



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101649354 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 200910203986. 1

审查员 封明艳

(22) 申请日 2009. 04. 20

(30) 优先权数据

61/046720 2008. 04. 21 US

12/421188 2009. 04. 09 US

(73) 专利权人 原子能和替代能源委员会

地址 法国巴黎

专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

(72) 发明人 K · A · 鲍尔 D · H · 盖尔芬德

I · G · 古特 F · 莫杰

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 权陆军 付磊

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12M 1/38(2006. 01)

C12M 1/34(2006. 01)

权利要求书1页 说明书33页 附图8页

(54) 发明名称

核糖核苷酸标记核酸检测

(57) 摘要

本申请提供了包含 5' - 尾的多核苷酸, 所述 5' 尾具有用于靶核酸序列检测的序列段, 以及它们应用于靶核酸检测的方法。所述的多核苷酸用于在一个或多个核糖核苷酸存在下扩增靶核酸的子序列。所述的核糖核苷酸以互补于 5' - 尾序列段的规则的间隔整合入扩增产物。扩增产物紧在整合的核糖核苷酸 3' 的键的切割, 产生了指示靶核酸存在或不存在的可检测地不同的片段。

1. 多核苷酸、核苷酸集以及核苷酸整合生物催化组分在制备用于检测靶核酸的方法中的试剂盒中的用途,其中

(i) 多核苷酸包含 5' 部分和 3' 部分,所述 5' 部分包含一个或多个邻接序列段,其中每个序列段包含至少 3 个核苷酸碱基,并且每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段内是独特的并在每个序列段内是相同的;并且 3' 部分包含足以与靶核酸杂交并在扩增条件下延伸的互补的序列段;

(ii) 所述核苷酸集包含至少两种脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 形式的核苷酸碱基,并且至少一种核苷酸碱基的大多数是核糖核苷酸 (rNTP) 形式,其中所述的核糖核苷酸碱基与所述多核苷酸每个序列段的独特 5' 核苷酸碱基互补;并且

(iii) 所述核苷酸整合生物催化组分包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性;

所述的方法包括:

(a) 将靶核酸与所述多核苷酸、所述核苷酸集以及所述核苷酸整合生物催化组分接触;

(b) 在一个或多个引物对的存在下在扩增条件下扩增靶核酸以产生包含与所述多核苷酸 5' - 部分互补的 3' 序列段的扩增子,其中所述 3' 序列段包含一个或多个邻接序列段,其中每个序列段的 3' - 末端核苷酸碱基是具有与核苷酸集中 NTP 相同的碱基的核苷一磷酸 (NMP);

(c) 将每个 NMP3' 的扩增子切割为片段,其中所述切割释放作为个别片段的序列段;以及

(d) 检测扩增子片段,其中检测的序列段片段指示靶核酸序列的扩增,从而检测靶核酸序列。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述方法包括使靶核酸序列与多核苷酸对相接触,其中多核苷酸对中的每个多核苷酸包含等质量的 5' 部分序列段。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述方法包括使靶核酸与至少一个多核苷酸相接触,其中来自多核苷酸互补体的序列段片段的检测指示靶核酸序列中多态性核苷酸的等位基因的存在。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述方法包括使靶核酸与至少两个不同的多核苷酸相接触,其中多核苷酸的 3' - 部分仅在 3' - 末端核苷酸碱基上不同,其中每个多核苷酸的 3' - 末端核苷酸碱基对应于具有独特质量的序列段,并且来自至少一个多核苷酸互补体的序列段片段的检测指示靶核酸序列中多态性核苷酸的等位基因的存在。

5. 权利要求 1 的用途,其中使许多不同靶核酸序列与许多不同多核苷酸相接触,每个不同的多核苷酸包含独特质量的序列段,其中多核苷酸的序列段是所述许多不同靶核酸序列之一的鉴定剂,由此,从至少一个多核苷酸的互补体中检测到序列段片段指示所述许多不同靶核酸序列的至少一个的存在。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述多核苷酸包含阻止多核苷酸延伸的封闭部分,并且所述的方法进一步包括在扩增前从所述多核苷酸去除封闭部分的步骤。

核糖核苷酸标记核酸检测

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸检测领域。具体而言,本发明提供了具有多个邻接序列段的多核苷酸,其中每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基是该序列段中独特的并在每个序列段中是相同的,且提供了所述多核苷酸用于检测靶核酸的方法。

背景技术

[0002] 已知有很多检测靶核酸的方法(如 SNP 基因型分型)。目前可用于 SNP 基因型分型的均相测定包括 TAQMAN^(R)、AMPLIFLUOR^(R)、染料结合、等位基因选择动态 PCR(allele-selective kinetic PCR) 以及 SCORPION^(R) 引物测定。这些测定在每个反应孔中提供一个或至多两个(如果应用四种不同的荧光染料)SNPs(如染料结合动态 PCR 对于一个 SNP 需要两个孔)。SNP 基因型分型的可用方法在从那些在反应孔中允许单个 SNP 基因型分型的方法,到那些允许单个孔中数千个 SNPs 基因型分型的方法(如 GOLDEN GATE^(R) 测定,Illumina) 的范围内。目前的基因型分型测定程序不易多重化,这归因于每种类型的等位基因需要不同的染料,并因而限制了其改善的可能。GOLDEN GATE^(R) 测定需要复杂的分析设备,诸如纤维光学阵列读数器。SNP 基因型分型的读取分析仪在从板读数器(任选地,带有包含的 PCR 机器)至测序仪(如毛细管测序仪)、阵列读数器以及质谱仪的范围内。此外,在质谱仪已用于基因型分型的程度上,目前可用的程序不允许真实的多重化。

发明内容

[0003] 本发明提供了用于一个或多个靶核酸的有效且高灵敏度的并行检测的多核苷酸。所述的多核苷酸设计为具有包含一个、两个或更多个邻接序列段的 5' 部分,从而序列段或其互补体的质量,鉴别靶核酸或靶核酸内的靶核苷酸。在一些实施方案中,所述的序列段是等质量的。等质量的序列段可以但不需要具有相同的序列。序列段切割自多核苷酸的互补体,并且其质量被测量或检测以鉴别靶核酸的存在、不存在或存在的水平。

[0004] 因此,在第一个方面,本发明提供了包含一个、两个或更多个序列段的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含 5' 部分和 3' 部分,其中:

[0005] a) 5' 部分包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段包含至少三个核苷酸碱基,具有相等质量,并且每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段中是独特的并在每个序列段中是相同的;并且

[0006] b) 3' 部分包含至少 5 个核苷酸,其中所述的多核苷酸的长度少于约 100 个核苷酸碱基。在一些实施方案中,所述的多核苷酸的长度少于约 75、50 或 25 个核苷酸。

[0007] 在优选的实施方案中,每个序列段具有相同的核苷酸序列。

[0008] 在其它优选的实施方案中,5' 部分包含至少 3、4、5、6、7 或 8 个邻接序列段。在一些优选实施方案中,每个序列段包含至少 3、4、5、6、7 或 8 个核苷酸。

[0009] 在同样优选的实施方案中,3' - 末端包含可去除的封闭部分,其基本上阻止多核苷酸的延伸。在特别优选的实施方案中,3' - 末端包含 2' 终止子部分。

[0010] 在另一方面,本发明提供了检测靶核酸的方法。在一些实施方案中,所述的方法包括:

[0011] a) 将靶核酸与多核苷酸、核苷酸集以及核苷酸整合生物催化组分接触,其中:

[0012] (i) 所述的多核苷酸包含 5' 部分和 3' 部分,所述的 5' 部分包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段包含至少三个核苷酸碱基,并且每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段中是独特的并在每个序列段中是相同的;并且 3' 部分包含足以与靶核酸杂交并在扩增条件下延伸的基本上互补的序列段;

[0013] (ii) 所述的核苷酸集包含至少两种脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 形式的核苷酸碱基,并且至少一种核苷酸碱基的大多数是核糖核苷酸 (rNTP) 形式,其中所述的核糖核苷酸碱基与所述多核苷酸每个序列段的独特 5' 核苷酸碱基互补;以及

[0014] (iii) 所述核苷酸整合生物催化组分包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性;

[0015] b) 在扩增条件下扩增靶核酸以产生包含与该多核苷酸 5' - 部分互补的 3' 序列段 (即 3' - 部分) 的扩增子,其中所述 3' 序列段包含至少一个或至少两个序列段,其中每个序列段的 3' 末端核苷酸碱基是具有和核苷酸集中 NTP 相同碱基的核苷一磷酸 (NMP);

[0016] c) 将每个 NMP 3' 的扩增子切割为片段,其中所述切割释放作为个别片段的序列段;以及

[0017] d) 检测扩增子片段,其中检测的序列段的片段指示靶核酸序列的扩增,从而检测靶核酸序列。

[0018] 在优选的实施方案中,5' 部分序列段是等质量的。

[0019] 在其它优选的实施方案中,至少一种核苷酸碱基的至少 80% 是核糖核苷酸 (rNTP) 的形式。

[0020] 在其它优选的实施方案中,通过使扩增子经受碱性溶液进行所述切割。

[0021] 在优选的实施方案中,碱性溶液包含下面的至少一种:NaOH、KOH、RbOH、Mg(OH)₂、Ca(OH)₂ 或 NH₄OH。在更优选的实施方案中,碱性溶液包含下面的至少一种:NaOH、KOH 或 NH₄OH。

[0022] 在同样优选的实施方案中,所述的方法进一步包括将靶核酸序列与多核苷酸对相接触的步骤,其中所述多核苷酸对中的每个多核苷酸包含等质量的 5' 部分序列段。

[0023] 在其它优选的实施方案中,所述的方法进一步包括将靶核酸与至少一个多核苷酸相接触的步骤,其中从多核苷酸或其互补体检测到序列段片段指示靶核酸序列中存在多态性核苷酸等位基因。

[0024] 在其它优选的实施方案中,所述的方法进一步包括将靶核酸与至少两个不同多核苷酸相接触的步骤,其中所述多核苷酸仅在 3' - 末端核苷酸碱基上不相同,其中每个多核苷酸的 3' - 末端核苷酸碱基对应于独特质量的序列段,并且,其中从至少一个多核苷酸或其互补体检测到序列段片段指示靶核酸序列中多态性核苷酸的等位基因的存在。

[0025] 在其它优选的实施方案中,许多不同靶核酸序列与许多不同多核苷酸相接触,每种不同的多核苷酸包含独特质量的序列段,其中多核苷酸的序列段是许多不同靶核酸序列之一的鉴定剂 (identifier),由此,从至少一个多核苷酸或其互补体中检测到序列段片段指示许多不同靶核酸序列中至少一个的存在。

[0026] 在其它优选的实施方案中,所述核苷酸整合生物催化组分包含单个催化结构域,所述的催化结构域包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性。根据本发明进一步优选的是,核苷酸整合生物催化组分包含第一和第二催化结构域,其中第一催化结构域包含脱氧核糖核苷酸整合活性,且第二催化结构域包含核糖核苷酸整合活性。

[0027] 在优选的实施方案中,通过质谱分析法进行所述检测。在一些优选的实施方案中,通过气相离子质谱分析法进行检测或备选地,通过激光解吸电离质谱分析法进行检测。

[0028] 在其它优选的实施方案中,多核苷酸包含基本上阻止多核苷酸延伸的封闭部分,并且其中所述的方法进一步包括在扩增前从多核苷酸中去除封闭部分的步骤。

[0029] 在另一方面,本发明提供了反应混合物,如用于进行上文所述检测的创造性方法的反应混合物。在优选的实施方案中,反应混合物包含:

[0030] a) 包含 5' 部分和 3' 部分的第一多核苷酸,其中所述的 5' 部分包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段包含至少三个核苷酸碱基,其中每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段中是独特的并在每个序列段中是相同的;并且 3' 部分包含足以与靶核酸杂交并在扩增条件下延伸的基本上互补的序列段;

[0031] b) 核苷酸集,其包含至少两种脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 形式的核苷酸碱基,且至少一种核苷酸碱基的大多数是核糖核苷酸 (rNTP) 的形式,其中所述的作为核糖核苷酸提供的核苷酸碱基互补于每个序列段的独特 5' 核苷酸碱基;以及

[0032] c) 核苷酸整合生物催化组分,其包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性。

[0033] 在优选的实施方案中,反应混合物包含至少一个靶核酸序列。

[0034] 在相关的方面,本发明提供了试剂盒。在优选的实施方案中,试剂盒包含:

[0035] a) 包含 5' 部分和 3' 部分的第一多核苷酸,其中所述的 5' 部分包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段包含至少三个核苷酸碱基,且每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段中是独特的并在每个序列段中是相同的;并且 3' 部分包含足以与靶核酸杂交并在扩增条件下延伸的基本上互补的序列段;

[0036] b) 核苷酸集,其包含至少两种脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 形式的核苷酸碱基,且至少一种核苷酸碱基的相当大多数是核糖核苷酸 (rNTP) 的形式,其中所述的作为核糖核苷酸提供的核苷酸碱基互补于每个序列段的独特 5' 核苷酸碱基;以及

[0037] c) 核苷酸整合生物催化组分,其包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性。

[0038] 反应混合物和试剂盒的实施方案如上文对于多核苷酸和方法的描述以及如此处所描述。根据本发明的优选试剂盒例如是这样的试剂盒:其中每个 5' 部分序列段是等质量的,并且所述多核苷酸的 5' 部分序列段包含至少三个序列段,更优选的至少四个核苷酸碱基,以及最优选的至少七个核苷酸碱基。在试剂盒的其它优选实施方案中,所述的 3' - 末端包含可去除的封闭部分,其基本上阻止多核苷酸的延伸,更优选地多核苷酸的 3' - 末端包含 2' 终止子部分。

[0039] 在其它方面,本发明提供了扩增子。在一些实施方案中,扩增子包含双链多核苷酸,所述双链多核苷酸包含:

[0040] a) 包含 5' 部分和 3' 部分的第一链,其中 5' 部分包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段包含至少三个核苷酸碱基,具有相等质量,并且每个序列段的 5' - 末端核苷酸碱基在一个序列段中是独特的并在每个序列段中是相同的;并且 3' 部分包含至

少五个核苷酸,以及

[0041] b) 与第一链互补并且包含 3' 部分的第二链,所述 3' 部分包含这样的序列段,所述序列段包含至少一个或至少两个邻接序列段,其中每个序列段的 3' - 末端核苷酸碱基是 NMP。

[0042] 在另一方面,本发明提供了系统。在一些实施方案中,所述的系统包含至少一个容器或支持物,其包含:

[0043] a) 包含本发明扩增子的组合物;

[0044] b) 至少一个配置来与所述容器或支持物热交流以调节容器内或支持物上温度的热调节器;

[0045] c) 至少一个转移试剂至容器或支持物和 / 或从容器或支持物转移试剂的试剂转移部件;以及

[0046] d) 至少一个配置来检测容器中或支持物上产生的一个或多个序列段质量的检测器。

[0047] 在优选的实施方案中,所述的检测器包含气相离子光谱测定仪。

[0048] 在优选的实施方案中,所述系统包含至少一个控制器,所述控制器可操作地连接于:

[0049] - 实现调节容器中或支持物上温度的热调节器,

[0050] - 实现转移试剂至容器或支持物和 / 或从容器或支持物转移试剂的试剂转移部件,和 / 或,

[0051] - 实现检测容器中或支持物上产生的序列段质量的检测器。

[0052] 定义

[0053] 术语“核酸”或“多核苷酸”可互换地应用于对应于核糖核酸 (RNA) 或脱氧核糖核酸 (DNA) 聚合物或其类似物的聚合物。这包括核苷酸聚合物诸如 RNA 和 DNA 及其修饰形式、肽核酸 (PNAs)、锁定核酸 (LNA™) 等等。在某些实施方案中,核酸可以是包括多个单体类型,例如包括 RNA 亚单位和 DNA 亚单位两者的聚合物。核酸可以是或可包括如染色体或染色体区段、载体 (如表达载体)、表达盒、裸 DNA 或 RNA 聚合物、聚合酶链反应 (PCR) 的产物、寡核苷酸、探针、引物等等。核酸可以是如单链、双链、三链等等并且其不限于任何特定长度。除非另有指定,除明确指明的任意序列之外,特定核酸序列还任选地包含或编码互补序列。

[0054] 核酸不限于具有天然存在的多核苷酸序列或结构、天然存在的主链、和 / 或天然存在的核苷酸间键的分子。例如,含有一个或多个碳环糖的核酸也包括这一定义之内 (Jenkins 等 (1995) Chem. Soc. Rev. 169-176 页)。为进一步说明,尽管核酸将通常包含磷酸二酯键,但在一些情况下,包括那些具有额外的主链的核酸类似物。这些包括但不限于:磷酸酰胺 (Beaucage 等 (1993) Tetrahedron 49(10):1925 及其中的参考文献; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzl 等 (1977) Eur. J. Biochem. 81:579; Letsinger 等 (1986) Nucl. Acids Res. 14:3487; Sawai 等 (1984) Chem. Lett. 805; Letsinger 等 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; 以及 Pauwels 等 (1986) Chemica Scripta 26:1419)、硫代磷酸酯 (Mag 等 (1991) Nucleic Acid Res. 19:1437 以及美国专利 No. 5,644,048)、二硫代磷酸酯 (Briu 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321)、O- 甲基亚磷酸酰胺键 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University

Press(1992))、以及肽核酸主链和键 (Egholm(1992) J. Am. Chem. Soc. 114 :1895 ;Meier 等 (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31 :1008 ;Nielsen(1993) Nature 365 :566 ; 以 及 Carlson 等 (1996) Nature 380 :207)。

[0055] 另外的类似物核酸包括具有正电荷主链 (Denpcy 等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :6097) ; 非离子主链 (美国专利 Nos. 5, 386, 023、5, 637, 684、5, 602, 240、5, 216, 141 以 及 4, 469, 863 ;Angew(1991) Chem. Intl. Ed. English 30 :423 ;Letsinger 等 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110 :4470 ;Letsinger 等 (1994) Nucleoside & Nucleotide 13 :1597 ;第二章和第三章, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook ;Mesmaeker 等 (1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4 :395 ;Jeffs 等 (1994) J. Biomolecular NMR 34 :17 ;Tetrahedron Lett. 37 :743 (1996)) 以及非核糖主链的那些, 包括那些描述于美国专利 Nos. 5, 235, 033 和 5, 034, 506, 以及第 6 和第 7 章, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook 中的。几种核酸类似物还描述于, 如 Rawls, C & E News 1997 年 6 月 2 日, 第 35 页。可进行核糖磷酸主链的修饰以促进附加部分 (诸如标记部分) 的添加, 或改变该分子在生理环境下的稳定性和半衰期。

[0056] 除了天然存在的通常发现于核酸的杂环碱基 (如腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶) 之外, 核酸类似物还包括那些非天然存在的杂环或其它修饰的碱基。为了说明, 任选地包括用于核苷酸中作为解链温度 (T_m) 调节物的某些碱基。例如, 这些碱基中的一些包括 7-脱氮嘌呤 (如 7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑 [3,4-d] 嘧啶、丙炔基 -dN (如丙炔基 -dU、丙炔基 -dC 等) 等等。参见例如美国专利 No. 5, 990, 303。其它代表性杂环碱基包括如 :次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤 ;2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的 8-氮杂衍生物 ;腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的 7-脱氮-8-氮杂衍生物 ;6-氮杂胞嘧啶 ;5-氟胞嘧啶 ;5-氯胞嘧啶 ;5-碘胞嘧啶 ;5-溴胞嘧啶 ;5-甲基胞嘧啶 ;5-丙炔基胞嘧啶 ;5-溴乙烯基尿嘧啶 (5-bromovinyluracil) ;5-氟尿嘧啶 ;5-氯尿嘧啶 ;5-碘尿嘧啶 ;5-溴尿嘧啶 ;5-三氟甲基尿嘧啶 ;5-甲氧基甲基尿嘧啶 ;5-乙炔基尿嘧啶 ;5-丙炔基尿嘧啶等等。许多非天然存在的碱基也描述于例如 :Seela 等 (1991) Helv. Chim. Acta 74 :1790, Grein 等 (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4 :971-976, 以 及 Seela 等 (1999) Helv. Chim. Acta 82 :1640。修饰的碱基和核苷酸的其它实例也描述于例如美国专利 Nos. 5, 484, 908、5, 645, 985、5, 830, 653、6, 639, 059、6, 303, 315 以及美国专利申请公开 No. 2003/0092905。

[0057] “核苷酸”指的是核苷的酯, 如核苷的磷酸酯。为了说明, 核苷酸可包括 1、2、3 个或更多共价连接至所述核苷的糖部分 (如 5' 位、3' 位、2' 位等等) 的磷酸基团。

[0058] “核苷酸整合生物催化剂”指的是催化核苷酸整合入核酸的催化剂。核苷酸整合生物催化剂通常是酶。“酶”是基于蛋白质的催化剂, 其发挥作用以减少涉及其它化合物或“底物”的化学反应的活化能。“核苷酸整合酶”指的是催化核苷酸整合入核酸的酶。实例性核苷酸整合酶包括, 如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、终端转移酶、逆转录酶、端粒酶、多核苷酸磷酸化酶等等。其它的生物催化剂可以是基于 DNA 的 (“DNA 核酶”) 或基于 RNA 的 (“核酶”)。“耐热酶”指的是对热稳定的酶, 当经受选择的时间段的升高的温度时是热抗性的, 并保留足够的催化活性。例如, 当经受实现双链核酸变性所需时间的升高温度时, 耐热聚合酶保持

足够的实现随后的引物延伸反应的活性。核酸变性必需的加热条件是本领域所熟知的,并且例示于题为“PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES”、1987年7月28日授权给 Mullis 的美国专利 No. 4, 683, 202, 以及题为“PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR-CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES”、1987年7月28日授权给 Mullis 等的美国专利 No. 4, 683, 195 中。本发明所使用的耐热聚合酶通常适合在温度循环反应诸如 PCR 或 5'-核酸酶反应中应用。对于耐热聚合酶,酶活性指的是以正确的方式催化核苷酸聚合以形成互补于模板核酸的引物延伸产物。

[0059] 示例性的核苷酸整合生物催化剂包括,如 G46E E678G CS5 DNA 聚合酶、G46E L329A E678G CS5 DNA 聚合酶、G46E L329A D640G S671F CS5 DNA 聚合酶、G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNA 聚合酶、G46E E678G CS6DNA 聚合酶、 Δ Z05R 聚合酶、E615G Taq DNA 聚合酶、黄栖热菌 (*Thermus flavus*) 聚合酶、TMA-25 聚合酶、E678G TMA-25 聚合酶、TMA-30 聚合酶、E678GTMA-30 聚合酶、Tth DNA 聚合酶、栖热菌属 (*Thermus*) 物种 SPS-17 聚合酶、E615G Taq 聚合酶、栖热菌属 Z05R 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、科恩伯格 (Kornberg) DNA 聚合酶、克列诺 (Klenow) DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、微球菌 DNA 聚合酶、 α DNA 聚合酶、逆转录酶、AMV 逆转录酶、M-MuLV 逆转录酶、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、大肠杆菌 (*E. coli*) RNA 聚合酶、SP6RNA 聚合酶、T3 RNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶、T7 RNA 聚合酶、RNA 聚合酶 II、末端转移酶、多核苷酸磷酸化酶、核糖核苷酸整合 DNA 聚合酶,等等。

[0060] 术语“序列段”指的是本发明多核苷酸的 5'-部分的多核苷酸子序列(即 5'尾)。5'-部分包含一个、两个或更多个序列段,每个序列段具有位于 5'-末端的独特碱基,它们在一种多核苷酸 5'-尾上对于所有序列段是相同的。序列段可具有约 3-10 个或更多碱基的长度,例如,约 3-8、3-6、4-6、4-8 或 7-8 碱基的长度,并且 5'-部分可包含 2 个至约 10 个或更多序列段。序列段可以是但不需要是等质量的。等质量的序列段可以是但不需要具有相同的序列。共享相同核酸序列的 5'-尾中的序列段是重复。

[0061] 术语“5'-末端”和“3'-末端”可互换指代多核苷酸上的核苷酸位置,其处于 5'-端或 3'-端(即 5'-或 3'-末端碱基),或距离核酸或其子序列末端的一个或两个核苷酸碱基位置(即,处于距 5'-或 3'-末端(-1)或(-2)的位置)。

[0062] 术语“封闭部分”或“封闭基团”指的是附着至多核苷酸 3'-末端的化学基团或部分,其阻止核酸的延伸,如通过至少一个核苷酸整合生物催化剂的延伸。示例性的封闭部分包括在 3'-末端核苷酸碱基的 2' 位的取代基,即 2' 终止子核苷酸。

[0063] “2' 终止子核苷酸”指的是在核苷酸糖部分 2' 位包含封闭基团 (BG) 的核苷酸类似物。2' 终止子核苷酸可以是不可被一个或多个核苷酸整合生物催化剂延伸的。那就是,一旦 2' 终止子核苷酸被整合入核酸(如在核酸的 3' 终末端),封闭基团就阻止通过至少一个核苷酸整合催化剂的核酸的进一步延伸。示例性的封闭基团是磷酸基团。示例性的 2' 终止子核苷酸包括 2'-单磷酸-3'-羟基-5'-三磷酸核苷和 2'-单磷酸-3'-羟基-5'-二磷酸核苷。2' 终止子核苷酸详细描述于,例如美国专利公开 Nos. 2007/0219361 和 2007/0154914。

[0064] 术语“靶核酸”指的是任何包括待检子序列的核酸。靶核酸可以是 DNA 或 RNA。靶核酸可以是任意来源,包括基因组 DNA、mRNA、cDNA。靶核酸可以是天然存在的或合成的(如扩增子、载体等等)。靶核酸可以是但不需要是纯化或分离的。取决于检测测定的性质,靶

核酸可以是来源于植物或动物组织,或取自反应混合物。靶核酸在长度上没有限制,尽管靶核酸可以在由目前的方法检测或鉴定之前暴露于限制性内切核酸酶。对于本发明方法的目的而言,靶核酸采用本领域已知的方法制备。

[0065] 术语“扩增条件”指的是扩增反应(如 PCR 扩增、RT-PCR 扩增)的条件,所述的扩增反应允许可延伸多核苷酸(例如,引物)与靶核苷酸的杂交,以及可延伸多核苷酸的模板依赖的延伸。如本发明所使用的,“扩增条件”或用于扩增靶核酸的充足条件是本领域熟知的。参见例如:PCR Primer:A Laboratory Manual, Dieffenbach 和 Dveksler, 编辑, 2003, Cold Spring Harbor Press; 以及 PCR Protocols, Bartlett 和 Stirling, 编辑, 2003, Humana Press。

附图说明

[0066] 图 1 示例说明了本发明的多核苷酸以及方法的示意表示。在此示例性实施方案中,多核苷酸包含具有 3 个相同序列段(即“重复”)的 5'-部分或 5'-尾(5'-NTAATAATAAT-3'; SEQ ID NO:1)。所述的多核苷酸用于检测靶核酸内的多态性核苷酸。所述的核苷酸集可包含约 50%至 100%的核糖核苷酸,所述的核糖核苷酸互补于每个序列段的 5'-末端位置的核苷酸(如 $rATP=\overset{\text{A}}{\text{A}}$)。核糖核苷酸被整合入互补于多核苷酸的扩增子链。使扩增子经受片段化,从而释放序列段。接着,检测释放的序列段的质量。核糖核苷酸也将整合入靶核酸的互补链(3'- $\overset{\text{A}}{\text{A}}$ TT $\overset{\text{A}}{\text{A}}$ TT $\overset{\text{A}}{\text{A}}$ TT $\overset{\text{A}}{\text{A}}$ -5'; SEQ ID NO:2)。因此,靶核酸的扩增链也将在核糖核苷酸被整合的位置经受切割。

[0067] 图 2 示例说明了应用于此以及实施例 1 所描述的方法在 H19 基因内 SNP 的 C 等位基因的成功基因型分型。“GTCTTA”指的是询问引物(interrogating primer)中重复六聚体的反向互补核酸序列。“噪声”表明没有检测到可辨别的信号。

[0068] 图 3 示例说明了应用于此以及实施例 1 所描述的方法在 H19 基因内 SNP 的 T 等位基因的成功基因型分型。“GCTCTA”指的是询问引物中重复六聚体的反向互补核酸序列。“噪声”表明没有检测到可辨别的信号。

[0069] 图 4 示例说明了应用于此以及下面的实施例 1 所描述的方法在 H19 基因内 SNP 的 C 和 T 等位基因的成功并行基因型分型。“噪声”表明没有检测到可辨别的信号。

[0070] 图 5 示例说明了应用 80%或 90%核糖核苷酸(此处是 rATP)以及脱氧核糖核苷酸 dU 和 dC 对 HIV 转录物的成功鉴定。未从不具有模板的样品中获得信号。参见实施例 2。“CCUA”指的是上游引物中重复四聚体的反向互补核酸序列(4×CCUA = SEQ ID NO:6)。“GUGA”指的是下游引物中重复四聚体的反向互补核酸序列(4×GUGA = SEQ ID NO:7)。“噪声”表明没有检测到可辨别的信号。

[0071] 图 6 示例说明了应用 80%或 90%核糖核苷酸(此处是 rATP)以及脱氧核糖核苷酸 dU 和 5-Me-dC 对 HIV 转录物的成功鉴定(4×CmeCmeUA = SEQ ID NO:8; 4×GUGA = SEQ ID NO:7)。未从不具有模板的样品中获得信号。参见实施例 2。“噪声”表明没有检测到可辨别的信号。

[0072] 图 7 总结了图 5 和图 6 示例说明的测试样品的结果(4×CmeCmeUA = SEQ ID NO:8; 4×CCUA = SEQ ID NO:6)。

[0073] 图 8A-C 示例说明了 NOS1_361 的 SNP R 的 ATP 核糖-PCR 的 7-聚体区域的质谱。

A, 对应于纯合子 A 的 3 片段 GTTTCTA ($3 \times \text{GTTTCTA} = \text{SEQ ID NO:9}$)。B, 对应于杂合子 AG 的 3 片段 GTTTCTA 和 GTTTTGA ($3 \times \text{GTTTTGA} = \text{SEQ ID NO:10}$)。C, 对应于纯合子 G 的三片段 GTTTTGA。

具体实施方式

[0074] 1、引言

[0075] 本发明提供了多重检测程序, 其要求最小数目的反应步骤并允许方便和真实的多重化。该程序利用整合核糖核苷酸碱基的反应 (如包含四种核苷酸 (A、C、G、T) 至少之一全部或部分作为核糖碱基 (ribo base) (rNTP) 的扩增反应)。采用了对靶核酸特异的引物。引物中的一个或两个具有 5'-尾, 所述 5'-尾带有一个、两个或更多个约 3-10 个或更多个碱基的序列段, 并且带有位于每个序列段 5'-末端的与核糖碱基互补的碱基。序列段可以但不需要是等质量的。扩增导致引物序列包括其 5' 部分包括入扩增子 (即扩增产物)。扩增子也将包含整合的核糖碱基。为了通过质谱分析法进行分析, 使扩增产物经历片段化, 例如, 通过暴露于碱。所述的碱选择性地切割紧在整合的核糖碱基 3' 的 DNA 主链。因此, 扩增产物中的引物序列的整合, 以及序列段, 使得可通过检测序列段的不同质量而检测产物的存在。引物的使用转化为具有拷贝并扩增的序列段的质量的产物的存在。

[0076] 为用于多重化, 用于多个靶核酸 (如不同的等位基因) 的引物尾端具有不同的 5' 部分序列段, 其在切割后生成不同质量的产物。所有新合成的 DNA 含有整合的核糖碱基并因而在经受碱的时候产生片段。为方便解释, 可设计整个系统, 从而使得从引物以及其他核酸的杂交部分通常出现的质量信号不同于 5'-尾序列段或其互补体的质量。单个尾中的序列段可以是等质量的, 并且可以是相同序列的 (即重复)。重复序列段的重复导致了超过衍生自引物与靶核酸退火或拷贝靶核酸的部分的序列的信号清晰信号。根据权利要求 1 的方法, 其中每个 5' 部分序列段是等质量的, 因而是本发明的优选实施方案。

[0077] 程序允许单个孔中具有最少数目的反应步骤的 10 个或更多个样品的有效多重基因型分型。所述的步骤通常需要 DNA 模板和主混合物 (mastermix) 的混合。在热循环之后, 加入碱溶液, 且测量片段化的序列段的质量, 例如, 通过质谱分析法。可采用任意已知用于质量测量的方法。当应用质谱分析法时, 任一种类的质谱仪都适合用于分析。

[0078] 引物可任选地包含可去除的 3'-末端封闭剂 (即, “热启动”) 以使得相同的耐热 DNA 聚合酶能实现 “热启动”, 从而提高特异性以及允许更大程度的多重化。

[0079] 在实施目前方法的一个实例中, 核糖 PCR (ribo PCR) 可用对于每个靶核酸 (如每个 SNP, 每个等位基因) 的 DNA 样品、两个正向引物以及一个反向引物实施。正向引物设计为特异于一个靶核酸 (如一个 SNP, 一个等位基因), 其 3'-末端或 3'-末端倒数第二个碱基特异互补于靶核酸上的识别碱基。每个正向引物具有特异的 5'-尾, 其包含一个、两个或更多个具有相同质量的序列段, 其中每个序列段的 5'-末端碱基互补于 PCR 扩增混合物中的核糖核苷酸 (NTP)。序列段的质量设计为在不同的等位基因、SNP 以及其他可检测靶核酸中是不相同的并且可区别的。

[0080] 为生成具有可区别质量的序列段, 引物的 5'-尾可包含, 例如, 约 2-10 个约为 3-10 个碱基长度的序列段, 或约 4-7 个约为 4-6 个碱基长度的序列段, 或约 2-3 个约为 7-8 个碱基长度的序列段。

[0081] 核糖-PCR(Ribo-PCR) 或核糖扩增(ribo-amplification)是具有脱氧核苷酸以及至少一个核苷酸(核糖核苷酸或 rNTP)的混合物的 PCR 反应或扩增反应。这种反应的例子是:包含 dGTP、核糖核苷酸 rTTP(即 5'-甲基-UTP)、dCTP 以及 dATP,以及在合适缓冲液中有有效整合及延伸核糖核苷酸的 DNA 聚合酶的 PCR 混合物。所述的反应可通过任意延伸反应包括热循环反应来实施。热循环之后,可以用碱处理反应混合物。所述的碱可以是强碱,例如 NaOH 或 KOH。所述的碱切割紧在整合的核糖碱基 3' 的 DNA 主链,并导致片段的生成。靶核酸的存在导致特异于靶核酸的正向引物的应用并且因此存在扩增的 5'-尾序列。拷贝并切割的尾的互补体具有独特的质量。所述的质量用于确定测试样品中靶核酸的存在。对应于被切割的互补尾序列的质量信号的存在被用于鉴定测试样品中靶核酸的存在。为用于多重化,应用了许多不同的尾序列,每个尾序列具有切割后产生特定质量的 DNA 的碱基组成。

[0082] 2、多核苷酸

[0083] 本发明的多核苷酸包含 5'-部分或 5'-尾,所述 5'-部分或 5'-尾包含一个、两个或更多个串联序列段,以及设计为足够互补以与靶核酸退火以允许核苷酸基于模板延伸的 3' 部分。

[0084] a. 5'-部分

[0085] 5'-部分或 5'-尾包含一个、两个或更多个串联(即邻接的)序列段,每个序列段包含独特的核苷酸碱基(即在该段中仅用一次),其位于每个序列段的 5'-末端。在优选的实施方案中,5'-部分或 5'-尾中的每个序列段具有相等的质量。在另一个优选的实施方案中,5'-部分或 5'-尾中的每个序列段具有相同的(意味着同样的)的核苷酸序列。将具有相同的核苷酸序列的串联序列段称为重复。独特的核苷酸碱基可接着最后一个(第二个或第三个或第四个,等等)串联序列段。例如,具有 3 个相同质量、每一个 4 个核苷酸长度的序列段的 5'-部分或 5'-尾的序列可以是:5'-TAGCTAGCTAGCT-3'(SEQ ID NO:3),其中核苷酸碱基“T”互补于反应混合物中的核糖碱基。

[0086] 如同上文的示例,在一些实施方案中,5'-部分或 5'-尾的 3'-末端核苷酸碱基互补于反应混合物中的核糖碱基。因为碱性溶液切割紧在整合的核糖碱基 3' 的键,包括在 5'-部分的 3'-末端,互补于反应混合物中核糖碱基的核苷酸碱基使得所有序列段释放。保留在切割的扩增子 3'-末端的是整合的具有 2' 或 3' 磷酸的核糖碱基。参见图 1。如果 5'-部分仅包含一个序列段,则要求位于 5'-部分 3'-末端的互补于反应混合物中核糖碱基的核苷酸碱基。如果两个或更多个序列段具有不同质量,则也要求位于 5'-部分 3'-末端的互补于反应混合物中核糖碱基的核苷酸碱基。然而,如果靶互补部分的末端 5'-核苷酸也是相同的“独特”核苷酸碱基,或者如果 5'-部分含有两个或更多个相等质量的序列段,则位于 5'-部分 3'-末端的互补于反应混合物中核糖碱基的核苷酸碱基是任选的。

[0087] 在优选的实施方案中,附加的核苷酸碱基包含于 5'-部分的 5'-末端。附加的 5'-末端核苷酸碱基可以是任意的碱基。示例性的具有附加 5'-末端核苷酸碱基的 5'-部分可以是:5'-NTAGCTAGCTAGCT-3'(SEQ ID NO:4)。包括附加的 5'-末端核苷酸碱基增加了释放的片段质量的均匀性与准确性。这是因为,当碱性溶液切割紧在整合的核糖碱基 3' 的键时,2' 或 3' 磷酸部分保持附着于核糖碱基。参见图 1。当应用不进行模板非依赖性延伸的核苷酸整合生物催化剂时,包含在 5'-部分 5'-末端的附加核苷酸碱基找到了用途。

[0088] 在其它优选的实施方案中,5'-部分或 5'-尾中的序列段具有相同的质量但序列

不同。例如,具有 3 个相同质量、每一个四个核苷酸长度的序列段的 5' - 部分或 5' - 尾的序列可以是:5' -TAGCTCAGTGCAT-3' (SEQ ID NO:5),其中所述的核苷酸碱基“T”互补于反应混合物中的核糖碱基。

[0089] 在进一步优选的实施方案中,5' - 部分或 5' - 尾中的序列段可以是不同长度(如 3、4 和 / 或 5 个核苷酸碱基)和不同质量的,但当扩增子进行切割时,整个 5' - 部分或 5' - 尾产生可被例如质谱分析法鉴定的可区分的“特征”模式。

[0090] 5' - 部分或 5' - 尾可包含有如所需的 2 到约 10 个序列段,或更多个,例如,约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个串联序列段。每个序列段可以是约 3 个到约 10 个核苷酸碱基长度,或更长,例如,约 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个核苷酸碱基长度。通常,序列段越长,需要包含于 5' - 尾中的就越多。相反地,序列段越短,将包含于 5' - 尾内的就越多。例如,5' - 尾可以包含约 2-4 个约 7-8 个核苷酸碱基长度的序列段,或约 4-6 个约 4-6 个核苷酸碱基长度的序列段,或约 5-8 个约 3-5 个核苷酸碱基长度的序列段。

[0091] 多核苷酸用作靶核酸延伸以及扩增反应中的引物。位于每个 5' - 尾序列段的 5' - 末端的独特核苷酸碱基互补于包括在反应混合物中的核糖核苷酸碱基,所述反应混合物用于被本发明的多核苷酸杂交的靶核酸的延伸或扩增。

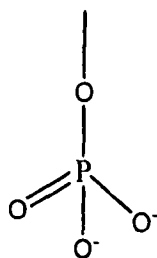
[0092] b. 3' - 部分

[0093] 多核苷酸的 3' - 部分被设计为具有足够互补以与靶核酸序列杂交并延伸的核酸序列。3' - 部分如所需的至少是 5 个核苷酸碱基长度,且可以更长,例如,约 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个核苷酸碱基长度。3' - 部分的 3' - 末端或 3' - 末端的 (-1) 或 (-2) 位核苷酸碱基,可根据本领域已知的方法,用于区分靶核酸中的特定等位基因或 SNPs。示例性的例如用于引物延伸或热循环的反应条件包括约 50mM N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基]甘氨酸-KOH(Tricine-KOH), pH 7.5, 100mM KOAc, 3.0mM Mg(OAc)₂, 以及 200 μM 的各种 dNTP; 退火或杂交温度可以为约 50°C -70°C, 例如为约 60-65°C。

[0094] 在优选的实施方案中,3' - 部分的 3' - 末端任选地具有封闭基团或封闭部分,其可逆地阻止多核苷酸的延伸。示例性的可逆封闭部分包括附着于 3' - 末端核苷酸的 2' 位置的取代基(即 2' 终止子)。在特别优选的实施方案中,2' - 终止子部分是磷酸或磷酸类似物,例如甲基氨基磷酸。

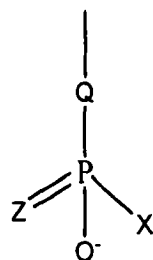
[0095] 通常,在糖部分 2' 位置利用的封闭基团(BG)可包括各种不同的实施方案。优选的,例如,所述的 BG 是负电荷基团和 / 或大体积基团。为进一步解释说明,BG 任选地选自如 CN、NO₂、N₃、卤基团、醚基、醛基、羧酸基团、酯基团、氨基基团、OCH₃、OCH₂COOH、O- 甲硅烷醚基团、酮基基团、O- 内酯基团、O- 烷基基团、O- 环烷基基团、O- 链烯基基团、O- 炔基(alkynyl)基团、氨基甲酸酯基团、酰亚胺基团、酰胺基团及其组合。更特别地,BG 任选地包含式(I):

[0096]



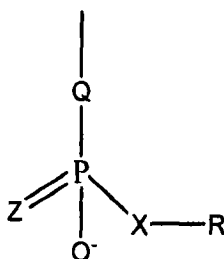
[0097] 在其它优选的实施方案中,BG 包含式(II):

[0098]



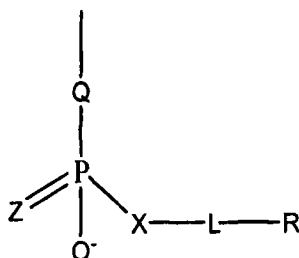
[0099] 其中 Q 是 O、S 或 NH；X 是 H、OH、CH₃、BH₃、F 或 SeH；并且 Z 是 O、S 或 Se。为进一步解释说明，BG 任选地包含式 (III)：

[0100]



[0101] 其中 Q 是 O、S 或 NH；X 是 O、S 或 NH；Z 是 O、S 或 Se；并且 R 是烷基基团、链烯基基团或炔基基团。在另一个示例性优选的实施方案中，BG 包含式 (IV)：

[0102]



[0103] 其中 Q 是 O、S 或 NH；X 是 O、S 或 NH；Z 是 O、S 或 Se；L 是 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ 、或 $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ；n 是大于零的整数，并且 R 是 NH₂、SH、COOH、猝灭部分、报道部分、生物素或亲和部分。

[0104] 示例性有用的 2'-终止子核苷酸包括 2'-单磷酸-3'-羟基-5'-三磷酸核苷以及 2'-单磷酸-3'-羟基-5'-二磷酸核苷。2'-终止子可逆封闭基团详细描述于，例如美国专利公开 Nos. 2007/0219361 以及 2007/0154914。

[0105] 本发明的多核苷酸可任选地含有非天然存在的核苷酸主链键、核苷酸碱基以及核苷酸碱基类似物，如本发明所述。多核苷酸可以是单链或双链的。在优选的实施方案中，多核苷酸在它们的全长均是单链。多核苷酸可以含有但时常不含有任何标记，例如附着的荧光团、放射性同位素、酶或其它鉴定剂。多核苷酸可以是分离的、合成的或重组的。多核苷酸，包括 5'-和 3'-部分，可以是任意长度的并且通常是约 200 个核苷酸或更短，例如，约 150、125、100、75、50 或 25，或更少的核苷酸长度。

[0106] 3、检测方法

[0107] a. 使靶核酸与本发明的多核苷酸接触

[0108] 实施检测方法的第一步涉及将靶核酸与本发明的多核苷酸、核苷酸集以及核苷酸整合生物催化组分接触。

[0109] i. 核苷酸集

[0110] 用于本方法的核苷酸集包含至少一个核糖核苷酸碱基形式的碱基（如 A、U、G 或 C 或另一个核糖核苷酸，rNTP）。在一些实施方案中，核苷酸集含有至少两个核糖核苷酸碱基形式的碱基。所述的一个或多个作为核糖核苷酸碱基被包括的碱基，可以是全部（如 100% 的核糖核苷酸）或部分地（如少于 100% 的核糖核苷酸，如碱基的残余部分是脱氧核苷酸或 dNTP）作为核糖核苷酸碱基被包括在核苷酸集中的。在优选的实施方案中，一个或多个核苷酸碱基以大部分作为核糖核苷酸（rNTP）存在，即超过 50%，如 60%、70%、80%、85%、90%、95%，以及以小部分作为脱氧核糖核苷酸（dNTP）存在（即少于 50%）。在特别优选的实施方案中，至少一种核苷酸碱基的至少 80% 是核糖核苷酸的形式。一个或多个核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸一起被包括在内以完成完整的核苷酸集（A、T、C 和 G 核苷酸存在）。

[0111] ii. 生物催化组分

[0112] 本发明的方法采用的核苷酸整合生物催化组分包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性。在优选的实施方案中，相同的催化结构域可催化脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸整合活性。在其它优选的实施方案中，生物催化组分包含至少两个催化结构域，一个具有脱氧核糖核苷酸整合活性，另一个具有核糖核苷酸整合活性。

[0113] 适合用于本发明方法的示例性生物催化组分包括，但不限于，作为修饰的 Z05、CS5、CS6 或 Taq 聚合酶的聚合酶。CS5、CS6 嵌合聚合酶进一步描述于，如美国专利申请公开 No. 2004/0005599。栖热菌属（*Thermus*）物种 Z05 已在 PCT 国际专利公开 No. WO 92/06200 中公开。示例性的修饰酶包括，如 G46E E678GCS5DNA 聚合酶、G46E L329A E678G CS5DNA 聚合酶、G46E L329A D640GS671F E678G CS5DNA 聚合酶、G46E L329A T606S D640G S671F E678G CS5DNA 聚合酶、G46E E678G CS6 DNA 聚合酶、E615G Taq DNA 聚合酶等等。例如相对于缺乏一个或多个这些突变的酶，这些修饰的酶包括增强核糖核苷酸整合的、以及增强核糖核苷酸 2' - 修饰类似物整合的、和 / 或减少或消除 5' -3' 外切核酸酶活性的突变，。

[0114] 涉及有用的核苷酸整合生物催化剂的其它细节也在如美国专利申请 No. 11/873,896 以及美国专利 Nos. 5,939,292、4,889,818、5,374,553、5,420,029、5,455,170、5,466,591、5,618,711、5,624,833、5,674,738、5,789,224、5,795,762、7,148,049 以及 7,179,590 中提供。

[0115] 可通过各种方法，如位点定向诱变、化学修饰等，来完成具有如整合核糖核苷酸以及 2' - 终止子核苷酸的增强效率或其他所需性质的修饰酶的生产。更具体地，位点定向诱变通常通过位点特异性引物指导的诱变来完成。这种技术可采用除了代表所需突变的有限错配外互补于待诱变的单链噬菌体 DNA 的合成寡核苷酸引物来实施。简而言之，合成的寡核苷酸用作引物以指导互补于质粒或噬菌体的链的合成，并且将所得的双链 DNA 转化进入支持噬菌体的宿主细菌。所得的细菌可通过如 DNA 序列分析或探针杂交来测定，以鉴定那些携带所需突变基因序列的噬菌斑。为进一步解释说明，也可利用许多其它的修饰核酸的方法，诸如“重组 PCR”方法。

[0116] 在本发明的实践方面（如生产修饰的酶、实施测序反应等等），任选地应用分子生物学以及重组 DNA 的许多常规技术。这些技术是公知的并且解释于，例如，Current Protocols in Molecular Biology, 1997-2007 (F.M. Ausubel 编辑)，WileyInterscience；Sambrook 等, 2001, Molecular Cloning. :A laboratory Manual, 第三版, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.; Berger 和 Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology 卷 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger), DNA Cloning: A Practical Approach, 卷 I 和 II, 1985 (D. N. Glover ed.) ; Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.) ; Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames 和 Higgins) ; Transcription and Translation, 1984 (Hames 和 Higgins eds.) ; Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.) ; Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press) ; Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning, 系列, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller 和 M. P. Calos 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Methods in Enzymology 卷 154 和卷 155 (分别为 Wu 和 Grossman, 以及 Wu, 编辑)。

[0117] iii. 多核苷酸

[0118] 用于本方法的 5' - 加尾的多核苷酸如上文和此处描述。在优选的实施方案中, 靶核酸与许多 (如两个或更多个) 5' - 加尾的多核苷酸相接触。在其它优选的实施方案中, 这些许多多核苷酸中的每一个通过具有包含一个、两个或更多个等质量序列段的 5' - 部分分别地可识别。在此情况下, 每个 5' - 加尾的多核苷酸互补序列的扩增子或互补体的片段化产生不同的质量信号或特征质量概况。在进一步优选的实施方案中, 多核苷酸作为一个或多个引物对与靶核酸相接触。引物对中的一个或两个多核苷酸可包括包含串联序列段的 5' - 尾。还可以提供作为一个或多个引物对与靶核酸接触的多重多核苷酸, 其中引物对中的每个引物包含含有相同质量的串联序列段的 5' - 部分。在此情况下, 用于产生扩增子的引物对中每个引物的 5' - 部分的互补体的片段化生产更大 (如, 约两倍) 强度的单质量信号。备选地, 引物对中的每个引物可包含一个序列段, 引物对中每个引物中的序列段是相同质量的。

[0119] 在方法的优选实施方案中, 5' - 加尾的多核苷酸可包含具有不同质量的一个序列段以产生可检测的切割产物。

[0120] iv. 靶核酸

[0121] 靶核酸可来源于任意来源, 如来源于动物、植物、细菌或病毒的组织样品, 或者可以是例如从反应混合物合成的。靶核酸可以是, 如基因组 DNA、染色体或染色体节段、mRNA、cDNA、载体 (如表达载体)、表达盒、裸 DNA 或 RNA 聚合物、聚合酶链反应 (PCR) 的产物、寡核苷酸、探针、引物等等。靶核酸可以是, 如单链、双链、三链等等, 并且不限于任何特定的长度。用于本发明方法的靶核酸时常地将包含一个或多个单核苷酸多态性 (SNP)、插入、缺失、置换或其它辨别特征。靶核酸通常在样品中提供。

[0122] 在优选的实施方案中, 以辨别一个或多个 SNPs 的目的接触靶核酸 (即实施的方法)。在这样的应用中, 采用了至少两个不同的等位基因 - 辨别性 5' - 加尾的多核苷酸, 它们的 3' - 部分不相同, 从而使得它们特异性地与特定等位基因退火, 并且, 它们的 5' - 部分也不相同, 从而使得一个或多个序列段具有对应于并独特地鉴别被 3' - 部分结合的等位基因的质量。

[0123] 在其它优选的实施方案中, 以检测靶核酸中一个或多个稀有突变的目的接触靶核酸。在这样的应用中, 存在一个或多个具有特异性与靶核酸中特定位置的突变退火的 3' - 部分的多核苷酸 (具有特异性与野生型在相同位置退火的 3' - 部分的多核苷酸, 可任

选地存在于相同或分开的反应中)。当评估靶核酸序列中的一个突变时,可以应用一个、两个或更多个区分不同突变的 5' - 加尾的多核苷酸,其在 3' - 部分不同,从而使得它们特异性与野生型或一个或多个突变型退火,并且,它们在 5' - 部分也不同,从而使得一个或多个序列段具有这样的质量,所述质量对应于并独特地鉴别被 3' - 部分结合的等位基因。在评估一个靶核酸中的两个或更多个突变的应用中,具有特异性检测靶核酸中第一位置的突变的 3' - 部分的多核苷酸,可以具有全部是第一质量的 5' - 部分序列段;具有特异性检测靶核酸中第二位置的突变的 3' - 部分的多核苷酸,可以具有全部是第二质量的 5' - 部分序列段。备选地,多核苷酸 5' - 部分序列段的质量可以彼此不同,作为独特的鉴定剂操作。

[0124] 在其它优选的实施方案中,如那些涉及多重扩增或延伸的,作为两个或更多个引物对提供多核苷酸。在第一引物对中,引物对中的每个引物的 5' - 部分含有第一质量的序列段;第二引物对中每个引物的 5' - 部分含有第二质量的序列段,其可检测地不同于第一质量;第三引物对中每个引物的 5' - 部分含有第三质量的序列段,其可检测地不同于第一和第二序列段的质量;后续引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有可检测地不同于前面所有的或其它引物对的质量的序列段。引物对的数目以及扩增或延伸反应受反应混合物中游离核苷酸碱基可用度的限制。在一些优选的实施方案中,反应混合物可包含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多引物对。这种策略允许多个靶核酸或单个靶核酸当中的多个靶的并行检测。

[0125] b. 扩增靶核酸以生产扩增子

[0126] i. 扩增方法

[0127] 可采用一个或多个本发明的多核苷酸,应用本领域已知的任意的多核苷酸延伸或扩增的方法来扩增靶核酸。应用聚合酶链反应 (PCR) 的任意已知变化,包括 RT-PCR、定量 PCR、多重以及实时 PCR 的扩增在本发明的方法中是有用的。扩增也包括了等温扩增方法和本领域已知的多核苷酸延伸方法。实施 PCR 的规程是本领域所熟知的,且其描述于,例如 PCR Primer :A Laboratory Manual, Dieffenbach 和 Dveksler, 编辑, 2003, Cold Spring Harbor Laboratory Press ; A-Z of Quantitative PCR, Bustin, 编辑, 2004, International University Line ; Edwards, Real-Time PCR : An Essential Guide, 2004, Taylor & Francis ; Real Time PCR, Dorak, ed., 2006, Taylor & Francis ; PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, Innis, 等, 编辑, 1990, Academic Press, San Diego ; PCR Strategies, Innis, 等, 编辑, 1995, Academic Press, San Diego ; 以及 PCR Applications : Protocols for Functional Genomics, Innis, 等, 编辑, 1999, Academic Press, San Diego。靶核酸扩增或延伸足够的时间量或足够数目的循环以产生可检测量的扩增子。

[0128] 如上文所讨论那样,可扩增一个或多个靶核酸,或者可扩增单个靶核酸中的一个或多个靶位置。由于基本上对具有可区别质量的序列段的不同 5' - 部分的数目没有限制,所以方法特别适合于多重扩增测定。一个或多个用于扩增靶核酸或靶核酸中特异位置的多核苷酸可具有不同的带有唯一可识别质量序列段的 5' - 部分。用作引物对的多核苷酸对可具有带有相同质量的序列段的 5' - 部分。在具体的实施方案中,序列段共有相同的序列。多重扩增测定可并行确定至少 5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100 个或更多个不同靶核酸或靶核酸中的位置的存在 (或不存在),如同所需的那样。

[0129] 本发明的扩增以及多核苷酸延伸反应采用生物催化单位 (如聚合酶), 其包括整

合核糖核苷酸入待延伸核酸链的酶活性（如，“核糖-PCR”、“核糖-扩增”或“核糖-延伸（ribo-extension）”）。示例性的具有核糖核苷酸整合活性的生物催化单位包括 G46E CS6R DNA 聚合酶以及 KB17 DNA 聚合酶，其可从 RocheMolecular System 获得，并描述于，例如：Mauger 等，Nucleic Acids Research (2007) 35 (8) :e62 以及 Mauger 等，Nucleic Acids Research (2006) 34 (3) :e18。可用的其它生物催化组分在上文以及此处进行了讨论。也可参见美国专利 No. 5, 939, 292。

[0130] ii. 扩增子产生

[0131] 靶核苷酸序列的扩增将产生双链的扩增子，其中互补于多核苷酸 5' - 部分的扩增子链将包括含有一个或多个序列段的 3' - 部分，其中序列段的 3' - 末端核苷酸碱基包含有整合的核糖核苷单磷酸 (rNMP)。

[0132] c. 切割扩增子

[0133] 可应用本领域已知的任意方法切割扩增子的序列段。在根据本发明的优选实施方案中，通过使扩增子经受碱（即碱性溶液），在整合的 NMP 3' 的键切割扩增子。扩增子优选暴露于碱性溶液以被切割，特别地是暴露足以实现切割整合的 NMP 3' 的键的时间段和温度。通常，温度越高，碱处理所需的时间段越短。例如，切割或片段化步骤可在 70℃ 施行约 1.5 小时，或在约 55℃ 施行约 8 小时（即过夜）。碱处理温度可以低至冷冻温度（如 4℃）以及高至邻近沸点温度（如约 95℃）。在优选的实施方案中，碱性溶液可以是 pH 大于约 8.5 的任意溶液，例如，pH 至少是约 9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0 或更高。在一些实施方案中，碱性溶液将包含至少约 0.2M、0.3M、0.5M、0.8M、1.0M 或更多的碱性化合物。

[0134] 碱性溶液将通常含有至少一种强碱。在一些实施方案中，可采用弱碱，例如，如果以较高浓度包含在碱性溶液中的话。通常，碱性溶液将包含至少一个具有约 5.0 或更小 pK_b 的碱性化合物，例如，约 4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5 或更小的 pK_b 。示例性的用于在整合的 NMP 3' 的键片段化扩增子的碱性化合物包括，例如 NaOH、KOH、RbOH 以及 NH_4OH ，优选 NaOH、KOH 或 NH_4OH 。其它的碱或碱性化合物也可使用。参见例如：Mauger 等，Nucleic Acid Research (2007) 35 (8) :e62 以及 Mauger 等，Nucleic Acids Research (2007) 34 (3) :e18 的碱处理程序。

[0135] d. 检测扩增子片段

[0136] 可应用本领域已知的任何方法来检测扩增子片段或切割且释放的序列段。在优选的实施方案中，通过质量鉴定来检测切割的片段。序列段也可在切割之前或之后例如用荧光团或放射性同位素进行可检测地标记。可在 5' - 末端或 3' - 末端或在从头到尾的任意的核苷酸碱基标记片段。示例性的检测方法包括但不限于：质谱分析法、电泳分离、时间分辨荧光检测、自旋共振检测以及带有之后的检测的与固相（如阵列）杂交。

[0137] 在优选的实施方案中，采用质谱分析法检测从扩增子释放的切割的序列段。质谱分析法方法是本领域所熟知的。任何质谱分析法技术均可应用，包括例如：激光解吸电离质谱分析法（如基质辅助激光解吸电离质谱分析法 (MALDI)，以及表面增强激光解吸电离质谱分析法 SELDI）、气相离子光谱测定法、气相层析质谱分析法、串联质谱分析法以及其他质谱分析法技术。质谱分析法方法是本领域所熟知的，并描述于例如：Gross, Mass Spectrometry :A Textbook, 2006, Springer Verlag；以及 Dass, Fundamentals of

Contemporary MassSpectrometry, 2007, Wiley Interscience。

[0138] 检测的扩增子片段可以是互补于或扩增自多核苷酸 5' - 部分的扩增子的切割的序列段。当然,应当理解可切割的序列段可从扩增子长度从头到尾产生。在碱性条件下,紧在已整合核糖核苷酸处 3' 的键进行切割。在优选的实施方案中,扩增子片段可从扩增的靶核酸检测(如,从互补于多核苷酸 3' - 部分的序列段)。如所需的,可检测从多核苷酸的 5' - 部分和 / 或 3' - 部分或其互补体切割的序列段。来自检测的扩增子片段的信号产生指示待鉴定靶核酸的峰特征。

[0139] 4、反应混合物

[0140] 本发明也提供了本发明方法涉及的反应混合物。可产生上文所描述的任意反应混合物。示例性的反应混合物包括,例如:一个或多个本发明的多核苷酸,其包括包含一个、两个或更多个串联序列段的 5' - 部分或 5' - 尾,以及设计为足够互补以与靶核酸退火的 3' - 部分;包含 dNTP 的核苷酸集,其中至少一种碱基的大多数是核糖核苷酸;以及具有核糖核苷酸整合活性的生物催化组分。在一些实施方案中,反应混合物包含一个或多个靶核酸序列。本发明的反应混合物还可包含通过本发明方法所生产的扩增子,所述的扩增子包含具有互补于本发明多核苷酸 5' - 部分的序列段的 3' - 部分,其中每个序列段的 3' - 末端核苷酸碱基是核苷一磷酸(NMP)。本发明的反应混合物优选包含含有与多核苷酸相同的 5' 位置的扩增子。反应混合物中的许多多核苷酸可以作为多核苷酸对提供,如引物对,其中每个多核苷酸对中的每个多核苷酸优选包含等质量的 5' 位置序列段。反应混合物中组分的实施方案在上文以及此处描述。

[0141] 在优选的实施方案中,反应混合物包含两个或更多个引物对。在第一引物对中,引物对中的每个引物的 5' - 部分包含具有第一质量的序列段;第二引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有第二质量的序列段,其可检测地不同于第一质量;第三引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有第三质量的序列段,其可检测地不同于第一和第二序列段的质量;后续引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有可检测地不同于前面所有的或其它引物对的质量的序列段。在特别优选的实施方案中,反应混合物可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多引物对。

[0142] 在其它优选的实施方案中,反应混合物包括核苷酸集,其包含非常规或非天然存在的核苷酸碱基或标记的核苷酸碱基,如带有荧光团或放射性同位素。反应混合物也可如需要的那样包含缓冲组分和盐。在其它优选的实施方案中,反应混合物包含碱性组分,如上文所述,例如 NaOH 或 KOH。与此处描述的方法相一致,一般已将含有高浓度的碱性组分(如约 0.1M-0.2M 或更高)的反应混合物进行扩增。

[0143] 进一步优选地,反应混合物包含由本发明的方法所生产的扩增子以及碱性组分,如本文所描述。

[0144] 5、试剂盒

[0145] 本发明还提供了用于本发明方法的试剂盒。一般地,为使用方便,试剂盒进行了区室化并含有提供实施本发明方法的组分的容器,例如,一个或多个本发明的核苷酸,其包括包含一个、两个或更多个串联序列段的 5' - 部分或 5' - 尾,以及设计为足够互补以与靶核酸退火的 3' - 部分;包含 dNTPs 的核苷酸集,且其中至少一种碱基的大多数是核糖核苷酸;以及具有核糖核苷酸整合活性的生物催化组分。在优选的实施方案中,试剂盒包含一个或

多个靶核酸序列,包括对照核酸序列(用于阳性和/或阴性对照)。试剂盒可以提供实施分离的对照反应的试剂,包括对照多核苷酸和对照靶核酸序列。试剂盒中许多多核苷酸可以作为多核苷酸对如引物对而提供。试剂盒中组分的实施方案如上文和此处所述。

[0146] 在优选的实施方案中,试剂盒包含两个或更多个引物对。在第一引物对中,引物对中的每个引物的 5' - 部分包含具有第一质量的序列段;第二引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有第二质量的序列段,其可检测地不同于第一质量;第三引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有第三质量的序列段,其可检测地不同于第一和第二序列段的质量;后续引物对中每个引物的 5' - 部分包含具有可检测地不同于前面所有的或其它引物对的质量的序列段。在特别优选的实施方案中,试剂盒可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多引物对。

[0147] 还可以包括一个或多个附加的提供附加试剂的容器。这样的附加容器可包括被熟练技术人员识别的、用于根据上文所述方法的引物延伸或扩增程序的任意试剂或其它成分,包括用于如核酸扩增程序(如 PCR、RT-PCR)、DNA 测序程序或 DNA 标记程序所用的试剂。在其它的非互斥的变体中,试剂盒包括一个或多个提供游离核苷酸(常规的和/或非常规的)的容器。在具体的实施方案中,试剂盒包括 α -硫代磷酸酯 dNTPs、dUTP、dITP 和/或标记的 dNTPs 诸如,如荧光素-或花青苷染料家族 dNTPs。在其它的非互斥变体中,试剂盒包括一个或多个提供适合引物延伸反应的缓冲液的容器。在优选的实施方案中,试剂盒包含碱性组分,如上文所述,例如 NaOH 或 KOH。

[0148] 6、扩增子

[0149] 本发明还提供了本发明方法产生的扩增子。PCR 扩增子,例如,通常是双链的并且包含互补于本发明多核苷酸的链。扩增子包含互补于本发明多核苷酸 5' - 部分的 3' 序列段,其中所述扩增子的 3' 序列段包含至少一个、两个或更多个序列段,其中所述序列段的 3' - 末端核苷酸碱基是具有与用于生产扩增子的核苷酸集中的 NTP 相同的碱基的核苷一磷酸(NMP)。

[0150] 7、系统

[0151] 本发明进一步提供了自动实施本发明方法的系统。所述系统包含至少一个包含组合物的容器或支持物,所述组合物含有本发明的多核苷酸或扩增子或反应混合物;配置以在一个或几个温度与包含所述多核苷酸或扩增子的组合物热交流的热调节器(如核酸热循环机器;培养箱);至少一个转移试剂至容器或支持物或从容器或支持物转移试剂的试剂转移装置;以及至少一个配置以检测片段化的序列段质量的检测器(如质谱仪;荧光计)。在优选的实施方案中,系统包含至少一个与热调节器、试剂转移装置和配置以检测质量的检测器的至少一个可操作交流的控制装置。

[0152] 实施例

[0153] 下面的实施例提供来解释说明而不限本发明。

[0154] 实施例 1- 用于高通量 SNP 基因型分型的 Flag- 标签

[0155] 制备含有人类 H19 基因中 SNP 的扩增子用于分析。靶序列是 gtgaggagtgtggagtagg yGCCCAGGCATCGTGCagacaggcgacatcagc (SEQ IDNO :11) (小写字母指示与引物退火的序列,“y”指示 SNP 位置,C 或 T)。在 20 μ l 的总体积中实施 PCR,其中 2 μ l 来源于稀释至 10ng/ μ l 的基因组 DNA 样品。PCR 扩增含有下述组分:50mM N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基]甘

氨酸, pH7.5、100mMKOAc、2.75mM Mg(OAc)₂、以及 1.6% 的存储缓冲液, 其依次含有 50% 体积比的甘油、100mM KCl、0.1mM EDTA、20mM Tris pH8.0、1mM DTT 以及 0.5% Tween20。还包括在 PCR 内的是各 0.2mM 的 5-甲基-dCTP 和 dGTP、0.4mMdUTP、0.18mM rATP、0.02mM dATP 以及 0.1mM 焦磷酸。核苷酸碱基混合物含有 90% rATP 和 10% dATP。PCR 扩增中应用的酶是 0.02U/ μ l 尿嘧啶-DNA 糖基化酶 (UNG) 以及 20nM GLTDSE DNA 聚合酶。参见例如, PCT 公开号 W02008/046612 以及 W0 2009/010251。高浓度的酶原液 (8U/ μ l 以及 5 μ M, 分别地) 用于最小化甘油和 Tween 遗留。每种引物均添加至 0.2 μ M。所有反应中共有的一个引物具有序列 5'-GCTGATGTCGCCCTGTC-2'-PO₄-U-3' (SEQ ID NO:12)。SNP 询问引物是检测 H19C 等位基因 (参见图 2) 的 5'-CC **TAAGAC** TAAGACTAAGACTCGTGAGGAGTGTGGAGTAGG-2'-PO₄-C-3' (SEQ ID NO:13) 或检测 H19T 等位基因 (参见图 3) 的 5'-CC **TAGAGC** TAGAGCTAGAGCTCGTGAGGAGTGTGGAGTAGG-2'-PO₄-U-3' (SEQ ID NO:14), 或两者的 50/50 混合物。对应于靶序列的引物部分加了下划线。这些引物在其 5' 末端包括由 T 残基侧接的不同重复六聚体: 在检测 H19C 等位基因的引物中为 (3xTAAGAC = SEQ ID NO:15) 或在检测 H19T 等位基因的引物中为 (3xTAGAGC = SEQ ID NO:16) (单个六聚体已在引物序列中以粗体表示)。重复六聚体并不互补于基因组靶, 但当整合入扩增子时, 导致六聚体“flag-标签”在碱消化后释放。

[0156] 热循环条件是: 50°C 10 分钟 (UNG 灭菌); 95°C 1 分钟 (UNG 变性); 然后在 92°C 15 秒 (变性) 和在 60°C 2 分钟 (退火/延伸) 之间循环 99 次。随后在 60°C 保持 5 分钟。热循环在 ABI 9800 中实施。

[0157] 6 种不同的基因组 DNA 样品均以所有三种引物对一式两份进行测试。此外, 每个引物对做 4 份“无模板”对照。

[0158] 热循环之后, 汇集重复反应。加入碱并热处理扩增子。为使样品脱盐, 加入螯合剂并离心溶液。将上清液应用到基质并在质谱仪中分析。通过分析数据以及记录 flag 序列的出现, 确定 6 份样品中每一份在 SNP 位置的基因型。结果描绘于图 2、3 和 4。

[0159] 实施例 2- 用于传染物的高通量筛选的 Flag- 标签

[0160] 应用编码 HIV 衍生序列的 RNA 转录物来测试传染物筛选的 flag- 标签技术的应用。这些实验所用的转录物通过将 gag 区域从 HIV 株 HXB2 克隆入表达载体产生。线性化之后, 应用 T7RNA 聚合酶制备转录物。随后在聚-脱氧胸苷酸 (poly-dT) 柱上纯化转录物。靶序列是 catgcagggcctattgcaccaGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGgaagtgcacatagcaggaactactagt acccttcagga (SEQ ID NO:17) (引物序列以小写字母表示)。

[0161] 应用所述转录物的 RT-PCR 一式两份地实施, 每个反应的总体积是 50 μ l。进行的反应中每个反应具有或不具有 10⁶ 拷贝的转录物。所述反应包含有下述组分: 100mM N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基] 甘氨酸 pH 7.3、120mM KOAc、1mMMn(OAc)₂、0.2mM dGTP、0.4mM dUTP、rATP 和 dATP 的混合物, 总浓度是 0.2mM, 其中 80% 或 90% 是 rATP, 0.2mM dCTP 或 0.2mM 5-甲基-dCTP, 以及 0.15mM 焦磷酸。反应中所采用的酶是 0.02U/ μ l UNG 以及 25nM GLDSE DNA 聚合酶。参见 PCT 公开 No. W02008/046612。高浓度的酶原液 (2U/ μ l 以及 2.5 μ M, 分别地) 用于最小化甘油和 Tween 遗留。每种引物均添加至 0.2 μ M。上游引物具有序列 5'-AT **AGGT** AGGTAGGTAGGTCATGCAGGGCCTATTGCACC-2'-PO₄-A-3' (SEQ ID NO:18)。

[0162] 下游引物具有序列 5'-AT **CACT** CACTCACTCACTCCTGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTATG TCACT-2'-PO₄-U-3' (SEQ ID NO:19)。引物的与靶序列退火的部分加以下划线。这些引物在其 5' 末端包括由 T 残基侧接的不同重复四聚体:TCAC 和 TAGG (单个四聚体在引物序列中以粗体表示)。重复四聚体并不互补于转录物靶,但当整合入扩增子时,导致四聚体“flag-标签”在碱消化后释放。在这个实施例中,两条引物均含有标签。然而,如实施例 1 所展示的,并不需要标记两条引物来检测扩增子。5-甲基-dCTP 的应用在含有 C 残基和 U 残基的标签之间提供了更大的质量差异。因为 dCTP 和 dUTP 仅仅相差 1 个原子质量单位 (amu),所以难以在质量基础上加以区分。相反,dUTP 和 5-甲基-dCTP 易于通过测定质量来区分 (即相差大于一个原子质量单位)。

[0163] 热循环条件是:50°C 2 分钟 (UNG 灭菌);60°C 60 分钟 (逆转录步骤);93°C 1 分钟 (UNG 变性);然后在 92°C 15 秒 (变性)和 60°C 4 分钟 (退火/延伸)之间循环 60 次。热循环在 ABI 9700 中实施。

[0164] 从含有 80%或 90% rATP 以及 dCTP 或 5-甲基-dCTP 的反应生成了扩增子。这四种条件的阴性模板反应也同样运行。汇集所有八种条件的一式两份的反应,并准备用于分析。加入碱并热处理扩增子。为使样品脱盐,加入螯合剂并离心溶液。将上清液加到基质中并在质谱仪中分析。通过质谱分析法鉴定所有包含转录物的样品的预期标志序列,但不在不具有模板的对照样品中鉴定。结果显示在图 5、6 和 7。

[0165] 实施例 3- 在 NOS1_361 中 SNPR 的 A/G 等位基因的检测

[0166] 等位基因特异性 PCR:

[0167] 在 20 μl 中进行核糖-PCR 扩增,其具有 1ng/μl 的人类基因组 DNA,0.4 μM 的每种引物 (表 1),0.15mM 焦磷酸钠,100mM N-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基]甘氨酸/KOH pH 7.3,100mM KCOO pH7.5,3mM Mg(COO)₂,0.2mM 的每一种 (rATP, dCTP, dGTP 以及 dTTP) 以及 0.25U/μl FP-1DNA 聚合酶 (即 GLTDSE DNA 聚合酶)。PCR 的热循环概况是:92°C 4 分钟,随后是 60 个循环的 92°C 15 秒,63°C 4 分钟。这总是在 4°C 结束。将 5 μl 的 PCR 加入 2% 的琼脂糖凝胶以控制 PCR。

[0168] 表 1 提供了该实施例应用的引物序列。符号 * 指示包含 2'-PO₄ 的残基。符号 (C) 指示 2'Ome 胞苷碱基。具有下划线的序列代表了引物的 Flag 部分,并且单个七聚体在引物序列中以粗体表示。

[0169] 表 1

[0170]

引物	序列	
正向1	<u>CCTAGAAACTAGAAACTAGAACT</u> CTGATGGCTCACCATTGAAAA*	SEQ ID NO:20
正向2	<u>CCTAAAAACTAAAAACTAAAACT</u> CTGATGGCTCACCATTGAAAG*	SEQ ID NO:21
反向	GTCAATGAAGGAAGGTAG (C) A	SEQ ID NO:22

[0171] 碱切割

[0172] 为进行碱切割 (表 2),将 5.0 μl 的 1.2M 氢氧化钠加入剩余的 15 μl 的扩增反应中,终浓度为 0.3M,并在 70°C 温育 1.5 小时。

[0173] 表 2 显示了 NOS_361 的 SNP R 的 ATP 核糖-PCR 切割的片段的预测质量。带下划

线的序列代表了引物的 Flag 部分,并且单个七聚体在引物序列中以粗体表示。

[0174]

表 2

SNP	序列	SEQ ID NO:	质量	开始	结束	有义
	tca		940,6	28	26	反向
	gccca		1254,8	32	29	反向
	ttga		1284,8	69	72	正向
	tggtga		1943,2	38	33	反向
Flag A		—		23	17	反向
		—		16	10	反向
	gttttcta	—	2182,4	9	3	反向
Flag G		—		23	17	反向
		—		16	10	反向
	gtttttta	—	2197,4	9	3	反向
	ccttccttca	23	3009,9	59	68	正向
	gggggctgcta	24	3509,2	48	58	正向
G	gtcaatgaaggaaggtagcagcccccttcttca	25	10522,8	73	40	反向
A	gtcaatgaaggaaggtagcagcccccttcttca	26	10537,8	73	40	反向
A	cctagaaactagaaactagaaactctgatggctcaccattgaaaa	27	13919	1	46	正向
G	cctaaaaactaaaaactaaaaactctgatggctcaccattgaaaga	28	14230,3	1	46	正向

[0175] 纯化

[0176] 样品通过添加带有 H⁺ 的阳离子交换树脂而脱盐。将 6mg 的树脂加入到具有 MassArray[®] Clean Resin 工具试剂盒的反应中,并在室温搅拌下温育 20 分钟。其后,在

134xg 离心样品 2 分钟以沉降树脂。

[0177] MALDI-TOF MS :

[0178] 三羟苯乙酮 (THAP) 用作基质。为了制备, 0.5 μ l 的 0.2M 溶于 50% 乙腈的 2,4,6 以及 2,3,4THAP 以及 0.3M 溶于水中的柠檬酸铵以 6/3/2 (体积比) 沉积在 MALDI 靶盘 (AnchorChip™ 靶, 具有 400 μ m 大小的点, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, 德国) 的锚定位置。然后, 加入 0.5 μ l 的上清液并在室温干燥。

[0179] 将靶引入 MALDI-TOF 质谱仪 (Autoflex, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, 德国) 用于分析。质谱分析法分析 (图 8) 在阴离子模式下执行, 加速电压为 20kV, 应用线性的 100ns 脉冲离子提取延迟 (pulsed ion extraction delay) 并进行外部校准。获得的每个谱是 200 个激光发射 (laser shot) 的总和。

[0180] 应当理解, 此处的实施例和实施方案仅用于解释的目的, 且根据它的各种不同的修饰或变化将是本领域技术人员可预料的, 并被包括在本申请的精神和范围以及附加的权利要求的范围内。

[0181] 序列表

[0182] <110>F. Hoffmann-La Roche AG

[0183] Centre National de Génotypage (CNG)

[0184] <120> 核糖核苷酸标记核酸检测

[0185] <130>23855 KOE

[0186] <150>US 61/046,720

[0187] <151>2008-04-21

[0188] <160>28

[0189] <170>PatentIn Ver. 2.1

[0190] <210>1

[0191] <211>11

[0192] <212>DNA

[0193] <213> 人工序列

[0194] <220>

[0195] <223> 人工序列描述 : 具有 3 个序列段重复的多核苷酸靶核酸的 5' 部分

[0196] <220>

[0197] <221>modified_base

[0198] <222>(1)

[0199] <223>n = 任何核苷酸

[0200] <400>1

[0201] ntaataataa t

11

[0202] <210>2

[0203] <211>11

[0204] <212>DNA

[0205] <213> 人工序列

[0206] <220>

[0207] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 : 含有整合的核酸核苷酸的具有 3 个序列段重复的多核苷酸

[0208] 靶核酸的 5' 部分的互补链

[0209] <220>

[0210] <223> 人工序列描述 : 含有整合的核酸核苷酸的具有 3 个序列段重复的多核苷酸靶核酸的 5'

[0211] 部分的互补链

[0212] <220>

[0213] <221>modified_base

[0214] <222>(1)

[0215] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)

[0216] <220>

[0217] <221>modified_base

[0218] <222>(4)

[0219] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)

[0220] <220>

[0221] <221>modified_base

[0222] <222>(7)

[0223] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)

[0224] <220>

[0225] <221>modified_base

[0226] <222>(10)

[0227] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)

[0228] <220>

[0229] <221>modified_base

[0230] <222>(11)

[0231] <223>n = 与 SEQ ID NO:1 的位置 1 互补的任何核苷酸

[0232] <400>2

[0233] attattatta n 11

[0234] <210>3

[0235] <211>13

[0236] <212>DNA

[0237] <213> 人工序列

[0238] <220>

[0239] <223> 人工序列描述 : 具有相同的串联重复序列段的 5' - 部分或 5' - 尾的多核苷酸

[0240] <400>3

[0241] tagctagcta gct 13

[0242] <210>4

- [0243] <211>14
- [0244] <212>DNA
- [0245] <213> 人工序列
- [0246] <220>
- [0247] <223> 人工序列描述 :具有相同的串联重复序列段和在 5' - 末端的额外核苷酸碱基的多核苷
- [0248] 酸 5' - 部分或 5' - 尾
- [0249] <220>
- [0250] <221>modified_base
- [0251] <222>(1)
- [0252] <223>n = 任何核苷酸
- [0253] <400>4
- [0254] ntagctagct agct 14
- [0255] <210>5
- [0256] <211>13
- [0257] <212>DNA
- [0258] <213> 人工序列
- [0259] <220>
- [0260] <223> 人工序列描述 :具有不同的串联序列段的多核苷酸 5' - 部分或 5' - 尾
- [0261] <400>5
- [0262] tagctcagtg cat 13
- [0263] <210>6
- [0264] <211>16
- [0265] <212>DNA
- [0266] <213> 人工序列
- [0267] <220>
- [0268] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 :上游引物中重复四聚体的反向互补体
- [0269] <220>
- [0270] <223> 人工序列描述 :上游引物中重复四聚体的反向互补体 (4 CCUA)
- [0271] <220>
- [0272] <221>modified_base
- [0273] <222>(3)
- [0274] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0275] <220>
- [0276] <221>modified_base
- [0277] <222>(4)
- [0278] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0279] <220>
- [0280] <221>modified_base

- [0281] <222>(7)
- [0282] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0283] <220>
- [0284] <221>modified_base
- [0285] <222>(8)
- [0286] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0287] <220>
- [0288] <221>modified_base
- [0289] <222>(11)
- [0290] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0291] <220>
- [0292] <221>modified_base
- [0293] <222>(12)
- [0294] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0295] <220>
- [0296] <221>modified_base
- [0297] <222>(15)
- [0298] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0299] <220>
- [0300] <221>modified_base
- [0301] <222>(16)
- [0302] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0303] <400>6
- [0304] ccnaccnacc naccna 16
- [0305] <210>7
- [0306] <211>16
- [0307] <212>DNA
- [0308] <213> 人工序列
- [0309] <220>
- [0310] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 : 下游引物中重复四聚体的反向互补体 (4 GUGA)
- [0311] <220>
- [0312] <223> 人工序列描述 : 下游引物中重复四聚体的反向互补体 (4 GUGA)
- [0313] <220>
- [0314] <221>modified_base
- [0315] <222>(2)
- [0316] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0317] <220>
- [0318] <221>modified_base
- [0319] <222>(4)

- [0320] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0321] <220>
- [0322] <221>modified_base
- [0323] <222>(6)
- [0324] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0325] <220>
- [0326] <221>modified_base
- [0327] <222>(8)
- [0328] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0329] <220>
- [0330] <221>modified_base
- [0331] <222>(10)
- [0332] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0333] <220>
- [0334] <221>modified_base
- [0335] <222>(12)
- [0336] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0337] <220>
- [0338] <221>modified_base
- [0339] <222>(14)
- [0340] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0341] <220>
- [0342] <221>modified_base
- [0343] <222>(16)
- [0344] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0345] <400>7
- [0346] gngagngagn gagnga 16
- [0347] <210>8
- [0348] <211>16
- [0349] <212>DNA
- [0350] <213> 人工序列
- [0351] <220>
- [0352] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 : 上游引物中重复四聚体的反向互补体 (4 CmeCmeUA)
- [0353] <220>
- [0354] <223> 人工序列描述 : 上游引物中重复四聚体的反向互补体 (4 CmeCmeUA)
- [0355] <220>
- [0356] <221>modified_base
- [0357] <222>(1).. (2)

[0358] <223>c = cm
[0359] <220>
[0360] <221>modified_base
[0361] <222>(3)
[0362] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
[0363] <220>
[0364] <221>modified_base
[0365] <222>(4)
[0366] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
[0367] <220>
[0368] <221>modified_base
[0369] <222>(5).. (6)
[0370] <223>c = cm
[0371] <220>
[0372] <221>modified_base
[0373] <222>(7)
[0374] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
[0375] <220>
[0376] <221>modified_base
[0377] <222>(8)
[0378] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
[0379] <220>
[0380] <221>modified_base
[0381] <222>(9).. (10)
[0382] <223>c = cm
[0383] <220>
[0384] <221>modified_base
[0385] <222>(11)
[0386] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
[0387] <220>
[0388] <221>modified_base
[0389] <222>(12)
[0390] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
[0391] <220>
[0392] <221>modified_base
[0393] <222>(13).. (14)
[0394] <223>c = cm
[0395] <220>
[0396] <221>modified_base

- [0397] <222>(15)
- [0398] <223>n = 脱氧尿苷 (dU)
- [0399] <220>
- [0400] <221>modified_base
- [0401] <222>(16)
- [0402] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸) 脱氧腺苷
- [0403] <400>8
- [0404] ccnaccnacc naccna 16
- [0405] <210>9
- [0406] <211>21
- [0407] <212>DNA
- [0408] <213> 人工序列
- [0409] <220>
- [0410] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 : 上游引物中重复六聚体的反向互补体 (3 GTTTCTA)
- [0411] <220>
- [0412] <223> 人工序列描述 : 上游引物中重复六聚体的反向互补体 (3 GTTTCTA)
- [0413] <220>
- [0414] <221>modified_base
- [0415] <222>(7)
- [0416] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0417] <220>
- [0418] <221>modified_base
- [0419] <222>(14)
- [0420] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0421] <220>
- [0422] <221>modified_base
- [0423] <222>(21)
- [0424] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0425] <400>9
- [0426] gtttctagtt tctagtttct a 21
- [0427] <210>10
- [0428] <211>21
- [0429] <212>DNA
- [0430] <213> 人工序列
- [0431] <220>
- [0432] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 : 下游引物中重复六聚体的反向互补体 (3 GTTTTTA)
- [0433] <220>

- [0434] <223> 人工序列描述 :下游引物中重复六聚体的反向互补体 (3 GTTTTTA)
- [0435] <220>
- [0436] <221>modified_base
- [0437] <222>(7)
- [0438] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0439] <220>
- [0440] <221>modified_base
- [0441] <222>(14)
- [0442] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0443] <220>
- [0444] <221>modified_base
- [0445] <222>(21)
- [0446] <223>a = 腺苷 (腺嘌呤核糖核苷酸)
- [0447] <400>10
- [0448] gtttttagtt ttttagttttt a 21
- [0449] <210>11
- [0450] <211>53
- [0451] <212>DNA
- [0452] <213> 人工序列
- [0453] <220>
- [0454] <223> 人工序列描述 :人 H19 基因 SNP 靶序列
- [0455] <400>11
- [0456] gtgaggagtg tggagtaggy gcccaggcat cgtgcagaca gggcgacatc agc 53
- [0457] <210>12
- [0458] <211>18
- [0459] <212>DNA
- [0460] <213> 人工序列
- [0461] <220>
- [0462] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 :所有人 H19 基因 SNP 反应共同的 PCR 扩增引物
- [0463] <220>
- [0464] <223> 人工序列描述 :所有人 H19 基因 SNP 反应共同的 PCR 扩增引物
- [0465] <220>
- [0466] <221>modified_base
- [0467] <222>(17)
- [0468] <223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 c
- [0469] <400>12
- [0470] gctgatgtcg ccctgtnu 18
- [0471] <210>13
- [0472] <211>42

- [0473] <212>DNA
- [0474] <213> 人工序列
- [0475] <220>
- [0476] <223> 人工序列描述 :检测 H19C 等位基因的人 H19 基因 SNP PCR 扩增 SNP 询问引物
- [0477] <220>
- [0478] <221>modified_base
- [0479] <222>(41)
- [0480] <223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 g
- [0481] <400>13
- [0482] cctaagacta agactaagac tcgtgaggag tgtggagtag nc 42
- [0483] <210>14
- [0484] <211>42
- [0485] <212>DNA
- [0486] <213> 人工序列
- [0487] <220>
- [0488] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 :检测 H19T 等位基因的人 H19 基因 SNP PCR 扩增 SNP 询问引物
- [0489] 物
- [0490] <220>
- [0491] <223> 人工序列描述 :检测 H19T 等位基因的人 H19 基因 SNP PCR 扩增 SNP 询问引物
- [0492] <220>
- [0493] <221>modified_base
- [0494] <222>(41)
- [0495] <223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 g
- [0496] <400>14
- [0497] cctagagcta gagctagagc tcgtgaggag tgtggagtag nu 42
- [0498] <210>15
- [0499] <211>18
- [0500] <212>DNA
- [0501] <213> 人工序列
- [0502] <220>
- [0503] <223> 人工序列描述 :检测 H19C 等位基因的引物中的 5' - 末端重复六聚体
- [0504] <400>15
- [0505] taagactaag actaagac 18
- [0506] <210>16
- [0507] <211>18
- [0508] <212>DNA

- [0509] <213> 人工序列
- [0510] <220>
- [0511] <223> 人工序列描述 :检测 H19T 等位基因的引物中的 5' - 末端重复六聚体
- [0512] <400>16
- [0513] tagagctaga gctagagc 18
- [0514] <210>17
- [0515] <211>80
- [0516] <212>DNA
- [0517] <213> 人工序列
- [0518] <220>
- [0519] <223> 人工序列描述 :HIV 株 HXB2 gag 区靶序列
- [0520] <400>17
- [0521] catgcagggc ctattgcacc aggccagatg agagaaccaa ggggaagtga catagcagga 60
- [0522] actactagta cccttcagga 80
- [0523] <210>18
- [0524] <211>39
- [0525] <212>DNA
- [0526] <213> 人工序列
- [0527] <220>
- [0528] <223> 人工序列描述 :HIV 株 HXB2 gag 区 RT-PCR 上游引物
- [0529] <220>
- [0530] <221>modified_base
- [0531] <222>(38)
- [0532] <223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 c
- [0533] <400>18
- [0534] ataggtaggt aggtaggtca tgcagggcct attgcacna 39
- [0535] <210>19
- [0536] <211>53
- [0537] <212>DNA
- [0538] <213> 人工序列
- [0539] <220>
- [0540] <223> 组合的 DNA/RNA 分子描述 :HIV 株 HXB2 gag 区 RT-PCR 下游引物
- [0541] <220>
- [0542] <223> 人工序列描述 :HIV 株 HXB2 gag 区 RT-PCR 下游引物
- [0543] <220>
- [0544] <221>modified_base
- [0545] <222>(52)
- [0546] <223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 t
- [0547] <400>19

[0548]	atcactcact cactcactcc tgaagggtac tagtagttcc tgctatgtca cnu	53
[0549]	<210>20	
[0550]	<211>45	
[0551]	<212>DNA	
[0552]	<213> 人工序列	
[0553]	<220>	
[0554]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R ATP 核糖 -PCR 扩增正向引物 1	
[0555]	<220>	
[0556]	<221>modified_base	
[0557]	<222>(45)	
[0558]	<223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 a	
[0559]	<400>20	
[0560]	cctagaaact agaaactaga aactctgatg gctcaccatt gaaan	45
[0561]	<210>21	
[0562]	<211>45	
[0563]	<212>DNA	
[0564]	<213> 人工序列	
[0565]	<220>	
[0566]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R ATP 核糖 -PCR 扩增正向引物 2	
[0567]	<220>	
[0568]	<221>modified_base	
[0569]	<222>(45)	
[0570]	<223>n = 由 2' - 磷酸修饰的 g	
[0571]	<400>21	
[0572]	cctaaaaact aaaaactaaa aactctgatg gctcaccatt gaaan	45
[0573]	<210>22	
[0574]	<211>20	
[0575]	<212>DNA	
[0576]	<213> 人工序列	
[0577]	<220>	
[0578]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R ATP 核糖 -PCR 扩增反向引物	
[0579]	<220>	
[0580]	<221>modified_base	
[0581]	<222>(19)	
[0582]	<223>c = cm	
[0583]	<400>22	
[0584]	gtcaatgaag gaaggtagca	20
[0585]	<210>23	
[0586]	<211>10	

[0587]	<212>DNA	
[0588]	<213> 人工序列	
[0589]	<220>	
[0590]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R 的 ATP 核糖 -PCR 的正向有义碱切割片段	
[0591]	<400>23	
[0592]	ccttccttca	10
[0593]	<210>24	
[0594]	<211>11	
[0595]	<212>DNA	
[0596]	<213> 人工序列	
[0597]	<220>	
[0598]	<223> 人工序列描述 :NOS_1361 中 SNP R 的 ATP 核糖 -PCR 的正向有义碱切割片段	
[0599]	<400>24	
[0600]	gggggctgct a	11
[0601]	<210>25	
[0602]	<211>34	
[0603]	<212>DNA	
[0604]	<213> 人工序列	
[0605]	<220>	
[0606]	<223> 人工序列描述 :NOS_1361 中 SNP R 的 ATP 核糖 -PCR 的反向有义碱切割片段	
[0607]	<400>25	
[0608]	gtcaatgaag gaaggtagca gcccccttct ttca	34
[0609]	<210>26	
[0610]	<211>34	
[0611]	<212>DNA	
[0612]	<213> 人工序列	
[0613]	<220>	
[0614]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R 的 ATP 核糖 -PCR 的反向有义碱切割片段	
[0615]	<400>26	
[0616]	gtcaatgaag gaaggtagca gccccctttt ttca	34
[0617]	<210>27	
[0618]	<211>45	
[0619]	<212>DNA	
[0620]	<213> 人工序列	
[0621]	<220>	
[0622]	<223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R ATP 核糖 -PCR 正向有义扩增引物	
[0623]	<400>27	
[0624]	cctagaaact agaaactaga aactctgatg gctcaccatt gaaaa	45
[0625]	<210>28	

-
- [0626] <211>46
- [0627] <212>DNA
- [0628] <213> 人工序列
- [0629] <220>
- [0630] <223> 人工序列描述 :NOS1_361 中 SNP R ATP 核糖 -PCR 正向有义扩增引物
- [0631] <400>28
- [0632] cctaaaaact aaaaactaaa aactctgatg gctcaccatt gaaaga 46

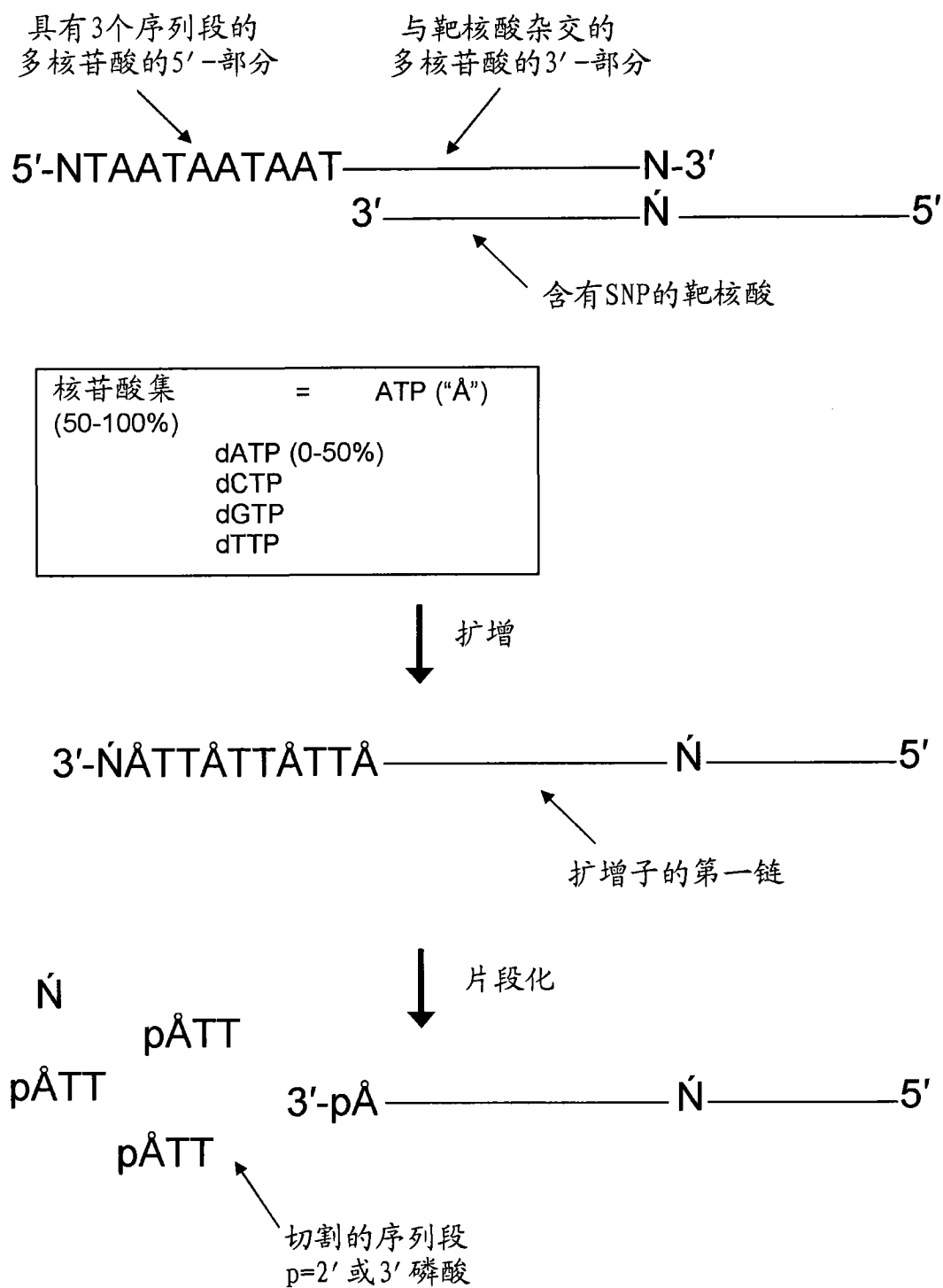


图 1

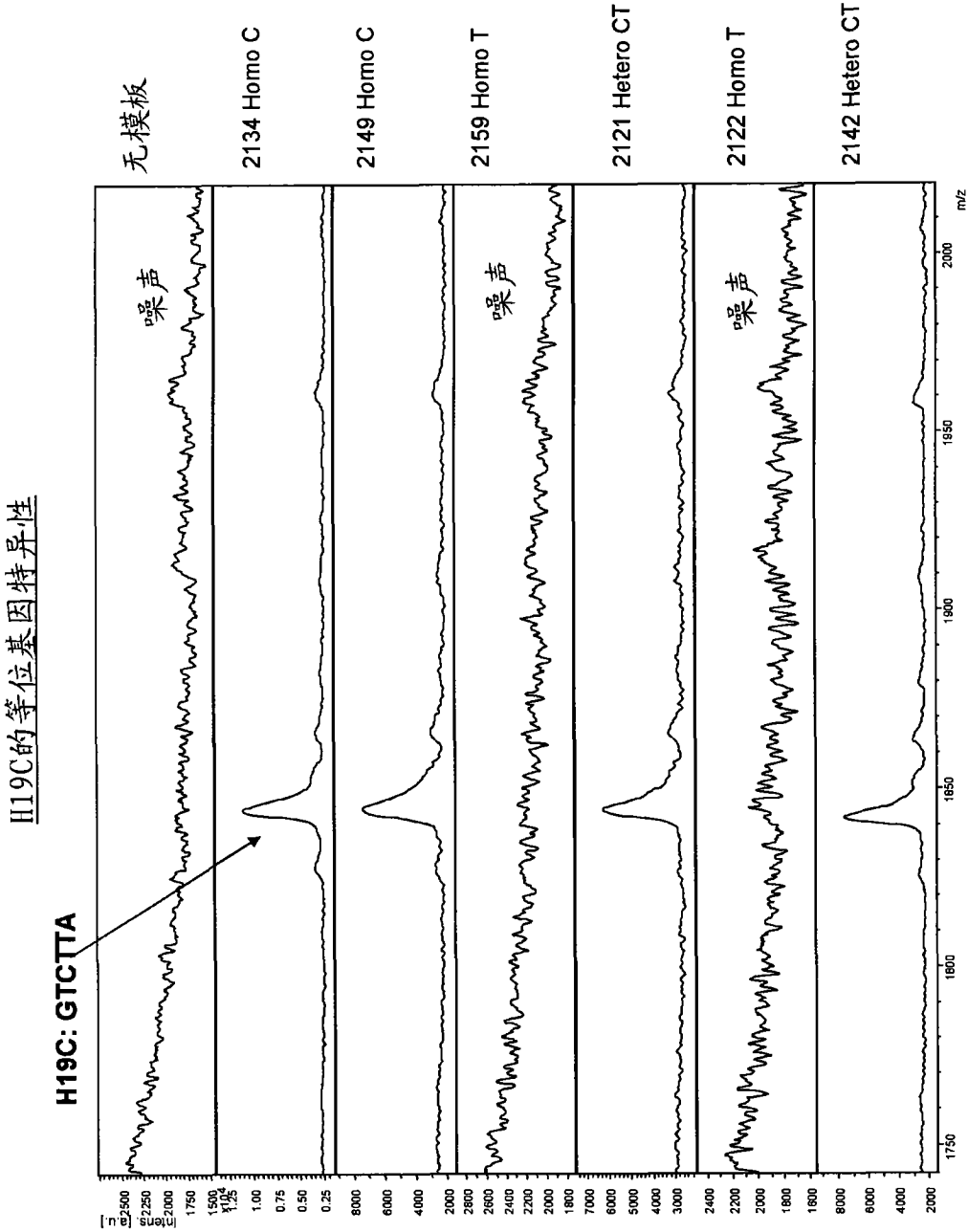


图 2

H19T的等位基因特异性

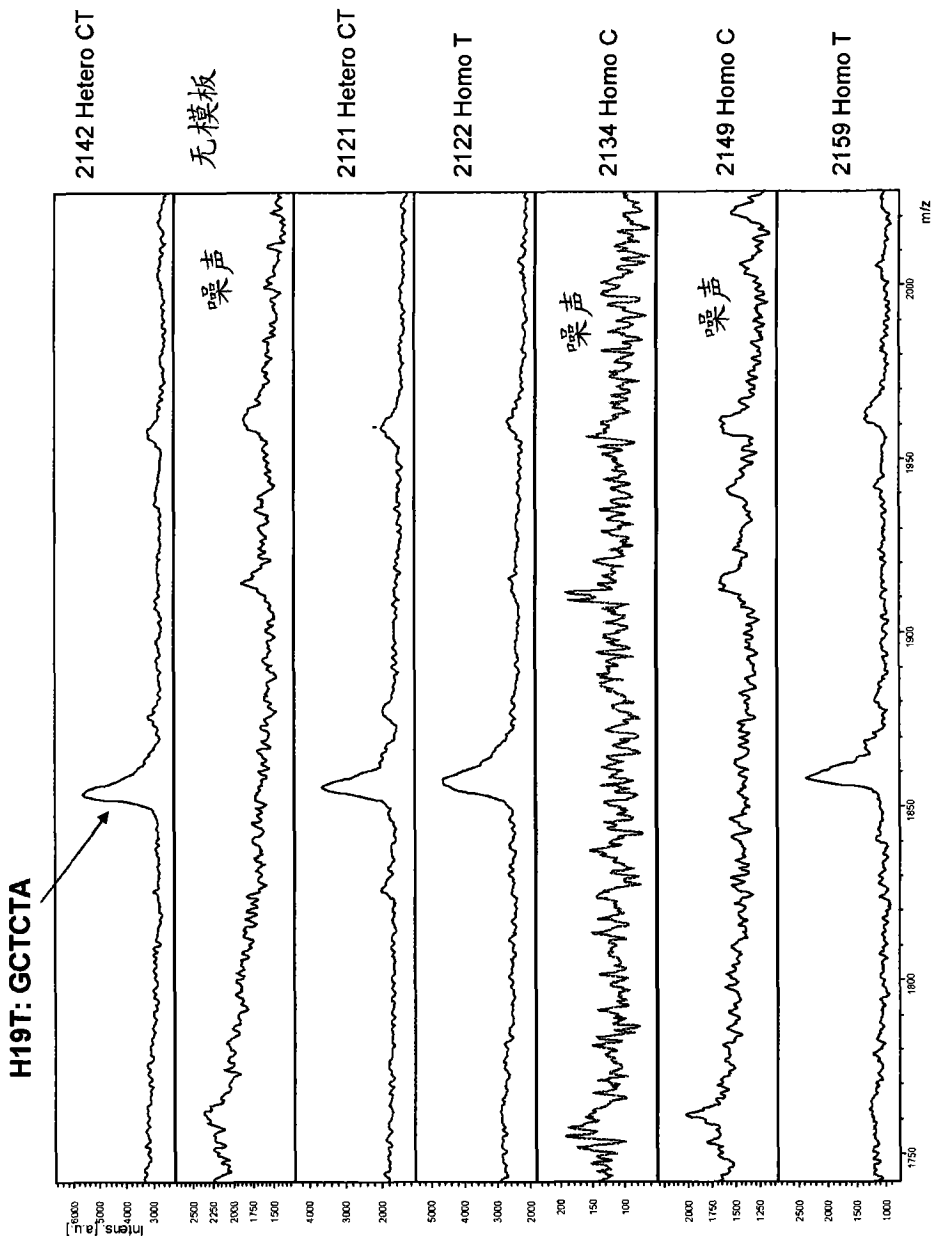


图 3

H19C & H19T的等位基因特异性

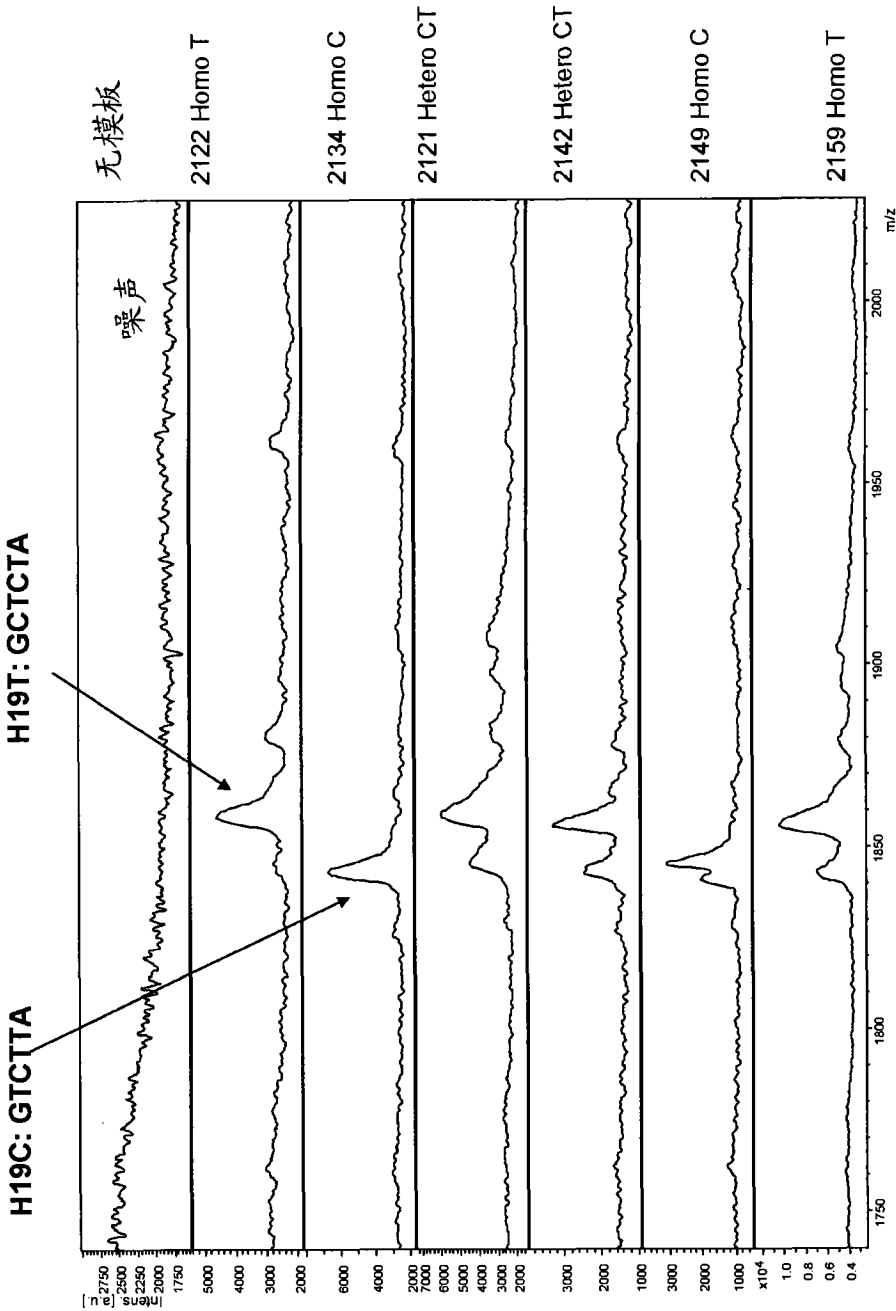


图 4

具有dU和dC的80或90% rATP的标签

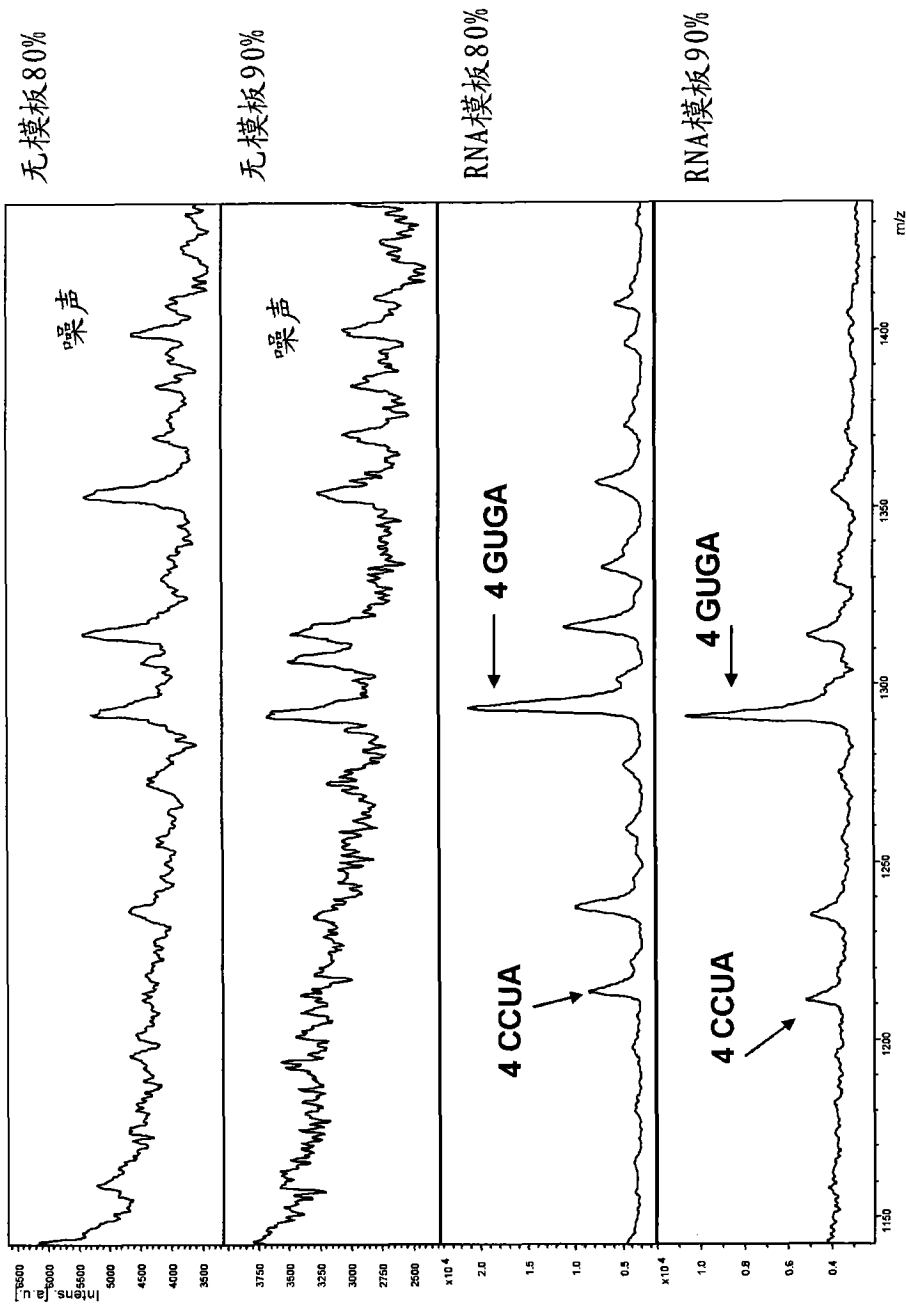


图 5

具有dU和5-Me-dC的80或90% rATP的标签

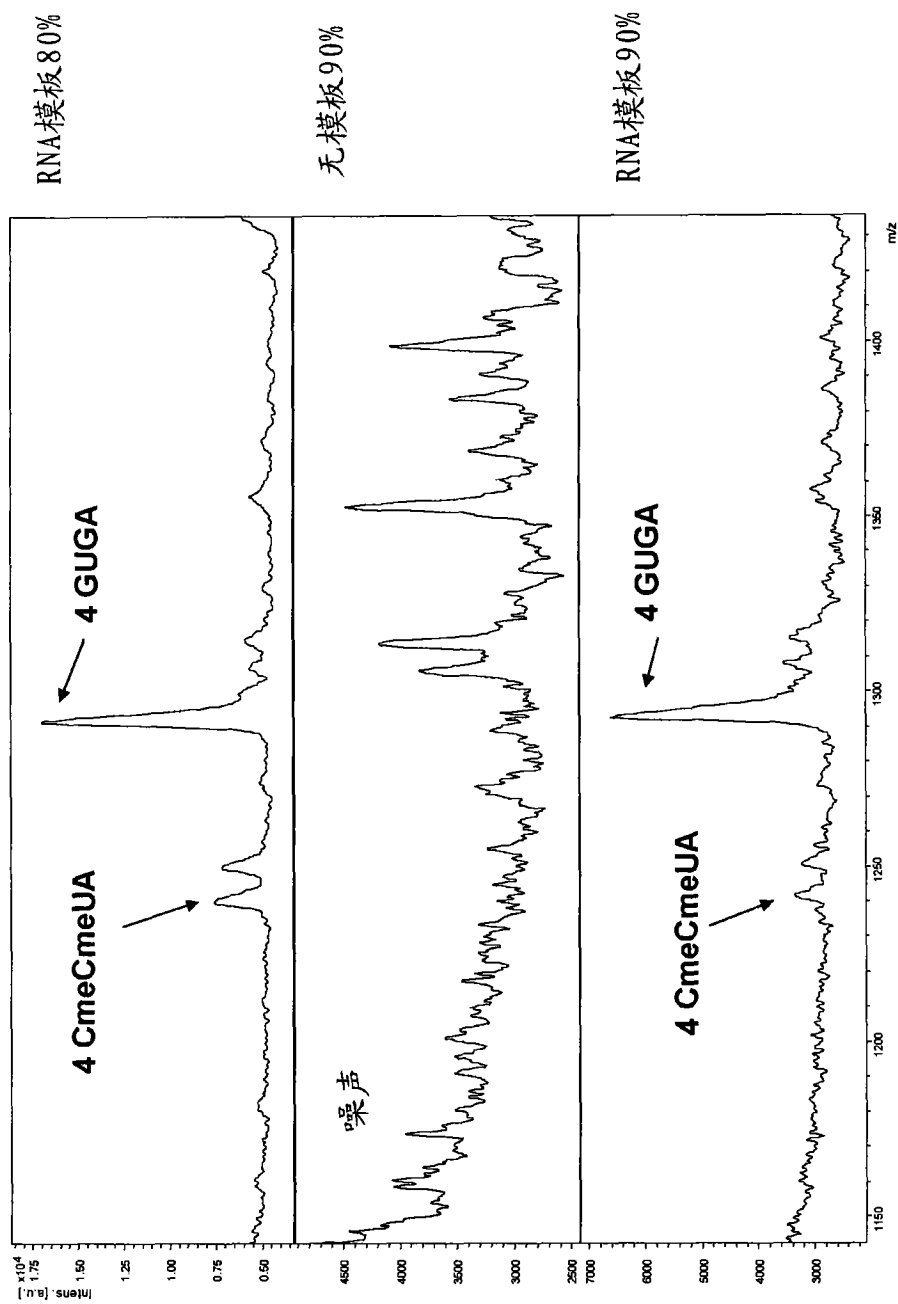


图 6

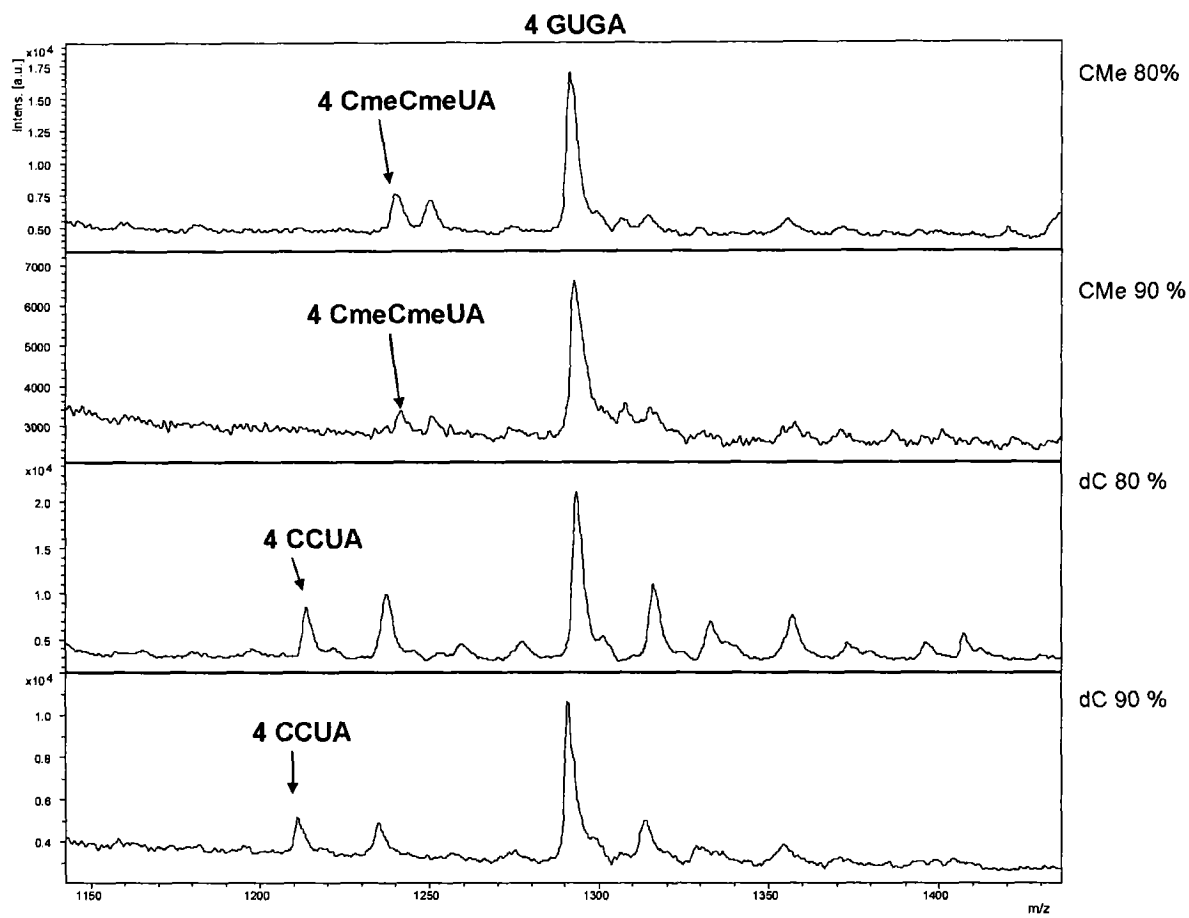
RNA模板的HIV样品的标签

图 7

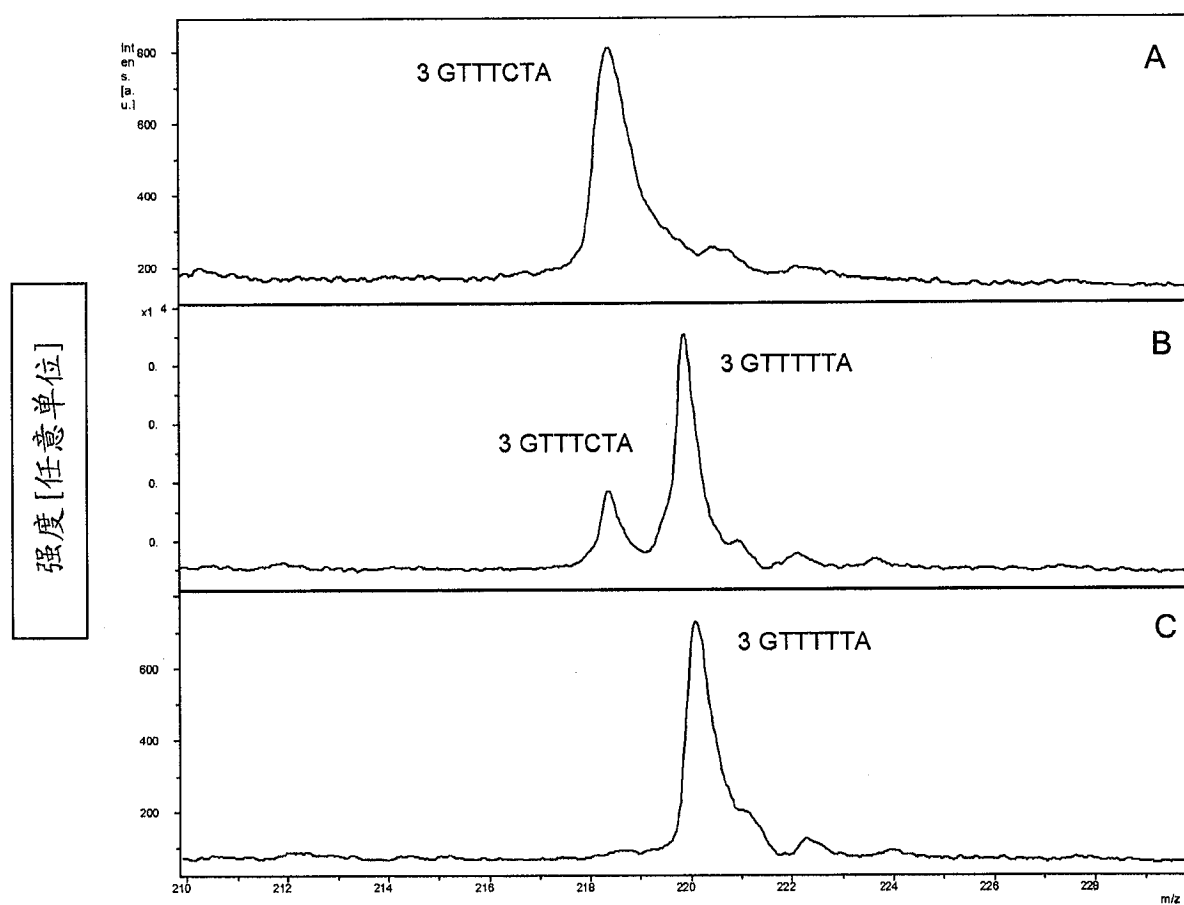


图 8