



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101238221 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200680020917. 1  
 (22) 申请日 2006. 04. 10  
 (30) 优先权数据  
 PA200500522 2005. 04. 12 DK  
 (85) PCT申请进入国家阶段日  
 2007. 12. 12  
 (86) PCT申请的申请数据  
 PCT/DK2006/050011 2006. 04. 10  
 (87) PCT申请的公布数据  
 W02006/108422 EN 2006. 10. 19  
 (73) 专利权人 NOVIA 公司名下的现场 RCP 公司  
 地址 丹麦奥尔堡  
 (72) 发明人 J·克啻 M·斯托加德 J·S·罗曼  
 (74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
 利商标事务所 11038  
 代理人 胡国群  
 (51) Int. Cl.  
 C12Q 1/68(2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 WO 0077250 A2, 2000. 12. 21, 参见摘要及全  
 文.  
 EP 0971039 A2, 2000. 01. 12, 参见摘要及全  
 文.  
 WO 9949079 A1, 1999. 09. 30, 参见摘要及全

文.  
 WO 0177383 A2, 2001. 10. 18, 参见摘要及全  
 文.  
 WO 0250310 A2, 2002. 06. 27, 参见摘要及全  
 文.  
 WO 2004059005 A2, 2005. 01. 06, 参见摘要及  
 全文.  
 WO 2005001063 A2, 2005. 01. 06, 参见摘要及  
 全文.  
 ALSMADI OSAMA A ET AL. "High accuracy  
 genotyping directly from genomic DNA  
 using a rolling circle amplification based  
 assay.". 《BMC GENOMICS》. 2003, 第 4 卷 (第 21  
 期), 参见摘要及全文.  
 LARSSON C ET AL. "IN SITU GENOTYPING  
 INDIVIDUAL DNA MOLECULES BY TARGET-PRIMED  
 ROLLING-CIRCLE AMPLIFICATION OF PADLOCK  
 PROBES". 《NATURE METHODS》. 2004, 第 1 卷 (第  
 3 期), 227-232.

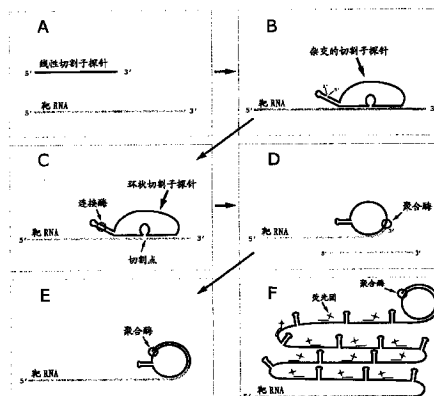
审查员 周洋

权利要求书 4 页 说明书 42 页 附图 9 页

(54) 发明名称  
 新型环形探针及其在鉴定生物分子中的用途

(57) 摘要  
 本发明提供了用于使用滚环复制来有效地检测靶核酸的寡核苷酸和方法。在一个方面, 本发明的寡核苷酸的特征在于它们可以无需外部连接模板而环化。在另一方面, 本发明的寡核苷酸的特征在于它们可以产生对于滚环复制所需的靶核酸的游离 3' - 末端。本发明的寡核苷酸和检测方法可用作例如研究工具和用于检定。

CN 101238221 B



1. 用于靶向核酸序列的环状核酸探针,所述探针具有 30-200 个核苷酸的总长度,并包含:

I. 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度,

II. 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度,

III. 包含与所述靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸,

其中所述探针包含具有核酸内切酶活性的一个或多个元件,并且

其中所述具有核酸内切酶活性的一个或多个元件位于靶互补序列内,将其分成两个或更多个部分。

2. 根据权利要求 1 的环状核酸探针,其中所述第四个部分包含与靶 RNA 序列至少 75% 互补的核酸残基序列。

3. 根据权利要求 1 和 2 中任一项的环状核酸探针,其进一步包含限定所述特定探针的一个或多个元件。

4. 根据权利要求 3 的环状核酸探针,其中限定所述特定探针的所述元件是 6-150 个核苷酸的核苷酸序列。

5. 根据权利要求 3 的环状核酸探针,其中限定所述特定探针的所述元件由一个或多个人工核苷酸组成。

6. 环状核酸探针,其是预先形成的环形探针或挂锁探针,其中所述探针包含具有核酸内切酶活性的一个或多个元件,并且其中所述具有核酸内切酶活性的一个或多个元件位于靶互补序列内,将其分成两个或更多个部分。

7. 根据权利要求 6 的环状核酸探针,其包含:

i) 一个或多个部分,每个部分包含与靶核酸序列的区域至少 75% 互补的核酸残基序列,和

ii) 限定在权利要求 4 和 5 中任一项之中所引用的特定探针的元件。

8. 根据权利要求 6 和 7 中任一项的环状核酸探针,其中与靶核酸序列的区域具有至少 75% 互补性的所述一个或多个部分的总长度为 6-100 个核苷酸。

9. 根据权利要求 6 和 7 中任一项的环状核酸探针,其中所述探针的总长度为 30-200 个核苷酸。

10. 根据权利要求 1-6 中任一项的环状核酸探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是核酸序列。

11. 根据权利要求 10 的环状核酸探针,其中所述核酸序列是 DNA 序列。

12. 根据权利要求 11 的环状核酸探针,其中所述 DNA 序列是 DNA 核酶。

13. 根据权利要求 12 的环状核酸探针,其中所述 DNA 核酶是 10-23DNA 核酶。

14. 根据权利要求 12 的环状核酸探针,其中所述 DNA 核酶是来自 8-17 家族的 DNA 核酶。

15. 根据权利要求 12 的环状核酸探针,其中所述 DNA 核酶是 17EDNA 核酶。

16. 根据权利要求 1-6 中任一项的环状核酸探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元

件是反应性化学基团。

17. 根据权利要求 16 的环状核酸探针, 其中所述反应性化学基团选自: 三联吡啶-Cu(II)、5-氨基-2,9-二甲基菲咯啉-Zn(II)、四氮杂大环-Eu(III) 和新亚铜试剂-Zn(II)。

18. 试剂盒, 其包含根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针以及选自下列的至少一种其他组分: 缓冲液、反应物、抗体和一种或多种靶核酸的对照制剂。

19. 用于检测靶 DNA 分子的方法, 所述方法包括下列步骤:

i) 使根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针与靶 DNA 序列在所述靶 DNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交;

ii) 进行滚环复制; 和

iii) 检测滚环产物。

20. 用于检测靶 RNA 分子的方法, 所述方法包括下列步骤:

i) 使根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针与靶 RNA 序列在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交;

ii) 进行滚环复制; 和

iii) 检测滚环产物。

21. 根据权利要求 20 的方法, 其包括下列步骤:

I. 获得包含所述靶 RNA 分子的制剂,

II. 提供所述环状核酸探针,

III. 使所述探针与所述靶 RNA 分子在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交,

IV. 用所述探针作为模板来实施滚环复制, 和

V. 通过使滚环产物可视化来检测所述靶 RNA 分子。

22. 根据权利要求 20 和 21 中任一项的方法, 其中所述方法进一步包括连接所述探针以形成闭合环状结构的步骤。

23. 根据权利要求 20 和 21 中任一项的方法, 其中所述靶 RNA 分子的检测在细胞或组织中原位发生。

24. 根据权利要求 20-22 中任一项的方法, 其中所述靶 RNA 固定在固体支持物上。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其进一步包括下列步骤:

i) 提供附着至固体支持物的捕获寡核苷酸, 和

ii) 使所述捕获寡核苷酸与所述靶核酸分子杂交, 从而将所述靶核酸分子附着至所述固体支持物。

26. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述捕获寡核苷酸在所述支持物上直接合成。

27. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述捕获寡核苷酸用标记物进行标记, 并且通过所述标记物与固定在固体支持物上的受体分子的结合而附着至固体支持物。

28. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述靶核酸分子通过抗体而附着至固体支持物。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中所述靶 RNA 分子通过靶向所述核酸分子的 5' - 帽的抗体而附着至固体支持物。

30. 根据权利要求 19-29 中任一项的方法, 其中所述环状核酸探针与来自所述靶核酸分子的 3' - 末端的 25 个或更少的核苷酸杂交。

31. 根据权利要求 19-30 中任一项的方法,其进一步包括用具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶来使所述靶核酸分子的 3' - 末端凹陷。

32. 根据权利要求 31 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶选自具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的聚合酶和具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。

33. 根据权利要求 32 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶是具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。

34. 根据权利要求 32 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶是具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶。

35. 用于检测靶核酸分子的方法,所述方法包括下列步骤:

i) 使探针与靶核酸分子杂交,所述探针是根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针;

ii) 用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,以在所述靶核酸分子内产生 3' - 末端;

iii) 从所述新的 3' - 末端开始进行滚环复制;和

iv) 检测滚环产物。

36. 根据权利要求 35 的方法,其中所述靶核酸分子是 RNA 分子。

37. 根据权利要求 35 和 36 中任一项的方法,所述方法包括:

i) 获得包含所述靶核酸分子的制剂,

ii) 提供所述环状核酸探针,

iii) 使所述探针与所述靶核酸分子杂交,和

iv) 用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,从而在所述靶核酸分子内产生新的 3' - 和 5' - 末端,

v) 用所述探针作为模板从在所述靶核酸分子内的所述新的 3' - 末端开始实施滚环复制,和

vi) 通过使滚环产物可视化来检测所述靶核酸分子。

38. 根据权利要求 35-37 中任一项的方法,其中所述探针是根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针,并且其中所述方法包括连接所述探针以形成闭合环状结构的进一步步骤。

39. 根据权利要求 35-38 中任一项的方法,其中在细胞或组织中原位检测所述靶核酸分子。

40. 根据权利要求 35-38 中任一项的方法,其中所述靶核酸分子固定在固体支持物上。

41. 根据权利要求 40 的方法,其中所述靶核酸分子是 RNA。

42. 根据权利要求 40 和 41 中任一项的方法,其进一步包括下列步骤:

i) 提供附着至固体支持物的捕获寡核苷酸,和

ii) 使所述捕获寡核苷酸与所述靶核酸分子杂交,从而将所述靶核酸分子附着至所述固体支持物。

43. 根据权利要求 42 的方法,其中所述捕获寡核苷酸在所述支持物上直接合成。

44. 根据权利要求 42 的方法,其中所述捕获寡核苷酸用标记物进行标记,并且通过所述标记物与固定在固体支持物上的受体分子的结合而附着至固体支持物。

45. 根据权利要求 40 的方法,其中所述靶核酸分子通过抗体而附着至固体支持物。
46. 根据权利要求 41 的方法,其中所述靶 RNA 分子通过靶向所述核酸分子的 5' - 帽的抗体而附着至固体支持物。
47. 根据权利要求 35-46 中任一项的方法,其中所述靶核酸分子的所述新的 3' - 末端被修饰从而获得游离的羟基。
48. 根据权利要求 47 的方法,其中所述靶核酸分子的所述新的 3' - 末端通过 T4 多核苷酸激酶进行修饰。
49. 根据权利要求 35-47 中任一项的方法,其中所述靶核酸分子的所述新的 3' - 末端通过具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶进行修饰。
50. 根据权利要求 49 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶选自具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的聚合酶和具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。
51. 根据权利要求 50 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶是具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。
52. 根据权利要求 50 的方法,其中所述具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的酶是具有 3' - > 5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶。
53. 根据权利要求 19-52 中任一项的方法,其中所述包含靶核酸分子的制剂从选自哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、爬行动物细胞、两栖动物细胞、鸟类细胞和植物细胞的细胞中获得。
54. 根据权利要求 53 的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。
55. 根据权利要求 54 的方法,其中所述细胞是人细胞。
56. 根据权利要求 19-52 中任一项的方法,其中所述包含靶核酸分子的制剂从选自哺乳动物组织、爬行动物组织、两栖动物组织、鸟类组织和植物组织的组织中获得。
57. 根据权利要求 56 的方法,其中所述组织是哺乳动物组织。
58. 根据权利要求 57 的方法,其中所述组织是人组织。
59. 根据权利要求 19-52 中任一项的方法,其中所述包含靶核酸分子的制剂从病毒中获得。
60. 根据权利要求 19-59 中任一项的方法,其中通过计数滚环复制信号的数目来定量测量靶核酸分子的量。
61. 根据权利要求 19-60 中任一项的方法,其中基于测量来自滚环复制的荧光信号的量来定量测量靶核酸分子的量。
62. 检定方法,其包括下列步骤:
  - i) 使根据权利要求 1-17 中任一项的环状核酸探针与靶核酸分子杂交;
  - ii) 进行滚环复制;和
  - iii) 检测所述滚环复制产物。
63. 根据权利要求 62 的检定方法,其中所述靶核酸分子是 RNA。

## 新型环形探针及其在鉴定生物分子中的用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一般而言核酸,特别是 RNA 的局域化 (localised) 检测,其通过采用或不采用核酸内切酶活性,使用环状探针、或能够形成环的探针进行滚环核酸合成来实现。在某些方面,探针包含用于改善其在滚环核酸合成之前的杂交 / 连接事件中的性能的性能的分子内结构,并且在某些方面,探针包含能够切割靶核酸的切割元件。本发明涉及这些探针及其使用方法。

[0002] 发明背景

[0003] 滚环复制利用了环状核酸分子的复制本质上是产生重复拷贝的环的无尽过程这一事实——这就是原核生物基因组在自然界中进行复制的方式。

[0004] 该反应的研究变化形式利用线性寡核苷酸,其一般通过在两个末端经过与连接模板杂交而被置于邻近位置后将它们连接在一起而成形为环。随后,可以在滚环复制中拷贝这些环。这个反应通常通过向闭合环中加入引物来启动,但如 WO 97/20948 中指出的,它同样可以从连接模板 (最初的杂交靶) 来良好地启动。

[0005] 该研究背景中的反应通常称为滚环扩增 (RCA),尽管严格来说这应当被保留用于其中滚环产物通过高分枝 (hyperbranch) 或 DNA 级联反应进一步进行扩增的情况 (WO 97/19193 和 WO 97/20948)。

[0006] 滚环产物可以保持一连串环的串联重复拷贝,或可以通过用限制性酶或核酶消化而还原成单体。这个基本过程在专利文献 (例如 WO 98/38300) 和科学论文 (Dahl F 等人, Proc Natl Acad Sci USA. 101(13), 4548-53(2004)) 中描述。

[0007] 在细胞和组织样品中通过杂交来检测特定核酸对于研究和诊断目的具有重要意义。最初,这通过经标记的 DNA 或 RNA 探针与样品杂交 (原位杂交) 来完成。然而,这种方法的分子分辨率 (检测杂交靶中的变异的能力) 和灵敏度对于许多目的来说是不够的。

[0008] 因此引进了修改方法,其中使用未标记的、线性的、短的 (寡核苷酸) 探针来诱导杂交位点处的经标记的 DNA 的合成。这种所谓的引物原位杂交 (Primed IN Situ) 技术 (PRINS, Koch 等人, 1989, 以及许多后续出版物) 通过用短探针获得的在靶序列中的更佳区分,以及来自位点特异性 DNA 合成的信号扩增而提供了改善的分辨率和灵敏度,但只对某些杂交靶起作用。

[0009] 因此,在 WO 97/20948 中提出了改善该技术的性能的策略。根据这种策略,用环状寡核苷酸探针代替线性探针,并且使用环形探针作为 DNA 合成的模板从杂交靶引发位点特异性 DNA 合成,由此杂交靶变得以具有所述 DNA 环的互补序列的众多串联重复拷贝这样的方式进行延伸。这些拷贝随后可以通过在 DNA 合成过程中掺入经标记的核苷酸,或通过与串联重复序列的后续杂交来检测。这种通过滚环复制来进行的可识别的 DNA 的局域化产生在这节的下列部分中称为滚环 PRINS。

[0010] 通过滚环 PRINS 进行的核酸分子的局域化检测要求合成反应有效地保持在这些分子最初所存在的位点处。这可以通过使用靶核酸分子的游离 3' - 末端作为用于 DNA 聚合酶的引物,使其能够起始环形探针的滚环复制来获得。在 DNA 中,此类末端已可以作为

在体内断裂 DNA 的生物过程的结果而获得 (Andersen CL. 等人, Chromosome Res. 10(4), 305-12(2002)) 或作为人工制备物而获得。此类“天然存在的”3' - 末端在 WO 97/20948 中使用。备选地, 如果用核酸内切酶在靶位点的 3' 消化靶 DNA, 那么可以使用核酸酶来产生适当放置的 3' - 末端以制备用于反应的靶 DNA。如果所得到的末端并非正好紧邻环进行杂交的地方, 那么用核酸外切酶或具有核酸外切酶活性的聚合酶消化靶 DNA, 以使 3' - 末端凹陷 (recess) 直至它可以引发滚环过程的点。如 WO 99/49079 和 Larsson C. 等人, Nature Methods 1, 227-32(2004) 中所述, 这些步骤可以在环与靶 DNA 杂交之前、期间或之后进行。WO 02/50310 提及, 不仅 DNA, 而且 RNA 都可以通过滚环 DNA 合成来检测 (在溶液中、在载玻片上和石蜡切片中, p. 11, 1. 6)。然而, 没有给出关于制备用于滚环过程的靶 RNA 的指示, 并且为 DNA 检测所准备的工具 (限制性消化) 不能应用于 RNA 靶。另外, 用于 DNA 检测的过程要求添加分开的滚环引物, 并且因为没有强调差异, 所以这必须同样应用于 RNA 检测。

[0011] 因此, 总之, 既没有在 WO 97/20948 中提供, 也没有在 WO 02/50310 中提及对于 RNA 靶的靶引发检测 (target primed detection) 特异的基于滚环 DNA 合成的方法。

[0012] RNA 的滚环检测也在 WO 99/49079 和 WO 01/77383 中提议。这些专利申请详细说明了下列内容的基本概念, 即通过提供对于经由在 RNA 模板上进行连接来形成环形探针来说优化的反应条件来进行 RNA 靶的滚环检测, 并提出靶分子的断裂可以用 RNA 酶 H 或 RNA 酶 A 来获得。然而, 尽管优化了关于探针形成的条件, 但在该优化条件下 DNA 环的产率仍显著低于当在 DNA 模板上形成环时所获得的产率。至于用 RNA 酶 A 进行消化, 它提供了 RNA 靶的随机切割, 而不是所想要的定向切割。定向切割可以通过用 RNA 酶 H 消化 RNA 来获得, 所述 RNA 酶特异性地切割 DNA/RNA 杂交物中的 RNA 组分, 导致只在环形探针所位于的位点处发生 RNA 降解。不幸的是, 这种降解导致探针脱离其杂交靶, 从而使得它不再报告那种靶的定位 (Koch, 未公布的观察结果)。因此仍未公布先前关于 DNA 检测而描述的靶引发滚环 PRINS 的有效 RNA 检测版本。

[0013] US2003/0087241 公开了用于合成寡核苷酸 (优选 RNA 寡核苷酸) 的小单链环状寡核苷酸模板。环状寡核苷酸进一步包含用于将合成的多聚体转变成单体的手段; 此类手段可以是例如自切割核酶。公开的方法的目的是有效、低成本且大规模地合成寡核苷酸。没有设想检测方法。

[0014] 因此, 尽管滚环技术中存在近期进展, 但仍需要技术改进, 特别是提供包含适当定位的限制性位点的、除双链 DNA 序列之外的核酸序列的检测。特别地, 需要该技术的进一步发展, 使得可能进行单链核酸序列 (包括 RNA 和单链 DNA) 的位点特异性切割, 以便允许通过靶引发滚环 PRINS 来检测此类序列。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明旨在改善用于检测核酸分子的滚环技术。这涉及将公开的环形探针数目从 2 扩大到 6 (图 1), 这部分地通过补充已知的预先形成的环 (图 1A) 和具有第三种设计的挂锁探针 (图 1C)、本文公开的自我模板式 (龟形) 探针, 和部分地通过引入可以加入至所有 3 种探针设计中的新元件——切割子 (slicer) (图 1E-H) 来实现。对于某些应用, 它可能足以在靶核酸分子的 3' - 末端处或附近放置合适的探针, 并且在必要时使那个末端凹陷至其中滚环复制可以开始的点。对于其他应用, 可能需要切割靶分子以产生适当定位的 3' - 末端。切割子基本上是切割元件, 它包含构建到探针内的核酸内切酶活性, 这使其能

够产生适当定位的 3' - 末端。这些新型探针设计使得能够获得改善的基于靶引发滚环复制的检测方法,其同样在本文公开。

[0017] 在第一个方面,本发明通过向已知探针即预先形成的环形探针和挂锁探针添加龟形探针来扩大环形探针的跨度。在本发明的一个优选实施方案中,这种龟形探针(图 1D)是环状核酸探针,其包含:

[0018] i) 包含至少 75% 互补的核酸序列的第一个部分和第三个部分

[0019] ii) 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,

[0020] 进一步包含与靶核酸序列至少 75% 互补的第四个核酸部分以及限定所述特定探针的一个或多个元件。

[0021] 由于经由在其序列内所包含的发夹结构和两个互补序列而介导的分子内杂交,龟形探针可以使用自我模板式连接来进行连接。当这些互补序列杂交时,探针的 5' - 末端和 3' - 末端变得接近,这使得探针能够进行连接而形成闭合环状结构。当在靶核酸分子上的连接效率很低时(例如在包含由于降解、制备或固定而产生的修饰的 RNA 靶或 DNA 靶上,例如,向核酸碱基添加单羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH),导致通过亚甲基桥接而产生腺嘌呤基团的二聚化),此类自我模板式连接可能是优选的。

[0022] 因此,在一个实施方案中,本发明可以被描述为总长度为 30-200 个核苷酸的环状核酸探针,其包含:

[0023] i) 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度

[0024] ii) 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度

[0025] iii) 包含与靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸。

[0026] 在第二个方面,本发明通过引入切割子来扩大环形探针的跨度,所述切割子是可以掺入至下列三种探针中任何一种之内的切割元件:龟形探针、预先形成的环形探针和挂锁探针(图 1E-1H)。

[0027] 在本发明的另一优选实施方案中,环形探针是含有一个或多个插入的切割元件的龟形探针,称为切割子-龟形探针。因此,根据第一个方面,切割子-龟是环状核酸探针,其中所述探针包含具有核酸内切酶活性的一个或多个元件(图 1H)。

[0028] 备选地,可以将一个或多个切割元件掺入环形探针内,所述环形探针是预先形成的环形探针或挂锁探针,从而使得所述探针包含具有核酸内切酶活性的一个或多个元件。此类预先形成的切割子-环形探针、或切割子-挂锁探针除了所述一个或多个切割元件(图 1E-F 和 1G) 以外还包含:

[0029] 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度;

[0030] 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度;

[0031] 包含与靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第



四个部分的长度为 6-100 个核苷酸。

[0032] 如果备选的环形探针是预先形成的切割子-环形探针,那么它优选通过在杂交前连接该切割子-龟形探针来获得(图 1F)。备选地,它可以通过使用外部连接模板在杂交前连接该切割子-挂锁探针来获得(图 1E)。

[0033] 在第三个方面,本发明涉及用于检测靶 DNA 分子的方法,所述方法包括使环状核酸探针与靶 DNA 序列在该靶 DNA 分子的 3' - 末端处或附近杂交,所述环状核酸探针为龟形探针;进行滚环复制;和检测滚环产物。

[0034] 备选地,本发明涉及用于检测靶 RNA 分子的方法,所述方法包括使环状核酸探针与靶 RNA 序列在该靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近杂交,所述环状核酸探针是龟形探针、预先形成的环形探针或挂锁探针;进行滚环复制;和检测滚环产物。

[0035] 这种方法包括:

[0036] i) 获得包含所述靶 RNA 分子的制剂,和

[0037] ii) 提供所述环状核酸探针,和

[0038] iii) 使所述探针与所述靶 RNA 分子在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交,和

[0039] iv) 用所述探针作为模板来实施滚环复制,

[0040] 应当理解,在环形探针以开放环状结构存在的任何时候,它进一步需要在滚环复制前连接成闭合环状结构。

[0041] 并通过使滚环产物可视化来检测所述靶 RNA 分子。

[0042] 在第四个方面,本发明涉及用于检测靶核酸分子的方法,所述方法包括使环形探针与所述靶核酸分子杂交,所述环形探针是切割子-龟形探针、预先形成的切割子-环形探针、或切割子-挂锁探针;用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,以在所述靶核酸分子内产生 3' - 末端;从所述新的 3' - 末端开始进行滚环复制;和检测滚环产物(图 2)。

[0043] 这种方法包括:

[0044] i) 获得包含所述靶核酸分子的制剂,和

[0045] ii) 提供所述环状核酸探针,和

[0046] iii) 使所述探针与所述靶核酸分子杂交,和

[0047] iv) 用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,在所述靶核酸分子内产生新的 3' - 和 5' - 末端,和

[0048] v) 用所述探针作为模板从在所述靶核酸分子内的所述新的 3' - 末端开始实施滚环复制,

[0049] 并通过使滚环产物可视化来检测所述靶核酸分子。

[0050] 应当理解,在环形探针以开放环状结构存在的任何时候,它进一步需要在滚环复制前连接成闭合环状结构。

[0051] 在第一个应用方面,本发明涉及用于原位即在标准细胞学或组织学制备物中检测靶核酸序列的方法。环形探针被设计为识别在位于细胞或组织中的靶核酸分子之中的靶区域,并且使用适合于所选探针和靶的程序。

[0052] 在第二个应用方面,本发明涉及用于检测固定在固体支持物上的靶核酸分子的方法

法,所述方法包括使所述靶核酸与任何所述探针杂交;用所述探针作为模板来进行滚环复制;和检测滚环产物。

[0053] 该方法还包括一些除了关于原位应用所提及的那些以外的步骤。因此,本发明例如涉及进一步包括下列步骤的方法:

[0054] i) 提供附着至固体支持物的捕获寡核苷酸,和

[0055] ii) 使所述捕获寡核苷酸与所述靶核酸分子杂交,从而将所述靶核酸分子附着至所述固体支持物。

[0056] 本发明还涉及体外检定方法以及基于本发明探针的试剂盒 (kit-of-parts)。

[0057] 定义

[0058] 5' - 帽:在真核生物 mRNA 的 5' - 末端中发现的结构,其包含末端甲基鸟苷残基。

[0059] DNA 核酶 (DNAzyme):可以充当序列特异性核酸内切酶的 DNA 序列。

[0060] 10-23DNA 核酶:由下列序列组成的 DNA 核酶:5' -NNNNNN<sub>n</sub>-(A/G)GGCTAGCTACAACGA-NNNNNN<sub>n</sub>-3' (N 是包括经修饰的核苷酸的任何天然或人工核苷酸,和 n 表示核苷酸的随机数目)。

[0061] 8-17 家族:由下列序列组成的 DNA 核酶:5' -NNNNNN<sub>n</sub>-TN<sub>a1</sub>N<sub>a2</sub>N<sub>a3</sub>AGCN<sub>b1</sub>N<sub>b2</sub>N<sub>b3</sub>WCGAA-NNNNNN<sub>n</sub>-3', N 是包括经修饰的核苷酸的任何天然或人工核苷酸, n 表示核苷酸的随机数目, W 表示 A 或 T, 并且 N<sub>a1</sub> 与 N<sub>b1</sub> 互补, N<sub>a2</sub> 与 N<sub>b2</sub> 互补, 和 N<sub>a3</sub> 与 N<sub>b3</sub> 互补。

[0062] 17E DNA 核酶:来自 8-17 家族且由下列序列组成的 DNA 核酶:5' -NNNNNN<sub>n</sub>-TCCGAGCCGGTTCGAA-NNNNNN<sub>n</sub>-3' (N 是包括经修饰的核苷酸的任何天然或人工核苷酸, 和 n 表示核苷酸的随机数目)。

[0063] 切割元件:具有核酸内切酶活性的元件,所述核酸内切酶活性使其能够切割核酸分子。切割元件的例子包括 DNA 核酶和化学基团例如镧系元素 (III) 络合物。

[0064] 开放环状结构:处于环状结构的核酸序列,其通过外部连接模板自我模板来辅助,含有至少一个 5' - 末端和一个 3' - 末端。这种开放环状结构随后可以通过连接而变成闭合环状结构。

[0065] 闭合环状结构:具有无终止的主链的核酸序列,所述主链为例如但不限于 DNA 和 RNA 中的糖 - 磷酸,或 PNA 中通过肽键连接的 N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单位。

[0066] 杂交:两个互补核酸序列之间的碱基配对。

[0067] 探针:由天然或人工的、修饰或未修饰的核苷酸组成的核酸序列,其具有例如 6-200 个核苷酸的长度。

[0068] 环形探针 (circle probe) (也称为环状探针):用于形成具有无终止主链的探针的核酸序列,因此它可以为闭合环状结构或开放环状结构形式。它能够与靶核酸序列杂交。因此关于环形探针所讨论的任何特征和 / 或方面可以通过类推而应用于闭合环状结构或开放环状结构或二者。

[0069] 龟形探针 (turtle probe):包含具有游离 3' - 末端和游离 5' - 末端的核酸序列的一类环形探针。龟形探针能够与靶序列杂交,并且提供分子内结构例如发夹结构形式的其自身连接模板。这种自我提供的连接模板允许连接所述探针以形成闭合环状结构。

[0070] 挂锁探针:包含具有游离 3' - 末端和游离 5' - 末端的核酸序列的一类环形探

针,它在与其靶杂交后将这样折叠,即使得 3' - 末端和 5' - 末端位于互相紧邻的位置,从而使得能够进行连接以形成闭合环状结构。

[0071] 连接模板:同一个或第二个核苷酸序列的 5' - 末端和 3' - 末端可以与之杂交并且以使得该两个末端能够连接以形成闭合环状结构的方式进行排列的核酸序列。

[0072] 外部连接模板:第二个核苷酸序列的 5' - 末端和 3' - 末端可以与之杂交并且以使得该第二个核苷酸能够连接以形成闭合环状结构的方式进行排列的核酸序列。

[0073] 自我模板式连接 (self-templated ligation):使用为所述核酸序列的一部分的连接模板来连接核酸序列的 5' - 末端和 3' - 末端。

[0074] 预先形成的环形探针 (Preformed circle probe):一类环形探针,其在它与其靶序列杂交之前具有闭合环状结构,并包含能够与靶序列杂交的核酸序列。优选地,可以使用外部连接模板,通过连接来自龟形探针类别的探针,或者备选地通过连接来自挂锁探针类别的探针连接来获得这类环形探针。

[0075] 分子内结构:分子中的一个或多个核酸序列部分与同一个分子的一个或多个核酸序列部分杂交。

[0076] 发夹:在其自身上杂交从而形成单链核酸环和双链核酸区域的单链核酸序列部分。

[0077] LNA:锁定核酸。

[0078] PNA:肽核酸。

[0079] 天然核酸:核苷酸 G、C、A、T、U 和 I。

[0080] 人工核酸:这是在自然界中未发现的两种核酸,例如但不限于 PNA、LNA、异 -dCTP 或异 -dGTP,以及任何经修饰的核苷酸,例如但不限于偶联有生物素的核苷酸、偶联有荧光团的核苷酸或放射性核苷酸。

[0081] 寡核苷酸:它在本文中定义为单链核酸序列,其长度为例如 10-200 个核苷酸。

[0082] 捕获寡核苷酸:直接或间接附着至固体支持物并能够经由杂交来捕获靶 RNA 分子的核酸序列。应当理解,捕获寡核苷酸可以在附着至固体支持物之前或之后与靶核酸杂交,而且它可以包含任何天然或人工核酸。

[0083] 抗体:识别特定抗原并选择性地与之结合的免疫球蛋白家族的蛋白质。这还包括抗体片段,例如但不限于 FAB 片段。

[0084] 受体和标记物分子:能够 1) 互相选择性地结合和 2) 附着至固体表面或生物分子的分子对,例如生物素 / 链霉抗生物素蛋白。附着可以是直接的或间接的,例如经由 A 蛋白。

[0085] 固体支持物:寡核苷酸或者受体 / 标记物对可以与其附着或在其上合成的任何固体表面,例如但不限于,显微镜载玻片、ELISA 平板、微芯片或珠。

[0086] 靶 RNA 分子:RNA 分子,将探针设计为与之杂交。

[0087] 靶核酸分子:核酸分子,将探针设计为与之杂交。

[0088] 靶序列:探针可以与之杂交的在靶核酸分子中的序列。

[0089] 偶联有生物素的寡核苷酸:具有与其 3' - 末端、5' - 末端或在寡核苷酸内某处结合的生物素的寡核苷酸。

[0090] 滚环模板:人工或天然核苷酸的闭合环状序列,在滚环复制过程中聚合酶将其用

作模板。

[0091] 滚环复制:使用环状单链寡核苷酸作为滚环模板和使用靶 RNA 分子或靶 DNA 分子作为引物的 DNA 合成。加入 DNA 聚合酶和 dNTPs 开始了聚合。因为滚环模板是无末端的,所以产物将是由与滚环模板互补的串联重复序列组成的长的单链 DNA 链。人工以及天然核酸残基可以充当用于滚环复制的底物。

[0092] 切口:切口应当被理解为由于缺失磷酸二酯键而引起的在双链核酸的一条链中的裂口,这留下游离的 3' - 羟基和 5' - 磷酸基。与切口邻近的碱基将仍与相反链上的碱基杂交。切口例如是通过切刻核酸内切酶(nicking endonuclease)进行消化的结果。切口还可以是下列过程的结果:使两个序列在连接模板上进行杂交,从而使得一个序列的 5' - 末端邻近于另一个序列的 3' - 末端。切口可以通过连接酶的作用而进行连接。

[0093] 发明详述

[0094] 本发明涉及新型环形探针设计及其用于通过滚环复制来检测单链核酸分子的方法。下文提及的方法和探针可以用于体外检定和检定试剂盒。

[0095] 在一个实施方案中,本发明涉及新型环形探针设计,即龟形探针:

[0096] 环状核酸探针,其进一步包含:

[0097] i) 包含至少 75% 互补的核酸序列的第一个部分和第三个部分;

[0098] ii) 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分。

[0099] 例如但不限于总长度为 30-200 个核苷酸的环状核酸探针,其包含:

[0100] i) 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度;

[0101] ii) 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度;

[0102] iii) 包含与靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸。

[0103] 在一个实施方案中,本发明还可以被描述为环状核酸探针,其中 3' - 末端和 5- 末端通过所述探针中的分子内结构而变得接近,从而使得 3' - 末端和 5- 末端由切口分隔开。

[0104] 在特别优选的实施方案中,探针可以是单链的。并且在特别优选的实施方案中,所述探针是 DNA 探针。

[0105] 龟形探针的特征在于,在探针序列中包含其自身连接模板,这允许所述探针通过自我模板式连接来进行连接以形成闭合环状结构,而无需添加外部连接模板。

[0106] 龟形探针的目的和特征在下文中详细阐述。

[0107] 互补性

[0108] 由于经由包含在其序列内的发夹结构和 2 个互补序列所介导的龟形探针的分子内杂交,自我模板式连接是可能的。当这些互补序列在发夹附近杂交时,探针的 5' - 末端和 3' - 末端变得接近,这使得能够连接探针以形成闭合环状结构。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其包含:包含至少 75% 互补的核酸序列的第一个部分和第三个部分,以及包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,例如 75-100% 互补,或例如 80-100% 互补,或例如 85-100% 互补,或例如 90-100% 互

补,或例如 95-100%互补,或例如 100%互补。

[0109] 应当理解,互补部分能够互相杂交。

[0110] 当在靶核酸分子上的连接效率很低时(例如在包含由于降解、制备或固定而产生的修饰的 RNA 靶或 DNA 靶上,例如,向核酸碱基添加单羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH),导致通过亚甲基桥接而产生腺嘌呤基团的二聚化),此类自我模板式连接可能是优选的。回复此类碱基修饰的操作程序已公开(Masuda N. 等人,Nucleic Acids Res. 15 ;27(22)4436-43(1999)),但它们只减少损害,因为所有修饰的完全去除是不可能的。龟形探针的另一个优点是自我包含的连接模板是一段裸露的 DNA,其与使用例如染色质 DNA 的外部模板式连接相比较,应当导致更高的连接效率。因此,在第二个实施方案中,本发明涉及核酸探针,其进一步包含含有核酸残基序列的第四个部分,所述核酸残基序列与靶核酸序列至少 75%互补,例如 75-100%互补,或例如 80-100%互补,或例如 85-100%互补,90-100%互补,或例如 95-100%互补,或例如 100%互补。

[0111] 龟形探针可以检测单个非多腺苷酸化的 RNA's,例如但不限于,来自 EB 病毒的 EBER1 和 EBER2、腺病毒编码的小 RNA's VA1 和 VA2、核糖体 RNA's、端粒酶复合物(hTERC)的 RNA 部分、小干扰 RNA's(siRNA's)和微小 RNA's(miRNA's)。

[0112] 关于 RNA 靶,本发明的一个优选实施方案涉及包含第四个部分的核酸残基的环状核酸探针,其中所述第四个部分包含核酸残基序列,所述核酸残基序列与靶 RNA 序列至少 75%互补,例如 75-100%互补,或例如 80-100%互补,或例如 85-100%互补,90-100%互补,或例如 95-100%互补,或例如 100%互补。

[0113] 包含与靶核酸序列互补的核酸序列的龟形探针的第四个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸,例如 20-100 个核苷酸,或例如 20-80 个核苷酸,或例如 20-60 个核苷酸,或例如 20-40 个核苷酸,或例如 20-30 个核苷酸。

[0114] 龟形探针的第一个和第三个部分包含在互相杂交后能够(连同第二个部分一起)将探针折叠成开放环状结构的互补序列,所述开放环状结构可以连接成闭合环状结构(图 1D)。这些部分的长度必需具有允许在反应条件下进行杂交的大小。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其中所述第一个部分和第三个部分的长度各为 3-100 个核苷酸,例如 3-50 个核苷酸,或例如 3-40 个核苷酸,或例如 3-30 个核苷酸,或例如 3-20 个核苷酸,或例如 3-10 个核苷酸。

[0115] 包含发夹的龟形探针的第二个部分对于在分子内杂交后使探针变成开环是重要的。这个部分的长度必需具有允许在反应条件下进行杂交的大小。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其中所述第二个部分的长度为 9-50 个核苷酸,例如 15-50 个核苷酸,或例如 15-40 个核苷酸,或例如 15-30 个核苷酸,或例如 10-20 个核苷酸,或例如 15-10 个核苷酸。

[0116] 为了标示龟形探针或者区分不同的龟形探针(如果反应中存在超过一种的龟形探针),那么需要限定特定龟形探针的元件——标示物(identifier)。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其进一步包含一个或多个限定该特定探针的元件。

[0117] 在一个目前优选的实施方案中,本发明涉及总长度为 30-200 个核苷酸的环状核酸探针,其包含:

[0118] 1. 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度;

[0119] 2. 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度;

[0120] 3. 包含与靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸。

[0121] 可以使用不同方法来标示特定特定龟形探针,并且标示物元件将依据所选择的方法而不同。

[0122] 如果通过经标记的寡核苷酸与标示物元件杂交来获得检测,那么标示物需要具有一定长度,以对于靶序列来说特异,并允许在反应条件下杂交。理论上,标示物可以匹配探针的总长度,但在大多数情况下较短的标示物元件将是优选的。较短的标示物将具有较快的杂交动力学,且将使得探针能够包含超过一种的标示物。因此,在一个实施方案中,本发明涉及限定该特定探针的元件,其是 6-200 个核苷酸的核苷酸序列,例如 6-150 个核苷酸,或例如 6-100 个核苷酸,或例如 6-80 个核苷酸,或例如 6-60 个核苷酸,或例如 6-50 个核苷酸,或例如 10-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸,或例如 15-30 个核苷酸。

[0123] 然而,因为所述龟形探针在滚环复制中用作模板,所以检测还可以通过合成来获得。此类通过合成的检测可以以类似于已建立的线性 PRINS 反应的方式来进行。尽管经标记的(例如荧光团)A、T、G、C 或 U 的掺入是显而易见的方法,但它将引起背景染色,因为这些核苷酸不仅可以掺入滚环复制产物中,而且还可以掺入样品中的其他地方。因此,可能优选的是,在复制时将一种或多种人工核苷酸例如 isoC 或 isoG 掺入探针序列中,并提供互补核苷酸作为经标记的核苷酸(例如荧光团)。因为此类人工核苷酸在自然界中未发现,所以异-dCTP 和异-dGTP 不会掺入样品中的其他地方,从而最小化了背景反应。这个方面使得利用偶联有荧光团的异-dCTP 核苷酸或异-dGTP 核苷酸是优选的。如果检测通过合成来获得,那么限定该特定探针的标示物元件因此优选地可以是一种或多种人工核苷酸。因此,在另一实施方案中,本发明涉及限定该特定探针的元件,其由一个或多个个人工核苷酸组成,例如 1-20 个人工核苷酸,或例如 1-10 个人工核苷酸,或例如 1-5 个人工核苷酸,或例如 4 个人工核苷酸,或例如 3 个人工核苷酸,或例如 2 个人工核苷酸,或例如 1 个人工核苷酸。

[0124] 龟形探针的总长度可以依上文限定的每种元件的具体长度而变。此外,目前化学合成的寡核苷酸的长度限制为大约 150-200 个核苷酸。还可以是有利的是,使用尽可能短的探针(无需明显地对杂交事件和滚环效率进行折衷),因为圆环越短,每单位长度的合成的 DNA 中标示物元件将拷贝越多次,从而增加反应结束时的检测信号。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其中探针总长度为 30-200 个核苷酸,例如 30-150 个核苷酸,或例如 50-150 个核苷酸,或例如 70-150 个核苷酸,或例如 90-150 个核苷酸,或例如 70-130 个核苷酸,或例如 70-110 个核苷酸。

[0125] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :1) 的龟形探针:

[0126] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCACATGTTTGGCTCCAAAACATGCGGACCACC-, AGCTGGTACTTGA CCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0127] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0128] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :2) 的龟形探针:

[0129] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCACATGTTTGGCTCCAAAAATAGCGGACAAGCCGAATA-CCCTTCTCCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0130] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0131] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :3) 的龟形探针:

[0132] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACAAAACATGCGGACCACCAGC-TGGTACTTGACCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0133] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0134] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :4) 的龟形探针:

[0135] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACAAAATAGCGGACAAGCC-GAATACCCTTCTCCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0136] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0137] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :5) 的龟形探针:

[0138] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACGCATGTGTGAGCCGAGTCC-TGGGTGCACGTCACACAGCTCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0139] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0140] 当使用靶引发的滚环复制用于检测靶核酸分子时,3' - 末端必须存在于接近探针进行杂交的位置处,以充当滚环复制的引物。当检测 DNA 时,这个 3' - 末端可以由于生物过程或人工制备而存在 (WO 97/20948),或者它可以例如使用限制性酶来随后产生 (WO 99/49079 和 Larsson C. 等人, Nature Methods 1, 227-32 (2004))。

[0141] 然而,如果靶分子是 RNA,那么不能使用限制性酶,因为人工制备物在制备物之间将非常不同,3' - 末端的更特异的产生将是优选的。某些 RNA 分子具有接近于探针进行杂交的区域的可用的 3' - 末端,并且在这种情况下可以使用不含切割元件的探针。然而,对于 3' - 末端的这种要求限制了探针位置位于 RNA 分子的 3' - 末端附近。

[0142] 这个问题通过引入切割子探针来解决,所述切割子探针是含有掺入的切割元件的环状探针。这种切割元件使得切割子探针能够切割靶核酸,从而在其杂交之处产生新的 3' - 末端。因此,可以靶向任何核酸分子的任何可接近区域,使得能够检测例如在 3' - 末端处多腺苷酸化的真核生物信使 RNA。

[0143] RNA 剪接是受严格调节的过程,其中前 mRNA (前信使 RNA) 被去除了内含子从而产生随后翻译成蛋白质的外显子序列,所述前 mRNA 是包含交替的外显子和内含子的基因的编码序列的精确拷贝。还可以在剪接过程中从最终 mRNA 中省略外显子。这是称为可变剪接的常见现象,这允许一个基因产生几种不同的 mRNA' s,并由此产生几种不同的蛋白质。它提供了调节蛋白质活性或由同一基因产生具有不同活性的蛋白质的方法。然而,如果可变剪接没有被正确调节,那么它可以具有严重后果,并且可变剪接已被发现在许多人类疾病例如癌症的发展中起重要作用。

[0144] 真核生物信使 RNA 例如剪接变体的检测可以通过如下来进行:将切割元件定位在切割子探针的靶互补部分内,从而将靶互补部分分成两个部分。如果这两个部分被设计为识别两个邻近外显子 (例如分别为外显子 2 和 1) 的部分,那么切割子探针在外显子 1-2 接头处杂交。然后,信号将只在存在外显子 1-2 接头从而允许切割子探针杂交并切割靶 RNA 时出现。如果存在不含外显子 2 但含外显子 1-3 接头的剪接变体,那么它可以通过加入其

中两个靶互补部分识别外显子 1-3 接头的不同切割子探针来同时检测。因此,不同的剪接变体可以使用本发明的切割子探针来检测。类似地,外显子-内含子接头可以用包含跨越外显子-内含子接头的靶互补部分的切割子探针来检测。因为各具有其自身标示物的多个探针可以共杂交,所以几种剪接变体的筛选可以同时完成。

[0145] 显示出可以通过切割子探针来检测的可变剪接的癌症相关基因的例子包括但不限于, CD44、WT1、BRCA1、BRCA2、MDM2、FGFR 1-4、kallikrein 家族成员、NRSF、NF1、SVH、SRF、FYN、胱天蛋白酶-8、PASG、MUC1、胰岛素受体、Rac1、KAI1/CD82、WISP1、肠泌素受体、胃泌素受体、DNMT3b4、SVH、C-CAM、VEGF、辅肌动蛋白-4、SHBG、整联蛋白<sub>1C</sub>、AIB1、雄激素受体、雌激素受体、Syk、uPAR、FGFR1、Crk、NF1、TSG101、生腱蛋白-C、纤连蛋白、Ikaros、RET、HE4/WFDC2、Bradeion、SSCA/SERPINB3、TADG-12/TMPRSS3、Testisin、PSCA、Bin-1、Bim/BCL2L11、Fas 抗原 /CD95、聚集蛋白聚糖、TACC、RSU-1、酪氨酸羟化酶、RON、生腱蛋白、纤蛋白-1、hSlo、甲状腺激素受体、FGF-8、CEACAM1/CD66a/BGP、和 WWOX (Brinkman BM, Clin Biochem. 37 (7), 584-94 (2004) ;和 Venables JP, Cancer Res. 64 (21), 7647-54 (2004))、骨桥蛋白、存活蛋白、hTERT (端粒酶)、细胞周期蛋白 D1、或胰岛素受体。

[0146] 几种核酸酶已在文献中被描述为能够切割核酸序列。这些核酸酶可以是脱氧核酶和核酶,并且这两种类型都能够提供切割元件所要求的活性。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是核酸序列。然而,因为 DNA 比 RNA 更稳定,并所使用的优选聚合酶是 DNA 聚合酶,所以脱氧核酶作为切割元件是优选的。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是 DNA 序列。近年来已通过体外选择策略产生了完全由 DNA 组成的许多不同的催化核酸,并且已命名为脱氧核酶 (DNA 核酶)。包含核酸内切酶活性的 DNA 核酶介导序列特异性切割,因此作为切割元件是理想的。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是 DNA 核酶。

[0147] 所描述的大多数 DNA 核酶显示出核糖核酸酶活性,并且目前最感兴趣的用于切割 RNA 的 DNA 核酶是 10-23、8-17、17E (8-17 酶的衍生物) 和 16.2-11。

[0148] 因为它是体外选择的第 10 个循环的第 23 个克隆,所以如此将其称为 10-23 DNA 核酶,其包含由 15 个核苷酸组成的二价金属离子依赖性催化结构域,侧翼是通过沃森-克里克碱基配对而结合靶 RNA 的 2 个底物识别臂。已报道,10-23DNA 核酶用几种不同的二价金属离子作为辅因子来发挥作用。10-23DNA 核酶切割未配对的嘌呤 A/G 和配对的嘧啶 U(/C) 之间的特定磷酸二酯键,产生 2', 3' - 环状磷酸末端,和 5' - 羟基末端 (Santoro SW 和 Joyce GF Proc Natl Acad Sci USA. 29 ;94 (9) :4262-6. (1997))。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是 10-23DNA 核酶。

[0149] 因为它是来自体外选择的第 8 轮的 17 个克隆,所以如此将其称为 8-17 DNA 核酶,其包含由 13 个核苷酸组成的二价金属离子依赖性催化结构域,侧翼是通过沃森-克里克碱基配对而结合靶 RNA 的 2 个底物识别臂 (Santoro SW 和 Joyce GF Proc Natl Acad Sci USA. 29 ;94 (9) :4262-6. (1997))。

[0150] 如同 10-23DNA 核酶一样,已报道,8-17DNA 核酶用几种不同的二价金属离子作为辅因子来发挥作用。8-17DNA 核酶切割在与随后为任何核糖核苷酸 (A、C、G 或 U) 的 G 摆动配对的 T 之间的特定磷酸二酯键,产生 2', 3' - 环状磷酸末端,和 5' - 羟基末端。因此,



在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是来自 8-17 家族的 DNA 核酶。

[0151] 一般地,切割 RNA 的 DNA 核酶作为切割元件是理想的,因为它们容易掺入探针序列内,从而产生切割子探针。然而,当使用此类设计时,切割子探针在切割靶 RNA 分子后将产生 5' - 羟基末端和 2', 3' - 环状磷酸末端,其中所述 2', 3' - 环状磷酸末端具有对于切割子探针的一个核苷酸突出端。通常,一个碱基核苷酸突出端在滚环复制开始前通过包含核酸外切酶活性的聚合酶容易去除。然而,因为 2', 3' - 环状磷酸有效地抑制至少一些 DNA 聚合酶(例如 Phi29 DNA 聚合酶)的核酸外切酶和聚合酶活性,所以需要修饰/去除此类 2', 3' - 环状磷酸以允许该 3' - 末端引发滚环反应。2', 3' - 环状磷酸的去除可以使用 T4 多核苷酸激酶来酶促完成,这产生引发滚环反应所需的 3' - 羟基末端。已对 8-17DNA 核酶实施了体外选择的另外轮回,这已导致产生这种 DNA 核酶的新变体。在这些新变体中,17E DNA 核酶是最感兴趣的,因为已报道它包含两步机制,其中通常由 DNA 核酶切割而产生的 2', 3' - 环状磷酸被水解。2', 3' - 环状磷酸的这种水解仅在将  $Pb^{2+}$  用作二价金属辅因子时发生。然而,如果 17E DNA 核酶用作切割元件,而  $Pb^{2+}$  作为辅因子,那么切割产物是 3' -(或 2' -) 单磷酸末端和 5' - 羟基末端(Brown AK 等人, *Biochemistry* 17 ;42 (23) :7152-61 (2003))。如果使用包含核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶,那么这可以允许该新的 3' - 末端充当滚环复制的引物而不要求修饰/去除。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是 17E DNA 核酶。

[0152] 包含脱氧核糖核酸酶活性的 DNA 核酶也已得到描述,但由于 DNA 的更大的稳定性,所以此类 DNA 核酶很可能必须包含更复杂的活性位点。包含脱氧核糖核酸酶活性的有效 DNA 核酶因此一定比包含核糖核酸酶活性的 DNA 核酶更罕见。已将包含脱氧核糖核酸酶活性的 DNA 核酶分成两类:需要  $Cu^{2+}$  和抗坏血酸盐以促进 DNA 切割的类型 I,和只需要  $Cu^{2+}$  的类型 II(Carmi N. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*. 3 ;95 (5) :2233-7 (1998))。目前, DNA 核酶对于 DNA 切割比对于 RNA 切割具有更低的效率,但将来将极有可能开发出对 DNA 具有更高切割效率的 DNA 核酶。

[0153] 一些脱氧核酶包含分子内的碱基配对,例如 8-17 DNA 核酶。此类结构可以通过掺入已知改善杂交效率的人工核苷酸例如 PNA 或 LNA 可以而得到强化,这可以改善切割效率。

[0154] 在文献中,已报道与寡核苷酸偶联的不同反应性化学基团能够诱导核酸分子的序列特异性切割。类似于 DNA 核酶,这些化学基团中的许多使用二价金属离子作为辅因子。与化学络合物偶联的寡核苷酸与靶核酸分子中的序列杂交,从而通过其序列确定切割位点。如果这种偶联的寡核苷酸是切割子探针的一部分,那么切割子探针通过探针与靶核酸分子的杂交而提供靶特异性,并且化学基团切割靶核酸分子,从而产生用作滚环反应引物的 3' - 末端。在化学络合物抑制滚环复制的情况下,如果化学基团通过切割连接体例如但不限于二硫桥而与探针偶联,那么络合物可以在滚环复制前从切割子探针上释放。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是反应性化学基团。

[0155] 如使用 DNA 核酶一样,已描述了包含核糖核酸酶活性的反应性化学基团,并且这些基团中的一些已与寡核苷酸相偶联以提供序列特异性,例如但不限于,三联吡啶 -Cu(II) (Terpyridine-Cu(II)) (Sakamoto S. 等人, *Nucleic Acids Res.* 1 ;

31(5):1416-25(2003))、5-氨基-2,9-二甲基菲咯啉-Zn(II) (Astrom H. 等人, *Org Biomol Chem.* 7;1(9):1461-5(2003))、四氮杂大环-Eu(III) (Huang L. 等人, *J Biol Inorg Chem.* 5(1):85-92(2000)) 和新亚铜试剂-Zn(II) (Whitney A. 等人, *Chem Commun (Camb).* 7;(1):36-7(2003)), 已报道所有这些诱导由偶联的寡核苷酸所指导的序列特异性切割。在新亚铜试剂-Zn(II) 的情况下, 寡核苷酸包含 PNA 形式的人工核苷酸, 所述人工核苷酸因为增加的靶亲和性、序列特异性和生物化学稳定性而被使用。因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及切割子探针, 其中所述具有核酸内切酶活性的元件选自下列: 三联吡啶-Cu(II)、5-氨基-2,9-二甲基菲咯啉-Zn(II)、四氮杂大环-Eu(III) 和新亚铜试剂-Zn(II)。

[0156] 尽管 DNA 与 RNA 相比具有更大的稳定性, 但也已报道了包含脱氧核糖核酸酶活性的反应性化学基团, 例如但不限于, 用  $\text{Cu}^{2+}$  作为辅因子的环丙沙星 (HCp)。在抗坏血酸盐/过氧化氢激活后, HCp 可以使用  $\text{Cu}^{2+}$  作为辅因子而充当有效的化学核酸酶 (Jimenez-Garrido N 等人, *J Inorg Biochem.* 99(3):677-89(2005))。如使用 DNA 核酶一样, 反应性化学基团目前对于 DNA 切割比对于 RNA 切割具有更低的效率, 但将来将极有可能开发出对 DNA 具有更高切割效率的反应性化学基团。

[0157] 反应性化学基团已被报道为偶联至与靶核酸分子杂交的寡核苷酸的一个末端, 和为偶联至在杂交区域内的核酸分子, 而 DNA 核酶必须位于杂交区域内。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及切割子探针, 其中所述一个或多个具有核酸内切酶活性的元件位于靶互补序列内部, 从而将其分成两个或多个部分, 并且在另一实施方案中, 本发明涉及切割子探针, 其中所述具有核酸内切酶活性的元件是位于靶互补区域的一个末端中的反应性化学基团。

[0158] 为了标示切割子探针或者区分不同的切割子探针 (如果反应中存在超过一种的切割子探针), 那么需要一个或多个限定特定切割子探针的元件——标示物。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及环状核酸探针, 其进一步包含一个或多个限定该特定探针的元件。

[0159] 可以使用不同方法来标示特定切割子探针, 并且标示物元件将依据所选择的方法而不同。

[0160] 如果通过经标记的寡核苷酸与标示物元件杂交来获得检测, 那么标示物需要具有一定长度, 以对于靶序列来说特异, 并允许在反应条件下杂交。理论上, 标示物可以匹配探针的总长度, 但在大多数情况下较短的标示物元件将是优选的。较短的标示物将具有较快的杂交动力学, 且将使得探针能够包含超过一种的标示物。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及限定该特定探针的元件, 其是 6-200 个核苷酸的核苷酸序列, 例如 6-150 个核苷酸, 或例如 6-100 个核苷酸, 或例如 6-80 个核苷酸, 或例如 6-60 个核苷酸, 或例如 6-50 个核苷酸, 或例如 10-40 个核苷酸, 或例如 10-30 个核苷酸, 或例如 15-30 个核苷酸。

[0161] 然而, 因为所述切割子-龟形探针在滚环复制中用作模板, 所以检测还可以通过合成来获得。此类通过合成的检测可以以类似于已建立的线性 PRINS 反应的方式进行。尽管经标记的 (例如荧光团) A、T、G、C 或 U 的掺入是显而易见的方法, 但它将引起背景染色, 因为这些核苷酸不仅可以掺入滚环复制产物中, 而且还可以掺入样品中的其他地方。因此, 可能优选的是, 在复制时将一种或多种人工核苷酸例如 isoC 或 isoG 掺入探针序列中, 并提供互补核苷酸作为经标记的核苷酸 (例如荧光团)。因为此类人工核苷酸在自然界中

未发现,所以它们不会以任何大的程度掺入样品中的其他地方,从而最小化了背景反应。这个方面使得利用偶联有荧光团的异-dCTP 核苷酸或异-dGTP 核苷酸是优选的。如果检测通过合成来获得,那么限定该特定探针的标示物元件因此优选地可以是一种或多种人工核苷酸。因此,在另一实施方案中,本发明涉及限定该特定探针的元件,其由一个或多个个人工核苷酸组成,例如 1-20 个人工核苷酸,或例如 1-10 个人工核苷酸,或例如 1-5 个人工核苷酸,或例如 4 个人工核苷酸,或例如 3 个人工核苷酸,或例如 2 个人工核苷酸,或例如 1 个人工核苷酸。

[0162] 切割子-龟形探针的总长度可以依上文限定的每种元件的具体长度而变。此外,当前化学合成的寡核苷酸的长度限制为大约 150-200 个核苷酸。还可以是有利的是,使用尽可能短的探针(无需明显地对杂交事件和滚环效率进行折衷),因为圆环越短,每单位长度的合成的 DNA 中标示物元件将拷贝越多次,从而增加反应结束时的检测信号。因此,在一个实施方案中,所述方法涉及环状核酸探针,其中探针总长度为 30-200 个核苷酸,例如 30-150 个核苷酸,或例如 50-150 个核苷酸,或例如 70-150 个核苷酸,或例如 90-150 个核苷酸,或例如 70-130 个核苷酸,或例如 70-110 个核苷酸。

[0163] 优选的切割子探针设计是切割子-龟,因为它可以通过自我模板式连接来连接,特别地,当在靶核酸分子上的连接效率很低时(例如在包含由于制备或固定而产生的修饰的 RNA 靶或 DNA 靶上,例如,向核酸碱基添加单羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH),导致通过亚甲基桥接而产生腺嘌呤基团的二聚化),所述自我模板式连接可能是优选的。因此,在一个优选实施方案中,本发明涉及切割子-龟形探针类型的环状核酸探针,其中所述探针包含一个或多个具有核酸内切酶活性的元件。

[0164] 切割子-龟形探针的特征在于包含一个或多个切割元件,并且在探针序列中包含其自身连接模板,允许连接探针以形成闭合环状结构,而无需添加外部连接模板。

[0165] 因此,在一种优选设计中,切割子-龟形探针包括(图 6H):

[0166] 环状核酸探针,其包含:

[0167] I. 包含核酸序列的第一个部分和第三个部分,所述核酸序列互相至少 75% 互补并且各具有 3-100 个核苷酸的长度;

[0168] II. 包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,并且其中所述第二个部分具有 9-50 个核苷酸的长度;

[0169] III. 包含与靶核酸序列至少 75% 互补的核酸残基序列的第四个部分,并且其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸。

[0170] IV. 切割元件。

[0171] 由于经由包含在其序列内的发夹结构和 2 个互补序列所介导的切割子-龟形探针的分子内杂交,自我模板式连接是可能的。当这些互补序列杂交时,切割子-龟形探针的 5' - 末端和 3' - 末端变得接近,这使得能够连接探针以形成闭合环状结构。因此,在一个实施方案中,本发明涉及核酸探针,其包含:包含至少 75% 互补的核酸序列的第一个部分和第三个部分,和包含由所述第一个部分或所述第三个部分延伸的发夹结构的第二个核酸部分,以及切割元件,例如 75-100% 互补,或例如 80-100% 互补,或例如 85-100% 互补,90-100% 互补,或例如 95-100% 互补,或例如 100% 互补。

[0172] 应当理解,互补部分能够互相杂交。

[0173] 切割子-龟形探针可以包含一个或多个切割元件,并且切割元件可以位于杂交区域内或杂交区域的一个末端中(如果切割元件是反应性化学基团)。因此,与靶核酸分子杂交的切割子-龟形探针的这一部分可以分成两个或更多个杂交部分。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-龟形探针,其中所述一个或多个具有核酸内切酶活性的元件位于靶互补序列内部,从而将其分成两个或更多个部分,并且在另一实施方案中,本发明涉及切割子-龟形探针,其中所述具有核酸内切酶活性的元件是位于靶互补区域的一个末端中的反应性化学基团。

[0174] 然而,在一个优选实施方案中,使用一个切割元件,所述切割元件位于杂交部分内,从而将其分成两个部分。因此,在另一实施方案中,本发明涉及切割子-龟类型的核酸探针,其进一步包含第四个和第五个部分,它们各包含核酸残基序列,所述核酸残基序列与靶核酸序列至少 75% 互补,例如 75-100% 互补,或例如 80-100% 互补,或例如 85-100% 互补,或例如 90-100% 互补,或例如 95-100% 互补,或例如 100% 互补。关于 RNA,本发明的这个优选实施方案涉及切割子-龟类型的环状核酸探针,其包含核酸残基的第四个和第五个部分,其中所述第四个和第五个部分各包含与靶 RNA 序列至少 75% 互补的核酸残基序列。

[0175] 切割子-龟的第四个和第五个部分可以具有相同或不同的长度,只要它们均能够在反应条件下与靶核酸分子杂交。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的切割子-龟形探针的第四个部分可以具有 6-100 个核苷酸的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-龟类型的环状核酸探针,其中所述第四个部分的长度为 6-100 个核苷酸,例如 10-100 个核苷酸,或例如 10-80 个核苷酸,或例如 10-60 个核苷酸,或例如 10-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的切割子-龟形探针的第五个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-龟类型的环状核酸探针,其中所述第五个部分的长度是 6-100 个核苷酸,例如 10-100 个核苷酸,或例如 10-80 个核苷酸,或例如 10-60 个核苷酸,或例如 10-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸。

[0176] 切割子-龟形探针的第一个和第三个部分包含在互相杂交后能够(连同第二个部分一起)将探针折叠成开放环状结构的互补序列,所述开放环状结构可以连接成闭合环状结构(图 1H)。这些部分的长度必需具有允许在反应条件下进行杂交的大小。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-龟类型的环状核酸探针,其中所述第一个部分和第三个部分的长度各为 3-100 个核苷酸,例如 3-50 个核苷酸,或例如 3-40 个核苷酸,3-30 个核苷酸,或例如 3-20 个核苷酸,或例如 3-10 个核苷酸。

[0177] 切割子-龟形探针的第二个部分包含发夹,所述发夹对于在分子内杂交后使探针变成开放环状结构是重要的。这个部分的长度必需具有允许在反应条件下进行杂交的大小。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-龟类型的环状核酸探针,其中所述第二个部分的长度为 9-50 个核苷酸,例如 15-50 个核苷酸,或例如 15-40 个核苷酸,15-30 个核苷酸,或例如 10-20 个核苷酸,或例如 15-10 个核苷酸。

[0178] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :6) 的切割子-龟:

[0179] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACGCTACAGCCACACAGGCTAGCTACAACGAGTC TCCTCCCTAGCAAAACCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0180] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0181] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO:7) 的切割子-龟:

[0182] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCACATGTTTGGCTCCTCGGTAGCACCCGCAGGCTAGCTACAACGATGAGCGTTGGCGGTGTGTCCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0183] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0184] 挂锁探针和预先形成的环形探针均同样可以通过将一个或多个切割元件引入环形探针中而变成切割子探针(分别为切割子-挂锁和预先形成的切割子-环)。因此,在另一实施方案中,本发明涉及环状核酸探针,其为预先形成的环形探针或挂锁探针,其中所述探针包含一个或多个具有核酸内切酶活性的元件。

[0185] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子探针,其为环状核酸探针,包含:

[0186] i) 一个或多个部分,每个部分包含与靶核酸序列的区域至少 75% 互补的核酸残基序列,和

[0187] ii) 限定该特定探针的元件。

[0188] 在这个实施方案中,本发明可以进一步涉及切割子探针,其中与靶核酸序列的区域具有至少 75% 互补性的所述一个或多个部分的总长度为 6-100 个核苷酸。

[0189] 预先形成的切割子-环的特征在于包含一个或多个靶识别部分、一个或多个切割元件(一般而言与切割子探针一样),并且在其用作杂交探针前是闭合环状结构。这些类型的切割子探针优选可以通过在使用前连接切割子-龟来获得。切割子-龟形探针对于制备预先形成的切割子-环形探针是理想的,因为它们自我模板式的,因此可以进行连接以形成闭合环状结构而无需外部连接模板。外部连接模板将必须在杂交前从预先形成的切割子-环形探针中去除,以确保外部连接模板不会用作滚环引物而产生假信号。因为切割子-探针提供单分子检测,所以这种去除将必须绝对完全,这在实践中可能难以达到。

[0190] 因此,在一种优选设计中,预先形成的切割子-环形探针包含:

[0191] i) 一个或多个部分,每个部分包含与靶核酸序列的区域至少 75% 互补的核酸残基序列,和

[0192] ii) 限定该特定探针的元件,和

[0193] iii) 一个或多个切割元件,和

[0194] iv) 闭合环状结构,即无终止的主链。

[0195] 预先形成的切割子-环可以包含一个或多个切割元件,并且切割元件可以位于杂交区域内或杂交区域的一个末端中(如果切割元件是反应性化学基团)。因此,与靶核酸分子杂交的预先形成的切割子-环的这一部分可以分成两个或更多个杂交部分。因此,在一个实施方案中,本发明涉及预先形成的切割子-环形探针,其中所述一个或多个具有核酸内切酶活性的元件位于靶互补序列内部,从而将其分成两个或更多个部分,或其中所述具有核酸内切酶活性的元件是位于靶互补区域的一个末端中的反应性化学基团。

[0196] 在一个优选实施方案中,使用一个切割元件,所述切割元件位于杂交部分内,从而将其分成两个部分。因此,在一个实施方案中,本发明涉及预先形成的切割子-环类型的核酸探针,其进一步包含第一个和第二个部分,它们各包含核酸残基序列,所述核酸残基序列与靶核酸序列至少 75% 互补,例如 80-100% 互补,或例如 85-100% 互补,90-100% 互补,或

例如 95-100% 互补, 或例如 100% 互补。关于 RNA 靶, 本发明的一个优选实施方案涉及预先形成的切割子-环, 其中所述第一个和第二个部分各包含与靶 RNA 序列至少 75% 互补的核酸残基序列。

[0197] 预先形成的切割子-环的第一个和第二个部分可以具有相同或不同的长度, 只要它们均能够在反应条件下与靶核酸分子杂交。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的预先形成的切割子-环的第一个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及预先形成的切割子-环类型的环状核酸探针, 其中所述第一个部分的长度为 6-100 个核苷酸, 例如 10-100 个核苷酸, 或例如 10-80 个核苷酸, 或例如 10-60 个核苷酸, 或例如 10-40 个核苷酸, 或例如 10-30 个核苷酸。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的预先形成的切割子-环状探针的第二个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及环状核酸探针即预先形成的切割子-环, 其中所述第二个部分的长度为 6-100 个核苷酸, 例如 10-100 个核苷酸, 或例如 10-80 个核苷酸, 10-60 个核苷酸, 或例如 10-40 个核苷酸, 或例如 10-30 个核苷酸。

[0198] 切割子-挂锁探针的特征在于包含两个或更多个靶识别部分以及一个或多个切割元件(一般而言与切割子探针一样)。切割子-挂锁探针(图 1G) 具有两个或更多个部分, 所述部分各包含与靶核酸序列的区域至少 75% 互补的核酸残基序列, 从而使得能够使用靶核酸作为连接模板来进行外部模板式连接。

[0199] 因此, 在一种优选设计中, 切割子-挂锁探针包含(图 1G):

[0200] i) 两个或更多个部分, 每个部分包含与靶核酸序列的区域至少 75% 互补的核酸残基序列, 和

[0201] ii) 限定该特定探针的元件, 和

[0202] iii) 一个或多个切割元件。

[0203] 应当理解, 切割子-挂锁的环化/连接以及切割元件的结合都需要靶识别, 并且环化/连接和切割元件可能识别相同或不同的靶(图 1G)。

[0204] 通过使用置于挂锁探针的环化/连接元件内的切割元件, 环化和切割官能团识别相同的靶分子和那种靶分子的不同部分。如果切割元件置于负责挂锁探针环化的所述一个或多个靶识别部分外, 那么该切割子-探针可以识别两种或更多种靶分子, 或相同靶分子的两个或更多个部分。在后面一种情况下, 该切割子-探针将报告两种或更多种靶的共定位。

[0205] 切割子-挂锁可以包含一个或多个切割元件, 并且切割元件可以位于与靶杂交的游离核酸部分内, 或当切割元件是反应性化学基团时, 位于在最接近靶核酸分子 3' - 末端处进行杂交的游离核酸末端部分的一个末端中。因此, 与靶核酸分子杂交的切割子-挂锁的部分可以分成三个或更多个杂交部分。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及切割子-挂锁探针, 其中所述一个或多个具有核酸内切酶活性的元件位于靶互补序列内, 从而将其分成三个或更多个部分, 或者其中所述切割元件是位于杂交区域的一个末端中的反应性化学基团。

[0206] 在一个优选实施方案中, 使用位于杂交部分之一内的一个切割元件, 从而将切割子-挂锁的靶识别部分分成三个部分(图 1G)。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及切割子-挂锁类型的核酸探针, 其进一步包含第一个、第二个部分和第三个部分, 它们各包含

核酸残基序列,所述核酸残基序列与靶核酸序列至少 75% 互补,例如 75-100% 互补,例如 80-100% 互补,或例如 85-100% 互补,90-100% 互补,或例如 95-100% 互补,或例如 100% 互补。

[0207] 关于 RNA 靶,本发明的另一个优选实施方案涉及环状核酸探针即切割子-挂锁,其包含第一个、第二个和第三个部分的核酸残基,其中所述第一个、第二个和第三个部分各包含与靶 RNA 序列至少 75% 互补的核酸残基序列。

[0208] 切割子-挂锁的第一个、第二个和第三个部分可以具有相同或不同的长度,只要它们都能够在反应条件下与靶核酸分子杂交。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的预先形成的切割子-环形探针的第一个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-挂锁类型的环状核酸探针,其中所述第一个部分的长度为 6-100 个核苷酸,例如 6-100 个核苷酸,或例如 6-80 个核苷酸,或例如 6-60 个核苷酸,或例如 8-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的切割子-挂锁探针的第二个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及切割子-挂锁类型的环状核酸探针,其中所述第二个部分的长度为 6-100 个核苷酸,例如 6-100 个核苷酸,或例如 6-80 个核苷酸,6-60 个核苷酸,或例如 8-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸。包含与靶核酸序列互补的核酸序列的切割子-挂锁探针的第三个部分可以具有 6-100 的线性长度。因此,在一个实施方案中,本发明涉及环状核酸探针即切割子-挂锁,其中所述第三个部分的长度为 6-100 个核苷酸,例如 6-100 个核苷酸,或例如 6-80 个核苷酸,6-60 个核苷酸,或例如 8-40 个核苷酸,或例如 10-30 个核苷酸。

[0209] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :8) 的切割子-挂锁:

[0210] 5' -P-CATCGGGAGAAGCTCATAGATTTATTTCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTTGGATGTCTGACAGTCTAGGCTAGCTACAACGATGGTTTGCAGAGACCCAGTGGC-3' ,

[0211] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0212] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :9) 的切割子-挂锁:

[0213] 5' -P-CCATGTCAAATCACTCCCATTTATTTCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTT-ACTTGGATGTCTGTAAAGAGAGGCTAGCTACAACGAGATGGCACCTGGCACCC-3' ,

[0214] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0215] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :10) 的切割子-挂锁:

[0216] 5' -P-TACTTCATCGCATCTTTGTGTTTATTTCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTT-ACTTGGATGTCTAGGGAAAAGGCTAGCTACAACGATAAGAAATTCGATGCTGC-3' ,

[0217] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0218] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :11) 的切割子-挂锁:5' -P-TAATTACTGATTGTGTATCTTTTATTTCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTT-AC TTGGATGTCTAGAACGTAGGCTAGCTACAACGAAAATAGTAGTCATTTGC-3' ,

[0219] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0220] 因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :12) 的切割

子-挂锁：

[0221] 5' -P-CTAGCAAAACCTCTCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTTTACAGCCAGG-CTAGCTACAACGAACACGTCTCCTCC-3' ，

[0222] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0223] 因此，在另一实施方案中，本发明涉及包含下列序列 (SEQ ID NO :13) 的切割子-挂锁：

[0224] 5' -P-CGCACTGAGCGTTCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTTGGACTTGAGG-CTAGCTACAACGACTCGGGTCGGTAGCAC-3' ，

[0225] 其中 P 是 5' - 磷酸。

[0226] 上文描述的不同探针可以用于在溶液中、原位和在如下文详细描述的进行阵列的测定法中检测核酸。

[0227] 通过靶引发的滚环复制来检测核酸分子具有由于反应的靶引发特征而引起的强信号扩增和局域化信号的优点。

[0228] 在本发明的一个方面，靶引发的滚环反应从核酸分子的天然 3' - 末端开始引发。因为这种方法需要在 RNA 中探针进行杂交的区域处或附近存在 3' - 末端，所以靶 RNA 优选可以是非多腺苷酸化的 RNA，例如但不限于，来自 EB 病毒的 EBER1 和 EBER2、腺病毒编码的小 RNA' s VA1 和 VA2、核糖体 RNA' s、端粒酶复合物 (hTERC) 的 RNA 部分、小干扰 RNA' s (siRNA' s) 和微小 RNA' s (miRNA' s)。因此，在一个实施方案中，本发明涉及用于检测靶 RNA 分子的方法，所述方法包括使环状核酸探针与靶 RNA 序列在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交，所述环状核酸探针是预先形成的环形探针、挂锁探针、或龟类型的环状核酸探针；进行滚环复制；和检测滚环产物。

[0229] 因此，在这个实施方案中，本发明可以涉及包括下列步骤的方法：

[0230] i) 获得包含所述靶 RNA 分子的制剂，和

[0231] ii) 提供所述环状核酸探针，和

[0232] iii) 使所述探针与所述靶 RNA 分子在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交，和

[0233] iv) 用所述探针作为模板来实施滚环复制，

[0234] 并通过使滚环产物可视化来检测所述靶 RNA 分子。

[0235] 备选地，本发明还涉及用于检测靶核酸分子的方法，所述方法包括使环状核酸探针与靶核酸序列在所述靶核酸分子的 3' - 末端处或附近进行杂交，所述环状核酸探针是预先形成的环形探针、挂锁探针或根据本发明的环状核酸探针；进行滚环复制；和检测滚环产物，其中所述靶核酸是 RNA 分子。

[0236] 在一个实施方案中，所述方法包括：

[0237] i) 获得包含所述靶 RNA 分子的制剂，和

[0238] ii) 提供所述环状核酸探针，和

[0239] iii) 使所述探针与靶 RNA 分子在所述靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交，和

[0240] iv) 使用所述靶核酸分子作为连接模板或使用对于所述环状核酸探针来说内在的连接模板，来连接环状探针以形成闭合环状结构，



[0241] v) 用所述探针作为模板来实施滚环复制,

[0242] vi) 通过使滚环产物可视化来检测所述靶 RNA 分子,

[0243] 其中步骤 iv) 也可以在步骤 iii) 之前进行。

[0244] 如果所使用的探针是龟形探针或挂锁探针,那么在实施滚环复制前需要连接步骤。因此,在这个实施方案中,本发明可以进一步涉及这样的方法,其中所述探针是挂锁探针或龟类型的环状核酸探针,其中所述方法进一步包括连接所述探针以形成闭合环状结构的步骤(图 5 和 7)(实施例 3 和 5)。

[0245] 然而,如果靶 DNA 是染色质 DNA 或包含修饰的 DNA,所述修饰为例如由于降解、制备或固定而产生的修饰,例如向核酸碱基添加单羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH),导致通过亚甲基桥接而产生腺嘌呤基团的二聚化,那么通过使用龟形探针获得的自我模板式连接可能是优选的。因此,在另一实施方案中,本发明涉及用于检测靶 DNA 分子的方法,所述方法包括使龟类型的环状核酸探针与靶 DNA 序列在所述靶 DNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交;进行滚环复制;和检测滚环产物。

[0246] 通过靶引发的滚环复制来检测核酸分子还可以原位进行,这具有下列几个优点:它提供关于某些 RNA 分子的表达的信息;它揭示出所述 RNA 在哪种细胞类型中发现;并且它提供关于在该细胞中所述 RNA 存在于何处的信息,例如存在于细胞核或细胞质中。由于集中在基于阵列的技术,通常低估了单细胞检测的重要性以及 RNA 种类在细胞内的定位。然而,因为不正确定位的 RNA 可以对细胞具有有害后果,例如如果信使 RNA 或核糖体 RNA 保留在细胞核中,那么 RNA 在细胞内的定位不能被忽视。同样,大多数其他技术(例如基于 PCR 和基于阵列的)使用从几种细胞中提取的 RNA,并因此在不同类型的细胞上求平均值,所述不同类型的细胞各取决于细胞类型和来自周围细胞的调节而具有不同表达谱。因此,表达谱将通常代表在一组细胞上的平均值。因此,如果例如一半的细胞不表达某种 RNA,而另一半以高于正常的量表达这种 RNA,那么结论可以是所有细胞都以正常量表达该 RNA。因此,在一个实施方案中,本发明涉及其中所述靶 RNA 分子的检测原位发生的方法(图 5-7)(实施例 3-5)。

[0247] 在实践中,这个实施方案可以例如采取下列形式:

[0248] 取决于靶 RNA 分子是作为组织还是作为细胞提供,可能需要不同的预处理,例如以石蜡包埋组织的脱蜡形式,或如果细胞是例如植物或酵母,以细胞壁降解的形式。然而,预处理后的操作程序对于不同细胞或组织是类似的,取决于所使用的环形探针类型而对操作程序有小改变(例如如果使用预先形成的环,那么省略连接步骤)。

[0249] 探针在杂交混合物中混合至 0.001-100  $\mu$ M,优选 0.01-10M 的终浓度。所使用的杂交混合物包含:20%甲酰胺、2xSSC、5%甘油、1  $\mu$ g/ $\mu$ l 载体 DNA。这种杂交混合物还可以包含载体 RNA,并且载体 DNA、载体 RNA、甲酰胺和甘油的量可以改变以适合特殊需要。将杂交混合物加入至包含靶核酸的制剂中并于 95°C 孵育 0.5-60 分钟,优选 2-10 分钟,随后冷却至 37°C 并孵育 5-30 分钟(延伸的杂交可以于 37°C 进行过夜)。备选地,杂交可以于 37°C 进行而无需加热至 95°C。应当理解,杂交温度可以例如依据所使用的探针的解链温度而不同。

[0250] 探针杂交后,可以使用 T4 DNA 连接酶来进行连接。取决于所使用的环形探针的类型,对于连接需要不同的条件,并且如果所述环形探针是预先形成的环,那么省略连接步

骤。

[0251] 优选地,所使用的环形探针是龟形探针,因为龟形探针包含其自身的连接模板。这允许连接反应能够用几种不同的 DNA 连接酶来进行,例如但不限于下列连接酶中的任何一种:T4 DNA 连接酶、Tsc 连接酶、Tth 连接酶、Pfu 连接酶、Taq 连接酶、Amp 连接酶 (Ampligase) 或大肠杆菌 DNA 连接酶。优选地,T4 DNA 连接酶 (Fermentas) 以 0.05-0.15U/ $\mu$ l 的浓度使用,备选地可以使用 0.001-0.7U/ $\mu$ l。可以加入 RNA 酶抑制剂,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂 (Fermentas)。使用 0.01-2U/ $\mu$ l,优选 0.5-1.5U/ $\mu$ l Ribolock (Fermentas) 的终浓度。如果连接反应在细胞或组织中发生,那么添加 BSA 至 0.05-0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l,备选地 0.01-1  $\mu$ g/ $\mu$ l 的终浓度可以改善酶促反应。在适合于所选连接酶的温度下使用 2 分钟-24 小时,优选 5 分钟-5 小时的孵育时间。

[0252] 备选地,环形探针可以是使用靶 RNA 作为模板来进行连接的挂锁探针。这种连接反应比使用龟形探针获得的连接反应具有更低的效率,并且在缓冲液中使用 T4 DNA 连接酶最有效地进行(根据 Nilsson M. 等人, *Nat Biotechnol.* 18(7):791-3. (2000)),所述缓冲液包含:10mM Tris-HCL (在 25°C 下 pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10  $\mu$ M ATP 和 0.1U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (Fermentas)。如果连接反应在细胞或组织中发生,那么添加 BSA 至 0.05-0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l,备选地 0.01-1  $\mu$ g/ $\mu$ l 的终浓度可以改善酶促反应。在 37°C 下使用 5 分钟-24 小时,优选 15 分钟-5 小时的孵育时间。备选地,可以使用 T4 RNA 连接酶或 Amp 连接酶。

[0253] 如果探针不是正好在靶核酸的 3' - 末端处杂交,那么可以使用包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性的酶以使靶核酸分子的 3' - 末端凹陷至滚环复制可以开始的点。优选地,这种酶是包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性并能够进行滚环复制的 DNA 聚合酶,例如但不限于,Phi29 DNA 聚合酶。然而,如果所使用的聚合酶不能提供所需的 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性,那么可以使用包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶或包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性的另一种聚合酶。

[0254] 滚环反应使用靶 RNA 的 3' - 末端作为滚环复制的引物来进行。优选地,所使用的聚合酶是 Phi29 DNA 聚合酶,因为它包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性、强的链置换活性和强的持续合成能力 (processivity)。使用的终浓度为 0.001-2U/ $\mu$ l,优选 0.05-1.5U/ $\mu$ l 的 Phi29 聚合酶 (Fermentas)。使用 0.001-2mM,优选 0.05-1mM 的最终 dNTP 浓度。备选地,可以使用其他聚合酶,例如 T7 DNA 聚合酶或 Sequenase Version 2.0 T7 DNA 聚合酶。在对于所选聚合酶的最佳温度上,使用 10 分钟-24 小时,优选 20 分钟-4 小时的孵育时间。可以加入 RNA 酶抑制剂,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂 (Fermentas)。如果反应在细胞或组织中发生,那么添加 BSA 至 0.05-0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l,备选地 0.01-1  $\mu$ g/ $\mu$ l 的终浓度可以改善酶促反应。对于某些聚合酶,单链结合蛋白 (SSB) 的添加强烈增加了滚环复制的效率。因为 Phi29 DNA 聚合酶不被 SSB 增强,所以优选使用 0  $\mu$ g/ $\mu$ l SSB 的浓度。备选地,可以使用 0.001-0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l 的浓度。应当理解,滚环反应的不同变化形式例如但不限于高分枝反应也可用于信号扩增。

[0255] 延伸的速度和持续时间可以通过改变 dNTP、聚合酶、环、引物和 SSB 的浓度来控制。此外,温度和缓冲条件是可调整的。

[0256] 在一个优选实施方案中,产物使用与滚环产物的一部分互补的经标记的寡核苷酸(例如用荧光团标记的)来检测。此类寡核苷酸加入至 0.001-10  $\mu$ M,优选 0.01-0.5  $\mu$ M 的

终浓度。如果是多重的 (multiplexed), 那么这些浓度间隔应用于每种寡核苷酸。在 37°C 下使用 5 分钟 -24 小时, 优选 10 分钟 -2 小时的孵育时间。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除任何未结合的经标记的寡核苷酸, 并通过 70%、85% 和 99% 的系列乙醇来脱水。备选地, 滚环产物可以通过如上所述在滚环复制过程中掺入经标记的核苷酸 (天然或人工核苷酸) 来检测。风干载玻片, 加入包含 DAPI 的封固溶液 (mounting solution) (例如 VectorShield+DAPI), 并分析载玻片。

[0257] 对于纯化的 RNA, 例如从组织或细胞中提取的 RNA, 可以使用包括类似于在组织和细胞中的检测的步骤的操作程序。这可以通过将靶 RNA 固定在固体支持物 (例如, 显微镜载玻片、ELISA 平板、芯片、珠等) 上以阵列形式来进行。因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及其中所述靶 RNA 固定在固体支持物上的方法。原则上, RNA 可以非特异性地附着, 例如经由抗体, 或特异性地附着, 例如经由捕获寡核苷酸。如果 RNA 的附着是非特异性的, 那么探针需要提供靶特异性。然而, 如果靶 RNA 是特异性地附着, 例如经由捕获寡核苷酸, 那么特异性可以由捕获寡核苷酸专门提供。识别个体外显子的捕获寡核苷酸可以例如位于阵列中, 并且可以使用包含聚 -T 靶互补区域的龟形探针以显示哪个外显子作为多腺苷酸化的 RNA 而存在。如果靶 RNA 是非腺苷酸化的, 那么环状探针例如龟形探针可以被设计为在靶 RNA 分子的 3' - 末端处或附近进行杂交, 并由此提供区分特定 RNA's 所需的特异性。因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及进一步包括下列步骤的方法:

[0258] i) 提供附着至固体支持物的捕获寡核苷酸, 和

[0259] ii) 使所述捕获寡核苷酸与所述靶核酸分子杂交, 从而将所述靶核酸分子附着至所述固体支持物。

[0260] 下列步骤举例说明了可以如何进行靶 RNA 分子的基于阵列的检测, 使用经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片作为固体支持物, 与用生物素标记的捕获寡核苷酸以及龟形 - 探针相组合。

[0261] 在实践中, 这个实施方案可以例如采取下列形式:

[0262] a) 使捕获寡核苷酸附着至经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片, 和

[0263] b) 使靶 RNA 与捕获 - 寡核苷酸杂交, 和

[0264] c) 使龟形 - 探针与靶 RNA 杂交, 和

[0265] d) 连接龟形 - 探针以形成闭合环状结构, 和

[0266] e) 可选地, 修饰 / 凹陷 3' - 末端至滚环复制可以开始的点, 和

[0267] f) 滚环复制, 和

[0268] g) 检测滚环产物。

[0269] 将与靶 RNA 中的区域互补的捕获寡核苷酸附着至经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片, 使用浓度为 0.01pmol-1nmol 的捕获寡核苷酸, 优选使用 0.1-100pmol 的偶联有生物素的寡核苷酸。优选地, 使用包含 0.1M Tris-HCl (在 25°C 下 pH7.5)、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 -20 的缓冲液。备选地, 杂交可以在 pH 为 5-8 的广泛范围的其他缓冲液中进行。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除任何未结合的捕获寡核苷酸。

[0270] 为了使靶 RNA 固定在固体支持物上; 向包含附着的捕获寡核苷酸的载玻片加入 0.01-10pmol RNA, 备选地 0.001 pmol-1 μmol RNA, 优选地在包含 0.1M Tris-HCl (在 25°C 下 pH7.5)、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 -20 的缓冲液中进行。备选地, 杂交可以在 pH 为 5-8

的广泛范围的其他缓冲液中进行。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除任何未结合的捕获寡核苷酸。

[0271] 龟形-探针与靶 RNA 的杂交通过向载玻片加入龟形-探针来进行,所述载玻片包含通过捕获寡核苷酸而附着至载玻片的靶 RNA,龟形探针的浓度为 0.1-100pmol,备选地 0.002pmol-2 $\mu$ mol,在包含 0.1M Tris-HCl(在 25 $^{\circ}$ C 下 pH7.5)、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20 的缓冲液中进行。备选地,杂交可以在 pH 为 5-8 的广泛范围的其他缓冲液中进行。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除未结合的捕获寡核苷酸。

[0272] 可以使用(但不限于)下列连接酶中的任何一种来连接龟形-探针以形成闭环环状结构:T4 DNA 连接酶、Tsc 连接酶、Tth 连接酶、Pfu 连接酶、Taq 连接酶、Amp 连接酶或大肠杆菌 DNA 连接酶。优选地,T4DNA 连接酶(Fermentas)以 0.1-1U/ $\mu$ l 的浓度使用,备选地可以使用 0.0001-2U/ $\mu$ l。可以加入 RNA 酶抑制剂,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂(Fermentas),终浓度为 0.01-2U/ $\mu$ l,优选 0.5-1.5U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas)。在适合于所选连接酶的温度下使用 2 分钟-24 小时,优选 10 分钟-60 分钟的孵育时间。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除所述酶。

[0273] 滚环反应使用靶 RNA 的 3'-末端作为滚环复制的引物来进行。优选地,所使用的聚合酶是 Phi29 DNA 聚合酶,因为它包含 3' $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性、强的链置换活性和强的持续合成能力(processivity)。使用的终浓度为 0.001-2U/ $\mu$ l,优选 0.05-1.5U/ $\mu$ l 的 Phi29 聚合酶(Fermentas)。使用 0.001-2mM,优选 0.05-1 mM 的最终 dNTP 浓度。备选地,可以使用其他聚合酶,例如 T7 DNA 聚合酶或 Sequenase Version 2.0 T7 DNA 聚合酶。在对于所选聚合酶的最佳温度上,使用 10 分钟-24 小时,优选 20 分钟-4 小时的孵育时间。可以加入 RNA 酶抑制剂,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂(Fermentas)。如果反应在细胞或组织中发生,那么添加 BSA 至 0.05-0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l,备选地 0.01-1 $\mu$ g/ $\mu$ l 的终浓度可以改善酶促反应。对于某些聚合酶,单链结合蛋白(SSB)的添加强烈增加了滚环复制的效率。因为 Phi29 DNA 聚合酶不被 SSB 增强,所以优选使用 0 $\mu$ g/ $\mu$ l SSB 的浓度。备选地,可以使用 0.001-0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l 的浓度。应当理解,滚环反应的不同变化形式例如但不限于高分枝反应也可用于信号扩增。

[0274] 延伸的速度和持续时间可以通过改变 dNTP、聚合酶、环、引物和 SSB 的浓度来控制。此外,温度和缓冲条件是可调整的。

[0275] 在一个优选实施方案中,产物使用与滚环产物的一部分互补的经标记的寡核苷酸(例如用荧光团标记的)来检测。此类寡核苷酸加入至 0.001-10 $\mu$ M,优选 0.01-0.5 $\mu$ M 的终浓度。如果是多重的,那么这些浓度间隔应用于每种寡核苷酸。在 37 $^{\circ}$ C 下使用 5 分钟-24 小时,优选 10 分钟-2 小时的孵育时间。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除任何未结合的经标记的寡核苷酸,并通过 70%、85%和 99%的系列乙醇来脱水。备选地,滚环产物可以通过如上所述在滚环复制过程中掺入经标记的核苷酸(天然或人工核苷酸)来检测。风干载玻片,加入包含 DAPI 的封固溶液(例如 VectorShield+DAPI),并分析载玻片。

[0276] 备选地,可以组合某些步骤,例如步骤 b-d),导致产生更简单的方案,其包括:

[0277] a) 使捕获寡核苷酸附着至经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片,和

[0278] b) 使靶 RNA 与捕获寡核苷酸杂交,使龟形-探针与靶 RNA 杂交,和连接龟形-探针,和

[0279] c) 滚环复制,和

[0280] d) 检测滚环产物。

[0281] 将与靶 RNA 的一部分互补的捕获寡核苷酸附着至经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片,使用浓度为 0.01pmol-1nmol 的捕获寡核苷酸。优选地,使用 0.1-100pmol 的偶联有生物素的寡核苷酸。优选地,使用包含 0.1M Tris-HCl(在 25°C 下 pH7.5)、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20 的缓冲液。备选地,杂交可以在 pH 为 5-8 的广泛范围的其他缓冲液中进行。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除未结合的捕获寡核苷酸。

[0282] 为了在一个步骤中使靶 RNA 固定在固体支持物上、使龟形探针与靶 RNA 杂交以及连接龟形探针;向包含附着的捕获寡核苷酸的载玻片同时加入靶 RNA、探针和连接酶,在适合于所选连接酶的连接缓冲液中进行。浓度可以类似于上文所述的更复杂的操作程序;例如在 1xT4DNA 连接酶缓冲液中混合的 0.01-10pmol RNA,备选地 0.001pmol-1 $\mu$ mol RNA, 0.1-100pmol 龟形探针,备选地 0.002pmol-2 $\mu$ mol,以及 0.1-1U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶,备选地 0.001-2U/ $\mu$ l。可以将 RNA 酶抑制剂加入至该混合物中,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂 (Fermentas),终浓度为 0.01-2U/ $\mu$ l,优选 0.5-1.5U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas)。在适合于所选连接酶的温度下使用 2 分钟-24 小时,优选 10 分钟-60 分钟的孵育时间。在洗涤缓冲液中洗载玻片涂以去除未结合的 RNA 和探针,并去除所述酶。

[0283] 滚环反应使用靶 RNA 的 3'-末端作为滚环复制的引物来进行。优选地,所使用的聚合酶是 Phi29 DNA 聚合酶,因为它包含 3'  $\rightarrow$ 5' 核酸外切酶活性、强的链置换活性和强的持续合成能力(processivity)。使用的终浓度为 0.001-2U/ $\mu$ l,优选 0.05-1.5U/ $\mu$ l 的 Phi29 聚合酶 (Fermentas)。使用 0.001-2mM,优选 0.05-1mM 的最终 dNTP 浓度。备选地,可以使用其他聚合酶,例如 T7 DNA 聚合酶或 Sequenase Version 2.0 T7 DNA 聚合酶。在对于所选聚合酶的最佳温度上,使用 10 分钟-24 小时,优选 20 分钟-4 小时的孵育时间。可以加入 RNA 酶抑制剂,例如但不限于 Ribolock RNA 酶抑制剂 (Fermentas)。如果反应在细胞或组织中发生,那么添加 BSA 至 0.05-0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l,备选地 0.01-1 $\mu$ g/ $\mu$ l 的终浓度可以改善酶促反应。对于某些聚合酶,单链结合蛋白(SSB)的添加强烈增加了滚环复制的效率。因为 Phi29 DNA 聚合酶不被 SSB 增强,所以优选使用 0 $\mu$ g/ $\mu$ l SSB 的浓度。备选地,可以使用 0.001-0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l 的浓度。应当理解,滚环反应的不同变化形式例如但不限于高分枝反应也可用于信号扩增。

[0284] 延伸的速度和持续时间可以通过改变 dNTP、聚合酶、环、引物和 SSB 的浓度来控制。此外,温度和缓冲条件是可调整的。

[0285] 在一个优选实施方案中,产物使用与滚环产物的一部分互补的经标记的寡核苷酸(例如用荧光团标记的)来检测。此类寡核苷酸加入至 0.001-10 $\mu$ M,优选 0.01-0.5 $\mu$ M 的终浓度。如果是多重的,那么这些浓度间隔应用于每种寡核苷酸。在 37°C 下使用 5 分钟-24 小时,优选 10 分钟-2 小时的孵育时间。在洗涤缓冲液中洗涤载玻片以去除任何未结合的经标记的寡核苷酸,并通过 70%、85%和 99%的系列乙醇来脱水。备选地,滚环产物可以通过如上所述在滚环复制过程中掺入经标记的核苷酸(天然或人工核苷酸)来检测。风干载玻片,加入包含 DAPI 的封固溶液(例如 VectorShield+DAPI),并分析载玻片。

[0286] 此外,如果捕获寡核苷酸在固体支持物上合成,那么步骤 a) 可以省略,从而将方案减少至:

[0287] a) 使靶 RNA 与捕获寡核苷酸杂交,使龟形-探针与靶 RNA 杂交,和连接龟形-探针,和

[0288] b) 滚环复制,和

[0289] c) 检测滚环产物。

[0290] 如果使用预先形成的环形探针,那么在该复杂方案中可以省略连接步骤。在该简化方案中,可以省略连接酶,并且靶 RNA 在固体支持物上的固定和龟形探针与靶 RNA 的杂交可以优选地使用洗涤缓冲液代替连接酶缓冲液来进行。

[0291] 如前所述,将靶 RNA 附着至固体支持物上的捕获寡核苷酸可以优选地在该固体支持物上合成。这可以通过标准化学方法来完成,例如  $\beta$ -氰乙基亚磷酰胺化学。备选地,捕获寡核苷酸可以在合成后通过例如但不限于链霉抗生物素蛋白/生物素复合物而附着至固体支持物。因此,在一个实施方案中,本发明涉及其中捕获寡核苷酸直接在载体上合成的方法,和在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中捕获寡核苷酸用标记物进行标记,并且通过所述标记物与固定在固体支持物上的受体分子的结合而附着至固体支持物。

[0292] 如前所述,探针可以在靶核酸分子的 3' - 末端处或附近杂交,无论所述探针是龟形探针、预先形成的环形探针,还是挂锁探针。因此,在一个实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述环状核酸探针与来自所述靶核酸分子 3' - 末端的 25 个或更少的核苷酸杂交,例如 0-25 个核苷酸,或例如 0-20 个核苷酸,或例如 0-15 个核苷酸,或例如 0-10 个核苷酸,或例如 0-5 个核苷酸,或例如 4 个核苷酸,或例如 3 个核苷酸,或例如 2 个核苷酸,或例如 1 个核苷酸,或例如 0 个核苷酸。

[0293] 如果探针不是正好在紧邻靶核酸的 3' - 末端处杂交,那么可以使用包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶以使靶核酸分子的 3' - 末端凹陷至滚环复制可以开始的点。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其进一步包括用包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶来使靶核酸分子的 3' - 末端凹陷。所述包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶可以是例如包含 3' ->5' 核酸外切酶的聚合酶或核酸外切酶。因此,在另外一个实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶选自具有 3' ->5' 核酸外切酶活性的聚合酶和具有 3' ->5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。优选地,这种酶是包含 3' ->5' 核酸外切酶活性并能够进行滚环复制的 DNA 聚合酶,例如但不限于,Phi29 DNA 聚合酶。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶是包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶。然而,如果所使用的聚合酶不能够提供所需的 3' ->5' 核酸外切酶活性,那么可以使用包含 3' ->5' 核酸外切酶活性并能够使靶核酸的 3' - 末端凹陷的核酸外切酶。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的酶是包含 3' ->5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。

[0294] 在第二个方面,本发明涉及使用切割子探针来检测靶核酸分子的方法,所述切割子探针在与靶核酸分子杂交时能够产生其自己的 3' - 末端。切割子探针可以是切割子-龟形探针(图 1H)、预先形成的切割子-环形探针(图 1E-F)或切割子-挂锁探针(图 1G)。因此,在下列部分中,应当理解所有提及的探针包含切割子元件,除非另有说明。

[0295] 因为切割子探针在杂交后产生其自己的 3' - 末端,所以本发明的方法能够对靶的任何最大长度起作用。然而,应当存在足够的核酸残基以确保在反应条件下靶核酸和切

割子探针之间的杂交。如果探针和其靶之间的杂交例如通过掺入增加解链温度的核酸残基例如 PNA 或 LNA 来增强,那么可以扩展确保杂交所需的核苷酸下限。因此,在一个实施方案中,本发明涉及用于检测靶核酸分子的方法,所述方法包括使探针与靶核酸分子杂交,所述探针是龟形探针类型的环状核酸探针、预先形成的环形探针或挂锁探针;用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,以在靶核酸分子内产生 3' - 末端;由所述新的 3' - 末端进行滚环复制;和检测滚环产物。

[0296] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及包括下列步骤的方法:

[0297] i) 获得包含所述靶核酸分子的制剂,和

[0298] ii) 提供所述环状核酸探针,和

[0299] iii) 使所述探针与所述靶核酸分子杂交,和

[0300] iv) 用具有核酸内切酶活性的元件切割所述靶核酸分子,在所述靶核酸分子内产生新的 3' - 和 5' - 末端,和

[0301] v) 用所述探针作为模板从在所述靶核酸分子内的所述新的 3' - 末端开始实施滚环复制,

[0302] 并通过使滚环产物可视化来检测所述靶核酸分子。

[0303] 由切割子探针所包含的切割元件使得该探针能够切割靶核酸,从而在它进行杂交之处产生新的 3' - 末端(图 3b)。因此,它可以靶向任何核酸分子的任何区域,使得能够检测例如在 3' - 末端处多腺苷酸化的真核生物信使 RNA。切割子探针因此对于检测信使 RNA,或其中不存在用于探针 - 杂交的合适 3' - 末端的其他 RNA 种类是理想的。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中所述靶核酸分子是 RNA 分子的方法。

[0304] 所述用于检测靶核酸分子的方法可以使用任何切割子探针。优选使用切割子 - 龟,且备选地可以使用预先形成的切割子 - 环或切割子 - 挂锁。如果使用的切割子探针是切割子 - 龟或切割子 - 挂锁,那么在滚环复制步骤前需要连接该探针以形成闭合环状结构的步骤。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中所述探针是切割子 - 龟类型的环状核酸探针、或切割子 - 挂锁探针的方法,并且所述方法包括连接所述探针以形成闭合环状结构的进一步步骤。

[0305] 如前所述,通过靶引发的滚环复制来检测核酸分子还可以原位进行,这具有下列几个优点:它提供关于某些 RNA 分子的表达的信息;它揭示出所述 RNA 在哪种细胞类型中发现;并且它提供关于在该细胞中所述 RNA 存在于何处的信息,例如存在于细胞核或细胞质中。由于集中在基于阵列的技术,通常低估了单细胞检测的重要性以及 RNA 种类在细胞内的定位。然而,因为不正确定位的 RNA 可以对细胞具有有害后果,例如如果信使 RNA 或核糖体 RNA 保留在细胞核中,那么在细胞内的定位不能被忽视。同样,大多数其他技术(例如基于 PCR 和基于阵列的)使用从几种细胞中提取的 RNA,并因此在不同类型的细胞上求平均值,所述不同类型的细胞各取决于细胞类型和来自周围细胞的调节而具有不同表达谱。因此,表达谱将通常代表在一组细胞上的平均值。因此,如果例如一半的细胞不表达某种 RNA,而另一半以高于正常的量表达这种 RNA,那么结论可以是所有细胞都以正常量表达该 RNA。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中原位检测所述靶核酸分子的方法,并且所述方法进一步包括将包含靶核酸分子的细胞或组织固定在表面上(标准细胞学或组织学制备物)(图 8)(实施例 6)。

[0306] 切割子探针可以以基于阵列的方式使用,类似于使用龟形-探针(不含切割子元件)的基于阵列的方法。然而,尽管使用龟形探针(不含切割子元件)的基于阵列的方法受到在靶核酸中的探针结合区域处或附近需要合适的3'-末端这一要求的限制,但使用切割子探针的基于阵列的方法可以检测任何核酸,因为它在杂交后产生新的3'-末端。

[0307] 此类基于阵列的检测通过将靶核酸固定在固体支持物(例如显微镜载玻片、ELISA 平板、芯片、珠等)上来进行。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中所述靶核酸分子固定在固体支持物上的方法。如果核酸分子的滚环检测以基于阵列的形式进行,那么除了关于使用切割子探针的核酸检测已提及的步骤之外该方法还将包括一些另外步骤。因此,在另一实施方案中,本发明涉及进一步包括下列步骤的方法:

[0308] i) 提供附着至固体支持物的捕获寡核苷酸,和

[0309] ii) 使所述捕获寡核苷酸与所述靶核酸分子杂交,从而将所述靶核酸分子附着至所述固体支持物。

[0310] 使用切割子探针的此类方法看起来特别有希望用于 RNA 检测,因为切割子探针可以用于检测不同的剪接变体或不同的 RNA 种类。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中所述靶核酸分子是 RNA 的方法(图 4)(实施例 2)。

[0311] 将靶 RNA 附着至固体支持物的捕获寡核苷酸可以优选在固体支持物上合成。这可以通过标准化学方法来完成,例如  $\beta$ -氰乙基亚磷酸胺化学,备选地,捕获寡核苷酸可以在合成后通过例如但不限于链霉抗生物素蛋白/生物素复合物或共价连接(例如来自 AmershamBoisciences 的 Codelink 活化的载玻片)而附着至固体支持物。因此,在一个实施方案中,本发明涉及其中捕获寡核苷酸直接在载体上合成的方法,和在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中捕获寡核苷酸用标记物进行标记,并且通过所述标记物与固定在固体支持物上的受体分子的结合而附着至固体支持物。

[0312] 此外,当使用切割子探针时,核酸分子可以非特异性地结合至固体支持物,例如经由抗体,并且切割子探针随后可以用于选择单个特异性靶核酸。因此,在一个实施方案中,本发明涉及其中靶核酸分子经由抗体附着至固体支持物的方法。此类抗体可以例如针对多腺苷酸化的信使 RNA 的 5'-帽。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中靶 RNA 分子通过靶向所述核酸分子的 5'-帽的抗体而附着至固体支持物,这是直接或间接的,例如经由 CAP 结合蛋白。

[0313] 当使用切割子探针用于切割靶核酸时,结果所得的对于引发滚环复制来说所需的新的 3'-末端可能需要进行修饰以便聚合酶或核酸外切酶识别该 3'-末端。通常,该 3'-末端将包含羟基,但如果由切割子探针所包含的切割元件是例如 10-23 或 8-17 DNA 核酶,那么产生的 3'-末端将是包含 2',3'-环状磷酸的一个碱基突出端(图 3A)。此类 2',3'-环状磷酸将抑制至少某些聚合酶,例如优选的聚合酶(Phi29DNA 聚合酶),因此可能需要修饰步骤(图 4E)。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中修饰所述靶核酸分子的所述新的 3'-末端以获得游离的羟基。

[0314] 由大多数 DNA 核酶产生的 2',3'-环状磷酸的去除可以使用 T4 多核苷酸激酶来完成,所述 T4 多核苷酸激酶包含激酶和磷酸酶活性(比较图 4D 和 4E)。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中所述靶核酸分子的所述新的 3'-末端被 T4 多核苷酸激酶修饰。备选地,如果 DNA 核酶是例如 17E DNA 核酶,所述 17E DNA 核酶已报道产生



3' - 磷酸 (或 2' - 磷酸) 而不是 2', 3' - 环状磷酸 (Brown AK 等人, Biochemistry 17; 42(23):715 2-61(2003)), 那么包含磷酸酶活性的任何酶可以用于修饰该 3' - 末端, 例如但不限于牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、细菌碱性磷酸酶 (BAP) 和虾碱性磷酸酶 (SAP)。

[0315] 如果切割元件是例如 10-23DNA 核酶、8-17DNA 核酶或 17E DNA 核酶, 那么在靶核酸的新的 3' - 末端产生一个碱基突出端。这种一个碱基突出端可能需要被去除以便该 3' - 末端引发滚环复制。包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶可以用于去除该一个碱基突出端。因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及这样的方法, 其中所述靶核酸分子的所述新的 3' - 末端被包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶修饰。所述包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶可以是例如包含 3' →5' 核酸外切酶的聚合酶或核酸外切酶。因此, 在另外一个实施方案中, 本发明涉及其中所述靶核酸分子的所述新的 3' - 末端被酶修饰的方法, 所述酶选自具有 3' →5' 核酸外切酶活性的聚合酶和具有 3' →5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶。优选地, 所述包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶是包含 3' →5' 核酸外切酶活性并能够进行滚环复制的 DNA 聚合酶, 例如但不限于, Phi29 DNA 聚合酶。因此, 在一个优选实施方案中, 本发明涉及这样的方法, 其中所述包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶是包含 3' →5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶, 例如 Phi29 DNA 聚合酶、或例如 T4 DNA 聚合酶、或例如 T7 DNA 聚合酶、或例如 Deep Vent DNA 聚合酶、或例如 DNA 聚合酶 I、或例如 Klenow 片段、或例如 Vent DNA 聚合酶、或例如 9° N<sub>u</sub> DNA 聚合酶、或例如等温 Bst DNA 聚合酶。然而, 如果使用的聚合酶不能提供所需 3' →5' 核酸外切酶活性, 那么可以另外使用包含 3' →5' 核酸外切酶活性并能够使靶核酸的该 3' - 末端凹陷的核酸外切酶。因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及这样的方法, 其中所述包含 3' →5' 核酸外切酶活性的酶是包含 3' →5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶, 例如核酸外切酶 T、或例如 CCR4、或例如 Rrp6p、或例如外来体复合物核酸外切酶 RRP41。

[0316] 在某些操作程序中, 双酶系统因此可能是优选的, 它可以是例如与包含 3' →5' 核酸外切酶活性的核酸外切酶或包含 3' →5' 核酸外切酶的另一聚合酶相组合的不含 3' →5' 核酸外切酶活性的聚合酶。另一种其中在这种情况下包含两种聚合酶的双酶系统可能是优选的情形是, 当用于滚环复制的聚合酶不能掺入某些核苷酸, 例如人工或修饰的核苷酸时。这种无能随后可以通过添加能够掺入此类核苷酸的第二种聚合酶来补偿, 例如 Klenow 片段、或例如 Taq 聚合酶、或例如 9° N<sub>u</sub> DNA 聚合酶、或例如 Terminator DNA 聚合酶、或例如 Pwo DNA 聚合酶、或例如 Pfu DNA 聚合酶、或例如 DNA 聚合酶 I、或例如 Vent DNA 聚合酶、或例如 Tth DNA 聚合酶、或例如等温 Bst DNA 聚合酶。

[0317] 在不同方法中提及的靶核酸可以从细胞或从组织中获得。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及其中包含靶核酸分子的制备物从细胞中提供的方法, 所述细胞选自哺乳动物、细菌、酵母、爬行动物、两栖动物、鸟类和植物细胞, 和在另一实施方案中, 本发明涉及其中包含靶核酸分子的制备物从组织中提供的方法, 所述组织选自哺乳动物、爬行动物、两栖动物、鸟类和植物组织。在另一实施方案中, 本发明涉及其中所述细胞是哺乳动物细胞的方法。在另一实施方案中, 本发明涉及其中所述组织是哺乳动物组织的方法。在另一实施方案中, 本发明涉及其中所述细胞是人细胞的方法。在另一实施方案中, 本发明涉及其中所述组织是人组织的方法。

[0318] 也可以通过上文提及的方法来检测来源于病毒的核酸。然而, 因为病毒具有在宿

主细胞内和在宿主细胞外的阶段,所以来源于病毒的核酸也可从体液或排泄物中检测,所述体液或排泄物例如但不限于脊髓液、或例如尿、或例如粪便、或例如唾液、或例如血液。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中包含靶核酸分子的制备物从病毒中提供的方法。

[0319] 因为靶引发的滚环复制检测单个分子,所以一个信号等于一个靶核酸分子。因此,通过计数信号的数目,并可能地将其与参照相比较,可以获得靶核酸分子总量的测量结果。因此,在一个实施方案中,本发明涉及其中靶核酸分子的量通过计数滚环复制信号的数目来定量测量的方法。备选地,靶核酸分子总量的测量结果可以通过测量来自滚环复制的荧光信号的量来获得。此外,这可能包括内部或外部参照。因此,在另一实施方案中,本发明涉及这样的方法,其中基于测量来自滚环复制的荧光信号的量来定量测量靶核酸分子的量。

[0320] 所述方法和探针可以在检定试剂盒中使用。因此,在一个实施方案中,本发明涉及包含环状核酸探针以及选自下列的至少一种组分的试剂盒:缓冲液、反应物、抗体、一种或多种靶核酸的对照制剂。

[0321] 所述方法或探针中的任何可以用于体外检定。因此,在另一实施方案中,本发明涉及应用所述方法中的任何一种的检定方法,和在另一实施方案中,本发明涉及包括使环状核酸探针与靶核酸分子杂交的检定方法,其中所述环状核酸探针选自龟形探针、预先形成的环形探针、挂锁探针、切割子-龟形探针、预先形成的切割子-环形探针或切割子-挂锁探针。

[0322] 优选地,所述体外检定对 RNA 进行,例如但不限于,检测经剪接的 RNA、经可变剪接的信使 RNA、来自 EB 病毒的 EBER1 和 EBER2、腺病毒编码的小 RNA's VA1 和 VA2、核糖体 RNA's、端粒酶复合物(hTERC)的 RNA 部分、小干扰 RNA's(siRNA's)和微小 RNA's(miRNA's)。因此,在另一实施方案中,本发明涉及其中所述靶核酸分子是 RNA 的检定方法。

[0323] 与相关申请的交叉参考

[0324] 本申请要求于 2005 年 4 月 12 日提交的 DK PA2005 00522 的优先权。

[0325] 在本文中引用的这些申请、专利中的每一个和每个文件,以及在这些申请、专利和文件(“申请所引用的文件”)中的每一个中引用的每个文件,以及(在申请及其专利的文本中或在其申请过程中)申请所引用的文件中参考或引用的每个文件,以及在其申请过程中提出的支持可专利性的所有论点,在此引入本文作为参考。

[0326] 另外,单数参考不排除复数。因此,提及“a”、“an”、“第一个(种)”、“第二个(种)”等时,并不排除复数。

[0327] 在整个本说明书中,术语“包含”,或变化形式“包括”或“含有”,应当理解为意味着包括所述的元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的组,但不排除任何其他元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的组。

[0328] 如将是显而易见的,本发明的一个方面的优选特征和特点可以应用于本发明的其他方面。

[0329] 等价形式

[0330] 本发明还可以其他具体形式体现而不背离其精神或基本特征。因此,前述实施方案在所有方面应被视为对于本文描述的发明是举例说明性的而不是限制性的。因此,本发

明的范围由所附权利要求书而不是由前述描述指明,并且希望通过其中的参考而包括在权利要求书的等价性的含义和范围内的所有变化。

[0331] 在下文中,本发明将借助于下列非限制性附图和实施例来进行描述。

[0332] 图例

[0333] 图 1

[0334] 用于在滚环复制中使用的不同环形探针设计。

[0335] 如在发明概述中提及的,最初存在用于在滚环复制中使用的两种环形探针设计;这个数目已增至 6。不仅使得能够从靶分子的天然 3' - 末端开始滚环复制,还使得能够在靶分子中的所需点处序列特异性地产生新的 3' - 末端。A) 预先形成的环形探针。B) 由龟形探针形成的预先形成的环形探针,所述龟形探针不需要外部模板用于连接;因此不存在含模板的环形探针的污染,所述模板可以充当滚环引物从而产生假产物。C) 挂锁探针。D) 龟形探针。E) 预先形成的切割子 - 环形探针。F) 预先形成的切割子 - 环形探针,其由切割子 - 龟形探针形成。G) 切割子 - 挂锁探针。H) 切割子 - 龟形探针。当它们在权利要求书和详细描述中出现时,编号图解说明了探针的不同核酸部分, | 指元件或部分之间的边界, CE 指切割元件,和 Id 指标示物元件。

[0336] 在切割子 - 挂锁 (图 1G) 中,为了简单起见,在其中环化官能团和切割官能团识别相同靶分子和那种靶分子的相同部分的情况下,已将切割元件置于用于环化 / 连接所述探针的靶识别部分内。如果切割元件置于靶识别部分外,那么该探针识别两种靶分子,或同一分子的两个分开的部分。在后面一种情况下,该探针将报告两种靶的共定位。

[0337] 图 2

[0338] 使用切割子 - 探针的滚环复制操作程序的图解说明。

[0339] 用切割子 - 龟举例说明的滚环操作分成下列步骤。其中:步骤 A) 提供切割子 - 探针和靶 RNA;步骤 B) 使所述切割子 - 龟与所述靶 RNA 杂交;步骤 C) 连接所述切割子 - 龟以形成闭合环状结构,和切割所述靶 RNA;步骤 D) 和步骤 E) 滚环复制;和步骤 F) 通过加入荧光偶联的检测寡核苷酸来检测滚环产物。必要时切割也可以在杂交过程中进行,并且切割产生的 3' - 末端的修饰可以在步骤 C) 和 D) 之间进行。

[0340] 图 3

[0341] 靶 RNA 的 DNA 核酶水解。

[0342] DNA 核酶是包含酶促活性的核酸序列。这些通常通过体外选择实验来制备,并且对于活性一般需要二价金属离子。A) 显示了由 10-23DNA 核酶、17E DNA 核酶和几种其他 DNA 核酶催化的靶 RNA 的水解。B) 使用含 10-23 DNA 核酶作为切割元件的、体外转录的 RNA 和切割子 - 挂锁探针来进行的实验,其举例说明了新的 3' - 末端的序列特异性形成 (实施例 1)。泳道 1 是低范围 RNA 梯 (Low Range RNA Ladder) (Fermentas);泳道 2 是体外转录的靶 RNA,不含切割子 - 挂锁;泳道 3 是切割子 - 挂锁,不含 RNA;泳道 4 是未与 T4 FNA 连接酶一起孵育的切割子 - 挂锁和靶 RNA;泳道 5 是与 T4 FNA 连接酶一起孵育的切割子 - 挂锁和靶 RNA,导致切割子 - 挂锁环化;泳道 6 是含有 T4 FNA 连接酶的切割子 - 挂锁和外部连接模板 (DNA)。

[0343] 图 4

[0344] 使用切割子探针的基于固体支持物 / 阵列的 RNA 检测。

[0345] 如实施例 2 中所述, 该实验使用切割子-挂锁探针、体外转录的 RNA、偶联有生物素的捕获寡核苷酸以及作为固体支持物的经链霉抗生物素蛋白包被的显微镜载玻片来进行。A) 阴性对照, 其中捕获寡核苷酸和靶 RNA 都被省略。B) 阴性对照, 其中靶 RNA 被省略。C) 阴性对照, 其中捕获寡核苷酸被省略。D) 包含所有反应物和步骤的完整反应 (实施例 2)。E) 阴性对照, 其中 T4 多核苷酸激酶被省略。F) 阴性对照, 其中使用挂锁探针代替切割子-挂锁, 这两种探针均识别靶 RNA 中完全相同的核酸序列。

[0346] 图 5

[0347] 使用龟形探针的原位检测。

[0348] 在 EBV 阳性人扁桃体组织中原位检测非多腺苷酸化的 EB 病毒 (EBV) RNA 即 EBER1, 所述扁桃体组织在福尔马林中固定并在石蜡中包埋。因为 EBER1 RNA 是非多腺苷酸化的, 所以可以使用在 EBER1 RNA 的 3' - 末端中杂交的不含切割元件的探针, 在这种情况下所述探针是龟形探针。

[0349] A) 如实施例 3 中所述处理的扁桃体组织切片, 其中箭头指出滚环产物, 即 EBER1 RNA 阳性细胞。B) 在实施例 3 中使用的龟形探针的设计。

[0350] 图 6

[0351] 使用预先形成的环的原位检测。

[0352] 在 EBV 阳性人扁桃体组织中原位检测非多腺苷酸化的 EB 病毒 (EBV) RNA 即 EBER1, 所述扁桃体组织在福尔马林中固定并在石蜡中包埋。因为 EBER1 RNA 是非多腺苷酸化的, 所以可以使用在 EBER1 RNA 的 3' - 末端中杂交的不含切割元件的探针, 在这种情况下所述探针是在杂交前通过连接龟形探针而形成的预先形成的环形探针。使用龟形探针代替挂锁探针来制备预先形成的环形探针的原因是, 龟形探针包含其自身的连接模板, 并且不需要外部添加连接模板。因此, 不存在含寡核苷酸的预先形成的环的污染, 所述寡核苷酸可以充当引物而导致假滚环信号。

[0353] A) 如实施例 4 中所述处理的扁桃体组织切片, 其中箭头指出滚环产物, 即 EBER1 RNA 阳性细胞。B) 显示了在实施例 4 中使用的环形探针的设计。

[0354] 图 7

[0355] 使用挂锁探针的原位检测。

[0356] 在 EBV 阳性人扁桃体组织中原位检测非多腺苷酸化的 EB 病毒 (EBV) RNA 即 EBER1, 所述扁桃体组织在福尔马林中固定并在石蜡中包埋。因为 EBER1 RNA 是非多腺苷酸化的, 所以可以使用在 EBER1 RNA 的 3' - 末端中杂交的不含切割元件的探针, 在这种情况下所述探针是挂锁探针。

[0357] A) 如实施例 5 中所述处理的扁桃体组织切片, 其中箭头指出滚环产物, 即 EBER1 RNA 阳性细胞。B) 在实施例 5 中使用的挂锁探针的设计。

[0358] 图 8

[0359] 使用切割子-龟形探针的原位检测。

[0360] 在 EBV 阳性人扁桃体组织中原位检测非多腺苷酸化的 EB 病毒 (EBV) RNA 即 EBER1, 所述扁桃体组织在福尔马林中固定并在石蜡中包埋。切割子-龟形探针被设计为与定位在来自 3' - 末端的 112 个核苷酸的 EBER1 RNA 区域杂交。识别相同区域的龟形探针不产生信号 (数据未显示), 这表明在这种情况下需要切割元件。

[0361] A) 如实施例 6 中所述处理的扁桃体组织切片,其中箭头指出滚环产物,即 EBER1 RNA 阳性细胞。B) 在实施例 6 中使用的切割子-龟形探针的设计。

[0362] 图 9

[0363] 使用两种不同龟形探针的平行原位检测(多路技术(multiplexing))。

[0364] 在 EBV 阳性人何杰金氏淋巴瘤组织中原位检测非多腺苷酸化的 EB 病毒(EBV)RNA 即 EBER1 和非多腺苷酸化的 hTR(人端粒酶 RNA 亚单位),所述组织在福尔马林中固定并在石蜡中包埋。因为 EBER1RNA 和 hTR RNA 都是非多腺苷酸化的,所以可以使用在靶 RNA 的 3'-末端中杂交的不含切割元件的探针,在这种情况下所述探针是龟形探针。

[0365] A) 如实施例 7 中所述处理的何杰金氏组织切片,其中红色通道已被去除,从而使得只能看见来自 EBER1 探针的绿色信号和细胞核的蓝色染色。

[0366] B) 如实施例 7 中所述处理的何杰金氏组织切片,其中绿色通道已被去除,从而使得只能看见来自 hTR 探针的红色信号和细胞核的蓝色染色。

[0367] 实施例

[0368] 实施例 1

[0369] 使用含 10-23 DNA 核酶作为切割元件的切割子探针来切割 RNA

[0370] 连接切割子-挂锁以形成闭合环状结构以及切割 RNA 在一个步骤中完成。

[0371] 所使用的 RNA 是体外转录的酵母 SSA4 RNA 的 3'-UTR 的片段,所述转录使用 T7 RNA 聚合酶和作为转录模板的 Puc18 载体来进行,所述 Puc18 载体含有 DNA 片段,该 DNA 片段包含插入的酵母 SSA4 的 3'-UTR 的部分。

[0372] SSA4 RNA 的切割在包含 10mM Tris-HCL(在 25°C 下 pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub> 和 10 μM ATP 的缓冲液中进行,因为这些条件对于在溶液中在 RNA 模板上连接 DNA 是优化的(根据 Nilsson M. 等人, NatBiotechnol. 18(7):791-3. (2000))。因为这种缓冲液包含 Mg<sup>2+</sup>,所以靶 RNA 的切割可以与探针的连接同时进行。SSA4 RNA 和 SSA4-切割子-挂锁探针的终浓度分别为 0.5 μM 和 1 μM。反应体系于 37°C 孵育 90 分钟,并加载到 5% 聚丙烯酰胺凝胶上。

[0373] 体外转录的靶 RNA (SEQ ID NO :14) :

[0374] 5' -GGGAUAAAUACAAAGAUGCGAUGAAGUAGCAGCAUCGAAUUUCUUAGUUUCCCUCUUAACAACUUUUUAUAAGUAUAUAUAUAAGAUACACAAUCAGUAAUUAGCAAUGACUACUAAUUUGUACGUUCUCAUCGUCAUAA GCCAGAGUUUAAUUAAGUGCCUCAACCGGAUGCGAUUUCGCGUUCAUUAUACAAAGCCGAAAUGACAAUAAGAAAGUCAUCGCCAAACAACACGACCCUUUAGUGAGGGUAAUUG-3' 。

[0375] SSA4-切割子-挂锁探针 (SEQ ID NO :11) :

[0376] 5' -P-TAATTACTGATTGTGTATCTTTTATTTCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTTGGATGTCTAGAACGTAGGCTAGCTACAACGAAAATAGTAGTCATTTGC-3' ,

[0377] 其中

[0378] P 是 5' -磷酸。

[0379] 实施例 2

[0380] 使用切割子-挂锁探针的基于阵列的 RNA 检测

[0381] 基于阵列的 RNA 检测,其使用经链霉抗生物素蛋白包被的显微镜载玻片作为固体支持物和使用体外转录的 SSA4 RNA(类似于实施例 1 中使用的 RNA) 作为靶 RNA(图 4)。

[0382] 体外转录的 SSA4 RNA 使用 T7 RNA 聚合酶和作为转录模板的 Puc18 载体来产生,

所述 Puc18 载体含有 DNA 片段,所述 DNA 片段包含作为转录模板插入的 SSA4 序列。

**[0383] 捕获寡核苷酸的杂交:**

[0384] 在这个测定法中使用的捕获寡核苷酸是与体外转录的靶 RNA 分子 5' - 末端互补的偶联有 3' - 生物素的寡核苷酸,并且以经链霉抗生物素蛋白包被的显微镜载玻片形式提供固体支持物。将包含直径为大约 6mm 的孔的塑料盖附着至载玻片,以便分开不同反应体系。将终浓度为 1  $\mu$ M 的捕获寡核苷酸在缓冲液中附着至经链霉抗生物素蛋白包被的载玻片,所述缓冲液包含 10mM Tris-HCl(在 25 $^{\circ}$ C 下 pH7.5) 和 10mM MgCl<sub>2</sub>。取决于固体支持物的规模,更大或更小量的捕获寡核苷酸可能是优选的。在杂交后,于 37 $^{\circ}$ C 用洗涤缓冲液(0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20)洗涤载玻片。

**[0385] 杂交、连接和切割:**

[0386] 靶 RNA 分子与捕获寡核苷酸的杂交、SSA4-切割子-挂锁探针的连接以及靶 RNA 的切割在一个步骤中进行。这通过在混合物中将靶 RNA 和探针加至载玻片,并将载玻片于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟来完成,所述混合物包含 10nM 靶 RNA、120nM 探针、10mM Tris-HCl(在 25 $^{\circ}$ C 下 pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10  $\mu$ M ATP、5mM DTT、1U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas) 和 0.1U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶(Fermentas)。这些连接条件对于在溶液中在 RNA 模板上连接 DNA 是优化的(根据 Nilsson M. 等人, Nat Biotechnol. 18(7):791-3. (2000))。在 37 $^{\circ}$ C 孵育后,于 37 $^{\circ}$ C 用洗涤缓冲液(0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20)洗涤载玻片。

**[0387] 3' - 末端修饰:**

[0388] 因为在这个实验中的切割子探针是包含 10-23 DNA 核酶作为切割元件的切割子-挂锁(图 8B),所以切割在 3' - 末端处产生环状磷酸而不是常规的羟基。RNA 的新的 3' - 末端因此需要进行修饰以使得 Phi29DNA 聚合酶能够开始滚环复制。这通过下列方式来完成:使用 T4 多核苷酸激酶来去除环状磷酸,从而在靶 RNA 的 3' - 末端处产生常规的羟基。这个反应通过下列方式来进行:加入在补充有 0.3M NaCl、4mM ATP 和 1U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas) 的 1x 交换缓冲液(Fermentas) 中的 1U/ $\mu$ l T4 多核苷酸激酶(Fermentas),并将载玻片于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。在 37 $^{\circ}$ C 孵育后,于 37 $^{\circ}$ C 用洗涤缓冲液(0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20)洗涤载玻片。

**[0389] 滚环复制**

[0390] 滚环复制使用所述探针作为滚环复制模板并从靶 RNA 的新的 3' - 末端开始,使之成为靶引发的滚环复制。滚环复制于 37 $^{\circ}$ C 在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟: 1xPhi29 反应缓冲液(Fermentas)、0.25mM dNTP、1U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas) 和 0.25U/ $\mu$ l Phi29DNA 聚合酶(Fermentas)。在滚环复制后,通过于 37 $^{\circ}$ C 将其轻柔地浸入洗涤缓冲液中 2 分钟来洗涤载玻片,以避免破坏滚环复制产物。

**[0391] 滚环复制产物的检测:**

[0392] 滚环复制产物的检测通过下列方式来进行:加入包含 10mM Tris-HCl(在 25 $^{\circ}$ C 下 pH7.5) 和 10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM DTT、1U/ $\mu$ l Ribolock(Fermentas) 以及 0.25  $\mu$ M 荧光探针 A 和 0.25  $\mu$ M 荧光探针 B 的混合物,并将载玻片于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

[0393] 为了能够区分假信号和真信号,加入两种荧光探针(探针 A 和探针 B),尽管只有一种与滚环复制产物退火。真信号在探针 A 的光谱中可见,而假信号(如果存在)则将在探针 A 和探针 B 的光谱中可检测到。

[0394] 在 37°C 孵育后, 通过于 37°C 将其轻柔地浸入洗涤缓冲液中 2 分钟来洗涤载玻片以避免破坏滚环复制产物, 脱水, 用包含 DAPI 的 VectorShield 进行封固 (mount), 并在荧光显微镜下可视化。

[0395] 体外转录的靶 RNA (SEQ ID NO :14) :

[0396] 5' -GGGAUAAAUACAAAGAUGCGAUGAAGUAGCAGCAUCGAAUUUCUUAGUUUCCUCUUAACAACUUUUUAUAAGUAUAUAUAUAAGAUACACAAUCAGUAAUUAGCAAUGACUACUAAUUUGUACGUUCUCAUCGUCAUAA GCCAGAGUUUAAUUAAGUGCCUCAACCGGGAUGCGAUUUCGCGUUCUAUAUACAAAGCCGAAAUGACAAUAAGAAAGU CAUCGCCAAACAACACGACCCUUUAGUGAGGGUAAUUG-3' 。

[0397] 经链霉抗生素蛋白包被的载玻片购自 Xenopore。

[0398] 捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO :15) :

[0399] 5' -AGAGGGAAAATAAGAAATTCGATGCTGCTACTTC-z-3' ,

[0400] 其中

[0401] z 是生物素。

[0402] SSA4- 切割子 - 挂锁探针 (SEQ ID NO :11) :

[0403] 5' -P-TAATTACTGATTGTGTATCTTTTATTTCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTT GGATGTCTAGAACGTAGGCTAGCTACAACGAAAATAGTAGTCATTTGC-3' ,

[0404] 其中

[0405] P 是 5' - 磷酸。

[0406] 荧光探针 A (SEQ ID NO :16) :

[0407] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0408] 其中

[0409] x 是荧光团 TAMRA (罗丹明)。

[0410] 荧光探针 B (SEQ ID NO :17) :

[0411] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0412] 其中

[0413] y 是荧光团 FAM (FITC)。

[0414] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0415] 实施例 3

[0416] 使用龟形探针来原位检测 RNA

[0417] 在石蜡包埋、福尔马林固定、感染了 EB 病毒 (EBV) 的人扁桃体组织中原位检测 EBER1 (EB 早期区域) RNA (参见图 5)。

[0418] 预处理: 福尔马林固定、石蜡包埋的组织用二甲苯脱蜡 2×10 分钟, 并随后在 99%、85%、70% 的系列乙醇中洗涤以去除残留的二甲苯。然后, 将该组织在室温下脱水并风干。将该组织用溶解在 0.1 M HCl 中的 0.05% 胃蛋白酶 (Sigma) 于 37°C 处理 15 分钟。胃蛋白酶处理通过将载玻片浸入洗涤缓冲液 (0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 -20) 中来终止。将该组织在处于 1x PBS 中的 0.4% 低聚甲醛中再固定 20 分钟, 和于 37°C 在洗涤缓冲液中洗涤 5 分钟, 并在室温下脱水和风干。

[0419] 探针杂交: 将包含 0.1 μM EB1- 龟形探针、20% 甲酰胺、2xSSC、0.2 μg/μl BSA、5% 甘油和 0.2 μg/μl 载体 DNA 的杂交混合物加至载玻片, 并用盖玻片覆盖。用耐热胶将

盖玻片密封至载玻片。载玻片于 95°C 加热 2 分钟,冷却至 37°C 并在那个温度下孵育 30 分钟。在杂交后,将载玻片在含 0.05% 吐温 -20 的 2x SSC 中于 37°C 洗涤 5 分钟,在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟,并最后在室温下脱水和风干。杂交可以于 37°C 进行而无需首先加热至 95°C,但已发现加热至 95°C 可增加信号数目。载体 DNA 或 RNA 可能不一定需要,但通常似乎可增加信号数目。

[0420] **探针连接**:使用龟形探针的优点是,这种探针包含其自身的连接模板,从而使得探针-连接在这种自身包含的 DNA 模板上来进行而不是使用靶 RNA 作为模板来进行。这种探针设计在大多数情况下将是优选的,因为使用 RNA 模板的 DNA 连接比使用 DNA 模板的 DNA 连接具有低得多的效率(比较图 5 和 7)。

[0421] 探针的连接在包含 1xT4 DNA 连接酶缓冲液 (Fermentas)、0.2 μg/μl BSA 和 0.1U/μl T4 DNA 连接酶 (Fermentas) 的混合物中于 37°C 进行 30 分钟。在与连接酶混合物一起孵育后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。

[0422] **滚环复制**:该滚环复制使用所述探针作为滚环复制模板并从靶 RNA 的天然 3' - 末端开始,使之成为靶引发的滚环复制。这个操作程序不仅检测靶分子的存在,而且还检测其在单个细胞内的定位。滚环复制于 37°C 在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟:1x Phi29 反应缓冲液 (Fermentas)、0.25mM dNTP、0.2 μg/μl BSA、5% 甘油和 1U/μl Phi29 DNA 聚合酶 (Fermentas)。在滚环复制后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。

[0423] **滚环复制产物的检测**:滚环复制产物的检测通过下列来进行:加入包含 20% 甲酰胺、2x SSC、5% 甘油以及 0.25 μM 荧光探针 A 和 0.25 μM 荧光探针 B 的杂交混合物,并将载玻片于 37°C 孵育 30 分钟。

[0424] 为了区分假信号和真信号,加入两种荧光探针(探针 A 和探针 B),尽管只有一种与滚环复制产物退火。真信号在探针 A 的光谱中可见,而假信号(如果存在)则将在探针 A 和探针 B 的光谱中可检测到。

[0425] 将载玻片在洗涤缓冲液中洗涤,脱水,用包含 DAPI 的 VectorShield 封固,并在荧光显微镜下可视化。

[0426] EB1- 龟形探针 (SEQ ID NO :3) :

[0427] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACAAAACATGCGGACCACCAGCTGGTACTTGACCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0428] 其中

[0429] P 是 5' - 磷酸。

[0430] 荧光探针 A (SEQ ID NO :16) :

[0431] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0432] 其中

[0433] x 是荧光团 TAMRA (罗丹明)。

[0434] 荧光探针 B (SEQ ID NO :17) :

[0435] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0436] 其中

[0437] y 是荧光团 FAM (FITC)。



[0438] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0439] 实施例 4：

[0440] 使用预先形成的环形探针来原位检测 RNA

[0441] 在石蜡包埋、福尔马林固定、感染了 EB 病毒 (EBV) 的人扁桃体组织中原位检测 EBER1 (EB 早期区域) RNA (参见图 6)。

[0442] 在其用作杂交探针前通过连接 EB1- 龟形探针 (图 5) (实施例 3) 来制备预先形成的环。

[0443] 预先形成的环的制备：

[0444] 向所述混合物中加入使用 1x 连接 T4 DNA 连接缓冲液 (Fermentas)、0.1U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (Fermentas) 进行连接的 EB1- 龟形探针, 并将连接混合物于 37°C 孵育 30 分钟。

[0445] 预处理：福尔马林固定、石蜡包埋的组织用二甲苯脱蜡 2 $\times$ 10 分钟, 并随后在 99%、85%、70% 的系列乙醇中洗涤以去除残留的二甲苯。然后, 将该组织在室温下脱水并风干。将该组织用溶解在 0.1M HCl 中的 0.05% 胃蛋白酶 (Sigma) 于 37°C 处理 15 分钟。胃蛋白酶处理通过将载玻片浸入洗涤缓冲液 (0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 -20) 中来终止。将该组织在处于 1x PBS 中的 0.4% 低聚甲醛中再固定 20 分钟, 并于 37°C 在洗涤缓冲液中洗涤 5 分钟, 并在室温下脱水和风干。

[0446] 探针杂交：将包含 0.1  $\mu$ M preEB1- 龟形探针、20% 甲酰胺、2xSSC、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA、5% 甘油和 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l 载体 DNA 的杂交混合物加至载玻片, 并用盖玻片覆盖。用耐热胶将盖玻片密封至载玻片。载玻片于 95°C 加热 2 分钟, 冷却至 37°C 并在那个温度下孵育 30 分钟。在杂交后, 将载玻片在含 0.05% 吐温 -20 的 2x SSC 中于 37°C 洗涤 5 分钟, 在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟, 并最后在室温下脱水和风干。杂交可以于 37°C 进行而无需首先加热至 95°C, 但已发现加热至 95°C 可增加信号数目。载体 DNA 或 RNA 可能不一定需要, 但通常似乎可增加信号数目。

[0447] 滚环复制：该滚环复制使用所述探针作为滚环复制模板并从靶 RNA 的天然 3' - 末端开始, 使之成为靶引发的滚环复制。这个操作程序 不仅检测靶分子的存在, 而且还检测其在单个细胞内的定位。滚环复制于 37°C 在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟: 1x Phi29 反应缓冲液 (Fermentas)、0.25mM dNTP、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA、5% 甘油和 1U/ $\mu$ l Phi29 DNA 聚合酶 (Fermentas)。在滚环复制后, 载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。

[0448] 滚环复制产物的检测：滚环复制产物的检测通过下列来进行: 加入包含 20% 甲酰胺、2x SSC、5% 甘油以及 0.25  $\mu$ M 荧光探针 A 和 0.25  $\mu$ M 荧光探针 B 的杂交混合物, 并将载玻片于 37°C 孵育 30 分钟。

[0449] 为了区分假信号和真信号, 加入两种荧光探针 (探针 A 和探针 B), 尽管只有一种与滚环复制产物退火。真信号在探针 A 的光谱中可见, 而假信号 (如果存在) 则将在探针 A 和探针 B 的光谱中可检测到。

[0450] 将载玻片在洗涤缓冲液中洗涤, 脱水, 用包含 DAPI 的 VectorShield 封固, 并在荧光显微镜下可视化。

[0451] preEB1- 龟形探针 (SEQ ID NO:3) :

[0452] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACAAAACATGCGGACCACCAGCTGGTACTTGACC

GGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0453] 其中

[0454] P 是 5' - 磷酸。

[0455] 荧光探针 A (SEQ ID NO :16) :

[0456] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0457] 其中

[0458] x 是荧光团 TAMRA (罗丹明)。

[0459] 荧光探针 B (SEQ ID NO :17) :

[0460] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0461] 其中

[0462] y 是荧光团 FAM (FITC)。

[0463] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0464] 实施例 5

[0465] 使用挂锁探针来原位检测 RNA

[0466] 在石蜡包埋、福尔马林固定、感染了 EB 病毒 (EBV) 的人扁桃体组织中原位检测 EBER1 (EB 早期区域) RNA (图 7)。

[0467] 预处理: 福尔马林固定、石蜡包埋的组织用二甲苯脱蜡 2×10 分钟, 并随后在 99%、85%、70% 的系列乙醇中洗涤以去除残留的二甲苯。然后, 将该组织在室温下脱水并风干。将该组织用溶解在 0.1M HCl 中的 0.05% 胃蛋白酶 (Sigma) 于 37°C 处理 15 分钟。胃蛋白酶处理通过将载玻片浸入洗涤缓冲液 (0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 -20) 中来终止。将该组织在处于 1x PBS 中的 0.4% 低聚甲醛中再固定 20 分钟, 并于 37°C 在洗涤缓冲液中洗涤 5 分钟, 并在室温下脱水和风干。

[0468] 探针杂交: 将包含 0.1 μM EB1-挂锁探针、20% 甲酰胺、2x SSC、0.2 μg/μl BSA、5% 甘油和 0.2 μg/μl 载体 DNA 的杂交混合物加至载玻片, 并用盖玻片覆盖。用耐热胶将盖玻片密封至载玻片。载玻片于 95°C 加热 2 分钟, 冷却至 37°C 并在那个温度下孵育 30 分钟。在杂交后, 将载玻片在含 0.05% 吐温 -20 的 2x SSC 中于 37°C 洗涤 5 分钟, 在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟, 并最后在室温下脱水和风干。杂交可以于 37°C 进行而无需首先加热至 95°C, 但已发现加热至 95°C 可增加信号数目。载体 DNA 或 RNA 可能不一定需要, 但通常似乎可增加信号数目。

[0469] 探针连接: 探针的连接在包含 10mM Tris-HCl (在 25°C 下 pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10 μM ATP、5mM DTT、0.2 μg/μl BSA 和 0.1U/μl T4 DNA 连接酶 (Fermentas) 的混合物中于 37°C 进行 30 分钟。在与连接酶混合物一起孵育后, 将载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。这些连接条件对于在溶液中在 RNA 模板上连接 DNA 是优化的 (根据 Nilsson M. 等人, Nat Biotechnol. 18(7) :791-3. (2000))。

[0470] 滚环复制: 该滚环复制使用所述探针作为滚环复制模板并从靶 RNA 的天然 3' - 末端开始, 使之成为靶引发的滚环复制。这个操作程序不仅检测靶分子的存在, 而且还检测其在单个细胞内的定位。滚环复制于 37°C 在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟: 1x Phi29 反应缓冲液 (Fermentas)、0.25mM dNTP、0.2 μg/μl BSA、5% 甘油和 1U/μl Phi29 DNA 聚合酶 (Fermentas)。在滚环复制后, 载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分

钟。

[0471] 滚环复制产物的检测:滚环复制产物的检测通过下列来进行:加入包含 20%甲酰胺、2x SSC、5%甘油以及 0.25  $\mu$ M 荧光探针 A 和 0.25  $\mu$ M 荧光探针 B 的杂交混合物,并将载玻片于 37°C 孵育 30 分钟。

[0472] 为了区分假信号和真信号,加入两种荧光探针(探针 A 和探针 B),尽管只有一种与滚环复制产物退火。真信号在探针 A 的光谱中可见,而假信号(如果存在)则将在探针 A 和探针 B 的光谱中可检测到。

[0473] 将载玻片在洗涤缓冲液中洗涤,脱水,用包含 DAPI 的 VectorShield 封固,并在荧光显微镜下可视化。

[0474] EB1-挂锁探针 (SEQ ID NO:18):

[0475] 5' -P-CAGCTGGTACTTGACCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACTAGTGATTTACTTAAAACATGCGG ACCAC-3'

[0476] 其中

[0477] P 是 5' - 磷酸。

[0478] 荧光探针 A (SEQ ID NO:16):

[0479] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0480] 其中

[0481] x 是荧光团 TAMRA(罗丹明)。

[0482] 荧光探针 B (SEQ ID NO:17):

[0483] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0484] 其中

[0485] y 是荧光团 FAM(FITC)。

[0486] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0487] 实施例 6

[0488] 使用切割子-龟形探针来原位检测 RNA

[0489] 使用切割子-龟形探针在石蜡包埋、福尔马林固定、感染了 EB 病毒 (EBV) 的人扁桃体组织中原位检测 EBER1 (EB 早期区域) RNA (图 8)。

[0490] 预处理:福尔马林固定、石蜡包埋的组织用二甲苯脱蜡 2×10 分钟,并随后在 99%、85%、70% 的系列乙醇中洗涤以去除残留的二甲苯。然后,将该组织在室温下脱水并风干。将该组织用溶解在 0.1M HCl 中的 0.05%胃蛋白酶 (Sigma) 于 37°C 处理 15 分钟。胃蛋白酶处理通过将载玻片浸入洗涤缓冲液 (0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05%吐温 -20) 中来终止。将该组织在处于 1x PBS 中的 0.4%低聚甲醛中再固定 20 分钟,和于 37°C 在洗涤缓冲液中洗涤 5 分钟,并在室温下脱水和风干。

[0491] 探针杂交:将包含 0.1  $\mu$ M EB1-切割子-龟形探针、20%甲酰胺、2x SSC、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA、5%甘油和 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l 载体 DNA 的杂交混合物加至载玻片,并用盖玻片覆盖。用耐热胶将盖玻片密封至载玻片。载玻片于 95°C 加热 2 分钟,冷却至 37°C 并在那个温度下孵育 30 分钟。在杂交后,将载玻片在含 0.05%吐温 -20 的 2x SSC 中于 37°C 洗涤 5 分钟,在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟,并最后在室温下脱水和风干。杂交可以于 37°C 进行而无需首先加热至 95°C,但已发现加热至 95°C 可增加信号数目。载体 DNA 或 RNA 可能不一定需

要,但通常似乎可增加信号数目。

[0492] 探针连接:使用自我模板式探针的优点是,这种探针包含其自身的连接模板,从而使得探针-连接在这种自身包含的 DNA 模板上来进行而不是使用靶 RNA 作为模板来进行。这种探针设计在大多数情况下将是优选的,因为使用 RNA 模板的 DNA 连接比使用 DNA 模板的 DNA 连接具有低得多的效率(比较图 5 和 7)。

[0493] 探针的连接在包含 1x T4 DNA 连接酶缓冲液(Fermentas)、0.2g/ $\mu$ l BSA 和 0.1U/ $\mu$ l T4 DNA 连接酶(Fermentas)的混合物中于 37°C 进行 30 分钟。在与连接酶混合物一起孵育后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟,并最后在室温下脱水和风干。

[0494] 这种切割子的切割元件是 10-23 DNA 核酶,所述 10-23 DNA 核酶对于活性来说严格依赖于二价金属离子的存在,例如  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  或  $Pb^{2+}$ 。因为 1x T4 DNA 连接酶缓冲液包含  $Mg^{2+}$ ,所以靶 RNA 的切割与连接平行发生。靶 RNA 的切割也可以在杂交过程中进行,或作为分开的步骤进行,只要存在二价金属离子。

[0495] 3' - 末端修饰:因为 10-23 DNA 核酶当切割 RNA 时在 3' - 末端处产生环状磷酸而不是常规的羟基,所以 Phi29 DNA 聚合酶不能从所产生的 3' - 末端开始引发(图 4E)。因此,RNA 的新的 3' - 末端需要进行修饰以允许 Phi29 DNA 聚合酶能够开始滚环复制。这通过下列方式来完成:使用 T4 多核苷酸激酶来去除环状磷酸,以在 3' - 末端处产生常规的羟基。通过使用在补充有 0.3M NaCl、4mM ATP 和 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA 的 1x 交换缓冲液(Fermentas)中的 1U/ $\mu$ l T4 多核苷酸激酶(Fermentas),这个反应于 37°C 进行 30 分钟。在孵育后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。

[0496] 滚环复制:滚环复制使用所述探针作为滚环模板并从靶 RNA 的新的 3' - 末端开始,使之成为靶引发的滚环复制。这个操作程序不仅检测靶分子的存在,而且还检测其在单个细胞内的定位。滚环复制于 37°C 在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟:1x Phi29 反应缓冲液(Fermentas)、0.25mM dNTP、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA、5%甘油和 1U/ $\mu$ l Phi29 DNA 聚合酶(Fermentas)。在滚环复制后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37°C 洗涤 5 分钟。

[0497] 滚环复制产物的检测:滚环复制产物的检测通过下列来进行:加入包含 20%甲酰胺、2x SSC、5%甘油以及 0.25  $\mu$ M 荧光探针 A 和 0.25  $\mu$ M 荧光探针 B 的杂交混合物,并将载玻片于 37°C 孵育 30 分钟。

[0498] 为了区分假信号和真信号,加入两种荧光探针(探针 A 和探针 B),尽管只有一种与滚环复制产物退火。真信号在探针 A 的光谱中可见,而假信号(如果存在)则将在探针 A 和探针 B 的光谱中可检测到。

[0499] 将载玻片在洗涤缓冲液中洗涤,脱水,用包含 DAPI 的 VectorShield 封固,并在荧光显微镜下可视化。

[0500] EB1-切割子-龟形探针(SEQ ID NO:19):

[0501] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACCCAAAACGATCCCTCCTCTGGGCTAGCTACAA CGAACACACCGACATCGGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0502] 其中

[0503] P 是 5' - 磷酸。

[0504] 荧光探针 A(SEQ ID NO:16):

[0505] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0506] 其中

[0507] x 是荧光团 TAMRA(罗丹明)。

[0508] 荧光探针 B(SEQ ID NO:17) :

[0509] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0510] 其中

[0511] y 是荧光团 FAM(FITC)。

[0512] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0513] 实施例 7

[0514] 使用两种不同的龟形探针来平行地原位检测 RNA(多路技术)。

[0515] 在石蜡包埋、福尔马林固定、EB 病毒 (EBV) 阳性的人何杰金氏淋巴瘤组织中原位检测 EBER1(EB 早期区域)RNA 和 hTR(人端粒酶 RNA 亚单位)(参见图 5)。

[0516] 预处理:福尔马林固定、石蜡包埋的组织用二甲苯脱蜡 2×10 分钟,随后在 99%、85%、99%的系列乙醇中洗涤以去除残留的二甲苯,并在室温下风干。将该组织用溶解在 0.1M HCl 中的 0.05%胃蛋白酶(Sigma)于 37℃处理 15 分钟。胃蛋白酶处理通过将载玻片浸入洗涤缓冲液(0.1M Tris-HCl、0.15M NaCl 和 0.05%吐温-20)中来终止。将载玻片在室温下脱水和风干。

[0517] 探针杂交:将包含 0.1 μM EB1-龟形探针、0.1 μM hTR-龟形探针、20%甲酰胺、2x SSC、0.2 μg/μl BSA、5%甘油和 1 μg/μl 载体 RNA 的杂交混合物加至载玻片,并用盖玻片覆盖。用耐热胶将盖玻片密封至载玻片。载玻片于 95℃加热 2 分钟,冷却至 37℃并在那个温度下孵育 30 分钟。在杂交后,将载玻片在含 0.05%吐温-20 的 2x SSC 中于 37℃洗涤 5 分钟,在洗涤缓冲液中于 37℃洗涤 5 分钟,并最后在室温下脱水和风干。杂交可以于 37℃进行而无需首先加热至 95℃,但已发现加热至 95℃可增加信号数目。载体 DNA 或 RNA 可能不一定需要,但通常似乎可增加信号数目。

[0518] 探针连接:使用龟形探针的优点是,这种探针包含其自身的连接模板,从而使得探针-连接在这种自身包含的 DNA 模板上来进行,而不是使用靶 RNA 作为模板来进行(比较图 5 和 7)。

[0519] 探针的连接在包含 1x T4 DNA 连接酶缓冲液(Fermentas)、0.2 μg/μl BSA 和 0.1U/μl T4 DNA 连接酶(Fermentas)的混合物中于 37℃进行 30 分钟。在与连接酶混合物一起孵育后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37℃洗涤 5 分钟。为了使该混合物容易经过组织进行扩散,可以向该混合物加入 0.05%吐温-20 和 0.05% NP40。

[0520] 滚环复制:该滚环复制使用所述探针作为滚环复制模板并从靶 RNA 的天然 3' -末端开始,使之成为靶引发的滚环复制。这个操作程序不仅检测靶分子的存在,而且还检测其在单个细胞内的定位。滚环复制于 37℃在包含下列成分的混合物中进行 30 分钟:1x Phi29 反应缓冲液(Fermentas)、0.25mM dNTP、0.2 μg/μl BSA、5%甘油和 1U/μl Phi29 DNA 聚合酶(Fermentas)。在滚环复制后,载玻片在洗涤缓冲液中于 37℃洗涤 5 分钟。

[0521] 滚环复制产物的检测:滚环复制产物的检测通过下列来进行:加入包含 20%甲酰胺、2x SSC、5%甘油以及 0.25 μM 荧光探针 A 和 0.25 μM 荧光探针 B 的杂交混合物,并将载玻片于 37℃孵育 30 分钟。

[0522] 将载玻片在洗涤缓冲液中洗涤,脱水,用包含 DAPI 的 VectorShield 封固,并在荧光显微镜下可视化。

[0523] EB1- 龟形探针 (SEQ ID NO :3) :

[0524] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACAAAACATGCGGACCACCAGCTGGTACTTGACC GGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0525] 其中

[0526] P 是 5' - 磷酸。

[0527] hTR- 龟形探针 (SEQ ID NO :5) :

[0528] 5' -P-GTCGATCCCCTCAATGCTGCTGCTGTACTACGCATGTGTGAGCCGAGTCCTGGGTGCACGTCC CACAGCTCGGATCGACTCGGAATAACCGA-3' ,

[0529] 其中

[0530] P 是 5' - 磷酸。

[0531] 荧光探针 A (SEQ ID NO :16) :

[0532] 5' -x-CCTCAATGCTGCTGCTGTACTAC-3' ,

[0533] 其中

[0534] x 是荧光团 TAMRA (罗丹明)。

[0535] 荧光探针 B (SEQ ID NO :17) :

[0536] 5' -y-CCTCAATGCACATGTTTGGCTCC-3' ,

[0537] 其中

[0538] y 是荧光团 FAM (FITC)。

[0539] 所有探针购自 DNA Technology A/S。

[0540] 参考文献

[0541] WO 97/19193

[0542] WO 97/20948

[0543] WO 98/38300

[0544] WO 99/49079

[0545] WO 01/77383

[0546] WO 02/50310

[0547] US2003/0087241

[0548] Andersen CL. 等人, Chromosome Res. 10 (4), 305-12 (2002)

[0549] Astrom H. 等人, Org Biomol Chem. 7 ;1 (9) :1461-5 (2003)

[0550] Brown AK 等人, Biochemistry 17 ;42 (23) :7152-61 (2003)

[0551] Carmi N. 等人, Proc Natl Acad Sci USA. 3 ;95 (5) :2233-7 (1998)

[0552] Dahl F 等人, Proc Natl Acad Sci USA. 101 (13), 4548-53 (2004)

[0553] Huang L. 等人, J Biol Inorg Chem. 5 (1) :85-92 (2000)

[0554] Jimenez-Garrido N 等人, J Inorg Biochem. 99 (3) :677-89 (2005)

[0555] Koch J. Chromosoma 98 :259 (1989).

[0556] Larsson C. 等人, Nature Methods 1, 227-32 (2004))

[0557] Masuda N. 等人, Nucleic Acids Res. 15 ;27 (22) 4436-43 (1999)

- 
- [0558] Nilsson M. 等人, Nat Biotechnol. 18(7) :791-3. (2000)
- [0559] Sakamoto S. 等人, Nucleic Acids Res. 1 ;31(5) :1416-25(2003)
- [0560] Santoro SW 和 Joyce GF Proc Natl Acad Sci USA. 29 ;94(9) :4262-6. (1997)
- [0561] Whitney A. 等人, Chem Commun(Camb). 7 ;(1) :36-7(2003).

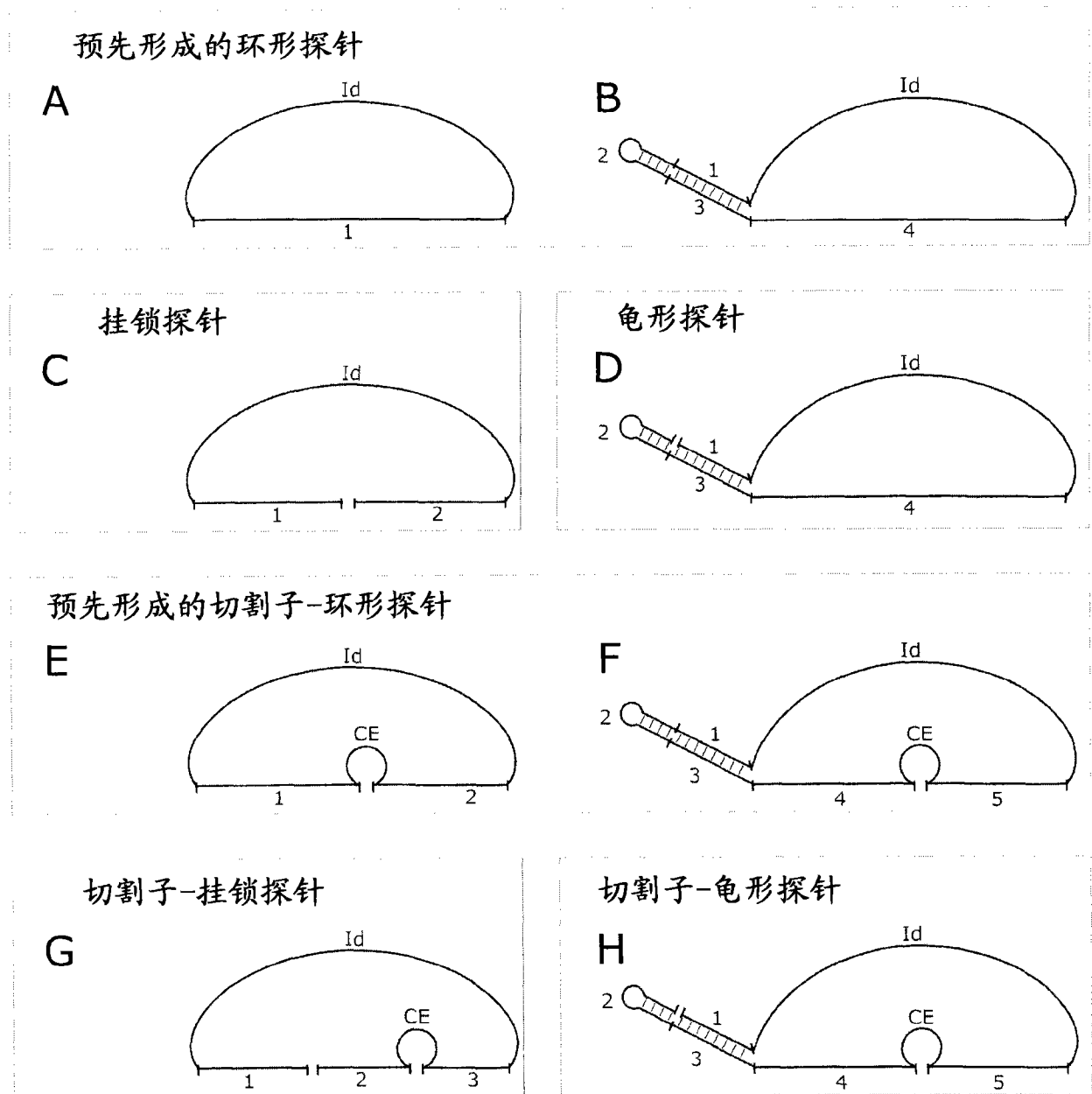


图 1



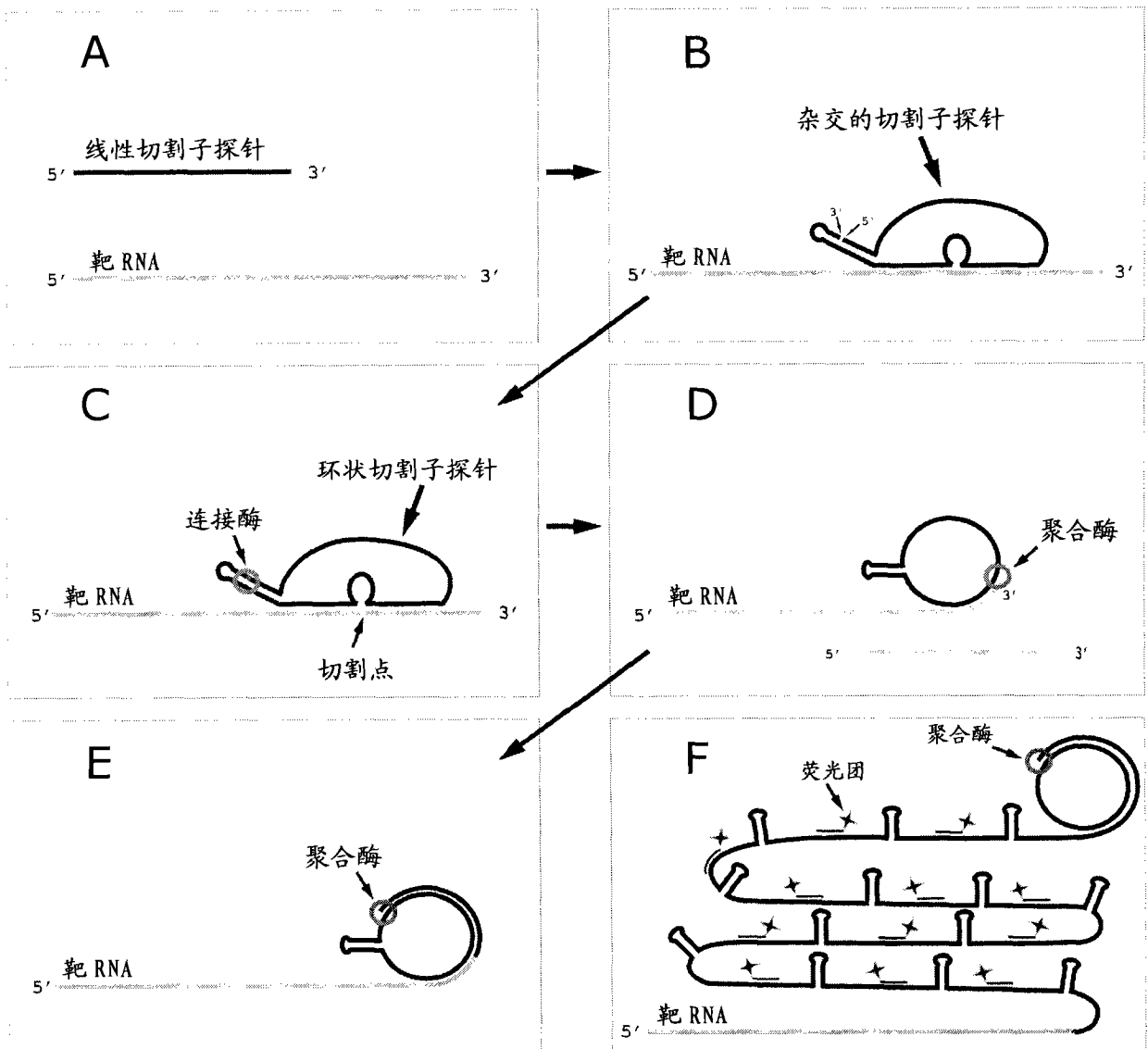


图 2

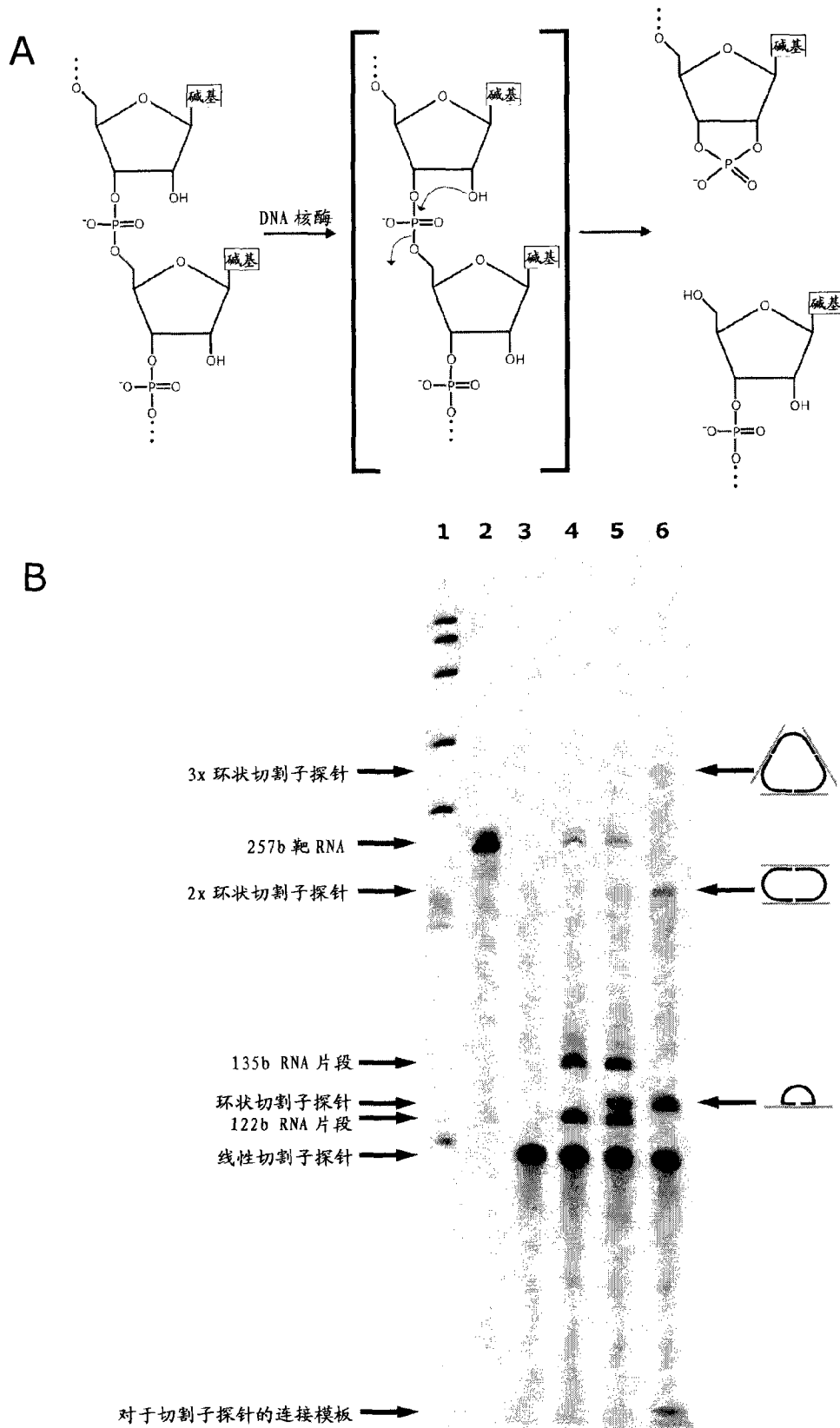


图 3

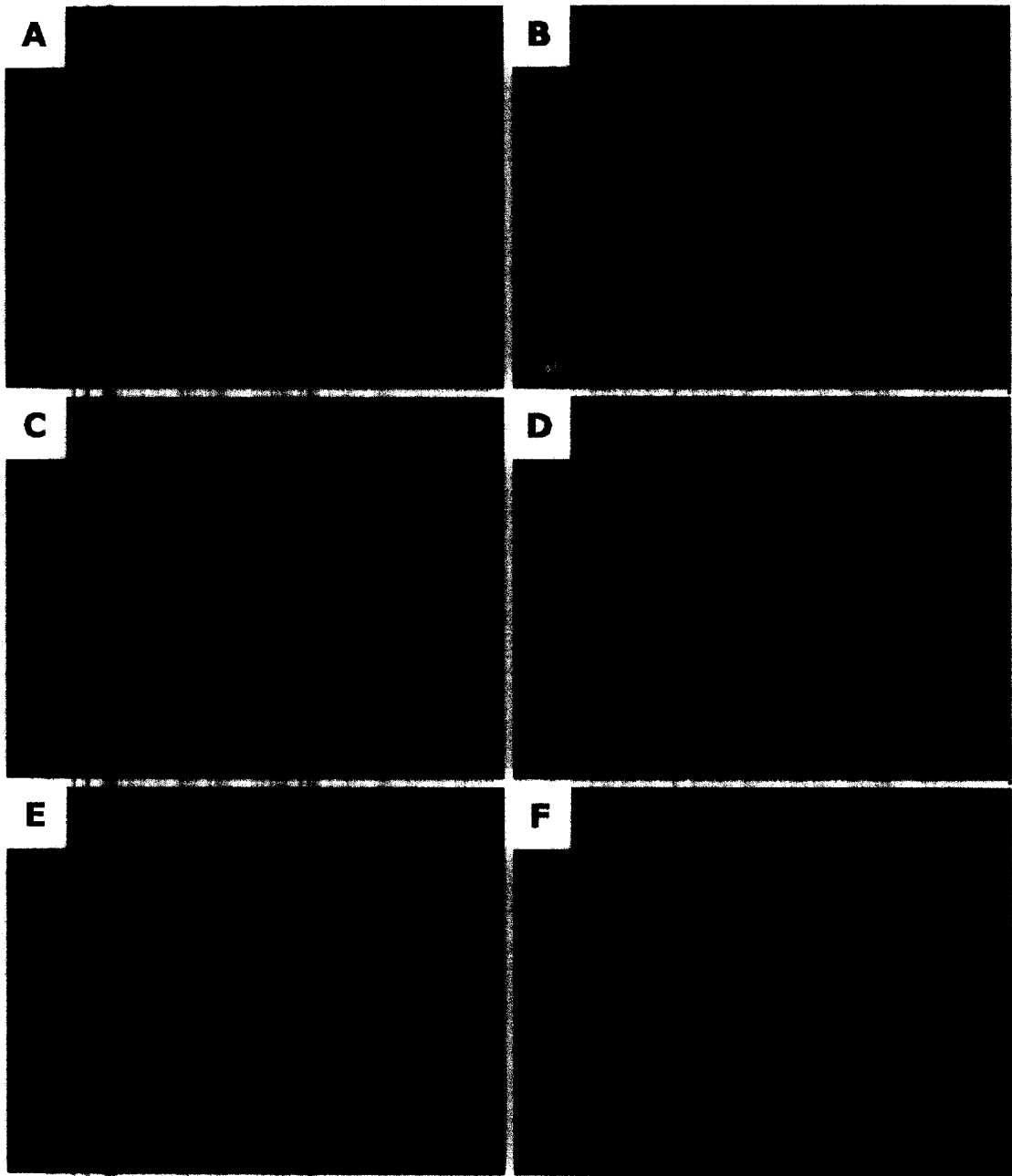


图 4

A

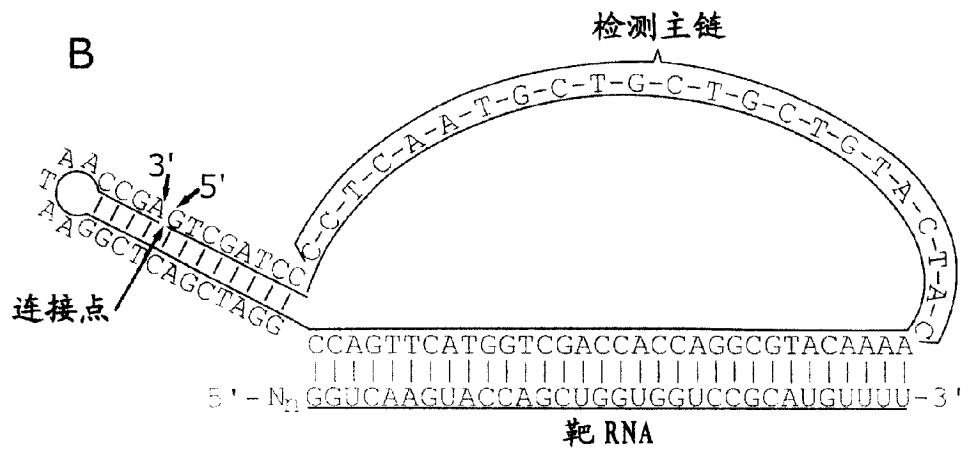
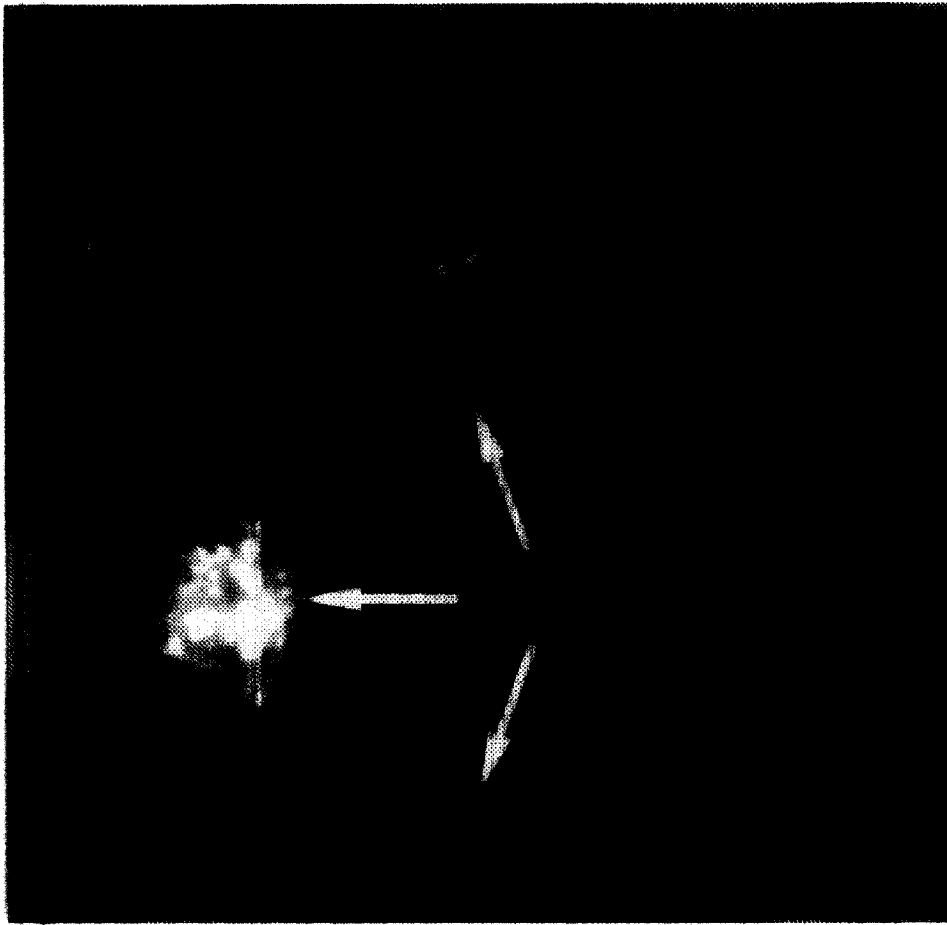


图 5

A

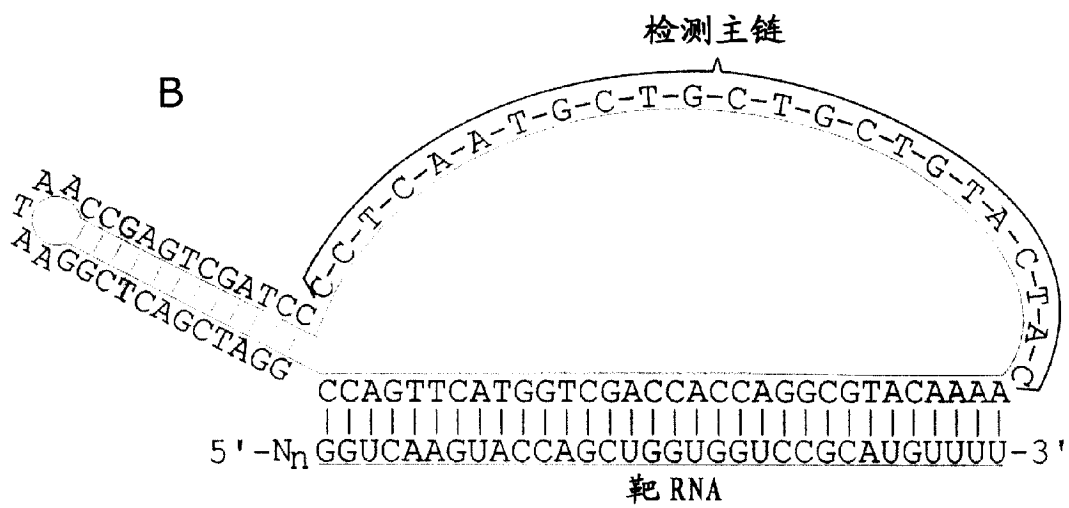
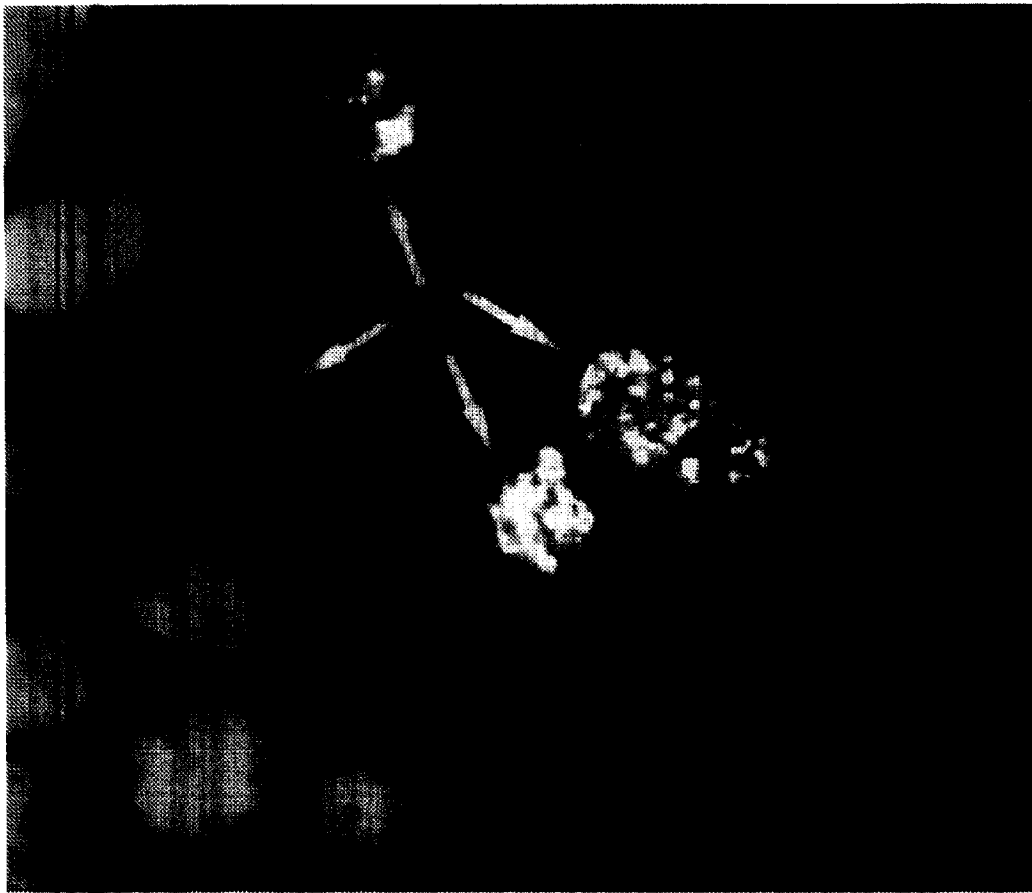


图 6

A

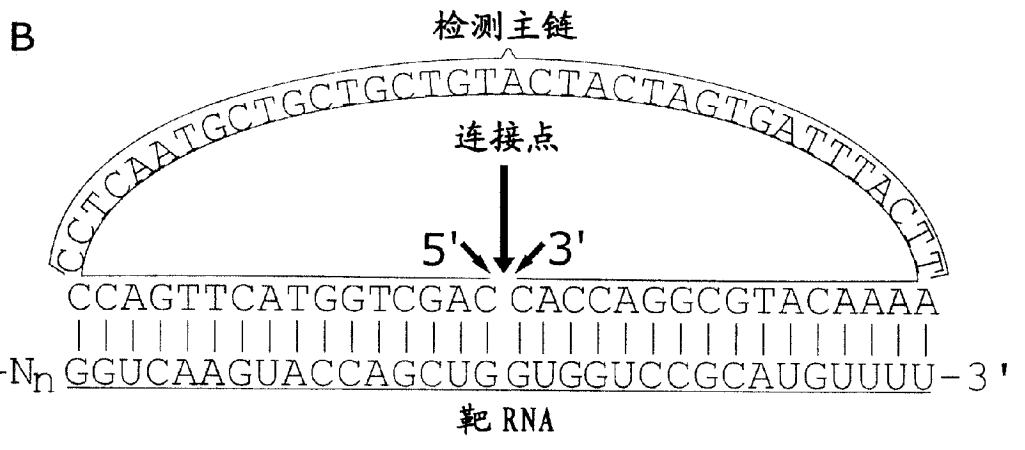


图 7

A

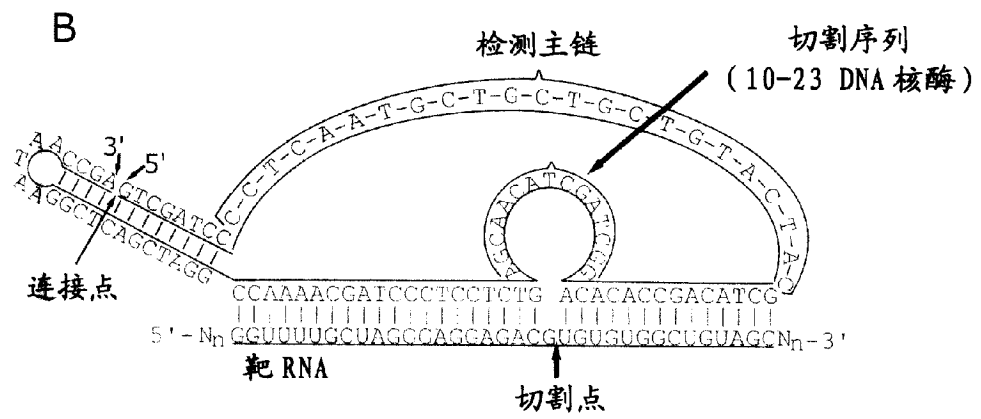
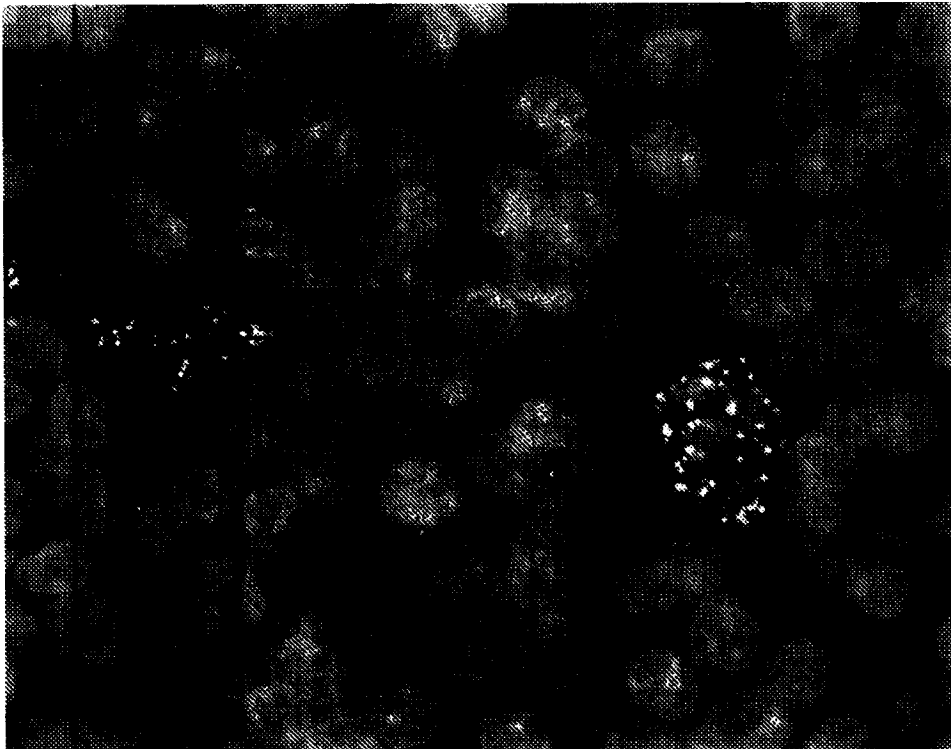


图 8

A



B

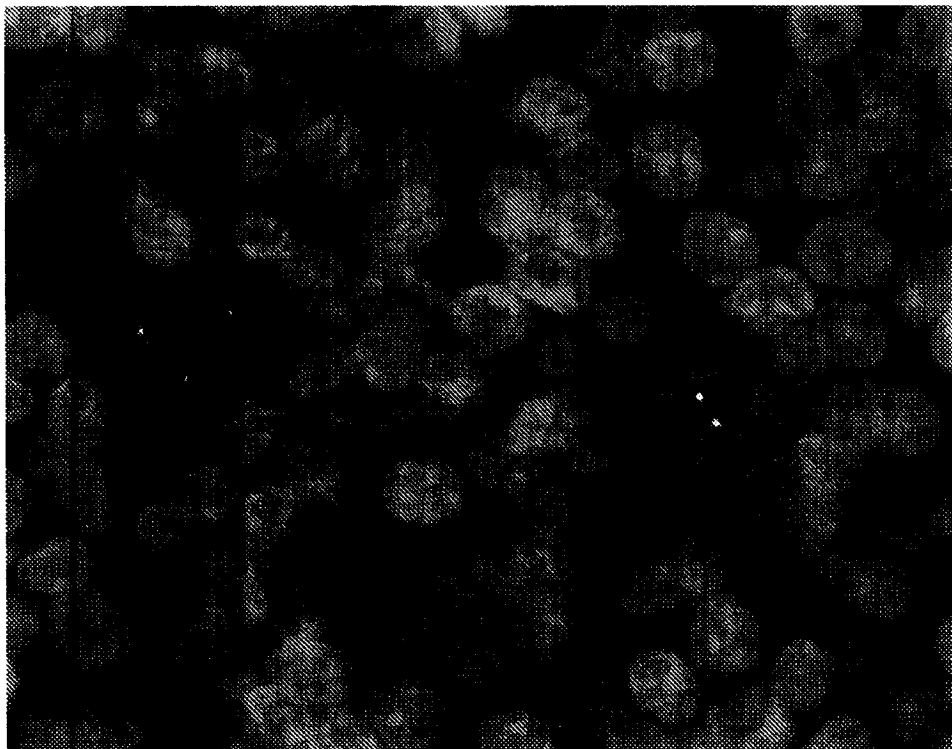


图 9