



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101495657 B

(45) 授权公告日 2016.08.10

(21) 申请号 200780028773.9

(22) 申请日 2007.07.30

(30) 优先权数据

60/834,410 2006.07.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.02.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/017015 2007.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/016562 EN 2008.02.07

(73) 专利权人 毕万里

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 毕万里

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

11285

代理人 张广育 刘文君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1514842 A, 2004.07.21,

US 6355432 B1, 2002.03.12,

WO 94/04548 A1, 1994.03.03,

WO 96/07669 A1, 1996.03.14,

US 6509157 B1, 2003.01.21,

WO 96/39414 A1, 1996.12.12,

审查员 朱宁

权利要求书2页 说明书17页 附图6页

(54) 发明名称

使用可逆修饰寡核苷酸扩增核酸

(57) 摘要

本发明提供了一种扩增靶核酸序列或信号的方法,其中所用的扩增反应混合物中含有至少一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸。此非羟基3'端可以在一种化学物质和/或辐射和/或温度范围作用下转化为羟基3'端。本发明还提供了一种如上所述的可逆修饰寡核苷酸,此外还提供了含有这种寡核苷酸的核酸扩增反应混合物和试剂盒。

1. 一种扩增靶核酸序列或信号的方法,该方法中所用的扩增反应混合物中含有至少一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸;该非羟基3'端可以在一种化学物质和一定温度范围作用下转化为羟基3'端,其中所述温度范围为高于60℃,其中所述可逆修饰寡核苷酸在其3'端具有一个羧酸酯基,并且其中所述羧酸酯是马来酸酯,并且使用羟胺或胍来再生3'羟基。

2. 权利要求1所述的方法,包括以下步骤:

(a) 将一个怀疑含有靶核苷酸的样本与扩增反应混合物相接触,该反应混合物含有至少一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可在一种化学物质和一定温度范围作用下转化为羟基3'端,其中所述温度范围为高于60℃;

(b) 将步骤(a)中混合物与所述的化学物质相接触和置于一定温度范围下,充分作用一段时间以再生羟基3'端;和

(c) 进行扩增反应。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述核酸为核糖核酸,所述方法包括如下步骤:

(a) 将一个怀疑含有靶核糖核酸的样本与扩增反应混合物相接触,该反应混合物含有至少一种具有非羟基3'端的一种第一可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可在一种第一化学物质和一个第一温度范围下转化为羟基3'端,其中所述第一温度范围为高于60℃;

(b) 在核糖核酸的逆转录条件下,孵育步骤(a)中混合物;

(c) 将步骤(b)中混合物与所述第一化学物质相接触和置于所述第一温度范围下,充分作用以使得所述第一可逆修饰的寡核苷酸的3'端再生为羟基;

(d) 进行扩增反应,产生引物延伸产物。

4. 权利要求3所述的方法,其中所述扩增反应混合物含有至少一种第二可逆修饰寡核苷酸,其中所述第二可逆性修饰寡核苷酸具有非羟基3'端,且该非羟基3'端可以在一种第二化学物质和一个第二温度范围作用下被转化成羟基3'端,其中所述第二温度范围为高于60℃;该方法还包括下述步骤,在步骤(b)之前,将步骤(a)的混合物与所述第二化学物质相接触和置于所述第二温度范围下,充分作用以使得所述第二可逆修饰寡核苷酸的3'端再生为羟基。

5. 权利要求3所述方法,所述方法为一种两酶体系的一步法RT-PCR过程,其中至少使用了一种逆转录酶和一种耐热DNA聚合酶,或者所述方法为一种单酶体系的一步法RT-PCR的过程,其中只使用了一种兼有逆转录酶和DNA聚合酶双重功能的酶。

6. 权利要求2-5任一项所述的方法,其中所述非羟基3'端有至少25%被转化成羟基3'端。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述非羟基3'端有至少50%被转化成羟基3'端。

8. 权利要求6所述的方法,其中所述非羟基3'端有至少75%被转化成羟基3'端。

9. 权利要求6所述的方法,其中所述非羟基3'端有至少90%被转化成羟基3'端。

10. 权利要求1所述的方法,在再生3'羟基时,一种化学物质和在一定温度范围内孵育同时作用,其中所述温度范围为高于60℃。

11. 权利要求1所述的方法,其中所述羧酸酯是马来酸酯,并且使用羟胺或胍来再生3'羟基,并同时在一定温度范围内孵育,其中所述温度范围为高于60℃。

12. 权利要求1-5任一项所述的方法,应用于侵入检测、聚合酶链式反应、连接酶链式反

应、滚环扩增、链置换扩增、转录介导扩增、基于核酸序列的扩增、自主序列复制系统、单引物等温扩增、指数单引物等温扩增或环介导扩增的过程中。

使用可逆修饰寡核苷酸扩增核酸

[0001] 本专利申请要求以2007年7月31日提交的美国专利No.60/834,41作为优先权基础。

技术领域

[0002] 本发明主要涉及核酸化学领域,更具体而言,本发明涉及扩增核酸序列或信号的方法和减少非特异性扩增的方法。

背景技术

[0003] 核酸扩增技术已被广泛应用于临床微生物学、血液检测、食品安全、遗传病的诊断与预后、环境微生物学、药物靶点发现和鉴定、法医学以及其他生物医学方面的研究。其中核酸扩增的简易高效性、特异性、灵敏度、准确度、精确度,以及经济可承受性至关重要。

[0004] 核酸序列特异性扩增可以对特定序列进行灵敏的检测。聚合酶链式反应(PCR)和连接酶链式反应(LCR)是两种热循环扩增技术。

[0005] 相比PCR和LCR,等温扩增技术是一种在基本不变的温度下进行的扩增方法。转录介导扩增(Transcription-mediated amplification,TMA)、基于核酸序列扩增(Nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)、链置换扩增(strand-displacement amplification,SDA)、滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)、单引物等温扩增(single primer isothermal amplification,SPIA™)、指数单引物等温扩增(exponential single primer isothermal amplification,X-SPIA™)、自主序列复制系统(self-sustained sequence replication,3SR)和环介导等温核酸扩增(loop mediated isothermal amplification,LAMP)均为等温扩增的具体实例。核酸序列也可通过信号扩增过程来检测,比如循环探针技术(cycling probe)和侵入检测(Invader Assay)。当杂交探针被核酸酶切除时,将会产生可检测的信号。

[0006] 由于所有的酶,无论其耐热性如何,都在一定的温度范围内具有活性,这样的性质会在其特异性、灵敏性、信噪比等方面对核酸扩增产生负面影响。这已在PCR过程中被明确地证实。耐热DNA聚合酶对PCR而言是必不可少的。虽然耐热DNA聚合酶活性最高的温度在60-75℃,但在低温下它依然具有活性。即使在室温下它也仍然具有明显的活性。但是其低温时的活性将会导致引物二聚体的形成和非特异性的扩增,从而降低检测灵敏度。

[0007] 使用热启动(hot-start)技术可以提高DNA PCR的效果。热启动技术是指任何具有下述特征的组装PCR反应的方法,即通过物理或化学方法使得在低温下反应组分中的一种或多种成分与其他成分分离开来,而在高温下使得反应发生。热启动PCR技术分为以下几种:

[0008] 1.通过物理屏障分隔将必需组分分隔为至少两部分,如美国专利5,411,876、5,565,339、5,413,924和5,643,764所述(上述文献均通过援引的方式纳入本文)。该屏障可通过高温加热来消除。

[0009] 2.使用可逆酶抑制剂来抑制酶在低温下的活性,如美国专利5,338,671、5,677,

152、5,773,258、6,183,998、5,693,502、5,874,557、5,763,173、6,020,130和6,183,967中所述(上述文献均通过援引的方式纳入本文)。与抑制剂的结合方式是非共价的或共价的。这些方法的热启动技术是在均一相中进行,这类技术也是目前最为广泛使用的。

[0010] 3. 辅助因子的相分离法,如美国专利6,403,341所述(该文献通过援引的方式纳入本文)。 Mg^{2+} 在低温下会沉淀,并会随着温度的上升而溶解。

[0011] 一步法RT PCR(One-step RT PCR)是在一个反应容器中连续完成RNA分子的逆转录过程与互补性cDNA分子的扩增过程,从而实现扩增靶点RNA的方法。靶点RNA分子包括艾滋病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、西尼罗河脑膜炎病毒(WNV)、人类流感病毒、禽流感病毒、登革病毒、埃博拉病毒等。在美国,检测捐血者血液中是否存在HIV,HBV,HCV和WNV是强制性的。一步法RT PCR在这些临床检验以及血液检测时有重要的作用。遗憾的是,目前没有一种热启动技术可以有效地应用于一步法RT PCR,原因如下:

[0012] 1. 大部分的逆转录酶(逆转录过程的关键酶)不能作为热启动过程的靶点,原因在于它们不具有耐热性,会在高温孵育后丧失活性。

[0013] 2. 待检的RNA分子是不稳定的,在高温下会降解。而二价金属离子如 Mg^{2+} 的存在会大大促进RNA分子的降解。目前没有一种已有的热启动技术可以在不损害靶点RNA分子的前提下进行。

[0014] 3. 逆转录过程的长时间孵育(一般在30分钟或更长)会极大地提高副反应发生的几率,因此将会导致检测灵敏度的明显降低。这表明基于酶抑制剂的热启动技术不能改善一步法RT PCR的效果。

[0015] 鉴于核酸扩增的现实重要性,核酸检测领域急需一种可以改善核酸扩增反应特别是一步法RT PCR的效果的新技术。本申请中将会详细描述一种新型核酸扩增反应的可控启动。在本说明书全文中提及的所有专利,专利申请以及出版物均以援引的方式纳入本文。

发明内容

[0016] 本发明的发明人发现,目前还没有一种涉及寡聚核苷酸的热启动技术,作为核酸扩增的必需成分,寡聚核苷酸是热启动或可控启动技术的理想靶位。

[0017] 本发明提供了一种靶核酸序列或信号的扩增方法,其中所用的扩增反应混合物含有至少一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可在一种化学物质和/或辐射和/或一定温度范围作用下转化为羟基3'端。

[0018] 本发明还提供了一种靶核酸序列或信号的扩增方法,包括下述步骤:

[0019] (a) 把一个怀疑含有靶核酸的样本与扩增反应混合物相接触,该反应混合物含有至少一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可在一种化学物质和/或辐射和/或一定温度范围作用下转化为羟基3'端;

[0020] (b) 将步骤(a)中混合物与所述的化学物质相接触和/或暴露于辐射和/或置于一定温度范围下,充分作用一段时间以再生羟基3'端;和

[0021] (c) 进行扩增反应。

[0022] 本发明还提供一种可以扩增靶核糖核酸序列的方法,所述方法包括如下步骤:

[0023] (a) 将一个怀疑含有靶核糖核酸的样本与扩增反应混合物相接触,该反应混合物至少含有一个具有非羟基-3'端的一种第一可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可在一种第

一化学物质和/或第一种辐射和/或一个第一温度范围作用下转化为羟基3'端;

[0024] (b)在核糖核酸的逆转录条件下,孵育步骤(a)中混合物;

[0025] (c)将步骤(b)中混合物与所述第一化学物质相接触和/或暴露于第一种辐射和/或置于所述第一温度范围下,充分作用以使得所述第一可逆修饰的寡核苷酸的3'端再生为羟基;

[0026] (d)进行扩增反应,产生引物延伸产物。

[0027] 在上述靶核糖核酸序列扩增方法的一个实施方案中,扩增反应混合物还含有至少一种第二可逆修饰寡核苷酸,其中所述第二可逆修饰寡核苷酸具有非羟基3'端,且该非羟基3'端可以在一种第二化学物质和/或辐射和/或一个第二温度范围作用下转化为羟基3'端;其中所述方法还包括下述步骤:在步骤(b)之前,将步骤(a)中的混合物与所述第二化学物质相接触和/或暴露于辐射和/或置于所述第二温度范围下,充分作用以使得所述第二可逆修饰寡核苷酸的3'端再生为羟基。

[0028] 本发明同时还提供了一种具有非羟基3'端的可逆修饰寡核苷酸,该非羟基3'端可以在一种化学物质和/或辐射和/或一定温度范围作用下转化为羟基3'端。

[0029] 本发明还提供一种核酸扩增反应混合物或试剂盒,所述混合物或试剂盒含有本发明的可逆修饰寡核苷酸。

[0030] 本发明的可逆修饰寡核苷酸的非羟基3'端的实例可以是但不限于羧酸酯基,含有硅烷基醚的醚基和光解基等基团。

[0031] 在一个优选实施方案中,本发明的方法可用于含有两酶体系的一步法RT-PCR过程,所述两酶体系中至少使用一种逆转录酶和一种耐热DNA聚合酶;或者本发明可用于含有单酶体系的一步法RT-PCR过程,所述单酶体系中仅使用一种兼有逆转录酶和耐热DNA聚合酶双重功能的酶。

[0032] 在另一个优选实施方案中,本发明的可逆修饰寡核苷酸的非羟基3'端有至少25%、优选至少50%、更优选至少75%和最优选90%被转化为羟基3'端。

[0033] 本发明的基于寡核苷酸的可控启动核酸扩增技术,不仅可以作为热启动技术的替代技术,而且还可以改善多种核酸扩增反应尤其是RT-PCR反应的效果。

附图说明

[0034] 图1.使用酸酐修饰寡核苷酸。

[0035] 催化剂DMAP在TEA中催化马来酸酐与寡核苷酸的5'和3'羟基形成酯。

[0036] 图2.寡核苷酸马来酸酯的水解。

[0037] 羟胺是一种强的亲核化学试剂,能够有效地破坏羧基酯键。由此再生5'和3'羟基并形成羟基酰胺。

[0038] 图3.使用三甲基氯硅烷修饰寡核苷酸。

[0039] 寡核苷酸的5'和3'羟基在咪唑的作用下与叔丁基二甲基氯硅烷反应生成叔丁基二甲基硅烷醚。

[0040] 图4.氟化物作用下的甲硅烷基醚切除。

[0041] 甲硅烷基醚被氟化物水解,由此再生5'和3'羟基。

[0042] 图5.DNA-PCR中,可逆修饰寡核苷酸的应用导致引物二聚体形成的减少。

[0043] 图5a是有模板(T^+)和无模板(即无模板对照,NTC)的条件下,常规未修饰寡核苷酸(R)和修饰寡核苷酸(M)的扩增曲线。PCR在常规的冷启动Taq聚合酶的作用下进行。用Sybr GreenTM染料进行扩增的监测,这种染料含有可对双链特异性核酸着色的荧光团。Sybr GreenTM染料以一种非序列特异性方式对双链DNA进行检测。因此扩增的引物二聚体和靶序列均被检测到,而引物二聚体和靶序列的扩增产物的退火曲线是不同的(图5b)。

[0044] 图6.一步法RT PCR反应条件下,含有常规未修饰寡核苷酸的热启动Taq DNA聚合酶对二聚体的形成无抑制作用。

[0045] 在一步法RT PCR条件下,常规的Taq DNA聚合酶(regT)和热启动Taq DNA聚合酶(hsT)无论在有模板(T^+)和无模板(即无模板对照,NTC)的条件下均产生引物二聚体。扩增曲线和退火曲线分别示于图6a和图6b。

[0046] 图7.使用修饰寡核苷酸时,引物二聚体形成的减少。

[0047] 无模板时,所有PCR反应均在常规Taq DNA聚合酶的作用下进行,因此观察到的所有产物均为引物二聚体。这是一种可以检测在不同情况下二聚体形成程度的方式,引物二聚体形成得越多,扩增曲线上升得越早。

[0048] 常规未修饰寡核苷酸(R)产生引物二聚体。有逆转录酶(RT^+)的情况下,将产生比无逆转录酶(RT^-)存在时更多的引物二聚体,在~4循环中不同的Ct值中得到充分反映。相比之下,在使用修饰寡核苷酸(M)时,引物二聚体将会减少。逆转录酶的存在没有导致更多引物二聚体的形成。

[0049] 图8.修饰寡核苷酸对一步法RT PCR效果的改善

[0050] 使用修饰寡核苷酸(M)时与使用常规寡核苷酸(R)时相比,引物二聚体的Ct值滞后11个循环。有常规寡核苷酸时,严重的引物二聚体形成导致靶序列没有扩增,即使在存在1250个靶序列拷贝时情况也是如此(图8b)。相比之下,如扩增产物的退火曲线所示,使用修饰寡核苷酸时产生纯净的不含引物二聚体的靶序列扩增。

[0051] 表1.引物二聚体可能的种类数量与扩增系统中存在的寡核苷酸数量的对比

[0052] 此表的建立基于以下假设:

[0053] 1.每个靶序列扩增需要两种不同的寡核苷酸;

[0054] 2.每个引物二聚体(PD)由两种不同的寡核苷酸形成;

[0055] 3.任意两种寡核苷酸均能且只能形成一种引物二聚体。

[0056] 以下公式用于计算引物二聚体可能的种类数量(#PD):

[0057] $\#PD=N(2N-1)$

[0058] N是待扩增的靶点数。

[0059] 当N增加时,寡核苷酸数量线性增加。而#PD呈几何级数增加。例如,一个单重扩增系统中,有两种寡核苷酸。在这样一个单重系统中,只有一种靶定位的扩增和一种引物二聚体,#PD/N的比值是1。而在一个十重扩增系统中,有二十种寡核苷酸和十种靶序列,此时,#PD增加到190,而#PD/N的比值是19。

[0060] 引物二聚体种类数目的几何级数增加使得多重PCR的靶序列扩增非常困难,对引物二聚体形成几率大大提高的一步法RT PCR而言就显得尤为困难。

具体实施方式

[0061] 本发明涉及一种靶核酸序列或信号的扩增方法,其中所用的扩增反应混合物含有至少一种可逆修饰寡核苷酸,该寡核苷酸含有一种非羟基3'端基团,该非羟基3'端可以在一种化学物质和/或辐射和/或一定温度范围作用下转变为羟基3'端。

[0062] “核酸扩增”是指核酸序列的扩增(例如:PCR,RT-PCR)或者核酸信号的扩增(例如侵入检测)。

[0063] 一般情况下,用于核酸扩增的寡核苷酸都有一个3'羟基。3'羟基是使得寡核苷酸可被核酸聚合酶延伸和可被核酸连接酶连接所必需的。它还可以影响:i.对被称为校对活性的3'→5'核酸酶活性的敏感性;ii.侵入检测中可切除结构的形成。因此,对寡核苷酸引物3'羟基的修饰可以有效地抑制其在扩增反应中的功能。

[0064] 选择合适的修饰基团的标准是:

[0065] 1.产生完全修饰的或接近完全修饰的寡核苷酸的过程。

[0066] 2.被修饰的寡核苷酸在存贮条件下具有稳定性。寡核苷酸一般存放在4℃或零下20℃的水溶液中,在此条件下不会发生可测出的自发逆转反应。

[0067] 3.用于去修饰作用的化学物质和切割产生的产物不会干扰核酸扩增。优选的是在一个均一系统中进行没有额外操作步骤的可控启动,因此,所述化学物质和/或切割产物既不应能明显抑制酶(聚合酶,裂解酶,核酸酶等)的活性,也不应能够改变反应的特异性,这一点很重要。

[0068] 4.在可以有效进行逆转修饰反应的温度下,反应体系中的酶仍然具有热稳定性。例如,在PCR体系中,逆转反应发生的温度最好高于60℃。对TMA核酸扩增而言,逆转反应的温度应该低于45℃。

[0069] 在一个优选实施方案中,本发明的可逆修饰寡核苷酸具有一个3'羧酸酯基。为了再生3'羟基,使用包括但不限于下列的化学物质:叠氮化合物、咪唑、吡啶、羟胺、胼和四丁基氢氧化铵等。

[0070] 在另一个优选实施方案中,本发明的可逆修饰寡核苷酸有一个3'甲硅烷基醚基。为了除去3'甲硅烷基并再生3'羟基,该反应体系中使用了含有氟的化学物质。

[0071] 在另一个优选实施方案中,本发明的可逆修饰寡核苷酸有一个3'醚基。

[0072] 在另一个优选实施方案中,本发明的可逆修饰寡核苷酸有一个通过光裂解而再生3'羟基的3'修饰基团。该光解基团可以在光作用下或者光与一种化学物质的组合作用下被去除。

[0073] 本发明的寡核苷酸的修饰物通过以下方式结合到寡核苷酸上:

[0074] 1.通过合成后修饰。

[0075] 2.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用带有修饰物的合成载体。

[0076] 3.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用带有被修饰的核苷的合成载体。

[0077] 4.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用被修饰的核苷磷酸胺。合成方向可以是5'到3',也可以是3'到5'。

[0078] 5.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用一种试剂。

[0079] 除了改进通过PCR反应的热启动进行的定量PCR扩增反应外,本发明还能够改善通过等温扩增进行的定性与定量的核酸扩增反应。

[0080] 使用各种等温扩增技术,如SDA、TMA、NASBA和RCA定量检测核酸(Walker,1996;

Spears, 1997; Nadeau, 1999; Leone, 1998; Nilsson, 2002) 已见于报道, 但是这些方法的准确性和精确性显然有待改善。导致定量测定效果不好的原因之一是缺乏扩增反应的可控启动。

[0081] 本发明中, 核酸扩增使用的寡核苷酸含有不是羟基基团的3'基团。在化学物质和/或辐射和/或一定温度范围作用下, 该3'基团可以再生成3'羟基。3'羟基的再生可通过下列途径来确保核酸扩增的进行:

[0082] i. 核酸聚合酶作用下的靶序列扩增。

[0083] 聚合酶介导靶序列扩增的方法包括聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、链置换扩增(strand-displacement amplification, SDA)、单引物等温扩增(single primer isothermal amplification, SPIA™)、指数单引物等温扩增(exponential single primer isothermal amplification, X-SPIA™)、环介导扩增(loop mediated amplification, LAMP)、基于核酸序列的扩增(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、转录介导扩增(Transcription-mediated amplification, TMA)和自主序列复制系统(self-sustained sequence replication, 3SR)。其中3'羟基是核酸聚合反应必需的基团。

[0084] ii. 连接介导靶序列扩增。

[0085] 在这类反应中, 连接作用是产生扩增靶序列的关键步骤, 包括的技术有: 连接酶链式反应(LCR)、允许(enabled)LCR(美国专利No. 6, 511, 810中有述)、缺口-LCR(gap-LCR, 美国专利No. 5, 427, 930)和连接介导PCR。

[0086] 在连接介导PCR中, 连接反应在PCR过程之前发生。连接反应是将一个引物序列连接到靶标上。用于连接反应和PCR的寡核苷酸都是本发明的主题。

[0087] iii. 侵入检测

[0088] 侵入检测(美国专利No. 6, 348, 314、6, 090, 543、6, 001, 567、5, 985, 557、5, 846, 717和5, 837, 450, 上述所有文献均通过援引的方式纳入本文)是一种信号扩增检测。靶模板, 一个上游侵入寡核苷酸和一个与上游侵入寡核苷酸有部分重叠的下游寡核苷酸形成一个侵入结构。Flap内切核酸酶切除下游寡核苷酸, 产生检测信号。发现侵入寡核苷酸的3'端显著影响酶切反应。事实上, 形成的切除结构与带有一个非羟基3'端的侵入寡核苷酸极大地削弱了酶切反应。

[0089] 通过在低于反应温度的温度下抑制引物二聚体的形成/非特异性反应以及控制反应的启动, 本发明可以改善上述核酸扩增方法的灵敏度和定量能力。

[0090] 本发明的寡核苷酸含有一段与所需的靶核酸序列特异性杂交的序列。在一个实施方案中, 寡核苷酸只含有一段与靶核酸序列互补的序列。在另一个实施方案中, 寡核苷酸含有一个与靶序列非互补的区域, 非互补的一段序列位于寡核苷酸的5'区。

[0091] 在另一个实施方案中, 本发明的寡核苷酸含有一个可以改变的二级结构, 例如, 在由扩增形成的二级结构上消失或减少。

[0092] 寡核苷酸可能由五部分组成:

[0093] 1. 碱基

[0094] 2. 糖基

[0095] 3. 核苷酸之间的连接基团

[0096] 4. 用于产生检测信号的基团

[0097] 5. 其它基团

[0098] 1. 碱基可以是任何天然碱基:包括但不限于腺嘌呤、N6甲基腺嘌呤、N6异戊烯基腺嘌呤、鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、Q(核)苷、Y(核)苷、次黄(嘌呤核)苷、胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、4-硫脲嘧啶和胸腺嘧啶。也可以使用碱基类似物:包括但不限于7-去氮腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤(腺嘌呤和鸟嘌呤)、2-和/或6-硫基嘌呤(腺嘌呤和鸟嘌呤)、5-溴尿嘧啶、5-硝基吡咯、5-丙炔基尿嘧啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、5-苯基尿嘧啶、2-N-甲基鸟嘌呤、5-丁炔基尿嘧啶、二甲基噻唑尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-苯基胞嘧啶、5-丁炔基胞嘧啶、二甲基噻唑胞嘧啶、9-氨基乙氧基吩噻嗪、5-N-氨基己基氨基甲酰尿嘧啶、6-氮(杂)胸腺嘧啶、N²-咪唑丙基-2-氨基腺嘌呤、N²-咪唑丙基-2-氨基鸟嘌呤、已被修饰的碱基如美国专利No.6,001,611所述。最常用的碱基是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。

[0099] 2. 寡核苷酸的骨架包括5'→3'磷酸二酯键,或是其各种不同的修饰体。修饰作用的例子包括像肽核酸(PNA)中的肽键、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、N3'→O5'氨基磷酸酯、O3'-N5'氨基磷酸酯、3'硫代磷酸酯、5'硫代磷酸酯、反向键、甲基膦酸酯、吗啉核酸、硼烷磷酸酯、磷-N-丁基酰胺和亚甲基甲基亚胺、d-间隔分子以及碳连接分子。

[0100] 3. 在本发明中所使用的寡核苷酸的糖基通常是核糖和/或2-脱氧核糖。也可能含有其他一种或多种糖单元,例如2-O-烷基核糖、2-氨基核糖、2-氟核糖、阿拉伯糖、2-脱氧阿拉伯糖、2-脱氧-2-氟阿拉伯糖、1,5-己糖醇酐、锁核酸(LNA)中的2-O,4-C-亚甲基核糖以及环己烯骨架。

[0101] 4. 在本发明中,寡核苷酸可能含有一种信号发生单元。此单元可为可以通过物理、化学、光化学、免疫化学和生物化学方法进行检测的任意单元,所述方法包括但不限于荧光、化学发光、生物发光、电发光、磷光、时间分辨光谱、荧光偏振、酶反应、辐射、比色、质谱法、磁方法、电泳和色谱法等方法。

[0102] 在一个实施方案中,产生信号单元包括一个指示单元和一个调控单元,两单元之间被一段序列分割开来,该序列可以形成核酸酶和核酶切割位点。比如Takara/Clontech的Q-酶检测。

[0103] 在另一个实施方案中,产生信号单元包括一个标记单元和一个淬灭单元,当寡核苷酸处于单链状态时,淬灭单元可以淬灭标记单元。当处于双链状态时,信号产生。Amplifluor™和Scorpion™是两种代表性的这类技术。标记单元与淬灭单元的相互作用可以是任何两个合适实体之间相互作用,所述实体包括但不限于小分子,比如荧光团与它们的淬灭团,还可以是大分子,比如蛋白质分子(Boute,2002)。两者之间相互作用的产生可基于任何合适的机制。比如,标记单元与淬灭单元的相互作用可以基于共振能量转移,包括但不限于荧光共振能量转移(FRET)、发光共振能量转移(LRET)、磷光共振能量转移(PRET)和生物发光共振能量转移(BRET)。

[0104] 在各种标记单元和淬灭单元中,FRET探针广泛应用于扩增靶分子的检测。最常用的FRET探针有两个相互作用的单元,其一是荧光供体基团,另一个是荧光受体基团。虽然荧光受体基团可以是发荧光的基团,但是优选的受体是非荧光基团。供体基团可以置于5'端、中间、或者3'端,受体基团也一样。优选的是将供体基团置于5'端。当探针与靶核酸杂交时,

结构特异性核酸酶将探针切割,使得供体基团与受体基团分离,并使得受体释放原先被淬灭的供体荧光。

[0105] 本发明的探针的产生信号单元还可以有两种以上的可以相互作用的单元。例如,美国专利No.5,952,180中公开了一种方法,可以产生带有特异性荧光发射光谱的可延伸寡核苷酸。其独特的荧光发射光谱是由组合的荧光能量转移标签产生的。在波长移动探针技术的另一个实例中,此探针带有三种相互作用的基团(美国专利No.6,037,130)。

[0106] 在另一个实施方案中,寡核苷酸本身可以是一个与指示单元相互作用的调控单元。例如,Nurmi报道过一种单一标记荧光钽整合探针的合成以及它在PCR产物检测中的应用(Nurmi,2000)。

[0107] 所述寡核苷酸还可以是双重或三重信号发生器的一部分。例如,本发明的探针可以根据美国专利No.6,432,642所述的方法制备的双重寡核苷酸。Li等人描述了另一种包括两个互补的寡核苷酸的双重探针(Li,2002)。此外,本发明中的探针还可以是根据制备三重分子信标的方法(Nutiu,2002)而制备的三重分子。一个不同点在于:寡核苷酸同时参与了扩增反应和检测反应。

[0108] 5.本发明的寡核苷酸还可以含有位于选定位点的基团。这些基团包括但不限于DNA小沟结合物、芘、胆固醇、吡啶、生物素、毛细管电泳迁移修饰物、胺、羧基、磷酸盐和硫醇等,这些基团可以促进靶点结合、促进与表面或其他分子结合或有利于毛细管电泳检测。

[0109] 对寡核苷酸上羟基的修饰是保护羟基、标记寡核苷酸、加入特异官能团、改变诸如核酸酶抗性、结合亲和力等各种特性的一种常用方法。例如自动化寡核苷酸合成中,在N-甲基咪唑和四氢呋喃(THF)存在下,使用乙酸酐来进行帽化作用。

[0110] 本发明中,合适的修饰基团需要满足以下要求:

[0111] 1.具有再生3'羟基的能力。

[0112] 优选地,10%到100%的修饰寡核苷酸可以再生其3'羟基。更优选地,至少50%的修饰寡核苷酸可以再生其3'羟基。再更优选地,至少75%的修饰寡核苷酸可以再生其3'羟基。最优选地,至少90%的修饰寡核苷酸可以再生其3'羟基。3'羟基的再生可以在核酸扩增开始之前发生或者伴随着扩增过程的进行而逐渐发生。

[0113] 2.可靠的修饰过程产生完全修饰或几乎完全修饰的寡核苷酸。核酸扩增体系中存在的未修饰寡核苷酸会削弱本发明的优势。对核酸检测产生负面影响所需的未修饰寡核苷酸所占比例与特定的扩增体系有关。

[0114] 3.修饰寡核苷酸在储存条件下应具有稳定性,不会发生可测出的自发逆转反应。存储溶液必须与核酸扩增反应体系相兼容。

[0115] 在所有成分均存在是反应混合物中,它应该也具有足够的稳定性。这一性质对化学辅助激活非常重要。优选地,温度的升高能够极大地加速激活过程。

[0116] 4.逆转反应的条件应该与核酸扩增过程相兼容。优选地,3'修饰寡核苷酸的激活与核酸扩增在同一个系统中进行。因此,用于激活的化学物质、激活产物、温度、pH、离子强度、溶剂、波长、光激活过程中的光强度和波长等均应该与核酸扩增过程相兼容。

[0117] 本发明的寡核苷酸含有一个非羟基3'基团,优选的基团为:

[0118] 1.羧酸酯基团

[0119] 2.包含有甲硅烷基醚基团的醚基

[0120] 3.光解基团

[0121] 本发明中,用于修饰寡核苷酸的修饰剂是通过以下方式连接到寡核苷酸上:

[0122] 1.通过合成后修饰。

[0123] 2.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用带有修饰物的合成载体。

[0124] 3.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用带有被修饰的核苷的合成载体。

[0125] 4.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用被修饰的核苷磷酸胺。合成方向可以是5'到3',也可以是3'到5'。

[0126] 5.通过寡核苷酸合成仪,该合成仪使用一种试剂。

[0127] 用寡核苷酸合成仪进行的合成优于合成后修饰。

[0128] 当通过合成后修饰作用将修饰物连接到3'端时,5'游离羟基很可能也被修饰。

[0129] 在一个优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸含有一个3'羧酸酯基。酯可以包括但不限于:甲酸酯、苯甲酰甲酸酯、卤代乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、马来酸酯及其衍生物、琥珀酸酯及其衍生物、4-氧代戊酸酯、新戊酸酯、丁烯酸酯、4-甲氧基丁烯酸酯和3-苯丙酸酯等。

[0130] 用化学物质再生3'羟基。这种化学物质可以包括但不限于:叠氮化物、咪唑、吡啶、羟胺、胼和四丁基氢氧化铵。

[0131] 当寡核苷酸的酰化作用在合成后进行时,使用酸酐的3'羟基的酰化需要碱性溶剂,比如三乙胺(TEA)。其他碱性溶剂例如吡啶、苯胺、二乙胺、三甲胺和吡咯烷酮。优选地,在反应中存在催化剂,例如二甲基氨基吡啶(DMAP)、氟化物、1-甲基咪唑、4-吡咯啉并吡啶、2-羟基吡啶。

[0132] 在一个优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸含有一个3'马来酸酯基。用羟胺来再生羟基。

[0133] 在另一个优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸带有一个3'甲硅烷基醚。

[0134] 该甲硅烷基醚选自:三甲基甲硅烷基醚、三乙基甲硅烷基醚、三异丙基甲硅烷基醚、二甲基异丙基甲硅烷基醚、二乙基异丙基甲硅烷基醚、二甲基己基甲硅烷基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、叔丁基二苯基甲硅烷基醚、三苯基甲硅烷基醚、三对二甲苯基甲硅烷基醚(tri-p-xylylsilyl ether)、三苯基甲硅烷基醚、二苯基甲基甲硅烷基醚与叔丁基甲氧基苯基甲硅烷基醚。

[0135] 在存在叔胺碱(例如咪唑、吡啶、三乙胺)的条件下,可以通过使用三甲基氯硅烷处理羟基使其转变为甲硅烷基醚。

[0136] 甲硅烷基醚基不受大部分的氧化剂和还原剂的影响,且在大部分非水溶性的酸和碱中保持稳定。叔丁基二甲基甲硅烷基醚基在pH范围2~12的水溶液中具有稳定性,因此它是最广泛应用的羟基修饰基团。

[0137] 甲硅烷基醚基的稳定性已被广泛研究,三甲基甲硅烷基是最容易被甲硅烷基化的,但是它也是最容易水解的。用叔丁基取代三甲基甲硅烷基的一个甲基会生成叔丁基二甲基甲硅烷基,此基团的稳定性大概是TMS基团的 10^4 倍。

[0138] 通常用氟离子处理来去除甲硅烷基醚基团,氟离子可以来自于四丁基氟化铵、氟化钠、氟化钾、氟化锂、氢氟酸。

[0139] 在另一个优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸含有3'醚基,优选的醚基是四氢

呋喃醚基。

[0140] 一种醚基是烯丙醚基,此基团可以被钨或铈催化剂水解。

[0141] 另一种醚基是对甲氧苄基醚基或对甲氧苄基醚基或3,4-二甲氧苄基醚基或(4-甲氧基苯氧基)甲基醚基,此醚基可用硝酸高铈铵去除。

[0142] 也可以使用对路易斯酸催化剂介导水解敏感的醚。这些醚包括甲氧基乙氧基甲基(MEM)醚、甲氧基甲基(MOM)醚、邻甲氧基苯酚甲基(GUM)醚、四氢吡喃基醚、四氢噻吩基醚。

[0143] 路易斯酸催化剂来自于 ZnX_2 、 MgX_2 、 AgX 、 CuX_2 、 MnX_2 、 SnX_2 、 FeX 、 CoX 、 PdX_2 、 HgX_2 、 FeX_3 、 AlX_3 、 $LiBF_4$ 、 $TiCl_4$ 等。 X 是卤原子。

[0144] 3'硅烷氧基甲醚或2-(三甲基硅烷基)乙氧基甲醚能够被氟化物移除,这些氟化物选自四丁基氟化胺、氟化钠、氟化钾、氟化锂、氢氟酸。

[0145] $LiBF_4$ 和/或氟化物能够水解3'端的2-(三甲基硅烷基)乙氧基甲醚,从而再生羟基。

[0146] 3'甲基醚可以被例如 BBr_3 、 $SiCl_4$ 、 NaI ,和 AlX_3 的一种或多种化学物质水解。

[0147] 在另一个优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸含有一个3'修饰基团,此基团能够通过光解切割而再生3'羟基。这些3'修饰基团选自含有对甲氧基苯甲基醚、硝酸酯和碳酸邻硝基苯甲酯的化学基团。

[0148] 除了光解切割外,也可以在反应体系中加入化学物质来减少对辐射强度和/或时间的要求。例如,当对甲氧基苯甲基醚被紫外光($>280nm$)切割时,可以在反应体系中加入硝酸高铈铵来加速水解反应。

[0149] 修饰基团、激活物质的性质、化学物质浓度、温度以及反应体系中的其它因素,比如pH、离子强度等均能够影响修饰剂去除过程的动力学和热力学特性。如果用辐射来再生3'羟基,辐射的强度和波长也会影响激活过程的速度和完全性。

[0150] 本发明在各种核酸扩增方法中的应用

[0151] 为了更好的理解如何将本发明用于核酸扩增方法,下面通过一些现有的核酸扩增方法和所使用的酶类来说明本发明。

[0152] 本发明在侵入检测中的应用

[0153] 侵入检测是一种信号扩增技术,如美国专利No.6,348,314;6,090,543;6,001,567;5,985,557;5,846,717和5,837,450中所述,上述文献均通过援引的方式纳入本文。

[0154] 在侵入检测中,上游侵入性寡核苷酸和下游信号产生探针寡核苷酸与靶分子进行杂交,形成切割结构。Flap内切核酸酶切割杂交的探针,产生可探测信号。与其它耐热酶一样,Flap内切核酸酶在较宽的温度范围内具有活性。它除了可以切割目标切割结构外,还可以切割很多结构。反应体系中的寡核苷酸可以形成不同的分子内结构和分子间结构,它们大部分仅在低温下保持稳定。对这些结构的切割会产生较高的背景信号或较低的可检测信号。减少甚至消除这些不想要的切割可以提高检测实验的质量。

[0155] 使用本文所述的具有修饰3'端的寡核苷酸是一种减少非模板依赖性切割的好方法。据报道,上游侵入性寡核苷酸的3'基团对切割有重要影响(Kaiser,1999)。所有3'羟基的替代物,包括3'脱氧、3'磷酸、3'D-间隔物会对其产生巨大的抑制作用。在一些例子中,这些替代物可以产生几乎完全的抑制作用。这些都清楚地表明3'羟基在切割时的重要性。本发明中,使用一种带有可逆修饰3'端的寡核苷酸来控制侵入检测的启动,目的是改善侵入

检测的定量能力。

[0156] 侵入检测还能够在无需进行逆转录的条件下检测RNA分子。RNA分子对热很敏感，尤其在二价金属离子如 Mg^{2+} 存在时更为敏感，而该离子是维持核酸酶活性所必需的。当检测RNA靶点时，优选的热启动条件是温和的。本发明提供了可用于多种激活条件的修饰剂。可以容易地确定激活反应的温和条件。其中一个温和激活的例子是放射激活，这种激活很温和，不会损害靶RNA分子。在这一点上，与基于酶热启动技术的化学修饰作用相比，本发明具有明显的优势。

[0157] 在聚合酶链式反应中的应用

[0158] 众所周知，热启动可以明显改善PCR的扩增性能。已经开发了多种热启动方法用于改善PCR扩增技术。这些方法可被分为以下几种：

[0159] 1. 形成物理屏障，可以在低温下将发生副反应所需的成分分离开来。

[0160] 美国专利No.5,411,876、5,565,339、5,413,924和5,643,764描述过形成这样一种屏障的技术，该屏障随着温度的上升将会消失。但是这一系统并不方便。在这样一种非均一体系中，各种成分的混合也是一件很困难的事情。

[0161] 2. 镁沉淀(美国专利No.6,403,341)

[0162] 镁是保持DNA聚合酶活性的关键元素。在该发明中，在低温下镁沉淀，因此不能参与DNA聚合反应。当达到一个合适的温度时，镁的溶解度升高。由此镁从沉淀中释放而激活DNA聚合酶。但是，这是一个非均一的热启动体系，会面临如1中所述的问题。同时，已沉淀的镁的分配是比较困难的。

[0163] 3. 抑制性分子与DNA聚合酶的可逆非共价结合

[0164] 这样的抑制性分子可以是抗体(美国专利No.5,338,671)或者是寡核苷酸(美国专利No.5,693,502、5,874,557、5,763,173、6,020,130和6,183,967)。抑制剂/DNA聚合酶复合物的稳定性具有温度依赖性。当温度达到一定值时，抑制剂从DNA聚合酶上脱落下来，此时DNA聚合酶具有活性。但是，由于是非共价抑制剂，所以很难实现完全抑制。同时，抑制剂(特别是寡核苷酸抑制剂)还会在一定程度上干扰扩增。

[0165] 4. DNA聚合酶的化学修饰(美国专利No.5,677,152、5,773,258和6,183,998)

[0166] 与非共价抑制剂一样，这些是均一热启动体系。在这些修饰过程中使用了二元酸酐和醛。需要高温下长时间的孵育，修饰剂才能从DNA聚合酶上剥离出来。此时DNA聚合酶活性被恢复。酶活的抑制非常完全。但是激活过程对酶会产生损伤。实际上，激活过程本身也会使许多酶分子变性。

[0167] 本发明也是一种化学修饰体系。但是本发明不使用经化学修饰的PCR酶，而是使用3'可逆修饰的寡核苷酸。

[0168] 当用PCR扩增DNA靶点时，化学可逆修饰寡核苷酸提供了一种与化学修饰酶相似的高严格性的热启动。当低温下未被激活时，3'修饰寡核苷酸不能被DNA聚合酶延伸。因此在低温下不会出现引物二聚体和副反应。从化学物质辅助激活到辐射介导激活，各种不同的激活使温和激活条件成为可能。

[0169] 当准备扩增RNA靶点时，RNA模板必须首先通过逆转录转化为DNA模板。如果逆转录在另一个分离的容器中进行并且逆转录的部分产物被用来进行PCR扩增，PCR过程基本上与上述用DNA模板进行的PCR一样。

[0170] 一步法RT-PCR是一种逆转录和PCR在同一个容器中先后进行的过程。正如“背景技术”部分所述,目前有一种热启动PCR能有效地用于一步法RT-PCR。本发明可以很大程度上改善一步法RT-PCR。

[0171] 对单重(single-plex)一步法RT-PCR而言,如果将本发明应用于此,将会只有一种用于逆转录过程的带有3'羟基的寡核苷酸。已经知道引物二聚体不会由一个单一引物产生。

[0172] 对三重(triplex)一步法RT-PCR过程而言(例如用于检测捐血者血液中有无HIV、HBV和HCV的罗氏(Roche's)产品),有六种引物。HIV和HCV是RNA靶点,而HBV是DNA靶点。用传统的技术可能形成15种引物二聚体,如表1所示。根据本发明,6种寡核苷酸中的4种带有3'修饰基团,因此只能产生一种引物二聚体。本发明技术的优势显而易见。

[0173] 应用本发明,使用双重修饰可以进一步改善一步法RT-PCR。一种修饰是对逆转录中所需的寡核苷酸的修饰,另一种修饰是对参与PCR扩增的寡核苷酸进行修饰。两种修饰具有两种不同的激活条件,因此逆转录反应和PCR过程的启动可以分开来控制。这种方法尤其对多重一步法RT-PCR有很大的作用。当逆转录将要开始时,RT引物将被激活并参与RT反应。同时,其它的引物保持非活性状态,直到PCR过程启动。这会避免在RT启动之前的引物二聚体形成/非特异性反应的发生。这种分步激活过程可以通过不同方式实现。例如,通过辐射作用移除一种修饰,通过化学辅助激活移除另一种修饰。另一个实例是两种修饰对于同一种化学物质/辐射有不同的敏感性。此外,温度是影响3'羟基产生的另一个重要因素。

[0174] 本发明在连接酶链式反应中的应用

[0175] 与PCR一样,LCR是包括热循环的指数靶点扩增方法。与LCR相关的检测低灵敏性很大程度上归因于耐热连接酶在低于其反应温度下的残余活性。在LCR中,非模板介导性扩增无法与模板介导性扩增区分开来。

[0176] 由于3'羟基是连接酶反应的必需基团,因此使用本发明中公开的3'修饰寡核苷酸的热启动LCR能够减少甚至消除在低温下的非模板介导性连接。

[0177] 美国专利No.6,511,810公开了一种方法,这种方法使用耐热性flap内切核酸酶来实现连接反应。当一个FRET探针加入到体系中时,能够使用它进行靶分子的实时定量。虽然此专利极大地改善了LCR检测,但并没有消除非模板介导性扩增。本发明公开的方法能够进一步降低背景信号。本发明非常适合于在上述过程中进行热启动。

[0178] 本发明在滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)、链置换扩增(strand-displacement amplification,SDA)、单引物等温扩增(single primer isothermal amplification,SPIA⁺)、指数单引物等温扩增(exponential single primer isothermal amplification,X-SPIA⁺)和环介导等温核酸扩增(loop mediated isothermal amplification,LAMP)中的应用

[0179] 这些技术分别在以下美国专利No.5,854,033;6,183,960;6,210,884;6,344,329;5,270,184;5,916,779;6,25.1,639与6,410,278中有描述。对以上所有等温扩增过程而言,所使用的共同成分是具有强烈链置换活性的DNA聚合酶。在这些技术中,最广泛使用的DNA聚合酶是Bst DNA聚合酶大片段。

[0180] 尽管Bst DNA聚合酶大片段在温度最高达65°C时仍有活性,但是它是非耐热性的。用酶化学修饰进行热启动是不可行的。实际上,适用于这些技术的热启动系统仍有待开发。

本发明所提供的各种激活条件,使得能够找到适合于每种具体扩增技术的条件。

[0181] 将本发明应用到这些检测中可以消除扩增开始前的所有副反应。传统的寡核苷酸被本发明的寡核苷酸取代。理想的情况是当扩增反应即将开始时,3'羟基才被再生。

[0182] 将本发明应用到这些过程中不仅可以提高扩增的灵敏度,而且还可以改进对靶点的定量,通过控制扩增的启动可以实现对靶点定量性能的改进。

[0183] 本发明在NASBA、TMA和3SR中的应用

[0184] 这些方法基本上是在等温下扩增RNA靶点。扩增过程包括以下步骤:

[0185] 1. 逆转录以产生互补DNA(cDNA)。

[0186] 逆转录产生一个DNA/RNA异聚双链。逆转录中使用的寡核苷酸在3'端区域有一个靶结合序列,在5'端区域有RNA聚合酶启动子区。单链启动子序列直到变成双链时才具有功能。

[0187] 2. RNase H降解DNA/RNA异聚双链中的RNA链

[0188] RNase H的活性来自于逆转录酶或分离的RNase H

[0189] 3. 双链DNA的合成

[0190] 另一个寡核苷酸与单链cDNA杂交,并在逆转录酶作用下延伸,产生一个DNA/RNA双链。此时,用于结合相应的RNA聚合酶的启动子区呈现双链结构且具有转录功能。

[0191] 4. 通过体外转录合成单链RNA

[0192] 在有功能的启动子与RNA聚合酶作用下,每个DNA/RNA双链会产生成百上千个RNA分子。此时完成了一个扩增循环。结果,每个RNA模板分子都被扩增了成百上千次。

[0193] 5. 重复1至4

[0194] 这样就能指数扩增靶核酸。

[0195] 一般而言,这些检测的灵敏性不如PCR。它们的定量能力也不如PCR。如果将可控启动应用在这些检测中,这两个重要方面将能得到改善。可控启动将能有效地减少甚至消除副反应,进而改善检测的灵敏度。

[0196] 将本发明应用在这些过程中也将会改善它们的靶定量能力。在没有可控启动系统的情况下,扩增反应在所有成分混合之后就立即启动。由于快速的扩增动力学原因,样本与标准品的不同的扩增开始时间会使得精确和准确的定量化十分困难。而可控启动将会使所有的扩增在同一时间开始启动。因而定量化效果可以被极大地改善。

[0197] 本发明的寡核苷酸可代替常规的带有3'羟基的寡核苷酸并用于这些核酸扩增过程。本发明的寡核苷酸序列仍然与常规使用的寡核苷酸一样。

[0198] 本领域技术人员应当理解,应用本发明所带来的优势的大小依赖于核酸扩增技术、寡核苷酸序列、反应体系、孵育条件等。

[0199] 本领域技术人员能够在应用本发明的寡核苷酸代替常规寡核苷酸时做出相应调整。根据具体使用的修饰基团和用于再生3'羟基的化学物质,有可能需要对寡核苷酸浓度、缓冲体系和孵育条件进行调整以达到最优化的反应条件。

[0200] 本发明可以与其它能够减少引物二聚体形成/非特异性反应的技术结合使用。正如之前所讨论的一样,热启动技术正是这些技术中的一个例子。还可以将单链DNA结合蛋白加入到反应体系中以进一步减少引物二聚体的形成和提高检测的特异性。

[0201] 在前三个核苷酸中,使用一些特殊的碱基和糖基来进一步减少引物二聚体的形成

和非特异性反应,而本发明中的寡核苷酸可与这种技术结合使用。这两种技术分别在美国专利No.6,001,611和6,794,142有描述,这两篇文献均以援引的方式纳入本文。

[0202] 本发明还涉及用于核酸扩增的试剂盒。虽然每种试剂盒的构成可能不同,但是至少有一种本发明的修饰的寡核苷酸是进行扩增反应所必需的成分。

[0203] 实施例

[0204] 通过以下实施例为本领域技术人员提供如何实施本发明的完全的公开和描述,这些实施例并不意在限制发明人所认为的本发明的范围;同样,提供这些实施例并不意在表示下述实施例是所进行过的全部实验。已经努力确保所使用的数字(例如数量、温度等等)的准确性,但是同样也应考虑到会有一些实验误差和偏差。

[0205] 实施例1:用马来酸酐对寡核苷酸进行修饰

[0206] 图1显示了反应流程。表2所列为用来检测乙肝病毒的三种寡核苷酸序列。

[0207] 表2.寡核苷酸序列

[0208]

寡核苷酸	序列
正向引物	CCG TCT GTG CCT TCT CAT CTG
逆向引物1	GGT TTC CAT GTAACG TGC AG
逆向引物2	GGT CTC CAT GCGACG TGC AG

[0209] 冻干的寡核苷酸溶解在1xTE(10mM TrisHCl,pH8.0,0.1mM EDTA)中,制备成浓度为100 μ M。将4-(二甲基氨基)-吡啶(DMAP)(Aldrich)溶于三乙胺(TEA)(Aldrich)制备成浓度为3mg/ml的溶液。将马来酸酐(Aldrich)溶于N,N'-二甲基甲酰胺(DMF,Sigma)制备成4M溶液。

[0210] 步骤1:在2.0ml的微量离心管内将16 μ l寡核苷酸和320 μ l的DMAP溶液混合

[0211] 步骤2:在寡核苷酸/DMAP混合物中加入6 μ l的4M马来酸酐溶液

[0212] 步骤3:室温下,以最快速度振荡混匀2分钟

[0213] 步骤4:加入1026 μ l异丙醇并混合均匀

[0214] 步骤5:在-20 $^{\circ}$ C孵育两小时

[0215] 步骤6:4 $^{\circ}$ C下,以14000rpm离心20分钟

[0216] 步骤7:移去上清液 \rightarrow 加入800 μ l异丙醇 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C下以14000rpm离心20分钟

[0217] 步骤8:将步骤7重复一次

[0218] 步骤9:移去上清液 \rightarrow 室温下干燥微离心管 \rightarrow 用水溶解寡核苷酸。

[0219] 实施例2:Taq DNA聚合酶的制备

[0220] 嗜热水生菌(Taq)DNA聚合酶基因是由基因库的序列(目录编码No.J04639)经由PCR克隆而来。Taq DNA聚合酶的纯化经由Lawyer等(Lawyer et al.,1989,JBC 264(11):6427-37;Lawyer et al.1989,PCR Meth.Appl.2(4):275-87)描述的过程来完成。

[0221] 实施例3:用顺甲基丁烯二酸修饰Taq DNA聚合酶

[0222] 顺甲基丁烯二酸(Aldrich)和N,N'二环己基碳二亚胺(DCC)(Aldrich)以及NHS(Aldrich)均溶解在DMF中,形成浓度均为1M的溶液。200 μ lDCC、200 μ l NHS和100 μ l顺甲基丁烯二酸混合于一1.5ml的微离心管中。然后将该混合物在室温下孵育1小时。然后,将该混合物在室温下以12000rpm离心20分钟。去除沉淀物,保留上清液用来修饰Taq DNA聚合酶。

[0223] 已纯化的Taq DNA聚合酶在20mM MOPS,pH8.0和100mM KCl中配成1mg/ml的溶液。已活化顺甲基丁烯二酸与Taq DNA聚合酶,按1:99体积比相混合,然后置于室温下孵育一小时,以使Taq DNA聚合酶失活。

[0224] 实施例4:使用修饰寡核苷酸的PCR扩增

[0225] Sybr Green优先和双链DNA结合,其亲和力比单链DNA高1000倍以上。它已被广泛运用于实时监控PCR的扩增。虽然这样的结合不具有序列特异性,但可以通过退火曲线分析来辨别不同的扩增产物,因为每种扩增产物都有一定的退火温度。Sybr Green在本发明中被用来监测引物二聚体的形成和靶序列的扩增。

[0226] PCR体系包括50mM TrisHCl、pH8.4、5mM KCl、3mM MgCl₂、0.01% Tween-20、0.005%明胶、1xSybr Green、500nM 5-R_{OX}、7.5mM羟基胺氯(Aldrich)、dATP、dCTP、dGTP和TTP各0.2mM、1U Taq DNA聚合酶、未修饰的或马来酸酐修饰的HBV引物各200nM。反应体积是25μl,在反应体系中加入零HBV模板拷贝(无模板对照或NTC)或加入500份HBV模板拷贝。

[0227] 反应在ABI Prizm7000上进行。热循环条件如下:95℃,10分钟→(95℃,5秒→60℃,30秒)×40循环。

[0228] 对于逆转修饰,高温下的预培养,即95℃10分钟,和羟基胺氯的存在都很重要。

[0229] 结果如图5a所示,和一般的未经修饰的引物(NTC/R)相比,含有马来酸酐修饰引物的NTC反应(NTC/M)显示超过7周期的滞后扩增。换句话说,NTC扩增或引物二聚体的形成被推迟了超过7个周期。这点很清楚地表明,经修饰的引物在降低引物二聚体形成方面是有效的。

[0230] 实施例5:PCR产物的退火曲线分析

[0231] 在图5a中显示,使用常规引物的含有HBV模板(T⁺/R)比相应的使用修饰引物的扩增反应(T⁺/M)几乎早5个周期。在没有引物二聚体形成之类的副作用发生时,两者因为包含相同的HBV模板数,所有也应该有类似的扩增动力学。这要求我们对扩增产品进行进一步的分析。

[0232] 进行了退火曲线分析。退火曲线结果如图5b所示,使用常规引物的含有HBV模板(T⁺/R)有两个扩增产物,一个是主要产物:解链温度大概在77℃的引物二聚体,另一个是少量产物:解链温度大概在83℃的模板介导扩增产物。对比之下,使用修饰引物的HBV模板扩增(T⁺/M)显示较纯净的扩增。只产生模板介导扩增产物。

[0233] 实施例6:在逆转录酶存在时使用常规Taq聚合酶和化学修饰Taq聚合酶的PCR

[0234] 各种基于热启动PCR的技术中,可逆化学修饰PCR DNA聚合酶技术的热启动最严格,也最有效。它能有效地改善DNA模板扩增,并实现多重multiplex PCR扩增。

[0235] 但是,在一步法RT.PCR系统中,它面临“背景技术”里所述的难题。测试了一种经化学修饰过的酶在逆转录酶存在时是否会减少引物二聚体的形成。

[0236] PCR体系包括50mM TrisHCl、pH8.4、5mM KCl、3mM MgCl₂、7.5mM羟基胺氯(Aldrich)、0.01% Tween-20、0.005%明胶、500nM 5-R_{OX}、1xSybr Green、dATP、dCTP、dGTP和TTP各0.2mM、4U的SuperScriptIII(Invitrogen)、未修饰的HBV引物各200nM、普通非热启动或化学修饰的热启动Taq DNA聚合酶1U。反应体积是25μl,在反应体系中加入零HBV模板拷贝(无模板对照或NTC)或加入500份HBV模板拷贝。

[0237] 反应在ABI Prizm7000上进行。热循环条件如下:55℃,15分钟→95℃,10分钟→

(95°C, 5秒→60°C, 30秒)×40个循环。

[0238] 扩增结果如图6所示,虽然含有化学修饰Taq(NTC/hsT)的NTC扩增比普通Taq(NTC/regT)延迟了约两个循环,但含有化学修饰Taq的NTC扩增很严重。在含有HBV模板的反应中,普通Taq和化学修饰Taq两者扩增达到的阈值的时间比正常要早(参见图5a)。对退火曲线的分析显示该实验中,所有四种扩增中均只有引物二聚体产生(图6b)。这表明:i. 逆转录酶可介导引物二聚体的形成;ii. 当反应系统中存在逆转录酶时,化学修饰PCR酶在减少引物二聚体形成方面效果不佳。

[0239] 实施例7:带有修饰寡核苷酸的PCR

[0240] 此实验的目的是为了进一步说明逆转录酶有促进引物二聚体形成的作用,以及可逆修饰引物有抑制引物二聚体形成的功能。

[0241] PCR体系包括50mM TrisHCl、pH8.4、5mM KCl、3mM MgCl₂、7.5mM羟基胺氯(Aldrich)、0.01% Tween-20、0.005% 明胶、500nM 5-ROX、1x Sybr Green, dATP、dCTP、dGTP和TTP各0.2mM、1U常规的未修饰Taq DNA聚合酶、0U或4U的SuperScript III(Invitrogen)、未修饰的或修饰的HBV引物各200nM。反应体积是25μl,该体系中无HBV模板。

[0242] 反应在ABI Prizm7000上进行。热循环条件如下:55°C, 15分钟→95°C, 10分钟→(95°C, 5秒→60°C, 30秒)×40个循环。

[0243] 带有常规未修饰的引物,NTC反应(RT⁺/R)中存在逆转录酶时,比不存在逆转录酶(RT⁻/R)时产生更多的引物二聚体(图7),并且早将近4个循环。

[0244] 修饰引物可以很大程度上减少引物二聚体的形成。和普通引物相比,不存在或存在4U逆转录酶时,引物二聚体的形成分别滞后了7个(RT⁻/R vs RT⁻/M)和11个循环(RT⁺/R vs RT⁺/M)。更重要的是,它表明了:当使用修饰引物时,逆转录酶的存在并没有对引物二聚体的形成造成很大影响(RT⁻/M vs RT⁺/M)。

[0245] 实施例8:带有修饰引物的靶序列的扩增

[0246] 此实验的目的是为了进一步证实可逆修饰引物在一步法RT PCR中可以改善PCR扩增效果。

[0247] PCR体系中包含50mM TrisHCl、pH8.4、5mM KCl、3mM MgCl₂、7.5mM羟基胺氯(Aldrich)、0.01% Tween-20、0.005% 明胶、500nM 5-ROX、1x Sybr Green, dATP、dCTP、dGTP和TTP各0.2mM、1U普通未修饰Taq DNA聚合酶、4U SuperScript III(Invitrogen)、未修饰或修饰HBV引物各200nM。反应体积是25μl,在反应体积中加入零HBV模板拷贝(无模板对照或NTC)或加入500拷贝HBV模板。

[0248] 反应在ABI Prizm7000上进行。热循环条件如下:55°C, 15分钟→95°C, 10分钟→(95°C, 5秒→60°C, 30秒)×40个循环。

[0249] 如图8a所示,修饰引物有效地将引物二聚体的形成推迟了11个循环(NTC/M vs NTC/R)。如图8b所示,使用修饰引物的模板介导扩增没有产生引物二聚体(T⁺/M),而使用普通引物的扩增即使在500份HBV模板拷贝下都只产生引物二聚体(图8a和8b中的T⁺/R)。

[0250] 参考文献

[0251] 美国(US)专利文件

[0252] 5,338,671 8/1994 Scalice et al. 435/91.2

[0253] 5,411,876 5/1995 Bloch et al. 435/6

- | | | | | |
|--------|--|---------|--------------------|-----------|
| [0254] | 5,413,924 | 5/1995 | Kosak et al. | 435/91.1 |
| [0255] | 5,427,930 | 6/1995 | Birkenmeyer et al. | 435/91.52 |
| [0256] | 5,565,339 | 10/1996 | Bloch et al. | 435/6 |
| [0257] | 5,643,764 | 7/1997 | Kosak et al. | 435/91.1 |
| [0258] | 5,677,152 | 10/1997 | Birch et al. | 435/91.2 |
| [0259] | 5,773,258 | 4/1998 | Birch et al. | 435/91.2 |
| [0260] | 5,693,502 | 12/1997 | Gold et al. | 435/91.2 |
| [0261] | 5,763,173 | 6/1998 | Gold et al. | 435/6 |
| [0262] | 5,773,258 | 6/1998 | Birch et al. | 435/91.2 |
| [0263] | 5,874,557 | 2/1999 | Gold et al. | 536/22.1 |
| [0264] | 6,001,611 | 12/1999 | Will | 435/91.2 |
| [0265] | 6,020,130 | 2/2000 | Gold et al. | 435/6 |
| [0266] | 6,183,967 | 2/2001 | Jayasena et al. | 435/6 |
| [0267] | 6,183,998 | 2/2001 | Ivanov et al. | 435/91.2 |
| [0268] | 6,403,341 | 6/2002 | Barnes et al. | 435/91.2 |
| [0269] | 6,511,810 | 1/2003 | Bi et al. | 435/6 |
| [0270] | 6,794,142 | 9/2004 | Laird et al. | 435/6 |
| [0271] | <u>其它出版物:</u> | | | |
| [0272] | Kaiser et al.,1999,"A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases" J,Biol.Chem.274(30):21387-21394. | | | |
| [0273] | Leone et al.,1998,"Molecular beacon probes combined with amplification by NABSA enable homogeneous,real-time detection of RNA" Nucleic Acids Res.26(9):2150-2155. | | | |
| [0274] | Nadeau et al.,1999,"Real-time,sequence-specific detection of nucleic acids during strand displacement amplification" Anal.Biochem.276:177-187. | | | |
| [0275] | Nilsson et al.,2002,"Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified molecular beacon design" Nucleic Acids Res.30(14):e66. | | | |
| [0276] | Spears et al.,1997,"Simultaneous strand displacement amplification and fluorescence polarization detection of Chlamydia trachomatis DNA" Anal.Biochem.247:130-137. | | | |
| [0277] | Walker et al.,1996,"DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using a DNA binding protein" Nucleic Acids Res.24(2):348-353. | | | |

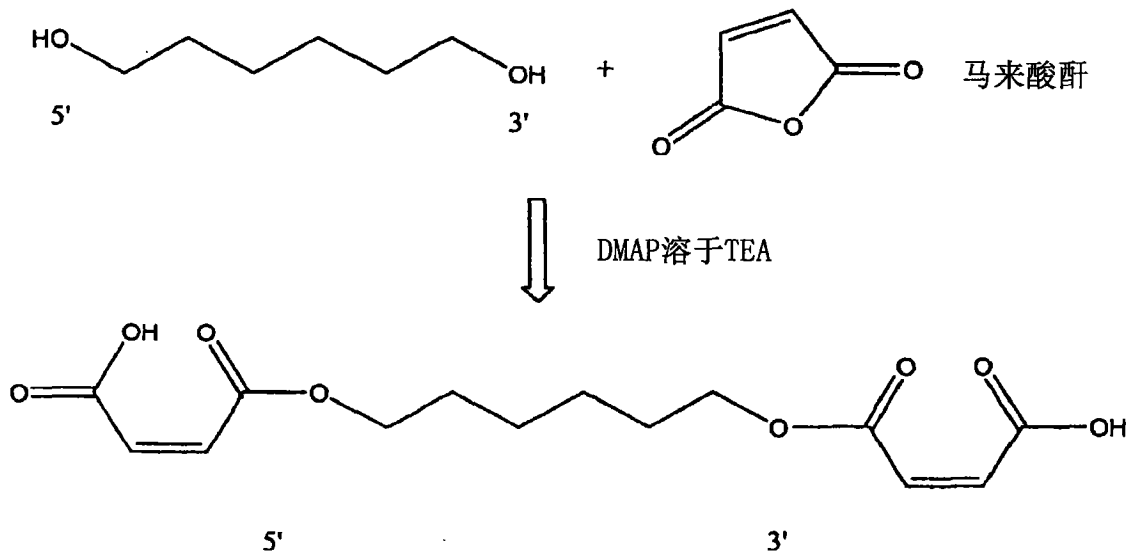


图1

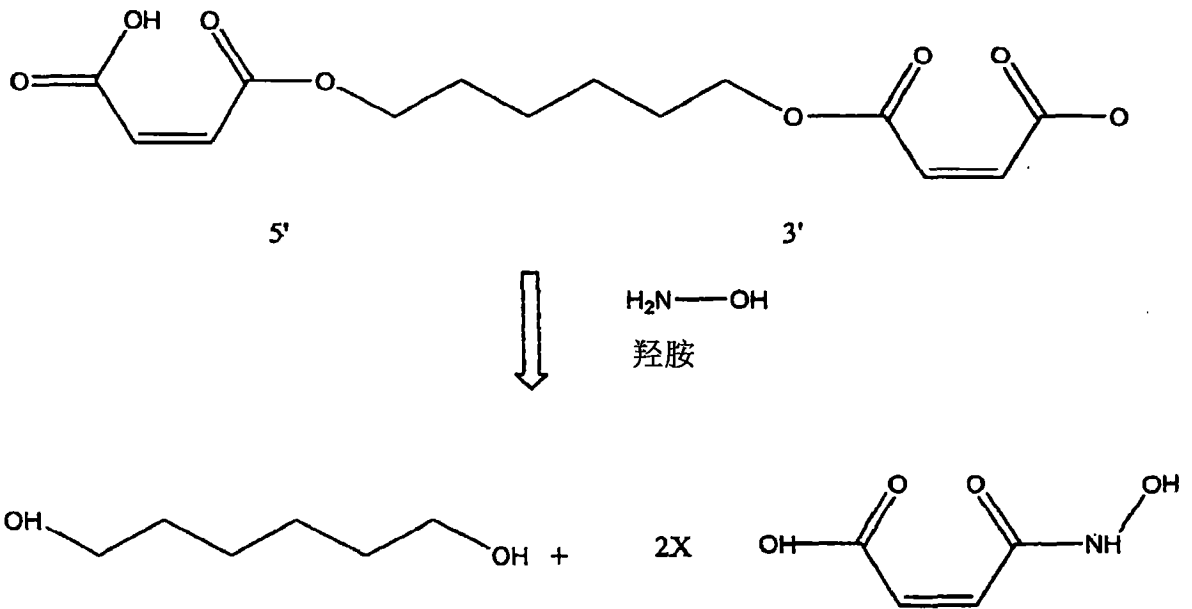


图2

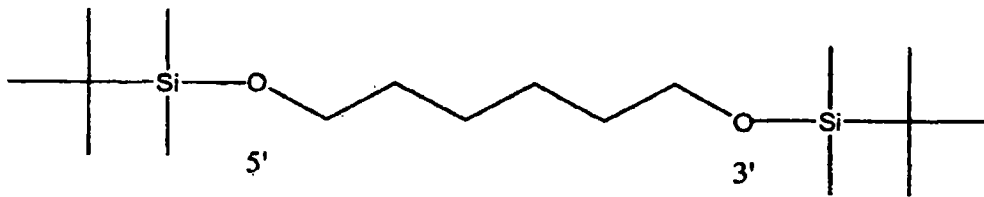
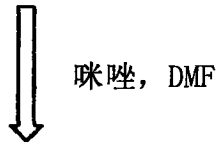
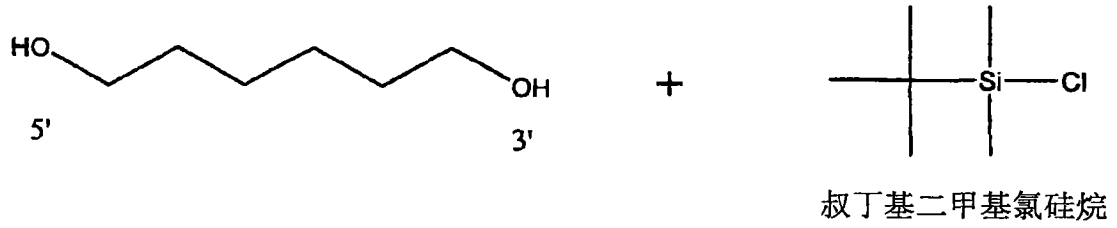


图3

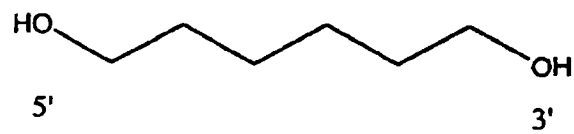
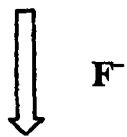
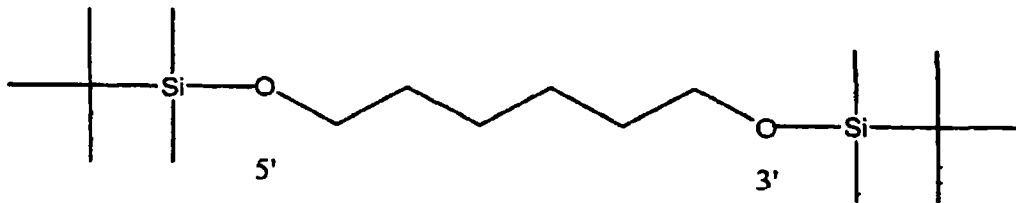


图4

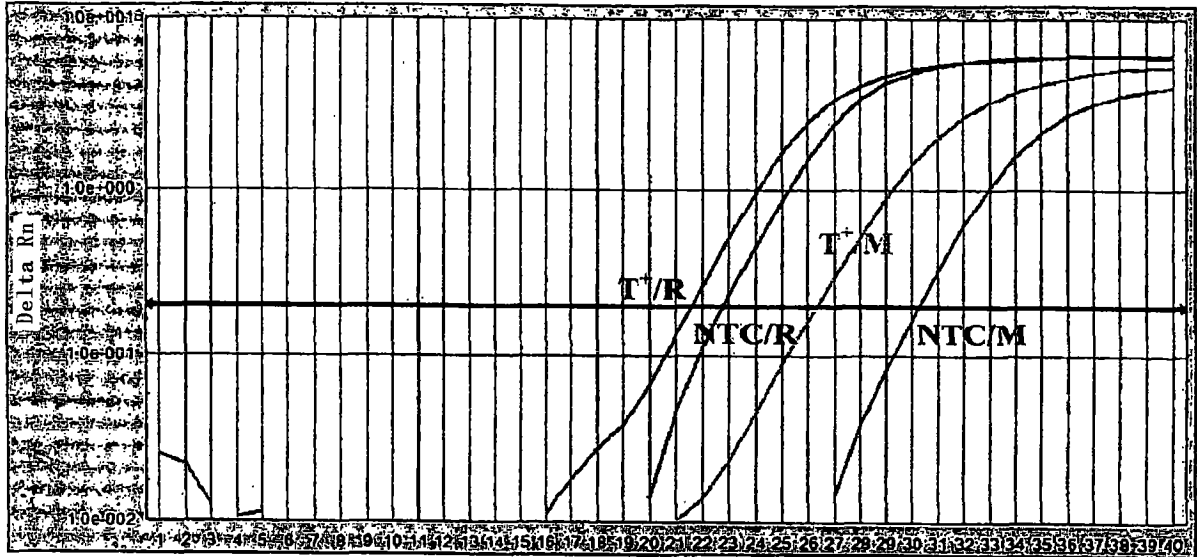


图5a

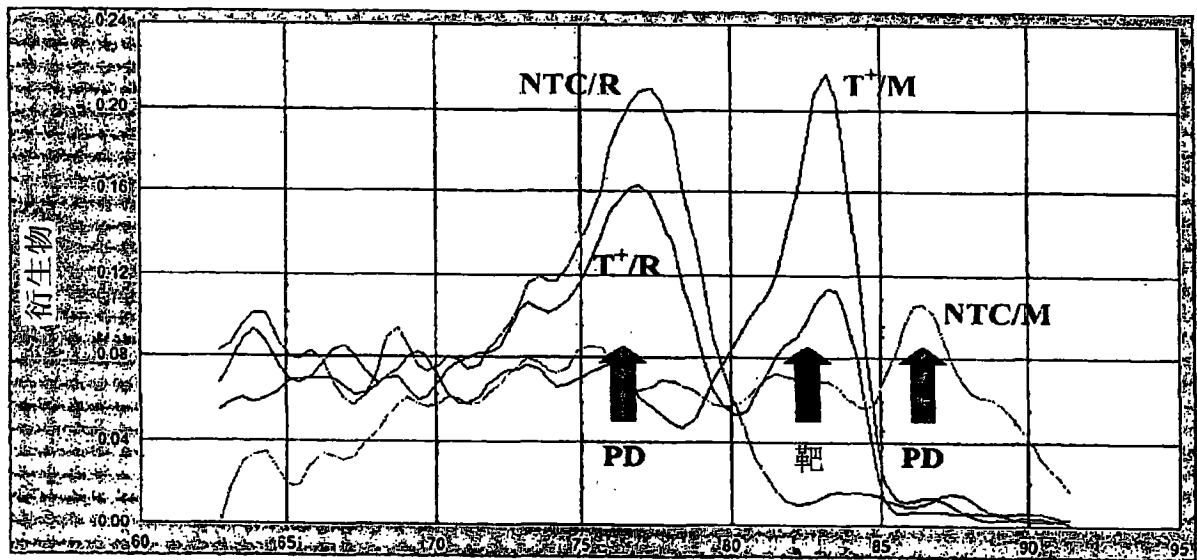


图5b

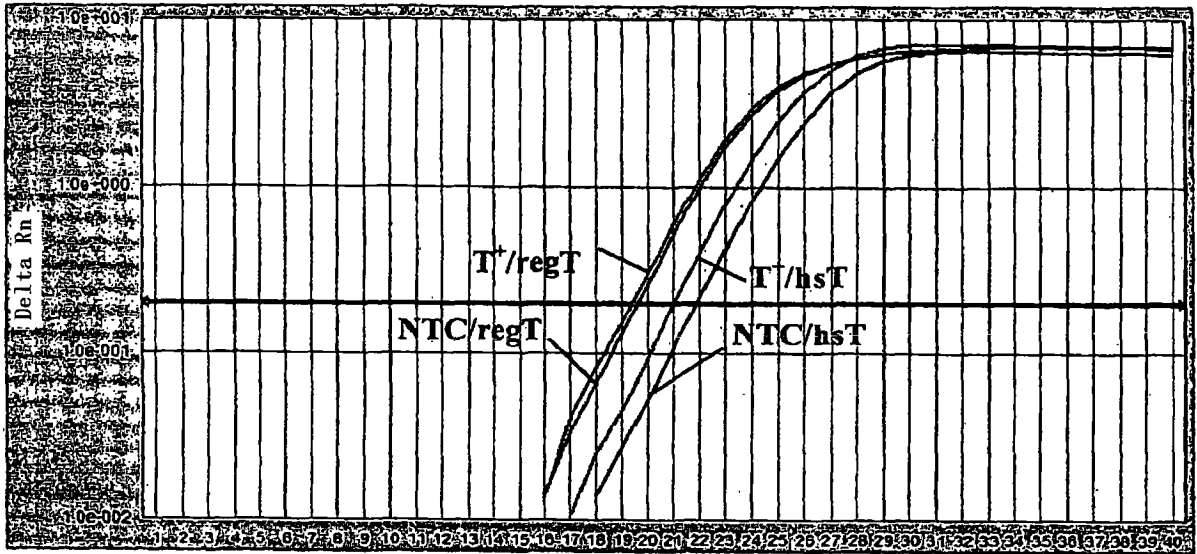


图6a

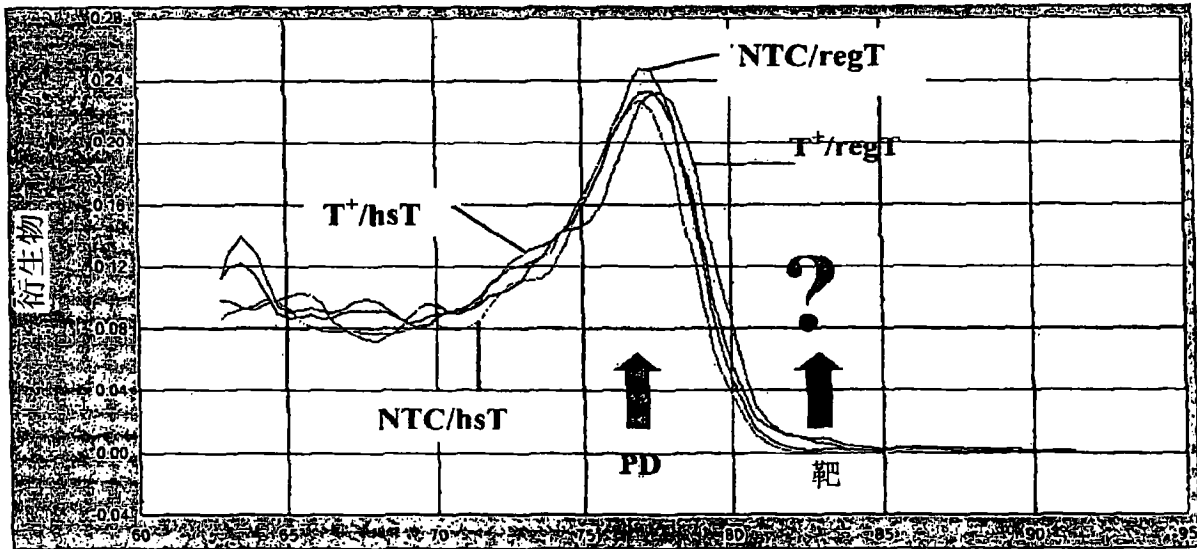


图6b

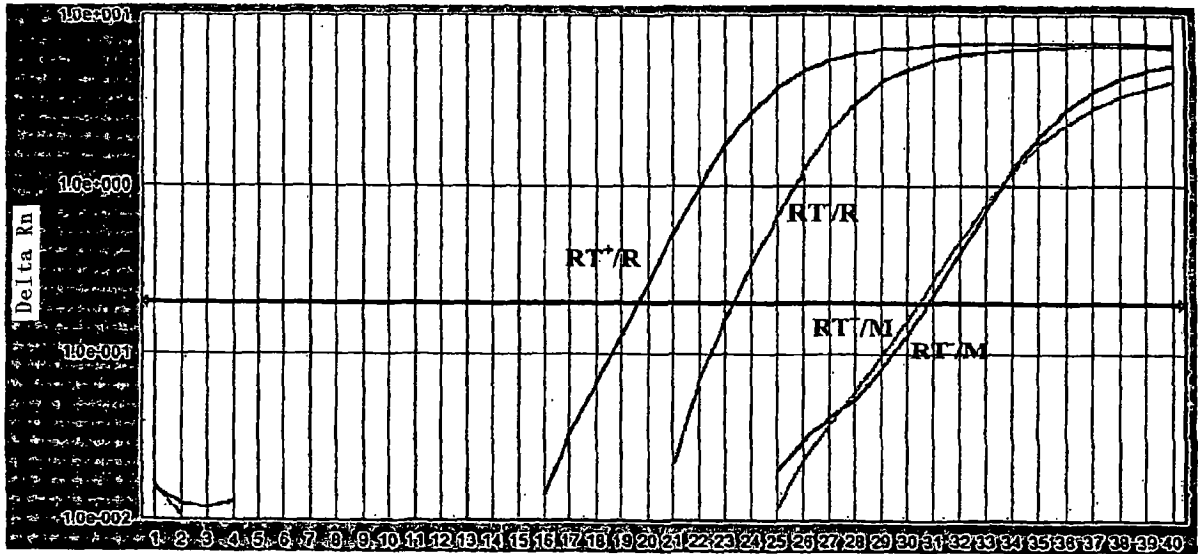


图7

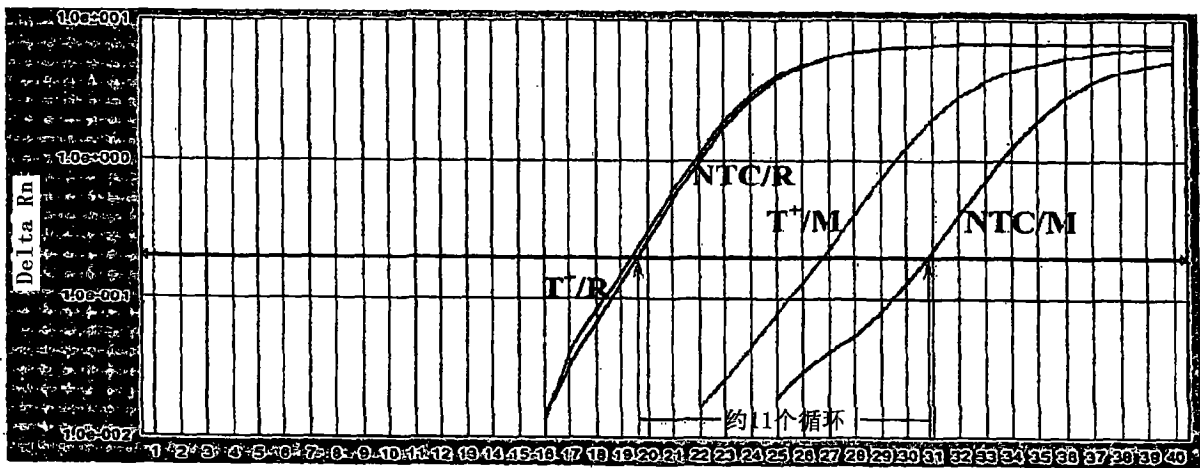


图8a

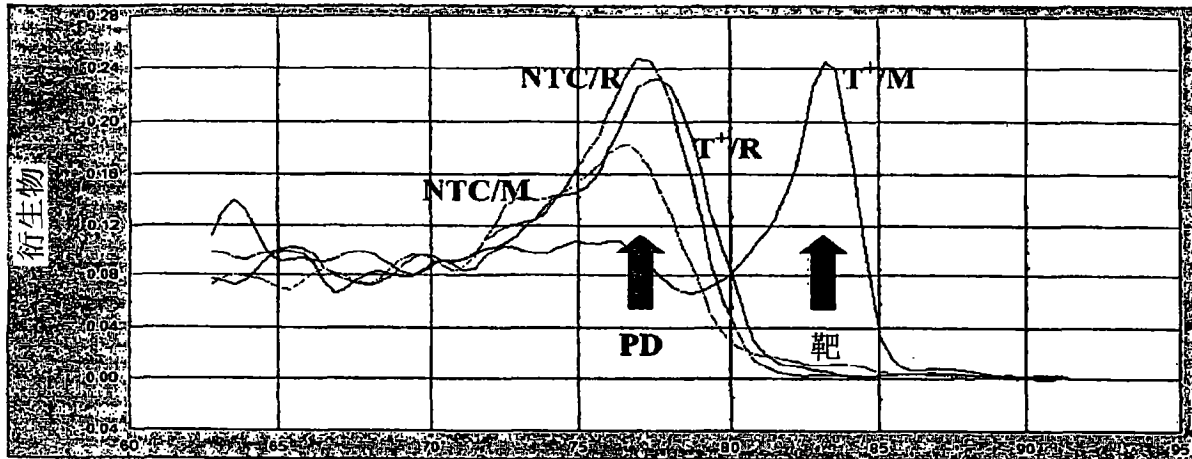


图 8b

多重	#引物	#扩增	#PD
1	2	1	1
2	4	2	6
3	6	3	15
4	8	4	28
5	10	5	45
6	12	6	66
7	14	7	91
8	16	8	120
9	18	9	153
10	20	10	190

表1