



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105793435 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201480061367.2

(22)申请日 2014.10.09

(30)优先权数据

61/888,754 2013.10.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/059935 2014.10.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/054516 EN 2015.04.16

(71)申请人 弗洛雷森特里克公司

地址 美国犹他州

(72)发明人 B·卡普林

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G07H 21/04(2006.01)

G07H 21/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书37页

序列表14页 附图17页

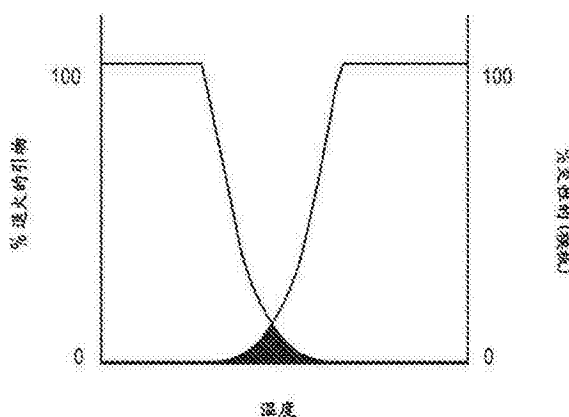
(54)发明名称

多重探针

(57)摘要

描述了适于实施聚合酶链式反应的方法和试剂。具体地,本公开提供了探针和引物,其适于动态通量扩增方法。在一些方面中,本公开提供了长寡核苷酸探针和引物,以及三链体形成探针和引物,其在动态通量扩增使用的窄T<sub>m</sub>范围内发挥功能。然而还提供了实施方案,其中本文所教导的所述探针和引物可用于标准PCR。

引物和模板的熔解温度重叠



1. 一种核酸系统,其包含:

a) 下游寡核苷酸探针,其含有至少50个碱基对,具有与靶寡核苷酸的第一序列互补并具有可切割序列的序列;和

b) 上游寡核苷酸引物,其含有至少50个碱基对,具有与靶寡核苷酸的第二序列互补并具有初始核酸聚合酶结合位点的序列,

其中对于聚合酶配置所述下游寡核苷酸探针以在其5'端切割单核苷酸或小寡核苷酸,且

其中所述下游寡核苷酸探针和上游寡核苷酸引物的 $T_m$ 在靶核酸 $T_m$ 的约 $15^\circ\text{C}$ 内。

2. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针包含可切割序列,所述可切割序列由与初始核酸聚合酶结合位点结合的聚合酶通过聚合独立性切割而进行切割。

3. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针包含至少一个由核酸酶活性切割的标记。

4. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针包含具有报告基因并具有报告基因下游的淬灭物的5'端。

5. 权利要求1的核酸系统,其中所述上游寡核苷酸引物和下游寡核苷酸探针与靶寡核苷酸杂交。

6. 权利要求1的核酸系统,其中当与上游寡核苷酸引物的初始核酸聚合酶结合位点结合时,所述下游寡核苷酸探针和上游寡核苷酸引物以对于核酸聚合酶足够接近的核苷酸距离与靶寡核苷酸退火以接触下游寡核苷酸探针的5'端。

7. 权利要求1的核酸系统,其中对于下游寡核苷酸探针协作配置所述上游寡核苷酸引物和下游寡核苷酸探针以由与上游寡核苷酸引物的初始核酸聚合酶结合位点结合的聚合酶通过聚合独立性切割而切割。

8. 权利要求1的核酸系统,其中当所述核酸聚合酶与上游寡核苷酸引物的初始核酸聚合酶结合位点结合时,所述下游寡核苷酸探针和上游寡核苷酸引物以对于核酸聚合酶足够远的核苷酸距离与靶寡核苷酸退火而不与下游寡核苷酸探针的5'端接触。

9. 权利要求1的核酸系统,其中对于下游寡核苷酸探针协作配置所述上游寡核苷酸引物和下游寡核苷酸探针以在聚合后由聚合酶通过聚合依赖性切割而切割。

10. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸包含上游标记和下游标记。

11. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针包含可互换位于所述探针5'或3'端上的荧光染料和淬灭物,从而当所述探针在溶液中时,来自荧光染料的信号通过淬灭物抑制。

12. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针包含可互换位于所述探针5'或3'端上的荧光染料和淬灭物,从而当所述上游寡核苷酸引物和下游寡核苷酸探针与靶寡核苷酸的结合发生时,伴随聚合酶与初始核酸聚合酶结合位点的结合,所述聚合酶将切割所述下游寡核苷酸探针的荧光标记或淬灭物。

13. 权利要求1的核酸系统,其中所述上游寡核苷酸引物或下游寡核苷酸探针之一包含菲咯啉-RU II复合物(bathophenanthroline-RU II complex)作为标记,且所述上游寡核苷酸引物或下游寡核苷酸探针的另一者包含能量供体分子。

14. 权利要求1的核酸系统,其中所述下游寡核苷酸探针是杂合发夹/切割的探针。

15. 一种检测靶核酸序列的方法,其包括:

- a) 提供根据权利要求1的核酸系统;
- b) 将具有所述靶序列的DNA变性;
- c) 将所述上游寡核苷酸引物和下游寡核苷酸探针与所述靶寡核苷酸杂交;
- d) 将聚合酶与初始核酸聚合酶结合位点结合;
- e) 使用聚合酶经由聚合使所述上游寡核苷酸引物向所述下游寡核苷酸探针延伸;
- f) 切割所述下游寡核苷酸探针的核苷酸或小寡核苷酸;和
- g) 检测所述切割产生的信号。

16. 一种多重核酸系统,其包含:

- a) 三链体形成寡核苷酸(TFO)引物,其具有:
  - i. 经设计以与靶寡核苷酸的靶序列杂交的杂交多核苷酸序列;和
  - ii. 与所述杂交多核苷酸序列关联的三链体形成区(TFR);和
- b) 靶核苷酸。

17. 权利要求16的多重核酸系统,其进一步包含与所述TFR杂交的TFO探针,因而在通过TFR引物的靶核苷酸序列的扩增过程中产生的双链DNA序列中形成三链体。

18. 权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFR探针包含选自下组的标记部分:荧光部分、放射性部分、彩色部分、荧光报告部分、荧光淬灭部分、一对荧光共振能量转移部分之一,及其组合。

19. 权利要求16的多重核酸系统,其中所述TFR在杂交多核苷酸序列的5'端或其中所述TFR在杂交多核苷酸序列的5'端附近。

20. 权利要求16的多重核酸系统,其中所述TFR在杂交多核苷酸序列的3'端或其中所述TFR在杂交多核苷酸序列的3'端附近。

21. 权利要求16的多重核酸系统,其中所述TFR在所述杂交多核苷酸序列的5'端和3'端之间的位置。

22. 权利要求16的多重核酸系统,其中所述杂交多核苷酸序列长度为约50个碱基或更多。

23. 权利要求16的多重核酸系统,其中所述杂交多核苷酸序列长度范围为约20至约100个碱基。

24. 权利要求16的多重核酸系统,其进一步包含与所述杂交多核苷酸序列连接的标记。

25. 权利要求17的多重核酸系统,其进一步在TFO探针的3'端包含抑制从3'端延伸的帽。

26. 权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针是三链体形成荧光探针(TFFP)。

27. 权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针是三链体形成荧光探针(TFFP)且其中仅当反应温度处于或低于引物的退火温度时所述TFFP与扩增的DNA退火,且从而所述TFFP不参与聚合反应。

28. 权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针是三链体形成荧光探针(TFFP)且所述双链DNA具有报告染料。

29. 权利要求28的多重核酸系统,当所述TFFP与扩增的双链DNA退火且光照在其上时,在TFFP共振物上的供体染料作为供体染料共振物,其将能量转移至位于所述双链DNA上的

受体染料,引起受体染料以特定的波长发荧光,发射对应该波长的彩色光从而指示所述靶序列存在并已被扩增。

30.权利要求17的多重核酸系统,其中所述双链DNA具有第一标记且其中所述TFO探针具有第二标记,其中所述第一标记和第二标记在紧密关联时提供可检测的发射。

31.权利要求16的多重核酸系统,其进一步包含多个具有不同靶序列的TFR引物,其中所述TFR引物具有不同的标记。

32.权利要求17的多重核酸系统,其进一步包含多个具有不同靶序列的TFR引物,其中所述TFR引物具有不同的第一标记,且所述TFO探针包含当与所述不同的第一标记关联时引起荧光的相应的第二标记。

33.权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针经设计以与所述TFR引物的 $T_m$ 大约相同或较低的温度退火。

34.权利要求16的多重核酸系统,其中所述TFR包含天然存在的TFR序列。

35.权利要求17的多重核酸系统,其进一步包含与杂交的三链体DNA结合的一种或多种非特异性DNA结合染料。

36.权利要求17的多重核酸系统,其进一步包含一种或多种四聚体结合染料。

37.权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针包含荧光染料或淬灭物。

38.权利要求17的多重核酸系统,其中所述TFO探针包含以发夹结构配置的荧光染料和淬灭剂。

39.权利要求16的多重核酸系统,其中当靶DNA包含与所述TFR引物序列具有互补性的序列时,所述TFR引物生成三链体形成DNA链。

40.权利要求16的多重核酸系统,其中所述靶DNA包含天然三链体形成区。

41.一种扩增靶核酸序列的方法,其包括:

a)提供权利要求16的多重核酸系统;

b)将所述TFR引物与所述靶核苷酸杂交,其中所述TFR引物包含具有一个或多个TFR并入其中的标签;

c)通过用聚合酶的聚合而延伸所述TFR引物;

d)从所述靶寡核苷酸去杂交所述延伸的TFR引物;

e)将引物与所述延伸的TFR引物杂交;

f)延伸所述引物从而形成所述延伸的TFR引物的互补物。

42.权利要求41的方法,其进一步包括:

a)提供TFO探针;和

b)检测所述TFO探针是否与扩增的靶核苷酸中的TFR区结合。

43.权利要求42的方法,其中所述TFO探针包含标记以促进扩增的靶核苷酸的检测。

44.一种具有权利要求1和16的两种或多种寡核苷酸的套盒。

45.权利要求44的套盒,其中至少一种寡核苷酸是三链体形成寡核苷酸。

46.权利要求44的套盒,其包含TFR引物。

47.权利要求44的套盒,其包含TFO探针。

48.权利要求44的套盒,其包含TFR引物和TFO探针。

49.权利要求44的套盒,其具有聚合试剂。

## 多重探针

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月9日提交的美国临时申请号61/888,754的优先权,其全部内容在此通过提述以其整体并入。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与该申请相关的序列表以文本形式代替纸质拷贝提供,且在此处通过提述并入说明书。包含序列表的文本形式的名称为FLUO\_001\_00WO\_ST25.txt。文本文件为19KB,在2014年10月9日生成,并经由EFS-Web电子提交。

[0005] 领域

[0006] 本公开涉及用于实施PCR扩增方案的方法和材料。

[0007] 具体地,本公开描述了方法和材料—其包括引物和探针组合—可用于实施动态通量扩增(“DFA”)。

[0008] 背景

[0009] 实时PCR通常依赖于荧光分子的使用,其允许实时量化或检测PCR产物,而其他检测/量化化学如电化学也适用。

[0010] 荧光分子可以是DNA结合染料如SYBR<sup>®</sup> Green或荧光标记的引物或探针。存在可用于不同应用的许多荧光染料和探针。用于实时PCR的最常使用的DNA-结合染料是SYBR<sup>®</sup> Green 1,相比单链DNA其优先与双链DNA(dsDNA)结合。当与dsDNA结合时,SYBR Green I荧光增加多至1,000倍。因此,荧光信号与dsDNA存在的量成比例。

[0011] DNA结合染料的主要缺陷是其缺少特异性,即,DNA结合染料可与任何dsDNA结合。结果,在实时或终点PCR反应中任何非特异性产物的存在将促成整体的荧光并影响量化或检测的准确性。此外,由于来自不同产物的荧光信号在不包含区分不同产物形成的PCR后熔解曲线分析时并不能加以区分,因此DNA结合染料不能在多重反应用于量化或检测。

[0012] 与之相反,基于引物和基于探针的检测化学确保仅当感兴趣的产物被扩增时生成信号。引物或靶物特异性寡核苷酸探针通常用报告荧光团标记,但在大多数情况中,当特异性靶物未扩增时或不存在于样品中时,荧光被淬灭。通常这通过如下完成:将淬灭物分子附接于所述引物或探针,并制定一些机制,通过所述机制当引物或探针与其特异性靶物结合时,报告基因(reporter)和淬灭物(quencher)分离。

[0013] 目前使用的主要的引物/探针检测化学如下:

[0014] 水解(TaqMan)探针

[0015] 水解测定法包括序列特异性荧光标记的寡核苷酸探针,以及序列特异性引物。水解测定法利用一些热稳定聚合酶如Taq或Tth的5'外切核酸酶活性。水解探针在一端用荧光报告基因标记并在相反端用淬灭物标记,尽管对此特定的设计的数种变化是通常使用的。当所述探针完整时,由于淬灭物附近的荧光团,荧光淬灭。通常使用的荧光报告基因-淬灭物对是发射绿色荧光的荧光素(FAM)和Black Hole Quencher 1染料,尽管这只是许多使用的染料/淬灭物组合之一。

[0016] 扩增反应包括组合的退火/延伸步骤,在该过程中所述探针与靶物杂交且Taq或

Tth的dsDNA特异性5'至3'外切核酸酶活性切割寡核苷酸,从淬灭物分离荧光团,得到与样品中扩增产物的量成比例的荧光信号。适当设计的水解探针可用于与相似设计的额外探针组合以确定扩增的靶物内的序列变化,即基因型。

#### [0017] 分子信标

[0018] 分子信标是染料标记的寡核苷酸(25-40nt),其形成发夹结构。5'和3'端具有形成茎的5-6个核苷酸的互补序列,而环经设计以与靶序列的15-30个核苷酸区特异性杂交。荧光报告分子附接于分子信标的一端,且淬灭物附接于另一端。当所述探针未结合时,发生发夹形成,使报告基因和淬灭物接近并使荧光淬灭。

[0019] 如果靶序列在扩增反应的退火步骤过程中存在,分子信标的环部分与其靶序列结合,引起茎变性。报告基因和淬灭物因而分离,淬灭不减少,且报告荧光是可检测的。由于仅当探针与靶物结合时从其发射荧光,检测到的荧光的量与反应中的靶物的量成比例。再次,适当设计的分子信标可用于区分扩增序列内潜在的序列变异,即基因型。通常,这使用PCR后的熔解曲线分析(melting curve analysis)来完成。

#### [0020] 双杂交探针

[0021] 该测定法使用两个与靶物中的相邻序列结合的序列特异性寡核苷酸探针。所述探针用可参与荧光共振能量转移(FRET)的染料对标记。供体染料附接于第一探针的3'端,而受体染料附接于第二探针的5'端。该顺序可逆转,只要两种寡核苷酸与靶物的结合带来FRET范围(福斯特半径(Forster radius))内的荧光团。

[0022] 在实时PCR过程中,在对于供体染料特异性的波长实施激发,并在受体染料的发射波长监测反应。在退火步骤,探针与其靶序列以头至尾的排列杂交。这使得供体染料和受体染料接近,允许FRET发生。受体荧光的量与存在的PCR产物的量成比例。杂交探针使得多种遗传检测和量化读数得以进行。

#### [0023] 引物/探针组合

[0024] 这些检测物使用序列特异性寡核苷酸引物和序列特异性寡核苷酸探针。设计所述引物和探针以与靶物的邻近序列结合,通常探针与由引物形成的链互补。探针和引物用可参与(FRET)的染料对标记。一般地,供体染料附接于引物的3'端附近,而受体染料附接于探针的3'端,其与通过引物延伸合成的互补链退火。

[0025] 由于具有双杂交探针,在DNA扩增的过程中,在对于供体染料特异性的波长实施激发,并在受体染料的发射波长监测反应。在退火步骤,探针和引物与其靶序列以头至尾的排列杂交。这使供体染料和受体染料接近,允许FRET发生。受体荧光的增加量与存在的PCR产物的量成比例。

#### [0026] 动态通量扩增

[0027] 上述传统探针化学的一个不足是其与动态通量扩增("DFA")技术并不相容。这部分是由于与DFA相比PCR中使用的探针所需的熔解温度的差异。PCR利用一般为20-30个碱基对范围的探针且一般具有比感兴趣序列的 $T_m$ 低至少20°C的 $T_m$ 。与之相反,DFA需要感兴趣序列的 $T_m$ 的20°C或更少之内的探针。因为DFA通常在用于PCR的探针技术使用的退火温度范围之外操作,此类目前实践的探针一般与DFA技术不相容。

[0028] 因此,本领域存在开发与DFA相容的探针化学、试剂和方法学的需要。具体地,在本领域中存在开发可用于DFA方案的引物和探针的未被满足的需求。

[0029] 在一些方面中,术语“极端链式反应”或“XCR”将用于本说明书。本发明人采用术语XCR作为DFA的同义词。因此,所述两个术语可互换使用。

#### [0030] 多重检测

[0031] 对于以最小量检测单个反应中两种不同的扩增靶物的能力的需求是现代诊断检验的一个根本方面。尽管一些测试以包含必需的测试性能对照的不同反应容器出售,就样品通量和试剂使用方面,在单个反应容器中并入反应对照是合算的。DFA的有效利用理想上将涉及同时检测一种或多种扩增靶物的手段。

[0032] 因此,扩充探针技术用于PCR引物和DFA中常用的高 $T_m$ 且通常是更长的引物两者是有用的。

[0033] 拥有与DFA相容的探针技术以在单个反应容器中同时检测多于一种扩增的靶物也是有用的。

### 发明内容

[0034] 在一个实施方案中,本公开提供核酸系统,其包含:下游寡核苷酸,它具有与靶寡核苷酸的第一靶序列互补并具有可切割序列的序列;上游寡核苷酸,它具有与靶寡核苷酸的第二靶序列互补的序列,其中上游寡核苷酸的3'端包含初始核酸聚合酶结合位点,其中所述下游寡核苷酸和上游寡核苷酸与靶寡核苷酸退火,其中对于聚合酶配置下游寡核苷酸以在达到下游寡核苷酸5'端时切割单核苷酸或小寡核苷酸。

[0035] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸包含可切割序列,其由与初始核酸聚合酶结合位点结合的聚合酶通过聚合独立性切割而进行切割。

[0036] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸包含具有报告基因并具有报告基因下游的淬灭物的5'端。

[0037] 在一个实施方案中,所述上游寡核苷酸是引物。

[0038] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸不是引物。

[0039] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸是探针。

[0040] 在一个实施方案中,所述系统包含引物,其具有与靶寡核苷酸的序列互补的序列。

[0041] 在一个实施方案中,所述上游寡核苷酸和下游寡核苷酸与靶寡核苷酸杂交。

[0042] 在一个实施方案中,互补寡核苷酸与靶寡核苷酸互补并杂交,所述互补寡核苷酸具有与其杂交的反向引物。

[0043] 在一个实施方案中,当与上游寡核苷酸的初始核酸聚合酶结合位点结合时,所述下游寡核苷酸和上游寡核苷酸与靶寡核苷酸以对于核酸聚合酶足够接近的核苷酸距离与靶寡核苷酸退火以接触下游寡核苷酸的5'端。

[0044] 在一个实施方案中,对于下游寡核苷酸协作配置所述上游寡核苷酸和下游寡核苷酸探针以由与上游寡核苷酸的初始核酸聚合酶结合位点结合的聚合酶通过聚合独立性切割而切割。

[0045] 在一个实施方案中,当所述核酸聚合酶与上游寡核苷酸的初始核酸聚合酶结合位点结合时,所述下游寡核苷酸和上游寡核苷酸以对于核酸聚合酶足够远的核苷酸距离与靶寡核苷酸退火而不与下游寡核苷酸的5'端接触从而在上游寡核苷酸和下游寡核苷酸之间保持足够远的核苷酸距离。

[0046] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸的5'端通过聚合酶切割成单核苷酸或小寡核苷酸直至下游寡核苷酸足够小以从靶寡核苷酸解离。

[0047] 在一个实施方案中,对于下游寡核苷酸协作配置所述上游寡核苷酸和下游寡核苷酸以在聚合后由聚合酶通过聚合依赖性切割而切割。

[0048] 在一个实施方案中,所述上游寡核苷酸是引物且所述下游寡核苷酸是探针。

[0049] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸包含至少一个由核酸酶活性切割的标记。

[0050] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸包含上游标记和下游标记。

[0051] 在一个实施方案中,所述上游标记包含荧光染料或淬灭物,且下游标记包含荧光染料和淬灭物,从而当下游寡核苷酸在溶液中时,来自荧光染料的信号被淬灭物抑制。

[0052] 在一个实施方案中,所述上游标记包含荧光染料或淬灭物,且下游标记包含荧光染料和淬灭物,从而当上游寡核苷酸和下游寡核苷酸与靶寡核苷酸的结合发生时,聚合酶切割下游寡核苷酸的荧光标记或淬灭物,将其释放入溶液,从而染料不再受制于淬灭物并可发荧光。

[0053] 在一个实施方案中,上游标记包含荧光染料或淬灭物,且下游标记包含荧光染料或淬灭物的另一者,从而一种寡聚物具有染料且另一种具有淬灭物,从而当下游寡核苷酸在溶液中时,来自荧光染料的信号被淬灭物抑制。

[0054] 在一个实施方案中,上游寡核苷酸或下游寡核苷酸之一包含菲咯啉-RU II复合物(bathophenanthroline-RU II complex)作为标记。

[0055] 在一个实施方案中,上游寡核苷酸或下游寡核苷酸之一包含菲咯啉-RU II复合物作为标记,且上游寡核苷酸或下游寡核苷酸的另一者包含能量供体分子。

[0056] 在一个实施方案中,上游寡核苷酸或下游寡核苷酸之一包含菲咯啉-RU II复合物作为标记,且上游寡核苷酸或下游寡核苷酸的另一者包含2,4-二氧四氢蝶啶(lumazine)生色团作为能量供体分子。

[0057] 在一个实施方案中,上游寡核苷酸或下游寡核苷酸之一包含菲咯啉-RU II复合物作为标记,且上游寡核苷酸或下游寡核苷酸的另一者包含能量供体分子,其中标记之一从下游寡核苷酸切割,检测到发光的改变。

[0058] 在一个实施方案中,配置上游寡核苷酸(正向引物)和反向引物以具有接近靶寡核苷酸或扩增子T<sub>m</sub>的T<sub>m</sub>。

[0059] 在一个实施方案中,上游寡核苷酸(正向引物)和反向引物具有至少50个碱基对,或至少40个碱基对,或至少30个碱基对,或至少20个碱基对,或至少10个碱基对。在实施方案中,上游寡核苷酸引物具有5-10个碱基对,或10-20个碱基对,或20-30个碱基对,或30-40个碱基对,或40-50个碱基对,或50-60个碱基对,或60-100个碱基对,或100-200个碱基对,或10个或更多个碱基对,或20或更多个碱基对,或30或更多个碱基对,或40或更多个碱基对,或50或更多个碱基对。

[0060] 在一个实施方案中,所述下游寡核苷酸(探针)具有至少50个碱基对,或至少40个碱基对,或至少30个碱基对,或至少20个碱基对,或至少10个碱基对。在实施方案中,所述下游寡核苷酸探针具有5-10个碱基对,或10-20个碱基对,或20-30个碱基对,或30-40个碱基对,或40-50个碱基对,或50-60个碱基对,或60-100个碱基对,或100-200个碱基对,或10或更多个碱基对,或20或更多个碱基对,或30或更多个碱基对,或40或更多个碱基对,或50



或更多个碱基对。

[0061] 在一个实施方案中,靶寡核苷酸比传统的实时PCR靶序列更长。

[0062] 在一个实施方案中,教导了扩增靶核酸序列的方法,所述方法包括:提供所附权利要求之一的核酸系统;使具有靶序列的DNA变性;将上游寡核苷酸和下游核苷酸与靶寡核苷酸杂交;将引物与靶寡核苷酸的互补寡核苷酸杂交;经由使用聚合酶的聚合将上游寡核苷酸向下游寡核苷酸延伸;切割下游寡核苷酸的核苷酸或小寡核苷酸;和完成靶寡核苷酸的互补物和互补寡核苷酸的聚合。在一个实施方案中,切割是聚合独立性切割。在一个实施方案中,切割是聚合依赖性切割。

[0063] 在一个实施方案中,实施者确定靶寡核苷酸或靶序列是否在样品中存在。

[0064] 在一个实施方案中,提供了多重核酸系统,其包含:三链体形成寡核苷酸(TFO探针),其具有:经设计以与靶寡核苷酸的靶序列杂交的杂交多核苷酸序列,和与杂交的多核苷酸序列关联的三链体形成区(TFR)。

[0065] 在一个实施方案中,所述TFR包含配置用于三链体碱基配对的序列。

[0066] 在一个实施方案中,所述TFO引物与靶寡核苷酸和第三寡核苷酸形成三链体。

[0067] 在一个实施方案中,杂交多核苷酸序列配置为具有探针部分的探针核苷酸。

[0068] 在一个实施方案中,TFR在杂交多核苷酸序列的5'端。

[0069] 在一个实施方案中,TFR在杂交多核苷酸序列的5'端附近。

[0070] 在一个实施方案中,TFR在杂交多核苷酸序列的3'端。

[0071] 在一个实施方案中,TFR在杂交多核苷酸序列的3'端附近。

[0072] 在一个实施方案中,TFR在杂交多核苷酸序列的5'端和3'端之间的位置。

[0073] 在一个实施方案中,杂交多核苷酸序列配置为引物序列。

[0074] 在一个实施方案中,TRF包含选自下组的标记部分:荧光部分、放射性部分、彩色部分、荧光报告部分、荧光淬灭部分、一对荧光共振能量转移部分之一(例如供体部分或受体部分),及其组合。

[0075] 在一个实施方案中,杂交多核苷酸序列长度为50个碱基或更多。

[0076] 在一个实施方案中,杂交多核苷酸序列长度范围为约20至约100个碱基,或长度为约100至约200个碱基,或长度为约200至约500个碱基,或约500或更多个碱基。此外,杂交多核苷酸可包含任何归于上述的范围。例如,杂交多核苷酸序列长度范围可为约100至约150个碱基,或长度为约150至约300个碱基,或长度为约200至约250个碱基,或长度为约250至约500个碱基或更多。

[0077] 在一个实施方案中,所述TFO探针与靶寡核苷酸的TFR靶序列杂交。

[0078] 在一个实施方案中,所述TFO探针通过与靶寡核苷酸的靶序列杂交的杂交多核苷酸序列与靶寡核苷酸杂交,其中TFR不与靶寡核苷酸杂交。

[0079] 在一个实施方案中,所述TFO探针通过与延伸的第一引物的靶序列杂交的杂交多核苷酸序列、与第一引物杂交的TFO探针的延伸多聚化区与延伸的第一引物杂交,且其中所述TFR与延伸的第一引物的TRF互补部分杂交。

[0080] 在一个实施方案中,利用3'磷酸帽。然而,其他实施方案利用本领域已知的任何阻断物,例如C-3、C6、C18等。

[0081] 在一个实施方案中,利用与杂交多核苷酸序列连接的标记。

- [0082] 在一个实施方案中,使用抑制从3'端延伸的帽。
- [0083] 在一个实施方案中,使用3'或5'标记或供体染料。
- [0084] 在一个实施方案中,所述TFO探针是三链体形成荧光探针(TFFP)。
- [0085] 在一个实施方案中,具有第二TFR的双链核酸,其中所述TFO探针的TFR与第二TFR形成三链体,从而TFO探针与双链核酸形成三链体。
- [0086] 在一个实施方案中,具有第二TFR和具有受体染料的双链核酸,其中所述TFO探针的TFR与第二TFR形成三链体,从而TFO探针与双链核酸形成三链体,且其中所述TFO探针具有供体染料。
- [0087] 在一个实施方案中,具有第二TFR并具有受体染料的双链核酸,其中所述TFO探针的TFR与第二TFR形成三链体,从而TFO探针与双链核酸形成三链体,且其中所述TFO探针具有邻近3'帽的供体染料。
- [0088] 在一个实施方案中,具有第二TFR并具有第一标记的双链核酸,其中所述TFO探针的TFR与第二TFR形成三链体,从而TFO探针与双链核酸形成三链体,且其中所述TFO探针具有第二标记,其中当紧密结合时所述第一标记和第二标记提供可检测的发射。
- [0089] 在一个实施方案中,仅当反应温度处于或低于引物的退火温度时TFFP与扩增的DNA退火,且由此TFFP不参与聚合反应。然而,在一些实施方案中,TFFP可在聚合酶延伸超过TFR的任何时间与模板结合。
- [0090] 在一个实施方案中,TFFP与扩增的双链DNA结合,且光照在其上,TFFP共振物上的供体染料作为供体染料共振物,其将能量转移至位于所述双链DNA上的受体染料,引起受体染料以特定的波长发荧光,发射对应该波长的彩色光从而指示靶序列存在并已被扩增。
- [0091] 在一个实施方案中,TFFP与扩增的双链DNA结合,且光照在其上,扩增的双链DNA上的供体染料作为供体染料共振物,其将能量转移至位于TFFP上的受体染料,引起受体染料以特定的波长发荧光,发射对应该波长的彩色光从而指示靶序列存在并已被扩增。
- [0092] 在一个实施方案中,具有不同靶序列的多个TFR引物,所述TFR引物具有不同的标记。
- [0093] 在一个实施方案中,具有不同靶序列的多个TFR引物,所述TFR引物具有不同的第一标记,且TFO探针包含当与不同的第一标记结合时引起荧光的对应的标记。
- [0094] 在一个实施方案中,设计TFO探针以在大致同于或低于TFR引物的 $T_m$ 的温度退火。然而,在其他实施方案中,TFO探针可以在常规PCR过程中通常遇到的温度退火。
- [0095] 在一个实施方案中,靶序列包含天然存在的TFR序列。
- [0096] 在一个实施方案中,TFR包含天然存在的TFR序列,且其中配置TFO探针以与靶序列和靶寡核苷酸的TFR杂交。
- [0097] 公开的实施方案包含一种或多种与杂交的三链体DNA结合的非特异性DNA结合染料。
- [0098] 公开的实施方案包含一种或多种结合四链体的染料。
- [0099] 公开的实施方案包含含有荧光染料和淬灭物的TFO探针。
- [0100] 在一些实施方案中,TFO探针以发夹配置包含荧光染料和淬灭物。
- [0101] 在一些实施方案中,当靶DNA包含具有与TFR的序列的互补性的序列时TFR生成三链体形成DNA的链。

[0102] 在一些实施方案中,当靶DNA包含具有与TFR的序列的互补性的序列时TFO沿长度生成三链体形成DNA的链。

[0103] 在一些实施方案中,当靶DNA包含具有与TFR的序列的互补性的序列时TFO生成附加到靶DNA的三链体形成DNA的链。

[0104] 在一些实施方案中,靶DNA包含三链体形成区。

[0105] 在一些实施方案中,将TFR人工添加至多重核酸至用多重核酸的扩增方案的扩增产物。

[0106] 在一些实施方案中,TFR是杂交多核苷酸序列中天然存在的三链体形成区。

[0107] 本文还提供扩增靶核酸序列的方法,所述方法包括:提供权利要求之一的包含TFR引物的核酸系统;将TFR引物与靶寡核苷酸杂交,其中所述TFR引物包含具有一个或多个并入寡核苷酸的TFR的标签;通过用聚合酶聚合而延伸所述TFR引物;从所述靶寡核苷酸去杂交所述延伸的TFR引物;将引物与所述延伸的TFR引物杂交;延伸所述引物从而形成所述延伸的TFR引物的互补物。本文还提供通过下列步骤检测扩增的靶序列的方法:提供如上文所述的包含TFO探针的核酸系统;和确定所述TFO探针是否与扩增的核酸中的TFR区结合。在一些方面中,TFO探针包含标记以促进扩增的靶序列的检测。在一些方面中,检测在扩增后发生。

[0108] 本文还提供了套盒,其包含任何上述的寡核苷酸、引物、探针和反应剂。具有权利要求之一的两种或多种寡核苷酸的套盒。

[0109] 对于下文解释的如下说明书、权利要求和附图,将更好地理解本发明实施方案的这些和其他特征、方面和优势。

[0110] 附图简述

[0111] 图1是重叠引物退火温度和模板变性温度设计的图示。

[0112] 图2是对通过实时PCR的常规扩增产物的说明。

[0113] 图3是显示图2中使用的相同模板的高温PCR扩增的图。

[0114] 图4是显示使用不同起始材料浓度的相同模板材料的HTPCR扩增的图。

[0115] 图5是根据本公开的切割探针技术的一般实施方案。

[0116] 图6描绘在PCR扩增中使用的一般引物和探针组合。

[0117] 图7描绘可与DFA使用的引物和探针组合的一个实施方案。

[0118] 图8描绘在其中菲咯啉-RU II复合物用作标记分子的实施方案中切割探针技术。

[0119] 图9描绘双杂交探针和引物组合。

[0120] 图10描绘能够参与FRET的引物/探针组合。

[0121] 图11说明了正向(顶部)和反向(底部)引物,其沿引物长度具有隔开约6-9个核苷酸的染料(方块),但具有在3'端上保留无染料的足够的核苷酸。当引物与其互补物结合时,释放荧光淬灭且因此生成可检测的信号。

[0122] 图12说明了由正向和反向引物(底部)结合在一起形成的淬灭的正向引物二聚体复合物(顶部)、淬灭的反向引物二聚体复合物(中部)和引物二聚体复合物,其可经由FRET信号检测。方块代表染料。

[0123] 图13说明了正向引物模板形成信号(顶部)和反向引物模板形成信号(中部)和当正向和反向引物产生靶模板时生成的信号(底部)。方块代表染料。

[0124] 图14说明了具有两种染料标记的引物的正确产物将显示从具有相等反应形成效率的两种不同染料的荧光信号的形成,因为它们扩增产物的形成中将直接彼此连接且可在两个荧光通道中同时监测。正向引物信号在左侧且反向引物信号在右侧。

[0125] 图15说明了本公开设计策略的数据评估优势是,其中形成扩增产物且通过扩增产物生成两荧光信号。由于相似引物将淬灭,任何导致FRET的引物二聚体信号可从形成的信号扣除以使得扩增信号基线标准化。正向和反向引物信号形成S型曲线。将扣除的引物二聚体信号经由在图底部的线说明。

[0126] 图16说明了TFR引物参与靶序列扩增、沿长度生成三链体形成DNA的链并附加至靶序列。

[0127] 图17说明了具有带帽的TF0探针的3'端的三链体形成寡核苷酸探针。

[0128] 图18描绘包含三链体形成区的双链DNA序列。双链DNA序列具有报告基因染料。TF0的TFR附接于双链DNA的三链体形成区。

[0129] 图19说明了在通过共价附接于TF0探针上的特定位置限制的染料的情况下,当TF0探针结合时,TF0探针的末端仅能与杂交的DNA结构结合且因此,将TF0探针置于附接于感兴趣的扩增序列的染料附近。因此,荧光信号指示扩增已发生。

[0130] 图20描绘在该实施方案中,TF0探针利用发夹染料和淬灭物配置。

[0131] 图21说明了具有相同TFR序列的两种或多种引物可与包含与TFR序列互补的序列的TFR引物一起使用。

[0132] 图22描绘其中六种引物分成三组每组两个的实施方案。

[0133] 图23供体染料附接于第一引物的3'端附近,而受体染料接近第二引物的3'端附近。

[0134] 图24说明溶液中(左侧)和附接于核苷酸(右侧)的结合染料的通用结构。

[0135] 发明详述

[0136] 在说明书和随后的表中,使用了多个术语,以提供说明书和权利要求的清楚和一致的理解,包括给出的这些术语的范围,提供下列定义。

[0137] 定义

[0138] 术语“一种”或“一个”指一个或多个该实体;例如,“一种引物”指一种或多种引物或至少一种引物。如此,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文可互换使用。此外,通过不定冠词“一个”或“一种”提述的“一个元件”不排除多于一种该元素存在的可能性,除非上下文清楚要求存在一个且仅有一个所述元素。

[0139] 如本文使用的术语“微生物”指细菌、古菌(archaea)、真菌、原生动物、寄生虫和/或病毒。

[0140] 本文提及的“受试者”可为能够作为微生物寄主的任何生物体,包括但不限于实验动物(例如小鼠、大鼠、兔等)和人。在多个实施方案中,受试者是患有传染病的人患者。在其他实施方案中,受试者是生物体自身,如人患者。

[0141] 本文描述的“生物样品”可包括取自受试者的任何生物材料,包括但不限于咳痰(例如痰)、血液、血细胞(例如淋巴细胞)、组织、活检、培养的细胞、胸(膜)、腹(膜)或脑脊液、汗、粪便和尿。在一些实施方案中,在进行根据本文提供的方法测定前,处理来自受试者的生物样品,例如以培养感染性微生物和/或扩增其遗传材料。

[0142] 如本文使用的术语“药物”可指任何化合物、作用剂、治疗模态(modality)或其组合。在一些优选的方面中,药物是抗生素化合物。

[0143] 如本文使用的术语“靶核酸”指源自感染性微生物、人、哺乳动物或植物的核酸。在一些方面中,靶核酸是根据本文提供的方法测定的生物体或微生物的核酸。

[0144] 如本文使用的术语“参照核酸”指对应靶核酸的核酸(例如,代表基因组DNA的相同部分),其与靶核酸相差一个或多个序列变化。例如,在一些方面中,参照核酸具有野生型微生物的序列(例如,对于感兴趣药物的响应性)。在进一步的方面中,参照核酸具有野生型人细胞(如疾病细胞,包括例如人癌细胞)的序列。

[0145] 如本文使用的与核酸相关的术语“序列变化”指相对于对应核酸的序列核酸序列中的差异(例如,代表相同基因或基因组DNA的其他部分的序列)。在一些实施方案中,根据本文提供的多种方法检测的序列变化为“单核苷酸多态性”(“SNPS”),由靶核酸和参照核酸之间的单核苷酸的同一性的差异产生。在进一步的实施方案中,根据本文提供的多种方法检测的序列变化包括“多核苷酸多态性”。在一些实施方案中,参照核酸对应非耐药表型且耐药表型根据本文提供的方法通过鉴定参照核酸和来自用微生物或疾病细胞(如耐药癌细胞)感染的受试者的生物样品的靶核酸之间的序列变化来检测。

[0146] 如本文使用的术语“响应性”和“药物响应性”可指与药物的治疗效果相关的微生物或疾病细胞如癌细胞的抗性、敏感性、易感性、耐性和/或其他表型特性,包括非响应性。药物响应性可根据药物对靶向的微生物或疾病细胞如癌细胞的作用直接评估(例如,细菌死亡或细胞死亡),和/或根据药物对由微生物引起的传染病的一个或多个方面的作用(例如,预防、改善、减轻和/或消除疾病或疾病的一个或多个症状)间接评估。在一些优选的方面中,本文提供了用于检测对一种或多种药物的抗性的系统和方法,其中所述抗性指可遗传的(基因)抗性。

[0147] 术语“可变序列元件”指由邻近核苷酸串组成的核酸区(例如,DNA或RNA),其包含至少一个已知与感兴趣的表型特性相关的序列变化,如抗性、敏感性和/或药物反应性的其他方面或特定疾病如癌症或心脏病的倾向性,或更多普通的表型特征如眼睛的颜色或毛发的颜色。例如,与药物抗性相关的序列变化会经常在核酸区中发生,所述核酸编码作为药物反应性的结构和/或功能决定簇的相应蛋白的位点,如药物结合位点。包括已知变化的可变序列元件(和周边核苷酸)将可能编码蛋白的结构和/或功能相关部分(例如,包含药物结合位点的袋(pocket)、折叠(fold)或其他结构),且可变序列元件内的其他未表征的变化将可能和与已知变化相同的表型相关。

[0148] 术语“核酸”和“寡核苷酸”指待检测的引物、探针和低聚物片段,且对多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、对多核苷酸(含有D-核糖)且对包含嘌呤或嘧啶碱基或修饰的嘌呤和嘧啶碱基的N糖苷的任何其他类型的多核苷酸通用。术语“核酸”和“寡核苷酸”之间在长度上没有有意的区分,且这些术语可互换使用。这些术语仅指分子的初级结构。因此,这些术语包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。

[0149] 寡核苷酸无需物理上源自任何已有或天然的序列,但可以任何方式生成,包括化学合成、DNA复制、逆转录或其组合。术语“寡核苷酸”意指基因组DNA或RNA、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸,它凭借其来源或操作:(1)不与与其天然结合的多核苷酸的全部或部分结合;和/或(2)连接于除与其天然连接者之外的多核苷酸;和(3)并非天然存在。

[0150] 术语“引物”可指多于一种引物并指寡核苷酸,无论天然存在与否,如在纯化的限制消化物中,或合成产生,当置于与核酸链互补的引物延伸产物的合成被催化的条件下,其能够作为沿互补链的起始合成的点。所述条件包括在适当的温度存在五个不同的脱氧核糖核苷三磷酸和聚合诱导剂如DNA聚合酶或逆转录酶。为了扩增中的最大效率,引物优选是单链。

[0151] 如本文使用的核酸序列的互补物指寡核苷酸,其当与核酸序列比对时从而一条序列的5'端与另一条的3'端配对,即以“反向平行结合”。一些在天然核酸中不常见的碱基可包括在本公开的核酸内,且包括例如,肌苷和7-deasaguanine(7-去氮杂鸟嘌呤)。互补性无需完美;稳定的双链体可包含错配的碱基对或不匹配的碱基。核酸技术领域的技术人员考虑到一些变量包括例如寡核苷酸的长度、碱基组成和寡核苷酸序列、离子强度和错配碱基对的发生率可凭经验确定双链体的稳定性。

[0152] 如本文使用的术语“等位基因”是涉及一种性状或特性的基因的一种或多种可替换形式的任何。在二倍体细胞或生物体中,给定基因的两个等位基因占据一对同源染色体上相应的基因座。

[0153] 如本文使用的术语“氨基酸序列”包含分离自植物、对于植物为天然的或天然存在于植物的寡肽、肽、多肽或蛋白及其部分,或为合成制备但包含内源性对应物的核酸序列。

[0154] 如本文使用的术语“效率”指实时PCR测定法的特征。理想的qPCR(定量PCR)反应具有100%的效率,具有-3.32的斜率,这与每循环过程中PCR产物的完美倍增相关联。然而,-3.1至-3.6之间的斜率伴随90-110%的效率一般认为是可接受的(Commission, C.A. (2009). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories(ENGL), (2008年10月), 1-8)。效率通过重复的标准曲线建立。扩增效率由标准曲线的log-线性部分的斜率确定且计算为 $E = (10^{(-1/\text{斜率})} - 1) * 100$ 。(Bustin, S.A.等(2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, 55(4), 1-12. doi:10.1373/clinchem.2008.112797)。

[0155] 如本文使用的术语“线性”指优化的实时PCR测定法的特征且由通过线性回归分析获得的R<sup>2</sup>值确定,其应为 $\geq 0.98$ (Bustin等, 2009)。

[0156] 对于本文基本上任何复数和/或单数术语的使用,本领域的技术人员可从复数转换成单数和/或从单数转换成复数,如对于上下文和/或应用适当的。为清楚起见,多个单数/复数排列组合可明确地在本文列出。

[0157] 术语“靶区”、“靶序列”和“靶核酸序列”指待检测、量化或基因分型的核酸区。

[0158] 术语“探针”指寡核苷酸,通常为标记的,其由于互补碱基配对与靶核酸的序列形成双链体结构。探针将包含“杂交区”,优选由30个或更多个核苷酸组成,且在一些实例中,由50个或更多个核苷酸组成,对应靶序列的区。理想地,探针的T<sub>m</sub>将在感兴趣序列的T<sub>m</sub>的30℃或更低之内。“相应的”意为与所指的核酸相同或互补。探针优选不包含与用于引发PCR的序列互补的序列。一般地,探针的3'端将被“阻断”以禁止探针并入引物延伸产物。“阻断”可通过使用非互补碱基或通过添加化学部分如生物素、磷酸基团或荧光团至碱基核苷酸的3'羟基而实现,取决于所选择的部分,其可通过还作为用于后续检测或捕获附接于标记的核酸的标记达到双重目的。阻断还可通过去除3'-OH或通过使用缺少3'-OH的核苷酸如双脱氧

核苷酸而实现。

[0159] 如本文使用的“标记”指可用于提供可检测(优选可量化)的信号且其可附接于核酸或蛋白的任何原子或分子。标记可提供通过荧光、磷光、化学发光、电化学、放射性、比色法、重量分析、X射线衍射或吸收、磁性、酶活性等可检测的信号。

[0160] 如本文定义,“5'---->3'核酸酶活性”或“5'至3'核酸酶活性”指模板特异性核酸聚合酶的活性,其包含传统上与一些DNA聚合酶相关的5'至3'外切核酸活性,由此从而核苷酸从寡核苷酸的5'端以顺序的方式去除(即大肠杆菌DNA聚合酶I具有此活性,而Klenow片段不具有),或5'至3'内切核酸酶活性,其中多于一个磷酸二酯键(核苷酸)从5'端或两端发生切割。

[0161] 如本文使用的术语“相邻/邻近”指相对于模板核酸的其互补链上探针的引物位置,其中所述核苷酸可直接彼此邻接。可替换地,用于聚合依赖的方法中,当本方法用于如本文教导的PCR和DFA和检测方法中时,“相邻/邻近”可为待扩增序列内的任何处,引物下游的任何处,从而引物延伸将定位聚合酶使得探针的切割发生。

[0162] “单重(singleplex)反应”意为其中对于单个反应容器中仅测试一种产物的反应。

[0163] “双重反应”意为其中对于单个反应容器中测试两种产物的反应。

[0164] “多重(multiplex)反应”意为其中对于单个反应容器中测试多于两组产物的反应。

[0165] 术语“序列特异性寡核苷酸”和“SSO”指寡核苷酸探针,其中杂交区与待检测的序列精确互补。这称为“严格杂交”。严格杂交条件(在该条件下探针将仅与精确互补的靶序列杂交)的使用允许特异性靶序列的检测。严格杂交条件为本领域已知(参见例如,Sambrook等1985,Molecular Cloning-A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor,N.Y.,通过提述并入本文)。严格条件是序列依赖的且在不同的环境中会有所不同。

[0166]  $T_m$ 是温度(例如,在限定的离子强度和pH的温度),在该温度50%的寡核苷酸解离。放松杂交条件的严格性会使得序列错配被容忍;容忍的错配程度可通过合适调整杂交条件来控制。

[0167] 术语“亚序列”在本文指包含于另一序列内的核苷酸序列。

[0168] 如本文使用的术语“标记”指任何原子或分子,其可附接于核酸且其可用于提供可检测的信号或与第二标记相互作用以修饰由第二标记提供的可检测的信号。标记可以是光发射化合物,其生成提供荧光、化学发光、磷光或生物发光可检测的信号。在可替换的方案中,标记可提供通过放射性、电化学、比色法、或通过光的吸收、产生荧光可检测的信号,或可用于将产物固定于阵列。

[0169] 术语“荧光团”指能够发荧光的化合物,即在一个频率吸收光并在另一个通常更低的频率发射光。

[0170] 术语“生物发光”指化学发光的形式,其中光发射化合物是存在于活生物体中的。生物发光化合物的实例包括细菌荧光素酶和萤火虫荧光素酶。

[0171] 术语“淬灭”指由第二化合物引起的第一化合物荧光的减少,而无论机制为何。淬灭通常需要化合物紧密接近。如本文使用的,化合物或化合物的荧光被淬灭,其理解为两种用途指相同的现象。

[0172] 术语“嵌入剂”指能够在核酸双螺旋中堆叠的碱基对之间非共价插入的作用剂或

部分。

[0173] 如本文应用至多步骤工艺的术语“均质的”指用于实施所述工艺步骤的方法,其中将步骤之间用于样品处理和操作的需要最小化或去除。例如,“均质的”扩增/检测测定法指偶联的扩增和检测测定法,其中将扩增和检测之间的样品处理和操作的需求最小化或去除。

[0174] 术语“反应混合物”指包含实施反应所需试剂的溶液。“扩增反应混合物”(其指含有实施扩增反应所需试剂的溶液)通常含有在适当缓冲剂中的寡核苷酸引物和DNA聚合酶。用于特定反应的反应混合物为文献中已知的。

[0175] 本领域的技术人员可以理解的是,一般地,本文和特别是所附权利要求书(例如,所附权利要求书的主体)中使用的术语一般意为“开放性”术语(例如,术语“包含”应理解为“包含但不限于”,术语“具有”应理解为“至少具有”,术语“包括”应理解为“包括但不限于”)。本领域的技术人员可进一步理解的是,如果引入的权利要求记载的特定数字是意欲的,则该意图将在权利要求中明确地记载,且这些记载不存在时,该意图并不存在。例如,为帮助理解,下述所附权利要求可包含引入性短语“至少一种”和“一种或多种”的使用以引入权利要求记载。然而这些术语的使用不应理解为暗示通过不定冠词“一种”或“一个”的权利要求记载的引入将包含这种引入的权利要求记载的任何特定权利要求限制为仅包含一个所述记载的实施方案,甚至当相同的权利要求包含引入性短语“一个或多个”或“至少一个”和不动冠词如“一种”或“一个”(例如,“一种”和/或“一个”应理解为意指“至少一个”或“一个或多个”)时;这同样适用于用于引入权利要求记载的定冠词的使用。此外,即使清楚地记载了引入的权利要求记载的特定数字,本领域的技术人员将认识到这些记载应理解为意指至少为记载的数字(例如,仅记载“两个记载”而无其他修饰,意指至少两个记载或两个或更多个记载)。

[0176] 此外,在使用类似于“A、B和C等至少之一”的惯用语的那些情况中,一般而言这样的理解意欲为本领域的技术人员会理解的该惯用语的意义(例如,“具有A、B和C至少之一的系统”会包括但不限于仅具有A、仅具有B、仅具有C、具有A和B一起、A和C一起、B和C一起和/或A、B和C一起等的系统)。在使用类似于“A、B或C等至少之一”的惯用语的那些情况中,一般而言这样的理解意欲为本领域的技术人员会理解的该惯用语的意义(例如,“具有A、B或C至少之一的系统”会包括但不限于仅具有A、仅具有B、仅具有C、具有A和B一起、A和C一起、B和C一起和/或A、B和C一起等的系统)。本领域的技术人员会进一步理解的是提供两个或更多个可替换术语的实质上任何反义词和/或短语,无论在说明书、权利要求或附图中,都应理解为涵盖包括术语之一、任一术语或两个术语的可能性。例如,短语“A或B”会理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0177] 此外,当本文的特征和方面以马库什组的术语描述时,本领域的技术人员会认识到,该公开由此还就马库什组任何单独的成员和成员的亚组进行了描述。

[0178] 如本领域的技术人员所理解的,出于任何或全部目的,如就提供书面说明而言,本文公开的全部范围还涵盖任何和全部可能的亚范围和其亚范围的组合。任何列举的范围可容易地识别为充分描述并能够将相同的范围分解为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围将很容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域的技术人员还会理解的是,全部语言如“多



至”、“至少”等包括记载的数字并指可随后分解为如上文讨论的亚范围的范围。最后,如本领域的技术人员会理解的是,范围包括每个单独的数字。因此,例如,具有1-3个细胞的组指具有1、2或3个细胞的组。相似地,具有1-5个细胞的组指具有1、2、3、4或5个细胞的组等等。

#### [0179] 动态通量扩增

[0180] 一般地,本公开涉及核酸以及用于将其与DNA扩增的方法联合使用的装置、系统和使用上述的方法,下文称为“动态通量扩增”或“DFA”。

[0181] 一般地,DFA指DNA和RNA扩增的特定技术。DFA利用DNA扩增可在相当窄的温度范围发生的事实。一旦确定了感兴趣序列的 $T_m$ ,可将DNA样品加热至该温度或该温度以上1-5°C。这限定了加热和冷却循环的上限参数。引物或探针的 $T_m$ (无论哪一种具有较低的 $T_m$ )限定了加热和冷却循环的下限参数,在1-5°C内。

[0182] 在实践DFA中,一般优选使用具有尽可能接近感兴趣序列 $T_m$ 的 $T_m$ 的引物,从而该温度可在窄范围内循环。该窄循环的结果是包含感兴趣的序列的互补核酸间双链体的动态开放和关闭,与整个DNA链完全或接近完全的变性相反。

[0183] 当前存在的引物(例如,测试的引物)靶向包含较少非特异性产物的核酸产物。因此,扩增的靶核酸产物可对于如本文所述的定量PCR和基因分型靶向检测应用整体上更加特异且敏感。

[0184] 寡核苷酸引物的“合理设计”可包括经由具有合意的熔解温度的引物的计算、实验或估算(computation)而进行的选择( $T_m$ )。合理设计可包括选择具有适当的GC的特定引物序列以获得合意的 $T_m$ 。此外,合理设计可包括对引物的修饰,其包括核苷酸间修饰、碱基修饰和核苷酸修饰。

#### [0185] DFA引物设计方法学

[0186] 在一些实施方案中,提供了用于选择DFA的引物的方法,其将感兴趣的可变序列元件置于靶核酸侧翼。

[0187] 在一些实施方案中,选择引物以具有靶核酸的 $T_m$ (引物:靶物 $T_m$ )。用于靶核酸的所述扩增的特定的窄温度范围依赖于靶核酸的熔解概貌,并由此靶核酸的序列被扩增。如此,当与靶核酸杂交时,窄温度范围可用作靶物温度范围以鉴定和/或生成具有足够高的 $T_m$ 值的特异性引物。

#### [0188] DFA引物设计-重叠退火/变性曲线

[0189] 因此,引物的 $T_m$ 值可在靶核酸的退火和/或变性温度范围内重叠(参见图1)。图1可与图2相比以说明具有在靶核酸 $T_m$ 范围内的 $T_m$ 的引物设计。图2显示用引物和靶核酸的常规扩增缺乏温度重叠(如图1所示),且在扩增的过程中对应于变性、退火和延伸循环需要极大的温度变化以产生扩增产物。这种极大的温度范围允许不合意的产物形成。

#### [0190] DFA引物设计-迭代设计

[0191] 在一些实施方案中,提供了迭代设计方法以为待扩增和/或检测的特定的靶核酸选择和/或优化引物。有利的是,迭代方法使得特定的靶核酸能够通过使用热条件的窄范围形成,其中靶核酸和与靶核酸杂交的寡核苷酸引物都在退火和变性的动态通量中。这种退火和变性的动态通量可导致靶核酸的特异性扩增,而非特异性扩增产物的形成相应地减少。这种用于选择和/或优化引物的迭代方法的意义在于提供了使用低花费染料(如具有荧光标记的那些)替代更昂贵的定制寡核苷酸探针,其可允许定量PCR或高解析变性用于分析

靶核酸的序列。此外,迭代方法可提供在精致的热控仪器不存在时发挥功能的引物用于扩增产物的形成。

[0192] 即,引物可在窄温度范围操作以扩增靶核酸,允许将核酸扩增用于更宽范围的用途。本领域已描述了用于计算已知序列的DNA的理论 $T_m$ 的多种方法,包括例如由Rychlik和Rhoads,*Nucleic acids Res.*17:8543-8551(1989);Sambrook,J等,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);和Breslauer等,*Proc Natl Acad.Sci.*83:3746-3750(1986)所述的方法。

[0193] 这种迭代方法可包括将初始靶核酸序列鉴定为靶扩增子,其中所述靶核酸序列可与特定的生物活性(如可能的抗药性)相关。然后扩增靶核酸序列以产生扩增的产物,且扩增产物(例如,扩增子)的 $T_m$ 值使用常规熔解曲线分析确定。然后利用熔解曲线分析以确定或计算用于扩增靶核酸的引物或引物组。

[0194] 然后用在通过扩增产物的熔解生成的熔解峰范围内的引物 $T_m$ 值设计经确定或计算的引物。然后制备或合成引物以具有经设计的引物 $T_m$ 值。

[0195] DFA引物设计-寡核苷酸化学修饰

[0196] 在一些实施方案中,可通过化学修饰寡核苷酸配置引物以具有在靶核酸 $T_m$ 的窄范围内的 $T_m$ 。可使用已知的寡核苷酸合成化学以增加引物的 $T_m$ 值因而它们对应于靶核酸的 $T_m$ 的温度范围。这类化学可使用修饰的碱基(例如,超级G、A、T、C)、LNA或PNA,或其他这样的寡核苷酸稳定化学。此外,可开发能够用于该应用的额外的寡核苷酸杂交稳定化学。

[0197] 例如,已将用常规磷酸二酯键化学和LNA化学两者合成的引物用于提供接近靶核酸序列的 $T_m$ 值的引物 $T_m$ 值。然而,可能的是一些靶核酸可具有低于引物的 $T_m$ 值,且杂交稳定化学可需要被包括以减少引物 $T_m$ 值,从而引物 $T_m$ 值在靶核酸序列的 $T_m$ 值的范围内。

[0198] DFA引物设计-熔解曲线分析

[0199] 在一些实施方案中,提供了用于精制引物设计以使靶核酸序列的特异性扩增的温度范围最小化的方法。如此,用标准反应热循环条件扩增靶核酸以确保靶核酸序列得以扩增。使用具有双链DNA结合染料如SYBR、LCGreen、LCGreen+、Eva染料等的实时PCR监测扩增。

[0200] 对扩增的靶核酸进行熔解曲线分析以确定靶核酸序列的真实 $T_m$ 值。可表示为 $-dF/dT$ 的熔解峰从熔解扩增的靶核酸生成,且可在跨越限定的温度范围具有与分布曲线相似的范围。在低温端,扩增的靶核酸模板部分变性。在最高温扩增的靶核酸的全部样品变性。在扩增步骤过程中变性靶核酸所需的温度在该温度分布内。

[0201] 最初,推荐最高温以确保更完全的变性。随后,在对引物进行任何迭代改变前,可将分布曲线的最低温用作用于扩增的设计的引物组的初始 $T_m$ 。

[0202] 初始引物可使用的窄温度范围的确认可在曾经(ever)增加退火温度的系列实验或平行实验中实施。

[0203] 可替换地,可将单独的引物添加至扩增的模板并可在组合的引物和模板熔解曲线上实施额外的熔解曲线分析。

[0204] 在任何事件中,可配置引物的 $T_m$ 以与包含靶核酸序列的 $T_m$ 的窄温度范围重叠。来自这些实验的最高退火温度(其中靶核酸序列特异性且有效扩增)可被认为是限定用于已有引物(例如,测试的引物)的最佳退火温度的温度。然后可使用额外的杂交稳定化学重新合成这些相同的引物或略微修饰的引物。对引物修饰以在预期方向改变 $T_m$ ,从而引物 $T_m$ 与

包含靶核酸序列的 $T_m$ 的窄温度范围重叠。这可使用在线设计工具,如可从Integrated DNA Technologies获得的LNA设计工具完成。这种设计工具可用于估计提高引物的 $T_m$ 以与靶核酸序列的熔解曲线更好重叠所需的必需LNA修饰的数目。

[0205] 在引物 $T_m$ 值大于靶核酸序列的最高熔解温度的情况中,可为必需的是重新设计引物以具有较低的 $T_m$ 。可替换地,可减少二价和/或单价阳离子盐或其他用于扩增方案(例如,PCR)的去稳定剂(例如,AgCl、DMSO等)的量以使这些寡核苷酸与模板的杂交去稳定。在任何事件中,引物 $T_m$ 的减少在一些情况中可为需要的。

[0206] DFA引物设计-GC含量修饰

[0207] 在一些实施方案中,引物 $T_m$ 可通过改变引物序列的GC含量修饰。通过改变GC含量,可选择性地改变引物 $T_m$ 。通常,增加GC含量可增加 $T_m$ ,且减少GC含量可减少 $T_m$ 。然而,存在会过度增加 $T_m$ 的高GC含量是合意的情况。在这些情况中,可使用去稳定剂以使得高GC含量引物包括在其中或用于高GC含量靶核酸序列的使用。去稳定剂可选择性地减少扩增步骤的温度。去稳定剂的实例包括DMSO、AgCl和其他。

[0208] DFA热循环范围

[0209] 在一些实施方案中,可制备引物从而可在热循环过程中以最小的温度差异实施靶核酸扩增或富集方案。这允许热循环在窄温度范围内完成从而促进特异性产物的形成。

[0210] 热循环的一个范围可在靶核酸约 $T_m$ 的 $15^\circ\text{C}$ 内,或靶核酸 $T_m$ 的 $10^\circ\text{C}$ 内,或靶核酸 $T_m$ 的 $5^\circ\text{C}$ 内,或靶核酸 $T_m$ 的 $2.5^\circ\text{C}$ 内,或靶核酸 $T_m$ 的 $1^\circ\text{C}$ 内,或甚至与靶核酸的 $T_m$ 基本上相同的 $T_m$ 。

[0211] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $1^\circ\text{C}$ - $15^\circ\text{C}$ 。

[0212] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $1^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ 。

[0213] 或者,在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $1^\circ\text{C}$ - $5^\circ\text{C}$ 。

[0214] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $5^\circ\text{C}$ - $15^\circ\text{C}$ 。

[0215] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $5^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ 。

[0216] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $5^\circ\text{C}$ 。

[0217] 在一些实施方案中,用于靶核酸扩增的热循环条件跨度范围是靶核酸序列的 $T_m$ 峰 $\pm$ 约 $2.5^\circ\text{C}$ 。

[0218] 该窄温度范围使其能够扩增特异性靶核酸而无对应PCR扩增正常阶段(变性、退火和延伸)的温度之间的热循环。

[0219] 此外,其使得在可设置在所选温度或可在窄温度范围变化的商业的温度控制仪器(如烤箱、加热块等)中实施扩增和富集成为可能。

[0220] 图3说明了使用如图2所示的相同靶核酸序列的窄温度范围PCR扩增的图,其显示了更多特异性产物形成且形成较少不合意的产物。

[0221] 在一些实施方案中,可在窄温度范围选择热循环的温度以基本上限制扩增靶核酸序列的扩增。如此,可修饰热循环条件以通过修饰退火温度至与扩增子的熔解峰的较低温度基础(lower temperature base)基本上相同来扩增靶核酸序列。而且,可修饰热循环条件以通过修饰退火温度至与扩增子的熔解峰的较高温度基础基本上相同来扩增靶核酸序列。

[0222] 在一些实施方案中,可选择引物 $T_m$ 从而靶核酸的扩增可在范围在约75°C至约90°C之间的温度实施。该温度范围或其中缩窄5°C-10°C范围可用于扩增DNA和/或RNA靶核酸序列以在扩增(例如,PCR)方法过程中减少非特异性产物的形成。

[0223] 在一些实施方案中,可选择引物 $T_m$ 从而扩增在等温扩增条件在靶核酸序列的 $T_m$ 范围实施以确保适当的产物形成。

[0224] 在一些实施方案中,本公开包括设计具有靶核酸的 $T_m$ 的引物组的方法,所述 $T_m$ 在靶核酸序列的 $T_m$ 的窄范围内。如此,可设计引物组从而引物 $T_m$ 与靶核酸序列的 $T_m$ 的分布曲线重叠。例如,可将引物组用于实时PCR测定法从而引物 $T_m$ 与靶核酸序列的 $T_m$ 的分布曲线重叠,从而窄温度范围可用于扩增靶核酸序列。

[0225] DFA pH修饰

[0226] 在一些实施方案中,可修饰用于扩增靶核酸序列的方案的条件至适当的pH以增加选择性扩增靶核酸相对于其他核酸的特异性。如此,适当pH的使用可增加选择性扩增靶核酸序列的能力。这可包括扩增缓冲剂的使用,其可使得化学失活热稳定DNA聚合酶的活化。此外,用选择的扩增缓冲剂调整pH可允许在减少的温度实施扩增方案,如本文已记载的那些温度范围。

[0227] 在一些实施方案中,可调整扩增缓冲剂的pH从而允许化学上失活的酶转化为活化状态。如此,酶可在略微酸性的条件中活化;然而,碱性pH值也可用于一些酶。对于酸活化的酶,标准的基于Tris的PCR缓冲剂可具有显著的温度依赖性(例如,每°C减少0.028pH单位)。酶(例如,化学上失活的热稳定DNA聚合酶)从失活状态的完全活化可需要pH小于约7,更优选小于约6.75,且最优选小于6.5。

[0228] 在一些实施方案中,扩增方案包括使用较低pH缓冲剂,从而扩增可在较低的活化温度实施。例如,95°C以下的每10°C,酶活化温度可被降低0.3pH单位。然而,对此方法的限制完全是用于实时检测扩增的模板的染料化学的功能(例如,在pH7.3以下基于荧光素的检测具有显著减少的荧光)。

[0229] 扩增子大小的DFA调节

[0230] 在一些实施方案中,可调节引物和/或扩增条件的设计从而调节被扩增的靶核酸序列的大小。这可包括调节引物和/或扩增条件的设计从而扩增子的大小显著大于仅有的组合的引物的大小。这可包括比引物长1-3个核苷酸,或为引物的2倍长或为引物的5倍长且更优选为引物的10倍长的扩增子。

[0231] DFA阵列

[0232] 在一些实施方案中,可用不同浓度的起始材料在扩增步骤的阵列中采用如本文所述设计的引物。即,可将起始材料以不同的浓度分入阵列,且可将引物用于如本文所述的窄温度扩增方案。

[0233] 使用具有不同浓度的起始材料的阵列的窄温度扩增方案和引物可用于定量起始

材料中靶核酸的量。

[0234] 图4是显示具有不同浓度的起始材料的阵列的方案和引物从而可定量靶材料的量的图。

[0235] 靶核酸扩增富集

[0236] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括扩增或富集靶核酸的步骤。所述方法可包括与全基因组扩增和全转录组扩增的已知方法基本上相似的步骤。

[0237] 这可包括用基因组文库生成步骤扩增基因组,其后可为文库扩增步骤。而且,文库生成步骤可利用具有DNA聚合酶或逆转录酶的本文所述的特异性引物或特异性引物的混合物。可用所述引物设计特异性引物的混合物从而消除混合物内自身杂交和/或与其他引物杂交的能力,但允许引物有效且频繁地引发靶核酸序列,其中所述引物可如本文所述设计。

[0238] 在一些实施方案中,提供了用于同时确定物种的个体成员相对于物种的整个标准基因组的基因表达概貌的方法。所述方法可包括将基因组材料的液体样品分布入底物反应室的阵列中。阵列可包含引物组和沿整个标准基因组对于每个靶核酸序列的探针。液体样品可基本上包含成员的全部遗传材料。每个反应室可包含引物组和用于至少一个靶核酸序列的探针和聚合酶。所述方法可进一步包括在阵列中扩增液体样品,检测由至少一个探针发射的信号并响应于所述信号鉴定基因表达概貌。

[0239] 由于从痰样品中分离适当量的微生物如MTb可为显著的挑战,可使用本文所述的基因组扩增技术取代传统的培养和纯化方案。尽管许多分子诊断技术使得能够检测非常少量的起始遗传材料(例如,低至单拷贝靶核酸序列),但确保特定样品实际上包含靶核酸序列的合意的单拷贝常常是困难的。

[0240] 为使非常稀有或珍贵的样品能够在分子诊断步骤中被准确地测试,已采用称为全基因组扩增的技术以富集起始材料用于下游分子诊断方法。此处描述的方法将全基因组扩增方法应用于常常含有如此少量的活生物体的痰样品的MTb筛选问题。以别的方式,标准方法可使用必须生长多至2个月的MTb的分离物以确保足够量的遗传材料可从样品获得从而用于分子诊断应用。

[0241] 使用开发用于稀有和珍贵的DNA和/或RNA样品的体外富集的全基因组扩增技术,已开发了新型遗传材料富集方法以富集包含微生物DNA(如MTb DNA)的样品。该技术使得之前已使用的常规培养方法得以规避以增加微生物的浓度,其常常是下游分子诊断所需的。这种全基因组扩增技术使用来自直接裂解的微生物样品的少量基因组DNA。包含使用Petroff方法分离的活微生物的样品可通过商业可获得的产品直接裂解,且所得的少量微生物DNA可进行全基因组扩增技术以提供用于下游分子诊断应用的扩增子。

[0242] 尽管关于MTb描述了采用全基因组扩增技术的方法,可理解的是该技术可应用至任何微生物。使用常规的活生物体制备方法Petroff方法,将分离的MTb从痰样品分级,保留少量的生物体于水的悬液中。按照分枝杆菌(*mycobacterium*)裂解溶液MycoBuffer(RAOGene;Milford,Pa.)的制造商的方案,将在残留材料中少量的MTb DNA从MycoBuffer产物分离。

[0243] 使用该直接裂解的DNA样品并将其与在全基因组扩增方法中使用的那些相似的反应成分组合,使得已称为互补核酸“呼吸”或“通量”的核苷酸的动态开放和关闭成为可能。由于仅这些通量中的区可通过引物或探针询问(interrogate),该通量使得仅通过特异性

引物和探针接近和结合成为可能。这又使其如此发生,从而扩增是完全特异性的且随后基本上消除非特异性产物(NSP)的形成。

[0244] DFA技术已针对多种DNA模板进行了验证,且已确定DFA在30-66%G+C含量模板的宽范围起作用,其中DFA技术以与PCR可比的敏感性实施而不形成非特异性产物(NSP)。DFA已适应下列检测技术:实时PCR(dsDNA结合染料)、凝胶电泳、化学发光、比色和ELISA。

[0245] DFA探针和引物

[0246] DFA探针和引物的区别特征是具有接近靶序列的 $T_m$ 的熔解温度( $T_m$ )。为满足该开放参数,引物和探针一般必须具有比用于PCR扩增中的那些更高的 $T_m$ 。作为结果,用于PCR的通用探针设计一般不能以DFA起作用,特别是如果实时读数是合意的。因此,下列说明书描述了引物和探针设计以及可与DFA使用的探针和引物组合。

[0247] 在一个或多个实施方案中,描述的技术涉及已有探针和引物技术的修饰以与DFA发挥功能。

[0248] 在其他实施方案中,描述的技术使DFA操作所需探针和引物的数目最小化。可配置寡核苷酸并用于限制反应过程中存在的不同寡核苷酸的数目。

[0249] 多种特异性探针设计和探针标记组合在文献中讨论且为本领域的普通技术人员所知。这些包括但不限于下列专利中所列的技术:U.S.5,491,063;U.S.5,538,848;U.S.5,571,673;U.S.5,573,906和5,804,375,其每一篇通过具体提述以其整体并入。

[0250] i.DFA切割探针技术-考虑

[0251] 由于例示的原因,本公开的一个实施方案基于切割探针技术(cleaved probe technology),一般性地在图5中说明并如下所列。切割探针技术指可用于将未切割的标记的寡核苷酸与其切割片段相区分的几种策略中的任何。以这种方式,切割探针技术允许鉴定包含与上游和下游寡核苷酸互补的序列的那些核酸样品。

[0252] 本DFA切割探针技术实施方案是已有的切割探针技术的修饰。出于背景目的,切割探针技术描述如下。切割探针技术基于5'至3'核酸酶活性,由此核酸聚合酶可从与其靶寡核苷酸退火的寡核苷酸(例如,下游寡核苷酸)切割单核苷酸或小寡核苷酸。为了切割的有效发生,上游寡核苷酸还必须与相同的靶寡核苷酸退火。

[0253] 该上游寡核苷酸的3'端提供了用于核酸聚合酶的初始结合位点。一旦结合的聚合酶与下游寡核苷酸的5'端相遇,聚合酶可从其切割单核苷酸或小寡核苷酸。

[0254] 可设计两种寡核苷酸从而其与互补的靶核酸紧密接近时退火,从而核酸聚合酶与上游寡核苷酸的3'端的结合在称为“聚合独立性切割”的过程中自动将其与下游寡核苷酸的5'端接触。

[0255] 可替换地,如果所述两寡核苷酸与模板核酸靶物的更远间隔区退火,聚合必须在核酸聚合酶与下游寡核苷酸的5'端相遇前发生。随聚合持续,聚合酶逐步从下游寡核苷酸的5'端切割单核苷酸或小寡核苷酸。该切割持续直至下游寡核苷酸的剩余已在称为“聚合依赖性切割”的过程中去稳定化至其从模板分子解离的程度。

[0256] 在实践中,所述上游寡核苷酸包含引物且下游寡核苷酸包含探针。

[0257] 所述探针包含至少一种标记,其通过核酸酶活性切割。在一些实施方案中,所述探针包含上游标记和下游标记。上游标记包含荧光染料或淬灭物,且下游标记包含荧光染料或淬灭物,从而当探针在溶液中时,来自荧光染料的信号被淬灭物抑制。因此,当上游标记

包含荧光染料时,下游标记包含淬灭物,且反之亦然。

[0258] 当探针和引物与靶寡核苷酸的结合发生时,聚合酶切割荧光标记或淬灭物,或两者,将其释放入溶液,从而染料不在受制于淬灭物且可发荧光。

[0259] 在DFA的情况中设计引物和探针组合以利用探针技术聚合酶时,必须将下列因素考虑在内。

[0260] 第一,由于DFA的中心特征之一是引物的 $T_m$ 和感兴趣序列的 $T_m$ 之间的紧密接近,引物必须经常长于在PCR中使用的引物。在实施方案中,引物通常为50个碱基对,或多或少(more or less)。

[0261] 第二,由于探针还必须在与引物大致相同或略高的温度退火,其经常长于在PCR中使用的探针。在实施方案中,探针还必须为50个碱基对或更多。

[0262] 第三,为容纳此长度的探针和引物,靶序列必须比PCR中的长。这些长度可依赖于相应的探针和引物的GC含量而有所变化。

[0263] 图6描述了在PCR扩增中使用的一般引物和探针组合。感兴趣的序列一般为100至200个碱基对长。引物一般为15-20个碱基对长且探针一般为20-25个碱基对长。探针和引物一般具有在感兴趣序列的熔解温度 $30^{\circ}\text{C}$ 或更多之内的熔解温度。

[0264] 由于下述原因,更长的探针长度在使用具有DFA的已有切割探针化学中产生问题。淬灭一般遵循下式: $F=1/r^3$ 。

[0265] 因此,在已有切割探针化学的情况中,淬灭物一般足以径向接近荧光团,当探针在溶液中时,淬灭有效发生。在DFA探针的情况中,当探针在溶液中时,淬灭物一般不足以径向接近荧光团以进行淬灭。

[0266] 因此,在传统切割探针化学的情况中,不可能将切割的探针和仍在溶液中的探针之间进行区分。

[0267] 该问题的解决方案在本文称为“杂合发夹/切割的探针”或简称为“杂交探针”。

[0268] ii. DFA切割探针技术-杂合发夹/切割的探针

[0269] 具体地,这些杂合发夹/切割的探针与传统发夹探针相似之处在于包含探针的寡核苷酸链含有至少一对互补序列。当所述探针在溶液中时,互补序列彼此分子内杂交,引起探针呈现发夹样形状且由此使淬灭物足够径向接近与荧光团以从荧光团淬灭信号。

[0270] 下列包含用于将形成发夹的DFA寡核苷酸探针的例示性序列:

[0271] mfold实例1的结构1折叠碱基1-72(SEQ ID NO:1)

dG = -2.98    dH = -84.20    dS = -261.87    T<sub>m</sub> = 48.4 °C

```

      10      20
      .-ACCTCCAATGCC|      ACTCC
                AAACATT      T
                TTTGTAA      T
      \-----^      CTCAG
[0272]
                30
    
```

```

      40      50
      CCTGT      CGATGCGCT
                GCCA      T
                CGGT      A
      C----- ACCCAGATT
                70      60
    
```

[0273] mfold实例2的结构1折叠碱基1-67(SEQ ID NO:2)

[0274] dG = -5.79    dH = -129.70    dS = -399.52    T<sub>m</sub> = 51.5 °C

```

      10
      .-A      --| TT
                GCACT CAG \
                CGTGG GTC A
      \ -      TC^ TT
                20
    
```

```

      30
      .-ACTT CA
[0275]
                GC \
                CG G
      \----- TT
    
```

```

      40      50
      ATG G      ATAC
                G CCTCAT      A
                C GGGTA      A
      T-- G      GGAC
                60
    
```

[0276] mfold实例3的结构1折叠碱基1-83(SEQ ID NO:3)



$dG = -3.35$     $dH = -101.40$     $dS = -316.14$     $T_m = 47.6^\circ\text{C}$

```

      10      20
      -ATGGACGTGGCTT|   T
                    AGCGTA A
                    TCGTAT T
      \-----^      T
    
```

[0277]

```

      30      40      50
      -GATGGAAAAATGGTAA   GCT
                    ACGAA  \
                    TGCTT  T
      \-----^      GAT
                    60
    
```

```

      70
      CAAGG  GG
      CTT  \
      GAA  C
      TCGTT  AT
    
```

[0278]

mfold实例3的结构2折叠碱基1-83(SEQ ID NO:4)

$dG = -2.92$     $dH = -94.60$     $dS = -295.60$     $T_m = 46.9^\circ\text{C}$

```

      10      20
      -ATGGACGTGGCTT   T
                    AGCGTA A
                    TCGTAT T
      \-----^      T
    
```

[0279]

```

      30      40      50      60
      GATGGAAAAATGGTAAACGAAG|   TCGTCA
                    CTTTAGT   \
                    GAAATCG   A
      TCGTT-----^      GTTCGG
      80      70
    
```

[0280]

mfold实例4的结构1折叠碱基1-67(SEQ ID NO:5)

$dG = -13.55$     $dH = -129.20$     $dS = -372.88$     $T_m = 73.3^\circ\text{C}$

10  
 .-A    ==| TT  
   GCACT CAG \  
   CGTGG GTC A  
 \ -    TC^ TT  
 20

30  
 [0281] .-ACT CA  
           TGC \  
           ACG G  
 \ --- TT

40        50  
 TG G     ATAC  
   G CCTCAT A  
   C GGGGTA A  
 T- G     GGAC

[0282] LTSOW\_SNP2CT\_xm1的结构1折叠碱基1-38(SEQ ID NO:6)

[0283]  $dG = -2.40$     $dH = -75.20$     $dS = -234.73$     $T_m = 47.2^\circ\text{C}$

10  
 TG--| TCC TTTC  
 [0284] GCAA CAGGT T  
           CGTT GTCCA T  
 AACT^ T-- TCTT  
 30        20

[0285] LTSOW\_TERT\_XM1 75-90的结构7折叠碱基1-36(SEQ ID NO:7)

$dG = -0.79$     $dH = -30.80$     $dS = -96.76$     $T_m = 45.2^\circ\text{C}$

10  
 C-----| A ATCCCC  
 [0286]           AG CCC \  
           TC GGG C  
 TCCTCCGGTA^ A AGTGGA  
 30        20

[0287] LTSOW\_RNAseP\_XM1的结构1折叠碱基1-30(SEQ ID NO:8)

$$dG = -2.25 \quad dH = -22.40 \quad dS = -64.97 \quad T_m = 71.6^\circ\text{C}$$

10 20

TCAATGGCTGAGGTGAGGTAC| G

[0288] CCC \

GGG C

-----^ A

30

[0289] LTSOW\_CC3\_XM1的结构1折叠碱基1-42(SEQ ID NO:9)

$$dG = 0.02 \quad dH = -40.30 \quad dS = -130.00 \quad T_m = 36.8^\circ\text{C}$$

10 20

TTTGCT| AGTTCCCCCTGT

[0290] CTGAG C

GACTC C

-----^ CCTTCCACCTCC

40 30

[0291] LTSOW\_CYPD2D\_XM1的结构1折叠碱基1-45(SEQ ID NO:10)

$$dG = -3.06 \quad dH = -31.50 \quad dS = -91.70 \quad T_m = 70.4^\circ\text{C}$$

10 20

TGCAAGAGTCACCAAAATT| G

[0292] GCC A

CGG G

ACCCTACGATTGACCC-----^ A

40 30

[0293] mfold版本3.5

[0294] M.Zuker,Rensselaer Polytechnic Institute

[0295] 然而,杂交探针与传统发夹探针以下列方式不同。与传统发夹探针不同,杂交探针在其端部包含序列,该序列与探针所退火的DNA链上的反向序列互补。这引起探针完全与靶序列退火,与切割探针的方式相同或相似。因此,如同切割的探针,随聚合酶延伸序列杂交探针被切割。这与传统发夹探针的区别在于传统发夹探针的端部经故意设计以不补足其反向靶序列。如此完成以允许聚合酶在探针下移动。

[0296] 下列是杂交/发夹探针设计的实例和其互补DNA序列。

[0297] Ex.1.

[0298] GCACATAAGTTGATAATTAGTGAGTTGGGTGATACATACACAAGGGT-引物(SEQ ID NO:62)

[0299] CGTGTATTCAACTATTAATCACTCAACCCACTATGTATGTGTTCCCA-靶物(SEQ ID NO:63)

[0300] GGTTGAAGAAGTTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGTGCTGAG-引物(SEQ ID NO:64)

[0301] CCAACTTCTTCAACTCCTTCTCCAACCTTCTTACGACTC-靶物(SEQ ID NO:65)

[0302] 5'FAM-AGAAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGGATCC-3'BHQ1-探针(SEQ ID NO:66)

[0303] TCTTTAGAGCACGGGTTTGGACCACTACCTAGG-靶物(SEQ ID NO:67)

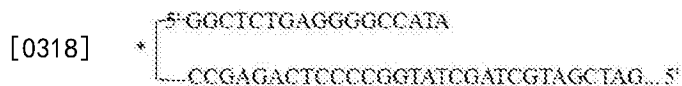
[0304] 5'染料-AGAAATCTCGTGCCCAAACCTGGTGATGAATCC-3'淬灭物-探针(SEQ ID NO:68)

- [0305] TCTTTAGAGCACGGGTTTGGACCACTACTTAGG-靶物(SEQ ID NO:69)
- [0306] Ex. 2.
- [0307] ATGTAAGGAAGTCCAAATGTTACCTGAAGACAACCTGTGGT-引物(SEQ ID NO:70)
- [0308] TACATTCCTCAGGTTTACAAGTGGACTTCTGTTGACACCA-靶物(SEQ ID NO:71)
- [0309] GCCTCTGGCAACAGTAAAGCAGGGGCAT-引物(SEQ ID NO:72)
- [0310] CGGAGACCGTTGTCATTTTCGTCCCGTA-靶物(SEQ ID NO:73)
- [0311] 5' FAM-TGGCAATCCCAGGTTCTCTTTTCTACCTGTTTGCTCAA-3' BHQ1-探针(SEQ ID NO:74)
- [0312] ACCGTTAGGGTCCAAGAGAAAAGATGGACAAACGAGTT-靶物(SEQ ID NO:75)
- [0313] 5' 染料-TGGCAATCCCAGGTTTTCTTTTCTACCTGTTTGCTCAA-3' 淬灭物-探针(SEQ ID NO:76)
- [0314] ACCGTTAGGGTCCAAAAGAAAAGATGGACAAACGAGTT-靶物(SEQ ID NO:77)

[0315] 图7描述了可用于DFA的引物和探针组合的一个实施方案。其描绘了用于获得接近感兴趣的序列的熔解温度的探针和引物的熔解温度的方法。在该实施方案中,探针和引物长度一般为50个碱基对或更多。为容纳此长度的引物和探针,感兴趣的序列一般长度为250-300个碱基对。这给出了引物、探针和感兴趣的序列之间熔解温度的差异为20°C或更少。

[0316] 在另一实施方案中,可增加引物和探针的熔解温度,而无需通过结合单或双链DNA的共价偶联剂显著增加寡核苷酸长度而由此增加 $T_m$ 。已知作为小沟结合剂的一类作用剂结合并稳定螺旋形DNA,且已在受限的温度范围用作探针。通过增加 $T_m$ ,较短引物和探针可在DFA温度范围内发挥作用。对于PCR温度范围,该方法的实例是使用小沟结合剂。涵盖许多其他类的作用剂(包括与单链和双链DNA都结合的那些)如在下文的实例中。

[0317] (SEQ ID NO:11)



[0319] 如上文所示,引物或探针具有共价连接部分(标记为“\*”),其结合邻近DNA并增加引物/探针 $T_m$ 。稳定部分可与ds或ssDNA结合。

[0320] 在进一步的实施方案中,也可利用增加 $T_m$ 的寡核苷酸骨架或碱基修饰以将引物/探针 $T_m$ 移动入DFA范围而不增加寡核苷酸长度。

[0321] 该修饰包括但不限于LNA、PNA、二硫代磷酸酯连接、2'糖修饰如2'-O-甲基、2'-氟、碱基修饰如5-卤代吡啶、5-甲基嘧啶、产生额外氢键的碱基、其他嘌呤碱基修饰如超级G、2-氨基嘌呤等。

[0322] iii. DFA探针技术-FRET探针

[0323] 在切割探针技术的另一实施方案中,图8中所描绘的,将菲咯啉-Ru II复合物用作标记分子。这些复合物可以是标记分子的相互作用对的部分,允许能量从合适的能量供体分子转移至Ru复合物。由于能量转移的效率高度依赖于供体和受体分子之间的距离,这种能量转移系统在研究分子相互作用中很有用。

[0324] 可用作Ru复合物的受体分子的合适类型是分子的2,4-二氧四氢蝶啶生色团。使用该组合,可在Ru菲咯啉复合物和2,4-二氧四氢蝶啶生色团之间检测到能量转移,其中Ru复

合物位于距离2,4-二氧四氢蝶啶生色团合适的距离。当用于与聚合酶切割技术联合时,其中两种标记之一从探针切割,可检测到发光的改变,其可用于确定靶序列的扩增是否已实现。

[0325] 图9描绘了双杂交探针和引物组合。该实施方案包含两种序列特异性寡核苷酸探针以及两种序列特异性引物。所述探针包含染料对,其可参与荧光共振能量转移(FRET),其中供体染料附接于一个探针且受体染料附接于另一探针,定位供体染料和受体染料两者使得当探针附接于靶序列时,其彼此充分接近以参与FRET。探针和引物两者都满足XCR的温度要求。

[0326] 图10描绘了能够参与FRET的引物/探针组合。设计序列特异性寡核苷酸引物和序列特异性寡核苷酸探针以与邻近的靶物序列结合,通常其中与所述链互补的探针通过引物形成,从而探针与从延伸的标记的引物合成的互补链退火。

[0327] 下列是用于能够参与FRET的引物/探针组合的序列设计的实例。下列实例在埃博拉(Ebola)中。

[0328] 双链埃博拉DNA的序列(SEQ ID NOs:12和61)

3781 ACATTCGGCAAAGGATTGAGAAACATTATGTATGATCACTGCCTGGTTTTGGAAC TG  
TGTAAGCCGTTTCCTAAACICTTTGTAATACATACTAGTGAACGGACCAAAACCTTGAC

[0329] 3841 CTTTCCACCAATTAGTACAAGTGATTTGTAAATTGGGAAAAGATAGCAACTCATTGGACA  
GAAAGGTGGTTAATCATGTTCACTAAACATTTAACCCCTTTCTATCGTTGAGTAACTGT

3901 TCATTCATGCTGAGTTCAGGCCAGCCTGGCTGAAGGAGACTCTCCTCAATGTGCCCTAA  
AGTAAGTACGACTCAAGGTCCGGTCGGACCGACTTCCTCTGAGAGGAGTTACACGGGATT

[0330] 正向引物(SEQ ID NO:13):

[0331] EbolaZFxcr

[0332] ATCACTTGCCTGGTTTTGGAACCTGCTTT(-Q670)CCACC

[0333] 反向引物(SEQ ID NO:14):

[0334] EbolaZRxcr

[0335] CCTTCAGCCAGGCTGGCCT(-Ca1610)GGAACCT

[0336] 探针(SEQ ID NO:15):

[0337] EbolaZXxcr

[0338] FAM-TACAAGTGATTTGTAAATTGGGAAA~GATAGCAACTCATTGGACATCATTTCATGC-FAM

[0339] 设计包含这些长度的探针和引物的测定法获得意想不到的结果,其中一般认为不能设计这些长度的探针和引物以具有DFA所需的靶序列的 $T_m$ 的窄范围内的 $T_m$ 。然而,已发现具有用于DFA的足够的 $T_m$ 范围的探针和引物可以容易地设计。

## 实施例

[0340] 实施例1:对照检验

[0341] 生成下列探针和引物以用于与DFA联合以扩增对照靶序列。

[0342] 靶序列(SEQ ID NO:16):

[0343]

CCATTGCCATATTTGGTTATCAGGTATCTGTTAGAGGGGCTAAAGCTAACCCACCAATTCCTGTGCCAGAGSAATAA  
AATTCCCATCGCAATTCCTCTGTGAGCACTGAAATAGGGCGGTGCATGAACAATAGCCGGTAGGTATGTCAGAAAAC  
CTCCAATGCCAAACATTACTCCTTGACTCAATGTTTCCTGTGCCACGATGCGCTTATTAGACCCATGGCCATCAAA  
AGTGACCCGAGCACCATCGTTTGGATTGAAAAGAAGTGCTGTAGTACGTTATTACCGAT

[0344] 正向引物序列(SEQ ID NO:17):

[0345] ATTGCCATCCATATTTGGTTATCAGGTATCTCGTTAGAGGGGCTAAAGCTAACCCACCATTC

[0346] 反向引物序列(SEQ ID NO:18):

[0347] GGTAATAACGTACTACATCAGCACTTCTTTTCAATCCAACGATGGTGCTGGGTCACT

[0348] 探针序列(SEQ ID NO:19):

[0349] BHQ1-ACCTCCAATGCCAAACATTACTCCTTGACTCAATGT(T-FAM)  
TCCTGTGCCACGATGCGCTTATTAGACCCATGGCC-磷酸

[0350] 靶序列Tm:88.00℃

[0351] 正向引物Tm:80.04℃

[0352] 反向引物Tm:80.07℃

[0353] 探针Tm:84.07℃

[0354] 实施例2:Flu Mat A测试

[0355] 生成如下探针和引物测定法设计以用于与DFA联合而测试Flu mat A:

[0356] 靶序列(SEQ ID NO:20):

[0357]

GAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTNAATGGGAATGGGGATCCAATAACATGGACAG  
AGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTTAAGGGATAACGTTCCATGGGGCCAAAGAAATAGCACTCAGTTATTVTGCTGG  
TGCACTTGCCAGTTGCATGGGCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACNGAAGCNGCATTGGCCTNGTATG  
TGCAACNTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATAGGTCTCATAGGCAATGGTNACAACAACCAATCCATTAATAAG  
ACATGAGAACAGAATGGTTCTGGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGC

[0358] 正向引物序列(SEQ ID NO:21):

[0359] GTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCC

[0360] 反向引物序列(SEQ ID NO:22):

[0361] GCCATTTGCTCCATAGCCTTAGCTGTAGTGCTGGCCAGAACCATTCTGTTCTCATGTCTTATTAAT

[0362] 探针序列(SEQ ID NO:23):

[0363] BHQ1-AGCACTCAGTTATCTGCTGGTGCACT(T-FAM)  
TGCCAGTTGCATGGGCTCATATACAACAGGATGGGGGCT-磷酸

[0364] 靶序列Tm:89.4℃

[0365] 正向引物Tm:79.9℃

[0366] 反向引物Tm:80.1℃

[0367] 探针Tm:85℃

[0368] 实施例3:S Aurues(金黄色葡萄球菌)Nuc基因测试

[0369] 生成下列探针和引物测定法设计以用于与DFA联合而测试S Aurues Nuc基因:

[0370] 靶序列(SEQ ID NO:24):

[0371]

AGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAAATGGTAGAAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGCCAAAGAAGCTG  
ATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTG  
GCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACAAATACACATGAACAACTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAA  
AGAGAAATTAATATTTGGAGCG

[0372] 正向引物序列(SEQ ID NO:25):

[0373] AGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAAATGGTAGAAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGT

[0374] 反向引物序列(SEQ ID NO:26):

[0375]

CGCTCCAAATATTTAATTTCTCTTTTTTTGCTTGTGCTTCACTTTTTCTTAAAAGTTGTTTCATGTGTATTGTTAGGT

[0376] 探针序列(SEQ ID NO:27):

[0377] 5' BHQ1-ATGGACGTGGCTTAGCGTATA(T)TTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTC  
GTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCT-磷酸

[0378] (T)=FAM-T

[0379] 探针序列(SEQ ID NO:28):

[0380] BHQ1-AGCACTCAGTTATTCTGCTGGTGAC(T-FAM)TGCCAGTTGCATGGGCCTCATATACAACAGG  
ATGGGGGCT-磷酸

[0381] 靶序列 $T_m$ :83°C

[0382] 正向引物 $T_m$ :76.76°C

[0383] 反向引物 $T_m$ :76.76°C

[0384] 探针 $T_m$ :82°C

[0385] 实施例4:引物/引物XCR检测化学

[0386] 来自现存探针检测化学(如HybBeacon和HyGlow探针)的观察显示探针天然折叠成紧密的二级结构且如果不彼此实际接近,则荧光染料的伴随的相对疏水性允许这些荧光部分紧密接近。由于折叠的寡核苷酸和其附着的染料相信这由一般熵变上有利的配置发生。

[0387] XCR已证明了其以几乎10x传统PCR技术的速度扩增DNA或RNA模板的能力。在这些速度实施扩增的一个实质性限制是在扩增方案的过程中需要并入基于探针的检测。所需额外时间的主要来源是探针杂交的需要,且在5'核酸酶XCR探针的情况中,待切割的探针需要额外时间以从其淬灭物释放染料的淬灭。

[0388] 下文描述了在实时扩增中检测荧光的方法,其利用了HybBeacon和HyGlow技术,其中荧光淬灭通过抑制寡核苷酸与其互补模板的结合而释放。

[0389] 根据该设计,替代作为探针的荧光寡核苷酸,荧光分子是用于产生扩增的引物。

[0390] 不需要额外时间以允许荧光探针结合的主要优势,由于引物固有地退火且在模板上展现出,因而当起始引发复合物时释放荧光淬灭。参见图11,说明了正向和反向引物,其具有沿引物长度约6-9个核苷酸间隔的染料,但在3'端留有无染料的足够的核苷酸。当引物与其互补物结合时,释放荧光淬灭且因此生成可检测的信号。

[0391] 荧光引物在此设计中满足多个目的。首先,生成两个荧光信号,一个是用于与适当的模板结合的正向引物且另一个是用于与反向链模板结合的反向引物。

[0392] 引物与其他相似的引物应形成延伸产物,引物二聚体,随后在引物上的染料应足

够接近以防止淬灭的释放且因此保持淬灭且从该引物二聚体复合物不产生荧光信号。

[0393] 两种不同标记的引物应形成引物二聚体复合物,其淬灭将不松弛(relax),而会形成FRET复合物,且指示引物二聚体复合物形成的信号将通过在较高能量波长激发和较低能量波长发射(标准FRET信号)可监测。参见图12,其说明淬灭的正向引物-二聚体复合物、淬灭的反向引物-二聚体复合物和由正向和反向引物结合在一起形成的引物-二聚体复合物,其可经由FRET信号检测。

[0394] 在一些情况下,其中生成模板依赖性非特异性产物,这对于单引物初始模板的引发是可能的。这些产物将产生单荧光染料信号。参见图13,说明正向引物模板形成信号和反向引物模板形成信号和当正向和反向引物产生靶向的模板时生成的信号。

[0395] 而具有两种染料标记的引物的正确产物将显示来自两种不同染料以相等反应形成效率的荧光信号形成,由于它们在扩增产物形成中彼此直接连接且可在两种荧光通道中同时监测。参见图14。

[0396] 该设计策略的另一数据评估优势是其中扩增产物形成且两荧光信号通过扩增产物生成。随着相似的(like)引物将淬灭,任何导致FRET的引物-二聚体信号可从形成的信号扣除以实现扩增信号的基线标准化。参见图15。

[0397] 整体上,由于不再需要等待探针杂交或探针被切割,该技术的优势在于扩增过程中其将不限制XCR速度。

[0398] 除XCR外,该设计也适于PCR测定法;然而,该化学并未执行且其仍为非显而易见的原因是PCR遭受大量的非特异性产物形成且仅使用引物,如在双链DNA结合染料如SYBR Green 1的情况下,由于适于诊断测试的方法学,其已在很大程度上被忽略。

[0399] 如下说明适于该方法的序列配置。

[0400] FAM染料高亮显示的例示性正向引物(SEQ ID NO:29):

[0401] AGGGCGGTGCATGAACAATAGCCGGTAGGTATGTCAGAAAACCTCCAA 80.7°C T<sub>m</sub>

[0402] 高亮显示的RED染料的例示性反向引物位置(SEQ ID NO:30):

[0403] ATGGCCATGGGTCTAATAAGCGCATCGTGGGCACAGGAA 80.8°C T<sub>m</sub>

[0404] 例示性靶序列(SEQ ID NO:31):

[0405]

AAGAGGGAAGAGGGGGAGGGCGGTGCATGAACAATAGCCGGTAGGTATGTCAGAAAACCTCCAATGCCAAACATTAC  
TCCTTGACTCAATGTTTCTGTGCCACGATGCGCTTATTAGACCCATGGCCATCAAAGTGACCCGAGCACCATCG  
TTTGTGGATTGAAAAGAAGTGCTGT 88.9°C T<sub>m</sub>

[0406] 实施例5:三链体形成区探针设计

[0407] 在另一实施方案中,本公开提供了适用于DFA的多重探针技术。

[0408] 该实施方案通过消除探针参与反应的扩增部分的需求而使所需寡聚物(例如引物和探针)的数目最小化。

[0409] 大多目前的探针技术利用单独或多重寡核苷酸探测扩增的序列。寡核苷酸探针在DNA扩增的过程中与感兴趣的序列结合。

[0410] 与之相反,本公开的内容使用衔接至序列特异性引物的三链体形成区(TFR)。本公开随后使用经设计以在TFR与每种特异性产物相互作用的三链体形成寡核苷酸探针以基于形成的特定产物产生独特的荧光颜色。这减少了反应中存在的寡核苷酸的数目。



[0411] 三链体形成探针不参与扩增反应且不减慢反应,而已有探针的方式则具有该趋势。

[0412] 当两种不同的、非重叠寡核苷酸与相同线性互补核酸序列的不同区退火,且寡核苷酸的3'端指向另一者的5'端时,前者可称为“上游”寡核苷酸且后者可称为“下游”寡核苷酸。

[0413] 除非另外指示,本发明的实践将采用分子生物学、微生物学和重组DNA技术的常规技术,如在文献中所详细说明的,以及美国专利号US 7,838,235公开的方法,其通过提述以其整体并入本文。

[0414] 在一个实施方案中,利用了用于核酸扩增产物的基于三链体形成寡核苷酸探针的检测化学。根据该方法,三链体形成引物根据下列方法合成。

[0415] 将人工序列三链体形成区(TFR)添加至经设计的寡核苷酸以生成三链体形成引物。

[0416] 如本文使用的,三链体形成区或TFR指将其自身借给Hoogsteen或三链体碱基配对的特定DNA序列,其中DNA的第三链与双链TFR结合以形成DNA的三链长度,称为三链体。

[0417] 下文是三链体形成区的序列的说明性实例:

[0418] 5'-GTGTGGGAAGAGGGGGAXGAGGGGGAGGAGC-3'(SEQ ID NO:32)

[0419] 3'-CACACCCCTTCTCCCTXCTCCCCTCCGTCG-5'(SEQ ID NO:33)

[0420] 5'-GTGTGGGAAGAGGGGGAXGAGGGGGAGGAGC-3'(SEQ ID NO:34)

[0421] 3'-CACACCCCTTCTCCCTXCTCCCCTCCGTCG-5'(SEQ ID NO:35)

[0422] 在一个实施方案中,TFR位于经设计的引物的5'端。

[0423] 在可替换的实施方案中,TFR位于接近经设计的引物的5'端。

[0424] 在另一实施方案中,TFR位于经设计的引物的内部的任何位置。

[0425] 在另一实施方案中,TFR位于经设计的引物的3'端。

[0426] 在另一实施方案中,TFR位于接近经设计的引物的3'端。

[0427] 三链体形成引物可以是DNA或RNA的区段,其与给定的DNA序列互补且其为通过DNA聚合酶的初始复制所需要的。

[0428] 三链体形成寡核苷酸可包含三链体形成寡核苷酸探针(TFO探针)。TFO探针可复合至双链核酸序列的适当的序列三链体形成区且因此,当TFO探针以某种方式如用荧光团标记时,可使用TFO探针以鉴定任何核酸序列。

[0429] 在一个实施方案中,包含三链体形成区的引物(TFR引物)还可具有荧光染料。

[0430] 如图16所示,TFR引物参与靶序列的扩增,沿附接至靶序列的长度生成三链体形成DNA的链。

[0431] 步骤1描绘了靶序列的变性DNA的单链,结合至寡核苷酸引物。寡核苷酸引物包含不匹配靶序列的标签末端序列。标签末端序列包含一个或多个三链体形成序列。

[0432] 步骤2描绘了扩增方法的延伸阶段。在该阶段中,引物朝其3'端延伸以生成用于下一循环的靶物。

[0433] 步骤3描绘了从靶物变性的延伸引物。

[0434] 步骤4描绘了不具有标签的与延伸的TFR引物退火的引物。

[0435] 步骤5描绘了不具有标签的引物的延伸阶段以生成具有三链体形成区的双链DNA

序列。

[0436] 随后可采用下列检测方法以确定TFO探针是否已与扩增的DNA的双链三链体形成区结合,指示DNA具有感兴趣的序列。

[0437] 如图16中说明,三链体形成寡核苷酸探针以下列方式生成。设计单链TFO以与在扩增过程中生成的靶序列中的三链体形成区结合。能够参与荧光能量转移(FRET)的染料附接于三链体TFO探针。在该实例中,染料是供体染料。下文是具有双链DNA及TFR形成三链体的单链DNA的两个实例:

[0438] 5'-GGAGGGGAGAAGGGAGAAGGG-3'(SEQ ID NO:36)

[0439] 3'-CCTCCCCCTCTTCCCTCTTCCC-5'(SEQ ID NO:37)

[0440] 5'-GGTGGGGTGTGGGTGTGGG-3'TFO(SEQ ID NO:38)

[0441] 3'-GGGTTGTGGGTTGTGGGGTGG-5'TFO(SEQ ID NO:39)

[0442] 5'-GTGTGGGAAGAGGGGGAXGAGGGGGAGGAGC-3'(SEQ ID NO:40)

[0443] 3'-CACACCCCTTCTCCCTXCTCCCCTCCGTCG-5'(SEQ ID NO:41)

[0444] 如图17所述,TFO探针的3'端使用磷酸带帽以防止TFO探针参与扩增过程。TFO探针还可通过荧光染料、不可延伸接头或任何本领域的技术人员已知的其他适当的原子或分子加帽以防止扩增反应过程中寡核苷酸延伸。供体染料可附接于探针的3'端处或附近。供体染料还可附接于TFO探针的5'端处或附近。供体染料还可附接于TFO探针的5'端和3'端之间的任意处。当染料附接于TFO探针时,其包含三链体形成荧光探针(TFFP)。

[0445] 图18描绘了包含三链体形成区的双链DNA序列。所述双链DNA序列具有受体染料。TFFP的TFR附接于双链DNA的三链体形成区。

[0446] 在一个实施方案中,仅当反应温度处于或低于引物的退火温度时TFFP与扩增的DNA退火。因此,三链体形成荧光探针不参与反应。当TFFP与扩增的序列结合时,且光照射其上,TFFP上的供体染料产生共振。随供体染料共振,其将能量转移至位于双链DNA上的受体染料,引起受体染料在特定的波长发荧光,发射对应于该波长的彩色光。这指示感兴趣的序列在测试样品中存在且已被扩增。

[0447] 在可替换的实施方案中,受体染料附接于TFFP且供体染料附接于扩增的双链DNA产物。在该实施方案中,当感兴趣的序列已扩增时受体染料发荧光。

[0448] 在另一实施方案中,可使用多个引物,其中设计每个引物以结合并特异性扩增感兴趣的序列。每个引物具有与其附接的不同受体染料从而每个受体染料在不同的波长发荧光。三链体形成荧光探针将与扩增产物的三链体形成区结合。附接于三链体形成探针的供体染料将引起扩增产物上的受体染料发一定颜色的荧光,取决于何种产物已扩增。以此方式,可立即测试多个不同的序列。该实施方案将允许多个不同的感兴趣的潜在序列在一个反应容器中得到测试。在一个反应容器中测试多个不同的感兴趣的潜在序列称为多重。

[0449] 在多重探针组合的可替换的实施方案中,受体染料可附接于TFFP且供体染料可附接于扩增的双链DNA产物。在该实施方案中,每个引物将具有不同颜色的供体染料,从而附接于TFO探针的受体染料将以不同的颜色发荧光,取决于何种引物已扩增感兴趣的序列。

[0450] 在另一实施方案中,设计TFO探针以在与引物的 $T_m$ 大致相同或略微更高或更低的温度退火。该实施方案允许扩增结果在实时读取。

[0451] 实施例6:具有天然存在的TFR的三链体形成区探针设计

[0452] 另一实施方案利用了位于感兴趣的序列本身或其附近的天然存在的三链体形成区(TFR)。如下是双链DNA中天然存在的TFR序列的实例。

[0453] 5'TTTTTCCCGTCC 3'(SEQ ID NO:42)

[0454] 3'AAAAAGGGCAGG 5'(SEQ ID NO:43)

[0455] 5'GGCGAGGGGGGAGCGGG 3'(SEQ ID NO:44)

[0456] 3'CCGCTCCCCCTCGCCC 5'(SEQ ID NO:45)

[0457] 5'GGAGGTGGGGGAG 3'(SEQ ID NO:46)

[0458] 3'CCTCCACCCCTC 5'(SEQ ID NO:47)

[0459] 5'GGAGGTGGGGGAG 3'(SEQ ID NO:48)

[0460] 3'CCTCCACCCCTC 5'(SEQ ID NO:49)

[0461] 5'GGAGAAGGTGAGGAAGAAGAAGAGGAAGAA 3'(SEQ ID NO:78)

[0462] 在该实施方案中,设计引物以与天然存在的三链体形成区以及与感兴趣的序列结合。

[0463] 在该方式中,在扩增感兴趣的序列时扩增DNA的三链体形成区至可检测水平。引物具有与其附接的受体染料。生成具有与天然存在的感兴趣的序列互补的序列的三链体形成探针。

[0464] 在多重方法的另一实施方案中,经设计以测试特定的感兴趣的序列每个引物组包含其独特的TFR碱基对序列以及其本身独特的彩色染料。在一个实施方案中,染料将是供体染料。然后设计多个TFO探针,其每组包含TFR以匹配扩增产物之一的特定TFR。每个探针组还包含其自身独特的受体染料颜色。哪种产物扩增决定哪种探针将与之结合。当其以TFO探针的染料经受FRET时,哪种探针附接于扩增的产物且因此,由探针荧光的颜色确定哪种感兴趣的序列存在于样品中。

[0465] 在另一实施方案中,检测方法可包括使用优先与三链体DNA结构结合的特殊DNA结合染料。在一个实施方案中,染料包含噻唑橙(Thiazole Orange)。在另一实施方案中,染料包含Cyanine 40染料。除本文所述的染料,可使用本领域普通技术人员已知的优先与三链体DNA结构结合的任何其他染料。这些结合三链体的染料可在引物上或在产物自身的内部与染料标记的TFR组合使用,以产生基于FRET的信号,其也可指示特异性形成的靶序列的存在。

[0466] 可替换的方法涉及与DNA结合染料偶联的TFO探针。这些将包括但不限于:Sybr Green 1;Sybr Gold;Eva Green;LightCycler Green I;LightCycler Green II;Toto/Yoyo/Toyo和本领域普通技术人员已知的与杂交的DNA结构结合的其他DNA结合染料。如图19中所描绘,结合染料受限于TFO探针上于特定位置的共价附接,在这种情况下,当TFO探针结合时,TFO探针的端部可仅与杂交的DNA结构结合且因此将TFO探针置于接近附接于感兴趣的扩增序列的染料。因此,荧光信号指示扩增已发生。

[0467] 在另一实施方案中,可使用Cy2或本领域普通技术人员已知的其他四链体结合染料。

[0468] 在另一实施方案中,TFO探针可用沿其长度位于任何位置的荧光染料和淬灭物合成。如图20所述,该实施方案利用发夹染料和淬灭物配置。当TFO探针与感兴趣的序列结合

时,消除探针的发夹结构,其结果是淬灭物变得与染料足够远,其不再能够抑制染料的荧光。如果感兴趣的序列已扩增,这导致发射某种颜色的荧光。特异性荧光信号改变是不相关的,只要其与反应混合物中的任何其他产物有所区别。可检测的反应的总数仅取决于反应在其上实施的仪器平台而进行区分。

[0469] 在另一实施方案中,描述于图21,两个或多个具有相同TFR序列的引物可与包含与TFR序列互补的序列的TFR引物一起使用。图21说明了三个TFR引物,每个具有不同颜色的染料。在步骤2中,包含红色染料的引物已与感兴趣的序列结合并扩增。在步骤3中,TFR引物已在与三链体优选结合的结合染料存在下结合TFR。这种结合染料可包含噻唑橙、青蓝40(Cyan 40)或任何本领域普通技术人员已知的其他三链体结合染料。所述结合染料参与具有附接的荧光团的FRET,指示与包含红色染料的引物互补的序列已扩增。

[0470] 在可替换的实施方案中,产物可通过三链体产物的颜色、熔解温度或颜色和熔解温度两者的组合进行区分。图22描绘了实施方案,其中将6个引物分为三组,每组两个。每组的两个引物包含相同的TFR序列且三组各包含三种不同的TFR序列,从而三组引物的每一组可与其他两组凭借具有不同的熔解温度进行区分。在每组中两个分享TFR的引物各具有不同颜色的染料。该方法还包括使用三组探针,其包含结合引物对之一的TFR的序列。产物将基于其熔解温度和颜色的独特组合进行区分。这些不同的区分产物的方法可使得将三链体DNA形成在扩增产物的检测中用作定量的、基因分型的或简单的靶物检测成为可能。

[0471] 如下是经设计以利用DFA的独特性质的引物和探针技术的可替换的实施方案。在该实施方案中,引物对的每种引物用可参与荧光共振能量转移(FRET)的染料标记。如图23所述,供体染料附接于第一引物3'端附近,而受体染料附接于第二引物的3'端附近。在退火步骤,引物与其靶序列以接近尾对尾的排列杂交,使染料足够接近,用于FRET的发生。受体荧光的量与存在的DFA产物的量成比例。

[0472] 本文用于扩增和/或检测DNA样品的靶序列的测定套盒可包含:i)本文所述的引物和探针,和ii)缓冲剂、dNTP、和酶。这些反应物以足够的量存在以实施多个测定。

[0473] 实施例7:进一步的三链体形成区探针设计

[0474] 三链体形成寡核苷酸提供用于检测扩增产物的独特方法,其不同于PCR、XCR、RAMP、HAD、NEAR或导致大量扩增的双链DNA的任何其他扩增技术。

[0475] 我们已描述了引入沿引物长度附接于某处的人工TFR。尽管,更有趣的是三链体形成区(TFR)的大量天然存在,其为令人惊讶地丰富。例如,具有200万碱基对基因组的无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)具有16个碱基对或更长的多至29个TFR。这种TFR的相对高丰度使得利用该TFR(无论是同型嘌呤或同型嘧啶伸展)作为用于扩增合意的核酸的潜在诊断标记物成为合理的。

[0476] 一个这种用于检测扩增的DNA的三链体形成寡核苷酸的基本设计的实例于下文图解,其中适用于DFA的引物组产生扩增产物,其对于选择的靶物都具有诊断性且引物之间的序列包含三链体形成区(TFR),其可合适地使用三链体形成寡核苷酸(TFO)检测。

[0477] TFO将与扩增的双链DNA在反应过程中在任何点结合,其中完全的双链延伸已通过产物的TFR部分发生。

[0478] 有利地,这种结合事件可在扩增的许多不同阶段监测且因此(不同于其他杂交化学)实时读数不必在反应的最低温度发生,此时暴露未延伸的单链DNA用于探针结合。

[0479] 能够使用用于荧光读数的更高温度的一个不同优势是反应可加快到最大速度,其通过在相对低的反应温度保持延伸时间(times)而具有不促使非特异性产物形成的相应优势。

[0480] 用于检测扩增的腺病毒的TF0:

[0481] 腺病毒XCR正向:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGAT(SEQ ID NO:50)

[0482] 腺病毒XCR反向:GTCTCCCGGTGCGTCGCCGT(SEQ ID NO:51)

```

900i   CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGCGAT
      GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCTCGGACTACTCGAGCCGCTA
906i   GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCTCTCTTCTTCTTCTTCCAT
      3'F-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA-Q

```

[0483]

```

912i   CCACCCGCGTGGAGCGGAGCTTTAGGGGCCCGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA
      GACGACCTCTTCTTCTATTTCTTCTCTGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGCCCGACGACG
      CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGCTGC
918i   ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCGCGGCGGCGACG
      TGCCGCTGCGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCTGC

```

**(SEQ ID NO: 52)**

[0484] 结合在SEQ ID NO:52的较长腺病毒核苷酸内的TF0探针指定为SEQ ID NO:53且包含3'F和5'Q标记。

[0485] 此外,我们已知可使用小沟结合剂以生成较短的TF0并稳定其结合。

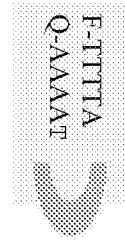
[0486] TF还可用于序列变化的基因分型,如下文所示。

[0487] 发夹TF0:

[0488] 腺病毒XCR正向:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGAT(SEQ ID NO:50)

[0489] 腺病毒XCR反向:GTCTCCCGGTGCGTCGCCGT(SEQ ID NO:51)

TFO 发夹: TTTTAGGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA  
(SEQ ID NO: 54)



9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGCAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCTCGGACTACTCGAGCCGCTA

[0490]



9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCCCTCTTCTTCTCTTCTTCCAT  
3' - GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

9121 GACGACCTCTTCTTCTATTCTTCTCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGTGTC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCGCGGGCGGACG  
TGCGGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCTGC

(SEQ ID NO: 52)

[0491] 在SEQ ID NO:52的较长腺病毒核苷酸内结合的TFO发夹探针指定为SEQ ID NO:54且当探针未与靶物结合时,包含能够形成发夹结构的互补的末端碱基。

[0492] 小沟结合剂TFO:

[0493] 腺病毒XCR正向:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGAT(SEQ ID NO:50)

[0494] 腺病毒XCR反向:GTCTCCCGGTGCGTCGCCGT(SEQ ID NO:51)

[0495] TFO<sub>mgb</sub>:Q-mgb-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA-F(SEQ ID NO:55)

9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGCAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCTCGGACTACTCGAGCCGCTA

9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCCCTCTTCTTCTCTTCTTCCAT  
3' - Q-mgb- GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA - F  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

[0496]

9121 GACGACCTCTTCTTCTATTCTTCTCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGTGTC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCGCGGGCGGACG  
TGCGGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCTGC

(SEQ ID NO: 52)

[0497] 在SEQ ID NO:52的较长腺病毒核苷酸内结合的TFO小沟结合剂(mgb)探针指定为SEQ ID NO:55。

[0498] 双MGB结合剂TFO:

[0499] 当TFR较短时这些TFO可以是特别有用的且存在对额外稳定性的需求以允许TFO在DFA热循环条件过程中结合。

[0500] 腺病毒XCR正向:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGAT(SEQ ID NO:50)

[0501] 腺病毒XCR反向GTCTCCCGGTGCGTCGCCGT(SEQ ID NO:51)

[0502] TFOmgb2:Q-mgb-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA-mgb-F(SEQ ID NO:56)

9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGGCAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCCTCGGACTACTCGAGCCGCTA

9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCTCCTCTTCTTCTTCTTCCAT  
3'-Q-mgb-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA-mgb  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCCCGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

[0503]

9121 GACGACCTCTTCTTCTATTTCTTCCCTCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGTGC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGGCGGGCGACG  
TGCCGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCGTGC  
(SEQ ID NO: 52)

[0504] 在SEQ ID NO:52的较长腺病毒核苷酸内结合的TFO双重小沟结合剂(mgb)探针指定为SEQ ID NO:56。

[0505] 用TFO的基因分型:

[0506] 本公开提供利用TFO实施基因分型的方法。

[0507] 腺病毒XCR正向:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGAT(SEQ ID NO:50)

[0508] 腺病毒XCR反向:GTCTCCCGGTGCGTCGCCGT(SEQ ID NO:51)

[0509] TFO基因型1:Q-GGAGGAGAAGGAGGAGAAGAAGGTA-F(SEQ ID NO:57)

[0510] TFO基因型2:Q-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGGTA-R(SEQ ID NO:58)

[0511] 基因型1扩增子:

[0512] 在实施方案中,其中仅在与TFO或与发夹形成TFO具有完美匹配时生成信号,可用于熔解曲线分析。

[0513] 9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGGCAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCCTCGGACTACTCGAGCCGCTA

9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCTCCTCTTCTTCTTCTTCCAT  
3'-Q-GGAGGAGAAGGAGGAGAAGAAGGTA-F  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCCCGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

[0514] 9121 GACGACCTCTTCTTCTATTTCTTCCCTCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGTGC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGGCGGGCGACG  
TGCCGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCGTGC  
(SEQ ID NO: 52)

[0515] 基因型2扩增子:

[0516] 在实施方案中,其中仅在与TFO或与发夹形成TFO具有完美匹配时生成信号,可用于熔解曲线分析。

9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGCGAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCTCGGACTACTCGAGCCGCTA

9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGECTCTCTTCTTCTCTTCTTCCAT  
3'-Q-GGAGGAGAAGGAGAGAAGAAGGTA-R  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCCCGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

[0517]

9121 GACGACCTTCTTCTATTCTTCTCTGCGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGCTGC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGCGGGCGGACG  
TGCCCGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCTGC  
(SEQ ID NO: 52)

[0518] 量子交换TFO:

[0519] 本文给出了监测靶扩增子形成的新型方法。

[0520] 在该实例中,荧光素标记的正向引物腺病毒XCR FOR-FAM用蓝光激发。将激发的荧光素(FAM-T)的能量转移至TFO波1上的(Resorufin-T(试卤灵-T))Nearby(附近),将其能量转移至TFO波2上的(NFAM-T),然后最终至腺病毒XCR REV-RED上的(Cy5-T)。依赖于扩增子内天然存在的TFR的可用性和扩增子的长度,一个或多个QETFO可包括在反应中。

[0521] 腺病毒XCR正向-FAM:CGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCC(FAM-T)GAT(SEQ ID NO:50)

[0522] 腺病毒XCR反向-RED:GTCTCCCGGTGCG(Cy5-T)CGCCGT(SEQ ID NO:51)

[0523] TFO波1:3'-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGG(试卤灵-T)A-mgb-F(SEQ ID NO:59)

[0524] TFO波2:3'-GGAGAAGAAGA(NFAM-T)AAAGAAGGAGA-5'(SEQ ID NO:60)

[0525] 9001 CTGGGCATTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCTGATGAGCTCGGCGAT  
GACCCGTAACGCCCGGCTCTGGCACTCGAGCAGAAGGTCTCGGACTACTCGAGCCGCTA  
9061 GGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGECTCTCTTCTTCTTCTTCCAT  
3'-GGAGGAGAAGGAGAAGAAGAAGG(试卤灵-T)A-5'  
CCACCGCGCGTGGAGCGCGAGCTTTAGGGGCCCCCGAGGAGAAGAAGGAGAAGAAGGTA

9121 GACGACCTTCTTCTATTCTTCTCTGCGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGCCGACGACG

[0526] 3'-GGAGAAGAAGAAGAAGAAGGAGA-5'  
CTGCTGGAGAAGAAGATAAAGAAGGAGACCCCGCCACCACCACCGCCCGGGCTGCTGC

9181 ACGGCGACGCACCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGCGGGCGGACG  
TGCCCGCTGGGTGGCCCTCTGCCAGCTGCTTCGCGAGCTAGTAGAGGGGCGCCCGCTGC

(SEQ ID NO: 52)

[0527] 本领域的技术人员会理解的是,对于本文公开的这些和其他过程和方法,过程和方法中实施的功能可以不同顺序执行。此外,概述的步骤和操作仅作为实例提供,且步骤和



操作中的一些可以是任选的,组合为较少的步骤和操作,或扩充为额外的步骤和操作而不减损公开的实施方案的本质。

[0528] 就本申请中所述的具体的实施方案来说,本公开并非被限制,其意欲作为多个方面的说明。可生产许多修饰和变化而不背离其精神和范围,如对于本领域的技术人员会是显而易见的。本公开范围内的功能上等同的方法和设备,以及本文枚举的那些从上文说明对于本领域的技术人员会是显而易见的。这些修饰和变化意欲落入所附权利要求的范围内。本公开仅受所附的权利要求以及这些权利要求所授权的等同方案的全部范围的限制。可理解的是本公开不受限于特定方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,其当然可以变化。还可理解的是本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而并非意欲为限制性的。

[0529] 通过提述并入

[0530] 本文引用的全部参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请出于全部的目的均通过提述以其整体并入。然而,本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请的提及并非也不应该理解为是对它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家中公知常识的部分的承认或任何形式的暗示。

## 序列表

	<110> 弗洛雷森特里克公司 (Fluorescentric, Inc.)	
	<120> 多重探针	
	<130> FLU0-001/00W0	
	<150> US 61/888,754	
	<151> 2013-10-09	
	<160> 78	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 1	
	acctccaatg ccaaacatta ctccttgact caatgtttcc tgtgccagca tgcgcttatt	60
	agacccatgg cc	72
	<210> 2	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
[0001]	<400> 2	
	agcacgcagt tattctgctg gtgcacttgc cacttgcctg ggctcctat acaaacaggat	60
	gggggct	67
	<210> 3	
	<211> 83	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 3	
	atggacgtgg cttagcgtat atttatgctg atggaaaaat ggtaaacgaa gctttagttc	60
	gtcaaggctt ggctaaagtt gct	83
	<210> 4	
	<211> 83	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 4	
	atggacgtgg cttagcgtat atttatgctg atggaaaaat ggtaaacgaa gctttagttc	60
	gtcaaggctt ggctaaagtt gct	83
	<210> 5	
	<211> 67	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 5	
	agcactcagt taitctgctg ggcacttgc cagttgcatg ggcctcatai acaacaggat	60
	gggggct	67
	<210> 6	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 6	
	tggcaatecc aggttttctt ttctacctgt ttgctcaa	38
	<210> 7	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 7	
	cagacccatc ccccaggatga gggactatgg cctcct	36
[0002]	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 8	
	tcaatggctg aggtgagta ccccgagg	30
	<210> 9	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 9	
	tttgcctga gaggcccc tgteccctcc accttccctc ag	42
	<210> 10	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 折叠的发夹样探针实例	
	<400> 10	
	tgcaagagtc accaaaattg ccgagaggcc ccagttagca tccca	45
	<210> 11	

	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 实验室制备	
	<400> 11	
	gatcgatgct agctatggcc cctcagagcc ggtcttgagg ggccata	47
	<210> 12	
	<211> 180	
	<212> DNA	
	<213> 埃博拉病毒	
	<400> 12	
	acatttcggc aaaggatttg agaaacatta tgtatgatca ettgectggt tttggaactg	60
	ctttccacca attagtacaa gtgatttfgta aaftgggaaa agatagcaac tcattggaca	120
	tcattcatgc tgagtccag gccagccitgg ctgaaggaga ctctcctcaa tgtgecctaa	180
	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 13	
	atcaacttgc tggttttgga actgctttcc acc	33
[0003]	<210> 14	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 14	
	ccttcagcca ggctggcctg gaact	25
	<210> 15	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向埃博拉病毒 DNA 的寡核苷酸探针	
	<400> 15	
	tacaagtgat ttgtaaatig gaaaagatag caactcattg gacatcatte atgc	54
	<210> 16	
	<211> 294	
	<212> DNA	
	<213> 噬菌体 SPW	
	<400> 16	
	ccattgccat atttggttat caggtatctg ttagaggggc taaagctaac ccaccaatte	60
	ctgtgccaga gsaataaaat tcccategca attectctgt gageactgaa ataggcggt	120
	gcatgaacaa tagccggtag gtaigtcaga aaacctcaa tgccaacat tactccttga	180
	ctcaatgttt cctgtgccca egatgcgctt attagaacca tggecatcaa aagtgaeccg	240

	agcaccatcg ttgttggat tgaaaagaag tgctgtagta cgttattacc gatg	294
	<210> 17	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 17	
	atggccatcc atatttggit atcaggtatc tcgtagagg ggctaaagct aaccacccat	60
	tcc	63
	<210> 18	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	ggtaataacg tactacatca gcacttcttt tcaatccaac gatggtgctg ggccaact	57
	<210> 19	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0004]	<223> 寡核苷酸探针 - 靶向噬菌体 SPW	
	<400> 19	
	acctccaatg ccaaacatta ctccctgaact caatgtttcc tgtgcccacg atgecctat	60
	tagaccatg gcc	73
	<210> 20	
	<211> 365	
	<212> DNA	
	<213> 甲型流感病毒	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (46)..(46)	
	<223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (209)..(209)	
	<223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (215)..(215)	
	<223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (226)..(226)	
	<223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (238)..(238)	

	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<222> (285)..(285)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 20	
	gagtgagcga ggactgcagc gtagacgctt tgcceaaaat gccctnaatg ggaatgggga	60
	lccaataaca tggacagagc agttaaactg tataggaagc ttaagggata acgttccatg	120
	ggcccaaaga aatagcactc agttattvtg ctggigcact tgcacgttgc atgggcctca	180
	tatacaacag gatgggggct gtgaccacng aagcngcatt ggcctngtat gtgcaacntg	240
	tgaacagatt gctgactcce agcataggtc tcataggcaa tggtnacaac aaccaatcca	300
	ttaataagac atgagaacag aatggttctg gccagcacta cagctaaggc tatggagcaa	360
	atggc	365
	<210> 21	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 甲型流感病毒	
	<400> 21	
	gtgagcgagg actgcagcgt agacgcttig tccaaaatgc c	41
	<210> 22	
	<211> 66	
	<212> DNA	
[0005]	<213> 甲型流感病毒	
	<400> 22	
	gccatttgc tccatagcctt agctgtagtg ctggccagaa ccaattcigt cteatgtctt	60
	attaat	66
	<210> 23	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针 - 靶向 Flu mat A 序列	
	<400> 23	
	agcactcagt tattctctgt gtgcacttgc cagttgcatg gccctcatat acaacaggat	60
	gggggct	67
	<210> 24	
	<211> 254	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)	
	<400> 24	
	agcaagtgca ttacgaaaa aatggtaga aatgcaaag aaaattgaag tcgagtttga	60
	caaaggccaa agaactgata aatatggacg tggcttagcg tatatttatg ctgatggaaa	120
	aatggtaac gaagctttag ttcgcaagg cttggctaaa gttgcitatg tttataaacc	180
	taacaataca caigaacaac ttttaagaaa aagtgaagca caagegaaaa aagagaaatt	240
	aaatatttgg agcg	254

	<210> 25	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
	<400> 25	
	agcaagtgca ttacgaaaa aatggtaga aatgcaaag aaaattgaag tcgagt	56
	<210> 26	
	<211> 77	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
	<400> 26	
	cgetccaaat atttaatttc tctttttttg ettgtgettc acitttttctt aaaagttgtt	60
	catgtgtatt gttaggt	77
	<210> 27	
	<211> 83	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针 - 靶向金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
	<400> 27	
	atggacgtgg cttagcgtat atttatgctg atggaaaaat ggtaaacgaa gcttttagtgc	60
	gtcaaggctt ggctaaagtt gct	83
[0006]	<210> 28	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针 - 靶向金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
	<400> 28	
	agcactcagt tattctgctg gtgcacttgc cagttgcatg ggctccatat acaacaggat	60
	gggggct	67
	<210> 29	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 实验室制备 - 引物	
	<400> 29	
	agggcggtgc atgaacaata gccggtaggt atgtcagaaa acctccaa	48
	<210> 30	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 实验室制备 - 引物	
	<400> 30	
	atggccatgg gtctataaag cgcctcgtgg gcacaggaa	39

	<210> 31	
	<211> 180	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 实验室制备 - 靶序列	
	<400> 31	
	aagaggggaag agggggaggg cggtgcata acaatagccg gtaggtaigt cagaaaacct	60
	ccaatgccaa acattactcc ttgactaat gtttcctgtg cccacgatgc gttattaga	120
	cccatggcca tcaaaagtga cccgagcacc atcgtttggt ggattgaaaa gaagtgctgt	180
	<210> 32	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成区序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 32	
	gtgtgggaag aggggganga gggggaggag c	31
[0007]	<210> 33	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成区序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 33	
	gtgctctccc ctctccctc ttcccacac	30
	<210> 34	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成区序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 34	
	gtgtgggaag aggggganga gggggaggag c	31
	<210> 35	
	<211> 30	
	<212> DNA	



	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成区序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 35	
	getgcctccc ctctccctc ttccccacac	30
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
	<400> 36	
	ggagggggag aagggagaag gg	22
	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
[0008]	<400> 37	
	cccttctccc ttctccccct cc	22
	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
	<400> 38	
	ggtgggggtg ttgggtgtg gg	22
	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
	<400> 39	
	ggtgggggtg ttgggtgtg gg	22
	<210> 40	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
	<220>	

	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(18)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 40	
	gtgtgggaag aggggganga gggggaggag c	31
	<210> 41	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 三聚体形成序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> n是 a、c、g 或 t	
	<400> 41	
	gtgtcctccc ctctcctcctc ttecccaaac	30
	<210> 42	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400> 42	
[0009]	ttttttcccg tcc	13
	<210> 43	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400> 43	
	ggacgggaaa aa	12
	<210> 44	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 刺猬绦虫( <i>Spirometra erinaceieuropaei</i> )	
	<400> 44	
	gscgaggggg gagcggg	17
	<210> 45	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 犬弓蛔虫( <i>Toxocara canis</i> )	
	<400> 45	
	cccgtcccc cctcgcc	17
	<210> 46	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 未知	

	<220>		
	<223>	双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400>	46	
		ggaggtgggg gag	13
	<210>	47	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	未知	
	<220>		
	<223>	双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400>	47	
		ctccccacc tcc	13
	<210>	48	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	未知	
	<220>		
	<223>	双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400>	48	
		ggaggtgggg gag	13
	<210>	49	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	未知	
[0010]	<220>		
	<223>	双链 DNA 中天然存在的 TFR 序列	
	<400>	49	
		ctccccacc ctcc	14
	<210>	50	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人腺病毒 D 株	
	<400>	50	
		cgtgagctcg tcttcaggga gccfgat	27
	<210>	51	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人腺病毒 D 株	
	<400>	51	
		gtctcccggt gctcgcct	20
	<210>	52	
	<211>	480	
	<212>	DNA	
	<213>	人腺病毒 D 株	
	<400>	52	
		ctgggcattg cgggcccaga ccgtgagctc gtcttcagg agcctgatga gctcggcgt	60
		gacccgtaac gcccgctct ggcactcgag cagaaggctc tcggactact cgagccgcta	120
		gatggcgcc acctcgcct cgaatcccc gggggcctcc tcttcttctc ettcttceat	180

	ccaccgcgcg tggagcgcga gctttagggg cccccggagg agaagaagga gaagaaggta	240
	gacgacctct tcttctatit cttcctctgg gggcgggtgt ggtggcgggg cccgacgacg	300
	ctgctggaga agaagataaa gaaggagacc cccgccacca ccaccgccc gggtctctgc	360
	acggcgacgc accgggagac ggtcgacgaa gcgctcgatc atctccccgc ggcggcgacg	420
	tgccgctgcg tggccctctg ccagctgctt cgcgagctag tagagggcg ccgccctgc	480
	<210> 53	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 53	
	ggaggagag gagaagaga aggta.	25
	<210> 54	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 54	
	tittaggagg agaaggagaa gaagaaggta aaa	33
[0011]	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 55	
	ggaggagaag gagaagaaga aggta.	25
	<210> 56	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 56	
	ggaggagaag gagaagaaga aggta.	25
	<210> 57	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 57	
	ggaggagaag gaggagaaga aggta.	25
	<210> 58	
	<211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 58	
	ggaggagaag gagaagaaga aggta	25
	<210> 59	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 59	
	ggaggagaag gagaagaaga aggta	25
	<210> 60	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 靶向腺病毒科 DNA 的探针	
	<400> 60	
	ggagaagaag ataaagaagg aga	23
[0012]	<210> 61	
	<211> 180	
	<212> DNA	
	<213> 埃博拉病毒	
	<400> 61	
	tgtaaagccg tttcctaaac tctttgtaat acatactagt gaacggacca aaaccttgac	60
	gaaaggtggf taatcatggt cactaaacat ttaacccttt tctatcgttg agtaacctgt	120
	agtaagtacg actcaaggtc cggtcggacc gacttcctct gagaggagtt acacgggatt	180
	<210> 62	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 62	
	gcacataagt tgataattag tgagttgggt gatacataca caagggt	47
	<210> 63	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 63	
	cgtgtattca actattaatc actcaaccca ctatgstatgt gttecca	47
	<210> 64	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>		
<223>	引物	
<400>	64	
	ggttgaagaa gttgaggaag aggttgaaga agtgctgag	39
<210>	65	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo sapiens)	
<400>	65	
	ccaactttctt caactccttc tccaacttctt tcacgactc	39
<210>	66	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	66	
	agaaatctcg tgcccaaacc iggtgatgga tcc	33
<210>	67	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo sapiens)	
<400>	67	
	tctttagagc acgggtttgg accactacctt agg	33
[0013]		
<210>	68	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	68	
	agaaatctcg tgcccaaacc iggtgatgaa tcc	33
<210>	69	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo sapiens)	
<400>	69	
	tctttagagc acgggtttgg accactacctt agg	33
<210>	70	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	70	
	atgtaaggaa gtccaaatgt tcacctgaag acaactgtgg t	41
<210>	71	
<211>	41	
<212>	DNA	

	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 71	
	tacattccctt caggtttaca agtggacttc igtfgacacc a	41
	<210> 72	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 72	
	gcctctggca acagtaaagc aggggcat	28
	<210> 73	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 73	
	eggagaccgt igtccatttcg tccccgta	28
	<210> 74	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0014]	<400> 74	
	tggcaatccc aggttctctt ttctaccgt ttgtcaa	38
	<210> 75	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 75	
	accgtaggg tccaagaaa aagatggaca aacgagt	38
	<210> 76	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 76	
	tggcaatccc aggttttctt ttctaccgt ttgtcaa	37
	<210> 77	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 77	
	accgtaggg tccaaaagaa aagatggaca aacagt	37
	<210> 78	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 停乳链球菌( <i>Streptococcus dysgalactiae</i> )	
[0015]	<400> 78	
	ggagaaggtg aggaagaaga agaggaagaa	30

引物和模板的溶解温度重叠

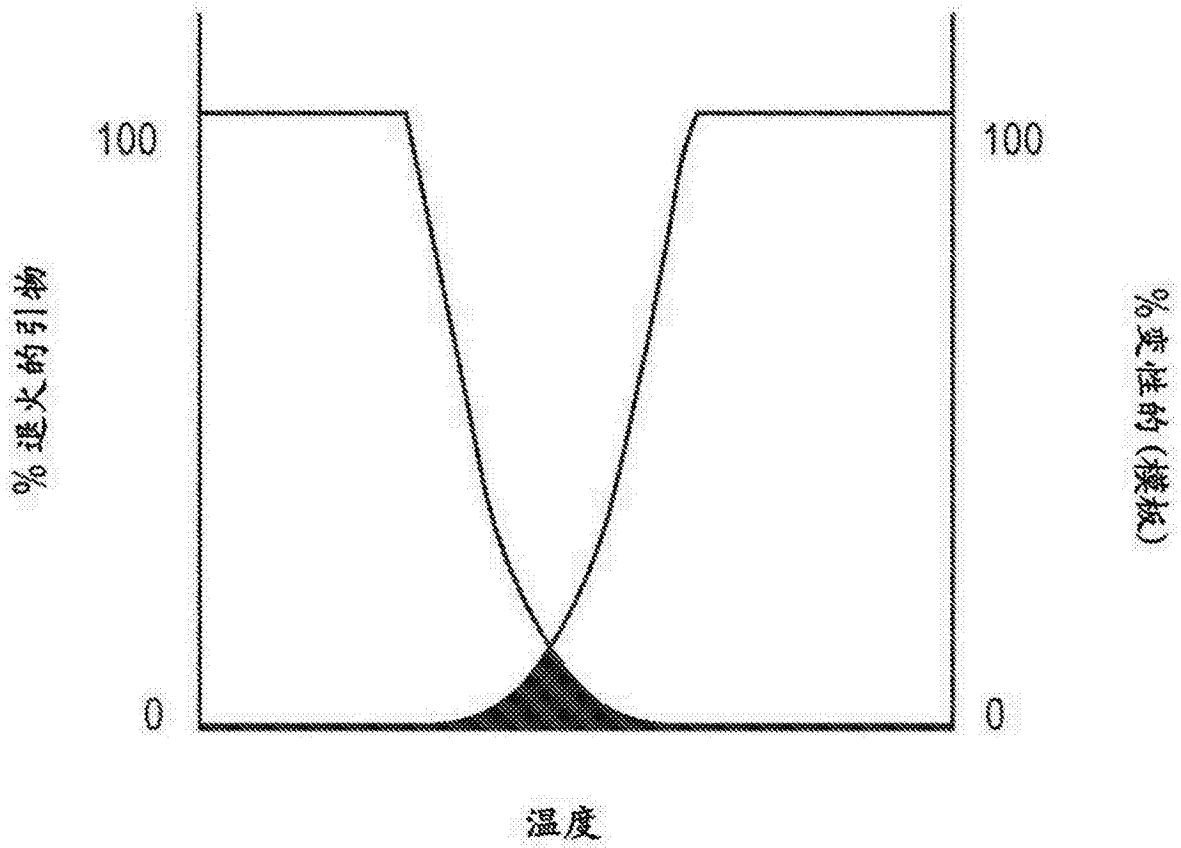


图1



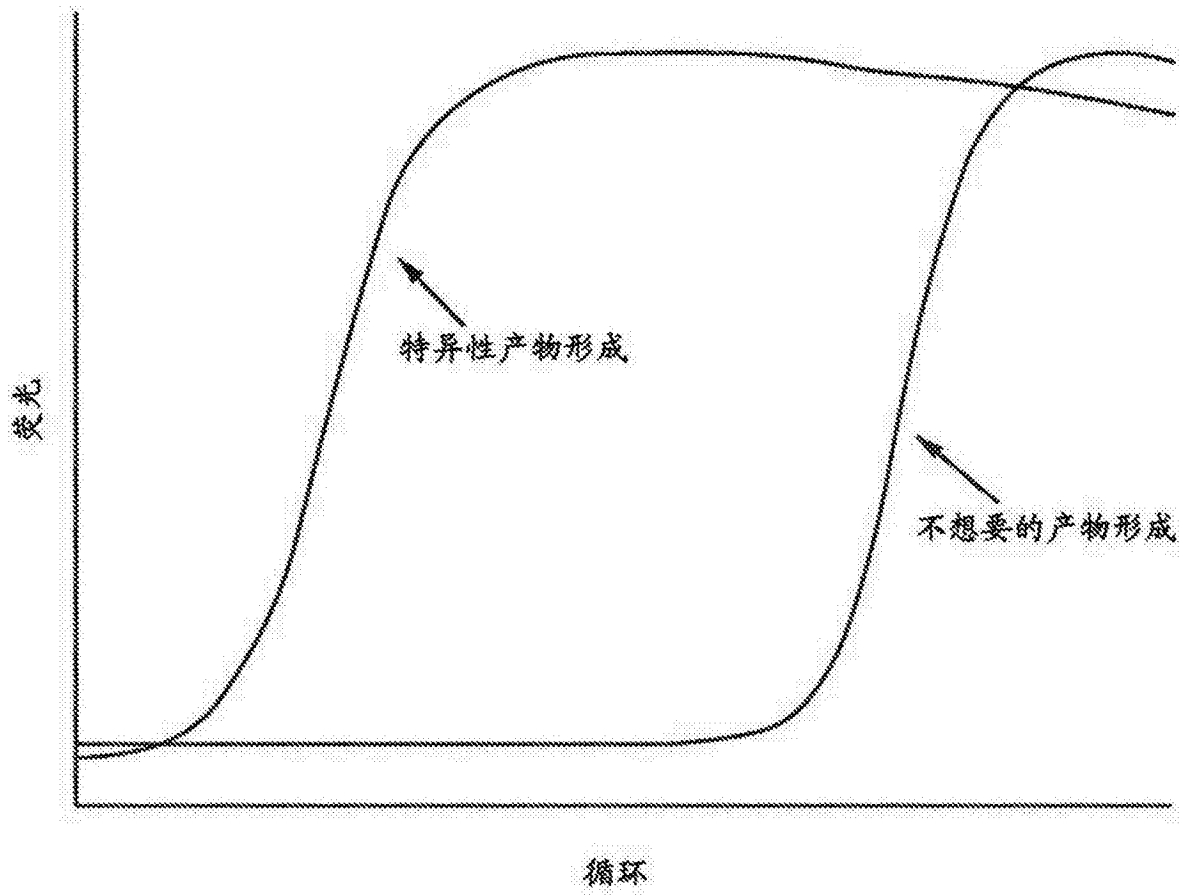


图2

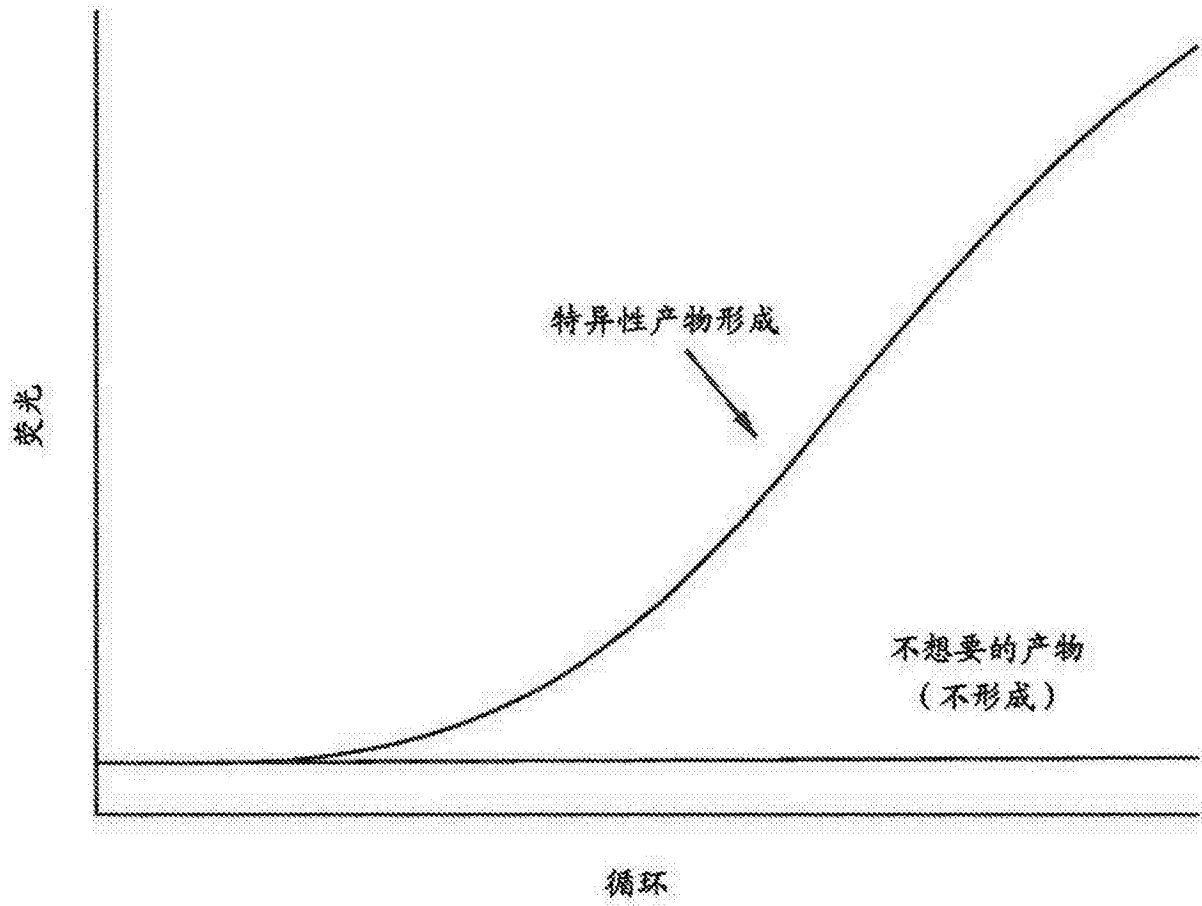


图3

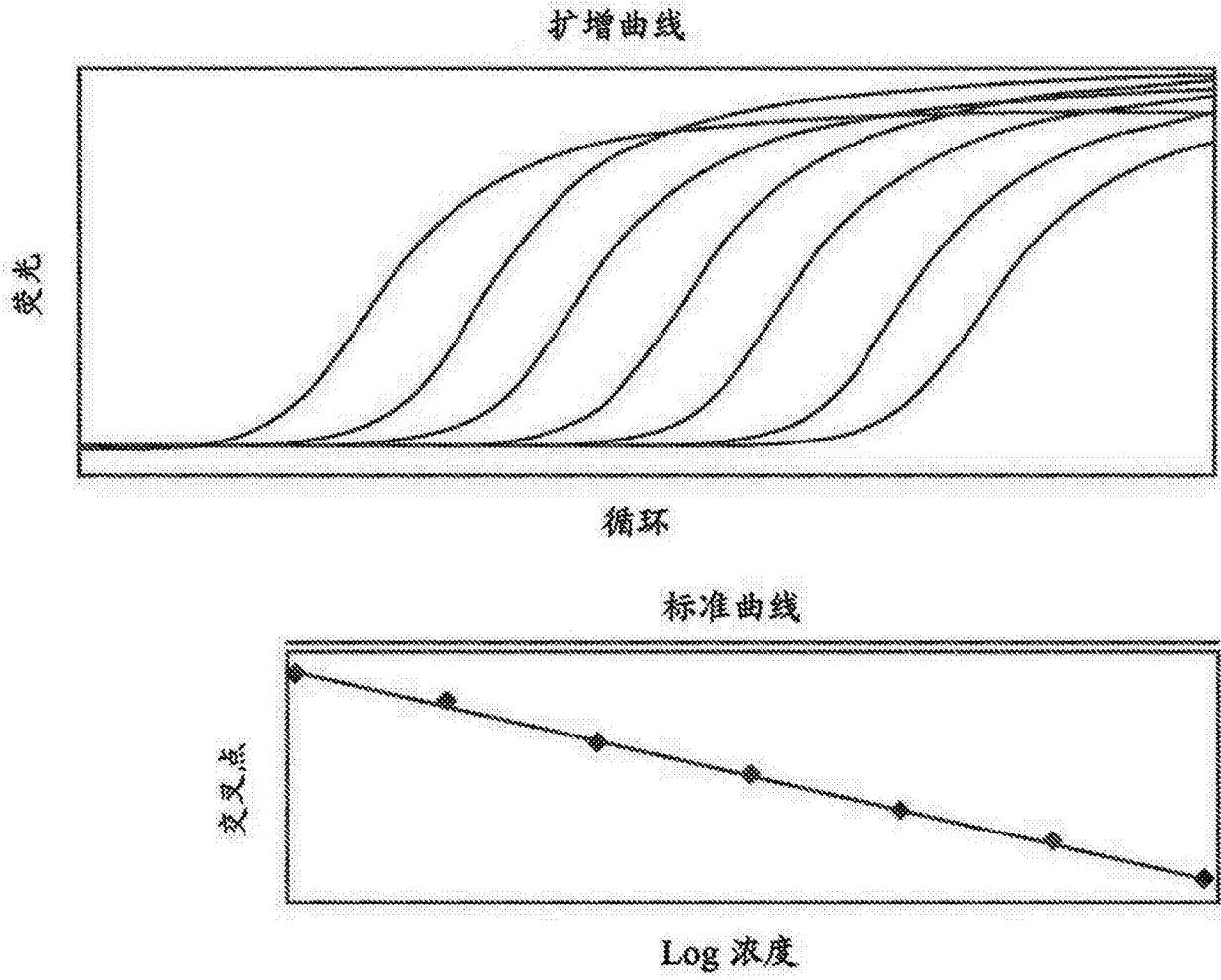
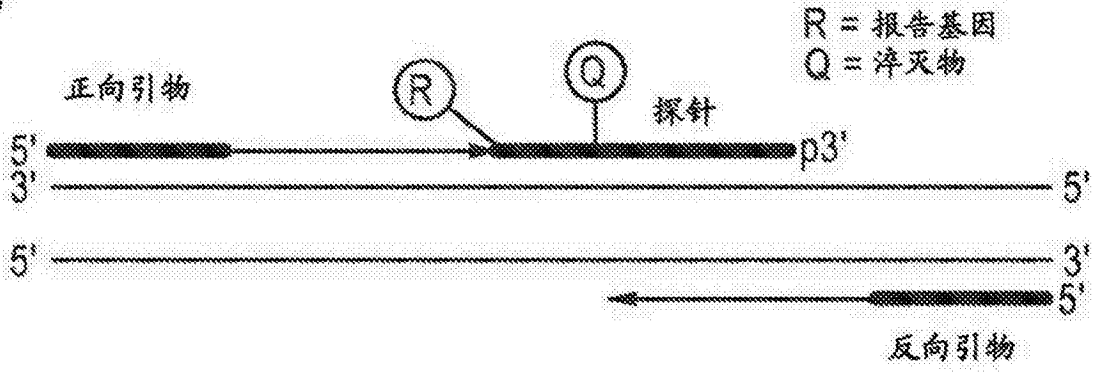
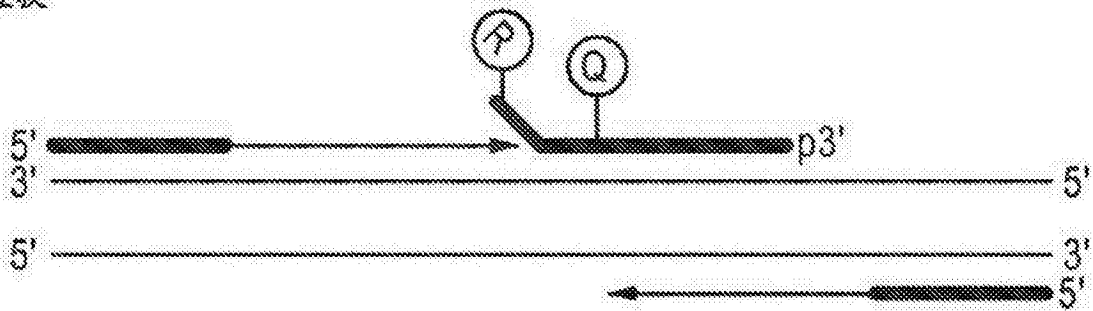


图4

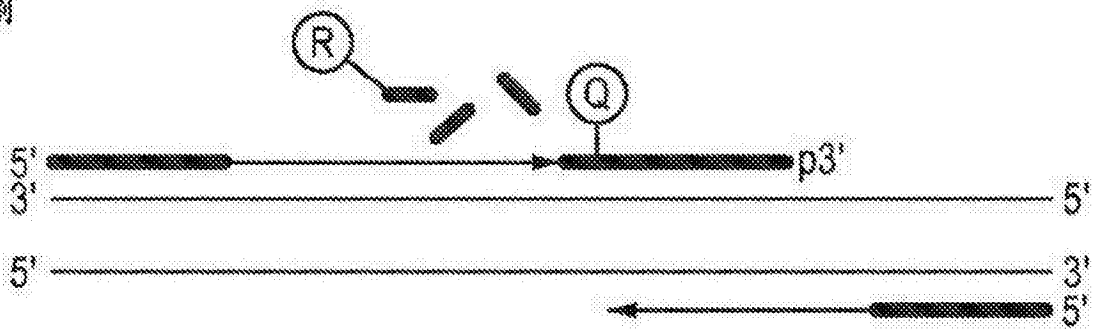
聚合



链置换



切割



聚合完成

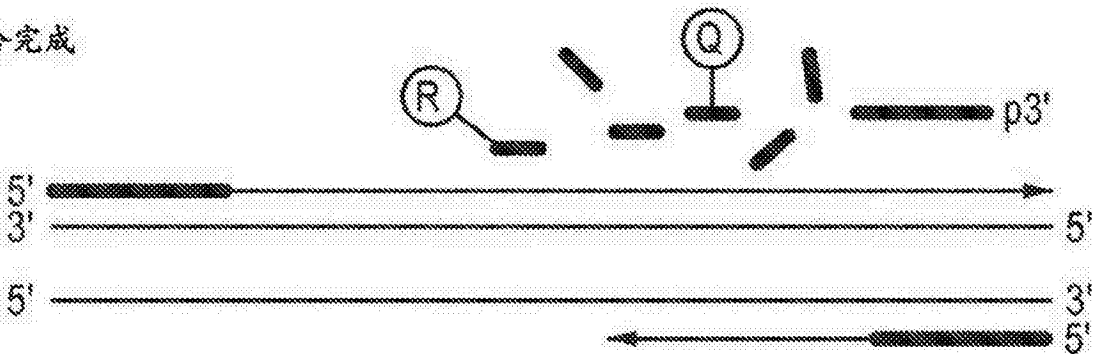


图5

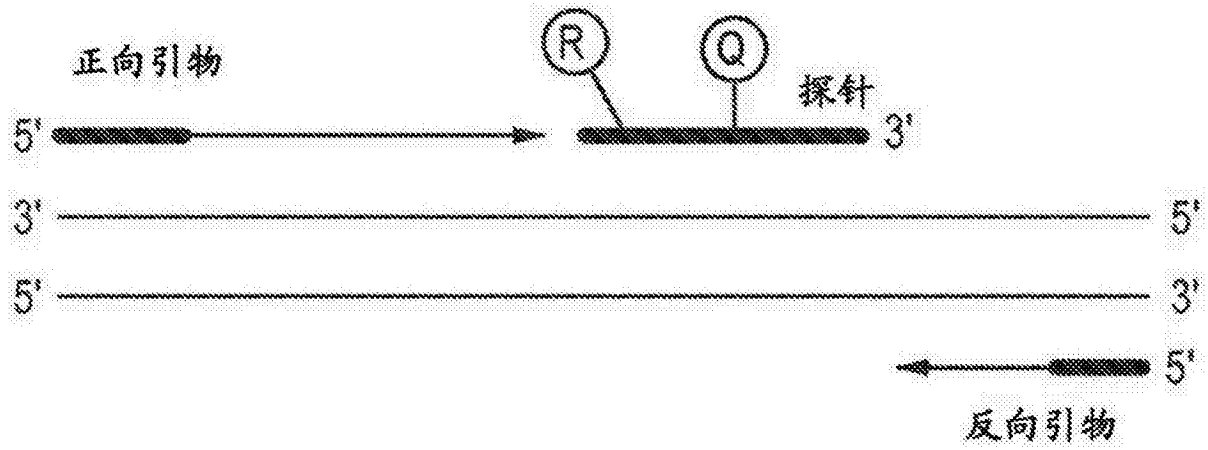


图6

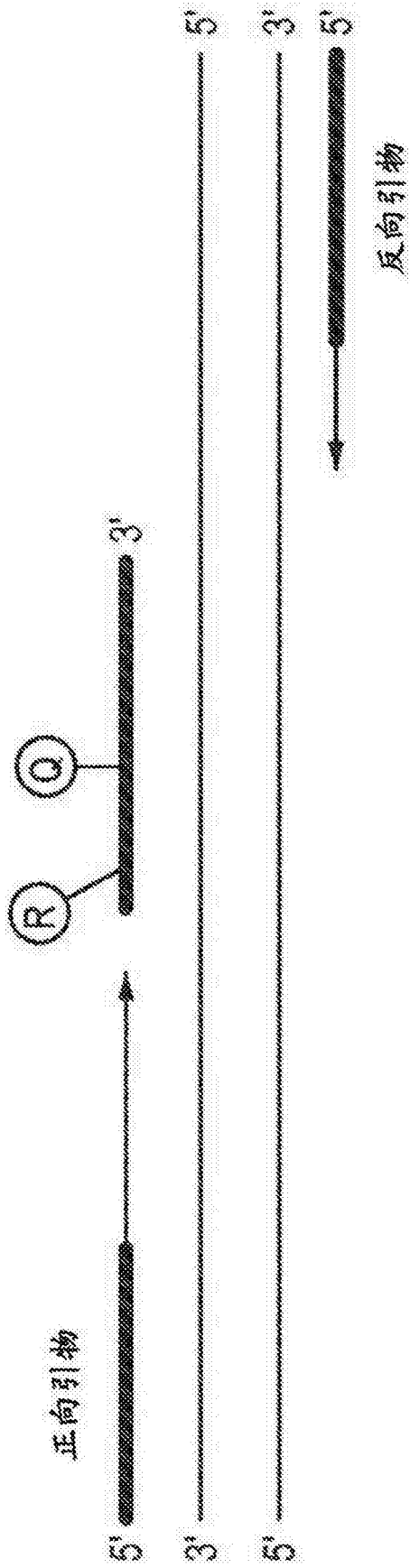


图7

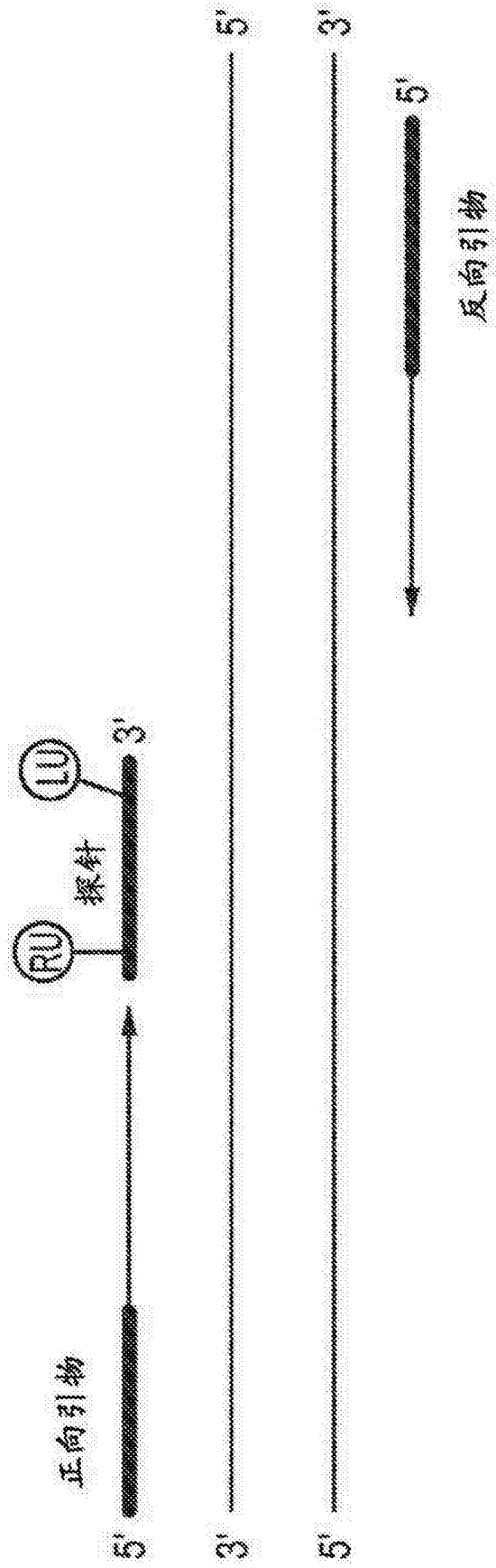


图8

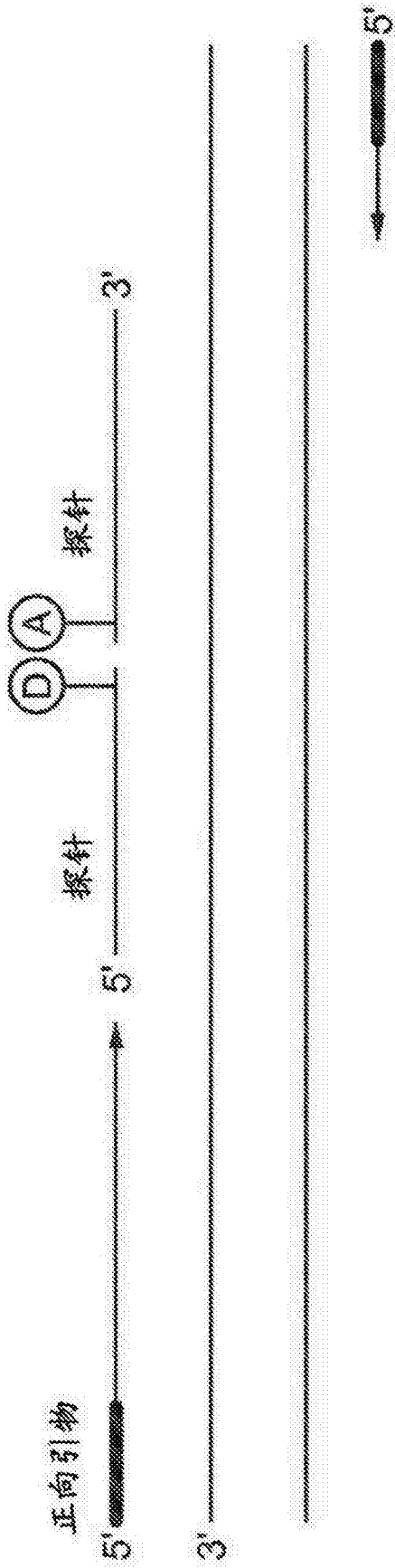


图9

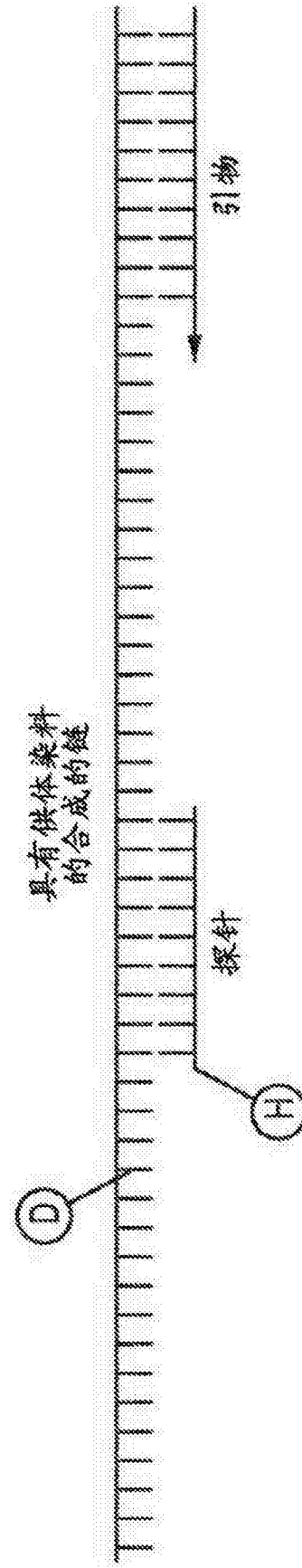


图10



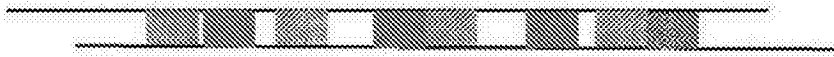
图11



淬灭的



淬灭的



Ex494 Em650

图12



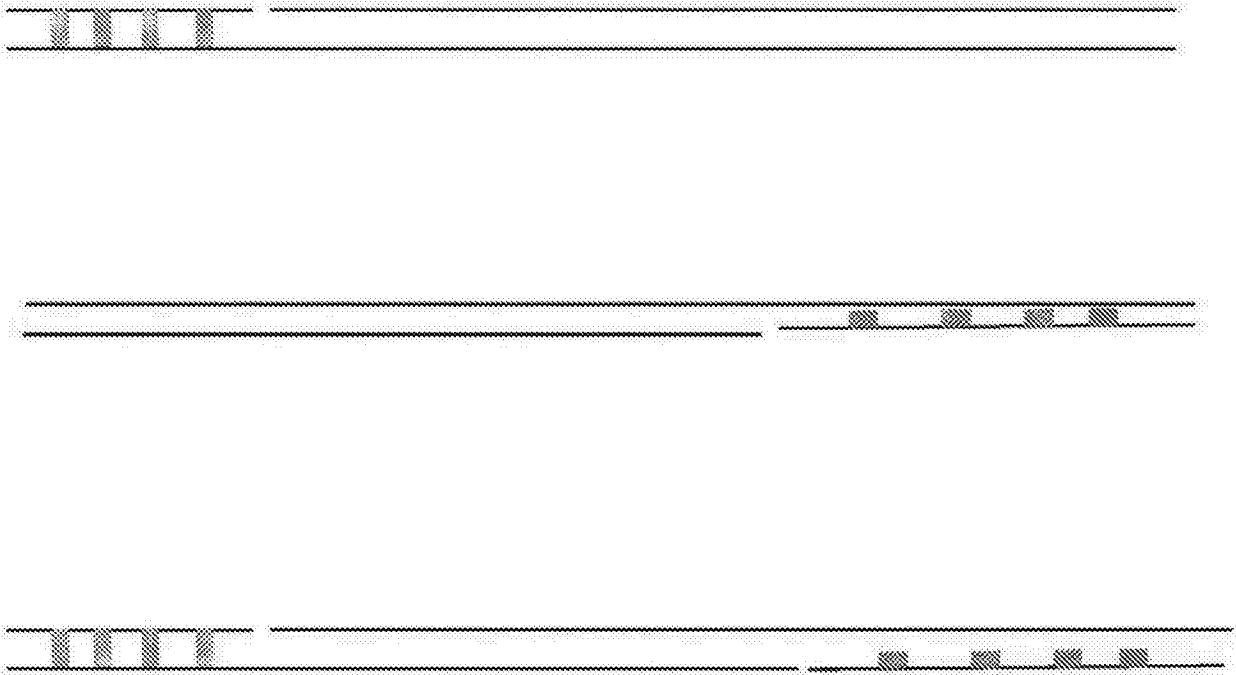


图13

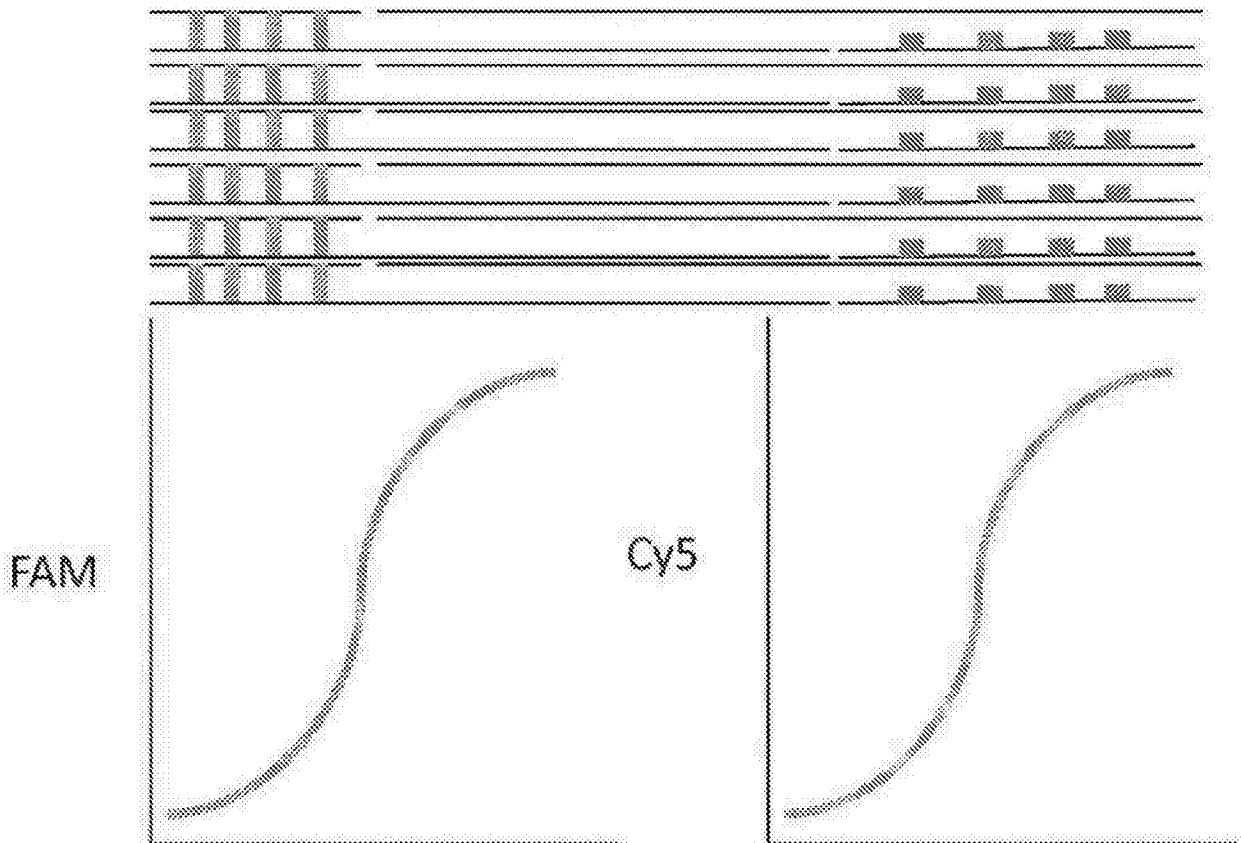


图14

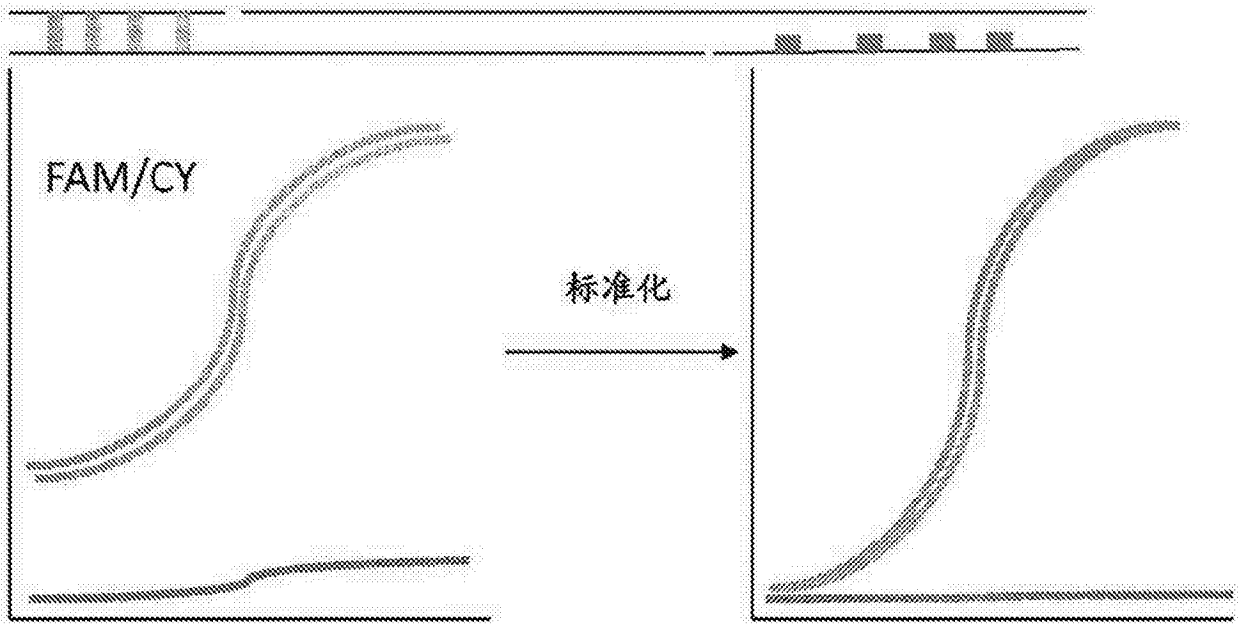


图15

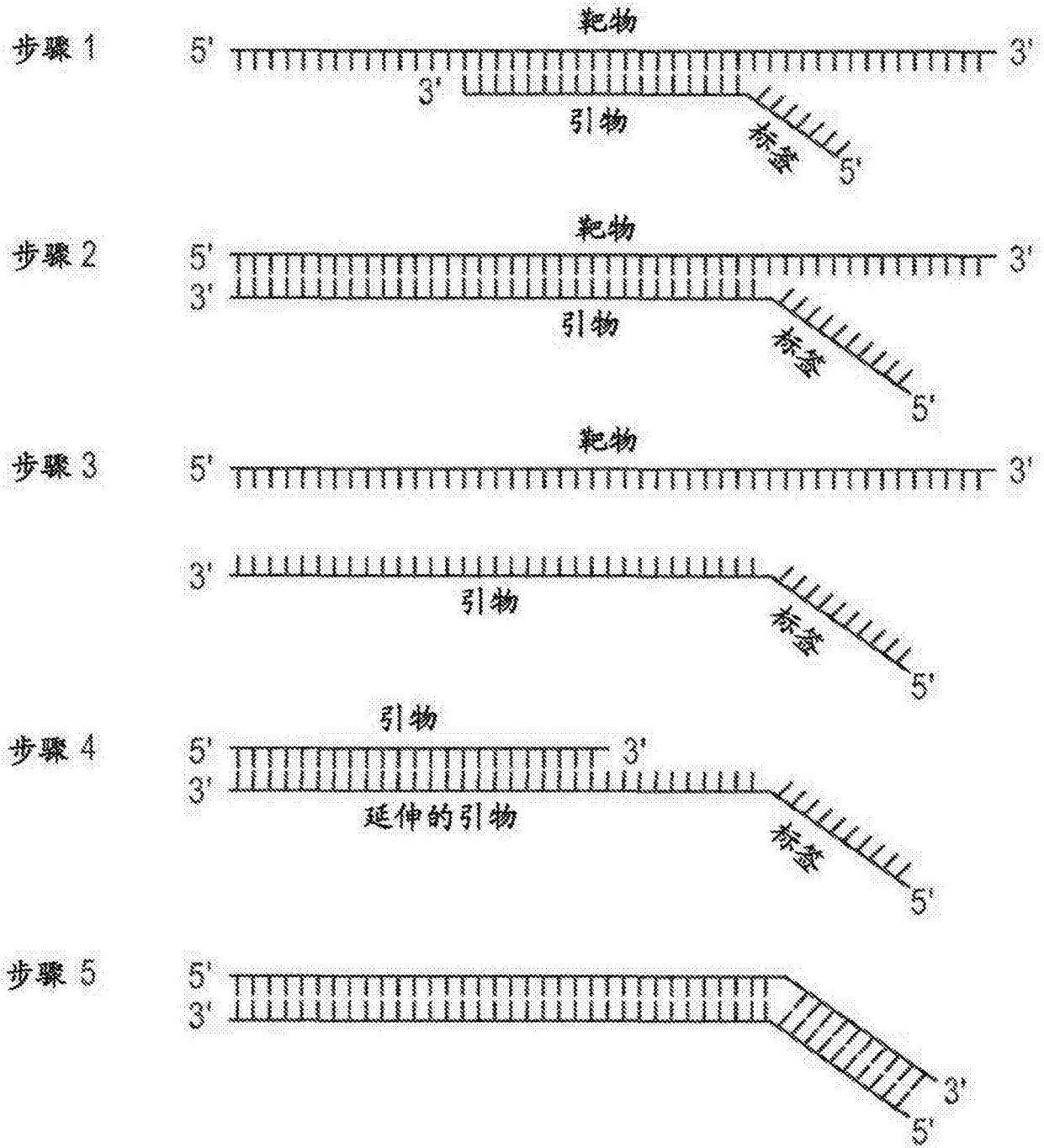


图16

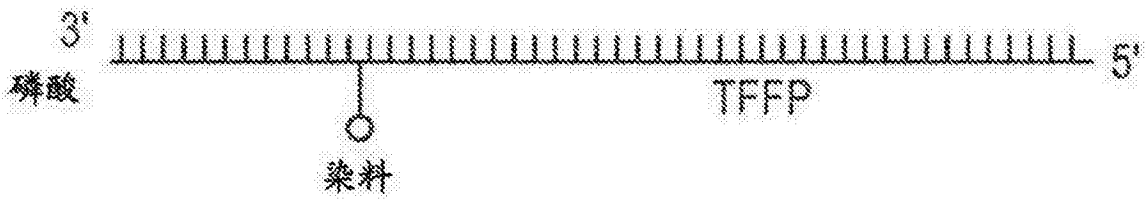


图17

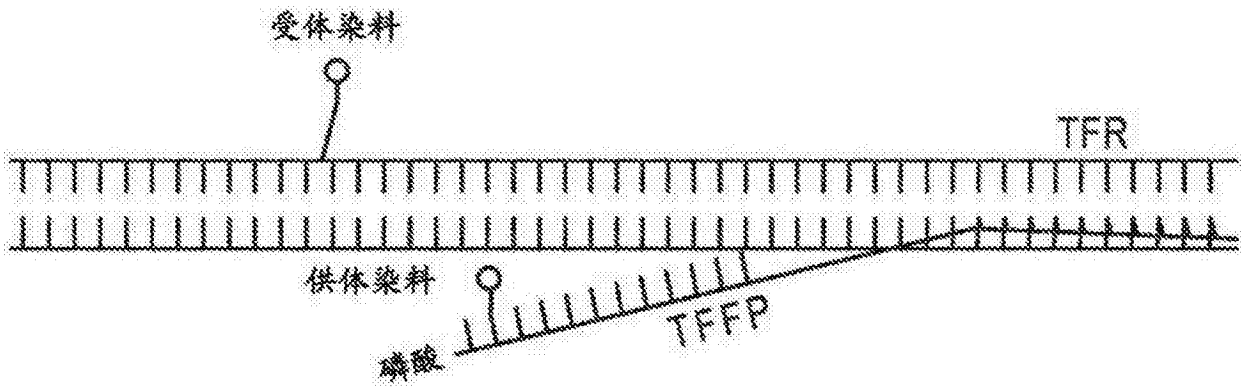


图18

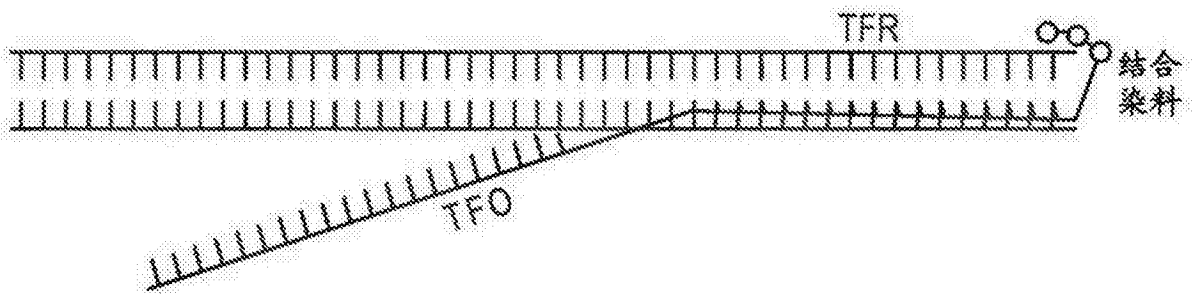


图19

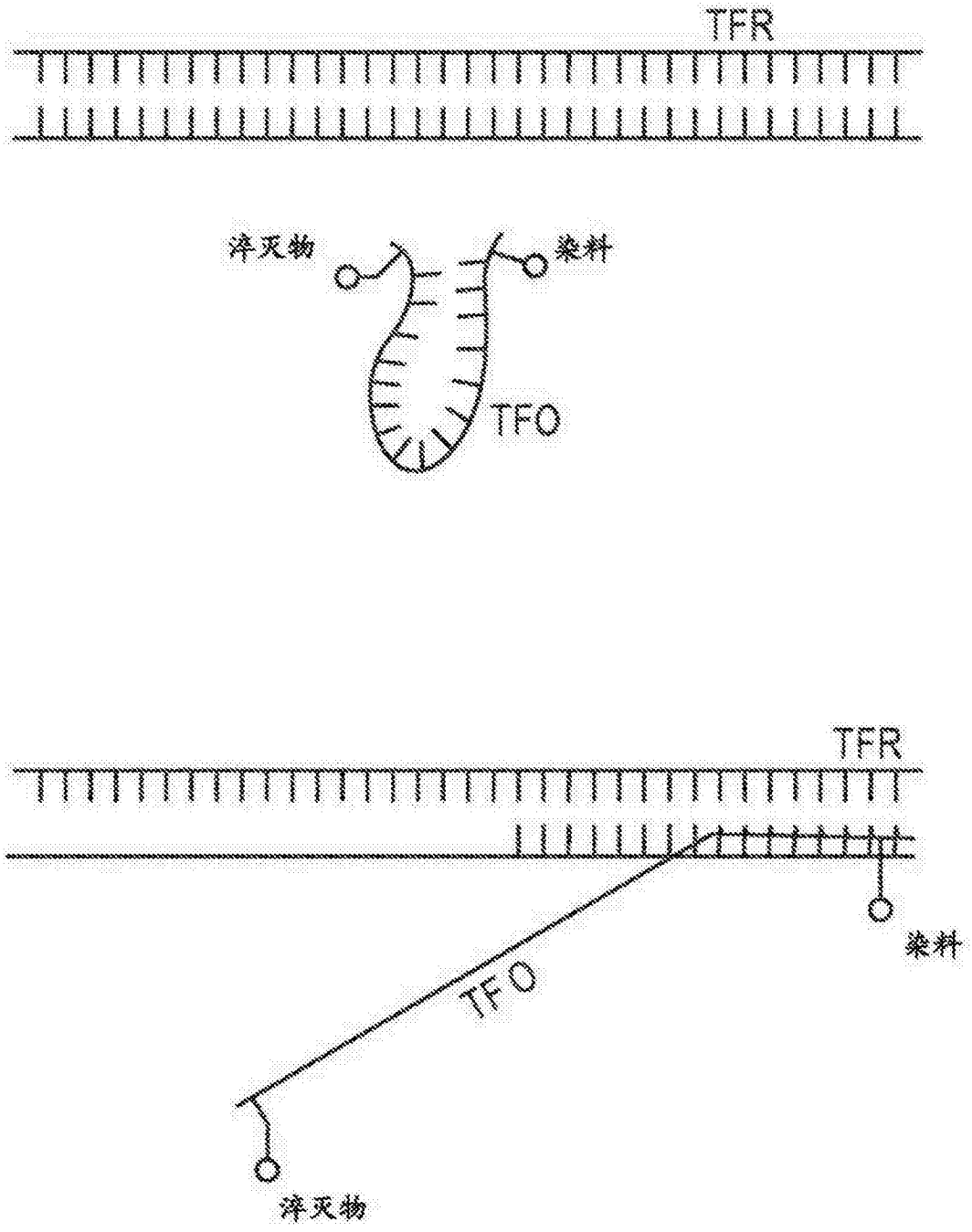


图20

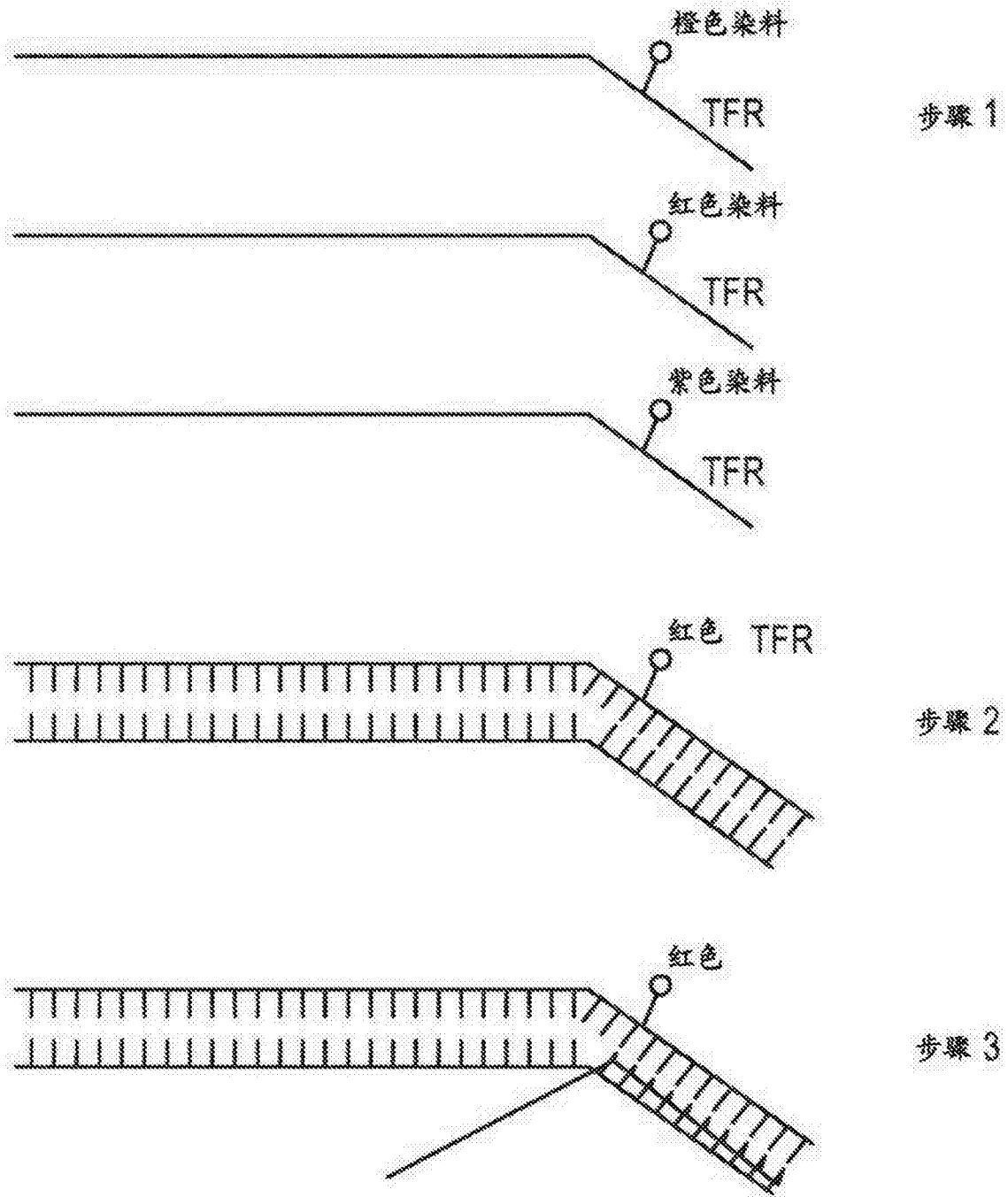


图21

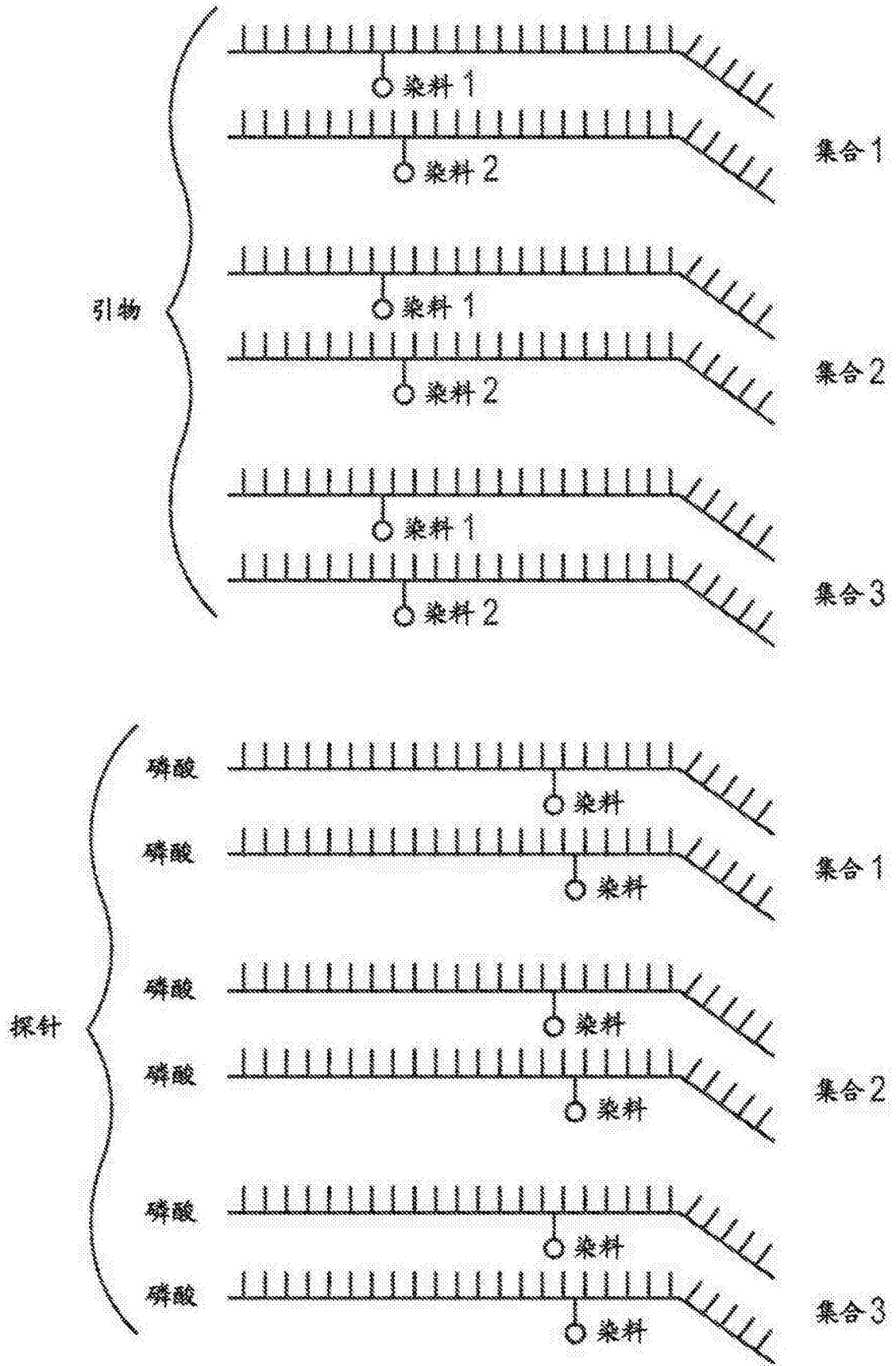


图22

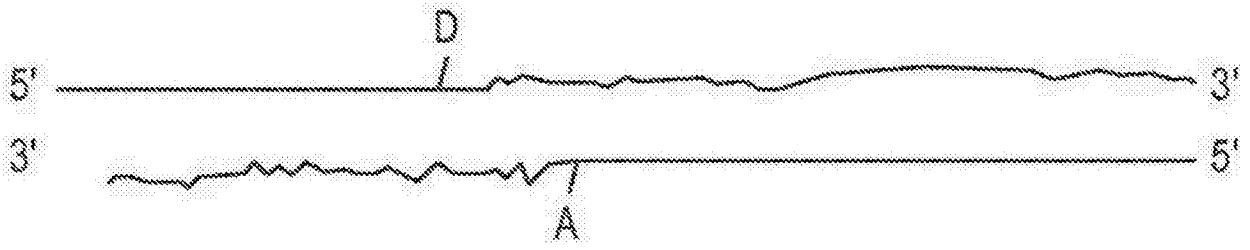


图23

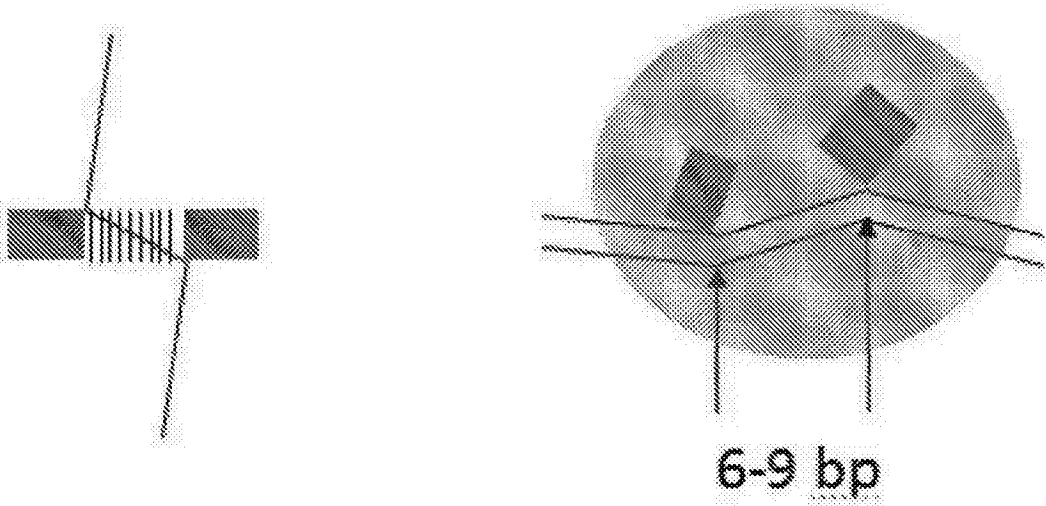


图24