



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101809170 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200880109213. 0

CN 1940087 A, 2007. 04. 04, 全文.

(22) 申请日 2008. 09. 26

EP 1780291 A1, 2007. 05. 02, 全文.

EP 1726664 A1, 2006. 11. 29, 全文.

(30) 优先权数据

60/976, 260 2007. 09. 28 US

Ahmad AI. 《New FRET primers for

quantitative real-time PCR》. 《ANALYTICAL

AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 》. 2007, 第 387

卷 (第 8 期), 2737-2743.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 03. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/077831 2008. 09. 26

审查员 汪未申

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/042851 EN 2009. 04. 02

(73) 专利权人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 耶西·D·米勒

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张爽 樊卫民

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101017141 A, 2007. 08. 15, 全文.

W0 2007060707 A3, 2007. 10. 18, 全文.

权利要求书3页 说明书13页

序列表3页 附图3页

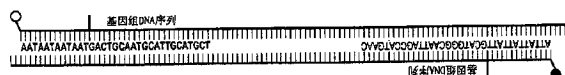
(54) 发明名称

用于检测核酸的双寡核苷酸方法

(57) 摘要

本发明描述了用于扩增和检测核酸的方法，
以及经 5' 标记的寡核苷酸的组。

循环2产物
荧光



猝灭



1. 一组用于检测靶核酸的寡核苷酸,所述寡核苷酸组包含:

a) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第一寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 序列与所述靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%,且其中荧光部分连接在所述第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;和

b) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第二寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 核苷酸序列与所述靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%,且其中受体部分连接在所述第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;

其中所述第一寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%,且其中每个所述寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述第一寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记,和

其中所述第一和第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列在如下温度下退火,所述温度比所述第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列退火到所述靶核酸所需的温度更低。

2. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸组,其中所述受体分子是猝灭剂。

3. 根据权利要求 2 所述的寡核苷酸组,其中所述寡核苷酸在 42℃至 50℃下退火,且其中所述荧光部分的荧光在所述退火温度下被猝灭。

4. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸组,所述组还包含用于检测不同靶核酸的第三和第四寡核苷酸,其中所述第三寡核苷酸包含 5' 和 3' 核苷酸序列,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第三寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 序列与所述不同靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%,且其中荧光分子连接在所述第三寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;以及

其中所述第四寡核苷酸包含 5' 和 3' 核苷酸序列,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第四寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 核苷酸序列与所述不同核酸的第二部分的同一性为至少 90%,且其中受体分子连接在所述第四寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;其中所述第三寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第四寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%,且其中所述第三和第四寡核苷酸每一者的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述第一或第三寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二或第四寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记。

5. 一种检测在生物样品中是否存在靶核酸的方法,所述方法包括:

(a) 使所述生物样品与一组寡核苷酸接触,从而在所述样品中存在所述靶核酸时产生荧光标记的扩增子,所述寡核苷酸组包含:

i) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第一寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 序列与所述靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%,且其中荧光部分连接在所述第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;和

ii) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第二寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 核苷酸序列与所述靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%,且其中受体部分连接在所述第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;其中所述第一寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%,且其中每个所述寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述

第一寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记 ; 以及

(b) 检测所述扩增子的荧光,

其中所述第一和第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列在如下温度下退火, 所述温度比所述第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列退火到所述靶核酸所需的温度更低。

6. 一种检测在生物样品中是否存在至少两种靶核酸的方法, 所述方法包括:

(a) 使所述生物样品与一组寡核苷酸接触, 从而在所述样品中存在所述靶核酸时产生两种荧光标记的扩增子, 所述寡核苷酸组包含:

i) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第一寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 序列与第一靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%, 且其中荧光部分连接在所述第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 和

ii) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第二寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 核苷酸序列与所述第一靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%, 且其中受体部分连接在所述第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 其中所述第一寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90% ;

iii) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第三寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第三寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 序列与第二靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%, 且其中荧光分子连接在所述第三寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 和

iv) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第四寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第四寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 核苷酸序列与所述第二靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%, 且其中受体分子连接在所述第四寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 其中所述第三寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第四寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%, 且其中每个所述寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述第一或第三寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二或第四寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记 ; 以及

(b) 检测所述扩增子的荧光,

其中所述第一和第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列在如下温度下退火, 所述温度比所述第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列退火到所述靶核酸所需的温度更低。

7. 一种用于检测核酸的试剂盒, 其包含一组寡核苷酸, 所述寡核苷酸组包含:

a) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第一寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 序列与所述靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%, 且其中荧光部分连接在所述第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 和

b) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第二寡核苷酸, 其中所述 5' 核苷酸序列从所述第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中所述 3' 核苷酸序列与所述靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%, 且其中受体部分连接在所述第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 ; 其中所述第一寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%, 且其中每个所述寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述第一寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分

或受体部分进行标记,

其中所述第一和第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列在如下温度下退火,所述温度比所述第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列退火到所述靶核酸所需的温度更低。

8. 一种用于对聚合酶链式反应进行基于荧光的监测的反应混合物,所述反应混合物包含一组寡核苷酸、DNA 聚合酶、dNTP 和 MgCl₂,其中所述组寡核苷酸包含:

a) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第一寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 序列与所述靶核酸的第一部分的同一性为至少 90%,且其中荧光部分连接在所述第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;和

b) 包含 5' 和 3' 核苷酸序列的第二寡核苷酸,其中所述 5' 核苷酸序列从所述第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中所述 3' 核苷酸序列与所述靶核酸的第二部分的同一性为至少 90%,且其中受体部分连接在所述第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列;其中所述第一寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列与所述第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列的互补序列的同一性为至少 90%,且其中每个所述寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到所述第一寡核苷酸的所述荧光部分或连接到所述第二寡核苷酸的所述受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记,

其中所述第一和第二寡核苷酸的所述 5' 核苷酸序列在如下温度下退火,所述温度比所述第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列退火到所述靶核酸所需的温度更低。

用于检测核酸的双寡核苷酸方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2007 年 9 月 28 日提交的美国临时专利申请 No. 60/976, 260 的权利, 将该专利申请以引用方式并入本文。

[0003] 发明背景

技术领域

[0004] 本文件涉及用于检测核酸的方法和材料。更具体地讲, 本文件涉及用两种含有互相互补的序列以及与靶核酸不同部分互补的序列的经 5' 标记的寡核苷酸来检测核酸的方法。

[0005] 背景信息

[0006] 荧光共振能量转移 (FRET) 机制已被结合到多种用于检测核酸的测定法中, 包括分子信标测定法和 Taqman 测定法。参见 Epstein 等人 (2002), *Analytica Chimica Acta*, 469 :3-36。对于分子信标, 使用能形成发夹结构的单链探针。该探针经双重标记, 在一端含有荧光团, 在另一端含有猝灭剂。当该探针处于发夹构象时, 荧光被猝灭。当与其靶标杂交时, 则观察到荧光。Taqman 测定法依靠 DNA 聚合酶的 5' - 外切核酸酶活性来消化双重标记探针, 这使荧光标记的核苷酸与猝灭剂物理分离, 导致荧光增加。对于不要求双重标记探针或两种以上的寡核苷酸的核酸检测方法存在着需求。

发明内容

[0007] 本文公开了扩增和检测核酸的简化方法, 该方法使用两种含有 5' 互补序列和 3' 靶标特异性序列的经 5' 标记的寡核苷酸。当该寡核苷酸与它们的靶标退火时, 观察到荧光。相反, 当寡核苷酸互相退火时, 荧光被猝灭。本文所述的方法与传统的实时扩增技术相比背景减低, 可用于从多种样品检测核酸。

[0008] 在一个方面, 本发明涉及一组用于检测靶核酸的寡核苷酸。该组寡核苷酸包括第一和第二寡核苷酸。第一寡核苷酸包括 5' 和 3' 核苷酸序列, 其中 5' 核苷酸序列从第一寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中 3' 序列与靶核酸的第一部分具有至少 80% (例如至少 90% 或 99%) 同一性, 且其中荧光部分连接在第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 (例如连接到 5' 末端核苷酸)。第二寡核苷酸包括 5' 和 3' 核苷酸序列, 其中 5' 核苷酸序列从第二寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸, 其中 3' 核苷酸序列与靶核酸的第二部分具有至少 80% (例如至少 90% 或 99%) 同一性, 且其中受体部分连接在第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列 (例如连接到 5' 末端核苷酸)。第一寡核苷酸的 5' 核苷酸序列与第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列的互补序列具有至少 80% (例如至少 90% 或 99%) 同一性。每种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到第一寡核苷酸的荧光部分或连接到第二寡核苷酸的受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记。第一和第二寡核苷酸长度可为 25 至 50 个核苷酸。

[0009] 第一和第二寡核苷酸的 5' 核苷酸序列在比第一或第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序

列退火到靶核酸所需的温度更低的温度下互相退火。例如,第一和第二寡核苷酸的5' 核苷酸序列可在比第一或第二寡核苷酸二者的3' 核苷酸序列退火到靶核酸所需的温度更低的温度下互相退火。

[0010] 受体分子可为猝灭剂(例如 IOWA BLACK)。寡核苷酸可在 42℃至 50℃下互相退火,荧光部分的荧光可在退火温度下被猝灭。相对于荧光部分在不存在猝灭时的荧光,荧光可被猝灭至少 50%。荧光部分的最大发射光谱可在 420 至 620nm 之间(例如 6-羧基荧光素(6-FAM)、罗丹明绿、俄勒冈绿、六氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、四氯荧光素(TET)或吡啶二碳菁 3(Cy3))。

[0011] 该组寡核苷酸还可包括用于检测不同靶核酸的第三和第四寡核苷酸。第三寡核苷酸可包括 5' 和 3' 核苷酸序列,其中 5' 核苷酸序列从第三寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中 3' 序列与该不同靶核酸的第一部分具有至少 80%(例如至少 90%或 99%)同一性,且其中荧光分子连接在第三寡核苷酸的 5' 核苷酸序列(例如连接到 5' 末端核苷酸)。第四寡核苷酸可包括 5' 和 3' 核苷酸序列,其中 5' 核苷酸序列从第四寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5-23 个核苷酸,其中 3' 核苷酸序列与该不同靶核酸的第二部分具有至少 80%(例如至少 90%或 99%)同一性,且其中受体分子连接在第四寡核苷酸的 5' 核苷酸序列(例如连接到 5' 末端核苷酸)中。第三寡核苷酸的 5' 核苷酸序列与第四寡核苷酸的 5' 核苷酸序列的互补序列具有至少 80%(例如至少 90%或 99%)同一性。第三和第四寡核苷酸各自的 3' 核苷酸序列不用与连接到第一或第三寡核苷酸的荧光部分或连接到第二或第四寡核苷酸的受体部分相容的荧光部分或受体部分进行标记。

[0012] 本发明还涉及检测在生物样品中是否存在靶核酸的方法。该方法包括(a)使生物样品与一组寡核苷酸接触,以在样品中存在靶核酸时产生荧光标记的扩增子,以及(b)检测该扩增子的荧光。该组寡核苷酸包括本文所述的两种寡核苷酸。该接触步骤和检测步骤可在实时 PCR 条件下进行。该检测步骤可包括对荧光的量进行定量。扩增子长度可在 30 至 500 个(例如 50 至 150 个)核苷酸之间。

[0013] 另一方面,本发明描述了检测在生物样品中是否存在至少两种靶核酸的方法。该方法包括(a)使生物样品与一组寡核苷酸接触,以在样品中存在靶核酸时产生两种荧光标记的扩增子;和(b)检测扩增子的荧光。该组寡核苷酸包括本文所述的四种寡核苷酸。

[0014] 又一方面,本发明描述了用于检测核酸的试剂盒。该试剂盒包括本文所述的一组寡核苷酸。该试剂盒还可包括 DNA 聚合酶、MgCl₂、KCl 或脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)。

[0015] 本发明还描述了用于对聚合酶链式反应进行基于荧光的监测的反应混合物。该反应混合物包括本文所述的一组寡核苷酸、DNA 聚合酶、dNTP 和 MgCl₂。该反应混合物还可包括荧光标记的扩增子。该扩增子的有义链的 5' 核苷酸序列与该扩增子的反义链的 5' 核苷酸序列的互补序列具有至少 80%序列同一性,其中所述 5' 核苷酸序列从该扩增子的每条链的 5' 末端开始长度为 5 至 23 个核苷酸,且其中该扩增子的一条链的 5' 核苷酸序列用荧光部分进行标记,该扩增子的另一条链的 5' 核苷酸序列用相容的受体部分进行标记。该扩增子的长度可为 30 至 500 个核苷酸。

[0016] 除非另有定义,否则本文使用的所有科学技术术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。下文描述的是合适的方法和材料,不过与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料也可用于实施本发明。本文提及的所有出版物、专利

申请、专利及其他参考文献全文以引用方式并入本文中。如有冲突,应以本说明书(包括定义在内)为准。另外,材料、方法和实例仅是示例性的,并无意于限制本发明。

[0017] 本发明的一个或多个实施例的细节在以下附图和具体实施方式中给出。根据具体实施方式和附图以及权利要求书,本发明的其他特征、目标和优点将显而易见。

附图说明

[0018] 图 1A-1C 是用一对 5' 标记引物进行的扩增程序的示意图。

具体实施方式

[0019] 大体上讲,本发明公开了使用一组两种寡核苷酸来扩增和检测核酸的材料和方法,其中所述寡核苷酸的 5' 核苷酸序列互相互补,并且 3' 核苷酸序列与靶标特异性序列的不同部分互补。每种寡核苷酸在 5' 核苷酸序列中(例如在其 5' 末端处)进行标记;一种寡核苷酸用荧光供体部分进行标记,并且另一种寡核苷酸用相容的受体部分进行标记。如下所述,这样的寡核苷酸对可作为引物用来实时扩增和检测核酸,而不需要进行双重标记或另外的寡核苷酸引物或探针。

[0020] 寡核苷酸

[0021] 如本文所用,术语“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚体或多聚体,或者它们的类似物。核酸类似物可在碱基部分、糖部分或磷酸主链进行修饰,以例如改善核酸的稳定性、杂交或溶解性。在碱基部分的修饰包括用脱氧尿苷取代脱氧胸苷,和用 5-甲基-2'-脱氧胞苷和 5-溴-2'-脱氧胞苷取代脱氧胞苷。可取代天然碱基的核碱基的其他例子包括 5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟基甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基衍生物和其他烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基衍生物和其他烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶;2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-氮杂尿嘧啶;胞嘧啶和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代特别是 5-溴、5-三氟甲基和其他 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和 7-脱氮腺嘌呤以及 3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。其他有用的核碱基包括例如美国专利 No. 3,687,808 中所公开的那些。

[0022] 糖部分的修饰可包括修饰核糖的 2' 羟基以形成 2' -O-甲基糖或 2' -O-烯丙基糖。可将脱氧核糖磷酸主链进行修饰,以产生其中每个碱基部分与六元吗啉代环连接的吗啉代核酸,或者其中脱氧磷酸主链被假肽主链(例如氨基乙基甘氨酸主链)取代而保留四种碱基的肽核酸。参见例如 Summerton 和 Weller(1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195;和 Hyrup 等,(1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5-23。另外,脱氧磷酸主链可用例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯主链、亚磷酸酰胺或烷基磷酸三酯主链代替。参见例如美国专利 No. 4,469,863、5,235,033、5,750,666 和 5,596,086 关于制备具有经修饰的主链的寡核苷酸的方法。

[0023] 本发明的寡核苷酸长度可在 15 至 50 个(例如 15-30、25-50、30-45、33-40、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、35、37、38、39 或 40 个)核苷酸之间,且具

有相互互补的 5' 核苷酸序列。通常,5' 核苷酸序列从寡核苷酸的 5' 末端开始长度为 5 至 23 个核苷酸。本领域知道,寡核苷酸的序列不需要与其靶核酸的序列 100% 互补才能进行杂交。相反,当一种寡核苷酸的 5' 核苷酸序列与另一种寡核苷酸的 5' 核苷酸序列的互补序列具有至少 80% (例如至少 85%、90%、95%、99% 或 100%) 序列同一性时,就可进行杂交。可基于聚合酶链式反应 (PCR) 循环的退火温度下的荧光水平检测 5' 核苷酸序列的杂交,即当两种寡核苷酸在退火温度下互相杂交时,发生荧光共振能量转移 (FRET),从而荧光被猝灭。如果不发生杂交,则产生荧光。

[0024] 可如下测定核酸序列的同一性百分数。首先,用 BLAST 2Sequences (B12seq) 程序将某核酸序列与靶核酸序列进行比较,该程序来自包含 BLASTN 2.0.14 版和 BLASTP 2.0.14 版的单机版 BLASTZ。该单机版 BLASTZ 可获自 Fish&Richardson 的网站 (www.fr.com/blast)、美国政府的国家生物技术信息中心网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 或者纽约州立大学 Old Westbury 分校图书馆 (QH 497.m6714)。介绍如何使用 B12seq 程序的说明书可在 BLASTZ 随附的自述文件中找到。

[0025] B12seq 是用 BLASTN 算法进行两个序列之间的比较。为比较两个核酸序列,将选项设置如下:-i 设置为含有要比较的第一核酸序列的文件 (例如 C:\seq1.txt);-j 设置为含有要待比较的第二核酸序列的文件 (例如 C:\seq2.txt);-p 设置为 blastn;-o 设置为任何所需的文件名 (例如 C:\output.txt);-q 设置为 -1;-r 设置为 2;所有其他选项保留其默认设置。例如,可用以下命令来产生含有两个序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastn-o c:\output.txt-q-1-r2。如果第一核酸序列与第二核酸序列的任何部分具有同源性,则指定的输出文件将把那些同源性区域作为比对序列呈现。如果第一核酸序列与第二核酸序列的任何部分不具有同源性,则指定的输出文件将不呈现比对序列。

[0026] 一旦得到比对,则通过对所显示的第一核酸序列与第二核酸序列的序列对齐的连续核苷酸的数目进行计数,来确定长度。匹配位置是任何其中同一核苷酸在靶标序列和哺乳动物序列两者中都呈现的位置。第一序列中出现的空位不进行计数,因为空位不是核苷酸或氨基酸残基。同样,第二序列中出现的空位也不进行计数。

[0027] 某确定长度上的同一性百分数是如下进行测定:计数该长度上的匹配位置的数目,将该数目除以该长度,然后将所得数值乘以 100。例如,如果 (1) 将某 300 个氨基酸的靶标序列与参考序列进行比较,(2) B12seq 程序显示靶标序列有 200 个连续氨基酸与参考序列的某个区域进行对齐,以及 (3) 在该 200 个对齐的氨基酸中匹配的数目为 180,则该 300 个氨基酸的靶标序列含有长度为 200 且该长度上同一性百分数为 90 (即 $(180 \div 200) \times 100 = 90$) 的氨基酸区段。

[0028] 应指出,序列同一性百分数值四舍五入到小数点后一位。例如,75.11、75.12、75.13 和 75.14 下舍入为 75.1,而 75.15、75.16、75.17、75.18 和 75.19 上舍入为 75.2。还应指出,长度值总是整数。

[0029] 本发明的寡核苷酸的 3' 核苷酸序列与靶核酸的不同部分具有至少 80% (例如至少 85%、90%、95%、99% 或 100%) 序列同一性,使得当该对寡核苷酸引物用于相同的 PCR 反应时,靶核酸的特定区域可得到扩增 (即得到复制,使得产生出许多拷贝)。一种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列与该待扩增的靶核酸的该特定区域的有义链具有至少 80% 序列同一

性,而另一寡核苷酸与该靶核酸的该特定区域的反义链具有至少 80%序列同一性。通常,3' 核苷酸序列长度为 5 至 45 个核苷酸。

[0030] 在某些实施例中,一种或多种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列可包含万古霉素抗性基因的一部分,所述基因为例如屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 的 VanA 基因。在某些实施例中,其中一种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列包含如本文中 SEQ ID NO:1 中或 SEQ ID NO:2 中所列出的核苷酸序列,如表 1 中所示。在某些实施例中,第一寡核苷酸的 3' 核苷酸序列可包含如 SEQ ID NO:1 中所列出的核苷酸序列,第二寡核苷酸的 3' 核苷酸序列可包含如 SEQ ID NO:2 中所列出的核苷酸序列。

[0031] 表 1 vanA 寡核苷酸的核苷酸序列

[0032]

SEQ ID NO:1	5' TTGTGCGGTATTGGGAAACAGTG 3'
SEQ ID NO:2	5' CCGGCTCGACTTCCTGATGAATA 3'

[0033] 由 SEQ ID NO:1 中所表示的核苷酸序列组成的寡核苷酸可与 vanA 核酸靶标杂交,对应于 GenBank 登记号 EF206285 (在本文中标示为 SEQ ID NO:3) 的核苷酸 590-611, EF206285 描述的是屎肠球菌的 vanA 部分基因序列。由 SEQ ID NO:2 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸可与 vanA 核酸靶标杂交,对应于 SEQ ID NO:3 的核苷酸 667-689 的反向互补序列。

[0034] 包含 SEQ ID NO:1 中所列出的 3' 核苷酸序列的寡核苷酸,或者包含 SEQ ID NO:2 中所列出的 3' 核苷酸序列的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸包含 SEQ ID NO:1 中所列出的 3' 核苷酸序列并且第二寡核苷酸包含 SEQ ID NO:2 中所列出的 3' 核苷酸序列的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。基本上由 SEQ ID NO:1 中所列出的 3' 核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者基本上由 SEQ ID NO:2 中所列出的 3' 核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO:1 中所列出的 3' 核苷酸序列组成并且第二寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO:2 中所列出的 3' 核苷酸序列组成的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。

[0035] 表 2. GenBank 登记号 EF206285 所列出的屎肠球菌的部分 vanA 核苷酸序列。

[0036]

SEQ ID NO :3	1 ggtaaaatct gcaatagaga tagccgctaa cattaataaa 41 gaaaaatacg agccgttata cattggaatt acgaaatctg 81 gtgtatggaa aatgtgcgaa aaaccttgcg cggaatggga 121 aaacgacaat tgctattcag ctgtactctc gccggataaa 161 aaaatgcacg gattacttgt taaaaagaac catgaatatg 201 aaatcaacca tgttgatgta gcattttcag ctttgcattg 241 caagtcaggt gaagatggat ccatacaagg tctgtttgaa 281 ttgtccggta tcccttttgt aggetgcgat attcaaagct 321 cagcaatttg tatggacaaa tcgttgacat acatcgttgc 361 gaaaaatgct gggatagcta ctcccgccctt ttgggttatt 401 aataaagatg ataggccggg ggcagctacg tttacctatc 441 ctgtttttgt taagccggcg cgttcaggct catccttcgg 481 tgtgaaaaaa gtcaatagcg cggacgaatt ggactacgca 521 attgaatcgg caagacaata tgacagcaaa atcttaattg 561 agcaggctgt ttcgggctgt gaggtcgggt gtgcggattt 601 gggaaacagt gccgcgttag ttgttggega ggtggaccaa 641 atcaggctgc agtacggaat ctttcgtatt catcaggaag 681 tcgagccgga aaaaggctct gaaaacgcag ttataaccgt 721 tccgcagac ctttcagcag aggagcgagg acggatacag 761 gaaacggcaa aaaaaatata taaagcgctc ggctgtagag 801 gtctagcccg t
--------------	--

[0037] 由 SEQ ID NO :4 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸可与 SEQ IDNO :3 杂交。由 SEQ ID NO :5 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸可与 SEQ ID NO :3 杂交。

[0038] 包含 SEQ ID NO :4 所列出的核苷酸序列的寡核苷酸,或者包含 SEQ ID NO :5 所列出的核苷酸序列的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸包含 SEQ ID NO :4 所列出的核苷酸序列并且第二寡核苷酸包含 SEQ IDNO :5 所列出的核苷酸序列的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。基本上由 SEQ ID NO :4 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者基本上由 SEQ ID NO :5 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO :4 所列出的核苷酸序列组成并且第二寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO :5 所列出的核苷酸序列组成的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。

[0039] 表 3. 与 vanA 基因杂交的寡核苷酸的核苷酸序列。

[0040]

SEQ ID NO :4	5' CACCACCACCACCTTGTGCGGTATTGGGAAACAGTG 3'
SEQ ID NO :5	5' GGTGGTGGTGGTGCCGGCTCGACTTCCTGATGAATA 3'

[0041] 将寡核苷酸(如包含 SEQ ID NO :4、5、6 或 7 中所列出的核苷酸序列中的任意一者的寡核苷酸或者基本上由 SEQ ID NO :4、5、6 或 7 中所列出的核苷酸序列中的任意一者组成的寡核苷酸)的 5' 核苷酸序列设计成使得 5' 核苷酸序列相互间的退火温度比 3' 核苷酸序列和它们的靶标之间的退火温度低。例如,5' 核苷酸序列的退火温度可比 3' 核苷

酸序列与它们的靶标的退火温度低 5 至 20℃ (例如 6 至 18℃、7 至 17℃、8 至 14℃或 9 至 11℃)。这使得每种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列在寡核苷酸互相退火 (即退火成引物二聚体) 之前与其靶标退火。参见图 1A-1C。5' 核苷酸序列相互间的退火温度和 3' 核苷酸序列与它们的靶标序列的退火温度之间较大的差异,能使得在达到寡核苷酸可互相退火而形成引物二聚体的最终退火温度之前,反应偏向于寡核苷酸与它们的靶标退火。退火温度可凭经验确定,或者由计算得到的寡核苷酸解链温度 (T_m) 减去 5 至 10℃ 来确定。寡核苷酸的 T_m 值取决于序列的长度、序列的鸟嘌呤 + 胞嘧啶含量以及所存在的阳离子 (特别是钠离子 (Na^+)) 的类型和浓度,可按 SantaLucia(Proc Natl Acad Sci U S A(1998)95:1460-5) 的方法计算。

[0042] 在某些实施例中,寡核苷酸的 5' 核苷酸序列可包含 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 所列出的核苷酸序列。

[0043] 表 4. 寡核苷酸的 5' 核苷酸序列。

[0044]

SEQ ID NO:6	5' CACCACCACCACC 3'
SEQ ID NO:7	5' GGTGGTGGTGGTG 3'

[0045] 包含 SEQ ID NO:6 所列出的 5' 核苷酸序列的寡核苷酸,或者包含 SEQ ID NO:7 所列出的 5' 核苷酸序列的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸包含 SEQ ID NO:6 所列出的 5' 核苷酸序列并且第二寡核苷酸包含 SEQ ID NO:7 所列出的 5' 核苷酸序列的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。基本上由 SEQ ID NO:6 所列出的 5' 核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者基本上由 SEQ ID NO:7 所列出的 5' 核苷酸序列组成的寡核苷酸,或者其中第一寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO:6 所列出的 5' 核苷酸序列组成并且第二寡核苷酸基本上由 SEQ ID NO:7 所列出的 5' 核苷酸序列组成的寡核苷酸混合物,可用于根据本公开内容的检测靶核酸的方法。

[0046] 每种寡核苷酸 (例如包含 SEQ ID NO:4、5、6 或 7 所列出的核苷酸序列中的任意一者的寡核苷酸或者基本上由 SEQ ID NO:4、5、6 或 7 所列出的核苷酸序列中的任意一者组成的寡核苷酸) 的 5' 核苷酸序列用荧光供体部分或受体部分进行标记。每种寡核苷酸的 3' 核苷酸序列不用与连接到该组寡核苷酸中的任何寡核苷酸的荧光供体部分或受体部分相容的荧光供体部分或受体部分进行标记。在许多实施例中,5' 核苷酸序列在其 5' 末端进行标记,即 5' 末端核苷酸被标记。很多种荧光供体在文献中公知,包括例如咕吨染料,例如荧光素染料或罗丹明染料,包括 5-羧基荧光素 (FAM)、6-羧基荧光素 (6-FAM)、六氯荧光素 (HEX)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)、四氯荧光素 (TET)、荧光素的氟化类似物 (例如俄勒冈绿 3)、6-羧基罗丹明 (R6G)、N,N,N,N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明 (ROX)。合适的荧光供体还包括在 α 或 β 位置具有氨基的萘胺染料。萘基氨基化合物的非限制性例子包括 1-二甲氨基萘基-5-磺酸盐、1-苯胺基-8-萘磺酸酯和 2-对甲苯氨基-6-萘磺酸盐、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸 (EDANS)。其他的荧光供体包括香豆素,如 3-苯基-7-异氰酸香豆素;吖啶,例如 9-异硫氰酸根合吖啶和吖啶橙;N-(p-(2-苯并噻唑基)苯基)马来酰亚胺;花菁,如吖啶二碳菁 3 (Cy3)、吖啶二碳菁 5 (Cy5)、吖啶二碳菁 5.5 (Cy5.5)、3-(-羧基-戊基)-3'-乙基-5,

5' - 二甲基氧杂碳菁 (CyA) ;1H,5H,11H,15H- 咕吨并 [2,3,4-ij :5,6,7-i' j'] 二喹啉 -18- 蒽、9-[2(或4)-[[[6-[2,5- 二氧化-1- 吡咯烷基) 氧基]-6- 氧代己基] 氨基] 磺酰基]-4(或2)- 磺苯基]-2,3,6,7,12,13,16,17- 八氢内盐 (TR 或者说德克萨斯红) ; BODIPYTM 染料 ; 苯并噁二唑 ; 芪 ; 芪等。

[0047] 5' 受体部分必须与 5' 供体荧光部分相容。本文所用的“相容受体”是其吸收光谱与供体的发射光谱重叠的分子。受体部分可以是猝灭剂,即造成供体部分降低其荧光发射强度的非荧光分子,或者是接受从供体非发射性放出的能量并以受体的特征性发射光谱再发射该能量的荧光分子。参见 Epstein 等 (2002) *Analytica Chimica Acta*, 469 :3-36。

[0048] 受体部分的非限制性例子包括 TAMRA、Dabcyl (4-(二甲氨基偶氮) 苯 -4- 甲酸)、Black Hole Quencher[®] 如 BHQ[®]-1 (对 500-550nm 波长范围内的光的吸收最大)、BHQ[®]-2、BHQ[®]-3 (对 650-700nm 波长范围内的光的吸收最大)、Iowa Black3FQ (对 420-700nm 之间 (例如 420-620nm 之间) 的光的吸收最大)、LCTM-Red 640、LCTM-Red 705、Cy5、Cy5.5 (对 500-705nm 之间的光的吸收最大)、丽丝胺罗丹明 B 磺酰氯、四甲基异硫氰酸罗丹明、异硫氰酸罗丹明 x、异硫氰酸赤藓红、荧光素、二亚乙基三胺五乙酸或镧系元素离子 (例如铕或铽) 的其他螯合物。例如,6-FAM、罗丹明绿、俄勒冈绿、HEX、JOE、TET 或 Cy3 可用作荧光供体,Iowa Black3FQ 可用作受体。参见例如美国专利申请公开 No. 20060263816 关于合成暗猝灭剂和将暗猝灭剂连接到寡核苷酸的方法。供体部分和受体部分可获自例如 Molecular Probes (Junction City, OR)、Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA) 或 SigmaChemical Co. (St. Louis, MO)。

[0049] 经 5' 标记的寡核苷酸互相杂交后,荧光供体部分和相容的受体部分必须靠近以使得 FRET 可发生。FRET 技术 (参见例如美国专利 No. 4,996,143、5,565,322、5,849,489 和 6,162,603) 是基于这样的原理:当将供体部分和相容的受体部分定位成相互间相隔 Förster 距离以内时,这两个部分之间发生可见的或者以别的方式检测的和 / 或定量的能量转移。Förster 距离指相容的 FRET 对之间的共振能量转移下降至 50% 时的距离,通常在 10 至 100Å 之间。因此,当寡核苷酸互相杂交时,每种寡核苷酸的 5' 供体部分和 5' 受体部分相隔可最长达 23 个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23) 个核苷酸。优选地,5' 标记相互间相隔 1 至 20 个 (例如 3 至 20、4 至 19、6 至 18、8 至 15 或 11 至 14 个) 核苷酸以内。当受体部分是猝灭剂时,两种寡核苷酸互相杂交时会观察到荧光发射强度下降。相对于荧光分子在不存在猝灭时的荧光,供体的荧光下降至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 是特别有用的。如果受体部分是另一荧光部分,会在该受体的特征性发射光谱观察到荧光,而供体荧光降低。

[0050] 合成寡核苷酸的方法是已知的。通常使用自动 DNA 合成仪,如得自 Applied Biosystems (Foster City, CA) 的自动 DNA 合成仪。一旦合成寡核苷酸并除去任何保护基,可将该寡核苷酸纯化 (例如通过萃取和凝胶纯化或离子交换高效液相色谱法 (HPLC) 进行纯化),并可测定该寡核苷酸的浓度 (例如通过在分光光度计中于 260nm 处测量光密度来测定)。

[0051] 寡核苷酸可在合成过程中用供体部分或受体部分进行标记,或者可在合成之后连接上供体部分或受体部分。可使用接头分子用本领域已知的技术将供体部分或受体部分连接到寡核苷酸。参见例如《Molecular Probes 公司的荧光探针和标记技术指南手

册》(The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies from Molecular Probes, 见 www.probes.invitrogen.com/handbook)。常用来将供体荧光部分(如荧光素)偶联到寡核苷酸的接头包括硫脲接头(FITC 衍生的,例如得自 Glen Research 或 ChemGene(Ashland, MA) 的荧光素-CPG)、酰胺接头(荧光素-NHS-酯衍生的,如得自 BioGenex(San Ramon, CA) 的荧光素-CPG)或者要求在寡核苷酸合成后偶联荧光素-NHS-酯的 3'-氨基-CPG。

[0052] 检测核酸的方法

[0053] 本文公开的方法可用于检测任何生物体的核酸,包括任何微生物、植物或动物(例如哺乳动物,如小鼠、大鼠、猫、狗、马、牛、非人灵长类动物如食蟹猴、或者人)。因此,所述方法可用于诊断生物样品(例如食物产品或者来自人的血液或组织样品)中是否存在传染病因子(例如引起人类疾病的微生物)。

[0054] 特别值得关注的微生物包括原核微生物和真核微生物,特别是革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、支原体、酵母、病毒和脂质包膜病毒。通常,革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌可通过检测该细菌的特征性细胞壁成分(如编码细胞壁蛋白质的核酸)的存在来进行鉴定。特别相关的微生物包括肠杆菌科(Enterobacteriaceae)或微球菌科(Micrococcaceae)或葡萄球菌属(Staphylococcus)物种、链球菌属(Streptococcus)物种、假单胞杆菌属(Pseudomonas)物种、肠球菌属(Enterococcus)物种、沙门氏菌属(Salmonella)物种、军团菌属(Legionella)物种、志贺杆菌属(Shigella)、耶尔森氏菌属(Yersinia)、肠杆菌属(Enterobacter)物种、埃希氏菌属(Escherichia)物种、芽孢杆菌属(Bacillus)物种、李斯特菌属(Listeria)物种、弧菌属(Vibrio)物种、棒杆菌属(Corynebacteria)物种以及疱疹病毒、曲霉属(Aspergillus)物种、镰刀菌属(Fusarium)物种和假丝酵母属(Candida)物种。毒力特别强的微生物包括金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)(包括抗性菌株如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA))、表皮葡萄球菌(S. epidermidis)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、无乳链球菌(S. agalactiae)、化脓性链球菌(S. pyogenes)、屎肠球菌(Enterococcus faecalis)、万古霉素抗性肠球菌(Enterococcus(VRE))、万古霉素抗性金黄色葡萄球菌(VRSA)、万古霉素中等抗性金黄色葡萄球菌(VISA)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa)、大肠杆菌(Escherichia coli)0157 和多药物抗性革兰氏阴性杆菌(MDR)。通常,可由是否存在编码负责抗生素抗性的内部细胞成分(如膜蛋白、转运蛋白、酶等)的核酸,来检测抗生素抗性微生物。

[0055] 可通过使生物样品与上述的一对寡核苷酸接触,从而在样品中存在靶核酸时产生荧光标记的扩增子,来检测在生物样品中是否存在靶核酸。如本文所用的,“扩增子”指长度

通常为 30-500 个核苷酸（例如 30-300、30-200、30-150 或 50-150 个核苷酸）的双链扩增产物。在荧光标记的扩增子当中，有义链的 5' 核苷酸序列与反义链的 5' 核苷酸序列的互补序列具有至少 80%（例如至少 85%、90%、95%、99% 或 100%）序列同一性。术语“有义链”和“反义链”在本文中用来表示双链核酸分子的每条链，并不限于该核酸的编码区。5' 核苷酸序列从扩增子的每条链的 5' 末端开始长度为 5 至 23 个核苷酸。此外，一条链的 5' 核苷酸序列用荧光部分进行标记，另一条链的 5' 核苷酸序列用相容的受体部分进行标记。在一个实施例中，对每条链的 5' 末端核苷酸进行标记。参见例如图 1C。

[0056] 接触步骤是在 PCR（例如实时 PCR）条件下进行，使得靶核酸（如果存在的话）能被扩增而产生荧光标记的扩增子。通常，在实时 PCR 条件下产生的扩增子长度在 30-200 个（例如 30-150 或 50-150 个）核苷酸。在本文所述的方法中，对核酸分子进行扩增包括：使模板核酸变性；通过逐渐降低温度，直到达到低于引物的 5' 核苷酸序列的解链温度的最终退火温度，使寡核苷酸引物与靶核酸退火或者寡核苷酸引物互相退火；从引物进行酶促延伸，产生荧光标记的扩增子。如上所论述的，寡核苷酸引物的 3' 核苷酸序列在比寡核苷酸引物的 5' 核苷酸序列互相退火的温度高的温度下与它们的靶标退火。引物二聚体的形成不会对背景荧光有贡献，因为有猝灭发生，且引物二聚体不能被聚合酶延伸。因此，引物二聚体的形成不会干扰反应。

[0057] 扩增通常要求存在有脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、DNA 聚合酶（例如 **Platinum[®]** Taq）和使聚合酶处于最佳活性的适当缓冲液和 / 或辅因子。PCR 条件通常由反应缓冲液中的盐（例如 $MgCl_2$ 和 KCl）的浓度和由解链、退火和延伸所采用的温度来限定。还可提出寡核苷酸引物、靶核酸、dNTP 和 DNA 聚合酶的具体浓度和数量。例如，如下的 PCR 条件可以是特别有用的：缓冲液含有 1.5 至 2.5mM $MgCl_2$ ，解链、退火和延伸温度分别为 94-95℃、35-65℃（例如 42-50℃）和 60-72℃。在一些实施例中，可使用含有适当浓度的缓冲液、盐、dNTP 和 DNA 聚合酶的市售混合物（例如得自 Applied Biosystems 公司的 **GeneAmp[®]** Fast PCR Master Mix(2X)）。每个循环中变性、退火和延伸各可进行例如 15-45 秒（例如 30 秒），共 25 至 50 个循环（例如 45 个循环）。初始变性步骤（例如 94-95℃ 1 至 2 分钟）和 / 或最终延伸步骤（例如 60-72℃ 1 至 10 分钟）也可以是可用的。例如，可进行 95℃ 变性 1 分钟，接着进行 45 个循环的 95℃ 变性 15 秒，45℃ 退火 30 秒，60℃ 延伸 30 秒。在变性、退火和延伸步骤之间可根据需要以每秒 5-30℃（例如 20℃）的速度降低或提高温度。

[0058] 单个 PCR 反应混合物可含有一组寡核苷酸引物。一组引物是一对即两种寡核苷酸。或者，单个反应混合物可含有多种寡核苷酸引物对，在这种情况下可产生许多扩增子。每组引物可扩增例如编码区或其部分（例如全长编码区、一个外显子或外显子的一部分）或者非编码区或其部分（例如启动子或内含子或它们的部分）。在使用两组或更多组寡核苷酸引物的实施例中，每组寡核苷酸的 3' 核苷酸序列可设计成使得从两种或更多种靶核酸产生扩增子（例如为了检测一群或更多群微生物），或者从同一靶核酸的两个或更多个区域产生扩增子（例如为了使针对具有遗传变异的微生物的检测的包容性最大化）。各引物对的 5' 核苷酸序列可具有相同或不同的核苷酸序列。

[0059] 可使用例如光子计数落射荧光显微镜系统（装有适当的用于监测特定范围的荧光发射的二向色镜和滤光器）、光子计数光电倍增器系统或荧光计，对扩增子的荧光进行检测，在一些实施例中还进行定量。可用氩离子激光器、高强度汞（Hg）弧光灯、纤维导光光源

或其他经适当滤光以在所需范围进行激发的高强度光源来进行激发以引发能量转移。可在已达到最终退火温度和寡核苷酸已互相退火之后进行荧光检测。可将可检测到 FRET 的循环数目（即 Ct 值）与生物样品中的靶核酸的量建立关联。

[0060] 更通常，在热循环仪装置当中进行多个接触步骤和检测步骤，所述装置为例如 LIGHTCYCLER(Roche)（美国犹他大学研究基金会、国际公开号 WO 97/46707、WO 97/46714 和 WO 97/46712）、Mx3005P 实时 PCR 系统（Stratagene, La Jolla, CA）或得自 Bio-Rad 公司的扩增装置。可优选结合微流控装置来实施本发明。“微流控装置”指具有至少一个或多个流体通道、室或导管的装置，所述流体通道、室或导管具有至少一个小于 500 μm 、通常在 0.1 μm 至 500 μm 之间的内截面尺寸，例如深度、宽度、长度、直径等。通常，微流控装置包括多个室（例如扩增反应室、上样室等），每个室限定用于容纳样品的容积。潜在合适的微流控装置的一些例子在美国专利 No. 6,627,159 (Bedingham 等)；6,720,187 (Bedingham 等)；6,734,401 (Bedingham 等)；6,814,935 (Harms 等)；6,987,253 (Bedingham 等)；7,026,168 (Bedingham 等)；7,164,107 (Bedingham 等) 和 7,192,560 (Parthasarathy 等) 中有所描述。应理解，本发明并不受用来扩增和检测扩增子的装置的限制。

[0061] 在一些实施例中，本发明的方法可包括避免污染的步骤。例如，利用尿嘧啶-DNA 糖基化酶的酶学方法在美国专利 No. 5,035,996、5,683,896 和 5,945,313 中描述用于减少或消除一次热循环仪运行和下一次运行之间的污染。另外，当实践本发明的方法时，标准的实验室防护规范和程序是可取的。防护规范和程序包括但不限于：分开的工作区用于方法的不同步骤、防护罩、阻挡滤片移液管头和专用的空气排代移液管。专业人员执行一致的防护规范和程序通常是为了操作临床样品的诊断实验室的准确性。

[0062] 在每轮 PCR（例如每次热循环仪运行）中还可将对照样品进行循环。阳性对照样品可使用例如对照寡核苷酸引物扩增核酸对照模板（例如来自质粒）。这种质粒对照可被内部扩增（例如在生物样品中扩增）或者在与试验样品并行运行的单独样品中被扩增。每次热循环仪运行还可包括例如没有靶核酸的阴性对照。这种对照是扩增和 / 或 FRET 反应成功与否的指标。因此，对照反应可容易确定例如引物以序列特异性退火和引发延伸以及使 FRET 发生的能力。

[0063] 制品

[0064] 本发明的寡核苷酸可与包装材料组合，作为用于检测生物样品的核酸的试剂盒出售。例如，试剂盒可包括用于检测特定微生物的寡核苷酸，所述微生物例如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* (包括 MRSA))、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、无乳链球菌 (*S. agalactiae*)、化脓性链球菌 (*S. pyogenes*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、VRE、VRSA、VISA、炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、烟曲霉 (*A. fumigatus*)、棒曲霉 (*A. clavatus*)、茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、厚垣镰刀菌 (*F. chlamydosporum*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、伊凡诺夫李斯特菌 (*Listeria ivanovii*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*C. glabrata*)、克柔念珠菌 (*C. krusei*)、阪

嗜肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 0157 和 MDR。生产制品的组分和方法是公知的。制品可组合本文所述的两种或更多种寡核苷酸。此外,制品可包括一个或多个另外的寡核苷酸引物组(例如 3、4、5 或 6 种引物对),使得可产生多种核酸产物。

[0065] 本发明的制品还可包括一种或多种用于标记寡核苷酸的供体荧光部分或受体部分,或者,随试剂盒供应的寡核苷酸可以是经标记的。例如,制品可包括用于标记其中一种寡核苷酸的供体荧光部分和用于标记另一种寡核苷酸的相容的猝灭剂部分。上文提供了合适的 FRET 供体荧光部分和相容的受体部分的例子。

[0066] 制品还可包括用于实施本文公开的方法的试剂(例如缓冲液、DNA 聚合酶、 $MgCl_2$ 、 KCl 、 $MgSO_4$ 、dNTP、辅因子、对照核酸、防污染剂或者其他可用于进行 PCR 反应的试剂)。这些试剂可适用于本文所述的市售仪器之一。在这种试剂盒中还可包括指示如何使用寡核苷酸来检测核酸的说明书。

[0067] 在一些实施例中,制品可包括用于对 PCR 进行基于荧光的监测的反应混合物。该反应混合物可包括本文所论述的一组寡核苷酸和用于进行 PCR 反应的试剂。例如,反应混合物中可包括 DNA 聚合酶、dNTP 和 $MgCl_2$ 或 KCl 。这种制品还可包括指示如何使用该反应混合物来检测核酸的说明书。

[0068] 以下实例将进一步描述本发明,这些实例并不限制权利要求书中所描述的本发明范围。

[0069] 实例

[0070] 在本实例中,用一对经 5' 标记的引物扩增和检测万古霉素抗性屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) (ATCC 700221, Manassas VA) (VRE) 的 *vanA* 基因。将屎肠球菌划线到血液琼脂培养基上,在 37°C 下孵育 20 小时。孵育后,通过将新鲜生长物的样品稀释于 TE 缓冲液 (10mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 至 0.5McFarland 标准来制备细胞悬浮液,这相当于大约 1×10^8 CFU/mL。用 MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (细菌、真菌) 试剂盒 (仪器和试剂 Roche (Indianapolis, IN)) 按照生产商说明书从 100TL 的细胞悬浮液提取和分离屎肠球菌 DNA。

[0071] 以下引物由 Integrated DNA Technologies 公司 (Coralville, IA) 合成。*vanA* 正向引物序列 5' CACCACCACCACCTTGTGCGGTATTGGGAAACAGTG 3' (SEQ IDNO:4) 用 6-羧基 -4', 5' -二氯 -2', 7' -二甲氧基荧光素 (JOE) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 在 5' 位置进行标记。*vanA* 反向引物序列 5' GGTGGTGGTGGTGCCGGCTCGA CTTCCTGATGAATA 3' (SEQ IDNO:5) 用 Iowa Black3FQ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 在 5' 位置进行标记。

[0072] 将纯化的屎肠球菌 DNA 进行实时 PCR 扩增,该扩增每个样品取 3.5 μ L 用不同浓度的探针进行,重复一次。具体地讲,PCR 扩增是在 10 μ L 的总体积中进行,该体积含有 3.5 μ L 的样品和 6.5mL 的以下混合物:两个不同初始浓度的引物 -2 μ M 和 4 μ M (各 0.5 μ L) 和 GeneAmp® Fast PCR Master Mix (5.5mL 的 2X, Applied Biosystems, Foster City, CA)。扩增是在 Stratagene Mx3005P 实时 PCR 系统 (Stratagene) 上按以下方案进行:95°C 初始变性 60 秒,接着 45 个 PCR 循环的 95°C 15 秒 (每秒降低 20°C), 45°C 30 秒 (每秒降低 20°C), 60°C 30 秒 (每秒降低 20°C)。结果用随 Stratagene Mx3005P 实时 PCR 系统提供的软件进行分析。在本实例给出的条件下,探针成功地扩增了 *vanA* 基因,如下表 5 所示。表

5 中的 Ct 值指荧光的增加为指数增加并越过阈值时的循环数目。

[0073] 表 5

[0074] VRE 的 vanA 基因的实时 PCR 扩增

[0075]	样品	Ct	
[0076]	2 μ M 正向 / 2 μ M 反向	20.14	19.87
[0077]	2 μ M 正向 / 4 μ M 反向	19.5	19.2
[0078]	4 μ M 正向 / 2 μ M 反向	19.36	19.28
[0079]	4 μ M 正向 / 4 μ M 反向	19.07	18.86
[0080]	无模板对照 :	37.37	36.72
[0081]	2 μ M 正向 / 2 μ M 反向		

[0082] 这些结果表明,用具有 SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 所表示的核苷酸序列的经 5' 标记的引物成功扩增和检测了 vanA 基因。在 2.2% 琼脂糖快速凝胶 (Lonza, Basel, Switzerland) 上对每个反应的反应产物进行分析,显示出除了“无模板对照”外,每个样品都有产物。

[0083] 其他实施例

[0084] 应当理解,虽然已结合具体实施方式对本发明进行了描述,但前面的描述旨在举例说明而非限制本发明的范围,本发明范围是由所附权利要求书的范围来限定。其他的方面、优点和修改形式也落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110>3M 创新有限公司

<120> 用于检测核酸的双寡核苷酸方法

<130>SCT101581-80

<150>US 60/976, 260

<151>2007-09-28

<160>7

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>23

<212>DNA

<213>Enterococcus faecium

<400>1

ttgtgcggta ttgggaaaca gtg

23

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213>Enterococcus faecium

<400>2

ccggctcgac ttctgatga ata

23

<210>3

<211>811

<212>DNA

<213>Enterococcus faecium

<400>3

ggtaaaatct gcaatagaga tagccgctaa cattaataaa gaaaaatacg agccgttata

60

catttggaatt acgaaatctg gtgtatggaa aatgtgcgaa aaaccttgcg cggaatggga

120

aaacgacaat tgctattcag ctgtactctc gccggataaa aaaatgcacg gattacttgt	180
taaaaagaac catgaatatg aaatcaacca tgttgatgta gcattttcag ctttgcattg	240
caagtcaggt gaagatggat ccatacaagg tctgtttgaa ttgtccggta tcccttttgt	300
aggctgcgat attcaaagct cagcaatttg tatggacaaa tcgttgacat acatcgttgc	360
gaaaaatgct gggatagcta ctcccgcctt ttgggttatt aataaagatg ataggccggt	420
ggcagctacg ttacctatc ctgtttttgt taagccggcg cgttcaggct catccttcgg	480
tgtgaaaaaa gtcaatagcg cggacgaatt ggactacgca attgaatcgg caagacaata	540
tgacagcaaa atcttaattg agcaggtgtt ttcgggctgt gaggtcgggt gtgcggtatt	600
gggaaacagt gccgcgttag ttgttggcga ggtggaccaa atcaggctgc agtacggaat	660
ctttcgtatt catcaggaag tcgagccgga aaaaggctct gaaaacgcag ttataaccgt	720
tcccgcagac ctttcagcag aggagcggag acggatacag gaaacggcaa aaaaaatata	780
taaagcgctc ggctgtagag gtctagcccg t	811

<210>4

<211>36

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer derived from E. faecium vanA gene

<400>4

caccaccacc accttgtgcg gtattgggaa acagtg	36
---	----

<210>5

<211>36

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer derived from E. faecium vanA gene

<400>5

ggtggtggtg gtgccggctc gacttctga tgaata	36
--	----

<210>6

<211>13

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic oligonucleotide for 3' sequence

<400>6

caccaccacc acc

13

<210>7

<211>13

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Synthetic oligonucleotide for 3' sequence

<400>7

ggtggtggtg gtg

13

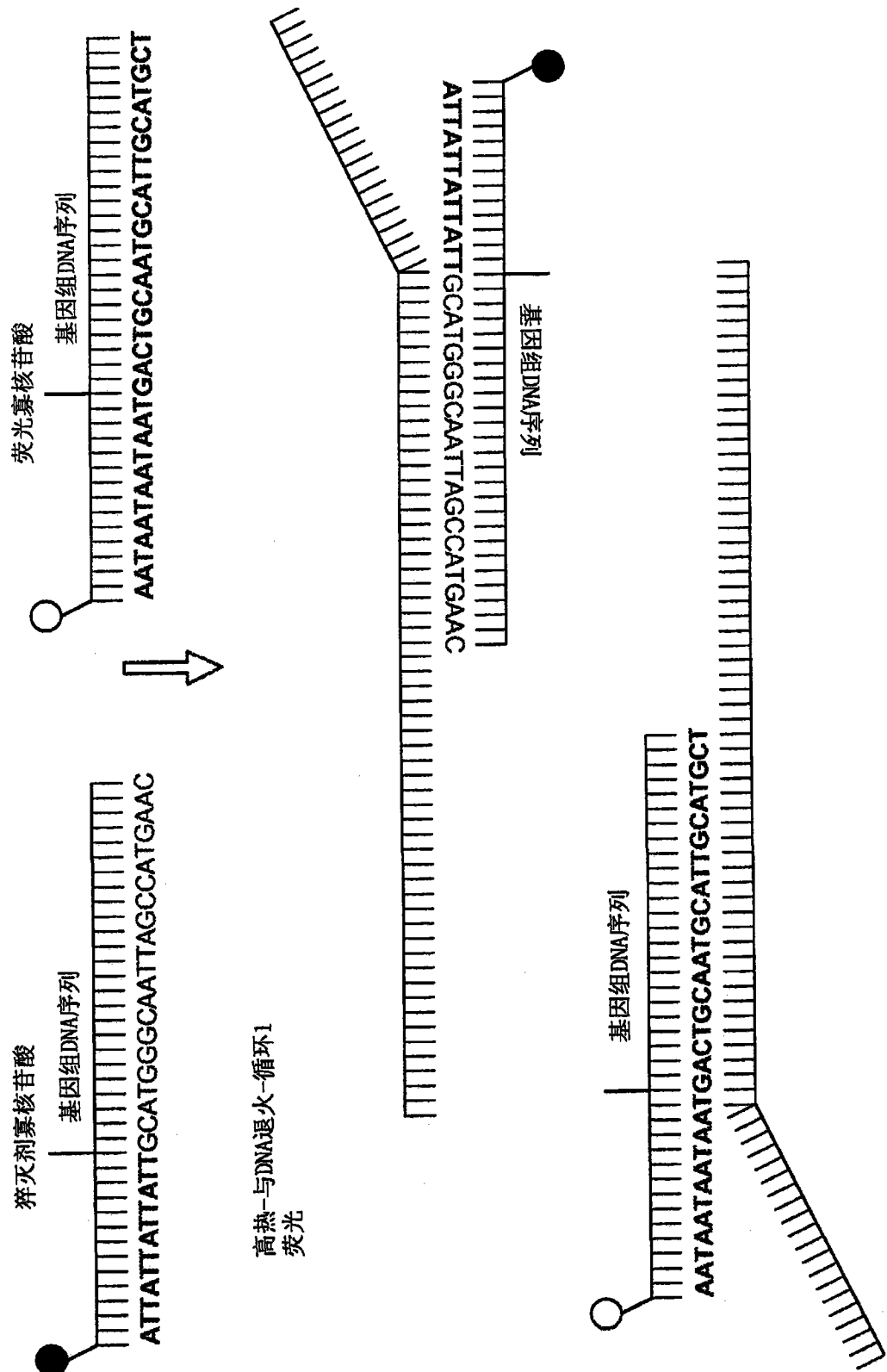


图 1A

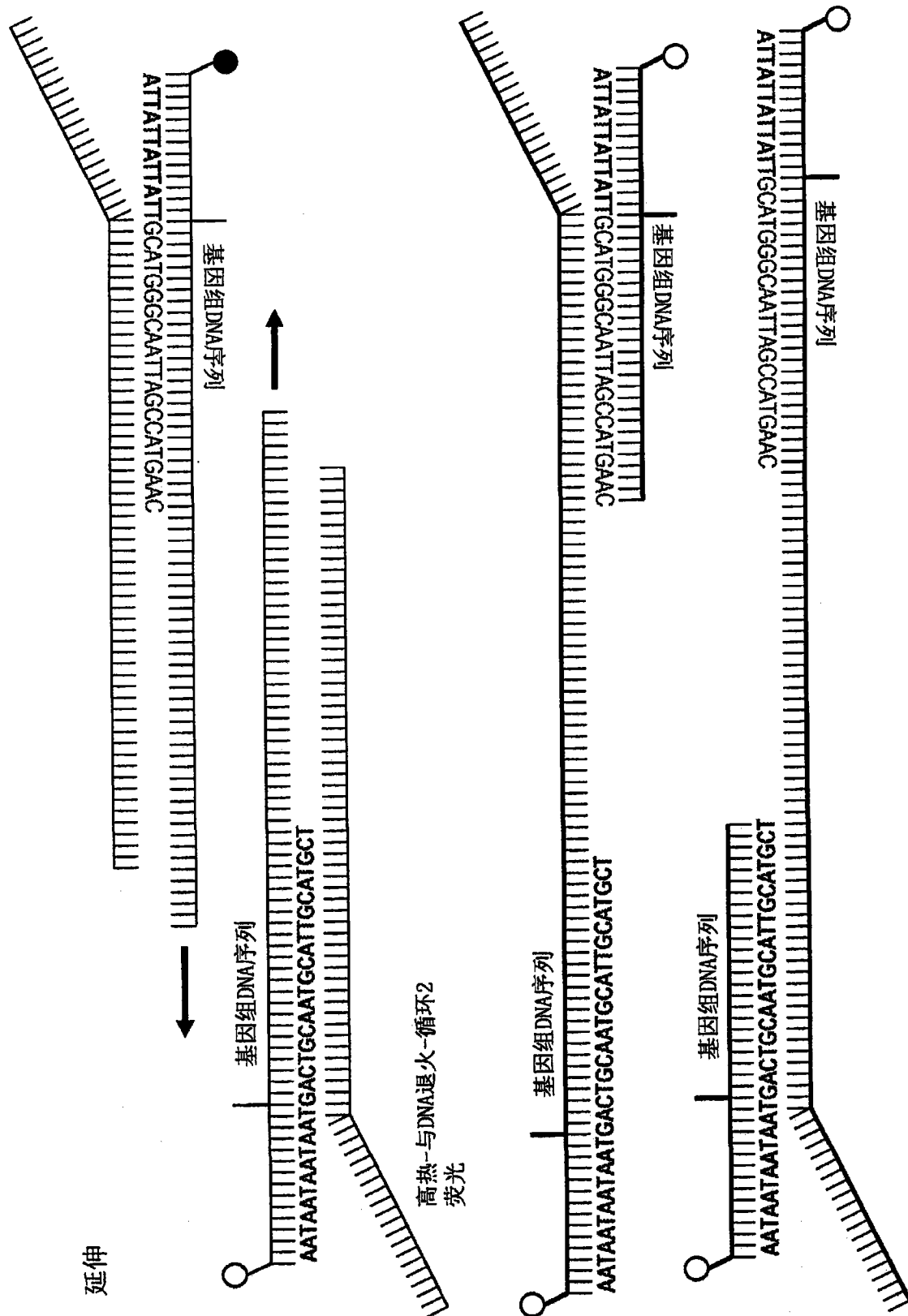


图 1B

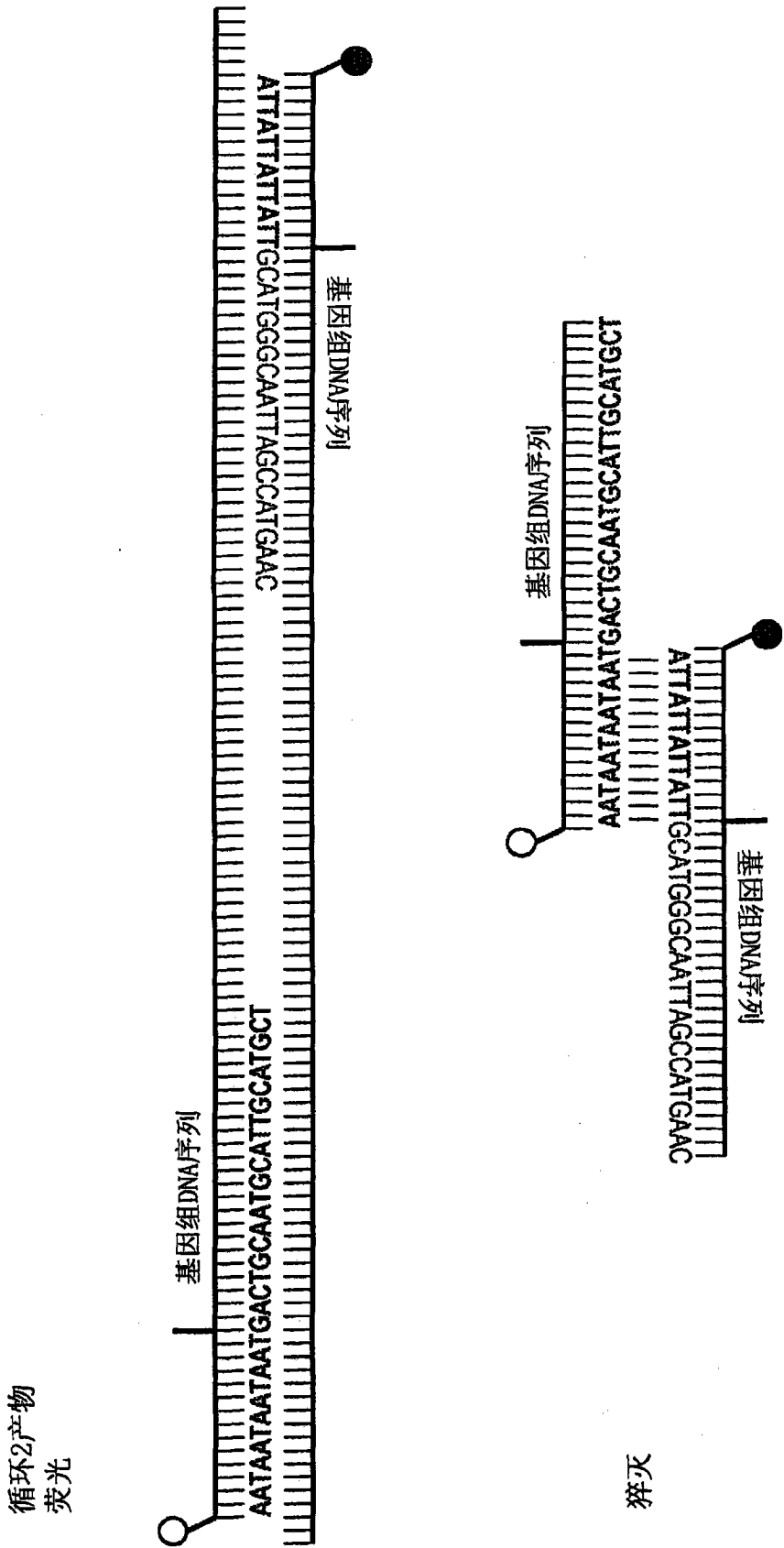


图 1C