>25</sub>F): 5' -S<sub>4</sub>-GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

[0222] SEQ ID N° 22 (E7S<sub>4</sub>N<sub>20</sub>F): 5' -S<sub>4</sub>-TGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

[0223] S<sub>4</sub> = 4 个精胺残基

[0224] 实施例 6: 寡核苷酸-寡聚阳离子缀合物作为用于检测固定在固体支持物上的靶核酸的荧光探针的用途。

[0225] 就它们用作用于检测和 / 或基因分型固定的靶核酸的杂交探针的用途评估本发明的分子。

[0226] 图 9 显示斑点-印迹 DNA 杂交实验的结果。靶核酸是 pGL2 和 pGL3Luciferase Reporter 载体 (Promega)。设计短探针 (14 聚体) 以完全匹配 pGL3 载体。通过与 pGL2 杂

交,所述序列形成错配。将本发明的探针与其标准对应物相比较。两个探针都用荧光素进行 5' 标记。

[0227] 通过在 80°C 下衬背 (backing) 60 分钟将 1 μg 的 pGL2 和 pGL3 载体固定在带正电荷的尼龙膜 (Roche) 上,并通过在 NaOH 0.4M 中温育膜 5 分钟来使所述载体变性。然后将膜在 2X SSC (柠檬酸钠盐缓冲液) 中短暂清洗,之后风干。在 5X SSC, 5X Denhardt' s 溶液中于 55°C 下进行预杂交步骤 60 分钟。将膜在 55°C 下于 1X SSC 中与 10nM 探针一起温育 120 分钟。在 1X SSC 中于 55°C 下清洗 (进行 5 分钟) 3 次后,在 Typhoon 成像系统 (Amersham Bioscience) 上扫描膜。

[0228] 如图 9 中所示,本发明的探针使得能够在严格条件 (55°C 和低盐) 下检测靶核酸,然而标准探针却不能。在错配的靶上未检测到信号,这显示本发明的探针的高特异性。

[0229] • 探针的序列

[0230] SEQ ID N° 23 (N14) :5' - 荧光素 -AAG ATG GAA CCG CT-3'

[0231] SEQ ID N° 25 (S4N14) :5' - 荧光素 -S4-AAG ATG GAA CCG CT-3'

[0232] S<sub>4</sub> = 4 个精胺残基

[0233] 错配位点以下划线标示。

[0234] 参考文献

[0235] Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* 1998 Oct; 153(4) :1055-61.

[0236] Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD. Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem Sci.* 2004 Feb; 29(2) : 62-71. Review

[0237] de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995 Apr; 76(Pt4) :1057-62.

[0238] Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuisink ZM, Molano M, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep; 43(9) :4868-71.

[0239] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15; 88(16) :7276-80.

[0240] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Jun; 4(6) :357-62.

[0241] Luderer R, Verheul A, Kortlandt W. Rapid detection of the factor V

Leiden mutation by real-time PCR with TaqMan minor groove binder probes. Clin Chem. 2004Apr ;50(4) :787-8.

[0242] Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes.

[0243] Biochem J. 1986Mar 1 ;234(2) :249-62. Review.

[0244] Pons B, Kotera M, Zuber G, Behr JP. Online synthesis of diblock cationic oligonucleotides forenhanced hybridization to their complementary sequence. Chembiochem. 2006Aug ;7(8) :1173-6.

[0245] Tabor CW, Tabor H. Polyamines. Annu Rev Biochem. 1984 ;53 :749-90. Review.

## 序列表

<110>Polyplus Transfection  
Centre National de la Recherche Scientifique  
Universit ? Louis Pasteur

<120> 用于杂交核酸的方法

<130>CP/BB 62715-3159

<140>PCT/IB2008/055256

<141>2008-12-12

<150>EP 07025148.3

<151>2007-12-27

<150>US 61/009145

<151>2007-12-27

<160>19

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>1

gaggaggagg atgaaataga tggt 24

<210>2

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>2

gccattaac aggtcttcca a 21

<210>3

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>3

gaggaggagg atgaaataga tggt 24

<210>4

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>4

gccattaac aggtcttcca a 21

<210>5

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>5

gaggaggagg atgaaataga tggt 24

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>6

gccattaac aggtcttcca a 21

<210>7

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>7

tttgttactg ttggtgatac tac 23

<210>8

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>8

gaaaaataaa ctgtaaatac tatte 25

<210>9

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>9

tttgttactg ttgttgatac tac 23

<210>10

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>10

gaaaaataaa ctgtaaatca tatte 25

<210>11

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>11

tttgttactg ttgttgatac tac 23

<210>12

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>12

gaaaaataaa ctgtaaatca tatte 25

<210>13

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>13

gcctctgggc taataggact actt 24

<210>14

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>14

ttctgaaagg ttacttcaag gacaa 25

<210>15

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>15

acctgtatc ctcgcct 17

<210>16

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>16  
acctgtattc ctcgcct 17

<210>17  
<211>22  
<212>DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 寡核苷酸

<400>17  
acctgtattc ctcgcctgtc ca 22

<210>18  
<211>14  
<212>DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸

<400>18  
aagatggaac cgct 14

<210>19  
<211>14  
<212>DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸

<400>19  
aagatggaac cgct 14

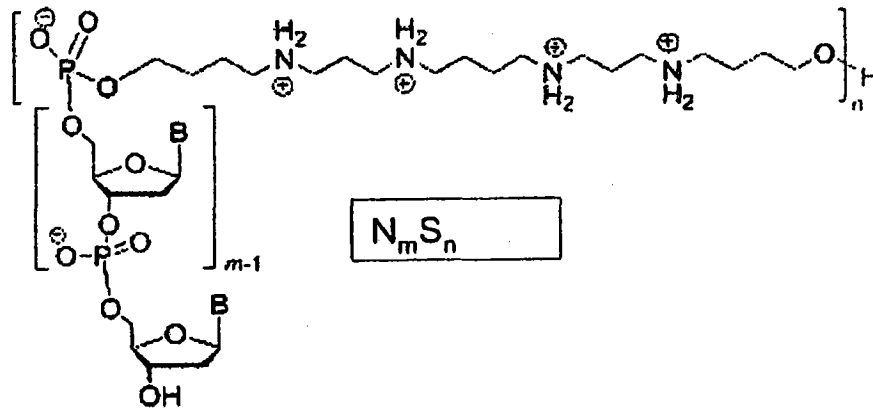
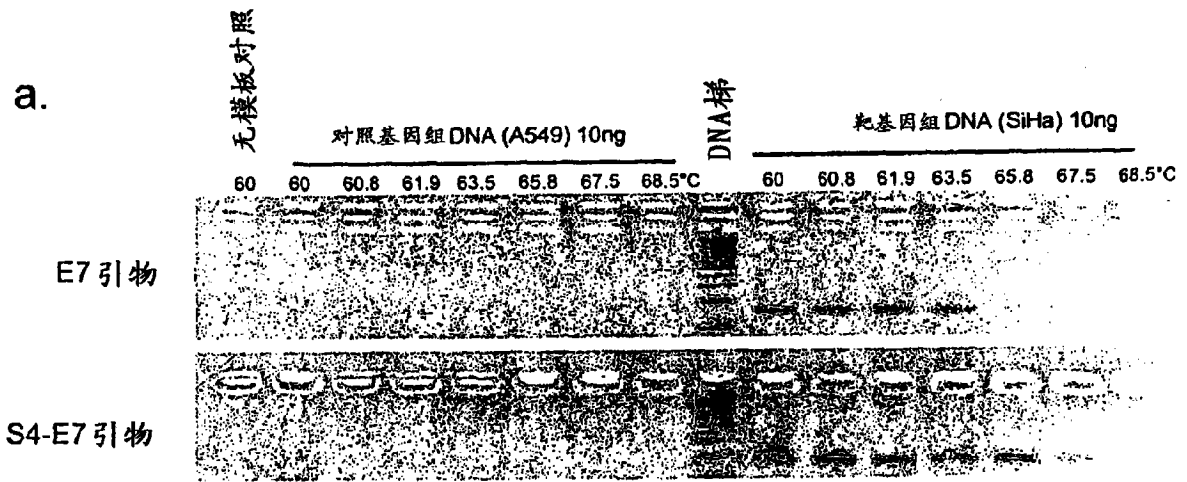
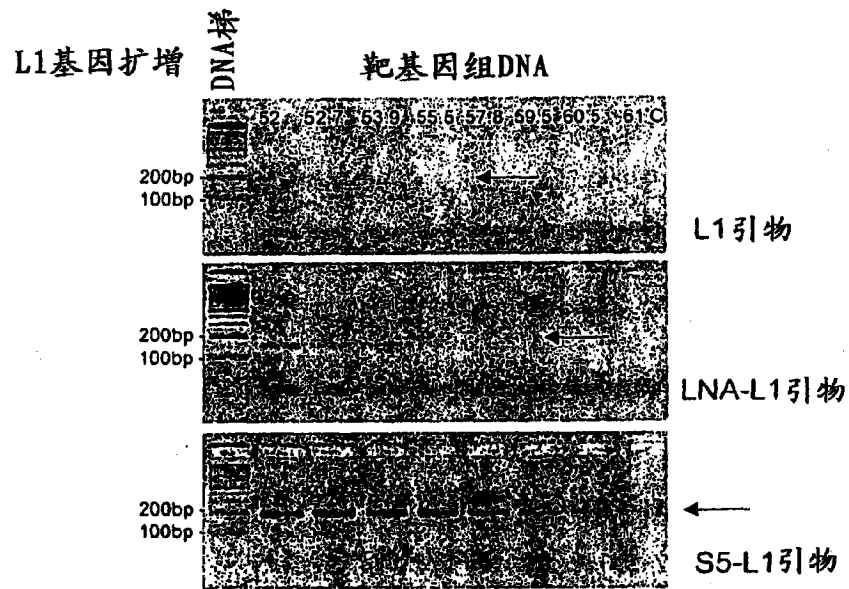


图 1



b.



c.

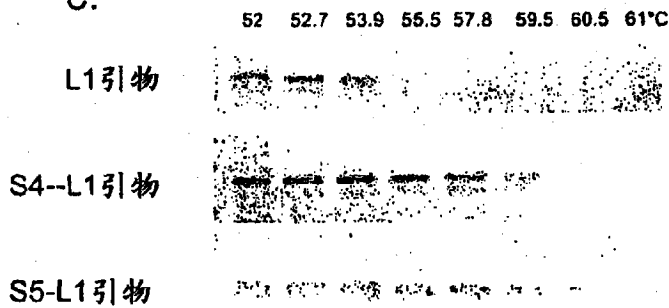


图 2

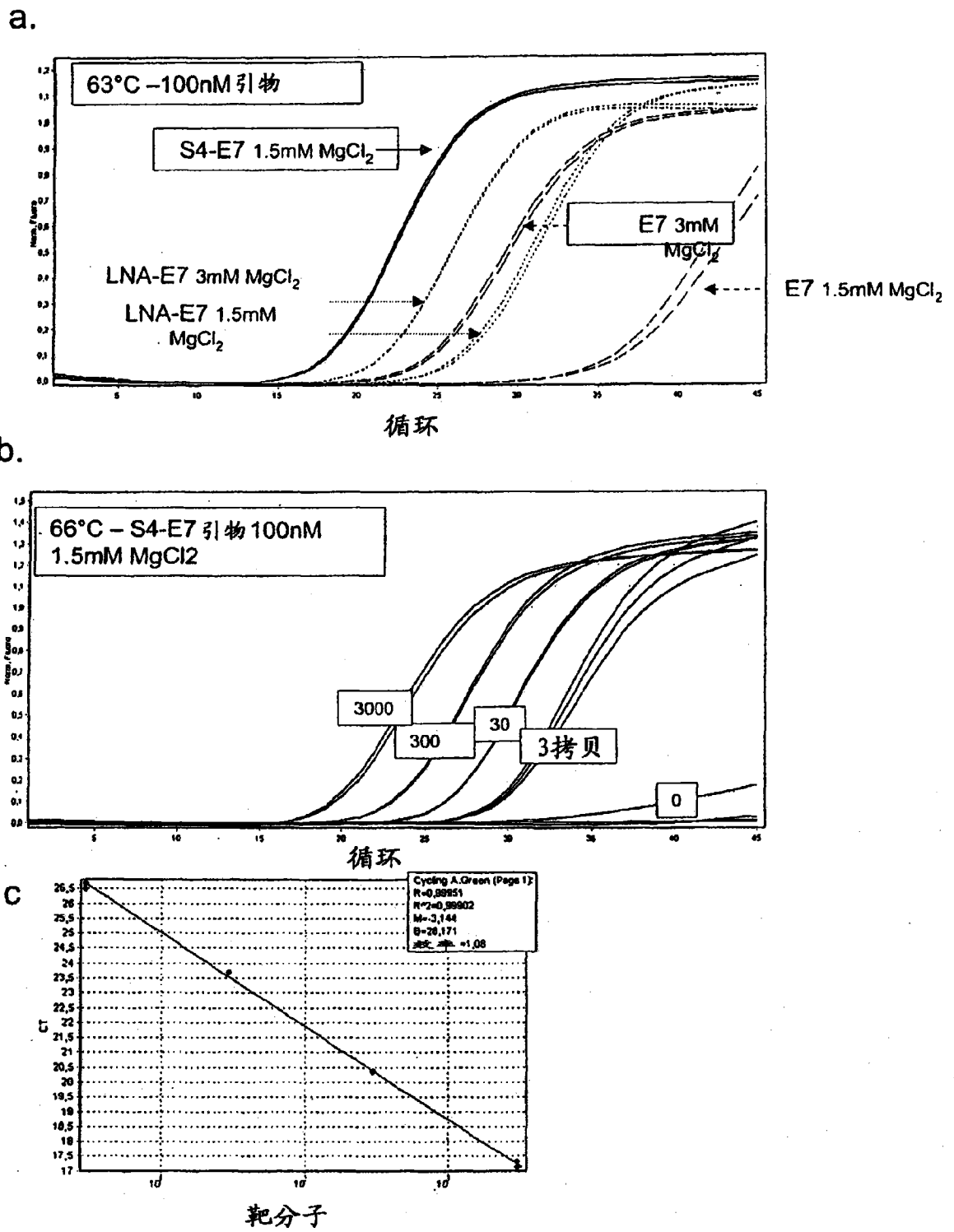
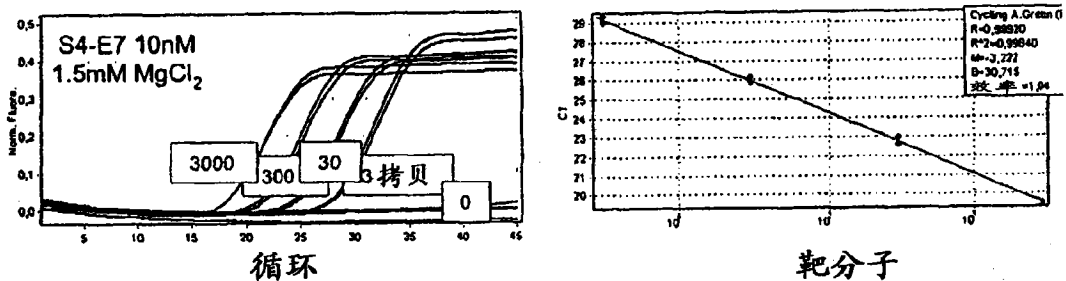


图 3

a.



b.

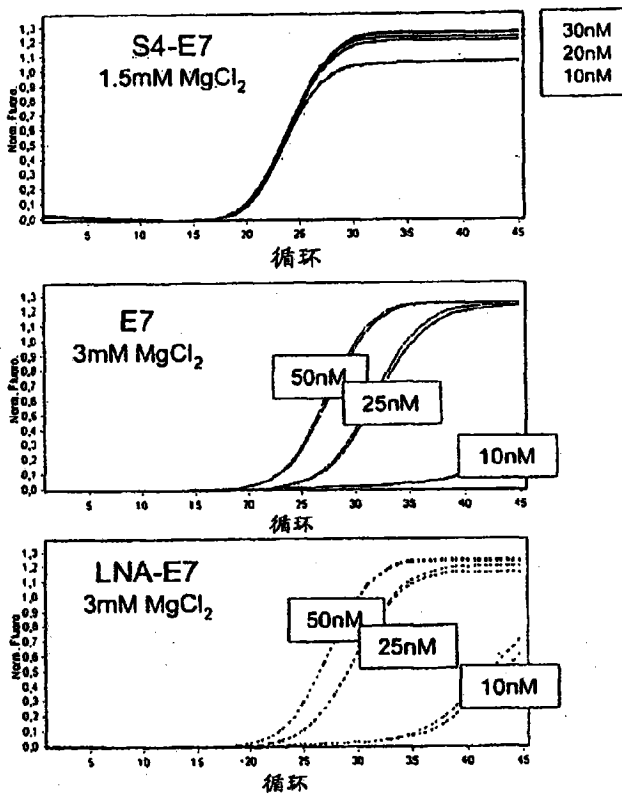
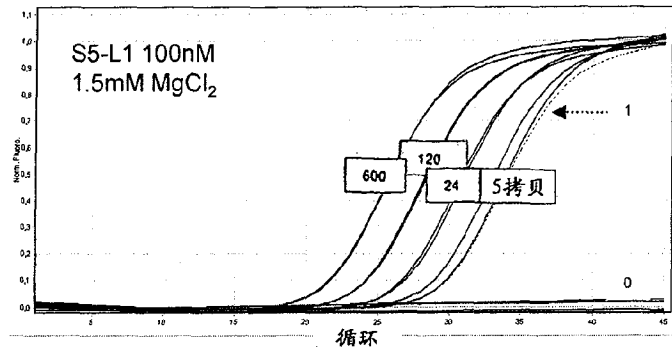
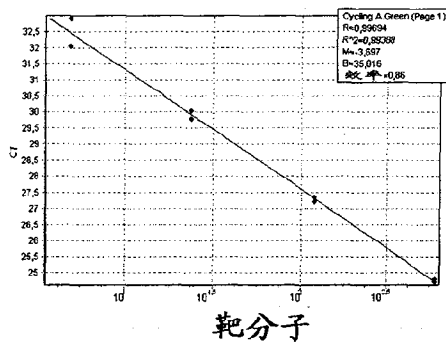


图 4

a.



b.

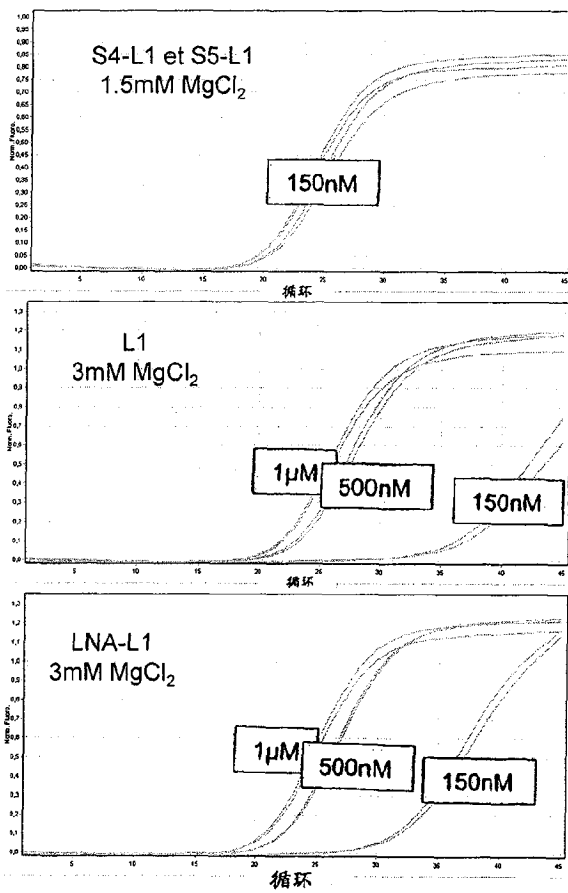


图 5

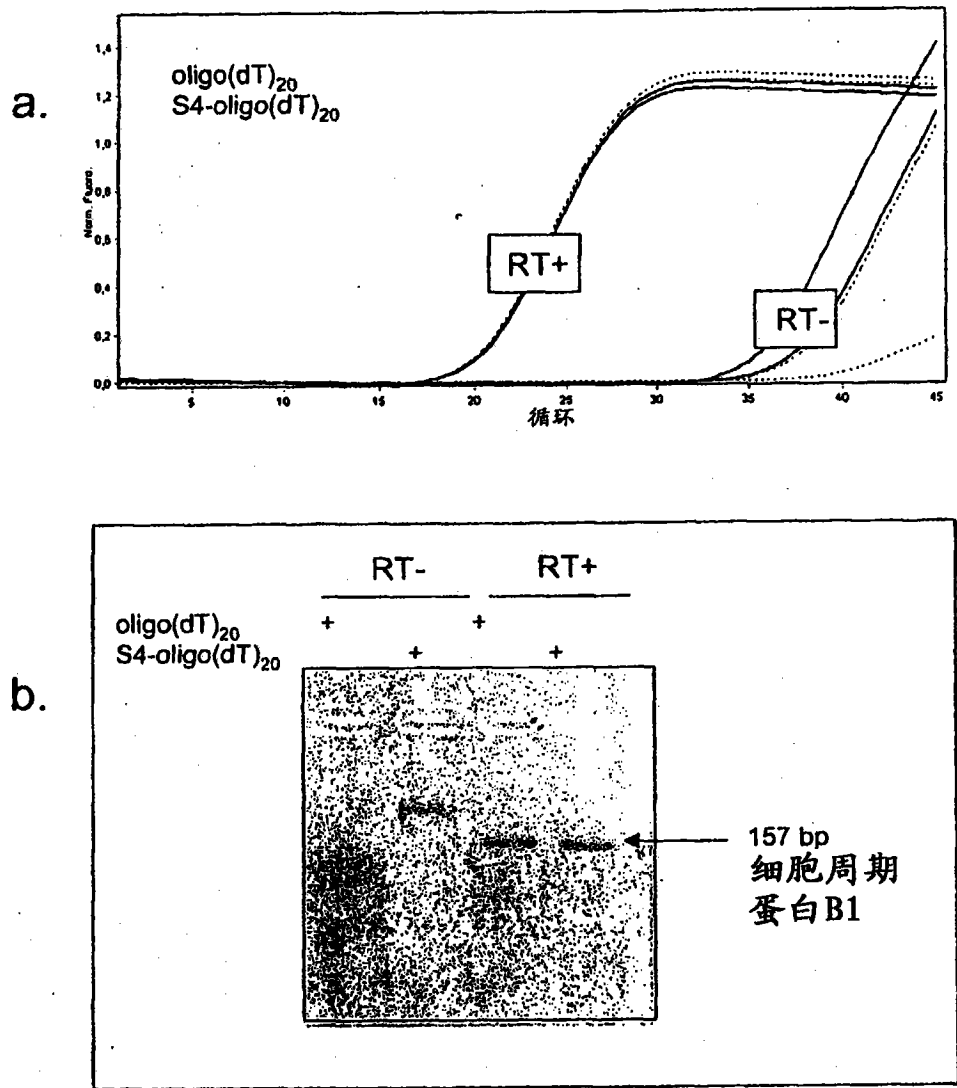
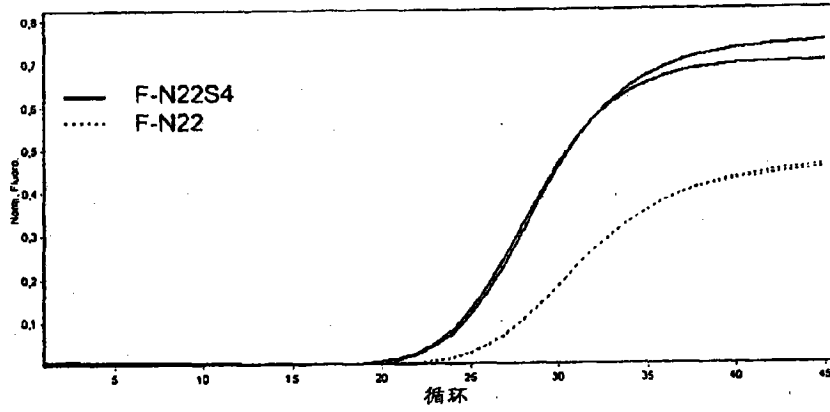


图 6

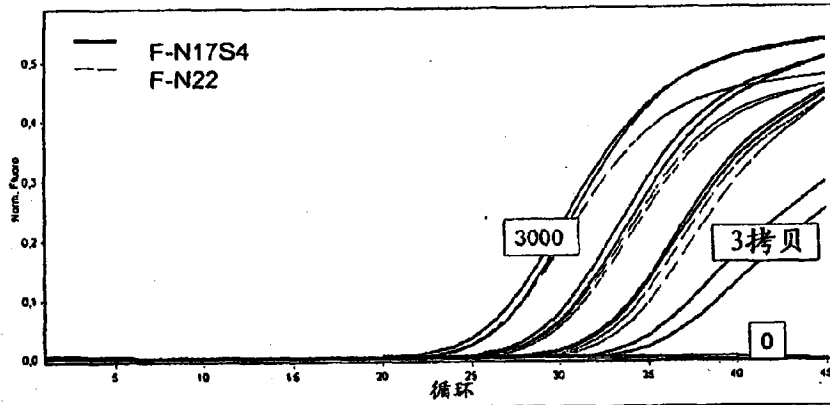
a.

探针	原始背景荧光
F-N22S4	4.8
F-N22	24

b.



c.



d.

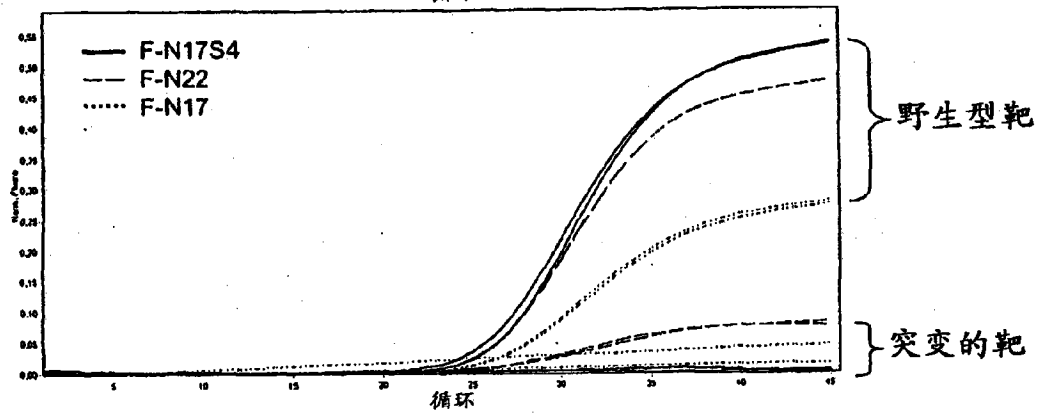
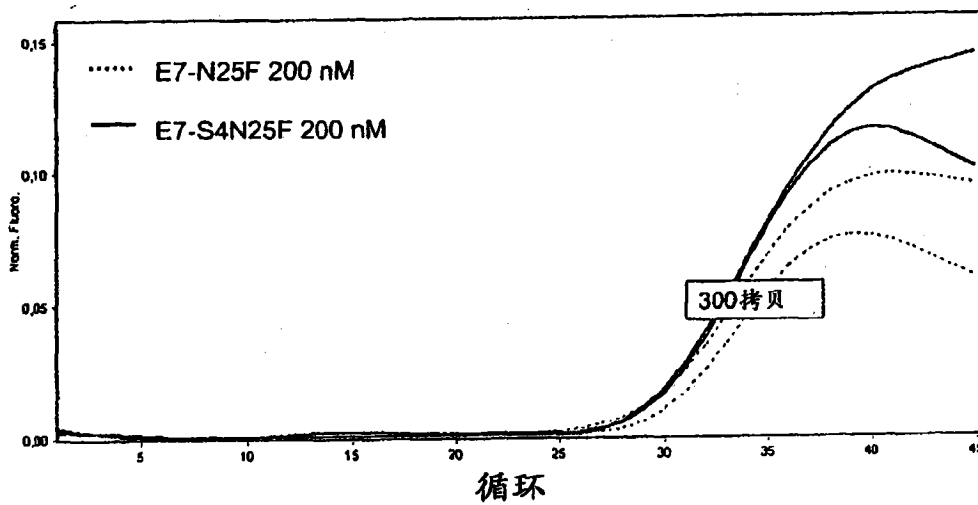


图 7

a.



b.

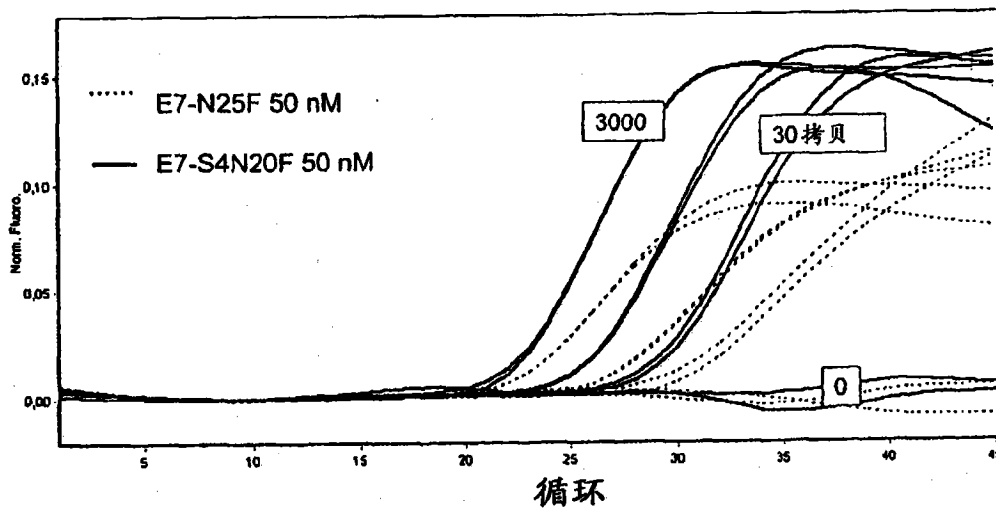


图 8

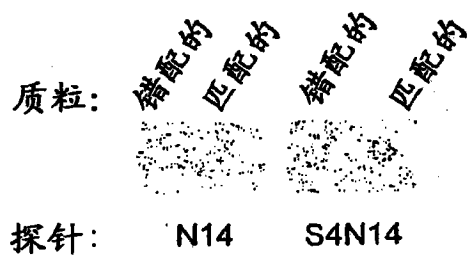


图 9

1. 用于操作、分离、检测或扩增样品中的靶核酸的方法，其包括至少寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物  $A_i-B_j$ ，且包括步骤

- 以所述靶核酸为模板延伸结构 I 至 III 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物  $A_i-B_j$

或

- 用结构 I 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物  $A_i-B_j$  检测所述靶核酸

其中在所述缀合物  $A_i-B_j$  中

.  $A_i$  是  $i$  聚体寡核苷酸， $i = 3$  至  $50$ ，其中  $A_i$  是具有天然或非天然发生的核碱基和 / 或戊呋喃糖基和 / 或天然磷酸二酯键的寡聚体，其任选地包含标记物基团，

.  $B_j$  部分连接至  $A_i$  部分或连接体，所述连接体通过磷酸二酯键连接至  $A_i$ ，

.  $B_j$  是  $j$  聚体有机寡聚阳离子部分， $j = 1$  至  $50$ ，其中  $B$  是

- $HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$ ，其中  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  是相同的或不同的 C1-C6 亚烷基，当  $n$  大于 1 时， $NH-R_2$  部分是相同的或不同的；

- $HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$ ，其中  $R_1$  和  $R_3$  是相同或不同的 C1-C6 亚烷基，并且  $X$  是腐胺、亚精胺或精胺残基，

所述结构 I 至 X 如下：

结构 I

$HO-3', A_i^{5'}, -B_j-R_4$

结构 II

$HO-3', A_{i5}', -R_5-B_j-R_4$

结构 III

$HO-3', A_{i1}^{5'}, -B_j-A_{i2}-R_4$

结构 IV

$R_4-B_j-3', A_i^{5'}, -R_6$

结构 V

$R_4-B_j-R_5-3', A_i^{5'}, -R_6$

结构 VI

$R_7-3', A_i^{5'}, -B_j-R_4$

结构 VII

$R_7-3', A_i^{5'}, -R_5-B_j-R^4$

结构 VIII

$R_7-3', A_{i1}^{5'}, -B_j-3', A_{i2}^{5'}, -R_4$

结构 IX

$R_7-3', A_{i1}^{5'}, -B_j-5', A_{i2}^{3'}, -R_8$

结构 X

$R_4-B_{j1}-3', A_i^{5'}, B_{j2}-R_6$

其中

- $A_{i1}$  和  $A_{i2}$  相同或不同，且如上文中对于  $A_i$  所定义；

- $R_4$  和  $R_6$  是相同的或不同的，它们是 H 或连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、糖或磷酸基团；

-R<sub>5</sub>, 与 H、A<sub>i</sub> 和 B<sub>j</sub> 不同, 是 A<sub>i</sub> 与 B<sub>j</sub> 之间的化学上稳定的或可切割的连接体,

-B<sub>j1</sub> 和 B<sub>j2</sub> 相同或不同, 且如上文中对于 B<sub>j</sub> 所定义;

-R<sub>7</sub> 和 R<sub>8</sub> 是相同的或不同的, 它们与 H 不同, 并且选自连接体、猝灭剂、标记物例如生色团或荧光团、或化学部分例如生物素、疏水链、胆固醇衍生物、抗原、蛋白质、肽、磷酸基团或糖。

脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和非天然发生的核碱基例如锁 (LNA) 核苷酸、PNA 以及它们的化学修饰物或取代物例如硫代磷酸酯、2' - 氟或 2' -O- 烷基。

3. 权利要求 1 至 2 的任一项的方法, 其中所述结构 I 至 III 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用作 DNA 或 RNA 聚合酶的引物。

4. 权利要求 1 至 3 的任一项的方法, 其通过使用至少一个结构 I、II 或 III 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物允许进行核酸扩增。

5. 权利要求 1 至 4 的任一项的方法, 其中所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用于作用于逆转录的引物。

6. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中结构 IV 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物 A<sub>i</sub>-B<sub>j</sub> 用作探针以在包括至少引物延伸步骤的测定中检测所述靶核酸。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物在核酸扩增测定中用于检测靶核酸的探针。

8. 权利要求 6 或 7 的方法, 其中所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物在 PCR、实时 PCR 或逆转录测定中用作探针。

9. 权利要求 6 的方法, 其中所述寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物在包括核酸合成步骤的测定中用作探针。

10. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中结构 IV 至 X 中的至少一个用作夹钳以抑制靶核酸的检测或扩增。

11. 权利要求 1 至 8 的任一项的方法, 其用于扩增和检测靶核酸。

12. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中至少结构 I 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用于在包括核酸合成步骤的测定中检测靶。

13. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中至少一个结构 I 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用于在包括核酸合成步骤的测定中区分野生型和突变型靶核酸。

14. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中至少一个结构 I 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用于多重测定。

15. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中至少一个结构 I 至 X 的寡核苷酸 - 寡聚阳离子缀合物用于包括至少核酸合成步骤的测定中。

16. 权利要求 1 或 2 的方法, 其还包括使用至少一个结构 I 至 X 的分子进行的操作步骤例如纯化、捕获和修饰所述靶核酸。

17. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中至少一个结构 I 至 X 的分子用于区分野生型和突变型靶核酸。