



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107075585 B

(45) 授权公告日 2021.07.20

(21) 申请号 201580056020.3

(22) 申请日 2015.10.13

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107075585 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据  
62/063,666 2014.10.14 US  
62/098,066 2014.12.30 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.04.14(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/IB2015/002141 2015.10.13(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/059473 EN 2016.04.21(73) 专利权人 雅培实验室  
地址 美国伊利诺伊州  
专利权人 国立大学法人东京工业大学

(72) 发明人 小宫健 小森诚 吉村徹

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所  
11410

代理人 石宝忠

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/6844 (2018.01)  
C12Q 1/682 (2018.01)  
C12N 15/11 (2006.01)(56) 对比文件  
CN 1748028 A, 2006.03.15  
Asli N Silahatoglu等.Detection of microRNAs in Frozen Tissue Sections by Fluorescence in Situ Hybridization Using Locked Nucleic Acid Probes and Tyramide Signal Amplification.《NATURE PROTOCOLS》.2007,第2卷(第10期),第2520-2528页.

审查员 徐丹

权利要求书3页 说明书20页  
序列表18页 附图3页

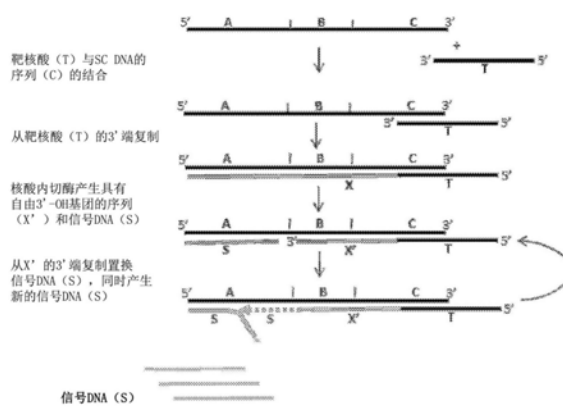
## (54) 发明名称

具有锁核酸的序列转换和信号扩增DNA以及使用其的检测方法

## (57) 摘要

公开了检测样品中靶核酸的方法。所述方法包括在聚合酶和核酸内切酶的存在下使所述样品与在足以减少非特异性背景信号扩增的选择位置处具有锁核酸的序列转换寡核苷酸接触。还公开了检测样品中靶核酸的方法,其中在聚合酶和核酸内切酶的存在下使所述样品与序列转换寡核苷酸和信号扩增寡核苷酸接触,序列转换寡核苷酸和信号扩增寡核苷酸二者均在足以减少非特异性背景信号扩增的选择位置处具有锁核酸。本文还提供了包含这种序列转换和信号扩增寡核苷酸的组合物和试剂盒。

靶DNA与SC DNA的结合以及信号DNA (S) 的产生



1. 一种试剂在制备用于检测样品中靶核酸的组合物中的用途,所述试剂包含:

第一寡核苷酸,所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述靶核酸的3'端互补的序列;

第二寡核苷酸,所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的序列;

聚合酶;和

用于切口反应的核酸内切酶;

其中所述锁核酸位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或其组合处。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述第二寡核苷酸包含2、3或4个锁核酸。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述锁核酸位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置3和6处。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述锁核酸位于发夹结构的茎中。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述茎包含2至10个碱基对。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述与所述靶核酸的3'端互补的序列还包含锁核酸。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中当将所述组合物用于检测所述靶核酸的方法中时,所述方法在基本恒定的温度下进行,并且其中所述基本恒定的温度在 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 的范围内波动。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中当将所述组合物用于检测所述靶核酸的方法中时,所述方法在 $20^{\circ}\text{C}$ 至 $42^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述聚合酶具有链置换活性。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中所述聚合酶是3'至5'核酸外切酶缺乏的、5'至3'核酸外切酶缺乏的或者二者。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述聚合酶包含选自由如下组成的组中的DNA聚合酶:从大肠杆菌获得的DNA聚合酶I的Klenow片段、从嗜热脂肪芽孢杆菌获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bst DNA聚合酶、和从热稳定芽孢杆菌获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bca DNA聚合酶。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述核酸内切酶是选自由Nb.BbvCI、Nt. AlwI、Nt.BbvCI和Nt.BsmAI所组成的组中的酶。

13. 根据权利要求1所述的用途,其中所述靶核酸是微RNA。

14. 根据权利要求1所述的用途,其中所述靶核酸来源于感染物。

15. 一种用于检测样品中靶核酸的组合物,所述组合物包含:

第一寡核苷酸,所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述靶核酸的3'端互补的序列;

第二寡核苷酸,所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的序列;

其中所述锁核酸位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或其组合处。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述锁核酸位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置3和6处。

17. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述锁核酸位于发夹结构的茎中。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述茎包含2至10个碱基对。

19. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述与所述靶核酸的3'端互补的序列还包含锁核酸。

20. 根据权利要求15所述的组合物,其还包含聚合酶和用于切口反应的核酸内切酶。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述聚合酶具有链置换活性。

22. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述聚合酶是3'至5'核酸外切酶缺乏的、5'至3'核酸外切酶缺乏的或者二者。

23. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述聚合酶包含选自如下组成的组中的DNA聚合酶:从大肠杆菌获得的DNA聚合酶I的Klenow片段、从嗜热脂肪芽孢杆菌获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bst DNA聚合酶、和从热稳定芽孢杆菌获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bca DNA聚合酶。

24. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述核酸内切酶是选自Nb.BbvCI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI和Nt.BsmAI所组成的组中的酶。

25. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述靶核酸是微RNA。

26. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述靶核酸来源于感染物。

27. 一种用于检测样品中靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包含:

第一寡核苷酸,所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述靶核酸的3'端互补的序列;和

第二寡核苷酸,所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的信号DNA产生序列、核酸内切酶识别位点和包含锁核酸且与所述第一寡核苷酸的信号DNA产生序列同源的序列;

其中所述锁核酸位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或其组合处。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含聚合酶。

29. 根据权利要求27或28所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于切口反应的核酸内切酶。

30. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述第二寡核苷酸包含两个位于从所述第二寡核苷酸的3'端的位置3和6处的锁核酸。

31. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述锁核酸位于发夹结构的茎中。

32. 根据权利要求31所述的试剂盒,其中所述茎包含2至10个碱基对。

33. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述与所述靶核酸的3'端互补的序列还包含锁核酸。

34. 根据权利要求28所述的试剂盒,其中所述聚合酶是具有链置换活性的DNA聚合酶。

35. 根据权利要求28所述的试剂盒,其中所述聚合酶是3'至5'核酸外切酶缺乏的、5'至

3' 核酸外切酶缺乏的或者二者。

36. 根据权利要求28所述的试剂盒, 其中所述聚合酶选自由如下组成的组中: 从大肠杆菌获得的DNA聚合酶I的Klenow片段、从嗜热脂肪芽孢杆菌获得的5' 至3' 核酸外切酶缺乏型Bst DNA聚合酶、和从热稳定芽孢杆菌获得的5' 至3' 核酸外切酶缺乏型Bca DNA聚合酶。

37. 根据权利要求29所述的试剂盒, 其中所述核酸内切酶是选自由Nb.BbvCI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI和Nt.BsmAI所组成的组中的酶。

38. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其中所述靶核酸是微RNA。

39. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其中所述靶核酸来源于感染物。

40. 根据权利要求27所述的试剂盒, 其还包含使用说明书。

41. 一种化学修饰的寡核苷酸, 其在5' 至3' 方向上包含与已知的信号DNA序列互补的第一序列、核酸内切酶识别位点和与第一序列相同的已知信号DNA序列互补的第二序列, 其中第二序列包含锁核酸, 所述锁核酸位于从所述寡核苷酸的3' 端的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或其组合处。

42. 根据权利要求41所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述锁核酸位于从所述寡核苷酸的3' 端的位置3和6处。

43. 根据权利要求41所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述锁核酸位于发夹结构的茎中。

44. 根据权利要求43所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述茎包含2至10个碱基对。

45. 根据权利要求41所述的化学修饰的寡核苷酸, 其在选自由如下组成的组中的位置处包含锁核酸:

- a) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置6与任何其它位置1-5和7-10组合;
- b) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置1和2;
- c) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置1和10;
- d) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置2和10;
- e) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置4和8;
- f) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置5和9;
- g) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置1和8;
- h) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置2和8;
- i) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置3和8; 和
- j) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置2和7。

46. 根据权利要求41所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述第二序列包含3个锁核酸。

47. 根据权利要求46所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述锁核酸位于选自由如下组成的组中的位置处:

- a) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置6与任何其它位置1-5和7-10组合; 和
- b) 从所述寡核苷酸的3' 端的位置1、2和10。

48. 根据权利要求41所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述第二序列包含4个锁核酸。

49. 根据权利要求48所述的化学修饰的寡核苷酸, 其中所述锁核酸位于从所述寡核苷酸的3' 端的位置6与任何其它位置1-5和7-10组合处。

50. 根据权利要求41-49中任一项所述的化学修饰的寡核苷酸, 其还包含3' 端修饰。

## 具有锁核酸的序列转换和信号扩增DNA以及使用其的检测方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] [不适用]

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含一个序列表,其通过引用并入,并且以作为名称为“12350USL1\_SeqList.TXT”的文本文件的方式与本申请一起提交。序列表文件是在2014年10月7日创建的,大小为17464字节。

[0005] 基金

[0006] 本文所披露的研究中至少有一部分得到了日本政府机构的日本科技机构(JST)的资助。

### 技术领域

[0007] 检测样本中的靶核酸在各个领域都很重要,包括医学和生物学。许多组合物、测定平台和程序可用于检测特异性核酸分子。为了使检测是可重现的和准确的,这些方法要求没有或低水平的非特异性背景扩增。然而,扩增方法可能会产生影响结果的质量、准确性、可重复性和整体可靠性的假阳性信号。在一些试验中,可以在多种样品中检测到这些“假”阳性信号,包括含有非模板DNA(非靶DNA)的对照样品或甚至缺乏任何DNA模板的样品。

### 背景技术

[0008] 用于从混合核酸序列群体扩增特定序列的一种常用方法是聚合酶链式反应(PCR)。由于典型的PCR在三个不同的温度下进行,所以反应可能遇到一些挑战,例如难以保持精确的温度,以及时间损耗随着扩增循环的数目而成比例地增加。双链模板DNA变性为单链(虽然在一定程度上依赖于特定序列)通常需要使用高“解链”温度,这限制了能够用于高热稳定的那些的DNA聚合酶的类别。因此,已经开发了等温扩增平台技术来在比PCR中使用的反应条件更温和的反应条件下检测核酸。然而,这些等温扩增技术尚未解决由能够干扰靶序列检测的高背景信号和非特异性扩增事件所呈现的挑战。

[0009] 以下公开内容提供了用于在比PCR中使用的那些反应条件更不严格的反应条件下检测核酸序列(例如DNA或RNA)的替代方法和组合物。本方法和组合物保持序列选择性和灵敏度,其允许检测可能以低浓度在样品中的核酸分子和/或长度短的核酸分子。本方法和组合物还可以减小可能由非特异性和/或非目标依赖性的扩增事件引起的任何背景信号。在其它方面,本公开提供了新方法和核酸分子,其能够在低温、等温条件下提高样品中靶核酸的检测限,并且能够简化或改进样品制备和自动检测方法。

### 发明内容

[0010] 在一个方面,本公开涉及一种检测样品中靶核酸的方法,所述方法包括使所述样品与如下物质接触:寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述寡核苷酸在5'至3'方向上包含

信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个化学修饰的核苷酸且与靶核酸的3'端互补的序列(C);聚合酶;和用于切口反应的核酸内切酶。在该方面的实施方式中,该方法还包括确定信号DNA是否存在,其中信号DNA的存在表明在样品中存在靶核酸。

[0011] 在一个方面,本公开涉及一种检测样品中靶核酸的方法,所述方法包括使所述样品与如下物质接触:第一寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个化学修饰的核苷酸且与靶核酸的3'端互补的序列(C);第二寡核苷酸(信号扩增DNA或SA DNA),所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识别位点(E)(其可以与SA DNA中核酸内切酶识别位点(B)相同或者不同)和具有至少一个化学修饰的核苷酸且与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的序列(F);聚合酶;和用于切口反应的核酸内切酶。在该方面的实施方式中,该方法还包括确定信号DNA是否存在,其中信号DNA的存在表明在样品中存在靶核酸。

[0012] 在另一个方面,本公开涉及一种检测样品中靶核酸的方法,所述方法包括使所述样品与如下物质接触:寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C);聚合酶;和用于切口反应的核酸内切酶。在该方面的实施方式中,该方法还包括确定信号DNA是否存在,其中信号DNA的存在表明在样品中存在靶核酸。

[0013] 在另一个方面,本公开涉及检测样品中靶核酸的方法,所述方法包括使所述样品与如下物质接触:第一寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C);第二寡核苷酸(信号扩增DNA或SA DNA),所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识别位点(E)(其可以与SA DNA中核酸内切酶识别位点(B)相同或者不同)和具有至少一个LNA且与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的序列(F);聚合酶;和用于切口反应的核酸内切酶。在该方面的实施方式中,该方法还包括确定信号DNA是否存在,其中信号DNA的存在表明在样品中存在靶核酸。

[0014] 在某些实施方式中,在SC DNA的序列(C)或SA DNA的序列(F)中存在的LNA可以包含任何LNA,例如G、T、U、A和C及其化学修饰的衍生物。在其中核苷酸分子包含超过一种LNA的实施方式中,每种LNA可以独立地选自任何LNA(例如G、T、U、A和C)及其化学修饰的衍生物或其任意组合。在某些实施方式中,至少一个LNA位于从SC DNA(在序列(C)内)和SA DNA(在序列(F)内)的3'端的位置1至50、1至45、1至40、1至35、1至30、1至25、1至20、1至15、1至10或者1至5处。如下面进一步所讨论,发明人已经阐明了本公开的某些实施方式,其举例证明了在SC DNA中和在SA DNA中包含一个或多个LNA在本文公开的方法中减小了背景信号(例如,由非目标依赖性的扩增引起的背景信号)。

[0015] 在一些实施方式中,向SA DNA的序列(F)和SC DNA的序列(C)中引入LNA能够消除在扩增反应中非特异性背景信号的产生。在其它实施方式中,在SA DNA和SC DNA分子中引入LNA能够延迟非特异性扩增事件的产生一段时间,所延迟的一段时间允许特异性且准确地测量靶核酸。因此,本公开提供了核酸分子、组合物、试剂盒和方法,其允许在产生任何非特异性干扰背景信号之前测定表明靶核酸存在的信号序列。例如,在一些实施方式中,在可

检测到任何干扰性非特异性背景信号之前约10至约120分钟,可检测到由样品中约1nM至约1fM靶核酸的存在产生的信号。

[0016] 在一些实施方式中,聚合酶可以具有链置换活性。在另外的实施方式中,聚合酶可以是3'至5'核酸外切酶缺乏的、5'至3'核酸外切酶缺乏的或者既是3'至5'核酸外切酶缺乏的又是5'至3'核酸外切酶缺乏的。在一些实施方式中,聚合酶包含DNA聚合酶。

[0017] 在实施方式中,核酸内切酶可以包含能够在切口寡核苷酸的反应中使用的限制性核酸内切酶或切口核酸内切酶。

[0018] 虽然本文公开的方法可以在典型的DNA扩增条件(例如,与标准PCR相关的典型温度、反应物浓度、时间循环等)下进行,但在一些实施方式中,该方法可以在等温条件下或在基本恒定的温度下进行。在另外的实施方式中,该方法可以在低于标准PCR方法中所使用的温度的温度下进行。作为一个示例,该方法的一些实施方式可以在等于或低于:下文所述的SA DNA的序列(F)和信号DNA(S)的、SC DNA的序列(C)和靶核酸(T)的计算得到的最佳杂交或退火温度或者实验测定的杂交或退火温度。在实施方式中,该方法可以在低于与SA DNA的序列(F)结合的信号DNA(S)或者与SC DNA的序列(C)结合的靶核酸(T)的解链温度的温度下进行。在另外其它实施方式中,该方法可以在允许聚合酶和/或核酸内切酶活性的温度下进行。在另外的实施方式中,该方法可以在用于检测样品中靶核酸的反应混合物中存在的聚合酶和/或核酸内切酶的最佳反应温度下或者大约该最佳反应温度下进行。

[0019] 在另一个方面,本公开涉及化学修饰的寡核苷酸,其在本文中可以被称为“序列转换DNA”(或“SC DNA”),其在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C)。

[0020] 在另一个方面,本公开涉及化学修饰的寡核苷酸,其在本文中可以被称为“信号扩增DNA”(或“SA DNA”),其在5'至3'方向上包含与序列转换DNA(SC DNA)的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识别位点(E)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与序列转换DNA(SC DNA)的信号DNA产生序列(A)同源的序列。

[0021] 靶核酸序列可以是感兴趣的任何核苷酸序列,并且在一些实施方式中,可以包含来源于感染物或微RNA的序列。在其它实施方式中,靶核酸可以包含来自可能与疾病或病症相关的基因的序列。

[0022] 在一些实施方式中,核酸内切酶识别位点包含与被核酸内切酶切割的序列互补的序列。在其它实施方式中,被核酸内切酶切割的序列与被核酸内切酶特异性识别的序列相邻(下游或上游)。

[0023] 在另一个方面,本公开涉及一种用于检测样品中靶核酸的组合物,所述组合物包含:寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C);聚合酶;和用于切口反应的核酸内切酶。

[0024] 在另一个方面,本公开涉及一种用于检测样品中靶核酸的组合物,所述组合物包含:第一寡核苷酸(序列转换DNA或SC DNA),所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C);第二寡核苷酸(信号扩增DNA或SA DNA),所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识

别位点(E) (其可以与SA DNA中核酸内切酶识别位点(B) 相同或者不同) 和具有至少一个LNA且与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A) 同源的序列(F); 聚合酶; 和用于切口反应的核酸内切酶。

[0025] 组合物还可以包含聚合酶和/或当核酸内切酶识别位点是双链时能够在第一和第二寡核苷酸的核酸内切酶识别位点处或相邻处切割的核酸内切酶。组合物还可以包含其它试剂, 例如反应缓冲剂、脱氧核糖核苷酸和报道分子, 例如用于荧光检测新合成的DNA的荧光团修饰的探针DNA (例如分子信标探针)。

[0026] 在另外的一个方面, 本公开涉及一种用于检测样品中靶核酸的试剂盒, 所述试剂盒包含: 寡核苷酸 (序列转换DNA或SC DNA), 所述寡核苷酸在5' 至3' 方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B) 和具有至少一个锁核酸(LNA) 且与靶核酸的3' 端互补的序列(C); 聚合酶; 和用于切口反应的核酸内切酶。在一些实施方式中, 试剂盒还可以包含聚合酶和/或能够在核酸内切酶识别位点或与核酸内切酶识别位点相邻的位点处切割的核酸内切酶。试剂盒还可以包含诸如如下的试剂: 例如反应缓冲剂、脱氧核糖核苷酸和报道分子, 例如用于荧光检测新合成的DNA (例如信号DNA) 的荧光团修饰的探针DNA (例如分子信标探针)。在本文所公开的任意一个方法的实践中, 试剂盒还可以包含使用说明书。

[0027] 在另外的一个方面, 本公开涉及一种用于检测样品中靶核酸的试剂盒, 所述试剂盒包含: 第一寡核苷酸 (序列转换DNA或SC DNA), 所述第一寡核苷酸在5' 至3' 方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B) 和具有至少一个锁核酸(LNA) 且与靶核酸的3' 端互补的序列(C); 第二寡核苷酸 (信号扩增DNA或SA DNA), 所述第二寡核苷酸在5' 至3' 方向上包含与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A) 同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识别位点(E) (其可以与SA DNA中核酸内切酶识别位点(B) 相同或者不同) 和具有至少一个LNA且与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A) 同源的序列(F); 聚合酶; 和用于切口反应的核酸内切酶。在一些实施方式中, 试剂盒还可以包含聚合酶和/或能够在核酸内切酶识别位点或与核酸内切酶识别位点相邻的位点处切割的核酸内切酶。试剂盒还可以包含诸如如下的试剂: 例如反应缓冲剂、脱氧核糖核苷酸和报道分子, 例如用于荧光检测新合成的DNA (信号DNA) 的荧光团修饰的探针DNA (例如分子信标探针)。在本文所公开的任意一个方法的实践中, 试剂盒还可以包含使用说明书。

[0028] 本文中所公开的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以与集成的系统平台组合使用。例如, 本发明的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以与Abbott's ARCHITECT系统组合使用。本文中所公开的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以与样品制备系统平台一起使用, 例如m2000sp样品制备系统 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL)。类似地, 本文中所公开的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以与床旁护理 (point-of-care) 系统平台, 例如Abbott's i-STAT床旁护理系统 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL)。此外, 本发明的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以与任意数量的其它装置、试验平台和仪器一起使用, 例如手持式荧光检测器、微pH计、微流体装置、微阵列、酶检测系统、免疫色谱条和侧流装置。

[0029] 本文中公开的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以用于分子诊断领域, 包括非感染性和感染性疾病的诊断。例如, 本发明的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可以用于检测人体液例如血液、尿液、唾液、汗液和粪便中的微RNA、信使RNA、非编码RNA和甲基化DNA。类



似地,本发明的方法、寡核苷酸、组合物和试剂盒可用于在人体液例如血液、尿液、唾液、汗液和粪便中检测来源于感染性疾病的靶核酸,例如HBV、HCV、HIV、HPV、HTLV-1、Parvo病毒、结核病、梅毒、疟疾和溶组织内阿米巴。

[0030] 应当理解,在本公开的一些方面,本文公开的SC和SA DNA可以包含除了锁核酸之外的在相同或不同位置处的化学修饰的核苷酸。例如,本文公开的SC和SA DNA可以包含BNA(桥连核酸)、ENA(乙烯桥连核酸)、GNA(乙二醇核酸)、TNA(苏糖核酸)、PNA(肽核酸)、吗啉代核酸和硫代磷酸酯核苷酸。

[0031] 考虑到下文的描述,由本公开提供的其它方面、实施方式和优点将变得显而易见。

## 附图说明

[0032] 图1A是示意性说明用于检测样品中靶核酸的序列转换DNA(SC DNA)的非限制性实例的图。SC DNA在5'至3'方向上包含信号产生序列(A)、可用于切口反应的核酸内切酶识别位点(B)和包含锁核酸(LNA)且与靶核酸互补的序列(C)。

[0033] 图1B是示意性说明用于检测样品中靶核酸的信号扩增DNA(SA DNA)的非限制性实例的图。SA DNA在5'至3'方向上包含与SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D);核酸内切酶识别位点(E)(其可以与SC DNA的核酸内切酶识别位点(B)相同或不同)和包含锁核酸且与第一SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源的序列(F)。

[0034] 图2A是示意性说明靶(T)核酸与用于检测样品中靶核酸的序列转换(SC)DNA的示例性反应进展的图。序列(A)-(C)如图1A所示,序列(T)表示靶序列,序列(X)表示当通过聚合酶来扩展与序列(C)结合的序列(T)时所产生的序列,序列(X')表示切口的扩展序列,并且序列(S)表示最终产生的信号DNA序列。

[0035] 图2B是示意性地说明信号DNA(S)与用于检测样品中靶核酸的信号扩增(SA)DNA的示例性反应进展的图。序列(D)-(F)如图1B所述,如图2A所述,序列(S)是由靶(T)核酸与SC DNA反应产生的信号DNA,序列(Y)表示当通过聚合酶来扩展与序列(D)结合的信号DNA(S)时所产生的序列,序列(Y')表示切口的扩展序列,并且序列(S)表示最终产生的信号DNA序列。由于SA信号产生序列(D)与SC信号产生序列(A)同源,因此产生相同的信号DNA(S)。

[0036] 图3描绘了使用DINAMelt(Nucleic Acids Res.,33,W577-W581;和Structure, Function and Applications(Series:Methods in Molecular Biology,Vol.No.:453),第1章,第3-31页(ISBN 978-1-60327-428-9))计算的SA DNA#339(序列号:25)的所预测的发夹结构。还示出了在从SA DNA#339的3'端的位置3和6处的发夹结构的茎内的两个LNA的位置。

## 具体实施方式

[0037] 在一般意义上,本公开涉及在测试样品中检测靶核酸时令人惊奇地有效的核酸构建体。本文中公开的构建体包含允许产生信号DNA的核酸序列,所述信号DNA是在靶核酸存在下产生的,伴随着由不存在靶核酸和/或非特异性扩增事件引起的背景信号的减小。本文中公开的方法和核酸构建体提供了可有利地在低温和等温条件下进行靶核酸的选择的和灵敏的检测。

[0038] 在一个方面,本公开涉及化学修饰的寡核苷酸,其可以在本文中被称作“信号扩增

DNA”(或“SA DNA”),其在5'至3'方向上包含与已知的信号DNA序列互补的第一序列、核酸内切酶识别位点和与第一序列相同的已知的信号DNA序列互补的第二序列,其中第二序列包含锁核酸(LNA)。第一序列是图1B中的信号DNA产生序列(D),其与SC DNA的已知的信号DNA产生序列(A)同源。第二序列是图1B中的序列(F),其具有至少一个LNA且与相同SC DNA的相同的已知的信号DNA产生序列(A)同源。在该方面的一些实施方式中,第二序列包含多个LNA(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个LNA)。在一些实施方式中,第二序列包含2-6个LNA。在一些实施方式中,第二序列包含2个LNA、3个LNA或4个LNA。在其它实施方式中,化学修饰的寡核苷酸还包含3'端修饰。

[0039] 在该方面,第一和第二序列的长度可以改变,但通常每个序列与另一个序列的长度大约相同。在实施方式中,序列的长度可以在从约5到约100个核苷酸的范围中,但更典型地在长度上为从约5至约30、从约10至约30或者从约15至约30个核苷酸。核酸内切酶识别位点包含可以被本文中所描述的核酸内切酶识别、结合和切割的序列。这种序列在本领域中通常是已知的。核酸内切酶识别位点可以包含在5'或3'处与核酸内切酶结合位点(或者5'和3'二者)结合的额外的核苷酸,但通常在长度上不超过10个核苷酸。

[0040] 在本文中所公开的某些实施方式中,在第二序列中的LNA或多个LNA的位置是相对于序列的3'端被识别的并且可以改变。在一些实施方式中,LNA或多个LNA位于从序列的3'端的一个或多个位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20处。在包含单个LNA的一些实施方式中,LNA位于从序列的3'端的位置1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20中的任意一个位置处。

[0041] 在包含两个LNA的实施方式中,LNA可以位于选自从序列的3'端的位置1至20的两个位置的任意组合。在一些实施方式中,LNA可以位于从序列的3'端的位置6和任何其它位置1-5和7-20(例如1和6、2和6、3和6、4和6、5和6、7和6、8和6、9和6、10和6、11和6、12和6、13和6、14和6、15和6、16和6、17和6、18和6、19和6、或20和6);从序列的3'端的位置1和2;位置1和10;位置2和10;位置4和8;位置5和9;位置1和8;位置2和8;位置3和8;以及位置2和7。

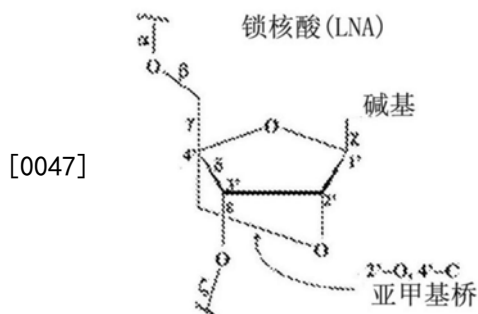
[0042] 在包含三个LNA的实施方式中,LNA可以位于选自从序列的3'端的位置1至20的三个位置的任意组合。在一些实施方式中,LNA可以位于从序列的3'端的位置6以及两个位置1-5和7-20的任意其它组合;以及从序列的3'端的位置1、2和10。

[0043] 在包含四个LNA的实施方式中,LNA可以位于选自从序列的3'端的位置1至20的四个位置的任意组合。在一些实施方式中,LNA可以位于从序列的3'端的位置6以及三个位置1-5和7-20的任意其它组合。

[0044] 在该方面的实施方式中,本公开提供了一种可用于检测样品中靶核酸的新型序列转换(SC)和信号扩增(SA)寡核苷酸构建体及其组合,伴随着背景信号的减小。如图1A的说明性实施方式所描绘,用于检测样品中靶核酸的序列转换DNA(SC DNA)寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有至少一个锁核酸(LNA)且与靶核酸的3'端互补的序列(C)。

[0045] 如图1B的说明性实施方式所描绘,用于检测样品中靶核酸的信号扩增DNA(SA DNA)在5'至3'方向上包含与SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D);核酸内切酶识别位点(E)(其可以与SC DNA的核酸内切酶识别位点(B)相同或不同)和包含锁核酸(LNA)和与SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源的序列的序列(F)。

[0046] 在本公开的一些实施方式中,SC DNA的序列(C)和SA DNA的序列(F)二者均包含锁核酸(LNA)。在其它实施方式中,仅SA DNA的序列(F)会包含锁核酸(LNA)。锁核酸是具有如下结构的经修饰的RNA核苷酸:



[0048] 如图所示,LNA核苷酸的核糖片段通过以3'端结构锁定核糖且连接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基桥而由典型的核糖结构修饰。这样的LNA可以包含任何天然嘌呤或嘧啶碱基或非天然碱基(例如肌苷、化学修饰的碱基等)。

[0049] 通过将LNA引入到扩增寡核苷酸例如本文所述的SA DNA的序列(F)或引入到SC DNA的序列(C)中,非特异性背景信号扩增被完全消除或延迟一段时间,所述一段时间足以在不存在来自非特异性背景信号的任何干扰的情况下检测由靶核酸的存在产生的信号序列。例如,在一些实施方式中,在可检测到任何非特异性背景信号之前,由样品中约1nM至约1fM靶核酸的存在产生的信号在约5至约120分钟内、约5至约90分钟内、约5至约60分钟内、约5至约30分钟内、或约5至约15分钟内是可检测到的。在一些实施方式中,在可检测到任何非特异性背景信号之前,由样品中约1nM至约1pM靶核酸的存在产生的信号在约5至约120分钟内、约5至约90分钟内、约5至约60分钟内、在约5至约30分钟内、或在约5至约15分钟内是可检测到的。在其它实施方式中,在可检测到任何非特异性背景信号之前,样品中约1pM至约1fM靶核酸的存在产生的信号在约5至约120分钟内、约5至约90分钟内、约5至约60分钟内、在约5至约30分钟内、或在约5至约15分钟内是可检测到的。在一些实施方式中,该方法不产生任何可检测到的非特异性背景信号。

[0050] 如上所述,在没有靶核酸的情况下,在有效减少或消除非特异性背景信号扩增的任何位置处,将LNA引入到SA DNA的序列(F)和SC DNA的序列(C)中。在一些实施方式中,在从各自的SC或SA DNA的3'端的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20处或其组合处,将LNA引入到SA DNA的序列(F)中和SC DNA的序列(C)中。在一些实施方式中,LNA位于从SA DNA的3'端的位置6或位置3和6。在其它实施方式中,LNA存在于SA DNA中,在以下位置(从3'端开始数)处:1、2、6和10(例如,序列号:2);1、2和6(例如,序列号:3);1、2和10(例如,序列号:4);1、6和10(例如,序列号:5);2、6和10(例如,序列号:6);1和2(例如,序列号:7);1和6(例如,序列号:8);2和6(例如,序列号:9);1和10(例如,序列号:10);2和10(例如,序列号:11);1(例如,序列号:16);4和8(例如,序列号:23);2、3和6(例如,序列号:26);2、3、6和10(例如,序列号:27);或者3和10(例如,序列号:35)。

[0051] 在一些实施方式中,一个或多个LNA被引入到SA DNA的序列(F)中和SC DNA的序列(C)中,在包含任一序列的具体结构基序处或内部。例如,SA DNA的序列(F)可以自身形成发夹(茎-环)结构,或者与SA DNA内的一些其它序列(例如,序列(D)或(E))的部分形成发夹(茎-环)结构,并且LNA可以位于茎内。茎可以包含约2至约10个碱基对、约2至约8个碱基对、

约2至约6个碱基对、或约2至约4个碱基对,以及2个和10个碱基对之间的所有整数。或者,LNA可以位于单链DNA区域(例如,发夹结构的环或3'末端)中。类似地,SC DNA的序列(C)可以自身形成发夹(茎-环)结构,或者与SC DNA内的一些其它序列(例如,序列(A)或(B))的部分形成发夹(茎-环)结构,并且LNA可以位于茎内。在替代的方式中,LNA可以位于单链DNA区域(例如,发夹结构的环或3'末端)中。(参见例如图3)。

[0052] 如图1A中所示,本文公开的SC DNA包含信号产生序列(A)。SC DNA中的信号产生序列(A)可以包含任何所期望的核酸序列,并且不受任何具体序列的限制。如下面更详细地讨论,信号产生序列(A)提供信号DNA的模板的至少一部分(例如,图2中的核酸(S)),其产生表明靶核酸的存在。SC DNA中的信号产生序列(A)不受长度限制。在一些实施方式中,SC DNA中的信号产生序列(A)为约5至约100个核酸碱基,以及5至100之间的所有整数。在实施方式中,SC DNA中的信号产生序列(A)是从约5至约30个核酸碱基,以及5至30之间的所有整数。在一些实施方式中,SC DNA中的信号产生序列(A)为从约10至约30个核酸碱基,以及10至30之间的所有整数。在另外其它的实施方式中,SC DNA中的信号产生序列(A)为约15至约30个核酸碱基,以及15至30之间的所有整数(例如约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个碱基)。

[0053] 如图1B所示,本文公开的SA DNA包含与SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源的序列(D)和与同一SC DNA的相同信号DNA产生序列(A)同源的序列(F)(包含锁核酸)。在一些实施方式中,为了与SC DNA的信号DNA产生序列同源,序列(D)和(F)与相应的信号DNA产生序列(A)完全相同。在其它实施方式中,序列(F)与SC DNA的相应信号DNA产生序列(A)在序列上是相同的,除了它在3'端为更短了约1至约5、或约1至约4、或约1至约3个、或约1至约2个、或1个碱基外。当SA DNA的信号DNA产生序列(D)与SC DNA的信号DNA产生序列(A)同源时,随后产生了相同的信号DNA(S)并且相同的信号DNA(S)被指数扩增。

[0054] SC和SA DNA分别包含可以相同或不同的核酸内切酶识别位点(B)和(E)。在单链形式(例如,图1A和1B的结构)中,核酸内切酶识别位点(B)和(E)可以包含与可由核酸内切酶切割的序列互补的序列。由核酸内切酶切割的序列可以在核酸内切酶识别的序列的内部、下游或上游。适当地,当双链时,核酸内切酶识别位点(B)和(E)可被存在于反应中的一个或多个核酸内切酶识别,并且核酸内切酶识别位点(B)和(E)(或者与核酸内切酶识别位点(B)和(E)相邻的序列)可以仅在双链DNA的一条链上被切开(即,切割)。如下面更详细描述的那样,靶核酸与SC DNA的互补序列(C)的结合通过DNA聚合酶引发复制,以产生目前能够作为核酸内切酶的识别位点的活性双链形式的核酸内切酶识别位点(B)(图2A)。核酸内切酶在新产生的双链核酸内切酶位点(B)处或在与新产生的双链核酸内切酶位点(B)相邻的位点处切割,然后通过DNA聚合酶引发复制,并产生信号DNA(S)(参见例如图2A)。如图2A中所示,核酸内切酶识别位点(B)是取向的,以使得新复制的链被切割而不是SC DNA。也就是说,当产生新复制的链时,(B)中的核酸内切酶识别位点的取向指引新复制的链的核酸内切酶活性(切开)。以其本身而言,核酸内切酶识别位点包含与由核酸内切酶切割的序列互补的序列,这允许SC寡核苷酸在整个反应中保持完整(即,SC DNA是未被切割或切开的)。

[0055] 如下面更详细地描述,由SC DNA的信号产生序列(A)产生的信号DNA(S)与SA DNA的序列(F)的结合通过DNA聚合酶引发复制,以产生能够作为核酸内切酶的识别位点的活性双链形式的SA DNA的核酸内切酶识别位点(E)(图2B)。核酸内切酶在SA DNA的新产生的双

链核酸内切酶位点(E)处或邻近新产生的双链核酸内切酶位点(E)的位点处切割,然后通过DNA聚合酶引发复制,并产生与从SC DNA产生的信号DNA(S)相同的信号DNA(S)(图2B)。如图2B中所示,核酸内切酶识别位点(E)是取向的,以使得新复制的链被切割,而不是SA DNA。也就是说,当产生新复制的链时,E中的核酸内切酶识别位点的取向指引新复制的链的核酸内切酶活性(切开)。以其本身而言,核酸内切酶识别位点包含与由核酸内切酶切割的序列互补的序列,这允许SA寡核苷酸在整个反应中保持完整(即,SA DNA是未被切割或切开的)。

[0056] 与靶DNA互补的SC DNA的序列(C)不受长度限制,并且可以是约5至约100个核酸碱基,以及5和100之间的所有整数。在一些实施方式中,SC DNA的序列(C)为约5至约30个核酸碱基,以及5和30之间的所有整数。在一些实施方式中,SC DNA中的序列(C)为约10至约30个核酸碱基,以及10和30之间的所有整数。在另外的实施方式中,SC DNA的序列(C)为约15至约30个核酸碱基,以及15和30之间的所有整数。

[0057] 互补序列能够形成氢键相互作用,以形成双链核酸结构(例如,核酸碱基对)。例如,与第一序列互补的序列包含能够与第一序列形成Watson-Crick碱基对的序列。本文中使用术语“互补”不要求序列在其互补链的全长上是互补的,并且涵盖了与另一序列的一部分互补的序列。因此,在一些实施方式中,互补序列涵盖了在序列的整个长度上或其一部分上互补的序列(例如,大于序列长度的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%)。例如,两个序列可以在约2至约100个连续(相邻)核苷酸之间的长度或者2至100之间的任何整数的长度上彼此互补。在一些实施方式中,两个序列可以在约15至约30个连续(相邻)核苷酸的长度或者15至30之间的任何整数的长度上彼此互补。如本文所用,互补序列可以涵盖其中一些序列不匹配的序列。例如,互补序列可以包括序列长度的至少约70%至100%、优选地大于高于95%互补的序列。尽管一些量的错配,互补序列通常具有在适当条件下与另一个选择性地杂交的能力,适当条件是例如严格和高度严格的条件,例如本文描述的那些或本领域普通技术人员公知的那些。

[0058] SC和SA DNA可以通过已知方法合成。例如,可以使用亚磷酸胺法、磷酸三酯法、H-磷酸酯法或硫代磷酸盐法来合成SC和SA DNA。在一些实施方式中,可以纯化SC和/或SA DNA,例如使用离子交换HPLC。

[0059] SC和SA DNA可以包含本领域公知的化学修饰。在一些实施方式中,例如,SC和SA DNA可以包含化学修饰的核苷酸(例如2'-O甲基衍生物、硫代磷酸酯等)、3'端修饰、5'端修饰或其任何组合。在一些实施方式中,可以修饰SC和SA DNA的3'端,使得扩展反应不会从SC或SA DNA的3'端发生(例如,在结合靶序列或可能作为聚合酶扩增的引物的另一非靶序列时)。如图2A中所示,是靶核酸(T)的3'端,而不是SC DNA,起始DNA复制。从SC或SA DNA的3'端起始的任何复制可能导致检测错误(例如假阳性)。此外,由如下事件引起从SC DNA的未修饰的3'端的非特异性扩展反应也可能导致检测错误,所述事件例如:SC DNA与非靶序列之间的结合、SC DNA与靶序列之间在错误位置结合、SC和SA DNA之间的结合、或者非模板的重新或从头的DNA合成。因此,在实施方式中,SC和SA DNA包含3'端修饰,所述3'端修饰能够减少或消除任何不期望的扩展反应(例如上述讨论的那些)的发生。3'端修饰的非限制性实例包括TAMRA、DABCYL和FAM。修饰的其它非限制性实例包括例如生物素化、荧光染色、磷酸化、硫醇化、胺化、反转核苷酸或无碱基团。

[0060] 在另一个方面,本发明涵盖了检测样品中靶核酸(T)的方法。所述方法一般包括使

所述样品与如下物质接触：第一寡核苷酸(或序列转换DNA或SC DNA)，所述第一寡核苷酸在5'至3'方向上包含信号DNA产生序列(A)、核酸内切酶识别位点(B)和具有锁核酸(LNA)且与所述靶核酸(T)的3'端互补的序列(C)；第二寡核苷酸(或信号扩增DNA或SA DNA)，所述第二寡核苷酸在5'至3'方向上包含与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的信号DNA产生序列(D)、核酸内切酶识别位点(E) (其与第一寡核苷酸的核酸内切酶识别位点(B)相同或不同)和包含锁核酸(LNA)且与第一寡核苷酸的信号DNA产生序列(A)同源的序列(F)；聚合酶；和用于切口反应的核酸内切酶。在该方面的实施方式中，该方法还包括确定信号DNA是否存在，其中信号DNA的存在表明在样品中存在靶核酸。

[0061] 该方法包含使样品与核酸内切酶接触。核酸内切酶可以是切口核酸内切酶或限制性核酸内切酶，其能够或可以用于切割在SC DNA内使与核酸内切酶识别位点(B)互补的序列、或切割在SA DNA内与核酸内切酶识别位点(E)互补的序列。在一些实施方式中，核酸内切酶包含切口核酸内切酶或限制性核酸内切酶，其可以催化或者可以用于催化双链DNA切口反应。在提供切口核酸内切酶的实施方式中，双链DNA的一条链的磷酸二酯键可以被切开，以在切开位点产生5'侧的磷酸酯基和3'侧的羟基。切口核酸内切酶的非限制性实例包括Nb.BbvCI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.BspQI、Nt.BstNBI、Nb.BsmI、Nt.CviPII和Nt.BsmAI。

[0062] 在一些实施方式中，核酸内切酶可以是限制性核酸内切酶。在这些实施方式中，限制性核酸内切酶识别位点可以被修饰，以使限制性核酸内切酶仅在双链DNA的一条链上切开磷酸二酯键，并且在双链上产生切口。可以使用许多方法或策略来修饰限制性核酸内切酶的活性，例如包括未被限制酶切开的双链核酸的至少一条链中的化学修饰。这种修饰的一个非限制性示例包括用硫原子替换一条链的磷酸二酯键的氧原子。

[0063] 在提供限制性核酸内切酶的实施方式中，双链DNA的一条链的磷酸二酯键可以被切开，以在切开位点产生5'侧的磷酸酯基和3'侧的羟基。限制性核酸内切酶的非限制性示例包括Hinc II、Hind II、Ava I、Fnu4HI、TthI 11I和NciI。

[0064] 本方法包括使样品与聚合酶接触。在一些实施方式中，聚合酶可以是具有链置换活性的DNA聚合酶。在一些实施方式中，聚合酶可以缺乏5'-3'核酸外切酶活性、缺乏3'-5'核酸外切酶活性、或者缺乏5'-3'和3'-5'核酸外切酶活性二者的聚合酶。聚合酶可以来源于真核生物、原核生物或病毒，也可以被遗传修饰。在一些实施方式中，聚合酶选自在较低温度(包括环境温度(例如室温))下起作用的那些聚合酶。DNA聚合酶的非限制性实例包括Klenow片段、从大肠杆菌(*E.coli*)获得的DNA聚合酶I、从嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bst DNA聚合酶、以及从热芽孢杆菌(*Bacillus caldotenax*)获得的5'至3'核酸外切酶缺乏型Bca DNA聚合酶。

[0065] 在图2A和2B中示出了本文公开的方法的一个非限制性实施方式。简言之，如图2A所示，在DNA聚合酶和能够切割双链形式(即互补序列)的核酸内切酶识别位点(B)或邻近双链形式的核酸内切酶识别位点(B)的位点的核酸内切酶存在下，使样品与SC DNA接触。如果样品中存在靶核酸(T)，则靶核酸(T)的3'端序列与SC DNA的序列(C)杂交，其与靶标互补，并引发或起始复制(通过存在于反应混合物中的DNA聚合酶)，从而产生包含双链核酸内切酶识别位点(B)的双链扩展序列(X)。新产生的双链核酸内切酶识别位点(B) (通过反应混合物中存在的核酸内切酶)的识别和随后的对新产生的链(由反应混合物中存在的核酸内切

酶)进行的切割,产生寡核苷酸信号序列(S)和扩展序列(X')。因为切口处的序列(X')的3'-OH作为后续一连串的链置换复制的起始位点,所以寡核苷酸(S)通过在反应混合物中继续复制并扩增信号DNA(S)的DNA聚合酶来从SC DNA中置换。

[0066] 如图2B中进一步所示,可以通过信号扩增DNA(或SA DNA)的存在来进一步扩增由信号DNA(S)的产生所获得的信号。简言之,反应中存在的信号DNA(S)与引发或起始复制(由反应混合物中存在的DNA聚合酶)的SA DNA的序列(F)杂交,从而产生包含双链核酸内切酶识别位点(E)的双链扩展序列(Y)。新产生的双链核酸内切酶识别位点(E)的识别(通过在反应混合物中存在的核酸内切酶)和随后的对新产生的链(通过反应混合物中存在的核酸内切酶)进行的切割,产生寡核苷酸信号序列(S)和扩展序列(Y')。因为切口处的序列(Y')的3'-OH作为后续一连串的链置换复制的起始位点,所以寡核苷酸(S)通过在反应混合物中继续复制并扩增信号DNA(S)的DNA聚合酶来从SA DNA中置换。

[0067] 根据本发明的方法可以在等温或基本恒定的温度条件下进行。在涉及在基本恒定的温度下执行该方法的实施方式中,温度的一些波动是允许的。例如,在一些实施方式中,基本恒定的温度可以在期望的或确认的目标温度范围(例如,约 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 或约 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )内波动。在实施方式中,基本恒定的温度可以包含不包括热循环的温度。在一些实施方式中,方法可以在等温或基本恒定的温度下进行,例如(1)温度大约等于或低于计算/预测或实验确定的靶核酸(T)到SC DNA的序列(C)的最佳杂交或退火温度;(2)温度等于或低于与SC DNA结合的靶核酸(T)的解链温度(通常,杂交或退火温度略低于解链温度);(3)温度等于或低于与SA DNA结合的信号DNA(S)的解链温度;或者(4)温度等于或大约为计算/预测或实验确定的在反应混合物中存在的聚合酶和/或核酸内切酶的最佳反应温度。

[0068] 该方法可以包括约 $20^{\circ}\text{C}$ 至约 $70^{\circ}\text{C}$ 的反应温度,包括落在约 $20^{\circ}\text{C}$ 至约 $42^{\circ}\text{C}$ 范围内的较低温度。在一些实施方式中,反应温度范围为 $35^{\circ}\text{C}$ 至 $40^{\circ}\text{C}$ (例如, $35^{\circ}\text{C}$ 、 $36^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $38^{\circ}\text{C}$ 、 $39^{\circ}\text{C}$ 或 $40^{\circ}\text{C}$ )。在其它实施方式中,反应温度低于 $65^{\circ}\text{C}$ ,包括低于约 $55^{\circ}\text{C}$ 、约 $50^{\circ}\text{C}$ 、约 $45^{\circ}\text{C}$ 、约 $40^{\circ}\text{C}$ 或约 $30^{\circ}\text{C}$ 的较低温度。在另外其它实施方式中,反应温度可以是约 $20^{\circ}\text{C}$ 、约 $21^{\circ}\text{C}$ 、约 $22^{\circ}\text{C}$ 、约 $23^{\circ}\text{C}$ 、约 $24^{\circ}\text{C}$ 、约 $25^{\circ}\text{C}$ 、约 $26^{\circ}\text{C}$ 、约 $27^{\circ}\text{C}$ 、约 $28^{\circ}\text{C}$ 、约 $29^{\circ}\text{C}$ 、约 $30^{\circ}\text{C}$ 、约 $31^{\circ}\text{C}$ 、约 $32^{\circ}\text{C}$ 、约 $33^{\circ}\text{C}$ 、约 $34^{\circ}\text{C}$ 、约 $35^{\circ}\text{C}$ 、约 $36^{\circ}\text{C}$ 、约 $37^{\circ}\text{C}$ 、约 $38^{\circ}\text{C}$ 、约 $39^{\circ}\text{C}$ 、约 $40^{\circ}\text{C}$ 、约 $41^{\circ}\text{C}$ 、约 $42^{\circ}\text{C}$ 、约 $43^{\circ}\text{C}$ 、约 $44^{\circ}\text{C}$ 、约 $45^{\circ}\text{C}$ 、约 $46^{\circ}\text{C}$ 、约 $47^{\circ}\text{C}$ 、约 $48^{\circ}\text{C}$ 、约 $49^{\circ}\text{C}$ 、约 $50^{\circ}\text{C}$ 、约 $51^{\circ}\text{C}$ 、约 $52^{\circ}\text{C}$ 、约 $53^{\circ}\text{C}$ 、约 $54^{\circ}\text{C}$ 、约 $55^{\circ}\text{C}$ 、约 $56^{\circ}\text{C}$ 、约 $57^{\circ}\text{C}$ 、约 $58^{\circ}\text{C}$ 、约 $59^{\circ}\text{C}$ 、约 $60^{\circ}\text{C}$ 、约 $61^{\circ}\text{C}$ 、约 $62^{\circ}\text{C}$ 、约 $63^{\circ}\text{C}$ 、约 $64^{\circ}\text{C}$ 、约 $65^{\circ}\text{C}$ 、约 $66^{\circ}\text{C}$ 、约 $67^{\circ}\text{C}$ 、约 $68^{\circ}\text{C}$ 、约 $69^{\circ}\text{C}$ 或约 $70^{\circ}\text{C}$ 。

[0069] 本方法可以进行在靶核酸存在下足以允许扩增可检测到的量的信号序列的时间。在一些实施方式中,反应时间范围可以为约5分钟至16小时或者约3分钟至16小时。在另外其它实施方式中,反应时间范围可以为约5至120分钟,或约15至60分钟。

[0070] 在整个说明书中,寡核苷酸(S)也称为信号DNA(S)。因为信号DNA仅在靶核酸(T)的存在下产生,所以根据本发明的方法通过检测信号DNA的存在或不存在来检测样品中存在或不存在靶核酸(T)。信号DNA(S)不受序列限制,可以是可检测到的任何序列。信号DNA也不受长度限制。优选地,信号DNA可以是约5至约100个碱基,以及5至100之间的任何整数。在一些实施方式中,信号DNA可以是约5至约30个核酸碱基,以及在5和30之间的所有整数。在一些实施方式中,信号DNA的长度可以为约10至约30个碱基,以及10至30之间的所有整数。在另外其它实施方式中,信号DNA的长度可以为约15至约30个碱基,以及15和30之间的所有整

数。

[0071] 根据本公开的方法可以在包含约4至约10或者约7至约9的pH范围的缓冲条件下进行。缓冲液可以包含约10mM至约500mM或约50mM至150mM的盐浓度。在一些实施方式中,方法可以使用如下含量的SC和/或SA DNA进行本方法,所述含量的SC和/或SA DNA允许在靶核酸存在下扩增可检测到的量的信号序列。在一些实施方式中,SC和/或SA DNA浓度范围可以为约100pM至约100μM、约1nM至约150nM、约5nM至约50nM或者约5nM至约25nM。

[0072] 信号DNA (S) 的存在可以通过本领域已知的任何方法检测。例如,可以使用凝胶电泳和用溴化乙锭染色。此外,信号DNA的存在可以使用荧光偏振、免疫试验、荧光共振能量转移、酶标记(例如过氧化物酶或碱性磷酸酶)、荧光标记(例如荧光素或罗丹明)、化学发光、生物发光、表面等离子体共振 (SPR) 或荧光团修饰的探针DNA (例如, TaqMan探针) 来检测。扩增产物也可以通过使用标记的(例如用生物素标记的)核苷酸来检测。在这种情况下,例如,可以使用荧光标记的抗生物素蛋白或酶标记的抗生物素蛋白来检测扩增产物中的生物素。也可以通过使用本领域技术人员已知的氧化还原嵌入剂来用电极检测扩增产物。也可以使用表面等离子体共振 (SPR)、石英晶体微量天平 (QCM) 或电化学方法(包括使用纳米孔传感器的那些方法) 来检测扩增产物。

[0073] 根据本发明的方法检测样品中存在或不存在靶核酸(T)。根据本发明的方法还可以用于定量测量靶核酸在测试样品中的浓度。例如,根据本公开的方法可以在靶核酸的不同的已知浓度的范围的存在下进行,然后如本领域通常实践的那样,可以制作和使用校准曲线。靶核酸(图2中的(T))可以包含任何核酸序列,并且可以包括DNA、RNA、化学修饰的核酸、非天然核酸、核酸类似物或任何杂交体或其组合。因此,在一些实施方式中,DNA可以包括cDNA、基因组DNA和合成的DNA,并且RNA可以包括总RNA、mRNA、rRNA、siRNA、hnRNA、piRNA、aRNA、miRNA和合成的RNA。尽管一些实施方式涉及具体的靶核酸序列,但任何核酸序列(包括辅助核酸序列)可以是待检测的靶核酸序列。本公开提供了即使当核酸是短链核酸时仍具有选择性和灵敏度的靶核酸的检测。因此,SC DNA的序列(C)与靶核酸(T)之间的互补程度允许序列之间的特异性杂交(例如,靶核酸序列和序列转换DNA的序列(C)中互补核苷酸的数目避免了在给定的一组反应条件下的非特异性杂交)。

[0074] 在实施方式中,靶核酸序列可来自或衍生自任何数量的来源,包括例如基因组DNA、表达的mRNA、来自病原体的核酸序列(微生物、病毒)或治疗性核酸。因此,SC和SA DNA以及本文公开的方法可用于疾病的诊断和预后(例如,由遗传和感染源产生)、污染物的鉴定(例如,食源性疾病、设备污染)和个性化医学(例如,治疗的监测和/或预后)等。例如,可以针对以下感染性疾病进行分子诊断测试:乙型肝炎病毒(HBV);丙型肝炎(HCV);HCV(基因型1-6);人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1);沙眼衣原体;淋病奈瑟氏菌;甲型流感;乙型流感;呼吸道合胞病毒(RSV);和Parvo病毒。

[0075] 在一些实施方式中,靶核酸可以包含微RNA(miRNA)。微RNA包括约22个核苷酸的小的非编码RNA分子。已知微RNA在基因表达的转录和转录后调控中起作用。已知微RNA通过与信使RNA(mRNA)的互补区域的碱基配对而起作用,从而通过翻译抑制或靶标降解导致基因沉默。

[0076] 可以包含靶核酸的任何类型的样品可用于本文公开的方法中。就本身而言,含有或怀疑含有靶核酸的样品没有特别限制,包括例如来自活体的生物样品,例如全血、血清、



血沉棕黄层、尿液、粪便、脑脊髓液、精液、唾液、组织(例如癌组织或淋巴结)、细胞培养物(例如哺乳动物细胞培养物或细菌培养物);含有核酸的样品,例如类病毒、病毒、细菌、真菌、酵母、植物和动物;可能含有微生物或被微生物(如病毒或细菌)感染的样品(如食品和生物制品);以及可能含有生物物质的样品,如土壤、工业处理和制造设备以及废水;和来自各种水源(例如饮用水)的样品。此外,可以通过任何已知方法处理样品,以制备在本文公开的方法中使用的含有核酸的组合物。这种制品的实例可以包括细胞碎片(例如,细胞裂解物和提取物)、样品馏分、样品中的核酸和特异性核酸分子基团,例如富含mRNA的样品。在检测本发明的靶核酸的方法中使用的样品不限于如上所述的从生物产品和天然产品获得的那些样品,并且可以是含有合成的寡核苷酸的样品。

[0077] 根据本发明的方法可以与Abbott m2000sp样品制备系统结合进行。m2000sp使用磁粉技术捕获核酸,并洗涤颗粒以除去未结合的样品组分。将结合的核酸洗脱并转移到96深孔板中。Abbott m2000sp还可以与将洗涤后的核酸转移到96深孔板中所需要的任何试剂结合,以便执行根据本技术的方法。例如,可以根据需要或期望来添加SC和SA DNA、聚合酶、核酸内切酶、分子信标和任何其它试剂(例如dNTP)。

[0078] 根据本发明的方法也可以与床旁护理平台接口。例如,将脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)引入到生长的DNA链中涉及共价键的形成以及影响反应pH的带正电荷的氢离子和焦磷酸盐的释放。就本身而言,可以通过使用例如床旁护理微量pH计跟踪pH的变化来检测根据本发明的方法的信号DNA的合成。例如,Abbott's i-STAT床旁护理系统可以提供单次使用的一次性药筒,其中包含微型制造的传感器、校准溶液、流体系统和用于pH分析的废物室。

[0079] 本文公开的方法可以包含额外的试剂。可用于核酸扩增反应的其它试剂的一些非限制性实例包括金属盐,例如氯化钠、氯化镁、乙酸镁和硫酸镁;底物,例如dNTP混合物;和缓冲液,例如Tris-HCl缓冲液、三氯缓冲液、磷酸钠缓冲液和磷酸钾缓冲液。同样,洗涤剂、氧化剂和还原剂也可用于本文公开的方法的实践中。此外,可以使用诸如二甲基亚砜和甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸);国际公开号W0 99/54455中描述的酸性物质以及阳离子络合物的试剂。

[0080] 本文提供的方法和核酸结构可以与其它方法组合使用,以提供在靶核酸存在下信号DNA的指数扩增。例如,根据本公开的方法和组合物可以与覆盖序列转换DNA组合使用,如名称为“覆盖序列转换DNA和检测方法”的美国临时申请61/927710中所述,该临时申请通过引用并入本文。

[0081] 术语“约”通常是指本领域技术人员将认为等同于所引用的值(即具有相同的功能或结果)的数量范围。本文中使用时,术语“约”旨在表示大于或小于参考值的约10-20%的范围。在某些情况下,本领域技术人员将认识到,由于参考值的性质,术语“约”可以意味着与该值的偏差大于或小于10-20%。

[0082] 以下实施例旨在说明上述各方面和实施方式。上述公开内容和下文的实施例都不应视为限制所附权利要求的范围。本领域技术人员将理解,本公开不受用于描述和说明本公开的各个方面的特定术语的限制。

[0083] 实施例1

[0084] 在如下情况下进行反应:使用SC DNA#246:5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCCTGTTCC

TGCTGAAGTGAAGCCA-idT-idT-3' (序列号:32;粗体位置表示存在LNA) 和SA DNA#253:5'-AGC CCTGTACAATGCCCTCAGCAGCCCTGTACAAT-idT-idT-3' (序列号:2;粗体位置表示存在LNA) 来检测在靶DNA的以各种用量 (1nM、100pM、10pM、1pM、100fM、10fM或1fM) 存在或不存在下信号DNA的产生,其是与人hsa-miR-24 (序列号:33) 相同的DNA序列。SC DNA#246和SA DNA#253二者均使用离子交换HPLC来被纯化。

[0085] 反应在37℃下在含有终浓度为10mM Tris-HCl、50mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、pH 7.9的New England Biolabs (NEB) 缓冲液2的25μL反应体积中进行。在反应中使用的切口核酸内切酶是Nb.BbvCI,其以0.1单位/μL的浓度存在。在反应中使用的聚合酶是Bst DNA聚合酶大片段,其以0.08单位/μL的浓度存在。每个dNTP以200μM的终浓度存在。反应中存在的SC和SA DNA的终浓度分别为5nM和20nM。使用最终浓度为100nM的分子信标探针 (序列号:34) 来检测信号DNA的产生。使用Bio-Rad实时PCR系统CFX96进行荧光测量,并且结果示于下表1中。

[0086] 表1

靶DNA的浓度	扩增时间 (分钟)
0	>138.22
1nM	5.84
100pM	15.03
10pM	32.18
1pM	55.31
100fM	69.68
10fM	73.48

[0088] 实施例2

[0089] 在如下情况下进行反应:在各种温度 (20℃、25℃、30℃、37℃、45℃和50℃) 下使用SC DNA#246 (序列号:32) 和SA DNA#339 (序列号:25), 来检测在靶DNA的存在 (1nM、100pM、10pM、1pM、100fM) 或不存在下信号DNA的产生,其是与人hsa-miR-24 (序列号:33) 相同的DNA序列。SC DNA#246和SA DNA#339二者均使用离子交换HPLC来被纯化。

[0090] 除温度外,反应条件如实施例1所述,并且结果示于下表2中。

[0091] 表2

靶 DNA 的浓度	温度	扩增时间 (分钟)
0	20℃	>393.32
1 nM	20℃	109.93
0	25℃	>393.32
1 nM	25℃	45.36
100 pM	25℃	110.75

[0093]

10 pM	25°C	244.64
0	30°C	>393.32
1 nM	30°C	18.42
100 pM	30°C	45.58
10 pM	30°C	105.79
1 pM	30°C	186.44
0	37°C	>393.32
1 nM	37°C	7.59
100 pM	37°C	19.61
10 pM	37°C	42.89
1 pM	37°C	83.07
100 fM	37°C	120.90
0	45°C	>393.32
1 nM	45°C	3.68
100 pM	45°C	10.07
10 pM	45°C	25.88
1 pM	45°C	60.34
0	50°C	>393.32
1 nM	50°C	3.65

[0094] 实施例3至38

[0095] 使用SC DNA#246 (序列号:32) 连同许多不同的SA DNA (如下表3所述) 进行进一步的反应,以检测在靶DNA的存在 (100pM) 或不存在下信号DNA的产生,其是与人hsa-miR-24 (序列号:33) 相同的DNA序列。

[0096] 反应条件如实施例1中所述,并且结果如表3中所示。序列扩增DNA序列提供于表格上方,并且表示可以包含LNA的位置 (从3'端编号)。

[0097]

	35	30	25	20	15	10	5	1
5' -	AGCCC	TGTAC	AATGC	CCTCA	GCAGC	CCTGT	ACAAT	- 3'

[0098] 表3

[0099]

实施例	SA DNA #	序列号	从 SA DNA 的 3' 端的 LNA 位置	扩增时间 (分钟) 100 pM 靶核酸	扩增时间 (分钟) 0 pM 靶核酸	差异 (分钟) (0 pM 靶标)-(100 pM 靶标)
3	311	1	无	5.16	17.45	12.29
4	296	2	1, 2, 6, 10	19.44	61.99	42.55
5	297	3	1, 2, 6	16.21	55.60	39.39
6	298	4	1, 2, 10	13.38	31.76	18.38
7	299	5	1, 6, 10	22.62	86.26	63.64
8	300	6	2, 6, 10	20.47	84.86	64.39
9	301	7	1, 2	11.16	28.74	17.57
10	302	8	1, 6	19.00	77.69	58.69
11	303	9	2, 6	16.99	66.14	49.15
12	304	10	1, 10	16.30	47.75	31.45
13	305	11	2, 10	9.42	23.07	13.65
14	306	12	6, 10	13.97	104.81	90.85
15	307	13	10	5.89	18.83	12.94
16	308	14	6	12.94	70.61	57.67
17	309	15	2	5.03	15.87	10.84
18	310	16	1	13.03	70.22	57.19
19	326	2	1, 2, 6, 10	9.55	67.44	57.89
20	327	13	10	4.42	18.86	14.44
21	328	17	9	5.31	15.09	9.78
22	329	18	8	6.29	46.83	40.54
23	330	19	7	5.95	33.17	27.22
24	331	14	6	9.50	99.25	89.75
25	332	20	5	8.36	54.10	45.74
26	333	21	4	7.13	34.16	27.04

[0100]

27	334	22	3	4.79	17.89	13.10
28	335	15	2	4.67	17.35	12.68
29	336	16	1	8.37	38.02	29.65
30	337	23	4, 8	10.15	91.63	81.48
31	338	24	5, 9	6.95	29.98	23.03
32	339	25	3, 6	12.80	> 137.88	> 125.08
33	340	26	2, 3, 6	12.98	> 137.88	> 124.91
34	341	27	2, 3, 6, 10	14.33	> 137.88	> 123.55
35	342	28	1, 8	11.44	84.57	73.14
36	344	29	2, 8	6.72	30.02	23.29
37	345	30	3, 8	8.83	46.90	38.07
38	346	31	2, 7	5.84	24.41	18.57

[0101] 实施例39-92

[0102] 使用SC DNA#246 (序列号:32) 连同许多不同的SA DNA (如下表4所述) 进行进一步的反应,以检测在靶DNA的存在 (1nM、100pM、10pM、1pM和100fM) 或不存在下信号DNA的产生,其是与人hsa-miR-24 (序列号:33) 相同的DNA序列。如表4所示,使用未纯化或HPLC纯化的SA DNA进行实验。

[0103] 反应条件如实施例1所述,并且结果如表4所示。序列扩增DNA序列提供于表格上方,并且表示可以包含LNA的位置 (从3'端编号)。

[0104]

35      30      25      20      15      10      5      1

|        |        |        |        |        |        |

5' - AGCCC TGTAC AATGC CCTCA GCAGC CCTGT ACAAT - 3'

[0105] 表4

[0106]

实施例	SA DNA	序列号	HPLC	从 SA DNA 的 3'端的 LNA 位置	差异 (分钟) (0 靶标) - (1 nM 靶标)	差异 (分钟) (0 靶标) - (100 pM 靶标)	差异 (分钟) (0 靶标) - (10 pM 靶标)	差异 (分钟) (0 靶标) - (1 pM 靶标)	差异 (分钟) (0 靶标) - (100 fM 靶标)	差异 (分钟) (0 靶标) - (100 fM 靶标)

[0107]

39	311	1	否	无	18.23	13.86	7.05	1.70	0.12	-0.46
40	311	1	是	无	24.08	20.01	14.17	9.28	1.48	-1.05
41	296	2	否	1, 2, 6, 10	50.09	38.24	20.86	5.20	-4.07	-6.85
42	296	2	是	1, 2, 6, 10	110.50	101.55	77.64	40.23	23.09	-0.48
43	298	4	否	1, 2, 10	27.75	22.53	13.28	4.31	-0.21	-0.90
44	298	4	是	1, 2, 10	27.61	23.07	14.71	5.91	0.92	0.00
45	299	5	否	1, 6, 10	81.47	72.26	49.38	15.09	-4.33	-6.79
46	299	5	是	1, 6, 10	> 133.87	> 123.93	> 94.42	> 38.84	N/A	N/A
47	300	6	否	2, 6, 10	81.75	72.64	51.27	20.57	-0.52	-5.63
48	300	6	是	2, 6, 10	126.12	116.85	91.02	49.23	10.15	3.71
49	301	7	否	1, 2	21.48	17.60	10.33	3.31	0.23	-0.74
50	301	7	是	1, 2	21.90	18.33	11.02	3.91	0.22	-0.37
51	302	8	否	1, 6	70.60	63.23	44.93	17.96	2.91	-1.32
52	302	8	是	1, 6	96.99	89.16	67.41	39.23	9.30	-3.69
53	303	9	否	2, 6	71.73	63.60	46.48	19.67	3.76	0.38
54	303	9	是	2, 6	89.19	80.59	62.28	37.42	13.29	0.96
55	304	10	否	1, 10	53.87	44.92	29.13	9.88	2.10	1.23
56	304	10	是	1, 10	70.68	61.59	45.79	25.84	7.74	-0.20

[0108]

57	305	11	否	2, 10	18.67	14.10	8.68	3.08	0.39	0.57
58	305	11	是	2, 10	22.25	18.32	13.48	7.21	2.49	-0.57
59	306	12	否	6, 10	92.07	80.17	54.53	13.19	2.27	4.15
60	306	12	是	6, 10	> 133.30	> 120.41	> 88.18	> 24.20	N/A	N/A
61	307	13	否	10	21.95	17.15	9.96	2.02	0.69	0.38
62	307	13	是	10	25.99	21.80	16.71	8.38	2.06	1.42
63	308	14	否	6	65.98	56.79	36.08	7.00	3.18	0.47
64	308	14	是	6	117.75	108.40	85.99	44.28	8.00	-3.17
65	309	15	否	2	17.04	13.92	8.15	2.50	0.08	-0.08
66	309	15	是	2	20.43	18.22	12.59	7.62	2.23	1.09
67	310	16	否	1	37.55	30.61	16.68	4.85	0.04	-0.06
68	310	16	是	1	50.77	44.61	32.67	18.37	6.27	1.60
69	326	2	否	1, 2, 6, 10	66.95	56.25	34.00	12.44	5.24	2.03
70	326	2	是	1, 2, 6, 10	103.95	92.33	67.10	36.34	1.75	-0.24
71	327	13	否	10	24.95	20.71	13.02	5.84	0.87	-0.15
72	327	13	是	10	25.31	21.25	14.95	8.91	2.89	0.35
73	328	17	否	9	15.05	11.92	6.84	2.26	0.24	-0.20
74	328	17	是	9	20.53	17.38	12.21	7.25	2.93	0.56
75	329	18	否	8	61.98	54.25	37.98	23.51	16.85	14.40
76	329	18	是	8	63.53	56.82	42.94	27.45	13.69	5.17

[0109]

77	330	19	否	7	36.79	31.21	20.02	8.36	2.40	0.86
78	330	19	是	7	50.62	44.32	32.65	20.78	4.03	0.05
79	331	14	否	6	106.33	95.63	71.62	30.73	6.38	0.44
80	331	14	是	6	122.99	111.94	85.44	40.13	9.04	0.00
81	332	20	否	5	69.31	60.27	42.72	19.21	4.02	0.31
82	332	20	是	5	78.59	69.51	51.76	26.48	5.25	-1.48
83	333	21	否	4	40.90	33.09	21.21	9.29	1.97	0.05
84	333	21	是	4	52.10	44.17	33.30	21.03	8.37	1.80
85	334	22	否	3	23.34	17.95	11.50	4.68	0.61	0.49
86	334	22	是	3	31.21	26.09	18.85	10.91	3.83	0.28
87	335	15	否	2	21.21	17.85	9.96	3.44	-0.68	-0.07
88	335	15	是	2	21.33	18.31	12.00	8.21	1.06	-1.79
89	336	16	否	1	41.11	33.90	21.81	8.70	2.53	0.85
90	336	16	是	1	50.65	43.87	31.68	18.42	5.77	0.96
91	339	25	否	3, 6	164.66	155.83	125.30	68.44	17.49	-1.41
92	339	25	是	3, 6	> 246.97	> 237.39	> 202.59	> 128.53	> 28.94	N/A

[0110] 虽然已经参考某些方面和实施方式描述了本申请,但是本领域技术人员将理解,可以对本文提供的公开内容进行改变,并且在不违背本公开的保护范围的情况下可以替换等同物。因此,本申请不应该限于所公开的具体方面和实施方式,而应理解为和意识到包括落在所附权利要求的范围内的所有方面和实施方式。



- [0001] 序列表
- [0002] <110> Ken Komiya
- [0003] Makoto Komori
- [0004] Toru Yoshimura
- [0005] <120> 具有锁核酸的序列转换和信号扩增DNA以及使用其的检测方法
- [0006] <130> 28295US01 (12350US01)
- [0007] <160> 35
- [0008] <170> PatentIn版本3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 35
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 信号扩增DNA
- [0015] <220>
- [0016] <221> 尚未归类的特征
- [0017] <222> (35) .. (35)
- [0018] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0019] <400> 1
- [0020] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 35
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列
- [0025] <220>
- [0026] <223> 信号扩增DNA在位置26,30,34,35处具有锁核酸
- [0027] <220>
- [0028] <221> 修饰的碱基
- [0029] <222> (26) .. (26)
- [0030] <223> LNA修饰的碱基
- [0031] <220>
- [0032] <221> 修饰的碱基
- [0033] <222> (30) .. (30)
- [0034] <223> LNA修饰的碱基
- [0035] <220>
- [0036] <221> 修饰的碱基
- [0037] <222> (34) .. (34)
- [0038] <223> LNA修饰的碱基

- [0039] <220>
- [0040] <221> 修饰的碱基
- [0041] <222> (35) .. (35)
- [0042] <223> LNA修饰的碱基
- [0043] <220>
- [0044] <221> 尚未归类的特征
- [0045] <222> (35) .. (35)
- [0046] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0047] <400> 2
- [0048] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0049] <210> 3
- [0050] <211> 35
- [0051] <212> DNA
- [0052] <213> 人工序列
- [0053] <220>
- [0054] <223> 信号扩增DNA在位置30,34,35处具有锁核酸
- [0055] <220>
- [0056] <221> 修饰的碱基
- [0057] <222> (30) .. (30)
- [0058] <223> LNA修饰的碱基
- [0059] <220>
- [0060] <221> 修饰的碱基
- [0061] <222> (34) .. (34)
- [0062] <223> LNA修饰的碱基
- [0063] <220>
- [0064] <221> 修饰的碱基
- [0065] <222> (35) .. (35)
- [0066] <223> LNA修饰的碱基
- [0067] <220>
- [0068] <221> 尚未归类的特征
- [0069] <222> (35) .. (35)
- [0070] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0071] <400> 3
- [0072] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0073] <210> 4
- [0074] <211> 35
- [0075] <212> DNA
- [0076] <213> 人工序列
- [0077] <220>

- [0078] <223> 信号扩增DNA在位置26,34,35处具有锁核酸
- [0079] <220>
- [0080] <221> 修饰的碱基
- [0081] <222> (26) .. (26)
- [0082] <223> LNA修饰的碱基
- [0083] <220>
- [0084] <221> 修饰的碱基
- [0085] <222> (34) .. (34)
- [0086] <223> LNA修饰的碱基
- [0087] <220>
- [0088] <221> 修饰的碱基
- [0089] <222> (35) .. (35)
- [0090] <223> LNA修饰的碱基
- [0091] <220>
- [0092] <221> 尚未归类的特征
- [0093] <222> (35) .. (35)
- [0094] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0095] <400> 4
- [0096] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0097] <210> 5
- [0098] <211> 35
- [0099] <212> DNA
- [0100] <213> 人工序列
- [0101] <220>
- [0102] <223> 信号扩增DNA在位置26,30,35处具有锁核酸
- [0103] <220>
- [0104] <221> 修饰的碱基
- [0105] <222> (26) .. (26)
- [0106] <223> LNA修饰的碱基
- [0107] <220>
- [0108] <221> 修饰的碱基
- [0109] <222> (30) .. (30)
- [0110] <223> LNA修饰的碱基
- [0111] <220>
- [0112] <221> 修饰的碱基
- [0113] <222> (35) .. (35)
- [0114] <223> LNA修饰的碱基
- [0115] <220>
- [0116] <221> 尚未归类的特征

- [0117] <222> (35) .. (35)
- [0118] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0119] <400> 5
- [0120] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0121] <210> 6
- [0122] <211> 35
- [0123] <212> DNA
- [0124] <213> 人工序列
- [0125] <220>
- [0126] <223> 信号扩增DNA在位置26,30,34处具有锁核酸
- [0127] <220>
- [0128] <221> 修饰的碱基
- [0129] <222> (26) .. (26)
- [0130] <223> LNA修饰的碱基
- [0131] <220>
- [0132] <221> 修饰的碱基
- [0133] <222> (30) .. (30)
- [0134] <223> LNA修饰的碱基
- [0135] <220>
- [0136] <221> 修饰的碱基
- [0137] <222> (34) .. (34)
- [0138] <223> LNA修饰的碱基
- [0139] <220>
- [0140] <221> 尚未归类的特征
- [0141] <222> (35) .. (35)
- [0142] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0143] <400> 6
- [0144] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0145] <210> 7
- [0146] <211> 35
- [0147] <212> DNA
- [0148] <213> 人工序列
- [0149] <220>
- [0150] <223> 信号扩增DNA在位置34,35处具有锁核酸
- [0151] <220>
- [0152] <221> 修饰的碱基
- [0153] <222> (34) .. (34)
- [0154] <223> LNA修饰的碱基
- [0155] <220>

- [0156] <221> 修饰的碱基  
[0157] <222> (35) .. (35)  
[0158] <223> LNA修饰的碱基  
[0159] <220>  
[0160] <221> 尚未归类的特征  
[0161] <222> (35) .. (35)  
[0162] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0163] <400> 7  
[0164] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0165] <210> 8  
[0166] <211> 35  
[0167] <212> DNA  
[0168] <213> 人工序列  
[0169] <220>  
[0170] <223> 信号扩增DNA在位置30,35处具有锁核酸  
[0171] <220>  
[0172] <221> 修饰的碱基  
[0173] <222> (30) .. (30)  
[0174] <223> LNA修饰的碱基  
[0175] <220>  
[0176] <221> 修饰的碱基  
[0177] <222> (35) .. (35)  
[0178] <223> LNA修饰的碱基  
[0179] <220>  
[0180] <221> 尚未归类的特征  
[0181] <222> (35) .. (35)  
[0182] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0183] <400> 8  
[0184] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0185] <210> 9  
[0186] <211> 35  
[0187] <212> DNA  
[0188] <213> 人工序列  
[0189] <220>  
[0190] <223> 信号扩增DNA在位置30,34处具有锁核酸  
[0191] <220>  
[0192] <221> 修饰的碱基  
[0193] <222> (30) .. (30)  
[0194] <223> LNA修饰的碱基

- [0195] <220>  
[0196] <221> 修饰的碱基  
[0197] <222> (34) .. (34)  
[0198] <223> LNA修饰的碱基  
[0199] <220>  
[0200] <221> 尚未归类的特征  
[0201] <222> (35) .. (35)  
[0202] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0203] <400> 9  
[0204] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0205] <210> 10  
[0206] <211> 35  
[0207] <212> DNA  
[0208] <213> 人工序列  
[0209] <220>  
[0210] <223> 信号扩增DNA在位置26,35处具有锁核酸  
[0211] <220>  
[0212] <221> 修饰的碱基  
[0213] <222> (26) .. (26)  
[0214] <223> LNA修饰的碱基  
[0215] <220>  
[0216] <221> 修饰的碱基  
[0217] <222> (35) .. (35)  
[0218] <223> LNA修饰的碱基  
[0219] <220>  
[0220] <221> 尚未归类的特征  
[0221] <222> (35) .. (35)  
[0222] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0223] <400> 10  
[0224] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0225] <210> 11  
[0226] <211> 35  
[0227] <212> DNA  
[0228] <213> 人工序列  
[0229] <220>  
[0230] <223> 信号扩增DNA在位置26,34处具有锁核酸  
[0231] <220>  
[0232] <221> 修饰的碱基  
[0233] <222> (26) .. (26)

- [0234] <223> LNA修饰的碱基  
[0235] <220>  
[0236] <221> 修饰的碱基  
[0237] <222> (34) .. (34)  
[0238] <223> LNA修饰的碱基  
[0239] <220>  
[0240] <221> 尚未归类的特征  
[0241] <222> (35) .. (35)  
[0242] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0243] <400> 11  
[0244] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0245] <210> 12  
[0246] <211> 35  
[0247] <212> DNA  
[0248] <213> 人工序列  
[0249] <220>  
[0250] <223> 信号扩增DNA在位置26,30处具有锁核酸  
[0251] <220>  
[0252] <221> 修饰的碱基  
[0253] <222> (26) .. (26)  
[0254] <223> LNA修饰的碱基  
[0255] <220>  
[0256] <221> 修饰的碱基  
[0257] <222> (30) .. (30)  
[0258] <223> LNA修饰的碱基  
[0259] <220>  
[0260] <221> 尚未归类的特征  
[0261] <222> (35) .. (35)  
[0262] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0263] <400> 12  
[0264] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0265] <210> 13  
[0266] <211> 35  
[0267] <212> DNA  
[0268] <213> 人工序列  
[0269] <220>  
[0270] <223> 信号扩增DNA在位置26处具有锁核酸  
[0271] <220>  
[0272] <221> 修饰的碱基

[0273]	<222> (26) .. (26)
[0274]	<223> LNA修饰的碱基
[0275]	<220>
[0276]	<221> 尚未归类的特征
[0277]	<222> (35) .. (35)
[0278]	<223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
[0279]	<400> 13
[0280]	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
[0281]	<210> 14
[0282]	<211> 35
[0283]	<212> DNA
[0284]	<213> 人工序列
[0285]	<220>
[0286]	<223> 信号扩增DNA在位置30处具有锁核酸
[0287]	<220>
[0288]	<221> 修饰的碱基
[0289]	<222> (30) .. (30)
[0290]	<223> LNA修饰的碱基
[0291]	<220>
[0292]	<221> 尚未归类的特征
[0293]	<222> (35) .. (35)
[0294]	<223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
[0295]	<400> 14
[0296]	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
[0297]	<210> 15
[0298]	<211> 35
[0299]	<212> DNA
[0300]	<213> 人工序列
[0301]	<220>
[0302]	<223> 信号扩增DNA在位置34处具有锁核酸
[0303]	<220>
[0304]	<221> 修饰的碱基
[0305]	<222> (34) .. (34)
[0306]	<223> LNA修饰的碱基
[0307]	<220>
[0308]	<221> 尚未归类的特征
[0309]	<222> (35) .. (35)
[0310]	<223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
[0311]	<400> 15



[0312] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0313] <210> 16  
[0314] <211> 35  
[0315] <212> DNA  
[0316] <213> 人工序列  
[0317] <220>  
[0318] <223> 信号扩增DNA在位置35处具有锁核酸  
[0319] <220>  
[0320] <221> 修饰的碱基  
[0321] <222> (35) .. (35)  
[0322] <223> LNA修饰的碱基  
[0323] <220>  
[0324] <221> 尚未归类的特征  
[0325] <222> (35) .. (35)  
[0326] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0327] <400> 16  
[0328] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0329] <210> 17  
[0330] <211> 35  
[0331] <212> DNA  
[0332] <213> 人工序列  
[0333] <220>  
[0334] <223> 信号扩增DNA在位置27处具有锁核酸  
[0335] <220>  
[0336] <221> 修饰的碱基  
[0337] <222> (27) .. (27)  
[0338] <223> LNA修饰的碱基  
[0339] <220>  
[0340] <221> 尚未归类的特征  
[0341] <222> (35) .. (35)  
[0342] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0343] <400> 17  
[0344] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0345] <210> 18  
[0346] <211> 35  
[0347] <212> DNA  
[0348] <213> 人工序列  
[0349] <220>  
[0350] <223> 信号扩增DNA在位置28处具有锁核酸

- [0351] <220>  
[0352] <221> 修饰的碱基  
[0353] <222> (28) .. (28)  
[0354] <223> LNA修饰的碱基  
[0355] <220>  
[0356] <221> 尚未归类的特征  
[0357] <222> (35) .. (35)  
[0358] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0359] <400> 18  
[0360] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0361] <210> 19  
[0362] <211> 35  
[0363] <212> DNA  
[0364] <213> 人工序列  
[0365] <220>  
[0366] <223> 信号扩增DNA在位置29处具有锁核酸  
[0367] <220>  
[0368] <221> 修饰的碱基  
[0369] <222> (29) .. (29)  
[0370] <223> LNA修饰的碱基  
[0371] <220>  
[0372] <221> 尚未归类的特征  
[0373] <222> (35) .. (35)  
[0374] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0375] <400> 19  
[0376] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0377] <210> 20  
[0378] <211> 35  
[0379] <212> DNA  
[0380] <213> 人工序列  
[0381] <220>  
[0382] <223> 信号扩增DNA在位置31处具有锁核酸  
[0383] <220>  
[0384] <221> 修饰的碱基  
[0385] <222> (31) .. (31)  
[0386] <223> LNA修饰的碱基  
[0387] <220>  
[0388] <221> 尚未归类的特征  
[0389] <222> (35) .. (35)

[0390] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0391] <400> 20  
[0392] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0393] <210> 21  
[0394] <211> 35  
[0395] <212> DNA  
[0396] <213> 人工序列  
[0397] <220>  
[0398] <223> 信号扩增DNA在位置32处具有锁核酸  
[0399] <220>  
[0400] <221> 修饰的碱基  
[0401] <222> (32) .. (32)  
[0402] <223> LNA修饰的碱基  
[0403] <220>  
[0404] <221> 尚未归类的特征  
[0405] <222> (35) .. (35)  
[0406] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0407] <400> 21  
[0408] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0409] <210> 22  
[0410] <211> 35  
[0411] <212> DNA  
[0412] <213> 人工序列  
[0413] <220>  
[0414] <223> 信号扩增DNA在位置33处具有锁核酸  
[0415] <220>  
[0416] <221> 修饰的碱基  
[0417] <222> (33) .. (33)  
[0418] <223> LNA修饰的碱基  
[0419] <220>  
[0420] <221> 尚未归类的特征  
[0421] <222> (35) .. (35)  
[0422] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0423] <400> 22  
[0424] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0425] <210> 23  
[0426] <211> 35  
[0427] <212> DNA  
[0428] <213> 人工序列

- [0429] <220>  
[0430] <223> 信号扩增DNA在位置28,32处具有锁核酸  
[0431] <220>  
[0432] <221> 修饰的碱基  
[0433] <222> (28) .. (28)  
[0434] <223> LNA修饰的碱基  
[0435] <220>  
[0436] <221> 修饰的碱基  
[0437] <222> (32) .. (32)  
[0438] <223> LNA修饰的碱基  
[0439] <220>  
[0440] <221> 尚未归类的特征  
[0441] <222> (35) .. (35)  
[0442] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0443] <400> 23  
[0444] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0445] <210> 24  
[0446] <211> 35  
[0447] <212> DNA  
[0448] <213> 人工序列  
[0449] <220>  
[0450] <223> 信号扩增DNA在位置27,31处具有锁核酸  
[0451] <220>  
[0452] <221> 修饰的碱基  
[0453] <222> (27) .. (27)  
[0454] <223> LNA修饰的碱基  
[0455] <220>  
[0456] <221> 修饰的碱基  
[0457] <222> (31) .. (31)  
[0458] <223> LNA修饰的碱基  
[0459] <220>  
[0460] <221> 尚未归类的特征  
[0461] <222> (35) .. (35)  
[0462] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0463] <400> 24  
[0464] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0465] <210> 25  
[0466] <211> 35  
[0467] <212> DNA

- [0468] <213> 人工序列
- [0469] <220>
- [0470] <223> 信号扩增DNA在位置30,33处具有锁核酸
- [0471] <220>
- [0472] <221> 修饰的碱基
- [0473] <222> (30) .. (30)
- [0474] <223> LNA修饰的碱基
- [0475] <220>
- [0476] <221> 修饰的碱基
- [0477] <222> (33) .. (33)
- [0478] <223> LNA修饰的碱基
- [0479] <220>
- [0480] <221> 尚未归类的特征
- [0481] <222> (35) .. (35)
- [0482] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0483] <400> 25
- [0484] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
- [0485] <210> 26
- [0486] <211> 35
- [0487] <212> DNA
- [0488] <213> 人工序列
- [0489] <220>
- [0490] <223> 信号扩增DNA在位置30,33,34处具有锁核酸
- [0491] <220>
- [0492] <221> 修饰的碱基
- [0493] <222> (30) .. (30)
- [0494] <223> LNA修饰的碱基
- [0495] <220>
- [0496] <221> 修饰的碱基
- [0497] <222> (33) .. (33)
- [0498] <223> LNA修饰的碱基
- [0499] <220>
- [0500] <221> 修饰的碱基
- [0501] <222> (34) .. (34)
- [0502] <223> LNA修饰的碱基
- [0503] <220>
- [0504] <221> 尚未归类的特征
- [0505] <222> (35) .. (35)
- [0506] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶

- [0507] <400> 26  
[0508] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0509] <210> 27  
[0510] <211> 35  
[0511] <212> DNA  
[0512] <213> 人工序列  
[0513] <220>  
[0514] <223> 信号扩增DNA在位置26,30,33,34处具有锁核酸  
[0515] <220>  
[0516] <221> 修饰的碱基  
[0517] <222> (26) .. (26)  
[0518] <223> LNA修饰的碱基  
[0519] <220>  
[0520] <221> 修饰的碱基  
[0521] <222> (30) .. (30)  
[0522] <223> LNA修饰的碱基  
[0523] <220>  
[0524] <221> 修饰的碱基  
[0525] <222> (33) .. (33)  
[0526] <223> LNA修饰的碱基  
[0527] <220>  
[0528] <221> 修饰的碱基  
[0529] <222> (34) .. (34)  
[0530] <223> LNA修饰的碱基  
[0531] <220>  
[0532] <221> 尚未归类的特征  
[0533] <222> (35) .. (35)  
[0534] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0535] <400> 27  
[0536] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0537] <210> 28  
[0538] <211> 35  
[0539] <212> DNA  
[0540] <213> 人工序列  
[0541] <220>  
[0542] <223> 信号扩增DNA在位置28,35处具有锁核酸  
[0543] <220>  
[0544] <221> 修饰的碱基  
[0545] <222> (28) .. (28)

- [0546] <223> LNA修饰的碱基  
[0547] <220>  
[0548] <221> 修饰的碱基  
[0549] <222> (35) .. (35)  
[0550] <223> LNA修饰的碱基  
[0551] <220>  
[0552] <221> 尚未归类的特征  
[0553] <222> (35) .. (35)  
[0554] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0555] <400> 28  
[0556] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0557] <210> 29  
[0558] <211> 35  
[0559] <212> DNA  
[0560] <213> 人工序列  
[0561] <220>  
[0562] <223> 信号扩增DNA在位置28,34处具有锁核酸  
[0563] <220>  
[0564] <221> 修饰的碱基  
[0565] <222> (28) .. (28)  
[0566] <223> LNA修饰的碱基  
[0567] <220>  
[0568] <221> 修饰的碱基  
[0569] <222> (34) .. (34)  
[0570] <223> LNA修饰的碱基  
[0571] <220>  
[0572] <221> 尚未归类的特征  
[0573] <222> (35) .. (35)  
[0574] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0575] <400> 29  
[0576] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0577] <210> 30  
[0578] <211> 35  
[0579] <212> DNA  
[0580] <213> 人工序列  
[0581] <220>  
[0582] <223> 信号扩增DNA在位置28,33处具有锁核酸  
[0583] <220>  
[0584] <221> 修饰的碱基

- [0585] <222> (28) .. (28)  
[0586] <223> LNA修饰的碱基  
[0587] <220>  
[0588] <221> 修饰的碱基  
[0589] <222> (33) .. (33)  
[0590] <223> LNA修饰的碱基  
[0591] <220>  
[0592] <221> 尚未归类的特征  
[0593] <222> (35) .. (35)  
[0594] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0595] <400> 30  
[0596] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0597] <210> 31  
[0598] <211> 35  
[0599] <212> DNA  
[0600] <213> 人工序列  
[0601] <220>  
[0602] <223> 信号扩增DNA在位置29,34处具有锁核酸  
[0603] <220>  
[0604] <221> 修饰的碱基  
[0605] <222> (29) .. (29)  
[0606] <223> LNA修饰的碱基  
[0607] <220>  
[0608] <221> 修饰的碱基  
[0609] <222> (34) .. (34)  
[0610] <223> LNA修饰的碱基  
[0611] <220>  
[0612] <221> 尚未归类的特征  
[0613] <222> (35) .. (35)  
[0614] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0615] <400> 31  
[0616] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35  
[0617] <210> 32  
[0618] <211> 44  
[0619] <212> DNA  
[0620] <213> 人工序列  
[0621] <220>  
[0622] <223> 序列转换DNA在位置30,38处具有锁核酸  
[0623] <220>



- [0624] <221> 修饰的碱基
- [0625] <222> (30) .. (30)
- [0626] <223> LNA修饰的碱基
- [0627] <220>
- [0628] <221> 修饰的碱基
- [0629] <222> (38) .. (38)
- [0630] <223> LNA修饰的碱基
- [0631] <220>
- [0632] <221> 尚未归类的特征
- [0633] <222> (44) .. (44)
- [0634] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶
- [0635] <400> 32
- [0636] agccctgtac aatgccctca gcctgttcct gctgaactga gccca 44
- [0637] <210> 33
- [0638] <211> 22
- [0639] <212> DNA
- [0640] <213> 人工序列
- [0641] <220>
- [0642] <223> 与人hsa-miR-24相同的DNA序列
- [0643] <400> 33
- [0644] tggctcagtt cagcaggaac ag 22
- [0645] <210> 34
- [0646] <211> 19
- [0647] <212> DNA
- [0648] <213> 人工序列
- [0649] <220>
- [0650] <223> 分子信标探针,具有在5'端的6-羧基荧光素和3'端的4-(4'-二甲基氨基苯偶氮)苯甲酸
- [0651] <220>
- [0652] <221> 尚未归类的特征
- [0653] <222> (1) .. (1)
- [0654] <223> 5'端FAM修饰
- [0655] <220>
- [0656] <221> 尚未归类的特征
- [0657] <222> (19) .. (19)
- [0658] <223> 3'端DABCYL修饰
- [0659] <400> 34
- [0660] agccctgtac aatgcggct 19
- [0661] <210> 35

- 
- [0662] <211> 35  
[0663] <212> DNA  
[0664] <213> 人工序列  
[0665] <220>  
[0666] <223> 信号扩增DNA在位置26,33处具有锁核酸  
[0667] <220>  
[0668] <221> 修饰的碱基  
[0669] <222> (26) .. (26)  
[0670] <223> LNA修饰的碱基  
[0671] <220>  
[0672] <221> 修饰的碱基  
[0673] <222> (33) .. (33)  
[0674] <223> LNA修饰的碱基  
[0675] <220>  
[0676] <221> 尚未归类的特征  
[0677] <222> (35) .. (35)  
[0678] <223> 3'端修饰:两个倒置的胸腺嘧啶  
[0679] <400> 35  
[0680] agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35

## 序列转换DNA (SC DNA)

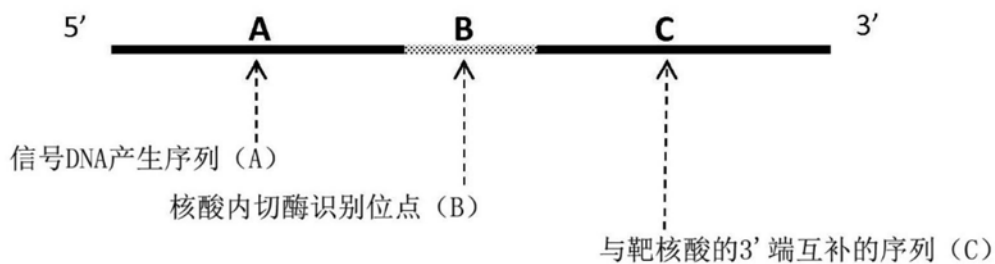


图1A

## 信号扩增DNA (SA DNA)

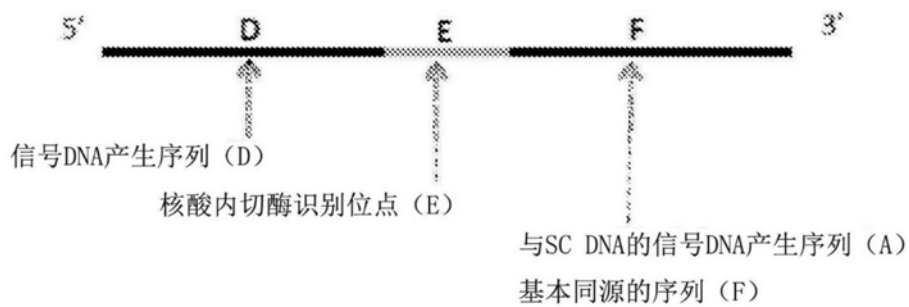


图1B

## 靶DNA与SC DNA的结合以及信号DNA (S) 的产生

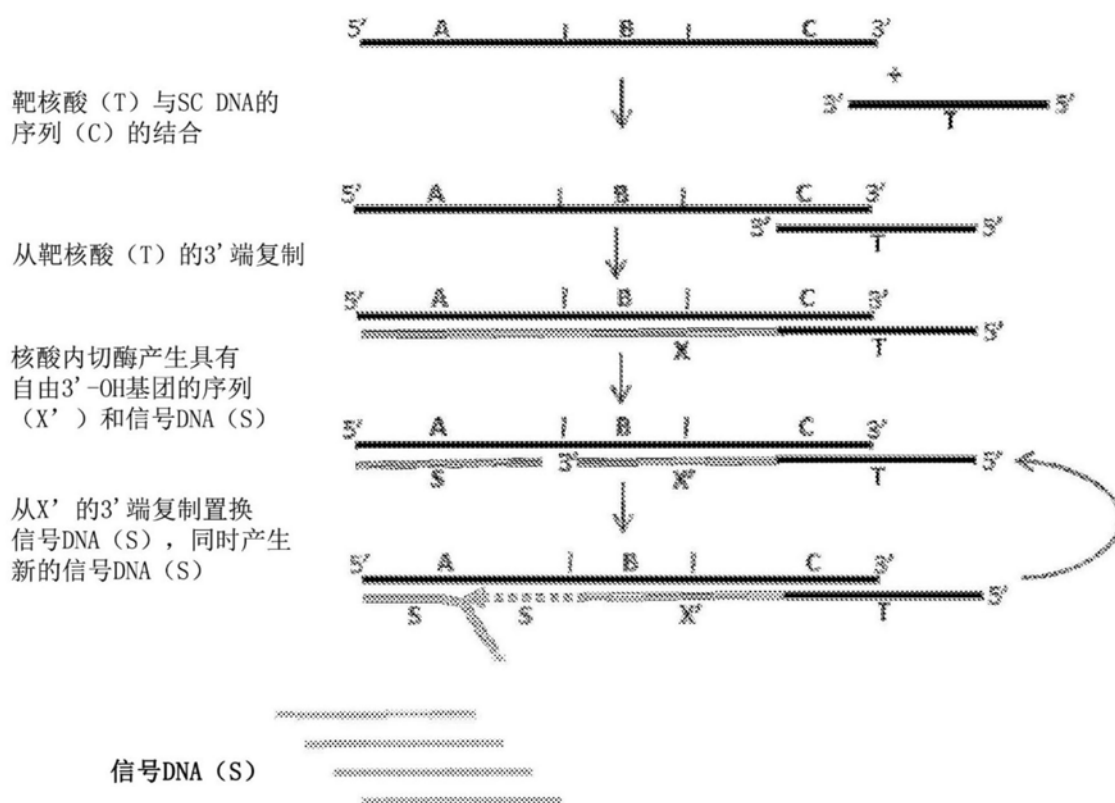


图2A

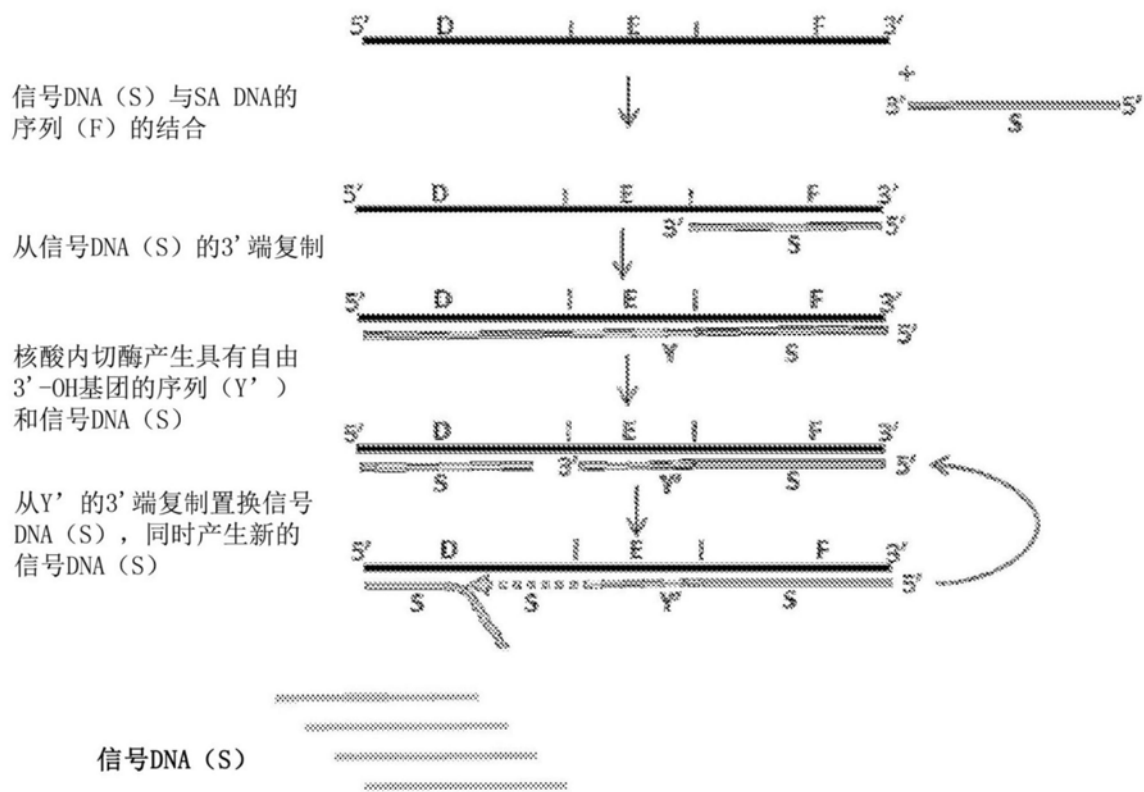


图2B

## SA DNA的DINAMelt分析

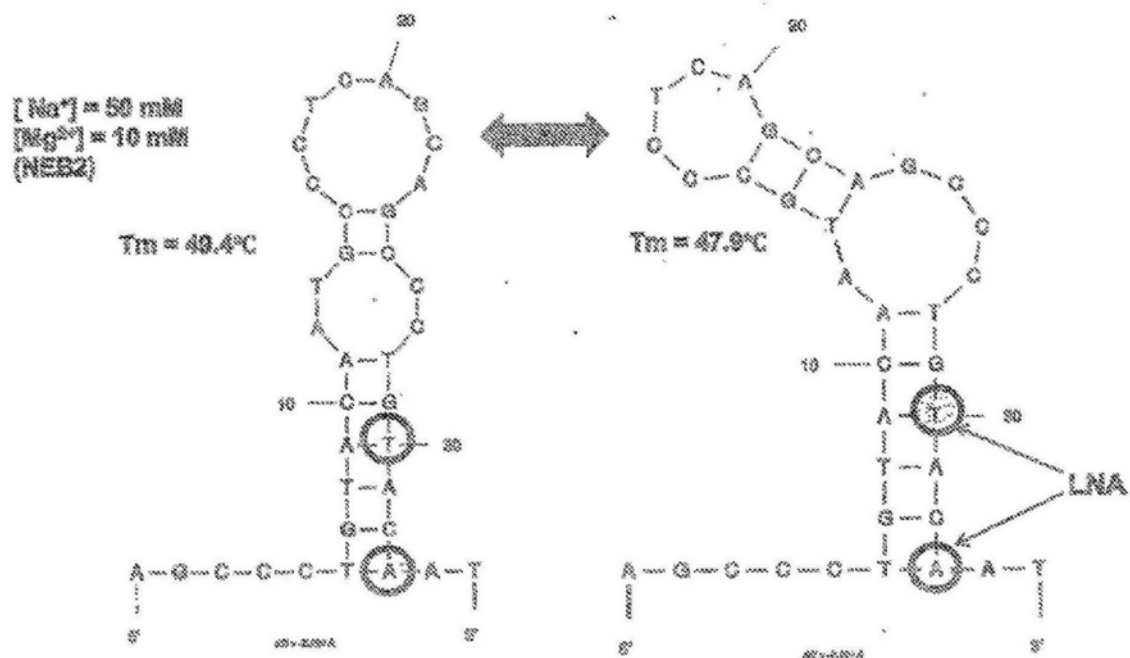


图3