



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103789311 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201310751941. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 10. 06

C12N 15/113 (2010. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

60/724, 567 2005. 10. 07 US

60/726, 291 2005. 10. 13 US

(62) 分案原申请数据

200680045926. 6 2006. 10. 06

(71) 申请人 强生研究有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 伊丽莎·莫卡尼

唐纳德·约翰·伯基特

艾莉森·威尔彦·托德

崔姆·比奇·多恩

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书2页 说明书98页

序列表29页 附图25页

(54) 发明名称

多组分核酸酶及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及多组分核酸酶 (MNAzyme) 及其使用方法。MNAzyme 包含两种或更多种寡核苷酸组分, 所述组分在一种或多种 MNAzyme 组装易化子分子的存在下自组装形成催化活性结构。本发明提供制备 MNAzyme 的组合物以及 MNAzyme 集。本发明还提供使用 MNAzyme 检测、鉴定和 / 或定量一种或多种靶的方法。所述方法能够在以溶液为基础的分析或将一种或多种反应组分附着到载体结构上的分析中实践。该方法允许使 MNAzyme 检测复合以便在单一反应中检测多种靶。还提供制备所述组合物以及实践在此提供的方法的试剂盒。

1. 产生多组分核酸酶 (MNAzyme) 并测定 MNAzyme 是否具有催化活性的方法, 所述方法包括:

选择分裂核酸酶催化核核苷酸序列的点, 以在该点的相对侧上形成第一和第二部分催化核部分;

在允许 MNAzyme 自组装和 MNAzyme 潜在催化活性的条件下, 接触包括位于底物臂部分和感应臂部分之间的所述第一部分催化核部分的第一组分寡核苷酸, 包括位于底物臂部分和感应臂部分之间的所述第二部分催化核部分的第二组分寡核苷酸, MNAzyme 组装易化子, 以及潜在的能够由 MNAzyme 催化修饰的第一底物,

其中所述组装易化子与所述第一和第二组分寡核苷酸的所述感应臂部分杂交时, 所述第一组分寡核苷酸和所述第二组分寡核苷酸自组装形成 MNAzyme, 由此维持所述第一和第二寡核苷酸组分的邻近使得它们各自的部分催化核部分缔合形成所述 MNAzyme 的所述催化核, 并且允许所述第一和第二组分寡核苷酸的底物臂部分各自与所述底物的通过所述催化核易化潜在修饰的底物杂交; 以及

测定 MNAzyme 是否催化修饰底物,

其中底物的催化修饰指示 MNAzyme 是催化活性的, 底物缺乏催化修饰指示 MNAzyme 无催化活性。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述选择步骤选择多个点, 所述接触步骤进行多个第一组分寡核苷酸和多个第二组分寡核苷酸, 由此多个 MNAzymes 自组装, 所述 MNAzymes 的分裂点不同, 以及所述测定步骤测定了多个 MNAzymes 中的哪一个催化修饰底物。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其还包括合成分别包括已测定活性的 MNAzyme 的催化部分核的第一和第二寡核苷酸组分。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其还包括形成包括合成的第一和第二寡核苷酸组分的试剂盒。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述核酸酶催化核核苷酸序列来自 DNAzyme 或核酶。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述核酸酶催化核核苷酸序列来自 8:17DNAzyme 或 10:23DNAzyme。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述核酸酶催化核核苷酸序列来自 8:17DNAzyme, 并且为 NTNNNAGCNNNWCCKN。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述点在核酸酶催化核核苷酸序列的核苷酸 5, 6, 7, 8, 9, 10 或 11 之后。

9. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述核酸酶催化核核苷酸序列来自 10:23DNAzyme, 并且为 NGGMTMGHNDNNMGGDN。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法, 其中所述点在核酸酶催化核核苷酸序列的核苷酸 5, 6, 7, 8, 9, 10 或 11 之后。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其还包括用不同的核苷酸取代核酸酶催化核核苷酸序列的一个或多个核苷酸。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述不同的核苷酸是核糖核苷酸。

13. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述不同的核苷酸是脱氧核糖核苷酸。

14. 如权利要求 11 所述的方法, 其包括用不同的核苷酸取代核酸酶催化核核苷酸序列

的两个或多个核苷酸。

15. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中所述组装易化子和 / 或底物包括任意一个或多个脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸以及多组分。

16. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中所述通过 MNAzyme 修饰底物是酶切底物。

17. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其还包括提供能够与所述感应臂的至少一个杂交的第二底物,其中所述通过 MNAzyme 修饰第一底物是与所述第二底物连接。

18. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中所述通过 MNAzyme 修饰底物选自:卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键,或其任意组合。

19. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其还包括测定对照 MNAzyme 的催化活性,用于比较所述 MNAzyme 的催化活性或其缺乏。

20. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其还包括提供能够结合适体部分的分子,其中

所述第一组分寡核苷酸和 / 或第二组分寡核苷酸包括所述适体;

当所述适体部分与所述第一组分寡核苷酸和 / 或第二组分寡核苷酸杂交时,所述 MNAzyme 不能或基本不能对底物发挥催化活性;

所述接触包括将分子与所述第一和第二组分寡核苷酸接触;以及

所述条件允许所述分子与所述适体部分结合。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述第一和第二组分寡核苷酸、MNAzyme 组装易化子和底物在与所述分子接触之前接触。

22. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述第一和 / 或第二组分寡核苷酸的一个或多个感应臂包括所述适体。

23. 如权利要求 20 至 22 中任一项所述的方法,其中所述分子和 / 或所述适体是核酸、肽、多肽、蛋白、或其衍生物或组合物。

24. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中所述底物包括可检测部分和猝灭基因部分,并且所述通过所述 MNAzyme 修饰所述第一底物将可检测部分和猝灭基因部分分离,以由此提供可检测作用。

多组分核酸酶及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求分别于 2005 年 10 月 13 日提交的第 60/726, 291 号和于 2005 年 10 月 7 日提交的第 60/724, 567 号美国临时专利申请的权益, 其各自整体在此通过引用并入本申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及多组分催化核酸及其使用方法。更具体地, 本发明涉及包含自组装的多组分核酸酶的组合物, 所述组合物的制备方法, 和所述组合物的使用方法, 包括通过检测所述多组分核酸酶对底物的催化修饰来检测、鉴定和 / 或定量诸如组装易化子和其它实体的靶。

[0004] 发明背景

[0005] 整个本说明书在括号中引用了各种出版物, 包括专利、公开的申请、技术文献和学术文献, 在本说明书的结尾处可以找到每一完整引用文献。这些引用的出版物每一篇都整体在此通过引用并入本申请。

[0006] 核酸分子能够采用可赋予酶促或催化活性的二级结构构型。体外演化技术已经促进了这种催化核酸的发现和开发, 这种催化核酸通常被称为“DNA 酶”或“核酶”, 能够催化大范围的反应, 包括核酸酶切 (Carmi et al., 1996; Raillard and Joyce, 1996; Breaker, 1997; Santoro and Joyce, 1998)、核酸的连接 (Cuenoud and Szostak, 1995)、卟啉金属化 (Li and Sen, 1996), 以及形成碳碳键 (Tarasow et al., 1997)、酯键 (Illangasekare et al., 1995) 或酰胺键 (Lohse and Szostak, 1996)。

[0007] 具体地, 已经表征出在通过 Watson Crick 碱基配对杂交之后特异性酶切不同核酸序列的 DNA 酶和核酶。DNA 酶能够酶切 RNA (Breaker and Joyce, 1994; Santoro and Joyce, 1997) 或 DNA (Carmi et al., 1996) 分子。催化 RNA 分子 (核酶) 也能够酶切 RNA (Haseloff and Gerlach, 1988) 和 DNA (Raillard and Joyce, 1996) 两种序列。大多数核酸酶的催化酶切速率取决于二价金属离子如 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} (Santoro and Joyce, 1998; Brown et al., 2003) 的存在和浓度。

[0008] 催化核酸如锤头核酶和 10:23 和 8:17DNA 酶具有多个结构结构域。它们具有保守的催化结构域 (催化核), 其侧邻有两个非保守的底物结合结构域 (“杂交臂”), 即与所述底物特异结合的序列区域。Haseloff 和 Gerlach 工程化了锤头核酶, 其以将两个保守结构域合在一起形成催化核的茎环结构而命名 (Haseloff and Gerlach, 1988)。所述“10:23”和“8:17”DNA 酶能够在特定的磷酸二酯键处酶切核酸底物 (Santoro and Joyce, 1997)。所述 10:23DNA 酶具有 15 个脱氧核苷酸的催化结构域, 所述结构域侧邻两个底物识别臂。所述 8:17DNA 酶具有 14 个脱氧核苷酸的催化结构域, 所述结构域也侧邻两个底物识别臂。

[0009] 催化核酸能够酶切具有满足最低要求的靶序列的核酸底物。所述底物序列必须与所述催化核酸的所述杂交臂基本上互补, 并且所述底物在酶切位点必须含有特定序列。酶切位点处特定的序列要求包括, 例如由所述 10:23DNA 酶酶切的嘌呤: 嘧啶核苷

酸序列 (Santoro and Joyce, 1997) 以及由所述锤头核酶切的序列尿苷 :X (Perriman et al., 1992), 其中 X 能够是 A、C、或 U, 但不能是 G。

[0010] 已经证实催化核酸在形成所述催化核的区域仅容许某些修饰 (Perreault et al., 1990; Perreault et al., 1991; Zaborowska et al., 2002; Cruz et al., 2004; Silverman, 2004)。负责 DNA 酶催化活性的序列的实例列于表 1 中。

[0011] 表 1: 某些活性 DNA 酶及其底物的代表性序列

| | DNA 酶类型 | DNA 酶序列 | 底物序列 |
|--------|---------|--|---|
| [0012] | 8:17 | (N) _x TNNNAGCNNNWCCK(N) _x | (N') _x (rN) _x G (N') _x |
| | 10:23 | (N) _x GGMTMGHNDNNNMGD(N) _x | (N') _x rR rY (N') _x |

[0013] N = A、C、T、G 或任何类似物; N = 与 N 互补的任何核苷酸; (N)_x 或 (N')_x = 任何数目的核苷酸; W = A 或 T; K = A、G 或 AA; rN = 任何核苷酸碱基; (rN)_x = 任何数目的核苷酸; rR = A 或 G; rY = C 或 U; M = A 或 C; H = A、C 或 T; D = G、A 或 T。

[0014] 已经尝试在某些条件下用某些脱氧核糖核苷酸取代已知的核酶中的某些核苷酸 (McCall et al., 1992)。由于 RNA 和 DNA 的构象差异, 已经完全转化成 DNA 的核酶没有活性 (Perreault et al., 1990)。这些研究表明仅通过用脱氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸不能够将 RNA 酶修饰成工作 DNA 酶。

[0015] 已有一些研究尝试开发应用于治疗用途的某些同二聚体或异二聚体核酶 (Kuwabara et al., 1999; Kuwabara et al., 2000; Oshima et al., 2003)。在那些研究中, 所述核酶的所述催化核只由核苷酸组成。此外, 尚未考虑 DNA 酶在二聚体或多聚体形式中起作用的能力, 也未提供关于如何根据二聚体 DNA 酶的可能结构从二聚体核酶推断出二聚体 DNA 酶和因而产生的活性的信息。

[0016] 催化核酸已经作为产生可检测信号的手段用于与体外扩增程序组合, 从而能够实时监测所扩增的核酸靶序列 (Todd et al., 2000) (US6, 140, 055; US6, 201, 113; W099/45146; PCT/IB99/00848; W099/50452)。酶原检测 (US6, 140, 055; US6, 201, 113; W099/45146; PCT/IB99/00848; W099/50452) 在本领域也称为 DzyNA 检测 (Todd et al., 2000), 导致靶和信号扩增共存。产生这种情形是因为所述催化 DNA 酶或核酶与靶序列共扩增产生扩增子, 所述扩增子具有能够多种折叠的真正酶的作用。这样, 每一催化核酸扩增子酶切多个报告底物。通过使用具有 5' 标签的引物将所述 DNA 酶和核酶引入所述扩增子, 所述引物是催化核酸的惰性、反义序列。在体外扩增期间复制这些序列时, 所述催化活性有义序列与靶序列共扩增。所述酶原 /DzyNA 方法非常灵活, 因为催化信号扩增能够与靶扩增方法联用, 所述靶扩增方法包括产生 DNA 酶扩增子的 PCR (聚合酶链反应)、单链置换扩增 (“SDA”)、或滚环扩增 (“RCA”) ; 和产生核酶扩增子的扩增方法依赖核酸序列的扩增 (“NASBA”)、自主序列复制 (“3SR”) 或转录介导的扩增 (“TMA”)。另外, 由于已经发现或离析出许多具有广泛催化活性的催化核酸分子, 所述酶原方法能够使用报告底物而非核酸, 其中检测的信息显示取决于核酸底物的化学修饰而非酶切。所述酶原 /DzyNA (Todd et al., 2000) 或 NASBA 方

法 / 核酶 (W000/58505) 方法可以被视为灵敏有用,但由于扩增引物序列而可能有噪音。

[0017] 已经使用 NASBA 制造 RNA 扩增子,所述扩增子含有靶核酸和所述锤头核酶的所述催化核的一个片段 (GAArA),作为标记到引物上并然后复制的反义序列被引入 (W000/58505)。将催化活性所需的另外的序列 (CUGANrGrA) 作为有义序列引入到第二分子上,所述第二分子用荧光基团和淬灭基团标记,并且也用作报告底物。某些核苷酸碱基 (上述的 rN) 必须作为核苷酸保留,否则将失去催化核酶活性。全部由 DNA 组成的两个分子被认为不能形成催化活性异二聚体酶 (W000/58505)。

[0018] 也已将催化核酸用于检测单核苷酸多态性 (“SNP”)。对所述催化核酸结合臂与所述底物之间 Watson Crick 碱基配对的严紧要求使得能够开发能区分十分相关的短序列的方法。已经证明 DNA 酶和核酶可以在差别小到单一碱基的两个序列之间进行区分。

[0019] DNA 酶具有这样一些性质,即所述性质在某些体外应用方面与核酶相比具有优势。DNA 固有地比 RNA 更稳定,因此更坚固、储存期更长。DNA 能够在室温下长期储存,无论在溶液中还是以冻干形式。在某些应用中 DNA 酶也比大多数蛋白质酶更为优选,因为例如,在扩增期间暴露于高温时它们不会发生不可逆变性。

[0020] 因此,本领域亟需检测、鉴定和定量核酸序列及其它实体的简单、快速并且划算的方法,所述方法优选提供基于 DNA 酶和 / 或核酶的催化核酸。

[0021] 发明概述

[0022] 根据本发明的第一方面,提供包含至少两种或更多种寡核苷酸组分的组合物,其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在 MNzyme 组装易化子的存在下自组装形成催化活性多组分核酸酶 (MNzyme),其中每一所述至少第一和所述第二寡核苷酸组分包含底物臂部分、催化核部分和感应臂部分;其中自组装时,所述第一和第二寡核苷酸组分的所述感应臂部分用作所述 MNzyme 的感应臂,所述第一和第二寡核苷酸组分的所述底物臂部分用作 MNzyme 的底物臂,并且所述第一和第二寡核苷酸组分的所述催化核部分用作所述 MNzyme 的催化核;

[0023] 并且其中所述 MNzyme 的所述感应臂与所述 MNzyme 组装易化子相互作用以便维持所述第一和第二寡核苷酸组分的邻近使得它们各自的催化核部分缔合形成所述 MNzyme 的所述催化核,所述催化核能够修饰至少一种底物,并且其中所述 MNzyme 的所述底物臂接合底物使得所述 MNzyme 的所述催化核能够修饰所述底物。

[0024] 所述寡核苷酸组分、组装易化子或底物的至少之一可以包含 DNA 或其类似物。

[0025] 所述组装易化子可以是待鉴定、检测或定量的靶。所述靶可以包含核酸。所述核酸可以选自 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、转运 RNA、信使 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA,其衍生物、扩增子或上述的任意组合。所述核糖体 RNA 可以是 16S 核糖体 RNA。

[0026] 核酸的来源可以选自合成、哺乳动物、人类、动物、植物、真菌、细菌、病毒、古细菌 (archael) 或上述的任意组合。

[0027] 可以扩增所述核酸。所述扩增可以包含下述的一种或多种:聚合酶链反应 (PCR)、单链置换扩增 (SDA)、环介导等温扩增 (LAMP)、滚环扩增 (RCA)、转录介导扩增 (TMA)、自主序列复制 (3SR)、依赖核酸序列扩增 (NASBA) 或逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)。

[0028] 所述组合物还可以包含至少第三寡核苷酸组分,所述第三核苷酸可稳定所述底物臂部分或感应臂部分的至少之一。

[0029] 所述组装易化子、所述寡核苷酸组分或底物的至少之一或上述的组合可以由多于一个的分子组成。

[0030] 所述第一核苷酸组分的所述催化核部分可以选自 SEQ ID NO149-153、155-157、159 和 161,并且所述第二寡核苷酸组分的所述催化核部分可以选自 SEQ ID NO166-170 和 172。

[0031] 所述组合物还可以包含所述 MNAzyme 的所述自组装的至少一种抑制因子。

[0032] 所述寡核苷酸组分或组装易化子或底物或其组合还可以包含至少一种适体或其部分。所述适体或其部分可以由核酸、肽、多肽或蛋白的至少之一或其衍生物或其组合组成。

[0033] 所述组合物可以还包含所述 MNAzyme 的所述自组装的至少一种抑制因子。

[0034] 所述第一或所述第二寡核苷酸组分或所述组装易化子或所述底物的至少之一还可以包含能够形成发夹结构的至少一部分自互补序列。所述发夹结构可以抑制所述 MNAzyme 的所述自组装。自组装的所述抑制可以在适体与靶接触时被解除。所述适体或其部分可以与靶结合,所述靶选自核酸、蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合。

[0035] 所述底物可以包含核酸或蛋白。所述核酸可以包含标记核酸、RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体中的至少之一或上述的任意组合。所述蛋白可以包含抗体、多肽、糖蛋白、脂蛋白中的至少之一或上述的任意组合。所述底物还可以包含纳米颗粒或微粒中的至少之一或上述的组合。所述底物可以附着到不溶性载体(support)上或在溶液中游离。所述底物可以包含可检测部分和淬灭基团部分,其中当所述 MNAzyme 修饰所述底物时,所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。

[0036] 所述底物臂可以通过互补碱基配对而接合所述底物。

[0037] 所述 MNAzyme 对所述底物的所述修饰可以提供可检测的作用。所述底物的修饰选自酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键,或上述的任意组合。所述可检测作用的检测方法可以通过荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,NMR(核磁共振),电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,UV(紫外)、可见光或红外光谱,酶促方法,或上述的任意组合。可以测量所述可检测作用,其中所述测量的大小提示所述靶的量。

[0038] 所述寡核苷酸组分、所述组装易化子或所述底物的至少之一可以选自 DNA、RNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体或上述的组合。所述组装易化子和所述底物可以包含与至少部分所述第一或第二寡核苷酸组分全部或部分互补的核酸。所述寡核苷酸组分、所述组装易化子或所述底物的至少之一可以包含核苷酸取代或添加中的至少一种,所述核苷酸选自 4-乙酰胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、2'-O-甲基胞苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫基代尿苷、二氢尿苷、2'-O-甲基假尿苷、 β ,D-半乳糖基 Q 核苷、2'-O-甲基鸟苷、肌苷、N6-异戊烯基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基假尿苷、1-甲基鸟苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、3-甲基胞苷、5-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、

5- 甲基氨基甲基尿苷、5- 甲氧基氨基甲基 -2- 硫代尿苷、 β , D- 甘露糖基甲基尿苷、5- 甲氧基羰基甲基尿苷、5- 甲氧基尿苷、2- 硫代甲基 -N6- 异戊烯基腺苷、N-((9- β - 呋喃核糖基 -2- 硫代甲基嘌呤 -6- 基) 氨基甲酰) 苏氨酸、N-((9- β - 呋喃核糖基嘌呤 -6- 基) N- 甲基 - 氨基甲酰) 苏氨酸、尿苷 -5- 氧基乙酸甲基酯、尿苷 -5- 氧基乙酸 (v)、wybutoxosine、假尿苷、Q 核苷、2- 硫代胞苷、5- 甲基 -2- 硫代尿苷、2- 硫代尿苷、4- 硫代尿苷、5- 甲基尿苷、N-((9- β -D- 呋喃核糖基嘌呤 -6- 基) 氨基甲酰) 苏氨酸、2'-O- 甲基 -5- 甲基尿苷、2'-O- 甲基尿苷、wybutosine、3-(3- 氨基 -3- 羧基丙基) 尿苷、 β D- 阿拉伯糖基尿苷、 β D- 阿拉伯糖基胸苷。

[0039] 所述组合物还可以包含在至少一种另外的组装易化子的存在下自组装形成至少一种另外的催化活性 MNzyme 的至少第三寡核苷酸组分和第四寡核苷酸组分, 其中每一所述至少第三和第四寡核苷酸组分包含底物臂部分、催化核部分和感应臂部分;

[0040] 其中当至少第三寡核苷酸组分和第四寡核苷酸组分自组装时, 所述至少第三和所述至少第四寡核苷酸组分的所述感应臂部分形成所述至少一种另外的催化活性 MNzyme 的感应臂, 所述至少第三和所述至少第四寡核苷酸组分的所述底物臂部分形成所述至少一种另外的催化活性 MNzyme 的底物臂, 并且所述至少第三和所述至少第四寡核苷酸组分的所述催化核部分形成所述至少一种另外的催化活性 MNzyme 的催化核;

[0041] 并且其中所述至少一种另外的 MNzyme 的所述感应臂与所述至少一种另外的组装易化子相互作用以便维持所述至少第三和所述至少第四寡核苷酸组分的邻近使得它们各自的催化核部分缔合形成所述至少一种另外的 MNzyme 的所述催化核, 所述催化核能够作用于至少一种另外的底物, 并且其中所述至少一种另外的 MNzyme 的所述底物臂接合至少一种另外的底物使得所述至少一种另外的 MNzyme 的所述催化核能够作用于所述至少一种另外的底物。

[0042] 每一所述另外的底物可以相同、不同或是其组合。

[0043] 根据本发明的第二方面, 提供了检测至少一种组装易化子存在的方法, 其包括:

[0044] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分, 其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在组装易化子的存在下自组装形成至少一种催化活性多组分核酸酶 (MNzyme);

[0045] (b) 在允许下述情况的条件下, 使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述组装易化子的样品接触:

[0046] (1) 所述至少一种催化活性 MNzyme 的所述自组装, 和

[0047] (2) 所述 MNzyme 的所述催化活性; 和

[0048] (c) 确定所述至少一种 MNzyme 的所述催化活性的存在, 其中所述催化活性的存在提示所述至少一种组装易化子的存在。

[0049] 所述寡核苷酸组分或组装易化子的至少之一可以由 DNA 或其类似物组成。

[0050] 所述组装易化子可以是待鉴定、检测或定量的靶。所述靶可以包含核酸。所述核酸可以选自 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、转运 RNA、信使 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA, 其衍生物、扩增子或上述的任意组合。所述核糖体 RNA 可以是 16S 核糖体 RNA。

[0051] 所述核酸的来源可以选自合成、哺乳动物、人类、动物、植物、真菌、细菌、病毒、古

细菌或上述的任意组合。

[0052] 该方法还可以包含扩增所述组装易化子的步骤。所述扩增步骤可以包含下述的一种或多种：聚合酶链反应 (PCR)、单链置换扩增 (SDA)、环介导等温扩增 (LAMP)、滚环扩增 (RCA)、转录介导扩增 (TMA)、自主序列复制 (3SR)、依赖核酸序列扩增 (NASBA) 或逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)。

[0053] 所述组装易化子、所述寡核苷酸组分或底物的至少之一或上述的组合可以由多于一个的分子组成。

[0054] 该方法还可以包括在所述扩增期间或之后确定所述催化活性的存在。

[0055] 所述 MNzyme 的所述自组装可以需要所述组装易化子与所述第一和第二寡核苷酸组分之一接触或与两者都接触。

[0056] 所述方法还可以包含与所述第一和第二寡核苷酸组分之一或两者的至少一部分接触以自组装 MNzyme 的至少第三寡核苷酸组分。所述第三寡核苷酸组分可以由多于两个的分子组成。

[0057] 根据本发明的第三方面,提供检测至少一种组装易化子的存在的方法,其包括:

[0058] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在至少第一组装易化子的存在下自组装形成至少第一催化活性多组分核酸酶 (MNzyme);

[0059] (b) 提供至少第一底物,所述第一底物能够被所述第一 MNzyme 修饰,其中所述 MNzyme 对所述底物的所述修饰提供可检测作用;

[0060] (c) 在允许下述情况的条件下,使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述至少第一组装易化子的样品接触:

[0061] (1) 所述至少第一 MNzyme 的所述自组装,和

[0062] (2) 所述至少第一 MNzyme 的所述催化活性;和

[0063] (d) 检测所述可检测作用。

[0064] 所述寡核苷酸组分、组装易化子或底物的至少之一可以由 DNA 或其类似物组成。

[0065] 所述组装易化子可以是待鉴定、检测或定量的靶。所述靶可以包括核酸。所述核酸可以选自 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、转运 RNA、信使 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA,其衍生物、扩增子,或上述的任意组合。核糖体 RNA 可以是 16S 核糖体 RNA。

[0066] 核酸的来源可以选自合成、哺乳动物、人类、动物、植物、真菌、细菌、病毒、古细菌或上述的任意组合。

[0067] 该方法还可以包括扩增核酸的步骤。扩增步骤可以包括下述的一种或多种:聚合酶链反应 (PCR)、单链置换扩增 (SDA)、环介导等温扩增 (LAMP)、滚环扩增 (RCA)、转录介导扩增 (TMA)、自主序列复制 (3SR)、依赖核酸序列扩增 (NASBA) 或逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)。

[0068] 所述组装易化子或所述第一或所述第二寡核苷酸组分或底物的至少之一或上述的组合中可以由多于一个的分子组成。

[0069] 该方法还可以包括在所述扩增期间或之后检测所述可检测作用。所述可检测作用

可以提示所述组装易化子的存在。所述可检测作用可以定量或定性地测量。

[0070] 所述底物可以是核酸或蛋白。所述核酸可以包括标记核酸、RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体中的至少之一或上述的任意组合。所述蛋白可以包括抗体、多肽、糖蛋白、脂蛋白中的至少之一或上述的任意组合。所述底物还可以包括纳米颗粒或微粒中的至少之一或上述的组合。所述底物可以附着到不溶性载体上或在溶液中游离。

[0071] 所述底物可以包括核酸并且所述底物臂可以通过互补碱基对接合所述底物。

[0072] 所述底物可以包括可检测部分和淬灭基团部分,其中 MNzyme 修饰底物时,所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。所述可检测作用可以通过如下方法检测:荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,核磁共振,电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,紫外、可见光或红外光谱,酶促方法或上述的任意组合。

[0073] 该方法还可以包括通过使用可检测作用扩增级联扩增可检测作用。可检测作用扩增级联可以包括一个或多个核酶/连接酶级联、循环核酸酶级联、蛋白质酶级联或附着到载体上的一种或多种酶,或上述的任意组合。

[0074] 所述底物的修饰可以选自酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键。

[0075] 该方法还可以包括提供至少第三和第四寡核苷酸组分,所述至少第三和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的组装易化子的存在下能够自组装形成至少一种另外的催化活性 MNzyme,和

[0076] 其中样品中存在至少一种另外的底物,所述另外的底物能由所述另外的 MNzyme 修饰,其中所述修饰提供所述另外的可检测作用。

[0077] 所述至少一种另外的可检测作用可以独立地检测到。

[0078] 各另外的底物中的至少之一可以附着到不溶性载体上使得在所述另外的 MNzyme 修饰所述另外的底物时,所述另外的底物的可检测部分和淬灭基团部分中仅有一者仍附着在所述载体上。

[0079] 一种另外的底物可以附着到至少一种不溶性载体上使得在其各自的 MNzyme 修饰该底物时产生可检测作用。

[0080] 根据本发明的第四方面,提供检测至少一种靶存在的方法,其包括:

[0081] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其中至少第一寡核苷酸组分和至少第二寡核苷酸组分在所述靶的存在下能够自组装形成催化活性多组分核酸酶 (MNzyme);并且其中所述第一和所述第二寡核苷酸组分中的至少之一还包含至少一种适体的部分;

[0082] (b) 在允许下述情况的条件下,使所述寡核苷酸组分与推定含有所述至少一种靶的样品接触:

[0083] (1) 所述靶结合所述适体的部分和

[0084] (2) 所述 MNzyme 的催化活性;和

[0085] (c) 确定所述 MNzyme 的所述催化活性的存在,其中所述催化活性的存在提示所述靶的存在。

[0086] 所述寡核苷酸中的至少之一可以附着到固体载体上。

[0087] 所述寡核苷酸中的至少之一可以由 DNA 或其类似物组成。

[0088] 所述靶可以被鉴定、检测或定量。

[0089] 该方法还可以包含提供至少第三和第四寡核苷酸组分,所述至少第三和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的靶的存在下能够自组装形成至少一种另外的催化活性 MNzyme。

[0090] 并且其中所述第三或第四寡核苷酸组分中的至少之一包含与所述至少一种另外的靶结合的至少一种另外的适体的部分。

[0091] 根据本发明的第五方面,提供检测至少一种靶存在的方法,其包括:

[0092] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在至少一种组装易化子和所述至少一种靶的存在下能够自组装形成至少一种催化活性多组分核酸酶 (MNzyme);并且其中所述第一和所述第二寡核苷酸组分中的至少之一或所述至少一种组装易化子还包含至少一种适体或其部分,且其中所述靶能够与所述至少一种适体或其部分结合;

[0093] (b) 提供所述 MNzyme 的所述自组装的至少一种抑制因子;

[0094] (c) 在允许下述情况的条件下,使所述寡核苷酸组分、组装易化子和所述抑制因子与推定含有所述至少一种靶的样品接触:

[0095] (1) 所述靶结合所述适体或其部分,和

[0096] (2) 所述至少一种 MNzyme 的催化活性;和

[0097] (3) 解除所述催化活性 MNzyme 的所述自组装的所述抑制;和

[0098] (d) 确定所述 MNzyme 的所述催化活性的存在,其中所述催化活性的存在提示所述靶的存在。

[0099] 所述至少一种靶可以选自蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒、核酸或上述的任何衍生物、部分或组合。

[0100] 所述寡核苷酸组分、组装易化子或抑制因子的至少之一可以附着到不溶性载体载体上。

[0101] 所述寡核苷酸组分、组装易化子、适体或适体的部分的至少之一还可以包含所述抑制因子。

[0102] 所述第一或所述第二寡核苷酸组分或组装易化子的至少之一还可以包含能够形成发夹结构的部分自互补序列。所述发夹结构可以抑制所述催化活性 MNzyme 的自组装。

[0103] 所述适体或其部分可以由核酸、肽、多肽或蛋白中的至少之一或其衍生物或组合组成。

[0104] 所述催化活性 MNzyme 的自组装的所述抑制可以在所述适体或适体的部分与所述靶接触时被解除。

[0105] 所述抑制因子能够与所述适体或其部分中的至少之一结合。

[0106] 所述抑制因子可以选自 RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体或上述的组合。

[0107] 所述方法还可以包括提供能够由所述 MNzyme 修饰以提供可检测作用的底物。所述修饰可以选自酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键。在缺少所述组装易化子和所述靶时,所述底物不被所述第一或第二寡核苷酸组分单独修饰或不被所述第一和第二寡核苷酸组分两者修饰。

[0108] 所述底物可以包含核酸或蛋白。所述核酸包含标记核酸、RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体中的至少之一或上述的任意组合。所述蛋白可以包含抗体、多肽、糖蛋白、脂蛋白中的至少之一或上述的任意组合。

[0109] 所述底物还可以包含纳米颗粒或微粒中的至少之一或上述的组合。

[0110] 检测到所述可检测作用可以提示所述催化活性 MNzyme 的所述催化活性,并且其中所述催化活性提示所述靶。所述可检测作用可以定量或定性地测量。所述可检测作用可以通过如下方法检测:荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,核磁共振,电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,紫外、可见光或红外光谱,酶促方法或上述的任意组合。

[0111] 所述底物可以包含可检测部分和淬灭基团部分,其中当所述 MNzyme 修饰所述底物时,所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。

[0112] 根据本发明的第六方面,提供检测至少一种靶存在的方法,其包括:

[0113] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在至少第一组装易化子和所述至少第一靶的存在下能够自组装形成至少第一催化活性多组分核酸酶 (MNzyme);

[0114] (b) 提供至少第一底物,所述至少第一 MNzyme 能够修饰所述第一底物,其中所述 MNzyme 对所述底物的所述修饰提供可检测作用;

[0115] (c) 其中所述第一或所述第二寡核苷酸组分或所述至少第一组装易化子或所述至少第一底物的至少之一还包含适体,并且其中所述靶能够与至少部分所述适体结合,提供至少第一抑制因子,所述第一抑制因子在缺少所述靶时能够抑制所述催化活性 MNzyme 的所述自组装;

[0116] (d) 在允许下述情况的条件下,使所述寡核苷酸组分、所述组装易化子、所述底物和所述抑制因子与推定含有所述靶的样品接触:

[0117] (1) 所述靶结合所述适体,和

[0118] (2) 解除所述催化活性 MNzyme 的所述自组装的所述抑制

[0119] (3) 所述 MNzyme 的催化活性;和

[0120] (e) 确定所述可检测作用的存在,从而检测所述靶的存在。

[0121] 所述寡核苷酸组分或组装易化子的至少之一可以由 DNA 或其类似物组成。

[0122] 所述适体或其部分可以与靶结合,所述靶选自核酸、蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合。

[0123] 所述寡核苷酸组分、组装易化子、底物或抑制因子中的至少之一可以附着到不溶性载体上。

[0124] 所述寡核苷酸组分、组装易化子、适体或适体的部分还可以包含所述抑制因子。

[0125] 所述适体或其部分可以由核酸、肽、多肽或蛋白中的至少之一或其衍生物或组合组成。

[0126] 所述第一和所述第二寡核苷酸组分、组装易化子或底物的至少之一还可以包含能够形成发夹结构的部分自互补序列。所述发夹结构可以抑制所述催化活性 MNzyme 的自组装。所述催化活性 MNzyme 的自组装的所述抑制可以在所述适体或适体的部分与所述靶接

触时被解除。

[0127] 所述抑制因子能够与所述适体或其部分中的至少之一结合。所述抑制因子可以选自 RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体或上述的任意组合。

[0128] 所述底物可以包含核酸或蛋白。所述核酸可以包含标记核酸、RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体中的至少之一或上述的任意组合。所述蛋白可以包含抗体、多肽、糖蛋白、脂蛋白中的至少之一或上述的任意组合。

[0129] 所述底物还可以包含纳米颗粒或微粒中的至少之一或上述的组合。

[0130] 检测所述可检测作用可以检测所述靶的存在。所述可检测作用可以定量或定性地测量。所述可检测作用可以通过如下方法检测：荧光光谱，表面等离子体共振，质谱，核磁共振，电子自旋共振，荧光偏振光谱，圆二色谱，免疫测定，色谱法，辐射线测定，光度测定，闪烁扫描法，电子方法，紫外、可见光或红外光谱，酶促方法或上述的任意组合。

[0131] 所述底物可以包含可检测部分和淬灭基团部分，其中当所述 MNAzyme 修饰所述底物时，所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。所述修饰可以选自酶切、连接、卟啉金属化，形成碳碳键、酯键或酰胺键。

[0132] 所述方法还可以包含提供至少第三和第四寡核苷酸组分，其中所述至少第三和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的组装易化子和至少一种另外的靶的存在下能够自组装形成至少一种另外的催化活性 MNAzyme，和

[0133] 其中所述样品中存在至少一种另外的底物，所述另外的 MNAzyme 能够修饰所述另外的底物，其中所述修饰提供另外的可检测作用；

[0134] 并且其中所述第三或第四寡核苷酸组分或所述另外的组装易化子或所述另外的底物的至少之一还包含至少一另外的适体，所述适体与所述至少一种另外的靶结合；

[0135] 其中至少一种另外的抑制因子分子与部分所述另外的适体接触，从而在缺乏所述另外的靶时抑制所述另外的催化活性 MNAzyme 的所述自组装；和

[0136] 其中所述至少一种另外的组装易化子与至少部分所述另外的寡核苷酸组分接触。

[0137] 所述至少一种另外的可检测作用可以独立地可检测。

[0138] 每一所述另外的底物可以相同、不同或是其组合。

[0139] 每一另外的底物中的至少之一可以附着到不溶性载体上使得在所述另外的 MNAzyme 修饰所述另外的底物时，所述另外的底物的可检测部分和淬灭基团部分中仅有一者仍附着在所述载体上。

[0140] 根据本发明的第七方面，提供检测至少一种核酸的序列变异存在的方法，其包括：

[0141] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分，其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在核酸的序列变异的存在下自组装形成催化活性多组分核酸酶 (MNAzyme)；

[0142] (b) 提供至少一种底物，所述第一 MNAzyme 能够修饰所述底物，其中所述 MNAzyme 对所述底物的所述修饰提供可检测作用；

[0143] (c) 在允许下述情况的条件下，使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述序列变异的样品接触：

[0144] (1) 所述催化活性 MNAzyme 的所述自组装，和

[0145] (2) 所述 MNAzyme 的所述催化活性；和

[0146] (d) 确定所述可检测作用的存在,从而检测所述至少一种序列变体的存在。

[0147] 所述序列变异可以选自单核苷酸多态性、多核苷酸多态性、插入、缺失、复制、易位、移码序列变异、无义序列变异或上述的任意组合。所述序列变异可存在于DNA或RNA中。

[0148] 所述第一寡核苷酸组分和所述第二寡核苷酸组分任一者或两者可以由多于一个的分子组成。

[0149] 含有所述序列变异的样品可以选自亚硫酸氢盐修饰的甲基化或非甲基化DNA、亚硫酸氢盐修饰的甲基化或非甲基化RNA、亚硫酸氢盐修饰的甲基化或非甲基化DNA中的至少一种扩增子、亚硫酸氢盐修饰的甲基化或非甲基化RNA中的至少一种扩增子或上述的组合。

[0150] 所述多组分核酸酶的所述自组装可以需要所述第一和第二寡核苷酸组分的任一者或两者的至少一部分与包含所述序列变异的所述核酸接触。

[0151] 该方法还可以包括扩增含有所述序列变异的所述核酸的步骤。所述扩增步骤可以包括下述的一种或多种:聚合酶链反应(PCR)、单链置换扩增(SDA)、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、转录介导扩增(TMA)、自主序列复制(3SR)、依赖核酸序列扩增(NASBA)或逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。该方法还可以包括在所述扩增期间或之后确定所述核酸序列变异的存在。

[0152] 所述可检测作用可以通过如下方法检测:荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,核磁共振,电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,紫外、可见光或红外光谱,酶促方法或上述的任意组合。

[0153] 所述底物可以包含可检测部分和淬灭基团部分,其中当所述MNAzyme修饰所述底物时,所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。

[0154] 所述底物可以附着到不溶性载体上或在溶液中游离。

[0155] 所述修饰可以选自酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键。

[0156] 该方法还可以包括:

[0157] (a) 提供至少第三寡核苷酸组分和至少第四寡核苷酸组分,所述至少第三寡核苷酸组分和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的核酸的序列变异的存在下自组装形成至少一种另外的催化活性多组分核酸酶(MNAzyme);

[0158] (b) 在允许下述情况的条件下,使所述至少第三和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的底物的存在下与推定含有至少一种另外的核酸的序列变异的样品接触,所述至少一种另外的MNAzyme能够修饰所述至少一种另外的底物,其中所述至少一种另外的底物的所述修饰提供至少一种另外的可检测作用:

[0159] (1) 至少一种MNAzyme的所述自组装,和

[0160] (2) 至少一种MNAzyme的所述催化活性;和

[0161] (c) 检测所述至少一种另外的可检测作用,从而检测所述至少一种另外的序列变异的存在。

[0162] 所述至少一种另外的可检测作用可以独立地检测到。

[0163] 每一所述另外的底物可以相同、不同或是其组合。

[0164] 该方法还可以包括提供其上附着有所述底物的不溶性载体。

[0165] 每一另外的底物中的至少之一可以附着到不溶性载体上使得在所述另外的

MNAzyme 修饰所述另外的底物时,所述另外的底物的可检测部分和淬灭基团部分中仅一者仍附着在所述载体上。

[0166] 根据本发明的第八方面,提供检测核酸的序列变异存在的方法,其包括:

[0167] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其包含在核酸的存在下能够自组装形成至少第一催化活性多组分核酸酶(MNAzyme)的至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分;

[0168] (b) 在允许下述情况的条件下,在可由所述至少第一 MNAzyme 修饰的至少第一底物的存在下使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述核酸的样品接触,其中所述底物包含在所述至少第一 MNAzyme 修饰所述底物时能够提供至少第一可检测作用的可检测部分:

[0169] (1) 所述 MNAzyme 的所述自组装,和

[0170] (2) 所述 MNAzyme 的所述催化活性;和

[0171] (c) 其中没有所述催化活性提示所述核酸中存在序列变异。

[0172] 根据本发明的第九方面,提供检测至少一种甲基化核酸存在的方法,其包括:

[0173] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在甲基化核酸的存在下自组装形成至少一种催化活性多组分核酸酶(MNAzyme);

[0174] (b) 提供至少第一底物,所述第一 MNAzyme 能够修饰所述第一底物,其中所述 MNAzyme 对所述底物的所述修饰提供至少第一可检测作用;

[0175] (c) 在允许下述情况的条件下,使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述甲基化核酸的样品接触:

[0176] (1) 所述催化活性 MNAzyme 的所述自组装,和

[0177] (2) 所述 MNAzyme 的所述催化活性;和

[0178] (d) 确定所述至少一种可检测作用的存在,从而检测所述至少一种甲基化核酸的存在。

[0179] 所述条件还可以包括促进所述 MNAzyme 与所述甲基化核酸杂交但不与非甲基化核酸杂交的温度。

[0180] 该方法还可以包括通过使用可检测作用扩增级联扩增所述可检测作用。所述可检测作用扩增级联可以包括一个或多个核酶/连接酶级联、循环核酸酶级联、蛋白质酶级联或附着到载体上的一种或多种酶,或上述的任意组合。

[0181] 所述甲基化核酸的来源可以选自合成、哺乳动物、人类、动物酸、植物、真菌、细菌、病毒、古细菌或上述的任意组合。

[0182] 所述甲基化核酸可以选自甲基化 RNA 或甲基化 DNA。

[0183] 所述多组分核酸酶的所述自组装可以需要所述甲基化核酸与所述第一和第二寡核苷酸组分一者接触或与两者都接触。

[0184] 该方法还可以包括提供其上附着有所述底物或所述第一或第二寡核苷酸组分中的至少之一或上述的组合的不溶性载体。

[0185] 所述可检测作用可以通过如下方法检测:荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,核磁共振,电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,紫外、可见光或红外光谱,酶促方法或上述的任意组合。

[0186] 所述底物可以包含可检测部分和淬灭基团部分,其中当所述 MNAzyme 修饰所述底

物时,所述可检测部分提供的可检测作用增加或减少。

[0187] 所述修饰可以选自酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键。

[0188] 该方法还可以包括提供至少第三和第四寡核苷酸组分,其中所述至少第三和至少第四寡核苷酸组分在至少一种另外的甲基化核酸的存在下能够自组装形成至少一种另外的催化活性 MNzyme,和

[0189] 其中所述样品中存在至少一种另外的底物,所述另外的 MNzyme 能够修饰所述另外的底物,其中所述修饰提供所述另外的可检测作用。

[0190] 所述至少一种另外的可检测作用可以独立地检测到。

[0191] 每一所述另外的底物可以相同、不同或是其组合。

[0192] 所述另外的底物中的至少之一可以附着到不溶性载体上使得在所述另外的 MNzyme 修饰所述另外的底物时,所述另外的底物的另外的可检测部分和另外的淬灭基团部分中仅一者仍附着在所述载体上。

[0193] 根据本发明的第十方面,提供使用扩增级联检测至少一种组装易化子的方法,其包括:

[0194] (a) 提供两种或更多种寡核苷酸组分,其包括在至少第一组装易化子的存在下自组装形成至少第一催化活性多组分核酸酶 (MNzyme) 的至少第一寡核苷酸组分和至少第二寡核苷酸组分;

[0195] (b) 提供其上附着有至少第一底物的不溶性载体,所述 MNzyme 能够修饰所述第一底物,其中所述第一底物包含至少第三分子,所述第三分子包含在所述第一 MNzyme 修饰所述第一底物时被释放的至少第一催化活性酶;

[0196] (c) 在允许下述情况的条件下,在其上附着有所述第一底物的所述不溶性载体的存在下,使所述两种或更多种寡核苷酸组分与推定含有所述组装易化子的样品接触:

[0197] (1) 所述 MNzyme 的所述自组装,和

[0198] (2) 所述 MNzyme 的所述催化活性;和

[0199] (d) 提供其上附着有至少第二底物的不溶性载体,所述第二底物可由所述第一催化活性酶分解,其中所述第二底物包含含有至少可检测部分的至少第四分子,所述可检测部分在所述第一酶修饰所述第二底物时被释放;

[0200] (e) 其中所述第一催化活性酶修饰多个所述第二底物从而释放多个可检测部分;

[0201] (f) 其中所述可检测部分在所述第一催化活性酶修饰所述第二底物后能够检测到;

[0202] (g) 其中检测到所述可检测部分提示存在所述组装易化子。

[0203] 所述可检测部分还可以包含能够修饰所述第一底物从而释放另外的催化活性酶的另外的第二催化活性酶。所述第一或所述第二催化活性酶中的至少之一可以选自 MNzyme、DNA 酶、核酶、产生水解作用的酶 (hydrolytic enzyme)、限制性内切酶、外切酶、蛋白酶 (proteases)、蛋白酶类 (proteinases)、水解酶 (hydrolases)、溶细胞酶、肽酶、二肽酶、酯酶、半胱天冬酶 (caspases)、组织蛋白酶 (cathepsins)、脱巯基酶、酰胺酶、糖苷酶。

[0204] 所述组装易化子可以包含待鉴定、检测或定量的靶。所述靶可以选自核酸、蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒、核酸或上述的任何衍生物、部分或组合。

所述核酸可以选自 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、转运 RNA、信使 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA，其衍生物、其扩增子或上述的任意组合。

[0205] 根据本发明的第十一方面，提供使用 MNzyme 介导的信号扩增级联检测靶的方法，其包括：

[0206] (a) 提供在所述靶的存在下自组装形成第一催化活性多组分核酸酶 (MNzyme) 的第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分；

[0207] (b) 提供其上附着有第一和第二底物的不溶性载体，所述第一 MNzyme 能够修饰所述第一和第二底物，其中所述第一和第二底物各自包含能够形成第二催化活性 MNzyme 的至少第三和第四寡核苷酸组分，其中所述第三和第四寡核苷酸组分在所述第一 MNzyme 修饰所述第一和第二底物时被释放；

[0208] (c) 提供其上附着有第三和第四底物的所述不溶性载体，所述第二 MNzyme 能够修饰所述第三和第四底物，其中所述第三和第四底物各自包含能够形成第三催化活性 MNzyme 的至少第五和第六寡核苷酸组分，其中所述第五和所述第六寡核苷酸组分在所述第二 MNzyme 修饰所述第三和第四底物时被释放，和；

[0209] (d) 提供能够促进所述第二和所述第三 MNzyme 的所述组装的组装易化子，和；

[0210] (e) 提供能够被所述第二 MNzyme 修饰以提供可检测作用的第五底物；

[0211] (f) 在允许下述条件的条件下，在所述组装易化子的存在下，和在其上附着有所述第一、第二、第三和第四底物的所述不溶性载体的存在下，使所述第一和第二寡核苷酸组分与推定含有所述靶的样品接触：

[0212] (1) 所述第一、第二和第三 MNzyme 的自组装，和

[0213] (2) 所述第一、第二和第三 MNzyme 的催化活性；和

[0214] (g) 其中所述第三 MNzyme 修饰所述第一和第二底物从而进一步提供所述第二 MNzyme，其中所述第二 MNzyme 进一步修饰所述第三、第四和第五底物中的至少之一，从而进一步提供所述第三 MNzyme，从而进一步提供所述可检测作用，和；

[0215] (h) 其中检测到所述可检测作用提示存在所述靶。

[0216] 所述靶可以待鉴定、检测或定量。所述靶可以选自核酸、蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒、核酸或上述的任何衍生物、部分或组合。所述核酸可以选自 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、信使 RNA、转运 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA，其衍生物、其扩增子或上述的任意组合。

[0217] 所述第五底物可以与所述第一、第二、第三或第四底物中的任一者相同或不同。

[0218] 每一所述第一、第二、第三或第四底物可以存在于相同固体载体上或不同固体载体上或上述的任意组合。

[0219] 所述第一、第二、第三或第四底物中的至少之一的所述修饰还可以提供可检测作用。

[0220] 根据本发明的第十二方面，提供各自识别至少一组组装易化子并修饰底物的多种多组分核酸酶 (MNzyme) 的制备方法，所述方法包括：

[0221] (a) 提供待鉴定、检测或定量的多种组装易化子，

[0222] (b) 设计两种或更多种寡核苷酸组分，其中至少第一寡核苷酸组分和第二寡核苷酸组分在一种组装易化子的存在下自组装形成催化活性多组分核酸酶 (MNAzyme)，其中每一所述至少第一和第二寡核苷酸组分包含底物臂部分、催化核部分和感应臂部分，

[0223] 其中当自组装时，所述第一和第二寡核苷酸组分的所述感应臂部分形成所述 MNAzyme 的感应臂，所述第一和第二寡核苷酸组分的所述底物臂部分形成所述 MNAzyme 的底物臂，所述第一和第二寡核苷酸组分的所述催化核部分形成所述 MNAzyme 的催化核；

[0224] 并且其中所述 MNAzyme 的所述感应臂与组装易化子相互作用以便维持所述第一和第二寡核苷酸组分的邻近使得它们各自的催化核部分缔合形成所述 MNAzyme 的所述催化核，所述催化核能够作用于至少一底物，并且其中所述 MNAzyme 的所述底物臂接合底物使得所述 MNAzyme 的所述催化核能够修饰所述底物；

[0225] (c) 改变所述两种或更多种寡核苷酸组分使得所述第一和第二寡核苷酸组分的所述底物臂部分和所述催化核部分恒定不变，并且所述第一和第二寡核苷酸组分中的至少之一的所述感应臂部分适合于识别所述多种组装易化子中的另一种，和

[0226] (d) 对于所述多种组装易化子中的每一种重复所述改变步骤。

[0227] 根据本发明的第十三方面，提供检测多种靶的存在的试剂盒，其包含多种被设计用于组装多种 MNAzyme 的多种寡核苷酸组分和至少一种底物，每一所述 MNAzyme 对应于多种靶中的至少之一。

[0228] 根据本发明的第十四方面，提供组装多种 MNAzyme 的试剂盒，其包含多种组装易化子、被设计用于组装多种 MNAzyme 的多种寡核苷酸组分和至少一种底物，每一所述 MNAzyme 对应于所述多种组装易化子中的每一种。

[0229] 根据本发明的第十五方面，提供检测靶的试剂盒，其包含多种寡核苷酸组分和底物，所述寡核苷酸组分被设计用于组装对应于所述靶的 MNAzyme。

[0230] 附图简述

[0231] 现在将仅通过举例的方式参考附图描述本发明的优选实施方案，其中：

[0232] 图 1：MNAzyme 的设计：图示为 MNAzyme 的代表性设计的描述，其中部件酶 (partzyme) A 和 B 的底物臂部分 (A) 结合报告底物，所述报告底物上附着有荧光标记 (左) 和淬灭基团 (右)。催化核部分 (C) 位于底物臂部分 (A) 和感应臂部分 (B) 之间。当感应臂部分 (B) 结合靶时，所述报告底物在 MNAzyme 酶切位点酶切，从而使荧光增强。

[0233] 图 2：MNAzyme 介导的靶检测策略：图示为显示使用 MNAzyme 的靶检测方法的代表性应用流程图。MNAzyme 能够用于 (1) 直接检测；(2) 通过例如 PCR、SDA、LAMP、RCA、TMA、3SR 或 NASBA 检测在扩增期间或之后产生的扩增子；和 (3) 启动信号扩增级联。

[0234] 图 3：使用 MNAzyme 和锚定通用底物的靶检测方法：图示为代表性 MNAzyme 和使用 MNAzyme 的靶检测方法，所述 MNAzyme 酶切附着在载体上的底物。在该实施方案中，所述 MNAzyme 仅在组装易化子 (靶) 的存在下形成。当所述 MNAzyme 在荧光基团和淬灭基团之间酶切所附着的底物时，信号产生。如在此显示的那样，在荧光基团 F 和淬灭基团 Q 之间酶切时，导致荧光增加。通常，可以将该方法设计成使得一旦酶切发生时荧光基团 F 或淬灭基团 Q 中任一者仍附着在所述载体上。插图 (i)：仅有一种底物附着到所显示的所述载体上。插图 (ii)：可以在不同位置附着多种底物。每一种底物仅能由在特定 MNAzyme 组装易化子

分子的存在下形成的 MNzyme 酶切—在这里,靶 1 和 2 分别促进 MNzyme1 和 2 的自组装。因此,在该实施例中 MNzyme1 仅在靶 1 的存在下自组装且仅酶切底物 1。类似地,MNzyme2 仅在靶 2 的存在下自组装且仅酶切底物 2。所述信号可以通过定位表面上的所述底物来定位,从而能够特异性检测不同的组装易化子。

[0235] 图 4:靶检测的代表性方法:图示为用 MNzyme 检测靶分析物 (An) 的方法的实施例,所述靶分析物例如包括但不限于蛋白或小分子。该实施例显示通过 MNzyme 酶切底物产生信号,所述底物用荧光基团 (F) 和淬灭基团 (Q) 标记。通常的设计可以以其它形式使用,借此信号通过非酶切的修饰产生和 / 或其中读出信息显示不是荧光的,而是例如比色的、放射性的等。在该图中阐述了三个通常的策略。(i) 将结合靶分析物的适体与一部件酶 (partzyme) 连接 (适体-部件酶, apta-partzyme)。该分子有自互补性,而且在缺乏靶分析物时不能够促进活性 MNzyme 组装。还提供第二部件酶、底物和组装易化子。当特定靶分析物结合适体结构域时,所述适体-部件酶 (apta-partzyme) 中的所述互补碱基分开,使得所述适体-部件酶采取能够促进活性 MNzyme 组装的构象。所述活性 MNzyme 能够酶切所述底物并产生荧光。(ii) 将结合靶分析物的适体与组装易化子连接。该分子有自互补性,而且在缺乏靶分析物时不能够引导所述部件酶排列并组装活性 MNzyme。还提供两种部件酶和底物。当特定靶分析物结合所述适体结构域时,所述组装易化子中的所述互补碱基分开,使得所述组装易化子采取能够引导活性 MNzyme 的所述组装的构象。所述活性 MNzyme 能够酶切所述底物并产生荧光。(iii) 在底物的存在下温育各自含有部分适体的两种适体-部件酶。在缺乏靶分析物时,所述两种适体-部件酶不能够组装形成活性 MNzyme。当特定靶分析物存在并结合含有部分所述适体的两个所述结构域时,导致所述两种适体-部件酶十分接近并能够组装成活性 MNzyme。所述活性 MNzyme 能够酶切所述底物并产生荧光。

[0236] 图 5:PCR 扩增微小 RNA 并用 MNzyme 检测:图示为扩增并检测短序列如微小 RNA (miR) 的 MNzyme 策略的描述。该方法使用在 3' 末端结合所述 miR 并且具有不相关的延伸序列 (如虚线框所示) 的 3' 引物,所述延伸序列可以 ((i) 和 (ii) 部分,环引物,左) 或不可以 ((iii) 和 (iv) 部分,标记引物,右) 在 5' 末端形成茎环结构。在逆转录酶的存在下延伸所述 3' miR 引物 ((i) 和 (iii) 部分),然后用 5' 和 3' 引物通过 PCR 进行扩增,其中 miR 特异性序列在 3' 末端,不相关的延伸序列在 5' 末端 ((ii) 和 (iv) 部分)。所述扩增子可以通过与所述扩增子杂交的 MNzyme 检测,包括所述 5' 和 3' 引物之间的区域。所述 MNzyme 感应臂和所述靶核酸严紧的互补性要求使得能够区分十分相近的序列。F: 荧光基团;Q: 淬灭基团。

[0237] 图 6:与酶介导信号扩增联用的 MNzyme 检测:图示是引发信号扩增级联的 MNzyme 的描述。在该实施方案中 MNzyme 引发信号产生的下游级联,其中 (从左到右,上组) MNzyme 仅在靶的存在下形成并然后从载体上的附着位置释放酶。如下组所示,游离出来的酶然后酶切荧光底物分子。所述荧光底物很容易检测。F: 荧光基团;Q: 淬灭基团。

[0238] 图 7:用 MNzyme 和信号扩增检测分析物:MNzyme 能够引发用空间分开的 DNA 酶产生的级联。如连续标号的步骤所示,仅在靶的存在下发生的初始 MNzyme 酶切事件能够酶切固定的底物,从而释放第一附着的 DNA 酶 A (“A”) (步骤 1-3)。DNA 酶 A 一旦游离,然后酶切并释放第二附着的 DNA 酶 B (“B”) (用荧光基团标记) (步骤 4-6),所述 DNA 酶 B 反过来又酶切并释放另外的 DNA 酶 A (步骤 7-8),导致级联的启动。由于具有荧光基团的 DNA

酶 B 在继发级联中释放,指数信号扩增使得测量很容易进行。F: 荧光基团;Q: 淬灭基团。

[0239] 图 8:RPLPO 靶的 MNzyme 设计:插图 (i):MNzyme 设计 1(上组)和 2(下组)的代表性序列;插图 (ii):通过 MNzyme 设计 1(上组)和 2(下组)进行的报告底物的靶依赖酶切结果。N=A、G、C、T 或任何类似物;N' = 任何与 N 互补的核苷;(N 或 N')_x = 任何数目的核苷酸或类似物;K=A、G 或 AA;W=A 或 T;rN= 任何核糖核苷酸和 / 或任何数目的核糖核苷酸;*= 摆动碱基 (wobble base)。

[0240] 图 9:RPLPO 靶的 MNzyme 设计:插图 (i):MNzyme 设计 3 的代表性序列;插图 (ii):报告底物的靶依赖酶切结果。图示的对照反应包括无靶、杂交对照、两个脱靶对照和含有部件酶 A 或部件酶 B 寡核苷酸但不同时含有该两者的反应。N=A、G、C、T 或任何类似物;N' = 任何与 N 互补的核苷酸;(N 或 N')_x = 任何数目的核苷酸或类似物;K=A、G 或 AA;W=A 或 T;rN= 任何核糖核苷酸和 / 或任何数目的核糖核苷酸;*= 摇摆碱基 (wobble base)。

[0241] 图 10:RPLPO 靶的 MNzyme 设计:插图 (i):MNzyme 设计 4 的代表性序列;插图 (ii):设计 3 和 4 的靶依赖酶切的效率。显示了含有所述靶 RPLPO 寡核苷酸的结果,以及缺乏靶的对照的结果。N=A、G、C、T 或任何类似物;N' = 任何与 N 互补的核苷酸;(N 或 N')_x = 任何数目的核苷酸或类似物;K=A、G 或 AA;W=A 或 T;rN= 任何核糖核苷酸和 / 或任何数目的核糖核苷酸;*= 摇摆碱基 (wobble base)。

[0242] 图 11:MNzyme 区分十分相近序列的用途:插图 (i):图示与 hsa-miR-20 和相关的 miR 序列同源的、在图 11 和 12 中用作靶序列的 DNA 序列。D-20 和相关的 D-miR 之间的序列差异加有下划线。竖的黑体虚线将两个感应臂识别的寡核苷酸区域分开。插图 (ii):描述用于检测 miR-20 的设计 4 的 MNzyme 的代表性序列。插图 (iii):报告底物的 D-20MNzyme 靶依赖酶切结果。图示的对照反应:“脱靶”寡核苷酸 (D-17-5p、D-106a、D-106b、D-93),和“无靶”(dH₂O) 对照反应。

[0243] 图 12:MiR-20MNzyme 系统的 MgCl₂ 优化:使用用于 miR-20 检测的代表性设计 4MNzyme 系统获得的结果。报告底物的靶 (D-20) 依赖酶切。图示了分别含有 (i)5mM、(ii)25mM 或 (iii)100mM MgCl₂ 的反应的对照反应,所述对照反应含有“脱靶”序列 (D-17-5p、D-106a、D-106b、D-93) 或“无靶”(dH₂O)。

[0244] 图 13:RPLPO 靶的 MNzyme 设计:插图 (i):MNzyme 设计 5 和 6 的代表性序列。插图 (ii):使用 MNzyme 设计 5 和 6 及其“无靶”对照进行的报告底物的靶依赖酶切结果。N=A、G、C、T 或任何类似物;N' = 任何与 N 互补的核苷酸;(N 或 N')_x = 任何数目的核苷酸或类似物;R=A 或 G;Y=C 或 U;rN= 核苷酸碱基。

[0245] 图 14:PCR 扩增的 RPLPO 的检测:通过针对人类 RPLPO 基因的所述设计 4MNzyme 系统进行的报告底物和多种对照反应的靶依赖酶切结果。RPLPO MNzyme 反应含有如下之一:(i) 对照 RPLPO 寡核苷酸,(ii) 通过使用与所述 RPLPO 基因互补的引物扩增人类基因组 DNA(100ng) 制备的 RPLPO PCR 扩增子 (5 μ l),(iii) 缺少基因组 DNA 的“无靶”RPLPO PCR 反应或 (iv) 未扩增的人类基因组 DNA(500ng)。

[0246] 图 15:所扩增的短 (22mer) 序列的检测:插图 (i):通过针对人类 miR-20 序列的设计 4MNzyme 系统进行的报告底物的靶依赖酶切结果。MiR-20MNzyme 反应用如下之一进行:(i)10¹²(1E+12) 拷贝的对照 D-20 靶寡核苷酸 (未扩增的);(ii) 使用与所述 MiR-20 序列互补的引物扩增 2x10⁷(2E+7) 拷贝的所述 D-20 靶寡核苷酸,(iii) 缺少 D-20 靶寡核

苷酸的“无靶”PCR反应;(iv) 10^8 ($1E+8$) 拷贝的 D-20 靶寡核苷酸(未扩增的);和(v)“脱靶”对照 D-17-5p 靶(通过 PCR 扩增的 2×10^7 ($2E+7$) 拷贝)。插图(ii):比较 D-20 靶序列与脱靶序列 D-17-5p。D-17-5p 寡核苷酸与 D-20 靶序列相比在 PCR 引物结合区域内有一处错配,并在被所述 MNzyme 的感应臂识别(interrogate)的区域(位于所述引物之间)内有一处错配。

[0247] 图 16:所扩增的 miR-20 扩增子的检测:PCR 扩增后使用 MNzyme 进行的扩增子的端点检测实施例。用 PCR 扩增存在于来自人胸腺细胞的总 RNA 中的 mir-20 微小 RNA,并用 MNzyme 方法检测。图示了所扩增的样品和对照。

[0248] 图 17:通过 MNzyme 设计 6 进行 RPLPO 外显子 5 的定量实时 PCR 分析:使用 MNzyme 方法实时检测和定量的实施例,其中使用 MNzyme 检测所述 RPLPO 基因以监测 RPLPO 的外显子 5 的累积。插图(i):MNzyme 设计 6;插图(ii):指示所示的不同模板数的实时 PCR 的荧光信号;插图(iii):所扩增材料的标准曲线与定量。结果表明对于通过 PCR 扩增的人类基因组 DNA 的 MNzyme 检测来说,荧光的时间依赖性增加。 $R^2=0.995$;斜率 $=-3.698$ 。

[0249] 图 18:多种靶的代表性复合分析的图示:能够使用两种或更多种底物同时检测两种或更多种靶,每一种所述底物对一种 MNzyme 具有特异性。优选不同的荧光基团标记底物。在该实施例中,靶 1 能够通过监测 FAM 荧光的增加进行检测,靶 2 能够通过监测 JOE 荧光的增加进行检测。Q:淬灭基团;FAM、JOE:荧光基团。

[0250] 图 18:RPLPO 和 D-20 序列的单一和复合检测:使用 JOE- 标记的底物监测 RPLPO 的检测,使用 FAM- 标记的底物监测 D-20 靶序列的检测。插图(i):MNzyme 设计 6 包含仅仅一种 MNzyme 系统的部件酶,要么 RPLPO(上组)要么 D-20(下组)。插图(ii):MNzyme 设计 6 包含针对 RPLPO 和 D-20 两者的 MNzyme。

[0251] 图 20:使用适体进行的靶的 MNzyme 检测:描述了靶检测的一代表性策略。在该策略中,适体序列在部件酶末端引入(适体-部件酶),所述部件酶的构型使其仅在所述靶的存在下形成活性 MNzyme。所阐述的 MNzyme 检测策略要求的寡核苷酸组分包括:(a) 标准的部件酶;(b) 适体-部件酶,是将适体引入其一个末端的部件酶;(c) 与所述适体-部件酶和所述部件酶两者都结合的使得能够组装活性 MNzyme(在靶的存在下)的组装易化子;(d) 报告探针底物;和(e) 与所述适体-部件酶杂交的组装抑制因子,杂交区域跨越至少部分所述适体序列和部分所述部件酶序列的底物结合臂。在缺乏靶分析物时(插图(i)),所述组装抑制因子与所述适体-部件酶结合从而阻止所述报告探针底物的结合(及酶切)。在靶分析物的存在下(插图(ii)),所述靶结合所述适体-部件酶的适体序列,抑制组装抑制因子的结合并允许所述报告探针底物的结合及酶切。这样, MNzyme 仅在靶的存在下能够形成并引起荧光信号的产生。

[0252] 图 21:使用适体的小分子的 MNzyme 检测:描述了使用 MNzyme 检测靶尤其是 ATP 的实施例。用检测小分子 ATP 的实施例例证了图 20 中图解的策略。插图(i):图解了用来检测 ATP 的所述寡核苷酸组分的序列。这些序列包括部件酶、适体部件酶(其引入结合 ATP 的适体)、适体/MNzyme 组装抑制因子、报告底物和组装易化子。插图(ii):SubBi-1-FB 酶切分析显示在存在或缺乏 ATP 及其它核苷酸时温育所述寡核苷酸组分后获得的结果。在存在 ATP 和 dATP 但不存在 GTP 或 CTP 时观察到荧光随时间增加。此外,在缺乏任何靶时(仅

有水的对照)没有观察到荧光增加。

[0253] 图 22 :使用 MNAzyme 检测单一碱基错配 :描述了使用 MNAzyme 检测单一碱基错配的实施例。插图 (i) 图解了用来在 RPLPO 外显子 5 靶序列中检测单一碱基错配的所述寡核苷酸组分的序列。所图解的寡核苷酸包含基于 MNAzyme 设计 7 的两种部件酶 (A5 和 B6) 和报告底物。所述部件酶 B 感应臂中的第三碱基 (X) 与所述靶序列匹配或错配。当 X=G 时所述部件酶与靶完全匹配。当 X=C 时所述感应臂与所述靶 RPLPO 之间有错配。插图 (ii) 显示在含有与所述 RPLPO 靶完全匹配或错配的部件酶 B 的反应中 PCR 扩增并实时检测后获得的结果。

[0254] 图 23 :SNP 检测的所述 MNAzyme 策略及结果 :该方法使用与一部分 (one version) 所述 SNP 完全匹配的截短的部件酶 B 感应臂,和在所述完全匹配靶的存在下促进 MNAzyme 组装的稳定因子寡核苷酸。所述部件酶 B 感应臂和所述靶核酸严紧的互补性要求使得能够区分十分相近的序列。插图 (i) :完全匹配的 5- 碱基感应臂和稳定因子寡核苷酸 ;插图 (ii) :错配的 5- 碱基感应臂和稳定因子寡核苷酸 ;插图 (iii) :无稳定因子对照 ;插图 (iv) :无靶对照 ;插图 (v) :用完全匹配靶、错配靶、无稳定因子对照和无靶对照进行的 MNAzyme SNP 检测结果。

[0255] 图 24 :调整 MNAzyme 检测以产生变色反应 :该方法使用附着有寡核苷酸的纳米金颗粒,所述寡核苷酸当通过桥连寡核苷酸连接时形成蓝色聚集体 (插图 (i))。所述桥连寡核苷酸掺有底物序列。在靶 (插图 (ii)) 的存在下,所述 MNAzyme 组装并酶切所述底物序列,释放各自的金颗粒,并引起肉眼可见的蓝至红色的颜色改变。

[0256] 图 25 :使用附着的部件酶的 MNAzyme 级联实施例 :该图图解了 MNAzyme 能够用于启动信号扩增级联。该反应含有如下要素 : (i) 在溶液中游离的 MNAzyme1 的部件酶 ; (ii) 在溶液中游离 (如图所示) 或者通过底物 sub1 附着到不溶性载体上的 MNAzyme2 和 3 (具有相同的感应臂) 的组装易化子 ; (iii) 通过底物 sub1 附着到不溶性载体上的 MNAzyme2 的部件酶。sub1 能够被 MNAzyme1 (在靶的存在下) 或 MNAzyme3 (在组装易化子的存在下) 酶切,酶切引起 MNAzyme2 的部件酶释放入溶液中 ; (iv) 通过底物 sub2 附着到不溶性载体上的 MNAzyme3 的部件酶,sub2 能够被 MNAzyme2 (在组装易化子的存在下) 酶切,酶切引起 MNAzyme3 的部件酶释放入溶液中 ; (v) 与 Sub2 序列相同但是在溶液中游离并且用荧光基团 (F) 和淬灭基团 (Q) 双重标记的 Sub2-FQ。Sub2-FQ 能够被 MNAzyme2 酶切产生荧光信号。在靶的存在下,从游离于溶液中的部件酶形成活性 MNAzyme1。MNAzyme1 切割其 Sub1,从而释放 MNAzyme2 的部件酶。一旦游离,这些部件酶与所述组装易化子杂交并形成 MNAzyme2,所述 MNAzyme2 酶切游离的 Sub2-FQ (产生荧光信号) 或附着的 Sub2 (释放 MNAzyme3 的部件酶)。由于 MNAzyme3 与 MNAzyme1 具有相同的底物臂,它也能够酶切附着的 Sub1,从而释放 MNAzyme2 的更多部件酶。这引起更多酶 (MNAzyme) 的所述组分 (部件酶) 的酶产生级联以及伴随的信号扩增级联。

[0257] 定义

[0258] 在此使用具有如下阐述的含义的某些术语。

[0259] 术语“包含”(“comprising”)意思是“基本上包括,但不一定仅仅包括”。此外,单词“包含”(“comprising”)的变体,如“包含”(“comprise”)和“包含”(“comprises”)具有相应地变化的含义。

[0260] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可以互换地使用并涉及下列物质的单链或双链聚合体：脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基或其类似物、衍生物、变体、片段或组合，包括但不限于 DNA、甲基化 DNA、烷基化 DNA、RNA、甲基化 RNA、微小 RNA、短干扰 RNA、短发夹 RNA、信使 RNA、转运 RNA、核仁小分子 RNA、小型临时 RNA、调节性小 RNA、前体微小 RNA 和初始微小 RNA、其它非编码 RNA、核糖体 RNA，其衍生物、其扩增子或上述的任意组合。以非限制性实例的方式，所述核酸的来源可以选自合成、哺乳动物、人类、动物、植物、真菌、细菌、病毒、古细菌或上述的任意组合。

[0261] 术语“寡核苷酸”和“引物”通常代表 DNA 或含有 DNA 的核酸分子、或 RNA 或含有 RNA 的分子或上述的组的片段。寡核苷酸的实例包括核酸靶；底物，例如，能够被 MNase 修饰的那些；引物，如用来通过诸如 PCR 的方法进行体外靶扩增的那些；和 MNase 组分。在某些实施方案中，MNase 组装易化子可以包含如在此定义的寡核苷酸。在此使用的部件酶也可以包含寡核苷酸。

[0262] 除非另有说明，术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”包括任何所指定的序列以及与其互补的序列。寡核苷酸可以包含至少一种添加或取代，包括但不限于 4-乙酰胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、2'-O-甲基胞苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、二氢尿苷、2'-O-甲基假尿苷、 β -D-半乳糖基 Q 核苷、2'-O-甲基鸟苷、肌苷、N6-异戊烯基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基假尿苷、1-甲基鸟苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、3-甲基胞苷、5-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷、 β -D-甘露糖基甲基尿苷、5-甲氧基羰基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、2-硫代甲基-N6-异戊烯基腺苷、N-((9- β -呋喃核糖基-2-硫代甲基嘌呤-6-基)氨基甲酰)苏氨酸、N-((9- β -呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰)苏氨酸、尿苷-5-氧基乙酸甲基酯、尿苷-5-氧基乙酸(v)、wybutoxosine、假尿苷、Q 核苷、2-硫代胞苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-甲基尿苷、N-((9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰)苏氨酸、2'-O-甲基-5-甲基尿苷、2'-O-甲基尿苷、wybutosine、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷、 β -D-阿拉伯糖基尿苷、 β -D-阿拉伯糖基胸苷。

[0263] 术语“催化核酸分子”、“催化核酸”、“核酸酶”和“催化核酸序列”在此可互换使用，并表示 DNA 分子或含有 DNA 的分子（本领域中也称为“DNA 酶”（“DNA enzyme”）、“脱氧核酶”（“deoxyribozyme”）或“DNA 核酶”（“DNAzyme”））或 RNA 或含有 RNA 的分子（本领域中也称为“RNA 酶”或“核酶”）或上述的组合，是可以识别底物并催化所述底物的修饰的 DNA-RNA 杂交分子。所述催化核酸中的核苷酸残基可以包括碱基 A、C、G、T 和 U，及其衍生物和类似物。

[0264] 当术语“衍生物”用于本发明的核酸或核苷酸时，其包括任何功能等同的核酸或核苷酸，包括完整地制备（例如，通过重组方法）或在合成后添加（例如，通过化学方法）的任何融合分子。这样的融合可以包含其中添加了 RNA 或 DNA 或与多肽（例如，嘌呤霉素）、小分子（例如，补骨脂素）或抗体偶联的本发明的寡核苷酸。

[0265] 当术语“类似物”用于本发明的核酸或核苷酸时，其包括具有与 DNA 或 RNA 分子或残基相关的物理结构的化合物，并能够与 DNA 或 RNA 残基或其类似物形成氢键（即，它能够与 DNA 或 RNA 残基或其类似物退火形成碱基对），但是这样的成键并非为所述化合物包括进术语“类似物”中所需。这样的类似物可以具有与在结构上与之相关的核糖核苷酸或脱

氧核糖核苷酸不同的化学和生物学性质。甲基化、碘化、溴化或生物素化残基是类似物的实例。已经描述含有核苷酸类似物的活性 DNAzyme, 所述核苷酸类似物包括脱氧肌苷、C-5- 咪唑脱氧尿苷、3-(氨基丙炔基)-7- 去氮 -dATP、2'-O- 甲基 RNA、2'-O- 甲基帽 (Warashina et al., 1999; Cairns et al., 2003; Schubert et al., 2004; Sidorov et al., 2004)。其它的类似物与 MNAzyme 的催化活性相适宜。催化核酸序列的变化, 例如用一个碱基取代另一个、用类似物取代碱基或糖组分或磷酸二酯主链的变化, 对本领域技术人员而言是显而易见的。例如, 能够在合成期间进行改变, 或通过合成后修饰特定碱基进行改变。引入诸如碱基改变或碱基类似物的变化的催化核酸的经验性测试允许评价改变的序列或特定类似物对催化活性的影响。碱基 A、C、G、T 和 U 的类似物为本领域已知, 其亚类列于表 2 中。

[0266] 表 2: 在此有用的核苷酸类似物实例

[0267]

| 缩写 | 名称 |
|---------|----------------------|
| ac4c | 4-乙酰胞苷 |
| chm5u | 5-(羧羟甲基)尿苷 |
| Cm | 2'-O-甲基胞苷 |
| Cmm5s2u | 5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷 |
| D | 二氢尿苷 |
| Fm | 2'-O-甲基假尿苷 |
| Galq | β -D-半乳糖基 Q 核苷 |
| Gm | 2'-O-甲基鸟苷 |
| i | 肌苷 |
| i6a | N6-异戊烯基腺苷 |
| m1a | 1-甲基腺苷 |
| m1f | 1-甲基假尿苷 |
| m1g | 1-甲基鸟苷 |
| M1i | 1-甲基肌苷 |
| m22g | 2,2-二甲基鸟苷 |
| m2a | 2-甲基腺苷 |
| m2g | 2-甲基鸟苷 |
| m3c | 3-甲基胞苷 |
| m5c | 5-甲基胞苷 |
| m6a | N6-甲基腺苷 |
| m7g | 7-甲基鸟苷 |
| mam5u | 5-甲基氨基甲基尿苷 |
| mam5s2u | 5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷 |
| Manq | β ,D-甘露糖基甲基尿苷 |

[0268]

| 缩写 | 名称 |
|---------|-------------------------------------|
| mcm5s2u | 5-甲氧基羰基甲基-2-尿苷 |
| Mo5u | 5-甲氧基尿苷 |
| Ms2i6a | 2-硫代甲基-N6-异戊烯基腺苷 |
| Ms2t6a | N-((9-β-呋喃核糖基-2-硫代甲基嘌呤-6-基)氨基甲酰)苏氨酸 |
| Mt6a | N-((9-β-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基-氨基甲酰)苏氨酸 |
| Mv | 尿苷-5-氧基乙酸甲基酯 |
| o5u | 尿苷-5-氧基乙酸(v) |
| Osyw | Wybutoxosine |
| P | 假尿苷 |
| Q | Q 核苷 |
| s2c | 2-硫代胞苷 |
| s2t | 5-甲基-2-硫代尿苷 |
| s2u | 2-硫代尿苷 |
| s4u | 4-硫代尿苷 |
| T | 5-甲基尿苷 |
| t6a | N-((9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)氨基甲酰)苏氨酸 |
| Tm | 2'-O-甲基-5-甲基尿苷 |
| Um | 2'-O-甲基尿苷 |
| Yw | Wybutosine |
| X | 3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷, (acp3)u |
| AraU | β-D-阿拉伯糖基尿苷 |
| AraT | β-D-阿拉伯糖基胸苷 |

[0269] 当术语“片段”用于核酸时,是指所述核酸的组成部分。通常所述片段具有与所述核酸一致的定性的生物学活性,但不一定总是这种情况。核酸片段不一定需要编码保留生物学活性的多肽。更确切地说,核酸片段可以,例如,用作杂交探针或 PCR 寡核苷酸。所述片段可以衍生自本发明的核酸或者可以通过某些其它手段合成,例如化学合成。

[0270] 在此使用的术语“变体”涉及基本上相似的核酸或多肽序列。通常,序列变异具

有一致的定性的生物学活性。此外,这样的序列变异可以具有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列一致性。术语“变体”的含义也包括同源物,所述同源物通常是来自不同物种但与在此公开的相应多肽或核酸具有基本上相同的生物学功能或活性的多肽或核酸。

[0271] 在此使用的术语“高度严紧性”(“high stringency”)是指两个核酸可以杂交的条件,并且可以包括例如溶液中盐和 / 或洗涤剂的浓度、在两个核酸杂交期间使用的溶液的温度和杂交的时间段。因此,在此使用的术语“高度严格性”是指有益于两个核酸杂交的溶液条件,只有在该条件下所述核酸才具有高度的互补性。所述互补性的程度可以包括但不限于约 55% 到 99% 的范围。因此,“高度严紧性”条件可以包括但不限于,使用变动的温度和包含各种浓度的洗涤剂、盐和二价阳离子的缓冲液。

[0272] 在此使用的术语“组装易化子分子”、“组装易化子”、“MNAzyme 组装易化子分子”、“易化子”和“MNAzyme 组装易化子”是指可以促进组分部件酶自组装形成催化活性 MNAzyme 的实体。在优选实施方案中,组装易化子为 MNAzyme 的自组装所需。某些实施方案中的组装易化子包含诸如核酸或非核酸的靶。组装易化子可以包含可以与一种或多种寡核苷酸“部件酶 (partzyme)”配对或结合的一个或多个区域或分子,所述“部件酶 (partzyme)”构成“MNAzyme”的组分或部分。不要求组装易化子与每一组分部件酶或寡核苷酸相互作用、配对或结合,条件是它与 MNAzyme 的组分部件酶中的至少之一相互作用、配对或结合。如在此使用的那样,意欲使 MNAzyme 组装易化子包括能够促进 MNAzyme 的自组装的最广范围的组分。在某些实施方案中,组装易化子可以包含核酸。在其它实施方案中,组装易化子可以包含任何细胞或其任何部分,例如任何真核或原核细胞、病毒、朊病毒、酵母或真菌,或任何其它分子,例如,包括但不限于蛋白、多肽、肽或核酸。在其它实施方案中,组装易化子可以包含病毒、朊病毒、酵母或真菌,或任何其它分子,例如,包括但不限于糖蛋白、脂质、脂蛋白、完整有机体、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合。

[0273] 在此使用的术语“靶”包括试图通过特定 MNAzyme 检测、鉴定或定量的任何天然或合成的实体、组分或分析物。靶因此包括最广范围的可检测实体、组分或分析物,为此需要灵敏的检测、鉴定和 / 或定量方法。在某些实施方案中,靶包含组装易化子。某些代表性靶包括但不限于蛋白、多肽、肽或核酸、糖蛋白、脂质、脂蛋白、完整有机体、细胞、病毒、细菌、古细菌、酵母、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合。也预期在此使用其它靶。

[0274] 在此使用的术语“底物”、“底物分子”和“化学底物”包括能够被催化分子识别、作用或化学修饰的任何分子。在具体实施方案中,底物可以被酶识别并修饰。在其它实施方案中,底物可以被催化核酸酶识别并修饰。底物的化学修饰可以通过修饰反应产物的出现或增加或通过修饰反应的底物的消失或减少来测量。特定催化分子可以识别一个或多个不同的底物分子,条件是每一底物分子具有催化活性可被催化分子识别的至少最小结构。

[0275] 在此使用的“报告底物”、“报告探针”或“报告探针底物”是特别适合于促进测量底物的消失或与催化反应相关产物的出现的底物。报告底物可以在溶液中游离或结合(或“附着”)于例如表面或另一分子。报告底物能够通过许多种手段中的任何手段进行标记,包括,例如,荧光基团(含有一种或多种另外的组分,如淬灭基团)、放射标记物、生物素标

记（例如生物素化）或化学发光标记物。催化核酸的报告底物还可以包括蛋白或核酸酶，例如共价地连接到它们的末端上的蛋白或核酸酶。

[0276] 如在此使用的那样，“通用 (generic)”或“普遍性 (universal)”底物是被多种 MNzyme 识别并对其起催化作用的底物，其中每一 MNzyme 能够识别不同的靶，例如报告底物。这样的底物的用途促进开发用结构上相关的 MNzyme 检测、鉴定或定量许多种靶的不同分析，所有所述 MNzyme 识别普遍性底物。这些普遍性底物每一个能够独立地用一种或多种标记物标记。在优选实施方案中，使用可独立检测的标记物标记一种或多种一般底物以便为用 MNzyme 独立地或同时检测多种靶创造方便的系统。

[0277] 如在此使用的那样，术语“部件酶 (partzyme)”、“组部件酶 (component partzyme)”和“组分寡核苷酸”是指含有 DNA 或含有 RNA 或含有 DNA-RNA 的寡核苷酸，其中两种或更多种所述寡核苷酸仅在 MNzyme 组装易化子分子的存在下能够一起形成“MNzyme”。在某些优选实施方案中，一种或多种组部件酶，并优选至少两种可以包含三个区域 (region) 或结构域 (domain)：形成催化化学修饰的部分 MNzyme 催化核的“催化”结构域；可以与组装易化子（例如靶）缔合和 / 或结合的“感应臂”结构域；以及可以和底物缔合和 / 或结合的“底物臂”结构域。这些区域或结构域的描述能够在例如图 1 中看到。部件酶可以包含一个或多个分子。部件酶可以包含至少一种另外的组分，包括但不限于适体，所述适体在此是指“适体 - 部件酶”。部件酶还可以包括底物，其可以在例如图 25 中看到。

[0278] 在此使用的术语“MNzyme”是指两个或多个寡核苷酸序列（例如部件酶），仅在 MNzyme 组装易化子分子（例如靶）的存在下才能形成能够催化性修饰底物的活性核酸酶。图 1 描述了包含部件酶 A 和部件酶 B 的代表性 MNzyme。参考图 1，DNA 部件酶 A 和 B 各自与靶结合（例如，通过与核酸靶 Watson-Crick 碱基配对）。仅当部件酶 A 和 B 的感应臂在所述靶上彼此邻近杂交时形成所述 MNzyme。所述 MNzyme 的所述底物臂接合所述报告底物，由部件酶 A 和 B 的所述催化结构域相互作用形成的所述 MNzyme 的所述催化核催化所述底物的酶切。所述 MNzyme 在荧光基团和淬灭基团染色对 (dye pair) 之间酶切所述底物，从而产生信号。附图中例证了 DNA/RNA 嵌合体（报告底物）的酶切。术语“多组分核酸酶”和“MNzyme”在此可以互换使用并包含由两个分子组成的双部结构，或由三个核酸分子组成的三部结构，或其它多部结构，例如由四个或更多核酸分子形成的那些。MNzyme 还可以包含通过与组装易化子或底物相互作用给所述 MNzyme 提供稳定性的稳定寡核苷酸。很明显，形成 MNzyme 要求至少所述部件酶组分与所述组装易化子组装以及与底物结合，使得催化活性可检测，并且缺乏这些组分的任何一种将导致缺乏催化活性。

[0279] 在此使用的术语“适体”可以包含能够识别一个或多个配体的结构。例如，所述识别可以由于所述适体的较高水平结构如三维结合结构域或口袋而具有高度特异性。因此，适体可以结合蛋白、多肽、肽或核酸、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、完整有机体、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合，或任何其它实体。优选的适体在此可以包括短的单链 DNA 或 RNA 低聚体，所述低聚体能够通过吸附、回收和再扩增的反复过程从合成核酸的复合物库中分离出来。因此，几乎对任何靶都能产生适体，所述靶的范围从小分子如氨基酸或抗体到蛋白和核酸结构。

[0280] 如在此使用的那样,术语“级联”是指在连续阶段中发生的任何连续的过程或操作,在所述连续阶段中每一阶段的发生通常依赖于前一阶段的发生。级联可以因此包括但不限于酶促级联或其它信号转导级联。在某些实施方案中,级联可以包括扩增因 MNzyme 的催化活性而产生的信号。在优选实施方案中,这样的扩增级联可以包括反复并因此而循环的信号扩增,其中第一 MNzyme 的催化活性使得第二 MNzyme 的催化活性所需要的分子可获得。在某些实施方案中,所述所需要的分子可以包含部件酶、酶、组装易化子、底物、靶、其部分或片段或上述的组合。在某些实施方案中,级联可以因此包括制造累积效应,从而通过将信号产生至可以检测的水平来检测低丰度靶。在其它实施方案中,可以使用多于两个的催化阶段。所述级联可以是线性的。在一个优选实施方案中,所述级联可以是指数的。

[0281] 如在此使用的那样,术语“抑制因子”或“组装抑制因子”包括,但不限于任何蛋白、多肽、肽或核酸、RNA、DNA、核酸类似物、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、完整有机体、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合,或与在此定义的 MNzyme 的一种或多种组分相互作用,或与底物或组装易化子相互作用以防止 MNzyme 组装的任何其它实体或分子。“抑制因子”或“组装抑制因子”不需要与 MNzyme 在物理上邻近,但是通过非限制性实例的方式,可以与 MNzyme、底物或组装易化子的组成部分竞争性结合,从而阻止这样的组成部分可获得用于 MNzyme 组装。这样的结合可以包括,例如与包含 MNzyme 组成部分的寡核苷酸互补的抑制性核酸。

[0282] 下列缩写在此使用并贯穿本说明书:

[0283] MNzyme: 多组分核酸酶,或多部核酸酶;

[0284] DNAzyme: 脱氧核糖核酸酶;

[0285] RNAzyme: 核糖核酸酶,或核酶;

[0286] PCR: 聚合酶链反应;

[0287] SDA: 单链置换扩增;

[0288] LAMP: 环介导等温扩增;

[0289] RCA: 滚环扩增;

[0290] TMA: 转录介导扩增;

[0291] 3SR: 自保留序列复制;

[0292] NASBA: 依赖核酸序列扩增;

[0293] dH₂O: 去离子蒸馏水;

[0294] LNA: 锁核酸;

[0295] PNA: 肽核酸;

[0296] bDNA: 分支 DNA 测定;

[0297] FCS: 荧光相关谱;

[0298] TSA: 酪胺信号放大;

[0299] An: 分析物或靶;

[0300] F: 荧光基团;

[0301] Q: 淬灭基团;

[0302] miR: 微小 RNA;

- [0303] N=A、C、T、G,或其任何类似物；
- [0304] N' = 与 N 互补或能够与 N 碱基配对的任何核苷酸；
- [0305] (N)_x: 任何数目的 N；
- [0306] (N')_x: 任何数目的 N'；
- [0307] W:A 或 T；
- [0308] K:A、G 或 AA；
- [0309] rN: 任何核苷酸碱基；
- [0310] (rN)_x: 任何数目的 rN；
- [0311] rR:A 或 G；
- [0312] rY:C 或 U；
- [0313] M:A 或 C；
- [0314] H:A、C 或 T；
- [0315] D:G、A 或 T；
- [0316] JOE 或 6-JOE:6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素；
- [0317] FAM 或 6-FAM:6-羧基荧光素。
- [0318] BHQ1: 黑孔淬灭基团 1
- [0319] BHQ2: 黑孔淬灭基团 2
- [0320] M-MLV RT(H-): 莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶, RNA 酶 H 负链
- [0321] shRNA: 短发夹 RNA
- [0322] siRNA: 短干扰 RNA
- [0323] mRNA: 信使 RNA
- [0324] tRNA: 转运 RNA
- [0325] snoRNA: 核仁小分子 RNA
- [0326] stRNA: 小型临时 RNA
- [0327] smRNA: 调节性小 RNA
- [0328] pre-microRNA: 前体微小 RNA
- [0329] pri-RNA: 初始微小 RNA
- [0330] 说明性实施方案详述
- [0331] 首先应当理解,在此提供的附图和实施例是用于举例说明而不是限制本发明及其各种实施方案。

[0332] 根据本发明,提供检测、鉴定和 / 或定量靶的组合物、方法和试剂盒。本方法通常包括使用包含多组分或多部核酸酶的组合物,所述多组分或多部核酸酶优选通过在组装易化子的存在下自组装形成活性核酸酶的多核酸组分形成。在优选实施方案中,所述组装易化子是所述靶,因此所述多组分核酸酶仅在所述靶的存在下形成。

[0333] 1. 组合物 -MNAzyme

[0334] 所述多组分核酸酶(在此也对等地称为多部核酸酶或“MNAzyme”)能够由两种或更多种寡核苷酸组分(在此也称为部件酶)自组装形成。部件酶寡核苷酸在 MNAzyme 自组装易化子的存在下自组装形成 MNAzyme。因此,MNAzyme 是催化活性核酸酶。在某些实施方案中, MNAzyme 的存在可以被检测,并提示靶的存在,这是因为所述 MNAzyme 仅在所述靶的

存在下形成,其中所述靶包含所述组装易化子。在此提供了许多种基于上述基本原理的分析。还在此提供了包含能够形成 MNAzyme 的寡核苷酸的组合物,以及各种序列的 MNAzyme。在某些实施方案中,所述寡核苷酸组分、组装易化子或底物中的至少之一还可以包括/包含能够与靶结合的适体。

[0335] 在优选实施方案中,所述 MNAzyme 的结构以一种或多种 DNA 酶和/或核酶为基础。更为优选的是基于特定 DNA 酶结构的那些 MNAzyme 结构。目前的优选结构基于包括 10:23 和 8:17DNA 酶的 DNA 酶。在各种实施方案中所述 MNAzyme 包含核苷酸碱基和脱氧核糖核苷酸碱基中的任一者或两者都包含。在更优选的实施方案中,MNAzyme 的结构至少部分基于 DNA 酶的结构。在其它优选实施方案中,MNAzyme 包含至少一些脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物。在更优选的实施方案中,所述 MNAzyme 的催化核包含一个或多个脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物。在更优选的实施方案中,一个或多个脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物参与底物的催化。在其它实施方案中,所述催化核中的至少一个脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物促进催化活性。在其它实施方案中,相对于在不存在脱氧核糖核苷酸碱基的情况下可比较的 MNAzyme 的速率,为了使催化以可测量的速率发生,对所述 MNAzyme 的催化核中至少一个脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物有严格的要求,

[0336] 如在此提供的那样,MNAzyme 可以含有一个或多个取代,如类似物,衍生物,修饰或改变的碱基,核糖核苷酸,糖或磷酸主链的改变,各种删除、插入、取代、重复或其它修饰,或这些的任意组合,为本领域技术人员所熟知。这样的修饰、取代、删除、插入等可以在感应臂和/或底物臂和/或催化核部分进行,如在此阐述的那样,使得所述分子保持催化活性。与所述底物或组装易化子结合的臂的取代和修饰可以很耐受并且实际上是允许改变所述分子以适合不同底物/组装易化子的基础。例如,对所述感应臂的修饰会允许针对不同的组装易化子进行调整,而对所述底物臂的修饰会允许针对不同的底物进行调整。

[0337] 因此,在某些优选实施方案中,本发明涉及具有催化活性的 MNAzyme,所述 MNAzyme 由脱氧核糖核苷酸组成或通过某些修饰/取代等衍生自这样的分子。作为通常规则,将整个分子用例如核糖核苷酸取代会使所述分子失活,因为它的活性依赖于某些关键的脱氧核糖核苷酸。在相应的方式中,核酶中的某些核苷酸可以用脱氧核糖核苷酸取代但是将整个分子用例如脱氧核糖核苷酸取代会使所述分子失活。

[0338] 本领域技术人员应当理解,所述 MNAzyme 包含脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸中的任一者或甚至两者都包括。目前优选的是。包含至少一种和多种脱氧核糖核苷酸组分,优选所有的都为脱氧核糖核苷酸组分。在所述 MNAzyme 的催化核中包含至少一种脱氧核糖核苷酸碱基或其类似物的那些 MNAzyme 也是优选的。甚至更优选的是这样的碱基为催化活性所必需的那些实施方案。

[0339] 本领域技术人员也应当理解,多部 DNA 酶比多部核酶具有优势,例如在稳定性和使用的容易程度方面。因此,在此提供的多组分 MNAzyme 能够提供多组分核酶的目前优选的替代物,所述多组分核酶也根据各种实施方案提供。还应当理解,在某些实施方案中,MNAzyme 比单分子核酸酶如 DNA 酶有优势,所述单分子核酸酶仅能够识别一底物,而单一 MNAzyme 能够识别两个分子,即组装易化子(例如靶)和底物。例如,MNAzyme 的这些性质使它们适合于例如检测靶,包括原位、体内或体外检测。

[0340] 2. 使用 MNAzyme 检测、鉴定或定量靶的方法

[0341] 本发明提供利用一种或多种 MNzyme 来检测、鉴定或定量至少一种靶的各种方法。在一实施方案中,第一和第二寡核苷酸组分仅在与含有组装易化子的样品接触时才自组装,因此所述催化活性 MNzyme 的自组装表明所述组装易化子的存在,其中所述组装易化子是所述靶。在其它实施方案中,例如包括适体的那些,所述组装易化子可以不是所述靶,从而可以仅包含所述 MNzyme 的自组装所需要的组分。

[0342] 本发明的各种实施方案中的一些通过图示陈述可以更好地理解。因此,参考所述附图,并根据在此的组合物和方法,通常提供的是仅用核酸酶(例如,图 1、3、4、7-13、20、21、24、25)而无需蛋白质酶如聚合酶来检测至少一种靶的基于 MNzyme 的方法。尽管在此不排除联合 MNzyme 使用蛋白质酶,并且在此的某些实施方案中包括蛋白质酶是允许的,或甚至是优选的,但是不需要蛋白质酶的方法的反应条件通常限制较少而且更容易优化,例如 MNzyme 酶切的效率。无需蛋白质酶也通常降低试剂的成本。

[0343] 如还在此提供的,为检测靶而使用 MNzyme 的某些方法不要求热循环和/或靶的变性。等温方法比要求热循环的方法更灵活而且也能区分包含单链和双链核酸的靶。此外,不需要热循环可以使这样的方法更容易和更便宜。根据该方法提供的是简单、快速、成本划算、等温而且程序灵活的在样品中检测感兴趣靶的方法,所述样品可以是合成的或天然的。

[0344] 在此提供的某些样品例示通过引起例如荧光报告底物的 MNzyme 介导酶切的 MNzyme 的靶特异性组装来检测核酸靶。此外,由于所述 MNzyme 分子的性质,反应能够在很大的温度范围内进行,仅需视 MNzyme 的组装和所用底物的催化修饰(例如酶切)而定。

[0345] 图 1 描述了 MNzyme 结构的基本实施例。图示的结构包含已经与在此简单地显示为靶的 MNzyme 组装易化子分子碱基配对的部件酶 A 和部件酶 B。部件酶 A 和 B 通过与靶相互作用使得所述催化核紧密靠近从而形成。所述 MNzyme 的所述底物臂与底物(在这里是报告底物)相互作用并碱基配对。因此,所述 MNzyme 自组装,并且通过所述 MNzyme 组装易化子分子靶的存在促进了这个过程。在缺乏靶时,不形成 MNzyme。在底物中竖向箭头代表的 MNzyme 酶切位点处,所述 MNzyme 的催化核催化所述底物的修饰(在该例中是酶切)。本发明该具体实施方案中的所述底物包含具有可检测信号的可检测部分,例如荧光基团 F,和通过淬灭基团 Q 的作用对可检测信号 F 具有淬灭作用的淬灭基团部分。当于 MNzyme 酶切位点处酶切时,容易检测或定量的可检测信号(在这里是荧光)显著增加。

[0346] 图 1 还能够进一步理解为描述了使用 MNzyme 检测靶的基本方法的实施例,所述靶在某些实施方案中包含组装易化子。策略 1(见图 2)使用适合于检测包括 DNA、RNA 和蛋白的靶的 MNzyme。报告底物能够在溶液中游离(图 1)或结合到载体上(图 3)。信号能够通过各种手段如分离荧光基团 F 和淬灭基团 Q 染色对(图 1 和 3)而产生。

[0347] 更特别地,部件酶 A 和部件酶 B 如图 1 所示,各自包含底物臂部分、催化核部分和感应臂部分。在靶的存在下,部件酶 A 和部件酶 B 的所述感应臂部分能够开始与所述靶,例如 DNA 或 RNA 序列杂交并与其互补部分碱基配对。当以这样的方式与所述靶接触时,所述 MNzyme 自组装形成能够修饰被底物臂结合的底物的催化核。优选地,所述 MNzyme 的存在通过其催化活性的检测或测量来检测。因而组装的 MNzyme 的底物臂能够通过所述底物臂和所述底物上互补序列的相互作用接合底物,例如图 1 所示的报告底物。一旦所述底物臂这样接合所述底物,所述催化核能够促进所述底物的修饰(例如酶切),从而能够直接或间接测量或检测。

[0348] 继续参考附图,图 2 提供 MNAzyme 分析的一些实例应用的程式化概述。策略 1 例示了上述 MNAzyme 分析的基本应用。当所述寡核苷酸识别靶并与之结合时,形成由具有靶和底物两者的识别序列的独立寡核苷酸组成的 MNAzyme。所述底物,例如报告底物,被所述 MNAzyme 的催化活性修饰并引起可检测信号的产生,所述可检测信号的产生为直接产生(策略 1)、靶扩增期间或之后产生(策略 2)或通过信号级联产生(策略 3)。在某些实施方案中,靶和信号扩增两者同时发生。

[0349] 本领域技术人员应知道 MNAzyme 可以在覆盖广泛应用领域的组装易化子的检测、鉴定或定量策略中使用。这些领域包括,但不限于,医学、兽医、农业、食品技术、成像和生物恐怖应用。

[0350] 对本领域技术人员而言也是显而易见的是,MNAzyme 能够用来检测、鉴定和/或定量溶液中的靶。例如,涉及使用单个底物检测、鉴定和/或定量单个靶的策略可以应用于这样的检测。在某些实施方案中,这可以包括使用通用底物。也能够使用修饰一系列通用底物的多种 MNAzyme 在溶液中检测多种靶,每一底物的修饰产生截然不同的可检测信号,例如不同的荧光。

[0351] 3. 使用多种 MNAzyme 的方法

[0352] 本领域技术人员应知道,在此提供的各种分析通常能够用来在每个反应或分析中检测单个靶,或在单个反应或分析中检测多种靶。在检测多种靶时,能够根据分析和待检测对象而使用一种或多种 MNAzyme。例如,单个 MNAzyme 可以满足检测多个相关结构的要求,例如具有相同的关键序列(被所述 MNAzyme 识别)并且仅在例如长度上或在所述关键序列之外的序列上不同的一组序列。具有所述关键序列的任何序列都可以检测。复合 MNAzyme 对检测差异小至单个核苷酸的相关序列或甚至差异很大的靶会有用,而且可以知道每一个的存在或缺乏。类似地,在某些实施方案中,单个底物会满足要求,而在其它实施方案中检测几个靶中的每一个靶都需要独一无二的底物。在某些情况下,方法的多元化要求对每一底物使用截然不同的或独一无二的可检测信号以便设计方法。当所述底物附着到一种或多种载体上并且能够通过它们在一种或多种载体上的位置区分开时,对每一底物可以不要求截然不同的或独一无二的可检测信号。本领域技术人员很容易理解这些设计特征。在某些实施方案中,所述方法可以在一个反应中检测多种不同类型的靶,例如核酸靶和蛋白。

[0353] 4. 使用靶扩增的方法

[0354] 本领域技术人员很容易理解,在此描述的方法可以包括在 MNAzyme 的催化活性之前、期间或之后扩增靶。这样的靶扩增在本发明的实施方案中具有具体应用,其中待检测、鉴定或定量的靶的量是提供使用其他方法可能检测不到的信号的量。这样的扩增可以包括下述的一种或多种:聚合酶链反应(PCR)、单链置换扩增(SDA)、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、转录介导扩增(TMA)、自主序列复制(3SR)、依赖核酸序列扩增(NASBA)或逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

[0355] 策略 2(图 2)例示了使用适合于在体外扩增核酸靶期间或之后监测扩增子的累积的 MNAzyme。体外扩增核酸序列的技术为本领域已知。这些技术包括由 DNA 聚合酶介导的技术,如聚合酶链反应(“PCR”)(见,例如,美国专利第 4,683,202 号;美国专利号第 4,683,195 号;美国专利第 4,000,159 号;美国专利第 4,965,188 号;美国专利第 5,176,995 号)(Saiki et al., 1985; Chehab et al., 1987)、链置换扩增(“SDA”)(Walker

et al., 1992)、滚环扩增 (“RCA”) (Lizardi et al., 1998)、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和环介导等温扩增 (“LAMP”) (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002)。其它的靶扩增技术由 RNA 聚合酶介导, 例如转录介导扩增 (“TMA”) (Jonas et al., 1993)、自主序列复制 (“3SR”) (Fahy et al., 1991) 和依赖核酸序列扩增 (NASBA) (Compton, 1991)。

[0356] 通过 PCR、RT-PCR、SDA、RCA 和 LAMP 生产的扩增产物 (“扩增子”) 由 DNA 组成, 而 RNA 扩增子通过 TMA、3SR 和 NASBA 产生。

[0357] 进一步参考如图 2 中例证的策略 2, 在其几个方面中的一方面, 本发明提供与靶扩增方法联用的使用 MNAzyme 的方法, 所述靶扩增方法包括例如上述的 PCR、RT-PCR、SDA、RCA、LAMP、TMA、3SR 和 NASBA。实施例 4、5、6 和 9 例示了 PCR 扩增子的检测。在实施例 4、5、6 和 9 中, PCR 后的终点分析促进了所述靶核酸存在与否的快速检测。实施例 8、10、11、13、14、15、16、19 和 20 例示了 PCR 的实时监测, 从而允许所述靶核酸的定量。使用非对称或对称引物比通过 PCR 产生的扩增子的累积能够使用 MNAzyme 监测。

[0358] 在图 2 (策略 2) 中能够看到, 根据扩增核酸 (即 DNA 或 RNA) 的程序扩增靶核酸。优选地, 使用标准的体外扩增方法。扩增期间产生的扩增子用作 MNAzyme 的靶, 因此 MNAzyme 的活性提示靶的存在。本领域技术人员应当理解, 这样的监测能够在允许扩增和 MNAzyme 组装和催化活性的条件下在单一容器中进行, 或者能够通过扩增反应过程结束时或期间移走样品, 在扩增之后或在整个扩增期间的时间点进行 MNAzyme 分析。

[0359] 还要理解的是, 将靶扩增与催化核酸活性相结合的方法或方案可以要求特定的反应条件。优选地, 反应条件与聚合酶活性 (对于扩增) 和底物的催化核酸修饰 (对于检测) 两者都相适宜。已经描述了用于确定对于 DNA 酶的在高温条件下 (如 PCR 期间) 同时测定催化活性和聚合酶活性的测定条件的方案 (Impey et al., 2000)。在这篇论文中论证了包括 DNA 酶臂长、缓冲液、温度、二价离子浓度的因素的影响和添加剂的影响。DNA 酶适合与体外扩增策略结合使用。例如, 它们在扩增期间暴露于高温中时不会不可逆地变性。

[0360] 5. 使用不溶性和固体载体的方法

[0361] 还要理解的是, 无论复合与否, 所述方法通常可应用在溶液中, 或联合不溶性载体或固体载体应用, 所述载体上结合、附着或固定有一种或多种底物、酶或其部分、MNAzyme 组装易化子和 / 或靶。有了在此例示的方法和变化以及工作实施例, 本领域技术人员通常也应当理解这样的分析系统的特征。因此, 本发明不应视为限制于在此的教导, 而应视为能够与在此提供的教导的原则和范围及本领域知识相一致地修饰和改变。

[0362] 参考图 3, 插图 (i), 描述了使用 MNAzyme 和固定在载体上的底物检测靶的代表性方法。在该实施方案中, 底物优选为如图所示具有可检测部分和淬灭基团部分的底物, 所述可检测部分包含可检测信号例如荧光基团, 所述淬灭基团部分在底物的可检测部分与淬灭基团部分保持紧密邻近直到例如底物被例如酶切而修饰的同时减少或消除可检测信号。底物附着到载体上。载体优选为不溶性材料或为保持底物的基质, 并阻止底物在大量反应混合物中自由移动。本领域已知这样的载体用于固定或定位底物, 包括核酸靶。本领域技术人员应当理解, 所述载体能够选自多种形式的各种基质、聚合物等包括便于在微分析中使用的珠, 以及与反应条件相适宜的其它材料。在某些优选实施方案中, 所述载体能够是塑料如塑料珠或薄片, 或在其中进行特定分析的塑料容器 (well) 或管道。

[0363] 设计将底物附着在载体上使得在 MNAzyme 修饰 (如酶切) 底物时, 可检测部分或

淬灭基团部分任一者仍然附着到载体上（但不是两者都仍然附着到载体上），而另一者被释放并移动进入大量反应混合物，远离仍然附着的部分。因此，在酶切实施例中，当淬灭基团部分和可检测部分随酶切而分开时，可检测信号显著增加。在图 3 的插图 (i) 所示的实施方案中，含有荧光基团的可检测部分在酶切后仍附着在载体上。这具有允许信号定位于所述载体上的益处，但在某些情况下，荧光基团可以被释放入溶液中。在发生例如连接的另一实施方案中，可以将淬灭基团与荧光基团连接从而减少可检测信号。

[0364] 参考图 3, 插图 (ii), 示出了包含多种 MNzyme 组分用于制备对不同靶具有特异性的复合 MNzyme 的复合 (multiplexed) 方法。该实施方案包括在具体已知位置例如“芯片”包含底物的结构, 所述“芯片”处可获得复合位置以结合多个底物, 例如底物 1、底物 2。每一底物的可检测部分的位置都能被追踪并被限定在该位置。对每一 MNzyme, 例如 MNzyme1、MNzyme2, 如果靶例如靶 1、靶 2 存在于例如测试溶液中, 与该靶相应并对其具有特异性的 MNzyme 会自组装并能催化其相应底物的酶切, 导致在该位置产生信号。可检测信号的位置会因此鉴定哪个 MNzyme 酶切了它的底物, 并因此鉴定哪个 / 些靶存在于测试溶液中。在该实施方案中, 对底物的修饰通过其位置引起可鉴定信号。底物不需要可独立鉴定的检测机理, 例如不同的荧光基团, 但本领域技术人员应当理解这样的预期在本发明的范围之内。

[0365] 包括“芯片”(又称为阵列或微阵列) 形式的不溶性载体的本发明的实施方案通常包括偶合、拴系或附着到芯片上的多个底物。在具体实施方案中, 所述底物包含核酸。多个核酸可以通过本领域已知的任何适当方法定位在芯片上, 例如, 通过吸液管、喷墨打印、接触打印或光刻法。芯片可以由至少一种要素组成, 每一所述要素包含至少一种核酸。所述至少一种要素可以由具有相同序列的多个核酸组成。包含芯片的所述要素数可以是任何数量, 并且在芯片上定位有多个所述要素时, 所述要素可以以均一的距离隔开或以变化的距离隔开、或为其组合。在某些实施方案中, 所述要素可以随机定位, 然后测定每一所述要素各自的位置。所述要素的大小和形状会取决于本发明的具体应用, 并且具有不同大小和形状的所述要素可以组合成单一芯片。芯片表面可以基本平坦或可以具有如凹陷或突起的特征, 且所述要素可以定位在凹陷内或定位到突起上。这样的凹陷可以为所述要素被浸入的溶液提供贮液器, 或这样的突起可以促使所述要素干燥。例如, 可以将所述要素放在 96 孔板的每一孔中。在某些实施方案中, 所述芯片可以包括独特的鉴定物如指示剂、射频标记、整合装置如微处理器、条形码和其它标记以便鉴定每一所述要素。独特的鉴定物可以另外或可替换地包含阵列表面上的凹陷或突起。此外, 独特的鉴定物能够提供芯片的正确定位或鉴定。独特的鉴定物可以通过数据捕获装置或通过光学扫描仪或检测器直接读取。

[0366] 6. 方法中使用的报告底物系统

[0367] 根据本发明, 还提供了通用报告底物系统, 通过轻易的设计改变以创造识别不同靶的新 MNzyme, 所述通用报告底物系统可以用于快速分析的开发。如在此讨论的那样, 部件酶的底物臂部分和催化核部分可以保持不变, 仅改变新靶所要求的一种或多种部件酶的感应臂部分。提供通用底物序列并且因此能够将相同的底物引入许多不同靶的分析中。此外, 可以将相同的底物引入在此的各种实施方案的方法中, 包括底物在溶液中游离或拴系或附着在载体上的分析。可以将一系列通用底物用在可以同时检测多种靶的复合反应中。

[0368] 使用通用底物的 MNzyme 策略与如要求为每一新靶设计并使用探针的 TaqMan® 或 Beacons 技术相比具有显著优势。

[0369] 7. 方法中使用的底物

[0370] 如接下来详细描述的那样,在某些实施方案中 MNAzyme 具有能利用普遍性或通用底物的有利性质。表 1 以目前优选的构型示出了这样的底物,其中所述底物包含可检测部分和淬灭基团两部分。淬灭基团部分适合于使来自底物可检测部分的信号减少或消除,直到 MNAzyme 酶切该底物。例如,淬灭基团部分可以包含“黑孔淬灭基团 1”(BHQ1)或“黑孔淬灭基团 2”(BHQ2)。

[0371] 因此, MNAzyme 在可检测部分和淬灭基团部分之间酶切底物使这两部分在溶液中分开,从而使得在淬灭基团部分远离可检测部分或从其局部环境有效移走时可检测信号出现或增加。

[0372] 通过设计 MNAzyme 的组部件酶,能够使用通用或普遍性底物。通过仅改变部件酶的感应臂,但不改变底物臂,能够设计特异性针对多种靶中的每一个的各种 MNAzyme,所有所述 MNAzyme 都利用普遍性底物来检测。本领域技术人员应当理解下述优势,即这不再需要对于每一靶都提供专门的或独特的底物。每一新靶只需要一个或多个感应臂部分的一个或多个改变;底物臂部分和催化核部分可以保持不变。因此,可以使用 MNAzyme 将单个报告底物用于单个靶,并使用改变的 MNAzyme 将单个报告底物在一系列分析中用于多种靶。多个报告底物可以复合以便使用多种 MNAzyme(每一种 MNAzyme 用于每一种靶)在单一分析中检测多种靶。使用 MNAzyme 的这样的复合方法被容易地在溶液中(图 18)或附着到载体系统上(图 3)实现。在这里,预期复合分析能够因此在包括将一个或多个底物、MNAzyme 部件酶或组装易化子或另外的酶活性附着到载体上的系统中实现,如在此描述的那样。

[0373] 此外,所述底物可以包括另外的实体如标记核酸、纳米颗粒、微粒、蛋白、抗体、RNA、DNA、核酸类似物、蛋白、糖蛋白、脂蛋白、肽核酸、锁核酸、肽-核酸嵌合体或上述的任意组合。例如,所述纳米颗粒可以是金纳米颗粒,其中这些金纳米颗粒与多种靶如核酸缔合。

[0374] 所述底物可以被 MNAzyme 修饰从而提供可检测作用。在检测过程中, MNAzyme 对底物的修饰可以包括,例如,酶切、连接、卟啉金属化,形成碳碳键、酯键或酰胺键。由于 MNAzyme 修饰底物,产生了可检测作用并且该作用的强度因此可以提示待测靶的量。可检测作用可以通过多种方法检测,包括荧光光谱,表面等离子体共振,质谱,核磁共振,电子自旋共振,荧光偏振光谱,圆二色谱,免疫测定,色谱法,辐射线测定,光度测定,闪烁扫描法,电子方法,紫外、可见光或红外光谱,酶促方法或上述的任意组合。

[0375] 某些组已经报道了对于核酸靶以及具有比色信息显示(Elghanian et al., 1997, Mirkin et al., 1996, 以及 Liu and Lu, 2004)的其它分析物的检测。该策略包括批量制备金纳米颗粒,每一所述颗粒表面附着有截然不同的 DNA 寡核苷酸序列。然后能够通过加入与附着到金颗粒上的序列互补的“桥连寡核苷酸”使金颗粒聚集。颗粒聚集引起颜色从红到蓝的伴随改变(Mirkin et al., 1996)。更近一些的研究表明,在桥连寡核苷酸中引入 DNA 酶底物序列能够提供逆转金颗粒聚集的机制(Liu and Lu, 2004)。DNA 酶的活化和随后底物/桥连寡核苷酸的酶切引起金颗粒的解离和颜色从蓝到红的改变。

[0376] 设计了基于上述概念的简易铅检测器,所述检测器通过利用特定 DNA 酶的催化活性对铅的依赖而起作用。设计 DNA 酶以酶切用于聚集金颗粒的桥连寡核苷酸(Liu and Lu, 2004)。类似地,含有对腺苷具有特异性的适体的 aptazyme,和仅在腺苷的存在下能够酶切

桥连寡核苷酸的 DNA 酶使得可以以比色形式检测腺苷。

[0377] 8. 方法的优化

[0378] 本领域技术人员会容易理解,在此描述的方法可以使用各种实验参数进行优化,以优化靶的检测、鉴定和 / 或定量。优化的具体实验参数和该优化的水平会取决于采用的具体方法和待检测、鉴别和 / 或定量的具体靶。这样的参数包括,但不限于,时间、温度,盐、洗涤剂、阳离子和包括但不限于二甲亚砜 (DMSO) 的其它试剂的浓度,以及核酸的长度、互补性、GC 含量和解链温度 (T_m)。

[0379] 在某些实施方案,例如包括检测序列变异和 / 或检测甲基化 DNA 的那些方法中,可以优化实验参数,优选包括实施该方法的温度,以便区分 MNzyme 组分核酸与分别包含或是不包含序列变化或甲基化核苷酸的靶核酸的结合。实施这样的方法的温度可以是约 20°C 到约 96°C、约 20°C 到约 75°C、约 20°C 到约 60°C 或约 20°C 到约 55°C。

[0380] 在一优选的实施方案中,在此提供优化的反应以实践使用 MNzyme 的方法。在这样的优化的反应中,催化活性比未优化的反应增加高达 10%、20% 或 30%。更优选的反应条件使催化活性增加至少 35% 或 40%,并优选高达 50% 或更多。在更优选的实施方案中,优化的反应的催化活性增加超过 50%,并高达 66%、75% 或甚至 100%。在更优选的实施方案中,被充分优化的反应方法会使催化活性增加 100%、200% 或甚至 300% 或更多。其它的优选反应条件与以未优化的反应条件实践的方法相比,能够使催化活性增加高达 1000% 或更多。优化在此提供的方法的高度优选的反应条件是引入某些二价阳离子。二价阳离子的浓度可以以浓度依赖方式影响大多数核酸酶的催化活性。优选的优化反对于 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 中的一种或多种进行优化。

[0381] 9. 使用适体的方法

[0382] 本领域技术人员会容易理解,在此描述的方法可以用适体实施,其中所述适体可以促进靶包括非核酸的靶的检测、鉴别和 / 或定量。

[0383] 参考图 4 和 20,例示了用 MNzyme 检测靶包括非核酸实体的方法。该方法使用可以包含能够识别一种或多种配体的核酸或蛋白、多肽或肽或上述的组合。所述适体可以与例如蛋白、多肽、肽或核酸、糖蛋白、脂质、脂蛋白、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、完整有机体、小分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合,或任何其它实体 (Lee et al., 2004)。

[0384] 优选的适体在此可以包括短单链 DNA 或 RNA 低聚体或肽,所述短单链 DNA 或 RNA 低聚体或肽能够通过吸附、回收和再扩增的反复过程从合成核酸或肽的复合物库中分离出来。因此,几乎对任何靶都能产生适体,所述靶的范围从诸如氨基酸或抗体的小分子到蛋白和核酸结构。在优选的实施方案中,所述适体包括例如优选通过演化和选择技术产生的核酸结合分子。优选地,所述适体可以包括 DNA 或 RNA 分子,或二者的组合,包括但不限于按照例如上述表 2 的核苷酸类似物。

[0385] 图 4 和 20 图解了将适体与 MNzyme 结合使用的策略。参考图 4 插图 (i),该 MNzyme 检测策略需要的核酸寡核苷酸可以包括:(a) 标准部件酶;(b) 适体-部件酶,是纳入适体(黑体序列)和能够形成发夹从而抑制 MNzyme 组装的互补序列的部件酶;(c) 能够与适体-部件酶和部件酶二者结合从而能够组装活性 MNzyme 的组装易化子;和(d) 底物。没有靶分析物 (An) 时,适体-部件酶采取抑制活性 MNzyme 组装的发夹结构。在存在

靶分析物时,靶分析物与适体-部件酶的适体结构域结合,从而破坏发夹结构并使适体-部件酶参与活性 MNAzyme 的组装。然后,活性 MNAzyme 能够修饰底物,引起例如荧光信号的产生。

[0386] 参考图 4 插图 (ii),该 MNAzyme 检测策略需要的核酸寡核苷酸可以包括:(a) 两种标准部件酶;(b) 纳入适体(黑体序列)和能够形成发夹结构的互补抑制因子的组装易化子;和(c) 底物。在没有靶分析物时,组装易化子采取发夹结构,所述发夹结构抑制该组分引导组装活性 MNAzyme 的能力。在存在靶分析物时,靶分析物与组装易化子的适体结构域结合,从而破坏发夹结构并使该组分引导活性 MNAzyme 的组装。然后,活性 MNAzyme 能够修饰底物,引起例如荧光信号的产生。

[0387] 本领域技术人员应当理解,可以将适体纳入组装易化子分子的任意端。此外,应当理解,可以将多种适体纳入一种或多种部件酶寡核苷酸组分。图 4 插图 (i) 和插图 (ii) 图解的策略能够包含 DNA、RNA、LNA、PNA 或含有一种或多种核苷酸碱基类似物的序列。在其它实施方案中,靶 An 是核酸。在这样的实施方案中,用与靶核酸互补的序列取代图 4 的黑体适体序列。

[0388] 参考图 4 插图 (iii),该 MNAzyme 检测策略需要的核酸寡核苷酸可以包括两种适体-部件酶,每一所述适体-部件酶包含部分适体。在没有靶分析物时,活性 MNAzyme 不能组装。在存在靶分析物时,靶分析物用作将寡核苷酸组分聚在一起从而引导活性 MNAzyme 组装的组装易化子。然后,活性 MNAzyme 能够修饰底物,引起例如荧光信号的产生。

[0389] 图 20 图解了将适体结合与 MNAzyme 组装相结合的相关策略。在该策略中,在下述构型的部件酶(适体-部件酶)端纳入适体序列,即使得活性 MNAzyme 仅在靶分析物的存在下形成的构象。该图解的 MNAzyme 检测策略需要的寡核苷酸组分包括:(a) 标准部件酶;(b) 适体-部件酶,其是在一端有适体纳入的部件酶;(c) 与适体-部件酶和部件酶两者结合、使活性 MNAzyme 能够组装的组装易化子(在靶的存在下);(d) 报告探针底物;和(e) 在跨越部件酶序列的至少部分适体序列和部分底物结合臂的区域与适体-部件酶杂交的组装抑制因子。当没有靶时(左手插图),组装抑制因子与适体-部件酶结合从而阻止报告探针底物的结合(及酶切)。当存在靶时(右手插图),靶与适体-部件酶的适体序列结合,阻止组装抑制因子的结合并允许报告探针底物的结合和酶切。这样,活性 MNAzyme 仅能在靶的存在下形成并引起荧光信号的产生。

[0390] 此外,本领域技术人员应当理解,图 20 图解的策略与图 4 插图 (i) 图解的策略相似,差别在于阻止活性 MNAzyme 形成的互补抑制因子序列是纳入寡核苷酸部件酶组分中(图 4 插图 (i)) 还是纳入独立的分子中(图 20)。这样,能够将抑制因子序列纳入独立的分子中或纳入到参与 MNAzyme 复合的组分之一中。

[0391] 本领域技术人员也应当理解,可以将一种或多种适体纳入任何寡核苷酸组分中,包括部件酶、组装易化子或底物。此外,可以将适体纳入这些寡核苷酸中任意一者的任意端。

[0392] 参考实施例 18 和 21 可以更好地理解本发明,其中适体/MNAzyme 策略分别用来检测小分子(ATP)和蛋白(Taq 聚合酶)。

[0393] 10. 检测、鉴定和定量微小 RNA 的方法

[0394] 本领域技术人员应当理解,检测、鉴定和/或定量微小 RNA 代表在此描述的方法的

具体实施方案。参考图 5, 例示了使用 MNAzyme 扩增短核酸 (例如微小 RNA (miR)) 序列并检测扩增子的策略。

[0395] 检测短核酸序列如微小 RNA (miR) 需要另外的策略主要是因为这些靶的尺寸小。MiR 分子是长度大约 22 个核苷酸的非编码 RNA。它们能够通过克隆或 northern blot 分析来检测, 但是这些方法费力而且比诸如 RT-PCR 的技术需要更多的总 RNA。MiR 的小尺寸提供不完整的序列以容纳标准设计的两个 PCR 引物。此外, 即使实现了 miR 扩增, 仍难以用任意尺寸 (用电泳证实) 区分真正的扩增子与引物二聚体, 或区分荧光与非特异性染料如 Sybr Green 或溴化乙锭的插入。通过用内杂交探针如 **TaqMan®** 或 Beacon 探针探查 miR 扩增子可以克服这一局限性, 然而, 扩增子的小尺寸再次限制了标准设计探针的使用。

[0396] 进行 miR 分析的改进的 **TaqMan®** RT-PCR 方法 (Chen et al., 2005) 用 3' 引物启动逆转录, 所述 3' 引物具有 miR 特异性 3' 末端和在它们的 5' 末端处能够形成茎环的另外的无关序列。用这些 3' 引物和 5' 引物扩增所产生的 cDNA, 所述 5' 引物也具有 miR 特异性 3' 末端和在它们的 5' 末端处的另外的无关序列。该扩增产用 **TaqMan®** 探针实时监测, 所述探针与 miR 序列和由引物引入的无关序列都相结合。然而, 由于引物设计以及 **TaqMan®** 探针的尺寸和位置, 仍然存在不能够将特定 miR 与十分相近的序列区分开的可能性。

[0397] 如图 5 所示, 这里使用的方法优选采用 3' 引物, 所述 3' 引物在 3' 端与 miR 结合, 并且具有与 miR 无关的可以或不可以在 5' 端形成茎环的延伸序列。如图 5 描述的那样, 引物的无关序列可以形成环结构 (图 5, 左手边) 或可以仅形成标记结构 (图 5, 右手边)。在任一实施例中, 3' miR 引物在逆转录酶的存在下延伸, 然后用在 3' 端具有 miR 特异性序列、在 5' 端具有无关延伸序列的 5' 和 3' 引物进行 PCR 扩增。扩增子通过 MNAzyme 很容易检测, 所述 MNAzyme 识别并与包括 5' 和 3' 引物之间区域的扩增子杂交。对 MNAzyme 感应臂与靶核酸之间互补性的严格要求使得能够区分甚至十分相近的序列。下述实施例中的实施例 5 和实施例 10 示出了使用 MNAzyme 检测通过扩增短核酸序列产生的扩增子的结果 (也参见上述图 2 中的策略 2)。此外, 实施例 5 示出了使用 MNAzyme 的方法区分仅有单一核苷酸差异的两个序列的能力。这提供了显著优势, 即甚至在扩增过程不能区分十分相近的序列时, MNAzyme 可以在得到的扩增子中区分细微的序列变化。

[0398] 11. 使用级联的方法

[0399] 本领域技术人员应当理解, 在此描述的方法可以用来实施在此定义的级联。实施在此公开这样的方法的具体实施方案包括但不限于 (1) 仅在靶的存在下使用 MNAzyme 酶切底物, 其中然后使所述底物可获得用于参与诸如产生可检测信号的第二事件, 如图 6 所示, 其中底物的酶切使得可获得可以接着酶切锚 (anchor) 的酶, 从而使荧光标记从淬灭基团解离; 或 (2) 仅在靶的存在下使用 MNAzyme 酶切底物, 其中然后使所述底物可获得用于参与第二事件, 其中所述第二事件的实施又可获得参与任意数目的后续事件的另一底物, 以使后续事件可获得参与实施较早事件的底物, 从而产生循环级联, 如图 7 和图 25 所述, 其中这样的循环级联能够用于扩增信号, 例如, 在低丰度的靶不能提供可检测信号的应用中。

[0400] 可检测作用扩增级联可以包括一个或多个核酶 / 连接酶级联、循环核酸酶级联、蛋白质酶级联或附着到载体上的一种或多种酶或上述的任意组合。

[0401] 参考图 2, 策略 3 示出了通过使用信号级联使用 MNAzyme 扩增信号的方法概况。这

将参考图 6、7 和 25 更详细地讨论。

[0402] 图 6 描述了与酶介导信号扩增联用的靶的 MNzyme 检测的代表性方法。如上讨论的那样,本发明提供其中靶被扩增的使用 MNzyme 检测的方法,以及其中产生的信号被扩增的方法。在某些实施方案中,将 MNzyme 技术与信号扩增策略相结合提供将 MNzyme 分析与靶扩增相结合的替代方案,尽管在某些情况下靶扩增与信号扩增能够一起使用。扩增信号的优选方法包括级联机制,本领域技术人员应当理解,这经常包括在生物学系统的信号扩增中。

[0403] 使用催化核酸的扩增级联的某些实施例在本领域为已知并预期在此使用。连接级联 (Paul 和 Joyce, 2004) 使用连接含有寡核苷酸的两个 RNA 以形成第二核酶 (B) 的第一核酶 (A)。然后核酶 (B) 连接含有寡核苷酸的两个其它的 RNA 以形成新的第一核酶 (A),从而引发级联反应。

[0404] 适合于在此使用的第二扩增级联使用环化 DNA 酶 / 底物分子 (Levy and Ellington, 2003)。当 DNA 酶 (A) 为环状时没有活性,但当酶切环状 DNA 酶 (A) 的第二 DNA 酶 (B) 将其线性化时开始活化。然后活性线性 DNA 酶 (A) 酶切环状 DNA 酶 (B) 分子从而将它们线性化和活化。能够彼此酶切 / 线性化的两种 DNA 酶引起催化性核酸活性的级联。

[0405] 本领域技术人员应当理解可以使用其它方法—例如将 DNA 酶与适体的多功能性结合使用和 / 或与传统蛋白质酶的催化能力结合使用 (参见例如 Zhang et al., 2005)。Zhang 的方法引起蛋白质酶的释放,所述蛋白质酶又能够催化形成可检测分子从而产生并扩增信号。Zhang 的方法允许灵敏检测,但因为每一分析都要求高度专门的分子而很昂贵。将肽与核酸偶合的方法在本领域为已知 (参见例如 Cheng et al., 1993),将 DNA 附着到载体结构上的方法也是如此。例如, Asher (PCT/US96/02380) 描述了将酶 (核酶) 拴系到不溶性载体上,所述酶在释放时酶切底物从而使用两个空间上分开的核酶启动信号扩增。

[0406] 用于体外方法的信号扩增的其它实施例在本领域中为已知,并且还能够在与已证明成功的那些相类似的技术创造信号扩增的其它策略。例如分支的 DNA 分析 (bdNA) (Urdea, 1993) 通过采用附着到介导反应的标记探针的二级报告分子 (例如碱性磷酸酶) 扩增信号。荧光相关光谱 (FCS) 采用信号的电子扩增 (Eigen 和 Rigler, 1994)。酪胺信号扩增 (TSA) (Bobrow et al., 1989 ; Adams, 1992 ; Raap et al., 1995 ; van Gijlswijk et al., 1997) 使用辣根过氧化物酶将酪胺转化成其活性形式,所述辣根过氧化物酶结合蛋白质中的酪氨酸残基。TSA 用于细胞免疫化学的多种应用中。Invader 分析 (Hall et al., 2000) 采用以下述方式与靶序列结合的两个寡核苷酸,即允许每个靶分子随时间引起超过 1000 个酶切事件的核酸酶切割,并且所述酶切反应能够与荧光探针结合。然而,对已知的信号扩增方法有限制。例如, bdNA 分析不如靶扩增方法灵敏。

[0407] 因此,进一步参考图 6,描述的是采用 MNzyme 释放的酶作为部分信号扩增策略的方法实施例。能够产生信号,例如通过底物在荧光基团部分和淬灭基团部分之间的酶切从而使信号产生。预期在此使用的酶包括,但不限于,具有可测量活性的 DNA 酶、MNzyme、核酶和蛋白质酶 (protein enzyme),如蛋白酶 (protease)、限制性核酸内切酶和其它水解酶。优选的靶是核酸序列,包括但不限于人类、动物、植物、病毒、细菌 DNA 或 RNA。其它优选的靶可以包括朊病毒、酵母或真菌,或任何其它分子,例如包括但不限于糖蛋白、脂质、脂蛋白、完整有机体、细胞、病毒、细菌、古细菌、真菌、抗体、代谢物、病原体、毒素、污染物、毒物、小

分子、聚合物、金属离子、金属盐、朊病毒或上述的任何衍生物、部分或组合。

[0408] 从图 6 可以看出,在此被指定为“酶 (Enzyme)”的代表性酶通过可酶切分子,优选核酸,附着到第一不溶性载体上。如图 6 中的实施例所示,用作酶“酶 (Enzyme)”的附着物的可酶切分子是通用或普遍性 MNzyme 底物。酶“酶 (Enzyme)”的“可酶切锚”底物也附着在不溶性载体上但不与所述第一不溶性载体接触。“酶 (Enzyme)”是具有可检测活性的任何酶,例如如上所述的 MNzyme、DNA 酶、核酶或蛋白质酶。在优选的实施方案中, MNzyme 或 DNA 酶特别有用。在自组装形成能够酶切普遍性或通用底物的寡核苷酸组分或部件酶的存在下,和 MNzyme 靶的存在下, MNzyme 形成并催化性酶切来自载体的“酶 (Enzyme)”,从而将其释放并使其接近“可酶切锚”底物并将该底物酶切。酶切“可酶切锚”从附着的底物上释放荧光基团。所述荧光基团很容易检测和测量。

[0409] 被固定或附着的酶与其底物(也优选被固定或附着到载体上)的物理分开有时候在此被称为“空间分开”。一个或多个酶能够与其各自的底物“空间分开”,也能够彼此之间“空间分开”。能够产生信号扩增级联,尤其是当第一酶的底物的酶切释放第二酶,而在酶切第二酶的底物时又释放更多的第一酶时(见图 7)。

[0410] 在优选的实施方案中,酶“酶 (Enzyme)”的底物是如图所示包含淬灭基团部分和可检测部分的双官能团底物。特别优选的实施方案是其中酶“酶 (Enzyme)”的底物是在未酶切底物中不具有可检测信号且在酶切时其可检测信号增加一个或多个量级的分子的实施方案。

[0411] 现在参考图 7,示出了使用 MNzyme 的检测和使用两个“空间分开”的酶的信号扩增的实施例。也能够使用如上所述的“空间分开”的 DNA 酶产生信号扩增级联。初始 MNzyme 酶切事件酶切固定的拴系底物,从而释放 DNA 酶 A。然后 DNA 酶 A 移动到拴系有第二 DNA 酶 B 的第二序列。DNA 酶 A 释放 DNA 酶 B,而这又释放更多的 DNA 酶 A,启动了引起信号扩增的级联。在各种实施方案中,所述靶能够是核酸序列,包括但不限于人类、病毒、细菌 DNA 或 RNA;或所述靶能够是蛋白、病毒、朊病毒、抗体、完整细胞或小分子。

[0412] 具体地,从图 7 的实施例能够看出, DNA 酶 A 通过也被 DNA 酶 B 酶切的第一普遍性 MNzyme 底物或通用底物被附着到载体上。DNA 酶 B 通过第二通用底物被附着到不溶性载体上,所述第二通用底物是 DNA 酶 A 的底物。保持两个 DNA 酶使得其各自的底物无法接近它们。在自组装形成酶切普遍性底物的 MNzyme 的部件酶的存在下,并进一步在靶的存在下, MNzyme 形成并酶切保持 DNA 酶 A 的普遍性 MNzyme 底物,从而释放 DNA 酶 A。DNA 酶 A 现在能够移动到第二通用底物。DNA 酶 A 酶切第二通用底物时,释放 DNA 酶 B 及其附着的可检测信号,在此显示为荧光基团 F。由于与保持的淬灭基团部分 Q 分开,荧光基团 F 现在是可检测的。现在能够接近其底物的释放的 DNA 酶 B 因此酶切它(第一通用底物)从而释放另外的 DNA 酶 A,这又释放更多的 DNA 酶 B 和可检测信号 F。因此,强烈的信号扩增级联被建立,其可检测信号 F 的量指数增加。

[0413] 参考图 25 能够更好地理解使用拴系的部件酶的 MNzyme 级联实施例。MNzyme 能够用来启动该图所示的信号扩增级联。该反应含有如下要素:(i) 在溶液中游离的 MNzyme1 的部件酶;(ii) 在溶液中游离(如图所示)或由底物 Sub1 拴系在不溶性载体上的 MNzyme2 和 3(具有相同的感应臂)的组装易化子;(iii) 由底物 Sub1 拴系在不溶性载体上的 MNzyme2 的部件酶。Sub1 能够被 MNzyme1 酶切(在靶分析物的存在下),也能够

被 MNAzyme3 酶切（在组装易化子的存在下），并且酶切引起 MNAzyme2 的部件酶释放至溶液中；(iv) 由底物 Sub2 拴系在不溶性载体上的 MNAzyme3 的部件酶。Sub2 能够被 MNAzyme2 酶切（在组装易化子的存在下），并且酶切引起 MNAzyme3 的部件酶释放至溶液中；(v) 具有与 Sub2 相同的序列但在溶液中游离并用荧光基团 (F) 和淬灭基团 (Q) 双重标记的 Sub2-FQ。Sub2-FQ 能够被 MNAzyme2 酶切以产生荧光信号。

[0414] 在靶分析物的存在下，从溶液中游离的部件酶形成活性 MNAzyme1。MNAzyme1 酶切其 Sub1 从而释放 MNAzyme2 的部件酶。这些部件酶一旦游离，便与组装易化子杂交并形成 MNAzyme2，所述 MNAzyme2 酶切游离的 Sub2-FQ（产生荧光信号）或拴系的 Sub2（释放 MNAzyme3 的部件酶）。由于 MNAzyme3 与 MNAzyme1 具有相同的底物臂，它也能够酶切拴系的 Sub1，从而释放 MNAzyme2 的更多部件酶。这引起了更多酶 (MNAzyme) 的组分（部件酶）的酶促产生级联和伴随的信号扩增级联。

[0415] 12. 甲基化核酸的检测、鉴定和定量方法

[0416] MNAzyme 介导的信号产生使得能够区分完全匹配的核酸序列与含有错配的核酸序列。这样的能力使 MNAzyme 能用来检测、鉴别和定量甲基化核酸。

[0417] 与诸如癌症、糖尿病、自身免疫疾病和精神失常的疾病相关的甲基化模式的改变经常发生。目前用于甲基化分析的大多数方法都以亚硫酸氢盐修饰基因组 DNA 开始。亚硫酸氢盐修饰将未甲基化的而不是甲基化的胞苷转化成尿苷。如果然后通过例如 PCR 扩增亚硫酸氢盐修饰的核酸，则胸苷取代尿苷并且胞苷取代甲基化胞苷。修饰的扩增子能够用允许区分含有 T（在最初含有未甲基化 C 的位置）和 C（在最初含有甲基化的 C 的位置）的序列的各种方法进行分析。

[0418] MNAzyme 区分十分相近序列的能力使这一技术非常适合于区分最初甲基化或未甲基化的亚硫酸氢盐修饰的序列。参考实施例 11 可以更好地理解这一方法。此外，MNAzyme 能够提供直接分析甲基化与未甲基化的 DNA 而无需用亚硫酸氢盐修饰的新方法。这提供了显著的优势因为亚硫酸氢盐修饰费力、耗时而且对于待分析的核酸有破坏性。

[0419] 已经使用带有具有截短的感应臂的部件酶的稳定因子臂来论证 MNAzyme 检测存在于组装易化子中的单一核苷酸多态性的能力（实施例 22）。在该实施例中使用的实验条件下，具有截短的（5 个碱基）感应臂的部件酶在远超过其预期解链温度之上的温度具有功能。具有稳定因子臂的系统和具有截短的感应臂的部件酶对靶中的小改变非常敏感，并且可在高度严紧的温度下使用。这样的检测策略能够进一步扩展到直接区分在特定的胞苷残基上甲基化或未甲基化的靶，不需要之前的亚硫酸氢盐修饰。

[0420] 相对于未甲基化的胞苷，5-甲基胞苷的存在使 DNA 的解链温度增加，每一甲基化碱基增加 1.3°C。当在适合于在甲基化靶的存在下杂交和活性 MNAzyme 组装但是对于在未甲基化靶的存在下的 MNAzyme 组装太高的温度下温育部件酶、稳定因子臂和底物时，信号会仅在甲基化靶的存在下产生。这提供了直接分析甲基化模式的新策略，所述甲基化模式能够提供作为癌症和其它疾病的标记物的甲基化碱基的检测方法。

[0421] 因此，本领域技术人员会很容易理解和知道，预期将在此公开的温度的实验参数的最优化包括在本发明方法的范围之内，而且这样的优化尤其可用于实施与直接或在亚硫酸氢盐修饰之后检测甲基化 DNA 相关的方法。

[0422] 13. 核酸序列变异的检测和鉴定方法

[0423] 本发明还提供检测和鉴别序列变异的方法,所述方法基于 MNAzyme 介导的信号产生使得能够区分完全匹配的核酸序列与含有错配的那些核酸序列。

[0424] 能够通过本发明的方法检测的序列变异包括但不限于添加、删除、取代、转换、重复、易位、移码序列变异、无义序列变异或上述的任意组合。

[0425] 该方法可以应用于任何需要检测和 / 或鉴别核酸序列变异的情形,包括但不限于疾病或患所述疾病的素因的诊断、多态性的鉴别或核酸复制准确性的评价。此外,也可以检测更大的改变,如与各种癌症类型相关的易位,所述易位引起融合转录。这些情形的发生经常与白血病相关。例如, PML/RAR α 融合转录与急性早幼粒细胞白血病相关, bcr/abl 融合转录与慢性粒细胞白血病相关。

[0426] MNAzyme 介导的靶检测能够通过部件酶感应臂和组装易化子的 Watson-Crick 碱基识别进行。能够采用对互补性的要求以检测小的序列变异,包括但不限于部件酶感应臂和组装易化子之间的单个碱基错配。参考实施例 5、19 和 22 可以更好地理解区分序列变异的能力。

[0427] 那些实施例均证实了 MNAzyme 区分感应臂和组装易化子完全匹配的情形与有至少单个碱基错配或多态性的情形的能力。

[0428] 区分单个碱基错配的能力依赖于多个因素,包括:(a) 反应条件的严紧性,能够被包括温度、盐浓度、阳离子浓度的多种因素影响;(b) 错配的类型;(c) 部件酶臂中错配的位置;和(d) 部件酶臂的长度。根据本申请,能够调整反应的严紧性使之不耐受或耐受感应臂和组装易化子之间一定程度的错配。严紧的条件使得能够区分十分相近的序列变异,如单个核苷酸的差异。更低的严紧性条件不可以区分序列十分相近的组装易化子。因此,可以用该方法以单个 MNAzyme 在单个反应中同时检测一组十分相近的序列。

[0429] 能够通过使用具有截短感应臂的部件酶扩展对单个核苷酸多态性的区分(图 23 和实施例 22)。截短感应臂能够通过稳定因子寡核苷酸组分进行稳定,所述稳定因子寡核苷酸组分虽然是单独的分子,但能够视作截短部件酶的第二组分,它与截短感应臂相邻地结合。

[0430] 14. 用于检测、鉴定和 / 或定量细菌和病毒的 MNAzyme

[0431] 本发明包括检测细菌、病毒或任何其它微生物的方法,例如通过设计适合于与任何分子如待检测、鉴别和 / 或定量的微生物独有的核酸杂交的 MNAzyme 感应臂。另外或可选地,可以检测许多微生物,例如包括但不限于革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌。该方法的进一步变化在本领域技术人员的预期范围内,包括但不限于,使用适合于与待检测、鉴别和 / 或定量的微生物独有的蛋白、小分子、细胞、细胞组分或细胞产物如毒素相结合的适体。

[0432] 细菌和病毒含有能够为用 MNAzyme 技术进行快速灵敏鉴别、检测和 / 或定量提供模板的 DNA 和 / 或 RNA。细菌和病毒种类和株之间的序列变异能够用于各种类与株之间的灵敏区分。复合 MNAzyme 方法尤其优选用于同时检测和 / 或区分多种细菌或病毒种类、株或分离株。

[0433] 或者,细菌或病毒种类和株中具有序列相似性的区域能够用来在单一 MNAzyme 分析中鉴别任何一组种类和株的存在与否。图 15 例示了这后一种方法,其中在细菌核糖体 16S 序列中发现的保守区域用作分析的基础,以取代用于快速释放测试无菌状态和 / 或支原体污染的革兰氏染色的细菌测试。

[0434] 例示使用 MNAzyme 检测和定量 HIV-1 病毒 RNA 的实施例 16 论证了把 MNAzyme 用作病毒检测和定量的灵敏工具。

[0435] 15. 试剂盒

[0436] 本发明也提供了用于实践在此公开的方法的试剂盒。通常,实施本发明方法的试剂盒含有实施本方法的所有必需试剂。例如,在一实施方案中试剂盒可以包含第一容器和第二容器,所述第一容器含有包含第一和第二部件酶的至少第一和第二寡核苷酸组分,所述第二容器包含底物,其中第一和第二部件酶和底物自组装成 MNAzyme 需要存在于测试样品中的组装易化子的协助。因此,在这样的实施方案中,所述第一和第二部件酶以及所述底物可以应用于测试样品以便确定所述组装易化子的存在,其中所述组装易化子包含靶。

[0437] 通常,本发明的试剂盒也会包含一个或多个其它的容器,其含有例如洗涤剂和/或在实施本发明的方法中需要的其它试剂。

[0438] 在本发明的背景下,间隔化的试剂盒包括其中试剂包含在独立容器中的任何试剂盒,并可以包括小玻璃容器、塑料容器或塑料条或纸条。这样的容器使得可以从一个隔间向另一隔间进行高效的试剂转移,同时避免样品与试剂的交叉污染,并且每一容器中的试剂或溶液可以定量地从一个隔间加入另一隔间。这样的试剂盒也可以包括会接受测试样品的容器、含有在分析中使用的试剂的容器、含有洗涤剂的容器和含有检测试剂的容器。通常,本发明的试剂盒也会包括使用试剂盒组分实施适当方法的说明书。本发明的试剂盒和方法可以与自动分析仪器及系统结合使用,例如,包括但不限于实时 PCR 仪器。

[0439] 对于检测、鉴别或定量不同靶的应用,本发明的单一试剂盒可能是适合的,或者可选地为不同的试剂盒,例如含有对每一靶具有特异性的试剂。本发明的方法和试剂盒可以应用于其中要求检测、鉴别或定量任何实体的任何情形。

[0440] 现在将参考如下具体的实施例更详细地进一步描述本发明,这些实施例不应以任何方式解释为对本发明范围的限制。

实施例

[0441] 在如下实施例中,基于分裂 10:23 或 8:17DNAzyme 的催化核的某些 MNAzyme 设计适合于各种靶核酸和底物(表 3)。这些靶底物系统已经在各种反应条件下测试过并被证明很强健。

[0442] 在如下实施例中使用的 MNAzyme 设计和特异性部件酶的实例列于表 3 中。将部件酶命名为使得该名称(例如 R 04A1/1)纳入对靶结构域(例如 RPLP0 外显子 4 的 R04)、MNAzyme 催化活性必需的结构域(例如 A1)和底物结构域(例如 SubBi-1 的 1)的引用。

[0443] 表 3: 示例性 MNAzyme 和底物。工作实施例中使用的特异性部件酶

[0444]

| MNAzyme 设计 (催化核) | 部件酶 A 和 B | 特异性部件酶 靶 底物 | 实施例 (图) |
|---------------------|--------------|---|------------------------------|
| 1 (8:17) | A1: B1 | RO4A1/1: RO4B1/1 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-1-FB (1) | 1 (8) |
| 2 (8:17) | A1: B2 | RO4A1/1: RO4B2/1 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-1-FB (1) | 1 (8) |
| 3 (8:17) | A1: B3 | RO4A1/1: RO4B3/1 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-1-FB (1) | 1 (9, 10) |
| 4 (8:17) | A2: B3 | RO4A2/1: RO4B3/1 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-1-FB (1) | 1 和 4 (10, 14) |
| | | miR20A2/1: miR20B3/1 MiR-20 SubBi-1-FB (1) | 2, 5 和 6 (11, 12, 15, 16) |
| | | AtpA2/1: Atp B3/1 ATP 和 dATP SubBi-1-FB (1) | 18 |
| | | TaqA2/1: AtpB3/1 Taq 聚合酶 SubBi-1-FB (1) | 21 |
| | | miR143 A2/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1) | 12 |
| | | miR143 A2/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1) | 12 |
| | | miR143 A2H/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1) | 12 |
| | | miR143 A2H/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1) | 12 |
| 5 (10:23) | A3: B4 | RO5A3/2: RO5B4/2 RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 3 (13) |
| 6 (10:23) | A4: B5 | RO5A4/2: RO5B5/2 RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 3 (13) |
| | | RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-3-FB (3) | 8 (17) |

[0445] 表 3(续): 示例性 MNAzyme 和底物。工作实施例中使用的特异性部件酶

[0446]

| MNAzyme 设计 (催化核) | 部件酶 A 和 B | 特异性部件酶 靶 底物 | 实施例 (图) |
|---------------------|--------------|---|------------|
| | | RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-3-Q6B2 (3) | 13 |
| | | RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-3-JB (3) | 9 (19) |
| | | RO5A4/4-P: RO5B5/4-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-4-JB (4) | 14 |
| | | RO5A4/2-P: RO5B5(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |
| | | RO5A4/2-P: RO5B5/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2 (2) | 24 |
| | | miR20A4/2: miR20B5/2 miR-20 SubBi-2-FB (2) | 9 (19) |
| | | PCR7aA4/2-P: PCR7aB5/2-P Let-7a SubBi-2-FB (2) | 10 |
| | | BaA4/2-P: BaB5/2-P B-肌动蛋白 SubBi-2-JB (2) | 13 |
| | | BaA4/7-P: BaB5/7-P B-肌动蛋白 SubBi-7-FB (7) | 14 |
| | | BCRA4/6-P: BCRB5/6-P BCR SubBi-6-TRB2 (6) | 13 和 14 |
| | | HPRTA4/7-P: HPRTB5/7-P HPRT SubBi-7-FB (7) | 13 |
| | | HPRTA4/2-P: HPRTB5/2-P HPRT SubBi-2-A350B (2) | 14 |
| | | RO4A4/3-P: RO4B5/3-P RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-3-Q6B2 (3) | 14 |
| | | RO4A4/3-5b: RO4B5/3-3b RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-3-FB (3) | 24 |
| | | NefA4/6-P: NefB5/6-P HIV-1 Nef SubBi-6-TRB2 (6) | 16 |
| | | XdA4/2-P: XdB5/2-P Xd SubBi-2-FB (2) | 22 (23) |
| 7 (10:23) | A5:B6 | p16A5/3-P: p16B6/3-P p16 SubBi-3-FB (3) | 11 |

[0447] 表 3(续): 示例性 MNAzyme 和底物。工作实施例中使用的特异性部件酶

[0448]

| MNAzyme 设计 (催化核) | 部件酶 A 和 B | 特异性部件酶 靶 底物 | 实施例 (图) |
|---------------------|--------------|---|------------|
| | | 16S1A5/2-P: 16S1B6/2-P 细菌核糖体 16 S SubBi-2-FB (2) | 15 |
| | | RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2(11G)-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 19 (22) |
| | | RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2(11C)-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 19 (22) |
| | | RO5A5/2(22)-P: RO5B6(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |
| | | RO4A5/2: RO4B6/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2-G14A: RO4B6/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2-A12T: RO4B6/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2-A11T: RO4B6/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2-A9T: RO4B6/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2: RO4B6/2-C7A RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5/2: RO4B6/2-T4C RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 17 |
| | | RO4A5(18)/2-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |
| | | RO4A5(18)/2-rA9-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |
| | | RO4A5(18)/2-rG14-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |
| | | RO4rA5(18)/2: RO4B6 (19)/2-P RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |
| | | RO4A5(18)/2-P: RO4rB6(19)/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |
| | | RO4rA5(18)/2: RO4rB6(19)/2 RPLPO 外显子 4 (RO4) SubBi-2-FB (2) | 23 |

[0449] 表 3(续): 示例性 MNAzyme 和底物。工作实施例中使用的特异性部件酶

[0450]

| MNAzyme 设计 (催化核) | 部件酶 A 和 B | 特异性部件酶 靶 底物 | 实施例 (图) |
|------------------|-----------|--|---------|
| 8 (10:23) | A6:B7 | RO5A6(22)/2-P: RO5B7(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |
| 9 (10:23) | A7:B8 | RO5A7(22)/2-P: RO5B8(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |
| 10 (10:23) | A8:B9 | RO5A8(22)/2-P: RO5B9(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |
| 11 (10:23) | A9:B10 | RO5A9(22)/2-P: RO5B10(16)/2-P RPLPO 外显子 5 (RO5) SubBi-2-FB (2) | 20 |

[0451] 实施例 1 :MNAzyme 直接检测靶核酸的应用 (人类 RPLPO 序列)

[0452] 1.1 部件酶寡核苷酸

[0453] 测试了基于 8:17DNA 酶的对于 MNAzyme 的四个设计 (图 8-10)。本领域技术人员应当理解,“N”表示的感应臂 (靶结合) 序列可以用任何已知核酸靶的靶特异性序列代替 (图 8-10)。与报告底物结合的底物臂序列能够是通用的并且能够用于许多靶。本领域技术人员应当理解,图 8-10 中“N”表示的底物序列可以用 DNA、RNA 或 DNA/RNA 嵌合序列代替,用“r”表示的那些可以用其它和 / 或不同数目的核苷酸序列代替。

[0454] 在用于测量在图 8-10 中描述的 RPLPO MNAzyme 催化活性的实验中,设计针对 RPLPO 基因的靶外显子 4 的 A 和 B 寡核苷酸部件酶。A 和 B 部件酶的序列从 5' 到 3' 如下所示,其中加下划线的碱基形成组装 MNAzyme 的至少部分活性催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0455] SEQ ID NO:1: 部件酶 A1R04A1/1:

[0456] **GCTGGTCATCCAGCA** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0457] SEQ ID NO:2: 部件酶 A2R04A2/1:

[0458] **GCTGGTCATCCAGCAG** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0459] SEQ ID NO:3: 部件酶 B1R04B1/1:

[0460] *CATCTCTTCT* CCGTCGAA **GTGTTTCGACAATGGC**

[0461] SEQ ID NO:4: 部件酶 B2R04B2/1:

[0462] *CATCTCTTCT* CCG **GTGTTTCGACAATGGC**

[0463] SEQ ID NO:5: 部件酶 B3R04B3/1:

[0464] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GTGTTTCGACAATGGC**

[0465] 1.2. 报告底物

[0466] 通过酶切双重标记的核酸报告底物监测 MNAzyme 的活性。报告底物是含有先前已经用作 8:17DNA 酶的底物的 RNA 和 DNA 碱基的嵌合序列 (Li et al., 2000)。在当前实施例中,报告底物被命名为 SubBi-1-FB 并具有内部标记,分别是附着到 RNA 碱基核苷酸 5' 端的

6-羧基荧光素 (“6-FAM”), 和附着到 RNA 碱基核苷酸 3' 端的黑孔淬灭基团 1 (“BHQ1”) 部分。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测 MNzyme 对于 SubBi-1-FB 的酶切。SubBi-1-FB 的标记序列如下, 5' 到 3', 加下划线的碱基提示 6-FAM 和 BHQ1 部分的位置。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。

[0467] SEQ ID NO:6:SubBi-1 - FB:

[0468] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0469] 1. 3. 对照 MNzyme 序列

[0470] 通过使对催化核的形成至关重要的 A1 寡核苷酸中的单个碱基突变使杂交对照 (无活性的 MNzyme) 失活。尽管报告底物和靶序列仍然能够与 MNzyme 结合, 由于 MNzyme 催化核的修饰, 底物不能被酶切。由于杂交时报告底物的构象改变, 报告底物与部件酶分子的结合本身可以产生荧光的测量值。将使用突变的 A1 部件酶分子 (R04A1mut) 的对照包括在内并将其命名为杂交对照。突变的 MNzyme 序列例示如下, 被改变为 T 的 G 碱基的位置加有下划线。

[0471] SEQ ID NO:7: 突变体部件酶 A

[0472] R04A1mut/1:GCTGGTCATCCAGCACGGTCTAAATAGTGAGT

[0473] 1. 5. 靶

[0474] 该实施例的靶序列是寡核苷酸, R04/1 靶, 其具有与人类 RPLP0 基因的外显子 4 的片段相同的序列。R04/1 靶的序列如下, 从 5' 到 3' 书写。

[0475] SEQ ID NO:8R04/1 靶:

[0476] GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

[0477] 为了保证当存在不正确的靶序列时不能检测到信号, “脱靶” 效应通过使用 $3 \mu\text{g} \lambda$ DNA (PROMEGA) 或无关序列的合成的阴性对照寡核苷酸 (R04/1mut 靶) 来确定。

[0478] SEQ ID NO:9R04/1mut 靶:

[0479] CGACCATTAGGTCGTCCACAAGCTGTTACCG

[0480] 1. 5. 反应组分

[0481] 靶序列的检测通过由催化活性 MNzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 $25 \mu\text{L}$ 。所有的反应在 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光, 总共读 10 分钟。表 4 中的所有反应含有在 Tris HCl 中的 $1 \mu\text{M}$ SubBi-1-FB ($\text{pH}9.0$, 25°C) 和 25mM MgCl_2 的散装混合物。

[0482] 表 4: 用于检测核酸的反应组分

| 设计 | MNAzyme 反应 | 部件酶 | | 靶 | 图 |
|----|------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|------|
| | | A | B | | |
| 1 | 靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B1/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | 图 8 |
| | 无靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B1/1 | 水 | |
| 2 | 靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B2/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | 图 9 |
| | 无靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B2/1 | 水 | |
| 3 | 靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | 图 9 |
| | 无靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 水 | |
| | 脱靶 1 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 1 μ M RO4/1mut 靶 | |
| | 脱靶 2 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 3 μ g λ DNA | |
| | 杂交对照 | 1 μ M RO4A1mut/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | |
| | 仅部件酶 A | 1 μ M RO4A1/1 | - | 1 μ M RO4/1 靶 | |
| 3 | 靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | 图 10 |
| | 无靶 | 1 μ M RO4A1/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 水 | |
| 4 | 靶 | 1 μ M RO4A2/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 1 μ M RO4/1 靶 | 图 10 |
| | 无靶 | 1 μ M RO4A2/1 | 1 μ M RO4B3/1 | 水 | |
| 全部 | 背景 | - | - | - | - |

[0484] 首先测试实验期间使用的 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平, 因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0485] 1.6. 结果: 检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0486] 设计 1 和 2MNAzyme 示出了在本实验的条件下报告底物的靶依赖酶切的一点证据 (图 8)。有和没有靶 RPLP0 寡核苷酸靶的反应的荧光相似。对于设计 3 (图 9 和 10) 和设计 4 (图 10), 加入靶 RPLP0 寡核苷酸导致荧光增加。这与在靶核酸的存在下形成活性 MNAzyme 引起报告底物在荧光基团和淬灭基团染色对之间酶切而导致荧光增加相一致。无靶对照的荧光低于含有靶的反应的荧光并且没有一个对照反应显示荧光随时间增加 (图 8-10)。这表明在含有靶的反应中产生的荧光增加是由于催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装, 所述 MNAzyme 然后酶切报告底物。对于 RPLP0 系统设计 4 的酶切效率大于设计 3 (图 10)。

[0487] 设计 3 示出脱靶、杂交、仅部件酶 A 和仅部件酶 B 的对照反应 (图 9)。这些对照的荧光水平比无靶反应低或相似。没有一个对照反应显示荧光随时间增加。这些结果进一步表明报告底物的酶切依赖于部件酶 A 和部件酶 B 寡核苷酸两者以及靶核酸序列的存在,所述部件酶 A 和部件酶 B 寡核苷酸是活性 MNAzyme 的组装所必需的。

[0488] 实施例 2:用于检测 miR-20 或与 miR-20 具有同源性的短 DNA 序列的 MNAzyme

[0489] 2.1. 部件酶寡核苷酸

[0490] 使用 MNAzyme 的检测也能够用来分析 miR。在本实施例中, MNAzyme 仅在存在正确的 miR 序列时形成。这样的 MNAzyme 能够区分相关的 miR 序列例如 hsa-miR-20 和 hsa-miR-93。

[0491] 在为测量图 11 中描述的 MNAzyme 的催化活性而进行的实验中,将 A 和 B 部件酶寡核苷酸设计成靶向 hsa-miR-20。部件酶 A 和 B 寡核苷酸的序列从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0492] SEQ ID NO:10: 部件酶 A2:

[0493] miR20A2/1: **TACCTGCACTA** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0494] SEQ ID NO:11: 部件酶 B3:

[0495] miR20B3/1: *CATCTCTTCT* CCGAGC **TAAGCACTTTA**

[0496] 2.2. 报告底物

[0497] 通过酶切双重标记的核酸报告底物监测 MNAzyme 活性。本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB,其序列从 5' 到 3' 如下所示。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端的 6-FAM 部分和 3' 端的 BHQ1 部分的位置。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测在 FAM 和 BHQ1 之间的核苷酸处酶切 SubBi-1-FB 所引起的荧光改变。

[0498] SEQ ID NO:6:SubBi-1 - FB:

[0499] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0500] 2.3. 靶

[0501] 本实施例的靶序列是 DNA 寡核苷酸, D-20, 其具有与 RNA hsa-miR-20 (图 11(i)) 同源的序列。D-20 靶的序列如下所示,从 5' 到 3' 书写。

[0502] SEQ ID NO:12:D-20 靶:

[0503] TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

[0504] 2.4. 对照序列

[0505] 被开发用来检测微小 RNA 的任何分析都必须特异地区分想要的 miR 序列例如 hsa-miR-20 与相关序列如 hsa-miR-17-5p, 所述 hsa-miR-17-5p 可以与靶 miR 具有一个或多个碱基不同 (图 11(i))。hsa-miR-20 相关的“脱靶”17-5p、93、106a 和 106b miR 寡核苷酸也被合成为 DNA 并从 5' 到 3' 写在下面。

[0506] SEQ ID NO:13:D-17-5p 靶:

[0507] CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

[0508] SEQ ID NO:14:D-93 靶:

[0509] AAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG

[0510] SEQ ID NO:15:D-106a 靶：

[0511] AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGC

[0512] SEQ ID NO:16:D-106b 靶：

[0513] TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT

[0514] 2.5. 反应条件

[0515] 靶序列的检测通过由催化活性 MNzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光, 总共读 4 分钟。表 5 中的所有反应含有由 1 μ M SubBi-1-FB、Tris HCl (pH9.0, 25°C) 和 25mM MgCl₂ 组成的散装混合物。

[0516] 表 5: 如图 11 所示检测核酸靶的反应组分

| MNzyme 反应 | 模板 | 部件酶 A | 部件酶 B |
|------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| 靶 | 1 μ M D-20 | 1 μ M miR20A2/1 | 1 μ M miR20B3/1 |
| 无靶 | 水 | | |
| 脱靶 D-17-5p | 1 μ M D-17-5p | | |
| 脱靶 D-93 | 1 μ M D-93 | | |
| 脱靶 D-106a | 1 μ M D-106a | | |
| 脱靶 D-106b | 1 μ M D-106b | 1 μ M miR20A2/1 | - |
| 仅 A 部件酶 | 1 μ M D-20 | | |
| 仅 B 部件酶 | 1 μ M D-20 | - | 1 μ M miR20B3/1 |

[0518] 首先测试实验期间使用的 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平, 因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0519] 也在 5mM 和 100mM MgCl₂ 浓度的存在下进行了含靶、“无靶”和“脱靶”反应并与 25mM MgCl₂ 比较 (图 12)。

[0520] 2.6. 结果: 检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0521] MNzyme 的部件酶 A 和 B 寡核苷酸仅在靶序列的存在下组装成催化活性 MNzyme。在本实施例中脱靶对照与感应臂 (miR-20 靶结合序列) 的差异小到仅有两个错配碱基。“脱靶”D-17-5p 有两个错配碱基, 其中仅有一个在位于 miR-20 序列中间的最有差别的区域发生。含有靶序列 D-20 的酶切反应与无靶对照 (图 11(iii)) 相比信号增加 26 倍。这与脱靶对照相比较, D-17-5p 和 D-106a 与无靶对照相比信号增加 3.5 倍, 而 D-93 和 D-106b 与无靶对照相比信号没有增加 (图 11(iii))。因此, D-20 与相关序列的差异证实了 MNzyme 系统区分仅几个碱基不同的序列的能力。先前使用单分子 DNA 酶的研究已经证实 DNA 酶具有区分单个碱基突变的能力 (Impey et al., 2000)。MNzyme 也可以区分单个碱基的改变 (见下文的实施例 5)。

[0522] “仅部件酶 A”和“仅部件酶 B”的对照具有与背景荧光相似 (数据未显示) 的荧光。

[0523] 使用蛋白质酶要求反应中的其它试剂处在对于蛋白质酶活性来说最佳的浓度下。例如, 辅助 DNA 酶酶切报告底物的金属离子辅因子的浓度在使用酶样聚合酶的方法中维

持在最低值。使用 MNAzyme 的直接检测不需要任何蛋白质酶因此能够为快速底物酶切而优化反应条件。在这些反应中能够增加金属离子辅因子例如 Mg^{2+} 以优化 MNAzyme 的催化速率。图 12 示出如何能够将 $MgCl_2$ 的浓度增加到靶检测方法正常不能耐受的水平。在高 $MgCl_2$ (100mM) 时 MNAzyme 的催化效率较高。此外,当检测 D-20 靶时 $MgCl_2$ 的增加不影响反应的特异性,因为仍然能将 D-20 靶清楚地与相关的序列 D-17-5p 靶、D-106a 靶、D-93 靶和 D-106b 靶进行区分。

[0524] 实施例 3 :用于直接检测核酸靶的 MNAzyme (设计 5 和 6)

[0525] 3.1. 部件酶寡核苷酸

[0526] 测试基于 10:23DNA 酶的 MNAzyme 的设计 5 和 6 的催化活性 (图 13)。本领域技术人员应当理解,“N”表示的感应臂 (靶结合) 序列可以用任何已知核酸靶的靶特异性序列代替。与报告底物结合的底物臂序列能够是通用的并且能够用于许多靶。本领域技术人员应当理解,图 13 中“N”表示的底物序列可以用 DNA、RNA 或 DNA/RNA 嵌合序列代替。

[0527] 在进行测量在图 13 中描述的 RPLPO MNAzyme 催化活性的实验中,设计靶向 RPLPO 基因的外显子 5 的 A 和 B 寡核苷酸部件酶。A 和 B 部件酶的序列从 5' 到 3' 如下所示,其中加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 中既非加下划线、黑体也非斜体的序列优选形成例如图 13 中描述的茎结构 (见例如,设计 5)。

[0528] SEQ ID NO:17 部件酶 A3R05A3/2:

[0529] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC** CGCACAACGA *GAGGAAACCTT*

[0530] SEQ ID NO:18 部件酶 B4R05B4/2:

[0531] *TGCCCAGGGA* GGCTAGCTGCG **GTGGAGACGGATTACACCTTC**

[0532] SEQ ID NO:19 部件酶 A4R05A4/2:

[0533] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCT** ACAACGA *GAGGAAACCTT*

[0534] SEQ ID NO:20 部件酶 B5R05B5/2:

[0535] *TGCCCAGGGA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC**

[0536] 3.2. 报告底物

[0537] 本实施例的报告底物是 SubBi-2,其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-FB。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0538] SEQ ID NO:21 SubBi-2-FB:

[0539] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0540] 3.3. 靶序列

[0541] 本实施例中的靶序列是合成的寡核苷酸 R05/1 靶,其序列从 5' 到 3' 如下所示。该靶序列具有与 RPLPO 基因外显子 5 部分相同的序列。

[0542] SEQ ID NO:22R05/1 靶:

[0543] GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

[0544] 3.4. 反应组分

[0545] 靶序列的检测通过由催化活性 MNzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有反应在 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 55°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光, 总共读 5 分钟。表 6 中的所有反应含有 1 μ M SubBi-1-FB、Tris HCl (pH9.0, 25°C) 和 25mM MgCl₂。

[0546] 表 6: 如图 13 所示用于检测核酸靶的反应组分

| 设计 | 部件酶 A (1 μ M) | 部件酶 B (1 μ M) | MNzyme 反应 | 靶 |
|----------|----------------------|----------------------|--------------|-----------------|
| [0547] 5 | RO5A3/2 | RO5B4/2 | 靶 | 1 μ M RO5/1 |
| | | | 无靶 | 水 |
| 6 | RO5A4/2 | RO5B5/2 | 靶 | 1 μ M RO5/1 |
| | | | 无靶 | 水 |

[0548] 首先测试实验期间使用的 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平, 因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0549] 3.5. 底物的检测和酶切

[0550] 使用设计 5 和 6 的 MNzyme 的含靶反应表明与无靶对照 (图 13ii) 相比, 上插图和下插图各自的荧光随时间增加。这表明部件酶寡核苷酸仅在靶序列的存在下组装形成催化活性 MNzyme 并酶切报告底物。无靶对照没有显示荧光的增加, 表明没有发生酶切。设计 6 的酶切速率比设计 5 快很多。

[0551] 实施例 4: 使用 MNzyme 检测来自体外 PCR 扩增核酸序列的扩增子

[0552] 4.1. 部件酶寡核苷酸

[0553] MNzyme 也能够用于检测来自体外扩增核酸序列的扩增子。对于本实施例, 检测扩增子以两步法进行, 但也可以在单一反应中进行。在这种情况下, 用来检测扩增子的寡核苷酸以设计 4 为基础, 所述设计 4 使用检测人类 RPLP0 基因的寡核苷酸 R04A2/1 和 R04B3/1 (图 10)。A 和 B 部件酶寡核苷酸如下所示。在如下的序列中, 加下划线的碱基形成组装的 MNzyme 的部分催化核, 黑体碱基与靶杂交, 斜体碱基与底物杂交。

[0554] SEQ ID NO:2 部件酶 A2R04A2/1:

[0555] **GCTGGTCATCCAGCAG** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0556] SEQ ID NO:5 部件酶 B3R04B3/1:

[0557] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GTGTTTCGACAATGGC**

[0558] 4.2. 报告底物

[0559] 本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端处 6-FAM 部分和 3' 端处 BHQ1 部分的位置。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-1-FB 的酶切。

[0560] SEQ ID NO:6 SubBi-1 - FB:

[0561] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0562] 4.3. PCR 扩增人类 RPLP0 基因的引物

[0563] 本实施例的靶序列使用如下所示的 PCR 引物通过体外 PCR 扩增来自 RPLPO 基因的外显子 4 的序列产生,所述 RPLPO 基因来自从 K562 (PROMEGA) 细胞系提取的人类基因组 DNA。

[0564] SEQ ID NO:23 引物 5R04/3:

[0565] CAAGACTGGAGACAAAGTG

[0566] SEQ ID NO:24 引物 3R04/2:

[0567] GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

[0568] 4.4. 对照靶寡核苷酸

[0569] 合成寡核苷酸并将其用作 RPLPO 序列的阳性对照。在这些实验中,对照寡核苷酸不通过 PCR 扩增。

[0570] SEQ ID NO:8R04/1 靶:

[0571] GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

[0572] 4.5. 反应组分:PCR 扩增 RPLPO 基因

[0573] RPLPO 基因的 PCR 扩增以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的扩增反应在 **GeneAmp**[®] PCR 系统 9700 热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行。循环参数是 95 $^{\circ}$ C 7 分钟、95 $^{\circ}$ C 5 秒钟和 65 $^{\circ}$ C (每一循环温度降低 1 $^{\circ}$ C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95 $^{\circ}$ C 5 秒钟和 55 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 50 个循环。所有的反应含有 40nM5R04/3 和 200nM3R04/2、3mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、1x Immobuffer (Bioline) 和 1 单位 Immolase (Bioline), 含有或不含有 500ng K562 人类基因组 DNA (PROMEGA)。

[0574] 4.6. 反应组分:检测靶序列

[0575] 靶序列的检测通过由催化活性 MNazyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 **SmartCycler**[®] 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40 $^{\circ}$ C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光,总共读 10 分钟。表 7 中的所有反应含有 1 μ M SubBi-1-FB、Tris HCl (pH9.0, 25 $^{\circ}$ C 时) 和 25mMMgCl₂ 的散装混合物。寡核苷酸部件酶 A 和 B 的浓度是 1 μ M。

[0576] 表 7: 体外 PCR 后用于检测 RPLPO DNA 扩增子的反应组分。使用设计 4 的 MNazyme 系统 (R04A2/1:R04B3/1)

| | RPLPO MNazyme 反应 | 靶 |
|--------|-------------------------|--|
| [0577] | 靶-寡核苷酸(阳性对照 RPLPO) | 10 ¹² 拷贝 RO4/1 靶寡核苷酸 |
| | 靶-PCR 产物 RPLPO (测试) | 5 μ L RPLPO PCR 产物(与 100ng 基因组 DNA 相当) |
| | 无靶(阴性对照 RPLPO) | 5 μ L 水 |
| | 非扩增基因组 DNA (阴性对照) | 5 μ L 含 500 ng 基因组 DNA |

[0578] 首先测试实验期间使用的 **SmartCycler**[®] 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平,因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0579] 4.7. 结果:检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0580] 用于检测 RPLPO 外显子 4 的 MNazyme 设计 4 表明,当靶 RPLPO 序列是从人类基因组

DNA 通过 PCR 扩增时, 荧光随时间增加 (图 14)。RPLPO 扩增子的荧光增加与可见到的 1012 拷贝的阳性对照 R04/1 靶寡核苷酸的荧光增加相似。无靶对照的荧光低于含靶反应中的荧光并且没有一个阴性反应显示荧光随时间增加。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNzyme 的靶依赖性组装。

[0581] 实施例 5 : 使用 MNzyme 检测体外 PCR 扩增短核酸序列产生的扩增子

[0582] 5.1. 部件酶寡核苷酸

[0583] MNzyme 能够用来检测来自体外扩增核酸序列的扩增子。在本实施例中扩增和检测用三步法进行 (图 5) 但是逆转录、PCR 扩增和检测也可以在单一反应管中同时进行。对于本实施例, 用来检测扩增子的寡核苷酸使用被设计用来检测 hsa-miR-20 的设计 4、miR 部件酶 A 和 B 寡核苷酸 (图 11)。MNzyme 部件酶寡核苷酸如下所示, 使得加下划线的碱基形成组装的 MNzyme 的部分催化核, 黑体碱基与靶杂交, 斜体碱基与底物杂交。

[0584] SEQ ID NO:10 部件酶 A2miR20A2/1:

[0585] **TACCTGCACTA** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0586] SEQ ID NO:11 部件酶 B3miR20B3/1:

[0587] *CATCTCTTCT* CCGAGC **TAAGCACTTA**

[0588] 5.2. 报告底物

[0589] 本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端处 6-FAM 部分和 3' 端处 BHQ1 部分的位置。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-1-FB 的酶切。

[0590] SEQ ID NO:6SubBi-1 - FB:

[0591] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0592] 5.3. 用于扩增 22mer D-20 寡核苷酸靶序列的 PCR 引物

[0593] 本实施例的靶序列通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物体外扩增 D-20 寡核苷酸产生。

[0594] SEQ ID NO:25 引物 5miR20/1:

[0595] ACGTGACGCTAAAGTGCT

[0596] SEQ ID NO:26 引物 3miR20/L1:

[0597] CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

[0598] SEQ ID NO:27 引物 3miR20/P1:

[0599] CGAATGACGTACCTGCAC

[0600] 5.4. 靶序列和对照

[0601] 把与 miR-20 同源的 DNA 序列 (D-20 靶) 用作模板来例示用 PCR 和 MNzyme 扩增和检测短序列。

[0602] SEQ ID NO:12D-20 靶:

[0603] TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

[0604] 此外, 为了确保错误地扩增的任何十分相近的“脱靶”序列不能用 miR-20 系统检测到, 对照靶 DNA 寡核苷酸 D-17-5p 靶也用 miR-20 部件酶 A 和 B 寡核苷酸系统测试。

[0605] SEQ ID NO:13D-17-5p 靶:

[0606] CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

[0607] 5.5. 反应组分 :扩增靶序列

[0608] 扩增靶序列以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的扩增反应在 **GeneAmp®PCR** 系统 9700 热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行。步骤 1 和 2 (逆转录和 PCR) 的循环参数是 42°C 30 分钟、95°C 7 分钟、95°C 5 秒钟和 30°C (每一循环增加 2°C) 30 秒钟的 10 个循环和最后 95°C 5 秒钟和 50°C 30 秒钟的 50 个循环。反应最初仅含有 10nM3miR20/L1, 42°C 30 分钟之后反应暂停并加入 30nM3miR20/P1 和 200nM5miR20/1。列出的所有其它试剂都在初始的反应混合物中, 3mMMgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、1x Immobuffer (Bioline) 和 1 单位 Immolase (Bioline), 以及 a) 10⁸ 拷贝 D-20 靶、b) 无靶 (dH₂O) 或 c) 10⁸ 拷贝脱靶 DNA (D-17-5p 靶) 之一。

[0609] 5.6. 反应组分 :检测靶序列

[0610] 靶序列的检测通过由催化活性 MNAzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 **SmartCycler®** 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光, 总共读 10 分钟。表 8 中的所有反应含有 1 μ M SubBi-1-FB、Tris HCl (pH9.0, 25°C) 和 25mM MgCl₂ 的散装混合物。部件酶 A 和 B 的浓度是 1 μ M。

[0611] 表 8: 用于检测体外扩增的短 (20-25mer) 核酸序列的反应组分。MNAzyme 系统使用设计 4 (miR20A2/1:miR20B3/1)。

| | MNAzyme 反应 | 靶 |
|--------|-----------------------------|--|
| [0612] | miR-20 靶-寡核苷酸 (阳性对照 miR20) | 5 μ L 中 10 ¹² 拷贝 D-20 靶(未扩增) |
| | miR-20 靶-PCR 产物 (测试) | D-20 PCR 产物(来自 25 μ L 反应的 5 μ L) (与 PCR 扩增的 2 x 10 ⁷ 拷贝的 D-20 靶相当) |
| [0613] | miR-20 靶-寡核苷酸 (对照未扩增的 D-20) | 5 μ L 中 10 ⁸ 拷贝 D-20 靶(未扩增) |
| | 无靶 (阴性对照 miR20) | 5 μ L 水 |
| | 脱靶 (miR20 的脱靶对照) | D-17-5p PCR 产物 (来自 25 μ L 反应的 5 μ L) (与 PCR 扩增的 2 x 10 ⁷ 拷贝的 D-17-5p 靶相当) |

[0614] 首先测试实验期间使用的 **SmartCycler®** 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0615] 5.7. 结果 :检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0616] 用于检测 miR-20 的 MNAzyme 设计 4 表明, 当所用的靶序列是通过 PCR 扩增的 D-20 靶时荧光随时间增加 (图 15(i))。

[0617] 无靶对照的荧光比含靶反应低, 并且没有一个阴性对照显示荧光随时间增加。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖

性组装。

[0618] 在本实施例中脱靶对照 (D-17-5p) 也用 miR-20 引物扩增,因为它仅在与 miR-20 引物杂交的区域内的末端位置有一错配。D-20 靶和 D-17-5p 靶两者的扩增通过电泳证实。由于这两种扩增子在它们的末端纳入引物序列,它们现在仅在扩增子的中间有单一碱基不同。MNAzyme 成功地区分了 D-20 和 D-17-5p 扩增子。这一区分是位于图 15(ii) 所描述的引物之间的区域内 D-20 和 D-17-5p 扩增子中的单个核苷酸差异的结果。MNAzyme 要求引物之间的四个碱基存在(从而能够区分引物二聚体与真正的扩增子)而且那四个碱基必须确实没有取代耐受。本实施例例示了 MNAzyme 区分十分相近的序列的能力,包括仅单一核苷酸多态性不同的那些序列。

[0619] 实施例 6 :使用 MNAzyme 检测体外 PCR 扩增总 RNA 产生的微小 RNA 扩增子

[0620] 6.1. 部件酶寡核苷酸

[0621] MNAzyme 能够用来检测来自体外扩增的核酸序列的扩增子。在本实施例中扩增和检测用两步法进行(图 5),其中逆转录和 PCR 扩增在第一管中发生,接着是第二管中 MNAzyme 介导的检测。对于本实施例,用来检测扩增子的寡核苷酸是被设计用来检测 hsa-miR-20 的设计 4、miR 部件酶 A 和 B 寡核苷酸(图 11)。MNAzyme 部件酶寡核苷酸如下所示,使得加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0622] SEQ ID NO:10 部件酶 A2miR20A2/1:

[0623] **TACCTGCACTA** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0624] SEQ ID NO:11 部件酶 B3miR20B3/1:

[0625] *CATCTCTTCT* CCGAGC **TAAGCACTTTA**

[0626] 6.2. 报告底物

[0627] 本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB,其序列从 5'到 3'如下所示。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5'端处 6-FAM 部分和 3'端处 BHQ1 部分的位置。以 485nm(FAM 激发波长)激发在 530nm(FAM 发射波长)下监测 SubBi-1-FB 的酶切。

[0628] SEQ ID NO:6SubBi-1-FB:

[0629] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0630] 6.3. 扩增 hsa-miR-20 的 PCR 引物

[0631] 本实施例的靶序列通过使用下列寡核苷酸引物体外扩增人胸腺总 RNA(Ambion)产生。

[0632] SEQ ID NO:25 引物 5miR20/1:

[0633] ACGTGACGCTAAAGTGCT

[0634] SEQ ID NO:26 引物 3miR20/L1:

[0635] CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

[0636] 6.4. 靶序列和对照

[0637] 人胸腺总 RNA(Ambion)用作扩增 miR-20 的模板,然后用 MNAzyme 检测扩增子(6.6 部分)。

[0638] 与 miR-20 同源的 RNA 序列(R-20 靶)用作证实短序列扩增的阳性对照,然后用

MNAzyme 检测所得到的扩增子。

[0639] SEQ ID NO:28R-20 靶：

[0640] uaaagugcuuauagugcaggua

[0641] 6.5. 反应组分：扩增靶序列

[0642] 靶序列的逆转录和 PCR 扩增以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的扩增反应在 **GeneAmp® PCR** 系统 9700 热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行。循环参数是 40°C 30 分钟、95°C 7 分钟、95°C 5 秒钟和 30°C (每一循环温度升高 2°C) 30 秒钟的 10 个循环和最后 95°C 5 秒钟和 50°C 30 秒钟的 50 个循环。反应含有 40nM3miR20/L1 和 200nM5miR20/1、3mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、10 单位 Rnasin(Promega)、30 单位 MMLV(-H) 逆转录酶 (Promega)、1xImmobuffer (Bioline) 和 0.5 单位 Immolase (Bioline)，以及 a) 1 μ g 总 RNA、b) 无靶 (dH₂O) 或 c) 1014 拷贝 R-20 靶寡核苷酸。

[0643] 6.6. 反应组分：检测靶序列

[0644] 靶序列的检测通过由催化活性 MNAzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 **SmartCycler®** 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40°C 下进行。每 30 秒钟读取每一反应的荧光，总共读 5 分钟。表 9 中的所有反应含有 1 μ M SubBi-1-FB、1 μ M partzyne A、1 μ M partzyne B、50mM Tris HCl (pH9.0, 25°C)、25mM MgCl₂ 和靶的散装混合物 (如表 9 所示)。

[0645] 表 9: 用于检测体外扩增的总 RNA 的反应组分。MNAzyme 系统使用设计 4 (miR20A2/1:miR20B3/1)。

| | MNAzyme 反应 | 靶 |
|--------|---|--|
| | miR-20 靶 - RNA 寡核苷酸 (阳性对照 miR-20) | R-20 靶 PCR-产物(来自 25 μ L 反应的 5 μ L) (与 2 x 10 ¹³ 拷贝扩增的 R-20 靶寡核苷酸相当) |
| [0646] | miR-20 靶-总 RNA (测试) | PCR 产物(来自 25 μ L 反应的 5 μ L) (与 200ng 的总扩增 RNA 相当) |
| | 无靶 RNA (阴性对照 miR20) | 来自“无靶对照”反应的 PCR 产物(来自 25 μ L 反应的 5 μ L) 含 dH ₂ O. |
| | 非扩增的总 RNA (阴性对照 miR20) | 5 μ l 总体积中的总 RNA (1 μ g) |

[0647] 测试 **SmartCycler®** 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0648] 6.7. 结果：检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0649] 用于检测 miR-20 的 MNAzyme 设计 4 表明，当所用的靶序列是通过 PCR 扩增的总 RNA 时荧光随时间增加 (图 16)。

[0650] 无 RNA 靶对照的荧光比含 RNA 靶反应的荧光低，并且没有一个阴性对照反应显示荧光随时间增加。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。虽然本实验分两步进行 (逆转录 /PCR, 然后 MNAzyme 终点检

测),所有步骤可以在单一反应管中同时进行以实时监测反应。

[0651] 实施例 7:通过 MNzyme 与核酸信号级联结合进行靶检测

[0652] 7.1. MNzyme 启动信号扩增级联

[0653] 通过将 MNzyme 检测与信号扩增级联反应结合能够减少核酸检测的限制,如图 7 所示。MNzyme 也可以使级联启动的引发机理具有高度特异性。

[0654] 7.2. 空间分开的 DNA 酶级联

[0655] 能够用各种方法将 DNA 酶拴系到载体上,所述方法包括附着到用抗生蛋白链菌素涂覆的塑料晶片上,所述抗生蛋白链菌素允许生物素标记的 DNA 酶的附着。用于附着的序列也能够用作通用 MNzyme/DNA 酶底物。在靶与允许形成活性 MNzyme 的部件酶序列杂交后,能够检测到靶(例如核酸序列)。然后 MNzyme 能够酶切拴系的通用底物从而释放 DNA 酶 A。然后 DNA 酶 A 能够移动到拴系 DNA 酶 B 的第二固体表面的第二通用底物。DNA 酶 A 能够酶切第二通用序列,从而释放 DNA 酶 B。在荧光基团/淬灭基团染色对之间酶切该底物能够引起荧光增加。释放的 DNA 酶 B 又能够酶切更多的第一底物,从而释放更多的 DNA 酶 A 并启动引起信号扩增的信号级联(图 7)。

[0656] 本实施例描述了一种使用空间分开的 DNA 酶产生信号级联的机制,然而,也存在可以使用催化核酸进行信号扩增的其它方法。本领域技术人员应当理解,任何这样的方法完全可以在此使用,条件是通过某些附着或物理分隔手段使底物保持与作用于它的酶“无法接近”。可以与 MNzyme 启动的反应结合的核酸信号扩增的其它实施例包括但不限于,连接级联(Paulhe and Joyce, 2004)和循环 DNA 酶级联(Levy and Ellington, 2003),其中每一级联都具有保持酶与其底物“分开”的基本原则,当酶与底物接触使得能够产生催化活性时,直接或间接的扩增信号或信号级联就会产生。

[0657] 实施例 8:使用 MNzyme 定量核酸靶

[0658] 8.1. 部件酶寡核苷酸

[0659] 使用体外靶扩增方法如 PCR,能够将 MNzyme 用来实时监测靶核酸的扩增。此外,实时监测可以定量反应中最初存在的靶的量。在本实施例中,扩增和检测用一步法进行,其中 PCR 扩增和 MNzyme 介导的检测在单一管中同时发生。部件酶寡核苷酸 A 和 B 使用设计 6,所述设计 6 具有与人类 RPLP0 基因的外显子 5 互补的感应臂(图 17(i))。部件酶寡核苷酸如下所示,其中“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[0660] SEQ ID NO:29 部件酶 A4R05A4/3-P:

[0661] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA GGTTGTGCTG -P

[0662] SEQ ID NO:30 部件酶 B5R05B5/3-P:

[0663] CGGTTGGTGA GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC** -P

[0664] 8.2. 报告底物

[0665] 本实施例的报告底物是 SubBi-3,其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中,对于 SubBi-3-FB 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记。以 485nm(FAM 激发波长)激发在 530nm(FAM 发射波长)下监测 SubBi-3-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0666] SEQ ID NO:31SubBi-3-FB:

[0667] CAGCACAACCGuCACCAACCG

[0668] 8.3. 用于扩增 RPLP0 外显子 5 的 PCR 引物

[0669] 本实施例的靶序列通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物体外扩增人类基因组 DNA 而产生。

[0670] SEQ ID NO:32 引物 5R05/1:

[0671] CATTCTATCATCAACGGGTA

[0672] SEQ ID NO:33 引物 3R05/1:

[0673] CAAAGGCAGATGGATCAG

[0674] 8.4. 靶序列

[0675] 从 K562 细胞系 (Promega) 提取的人类基因组 DNA 用作扩增 RPLP0 基因的模板。

[0676] 8.5. 反应组分: 扩增和定量靶序列

[0677] 实时扩增和定量靶序列以 25 μ l 的总反应体积进行。所有的反应在 ABI7700 热循环仪 (Applied Biosystems) 中进行。循环参数是 95°C 7 分钟、95°C 5 秒钟和 60°C (每一循环温度降低 1°C) 30 秒钟的 10 个循环和最后 95°C 5 秒钟和 50°C 30 秒钟的 50 个循环。反应含有 40nM5R05/1 和 200nM3R05/1、200nM R05A4/3-P 和 200nM R05B5/3-P、200nM SubBi-3-FB、10mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、10 单位 Rnasin (Promega)、1x ROX 参照 (reference) (Invitrogen)、1x Immobuffer (Bioline)、0.25 单位 Immolase (Bioline), 以及基因组 DNA 模板 (20,000pg、4000pg、800pg、160pg、32pg 和 6.4pg) 或无靶 (dH₂O)。

[0678] 8.6. 结果: 扩增靶和酶切 SubBi-3-FB 报告底物

[0679] 实时检测和定量 RPLP0 外显子 5 的 MNAzyme 设计 6 表明, 当所用的靶序列是通过 PCR 扩增的人类基因组 DNA 时荧光随时间增加 (图 17(ii))。

[0680] 无 DNA 靶对照的荧光低于含 DNA 靶反应中的荧光并且在反应期间不增加。这表明含靶反应产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。通过将 DNA 浓度的对数对引起线性图的循环阈值作图, 产生相关系数为 0.995 的标准曲线。在含有 6.4pg 基因组 DNA 的反应中, 会存在大约 10 拷贝的靶。本实施例表明本方法的高灵敏度。

[0681] 虽然本实验使用不对称的引物比, 接下来使用实时 PCR (数据未示出) 的实验表明 MNAzyme 检测也与使用对称引物比的 PCR 相适宜。

[0682] 实施例 9: 同时针对多种靶使用多种 MNAzyme 的复合反应

[0683] 9.1. 部件酶寡核苷酸

[0684] 在包含多个独特 MNAzyme 的一复合反应中能够同时检测多种靶。每一 MNAzyme 具有对一种靶具有特异性的感应臂和对一系列通用底物中的独特成员具有特异性的底物臂, 每一所述底物用不同的荧光基团标记 (图 18)。在如下的实施例中, 设计 MNAzyme 以检测两种不同的靶, 即 RPLP0 和 D-20 序列。应当理解, 能够根据本方法使用任何数目的靶。部件酶 A 和 B 的序列从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中, 加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核, 黑体碱基与靶杂交, 斜体碱基与底物杂交。

[0685] SEQ ID NO:29 部件酶 A4R05A4/3-P:

[0686] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA *GGTTGTGCTG*-P

[0687] SEQ ID NO:30 部件酶 B5R05B5/3-P:

[0688] *CGGTTGGTGA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC** -P

[0689] SEQ ID NO:34 部件酶 A4miR20A4/2:

[0690] **TACCTGCACTA** ACAACGA GAGGAAACCTT

[0691] SEQ ID NO:35 部件酶 B5miR20B5/2:

[0692] TGCCCAGGGA GGCTAGCT **TAAGCACTTA**

[0693] 9.2. 报告底物

[0694] 本实施例中使用的两报告底物是 SubBi-2 和 SubBi-3, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中, 对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-2-FB。对于 SubBi-3 在 5' 端用 6-JOE 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-3-JB。

[0695] 以 485nm(FAM 激发波长) 激发在 530nm(FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切, 并且以 520nm(JOE 激发波长) 激发在 548nm(JOE 发射波长) 下监测 SubBi-3-JB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。

[0696] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[0697] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0698] SEQ ID NO:36SubBi-3-JB:

[0699] CAGCACAACCGuCACCAACCG

[0700] 9.3. 靶序列

[0701] 本实施例的靶序列是合成寡核苷酸 R05/1 和 D-20 靶, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。R05/1 靶序列具有与 RPLP0 基因的外显子 5 部分相同的序列, D-20 靶序列是 RNA hsa-miR-20 的 DNA 同源物,

[0702] SEQ ID NO:22R05/1 靶:

[0703] GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

[0704] SEQ ID NO:12D-20 靶:

[0705] TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

[0706] 9.4. 反应条件

[0707] 靶序列的检测通过监测由催化活性 MNzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 **SmartCycler®** 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 55°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光, 总共读 5 分钟。表 10 中的所有反应含有 PCR II 缓冲液 (Applied Biosystems) 和 25mM $MgCl_2$ 。

[0708] 表 10: 用于同时检测两种不同核酸靶的反应组分。

| 反应类型 | 部件酶 A (1 μ M) | 部件酶 B (1 μ M) | 靶 |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| [0709] 单位点 D-20 | miR20A4/2 | miR20B5/2 | 1 μ M D-20 靶 |
| | | | 无靶(H ₂ O) |
| 单位点 RPLPO | RO5A4/3-P | RO5B5/3-P | 1 μ M RO5/1 靶 |
| | | | 无靶(H ₂ O) |
| 复合 D-20 和 RPLPO | miR20A4/2 和 RO5A4/3-P | miR20B5/2 和 RO5B5/3-P | 1 μ M D-20 靶 和 1 μ M RO5/1 靶 |
| | | | 无靶(水) |

[0710] 首先测试实验期间使用的 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平, 因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在该孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0711] 9. 5. 结果 : 底物的检测和酶切

[0712] 含有靶 D-20 或 RPLPO 的单位点反应表明, 与无靶对照相比荧光随时间增加 (图 19(i))。这表明部件酶仅在靶序列的存在下组装成催化活性 MNzyme 并酶切报告底物。“无靶” (dH₂O) 对照的荧光不增加, 表明缺乏靶时没有发生酶切。同时检测 RPLPO 和 D-20 的复合反应产生的每一靶的结果 (图 19(ii)) 与在单位点 (单位点) 反应中观察到每一靶的结果相似。“无靶”对照反应中没有观察到荧光增加。这些结果表明在单一反应中同时检测多种靶而不失去特异性。

[0713] 实施例 10 : 使用 MNzyme 定量体外扩增微小 RNA 产生的扩增子

[0714] 10. 1. 部件酶寡核苷酸

[0715] 使用体外靶扩增方法如 RTPCR, MNzyme 能够用来实时监测靶核酸的扩增。此外, 实时监测可以定量反应中最初存在的靶的量。在本实施例中, 扩增和检测用两步法进行, 其中第一步包括通过逆转录产生 cDNA, 然后 PCR 扩增和 MNzyme 介导的 cDNA 检测在第二步中同时发生。部件酶寡核苷酸 A 和 B 使用具有与人类微小 RNAhsa-let-7a 互补的感应臂的设计 6。部件酶寡核苷酸如下所示, 其中“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。在如下序列中, 加下划线的碱基形成组装的 MNzyme 的部分催化核, 黑体碱基与靶杂交, 斜体碱基与底物杂交。

[0716] SEQ ID NO:37 部件酶 A4PCR7aA4/2-P:

[0717] **GACCGTGAGGTAGTA** ACAACGA *GAGGAAACCTT*-P

[0718] SEQ ID NO:38 部件酶 B5PCR7aB5/2-P:

[0719] *TGCCCAGGGA* GGCTAGCT **GGTTGTATAGTTGTC**-P

[0720] 10. 2. 报告底物

[0721] 本实施例的报告底物是 SubBi-2, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前实施例中, 对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-2-FB。以 492nm (FAM 激发波长) 激发在 516nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。在如下序列中, 小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。

[0722] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[0723] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0724] 10.3. 靶序列

[0725] 本实施例的标准曲线通过合成 RNA 寡核苷酸 R-let7a 的两步 RTPCR 产生,所述合成 RNA 寡核苷酸 R-let7a 具有与 RNA hsa-let-7a 同源的序列。R-let7a 的序列从 5' 到 3' 如下所示。

[0726] SEQ ID NO:39R-let7a:

[0727] ugagguaguagguuguauaguu

[0728] 扩增来自结肠细胞 (Ambion)、K562 白血病细胞、HeLa 宫颈癌细胞 (Ambion) 和脾细胞 (Clontech) 的人类总 RNA 样品并分析 hsa-let-7a 的丰度。

[0729] 10.4. 用于扩增 hsa-let-7a 的 PCR 引物

[0730] 使用下列引物来扩增 hsa-let-7a。引物 3let7a 用于逆转录,引物 5let7a 和 3PCR7a 用于 PCR 扩增。

[0731] SEQ ID NO:40 引物 3let7a:

[0732] AGCGAAGCTGAGACAACTATACAA

[0733] SEQ ID NO:41 引物 5let7a:

[0734] CGACGTGACCGTGAGGTAG

[0735] SEQ ID NO:42 引物 3PCR7a:

[0736] CATGGCACAAGCGAAGCTGA

[0737] 10.5. 反应组分:靶序列的逆转录

[0738] 靶序列的逆转录以 25 μ L 的总反应体积进行。反应在 2720 热循环仪 (Applied Biosystems) 上在 20°C 温育 20 分钟,接着在 30°C 温育 20 分钟,然后在 40°C 温育 20 分钟。反应含有 10nM3let7a、5mM $MgCl_2$ 、300 μ M 的每一 dNTP、20 单位 Rnasin (Promega)、1x Immobuffer (Bioline)、100 单位 M-MLV RT (H-),和来自正常结肠 (0.1 μ g)、K562 (0.1 μ g)、HeLa (0.2 μ g) 或脾 (0.2 μ g) 的 R-let7a (6×10^{11} 拷贝) 或人类总 RNA。对照反应含有上述所有试剂但是缺乏 RNA 靶而代之以仅含 5 μ L dH_2O 。

[0739] 10.6. 反应组分:靶序列的扩增和定量

[0740] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 Mx3005P™ QPCR 系统 (Stratagene) 上进行。循环参数是 95°C 7 分钟、95°C 15 秒钟和 40°C (每一循环温度增加 1°C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95°C 15 秒钟和 50°C 30 秒钟的 50 个循环。所有的反应含有 200nM3PCR7a 和 40nM5let7a、400nM PCR7aA4/2-P 和 400nM PCR7aB5/2-P、200nM SubBi-2-FB、10mM $MgCl_2$ 、200 μ M 每一 dNTP、20 单位 Rnasin (Promega)、1x Immobuffer (Bioline)、1 单位 Immolase (Bioline),和 5 μ L R-let7a cDNA (含 5×10^8 、 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 拷贝)、人类总 RNA 模板 (正常结肠,0.5 μ g;K562,0.5 μ g;HeLa,1 μ g;脾,1 μ g) 或无靶 (dH2O)。

[0741] 10.7. 结果:靶的扩增和 SubBi-2-FB 报告底物的酶切

[0742] 用于实时检测和定量 hsa-let-7a 的 MNAzyme 表明,当所用的靶序列产生自合成 RNA 寡核苷酸或人类总 RNA 时,荧光随时间增加。没有检测到无靶对照反应的信号 (表 11)。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。通过将初始 RNA 浓度的对数对循环阈值作图产生标准曲线,得到相关系数

为 0.999 的直线图。也扩增了 4 个人类总 RNA 样品并通过从标准曲线外推估计出了每一样品中 hsa-let-7a 的量 (表 11)。

[0743] 表 11: 扩增和检测 hsa-let-7a 扩增子的反应结果

| 样品 | 阈值 (Ct) 两份的平均值 | 拷贝数 已知的标准值(S) 或估计值(E) | 评论 |
|---------------|-------------------|-----------------------------|--|
| 标准 1 | 19.4 | 5×10^8 (S) | 标准曲线 (两份反应的平均值) $R^2 = 0.999$ 斜率 = -3.829 效率 = 83% |
| 标准 2 | 23.1 | 5×10^7 (S) | |
| 标准 3 | 26.9 | 5×10^6 (S) | |
| 标准 4 | 30.9 | 5×10^5 (S) | |
| 标准 5 | 34.7 | 5×10^4 (S) | |
| 无 RNA 靶 对照 | 无信号 | 0 | 无信号 |
| 结肠 RNA | 20 | 4×10^8 (E) | 所有测试样品中检测 和定量的 hsa-let-7a |
| K562 RNA | 31 | 3.5×10^5 (E) | |
| HeLa RNA | 22 | 1.3×10^8 (E) | |
| 脾 RNA | 22 | 7.6×10^7 (E) | |

[0745] 本实施例证实了 MNAzyme 检测和定量通过 RTPCR 扩增人类微小 RNA 产生的扩增子的能力。由于其约 22 个碱基的小尺寸,微小 RNA 难以扩增和检测。MNAzyme 适合于这一应用。

[0746] 实施例 11 :使用 MNAzyme 检测 DNA 甲基化

[0747] 11.1. 部件酶寡核苷酸

[0748] 实施例 19 表明,实时 PCR 和 MNAzyme 介导的信号产生允许区分完全匹配的核酸序列和包含 C/C 错配的那些序列。该能力使得 MNAzyme 能够用来分析细胞的甲基化状态。甲基化模式改变的发生经常与癌症相关。大多数甲基化分析方法以用亚硫酸氢盐修饰基因组 DNA 开始,该修饰将未甲基化而非甲基化的胞苷转化成尿苷。然后,PCR 扩增修饰过的 DNA 以胸苷替换尿苷,并能够用多种方法区分含 T(原先未甲基化的 C) 和 C(原先甲基化的 C) 的序列。在如下实施例中,使用 MNAzyme 在亚硫酸氢盐修饰过的 DNA 中确定在 p16 基因启动子区域的特异性 CpG 对 (doublet) 的甲基化状态。

[0749] 在本实施例中,部件酶被设计用来匹配亚硫酸氢盐修饰甲基化 p16 基因后产生的序列。部件酶的序列如下所示 (5' 到 3')。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与亚硫酸氢盐修饰的靶杂交,斜体碱基与底物杂交。“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[0750] SEQ ID NO:43 部件酶 A5p16A5/3-P:

[0751] **GCCCCGCTCCAAC** TACAACGA *GGTTGTGCTG* -P

[0752] SEQ ID NO:44 部件酶 B6p16B6/3-P:

[0753] *CGGTTGGTGA* GGCTAGC **AACGCCCGCACCTC** -P

[0754] 11.2. 报告底物

[0755] 本实施例中使用的报告底物是 SubBi-3。在当前实施例中,对于 SubBi-3 在 5' 端

用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-3-FB。以 485nm(FAM 激发波长) 激发在 530nm(FAM 发射波长) 下监测 SubBi-3-FB 的酶切。SubBi-3-FB 的序列如下所示(5' 到 3') ;小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0756] SEQ ID NO:31SubBi-3-FB:

[0757] CAGCACAACCGuCACCAACCG

[0758] 11. 3. 扩增亚硫酸氢盐修饰的 p16 的 PCR 引物

[0759] 在本实施例中,PCR 引物被设计用来匹配亚硫酸氢盐修饰的靶,所述靶原先已被甲基化。本实施例的靶序列通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物(5' 到 3') 体外扩增亚硫酸氢盐修饰的人类基因组 DNA 产生。

[0760] SEQ ID NO:45 引物 5p16:

[0761] GTTGGTTACGGTCGCGGTTC

[0762] SEQ ID NO:46 引物 3p16:

[0763] CCGACCGTAACTATTCGATACG

[0764] 11. 4. 靶序列和对照

[0765] 从 K562 细胞系提取的人类基因组 DNA 用作含未甲基化 p16 基因启动子的阴性对照基因组 DNA。普遍性 CpG 甲基化基因组 DNA(Chemicon) 用作甲基化 p16 基因启动子的对照。根据厂家的说明书,用 MethylEasy 试剂盒(Human Genetic Signatures) 将基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰过夜。然后,将甲基化 DNA 和未甲基化 DNA 连续地稀释以得到一系列样品,它们含有不同比例的在 p16 基因启动子上甲基化的 DNA,这些比例分别为 :100%、20%、4%、0. 8%、0. 16% 和 0. 032%。不含核酸酶的 dH₂O 代替基因组 DNA 用作无靶对照。

[0766] 11. 5. 反应组分 :扩增和定量靶序列

[0767] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 MX3005p QPCR 系统上进行。循环参数是 95 $^{\circ}$ C 7 分钟、95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 56 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 10 个循环、最后 95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 52 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 50 个循环。反应含有 200nM5p16 和 40nM3p16、200nM p16A5/3-P 和 200nM p16B6/3-P、200nM SubBi-3-FB、7. 5mM MgCl₂、200 μ M 每一 dNTP、10 单位 Rnasin(Promega)、1x Immobilizer(Bioline)、1 单位 Immobilase(Bioline),以及 150ng 亚硫酸氢盐修饰的基因组 DNA(含有 100%、20%、4%、0. 8%、0. 16% 或 0. 032% 甲基化的 DNA) 或仅 dH₂O(无靶对照反应)。所有的反应以双份进行。

[0768] 11. 6. 结果 :通过 MNAzyme 检测甲基化

[0769] 甲基化特异性 MNAzyme 表明,当靶样品含有 100% 到低至 0. 16% 的甲基化 DNA 时荧光随时间增加(表 12)。与之相比,当靶样品含有 0. 032% 和 0% 的甲基化 DNA 时,反应显示低荧光水平,与在无靶对照中看到的相似,并且荧光不随时间增加。由于甲基化靶的比例减少,反应的 Ct 增加并作出 R² 值为 0. 996 的标准曲线。实验结果总结于如下的表 12 中。

[0770] 表 12. 使用 MNAzyme 检测亚硫酸氢盐修饰的基因组 DNA 样品中的 DNA 甲基化。

[0771]

| % 甲基化 | Ct (两份的平均值) | 评论 |
|--------------|-------------|---|
| 100 | 19.36 | 用这些值生成的标准曲线 $R^2 = 0.996$, 效率 = 133%, 斜率 = -2.72。 |
| 20 | 20.94 | |
| 4 | 23.33 | |
| 0.8 | 24.83 | |
| 0.16 | 27.02 | |
| 0.032 | 无 Ct | 未检测 |
| 0 (100%未甲基化) | 无 Ct | 未甲基化的对照无信号 |
| 无靶对照 | 无 Ct | 无靶对照无信号 |

[0772] 在本实施例中使用的条件下,甲基化的 p16 特异性引物和 MNAzyme 能够区分甲基化和未甲基化的靶。此外,该系统在未甲基化靶的背景下允许检测 0.16% 的甲基化靶。PCR 反应中的 100% 效率暗示每一循环处有倍增。在本实验中观察到的 133% 的效率提示既有靶扩增 (通过 PCR), 也有 MNAzyme 的催化活性扩增的扩增子检测。

[0773] 实施例 12: 由具有形成发夹结构的感应臂的部件酶组装的 MNAzyme。

[0774] 能够组装成活性 MNAzyme 的部件酶的结构是灵活多样的。本实施例示出了与 MNAzyme 活性相适宜的另外的结构。

[0775] 12.1. 部件酶寡核苷酸

[0776] 当部件酶 A、部件酶 B 或部件酶 A 和 B 两者的感应臂区域后面连着任意的发夹序列时,也能够用 MNAzyme 进行检测。在如下实验中,部件酶 A 和 B 被设计用来靶向人类微小 RNA hsa-miR-143 的序列。部件酶 A 和部件酶 B 寡核苷酸的序列从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交,并且普通文本的碱基形成发夹。

[0777] SEQ ID NO:142 部件酶 A2miR143A2/1:

[0778] **TGAGCTACAGT** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0779] SEQ ID NO:143 部件酶 B3miR143B3/1:

[0780] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GCTTCATCTCA**

[0781] SEQ ID NO:144 部件酶 A2miR143A2H/1:

[0782] GGCACAAACGTGCC **TGAGCTACAGT** CGGTCGAA *ATAGTGAGT*

[0783] SEQ ID NO:145 部件酶 B3miR143B3H/1:

[0784] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GCTTCATCTCA** CGACGATAACGTCC

[0785] 12.2. 报告底物

[0786] 通过酶切双重标记的核酸报告底物监测 MNAzyme 的活性。本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB, 其序列从 5' 到 3' 如下书写。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端 6-FAM 的位置和 3' 端 BHQ1 部分的位置。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测由于在 FAM 和 BHQ1 之间的脱氧核糖核苷酸

处酶切 SubBi-1-FB 引起的荧光改变。

[0787] SEQ ID NO:6SubBi-1 - FB:

[0788] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[0789] 12.3. 靶

[0790] 本实施例的靶序列是 DNA 寡核苷酸 D-143 靶,所述 D-143 靶具有与人类微小 RNA hsa-miR-143 同源的序列。D-143 靶的序列从 5' 到 3' 如下书写。

[0791] SEQ ID NO:146D-143 靶:

[0792] TGAGATGAAGCACTGTAGCTCA

[0793] 12.4. 反应条件

[0794] 靶序列的检测通过由催化活性 MNAzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。所有的反应在 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 中在 40°C 下进行。每 7 秒钟读取每一反应的荧光,总共读 10 分钟。表 13 中的所有反应含有在 1 μ M SubBi-1-FB、10mM Tris HCl (pH9.0, 25°C) 和 25mM MgCl₂ 的散装混合物。

[0795] 表 13: 用于检测核酸靶的反应组分。

| 反应类型 | 部件酶 A miR143 (0.8 μ M) | 部件酶 B miR143 (0.8 μ M) | MNAzyme 反应 | 模板 (D-143 靶) |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------------|
| [0796] 两部件酶都没有发夹 | A2/1 | B3/1 | 靶 | 0.1 μ M |
| | | | 无靶 | Nil (仅水) |
| 一种部件酶含发夹 | A2H/1 | B3/1 | 靶 | 0.1 μ M |
| | A2/1 | B3H/1 | 靶 | 0.1 μ M |
| 两种部件酶都含发夹 | A2H/1 | B3H/1 | 靶 | 0.1 μ M |
| | | | 无靶 | Nil (仅水) |

[0797] 首先测试实验期间使用的 SmartCycler® 系统热循环仪 (Cepheid) 上每一反应孔的背景荧光水平,因为已知这在各孔之间有变化。这通过单独读取散装混合物的荧光来测定。然后从在各孔进行的所有其它反应中减去这一值以便在各孔之间进行比较。

[0798] 12.5. 结果:检测 SubBi-1-FB 报告底物的酶切

[0799] 部件酶 A 和 B 的设计的各种组合都能够被组装成活性 MNAzyme。这些 MNAzyme 仅在靶序列的存在下酶切报告底物,如荧光增加所证明的那样。在本实施例中,已经用形成发夹的序列将部件酶的感应臂延长。含有具有发夹的一种部件酶 (部件酶 A 或部件酶 B) 的反应,或两种部件酶 (A 和 B) 都含发夹的反应给出与使用没有发夹的部件酶时可见的相似的荧光信号。在没有靶的任一对照反应中没有观察到信号增加。

[0800] 含有发夹的部件酶的设计提供适合于检测短序列如微小 RNA 的策略。在本实验中检测的 DNA 寡核苷酸仅为 22 个碱基。使用了含发夹或不含发夹的部件酶检测该序列。该发夹设计提供更稳定的结构并在已知与 MNAzyme 组装和催化活性相适宜的部件酶的设计中进一步提供灵活性。

[0801] 实施例 13:使用 MNAzyme 通过实时 RTPCR 同时定量四种核酸序列

[0802] 13.1. 用于四重 RTPCR 分析的部件酶寡核苷酸

[0803] 使用体外靶扩增方法如 RTPCR 能够同时实时扩增多种靶。此外,靶的扩增能够在包含多种独特 MNzyme 的一复合反应中同时实时监测。每一种 MNzyme 具有对一种靶具有特异性的感应臂,和对一系列通用底物的独特成员具有特异性的底物臂,每一所述底物用不同的荧光基团标记(图 18),在本实施例中, MNzyme 被设计用来检测四种不同靶,即人 BCR、RPLP0、 β -肌动蛋白和 HPRT 转录本。应当理解,根据本方法能够使用任何数目的靶。每一种靶的部件酶 A 和 B 序列从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0804] SEQ ID NO:51 部件酶 A4BaA4/2-P:

[0805] **AGATCAAGATCATTGCTCC** ACAACGA *GAGGAAACCTT*-P

[0806] SEQ ID NO:52 部件酶 B5BaB5/2-P:

[0807] *TGCCAGGGA* GGCTAGCT **TCCTGAGCGCAAGTACTC** -P

[0808] SEQ ID NO:29 部件酶 A4R05A4/3-P:

[0809] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA *GGTTGTGCTG*-P

[0810] SEQ ID NO:30 部件酶 B5R05B5/3-P:

[0811] *CGGTTGGTGA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC** -P

[0812] SEQ ID NO:55 部件酶 A4BCRA4/6-P:

[0813] **AGTTCAAATCTGTACTGCACC** ACAACGA *GAGGCGTGAT*-P

[0814] SEQ ID NO:56 部件酶 B5BCRB5/6-P:

[0815] *CTGGGAGGAA* GGCTAGCT **CTGGAGGTGGATTTCCTTTGG** -P

[0816] SEQ ID NO:57 部件酶 A4HPRTA4/7-P:

[0817] **ACTGAATAGAAATAGTGATAGAT** ACAACGA *GTGCCATGTTAA* -P

[0818] SEQ ID NO:58 部件酶 B5HPRTB5/7-P:

[0819] *TATCACAGCCAA* GGCTAGCT **CCATTCCTATGACTGTAGATT** -P

[0820] 13.2. 报告底物

[0821] 对于本实施例,使用四种不同的报告底物,每一种用不同的荧光基团标记。底物的序列从 5' 到 3' 如下书写。在当前实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-JOE 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-JB。以 535nm 激发在 555nm 下监测 SubBi-2-JB 的酶切。对于 SubBi-3 在 5' 端用 Quasar670 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ2 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-3-Q6B2。以 635nm 激发在 665nm 下监测 SubBi-3-Q6B2 的酶切。对于 SubBi-6 在 5' 端用德克萨斯红 (Texas Red) 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ2 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-6-TRB2。以 585nm 激发在 610nm 下监测 SubBi-6-TRB2 的酶切。对于第四底物 SubBi-7 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-7-FB。以 492nm 激发在 516nm 下监测 SubBi-7-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0822] SEQ ID NO:59SubBi-2-JB:

[0823] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0824] SEQ ID NO:60SubBi-3-Q6B2:

[0825] CAGCACAACCGuCACCAACCG

[0826] SEQ ID NO:61SubBi-6-TRB2:

[0827] ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

[0828] SEQ ID NO:62SubBi-7-FB:

[0829] TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

[0830] 13. 3. 用于扩增四种扩增子的靶序列和 PCR 引物

[0831] 将从 K562 白血病细胞提取的人类总 RNA 用作所有四种靶转录本的体外扩增的模板。扩增子通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物的 RTPCR 产生。

[0832] SEQ ID NO:325' 引物 5R05/1:

[0833] CATTCTATCATCAACGGGTA

[0834] SEQ ID NO:333' 引物 3R05/1:

[0835] CAAAGGCAGATGGATCAG

[0836] SEQ ID NO:635' 引物 5B 肌动蛋白:

[0837] CATTGCCGACAGGATGCAGA

[0838] SEQ ID NO:643' 引物 3B 肌动蛋白:

[0839] GAGCCGCCGATCCACACG

[0840] SEQ ID NO:655' 引物 5BCR14:

[0841] CACTCAGCCACTGGATTTAA

[0842] SEQ ID NO:663' 引物 3BCR15/6:

[0843] GCGCGTCTTTGCTTTATTC

[0844] SEQ ID NO:675' 引物 5HPRT/5:

[0845] CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

[0846] SEQ ID NO:683' 引物 3HPRT/8:

[0847] CCTGTTGACTGGTCATTACAA

[0848] 13. 4. 反应组分:靶序列的扩增和定量

[0849] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 Mx3005P™ QPCR 系统 (Stratagene) 上进行。循环参数是 50°C 30 分钟、95°C 7 分钟、95°C 15 秒钟和 65°C (每一循环温度降低 1°C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95°C 15 秒钟和 54°C 30 秒钟的 40 个循环。反应含有 40nM 每一 5' 引物和 200nM 每一 3' 引物、200nM 每一 A 部件酶和 200nM 每一 B 部件酶、200nM 每一底物、10mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、10 单位 Rnasin (Promega)、20 单位 M-MLV RT(H-), 1x Immobuffer (Bioline)、1.5 单位 Immobilase (Bioline), 以及总 RNA 模板 (100ng、20ng、4ng、800pg、160pg 或 32pg) 或无靶 (dH₂O)。

[0850] 表 14: 用于同时检测四种不同核酸靶的反应组分。

| 反应类型 | 引物 5'(40 nM) 3'(200 nM) | 部件酶 A (200 nM) | 部件酶 B (200 nM) | 底物 (200 nM) | 靶 |
|---|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|--|
| [0851] 复合 β-肌动蛋白 RPLPO BCR HPRT | 5B 肌动蛋白 3B 肌动蛋白 | BaA4/2-P | BaB5/2-P | SubBi-2-JB | 人类总 RNA 100 ng 20 ng 4 ng 800 pg 160 pg 32 pg 或无 RNA (水) |
| | 5RO5/1 3RO5/1 | RO5A4/3-P | RO5B5/3-P | SubBi-3-Q6 B2 | |
| | 5BCR14 3BCR15/6 | BCRA4/6-P | BCRB5/6-P | SubBi-6-TR B2 | |
| | 5HPRT/5 3HPRT/8 | HPRTA4/7-P | HPRTB5/7-P | SubBi-7-FB | |

[0852] 13.5. 结果 :四种不同靶序列的同时扩增以及通过酶切四种不同报告底物的检测
 [0853] 用来实时检测和定量 β - 肌动蛋白、RPLPO、BCR 和 HPRT 转录本的四种 MNAzyme 表明,当所用的靶序列是通过 RTPCR 扩增的人类总 RNA 时荧光随时间增加(表 15)。所有四个反应中无 RNA 靶对照的荧光低于含 RNA 靶反应中的荧光并且在反应期间不增加(表 15)。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。

[0854] 通过将 RNA 浓度的对数对循环阈值作图,生成所有四种靶的标准曲线,得到线性图。每一标准的阈值(Ct)如表 15 所示。表中所示的 Ct 值是两份反应结果的平均值。每一靶的相关系数(R²)、斜率和反应效率也如表 15 所示。

[0855] 表 15: 同时扩增和检测四种不同核酸靶的反应结果

[0856]

| 模板(总 RNA) | 阈值(Ct) | | | |
|--------------|-----------------|-----------------------|--------------------|---------------|
| | β-肌动蛋白 (JOE) | RPLPO (Quasar 670) | BCR (德克萨斯 红) | HPRT (FAM) |
| 100 ng | 11.2 | 12.8 | 17.6 | 16.2 |
| 20 ng | 13.8 | 15.2 | 19.9 | 18.5 |
| 4 ng | 16.7 | 17.5 | 22.4 | 20.9 |

[0857]

| | | | | |
|----------|---|---|--|---|
| 800 pg | 19.1 | 20.1 | 25.0 | 23.5 |
| 160 pg | 21.5 | 22.7 | 27.1 | 26.0 |
| 32 pg | 23.8 | 25.2 | 29.1 | 27.7 |
| 无 RNA 对照 | 无 Ct | 无 Ct | 无 Ct | 无 Ct |
| 标准曲线 | R ² = 0.998 斜率 = -3.599 效率 = 90% | R ² = 1.000 斜率 = -3.561 效率 = 91% | R ² = 0.998 斜率 = -3.320 效率 = 100% | R ² = 0.997 斜率 = -3.370 效率 = 98% |

[0858] 本实施例中的MNAzyme RTPCR反应允许在包括四种通用底物的单一复合反应中同时检测四种靶,并生成用于定量这四种靶的标准曲线。这些通用底物适合于在单一反应中监测四种靶的其它组合。

[0859] 实施例 14 :使用 MNAzyme 在实时复合 RTPCR 中同时定量五种核酸序列

[0860] 14.1. 用于五重 RTPCR 分析的部件酶寡核苷酸

[0861] 使用体外靶扩增方法如 RTPCR 能够同时实时扩增多种靶。此外,靶的扩增能够在包含多种独特 MNAzyme 的复合反应中同时实时监测。每一 MNAzyme 具有对一种靶具有特异性的感应臂,和对一系列通用底物的独特成员具有特异性的底物臂,每一所述底物用不同的荧光基团标记(图 18)。在本实施例中,MNAzyme 被设计用来检测五种不同靶,即 BCR、RPLP0 外显子 4、 β -肌动蛋白、RPLP0 外显子 5 和 HPRT mRNA 序列。应当理解,根据本方法能够使用任何数目的靶。部件酶 A 和 B 的序列从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0862] SEQ ID NO:69 部件酶 A4BaA4/7-P:

[0863] **AGATCAAGATCATTGCTCC** ACAACGA *GTGCCATGTTAA* -P

[0864] SEQ ID NO:70 部件酶 B5BaB5/7-P:

[0865] *TATCACAGCCAA* GGCTAGCT **TCCTGAGCGCAAGTACTC** -P

[0866] SEQ ID NO:71 部件酶 A4R05A4/4-P:

[0867] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA *GTGCGCCATG* -P

[0868] SEQ ID NO:72 部件酶 B5R05B5/4-P:

[0869] *TACTTCTCCCAA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC** -P

[0870] SEQ ID NO:55 部件酶 A4BCRA4/6-P:

[0871] **AGTTCAAATCTGTACTGCACC** ACAACGA *GAGGCGTGAT* -P

[0872] SEQ ID NO:56 部件酶 B5BCRB5/6-P:

[0873] *CTGGGAGGAA* GGCTAGCT **CTGGAGGTGGATTTCCTTTGG** -P

[0874] SEQ ID NO:75 部件酶 A4HPRTA4/2-P:

[0875] **ACTGAATAGAAATAGTGATAGAT** ACAACGA *GAGGAAACCTT* -P

[0876] SEQ ID NO:76 部件酶 B5HPRTB5/2-P:

[0877] *TGCCCAGGGA* GGCTAGCT **CCATTCCTATGACTGTAGATT** -P

[0878] SEQ ID NO:77 部件酶 A4R04A4/3-P:

[0879] **GCTGGTCATCCAGCAG** ACAACGA *GGTTGTGCTG* -P

[0880] SEQ ID NO:78 部件酶 B5R04B5/3-P

[0881] *CGGTTGGTGA* GGCTAGCT **GTGTTGACAATGGC** -P

[0882] 14.2. 报告底物

[0883] 对于本实施例,使用五种不同的报告底物,每一种用五种不同的荧光基团中的一种标记。底物的序列从 5' 到 3' 书写。在当前实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 Alexa350 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-A350B。以 350nm 激发在 440nm 下监测 SubBi-2-A350B 的酶切。对于 SubBi-3 在 5' 端用 Quasar670 部分进

行末端标记,在 3' 端用 BHQ2 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-3-Q6B2。以 635nm 激发在 665nm 下监测 SubBi-3-Q6B2 的酶切。对于 SubBi-6 在 5' 端用德克萨斯红部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ2 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-6-TRB2。以 585nm 激发在 610nm 下监测 SubBi-6-TRB2 的酶切。对于 SubBi-7 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-7-FB。以 492nm 激发在 516nm 下监测 SubBi-7-FB 的酶切。对于 SubBi-4 在 5' 端用 6-JOE 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-4-JB。以 535nm 激发在 555nm 下监测 SubBi-4-JB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0884] SEQ ID NO:79SubBi-2-A350B:

[0885] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0886] SEQ ID NO:60SubBi-3-Q6B2:

[0887] CAGCACAACCGuCACCAACCG

[0888] SEQ ID NO:61SubBi-6-TRB2:

[0889] ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

[0890] SEQ ID NO:62SubBi-7-FB:

[0891] TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

[0892] SEQ ID NO:83SubBi-4-JB:

[0893] CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA

[0894] 14. 3. 用于扩增五种 mRNA 靶序列的靶序列和 PCR 引物

[0895] 将从 K562 细胞提取的人类总 RNA 用作所有五种靶体外扩增的模板。扩增子通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物体外扩增而产生。

[0896] SEQ ID NO:325' 引物 5R05/1:

[0897] CATTCTATCATCAACGGGTA

[0898] SEQ ID NO:333' 引物 3R05/1:

[0899] CAAAGGCAGATGGATCAG

[0900] SEQ ID NO:635' 引物 5B 肌动蛋白:

[0901] CATTGCCGACAGGATGCAGA

[0902] SEQ ID NO:643' 引物 3B 肌动蛋白:

[0903] GAGCCGCCGATCCACACG

[0904] SEQ ID NO:655' 引物 5BCR14:

[0905] CACTCAGCCACTGGATTAA

[0906] SEQ ID NO:663' 引物 3BCR15/6:

[0907] GCGCGTCTTTGCTTTATTC

[0908] SEQ ID NO:675' 引物 5HPRT/5:

[0909] CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

[0910] SEQ ID NO:683' 引物 3HPRT/8:

[0911] CCTGTTGACTGGTCATTACAA

[0912] SEQ ID NO:845' 引物 5R04/3:

[0913] CAAGACTGGAGACAAAAGTG

[0914] SEQ ID NO:853' 引物 3R04/2:

[0915] GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

[0916] 14.4. 反应组分:靶序列的扩增和定量

[0917] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 Mx3005P™ QPCR 系统 (Stratagene) 上进行。循环

[0918] 参数是 50°C 30 分钟、95°C 7 分钟、95°C 15 秒钟和 65°C (每一循环温度降低 1°C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95°C 15 秒钟和 54°C 30 秒钟的 40 个循环。反应含有 40nM5B 肌动蛋白、5BCR14、5HPRT/5, 和 80nM5R04/3、5R05/1, 和 200nM3B 肌动蛋白、3BCR15/6、3HPRT/8, 和 400nM3R04/2 和 3R05/1。对于 β 肌动蛋白、BCR、RPLPO 外显子 4 和 HPRT 有 200nM 的每一 A 部件酶和 B 部件酶。对于 RPLPO 外显子 5 有 400nM 的每一 A 部件酶和 B 部件酶。有 200nM 的 SubBi-2-A350B、SubBi-3-Q6B2、SubBi-6-TRB2 和 SubBi-7-FB, 以及 400nM 的 SubBi-4-JB。还有 10mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、10 单位 Rnasin (Promega)、20 单位 M-MLV RT(H-) (Promega)、1x Immobuffer (Bioline)、2 单位 Immolase (Bioline), 以及 5 μ LRNA 模板 (100ng、20ng、4ng、800pg 或 160pg) 或无靶 (dH₂O)。

[0919] 表 16: 用于同时检测五种不同核酸靶的反应组分

| 反应类型 | 引物 | 部件酶 A 和 B | 底物 | 部件酶 / 底物的量 | 3'/5'引物的量 |
|--|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| [0920] β -肌动蛋白 | 5B 肌动蛋白 3B 肌动蛋白 | BaA4/7-P BaB5/7-P | SubBi-7-FB | 200 nM / 200 nM | 200 nM / 40 nM |
| [0921] 白, RPLPO 外显子 5, BCR, HPRT, RPLPO 外显子 4. | 5R05/1 3R05/1 | RO5A4/4-P RO5B5/4-P | SubBi-4-JB | 400 nM / 400 nM | 400 nM / 80 nM |
| | 5BCR14 3BCR15/6 | BCRA4/6-P BCRB5/6-P | SubBi-6-TR B2 | 200 nM / 200 nM | 200 nM / 40 nM |
| | 5HPRT/5 3HPRT/8 | HPRTA4/2-P HPRTB5/2-P | SubBi-2-A3 50B | 200 nM / 200 nM | 200 nM / 40 nM |
| | 5R04/3 3R04/2 | RO4A4/3-P RO4B5/3-P | SubBi-3-Q6 B2 | 200 nM / 200 nM | 400 nM / 80 nM |

[0922] 14.5. 结果:五种不同靶序列的同时扩增以及通过酶切五种不同报告底物的检测

[0923] 用来实时检测和定量具有 RPLPO 外显子 4、BCR、 β -肌动蛋白、RPLPO 外显子 5 和 HPRT 的 RNA 序列的五种 MNAzyme 表明,当所用的靶序列是通过 RTPCR 扩增的人类总 RNA 时荧光随时间增加(表 17)。所有五个反应中无 RNA 靶对照的荧光低于含 RNA 靶反应中的荧光并且在反应期间不增加(表 17)。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。

[0924] 通过以 RNA 浓度的对数对循环阈值作图,生成所有五种靶的标准曲线,得到线性

图。每一标准的阈值 (Ct) 如表 17 所示。Ct 值是两份反应结果的平均值。每一靶的相关系数 (R^2)、斜率和反应效率也如表 17 所示。

[0925] 表 17: 同时扩增和检测五种不同核酸靶的反应结果

[0926]

| | 阈值(Ct) | | | | |
|------------|------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|
| | β -肌动蛋白 (FAM) | RPLPO 外显子 5 (JOE) | BCR (德克 萨斯红) | HPRT (Alexa 350) | RPLPO 外 显子 4 (Quasar 670) |
| 100 ng RNA | 13.8 | 13.7 | 17.2 | 21.4 | 17.2 |
| 20 ng RNA | 16.3 | 17.0 | 19.5 | 23.5 | 19.8 |
| 4 ng RNA | 19.0 | 20.8 | 22.0 | 25.8 | 23.2 |
| 800 pg RNA | 21.9 | 24.0 | 24.3 | 28.6 | 26.0 |
| 160 pg RNA | 24.1 | 26.8 | 26.8 | 30.8 | 28.8 |

[0927]

| | | | | | |
|----------|--|--|--|--|--|
| 无 RNA 对照 | 无信号 | 无信号 | 无信号 | 无信号 | 无信号 |
| 标准曲线 | $R^2 = 0.998$ 斜率 = -3.729 效率 = 85% | $R^2 = 0.997$ 斜率 = -4.750 效率 = 62% | $R^2 = 1.000$ 斜率 = -3.425 效率 = 96% | $R^2 = 0.997$ 斜率 = -3.440 效率 = 95% | $R^2 = 0.999$ 斜率 = -4.192 效率 = 73% |

[0928] 本实施例中的 MNAzyme RT-PCR 反应允许在包括五种通用底物的单一复合反应中同时检测五种靶, 并生成用于定量这五种靶的标准曲线。这些通用底物适合于在单一反应中监测五种靶的其它组合。

[0929] 实施例 15: 使用 MNAzyme 定量细菌中核糖体 16S

[0930] 为了取代革兰氏染色 (Gram stain) 的细菌测试, MNAzyme 能够基于在细菌种类中发现的保守核酸序列用来进行无菌和 / 或支原体污染的快速释放测试。使用体外靶扩增方法如 RT-PCR, MNAzyme 能够用来实时监测靶细菌核酸的扩增。在本实施例中, 使用在细菌核糖体 16S 序列中发现的保守区域, 其中逆转录、PCR 扩增和 MNAzyme 介导的检测在一管中同时发生。

[0931] 设计了一种靶向某些细菌种类共有的核糖体 16S 序列的区域的系统, 这些细菌种类包括头状葡萄球菌 (*Staphylococcus capitis*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)、洛菲不动杆菌 (*Acinetobacter woffii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。

[0932] 15.1. 部件酶寡核苷酸

[0933] 部件酶寡核苷酸 A 和 B 使用设计 7, 所述设计 7 具有与细菌种类之间的保守区域互补的感应臂。部件酶寡核苷酸如下所示, 其中“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。在如下序

列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0934] SEQ ID NO:86 部件酶 A516S1A5/2-P:

[0935] **GGTTGTCGTCAGCTCGTG** TACAACGA *GAGGAAACCTT* -P

[0936] SEQ ID NO:87 部件酶 B616S1B6/2-P:

[0937] *TGCCCAGGGA* GGCTAGC **TCGTGAGATGTTGGGTTAAG** -P

[0938] 15.2. 报告底物

[0939] 本实施例的报告底物是 SubBi-2,其序列从 5'到 3'如下所示。在当前实施例中,对于 SubBi-2 在 5'端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3'端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-FB。以 492nm(FAM 激发波长)激发在 516nm(FAM 发射波长)下监测 SubBi-2-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0940] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[0941] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[0942] 15.3. 用于扩增细菌核糖体 16S 的 PCR 引物

[0943] 本实施例的靶序列使用下列寡核苷酸 PCR 引物通过体外扩增枯草芽孢杆菌而产生。

[0944] SEQ ID NO:885' 引物 516S1-1:

[0945] TGGTGCATGGTTGTCGTC

[0946] SEQ ID NO:893' 引物 316S1-1:

[0947] TTGCGCTCGTTGCGGGA

[0948] 15.4. 靶序列和对照

[0949] 从枯草芽孢杆菌细胞提取细菌核糖体 RNA 并将其用作扩增 16S 区域的模板。无核酸酶的 dH₂O 取代 RNA 用作无靶对照。

[0950] 15.5. 反应组分:靶序列的扩增和定量

[0951] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μL 的总反应体积进行。所有的反应在 Mx3005p QPCR 系统 (Stratagene) 上进行。循环参数是 50 °C 30 分钟、95 °C 7 分钟、95 °C 15 秒钟和 65 °C (每一循环温度降低 1 °C) 30 秒钟的 10 个循环和最后 95 °C 5 秒钟和 55 °C 30 秒钟的 40 个循环。反应含有 40nM516S1-1 和 200nM 的 316S1-1、200nM16S1A5/2-P 和 200nM16S1B6/2-P、200nM SubBi-2-FB、7.5mM MgCl₂、200 μM 的每一 dNTP, 10 单位 Rnasin(Promega)、1x Immobilizer(Bioline)、1 单位的 Immolase(Bioline),以及 RNA 模板 (500ng、50ng、5ng 或 500pg) 或无靶 (dH₂O)。

[0952] 15.6. 结果:靶的扩增和 SubBi-2-FB 报告底物的酶切

[0953] 用于实时检测和定量细菌核糖体 16S 的 MNAzyme 表明,当所用的靶序列是通过 RTPCR 扩增的细菌 RNA 时,荧光随时间增加。无模板对照的荧光低于含 RNA 反应中的荧光并且在反应期间不增加。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。通过以 RNA 浓度的对数对循环阈值作图生成标准曲线,得到相关系数为 0.992 的线性图。

[0954] 表 18: 扩增和检测细菌核糖体 16S 扩增子的反应结果

| 样品(pg) | 循环阈值 (Ct) 两份的平均值 | 结果 |
|---------------|---------------------|--|
| 500,000 | 12.5 | 标准曲线 (两份反应的平均值) $R^2 = 0.992$ 斜率 = -4.461 效率 = 68% |
| 50,000 | 16.4 | |
| 5000 | 20.5 | |
| 500 | 26.0 | |
| 无 RNA 靶 对照 | 无信号 | 无信号 |

[0956] 本实施例证实 MNazyme 检测和定量通过 RTPCR 扩增细菌核糖体 16S RNA 产生的扩增子的能力。本实施例使用的 MNazyme 靶向细菌 16S 的区域,所述区域下述细菌种类之间 100% 保守:头状葡萄球菌 (*Staphylococcus capitis*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)、洛菲不动杆菌 (*Acinetobacter woffii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。这样,单一 MNazyme 和报告底物可以用来筛选存在任一种上述细菌的样品。信号 (例如 FAM) 的检测可以提示样品中存在一种或多种这些细菌种类。

[0957] 实施例 16 :通过单管 RT-PCR 使用 MNazyme 检测和定量病毒 RNA

[0958] 使用体外靶扩增方法如 RTPCR, MNazyme 能够用来实时监测靶核酸的扩增。此外,实时检测允许定量反应中最初存在的靶的量。本实施例例示使用 MNazyme 检测和定量 HIV 病毒 RNA。逆转录、PCR 扩增和 MNazyme 检测在单管反应中进行。

[0959] 16.1. 部件酶寡核苷酸

[0960] 将部件酶设计成以特异性靶向 HIV-1 的 Nef 基因。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNazyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[0961] SEQ ID NO:90 部件酶 A4NefA4/6-P:

[0962] **GAAGAGGCCAATAAAGGAGAG** ACAACGA *GAGGCGTGAT*-P

[0963] SEQ ID NO:91 部件酶 B5NefB5/6-P:

[0964] *CTGGGAGGAA* GGCTAGCT **AACACCAGCTTGTTACACC**-P

[0965] 16.2. 报告底物

[0966] 本实施例的报告底物是 SubBi-6,其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前实施例中,对于 SubBi-6 在 5' 端用德克萨斯红部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ2 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-6-TRB2。以 585nm (德克萨斯红激发波长) 激发在 610nm (德克萨斯红发射波长) 下监测 SubBi-6-TRB2 的酶切。在如下序列中,小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[0967] SEQ ID NO:61SubBi-6-TRB2:

[0968] ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

[0969] 16.3. 靶序列

[0970] 本实施例中的标准曲线通过 RTPCR 扩增 HIV-1 病毒 RNA 产生。使用 QIAGEN Ultrasens 病毒试剂盒 HIV-1 从采集自感染 HIV-1 的人 CEMT4 细胞的介质中分离病毒 RNA。使用无核酸酶 (NF) 的水替代病毒 RNA, 作为无靶对照。

[0971] 16.4. 用于扩增 HIV-1Nef 转录本的 PCR 引物

[0972] 使用如下的引物扩增 HIV-1Nef 转录本。使用 3' 引物 Nef/3PCR 逆转录, 然后该引物和 5' 引物 Nef/5PCR 促进 PCR 扩增。

[0973] SEQ ID NO:92 引物 Nef/3PCR:

[0974] CAGGGTCATCCATTCCATGCAG

[0975] SEQ ID NO:93 引物 Nef/5PCR:

[0976] GCTAGTACCAGTTGAGCCAG

[0977] 16.5. 反应组分: 靶序列的扩增和定量

[0978] 靶序列的实时扩增和定量以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 Mx3005p QPCR 系统 (Stratagene) 上进行。循环参数是 50 $^{\circ}$ C 30 分钟、95 $^{\circ}$ C 7 分钟、95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 65 $^{\circ}$ C (每一循环温度降低 1 $^{\circ}$ C) 30 秒钟的 10 个循环和最后 95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 55 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 50 个循环。反应含有 200nM 的 3' 引物 Nef/3PCR 和 40nM 的 5' 引物 Nef/5PCR、200nM 的部件酶 NefA4/6-P 和 200nM 的部件酶 NefB5/6-P、200nM SubBi-6-TRB2、10mM MgCl₂、200 μ M 的每一 dNTP、10 单位 Rnasin (Promega)、1x Immobuffer (Bioline)、0.5 单位的 Immolase (Bioline)、10 单位 MMLV RT(H-), 以及 5 μ L 的总 RNA 模板 (含 45,000pg、4,500pg、450pg、45pg、4.5pg 或 0.45pg) 或无靶 (仅 H₂O)。

[0979] 16.6. 结果: 靶的扩增和 SubBi-6-TRB2 报告底物的酶切

[0980] 实时检测和定量 HIV-1Nef 转录本的 MNAzyme 表明, 当所用的靶序列是通过 RTPCR 扩增的 HIV-1 病毒 RNA 时, 荧光随时间增加。无靶 (仅 H₂O) 对照反应的信号没有增加。这表明含靶反应中产生的荧光增加是由于随后酶切报告底物的催化活性 MNAzyme 的靶依赖性组装。

[0981] 通过以每一反应中 RNA 模板量的对数对循环阈值 (Ct) 作图生成标准曲线, 得到线性图。每一标准的 Ct, 以及相关系数 (R²)、斜率和反应效率如表 19 所示。

[0982] 表 19: 扩增和检测 HIV Nef 转录本的结果

| 样品 | 循环阈值(Ct) (两份反应的平均 值) | HIV 病毒 RNA (pg) | 结果 |
|------|----------------------------|--------------------|---|
| 标准 1 | 5.22 | 45,000 | 校准曲线 R ² = 0.996 斜率 = -4.271 效率 = 71.4% |
| 标准 2 | 9.96 | 4,500 | |
| 标准 3 | 13.78 | 450 | |
| 标准 4 | 17.22 | 45 | |
| 标准 5 | 22.09 | 4.5 | |
| 标准 6 | 27.15 | 0.45 | |
| 无靶对照 | 无信号 | 0 | 无信号 |

[0984] 本实施例证实了 MNAzyme 用于检测和定量病毒序列包括 HIV-1 的能力。

[0985] 实施例 17: MNAzyme 催化活性的的序列要求

[0986] 17.1. 部件酶寡核苷酸

[0987] 原先发现的 10:23DNA 酶的催化核包含 15 个核苷酸 (Santoro&Joyce, 1997)。对催化核中关键碱基后来的研究表明,某些特定碱基取代显著降低催化活性,而其它的取代耐受性很好 (Zaborowska et al.)。

[0988] 在本实施例中,设计并检测一系列部件酶以研究 MNAzyme 催化核对两种部件酶的部分核中序列变异的耐受性。用于检测人类 RPLP0 基因的 MNAzyme 的未修饰的部件酶 A 和 B 用作对照,并与各种变异的部件酶序列比较,所述变异的部件酶序列中在部分催化核区域进行单个碱基取代。用来检测靶的部件酶寡核苷酸基于设计 7 (见实施例 20),从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,使加下划线的、斜体或黑体碱基与对照 (未变异) 的部分核序列相比发生变异,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。

[0989] SEQ ID NO:94 部件酶 A5R04A5/2:

[0990] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TACAACGA *GAGGAAACCTT*

[0991] SEQ ID NO:95 部件酶 A5R04A5/2-G14A:

[0992] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TACAAC **A** *A* *GAGGAAACCTT*

[0993] SEQ ID NO:96 部件酶 A5R04A5/2-A9T:

[0994] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** T **T** CAACGA *GAGGAAACCTT*

[0995] SEQ ID NO:97 部件酶 A5R04A5/2-A12T:

[0996] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TACA **T** CGA *GAGGAAACCTT*

[0997] SEQ ID NO:98 部件酶 A5R04A5/2-A11T:

[0998] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TAC **T** ACGA *GAGGAAACCTT*

[0999] SEQ ID NO:99 部件酶 B6R04B6/2:

[1000] *TGCCCAGGGA* GGCTAGC **GTGTTCGACAATGGCAGCA**

[1001] SEQ ID NO:100 部件酶 B6R04B6/2-C7A:

[1002] *TGCCCAGGGA* GGCTAG **AGTGTTCGACAATGGCAGCA**

[1003] SEQ ID NO:101 部件酶 B6R04B6/2-T4C:

[1004] *TGCCCAGGGA* GGCCAGC **GTGTTCGACAATGGCAGCA**

[1005] 17.2. 报告底物

[1006] 本实施例的报告底物是 SubBi-2,其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-FB。以 485nm (FAM 激发波长) 激发在 530nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。在如下序列中,小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[1007] SEQ ID NO:21 SubBi-2-FB:

[1008] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[1009] 17.3. 靶序列

[1010] 在本实验中将合成 DNA 寡核苷酸用作靶模板,所述靶的序列从 5' 到 3' 如下所示。

[1011] SEQ ID NO:102R04/2 靶:

[1012] ATGCTGCCATTGTCTGAACACCTGCTGGATGACCAGCCCAA

[1013] 17.4. 反应条件

[1014] 各种部件酶对的催化活性分析用 SmartCycler 系统热循环仪 (Cepheid) 进行。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 25 μ L。每一反应含有 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems)、10mM MgCl₂、0.2 μ M 的 SubBi-2FB、2 μ M 的 RO4/2 靶, 以及一对 A 和 B 部件酶 (每一为 2 μ M)。每一反应中的部件酶对如下表 20 所示。

[1015] 表 20: 用于检测核酸靶的反应组分

| 反应 | 部件酶 A | 部件酶 B | 复制的数量 |
|-------------------------------|--------------|-------------|-------|
| 对照(未变异)部件酶 A 和 B | RO4A5/2 | RO4B6/2 | 6 |
| 变异部件酶 A (G14A)和对照部件酶 B | RO4A5/2-G14A | RO4B6/2 | 3 |
| 变异部件酶 A (A12T)和对照部件酶 B | RO4A5/2-A12T | RO4B6/2 | 3 |
| [1016] 变异部件酶 A (A11T)和对照部件酶 B | RO4A5/2-A11T | RO4B6/2 | 3 |
| 变异部件酶 A (A9T)和对照部件酶 B | RO4A5/2-A9T | RO4B6/2 | 3 |
| 对照部件酶 A 和变异部件酶 B (C7A) | RO4A5/2 | RO4B6/2-C7A | 3 |
| 对照部件酶 A 和变异部件酶 B (T4C) | RO4A5/2 | RO4B6/2-T4C | 3 |

[1017] 反应在 54°C 温育 20 分钟, 以 12 秒钟的间隔收集荧光数据。由于在 SmartCycler 系统热循环仪上各孔的初始荧光可能不同, 从每一反应在每一时间点的荧光中减去初始荧光值以便比较不同孔中的反应。然后将含变异部件酶 A 或变异部件酶 B 的复制反应的平均值表示为对照复制荧光的百分数。

[1018] 17.5. 结果 :SubBi-2FB 报告底物酶切的检测

[1019] 通过荧光随时间的变化测量各种部件酶对对底物的酶切。然后将每一反应的正常化荧光值表示为在相同时间点在对照反应中观察到的荧光的百分数 (表 21)。

[1020] 表 21: 各种部件酶序列变异体的酶切活性 (* 本实施例) 以及与变异 10:23DNA 酶 (**Zaborowska) 活性的比较。

[1021]

| 催化核内从 5' 到 3' 的位置数 | 部件酶部分核的序列(对照) | | 序列 10:23 核 (Santoro & Joyce 1997) | (*) 部件酶 A 或 B 中或 (**) 10:23 DNA 酶中被取代的碱基 (和名称) | 具有取代的 DNA 酶的酶切活性(对照的百分数) | |
|--------------------|---------------|-------|-----------------------------------|--|--------------------------|----------------------------|
| | 部件酶 B | 部件酶 A | | | * MNAzyme (54°C 10 分钟) | **10:23 DNA 酶 (37°C 20 分钟) |
| 1 | G | | G | | | |
| 2 | G | | G | | | |
| 3 | C | | C | | | |
| 4 | T | | T | C (T4C) | 17% | < 10% |
| 5 | A | | A | | | |
| 6 | G | | G | | | |
| 7 | C | | C | A (C7A) | 40 % | < 80% |
| 8 | | T | T | | | |
| 9 | | A | A | T (A9T) | 70 % | 90% |
| 10 | | C | C | | | |
| 11 | | A | A | T (A11T) | 86 % | 80% |
| 12 | | A | A | T (A12T) | 80 % | 80% |
| 13 | | C | C | | | |
| 14 | | G | G | A (G14A) | 3 % | < 10% |
| 15 | | A | A | | | |

[1022] 本试验表明,部件酶 A 或 B 的部分催化核中的各种取代与活性 MNAzyme 的形成相适宜。相比之下,其它取代耐受性不好并产生催化活性很小或无催化活性的结构。当把使用 MNAzyme 所得结果与报道的 10:23DNA 酶催化核中同等取代的结果相比较时 (Zaborowska et al.), 观察到了上述类似的模式 (表 21)。例如,在部件酶 A 中或 10:23 核中位置 14 处用 G 取代 A (G14A) 导致大于 90% 的酶切活性丧失。相比之下,在部件酶 A 中或 10:23 核中位置 12 处用 A 取代 T (A12T) 导致分子的酶切活性与对照序列相比保留大约 80%。

[1023] 这样,当将相同序列变异引入一种部件酶时,关于其它序列取代的文献中的信息可以预测期望的催化活性,所述序列取代与 DNA 酶活性相适宜 (例如 10:23DNA 酶或 8:17DNA 酶)。此外,本领域技术人员可以用经验测试来鉴定另外的部件酶部分催化核序列变异,所述变异与活性 MNAzyme 形成相适宜。

[1024] 实施例 18 :MNAzyme 用于检测包括诸如 5' - 三磷酸腺苷的小分子的靶

[1025] 适体是这样的单链 DNA 或 RNA 分子,即因以高度亲和力和特异性结合靶的能力而从大量随机序列的寡核苷酸体外离析而来的单链 DNA 或 RNA 分子。已经选择能与多种靶特异性结合的适体,所述靶包括蛋白、糖类、脂质、核苷酸、完整细胞和病毒。在本实施例中,将适体序列引入具有使得活性 MNAzyme 仅在靶的存在下才能形成的构型的部件酶的末端 (适体 - 部件酶)。有多种方式实现这一目标,包括图 4 概述的策略和图 20 中例示的如下实施

例中使用的策略。

[1026] 图 20 中例示的 MNAzyme 检测策略需要的核酸寡核苷酸包括 ;标准部件酶 ;

[1027] a) 适体 - 部件酶,是将适体引入其一个末端的部件酶 ;

[1028] b) 组装易化子,是与能够组装成活性 MNAzyme 的适体 - 部件酶和部件酶都结合的寡核苷酸 ;

[1029] c) 报告底物 ;和

[1030] d) 抑制因子寡核苷酸,其在跨越至少部分适体序列和部件酶序列的部分底物结合臂的区域与适体 - 部件酶杂交。

[1031] 在没有与适体结合的靶 (图 20 左手插图) 时,抑制因子寡核苷酸与适体 - 部件酶结合从而阻止报告探针底物的结合 (与酶切)。在存在与适体结合的靶 (图 20 右手插图) 时,该靶与适体 - 部件酶的适体序列结合,阻止抑制因子寡核苷酸的结合并允许报告探针底物的结合与酶切。这样, MNAzyme 仅在靶的存在下形成并引起荧光信号的产生。

[1032] 该策略使用检测小分子 ATP 来证实。本实施例使用的 27 个核苷酸长度的适体序列先前已报道为能够与 ATP 和 dATP 高度特异地结合 (Achenbach, 2005; Huizenga and Szostak, 1995)。

[1033] 18. 1. 部件酶寡核苷酸、组装和抑制性寡核苷酸

[1034] 在本实施例中,将 ATP 适体序列置于邻近适体 - 部件酶 A 的底物臂 (图 20)。将适体 - 部件酶 A 和部件酶 B 的感应臂设计成与组装易化子结合。适体 - 部件酶 AtpA2/1 和部件酶 Atp B3/1 (图 21) 的序列如下所示 (5' 到 3')。在如下序列中,黑体碱基与组装易化子杂交,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,斜体碱基与底物杂交。此外,部件酶 AtpA2/1 中普通文本的碱基表示与 ATP 或 dATP 结合的 DNA 适体序列。

[1035] SEQ ID NO:103 适体 - 部件酶 A2AtpA2/1:

[1036] **AACGTACACTGCACG** CGGTCGAA *ATAGTGAGT* ACCTGGGGGAGTAT

[1037] TGCGGAGGAAGGT

[1038] SEQ ID NO:104 部件酶 B3AtpB3/1:

[1039] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GTCTGTACCGTGTAC**

[1040] 组装易化子的序列如下所示 (5' 到 3') :

[1041] SEQ ID NO:105 组装易化子 AtpC/1:

[1042] GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

[1043] 抑制因子寡核苷酸的序列如下所示 (5' 到 3') :

[1044] SEQ ID NO:106 抑制因子 AtpR/1:

[1045] CCAGGTACTCACTATTT

[1046] 18. 2. 报告底物

[1047] 通过酶切双重标记的核酸报告底物监测 MNAzyme 活性。本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB,其序列从 5' 到 3' 如下所示。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端的 6-FAM 部分和 3' 端的 BHQ1 部分的位置。以 490nm (FAM 激发波长) 激发在 520nm (FAM 发射波长) 下监测在 FAM 和 BHQ1 之间的核苷酸处酶切 SubBi-1-FB 所引起的荧光改变。

[1048] SEQ ID NO:6:SubBi-1 - FB:

[1049] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[1050] 18.3. 靶

[1051] 本实施例的靶分子是 5' - 三磷酸腺苷 (ATP) 和 5' - 三磷酸脱氧腺苷 (dATP)。5' - 三磷酸鸟苷 (GTP) 和 5' - 三磷酸胞苷 (CTP) 用作阴性对照。所有分子购自 Bioline。无核酸酶的水用作无靶对照。

[1052] 18.4. 反应条件

[1053] 靶的检测通过由催化活性 MNAzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 50 μ L。在底物注射之前,所有的反应在 60°C 预温育 5 分钟 (以减少二级结构)。反应在 FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech) 上在 47°C 下进行。每 3 秒钟读取每一反应的荧光,总共读 10 分钟。每一反应含有如下终浓度的物质:200nM AtpA2/1、200nM AtpB3/1、200nM AtpC/1、200nM AtpR/1、200nM SubBi-1-FB、25mM MgCl₂、50mM Tris HCl pH7.5,以及 2mM 的 ATP、dATP、GTP、CTP 或无靶 (水)。

[1054] 18.5. SubBi-1-FB 报告底物的检测与酶切

[1055] 在没有 ATP 或 dATP 时,观察到不随时间增加的低水平荧光,表明抑制因子寡核苷酸能够阻止活性 MNAzyme 的组装 (图 21)。在存在 ATP 或 dATP 时,荧光信号较高而且随时间增加。这表明 dATP 和 ATP 取代了抑制因子寡核苷酸并且活性 MNAzyme 形成。由于在 GTP 和 CTP 存在时的荧光信号与没有 ATP 或 dATP 时即在无分析物的水对照中的荧光信号相同, MNAzyme 的组装具有靶依赖性。本实施例表明 MNAzyme 能够以对靶具有高度特异性的方式与用于检测靶的适体结合,所述靶包括核酸和非核酸靶。

[1056] 本领域技术人员应当认识到该策略的设计能够灵活进行。能够将适体引入含有部分催化核序列的两种部件酶的任一者的任意一端 (5' 或 3')。这样,抑制因子寡核苷酸能够与适体区域以及底物臂 (结合报告底物) 或感应臂 (结合组装易化子) 相结合。在前一设计 (图 20;本实施例) 中,抑制因子阻止报告底物的结合。在后一设计中,抑制因子会阻止组装易化子与部件酶结合从而阻止活性 MNAzyme 形成。

[1057] 文献中含有能够检测多种靶的大量适体的序列。这些序列包括蛋白、糖类、脂质、朊病毒、核苷酸、完整细胞和病毒。所有这些种类的靶的适体都可以连接到部件酶上以检测大范围的各种分子。与靶结合适体 (或适体 - 部件酶) 和 MNAzyme 酶切报告底物都相适宜的反应条件 (缓冲液、温度、二价阳离子浓度等) 能够通过经验测试确定。此外,由于适体是在研究者选择的反应条件下体外离析得到,有可能调整分子离析以允许对任何想得到的靶开发适体,所述靶会在与 MNAzyme 酶切相适宜的条件下结合。由于 MNAzyme 在非常宽广的条件范围内都有活性,本领域技术人员可以轻易确定与 MNAzyme 酶切相适宜的条件。

[1058] 实施例 19:使用 MNAzyme 检测单个碱基错配

[1059] 使用体外靶扩增方法如 PCR, MNAzyme 能够用来实时检测和定量靶核酸。通过例如检测核酸序列的改变, MNAzyme 也能够用来产生定量结果。通过感应臂和靶序列的 Watson-Crick 碱基识别,能够进行 MNAzyme 介导的靶检测。在本实施例中,通过采用部件酶感应臂和靶核酸序列的该互补性要求, MNAzyme 被用来检测单个碱基错配。

[1060] 19.1. 部件酶寡核苷酸

[1061] 将部件酶寡核苷酸设计成使之要么与靶序列完全互补,要么相对于靶序列有错配 (图 22 (i))。完全匹配的部件酶 A (R05A5/2 (22) -P)、完全匹配的部件酶 B (R05B6/2 (11G) -P)

和错配的部件酶 B(R05B6/2(11C)-P) 的序列如下所示 (5' 到 3')。在如下序列中,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与靶杂交,斜体碱基与底物杂交。部件酶 R05B6/2(11C)-P 的错配碱基为黑体并加了下划线。“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[1062] SEQ ID NO:107 部件酶 A5R05A5/2(22)-P:

[1063] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** TACAACGA *GAGGAAACCTT*-P

[1064] SEQ ID NO:108 部件酶 B6R05B6/2(11G)-P:

[1065] *TGCCCAGGGA* GGCTAGC **GTGGAGACGGA**-P

[1066] SEQ ID NO:109 部件酶 B6R05B6/2(11C)-P:

[1067] *TGCCCAGGGA* GGCTAGC **GTCGAGACGGA**-P

[1068] 19.2. 报告底物

[1069] 本实施例中使用的报告底物是 SubBi-2。在当前的实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-FB。以 485nm(FAM 激发波长) 激发在 530nm(FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。SubBi-2-FB 的序列如下所示 (从 5' 到 3');小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[1070] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[1071] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[1072] 19.3. 用于扩增 RPLP0 外显子 5 的 PCR 引物

[1073] 本实施例的靶序列通过使用下列寡核苷酸 PCR 引物 (从 5' 到 3') 体外扩增人类基因组 DNA 产生。

[1074] SEQ ID NO:32 引物 5R05/1:

[1075] CATTCTATCATCAACGGGTA

[1076] SEQ ID NO:110 引物 3R05/2:

[1077] AGCAGCCACAAAGGCAGA

[1078] 19.4. 靶序列和对照

[1079] 从人 K562 细胞系提取的人类基因组 DNA 用作扩增 RPLP0 基因的模板。无核酸酶 (NF) 的水替代基因组 DNA 用作无靶对照。

[1080] 19.5. 反应组分:靶序列的扩增和检测

[1081] 靶序列的实时扩增和检测以 25 μ L 的总反应体积进行。所有的反应在 ABI7700 热循环仪 (Applied Biosystems) 上进行。循环参数是 95°C 7 分钟、95°C 15 秒钟和 65°C (每一循环温度降低 1°C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95°C 15 秒钟和 47°C 30 秒钟的 50 个循环。反应含有 40nM5R05/1、200nM 的 3R05/2、200nM R05A5/2(22)-P 和 200nMR05B6/2(11G)-P 或 200nM R05B6/2(11C)-P、200nM SubBi-2-FB、10mM MgCl₂、200 μ M 每一 dNTP、10 单位 Rnasin (Promega)、1x ROXreference (Invitrogen)、1x Immobuffer (Bioline)、1 单位每一 Immolase (Bioline),以及 100ng 基因组 DNA 模板或 NF 水。

[1082] 19.6. 结果:使用 MNAzyme 检测单一碱基错配

[1083] 包含完全匹配的感应臂 B 的 MNAzyme 表明,当所用的靶序列是通过 PCR 扩增的人类基因组 DNA 时,荧光随时间增加 (图 22(ii))。相比之下,含错配的感应臂 B 的 MNAzyme 显示基因组靶的低水平荧光,与在无靶对照中看到的相似,而且荧光不随时间增加。因此,

离部件酶 A 和 B 接合点三个碱基处的单个碱基错配足够阻止活性 MNzyme 的形成。

[1084] 本实施例表明 MNzyme 能够用于检测靶和感应臂之间的单个碱基错配。由于 MNzyme 能够检测小到单个碱基改变的变化, MNzyme 也能够用于区分由小的删除或小的插入引起的序列差异对本领域技术人员而言是显而易见的。此外,也能够检测较大的变化,如与引起融合转录的各种癌症相关的易位。这些变化经常与白血病相关,例如 PML/RAR α 融合转录与急性早幼粒细胞白血病相关, bcr/abl 融合转录与慢性粒细胞白血病相关。

[1085] 虽然本实施例表明单个碱基错配能够足以阻止活性 MNzyme 的组装,但是另外的实验表明并非所有单个碱基错配在所有条件下都能完全阻碍 MNzyme 的组装。区分单个碱基错配的能力取决于多个因素,包括 a) 反应条件的严紧性,所述严紧性能够受到多种因素包括温度、盐浓度、阳离子浓度的影响, b) 错配类型,例如 G/T 错配对 C/C 错配, c) 部件酶臂中错配的位置,和 d) 部件酶臂的长度。

[1086] 能够使用另外的策略增加 MNzyme 检测单个碱基多态性的能力。这些策略包括,例如使用如实施例 22 所示的截短的部件酶感应臂。

[1087] 实施例 20: 从含有源自 10:23 催化核的变异部分催化核序列的一系列部件酶对中测试 MNzyme 的活性

[1088] 能够制备从各种体外离析的 DNA 酶纳入部分序列的多组分核酸酶 (MNzyme)。已经例示了基于来自 8:17 和 10:23DNA 酶的部分序列的活性 MNzyme。此外,已经表明,基于 8:17 和 10:23DNA 酶的多个可选的部件酶设计要么有活性 (实施例 1、3, 图 9、10、13), 要么缺乏活性 (实施例 1, 图 8)。本实施例进一步扩展这些研究并鉴定基于来自 10:23DNA 酶的部分催化核序列的有活性和无活性的部件酶序列。此外,本实施例为鉴定最佳位置以酶切催化核序列使得当将部分催化核序列纳入部件酶时生成功能活性 MNzyme 所需的步骤提供了一般方法。

[1089] 20.1. 部件酶寡核苷酸

[1090] 本实施例的方法用来研究 10:23 催化核序列中哪些位置适合于酶切成部分催化核序列,当所述部分催化核序列纳入部件酶时,得到功能活性 MNzyme。在多个位点酶切 10:23 序列,然后将这两个部分序列纳入被设计用来在靶 (人类 RPLP0 基因) 的存在下酶切底物的一系列部件酶对中。被测试的每一部件酶对的部分催化核参考 10:23DNA 酶的完整催化核序列如表 22 所示 (Santoro and Joyce, 1997)。

[1091] 表 22: 10:23DNA 酶和一系列变异的部件酶对中的碱基和位置,其中在核中 1-15 的位置的碱基在两个部件酶 A 和 B 之间不同地分布。

[1092]

| 位置# | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| 10:23 DNA 酶 (Santoro & Joyce, 1997) | | G | G | C | T | A | G | C | T | A | C | A | A | C | G | A |
| 设计 6 A4:B5 (T8-A9) | 部件酶 A | | | | | | | | | A | C | A | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | G | C | T | | | | | | | |
| 设计 7 A5:B6 (C7-T8) | 部件酶 A | | | | | | | | T | A | C | A | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | G | C | | | | | | | | |
| 设计 8 A6:B7 (A11-A12) | 部件酶 A | | | | | | | | | | | | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | G | C | T | A | C | A | | | | |
| 设计 9 A7:B8 (A9-C10) | 部件酶 A | | | | | | | | | | C | A | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | G | C | T | A | | | | | | |
| 设计 10 A8:B9 (G6-C7) | 部件酶 A | | | | | | | C | T | A | C | A | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | G | | | | | | | | | |
| 设计 11 A9:B10 (A5-G6) | 部件酶 A | | | | | | G | C | T | A | C | A | A | C | G | A |
| | 部件酶 B | G | G | C | T | A | | | | | | | | | | |

[1093] 所有的序列从 5' 到 3' 书写。MNAzyme 设计和部件酶命名自表 3 中的系列延续并在本表中扩展以鉴定核中的酶切位置。例如,设计 6 是具有部件酶 A4 和部件酶 B5 设计 (A4:B5) 的 10:23 衍生 MNAzyme,其中该核已在位置 8 的 T 和位置 9 的 A(T8-A9) 之间被酶切。

[1094] 在本实验中,部件酶对的系列都是合成的,其中感应臂被设计用来与人类 RPLP0 基因的外显子 5 杂交,并且底物臂针对底物 SubBi-2。本实验中使用的部件酶对通过 Sigma-Proligo 合成,其序列如下所示(从 5' 到 3')。加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,黑体碱基与核酸靶杂交,斜体碱基与底物杂交。“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[1095] RPLP0 部件酶对 A4:B5SEQ ID NO:147R05A4/2-P

[1096] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA *GAGGAAACCTT* -P

[1097] SEQ ID NO:112R05B5(16)/2-P

[1098] *TGCCAGGGA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACA** -P

- [1099] RPLP0 部件酶对 A5:B6
- [1100] SEQ ID NO:107R05A5/2(22)-P
- [1101] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** TACAACGA GAGGAAACCTT - P
- [1102] SEQ ID NO:114R05B6(16)/2-P
- [1103] **TGCCCAGGGA** GGCTAGC GTGGAGACGGATTACA - P
- [1104] RPLP0 部件酶对 A6:B7
- [1105] SEQ ID NO:115R05A6(22)/2-P
- [1106] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACGA GAGGAAACCTT - P
- [1107] SEQ ID NO:116R05B7(16)/2-P
- [1108] **TGCCCAGGGA** GGCTAGCTACA GTGGAGACGGATTACA - - P
- [1109] RPLP0 部件酶对 A7:B8
- [1110] SEQ ID NO:117R05A7(22)/2-P
- [1111] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** CAACGA GAGGAAACCTT - P
- [1112] SEQ ID NO:118R05B8(16)/2-P
- [1113] **TGCCCAGGGA** GGCTAGCTA GTGGAGACGGATTACA - P
- [1114] RPLP0 部件酶对 A8:B9
- [1115] SEQ ID NO:119R05A8(22)/2-P
- [1116] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** CTACAACGA GAGGAAACCTT - P
- [1117] SEQ ID NO:120R05B9(16)/2-P
- [1118] **TGCCCAGGGA** GGCTAG GTGGAGACGGATTACA - P
- [1119] RPLP0 部件酶对 A9:B10
- [1120] SEQ ID NO:121R05A9(22)/2-P
- [1121] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** GCTACAACGA GAGGAAACCTT - P
- [1122] SEQ ID NO:122R05B10(16)/2-P
- [1123] **TGCCCAGGGA** GGCTA GTGGAGACGGATTACA -P
- [1124] 20.2. 报告底物
- [1125] 本实施例的报告底物是 SubBi-2, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中, 对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-2-FB。以 485nm(FAM 激发波长) 激发在 530nm(FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。
- [1126] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:
- [1127] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
- [1128] 20.3. 用于扩增人类 RPLP0 基因的外显子 5 的 PCR 引物。
- [1129] 引物的序列从 5' 到 3' 如下所示。
- [1130] SEQ ID NO:1235' 引物 5R05/2
- [1131] GCTACCCAACTGTTGCATC
- [1132] SEQ ID NO:1103' 引物 3R05/2

[1133] AGCAGCCACAAAGGCAGA

[1134] 20.4. 靶模板

[1135] 从 K562 细胞中提取的人类基因组 DNA 用作 PCR 扩增的模板。

[1136] 20.5. 反应条件

[1137] 靶序列的实时扩增和部件酶对的催化活性检测在 25 μ L 的反应中在 ABI7700 热循环仪 (Applied Biosystems) 上进行。循环参数是 95 $^{\circ}$ C 7 分钟、95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 65 $^{\circ}$ C (每一循环温度降低 1 $^{\circ}$ C) 30 秒钟的 10 个循环、最后 95 $^{\circ}$ C 15 秒钟和 50 $^{\circ}$ C 30 秒钟的 50 个循环。每一反应含有 0.04 μ M5R05/1 和 0.2 μ M 的 3R05/2、10mM MgCl₂、50 μ M 每一 dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、1x Immobuffer (Bioline)、0.2 μ MSubBi-2-FB、1x Rox 参考染料 (Invitrogen)、10 单位的 Rnasin (Progema) 和 1 单位的 Immolase 聚合酶 (Bioline) 和 100ng 的基因组 DNA。另外,每一反应含有具有 0.2 μ M 的部件酶 A 和 0.2 μ M 的部件酶 B 的部件酶对 (RPLPO 部件酶对 A4:B5 或 A5:B6 或 A6:B7 或 A7:B8 或 A8:B9 或 A9:B10)。

[1138] 20.6. 结果

[1139] 使用实时 MNzyme-PCR 方法,从六个 RPLPO 部件酶对的三个检测催化活性。部件酶对 A4:B5 和 A5:B6 显示高水平的催化活性水平,允许 \leq 22 个循环的靶的检测 (表 23)。A7:B8 部件酶对也有活性,但活性比 A4:B5 和 A5:B6 低。在本实验的条件下没有从部件酶对 A6:B7、A8:B9 或 A9:B10 检测到催化活性。

[1140] 表 23: 使用各种部件酶对获得的循环阈值 (Ct)

[1141]

| 核酶切 (见本实施例的上 表) | Ct | 评论 |
|-----------------------|---------------|---|
| A4:B5 (T8-A9) | 19.3 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合与活性 MNzyme 的形成相适宜。 |
| A5:B6 (C7-T8) | 21.6 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合与活性 MNzyme 的形成相适宜。 |
| A6:B7 (A11-A12) | 50 循环后 无信号 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合在这些实验条件下与活性 MNzyme 的形成不相适宜。 |
| A7:B8 (A9-C10) | 31.7 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合与活性 MNzyme 的形成相适宜。 |
| A8:B9 (G6-C7) | 50 循环后 无信号 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合在这些实验条件下与活性 MNzyme 的形成不相适宜。 |
| A9:B10 (A5-G6) | 50 循环后 无信号 | 在这些部件酶中,部分催化核序列的这一组合在这些实验条件下与活性 MNzyme 的形成不相适宜。 |

[1142] 当将阈值荧光水平设定为 0.2 并且在循环 1 和 14 之间减去基线背景荧光时,Ct 值是三份反应的平均值。

[1143] 实施例 21: 应用 MNzyme 检测蛋白靶

[1144] 如实施例 18 所示,通过将适体序列纳入到部件酶的末端 (适体 - 部件酶),

MNAzyme 能够用来检测靶。在本实施例中,使用已被报道与 Taq 聚合酶高度特异地结合的 46 个核苷酸长度的适体序列,相同的 MNAzyme 检测策略(图 20)被用来检测蛋白 Taq 聚合酶(Yakimovich, 2003)。组装易化子和部件酶 B 与在使用 MNAzyme 检测 ATP 的实施例 18 中使用的相同。

[1145] 21.1. 部件酶寡核苷酸、组装和抑制性寡核苷酸

[1146] 在本实施例中,将 Taq 聚合酶适体序列置于邻近适体-部件酶 A 的底物臂(图 20)。适体-部件酶 A 和部件酶 B 的感应臂被设计用来与组装易化子结合。适体-部件酶 TaqA2/1 和部件酶 AtpB3/1 的序列如下所示(5' 到 3')。在如下序列中,黑体碱基与组装易化子杂交,加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核,斜体碱基与底物杂交。另外,适体-部件酶 A2TaqA2/1 中普通文本的碱基表示与 Taq 聚合酶结合的 DNA 适体序列。

[1147] SEQ ID NO:124 适体-部件酶 A2TaqA2/1:

[1148] **AACGTACACTGCACG** CGGTCGAA *ATAGTGAGT* GCGGTCGGCTCGGG

[1149] GCATTCTTAGCGTTTTGCCCCGAGCCGACCGC

[1150] SEQ ID NO:104 部件酶 B3AtpB3/1:

[1151] *CATCTCTTCT* CCGAGC **GTCTGTACCGTGTAC**

[1152] 组装易化子的序列如下所示(5' 到 3'):

[1153] SEQ ID NO:105 组装易化子 AtpC/1:

[1154] GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

[1155] 抑制因子寡核苷酸的序列如下所示(5' 到 3'):

[1156] SEQ ID NO:125 抑制因子 TaqR/1:

[1157] TGCCCCGAGCCGACCGAACTCACTATTT

[1158] 21.2. 报告底物

[1159] 通过酶切双重标记的核酸报告底物监测 MNAzyme 活性。本实施例的报告底物是 SubBi-1-FB,其序列从 5' 到 3' 如下所示。小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。加下划线的碱基表示 5' 端的 6-FAM 部分和 3' 端的 BHQ1 部分的位置。以 490nm (FAM 激发波长) 激发在 520nm (FAM 发射波长) 下监测在 FAM 和 BHQ1 之间的核苷酸处酶切 SubBi-1-FB 所引起的荧光改变。

[1160] SEQ ID NO:6SubBi-1-FB:

[1161] ACTCACTATaGGAAGAGATG

[1162] 21.3. 靶

[1163] 本实施例的靶分子是 Taq DNA 聚合酶 (Amersham Biosciences), Klenow 聚合酶 (Amersham Biosciences) 用作阴性对照。无核酸酶的水用作“无靶”对照。

[1164] 21.4. 反应条件

[1165] 靶序列的检测通过由催化活性 MNAzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 50 μ L。反应在 FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech) 上在 40°C 下进行。每 6 秒钟读取每一反应的荧光,总共读 15 分钟。每一反应含有如下终浓度的物质:200nM TaqA2/1、200nM AtpB3/1、200nM AtpC/1、200nM TaqR/1、200nM SubBi-1-FB、25mM MgCl₂、25mM Tris HCl pH6.8,以及 5 单位的 Taq DNA 聚合酶、5 单位的 Klenow 聚合酶或无蛋白(仅水)。

[1166] 21.5. 结果 :SubBi-1-FB 报告底物的检测和酶切

[1167] 在没有 Taq 聚合酶时观察到仅随时间轻微增加的低荧光水平,表明抑制因子寡核苷酸能够阻止活性 MNzyme 的组装。在存在 Taq 聚合酶时荧光信号水平较高并且随时间增加。这表明 Taq 聚合酶取代了抑制因子寡核苷酸并且活性 MNzyme 形成。由于 Klenow 聚合酶存在时的荧光信号与没有 Taq 聚合酶时即“无靶”水对照时的荧光信号相似, MNzyme 的组装具有靶依赖性。这与 Yakimovich et al. (2003) 的观察结果一致,他们证实 Taq 聚合酶适体序列对 Taq 聚合酶具有特异性而且不与 Klenow 结合。以上的这一 MNzyme 实施例表明 MNzyme 能够与适体结合以检测特定蛋白。

[1168] 实施例 22: 使用截短的部件酶和稳定因子寡核苷酸检测单核苷酸多态性 (SNP)

[1169] 通过部件酶感应臂和靶序列的 Watson-Crick 碱基识别能够进行 MNzyme 介导的靶检测。在实施例 19 中,这一互补性要求用于检测部件酶感应臂和靶核酸序列之间的单个碱基错配。在如下实施例中,再次采用所述互补性要求使用下述策略检测单核苷酸多态性 (SNP),即使用具有截短的感应臂的部件酶的策略,所述截短的感应臂可以由稳定因子寡核苷酸稳定。在本实施例中使用的 MNzyme 检测策略如图 23 所示,所要求的寡核苷酸描述如下:

[1170] a) 标准的部件酶;

[1171] b) 具有截短的感应臂(例如 5 个碱基)的部件酶,所述截短的感应臂被设计成与 SNP 的一种形式完全匹配但不与其其它形式完全匹配;

[1172] c) 稳定因子寡核苷酸(例如 15 个碱基),其与与部件酶的截短的感应臂邻近的靶杂交;

[1173] 稳定因子被设计用来在 5 个核苷酸的感应臂与靶杂交时促进 MNzyme 的组装;和

[1174] d) 报告探针底物。

[1175] 22.1. 部件酶寡核苷酸和稳定因子寡核苷酸

[1176] 在本实施例中,部件酶 B 的感应臂被设计成仅有 5 个核苷酸长并用来区分在靶寡核苷酸中存在的 SNP。部件酶 B 的感应臂被设计成与 SNP 的“T”形式杂交但不与 SNP 的“C”形式杂交。部件酶 A 和 B 和稳定因子寡核苷酸的序列如下所示(5' 到 3')。在如下序列中,黑体碱基与靶杂交,加下划线的碱基形成组装的 MNzyme 的部分催化核,斜体碱基与底物杂交。“-P”表示寡核苷酸的 3' 磷酸化。

[1177] SEQ ID NO:126 部件酶 A4XdA4/2-P:

[1178] **ACTGGATGTCCATCTGTCTG** ACAACGA *GAGGAAACCTT-P*

[1179] SEQ ID NO:127 部件酶 B5XdB5/2-P:

[1180] **TGCCCAGGGA** GGCTAGCT **TATAC-P**

[1181] SEQ ID NO:128 稳定因子 XdF/2-P:

[1182]

CTTCGTGAGGGTGAG-P

[1183] 22.2. 报告底物

[1184] 本实施例中使用的报告底物是 SubBi-2。在当前的实施例中,对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记,在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记,并命名为 SubBi-2-FB。以 490nm (FAM 激发波长) 激发在 520nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。SubBi-2-FB

的序列如下所示 (5' 到 3') ;小写字母的碱基代表 RNA,大写字母的碱基代表 DNA。

[1185] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[1186] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[1187] 22.3. 靶

[1188] 本实施例的靶分子是源自 Xd 基因的合成寡核苷酸。所述靶之一与 SNP(XdC/2(52)) 的“T”形式对应并与部件酶 B 的感应臂完全匹配。另一种靶与 SNP 的“C”形式对应并与部件酶 B 感应臂错配。合成的寡核苷酸自 Sigma-Prologo 订购,无核酸酶的水代替靶用作“无靶”对照。这两种靶的序列如下所示 (5' 到 3'),其中 SNP 加下划线。

[1189] SEQ ID NO:129 靶 XdC/2(52):

[1190] TGCCCCCTCACCTCACGAAGGTATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

[1191] SEQ ID NO:130 靶 (错配)XdC/2(1M52):

[1192] TGCCCCCTCACCTCACGAAGGCATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

[1193] 22.4. 反应条件

[1194] 靶序列的检测通过由催化活性 MNzyme 酶切报告底物引起的荧光信号增加来测量。加入底物启动反应并且所有反应的总体积是 50 μ L。反应在 FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech) 上在 55°C 下进行。每 2 秒钟读取每一反应的荧光,总共读 5 分钟。所有反应含有 200nM XdA4/2-P、200nM XdB5/2-P、1x PCR Buffer II (Applied Biosystem) 和 25mM MgCl₂。另外,反应含有表 24 中列出的寡核苷酸。

[1195] 表 24. MNzyme 反应中另外的试剂

[1196]

| 反应 | 靶 | 稳定因子 |
|----|----------------------|-----------------|
| A | 200nM 的 XdC/2(52) | 200nM 的 XdF/2-P |
| B | 200nM 的 XdC/2(1M52): | 200nM 的 XdF/2-P |
| C | 200nM 的 XdC/2(52) | 无稳定因子 |
| D | 无靶 | 200nM 的 XdF/2-P |

[1197] 22.5. 结果 :SubBi-2-FB 报告底物的检测和酶切

[1198] MNzyme 表明,当使用完全匹配的 SNP 模板时荧光随时间增加 (反应 A :图 23)。相比之下,当模板有错配时 (含 SNP),荧光信号不随时间增加 (反应 B :图 23)。类似地,在没有靶寡核苷酸时荧光不增加 (反应 D :图 23)。稳定因子寡核苷酸的存在显示对于稳定 MNzyme 复合物至关重要。含有包括完全匹配的靶但缺乏稳定因子寡核苷酸的所有反应组分的反应,荧光不随时间增加 (反应 C :图 23)。这样,感应臂的 5 个碱基不足以形成稳定的 MNzyme 复合物但是稳定因子寡核苷酸的存在可以弥补部件酶感应臂长度短 (5 个碱基) 的缺点并允许在严紧的温度条件 (本实施例中为 55°C) 下形成稳定的 MNzyme。稳定因子寡核苷酸可以视为本系统的第三部件酶,因为它是形成稳定的 MNzyme 所必需的。

[1199] 本实施例表明,MNzyme 能够用来区分差异小至 SNP 的两个靶。此外,它例示了具有截短的感应臂的部件酶的应用,以及它们与稳定因子寡核苷酸联合的使用。

[1200] 实施例 23: 具有核苷酸取代的 MNAzyme 的催化活性

[1201] 与核酶不同, 尚未发现 DNA 酶在自然界存在。DNA 酶在体外离析自大的寡核苷酸库。已经尝试在某些条件下将已知的核酶中某些脱氧核糖核苷酸取代为某些核糖核苷酸 (McCall et al., 1992)。由于 RNA 和 DNA 的构象差异, 完全转化成 DNA 的核酶没有活性 (Perreault et al., 1990)。这些研究表明, 不能够仅仅通过以脱氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸而将 RNA 酶修饰成工作 DNA 酶。发明者进行了实验以研究 MNAzyme 对于核糖核苷酸取代为脱氧核糖核苷酸的耐受性。

[1202] 23. 1. 部件酶寡核苷酸

[1203] 在本实施例中, 合成了各种部件酶, 其中在构成催化核的区域, 以核糖核苷酸取代一个或多个脱氧核糖核苷酸。合成的部件酶要么具有单个核糖核苷酸取代, 要么整个部分催化核区域被核糖核苷酸取代。部件酶寡核苷酸 A 和 B 具有与人类 RPLP0 基因的外显子 4 区域互补的感应臂。部件酶寡核苷酸从 5' 到 3' 如下所示。在如下序列中, 加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核, 黑体碱基与靶杂交, 斜体碱基与底物杂交。小写字母的碱基代表已经取代 DNA 碱基的 RNA 碱基。

[1204] SEQ ID NO:131 部件酶 A(对照)R04A5(18)/2-P

[1205] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TACAACGA *GAGGAAACCTT*-P

[1206] SEQ ID NO:132 部件酶 B(对照)R04B6(19)/2-P

[1207] *TGCCCAGGGA* GGCTAGC **GTGTTCGACAATGGCAGCA-P**

[1208] SEQ ID NO:133 部件酶 A(ribo-14g):R04A5(18)/2-rG14-P

[1209] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TACAACgA *GAGGAAACCTT*-P

[1210] SEQ ID NO:134 部件酶 A(ribo-9a):R04A5(18)/2-rA9-P

[1211] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** TaCAACGA *GAGGAAACCTT*-P

[1212] SEQ ID NO:135 部件酶 A(ribo x8):R04rA5(18)/2

[1213] **GGGCTGGTCATCCAGCAG** uacaacga *GAGGAAACCTT*

[1214] SEQ ID NO:136 部件酶 B(ribo x7):R04rB6(19)/2

[1215] *TGCCCAGGGA* ggcuagc **GTGTTCGACAATGGCAGCA**

[1216] 23. 2. 报告底物

[1217] 本实施例的报告底物是 SubBi-2, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中, 对于 SubBi-2 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-2-FB。以 485nm(FAM 激发波长) 激发在 530nm(FAM 发射波长) 下监测 SubBi-2-FB 的酶切。在如下序列中小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。

[1218] SEQ ID NO:21SubBi-2-FB:

[1219] AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

[1220] 23. 3. 靶序列

[1221] 在本实验中, 合成的 DNA 寡核苷酸用作靶模板。靶的序列从 5' 到 3' 如下所示。

[1222] SEQ ID NO:8R04/1 靶

[1223] GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

[1224] 23. 4. 反应条件

[1225] 各种部件酶对的催化活性分析用 SmartCycler 系统热循环仪 (Cepheid) 进行。反应的总体积是 25 μ L 并且每一反应含有 1X PCR Buffer II (Applied Biosystems)、10mM $MgCl_2$ 、0.2 μ M 的 SubBi-2-FB、2 μ M 的 RO4/1 靶, 以及一对 A 和 B 部件酶 (每一为 2 μ M)。每一反应中的部件酶对见表 24。

[1226] 表 24: 各种反应中的部件酶。

[1227]

| 反应 | 部件酶 A | 部件酶 B | 复制的数量 |
|-----------------------------------|--------------------|----------------|-------|
| 对照部件酶 A 和 B (仅 DNA) | RO4A5(18)/2-P | RO4B6(19)/2-P | 4 |
| 部件酶 A (ribo - 9a) 和对照部件酶 B | RO4A5(18)/2-rA9-P | RO4B6 (19)/2-P | 3 |
| 部件酶 A (ribo - 14g) 和对照部件酶 B | RO4A5(18)/2-rG14-P | RO4B6 (19)/2-P | 3 |
| 部件酶 A (ribo x 8) 和对照部件酶 B | RO4rA5(18)/2 | RO4B6 (19)/2-P | 3 |
| 对照部件酶 A 和部件酶 B (ribo x 7) | RO4A5(18)/2-P | RO4rB6(19)/2 | 3 |
| 部件酶 A (ribo x 8)和部件酶 B (ribo x 7) | RO4rA5(18)/2 | RO4rB6(19)/2 | 3 |

[1228] 反应在 54°C 温育 20 分钟, 每隔 12 秒钟采集荧光数据。由于 SmartCycler 系统热循环仪上各孔之间的初始荧光会不同, 从每一反应的每一时间点的荧光中减去初始荧光值以便比较不同孔中的反应。

[1229] 23.5. 结果: 部件酶部分催化核序列中具有核糖核苷酸取代的 MNzyme 的催化活性

[1230] 由各种部件酶对组成的 MNzyme 对底物的催化酶切以荧光随时间的改变来监测 (表 25)。

[1231] 表 25: 用各种部件酶组合获得的结果

| 反应 | 结果 |
|-----------------------------------|--------------------------|
| 仅具有 DNA 的部件酶 A 和 B 的对照反应 | 荧光迅速增加; 温育 5 分钟后荧光达到平台。 |
| 部件酶 A (ribo - 9a)和对照部件酶 B | 荧光增加; 温育 20 分钟后荧光尚未达到平台。 |
| 部件酶 A (ribo - 14g)和对照部件酶 B | 荧光迅速增加; 温育 5 分钟后荧光达到平台。 |
| 部件酶 A (ribo x 8)和对照部件酶 B | 荧光不随时间增加。 |
| 对照部件酶 A 和部件酶 B (ribo x 7) | 荧光不随时间增加。 |
| 部件酶 A (ribo x 8)和部件酶 B (ribo x 7) | 荧光不随时间增加。 |

[1232] 本实验表明, 部件酶的部分催化核中的某些核糖核苷酸取代与活性 MNzyme 的形

成相适宜。虽然在这些条件下单取代（部件酶 A(ribo14g)）与所有的 DNA 部件酶具有相似的活性，但是可选的单取代（部件酶 A(ribo9a)），虽然仍与活性 MNAzyme 的形成相适宜，酶切底物的速率比对照慢。MNAzyme 不耐受部件酶 A 和 / 或部件酶 B 的部分催化核结构域中所有核苷酸的取代。

[1234] 实施例 24: 作为启动信号扩增级联机制通过释放拴系的部件酶使 MNAzyme 活化

[1235] 24. 1. MNAzyme 介导的信号扩增级联

[1236] MNAzyme 能够用来启动信号扩增级联。图 25 例示了这样的信号扩增级联的一个策略。在靶的存在下，从在溶液中游离的部件酶形成活性 MNAzyme1。MNAzyme1 酶切其拴系的底物 Sub1，从而释放 MNAzyme2 的部件酶组分。一旦游离，这些部件酶与组装易化子杂交并形成酶切底物 Sub2 的 MNAzyme2。MNAzyme2 酶切溶液中游离的双重标记的 Sub2 并产生荧光信号。此外，MNAzyme2 酶切拴系的 Sub2 释放部件酶，所述部件酶与 MNAzyme2 具有相同的感应臂并且在与组装易化子杂交时形成 MNAzyme3。（组装易化子可以被拴系，也可以在溶液中游离）。由于 MNAzyme3 与 MNAzyme1 有相同的底物臂，它也能够酶切拴系的 Sub1，从而释放 MNAzyme2 的更多部件酶组分。这导致更多酶（MNAzyme）组分（部件酶）的酶促产生以及伴随的信号扩增级联的级联。

[1237] 24. 2. 能够酶切荧光标记底物的拴系的 MNAzyme 的活化

[1238] 本实施例例示图 25 所示的信号扩增级联的第一步。在这一启动步骤中，靶与溶液中游离的部件酶结合并形成活性 MNAzyme1。MNAzyme1 酶切拴系的底物 Sub1，从而释放 MNAzyme2 的部件酶组分。一旦游离，这些部件酶与组装易化子杂交并形成 MNAzyme2。MNAzyme2 酶切溶液中游离的双重标记的 Sub2-FQ（尤其是本实施例中的 SubBi-3-FB）并产生荧光信号。

[1239] 24. 3. 部件酶寡核苷酸

[1240] 在如下序列中，加下划线的碱基形成组装的 MNAzyme 的部分催化核，黑体碱基与靶杂交，斜体碱基与底物杂交。既是斜体又加下划线的碱基表示与待拴系的部件酶相结合的底物序列。“-P”表示寡核苷酸的磷酸化，“(Biotin)”表示寡核苷酸的生物素化。小写字母的碱基代表 RNA，大写字母的碱基代表 DNA。所有的序列从 5’ 到 3’ 如下书写。

[1241] 溶液中游离的 MNAzyme1 部件酶被设计用来与人类 RPLP0 基因的外显子 5 特异性结合，拴系的 MNAzyme2 部件酶被设计用来与组装易化子杂交。

[1242] SEQ ID NO:147 部件酶 A4R05A4/2-P:

[1243] **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT** ACAACGA GAGGAAACCTT - P

[1244] SEQ ID NO:148 部件酶 B5R05B5/2-P:

[1245] *TGCCCAGGGA* GGCTAGCT **GTGGAGACGGATTACACCTTC** - P

[1246] SEQ ID NO:138 拴系的底物 1/ 部件酶 A4R04A4/3-5b:

[1247] (生物素) AAAAAA AAGGTTTCCTC *gu* CCCTGGGCAGCTGGTCATCCAGC

[1248] **AG** ACAACGA GGTTGTGCTG

[1249] SEQ ID NO:139 拴系的底物 1/ 部件酶 B5R04B5/3-3b:

[1250] *CGGTTGGTGA* GGCTAGCT **GTGTTTCGACAATGGC** AAGGTTTCCTC *gu*

[1251] CCCTGGGCA AAAAAA (生物素)

[1252] 24.4. 报告底物

[1253] 本实施例的报告底物 (Sub2 ;图 25) 是 SubBi-3, 其序列从 5' 到 3' 如下所示。在当前的实施例中, 对于 SubBi-3 在 5' 端用 6-FAM 部分进行末端标记, 在 3' 端用 BHQ1 部分进行末端标记, 并命名为 SubBi-3-FB。以 492nm (FAM 激发波长) 激发在 516nm (FAM 发射波长) 下监测 SubBi-3-FB 的酶切。小写字母的碱基代表 RNA, 大写字母的碱基代表 DNA。

[1254] SEQ ID NO:31SubBi-3-FB:

[1255] CAGCACAACCguCACCAACCG

[1256] 24.5. 合成靶和组装易化子

[1257] 在如下序列中, “生物素 (Biotin)” 表示寡核苷酸的生物素化。

[1258] SEQ ID NO:140 组装易化子 R04/2-3b:

[1259] GCCATTGTGCAACACCTGCTGGATGACCAGC-(生物素)

[1260] SEQ ID NO:141RPLP05 合成靶 (R05):

[1261] GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

[1262] 24.6. 将生物素化的部件酶拴系到包被链霉亲和素的微量测定板上

[1263] 对于生物素化的部件酶和组装易化子的固定以 100 μ l 的总体积在室温下进行。在 Amresco PBS 溶液 (不含 Ca⁺ 和 Mg⁺) 中, 结合混合物含有 200nM 的部件酶 R04A4/3-5b、200nM 的部件酶 R04B5/3-3b 和 200nM 的组装易化子 R04/2-3b。将结合混合物 (100 μ l) 等分到包被链霉亲和素的微量测定板 (Roche 诊断学) 的每一孔中。结合时间为 30 分钟, 然后用 PBS 洗三次, 每次洗尽前温育 15 分钟。

[1264] 24.7. 酶切拴系的 MNAzyme 并检测酶切的荧光标记底物

[1265] 荧光标记的底物 SubBi-3-FB 的酶切在 FluoStar Optima 荧光计 (BMG LabTech) 上以 100 μ L 的总反应体积于 55°C 等温监测 4 分钟。反应含有 200nM 的部件酶 R05A4/2-P、200nM 的部件酶 R05B5/2-P、200nM 的底物 SubBi-3-FB、25mM MgCl₂、1x PCR Buffer II (Applied Biosystems) 和 200nM 的合成 R05 靶。无核酸酶的水代替合成 R05 靶用作“无靶”对照。加入底物 SubBi-3-FB 启动反应。

[1266] 24.8. 结果: 存在 R05 靶与“无靶”对照相比的荧光水平改变

[1267] 与无靶反应 (水对照) 比较, 存在 R05 靶时荧光有增加。与无靶对照中小于 1,000 单位相比, 存在靶时 4 分钟后荧光的改变大约是 36,000 单位。这证实了 MNAzyme1 (由部件酶 R05A4/2-P 和 R05B5/2-P 组成) 酶切拴系的底物并释放组成 MNAzyme2 的部件酶的能力。此外, 它证实了部件酶一旦释放就能够与能够酶切底物引起信号产生的组装易化子形成活性 MNAzyme。

[1268] 实施例 25: 直接区分 DNA 中甲基化胞苷与胞苷

[1269] 使用具有部件酶的稳定因子臂以证实 MNAzyme 检测靶组装易化子中存在的单核苷酸多态性 (SNP), 所述部件酶具有截短的感应臂 (实施例 22)。在本实验中使用的实验条件下, 在远高于其期望的解链温度的 55°C 下, 将 5 个碱基的感应臂用作 SNP 的探针。具有稳定因子臂的系统和具有截短的感应臂的部件酶对靶中的小改变非常敏感。这一检测策略能够进一步扩展到直接区分在特定的胞苷残基处甲基化或未甲基化的靶而无需进行之前的亚硫酸氢盐修饰 (见实施例 11)。

[1270] 5-甲基胞苷的存在使 DNA 的解链温度与未甲基化胞苷相比增加,每一甲基化碱基增加 1.3°C。因此,具有例如 5 个核苷酸长度的感应臂的部件酶能够与含有三个 5-甲基胞苷的靶结合的温度,与其能够与相同序列的未甲基化靶结合的温度相比,高几乎 4°C。

[1271] 当在适合于在甲基化靶的存在下杂交并形成 MNAzyme、但是对于在未甲基化靶的存在下形成 MNAzyme 又太高的温度下温育部件酶、稳定因子臂和底物时,信号会仅在甲基化靶的存在下产生。

[1272] 这提供了分析甲基化模式的新策略,所述策略能够提供作为癌症和其它疾病的标志物的甲基化碱基的检测方法。

[1273] 实施例 26: 使用 MNAzyme 诱导响应靶的颜色改变

[1274] 图 24 例示将 MNAzyme 用于比色形式的策略。在该方法中,可能将 MNAzyme 底物纳入桥连寡核苷酸。桥连寡核苷酸与附着到金颗粒上的寡核苷酸有互补性。如果没有组装易化子存在,桥连寡核苷酸会保持完整而且金颗粒会聚集而使反应变蓝。如果存在组装易化子例如靶核酸,那么溶液中存在的部件酶会组装成 MNAzyme 并酶切底物(并因此酶切桥连寡核苷酸)。这会引发金颗粒聚集体的解散,而这又会导致颜色从蓝到红的改变。

[1275] 这一 MNAzyme 策略提供了纳入若干通用组分的系统。这样,它提供能够快速适用于任何新靶的方法。这比其它系统相比的优势在于使用要求更多复合分子的 DNA 酶和金颗粒。在这一 MNAzyme 策略中,具有附着的寡核苷酸的 MNAzyme 底物和金颗粒可以是通用的并用于分析任何核酸靶。新分析系统会仅要求合成新部件酶,所述新部件酶具有与新靶互补的感应臂。此外,比色反应也能够用于与对核酸、蛋白或其它靶的活化敏感的 MNAzyme 系统联合。

[1276] 参考文献

[1277] 专利和专利公布:

[1278] PCT 国际公布第 W099/45146 号

[1279] PCT 国际公布第 IB99/00848 号

[1280] PCT 国际公布第 W099/50452 号

[1281] PCT 国际公布第 W000/58505 号

[1282] PCT 申请 PCT/US96/02380 (“Asher”)

[1283] 美国专利第 4,683,202 号

[1284] 美国专利第 4,683,195 号

[1285] 美国专利第 4,000,159 号

[1286] 美国专利第 5,176,995 号

[1287] 美国专利第 4,965,188 号

[1288] 美国专利第 6,140,055 号

[1289] 美国专利第 6,201,113 号

[1290] 其他参考文献:

[1291] Achenbach, J., Nutiu, R. and Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymes (结构转换的变构脱氧核酶). *Analytica Chimica Acta*. 534(1):41-51.

[1292] Adams, J. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains (组织化学染色中生物素和辣根过氧化物

酶信号的生物素扩增). *J Histochem Cytochem.* Oct;40(10):1457-63.

[1293] Bobrow, M., Harris, T., Shaughnessy, K. and Litt, G. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification (催化报告分子沉积, 信号扩增的新方法). Application to immunoassays. *J Immunol Methods.* Dec20(125(1-2)):279-85.

[1294] Breaker, R. (1997) DNA enzymes (DNA 酶). *Nat Biotech.* 15:427-431.

[1295] Breaker, R. R. and Joyce, G. F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA (酶切 RNA 的 DNA 酶). *Chem Biol.* Dec;1(4):223-9.

[1296] Brown, A., Li, J., Pavot, C. and Lu, Y. (2003) A lead-dependent DNAzyme with a two-step mechanism (具有两步机制的铅依赖 DNA 酶). *Biochem.* Jun17;42(23):7152-61.

[1297] Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA (使用催化 DNA 的核酸变异分析). *Nucl Acids Res.* 28(3):e9.

[1298] Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites (10-23 DNA 酶-底物配对相互作用的最优化在嘌呤-胞苷靶点位置增强 RNA 酶切活性). *Nucl Acids Res.* Jun1;31(11):2883-9.

[1299] Carmi, N., Shultz, L. A. and Breaker, R. R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs (自酶切 DNA 的体外选择性). *Chem Biol.* 3(12):1039-46.

[1300] Chehab, F. F., Doherty, M., Cai, S. P., Kan, Y. W., Cooper, S. and Rubin, E. M. (1987) Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias (镰刀形细胞贫血病和地中海贫血的检测) [letter] [published erratum appears in *Nature* 1987 Oct 22-28; 329(6141):678]. *Nature.* 329(6137):293-4.

[1301] Chen, C., Ridzon, D., Broomer, A., Zhou, H., Barbisn, M., Lao, K. and Livak, K. (2005) MicroRNA quantitation by looped RT-PCR (通过环 RT-PCR 定量微小 RNA). AACR. poster.

[1302] Cheng, S., Merlino, G. T. and Pastan (1993) A versatile method for coupling of proteins to DNA: synthesis of α 2-macroglobin-DNA conjugates (将蛋白与 DNA 结合的通用方法: α 2-巨球蛋白-DNA 偶联物的合成). *Nucleic Acid Research:* 11, 659-669.

[1303] Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification (基于核酸序列的扩增). *Nature.* 350(6313):91-2.

[1304] Cruz, R. P., Withers, J. B. and Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme (8-17 脱氧核酶的二核苷酸接合酶切多功能性). *Chem Biol.* Jan;11(1):57-67.

[1305] Cuenoud, B. and Szostak, J. W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity (具有 DNA 连接酶活性的 DNA 金属酶). *Nature.* 375(6532):611-4.

[1306] Eigen, M. and Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology (筛选单个分子: 应用于诊断学和进化生物技术). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(13):5740-7.

[1307] Elghanian, R., Storhoff, J., Mucic, R., Letsinger, R. and Mirkin, C. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the

distance-dependent optical properties of gold nanoparticles(基于金纳米颗粒的距离依赖光学性质的多核苷酸选择性比色检测). *Science*. 277:1078-1079.

[1308] Fahy, E., Kwok, D. and Gingeras, T. (1991) Self-sustained sequence replication(3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR(自主序列复制(3SR):可代替PCR的基于等温转录的扩增系统). *PCR Methods Appl.* Aug;1(1):25-33.

[1309] Hall, J. G., Eis, P. S., Law, S. M., Reynaldo, L. P., Prudent, J. R., Marshall, D. J., Allawi, H. T., Mast, A. L., Dahlberg, J. E., Kwiatkowski, R. W., de Arruda, M., Neri, B. P. and Lyamichev, V. I. (2000) From the Cover: Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction(通过连续入侵的信号扩增反应灵敏检测 DNA 多态性). *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(15):8272-8277.

[1310] Haseloff, J. and Gerlach, W. L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities(具有新的高效特异性核糖核酸内切酶活性的简单 RNA 酶). *Nature*. Aug18;334(6183):585-91.

[1311] Huizenga, D. and Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP(结合腺苷和 ATP 的 DNA 适体). *Biochemistry*. 34:656-665

[1312] Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. and Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA(通过 RNA 催化的氨酰基-RNA 合成). *Science*. 267(5198):643-7.

[1313] Impey, H., Applegate, T., Haughton, M., Fuery, C., King, J. and Todd, A. (2000) Factors that influence deoxyribozyme cleavage during polymerase chain reaction(聚合酶链式反应期间影响脱氧核酶酶切的因素). *Anal Biochem*. Nov15;286(2):300-3.

[1314] Jonas, V., Alden, M., Curry, J., Kamisango, K., Knott, C., Lankford, R., Wolfe, J. and Moore, D. (1993) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA(通过 rRNA 扩增从唾液沉淀物直接检测和鉴定结核分支杆菌). *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2410-2416.

[1315] Kuwabara, T., Warashina, M., Nakayama, A., Ohkawa, J. and Taira, K. (1999) tRNA^{Val}-heterodimeric maxizymes with high potential as gene inactivating agents: Simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA in cultured cells(很可能用作基因失活剂的 tRNA^{Val}-异二聚体大酶:在培养细胞中的 HIV-1 的 tat mRNA 两个位点处同时酶切). *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(5):1886-1891.

[1316] Kuwabara, T., Warashina, M. and Taira, K. (2000) Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity(变构可控的大酶高效和高特异性地酶切 mRNA). *TIBTECH*. Nov(18):462-468.

[1317] Lee, J. F., Hesselberth, J. R., Meyers, L. A. and Ellington, A. D. (2004) Aptamer Database(适体数据库). *Nucl Acids Res*. 32(90001):D95-100.

[1318] Levy, M. and Ellington, A. (2003) Exponential growth by cross-catalytic cleavage of deoxyribozymogens(通过脱氧核酶原的交叉催化酶切的指数增长). *Proc*

Natl Acad Sci USA. 100(11):6416-21.

[1319] Li, J., Zheng, W., Kwon, A. H. and Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme (高效 Zn(II) 依赖的 RNA 酶切脱氧核酶的体外选择性及表征). Nucl Acids Res. 28(2):481-488.

[1320] Li, Y. and Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation (卟啉金属化的催化 DNA) [letter]. Nat Struct Biol. 3(9):743-7.

[1321] Liu, J. and Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor (使 aptazyme 官能化的金纳米颗粒的腺苷依赖组装及其作为比色生物感应器的应用). Analytical Chemistry. 76:1627-1632.

[1322] Lizardi, P., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. and Ward, D. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification (使用等温滚环扩增的变异检测和单分子计数). Nat Genet. Jul;19(3):225-32.

[1323] Lohse, P. A. and Szostak, J. W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions (核酶催化的氨基酸转移反应). Nature. 381(6581):442-4.

[1324] McCall, M., Hendry, P. and Jennings, P. (1992) Minimal Sequence Requirements for Ribozyme Activity (核酶活性的最低序列要求). Proc Natl Acad Sci USA. 89(13):5710-5714.

[1325] Mirkin, C., Letsinger, R., Mucic, R. and Storhoff, J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials (将纳米颗粒合理地组装成肉眼可见材料的基于 DNA 的方法). Nature. 382:607-609.

[1326] Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T. (2002) Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products (单链 DNA 与环介导等温扩增产物的分离). Biochemical and Biophysical Research Communications. 290(4):1195-1198.

[1327] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA (DNA 的环介导等温扩增). Nucl Acids Res. Jun15;28(12):E63.

[1328] Oshima, K., Kawasaki, H., Soda, Y., Tani, K., Asano, S. and Taira, K. (2003) Maxizymes and Small Hairpin-Type RNAs That Are Driven by a tRNA Promoter Specifically Cleave a Chimeric Gene Associated with Leukemia in Vitro and in Vivo (tRNA 启动子驱动的大酶和小发夹类 RNA 在体外或体内特异性酶切与白血病相关的嵌合基因). Cancer Res. 63(20):6809-6814.

[1329] Paul, N. and Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems (最小的自复制系统). Current Opinion in Chemical Biology. 8(6):634-639.

[1330] Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. and Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA

domain:a model for ribozyme catalysis(在锤头 RNA 结构域中 2'-羟基和镁结合之间的关系:核酶催化模型). *Biochemistry*. 30(16):4020-5.

[1331] Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity(具有催化活性的混合脱氧核糖寡核苷酸和核糖寡核苷酸). *Nature*. 344(6266):565-7.

[1332] Perriman, R., Delves, A. and Gerlach, W. L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme(对锤头核酶具有特异性的延伸的靶点). *Gene*. 113(2):157-63.

[1333] Raap, A., van de Corput, M., Vervenne, R., van Gijlswijk, R., Tanke, H. and Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides(生物素或荧光染料酪胺分子的过氧化物酶介导的沉淀作用的超灵敏 FISH). *Hum Mol Genet*. Apr; 4(4):529-34.

[1334] Raillard, S. A. and Joyce, G. F. (1996) Targeting sites within HIV-1cDNA with a DNA-cleaving ribozyme(以酶切 DNA 的核酶靶向 HIV-1cDNA 中的位点). *Biochemistry*. 35(36):11693-701.

[1335] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia(β -球蛋白基因组序列的酶促扩增和诊断镰刀形细胞贫血病的限制位点分析). *Science*. 230(4732):1350-4.

[1336] Santoro, S. and Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzyme(酶切 DNA 酶的通常目标 RNA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4262-4266.

[1337] Santoro, S. W. and Joyce, G. F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme(酶切 RNA 的 DNA 酶的机制和应用). *Biochem*. 37(38):13330-42.

[1338] Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozymes(获得脱氧核酶的靶入口). *J Mol Biol*. May 28; 339(2):355-63.

[1339] Sidorov, A., Grasby, J. and Williams, D. (2004) Sequence-specific cleavage of RNA in the absence of divalent metal ions by a DNzyme incorporating imidazolyl and amino functionalities(在无二价金属离子时通过纳入咪唑基和氨基官能度的 DNA 酶对于 RNA 的序列特异性酶切). *Nucl Acids Res*. Mar 5; 32(4):1591-601.

[1340] Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA)(裂解很容易做(如果是酶切 RNA 的 DNA 酶)). *Chem Biol*. Jan; 11(1):7-8.

[1341] Tarasow, T. M., Tarasow, S. L. and Eaton, B. E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation(RNA 催化的碳碳键形成). *Nature*. 389(6646):54-7.

[1342] Todd, A. V., Fuery, C. J., Impey, H. L., Applegate, T. L. and Haughton, M. A. (2000) DzyNA-PCR: use of DNzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format(使用 DNA 酶以实时荧光形式检测和定量核酸序列). *Clin Chem*. May; 46(5):625-630.

[1343] Urdea, M. (1993) Synthesis and characterization of branched DNA (bdNA) for

direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV (用于直接和定量检测 CMV、HBV、HCV 和 HIV 的分支 DNA (bdNA) 的合成及表征). Clin Chem. 39:725-726.

[1344] van Gijlswijk, R., Zijlmans, H., Wiegant, J., Bobrow, M., Erickson, T., Adler, K., Tanke, H. and Raap, A. (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization (荧光染料标记的酪胺: 在免疫细胞化学和原位杂交的荧光中的使用). J Histochem Cytochem. Mar; 45(3):375-82.

[1345] Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G. and Malinowski, D. P. (1992) Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique (链置换扩增--等温的体外 DNA 扩增技术). Nucl Acids Res. 20(7):1691-6.

[1346] Warashina, M., Kuwabara, T., Nakamatsu, Y. and Taira, K. (1999) Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome (具有费城染色体的细胞中 DNA 酶的极高而且有特异性的活性). Chem Biol. Apr; 6(6):237-50.

[1347] Yakimovich, O., Alekseev, Y., Maksimenko, A., Voronina, O. and Lunin, V. (2003) Influence of DNA aptamer structure on the specificity of binding to Taq DNA polymerase (DNA 适体结构对于与 Taq DNA 聚合酶结合的特异性的影响). Biochemistry (Moscow). 68(2):228-235.

[1348] Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme ("10-23" DNA 酶的催化核中的序列要求). J Biol Chem. 277(43):240617-22.

[1349] Zhang, S., Scharadin, N., Purohit, P. and Chasin, L. (2005) Aptamer-based multiplexed amplified real-time biochemical detector (基于适体的复合扩增的实时生物化学检测器). Indiana Biosensor Symposium. Poster.

[0001]

序列表

<110> 强生研究有限公司
 <120> 多组分核酸酶及其使用方法
 <130> D13C11208CN
 <150> US60/724,567
 <151> 2005-10-7
 <150> US60/726,291
 <151> 2005-10-13
 <160> 176
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 1
 gctggtcatc cagcacggtc gaaatagtga gt 32
 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 2
 gctggtcatc cagcagcggc cgaaatagtg agt 33
 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 3
 catctcttct ccgtcgaagt gttcgacaat ggc 33
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 4
 catctcttct ccggtgttcg acaatggc 28
 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 5
 catctcttct ccgagcgtgt tcgacaatgg c 31

[0002]

| | | |
|-------------------------------------|--|----|
| <210> 6 | | |
| <211> 20 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <220> | | |
| <221> RNA | | |
| <222> (10)..(10) | | |
| <400> 6 | | |
| actcactata ggaagagatg | | 20 |
| <210> 7 | | |
| <211> 32 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <400> 7 | | |
| gctggtcate cagcacggtc taaatagtga gt | | 32 |
| <210> 8 | | |
| <211> 31 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <400> 8 | | |
| gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c | | 31 |
| <210> 9 | | |
| <211> 31 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <400> 9 | | |
| cgaccattag gtgtccaca agctggttacc g | | 31 |
| <210> 10 | | |
| <211> 28 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <400> 10 | | |
| tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt | | 28 |
| <210> 11 | | |
| <211> 27 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> 合成的 | | |
| <400> 11 | | |
| catctcttct ccgagetaag cacttta | | 27 |
| <210> 12 | | |
| <211> 22 | | |
| <212> DNA | | |

[0003]

| | |
|--|----|
| <213> 合成的 | |
| <400> 12 | |
| taaagtgcctt atagtgcagg ta | 22 |
| <210> 13 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 13 | |
| caaagtgcctt acagtgcagg tagt | 24 |
| <210> 14 | |
| <211> 22 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 14 | |
| aaagtgcctt tcgtgcagg ag | 22 |
| <210> 15 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 15 | |
| aaaagtgcctt acagtgcagg tagc | 24 |
| <210> 16 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 16 | |
| taaagtgcctt acagtgcaga t | 21 |
| <210> 17 | |
| <211> 42 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 17 | |
| caaacgagtc ctggccttgt ccgcacaacg agaggaaacc tt | 42 |
| <210> 18 | |
| <211> 42 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 18 | |
| tgcccagggg ggotagctgc ggtggagacg gattacacct tc | 42 |
| <210> 19 | |
| <211> 40 | |
| <212> DNA | |

[0004]

<213> 合成的
 <400> 19
 caaaogagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacett 40

<210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 20
 tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)
 <400> 21
 aaggtttcct cguccctggg ca 22

<210> 22
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 22
 gaaggtgtaa tccgtctoca cagacaaggo caggactcgt ttg 43

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 23
 caagactgga gacaaagtg 19

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 24
 gcagagtttc ctctgtgata 20

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <400> 25
 acgtgacgct aaagtgct 18

[0005]

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 26
 cgtcggaatg acgtacctgc ac 22

 <210> 27
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 27
 cgaatgacgt acctgcac 18

 <210> 28
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> 合成的

 <400> 28
 uaaagugcuu auagugcagg ua 22

 <210> 29
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (39)..(39)

 <400> 29
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag gttgtgctg 39

 <210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (39)..(39)

 <400> 30
 cggttggtga ggctagctgt ggagaaggat tacacctc 39

 <210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

[0006]

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

 <400> 31
 cagcacaacc gucaccaacc g 21

 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 32
 catttatca tcaacgggta 20

 <210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 33
 caaaggcaga tggatcag 18

 <210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 34
 tacctgcact aacaacgaga ggaaacott 29

 <210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 35
 tgcccaggga ggctagctaa gcacttta 28

 <210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

 <400> 36
 cagcacaacc gucaccaacc g 21

 <210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

[0007]

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

 <400> 37
 gaccgtgagg tagtaacaac gagaggaaac ott 33

 <210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

 <400> 38
 tgcccaggga ggetagctgg ttgtatagtt gtc 33

 <210> 39
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> 合成的

 <400> 39
 ugagguagua gguuguauag uu 22

 <210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 40
 agcgaagctg agacaactat acaa 24

 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 41
 cgacgtgacc gtgaggtag 19

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 42
 catggcacia gcgaagctga 20

 <210> 43
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

[0008]

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

 <400> 43
 gcccccgcct ccaactacaa cgaggttggtg ctg 33

 <210> 44
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (31)..(31)

 <400> 44
 cggttggtga ggctagcaac gcccgcaact c 31

 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 45
 gttggttacg gtcgcggttc 20

 <210> 46
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 46
 ccgaccgtaa ctattogata cg 22

 <210> 47

 <400> 47
 000

 <210> 48

 <400> 48
 000

 <210> 49

 <400> 49
 000

 <210> 50

 <400> 50
 000

[0009]

<210> 51
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

<400> 51
 agatcaagat cattgctcca caacgagagg aaacott

37

<210> 52
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (36)..(36)

<400> 52
 tgcccagggg ggctagcttc ctgagcgcaa gtactc

36

<210> 53

<400> 53
 000

<210> 54

<400> 54
 000

<210> 55
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

<400> 55
 agttcaaadc tgtactgcac cacaacgaga ggcgtgat

38

<210> 56
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>

[0010]

<221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

 <400> 56
 ctgggaggaa ggctagctct ggaggtggat tcctttgg 38

<210> 57
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (42)..(42)

 <400> 57
 actgaataga aatagtgata gatacaacga gtgccatggt aa 42

<210> 58
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (41)..(41)

 <400> 58
 tatcacagcc aaggtagct ccattcctat gactgtagat t 41

<210> 59
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)

 <400> 59
 aaggtttctt cguccctggg ca 22

<210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

 <400> 60
 cagcacaacc guaccaacc g 21

[0011]

<210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

<400> 61
 atcacgcctc gutcctccca g 21

<210> 62
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (13)..(14)

<400> 62
 ttaacatggc acgutggctg tgata 25

<210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 63
 cattgccgac aggatgcaga 20

<210> 64
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 64
 gagccgccga tccacacg 18

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 65
 cactcagcca ctggatttaa 20

<210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 66
 gcgcgtottt gotttatto 19

[0012]

<210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 67
 ctttgctgac ctgctggatt a 21

 <210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 68
 cctgttgact ggtcattaca a 21

 <210> 69
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

 <400> 69
 agatcaagat cattgctcca caacgagtgc catgttaa 38

 <210> 70
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

 <400> 70
 tatcacagcc aaggctagct tctgagcgc aagtactc 38

 <210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (39)..(39)

 <400> 71
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag tgcgccatg 39

 <210> 72
 <211> 41

[0013]

<212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (41)..(41)

<400> 72
 taattotccc aaggctagct gtggagaagg attacacctt c 41

<210> 73

<400> 73
 000

<210> 74

<400> 74
 000

<210> 75
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (41)..(41)

<400> 75
 actgaataga aatagtgata gatacaaoga gaggaaacct t 41

<210> 76
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (39)..(39)

<400> 76
 tgcccaggga ggctagctcc attoctatga ctgtagatt 39

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

<400> 77

[0014]

gctgggtoatc cagcagacaa cgagggttggtg ctg 33

<210> 78
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

<400> 78
 cggttggtgga ggctagctgt gttcgacaat ggc 33

<210> 79
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)

<400> 79
 aaggtttctct cguccctggg ca 22

<210> 80

<400> 80
 000

<210> 81

<400> 81
 000

<210> 82

<400> 82
 000

<210> 83
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

<400> 83
 catggcgcac gutgggagaa gta 23

[0015]

<210> 84
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 84
 caagactgga gacaaagtg 19

 <210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 85
 gcagagtttc ctctgtgata 20

 <210> 86
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

 <400> 86
 ggttgctgctc agctogtgta caacgagagg aaacott 37

 <210> 87
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

 <400> 87
 tgcccagggga ggctagctcg tgagatgttg ggttaag 37

 <210> 88
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 88
 tggatgatgg ttgtcgtc 18

 <210> 89
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 89
 ttgcgctcgt tcgaggga 17

[0016]

<210> 90
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

 <400> 90
 gaagaggcca ataaaggaga gacaacgaga ggcgtgat 38

 <210> 91
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

 <400> 91
 ctgggaggaa ggctagctaa caccagcttg ttacacc 37

 <210> 92
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 92
 cagggtcate cattccatgc ag 22

 <210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 93
 gctagtacca gttgagccag 20

 <210> 94
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 94
 gggctggtea tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

 <210> 95
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 95
 gggctggtoa tccagcagta caacaagagg aaacctt 37

[0017]

| | | |
|-------|---|----|
| <210> | 96 | |
| <211> | 37 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 96 | |
| | gggctgggtca tccagcagtt caacgagagg aaacott | 37 |
| <210> | 97 | |
| <211> | 37 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 97 | |
| | gggctgggtca tccagcagta catcgagagg aaacott | 37 |
| <210> | 98 | |
| <211> | 37 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 98 | |
| | gggctgggtca tccagcagta ctacgagagg aaacott | 37 |
| <210> | 99 | |
| <211> | 36 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 99 | |
| | tgcccagggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca | 36 |
| <210> | 100 | |
| <211> | 36 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 100 | |
| | tgcccagggga ggctagagtg ttcgacaatg gcagca | 36 |
| <210> | 101 | |
| <211> | 36 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 101 | |
| | tgcccagggga ggccagcgtg ttcgacaatg gcagca | 36 |
| <210> | 102 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 合成的 | |
| <400> | 102 | |
| | atgctgccat tgtogaacac ctgctggatg accagcccaa | 40 |

[0018]

<210> 103
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 103
 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtacctgggg gagtattgog gaggaaggt 59

 <210> 104
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 104
 catctcttct ccgagcgtct gtaccgtgta c 31

 <210> 105
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 105
 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacgtt 30

 <210> 106
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 106
 ccaggtactc actatatt 17

 <210> 107
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (41)..(41)

 <400> 107
 caaacgagtc ctggccttgt ottacaoga gaggaaacct t 41

 <210> 108
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (28)..(28)

 <400> 108

[0019]

tgcccaggga ggotagcgtg gagacgga 28

<210> 109
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (28)..(28)

<400> 109
 tgcccaggga ggotagcgtc gagacgga 28

<210> 110
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 110
 agcagccaca aaggcaga 18

<210> 111

<400> 111
 000

<210> 112
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (34)..(34)

<400> 112
 tgcccaggga ggotagcgtg ggagacggat taca 34

<210> 113

<400> 113
 000

<210> 114
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (33)..(33)

<400> 114

[0020]

| | |
|--|----|
| tgcccaggga ggctagcgtg gagacggatt aca | 33 |
| <210> 115 | |
| <211> 37 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <220> | |
| <221> 磷酸化 | |
| <222> (37)..(37) | |
| <400> 115 | |
| caaacgagtc ctggccttgt ctacgagagg aaacctt | 37 |
| <210> 116 | |
| <211> 37 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <220> | |
| <221> 磷酸化 | |
| <222> (37)..(37) | |
| <400> 116 | |
| tgcccaggga ggctagctac agtggagagc gattaca | 37 |
| <210> 117 | |
| <211> 39 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <220> | |
| <221> 磷酸化 | |
| <222> (39)..(39) | |
| <400> 117 | |
| caaacgagtc ctggccttgt ctcaacgaga ggaaacctt | 39 |
| <210> 118 | |
| <211> 35 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <220> | |
| <221> 磷酸化 | |
| <222> (35)..(35) | |
| <400> 118 | |
| tgcccaggga ggctagctag tggagacgga ttaca | 35 |
| <210> 119 | |
| <211> 42 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |

[0021]

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (42)..(42)

 <400> 119
 caaacgagtc ctggccttgt ctctacaacg agaggaaacc tt 42

 <210> 120
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (32)..(32)

 <400> 120
 tgcccaggga ggctaggtgg agacggatta ca 32

 <210> 121
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (43)..(43)

 <400> 121
 caaacgagtc ctggccttgt ctgctacaac gagaggaaac ctt 43

 <210> 122
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (31)..(31)

 <400> 122
 tgcccaggga ggctagtgga gacggattac a 31

 <210> 123
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 123
 getacccaac tgttgcatc 19

 <210> 124
 <211> 78

[0022]

<212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 124
 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtgcgggtogg ctcggggcat tcttagogtt 60
 ttgccccgag ccgaccgc 78

 <210> 125
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 125
 tgccccgagc cgaccgaact cactattt 28

 <210> 126
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (38)..(38)

 <400> 126
 actggatgtc catctgtctg acaacgagag gaaacott 38

 <210> 127
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (23)..(23)

 <400> 127
 tgcccagga ggetagetta tac 23

 <210> 128
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (15)..(15)

 <400> 128
 ettctgtagg gtgag 15

 <210> 129
 <211> 52
 <212> DNA

[0023]

<213> 合成的
 <400> 129
 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

 <210> 130
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 130
 tgccccctca ccctcacgaa ggcatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

 <210> 131
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

 <400> 131
 gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

 <210> 132
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (36)..(36)

 <400> 132
 tgcccaggga ggctagcgtg ttgcacaatg gcagca 36

 <210> 133
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> RNA
 <222> (25)..(25)

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

 <400> 133
 gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

 <210> 134
 <211> 37

[0024]

<212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (20)..(20)

<220>
 <221> 磷酸化
 <222> (37)..(37)

<400> 134
 gggetggtca tccagcagta caacgagagg aaacott 37

<210> 135
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (19)..(26)

<400> 135
 gggetggtca tccagcagua caacgagagg aaacott 37

<210> 136
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(17)

<400> 136
 tgcccaggga ggcuaagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 137
 <400> 137
 000

<210> 138
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 生物素
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> RNA
 <222> (18)..(19)

[0025]

<400> 138
 aaaaaaaagg tttcctcguc cctgggcagc tggtcatoaa gcagacaacg aggttgtgct g 61

<210> 139
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> RNA
 <222> (45)..(46)

<220>
 <221> 生物素
 <222> (61)..(61)

<400> 139
 cggttggtga ggctagetgt gtcgacaat ggcaaggttt cctcguccct gggcaaaaaa a 61

<210> 140
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 生物素
 <222> (31)..(31)

<400> 140
 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31

<210> 141
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 141
 gaaggtgtaa tccgtctcaa cagacaaggc caggactogt ttg 43

<210> 142
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 142
 tgagctacag tccgtcgaaa tagtgagt 28

<210> 143
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 合成的

<400> 143
 catctcttct ccgagcgctt catctca 27

[0026]

<210> 144
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 144
 ggcaactaacg tgcctgagct acagtcgggc gaaatagtga gt 42

 <210> 145
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 145
 catctctctt cggagcgtt catctcaaga cgataacgtc g 41

 <210> 146
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <400> 146
 tgagatgaag cactgtagct ca 22

 <210> 147
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (40)..(40)

 <400> 147
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40

 <210> 148
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>
 <221> 磷酸化
 <222> (39)..(39)

 <400> 148
 tgcccagggg ggctagctgt ggagaaggat tacaccttc 39

 <210> 149
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 合成的

 <220>

[0027]

| | |
|------------------|---|
| <221> RNA | |
| <222> (2) .. (2) | |
| <400> 149 | |
| tacaacga | 8 |
| <210> 150 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 150 | |
| cggtcgaa | 8 |
| <210> 151 | |
| <211> 7 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 151 | |
| acaacga | 7 |
| <210> 152 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 152 | |
| tacaacga | 8 |
| <210> 153 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <220> | |
| <221> RNA | |
| <222> (7) .. (7) | |
| <400> 153 | |
| tacaacga | 8 |
| <210> 154 | |
| <400> 154 | |
| 000 | |
| <210> 155 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 155 | |
| tacaacaa | 8 |

[0028]

| | |
|-----------|---|
| <210> 156 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 156 | |
| ttcaacga | 8 |
| <210> 157 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 157 | |
| tacatcga | 8 |
| <210> 158 | |
| <400> 158 | |
| 000 | |
| <210> 159 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 159 | |
| tactacga | 8 |
| <210> 160 | |
| <400> 160 | |
| 000 | |
| <210> 161 | |
| <211> 6 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 161 | |
| caacga | 6 |
| <210> 162 | |
| <400> 162 | |
| 000 | |
| <210> 163 | |
| <400> 163 | |
| 000 | |
| <210> 164 | |
| <400> 164 | |
| 000 | |

[0029]

| | |
|------------------------|---|
| <210> 165 | |
| <400> 165 000 | |
| <210> 166 | |
| <211> 6 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 166 ccgagc | 6 |
| <210> 167 | |
| <211> 8 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 167 ggctagct | 8 |
| <210> 168 | |
| <211> 7 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 168 ggctagc | 7 |
| <210> 169 | |
| <211> 7 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 169 ggctaga | 7 |
| <210> 170 | |
| <211> 7 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 170 ggccagc | 7 |
| <210> 171 | |
| <400> 171 000 | |
| <210> 172 | |
| <211> 9 | |
| <212> DNA | |
| <213> 合成的 | |
| <400> 172 ggctagcta | 9 |

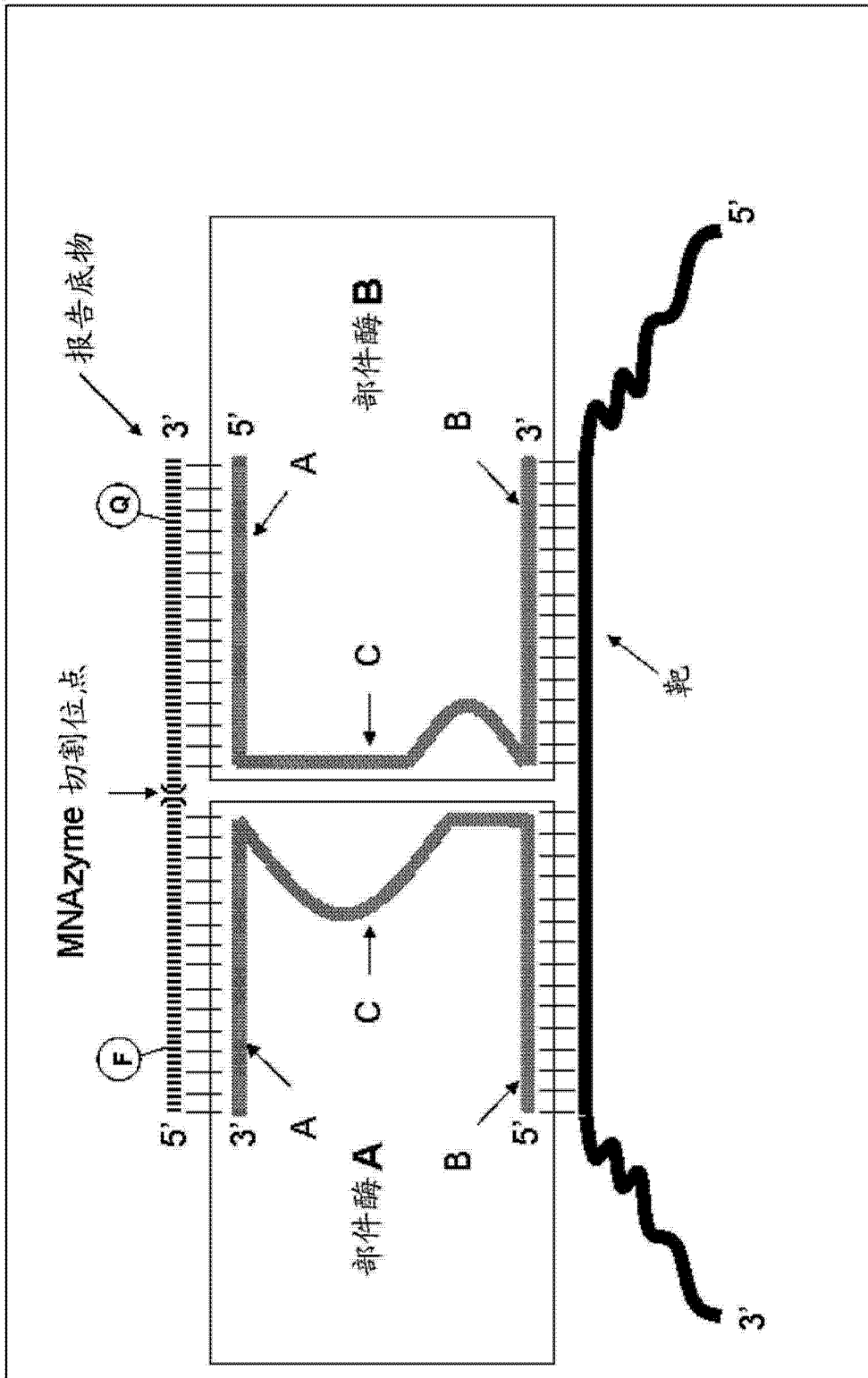


图 1

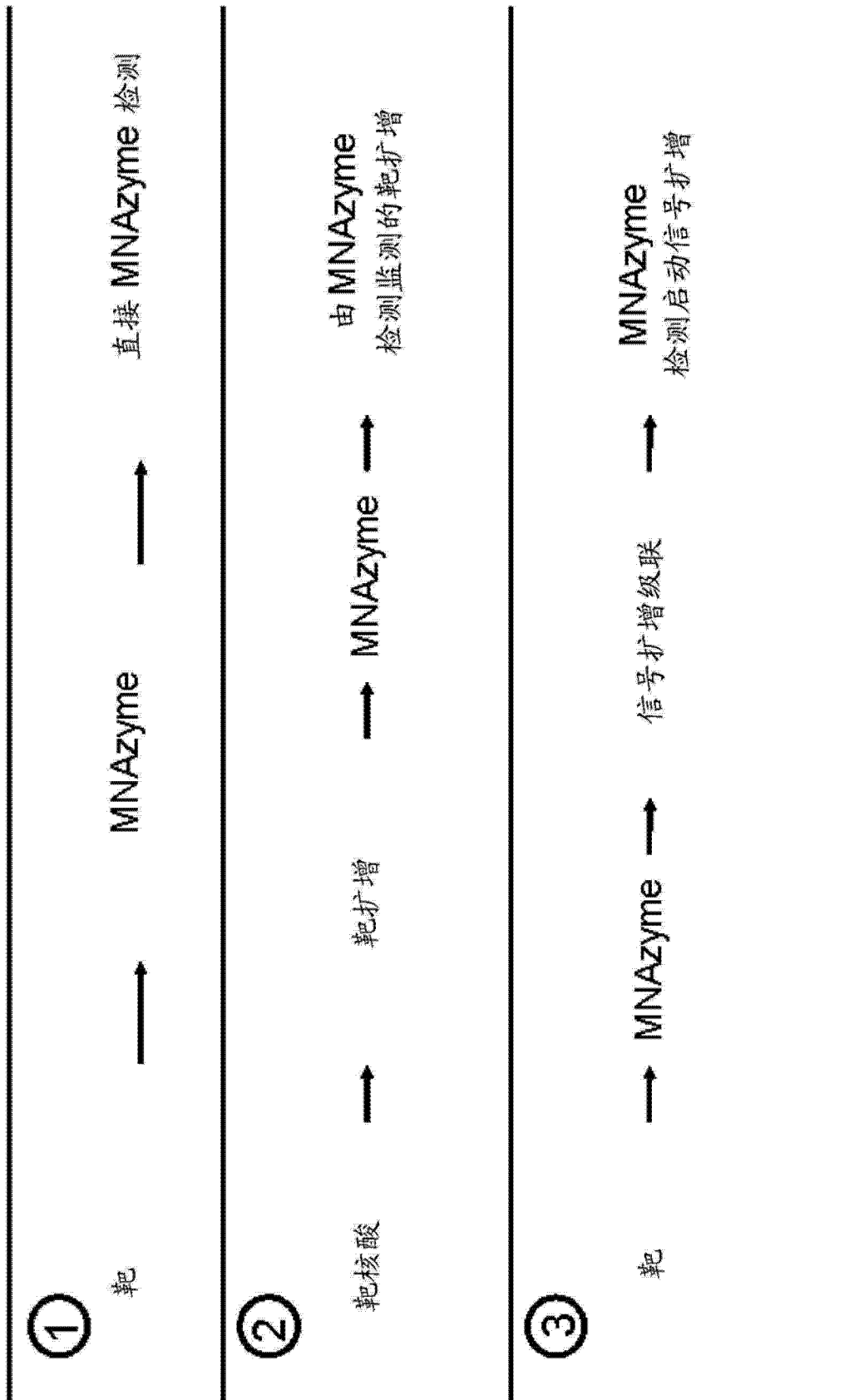


图 2

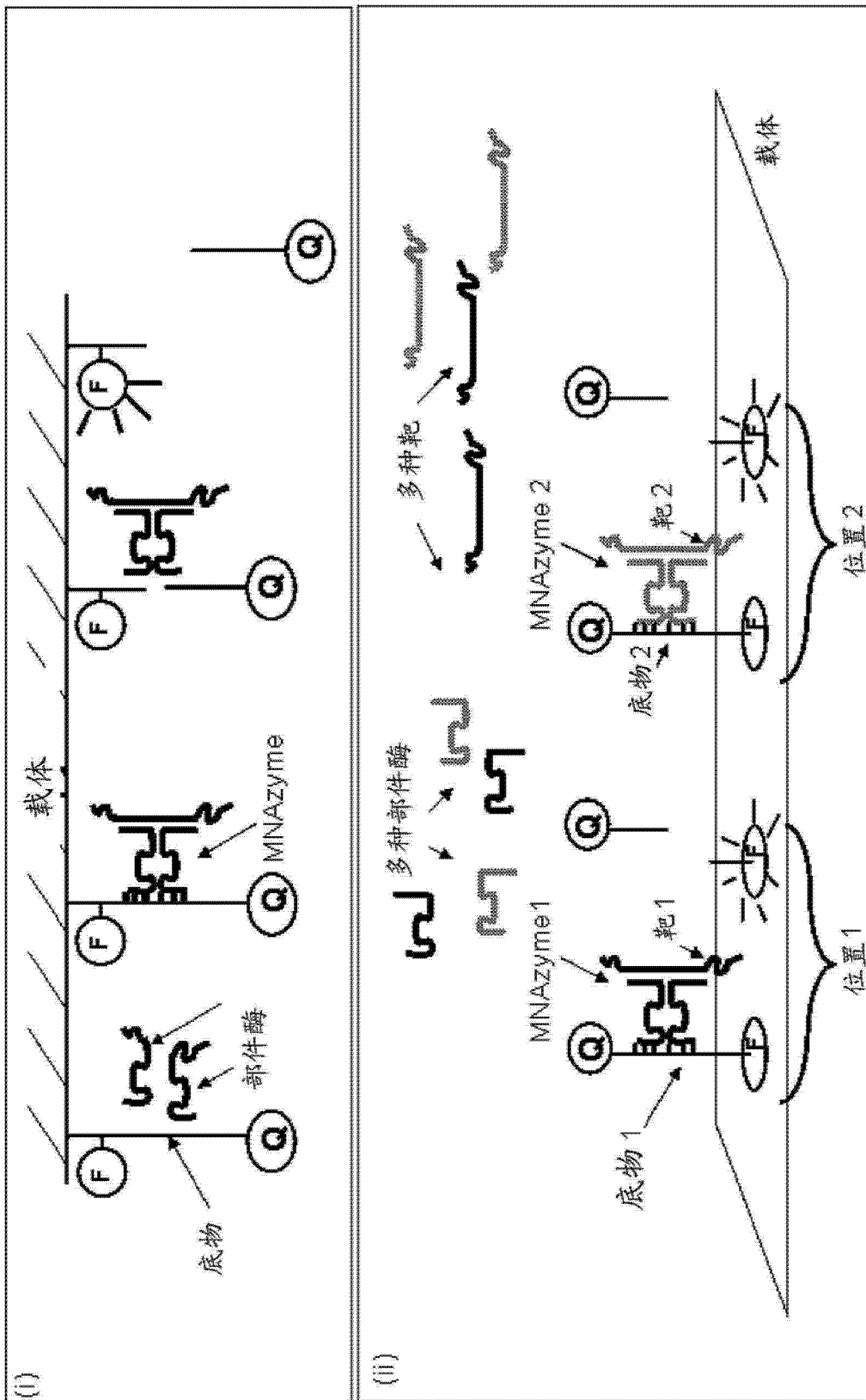


图 3

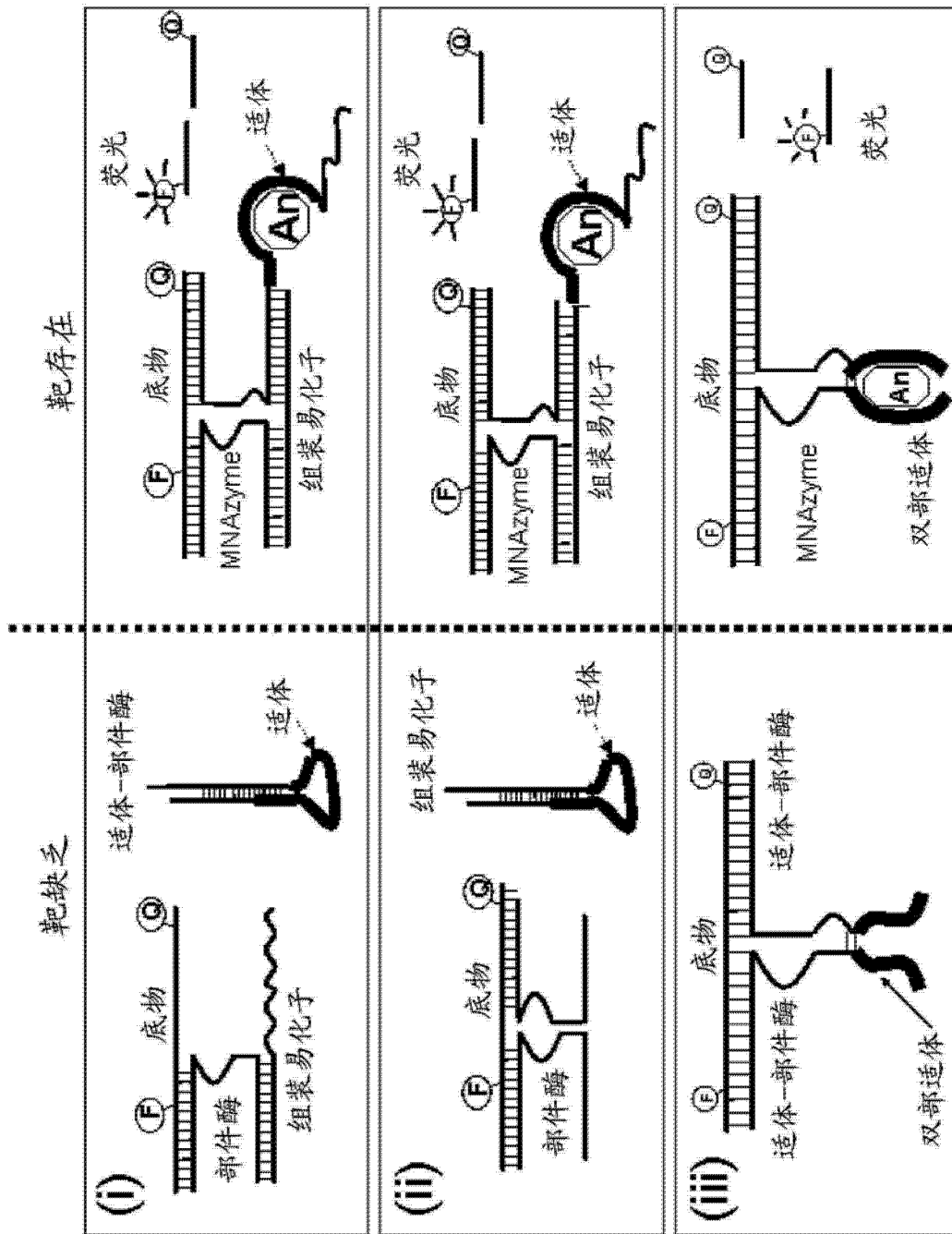


图 4

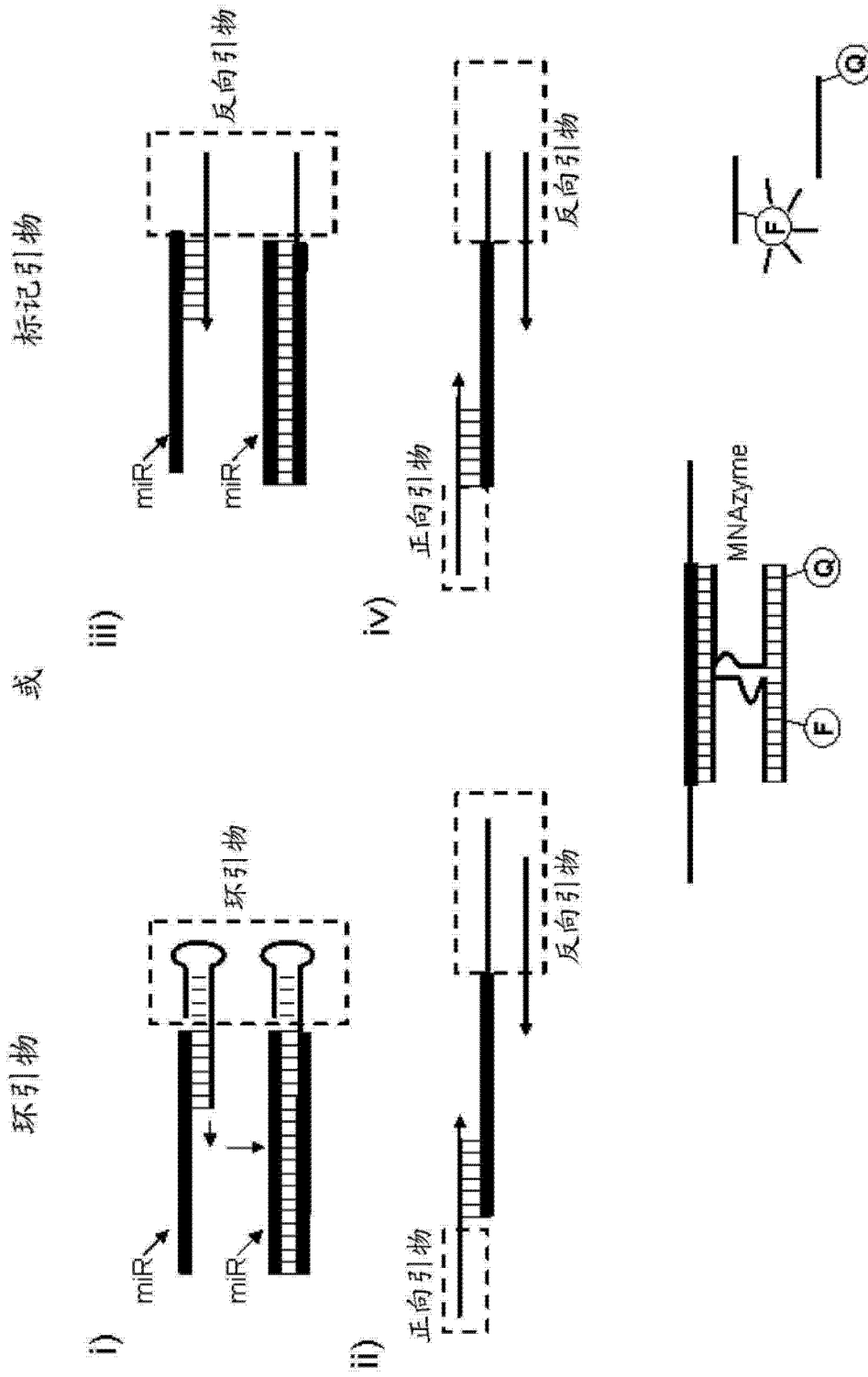


图 5

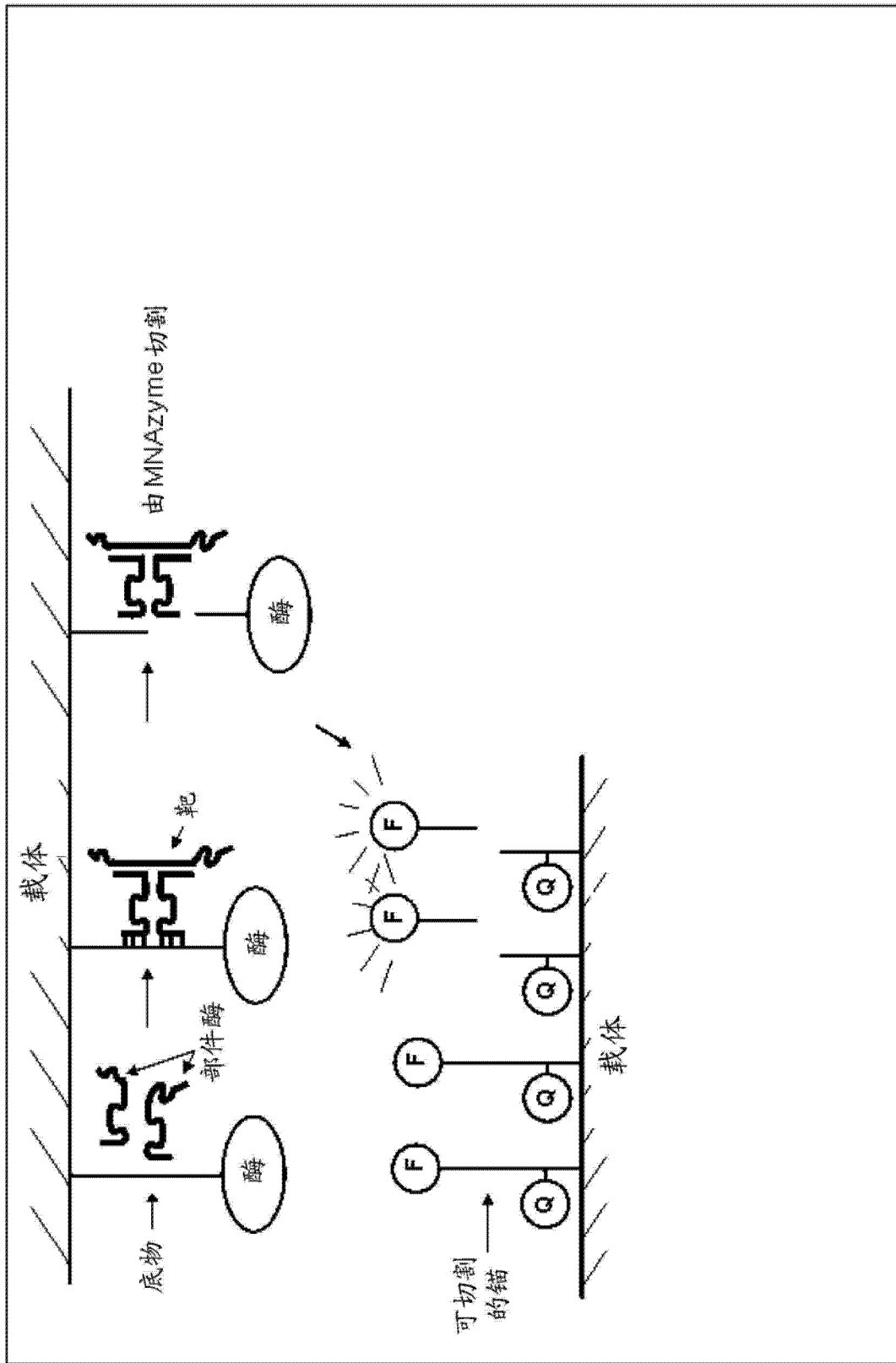


图 6

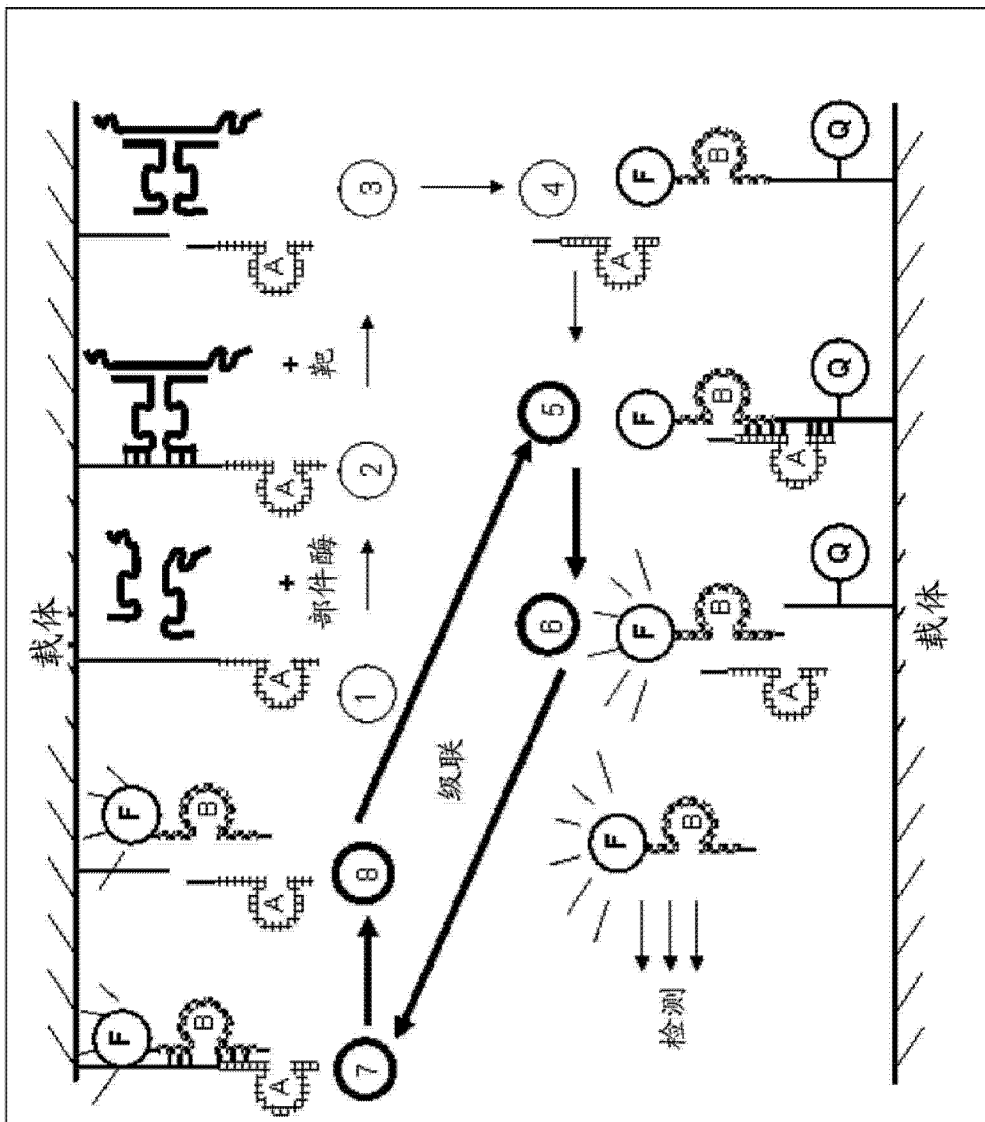


图 7

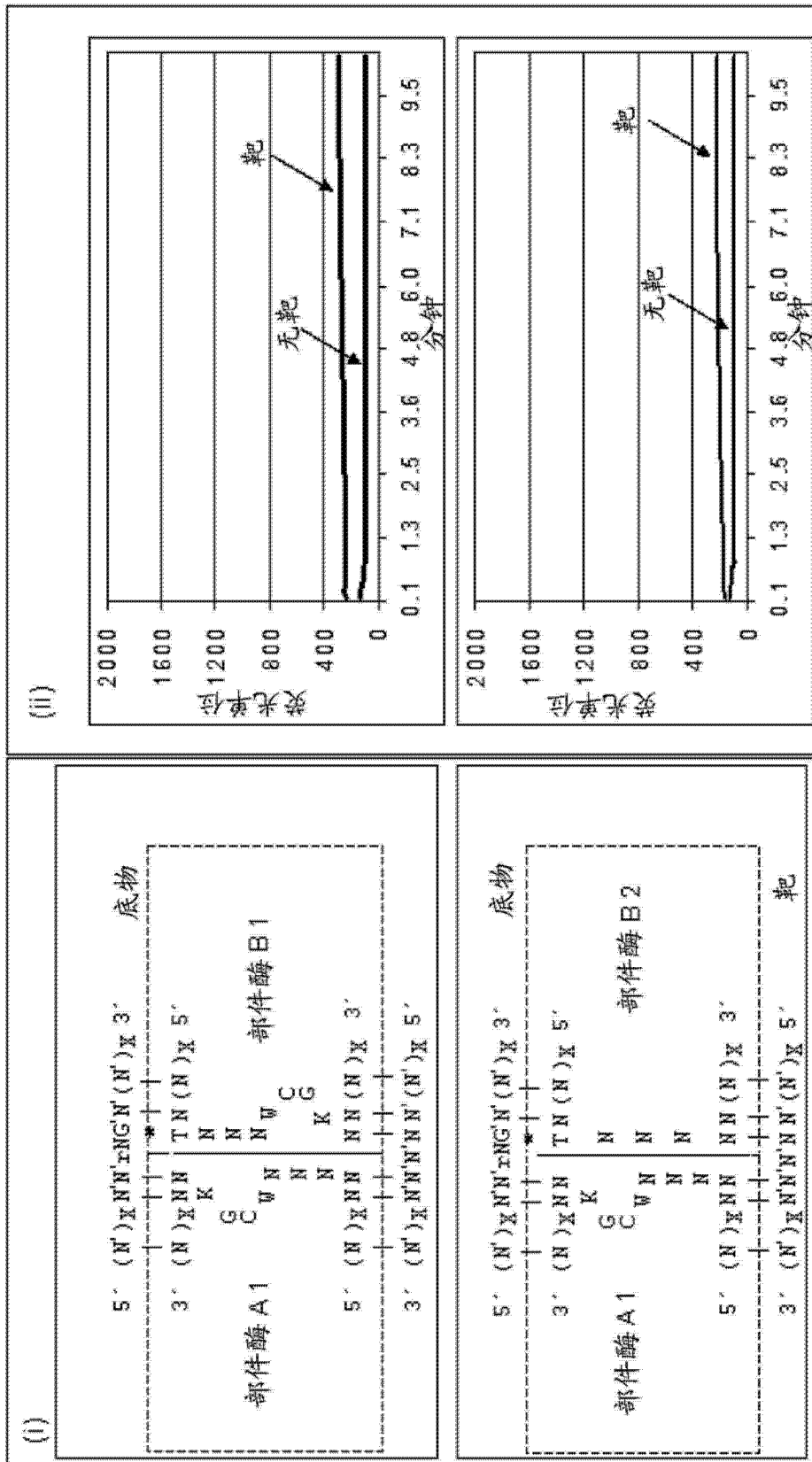


图 8

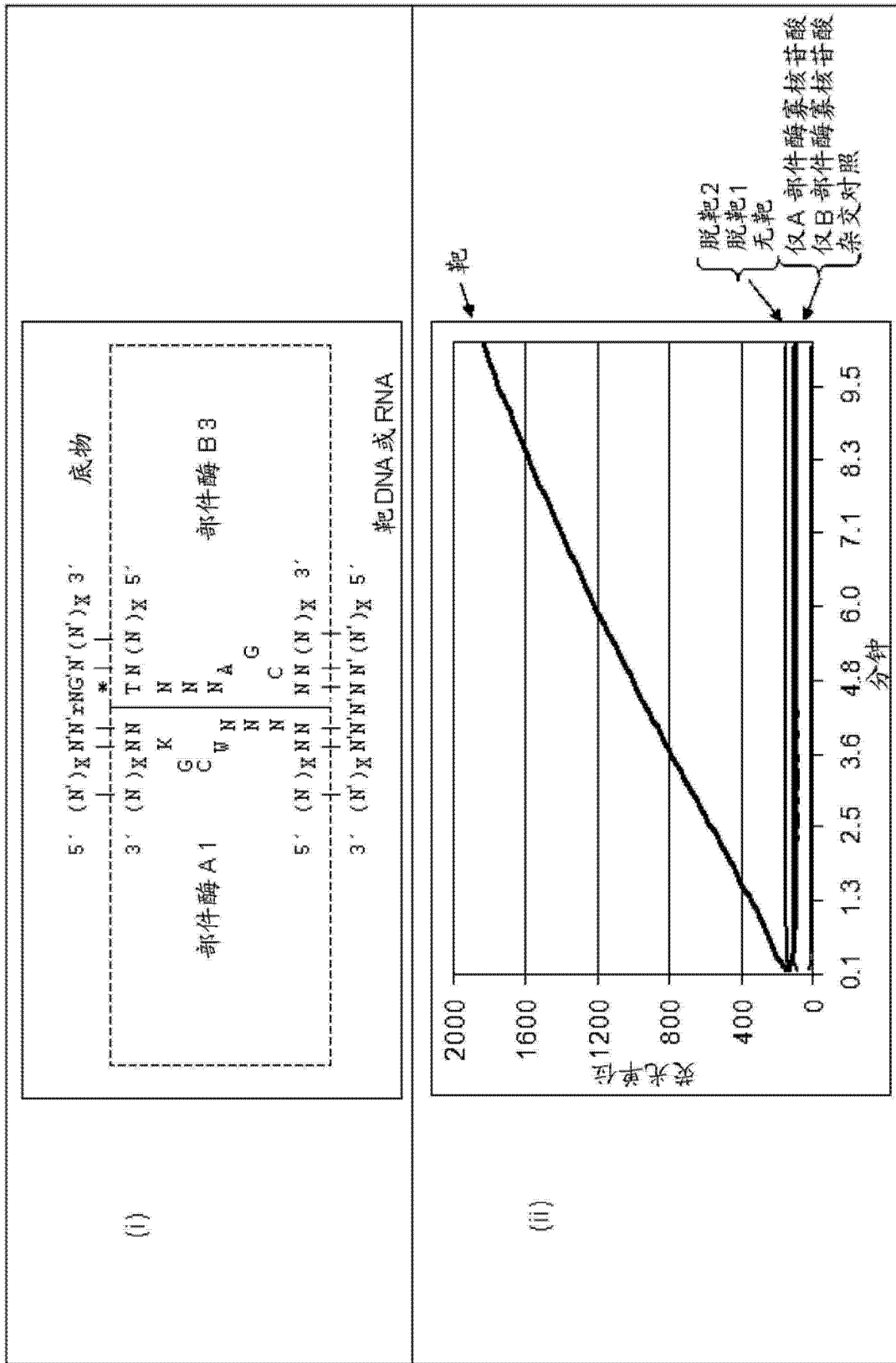


图 9

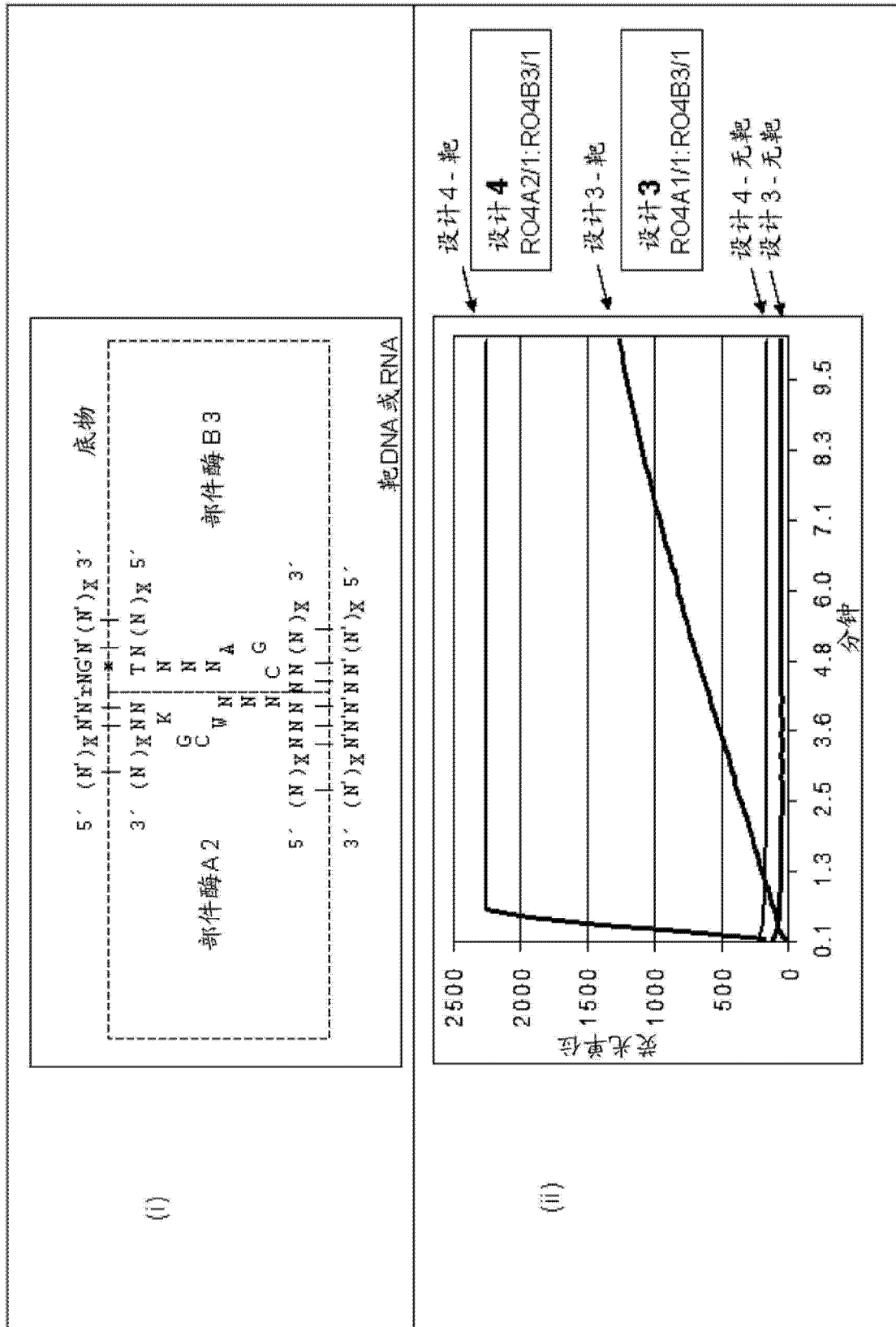


图 10

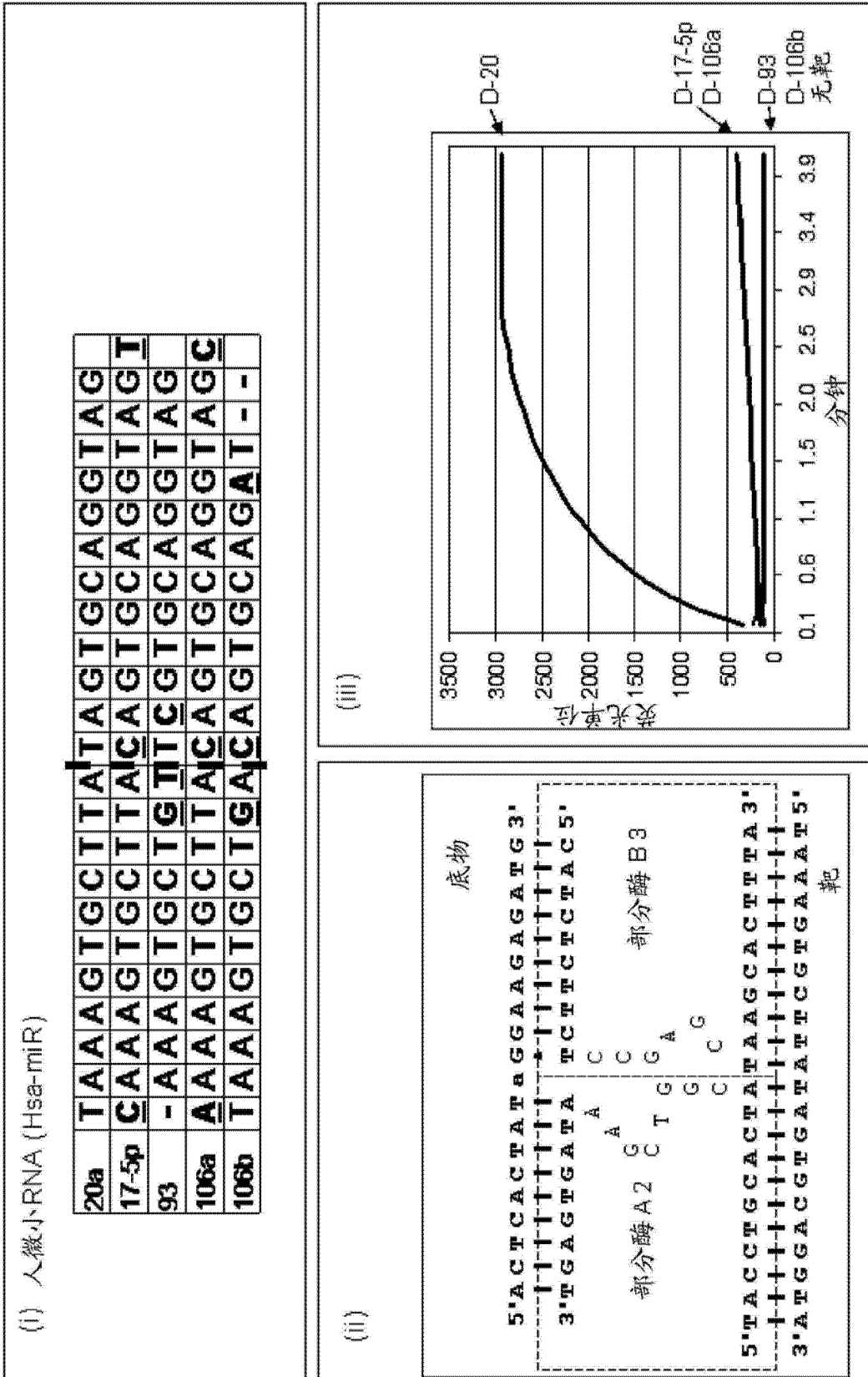


图 11

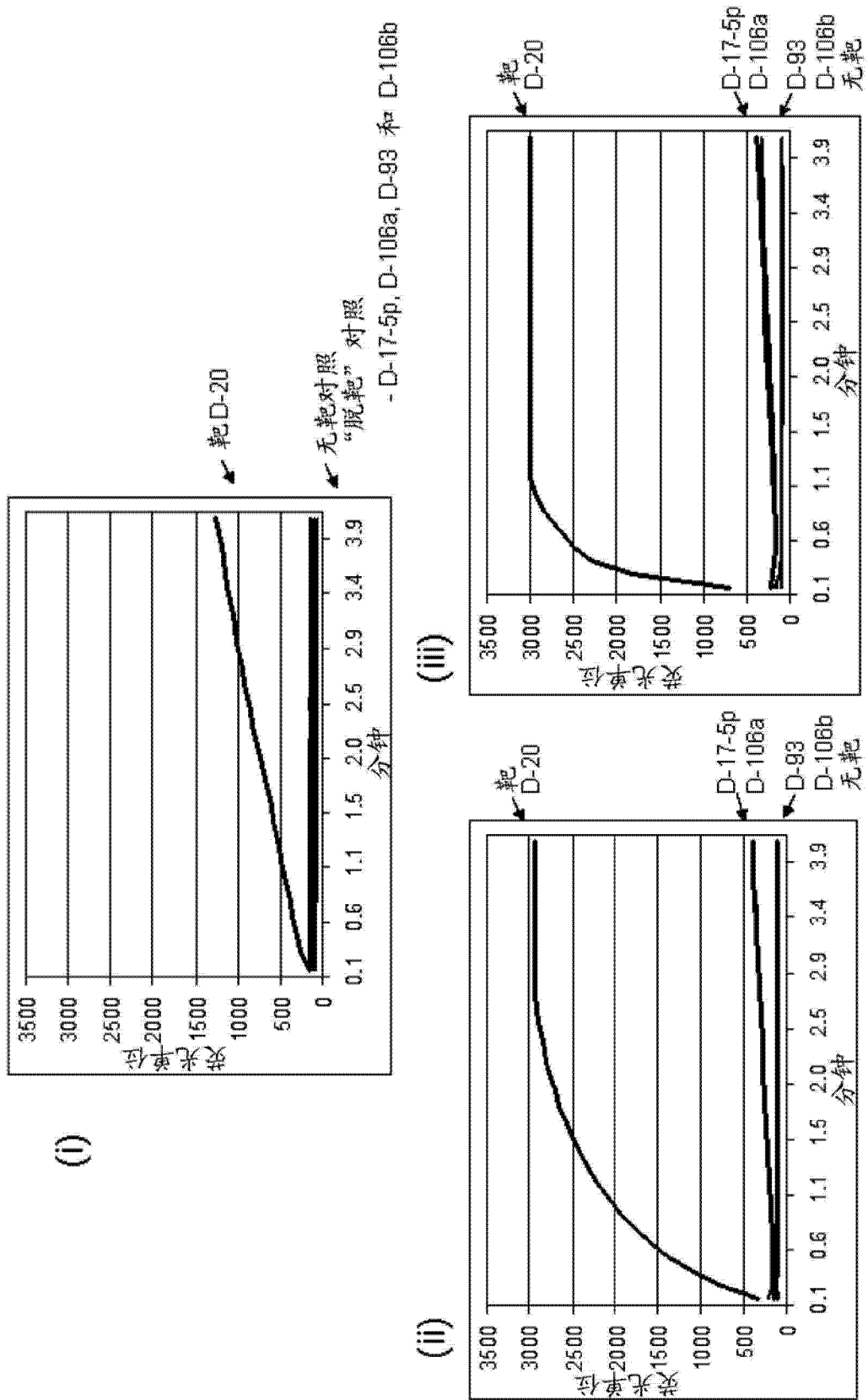


图 12

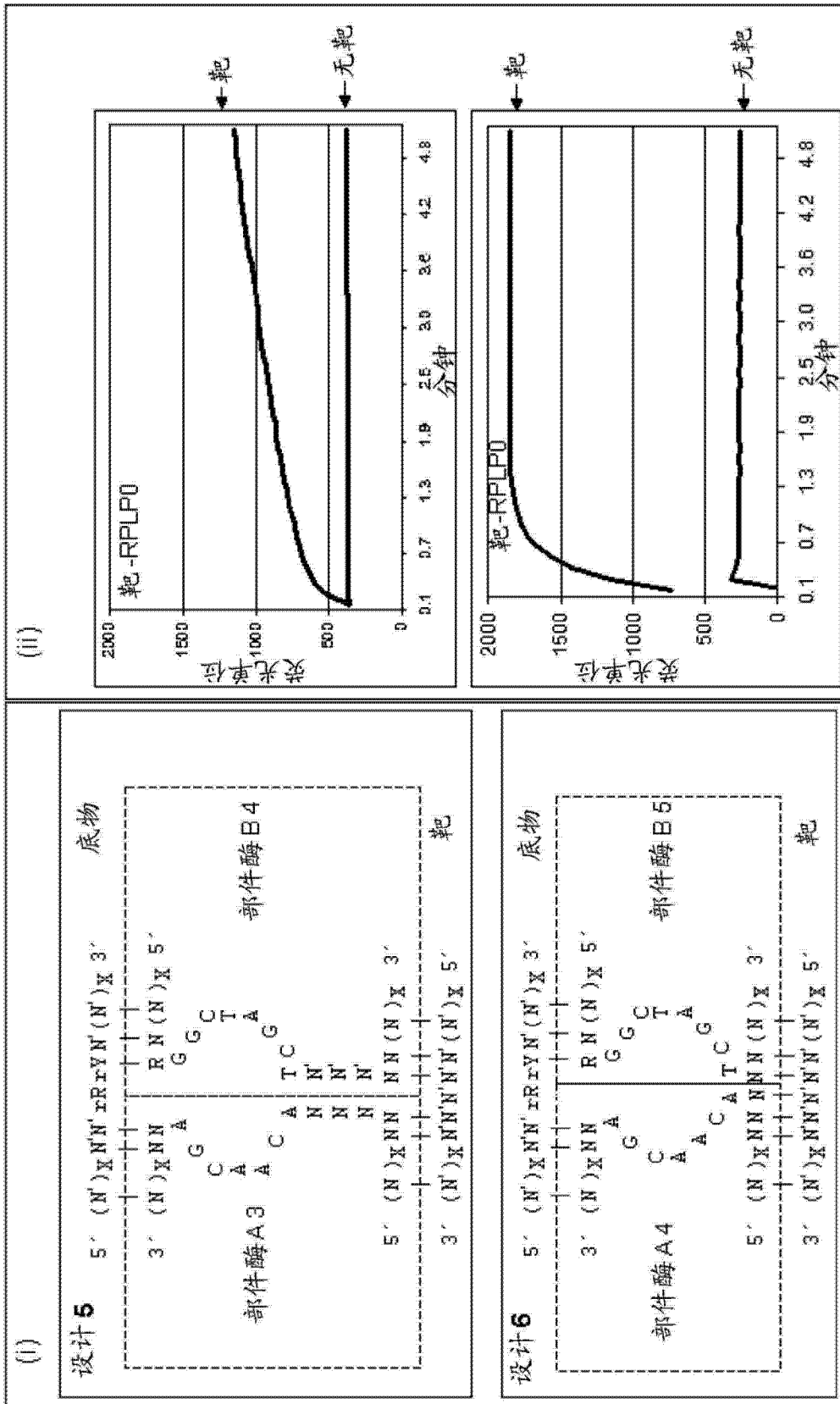


图 13

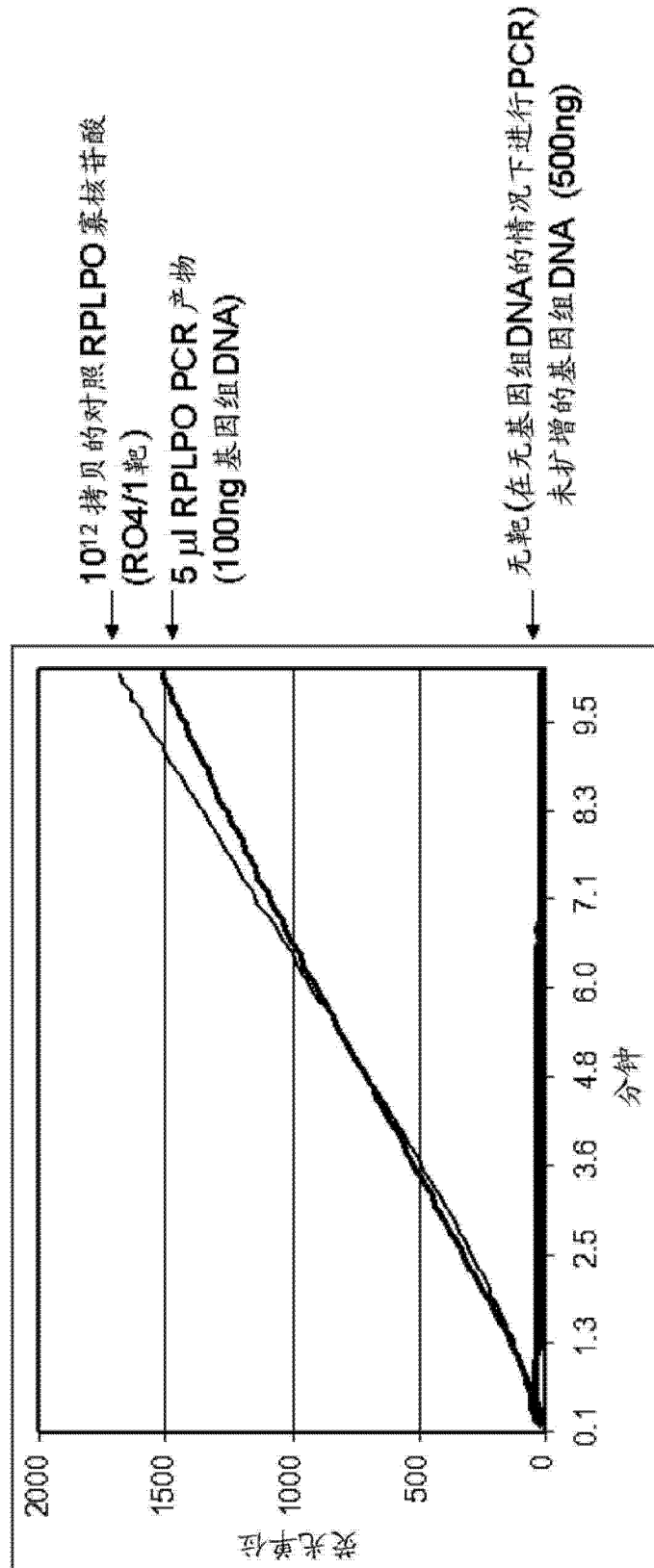


图 14

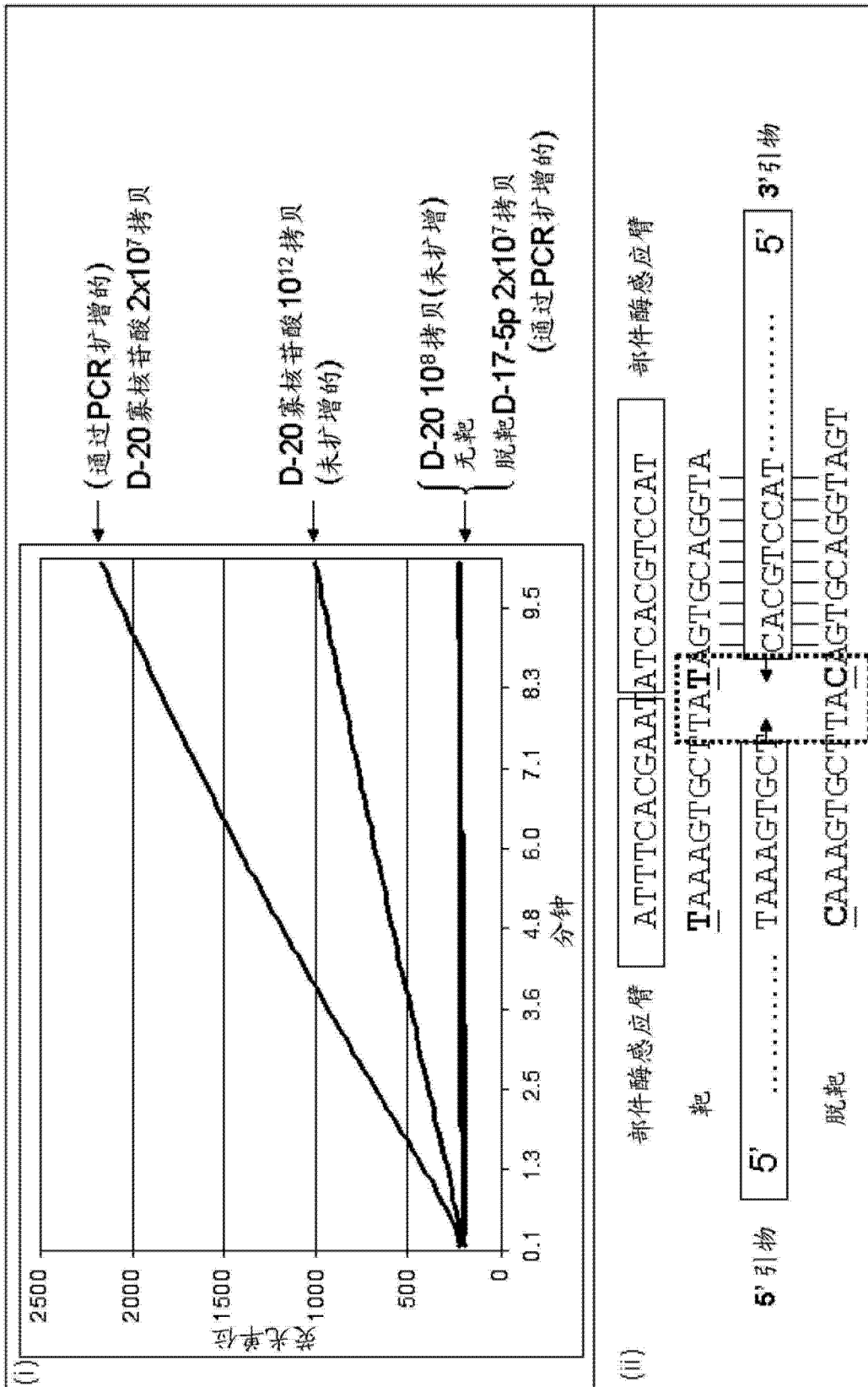


图 15

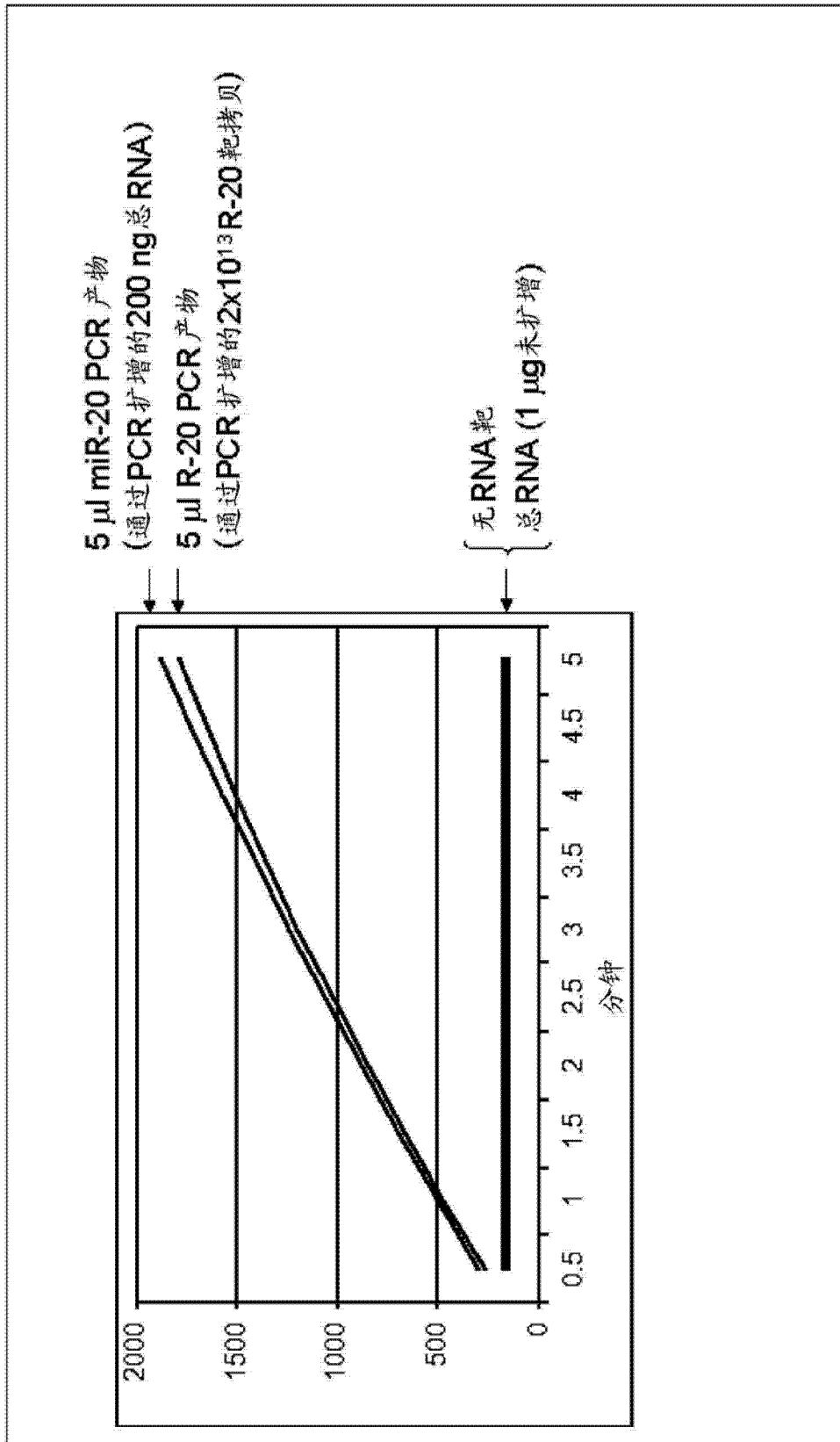


图 16

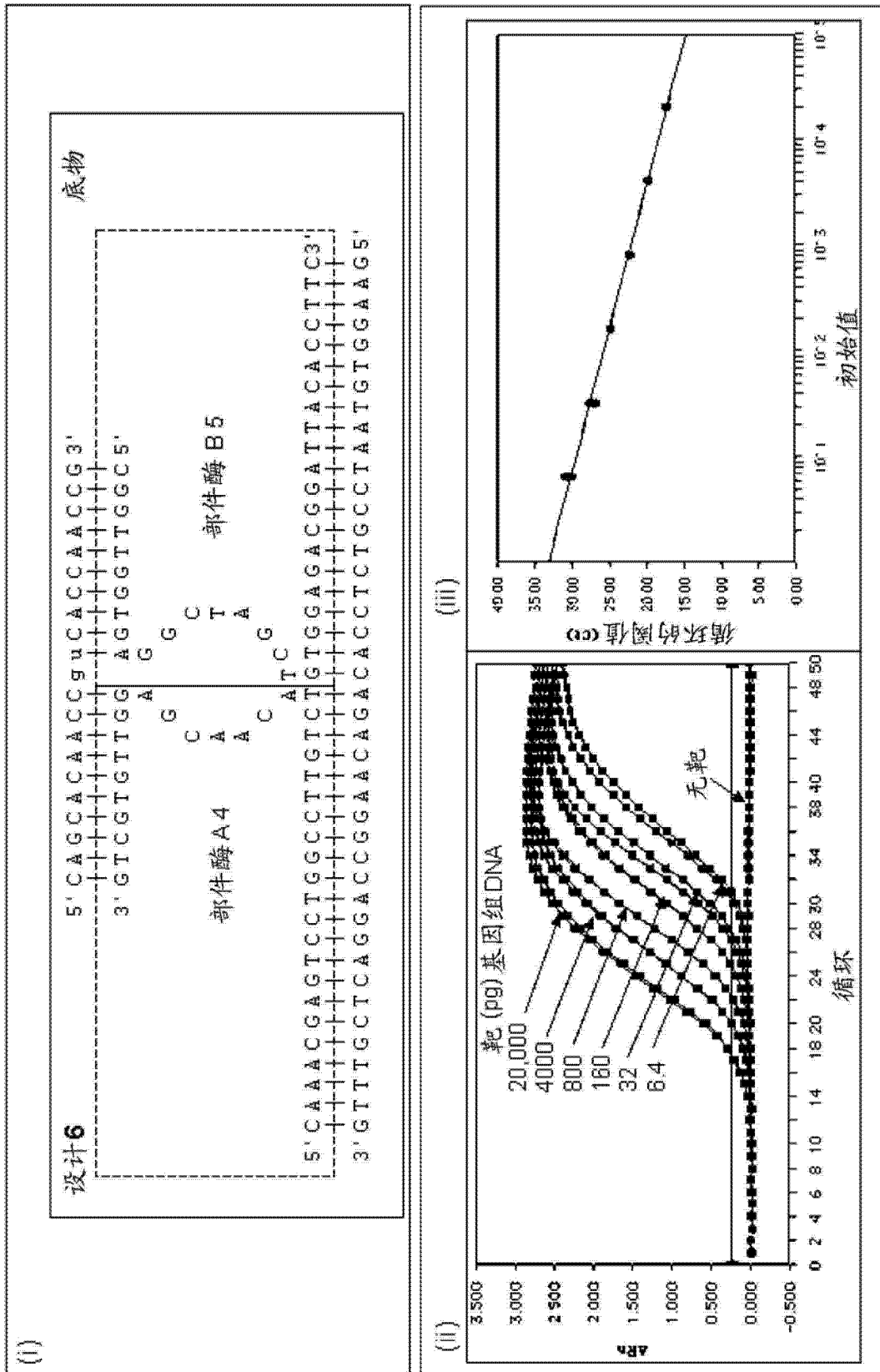


图 17

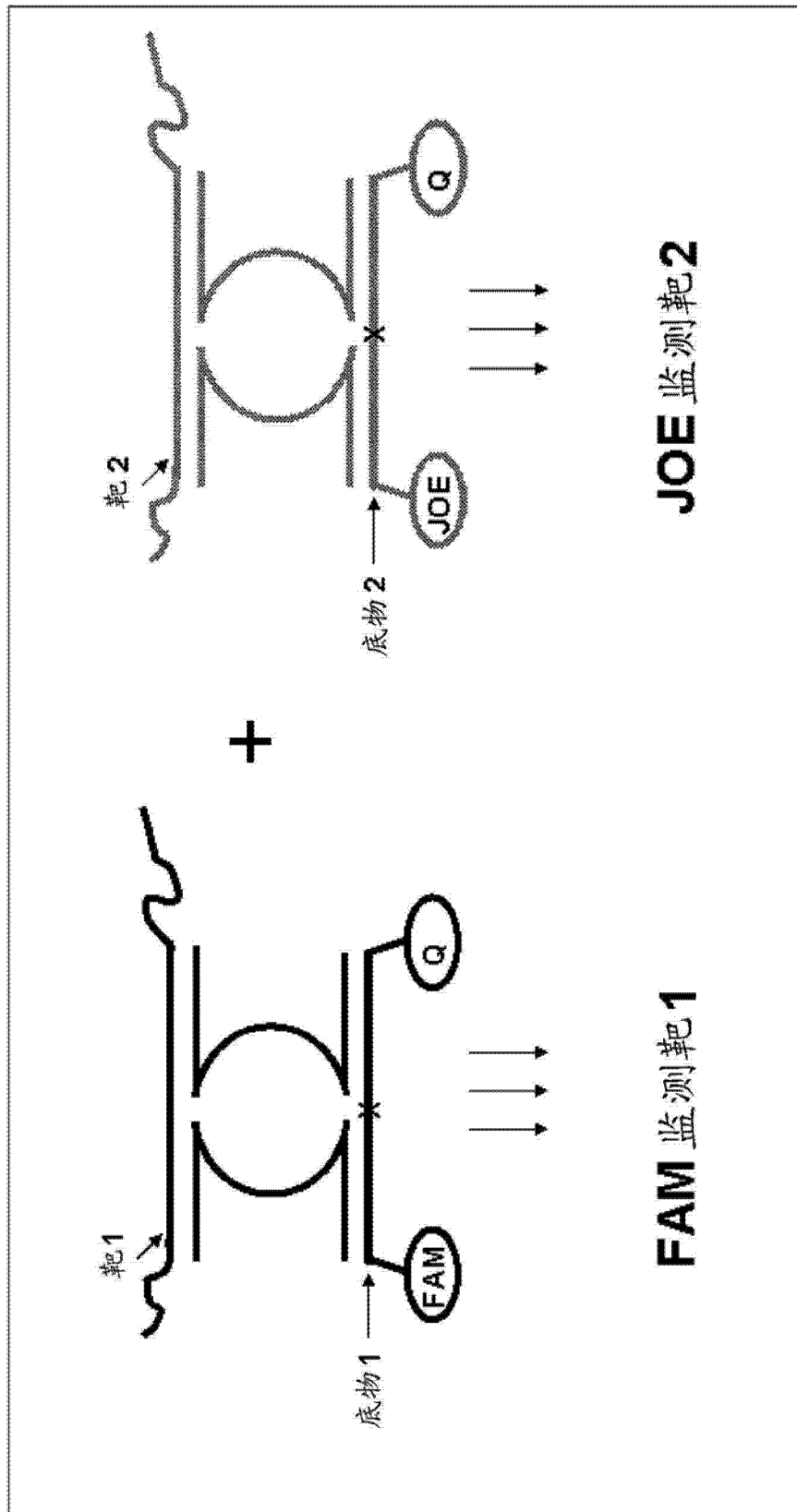


图 18

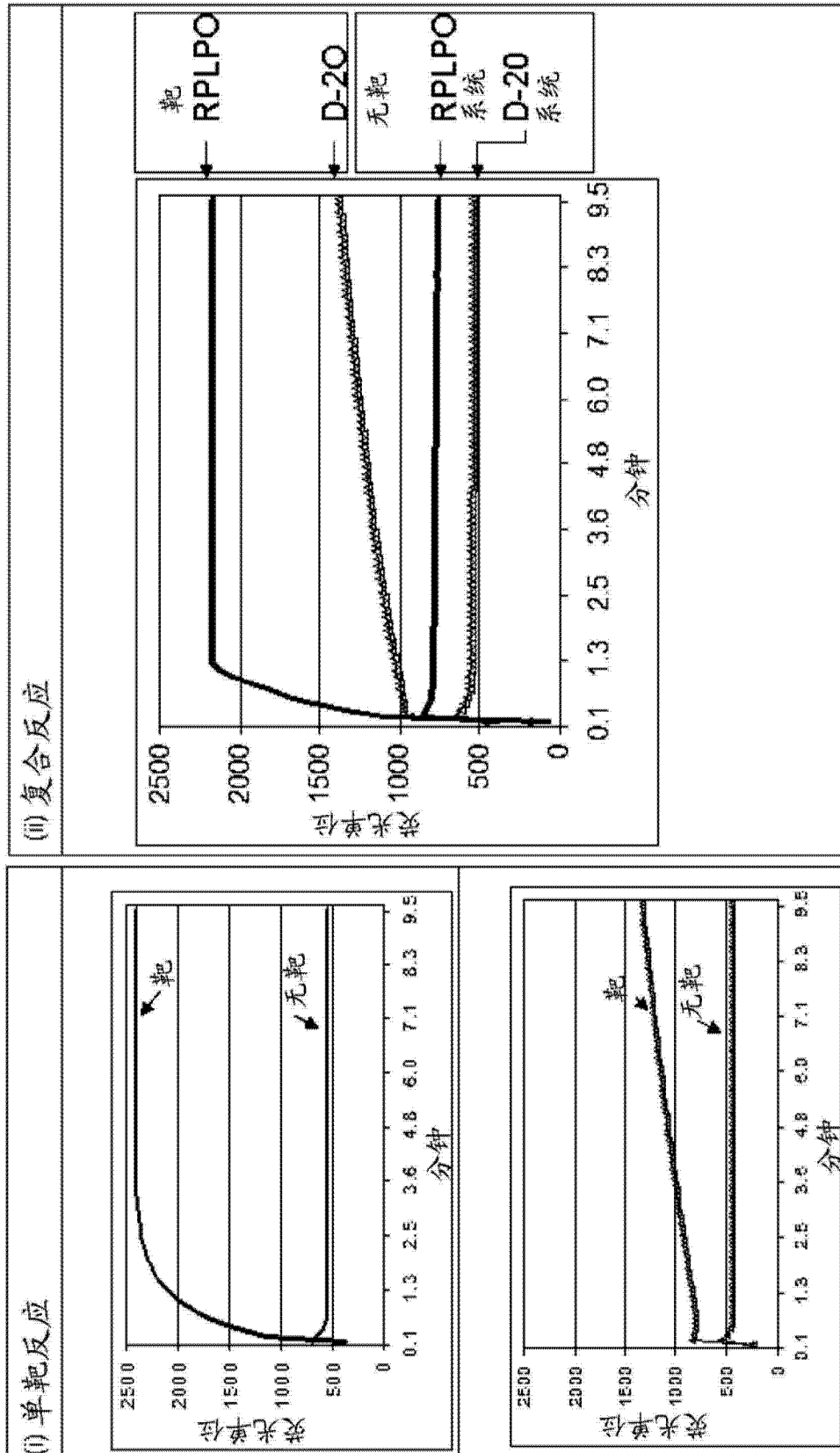


图 19

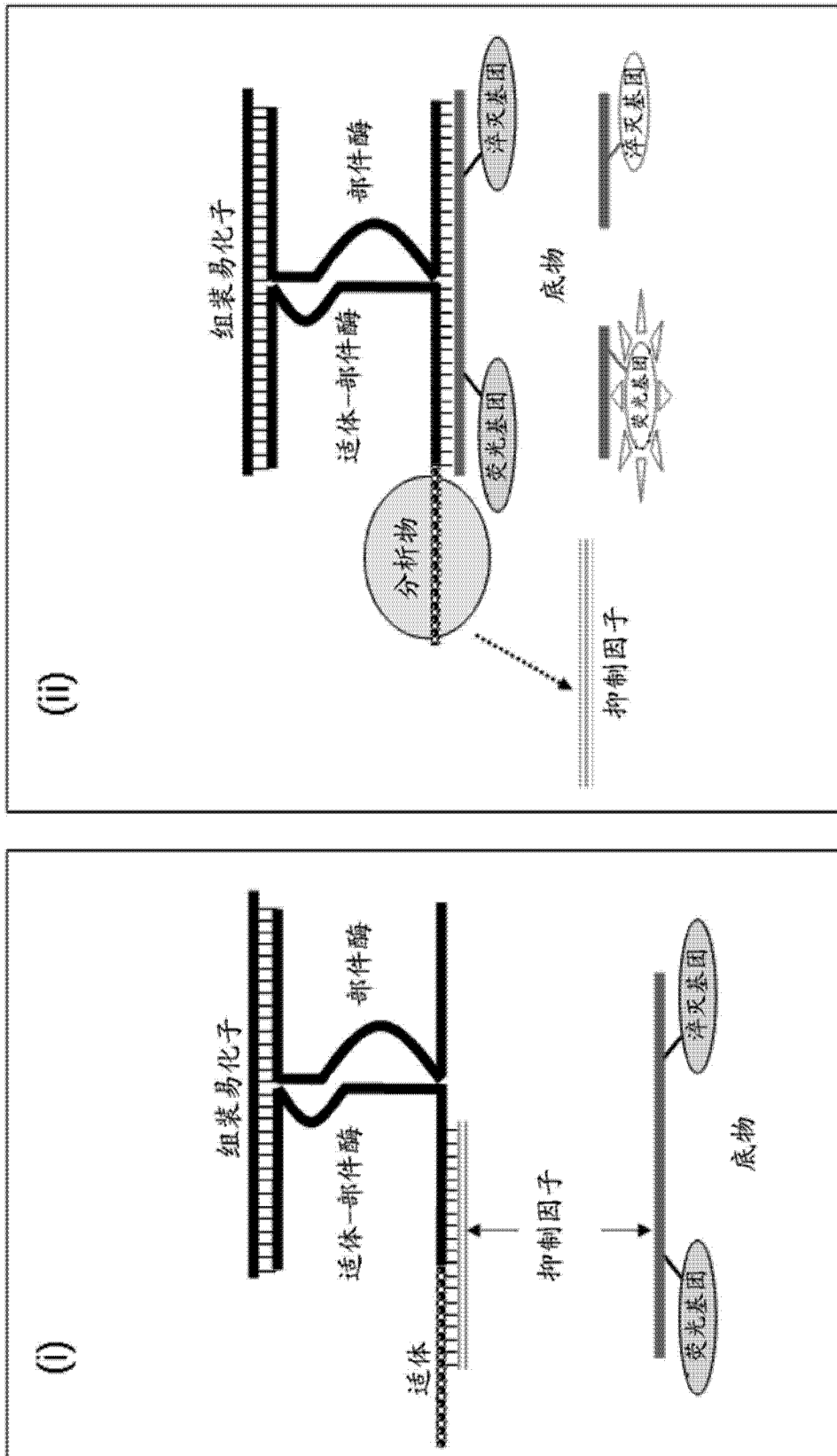


图 20

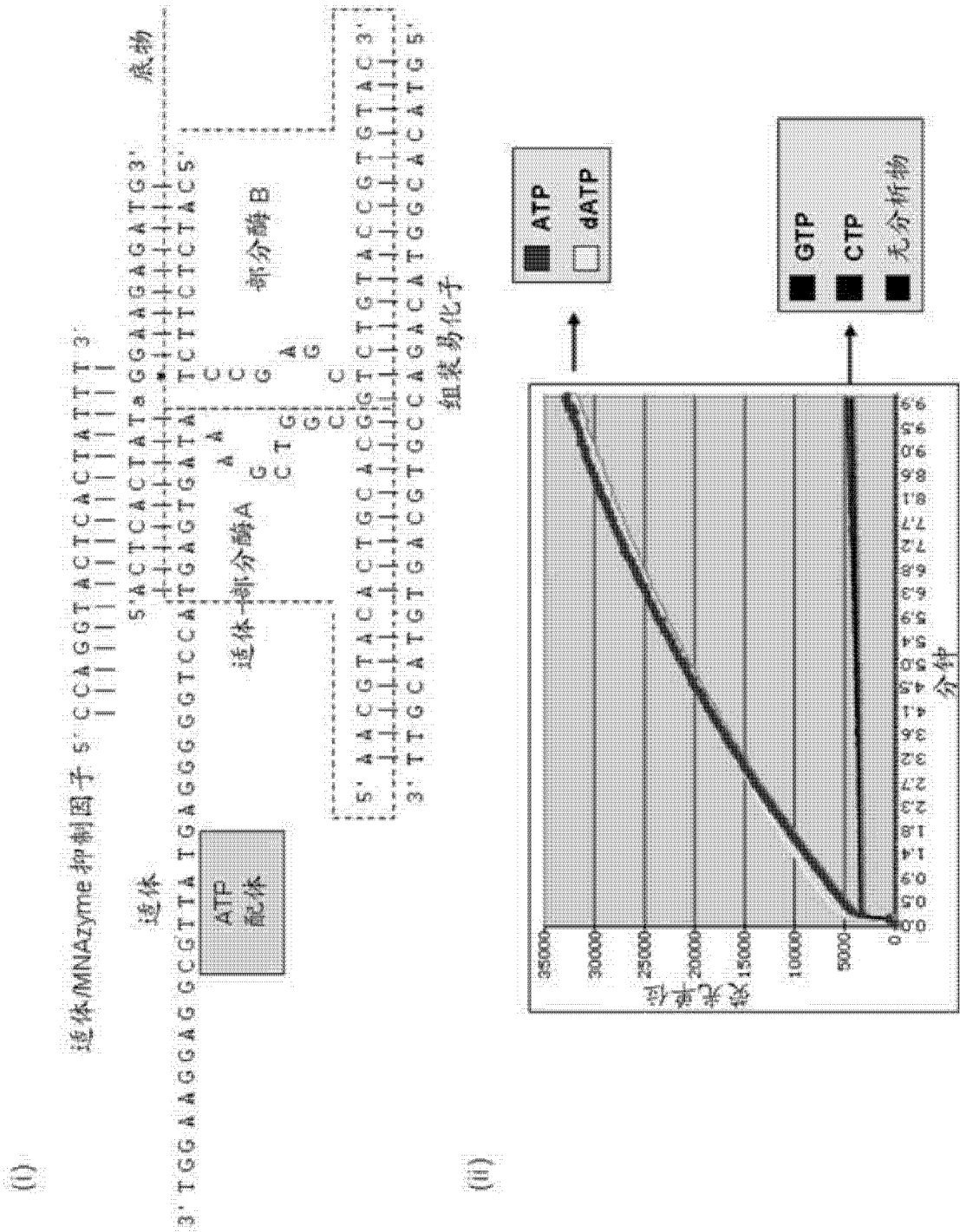


图 21

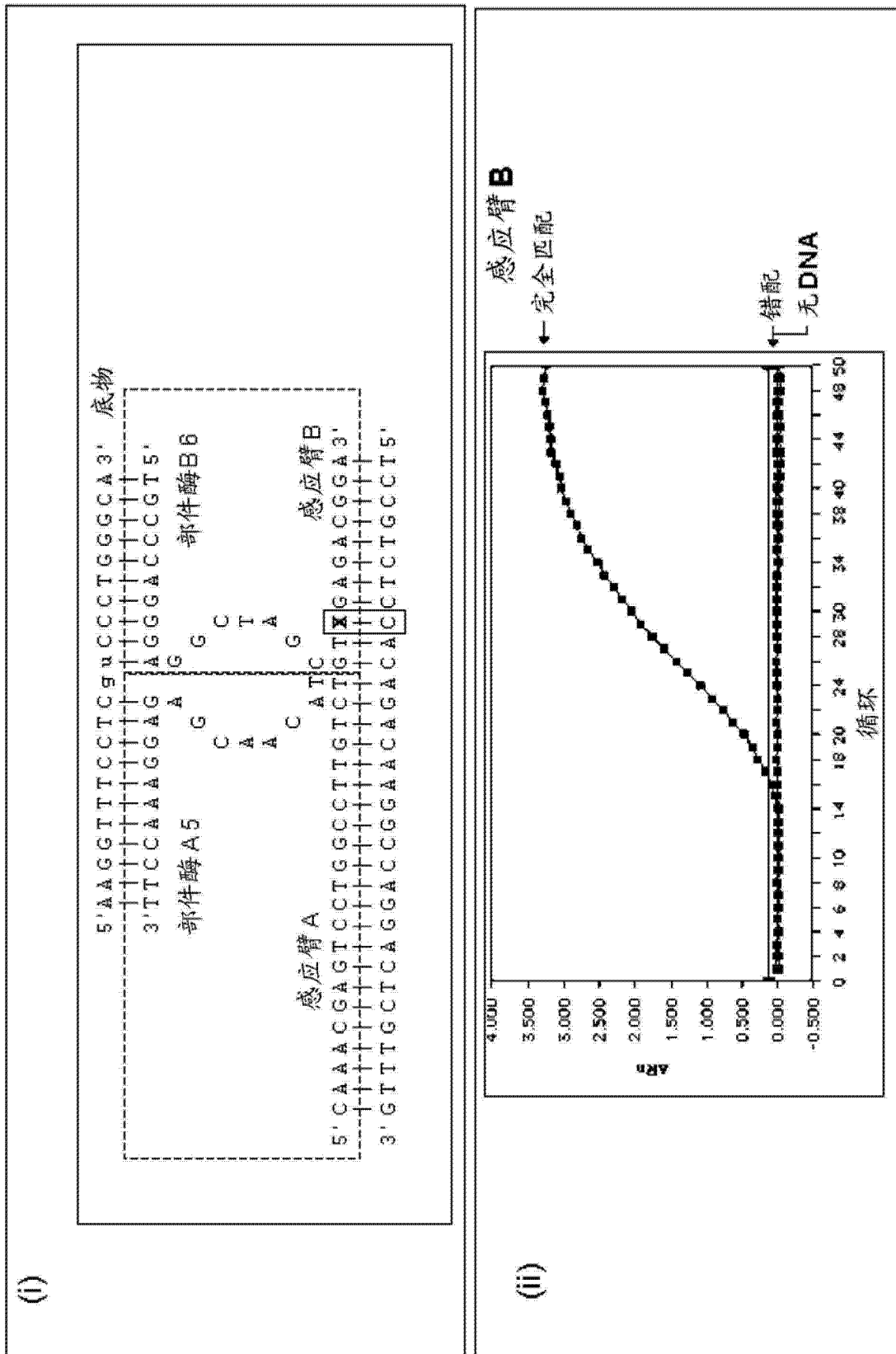


图 22

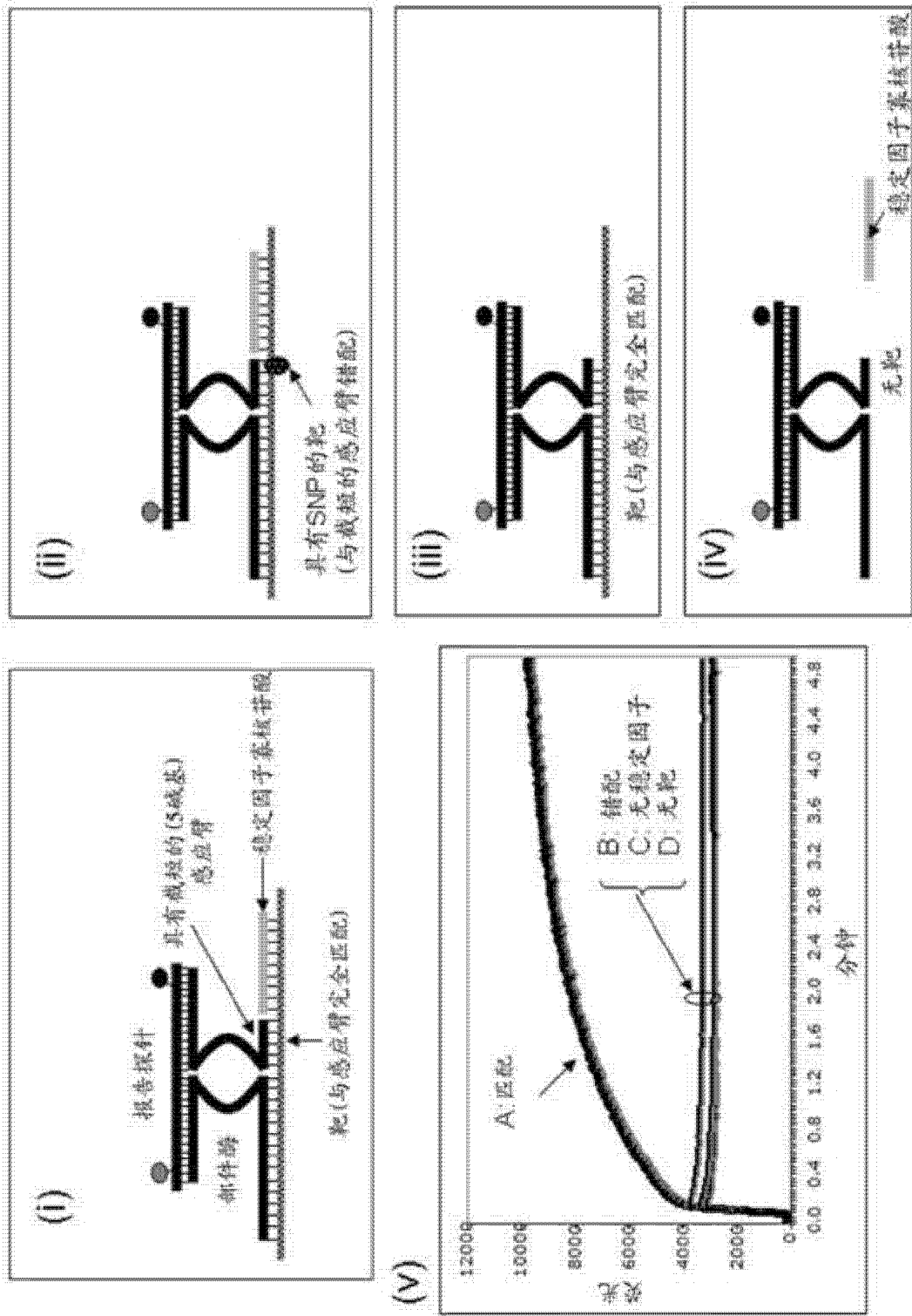


图 23

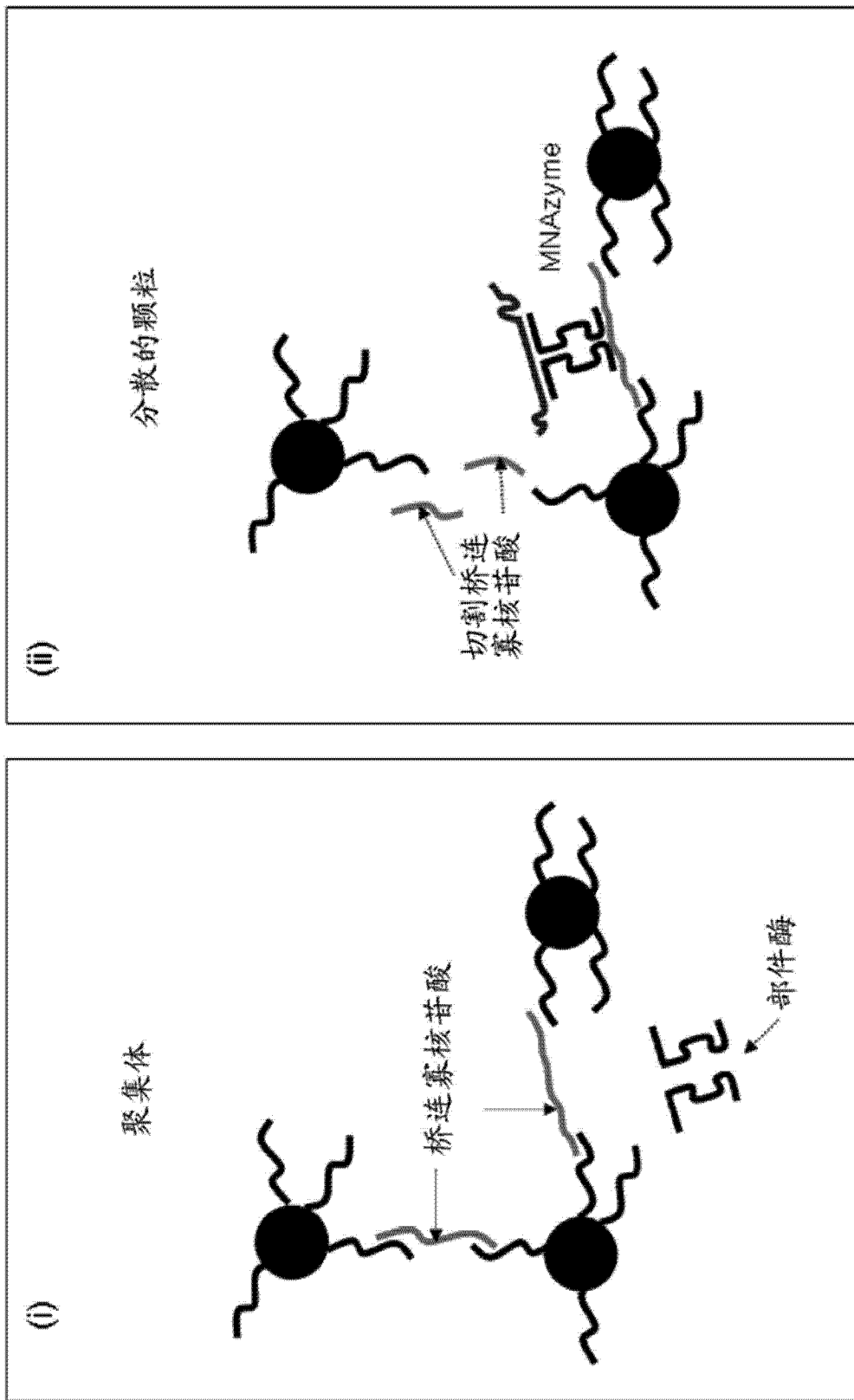


图 24

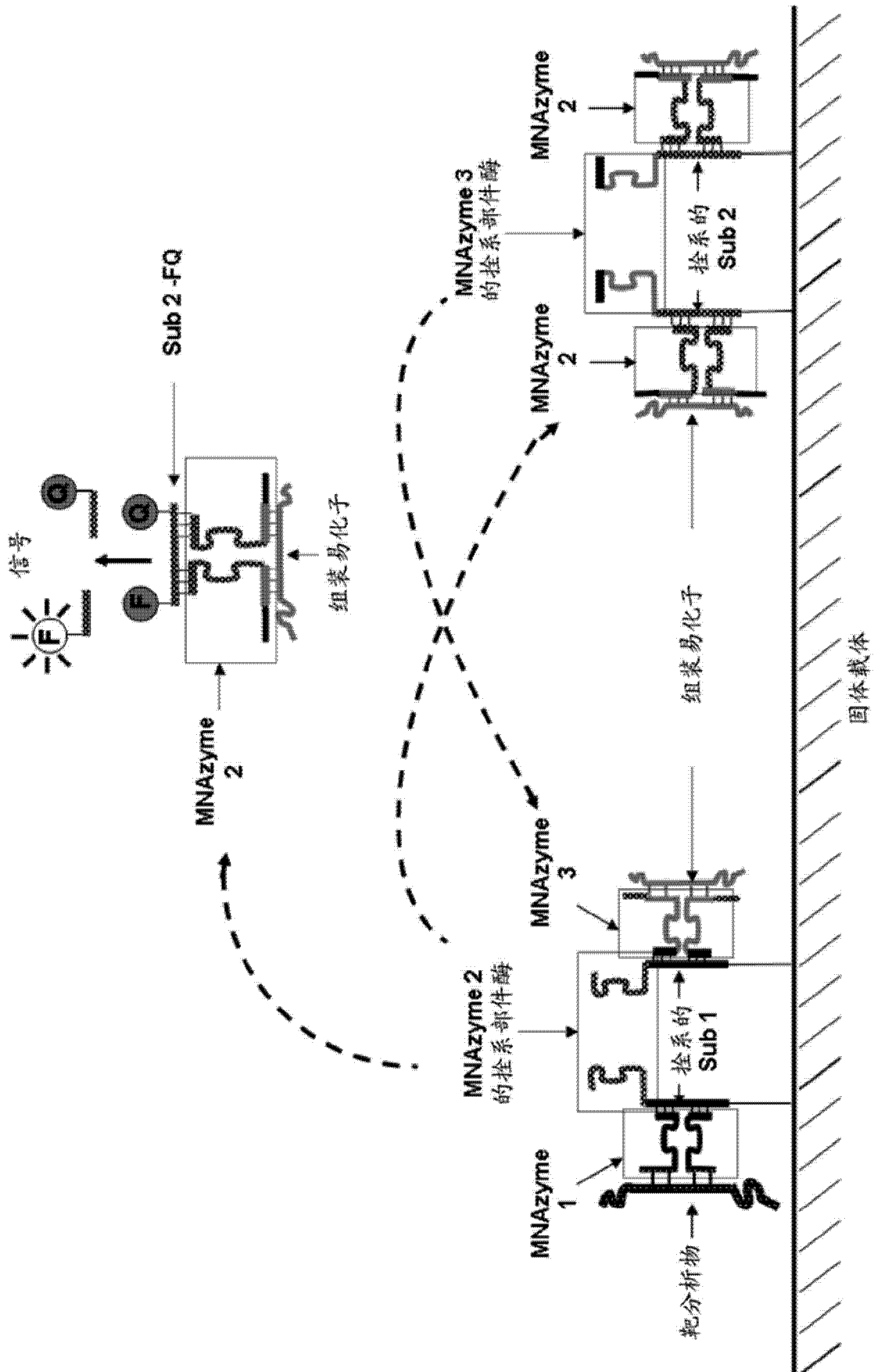


图 25