



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102421918 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201080020170.6

(22) 申请日 2010.03.11

(30) 优先权数据

61/202565 2009.03.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.11.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/027011 2010.03.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/105074 EN 2010.09.16

(73) 专利权人 布兰代斯大学

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 L·J·万 J·赖斯 N·赖斯

贾艳伟

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004/090153 A2, 2004.10.21, 全文.

WO 2006/044994 A2, 2006.04.27, 全文.

WO 2007/008728 A2, 2007.01.18, 全文.

KABOEV O K ET AL. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). 《NUCLEIC ACIDS RESEARCH》. 2000, 第28卷(第21期), e94.

KAINZ PETER ET AL. Specificity-enhanced hot-start PCR: Addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature. 《BIOTECHNIQUES》. 2000, 第28卷(第2期), 278-282.

审查员 曲凯

权利要求书2页 说明书66页

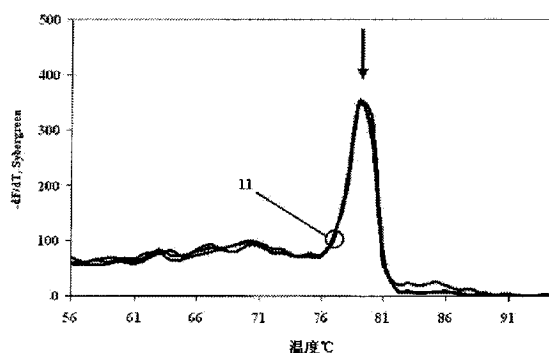
序列表47页 附图27页

(54) 发明名称

用于 PCR 的试剂和方法

(57) 摘要

本发明涉及修饰的双链寡核苷酸, 其在每个链上具有末端区, 具有 6-50 个核苷酸长的杂交物长度, 具有至少 32°C 的解链温度 T_m , 并且包括 2-4 个修饰基团, 每个修饰基团共价连接到不同末端区, 优选连接到末端核苷酸, 所述修饰基团为不具有非平面大体积部分的多环取代基, 所述修饰的寡核苷酸能够结合到 DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶域, 并且当以通常不高于 2000nM 的浓度包括在 PCR 或其它引物依赖性 DNA 扩增反应中时, 该浓度对于以下功能的至少一个是有效的: 抑制引导错误、增加聚合酶对 3' 端错配的选择性、增加聚合酶对富含 AT 3' 端的选择性、减少重复间发散、抑制聚合酶 5' 核酸外切酶活性和抑制聚合酶活性; 以及包含此类修饰的双链寡核苷酸的扩增反应混合物, 和包括此类修饰的双链寡核苷酸的扩增反应、扩增测定和试剂盒。



1. 一种用于通过 LATE-PCR 进行的引物依赖性 DNA 扩增反应的反应混合物, 所述反应混合物包括:

(a) 至少一个引物对,

(b) DNA 聚合酶和 dNTP,

(c) 双链寡核苷酸添加物, 该双链寡核苷酸添加物具有 8-22 个核苷酸长的杂交物长度, 在 32°C 下至少 50% 为双链, 在其每条链上具有末端区并且包括 1-4 个修饰基团, 每个修饰基团均共价连接到不同末端区, 所述修饰基团选自 Dabcyl、地高辛配基 (DIG)、香豆素 (CMN) 和 QSY 21 (QSY), 其中所包括的所述双链寡核苷酸添加物的浓度是 25-2000nM。

2. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 其中所述修饰基团为 2-4 个修饰基团。

3. 根据权利要求 2 所述的扩增反应混合物, 其中所述 2-4 个修饰基团为 3 个修饰基团。

4. 根据权利要求 3 所述的扩增反应混合物, 其中所述反应混合物还包含靶序列, 其中所述添加物是: 第一链, 其为所述靶序列的引物或探针; 和反向互补链, 其互补于所述第一链。

5. 根据权利要求 2 所述的扩增反应混合物, 其中所述 2-4 个修饰基团为 4 个修饰基团。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的扩增反应混合物, 其中所述修饰基团共价连接到所述双链寡核苷酸添加物的末端核苷酸。

7. 根据权利要求 6 所述的扩增反应混合物, 其中所述修饰基团为 Dabcyl。

8. 根据权利要求 7 所述的扩增反应混合物, 其中所述双链寡核苷酸添加物由天然核苷酸组成。

9. 根据权利要求 7 所述的扩增反应混合物, 其中所述双链寡核苷酸添加物为 DNA。

10. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 其中所述添加物不是所述至少一个靶序列的引物或探针。

11. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 其中所述双链寡核苷酸添加物的浓度不超过 1000nM。

12. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 还包括逆转录酶。

13. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 其中所述双链添加物包括 1 至 4 个单链突出端。

14. 根据权利要求 13 所述的扩增反应混合物, 其中所述至少一个双链添加物包含至少一个链, 所述链在未杂交时, 形成茎-环结构。

15. 一种用于扩增至少一个 DNA 靶序列的方法, 所述方法包括: 使所述至少一个 DNA 靶序列与根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物接触; 和使所述反应混合物经历具有引物退火温度和引物延伸温度的聚合酶链式反应扩增, 其中所述方法不用于疾病的诊断。

16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中使所述至少一个 DNA 靶序列与所述反应混合物接触是由加入所述至少一个单链形式的 DNA 靶序列到所述反应混合物中所组成。

17. 根据权利要求 15 所述的方法, 其包括逆转录 RNA 以获得至少一个 DNA 靶序列。

18. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述至少一个修饰物为 2-4 个修饰物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述双链寡核苷酸具有在引物退火温度到引物退火温度以下不超过 5°C 的范围内的解链温度 T_m 。

20. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述双链寡核苷酸具有高于所述引物退火温度

的解链温度 T_m 。

21. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述添加物具有三个修饰基团并且包括: 第一链, 其为所述至少一个靶序列的引物或探针; 和反向互补链, 其部分互补于所述第一链。

22. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述至少一个添加物为两种添加物的混合物。

23. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述混合物包括: 第一添加物, 其具有 T_m 在所述引物退火温度到所述引物退火温度以下不超过 5°C 的范围内的双链寡核苷酸; 和第二添加物, 具有 T_m 高于所述引物退火温度的双链寡核苷酸。

24. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中每个添加物包括 3-4 个修饰基团。

25. 根据权利要求 15-24 中任一项所述的方法, 其中所述聚合酶链式反应扩增为聚合酶链反应 (PCR) 扩增反应。

26. 根据权利要求 15-24 中任一项所述的方法, 其中所述聚合酶链式反应扩增为 LATE-PCR 扩增反应。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述至少一个 DNA 靶序列逆转录自 RNA 靶序列。

28. 一种扩增测定方法, 其包括根据权利要求 15-27 中任一项所述的扩增和在扩增期间实时或在扩增后端点对反应的单链产物、反应的双链产物、或两者进行荧光检测, 其中所述反应的双链产物用荧光 DNA 染料检测, 所述反应的单链产物用至少一个荧光标记的杂交探针检测, 或两者均有, 其中所述测定方法不用于疾病的诊断。

29. 一种扩增至少一个 DNA 靶序列的试剂盒, 所述试剂盒包括所述用于根据权利要求 1-14 中任一项所述的反应混合物的试剂。

30. 根据权利要求 29 所述的试剂盒, 还包括逆转录酶。

31. 根据权利要求 29 或 30 所述的试剂盒, 还包括 DNA 染料。

32. 根据权利要求 29 所述的试剂盒, 还包括用于所述至少一个靶序列的荧光标记的检测探针。

33. 一种修饰的双链寡核苷酸, 包含两条各为 8-22 个核苷酸长度的核酸链, 所述修饰的双链寡核苷酸在其各链上具有末端区, 在 32°C 下至少 50% 为双链, 并且包括 2-4 个修饰基团, 所述修饰基团各自共价连接到不同末端区, 所述修饰基团选自 Dabcyl、地高辛配基 (DIG)、香豆素 (CMN) 和 QSY 21 (QSY), 所述修饰寡核苷酸能够抑制 DNA 聚合酶的所述 5' 核酸外切酶域。

34. 根据权利要求 33 所述的修饰的寡核苷酸, 其中所述双链寡核苷酸为 DNA。

35. 根据权利要求 33 或 34 所述的修饰的寡核苷酸, 其中所述修饰基团连接到末端核苷酸。

36. 一种根据权利要求 33-35 中任一项所述的两个修饰的双链寡核苷酸的混合物。

37. 根据权利要求 36 所述的混合物, 其中所述两个双链寡核苷酸包含三个链。

38. 根据权利要求 1 所述的扩增反应混合物, 其中所述 DNA 聚合酶为热稳定的。

用于 PCR 的试剂和方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 3 月 12 日提交的 Zhang 的美国临时专利申请 No. 61/202, 565 的权益, 该专利申请据此通过引用整体并入。

[0003] 领域

[0004] 提供了包括实时和端点均相聚合酶链反应 (PCR) 单重和多重扩增测定的核酸扩增反应和测定。

[0005] 背景

[0006] 对于扩增和检测核酸靶序列, 熟知的是使用 DNA 引物和 DNA 聚合酶的扩增和扩增测定。用于指数式扩增的方法包括聚合酶链反应 (PCR)、链置换扩增 (SDA)、基于核酸序列的扩增 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA)、和滚环扩增 (RCA)。这些引物依赖性扩增方法 (例如 PCR) 中的某些包括热循环, 而其它方法 (例如 NASBA) 是等温的。在众多 DNA 聚合酶中, 通常使用的是栖热水生菌 (*Thermus aquaticus*) DNA 聚合酶 (Taq 聚合酶) 和逆转录酶。线性 DNA 寡核苷酸扩增引物的设计通常是借助于为该目的而设计的计算机程序来实现。可用的程序中, 可以使用的是 PRIDE (Haas 等人, *Nucl. Acids Res.* 26 :3006-3012 1998) ; OLIGO (Rychlik 等人, *Nucl. Acids Res.* 17(21) :8543-51 1989) ; OSP (Hilber 等人, *OSP : a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers.* *PCR Methods Appl.* 1(2) :124-128 1991) ; Primo (Li 等人, *Genomics* 40(3) :476-85 1997) ; 和 Primer Master (Proutski 等人, *Comput Appl Biosci* 12(3) :253-5 1996)。

[0007] 采用 PCR 的核酸扩增是熟知的, 如包括 PCR 扩增的测定。参见美国专利 4, 683, 202、4, 683, 195 和 4, 965, 188, 以及通常参见 PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis 等人编, Academic Press (San Diego, CA (USA) 1990)。均相 PCR 测定也是熟知的, 其不需要洗涤来移除未结合的检测试剂或探针, 因此不用打开扩增反应容器便可进行。均相 PCR 测定包括其中在扩增反应结束时检测到扩增产物的端点测定和其中反应进行时在一些和所有热循环期间检测到扩增产物的实时测定。参见美国专利 5, 994, 056、5, 487, 972、5, 925, 517 和 6, 150, 097。

[0008] PCR 扩增反应, 如上文所述的其它扩增方法, 一般被设计为对称的, 即通过使用“匹配”的正向引物和反向引物来制备双链扩增子; 即, 它们的解链温度尽可能接近, 并且将它们以等摩尔浓度加入反应中。已发现的有限地用于在 PCR 反应中直接制备单链 DNA 的技术为“不对称 PCR”。Gyllenstein 和 Erlich, “Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85 :7652-7656 (1988) ; 和美国专利 5, 066, 584。不对称 PCR 与对称 PCR 不同之处在于, 一个引物以通常为另一引物浓度的 1-20% 的有限量加入。

[0009] 已知最近发展的不对称 PCR 扩增方法称为“指数后线性 (Linear-After-The-Exponential)”PCR 或简称为“LATE-PCR”。参见 Sanchez 等人 (2004) PNAS 101 :1933-1938, Pierce 等人 (2005) PNAS 102 :8609-8614, 和公布的国际专利申请 WO 03/054233 (2003 年 7

月 3 日),该专利申请以引用方式整体并入本文。LATE-PCR 将扩增起始时 PCR 引物的实际浓度调节的解链温度纳入考虑,该温度称为 $T_{m[0]}$ 。 $T_{m[0]}$ 可以通过经验测定(在使用非天然核苷酸时是必要的)或计算。多种荧光探针可用于 LATE-PCR,包括下列及其他:分子信标,其为能够形成茎-环结构的单链,当不结合到靶标时该结构可封闭,从而使一端上的荧光团和另一端上的淬灭剂相互靠近;线性单链探针,其在一端上具有荧光团而在另一端上具有淬灭剂;FRET 探针对,其为邻近地杂交于靶序列上的双标记、单链探针,允许它们的标记通过 FRET 在其间传递能量;荧光团标记线性探针,其具有 DNA 染料的 FRET;和线性双链探针,其中荧光团在结合到靶标的链上,并且淬灭剂位于在靶标不存在的情况下相等 T_m 下结合到探针的互补链上。

[0010] 对称 PCR 扩增的不利特征是,在扩增指数期后,通过实时监测重复扩增而获得的荧光曲线在不同水平发散和达到稳定。发散表明重复不具有相同的反应效率并且降低检测精确度。这对 PCR 测定来说是个一般性问题,但就端点分析而言是特别不期望的。虽然重复间的发散显著降低但在 LATE-PCR 测定和不对称 PCR 测定中依然存在,这两个测定均具有指数期和线性期。线性期的发散部分反映出当限制性引物耗尽时指数扩增结束处平稳阶段中的发散。

[0011] 引物依赖性扩增反应(包括 PCR 扩增)的另一个重要问题为引导错误,我们认为其显示为几种不同类型:1 型引导错误,其发生在扩增起始前制备反应混合物期间;2 型引导错误,如果温度(其在 PCR 扩增中意味任何热循环中的温度)由于任何原因降到引物解链温度以下则发生在扩增期间;和 3 型引导错误,其发生在已产生高浓度扩增子后继续进行的扩增(包括 PCR 扩增)后期阶段。当在 LATE-PCR 和不对称反应中发生 3 型引导错误时,单链扩增子引物的 3' 端引导入另一 ss-DNA 分子上,从而将 ss-DNA 转换为 ds-DNA。反应中的引导错误还可导致重复反应中的发散。引导错误包括可发生于扩增任何阶段的引物二聚体形成。

[0012] 已采用若干方法来解决 1 型引导错误。一种方法为在化学修饰聚合酶使其在被加热到高温如 95°C 之前是失活的。参见美国专利 5,677,152 和 5,773,258。另一方法为将抗体结合到聚合酶,以在反应被加热到高温如 95°C 以不可逆地变性抗体之前抑制聚合酶。参见美国专利 5,338,671。化学修饰的和抗体结合的 DNA 聚合酶常常称为“热启动”DNA 聚合酶。另一“热启动”方法为使反应混合物中包括适配体。参见 Doug 和 Jayasena(1996), J. Mol. Biol. 264:268-278 和美国专利 6,020,130。适配体为约 30 个核苷酸长度的单链寡核苷酸,其结合到聚合酶并且抑制聚合酶在低温下延伸 3' 凹端的能力。适配体未在 95°C (PCR 循环来说通常是最高温)不可逆地变性。Eppendorf-5 Prime Inc. 销售一种专有配体,其据说以温度依赖性方式结合到 Taq 聚合酶,并且抑制 Taq 聚合酶在温度低于约 50°C 时结合到双链 DNA。尽管做了这许多尝试,引导错误仍然是 PCR 扩增的一个问题。

[0013] 在引物依赖性扩增反应(包括 PCR 扩增)期间的另一类型的引导错误称为引物二聚体形成和引物二聚体扩增。根据该现象,一个引物杂交到其它引物或其自身另一拷贝,然后经历 3' 端延伸以生成小双链扩增子,然后所述扩增子可进一步扩增或可多聚化并进一步扩增。可在不存在靶标的情况下发生引物二聚体形成。

[0014] 通过实时检测方法已使扩增反应(包括 PCR 扩增)的定量分析成为可能。在 PCR 扩增中,高于阈值循环时荧光信号变得可见的 PCR 循环或反应的 C_T 指示起始靶标浓度。端点

分析最好为半定量的,部分由于反应退出指数扩增时的重复间发散。双链扩增子的电泳分析为半定量的,并且可以使用荧光标记引物。使用荧光标记探针的端点分析(等位基因辨别探针或容许错配的探针)也最好为半定量的。通过减少发散和制备单链产物,LATE-PCR在端点分析中提供显著提高,但重复间发散通常并未完全消除,使定量和多重检测不够准确并且问题比预期更加严重。

[0015] 多重 PCR 测定的设计和构建通常遇到引导错误的问题,因为单个反应中多个引物对的使用几何级数地增加了引物与靶序列或可能存在的其它 DNA 链可能的非预期相互作用数目。实际上,在对称多重 PCR 测定中,很难设计所有引物对具有相同解链温度,并且在不对称或 LATE-PCR 多重 PCR 测定中,很难设计所有限制性引物具有单个解链温度并且所有过量引物具有单个解链温度。因此,在多重 PCR 测定中,用于一个或多个热循环的特定退火温度不可能对于所有引物对为最优。如果 PCR 循环的引物退火步骤设定为允许最低 T_m 引物的杂交,则该反应对于具有较高 T_m 的引物将具有降低的严格性,从而增加引导错误发生机会。此外,LATE-PCR 测定中,所用限制性引物(无论单重或多重)的解链温度通常比过量引物的解链温度高 5°C 或更多,又使其可以将单个引物退火温度匹配到两个引物的解链温度。

[0016] 引物依赖性扩增(包括 PCR 扩增)中的 DNA 聚合酶的性能为选择性的标称量,特别是在完全互补于引物的靶序列与除了在引物 3' 端核苷酸处的错配以外完全互补的序列之间辨别的标称能力。已试图通过设计引物使其 3' 端核苷酸互补于遭受突变的靶核苷酸,利用该标称选择性来检测单核苷酸突变或 SNP。称为扩增阻滞突变系统 (ARMS) 的扩增测定方法试图这样做 (Newton 等人, Nucl. Acids Res. 17, 2503-2516 (1989); Wu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :2757-2760 (1989))。由于引导错误和引物二聚体形成,ARMS 测定易于产生假阳性信号。某些引导错误事件可涉及不正确杂交的引物,使得存在 3' 错配核苷酸。引物二聚体形成还可能涉及错配的 3' 核苷酸。在 LATE-PCR 扩增的最后阶段,反应混合物中另一单链上的单链扩增子的引导错误还可能涉及错配的 3' 核苷酸。因此,除了其它效果外,增强聚合酶对 3' 端错配的辨别可减少引导错误。已试图通过使扩增引物其自身更具选择性,以提高超过上述标称选择性的扩增期间的选择性。例如, Tyagi 等人向引物的 5' 端加入互补于引物 3' 端的序列以形成茎-环结构,其中环和茎的 3' 部分互补于靶链(美国专利 6,277,607)。经观察,该方法并未降低设计用于多个测定的引物的难度(如上所述)。当然,使引物更具选择性不会提高 DNA 聚合酶的选择性。

[0017] 为提高选择性,修饰引物的替代方式为影响 DNA 聚合酶自身。美国专利申请 US 11/242,506 描述了一类试剂添加物,稍微提高产物特异性并且大大降低或在某些情况下可行地消除 PCR 扩增反应中引导错误的影响。该类试剂包含单一寡核苷酸分子,其能在温度低于茎的解链温度时折叠成具有茎和环的发夹结构。虽然双链茎封闭,但 3' 和 5' 端的核苷酸往往会解旋。因此,这些添加物在其 3' 和 5' 端上被化学修饰以保持末端封闭。这种方式的末端封闭有效地提高了茎的解链温度。在封闭构型中,这些试剂添加物与 DNA 聚合酶相互作用,以便提高选择性。在封闭构型中,它们还抑制 DNA 聚合酶的聚合酶活性。虽然这些添加物优于所有类型 PCR 中现有的“热启动”方法,并且可用于在反应的早期阶段和在具有许多循环(通常 60 个循环和更多)的 LATE-PCR 反应期间防止非所需产物(包括引物二聚体和引导错误的扩增子)的积聚,但它们的确具有其包含单一寡核苷酸固有的

局限性。特别地,茎长度不能大于约 12 个核苷酸,因为如果这样并且还在其末端被化学修饰,则其解链温度会变得很高,以致于当 PCR 被加热到延伸温度时,其不容易打开。甚至当以低浓度加入时,具有长茎和高 T_m 的发夹分子往往抑制反应。这些添加物固有的另一难点在于,它们为非线性对称,即,闭合发夹的一端为打开的而另一端为环。如美国专利申请 US 11/242,506 中所述,具有包含 3-22 个核苷酸的环的分子往往比其中使用 3 碳或 6 碳连接子形成环的分子更容易倾向于抑制扩增。期望具有结构对称的端-到-端的试剂。

[0018] Kainz 等人 (2000) *Biotechniques* 28:278-282 报道,具有 16-21 个核苷酸长度的 DNA 片段 (双链 DNA 寡核苷酸) 可抑制在对称 PCR 反应的最佳退火温度或略低于退火温度下发生的引导错误,从而防止非特异性产物的扩增。DNA 低聚物在 PCR 循环的解链步骤期间被可逆地变性。在所有情况下, Kainz 等人采用的测定均显示存在和抑制引导错误,所述引导错误是在 95°C 下的第一次解链事件后温度降低到最佳退火温度时发生的。这并未解决 1 型引导错误,如 Kainz 等人证实并且他们的数据显示,在 1 型引导错误发生时仅为双链的双链片段 (即,解链温度大于 5°C 而小于反应的退火温度) 不能防止引导错误。来自 Kainz 等人的一人推断他们的方法在多重反应中可能更不可靠,因为如上所解释,退火温度不可能同时对所有引物对为最佳。Kainz 等人还承认,虽然他们未在其具体实验中观察到这一点,但如果它们变为反应中的一个或多个引物杂交的靶标,则双链 DNA 寡核苷酸可以触发引导错误。

[0019] 概述

[0020] 一个实施方案为用于引物依赖性 DNA 扩增反应 (优选 PCR 扩增反应) 的反应混合物,所述扩增反应包括通过扩增至少一个 DNA 靶序列的 DNA 聚合酶来引物延伸,所述反应混合物包括至少一个引物对、热稳定 DNA 聚合酶和 dNTP,改良处包括:在扩增开始前将至少一个双链寡核苷酸添加物包括在反应混合物内,该双链寡核苷酸添加物具有 6-50 个核苷酸长的杂交物长度,在 32°C 下至少 50% 为双链,在其每条链上具有末端区并且包括 1-4 个修饰基团 (优选 2 个、3 个或 4 个修饰基团),每个修饰基团均共价连接到不同末端区 (优选连接到末端核苷酸),所述修饰基团为不具有非平面大体积部分的多环部分,其中所包括的所述至少一个双链寡核苷酸添加物的浓度与所述 DNA 聚合酶浓度有关并且对于以下功能的至少一个是有效的:抑制引导错误、提高聚合酶对具有未完全互补的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、提高聚合酶对具有富含 AT 的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、降低重复反应间的发散、抑制聚合酶 5' 核酸外切酶活性、以及抑制聚合酶活性;条件是,如果添加物为任何靶序列的引物或检测探针,则其包括至少三个修饰基团。

[0021] 另一个实施方案为如前文所述的反应混合物,其包括两种此类双链添加物的混合物。

[0022] 另一个实施方案为上述反应混合物,其中该添加物包括:第一链,其为所述至少一个靶序列的引物或探针;和反向互补链,其部分互补于第一链,并且其中添加物包括三个所述修饰基团。

[0023] 另一个实施方案为 DNA (包括 cDNA) 靶标的引物依赖性扩增 (优选 PCR 扩增),使用上述反应混合物,并且其中需要逆向转录 RNA 以获得待扩增的 DNA 靶序列。

[0024] 另一个实施方案为均相检测测定 (实时和端点测定),其包括扩增此类引物依赖性产物及扩增产物的荧光检测。

[0025] 另一个实施方案为试剂盒,其包含针对至少一个 DNA 靶序列的引物、dNTP、热稳定的 DNA 聚合酶、和如上所述至少一个修饰的双链寡核苷酸添加物。

[0026] 另一个实施方案为此类试剂盒,其也包括用于均相地检测扩增反应产物的至少一种荧光检测试剂。

[0027] 另一个实施方案为修饰的双链寡核苷酸,其在各链上具有末端区,具有 6-50 个核苷酸长的杂交物长度,在 40℃ 下(优选 32℃ 下)至少 50% 为双链,并且包括 2-4 个修饰基团,各修饰基团共价连接到不同末端区,优选连接到末端核苷酸,所述修饰基团为不具有非平面大体积部分的多环部分,所述修饰的寡核苷酸能够结合到 DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶域。

[0028] 另一个实施方案为引物依赖性 DNA 扩增反应混合物,其包括通过用于扩增至少一个 DNA 靶序列的 DNA 聚合酶来引物延伸,所述反应混合物包括至少一个引物对、DNA 聚合酶和 dNTP,改良处包括:在扩增起始前将至少一个双链寡核苷酸添加物包括在反应混合物内,该双链寡核苷酸添加物具有 6-50 个核苷酸长的杂交物长度,在 32℃ 下至少 50% 为双链,在其每条链上具有末端区并且包括 1-4 个修饰基团,每个修饰基团均共价连接到不同末端区,所述修饰基团为不具有非平面大体积部分的多环部分,其中所包括的所述至少一个双链寡核苷酸添加物的浓度与所述 DNA 聚合酶浓度有关并且对于以下功能的至少一个是有效的:抑制引导错误、提高聚合酶对具有未完全互补的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、提高聚合酶对具有富含 AT 的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、减少重复反应间的发散、抑制聚合酶 5' 核酸外切酶活性、以及抑制聚合酶活性;条件是,如果添加物为任何靶序列的引物或检测探针,则其包括至少三个修饰基团。

[0029] 另一个实施方案为扩增测定,其包括在扩增期间实时或在扩增后端点对反应的单链产物、反应的双链产物、或两者进行扩增和荧光检测,其中所述反应的双链产物用荧光 DNA 染料检测,所述反应的单链产物用至少一个荧光标记杂交探针检测,或两者均有。

[0030] 另一个实施方案为修饰的双链寡核苷酸,在其各链上具有末端区,具有 6-50 个核苷酸长的杂交物长度,在 32℃ 下至少 50% 为双链,并且包括 2-4 个修饰基团,每个修饰基团均共价连接到不同末端区,所述修饰基团为不具有非平面大体积部分的多环部分,所述修饰寡核苷酸能够抑制 DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶域。修饰的双链寡核苷酸可以具有 1 到 4 个单链突出端,并在未杂交于双链寡核苷酸结构中时,其可以具有形成茎-环(发夹)结构的 1 个或 2 个单链,在此情况下,该茎有 6 个或更少个碱基对长度。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 示出在实施例 1 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 16merA 的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0033] 图 2 示出在实施例 1 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 16merB 的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0034] 图 3 示出在实施例 1 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 EP049 的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0035] 图 4 示出在实施例 1 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 EP027 的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0036] 图 5 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 1 中描述的使用浓度为 100nM、300nM、600nM

和 1000nM 的添加物 EP027 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0037] 图 6 示出在实施例 2 中描述的使用浓度为 100nM 的添加物 22merA 和使用浓度为 100nM 的添加物 EP003 的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0038] 图 7A 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 25/600/575nM 的三链添加物混合物 EP043 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0039] 图 7B 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 50/600/550nM 的三链添加物混合物 EP043 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0040] 图 7C 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 75/600/525nM 的三链添加物混合物 EP043 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0041] 图 7D 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 100/600/500nM 的三链添加物混合物 EP043 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0042] 图 8A 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 25/600/575nM 的三链添加物混合物 EP045 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0043] 图 8B 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 50/600/550nM 的三链添加物混合物 EP045 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0044] 图 8C 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 4 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 75/600/525nM 的三链添加物混合物 EP045 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0045] 图 8D 为 SYBR Green 荧光作为在使用实施例 4 中描述的总浓度为 600nM 和链浓度为 100/600/500nM 的三链添加物混合物 EP046 的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数变化的函数的图。

[0046] 图 9A 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的未使用添加物和退火温度为 65℃的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0047] 图 9B 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的使用浓度为 400nM 的添加物 EP020 和 65℃的退火温度的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0048] 图 9C 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的使用浓度为 400nM 的添加物 EP020 和 60.7℃的退火温度的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0049] 图 9D 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 EP013 和 66℃的退火温度的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0050] 图 9E 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 EP013 和 64.2℃的退火温度的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0051] 图 9F 为来自两种探针的荧光作为在实施例 5 中描述的使用浓度为 300nM 的添加物 EP013 和 60.7℃的退火温度的 LATE-PCR 双重扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0052] 图 10 为探针荧光作为实施例 6 中描述的使用若干添加物中的任何添加物或未使用添加物的不依赖引物的探针-裂解测定的温度振荡循环次数的函数的图。

[0053] 图 11A 示出由实施例 7 中描述的未使用添加物的 LATE-PCR 扩增的重复引起的探针扩增子杂交物的解链曲线,以及单独探针的解链曲线。

[0054] 图 11B 示出由实施例 7 中描述的使用浓度为 600nM 的添加物 EP013 的 LATE-PCR 扩增的重复引起的探针扩增子杂交物的解链曲线,以及单独探针的解链曲线。

[0055] 图 12 为示出在实施例 8 中描述的未使用添加物、使用浓度为 300nM 的添加物 EP011、使用浓度为 600nM 的添加物 EP011 由 1000 个线粒体基因组 DNA(靶序列)拷贝起始的 12 重 LATE-PCR 扩增的产物的电泳凝胶。

[0056] 图 13 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 9 中描述的未使用添加物的 Taq DNA 聚合酶、未使用添加物的 Taq DNA 聚合酶和抗体、使用浓度为 600nM 的添加物 EP046 的 Taq DNA 聚合酶、和使用浓度为 600nM 的添加物 EP046 的 Taq DNA 聚合酶和抗体的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0057] 图 14A 为探针荧光作为在实施例 10 中描述的使用浓度为 600nM 的添加物 EP010 由 1000 个、100 个和 10 个靶标拷贝起始的具有低温检测步骤的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0058] 图 14B 示出在实施例 10 中所描述的使用浓度为 600nM 的添加物 EP010 由 1000 个、100 个和 10 个靶标拷贝起始的 LATE-PCR ColdStop 扩增的 40 个循环之后探针扩增子杂交物的解链曲线。

[0059] 图 14C 示出在实施例 10 中所描述的使用浓度为 600nM 的添加物 EP010 由 1000 个、100 个和 10 个靶标拷贝起始的 LATE-PCR ColdStop 扩增的 70 个循环之后探针扩增子杂交物的解链曲线。

[0060] 图 15A 为 SYBR Green 荧光作为在实施例 13 中描述的使用总浓度为 600nM 和链浓度为 50/600/550nM 的添加物混合物 EP043、用去尾引物和加尾引物的 LATE-PCR 扩增的重复的扩增循环次数的函数的图。

[0061] 图 15B 示出具有添加物 EP043 的 6 种扩增产物的解链曲线,其中朝下的箭头指示正确双链 DNA 产物的解链温度(86°C)。圆圈 153 标示具有去尾引物的一个重复,示出图 15A 中无产物进化(平稳段)的正确峰,并且圆圈 154 标示具有加尾引物的两个重复,也示出图 15A 中无产物进化(平稳段)。

[0062] 图 16A 示出在实施例 14 中描述的使用 5'-Dabcyl 化引物但无反向互补序列的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0063] 图 16B 示出在实施例 14 中描述的使用 5'-Dabcyl 化引物和浓度为 100nM 的反向互补序列的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0064] 图 16C 示出在实施例 14 中描述的使用 5'-Dabcyl 化引物和浓度为 200nM 的反向互补序列的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0065] 图 16D 示出在实施例 14 中描述的使用 5'-Dabcyl 化引物和浓度为 300nM 的反向互补序列的 LATE-PCR 扩增的重复的解链曲线。

[0066] 图 17A 为探针荧光作为在实施例 15 描述的使用浓度为 2000nM 的添加物 EP020 的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数的函数的图。

[0067] 图 17B 为探针荧光作为在实施例 15 描述的使用浓度为 200nM 的添加物 EP010 的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数的函数的图。

[0068] 图 17C 为随在实施例 15 描述的使用浓度为 400nM 的添加物 EP003 的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数变化的探针荧光图。

[0069] 图 17D 为探针荧光作为在实施例 15 描述的使用浓度为 400nM 的添加物 EP010 和浓度为 1000nM 的添加物 EP020 的混合物的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数的函数的图。

[0070] 图 17E 为探针荧光作为在实施例 15 描述的使用浓度为 400nM 的添加物 EP003 和浓度为 1000nM 的添加物 EP020 的混合物的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数的函数的图。

[0071] 图 17F 为探针荧光作为在实施例 15 描述的未使用添加物的具有 RNA 靶标逆转录的 LATE-PCR 扩增的重复循环次数的函数的图。

[0072] 图 18A 为根据本发明的由两个线性（无规卷曲）寡核苷酸形成并且具有单链突出端的修饰双链添加物的示意图。

[0073] 图 18B 为如图 18A 中所述的修饰双链添加物（但由一个线性寡核苷酸和一个发夹形成寡核苷酸形成）的示意图。

[0074] 图 18C 为如图 18A 中所述的修饰双链添加物（但由两个发夹寡核苷酸形成）的示意图。

[0075] 图 19A 示出如实施例 16 中所述的利用 Taq 聚合酶加抗体、用或不用添加物 SL04 的 LATE-PCR 扩增产物的解链曲线。

[0076] 图 19B 示出如实施例 16 中所述的利用 Taq 聚合酶加抗体、用或不用添加物 SL07 的 LATE-PCR 扩增的产物的解链曲线。

[0077] 图 19C 示出如实施例 16 中所述的利用 Taq 聚合酶加抗体、用或不用添加物 SL08 的 LATE-PCR 扩增的产物的解链曲线。

[0078] 图 19D 示出如实施例 16 中所述的利用 Taq 聚合酶加抗体、用或不用添加物 SL09 的 LATE-PCR 扩增的产物的解链曲线。

[0079] 图 20 为探针荧光作为在实施例 18 中描述的使用不同浓度添加物的不依赖引物的探针 - 裂解测定的温度振荡循环次数的函数的图。

[0080] 图 21 为示出阻断物寡核苷酸在限制性引物与靶标之间形成与引物完全互补的 3' 端错配的作用的示意图。

[0081] 图 22A 为针对如实施例 19 中描述的不用阻断物的稀释系列扩增的阈值循环 (C_T) 与靶标起始浓度（拷贝数）的关系图。

[0082] 图 22B 为针对如实施例 19 中描述的利用阻断物的稀释系列扩增的阈值循环 (C_T) 与靶标起始浓度（拷贝数）的关系图。

[0083] 图 23A 为示出抗体在实施例 20 中描述的扩增中的作用的 SYBRGreen 荧光与扩增循环次数的关系图。

[0084] 图 23B 为示出添加物 EP010 在实施例 20 中描述的扩增中的作用的 SYBR Green 荧光与扩增循环次数的关系图。

[0085] 图 23C 为实施例 20 中描述的仅用 DNA 聚合酶制备的产物和用在测定的第一孵育

步骤之后添加的抗体制备的产物的解链曲线。

[0086] 图 23D 为实施例 20 中描述的用在测定的第一孵育步骤之前添加的抗体制备的产物的解链曲线。

[0087] 图 23E 为实施例 20 中描述的用在测定的第一孵育步骤之前和之后添加的添加物 EP010 制备的产物的解链曲线。

[0088] 详述

[0089] 提及双链添加物、引物和探针的解链温度 (T_m)。根据定义, T_m 是指双链寡核苷酸为 50% 双链和 50% 单链时的温度。对于添加物, T_m 是指的双链寡核苷酸的计算 T_m , 不说明取代基修饰物的任何效应。本说明书中所示的双链添加物的 T_m 是根据以下文献计算: Markham 和 Zuker (2005) DINAMLT web server for nucleic acid melting prediction, Nucleic Acids Res 33 :W577-W581, 以及 Markham 和 Zuker (2008) UNAFOLD :software for nucleic acid folding and hybridization. Keith, J.M. 编, BIOINFORMATICS, vol. II, Structure, Functions and Applications, No. 453 Methods in Molecular Biology, 第 1 章, 第 3 页至第 31 页 (Humana Press, Totowa, New Jersey. ISBN978-1-60327-428-9。在使用提及的万维服务器时, 进行以下输入: 各链浓度, 以 μM 计, 如实施例中所报道; 70mM 的盐浓度; 和 3mM 的镁浓度。扩增起始时 LATE-PCR 扩增反应中的探针和引物的 T_m 称为 $T_{m[0]}$ 。 $T_{m[0]}$ 可凭经验测定 (在使用结构探针时是必要的), 或使用盐浓度调整根据“最近邻”方法 (Santa Lucia, J. (1998) PNAS (USA) 95 :1460-1465; 及 Allawi, H. T. 和 Santa Lucia, J. (1997) Biochem. 36 :10581-10594) 计算, 该文献通过引用整体并入本文。在工作中, 我们使用 0.07M 的单价盐浓度, 但也可使用其它浓度。

[0090] 提及位于末端区寡核苷酸链上的修饰基团。“末端区”是指连接到 5' 或 3' 端核苷酸或连接到从 5' 或 3' 端不超过 5 个、不超过 3 个、或不超过 2 个核苷酸的内部核苷酸。在一些实施方案中, 末端修饰物连接到 5' 或 3' 端核苷酸。

[0091] 提及选择性。“选择性”通常是指在满足某些条件时 DNA 聚合酶延伸 3' 凹端的优选性。一般来讲, 结合到靶序列的 3' 凹端为热不稳定的, 即其交替地结合到链上和从其所杂交的链上局部解旋。据称, 这些端结合到受益于形成更多氢键的靶标时这些端是稳定的, 而在形成较少氢键时则是不稳定的。根据此观点, 完全互补于其靶标的 3' 凹端比未完全互补于其靶标的 3' 端更稳定。相似地, 富含 GC 的 3' 凹端通常比富含 AT 的 3' 凹端更稳定, 因为 GC 二核苷酸对形成 3 个氢键, 而 AT 二核苷酸对形成 2 个氢键。

[0092] 根据此理解, 一种选择性类型为当 3' 凹端的 3' 端区域 (特别是包括 3' 末端核苷酸) 完全互补 (即, 无错配的杂交) 时 DNA 聚合酶优选延伸杂交物的 3' 凹端。换句话说, 这种类型的选择性为对未完全匹配到其靶标的 3' 端引导序列的选择性。对 3' 端区域错配的选择性适用于引物-靶杂交物, 其中它表明相比于在例如 3' 末端核苷酸上具有错配的引物-靶杂交物, 聚合酶优先选择在引物 3' 端上完全互补的引物-靶杂交物。对 3' 端-区域错配的选择性也更一般地适用于通过任何 2 个 DNA 链在扩增反应混合物中形成的具有可延伸的 3' 凹端的杂交物, 例如当一个扩增子链杂交到另一扩增子链上 (即, 引导) 时可能发生的。

[0093] 第二种类型的选择性为 DNA 聚合酶优选具有富含 GC 而非富含 AT 的 3' 端区域的引物 (或引物链), 或换句话说, 对末端区富含 AT 的引物或其它引物链的选择性。

[0094] 对于任一类型的选择性来说,选择性的度量为来自非优选杂交物(例如,由引物和错配靶标形成的杂交物)扩增的信号阈值循环(C_T)与来自优选杂交物(例如,引物和错配靶标形成的杂交物)扩增的信号 C_T 之间的差值(ΔC_T)。使用添加物引起的选择性提高为净 C_T 差异,其通过从具有添加物产生的 ΔC_T 中减去没有添加物的 ΔC_T 而获得。

[0095] 可包括在引物依赖性 DNA 扩增反应和使用此类反应(包括 PCR 扩增反应和 PCR 扩增测定)的核酸检测测定中减少引导错误、抑制 DNA 聚合酶活性、提高任一类型的 DNA 聚合酶选择性、抑制 DNA 聚合酶核酸外切酶活性或减少重复反应间的发散或上述任何组合的添加物。

[0096] 溶于 DNA 扩增缓冲液并且包括 1 到 4 个或 2 到 4 个共价结合部分(称为修饰基团或简称修饰物)的化学试剂抑制引导错误并且提高聚合酶对引物和完全互补靶序列之间的杂交物的选择性。共价结合的修饰基团是多环的(包括但不限于芳族)部分,其如果是大体积的,则为平面的并且可被构型成结合到具有核酸外切酶域的 DNA 聚合酶(活性或非活性的),以便抑制引导错误和提高聚合酶对引物和完全互补靶序列之间的杂交物的选择性。

[0097] 在一些实施方案中,淬灭剂 Dabcyl(4-(4'-二甲基氨基偶氮苯基))可以用作这些试剂的修饰基团。

[0098] 通过将多环部分连接到双链寡核苷酸,可使多环部分溶解。如上所述的具有 1-4 个多环部分的某些双链寡核苷酸可用作在引物依赖性 DNA 扩增反应和使用此类反应(包括 PCR 扩增反应和 PCR 扩增测定)的核酸检测测定中用于减少引导错误、抑制 DNA 聚合酶活性、增加 DNA 聚合酶选择性、抑制 DNA 聚合酶核酸外切酶活性、减少重复间发散或上述的任何组合的添加物。修饰的双链寡核苷酸可以包含天然核苷酸,即,其可以为 DNA、RNA、或 DNA 和 RNA 的混合物。修饰双链寡核苷酸还可包含非天然核苷酸,例如 LNA 和 2'-O-甲基核苷酸。扩增反应可能是对称或非对称的,包括不对称 PCR 扩增反应,并且优选 LATE-PCR 反应。

[0099] 添加物可以是修饰的线性双链 DNA 寡核苷酸,其中互补核酸链为 6-50 个、优选 12-30 个、更优选 16-26 个核苷酸长度。修饰的双链的寡核苷酸可以是平端的或可以在一个或两个端上包含 1-8 个核苷酸、优选 1-5 个核苷酸的短突出端。图 18A-18C 示出在添加物双链区域的一个或两个末端处的链中具有非互补末端区的若干不同实施方案。为了示例,示出所有构型含具有具体位置的 3 个修饰基团(M),但应理解,诸如此类的实施方案不限于所示位置或不限于包括 3 个修饰基团。图 18A 示出杂交以形成双链添加物 183 的两个部分互补、无规卷曲寡核苷酸 181、182,所述双链添加物 183 包括双链区域 184 和单链突出端 185、186。杂交物 184 的解链温度(T_m)可通过改变其长度和 GC 含量来调节。类似地,图 18B 示出杂交以形成双链添加物 189 的两个部分互补寡核苷酸 187、188,所述双链添加物 189 包括双链区域 190 和单链突出端 191、192。突出端 191、192 可以包含即便在低温下也不相互杂交的序列。可选地,突出端可以包含仅在低温下相互杂交的序列(T_m 低于双链区域 184 的 T_m ,如由互补程度和 GC 含量决定)。图 18B 中示出的实施方案不同于图 18A 中所示实施方案,在于一个寡核苷酸即寡核苷酸 187,当未杂交于寡核苷酸 188 时,呈现包括多达 6 个核苷酸长度的双链茎 193 的发夹结构。图 18C 示出杂交以形成双链添加物 196 的两个部分互补寡核苷酸 194、195,所述双链添加物 196 包括双链区域 197 和单链突出端 198-201。在图 18C

所示实施方案中,寡核苷酸 194 和 195 两者,当不相互杂交时,分别呈现包括茎 202 和 203 的发夹结构。实施例 16 和 17 使用图 18C 中所示结构。对于其中任一链或两个链形成发夹、或茎-环结构的添加物,每个茎的 T_m 高于双链区域的 T_m ,以确保在使用期间形成发夹,但不会太高以致于当在使用期间反应温度降低时,在合理时间段内阻止形成添加物的双链构象。在一些实施方案中,其中寡核苷酸链不用作扩增引物或探针,两个 3' 端均被阻断以阻止通过 DNA 聚合酶延伸。阻断可以通过以下方式实现:共价链接修饰基团到链的 3' 端核苷酸,或否则阻断延伸,例如通过包括 3' 端磷酸酯基。添加物可包括 32°C 下至少 50% 为双链的双链寡核苷酸,这一温度与在组装扩增反应混合物期间可能遇到的温度相同。

[0100] 在线性双链寡核苷酸中包括 1-4 个修饰基团,优选 2 个、3 个或 4 个修饰基团。修饰物在其末端区中共价连接到添加链,即在末端核苷酸处,或在距离末端核苷酸不超过 5 个,优选不超过 2 个核苷酸的核苷酸处。一些实施方案使用连接到双链寡核苷酸的末端核苷酸的修饰物。这些修饰物可共价连接到寡核苷酸链。修饰基团的共价连接在例如用于掺入荧光团和淬灭剂的领域中是熟知的。

[0101] 修饰基团可以是多环部分,包括但不限于聚芳族,并且如果为大体积部分则具有总体平面形状。例子包括:地高辛配基,一种植物甾体化合物;香豆素,一种双环芳族;QSY-21,一种非平面的用作淬灭剂的小聚芳族化合物。据信包括了黄腐酸和腐殖酸。在一些实施方案中,修饰基团为熟知的淬灭剂 Dabcyl,其为大体积并且是平面的聚芳族。因此,修饰基团可为不具有非平面大体积部分的多环部分,优选为聚芳族。

[0102] 添加物可包括具有 1 个、2 个、3 个和 4 个修饰基团的各种可能构型的线性双链 DNA 寡核苷酸。就一个末端修饰基团而言,存在 4 种可能的构型:修饰物可以连接到任一链的 3' 或 5' 末端核苷酸。就 2 个末端修饰基团而言,存在 6 个可能的构型;就 3 个末端修饰基团而言,存在 4 个可能的构型;以及就 4 个修饰基团而言,仅存在一个可能的构型。连接修饰物到末端区的内部核苷酸产生了另外的可能构型。在其中链不是引物并且修饰基团未连接到链的 3' 端核苷酸的所有情况下,所述核苷酸以不同方式阻断,如通过磷酸酯基团(实施例中以“p”在序列中标示)阻断。

[0103] 在某些实施方案中,一个链还用作引物,并且其 3' 端未阻断。在某些其它的实施方案中,一个链用作检测探针,其中它的 3' 端可被阻断,例如,通过末端修饰基团、末端荧光团、或末端磷酸酯基。对于引物的实施方案,通过包括互补于该引物的单链寡核苷酸(我们称之为反向互补序列),单链扩增引物可被转变成添加物,从而其形成具有引物的双链杂交物。当杂交物为双链时其可作为添加物起作用。杂交物可包括 3 个修饰物,例如 Dabcyl 基。引物链的反向互补序列的 T_m 可设计成 5-30°C,优选 15-25°C,低于扩增靶序列的引物链的 T_m 。为实现 T_m 的差异,通过使其较短和/或在一个或多个核苷酸上错配或通过两者,可以使反向互补序列部分互补于引物链。对于探针实施方案,标记的单链杂交探针可类似于引物的转变,被转变为添加物并且 T_m 类似地低于探针靶杂交物的 T_m 。优选的探针的实施方案包括具有荧光团和淬灭剂的探针链以及具有两个末端淬灭剂的反向互补序列。

[0104] 可以包括用于扩增至少一个 DNA 或 cDNA 靶的引物依赖性扩增反应混合物。反应混合物包括上述添加物中的至少一个以及靶核酸和包括引物、DNA 聚合酶、dNTP 和(通常地)扩增缓冲液的扩增试剂。如果扩增混合物是用于包括双链扩增产物、单链扩增产物、或两者的扩增和均相检测的扩增测定,则反应混合物可包括至少一种用于产物检测、优选荧

光检测的试剂。用于检测双链扩增产物的优选试剂为 DNA 染料,例如 SYBR Green。用于检测单链产物的优选试剂为荧光标记检测探针,其对单链产物的杂交导致可检测荧光信号改变或其在扩增期间对单链产物的杂交引起可检测荧光信号改变。许多均相检测试剂是本领域所已知的,并且可使用任何适当的检测试剂或试剂。也可使用其它试剂。如果所包括的靶核酸为 RNA 靶序列,则反应混合物将包括逆转录酶。

[0105] 反应混合物可包括用于多重扩增和测定的多个靶的多个引物对。实施例 5 示出反应混合物,用于针对包括 2 个引物对和每个扩增产物的荧光探针的两个靶序列的双重 LATE-PCR 测定。实施例 8 示出高度多重扩增的反应混合物,包含用于 12 个不同靶标的 12 个引物对的 12 重体。如果添加物包括引物链中的一个,则反应混合物还可包括合适的反向互补序列。反应混合物可为 PCR 反应混合物,在一些实施方案中为 LATE-PCR 反应混合物。反应混合物可以包括 2 种添加物的组合或混合物。此类混合物可包含 4 个链,或者如果所述 2 个添加物共享共有链,则具有 3 个链。反应混合物可包括至少一个修饰的双链添加物,所述双链添加物总浓度高达 2000nM,优选高达 1000nM 并且更优选高达 600nM。如果反应混合物包括添加物的混合物,则添加物的总浓度可保持如所述。

[0106] 提供了使用上述反应混合物用于一个或多个 DNA 或 cDNA 靶序列的引物依赖性扩增以及具有扩增产物的均相检测(即,具有均相检测的扩增测定)的一个或多个 DNA 或 cDNA 靶序列的引物依赖性扩增的方法。扩增方法和扩增测定方法的可以包括等温扩增反应或热循环扩增反应。在一个实施方案中,扩增方法可为 PCR,并且在一些实施方案中,为 LATE-PCR。经选择用于具体扩增或扩增测定的添加物或添加物的组合,以及该添加物或添加物的组合的量取决于所需效果和扩增期间使用的温度。等温扩增可以仅包括反应混合物制备温度,通常为室温,然后在单个反应温度如 37℃ 下等温扩增反应。PCR 和其它热循环扩增方法包括反应混合物制备温度,然后是许多热循环,所述热循环包括引物退火温度(退火温度)、引物延伸温度(延伸温度)、和链变性温度(解链温度)。虽然退火温度和延伸温度可以相同,但更通常来说退火温度应低于延伸温度 5-20 摄氏度(℃)。LATE-PCR 测定还可以在一种或所有热循环中包括低温检测步骤,在其间,反应混合物的温度降低到退火温度以下,以使得低温探针结合到其靶序列。扩增反应可以在中间点被中断,以便进行可能包括低温(低于退火温度)的一些操作,其后扩增反应可重新开始。扩增可以利用其它的减少引导错误的方法。例如,所用的 DNA 聚合酶可以是热启动聚合酶。另外,所用引物可被设计成具有富含 AT 的 5' 端,包括在必要时增加延伸。另外地或可选地,引物的 3' 端可被设计成富含 GC 或富含 AT,以便改变扩增和扩增测定中的聚合酶抑制作用。扩增反应的产物可适用于测序,包括但不限于双脱氧法测序。

[0107] 扩增测定可以包括在 DNA 靶序列的扩增期间例如在 PCR 扩增反应的一些或所有循环期间多次实时均相检测单链产物、双链产物或两者。如上所述,可以使用荧光检测。可选地,扩增测定可以包括在扩增反应完成之后在端点处均相检测。检测可以包括作为温度的函数的解链扩增产物和检测荧光改变。检测可以为定性或定量的。对于靶标是 RNA 的测定可包括逆向转录。

[0108] 提供了用于进行扩增和扩增测定的试剂盒。此类试剂盒可包括制备反应混合物必需的试剂,包括至少一个靶序列的引物、dNTP、DNA 聚合酶和至少一个修饰的双链添加物,如上所述。用于扩增测定的试剂盒还可包括至少一种检测试剂,例如, DNA 荧光染料或荧光标

记杂交探针。扩增试剂盒和扩增测定试剂盒还可包括用于样品制备的试剂（例如，细胞裂解试剂）、用于核酸分离的试剂和逆转录酶。扩增测定试剂盒可以包括对照靶序列和用于其扩增的引物。

[0109] 对添加物或添加物混合物的选择可考虑以下：DNA 聚合酶抑制作用的性质、对 3' 端引物错配的选择性、对富含 AT 引物 3' 端区域的选择性、聚合酶核酸外切酶活性的抑制、引导错误的抑制和重复间发散的减少。添加物的效果又取决于添加物的固有性质、其浓度、其解链温度和其浓度。例如，固有聚合酶抑制作用往往随添加物中所包括的修饰物数目而增加，并且添加物的有效抑制随其浓度而增加。已发现，对 3' 端引物错配的选择性与 DNA 聚合酶的阻断核酸外切酶活性有关，该 DNA 聚合酶具有该活性或至少具有核酸外切酶位点。这可能是通过通过添加物阻断了酶的核酸外切酶位点。

[0110] 添加物可以对于以下一个或多个功能有效的浓度加入扩增反应混合物中：抑制引导错误、提高聚合酶对具有未完全互补的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、提高聚合酶对具有富含 AT 的 3' 凹端序列的杂交物的选择性、减少重复反应间的发散、抑制聚合酶 5' 核酸外切酶活性、以及抑制聚合酶活性。因为添加物与 DNA 聚合酶相互作用，所需浓度随扩增反应混合物中所包括的 DNA 聚合酶的浓度而变化。对有效用于上述功能中的一个或多个所需的添加物浓度的测定，以及对最佳浓度的测定，可常规通过尝试在扩增反应或扩增测定中添加物所希望的若干浓度来测定，如在以下实施例中所示。例如，实施例 3 报道了若干浓度的若干添加物的经验性试验，以确定各种浓度的添加物的效果，以帮助选择优选的添加物，明确有效浓度，以及确定具体 LATE-PCR 测定中用于特定目的的最佳浓度。对于 Taq DNA 聚合酶（对扩增反应和测定而言最常使用的聚合酶），通常的聚合酶浓度可能为 25 微升（ μ l 或 u1）反应混合物中 1.25 个单位。在一些实施方案中，需要不超过 2000 纳摩尔（nM）的添加物，在一些实施方案中，需要不超过 1000nM，以及在一些实施方案中，不超过 600nM。对于可能以比 Taq DNA 聚合酶更高的浓度包含在反应混合物中的 Tfi DNA 聚合酶，相同浓度的添加物通常是有效的。

[0111] 对于充当“热启动”试剂的添加物，优选的是，在低于等温扩增的反应温度和低于热循环反应例如 PCR 的退火温度的温度下，几乎或完全抑制所用聚合酶（例如，Taq DNA 聚合酶）的聚合酶活性的添加物。为此，添加物可具有对聚合酶活性的高抑制作用，和解链温度（ T_m ），其为至少 32°C 并等于或低于等温反应温度或 PCR 温度，优选比其低 1-15°C，更优选比其低 1-5°C，并且浓度足以完全或至少基本上抑制聚合酶活性。当添加物通过在高于其 T_m 的温度下解链分开而没有不可逆变性时，在 PCR 热循环的等温反应期间每次温度降低足以使添加物变成双链时添加物将起作用，例如，在低温检测步骤期间，如有时用于 LATE-PCR 测定。

[0112] 在等温扩增的反应温度或在高于 PCR 扩增的退火温度的温度下，特别是在延伸温度下，添加物也可用于减少引导错误和提高聚合酶选择性。为此，添加物可具有低的至适度的对聚合酶活性的抑制作用，和这样的解链温度，其比等温反应温度或 PCR 延伸温度低不超过 2°C，优选至少等于该温度，并且更优选高于该温度，并且浓度仅与足以实现所需效应而不过度地抑制反应效率所必需的一样高。另外，因为在 PCR 循环的链-解链步骤期间未使添加物不可逆变性，所以在每个 PCR 循环期间当温度对于链-解链温度而言降低至退火温度或更低的温度时，添加物可用于提高聚合酶选择性。

[0113] 添加物可单独或组合使用。两个修饰的双链寡核苷酸的混合物可以包括 4 个链，或者，如果两个添加物共享共有链，则包括 3 个链。3 个链混合物将不到一个链插入反应混合物，这在实施方案中可能是有利的，其中添加物不是针对扩增反应混合物中任何靶序列的引物和探针。使用组合的添加物赋予设计灵活性。例如，为抑制 I 型引导错误，混合物可包括第一添加物，所述第一添加物通过其固有性质（ T_m 和浓度）在低于扩增反应的引物退火温度下充分抑制聚合酶活性，但其在扩增期间为单链以便不抑制聚合反应。与此类添加物组合以抑制 II 型引导错误以及在合适时在扩增期间抑制 III 型引导错误，混合物可以包括在引物退火期间为双链但在引物延伸期间最低程度地抑制聚合酶活性的添加物。

[0114] 提供了直接与等温 DNA 扩增反应或热循环 DNA 扩增反应例如 PCR 反应中所用的 DNA 聚合酶相互作用的寡核苷酸试剂。寡核苷酸试剂可在其中它们为双链的所有步骤期间作用于扩增反应。它们可具有抑制引导错误和增加聚合酶选择性的效果，包括相比于非完全互补的杂交链的 3' 凹端，DNA 聚合酶优选延伸完全互补的杂交链的 3' 凹端。引导错误可根据不同类型来考虑。I 型是每当反应混合物温度低于引物退火温度时就发生的引导错误。它发生于在扩增起始前反应混合物制备期间。如果温度降低到引物退火温度以下，它也可能发生于扩增期间。II 型在扩增期间每当反应混合物温度处于或高于引物退火温度但低于存在的引物的解链温度时发生的引导错误。III 型是在已制备了高浓度扩增产物（扩增子）之后继续的扩增期间发生的引导错误。引导错误的另一表现为引物二聚体形成，其中一个引物杂交到另一引物或杂交到其自身然后经历延伸以生成短双链扩增子，该短双链扩增子然后可进一步扩增或甚至进一步多聚化并扩增。将扩增反应分为阶段来考虑引导错误可能性是有用的。引导错误产生了可扩增产物，所以发生于扩增反应早期的引导错误事件将被扩增，几乎就如其为靶分子一样。随后的一般性描述是针对 PCR 反应，但本领域技术人员将会理解其适用于其它扩增反应。PCR 的该一般性说明是仅为了示例，而并非意图限制可用扩增反应的类型。

[0115] 预备阶段：制备试剂并在 25℃ 或更低温度（例如，冰上）混合。引物浓度在预备阶段期间为最高，该阶段通常持续数分钟。通常，靶标数目在预备阶段期间低或非常低，并且这些靶标中一些或所有可以为单链，取决于样品如何制备和其是否为 cDNA。实际上，使用酶例如逆转录酶的 cDNA 合成也是预备阶段的一部分，当用于 cDNA 合成的反应混合物也包含引物和 DNA 聚合酶时，因为反应混合物的这些成分可能在 cDNA 合成所需条件下错误引导，通常在 40–60℃ 的温度范围内 5–30 分钟。通过加热到高温（例如 95℃）以使反应混合物中的所有双链 DNA 变性来结束预备阶段。如果 DNA 聚合酶以非活性形式（例如，抗体结合的 DNA 聚合酶）加入，则该加热步骤激活该聚合酶，此过程称为“热启动”。

[0116] I 型引导错误发生于预备阶段期间。如果 DNA 聚合酶不是热启动酶并且如果反应混合物中未包括任何其它聚合酶活性抑制剂，则 I 型引导错误的机率增加。而且，如果聚合酶的热启动改性或用于阻断聚合酶活性的所加入抑制剂未能进行完全抑制，则发生 I 型引导错误。引物二聚体形成和 I 型引导错误在预备阶段期间优先发生，因为温度较低。预备阶段引导错误的产物将被扩增。

[0117] 早期阶段：反应的该阶段通常为 10–15 个热循环的 PCR 扩增。3 步 PCR 的每个循环的热曲线包括链 – 解链温度、引物退火温度和引物延伸温度。对于 2 步 PCR，引物退火和引物延伸是在相同温度下进行。分配给热循环中每个步骤的时间量通常为几秒长。在第一

和第二热循环期间,引物第一次退火至其在全长靶标内的靶序列并且旨在仅当在完全互补靶序列上时选择性延伸。引物退火至并且延伸于靶标的两个链上,并且如果所有都完美进行,则生成并随后指数扩增确定长度的两个互补链。产物链相互杂交的趋势低,因为其浓度低。

[0118] 如果引物延伸于其非完全互补的等位靶标上,则 II 型引导错误可在早期阶段期间发生。对于引物来说,通常具有高于退火温度若干度或甚至更多的 T_m ,这会招致 II 型引导错误。较短退火时间和较高退火温度(相对于引物 T_m) 比较长退火时间和较低退火温度更严格,因此降低了 II 型引导错误并提高聚合酶选择性。II 型引导错误的产物可在剩余扩增期间被扩增。在此未使用热启动聚合酶改性,因为首次加热到高温会不可逆地使热启动抗体或酶烷基化反应失活。热稳定抑制剂,包括本文所述的那些,将在首次和后续的退火步骤期间起作用,因为它们未被高温不可逆地变性。

[0119] 中期阶段:PCR 反应的该阶段通常包含 10-25 个热循环并且包括解链、引物退火和引物延伸。在热循环中分配给每个步骤的时间量通常为几秒长。引物退火到和延伸于靶标的两个链上,并在最佳条件下,生成和随后指数扩增由引物对决定的确定长度的 2 个互补链。

[0120] 就实时对称 PCR 测定而言,中期阶段通常包括在反应的退火步骤或延伸步骤期间的产物检测。就 LATE-PCR 反应而言,中期阶段可以包括在低于退火温度的温度下的产物检测,并且该检测发生于延伸步骤之后。使用杂交探针的荧光信号通常在对称 PCR 和 LATE-PCR 的指数期晚期变得可检测。

[0121] 在对称 PCR 中期阶段结束时,指数性蓄积的产物链的浓度增长到足够高以在引物-退火步骤期间杂交产物链。指数扩增减慢并达到稳定,因为据信聚合酶结合到反应的双链产物。就 LATE-PCR 而言,在产物链浓度变得足够高以减慢反应之前,限制性引物耗尽并且终止反应指数期。

[0122] 在包括低温检测步骤的 LATE-PCR 扩增中, I 型和 II 型引导错误可发生于中期阶段,正如在早期阶段中。这在实时 LATE-PCR 中的低温检测步骤期间尤其是个风险。当产物链浓度增加时, III 型引导错误还可发生于中期阶段。任何类型的引导错误,无论在预备阶段、早期阶段或中期阶段期间,均导致重复反应间的发散,这在指数扩增减慢时尤其明显。

[0123] 晚期阶段:扩增的晚期阶段通常仅发现于 LATE-PCR 中,因为对称 PCR 已达到稳定并且已通过此阶段终止。LATE-PCR 扩增的该阶段通常包含 10-25 个热循环,所述热循环包括解链步骤、引物退火(仅过剩引物)、和引物延伸(仅过剩引物)。热循环中分配给各步骤的时间量通常为几秒长。每个过剩引物退火到并延伸于通过延伸其对应限制性引物(其限制性引物链)来制备的延伸产物上,并且如果所有都完美进行,则有效地生成过剩引物链,其线性累计直到其开始超过该过剩引物自身。因而,LATE-PCR 反应减慢,但没有像对称 PCR 反应那样达到稳定。

[0124] 就实时 LATE-PCR 测定而言,该阶段可以包括在引物退火温度或在低于退火温度的温度下的产物检测,并且所述产物检测发生于延伸期之后。使用杂交探针的荧光信号在该阶段期间通常随大约线性的动力学提高。

[0125] III 型引导错误可发生于在多个线性循环之后的晚期阶段,因为过剩引物链的 3' 端可沿着过剩引物链的另一分子的任何位置错误引导。因此, III 型引导错误的概率随以下

情况增加：1) 单链产物浓度增加；2) 多重反应中不同单链产物的数目增加；3) 反应温度降低；4) 过剩引物链的 3' 端或靠近 3' 端的碱基富含 GC 并且更容易杂交（错误引导）。III 型引导错误导致单链 DNA 转化回双链 DNA，我们称之为“产物进化”（虽然产物不完整或不正常）。产物进化表现为在使用检测双链产物的染料的荧光中突然的后期增加（平稳阶段后的斜率增加），或来自检测单链 DNA 的探针的荧光突然降低。因此，III 型引导错误类似于 II 型引导错误，原因在于错误可在退火温度以上发生，但 III 型引导错误还类似于 I 型引导错误，原因在于错误可在退火温度以下发生。当然，II 型引导错误可发生于该阶段，同样，如果包括了低温步骤，则 I 型引导错误也可发生于该阶段。

[0126] 结束阶段：LATE-PCR 中的结束阶段不涉及额外扩增，因为双链产物不再解链分离。结束阶段为扩增后阶段，其中进行了一些操作。最普遍地，温度降低至退火温度以下以允许探针靶向杂交（信号产生=退火信号），然后温度随时间升高以解链分离探针靶复合物（信号丧失=解链）。我们称之为“探针退火-解链分析”。结束阶段的探针退火-解链分析可在 LATE-PCR 扩增期间用或不用实时分析来进行。通常，在 10-15 个循环的晚期阶段之后的探针退火-解链分析生成关于反应起始时存在的靶拷贝数的定量信息。

[0127] 通常，在结束阶段不发生引导错误，或者如果发生，则其之后不发生使引导错误的产物可见所需的额外扩增。并且，如实施例 10 所示，可以使用“ColdStop（冷终止）”方案来在晚期阶段进行探针退火-解链分析，然后为额外循环重新起始扩增，直到达到结束阶段，此时可重复探针退火-解链分析。如实施例 10 所示，当在探针退火-解链分析之前未使用实时分析时，重复间发散较少，因为通过在每个热循环中省略检测步骤减少了 III 型引导错误的频率。

[0128] 虽然不愿受任何理论束缚，但我们推论，修饰的双链寡核苷酸（如本文所述）直接与 DNA 聚合酶相互作用，从而抑制所有类型的引导错误，即 I 型、II 型、III 型和引物二聚体。我们相信，当添加物为双链时，优选结合到 DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶域，但如果以足以超过饱和 5' 核酸外切酶域的浓度加入，则也结合到 DNA 聚合酶的聚合酶域。从经验来看，25 μ L 反应体积中每 1.25 单位 Taq DNA 聚合酶 300-600nM 浓度的添加物可足以饱和 5' 核酸酶域和聚合酶域。

[0129] 虽然不愿受任何理论束缚，但我们推论，通过在低于引物退火温度的温度下饱和两个域，通过质量作用和由于修饰基团引起的结合的组合而有效停止聚合酶，添加物（如本文所述）阻止 I 型引导错误。在高于引物退火温度的温度下，添加物可在不饱和 5' 核酸外切酶域和聚合酶域的浓度下使用。在这些温度下，添加物优选结合到并且选择性抑制 5' 核酸外切酶域的活性，同时留给聚合酶域极大自由来进行正确杂交的引物的延伸。通过选择性结合到 5' 核酸外切酶域，添加物通过变构效应增加聚合酶域的选择性。

[0130] 虽然不愿受任何理论束缚，我们推论，通过可用于针对特定目的来选择一或多个添加物的方式，修饰基团（例如 Dabcyl 基）有助于添加物的功能。甚至一个 3' 端修饰基团都可抑制潜在地由添加物自身导致的引导错误。然而，3' 端修饰基团，无论一个还是两个在双链寡核苷酸上，不会提高聚合酶对在引物 3' 端的错配的选择性起作用。另一方面，5' 末端的修饰基团，特别是两个 5' 修饰基团，可显著提高该聚合酶选择性。在双链寡核苷酸两个链的一个端上包括修饰物（即，一个 5' 修饰物和一个 3' 修饰物）可显著提高选择性，即使双链寡核苷酸不是平端的。对于选择性增强来说，在双链寡核苷酸的两个端上具有

两个修饰物可比仅在一个端上具有两个修饰基团更好,但具有 4 个修饰基团的双链寡核苷酸往往比具有一个、两个或三个修饰基团的双链寡核苷酸更能降低聚合反应的效率。我们推论,原因在于,具有四个修饰基团的添加物比具有较少修饰基团的添加物更有效地结合到聚合酶域。

[0131] I 型引导错误的抑制

[0132] 添加物包括双链寡核苷酸,其位于或靠近链末端(即在链的末端区)通过加成 1、2、3 或 4 个修饰基团(例如 Dabcy1 修饰基团)被修饰。在一些实施方案中,存在 2-4 个此类基团,而在一些实施方案中,这些基团共价连接到末端核苷酸。在实施例 1 中,如本文所述的添加物,无论单一添加物还是混合物,由前缀“EP”指示以使其区别于用于比较而描述的其它添加物。实施例 1 表明添加物抑制 I 型引导错误而不导致额外的引导错误。在该实施例中,使用了产生错误产物(与引物对定义的产物不同的产物,如由解链分析所确定)的 LATE-PCR 扩增。错误产物的产生指示 I 型引导错误。在此扩增中,尝试将包含具有相同长度(16 个核苷酸)但不同序列的未修饰双链寡核苷酸的两个不同添加物作为对照添加物。一个添加物(16merA)以至少 300nM 的浓度加入使得反应产生正确产物(图 1)。另一个添加物(16merB)则不会(图 2),甚至当以 600nM 或 1000nM 的浓度加入时也不会,并且实际上导致引导错误。此不一致性符合 Kainz 等人的教导:双链寡核苷酸可能抑制引导错误或可能导致引导错误。用添加物重复该测定,所述添加物为导致引导错误的寡核苷酸(16merB)的修饰,该修饰包括一个或两个末端 Dabcy1 修饰物。相比于 16merB(图 2),包括 600nM 浓度的单一 Dabcy1 修饰物、添加物 EP048(图 3)或添加物 E0049 抑制引导错误,包括由未修饰低聚物导致的引导错误。包括仅 300nM 浓度的两个 Dabcy1 修饰物、添加物 EP027 时能抑制引导错误,并且当以仅 100nM 浓度加入时提供改善(图 4)。如包含不同浓度的添加物 EP027(图 5)的反映的动力学分析所示,300nM 浓度的添加物 EP027 消除重复间发散,并且认为 300nM 为此测定中的最佳浓度。

[0133] 用长度 12 到 30 个核苷酸的若干其它未修饰双链寡核苷酸来重复实施例 1 的测定。实施例 1 中所报道的结果证实就抑制或导致 I 型引导错误来说未修饰寡核苷酸是不一致的。如实施例 1 中所报道,还用许多双链寡核苷酸重复该测定,所述双链寡核苷酸具有 8-22 个核苷酸的长度范围并且具有两个 Dabcy1 修饰物、两个地高辛配基修饰物、四个 Dabcy1 修饰物、或四个地高辛配基修饰物。结果证实如本文所述的添加物抑制 I 型引导错误。这些结果还显示出 T_m 对添加物的影响。(在本申请中,添加物的 T_m 是指未修饰双链序列的计算 T_m ,如上所定义。修饰物往往会稍微提高实际 T_m ,也许提高 1-2°C,读者可纳入考虑)。为抑制 I 型引导错误,优选的是,直至或近乎至引物退火温度和引物 T_m 时维持双链的添加物。在实施例 1 中,第一次 10 个循环的引物退火温度为 55°C。虽然在实施例 1 中,在 600nM 浓度的所有情况下用 T_m 范围为 37°C 到 63°C 的添加物获得了良好结果,但其仅为添加物 EP021,具有最低 T_m 的添加物在 300nM 下也不提供良好结果。在 100nM 和 50nM 浓度下表现最佳的添加物的 T_m 至少为 60°C。为抑制 PCR 扩增反应中的 I 型引导错误,添加物的 T_m 可至少为 32°C,更通常为至少 50°C,并且更优选为至少 60°C。

[0134] 作为对本文所述添加物抑制 I 型引导错误的一致性的进一步检查,我们使用不同引物进行不同靶序列的 LATE-PCR 测定。在此测定中,如实施例 2 中所报道,我们比较了 12 个添加物与在实施例 1 的第一部分的测定中表现良好的未修饰双链寡核苷酸(寡核苷

酸 22merA)。添加物均具有 22 个核苷酸的长度、若干不同序列、和两个、三个或四个末端 Dabcy1 修饰物的若干不同构型。所有这些在 300nM 浓度下在抑制引导错误方面至少与添加物 22mer A 一样好,并且在仅 100nM 的较低浓度下几乎其中的一半也能达到相同效果。图 6 为添加物 EP003 和添加物 22merA 的解链曲线,表明只有 100nM 浓度的添加物抑制引导错误。

[0135] 实施例 9 示出定量 LATE-PCR 测定以在第一热循环之前测量 DNA 聚合酶的聚合酶活性。相同的测定可用于定量和比较添加物的 DNA 聚合酶抑制能力,其可在宽范围的浓度、温度和孵育时间上进行测定。初始反应混合物包括高浓度的两个寡核苷酸(分别 62 个和 75 个碱基对),该寡核苷酸能够在其 3' 端处退火至彼此上以形成杂交物,该杂交物为 27 个碱基对长并且具有 60°C 的计算 T_m 。它们在 5' 端上也具有引入部位。扩增引物未包括在初始反应混合物内。反应的热曲线是以在 50°C 下等温浸泡 10 分钟起始。在此步骤期间,重叠的寡核苷酸可引入其自身,即,杂交并且通过活性 DNA 聚合酶延伸。如果这种情况发生,则将为引物产生双链靶标的拷贝,其在热循环之前加入反应混合物。在 50°C 长时间孵育期间聚合酶活性的活性抑制将减少该步骤期间形成的靶标拷贝数。

[0136] 在 50°C 长时间孵育之后,加入高 T_m 引物,并且进行 2 步 LATE-PCR 扩增以扩增已制备的任何靶标。用于扩增的引物退火温度(72°C)远高于重叠核苷酸的 T_m ,从而不产生额外双链靶标。在此测定中,生成可探测水平产物所需的循环次数(以 SYBR Green 或过剩引物链的探针来观察)取决于在部分互补低聚物的初始等温孵育期间产生了多少全长链。这又取决于在等温孵育期间 DNA 聚合酶的活性,因为存在/不存在已知组合物和浓度的任何潜在酶抑制剂(此类抑制剂),已在冰上并在重叠寡核苷酸加入之前首次组装反应混合物时被加入反应混合物中。

[0137] 我们在此定量分析中测试了添加物,包括 T_m 处于或低于 50°C 孵育温度的添加物(EP020, T_m 50°C; EP022, T_m 45°C)和 T_m 显著高于孵育温度的添加物(EP046, T_m 67°C)。较低 T_m 的添加物在 50°C 孵育期间可能为基本上至少为单链,而高 T_m 添加物 EP046 可能为双链。低 T_m 添加物掺入反应混合物未引起 C_T 延迟,但 600nM 浓度的 EP046 的掺入引起 C_T 延迟,无论聚合酶为 Taq 还是 Taq 加抗体。添加物 EP046 的动力学曲线示于图 13 中。图 13 表明,在不存在任何 DNA 聚合酶抑制剂的情况下,重叠寡核苷酸的 3' 端相互杂交并且延伸。加入具有用于热启动的聚合酶的抗体部分抑制 I 型引导错误达约 1000 倍,但进一步加入 600nM EP046 抑制 I 型引导错误额外 10 倍。

[0138] 实施例 16 报道用具有 6 个核苷酸长度的单链突出端和 22 个碱基对的双链区域的添加物的类似测试。添加物均含有相同的链序列,但不同的是修饰物(该实施例中为 Dabcy1 基)的数目和位置。两种个别链形成发夹,如图 18C 所示。测试方法包括在 50°C 下等温浸泡 1 分钟(而不是实施例 9 中的 10 分钟),然后在冰上孵育并随后 LATE-PCR 扩增。解链曲线分析表明具有两个修饰物(图 19A)和三个修饰物(图 19B、图 19C)的添加物减少了不正确产物的产生,并且具有四个修饰物(图 19D)的添加物完全抑制其产生。

[0139] 实施例 20 报道根据实施例 9 的测试,其在预备阶段期间更严格地隔离了 I 型引导错误。通过使用在 PCR 退火/延伸温度下变为单链的添加物,消除了可能的 II 型引导错误。基于实施例 20 报道的结果,我们断定:a) 热启动抗体不完全抑制 DNA 合成并且在抗体存在下生成的大多数产物是 I 型引导错误所引起;b) 在冰上孵育期间合成的产物大部分为 I 型

引导错误的结果;c) 添加物 EP010 用于提高产物冰上延伸的特异性,并且因为大多数冰上产生的产物是 I 型引导错误的结果,所以 EP010 抑制了大部分冰上引物延伸事件。因为含添加物 EP010 的扩增产物的解链曲线(图 23E)表明,双链形式在 72℃ 下不再存在,该温度为在扩增时引物退火和延伸进行的温度,实施例 20 中所观察的 EP010 的效果完全是由于起始扩增前在 50℃ 和冰上孵育时 EP010 活性所致。实施例 9 中所用添加物的相同分析表明,它们具有高于 EP010 的解链峰(未示出),因此实施例 9 中添加物的效果并不仅严格归因于扩增前步骤,而且还归因于扩增期间的步骤。

[0140] 抑制 II 型引导错误和增加 PCR 反应的聚合酶选择性

[0141] 添加物可抑制 II 型引导错误和提高 DNA 聚合酶对引物的杂交 3' 端核苷酸的选择性。为测定在 LATE-PCR 测定中在扩增期间在限制性引物的 3' 端核苷酸上错配的选择性,我们扩增完全互补于两种引物的靶标(匹配靶标),并且我们分别扩增完全互补于过剩引物但包含对限制性引物的 3' 端核苷酸的单一错配的靶标。或者,如下文所述并且在实施例 19 中所显示,3' 端错配可通过使用阻断物寡核苷酸来产生。我们通过 DNA 染料检测双链产物。“选择性”为介于来自错配靶标的扩增信号的 C_T 与来自匹配靶标的扩增信号的 C_T 差异 (ΔC_T)。当在不含添加物的样品上进行时,该测定可显示聚合酶对引物/匹配靶标的基本选择性超过引物/错配靶,以及引物/匹配靶的扩增的基本效率。对于 Taq DNA 聚合酶, ΔC_T 可能少于两个扩增循环。添加物引起的选择性提高为由扩增反应混合物中包括添加物所引起的 ΔC_T 的增益。

[0142] 我们在该选择性测定中测试了未修饰双链寡核苷酸和多个添加物。在实施例 3 中报道了一式三份的运行的测定结果。基于三次重复的平均,所报道的 C_T 差异 (ΔC_T) 为选择性的提高。未修饰的双链寡核苷酸 22merA, 尽管 T_m 稍微高于测定的引物退火温度,但通过小于两个 C_T 单位在多达 300nM 的浓度下也提高了 Taq DNA 聚合酶其自身的基本选择性。我们测试了具有相同长度(22 个核苷酸)和具有两个、三个、或四个 Dabcyl 修饰物的不同构型的许多添加物。如在实施例 3 中所报道,两个、三个、或四个 Dabcyl 修饰物的大多数构型显著提高聚合酶的选择性,从而减低了其 II 型引导错误的倾向。如在实施例 3 中进一步报道,我们还测试了用于添加物和荧光素(FAM)而不在添加物中用作修饰基团的三个其它修饰物。在至少一些双链寡核苷酸中,相比于添加物 22merA 和相比于 22 个核苷酸长的具有四个 FAM 修饰物的寡核苷酸,修饰物地高辛配基、香豆素和淬灭剂 QSY21 中的每一个均显著提高选择性。

[0143] 如实施例 17 中所报道,我们相似地用不同量的 3 个添加物测试了扩增,所述添加物具有 22 个碱基对的双链区域和 6 个核苷酸长的单链突出端。添加物的序列在实施例 16 中给出。添加物包含两个形成发夹的链,如图 18C 中所示。具有两个和三个 Dabcyl 基作为修饰物的此类添加物示出大于 3 个 C_T 单位的选择性 (ΔC_T) 的适当提高。选择性的最大增益是用具有 4 个 Dabcyl 基作为修饰物的添加物来实现的,即大于 6 个 C_T 单位。

[0144] 添加物还可在常规的对称 PCR 扩增中抑制 II 型引导错误和提高聚合酶选择性。实施例 11 报道用于两个靶序列的对称 PCR 测定,一个完全互补于两个引物,一个完全互补于一个引物但含有相对另一引物 3' 端核苷酸的错配。该测定既在反应混合物中无添加物时进行,也在反应混合物中具有两个添加物的组合时进行。该组合(命名为 EP043)包括组合浓度为 300nM 的具有 Dabcyl 修饰物的两个双链寡核苷酸。在实施例 11 的测定中,Platinum

Taq DNA 聚合酶、热启动 DNA 聚合酶和高度辨别等位基因-特异性引物对的组合相对于错配靶标优选以 7.84C_T 值扩增匹配靶标。该检测特异性可能等同于在两个 DNA 靶标的理论混合群体中在超过 229 个错配靶标中检测 1 个匹配靶标（即 0.43% 预期靶标）。与之相比，将添加物 EP043 加入相同的对称 PCR 测定提高了有利于匹配靶标的特异性由另外 4.75C_T 值到 12.59C_T 值，这可能等同于在超过 6,615 个错配靶标中检测 1 个匹配靶标（即 0.02%），对应于在检测特异性中提高 26.7 倍。

[0145] 在实施例 5 中报道的实验中，我们通过不用添加物、用低 T_m 添加物（EP020（T_m 51℃））和用高 T_m 添加物（EP013（T_m 62℃））进行了一系列 LATE-PCR 扩增。该实验包括在高度严格条件（高退火温度）、中等严格条件和相当不严格条件（相对于引物 T_m 的低退火温度）下使用不同引物退火温度来测试扩增反应。当严格性降低时，引导错误问题通常恶化。测定为用于两个靶序列的双重测定，每个序列均具有其自身的引物对和其自身的检测探针。

[0146] 探针为在杂交到正确扩增子后发荧光的分子信标探针。图 9A-9F 中报道了在首先的 50 个循环上的探针荧光的动力学曲线。

[0147] 图 9A 示出，在该扩增反应中，Platinum Taq DNA 聚合酶（一种热启动聚合酶）未能抑制 I 型和 II 型引导错误，即便是在严格条件下：对于所有循环 65℃ 退火温度。相比之下，两个添加物在所用浓度下能够抑制（图 9B 和 9D）。在首次 20 个循环（退火温度 60.7℃）期间低严格性情况下，在退火温度下不为双链的低 T_m 添加物 EP020 在扩增期间（图 9C）未抑制 II 型引导错误，但较高 T_m 添加物 EP013 能抑制（图 9F）。这表明，为抑制在特定温度发生的引导错误类型，添加物应在该温度下为双链。对图 9D-9F 的比较表明，用添加物 EP013，对首次 20 个循环使用严格退火条件（66.5℃）实现了最少的重复间发散，并且在最不严格条件（60.7℃）下比在中等严格性（64.2℃）下的发散更少。后一种结果的解释在于，事实上，双链的浓度（添加物的作用浓度）在较低退火温度下较高，说明了添加物浓度和引物退火温度间的相互关系。从图 9D-9F 中可知，用添加物 EP013，一个靶序列在反应中扩增显著不如另一产物序列有效。我们发现，通过将用于效率较低的扩增的限制性引物浓度从 50nM 增加到 100nM，可大大减小差异。

[0148] III 型引导错误的抑制

[0149] 添加物可抑制 III 型引导错误。实施例 13 报道一种实验，其中 LATE-PCR 反应进行到 65 个循环，足以发生 III 型引导错误并且产生由另一扩增子链引导一个扩增子链而形成的长双链产物。我们测试了：不用添加物的扩增；用 T_m 十分接近于 58℃ 引物退火温度（添加物 EP047，T_m 59.1℃）的添加物的扩增；和用添加物混合物的扩增，在混合物中，将少量（仅约十分之一）的添加物 EP047 替换为在高于退火温度的温度下为双链的添加物。在该实施例中，我们使用了较高 T_m 的添加物，其 T_m（67.4℃）基本上高于退火温度。不用添加物的三次重复扩增的解链曲线表明，在 65 个扩增循环之后，所检测产物的 T_m 高于预期产物，说明发生了产物进化。动力学曲线表明在稳定期中 SYBR 信号发生增加，也说明发生了产物进化。当限制性引物的 5' 端通过加入一对 A- 核苷酸来修饰时，结果仍然相同：解链曲线示出与所需扩增子相比产物具有更高的 T_m。包括 600nM 浓度的 EP047 及未修饰限制性引物有少许帮助：其将产物进化延迟了若干循环，并且在三次重复的两次中的某些所检测产物具有正确 T_m。包括 600nM 的 EP047 和使用修饰的限制性引物显著减少了产物进化并且在 3

次重复中的一次中完全阻止了产物进化。当使用未修饰限制性引物时,包括 600nM 总浓度的添加物混合物 EP043 显著降低了产物进化并且在 3 次重复中的一次中完全阻止了产物进化。包括 600nM 的 EP043 和使用修饰的限制性引物显著减少了产物进化并且在 3 次重复中的两次中完全阻止了产物进化。因此,经设计具有高于引物退火温度的 T_m 的低浓度添加物可抑制 III 型引导错误。另外,效果可被增强,如果使扩增子链的 3' 端富含 AT- 核苷酸,这可(必要时)通过修饰限制性引物的 5' 端来实现。

[0150] 实施例 15 包括针对示出严重 III 型引导错误的 RNA 靶序列的无添加物对照扩增测定。还表明,包括添加物(双链寡核苷酸及双链寡核苷酸的四链混合物)可抑制对照中所见的 III 型引导错误。实施例 15 显示添加物、反应混合物和方法未抑制用于将 RNA 靶标转变成 cDNA 靶标的逆转录酶。

[0151] 多重反应

[0152] 添加物可以使多种引物对与多种靶序列高度多重反应。实施例 8 报道 12 重反应,即在单一反应混合物中使用 12 个引物对 12 个靶序列的重复扩增。该扩增反应为 65 个循环的 LATE-PCR 扩增。所述靶序列被包括作为人类线粒体基因组 DNA,其以 1000 个、100 个和 10 个启动拷贝数包括在反应混合物内。除了不用添加物的对照扩增以外,在反应混合物中还包括浓度为 300nM 和 600nM 的添加物 EP011。在扩增之后,反应混合物经电泳分离以确定是否制备了 12 个预期产物。另外,进行双脱氧法测序以评价扩增子。电泳凝胶图像(图 12)示出,以 1000 个拷贝起始但不用添加物的扩增不能产生 12 个产物的预期组,但用 1000 个拷贝加上浓度为 300nM 和 600nM 的添加物 EP011 起始的扩增产生了 12 个产物。凝胶显示,在该反应中 300nM 浓度的 EP011 不能完全抑制引导错误,如通过轻量级产物带所证实。当添加物 EP011 以 600nM 浓度包括于反应混合物中时,引导错误产物未见于该凝胶中。作为对此终产物的进一步分析,对其测序。测序结果表明,已产生了足够量的 12 个扩增子中的每一个以允许通过简化的 Dilute' N' Go 方案进行双脱氧法测序。当靶标的起始数目减少到 100 个和 10 个拷贝时,发现情况并非如此。1000 个拷贝的线粒体 DNA 的结果表明,在扩增前和在扩增期间,引导错误均被成功抑制。

[0153] 添加物混合物

[0154] 添加物的混合物(添加物混合物 EP043)在上文结合实施例 13 作了讨论。使用混合物的原因可(例如)通过参考实施例 1 来理解。结果表明,I 型引导错误的抑制通常需要适当高浓度的添加物。然而,图 5 中的动力学曲线表明,随着 T_m 显著高于引物退火温度的添加物的浓度提高时,聚合反应的效率倾向于降低。实施例 13 也表明,可能需要高 T_m 添加物来抑制 III 型引导错误。添加物的混合物可被设计成抑制两种类型的引导错误,而使扩增效率的减低减小化。在一个实施方案中,使用了包括 T_m 接近退火温度的较高浓度(300nM 到 1000nM)的添加物和在高于退火温度的温度时为双链的较低浓度(25nM 到 300nM)的添加物的混合物,具体而言, T_m 高于退火温度若干度的添加物(或较高退火温度,如果在反应中使用了两种添加物)可用于抑制两种类型的引导错误。添加物的混合物可以包含 4 个不同链,即未共有共同链的 2 个双链添加物。可选地,添加物的混合物可以包含 3 个链,即共有共同链的 2 个双链添加物。后一种方法减少了扩增混合物中所包括的不同链的数目。

[0155] 我们在实施例 3 所述的聚合酶选择性测定中测试了添加物的混合物(未修饰的双链寡核苷酸的混合物和添加物的混合物)。实验结果实施例 4 中有所报道。所测试混合物均

为 3 链混合物,其中两个添加物共有共同链。混合物均包括:高 T_m 添加物,其 T_m 为 67.4℃,高于引物退火温度(在本实验中为 62℃)若干度;和低 T_m 添加物,其 T_m 在 57.4–59.1℃ 的范围内,即稍微低于退火温度。两种混合物,添加物 041 和添加物 042,含有未修饰的双链寡核苷酸。当针对较高 T_m 杂交物以 75nM 浓度加入和针对较低 T_m 杂交物以 325nM 加入时,具有未修饰的寡核苷酸的两种混合物均仅相对轻微地提高聚合酶的选择性(小于两个扩增循环)。我们还测试了添加物的 4 种混合物。在两个添加物(EP041, EP042)中,两个双链寡核苷酸均含有 3 个 Dabcyl 修饰物,在一个添加物(EP043)中,较高 T_m 的寡核苷酸含有 3 个 Dabcyl,而较低 T_m 的寡核苷酸含有 4 个 Dabcyl;并且在一个添加物(EP045)中,两个寡核苷酸均含有 4 个 Dabcyl。所有 4 个混合物均比添加物 041 和 042 提高更多选择性。图 7A–7D 和图 8A–8D 分别为在 600nM 的相同总浓度下但较高 T_m 杂交物量从 25nM 到 100nM 变化的情况下混合物 EP043 和 EP045 的动力学曲线。这些曲线显示添加物和重复间发散所引起的抑制作用。 ΔC_T 结果和动力学曲线一起表明,对于每个混合物而言,可能存在混合物中的较高 T_m 杂交物的最佳量。对于混合物 EP043, (a) 即便最低浓度(25nM)的高 T_m 组分也提高聚合酶选择性, (b) 通过增加高达 100nM 的高 T_m 组分的比例并未更多地提高聚合酶选择性,和 (c) 制剂中的任何一种均未显著抑制引物到其匹配靶标的扩增效率。对于混合物 EP045 来说, (a) 即便最低浓度(25nM)的高 T_m 组分也比 EP043 在更大程度上提高聚合酶选择性, (b) 聚合酶选择性提高高 T_m 组分浓度的比例, (c) 所有剂型均不显著地抑制其匹配靶标的引物的扩增效率,并且 (d) 抑制程度随高 T_m 组分比例而增加。我们判断混合物 EP043 的最佳剂型为 75/600/525nM,并且我们判断混合物 EP045 的最佳剂型为 50/600/550nM,当这些剂型具有重复间的低发散。

[0156] 在实施例 19 中,我们还在测定中测试了添加物混合物 EP043,其中通过使用阻断物寡核苷酸产生了 3' 端错配。该测定的方案一般性示于图 21A 和图 21B 中。图 21A、21B 示出了两个双链靶 231、232,它们在限制性引物的结合位点(箭头 233)近下游存在一个碱基对的差异(过剩引物链中的 G 或 A)。过剩引物的结合位点(箭头 234)也在两个靶标间被转变。寡核苷酸阻断物 235 为互补于,并且结合到靶标 231(图 21A),其为待选择的“错配”靶标。阻断物 235 为等位基因辨别的,并且错配于靶 232(图 21B)并且未结合至该靶 232。因此,引物 233 完全结合至靶 232 并且被延伸,但引物 233 的 3' 端不能结合到靶标 231,从而防止延伸。在图 21A 中,虚线 242 为由引物 233 延伸产生的限制性引物链。在图 21B 中,虚线 243 为通过延伸引物 233 产生的限制性引物链。阻断物 235 与末端荧光团 236 和末端淬灭剂 237 一同示出,但所有所需的是阻断物 235 具有阻断的 3' 端核苷酸,以便在扩增期间不可通过 DNA 聚合酶延伸。在图 21A、21B 中所示的具体实施方案中,靶标 231、232 经示出区别为来自阻断物 235 下游和来自过剩引物 234 下游的另一碱基对(图 21A 中的过剩引物链 241 中的 G 或图 21B 中过剩引物链 244 中的 C)。荧光团 239 和淬灭剂 240 标记的序列特异性探针 238 结合到靶标 231(“错配”靶标)的扩增产物,但未结合到靶标 232 的扩增产物,并在杂交后产生信号。探针 238 在不用于提高聚合酶选择性的意义上为任选的。例如,其可用于扩增产物的解链分析。实施例 19 表明,就诱导的 II 型引导错误而言,当添加物降低扩增效率时,以热循环依赖方式延迟了扩增,并且当由于存在添加物所致选择性增强的量度也为热循环依赖性时,选择性的明显增强需要针对效率的热循环依赖性降低来矫正。实施例 19 中示出了一种方法,用于在存在阻断物的情况下并且存在 / 不存在添加物的

情况下使用一系列靶标稀释反应进行矫正。

[0157] 我们在上述实施例 8 的 12 重反应中使用了添加物混合物 EP043, 以观察是否能产生足量的所有 12 个产物用于测序。对于这些实验, 我们通过加入富含 AT 的尾部修饰了限制性引物, 并且我们将扩增反应从 65 个循环扩展到 80-90 个循环。通过这些修饰, 当包括链浓度为 50/600/550nM 的添加物混合物 EP043 并且基因组线粒体 DNA 的起始量为仅 100 个拷贝或 10 个拷贝时, 以测序所需量成功制备了所有 12 个预期产物。这些结果表明, 在扩增之前和扩增期间成功阻止了引导错误, 尽管实际上扩增的延伸长度对 III 型引导错误的抑制构成严格测试。

[0158] 在实施例 12 中, 我们在限制性引物的 3' 端上有所不同的 LATE-PCR 扩增反应中, 测试了总浓度为 600nM 的混合物 EP043。一个反应包括具有富含 GC 的 3' 端 (GGC) 的限制性引物。其它反应包括具有富含 AT 的 3' 端 (AAG) 的限制性引物。相比无添加物的对照, 在扩增中包括添加物 EP013 (3 个 Dabcyl 修饰物, T_m 60°C) 及富含 GC 3' 端的引物导致聚合化 (4 个循环的 C_T 延迟) 效率相对很小的降低。然而, 相比无添加物的对照, 包括相同浓度的相同添加物及具有富含 AT 3' 端的引物导致效率显著更大的降低 (11 个循环的 C_T 延迟)。在继续进行 70 个循环的两个反应中, 相比无添加物对照, 添加物 EP013 显著降低 4 个重复中的发散。

[0159] 冷终止方案和所有类型的引导错误

[0160] 通过在用于实时检测的 PCR 循环中包括低温检测步骤, 增加了 II 型引导错误的可能性。通过延长 LATE-PCR 扩增以生成单链产物增加了 III 型引导错误。我们已测试了我们称为“冷终止”的方案, 其中, 作为对实时、低温检测的替换, 在一个或若干个中间点中断扩增反应以便进行可以包括低温步骤的操作。实施例 10 示出“冷终止”方案, 其中操作为解链分析。实施例 10 中的扩增为使用荧光检测的杂交探针进行的 70 个循环的 2 步 LATE-PCR 扩增。以 600nM 浓度测试添加物 EP010。为了比较, 用实时检测进行了扩增。对于实时检测, 在扩增循环的每个退火 / 延伸步骤后加入低温检测步骤 (60°C)。作为热循环函数的探针荧光示于图 14A 中, 该图示出用 1000 个、100 个和 10 个靶序列拷贝起始的扩增的重复间的适度发散。图 14A 也示出循环 70 附近开始会聚的初始靶的三个量的曲线。包括实时、低温检测增加了 II 型引导错误的机会。我们重复用无实时低温检测但具有 40 个循环后的中断的所有三个起始拷贝数的扩增以在 45°C 下进行解链起始。然后, 我们重新起始扩增以在 70 个循环后结束, 此时进行第二次解链。第一次解链的解链曲线示于图 14B 中。三个不同起始量的靶的重复有明显区别并且示出很小发散。第二次解链的解链曲线示于图 14C 中。在循环 70 附近, 初始靶量的三个水平的曲线已会聚, 并且检测到很小的发散。

[0161] 为解释图 14B 和图 14C 中所示结果, 描述以下内容。如果引导错误由于低温中断而发生, 则单链 DNA 将转变为双链 DNA, 并且单链产物的量将在循环 40 和循环 70 之间下降。此状况并未发生。如果引导错误在 40 个循环后的中断期间发生, 重复间的发散将在循环 40 和循环 70 之间增加。此状况并未发生。如果引导错误在中断期间发生, 由不同量的初始靶标产生的单链产物量在 70 个循环之后将不能达到平衡。此状况并未发生。图 14A、图 14B 和图 14C 的比较表明, 添加物 EP046 在此“冷终止”扩增中完全抑制所有类型的引导错误。具有单个中断的“冷终止”方案消除在循环 40 前和在循环 41 后的任何低温步骤。这降低了在除循环 41 之外的所有循环期间 II 型和 III 型引导错误的机会。该第一解链包括在低

于引物退火温度的温度下的较长时间（在该实施例中，约 15 分钟），从而增加了在解链（其可能包括错误引导的 3' 端的一个延伸）期间引导错误的可能性，作为交换在其它循环中消除低温步骤。该折衷选择可以帮助减少重复间发散。应了解，“冷终止”方案可用于筛选针对其对引导错误的效果来添加物组合物和浓度。

[0162] DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶活性的抑制作用

[0163] 添加物可有效抑制具有 5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶（例如 Taq DNA 聚合酶和 Tfi (+) DNA 聚合酶）的该活性。（此效果不适用于不具有该活性的 DNA 聚合酶，例如 Klenow 片段，其不具有 5' 核酸外切酶域，和 Tfi (-) DNA 聚合酶，其包含修饰的而使其失活的 5' 核酸外切酶域）。我们发展了实施例 6 中所报道的测定，作为不依赖引物的方式用于测量添加物对 DNA 聚合酶的 5' 核酸外切酶活性的抑制效果。在该测定中，荧光团和淬灭剂双标记的不可延伸探针被杂交到不具有反应混合物中所包括的引物的靶标。然后，反应混合物经受热振荡，其中温度在 45°C 与 60°C 之间循环 45 次，在此期间，实时检测探针荧光。探针裂解导致指示聚合酶的 5' 核酸外切酶活性的荧光增加。若干添加物以 300nM 的浓度在此测定中进行了测试，并且与包括探针但没有靶标的对照测定进行了对比。在对照测定中，无杂交物形成，并且探针未裂解。在包含探针和靶而无添加物的测定中，荧光发生较大增长。在包含探针、靶和添加物的测定中，相比于具有靶标而无添加物的测定，荧光增长明显减少，表明显著抑制了 5' 核酸酶活性。分别具有 3 个和 4 个共价连接的 Dabcyl 基的添加物 EP004 和 EP001，完全抑制了对探针的不依赖引物的 5' 核酸外切酶裂解。添加物 EP008（在其各 5' 核苷酸上具有共价连接的 Dabcyl 基）也完全抑制此测定中的引物独不依赖 5' 核酸外切酶活性。相比之下，添加物 EP009（在其每个 3' 核苷酸上具有共价连接的 Dabcyl 基）仅部分抑制此测定中的不依赖引物的 5' 核酸外切酶活性。结果表明双链寡核苷酸上的 Dabcyl 修饰物基团可增强以位置依赖性方式抑制 5' 核酸外切酶活性。优选在添加物的两个 5' 端上的 Dabcyl 基，与两个 Dabcyl 基相比，优选的是三个和四个 Dabcyl 基。加成实验显示针对 Tfi (+) DNA 聚合酶的一致结果。

[0164] 如实施例 18 中报道，我们以不同量的三个添加物进行实施例 6 的温度 - 振荡测定，所述添加物具有 22 个碱基对的单链区域和 6 个核苷酸长的单链突出端。添加物的序列在实施例 16 中给出。添加物包含两个形成发夹的链，如图 18C 中所示。此类添加物包括两个、三个、或四个 Dabcyl 基作为修饰物。如图 20 所示，具有两个 Dabcyl 修饰物的添加物以浓度依赖性方式抑制了 Taq DNA 聚合酶的不依赖引物的 5' 核酸外切酶活性，200nM 和 400nM 的浓度较大地抑制活性并且 600nM 的浓度几乎完全抑制活性。具有三个和四个修饰物的所测试添加物还以浓度依赖性方式抑制了聚合酶的不依赖引物的 5' 核酸外切酶活性，但程度不及图 20 中所示的结果。

[0165] 为量度在 PCR 扩增期间对 5' 核酸酶活性的抑制作用，我们使由实施例 5 中所述 LATE-PCR 扩增产生的探针和扩增子经受杂交条件，然后解链分析。探针的反应混合物单独地也经受解链分析。实施例 7 中报道了该实验，并且解链曲线示于图 11A 和图 11B 中。在图 11A 中比较单独来自探针和来自无添加物的扩增的荧光表明某些探针分子被裂解：解链完成后来自扩增反应的荧光没有下跌到探针荧光的水平。图 11B 表明当包括 600nM 浓度的添加物 EP013 的扩增反应混合物时，由于聚合酶（在这种情况下为 Taq DNA 聚合酶）的 5' 核酸酶活性导致的探针裂解被抑制：解链完成后来自扩增反应的荧光下跌到探针荧光的水

平。

[0166] 作为 PCR 引物的添加物

[0167] 实施例 14 示出 PCR 引物形式的添加物。为将用于 LATE-PCR 扩增的典型过剩引物转变成抑制 I 型引导错误的添加物,进行了两个操作:首先,修饰基团(在这种情况下为 Dabcyl 基)被添加到引物 5' 端;其次,部分互补于过剩引物且具有 5' 端 Dabcyl 基和 3' 端 Dabcyl 基的反向互补链以 100、200 或 300nM 的浓度被包括于反应混合物。通过将若干错配引入反向互补链(可选地,可降低反向互补链的长度),相对于由过剩引物和靶序列形成的杂交物的 T_m ,过剩引物和反向互补链形成的杂交物的 T_m 降低。由过剩引物和反向互补链形成的杂交物包括三个修饰基团。双链扩增产物的解链分析表明,在反应混合物中包括 200nM 或 300nM 浓度的反向互补序列产生具有极少到没有其它产物的期望的扩增子,并且解链曲线显示极少的重复间发散。相比之下,反应混合物中无反向互补序列的扩增产生预期扩增子和较低 T_m 产物的混合物,并且解链曲线显示出重复间发散。

[0168] 上述实施例试图示例添加物、反应混合物和方法的某些优选实施方案并且不应被解释为穷举性的或限制性的。许多变化是可能的并且将对所属领域的技术人员显而易见。例如,可使用除 PCR 以外的扩增方法,并且添加物可以为除双链 DNA 分子之外的分子的修饰版本。其它变化将对所属领域的技术人员显而易见。

实施例

[0169] 实施例 1. I 型引导错误的抑制

[0170] 使用单个引物对和单个靶标进行 LATE-PCR 测定以生成双链和单链扩增子。通过在扩增末端的解链分析来表征双链产物。除双链寡核苷酸之外的反应成分,以及反应条件如下。

[0171] 限制性引物 5' CCTGGATTATGCCTGGCACCAT (SEQ ID No. 1)

[0172] 过剩引物 5' CCTTGATGACGCTTCTGTATCTA (SEQ ID No. 2)

[0173] 靶标

[0174] 5' CCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGT

[0175] GTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAG

[0176] (SEQ ID No. 3)

[0177] 在由以下组成的 25 μ l 体积中进行 LATE-PCR 扩增:1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.25 单位的 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及人类基因组 DNA 的大约 1000 个基因组 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。使用浓度为 50、100、300、600、和 1000nM 的添加物,对每个添加物进行一式三份的扩增反应,以及无添加物反应。

[0178] 这些反应的热曲线条件如下:95 $^{\circ}C$ /10s-55 $^{\circ}C$ /30s-70 $^{\circ}C$ /30s, 10 个循环,然后 95 $^{\circ}C$ /10s-50 $^{\circ}C$ /30s-70 $^{\circ}C$ /30s, 40 个循环,然后,在 55 $^{\circ}C$ 开始解链,间隔 30 秒递增 1 $^{\circ}C$ 直到 97 $^{\circ}C$ 。

[0179] 使用双链 DNA 产物的 SYBR Green 荧光 ($-dF/dT$, SYBR) 的第一衍生物,通过解链曲线分析在 50 个循环结束时分析反应。另外,针对某些反应,分析产生双链产物的动力学

(作为热循环的函数的 SYBR 强度读数)。

[0180] A. 16mer

[0181] 16 个核苷酸长的以下添加物中的每一个均包括在起始反应混合物中(末端阻断物 C₃ 为 3 碳连接链):

[0182] 16merA. 5' CACGACCTCGCCGACC (C3)

[0183] (C3)GTGCTGGAGCGGCTGG 5' (SEQ ID No. 4)

[0184] 16merB. 5' CACGACCTCGCTGACC (C3)

[0185] (C3)GTGCTGGAGCGACTGG 5' (SEQ ID No. 5)

[0186] EP048:在顶链的 3' 端具有一个 Dabcyl 的 16merB (SEQ. ID No. 6)

[0187] EP049:在底链的 3' 端具有一个 Dabcyl 的 16merB (SEQ ID No. 7)

[0188] EP027:具有两个 Dabcyl (一个在每个链的 3' 端) 的 16merB (SEQ ID No. 8)

[0189] 无添加物下,扩增产生除“正确”产物以外的产物,即,除了引物定义的双链产物(扩增子)以外的产物。包含 300nM 浓度的添加物 16merA 的三次重复扩增反应的解链曲线示于图 1 中,指向下方的箭头标识了预期产物。圆圈 11 为三次重复的曲线。判断该扩增十分良好,因为(1)制备了正确产物而普遍排除不正确产物,并且(2)三次重复十分一致(重叠曲线)。较高浓度的 16merA 获得了相同结果。在较低浓度(50nM, 100nM)下,发现了大量不正确产物,并且三次重复不一致。

[0190] 300nM 浓度的添加物 16merB 的解链曲线示于图 2 中。圆圈 21 为三次重复的曲线。判断该扩增十分不可接受,因为发现大量不正确产物,并且三次重复不一致。在任何所用浓度下,均未发现扩增生成正确产物而普遍排除不正确产物,并且在任何浓度下重复均未高度一致。所述不正确产物显著不同于无添加物情况下获得的不正确产物,指示添加物 16merB 导致引导错误。

[0191] 600nM 浓度的添加物 EP049 的解链曲线示于图 3 中,通过指向下方的箭头标识预期产物。圆圈 31 为三次重复的曲线。判断该扩增十分良好,因为(1)制备了正确产物而普遍排除不正确产物,并且(2)三次重复十分一致(重叠曲线)。用较高浓度获得了相同结果,但较低浓度在重复间不一致并且提供了不正确产物。添加物 EP048 示出 100nM 和 600nM 浓度的更一致产物,指示出两个链均能够引导错误。

[0192] 100nM 浓度的添加物 EP027 的解链曲线示于图 4 中,通过指向下方的箭头标识预期产物。圆圈 41 为三次重复的曲线。判断该扩增为良好而非十分良好,因为(1)制备了正确产物而普遍排除不正确产物,并且(2)三次重复相当地一致,曲线间振荡较小。在该添加物的较高浓度下,判断结果为十分良好,因为三次重复十分一致。然而,在 50nM 下,制备了大量的不正确产物,并且重复并不一致。

[0193] EP027 的扩增动力学分析示于图 5 中。圆圈 51 为 100nM 浓度的三次重复;圆圈 52 为 300nM 浓度的三次重复;圆圈 53 为 600nM 浓度的三次重复;并且圆圈 54 为 1000nM 浓度的三次重复。在 100nM 浓度下,稳定区域中的三次重复间存在发散。包含 300nM 的三次反应具有完全重叠的动力学并且比包含 600 或 1000nM 的反应具有更高的效率。因此,300nM 的 EP027 在此测定中为最佳量。

[0194] B. 其它添加物

[0195] 由未添加修饰物的长度为 12 个、18 个、20 个、22 个和 24 个核苷酸的双链寡核苷酸

组成的若干添加物以 50nM、100nM、300nM、600nM 和 1000nM 的浓度在该实施例的测定中进行试验。如在 A 部分中讨论的 16mers, 结果是不一致的。例如, 在试验的三个不同 12mer 中, 一个在所有浓度下未能产生正确产物, 一个仅在 1000nM 浓度下产生正确产物, 并且一个在 600nM 和更高浓度下产生正确产物。在试验的八个较长寡核苷酸中, 甚至在 600 和 1000nM 的最高浓度下, 一半产生了大量的不正确产物。在 300nM 浓度下, 仅三个产生了正确产物而普遍排除不正确产物, 并且没有一个在更低浓度下做到如此。我们判断添加物 22merA 在此测定中为最佳 (末端阻断物 p 为磷酸酯):

[0196] 22merA. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0197] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5' (SEQ ID No. 9)

[0198] 还测试了由包括两个或四个末端修饰物并且长度为 8 个、11 个和 22 个核苷酸的双链寡核苷酸组成的若干添加物。修饰物为 Dabcy1 或地高辛配基 (DIG):

[0199] 添加物 EP010. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTG Dabcy1

[0200] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0201] (SEQ ID No. 10)

[0202] 添加物 EP018. 5' GGTCAGATGAAAATGATACGTG Dabcy1

[0203] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC 5'

[0204] (SEQ ID No. 11)

[0205] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAAATAAAAATAAAAATADabcy1

[0206] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'

[0207] (SEQ ID No. 12)

[0208] 添加物 EP021. 5' Dabcy1 CAGCCGGC Dabcy1

[0209] Dabcy1 GTCGGCCG Dabcy1 5' (SEQ ID No. 13)

[0210] 添加物 EP022. 5' Dabcy1 CCGCCGGC Dabcy1

[0211] Dabcy1 GGCGGCCG Dabcy1 5' (SEQ ID No. 14)

[0212] 添加物 EP023. 5' Dabcy1 GCGTACG CAGG Dabcy1

[0213] Dabcy1 CGCATGCGTCC Dabcy1 5' (SEQ ID No. 15)

[0214] 添加物 EP024. 5' Dabcy1 GCGTACGAAGG Dabcy1

[0215] Dabcy1 CGCATGCTTCC Dabcy1 5' (SEQ ID No. 16)

[0216] 添加物 EP026. 5' DIG GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA DIG

[0217] DIG CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT DIG 5'

[0218] (SEQ ID No. 17)

[0219] 添加物 EP028. 5' Dabcy1 TGAGAGATGAAAATGATCGAGT Dabcy1

[0220] Dabcy1 ACTCTCTACTTTTACTAGCTCA Dabcy1 5'

[0221] (SEQ ID No. 18)

[0222] 添加物 EP029. 5' GGTCAGATGAAAATGATACGTG DIG

[0223] DIG CCAGTCTACTTTTACTATGCAC 5'

[0224] (SEQ ID No. 19)

[0225] 所有这组添加物在等于或小于 600nM 的浓度下产生了正确产物而普遍排除了其它产物。除了一个 (EP021) 以外, 所有均在 300nM 或更小浓度下做到如此。添加物 EP028

在 100nM 浓度下做到如此,并且添加物 EP010 在 50nM 浓度下做到如此。

[0226] 实施例 2. I 型引导错误的抑制

[0227] 在针对具有不同引物的不同靶标的测定使用未修饰的双链寡核苷酸 22merA (判断为实施例 1 中的最佳未修饰添加物) 以及若干 Dabcy1- 修饰的寡核苷酸。在扩增起始之前以 100 和 300nM 的浓度将各添加物分别加入 LATE-PCR 扩增反应混合物。使用双链 DNA 产物的 SYBR Green 荧光 (-dF/dT, Sybr) 的第一衍生物,通过解链曲线分析在 50 个循环结束时分析反应。另外,针对某些反应分析产生双链产物的动力学 (Sybr 强度读数作为热循环的函数)。除双链寡核苷酸之外的反应成分以及反应条件如下。

[0228] 限制性引物 5' AAATTGCGTCATTGTTTCACAGGGCCA (SEQ ID No. 20)

[0229] 过剩引物 5' AATCTGGGTGGTGGTCATAC (SEQ ID No. 21)

[0230] 靶标

[0231] 5' AATCTGGGTGGTGGTCATACAGGTCATCACTGTAAAATTCTTTGA

[0232] ACTTTTCTGTATATATCTTTGAAAATTTTGAAAAAAAATGTTGG

[0233] AAAACTTAAAAGGCTGTTGCTTTGCTCATATTGGCGGTACATAT

[0234] ACAAAAGTGAAAGGATGAGATTGATTGGCATGGCCCTGTGAA

[0235] ACAATGACGCAATTT (SEQ ID No. 22)

[0236] 在由以下组成的 25 μ l 体积中进行 LATE-PCR 扩增:1X InvitrogenPCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM MgCl₂、250nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及人类基因组 DNA 的大约 1000 个基因组 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。这些反应的热曲线条件如下:25℃ 下 30 分钟,然后 95℃ /10s-62℃ /20s-70℃ /20s,50 个循环,然后以 55℃ /30s 开始解链并且 42 个循环的 1℃ 递增。(缩写“s”,如 20s,表示“秒”。)使用双链 DNA 产物的 SYBR Green 荧光 (解链曲线分析) 的第一衍生物在 50 个循环结束时分析所有反应。

[0237] 测试了以下添加物:

[0238] 添加物 22merA. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0239] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT5'

[0240] (SEQ ID No. 9)

[0241] 添加物 EP001. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0242] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0243] (SEQ ID NO. 23)

[0244] 添加物 EP002. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0245] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0246] (SEQ ID No. 24)

[0247] 添加物 EP003. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0248] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0249] (SEQ ID No. 25)

[0250] 添加物 EP004. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0251] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0252] (SEQ ID No. 26)

- [0253] 添加物 EP005. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1
[0254] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5'
[0255] (SEQ ID No. 27)
[0256] 添加物 EP006. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp
[0257] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5'
[0258] (SEQ ID No. 28)
[0259] 添加物 EP007. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1
[0260] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'
[0261] (SEQ ID No. 29)
[0262] 添加物 EP008. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp
[0263] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'
[0264] (SEQ ID No. 30)
[0265] 添加物 EP009. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1
[0266] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5'
[0267] (SEQ ID No. 31)
[0268] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAATAAAAATAAAATA Dabcy1
[0269] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'
[0270] (SEQ ID No. 12)
[0271] 添加物 EP052. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1
[0272] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT5'
[0273] (SEQ ID No. 32)
[0274] 添加物 EP053. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp
[0275] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'
[0276] (SEQ ID No. 33)

[0277] 判断 300nM 浓度的双链寡核苷酸 22merA 为十分良好, 因为 (1) 产生了正确产物而普遍排除不正确产物, 和 (2) 三次重复十分一致 (重叠曲线)。然而, 100nM 浓度 22merA 却并非如此, 因为其中一个重复并未普遍排除不正确产物。同样, 判断所有含 Dabcy1 添加物在 300nM 下十分良好。还判断它们中的五个 (EP001、EP002、EP003、EP004 和 EP005) 在 100nM 浓度下为十分良好。图 6 示出用添加物 EP003 和用添加物 22merA 在 100nM 浓度下的三个重复反应的解链曲线。圆圈 61 为添加物 22merA 的三次重复。圆圈 62 为添加物 EP003 的三次重复。

[0278] 实施例 3. II 型引导错误和聚合酶选择性

[0279] 我们进行了 LATE-PCR 测定, 其中我们扩增了互补于两个引物 (匹配靶标) 的靶标, 并且其中我们分别扩增了互补于过剩引物但含有对限制性引物的 3' 端核苷酸的单一错配的靶标。我们实时检测了双链产物, 即, 在每个 PCR 循环的引物退火部分期间, 通过 DNA 染料 (在这种情况下为 SYBR Green)。在存在任何浓度添加物的情况下对 3' 端错配的选择性为在来自错配靶标扩增的信号阈值循环 (C_T) 与来自匹配靶标扩增的信号 C_T 之间的差值 (ΔC_T)。一式三份地进行扩增反应。 C_T 差值使用三次重复的平均值来计算。用于提高 DNA 聚合酶的选择性的添加物的效果为具有添加物的 C_T 差值减去无任何添加物的 C_T 差值。

在这个和随后实施例中的标题“选择性”下,我们以 C_T 单位 (即,作为 ΔC_T) 报道了由添加物的使用产生的 C_T 差值的提高。

[0280] 引物和单链靶的序列如下:

[0281] 限制性引物 5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAGT

[0282] (SEQ ID NO. 34)

[0283] 过剩引物 5' GCCCAAGTTTATCGTTCTTCTCA (SEQ ID NO. 35)

[0284] 匹配靶标 (A).

[0285] 5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAG **A** AGGTTCTAA

[0286] GTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAAGTATGC

[0287] TGAGAA GAACGATAAACTTGGG (SEQ ID No. 36)

[0288] 错配靶标 (T).

[0289] 5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAG **T** AGGTTCTA

[0290] AGTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAAGTATGCTG

[0291] AGAAGAACGATAAACTTGGGCAA (SEQ ID No. 37)

[0292] 划线和加粗的核苷酸为其过剩引物链中的互补物将匹配或错配限制性引物的 3' 端核苷酸的核苷酸。

[0293] 在由以下组成的 25 μ l 体积中一式三份地 (三次重复测定) 进行 LATE-PCR 扩增: 1X Invitrogen PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.25 单位 Platinum Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及大约 1000 个单链靶 A (匹配的) 或 T (错配的)。这些反应的热曲线条件为: 95°C 3 分钟, 然后 95°C / 5s - 62°C / 20s - 72°C / 30s, 60 个循环。对于包含两个靶标的这个和其它测定, 我们进行了对照扩增, 使用过剩引物 (其完全互补于两个靶标) 和对照限制性引物 (其也完全互补于两个靶标) 以确保两个靶标的起始拷贝数相同, 在此情况下, 两个靶标的 C_T 相同。(如果对照扩增显示起始拷贝数不相同, 则有两个选择: 重新配制, 或者, 如果 C_T 差值轻微 - 如在本文报道的实施例中那样的情况, 则校正所观察到的 C_T 值以针对差值来调整。)

[0294] 在报道 T_m 时, 其为无修饰物的双链添加物的计算解链温度。本说明书中所述双链添加物的 T_m 是根据以下文献计算: Markham 和 Zuker (2005) DINAMELT web server for nucleic acid melting prediction, Nucleic Acids Res 33:W577-W581, 以及 Markham 和 Zuker (2008) UNAFOLD: software for nucleic acid folding and hybridization. 在 Keith, J. M. 编, BIOINFORMATICS, 第二卷, Structure, Functions and Applications, No. 453 于 Methods in Molecular Biology, Ch. 1, 第 3-31 页 (Humana Press, Totowa, New Jersey. ISBN 978-1-60327-428-9。

[0295] A. 无添加物

[0296] 该测定在没有添加物的情况下进行。实时检测 SYBR Green 信号, 即, 在所有 PCR 循环的引物退火部分期间。作为扩增循环次数的函数的荧光强度读数表明该酶对匹配靶标具有合适的固有选择性。当在测定中测试添加物时, 也包括了无添加物对照, 并且从针对添加物的匹配和错配靶序列之间的 C_T 差值上减去针对无添加物对照的匹配和错配靶序列间的 C_T 差值以达到所呈现的选择性提高数目 (ΔC_T)。

[0297] B. 无修饰物的双链添加物

[0298] 以下 22 个核苷酸长的双链寡核苷酸（命名为“22merA”，其中各链的 3' 端用磷酸酯（p）加帽以阻止通过 DNA 聚合酶延伸）以三个不同浓度用作添加物：

[0299] 22mer A. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0300] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5' (SEQ ID NO. 9)

[0301] 选择性的结果（错配靶 C_T 减去匹配靶 C_T ）示于表 1 中。

[0302] 表 1

[0303]

添加物	长度 (NT's)	T_m , °C	浓度, nM	选择性, ΔC_T
22merA	22	63.1	100	0.1
			200	1.2
			300	1.8

[0304] C. 具有两个 Dabcy1 修饰物的双链添加物

[0305] 实施例 1 (SEQ ID No. 5) 中所述的双链寡核苷酸 16mer B 通过以下方式用两个 Dabcy1 来修饰：将 Dabcy1 放置于顶链 5' 端上和将 Dabcy1 放置于底链 3' 端上（添加物 EP050, SEQ ID No. 38）；以及将 Dabcy1 放置于顶链 3' 端上和将 Dabcy1 放置于底链 5' 端上（添加物 EP051, SEQ ID No. 39）。在上文部分 B 中描述的双链寡核苷酸 22merA (SEQ ID No. 9) 通过以下方式来修饰：将 Dabcy1 放置于顶链 5' 端上和将 Dabcy1 放置于底链 3' 端上（添加物 EP006, SEQ ID No. 28）；将 Dabcy1 放置于顶链 3' 端上和将 Dabcy1 放置于底链 5' 端上（添加物 EP007, SEQ ID No. 29）；将 Dabcy1 放置于每个链 5' 端上（添加物 EP008, SEQ ID No. 30）；将 Dabcy1 放置于每个链 3' 端上（添加物 EP009, SEQ ID No. 31）；将 Dabcy1 放置于顶链每个端上（添加物 EP052, SEQ ID No. 32）；以及将 Dabcy1 放置于底链每个端上（添加物 EP053, SEQ ID No. 33）。这些添加物的序列在下文给出，并且选择性结果示于表 2 中。

[0306] 添加物 EP050. 5' Dabcy1 CAGGACCTGGCTGACC (C3)

[0307] Dabcy1 GTGCTGGAGCGACTGG 5' (SEQ ID No. 38)

[0308] 添加物 EP051. 5' CAGGACCTGGCTGACC Dabcy1

[0309] pGTGCTGGAGCGACTGG Dabcy1 5' (SEQ ID No. 39)

[0310] 添加物 EP006. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0311] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5'

[0312] (SEQ ID No. 28)

[0313] 添加物 EP007. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0314] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0315] (SEQ ID No. 29)

[0316] 添加物 EP008. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0317] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5' (SEQ ID No. 30)

[0318] 添加物 EP009. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0319] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5' (SEQ ID No. 31)

[0320] 添加物 EP052. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0321] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5' (SEQ ID No. 32)

[0322] 添加物 EP053. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0323] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 (SEQ ID No. 33)

[0324] 表 2

[0325]

添加物	长度 (NT' s)	T _m , °C	浓度, nM	选择性, ΔC _T
EP050	16	62.8	200	1.6
			300	2.9
			400	5.5
EP051	16	62.8	200	1.1
			300	2.7
			400	1.8
EP006	22	63.1	100	3.5
			300	8.3
			600	12.0
EP007	22	63.1	100	3.5
			300	7.3
			600	11.5

[0326]

EP008	22	63.1	100	1.7
			300	5.8
			600	9.7

[0327] D. 具有三个 Dabcy1 修饰物的添加物

[0328] 在上文部分 B 中所述的双链寡核苷酸 22merA (SEQ ID No. 9) 通过以下方式修饰：将 Dabcy1 放置于顶链的每个端和底链 5' 端上（添加物 EP002, SEQ ID No. 24）；将 Dabcy1 放置于顶链 3' 端上和底链的每个端上（添加物 EP003, SEQ ID No. 25）；将 Dabcy1 放置于顶链 5' 端上和底链的每个端上（添加物 EP004, SEQ ID No. 26）；以及将 Dabcy1 放置于顶

链的每个端上和底链 3' 端上 (添加物 EP005, SEQ ID No. 27)。添加物的序列在下文给出并且结果示于表 3 中。

[0329] 添加物 EP002. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0330] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5' (SEQ ID No. 24)

[0331] 添加物 EP003. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0332] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5' (SEQ ID No. 25)

[0333] 添加物 EP004. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0334] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5' (SEQ ID No. 26)

[0335] 添加物 EP005. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0336] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5' (SEQ ID No. 27)

[0337] 表 3

[0338]

添加物	长度 (NT' s)	T _m , °C	浓度, nM	选择性, ΔC _T
EP002	22	63.1	100	4.2

[0339]

			200	7.1
			300	9.2
EP003	22	63.1	100	2.1
			200	5.6
			300	8.2
EP004	22	63.1	100	5.0
			200	6.6
			300	11.9
EP005	22	63.1	100	5.9
			200	9.3
			300	7.8

[0340] E. 具有四个 Dabcy1 修饰物的添加物

[0341] 若干双链寡核苷酸用四个末端 Dabcy1 修饰物修饰：

[0342] 添加物 EP022. 5' Dabcy1 CGCCGCGC Dabcy1

[0343] Dabcy1 GCGGCGCG Dabcy1 5' (SEQ ID No. 14)

[0344] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAATAAAATAAAATA Dabcy1

- [0345] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'
- [0346] (SEQ ID No. 12)
- [0347] 添加物 EP001. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1
- [0348] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'
- [0349] (SEQ ID NO. 23)
- [0350] 添加物 EP028. 5' Dabcy1 TGAGAGATGAAAATCATCGAGT Dabcy1
- [0351] Dabcy1 ACTCTCACTTTTTACTAGCTCA Dabcy1 5'
- [0352] (SEQ ID No. 18)
- [0353] 结果示于表 4 中。
- [0354] 表 4
- [0355]

添加物	长度 (NT' s)	T _m , °C	浓度, nM	选择性, ΔC_T
EP0022	8	42. 8	600	1. 2
EP0020	22	47. 7	600	0. 9
EP001	22	63. 1	100	7. 1
			200	9. 5
EP028	22	60. 6	300	10. 0

- [0356] F. 具有不同修饰物的添加物

[0357] 若干双链寡核苷酸用 Dabcy1 之外的修饰物修饰：三个修饰物（地高辛配基 (DIG)、香豆素 (CMN)、QSY 21 (QSY)）经示出用于添加物，一个修饰物（荧光素 (FAM)）未示出。寡核苷酸的序列如下：

- [0358] 添加物 EP026. 5' DIG GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA DIG
- [0359] DIG CCTCGTTTTATCGTTACTCCATDIG 5'
- [0360] (SEQ ID No. 17)
- [0361] 添加物 EP029. 5' GGTCAGATGAAAATGATACGTG DIG
- [0362] DIG CCAGTCTACTTTTACTATGCAC 5'
- [0363] (SEQ ID No. 40)
- [0364] 添加物 EP031. 5' CMN GGTCAGATGAAAATGATACGTG CMN
- [0365] CMN CCAGTCTACTTTTACTATGCAC CMN 5'
- [0366] (SEQ ID No. 41)
- [0367] 添加物 EP033. 5' QSY GGTCAGATGAAAATGATACGTG QSY
- [0368] QSY CCAGTCTACTTTTACTATGCAC QSY 5'
- [0369] (SEQ ID No. 42)
- [0370] 添加物 F032. 5' FAM GGTCAGATGAAAATGATACGTG FAM
- [0371] FAM CCAGTCTACTTTTACTATGCAC FAM 5'

[0372] (SEQ ID No. 43)

[0373] 结果示于表 5 中。

[0374] 表 5

[0375]

添加物	长度 (NT' s)	T _m , °C	浓度, nM	选择性, ΔC_T
EP026	22	63.1	300	3.8
EP029	22	63.1	300	0.9
EP031	22	63.1	200	3.2
EP033	22	63.1	200	3.4
F032	22	63.1	200	0.9

[0376] 实施例 4. 使用添加物混合物的 II 型引导错误和聚合酶选择性

[0377] 两个添加物的组合可作为四个链加入反应混合物,即作为两个不同双链寡核苷酸的混合物。可选地,两个添加物可共有共同链,因此作为三个链加入反应混合物。该实施例报道在实施例 3 中报道的测定中使用三链版本混合物(包括无修饰物的对照混合物)获得的结果。对于共有共同链的两个添加物,我们将共同链写在中间,将与具有较高解链温度的中间链杂交的链写在顶部,以及将与具有较低解链温度的中间链杂交的链写在底部。我们以顶部 / 中间 / 底部方式书写链浓度 (nM)。我们以上方 / 下方的方式书写两个杂交物的 T_m(°C)。通过缩短底链或将错配引入底链来调整解链温度(错配核苷酸标有下划线)。所测试添加物为:

[0378] 添加物 041. pCCTCGTCTGATCGTGACTCCAT 5'

[0379] 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTAp

[0380] pTCTGATCGTGACTCCAT5'

[0381] (SEQ ID No. 44)

[0382] 添加物 EP041. Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0383] 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0384] Dabcy1 TCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0385] (SEQ ID No. 45)

[0386] 添加物 042. pCCTCGTCTGATCGTGACTCCAT 5'

[0387] 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTAp

[0388] pCCTGGTCTGATTGTGACTCCAT5'

[0389] (SEQ ID No. 46)

[0390] 添加物 EP042. Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0391] 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0392] Dabcy1 CCTGGTCTGATTGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0393] (SEQ ID No. 47)

- [0394] 添加物 EP043. 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1
 [0395] Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'
 [0396] 5' Dabcy1 AGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1
 [0397] (SEQ ID No. 48)
 [0398] 添加物 EP045. 5' Dabcy1 GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1
 [0399] Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'
 [0400] 5' Dabcy1 AGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1
 [0401] (SEQ ID No. 49)

[0402] 结果示于表 6, 以及上方两个链和下方两个链的未修饰杂交物的链浓度和 T_m 。相比无添加物对照 (ΔC_T) 的选择性提高的数目如实施例 3 中所述来计算。

[0403] 表 6

[0404]

添加物	T_m (上方 / 下方, (°C))	浓度, nM	选择性, C_T
041	67.4/59.0	顶部 75	1.7
		中间 400	
		底部 325	
EP041	67.4/59.0	顶部 75	4.8
		中间 400	
		底部 325	
042	67.4/57.4	顶部 75	1.9

[0405]

		中间 400	
		底部 325	
EP042	67.4/57.4	顶部 75	6.8
		中间 400	
		底部 325	
EP043	67.4/59.1	顶部 25	2.4

		中间 600	
		底部 575	
		顶部 50	2. 9
		中间 600	
		底部 550	
		顶部 75	2. 2
		中间 600	
		底部 525	
		顶部 100	3. 3
		中间 600	
		底部 500	
EP045	67. 4/59. 1	顶部 25	5. 0
		中间 600	
		底部 575	
		顶部 50	6. 9
		中间 600	

[0406]

		底部 550	
		顶部 75	7. 7
		中间 600	
		底部 525	

		顶部 100	10.8
		中间 600	
		底部 500	

[0407] 使用添加物 EP043 和 EP045 的扩增反应的动力学分析分别示于图 7A-7D 和图 8A-8D 中。这些图示出作为不同浓度添加物的 LATE-PCR 循环次数的函数的 SYBR Green 染料的荧光强度读数。图 7A 示出使用具有 25/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP043 的结果。在图 7A 中，圆圈 71 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 72 为错配靶标的三个重复。图 7B 示出使用具有 50/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP043 的结果。在图 7B 中，圆圈 73 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 74 为错配靶标的三个重复。图 7C 示出使用具有 75/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP043 的结果。在图 7C 中，圆圈 75 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 76 为错配靶标的三个重复。图 7D 示出使用具有 100/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP043 的结果。在图 7D 中，圆圈 77 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 78 为错配靶标的三个重复。

[0408] 图 8A 示出使用具有 25/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP045 的结果。在图 8A 中，圆圈 81 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 82 为错配靶标的三个重复。图 8B 示出使用具有 50/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP045 的结果。在图 8B 中，圆圈 83 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 84 为错配靶标的三个重复。图 8C 示出使用具有 75/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP045 的结果。在图 8C 中，圆圈 85 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 86 为错配靶标的三个重复。图 8D 示出使用具有 100/600/575nM 的链（上方 / 中间 / 下方链）浓度的添加物 EP045 的结果。在图 8D 中，圆圈 87 为匹配靶标的三个重复，并且圆圈 88 为错配靶标的三个重复。

[0409] 实施例 5 在双重反应中抑制 I 型和 III 型引导错误。

[0410] 一式三份地用两个 DNA 靶标、每个靶标的标引物对和每个靶标标的分子信标杂交探针进行双重 LATE-PCR 反应。每个反应混合物包含以下引物和探针。

[0411] 对于第一靶序列：

[0412] 过剩引物 . 5' TGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAA (SEQ ID No. 50)

[0413] 限制性引物 . 5' ACTGTCCCAGAATGCAAGAAGCCCAGACG

[0414] (SEQ ID No. 51)

[0415] 第一扩增子的探针 . 5' BHQ-1CCGTAGCTGCCCTGG' Cal Red 610

[0416] (SEQ ID No. 52)

[0417] 对于第二靶序列：

[0418] 过剩引物 5' GCACAGTTACAGTATTCCAGCAGACTCA

[0419] (SEQ ID No. 53)

[0420] 限制性引物 5' TCAGTGGTGGCAGTGGTAGTGGTGGC

[0421] (SEQ ID No. 54)

[0422] 第二扩增子的探针 5' BHQ-2TCAGTGGTGGCAGTGGTAGA Quasar

[0423] 670 (SEQ ID No. 55)

[0424] LATE-PCR 反应混合物包括在 25 μ l 体积中的 1X Platinum Taq 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、0.25nM dNTP、50nM 每种限制性引物、1000nM 每种过剩引物和 500nM 每种检测探针、1.25 单位 Platinum Taq 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和人类 DNA 的 1000 个基因组当量。不同反应混合物不含添加物、含有 400nM 浓度的添加物 EP020, 或 300nM 浓度的添加物 EP013。

[0425] LATE-PCR 扩增反应热曲线条件为 95 $^{\circ}C$ /10s 的 20 个循环、在以下指定的温度下退火 10s、和 72 $^{\circ}C$ /10s ;然后 95 $^{\circ}C$ /10s、65 $^{\circ}C$ /10s、72 $^{\circ}C$ /10s 的 50 个循环, 和 54 $^{\circ}C$ /20s 的荧光信号检测。使用允许在相同仪器中可进行具有不同退火温度的多个扩增温度曲线的温度梯度功能, 在 Bio-Rad IQ-5 多色实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中进行扩增。

[0426] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAATAAAAATAAAATA Dabcy1

[0427] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'

[0428] (SEQ ID No. 12)

[0429] 添加物 EP013. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTGp

[0430] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0431] (SEQ ID No. 56)

[0432] 进行了六个测定。它们具有以下添加物和初始退火温度 (首先 20 个循环):

[0433] 反应 1 :无添加物, 退火温度 :65 $^{\circ}C$

[0434] 反应 2 :添加物 EP020, 退火温度 65 $^{\circ}C$

[0435] 反应 3 :添加物 EP020, 退火温度 60.7 $^{\circ}C$

[0436] 反应 4 :添加物 EP013, 退火温度 66.5 $^{\circ}C$

[0437] 反应 5 :添加物 EP013, 退火温度 64.2 $^{\circ}C$

[0438] 反应 6 :添加物 EP013, 退火温度 60.7 $^{\circ}C$

[0439] 图 9 示出作为 LATE-PCR 热循环次数的函数的来自探针的荧光读数。图 9A 示出来自反应 1 的读数, 其中圆圈 911 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 912 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。图 9B 示出来自反应 2 的读数, 其中圆圈 913 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 914 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。图 9C 示出来自反应 3 的读数, 其中圆圈 915 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 916 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。图 9D 示出来自反应 4 的读数, 其中圆圈 917 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 918 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。图 9E 示出来自反应 5 的读数, 其中圆圈 919 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 920 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。图 9F 示出来自反应 6 的读数, 其中圆圈 921 为来自在第一靶标扩增的四个重复中第一探针的读数, 并且圆圈 922 为来自在第二靶标扩增的四个重复中第二探针的读数。

[0440] 实施例 6. 用于评估对 5' 核酸外切酶活性抑制的不依赖引物的振荡温度测定

[0441] 许多 DNA 聚合酶 (包括 Taq 和 Tfi (+)) 有能力在杂交至其靶链的寡核苷酸探针的 5' 端上裂解荧光标记核苷酸。在不存在上游引物延伸时该 5' 核酸外切酶裂解甚至发生在

等温条件下。因此,不依赖引物的裂解与发生于标准 5' 核酸酶扩增反应中的引物依赖性裂解形成对比。通过在高于和低于探针 / 靶杂交物的 T_m 的有限温度范围上振荡反应混合物温度,可提高不依赖引物的 5' 核酸外切酶裂解的速率。

[0442] 振荡反应在由以下组成的 25 μ l 体积中进行:1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、200nM dNTP、1.25 单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、200nM 具有 5' FAM 和 3' Black Hole Quencher 1 (BHQ1) 的探针和 100nM 互补的 41 核苷酸靶标。此反应混合物与和与任何添加物一起使用,并且与下文标识的 300nM 浓度的每种添加物一起使用。当在反应混合物中仅有寡核苷酸时,用探针进行对照反应。添加物包括 PS060、形成茎-环结构(形成茎的互补核苷酸标有下划线)的单链添加物,以及双链添加物。使用以下热曲线来振荡反应混合物:45°C / 20s, 60°C / 10s, 45 个循环,然后 45°C / 30s 开始解链并且 1°C 递增 30 个循环。在热曲线的 45°C / 10s 区段期间获得 FAM 荧光。探针、靶标和添加物的序列为:

[0443] 探针 5' FAM CCATGATACAAGCTTCC BHQ1 (SEQ ID No. 57)

[0444] 靶标 5' ACTTAGTAATTGGGAAGCTTGTATCATGGCACTTAGAACCT

[0445] (SEQ ID No. 58)

[0446] 添加物 EP001. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0447] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0448] (SEQ ID No. 23)

[0449] 添加物 EP004. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0450] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0451] (SEQ ID No. 26)

[0452] 添加物 EP008. 5' Dabcy1 GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp

[0453] pCCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy 15'

[0454] (SEQ ID No. 30)

[0455] 添加物 EP009. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0456] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT 5'

[0457] (SEQ ID No. 31)

[0458] 添加物 PS060. 5' CGCGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGAC

[0459] GCCGCG (SEQ ID No. 59)

[0460] 核酸外切酶裂解活性从探针中分离探针荧光团,从而导致荧光 (FAM) 提高。结果报道于图 10 中。在图 10 中,针对仅探针反应的曲线 101 示出,在不存在靶标时探针不裂解。针对包含探针和靶标但无添加物的反应的曲线 102 示出最高的探针裂解。PS060 的曲线 103 示出比添加物的曲线更高的探针裂解;即,曲线 104, EP009; 曲线 105, 对于 EP004 和 EP008 相同的曲线;和曲线 106, EP001。

[0461] 实施例 7. 在 PCR 期间的 5' 核酸外切酶活性抑制剂

[0462] 在如实施例 5 中所述的 LATE-PCR 扩增之后,用于第一靶标的检测探针在 50°C 下历时 1 分钟被杂交到其互补扩增产物。然后,当探针从扩增子上解链时,通过在 50°C 和 80°C 之间以 30 秒 1°C 间隔监测探针荧光强度,使探针靶标杂交物经历解链曲线分析。仅含探针的无模板对照也经受解链方案(在不存在探针裂解的情况下,荧光随温度轻微增长,因为

荧光团的荧光强度是温度依赖的)。使两个样品经受解链:一个不含添加物,而一个包含 600nM 浓度的添加物 EP013 (SEQ ID No. 47)。

[0463] 结果示于图 11A 和图 11B 中。在图 11A 中,曲线 111 仅针对探针,并且曲线 112 针对不含添加物的反应的扩增产物。在图 11B 中,曲线 113 仅针对探针,并且曲线 114 针对包含添加物 EP013 的扩增产物。通过来自扩增靶标溶解下来的探针的荧光信号匹配解链完成时仅含探针的对照样品的荧光信号,来证实对引物依赖性 Taq DNA 聚合酶 5' 核酸外切酶活性的抑制作用。

[0464] 实施例 8. 大的多重反应

[0465] 12 对引物(每种针对人类线粒体基因组的基因内的不同序列)被组合到用于 12 个不同靶序列的多重扩增的单一多重扩增混合物中。25 μ l 反应混合物含有 1x PCR 缓冲液、400nM dNTP、3mM MgCl₂、0.24x SYBR Green、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物和 3.75 个单位的 Tfi(-)DNA 聚合酶、无添加物或具有 300nM 浓度的添加物 EP011 或 600nM 浓度的添加物 EP011。

[0466] 使反应混合物经受以下 LATE-PCR 热循环方案:95℃ 下 3 分钟,然后 95℃ /5s、58℃ /20s 和 68℃ /2m,65 个循环;然后在 45℃ 下开始解链,以 30s 间隔递增 1℃ 至 95℃。使用双链 DNA 产物的 SYBR Green 荧光(-dF/dT, SYBR)的第一衍生物,通过解链曲线分析,在 65 个循环结束时分析反应。另外,针对反应,分析产生双链产物的动力学(作为热循环的函数的 SYBR Green 强度读数)。

[0467] 添加物 EP011 的序列和 12 个靶标的序列和用于扩增每种序列的引物如下:

[0468] 添加物 EP011. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTG Dabcy1

[0469] pCCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0470] (SEQ ID No. 60)

[0471] 靶标 HV1.

[0472] 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTGTGCGGGATATTGA

[0473] TTTACGGAGGATGGTGGTCAAGGGACCCCTATCTGAGGGG

[0474] GGTCATCCATGGGGACGAGAAGGGATTTGACTGTAATGTGC

[0475] TATGTACGGTAAATGGCTTTATGTACTATGTACTGTAAAGGG

[0476] TGGGTAGGTTTGTGGTATCCTAGTGGGTGAGGGGTGGCTT

[0477] TGGAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTGAGGGTTGATTGCT

[0478] GTACTTGCTTGTAAGCATGGGGAGGGGGTTTTGATGTGGAT

[0479] TGGGTTTTTATGTACTACAGGTGGTCAAGTATTTATGGTAC

[0480] CGTACAATATTCATGGTGGCTGGCAGTAATGTACGAAATA

[0481] CATAGCGTTGTTGATGGGTGAGTCAATACTTGGGTGGTAC

[0482] CCAAATCTGCTTCCCCATGAAAGAACAGAGAATAGTTTAA

[0483] ATTAGAATCTTAGCTTTGGGTGCTAATGGTGGAGTTAAAGACT

[0484] TTTTCTCTGATTTGTCCTTGGAAGGTTTTTCATCTCCGGT

[0485] TTACAAGACTGGTG (SEQ ID No. 61)

[0486] 限制性引物 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG

[0487] (SEQ ID No. 62)

- [0488] 过剩引物 5' CACCAGTCTTGTAAACCGGAGATGAA (SEQ ID No. 63)
- [0489] 靶标 HV2.
- [0490] 5' ACAGGTCTATCACCCATTAAACCACTCACGGGAGCTCTCC
- [0491] ATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTATGCACGCGATAGC
- [0492] ATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCCTATGTCGCAGTAT
- [0493] CTGTCTTTGATTCTGCCTCATCCTATTATTTATCGCACCTA
- [0494] CGTTCAATATTACAGGCGAACATACTTACTAAAGTGTGTTA
- [0495] ATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAAT
- [0496] GTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACATCATAACAAAAA
- [0497] ATTTCCACCAAACCCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCACAGCA
- [0498] CTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAAACAAAGAACCC
- [0499] TAACACCAGCCTAACCAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCG
- [0500] GTATGCACTTTTAAACAGTCACCCCCCACTAACACATTATT
- [0501] TTCCCCTCCCCTCCCATACTACTAATCTCATCAATACAAC
- [0502] CCCC GCCCATCCTACCCAGCACACACACACCGCTG
- [0503] (SEQ ID No. 64)
- [0504] 限制性引物 5' AGCGGTGTGTGTGTGCTGGGTAGGAT
- [0505] (SEQ ID No. 65)
- [0506] 过剩引物 5' ACAGGTCTATCACCCATTAAACCACTCA
- [0507] (SEQ ID No. 66)
- [0508] 靶标 C01-1.
- [0509] 5' AGGTTGCGGTCTGTTAGTAGTATAGTGATGCCAGCAGCT
- [0510] AGGACTGGGAGAGATAGGAGAAGTAGGACTGCTGTGATT
- [0511] AGGACGGATCAGACGAAGAGGGGCGTTTGGTATTGGGTTA
- [0512] TGGCAGGGGGTTTTATATTGATAATTGTTGTGATGAAATTG
- [0513] ATGGCCCCTAAGATAGAGGAGACACCTGCTAGGTGTAAGG
- [0514] AGAAGATGGTTAGGTCTACGGAGGCTCCAGGGTGGGAGT
- [0515] AGTTCCCTGCTAAGGGAGGGTAGACTGTTCAACCTGTTCCCT
- [0516] GCTCCGGCCTCCACTATAGCAGATGCGAGCAGGAGTAGG
- [0517] AGAGAGGGAGGTAAGAGTCAGAAGCTTATGTTGTTTATGC
- [0518] GGGGAAACGCCATATCGGGGGCACCGATTATTAGGGGAAC
- [0519] TAGTCAGTTGCCAAAGCCTCCGATTATGATGGGTATTACT
- [0520] ATGAAGAAGATTATTACAAATGCATGGGCTGTGACGATAA
- [0521] CGTTGTAGATGTGGTCGTTACCTAGAAGGTTGCCTGGCTGG
- [0522] CCCAGCTCGGCTCGAATAAGGAGGCTTAGAGCTGTGCCTA
- [0523] GGA CTCCAGCTCATGCGCCGAATAATAGGTATAGTGTTCCA
- [0524] ATGTCTTTGTGGTTTGTAGAGAATAGTCAACGGT
- [0525] (SEQ ID No. 67)
- [0526] 限制性引物 5' AGGTTGCGGTCTGTTAGTAGTATAGTGATGCCAGCA

- [0527] (SEQ ID No. 68)
- [0528] 过剩引物 5' ACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACA (SEQ ID No. 69)
- [0529] 靶标 C01-2.
- [0530] 5' ATGGAGGGTCTTCTACTATTAGGACTTTTCGCTTCGAAG
- [0531] CGAAGGCTTCTCAAATCATGAAAATTATTAATATTACTGCT
- [0532] GTTAGAGAAATGAATGAGCCTACAGATGATAGGATGTTTC
- [0533] ATGTGGTGTATGCATCGGGTAGTCCGAGTAACGTCGGGG
- [0534] CATTCCGGATAGGCCGAGAAAGTGTGTGGGAAGAAAGTT
- [0535] AGATTTACGCCGATGAATATGATAGTGAAATGGATTTTGGC
- [0536] GTAGGTTTGGTCTAGGGGTAGCCTGAGAATAGGGGAAATC
- [0537] AGTGAATGAAGCCTCCTATGATGGCAAATACAGCTCCTAT
- [0538] TGATAGGACATAGTGGAAGTGGGCTACAACGTAGTACGTG
- [0539] TCGTGTAGTACGATGTCTAGTGATGAGTTTGCTAATACAAT
- [0540] GCCAGTCAGGCCACCTACGGTGAAAAGAAAGATGAATCC
- [0541] TAGGGCTCAGAGCACTGCAGCAGATCATTTTCATATTGCTTC
- [0542] CGTGGAGTGTGGCGAGTCAGCTAAATACTTTGACGCCGGT
- [0543] GGGGATAGCGATGATTATGGTAGCGGAGGTGAAATATGCT
- [0544] CGTGTGTCTACGTCTATTCCTACTGTAAATATATGGTGTGC
- [0545] TCACACGATAAACCCCTAGGAAGCCAATTGATATCATAGCT
- [0546] CAGACCATACTATGTATCCAAATGGTTCTTTTTTTCCGGA
- [0547] GTAGTAAGTTACAATATGGGAGATTATTCCGAAGCCTGG
- [0548] TAGGAT (SEQ ID No. 70)
- [0549] 限制性引物 5' ATGGAGGGTCTTCTACTATTAGGACTTTTCGCT
- [0550] (SEQ ID No. 71)
- [0551] 过剩引物 5' ATCCTACCAGGCTTCGGAATAATCTC (SEQ ID No. 72)
- [0552] 靶标 C02.
- [0553] 5' AGGGTAAATACGGGCCCTATTTCAAAGATTTTATAGGGG
- [0554] AATTAATTCTAGGACGATGGGCATGAAACTGTGGTTTGCTC
- [0555] CACAGATTTTCAGAGCATTGACCGTAGTATACCCCGGTCTG
- [0556] TGTAGCGGTGAAAGTGGTTTGGTTTAGACGTCCGGGAATTG
- [0557] CATCTGTTTTTAAGCCTAATGTGGGGACAGCTCATGAGTGCA
- [0558] AGACGTCTTGTGATGTAATTATTATACGAATGGGGGCTTCA
- [0559] ATCGGGAGTACTACTCGATTGTCAACGTCAAGGAGTCGCA
- [0560] GGTCGCCTGGTTCTAGGAATAATGGGGGAAGTATGTAGGA
- [0561] GTTGAAGATTAGTCCGCCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGTTC
- [0562] AGTACCATTGGTGGCCAATTGATTTGATGGTAAGGGAGGG
- [0563] ATCGTTGACCTCGTCTGTTATGTAAAGGATGCGTAGGGAT
- [0564] GGGAGGGCGATGAGGACTAGGATGATGGCGGGCAGGATA
- [0565] GTTCAGACGGTTTCTATTTCTGAGCGTCTGAGATGTTAGTA

- [0566] TTAGTTAGTTTTGTTGTGAGTGTTAGGAAAAGGGCATACA
- [0567] GGACTAGGAAGCAGATAAGGA (SEQ ID No. 73)
- [0568] 限制性引物
- [0569] 5' AGGGTAAATACGGGCCCTATTTCAAAGATTTTATAGGGGA
- [0570] (SEQ ID No. 74)
- [0571] 过剩引物 5' TCCTTATCTGCTTCCTAGTCCTGTATGC (SEQ ID No. 75)
- [0572] 靶标 12srRNA.
- [0573] 5' CCTCTAAATCACCACGATCAAAAGGAACAAGCATCAA
- [0574] GCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCA
- [0575] CACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATA
- [0576] AACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTT
- [0577] GGTCAATTTTCGTGCCAGCCACCGCGGTACACGATTA
- [0578] ACCCAAGTCAATAGAAGCCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGAT
- [0579] CACCCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACTCACCTGAGTTGT
- [0580] AAAAACTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAGTGG
- [0581] CTTTAACATATCTGAACACACAATAGCTAAGACCCAAAC
- [0582] TGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACCTCAA
- [0583] CAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGAG
- [0584] CCACAGCTTAAAACTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATA
- [0585] TCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCGA
- [0586] TCAACCTCACACCTCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATC
- [0587] TTCAGCAAACCTGATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAG
- [0588] TACCCACGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAG
- [0589] GTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCCAGAAAAC
- [0590] ACGATAGCCCTTATGAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATT
- [0591] TAGCAGTAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGG
- [0592] CCCTGAAGCGGTACACACCGCCCGTCACCTCCTCAAG
- [0593] TATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATT
- [0594] TATATAGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGT
- [0595] ACTGGA (SEQ ID No. 76)
- [0596] 限制性引物 5' TCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTA
- [0597] (SEQ ID No. 77)
- [0598] 过剩引物 5' CCTCTAAATCACCACGATCAAAAGGAAC
- [0599] (SEQ ID No. 78)
- [0600] 靶标 Cytb-1.
- [0601] 5' TGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCCTCCTCAGAT
- [0602] TCATTGAACTAGGTCTGTCCCAATGTATGGGATGGCGGATA
- [0603] GTAAGTTTGTAATTACTGTGGCCCTCAGAATGATATTTGG
- [0604] 靶标 12srRNA.

- [0605] 5' CCTCTAAATCACCACGATCAAAAGGAACAAGCATCAA
[0606] GCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCA
[0607] CACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATA
[0608] AACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTT
[0609] GGTCAATTTTCGTGCCAGCCACCGCGGTCACACGATTA
[0610] ACCCAAGTCAATAGAAGCCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGAT
[0611] CACCCCCTCCCAATAAAGCTAAAACTCACCTGAGTTGT
[0612] AAAAACTCCAGTTGACACAAAAATAGACTACGAAAGTGG
[0613] CTTTAACATATCTGAACACACAATAGCTAAGACCCAAAC
[0614] TGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACCTCAA
[0615] CAGTTAAATCAACAAAACTGCTCGCCAGAACACTACGAG
[0616] CCACAGCTTAAAACTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATA
[0617] TCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCGA
[0618] TCAACCTCACACCTCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATC
[0619] TTCAGCAAACCCTGATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAG
[0620] TACCCACGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAG
[0621] GTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCCAAGAAACT
[0622] ACGATAGCCCTTATGAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATT
[0623] TAGCAGTAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGG
[0624] CCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAG
[0625] TATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAAACCCCTACGCATT
[0626] TATATAGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGT
[0627] ACTGGA (SEQ ID No. 76)
[0628] 限制性引物 5' TCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTA
[0629] (SEQ ID No. 77)
[0630] 过剩引物 5' CCTCTAAATCACCACGATCAAAAGGAAC
[0631] (SEQ ID No. 78)
[0632] 靶标 Cytb-1.
[0633] 5' TGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCCTCCTCAGAT
[0634] TCATTGAACTAGGTCTGTCCCAATGTATGGGATGGCGGATA
[0635] GTAAGTTTGTAATTACTGTGGCCCTCAGAATGATATTTGG
[0636] CCTCACGGGAGGACATAGCCTATGAAGGCTGTTGCTATAG
[0637] TTGCAAGCAGGAGGATAATGCCGATGTTTCAGGTTTCTGA
[0638] GTAGAGAAATGATCCGTAATATAGGCCTCGCCCGATGTGT
[0639] AGGAAGAGGCAGATAAAGAATATTGAGGCGCCATTGGCG
[0640] TGAAGGTAGCGGATGATTCAGCCATAATTTACGTCTCGAG
[0641] TGATGTGGGCGATTGATGAAAAGGCGGTTGAGGCGTCTGG
[0642] TGAGTAGTGCATGGCTAGGAATAGTCCTGTGGTGATTTGG
[0643] AGGATCAGGCAGGCGCCAAGGAGTGAGCCGAAGTTTC

- [0644] ATCATGCGGA (SEQ ID No. 79)
- [0645] 限制性引物 5' TGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCC
- [0646] (SEQ ID No. 80)
- [0647] 过剩引物 5' TCCGCATGATGAACTTCGGCTC (SEQ ID No. 81)
- [0648] 靶标 Cytb-2.
- [0649] 5' ACTCCACCTCCTATTCTTGACGAAACGGGATCAAACAA
- [0650] CCCCTAGGAATCACCTCCCATTCGGATAAAATCACCTTCC
- [0651] ACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTCT
- [0652] TCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGAC
- [0653] CTCCTAGGCGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCT
- [0654] TAAACACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTCT
- [0655] ATTCGCCTACACAATTCTCCGATCCGTCCCTAACAAACTAG
- [0656] GAGGCGTCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCTAGCA
- [0657] ATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAAT
- [0658] ATTTGCCCCACTAAGCCAATCACTTTATTGACTCCTAGCCG
- [0659] CAGACCTCTCATTCTAACCTGAATCG (SEQ ID No. 82)
- [0660] 限制性引物 5' CGATTCAGGTTAGAATGAGGAGGTCTGCGGCTAG
- [0661] (SEQ ID No. 83)
- [0662] 过剩引物 5' ACTCCACCTCCTATTCTTGACGA (SEQ ID No. 84)
- [0663] 靶标 ND1.
- [0664] 5' CATAAGAACAGGGAGGTTAGAAGTAGGGTCTTGGTGACAA
- [0665] AATATGTTGTGTAGAGTTCAGGGGAGAGTGCGTCATATGT
- [0666] TGTTCTAGGAAGATTGTAGTGGTGAGGGTGTTTATTATAA
- [0667] TAATGTTTGTGTATTCGGCTATGAAGAATAGGGCGAAGGG
- [0668] GCCTGCGGCGTATTCGATGTTGAAGCCTGAGACTAGTTCGG
- [0669] ACTCCCCCTCGGCAAGGTCGAAGGGGGTTCGGTTGGTCTC
- [0670] TGCTAGTGTGGAGATAAATCATATTATGGCCAAGGGTCAT
- [0671] GATGGCAGGAGTAATCAGAGGTGTTCTTGTGTTGTGATAA
- [0672] GGGTGAGAGGTTAAAGGAGCCACTTATTAGTAATGTTGA
- [0673] TAGTAGAATGATGGCTAGGGTGACTTCATATGAGATTGTTT
- [0674] GGGCTACTGCTCGCAGTGCGCCGATCAGGGCGTAGTTTGAG
- [0675] TTTGATGCTCACCTGATCAGAGGATTGAGTAAACGGCTA
- [0676] GGCTAGAGGTGGCTAGAATAAATAGGAGGCCTAGGTTGA
- [0677] GGTTGACCAGGGGGTTGGGTATGGGGAGGGGGTTCATA
- [0678] GTAGAAGAGCGATGGTGAGAGCTAAGGTCGGGGCGGTGA
- [0679] TGTAGAGGGTGATGGTAGATGTGGCGGGTTTTAGGGG
- [0680] (SEQ ID No. 85)
- [0681] 限制性引物 5' CATAAGAACAGGGAGGTTAGAAGTAGGGTCTTGGT
- [0682] (SEQ ID No. 86)

- [0683] 过剩引物 5' CCCCTAAAACCCGCCACAT (SEQ ID No. 87)
- [0684] 靶标 ND2.
- [0685] 5' AGTGTGATTGAGGTGGAGTAGATTAGGCGTAGGTAGAA
- [0686] GTAGAGGTAAAGGAGGGTGATGGTGGCTATGATGGTGGGG
- [0687] ATGATGAGGCTATTGTTTTTTGTGAATTCTTCGATAATGGC
- [0688] CCATTTGGGCAAAAAGCCGGTTAGCGGGGGCAGGCCTCC
- [0689] TAGGGAGAGGAGGGTGGATGGAATTAAGGGTGTAGTCAT
- [0690] GTTAGCTTGTTCAGGTGCGAGATAGTAGTAGGGTCGTGGT
- [0691] GCTGGAGTTTAAGTTGAGTAGTAGGAATGCGGTAGTAGTT
- [0692] AGGATAATATAAATAGTTAAATTAAGAATGGTTATGTTAG
- [0693] GGTTGTACGGTAGAACTGCTATTATTTCATCCTATGTGGGTA
- [0694] ATTGAGGAGTATGCTAAGATTTTTCGTAGCTGGGTTTGGTT
- [0695] TAATCCACCTCAACTGCCTGCTATGATGGATAAGATTGAG
- [0696] AGAGTGAGGAGAAGGCTTACGTTTAGTGAGGGAGAGATTT
- [0697] GGTATATGATTGAGATGGGGGCTAGTTTTTGTTCATGTGAG
- [0698] AAGAAGCAGGCCGGATGTCAGAGGGGTGCCTTGGGTAACC
- [0699] TCTGGGACTCAGAAGTAAAAGGGGGCTATTCCTAGTTTTAT
- [0700] TGCTATAGCTATTATGATTATTAATGATGAGTATTGATTGG
- [0701] TAGTATTGGTTATGGTTCATTGTCCGGAGAGTATATTGTTG
- [0702] AAGAGGATAGCTATTAGAAGGATTATGGATGCGGTTGCTT
- [0703] GCGTGAGGAAATACTTGATGGCAGCTTCTGTGGAACGAGGG
- [0704] TTTATTTTTTTGGTTAGAACTGGAATAAAAAGCTAGCATGTTT
- [0705] ATTTCTAGGCCTACTCAGGTAAAAAATCAGTGCGAGCTTA
- [0706] GCGCTGTGATGAGTGTGCCTGCA (SEQ ID No. 88)
- [0707] 限制性引物 5' AGTGTGATTGAGGTGGAGTAGATTAGGCGTAGGT
- [0708] AGAAGT (SEQ ID No. 89)
- [0709] 过剩引物 5' TGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCT
- [0710] (SEQ ID No. 90)
- [0711] 靶标 ND4-1.
- [0712] 5' AACACAACCACCCACAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTC
- [0713] TACTATTTTTTAACCAAATCAACAACAACCTATTTAGCTGTT
- [0714] CCCCACCTTTTCCTCCGACCCCTAACAACCCCTCCTA
- [0715] ATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTCACAATCATGGCAAG
- [0716] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACTATCACGAAAAAAA
- [0717] CTCTACCTCTCTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATT
- [0718] ATAACATTACAGCCACAGAACTAATCATATTTTATATCTT
- [0719] CTTGAAACACACTTATCCCCACCTTGGCTATCATCACCC
- [0720] GATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCACATA
- [0721] CTTCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCTACTCAT

- [0722] CGCACTAATTTACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACA
- [0723] TTCTACTACTCACTCTCACTGCCCAAGAACTATCAA
- [0724] ACTCCTGAGC (SEQ ID No. 91)
- [0725] 限制性引物 5' GCTCAGGAGTTTGATAGTTCTTGGGCAGTGAGAG
- [0726] (SEQ ID No. 92)
- [0727] 过剩引物 5' AACACAACCACCCACAGCCTAATTATTAG
- [0728] (SEQ ID No. 93)
- [0729] 靶标 ND4-2.
- [0730] 5' GTGGTGGGTGAGTGAGCCCCATTGTGTTGTGGTAAATAT
- [0731] GTAGAGGGAGTATAGGGCTGTGACTAGTATGTTGAGTCCT
- [0732] GTAAGTAGGAGAGTGATATTTGATCAGGAGAACGTGGTTA
- [0733] CTAGCACAGAGAGTTCTCCAGTAGGTTAATAGTGGGGG
- [0734] TAAGGCGAGGTTAGCGAGGCTTGCTAGAAGTCATCAAAAA
- [0735] GCTATTAGTGGGAGTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGAGGA
- [0736] TTATGATGCGACTGTGAGTGCGTTCGTAGTTTGAGTTTGCT
- [0737] AGGCAGAATAGTAATGAGGATGTAAGCCCGTGGGCGATTA
- [0738] TGAGAATGACTGCGCCGGTGAAGCTTCAGGGGGTTTGGAT
- [0739] GAGAATGGCTGTTACTACGAGGGCTATGTGGCTGATTGAA
- [0740] GAGTATGCAATGAGCGATTTTAGGTCTGTTTGTCGTAGGCA
- [0741] GATGGAGCTTGTTATAATTATGCCTCATAGGGATAGTACA
- [0742] AGGAAGGGGTAG (SEQ ID No. 94)
- [0743] 限制性引物 5' GTGGTGGGTGAGTGAGCCCCATTGTGT
- [0744] (SEQ ID No. 95)
- [0745] 过剩引物 5' CTACCCCTTCCTTGTACTATCCCTATGAG
- [0746] (SEQ ID No. 96)

[0747] 然后使用填充了组合有 $1\mu\text{L}$ 填充染料的 $1\mu\text{L}$ PCR 产物的 5% 聚丙烯酰胺凝胶分析扩增产物。凝胶在 4°C 、30 伏特下运行 8 个小时。使用 SYBR Gold, 将凝胶显影十分钟。凝胶的图片示于图 12 中。第一泳道为无添加物的反应。第二泳道为具有 300nM 浓度的添加物 EP011 的反应。第三泳道为具有 600nM 浓度的添加物 EP011 的反应。如从图 12 中可见, 无添加物的反应未能生成预期的一组 12 个产物。根据泳道 2 可见, 300nM 添加物 EP011 抑制大多数引导错误 (可在底部看见轻量产物的一个带)。根据泳道 3 可见, 600nM 浓度的添加物 EP011 抑制所有的引导错误。

[0748] 包含 600nM 添加物 EP011 的反应经受称为 Dilute- 'N' -Go 法的测序样品制备。参见, Rice, J. E. 等人 (2007), Monoplex/Multiplex Linear-After-The-Exponential PCR Assay Combined with Prime Safe and Dilute- 'N' -Go Sequencing, Nature Protocols 2:2429-2438。将制备的样品分为 12 个等分试样, 并且使用 12 个限制性引物中的一个作为测序引物, 使每一等分试样经受双脱氧法测序。测序结果显示, 扩增反应生成足够的每个扩增子的单链 DNA 以使得可以经由 Dilute 'N' Go 双脱氧法测序方案来测序来自单个反应的 12 个不同限制性引物链中的每一个。

[0749] 在每个反应中使用 1000 个拷贝的线粒体基因组 DNA 获得上述结果。该实验的另外的样品（结果未示出）显示，当每个反应仅包含 100 个或 10 个拷贝的线粒体基因组 DNA 时，未获得所有 12 个产物的完整扩增。这与 1 型和 3 型引导错误随着靶标数目减少而增加的事实是一致的。

[0750] 然而，用做了以下调整后的上述多重反应可成功扩增 100 个和 10 个拷贝的线粒体基因组 DNA：1) 使用具有 50/600/550nM 的链组合的 EP043；2) 提高扩增循环至 80-90；和 3) 根据实施例 14，通过加入至少两个错配的 A' 或 T' 到其 5' 端（下划线指示），来改变用于以下靶标的限制性引物。

[0751] 对于靶标 HV1：

[0752] 限制性引物 5' TAAAGCCCGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG

[0753] (SEQ ID No. 97)

[0754] 对于靶标 HV2：

[0755] 限制性引物 5' AAAGCGGTGTGTGTGTGCTGGGTAGGAT

[0756] (SEQ ID No. 98)

[0757] 对于靶标 C01-1：

[0758] 限制性引物

[0759] 5' AAAGGTTGCGGTCTGTAGTAGTATAGTGATGCCAGCA

[0760] (SEQ ID No. 99)

[0761] 对于靶标 C01-2：

[0762] 限制性引物 5' AAATGGAGGGTTCTTCTACTATTAGGACTTTTCGCT

[0763] (SEQ ID No. 100)

[0764] 对于靶标 C02：

[0765] 限制性引物 5' TAAGGGTAATAACGGGCCCTATTTCAAAGATTTTT

[0766] AGGGGA (SEQ ID No. 101)

[0767] 对于靶标 12srRNA：

[0768] 限制性引物

[0769] 5' AATCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTA

[0770] (SEQ ID No. 102)

[0771] 对于靶标 Cytb-1：

[0772] 限制性引物 5' AATGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCC

[0773] (SEQ ID No. 103)

[0774] 对于靶标 Cytb-2：

[0775] 限制性引物

[0776] 5' AACGATTCAAGTTAGAATGAGGAGGTCTGCGGCTAG

[0777] (SEQ ID No. 104)

[0778] 对于靶标 ND1：

[0779] 限制：5' AACATAAGAACAGGGAGGTTAGAAGTAGGGTCTTGGT

[0780] (SEQ ID No. 105)

[0781] 对于靶标 ND2：

[0782] 限制性引物 5' AAAGTGTGATTGAGGTGGAGTAGATTAGGCGT

[0783] AGGTAGAAGT (SEQ ID No. 106)

[0784] 对于靶标 ND4-1 :

[0785] 限制性引物

[0786] 5' AAGCTCAGGAGTTTGATAGTTCTTGGGCAGTGAGAG

[0787] (SEQ ID No. 107)

[0788] 对于靶标 ND4-2 :

[0789] 限制性引物 5' TAGTGGTGGGTGAGTGAGCCCCATTGTGT

[0790] (SEQ ID No. 108)

[0791] 实施例 9. 1 型引导错误的抑制的直接定量测量

[0792] 发展了该实施例中报道的测定来测量 I 型引导错误以及添加物和热启动试剂在抑制 I 型引导错误中的效果。在该测定中,可退火和延伸的两个重叠寡核苷酸首先在低于 LATE-PCR 退火温度的温度 (50℃) 下延长孵育期间 (10 分钟)。如果延伸发生,则产生用于一对 LATE-PCR 引物的引入部位,即,延伸的重叠核苷酸包括引入部位,但寡核苷酸其自身仅包含引入部位的补体。然后,使用引物对使反应混合物经受 LATE-PCR 扩增。在这些条件下,生成可探测水平产物所需的循环次数 (以 SYBR Green 或过剩引物链的探针来观察) 将取决于在部分互补低聚物的初始等温孵育期间产生了多少延伸 (全长) 链。这又将取决于 DNA 聚合酶在等温孵育期间有多少活性。通过比较具有抑制剂的反应和无抑制剂的反应的阈值循环 (C_T), 获得对抑制剂在抑制初始的等温延伸 (被认为是该测定中的引导错误事件) 时的效果的定量测量。当所有初始存在的低聚物在第一轮扩增之前完全延伸时,观察到最低 C_T 值。伴随越来越强的 DNA 聚合酶抑制,观察到越来越高的 C_T 值。在混合了反应的各自组合之后和在 50℃ 下等温孵育之前,所有反应都具有以大约 100,000 个拷贝加入的重叠寡核苷酸 1 和 2。

[0793] 使用了以下寡核苷酸。对于重叠寡核苷酸,互补于引入部位的序列标有下划线,并且重叠序列为斜体。

[0794] 重叠寡核苷酸 1 :

[0795] 5' TTGCACGAGAGCCAGCTCGTCAGGTAGTCACCACT *'ACAGTCCGCTTGTTGTCAAGACAGCACG* (SEQ ID No. 109)

[0796] 重叠寡核苷酸 2 :

[0797] 5' CAGCAGCAGACAGTGCACTCGTCACTCACTAACCGCTATTCTGA

[0798] GTTCG *CGTGCTGTCTTGACACAAGCGGACTGT* (SEQ ID No. 110)

[0799] 限制性引物 :5' TTGCACGAGAGCCAGCTCGTCAGGTAGTCACCACT

[0800] (SEQ ID No. 111)

[0801] 过剩引物 :5' CAGCAGCAGACAGTGCACTCGTCAC (SEQ ID No. 112)

[0802] 添加物 EP046. 5' Dabcy1 GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0803] Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0804] (SEQ ID No. 113)

[0805] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAATAAAAATAAAATA Dabcy1

[0806] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'

[0807] (SEQ ID No. 12)

[0808] 添加物 EP022. 5' Dabcy1 CCGCCGGC Dabcy1

[0809] Dabcy1 GGCGGCCG Dabcy1 5'

[0810] (SEQ ID No. 14)

[0811] 每个反应一式三份地在 25 μ l 体积中进行。每个反应混合物含有 1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 1.25 个单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。一个反应混合物仅含有 Taq DNA 聚合酶。第二反应混合物含有 Taq DNA 聚合酶和 600nM 浓度的添加物 EP046。第三反应混合物含有具有抗体的“热启动”Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。第四反应混合物含有具有抗体和 600nM 浓度的添加物 EP046 的 Taq DNA 聚合酶。在混合了反应成分的各自组合之后和在 50°C 下等温孵育之前,所有反应都具有每一反应以大约 100,000 个拷贝加入的重叠寡核苷酸 1 和 2。

[0812] 这些反应的热曲线条件如下:50°C, 10 分钟,然后在冰上孵育长时间足以添加引物,然后迅速加热到 98°C,然后 98°C /10s 和 72°C /40s 下 60 个循环。由重叠寡核苷酸形成的杂交物的解链温度为约 60°C,即,高于初始 10 分钟孵育的温度。两步 PCR 方案的退火/延伸温度低于浓度调整的限制性引物和过剩引物的解链温度,其根据实施例 1 中给出的方法计算分别为 75.1°C 和 73.6°C。每个样品通过 SYBRGreen 荧光实时分析,并且在该测定结束时,每个均经受解链曲线分析以确认反应生成 88°C 的单一产物峰,如对扩增反应的双链产物所预期(未示出)。

[0813] 作为扩增循环的函数的 SYBR Green 荧光示于图 13 中,其中圆圈 131 标识仅具有 Taq DNA 聚合酶的样品的重复,圆圈 132 标识具有 Taq DNA 聚合酶和添加物 EP046 的样品的重复,圆圈 133 标识具有 Taq DNA 聚合酶-加-抗体的样品的重复,并且圆圈 134 标识具有 Taq DNA 聚合酶-加-抗体和添加物 EP046 的样品的重复。

[0814] 实施例 10. 引导错误和“冷终止”检测

[0815] 为确定是否可能中断 PCR 扩增以进行一些低温操作。需要确定这样做的引导错误效果。为此目的,我们已发展了在该实施例中报道的测定。该测定为 LATE-PCR 扩增测定,其中我们使用了以下靶链、引物和杂交探针(一端上用荧光团 Quasar670 (Biosearch Technologies, Novato, CA) 标记并且另一端上用淬灭剂 BHQ2 (Biosearch Technologies, Novato, CA) 标记:

[0816] 限制性引物 5' CTCCAGCCCGGCACGCTCACGTGACAGACCG

[0817] (SEQ ID No. 114)

[0818] 过剩引物 5' CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAG (SEQ ID No. 115)

[0819] 探针 5' Quasar670 GCGGGTTGTTCTGGTCCATGA BHQ2

[0820] (SEQ ID No. 116)

[0821] 靶标

[0822] 5' CCGGTGGTCGCCGCGATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCA

[0823] GCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGGG

[0824] TTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGGCG

[0825] GTCTGTACGTGAGCGTGCCGGGCTGGAG (SEQ ID No. 117)

[0826] 反应混合物包括 1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、2mM MgCl₂、200nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、200nM 探针、1.25 个单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和待测添加物 (在这种情况下为 600nM 浓度的添加物 EP010)。另外,每个反应含有 1 千万个拷贝的人类基因组 DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。所测添加物的序列为:

[0827] 添加物 EP010. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTG Dabcy1

[0828] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0829] (SEQ ID No. 10)

[0830] 首先进行三个对照测定,用包括于反应混合物中的测试添加物,但没有热循环方案的任何中断,以确立未中断方案是敏感和稳固的。在扩增反应混合物中,对照测定以 1000 个、100 个和 10 个拷贝的靶链开始。热循环方案为:98℃ 下,3 分钟,然后 98℃ /10s、75℃ /40s 和 60℃ /30s 的 70 个循环,在 60℃ 下荧光读数。图 14A 示出作为 PCR 循环次数的函数的探针的荧光读数,其中圆圈 141 为具有 1000 个拷贝的靶标的样品的四个重复扩增的读数,圆圈 142 (虚线) 为 100 个拷贝的靶标的样品的重复的读数,并且圆圈 143 为具有 10 个拷贝的靶标的样品的重复。

[0831] 使分离的反应混合物经受中断的热循环方案。热曲线为 98℃ 下 1 分钟,然后 98℃ /10s、75℃ /40s 的 40 个循环,然后解链在 45℃ 下起始并且以每 30 秒 1℃ 梯级增加 (对各梯级的数据采集),共 40 步,然后 98℃ /10s、75℃ /40s 的 30 个以上的循环,在其结束时重复解链。

[0832] 两次解链的结果示于图 14B 和图 14C。这些图示出解链曲线,其中每个温度下的荧光值通过除以 75℃ (该温度下探针不结合于单链产物) 下的荧光值来归一化。在扩增结束后 (图 14C),在 40 个扩增循环 (图 14B) 和 70 个循环之后测定归一化解链。在图 14B 中,圆圈 144 为靶标的 1000 个拷贝的重复,圆圈 145 为具有 100 个拷贝的靶标的样品的重复,并且圆圈 146 为具有 10 个拷贝的靶标的样品的重复。相似地,在图 14C 中,圆圈 147 (黑实线) 为具有 1000 个拷贝的靶标的样品的三个重复扩增,圆圈 148 (虚线) 为具有 100 个拷贝的靶标的样品的重复,并且圆圈 149 (灰实线) 为具有 10 个拷贝的靶标的样品的重复。

[0833] 实施例 11. 对称 PCR 反应中的 II 型引导错误

[0834] 为证明添加物对常规的对称 PCR、等位基因 - 识别引物的特异性的效果,进行了以下测定。在单个核苷酸位置上不同的相等浓度的两个 DNA 靶序列在对称 PCR 条件下存在或不存在添加物 EP043 (SEQ ID No. 45) 的情况下使用引物对平行扩增,其中一个引物 (等位基因特异性引物) 对那些 DNA 靶标 DNA (称为“匹配靶标”) 为特异性。如在文献中所建议 (Newton 等人, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). 1989, Nucleic Acids Res. 17:2503-2516), 构建了用于匹配靶标的优选扩增的一对对称 PCR 引物,使得一个引物的 3' 端互补于预期 DNA 靶标特有的核苷酸并且倒数第二 3' 端位置错配于预期和非预期 DNA 靶标。因此,预期靶标特异性引物仅在其 3' 端一次与预期 DNA 靶标错配,但其在 3' 端错配两次于错配靶标。该引物设计导致匹配靶标的优选扩增。在该实验之前,包含匹配和错配靶标的基因组 DNA 样品用完全互补于两个靶标的引物定量,以归一化靶标基因组浓度的差值的数据。在此情况下,错配靶标的 C_T 比

匹配靶标的 C_T 低 1.52, 所以对于使用等位基因特异性引物的测定, 错配靶标的 C_T 的任何所示延迟必须通过将 1.52 添加到所观察 ΔC_T 来矫正, 以计算靶标浓度差值。

[0835] 用于优选扩增的靶标和引物序列, 以及添加物的序列为:

[0836] 等位基因特异性引物 5' TATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCTT

[0837] (SEQ ID No. 118)

[0838] 共同引物 5' GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC

[0839] (SEQ ID No. 119)

[0840] 匹配靶标 5'

[0841] GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGT

[0842] GACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTTATTATA

[0843] AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTT

[0844] GGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA

[0845] (SEQ ID No. 120)

[0846] 错配靶标 5' GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGT

[0847] GTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTT

[0848] ATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTT

[0849] GTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGC

[0850] CTTGACGATA (SEQ ID No. 121)

[0851] 添加物 EP043. 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0852] Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0853] 5' Dabcy1 AGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0854] (SEQ ID No. 48)

[0855] 对称 PCR 扩增在 25 μ l 的最终反应体积中进行: 1X Platinum Taq 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、0.2mM dNTP、1 μ M 引物对、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1 个单位 Platinum Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和包含匹配或错配靶序列的人类 DNA 的 1000 个基因组当量。反应混合物不含添加物或含有 300nM 总浓度的添加物 EP043, 其中顶链浓度为 100nM, 中间链浓度为 300nM, 并且底链浓度为 200nM。

[0856] 扩增条件为: 94 $^{\circ}C$ 下 5 分钟; 然后 94 $^{\circ}C$ /1 分钟 (m)、64 $^{\circ}C$ /1m、72 $^{\circ}C$ /1m 的 60 个循环, 并且以 72 $^{\circ}C$ 梯级进行数据采集; 和 72 $^{\circ}C$ /10m 的最终延伸步骤。扩增在 Bio-Rad IQ-5 多色实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中进行。

[0857] 根据 SYBR Green 实时荧光信号, 测定出在不含添加物的测定中, 来自错配靶标的信号相对于来自匹配靶标的信号延迟, 从而提供 7.84 的矫正 ΔC_T 。相似地, 在包含总浓度 300nM 的添加物 EP043 的测定中, 来自错配靶标的信号相对于来自匹配靶标的信号延迟甚至更多, 从而提供 12.59 的矫正 ΔC_T 。因此, 因存在 EP043 所致的增加的聚合酶特异性为 4.75 个循环。

[0858] 实施例 12. Taq DNA 聚合酶活性的抑制和限制性引物 3' 端的 AT 含量

[0859] 就由本文所述添加物的存在导致的延迟, 对使用 3' 端富含 GC 的限制性引物和 3' 端富含 AT 的限制性引物的 LATE-PCR 测定进行比较。进行了四个扩增反应: 一个反应使用

具有富含 GC3' 端的引物且无添加物,第二个使用相同引物和添加物 EP013;第三个使用具有富含 AT 3' 端的引物且无添加物;以及第四个使用相同引物和添加物 EP013。

[0860] 每个 25 μ l 扩增反应混合物包括:1X Platinum Taq 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、1.25 个单位 Platinum Taq 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、人类 DNA 的 1000 个基因组当量、1000nM 浓度的过剩引物、50nM 浓度的限制性引物和 500nM 浓度的检测探针。对于两个测定,包括的添加物 EP013 (SEQ ID Nos 47 和 157) 以 600nM 浓度包括于反应混合物中。

[0861] 热循环方案为:95℃下 10 秒、66.5℃下 10 秒、和 72℃下 10 秒,20 个循环;然后 95℃下 10 秒、65℃下 10 秒、72℃下 10 秒,50 个循环;以及 54℃下 20 秒的荧光信号检测。当结合于其靶标时每个探针的荧光检测是在 PCR 循环的退火阶段期间测量。

[0862] 在具有富含 GC 3' 端的限制性引物的测定中使用的靶标、引物和探针的序列为:

[0863] 过剩引物 5' GCACAGTTACAGTATTCCAGCAGACTCA

[0864] (SEQ ID No. 122)

[0865] 限制性引物 5' TCAGTGGTGGCAGTGGTAGTGGTGGC

[0866] (SEQ ID No. 123)

[0867] 富含 GC 引物的靶标

[0868] 5' GCACAGTTACAGTATTCCAGCAGACTCAAAT

[0869] ACAAGAACCTACTGCTAATGCCACCACTAC

[0870] CACTGCCACCACTGA (SEQ ID No. 124)

[0871] 检测探针 5' BHQ-2TCAGTGGTGGCAGTGGTAGA Quasar 670

[0872] (SEQ ID No. 125)

[0873] 在具有富含 AT3' 端的限制性引物的测定中使用的靶标、引物和探针的序列为:

[0874] 过剩引物 5' CTTTGGCACCAGAGGTGAGC

[0875] (SEQ ID No. 126)

[0876] 限制性引物 5' GGTGCGTGGGTCCCAGTCTGCAGTTAAG

[0877] (SEQ ID No. 127)

[0878] 富含 AT 引物的靶标 5' GGTGCGTGGGTCCCAGTCTGCAGTTAAGGG

[0879] GGCAGGAGTGGCGCTGCTCACCTCTGG

[0880] TGCCAAAG (SEQ ID No. 128)

[0881] 检测探针 5' BHQ-2GCAGGAGTGGCGCT Quasar 670 (SEQ ID No. 129)

[0882] 添加物 EP013 的序列如下:

[0883] 添加物 EP013. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTGp

[0884] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0885] (SEQ ID No. 56)

[0886] 在使用具有富含 GC 3' 端的限制性引物的测定中,将添加物 EP013 以 600nM 浓度加入反应混合物中导致相比无添加物的扩增而言阈值循环 (C_T) 延迟 4 个循环。在使用具有富含 AT 3' 端的限制性引物的测定中,将添加物 EP013 以 600nM 浓度加入反应混合物导致 C_T 延迟 11 个循环。

[0887] 实施例 13. 引物和 III 型引导错误的 5' 端的修饰

[0888] 我们使用另外的核苷酸来在一个 PCR 扩增引物的 5' 端上形成非互补尾部。在该实施例中,我们使用 LATE-PCR 扩增,并且我们修饰限制性引物。我们比较修饰的和未修饰的引物以完全结合和部分结合 3' 端之间进行区分。将两个腺嘌呤加到用于扩增人类线粒体细胞色素 b 基因(以下划线示出)的限制性引物的 5' 端。我们测试了两个添加物:添加物 EP047,靶标,引物;并且添加物序列如下:

[0889] 靶标 Cytb-1.

[0890] 5' TGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCCTCCTCAGAT

[0891] TCATTGAAGTAGGTCTGTCCCAATGTATGGGATGGCGGATA

[0892] GTAAGTTTGTAATTACTGTGGCCCCCTCAGAATGATATTTGG

[0893] CCTCACGGGAGGACATAGCCTATGAAGGCTGTTGCTATAG

[0894] TTGCAAGCAGGAGGATAATGCCGATGTTTCAGGTTTCTGA

[0895] GTAGAGAAATGATCCGTAATATAGGCCTCGCCCGATGTGT

[0896] AGGAAGAGGCAGATAAAGAATATTGAGGCGCCATTGGCG

[0897] TGAAGGTAGCGGATGATTCAGCCATAATTTACGTCTCGAG

[0898] TGATGTGGGCGATTGATGAAAAGGCGGTTGAGGCGTCTGG

[0899] TGAGTAGTGCATGGCTAGGAATAGTCCTGTGGTGATTTGG

[0900] AGGATCAGGCAGGCGCCAAGGAGTGAGCCGAAGTTTC

[0901] ATCATGCGGA (SEQ ID No. 79)

[0902] 限制性引物 5' TGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCC

[0903] (SEQ ID No. 80)

[0904] 过剩引物 5' TCCGCATGATGAACTTCGGCTC (SEQ ID No. 81)

[0905] 修饰的限制性引物

[0906] 5' AATGTGAGGGTGGGACTGTCTACTGAGTAGCC (SEQ ID No. 130)

[0907] 添加物 EP047. Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0908] 5' Dabcy1 AGACTAGCACTGAGGTA

[0909] (SEQ ID No. 131)

[0910] 添加物 EP043. 5' GGAGCAGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0911] Dabcy1 CCTCGTCTGATCGTGACTCCAT Dabcy1 5'

[0912] 5' Dabcy1 AGACTAGCACTGAGGTA Dabcy1

[0913] (SEQ ID No. 48)

[0914] 添加物 EP047 包括形成 17 个核苷酸长的双链区域的 22 个核苷酸的链和 17 个核苷酸长的链,并且其具有四个末端 Dabcy1 修饰物。添加物 EP047 的 T_m 为 59.1°C。添加物 EP043 为添加物的混合物。其包括作为一个组分的添加物 EP047(其包含两个底链),该添加物 EP047 以 550nM 浓度包括于此测试中。混合物 EP043 也包括作为顶部两个链示出的另一双链寡核苷酸。该第二低聚物包括两个 22 个核苷酸长的互补链,并且其具有三个末端 Dabcy1 修饰物。其 T_m 为 67.4°C,并且它以 50nM 浓度包括于该测试中。因为在混合物中的两个添加物共用共同链,所以链浓度对于顶部/中间/底链为 50/600/550。

[0915] LATE-PCR 反应混合物在 25 μ l 体积中包括 1x PCR 缓冲液、250nM dNTP、3mM $MgCl_2$ 、0.24x SYBR Green、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、人类线粒体 DNA 的 1000 个拷贝、

和 2.5 个单位的 TFi(-)DNA 聚合酶、抗体 - 结合 5' 核酸外切酶 (-) 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad CA)。进行了六个测定,其中反应混合物中的添加物和限制性引物如下:

[0916] (1) 无添加物,去尾限制性引物 (SEQ ID No. 80)

[0917] (2) 无添加物,加尾限制性引物 (SEQ ID No. 133)

[0918] (3) 600nM 浓度的添加物 EP047,去尾限制性引物

[0919] (4) 600nM 浓度的添加物 EP047,加尾引物

[0920] (5) 链浓度为 50/600/550 的三链添加物混合物 EP043,去尾引物

[0921] (6) 链浓度为 50/600/550 的三链添加物混合物 EP043,加尾引物

[0922] 按以下条件扩增六个反应混合物:95℃下 3 分钟,然后 95℃/5s、58℃/20s 和 68℃/2m 的 65 个循环。然后,进行产物的解链分析,45℃下开始,30s 间隔递增 1℃到 95℃。通过使用 SYBR Green,监测 PCR 扩增以及解链分析。

[0923] 对于无添加物的反应,产物进化导致 T_m 高于所需产物 T_m 的扩增子,无论使用哪种限制性引物。在反应混合物中包括添加物 EP047 通过若干扩增循环延迟了可检测的产物进化的发生,并且导致扩增产物的一部分为正确产物。用添加物 EP047,使用加尾引物比使用去尾引物制备更多正确产物。添加物 EP047 具有基于其 59.1℃的未修饰链的计算 T_m 。在反应混合物中包括添加物 EP043 也延迟了可检测产物进化的发生,并且导致最多正确产物生成。用添加物 EP043,使用加尾引物比使用去尾引物制备更正确产物。添加物 EP043 为混合物,具有基于 67.4℃和 59.1℃的未修饰链的计算 T_m 。

[0924] 具有添加物 EP043、加尾限制性引物和去尾限制性引物的六个重复的实时动力学曲线示于图 15A 中。在图 15A 中,圆圈 151(灰线)标识具有去尾引物的三个重复的曲线,圆圈 152(黑线)标识具有加尾引物的重复的曲线。图 15B 中示出具有添加物 EP043 的 6 种扩增产物的解链曲线,其中朝下的箭头指示正确双链 DNA 产物的解链温度(86℃)。在图 15B 中,圆圈 153 标示去尾引物的一个重复,示出图 15A 中无产物进化(平稳段)的正确峰,圆圈 154 标示加尾引物的两个重复,也示出图 15A 中无产物进化(平稳段)。

[0925] 实施例 14: 作为用于抑制引导错误的引物的添加物

[0926] 引物(其为添加物)为双链寡核苷酸,其中一个链为具有可延伸 3' 端的扩增引物。其 5' 端具有修饰物取代基。我们称为反向互补序列的另一链具有两个修饰物取代基,并且其 3' 端为不可延伸的。因为该实施例的扩增测定为 LATE-PCR 测定,其中限制性引物以十分低的浓度包括于反应混合物中,所以仅过剩引物制备了添加物。当杂交到和延伸于其靶链上时,具有游离 3' 端的链用作扩增引物,并且当杂交到修饰的的互补链时,其用作引导错误的抑制剂。在该实施例中,引物 - 反向互补序列添加物具有三个末端的 Dabcyl 修饰物。引物链通过修饰基团(此处为 Dabcyl 基)与其 5' 末端的核苷酸的共价键来修饰。反向互补序列通过修饰基团(此处为 Dabcyl 基)的与每个 5' 和 3' 端共价键来修饰。引物链的反向互补序列的 T_m 被设计成 5-30℃,优选 15-25℃,低于扩增靶序列的引物链的 T_m 。为实现 T_m 的差异,通过使反向互补序列部分缩短或在一个或多个核苷酸上错配,可以使其互补于引物链。在该实施例中,包括了若干错配核苷酸。在具有不止一对引物的多重反应中,至少一个引物被转变为其对应部分互补的反向互补序列的添加物。在单重和多重反应中,所述至少一个寡核苷酸的浓度被经验性滴定和最佳化以实现引导错误抑制以及最低重复反应间发散。通常,所述最佳浓度接近双链添加物的浓度,所述双链添加物并非是被加入

相同反应以抑制引导错误的引物。如所属领域技术人员将理解,使用添加物引物的反应可以进一步用非引物添加物补充,条件是后者不与前者交叉杂交。

[0927] 使用以下序列一式三份地进行 LATE-PCR 反应:

[0928] 限制性引物 5' TCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTA

[0929] (SEQ ID No. 132)

[0930] 过剩引物 5' Dabcy1 AGTTCACCCTCTAAATCACCACGAT

[0931] (SEQ ID No. 133)

[0932] 反向互补序列 5' Dabcy1 ATCGTTGTGGTATAGAGGGTGAAC-T-Dabcy1

[0933] (SEQ ID No. 134)

[0934] 靶标

[0935] 5' AGTTCACCCTCTAAATCACCACGATCAAAAGGAACAAGC

[0936] ATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCA

[0937] CACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAAC

[0938] GAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCG

[0939] TGCCAGCCACCGCGGTACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAGC

[0940] CGGCGTAAAGAGTGTTTTAGATCACCCCTCCCAATAAAGCTA

[0941] AAACCTCACCTGAGTTGTAAAAAACTCCAGTTGACACAAAATAGA

[0942] CTACGAAAGTGCTTTAACATATCTGAACACACAATAGCTAAGA

[0943] CCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACCT

[0944] CAACAGTTAAATCAACAAAACTGCTCGCCAGAACACTACGAGC

[0945] CACAGCTTAAAACTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTC

[0946] TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAACCCCGATCAACCTCAC

[0947] CACCTCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAAACCTGA

[0948] TGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAGTACCCACGTAAAGACGTTAG

[0949] GTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTC

[0950] TACCCAGAAAACTACGATAGCCCTTATGAACTTAAGGGTCGA

[0951] AGGTGGATTTAGCAGTAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAAC

[0952] AGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGT

[0953] ATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAAACCCCTACGCATTTATATA

[0954] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGACTGG

[0955] (SEQ ID No. 135)

[0956] 在由以下组成的 25 μ l 体积中进行 LATE-PCR 扩增:1X PlatinumTfi(-) 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBR Green(Invitrogen, Carlsbad, CA)、2.5 单位的 Platinum Tfi(-)DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及来自人类基因组 DNA 的大约 1000 个基因组。产生添加物的反向补体的浓度为 100nM、200nM 和 300nM。在此情况下,我们通过将错配引入反向互补链(错配核苷酸标有下划线),相对于引物-靶标杂交物降低了引物-反向互补杂交物的 T_m 。

[0957] 这些反应的热曲线条件如下:95°C 下 3 分钟,然后 95°C /5s-58°C /20s-68°C /2m 的 60 个循环,然后 45°C /45s 下开始解链,1°C 递增,持续 51 个循环。在热循环的延伸期期间

(68℃) 实时分析所有反应。使用双链 DNA 产物的 SYBR Green 荧光(解链曲线分析)的第一衍生物,在 60 个循环结束时分析扩增产物。

[0958] 解链曲线示于图 16A-16D 中。图 16A 为无反向互补序列的三个重复的解链曲线。曲线 161 表明,在不存在互补寡核苷酸的情况下,三个反应中仅一个产生了解链温度为 86℃(箭头)的预期产物。图 16B 为包含 100nM 浓度的反向互补序列的三个重复的解链曲线。曲线 162 表明,三个反应中的两个产生预期产物。图 16C 和图 16D 分别为具有 200nM 和 300nM 浓度的反向互补序列的重复的解链曲线。曲线 163 和 164 表明,在每个组的反应中所有三个重复产生正确产物(如通过存在 86℃的解链峰判断)。

[0959] 实施例 15 :具有 RNA 靶标的引导错误

[0960] 该实施例描述了一系列 LATE-PCR 测定,其中起始靶序列为 RNA 而非 DNA,所以初始反应混合物包括逆转录酶,并且该方案包括初始孵育以在 cDNA 扩增之前将 RNA 转变为 cDNA。在此系列中所用的 RNA 是位于包含来自肠道病毒 RNA 的一部分 5' 未翻译区域(UTR)的肠道病毒装甲的 RNA(Enterovirus Armored RNA)(EV, Catalog#42050,来自 Asuragen, Austin, TX, USA) 之内的序列。样品包括用于 EV 以及脚部和口腔疾病病毒(FMDV)的引物对,但无 FMDV 靶标包括于该实施例中。然后,通过使用具有荧光团(Cal Red 610)和淬灭剂(Black Hole Quencher No. 2)的分子信标探针,实时进行扩增反应。所有组的所有反应均一式三份地进行,并且经由解链曲线分析在端点处分析产物。

[0961] 将若干添加物(包括混合物)与无添加物对照进行比较。EV 引物、EV 探针和添加物的序列如下:

[0962] EV 限制性引物 5' GACTTGCGCGTTACGACAGGCCAATC

[0963] (SEQ ID No. 136)

[0964] EV 过剩引物 5' TGAATGCGGCTAATCCCAAC(SEQ ID No. 137)

[0965] EV 探针 5' Cal Red 610-AACCACCTGCCCTT-BHQ2(SEQ ID No. 138)

[0966] 添加物 EP020. 5' Dabcy1 GAAATAAAATAAAAAATAAAATA Dabcy1

[0967] Dabcy1 CTTTATTTTATTTTATTTTAT Dabcy1 5'

[0968] (SEQ ID No. 12)

[0969] 添加物 EP010. 5' Dabcy1 GGTCAGATGAAAATGATACGTG Dabcy1

[0970] Dabcy1 CCAGTCTACTTTTACTATGCAC Dabcy1 5'

[0971] (SEQ ID No. 10)

[0972] 添加物 EP003. 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA Dabcy1

[0973] Dabcy1 CCTCGTTTTATCGTTACTCCAT Dabcy1 5'

[0974] (SEQ ID No. 25)

[0975] EV 装甲的 RNA(EVArmored RNA) 在 pH 8.3 的 10mM TRIS 中稀释到约 25,000 个粒子/微升并且在 75℃下加热 3 分钟以变性外壳蛋白和释放 RNA。RNA(每个样品 2 μl)与包含浓缩引物(每个样品 3 μl)的溶液混合,并且室温下孵育 5 分钟,然后加入浓缩试剂混合物来在每个样品 25 μl 的最终体积中得到以下浓度:3mM 氯化镁、400nM 每个脱氧核苷酸、500nM 每个探针、50nM 每个限制性引物、500nM 每个过剩引物、1X Tfi(exo-) 反应缓冲液、每个样品 2 单位 Tfi(exo-) 聚合酶(Invitrogen, Cat.No. 60684-050)、以及每个样品 100 单位的 SuperScriptIII 逆转录酶(Invitrogen, Cat.No. 18080-044)。EV RNA 为每个样品约

50,000 个拷贝。所包括的添加物的浓度如下：

[0976] 反应 A-2000nM 的添加物 EP020

[0977] 反应 B-200nM 的添加物 EP010

[0978] 反应 C-400nM 的添加物 EP003

[0979] 反应 D-400nM 的添加物 EP010 和 1000nM 的添加物 EP020

[0980] 反应 E-400nM 的添加物 EP003 和 1000nM 的添加物 EP020

[0981] 反应 F- 无添加物对照

[0982] 将样品放入 Stratagene MX3005P 热循环仪并孵育, 50℃ 下 6 分钟, 95℃ 下 1 分钟, 然后 95℃ /10s、64℃ /10s 和 68℃ /20s 的 25 个循环, 然后 95℃ /10s、64℃ /10s、68℃ /20s 和 50℃ /30s 的 35 个循环, 在 50℃ 下进行对探针的荧光检测。

[0983] 图 17A-17F 示出在循环 26-60 中的低温 (50℃) 检测步骤期间探针荧光的实时结果。在图 17A 中, 圆圈 171 为反应 A 的三个重复的曲线。在图 17B 中, 圆圈 172 为反应 B 的三个重复的曲线。在图 17C 中, 圆圈 173 为反应 C 的三个重复的曲线。在图 17D 中, 圆圈 174 为反应 D 的三个重复的曲线。在图 17E 中, 圆圈 175 为反应 E 的三个重复的曲线。在图 17F 中, 圆圈 176 为反应 F 的三个重复的曲线。

[0984] 圆圈 176 的曲线表明, 无添加物对照显示出 III 型引导错误 (严重产物进化), 由在后期扩增循环 (大概为循环 42-60) 中单链产物的减少所示。含有非常高浓度的低 T_m 添加物 (T_m 为 47.7℃, 稍微低于退火温度 16℃ 且低于低温检测温度 2.3℃) 的反应 A 的圆圈 171 的曲线, 示出抑制 I 型引导错误, 但仅部分抑制 III 型引导错误, 并且循环 60 附近重复间发散高。含有非常低浓度的具有稍微较高 T_m 的添加物 (T_m 为 60℃, 低于退火温度 4℃, 但高于低温检测温度) 的反应 B 的圆圈 172 的曲线完全抑制了 I 型引导错误并仅部分抑制了 III 型引导错误 (三个重复中的两个示出在循环 60 附近探针信号的一些降低), 但在循环 60 处显著减少了发散。反应 C、D、和 E (所有均含有添加物) 显示通过循环 60 时探针信号未降低。因为圆圈 174 的曲线示出具有高信号的 III 型引导错误抑制, 指示反应效率的最小限度降低, 所以判断反应 D 对这组反应来说为最佳。

[0985] 实施例 16 通过具有突出端的添加物直接定量测量对 I 型引导错误的抑制

[0986] 此处报道的测定如实施例 9 中所述那样进行, 具有以下不同: (a) Taq 聚合酶抗体在 50℃ 孵育步骤期间存在于所有样品中; (b) 50℃ 孵育步骤历时 1 分钟。

[0987] 每个添加物包含相同的两个形成发夹的 34 核苷酸长的单链低聚物, 所述单链低聚物具有图 18C 中所示的低聚物 194、195 的结构, 其中 1 个、2 个、3 个或 4 个末端通过加入 Dabcyl 部分来修饰。所有其中 3' 端未被淬灭剂阻断的低聚物被磷酸酯 (P) 或三碳修饰物 (C₃) 阻断以阻止延伸。在每个单链低聚物的 5' 和 3' 端上的 6 个核苷酸是互补性的, 使得当这些端相互杂交时, 它们形成 6- 碱基对的茎和 22- 核苷酸的环结构。参照图 18C, 所述添加物的两个 22- 核苷酸环是互补的, 使得当相互杂交时形成添加物 196, 所述添加物 196 具有 22- 碱基对长的双链部分 197, 该部分具有四个非互补性单链 6- 碱基对长的末端 198、199、200、201。单链低聚物的序列并非随机指定, 而因设计中的固有互补性, 需要仔细考虑。该考虑为不允许低聚物在环接合的温度下形成其它结构, 尤其要阻止臂序列保持相互脱离以及未结合到任一寡核苷酸的任何互补环序列。这些添加物序列有能力在一温度范围内维持于预定构象。

[0988] 在其中一个或两个组分寡核苷酸链有能力形成茎-环结构(参见图 18B、18C) 的情况下,希望所述茎的解链温度(T_m) 高于添加物的双链的解链温度,但又不太高以致于阻止在反应温度降低时的适当时间形成添加物的双链构象。在这种情况下,添加物的双链部分的计算 T_m 为 59°C , 并且茎核苷酸的计算 T_m 为 65°C 。这些计算是根据 50°C 下 70mM Na^+ 、 3mM Mg^{++} 的试剂浓度得出。对于双链部分,使用了网站 (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php>), 而对于茎,使用了网站 (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>)。在实行过程中,实际 T_m 取决于相互作用的 Dabcy1 的数目并且可从计算 T_m 提高大约 4°C 。

[0989] 使用了以下添加物,并且互补性序列标有下划线。

[0990] 添加物 SL02.

[0991] 5' GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC(P)

[0992] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC

[0993] (SEQ ID No. 139)

[0994] 添加物 SL03.

[0995] 5' GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC(P)

[0996] 3' (P)GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC Dabcy1

[0997] (SEQ ID No. 140)

[0998] 添加物 SL04.

[0999] 5' Dabcy1 GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC(P)

[1000] 3' (P)GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC Dabcy1

[1001] (SEQ ID No. 141)

[1002] 添加物 SL05.

[1003] 5' GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC Dabcy1

[1004] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC

[1005] (SEQ ID No. 142)

[1006] 添加物 SL06.

[1007] 5' Dabcy1 GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC(P)

[1008] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC

[1009] (SEQ ID No. 143)

[1010] 添加物 SL07.

[1011] 5' Dabcy1 GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC Dabcy1

[1012] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC

[1013] (SEQ ID No. 144)

[1014] 添加物 SL08.

[1015] 5' Dabcy1 GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC(C3)

[1016] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC Dabcy1

[1017] (SEQ ID No. 145)

[1018] 添加物 SL09.

[1019] 5' Dabcy1 GCGCCTCACGTATCATTTTCATCTGACCAGGCGC Dabcy1

[1020] 3' Dabcy1 GCCTCCGTGCATAGTAAAAGTAGACTGGGGAGGC Dabcy1

[1021] (SEQ ID No. 146)

[1022] 每个反应在 25 μ l 体积中一式三份地进行。最终反应混合物含有 1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.25 单位的 Taq DNA 聚合酶和 Taq DNA 聚合酶抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。单独的反应混合物含有 300nM 的每种添加物和不含添加物。在混合了反应成分的各自组合之后和在 50°C 下等温孵育之前,所有反应都具有以大约 100,000 个拷贝加入的重叠寡核苷酸 1 和 2 (实施例 9)。

[1023] 这些反应的热曲线条件如下:50°C 下 1 分钟,然后冰上孵育,然后添加引物到所有反应混合物以达到 50nM 限制性引物和 1 μ M 过剩引物的最终浓度。此后,迅速加热到 95°C 历时 3 分钟,然后在 98°C /10s 和 72°C /40s 下的 50 个循环。每个样品通过 SYBR Green 荧光实时分析,并且在该测定结束时,均经受解链曲线分析以确认反应生成 88°C 的单一产物峰,如对扩增反应的双链产物所预期。

[1024] 添加物 SL04、SL07、SL08 和 SL09 的解链曲线分析示于图 19A-19D 中。各图中圆圈 210 标识的线条为具有 Taq DNA 聚合酶-加-抗体的样品的重复。圆圈 211、212、213 和 214 标识的线条分别为具有添加物 SL04、SL07、SL08 和 SL09 的重复。

[1025] 结果 (参见图 19A) 确认抗体 (圆圈 210) 未减轻引导错误,因为存在两个峰,一低解链峰 (即,不正确产物,85°C),且正确产物在较高峰 (88°C)。添加物 SL04、SL05、SL07 和 SL08 的结果表明,每个添加物极大降低了不正确产物的量但未完全抑制它。图 19D 示出添加物 SL09,其具有 4 个 Dabcy1,能够完全抑制不正确产物的产生。

[1026] 实施例 17. 具有突出端的添加物的 II 型引导错误和聚合酶选择性

[1027] 我们使用 200nM、400nM 和 600nM 浓度的添加物 SL06、SL07 和 SL09 (实施例 16) 进行了实施例 3 中所述的 LATE-PCR 测定。这些添加物分别包含两个、三个或四个 Dabcy1 修饰物。

[1028] 在由以下组成的 25 μ l 体积中一式三份地进行 LATE-PCR 扩增:1X Invitrogen PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM $MgCl_2$ 、250nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBRGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.25 单位 Platinum Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及大约 1000 个单链靶标 A (匹配的) 或 T (错配的)。这些反应的热曲线条件为:95°C 下 3 分钟,然后 95°C /5s-62°C /20s-72°C /30s 的 60 个循环。对于包含两个靶标的这个和其它测定,进行了对照扩增,使用过剩引物 (其完全互补于两个靶标) 和对照限制性引物 (其也完全互补于两个靶标) 以确保两个靶标的起始拷贝数相同,在此情况下,两个靶标的 C_T 相同。(如果对照扩增显示起始拷贝数不相同,则有两个选择:重新配制,或者,如果 C_T 差值轻微-如在本文报道的实施例中那样的情况,则矫正所观察 C_T 值以针对差值来调整。)

[1029] 选择性的结果 (ΔC_T 等于错配的靶标 C_T 减去匹配的靶标 C_T) 示于表 7 中。

[1030] 表 7

[1031]

添加物	浓度, nM	选择性, ΔC_T

SL06 (两个 Dabcy1)	200	1.3
	400	0.8
	600	3.2
SL07 (三个 Dabcy1)	200	0.8
	400	2.4
	600	2.6
SL09 (四个 Dabcy1)	200	2.8
	400	4.2
	600	6.8

[1032] 实施例 18. 通过具有突出端的添加物的抑制引物依赖性 5' 核酸外切酶活性

[1033] 我们如实施例 6 中详细描述那样进行了 LATE-PCR 测定,以使用具有图 18C 所示类型的单链突出端的添加物确定 DNA Taq 聚合酶的引物依赖性 5' 核酸外切酶活性的抑制功效。

[1034] 振荡反应在由以下组成的 25 μ l 体积中进行:1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM MgCl₂、200nM dNTP、1.25 单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、200nM 探针 (实施例 6) 和 100nM 靶标 (实施例 6)。在未与任何添加物的情况下和在 200nM、400nM、和 600nM 浓度的每个添加物的情况下,使用该反应混合物。当在反应混合物中仅有寡核苷酸时,用探针进行对照反应。添加物 (参见实施例 16) 包括:SL06,其具有两个 Dabcy1;SL07,其具有 3 个 Dabcy1;和 SL09,其具有 4 个 Dabcy1。使用以下热曲线来振荡反应混合物:45°C /20s,60°C /10s,45 个循环,然后 45°C /30s 开始解链,并且以 1°C 递增持续 25 个循环。在循环期间,在热曲线的 60°C /10s 区段期间获得 FAM 荧光。

[1035] 核酸外切酶裂解活性从探针中分离探针荧光团,从而导致荧光 (FAM) 提高。添加物 SL06 的结果报道于图 20 中,其中圆圈 220 标识仅探针对照;圆圈 221 标识具有探针和靶标但无添加物的样品;圆圈 222 标识具有探针、靶标和 200nM 浓度的添加物 SL06 的样品;圆圈 223 标识具有探针、靶标和 400nM 浓度的添加物 SL06 的样品;并且圆圈 224 标识具有探针、靶标和 600nM 浓度的添加物 SL06 的样品。

[1036] 实施例 19. 使用阻断物来产生 3' 端错配

[1037] 上述实施例 4 显示在针对靶序列的 LATE-PCR 扩增中,添加物混合物对 II 型引导错误和聚合酶选择性的效果,该靶序列完全互补于限制性引物,相对于在限制性引物的 3' 端核苷酸上包含单个碱基对错配的错配靶标。本实施例显示使用寡核苷酸 (称为“阻断物”) 来阻止限制性引物 3' 端杂交到靶标,其在错配核苷酸或核苷酸在限制性引物结合位点下游时,被认为是错配靶标 (即,选择所针对的靶标)。此类测定的靶标、引物和阻断物总

体性示于图 21A、图 21B 中。

[1038] 使用完全互补于双链第一靶标的链且也完全互补于双链第二靶标的链的限制性引物和过剩引物,进行了 LATE-PCR 扩增。希望第二靶标相对于第一靶标被选择性扩增。第二靶标含有两个与第一靶标的碱基对差异。第一碱基对差异在限制性引物结合位点的下游,并且包括于用于产生 3' 端错配的阻断物寡核苷酸的结合位点中。第二碱基对差异在限制性引物结合位点和阻断物结合位点的下游,以及过剩引物结合位点的下游,并且用于探测。阻断物结合位点在限制性引物的 3' 端重叠限制性引物结合位点,如图 21A 中所示。

[1039] 用于 LATE-PCR 测定的阻断物是等位基因特异性的,从而,由于靶标间的第一碱基对差异,其优选杂交到限制性引物杂交的第一靶链(参见图 21A)而不是第二靶标(参见图 21B)。阻断物的 5' 端和限制性引物的 3' 端均互补于第一靶链上的相同碱基,但所述链的阻断物的解链温度 $T_m(B)$ 较高,使得其可首先在扩增期间反应温度降低时结合,从而阻止引物 3' 端杂交到第一靶标,产生与完全互补引物的 3' 端错配。阻断物的 3' 端被自身阻断以阻止在扩增期间延伸。在此情况下,阻断物用荧光团 (Cal Orange 560) 在其 5' 端上和 Dabcyl 淬灭剂在其 3' 端上双重标记。

[1040] LATE-PCR 测定还含有等位基因特异性探针,在比杂交到由所述第二靶标产生的过剩引物链时的 $T_m(P2)$ 更高的解链温度 $T_m(P1)$ 下,其杂交到由所述第一靶标产生的过剩引物链(达到产生此类链的程度)。在此情况下,探针为分子信标探针,在 5' 端上用 Black Hole Quencher 2(BHQ2) 标记并在 3' 端上用荧光团 (Quasar 670) 标记。

[1041] 限制性引物、等位基因特异性阻断物和等位基因特异性探针与所述第一和第二靶标的结合一般性示于图 21A 和 21B 中。为有效阻断限制性引物的结合和延伸,阻断物必须与引物的 3' 端重叠至少一个核苷酸的。阻断物 5' 端不用必须完美匹配于靶标,只要阻断物比限制性引物在更高温度结合即可。

[1042] 反应成分和反应条件如下:

[1043] 限制性引物:5' GCACTCTTGCCTACGCC(SEQ ID NO. 147)

[1044] 过剩引物:5' CTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO. 148)

[1045] 等位基因特异性阻断物:

[1046] 5' Cal Org 560-GCCTACGCCACCAGCTCC-Dabcyl(SEQ ID NO. 149)

[1047] 分子信标探针:5' BHQ2-CAAGAACATGTCACACATAATG-Quasar

[1048] 670(SEQ ID NO. 150)

[1049] 所述第一靶标的过剩引物链:

[1050] 5' CTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAACCTTATGTGTGACAT

[1051] GTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGC

[1052] TGAAAATGA

[1053] CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAA

[1054] GAGTGC(SEQ ID NO. 151)

[1055] 所述第二靶标的过剩引物链(第一碱基对变化,其为阻断物结合位点的变化,被标示下划线;第二碱基对变化,其为探针结合位点的变化,被标示加粗):

[1056] 5' CTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAACCTTATGTGT **C** ACAT

[1057] GTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCT

[1058] GAAAATGA

[1059] CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAG

[1060] AGTGC

[1061] (SEQ ID NO. 152)

[1062] LATE-PCR 扩增在由以下组成的 25 μ l 体积中进行:1X PCR 缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3mM MgCl₂、200nM dNTP、50nM 限制性引物、1000nM 过剩引物、0.24X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、200nM 探针、2 单位 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 该聚合酶具有不同浓度的质粒 DNA (Epoch Biolabs, Inc, SugarLand, TX), 其提供在 10⁰到 10⁶范围内的起始拷贝数, 经系列稀释获得。在存在或不存在 500nM 阻断物以及无添加物或具有其链浓度 (顶部 / 中间 / 底部) 为 33.3nM、200nM 和 166.7nM 的添加物 EP043 (实施例 4) 下, 针对各条件, 一式两份地进行扩增反应。

[1063] 这些反应的热曲线条件如下:95℃ 下 3 分钟, 然后 95℃ /10s、70℃ /30s、62℃ /10s、72℃ /20s 的 70 个循环, 然后 30℃ 下开始解链, 30s 间隔递增 1℃ 到 90℃。SYBR Green 信号是在所有 PCR 循环的引物延伸部分期间实时检测, 并且测定了 C_T值。当一式两份地进行测定时, 平均在各浓度靶标下的两个 C_T值。图 22A 示出 C_T值作为在无阻断物、具有和不具有 EP043 添加物的情况下进行的测定的靶标浓度的函数。图 22B 示出 C_T值作为在无阻断物、具有和不具有添加物的情况下进行的测定的靶标浓度的函数。

[1064] 转到图 22A, 被填充的方形为在各种起始靶标量 (拷贝数)、无阻断物和无添加物的情况下具有第一靶标 (通过操作阻断物来判别) 的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 250 连接; 并且经填充的三角形为具有第二靶标 (将优选扩增, 因为其错配于阻断物)、无阻断物和无添加物的样品的 C_T, 并且 C_T值通过线条 251 链接。同样在图 22A 中, 空心方形为具有第一靶标和添加物但无阻断物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 252 连接; 并且空心三角形为具有第一靶标和添加物但无阻断物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 253 连接。

[1065] 转到图 22B, 经填充的方形为具有第一靶标和阻断物但无添加物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 254 (其经推断到低拷贝数) 连接; 并且空心方形为具有第二靶标和阻断物但无添加物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 255 (其经推断到低拷贝数) 连接。同样在图 22B 中, 经填充的圆圈为具有第一靶标、阻断物和添加物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 256 (其经推断) 连接; 并且空心圆圈为具有第二靶标、阻断物和添加物的样品的 C_T值, 并且 C_T值通过线条 257 (其经推断) 连接。

[1066] 在缺少添加物 (在这种情况下为添加物 EP043) 情况下, 针对所产生的 3' 端错配的选择性为在第一浓度下所述第一靶标的扩增的信号阈值循环 (C_T) 与在所述第一浓度下所述第二靶标的扩增的信号 C_T 之间的差值, 并且被指定为 ΔC_{TB} 。由于添加物 EP043 所致的选择性为双 -C_T 差值, 指定为 ($\Delta \Delta C_T$), 计算为 $\Delta C_{TA} - \Delta C_{TB}$, 其中 ΔC_{TA} 在第二浓度下在存在添加物和阻断物的情况下被测量为在所述第一靶标与所述第二靶标之间的 C_T 值的差值, 其中所述第二靶标的 C_T 值对于仅包含所述第一浓度的阻断物的反应和包含所述第二浓度的阻断物和添加物的反应是相同的。

[1067] 图 22A 示出, 在没有阻断物情况下, 对于任何靶标不存在任何选择性, 如我们所期望, 由于缺乏在限制性引物与任何靶标之间的 3' 端错配所致。数据表明, 在无添加物 EP043 的情况下, 测定是高效的, 因为线 250 和 251 均具有约 3.5 的斜率。然而, 在添加物 EP043 的

情况下,线 252 和 253 的斜率均为约 3.9,从而表明 EP043 降低针对两个靶标的 PCR 扩增。

[1068] 对于添加物对选择性的效果,转到图 22B。在具有等位基因特异性阻断物但无添加物的情况下,向所述第一靶标产生了限制性引物的错配 3' 端,第一靶标提供第一选择性,示为所述第一靶标的 C_T 与所述第二靶标的 C_T 之间的 ΔC_T 。如线条 254、255 所示, ΔC_T 为靶标浓度的函数。在阻断物和添加物 EP043 情况下,存在由于添加物所致的另一选择性。因为 EP043 对 PCR 扩增反应的抑制,在存在 EP043 情况下第一靶标和第二靶标间的 C_T 差值实际包括两个因素:1) 混合了由于 EP043 所致选择性的由于等位基因特异性阻断物所致的选择性;和 2) 由于 PCR 的 EP043 抑制所致的效率渐进降低。

[1069] 为判别和定量这两个因素的作用,我们用图 22B 的信息进行以下操作。在某靶标浓度(拷贝数)下,具有第二靶标、阻断物和添加物的样品的 C_T 具有线条 257 上的 A 点的值,并且具有第一靶标、阻断物和添加物的样品的 C_T 具有线 256 上的 D 点的值。这些 C_T 值分别为 35 和 62,提供样品 27 的 ΔC_{TA} 。然而,A 点的 C_T 值为线条 255 上的 B 点的 C_T 值(相同靶标,即,第二靶标,无添加物 EP043)。因为其对扩增的抑制,在存在 EP043 情况下,B 点的第二靶标的浓度为有效靶标浓度。在 B 点的浓度下, ΔC_{TB} 为区段 BC,其为 17。无添加物 EP043 情况下,所述第一靶标和所述第二靶标之间的该选择性是由等位基因特异性阻断物所致。为去除 ΔC_{TA} 的添加物 EP043 的抑制效果,从靶标的所述第二浓度下的 ΔC_{TA} (27) 上减去在靶标的所述第一浓度下的 ΔC_{TB} (17)。得到等于 10 的 $\Delta \Delta CT$ 。等于 10 的 $\Delta \Delta CT$ 为在 A 点的靶标浓度下存在诱导 -II 型引导错误的情况下添加物 EP043 的选择性效果。如从图 22B 可见,添加物 EP043 的选择性效果的大小取决于靶标浓度,因为线条 254、255、256、257 不相互平行。靶标浓度越低,添加物的选择性效果越大。情况就是如此,因为需要更多热循环来检测产物。

[1070] 实施例 20. 在扩增之前在冰上抑制 I 型引导错误

[1071] 此处报道的测定如实施例 9 中所述那样进行,具有以下不同:(a) 50°C 下孵育步骤历时 1 分钟;(b) 扩增循环的次数减少至 50;(c) 实施例 10 中所述,EP010 用作添加物;(d) 添加物的浓度为 300nM。

[1072] 在这些扩增反应中产生的双链产物的 SYBR Green 荧光示于图 23A 中,其中圆圈 260 标识仅具有 Taq DNA 聚合酶的样品的重复,圆圈 261 标识具有 Taq DNA 聚合酶和等温延伸步骤后立即加入的抗体的样品的重复,圆圈 262 标识具有在等温延伸步骤期间存在的 TaqDNA 聚合酶-加-抗体的样品的重复。

[1073] 图 23A 示出抗体对重叠寡核苷酸延伸的效果。无任何抗体的重复样品(圆圈 260)的 C_T 值为 22,因此,重叠模板的延伸是有效的。相比之下,重叠模板的延伸被充分抑制,当在 50°C 孵育步骤(圆圈 262)之前加入抗体。当抗体加入被延迟直到 50°C 孵育结束(圆圈 261)时, C_T 比在无抗体情况下(圆圈 260)更高。这意味着,大多数但非所有的可能的重叠模板在 50°C 下 1-分钟孵育期间被延伸。另外的重叠模板在随后的冰上孵育期间被延伸。

[1074] 图 23B 示出添加物 EP010 对重叠寡核苷酸的延伸的效果。具有 EP10 的重复(圆圈 263)在 50°C 下孵育之前或在 50°C 下孵育之后接收添加物 EP010。当在孵育步骤之前或之后加入 EP010 时,结果(组合为圆圈 263)表明无扩增差异。这说明 EP010 在孵育期间 50°C 步骤处未抑制聚合化。然而,相比在 50°C 步骤结束时接收抗体的 C_T 重复(圆圈 261),该 C_T 值稍微更高。这说明,添加物 EP010 的加入在冰上抑制重叠寡核苷酸延伸的方面比抗

体更有效。

[1075] 图 23C 示出在具有仅 Taq DNA 聚合酶的重复中（圆圈 264）和在延伸步骤后立即加入的 Taq DNA 聚合酶和抗体的重复中（圆圈 265）产生的双链产物的 SYBR Green 解链曲线。图 23D 示出在延伸步骤期间在具有 Taq DNA 聚合酶 - 加 - 抗体的重复中产生的双链产物的 SYBRGreen 解链曲线（圆圈 266）。图 23E 示出在 50℃ 下孵育之前（圆圈 267）或在 50℃ 下孵育之后（圆圈 268, 仅两个重复, 一个丢失）接收添加物 EP010 的重复中产生的双链产物的 SYBR Green 解链曲线（圆圈 267）。

[1076] 图 23C 说明, 完全省略抗体（圆圈 264）或在 50℃ 下孵育模板期间省略抗体（圆圈 265）导致相当清洁的在 88℃ 解链的产物的延伸和随后扩增。图 23D 说明, 相比之下, 在 50℃ 下孵育期间包括抗体（圆圈 266）导致在 88℃ 和 85℃ 具有峰的产物混合物。图 23E 说明, 50℃ 步骤之前或之后加入 EP010 添加物导致具有 88℃ 的急剧解链峰的清洁双链产物的扩增。图 23E 中的解链曲线还示出存在 67-71℃ 的小宽峰。该峰是由于解链双链形式的 EP010 所致。这表明, 双链形式在 72℃ 下不再存在, 在该温度下, 在这些反应的扩增期期间和在实施例 9 中进行延伸。相比之下, 实施例 9 所用添加物被发现具有高于 EP010 的解链峰（未示出）。

[1077] 上述特定实施方案不是穷举性的, 并且不应理解为限制权利要求。在不脱离本文所述概念的情况下, 可进行这些实施方案的各种修改。此类修改旨在落在权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> BRANDEIS UNIVERSITY

<120> 用于PCR的试剂和方法

<130> 038519-0465

<140> PCT/US2010/027011

<141> 2010-03-11

<150> 61/202,565

<151> 2009-03-19

<160> 165

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"

<400> 1

cctggattat gcctggcacc at

22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"

<400> 2

ccttgatgac gcttctgtat cta

23

<210> 3

<211> 84

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"

<400> 3

[0002]

cctggattat gcctggcacc attaaagaaa atatcatctt tgggtgtttcc tatgatgaat 60

atagatacag aagcgtcatc aaag 84

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 4

cacgacctcg ccgacc 16

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 5

cacgacctcg ctgacc 16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 6

cacgacctcg ctgacc 16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

[0003]

<400> 7 cacgacctcg ctgacc	16
<210> 8 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 8 cacgacctcg ctgacc	16
<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 9 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 10 ggtcagatga aaatgatacg tg	22
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 11	
[0004]	

ggtcagatga aaatgatacg tg	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 12	
gaaataaaaat aaaaataaaa ta	22
<210> 13	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 13	
cagccggc	8
<210> 14	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 14	
ccgccggc	8
<210> 15	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 15	
gcgtacgcag g	11

[0005]

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

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 16
gcgtacgaag g 11

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 17
ggagcaaaat agcaatgagg ta 22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 18
tgagagatga aaatgatcga gt 22

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 19
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

[0006]

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 20
 aaattgcgtc attgtttcac agggcca

27

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 21
 aatctgggtg gtggtcatac

20

<210> 22
 <211> 192
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶多核苷酸"

<400> 22
 aatctgggtg gtggtcatac aggtcatcac tgtaaaattc tttgaacttt tctgtatata
 tctttgaaaa ttttgaaaa aaaatgttgg aaaacttaaa aggctgttgc tttgctcata
 ttggcggtac atatacaaaa gtggaaagga tgagattgat tggcatggcc ctgtgaaaca
 atgacgcaat tt

60

120

180

192

<210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的"

[0007]

寡核苷酸”

<400> 23 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 24 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 24 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 25 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 25 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 26 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 26 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 27 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
[0008]	

<400> 27 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 28 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 28 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 29 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 29 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 30 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 30 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 31 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

[0009]

<400> 31 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 32 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 32 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 33 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 33 ggagcaaaat agcaatgagg ta	22
<210> 34 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 34 cgtaagatta caatggcagg ctccagt	27
<210> 35 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 35	
[0010]	

gcccaagttt tatcgttctt ctca	24
<210> 36	
<211> 95	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"	
<400> 36	
cgtaagatta caatggcagg ctccagaagg ttctaagtgc catgatacaa gcttcccaat	60
tactaagtat gctgagaaga acgataaaac ttggg	95
<210> 37	
<211> 98	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"	
<400> 37	
cgtaagatta caatggcagg ctccagtagg ttctaagtgc catgatacaa gcttcccaat	60
tactaagtat gctgagaaga acgataaaac ttgggcaa	98
<210> 38	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 38	
cacgacctcg ctgacc	16
<210> 39	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的	
[0011]	

寡核苷酸”

<400> 39
cacgacctcg ctgacc 16

<210> 40
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 40
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 41
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

<400> 42
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的寡核苷酸”

[0012]

<400> 43
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 44
cctcgtctga tcgtgactcc at 22

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 45
cctcgtctga tcgtgactcc at 22

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 46
cctcgtctga tcgtgactcc at 22

<210> 47
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

[0013]

<400> 47 cctcgtctga tcgtgactcc at	22
<210> 48 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 48 ggagcagact agcactgagg ta	22
<210> 49 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 49 ggagcagact agcactgagg ta	22
<210> 50 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 50 tgtcatcttc tgtcccttcc cagaaa	26
<210> 51 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 51	
[0014]	

actgtcccag aatgcaagaa gccagacg 29

<210> 52
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
探针"

<400> 52
ccgtagctgc cctgg 15

<210> 53
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 53
gcacagttac agtattccag cagactca 28

<210> 54
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 54
tcagtggtagg cagtggtagt ggtggc 26

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
探针"

<400> 55
tcagtggtagg cagtggtaga 20

[0015]

<210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 56
ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 57
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的探针"

<400> 57
ccatgataca agcttcc 17

<210> 58
<211> 41
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知物的描述：靶多核苷酸"

<400> 58
acttagtaat tgggaagctt gtatcatggc acttagaacc t 41

<210> 59
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 59
cgcgcggtca ggcatatagg ataccgggac agacgccgcg 40

[0016]

<210> 60
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 60
 ggtcagatga aaatgatacg tg 22

<210> 61
 <211> 549
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶多核苷酸"

<400> 61
 gcccgagcg aggagagtag cactcttggtg cgggatattg atttcacgga ggatggtggt 60
 caagggaccc ctatctgagg ggggtcatcc atggggacga gaagggattt gactgtaatg 120
 tgctatgtac ggtaaattggc ttatgtact atgtactgtt aagggtgggt aggtttgttg 180
 gtatcctagt gggtaggggg tggctttgga gttgcagttg atgtgtgata gttgagggtt 240
 gattgctgta cttgcttgta agcatgggga gggggttttg atgtggattg ggtttttatg 300
 tactacaggt ggtcaagtat ttatggtacc gtacaatatt catggtggct ggcagtaatg 360
 tacgaaatac atagcggttg ttgatgggtg agtcaatact tgggtggtac ccaaattctgc 420
 ttcccatga aagaacagag aatagtttaa attagaatct tagctttggg tgctaattgt 480
 ggagttaaag actttttctc tgatttgtcc ttggaaaaag gttttcatct ccggtttaca 540
 agactggtg 549

<210> 62
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

[0017]

<400> 62 gcccggagcg aggagagtag cactcttg	28
<210> 63 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 63 caccagtctt gtaaaccgga gatgaa	26
<210> 64 <211> 525 <212> DNA <213> 未知	
<220> <221> 来源 <223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"	
<400> 64 acaggtctat caccctatta accactcacg ggagctctcc atgcatttgg tatttttcgtc tggggggtat gcacgcgata gcattgcgag acgctggagc cggagcacc tatgtcgcag tatctgtctt tgattcctgc ctcatcctat ttttatcgc acctacgttc aatattacag gcgaacatac ttactaaagt gtgttaatta attaatgctt gtaggacata ataataacaa ttgaatgtct gcacagccac tttccacaca gacatcataa caaaaaattt ccaccaaacc ccccctcccc cgttcttggc cacagcactt aaacacatct ctgccaaacc ccaaaaacaa agaaccctaa caccagccta accagatttc aaattttatc ttttggcggt atgcactttt aacagtcacc ccccaactaa cacattattt tcccctccca ctcccatact actaatctca tcaatacaac ccccgcccat cctaccagc acacacacac cgctg	60 120 180 240 300 360 420 480 525
<210> 65 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	

[0018]

<400> 65 agcgggtgtgt gtgtgctggg taggat	26
<210> 66 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 引物"	
<400> 66 acaggtctat caccctatta accactca	28
<210> 67 <211> 634 <212> DNA <213> 未知	
<220> <221> 来源 <223> /注释="未知物的描述: 靶 多核苷酸"	
<400> 67 aggttgcggt ctgttagtag tatagtgatg ccagcagcta ggactgggag agataggaga	60
agtaggactg ctgtgattag gacggatcag acgaagaggg gcgtttggta ttgggttatg	120
gcaggggggtt ttatattgat aattgtttgtg atgaaattga tggcccctaa gatagaggag	180
acacctgcta ggtgtaagga gaagatggtt aggtctacgg aggctccagg gtgggagtag	240
ttccctgcta agggagggta gactgttcaa cctgttctg ctccggcctc cactatagca	300
gatgcgagca ggagtaggag agaggagagt aagagtcaga agcttatgtt gtttatgcgg	360
ggaaacgcca tatcgggggc accgattatt aggggaacta gtcagttgcc aaagcctccg	420
attatgatgg gtattactat gaagaagatt attacaaatg catgggctgt gacgataacg	480
ttgtagatgt ggtcgttacc tagaagggtg cctggctggc ccagctcggc tcgaataagg	540
aggcttagag ctgtgcctag gactccagct catgcgccga ataataggta tagtgttcca	600
atgtctttgt ggtttgtaga gaatagtcaa cggt	634
<210> 68 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	

[0019]

<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	68	
	aggttgcggt ctgttagtag tatagtgatg ccagca	36
<210>	69	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	69	
	accgttgact attctctaca aaccaca	27
<210>	70	
<211>	731	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="未知物的描述：靶多核苷酸"	
<400>	70	
	atggagggtt cttctactat taggactttt cgcttcgaag cgaaggcttc tcaaatacatg	60
	aaaattatta atattactgc tgtagagaa atgaatgagc ctacagatga taggatgttt	120
	catgtggtgt atgcatcggg gtagtccgag taacgtcggg gcattccgga taggccgaga	180
	aagtgttgtg ggaagaaagt tagattttacg ccgatgaata tgatagtga atggattttg	240
	gcgtaggttt ggtctagggt gtagcctgag aataggggaa atcagtgaat gaagcctcct	300
	atgatggcaa atacagctcc tattgatagg acatagtga agtgggctac aacgtagtac	360
	gtgtcgtgta gtacgatgtc tagtgatgag tttgctaata caatgccagt caggccacct	420
	acggtgaaaa gaaagatgaa tcctagggt cagagcactg cagcagatca tttcatattg	480
	cttccgtgga gtgtggcgag tcagctaaat actttgacgc cggtggggat agcgatgatt	540
	atggtagcgg aggtgaaata tgctcgtgtg tctacgtcta ttcctactgt aaatatatgg	600
	tgtgctcaca cgataaacc taggaagcca attgatatca tagctcagac catacctatg	660
[0020]		

tatccaaatg gttctttttt tccggagtag taagttacaa tatgggagat tattccgaag	720
cctggtagga t	731
<210> 71	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 71	
atggagggtt cttctactat taggactttt cgct	34
<210> 72	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 72	
atcctaccag gcttcggaat aatctc	26
<210> 73	
<211> 586	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"	
<400> 73	
agggtaaata cgggccctat ttcaaagatt tttaggggaa ttaattctag gacgatgggc	60
atgaaactgt ggtttctcc acagatttca gagcattgac cgtagtatac ccccggtcgt	120
gtagcggtag aagtggtttg gtttagacgt ccgggaattg catctgtttt taagcctaata	180
gtggggacag ctcatgagtg caagacgtct tgtgatgtaa ttattatacg aatgggggct	240
tcaatcgga gtaactactcg attgtcaacg tcaaggagtc gcaggtcgcc tggttctagg	300
aataatgggg gaagtatgta ggagttgaag attagtccgc cgtagtcggt gtactcgtag	360
gttcagtacc attggtggcc aattgatttg atggttaagg agggatcggt gacctcgtct	420
[0021]	

gttatgtaaa ggatgcgtag ggatgggagg gcatgagga ctaggatgat ggcgggcagg	480
atagttcaga cggtttctat ttcttgagcg tctgagatgt tagtattagt tagttttgtt	540
gtgagtgtta ggaagggc atacaggact aggaagcaga taagga	586
<210> 74 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 74 agggtaaata cgggccctat ttcaaagatt tttagggga	39
<210> 75 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 75 tccttatctg cttcctagtc ctgtatgc	28
<210> 76 <211> 859 <212> DNA <213> 未知	
<220> <221> 来源 <223> /注释="未知物的描述: 靶多核苷酸"	
<400> 76 cctctaaatc accacgatca aaaggaacaa gcatcaagca cgcagcaatg cagctcaaaa	60
cgcttagcct agccacaccc ccacgggaaa cagcagtgat taacctttag caataaacga	120
aagttaaact aagctatact aaccccaggg ttggtcaatt tcgtgccagc caccggggtc	180
acacgattaa cccaagtcaa tagaagccgg cgtaaagagt gtttagatc accccctccc	240
caataaagct aaaactcacc tgagttgtaa aaaactccag ttgacacaaa atagactacg	300

[0022]

aaagtggcctt taacatatct gaacacacaa tagctaagac ccaaactggg attagatacc	360
ccactatgct tagccctaaa cctcaacagt taaatcaaca aaactgctcg ccagaacact	420
acgagccaca gcttaaaaact caaaggacct ggcggtgctt catatccctc tagaggagcc	480
tgtttctgtaa tcgataaacc ccgatcaacc tcaccacctc ttgctcagcc tatataccgc	540
catcttcagc aaaccctgat gaaggctaca aagtaagcgc aagtaccac gtaaagacgt	600
taggtcaagg ttagcccat gaggtggcaa gaaatgggct acattttcta cccagaaaa	660
ctacgatagc ctttatgaaa cttaagggtc gaagggtgat ttagcagtaa actaagagta	720
gagtgccttag ttgaacaggg ccctgaagcg cgtacacacc gcccgtcacc ctctcaagt	780
atacttcaaa ggacatttaa ctaaaacccc tacgcattta tatagaggag acaagtcgta	840
acatggtgaag tgtactgga	859

<210> 77
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 77 tccagtacac ttaccatgtt acgacttgtc tcctcta	37
--	----

<210> 78
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 78 cctctaaatc accacgatca aaaggaac	28
--	----

<210> 79
 <211> 447
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶

[0023]

多核苷酸”

<400> 79
 tgtgaggggtg ggactgtcta ctgagtagcc tcctcagatt cattgaacta ggtctgtccc 60
 aatgtatggg atggcggata gtaagtttgt aattactgtg gcccctcaga atgatatttg 120
 gcctcacggg aggacatagc ctatgaaggc tgttgctata gttgcaagca ggaggataat 180
 gccgatgttt caggtttctg agtagagaaa tgatccgtaa tataggcctc gcccgatgtg 240
 taggaagagg cagataaaga atattgaggc gccattggcg tgaaggtagc ggatgattca 300
 gccataattt acgtctcgag tgatgtgggc gattgatgaa aaggcggttg aggcgtctgg 360
 tgagtagtgc atggctagga atagtcctgt ggtgatttgg aggatcaggc aggcgccaaag 420
 gagtgagccg aagtttcatc atgcgga 447

<210> 80
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的引物”

<400> 80
 tgtgaggggtg ggactgtcta ctgagtagcc 30

<210> 81
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成的引物”

<400> 81
 tccgatgat gaaacttcgg ctc 23

<210> 82
 <211> 434
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“未知物的描述：靶多核苷酸”

[0024]

<400> 82
 actccacctc ctattcttgc acgaaacggg atcaaacaac cccctaggaa tcacctccca 60
 ttccgataaa atcaccttcc acccttacta cacaatcaaa gaggccctcg gcttacttct 120
 cttccttctc tccttaatga cattaacact attctcacca gacctcctag gcgaccaga 180
 caattatacc ctagccaacc ccttaaacad cctccccac atcaagcccg aatgatattt 240
 cctattcgcc tacacaattc tccgatccgt ccctaacaaa ctaggaggcg tccttgccct 300
 attactatcc atcctcatcc tagcaataat ccccatcctc catatatcca aacaacaaag 360
 cataatattt cgcccactaa gccaatcact ttattgactc ctagccgcag acctcctcat 420
 tctaacctga atcg 434

<210> 83
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的
 引物"

<400> 83
 cgattcaggt tagaatgagg aggtctgcgg ctag 34

<210> 84
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的
 引物"

<400> 84
 actccacctc ctattcttgc acga 24

<210> 85
 <211> 638
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶
 多核苷酸"

[0025]

<400> 85
 cataagaaca gggagggttag aagtagggtc ttggtgacaa aatatgttgt gtagagttca 60
 ggggagagtg cgtcatatgt tggtcctagg aagattgtag tggtgagggt gtttattata 120
 ataatgtttg tgtattcggc tatgaagaat agggcgaagg ggcctgcggc gtattcgatg 180
 ttgaagcctg agactagttc ggactccccct tcggcaaggt cgaaggggggt tcggttggtc 240
 tctgctagtg tggagataaa tcatattatg gccaaagggtc atgatggcag gagtaatcag 300
 aggtgttctt gtgtttgtgat aagggtggag aggttaaagg agccacttat tagtaatgtt 360
 gatagtagaa tgatggctag ggtgacttca tatgagattg tttgggctac tgctcgcagt 420
 gcgccgatca gggcgtagtt tgagtttgat gctcacctg atcagaggat tgagtaaacg 480
 gctaggctag aggtggctag aataaatagg aggcctagggt tgaggttgac caggggggtg 540
 ggtatgggga ggggggttca tagtagaaga gcgatgggtg gagctaaggt cggggcggtg 600
 atgtagaggg tgatggtaga tgtggcgggt tttagggg 638

<210> 86
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 86
 cataagaaca gggagggttag aagtagggtc ttggt 35

<210> 87
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 87
 cccctaaaac ccgccacat 19

<210> 88
 <211> 870
 <212> DNA
 <213> 未知

[0026]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知物的描述: 靶
多核苷酸"

<400> 88

```

agtgtgattg aggtggagta gattagcgt aggtagaagt agaggttaag gagggatgatg      60
gtggctatga tgggtgggat gatgaggcta ttgttttttg tgaattcttc gataatggcc      120
catttgggca aaaagccggt tagcgggggc aggcctccta gggagaggag ggtggatgga      180
attaagggtg ttagtcatgt tagcttgttt caggtgcgag atagtagtag ggtcgtggtg      240
ctggagttta agttgagtag taggaatgcg gtagtagtta ggataatata aatagttaaa      300
ttaagaatgg ttatgttagg gttgtacggt agaactgcta ttattcatcc tatgtgggta      360
attgaggagt atgctaagat tttgcgtagc tgggttttgt ttaatccacc tcaactgcct      420
gctatgatgg ataagattga gagagtgagg agaaggctta cgtttagtga gggagagatt      480
tggtatatga ttgagatggg ggctagtttt tgtcatgtga gaagaagcag gccggatgtc      540
agaggggtgc cttgggtaac ctctgggact cagaagtgaagg gggggctat tcctagtttt      600
attgctatag ctattatgat tattaatgat gagtattgat tggtagtatt ggttatggtt      660
cattgtccgg agagtatatt gttgaagagg atagctatta gaaggattat ggatgcggtt      720
gcttgcgtga ggaaataact gatggcagct tctgtggaac gagggtttat ttttttggtt      780
agaactggaa taaaagctag catgtttatt tctaggccta ctcaggtaaa aaatcagtgc      840
gagcttagcg ctgtgatgag tgtgcctgca      870

```

<210> 89

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
引物"

<400> 89

```

agtgtgattg aggtggagta gattagcgt aggtagaagt      40

```

<210> 90

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0027]

<221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 90
 tgcaggcaca ctcacacag cgctaagct

29

<210> 91
 <211> 497
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶多核苷酸"

<400> 91
 aacacaacca cccacagcct aattattagc atcatccctc tactatTTTT taaccaaate 60
 aacaacaacc tatttagctg ttccccaacc tttctcctcg acccctaac aacccccctc 120
 ctaatactaa ctacctgact cctaccctc acaatcatgg caagccaag ccacttatcc 180
 agtgaaccac tatcacgaaa aaaactctac ctctctatac taatctccct acaaactctc 240
 ttaattataa cattcacagc cacagaacta atcatatTTT atatcttctt cgaaaccaca 300
 cttatcccca cttggctat catcacccga tgaggcaacc agccagaacg cctgaacgca 360
 ggcacatact tctattcta caccctagta ggctccctc cctactcat cgcactaatt 420
 tacactcaca acaccctagg ctactaaac attctactac tcactctcac tgccaagaa 480
 ctatcaaact cctgagc 497

<210> 92
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 92
 gctcaggagt ttgatgttc ttgggcagtg agag

34

<210> 93
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0028]

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的
 引物"

<400> 93
 aacacaacca cccacagcct aattattag

29

<210> 94
 <211> 493
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="未知物的描述：靶
 多核苷酸"

<400> 94
 gtggtgggtg agtgagcccc attgtgttgt ggtaaataatg tagagggagt atagggctgt 60
 gactagtatg ttgagtcctg taagtaggag agtgatattt gatcaggaga acgtggttac 120
 tagcacagag agttctccca gtaggttaat agtggggggt aaggcgaggt tagcgaggct 180
 tgctagaagt catcaaaaag ctattagtagg gagtagagtt tgaagtcctt gagagaggat 240
 tatgatgcga ctgtgagtg gttcgtagtt tgagtttgct aggcagaata gtaatgagga 300
 tgtaagcccg tgggcgatta tgagaatgac tgcgccggtg aagcttcagg gggtttggat 360
 gagaatggct gttactacga gggctatgtg gctgattgaa gagtatgcaa tgagcgattt 420
 taggtctgtt tgtcgtaggc agatggagct tgttataatt atgcctcata gggatagtag 480
 aaggaagggg tag 493

<210> 95
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的
 引物"

<400> 95
 gtggtgggtg agtgagcccc attgtgt

27

<210> 96
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0029]

<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	96	
	ctaccccttc cttgtactat ccctatgag	29
<210>	97	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	97	
	taaagcccgg agcgaggaga gtagcactct tg	32
<210>	98	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	98	
	aaagcgggtgt gtgtgtgctg ggtaggat	28
<210>	99	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400>	99	
	aaaggttgcg gtctgttagt agtatagtga tgccagca	38
<210>	100	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0030]		

<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"		
<400> 100		
aaatggaggg ttcttctact attaggactt ttcget		36
<210> 101		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"		
<400> 101		
taagggtaaa tacgggccct atttcaaaga ttttagggg a		41
<210> 102		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"		
<400> 102		
aatccagtac acttaccatg ttacgacttg tctcctcta		39
<210> 103		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"		
<400> 103		
aatgtgaggg tgggactgtc tactgagtag cc		32
<210> 104		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
[0031]		

<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 104	
aacgattcag gttagaatga ggaggtctgc ggctag	36
<210> 105	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 105	
aacataagaa cagggaggtt agaagtaggg tcttggt	37
<210> 106	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 106	
aaagtgtgat tgaggtggag tagattaggc gtaggtagaa gt	42
<210> 107	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的引物"	
<400> 107	
aagctcagga gtttgatagt tcttgggcag tgagag	36
<210> 108	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
[0032]	

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 108

tagtggtggg tgagtgagcc ccatttgtgt

29

<210> 109

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 109

ttgcacgaga gccagctcgt caggtagtca ccagtacagt ccgcttgtgt caagacagca

60

cg

62

<210> 110

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 110

cagcagcaga cagtgcactc gtcactcact aaccgctatt cgagttcgcg tgctgtcttg

60

acacaagcgg actgt

75

<210> 111

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 111

ttgcacgaga gccagctcgt caggtagtca ccagt

35

<210> 112

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

[0033]

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 112
cagcagcaga cagtgcactc gtcac

25

<210> 113
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
寡核苷酸"

<400> 113
ggagcagact agcactgagg ta

22

<210> 114
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 114
ctccagcccg gcacgctcac gtgacagacc g

31

<210> 115
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 115
ccggtgggtcg ccgcgatcaa ggag

24

<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0034]

<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 合成的 探针"	
<400>	116	
	gcgggttggtt ctggtccatg a	21
<210>	117	
<211>	150	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="未知物的描述: 靶 多核苷酸"	
<400>	117	
	ccggtggtcg ccgcgatcaa ggagttcttc ggcaccagcc agctgagcca attcatggac	60
	cagaacaacc cgctgtcggg gttgaccac aagcgccgac tgctggcgct ggggccccgc	120
	ggtctgtcac gtgagcgtgc cgggctggag	150
<210>	118	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 合成的 引物"	
<400>	118	
	tatcgtcaag gaactcttgc ctacgcctt	29
<210>	119	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 合成的 引物"	
<400>	119	
	gtactggtgg agtatttgat agtgtattaa cc	32
<210>	120	
<211>	158	
[0035]		

<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知物的描述：靶
多核苷酸"

<400> 120
gtactggtgg agtatttgat agtgtattaa cttatgtgt gacatgttct aatatagtca 60
cattttcatt atttttatta taaggcctgc tgaaaatgac tgaatataaa cttgtggtag 120
ttggagctga tggcgtaggc aagagtcct tgacgata 158

<210> 121
<211> 158
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知物的描述：靶
多核苷酸"

<400> 121
gtactggtgg agtatttgat agtgtattaa cttatgtgt gacatgttct aatatagtca 60
cattttcatt atttttatta taaggcctgc tgaaaatgac tgaatataaa cttgtggtag 120
ttggagctgg tggcgtaggc aagagtcct tgacgata 158

<210> 122
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

<400> 122
gcacagttac agtattccag cagactca 28

<210> 123
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
引物"

[0036]

<400> 123 tcagtggtagg cagtggtagt ggtggc	26
<210> 124 <211> 76 <212> DNA <213> 未知	
<220> <221> 来源 <223> /注释="未知物的描述: 靶 多核苷酸"	
<400> 124 gcacagttac agtattccag cagactcaaa tacaagaacc tactgctaata gccaccacta ccactgccac cactga	60 76
<210> 125 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 探针"	
<400> 125 tcagtggtagg cagtggtaga	20
<210> 126 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 引物"	
<400> 126 ctttggcacc agaggtgagc	20
<210> 127 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的	
[0037]	

引物”

<400> 127
ggtagcgtggg tcccagtcctg cagttaag 28

<210> 128
<211> 65
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“未知物的描述：靶
多核苷酸”

<400> 128
ggtagcgtggg tcccagtcctg cagttaagg ggcaggagtg gcgctgctca cctctgggtgc 60

caaag 65

<210> 129
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的
探针”

<400> 129
gcaggagtgg cgct 14

<210> 130
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成的
引物”

<400> 130
aatgtgaggg tgggactgtc tactgagtag cc 32

<210> 131
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

[0038]

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 131

tacctcagtg ctagtctgct cc

22

<210> 132

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 132

tccagtacac ttaccatggt acgacttgct tcctcta

37

<210> 133

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 133

agttcaccct ctaaatacacc acgat

25

<210> 134

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"

<400> 134

atcggtgtgg tatagagggt gaact

25

<210> 135

<211> 865

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知物的描述：靶

[0039]

多核苷酸”

<400> 135
 agttcaccct ctaaatacacc acgatcaaaa ggaacaagca tcaagcacgc agcaatgcag 60
 ctcaaaacgc ttagcctagc cacacccccca cgggaaacag cagtgattaa cttttagcaa 120
 taaacgaaag tttaactaag ctatactaac cccagggttg gtcaatttcg tgccagccac 180
 cgcggtcaca cgattaaccc aagtcaatag aagccggcgt aaagagtgtt ttagatcacc 240
 ccctccccaa taaagctaaa actcacctga gttgtaaaaa actccagttg acacaaaata 300
 gactacgaaa gtggctttta catatctgaa cacacaatag ctaagacca aactgggatt 360
 agatacccca ctatgcttag ccctaaacct caacagttaa atcaacaaaa ctgctcgcca 420
 gaacactacg agccacagct taaaactcaa aggacctggc ggtgcttcat atccctctag 480
 aggagcctgt tctgtaatcg ataaaccccg atcaacctca ccacctcttg ctcagcctat 540
 ataccgccat cttcagcaaa ccctgatgaa ggctacaaag taagcgcaag taccacgta 600
 aagacgttag gtcaaggtgt agcccatgag gtggcaagaa atgggctaca ttttctaccc 660
 cagaaaacta cgatagccct tatgaaactt aagggtcgaa ggtggattta gcagtaaact 720
 aagagtagag tgcttagttg aacagggccc tgaagcgcgt acacaccgcc cgtcaccctc 780
 ctcaagtata cttcaaagga catttaacta aaaccctac gcatttatat agaggagaca 840
 agtcgtaaca tggttaagtgt actgg 865

<210> 136

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 136

gacttgcgcg ttacgacagg ccaatc 26

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"

[0040]

<400> 137 tgaatgcggc taatcccaac	20
<210> 138 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 探针"	
<400> 138 aaccacctgc ccctt	15
<210> 139 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 寡核苷酸"	
<400> 139 g'gcctcag tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 140 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 寡核苷酸"	
<400> 140 g'gcctcag tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 141 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的 寡核苷酸"	
[0041]	

<400> 141 gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 142 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 142 gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 143 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 143 gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 144 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 144 gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 145 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 145	

[0042]

gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 146 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 146 gcgcctcacg tatcattttc atctgaccag gcgc	34
<210> 147 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 147 gcactcttgc ctacgcc	17
<210> 148 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的引物"	
<400> 148 ctggtggagt atttgatagt g	21
<210> 149 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 149 gcctacgcca ccagctcc	18
[0043]	

<210> 150
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的
探针"

<400> 150
caagaacatg tcacacataa tg 22

<210> 151
<211> 145
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知物的描述: 靶
多核苷酸"

<400> 151
ctgggtggagt atttgatagt gtattaacct tatgtgtgac atgtttctaat atagtcacat 60
tttcattatt ttattataa ggcttgcgtga aaatgactga atataaactt gtggtagttg 120
gagctggtgg cgtaggcaag agtgc 145

<210> 152
<211> 145
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知物的描述: 靶
多核苷酸"

<400> 152
ctgggtggagt atttgatagt gtattaacct tatgtgtcac atgtttctaat atagtcacat 60
tttcattatt ttattataa ggcttgcgtga aaatgactga atataaactt gtggtagttg 120
gagctgatgg cgtaggcaag agtgc 145

<210> 153
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

[0044]

<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 153	
cgccgcgc	8
<210> 154	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 154	
tgagagatga aaatcatcga gt	22
<210> 155	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 155	
actcgatcat ttttcactct ca	22
<210> 156	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 156	
tacctcagtg ttagtctggt cc	22
<210> 157	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
[0045]	

<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 157	
tacctcagtg ttagtctggt cc	22
<210> 158	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 158	
cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 159	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 159	
cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 160	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 160	
cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 161	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
[0046]	

<223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 161 cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 162 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 162 cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 163 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 163 cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 164 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 164 cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg	34
<210> 165 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

[0047]

寡核苷酸”

<400> 165

cggaggggtc agatgaaaat gatacgtgcc tccg

34

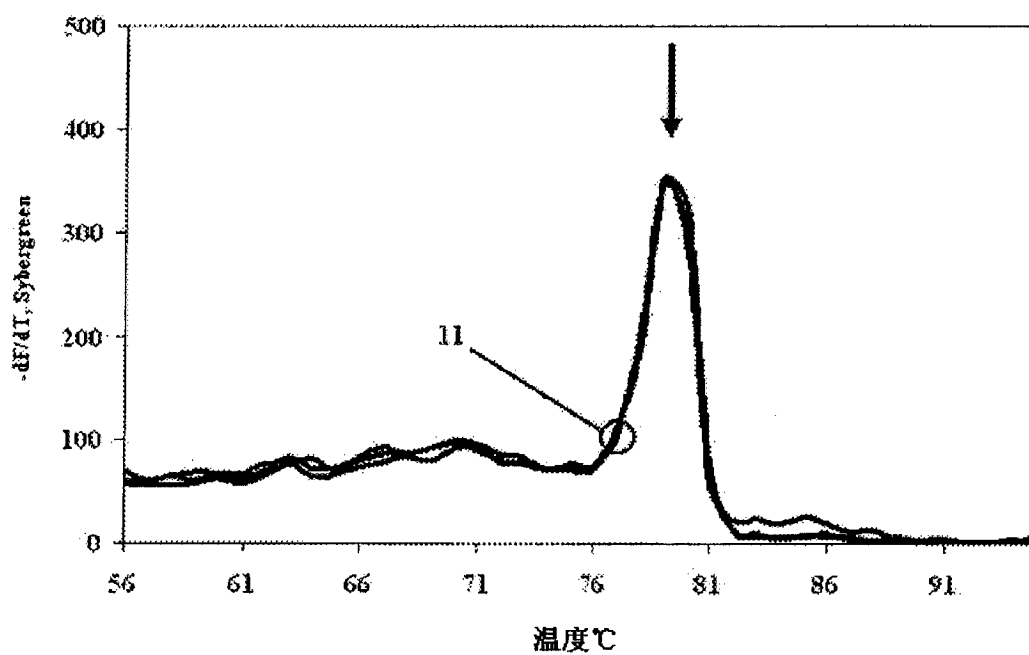


图 1

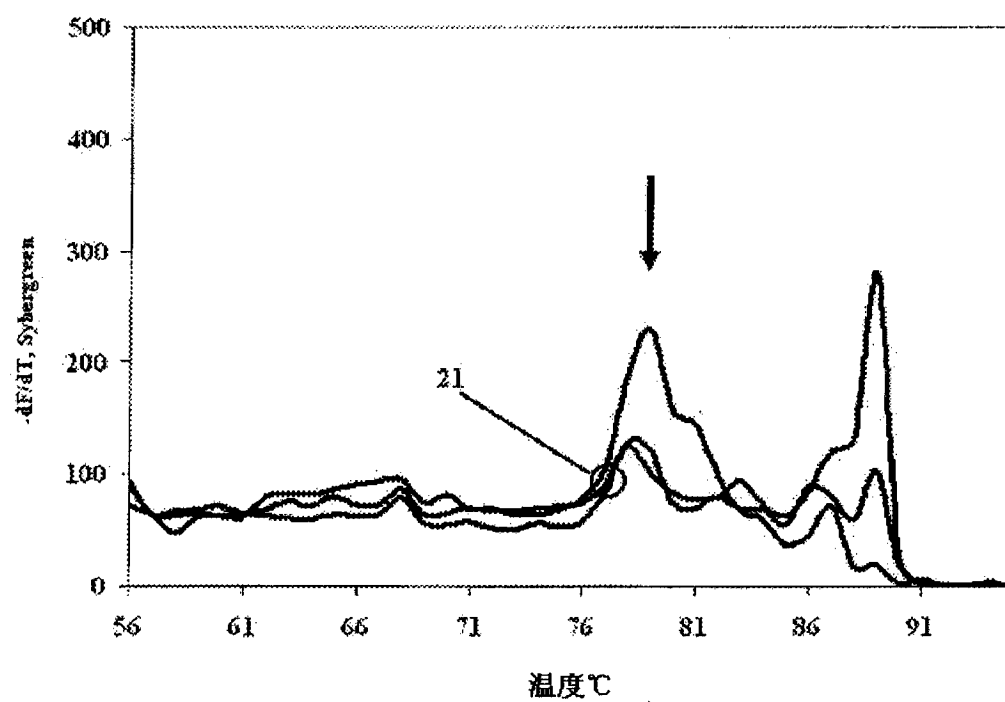


图 2

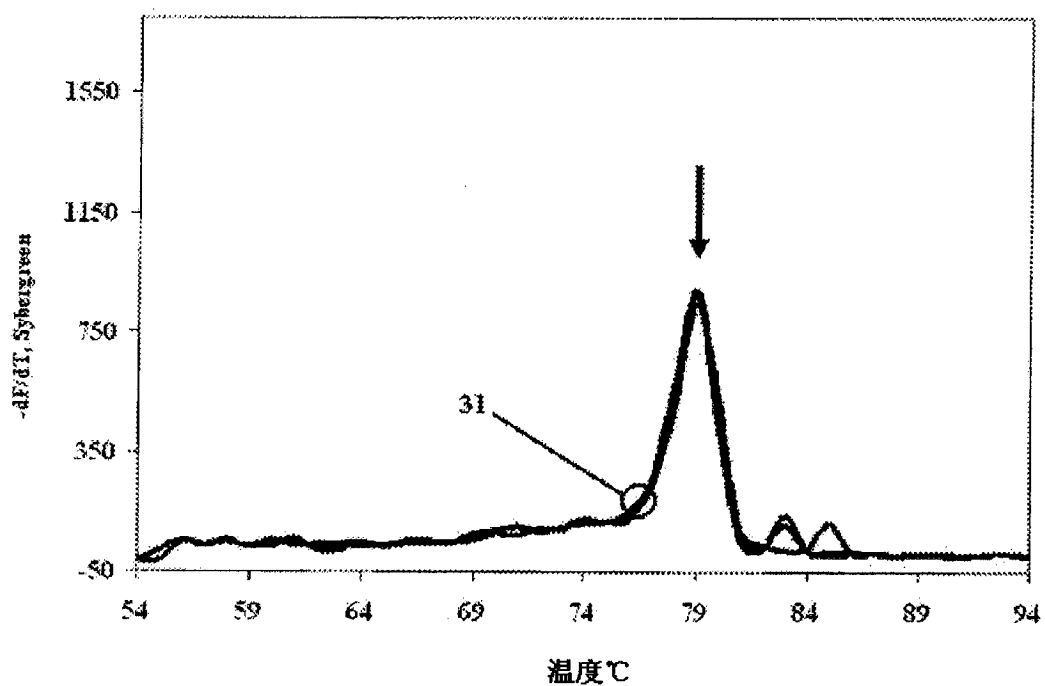


图 3

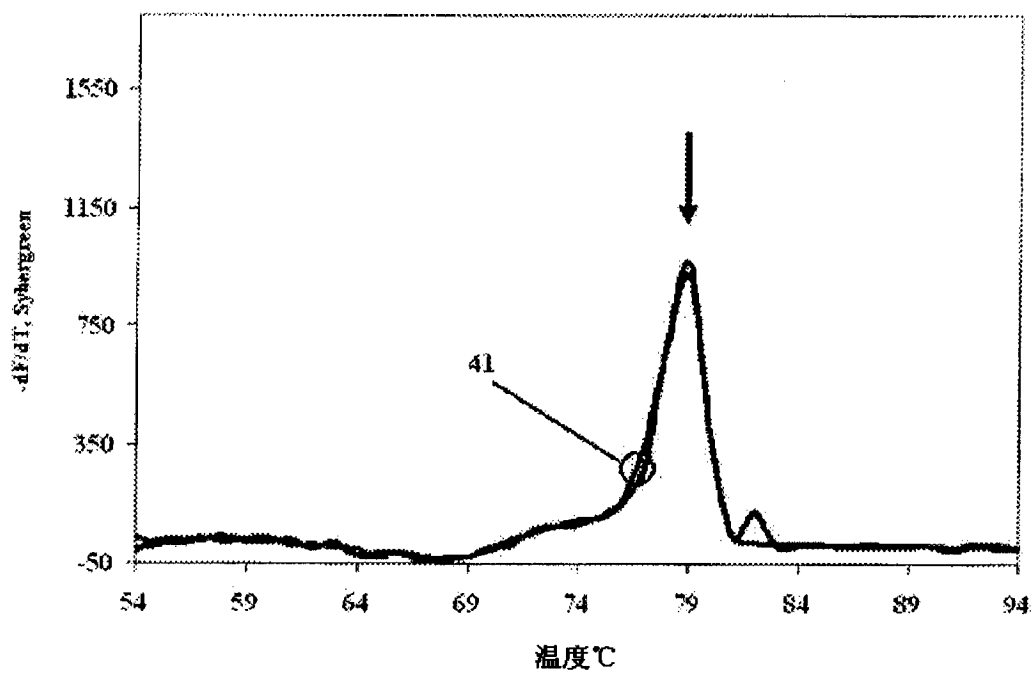


图 4

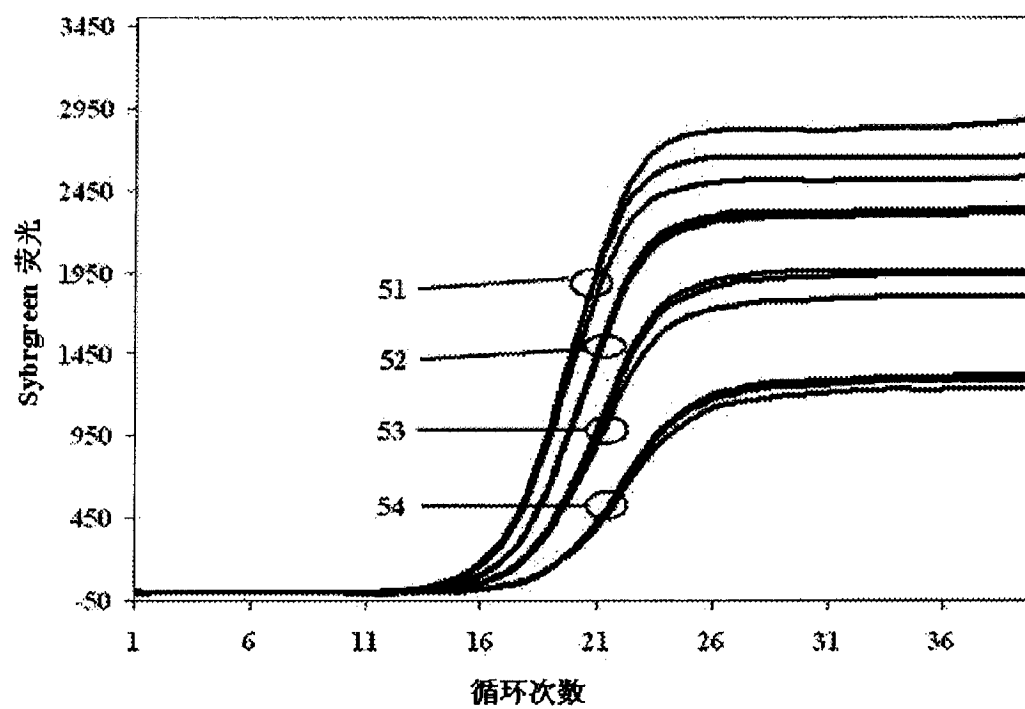


图 5

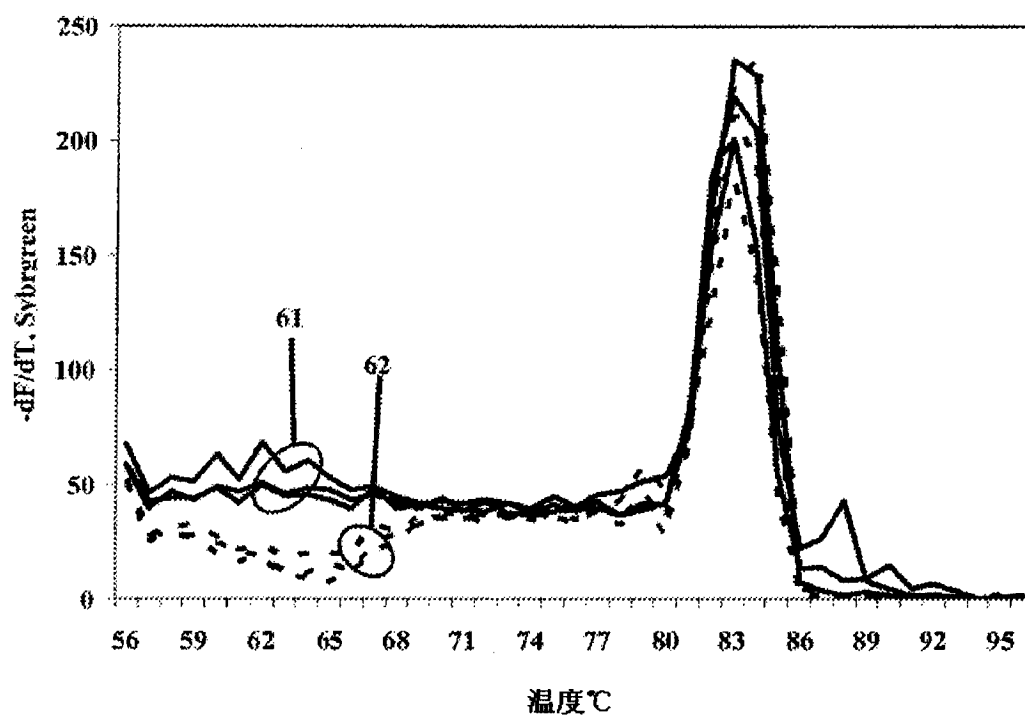


图 6

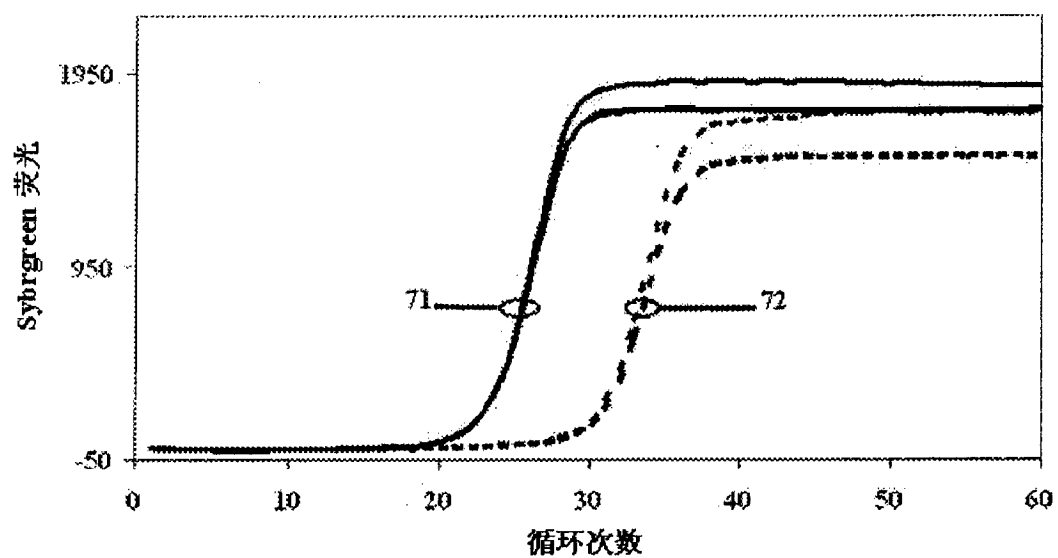


图 7A

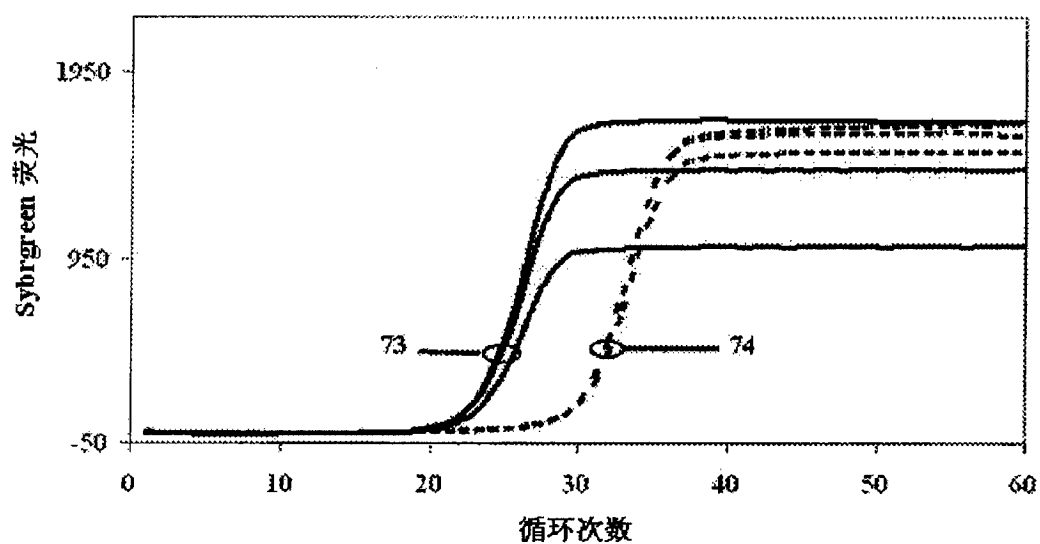


图 7B

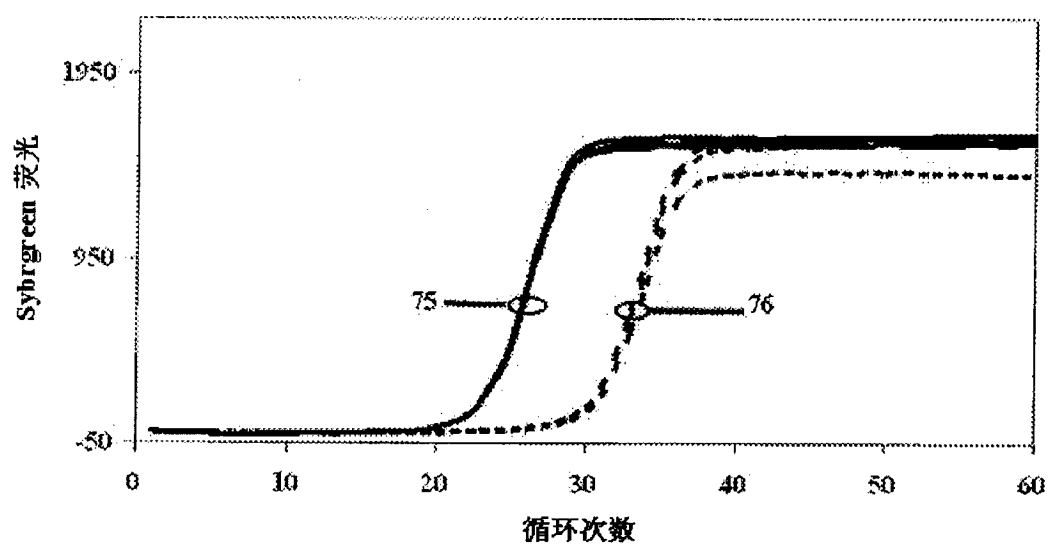


图 7C

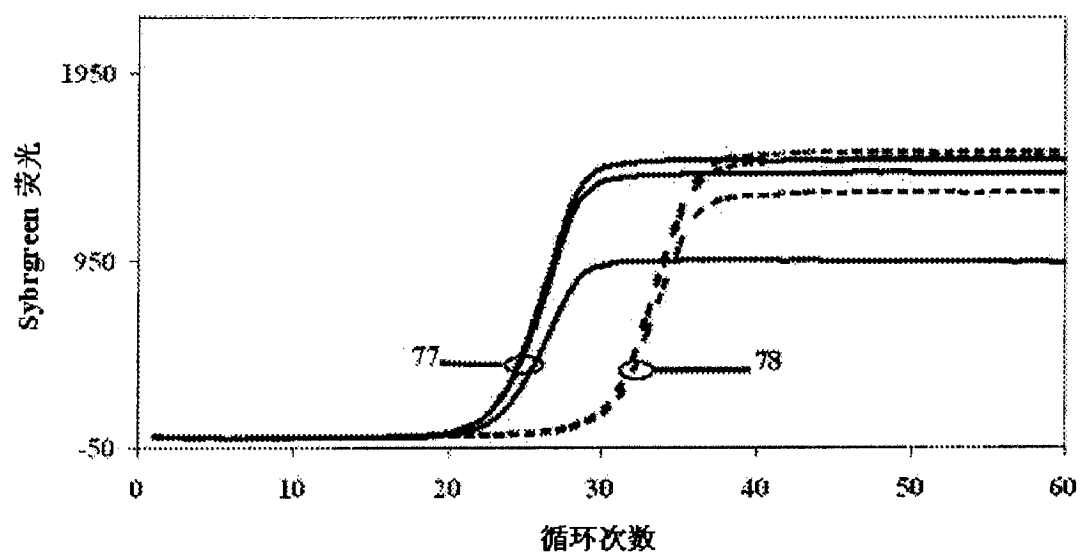


图 7D

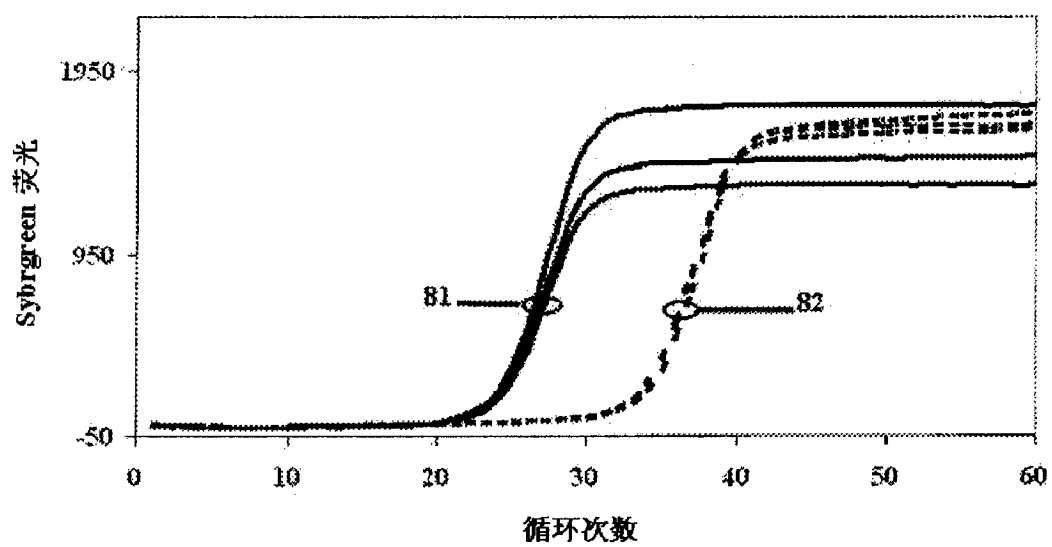


图 8A

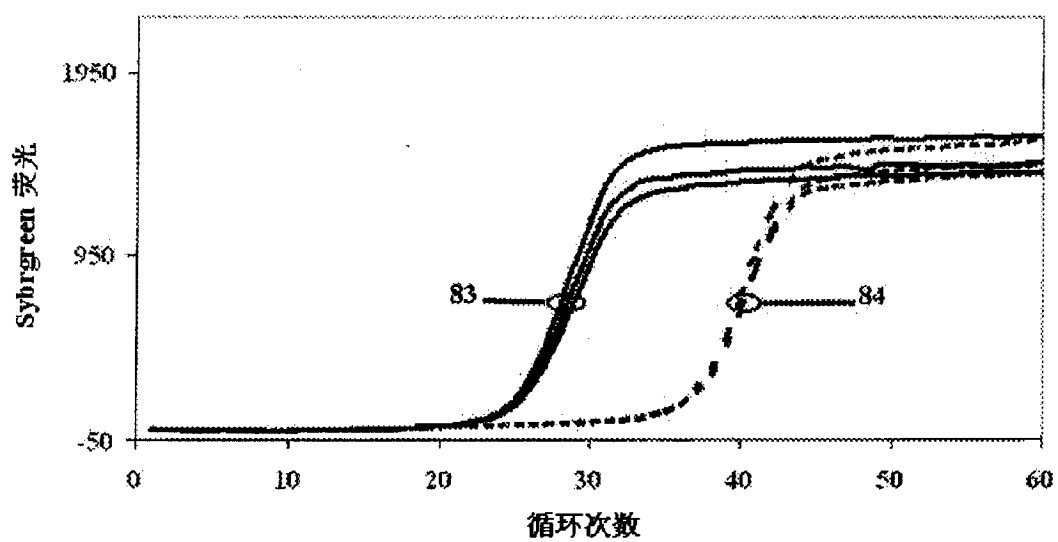


图 8B

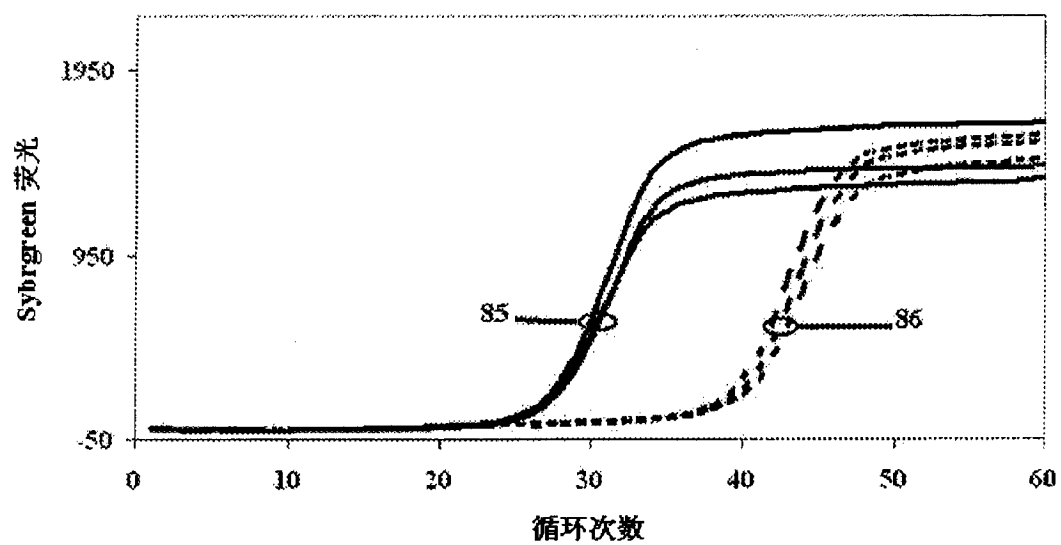


图 8C

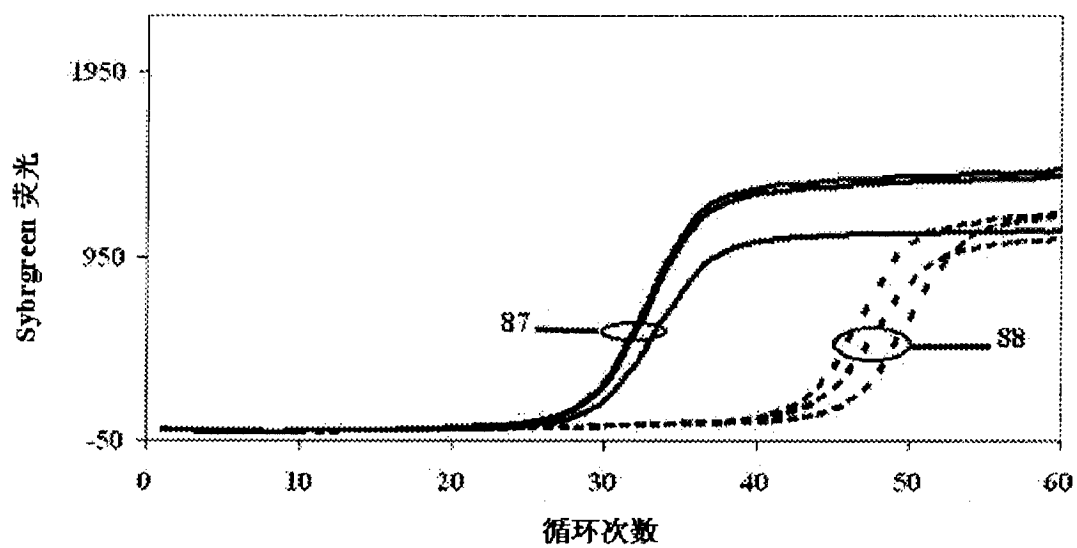


图 8D

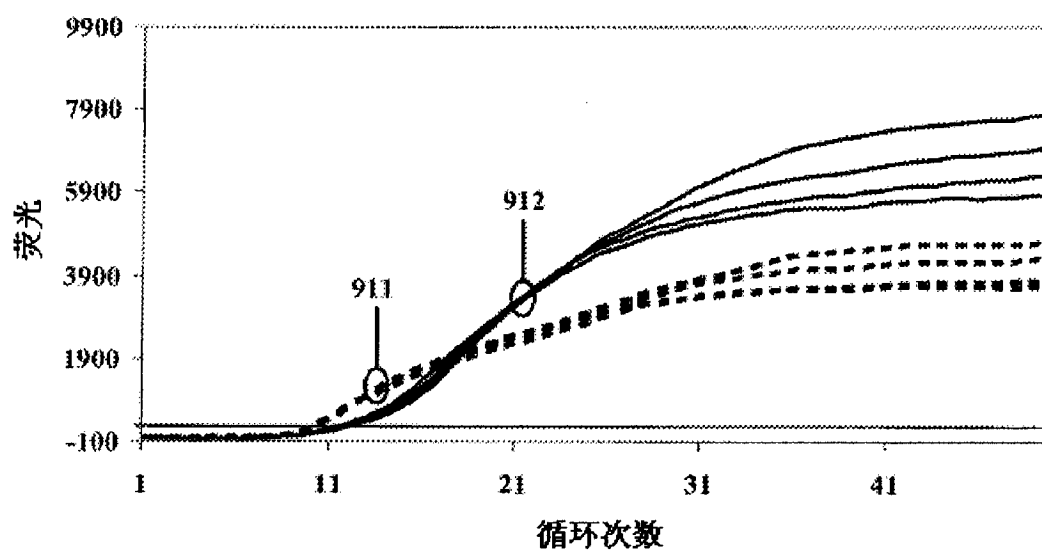


图 9A

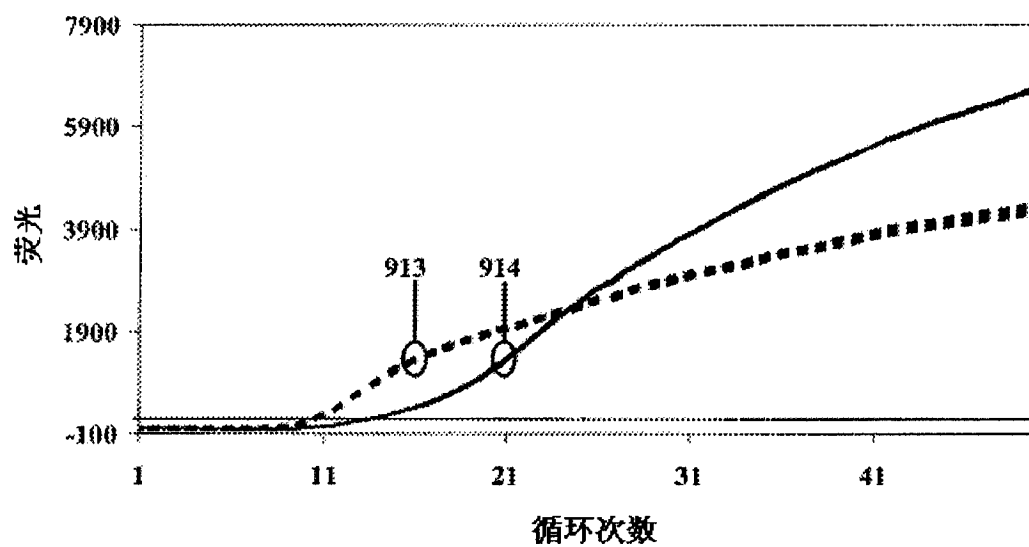


图 9B

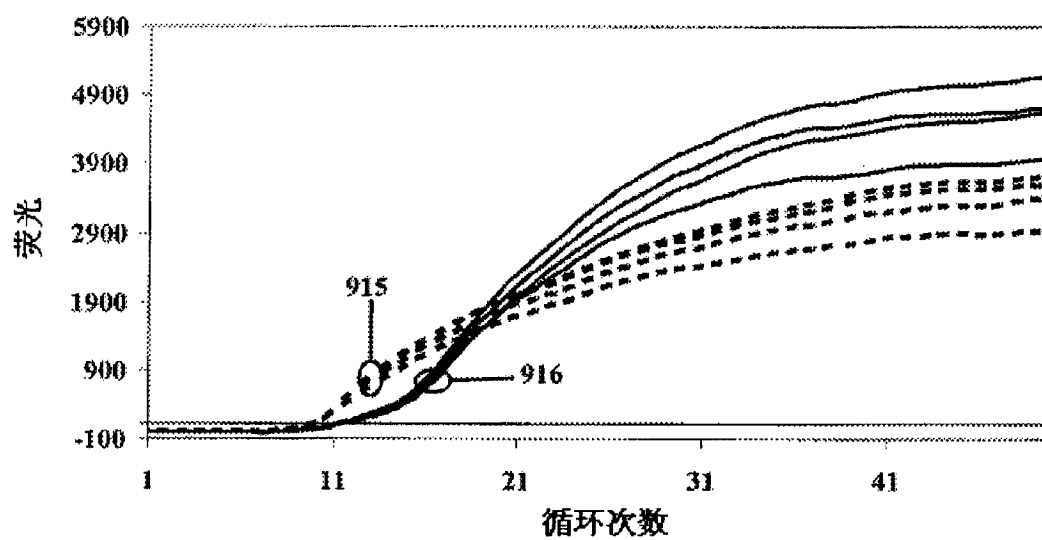


图 9C

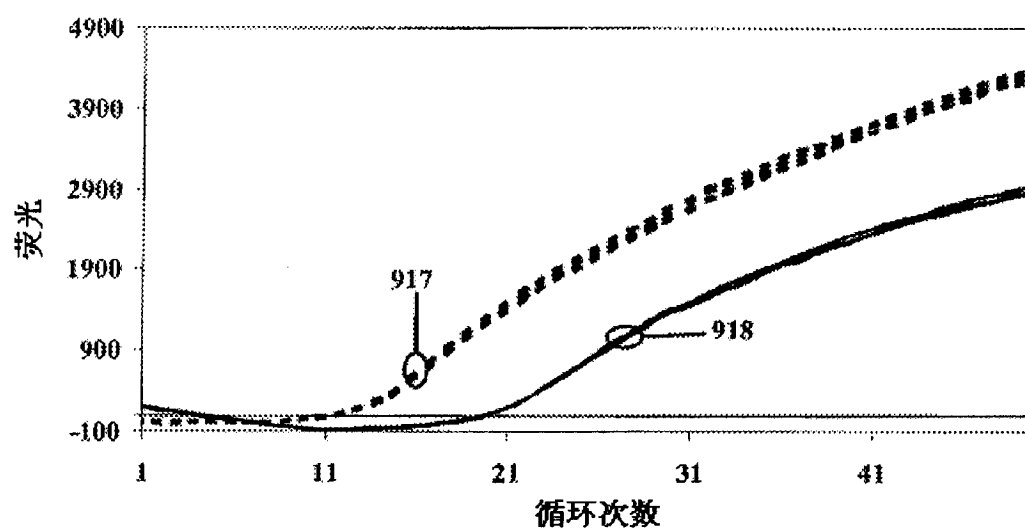


图 9D

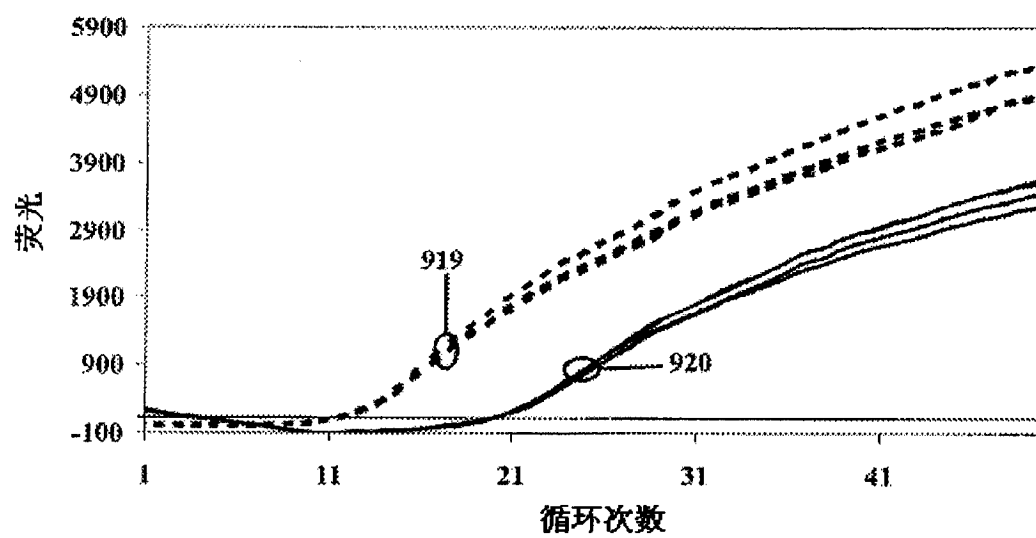


图 9E

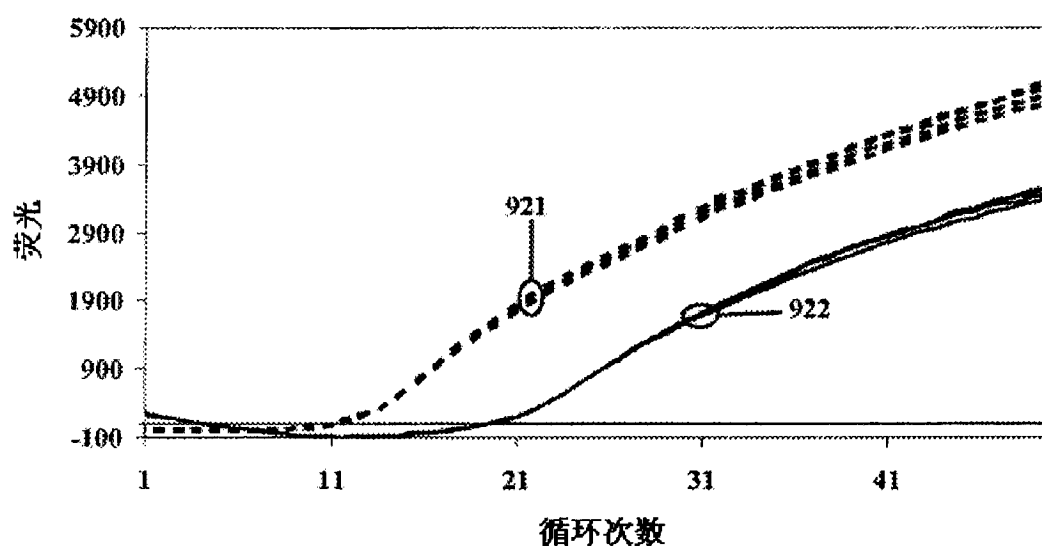


图 9F

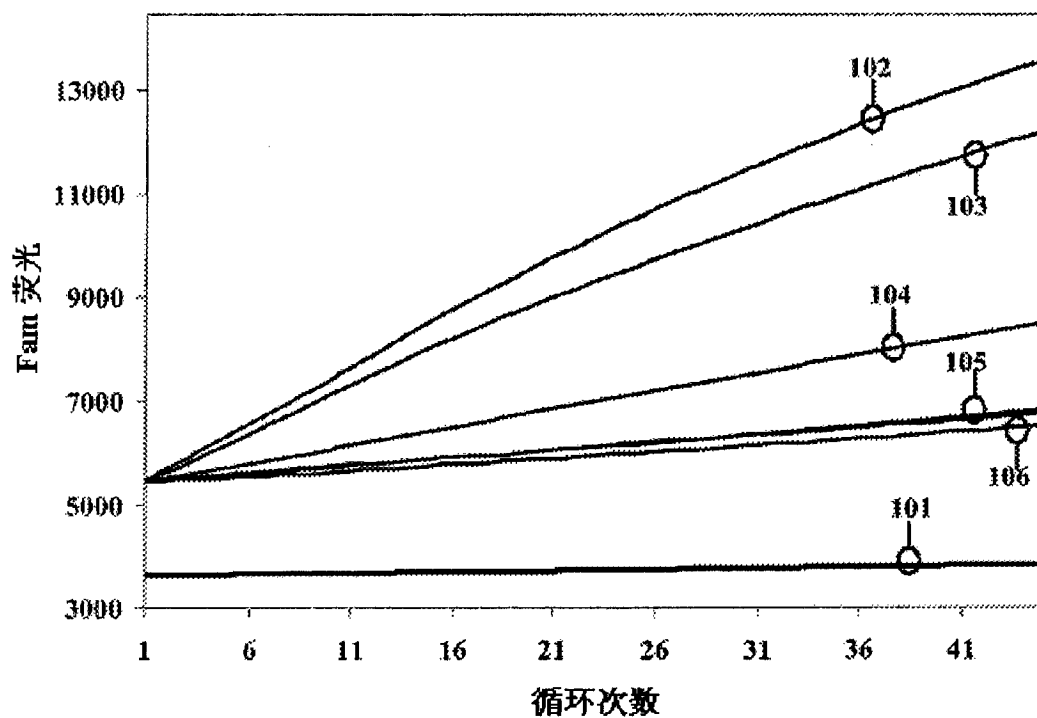


图 10

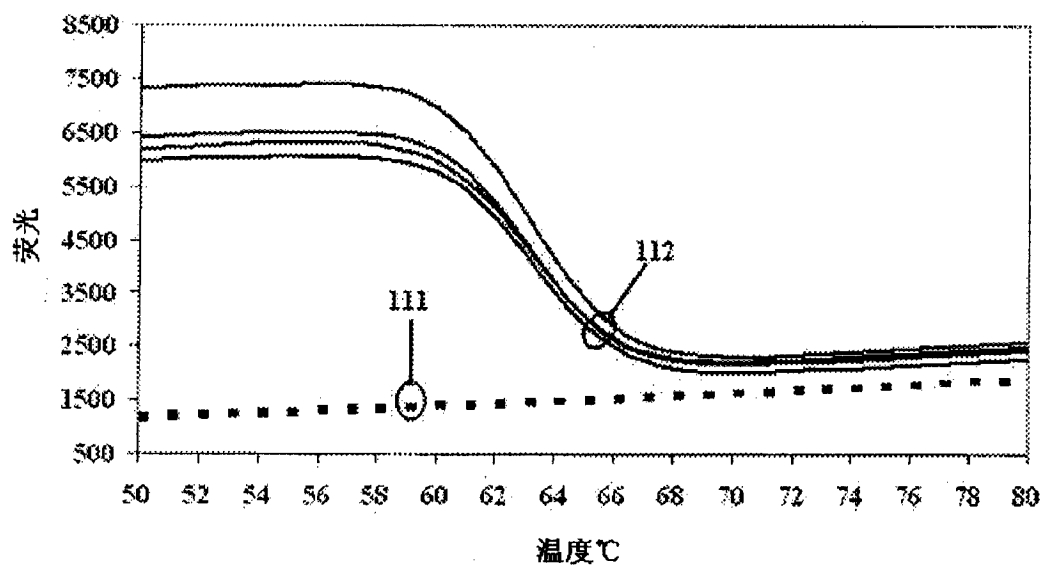


图 11A

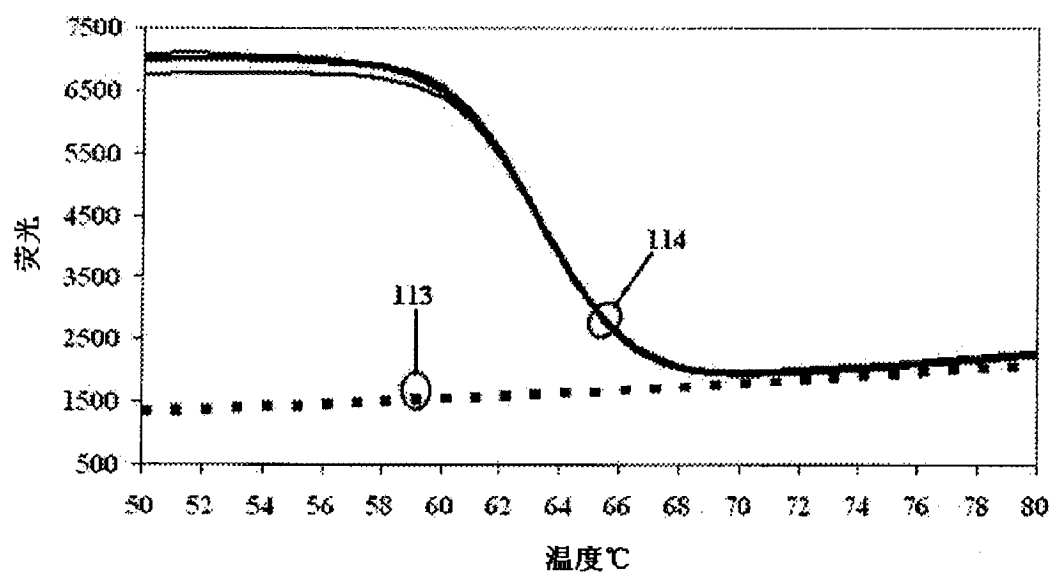


图 11B

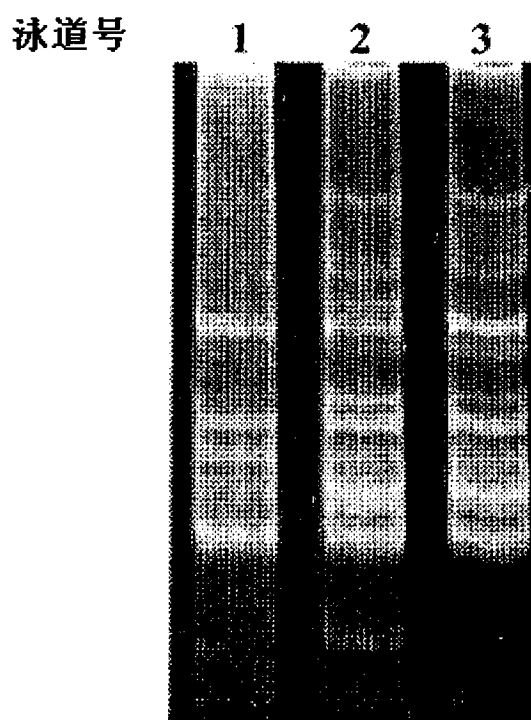


图 12

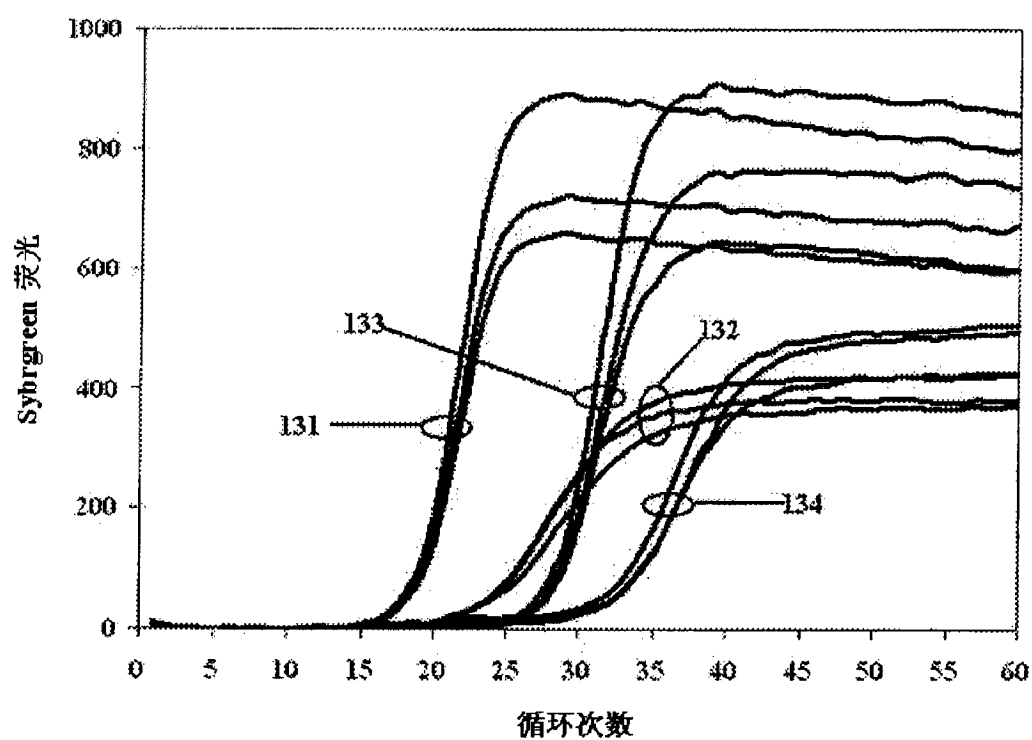


图 13

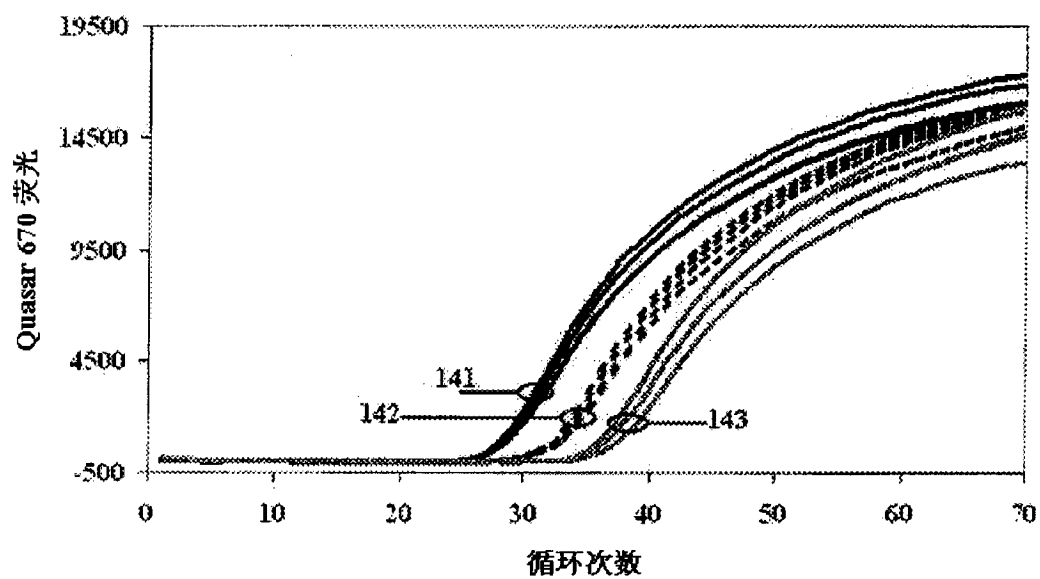


图 14A

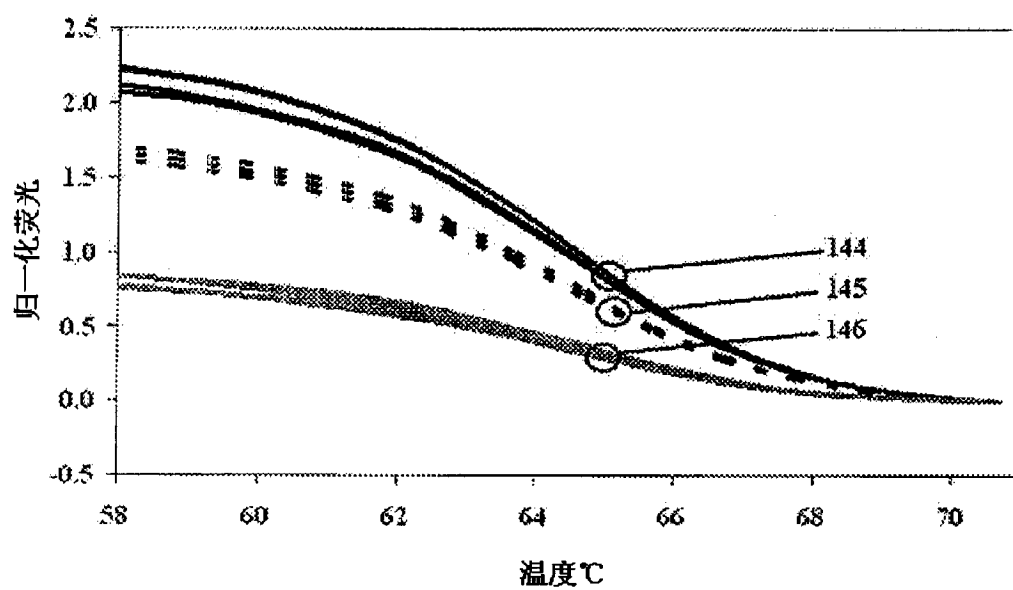


图 14B

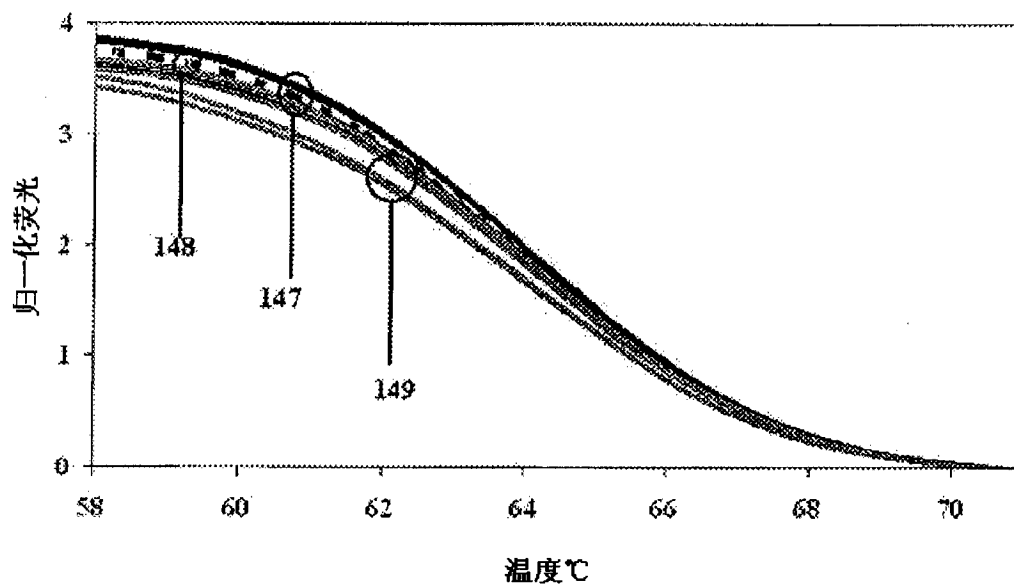


图 14C

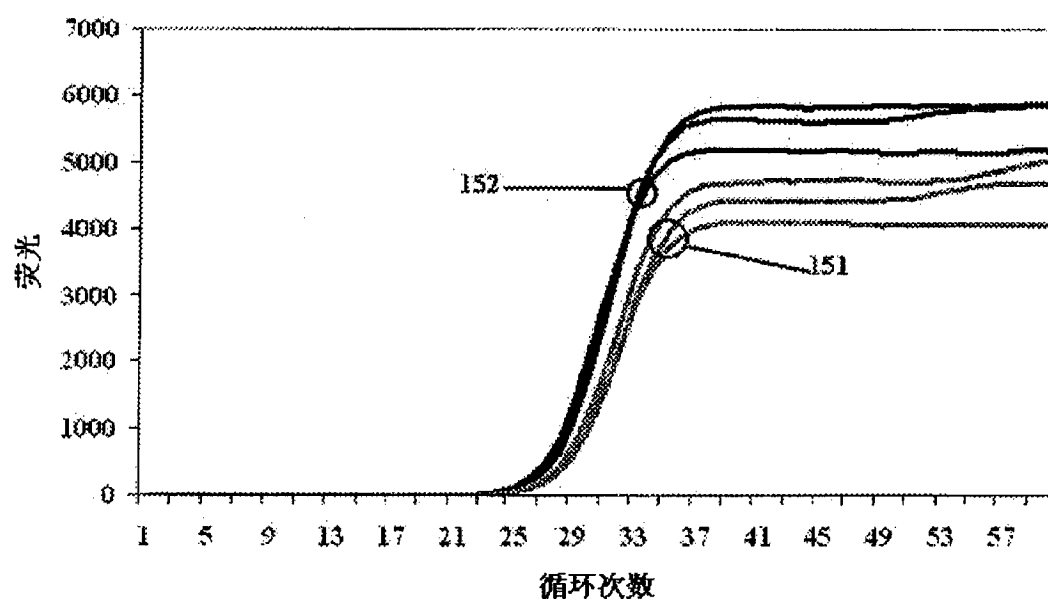


图 15A

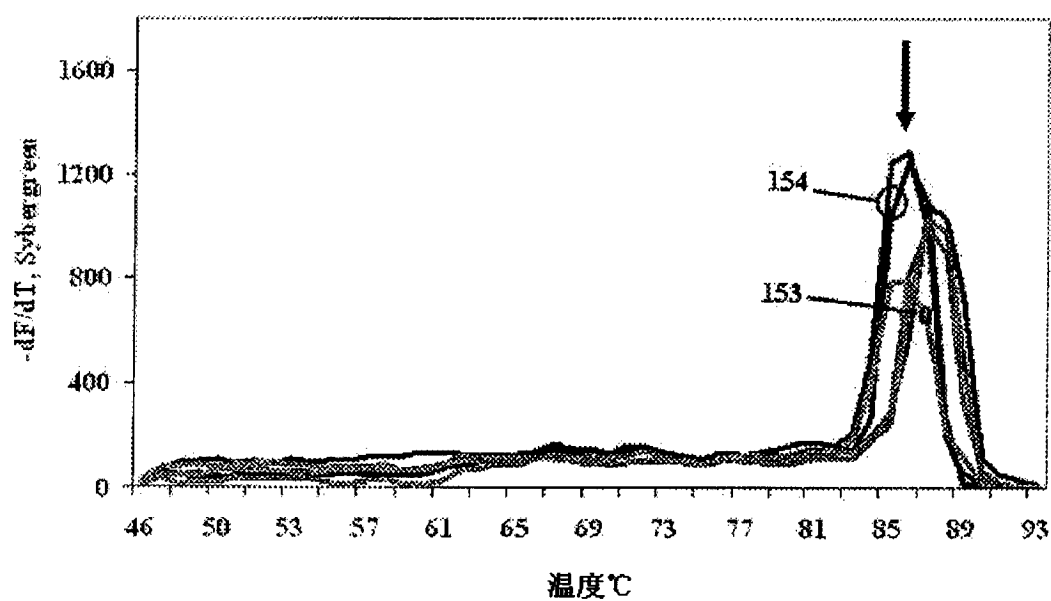


图 15B

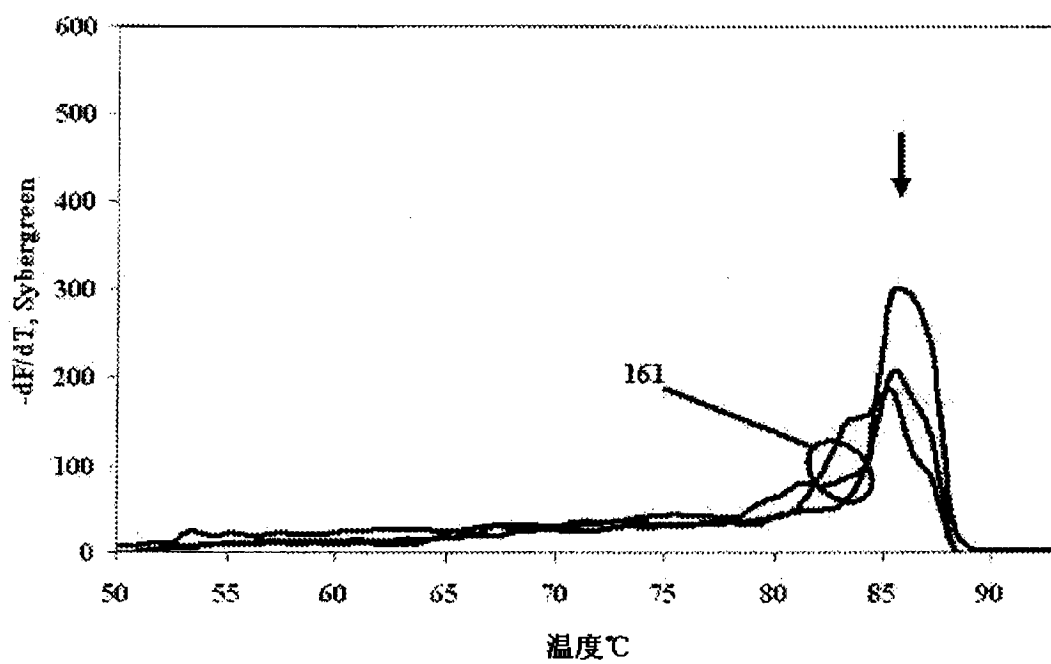


图 16A

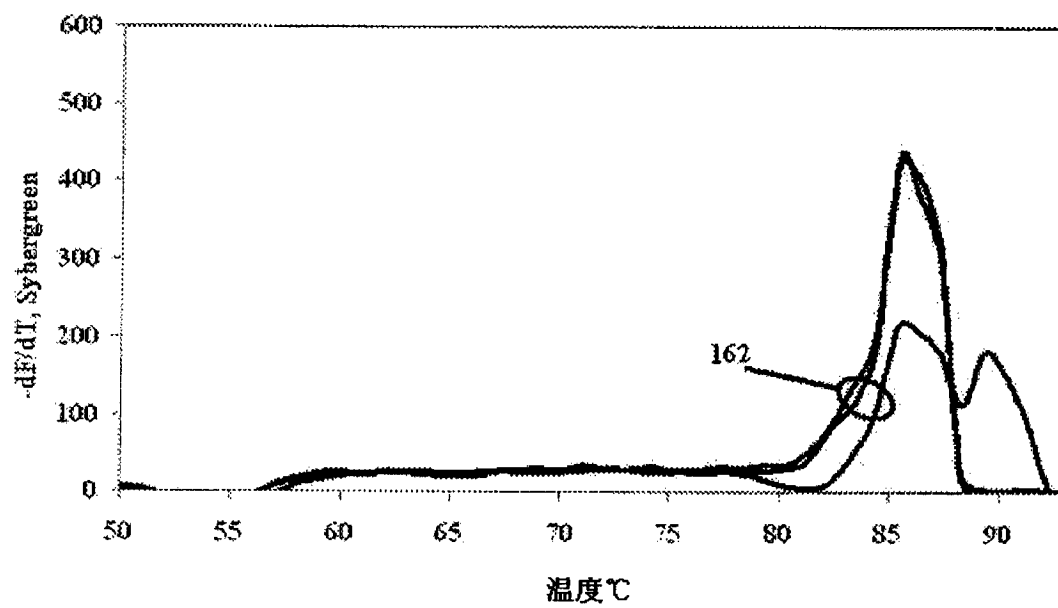


图 16B

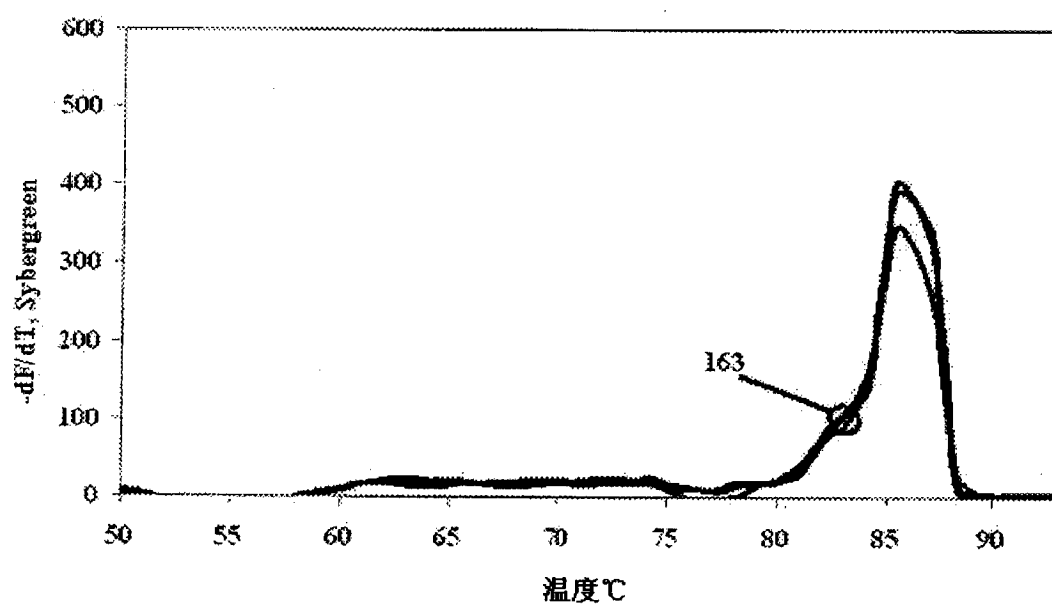


图 16C

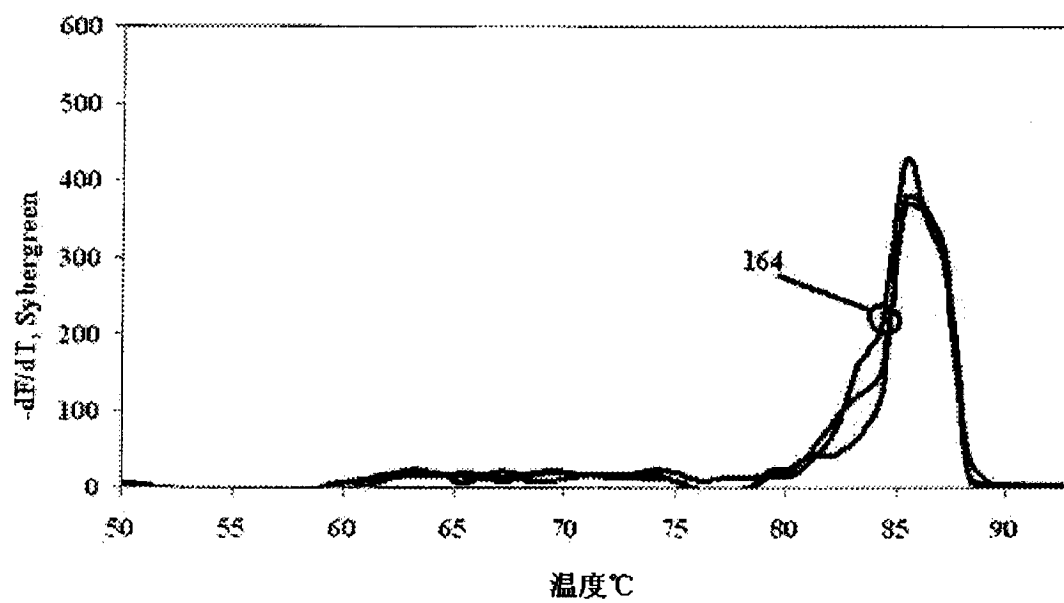


图 16D

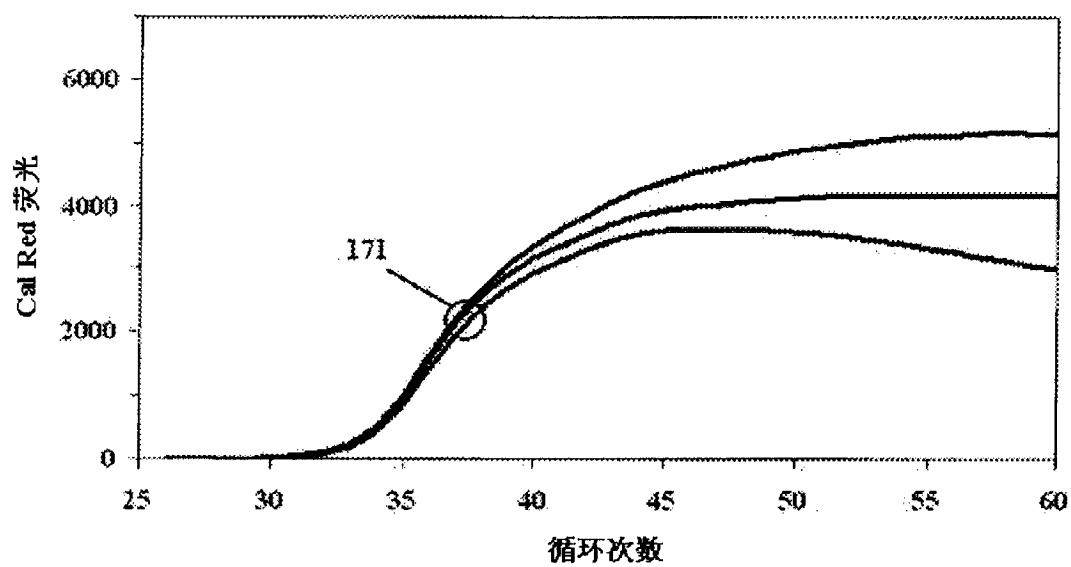


图 17A

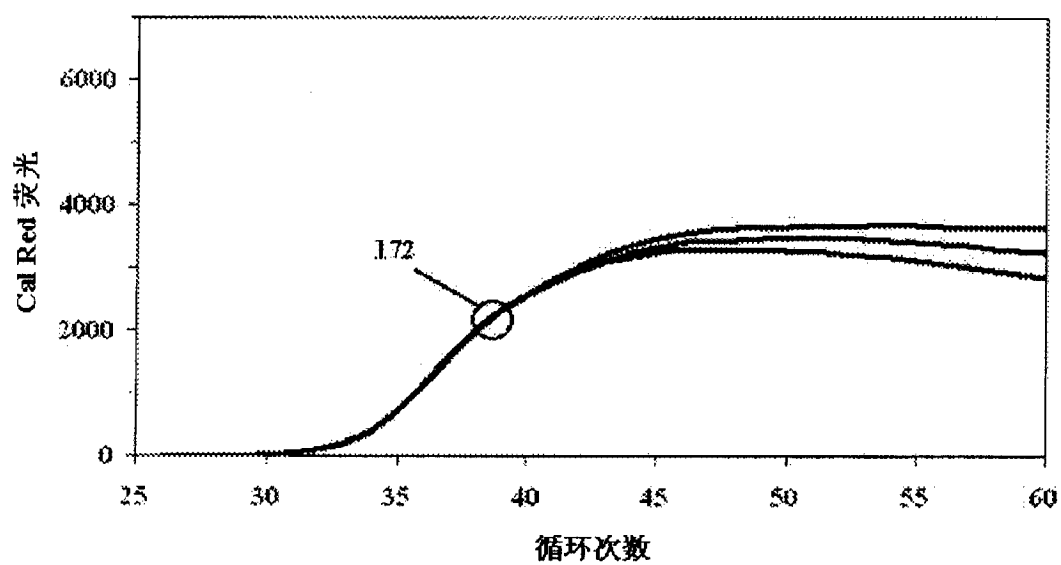


图 17B

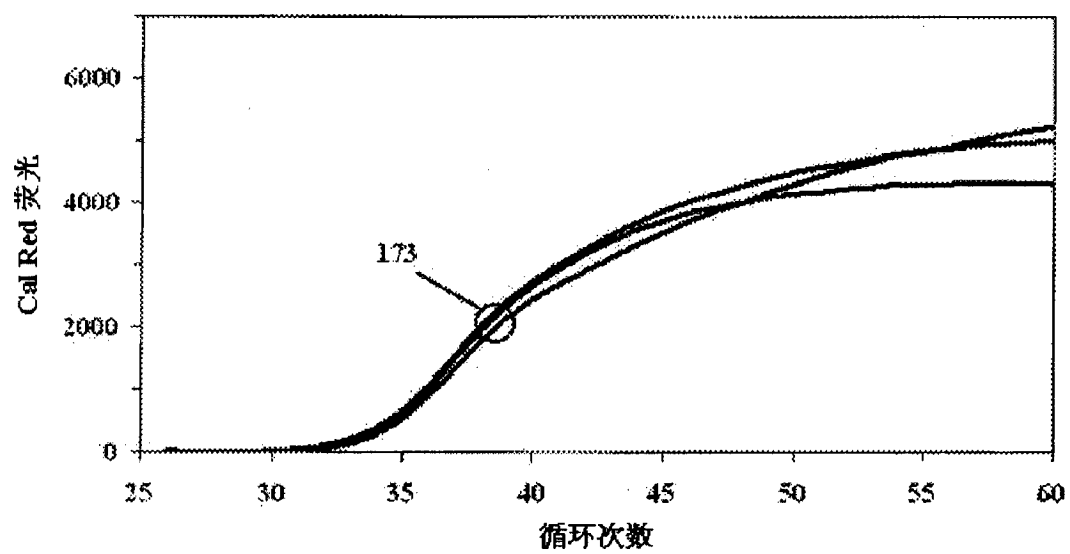


图 17C

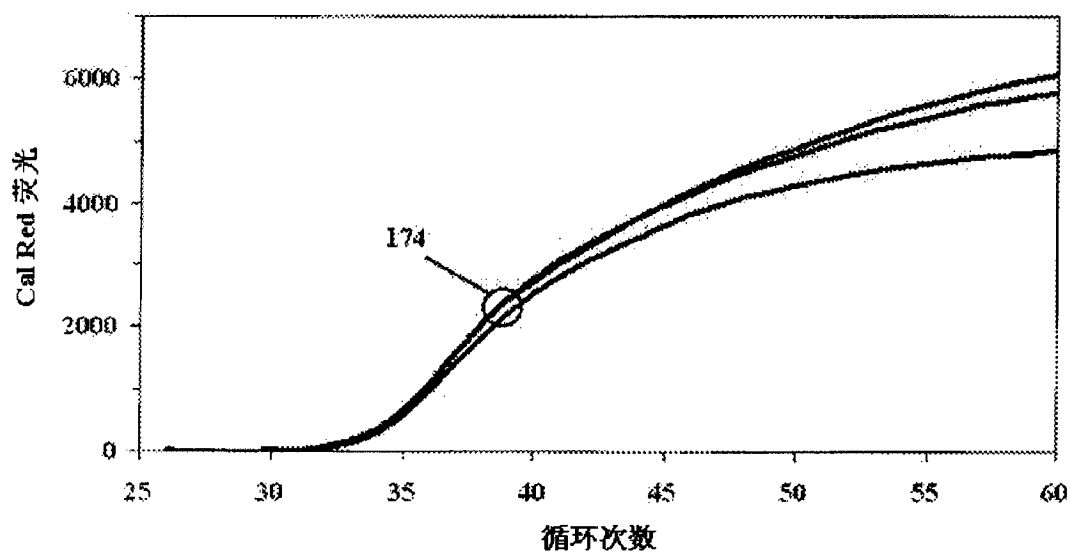


图 17D

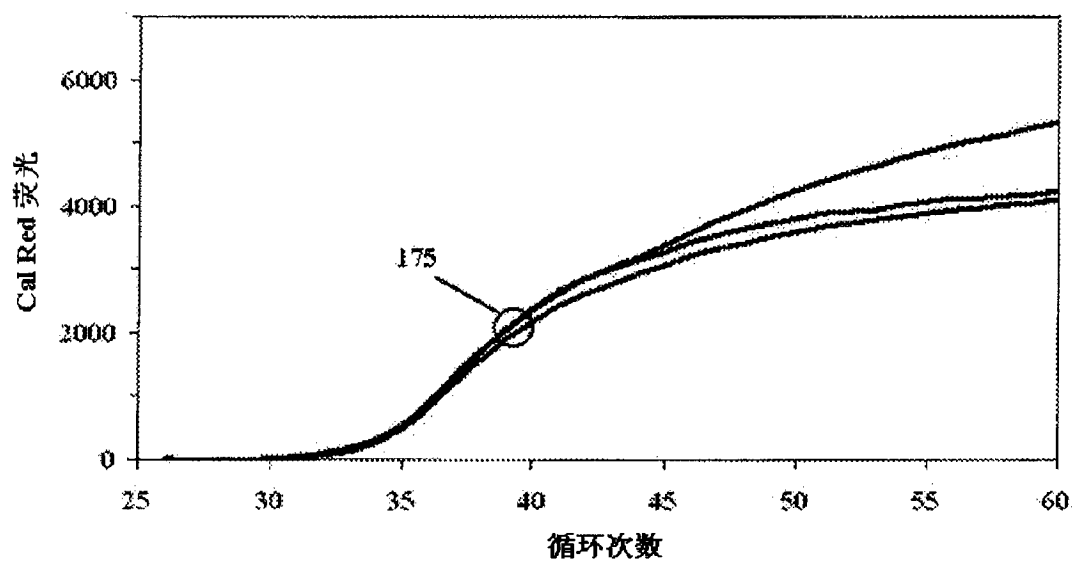


图 17E

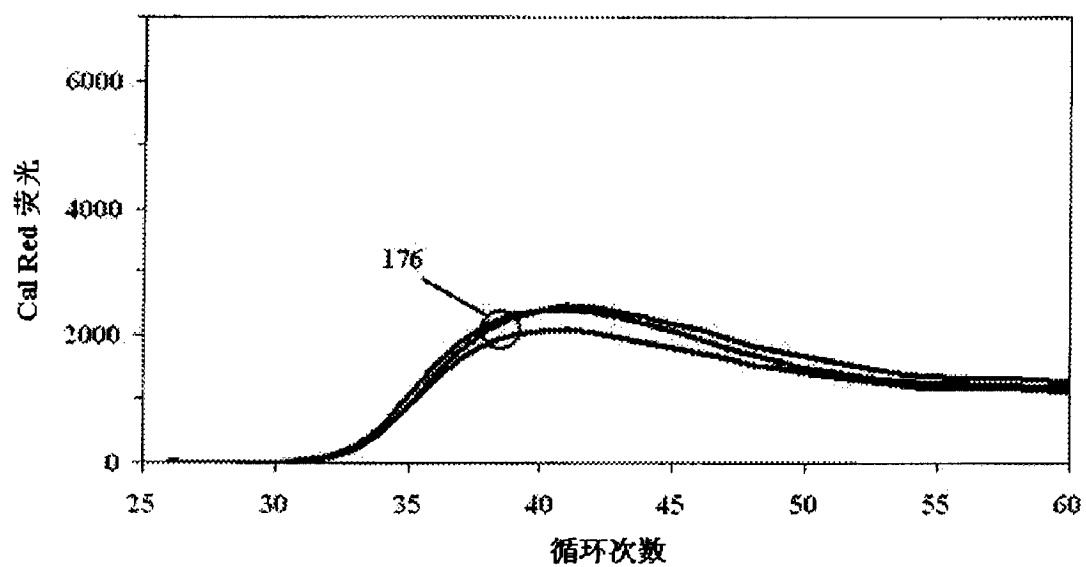


图 17F

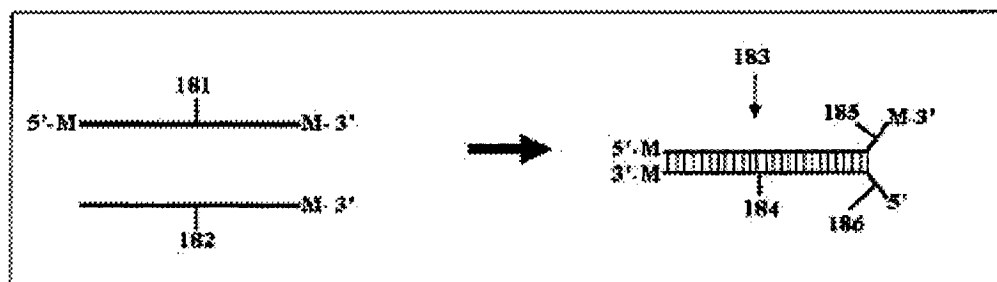


图 18A

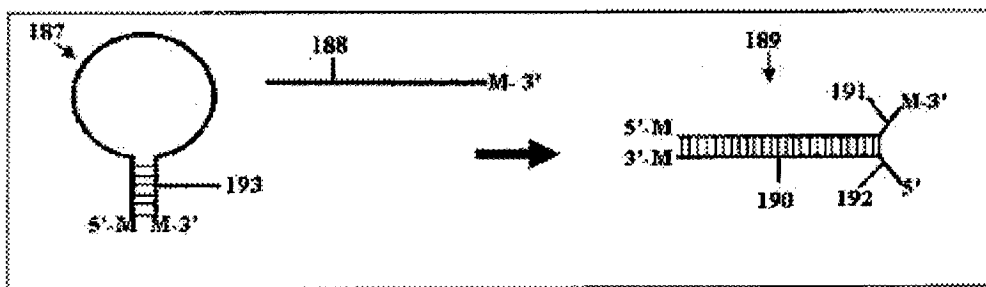


图 18B

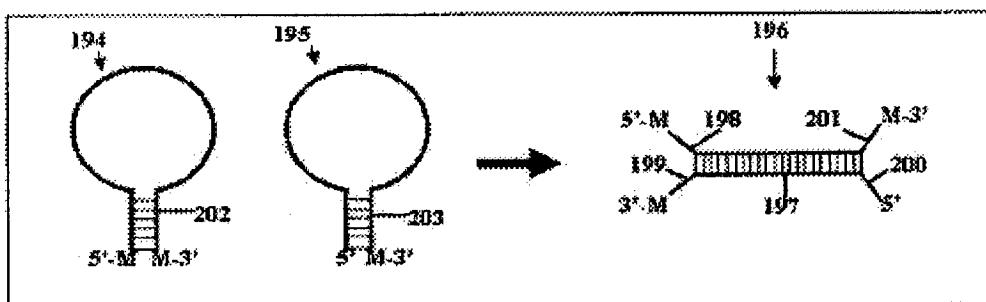


图 18C

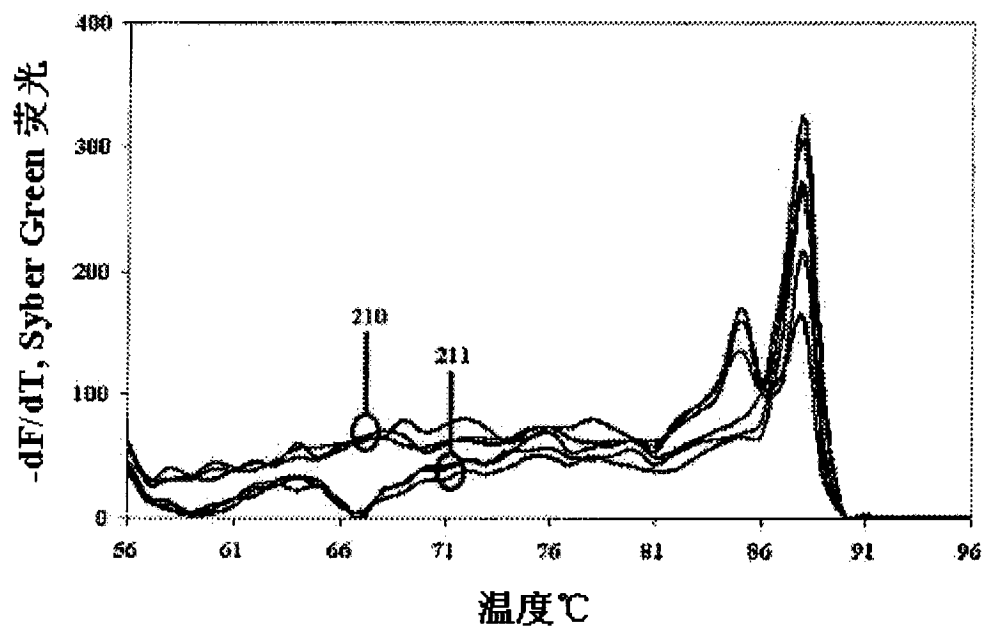


图 19A

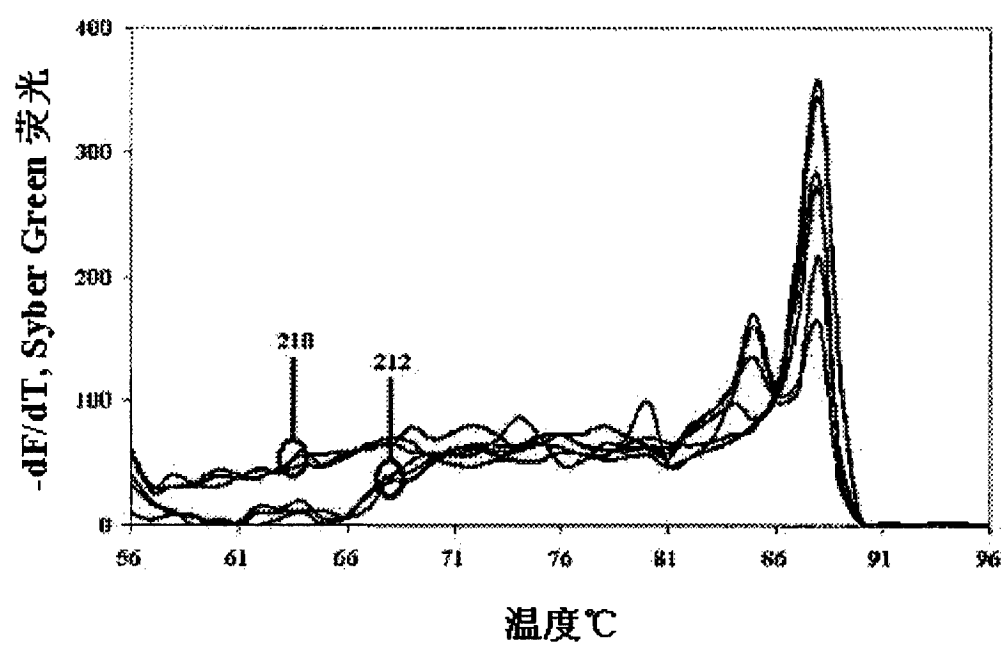


图 19B

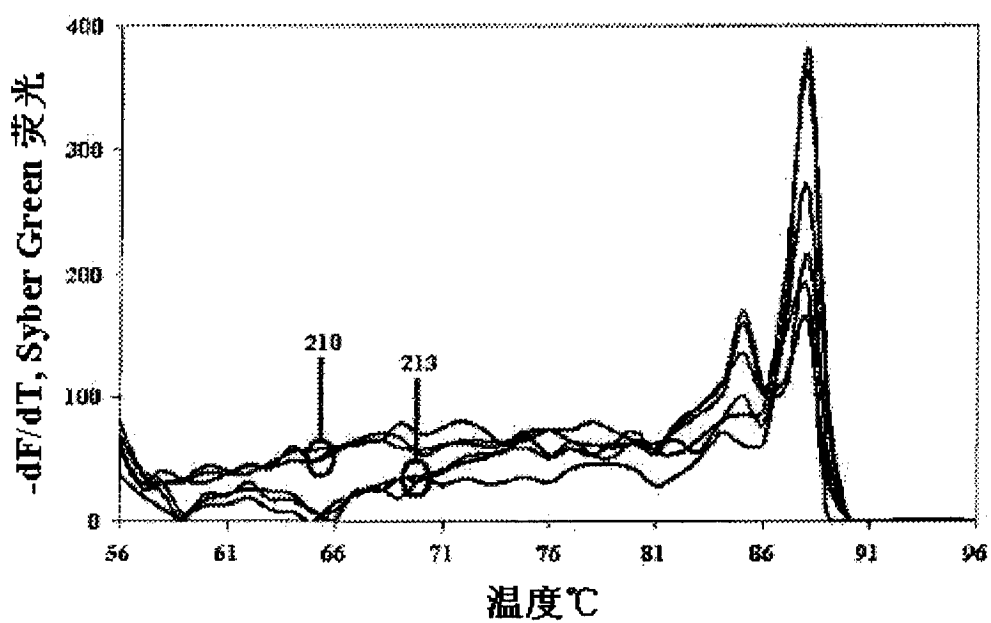


图 19C

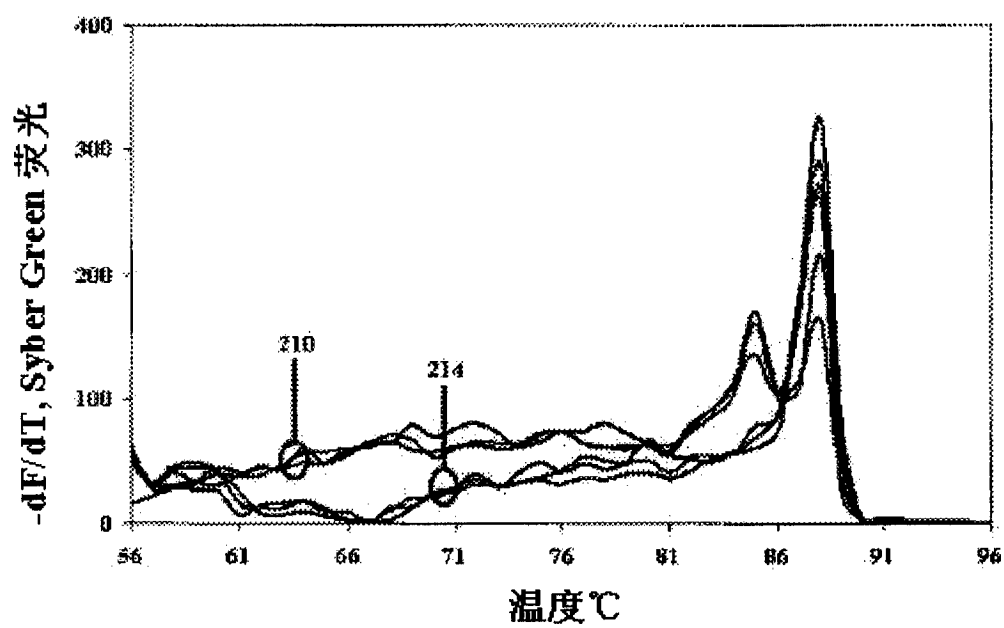


图 19D

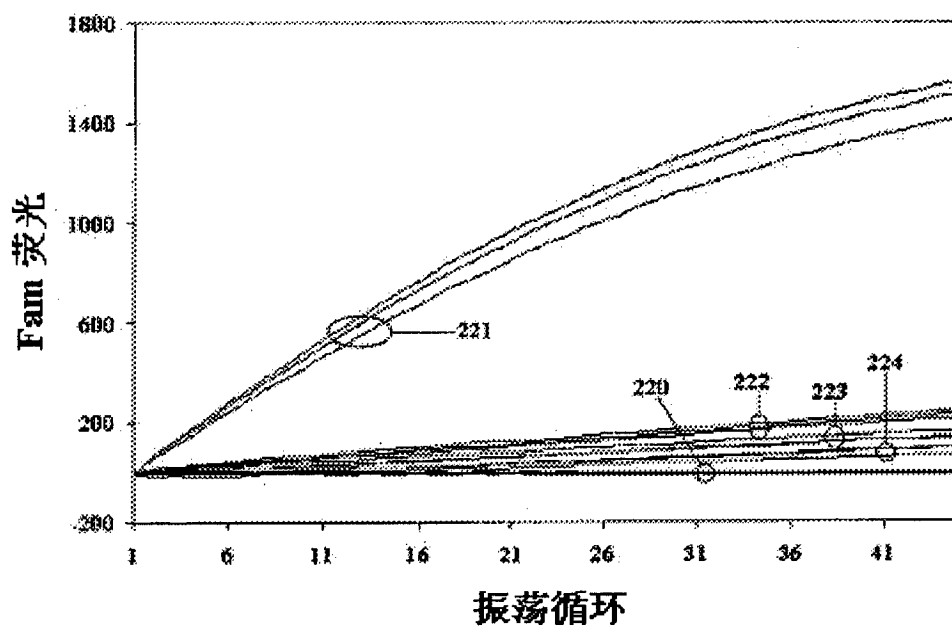


图 20

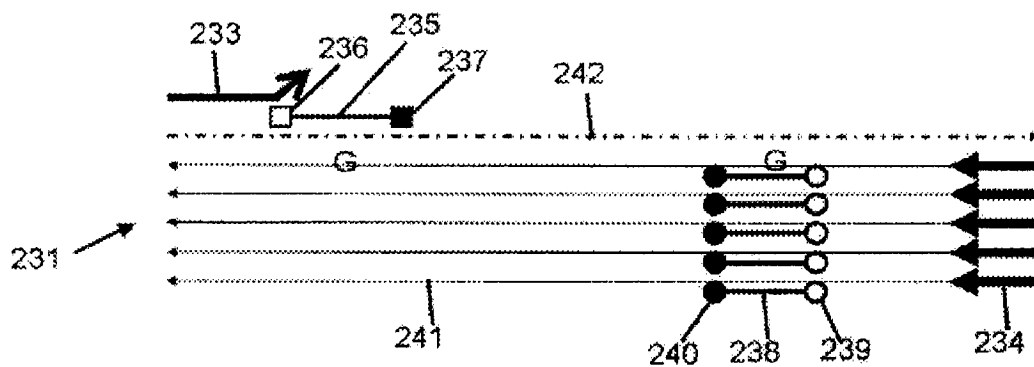


图 21A

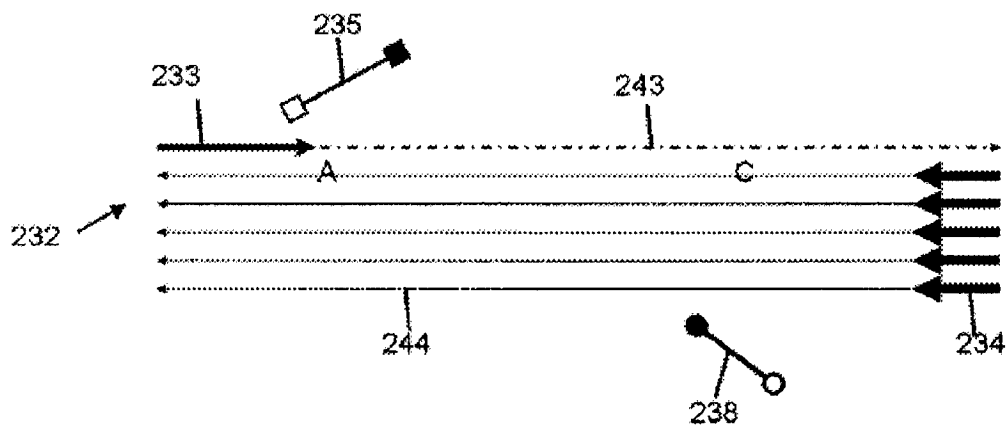


图 21B

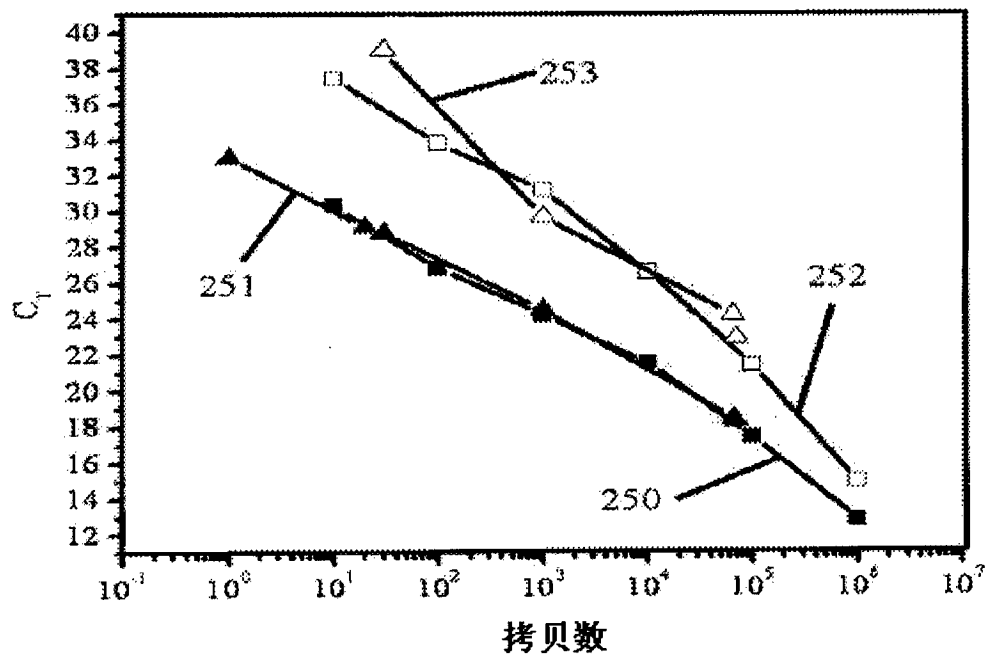


图 22A

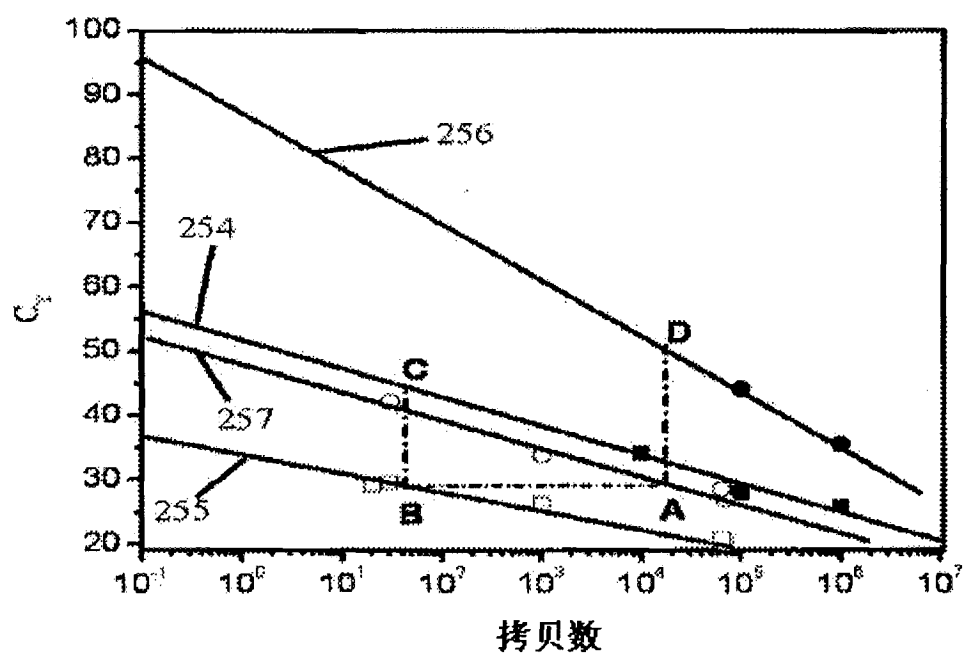


图 22B

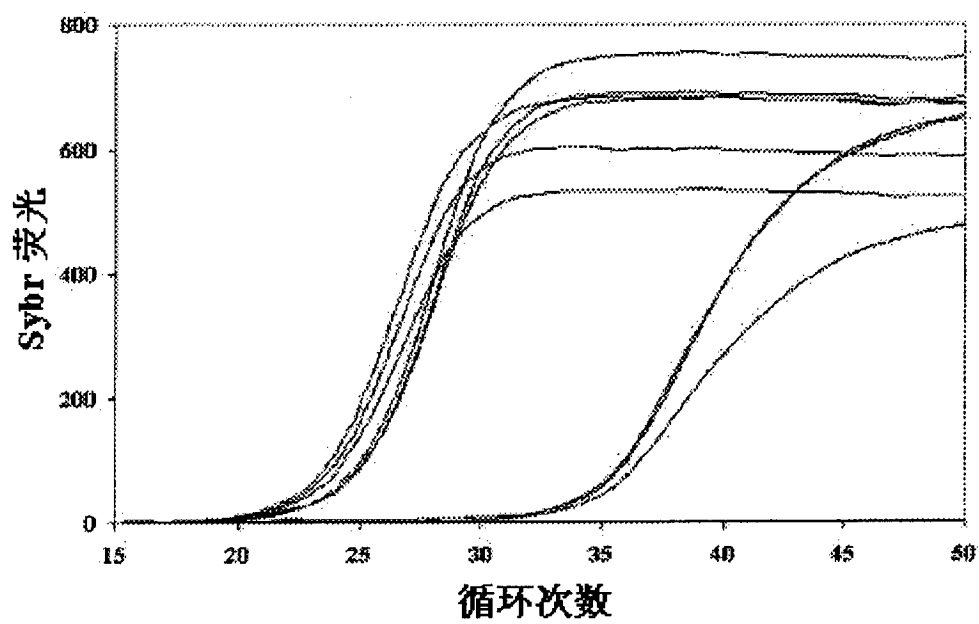


图 23A

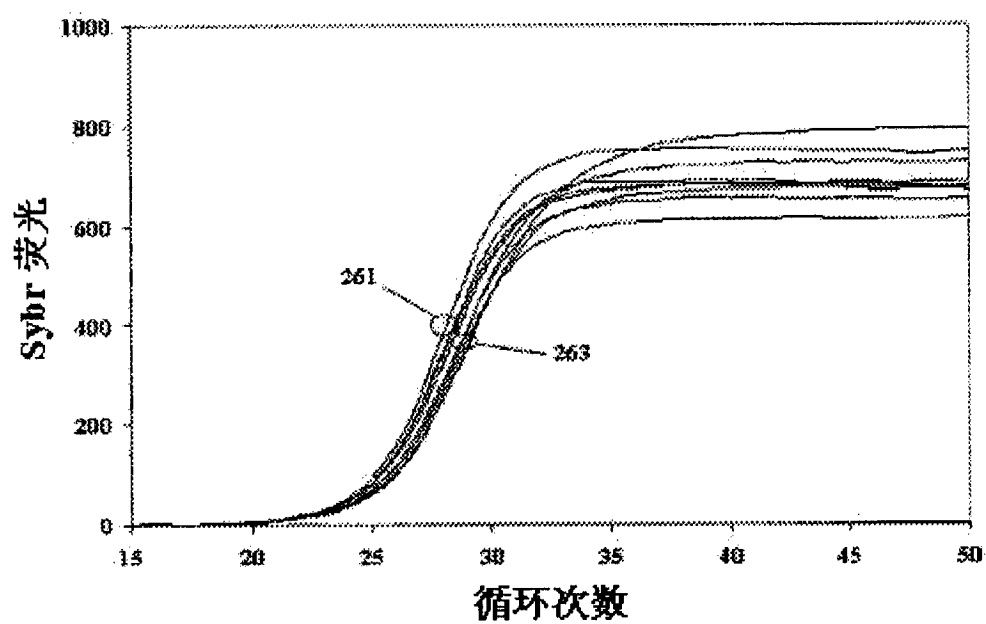


图 23B

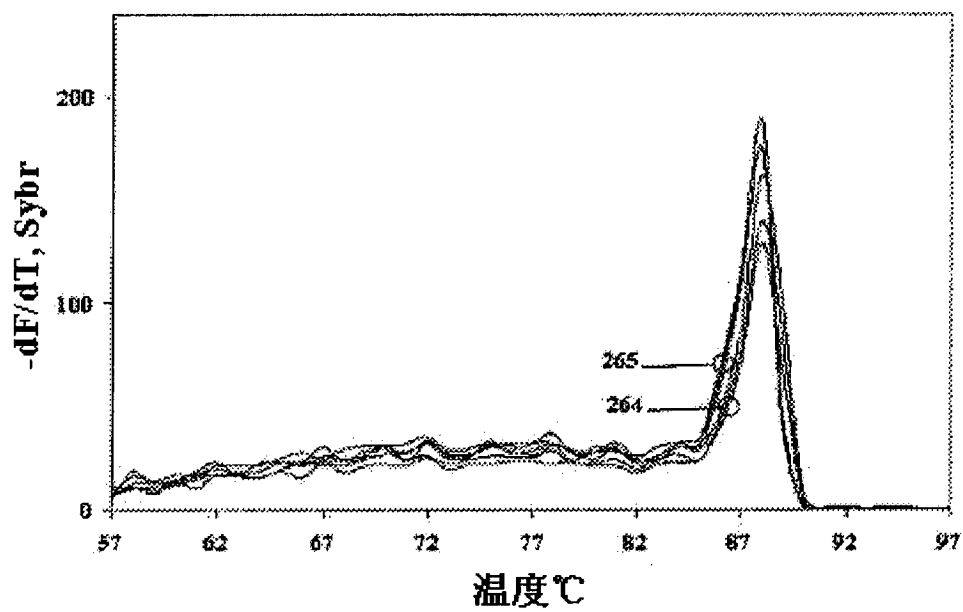


图 23C

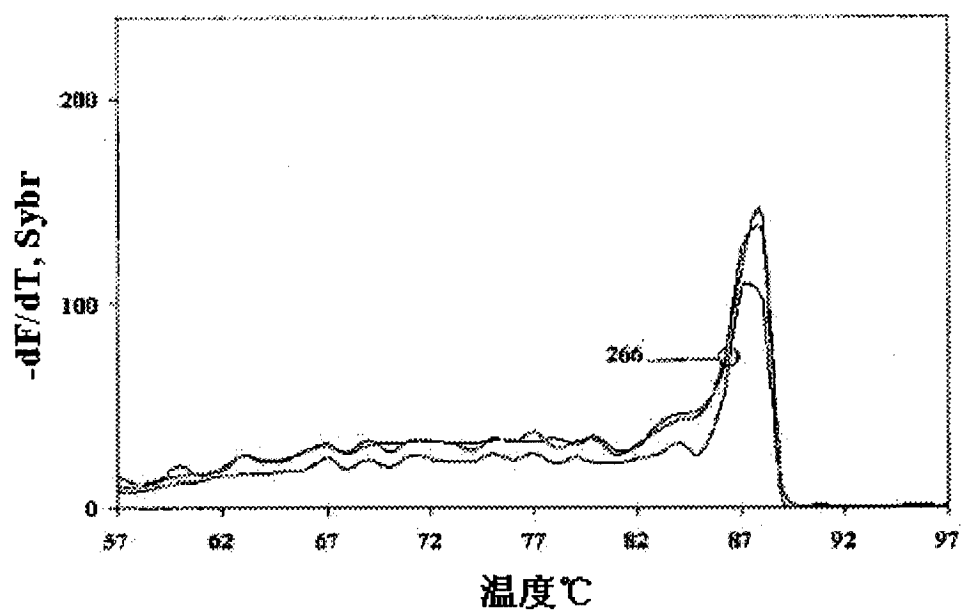


图 23D

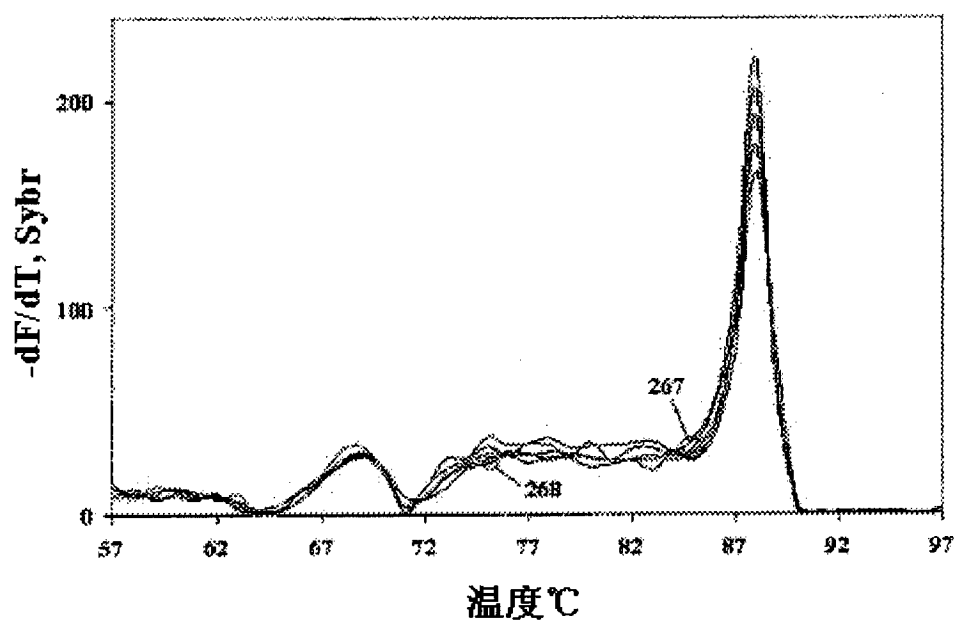


图 23E