(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108291252 B
(45)授权公告日 2022.05.13

(21)申请号 201680069920.6
(22)申请日 2016.12.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108291252 A
(43)申请公布日 2018.07.17
(30)优先权数据
62/271614 2015.12.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/082696 2016.12.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/114823 EN 2017.07.06
(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 A.古普塔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 梁谋 黄希贵
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6832(2018.01)
C12Q 1/6851(2018.01)

(56)对比文件
CN 101952461 A,2011.01.19
US 5939262 A,1999.08.17
US 5939262 A,1999.08.17
US 6251600 B1,2001.06.26
US 5210015 A,1993.05.11

审查员 张蕾

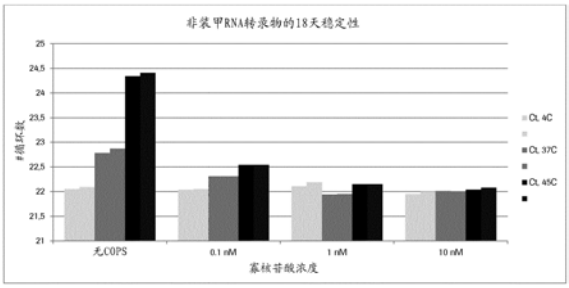
权利要求书2页 说明书21页
序列表8页 附图8页

(54)发明名称

稳定特定RNA的通用方法

(57)摘要

本发明涉及用于通过将一种或多种保护性/稳定性寡核苷酸杂交至RNA分子来稳定特定RNA分子的方法和组合物，所述特定RNA分子可以是检测目标或对照标准品。



CN 108291252 B

1.防止或降低在扩增反应中扩增的单链RNA模板的区段的降解的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 提供单链RNA模板；

b) 将所述单链RNA模板的区段与一种或多种寡核苷酸杂交，所述寡核苷酸的序列与被扩增的单链RNA模板的区段完全或部分互补，其中所述一种或多种寡核苷酸与被扩增的单链RNA模板超过48％的区段特异性杂交；和

c) 在这样的反应条件下逆转录和扩增所述单链RNA模板的区段：其中所述一种或多种寡核苷酸不干扰逆转录和扩增，并且其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸特征在于长度为11个核苷酸至50个核苷酸且具有比扩增过程中使用的延伸温度低至少5℃的解链温度，且其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸的序列不与来自所述一种或多种寡核苷酸的另一寡核苷酸的序列重叠；且所述一种或多种寡核苷酸以比逆转录和扩增过程中使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在。

2.权利要求1的方法，其中所述一种或多种寡核苷酸与被扩增的单链RNA模板的完整区段杂交。

3.权利要求1-2中任一项的方法，其中所述单链RNA模板被笼蔽。

4.权利要求3的方法，其中将单链RNA模板通过选自包封、包壳、捕获和在细胞内的方式笼蔽。

5.权利要求1-2中任一项的方法，其在步骤b)和步骤c)之间进一步包括分离或纯化单链RNA模板的步骤。

6.权利要求1-2中任一项的方法，其中所述一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

7.在扩增反应过程中检测核酸样品中测试的RNA序列的存在的方法，其包括：

a) 提供核酸样品；

b) 提供用作测试的RNA序列的检测和/或定量中的标准品的核酸标准品，其中所述核酸标准品包含单链RNA对照序列和一种或多种寡核苷酸，所述寡核苷酸的序列与单链RNA对照序列的区段完全或部分互补，其中所述一种或多种寡核苷酸与所述单链RNA对照序列超过48％的区段特异性杂交；

c) 将所述样品和所述核酸标准品混合；

d) 提供用于进行逆转录和扩增所述测试的RNA序列和单链RNA对照序列的区段两者的条件，其中在所述条件下，所述一种或多种寡核苷酸不干扰逆转录和扩增并且其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸特征在于长度为11个核苷酸至50个核苷酸且具有比扩增过程中使用的延伸温度低至少5℃的解链温度，且其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸的序列不与来自所述一种或多种寡核苷酸的另一寡核苷酸的序列重叠；且所述一种或多种寡核苷酸以比逆转录和扩增过程中使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在；和

e) 检测来自所述测试的RNA序列和来自所述单链RNA对照序列的区段的扩增产物。

8.权利要求7的方法，其中所述一种或多种寡核苷酸与所述单链RNA对照序列的完整区段杂交。

9.权利要求7-8中任一项的方法，其中所述单链RNA对照序列被笼蔽。

10.权利要求7-8中任一项的方法，其在步骤c)和步骤d)之间进一步包括分离或纯化所述单链RNA对照序列的步骤。

11.权利要求7-8中任一项的方法，其中所述一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

12.核酸标准品，其用作在扩增反应中被扩增的测试的RNA序列的检测和/或定量中的标准品，其中所述核酸标准品包含单链RNA对照序列和一种或多种寡核苷酸，所述寡核苷酸的序列与所述单链RNA对照序列完全或部分互补，并且与完整的所述单链RNA对照序列特异性杂交，其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸的特征在于具有比扩增反应过程中使用的延伸温度低至少5℃的解链温度和以比扩增反应过程中使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在，其中来自所述一种或多种寡核苷酸的每一寡核苷酸长度为11个核苷酸至50个核苷酸。

13.权利要求12的核酸标准品，其中所述一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

14.防止或降低单链RNA分子的区段的降解的方法，所述方法包括以下步骤：提供单链RNA分子；并将单链RNA分子与多个寡核苷酸杂交，所述寡核苷酸的序列与单链RNA分子完全或部分互补，其中所述多个寡核苷酸与完整的单链RNA分子特异性杂交，且其中来自所述多个寡核苷酸的每一寡核苷酸的序列不与来自所述多个寡核苷酸的另一寡核苷酸的序列重叠，其中来自所述多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸。

15.权利要求14的方法，其中所述提供和杂交步骤在溶液中进行。

稳定特定RNA的通用方法

发明领域

[0001] 本发明属于体外诊断学领域，且具体属于经扩增技术检测和定量核酸的领域。

[0002] 发明背景

[0003] 在分子诊断学领域中，从众多来源扩增核酸具有相当重要的意义。核酸扩增和检测的诊断学应用实例是检测病毒诸如人乳头瘤病毒(HPV)、西尼罗河病毒(WNV)或常规筛查献血者中人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)和/或丙型肝炎病毒(HCV)的存在。此外，所述扩增技术适用于细菌目标如分枝杆菌，或肿瘤标志物的分析。

[0004] 最突出和最广泛使用的扩增技术是聚合酶链式反应(PCR)。其他扩增反应尤其包括连接酶链式反应、聚合酶连接酶链式反应、Gap-LCR、修复链反应、3SR、NASBA、链置换扩增(SDA)、转录介导的扩增(TMA)和Qβ扩增。用于基于PCR分析的自动化系统通常利用在同一反应容器中的PCR过程中实时检测产物扩增。这种方法的关键是使用带有报道基团或标记的修饰的寡核苷酸。

[0005] 在临床核酸诊断领域中最期望的或者甚至是强制性的是使用具有已知序列的对照核酸来控制相应的扩增，以用于定性(性能控制)和/或定量(使用对照作为参考测定靶核酸的量)目的。考虑到特别是诊断靶标包括原核、真核以及病毒核酸的多样性，并且鉴于不同类型的核酸如RNA和DNA之间的多样性，对照核酸通常以特定方式设计。简言之，这些对照通常类似于它们作为对照的靶核酸，以便在该过程中模拟它们的性质。这种情况适用于定性和定量测定。在单个或平行实验中要检测多个参数的情况下，通常使用类似于不同靶核酸的不同对照，诸如，例如在Swanson等人(J. Clin.Microbiol., 2004, 42, 第1863-1868页)。Stöcher 等人(J. Virol.Meth., 2003, 108, 第1-8页)公开了其中多种病毒特异性竞争对照包含在同一DNA分子上的对照核酸。

[0006] 在过去的几年中，基于特定核酸序列的检测，已开发了针对特定mRNA种类的诊断测定和测定法。许多这些测定已经适用于确定特定RNA种类的绝对浓度。这些绝对定量测定需要使用之前已经确定了精确量的RNA标准品。这些RNA标准品通常通过体外转录来合成，或者是致病因子本身。纯化RNA，然后通过几种不同方法定量，如OD_{260}处的吸光度、磷酸盐分析、增色或同位素示踪分析(Collins，1995)。

[0007] 由于RNA固有的热不稳定性和无处不在的RNA酶污染源，用作标准品的特定目标mRNA和RNA在样品采集、储存或其他下游过程中经常经受不希望的降解，常常导致测试失败或检测灵敏度降低。

[0008] 一种常用的稳定RNA的方法是所谓的“装甲RNA(armored RNA)”方法，其中使用噬菌体的外壳蛋白包封RNA以产生假病毒颗粒(并且如在US 5,677,124和U.S.5,939,262中进一步描述的那样)。RNA包封的另一种方法涉及AccuPlex技术(SeraCare Life Sciences，Milford MA)，其中目标RNA由哺乳动物病毒包膜内的胞吐作用产生。然而，由这些包封颗粒提供的RNA保护在高温下受到限制。显然，需要新的方法和组合物，其增加在冷藏可能受限的区域中开发的产品中的RNA的保质期。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及用于稳定特定RNA分子的方法和组合物，所述特定RNA分子可以是检测目标或对照标准品。

[0011] 在一个方面，本发明涉及防止或降低在扩增反应中扩增的单链RNA模板的区段的降解的方法，所述方法包括以下步骤：提供单链RNA模板；将单链RNA模板与一种或多种寡核苷酸杂交，所述寡核苷酸的序列与扩增的单链RNA模板的区段完全或部分互补；和在反应条件下逆转录并扩增所述单链RNA模板的区段：其中所述一种或多种寡核苷酸不干扰逆转录和扩增。由此，一种或多种寡核苷酸在逆转录和扩增期间不用作引物、探针或模板。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有比扩增期间使用的延伸温度低至少5℃的解链温度。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的解链温度比逆转录和扩增期间使用的引物和探针的解链温度低至少5℃。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以比逆转录和扩增期间使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以0.1nM至2.0nM的浓度存在。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与扩增的单链RNA模板超过48％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与扩增的单链RNA模板超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与扩增的单链RNA模板的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸或11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自一种或多种寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在另一个实施方案中，单链RNA模板被笼蔽(caged)。可以通过包封、包壳、捕获或通过RNA模板在细胞内来完成笼蔽。在另一个实施方案中，分离或纯化单链RNA模板的步骤在逆转录和扩增步骤之前进行。在另一个实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0012] 在另一方面，本发明涉及在扩增反应期间检测样品中测试的RNA序列的存在的方法，其包括获得样品；获得用作检测和/或定量测试的RNA序列中的标准品的核酸标准品，其中所述核酸标准品包含单链RNA对照序列和一种或多种寡核苷酸，所述寡核苷酸的序列与单链RNA对照序列的区段完全或部分互补；混合样品和核酸标准品；提供进行测试的RNA序列和单链RNA对照序列区段的逆转录和扩增的条件，其中在这些条件下，所述一种或多种寡核苷酸不干扰逆转录和扩增；和检测来自测试的RNA序列和来自单链RNA对照序列的扩增产物。由此，一种或多种寡核苷酸在逆转录和扩增期间不用作引物、探针或模板。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有比扩增期间使用的延伸温度低至少5℃的解链温度。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的解链温度比逆转录和扩增期间使用的引物和探针的解链温度低至少5℃。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以比逆转录和扩增期间使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以0.1nM至2.0nM的浓度存在。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链

RNA对照序列超过48％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与扩增的单链RNA对照序列超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA对照序列的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸或11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自一种或多种寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在一个实施方案中，单链RNA对照序列被笼蔽(caged)。在一些实施方案中，将单链RNA对照序列通过选自包封、包壳、捕获和在细胞内的方式笼蔽。在另一个实施方案中，分离或纯化测试的RNA序列和单链RNA对照序列的区段的步骤在提供用于进行逆转录和扩增的条件的步骤之前进行。在另一个实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0013] 在另一方面，本发明涉及核酸标准品，其用作在扩增反应中扩增的测试RNA序列的检测和/或定量中的标准品，其中所述核酸标准品包含单链RNA对照序列和一种或多种寡核苷酸，所述寡核苷酸的序列与单链RNA对照序列的区段完全或部分互补并与单链RNA对照序列超过48％的区段杂交。在此，一种或多种寡核苷酸在扩增反应期间不用作引物、探针或模板。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有比扩增反应期间使用的延伸温度低至少5℃的解链温度。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的解链温度比扩增反应期间使用的引物和探针的解链温度低至少5℃。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以比扩增反应期间使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以0.1nM至2.0nM的浓度存在。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA对照序列超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA对照序列的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸或11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自一种或多种寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在另一个实施方案中，单链RNA对照序列被笼蔽(caged)。可以通过包封、包壳、捕获或通过RNA模板在细胞内来完成笼蔽。在另一个实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0014] 在另一方面，本发明涉及防止或降低单链RNA分子的区段降解的方法，所述方法包括以下步骤：提供单链RNA分子；并将单链RNA分子与多个寡核苷酸杂交，所述寡核苷酸的序列与单链RNA分子的区段完全或部分互补，其中所述多个寡核苷酸与单链RNA分子超过48％的区段杂交，其中来自所述多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50

个核苷酸。在一个实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自多个寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在另一个实施方案中，单链RNA分子被笼蔽(caged)。可以通过包封、包壳、捕获或通过RNA分子在细胞内来完成笼蔽。在另一个实施方案中，提供和杂交步骤在溶液中进行。在另一个实施方案中，多个寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0015] 在另一方面，本发明涉及一种或多种寡核苷酸用于防止或降低待进行逆转录反应或逆转录和扩增反应的单链RNA分子的区段的降解的用途，其中所述一种或多种寡核苷酸的序列与单链RNA的区段完全或部分互补。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有比逆转录反应或逆转录和扩增反应中使用的延伸温度低至少5℃的解链温度。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的解链温度比逆转录反应或逆转录和扩增反应期间使用的引物和探针的解链温度低至少5℃。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以比逆转录反应或逆转录和扩增反应期间使用的引物和探针的浓度低至少50倍的浓度存在。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸以0.1nM至2.0nM的浓度存在。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA超过48％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，所述一种或多种寡核苷酸与单链RNA的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸或11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自一种或多种寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自一种或多种寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在另一个实施方案中，单链RNA被笼蔽(caged)。可以通过包封、包壳、捕获或通过RNA模板在细胞内来完成笼蔽。在一个实施方案中，RNA至少是单链RNA对照序列。在一个实施方案中，RNA至少是单链RNA模板序列。在另一个实施方案中，RNA是至少一个单链RNA对照序列和至少一个单链RNA模板序列的混合物。在在一个实施方案中，在37℃的孵育温度下，防止或降低单链RNA的区段的降解持续至少18天的时期。在一个实施方案中，在45℃的孵育温度下，防止或降低单链RNA的区段的降解持续至少18天的时期。在某些实施方案中，在37℃或45℃的孵育温度下，防止或降低单链RNA的区段的降解持续至少45天的时期。在某些实施方案中，在37℃或45℃的孵育温度下，防止或降低单链RNA的区段的降解持续至少71天的时期。在某些实施方案中，在37℃或45℃的孵育温度下，防止或降低单链RNA的区段的降解

持续至少12周的时期。在另一个实施方案中，一种或多种寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0016] 在另一方面，本发明涉及用于防止或降低单链RNA分子的区段降解的混合物，所述混合物包含溶液中的单链RNA分子和多个寡核苷酸，所述寡核苷酸的序列与单链RNA分子的区段完全或部分互补，其中所述多个寡核苷酸与单链RNA分子超过48％的区段杂交，且其中来自所述多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至50个核苷酸。在一个实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过60％、超过75％或超过90％的区段杂交。在一个实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子的完整区段杂交。在一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11个核苷酸至40个核苷酸或长度为11个核苷酸至30个核苷酸。在某些实施方案中，多个寡核苷酸与单链RNA分子超过90％的区段杂交，其中来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的长度为11至30个核苷酸。在另一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸具有范围为20℃至80℃、或30℃至70℃、或40℃至70℃、或40℃至60℃的解链温度。在又另一个实施方案中，来自多个寡核苷酸的每一种寡核苷酸的序列不与来自多个寡核苷酸的另一个寡核苷酸的序列重叠。在另一个实施方案中，单链RNA分子被笼蔽(caged)。可以通过包封、包壳、捕获或通过RNA分子在细胞内来完成笼蔽。在另一个实施方案中，混合物进一步包含适合于进行逆转录反应或逆转录和扩增反应的缓冲液和盐。在另一个实施方案中，多个寡核苷酸包含一组寡核苷酸，其序列选自SEQ ID NO:1-10、11-19、20-27和28-35。

[0017] 附图简述

[0018] 图1显示稳定性实验中所用的互补寡核苷酸合并物的UPLC分析的结果。

[0019] 图2显示在互补寡核苷酸存在的情况下PEF066 RNA转录物的18天稳定性研究的结果。将样品在2-8℃、37℃和45℃下孵育，并通过RT-PCR进行扩增和检测，其中增加的循环阈值(值)指示样品降解。

[0020] 图3显示在互补寡核苷酸存在的情况下PEF070装甲RNA对照的18天稳定性研究的结果。将样品在2-8℃、37℃和45℃下孵育，并通过RT-PCR进行扩增和检测，其中增加的循环阈值(值)指示样品降解。

[0021] 图4显示在互补寡核苷酸不存在或存在的情况下PEF066 RNA转录物的12周稳定性研究的RT-PCR生长曲线。将样品在4℃、37℃和45℃下孵育，并通过RT-PCR进行扩增和检测，其中增加的循环阈值(值)指示样品降解。

[0022] 图5显示在互补寡核苷酸不存在或存在的情况下HIV-2 LTR RNA转录物的71天稳定性研究的RT-PCR生长曲线。将样品在4℃、37℃和45℃下孵育，并通过RT-PCR进行扩增和检测，其中增加的循环阈值(值)指示样品降解。

[0023] 图6显示在不存在(NO COPS)或存在(10nM COPS)互补寡核苷酸的情况下包封在Accuplex中的RNA对照的稳定性研究的结果。将在4℃、37℃或45℃下孵育1天、15天或71天的样品通过RT-PCR扩增并检测，其中增加的循环阈值(Cp值)指示样品降解。

[0024] 发明详述

[0025] *定义*

[0026] “扩增试剂”是能够扩增核酸的化学或生物化学组分。此类试剂包括但不限于核酸聚合酶、缓冲液、单核苷酸如核苷三磷酸、寡核苷酸例如作为寡核苷酸引物的寡核苷酸、盐

和它们各自的溶液、检测探针、染料等。

[0027] 如本领域所知，“核苷”是碱基-糖组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。这种杂环碱基的两种最常见的类别是嘌呤和嘧啶。

[0028] “核苷酸”是进一步包含与核苷的糖部分共价连接的磷酸基团的核苷。对于包含戊呋喃糖基糖的那些核苷，磷酸基团可连接至糖的2’-、3’-或5’-羟基部分。核苷酸是“寡核苷酸”的单体单元，其可以更一般地表示为“寡聚化合物”或“多核苷酸”，更一般地表示为“聚合化合物”。前述的另一个通用表达是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

[0029] “寡聚化合物”是由“单体单元”组成的化合物，其可以是单独的核苷酸或非天然化合物(参见下文)，更具体地是单独的修饰的核苷酸(或核苷酸类似物)或非核苷酸化合物或其组合。

[0030] “寡核苷酸”和“修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”)是寡聚化合物的亚组。在本文中，术语“寡核苷酸”是指由多个核苷酸作为其单体单元形成的组分。磷酸基团通常被称为形成寡核苷酸的核苷间骨架。RNA和DNA的正常键或骨架是3’至5’磷酸二酯键。寡核苷酸和修饰的寡核苷酸可以如本领域中主要描述的和本领域技术人员已知的进行合成。用于制备特定序列的寡聚化合物的方法是本领域已知的，并且包括例如克隆和限制适当的序列和直接化学合成。化学合成方法可以包括例如由Narang S. A. 等人, Methods in Enzymology 68 (1979) 90-98所述的磷酸三酯方法、由Brown E. L., 等人, Methods in Enzymology 68 (1979) 109-151所公开的磷酸二酯方法、公开于Beaucage 等人, Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859的亚磷酰胺方法、公开于Garegg 等人, Chem.Scr.25 (1985) 280-282的H-膦酸酯方法和公开于US 4,458,066的固体支持体方法。

[0031] 在上述方法中，寡核苷酸可以被化学修饰，即引物和/或探针包含修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。然后探针或引物是修饰的寡核苷酸。

[0032] “修饰的核苷酸”(或“核苷酸类似物”)通过一些修饰与天然核苷酸不同，但仍由碱基、戊呋喃糖基糖、磷酸部分、碱基样部分、戊呋喃糖基糖样部分和磷酸样部分或其组合组成。例如，标签可以连接到核苷酸的碱基部分，由此获得修饰的核苷酸。核苷酸中的天然碱基也可以被例如7-脱氮嘌呤代替，由此也获得修饰的核苷酸。

[0033] 属于寡聚化合物的另一特定亚组的“修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”)具有一个或多个核苷酸和一个或多个修饰的核苷酸作为单体单元。因此，术语“修饰的寡核苷酸”(或“寡核苷酸类似物”)是指以与寡核苷酸基本相似的方式起作用并可互换使用的结构。从合成角度来看，修饰的寡核苷酸(或寡核苷酸类似物)可以例如通过适当修饰磷酸骨架、核糖单位或核苷酸碱基而对寡核苷酸进行化学修饰来制备(Uhlmann和Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S.和Eckstein F., Annu.Rev. Biochem.67 (1998) 99-134)。代表性的修饰包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、膦酸甲酯、磷酸三酯或氨基磷酸酯核苷间键代替磷酸二酯核苷间键；脱氮-或氮杂嘌呤和-嘧啶代替天然嘌呤和嘧啶碱基，在5或6位具有取代基的嘧啶碱基；在2位、6位或8位或7位具有改变的取代基的嘌呤碱基为7-脱氮嘌呤；带有烷基-、烯基-、炔基或芳基-基团的碱基，例如低级烷基如甲基、乙基、丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基或芳基如苯基、苄基、萘基；在例如其2’位具有取代基的糖；或碳环或无环糖类似物。其他修改对于本领域技术人员是已知的。这种修饰的寡核苷酸(或寡核苷酸类似物)最好被描述为与天然寡核苷酸在功能上可互换、但

结构上不同。更详细地，示例性修饰描述于Verma S.和Eckstein F., Annu.Rev. Biochem.67 (1998) 99-134或WO 02/12263。另外，可以进行修饰，其中核苷单元经替代核苷间磷酸或糖磷酸键的基团连接。此类键包括公开于以下的那些：Verma S.和Eckstein F., Annu.Rev. Biochem.67 (1998) 99-134。当除了磷酸键被用于连接核苷单元时，这样的结构也被描述为“寡核苷”。

[0034] “核酸”以及“靶核酸”是本领域技术人员已知的核苷酸的聚合化合物。本文使用“靶核酸”来表示样品中应被分析的核酸，即应确定其在样品中的存在、不存在和/或量。术语“引物”在本文中如本领域技术人员已知来使用，并且是指寡聚化合物，主要指寡核苷酸，但也指能够通过模板依赖性DNA聚合酶引发DNA合成的修饰的寡核苷酸，即例如引物的3’端提供游离的3’-OH基团，另外核苷酸可以通过模板依赖性DNA聚合酶建立3’-至5’-磷酸二酯键与其连接，由此使用脱氧核苷三磷酸并且由此释放焦磷酸。“探针”还表示天然或修饰的寡核苷酸。如本领域所知，探针用于检测分析物或扩增物的目的。在上述方法的情况下，探针可用于检测靶核酸的扩增物。为此目的，探针通常带有标记。

[0035] 通常称为“报道基团”的“标记”通常是使得核酸特别是寡核苷酸或修饰的寡核苷酸以及与其结合的任何核酸与样本的其余部分可区分的基团(连接有标记的核酸也可以被称为标记的核酸结合化合物、标记的探针或仅仅探针)。示例性标记是荧光标记，其例如是荧光染料如荧光素染料、罗丹明染料、花青染料和香豆素染料。示例性的荧光染料是FAM、HEX、JA270、CAL635、香豆素343、Quasar705、Cyan500、CY5.5、LC-Red 640、LC-Red 705。

[0036] 任何引物和/或探针可以被化学修饰，即引物和/或探针包含修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。然后探针或引物是修饰的寡核苷酸。

[0037] 核酸扩增的方法是聚合酶链式反应(PCR)，除了其他参考文献，其还公开于美国专利号4,683,202、4,683,195、4,800,159和4,965,188中。PCR通常使用两种或更多种与选择的核酸模板(例如DNA或RNA)结合的寡核苷酸引物。可用于核酸分析的引物包括能够充当靶核酸的核酸序列内的核酸合成的起始点的寡核苷酸。引物可以通过常规方法从限制性消化中纯化，或者其可以合成产生。引物可以是单链的以获得最大的扩增效率，但引物也可以是双链的。首先将双链引物变性，即处理以分离链。一种使双链核酸变性的方法是通过加热。“热稳定聚合酶”是热稳定的聚合酶，即它是这样的酶，所述酶催化形成与模板互补的引物延伸产物并且当经历升高的温度持续实现双链模板核酸的变性所需的时间时而不会不可逆地变性。通常，合成从每个引物的3’端开始并沿着模板链以5’至3’方向进行。热稳定聚合酶已经例如从黄栖热菌(Thermus flavus)、红栖热菌(T. ruber)、嗜热栖热菌(T. thermophilus)、水生栖热菌(T. aquaticus)、乳栖热菌(T. lacteus)、红色栖热菌(T. rubens)、嗜热脂肪芽胞杆菌(Bacillus stearothermophilus)he 炽热甲烷嗜热菌(Methanothermus fervidus)中分离。尽管如此，如果酶得到补充，那么不耐热的聚合酶也可用于PCR测定中。

[0038] 如果模板核酸是双链的，则在将其用作PCR中的模板之前，需要分离两条链。链分离可以通过任何合适的变性方法来完成，包括物理、化学或酶促方法。分离核酸链的一种方法涉及加热核酸直至其主要变性(例如，大于50％、60％、70％、80％、90％或95％变性)。使模板核酸变性所需的加热条件将取决于例如缓冲盐浓度和变性核酸的长度和核苷酸组成，但通常在约90℃至约105℃的范围内，持续取决于反应特征如温度和核酸长度的时间。变性

通常进行约5秒至9分钟。为了不将各种聚合酶如Z05 DNA聚合酶暴露于如此高温下过长时间并因此可能会丧失功能性酶，可以优选使用短变性步骤。

[0039] 如果双链模板核酸通过加热而变性，则使反应混合物冷却至促进各引物退火至靶核酸上其靶序列的温度。

[0040] 退火温度可以为约35℃至约70℃，或约45℃至约65℃；或约50℃至约60℃，或约55℃至约58℃。退火时间可以从约10秒至约1分钟(例如，约20秒至约50秒；约30秒至约40秒)。在这种情况下，使用不同的退火温度以增加相应测定的包含性可能是有利的。简言之，这意味着在相对较低的退火温度下，引物也可以与具有单个错配的靶标结合，因此某些序列的变体也可以被扩增。这是期望的，例如，如果某种生物具有已知或未知的也应该被检测到的遗传变体。另一方面，相对高的退火温度具有提供更高特异性的优点，因为在更高的温度下，引物与不完全匹配的靶序列结合的可能性不断降低。为了受益于这两种现象，在本发明的一些实施方案中，上述方法包括在不同的温度下退火，例如首先在较低的温度下退火，然后在较高的温度下退火。如果例如第一次孵育发生在55℃约5个循环，则可能(预)扩增非完全匹配的靶序列。这随后可以是例如在58℃下约45个循环，在整个实验的主要部分中提供更高的特异性。这样，潜在重要的遗传变体不会被遗漏，而特异性仍然相对高。

[0041] 然后将反应混合物调节至聚合酶活性被促进或优化的温度，即足以使退火引物发生延伸以产生与待分析的核酸互补的产物的温度。温度应该足以从退火至核酸模板的各引物合成延伸产物，但不应该高至从其互补模板变性延伸产物(例如，延伸温度通常范围为约40℃至80℃(例如，约50℃至约70℃；约60℃)。延伸时间可以从约10秒至约5分钟、或约15秒至2分钟、或约20秒至约1分钟、或约25秒至约35秒。新合成的链形成可用于反应后续步骤的双链分子。可以根据需要经常重复链分离、退火和延长的步骤以产生对应于靶核酸的期望量的扩增产物。反应中的限制因素是反应中存在的引物、热稳定酶和核苷三磷酸的量。循环步骤(即变性、退火和延伸)可重复至少一次。为了用于检测，循环步骤的数量将取决于例如样品的性质。如果样品是复杂的核酸混合物，则需要更多的循环步骤来扩增足以进行检测的靶序列。通常，循环步骤重复至少约20次，但可以重复多达40、60或甚至100次。

[0042] 可以进行PCR，其中退火和延伸的步骤在相同的步骤(一步PCR)中进行，或者如上所述在分开的步骤(两步PCR)中进行。一起进行退火和延伸，并因此在相同的物理和化学条件下，用合适的酶诸如例如Z05 DNA聚合酶进行退火和延伸，具有节省每个循环中额外步骤的时间的优点，并且也消除了退火和延伸之间的额外温度调节的需求。因此，一步PCR降低了各个测定的整体复杂性。

[0043] 一般而言，整体扩增的时间较短可能是优选的，因为结果所需时间(time-to-result)减少并导致可能的较早的诊断。

[0044] 待使用的其他核酸扩增方法包括连接酶链式反应(LCR；Wu D. Y.和Wallace R. B., Genomics 4 (1989) 560-69;和Barany F., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88 (1991) 189-193)；聚合酶连接酶链式反应(Barany F., PCR Methods and Applic.1 (1991) 5-16)；Gap-LCR (WO 90/01069)；修复链式反应 (EP 0439182 A2)、3SR (Kwoh D.Y. 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 1173-1177；Guatelli J.C., 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87 (1990) 1874-1878；WO 92/08808)和NASBA (US 5,130,238)。此外，还有链置换扩增(SDA)、转录介导扩增(TMA)和Qb-扩增 (对于综述，例如参见

Whelen A. C.和Persing D. H., Annu.Rev. Microbiol.50(1996) 349-373; Abramson R. D.和Myers T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-47)。

[0045] 内部对照核酸可表现出与其序列有关的以下性质：

[0046] - 55℃至90℃、或65℃至85℃、或70℃至80℃、或约75℃的解链温度

[0047] - 长达500个碱基或碱基对、或50至300个碱基或碱基对、或100至200个碱基或碱基对、或约180个碱基或碱基对

[0048] - GC含量为30％至70％、或40％至60％、或约50％。

[0049] “序列”是核酸的主要结构，即各个核酸由其组成的单个核碱基的特定排列。必须理解的是，术语“序列”不表示特定类型的核酸如RNA或DNA，但是适用于两者以及其他类型的核酸例如PNA或其他核酸。在核碱基彼此对应的情况下，特别是在尿嘧啶(存在于RNA中)和胸腺嘧啶(存在于DNA中)的情况下，如相关领域中众所周知的，这些碱基可被认为是RNA和DNA序列之间的等同物。

[0050] 临床上相关的核酸常常是可以衍生自例如DNA病毒如乙型肝炎病毒(HBV)、巨细胞病毒(CMV)等、或细菌如沙眼衣原体(CT)、淋病奈瑟菌(NG)等的DNA。在这种情况下，使用由DNA组成的内部对照核酸可能是有利的，以反映靶核酸的性质。

[0051] 另一方面，与临床诊断相关的许多核酸是核糖核酸，如例如来自RNA病毒诸如例如人免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、西尼罗病毒(WNV)、人乳头瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒(JEV)、圣路易斯脑炎病毒(SLEV)及其他的核酸。本发明可以容易地应用于这样的核酸。在这种情况下，使用由RNA组成的内部对照核酸可能是有利的，以反映靶核酸的性质。如果在上述方法中分析RNA和DNA两者，则内部对照核酸可以是RNA，因为内部对照核酸模拟涉及多个靶标的测定的最敏感的靶标，并且RNA靶标通常必须更严密控制。

[0052] 因此，本发明的一个方面是上述方法，其中所述内部对照核酸是RNA。

[0053] 由于诸如碱性pH、核糖核酸酶等的影响，RNA比DNA更容易降解，因此可以提供由RNA制成的内部对照核酸为装甲颗粒。装甲颗粒例如特别是装甲RNA描述于例如EP910643中。简言之，可以化学或异源例如通过细菌诸如例如大肠杆菌产生的RNA至少部分包封在病毒外壳蛋白中。后者赋予RNA对外部影响特别是核糖核酸酶的抗性。必须理解内部对照DNA也可以作为装甲颗粒提供。装甲RNA和DNA两者都可用作内部对照核酸。在一个实施方案中，将RNA对照核酸用大肠杆菌中的MS2外被蛋白加上装甲。在另一个实施方案中，使用λ噬菌体GT11将DNA对照核酸加上装甲。

[0054] 因此，本发明的一个方面是上述方法，其中所述内部对照核酸是装甲核酸。

[0055] 通常，在基于扩增的核酸诊断中，RNA模板在扩增和检测之前被逆转录为DNA。

[0056] “具有逆转录酶活性的聚合酶”是能够基于RNA模板合成DNA的核酸聚合酶。一旦RNA已经被逆转录成单链cDNA，它也能够复制单链或双链DNA。在本发明的一个实施方案中，具有逆转录酶活性的聚合酶是热稳定的。

[0057] 如本文所使用的，术语“单链RNA模板的区段”或“单链RNA对照序列的区段”是指RNA模板或序列的部分，其降解被一种或多种用于本发明方法的寡核苷酸所防止或降低。在某些情况下，区段可以覆盖整个RNA模板或序列，而在其他情况下，区段可以覆盖被扩增和检测的RNA模板或序列的一部分。

[0058] 在一个实施方案中，根据本发明的方法包括在至少全部四种天然或修饰的脱氧核

糖核苷三磷酸存在的情况下，在含有金属离子缓冲剂(其在一个实施方案中缓冲pH和金属离子浓度两者)的适当缓冲液中，将含有RNA模板的样品和与所述RNA模板充分互补的寡核苷酸引物(以与后者杂交)以及热稳定的DNA聚合酶孵育。该孵育在足以使所述引物与所述RNA模板和所述DNA聚合酶杂交的温度下进行，以催化所述脱氧核糖核苷三磷酸的聚合以形成与所述RNA模板的序列互补的cDNA序列。

[0059] 如本文所用，术语“cDNA”是指使用核糖核酸链(RNA)作为模板合成的互补DNA分子。RNA可以是例如mRNA、tRNA、rRNa或另一种形式的RNA，诸如病毒RNA。cDNA可以是单链的、双链的或可以与互补RNA分子形成氢键如在RNA/cDNA杂化物中。

[0060] 适合与RNA模板退火的引物也可能适合于通过PCR扩增。对于PCR，与逆转录的cDNA链互补的第二引物为合成延伸产物提供了起始位点。

[0061] 在通过DNA聚合酶扩增RNA分子中，第一延伸反应是使用RNA模板的逆转录，并产生DNA链。第二次延伸反应使用DNA模板产生双链DNA分子。因此，通过DNA聚合酶从RNA模板合成互补DNA链提供了扩增的起始材料。

[0062] 热稳定DNA聚合酶可用于偶联的单酶逆转录/扩增反应。在本上下文中，术语“均质的”是指用于逆转录和扩增RNA靶标的两步单加成反应。均质的是指在逆转录(RT)步骤之后，在扩增步骤之前不需要打开反应容器或另外调节反应组分。在非均质RT/PCR反应中，在反转录之后和扩增之前，将一个或多个反应组分例如扩增试剂例如调整、加入或稀释，对此必须打开反应容器，或至少其内含物必须被操作。均质和非均质实施方案均包含在本发明的范围内。

[0063] 逆转录是RT/PCR中的重要步骤。例如，本领域已知RNA模板显示形成二级结构的趋势，其可能妨碍引物结合和/或通过各自的逆转录酶延长cDNA链。因此，RT反应的相对高的温度在转录效率方面是有利的。另一方面，提高孵育温度也意味着更高的特异性，即RT引物不会与显示与预期的一个或多个序列错配的序列退火。特别是在多种不同靶RNA的情况下，可能期望还转录并随后扩增和检测具有单个错配的序列，例如，在流体样本中可能存在生物的未知或稀有亚系或亚种的情况下。

[0064] 为了受益于上述两个优点，即二级结构的减少和具有错配的模板的逆转录，RT孵育可以在多于一种不同的温度下进行。

[0065] 因此，本发明的一个方面是上述方法，其中具有逆转录酶活性的聚合酶的所述孵育在30℃至75℃、或45℃至70℃、或 55℃至65℃的不同温度下进行。

[0066] 作为逆转录的另一个重要方面，长RT步骤可能破坏可能存在于流体样品中的DNA模板。如果液体样品同时含有RNA和DNA种类两者，则有利的是使RT步骤的持续时间尽可能短，但同时确保合成足够量的cDNA用于随后的扩增和任选的扩增物检测。

[0067] 因此、本发明的一个方面是上述方法、其中用于孵育具有逆转录酶活性的聚合酶的时段长达30分钟、20分钟、15分钟、12.5分钟、10分钟、5分钟或1分钟。

[0068] 本发明的另一方面是上述方法，其中具有逆转录酶活性并包含突变的聚合酶选自：

[0069] a)CS5 DNA聚合酶

[0070] b)CS6 DNA聚合酶

[0071] c)海栖热袍菌DNA聚合酶

[0072] d)水生栖热菌DNA聚合酶

[0073] e)嗜热栖热菌DNA聚合酶

[0074] f)黄栖热菌DNA聚合酶

[0075] g)丝状栖热菌DNA聚合酶

[0076] h)栖热菌种sps17 DNA聚合酶

[0077] i)栖热菌种Z05 DNA聚合酶

[0078] j)新阿波罗栖热袍菌DNA聚合酶

[0079] k)非洲栖热腔菌DNA聚合酶

[0080] l)Thermus caldophilus DNA聚合酶。

[0081] 特别适合于这些要求的是在聚合酶结构域中携带突变的酶,其在更快的延伸率方面增强其逆转录效率。

[0082] 因此,本发明的一个方面是上述方法,其中具有逆转录酶活性的聚合酶是包含相对于相应野生型聚合酶赋予改善的核酸延伸速率和/或改善的逆转录酶活性的突变的聚合酶。

[0083] 在一个实施方案中,在上述方法中,具有逆转录酶活性的聚合酶是包含相对于相应野生型聚合酶赋予改善的逆转录酶活性的突变的聚合酶。

[0084] 带有使它们特别有用的点突变的聚合酶公开于WO2008/046612中。特别地,待使用的聚合酶可以是在聚合酶结构域中包含至少以下基序的突变的DNA聚合酶:

[0085] T-G-R-L-S-S-Xb7-Xb8-P-N-L-Q-N;其中Xb7是选自S或T的氨基酸,并且其中Xb8是选自G、T、R、K或L的氨基酸,其中所述聚合酶包含3'-5'外切核酸酶活性并且具有改进的核酸延伸速率 和/或相对于野生型DNA聚合酶改善的逆转录效率,其中在所述野生型DNA聚合酶中,Xb8是选自D、E或N的氨基酸。

[0086] 一个实例是来自栖热菌种Z05的热稳定DNA聚合酶的突变体(例如在US 5,455,170中描述),相比于相应的野生型酶Z05,所述变异体在聚合酶结构域中包含突变。根据本发明的方法的一个实施方案是突变体Z05 DNA聚合酶,其中580位的氨基酸选自G、T、R、K和L。

[0087] 对于使用热稳定聚合酶的逆转录,Mn2+可以是二价阳离子并且通常作为盐包括在内,例如氯化锰(MnCl2)、乙酸锰(Mn(OAc)2)或硫酸锰(MnSO4)。例如,如果MnCl2包含在含有50mM Tricine缓冲液的反应物中,例如,则MnCl2通常以0.5-7.0mM的浓度存在;当使用200μM的每种dGTP、dATP、dUTP和dCTP时,通常存在2.5-3.5mM。

[0088] 由于在保留DNA靶核酸的同时将RNA靶核酸逆转录成cDNA在本发明的范围内,因此cDNA和DNA都可以用于随后的扩增,所以上述内部控制方法对于同时扩增源自具有RNA的生物或具有DNA基因组的生物的靶核酸特别有用。这种优势显着增加了可以在相同物理条件下分析的不同生物特别是病原体的范围。

[0089] 如本文所用,“生物”意指任何活的单细胞或多细胞生命形式。在此,病毒是生物。

[0090] 特别是由于适当的温度最佳条件,酶诸如Tth聚合酶或例如上述突变体Z05 DNA聚合酶适合于进行随后的靶核酸扩增步骤。利用相同的酶进行逆转录和扩增,促进简化实施该方法并且有利于其自动化,因为流体样品不必在RT和扩增步骤之间进行操作。

[0091] 扩增步骤的靶标可以是RNA/DNA杂化分子。靶标可以是单链或双链核酸。虽然最广泛使用的PCR程序使用双链靶标,但这不是必需的。在单链DNA靶标的第一扩增循环之后,反

应混合物含有由单链靶标和新合成的互补链组成的双链DNA分子。类似地，在RNA/cDNA靶标的第一扩增循环之后，反应混合物含有双链cDNA分子。此时，如上所述进行连续的扩增循环。

[0092] 合适的核酸检测方法是本领域技术人员已知的并且描述于标准教科书如Sambrook J. 等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989和Ausubel F. 等人:Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY。在核酸检测步骤进行之前，还可能存在进一步的纯化步骤，例如沉淀步骤。检测方法可以包括但不限于结合或嵌入特异性染料如嵌入双链DNA中并随后改变其荧光的溴化乙锭。纯化的核酸也可以通过电泳方法任选地在限制性消化之后进行分离并且之后可视化。也有基于探针的测定，其利用寡核苷酸杂交至特定序列并随后检测杂化物。

[0093] 可以在扩增反应期间或之后检测扩增的靶核酸以评估分析结果。特别是对于实时检测，使用核酸探针是有利的。

[0094] 有利的是实时监测扩增反应，即在扩增本身期间检测靶核酸和/或它们的扩增子。

[0095] 上述方法可基于供体荧光部分和受体荧光部分之间的荧光共振能量转移(FRET)。代表性的供体荧光部分是荧光素，且代表性的相应受体荧光部分包括LC-Red 640、LC-Red 705、Cy5和Cy5.5。通常，检测包括在由供体荧光部分吸收的波长处激发样品并且显现和/或测量由相应受体荧光部分发射的波长。在根据本发明的方法中，检测之后可以定量FRET。例如，在每个循环步骤之后执行检测。例如，实时进行检测。通过使用可商购的实时PCR仪器(例如LightCycler或TaqMan®)，PCR扩增和扩增产物的检测可以在单个封闭的比色杯中组合，显著减少循环时间。由于检测与扩增同时进行，实时PCR方法避免了扩增产物操作的需要，并且减少了扩增产物之间交叉污染的风险。实时PCR大大缩短了周转时间并且是临床实验室中常规PCR技术的有吸引力的替代方案。

[0096] 以下专利申请描述了如用于LightCycler技术中的实时PCR:WO 97/46707、WO 97/46714和WO 97/46712。LightCycler器是一种快速热循环仪，组合有采用高质量光学器件的微量荧光计。这种快速热循环技术使用薄玻璃比色杯作为反应容器。反应室的加热和冷却通过交替加热的空气和环境空气来控制。由于空气的质量低和比色杯的表面积与体积的高比率，在热室内可以实现非常快速的温度交换速率。

[0097] TaqMan®技术利用标记有两个荧光部分的单链杂交探针。当用合适波长的光激发第一荧光部分时，根据FRET的原理将吸收的能量转移到第二荧光部分。第二荧光部分通常是猝灭剂分子。以此形式使用的典型荧光染料例如尤其是FAM、HEX、CY5、JA270、Cyan和CY5.5。在PCR反应的退火步骤期间，标记的杂交探针与靶核酸(即扩增产物)结合，并且在随后的延长阶段被如技术人员已知的Taq或另一种合适的聚合酶(如突变体Z05聚合酶)的5'至3'外切核酸酶活性降解。结果是，激发的荧光部分和猝灭剂部分在空间上彼此分离。结果是，在不存在猝灭剂的情况下激发第一荧光部分时，可以检测来自第一荧光部分的荧光发射。

[0098] 在上述两种检测形式中，发射信号的强度可以与原始靶核酸分子的数量相关。

[0099] 作为FRET的替代方法，可以使用双链DNA结合染料如荧光DNA结合染料(例如SYBRGREEN I®或SYBRGOLD® (Molecular Probes))检测扩增产物。在与双链核酸相互作

用后，这种荧光DNA结合染料在用合适波长的光激发后发出荧光信号。也可以使用双链DNA结合染料，例如核酸插入染料。当使用双链DNA结合染料时，通常进行熔解曲线分析以确认扩增产物的存在。

[0100] 与FRET连接的分子信标也可用于使用本发明的实时PCR方法检测扩增产物的存在。分子信标技术使用标记有第一荧光部分和第二荧光部分的杂交探针。第二荧光部分通常是猝灭剂，且荧光标记通常位于探针的每个末端。分子信标技术使用具有允许二级结构形成的序列(例如发夹)的探针寡核苷酸。由于探针内形成二级结构，当探针处于溶液中时，两个荧光部分在空间上接近。在与扩增产物杂交后，探针的二级结构被破坏，并且荧光部分彼此分离，使得在用合适波长的光激发后，可以检测到第一荧光部分的发射。

[0101] 因此，根据本发明的方法是使用FRET的上述方法，其中所述探针包含允许二级结构形成的核酸序列，其中所述二级结构形成导致所述第一和第二荧光部分之间的空间接近。

[0102] 只有当荧光部分直接局部接近并且当供体荧光部分的发射光谱与受体荧光部分的吸收光谱重叠时才能发生有效的FRET。

[0103] 因此，在一个实施方案中，所述供体和受体荧光部分在所述探针上彼此不超过5个核苷酸内。

[0104] 在另一个实施方案中，所述受体荧光部分是猝灭剂。

[0105] 如上所述，以TaqMan®形式，在PCR反应的退火步骤期间，标记的杂交探针与靶核酸(即扩增产物)结合，并且在随后的延长阶段被如技术人员已知的Taq或另一种合适的聚合酶(如突变体Z05聚合酶)的5'至3'外切核酸酶活性降解。

[0106] 因此，在一个实施方案中，在上述方法中，扩增使用具有5'-至3'-外切核酸酶活性的聚合酶。

[0107] 仔细选择作为上述方法的结果产生的扩增子的长度是进一步有利的。通常，相对短的扩增子增加扩增反应的效率。因此，本发明的一个方面是上述方法，其中扩增的片段包含多达450个碱基、多达300个碱基、多达200个碱基或多达150个碱基。

[0108] 本发明中使用的内部对照核酸可以充当“定量标准核酸”，其易于作为或被用作参考以定量即测定靶核酸的量。为此目的，一个或多个定量标准核酸与靶核酸一起经历所有可能的样品制备步骤。此外，在相同反应混合物内在整个方法中处理定量标准核酸。它必须在存在或不存在靶核酸的情况下直接或间接产生可检测信号。为此，必须在每个测试中仔细优化定量标准核酸的浓度，以便不干扰灵敏度，但为了产生可检测信号，例如还在非常高的目标浓度下。就相应测定的检测限(LOD，见下文)而言，“定量标准核酸”的浓度范围是20-5000x LOD、20-1000x LOD或20-5000x LOD。定量标准核酸在反应混合物中的最终浓度取决于所完成的定量测量范围。

[0109] “检测限”或“LOD”是指样品中核酸的最低可检测量或浓度。低“LOD”对应于高灵敏度，且反之亦然。“LOD”通常通过单位“cp/ml”表示，特别是如果核酸是病毒核酸，或者以IU/ml表示。“Cp/ml”是指“每毫升拷贝数”，其中“拷贝”是相应核酸的拷贝。IU/ml代表“国际单位/毫升”，指WHO标准。

[0110] 一种广泛使用的计算LOD的方法是“Probit分析”，它是分析刺激(剂量)与质(全部或无)反应之间关系的方法。在典型的质反应实验中，动物组被给予不同剂量的药物。记录

每个剂量水平下的死亡百分比。这些数据可以使用Probit Analysis进行分析。Probit模型假定百分比响应与对数剂量作为累积正态分布相关。也就是说，对数剂量可以用作变量来读取死于累积正态的百分比。使用正态分布而不是其他概率分布，会影响可能剂量的高和低两端的预测响应率，但在中间附近几乎没有影响。

[0111] Probit Analysis可应用于不同的“命中率”。如本领域中已知的，“命中率”通常以百分比[%]表示，并且指示在分析物的特定浓度下阳性结果的百分比。因此，例如，可以在95%命中率下确定LOD，这意味着对于其中95%的有效结果是阳性的设置来计算LOD。

[0112] 在一个实施方案中，上述方法提供1至100cp/ml或0.5至50IU/ml、或1至75cp/ml或0.5至30IU/ml、或1至25cp/ml或1至20IU/ml的LOD。

[0113] 关于来自某些病毒的可能靶核酸的一些实例，上述方法提供以下LOD：

[0114] · HIV：高达60 cp/ml、高达50 cp/ml、高达40 cp/ml、高达30 cp/ml、高达20 cp/ml或高达15 cp/ml

[0115] · HBV：高达10 IU/ml、高达7.5 IU/ml或高达5 IU/ml

[0116] · HCV：高达10 IU/ml、高达7.5 IU/ml或高达5 IU/ml

[0117] · WNV I：高达20 cp/ml、高达15 cp/ml或高达10 cp/ml

[0118] · WNV II：高达20 cp/ml、高达15 cp/ml、高达10 cp/ml或高达5 cp/ml

[0119] · JEV：高达100 cp/ml、高达75 cp/ml、高达50 cp/ml或高达30 cp/ml

[0120] · SLEV：高达100 cp/ml、高达75 cp/ml、高达50 cp/ml、高达25 cp/ml或高达10 cp/ml。

[0121] 下面描述了如何基于用作定量标准核酸的内部对照核酸进行计算TaqMan®格式的定量结果的实例：从整个PCR运行的仪器校正荧光值的输入数据计算效价。一组含有靶核酸和作为定量标准核酸的内部对照核酸的样品在热循环仪上使用指定的温度概况进行PCR。在PCR概况期间的选定温度和时间，通过滤过光照射样品，并且针对靶核酸和内部对照核酸的每个样品收集经过滤的荧光数据。PCR运行完成后，处理荧光读数以产生内部对照核酸的一组染料浓度数据和靶核酸的一组染料浓度数据。每组染料浓度数据都以相同的方式处理。经过多次真实性检查后，计算内部对照核酸和靶核酸的肘值(elbow values)(CT)。肘值定义为靶核酸或内部对照核酸的荧光穿过预定义阈值(荧光浓度)的点。效价测定基于以下假设：靶核酸和内部对照核酸以相同的效率被扩增，并且在计算的肘值处扩增并检测等量的靶核酸和内部对照核酸的扩增子拷贝。因此，(CTQS-CT靶标)与log(靶标浓度/QS浓度)呈线性关系。在此情况下，QS表示用作定量标准核酸的内部对照核酸。然后可以例如通过使用如以下方程式中的多项式校准公式来计算效价T：

[0122] $T' = 10\ (a(CTQS - CT靶标)2 + b(CTQS - CT靶标) + c)$

[0123] 定量标准核酸的多项式常数和浓度是已知的，因此方程式中唯一的变量是差(CTQS-CT靶标)。

[0124] 此外，内部对照核酸可以充当“定性内部对照核酸”。“定性内部对照核酸”对于确认定性检测测定的测试结果的有效性特别有用：即使在阴性结果的情况下，也必须检测到定性内部对照，否则测试本身被认为不起作用。但是，在定性设置中，在阳性结果的情况下，则不一定必须检测到。结果是，其浓度必须相对较低。它必须仔细适应各个测定及其灵敏度。例如，定性内部核酸即第二对照核酸的浓度范围将包括每反应1个拷贝至每个反应1000

个拷贝的范围。关于各个测定的检测限(LOD),其浓度是测定的LOD至LOD的25倍值、或LOD至10x LOD。或者,它是2x至10x LOD。或者,它是5x至10x LOD。或者,它是5x或10x LOD。

[0125] 本发明的主要方面是制备和使用核酸酶和抗水解核酸标准品和对照。内部标准品和阳性对照在确保测试试剂盒正确发挥功能和确认测试结果方面发挥着重要作用。内部标准品也提供了量化的手段。随着RT-PCR的出现,样品中特定RNA的检测和定量已变得普遍。RT-PCR研究的内部标准品应该是RNA分子,因为它控制了逆转录和PCR扩增步骤。这是有问题的,因为RNA对RNA酶和热降解特别敏感。改变的测试结果可能在储存期间或在引入样品之后由于部分或完全降解RNA标准品而产生。至少部分RNA降解的可能性非常高,因为许多RNA检测方案设计用于检测血清样品中的病毒RNA,其中存在相对大量的各种RNA酶。RNA诊断测定的理想内部标准品是这样一种分子,其功能上等同于测定形式的RNA,但对核酸酶降解或水解有抵抗力。可以想象在RNA酶活性的环境中保护RNA免受酶介导降解的三种一般方法:(1)将RNA微囊包封在不可穿透的结构内,(2)将RNA与不允许核酸酶接近标准品的分子非共价结合,和(3)以这样的方式化学改变RNA的结构,使其不再是核酸酶的底物,但同时仍在功能上等同于测定形式的RNA。

[0126] 本发明标准品中的核酸可用于定量测定。这些标准品可用于多种目的,如定量RNA标准品(以测定特定RNA序列的绝对拷贝数),特别是用于量化在血浆、血清或脊髓液中的RNA病毒如HIV-1、HIV-2、HCV、HTLV-1、HTLV-2、庚型肝炎、肠道病毒、登革热病毒或狂犬病毒的数量。它们也可以用于通过RT-PCR测定来定量细胞或组织中特定mRNA的表达。标准品可能是内部或外部的。将内部标准品与已知浓度的样品混合,使得样品和标准品一致处理和测定。因此,使用由内部标准品产生的信号将样品之间的测定效率的差异标准化。外部标准品以已知浓度与样品平行处理和测定,但是它与样品分别进行处理。可以同时处理几种不同浓度的外部标准品以产生标准曲线,然后可以使用该标准曲线来确定未知样品的值。内部和外部标准品都可以用于定量,但内部标准品通常被认为更准确。可以将标准品用作作为诊断例如细菌、真菌或寄生虫疾病(所述疾病是基于RNA的诊断)或RT-PCR测定中的阳性对照的定性标准品以指示所有试剂都正常运行。这些标准品可用于测量RNA分离程序的完整性,其通过测量受保护的RNA经历分离程序及之后的Northern印迹之后在其中观察到的降解的量。它们可用作环境示踪物以追踪地下水的流动或者用独特的核酸序列来标记各公司的废物,所述序列可以追溯到违规的公司。

[0127] 本发明对于病毒定量特别有用。在开发和/或销售过程中有许多基于核酸的新测定。这些测定检测人血浆或血清中的致病性人病毒例如HIV和HCV。这些测定非常灵敏,每1.0ml血浆检测到甚至少于300个病毒体。在其目前的形式中,这些基于核酸的测定中的几种使用裸RNA作为其定量标准品。不幸的是,这些裸RNA标准品非常易于受到污染的核糖核酸酶和热介导的水解的影响,因此测定结果可能会受到影响。

[0128] 本发明的一个主要实施方案涉及包含核酸酶和水解抗性重组核酸区段(其包含编码标准核酸的序列)的核酸标准品。在一些优选的实施方案中,核酸标准品是包含核糖核酸酶和水解抗性的RNA区段(其包含编码标准RNA的序列)的RNA标准品。如本文所用,术语“标准核酸”和“标准RNA”分别指适用作待采用的特定测定中的标准品的核酸和RNA。本发明考虑核糖核酸酶和水解抗性重组RNA,其非常适合作为RNA病毒定量的RNA标准品,尽管它不需要是重组的并且可以用作从任何来源(例如来自组织培养物的细胞)分离的RNA的RNA标准

品。

[0129] 本文中，术语“核酸酶抗性”和“核糖核酸酶抗性”意指核酸相对于相同序列的裸露的、未修饰的核酸表现出一定程度的对核酸酶的抗性增加。类似地，术语“水解抗性”是指核酸相对于相同序列的裸露的、未修饰核酸表现出一定程度的对自发的温度依赖性水解的抗性增加。

[0130] 存在多种方法可以用来使核酸区段对核酸酶具有抗性。核酸区段可以是化学修饰的、用核酸酶抗性涂层包覆的、或笼蔽在核酸酶抗性的结构中。例如，RNA标准品可以是对核糖核酸酶具有抗性的化学修饰的RNA。使重组RNA区段具有核糖核酸酶抗性的另一种方法是用核糖核酸酶抗性涂层包覆它。这种涂层可以是任何以序列依赖或不依赖的方式与RNA结合并使RNA具有核糖核酸酶抗性的物质。在某些情况下，RNA标准品是被笼蔽在核糖核酸酶抗性结构中而与外部环境隔离的重组RNA。RNA可以简单地通过在细胞内进行笼蔽。笼蔽RNA的其他合成方法涉及RNA在病毒蛋白中的部分包壳、RNA的部分脂质包封、将RNA部分捕获在聚合物基质中等。

[0131] 在另一种方法中，核糖核酸酶或水解抗性结构由将RNA标准品部分包壳的病毒外壳蛋白构成。RNA在细菌宿主中体内转录，然后用噬菌体蛋白质包壳。RNA的这种“笼蔽”产生受到保护而免于核糖核酸酶的RNA(装甲RNA)。虽然核酸或RNA可以在核酸酶抗性或水解抗性结构中被完全或基本上笼蔽，但部分笼蔽的核酸和RNA也在本发明的范围内，只要部分笼蔽使得核酸或RNA是核酸酶或核糖核酸酶或水解抗性的。因此，当在本文中使用时，术语“包壳”、“包封”、“捕获”等包括这样的结构，其中包壳、包封、捕获等是部分的以及基本上的或是基本上完全的，只要所得的结构是(当那些术语在本文使用时)核酸酶或水解抗性的。

[0132] RNA也可以进行化学修饰以使其对核糖核酸酶具有抗性。化学修饰的RNA可以由化学修饰的核苷酸构成。这些核苷酸被修饰，使得核糖核酸酶不能作用于RNA。化学修饰的RNA通过化学修饰RNA或先前转录的RNA转录物来制备。或者，化学修饰的RNA可以从已经被化学修饰的核苷酸转录或合成。

[0133] RNA标准品还可以包含非共价结合或涂覆有核糖核酸酶抗性涂层的RNA。这种结合可以是序列依赖或不依赖的，使得RNA具有核糖核酸酶抗性。在一些实施方案中，结合的分子由蛋白构成。这种结合蛋白的实例是MS2/R17外壳蛋白、HIV-1核衣壳蛋白、gp32、T4的regA蛋白或噬菌体T4的gp32。在其他情况下，非共价结合的分子由小分子构成。例如聚胺、精胺和/或亚精胺。核糖核酸酶抗性涂层也可以由核酸构成。在一些优选的实施方案中，核酸与重组RNA杂交，阻断核酸酶，并可用作逆转录酶的引物。在其他情况下，聚-L-赖氨酸和阳离子去污剂例如CTAB可用于包覆和保护RNA。

[0134] 通用的内部对照/定量标准(IC/QS)概念是基于使用单一对照序列(例如来自一个序列的一个DNA和一个RNA)用于所有诊断测定。历史上，竞争性扩增已被用于设计内部对照，所述对照与靶标竞争引物。使用竞争性扩增概念，每个测定使用由与测定靶标相同的引物结合序列和通用探针结合位点构成的单独对照序列。对于每个新的测定，靶标引物也用作对照引物，因此在测定中不需要额外的引物。在多重测定中，只有一个内部对照用对应于靶标之一的引物结合位点构建。在多重测定中使用一种IC显然不再与测定中的其他靶标竞争。因此，全过程对照的目标只能部分实现。非竞争性对照的第二个实例使用源自样品中细胞的内源性人类基因组内部对照，其需要其自身的一组引物。通用IC/QS的关键要求包括以

下：它必须符合所有监管要求。它应该在各个测定中充当全过程对照(FPC)、内部对照(IC)和内部定量标准(IQS)。对于FPC，应该以与靶标相似的效率进行样品制备。它不应该与任何预期的靶标共享引物和探针结合位点，而应该以相似的效率扩增/检测，即当靶标产生时它应该失效并且应该以与靶标相似的方式对PCR抑制剂产生反应。通用IC/QS应导致改善的动态范围、LOD和测定精度，并应导致缩短的开发时间和降低的操作复杂性。

[0135] 通用对照概念将由共同对照序列组成，其可以是RNA或DNA，并且将被保护(例如如在称为装甲RNA(MS2噬菌体外壳蛋白颗粒)或装甲DNA(λ噬菌体颗粒)的颗粒中)。如果可能，通用对照将具有一组待用于所有测定中的新的通用引物和探针。为此，可以使用NCBI Blast程序和EMBOSS shuffleseq(European Molecular Biology Open Software Suite)来设计通用内部对照(GIC)以及引物和探针以产生独特的序列。

[0136] 本发明的基本概念是通过将目标特定RNA序列转化成核酸双链体来保护RNA免于水解或RNA酶降解的概念。在一个实施方案中，该双链体是RNA/DNA杂化双链体。已知双链体DNA中磷酸二酯键的水解速率比单链DNA慢10倍。而且，所有常见的污染性核糖核酸酶偏好单链RNA底物。尽管RNA/DNA杂化双链体是RNA酶H的优选底物，但这种核糖核酸酶不是常见的污染物。

[0137] 众所周知，单链RNA易于水解，且热稳定性低。这是由于2'-羟基紧密靠近，其可能导致邻位促进和酯基转移，然后是最终链断裂。还已知的是，导致2',3'-环状中间体的过渡态具有严格的几何和空间要求。2'-羟基必须能够将其自身定位在正确的位置，使得其与离去基团一致，形成瞬态三角双锥结构。2'-3'-环状磷酸酯中间体的形成在单链RNA构象中是不受限制的，因为由于键的柔性性质以及大量可用的自由度，过渡态的形成具有低能量需求。通过迫使RNA处于双链体形式，亲核体和离去基团将受到限制，并且官能团的自由度将大大降低。随着添加本发明的用于稳定的互补寡核苷酸合并物(COPS)，发生杂交，并形成DNA:RNA杂化双链体。当保持在双链体结构中时，RNA是刚性的，并且不再是柔性的。在双链体状态下，2'-羟基和磷酸二酯键(离去基团)不处于彼此相反的定向。不可能形成过渡态而不解开和破坏许多氢键。这在能量上非常不利，因此不被允许。此外，刚性双环2',3'-磷酸酯中间体不能在已经是刚性的结构中形成。这解释了由COPS策略赋予RNA的非凡的热稳定性。

[0138] 因此，本发明的关键特征可以通过适当地将一种或多种反向互补寡核苷酸序列引入储存溶液、样本或提取缓冲液来实现。通过与一种或多种反向互补寡核苷酸序列杂交，可以任选地覆盖待保护的整个RNA序列。正如本领域所理解的，互补寡核苷酸序列不必与目标RNA序列完全互补，并且可以与RNA序列部分互补，只要寡核苷酸和RNA之间的杂交仍然可以在中等严格条件下发生即可。互补寡核苷酸序列可以任选地被选择为彼此相邻。互补寡核苷酸序列的浓度、长度和组成以使得下游处理步骤(例如PCR扩增)将受到最小影响或损害的方式进行选择。例如，通过将寡核苷酸互补物的长度保持在允许在45℃或更高温度下与RNA序列杂交但是在下游样品制备过程中与固相的结合降至最低的范围内(例如11-50个核苷酸或11-30个核苷酸的长度)，后续RT-PCR反应中的任何有害干扰将降至最低。另外，通过设计寡核苷酸互补物以具有比引物足够低的解链温度，并且在逆转录(RT)步骤期间保持足够高的退火温度，可以使与引物的竞争降至最低。类似地，通过阻断寡核苷酸互补物的3'末端，可能仍然存在于随后的RT-PCR反应中的任何此类互补物将不能被聚合酶延伸。还可以

选择寡核苷酸互补物的浓度，使得其足够摩尔过量以提供对RNA序列的足够保护，但寡核苷酸互补物的浓度处于足够低以致不会对下游处理(例如PCR扩增)造成任何损害的浓度中。

[0139] 补体寡核苷酸序列的组成仅受它们与目标RNA序列形成稳定双链体的能力限制。因此，这些寡核苷酸可包含DNA、L-DNA、RNA、LNA、PNA、BNA等、或核苷酸碱基、糖或磷酸二酯骨架上的任何其他已知变化和修饰。

[0140] 尽管出于清楚和理解的目的已经详细描述了前述发明，但是本领域技术人员通过阅读本公开内容将清楚的是，可以进行形式和细节上的各种改变。例如，上述所有组合物和方法可以以各种组合使用。

[0141] 给出以下实施例来说明本发明的实施方案，因为其目前优选实施。应该理解，这些实施例是说明性的，并且除了如所附权利要求书中所指出的以外，本发明不被认为是受限制的。

实施例

[0142] 以下实施例说明本发明的方法。

[0143] *实施例1:互补寡核苷酸合并物的设计和制备*

[0144] 使用计算机设计工具针对RNA序列设计互补寡核苷酸。设计总计十个寡核苷酸以覆盖目标序列，其长度在14至26个碱基之间变化，且计算的Tm范围为49.9-57.9℃。这些序列在3'端用磷酸基团进一步修饰。表1中显示了10个寡核苷酸的序列和解链温度。

[0145] 表1

SEQ ID NO:	序列	Tm
1	TCACCTCGCCCCGA	53.8
2	GAGTTCGTCGGGCCGC	57.9
3	GGTTGTGACCGGAACC	51.0
4	TGCGCGTCCCGTTTTGA	54.7
5	TTTTCTAGCGTTCGCCCA	50.8
6	AGGGGCTTTTTACGTGGGAG	53.8
7	TACTTCGTAACGGTGCGGGGT	54.1
8	CTCACTTAATTGCTGGCGTCAG	53.4
9	CTTCATTCTTGACATGTATGGCGC	49.9
10	TTATACAGTACCAATCGTCGGTTCG	55.3

[0146] 通过HPLC合成和纯化寡核苷酸，并调节至各自的最终浓度为100微摩尔。将等体积的这些溶液合并以提供10微摩尔的互补寡核苷酸合并物，将其进一步通过使用C18反相柱和三乙基乙酸铵和乙腈的线性梯度的UPLC分析进行表征。结果显示在图1中，并证实全部10个寡核苷酸的存在。

[0147] *实施例2:用于促进的稳定性研究的RNA和装甲RNA样品的制备*

[0148] 在含有100mM KCl的Tris.HCl(pH 7.0)中以300个拷贝/微升的浓度制备RNA转录物和装甲RNA样品。将称为用于稳定的互补寡核苷酸合并物(Complementary Oligonucleotide Pools for Stabilization, COPS)的互补物合并物以0、0.1、1或10nM的

终浓度添加到样品中。将样品在2-8℃、37℃或45℃孵育18天的时段。

[0149] *实施例3:通过RT-PCR测定RNA稳定性*

[0150] 通过基于Taqman®的RT-PCR扩增5微升的每个样品。PCR反应混合物在具有以下最终浓度的96孔板上制备:60mM Tricine(pH 8.3)、120mM乙酸钾、3%甘油、5.4% DMSO、0.015%吐温20、400μM各dATP、dCTP和dGTP、800μM dUTP、600 nM各引物、100 nM探针、靶RNA转录物或装甲RNA(1,500个拷贝)、900单位/mL ZO5D DNA聚合酶(具有5'核酸酶活性)、200单位/mL UNG、44μM EDTA和3.3mM乙酸锰。使用Roche LightCycler® 480仪器(Roche Molecular Systems,Pleasanton,CA)进行逆转录、扩增和分析。使用以下温度概况:50℃ 2分钟,94℃ 5秒,55℃ 2分钟,60℃ 6分钟,65℃ 4分钟;95℃(10秒)至55℃(15秒)2个循环;然后从91℃(5 秒)到65℃(15秒)循环45次。这些实验的结果显示在图2和图3中。如可以容易地看出,在互补寡核苷酸合并物存在的情况下,RNA转录物和装甲RNA两者均更稳定,如同与没有COPS寡核苷酸的样品相比的更早的Cts所证明的。

[0151] *实施例4:具有COPS部分杂交的RNA稳定性研究*

[0152] 如实施例2制备RNA转录物和装甲RNA样品,不同之处在于,在一个反应中,仅添加对应于SEQ ID NO:1、3、5、7和10的COPS(组A),并且在另一反应中,仅添加对应于SEQ ID NO:2、4、6、8和9的COPS(B组)。计算表明,组A覆盖RNA转录物/装甲RNA序列的52%,而组B覆盖RNA转录物/装甲RNA序列的48%。在45℃孵育18天后,如实施例3所述,通过经RT-PCR测定每个反应的Ct值,可以比较不存在COPS或存在组A COPS或存在组B COPS时的RNA稳定性。

[0153] *实施例5:延长的孵育后的RNA稳定性*

[0154] 如实施例2制备RNA转录物和装甲RNA样品,不同之处在于以1500个拷贝/微升制备装甲RNA。然后将COPS以0、0.1、1或10nM的终浓度加入样品中,并将样品在4℃、37℃或45℃下孵育12周。如实施例3所述进行通过RT-PCR测定RNA稳定性。在37℃和45℃孵育条件下,对于非装甲RNA和装甲RNA而言,在COPS存在的情况下,稳定性都显着提高。图4显示了非装甲RNA模板的RT-PCR生长曲线的结果。在不存在COPS(上图)的情况下,与在4℃下孵育的样品相比,在45℃下孵育的样品显示出Ct值延迟10个循环。相反,在10nM COPS存在的情况下(下图),45℃样品仅显示1.4个循环的延迟,表明8.6个循环或RNA稳定性约400倍的提高。对于装甲RNA实验,观察到7.4个循环或约200倍的提高(数据未显示)。

[0155] *实施例6:Accuplex包封的RNA的稳定*

[0156] Accuplex(SeraCare Life Sciences,Milford MA)是一种重组技术,其能够将目标RNA分子包封在复制缺陷型哺乳动物病毒样颗粒内,所述颗粒包含蛋白质外壳和脂双层。为了测试COPS用于稳定Accuplex颗粒内的RNA的效用,将用于设计和制备实施例1中所述的互补寡核苷酸的RNA对照序列pEF070提供给SeraCare用于定制Accuplex包封的单链RNA。然后将COPS以10nM浓度添加到Accuplex-RNA样品中,并将样品在4℃、37℃或45℃下孵育71天。如实施例3中所述进行通过RT-PCR测定RNA稳定性,且研究结果示于图6。孵育71天后,COPS不存在和存在之间的 ΔCp 值在37℃下为4.3(30.9-26.6),在45℃下为8.3(35.3-27.0),清楚地显示COPS在降低储存在高温下的Accuplex颗粒中RNA的降解方面的有效性。

[0157] *实施例7:HIV RNA模板的COPS稳定*

[0158] 将对应于HIV-1 GAG、HIV-1 LTR和HIV-2 LTR区域的区段的三个RNA序列用作RNA模板以测试其对应的COPS的稳定效应。设计总计25个寡核苷酸,9个用于HIV-GAG,8个用于

HIV-1 LTR，且8个用于HIV-2 LTR，以覆盖各个目标序列。25个寡核苷酸的长度在17至26个碱基变化，且它们的序列显示在表2中。

表2

SEQ ID NO:	序列	模板
11	CCCCACTGTGTTTAGC	HIV-1 GAG
12	CCTGGTGCAATAGGCCC	HIV-1 GAG
13	TTCCTGCTATGTCACTTCC	HIV-1 GAG
14	CCTTGGTTCTCTCATCTGG	HIV-1 GAG
15	TATCCCATTCTGCAGCTTC	HIV-1 GAG
16	TGCATGCACTGGATGCACTC	HIV-1 GAG
17	TGCATGGCTGCTTGATGTCC	HIV-1 GAG
18	ATTTGTTCCTGAAGGGTACTAGTAG	HIV-1 GAG
19	CTCATTGATGGTCTCTTTTAACATT	HIV-1 GAG
20	CCGAGTCCTGCGTCGAG	HIV-1 LTR
21	TTCAAGTCCCTGTTCGGGC	HIV-1 LTR
22	GCTGTGTGCACTTCAGCAAG	HIV-1 LTR
23	ACCTAGAGTGGTCTGAGGGA	HIV-1 LTR
24	CGAGTCCCTATTAACTTTCGCT	HIV-1 LTR
25	TCTCTAGTTACCAGAGTCACACA	HIV-1 LTR
26	GCCACTGCTAGAGATTTTTACACT	HIV-1 LTR
27	AGAACTTCTCTGGAACTTTCGTTTT	HIV-1 LTR
28	TTCCTGCCTTGGTTTCC	HIV-2 LTR
29	AGCGTGGAGCCGTCTGC	HIV-2 LTR
30	ACCGAATGACCAGGCGGC	HIV-2 LTR
31	CAGGGTCTTGTTATTCAGGTGAAC	HIV-2 LTR
32	TTAACTTGCTTCTAACTGGCAGCT	HIV-2 LTR
33	CAAAGCAAGAAGGGTCCTAACAGAC	HIV-2 LTR
34	GACTAGGAGAGATGGGAACACACAC	HIV-2 LTR
35	TTATTAAGAGGTCTTTAAGCAAGCA	HIV-2 LTR

[0159]

[0160] 进行两项稳定性研究。在第一项研究中，装甲RNA模板在含有100mM KCl的Tris.HCl(pH 7.0)中以每微升100个拷贝使用。然后将对应于SEQ ID NO:11-35的COPS以0或10nM的终浓度添加到样品中，并将样品在4℃、37℃或45℃下孵育15周。使用实施例3中描述的条件进行使用对应于三种RNA模板的引物的RT-PCR。研究结果显示在表3中，并清楚地表明COPS的存在极大稳定了两种RNA模板。

表3

[0161]

模板	COPS 浓度	温度	Ct值 (循环数)	循环延迟
HIV-1 GAG	0	4°C	28.6	N/A
HIV-1 GAG	0	37°C	32.9	4.3
HIV-1 GAG	0	45°C	40.0	11.4
HIV-1 GAG	10nM	4°C	28.4	N/A
HIV-1 GAG	10nM	37°C	30.0	1.6
HIV-1 GAG	10nM	45°C	30.1	1.7
HIV-2 LTR	0	4°C	29.8	N/A
HIV-2 LTR	0	37°C	34.5	4.7
HIV-2 LTR	0	45°C	无信号	-
HIV-2 LTR	10nM	4°C	29.8	N/A
HIV-2 LTR	10nM	37°C	30.9	1.1
HIV-2 LTR	10nM	45°C	31.7	1.9

[0162] 在第二项研究中，在0或10nM浓度的相应COPS存在的情况下，以每微升300个拷贝使用非装甲HIV-1和HIV-2模板。将样品在4℃、37℃或45℃下孵育71天。使用实施例3中描述的条件进行使用对应于三种RNA模板的引物的RT-PCR。该研究的结果显示在表4中。图5显示对于HIV-2 LTR模板生成的RT-PCR生长曲线。这些实验显示COPS可以极大地增加装甲的和非装甲的RNA模板的稳定性。

表4

[0163]

模板	COPS 浓度	温度	Ct值 (循环数)	循环延迟
HIV-1 GAG	0	4°C	27.3	N/A
HIV-1 GAG	0	37°C	30.6	3.3
HIV-1 GAG	0	45°C	32.9	5.6
HIV-1 GAG	10nM	4°C	27.0	N/A
HIV-1 GAG	10nM	37°C	27.4	0.4
HIV-1 GAG	10nM	45°C	27.7	0.7
HIV-2 LTR	0	4°C	27.5	N/A
HIV-2 LTR	0	37°C	30.5	3.0
HIV-2 LTR	0	45°C	32.4	4.9
HIV-2 LTR	10nM	4°C	27.3	N/A
HIV-2 LTR	10nM	37°C	27.7	0.4
HIV-2 LTR	10nM	45°C	27.8	0.5

序列表

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

<120> 稳定特定RNA的通用方法

<130> P33287-WO-HS

<150> US 62/271,614
<151> 2015-12-28

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1
tcacctcgcc ccga 14

[0001]

<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2
gagttcgtcg ggccgc 16

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 3
ggttgtgacc ggaacc 16

<210> 4
<211> 17
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4
tgcgcgtccc gttttga 17

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5
ttttctagcg ttcgccca 18

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0002] <223> 合成的寡核苷酸

<400> 6
aggggctttt tacgtgggag 20

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7
tacttcgtaa cggtgcgggg t 21

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8
ctcacttaat tgctggcgtc ag 22

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 9
cttcattctt gacatgtatg gcgc 24

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 10
ttatacagta ccaatcgtcg gttcg 25

<210> 11
<211> 16
<212> DNA
[0003] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 11
ccccactgtg tttagc 16

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 12
cctggtgcaa taggccc 17

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 13
ttcctgctat gtcacttcc 19

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

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 14
ccttggttct ctcatctgg 19

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 15
tatcccattc tgcagcttc 19

[0004]

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 16
tgcatgcact ggatgcactc 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 17
tgcatggctg cttgatgtcc 20

<210> 18
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 18
atttgttcct gaagggtact agtag 25

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 GAG寡核苷酸

<400> 19
ctcattgatg gtctctttta acatt 25

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0005] <223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 20
ccgagtcctg cgtcgag 17

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 21
ttcaagtccc tgttcgggc 19

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 22
gctgtgtgca cttcagcaag 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 23
acctagagtg gtctgaggga 20

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 24
cgagtcccta ttaactttcg ct 22

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
[0006] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 25
tctctagtta ccagagtcac aca 23

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 26
gccactgcta gagattttta cact 24

<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-1 LTR寡核苷酸

<400> 27
agaacttctc tggaactttc gtttt 25

<210> 28
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 28
ttcctgcctt ggtttcc 17

<210> 29
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 29
agcgtggagc cgtctgc 17

[0007]

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 30
accgaatgac caggcggc 18

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 31
cagggtcttg ttattcaggt gaac 24

<210> 32
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 32
ttaacttgct tctaactggc agct 24

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 33
caaagcaaga agggtcctaa cagac 25

[0008] <210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 34
gactaggaga gatgggaaca cacac 25

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的HIV-2 LTR寡核苷酸

<400> 35
ttattaagag gtctttaagc aagca 25

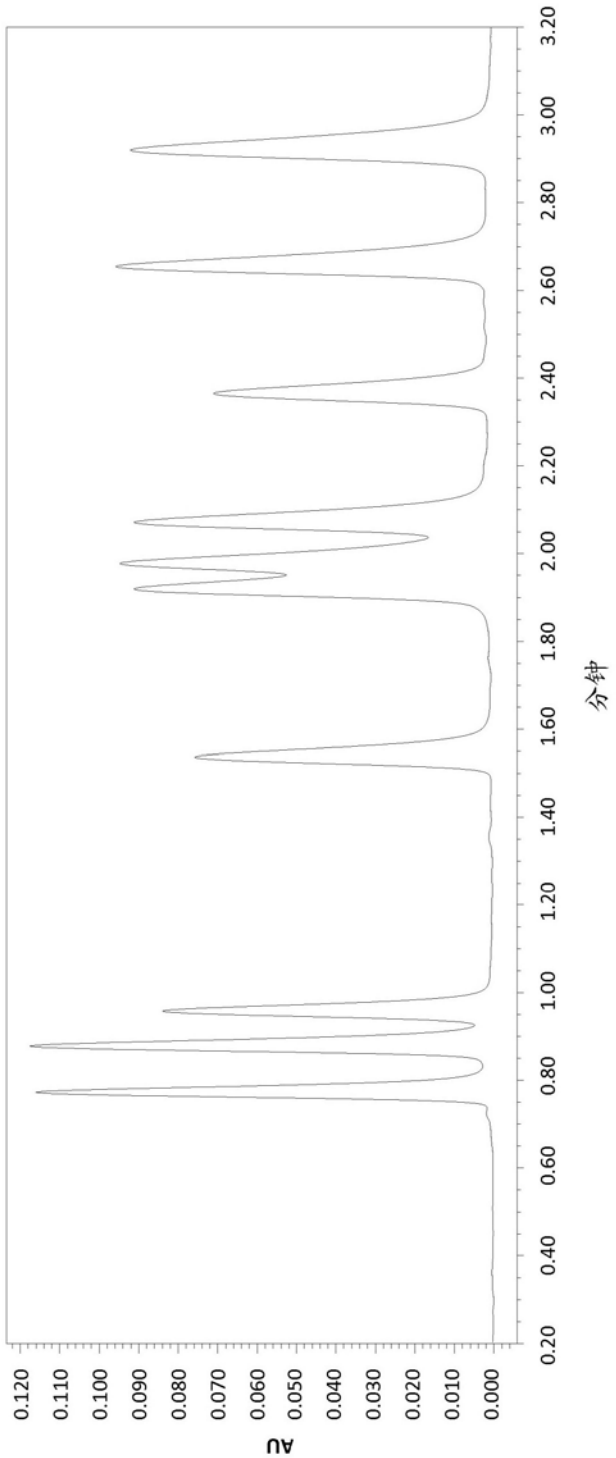

AU
0.120
0.110
0.100
0.090
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
1.80
2.00
2.20
2.40
2.60
2.80
3.00
3.20
分钟

图1

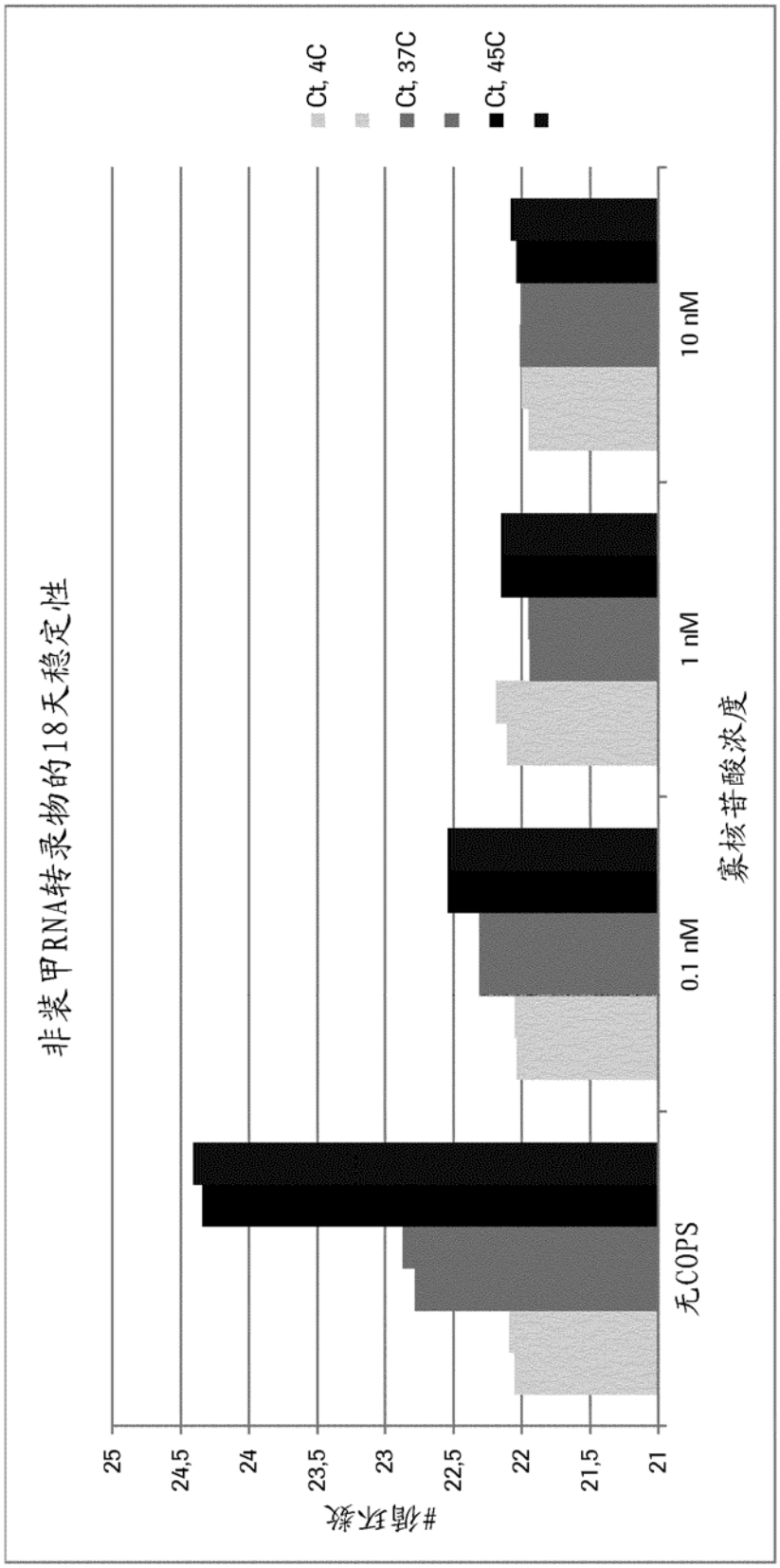

非装甲RNA转录物的18天稳定性
Ct, 4C
Ct, 37C
Ct, 45C
#循环数
25
24,5
24
23,5
23
22,5
22
21,5
21
无COPS
0.1 nM
1 nM
10 nM
寡核苷酸浓度

图 2

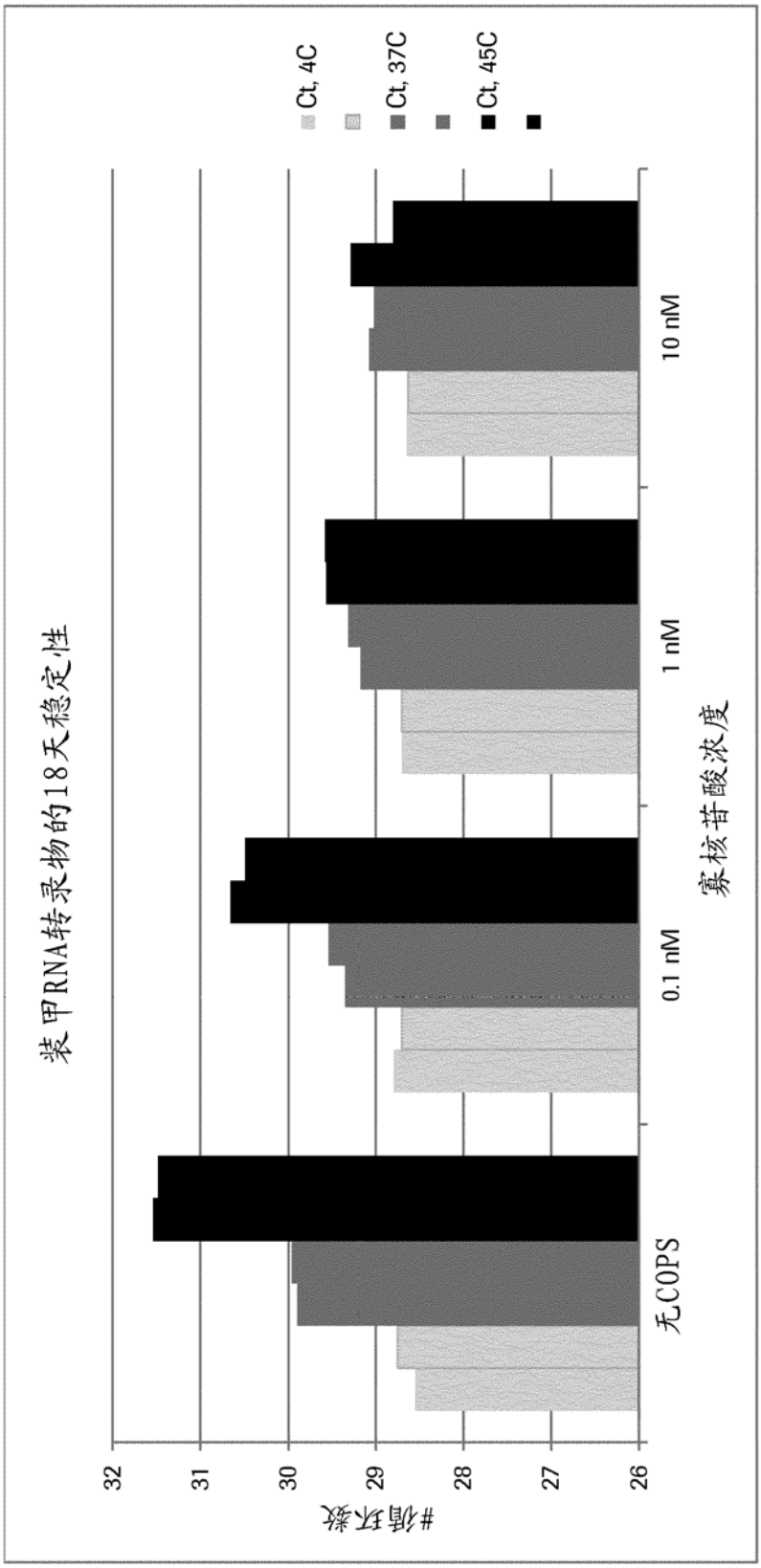

装甲RNA转录物的18天稳定性
Ct, 4C
Ct, 37C
Ct, 45C
#循环数
32
31
30
29
28
27
26
无COPS
0.1 nM
1 nM
10 nM
寡核苷酸浓度

图 3

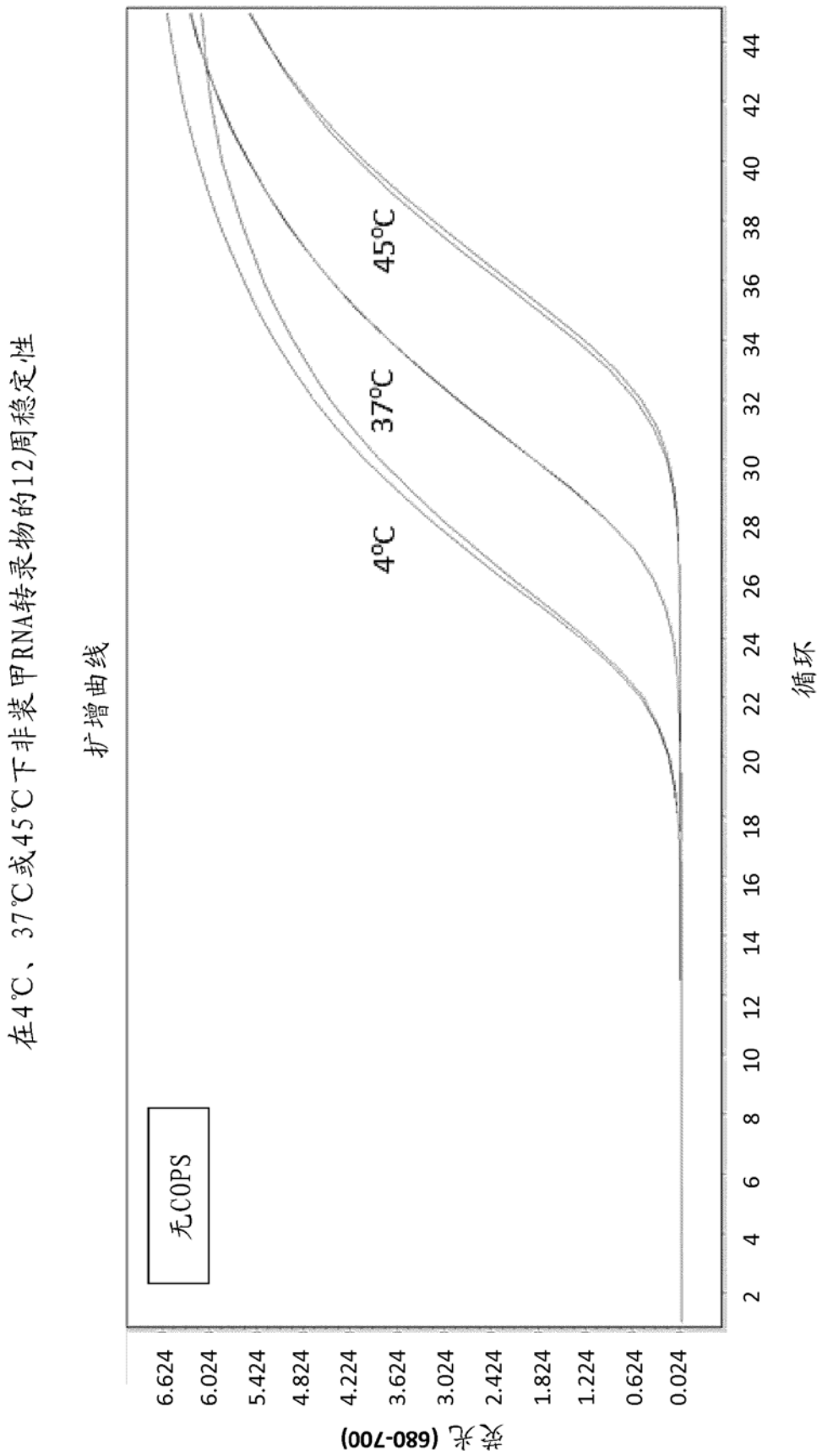

在4℃、37℃或45℃下非装甲RNA转录物的12周稳定性
扩增曲线
无COPS
4ºC
37ºC
45ºC
荧光 (680-700)
6.624
6.024
5.424
4.824
4.224
3.624
3.024
2.424
1.824
1.224
0.624
0.024
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
循环

图 4

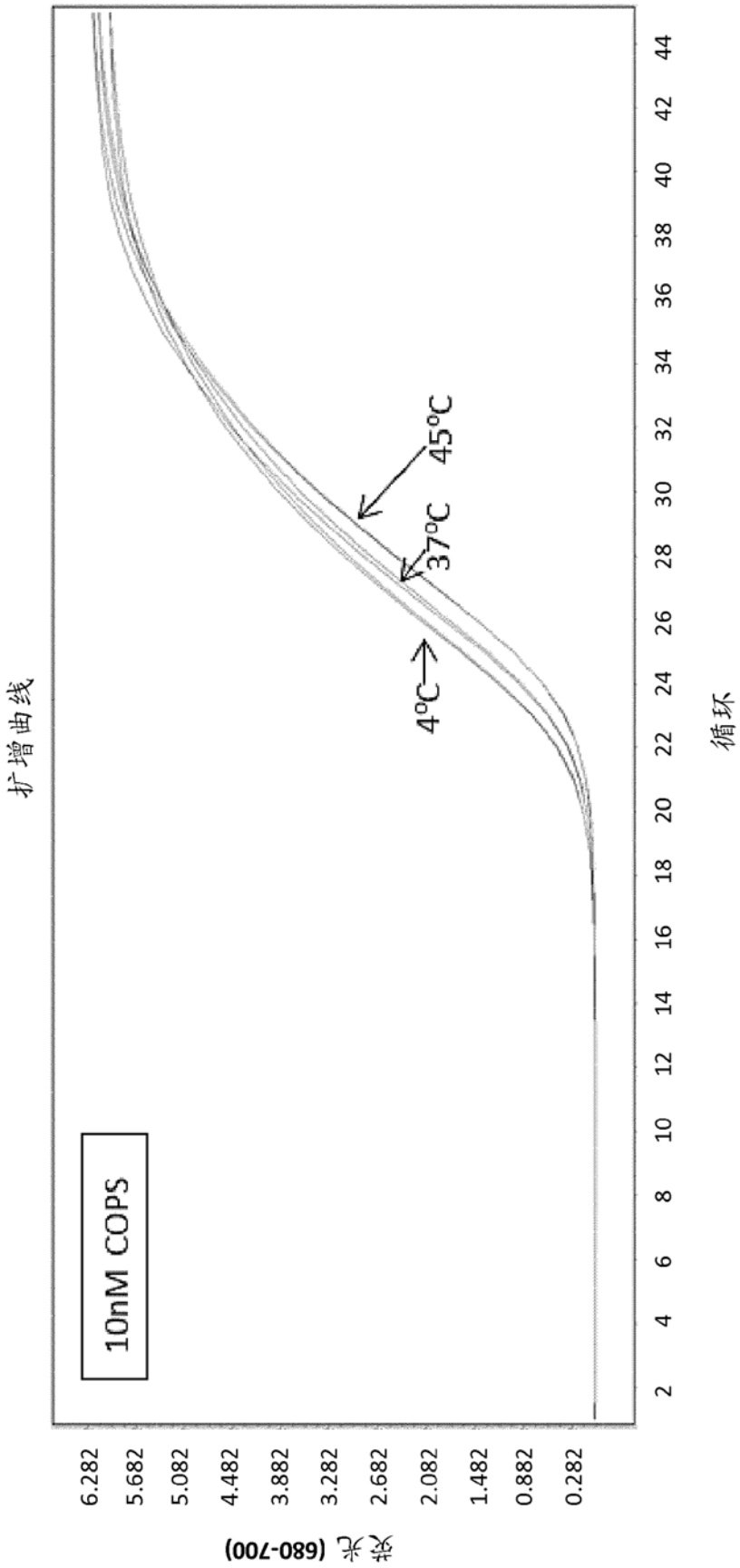

扩增曲线
10nM COPS
荧光 (680-700)
6.282
5.682
5.082
4.482
3.882
3.282
2.682
2.082
1.482
0.882
0.282
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
循环
4°C
37°C
45°C

图 4续

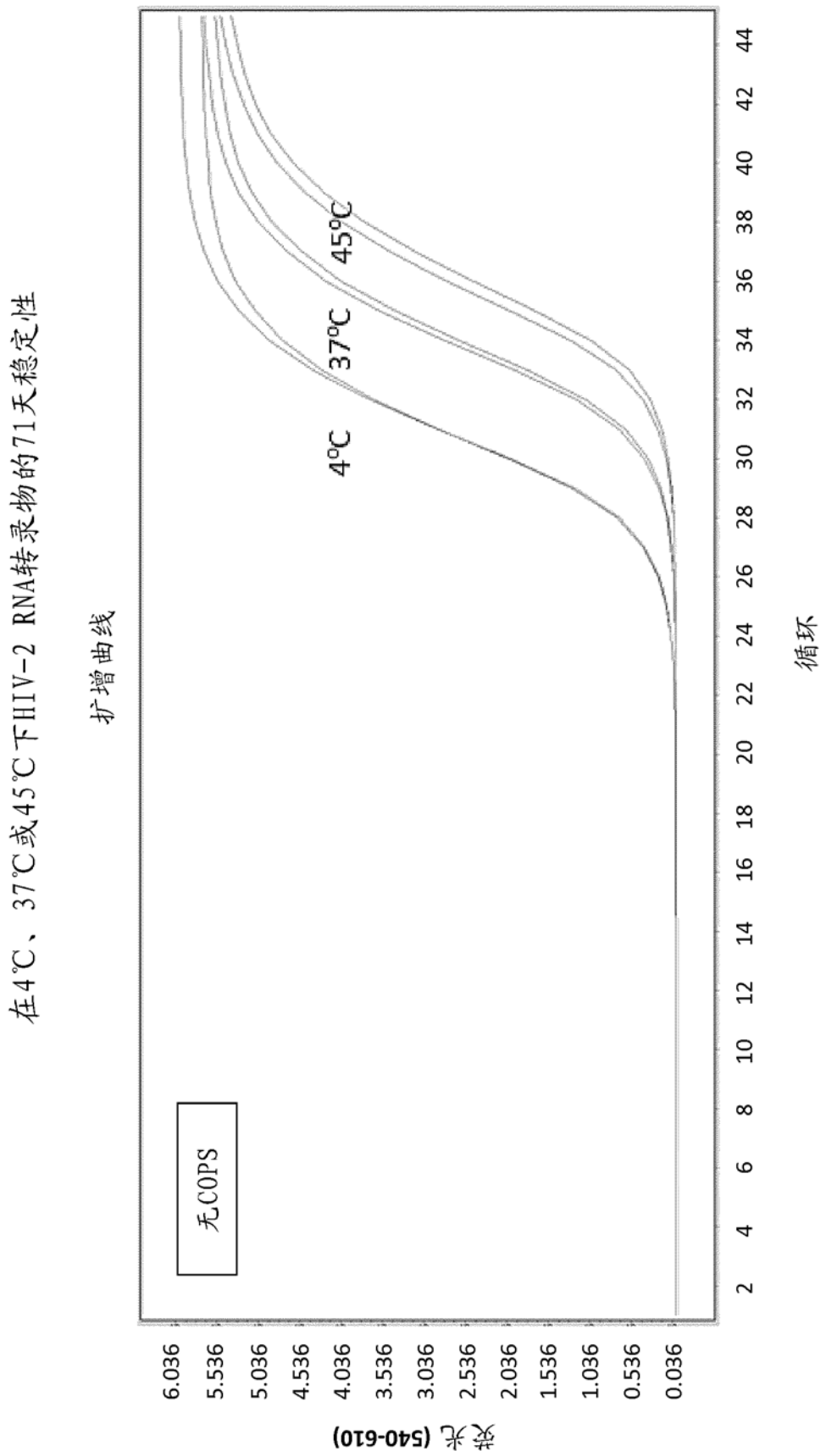

在4℃、37℃或45℃下HIV-2 RNA转录物的71天稳定性
扩增曲线
无COPS
4ºC
37ºC
45ºC
荧光 (540-610)
6.036
5.536
5.036
4.536
4.036
3.536
3.036
2.536
2.036
1.536
1.036
0.536
0.036
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
循环

图 5

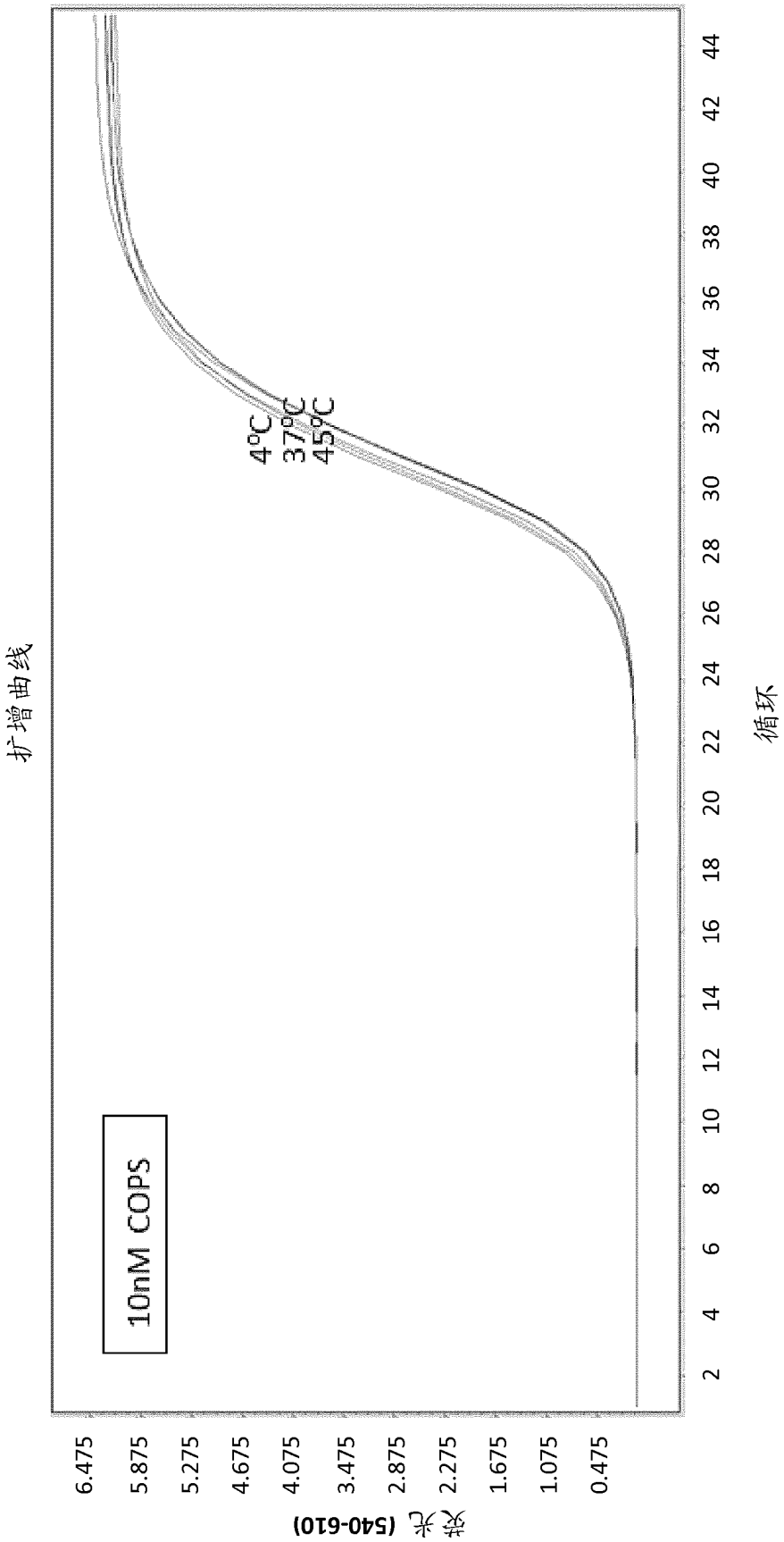

扩增曲线
10nM COPS
4°C
37°C
45°C
荧光 (540-610)
6.475
5.875
5.275
4.675
4.075
3.475
2.875
2.275
1.675
1.075
0.475
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
循环

图 5续

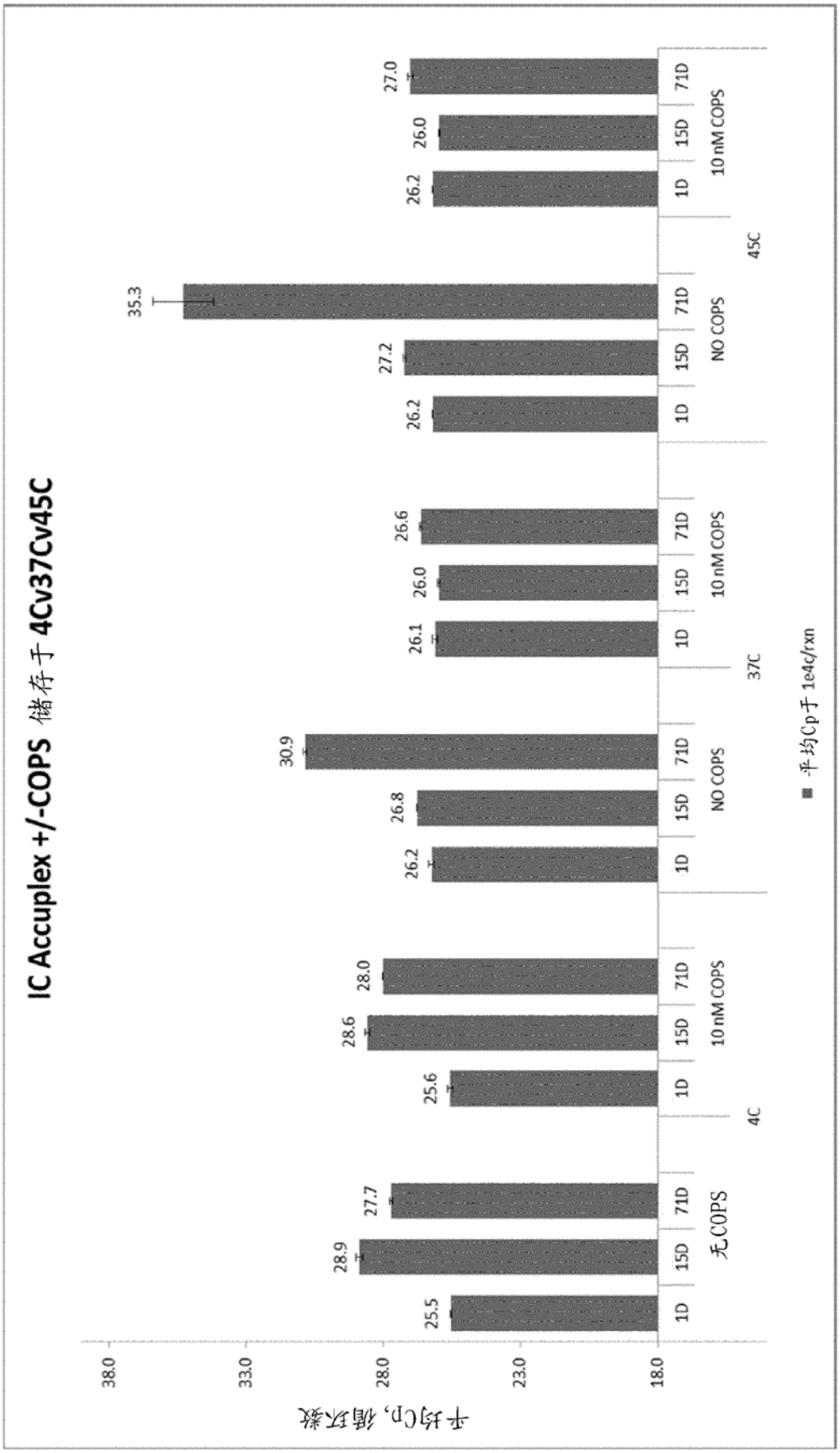

IC Accuplex +/-COPS 储存于 4Cv37Cv45C
平均Cp, 循环数
38.0
33.0
28.0
23.0
18.0
25.5
28.9
27.7
25.6
28.6
28.0
26.2
26.8
30.9
26.1
26.0
26.6
26.2
27.2
35.3
26.2
26.0
27.0
1D
15D
71D
无COPS
4C
10 nM COPS
NO COPS
37C
10 nM COPS
NO COPS
45C
10 nM COPS
平均Cp 于 1e4c/rxn

图 6