(19) **RU** (11) **2 149 186** (13) **C1**

(51) МПК[7] **C 12 N 15/00, G 01 N 33/50**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: **95120014/13, 23.11.1995**

(24) Дата начала действия патента: **23.11.1995**

(30) Приоритет: **23.11.1994 US 347.657**

(46) Дата публикации: **20.05.2000**

(56) Ссылки: **US 5210015 A, 11.05.93. US 4683202 A, 28.07.87.**

(98) Адрес для переписки:
101000, Москва, пер. Малый Златоустинский 10, кв.15, бюро "ЕВРОМАРКПАТ", Веселицкой И.А.

(71) Заявитель:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель: **Тереза Ким Хафф ПИКОНЕ (US)**

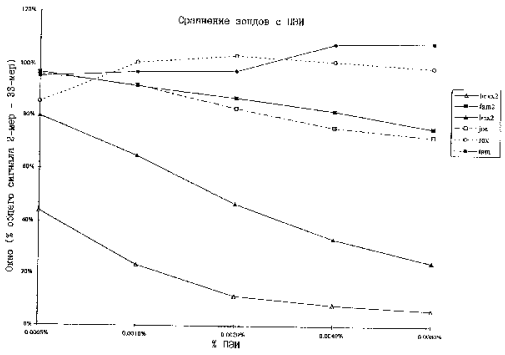
(73) Патентообладатель:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(74) Патентный поверенный:
Веселицкая Ирина Александровна

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ДЛИНЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА, МЕЧЕННОГО СВЕТОИСПУСКАЮЩЕЙ МЕТКОЙ

(57) Реферат:

В изобретении представлен способ обнаружения изменения длины олигонуклеотида, меченного светоиспускающей меткой, путем измерения испускания света в присутствии ДНК-связывающего соединения, которое взаимодействует с меткой, изменяя испускание света меткой, где степень взаимодействия зависит от длины олигонуклеотида. Способ применим к анализам по обнаружению последовательности нуклеиновой кислоты, использующим реакцию, которая приводит к селективному расщеплению гибридизированных олигонуклеотидных зондов, и, в частности, к анализам амплификации/обнаружения, где расщепление гибридизированных зондов сопровождается вставкой праймера. Использование изобретения позволяет повысить точность обнаружения изменения длины олигонуклеотида. 5 з.п. ф-лы, 3 ил., 1 табл.



Фиг.1

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

(19) **RU** (11) **2 149 186** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[7] **C 12 N 15/00, G 01 N 33/50**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **95120014/13, 23.11.1995**

(24) Effective date for property rights: **23.11.1995**

(30) Priority: **23.11.1994 US 347.657**

(46) Date of publication: **20.05.2000**

(98) Mail address:
101000, Moskva, per. Malyj Zlatoustinskij 10, kv.15, bjuro "EVROMARKPAT", Veselitskoj I.A.

(71) Applicant:
F. KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(72) Inventor: **Tereza Kim Khaff PIKONE (US)**

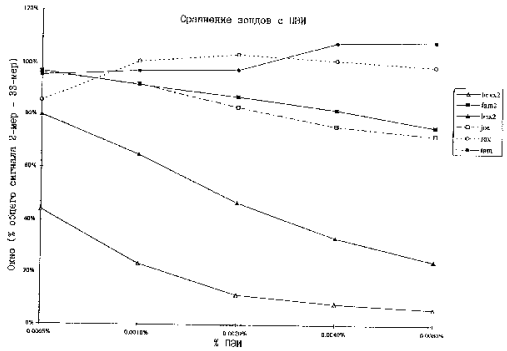
(73) Proprietor:
F. KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(74) Representative:
Veselitskaja Irina Aleksandrovna

(54) METHOD OF DETECTION OF ALTERNATION OF OLIGONUCLEOTIDE LENGTH LABELED WITH LIGHT-EMITTING LABEL

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry, nucleic acids. SUBSTANCE: invention relates to method of detection of alternation of oligonucleotide length labeled with light-emitting label by measurement of light emission in the presence of DNA-binding compound that interacts with label and alternates light emission by label where interaction degree depends on oligonucleotide length. Method can be used for detection of nucleic acid sequence using reaction that results to selective splitting hybridized oligonucleotide probes and, in part, for analysis of amplification/detection where cleavage of hybridized probes is accompanied by insertion of primer. EFFECT: increased precision of detection. 8 cl, 3 ex



Фиг.1

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

Изобретение относится к способам обнаружения изменения длины олигонуклеотидной метки, меченной светоиспускающей меткой. Кроме того, изобретение относится к способам обнаружения последовательностей нуклеиновой кислоты путем гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом, выполняющим функцию зонда.

Обнаружение нуклеиновой кислоты с использованием олигонуклеотидных зондов стало стандартным способом обнаружения специфической мишени. Описаны многочисленные виды анализа. Обычно образец нуклеиновой кислоты гибридизируют с меченым мишень-специфическим зондом, несвязанный зонд отделяют от дуплексов гибридизации и наличие дуплексов гибридизации обнаруживают с использованием метки. Разделение гибридизированных и негибридизированных зондов может быть достигнуто различными средствами. Например, образец нуклеиновой кислоты может быть иммобилизован на твердой подложке и негибридизованный зонд удален путем промывки, или дуплексы гибридизации и несвязанный зонд могут быть разделены с помощью гель-электрофореза. В целом в способах требуется наличие стадии разделения для того, чтобы сигнал, генерируемый вследствие последующей гибридизации, мог быть выделен из фонового сигнала, генерируемого несвязанным меченым зондом.

Описаны некоторые способы обнаружения нуклеиновых кислот, которые используют селективное расщепление олигонуклеотидных зондов после образования дуплексов гибридизации зонд-мишень. Обнаружение расщепленных зондов свидетельствует о наличии гибридизации и, следовательно, о присутствии последовательностей-мишеней. Например, Saiki и др., 1985, в Biotechnology 3:1008-1012 описывает способы обнаружения "олигомерной рестрикции", в которых гибридизация мишень-специфического зонда формирует сайт рестрикции, который затем отщепляют с помощью соответствующей рестриктазы. В опубликованной Международной заявке WO 89/09284 описаны способы, в которых используют РНК-зонды для обнаружения последовательностей ДНК-мишени. РНК-зонды, гибридизированные с ДНК-мишенью, расщепляют с использованием РНКазы Н, которая селективно расщепляет РНК в гибридных дуплексах РНК-ДНК. В патенте США 5210015 описаны способы, в которых используется 5'-3' экзонуклеазная активность полимеразы нуклеиновой кислоты расщеплять зонды, гибридизированные с последовательностями-мишенями, и, таким образом, высвобождать меченые олигонуклеотидные фрагменты для обнаружения.

Изобретение полимеразной реакции синтеза цепи (PCR), процесса для амплификации нуклеиновых кислот, позволило обнаруживать нуклеиновые кислоты с существенно возросшей чувствительностью и специфичностью. При использовании PCR сегменты уникальной копии геномной ДНК перед обнаружением могут быть селективно амплифицированы до легко обнаруживаемого уровня. Способы PCR раскрыты в патенте США 4683202. PCR и способы обнаружения продуктов PCR с использованием олигонуклеотидного зонда, способного к гибридизации с амплифицированной нуклеиновой кислотой-мишенью, описаны в патенте США 4683195 и в публикации Европейского патента 237362.

Описанные выше способы обнаружения нуклеиновых кислот, в которых используется селективное расщепление зондов гибридизации после образования дуплексов гибридизации зонд-мишень, были применены для обнаружения амплифицированной нуклеиновой кислоты. Saiki и др., 1985, в Science, 230:1350-1353 описывает применение "олигомерной рестрикции" для обнаружения PCR-амплифицированной нуклеиновой кислоты. В патенте США 5210015, см. выше, описывается анализ продуктов PCR-амплификации с использованием 5'-3' экзонуклеазной активности полимеразы нуклеиновой кислоты, позволяющей расщеплять меченые зонды, гибридизированные с последовательностями-мишенями, см. также Holland и др., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280. В способах, изложенных в патенте США 5210015, зонды, которые гибридизируют с областью нуклеиновой кислоты-мишени, связанной амплификационными праймерами, включают в амплификационную реакционную смесь. Гибридизированные зонды отщепляют с помощью 5'-3' нуклеазной активности полимеразы в ходе вставки праймера. Обнаружение меченых фрагментов свидетельствует о наличии как вставки праймера и гибридизации зонда, так и, следовательно, об амплификации специфической последовательности-мишени.

Описано большое количество агентов для мечения нуклеиновых кислот как зонда, так и мишени, способствующих облегчению обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени. Были описаны метки, обеспечивающие сигналы, определяемые с помощью флуоресценции, радиоактивности, колориметрии, дифракции или поглощения рентгеновских лучей, магнетизма и ферментной активности, и включающие, например, флуорофоры, хромофоры, радиоактивные изотопы (в частности, ^{32}P и ^{125}J), электронно-плотностные реагенты, ферменты и лиганды, имеющие специфических связывающих партнеров. Мечение может быть осуществлено с помощью большого количества средств, таких как химическая модификация праймера или зонда для включения метки, или использование полимеризующих агентов для включения модифицированного нуклеозидтрифосфата во вставочный продукт.

Использование олигонуклеотидных зондов, меченных взаимодействующими флуоресцентными метками, при анализе гибридизации нуклеиновой кислоты описано Morrison, 1992, в Nonisotopic DNA Probe Techniques, Kricka, изд. Academic Press, Inc., Сан-Диего, CA, глава 13; и Heller и Morrison, 1985 в Rapid Detection and Identification of Infections Agents, Academic Press, Inc., Сан-Диего, CA, стр.

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

245-256. Способы, основанные на изменении флуоресценции, которое происходит, когда пригодные флуоресцентные метки вносят в непосредственную близость, описаны в литературе как перенос флуоресцентной энергии (ПФЭ), перенос флуоресцентной резонансной энергии, перенос нерадиоактивной энергии, перенос длинноволновой энергии, перенос дипольно-связанной энергии или перенос энергии Ферстера.

Morrison, 1992, см. выше, описывает три вида анализов. В двух видах анализов взаимодействующие флуоресцентные метки связывают с отдельными олигонуклеотидами, которые либо вносят вместе, либо разделяют при гибридизации зонда. Эти виды анализов называют либо неконкурирующими, либо конкурирующими, в зависимости от того, конкурирует ли гибридизация зонд-зонд с гибридизацией зонд-мишень. В обоих видах анализов требуется синтез двух сайт-специфичных меченых зондов. В третьем виде анализа одну флуоресцентную метку связывают с зондом гибридизации, а вторую флуоресцентную метку помещают в непосредственной близости путем интеркаляции в двухцепочечный дуплекс гибридизации. В растворе не происходит значительного взаимодействия между интеркалированной меткой и негибридизированным зондом. Поскольку интеркалированную метку можно интеркалировать в любую двухцепочечную нуклеиновую кислоту, этот вид анализа практикуют только для обнаружения одноцепочечной нуклеиновой кислоты-мишени.

В патенте США 5210015 описано использование зонда гибридизации, который метят взаимодействующими флуоресцентными метками, находящимися в тесной близости. Метки наносят так, что разложение зонда в ходе амплификации разделяет метки, производя, таким образом, обнаруживаемое изменение флуоресценции. Такие множественно-меченые зонды трудно и дорого синтезировать.

Обычные способы молекулярной биологии и химии нуклеиновых кислот, относящиеся к данной области техники, объяснены полностью в литературе, см., например, Sambrook и др. ,1985, Moleqular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Нью-Йорк; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, изд. , 1984); Nucleic Acid Hibridization (B.D.Hames и S.J. Higgins, изд., 1984); и в серии Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.).

В целом в настоящем изобретении предложены условия, при которых происходит значительное гашение в растворе ДНК-связывающим соединением олигонуклеотида, меченного светоиспускающей меткой. Это гашение происходит в растворе без гибридизации меченого олигонуклеотида с комплементарной ему последовательностью. В способах по настоящему изобретению используется зависимость этого гашения от длины меченого олигонуклеотида. Гашение короткого меченого олигонуклеотида (примерно 6 или менее нуклеотидов) менее заметно, чем гашение более длинного меченого олигонуклеотида. Как явление гашения в растворе ДНК-связывающим соединением меченого светоиспускающей меткой олигонуклеотида, так и зависимость гашения от длины олигонуклеотида ранее не были описаны.

В настоящем изобретении предложены способы обнаружения изменения длины меченых олигонуклеотидов, основанные на изменении флуоресценции в присутствии ДНК-связывающего соединения. В частности, в настоящем изобретении предложены способы обнаружения деградации (расщепления) олигонуклеотидов в реакционной смеси без необходимости отделения фрагментов расщепленного олигонуклеотида от нерасщепленного олигонуклеотида. Олигонуклеотиды мечены светоиспускающей меткой. ДНК-связывающее соединение, которое может взаимодействовать с меткой для гашения испускания света меткой, добавляют в реакционную смесь. Деградацию олигонуклеотида обнаруживают путем измерения испускания света меткой после реакции. Поскольку гашение зависит от длины меченого олигонуклеотида, то деградация олигонуклеотида вызывает обнаруживаемое изменение испускания света меченым олигонуклеотидом.

В настоящем изобретении предложены усовершенствованные способы обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени в образце путем гибридизации с олигонуклеотидным зондом. Указанные способы основаны на селективном расщеплении зондов, гибридизированных с нуклеиновой кислотой-мишенью. Обнаружение расщепленных зондов с использованием способов по настоящему изобретению указывает на присутствие нуклеиновой кислоты-мишени.

В одном из примеров выполнения настоящего изобретения представлен способ обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени в образце, включающий:

(а) приготовление реакционной смеси, которая включает образец и олигонуклеотидный зонд, меченный светоиспускающей меткой, где указанный зонд содержит последовательность, способную к гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, и где ДНК-связывающее соединение способно модифицировать испускание света меткой;

(б) добавление ДНК-связывающего соединения к аликвотному количеству реакционной смеси стадии (а) и измерение испускания света меткой;

(в) обработку указанной смеси в условиях, при которых указанный олигонуклеотидный зонд гибридизируется с указанной последовательностью-мишенью и расщепляется;

(г) добавление ДНК-связывающего соединения к аликвотному количеству реакционной смеси стадии (в) и измерение испускания света меткой; и

(д) определение на основании разницы в испусканиях света, измеренных на стадиях (б) и (г), присутствует ли последовательность-мишень.

Селективное расщепление зондов, гибридизированных с нуклеиновой кислотой-мишенью, может быть достигнуто с помощью любых многочисленных известных

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

реакций. Примеры пригодных реакций, которые селективно расщепляют зонды, гибридизированные с последовательностью-мишенью, описаны выше Saiki и др., 1985, см. выше; в WO 89/09284, см. выше; и в патенте США 5210015, см. выше.

Способы по настоящему изобретению для обнаружения нуклеиновых кислот прежде всего пригодны для использования в сочетании с процессами амплификации. Так, в одном варианте выполнения изобретения последовательность-мишень амплифицируют до или в сочетании со стадией (в).

В предпочтительном варианте выполнения настоящее изобретение обеспечивает улучшение гомогенной PCR-амплификации и анализа по обнаружению продукта PCR, описанного в патенте США 5210015, в котором используется единая полимераза нуклеиновой кислоты как для вставки праймера, так и для расщепления гибридизированных меченых зондов. Усовершенствования, обеспечиваемые настоящим изобретением, позволяют использовать зонд, меченный одной светоиспускающей меткой, не требуя послереакционных действий для разделения расщепленных и нерасщепленных зондов.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ для обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в образце с использованием полимеразной реакции синтеза цепи (PCR), включающий:

(а) приготовление PCR-смеси, включающей образец, пару олигонуклеотидных праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, обладающую 5'-3' нуклеазной активностью и олигонуклеотидный зонд, способный к гибридизации с областью нуклеиновой кислоты-мишени, связанной олигонуклеотидными праймерами, и где указанный зонд мечен светоиспускающей меткой, и где ДНК-связывающее соединение обладает способностью модифицировать испускание света меткой;

(б) измерение испускания света меткой в реакционной смеси в присутствии ДНК-связывающего соединения;

(в) обработку PCR-смеси в условиях для PCR, где 5'-3' нуклеазная активность полимеразы нуклеиновой кислоты расщепляет зонды, гибридизированные с последовательностью-мишенью;

(г) измерение испускания света меткой в присутствии ДНК-связывающего соединения;

(д) определение по разнице в испусканиях света на стадиях (б) и (г), присутствует ли последовательность-мишень.

Фиг. 1 относится к зависимости гашения от длины меченого олигонуклеотида, светоиспускающей метки и концентрации ДНК-связывающего соединения, как описано в примере 1.

Фиг. 2 относится к зависимости гашения от молекулярного веса и концентрации использованного полиэтиленимина (ПЭИ), как описано в примере 2.

Фиг. 3 относится к количественному анализу нуклеиновых кислот путем амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в присутствии внутреннего стандарта количественного контроля, как описано в примере 3.

Для лучшего понимания изобретения некоторые термины определены ниже.

Термины "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" относятся к зондам и фрагментам олигомера, которые должны быть обнаружены, и они должны быть родственны полидеоксирибонуклеотидам (содержащим 2-деокси-О-рибозу), полирибонуклеотидам (содержащим D-рибозу) и любому другому типу полинуклеотида, который является N-глюкозидом с пуриновым или пиримидиновым основанием или с модифицированным пуриновым или пиримидиновым основанием. Термины "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" не подчеркивают разницу в длине, и эти термины могут использоваться взаимозаменяемо. Эти термины относятся только к первичной структуре молекулы. Таким образом, эти термины включают двух- и одноцепочечную ДНК, а также двух- и одноцепочечную РНК.

Термины "область-мишень", "последовательность-мишень" и "последовательность нуклеиновой кислоты-мишень" относятся к области нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена.

Термин "зонд" относится к олигонуклеотиду, обычно меченному, который образует дуплексную структуру с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени вследствие комплементарного объединения оснований. Зонд должен включать "область гибридизации", предпочтительно состоящую из 10-50 нуклеотидов, более предпочтительно из 20-30 нуклеотидов, соответствующих области последовательности-мишени. "Соответствующий" означает идентичный или комплементарный к рассматриваемой нуклеиновой кислоте. В настоящем изобретении олигонуклеотидные зонды мечены, т.е. связаны с флуоресцентной меткой для того, чтобы их можно было обнаружить.

Термин "гибридизация" относится к образованию дуплексной структуры вследствие комплементарного объединения оснований двух одноцепочечных нуклеиновых кислот. Гибридизация может происходить между полностью комплементарными цепочками нуклеиновой кислоты или между цепочками нуклеиновой кислоты, содержащими минорные области ошибочного спаривания. Условия, при которых будут гибридизироваться только полностью комплементарные цепочки нуклеиновой кислоты, называются "условиями строгой гибридизации". Две одноцепочечные нуклеиновые кислоты, которые являются комплементарными за исключением минорных областей ошибочного спаривания, называются "комплементарными в значительной степени". Стабильные дуплексы комплементарных в значительной степени последовательностей могут быть получены в условиях менее строгой гибридизации. Специалисты в области технологии нуклеиновых кислот могут эмпирически определить стабильность дуплекса, рассматривая множество переменных, включающих, например, длину и концентрацию пары оснований

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

олигонуклеотидов, ионную силу и встречаемость ошибочно спаренных пар оснований.

Термины "последовательность-специфический олигонуклеотид" и "ПСО" относятся к олигонуклеотидным зондам, у которых область гибридизации строго комплементарна последовательности, которая должна быть обнаружена. Использование условий строгой гибридизации, при которых зонд должен спариваться только со строго комплементарной последовательностью-мишенью, позволяет обнаруживать специфическую последовательность-мишень. Условия строгой гибридизации хорошо известны в данной области техники, см., например, Sambrook и др. , 1985, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Строгие условия зависят от последовательности и различны при различных обстоятельствах. Обычно строгие условия выбирают так, чтобы они были примерно на 5°C ниже термической точки плавления ($T_{п}$) для специфической последовательности при определенных ионной силе и pH. $T_{п}$ представляет собой температуру (при определенных ионной силе и pH), при которой диссоциировало 50% пар оснований. Снижение строгости условий гибридизации позволит допустить наличие ошибочно спаренных последовательностей; степень допущения наличия ошибочных спариваний может контролироваться путем подходящей корректировки условий гибридизации.

Термин "субпоследовательность" относится к нуклеотидной последовательности, содержащейся внутри другой последовательности.

Термин "метка", как он используется в настоящем описании, относится к любому атому или молекуле, которые могут быть присоединены к нуклеиновой кислоте и которые могут быть использованы либо для обеспечения обнаруживаемого сигнала, либо для взаимодействия со второй меткой для модификации обнаруживаемого сигнала, обеспечиваемого второй меткой. Предпочтительными метками являются соединения, испускающие свет, которые генерируют обнаруживаемый сигнал путем флуоресценции, хемолюминесценции или биолюминесценции.

Термин "флуорофор" относится к соединению, которое способно флуоресцировать, т.е. адсорбировать свет одной частоты и испускать свет другой, обычно более низкой частоты.

Термин "биолюминесценция" относится к форме хемолюминесценции, при которой соединение, испускающее свет, является соединением, обнаруживаемым в живых организмах. Примеры биолюминесцентных соединений включают бактериальную луциферазу и луциферазу светляков.

Термин "гашение" относится к уменьшению флуоресценции первого соединения, вызванному вторым соединением, независимо от механизма. Для гашения обычно требуется, чтобы соединения находились в тесной близости. Как употребляется в настоящем описании, когда говорится о том, что либо соединение, либо флуоресценция соединения гасится, то понимается, что оба высказывания относятся к одному и тому же явлению.

Термин "реакционная смесь" относится к раствору, содержащему реагенты, необходимые для проведения данной реакции. "Амплификационная реакционная смесь" относится к раствору, содержащему реагенты, необходимые для проведения амплификационной реакции, обычно содержащему олигонуклеотидные праймеры и ДНК-полимеразу в подходящем буфере. Реакционные смеси для специфических реакций хорошо известны из литературы.

Способы по настоящему изобретению применимы для обнаружения либо синтеза, либо расщепления олигонуклеотидов. Обнаружение отщепленного олигонуклеотида проводят в растворе, содержащем ДНК-связывающее соединение, которое может взаимодействовать с меткой, снижая испускание света меткой. Изменение длины меченого олигонуклеотида в результате синтеза или отщепления приводит к обнаруживаемому изменению испускания света присоединенной метки. Пригодные светоиспускающие метки и ДНК-связывающие соединения, которые могут взаимодействовать, изменяя испускание света меткой, описаны ниже.

В способах настоящего изобретения, приведенных в качестве примера, обнаруживают испускание света флуоресцентной меткой, связанной с одноцепочечным олигонуклеотидом. ДНК-связывающее соединение гасит флуоресценцию метки в той степени, которая зависит от длины присоединенного олигонуклеотида. С точки зрения уровня техники представляется неожиданным как наличие гашения в растворе ДНК-связывающим соединением флуоресцентной метки, связанной с одноцепочечным олигонуклеотидом, так и зависимость гашения от длины олигонуклеотида.

В предпочтительном варианте выполнения изобретения ДНК-связывающим агентом является полиэтиленимин (ПЭИ), который относится к классу разветвленных или неразветвленных полимеров этиленимина с различными молекулярными весами. Производные ПЭИ, такие как гидроксиэтилированный ПЭИ, могут быть пригодными в способах по настоящему изобретению. Другие соединения, которые, как было продемонстрировано, могут использоваться в способах по настоящему изобретению, включают спермин и спермадин.

Разветвленный ПЭИ является коммерчески доступным на фирме Polyscience, Inc. (Warrington, PA) с молекулярными весами, определяемыми на основе вязкости, составляющими от 600 до по меньшей мере 60000-80000. Были испытаны ПЭИ с молекулярными весами 600, 1200, 1800, 10000 и 60000-80000, и было показано, что их можно использовать в способах по настоящему изобретению для различения флуоресцентно меченных олигонуклеотидов с длиной 2 от таковых с длиной 33. Любой специалист в данной области техники способен эмпирически определить, какой

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

размер ПЭИ наиболее пригоден для конкретного применения.

Пригодные концентрации ДНК-связывающего соединения определяют эмпирически. Обычно оптимальная концентрация ДНК-связывающего соединения зависит от типа используемой светоиспускающей метки и от концентрации реакционных реагентов. В частности, было установлено, что на оптимальную концентрацию ПЭИ влияет концентрация соли. Было установлено, что в некоторых реакциях добавление хелатирующего агента (например, примерно 1,5 мМ ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоты)) в реакционную смесь расширяет диапазон ПЭИ, в котором "окно" близко к максимальной величине. Процедура оптимизации концентрации ДНК-связывающего соединения, которая обеспечивает максимальное различие между флуоресценцией длинных и коротких меченых олигонуклеотидов, может быть проведена, по существу, как описано ниже в примерах 1 и 2.

Многие светоиспускающие соединения, описанные в данной области техники, пригодны для использования в качестве олигонуклеотидных меток в способах по настоящему изобретению. В идеале флуорофор должен обладать большим смещением Стокса (т.е. большой разницей между длиной волны для максимума поглощения и длиной волны для максимума испускания света) для того, чтобы минимизировать интерференцию с рассеянным возбужденным светом. Пригодные соединения, которые хорошо известны в данной области техники, включают, но не ограничены ими, флуоресцин и его производные, такие как флуоресцин (FAM), гексахлорфлуоресцин (HEX), тетрахлорфлуоресцин (TET) и дихлордиметилфлуоресцин (JOE); родамин и производные, такие как Техасский красный, родамин (ROX) и тетраметилродамин (TAMRA); светящийся желтый и производные кумарина, такие как 7-Me $_2$N-кумарин-4-ацетат, 7-OH-4-CH $_3$-кумарин-3-ацетат и 7-NH $_2$-4-CH$_3$-кумарин-3-ацетат (AMCA). FAM, HEX, TET, JOE, ROX и TAMRA продаются фирмой Perkin Elmer, Applied Biosystems Division (Forster Sity, CA). Техасский красный и многие другие пригодные соединения поставляются фирмой Molecular Probes (Eugene, OR). Примеры хемолюминесцентных и биолюминесцентных соединений, которые могут быть пригодны в качестве энергетического донора, включают люминол (аминофталгидразид) и производные, и луциферазы.

Олигонуклеотид может быть получен с помощью любого пригодного способа, включая, например, клонирование и выделение соответствующих последовательностей с использованием рестриктаз и прямого химического синтеза способом, таким как фосфортриэфирный способ Narang и др., 1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99; фосфордиэфирный способ Brown и др., 1979, Meth. Enzymol., 109-151; диэтилфосфорамидитный способ Beaucage и др., 1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862; способ твердого носителя по патенту США 4458066. Способы синтеза меченых олигонуклеотидов описаны Agrawal и Zamecnik, 1990, Nucl. Acids. Res. 18(18): 5419-5423; MacMillan и Verdine, 1990, J. Org. Chem. 55:5931-5933; Pieles и др., 1989, Nucl. Acids. Res. 17(22):8967- 8978; Roget и др., 1989, Nucl. Acids. Res. 17(19):7643-7651; и Tesler и др., J. Am. Chem. Soc. 111: 6966-6976. Обзор способов синтеза дан Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry I(3):165-187.

Способы по настоящему изобретению прежде всего пригодны для обнаружения амплифицированных нуклеиновых кислот, как ДНК, так и РНК. Пригодные способы амплификации дополнительно к PCR (патенты США 4683195; 4683202 и 4965188) включают, но неограничены, следующие: лигазно-цепьевая реакция (LCR, Wu и Wallace, 1989, Genomics 4:560-569 и Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193); полимеразно-лигазно-цепьевая реакция (Barany, 1991, PCR Methods and Applic. 1:5-16); "брешь"-ЛЦР (публикация WO 90/01069); восстановительно-цепьевая реакция (описание Европейского патента 439182), 3SR (Kwoh и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177; Guatelli и др., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878; публикация WO 92/08800), и NASBA (патент США 5130238). Настоящее изобретение не ограничивается какой-либо конкретной системой амплификации. При разработке других систем эти системы могут оказаться полезными для использования в данном изобретении. Современный обзор систем амплификации был опубликован Abramson и Myers, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4:41-47.

Предпочтительный вариант выполнения настоящего изобретения обеспечивает усовершенствование процесса, описанного в патенте США 5210015, см. выше, и Holland и др., 1991, Procl. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280. Данный процесс включает использование 5'-3' экзонуклеазной активности термостабильной ДНК-полимеразы для отщепления ренатурированных меченых олигонуклеотидных зондов от дуплексов гибридизации и высвобождения меченых фрагментов для обнаружения. Расщепление меченых зондов по настоящему изобретению с помощью 5'-3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы высвобождает метки в реакционную смесь. Гашение сигнала в растворе ДНК-связывающим соединением существенно выше, если флуорофор связан с полноразмерным нерасщепленным олигонуклеотидным зондом, чем если он связан с укороченным отщепленным фрагментом. Результирующее увеличение наблюдаемой флуоресценции свидетельствует о расщеплении зонда, которое безусловно свидетельствует как о наличии последовательностей-мишеней, так и о том, что произошла гибридизация зонд/мишень.

В целом, нуклеиновая кислота в образце должна являться последовательностью ДНК, чаще всего геномной ДНК. Однако по настоящему изобретению можно использовать другие нуклеиновые кислоты, такие как матричная РНК, рибосомная РНК, вирусная РНК или клонированная ДНК. Пригодные образцы нуклеиновой кислоты

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

включают одно- и двухцепочечные ДНК или РНК для использования по настоящему изобретению. Для специалистов в данной области техники понятно, что в зависимости от используемой реакции для расщепления меченых олигонуклеотидных зондов, также как и от природы нуклеиновой кислоты, нуклеиновая кислота может быть обнаружена достаточно просто с применением соответствующих и хорошо понятных модификаций используемого способа.

Подготовка образца варьируется в зависимости от происхождения образца, мишени, которая должна быть обнаружена, и реакции разложения олигонуклеотида, используемой в данном анализе. Для каждого анализа требуется образец мишени в буфере, который должен быть совместим с используемыми в анализе реагентами. Если мишень амплифицируют либо перед, либо одновременно с обнаружением расщепления зонда, то нуклеиновая кислота-мишень должна быть в буфере, совместимом с ферментами, используемыми для амплификации мишени. Нуклеиновая кислота-мишень может быть выделена из различных биологических материалов, включающих ткани, жидкости тела, экскременты, мокроту, слюну, клетки растений, бактериальные культуры и т.д.

Способы подготовки образца, пригодные для каждого анализа, описаны в данной области техники, см., например, Sambrook и др., см. выше. Простые и быстрые способы подготовки образцов для PCR-амплификации последовательностей-мишеней описаны Higuchi, 1989, в PCR Technology (изд. Erlich, Stockton Press, New York) и в PCR Protocols, Chapters 18-20 (Innis и др., Academic Press, 1990). Специалист в данной области техники способен выбрать и оптимизировать опытным путем пригодную схему анализа.

Испускание света меткой в растворе измеряют с помощью спектрофлуорометра, такого как Hitach/Perkin Elmer Model 650-40 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) или люминесцентный спектрофотометр PTILS-100 (Photon Technology International, London, Ontario, Canada). Спектрофлуорометр в зависимости от характеристик конкретного прибора позволяет определять длину волны возбуждения и испускания света, а также ширину полосы частот. Обычный специалист в данной области техники знает, как определить настройку длины волны и ширину полосы частот, подходящих для обнаружения испускания света конкретной меткой. Общее руководство можно найти, например, в The Merck Index (редакторы Budavari и др. , 1989, Merck Co. Inc. Rahway, NJ) и в Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon) Catalog, 1990, Haugland. Хотя каждая метка имеет дискретный спектр испускания света, для использования данного изобретения пригоден широкий диапазон обнаружения длин волн.

Изменение испускания света в результате расщепления зонда предпочтительно определяют путем сравнения испускания света, измеренного до и после расщепления зонда. Альтернативно этому изменение в испускании света может быть измерено одновременно с расщеплением зонда путем включения ДНК-связывающего агента в реакционную смесь и контроля за флуоресценцией зонда непрерывно или периодически во время протекания реакции. В этом случае предпочтительно использование реакционных сосудов, которые также пригодны для измерения испускания света, которые позволяют непосредственно измерять испускание света, не открывая реакционный сосуд. Однако, так как определенные ДНК-связывающие агенты могут ингибировать определенные расщепляющие зонд реакции, может оказаться необходимым исключить ДНК-связывающий агент из реакционной смеси. В этом случае измерения должны быть проведены до начала реакции с использованием дуплицированной реакционной смеси. Обычно реакционную смесь разделяют до начала реакции, и часть реакционной смеси, которая не подвергается условиям реакции, используют для измерений испускания света до начала реакции. Обычно наиболее удобно измерять испускание света как до начала реакции, так и постреакционное испускание света после завершения реакции.

В предпочтительных способах, в которых способ обнаружения нуклеиновой кислоты объединяют с PCR-амплификацией, как описано выше, реакцию амплификации проводят в автоматическом режиме. В настоящее время доступны термоячейки для реакций фирмы Perkin Elmer (Norwalk, CT), в которых используется нагревательный блок, способный вмещать от 48 до 96 реакционных пробирок. Следовательно, одновременно можно проводить до 96 реакций амплификации.

Пригодные оптические системы для измерения испускания света из всех пробирок при PCR-амплификации описаны Higuchi и др., 1992, см. выше, Higuchi и др., 1993, см. выше, и в описании Европейского патента 512334. В одной из таких оптических систем используют многоволоконные оптические кабели для передачи возбужденного света от источника к реакционной пробирке и измерений испускания света от каждой пробирки. Для измерения флуоресценции от реакционных пробирок необходим только один спектрофлуорометр, так как каждое оптическое волокно может быть быстро считано в единицу времени. В другой оптической системе используется видеокамера для измерения флуоресценции от множества реакционных сосудов одновременно. Любому специалисту в данной области техники очевидно, что для настоящих способов могут быть адаптированы другие детекторные приборы.

В альтернативной пригодной схеме обнаружения используется 96-луночный формат для микротитрования. Этот тип формата часто предпочитают в клинических лабораториях для крупномасштабного скрининга образцов, например для генетического анализа, такого как скрининг серповидноклеточной анемии или вируса СПИДа в скрининговых процедурах банка крови. Настоящее изобретение пригодно для этого типа анализов и исключает необходимость в многочисленных процедурах промывки и экстрагирования, которые требуются в хорошо известных процедурах анализа "в лунке", как форматы типа ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

или других способах, основанных на оптической плотности, см., например, Kolber и др., 1988, J. Immun. Meth. 108:255-264, Huschtscha и др. , 1989, In Vitro Cell and Dev. Biol. 25(l):105-108 и Voller и др., 1979, The Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Dynatech Labs, Alexandria, VA. С помощью настоящих методов обнаружения также можно осуществлять прямое измерение испускания света с использованием аппаратуры, подобной планшет-ридеру ELISA, но предназначенной для возбуждения и измерения флуоресценции. Например, прибор CytoFluor™ 2300, изготовленный фирмой Millipore (Bedford, MA), пригоден для такого способа.

Любому специалисту в данной области техники очевидно, что способы по настоящему изобретению не ограничены конкретными способом обнаружения, термоячейкой для реакции или приборами, измеряющими сигналы, или количеством реакционных сосудов.

Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для одновременного обнаружения многочисленных последовательностей-мишеней. В реакционной смеси присутствуют зонды, специфические для каждой мишени. С каждой присутствующей в образце нуклеиновой кислотой-мишенью будет гибридизирован и должен быть расщеплен соответствующий зонд. Для того, чтобы обнаружить расщепленные зонды по-отдельности, каждый вид зонда метят меткой, которая испускает свет определенной обнаруживаемой длины волны. Каждый вид зонда затем обнаруживают по-отдельности с помощью пригодного разделения измеряемых длин волн.

Таким образом, способы по настоящему изобретению полезны для обнаружения амплифицированных продуктов при способах PCR-коамплификации для обнаружения нескольких мишеней в одном образце. Изобретение прежде всего полезно для количественных сравнений двух различных нуклеиновых кислот-мишеней в одном и том же образце. Способы количественного анализа нуклеиновых кислот описаны в патенте США 5219727. Описанные количественные способы являются способами, основанными на PCR, в которых используется внутренний стандарт для определения либо относительного количества мишеней, либо точной оценки количества мишеней, присутствующих до амплификации, соответственно.

Различное гашение коротких и длинных меченых олигонуклеотидов также может быть использовано для измерения включения нуклеотидов в синтезируемый олигонуклеотид. Например, в анализах ДНК-полимеразной активности измеряют скорость включения нуклеотидов. Для измерения включения нуклеотидов готовят реакционную смесь, содержащую меченые дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) в дополнение к другим реагентам, необходимым для олигонуклеотидного синтеза, например ДНК-полимеразу в подходящем буфере. Флуоресценцию реакционной смеси до синтеза измеряют в присутствии ДНК-связывающего соединения. До синтеза все метки связаны с одиночными нуклеотидами и гашение минимально. После синтеза флуоресценцию реакционной смеси измеряют в присутствии ДНК-связывающего соединения. Синтез олигонуклеотидов приводит к уменьшению количества меченых нуклеотидов. Поскольку более длинные, вновь синтезированные олигонуклеотиды более эффективно гасятся ДНК-связывающим соединением, включение дНТФ в олигонуклеотиды приводит к уменьшению флуоресценции.

Примеры настоящего изобретения, приведенные ниже, служат только для иллюстрации и не ограничивают объем изобретения. Многочисленные варианты выполнения изобретения в объеме формулы изобретения, которая следует за примерами, очевидны для обычных специалистов в данной области техники из предыдущего текста описания и последующих примеров.

Пример 1

Зависящее от длины гашение с помощью ПЭИ

В этом примере описано зависящее от длины гашение меченых олигонуклеотидов в растворе. Олигонуклеотиды длиной 33 и длиной 2 метили одной из различных меток и флуоресценцию каждого олигонуклеотида измеряли в растворе, содержащем ПЭИ. Измерения повторяли с использованием растворов, содержащих различные концентрации ПЭИ для определения оптимальной концентрации ПЭИ, при которой различие в сигналах между олигонуклеотидами длиной 33 и 2 оказалось максимальным.

Зонды синтезировали на синтезаторе ДНК ABI 394 (Perkin Elmer ABD, Foster City, CA) при масштабе 1 микромоль. Амидиты флуоресцентной метки использовали во время олигонуклеотидного синтеза для прямого получения 5'-меченого олигонуклеотида. Зонды длиной 33 синтезировали с группой PO_4 на 3'-конце для использования в способах, описанных в примере 2. Последовательность нуклеиновой кислоты каждого из меченых зондов длиной 33 была SK535 (SEQ ID NO:1) 5'-AGAAGGTGAGATGACCAGAGGACTGAGTC CAAT. Последовательность нуклеиновой кислоты зондов длиной 2 состояла из 5'-AG, соответствующих продукту разложения зондов длиной 33.

Использованные флуоресцентные метки перечислены в таблице вместе с показанными ниже длинами волн возбуждения и испускания света каждой метки. Ширина щели фильтра, используемого для обнаружения каждой метки, как описано ниже, также указана.

Для каждого из перечисленных ниже зондов, растворы для репликационного анализа, содержащие 1 мкМ зонда в 50 мкл буфера (50 мМ Бицина, 100 мМ KOAc (pH 8,3), 3,6 мМ $Mn(OAc)_2$) добавляли в лунки титрационных микропланшетов. Готовили серии растворов, содержащих ПЭИ (молекулярный вес 1200, от фирмы Polysciences Inc. , Warrington, PA) в концентрациях 0,016%, 0,008%, 0,004%, 0,002% и 0,001%. В одну лунку добавляли воду в объеме 50 мкл и ее использовали в качестве контроля с максимальным сигналом. В каждую из оставшихся лунок добавляли по

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

50 мкл раствора ПЭИ. Измерения флуоресценции проводили с помощью планшет-ридера Millipore Cytofluor 2300 Microtiter plate reader с использованием длин волн возбуждения и испускания, приведенных в таблице.

Способы по настоящему изобретению основаны на разнице в гашении коротких и длинных меченых олигонуклеотидов. Измерение этой разницы в гашении, отнесенное к "окну", вычисляли на основе измерений индивидуальной флуоресценции следующим образом. Во-первых, измеряли фоновый уровень гашения, получаемый от одного буфера, и его вычитали из измеренной флуоресценции каждого зонда. Во-вторых, остаточную флуоресценцию вычисляли как отношение флуоресценции зонда в присутствии ПЭИ к флуоресценции этого зонда без ПЭИ и выражали в процентах к непогашенной флуоресценции. Наконец, рассчитывали окно как разницу между остаточной флуоресценцией меченого олигонуклеотида длиной 2 и остаточной флуоресценцией олигонуклеотида длиной 33. Окно является мерой изменения сигнала, которое должно быть результатом разложения меченых зондов длиной 33 на фрагменты длиной 2. Концентрация ПЭИ, обеспечивающая максимальное окно, обеспечивает наивысшую чувствительность методов обнаружения по настоящему изобретению.

Эти результаты представлены на фиг. 1, где изображены зависимости окон, полученных с использованием различных меченых зондов, от концентрации ПЭИ. Обозначения линий соответствуют следующим меченым олигонуклеотидам:

hexx2: HEX-меченные олигонуклеотиды, у которых метка прикреплена к 5'-концу олигонуклеотида через спейсер;

fam2: FAM-меченные олигонуклеотиды;

hex2: HEX-меченные зонды, у которых метка прикреплена непосредственно к 5'-концу олигонуклеотидов;

joe: JOE-меченные олигонуклеотиды;

rox: ROX-меченные олигонуклеотиды;

tam: TAMRA-меченные олигонуклеотиды.

Как видно на фиг. 1, для каждой метки при некоторой концентрации ПЭИ наблюдали значительное окно. Размер полученного окна зависел как от метки, так и от концентрации ПЭИ. Наблюдали, что прикрепление HEX-метки к олигонуклеотиду через спейсер уменьшает размер окна, полученного в диапазоне испытанных концентраций ПЭИ.

Пример 2

Влияние молекулярного веса ПЭИ

В этом примере описано влияние молекулярного веса и концентрации ПЭИ на гашение флуоресцентно меченных зондов. Эксперименты, по существу, такие же, как описанные в примере 1, проводили с использованием FAM-меченных олигонуклеотидов, но используя различные по размерам ПЭИ и в более широком диапазоне концентраций, чем в примере 1.

ПЭИ с молекулярными весами 600, 1200, 1800 и 10000 кДа получали от фирмы Polysciences Inc. , Warrington, PA. Измерения испускания света проводили в растворах для анализа, содержащих буфер, состоящий из 50 мМ Бицина, 115 мМ KOAc, ацетата калия (pH 8,3) и 8% глицерина. Для каждого размера ПЭИ этот ПЭИ включали в растворы для анализа в концентрациях от 0,000013% до 0,02% (в отношении веса к объему). Для каждого размера и концентрации ПЭИ окно рассчитывали аналогично примеру 1.

Результаты представлены на фиг. 2. Установлено, что все размеры ПЭИ пригодны для способов по настоящему изобретению, хотя были получены небольшие различия в размере окна при использовании различных размеров ПЭИ. Для каждого размера ПЭИ по фиг. 2 может быть определена оптимальная концентрация ПЭИ, которая обеспечивает наибольшее окно. В вышеприведенном эксперименте приведен пример процедуры оптимизации размера ПЭИ и концентрации, которую любой специалист в данной области техники может осуществить для каждого проводимого анализа.

Пример 3

Количественный анализ с помощью PCR-амплификации

В данном примере описан количественный анализ нуклеиновой кислоты с использованием способов по настоящему изобретению. В этом примере мишень, состоящую из РНК вируса гепатита С (ВГС) амплифицировали с помощью RT-PCR в присутствии флуоресцентно меченных зондов. Благодаря экзонуклеазной активности ДНК полимераза расщепляла меченые зонды, гибридизированные с последовательностью-мишенью в 5'-3' направлении от праймера амплификации, высвобождая тем самым небольшие меченые олигонуклеотидные фрагменты зонда в реакционную смесь. После амплификации в реакционную смесь добавляли ПЭИ и измеряли флуоресценцию меченых зондов. Образование коротких меченых продуктов разложения олигонуклеотида приводит к увеличению измеряемой флуоресценции, т.к. продукты разложения не столь сильно гасятся ПЭИ, как полноразмерный неразложенный зонд. Поскольку разложению зонда сопутствует амплификация мишени, увеличение флуоресценции свидетельствует об амплификации мишени.

Количественную оценку количества исходных копий последовательности-мишени получали путем сравнения увеличения флуоресценции, происходящего в результате амплификации последовательности-мишени, и увеличения флуоресценции, происходящего в результате амплификации второй последовательности нуклеиновой кислоты. Вторую последовательность нуклеиновой кислоты с известным количеством копий вводят в реакцию, обеспечивая тем самым внутренний количественный стандарт (ВКС), с которым сравнивают амплификацию неизвестного образца. Обнаружение второй последовательности нуклеиновой кислоты достигают путем использования второй флуоресцентной метки, которая испускает свет с другой длиной волны.

Амплификация

Две РНК последовательности-мишени амплифицировали в каждой реакции. Обе последовательности-мишени нуклеиновой кислоты амплифицировали одновременно с использованием праймерной пары, KY78 и KY80. В данном примере РНК последовательности-мишени получали из

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

транскрипционных плазмид. Конструкция и использование транскрипционной плазмиды, содержащей ВГС-последовательность, праймеры амплификации и RT-PCR амплификация описаны в описании Европейского патента 529493 и Young и др., 1993, J. Clin. Microbiol. 31(4):882-886. Первая последовательность-мишень состоит из участка от 5' некодирующей области ВГС. Вторая последовательность-мишень нуклеиновой кислоты, которую использовали в качестве ВКС, включает те же два праймер-связывающих участка, расположенных сбоку последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит альтернативный зонд-связывающий участок. Следовательно, обе последовательности-мишени амплифицировались с использованием одной и той же праймерной пары, однако эти две последовательности-мишени могут быть обнаружены независимо с использованием различных сайт-специфических зондов. Конструкция и использование ВКС описано Mulder и др., 1994, J.Clin. Microbiology 34(2): 292-300.

Амплификацию проводили в присутствии как FAM-меченного зонда, специфического для ВГС-последовательности-мишени, так и HEX-меченного зонда, специфического для ВКС. Максимумы испускания света FAM и HEX соответствуют разным длинам волн, что позволяет независимо обнаруживать зонды путем подходящего выбора измеряемой частоты. Показано, что последовательности нуклеиновой кислоты находятся в 5'-3' ориентации. Зонды синтезировали, как описано выше, с метками на 5' конце. Каждый зонд синтезировали так, чтобы он имел 3'-PO_4 вместо 3'-OH для того, чтобы блокировать любую вставку Taq-полимеразой в ходе реакции амплификации. Последовательность FAM-меченного зонда для обнаружения ВГС-последовательности-мишени описана Young и др., 1993, см. выше, как KY88. Последовательность HEX-меченного зонда для обнаружения ВКС представлена выше в примере I (SEQ ID NO.1).

Амплификации проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей следующие реагенты:

ВГС-последовательность-мишень (с количеством копий, как описано ниже)
1000 копий ВКС
50 мМ Бицина
100 мМ KOAc, pH 8,3
3,6 мМ $Mn(OAc)_2$
0,4 мкМ каждого праймера
1 мкМ каждого зонда
0,2 мМ каждого dUTP, dATP, dGTP, dCTP
20 единиц rTth ДНК-полимеразы*
2 единицы ампераза-урацил-N-глюкозолазы*
8% глицерина

*Разработаны и производятся Hoffmann-La Roche и продаются Perkin Elmer, Norwalk, CT.

Амплификацию выполняли с использованием от 0 до 10 копий ВГС-мишени. В дополнение к реакционным смесям, подвергаемым условиям PCR-термического циклического процесса, готовили и накапливали (без термического процесса) две дополнительные реакционные смеси для использования при контрольных измерениях. Реакционные смеси подвергали амплификации по следующей схеме в термоячейке для реакций GeneAmp 9600 Termal Cycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT):

50°C в течение 2 минут
60°C в течение 30 минут
95°C в течение 1 минуты
2 цикла:
95°C в течение 15 секунд
60°C в течение 20 секунд
46 циклов:
90°C в течение 15 секунд
60°C в течение 20 секунд
72°C в течение по крайней мере 5-10 минут, до 1 часа

После амплификации реакционные смеси держали при 4°C до анализа.

Анализ

Пятьдесят мкл 0,004% раствора ПЭИ (молекулярный вес 1200), содержащего 0,8 мМ ЭДТК, добавляли к 50 мкл каждой реакционной смеси после амплификации, а также к одной из двух реакционных смесей, не подвергавшихся условиям амплификации. Флуоресценцию измеряли в планшет-ридере для микротитрования CytoFluor ^{TM}2300 (Millipore, Location). Флуоресценцию FAM-меченных зондов измеряли при комнатной температуре с использованием 485 нм фильтра возбуждения (ширина полосы пропускания 20 нм) и 530 нм фильтра испускания (ширина полосы пропускания 25 нм). Флуоресценцию HEX-меченных зондов измеряли при комнатной температуре с использованием 530 нм фильтра возбуждения (ширина полосы пропускания 25 нм) и 590 нм фильтра испускания (ширина полосы пропускания 35 нм).

Измеренную флуоресценцию каждой метки зонда корректировали путем вычитания флуоресценции не подвергавшейся циклическому процессу реакционной смеси без зонда, измеряемой в обоих случаях на длине волны, соответствующей данной метке. Результаты представлены на фиг. 3, где изображен логарифм (log) отношения флуоресценций (ВГС/ВКС) в зависимости от логарифма количества копий ВГС-мишени. "Стандартная кривая" получена линейной аппроксимацией данных по методу наименьших квадратов.

Стандартная кривая, полученная в вышеописанном эксперименте, позволяет количественно оценивать неизвестные образцы ВГК. Для количественной оценки неизвестного ВГК-образца нуклеиновую кислоту ВГК амплифицируют с известным количеством ВКС, как описано выше. Вычисляют логарифм отношения измеренных изменений флуоресценции и соответствующее количество копий ВГК определяют из уравнения стандартной кривой.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) Общая информация

(i) Заявитель: F.Hoffmann-La Roche AG

(ii) Название изобретения: Способ обнаружения изменения длины олигонуклеотидной метки, меченной светоиспускающей меткой

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

(iii) Количество последовательностей: 1
(iv) Почтовый адрес:
(A) Адресат: F.Hoffmann-La Roche AG
(B) Улица: Grenzacherstrasse 124
(C) Город: Basle
(D) Кантон: BS
(E) Страна: Switzerland
(F) Индекс: CH-4002
(v) Информация для телекоммуникационной связи:
(A) Телефон: 061 688 7493
(B) Телефакс: 061 688 13 95
(2) Информация для последовательности SEQ ID NO:1:
(i) Характеристики последовательности:
(A) Длина: 33 пар оснований
(B) Тип: нуклеиновая кислота
(C) Тип цепи: одноцепочечная
(D) Топология: линейная
(ii) Тип молекулы: ДНК (геномная)
(xi) Описание последовательности: SEQ ID NO:1:

AGAAGGTGAG ATGACCAGAG GACTGAGTCC AAT 33e

Формула изобретения:

1. Способ обнаружения изменения длины олигонуклеотида, меченного светоиспускающей меткой, включающий проведение реакции в реакционной смеси в условиях, приводящих к изменению длины олигонуклеотида, измерение испускания света меткой в реакционной смеси и обнаружения изменения длины нуклеотида в результате указанного измерения, отличающийся тем, что реакцию проводят в присутствии ДНК-связывающего соединения, способного взаимодействовать с меткой, изменяя испускание света меткой, причем это взаимодействие зависит от длины нуклеотида.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве реакционной смеси для реакции используют реакционную смесь, включающую образец и одноцепочечный олигонуклеотид, меченный светоиспускающей меткой, причем олигонуклеотид содержит последовательность, способную к гибридизации с нуклеиновой кислото-мишенью, а реакция катализирует расщепление олигонуклеотида только в том случае, когда олигонуклеотид гибридизован с нуклеиновой кислотой - мишенью, и создают условия, при которых олигонуклеотид гибридизуется с последовательностью и расщепляется, при этом, измеряя испускание света, определяют не только изменение длины олигонуклеотида, но и наличие последовательности - мишени в реакционной смеси.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что создаваемые условия обеспечивают амплификацию указанной последовательности - мишени.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что в качестве реакционной смеси используют смесь для полимеразной цепной реакции /P C R/, включающую образец, пару олигонуклеотидных праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, обладающую 5' - 3' нуклеазной активностью, и олигонуклеотид, способный к гибридизации с областью нулкиновой кислоты-мишени, причем олигонуклеотид гибридизуется внутри последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, связанной с олигонуклеотидными праймерами, и создают условия для PCR, при которых 5' - 3' нуклеазная активность полимеразы нуклеиновой кислоты расщепляет олигонуклеотид, гибридизованный с последовательностью - мишенью.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что в качестве ДНК - связывающего соединения используют полиэтиленимин или его производные.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что в качестве метки используют метку, выбранную из группы, включающей флуоресцин, родамин и их производные.

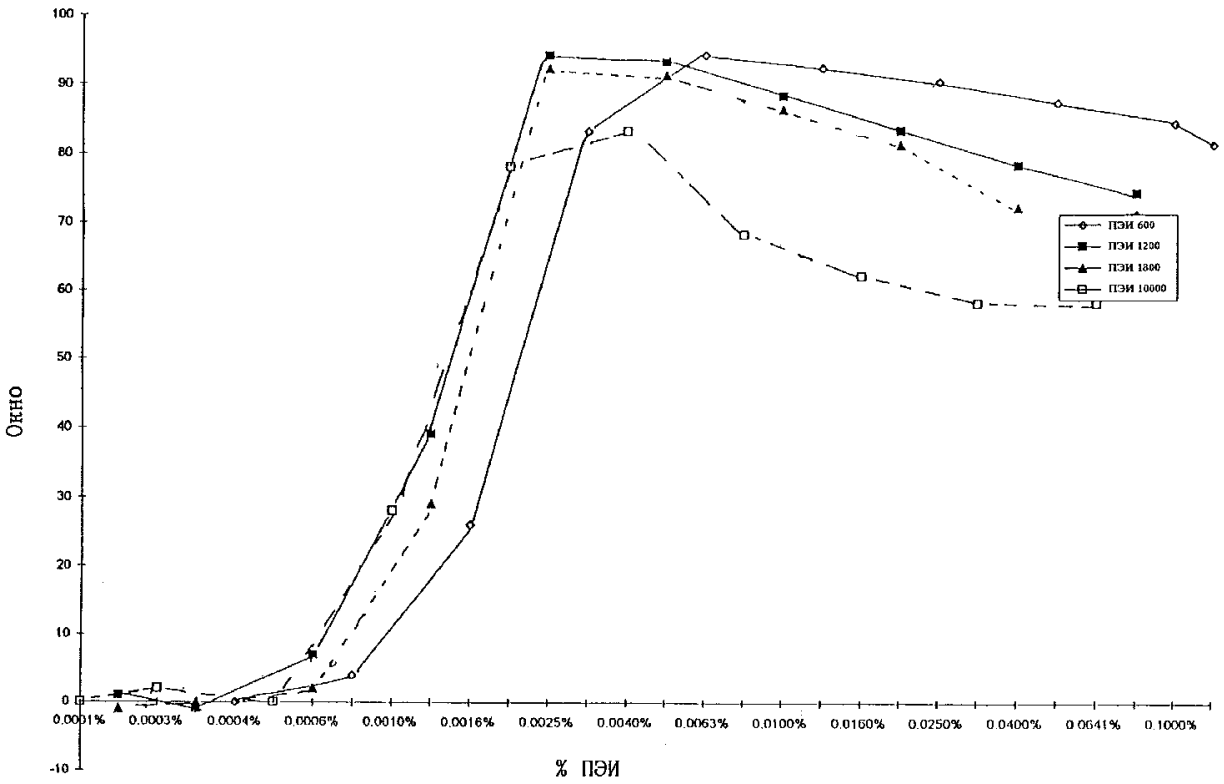
RU 2149186 C1

RU 2149186 C1

Фильтры, используемые для измерений флуоресценции

(длина волны и ширина щели указаны в нанометрах)

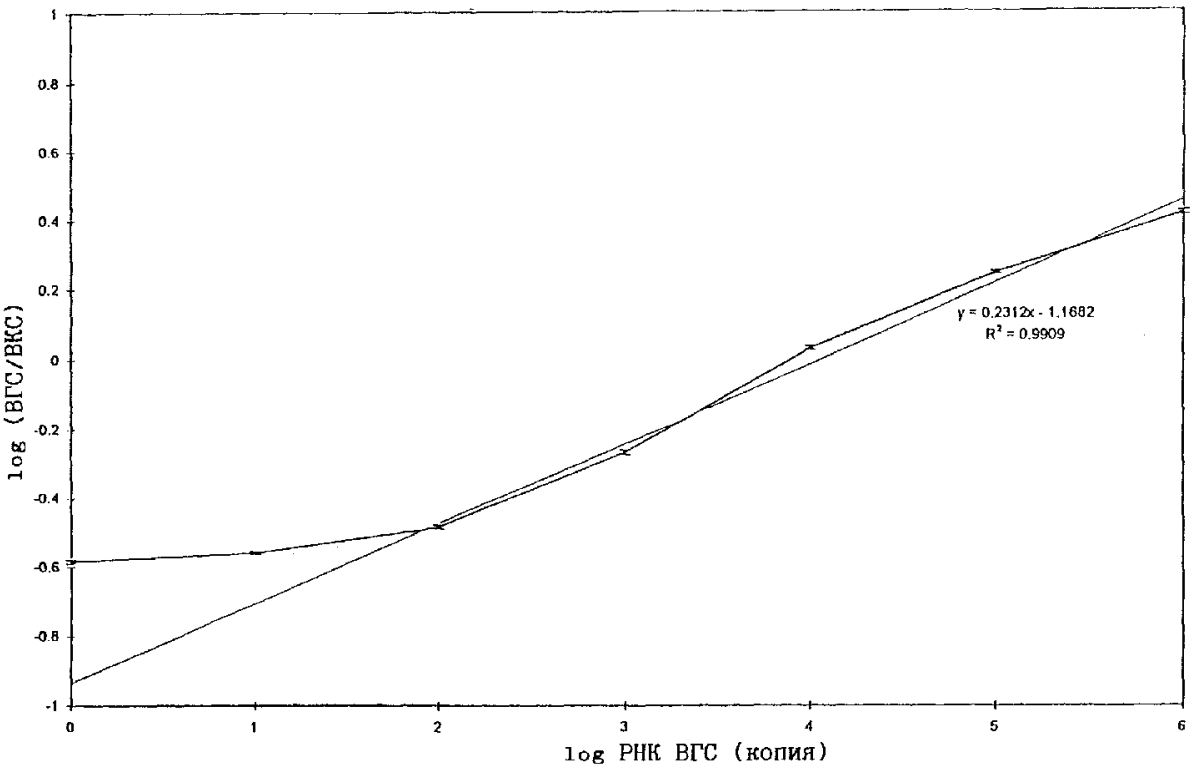
Метка	Максимум возбуждения	Максимум испускания
Флуоресцин (FAM)	485 (20)	530 (25)
Гексахлорфлуоресцин (HEX)	530 (25)	590 (35)
Дихлордиметилфлуоресцин (JOE)	490 (40)	580 (50)
Родамин (ROX)	590 (40)	645 (40)
Тетраметилродамин (TAMRA)	560 (20)	620 (40)



Фиг.2

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1



Фиг.3

RU 2149186 C1

RU 2149186 C1