



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106702000 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201710109955.4

(22)申请日 2010.01.07

(30)优先权数据

61/143113 2009.01.07 US

(62)分案原申请数据

201080004356.2 2010.01.07

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M.格罗 V.布罗菲

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 万雪松

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

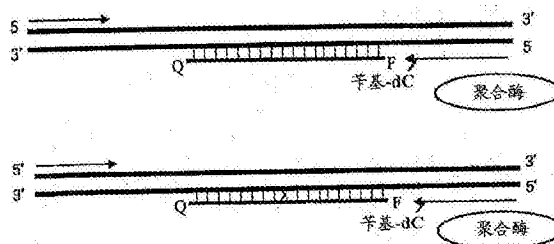
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

利用等位基因特异性抑制序列变体的核酸扩增

(57)摘要

本发明涉及利用等位基因特异性抑制序列变体的核酸扩增。本发明是选择性扩增目标序列的某些变体的改进方法,其通过等位基因特异性的抑制目标序列的一种或多种其它变体的扩增来得到增强。这种改进通过提供与目标序列的需要变体的杂交亲和力低于与目标序列的不需要变体的杂交亲和力的寡核苷酸,和任选通过提供化学修饰的引物和热启动条件来实现。



1. 一种选择性扩增目标序列的需要变体的方法, 所述目标序列以多种变体形式存在, 所述方法包括以下步骤:

- a) 在反应混合物中提供可能包含所述目标序列的至少一种变体的样品;
- b) 提供能与所述目标序列的多种变体杂交的第一寡核苷酸;
- c) 提供能与所述目标序列的多种变体杂交的第二寡核苷酸, 其中所述第二寡核苷酸的至少部分在3' 末端或其附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基, 且其中所述修饰的碱基是于环外氨基基团的修饰;
- d) 提供第三寡核苷酸, 其与所述目标序列的需要变体杂交的亲合力低于与所述目标序列的不需要变体杂交的亲合力, 并设计为与所述第二寡核苷酸杂交相同的链且位于所述第二寡核苷酸下游0-60个核苷酸之间;
- e) 提供基本上没有5' -3' 核酸酶活性的核酸聚合酶;
- f) 使所述反应混合物进行聚合酶链式反应,

其中所述第一和第二寡核苷酸的量是不相等的, 从而使得第一寡核苷酸过量存在; 并且当所述第三寡核苷酸杂交于所述目标序列的不需要变体时, 所述第三寡核苷酸显著抑制所述核酸聚合酶对所述第二寡核苷酸的延伸, 但是当所述第三寡核苷酸杂交于所述目标序列的需要变体时, 其基本上不抑制所述核酸聚合酶对所述第二寡核苷酸的延伸。

2. 权利要求1的方法, 其中所述第一、第二和第三寡核苷酸中的至少一种是标记的。

3. 权利要求1的方法, 其还包括检测扩增的核酸序列。

4. 权利要求1的方法, 其中所述第一寡核苷酸是SEQ ID NO:2, 所述第二寡核苷酸是SEQ ID NO:3和/或所述第三寡核苷酸是SEQ ID NO:5。

5. 权利要求1的方法, 其中所述核酸聚合酶具有热启动能力。

6. 一种用于选择性扩增目标序列的需要变体的反应混合物, 所述目标序列以多种变体形式存在, 所述混合物包括:

- a) 能与所述目标序列的多种变体杂交的第一寡核苷酸;
- b) 能与所述目标序列的多种变体杂交的第二寡核苷酸, 其中所述第二寡核苷酸的至少部分在3' 末端或其附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基, 且其中所述修饰的碱基是于环外氨基基团的修饰;
- c) 第三寡核苷酸, 其与所述目标序列的需要变体杂交的亲合力低于与所述目标序列的不需要变体杂交的亲合力, 并设计为与所述第二寡核苷酸杂交相同的链且位于所述第二寡核苷酸下游0-60个核苷酸之间;
- d) 基本上没有5' -3' 核酸酶活性的核酸聚合酶;

其中所述第一和第二寡核苷酸的量是不相等的, 从而使得第一寡核苷酸过量存在; 并且所述第三寡核苷酸能可检测性地抑制所述目标序列的不需要变体的扩增, 但是不抑制所述目标序列的需要变体的扩增。

7. 权利要求6的反应混合物, 其中所述第一、第二和第三寡核苷酸中的至少一种是标记的。

8. 权利要求6的反应混合物, 其还包括一定量的所述目标核酸。

9. 权利要求6的反应混合物, 其中所述第一寡核苷酸是SEQ ID NO:2, 所述第二寡核苷酸是SEQ ID NO:3和/或所述第三寡核苷酸是SEQ ID NO:5。

10. 权利要求6的反应混合物,其中所述核酸聚合酶具有热启动能力。

11. 一种用于选择性扩增目标序列的需要变体的试剂盒,所述目标序列以多种变体形式存在,所述试剂盒包括:

- a) 能与所述目标序列的多种变体杂交的第一寡核苷酸;
- b) 能与所述目标序列的多种变体杂交的第二寡核苷酸,其中所述第二寡核苷酸的至少部分在3' 末端或其附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基,且其中所述修饰的碱基是于环外氨基基团的修饰;
- c) 第三寡核苷酸,其与所述目标序列的需要变体杂交的亲合力低于与所述目标序列的不需要变体杂交的亲合力,并设计为与所述第二寡核苷酸杂交相同的链且位于所述第二寡核苷酸下游0-60个核苷酸之间;
- d) 基本上没有5' -3' 核酸酶活性的核酸聚合酶;
- e) 用于扩增核酸所必需的试剂和溶液;

其中所述第一和第二寡核苷酸的量是不相等的,从而使得第一寡核苷酸过量存在;并且所述第三寡核苷酸能可检测性地抑制所述目标序列的不需要变体的扩增,但是不抑制所述目标序列的需要变体的扩增。

12. 权利要求11的试剂盒,其还包括一种或多种适用于使核酸焦磷酸解作用最小化的试剂和适用于保护扩增反应免受核酸遗留污染的试剂。

利用等位基因特异性抑制序列变体的核酸扩增

[0001] 本申请是国际申请日为2010年1月7日的国际申请PCT/EP2010/000030进入中国、申请号为201080004356.2的题为“利用等位基因特异性抑制序列变体的核酸扩增”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及基于核酸的分子诊断领域,更具体地说,本发明涉及利用等位基因特异性抑制不需要序列变体扩增的核酸序列扩增的改进方法。

背景技术

[0003] 基于核酸的诊断测试广泛地用于医学、法医学和环境应用中。检测特定核酸序列中的变异提供关于多态性和突变(包括致病突变)的信息。例如,检测个体的突变基因型为遗传咨询提供携带者的状态。一个更具挑战性的任务是检测源于组织并引起疾病或疾病发展的体细胞突变。例如,许多癌症由特定突变引起。随后,在肿瘤进展期间,其它的突变积累存在于癌细胞中。参见Lea等(2007) Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site and exposure-specific patterns, *Carcinogenesis*, 28 (9): 1851-1858; Downward, J. (2003) Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy (2005), *Nature Rev. Cancer*, 3: 11-22。这些突变预示疾病结果和对治疗的响应。参见Ikediobi等(2008) Somatic pharmacogenomics in cancer, *Pharmacogenomics J.*, 8: 305-314; Pao等(2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib and or erlotinib, *PLoS Medicine*, 2 (1), e17。检测这种突变的能力对癌症诊断和治疗极其有用。然而,突变的检测,尤其是早期检测面临很多技术难题。

[0004] 检测癌症相关突变的主要难题是其罕见的性质,特别是癌发生中突变刚出现于单细胞时。最初,只有部分细胞携带突变,而周围细胞仍然携带野生型序列。因此在核酸的分离物中,新突变的核酸隐藏于过量的野生型核酸中。许多等位基因特异性检测方法(例如等位基因特异性PCR)包括相对于不需要的序列(野生型序列),优先扩增目标序列(突变序列)。不幸的是,多数情况下该方法的选择性并不完美,即不需要序列也被扩增,虽然比所需要序列的扩增效率低很多。因为存在的不需要(野生型)序列的摩尔数大大超过突变序列,其扩增劣势被消除,并且野生型序列被显著扩增从而遮蔽了存在的突变序列。

[0005] 已经开发了应对该难题的一些方法。例如,美国专利号5,849,497和2008年8月5日申请的申请顺序号12/186,311教导了利用防止竞争性不需要序列的扩增的扩增阻断剂。在该方法中,阻断剂是在一个扩增引物的下游与不需要序列(但是不与所需序列)形成稳定杂交体的不可延伸的寡核苷酸。当阻断剂稳定杂交后,缺乏5' -3' 核酸酶活性的DNA聚合酶不能完成引物的延伸。该方法的成功依赖于需要序列和不需要序列间的序列差异。该方法最好用于序列之间有多个差异的情形下,以确保阻断剂和待抑制序列之间的杂交稳定,而阻断剂和待扩增序列之间的杂交不稳定。

[0006] 上述方法有几个技术局限。较长的阻断剂寡核苷酸对阻断更有效,但可能不能区

分差异,因此阻断了所有序列变体的扩增。较短的阻断剂可能不能有效阻断任何扩增。在某些序列组成中,可能差异很少以至于阻断剂只能进行非常微弱的区分。因此,在某些有临床意义的基因座中,仅阻断剂还不足以解决等位基因特异性扩增的技术问题。

发明内容

[0007] 本发明是对目标序列的需要变体进行选择扩增的改进方法,其中所述目标序列以多种变体形式存在,该方法包括如下步骤:提供在反应混合物中可能包含至少一种目标序列变体的样品;提供能和目标序列的多种变体杂交的第一寡核苷酸;提供能和目标序列的多种变体杂交的第二寡核苷酸,其中所述第二寡核苷酸的至少一部分在3'末端或3'末端附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基;提供第三寡核苷酸,其与所述目标序列的需要变体杂交的亲合力低于与目标序列的不需要变体杂交的亲合力,并设计为与所述第二寡核苷酸杂交相同的链且位于所述第二寡核苷酸下游0-60个核苷酸之间的位置;提供基本上没有5'-3'核酸酶活性和具有热启动能力的核酸聚合酶;使所述反应混合物进行聚合酶链式反应,其中当所述第三寡核苷酸杂交目标序列的不需要变体时,所述第三寡核苷酸显著抑制所述核酸聚合酶对所述第二寡核苷酸的延伸,但是当所述第三寡核苷酸杂交于目标序列的需要变体时,其基本上不抑制所述核酸聚合酶对所述第二寡核苷酸的延伸。

附图说明

[0008] 图1是本发明方法的示意图。

[0009] 图2图示根据本发明的实施例1,分别扩增和解链分析野生型和KRAS突变靶的结果。

[0010] 图3-8图示根据本发明的实施例2,在野生型和突变体样品的混合物中,等位基因特异性扩增和检测KRAS突变的结果。

[0011] 图9图示根据本发明的实施例3,在得自患者的福尔马林固定石蜡包埋组织(FFPET)样品中,等位基因特异性扩增和检测KRAS突变的结果。

[0012] 图10图示本发明的实施例中使用的目标核酸序列。

具体实施方式

[0013] 本发明是选择性扩增目标序列的某些变体的改进方法,其通过等位基因特异性抑制目标序列的一种或多种其它变体的扩增而得到增强。

[0014] 定义

[0015] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解一致的含义。在描述本发明和主张本发明权利中,将使用以下的定义。

[0016] “生物样品”或“样品”指可能包含目的核酸的任何物质。本领域技术人员可用公知的任何方法获得样品。这样的样品可以是从小人或其它动物分离的一定量的组织或液体,或其纯化部分,包括但不限于:体液(例如血浆、血清、脊髓液、唾液、腹水、淋巴液、水性或玻璃体液、滑液、尿液、眼泪、精液、阴道液体、肺积液、浆膜液)和组织(包括血液、正常组织、肿瘤和石蜡包埋组织)。样品也可以是(或来自于)体外细胞培养物。样品可以包括条件培养液(medium)、细胞和细胞组分。核酸可用本领域公知的方法从生物样品中获得。

[0017] 本文所用“阻断剂寡核苷酸”指下列描述的寡核苷酸：

[0018] (1) 以足够低的解链温度和目标序列的某些变体形成双链体，以允许显著缺乏5' - 3' 核酸酶活性的聚合酶移除 (displace) 阻断剂寡核苷酸，使目标序列的那些变体得以复制；和

[0019] (2) 以足够高的解链温度和目标序列的其它变体形成双链体，以削弱显著缺乏5' - 3' 核酸酶活性的聚合酶复制目标序列的那些变体。

[0020] 阻断剂寡核苷酸通常在3' 末端包含修饰以防止阻断剂寡核苷酸通过聚合酶延伸。

[0021] “目标序列”指生物样品中待检测的核苷酸序列。目标序列可以是较大序列或分离的核酸的一部分。

[0022] 短语“削弱扩增”指消除或可检测地减少序列的扩增。如本文所述，和缺乏阻断剂寡核苷酸的对照反应相比，阻断剂寡核苷酸可以削弱目标序列的一种或多种变体的扩增，使得这些变体的扩增检测不到，或较少检测到。

[0023] 术语“核酸”和“多核苷酸”可交替使用，指RNA、DNA和其修饰形式（例如肽核酸 (PNA)、锁定核酸 (LNA) 等）的聚合体。术语“核酸”和“多核苷酸”之间的长度并无有意的区分。“寡核苷酸”通常是较短的核酸，其常为单链。

[0024] 核酸是单链或双链，通常包含磷酸二酯键，虽然在某些情况下，可能有替代骨架的核酸类似物也包含其中，包括例如磷酰胺 (Beaucage等 (1993) Tetrahedron 49 (10):1925; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzl等 (1977) Eur. J. Biochem. 81:579; Letsinger等 (1986) Nucl. Acids Res. 14:3487; Sawai等 (1984) Chem. Lett. 805; Letsinger等 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; 和 Pauwels等 (1986) Chemica Scripta 26:1419); 硫代磷酸酯 (Mag等 (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437 和美国专利号 5,644,048); 二硫代磷酸酯 (Briu等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321); 0-甲基亚磷酰胺键 (0-methylphosphoroamidite linkages) (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992)); 以及肽核酸骨架和键 (Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895; Meier等 (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008; Nielsen (1993) Nature 365:566; 和 Carlsson等 (1996) Nature 380:207)。其它类似物核酸包括具有正电荷骨架的类似物核酸 (Denpcy等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097); 非离子骨架核酸类似物 (美国专利号 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 和 4,469,863; Angew (1991) Chem. Intl. Ed. English 30:423; Letsinger等 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; Letsinger等 (1994) Nucleoside & Nucleotide 13:1597; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook 主编; Mesmaeker等 (1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395; Jeffs等 (1994) J. Biomolecular NMR 34:17; Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) 和非核糖骨架核酸类似物，包括以下文献所述的核酸类似物：美国专利号 5,235,033 和 5,034,506, 和 Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook 主编。包含一种或多种碳环糖的核酸也包括于核酸的定义范围内 (Jenkins等 (1995) Chem. Soc. Rev. pp 169-176)。数个核酸类似物也描述于例如 Rawls, C&E News Jun. 2, 1997 第35页。磷酸核糖骨架的这些修饰可以促进添加其它部分例如标记部分，或者改变这些分子在生理环境中的稳定性

和半寿期。

[0025] 核酸通常包含典型的含氮碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶)。不过,核酸也可以包含非天然的杂环碱基或其它修饰碱基。具体地说,这样的碱基描述于 Seela等(1991) *Helv.Chim.Acta* 74:1790, Grein等(1994) *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 4:971-976, 和 Seela等(1999) *Helv.Chim.Acta* 82:1640。其它碱基包括7-脱氮嘌呤(例如7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑并[3,4-d]嘧啶、丙炔基-dN(例如丙炔基-dU、丙炔基-dC等)等。参见例如美国专利号5,990,303。其它代表性的杂环碱基包括次黄嘌呤;肌苷;黄嘌呤;以下碱基的8-氮杂衍生物:2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤;以下碱基的7-脱氮-8-氮杂衍生物:腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤;6-氮杂胞苷;5-氟胞苷;5-氯胞苷;5-碘胞苷;5-溴胞苷;5-甲基胞苷;5-丙炔基胞苷;5-溴乙烯尿嘧啶;5-氟尿嘧啶;5-氯尿嘧啶;5-碘尿嘧啶;5-溴尿嘧啶;5-三氟甲基尿嘧啶;5-甲氧基甲基尿嘧啶;5-乙炔基尿嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶;4-乙酰胞苷;5-(羧基-羟甲基)尿嘧啶;5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-羧甲基-氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷(galactosylqueosine)、肌苷、N6-异戊烯腺苷、1-甲基鸟苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、7-脱氮腺苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、3-甲基胞苷、5-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、7-脱氮鸟苷、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧基-甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺苷、尿嘧啶-5-羟基乙酸(v)、假尿苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-硫基胞苷、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w, 2,6-二氨基嘌呤和5-丙炔基嘧啶等。

[0026] 非天然碱基和核苷酸的其它实例是5-丙炔基嘧啶,参见美国专利号5,484,908;和其它修饰嘧啶,参见美国专利号5,645,985和5,830,653。[2.2.1] 二环核苷酸描述于美国专利号6,639,059中。其它修饰嘌呤和嘧啶描述于美国专利号6,011,611中。

[0027] 术语“引物延伸”指核苷酸掺合生物催化剂(例如聚合酶)以在引物的3'端加上一个或多个核苷酸的能力。

[0028] “适合引物延伸的条件”指在这样的条件下杂交于模板核酸的引物通过核苷酸掺合生物催化剂(例如聚合酶)得以延伸。例如这种条件出现在聚合酶链式反应(PCR)的退火和延伸步骤中。本领域的技术人员能够理解这种条件可以变化,并且通常受溶液的离子强度、温度和特定模板核酸和引物的序列的影响。各种PCR条件描述于PCR Strategies (M.A.Innis,D.H.Gelfand和J.J.Sninsky主编,1995,Academic Press,San Diego,Calif.)的第14章;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications (M.A.Innis,D.H.Gelfand,J.J.Sninsky和T.J.White主编,1990 Academic Press,N.Y.)。

[0029] 当一种核酸的至少部分序列可以和另一种核酸的至少部分序列以反向平行的关系结合形成双链体时,则所述一种核酸相对于另一种核酸是“互补的”。本发明中,如果寡核苷酸和特定核酸序列“完全互补”,则寡核苷酸的每个碱基都和特定序列的对应碱基互补。当一种寡核苷酸中的一个或多个碱基和另一种特定核酸的对应碱基并不互补(“错配”),则所述一种寡核苷酸是和特定核酸序列“部分互补”。通常认为修饰的碱基和他们没有修饰的前体一样与相同的碱基互补。例如7-脱氮鸟嘌呤被认为和胞嘧啶互补,而N6-苄基-腺嘌呤

被认为和胸腺嘧啶互补。

[0030] “引物核酸”或“引物”是寡核苷酸,其在合适反应条件下能杂交于目标核酸(有时称作模板核酸)并通过核苷酸掺合生物催化剂(例如聚合酶)从而允许链延伸或延长。引物核酸通常是天然的或合成的寡核苷酸,长度范围是约6-100个核苷酸,而最常见的引物长度在15和35个核苷酸之间。短引物核酸通常需要较低的温度以便和模板核酸形成足够稳定的杂交双链复合体。与模板核酸至少部分互补的引物通常足以发生延伸。设计用于扩增给定目标序列的合适的引物是本领域公知的,且描述于本文引用的文献中。如需要,可以通过掺入分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它方法可检测的标记物来标记引物。为了举例说明,有用的标记物包括:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶(如在ELISA中常用的酶)、半抗原和抗血清或单抗体都可用的蛋白。这里的许多标记物和其它标记物在本文做了描述或者是本领域公知的。

[0031] 本文所用的术语“探针”指寡核苷酸或其它核酸序列,其由于与目标核酸的至少部分序列部分互补或完全互补,所以可以在合适的条件下与目标核酸的局部区域形成双链体结构。如在本文中讨论的,探针通常被标记从而允许检测目标核酸。探针的3'末端通常设计为防止探针通过掺入生物催化剂的核苷酸延伸。这可以利用非互补碱基或加入化学部分(例如生物素或磷酸基)到3'末端核苷酸的3'-羟基上来实现。这些3'末端化学部分可具有接下来用作检测标记或者捕获已杂交探针的核酸的双重功能。通过去除3'-OH、利用缺乏3'-OH(例如双脱氧核苷酸)的核苷酸或者添加利用位阻阻碍延伸的庞大基团实现抑制延伸。如本文进一步的讨论,本发明的阻断剂寡核苷酸可任选用作探针。

[0032] 术语“5'-3'核酸酶活性”指核酸聚合酶的活性,通常伴有核酸链合成,其中核苷酸从核酸链的5'端被除去,例如大肠杆菌DNA聚合酶I就具有这种活性,而Klenow片段则没有。

[0033] 术语“基本上没有5'-3'核酸酶活性的核酸聚合酶”或“5'-3'核酸酶缺陷型酶”或简化为“核酸酶缺陷型酶”指聚合酶的5'-3'活性比Taq DNA聚合酶的低50%以上。检测5'-3'核酸酶活性的方法和检测条件描述于美国专利号5,466,591中。缺乏5'-3'核酸酶活性的聚合酶的实例包括Taq DNA聚合酶的Stoffel片段(美国专利号5,466,591)、非洲栖热腔菌(*Thermus africanus*)DNA聚合酶的突变体(美国专利号5,968,799)、海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)DNA聚合酶的突变体(美国专利号5,624,833和5,420,029)、栖热菌sps17和栖热菌Z05 DNA聚合酶的突变体(美国专利号5,466,591和5,405,774)。5'-3'核酸酶缺陷型酶也可以是嵌合体(即嵌合蛋白),其由多种酶的结构域组成并且具有消除5'-3'核酸酶活性的突变(美国专利号5,795,762和6,228,628)。

[0034] 示例性的热稳定DNA聚合酶包括来自以下细菌的聚合酶:嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、*Thermus caldophilus*、栖热菌Z05(*Thermus sp. Z05*) (参见例如美国专利号5,674,738)、水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)、黄栖热菌(*Thermus flavus*)、丝状栖热菌(*Thermus filiformis*)、栖热菌sps17(*Thermus sp. sps17*)、抗辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*)、温泉家族B/克隆7(Hot Spring family B/clone 7)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、热坚芽孢杆菌(*Bacillus caldotenax*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)、那不勒斯海栖热袍菌(*Thermotoga neapolitana*)和非洲栖热腔菌(*Thermosiphon africanus*)。无数热稳定的DNA聚合酶的全长核酸和氨基酸序列可得自公共数据库。

[0035] 本文所用的术语“ T_m ”指“解链温度”。解链温度是指在该温度下一半数量的双链核酸分子(即完全或部分互补的核酸双链体)解链成为单链。预测双链多聚核苷酸的 T_m 要考虑碱基序列和其它因素,包括结构和序列特征、互补程度、聚合键性质和溶液的离子强度。本领域公知预测和试验性确定 T_m 的方法。例如, T_m 传统上由解链曲线分析确定,其中逐渐加热双链核酸分子,双链体的结合/解离状态通过检测与双链体的解链相关的可检测参数的变化来监测。标绘相对于温度改变的参数改变。从该解链曲线确定 T_m 。

[0036] 在核酸扩增反应中的术语“热启动”是一种试验设计,其中在温度升高到足以提供引物需要的杂交特异性之前,至少一种关键试剂不加入反应混合物(或者,如果存在于反应混合物中,则保持该试剂失活)。“热启动酶”是这样一种酶(通常为核酸聚合酶):其能在热启动的试验设计中作为“保留”或失活的试剂。

[0037] 本发明是选择性扩增核酸的改进,其使用等位基因特异性抑制目标序列的不需要变体的扩增。图1是本发明方法的示意图。该图显示双链核酸靶和能退火结合于其中之一引物(箭头所指)下游的核酸靶的阻断剂寡核苷酸。化学修饰位于阻断剂上游的引物的3'末端。F代表荧光报告部分,Q代表缀合于阻断剂寡核苷酸上的荧光猝灭剂。

[0038] 本发明的改进基于引物和阻断剂寡核苷酸相对邻近以及引物和聚合酶的特定化学修饰的发现,其大大改善了选择性扩增。

[0039] 2008年8月5日提交的美国申请顺序号12/186,311教导了抑制扩增目标序列的不需要变体的一般方法。通过阻断剂寡核苷酸的等位基因特异性抑制扩增的成功依赖于阻断剂寡核苷酸和靶之间杂交的稳定性。当阻断剂的杂交体越稳定(如在不需要序列的情况下),阻断剂就抑制扩增。当阻断剂的杂交体不太稳定(如在待扩增的序列的情况下),扩增发生。提高核酸杂交体稳定性的传统方法是增加杂交核酸的长度。但是,增加阻断剂寡核苷酸的长度会降低区分度。目标序列的所有变体的扩增都将被抑制。因此,对于任何给定的目标序列,优化阻断剂寡核苷酸的能力是受限的。

[0040] 如申请顺序号12/186,311中所描述,阻断剂寡核苷酸通常设计为在两条引物寡核苷酸之间的任何位置进行杂交。阻断剂可以杂交至目标核酸的一条或两条链。唯一已知的要求是阻断剂杂交的链必须和延伸将被抑制的引物结合的链相同而且必须位于该引物的下游。但是,在本发明中,发现引物的3'末端和阻断剂寡核苷酸的5'末端之间的距离影响阻断的效率。一般来说,引物和阻断剂相应末端之间的最佳距离是0-60个核苷酸。对于每个特定目标序列,该范围内的最佳距离可以利用本文提供的指引经验性确定。

[0041] 本文发现的另一个创新是引物(位于阻断剂寡聚核苷酸的上游并且杂交同一链)的3'末端可被化学修饰从而提升阻断的程度。传统上,化学修饰见于等位基因特异性引物,即引物与所需序列变体匹配但是与不需要的序列变体错配。美国专利号6,011,611描述了影响扩增引物特异性的化学修饰的实例。这些修饰包括在某些含氮碱基的环外氨基基团共价结合。普遍已知于引物3'末端大约5个核苷酸内的一个或多个核苷酸的修饰增加扩增的特异性。根据现有技术,当引物与所需的和不需要的序列变体同等互补时,则引物的化学修饰不是必需的。

[0042] 令人惊奇的是,本发明者们发现引物化学修饰在通过阻断剂寡核苷酸的等位基因特异性抑制扩增的成功中起作用。这种作用尤其令人惊讶,因为引物自身并不像现有技术要求的那样是等位基因特异性的。引物与需要的和不需要的序列变体同等互补。

[0043] 在某些实施方案中,本发明是等位基因特异性的抑制不需要序列变体扩增的选择性扩增分析,其是在少量的需要序列变体和摩尔过量的不需要序列变体存在下实施的。在某些实施方案中,需要的和不需要的序列变体的比例是1:1、1:20、1:100、1:1000或更高。

[0044] 本发明的阻断剂寡核苷酸设计为退火和杂交于引物结合位点之间的目标序列的部分。阻断剂可设计为杂交至目标核酸的一条或两条链。设计阻断剂寡核苷酸以形成与不需要形式的目标序列形成的杂交体的解链温度比需要形式的目标序列的高。2008年8月5号提交的美国专利申请顺序号12/186,311中描述了用于抑制不需要序列变体扩增的阻断剂寡核苷酸的设计。

[0045] 通常,设计阻断剂以掺入与目标序列的需要变体相比具有一个或多个错配。对于目标序列的其它变体,阻断剂具有较少的错配或完全没有错配。因为互补程度影响核酸杂交体的解链温度,所以阻断剂寡核苷酸和目标序列的需要变体之间形成的杂交体的 T_m 优选为阻断剂寡核苷酸形成的所有杂交体中最低的 T_m 。除了互补程度以外,寡核苷酸的解链温度也受非常规碱基的存在和数量的影响,其可以是如本领域公知的“稳定化”(例如5-甲基胞嘧啶和丙炔基尿嘧啶核苷)或“去稳定化”(例如 N^6 -苄基腺苷)。任选地,这样的碱基可以掺入阻断剂寡核苷酸中以进一步调节其解链温度。

[0046] 综合来说,现有技术教导阻断剂寡核苷酸必须位于两个扩增引物之间,并且杂交至延伸将被抑制的引物的下游而且与该引物相同的杂交链杂交。在本发明的范围内,发现阻断剂和引物寡核苷酸的相对位置极大地影响阻断剂抑制扩增的能力。例如,阻断剂可以位于引物3'末端下游的0-60个(例如0、1、2、3或更多个)核苷酸的位置,并且与上游引物杂交相同的链。

[0047] 阻断剂寡核苷酸可以“人工”设计或利用本领域从业者公知的任何一种寡核苷酸设计软件程序,包括Visual OMP (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Mich.)、Oligo 6 (Stratagene, La Jolla, Calif.)、Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, Mich.)和DNASar (DNASar, Inc., Madison, Wis.)。设计的目的是产生阻断剂寡核苷酸,使得在特定扩增分析的温度和条件下,目标序列的不同变体和阻断剂之间的杂交体具有不同热力学稳定性。

[0048] 在某些实施方案中,阻断剂寡核苷酸有用于检测目标序列扩增的探针的双重功能。要用为探针,可以用本领域公知的任何类型的可检测标记物标记该阻断剂寡核苷酸。例如,标记物可以是荧光、化学发光、放射性、酶等物质。这种阻断剂-探针寡核苷酸可以用于许多检测方法,例如扩增检测(“生长曲线”)和扩增后解链分析。

[0049] 在根据本发明的扩增反应中,可使用一种或多种阻断剂寡核苷酸。阻断剂寡核苷酸可以设计为和待扩增核酸的一条链杂交,或者不同的阻断剂可设计为与两条链杂交。当设计多条寡核苷酸与核酸的相同链杂交时,寡核苷酸可用于扩增反应的相同或不同的轮次中。例如,当第二轮扩增包含的引物位于第一轮所用引物的内部时,位于该第二轮引物内部的阻断剂可用于第二轮或随后轮次的扩增。所有的或至少一种阻断剂寡核苷酸应该根据本发明的指引来设计。

[0050] 本发明的扩增引物是至少部分互补于目标序列的至少一种现存变体的寡核苷酸。引物的长度可以在6-100个核苷酸之间,可是绝大多数的引物长度通常在15-35个核苷酸之间。已经描述了优化用于核酸扩增的引物的方法,例如PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等主编, (1990) Academic Press。通常引物为合成寡核

苷酸,由A、C、G和T核苷酸组成。但是,也可用不常见于核酸的非常规碱基核苷酸。例如,已知可增加扩增特异性的某些修饰的碱基,参见美国专利号6,001,011。这些修饰包括与核酸碱基环外氨基基团共价连接的烷基、芳基或烷基芳基基团。扩增引物中这些修饰碱基的传统用途是减少非特异性扩增。不过,本发明的一个方面,发现环外氨基基团上有共价修饰的碱基的核苷酸也增加使用阻断剂寡核苷酸的抑制扩增的程度。

[0051] 各种核苷酸掺入生物催化剂(例如DNA聚合酶)在本领域是公知的。任何缺乏5' -3' 核酸酶活性的热稳定性聚合酶都可用于本发明。有时最好使用没有校正阅读(3' -5' 核酸外切酶)活性的酶。

[0052] 合适酶的一个实例是 Δ Z05聚合酶。有时最好酶具有“热启动”能力,例如描述于美国专利号5,677,152和5,773,528中的可逆修饰的酶。热启动酶的一个实例是 Δ Z05-Gold聚合酶。

[0053] 根据本发明检测扩增产物可通过本领域公知的任何方法完成。这些检测方法包括使用标记引物和探针以及各种核酸结合染料。检测方法可以特异性地针对目标序列的一种变体,或者普适于目标序列的所有变体,甚至普适于所有的双链DNA。非特异性检测方法可以在目标序列的不需要变体的扩增极少且预期低于该方法检测极限水平时使用。

[0054] 检测扩增产物可以在扩增结束后,例如通过未标记产物的凝胶电泳和用核酸结合染料对凝胶染色。或者,通过利用合成时掺入或者利用标记的引物扩增产物可携带放射性或化学标记。电泳后或电泳期间,可用本领域公知的合适的放射学或化学工具检测标记的扩增产物。电泳后,也可通过本领域公知的任何一种方法标记的靶特异性的探针来检测产物。标记的探针也可以作用于靶序列而无需电泳,即用“斑点印迹”分析等。

[0055] 在其它实施方案中,扩增产物的存在可以用均相分析检测,即新生的产物在扩增循环中检测而不需要扩增后处理的分析方法。美国专利号5,210,015中描述了使用核酸酶探针的均相扩增分析方法。美国专利号5,871,908和6,569,627中描述了使用嵌入核酸染料的均相扩增分析方法。均相分析也可以采用荧光探针或用两种互相作用的荧光团标记的探针。这种探针的实例包括“分子信标”探针(Tyagi等(1996) Nat. Biotechnol., 14:303-308)或荧光标记的核酸酶探针(Livak等(1995) PCR Meth. Appl., 4:357-362)。

[0056] 本发明的另外一个实施方案是通过确定扩增产物独特的解链温度(T_m)来检测和鉴定它们的方法。在一个变型解链分析中,使用了特异性结合双链体核酸的荧光化合物来监测完整扩增子的解链。具体地说,美国专利号5,871,908中描述了检测嵌入双链体染料的荧光温度依赖性变化。荧光的减少反映了扩增子的解链,从而允许人们确定扩增子的 T_m 。

[0057] 在本发明的另一个实施方案中,杂交体形成于目标DNA和一种或多种荧光标记的探针之间。通常,探针用至少两种荧光团部分标记,形成FRET对。在某些实施方案中,形成FRET对的其中一个部分是非荧光性的猝灭剂。形成FRET对的部分可以缀合于相同或不同的探针分子。因为FRET对成员之间的物理距离的改变,模板-探针杂交体的解链或形成导致的温度改变伴随荧光可检测的变化。美国专利号6,174,670描述了检测缀合于探针对或单个探针的染料温度依赖性荧光改变。利用标记的引物对通过特定基因型独特的 T_m 对其进行鉴定的方法描述于De Silva等(1998) “Rapid genotyping and quantification on the LightCyclerTM with hybridization probes,” Biochemica, 2:12-15。

[0058] 在某些实施方案中,本发明包括不对称PCR。在不对称PCR混合物中,其中一种扩增

引物的量大于另一种引物。引物分别称为“过量引物”和“限制引物”。这些引物的延伸得到的核酸链分别称为“过量链”和“限制链”。可以选择性操作过量引物和限制引物的比例,其可以是200:1到2:1,但通常是9:1到5:1。由于引物过量,过量链以单链形式线性积累。这种过量单链在某些PCR后分析中有用。

[0059] 在某些实施方案中,本发明包括不对称PCR,随后通过解链温度分析表征PCR后的扩增子。美国专利申请公开号2007/0072211描述了不对称PCR后进行 T_m 分析。在典型的反应中,不对称PCR是在一种或多种标记探针存在下进行的。探针的解链和退火与荧光的可检测改变相关联,其反映了核酸双链体的形成和解链。典型地,在不对称PCR中,设计解链探针以杂交“过量链”,即扩增子链得自过量引物的延伸并且其以单链形式累积。

[0060] 本领域公知杂交探针的设计。不论探针是作为核酸酶探针,还是单杂交探针或杂交探针对的一个成员,探针寡核苷酸的设计遵循本领域公知的和本文描述的相同原理指导,并通过人工或者软件的帮助来完成。

[0061] 在本发明的某些实施方案中,为了抑制序列的不需要变体的扩增,结合于相邻的一个引物的阻断剂寡核苷酸也可以作为杂交探针或解链探针或两者。本领域技术人员会迅速识别出适用于这种双重功能寡核苷酸的设计标准。具体地,寡核苷酸应该与目标序列的不同变体具有不同的杂交体解链温度,但是每个解链温度应该在特定系统的检测范围之内。在大多数情况下,这包括解链温度既可检测性不同,但又相对接近。在本发明的其它实施方案中,探针是与阻断剂寡核苷酸分开的寡核苷酸。

[0062] 探针寡核苷酸可以通过掺入各种方法可检测的部分标记,包括放射学、分光镜、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法。对于基于荧光的检测,标记物可以包括染料,例如荧光素家族(FAM、HEX、TET、JOE、NAN和ZOE)、罗丹明家族(Texas Red、ROX、R110、R6G和TAMRA)、花菁家族(Cy2、Cy3、Cy5和Cy7)、香豆素家族、噁嗪家族、噻嗪家族、squaraine家族和其它适合标记和检测核酸的荧光染料家族。此外,荧光染料可与非荧光的猝灭剂部分配对,其实例参见Black Hole QuenchersTM(Biosearch Tech., Novato, Calif.)、Eclipse Dark QuenchersTM(Epoch Biosciences, Bothell, Wash.)和Iowa Black(Integrated DNA Tech., Coralville, Iowa)。

[0063] 在某些实施方案中,本发明包括检测疾病相关的突变,包括野生型(即未突变核酸序列)存在下癌症相关的突变。一般已知在癌症进展过程中,癌细胞累积赋予突变细胞选择有利性的突变,参见Downward, J. (2003) Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy (2005), Nature Rev. Cancer, 3:11-22。通常突变赋予对用于治疗抗肿瘤药物的耐药性,参见Pao等(2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib and or erlotinib, PLoS Medicine, 2(1), e17。检测这种突变会使患者免于所述肿瘤和服用伴有不良副作用的无效药物关联的不必要的风险。从更宽泛的角度来说,检测癌症相关的突变可为现有疾病的预后以及初期癌症筛查提供信息。

[0064] 在一个实施方案中,本发明可用于检测细胞亚群中出现的体细胞突变。为了成功扩增和检测突变核酸序列,扩增引物可设计为杂交怀疑突变位置侧翼的序列。为了抑制野生型序列的扩增,阻断剂寡核苷酸可以设计为完美地(或接近完美地)互补于野生型序列,但是相对于突变序列具有一个或多个错配。设计阻断剂寡核苷酸必须确保在特异性引物退火和延伸将发生的条件下,其与野生型序列形成稳定的杂交体但和突变序列形成不稳定

(或显著较不稳定)的杂交体。例如,利用可用的寡核苷酸设计工具,人们能够设计阻断剂寡核苷酸,以便在扩增反应的典型条件下,阻断剂和野生型序列形成的杂交体的解链温度将高于热循环中所用的退火温度。同时,阻断剂和突变序列形成的杂交体的解链温度将低于热循环中所用的退火温度。

[0065] 根据本发明,寡核苷酸引物可以设计成侧接针对特定疾病或症状的任何数目的目标怀疑突变位点,例如Downward, J. (2003) (同上)中所列的突变。根据本发明,核酸样品可来自新鲜的或保存的患者组织和非患病对照组织,包括福尔马林固定的石蜡包埋组织(FFPET)。

[0066] 仅作为说明并不限制本发明的范围,该方法用于检测已知与许多人实体肿瘤相关的KRAS基因的突变。KRAS突变发现于20-30%的非小细胞肺癌、30-40%的结直肠癌和高达90%的胰腺癌,参见Yeang等(2008) Combinatorial pattern of somatic gene mutations in cancer, FASEB J, 22:2605-2622。KRAS突变赋予针对表皮生长因子受体(EGFR)的药物的耐药性。这种耐药性似乎适用于与靶向EGFR的药物,不管作用的机理如何,酪氨酸激酶抑制剂和抗EGFR抗体都失去了它们抗KRAS突变细胞的效力。

[0067] KRAS基因是一种特别适合突变检测分析的靶基因:所有突变的99%只出现于三个密码子:密码子12(88%)、密码子13(10%)和密码子61(1-3%)。这种突变集群允许设计少量的等位基因特异性引物或探针就会覆盖临床相关突变的完整谱系。

[0068] 另一方面,本发明提供了选择性扩增核酸并等位基因特异性抑制不需要序列变体扩增的反应混合物。该反应混合物包括能和目标序列的多种变体杂交的第一和第二寡核苷酸,其中第二寡核苷酸的至少部分在3'末端或其附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基;第三寡核苷酸,其与目标序列的需要变体杂交的亲合力小于和目标序列的不需要变体杂交的亲合力,并设计为与所述第二寡核苷酸的下游0-60个核苷酸杂交;一种基本上没有5'-3'核酸酶活性且具有热启动能力的核酸聚合酶;并任选一种已知存在多种序列变体的目标核酸。在某些实施方案中,反应混合物进一步包含扩增和任选检测核酸通常需要的试剂和溶液,包括核酸前体(即三磷酸核苷)、适合支持聚合酶活性的有机和无机离子以及任选检测标记。在某些实施方案中,反应混合物中第一和第二寡核苷酸的量不相等,使第一寡核苷酸过量存在。在某些实施方案中,所述第三寡核苷酸是标记的。在本发明的某些实施方案中,目标核酸包含所有或部分的KRAS基因序列。在某些实施方案中,目标序列包括KRAS密码子12、13和61的一个或多个。

[0069] 另一方面,本发明提供实施选择性扩增核酸并等位基因特异性抑制不需要序列变体扩增的试剂盒。该试剂盒通常包含分析特异性的组分和一般进行核酸扩增分析需要的组分。作为分析特异性组分,本发明的试剂盒通常包含能与目标序列的多种变体杂交的第一和第二寡核苷酸,其中第二寡核苷酸的至少部分在3'末端或其附近的一个或多个核苷酸中包含修饰的碱基;第三寡核苷酸,其与目标序列的需要变体杂交的亲合力小于和目标序列的不需要变体杂交的亲合力,并设计为与所述第二寡核苷酸的下游0-60个核苷酸杂交;一种基本上没有5'-3'核酸酶活性且具有热启动能力的核酸聚合酶;和任选包含一定量的至少一种类型目标序列的对照核酸序列。在某些实施方案中,还包含多种类型的对照核酸序列。在某些实施方案中,所述第三寡核苷酸是标记的。作为核酸扩增和任选检测通常需要的组分,本发明的试剂盒通常包含:一种或多种核酸前体,例如三磷酸核苷(三磷酸脱氧核糖

核苷或三磷酸核糖核苷)、任选用于最小化核酸焦磷酸解作用的焦磷酸酶、用于预防扩增反应遗留污染的尿嘧啶N-糖基化酶(UNG)、扩增反应和任选检测需要的预制试剂和缓冲液,以及进行本发明等位基因特异性扩增的一套使用说明书。

[0070] 实施例

[0071] 以下的实施例使用了KRAS基因的片段-外显子2 (SEQ ID NO:1),图10)作为目标序列。突变序列在外显子2的密码子12或密码子13包含不同的错义突变。图10中SEQ ID NO:1的密码子12和13是用下划线标注的碱基。探针(SEQ ID NO:5)与野生型序列完美匹配。突变序列和探针有一个或多个错配。在以下的实施例中,同样的探针(SEQ ID NO:5)用作扩增检测探针和解链探针。另外,该探针还用作野生型序列扩增的抑制子。利用上游引物SEQ ID NO.6、下游引物SEQ ID NO.7和检测探针SEQ ID NO.8,外显子3序列与KRAS外显子2序列在同一反应中被共同扩增。为了简单起见,没有显示在分开的波长通道里检测的外显子3序列的扩增结果。引物和探针序列示于表1。

[0072] 表1

[0073] KRAS引物和探针序列

[0074]

外显子2上游引物	序列(5' -3')
SEQ ID NO:2	GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGT
外显子2下游引物	序列(5' -3')
SEQ ID NO:3	GAAUUAGEUGUAUEGUEAAGGEACTC
SEQ ID NO:4	GAAUUAGEUGUAUEGUEAAGGEACTM
外显子2探针	序列(5' -3')
SEQ ID NO:5	FUGEEUAEIEEIEEAGEUEQp
外显子3上游引物	序列(5' -3')
SEQ ID NO:6	GAGAAAEUEGUEUEUUGGAUUAUUCTC
外显子3下游引物	序列(5' -3')
SEQ ID NO:7	TCATGTACTGGTCCCTCATTGCAM
外显子3探针	序列(5' -3')
SEQ ID NO:8	LAEUEEUCTTGACEUEUQp

[0075] E=5-甲基dC

[0076] U=5-丙炔基dU

[0077] M=N⁴-苄基dC

[0078] I=dI(脱氧肌苷)

[0079] F=cx-FAM供体荧光团(荧光素)

[0080] Q=BHQ-2 Black HoleTM猝灭剂

[0081] L=cx-HEX供体荧光团(HEX-染料)

[0082] p=3' 磷酸基

[0083] 实施例1

[0084] 野生型和KRAS突变靶单独的扩增和解链分析

[0085] 每50μl反应物包含:10⁴拷贝的野生型或突变目标序列、0.7μM外显子2上游(过量)

引物 (SEQ ID NO:2)、0.025 μ M的第一外显子2下游(限制)引物 (SEQ ID NO:3,无化学修饰)和0.075 μ M的第二外显子2下游(限制)引物 (SEQ ID NO:4,被化学修饰)、0.3 μ M的外显子2溶解探针 (SEQ ID NO:5)、0.7 μ M外显子3上游(过量)引物 (SEQ ID NO:6)、0.1 μ M外显子3下游(限制)引物 (SEQ ID NO:7)、0.3 μ M的外显子3解链探针 (SEQ ID NO:8)、50mM Tricine (pH 7.7)、57mM醋酸甲 (pH 7.5)、8%甘油、1%DMSO、200 μ M dATP、200 μ M dCTP、200 μ M dGTP、400 μ M dUTP、50 μ M dTTP、0.01%Tween-20、0.04单位/ μ l的尿嘧啶-N-糖基化酶 (UNG)、0.6单位/ μ l的 Δ Z05 GOLD DNA聚合酶和3mM的醋酸镁。两种限制引物的混合物用于外显子2:1/4的具有未修饰的3'末端胞嘧啶的第一引物 (SEQ ID NO:3),和3/4的N⁴苯基化的3'末端胞嘧啶的第二引物 (SEQ ID NO:4)。反应中两种限制引物的比例允许最佳程度的野生型抑制 (参见实施例2):当突变型DNA不存在时,野生型DNA被扩增。但是,当突变型DNA也存在时,突变型DNA相对于野生型被优先扩增(数据未显示)。

[0086] 用Roche LightCycler 480仪器进行扩增和解链分析。反应用如下的温度条件:50 $^{\circ}$ C 5分钟 (UNG步骤),95 $^{\circ}$ C 10分钟 (聚合酶激活),随后50个循环包括95 $^{\circ}$ C 10秒钟和61 $^{\circ}$ C 40秒。荧光数据收集于每个61 $^{\circ}$ C步骤的末端,进而生成生长曲线(未显示)。反应物然后用作解链分析:最后一个扩增循环后,升高温度到95 $^{\circ}$ C 1秒钟,然后降低到40 $^{\circ}$ C 1分钟,再增高到95 $^{\circ}$ C,期间温度每升高1.0 $^{\circ}$ C检测荧光。最后,温度降低到40 $^{\circ}$ C结束解链分析。

[0087] 解链分析的结果示于图2。原始数据(“解链曲线”)显示为450–500nm波长间隔的荧光随温度改变。导数(“解链峰”)显示为相同温度间隔下荧光的第一导值(dF/dT)。突变型靶显示为实线,野生型模板显示为虚线。在本实施例中,当解链探针 (SEQ ID NO:5)与目标核酸结合形成双链体时,该探针放射出所需波长的荧光。随着温度的升高,因为探针从双链体中解离,因此观察到荧光的降低。分离和单链形式的探针形成构象,其中猝灭剂(BHQ-2)猝灭荧光团(FAM)的荧光。

[0088] 图2的结果显示突变型序列(实线)和野生型序列(虚线)截然不同的解链曲线图。突变体样品是通过解链峰最大值(T_m)比野生型样品的低来鉴定的。较低的 T_m 是因为探针和突变型序列之间互补程度比较低。突变体峰显示出 T_m 的变化是因为样品中密码子12或密码子13包含不同的突变。

[0089] 实施例2

[0090] 在野生型和突变型样品的混合物中等位基因特异性扩增和检测KRAS突变

[0091] 在本实施例中,对于野生型靶和突变型靶的混合物的扩增和解链分析是在同一管中进行。每50 μ l反应物包含8,000拷贝的目标DNA(包含野生型和突变型序列的混合物)。反应中突变型序列为总拷贝数的1%或5%,余下的99%或95%为野生型序列。利用大体如实施例1描述的条件和温度设置以及每个特定试验的指定修饰进行扩增和解链分析。结果示于图3–8。突变型靶的鉴定是通过解链峰最大值(T_m)比野生型靶的低来鉴定的。对于每个实验指定实线代表“抑制条件”,而虚线代表“对照条件”。

[0092] 图3中,抑制条件是:限制引物是SEQ ID NO:3和4的混合物,酶具有热启动的能力(Δ Z05 GOLD)。对照条件是:限制引物仅是SEQ ID NO:3(无3'末端化学修饰),酶没有热启动能力(Δ Z05)。对于 Δ Z05酶,调整pH到8.3,并且从循环设置中去除聚合酶激活步骤。

[0093] 图4显示与图3相同的试验的结果,除了抑制和对照条件都采用了热启动酶 Δ Z05 GOLD外。SEQ ID NO:3和4的混合物用于抑制条件,仅SEQ ID NO:3(无化学修饰)用于对照条

件。

[0094] 图5显示与图3相同的试验的结果,除了抑制和对照条件都采用了热启动酶 Δ Z05 GOLD外。SEQ ID NO:3和4的混合物用于抑制条件,仅SEQ ID NO:4(有化学修饰)用于对照条件。该结果表明使用引物的组合调节抑制的量,并确保在突变型序列不存在的情况下野生型序列被扩增。

[0095] 图6显示与图3相同的试验的结果,除了抑制和对照条件都采用了SEQ NO:3和4的混合物外。抑制条件采用了热启动酶 Δ Z05 GOLD,而对照条件采用了非热启动酶 Δ Z05。

[0096] 图7显示与图3相同的试验的结果,除了抑制和对照条件仅采用了SEQ NO:4(有化学修饰)外。抑制条件采用了热启动酶 Δ Z05 GOLD,而对照条件采用了非热启动酶 Δ Z05。

[0097] 图8显示与图7相同的试验的结果,除了抑制和对照条件仅采用了SEQ NO:3(无化学修饰)外。如在图7的图示性实施例中,抑制条件采用了热启动酶 Δ Z05 GOLD,而对照条件采用了非热启动酶 Δ Z05。在这个试验中,“抑制”条件不能产生抑制。

[0098] 该结果表明,抑制野生型的扩增促进突变体扩增子的产量。当突变型序列构成了总目标序列的1%时,没有野生型的抑制则不能检测到突变序列。在突变序列的较高浓度时,通过抑制野生型而使突变体扩增子的产量也显著改善。

[0099] 实施例3

[0100] 来自患者的福尔马林固定石蜡包埋组织(FFPET)样品中KRAS突变的等位基因特异性的扩增和检测

[0101] 在本实施例中,对自7例商购的FFPET样品中提取的DNA进行扩增和解链分析。每50 μ l反应物包含25ng FFPET DNA,该DNA提取自3x10 μ m的组织切片,用Nanodrop分光光度计定量。5%突变靶与95%野生型靶混合的反应物用作对照(虚线)。扩增和解链分析所用的条件和温度设置描述于实施例1,只是反应混合物中没有外显子3的引物和探针、 Δ Z05 GOLD聚合酶的量降低到0.3单位/ μ l和醋酸镁降低到2.5mM。图9显示解链峰的结果。突变靶是通过解链峰最大值(T_m)比野生型靶的低来鉴定的。虚线表示野生型序列,实线表示存在突变序列的患者样品。某些患者样品同时包含野生型和突变型序列。

[0102] 公知FFPET DNA是高度碎裂的,并且难于进行扩增和检测。但是,图9的结果清晰地显示出存在于FFPET样品中的野生型DNA背景下的突变型DNA的成功扩增和检测。如测序所证实,突变靶的 T_m 变化反映KRAS基因的不同密码子12或密码子13的突变(数据未显示)。

[0103] 虽然本发明用具体的实施例进行了详细的描述,但是在本发明的范围内进行各种修饰对本领域技术人员是显而易见的。因此本发明的范围并不限于本文描述的任何实施例,而体现在随附权利要求书中。

序列表

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

Roche Diagnostics GmbH

<120> 利用等位基因特异性抑制序列变体的核酸扩增

<130> 24874 W0

<140> 未知

<141> 未知

<150> 61/143,113

<151> 07.01.2009

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

tgacatgttc taatatagtc acattttcat tattttttatt ataaggcctg ctgaaaatga 60

ctgaatataa acttgtggta gttggagctg gtggcgtagg caagagtgcc ttgacgatac 120

agctaattca gaatcatttt gtggacgaat atgatccaac aatagaggta aatcttgt 178

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成引物

<400> 2

ggcctgctga aaatgactga atataaactt gt 32

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:合成引物

<220>

<223> 混合型DNA/RNA分子说明:合成引物

<400> 3

gaauuagcug uaucgucaag gcactc 26

<210> 4

<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明:合成引物	
<220>	
<223> 混合型DNA/RNA分子说明:合成引物	
<400> 4	
gaauuagcug uaucgucaag gcactc	26
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明:合成探针	
<220>	
<223> 混合型DNA/RNA分子说明:合成探针	
<220>	
<221> 修饰碱基	
<222> (8) .. (8)	
<223> 脱氧肌苷	
<220>	
<221> 修饰碱基	
<222> (11) .. (11)	
<223> 脱氧肌苷	
<400> 5	
ugccuacncc nccagcuc	18
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明:合成引物	
<220>	
<223>混合型DNA/RNA分子说明:合成引物	
<400> 6	
gagaaaccug ucucucuugg auauuctc	28
<210> 7	
<211> 24	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明:合成引物	
<400> 7	
tcattgtactg gtccttcatt gcac	24
<210> 8	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明:合成探针	
<220>	
<223> 混合型DNA/RNA分子说明:合成探针	
<400> 8	
acuccuettg accugcu	17

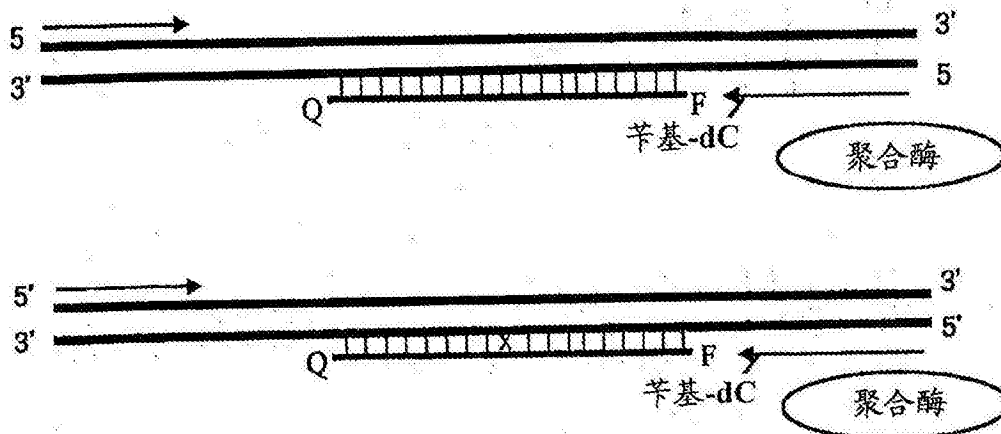


图1

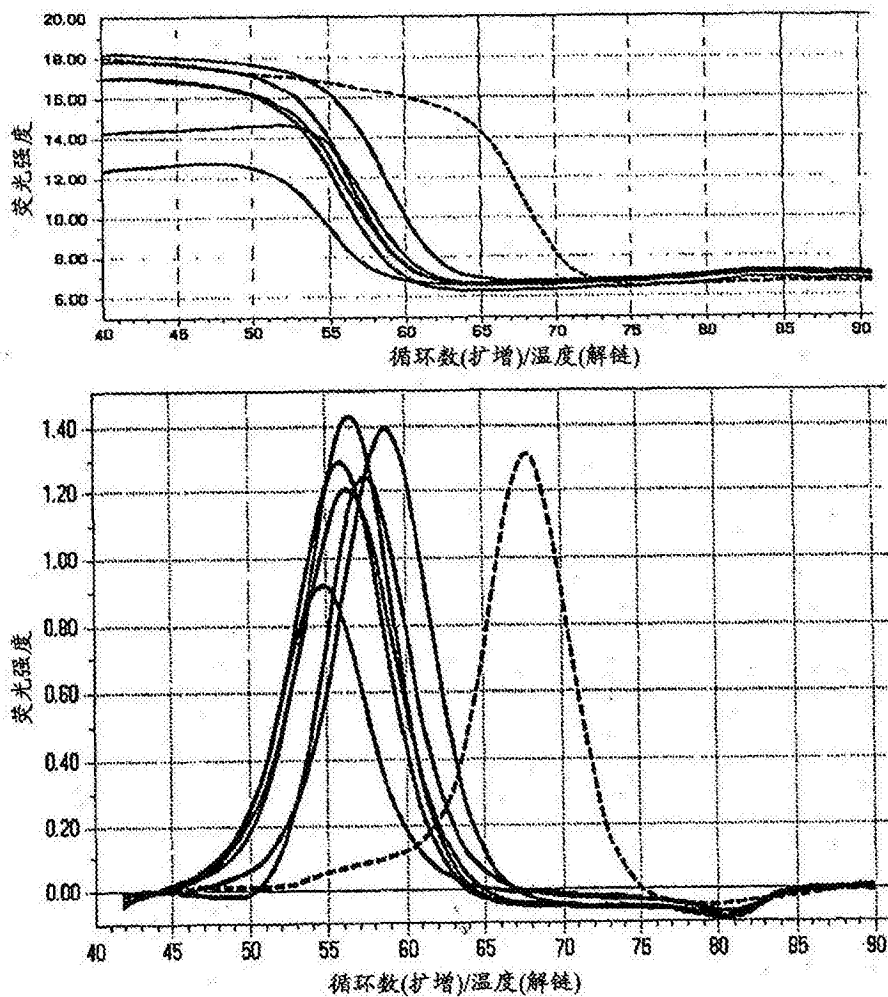


图2

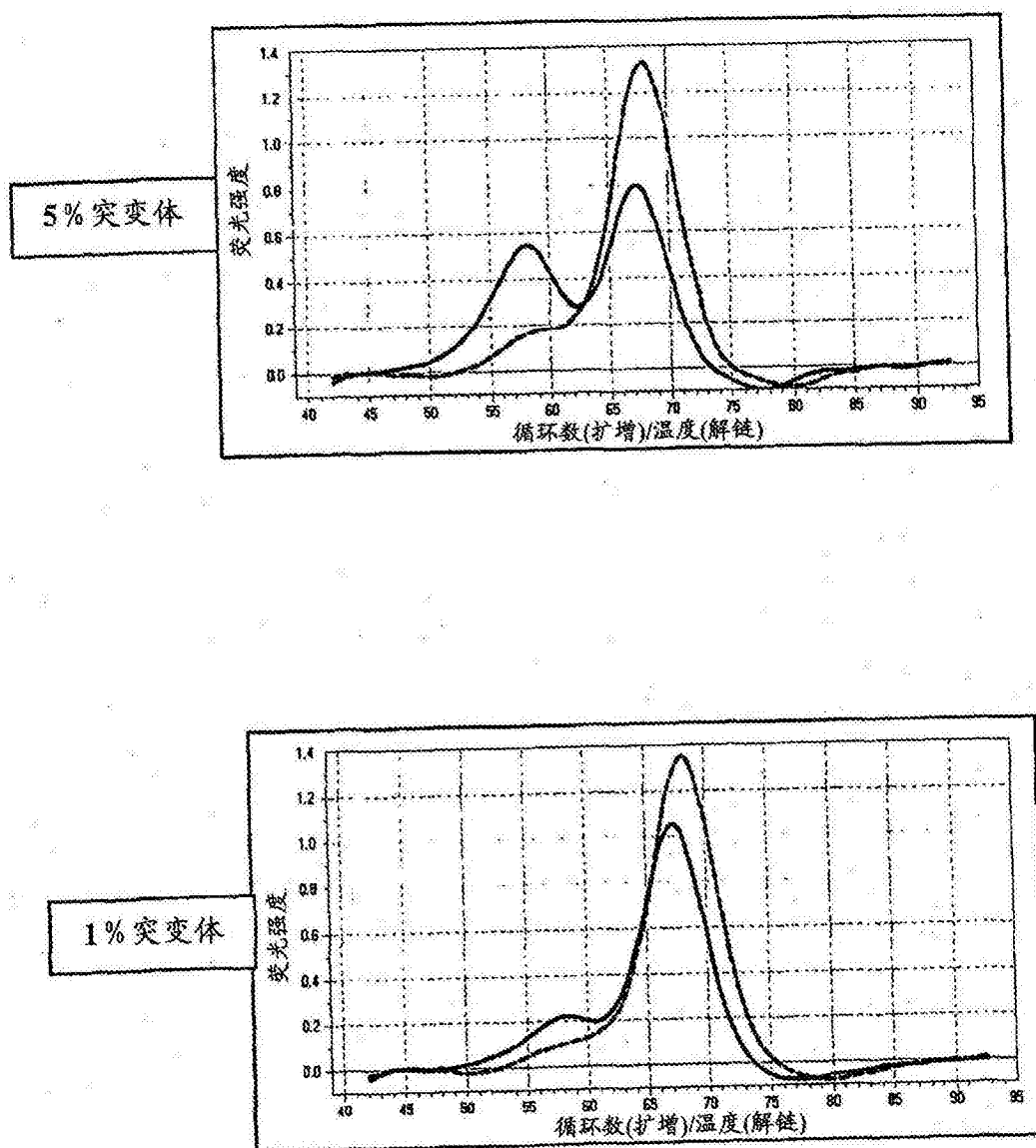


图3

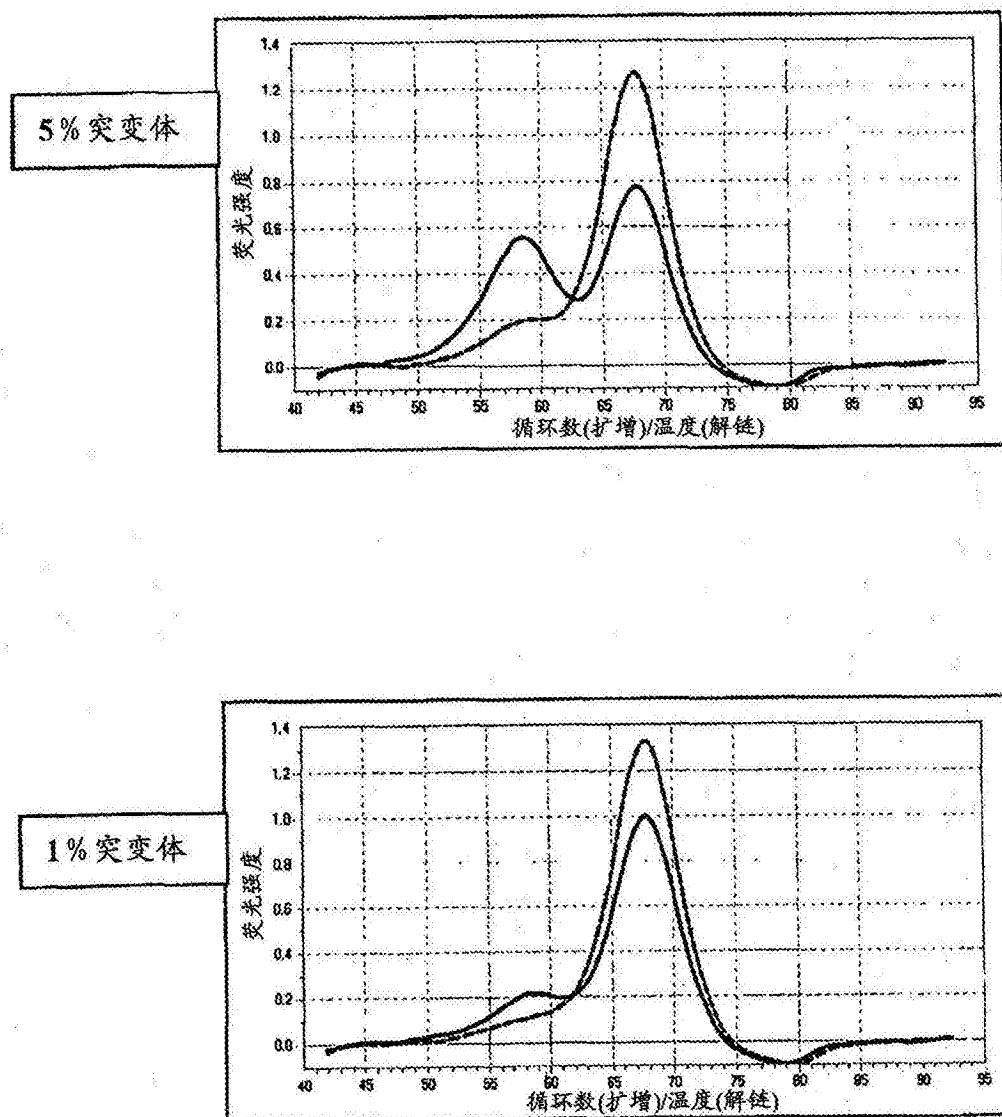


图4

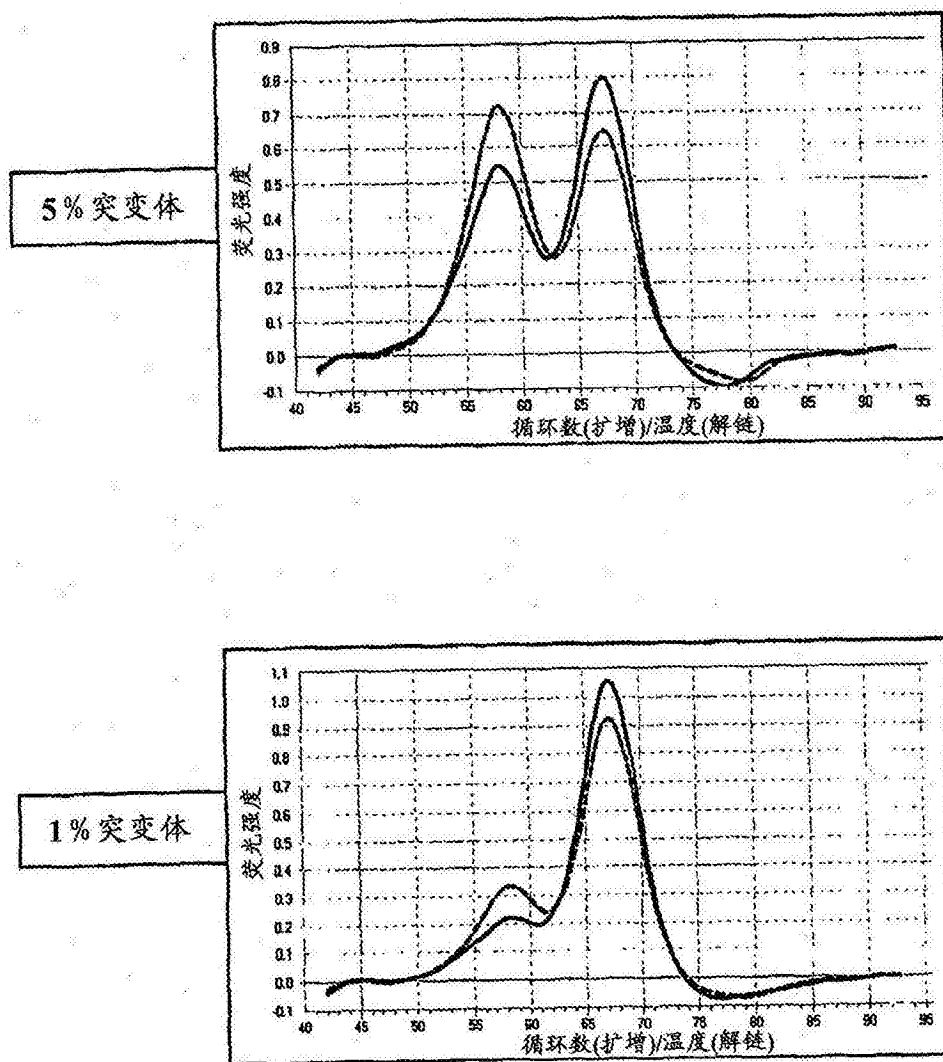


图5

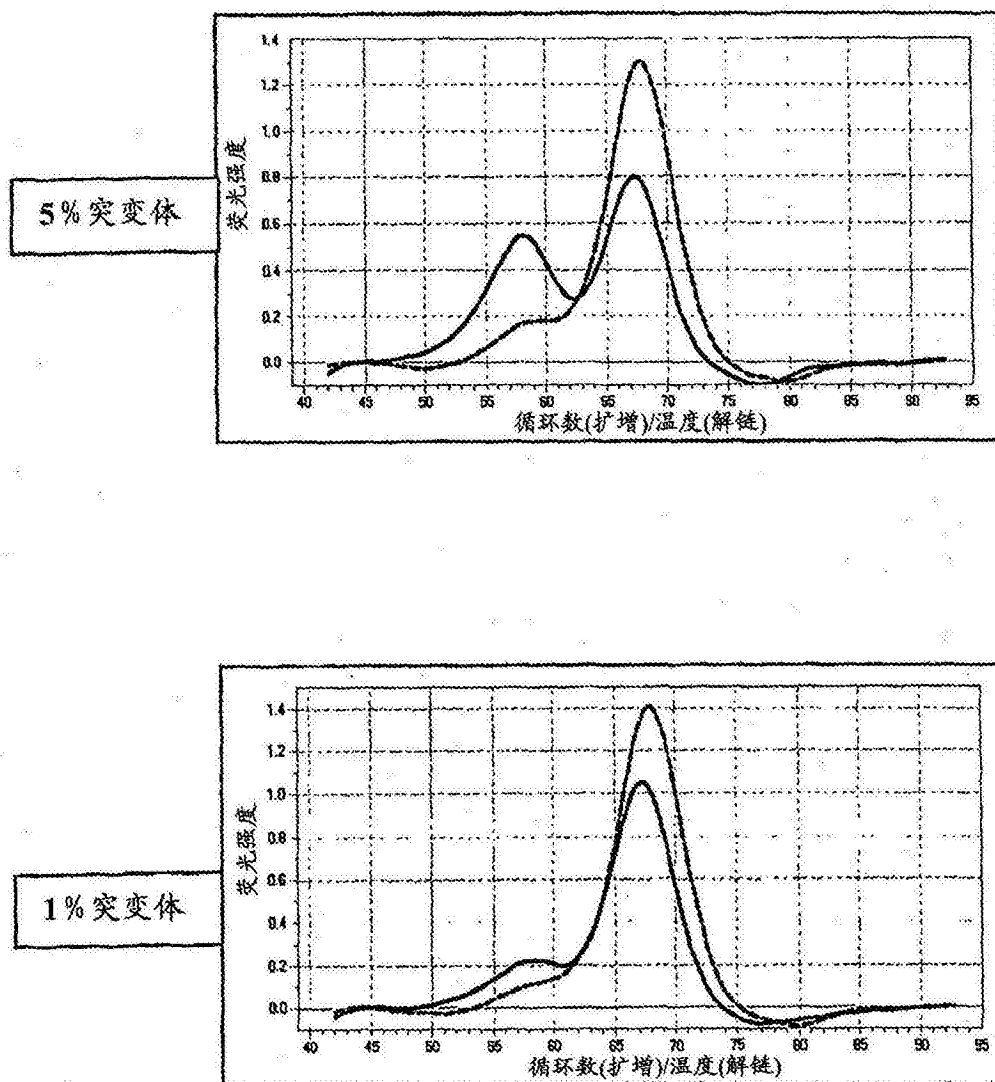


图6

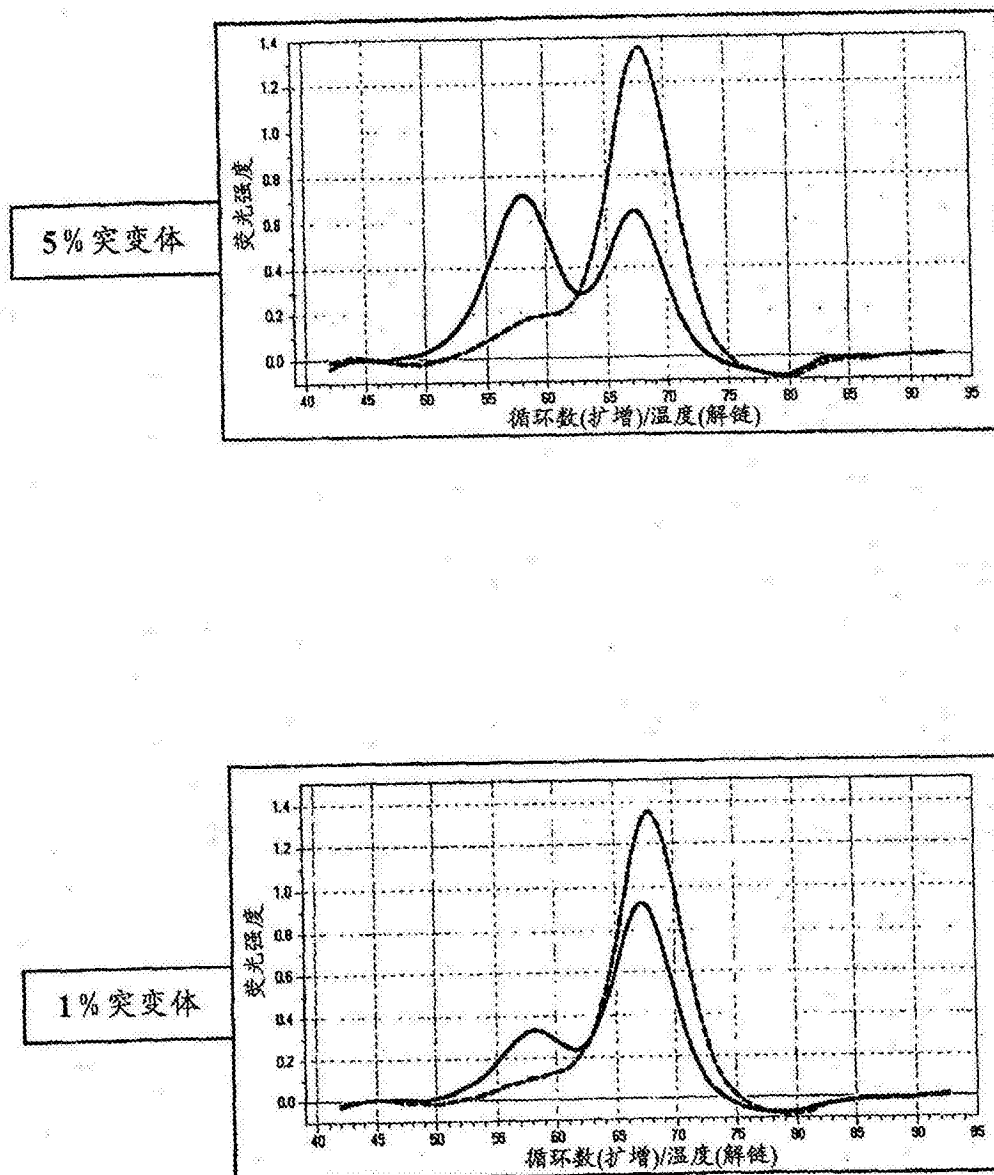


图7

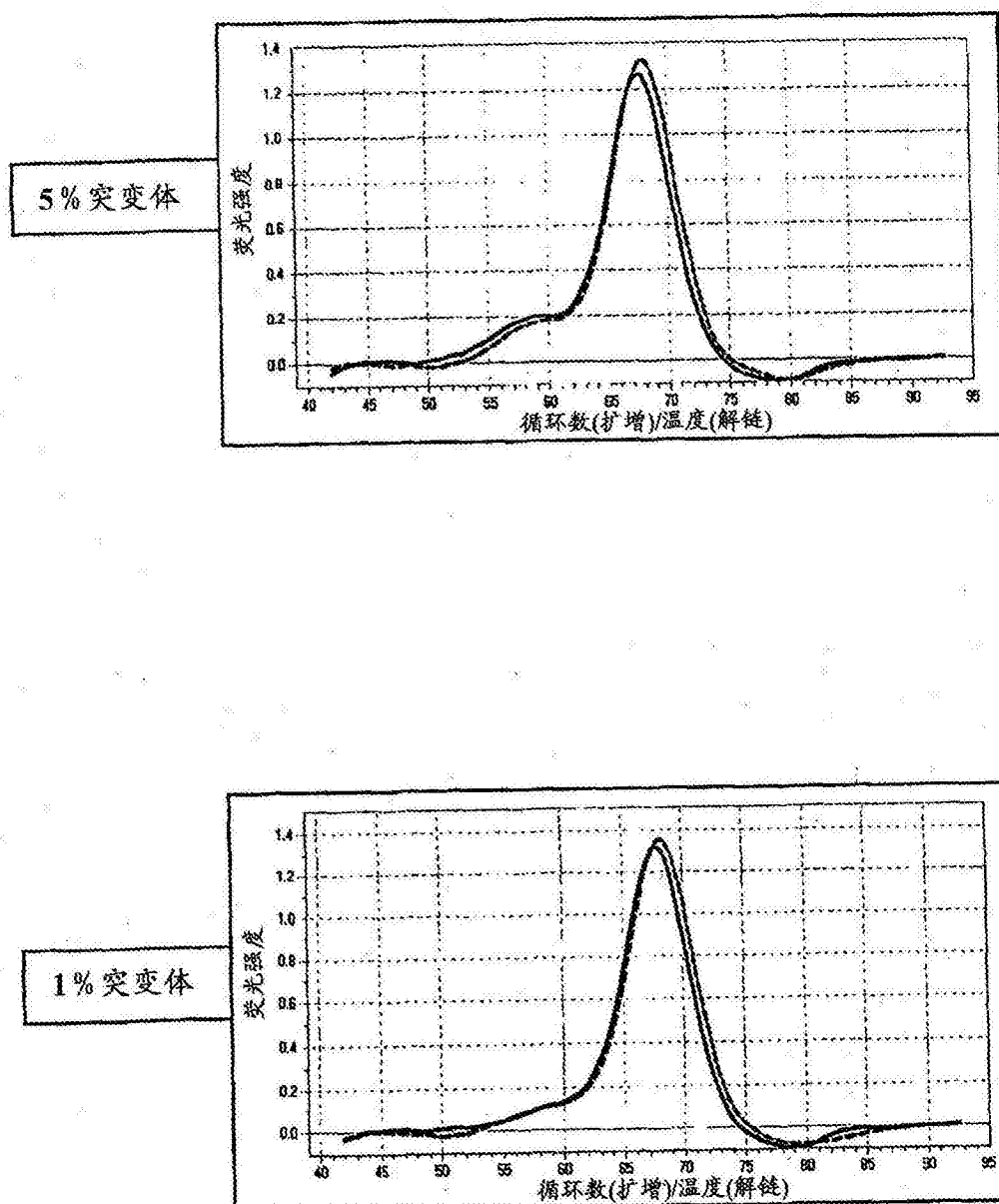


图8

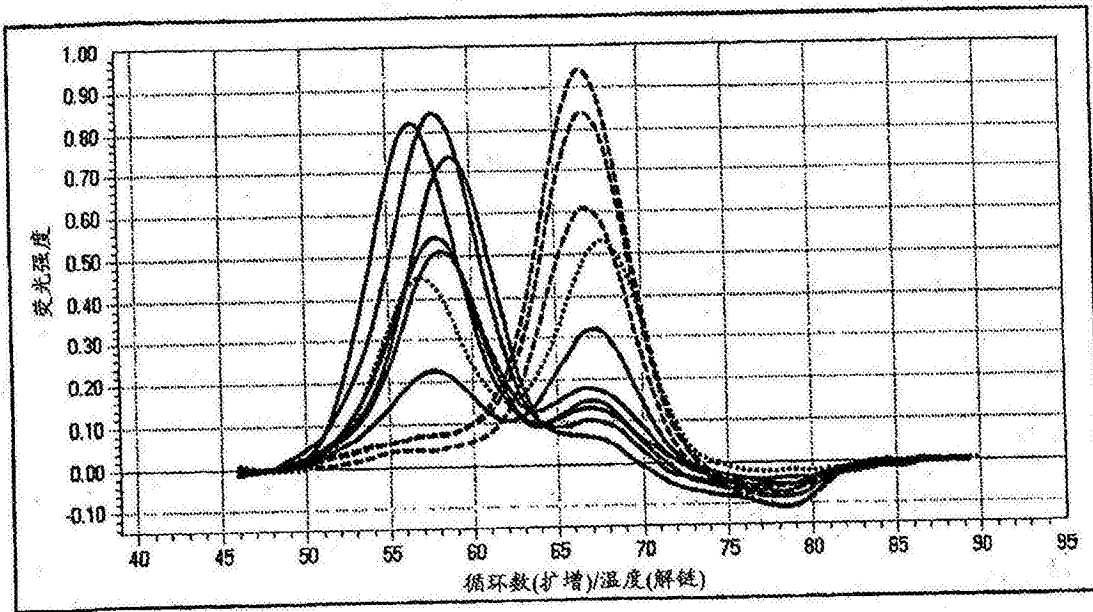


图9

目标序列

SEQ ID NO: 1(野生型 KRAS 扩增子)

5'-TGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCT
GAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGC
CTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG
GTAAATCTTGT-3'

图10