



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104145029 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201280071069. 2

C12Q 1/34(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 07. 03

C12N 15/11(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2012-0010681 2012. 02. 02 KR

10-2012-0028429 2012. 03. 20 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2012/005281 2012. 07. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/115442 EN 2013. 08. 08

(73) 专利权人 SEEGENE 株式会社

地址 韩国首尔

(72) 发明人 千钟润 李荣祚

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20080160535 A1, 2008. 07. 03,

WO 20100041049 A1, 2010. 02. 18,

WO 2011078441 A1, 2011. 06. 30,

US 7381532 B2, 2008. 06. 03,

彭晓谋. 《串联重复核酸序列构建及其杂交
信号放大作用》. 《生物医学工程学杂志》. 2004,
第 21 卷 (第 1 期), 38-41.

审查员 袁实

权利要求书6页 说明书42页

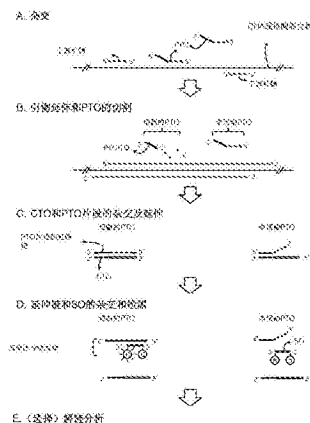
序列表3页 附图16页

(54) 发明名称

利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸 - 依赖性
信号传导寡核苷酸杂交的靶核酸序列的检测

(57) 摘要

本发明涉及利用探测和标记寡核苷酸切割及
延伸 - 依赖性信号传导寡核苷酸杂交 (PCE-SH,
PTO Cleavage and Extension-Dependent
Signaling Oligonucleotide Hybridization)
的靶核酸序列的检测。本发明不使用与靶核酸序
列杂交来提供靶信号的探针。本发明利用与以
靶 - 依赖性的方式形成的延伸链杂交的探针 (信
号传导寡核苷酸), 将具有人为选择的序列的捕
捉和模板化寡核苷酸作为模板合成上述延伸链。



1. 一种利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法,其特征在于,包括:

步骤(a),使上述靶核酸序列与上游寡核苷酸以及探测和标记寡核苷酸进行杂交;上述上游寡核苷酸包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;上述上游寡核苷酸位于上述探测和标记寡核苷酸的上游;

步骤(b),在用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件下,使上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触;上述上游寡核苷酸或者其延伸链诱导具有5'核酸酶活性的上述酶对于上述探测和标记寡核苷酸的切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;

步骤(c),使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸进行杂交;上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;

步骤(d),利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应;与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;

步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;以及

步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示上述延伸链的存在,且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸的至少一部分包含与上述延伸序列互补的序列。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述能够检测的信号是由(i)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记;(ii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及与从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段相结合的标记的组合;(iii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及在步骤(d)的延伸过程中,插入于上述延伸链的标记;或(iv)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记以及嵌入染料提供。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸与包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记相结合,在上述步骤(e)中,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸与单一标记相结合,在上述步骤(e)中,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述单一

标记的信号的变化,从而提供上述能够检测的信号。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,上述单一标记为单一荧光标记。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法进一步包括一个信号传导寡核苷酸,追加的上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,两个上述信号传导寡核苷酸接近于上述延伸链并进行杂交,两个上述信号传导寡核苷酸分别包含相互作用性双重标记中的一个标记,上述相互作用性双重标记包含报道分子及猝灭分子,两个上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段具有上述相互作用性双重标记中的另一个标记,上述延伸链具有来源于从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段的标记,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。

9.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位包含具有第一非-天然碱基的核苷酸,在具有第二非-天然碱基以及上述相互作用性双重标记中的另一个标记的核苷酸存在的条件下,实施上述步骤(d)的延伸反应,由此,向上述延伸链插入标记,上述第二非-天然碱基具有与第一非-天然碱基的特异性结合亲和性;上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。

10.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,在具有上述相互作用性双重标记中的另一个标记的核苷酸存在的条件下,实施上述步骤(d)的延伸反应,由此,向上述延伸链插入标记;上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。

11.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸包含荧光共振能量转移的受体,在嵌入染料存在的条件下,实施上述步骤(e)的杂交反应,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自与上述信号传导寡核苷酸相结合的上述受体的信号变化,从而提供能够检测的信号。

12.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸和/或信号传导寡核苷酸的3'-末端被阻断,用于防止延伸。

13.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述上游寡核苷酸为上游引物或上游探针。

14.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述上游寡核苷酸邻近于上述探测和标记寡核苷酸,其邻近的程度使得所述上游寡核苷酸诱导具有5'核酸酶活性的上述酶对上述探测和标记寡核苷酸的切割反应。

15.根据权利要求13所述的方法,其特征在于,上述上游引物借助其延伸链,来诱导基于具有5'核酸酶活性的上述酶对上述探测和标记寡核苷酸的切割反应。

16.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位

的5'-末端部位包含与上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的一部分序列互补的核苷酸序列。

17.根据权利要求16所述的方法,其特征在于,与上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的一部分互补的核苷酸序列长度为1-10个核苷酸。

18.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法在上述步骤(e)及步骤(f)之间还包括,使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交,从而提供能够检测的信号额外步骤,在上述步骤(f)中,检测上述额外步骤中提供的信号来检测延伸链的存在。

19.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法在上述步骤(f)之后还包括,使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交,从而提供能够检测的信号步骤,检测上述信号来再次检测延伸链的存在。

20.根据权利要求18或19所述的方法,其特征在于,上述延伸链的存在基于解链曲线分析或杂交曲线分析来检测。

21.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法在上述步骤(d)和步骤(e)之间还包括变性步骤。

22.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法还包括变性步骤来反复或追加实施上述步骤(a)~步骤(f)中的全部或一部分。

23.根据权利要求22所述的方法,其特征在于,上述方法还包括变性步骤来反复实施上述步骤(a)~步骤(e),且还包括使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交来提供能够检测的信号额外步骤,在上述步骤(f)中,检测上述额外步骤中提供的信号来检测延伸链的存在。

24.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述步骤(a)~步骤(f)在一个反应容器中实施,或上述步骤(a)~步骤(f)中的一部分步骤在单独的反应容器中实施。

25.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述方法为用于检测至少2种靶核酸序列的方法,上述上游寡核苷酸包含至少2种寡核苷酸,上述探测和标记寡核苷酸包含至少2种探测和标记寡核苷酸,上述捕捉和模板化寡核苷酸包含至少2种捕捉和模板化寡核苷酸,上述信号传导寡核苷酸包含至少2种信号传导寡核苷酸。

26.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在上述步骤(a)中,上述上游寡核苷酸为上游引物,在上述步骤(b)中,使用模板-依赖性核酸聚合酶来延伸上游引物。

27.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,上述靶核酸序列包含核苷酸变异。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其特征在于,上述方法在下游引物存在的条件下实施。

29.一种利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交测定来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法,其特征在于,包括:

步骤(a),使上述靶核酸序列与包含上游引物及下游引物的引物对以及探测和标记寡核苷酸进行杂交;上述上游引物及下游引物包含与分别上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;上述探测和标记寡核苷酸位于上述上游引物及

下游引物之间；上述探测和标记寡核苷酸的3'-末端被阻断，以防止延伸；

步骤(b)，在用于切割上述探测和标记寡核苷酸及延伸引物的条件下，使具有5'核酸酶活性的模板-依赖性核酸聚合酶与步骤(a)的结果物相接触；若上述探测和标记寡核苷酸杂交于上述靶核酸序列，则上述上游引物被延伸，且上述延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的上述模板-依赖性核酸聚合酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割，来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段；

步骤(c)，使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸进行杂交；上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含：(i)捕捉部位，其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列，以及(ii)模板化部位，其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列；从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交；

步骤(d)，利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应；与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸，来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链，由此形成延伸二聚物；

步骤(e)，使上述延伸链与信号传导寡核苷酸杂交的步骤；上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列，并与至少一个标记相结合，且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号；以及

步骤(f)，检测上述信号；上述信号的检测表示上述延伸链的存在，且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

30. 一种利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交测定来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法，其特征在于，包括：

步骤(a)，使上述靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸进行杂交；上述探测和标记寡核苷酸包含：(i)3'-靶向部位，其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列；以及(ii)5'-标记部位，其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列；上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交，上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交；

步骤(b)，在用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件下，使上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触；上述探测和标记寡核苷酸基于具有上述5'核酸酶活性的上述酶被切割，来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段；

步骤(c)，使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸进行杂交；上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含：(i)捕捉部位，其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列，以及(ii)模板化部位，其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列；从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交；

步骤(d)，利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应；与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸，来生成包含与上述捕捉和模

板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;

步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;以及

步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示上述延伸链的存在,且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

31.一种利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交测定来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的试剂盒,其特征在于,包含:

(a)探测和标记寡核苷酸,上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;

(b)上游寡核苷酸,上述上游寡核苷酸包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列,上述上游寡核苷酸位于上述探测和标记寡核苷酸的上游;上述上游寡核苷酸或者其延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;

(c)捕捉和模板化寡核苷酸,上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的上述5'-标记部位互补的序列或者与上述5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列;以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的上述5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;并且,与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸来形成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸二聚物;以及

(d)信号传导寡核苷酸,上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号。

32.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸的至少一部分包含与上述延伸序列互补的序列。

33.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒包含:(i)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记;(ii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及与从探测和标记寡核苷酸放出的片段相结合的标记;(iii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及在延伸过程中,插入于上述延伸链的标记;或(iv)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记以及嵌入染料。

34.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸与包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记相结合。

35.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸与单一标记相结合。

36.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒还包括一个信号传导寡核苷酸,上述追加的信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,两个上述信号传导寡核苷酸接近于上述延伸链并进行杂交,两个上述信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标

记中的一个标记,上述相互作用性双重标记分别包含报道分子及猝灭分子。

37.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段具有上述相互作用性双重标记中的另一个标记。

38.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位包含具有第一非-天然碱基的核苷酸,上述试剂盒还包含具有第二非-天然碱基以及上述相互作用性双重标记中的另一个标记的核苷酸,上述第二非-天然碱基具有与上述第一非-天然碱基的特异性结合亲和性。

39.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一个标记,上述试剂盒还包含具有上述相互作用性双重标记中的另一个标记的核苷酸。

40.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述信号传导寡核苷酸包含荧光共振能量转移的受体,上述试剂盒还包含嵌入染料。

41.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸和/或信号传导寡核苷酸的3'-末端被阻断,用于防止延伸。

42.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述上游寡核苷酸为上游引物或上游探针。

43.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒还包含具有5'核酸酶活性的酶。

44.根据权利要求31所述的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒为用于检测至少2种靶核酸序列的试剂盒,上述上游寡核苷酸包含至少2种寡核苷酸,上述探测和标记寡核苷酸包含至少2种探测和标记寡核苷酸,上述捕捉和模板化寡核苷酸包含至少2种捕捉和模板化寡核苷酸,上述信号传导寡核苷酸包含至少2种信号传导寡核苷酸。

45.根据权利要求31至44中的任一项所述的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒还包含下游引物。

利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交的靶核酸序列的检测

技术领域

[0001] 本发明涉及利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)的靶核酸序列的检测(Detection of Target Nucleic Acid Sequence by PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization Assay)。

背景技术

[0002] DNA杂交(hybridization)是分子生物学的基本的过程,受离子强度、碱基结构、核酸片段的长度、错配程度以及变性剂的存在的影响。基于DNA杂交的技术将成为决定特定核酸序列的非常有用的用具,将会明确有助于临床诊断、基因研究及法医学上的实验分析。

[0003] 但是,在仅依赖杂交的现有的方法以及过程中,发生因探针和非-靶序列之间的非-特异性杂交引起的假阳性结果的可能性高。因此,现有的方法以及过程存在改善可靠性的问题。

[0004] 除探针杂交过程以外还提出了利用酶反应的几种接近法,例如,TaqMan™探针方法。

[0005] 在TaqMan™探针方法中,与靶核酸序列杂交的标记探针基于上游引物-依赖性DNA聚合酶的5'核酸酶活性被切割,来产生表示靶序列存在的信号(美国专利第5210015号、第5538848号以及第6326145号)。TaqMan™探针方法提出用于信号产生的两个接近法:聚合-依赖性切割(polymerization-dependent cleavage)以及聚合-独立性切割(polymerization-independent cleavage)。在聚合-依赖性切割中,上游引物的延伸必须在核酸聚合酶与标记探针的5'-末端接触之前发生。随着延伸反应的进行,聚合酶逐渐地切割标记探针的5'-末端。在聚合-独立切割中,上游引物以及标记探针非常邻近,由此与靶核酸序列进行杂交,上游引物的3'-末端和核酸聚合酶的结合使上述核酸聚合酶与标记探针的5'-末端接触来放出标记。并且,TaqMan™探针方法公开,通过在其5'-末端部位具有不与靶序列杂交的5'-尾巴区域的标记探针被切割来形成包含5'-尾巴区域的片段。

[0006] 也有对具有对靶序列非-互补的5'-尾巴区域的探针被5'核酸酶切割,放出包含5'-尾巴区域的片段的几种方法的报告。

[0007] 例如,美国专利第5691142号就公开了对基于DNA聚合酶的5'核酸酶活性来被切割的切割结构。公开中例示了有对包含对模板非-互补的5'部位以及对模板互补的3'部位的寡核苷酸与模板杂交,并且,上游寡核苷酸与模板非常邻近而由此与模板进行杂交的切割结构。切割结构通过被具有5'核酸酶活性的DNA聚合酶或具有减少的合成活性的变形DNA聚合酶切割,来放出与模板非-互补的5'部位。之后,被放出的5'部位与具有发夹结构的寡核苷酸杂交,形成切割结构。由此,诱导渐进性的切割反应来检测靶序列。

[0008] 美国专利第7381532号公开了具有3'-末端被阻断的上游寡核苷酸的切割结构通

过被具有5'核酸酶活性的DNA聚合酶或FEN核酸酶切割,来放出非-互补的5'皮瓣(flapp)部位,被放出的5'皮瓣部位基于大小分析或者相互作用性双重标记来被检测的过程。美国专利第6893819号公开了能够检测的被放出的皮瓣基于核酸合成依赖性的、皮瓣-媒介连续性扩增方法而生成的内容。在此方法中,从第一个切割结构放出的皮瓣,以核酸合成依赖性方式切割第二个切割结构来从第二个切割结构放出皮瓣,并检测被放出的皮瓣。

[0009] 借助液相中的荧光-标记探针的杂交,即使利用一种荧光标记,也能够基于解链曲线分析来同时检测多个靶核酸序列。但是,在基于相互作用性-双重标记探针的5'核酸酶介导的切割来检测靶序列的现有技术中,在检测多重靶时,对互不相同的靶序列需要互不相同的种类的荧光标记,由于这种荧光标记的种类数量有限,因而检测出的靶序列的数量受限。

[0010] 美国申请公开号第2008-0241838号中公开了利用在靶核酸序列具有非-互补的5'部位的探针的切割以及捕捉(capture)探针的杂交的靶检测方法。标记位于非-互补的5'部位。杂交于靶序列的标记探针被切割而放出片段,之后,片段与捕捉探针杂交而检测靶序列的存在。在此方法中,未切割的/完好无损的(uncleaved/intact)探针不与捕捉探针杂交是必须的。为此,需要长度短的捕捉探针在固相基质上实现固定化。但是,这种限制会降低固相基质上的杂交效率,并且使反应条件的最优化变得困难。

[0011] 因此,对开发以更加便利、具有可靠性以及再现性的方式,不仅基于杂交,还基于5'核酸切割反应(5' nucleolytic reaction)等的酶反应,在液相以及固相中检测靶序列,更为优选地检测多个靶序列的新颖的接近法的要求正在抬头。并且,在本发明所属领域中正需求一种不受限于标记(尤其,荧光标记)种类的数量量的新颖的靶检测方法。

[0012] 因此,要求开发一种克服现有技术的缺点,并且能够以更加便利、具有可靠性、且可再现的方式检测靶核酸序列的方法。

[0013] 在本说明书全文中参照多个引用文献及专利文献,其引用由括号来表示。引用的文献及专利的公开内容,作为参照全部包括在本说明书中,因此能够更加明确地说明本发明所属的技术领域的水准及本发明的内容。

发明内容

[0014] 要解决的问题

[0015] 本发明人为了开发具有更加得到改善的准确性以及方便性的,尤其以多重方式检测靶序列的新颖的接近法而锐意研究努力。其结果,本发明人定立了用于检测靶序列的新颖的方案,根据这种新方案,靶检测不仅包括探针杂交,还包括5'核酸切割反应(5' nucleolytic reaction)及延伸等的酶反应和延伸反应-依赖性杂交反应。本发明的方案不仅优秀地适用于固相反应,而且也能够优秀地适用于液相反应,具有更加得到改善的准确性以及方便性,能够检测多个靶序列。

[0016] 因此,本发明的目的在于,提供利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,探测和标记寡核苷酸Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法。

[0017] 本发明的再一目的在于,提供用于利用PCE-SH来从DNA或核酸混合物检测靶核酸

序列的试剂盒。

[0018] 以下实施例、发明要求保护范围及附图能够使本发明的其他目的及优点更加明确。

附图说明

[0019] 图1示出了利用PCE-SH(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)试验的探测和标记的寡核苷酸(PTO, Probing and Tagging Oligonucleotide)、捕捉和模板化寡核苷酸(CTO, Capturing and Templating Oligonucleotide)以及信号传导寡核苷酸(SO, Signaling Oligonucleotide)的图示性结构。优选地,探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸以及信号传导寡核苷酸的3'-末端被阻断,以防止延伸。

[0020] 图2图示性地示出了利用链内相互作用性双重标记的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸包含报道分子及猝灭分子。

[0021] 图3图示性地示出了利用单一标记的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸具有报道分子作为单一标记。报道分子应根据单链形态或双链形态的存在与否,表示不同的信号强度。

[0022] 图4图示性地示出了利用链间相互作用性双重标记及2个信号传导寡核苷酸的PCE-SH试验。2个信号传导寡核苷酸分别包含相互作用性双重标记中的某一个标记,上述相互作用性双重标记包含报道分子及猝灭分子。

[0023] 图5图示性地示出了利用链间相互作用性双重标记的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸包含报道分子,延伸链包含猝灭分子。

[0024] 图6图示性地示出了利用链间相互作用性双重标记的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸包含报道分子,延伸链包含延伸反应过程中插入的猝灭-iso-dG残基。

[0025] 图7图示性地示出了利用链间相互作用性双重标记的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸包含报道分子,延伸链包含延伸反应过程中插入的猝灭-dA残基。

[0026] 图8图示性地示出了利用嵌入染料(intercalating dyes)的PCE-SH试验。信号传导寡核苷酸包含受体(acceptor),SYBR Green用作供体(donor)。

[0027] 图9图示性地示出了用于检测核苷酸变异的PCE-SH试验。

[0028] 图10A为通过PCE-SH试验实时检测淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)的基因的结果。信号传导寡核苷酸包含报道分子及猝灭分子。

[0029] 图10B为通过包括解链分析步骤的PCE-SH试验检测*Neisseria gonorrhoeae*的基因的结果。信号传导寡核苷酸包含报道分子及猝灭分子。

[0030] 图11A为随着PCR扩增利用PCE-SH试验来实时检测*Neisseria gonorrhoeae*的基因的结果。信号传导寡核苷酸包含报道分子及猝灭分子。

[0031] 图11B为通过包括PCR后的解链分析步骤的PCE-SH试验来检测*Neisseria gonorrhoeae*的基因的结果。信号传导寡核苷酸包含报道分子及猝灭分子。

[0032] 图12为通过包括PCR后的解链分析步骤的PCE-SH试验来检测靶核酸序列的单一核苷酸变异的结果。从亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR, Methylene tetrahydrofolate reductase)基因中检测到了C677T的突变。

[0033] 图13A为通过利用上游寡核苷酸-独立性5'-核酸酶活性的PCE-SH试验来实时检测

*Neisseria gonorrhoeae*的基因的结果。

[0034] 图13B为通过利用上游寡核苷酸-独立性5'-核酸酶活性的包括解链分析步骤的PCE-SH试验来检测*Neisseria gonorrhoeae*的基因的结果。

具体实施方式

[0035] 根据本发明的一实施方式,本发明提供利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法,上述利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法包括:步骤(a),使上述靶核酸序列与上游寡核苷酸(upstream oligonucleotide)以及探测和标记寡核苷酸进行杂交;上述上游寡核苷酸包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;上述上游寡核苷酸位于上述探测和标记寡核苷酸的上游;步骤(b),在用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件下,使上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触;上述上游寡核苷酸或者其延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的上述酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;步骤(c),使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸进行杂交;上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;步骤(d),利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应;与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸(Signaling Oligonucleotide)杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;以及步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示上述延伸链的存在,且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

[0036] 本发明人为了开发具有更加得到改善的准确性以及方便性的,尤其以多重方式检测靶序列的新颖的接近法而锐意研究努力。其结果,本发明人定立了用于检测靶序列的新颖的方案,根据这种新方案,靶检测不仅包括探针杂交,还包括5'核酸切割反应(5' nucleolytic reaction)及延伸等的酶反应和延伸-依赖性杂交反应。本发明的方案不仅能够优秀地适用于固相反应,而且也能够优秀地适用于液相反应,具有更加得到改善的准确性以及方便性,能够检测多个靶序列。

[0037] 本发明利用基于探针杂交而产生的结果(events),即探测和标记寡核苷酸(PTO,

Probing and Tagging Oligonucleotide)的切割和延伸反应及延伸反应-依赖性信号传导寡核苷酸杂交反应来实施,因此,被命名为“探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)分析”。

[0038] 分别以不同步骤对本发明进行详细的说明,如下。

[0039] 步骤(a):靶核酸序列和上游寡核苷酸(upstream oligonucleotide)及探测和标记寡核苷酸的杂交

[0040] 根据本发明的方法,首先,将上述靶核酸序列与上游寡核苷酸(upstream oligonucleotide)及探测和标记寡核苷酸(Probing and Tagging Oligonucleotide)进行杂交。

[0041] 在本说明书中使用的术语“靶核酸”、“靶核酸序列”或者“靶序列”意味着所要检测的核酸序列,且,在特定杂交、退火或者扩增条件下与探针或者引物进行退火或者杂交。

[0042] 在本说明书中使用的术语“探针(probe)”意味着与靶核酸序列实质上互补的部位或者包含这些部位的单链核酸分子。

[0043] 在本说明书中使用的术语“引物”意味着寡核苷酸,在诱导与核酸链(模板)互补的引物延伸产物的合成的条件,即,如核苷酸和DNA聚合酶等聚合剂的存在以及适合的温度与pH的条件下,可起到合成的起始点的作用。

[0044] 优选地,探针以及引物为单链脱氧核糖核苷酸分子。在本发明中利用的探针或者引物可包含天然(naturally occurring)脱氧单磷酸核苷(dNMP)(即,脱氧腺苷酸(dAMP)、dGMP(脱氧鸟苷酸)、dCMP(脱氧胞苷酸)及dTMP(脱氧胸苷酸))、变形的核苷酸或者非-天然核苷酸。并且,探针或者引物还可包含核糖核苷酸。

[0045] 就引物而言,应充分长,以便能够在聚合剂的存在之下引发延伸产物的合成。引物的适合的长度取决于包括例如,温度、应用领域及引物的根源(source)的多个因素。在本说明书中使用的术语“退火”或“引发”意味着在模板核酸并置(apposition)寡脱氧核苷酸或者核酸,就上述并置而言,通过聚合酶对核苷酸进行聚合而在模板核酸或者其一部分形成互补的核酸分子。

[0046] 在本说明书中使用的术语“杂交(hybridization)”意味着互补的单链核酸形成双链核酸。在两个核酸链之间的互补性完全匹配(perfect match)时发生杂交,或者即使存在一部分错配(mismatch)碱基也能发生杂交。杂交时所需的互补性的程度可随着杂交条件而不同,尤其是可通过温度来进行调节。

[0047] 上游寡核苷酸以及探测和标记寡核苷酸与靶核酸序列的杂交可在通常基于最佳化步骤而决定的合适的杂交条件下实施。温度、成分的浓度、杂交及清洗次数、缓冲液成分及它们的pH及离子强度等条件可根据包含寡核苷酸(上游寡核苷酸以及探测和标记寡核苷酸)的长度及糖皮质激素(GC)含量以及靶核苷酸序列等的多种因子而变化。例如,在利用相对短的寡核苷酸的情况下,优选地,选择低的严格条件(stringent condition)。用于杂交的详细条件可以在Joseph Sambrook,et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2001);及M.L.M.Anderson,Nucleic Acid Hybridization,Springer-Verlag New York Inc.N.Y.(1999)确认。

[0048] 术语“退火”和“杂交”没有区别,在本说明书中混用。

[0049] 上游寡核苷酸以及探测和标记寡核苷酸具有与靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列。术语“互补的”意味着在预定的退火条件或者严格条件下引物或者探针以选择性地与靶核酸序列杂交的程度充分地互补,并包括“实质上互补的(substantially complementary)”及“完全互补的(perfectly complementary)”,优选地,意味着完全互补的意思。

[0050] 本发明中所利用的探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位具有与靶核酸序列非-互补的核苷酸序列。捕捉和模板化寡核苷酸(CTO, Capturing and Templating Oligonucleotide)的模板化部位具有分别与探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列。术语“非-互补的”意味着在预定的退火条件或者严格条件下引物或者探针不以选择性地与靶核酸序列杂交的程度充分地非-互补,并包括“实质上非互补的(substantially non-complementary)”及“完全非-互补的(perfectly non-complementary)”,优选地,意味着完全非-互补的意思。

[0051] 例如,揭示探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位而所使用的术语“非-互补的”意味着在预定的退火条件或严格条件下,上述5'-标记部位不以选择性地与靶核酸序列杂交的程度充分地非-互补,并包括“实质上非互补的(substantially non-complementary)”及“完全非-互补的(perfectly non-complementary)”,优选地,意味着完全非-互补的意思。

[0052] 在本说明书中使用的术语“探测和标记的寡核苷酸(PTO, Probing and Tagging Oligonucleotide)”意味着寡核苷酸,其包含:(i)3'-靶向部位,其起到探针的作用;以及(ii)5'-标记部位,其包括与靶核酸序列非-互补的核苷酸序列,与靶核酸序列杂交后,进而从探测和标记寡核苷酸分离。上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位必须以5'→3'顺序而置。在图1中例示探测和标记寡核苷酸。

[0053] 优选地,在3'-靶向部位与靶核酸序列杂交,5'-标记部位不与靶核酸序列杂交的严格条件下实施步骤(a)的杂交。

[0054] 探测和标记寡核苷酸不要求特定的长度。例如,探测和标记寡核苷酸的长度可具有15-150核苷酸、15-100核苷酸、15-80核苷酸、15-60核苷酸、15-40核苷酸、20-150核苷酸、20-100核苷酸、20-80核苷酸、20-60核苷酸、20-50核苷酸、30-150核苷酸、30-100核苷酸、30-80核苷酸、30-60核苷酸、30-50核苷酸、35-100核苷酸、35-80核苷酸、35-60核苷酸或者35-50核苷酸的长度。只要探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与靶核酸序列特异性地杂交,就可以具有任何长度。例如,探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位可具有10-100核苷酸、10-80核苷酸、10-50核苷酸、10-40核苷酸、10-30核苷酸、15-100核苷酸、15-80核苷酸、15-50核苷酸、15-40核苷酸、15-30核苷酸、20-100核苷酸、20-80核苷酸、20-50核苷酸、20-40核苷酸或者20-30核苷酸的长度。只要探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位与捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位特异性地杂交后被延伸,就可以具有任何长度。例如,探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位可具有5-50核苷酸、5-40核苷酸、5-30核苷酸、5-20核苷酸、10-50核苷酸、10-40核苷酸、10-30核苷酸、10-20核苷酸、15-50核苷酸、15-40核苷酸、15-30核苷酸或者15-20核苷酸的长度。

[0055] 探测和标记寡核苷酸的3'-末端还可具有3'-OH末端(terminal)。优选地,探测和标记寡核苷酸的3'-末端被“阻断”,由此防止其延伸。

[0056] 阻断可通过现有方法来达成。例如,阻断可通过在最后核苷酸的3'-羟基上追加如生物素、标记、磷酸盐基、烷基、非-核苷酸连接肽、硫代磷酸酯或者烷烃-二醇残基等的化学组成部分(moiety)来实施。择一性地,阻断可通过去除最后核苷酸的3'-羟基或者利用如双脱氧核苷酸这种没有3'-羟基的核苷酸来实施。

[0057] 择一性地,可设计成使探测和标记寡核苷酸具有发夹结构。

[0058] 在本发明中,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与靶核酸序列杂交意味着在特定杂交条件下,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与靶核酸序列形成稳定的双链。根据本发明的优选一实例,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以不与靶核酸序列杂交的方式形成单链。

[0059] 上游寡核苷酸位于探测和标记寡核苷酸的上游。

[0060] 并且,与靶核酸序列杂交的上游寡核苷酸或者其延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的探测和标记寡核苷酸的切割。

[0061] 基于上游寡核苷酸的对探测和标记寡核苷酸切割的诱导可通过两种方式来达成。(i)诱导上游寡核苷酸延伸-独立性切割;以及(ii)诱导上游寡核苷酸延伸-依赖性切割。

[0062] 在上游寡核苷酸与探测和标记寡核苷酸相邻近,进而能够充分诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割反应的情况下,与上游寡核苷酸结合的上述酶能够无需延伸反应而切割探测和标记寡核苷酸。另一方面,在上游寡核苷酸与探测和标记寡核苷酸隔开的位置,具有聚合酶活性的酶(例如,模板-依赖性聚合酶)能够促进上游寡核苷酸(例如,上游引物)的延伸,与延伸产物结合的具有5'核酸酶活性的酶切割探测和标记寡核苷酸。

[0063] 因此,上游寡核苷酸能够以两种方式位于与探测和标记寡核苷酸相对的位置。上游寡核苷酸可位于与探测和标记寡核苷酸邻近的位置,由此以延伸-独立性方式能够充分诱导探测和标记寡核苷酸的切割。择一性地,上游寡核苷酸可位于充分能够以延伸-依赖性方式诱导探测和标记寡核苷酸切割的与探测和标记寡核苷酸隔开的位置。

[0064] 在本说明书中揭示方位(positions)或者位置(locations)而使用的术语“邻近的(adjacent)”意味着上游寡核苷酸紧位于与探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位相近的位置形成缺口(nick)。并且,上述术语意味着上游寡核苷酸位于从探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位隔开1-30核苷酸、1-20核苷酸或者1-15核苷酸的位置。

[0065] 在本说明书中揭示方位或者位置而使用的术语“隔开(distant)”包含能够充分产生延伸反应的某种位置或者位点。

[0066] 根据本发明的优选一实例,上游寡核苷酸可位于从探测和标记寡核苷酸隔开的位置,由此以延伸-依赖性方式能够充分诱导探测和标记寡核苷酸的切割。

[0067] 根据本发明的优选一实例,上游寡核苷酸为上游引物或者上游探针。上游引物适合诱导延伸-独立性切割或者延伸-依赖性切割,上游探针适合诱导延伸-独立性切割。

[0068] 选择性地,上游寡核苷酸可具有与探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-一部分部分重叠的序列(partial-overlapped sequence)。优选地,重叠的序列为1-10核苷酸长度、更优选为1-5核苷酸长度、进而优选为1-3核苷酸长度。在上游寡核苷酸具有与探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-一部分部分重叠的序列(partial-overlapped sequence)的情况下,在步骤(b)的切割反应中,3'-靶向部位将与5'-标记部位一起被部分切割。并且,

重叠的序列能够使3'-靶向部位中所需的特定部位被切割。

[0069] 根据本发明的优选一实例,上游引物通过其延伸链来诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的探测和标记寡核苷酸的切割反应。

[0070] 只要上游寡核苷酸能够诱导与靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸的切割,使得包含探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的一部分的片段被放出,与基于上游寡核苷酸的切割反应相关的现有技术就能够适用于本发明。例如,美国专利第5210015号、第5487972号、第5691142号、第5994069号、第7381532号以及美国申请公开号第2008-0241838号就能够应用于本发明。

[0071] 根据本发明的优选一实例,上述方法在存在下游引物的情况下实施。下游引物能够使与探测和标记寡核苷酸杂交的靶核酸序列追加生成,并能够提高靶检测的灵敏度。

[0072] 根据本发明的优选一实例,在利用上游引物以及下游引物的情况下,为了引物的延伸可追加使用模板-依赖性核酸聚合酶。

[0073] 根据本发明的优选一实例,上游寡核苷酸(上游引物或者上游探针)、下游引物和/或探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位具有由本发明人开发的双重引发寡核苷酸(DPO)结构。具有DPO结构的寡核苷酸与现有引物以及探针相比表现出相当得到改善的靶特异性(参照W02006/095981;Chun等,Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene,Nucleic Acid Research,35:6e40(2007))。

[0074] 根据本发明的优选一实例,探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位具有由本发明人开发的变形双重特异性寡核苷酸(mDSO)结构。变形双重特异性寡核苷酸(mDSO)结构与现有的探针相比表现出相当得到改善的靶特异性(参照W02011/028041)。

[0075] 步骤(b):从探测和标记寡核苷酸放出片段

[0076] 接着,在用于切割探测和标记寡核苷酸的条件,将上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触。与上述靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸被具有5'核酸酶活性的上述酶切割,因而放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段。

[0077] 在本说明书中使用的术语“用于切割探测和标记寡核苷酸的条件”意味着基于具有5'核酸酶活性的酶产生对与靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸的切割的充分的条件,例如,温度、pH、离子强度、缓冲液、寡核苷酸的长度及序列和酶。例如,在利用作为具有5'核酸酶活性的酶的Taq DNA聚合酶的情况下,用于切割探测和标记寡核苷酸的条件包含Tris-HCl缓冲液、氯化钾(KCl)、氯化镁(MgCl₂)以及温度。

[0078] 在探测和标记寡核苷酸与靶核酸序列杂交的情况下,虽然探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与靶核酸序列进行杂交,但是5'-标记部位则不与靶核酸序列杂交而形成单-链(参照图2)。像这样,将单-链以及双-链结构都包含在内的寡核苷酸可基于在本发明所属领域被告知的多种技术,利用具有5'核酸酶活性的酶来切割。

[0079] 探测和标记寡核苷酸的切割位置根据上游寡核苷酸(上游探针或者上游引物)的种类、上游寡核苷酸的杂交位置以及切割条件会不同(参照美国专利第5210015号、第5487972号、第5691142号、第5994069号以及第7381532号或者美国申请公开号第2008-0241838号)。

[0080] 为了探测和标记寡核苷酸的切割可利用现有的多种方法,会放出包含5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段。

[0081] 综合来看,在步骤(b)的切割反应中可有三种切割位置。第一切割位置为探测和标记寡核苷酸的杂交部位(3'-靶向部位)以及非-杂交部位(5'-标记部位)之间的连接位置(junction site)。第二切割位置为从探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的3'-末端沿着3'-方向隔开一部分核苷酸的位置。第二切割位置可位于探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分。第三切割位置为从探测和标记寡核苷酸的探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的3'-末端沿着5'-方向隔开一部分核苷酸的位置。

[0082] 根据本发明的优选一实例,上游引物被延伸的同时基于具有5'核酸酶活性的模板-依赖性聚合酶而开始切割探测和标记寡核苷酸的位置是探测和标记寡核苷酸及靶核酸序列之间的双链开始的地点或者从其开始的地点隔开1-3核苷酸的位置。

[0083] 因此,在本说明书中揭示基于具有5'核酸酶活性的酶的对探测和标记寡核苷酸的切割而使用的术语“包含探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段”意味着包含(i)5'-标记部位、(ii)5'-标记部位以及3'-靶向部位的5'-末端一部分、以及(iii)5'-标记部位的一部分。并且,在本发明中,术语“包含探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段”表现为“探测和标记寡核苷酸片段”。

[0084] 在本说明书中揭示如同探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的一部分、探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分以及捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端一部分的探测和标记寡核苷酸或者捕捉和模板化寡核苷酸而使用的术语“一部分(part)”意味着由1-40、1-30、1-20、1-15、1-10或者1-5核苷酸构成的核苷酸序列,优选为1核苷酸、2核苷酸、3核苷酸或者4核苷酸。

[0085] 根据本说明书的优选一实例,具有5'核酸酶活性的酶为具有5'核酸酶活性的DNA聚合酶或者FEN核酸酶,更优选为具有5'核酸酶活性的热稳定性DNA聚合酶或者FEN核酸酶。

[0086] 适合于本发明的具有5'核酸酶活性的DNA聚合酶为从多种细菌种得到的热稳定性DNA聚合酶,其包含水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)(Taq)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)(Tth)、丝状栖热菌(*Thermus filiformis*)、黄栖热菌(*Thermis flavus*)、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、红栖热菌(*Thermus ruber*)、红色栖热菌(*Thermus rubens*)、水管致黑栖热菌(*Thermus scotoductus*)、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z05*、*Thermus species sps 17*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosipho africanus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosipho africanus*、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictium occultum*、*Aquifex pyrophilus*以及*Aquifex aeolicus*。最优选地,热稳定性DNA聚合酶为Taq聚合酶。

[0087] 择一性地,本发明可使用变形为虽然具有5'核酸酶活性,但减少聚合活性的DNA聚合酶。

[0088] 所使用的皮瓣内切核酸酶(FEN, flap endonuclease)为5'皮瓣-特异性核酸酶(5'

flap-specific nuclease)。

[0089] 适合于本发明的FEN核酸酶包含从多种细菌种得到的FEN核酸酶,其包含 *Sulfolobus solfataricus*、*Pyrobaculum aerophilum*、*Thermococcus litoralis*、*Archaeoglobus veneficus*、*Archaeoglobus profundus*、*Acidianus brierlyi*、*Acidianus ambivalens*、*Desulfurococcus amylolyticus*、*Desulfurococcus mobilis*、*Pyrodictium brockii*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermococcus zilligii*、*Methanopyrus kandleri*、*Methanococcus igneus*、*Pyrococcus horikoshii*、*Aeropyrum pernix* 以及 *Archaeoglobus veneficus*。

[0090] 优选地,在步骤(a)中利用上游引物来实施的情况下,用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件包含上游引物的延伸反应。

[0091] 根据本发明的优选一实例,在步骤(a)中利用上游引物,为了使上述上游引物延伸而利用模板-依赖性聚合酶,上述模板-依赖性聚合酶可以为与具有上述5'核酸酶活性的酶相同或不同的酶。

[0092] 选择性地,在步骤(a)中利用上游引物,为了使上述上游引物延伸而利用模板-依赖性聚合酶,上述模板-依赖性聚合酶为与具有上述5'核酸酶活性的酶不同的酶。

[0093] 步骤(c):从探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸的杂交

[0094] 从探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸(CTO,Capturing and Templating Oligonucleotide)杂交。

[0095] 捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列。

[0096] 捕捉和模板化寡核苷酸起到用于延伸从探测和标记寡核苷酸放出的片段的模板的作用。起到引物作用的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸杂交,通过被延伸来形成延伸二聚物。

[0097] 只要模板化部位具有与探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的序列,就可以包含任何序列。并且,只要模板化部位能够起到用于延伸从探测和标记寡核苷酸放出的片段的模板的作用,就可以包含任何序列。

[0098] 如上所述,优选地,在放出具有探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的片段的情况下,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位应被设计成包含与5'-标记部位互补的核苷酸序列。优选地,在放出具有5'-标记部位以及3'-靶向部位的5'-末端一部分的片段的情况下,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位应被设计成包含与5'-标记部位以及3'-靶向部位的5'-末端一部分互补的核苷酸序列。优选地,在放出具有探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的一部分的片段的情况下,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位应被设计成具有与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列。

[0099] 另一方面,可通过预想探测和标记寡核苷酸的切割位置来设计捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位。例如,在捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位被设计成包含与5'-标记部位互补的核苷酸序列的情况下,具有5'-标记部位的一部分的片段或者具有5'-标记部位的片段可与捕捉部位杂交,之后将被延伸。在放出包含5'-标记部位以及3'-靶向部位的5'-末端

一部分的片段的情况下,上述片段可能与被设计成包含与5'-标记部位互补的核苷酸序列的捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,即使在上述片段的3'-末端部位存在错配核苷酸,也能够成功地被延长。这是由于即使引物的3'-末端包含一部分错配核苷酸(例如,1~3错配核苷酸),引物也能够根据反应条件而被延长。

[0100] 在放出包含5'-标记部位以及3'-靶向部位的5'-末端一部分的片段的情况下,通过将捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端一部分设计成具有与被切割的上述3'-靶向部位的5'-末端一部分互补的核苷酸序列,就能够解决与错配核苷酸相关的问题(参照图1)。

[0101] 优选地,对与被切割的3'-靶向部位的5'-末端一部分互补的捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端一部分的核苷酸序列,可根据探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位上的预想到的切割位置来选择。优选地,与被切割的3'-靶向部位的5'-末端一部分互补的捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端一部分的核苷酸序列为1-10核苷酸,更优选为1-5核苷酸,进而优选为1-3核苷酸。

[0102] 捕捉和模板化寡核苷酸的3'-末端可包含不包含于与片段的杂交的追加的核苷酸。并且,只要捕捉和模板化寡核苷酸与上述片段稳定地杂交,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位就能够包含仅仅与上述片段的一部分(例如,包含片段的3'-末端部位的片段的一部分)互补的核苷酸序列。

[0103] 对在本说明书中使用的术语“包含与5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列的捕捉部位”,如同上述,将包含捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的多种设计以及结构来进行说明。

[0104] 捕捉和模板化寡核苷酸可被设计成具有发夹结构。

[0105] 捕捉和模板化寡核苷酸的长度可以是多种的。例如,捕捉和模板化寡核苷酸具有7-1000核苷酸、7-500核苷酸、7-300核苷酸、7-100核苷酸、7-80核苷酸、7-60核苷酸、7-40核苷酸、15-1000核苷酸、15-500核苷酸、15-300核苷酸、15-100核苷酸、15-80核苷酸、15-60核苷酸、15-40核苷酸、20-1000核苷酸、20-500核苷酸、20-300核苷酸、20-100核苷酸、20-80核苷酸、20-60核苷酸、20-40核苷酸、30-1000核苷酸、30-500核苷酸、30-300核苷酸、30-100核苷酸、30-80核苷酸、30-60核苷酸或者30-40核苷酸的长度。只要与从探测和标记寡核苷酸放出的片段特异性地杂交,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位就可以具有任何长度。例如,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位可以具有5-100核苷酸、5-60核苷酸、5-40核苷酸、5-30核苷酸、5-20核苷酸、10-100核苷酸、10-60核苷酸、10-40核苷酸、10-30核苷酸、10-20核苷酸、15-100核苷酸、15-60核苷酸、15-40核苷酸、15-30核苷酸或者15-20核苷酸的长度。并且,只要捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位在从探测和标记寡核苷酸放出的片段的延伸反应中起到模板作用,捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位就可以具有任何长度。例如,捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位可以具有1-900核苷酸、1-400核苷酸、1-300核苷酸、1-100核苷酸、1-80核苷酸、1-60核苷酸、1-40核苷酸、1-20核苷酸、2-900核苷酸、2-400核苷酸、2-300核苷酸、2-100核苷酸、2-80核苷酸、2-60核苷酸、2-40核苷酸、2-20核苷酸、5-900核苷酸、5-400核苷酸、5-300核苷酸、5-100核苷酸、5-80核苷酸、5-60核苷酸、5-40核苷酸、5-30核苷酸、10-900核苷酸、10-400核苷酸、10-300核苷酸、15-900核苷酸、15-100核苷酸、15-80核苷酸、15-60核苷酸、15-40核苷酸或者15-20核苷酸的长度。

[0106] 捕捉和模板化寡核苷酸的3'-末端可以具有3'-OH末端。优选地,捕捉和模板化寡核苷酸的3'-末端被阻断,用于防止其延伸。通过现有方法就能够实现阻断捕捉和模板化寡核苷酸的非-延伸。例如,可以通过在捕捉和模板化寡核苷酸的最后核苷酸的3'-羟基追加如生物素、标记、磷酸基、烷基、非-核苷酸连接肽、磷硫酰或者烷烃-二醇残基等的化学性的部分(moiety)来实施阻断。择一性地,阻断可通过去除最后核苷酸的3'-羟基或者利用如双脱氧核苷酸这种没有3'-羟基的核苷酸来实施。

[0107] 从探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸杂交,提供适合于片段的延伸的形态。并且,即使非切割探测和标记寡核苷酸通过其5'-标记部位来与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,由于探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位不会与捕捉和模板化寡核苷酸杂交,因而防止延伸二聚物的形成。

[0108] 参照对步骤(a)中的杂交的说明,就能够更详细地说明步骤(c)中的杂交。

[0109] 步骤(d):片段的延伸

[0110] 接着,利用模板-依赖性核酸聚合酶及步骤(c)的结果物来实施延伸反应。与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物。相反,与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的未切割探测和标记寡核苷酸不被延伸,也不形成延伸链。

[0111] 在本说明中使用的术语“延伸二聚物”意味着基于将模板-依赖性核酸聚合酶和捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位利用为模板使与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的片段被延伸的延伸反应而形成的二聚物。

[0112] 本说明书中揭示术语片段并使用的术语“延伸链(extended strand)”是以包含片段及其延伸序列的意图而使用的术语。

[0113] 本说明书中揭示术语片段并使用的术语“延伸序列(extended sequence)”是以仅指延伸链中除了片段之外的新延伸的序列的意图而使用的术语。

[0114] 在步骤(d)中使用的模板-依赖性核酸聚合酶包含任何核酸聚合酶,例如,E.coli DNA聚合酶I的“克列诺(Klenow)”片段、热稳定性DNA聚合酶以及噬菌体T7 DNA聚合酶。优选地,聚合酶是能够从多种细菌种得到的热稳定性DNA聚合酶,其包含*Thermus aquaticus* (Taq)、*Thermus thermophilus* (Tth)、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus scotoductus*、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z05*、*Thermus species sps 17*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Pyrococcus furiosus* (Pfu)、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictum occultum*、*Aquifex pyrophilus*以及*Aquifex aeolicus*。最优选地,模板-依赖性核酸聚合酶为Taq聚合酶。

[0115] 根据本发明的优选一实例,模板-依赖性核酸聚合酶包含反转录酶。

[0116] 根据本发明的优选一实例,在步骤(b)中利用的具有5'核酸酶活性的酶与在步骤

(d)中利用的模板-依赖性核酸聚合酶是相同的酶。更为优选地,在步骤(b)中利用的具有5'核酸酶活性的酶、为了使上游引物延伸而利用的模板-依赖性核酸聚合酶以及在步骤(d)中利用的模板-依赖性核酸聚合酶是相同的酶。

[0117] 步骤(e):基于延伸链和信号传导寡核苷酸的杂交的信号生成

[0118] 上述延伸反应之后,使上述步骤(d)的延伸链和信号传导寡核苷酸(Signaling Oligonucleotide)杂交。生成表示靶核酸序列的存在的信号。信号包含信号生成、消灭或信号变化(信号增加或减少)。

[0119] 与延伸链杂交的信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列。

[0120] 信号传导寡核苷酸仅在相当于探测和标记寡核苷酸片段的部位包含互补的序列的情况下,在以下信号传导方法中的一部分方法中,有可能不会生成基于未切割探测和标记寡核苷酸和信号传导寡核苷酸的杂交物的生成的非-靶信号。

[0121] 如图6所示,适当调节插入于延伸链的标记的位置的情况下,即使使用仅在探测和标记寡核苷酸片段包含互补的序列的上述信号传导寡核苷酸,也有可能不会生成非-靶信号。

[0122] 另一方面,信号传导寡核苷酸仅在探测和标记寡核苷酸片段包含互补的序列的情况下,在以下信号传导方法中的一部分方法中,由于未切割探测和标记寡核苷酸和上述信号传导寡核苷酸的杂交,可生成非-靶信号(例如,图2的信号传导系统)。

[0123] 在非-靶信号成为问题的情况下,信号传导寡核苷酸部位应设计成在新合成的延伸序列部位包含互补的序列。

[0124] 根据本发明的优选一实例,上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸序列互补的序列。

[0125] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸的至少一部位包含与延伸序列互补的序列。包含与上述延伸序列互补的序列的信号传导寡核苷酸部位的核苷酸的长度至少为1、2、3、4、5或10个。

[0126] 若将信号传导寡核苷酸部位设计成包含与新生成的延伸序列的一部分互补的序列,则信号传导寡核苷酸和延伸链的杂交物的T_m值和信号传导寡核苷酸和未切割探测和标记寡核苷酸的杂交物的T_m值会不同。可根据上述T_m值之差来区别从两个上述杂交物提供的信号。例如,当进行实时检测时,可以考虑上述T_m值来调节检测温度,从而去除非-靶信号,或者在基于解链峰(melting peak)的解链曲线分析中去除非-靶信号。

[0127] 优选地,信号传导寡核苷酸在其整个序列包含与上述延伸序列互补的序列。择一性地,信号传导寡核苷酸可包含具有与延伸序列互补的序列的部位。例如,信号传导寡核苷酸的一部位可包含与延伸序列互补的序列,另一部位可包含与上述片段互补的序列。

[0128] 优选地,信号传导寡核苷酸在其整个序列包含与上述延伸序列互补的序列。

[0129] 本发明中所利用的信号传导寡核苷酸的长度可具有任何长度。例如,可具有5-100核苷酸、5-80核苷酸、5-60核苷酸、5-40核苷酸、5-20核苷酸、5-10核苷酸、10-100核苷酸、10-80核苷酸、10-60核苷酸、10-40核苷酸、10-30核苷酸、10-20核苷酸、15-100核苷酸、15-80核苷酸、15-60核苷酸、15-40核苷酸、15-30核苷酸、15-20核苷酸、20-100核苷酸、20-80核苷酸、20-60核苷酸、20-40核苷酸或20-30核苷酸的长度。

[0130] 信号传导寡核苷酸可设计成具有发夹结构。

[0131] 优选地,信号传导寡核苷酸的3'-末端被阻断,以防止延伸。

[0132] 择一性地,未被阻断的具有-OH基的信号传导寡核苷酸能够被延伸。

[0133] 本发明中所采用的信号传导系统的特征在于,信号传导寡核苷酸的杂交反应与信号生成有关。即,若信号传导寡核苷酸与延伸链杂交,则提供能够检测的信号。信号传导寡核苷酸和延伸链的杂交反应仅在靶核酸序列存在而切割探测和标记寡核苷酸的情况下发生。因此,能够检测的信号表示靶核酸序列的存在。因此,根据需要,本发明能够以实时方式实施。

[0134] 为了使信号传导寡核苷酸的杂交反应与信号的提供直接有关,本发明利用与信号传导寡核苷酸相结合的至少一种标记。

[0135] 根据本发明的优选一实例,表示靶核酸序列的存在的能够检测的信号是由(i)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记;(ii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及与从探测和标记寡核苷酸放出的片段相结合的标记;(iii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及在步骤(d)的延伸反应过程中,插入于上述延伸链的标记;或(iv)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记以及嵌入染料(intercalating dyes)提供。

[0136] 能够以如下方式详细记载本发明中所使用的标记系统。

[0137] (i)与信号传导寡核苷酸相结合的单一标记

[0138] 本发明能够提供利用单一标记来形成表示靶核酸序列的存在的延伸链的信号(参照图3)。

[0139] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸与单一标记相结合,在上述步骤(e)中,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述单一标记的信号的变化,从而提供上述能够检测的信号。

[0140] 上述单一标记在与标记相结合的核酸序列为单链的情况和为双链的情况下提供互不相同的信号。上述单一标记包含荧光标记、发光(luminescent)标记、化学发光(chemiluminescent)标记、电化学(electrochemical)标记以及金属标记。

[0141] 优选地,上述单一标记根据与标记相结合的核酸序列为单链或双链,来提供互不相同的强度(intensity)的荧光。

[0142] 图3例示了使用单一标记的本发明的优选实例。如图3所示,可见与杂交于延伸链的信号传导寡核苷酸相结合的单一标记比与未杂交的信号传导寡核苷酸相结合的标记表示更高的荧光。

[0143] 测定单一荧光标记的荧光强度的变化(增加或减少),来检测靶核酸序列的存在。

[0144] 本发明中所使用的单一荧光标记的种类及优选结合位置可参照美国专利第7537886号及第7348141中公开的内容。优选地,上述单一荧光标记包含JOE、FAM、TAMRA、ROX以及基于荧光素的标记(fluorescein-based label)。优选地,被标记的核苷酸残基位于上述寡核苷酸的内部的核苷酸残基,而不是5'-末端或3'-末端。

[0145] 根据本发明的优选一实例,上述信号传导寡核苷酸上的单一标记位于从5'-末端或3'-末端隔开1-15核苷酸、1-10核苷酸或1-5核苷酸的位置,更优选地,位于信号传导寡核苷酸的中央部位。

[0146] 对于本发明中所使用的单一荧光标记,可通过以下记载的报道分子及猝灭分子相关文献来进行说明。

[0147] (ii)信号传导寡核苷酸链内(intrastrand)相互作用性-双重标记

[0148] 相互作用性标记系统意味着能量以非-放射性(non-radioactively)方式传达到供体分子和受体分子之间的信号产生系统(signal generating system)。作为相互作用性标记系统的代表性例,荧光共振能量转移(FRET,fluorescence resonance energy transfer)标记系统包含荧光报道分子(供体分子)及猝灭分子(受体分子)。在FRET中,能量供体为荧光性,但是能量受体可以为荧光性或非-荧光性。在相互作用性标记系统的再一例中,能量供体为非-荧光性,例如为发色团(chromophore),能量受体为荧光性。在相互作用性标记系统的另一例中,能量供体为发光性,例如为生物发光(bioluminescent)、化学发光(chemiluminescent)、电化学发光(electrochemiluminescent),能量受体为荧光性。在本发明中,供体分子及受体分子分别可以为如上所述的报道分子及猝灭分子。

[0149] 优选地,表示延伸链的生成的信号(即,表示靶核酸序列的存在的信号)借助相互作用性标记系统来产生,更优选地,借助FRET标记系统(即,相互作用性双重标记系统)来产生。

[0150] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸与包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记相结合,在步骤(e)中,信号传导寡核苷酸和延伸链之间的杂交导致来自相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号。在上述信号传导寡核苷酸杂交之前,上述信号传导寡核苷酸上的上述报道分子及猝灭分子在结构上(conformational)相互接近,使得上述猝灭分子对来自上述报道分子的信号进行猝灭,若上述信号传导寡核苷酸杂交,则上述报道分子及猝灭分子在结构上隔开,使得上述猝灭分子不对来自上述报道分子的信号进行猝灭,从而导致来自相互作用性双重标记的信号变化。

[0151] 图2例示了使用相互作用性双重标记的本发明的优选实例。从与靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,并被延伸而生成延伸链。若延伸链与信号传导寡核苷酸杂交,则信号传导寡核苷酸上的上述猝灭分子不对来自上述报道分子的信号进行猝灭,并导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化(例如,来自报道分子的信号增加)。另一方面,在没有靶核酸序列的情况下,探测和标记寡核苷酸不被切割,且未切割探测和标记寡核苷酸与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,但不被延伸。与未杂交的信号传导寡核苷酸相结合的报道分子及猝灭分子在结构上相互接近,使得上述猝灭分子对来自上述报道分子的信号进行猝灭。

[0152] 本说明书中所使用的表达“报道分子及猝灭分子在结构上接近”意味着片段或信号传导寡核苷酸的形态结构(conformational structure),例如,意味着借助无规卷曲(colli)及发夹结构来使报道分子及猝灭分子以三维方式相邻。

[0153] 在本说明书中,术语“报道分子及猝灭分子在结构上(conformational)隔开”是指信号传导寡核苷酸与延伸链杂交而形成双链,且因信号传导寡核苷酸的形态结构(conformational structure)变化,上述报道分子及猝灭分子以三维方式隔开。

[0154] 根据本发明的优选一实例,报道分子及猝灭分子位于信号传导寡核苷酸的5'-末端(或3'-末端)及3'-末端(或5'-末端)。根据本发明的优选一实例,与信号传导寡核苷酸相结合的报道分子及猝灭分子中的一个位于5'-末端或从5'-末端隔开1-5核苷酸的位置,另一个位于根据信号传导寡核苷酸的形态(conformation)来对报道分子的信号进行猝灭和不对报道分子的信号进行猝灭的位置。

[0155] 根据本发明的优选一实例,与信号传导寡核苷酸相结合的报告分子及猝灭分子中的一个位于3'-末端或从3'-末端隔开1-5核苷酸的位置,另一个位于根据信号传导寡核苷酸的形态来对报告分子的信号进行猝灭和不对报告分子的信号进行猝灭的位置。

[0156] 根据本发明的优选一实例,报告分子及猝灭分子相互隔开80核苷酸以内,更优选为60核苷酸以内,更加优选为30核苷酸以内,进而优选为25核苷酸以内。根据本发明的优选一实例,报告分子及猝灭分子隔开至少4核苷酸,更优选为至少6核苷酸,更加优选为至少10核苷酸,进而优选为至少15核苷酸。

[0157] 本发明中所利用的报告分子及猝灭分子可包含本发明所属技术领域中公知的任何分子。上述荧光标记的具体例如下。Cy2TM(506)、YO-PROTM-1(509)、YOYOTM-1(509)、Calcein(517)、FITC(518)、FluorXTM(519)、AlexaTM(520)、Rhodamine 110(520)、Oregon GreenTM500(522)、Oregon GreenTM488(524)、RiboGreenTM(525)、Rhodamine GreenTM(527)、Rhodamine 123(529)、Magnesium GreenTM(531)、Calcium GreenTM(533)、TO-PROTM-1(533)、TOT01(533)、JOE(548)、BODIPY530/550(550)、Dil(565)、BODIPY TMR(568)、BODIPY558/568(568)、BODIPY564/570(570)、Cy3TM(570)、AlexaTM546(570)、TRITC(572)、Magnesium OrangeTM(575)、Phycoerythrin R&B(575)、Rhodamine Phalloidin(575)、Calcium OrangeTM(576)、Pyronin Y(580)、Rhodamine B(580)、TAMRA(582)、Rhodamine RedTM(590)、Cy3.5TM(596)、ROX(608)、Calcium CrimsonTM(615)、AlexaTM594(615)、Texas Red(615)、Nile Red(628)、YO-PROTM-3(631)、YOYOTM-3(631)、R-phycoerythrin(642)、C-Phycocyanin(648)、TO-PROTM-3(660)、TOT03(660)、DiD DilC(5)(665)、Cy5TM(670)、Thiadiazocarbocyanine(671)、Cy5.5(694)、HEX(556)、TET(536)、Biosearch Blue(447)、CAL Fluor Gold540(544)、CAL Fluor Orange 560(559)、CAL Fluor Red 590(591)、CAL Fluor Red 610(610)、CAL Fluor Red 635(637)、FAM(520)、Fluorescein(520)、Fluorescein-C3(520)、Pulsar 650(566)、Quasar570(667)、Quasar 670(705)及Quasar 705(610)。括号内的数字为以纳米为单位表示的最大的发光波长。优选地,报告分子及猝灭分子包含JOE、FAM、TAMRA、ROX或基于荧光素的标记(fluorescein-based label)。

[0158] 适合的一对报告分子-猝灭分子公开在许多文献中:Pesce et al., editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY(Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH(Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd EDITION(Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES(Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS(Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS(Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE(Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996; 美国专利第3996345号及第4351760号。

[0159] 在本发明中,值得关注的是,可以利用能够对广范围波长或者特定波长的荧光进行猝灭的非荧光黑猝灭分子(或暗猝灭分子)。例如,有BHQ及DABCYL。

[0160] 在适用于信号传导寡核苷酸的FRET标记中,报告分子包含FRET的供体,猝灭分子

包含FRET的另一伙伴(受体)。例如,荧光素染料(fluorescein dye)用作报道分子,罗丹明染料(rhodamine dye)用作猝灭分子。

[0161] (iii)链间(interstrand)相互作用性-双重标记

[0162] 在使用链间相互作用性-双重标记的实例中,延伸链具有包含报道分子及猝灭分子的相互作用性双重标记中的一种,猝灭分子及信号传导寡核苷酸具有相互作用性双重标记中的另一种。

[0163] 使用链间相互作用性-双重标记的实例可根据以下三种方式来实施。

[0164] 根据第一方式,信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的一个标记,从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段包含上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记,上述延伸链包含来源于从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段的标记;上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号(参照图5)。

[0165] 与信号传导寡核苷酸相结合的标记可以为报道分子或猝灭分子,与片段相结合的标记可以为猝灭分子或报道分子。

[0166] 考虑探测和标记寡核苷酸的切割位置来决定探测和标记寡核苷酸上的标记位置,由此能够使标记存在于探测和标记寡核苷酸片段上。

[0167] 在与信号传导寡核苷酸的杂交中,只要与结合于信号传导寡核苷酸的标记相互作用来诱导信号变化,标记就可以与探测和标记寡核苷酸片段的任何位置(例如,探测和标记寡核苷酸的标记部位)相结合。在与探测和标记寡核苷酸片段的杂交中,只要与结合于探测和标记寡核苷酸片段的标记相互作用来诱导信号变化,标记就可以与信号传导寡核苷酸的任何位置(例如,信号传导寡核苷酸的5'-末端)相结合。

[0168] 根据第二方式,信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的一个标记,上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位包含具有第一非-天然碱基的核苷酸,在具有第二非-天然碱基以及上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记的核苷酸存在的条件下,实施上述步骤(d)的延伸反应,由此,向上述延伸链插入标记,上述第二非-天然碱基具有与上述第一非-天然碱基的特异性结合亲和性;上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号(参照图6)。

[0169] 本说明书中所使用的术语“非-天然碱基”意味着如能够形成氢键碱基对的腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)的天然碱基(natural base)的衍生物。本说明书中所使用的术语“非-天然碱基”包含具有与作为母体化合物(mother compound)的天然碱基不同的碱基对模式的碱基,例如美国专利第5432272号、第5965364号、第6001983号及第6037120号中所记载。非-天然碱基之间的碱基对与天然碱基类似地包含两个或三个氢键。非-天然碱基之间的碱基对也以特定的方式形成。

[0170] 作为非-天然碱基的特定的例,包含以下碱基的碱基对组合:iso-C/iso-G、iso-dC/iso-dG、K/X、H/J及M/N(参照美国专利第7422850号)。

[0171] 优选地,在延伸过程中所插入的标记与核苷酸相结合,更优选地,在延伸过程中所插入的标记与核苷三磷酸(nucleotide triphosphate)相结合。优选地,上述标记与核苷三磷酸的碱基相结合。

[0172] 参照图6,说明例示的实施例。上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸杂交,上述捕捉和模板化寡核苷酸包含核苷酸,上述核苷酸包含与非-天然碱基(例如,iso-dG)具有特异性结合亲和性的非-天然碱基(例如,iso-dC)。延伸在具有用猝灭分子来标记的iso-dG的核苷酸存在的条件下实施。在延伸反应过程中,具有包含猝灭分子的iso-dG的核苷酸插入于具有iso-dC的核苷酸的相反侧。接着,若标记有报道分子的信号传导寡核苷酸与包含猝灭分子-iso-dG的延伸链杂交,则位于延伸链的猝灭分子对位于信号传导寡核苷酸的报道分子的信号进行猝灭,来导致信号变化,该信号变化提供能够检测的信号。

[0173] 相互作用性双重标记中的一个与信号传导寡核苷酸相结合,另一个在延伸反应过程中从反应液插入于延伸链。

[0174] 与信号传导寡核苷酸相结合的标记可以为报道分子或猝灭分子,插入于延伸链的标记可以为猝灭分子或报道分子。

[0175] 在与信号传导寡核苷酸的杂交中,只要与结合于信号传导寡核苷酸的标记相互作用来诱导信号变化,插入于延伸链的标记就可以与延伸链的任何位置(例如,延伸链的3'-末端)相结合。在与延伸链的杂交中,只要与插入于延伸链的标记相互作用来诱导信号变化,标记就可以与信号传导寡核苷酸的任何位置(例如,信号传导寡核苷酸的5'-末端)相结合。

[0176] 根据第三方式,信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的一个,步骤(d)的延伸反应在具有上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记的核苷酸存在的条件下实施,由此,向上述延伸链插入标记;上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号(参照图7)。

[0177] 与信号传导寡核苷酸相结合的标记可以为报道分子或猝灭分子(优选为报道分子),插入于延伸链的标记可以为猝灭分子或报道分子(优选为猝灭分子)。

[0178] (iv)利用两个信号传导寡核苷酸的相互作用性-双重标记

[0179] 在利用两个信号传导寡核苷酸的相互作用性-双重标记的实例中,本发明的方法进一步包括一个信号传导寡核苷酸,追加的上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,两个上述信号传导寡核苷酸接近于上述延伸链并进行杂交,两个上述信号传导寡核苷酸分别包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的一个标记,两个上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述相互作用性双重标记的信号的变化,从而提供能够检测的信号(参照图4)。

[0180] 优选地,两个上述信号传导寡核苷酸中至少一个信号传导寡核苷酸包含与在延伸反应中新生成的延伸序列杂交的部位。

[0181] 利用两个信号传导寡核苷酸的相互作用性-双重标记的原理如下。从与靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交并延伸,从而形成延伸链。接着,两个信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交。在杂交过程中,由于两个信号传导寡核苷酸相接近并与延伸链杂交,因此位于两个信号传导寡核苷酸的报道分子和猝灭分子相邻,使得上述猝灭分子对从上述报道分子出来的信号进行猝灭(quenching),其结果,导致从相互作用性双重标记的信号的变化(例如,来自报道分子的信号增加)。另一方面,在没有靶核酸序列的情况下,探测和标记寡核苷酸不被切割,且未切割

探测和标记寡核苷酸与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,但不被延伸。位于未杂交的两个信号传导寡核苷酸的报道分子及猝灭分子相隔开,从而产生从报道分子的信号。

[0182] 根据本发明的优选一实例,只要与延伸链杂交来使猝灭分子从报道分子对信号进行猝灭,两个信号传导寡核苷酸就可以与延伸链的任何位置杂交。优选地,可以正好相邻或隔开1-5核苷酸。

[0183] 根据本发明的优选一实例,两个信号传导寡核苷酸与延伸链相邻并杂交的情况下,只要使猝灭分子从报道分子对信号进行猝灭,报道分子及猝灭分子就可以与两个信号传导寡核苷酸的任何位置相结合。例如,可在一个信号传导寡核苷酸的5'-末端或从5'-末端隔开1-5核苷酸的位置结合报道分子或猝灭分子,可在另一信号传导寡核苷酸的3'-末端或从3'-末端隔开1-5核苷酸的位置结合猝灭分子或报道分子。

[0184] (v)利用嵌入染料的FRET标记

[0185] 根据本发明,荧光共振能量转移(FRET,fluorescence resonance energy transfer)信号传导可利用嵌入染料来达成。

[0186] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸包含FRET的受体,上述步骤(e)的杂交在嵌入染料存在的条件下实施,上述信号传导寡核苷酸和上述延伸链之间的杂交导致来自上述信号传导寡核苷酸的上述受体的信号变化,从而提供能够检测的信号(参照图8)。

[0187] 在本发明中有用的嵌入染料的例包含:SYBRTMGreen I、P0-PROTM-1、B0-PROTM-1、SYTOTM43、SYTOTM44、SYTOTM45、SYTOXTMBlue、POPOTM-1、POPOTM-3、BOBOTM-1、BOBOTM-3、LO-PROTM-1、JO-PROTM-1、YO-PROTM1、TO-PROTM1、SYTOTM11、SYTOTM13、SYTOTM15、SYTOTM16、SYTOTM20、SYTOTM23、TOTOTM-3、YOYOTM3、GelStarTM以及噻唑橙(thiazole orange)。上述嵌入染料特异性地插入于双-链核酸分子来产生信号。

[0188] 利用嵌入染料的FRET标记的原理如下。从与靶核酸序列杂交的探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交并延伸,从而形成延伸链。接着,标记有受体的信号传导寡核苷酸与延伸链杂交来形成双链核酸分子,嵌入染料与上述双链核酸分子相结合。若照射激发(excitation)供体的光,则能量从起到供体分子作用的嵌入染料向受体转移(transfer),并导致来自受体的信号变化,从而提供能够检测的信号。另一方面,在没有靶核酸序列的情况下,不发生这种FRET现象,其结果,没有信号变化。

[0189] 根据本发明的优选一实例,与信号传导寡核苷酸相结合的受体包含如上所述的各单-荧光标记,但并不局限于此。

[0190] 标记可利用公知的方法来与信号传导寡核苷酸或探测和标记寡核苷酸相连接。优选地,标记由包含至少三个碳原子的间隔区(spacer)(例如,3-碳间隔区、6-碳间隔区或12-碳间隔区)介导来与信号传导寡核苷酸或探测和标记寡核苷酸相连接。

[0191] 本发明中所使用的信号传导寡核苷酸包含借助杂交来提供信号的任何形态的探针,例如,如下。Molecular beaconTM(US 5925517),HybeaconsTM(D.J.French,et al.,Molecular and Cellular Probes(2001)13,363-374 and US 7348141),Dual-labeled, self-quenched probe(US 5876930),LUXTM(I.A.Nazarenko,et al.Nucleic Acids Res2002,30:2089-2095及US pat no.7537886)及Hybridization probe(Bernard PS,et al.,Clin Chem 2000,46,147-148 and Deepti Parashar et al.,Indian J Med Res 124,review article October 2006385-398)。

[0192] 步骤(f):靶信号的检测

[0193] 最终,是检测在步骤(e)中提供的能够检测的信号,上述信号的检测表示延伸链的存在,上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

[0194] 如上所述,信号传导寡核苷酸的杂交与来自杂交结果物的标记的信号传导同步化,从而提供表示靶核酸序列的存在的信号。因此,本发明在使用提供能够实时检测的信号标记的情况下,本发明能够以实时方式实施。

[0195] 择一性地,本发明中所利用的标记可在杂交结果物的解链或杂交结果物的解链及杂交过程中提供能够检测的信号,因此,能够通过解链分析来检测靶信号。

[0196] 本发明中所使用的术语“解链分析”意味着通过延伸二聚物的解链得到表示延伸二聚物的存在的靶信号,包括在两个不同的温度条件下测定信号的方法、解链曲线分析、解链模式分析。优选地,解链分析是解链曲线分析。

[0197] 例如,在信号传导寡核苷酸和延伸链的二聚物进行解链的情况下,单链信号传导寡核苷酸上的报道分子及猝灭分子在结构上(conformational)相接近,使得上述猝灭分子对来自上述报道分子的信号进行猝灭,并导致信号的变化,从而提供能够检测的信号。另一方面,在信号传导寡核苷酸及延伸链重新杂交并形成二聚物的情况下,信号传导寡核苷酸上的报道分子及猝灭分子在结构上相隔开,使得上述猝灭分子诱导从上述报道分子的信号的未猝灭,并导致信号的变化,从而提供能够检测的信号(参照图2)。

[0198] 根据本发明的优选一实例,通过利用信号传导寡核苷酸和延伸链二聚物的 T_m 值的解链曲线分析来检测探测和标记寡核苷酸片段的延伸链的存在。

[0199] 在利用信号传导寡核苷酸和延伸链二聚物的 T_m 值来进行分析的情况下,优选地,使用没有信号传导寡核苷酸和延伸链之间的杂交结果物的分离也能够进行同质性试验(homogeneous assay)的标记(例如,荧光标记)。

[0200] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸和延伸链之间的杂交结果物具有根据上述探测和标记寡核苷酸片段的序列和/或长度、上述捕捉和模板化寡核苷酸的序列和/或长度、上述信号传导寡核苷酸的序列和/或长度及它们的组合来调节的 T_m 值。

[0201] 例如,能够调节信号传导寡核苷酸序列的错配程度来调节杂交结果物的 T_m 值。或者,能够调节信号传导寡核苷酸的长度来调节杂交结果物的 T_m 值。

[0202] 优选地,本发明的方法在步骤(e)及步骤(f)之间还包括,使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交,从而提供能够检测的信号,在上述步骤(f)中,检测上述信号来检测延伸链的存在。

[0203] 择一性地,本发明在步骤(f)后还包括,使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交,从而提供能够检测的信号,由此,再次检测延伸链的存在。

[0204] 根据本发明的优选一实例,通过杂交曲线分析(hybridization curve analysis)来检测探测和标记寡核苷酸片段的延伸链的存在。

[0205] 术语“ T_m ”意味着解链温度。上述解链温度是双链核酸分子群体(population)中的一半分离为单链的温度。 T_m 值根据杂交的核苷酸的长度及G/C含量来决定。 T_m 值可通过如Wallace rule(R.B.Wallace, et al., Nucleic Acids Research, 6:3543-3547(1979))及nearest-neighbor方法(SantaLucia J. Jr., et al., Biochemistry, 35:3555-3562(1996)); Sugimoto N., et al., Nucleic Acids Res., 24:4501-4505(1996))的公知的方法

来计算。

[0206] 根据本发明的优选一实例,本发明的 T_m 值意味着实际使用的反应条件下的 T_m 值。

[0207] 解链曲线或杂交曲线可如现有技术,例如,美国专利第6174670号及第5789167号、Drobyshev等, *Gene* 188:45(1997); Kochinsky and Mirzabekov *Human Mutation* 19:343 (2002); Livehits等, *J. Biomol. Structure Dynam.* 11:783(1994); 以及Howell等, *Nature Biotechnology* 17:87(1999)中说明的方法来得到。例如,解链曲线或杂交曲线可由对于杂交严格度(stringency)的参数的输出信号(output signal)变化的图表绘制(graphic plot)或显示(display)构成。输出信号能够直接对杂交参数进行绘图。典型地,例如,解链曲线或杂交曲线在Y-轴具有表示二聚物结构的程度(即,杂交程度)的荧光,在X-轴具有绘图(plotting)有杂交参数的输出信号。

[0208] 荧光vs.温度的一阶导数(derivative)的绘图,即在荧光vs.温度(dF/dT vs. T)或($-dF/dT$ vs. T)的变化率绘图提供解链峰。

[0209] 延伸链的生成可根据延伸链的大小来检测。与延伸链杂交的信号传导寡核苷酸提供能够用延伸链的大小来检测延伸链的能够检测的信号。例如,在利用如凝胶电泳及聚丙烯酰胺(polyacrylamide)凝胶电泳的各种电泳方法来检测延伸链的生成的情况下,与上述延伸链杂交的信号传导寡核苷酸向凝胶基质上提供表示延伸链的存在的信号。优选地,上述信号传导寡核苷酸使用单一荧光标记的。

[0210] 探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸可由天然(naturally occurring)dNMPs构成。择一性地,探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸可包含变形核苷酸或者非-天然核苷酸,例如PNA(Peptide Nucleic Acid,参照PCT申请第W092/20702号)以及LNA(Locked Nucleic Acid,参照PCT申请第W098/22489号、第W098/39352号以及第W099/14226号)。探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸可包含如同脱氧肌苷(deoxyinosine)、肌苷(inosine)、1-(2'-脱氧- β -D-呋喃核糖)-3-硝基吡咯(1-(2'-deoxybeta-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole)以及5-硝基吲哚(5-nitroindole)等的通用碱基。术语“通用碱基”意味着分别对天然DNA/RNA碱基能够几乎没有区别地形成碱基对。

[0211] 如上所述,探测和标记寡核苷酸能够在从探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的3'-末端沿着3'-方向隔开的位置被切割。上述切割位置能够位于探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分。在探测和标记寡核苷酸片段包含探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分的情况下,与3'-靶向部位的5'-末端一部分杂交的捕捉和模板化寡核苷酸的位置能够包含通用碱基、退化性序列(degenerate sequence)或者它们的组合。例如,若探测和标记寡核苷酸在从探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的3'-末端沿着3'-方向隔开一个核苷酸的位置被切割,则为了与上述核苷酸的杂交,有利地,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端一部分包含通用碱基。如果探测和标记寡核苷酸在从探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位的3'-末端沿着3'-方向隔开两个核苷酸的位置被切割,有利地,捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位的5'-末端包含退化性序列,沿着其3'-方向邻近的核苷酸包含通用碱基。像这样,在3'-靶向部位的5'-末端一部分的多个位置上产生探测和标记寡核苷酸的切割的情况下,对捕捉和模板化寡核苷酸利用通用碱基以及退化性序列将具有用处。并且,在诱导上游引物延伸-依赖性切割的情况下,将具有相同的5'-标记

部位的探测和标记寡核苷酸利用到多个靶核酸序列筛选时,3'-靶向部位的5'-末端一部分能够生成互不相同的探测和标记寡核苷酸片段。在这种情况下,通用碱基以及退化性序列将被有用地使用到捕捉和模板化寡核苷酸。为了实现多个靶核酸序列的筛选,在对捕捉和模板化寡核苷酸利用通用碱基以及退化性序列的战略中使用一个类型的捕捉和模板化寡核苷酸或者最小数量的类型的捕捉和模板化寡核苷酸。

[0212] 根据本发明的优选一实例,本发明的方法在步骤(d)和步骤(e)之间还包括变性步骤。在步骤(d)中形成的延伸二聚物在变性为单链形态后,与信号传导寡核苷酸杂交。

[0213] 根据本发明的优选一实例,本发明的方法在反复循环(repeating cycle)之间还包括变性过程,来反复实施步骤(a)~步骤(f)中的全部或一部分。例如,本发明的方法在反复循环之间还包括变性过程,来反复实施步骤(a)~步骤(b)、步骤(a)~步骤(d)、步骤(a)~步骤(e)或步骤(a)~步骤(f)。通过这种反复,能够扩增靶核酸序列和/或靶信号。

[0214] 根据本发明的优选一实例,本发明在反复循环之间包括变性过程,来反复实施步骤(a)~步骤(e),且还包括使步骤(e)的杂交结果物解链或解链后杂交来提供能够检测的信号,在上述步骤(f)中,检测信号来检测延伸链的存在。

[0215] 可通过包含热、碱、甲酰胺、尿素及乙二醛处理、酶方法(如解旋酶作用)及结合蛋白质的公知的技术实施变性,但并不局限于此,例如,变性可在80~105°C温度范围内进行热处理来达成。在Joseph Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2001)中公开了如上所述的变性的常规方法。

[0216] 根据本发明的优选一实例,本发明能够进行一系列解链分析来定性或定量检测靶核酸序列。

[0217] 更优选地,本发明包括:(i)为了生成延伸链,反复在反复循环之间包括变性过程的步骤(a)~步骤(d)的步骤;(ii)实施信号传导寡核苷酸和延伸链的杂交结果物的解链分析的步骤;以及(iii)至少反复两次以上上述步骤(i)和步骤(ii)的步骤。这种情况下,解链分析具有一定间距(a certain interval),并至少反复两次来实施。

[0218] 根据本发明的优选一实例,上述步骤(a)~步骤(d)的反复次数可以随意调节。在实施一系列解链分析的过程中,为了一个解链分析而实施的步骤(a)~步骤(d)的反复次数可与为了另一个解链分析而实施的步骤(a)~步骤(d)的反复次数相同或不同。

[0219] 本发明所属技术领域的普通技术人员能够明确的是,上述步骤(a)~步骤(d)的反复为生成延伸链的一例。例如,在本发明中,可以在反复步骤(a)~步骤(b),并实施步骤(c)及步骤(d)来生成延伸链后,执行解链分析。

[0220] 根据本发明的优选一实例,步骤(a)~步骤(f)在一个反应容器或单独的反应容器中实施。例如,步骤(a)~步骤(b)、步骤(c)~步骤(d)或步骤(e)~步骤(f)可在单独的反应容器中实施。

[0221] 根据本发明的优选一实例,步骤(a)~步骤(b)及步骤(c)~步骤(f)能够根据反应条件(尤其,温度)在一个反应容器中同时或单独实施。

[0222] 根据本发明的优选一实例,步骤(a)~步骤(b)包括变性过程,来反复实施。

[0223] 在反复过程中,将上游引物用作上游寡核苷酸的情况下,本发明的方法在下游引物存在的条件下实施,优选地,借助PCR方法来实施。

[0224] 根据本发明的优选一实例,在本发明中,能够通过至少两次的解链分析来进行靶核酸序列的定量分析。

[0225] 通过解链分析得到的解链峰的面积及高度受延伸二聚物的量的影响,这提供靶核酸序列的最初量相关信息。

[0226] 根据本发明的优选一实例,本发明包括:(i)在反复循环之间包括变性过程,来反复步骤(a)~步骤(d),从而增加延伸链的数量的步骤;(ii)实施信号传导寡核苷酸和延伸链的杂交结果物的解链分析的步骤;以及(iii)至少反复两次上述步骤(i)和步骤(ii)的步骤。测定达到预定阈值(threshold)以上的解链峰面积和/或高度的解链分析的循环数,由此能够决定靶核酸序列的量。

[0227] 择一性地,绘图用于增加延伸链的量的反复循环数相关解链分析信息(例如,峰面积或高度),来达到靶核酸序列的定量。

[0228] 本发明中所要检测和/或扩增的靶核酸序列包括所有DNA(gDNA及cDNA)分子以及RNA分子均不要求具有任何特定序列或者长度。

[0229] 当把mRNA用作初期物质时,在实施退火步骤之前必需进行反转录步骤,以上详细的内容公开在Joseph Sambrook等、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(2001);以及Noonan、K.F等、Nucleic Acids Res.16:10366(1988)。为了实现反转录反应,可利用与随机六聚体或mRNA杂交的寡核苷酸dT引物。

[0230] 在本发明中可检测和/或扩增的靶核酸序列还都包含任何自然(naturally occurring)原核细胞核酸、真核细胞(例如,原生动物和寄生动物、菌类、酵母、高等植物、低等动物及包含哺乳动物和人类的高等动物)核酸、病毒(例如,疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV:HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS)、流感病毒、EB病毒(Epstein-Barr virus)、肝炎病毒以及脊髓灰质炎病毒等)核酸或者类病毒核酸。

[0231] 能够通过本发明来检测的靶核酸序列包含各种核酸序列,例如,基因组内序列、人为分离或片段化的序列及合成序列(例如,cDNA序列及条形码序列)。例如,靶核酸序列包含用于免疫PCR(IPCR,Immuno-PCR)的核酸标记序列。IPCR与PCR一同使用核酸标记序列及抗体间的接合体,这广泛适用于检测包含蛋白质的各种靶(Sano等,Science 258 pp:120-122 (1992),美国专利第5665539号、Niemeyer等,Trends in Biotechnology 23 pp:208-216 (2005)、美国申请公开号第2005/0239108号及Ye等,Journal of Environmental Science 22pp:796-800(2010))。

[0232] 并且,本发明对核苷酸变异的检测非常有用。优选地,靶核酸序列包含核苷酸变异。在本说明书中使用的术语“核苷酸变异”意味着在连续的DNA片段或者序列类似的DNA片段中存在特定定位点的DNA序列的所有单一或者多个核苷酸置换、缺失或者插入。这种连续的DNA片段包含一个基因或者一个染色体的任意其他部位。这种核苷酸变异可以是突变(mutant)或者多态性等位基因变异(polymorphic allele variations)。例如,在本发明中检测的核苷酸变异包括:单核苷酸多态性(SNP,single nucleotide polymorphism)、突变(mutation)、缺失、插入、置换以及移位。核苷酸变异的例子包括:人类组的多种变异(例如,亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR:methylenetetrahydrofolate reductase)基因的变异)、病原体的药物耐性相关的变异以及癌产生-相关的变异。本说明书中使用的术语“核苷酸变

异”包含DNA分子的特定定位点上的任何变异。即，术语“核苷酸变异”包含DNA分子的特定定位点上的野生型及其DNA分子的特定定位点上的任何突变类型。

[0233] 在检测靶核酸序列的核苷酸变异的本发明中，所使用的引物或者探针具有对靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列的情况下，包含上述核苷酸变异的靶核酸序列被记载为匹配模板(matching template)。在所使用的引物或者探针具有对靶核酸序列的核苷酸变异非-互补的序列的情况下，包含核苷酸变异的靶核酸序列在被记载为错配模板(mismatching template)。

[0234] 为了检测核苷酸变异，可将上游引物的3'-末端设计成位于靶核酸序列的核苷酸变异位置的对面。根据本发明的优选一实例，上游引物的3'-末端具有对靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列。具有对靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列的上游引物的3'-末端通过被匹配模板退火并被延伸来诱导探测和标记寡核苷酸切割。其结果，形成的探测和标记寡核苷酸片段通过与捕捉和模板化寡核苷酸杂交并延伸，与OS杂交来提供靶信号。相反，上游引物的3'-末端在错配模板中与核苷酸变异错配的情况下，即使上游引物与错配模板杂交，为了实现延伸反应，在需要对引物的3'-末端进行退火的条件下也不会被延伸，由此不会产生靶信号。

[0235] 择一性地，可利用对具有对靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列的探测和标记寡核苷酸的杂交有着依赖性的探测和标记寡核苷酸切割反应。例如，在已调节的条件下，具有对靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列的探测和标记寡核苷酸与匹配模板杂交后被切割。其结果，形成的探测和标记寡核苷酸片段通过与捕捉和模板化寡核苷酸杂交并延伸，与OS杂交来提供靶信号。相反，在已调节的条件下，探测和标记寡核苷酸不会与具有对核苷酸变异位置非-互补的序列的错配模板杂交，并且上述探测和标记寡核苷酸不会被切割。在这种情况下，优选地，对探测和标记寡核苷酸的核苷酸变异互补的序列位于探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的中央。

[0236] 择一性地，为了检测核苷酸变异，使探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分位于靶核酸序列的核苷酸变异，探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分具有与靶核酸序列的核苷酸变异互补的序列(参照图9)。

[0237] 在5'-末端部位包含核苷酸变异区别部位的探针与错配模板杂交的情况下，5'-末端部位在特定条件下能够形成单链。上述探针可相当于探测和标记寡核苷酸。可利用本发明的方法来提供信号。这种接近能够用于检测具有与探针的核苷酸变异区别位点(nucleotide variation discrimination site)非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列。

[0238] 根据本发明的优选一实例，本发明中所使用的靶核酸序列为预-扩增的(pre-amplified)核酸序列。预-扩增的核酸序列的利用能够明显提高本发明的靶检测的灵敏度及特异性。

[0239] 根据本发明的优选一实例，上述方法在下游引物存在的条件下实施。

[0240] 本发明的优点在于能够同时检测至少2种靶核酸序列(多重)。

[0241] 根据本发明的优选一实例，上述方法是为了检测至少两种(更优选为至少3种，进而优选为至少5种)靶核酸序列而实施的。

[0242] 根据本发明的优选一实例，上述方法为了检测至少2种(更优选为至少3种，进而优选为至少5种)靶核酸序列而实施；上游寡核苷酸包含至少2种(更优选为至少3种，进而优选

为至少5种)寡核苷酸,探测和标记寡核苷酸包含至少2种(更优选为至少3种,进而优选为至少5种)探测和标记寡核苷酸,捕捉和模板化寡核苷酸包含至少2种(更优选为至少3种,进而优选为至少5种)捕捉和模板化寡核苷酸,信号传导寡核苷酸包含至少2种(更优选为至少3种,进而优选为至少5种)信号传导寡核苷酸,在至少2种靶核酸序列存在的情况下,上述方法提供相当于至少2种靶核酸序列的至少2种靶信号(能够检测的信号)。

[0243] 至少2种探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位能够具有相同的序列。例如,本发明为了靶核酸序列的筛选而实施的情况下,探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位可以具有相同的序列。

[0244] 并且,一种捕捉和模板化寡核苷酸能够用于检测多个靶核酸序列。例如,将在上述5'-标记部位具有相同的序列的探测和标记寡核苷酸利用于靶核酸序列的筛选的情况下,可以使用一种捕捉和模板化寡核苷酸。

[0245] 为了通过解链曲线分析来同时检测至少2种靶核酸序列而实施本发明的情况下,相当于至少2种上述靶核酸序列的上述步骤(e)的杂交结果物具有互不相同的 T_m 值,由此,即使使用单一标记(例如,FAM),也能够检测至少2种靶核酸序列。

[0246] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸/延伸链杂交物的 T_m 值能够根据信号传导寡核苷酸的序列和/或长度、与信号传导寡核苷酸杂交的延伸链部位的序列和/或长度或它们的组合来调节。尤其,在多重检测过程中生成的延伸链与上述一种信号传导寡核苷酸杂交的情况下,若设计成与信号传导寡核苷酸杂交的延伸链的部位具有互不相同的序列,则上述延伸链和信号传导寡核苷酸的杂交物的 T_m 值互不相同。因此,即使使用一种信号传导寡核苷酸,也能够进行多重检测。

[0247] 本发明可在如微阵列的固相中实施。

[0248] 根据本发明的优选一实例,本发明在固相中实施,捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸通过其5'-末端或3'-末端固定于固相基质上。

[0249] 为了实现固相反应,捕捉和模板化寡核苷酸基于其5'-末端或者3'-末端(优选为,3'-末端)在固相基质的表面直接或者间接(优选为间接)实现固定化。并且,上述捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸能够以共价键或者非共价键方式,在固相基质表面上实现固定化。在固定化的上述捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸在固相基质上间接性地实现固定化的情况下,利用合适的连接肽。在本发明中使用的连接肽可包含利用于固相基质表面上的探针固定化的任何连接肽。例如,具有胺基的烷基或者芳基化合物、或者具有硫醇基的烷基或者芳基化合物可作为连接肽利用于捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸固定化。并且,可将聚胸腺嘧啶尾(poly T tail)或者聚腺苷酸尾(poly A tail)使用为连接肽。

[0250] 根据本发明的优选一实例,在本发明中利用的固相基质为微阵列。在本发明中提供反应环境的微阵列可以使用本发明所属的技术领域中公知的任何微阵列。本发明的全部过程,即与靶序列的杂交、切割、延伸、解链以及荧光的检测在微阵列上实施。在微阵列上实现固定化的上述捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸会被利用为杂交阵列因素(hybridizable array element)。用于制备微阵列的固相基质包括,金属(例如,金、金与铜的合金、铝)、金属氧化物、玻璃、陶瓷、石英、硅、半导体、Si/SiO₂晶圆、锗、砷化镓、碳、碳纳米管、聚合物(例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯以及聚丙烯酰胺)、琼脂糖凝胶(sepharose)、

琼脂糖(agarose)及胶体(colloids),但是不局限于此。本发明的多个固定化捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸可固定于固相基质上的一个寻址(addressable)部位或者多个寻址部位,固相基质可包括2~1000000个寻址部位。为了基于如光刻法、喷墨打印法、机械点样法及与其类似的方法等现有制备技术,生产用于特定应用的阵列而可以组装(fabricate)固定化的捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸。

[0251] 根据本发明的优选一实例,固定于固相基质的表面上的信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标记。

[0252] 在本发明中,探测和标记寡核苷酸片段通过与靶核酸杂交的探测和标记寡核苷酸的切割来生成,退火后,在捕捉和模板化寡核苷酸上被延伸,其结果,生成延伸链。

[0253] 为了增加延伸链的数量,可借助利用追加的探测和标记寡核苷酸的追加的5'核酸酶切割反应来提供在捕捉和模板化寡核苷酸上能够延伸的追加的片段。上述追加的探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,包含与延伸链互补的核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,包含与延伸链非-互补,但与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位互补的核苷酸序列。

[0254] 优选地,上述追加的探测和标记寡核苷酸位于与延伸链杂交的信号传导寡核苷酸的下游。上述信号传导寡核苷酸诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的追加的探测和标记寡核苷酸切割。信号传导寡核苷酸的3'-末端能够延伸的情况下,信号传导寡核苷酸的延伸链诱导上述追加的探测和标记寡核苷酸的切割。

[0255] 上述优选实例表示追加的片段形成对延伸链形成具有依赖性的特征。

[0256] 择一性地,上述追加的片段能够通过以下追加的探测和标记寡核苷酸的使用来提供。上述追加的探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,包含与捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,包含与捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位非-互补的核苷酸序列,并包含与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位互补的序列。

[0257] 伴随靶核酸序列扩增的优选实例

[0258] 优选地,本发明利用能够合成靶核酸序列的上游引物以及包含下游引物的一对引物,并同时扩增靶核酸序列。

[0259] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供一种利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PT0 Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法,包括:步骤(a),使上述靶核酸序列与包含上游引物及下游引物的引物对以及探测和标记寡核苷酸进行杂交;上述上游引物及下游引物包含与分别上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;上述探测和标记寡核苷酸位于上述上游引物及下游引物之间;上述探测和标记寡核苷酸的3'-末端被阻断,以防止延伸;步骤(b),在用于切割上述探测和标记寡核苷酸及延伸上述引物的条件下,使具有5'核酸酶活性的模板-依赖性核酸聚合酶与上述步骤(a)的结果物相接触;若上述探测和标记寡核苷酸杂交于上述靶核酸序列,则上述上游引物被延伸,且上述延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的上

述模板-依赖性核酸聚合酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;步骤(c),使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸进行杂交;上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;步骤(d),利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应;与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸(Signaling Oligonucleotide)杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示上述延伸链的存在,且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

[0260] 由于本发明的优选一实例实施上述的本发明的步骤,因此,为了避免本说明书过于复杂,省略它们之间共同的内容。

[0261] 根据本发明的优选一实例,上述方法在反复循环之间包括变性过程,还包括反复进行步骤(a)~步骤(f)的全部或部分步骤。例如上述方法在反复循环之间包括变性过程,步骤(a)~步骤(b)、步骤(a)~步骤(d)或者步骤(a)~步骤(f)的步骤。上述反应的反复伴随着靶核酸序列的扩增。优选地,上述扩增根据在美国专利第4683195号、第4683202号以及第4800159号中记载的聚合酶链式反应(PCR,polymerase chain reaction)来实施。

[0262] 根据本发明的优选一实例,上述方法是为了检测至少两种靶核酸序列而实施。

[0263] 利用基于上游寡核苷酸-独立性5'核酸酶活性的PCE-SH的靶检测

[0264] 可不使用上游寡核苷酸来实施本发明。

[0265] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,探测和标记寡核苷酸Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的方法,上述方法包括:步骤(a),使上述靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸(PT0, Probing and Tagging Oligonucleotide)进行杂交;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交;步骤(b),在用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件下,使上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触;上述探测和标记寡核苷酸基于具有5'核酸酶活性的上述酶而被切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;步骤(c),使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸(CT0,Capturing and Templating Oligonucleotide)进行杂交;上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探

测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;步骤(d),利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应;与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸(Signaling Oligonucleotide)杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;以及步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示上述延伸链的存在,且上述延伸链的存在表示上述靶核酸序列的存在。

[0266] 考虑靶核酸序列的扩增及上述探测和标记寡核苷酸的切割效率,优选地,本发明的PCE-SH使用上游寡核苷酸来实施。

[0267] 利用PCE-SH的核苷酸变异的检测

[0268] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来检测靶核酸序列内的核苷酸变异的方法,上述方法包括:步骤(a),使上述靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸(PTO,Probing and Tagging Oligonucleotide)进行杂交;上述上游寡核苷酸包含与分别上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;以及(iii)核苷酸变异区别位点(nucleotide variation discrimination site),其包含与靶核酸上的核苷酸变异互补的序列;上述核苷酸变异区别位点位于3'-靶向部位的5'-末端一部分,上述3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述5'-标记部位不与上述靶核酸序列杂交,上述上游寡核苷酸位于上述探测和标记寡核苷酸的上游,上述上游寡核苷酸或其延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的探测和标记寡核苷酸切割;步骤(b),在用于切割上述探测和标记寡核苷酸的条件下,使上述步骤(a)的结果物与具有5'核酸酶活性的酶相接触;上述探测和标记寡核苷酸与具有对上述核苷酸变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交,上述3'-靶向部位的5'-末端一部分与靶核酸序列形成双链,若从第一初期切割位置诱导切割,则放出第一片段;上述探测和标记寡核苷酸与具有对上述核苷酸变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交,上述3'-靶向部位的5'-末端一部分不与靶核酸序列形成双链,从位于第一初期切割位置的下流的第二初期切割位置诱导切割,则放出第二片段;上述第二片段包含追加的3'-末端部位,这使第二片段与第一片段不同;步骤(c),使从上述探测和标记寡核苷酸放出的上述片段与捕捉和模板化寡核苷酸(CTO:Capturing and Templating Oligonucleotide)进行杂交;上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列,以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的第一片段或第二片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;步骤(d),利用模板-依赖性核酸聚合酶及上述步骤(c)的结果物来实施延伸反应;若上述第一片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,则上述第一片段被

延伸,来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,若上述第二片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交,则不被延伸;步骤(e),使上述延伸链与信号传导寡核苷酸杂交的步骤;上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号;以及步骤(f),检测上述信号;上述信号的检测表示与上述探测和标记寡核苷酸的核苷酸区别部位互补的核苷酸变异的存在。

[0269] 本发明人发现,能够对关注的核苷酸变异的存在或不存在有依赖性地调节上述探针切割位置,在互不相同的位置被切割并放出的上述片段根据在人为模板上的延伸可能性而区分。

[0270] 本发明利用探针杂交、探测和标记寡核苷酸的切割及延伸、核苷酸变异-依赖性延伸链的生成以及利用信号传导寡核苷酸的延伸链检测的连续步骤。因此,被命名为基于探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交的变异检测(VD-PCE-SH, Variation Detection PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)。

[0271] 根据本发明的优选一实例,通过本发明来检测到的核苷酸变异为基于如SNP的单一核苷酸的变异。

[0272] 在本发明中,将具有与探测和标记寡核苷酸的核苷酸变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列记载为“匹配模板”。将具有与探测和标记寡核苷酸的核苷酸变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列记载为“错配模板”。

[0273] 在本发明的优选一实例中,关于与核苷酸变异区别位点非-互补的核苷酸变异而使用的术语“非-互补”包含基于插入或缺失的非-互补性。

[0274] 本发明的VD-PCE-SH为了对于特定核苷酸变异的探测和标记寡核苷酸的选择性,利用具有位于3'-靶向部位的5'-末端一部分的核苷酸变异区别位点的探测和标记寡核苷酸。若上述探测和标记寡核苷酸与具有与核苷酸变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列(即,匹配模板)杂交,则3'-靶向部位的5'-末端一部分与匹配模板形成双链。相反,若上述探测和标记寡核苷酸与具有与核苷酸变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列(即,错配模板)杂交,则3'-靶向部位的5'-末端一部分不与错配模板形成双链。

[0275] 像这样,关注的核苷酸变异的其他的杂交模式提供了探测和标记寡核苷酸的初期切割位置上的差异,据此生成2种探测和标记寡核苷酸片段,由此根据关注的核苷酸变异的存在与否发生信号差异是值得瞩目的。

[0276] 第一片段基于探测和标记寡核苷酸及匹配模板杂交物的切割而生成,第二片段分别基于探测和标记寡核苷酸及错配模板杂交物的切割而生成。上述第二片段包含追加的3'-末端部位,这使第二片段与第一片段不同。

[0277] 能够基于捕捉和模板化寡核苷酸上的延伸反应来检测第一片段或第二片段的生成。

[0278] 通常,引物的3'-末端一部分及模板的杂交对在严格的条件下的引物延伸很重要。在本发明中,第一片段及第二片段分别在捕捉和模板化寡核苷酸的相同位置杂交。如上所述,与第一片段相比,第二片段包含追加的3'-末端部位。能够调节杂交条件及第二片段的追加的3'-末端部位的对面的捕捉和模板化寡核苷酸序列,来仅使上述第一片段延伸。

[0279] 根据本发明的优选一实例,上述第二片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的情况下,捕捉和模板化寡核苷酸不与上述第二片段的上述追加的3'-末端部位杂交,因此选择捕捉和模板化寡核苷酸的序列,以防止上述第二片段的延伸。

[0280] 根据本发明的优选一实例,第二片段的追加的3'-末端部位的对面捕捉和模板化寡核苷酸的序列与上述追加的3'-末端部位非-互补。

[0281] 基于上述第一片段的延伸的延伸链的生成能够使用如上所述的信号传导寡核苷酸来检测。

[0282] 根据为了检测核苷酸变异而利用5'核酸酶活性的现有技术,所使用的探针的杂交受探针整个序列的影响或由其决定。在这种现有技术中,探针设计、制作及反应条件的最优化不容易,这是因为依赖于核苷酸变异的存在的探针的杂交主要根据单一核苷酸的差异而决定。

[0283] 根据VD-PCE-SH,核苷酸变异区别位点位于探针的杂交-参与部位的5'-末端一部分,这便于将杂交条件最优化。并且,VD-PCE-SH通过探针的一部分部位来区别并检测核苷酸变异,而不是通过探针的整个序列,并能够准确检测基于如SNP的单一核苷酸的差异。

[0284] 在本发明所属技术领域,已知与SNP的对面序列相邻的探针序列对探针杂交的影响很大。通常,现有的探针在中央部位具有SNP的对面序列。由此来看,现有的探针不能选择参与杂交的SNP的周边序列。现有技术因SNP周边序列而具有严重的限制。

[0285] 按照各自的不同步骤对本发明的VD-PCE-SH试验进行的详细说明如下。

[0286] 本发明的VD-PCE-SH试验为如上所述的PCE-SH试验之一,因此,为了避免本说明书过于复杂,省略它们之间共同的记载内容。

[0287] 步骤(a):靶核酸序列和上游寡核苷酸及探测和标记寡核苷酸的杂交

[0288] 根据本发明的方法,首先,使靶核酸序列与上游寡核苷酸及探测和标记寡核苷酸杂交。

[0289] 使用于核苷酸变异的检测的探测和标记寡核苷酸包含:(i)起到探针作用的3'-靶向部位;(ii)5'-标记部位,其包含与靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;以及(iii)核苷酸变异区别位点,其包含与靶核酸上的核苷酸变异互补的序列,并位于3'-靶向部位的5'-末端一部分。5'-标记部位与靶核酸序列杂交后,以核切割(nucleolytically)方式从探测和标记寡核苷酸分离。在上述探测和标记寡核苷酸中,5'-标记部位及3'-靶向部位必须以5'→3'方向定位。图9中例示了探测和标记寡核苷酸。

[0290] 探测和标记寡核苷酸包含核苷酸变异区别位点,上述核苷酸变异区别位点包含与核苷酸变异互补的序列,核苷酸变异区别位点位于3'-靶向部位的5'-末端一部分。

[0291] 在探测和标记寡核苷酸与具有对于变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交的情况下,3'-靶向部位的5'-末端一部分与靶核酸序列形成双链。探测和标记寡核苷酸与具有对变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交的情况下,3'-靶向部位的5'-末端一部分不与靶核酸序列形成双链。像这样,关注的核苷酸变异的明显的杂交模式提供在探测和标记寡核苷酸的初期切割位置的差异,据此生成2种探测和标记寡核苷酸片段,由此根据关注的核苷酸变异的存在与否发生信号差异。并且,与具有对变异区别位点非-互补的核苷酸的靶核酸序列杂交的情况下,上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分可以被记载为形成单链(single strand-forming)的上述探测和标记寡核

苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分。

[0292] 位于上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分的核苷酸变异区别位点包含与核苷酸变异互补的序列。例如,检测的核苷酸变异为SNP的情况下,核苷酸变异区别位点包含与上述SNP互补的核苷酸。

[0293] 根据本发明的优选一实例,上述核苷酸变异区别位点位于从探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端隔开10核苷酸,更优选为8核苷酸,更加优选为6核苷酸,进而优选为4核苷酸、3核苷酸、2核苷酸或1核苷酸的位置以内。优选地,核苷酸变异区别位点位于探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端。

[0294] 揭示探针的核苷酸变异区别位点或靶序列上的核苷酸变异位点而使用的术语“位点(site)”不仅包含单一核苷酸,还包含多个核苷酸。

[0295] 优选地,在步骤(a)中,杂交是在3'-靶向部位与靶核酸序列杂交,而5'-标记部位不与靶核酸序列杂交的严格条件下实施。

[0296] 步骤(b):从探测和标记寡核苷酸放出片段

[0297] 接着,在用于切割探测和标记寡核苷酸的条件下,使具有5'核酸酶活性的酶与步骤(a)的结果物相接触。

[0298] 若探测和标记寡核苷酸与具有对上述变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列(即,匹配模板)杂交,3'-靶向部位的5'-末端一部分与靶核酸序列形成双链,来从第一初期切割位置诱导切割,则放出第一片段(参照图9)。

[0299] 若探测和标记寡核苷酸与具有对上述变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列(即,错配模板)杂交,3'-靶向部位的5'-末端一部分不与靶核酸序列形成双链,来从位于第一初期切割位置的下流的第二初期切割位置诱导切割,则放出第二片段。上述第二片段包含追加的3'-末端部位,这使第二片段与第一片段不同(图9)。

[0300] 在试样内不存在靶核酸序列的情况下,不发生探测和标记寡核苷酸切割。

[0301] 像这样,基于靶核酸序列上的关注的核苷酸变异的存在与否的切割位置差异及生成的探测和标记寡核苷酸片段的差异表示延伸模式,且能够区别靶核酸序列上的核苷酸变异来检测。

[0302] 通常,基于上游引物延伸的切割位置沿着5'→3'方向位于包含单链及双链的结构内双链(即,分叉位点(bifurcation site))起始核苷酸或从起始核苷酸隔开1-2核苷酸的位置。借助切割反应而生成包含5'-标记部位及3-靶向部位的一部分的片段。若借助上游寡核苷酸延伸-独立性切割的诱导来实施本发明,则基于上游寡核苷酸的位置来调节探测和标记寡核苷酸的切割位置。

[0303] 本说明书中揭示探测和标记寡核苷酸而使用的术语“第一初期切割位置(a first initial cleavage site)”意味着在具有对变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸杂交的情况下,首先被切割的探测和标记寡核苷酸的切割位置。说明书中揭示探测和标记寡核苷酸而使用的术语“第二初期切割位置(a second initial cleavage site)”意味着在具有对变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸杂交的情况下,首先被切割的探测和标记寡核苷酸的切割位置。

[0304] 本发明中所使用的“第一片段(a first fragment)”意味着在第一初期切割位置借助切割而生成的片段。“第一片段”可替换为“第一分段(a first segment)”及“探测和标

记寡核苷酸第一片段(a PT0 first fragment)”来使用。术语“第二片段(a second fragment)”意味着在第二初期切割位置借助切割而生成的片段。“第二片段”可替换为“第二分段(a second segment)”及“PT0第二片段(a PT0 second fragment)”来使用。

[0305] 优选地,上述第一片段及第二片段分别包含5'-标记部位或5'-标记部位的一部分。

[0306] 可根据所利用的切割方法,在上述第一初期切割位置(或第二初期切割位置)的切割之后也能够连续进行上述切割。例如,与上游引物的延伸一同利用5'核酸酶切割反应的情况下,初期切割位置及与其连续的序列被切割。在使用上游探针的情况下,切割反应在从上述探针所处的地点隔开的特定位置发生,上述切割反应只在上述位置发生,不发生连续的切割。

[0307] 根据本发明的优选一实例,依赖于上游引物延伸的初期切割位置可沿着5'→3'方向位于双链的起始核苷酸(即,分叉位点(bifurcation site))。

[0308] 如图9所示,上述核苷酸变异区别位点位于3'-靶向部位的5'-末端一部分的5'-末端。这种情况下,第一初期切割位置沿着5'→3'方向正好与3'-靶向部位的5'-末端一部分相邻。即,上述第一初期切割位置沿着3'方向正好与核苷酸变异区别位点相邻。通常,第二初期切割位置位于从核苷酸变异区别位点沿着3'方向隔开1核苷酸的位置。

[0309] 上述核苷酸变异区别位点位于从3'-靶向部位的5'-末端一部分的5'-末端隔开1核苷酸的位置的情况下,第一初期切割位置沿着5'方向正好与核苷酸变异区别位点相邻。通常,第二初期切割位置位于从核苷酸变异区别位点沿着3'方向隔开1核苷酸的位置。

[0310] 根据本发明的优选一实例,上述5'-末端一部分局部包含非-杂交序列(或非-碱基对序列)。在上述探测和标记寡核苷酸与具有对核苷酸变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交的情况下,向上述5'-末端一部分导入非-杂交序列非常有助于使上述5'-末端一部分形成单链。并且,非-杂交序列的导入能够调节第二初期切割位置。

[0311] 根据本发明的优选一实例,上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位的5'-末端一部分包含位于从核苷酸变异区别位点隔开1-10核苷酸(更优选为1-5核苷酸)的位置以内的非-碱基对部分(non-base pairing moiety)。探测和标记寡核苷酸与具有对变异区别位点非-互补的核苷酸变异的靶核酸序列杂交的情况下,上述非-碱基对部分防止3'-靶向部位的5'-末端一部分与靶核苷酸序列形成双链。

[0312] 非-碱基对部分(例如,错配核苷酸)的利用提高对于核苷酸变异的探测和标记寡核苷酸的区别能力。

[0313] 根据本发明的优选一实例,在具有对核苷酸变异区别位点互补的核苷酸变异的靶核酸序列与探测和标记寡核苷酸杂交的情况下,非-碱基对部分不抑制5'-末端一部分与靶核酸序列形成双链。

[0314] 根据本发明的优选一实例,非-碱基对部分扩大第一初期切割位置及第二初期切割位置之间的距离。

[0315] 优选地,非-碱基对部分位于核苷酸变异区别位点的下游。

[0316] 例如,作为非-碱基对部分的错配核苷酸向沿着3'方向从核苷酸变异区别位点隔开2核苷酸的部位导入的情况下,第二初期切割位置调整为从核苷酸变异区别位点隔开2核苷酸的位置。不使用错配核苷酸的情况下,第二初期切割位置位于从核苷酸变异区别位点

隔开1核苷酸的位置。即,非-碱基对部分扩大第一初期切割位置及第二初期切割位置之间的距离。

[0317] 非-碱基对部分包含在靶核酸序列之间不形成碱基对的任何部分。优选地,非-碱基对部分是以下内容:(i)包含人为错配碱基、变形为无法碱基配对的非-碱基对碱基或通用碱基的核苷酸,(ii)变形为无法碱基配对的非-碱基对核苷酸或者(iii)非-碱基对化合物(non-base pairing chemical compound)。

[0318] 例如,非-碱基对部分包含亚烷基(alkylene group)、呋喃核糖萘(ribofuranosyl naphthalene)、脱氧呋喃核糖萘(deoxy ribofuranosyl naphthalene)、偏磷酸盐(metaphosphate)、硫代磷酸酯连接、烷基磷酸三酯连接、芳基磷酸三酯连接、磷酸烷基酯连接、磷酸芳基酯连接、氢磷酸酯连接、烷基磷酰胺酯连接及芳基磷酰胺酯连接。现有的碳间隔区也被利用为非-碱基对部分。作为非-碱基对部分的通用碱基对调节探测和标记寡核苷酸的切割位置有用。

[0319] 包含如同脱氧肌苷(deoxyinosine)、1-(2'-脱氧-β-D-呋喃核糖)-3-硝基吡咯(1-(2'-deoxybeta-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole)以及5-硝基吲哚(5-nitroindole)的通用碱基的碱基对的结合力低于天然碱基间的结合力,通用碱基在特定杂交条件下可利用为非-碱基对部分。

[0320] 导入5'-末端一部分的非-碱基对部分优选地具有1~10个部分,更优选地具有1~5个部分,进而优选地具有1~2个部分。5'-末端一部分的多个非-碱基对部分能够连续或不连续地存在。优选地,非-碱基对部分具有2~5个连续的部分。

[0321] 优选地,非-碱基对部分是非-碱基对化合物。

[0322] 根据本发明的优选一实例,核苷酸变异区别位点及探测和标记寡核苷酸的非-碱基对部分位于从3'-靶向部位的5'-末端隔开10核苷酸(更优选为8核苷酸、7核苷酸、6核苷酸、5核苷酸、4核苷酸、3核苷酸、2核苷酸或1核苷酸,进而优选为1核苷酸)的位置。

[0323] 择一性地,切割反应能够仅在上述第一初期切割位置实施。例如,使用上游探针,上述切割反应在从上述探针所处的地点隔开的特定位置发生的情况下,当探测和标记寡核苷酸与匹配模板杂交时,能够仅在第一初期切割位置发生切割反应。探测和标记寡核苷酸与错配模板杂交的情况下,由于分叉位点(bifurcation site)(第二初期切割位置)远离上游探针,因此不能被切割。

[0324] 根据本发明的优选一实例,探测和标记寡核苷酸与错配模板杂交的情况下,第二初期切割位置在包含单链及双链的结构中包含双链的起始位置(即,分叉位点(bifurcation site))。

[0325] 根据本发明的一实施例,探测和标记寡核苷酸具有阻断剂(blocker)部位,该阻断剂部位包含对具有5'核酸酶活性的酶引起的切割具有耐性的至少1个核苷酸阻断剂(blocker)。上述阻断剂部分位于第二初期切割位置)。上述阻断剂部位防止第二切割位置上发生的切割及连续的切割。

[0326] 阻断剂部位中所包含的阻断剂的数量不受限制,优选为1-10阻断剂,更优选为2-10阻断剂,进而优选为3-8阻断剂,最优选为3-6阻断剂。存在于探针的阻断剂能够以连续或不连续的方式存在,优选为连续的方式。作为阻断剂的核苷酸,即包含对5'→3'外切核酸酶活性具有耐性的主链的核苷酸包含本领域公知的任何部分。例如,上述核苷酸包含多种硫

代磷酸酯连接、膦酸酯连接、磷酰胺酯连接及2'-碳水化合物变形。根据本发明的更优选的实例,包含对5'→3'外切核酸酶具有耐性的主链的核苷酸包含硫代磷酸酯连接、烷基磷酸三酯连接、芳基磷酸三酯连接、膦酸烷基酯连接、膦酸芳基酯连接、氢膦酸酯连接、烷基磷酰胺酯连接、芳基磷酰胺酯连接、硒代磷酸酯(phosphoroselenate)连接、2'-O-氨基丙基变形、2'-O-烷基变形、2'-O-芳基变形、2'-O-丁基变形、 α -异头寡脱氧核苷酸及1-(4'-硫代- β -D-呋喃核糖)变形。

[0327] 步骤(c):从探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸的杂交

[0328] 从探测和标记寡核苷酸放出的片段与捕捉和模板化寡核苷酸杂交。

[0329] 通常,第一片段及第二片段包含能够与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的序列,由此,第一片段及第二片段之一与捕捉和模板化寡核苷酸杂交。

[0330] 与错配模板杂交而生成的第二片段与匹配模板杂交而生成的第一片段不同地包含追加的3'-末端部位。

[0331] 根据本发明的优选一实例,上述第二片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的情况下,捕捉和模板化寡核苷酸不与上述第二片段的上述追加的3'-末端部位杂交,因此,选择捕捉和模板化寡核苷酸的序列,以防止上述第二片段的延伸。例如,捕捉和模板化寡核苷酸的序列能够以在第二片段的追加的3'-末端部位的对面具有错配核苷酸的方式被选择。择一性地,通用碱基能够替代错配核苷酸。

[0332] 在某种条件下,第一初期切割位置(或第二初期切割位置)可以不固定,并且是多个。例如,初期切割位置可沿着5'→3'方向位于包含单链及双链的结构中双链(即,分叉位点(bifurcation site))的起始核苷酸及从起始核苷酸隔开1-2核苷酸的位置。这种情况下,优选地,在本发明中,选择捕捉和模板化寡核苷酸的序列,使借助第一初期切割来放出的片段中最短的片段选择性地被延伸,从而生成表示核苷酸变异的存在的延伸链。

[0333] 步骤(d):切割片段的延伸

[0334] 若捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位与第一片段杂交,则上述片段被延伸,并生成包含与捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链。第二片段与捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的情况下,上述第二片段不被延伸。

[0335] 通常,引物的延伸能够借助引物的3'-末端一部分与模板的杂交来被调节。能够调节引物序列及反应条件(例如,退火温度),来使在3'-末端一部分具有1~3错配核苷酸的引物延伸。择一性地,能够仅在引物具有与靶序列完全互补的序列时使引物延伸。

[0336] 根据本发明的优选一实例,选择捕捉和模板化寡核苷酸的序列,使第一片段或第二片段中的某一个选择性地被延伸。

[0337] 根据本发明的优选一实例,在一个错配存在于片段的3'-末端一部分的情况下,在不被延伸的条件下实施片段的延伸。

[0338] 步骤(e):借助延伸链和信号传导寡核苷酸的杂交的信号生成

[0339] 在上述延伸反应之后,使上述延伸链与信号传导寡核苷酸杂交。生成表示对探测和标记寡核苷酸的核苷酸区别位点互补的核苷酸变异的存在的信号。

[0340] 延伸链及信号传导寡核苷酸的杂交和标记系统及信号生成的相关详细内容见上述说明。

[0341] 步骤(f):信号的检测

[0342] 最终,检测在步骤(e)中提供的能够检测的信号,上述信号的检测表示延伸链的存在及对探测和标记寡核苷酸的核苷酸区别位点互补的核苷酸变异的存在。

[0343] 信号检测相关详细内容见上述说明。

[0344] 根据一实例,本发明能够无需上游寡核苷酸的帮助地检测核苷酸变异。本发明使用具有上游寡核苷酸-独立性5'核酸酶活性的酶。考虑靶核酸序列的扩增、反应条件及5'核酸酶活性时,优选地,使用上游寡核苷酸来实施本发明,更优选地,使用上游引物来实施本发明。

[0345] 用于检测靶的试剂盒

[0346] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)来从DNA或核酸混合物检测靶核酸序列的试剂盒,上述试剂盒包含:(a)探测和标记寡核苷酸(PTO,Probing and Tagging Oligonucleotide),上述探测和标记寡核苷酸包含:(i)3'-靶向部位,其包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列;以及(ii)5'-标记部位,其包含与上述靶核酸序列非-互补的核苷酸序列;上述探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位与上述靶核酸序列杂交,上述5'-标记部位不与靶核酸序列杂交;(b)上游寡核苷酸(upstream oligonucleotide),上述上游寡核苷酸包含与上述靶核酸序列互补的杂交核苷酸序列,上述上游寡核苷酸位于上述探测和标记寡核苷酸的上游;上述上游寡核苷酸或者其延伸链诱导基于具有5'核酸酶活性的酶的上述探测和标记寡核苷酸的切割,来放出包含上述探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位或者5'-标记部位的一部分的片段;(c)捕捉和模板化寡核苷酸(CTO,Capturing and Templating Oligonucleotide),上述捕捉和模板化寡核苷酸沿着3'→5'方向包含:(i)捕捉部位,其包含与上述探测和标记寡核苷酸的上述5'-标记部位互补的核苷酸序列或者与上述5'-标记部位的一部分互补的核苷酸序列;以及(ii)模板化部位,其包含分别与上述探测和标记寡核苷酸的上述5'-标记部位以及3'-靶向部位非-互补的核苷酸序列;从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交;并且,与上述捕捉和模板化寡核苷酸的捕捉部位杂交的上述片段被延伸来生成包含与上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位互补的延伸序列的延伸链,由此形成延伸二聚物;以及(d)信号传导寡核苷酸(Signaling Oligonucleotide),上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,并与至少一个标记相结合,且上述信号传导寡核苷酸与上述延伸链杂交来提供能够检测的信号。

[0347] 由于本发明的试剂盒是为了实施如上所述的本发明的检测方法的,因此,为了避免本说明书过于复杂,省略它们之间共通的内容。

[0348] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸的至少一个部位包含与上述延伸序列互补的序列。

[0349] 根据本发明的优选一实例,本发明的试剂盒包含:(i)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记;(ii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及从探测和标记寡核苷酸放出的片段相结合的标记的组合;(iii)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及插入于上述延伸链的标记的组合;或(iv)与上述信号传导寡核苷酸相结合的标记及嵌入染料的组合。

[0350] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸与包含报道分子及猝灭分子的相互

作用性双重标记相结合。

[0351] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸与单一标记相结合。

[0352] 根据本发明的优选一实例,试剂盒还包括一个信号传导寡核苷酸,追加的上述信号传导寡核苷酸包含与上述延伸链互补的序列,两个上述信号传导寡核苷酸接近于上述延伸链并进行杂交,两个上述信号传导寡核苷酸分别包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的某一个标记。

[0353] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸包含相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的某一个标记,从上述探测和标记寡核苷酸放出的片段具有上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记。

[0354] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸具有相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的某一个标记,上述捕捉和模板化寡核苷酸的模板化部位包含具有第一非-天然碱基的核苷酸,上述试剂盒还包含具有第二非-天然碱基以及上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记的核苷酸,上述第二非-天然碱基具有与上述第一非-天然碱基的特异性结合亲和性。

[0355] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸具有相互作用性双重标记的报道分子及猝灭分子中的某一个标记,上述试剂盒还包含具有上述报道分子及猝灭分子中的另一个标记的核苷酸。

[0356] 根据本发明的优选一实例,信号传导寡核苷酸包含荧光共振能量转移(FRET, fluorescence resonance energy transfer)的受体,上述试剂盒还包含嵌入染料。

[0357] 根据本发明的优选一实例,探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸和/或信号传导寡核苷酸的3'-末端被阻断,用于防止延伸。

[0358] 根据本发明的优选一实例,上述上游寡核苷酸为上游引物或上游探针。

[0359] 根据本发明的优选一实例,试剂盒还包含具有5'核酸酶活性的酶。

[0360] 根据本发明的优选一实例,试剂盒为用于检测至少2种靶核酸序列的试剂盒,上述上游寡核苷酸包含至少2种寡核苷酸,上述探测和标记寡核苷酸包含至少2种探测和标记寡核苷酸,上述捕捉和模板化寡核苷酸包含至少2种捕捉和模板化寡核苷酸,上述信号传导寡核苷酸包含至少2种信号传导寡核苷酸。

[0361] 根据本发明的优选一实例,试剂盒还包含下游引物。

[0362] 简要说明本发明的特征及优点如下:

[0363] (a)本发明不使用与靶核酸序列杂交来提供靶信号的探针。有趣的是,本发明利用与以靶-依赖性方式(target-dependent manner)形成的延伸链杂交的探针(信号传导寡核苷酸),上述延伸链将具有人为选择的序列的捕捉和模板化寡核苷酸作为模板合成。本发明第一次使用用于探测靶核酸序列的探测和标记寡核苷酸,第二次使用与靶-依赖性的延伸链杂交来提供信号的信号传导寡核苷酸,因此能够将特异度最大化,且能够与靶核酸序列无关地调节信号产生条件,从而容易设定反应条件。根据这种特征,在具有各种形态的临床样品中,当同时检测多重靶时,能够容易设定信号反应条件,并防止假阳性信号。

[0364] (b)在利用与靶核酸序列杂交的探针的现有技术中,探针应与靶核酸序列杂交,并与靶核酸序列的互补的序列竞争。但是,在本发明中,能够调节作为模板的捕捉和模板化寡核苷酸的量来仅扩增延伸链,因此能够有效进行探针的杂交,其结果,能够有效得到表示靶

核酸序列的存在的信号。

[0365] (c)本发明不仅能够实时检测靶核酸序列的存在,而且还能够通过解链曲线分析检测靶核酸序列的存在。

[0366] (d)能够根据信号传导寡核苷酸的序列和/或长度来调节延伸链与信号传导寡核苷酸的杂交结果物的 T_m 值,因此上述杂交结果物的 T_m 值能够预先设定(pre-determined)为任意值。若利用这种特征,则在本发明中,(i)由于在预定的 T_m 值以外的温度条件下产生的信号为假阳性信号,因此能够区别假阳性信号来检测靶核酸序列。(ii)上述杂交结果物相关 T_m 值的任意决定更有利于至少2种靶核酸序列的多重检测。

[0367] (e)对于探针及靶核酸序列的杂交物(hybrid)的现有的解链曲线分析中的 T_m 值受到靶核酸序列上的序列变异的影响。相反,在本发明中,延伸链与靶核酸序列上的变异序列无关地具有规定的 T_m 值,因此在解链曲线分析中呈现优秀的准确度。

[0368] (f)能够不考虑靶核酸序列而选择探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸的序列。因此,能够预先设计对于探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸的序列库(pool)。探测和标记寡核苷酸的3'-靶向部位应考虑靶核酸序列来制备,但捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸的情况下,无需靶核酸序列的信息或考虑,以现成(ready-made)的方式制备。

[0369] (g)本发明能够适用各种现有的标记的探针来检测靶核酸序列。

[0370] (h)延伸链及信号传导寡核苷酸的杂交结果物分别具有不同的 T_m 值的情况下,即使使用提供相同荧光特性的信号的标记方法,也能够通过解链曲线分析同时检测对于至少2种靶核酸序列的多重靶核酸序列。这种优点能够克服在多重实时检测中能够检测的荧光标记数量的限制引起的实现多重的限制。

[0371] 以下,通过实施例对本发明进行更为详细的说明。这些实施例仅是用于更加具体地说明本发明的,根据本发明的主旨本发明的范围不局限于这些实施例,这对本发明所属的技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0372] 实施例

[0373] 实施例1:探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,探测和标记寡核苷酸Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)试验的评价

[0374] 进行实验来得出新的探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交(PCE-SH,PTOCleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization)试验是否能够(i)在指定(pre-determined)温度条件下实时检测或者(ii)能够以解链分析方式实施来检测靶核酸序列(参照图2)。

[0375] 具有5'核酸酶活性的Taq DNA聚合酶用于上游引物的延伸、探测和标记寡核苷酸的切割及探测和标记寡核苷酸片段的延伸。

[0376] 探测和标记寡核苷酸及捕捉和模板化寡核苷酸没作标记,用碳间隔区来阻断了3'-末端。将对于淋病奈瑟菌(NG,Neisseria gonorrhoeae)基因的合成寡核苷酸用作靶模板。信号传导寡核苷酸在5'-末端包含荧光报道标记分子(CAL Fluor Red 610),在3'-末端包含猝灭分子(BHQ-2)。

[0377] 本实施例中所使用的合成模板、上游引物、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡

核苷酸及信号传导寡核苷酸序列如下。

[0378] NG-T 5'-AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTTCCTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA

[0379] CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO:1)

[0380] NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

[0381] NG-PT0 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO:3)

[0382] NG-CT0 5'-GCGCTGGATACCCTGGACGATATGCAGCCAAGCCGTCGT[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO:4)

[0383] NG-S0-1 5'-[CAL Fluor Red610]GCGCTGGATACCCTGGACGATATG[BHQ-2]-3' (SEQ ID NO:5)

[0384] (标有下划线的文字指探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位)

[0385] 1-1. 在指定温度条件下实时检测

[0386] 用含有对于2pmole(皮摩尔)的NG基因的合成模板(SEQ ID NO:1)、10pmole的上游引物(SEQ ID NO:2)、5pmole的探测和标记寡核苷酸(SEQ ID NO:3)、0.5pmole的捕捉和模板化寡核苷酸(SEQ ID NO:4)、0.5pmole的信号传导寡核苷酸(SEQ ID NO:5)及10μl的2X主混合液(Master Mix)(final, 200μM的dNTPs、2.5mM的MgCl₂、1.6U的H-Taq DNA聚合酶)((韩国索尔杰恩特公司(Solgent, Korea))的20μl的最终体积来实施了反应;使含有上述反应混合物的管位于实时热循环仪(CFX96, 伯乐公司:Bio-Rad);使上述反应混合物在95℃温度下进行15分钟变性后,在95℃温度下30秒钟、在60℃温度下60秒钟、在72℃温度下30秒钟的过程反复进行了30次。在每循环的杂交步骤(60℃)执行所产生的信号的检测。在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物(hybrid)能够保持双链形态的范围内决定了检测温度。

[0387] 如图10A所示,在模板存在的情况下检测到荧光信号。在没有模板、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸的情况下,没有检测到信号。

[0388] 1-2. 解链分析

[0389] 在实施例1-1的反应之后,将反应混合物降温至55℃,并在55℃温度下保持30秒钟后,从55℃慢慢加热至85℃,由此得到解链曲线。在温度增加的过程中,连续测定荧光来监测延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的分离。从解链曲线数据得到解链峰。

[0390] 如图10B所示,模板存在的情况下,在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的预测的T_m值(68.5℃)检测到峰。没有模板、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸或信号传导寡核苷酸的情况下,没有观察到峰。

[0391] 实施例2:利用PCE-SH试验的靶核酸序列的检测

[0392] 还进行实验来得出PCE-SH试验是否能够利用(i)实施PCR方式或(ii)post-PCR解链分析方式来检测靶核酸序列。

[0393] 具有5'核酸酶活性的Taq DNA聚合酶用于上游引物和下游引物的延伸、探测和标记寡核苷酸的切割及探测和标记寡核苷酸片段的延伸。

[0394] 探测和标记寡核苷酸及捕捉和模板化寡核苷酸没作标记,用碳间隔区来阻断了3'-末端。将NG基因的基因组DNA(genomic DNA)用作了靶模板。信号传导寡核苷酸在5'-末端包含荧光报道分子(CAL Fluor Red 610),在3'-末端包含猝灭分子(BHQ-2)。

[0395] 本实施例中所使用的上游引物、下游引物、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸序列如下。

[0396] NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3'(SEQ ID NO:6)

[0397] NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3'(SEQ ID NO:2)

[0398] NG-PTO 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3'(SEQ ID NO:3)

[0399] NG-CTO 5'-GCGCTGGATACCCTGGACGATATGCAGCCAAGCCGTCGT[C3 spacer]-3'(SEQ ID NO:4)

[0400] NG-SO-1 5'-[CAL Fluor Red 610]GCGCTGGATACCCTGGACGATATG[BHQ-2]-3'(SEQ ID NO:5)

[0401] (标有下划线的文字指探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位)

[0402] 2-1.在PCR过程中在指定温度条件下实时检测

[0403] 用含有100 pg的NG的genomic DNA、10pmole的上游引物(SEQ ID NO:2)、10pmole的下游引物(SEQ ID NO:6)、5pmole的探测和标记寡核苷酸(SEQ ID NO:3)、0.5pmole的捕捉和模板化寡核苷酸(SEQ ID NO:4)、0.5pmole的信号传导寡核苷酸(SEQ ID NO:5)以及10 μ l的2X主混合液(Master Mix)(final, 200 μ M的dNTPs、2.5mM的MgCl₂、1.6U的H-Taq DNA聚合酶)((韩国索尔杰恩特公司(Solgent, Korea))的20 μ l的最终体积来实施了反应;使含有上述反应混合物的管位于实时热循环仪(CFX96, 伯乐公司:Bio-Rad);使上述反应混合物在95 $^{\circ}$ C温度下进行15分钟变性后,在95 $^{\circ}$ C温度下30秒钟、在60 $^{\circ}$ C温度下60秒钟、在72 $^{\circ}$ C温度下30秒钟的过程反复进行了50次。在每循环的杂交步骤(60 $^{\circ}$ C)执行信号的检测。在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物(hybrid)能够保持双链形态的范围内决定检测温度。

[0404] 如图11 A所示,在模板存在的情况下,检测到荧光信号(Ct:30.34)。没有模板的情况下,没有检测到信号。

[0405] 2-2.Post-PCR解链分析

[0406] 在实施例2-1的反应之后,将反应混合物降温至55 $^{\circ}$ C,并在55 $^{\circ}$ C温度下保持30秒钟后,从55 $^{\circ}$ C慢慢加热至85 $^{\circ}$ C,并在温度增加的过程中,连续测定荧光来监测延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的分离。从解链曲线数据得到解链峰。

[0407] 如图11 B所示,模板存在的情况下,在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的预测的T_m值(68.5 $^{\circ}$ C)检测到峰。没有模板的情况下,没有观察到峰。

[0408] 实施例3:利用PCE-SH的靶核酸序列的单一核苷酸变异的识别

[0409] 还进行实验来得出是否能够通过PCE-SH识别靶核酸序列的单一核苷酸变异。

[0410] 具有5'核酸酶活性的Taq DNA聚合酶用于上游引物和下游引物的延伸、探测和标记寡核苷酸的切割及探测和标记寡核苷酸片段的延伸。探测和标记寡核苷酸及捕捉和模板化寡核苷酸没作标记,用碳间隔区来阻断了3'-末端。将对于MTHFR基因的C677T变异的人类基因组DNA(human genomic DNA)的Wild-type(C)、hetero-type(C/T)以及mutant-type(T)用作了靶核酸。信号传导寡核苷酸在5'-末端包含猝灭分子(BHQ-2),在3'-末端包含荧光报道分子(CAL Fluor Red610)。

[0411] PTO-1(SEQ ID NO:9)和CTO-1(SEQ ID NO:11)用于野生型(wild-type)的检测,PTO-2(SEQ ID NO:10)和CTO-2(SEQ ID NO:12)用于突变型(mutant-type)的检测。野生型

基因存在的情况下,使用CT0-1作为模板来生成延伸链(以下,“野生型延伸链”)。突变型基因存在的情况下,使用CT0-2作为模板来生成延伸链(以下,“突变型延伸链”)。当通过解链分析检测延伸链和信号传导寡核苷酸的杂交物时,使用一种信号传导寡核苷酸的情况下也能够单独检测两种延伸链。例如,若将延伸链设计成与信号传导寡核苷酸杂交的部位分别具有不同的序列,则杂交物具有不同的 T_m 值,因此能够区别延伸链的生成来检测。

[0412] 本实施例中使用的上游引物、下游引物、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸序列如下。

[0413] M677-F 5'-GCAGGGAGCTTTGAGGCTGIIIIIAAGCACTTGA-3'(SEQ ID NO:7)

[0414] M677-R 5'-CCTCACCTGGATGGGAAAGATIIIIIGGACGATGG-3'(SEQ ID NO:8)

[0415] M677-PT0-1 5'-CCCAGGCAACCCTCCGATTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCT[Spacer C3]-3'(SEQ ID NO:9)

[0416] M677-PT0-2 5'-CTCCTGCTCGCGTACTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAAG[Spacer C3]-3'(SEQ ID NO:10)

[0417] M677-CT0-1 5'-TCCGCTGCTTCACCACGCCTTCGAGAGGGTTGCCTGGG[Spacer C3]-3'(SEQ ID NO:11)

[0418] M677-CT0-2 5'-TCCGCTGCTTGACGACGCCTTCGATACGCGAGCAGGAG[Spacer C3]-3'(SEQ ID NO:12)

[0419] M677-S0 5'-[BHQ-2]TCCGCTGCTTCACCACGCCTTCGA[CA L Red 610]-3'(SEQ ID NO:13)

[0420] (I:Deoxyinosine)

[0421] (标有下划线的文字指探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位)

[0422] (粗体字指MTHFR基因的C677T变异位置的序列)

[0423] 用含有30ng的MTHFR(C677T)野生(wild)(C)、异质(hetero)(C/T)或突变(mutant)(T)型人类基因组(human genomic)DNA、10pmole的上游引物(SEQ ID NO:7)、10pmole的下游引物(SEQ ID NO:8)、各5pmole的探测和标记寡核苷酸(SEQ ID NO:9及10)、各0.1pmole的捕捉和模板化寡核苷酸(SEQ ID NO:11及12)、0.5pmole的信号传导寡核苷酸(SEQ ID NO:13)以及10 μ l的2X主混合液(Master Mix)(final,200 μ M的dNTPs,2.5mM的MgCl₂,1.6U的H-Taq DNA聚合酶)(韩国索尔杰恩特公司(Solgent,Korea))的20 μ l的最终体积来实施了反应;使含有上述反应混合物的管位于实时热循环仪(CFX96,伯乐公司:Bio-Rad);使上述反应混合物在95℃温度下进行15分钟变性后,在95℃温度下30秒钟、在55℃温度下60秒钟、在72℃温度下30秒钟的过程反复进行了40次。反应之后,将反应混合物降温至45℃,并在45℃温度下保持30秒钟后,从45℃慢慢加热至85℃,由此得到解链曲线。在温度增加的过程中,连续测定荧光来监测延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的分离。从解链曲线数据得到解链峰。

[0424] 如图12所示,野生型模板存在的情况下,在野生型延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的预测的 T_m 值(71.0℃)观察到峰。突变型模板存在的情况下,在突变型延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的预测的 T_m 值(55.5℃)检测到峰。异质型模板存在的情况下,在71.0℃(野生型)及55.5℃(突变型)观察到峰。任何模板也不存在的情况下,没有观察到峰。

[0425] 实施例4:利用探测和标记寡核苷酸的上游寡核苷酸-独立性切割的PCE-SH的评价

[0426] 还进行实验来得出PCE-SH试验是否能够不使用上游寡核苷酸,(i)在指定温度条件下实时-检测或(ii)以解链分析方式检测靶核酸序列。

[0427] 具有5'核酸酶活性的Taq DNA聚合酶用于探测和标记寡核苷酸的切割及探测和标记寡核苷酸片段的延伸。

[0428] 探测和标记寡核苷酸及捕捉和模板化寡核苷酸没作标记,用碳间隔区来阻断了3'-末端。将对于Neisseria gonorrhoeae(NG)基因的合成寡核苷酸用作靶模板。信号传导寡核苷酸在5'-末端包含荧光报道分子(CAL Fluor Red 610),在3'-末端包含猝灭分子(BHQ-2)。

[0429] 本实施例中所使用的合成模板、探测和标记寡核苷酸、捕捉和模板化寡核苷酸及信号传导寡核苷酸序列如下。

[0430] NG-T 5'-AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCATGATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3'(SEQ ID NO:1)

[0431] NG-PT0 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCTCATTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3'(SEQ ID NO:3)

[0432] NG-CT0 5'-GCGCTGGATACCCTGGACGATATGCAGCCAAGCCGTCGT[C3 spacer]-3'(SEQ ID NO:4)

[0433] NG-SO-1 5'-[CAL Fluor Red 610]GCGCTGGATACCCTGGACGATATG[BHQ-2]-3'(SEQ ID NO:5)

[0434] (标有下划线的文字指探测和标记寡核苷酸的5'-标记部位)

[0435] 4-1.在指定温度条件下实时检测

[0436] 用含有对2pmole的NG基因的合成模板(SEQ ID NO:1)、5pmole的探测和标记寡核苷酸(SEQ ID NO:3)、0.5pmole的捕捉和模板化寡核苷酸(SEQ ID NO:4)、0.5pmole的信号传导寡核苷酸(SEQ ID NO:5)以及10μl的2X主混合液(Master Mix)(final,200μM的dNTPs、2.5mM的MgCl₂、1.6U的H-Taq DNA聚合酶)(韩国索尔杰恩特公司(Solgent,Korea))的20μl的最终体积来实施了反应;使含有上述反应混合物的管位于实时热循环仪(CFX96,伯乐公司:Bio-Rad);使上述反应混合物在95℃温度下进行15分钟变性后,在95℃温度下30秒钟、在60℃温度下60秒钟、在72℃温度下30秒钟的过程反复进行了30次。在每循环的杂交步骤(60℃)执行所产生的信号的检测。在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物(hybrid)能够保持双链形态的范围内决定检测温度。

[0437] 如图13A所示,在模板存在的情况下,检测到荧光信号。没有模板的情况下,没有检测到信号。

[0438] 4-2.解链分析

[0439] 在实施例4-1的反应之后,将反应混合物降温至55℃,并在55℃温度下保持30秒钟后,从55℃慢慢加热至85℃,由此得到解链曲线。在温度增加的过程中,连续测定荧光来监测延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的分离。从解链曲线数据得到解链峰。

[0440] 如图13B所示,模板存在的情况下,在延伸链-信号传导寡核苷酸杂交物的预测的T_m值(68.5℃)观察到峰。没有模板的情况下,没有观察到峰。

[0441] 以上,详细记述了本发明的特定部分,能够明确的是,对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,这些具体技术仅属于优选实例,本发明的范围并不局限于此。因此,本

发明的实质性范围根据所附的发明要求保护范围和与其等同的技术方案来定义。

序列表

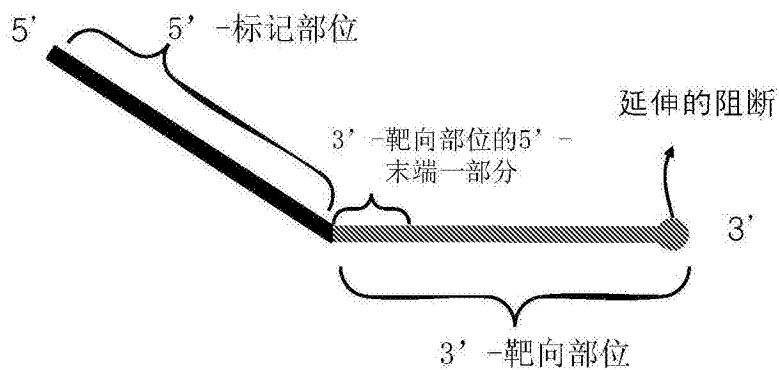
<110>	SEEGENE, INC.	
<120>	利用探测和标记寡核苷酸切割及延伸-依赖性信号传导寡核苷酸杂交的靶核酸序列的检测	
<130>	PP120066	
<150>	KR 10-2012-0010681	
<151>	2012-02-02	
<150>	KR 10-2012-0028429	
<151>	2012-03-20	
<160>	13	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	86	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NG-T	
<400>	1	
	aaatatgega aacacgccaa tgaggggcat gatgctttct ttttgttcct gctcggcaga	60
	gcgagtgata ccgagccatt gaaaaa	86
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NG-R	
<400>	2	
	caatggatcg giatcactcg c	21
<210>	3	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NG-PTO	
<400>	3	
	acgacggctt ggetgccect cattggcgig ttctg	35
<210>	4	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NG-CTO	
<400>	4	
	gcgctggata ccctggacga tatgcagcca agccgtcgt	39
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0001]

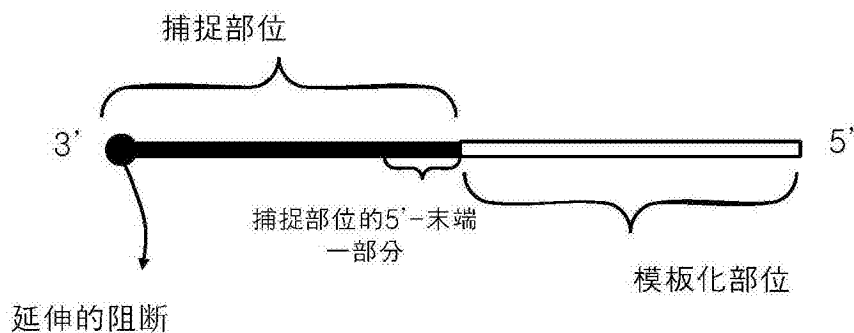
	<220>		
	<223>	NG-S0-1	
	<400>	5	
		gcgctggata ccctggacga tatg	24
	<210>	6	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	NG-F	
	<400>	6	
		tacgcctgct accttcacgc t	21
	<210>	7	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-F	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(20)..(24)	
	<223>	n表示脱氧核苷	
[0002]	<400>	7	
		gcagggagct ttgaggctgn nnnnaagcac ttga	34
	<210>	8	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-R	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(22)..(26)	
	<223>	n表示脱氧核苷	
	<400>	8	
		cctcacctgg atgggaaaga tnnnnnggac gatgg	35
	<210>	9	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-PT0-1	
	<400>	9	
		cccaggcaac cctccgattt catcatcacg cagcttttct ttgaggct	48
	<210>	10	
	<211>	40	
	<212>	DNA	

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-PT0-2	
	<400>	10	
		ctctgtgtcg cgtactcccg cagacacctt ctcttcaag	40
	<210>	11	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-CT0-1	
	<400>	11	
		tccgtgtgtt caccacgcct tcgagagggt tgcctggg	38
[0003]	<210>	12	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-CT0-2	
	<400>	12	
		tccgtgtgtt gaccacgcct tcgatacggc agcaggag	38
	<210>	13	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	M677-S0	
	<400>	13	
		tccgtgtgtt caccacgcct tcga	24

A. 探测和标记寡核苷酸 (Probing and Tagging Oligonucleotide : PTO)



B. 捕捉和模板化寡核苷酸 (Capturing and Templating Oligonucleotide : CTO)

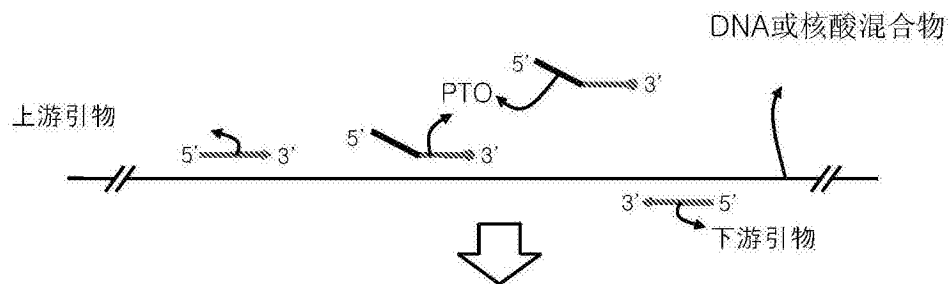


C. 信号传导寡核苷酸 (Signaling Oligonucleotide : SO)

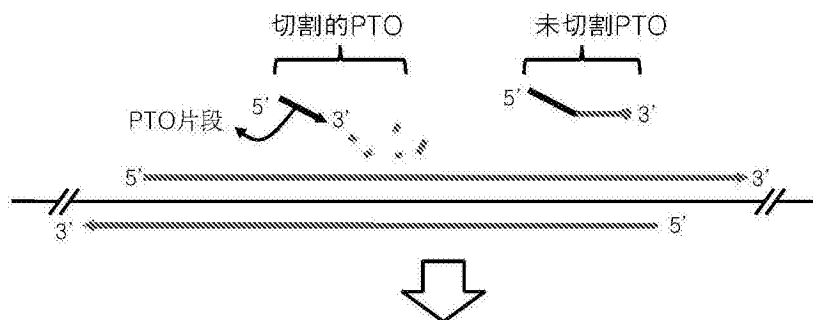


图1

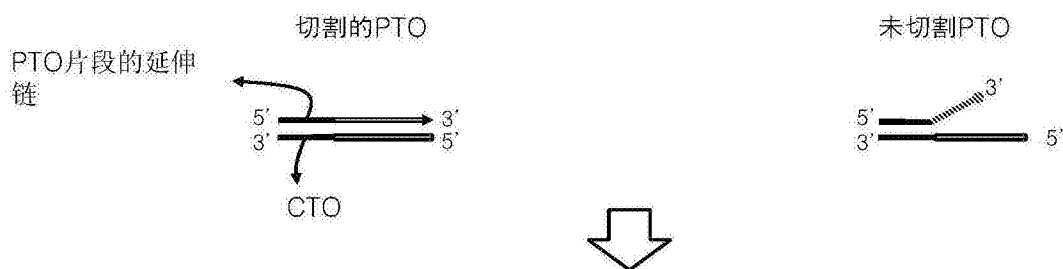
A. 杂交



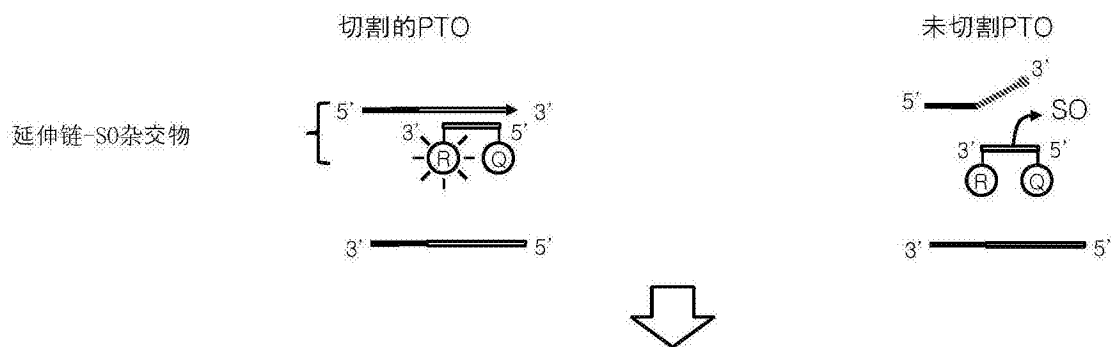
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



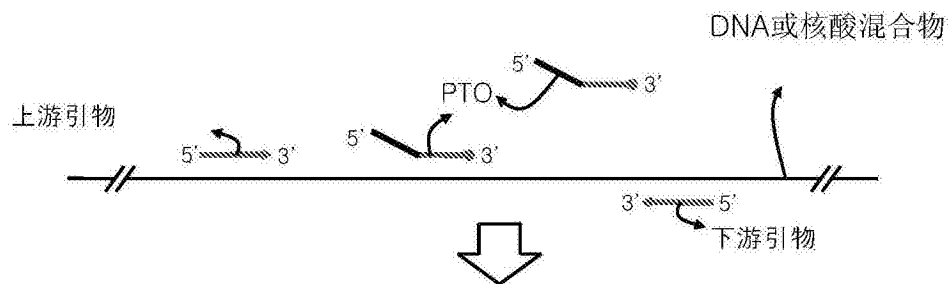
D. 延伸链和SO的杂交和检测



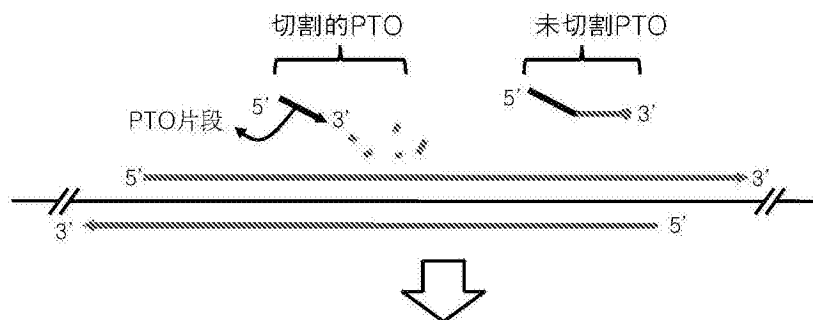
E. (选择) 解链分析

图2

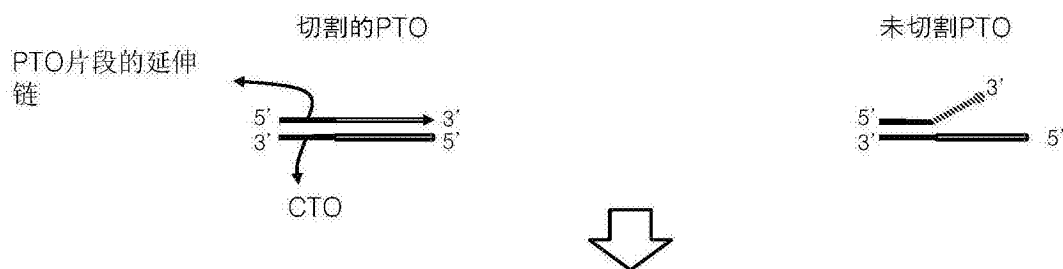
A. 杂交



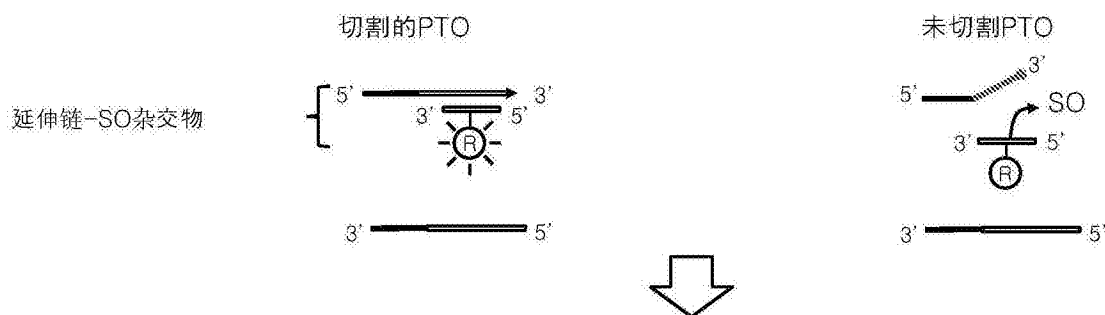
B. 引物延伸和PTO切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



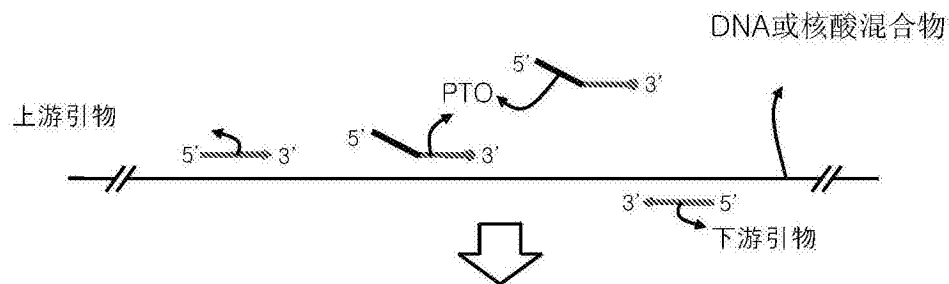
D. 延伸链和SO的杂交和检测



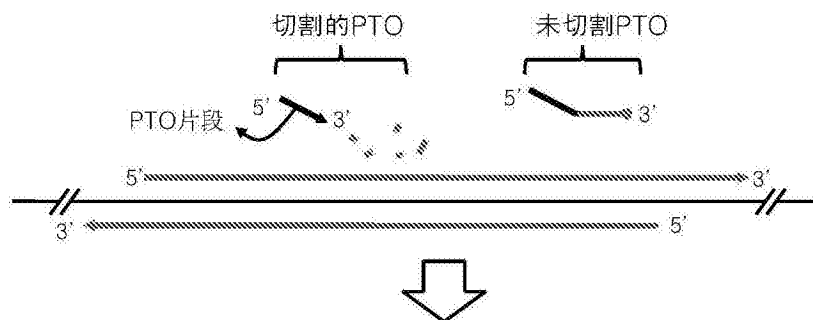
E. (选择) 解链分析

图3

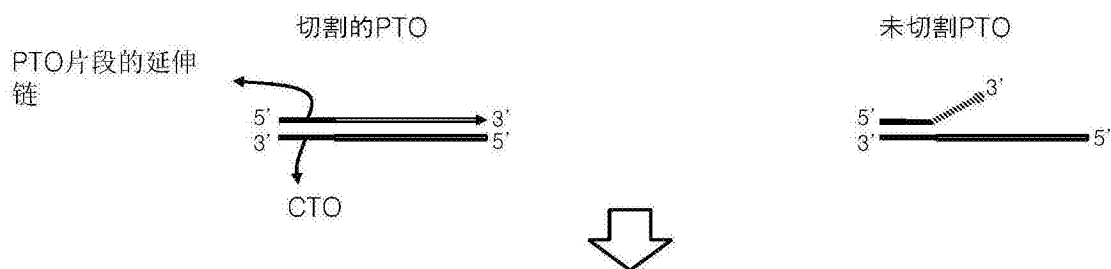
A. 杂交



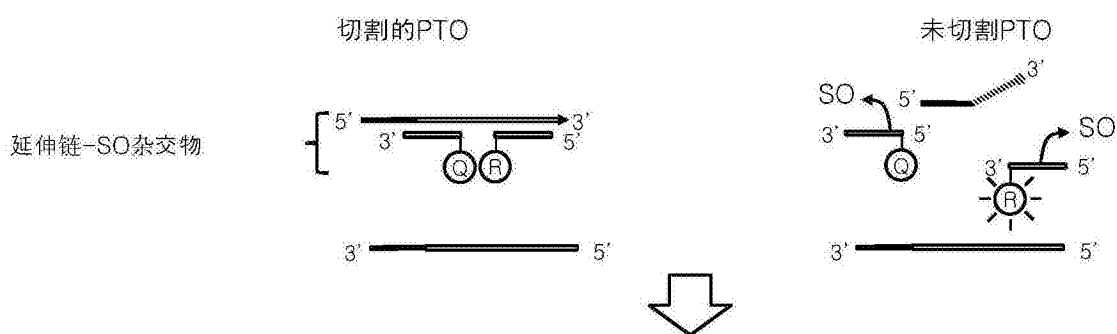
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



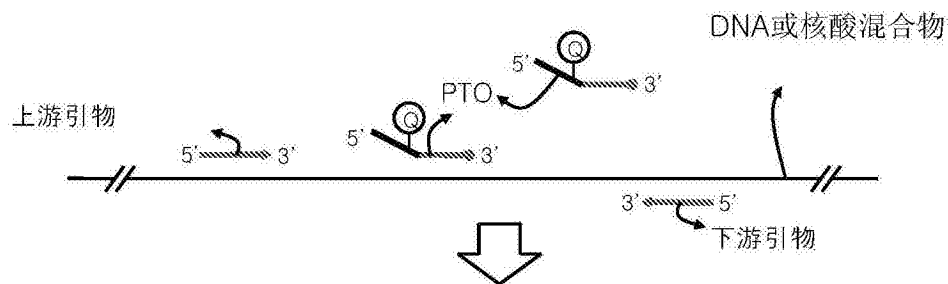
D. 延伸链和SO的杂交和检测



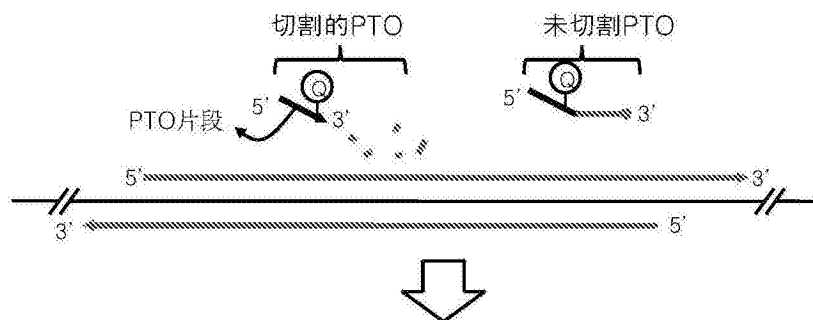
E. (选择) 解链分析

图4

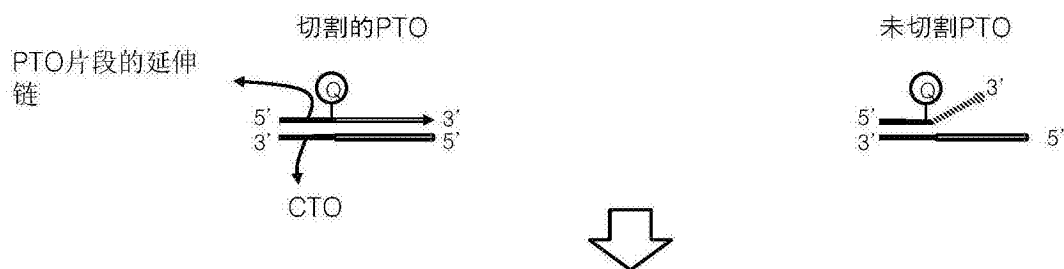
A. 杂交



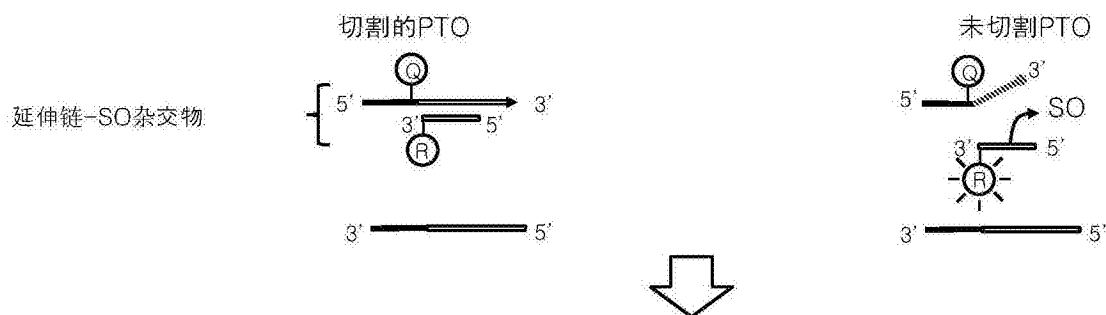
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



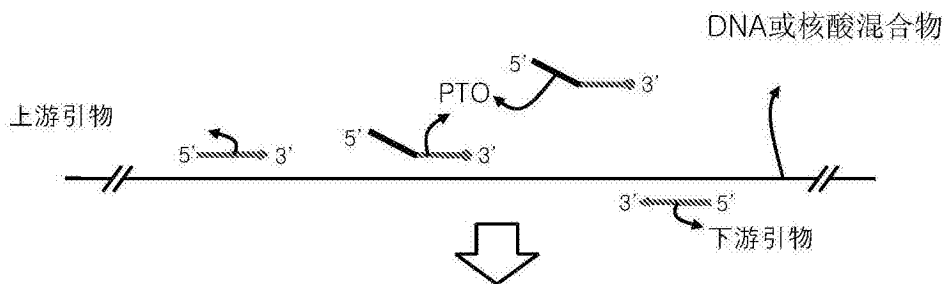
D. 延伸链和SO的杂交和检测



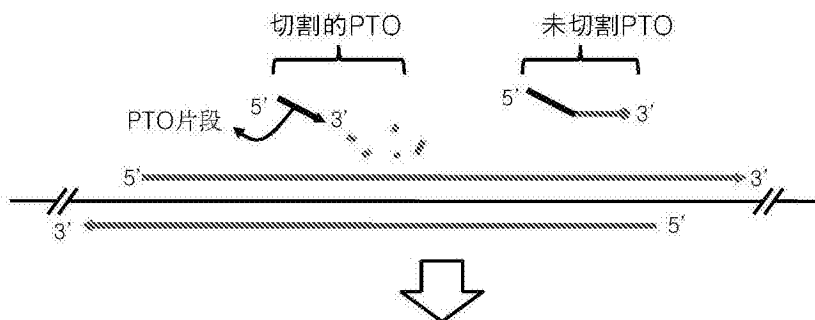
E. (选择) 解链分析

图5

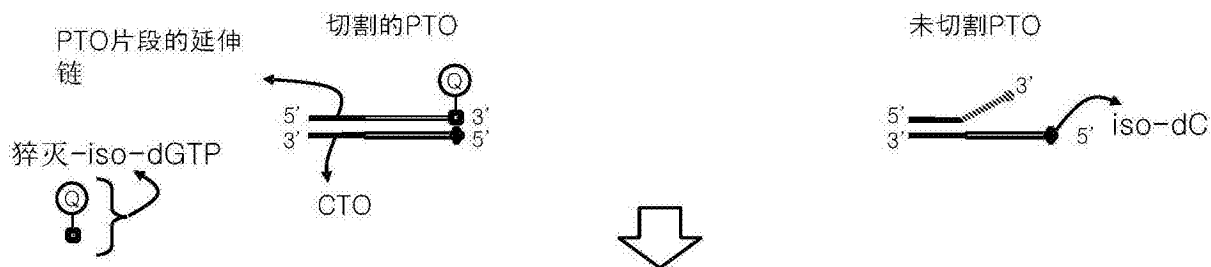
A. 杂交



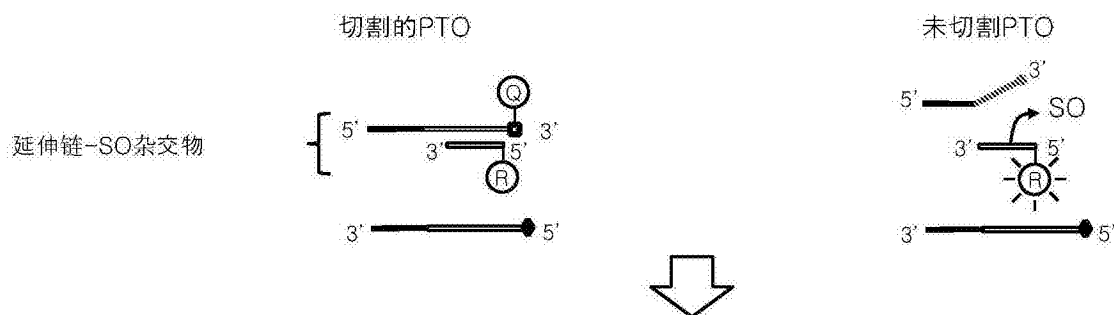
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



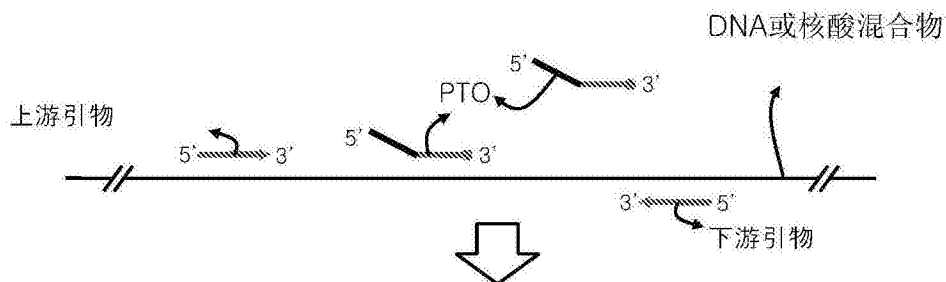
D. 延伸链和SO的杂交和检测



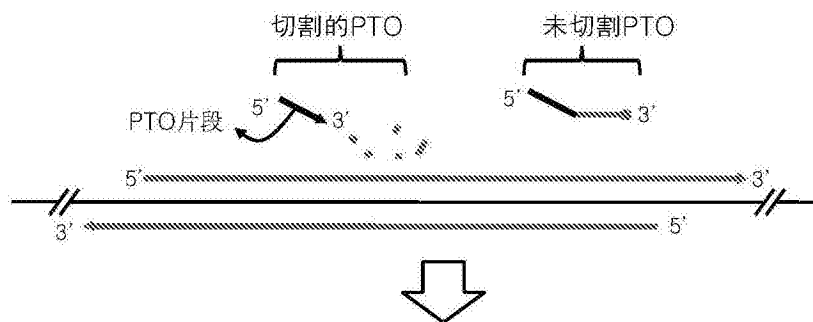
E. (选择) 解链分析

图6

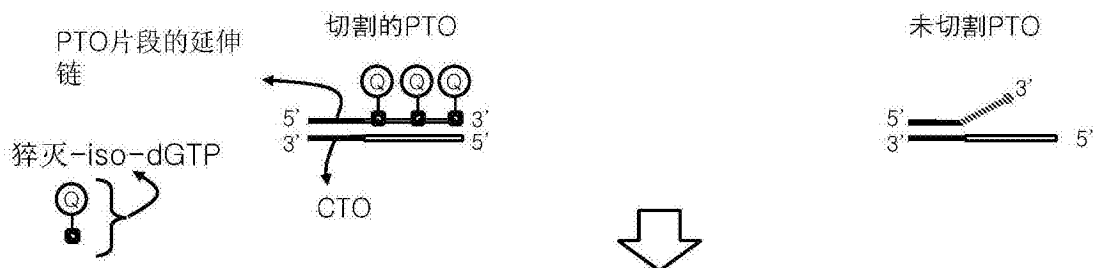
A. 杂交



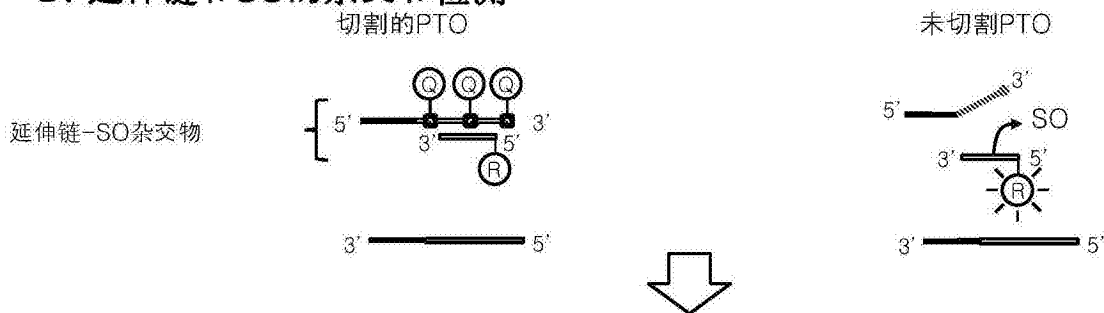
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



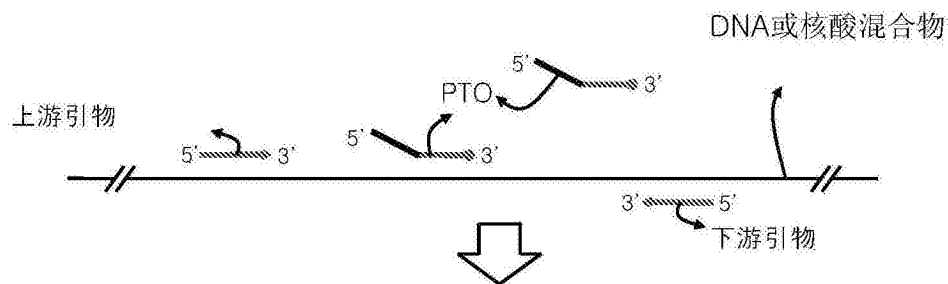
D. 延伸链和SO的杂交和检测



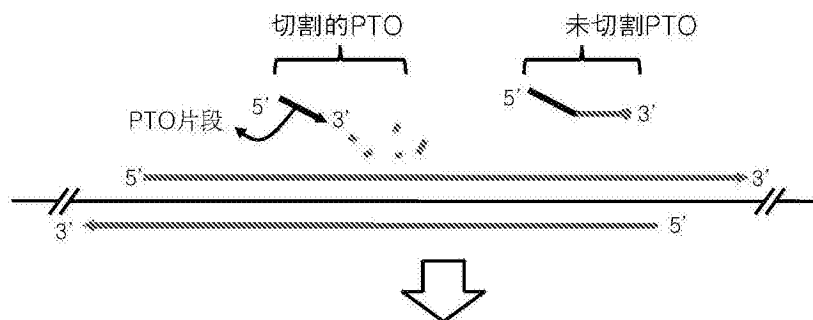
E. (选择) 解链分析

图7

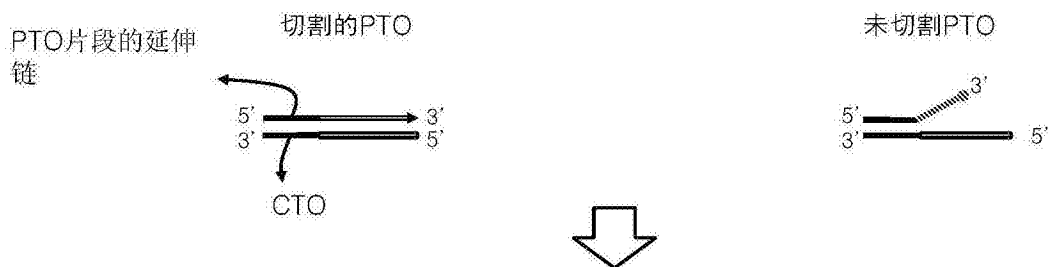
A. 杂交



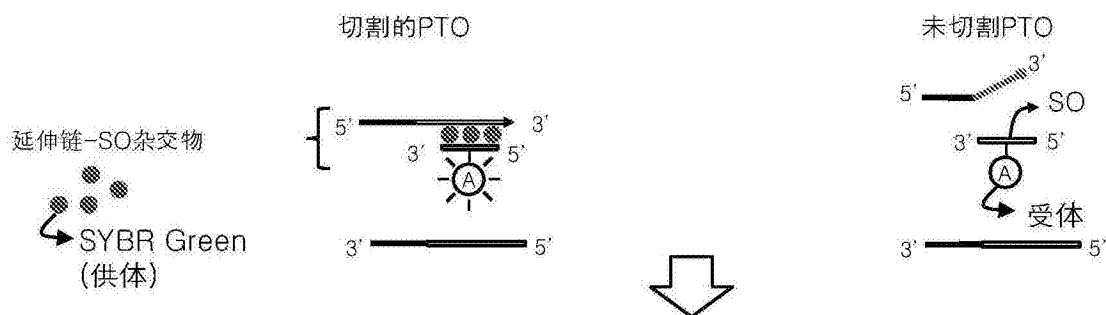
B. 引物延伸和PTO的切割



C. CTO和PTO片段的杂交及延伸



D. 延伸链和SO的杂交和检测



E. (选择) 解链分析

图8

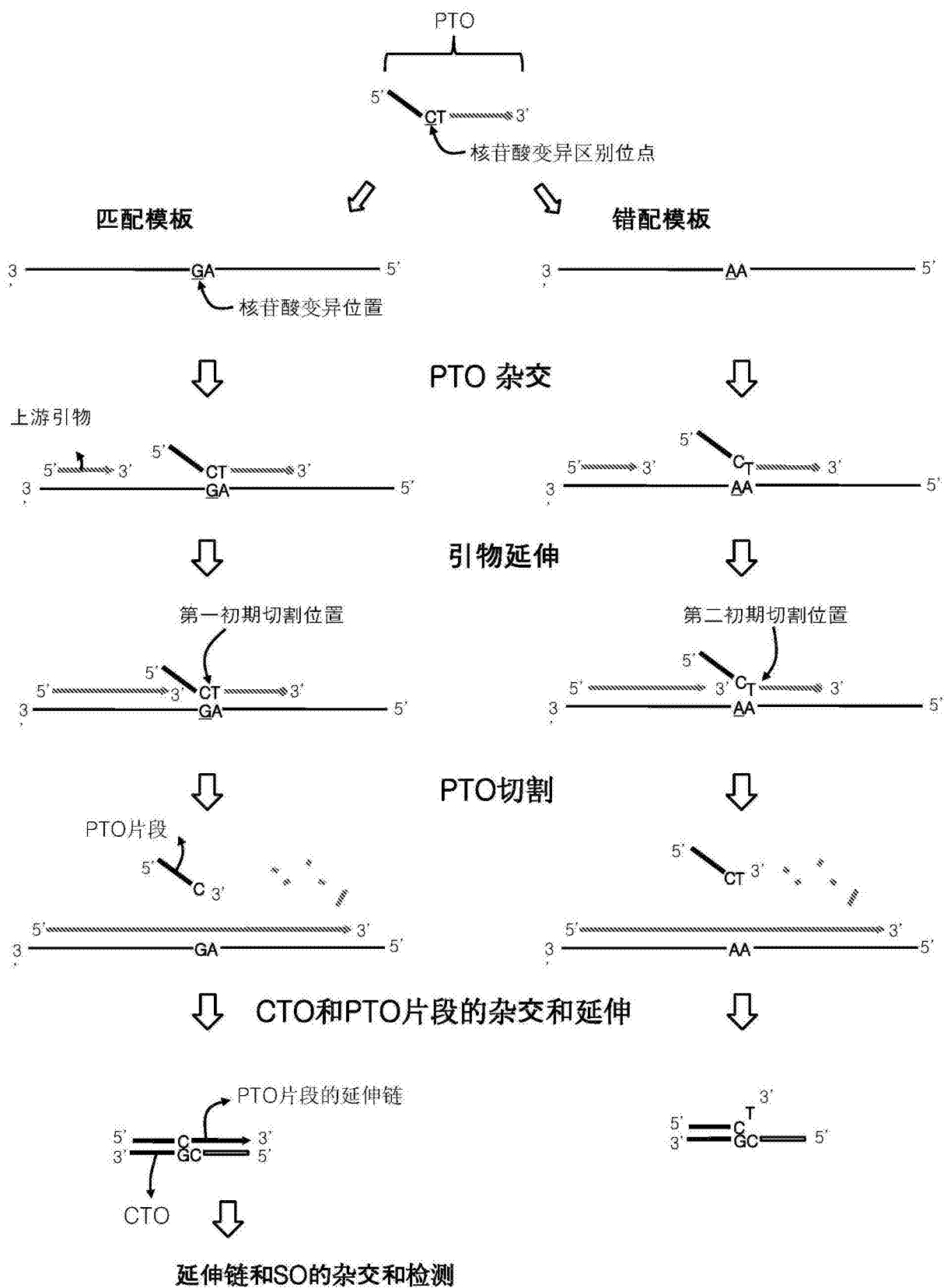
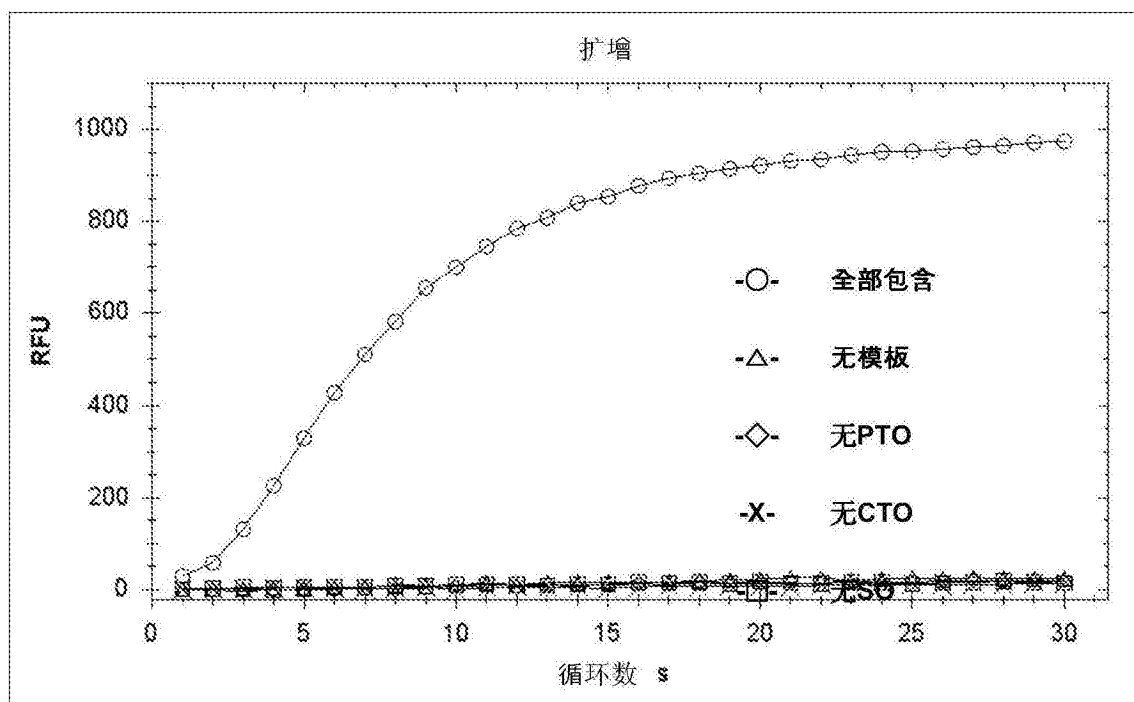


图9



模板 ¹⁾	上游引物	PTO ²⁾	CTO ³⁾	SO ⁴⁾	Ct
+	+	+	+	+	1.72
-	+	+	+	+	-
+	+	-	+	+	-
+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	-	-

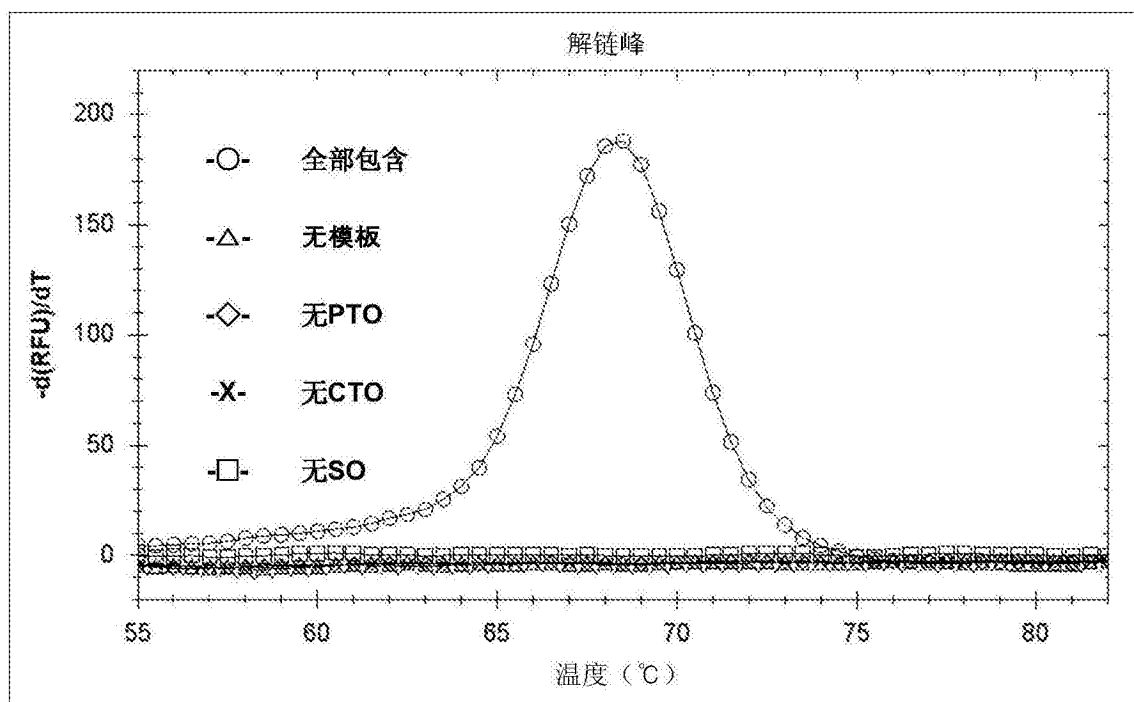
1) 模板为对于淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 基因的合成寡核苷酸。

2) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。

3) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。

4) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。

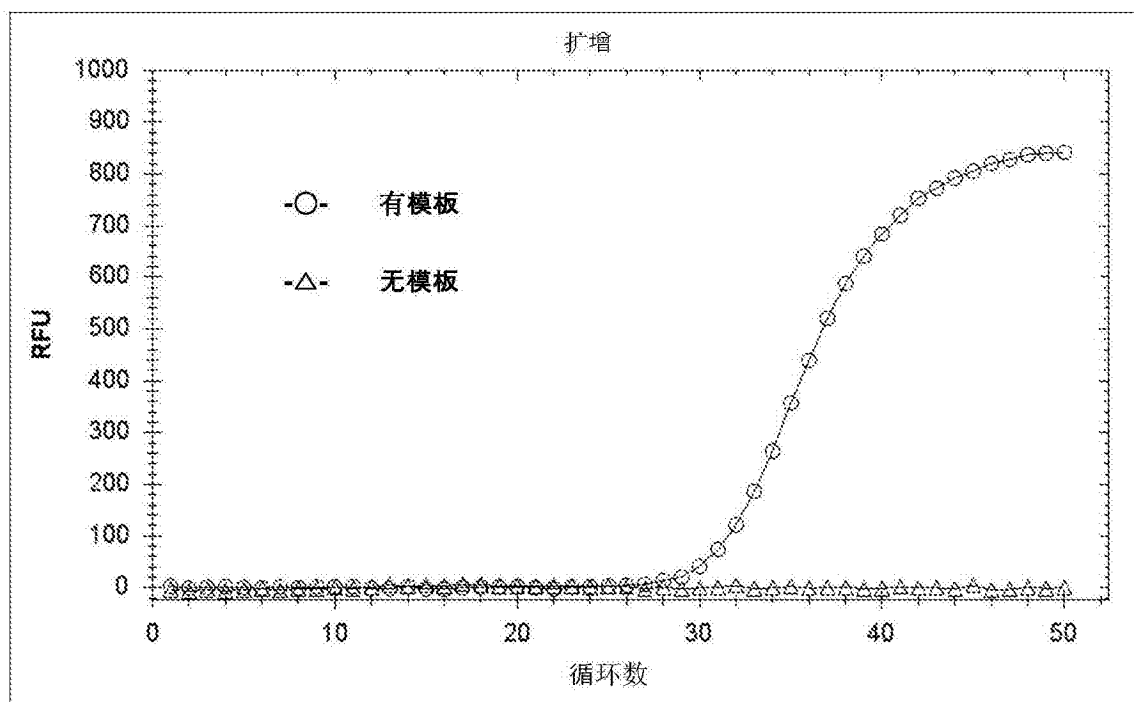
图10A



模板 ¹⁾	上游引物	PTO ²⁾	CTO ³⁾	SO ⁴⁾	Tm ⁵⁾
+	+	+	+	+	68.5
-	+	+	+	+	-
+	+	-	+	+	-
+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	-	-

- 1) 模板为对于淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 基因的合成寡核苷酸。
- 2) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 3) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。
- 5) Tm表示延伸链-SO杂交物的解链温度。

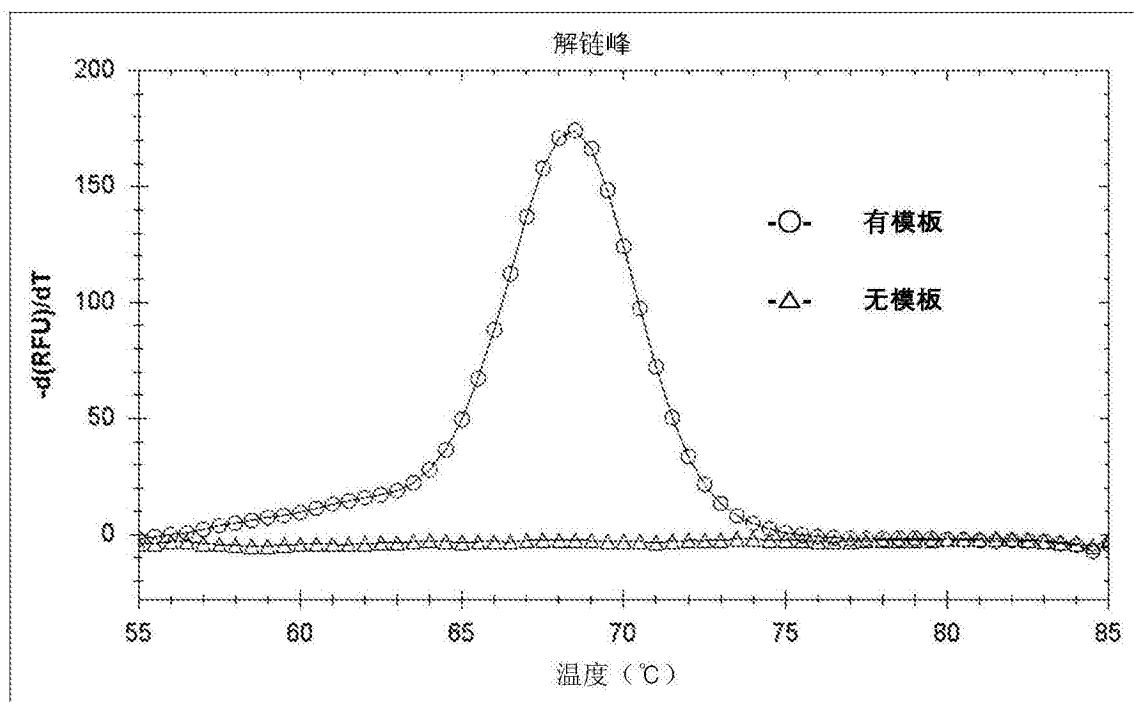
图10B



模板 ¹⁾	引物 ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	SO ⁵⁾	Ct
+	+	+	+	+	30.34
-	+	+	+	+	-

- 1) 模板为淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的基因组DNA (genomic DNA)。
- 2) 引物为用于PCR的一对引物。
- 3) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 5) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。

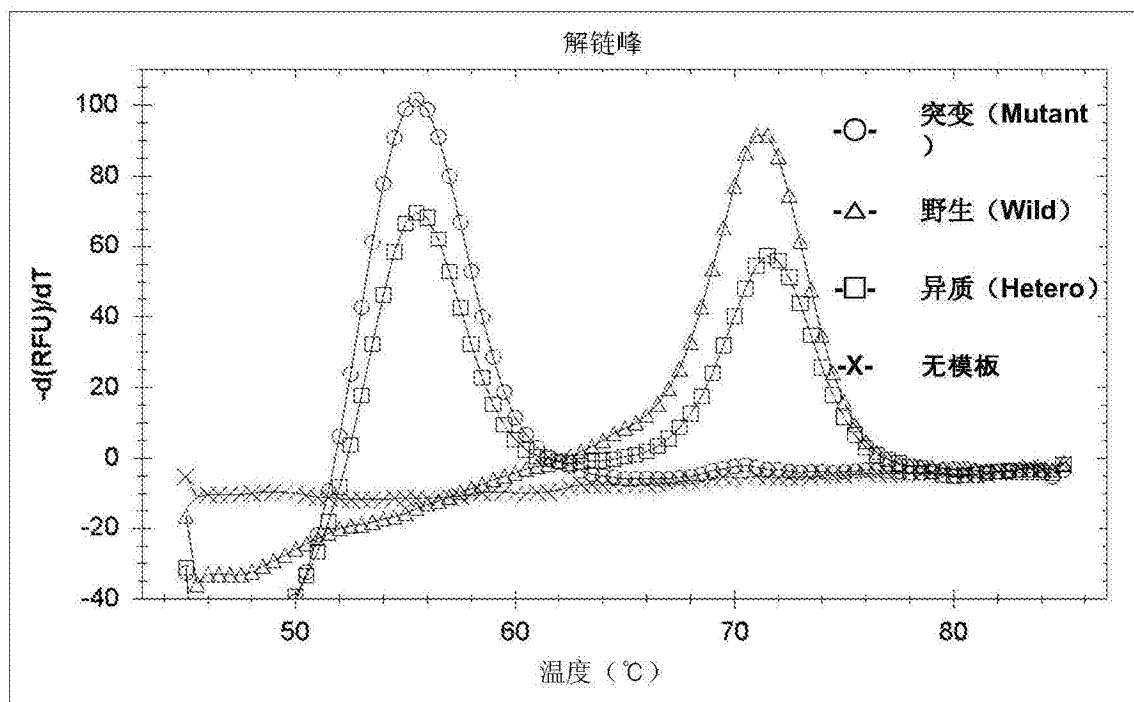
图11A



模板 ¹⁾	引物 ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	SO ⁵⁾	T _m ⁶⁾
+	+	+	+	+	68.5
-	+	+	+	+	-

- 1) 模板为淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的基因组DNA (genomic DNA)。
- 2) 引物为用于PCR的一对引物。
- 3) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 5) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。
- 6) T_m表示延伸链-SO杂交物的解链温度。

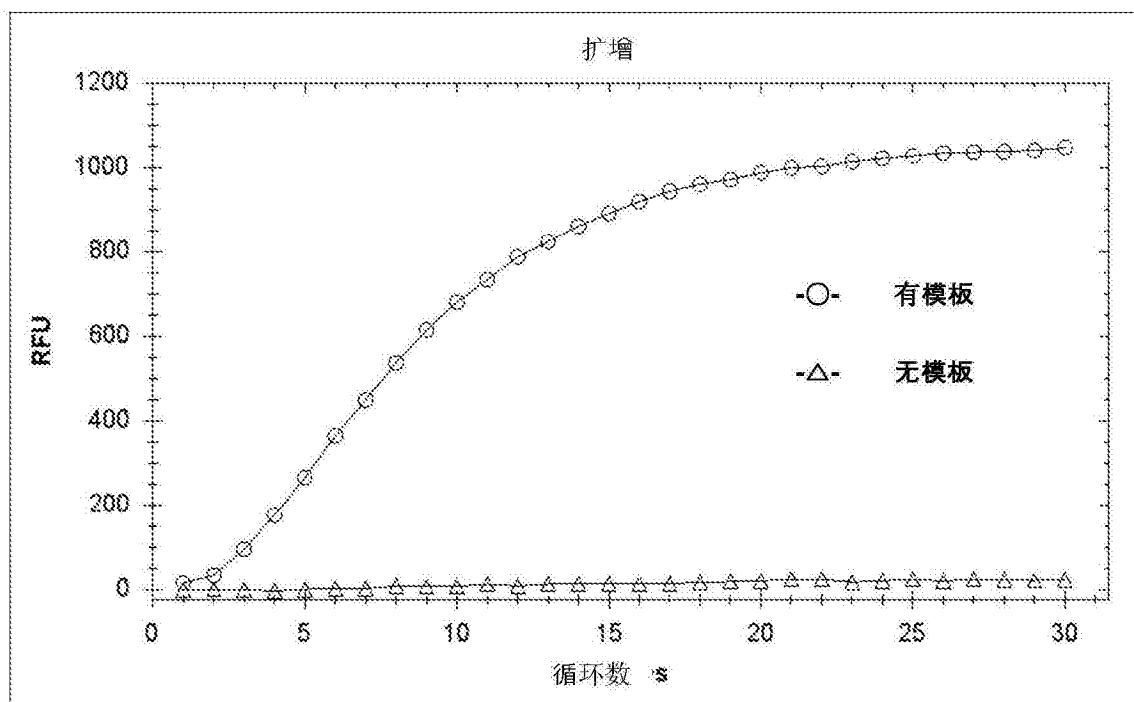
图11B



模板 ¹⁾	引物 ²⁾	PTOs ³⁾	CTOs ⁴⁾	SO ⁵⁾	T _m ⁶⁾
突变	+	+	+	+	55.5
野生	+	+	+	+	71.0
异质	+	+	+	+	55.5, 71.0
-	+	+	+	+	-

- 1) 模板为亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) (C677T) 野生型 (wild-type) (C)、突变型 (mutant-type) (T) 或异质型 (hetero-type) (C/T) 人类基因组DNA (human genomic DNA)。
- 2) 引物为用于PCR的一对引物。
- 3) PTOs (Probing and Tagging Oligonucleotide) 包含用于检测野生型模板的PTO及对于突变型的PTO, 上述PTO的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) CTOs (Capturing and Templating Oligonucleotide) 包含用于检测野生型模板的CTO及对于突变型的CTO, 上述CTO的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 5) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含猝灭分子, 且在其3'末端包含荧光分子。
- 6) T_m表示延伸链-SO杂交物的解链温度。

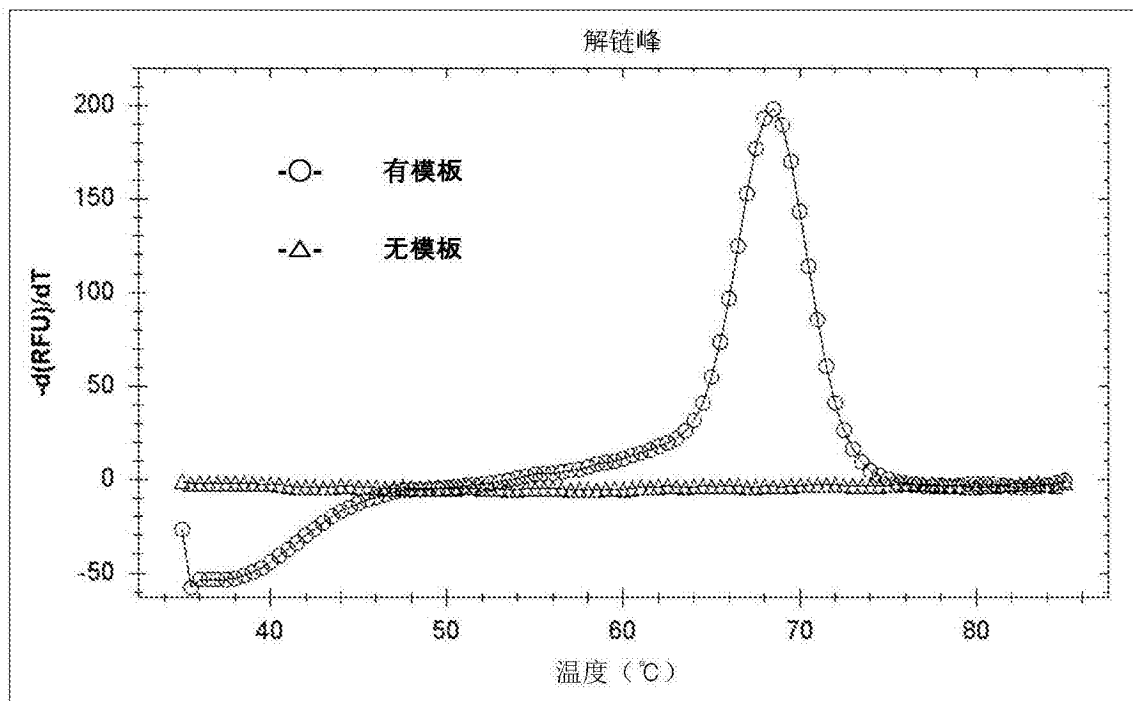
图12



模板 ¹⁾	PTO ²⁾	CTO ³⁾	SO ⁴⁾	Ct
+	+	+	+	3.10
-	+	+	+	-

- 1) 模板为对于淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 基因的合成寡核苷酸。
- 2) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 3) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。

图13A



模板 ¹⁾	PTO ²⁾	CTO ³⁾	SO ⁴⁾	T _m ⁵⁾
+	+	+	+	68.5
-	+	+	+	-

- 1) 模板为对于淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 基因的合成寡核苷酸。
- 2) PTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 3) CTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) 的3'末端用碳间隔区来阻断。
- 4) SO (Signaling Oligonucleotide) 在其5'末端包含荧光分子, 且在其3'末端包含猝灭分子。
- 5) T_m表示延伸链-SO杂交物的解链温度。

图13B