



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102686728 B

(45)授权公告日 2018.09.18

(21)申请号 201080035685.3

(22)申请日 2010.06.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102686728 A

(43)申请公布日 2012.09.19

(30)优先权数据

61/221,271 2009.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.02.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/040354 2010.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/008530 EN 2011.01.20

(73)专利权人 卢米耐克斯公司

地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 道格拉斯·F·惠特曼 张宏伟

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 田旻

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/6816(2018.01)

C12Q 1/6823(2018.01)

C12Q 1/6834(2018.01)

C12Q 1/6853(2018.01)

(56)对比文件

US 2007/0160992 A1,2007.07.12,全文.

US 2008/0138803 A1,2008.06.12,全文.

US 2009/0136956 A1,2009.05.28,全文.

CN 1836050 A,2006.09.20,权利要求26-27,32,74,说明书附图图2.

W0 2009/074882 A2,2009.06.18,全文.

审查员 张锦广

权利要求书6页 说明书45页
序列表11页 附图23页

(54)发明名称

具有发夹构象的嵌合引物及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了用于核酸扩增、检测和基因分型技术的方法和组合物。在一个实施方案中,公开了一种核酸分子,其具有靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5'的抗标签序列、抗标签序列5'的标签序列以及抗标签序列和标签序列之间的间隔区。本发明还公开了包含所述核酸分子的组合物以及利用所述核酸分子的方法。

1. 一种用作引物的核酸分子,其包含:
 - (a) 10-40个核苷酸长的靶标特异性引物序列;
 - (b) 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;
 - (c) 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和
 - (d) 所述抗标签序列与所述标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区。
2. 权利要求1的核酸分子,其中所述抗标签序列和标签序列的长度各为12至24个核苷酸。
3. 权利要求1的核酸分子,其中所述抗标签序列的长度为12个核苷酸。
4. 权利要求1的核酸分子,其中所述抗标签序列和标签序列的长度均为24个核苷酸。
5. 权利要求1的核酸分子,其中所述间隔区是iSp18部分或者iMe-isodC部分。
6. 一种组合物,其包含:
 - (a) 微球;
 - (b) 与所述微球共价连接的第一抗标签核酸;
 - (c) 与所述第一抗标签核酸杂交的标签核酸,其中所述抗标签核酸和所述标签核酸各自为6至60个核苷酸长;
 - (d) 共价连接在所述标签序列3' 的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;
 - (e) 第二抗标签核酸,其具有与所述第一抗标签核酸中至少8个连续核苷酸一致的序列,并且共价连接在所述间隔区的3' ;
 - (f) 共价连接在所述第二抗标签核酸3' 的10-40个核苷酸长的靶标特异性核酸;
 - (g) 与所述第二抗标签核酸和靶标特异性核酸杂交的核酸分子,其中所述核酸分子包含与所述抗标签核酸和所述靶标特异性核酸互补的序列。
7. 权利要求6的组合物,其中所述微球被荧光标记。
8. 权利要求6的组合物,其中所述微球是磁性的。
9. 权利要求6的组合物,其中与所述第二抗标签核酸和所述靶标特异性核酸杂交的核酸分子与报告物分子共价偶联。
10. 一种组合物,其包含:
 - (a) 第一核酸分子,其中所述第一核酸分子是引物对的第一成员,其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;
 - (ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和
 - (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;
 - (b) 第二核酸分子,其中所述第二核酸分子是引物对的第二成员,其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;
 - (ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的通用标签序列,其中所述通用抗标签序列和所述通用标签序列各自为6至60个核苷酸长;和

- (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区；
- (c) 第三核酸分子,其包含:
 - (i) 与所述通用标签序列互补的通用抗标签序列;和
 - (ii) 标记物。
- 11. 权利要求10的组合物,其中所述标记物是荧光标记物。
- 12. 权利要求11的组合物,其中所述荧光标记物是Cy3标记物。
- 13. 一种组合物,其包含用于扩增多种不同靶序列的多个引物对,每个引物对包含:
 - (a) 第一核酸分子,其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;
 - (ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和
 - (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;
 - (b) 第二核酸分子,其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;
 - (ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的通用标签序列,其中所述通用抗标签序列和所述通用标签序列各自为6至60个核苷酸长;和
 - (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;
 - (c) 经标记的通用抗标签分子,其包含:
 - (i) 与所述通用标签序列互补的通用抗标签序列;和
 - (ii) 标记物。
- 14. 权利要求13的组合物,其还包含与多种经编码微球共价连接的多种抗标签核酸分子,其中所述多种抗标签分子包含与所述多个引物对中之标签序列互补的抗标签序列,并且其中每个所述抗标签核酸分子的身份能够通过与其共价连接之经编码微球的编码来确定。
- 15. 一种扩增靶核酸的方法,其包括:
 - (a) 提供第一引物对,其包含:
 - (i) 第一引物,其包含:
 - 10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;
 - 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;
 - 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和
 - 所述抗标签序列和标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;和
 - (ii) 第二引物,其包含:
 - 10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;以及
 - (b) 提供报告物;
 - (c) 提供包含与固体支持物连接之抗标签序列的捕获复合物;以及
 - (d) 通过在适于扩增所述靶核酸的条件下将所述第一引物对、报告物、捕获复合物和包

含靶核酸的样品相组合对所述靶核酸进行扩增。

16. 权利要求15的方法,其还包括使经扩增的核酸与所述捕获复合物中的抗标签序列杂交。

17. 权利要求15的方法,其中所述报告物与所述第二引物连接。

18. 权利要求15的方法,其中所述报告物与dNTP连接。

19. 权利要求15的方法,其中所述报告物是DNA嵌入剂。

20. 权利要求15的方法,其中所述固体支持物是微球。

21. 权利要求20的方法,其中所述微球是磁性的并且被荧光标记。

22. 权利要求15的方法,其中所述靶核酸的扩增是由具有链置换活性但不具有外切核酸酶活性的聚合酶所催化的。

23. 权利要求16的方法,其还包括对所扩增的核酸进行检测。

24. 权利要求23的方法,其中对经扩增之核酸的检测包括对与所述捕获复合物结合的进行扩增靶核酸序列进行成像。

25. 权利要求15的方法,其中所述样品包含至少一种第二靶核酸。

26. 权利要求25的方法,其中将至少一种第二引物对与所述第一引物对、报告物、捕获复合物和包含靶核酸的样品在适于扩增所述靶核酸的条件下相组合。

27. 权利要求26的方法,其还包括使不同的经扩增靶核酸与可区分之捕获复合物中的不同抗标签序列杂交。

28. 权利要求27的方法,其中所述捕获复合物是空间上可区分的。

29. 权利要求27的方法,其中所述捕获复合物是光学可区分的。

30. 多个引物对以及经标记的通用抗标签分子用于制造用于检测样品中的微生物之组合物的用途,其中所述检测包括:

(a) 提供所述多个引物对,用于从多种不同微生物中扩增多种不同的靶核酸序列,每个引物对包含:

(i) 第一引物,其包含:

10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;

所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;

所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和

所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;和

(ii) 第二引物,其包含:

10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;

所述靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;

所述抗标签序列5' 的通用标签序列,其中所述通用抗标签序列和所述通用标签序列各自为6至60个核苷酸长;和

所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;以及

(b) 提供所述经标记的通用抗标签分子,其包含:

(i) 与所述通用标签序列互补的通用抗标签序列;和

(ii) 标记物;

(c) 提供包含与固体支持物连接之抗标签序列的多种捕获复合物；

(d) 通过在适于扩增所述靶核酸序列的条件下将多个引物对、经标记的通用抗标签分子、捕获复合物和样品相组合，而在所述样品中存在微生物的情况下扩增来自不同微生物的靶核酸序列；

(e) 使经扩增的靶核酸序列与其相应捕获复合物中的相应抗标签序列杂交；以及

(f) 通过对与其相应捕获复合物结合的经扩增靶核酸序列进行检测来检测所述样品中存在的微生物。

31. 权利要求30的用途，其中所述微生物是细菌。

32. 权利要求30的用途，其中所述微生物是病原体。

33. 权利要求30的用途，其中所述微生物是逆转录病毒、病毒或者真菌。

34. 权利要求30的用途，其中所述样品是患者样品。

35. 权利要求34的用途，其中所述患者样品是血液样品、血清样品或者脑脊液样品。

36. 权利要求30的用途，其中所述样品是环境样品。

37. 权利要求36的用途，其中所述环境样品是水样品或者土壤样品。

38. 权利要求30的用途，其中所述多种不同的靶核酸序列是由RNA序列逆转录获得的cDNA序列。

39. 权利要求30的用途，其中所述检测包括提供5至30个引物对。

40. 权利要求30的用途，其中所述检测包括对1至10种不同的微生物进行检测。

41. 对基因表达进行定量的方法，其包括：

(a) 将由mRNA逆转录形成的cDNA固定；

(b) 使经固定的cDNA与10-40个核苷酸长的包含通用引物结合序列和cDNA特异性序列的第一寡核苷酸以及10-40个核苷酸长的包含独特引物结合序列和cDNA特异性序列的第二寡核苷酸杂交；

(c) 使所述第一寡核苷酸与第二寡核苷酸连接，以形成经连接的寡核苷酸；

(d) 利用通用引物和独特引物对经连接的寡核苷酸进行扩增，所述独特引物包含独特引物序列、该独特引物序列5'的抗标签序列、该抗标签序列5'的标签序列以及所述抗标签序列和标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区，其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长；

(e) 通过使扩增子的标签序列与捕获复合物的抗标签序列杂交，从而捕获扩增子；

(f) 对所述扩增子进行标记；以及

(g) 对所捕获的经标记扩增子进行检测和定量。

42. 权利要求41的方法，其包括在经oligo-dT包被的孔或珠上捕获mRNA并且使其逆转录。

43. 权利要求41的方法，其中所述通用引物是T3引物。

44. 权利要求41的方法，其中所述对所捕获扩增子进行标记是利用DNA结合染料实现的。

45. 权利要求41的方法，其中对多种不同基因的表达进行定量，并且针对每个不同的基因具有不同的标签、抗标签和捕获复合物。

46. 权利要求41的方法，其中所述扩增子在捕获前被标记。

47. 权利要求41的方法,其中所述扩增子在捕获后被标记。

48. 一种组合物,其包含:

(a) 第一核酸分子,其中所述第一核酸分子是引物对的第一成员,其包含:

(i) 10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;

(ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;

(iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和

(iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;

(b) 第二核酸分子,其中所述第二核酸分子是引物对的第二成员,其包含:

(i) 10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;

(ii) 所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;

(iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;和

(iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;

(c) 第三核酸分子,其包含:

(i) 与所述第一和第二核酸分子上的标签序列互补的抗标签序列;和

(ii) 标记物。

49. 一种对靶核酸进行扩增的方法,其包括:

(a) 提供第一引物对,其包含:

(i) 10-40个核苷酸长的第一靶标特异性引物序列;

所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;

所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;

所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;和
与所述标签序列连接的生色团;和

(ii) 第二引物,其包含:

10-40个核苷酸长的第二靶标特异性引物序列;

所述靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;

所述抗标签序列5' 的标签序列,其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;

所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区;和
与所述标签序列连接的生色团;和

(b) 经标记的核酸分子,其包含:

(i) 与所述第一引物对中的标签序列互补的抗标签序列;和

(ii) 能够与所述第一引物对中的生色团发生福斯特共振能量转移的生色团;和

(d) 通过在适于扩增所述靶核酸的条件下将所述第一引物对、标记物核酸分子和包含所述靶核酸的样品相组合来对所述靶核酸进行扩增。

50. 权利要求49的方法,其中所述靶核酸的扩增是由具有链置换活性但不具有外切核酸酶活性的聚合酶所催化的。

51. 权利要求49的方法, 其还包括对经扩增的核酸进行检测。
52. 权利要求51的方法, 其中所述检测是实时的。
53. 权利要求49的方法, 其中所述样品包含至少一种第二靶核酸。
54. 权利要求49的方法, 其中所述靶核酸是扩增子。
55. 一种检测核酸切割反应之切割产物的方法, 其包括:
- (a) 提供一种寡核苷酸探针, 其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的切割产物特异性序列;
 - (ii) 所述切割产物特异性序列5' 的抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列, 其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;
 - (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区; 和
 - (v) 标记物;
 - (b) 使所述寡核苷酸探针与所述切割产物杂交; 以及
 - (c) 对所述寡核苷酸探针与切割产物的杂交进行检测。
56. 权利要求55的方法, 其中所述标记物是FRET供体或受体分子。
57. 权利要求55的方法, 其还包括将所述寡核苷酸探针固定到固体支持物上。
58. 权利要求57的方法, 其中通过使所述标签序列与偶联到所述固体支持物上之互补抗标签序列杂交而将所述寡核苷酸探针固定到固体支持物上。
59. 权利要求57的方法, 其中所述固体支持物是珠。
60. 权利要求55的方法, 其中所述切割产物是由结构特异性瓣状内切核酸酶产生的。
61. 权利要求55的方法, 其中所述切割产物是由绿豆核酸酶或者S1核酸酶产生的。
62. 一种检测连接产物的方法, 其包括:
- (a) 提供寡核苷酸探针, 其包含:
 - (i) 10-40个核苷酸长的连接产物特异性序列;
 - (ii) 所述连接产物特异性序列5' 的抗标签序列;
 - (iii) 所述抗标签序列5' 的标签序列, 其中所述抗标签序列和所述标签序列各自为6至60个核苷酸长;
 - (iv) 所述抗标签序列与标签序列之间的能够阻止聚合酶延伸至标签序列的间隔区; 和
 - (v) 标记物;
 - (b) 在所述连接产物与寡核苷酸探针杂交但所述连接产物中未连接的亚单元不与寡核苷酸探针杂交的温度下, 使所述寡核苷酸探针与所述连接产物杂交;
 - (c) 对所述寡核苷酸探针与连接产物的杂交进行检测。
63. 权利要求62的方法, 其中所述标记物是FRET供体或受体分子。
64. 权利要求62的方法, 其还包括将所述寡核苷酸探针固定到固体支持物上。
65. 权利要求64的方法, 其中通过使所述标签序列与偶联到固体支持物上之互补抗标签序列杂交而将所述寡核苷酸探针固定到固体支持物上。
66. 权利要求64的方法, 其中所述固体支持物是珠。

具有发夹构象的嵌合引物及其使用方法

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求享有2009年6月29日提交的美国临时申请(序列号No.61/221,271)的优先权,其作为整体通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般性地涉及遗传学和分子生物学领域。更特别地,本发明涉及用于扩增和检测核酸的方法和组合物。

背景技术

[0004] 核酸扩增和检测技术是分析DNA样品中的突变和多态性时经常使用的技术。它们还用于对细菌、病毒和真菌(包括感染性病原体)进行检测和分型,这通过分析其DNA或RNA来实现。例如等位基因特异性PCR(allele-specific PCR,AS-PCR)和等位基因特异性引物延伸法(allele-specific primer extension,ASPE)方法利用选定的寡核苷酸引物来检测突变和多态性,所选定的引物允许选择性地实现含有变体核苷酸之序列或含有野生型核苷酸之对应序列的引物延伸。此类方法描述于例如美国专利5,595,890、5,639,611和5,137,806中,其公开内容通过引用并入本文。

[0005] 美国专利申请(序列号No.12/262,842,其通过引用并入本文)描述了可通过例如上文所述的等位基因特异性引物延伸法(ASPE)和等位基因特异性PCR(AS-PCR)等方法来简化基因分析的方法和组合物。在某些实施方案中,‘842号申请在“一步式”测定方法中使用了在靶标特异性序列的5’具有标签序列的引物,以及包含与引物标签序列互补之抗标签序列的捕获复合物。‘842号申请公开了其一步式扩增和检测法可以将目前市售的Luminex Tag-It[®]技术平台中的多个测定步骤减少为单个步骤。

[0006] 尽管可以使用上文提及的技术,但是仍需要更好的核酸扩增和检测方法,使其能够提供需要较低程度之引物浓度优化的测定,提供更加快速的结果,当使用DNA结合染料时具有更低的非特异性背景和更高的特异性信号,提供总体上更为灵敏的检测,更好地代表产物/靶标浓度以及允许更加多重化的引物组。如下文所述,本发明的方法和组合物满足这些要求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的方法和组合物提供了核酸扩增、检测和基因分型技术。在一个实施方案中,本发明提供了一种核酸分子,其包含:靶标特异性引物序列、位于该靶标特异性引物序列5’的抗标签序列、位于该抗标签序列5’的标签序列以及抗标签序列与标签序列之间的间隔区。

[0009] 在另一实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含:微球、与微球共价连接的第一抗标签核酸、与第一抗标签核酸杂交的标签核酸、共价连接在标签序列3’的间隔区、与第一抗标签核酸序列相同并共价连接在间隔区3’的第二抗标签核酸、共价连接在第二抗标签核酸3’的靶标特异性核酸以及与第二抗标签核酸和靶标特异性核酸杂交的核酸分子(其

中该核酸分子包含与抗标签核酸和靶标特异性核酸互补的序列)。

[0010] 在另一实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 第一核酸分子,其中所述第一核酸分子是引物对的第一成员,其包含:(i) 第一靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(b) 第二核酸分子,其中所述第二核酸分子是引物对的第二成员,其包含:(i) 第二靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的通用标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(c) 第三核酸分子,其包含:(i) 与通用标签序列互补的通用抗标签序列;和(ii) 标记物。

[0011] 在另一些实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含用于扩增多种不同靶序列的多个引物对,每个引物对包含:(a) 第一核酸分子,其包含:(i) 第一靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(b) 第二核酸分子,其包含:(i) 第二靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的通用标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(c) 经标记的通用抗标签分子,其包含:(i) 与通用标签序列互补的通用抗标签序列;和(ii) 标记物。

[0012] 一种组合物,其包含:(a) 第一核酸分子,其中所述第一核酸分子是引物对的第一成员,其包含:(i) 第一靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的通用标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(b) 第二核酸分子,其中所述第二核酸分子是引物对的第二成员,其包含:(i) 第二靶标特异性引物序列;(ii) 靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的通用标签序列;和(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;以及(c) 第三核酸分子,其包含:(i) 与第一和第二核酸分子上的通用标签序列互补的通用抗标签序列;和(ii) 标记物。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供了一种核酸分子,其从5' 至3' 包含:24个核苷酸碱基的标签区、内部C18间隔区、与标签区的一部分互补的长度可变之序列以及长度可变的靶标特异性引物区。可以根据缓冲液组成、杂交条件和标签区序列对与标签区之一部分互补的序列的长度和组成进行优化。最佳地,标签区与互补序列的结合应当形成具有足够热力学稳定性的发夹结构,从而在扩增过程中在第二链合成之前保持封闭发夹的形式,但是能垒应当足够低,以允许在第二链合成过程中破坏发夹结构。

[0014] 在如本文所述的形成发夹的核酸分子中,标签区和抗标签区的长度可以相等或不相等。例如,标签区和抗标签区的长度可以均为24个核苷酸长,或者,一个区域可以为24个核苷酸长,而另一个区域较短(例如8~16个核苷酸)。使用不同长度的标签区和抗标签区以改变形成发夹之核酸分子的杂交性质是有利的。优选地,设计分子的发夹区使其具有足够强的结合能,从而在双链扩增产物形成导致发夹结构打开之前保持封闭状态,同时,结合能还要足够弱以在双链产物存在下保持打开状态。另一个需要考虑的因素是引物标签区和用于捕获和/或标记由引物合成之扩增子的抗标签区(例如固定于珠上的抗标签序列)之间的结合强度。本领域技术人员将熟悉影响DNA杂交的因素,例如序列长度和G+C含量,并且将能够确定形成发夹之核酸分子中标签区和抗标签区的适宜长度,从而针对特定应用实现上述性质。

[0015] 在一个实施方案中,提供了一种核酸分子,其从5' 至3' 包含:24个核苷酸碱基的标

签区、内部C18间隔区、不与反应中其它核酸互补的12个碱基、与标签区前12个碱基互补的12个碱基、长度可变的靶标特异性引物区。

[0016] 在一个实施方案中,提供了一种核酸分子,其从5'至3'包含:24个核苷酸碱基的标签区、内部C18间隔区、与标签区前12个碱基互补的12个碱基、长度可变的靶标特异性引物区。

[0017] 靶核酸可以是任何目的核酸,含有靶核酸的样品可以是含有或怀疑含有核酸的任何样品。在本发明的某些方面中,样品例如来自接受筛查是否存在一个或多个基因突变或多态性的对象。在本发明的另一个方面中,样品可以来自接受测试是否存在病原体的对象。当从对象获得样品时,可通过本领域人员已知的方法获得,例如抽吸、活组织检查、拭抹、静脉穿刺、脊椎抽液、排泄物样品或尿样。在某些实施方案中,对象是哺乳动物、鸟或鱼。哺乳动物可以是例如人、猫、狗、牛、马、绵羊、猪、兔、大鼠或小鼠。在本发明的一些方面中,样品是环境样品,例如水、土壤或空气样品。在本发明的另一些方面中,样品来自植物、细菌、病毒、真菌、原生动物或后生动物。

[0018] 引物是在模板依赖性过程中能够引导新生核酸合成的核酸。靶标特异性引物是指设计用于引导特定靶核酸合成的引物。引物对是指两条引物,通常称为“正向引物”和“反向引物”或者“上游引物”和“下游引物”,其设计用于扩增模板核酸分子上位于两条引物结合位点之间的靶序列。在某些实施方案中,引物具有长度为10~40、15~30或18~26个核苷酸的靶标特异性序列。

[0019] 本发明的多个方面使用多组互补的标签和抗标签序列。优选地,所述标签和抗标签不交叉杂交,即每个标签和抗标签应当仅与其互补伴侣杂交,而不与同一反应中的其它标签或抗标签杂交。优选地,在反应过程中标签和抗标签也不与样品中的其它核酸杂交。在测定(特别是需要严格的非交叉杂交的高度平行之杂交环境的测定)中,对不交叉杂交的标签和抗标签序列的适当选择是有用的。在某些实施方案中,标签和抗标签序列的长度为6~60、8~50、10~40、10~20、12~24或20~30个核苷酸。在一些实施方案中,标签和抗标签序列的长度是12、14、16或24个核苷酸。本领域已知多种标签和标签互补物(即抗标签)序列,可用于本发明中。例如,美国专利7,226,737(通过引用并入本文)描述了一组210种非交叉杂交的标签和抗标签。此外,美国公开的专利申请No.2005/0191625(通过引用并入本文)公开了一族1168种标签序列,其显示能够与其互补序列正确杂交且交叉杂交极低。“通用”标签或抗标签是指在多重反应的所有反应中序列相同的标签或抗标签。

[0020] 间隔区是在第二链合成过程中抑制新生核酸序列延伸的部分。间隔区部分的非限制性实例包括C6-20直链亚烷基、iSp18(18个原子的六乙二醇)、iMe-isodC、六乙二醇单体(hexethylene glycol monomer)、合成的核酸碱基、2-O-烷基RNA或与靶标特异性序列呈反方向的寡核苷酸序列。

[0021] 在本发明的某些方面中,使用固体支持物。已知多种用于固定生物分子的固体支持物。例如,固体支持物可以是硝酸纤维素、尼龙膜、玻璃、活化石英、活化玻璃、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、聚苯乙烯基质、基于聚丙烯酰胺的基质、其它聚合物、共聚物或交联聚合物(例如聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷、光敏聚合物(其含有能够与靶分子形成共价连接的光反应性种类,例如氮烯基、碳烯基和羰基))。固体支持物可采用例如珠(微球)、柱或芯片的形式。平面固体支持物上固定的分子通常通过其在支持物上的空间位置来

识别。非平面固体支持物(例如珠)上固定的分子通常通过如下所述的某种支持物编码形式来识别。

[0022] 可以对珠进行编码,从而使一个亚群的珠能够与另一亚群区分开。可利用多种技术进行编码。例如,可以利用具有不同发射光谱和/或不同信号强度的荧光染料对珠进行荧光标记。在某些实施方案中,珠是Luminex FlexMAP™微球或Luminex xMAP®微球。还可以利用亚群中珠的尺寸将一个亚群与另一亚群区分开。另一种对珠进行修饰的方法是将磁性反应性物质(例如Fe₃O₄)掺入结构中。在无磁场情况下,顺磁性和超顺磁性微球的磁性可忽略不计,但是施加磁场诱导微球中磁畴取向一致,使得微球被吸引至磁场源。将荧光染料、珠尺寸和/或磁性反应性物质联合应用于珠可进一步增加所能产生的珠之不同亚群数目。

[0023] 在本发明的某些方面中,组合物包含与多种经编码的微球共价连接的多种抗标签核酸分子,其中所述多种抗标签分子包含与多个引物对中的标签序列互补的抗标签序列,并且其中每个抗标签核酸分子的身份可以由与其共价连接之经编码微球的编码而确定。

[0024] 可以用报告物对本文所述之方法和组合物中的核酸进行标记。报告物是有益于检测与其连接之分子的分子。已知多种可用于标记核酸的报告分子。直接报告分子包括荧光团、生色团和放射团(radiophore)。荧光团的非限制性实例包括红色荧光方酸菁染料(squaraine dye)(例如2,4-双[1,3,3-三甲基-2-亚吲哚基甲基]环丁烯二𰌵-1,3-二氧戊烷(2,4-Bis[1,3,3-trimethyl-2-indolinyliidenemethyl]cyclobutenediylum-1,3-dioxolate))、红外染料(例如2,4双[3,3-二甲基-2-(1H-苯[e]亚吲哚基 甲基)]环丁烯二𰌵-1,3-二氧戊烷(2,4 Bis[3,3-dimethyl-2-(1H-benz[e]indolinyliidenemethyl)]cyclobutenediylum-1,3-dioxolate))或橙色荧光方酸菁染料(例如2,4-双[3,5-二甲基-2-吡咯]环丁烯二𰌵-1,3-二氧戊烷(2,4-Bis[3,5-dimethyl-2-pyrrolyl]cyclobutenediylum-1,3-diololate))。荧光团的另一些非限制性实例包括量子点、Alexa Fluor®染料、AMCA、BODIPY®630/650、BODIPY®650/665、BODIPY®-FL、BODIPY®-R6G、BODIPY®-TMR、BODIPY®-TRX、Cascade Blue®、CyDye™(包括但不限于Cy2™、Cy3™和Cy5™)、DNA嵌入染料、6-FAM™、荧光素、HEX™、6-JOE、Oregon Green®488、Oregon Green®500、Oregon Green®514、Pacific Blue™、REG、藻胆素蛋白(包括但不限于藻红蛋白和别藻蓝蛋白)、Rhodamine Green™、Rhodamine Red™、ROX™、TAMRA™、TET™、四甲基罗明丹或Texas Red®。可以使用信号放大试剂(例如酪胺(PerkinElmer))来增强荧光信号。间接报告分子包括生物素,其必须与另一分子(例如链霉亲和素-藻红蛋白)结合以用于检测。在多重反应中,如果扩增产物的身份可以基于特定位置或与其杂交之固体支持物的身份来确定的话,则与引物或dNTP相连的报告物在多重反应的所有反应中可以是相同的。

[0025] 在另一些实施方案中,提供了对靶核酸进行扩增的方法,其包括:(a)提供第一引物对,其包含:(i)第一引物,其包含:第一靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5'的抗标签序列、抗标签序列5'的标签序列以及抗标签序列与标签序列之间的间隔区;和(ii)第二引物,其包含:第二靶标特异性引物序列;(b)提供报告物;(c)提供包含与固体支持物连接之抗标签序列的捕获复合物;(d)通过在适于扩增靶核酸的条件下将第一引物对、报告物、捕获复合物和包含靶核酸的样品相组合对靶核酸进行扩增。在某些方面中,报告物与第二引物相连接。在另一些方面中,报告物与dNTP相连接。在另一些实施方案中,报告物是DNA嵌入剂。在一些实施方案中,所述方法还包括将经扩增的靶核酸与捕获复合物之抗标签序

列杂交。在另一些实施方案中,所述方法还包括对经杂交、扩增的靶核酸进行检测。对经扩增的核酸进行检测可包括例如对与捕获复合物结合的经扩增靶核酸序列成像。在一些实施方案中,样品包含至少一种第二靶核酸,并且将至少一个第二引物对与第一引物对、报告物、捕获复合物和包含靶核酸的样品在适于扩增靶核酸的条件下相组合。不同的经扩增靶核酸可以与可区分之捕获复合物的不同抗标签序列杂交。捕获复合物可以是例如空间上可区分和/或光学可区分的。

[0026] 还可以使用本文公开的形成发夹之引物扩增和检测靶核酸序列,而不使用捕获复合物。例如,在一个实施方案中,可以通过如下方法对靶核酸进行扩增,其包括:(a) 提供第一引物对,其包含:(i) 第一靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列、抗标签序列5' 的标签序列、抗标签序列与标签序列之间的间隔区以及与标签序列连接的生色团;和(ii) 第二引物,其包含:第二靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列、抗标签序列5' 的标签序列、抗标签序列与标签序列之间的间隔区以及与标签序列连接的生色团;和(b) 提供标记物核酸分子,其包含:(i) 与第一引物对之通用标签序列互补的抗标签序列;和(ii) 能够与第一引物对之生色团发生福斯特共振能量转移(Forster Resonance Energy Transfer)的生色团;和(d) 通过在适于扩增靶核酸的条件下将第一引物对、通用标记物核酸分子和包含靶核酸的样品对靶核酸相组合进行扩增。所述方法还可以包括对经扩增的核酸进行检测。所述检测可以包括对第一引物对之生色团和通用标记物之生色团之间的FRET进行检测。在某些实施方案中,进行实时检测(即该方法提供实时PCR)。该扩增方法可以是多重的,其中样品包含至少一种第二靶核酸和第二引物对。对于多重应用,每个引物对和相应的标记物核酸分子需要具有与反应中任何其它引物对和标记物核酸分子不同的标签和抗标签序列。此外,对于反应中的每个不同的引物对,需要使用具有不同发射波长的标记物。在一些实施方案中,引物对是巢式引物对,并且靶核酸本身是扩增子。

[0027] 还可以使用本文公开的形成发夹之探针来检测切割反应的产物。本领域已知若干用于检测核酸序列的基于切割之测定。例如,侵染技术(invader technology)是公知用于鉴别SNP(单核苷酸多态性)的技术,其使用结构特异性瓣状内切核酸酶(flap endonuclease, FEN)切割由等位基因特异性重叠寡核苷酸与含有SNP(单核苷酸多态性)位点的靶DNA杂交所形成的三维复合物。还已知使用绿豆核酸酶和S1核酸酶鉴别SNP,因为它们能够切割单个碱基错配。在一个实施方案中,本发明提供了一种检测核酸切割反应的切割产物的方法,其包括:(a) 提供寡核苷酸探针,其包含:(i) 切割产物特异性序列;(ii) 切割产物特异性序列5' 的抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的标签序列;(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;和(v) 标记物;(b) 使寡核苷酸探针与切割产物杂交;(c) 使切割产物延伸,从而将标签序列从与抗标签序列的杂交中置换出来;(d) 使经标记的抗标签探针与置换出的标签序列杂交,以及(e) 对寡核苷酸探针与切割产物的杂交和延伸进行检测。标记物可以是例如FRET供体或受体分子。可以通过将寡核苷酸探针固定到固体支持物上或不将寡核苷酸探针固定到固体支持物上来实施该方法。在将探针固定的实施方案中,可以通过使探针的标签序列与偶联到固体支持物(例如珠或者平面阵列)上的互补抗标签序列杂交来实现固定。如上文所讨论地,可以通过多种技术产生切割产物,包括但不限于使用结构特异性瓣状内切核酸酶、绿豆核酸酶或者S1核酸酶的技术。本领域技术人员能够设计在与特定

靶序列杂交时易于被切割的探针。

[0028] 此外,还可以使用本文公开的形成发夹之探针检测连接产物的形成。当两个寡核苷酸探针在靶核酸上彼此邻近地结合时,可形成连接产物。通常,利用连接酶来实现连接。在一个实施方案中,本发明提供了一种检测连接产物的方法,其包括:(a) 提供寡核苷酸探针,其包含:(i) 连接产物特异性序列;(ii) 连接产物特异性序列5' 的抗标签序列;(iii) 抗标签序列5' 的标签序列;(iv) 抗标签序列与标签序列之间的间隔区;和(v) 标记物;(b) 在连接产物与寡核苷酸探针杂交但连接产物之未连接亚单元不与寡核苷酸探针杂交的温度下使寡核苷酸探针与连接产物杂交;(c) 使连接产物延伸,以将标签序列从与抗标签序列的杂交中置换出来;(d) 使经标记的抗标签探针与置换出的标签序列杂交,以及(e) 对寡核苷酸探针与连接产物的杂交和延伸进行检测。标记物可以是例如FRET供体或受体分子。可以通过将寡核苷酸探针固定到固体支持物上或者不将寡核苷酸探针固定到固体支持物上来实施该方法。在将探针固定的实施方案中,可以通过使探针的标签序列与偶联到固体支持物(例如珠或平面阵列)上的互补抗标签序列杂交来实现固定。本领域技术人员将能够设计当与特定靶序列杂交时能够连接到一起以产生连接产物的探针。

[0029] 在一个实施方案中,本发明提供了对基因表达进行定量的方法,其包括:使靶基因的mRNA逆转录,以形成cDNA;使cDNA与包含通用引物结合序列和cDNA特异性序列的第一寡核苷酸以及包含独特引物结合序列和cDNA特异性序列的第二寡核苷酸杂交;使第一寡核苷酸与第二寡核苷酸连接,以形成经连接的寡核苷酸;利用通用引物和独特引物对经连接的寡核苷酸进行扩增,所述独特引物包含独特引物序列、独特引物序列5' 的抗标签序列、抗标签序列5' 的标签序列以及抗标签序列与标签序列之间的间隔区;通过使扩增子的标签序列与捕获复合物的抗标签序列杂交,从而捕获扩增子;对所捕获的扩增子进行标记;以及对所捕获的经标记扩增子进行检测和定量。任选地,如果在逆转录反应后进行清洗步骤,则可以将cDNA固定。连接介导的扩增方法是本领域已知的并描述于例如Peck 等, *Genome Biology*, 7:R61 (2006) (其通过引用并入本文)中。在对多个靶基因的表达进行分析的多重反应情况下,“通用引物”和“通用引物结合序列”是指用于分析反应中所有靶基因的共同引物和其互补序列。在某些实施方案中,通用引物是T3引物。相反地,“独特引物”和“独特引物结合序列”是指特异性针对所分析之每个不同靶基因的引物和其互补序列。然而,“独特引物”和“独特引物结合序列”不与靶基因自身的序列互补。“独特引物”和“独特引物结合序列”可以是标签/抗标签组,但是不应与多重反应中任何其它标签或抗标签序列互补。在多重反应中,针对进行测定的多个不同靶标中的每一个,使用标签序列、抗标签序列和捕获复合物的独特组合,这可以使针对每个靶标的扩增子与每个另外靶标的扩增子相区分。

[0030] 可以通过本领域已知的方法来固定cDNA。在一些具体的实施方案中,通过利用经oligo-dT包被的孔或珠捕获mRNA并使其逆转录来固定cDNA。

[0031] 在另一些实施方案中,本发明提供了检测样品中微生物的方法,其包括:(a) 提供多个引物对,以扩增来自多种不同微生物中的多种不同靶核酸序列,其中每个引物对包含:(i) 第一引物,其包含:第一靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5' 的抗标签序列、抗标签序列5' 的标签序列以及抗标签序列与标签序列之间的间隔区;和(ii) 第二引物,其包含:第二靶标特异性引物序列、靶标特异性引物序列5' 的通用抗标签序列、抗标签序列5' 的通用标签序列以及抗标签序列与标签序列之间的间隔区;(b) 提供经标记的通用抗标签分

子,其包含:(i)与通用标签序列互补的通用抗标签序列;和(ii)标记物;(c)提供包含与固体支持物连接之抗标签序列的捕获复合物;(d)通过在适于扩增靶核酸序列的条件下将多个引物对、经标记的通用抗标签分子、捕获复合物和样品相组合,而在样品中存在微生物的情况下扩增出多种微生物中的靶核酸序列;(e)将经扩增的靶核酸序列与其相应捕获复合物中的相应抗标签序列杂交;以及(f)通过对与其相应捕获复合物结合的经扩增靶核酸序列进行检测来检测样品中存在的微生物。

[0032] 微生物可以是例如细菌、病毒、逆转录病毒或真菌。在某些实施方案中,微生物是病原体。含有或者可能含有微生物的样品可以是患者样品,例如血液样品、血清样品、脑脊液样品、粪便样品、支气管肺泡灌洗样品、痰、心包液、腹膜液、胸膜液、尿液、胃吸出物、脓肿、气管吸出物、支气管洗出物、骨髓、组织等。在另一些实施方案中,样品是环境样品,例如水样品或土壤样品。在某些实施方案中,提供了用于检测2~100种不同微生物的2~100个引物对。每个引物对可以设计为检测一种不同的微生物,或者可以存在冗余,即所设计的两个或多个引物对用于检测同一种微生物。通常在临床/诊断情形中或者在环境背景下,预计患者样品或环境样品中仅存在一部分所筛选的微生物。例如,尽管可以对患者样品进行针对30种不同微生物的筛选,但患者样品中可能仅含有这些微生物中的约0~2种,这是因为一个人一般不会同时感染大量不同的微生物。在本发明的某些方面中,检测到0~10、1~10、1~5或1~3种不同的微生物。

[0033] 扩增可以是定性的、半定量的或者定量的。在某些实施方案中,可以对扩增进行实时监测(例如实时PCR)。当通过聚合酶链式反应(PCR)进行扩增时,应当使用具有链置换活性的聚合酶,因为这种聚合酶能够打开由引物的标签和抗标签区杂交所形成的发夹结构。在一些实施方案中,聚合酶是无外切核酸酶活性的聚合酶(exo(-) polymerase)。

[0034] 本发明的某些实施方案包括对经扩增的靶核酸进行检测。可以通过多种技术检测经扩增的靶核酸。在本发明的一个方面中,利用流式细胞术检测经扩增的靶核酸。当捕获复合物的固体支持物是珠或其它颗粒时,特别适合使用流式细胞术。在本发明的另一些方面中,对经扩增的靶核酸进行检测包括对与捕获复合物结合的经扩增靶核酸序列成像。可以例如在珠阵列平台或芯片阵列平台上成像。

[0035] 本发明的方法可以用于多重测定中。在这种多重测定中,样品通常包含至少一种第二靶核酸序列。在本发明的某些方面中,样品中包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、400、500、600、700、800、900、1000或者其间任意范围的靶核酸序列。如上所述,靶核酸序列可以是任何目的序列。一个靶核酸序列可以与另一靶核酸序列位于同一基因或不同基因中,并且靶核酸序列可以重叠或不重叠。当然,靶核酸序列不必位于基因内部,而是可以位于例如DNA的非编码区域内。在样品中存在至少一种待扩增之第二靶核酸的多重测定中,将至少一种第二鉴别引物或者第二引物对与第一引物对相组合。

[0036] 本文所述之方法的一个优点是其可以“封闭管”的方式进行。在“封闭管”测定中,所有试剂和样品均在反应开始时加入,从而不需要在反应起始后打开反应容器以加入试剂。这通常使得周转时间更快,并且减少了污染和人为失误的机会。这种“封闭管”测定特别

适用于期望快速得到结果、使测定中人工操作尽可能少以及无菌环境的即时检验 (Point-of-Care) 应用。

[0037] 应当理解,本文所述的任何方法或组合物的实施可与本文所述的任何其它方法或组合物相关联。

[0038] 除非明确指明仅择一选择或者备选方案之间互相排斥,否则权利要求中使用的术语“或”是指“和/或”,然而本文公开的内容支持择一选择以及“和/或”的定义。

[0039] 在本申请中,术语“约”用于表示数值包含由于测定该数值所使用的设备或方法导致的标准方差。

[0040] 根据现行专利法,当与“包含/包括”一起在权利要求书或说明书中使用,无数量词修饰的词语表示一个(种)或多个(种),特别指明时除外。

[0041] 根据下面的详细描述,本发明的其它目的、特征和优点将显而易见。然而应当理解,当阐述本发明的具体实施方案时,该详细描述和具体实施例仅以举例说明的方式提供,因为根据该详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和改动对于本领域技术人员来说均是显而易见的。

附图说明

[0042] 以下附图构成本申请说明书的一部分,并进一步展示本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多幅以及本文中特定实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0043] 图1A和1B.图1A显示形成发夹的引物和捕获复合物的示意图。图1B显示扩增产物,其中扩增使形成发夹之引物的结构打开,从而使引物的标签区能够与捕获复合物的抗标签区杂交。

[0044] 图2示意当使用不形成发夹的引物时,未延伸引物的标签区如何与已延伸引物的标签区竞争与捕获复合物的抗标签区杂交。

[0045] 图3A和3B.图3A和3B显示在扩增产物产生之前(图3A)和扩增产物产生之后(图3B)形成发夹的正向引物、形成发夹的反向引物、经标记的通用抗标签分子和捕获复合物。

[0046] 图4A至4E.图4A至4E显示在基于FRET的标记系统中供体和受体生色团的多种构型。

[0047] 图5A至5B.图5A至5B显示在基于荧光团/淬灭剂的标记系统中荧光团和淬灭剂的多种构型。

[0048] 图6.图6显示在存在过量的未延伸引物的情况下发夹引物比不形成发夹的引物更为有效。

[0049] 图7.图7显示在使用Qiagen Hotstart聚合酶的PCR中对12聚体、14聚体和16聚体茎的发夹引物及不形成发夹的引物(TIF)进行比较。

[0050] 图8.图8显示在使用aptaTaq无外切核酸酶活性的聚合酶的PCR中对12聚体、14聚体和16聚体茎的发夹引物及不形成发夹的引物(TIF)进行比较。

[0051] 图9.图9是使用形成发夹的正向引物或不形成发夹的正向引物的伪(pseudo)实时PCR不同PCR循环的MFI的图。

[0052] 图10.图10是在实时PCR中不同PCR循环的MFI的图。

[0053] 图11.图11表示在实时定量PCR中脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria Meningitidis*) DNA 的系列稀释。

[0054] 图12.图12示意实时PCR测定的化学原理。引物一旦延伸,发夹部分打开,允许与经标记的探针结合,从而发生福斯特共振能量转移 (FRET),使得可以在标准的实时热循环仪中进行实时检测。该化学原理的一个优点是,一旦提供了有效的发夹序列,终端用户仅需要设计引物,这使得设计非常容易。该测定中不需要使用珠。

[0055] 图13示意了一种测定方法,其中在侵染测定中使用形成发夹的探针。在侵染测定中,探针的瓣状部分 (B) 被切割。接着瓣状部分 (B) 可以用作引物,其通过聚合酶延伸能够打开发夹序列。利用可进行结合的发夹序列之标签区,其可以与FRET对中的经标记探针结合以进行无珠的实时检测,或者其可以与珠结合以进行高度多重化检测。

[0056] 图14.图14示意了包括使用连接机制的测定方法,其中在足够高的温度下进行测定,以使探针A和B不能与发夹引物/探针杂交,除非其发生连接。一旦其发生连接,其具有足够的结合强度与探针/引物结合并且在链置换聚合酶存在下延伸。利用可进行结合的发夹序列之标签区,其可以与FRET对中的经标记探针结合以进行无珠的实时检测,或者其可以与珠结合以进行高度多重化检测。

[0057] 图15.图15示意了包括使用绿豆核酸酶或S1核酸酶的测定方法,所述核酸酶具有切割单碱基错配的能力。一旦错配被切割,B可以用作能够置换发夹的引物,使标签暴露,以与连接或未连接到固体表面上的探针结合。

[0058] 图16示意了一种测定方法,其中通用发夹引物与靶标特异性发夹引物联合用于巢式实时PCR测定化学作用。引物一旦延伸,发夹部分将打开,允许经标记的探针结合,从而发生FRET,使得可以在标准的实时热循环仪中进行实时检测。该方法的一个优点是终端用户仅需要设计引物,这使得设计非常容易。该实施方案中不需要使用珠。

[0059] 发明详述

[0060] 1. 核酸

[0061] A. 引物

[0062] 与先前已有的引物相比,本文所述之方法和组合物中使用的引物提供了更好的核酸扩增和检测。使用这些引物的测定需要更低程度之引物浓度优化、更快地得到结果、当使用DNA结合染料时产生更低的背景和更高的特异性信号、提供更高的灵敏度、提供对产物/靶标浓度更精确地测量以及允许引物组更高多重化。本文使用的术语“引物”意指包括能够在模板依赖性过程中引导新生核酸合成的任何核酸。引物可以双链和/或单链形式提供,但优选单链形式。

[0063] 在某些实施方案中,本文公开的方法和组合物中使用形成发夹的引物,其中除了靶标特异性引物序列之外,所述引物还包含标签区和与标签区互补的区域(抗标签)。标签区和抗标签区由间隔区分隔开(以阻止聚合酶延伸至标签区)。这些引物也可称为是“嵌合的”,因为它们由功用不同的区域组成。扩增前,标签区与抗标签区杂交,形成发夹结构,从而使标签区被隔离。一旦形成双链扩增产物,发夹的茎结构被破坏,从而标签区可以与另一抗标签探针(例如固定到基底(例如珠)上的抗标签探针)杂交。形成发夹的引物是正向引物的一个实例示于图1A和1B中。本领域人员应当理解,在替代性的实施方案中,反向引物可以是形成发夹的引物。

[0064] 如图1A中所显示,形成发夹的正向引物包含靶标特异性引物区、抗标签区、间隔区(该图中为C18间隔物)和标签区。引物的抗标签区可以与标签区长度相等或者不等。在图1A中,抗标签区短于其互补的标签区,因此其被称为“部分抗标签区”。在聚合酶延伸和产生双链扩增产物之前,抗标签区与标签区杂交,从而形成发夹结构,其阻止引物上的标签区与偶联到珠上的抗标签区杂交。如图1B所示,反向引物一经延伸,具有链置换活性的聚合酶将破坏发夹茎并终止在间隔区处,这使得标签区可以与珠上的抗标签区杂交。

[0065] 由于发夹结构中的标签区被隔离,因此阻止了未延伸的正向引物与经固定的抗标签探针杂交。这是有利的,因为未延伸引物占据捕获复合物上的杂交位点可限制捕获探针与经标记扩增产物的结合,从而降低测定的灵敏度。这在扩增反应早期尤其成问题,因为在该阶段未延伸引物与延伸引物的比率很高。当试图以实时方式测量扩增产物的积累时,这种作用最为显著。如图2A所示,不形成发夹的过量的未延伸标签引物能够与扩增产物竞争捕获复合物上的杂交位点。此外,如果使用嵌入染料或DNA结合染料,它们会与由未延伸引物和探针杂交所产生的双链核酸结合,导致背景信号增加。相反,当使用具有发夹结构的引物时,引物和探针在PCR扩增产物形成前不会杂交。

[0066] 与使用不形成发夹的引物相比,使用如上所述的引物能够提供至少下列益处:(1)需要更低程度的引物浓度优化;(2)更快得到结果,因为达到可检出信号需要更少的PCR循环数;(3)当使用DNA结合染料时产生更低的背景和更高的特异性信号;(4)总体上提供更灵敏的检测;和(5)提供更精确的产物/靶标浓度展示。

[0067] 在某些实施方案中,引物对中的正向和反向引物均是形成发夹的引物。这在多重反应中特别有利。在这种情况下,引物对中的一条引物包含通用标签和抗标签序列。标签和抗标签序列是“通用的”,因为虽然多重扩增反应中每个不同靶标的靶标特异性引物序列不同,但是可使用同样的(即“通用的”)标签和抗标签序列。图3A和3B中所示的实例显示形成发夹的正向引物,其包含靶标特异性引物区、由间隔区隔开的互补的抗标签区和标签区。还显示了形成发夹的反向引物,其包含靶标特异性引物区以及由间隔区隔开的通用抗标签区和标签区。正向引物和反向引物设计为使得其在聚合酶链式反应过程中将引导双链核酸的合成。在多重反应中,对于反应中每个不同的正向引物,正向引物的抗标签区和标签区是独特的。这样,可以通过与探针序列的杂交对正向引物延伸的扩增产物进行鉴别。但是,通用抗标签区和通用标签区对于反应中所有的反向引物均是相同的。这允许使得经标记的通用抗标签探针可以标记反应中所有经延伸的反向引物。这大大降低了所需标记物(例如荧光团)的量。例如,在针对感染性疾病的30重PCR组中(其中对30条不同的反向引物进行直接标记),将需要6,000nM的荧光团,而利用经标记的通用抗标签将仅需要200nM的荧光团。所需报告物的量减少为1/30。这些计算基于预期样品对于0至2种感染原是阳性的30重组。能够使用较少标记物使测定背景降低、使所需试剂量减少并且可以无需清洗步骤(以去除测定中的过量标记物)。

[0068] B. 核酸的制备

[0069] 本文中公开的核酸可以通过本领域技术人员已知的任何技术制备,例如化学合成、酶促产生或者利用生物学方法产生。合成核酸(例如合成的寡核苷酸)的非限制性实例包括利用磷酸三酯、亚磷酸盐或亚磷酰胺化学作用和固相技术(例如描述于EP 266,032中,其通过引用并入本文)或者通过脱氧核苷氢亚磷酸酯中间产物(如由Froehler等,1986和美

国专利5,705,629所描述,二者通过引用并入本文)通过体外化学合成制备的核酸。寡核苷酸合成的多种不同机制已经公开于例如美国专利4,659,774、4,816,571、5,141,813、5,264,566、4,959,463、5,428,148、5,554,744、5,574,146、5,602,244中,其均通过引用并入本文。

[0070] 酶促产生的核酸的非限制性实例包括在扩增反应中由酶(例如PCRTM,参见例如美国专利4,683,202和美国专利4,682,195,二者通过引用并入本文)产生的或者通过寡核苷酸合成(描述于美国专利5,645,897中,其通过引用并入本文)产生的核酸。生物学方法产生的核酸的非限制性实例包括在活细胞中产生(即复制)的重组核酸,例如在细菌中复制的重组DNA载体(参见例如Sambrook等,2001,其通过引用并入本文)。

[0071] 用作扩增模板的核酸可以根据标准方法(Sambrook等,2001)从细胞、组织或者其它样品中分离。在某些实施方案中,对全细胞或者组织匀浆物或者生物液体样品进行分析,而不必对模板核酸进行实质性纯化。核酸可以是基因组DNA或者分级分离的或全细胞的RNA。当使用RNA时,期望首先将RNA转化成互补DNA(cDNA)。

[0072] 根据所需应用,可以选择仅允许完全互补的序列之间杂交的高严格度的杂交条件。在另一些实施方案中,在严格度降低的条件下发生杂交,以使得与引物序列含有一个或多个错配的核酸可以扩增。一旦杂交,使模板-引物复合体与利于进行模板依赖性核酸合成的一种或多种酶接触。进行多轮扩增(也称为“循环”),直至产生足够量的扩增产物。

[0073] 可以进行逆转录酶PCRTM扩增步骤,以使mRNA逆转录成cDNA。RT-PCR方法是本领域公知的(参见Sambrook等,2001)。RT-PCR的替代性方法利用热稳定性DNA聚合酶。这些方法描述于WO 90/07641中。聚合酶链式反应方法是本领域公知的。RT-PCR的代表性方法描述于美国专利No.5,882,864中。

[0074] 另一种扩增方法是连接酶链式反应(“LCR”),其公开于欧洲申请No.320 308(作为整体通过引用并入本文)中。美国专利4,883,750描述了一种类似于LCR的方法,其中使探针与靶序列结合。还可以使用基于PCRTM和寡核苷酸连接酶测定(OLA)的方法,其公开于美国专利5,912,148中。

[0075] 可以用于实施本发明某些方面的核酸序列扩增的替代性方法公开于美国专利5,843,650、5,846,709、5,846,783、5,849,546、5,849,497、5,849,547、5,858,652、5,866,366、5,916,776、5,922,574、5,928,905、5,928,906、5,932,451、5,935,825、5,939,291和5,942,391、英国专利申请No.2 202 328以及PCT申请No.PCT/US89/01025中,每件均作为整体通过引用并入本文。

[0076] PCT申请No.PCT/US87/00880中描述的Qbeta复制酶也可以用作本发明中的扩增方法。在该方法中,在RNA聚合酶存在下将RNA复制序列(其具有与靶标互补的区域)加入样品中。聚合酶将拷贝复制序列,并接着对其进行检测。

[0077] 本发明还可以使用等温扩增方法对核酸进行扩增,其中使用限制性内切核酸酶和连接酶对靶分子进行扩增,所述靶分子在一条链的限制性位点中含有核苷酸5'-[α-硫]-三磷酸(Walker等,1992)。对核酸进行等温扩增的另一种方法是公开于美国专利5,916,779的链置换扩增(SDA),其涉及进行多轮链置换和合成,即切口平移。

[0078] 核酸扩增的其它方法包括基于转录的扩增系统(TAS),其包括基于核酸序列的扩增(NASBA)和3SR(Kwoh等,1989;Gingeras等,PCT申请WO 88/10315,其作为整体通过引用并

入本文)。欧洲申请No.329 822公开了一种核酸扩增方法,其涉及循环合成单链RNA (“ssRNA”)和双链DNA(dsDNA)。

[0079] PCT申请W0 89/06700(作为整体通过引用并入本文)公开了一种核酸序列扩增方案,其基于使启动子区/引物序列与单链靶DNA (“ssRNA”)杂交,随后转录该序列的多个RNA拷贝。该方案不是循环性的,即新的模板不能由所得到的RNA转录物产生。其它扩增方法包括“race”和“单侧PCRTM”(Frohman,1990;Ohara等,1989)。

[0080] 可以使扩增产物显现。如果用放射性或荧光标记的核苷酸对扩增产物进行整合标记,可以使扩增产物在X射线胶片上曝光或者在适宜的激发谱下显现。在另一种方法中,使经标记的核酸探针与扩增产物杂交。探针可以与例如生色团、荧光团、放射性标记缀合,或者与结合伴侣(例如抗体或者生物素)缀合。

[0081] 本领域已知的多种核酸检测方法公开于美国专利5,840,873、5,843,640、5,843,651、5,846,708、5,846,717、5,846,726、5,846,729、5,849,487、5,853,990、5,853,992、5,853,993、5,856,092、5,861,244、5,863,732、5,863,753、5,866,331、5,905,024、5,910,407、5,912,124、5,912,145、5,919,630、5,925,517、5,928,862、5,928,869、5,929,227、5,932,413和5,935,791中,每件均通过引用并入本文。

[0082] C. 杂交

[0083] 序列特异性核酸杂交测定用于对特定基因序列进行检测,以指示基因异常、突变和疾病倾向。此外,其用于对多种生物学媒介物(agent)和感染性病原体进行检测。本文中使用的“杂交”、“与……杂交”或者“能够杂交”意指形成双链或者三链分子或者具有部分双链或三链性质的分子。本文中使用的术语“退火”与“杂交”同义。术语“杂交”、“与……杂交”或者“能够杂交”涵盖术语“严格条件”或“高严格度”以及术语“低严格度”或“低严格条件”。

[0084] 本文中使用的术语“严格条件”或者“高严格度”是允许含有互补序列的一条或多条核酸链之间或者内部杂交但是阻止非互补序列杂交的条件。这种条件是本领域技术人员公知的,优选针对需要高选择性的应用。严格条件可以包括低盐和/或高温条件,例如通过约0.02M至约0.15M NaCl、在约50℃至约70℃的温度下提供。应当理解,所需严格度的温度和离子强度部分地由特定核酸的长度、靶序列的长度和核苷碱基含量、核酸的电荷组成以及杂交混合物中甲酰胺、四甲基氯化铵或其它溶剂的存在或浓度来确定。

[0085] 还应当理解,这些用于杂交的范围、组成和条件仅以非限制性方式阐述,而特定杂交反应的期望严格度常常通过与一种或多种阳性或阴性对照比较而经验性地确定。低严格度条件的非限制性实例包括在约0.15M至约0.9M NaCl中、在约20℃至约50℃的温度下进行杂交。当然,本领域技术人员能够进一步改动低严格度条件或者高严格度条件,以适用于特定应用。

[0086] II. 核酸的检测

[0087] A. 标记物

[0088] 为了检测核酸,将核酸与适宜的检测系统相组合是有利的。可以使用整合到引物中、在扩增过程中整合到扩增产物中或者与与探针连接的识别部分对核酸分子进行鉴定。为此,可以使用多种不同的标记物(也称为“报告物”,例如荧光团、生色团、放射团、酶标签、抗体、化学/电发光标记物、亲和标记物等。本领域技术人员应理解,这些以及本文中未提及

的其它标记物可以成功用于本发明中。亲和标记物的实例包括但不限于：抗体、抗体片段、受体蛋白、激素、生物素、地高辛、DNP或者与亲和标记物结合的任何多肽/蛋白质分子。

[0089] 酶标签的实例包括例如脲酶、碱性磷酸酶或者过氧化物酶等。可以使用比色指示底物提供人眼或者分光光度法可见的检测方法，以鉴定与含有互补核酸之样品的特异性杂交。所有这些实例是本领域公知的，并且本领域技术人员将知晓本发明不限于上面描述的实例。

[0090] 荧光团的实例包括红色荧光方酸菁染料（例如2,4-双[1,3,3-三甲基-2-亚吡啶基甲基]环丁烯二 -1,3-二氧戊烷）、红外染料（例如2,4双[3,3-二甲基-2-(1H-苯并[e]亚吡啶基甲基)]环丁烯二 -1,3-二氧戊烷）或者桔色荧光方酸菁染料（例如2,4-双[3,5-二甲基-2-吡咯]环丁烯二 -1,3-二氧戊烷）。荧光团的另一些非限制性实例包括量子点、Alexa Fluor 染料、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY -FL、BODIPY -R6G、BODIPY -TMR、BODIPY -TRX、Cascade Blue 、CyDyeTM（包括但不限于Cy2TM、Cy3TM和Cy5TM）、DNA嵌入染料、6-FAMTM、荧光素、HEXTM、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific BlueTM、REG、藻胆素蛋白（包括但不限于藻红蛋白和别藻蓝蛋白）、Rhodamine GreenTM、Rhodamine RedTM、ROXTM、TAMRATM、TETTM、四甲基罗明丹或者Texas Red 。可以使用信号放大试剂（例如酪胺（PerkinElmer））来增强荧光信号。

[0091] 应当理解，本文中公开的方法和组合物可以使用基于FRET的检测系统。FRET（荧光共振能量转移或者福斯特共振能量转移）利用供体和受体生色团之间的能量转移。在某些实施方案中，将一个生色团与发夹序列或者间隔区连接，将另一生色团与捕获复合物连接，从而在引物与捕获复合物相连后即观察到由于供体和受体生色团之间的能量转移导致的信号增加。供体和受体生色团构型的非限制性实例示于图4A至4E中。与游离漂浮生色团方法相比，基于FRET的检测系统使背景降低，并因而允许引物组多重化程度更高，特别是在封闭管和实时检测系统中。

[0092] 还应当理解，本文中公开的方法和组合物可以使用基于荧光团/淬灭剂的检测系统。当淬灭剂和荧光团互相靠近时，淬灭剂使由荧光团产生的信号淬灭。核酸分子的构象变化使荧光团和淬灭剂分隔开，使得荧光团发出荧光信号。荧光团和淬灭剂构造的多种非限制性实例示于图5A至5B中。与基于FRET的检测类似，基于荧光团/淬灭剂的检测系统与游离漂浮荧光团方法相比使背景降低，因而允许引物组多重化程度更高，特别是在封闭管和实时检测系统中。

[0093] B. 基因芯片和微阵列

[0094] 本发明的某些实施方案涉及固体支持物。固体支持物可以是平面阵列，例如基因芯片或者微阵列。阵列和基因芯片技术提供了对能够与固定到固体基底上的多个单链寡核苷酸探针杂交的大量核酸样品进行快速筛选的方法。这些技术包括对大量基因进行快速且精确分析的定量方法。所述技术利用单链DNA的互补结合性质通过杂交来筛选DNA样品（Pease等，1994；Fodor等，1991）。基本上，阵列或者基因芯片包括固体基底，所述固体基底上已连接了单链DNA或者RNA分子的阵列。为进行筛选，使芯片或者阵列与单链DNA或者RNA样品接触，使其在严格条件下杂交。接着对芯片或者阵列进行扫描，以确定哪些探针已发生杂交。芯片或者平面阵列上探针的身份由其在芯片或者平面阵列上的空间位置（即xy坐标）

得知。

[0095] 在固体基底上直接合成或者使多核苷酸探针与固体基底连接的能力是本领域公知的。参见美国专利5,837,832和5,837,860,二者通过引用明确地并入本文。已经利用多种方法永久地或者可移除式地使探针与基底连接。实例性方法包括:将生物素化的核酸分子固定到经亲和素/链霉亲和素包被的支持物上(Holmstrom,1993)、将短的5'磷酸化引物直接共价连接到经化学修饰的聚苯乙烯板上(Rasmussen等,1991),或者用聚L-Lys或聚L-Lys、Phe预包被固相聚苯乙烯或玻璃,随后利用双功能交联试剂使经氨基或巯基修饰的寡核苷酸共价连接(Running等,1990;Newton等,1993)。当固定到基底上时,探针是稳定的,因此可以重复使用。一般地讲,利用经固定的核酸靶标或者连接到固体表面(例如硝酸纤维素、尼龙膜或者玻璃)上的探针分子进行杂交。可以使用多种其它的基质材料,包括强化硝酸纤维素膜、活化石英、活化玻璃、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、聚苯乙烯基质、基于聚丙烯酰胺的基质、其它聚合物(例如聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷、光敏聚合物(含有能够与靶分子形成共价连接的光反应性种类,例如氮烯基、碳烯基和羰游基))。

[0096] C. 珠阵列

[0097] 在一些实施方案中,固体支持物可以是微球。可以通过本领域技术人员已知的技术对基于微球的测定进行分析。例如,在某些实施方案中,可以使用Luminex xMAP®技术。Luminex技术允许检测固定到经荧光编码之微球上的核酸产物。通过使用两种光谱可区分之荧光色素(其中每种具有10种不同强度)对微球进行染色,产生100种具有荧光差异的微球群。这些单独的群(组)可以代表一种检测序列,并且可以单独检测针对每个组的杂交量。利用第三报告物测定杂交反应量,所述第三报告物通常是光谱可区分的第三荧光团。报告物分子通过与微球上的分子连接来指示反应程度。由于微球和报告物分子均被标记,因此,数字信号处理允许将信号转换成每个反应的实时定量数据。Luminex技术例如描述于美国专利5,736,330、5,981,180和6,057,107中,其均通过引用具体地并入本文。

[0098] 在基于微球的测定中,可以利用流式细胞术同时进行序列鉴定和杂交定量。通过流式细胞术对微球中的内部染料进行检测,并用其鉴定与微球偶联的特异性核酸序列。还通过流式细胞术对靶核酸分子上的标记物进行检测,并用其对靶标与微球的杂交进行定量。流式细胞术方法是本领域公知的,其描述于例如美国专利5,981,180、4,284,412、4,989,977、4,498,766、5,478,722、4,857,451、4,774,189、4,767,206、4,714,682、5,160,974和4,661,913中,其均通过引用具体地并入本文。

[0099] 还可以在阵列平台上对微球进行分析,使分布于基本平面的阵列上的珠和分析物成像。用这种方法,珠阵列的成像与上面讨论的基因芯片类似。但是,与通过阵列上的空间位置鉴定分析物的基因芯片不同的是,珠阵列通常通过与其结合的经编码微球对分析物进行鉴定。市售珠阵列系统的实例包括Illumina的BeadXpress™ Reader和BeadStation 500™。

[0100] D. 竞争性结合测定

[0101] 本发明的实施方案还可以与竞争性结合测定联用。一般地讲,该方法涉及偶联到固体表面的序列和溶液中与偶联到固体表面之序列互补的经标记序列。利用这种方法,受试样品中的靶序列不需要被标记。相反,由于靶序列与经标记的互补序列竞争而与经固定的检测序列杂交,因而可以检测样品中是否存在靶序列。因此,如果样品中存在靶序列,则

与样品中不存在靶序列相比信号减弱。上面描述的Luminex xMAP技术可以用于竞争性结合测定法中。采用竞争性结合测定法的Luminex技术描述于美国专利5,736,330和6,057,107中,其通过引用并入本文。

[0102] E. 标签序列

[0103] 如上面所提及,本发明的多个方面使用互补的标签序列(即标签和抗标签)。已开发出多种方法,涉及使用连接到固体支持物的寡核苷酸标签,所述寡核苷酸标签可用于与偶联至引物、探针序列、靶序列等的其标签互补序列特异性杂交。适当选择非交叉杂交的标签和抗标签序列在测定中是有用的,特别是高度平行的杂交环境下的测定(其需要严格的非交叉杂交反应)。

[0104] 在设计标签和抗标签序列时需考虑形成核酸杂交体的某些热动力学性质。寡核苷酸与其互补序列形成双链的温度(称为 T_m ,50%的核酸双链解离的温度)根据多种序列依赖性性质而变化,所述性质包括标准A-T和G-C对的氢键合能(反映为GC或者碱基组成)、堆积自由能以及(较小程度地)最邻近相互作用。这些能量在通常用于杂交测定中的寡核苷酸之间差异很大。例如,由24个核苷酸组成的两个探针序列(一个GC含量为40%,另一个GC含量为60%)在标准条件下与其互补靶标之杂交的解链温度理论上相差10°C (Mueller等,1993)。当在包括对于组中所有寡核苷酸序列的正确杂交并非均为最佳的单个杂交温度的杂交条件下形成杂交体时,杂交会出现问题。可发生非互补探针的错配杂交,形成具有可测量之错配稳定性的双链(Santalucia等,1999)。可以在如下杂交条件下发生特定寡核苷酸组中的双链错配,其中错配导致双链稳定性下降,使得产生比该特定组中最不稳定的正确双链更高的 T_m 值。例如,如果杂交在对富含AT的完美匹配双链序列有利的条件下进行,则存在含有错配碱基的富含GC双链序列(其解链温度仍然高于正确形成的富含AT双链)杂交的可能性。因此,设计可以用于多重杂交反应的寡核苷酸序列族时必须考虑寡核苷酸和双链形成的热动力学性质,这将减少或者消除所设计寡核苷酸组内部的交叉杂交反应。

[0105] 有多种不同的方法用于选择标签和抗标签序列以用于多重杂交测定中。对可在可寻址阵列中用作识别码(zip code)或者标签之序列的选择已经描述于由Brenner和其同事所采用方法的专利文献中(美国专利5,654,413,其通过引用并入本文)。Chetverin等(WO 93/17126,美国专利No.6,103,463和6,322,971,其通过引用并入本文)公开了分区的二元寡核苷酸阵列,以对核酸进行分选和研究。这些阵列具有与相邻的可变核苷酸序列连接的恒定核苷酸序列,二者均通过共价连接部分结合到固体支持物上。设计基于亚单元的标签时利用的参数描述于Barany等(WO 9731256,其通过引用并入本文)中。多重测序方法已描述于美国专利4,942,124中,其通过引用并入本文。该方法使用标签序列彼此不同的至少两种载体。

[0106] 美国专利7,226,737(通过引用并入本文)描述了一组210种非交叉杂交的标签和抗标签。美国专利申请公开No.2005/019625(通过引用并入本文)公开了一族1168种标签序列,其显示能与其互补序列正确杂交且交叉杂交尽可能少。

[0107] 寡核苷酸标签或者抗标签序列群可以以几种不同的方式(包括但不限于直接化学合成、化学偶联、连接、扩增等)与引物群或者其它多核苷酸序列缀合。已经与引物序列合成在一起的序列标签可以用于例如PCR扩增中,以使引物在靶标上酶促延伸。寡核苷酸标签或者抗标签序列群可以通过例如支持物表面上的表面化学性质缀合到固体支持物上。

[0108] F. 间隔区部分

[0109] 间隔区部分在第二链合成过程中阻止聚合酶延伸通过标签序列区,因而使得标签序列在扩增过程中保持单链,因此可以自由地与捕获复合物中的其互补抗标签序列杂交。

[0110] 间隔区部分是指当连接(例如共价连接)在第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间时能够有效地抑制(优选阻止)第一或者第二核苷酸序列(但不同时阻止第一和第二核苷酸序列)延伸的任何部分。多种分子可以用作间隔区部分。间隔区部分的非限制性实例包括 C6-20直链亚烷基和 iSp18(18个原子的六乙二醇)。间隔区部分可以包含例如至少一个呋喃脱氧核糖基萘或者呋喃核糖基萘部分,其可以通过3'-呋喃基键或者优选通过2'-呋喃基键与相邻核苷酸连接。间隔区部分可以是与靶标特异性序列反向的寡核苷酸序列。多种间隔区部分和其用途描述于美国专利5,525,494中,其通过引用并入本文。

[0111] III. 实施例

[0112] 下列实施例用于展示本发明的某些实施方案。根据本文公开的内容,本领域技术人员应当理解,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下对所公开的具体实施方案进行多种改动,并且仍得到类似的结果。

[0113] A. 实施例1

[0114] 进行平行(side by side)研究,以对包含标签和抗标签区的形成发夹的引物与包含标签区但不包含抗标签区的不形成发夹的引物进行比较。这些“带标签”引物用作正向引物。PCR扩增前,将经Cy3标记的反向引物(400nM)与相应的正向引物(形成发夹或者不形成发夹)以及检测珠一起加入。靶标是形成血栓倾向基因MTHFR外显子7.27个循环后,在室温下利用LX200(Luminex Corp.)对样品进行分析,其中不加入任何其它缓冲液或报告物,从而代表模拟的封闭管检测方法。

[0115] 正向引物是:

[0116] 12snap:

[0117] 5' C A A A C A A A C A T T C A A A T A T C A A T C / i S p 1 8 /
CTATCTATACATAATGTTTGTTCGAAGGAGGAGCTGCTGAAGATG3' (SEQ ID NO:1)

[0118] 12isoSNAP:

[0119] 5' C A A A C A A A C A T T C A A A T A T C A A T C / i e - i s o d C 所 M e i s o d C /
CTATCTATACATAATGTTTGTTCGAAGGAGGAGCTGCTGAAGATG3' (SEQ ID NO:2) .

[0120] Snap1:

[0121] 5' C A A A C A A A C A T T C A A A T A T C A A T C / i S p 1 8 /
GATTGATATTGAATGTTTGTTCGAAGGAGGAGCTGCTCAACATG3' (SEQ ID NO:3)

[0122] NoSnap

[0123] 5' C A A A C A A A C A T T C A A A T A T C A A T C / i S p 1 8 /
CTATCTATACATTTACAAACATTCCAAGGAGGAGCTGCTGAAGATG3' (SEQ ID NO:4)

[0124] TIF

[0125] 5' CAAACAAACATTCAAATATCAATC/iSp18/CAAGGAGGAGCTGCTCAACATG3' (SEQ ID NO:5)

[0126] 经Cy3标记的反向引物序列是:

[0127] /5Cy3/CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG (SEQ ID NO:6)

[0128] 12snap和12isoSNAP相互不同之处在于12snap含有iSp18间隔区,而12isoSNAP含有isodC间隔区。经Visual OMP软件计算,12snap和 12isoSNAP在溶液中99.9%的时间呈发夹构象(37℃;[一价]=0.0500mol/L;[Mg²⁺]=0.0015mol/L;[甜菜碱]=1.00mol/L)。Snap1与12snap类似,只是前者发夹中具有与其互补抗标签杂交的24个碱基的标签(而12snap中为12个碱基)。NoSnap与12snap长度相等,但是不具有发夹结构。TIF引物包含标签序列,但是没有互补的抗标签序列。

[0129] 所有PCR反应均在相同的混合物中进行。扩增27个循环和扩增36个循环后,对其进行分析。利用下列浓度和试剂制备PCR混合物:

[0130] 表1.

[0131]

	1倍体积	
预混合物	25μl	HotStart TAQ Plus预混合物2× (Qiagen)
H ₂ O	21μl	不含RNA酶的水 (Qiagen)
引物	1μl	IDT (每条引物的终浓度为400nM)
模板	1μl	来自UCLA的经纯化的人DNA样品 (100ng)
珠	2μl	MagPlex微球 (Luminex) (每组5000个)
总计	50μl	

[0132] 这些制剂与下游引物一起使用:

[0133] LUA-MED-TF/5Cy3/CACTTTGTGACCATTCGGTTTG (SEQ ID NO:7)。

[0134] 每条引物的浓度为400nM。反应的循环条件如下:

[0135] 热变性步骤:95℃ 5分钟;

[0136] 循环步骤(36个循环):94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s。

[0137] 扩增后,将反应储存至所有反应完成,接着置于V底板中,在96℃ 3分钟和37℃ 12分钟后利用Luminex 200分析仪进行分析。

[0138] 结果显示于下面表2中。分析物27是阳性珠组,其中抗标签区与珠偶联。分析物33是阴性对照,其中非特异性序列与珠偶联。显示的是中值。

[0139] 表2.

[0140]

位置	样品	分析物 27 MFI	分析物 33 MFI	循环数
1(1,A1)	12isoSNAP	77	11	36
2(1,B1)	12isoSNAP	86	4	
3(1,C1)	12snap	113	14	

[0141]

4(1,D1)	12snap	120	9.5	
5(1,E1)	NoSnap	107	13	
6(1,F1)	NoSnap	111.5	9.5	
7(1,G1)	snap1	98.5	10	
8(1,H1)	snap1	98.5	8	
9(1,A2)	TIF	118	12	
10(1,B2)	TIF	108	15	
11(1,C2)	TIF	36	10.5	27
12(1,D2)	TIF	32.5	7	
13(1,E2)	snap1	24.5	7	
14(1,F2)	snap1	21	13.5	
15(1,G2)	NoSnap	20	8	
16(1,H2)	NoSnap	26.5	12.5	
17(1,A3)	12snap	58	12	
18(1,B3)	12snap	53	15.5	

[0142]

19(1,C3)	12isoSNAP	25	9	
20(1,D3)	12isoSNAP	31.5	13	

[0143] 第27个循环时,与NoSnap引物的信号(MFI为20和26.5)相比,12snap引物的信号(MFI为58和53)较高,这表明12snap引物在应当折叠时发生折叠,并且预计在存在过量引物的反应阶段不会干扰杂交。

[0144] B. 实施例2

[0145] 进行另一项研究,其中如实施例1中所述扩增至27个循环后,向样品中加入更多的与最初扩增时所使用的同样的正向引物(400nM)。扩增后但在杂交前加入过量引物,以测试未延伸的发夹引物是否干扰与珠的杂交,以及TIF引物是否干扰杂交。如果存在干扰,可以预计所加入的引物会减少MFI值。

[0146] 表3.

[0147]

位置	样品	分析物 27 MFI	分析物 33 MFI	总事件数
1(1,A1)	TIF	91.5	8	203
2(1,B1)	TIF	94	5.5	201
3(1,C1)	12snap	115.5	11	211
4(1,D1)	12snap	119	8	206

[0148]

5(1,E1)	TIF 加入 400 nM	63	13.5	208
6(1,F1)	TIF 加入 400 nM	64	8.5	208
7(1,G1)	12snap 加入 400 nM	106	13	207
8(1,H1)	12snap 加入 400 nM	109	15	203

[0149] 如表3和图6中所示,当加入过量的TIF引物时,TIF引物样品的MFI值降至其初始值的68%,而当加入过量的12snap引物时,12snap引物仅使降至其初始值的92%。12snap引物中观察到的信号略微降低可能是由于这些引物形成不完整的发夹结构(因为仅12个碱基对可用于形成发夹)所致。

[0150] C. 实施例3

[0151] 在终止于27个循环的PCR反应中对不同量的引物浓度进行测试,以确定利用额外量的TIF引物或者12snap引物时信号会增加还是减少。结果显示于下面表4和5中。

[0152] 表4.12snap引物

[0153]

位置	引物浓度	分析物 27 MFI	分析物 33 MFI	总事件数
1(1,A1)	100 nM	96	4	213
2(1,B1)	100 nM	99	4	203

[0154]

3(1,C1)	100 nM	101.5	7	211
4(1,D1)	200 nM	111.5	8	220
5(1,E1)	200 nM	103	7	212
6(1,F1)	200 nM	108	10	200
7(1,G1)	400 nM	121	12	206
8(1,H1)	400 nM	114	8	205
9(1,A2)	400 nM	118.5	14.5	214

[0155] 表5.TIF引物

[0156]

位置	引物浓度	分析物 27 MFI	分析物 33 MFI	总事件数
1(1,A1)	100 nM	53	2	234
2(1,B1)	100 nM	63.5	5	214
3(1,C1)	100 nM	62	3.5	206
4(1,D1)	200 nM	60	5.5	209
5(1,E1)	200 nM	63	11	207

[0157]

6(1,F1)	200 nM	62	7.5	216
7(1,G1)	400 nM	55	13	209
8(1,H1)	400 nM	43	8.5	209
9(1,A2)	400 nM	52	14	203

[0158] 数据显示,利用发夹引物通过增加浓度能够获得更强信号,而通过增加TIF引物不能获得更强信号。这表明发夹引物对与珠杂交的干扰程度低于TIF引物。

[0159] D. 实施例4

[0160] 进行两项额外研究,以证实:(1)经Cy3标记的反向引物不与正向引物杂交;和(2)不形成引物二聚体。

[0161] 在PCR溶液中将引物(经Cy3标记的反向引物以及12snap或TIF)与带有抗标签的珠混合,并于96℃加热3分钟,随后于37℃12分钟。如表6中所示,未检测到反向引物与正向引物的非特异性结合。

[0162] 表6.

[0163]

位置	样品	分析物27MFI	分析物33MFI	总事件数
1 (1,A1)	12snap	14.5	24.5	204
2 (1,B1)	12snap	12	14	204

[0164]

3 (1,C1)	无正向引物	3	3.5	203
4 (1,D1)	TIF	12	10.5	205
5 (1,E1)	TIF	11	6	215
6 (1,F1)	无正向引物	2	2.5	200

[0165] 在无模板情况下利用上游引物12snap和TIF以及经Cy3标记的反向引物进行PCR反应,在检查引物二聚体的形成。通过进行96℃ 3分钟,37℃ 12分钟的杂交步骤,利用RD18一式两份运行反应。结果显示于表7中,其显示无引物二聚体形成并与珠杂交。

[0166] 表7.

[0167]

位置	样品	分析物 27 MFI	分析物 33 MFI	总事件数
1(1,A1)	TIF, 无模板	0.5	2	205
1(1,B1)	TIF, 无模板	0.5	0	209
6(1,F1)	12snap, 无模板	5	0.5	203
5(1,E1)	12snap, 无模板	2	0	212
9(1,A2)	TIF	102.5	0	200
10(1,B2)	TIF	104	0	207
14(1,F2)	12snap	132	3.5	208
13(1,E2)	12snap	120	0	224

[0168] E. 实施例5

[0169] 还对形成16聚体和14聚体茎结构的正向引物进行了研究。这些研究 中还包含额外的带有标签但不形成发夹的引物。

[0170] 16snap:

[0171] CAA ACA AAC ATT CAA ATA TCA ATC/iSp 18/CTC TCT ATT TTG AAT GTT

[0172] TGT TTG CAA GGA GGA GCT GCT GAA GAT G (SEQ ID NO:8)

[0173] 14snap:

[0174] CAA ACA AAC ATT CAA ATA TCA ATC/iSp18/CTC AAC TAT TTT GAA TGT

[0175] TTG TTT GCA AGG AGG AGC TGC TGA AGA TG (SEQ ID NO:9)

[0176] 利用与引物区互补的寡聚物在PCR反应和PCR溶液中对16snap和14snap进行测试。设计下列PCR方案,以在不额外加入MgCl₂的Qiagen Hotstart预混合物中对寡聚物进行测试。

[0177] 表8.

[0178]

预混合物	25μl
H ₂ O	19.75μl
引物	2μl
模板	0.25μl

珠 (2)	3 μ l
总计	50 μ l

[0179] 在27个循环时使反应终止,并于96℃ 2分钟以及随后的37℃ 12分钟进行杂交。结果如下:

[0180] 表9.

[0181]

位置	样品	分析物27MFI	分析物33MFI
1 (1,A1)	16snap	33	0
2 (1,B1)	16snap	34	1
3 (1,C1)	16snap	35	2
4 (1,E1)	14snap	32	2
5 (1,F1)	14snap	31	0
6 (1,G1)	14snap	34.5	3.5
7 (1,A2)	12snap	52.5	3
8 (1,B2)	12snap	59	0
9 (1,C2)	12snap	62.5	1
10 (1,E2)	TIF	47.5	0
11 (1,F2)	TIF	47	0

[0182]

12 (1,G2)	TIF	48	2
-----------	-----	----	---

[0183] 表9中的数据还图示于图7中。16snap和14snap引物产生的信号低于12snap。其产生的信号也低于TIF。推测Qiagen Hotstart预混合物中聚合酶的外切核酸酶活性使16snap和14snap引物的茎结构降解。相应地,利用无外切核酸酶活性的聚合酶apta taq进行另一项PCR,也终止于27个循环时。该PCR的混合物如下:

[0184] 表10.

[0185]

10×缓冲液	5 μ l
H ₂ O	29.5 μ l
引物	4 μ l
模板	0.25 μ l
珠 (2)	2 μ l
dNTP	1 μ l
apta taq	0.25 μ l
MgCl ₂	8 μ l
总计	50 μ l

[0186] 利用apta taq的反应结果如下:

[0187] 表11.

[0188]

位置	样品	分析物27MFI	分析物33MFI
----	----	----------	----------

1 (1,A1)	16snap	98	0
2 (1,B1)	16snap	99	2
3 (1,C1)	16snap	94	4
4 (1,D1)	16snap	106	2
5 (1,E1)	14snap	133	0
6 (1,F1)	14snap	127.5	0
7 (1,G1)	14snap	130.5	2
8 (1,H1)	14snap	125.5	0.5
9 (1,A2)	12snap	170	0
10 (1,B2)	12snap	157.5	2.5
11 (1,C2)	12snap	162.5	1
12 (1,D2)	12snap	162	0.5

[0189]

13 (1,E2)	TIF	34.5	5
14 (1,F2)	TIF	32	0
15 (1,G2)	TIF	36	0
16 (1,H2)	TIF	32	3

[0190] 表11中的数据还图示于图8中。所有形成发夹的引物(16snap、14snap和12snap)明显优于不形成发夹的引物(TIF)。

[0191] F. 实施例6

[0192] 用如上所述apta taq PCR中的PCR混合物作为杂交缓冲液,以使与16snap、14snap、12snap和TIF引物中每条引物的引物区互补的经标记寡聚物杂交。如表12中所示,16snap、14snap和12snap引物的发夹结构大大抑制了其珠杂交的能力。

[0193] 表12.

[0194]

位置	样品	分析物27MFI	分析物33MFI
1 (1,A1)	16snap	12.5	9
2 (1,B1)	16snap	10.5	8
3 (1,C1)	14snap	16	12
4 (1,D1)	14snap	19	9

[0195]

5 (1,E1)	12snap	35	10.5
6 (1,F1)	12snap	35	9.5
7 (1,A2)	TIF	425	12
8 (1,B2)	TIF	427	13.5

[0196] G. 实施例7

[0197] 还制备了用于扩增前凝血素基因的寡聚物。这些寡聚物如下:

[0198] PT TIF:

[0199] CAA TTC AAA TCA CAA TAA TCA ATC/iSp18/CTT CCT GAG CCC AGA GAG C (SEQ

ID NO:10)

[0200] 12SNAP/ptu:

[0201] CAA TTC AAA TCA CAA TAA TCA ATC/iSp18/ACA CTC CAC ACATGA TTT GAA TTG
CTT CCT GAG CCC AGA GAG C (SEQ ID NO:11)

[0202] PtdCY3:

[0203] /5Cy3/GTC ATT GAT CAG TTT GGA GAG TAG G (SEQ ID NO:12)

[0204] BeadPT:

[0205] /5AmMC12/GAT TGA TTA TTG TGA TTT GAA TTG (SEQ ID NO:13)

[0206] FV突变体寡聚物FV506Q2:

[0207] /5AmMC12/GTATTCCTTGCCTGTCCA (SEQ ID NO:14)。

[0208] BeadPT寡聚物与珠组29偶联。用上面描述的MTHFR研究中的分析物33和分析物27珠组作为阴性对照。

[0209] 制备两种PCR混合物,其中除了正向引物(PT TIF和12SNAP/ptu)之外所有试剂均相同。对于每种条件,加入无模板的对照和3份加入模板的样品。表13显示PCR混合物。结果示于表14中。

[0210] 表13.

[0211]

10x ThermoPol缓冲液	5 μ l
H ₂ O	34.7 μ l
引物	2 μ l (400 nM)
模板 #24	0.3 μ l (100 ng)
珠	2 μ l (5,000 个珠)
dNTP	1 μ l (0.2 mM)
Deep Vent 聚合酶 (New England BioLabs)	2 μ l (10 个单位)
MgSO ₄	3 μ l (8 mM)
总计	50 μ l

[0212] 表14.

[0213]

位置	样品	分析物 27 MFI	分析物 29 MFI	分析物 33	总事件数
1(1,A1)	12SNAP/ptu, 无模板	14.5	10	23	184
2(1,B1)	12SNAP/ptu	10.5	78	12.5	415
3(1,C1)	12SNAP/ptu	6.5	84	14	322
4(1,D1)	PT TIF,	7	16	17	346
5(1,E1)	PT TIF	15	38	14	336
6(1,F1)	PT TIF	6	36.5	10.5	193

[0214] 从表14中的结果可以看出,使用400nM的引物浓度进行27个循环后,12SNAP/ptu引物的信号差异大约是PT TIF引物的两倍,其中PCR方案为:97℃,5分钟;(97℃,30秒;55℃,30秒;72℃,30秒)×27个循环;随后72℃ 7分钟。这些结果还显示,如果联合用于多重反应中,PT引物不会与MHFTR引物组交叉杂交。

[0215] H. 实施例8

[0216] 进行伪实时PCR,其中将PCR混合物(利用Deep Vent无外切核酸酶活性的聚合酶)分成16份,以用于每个引物组中。随循环数的增加从热循环仪中依次取出每一份样品,以测定每个循环的信号水平。这利用两步式快速PCR反应进行,并在总共36个循环的PCR方案结束时于室温利用LX200 (Luminex)对小份样品进行测定。

[0217] 如图9中所显示,与PT TIF引物在29个循环(58分钟)时观察到信号相比,12SNAP/ptu引物在仅22个循环(44分钟)时就可以观察到信号。除了更早产生可观察到的信号之外,从图9中还可以看出,形成发夹的引物更加灵敏。在22个循环时,PT TIF引物的信号仅是12SNAP/ptu引物信号的16%,而在33个循环时峰值仅为75%。

[0218] I. 实施例9

[0219] 在玻璃载玻片上进行实时PCR实验,其中实验过程中镜头和hex-发光器位于玻片正上方。构建玻璃载玻片室,利用DMDCS对玻片进行化学修饰,随后浸入多聚腺苷酸钾盐中。利用原位PCR试剂盒用粘性垫(BioRad)使载玻片和盖玻片粘合到一起。将这些置于配有玻

片架的BioRad DNA Engine热循环仪上。该特定的玻片架上打有一孔,其位于96孔的一个孔正上方。将暴露的孔涂黑,将玻璃室放置于架中孔的正上方,以减少背景的反射光。通过将CCD相机和光源偶联到DNA Engine热循环仪,构建实时PCR装置。将Hex-发光器放置于载玻片正上方,并在PCR反应过程中保持于此处。将下列混合物放入25 μ L体积的玻璃室中:

[0220] 表15.

[0221]	10x ThermoPol 缓冲液	5 μ l
	H ₂ O	34.7 μ l
	引物 12SNAP/ptu & PtdCY3	200 nM 每种
	模板 #24	0.3 μ l (100 ng)

[0222]	珠	2 μ l (5,000个珠)
	dNTP	1 μ l (每种0.2mM)
	Deep Vent 聚合酶 (New England BioLabs)	2 μ l (10个单位)
	MgSO ₄	3 μ l (8 mM)
	总计	50 μ l

[0223] 运行下列PCR循环条件:1) 97 $^{\circ}$ C, 5分钟;2) 105 $^{\circ}$ C, 15秒;3) 96 $^{\circ}$ C, 30秒;4) 50 $^{\circ}$ C, 5秒;5) 68 $^{\circ}$ C, 30秒;6) 返回至2, 5次;7) 15 $^{\circ}$ C, 10秒;8) 24 $^{\circ}$ C, 5分钟;9) 返回至2, 6次;10) 结束。这些条件包括用于补偿由玻片架的加热延迟导致的额外过渡时间。

[0224] 于24 $^{\circ}$ C以每5个循环的间隔对珠采集图像4分钟。运行之间不摇动玻璃室。数据显

示于表16和图10中。

[0225] 表16.

所示循环之前	珠	MFI
6	1	251
	2	232
12	1	246

[0226]

[0227]

	2	248
18	1	235
	2	241
24	1	276
	2	220
30	1	316
	2	183
36	1	281
	2	154
42	1	299
	2	178

[0228] J. 实施例10

[0229] 对引物中使用之发夹茎区域长度的优化进行评估,所述引物含有相反链延伸时与

通用标记探针结合的通用标签序列。为了寻找反向引物发夹茎 区域长度的最佳长度以及通用报告探针的长度,使具有不同茎长度的一系列引物和具有不同长度的通用报告探针反应,以进行比较。

[0230] 在这些反应中,使用茎长度为11聚体、14聚体、16聚体和0聚体的反向发夹引物。使这些引物与偶联有探针的珠杂交,所述探针与这些发夹引物中每条引物的特异性引物区互补。每50μL反应包含:

[0231] 8mM MgCl₂

[0232] 1×Qiagen PCR缓冲液

[0233] 5000个珠

[0234] 200nM引物

[0235] 200nM通用报告探针

[0236] 所有试剂于95℃杂交5分钟,随后为37℃15分钟。接着利用Luminex Lx200分析仪对Luminex磁珠进行分析。

[0237] 该反应中使用下列寡聚物:

[0238] BeadTagantiprime

[0239] /5AmMC12/TAG TTG CAA ATC CGC GAC AA (SEQ ID NO:15)

[0240] NoSnaprevNei

[0241] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/AGG TAT TGA AGT TTT GTC GCG GATTTG CAA CTA (SEQ ID NO:16)

[0242] Univlabeled13

[0243] /5Cy3/AAT ACA TCA TCA T/3InvdT/ (SEQ ID NO:17)

[0244] UnivLabeled 15

[0245] /5Cy3/ACA ATA CAT CAT CAT/3InvdT/ (SEQ ID NO:18)

[0246] Snap11revNei

[0247] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/TAC ATC ATC ATT TGT CGC GGA TTT GCA ACT A (SEQ ID NO:19)

[0248] Snap14RevNei

[0249] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/CAA TAC ATC ATC ATTTGT CGC GGA TTT GCA ACT A (SEQ ID NO:20)

[0250] Snap16RevNei

[0251] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/TAC AAT ACA TCA TCA TTT GTC GCG GAT TTG CAA CTA (SEQ ID NO:21)

[0252] 表17.

[0253]

反向引物类型	通用探针	MFI
Snap11revNei	通用标记13	8
Snap11revNei	通用标记13	6
Snap11revNei	通用标记15	40

Snap11revNei	通用标记15	43
Snap14RevNei	通用标记13	3
Snap14RevNei	通用标记13	3
Snap14RevNei	通用标记15	3
Snap14RevNei	通用标记15	4
Snap16RevNei	通用标记13	3
Snap16RevNei	通用标记13	1
Snap16RevNei	通用标记15	2
Snap16RevNei	通用标记15	2
NoSnaprevNei	通用标记13	929
NoSnaprevNei	通用标记13	1009
NoSnaprevNei	通用标记15	862
NoSnaprevNei	通用标记15	1399

[0254] 该研究的目的是为了寻找一种引物/探针对,其中引物的发夹区在通用标记探针存在下保持封闭状态,但是一旦形成双链扩增产物,在通用探针存在下保持打开状态。为了确保形成双链产物后发夹保持打开状态,我们选择一种引物/探针对,其中发夹单体具有足够强的结合能以保持封闭状态,但是又具有足够弱的结合能以在双链产物和通用标记探针存在下保持打开状态。在该研究中,这种配对需要处于打开状态的临界点附近。经鉴定,最佳配对是Snap11revNei/通用标记13。选择该配对用于随后的PCR反应中,因为MFI值低表明其处于封闭状态,但是如果使用较长的通用标记探针,一些发夹打开(如40-43的MFI值所示)。这表明Snap11revNei/通用标记13是封闭的,但是接近于一些会打开的临界点。

[0255] K. 实施例11

[0256] 在封闭管中对用于实时定量PCR中的脑膜炎奈瑟氏菌DNA(ATCC 700532D-5)进行系列稀释。该实验显示能够进行定量实时PCR以鉴定模板DNA的不同输入浓度。制备PCR混合物,其中每25μL反应含有:

[0257] 8mM MgCl₂

[0258] 1×Qiagen PCR缓冲液

[0259] 5000个珠(每个区域)

[0260] 200nM引物

[0261] 200nM通用报告探针

[0262] 利用密封的玻璃室对脑膜炎奈瑟氏菌DNA进行实时扩增,将其置于带有玻片架的热循环仪上。如实施例11进行这些反应。第一个密封室含有一百万个拷贝的DNA,第二个室含有100,000个拷贝,第三个室含有10,000个拷贝的脑膜炎奈瑟氏菌DNA。

[0263] 该实验中使用两组珠。一组珠(组2)与和正向引物(Snap12fwdShrtNei)的标签区互补的探针(BeadTag Nei)偶联。另一组珠(组1)与不和反应中任何物质特异性杂交的探针(BeadTag antiList)偶联。组1用于监测反应中的非特异性信号,并且用作归一化和减除背景的工具,以补偿每次采集图像时光强度的不同。

[0264] Snap11revNei

[0265] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp 18/TAC ATC ATC ATT TGT CGC GGA

TTT GCA ACT A (SEQ ID NO:22)

[0266] BeadTag Nei

[0267] /5AmMC12/GAT TGA TAT TTG AAT GTT TGT TTG/3InvdT/ (SEQ ID NO:23)

[0268] Snap12fwdShrtNei

[0269] CAA ACA AAC ATT CAA ATA TCA ATC/iSp18/AAT GTT TGT TTG GCT GCG GTA GGT
GGT TCA A (SEQ ID NO:24)

[0270] Univlabeled13

[0271] AAT ACA TCA TCA T/3Cy3/ (SEQ ID NO:25)

[0272] BeadTag antiList

[0273] /5AmMC12/GTT TGT ATT TAG ATG AAT AGA AAG/3InvdT/ (SEQ ID NO:26)

[0274] 对于每个循环中每组珠的数据列于下面。所有3个反应中每个时间点每个珠组1的平均MFI是3931MFI。通过用非特异性珠组(组1)除以3931MFI,可以利用该平均值得到归一化系数。将每个原始数据点除以每个时间点特异性的归一化系数。经归一化后,用针对检测脑膜炎奈瑟氏菌的特异性珠组(组2)归一化的MFI减去组1归一化MFI。该计算得到每个时间点组2经归一化的净MFI。数据示于下表中。

[0275] 表18.

[0276] 一百万个拷贝

	循环数	珠子组	原始中值	归一化系数	净 MFI	归一化 MFI	净 归一化 MFI
[0277]	0	1	3757	0.96	127	3931	133
		2	3884			4064	
	12	1	3120	0.79	-76	3931	-96
		2	3044			3836	
	18	1	3124	0.79	158	3931	199
		2	3282			4130	
	24	1	3009	0.77	563	3931	736
		2	3572			4667	
	30	1	2863	0.73	601	3931	825
		2	3464			4757	
[0278]	100,000个拷贝						

	循环数	珠子组	原始中值	归一化系数	净 MFI	归一化 MFI	净 归一化 MFI
[0279]	0	1	3931	1.00	-15	3931	-15
		2	3916			3916	
	6	1	4120	1.05	18	3931	17
		2	4138			3949	
	12	1	4403	1.12	58	3931	52
		2	4461			3983	
	18	1	4431	1.13	154	3931	137
		2	4585			4068	
	24	1	4396	1.12	579	3931	518
		2	4975			4449	
	30	1	4083	1.04	790	3931	761
		2	4873			4692	
	36	1	4175	1.06	787	3931	741
		2	4962			4673	
	[0280]	10,000个拷贝					

	循环数	珠子组	原始中值	归一化系数	净 MFI	归一化 MFI	净 归一化 MFI
[0281]	0	1	4220	1.07	136	3931	127
		2	4356			4058	
	6	1	4417	1.12	244	3931	217
		2	4661			4149	
	12	1	4819	1.23	210	3931	171
		2	5029			4103	
	18	1	4671	1.19	144	3931	121
		2	4815			4053	
	24	1	4671	1.19	144	3931	121
		2	4815			4053	
	30	1	3326	0.85	521	3931	616
		2	3847			4547	
	36	1	3162	0.80	699	3931	869
		2	3861			4801	

重脑膜炎测定,以对脑膜炎奈瑟氏菌、单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria Monocytogenes*) 和流感嗜血杆菌 (*Haemophilus Influenzae*) 进行检测。在同一反应中同时使用3组引物。将各菌种的基因组DNA置于各反应中,以表明测定的特异性。

[0282] 从IDT订购下列引物和探针序列并使用。

[0283] 引物组1:

[0284] SIF4fwdList-t88

[0285] TTA CTT CAC TTT CTA TTT ACA ATC/iSp18/AAG TGA AGT AAA TTG CGA AAT TTG GTA CAG C (SEQ ID NO:27)

[0286] SIF13RCrevList

[0287] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/TAC ATC ATC ATC TGA TTG CGC CGA

AGT TTA CAT TC (SEQ ID NO:28)

[0288] 引物组2:

[0289] SIFprobeFwdHaem-t86

[0290] CTA ATT ACT AAC ATC ACT AAC AAT/iSp18/GTT AGT AAT TAG TTG TTT ATA ACA
ACG AAG GGA CTA ACG T (SEQ ID NO:29)

[0291] SIFrevHaem

[0292] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/TAC ATC ATC ATG ATT GCG TAA TGC
ACC GTG TT (SEQ ID NO:30)

[0293] 引物组3:

[0294] Snap12fwdShrtNei

[0295] CAA ACA AAC ATT CAA ATA TCA ATC/iSp18/AAT GTT TGT TTG GCT GCG GTA GGT
GGT TCA A (SEQ ID NO:31)

[0296] Snap11revNei

[0297] ATG ATG ATG TAT TGT AGT TAT GAA/iSp18/TAC ATC ATC ATT TGT CGC GGA TTT
GCA ACT A (SEQ ID NO:32)

[0298] 偶联到珠上的探针:

[0299] 珠组27/脑膜炎奈瑟氏菌特异性正向引物:/5AmMC12/GAT TGA TAT TTG AAT GTT
TGT TTG/3InvdT/ (SEQ ID NO:33)

[0300] 珠组62/单核细胞增生性李斯特菌特异性正向引物:GAT TGT AAA TAG AAA GTG
AAG TAA/3AmM/ (SEQ ID NO:34)

[0301] 珠组67/流血嗜血杆菌特异性正向引物:ATT GTT AGT GAT GTT AGT AAT TAG/
3AmM/ (SEQ ID NO:35)

[0302] 通用标记探针:13Uni-AAT ACA TCA TCA T/3Cy3Sp/ (SEQ ID NO:36)

[0303] 每种PCR混合物使用下列体积 (μL):

[0304] 表19

[0305]

材料	1x 体积
10x缓冲液	5
H2O	35.1
引物组 1 (10 μ M)	1
引物组 2 (10 μ M)	1
引物组 3 (10 μ M)	1
每种模板	1
dntp (10mM)	1
聚合酶 (50U/ μ L)	0.2
MgCl ₂ (50mM)	6
珠组 1 (5000 个珠/ μ L)	0.5
珠组 2 (5000 个珠/ μ L)	0.5
珠组 3 (5000 个珠/ μ L)	0.5
U13 (100 μ M)	0.2
总计	53

[0306] PCR材料: (Roche) Apta Taq delta exo DNA聚合酶, 无甘油, 50U/ μ L-样品2, 5KU (100 μ L); (Roche PN:13409500) PCR缓冲液, 无MgCl₂, 10 $\times$ 浓度; (Invitrogen PN:18427-088) 10mM dNTP混合物。

[0307] 热循环参数: 97 $^{\circ}$ C 4分钟, 接着35个循环 (97 $^{\circ}$ C 30秒, 62 $^{\circ}$ C 30秒), 接着72 $^{\circ}$ C 7分钟。

[0308] 利用Luminex MagPlex-C磁性微球, 通过使用Luminex推荐的EDC偶联步骤与其相应的探针序列偶联, 从而预先制备每组珠。

[0309] 下列基因组DNA样品从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 获得:

[0310] 表20.

[0311]

项目编号	描述	批号
700532D-5 DR	脑膜炎奈瑟氏菌 菌株 FAM18	7385221
BAA-679D-5 DR	单核细胞增生性李斯特菌菌株 EGDe	57878064
51907D FZ	流感嗜血杆菌	2662083

[0312] PCR反应后, 将样品加热至95 $^{\circ}$ C 2分钟, 并在利用Luminex 200分析仪分析之前于室温放置8分钟。每组珠收集100个珠事件, 并获得每个反应中每组珠的荧光强度中值 (Median Fluorescence Intensity, MFI)。每个样品获得下列MFI值:

[0313] 表21.

[0314]

输入基因组 DNA		珠组 27	珠组 62	珠组 67
样品 1	流感嗜血杆菌	7	10	67
样品 2	单核细胞增生性李斯特菌	6	87	3
样品 3	脑膜炎奈瑟氏菌	73	13.5	0
样品 4	无模板	2	9.5	0

[0315] 这些结果显示发夹引物具有多重测定的能力。

[0316] 针对不同菌种的靶标特异性引物组部分从下列公众可利用的文献中获得：

[0317] 脑膜炎奈瑟氏菌：

[0318] Corless,C.E.,Guiver,M.,Borrow,R.,Edwards-Jones,V.,Fox,A.J.,和Kaczmarek,E.2001.Simultaneous Detection of Neisseria Meningitidis, Haemophilus Influenzae,and Streptococcus Pneumoniae in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR.Journal of Clinical Microbiology.39:1553-1558.

[0319] 单核细胞增生性李斯特菌：

[0320] Johnson,w.,Tyler,S.,Ewan,E.,Ashton,F.,Wang,G.和Roze,K.1992.Detection of Genes Coding for Listeriolysin and Listeria monocytogenes Antigen A (LmaA) in Listeria spp.by the Polymerase Chain Reaction.Microbial Pathogenesis 12; 79-86.

[0321] Bohnert,M.,Dilasser,F.,Dalet,C.Mengaud,J.和Cossart,P.1992.Use of Specific Oligonucleotides for Direct Enumeration of Listeria monocytogenes in Food Samples by Colony Hybridization and Rapid Detection by PCR.Res.Microbiol.143;271-280.

[0322] 流感嗜血杆菌：

[0323] Maaroufi,Y.,Bruyne,J.,Heymans,C.和Crokaert,F.2007.Real-Time PCR for Determining Capsular Serotypes of Haemophilus Influenzae.Journal of Clinical Microbiology.45:2305-2308

[0324] 根据本文中公开的内容，本文中公开和要求保护的所有组合物和方法无需过度实验即可制备和实施。尽管已经通过优选的实施方式对本发明的组合物和方法进行了描述，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，在不背离本发明的构思、精神和范围的前提下，可以对本文中描述的组合物和方法以及方法的步骤或者步骤次序进行改动。更具体地，显而易见的是，可以用本文中描述的试剂来替换某些在化学上和生理上相关的试剂，而实现相同或者类似的结果。所有这些对于本领域技术人员来说显而易见的类似替代和改变均被视为在由所附权利要求限定的本发明的精神、范围和构思内。

[0325] 参考文献

[0326] 下列文献通过引用具体地并入本文，至提供示例性步骤或者其它细节的程度，以作为对本文中所涉及内容的补充。

[0327] 美国专利4,284,412
[0328] 美国专利4,498,766
[0329] 美国专利4,659,774
[0330] 美国专利4,661,913
[0331] 美国专利4,682,195
[0332] 美国专利4,683,202
[0333] 美国专利4,714,682
[0334] 美国专利4,767,206
[0335] 美国专利4,774,189
[0336] 美国专利4,816,571
[0337] 美国专利4,857,451
[0338] 美国专利4,883,750
[0339] 美国专利4,942,124
[0340] 美国专利4,959,463
[0341] 美国专利4,989,977
[0342] 美国专利5,137,806
[0343] 美国专利5,141,813
[0344] 美国专利5,160,974
[0345] 美国专利5,264,566
[0346] 美国专利5,428,148
[0347] 美国专利5,478,722
[0348] 美国专利5,525,494
[0349] 美国专利5,539,082
[0350] 美国专利5,554,744
[0351] 美国专利5,574,146
[0352] 美国专利5,595,890
[0353] 美国专利5,602,244
[0354] 美国专利5,639,611
[0355] 美国专利5,645,897
[0356] 美国专利5,654,413
[0357] 美国专利5,705,629
[0358] 美国专利5,714,331
[0359] 美国专利5,719,262
[0360] 美国专利5,736,330
[0361] 美国专利5,736,336
[0362] 美国专利5,766,855
[0363] 美国专利5,773,571
[0364] 美国专利5,786,461
[0365] 美国专利5,837,832

[0366] 美国专利5,837,860
[0367] 美国专利5,840,873
[0368] 美国专利5,843,640
[0369] 美国专利5,843,650
[0370] 美国专利5,843,651
[0371] 美国专利5,846,708
[0372] 美国专利5,846,709
[0373] 美国专利5,846,717
[0374] 美国专利5,846,726
[0375] 美国专利5,846,729
[0376] 美国专利5,846,783
[0377] 美国专利5,849,487
[0378] 美国专利5,849,497
[0379] 美国专利5,849,546
[0380] 美国专利5,849,547
[0381] 美国专利5,853,990
[0382] 美国专利5,853,992
[0383] 美国专利5,853,993
[0384] 美国专利5,856,092
[0385] 美国专利5,858,652
[0386] 美国专利5,861,244
[0387] 美国专利5,863,732
[0388] 美国专利5,863,753
[0389] 美国专利5,866,331
[0390] 美国专利5,866,366
[0391] 美国专利5,882,864
[0392] 美国专利5,891,625
[0393] 美国专利5,905,024
[0394] 美国专利5,908,845
[0395] 美国专利5,910,407
[0396] 美国专利5,912,124
[0397] 美国专利5,912,145
[0398] 美国专利5,912,148
[0399] 美国专利5,916,776
[0400] 美国专利5,916,779
[0401] 美国专利5,919,630
[0402] 美国专利5,922,574
[0403] 美国专利5,925,517
[0404] 美国专利5,928,862

- [0405] 美国专利5,928,869
- [0406] 美国专利5,928,905
- [0407] 美国专利5,928,906
- [0408] 美国专利5,929,227
- [0409] 美国专利5,932,413
- [0410] 美国专利5,932,451
- [0411] 美国专利5,935,791
- [0412] 美国专利5,935,825
- [0413] 美国专利5,939,291
- [0414] 美国专利5,942,391
- [0415] 美国专利5,981,180
- [0416] 美国专利6,057,107
- [0417] 美国专利6,103,463
- [0418] 美国专利6,287,778
- [0419] 美国专利6,322,971
- [0420] 美国专利7,226,737
- [0421] 美国专利7,226,737
- [0422] 美国专利申请公开2005/0191625
- [0423] Egholm et al., Nature, 365 (6446) :566-568, 1993.
- [0424] EP申请266,032
- [0425] EP申请320,308
- [0426] EP申请329,822
- [0427] Fodor et al., Biochemistry, 30 (33) :8102-8108, 1991.
- [0428] Froehler et al., Nucleic Acids Res., 14 (13) :5399-5407, 1986.
- [0429] Frohman, In: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, N.Y., 1990.
- [0430] GB Appln. 2 202 328
- [0431] Holmstrom et al., Anal. Biochem. 209:278-283, 1993.
- [0432] Koshkin and Dunford, J. Biol. Chem., 273 (11) :6046-6049, 1998a.
- [0433] Koshkin and Wengel, J. Org. Chem., 63 (8) :2778-2781, 1998b.
- [0434] Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173, 1989.
- [0435] Mueller et al., Current Protocols in Mol. Biol., 15:5, :1993.
- [0436] Newton et al., Nucl. Acids Res. 21:1155-1162, 1993.
- [0437] Ohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5673-5677, 1989.
- [0438] PCT申请WO 00/47766
- [0439] PCT申请WO 88/10315
- [0440] PCT申请WO 89/06700
- [0441] PCT申请WO 90/07641
- [0442] PCT申请WO 92/20702

- [0443] PCT申请W0 93/17126
- [0444] PCT申请W0 9731256
- [0445] PCT申请W005087789
- [0446] PCT申请W007/085087
- [0447] PCT申请PCT/EP/01219
- [0448] PCT申请PCT/US87/00880
- [0449] PCT申请PCT/US89/01025
- [0450] Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5022-5026, 1994.
- [0451] Rasmussen et al., Anal. Biochem, 198:138-142, 1991.
- [0452] Running et al., BioTechniques 8:276-277, 1990.
- [0453] Santalucia et al., Biochemistry; 38:3468-3477, 1999.
- [0454] Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (10) :5633-5638, 2000.
- [0455] Walker et al., Nucleic Acids Res. 20 (7) :1691-1696, 1992.

[0001]

序 列 表

<110> WHITMAN, DOUGLAS F.
ZHANG, HONGWEI

<120> 具有发夹构象的嵌合引物及其使用方法

<130> LUMN.P0036W0

<140> UNKNOWN

<141> 2010-06-29

<150> 61/221, 271

<151> 2009-06-29

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 1

caaacaaaca ttcaaataac aatccatctc atacataatg ttgttttgca aggaggagct 60

gctgaagatg 70

<210> 2

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 2

caaacaaaca ttcaaataac aatccctatc tatacataat gttgttttgc aaggaggagc 60

tgctgaagat g	71
<210> 3	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 3	
caaacaaca ttcaaatatc aatcgattga tattgaatgt ttgtttgcaa ggaggagctg	60
ctcaacatg	69
<210> 4	
<211> 70	
<212> DNA	
[0002] <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 4	
caaacaaca ttcaaatatc aatcctatct atacatttac aaacattcca aggaggagct	60
gctgaagatg	70
<210> 5	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 5	
caaacaaca ttcaaatatc aatccaagga ggagctgctc aacatg	46

	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 6	
	cactttgtga ccattccggt ttg	23
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
[0003]	<400> 7	
	cactttgtga ccattccggt ttg	23
	<210> 8	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 8	
	caaacaaca ttcaaatac aatcctctct attttgaatg ttgttttgca aggaggagct	60
	gctgaagatg	70
	<210> 9	
	<211> 71	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成引物	
<400>	9	
caaacaaca ttcaaatac aatcctcaac tattttgaat gtttgttgc aaggaggagc		60
tgctgaagat g		71
<210>	10	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	10	
caattcaaat cacaataac aatccttcct gagccagag agc		43
[0004]		
<210>	11	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	11	
caattcaaat cacaataac aatcacactc cacacatgat ttgaattgct tctgagccc		60
agagagc		67
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	

	<400> 12	
	gtcattgatc agtttggaga gtagg	25
	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 13	
	gattgattat tgtgattga attg	24
	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 14	
	gtattccttg cctgtcca	18
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 15	
	tagttgcaaa tccgcgacaa	20
	<210> 16	
	<211> 57	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	16	
	atgatgatgt attgtagtta tgaaaggat tgaagtttgcgcggattt gcaacta	57
<210>	17	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	17	
	aatacatcat cat	13
[0006]		
<210>	18	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	18	
	acaatacatc atcat	15
<210>	19	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	19	

	atgatgatgt attgtagtta tgaatacatc atcatttgtc gcggtattgc aacta	55
	<210> 20	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 20	
	atgatgatgt attgtagtta tgaacaatac atcatcattt gtgcgggatt tgcaacta	58
	<210> 21	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0007]	<223> 合成引物	
	<400> 21	
	atgatgatgt attgtagtta tgaatacaat acatcatcat ttgtcggga ttgcaacta	60
	<210> 22	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 22	
	atgatgatgt attgtagtta tgaatacatc atcatttgtc gcggtattgc aacta	55
	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	23	
		gattgatatt tgaatgttg ttg	24
	<210>	24	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	24	
		caaacaaca ttcaatatc aatcaatgtt tgtttgctg cggtaggtag ttcaa	55
[0008]	<210>	25	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	25	
		aatacatcat cat	13
	<210>	26	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	26	
		gtttgtattt agatgaatag aaag	24

	<210> 27	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 27	
	ttacttcaact ttctatttac aatcaagtga agtaaattgc gaaatttggt acagc	55
	<210> 28	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
[0009]	<400> 28	
	atgatgatgt attgtagtta tgaatacac atcatctgat tgcgccgaag ttacattc	59
	<210> 29	
	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 29	
	ctaattacta acatcactaa caatgtagt aattagttgt ttataacaac gaagggacta	60
	acgt	64
	<210> 30	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	30	
		atgatgatgt attgtagtta tgaatacatc atcatgattg cgtaatgcac cgtgtt	56
	<210>	31	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	31	
		caaacaca ttcaaatatc aatcaatgtt tgtttgctg cggtaggtgg ttcaa	55
[0010]	<210>	32	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	32	
		atgatgatgt attgtagtta tgaatacatc atcatttgc gcgatttgc aacta	55
	<210>	33	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	33	
		gattgatatt tgaatgtttg ttig	24

	<210> 34 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成引物 <400> 34 gattgtaaat agaaagtgaa gtaa	24
	<210> 35 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
[0011]	<220> <223> 合成引物 <400> 35 attgttagtg atgttagtaa ttag	24
	<210> 36 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成引物 <400> 36 aatacatcat cat	13

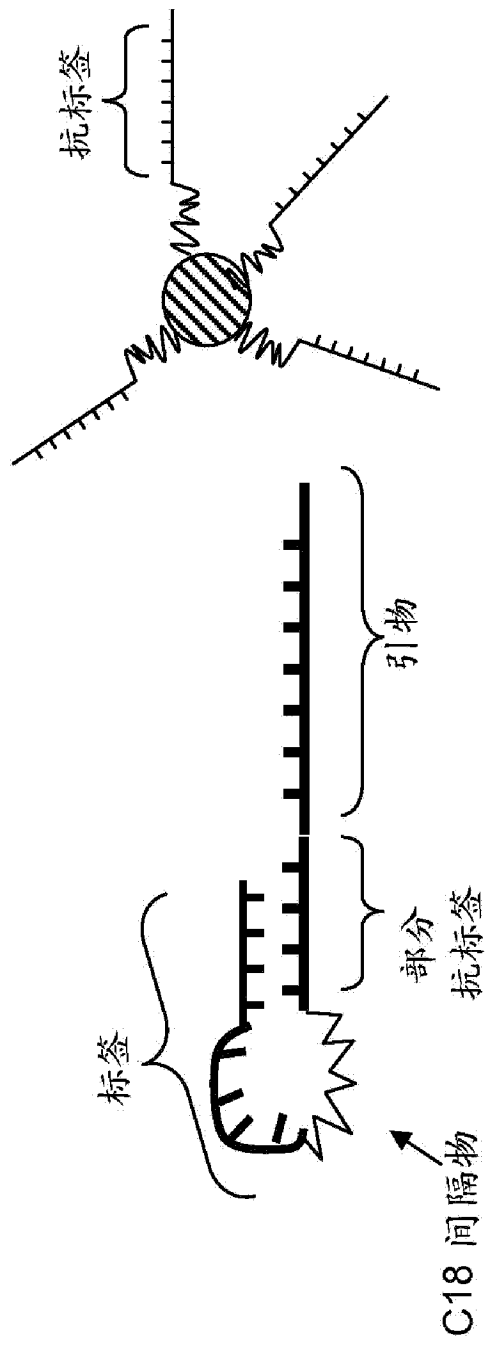


图1A

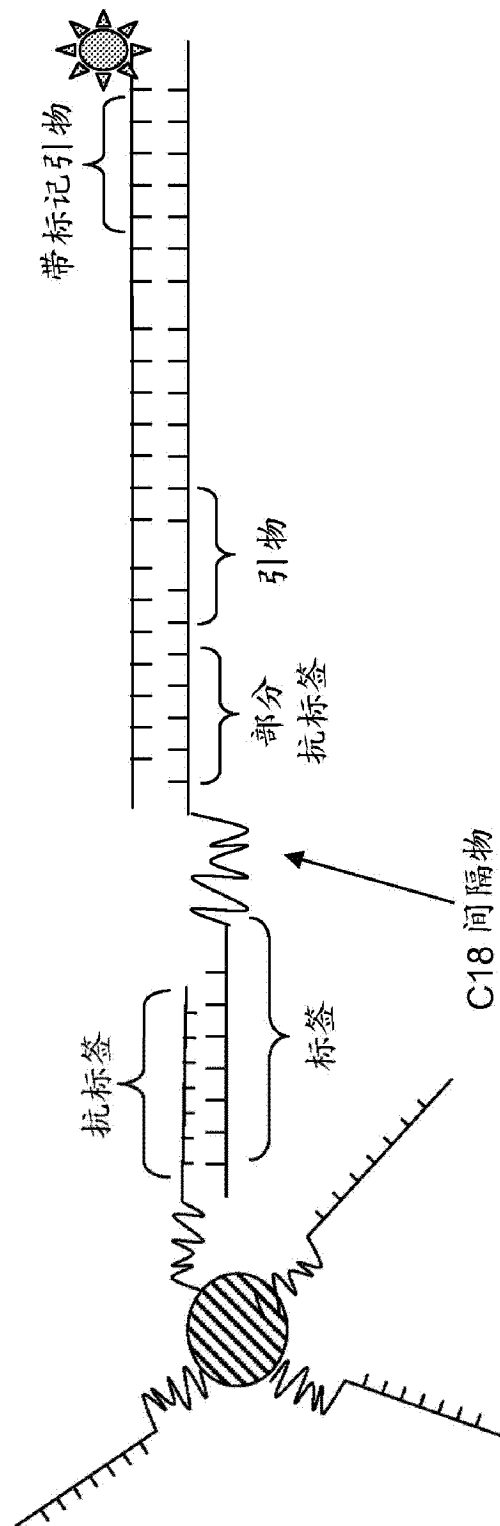


图1B

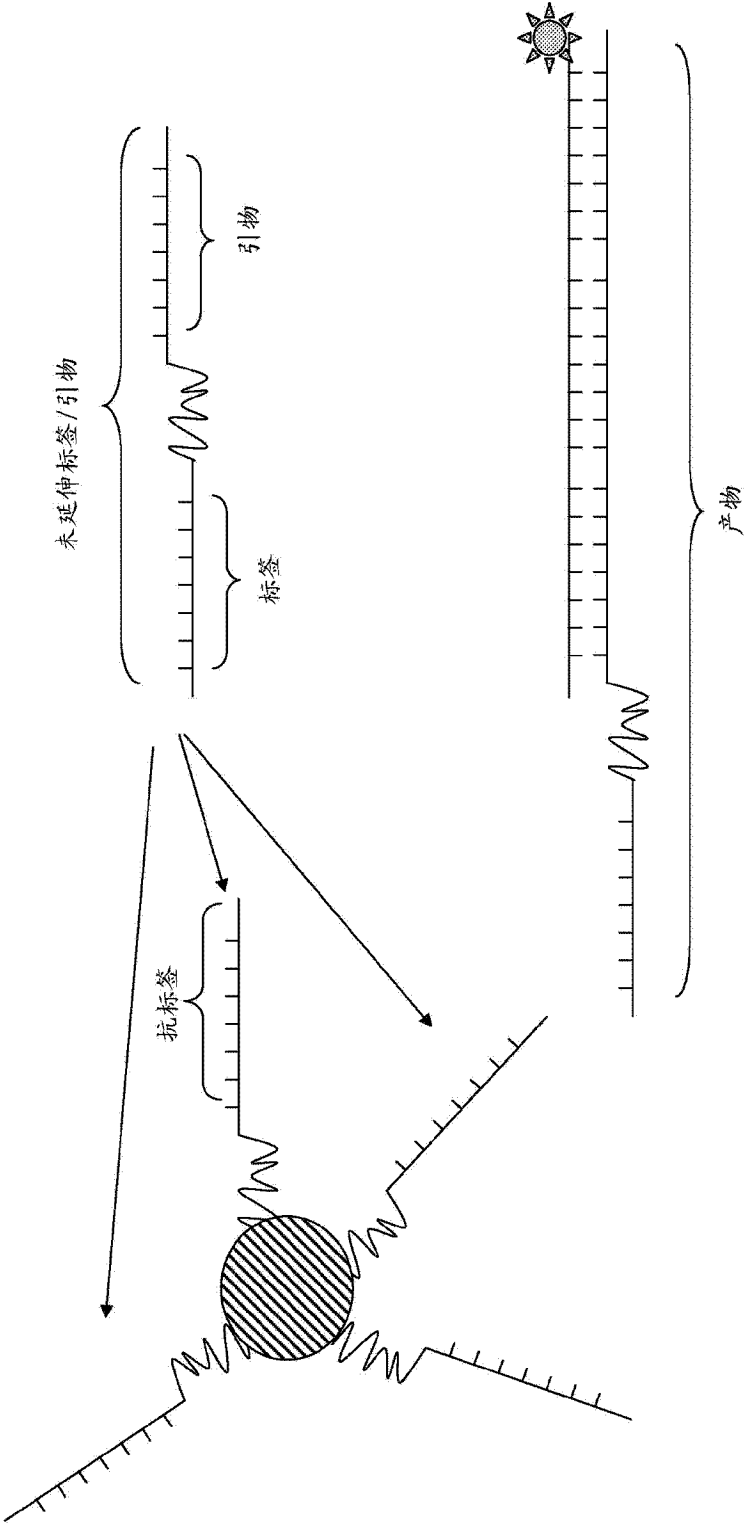


图2

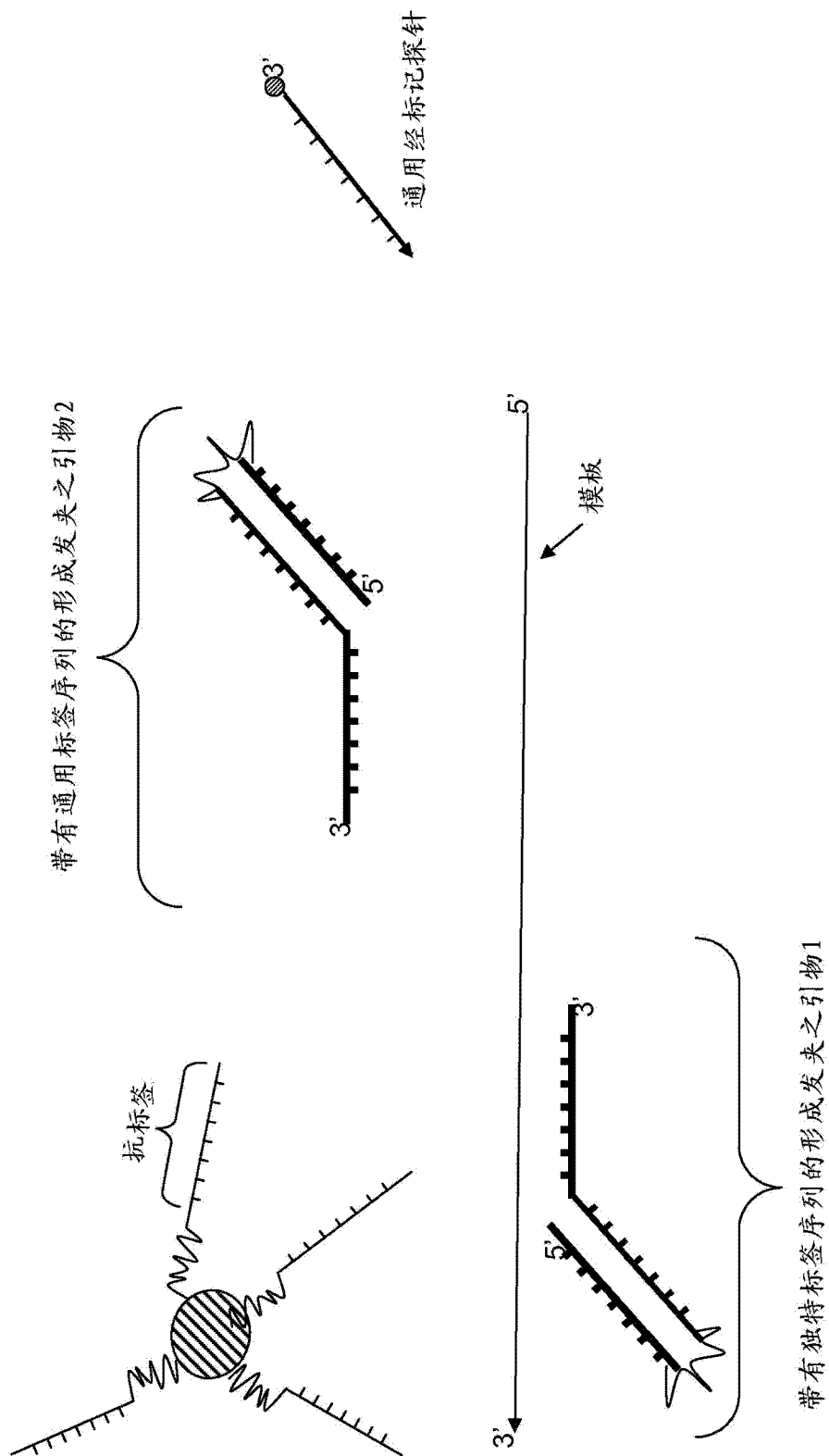


图3A

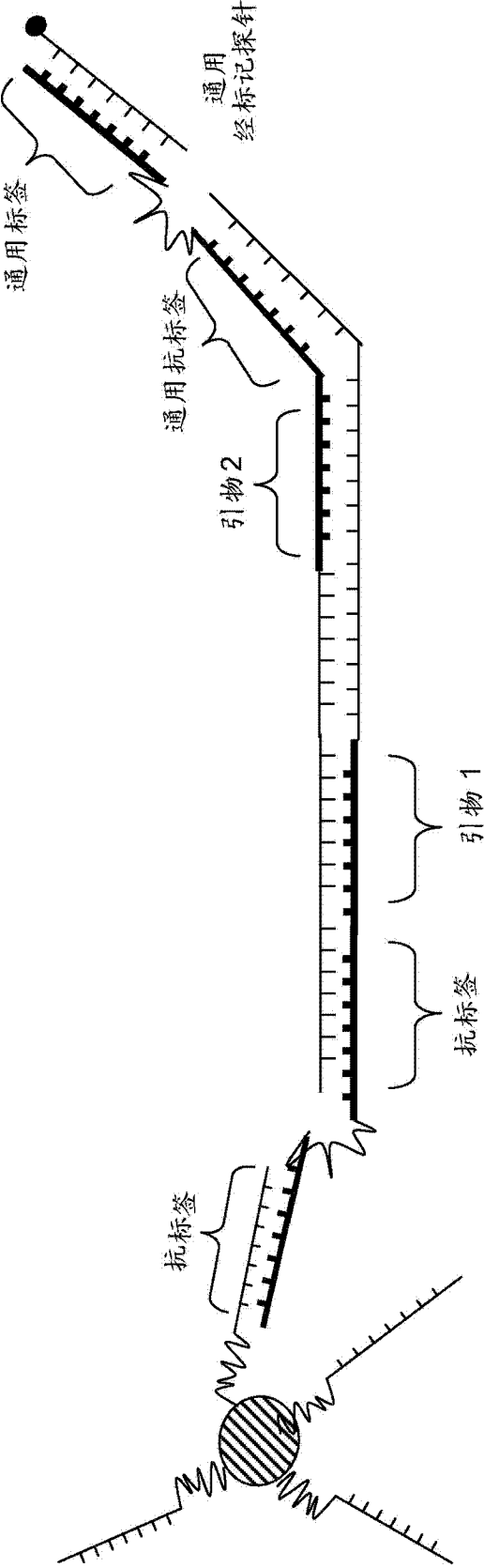
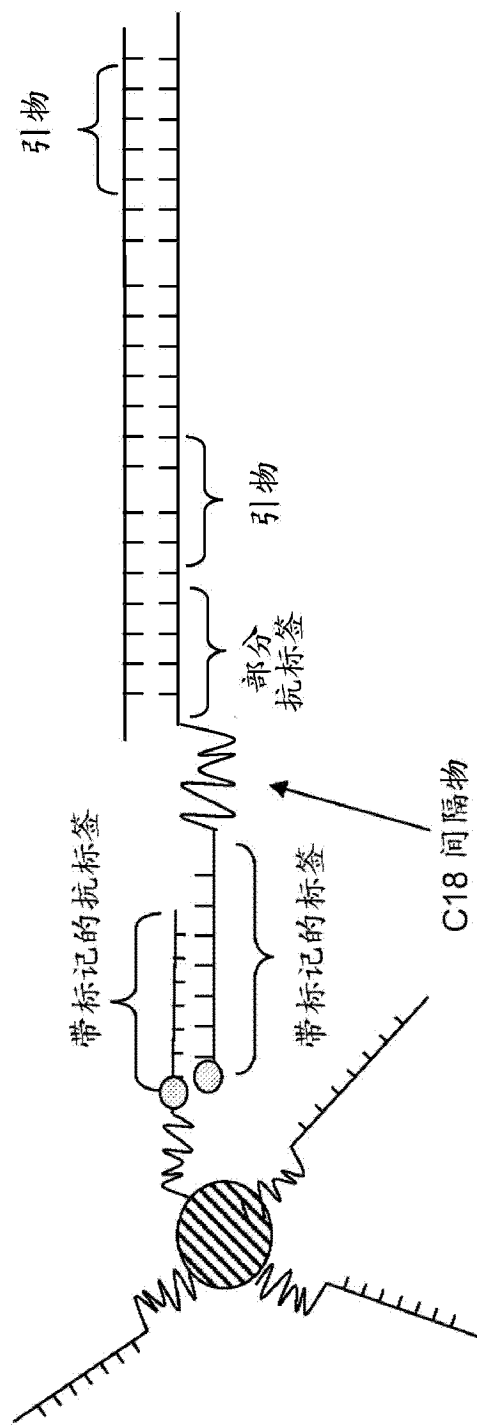
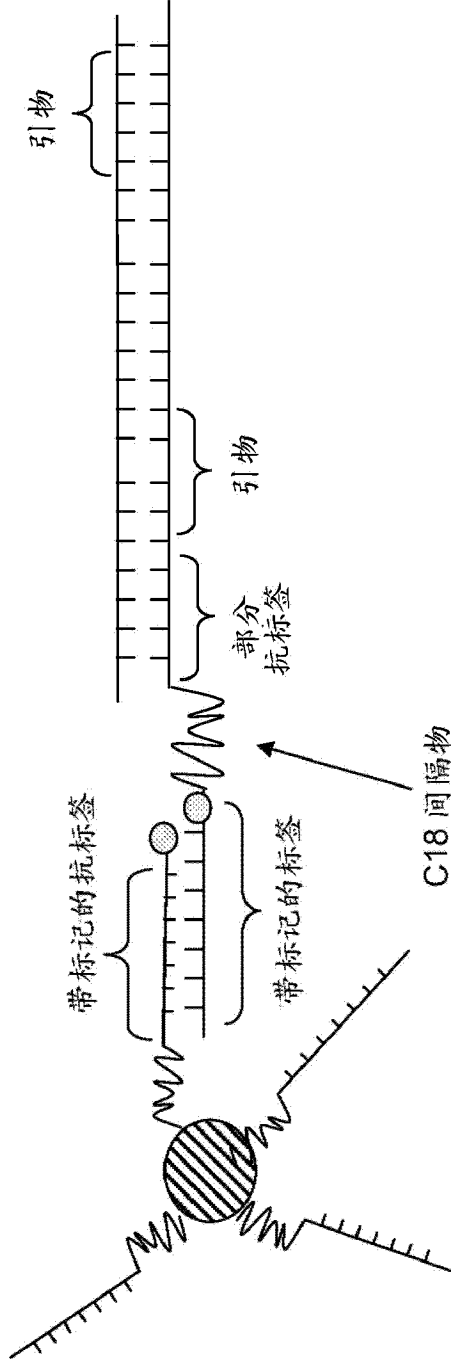


图3B



标记物是涉及FRET对（供体或受体）的荧光团

图4A



标记物是涉及FRET对（供体或受体）的荧光团

图4B

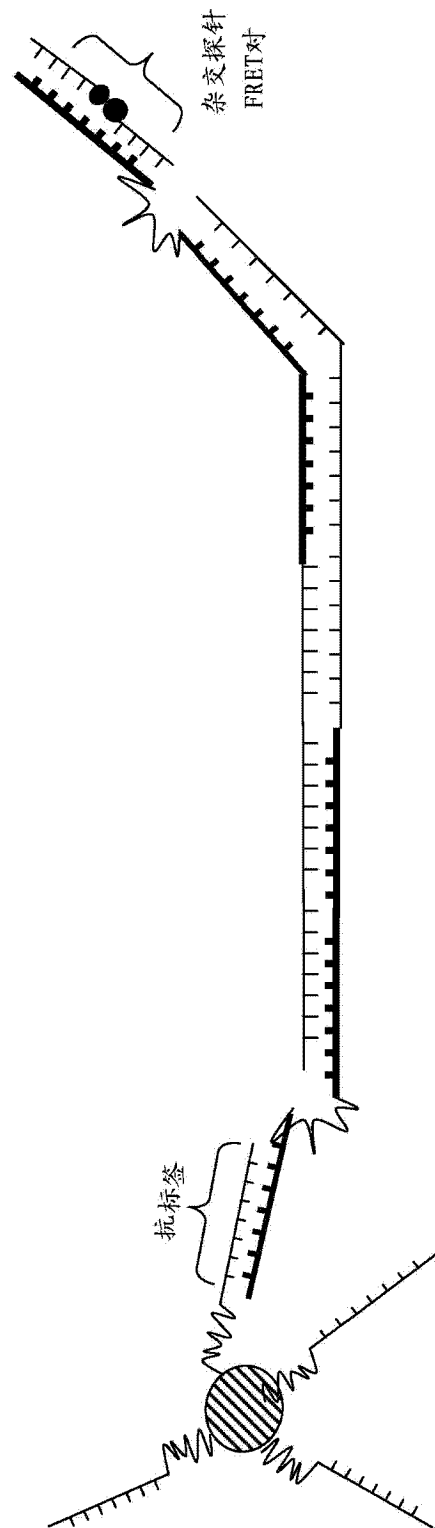


图4C

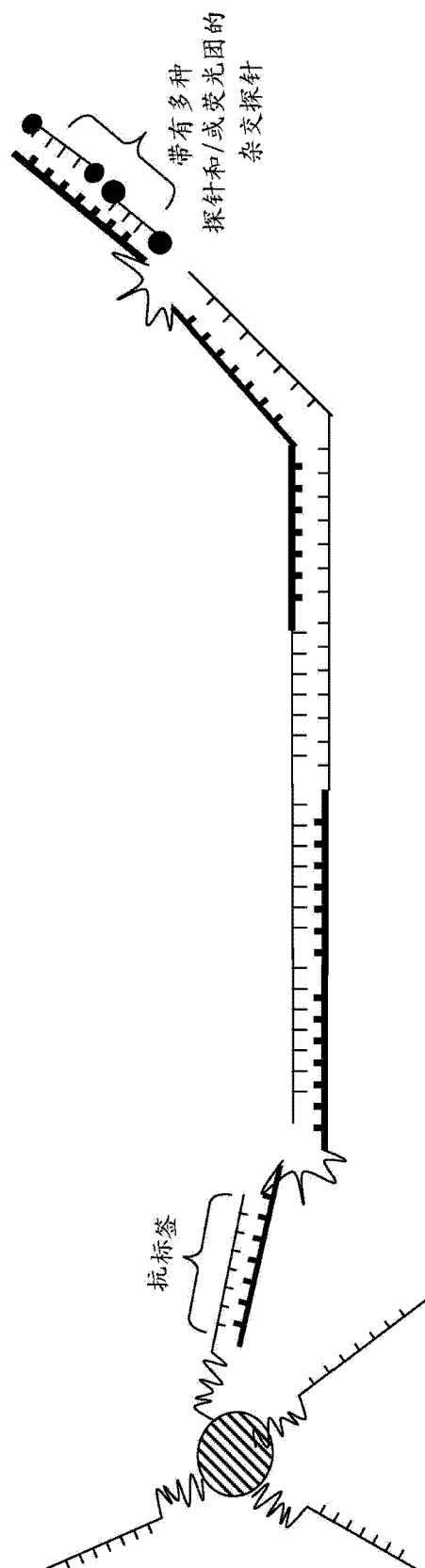


图4D

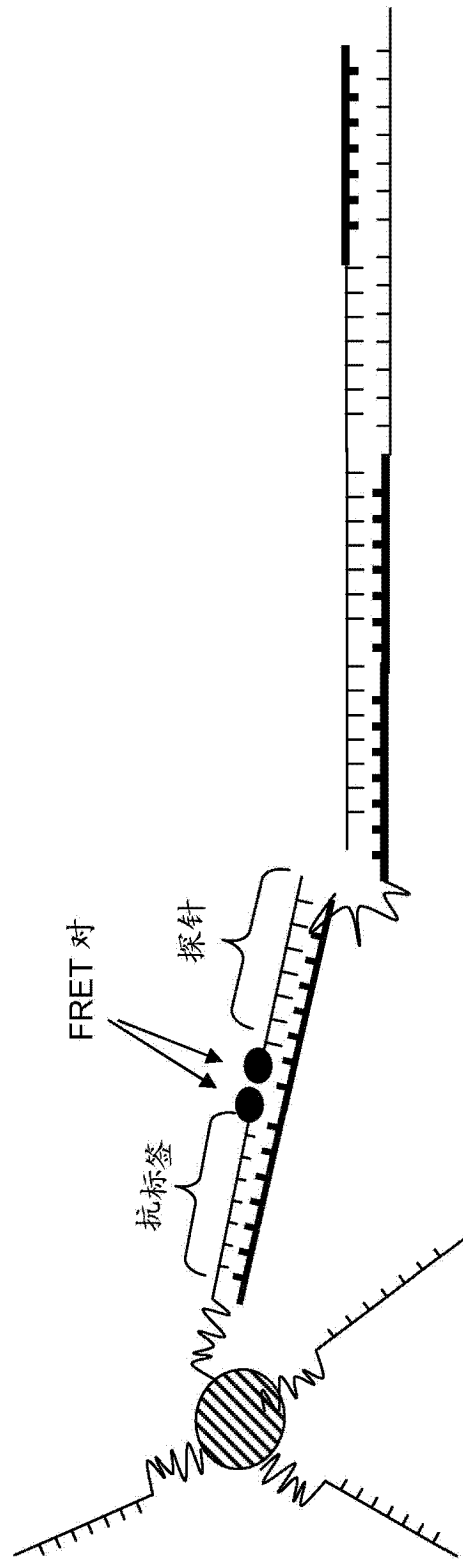


图4E

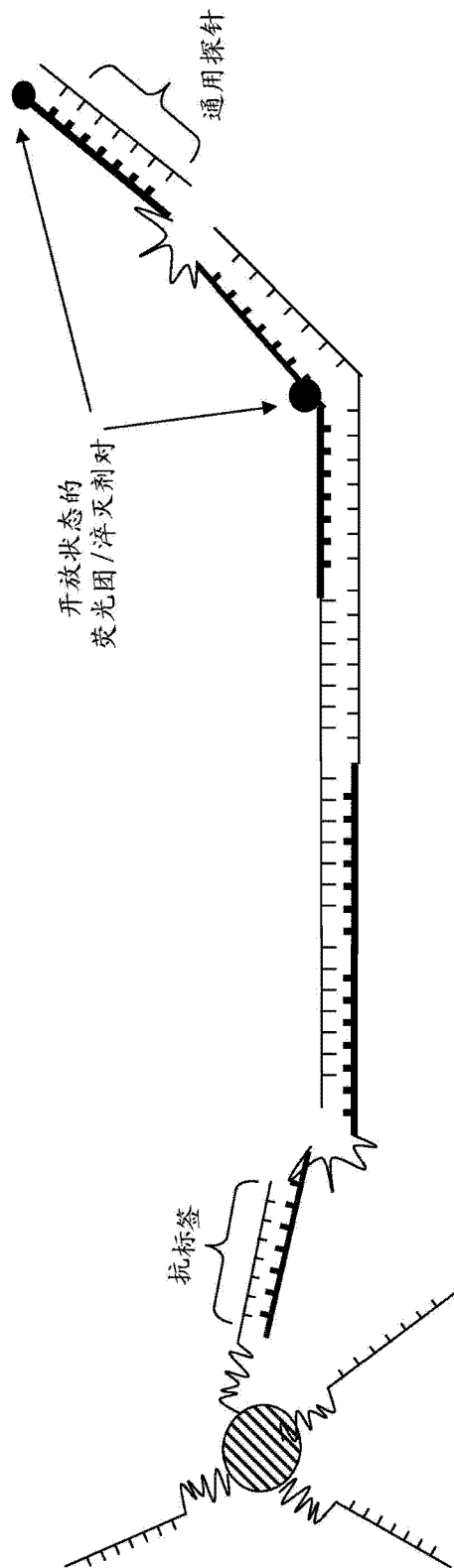


图5A

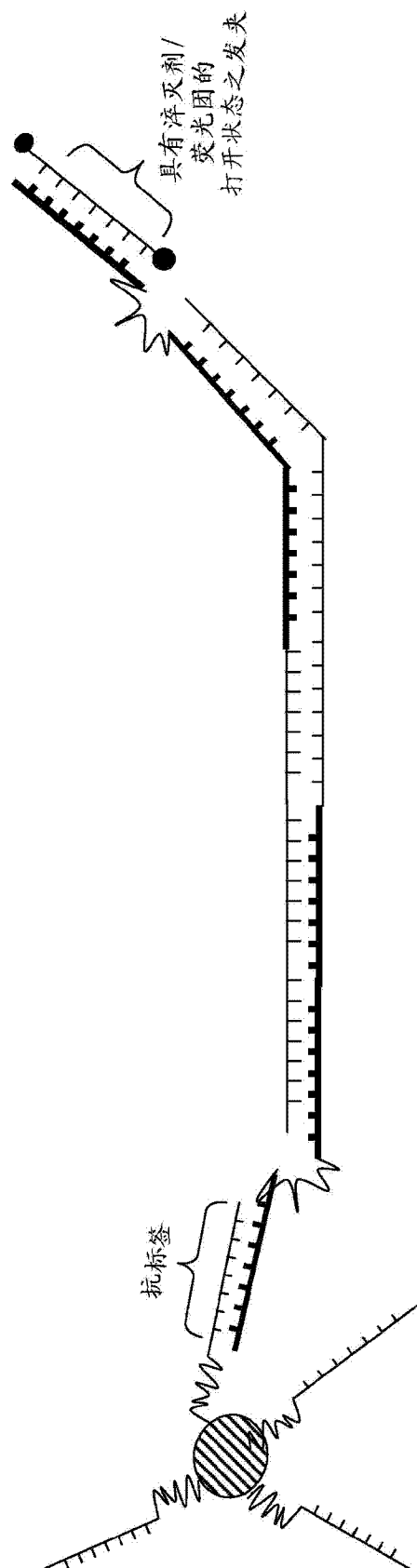


图5B

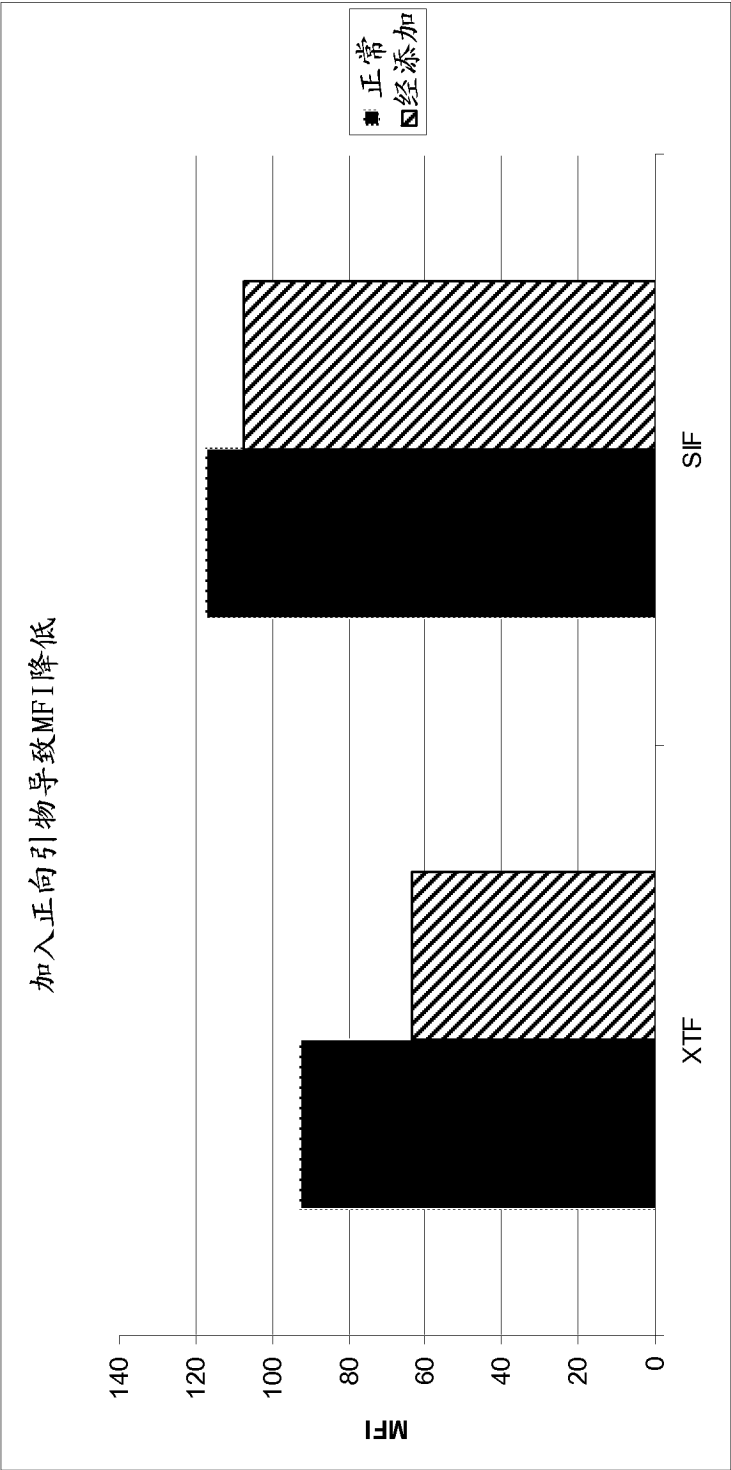


图6

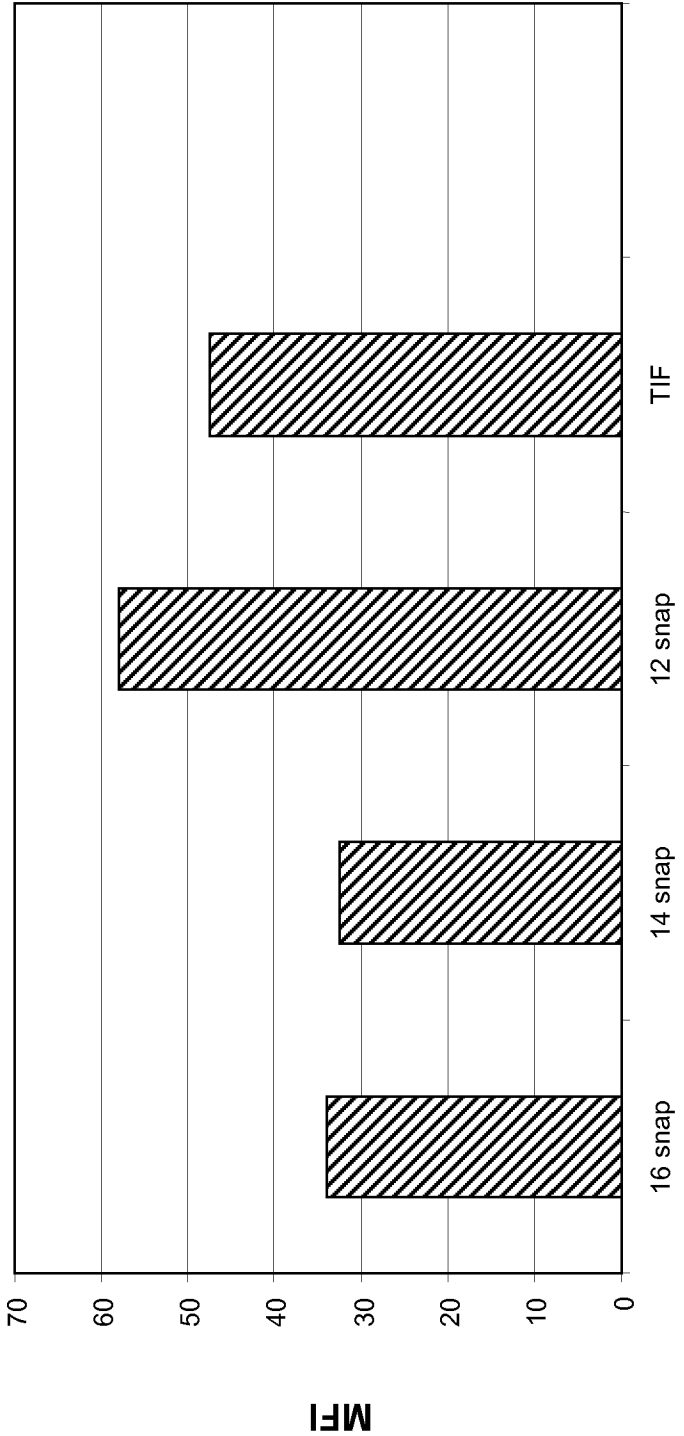


图7

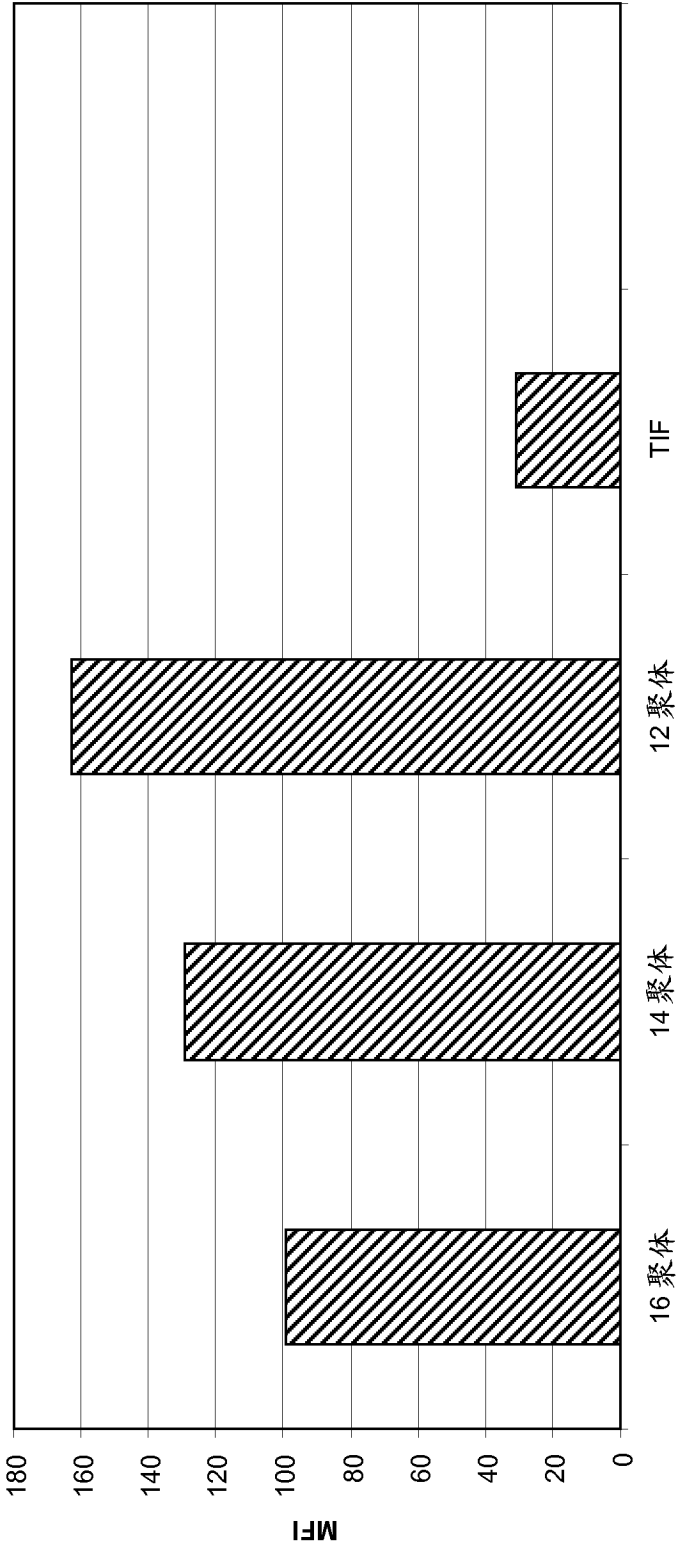


图8

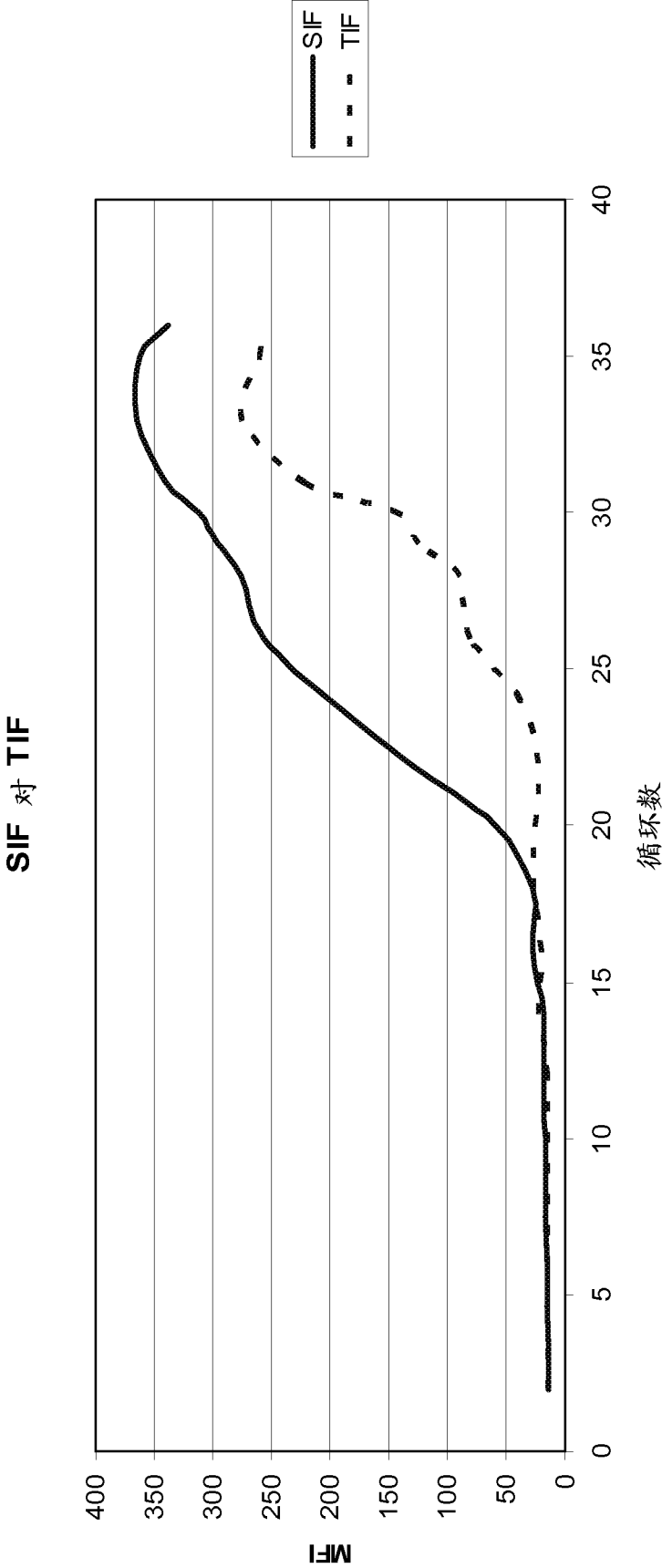


图9

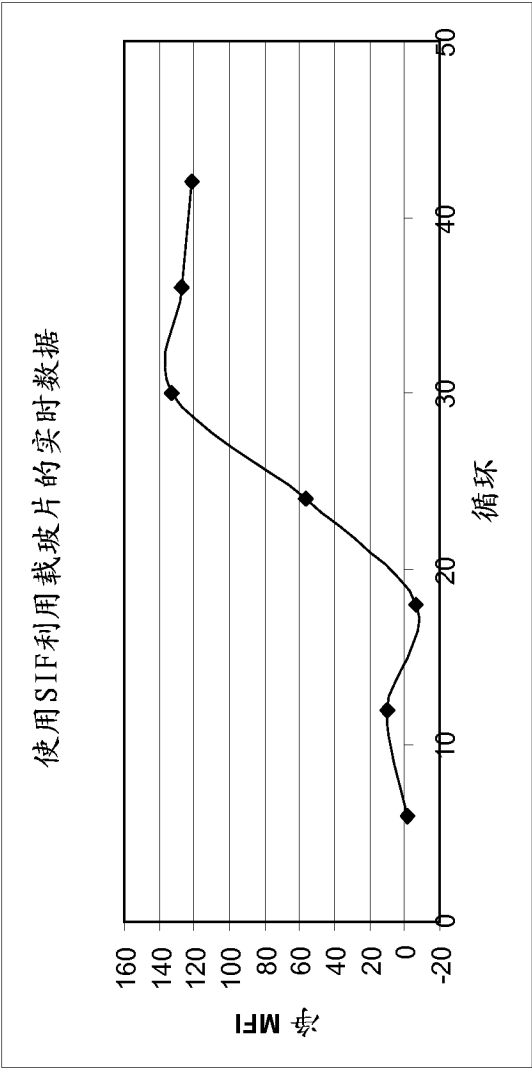


图10

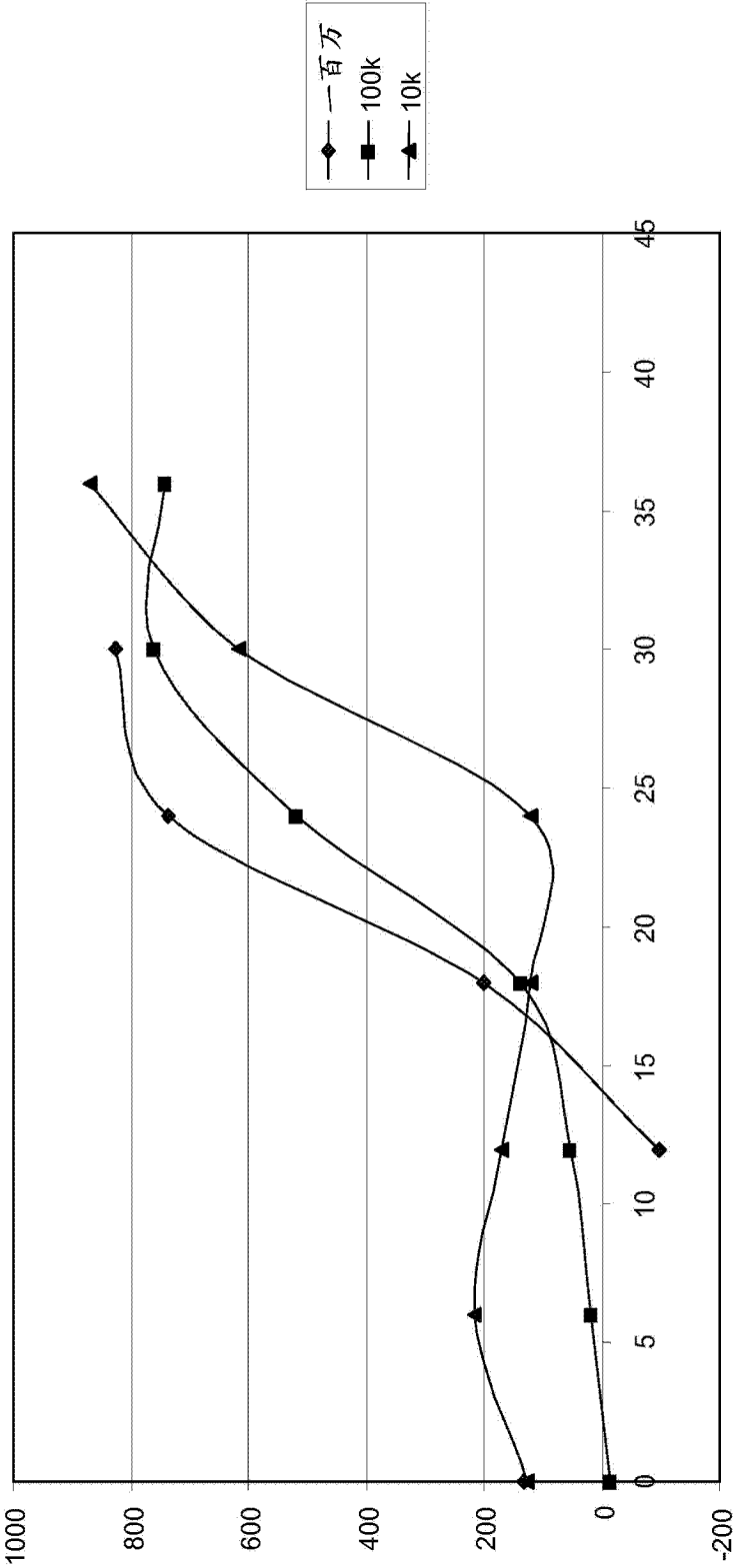


图11

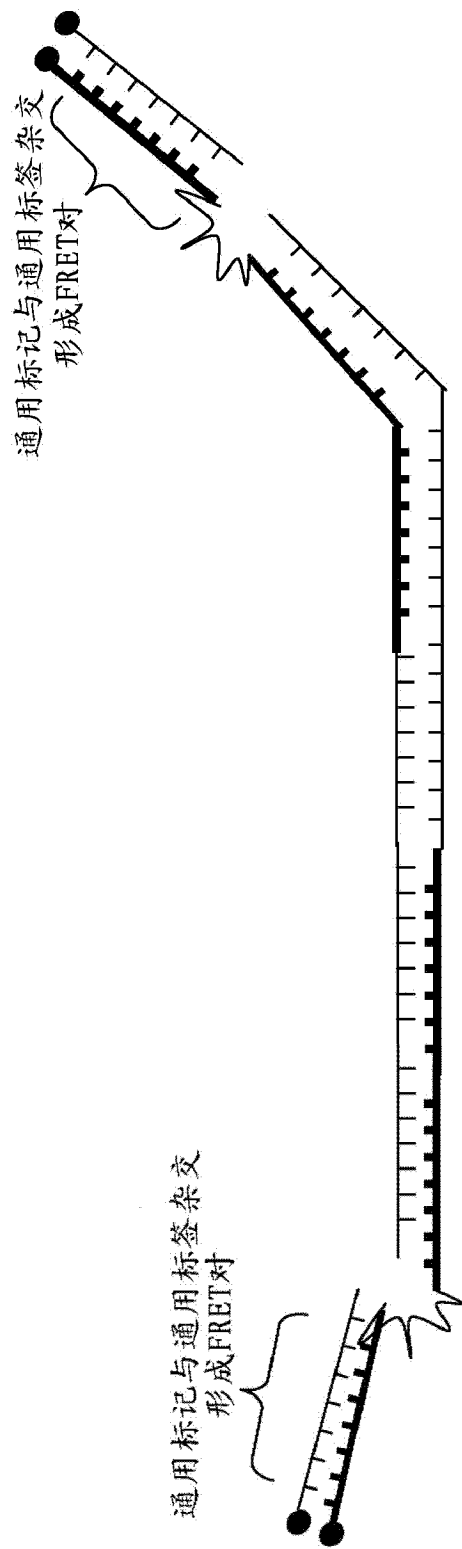


图12

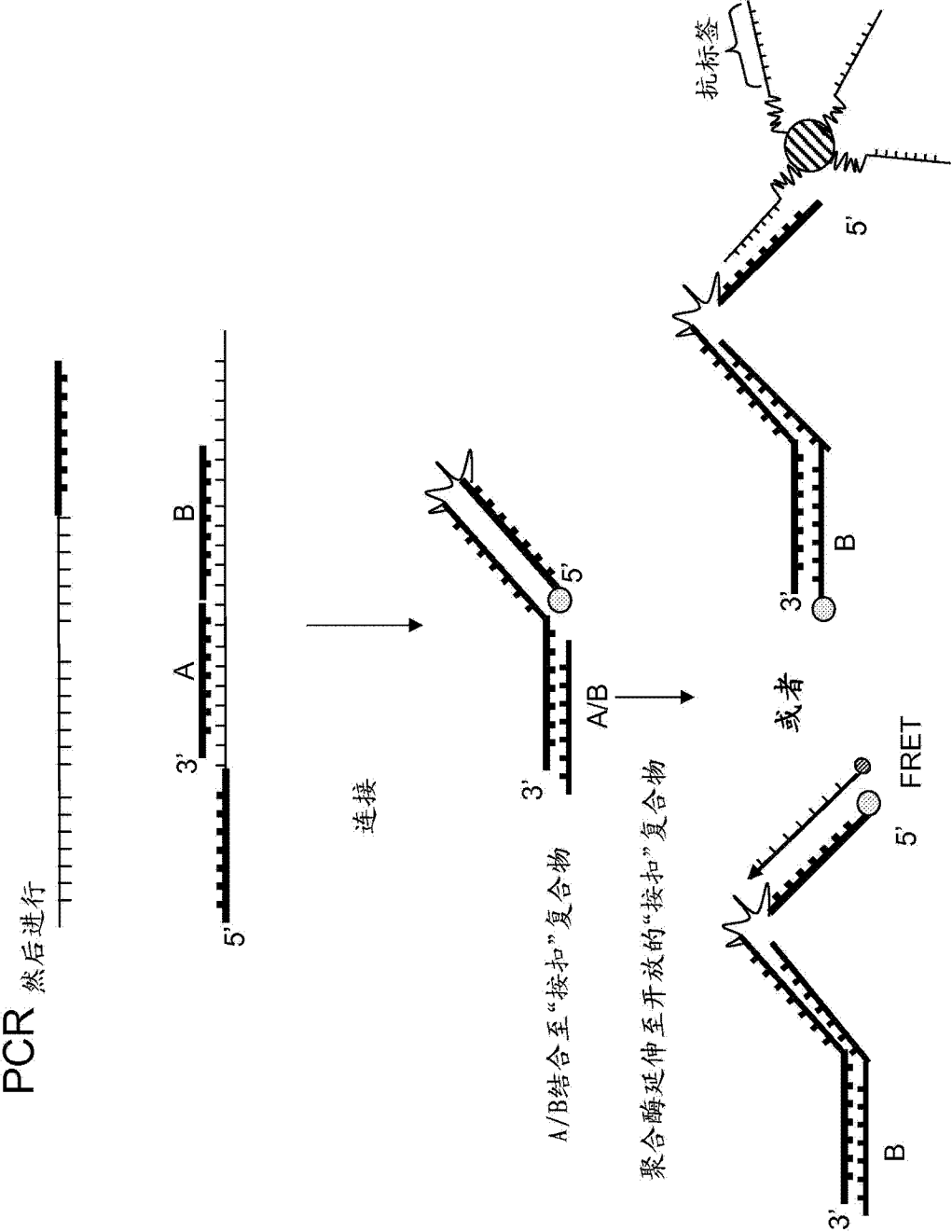


图14

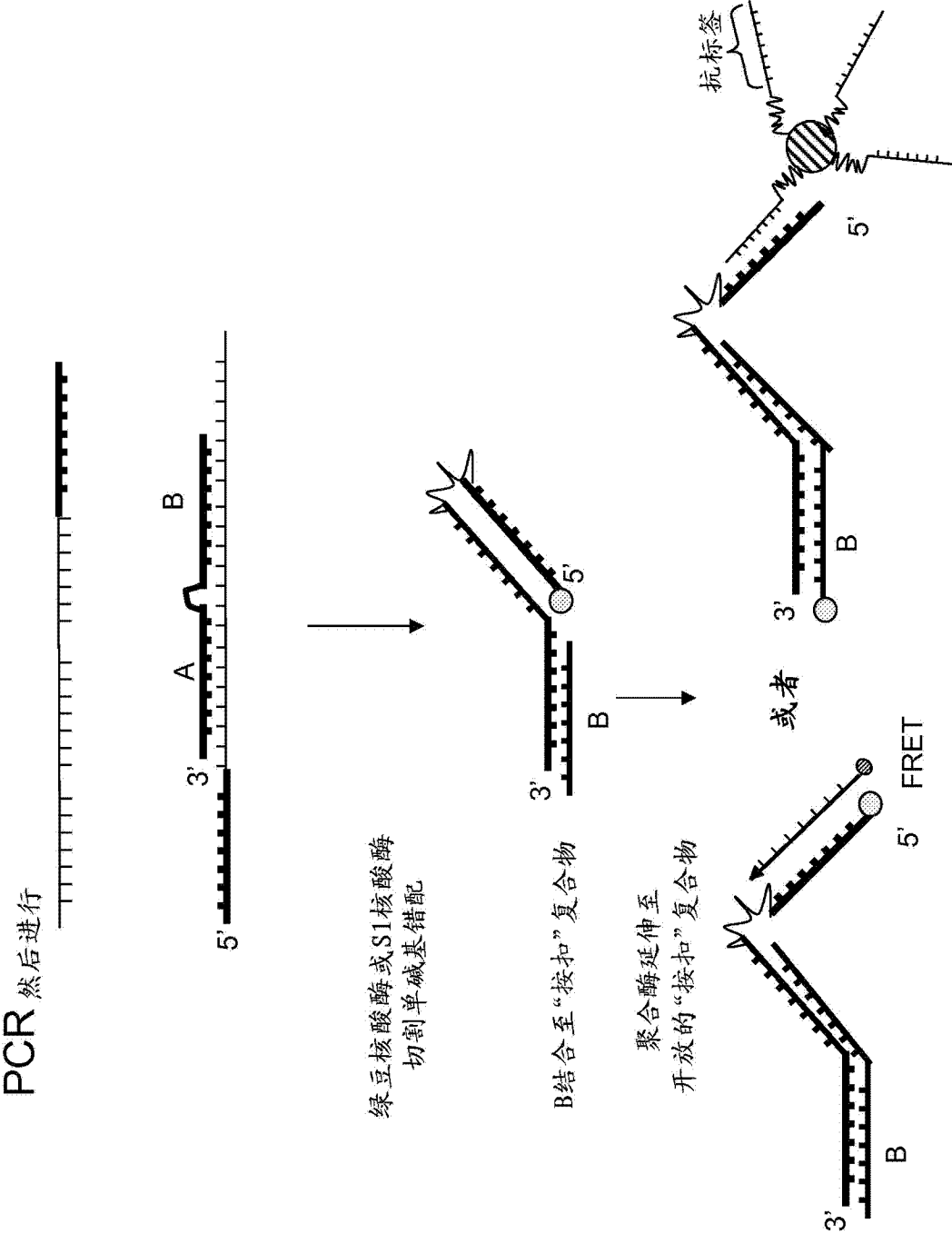


图15

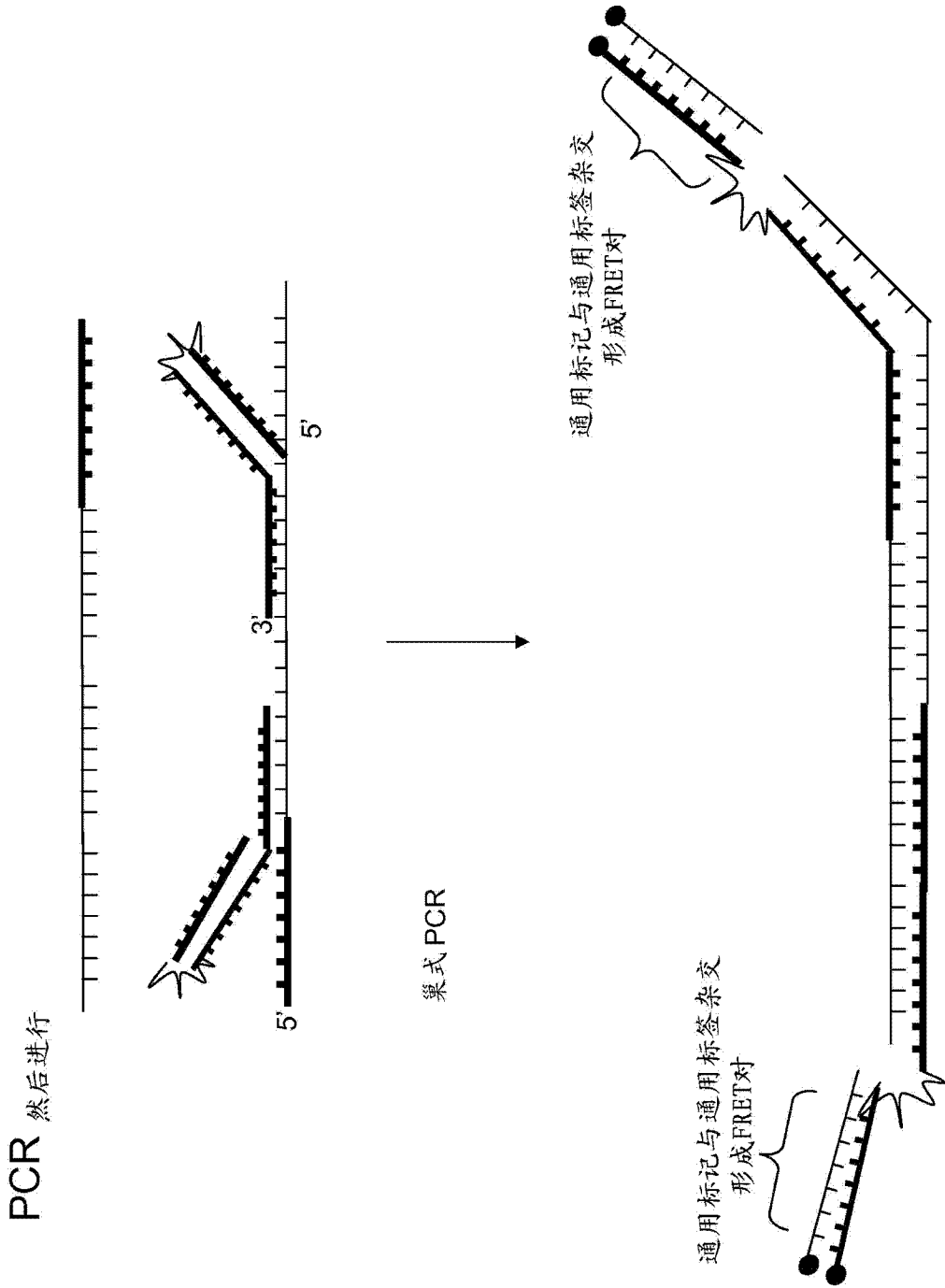


图16