



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115349019 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 15

(21) 申请号 202180020100.9

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

(22) 申请日 2021.01.15

专利代理师 张珂珂 朱雯

(30) 优先权数据

2000672.2 2020.01.16 GB

2000673.0 2020.01.16 GB

62/961,816 2020.01.16 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6834 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/050098 2021.01.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/144587 EN 2021.07.22

(71) 申请人 DNAE诊断有限公司

地址 英国伦敦

权利要求书4页 说明书64页

序列表9页 附图20页

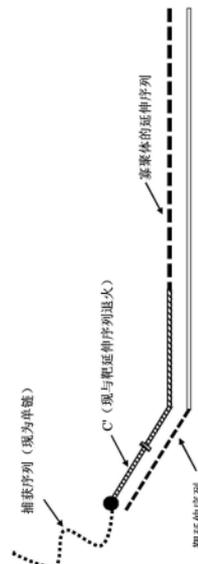
(72) 发明人 诺姆·纳尔逊 戴维·伍尔德里奇

(54) 发明名称

用于分离靶多核苷酸的组合物、试剂盒和方法

(57) 摘要

本文提供了用于捕获靶多核苷酸的寡聚体、组合物、试剂盒和方法,例如用于诸如扩增、文库制备或测序之类的下游应用。在一些实施方案中,提供或使用包含与互补序列退火的捕获序列的捕获寡聚体,捕获序列可阻止捕获,直到互补序列以靶-多核苷酸依赖性方式被置换为止。在一些实施方案中,捕获的靶多核苷酸的量小于或等于预定量。



1. 一种捕获寡聚体,其在5'至3'方向上包含:
捕获序列,
内部延伸阻断子,
所述捕获序列的互补序列,和
靶杂交序列,
其中所述捕获序列的互补序列被配置为当不存在与所述靶杂交序列以及所述捕获序列的互补序列退火的延伸靶序列时与所述捕获序列退火。
2. 根据权利要求1所述的捕获寡聚体,其中所述捕获寡聚体具有下式:
5'-A1-C-L-B-A2-C'-A3-RB-A4-THS-X-3',
其中A1为任选存在的第一附加序列;
C为所述捕获序列,
L为任选存在的接头,
B为所述内部延伸阻断子,
A2为任选存在的第二附加序列,
C'为所述捕获序列的互补序列,
A3为任选存在的第三附加序列,
RB为任选存在的可逆延伸阻断子,
A4为任选存在的第四附加序列,
THS为所述靶杂交序列;以及
X为任选存在的阻断部分。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的捕获寡聚体,其包含位于所述捕获序列和所述内部延伸阻断子之间的接头,所述接头任选地为核苷酸序列或非核苷酸接头或它们的组合。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的捕获寡聚体,其中所述内部延伸阻断子包含下列中的任意一者或以上:非核苷酸接头、或者一个或以上脱碱基位点、非天然核苷酸、或者经化学修饰的天然核苷酸。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的捕获寡聚体,其中所述捕获寡聚体包含位于所述靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子。
6. 根据权利要求5所述的捕获寡聚体,其中所述捕获寡聚体包含位于所述捕获序列的互补序列的3'以及所述靶杂交序列的5'的第三附加序列,任选地,其中所述第三附加序列包含衔接序列,并且所述可逆延伸阻断子位于所述衔接序列的3'。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的捕获寡聚体,其中所述捕获寡聚体包含位于所述可逆延伸阻断子的3'以及所述靶杂交序列的5'的第四附加序列,任选地,其中所述第四附加序列包含衔接序列。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的捕获寡聚体,其包含位于所述内部延伸阻断子和所述捕获序列的互补序列之间的第二附加序列,任选地,其中所述第二附加序列包含混合核苷酸区段。
9. 根据权利要求8所述的捕获寡聚体,其中所述可逆延伸阻断子包括:Iso-dC或Iso-dG、黄嘌呤或5-(2,4-二氨基嘧啶)、2-氨基-6-(N,N-二甲基氨基)嘌呤或吡啶-2-酮、4-甲基苯并咪唑或2,4-二氟甲苯、7-氮杂吡啶或异喹诺酮、dMMO2或d5SICS、dF或dQ;一个或多个经

化学修饰的核苷酸,其中所述修饰为通过可逆连接键进行附接,并且所述连接键可以通过提供以下任意一者或以上而逆转:化学品、酶、温度变化、试剂组成变化;可逆的核酸结构特征;或与所述捕获寡聚体可逆结合的分子,任选地,其中所述可逆结合的分子为蛋白质、酶、脂质、碳水化合物或化学部分。

10. 一种组合,其包含前述权利要求中任一项所述的捕获寡聚体或其组合,其中所述捕获寡聚体包含位于所述靶杂交序列的5'的衔接序列,并且所述组合还包含阻断子寡聚体,所述阻断子寡聚体包含衔接序列并且不可延伸,任选地,其中所述阻断子寡聚体被配置为以比所述捕获寡聚体的衔接序列更高的亲和性结合所述衔接序列的互补序列,或与所述衔接序列的互补序列形成比所述捕获寡聚体的衔接序列和所述衔接序列的互补序列的复合体具有更高的解链温度的复合体。

11. 一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,所述方法包括:

使所述靶多核苷酸与权利要求1至9中任一项所述的捕获寡聚体接触,其中在包含所述靶多核苷酸的3'端的位点处,所述捕获寡聚体的靶杂交序列与所述靶多核苷酸退火;

用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸所述靶多核苷酸的3'端,从而形成所述捕获序列的互补序列的互补序列,其与所述捕获寡聚体退火,使得所述捕获寡聚体的捕获序列可用于结合;

使所述捕获寡聚体的捕获序列与包含所述捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含所述靶多核苷酸、所述捕获寡聚体和所述第二捕获试剂的复合体;以及

从所述组合物中分离所述复合体,从而捕获所述靶多核苷酸。

12. 一种包含捕获寡聚体和互补寡聚体的组合,其中:

(a) 所述捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

捕获序列,其包含第一部分和第二部分,

内部延伸阻断子,

间隔序列,其包含第一部分和第二部分,和

靶杂交序列;以及

(b) 所述互补寡聚体在3'至5'方向上包含:

所述捕获序列的第二部分的互补序列,和

所述间隔序列的至少第一部分的互补序列,其中所述捕获序列的第二部分的互补序列和所述间隔序列的至少第一部分的互补序列被配置为当不存在所述间隔序列的互补序列时,同时与所述捕获寡聚体退火。

13. 根据权利要求12所述的组合,其中所述捕获寡聚体具有下式:

5'-A1-C1-C2-B-A2-S1-S2-A3-RB-A4-THS-X-3'

其中A1为任选存在的第一附加序列,

C1为所述捕获序列的第一部分,

C2为所述捕获序列的第二部分,

B为所述内部延伸阻断子,

A2为任选存在的第二附加序列,

S1为所述间隔序列的第一部分,

S2为所述间隔序列的第二部分，
A3为任选存在的第三附加序列，
RB为任选存在的可逆延伸阻断子，
A4为任选存在的第四附加序列，
THS为所述靶杂交序列，以及
X为任选存在的阻断部分。

14. 根据权利要求12或13中任一项所述的组合，其中所述互补寡聚体具有下式：

5'-S1'-A2'-L-C2'-X-3'

其中S1'为所述间隔序列的至少第一部分的互补序列，
A2'为任选存在于所述捕获寡聚体中的第二附加序列的任选存在的互补序列；
L为任选存在的接头，
C2'为所述捕获序列第二部分的互补序列，以及
X为任选存在的阻断部分。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的组合，其中所述捕获寡聚体和/或互补寡聚体在其3'端包含阻断部分。

16. 根据权利要求12至15中任一项所述的组合，其中如果所述捕获寡聚体的间隔序列被单独的互补序列占据，则所述捕获序列的第二部分的互补序列不足以在65°C或高于65°C的温度稳定地与所述捕获寡聚体的捕获序列退火。

17. 根据权利要求12至16中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中所述捕获序列包含poly A或poly T，并且所述捕获序列的互补序列或所述捕获序列的第二部分的互补序列包含poly T或poly A。

18. 根据权利要求12至17中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中所述捕获寡聚体包含衔接序列作为部分或全部的所述间隔序列，或者作为部分或全部的所述间隔序列的3'的第三附加序列或所述靶杂交序列的5'的第四附加序列。

19. 根据权利要求12至18中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中例如，所述捕获寡聚体包含位于所述靶杂交序列中的增强亲和性的修饰（例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上）。

20. 根据权利要求12至19中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中所述捕获寡聚体包含位于所述靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子。

21. 根据权利要求12至20中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其包含位于所述内部延伸阻断子和所述间隔序列的第一部分之间的第二附加序列，其中所述第二附加序列包含混合核苷酸区段。

22. 根据权利要求12至21中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其进一步包含第二捕获试剂，所述第二捕获试剂包含所述捕获序列的互补序列和(a)结合配偶体（例如生物素）或(b)固体载体（例如珠粒或表面）。

23. 根据权利要求12至22中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其进一步包含置换寡聚体，所述置换寡聚体包含置换靶杂交序列，所述置换靶杂交序列被配置为以一定的取向结合所述靶多核苷酸，其中所述置换靶杂交序列的3'端朝向由所述捕获寡聚体的

靶杂交序列结合的位点取向。

24. 一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,所述方法包括:

使所述组合物与权利要求12至22中任一项所述的组合接触,其中在包含所述靶多核苷酸的3'端的位点处,所述捕获寡聚体的靶杂交序列与所述靶多核苷酸退火;

用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸所述靶多核苷酸的3'端,从而形成所述间隔序列的互补序列,该互补序列与所述捕获寡聚体退火,使得所述互补寡聚体被置换至足以使所述捕获寡聚体的捕获序列可用于结合的程度;

使所述捕获寡聚体的捕获序列与包含所述捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含所述靶多核苷酸、所述捕获寡聚体和所述第二捕获试剂的复合体;以及

从所述组合物中分离所述复合体,从而捕获所述靶多核苷酸。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述第二捕获试剂包含结合配偶体(例如生物素),并且分离包括使所述复合体与包含第二结合配偶体(例如链霉亲和素)的固体载体(例如珠粒)接触,所述第二结合配偶体被配置为与所述第二捕获试剂的结合配偶体结合。

26. 一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,所述方法包括:

使所述靶多核苷酸与根据权利要求1至10或12至23中任一项所述的捕获寡聚体或组合接触,其中所述捕获寡聚体的靶杂交序列在所述靶多核苷酸的3'端上游的位点处与所述靶多核苷酸退火;

沿着所述靶多核苷酸延伸所述捕获寡聚体的3'端,从而形成第一延伸链;

使所述靶多核苷酸与置换寡聚体接触,所述置换寡聚体包含置换靶杂交序列,所述置换靶杂交序列在所述捕获寡聚体的靶杂交序列的下游与所述靶多核苷酸退火;

沿着所述靶多核苷酸延伸所述置换寡聚体,从而置换所述靶多核苷酸的所述第一延伸链,

任选地,其中将所述捕获寡聚体和所述置换寡聚体同时或依次添加至所述组合物中。

27. 根据权利要求26所述的方法,进一步包括:使所述第一延伸链与包含反向靶杂交序列的反向扩增寡聚体接触,所述反向靶杂交序列被配置为结合所述第一延伸链;以及延伸所述反向扩增寡聚体,从而形成第二延伸链。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述反向扩增寡聚体包含位于其靶杂交序列的5'的附加序列,任选地,其中所述第一延伸链的3'端进一步延伸,从而形成所述反向扩增寡聚体的附加序列的互补序列。

29. 根据权利要求26至28中任一项所述的方法,其中所述捕获寡聚体进一步包含位于所述靶杂交序列的5'的附加序列,任选地,其中如果存在第二延伸链的延伸,则形成所述捕获寡聚体的附加序列的互补序列。

用于分离靶多核苷酸的组合物、试剂盒和方法

[0001] 本申请要求于2020年1月16日递交的美国临时专利申请No.62/961,816、于2020年1月16日递交的英国专利申请No.2000673.0以及于2020年1月16日递交的英国专利申请No.2000672.2的优先权的权益,为了所有目的,将这些申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本文的实施方案涉及从组合物中分离靶多核苷酸,例如来自目的生物体的多核苷酸和扩增子。实施方案可用作(例如)工作流程的一部分以制备用于测序或其他分析的靶多核苷酸。

背景技术

[0003] 某些生物化学和分子生物学程序受益于或需要确定量的输入核酸。例如,测序文库制备程序可具有一定范围的可接受量的核酸,其中低于最小值的量会导致浪费带宽和低数据输出,而高于最大值的量会导致文库质量差。此外,通常期望将预定量的文库核酸(经常表示为“分子数”)用于测序工作流程的克隆扩增步骤(若使用的话),从而在一方面避免多克隆分子群,并且在另一方面避免浪费带宽和低数据输出;以及将预定量的文库核酸用于单分子测序工作流程,其中期望输入测序步骤的是限定分子数,以获得最佳结果。对于时间是关键的应用,例如通过对临床样品测序来快速检测病原体,现有的用于提供具有可接受量的核酸的样品的方法(例如)涉及定量程序和随后的浓缩或稀释步骤,可能会不期望地变慢。此外,各种现有方法可能苦于具有其他问题,例如过量的捕获寡聚体使固体载体饱和以及添加衔接子或其他序列相关的复杂性。

发明内容

[0004] 因此,需要能够提供改进的核酸捕获的组合物和方法,包括(例如)以受控或受限的方式(例如)以小于或等于预定量的量快速且准确地捕获核酸;捕获可以以靶依赖性方式捕获的寡聚体;以及高效添加衔接子或其他序列。本公开旨在提供满足这些需求中的一种或以上、提供其他有益效果或至少为公众提供有用选择的组合物和方法。本文提供了捕获寡聚体、捕获寡聚体与其他寡聚体的组合以及相关组合物、试剂盒和方法,以用于捕获和/或控制核酸的量,例如其中限定量的捕获寡聚体或另一种限制性试剂(例如第二捕获试剂)或它们的组合能够控制捕获程序的输出,并且捕获寡聚体可以以靶依赖性方式捕获;和/或以高效方式添加衔接子或其他序列。

[0005] 更具体地,本文提供了以下实施方案。实施方案1为一种捕获寡聚体,其在5'至3'方向上包含:

[0006] 捕获序列,

[0007] 内部延伸阻断子,

[0008] 捕获序列的互补序列,和

[0009] 靶杂交序列,

[0010] 其中捕获序列的互补序列被配置为当不存在与靶杂交序列以及捕获序列的互补序列退火的延伸靶序列时与捕获序列退火。

[0011] 实施方案2为实施方案1所述的捕获寡聚体,其中捕获寡聚体具有下式:

[0012] 5'-A1-C-L-B-A2-C'-A3-RB-A4-THS-X-3',

[0013] 其中A1为任选存在的第一附加序列;

[0014] C为捕获序列,

[0015] L为任选存在的接头,

[0016] B为内部延伸阻断子,

[0017] A2为任选存在的第二附加序列,

[0018] C'为捕获序列的互补序列,

[0019] A3为任选存在的第三附加序列,

[0020] RB为任选存在的可逆延伸阻断子,

[0021] A4为任选存在的第四附加序列,

[0022] THS为靶杂交序列;以及

[0023] X为任选存在的阻断部分。

[0024] 实施方案3为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中捕获序列包含poly A或poly T序列,并且捕获序列的互补序列包含poly T或poly A序列。

[0025] 实施方案4为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中捕获寡聚体包含位于捕获序列的5'的第一附加序列以及位于捕获序列的互补序列的3'的第三附加序列,它们分别包含第一稳定序列和第二稳定序列,任选地,其中稳定序列为GC夹序列。

[0026] 实施方案5为前一个实施方案所述的捕获寡聚体,其中第一稳定序列位于捕获序列的其余部分的5'和/或第二稳定序列位于捕获序列的互补序列的其余部分的3'。

[0027] 实施方案6为实施方案4或5所述的捕获寡聚体,其中GC夹序列各自包含(GC)₃序列或(CG)₃序列。

[0028] 实施方案7为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其包含位于捕获序列和内部延伸阻断子之间的接头,该接头任选地为核苷酸序列或非核苷酸接头或它们的组合。

[0029] 实施方案8为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中内部延伸阻断子包含下列中的任意一者或以上:非核苷酸接头、或者一个或以上脱碱基位点、非天然核苷酸、或者经化学修饰的天然核苷酸。

[0030] 实施方案9为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其包含第三附加序列,该第三附加序列包含位于捕获序列的互补序列和THS之间的衔接序列。

[0031] 实施方案10为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子。

[0032] 实施方案11为前一个实施方案所述的捕获寡聚体,其中可逆延伸阻断子位于捕获序列的互补序列的3'。

[0033] 实施方案12为实施方案10或11所述的捕获寡聚体,其中捕获寡聚体包含位于捕获序列的互补序列的3'和靶杂交序列的5'的第三附加序列,并且可逆延伸阻断子位于衔接序列的3',任选地,其中第三附加序列包含衔接序列。

[0034] 实施方案13为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中捕获寡聚体包含位

于可逆阻断子的3'和靶杂交序列的5'的第四附加序列,任选地,其中第四附加序列包含衔接序列。

[0035] 实施方案14为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其包含位于内部延伸阻断子和捕获序列的互补序列之间的第二附加序列,任选地,其中第二附加序列包含混合核苷酸区段。

[0036] 实施方案15为前一个实施方案所述的捕获寡聚体,其中可逆延伸阻断子包括: Iso-dC或Iso-dG、黄嘌呤或5-(2,4-二氨基嘧啶)、2-氨基-6-(N,N-二甲基氨基)嘌呤或吡啶-2-酮、4-甲基苯并咪唑或2,4-二氟甲苯、7-氮杂吲哚或异喹诺酮、dMM02或d5SICS、dF或dQ;一个或多个经化学修饰的核苷酸,其中所述修饰为通过可逆连接键进行附接,并且所述连接键可以通过提供以下任意一者或以上而逆转:化学品、酶、温度变化、试剂组成变化;可逆的核酸结构特征;或与捕获寡聚体可逆结合的分子,任选地,其中可逆结合的分子为蛋白质、酶、脂质、碳水化合物或化学部分。

[0037] 实施方案16为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其中靶杂交序列在其3'端包含阻断部分。

[0038] 实施方案17为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体,其包含一种或以上位于靶杂交序列中的增强亲和性的修饰(例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上)。

[0039] 实施方案18为一种组合,其包含前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体和第二捕获试剂,第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列和(a)结合配偶体(例如生物素)或(b)固体载体(例如珠粒或表面)。

[0040] 实施方案19为前一个实施方案所述的组合,其中组合进一步包含第二捕获寡聚体和第二捕获试剂,其中第二捕获寡聚体包含不同于捕获寡聚体的靶杂交序列的第二靶杂交序列和不同于捕获寡聚体的捕获序列的第二捕获序列,并且第二捕获试剂包含第二捕获序列的互补序列和(a)结合配偶体(例如生物素)或(b)固体载体(例如珠粒或表面)。

[0041] 实施方案20为实施方案18所述的组合,其中第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列和结合配偶体(例如生物素),并且该组合还包含固体载体(例如珠粒),其包含被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合的第二结合配偶体(例如生物素结合剂,诸如链霉亲和素)。

[0042] 实施方案21为一种组合,其包含前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体或组合,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的衔接序列,并且组合还包含不可延伸的阻断寡聚体,该阻断寡聚体包含衔接序列,任选地,其中阻断寡聚体被配置为以比捕获寡聚体的衔接序列更大的亲和性结合衔接序列的互补序列,或与具有比捕获寡聚体的衔接序列和衔接序列的互补序列的复合体更高的解链温度的衔接序列的互补序列形成复合体。

[0043] 实施方案22为一种组合,其包含前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体或组合,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的衔接序列,并且组合进一步包含第二寡聚体,第二寡聚体包含位于衔接序列的至少一部分的互补序列的5'的第二靶杂交序列,其中在具有第一靶杂交序列和第二靶杂交序列的可接近互补序列的靶多核苷酸存在的情况下,捕获寡聚体和第二寡聚体被配置为与靶多核苷酸形成三链连接。

[0044] 实施方案23为一种反应混合物,其包含前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体

或组合以及靶多核苷酸。

[0045] 实施方案24为前一个实施方案所述的反应混合物,其中靶标为扩增子,任选地还包含至少一种扩增引物,进一步任选地,其中捕获寡聚体的靶杂交序列对扩增子的亲和性比对引物的亲和性高(例如,更长的THS或增强亲和性的修饰)。

[0046] 实施方案25为实施方案23或24中任一项所述的反应混合物,其进一步包含第二捕获寡聚体、第二捕获试剂和第二靶多核苷酸,其中第二捕获寡聚体包含被配置为与第二靶多核苷酸退火的第二靶杂交序列、以及不同于捕获寡聚体的捕获序列的第二捕获序列,并且第二捕获试剂包含第二捕获序列的互补序列和(a)结合配偶体(例如生物素)或(b)固体载体(例如珠粒或表面)。

[0047] 实施方案26为前一个实施方案所述的反应混合物,其中第二靶多核苷酸以低于靶多核苷酸的浓度存在。

[0048] 实施方案27为实施方案25或26中任一项所述的反应混合物,其中靶多核苷酸和第二靶多核苷酸分离自或产生于来自生物体或环境类型的样本,并且第二靶多核苷酸在来自生物体或环境类型的样本中不大常见。

[0049] 实施方案28为一种组合,其包含捕获寡聚体和互补寡聚体,其中:

[0050] (a) 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0051] 捕获序列,其包含第一部分和第二部分,

[0052] 内部延伸阻断子,

[0053] 间隔序列,其包含第一部分和第二部分,和

[0054] 靶杂交序列;以及

[0055] (b) 互补寡聚体在3'至5'方向上包含:

[0056] 捕获序列的第二部分的互补序列,和

[0057] 间隔序列的至少第一部分的互补序列,其中捕获序列的第二部分的互补序列和间隔序列的至少第一部分的互补序列被配置为当不存在间隔序列的互补序列时,同时与捕获寡聚体退火。

[0058] 实施方案29为前一个实施方案所述的组合,其中捕获寡聚体具有下式:

[0059] 5'-A1-C1-C2-B-A2-S1-S2-A3-RB-A4-THS-X-3'

[0060] 其中A1为任选存在的第一附加序列,

[0061] C1为捕获序列的第一部分,

[0062] C2为捕获序列的第二部分,

[0063] B为内部延伸阻断子,

[0064] A2为任选存在的第二附加序列,

[0065] S1为间隔序列的第一部分,

[0066] S2为间隔序列的第二部分,

[0067] A3为任选存在的第三附加序列,

[0068] RB为任选存在的可逆延伸阻断子,

[0069] A4为任选存在的第四附加序列,

[0070] THS为靶杂交序列,以及

[0071] X为任选存在的阻断部分。

[0072] 实施方案30为实施方案28或29中任一项所述的组合,其中互补寡聚体具有下式:

[0073] $5' - S1' - A2' - L - C2' - X - 3'$

[0074] 其中S1'为间隔序列的至少第一部分的互补序列,

[0075] A2'为任选存在于捕获寡聚体中的第二附加序列的任选存在的互补序列;

[0076] L为任选存在的接头,

[0077] C2'为捕获序列第二部分的互补序列,以及

[0078] X为任选存在的阻断部分。

[0079] 实施方案31为一种组合,其包含捕获寡聚体和互补寡聚体,其中:

[0080] (a) 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0081] 捕获序列,其包含第一部分和第二部分,和

[0082] 靶杂交序列,其包含第二部分和第一部分;以及

[0083] (b) 互补寡聚体在3'至5'方向上包含:

[0084] 捕获序列的第二部分的互补序列,和

[0085] 靶杂交序列的第二部分的互补序列,其中捕获序列的第二部分的互补序列和靶杂交序列的第二部分的互补序列被配置为当不存在靶杂交序列的互补序列时,同时与捕获寡聚体退火。

[0086] 实施方案32为前一个实施方案所述的组合,其中捕获寡聚体具有下式:

[0087] $5' - A1 - C1 - C2 - A2 - S - A3 - THS2 - THS1 - X - 3'$

[0088] 其中A1为任选存在的第一附加序列,

[0089] C1为捕获序列的第一部分,

[0090] C2为捕获序列的第二部分,

[0091] A2为任选存在的第二附加序列,

[0092] S为任选存在的间隔序列,

[0093] A3为任选存在的第三附加序列,

[0094] THS2为靶杂交序列的第二部分,

[0095] THS1为靶杂交序列的第一部分,以及

[0096] X为任选存在的阻断部分。

[0097] 实施方案33为实施方案31或32中任一项所述的组合,其中互补寡聚体具有下式:

[0098] $5' - THS2' - A3' - S' - A2' - C2' - X - 3'$

[0099] 其中THS2'为靶杂交序列的第二部分的互补序列,

[0100] A3'为任选存在于捕获寡聚体中的第三附加序列的任选存在的互补序列;

[0101] S'为任选存在于捕获寡聚体中的间隔子的任选存在的互补序列,

[0102] A2'为任选存在于捕获寡聚体中的第二附加序列的任选存在的互补序列;

[0103] C2'为捕获序列的第二部分的互补序列,以及

[0104] X为任选存在的阻断部分。

[0105] 实施方案34为实施方案28至33中任一项所述的组合,其中捕获寡聚体和/或互补寡聚体在其3'端包含阻断部分。

[0106] 实施方案35为实施方案28至34中任一项所述的组合,其中如果捕获寡聚体的间隔序列被单独的互补序列占据,则捕获序列的第二部分的互补序列不足以在65°C或高于65°C

的温度稳定地与捕获寡聚体的捕获序列退火。

[0107] 实施方案36为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中捕获序列包含poly A或poly T,并且捕获序列的互补序列或捕获序列的第二部分的互补序列包含poly T或poly A。

[0108] 实施方案37为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中捕获寡聚体包含衔接序列作为部分或全部的间隔序列,或者作为部分或全部的间隔序列的3'的第三附加序列或靶杂交序列的5'的第四附加序列。

[0109] 实施方案38为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中例如,捕获寡聚体包含位于靶杂交序列中的增强亲和性的修饰(例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上)。

[0110] 实施方案39为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子。

[0111] 实施方案40为前一个实施方案所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中可逆延伸阻断子位于间隔序列的第二部分的3'。

[0112] 实施方案41为实施方案39或40中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中可逆延伸阻断子包括:Iso-dC或Iso-dG、黄嘌呤或5-(2,4-二氨基嘧啶)、2-氨基-6-(N,N-二甲基氨基)嘌呤或吡啶-2-酮、4-甲基苯并咪唑或2,4-二氟甲苯、7-氮杂吲哚或异喹诺酮、dMMO2或d5SICS、dF或dQ;一个或多个经化学修饰的核苷酸,其中所述修饰为通过可逆连接键进行附接,并且所述连接键可以通过以下任意一种、或者两种或以上的任意组合而逆转:化学品、酶、温度变化或试剂组成变化;可逆的核酸结构特征;与蛋白质、酶、脂质、碳水化合物或化学部分等核酸模板可逆结合。

[0113] 实施方案42为实施方案28至41中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其包含位于内部延伸阻断子和间隔序列的第一部分之间的第二附加序列,其中第二附加序列包含混合核苷酸区段。

[0114] 实施方案43为前一个实施方案所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中混合核苷酸区段包含5个核苷酸,其中每个核苷酸与其紧邻的核苷酸不相同。

[0115] 实施方案44为实施方案42或43中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中混合核苷酸区段不含重复的二核苷酸、重复的三核苷酸和/或相邻的重复序列。

[0116] 实施方案45为实施方案42至44中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其进一步包含夹板寡聚体,该夹板寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0117] 不存在于捕获寡聚体中的序列的互补序列;

[0118] 混合核苷酸区段;以及

[0119] 捕获序列的互补序列。

[0120] 实施方案46为前一个实施方案所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合,其中捕获寡聚体包含第三附加序列或第四附加序列,第三附加序列或第四附加序列包含位于靶杂交序列和间隔序列的第二部分之间的衔接序列,或者捕获寡聚体的靶杂交序列为衔接序列;以及

[0121] 夹板寡聚体还包含位于捕获序列的互补序列的3'的衔接序列的互补序列。

[0122] 实施方案47为实施方案28至46中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其进一步包含第二捕获试剂，第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列和(a)结合配偶体(例如生物素)或(b)固体载体(例如珠粒或表面)。

[0123] 实施方案48为前一个实施方案所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中第二捕获试剂包含结合配偶体并且组合进一步包含固体载体(例如，一个或以上珠粒)，固体载体包含被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合的第二结合配偶体，任选地，其中第二捕获试剂的结合配偶体为生物素，并且第二结合配偶体为生物素结合剂(例如，链霉亲和素)。

[0124] 实施方案49为实施方案28至48中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其进一步包含置换寡聚体，置换寡聚体包含置换靶杂交序列，置换靶杂交序列被配置为以一定的取向结合靶多核苷酸，其中置换靶杂交序列的3'端朝向由捕获寡聚体的靶杂交序列结合的位点取向。

[0125] 实施方案50为前一个实施方案所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'和捕获序列的互补序列的3'的衔接序列。

[0126] 实施方案51为实施方案49或50中任一项所述的捕获寡聚体、反应混合物或组合，其进一步包含扩增寡聚体，扩增寡聚体包含反向靶杂交序列，反向靶杂交序列被配置为以相对于捕获寡聚体相反的取向结合靶多核苷酸，并且任选地还包含位于反向靶杂交序列的5'的第二衔接序列。

[0127] 实施方案52为一种反应混合物，其包含前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体或组合，并且进一步包含靶多核苷酸。

[0128] 实施方案53为前一个实施方案所述的反应混合物，其中靶标为扩增子，其进一步包含扩增引物，该扩增引物包括结合与捕获寡聚体相同的链的扩增引物，任选地，其中捕获寡聚体的THS对扩增子的亲和性高于对结合与捕获寡聚体相同的链的引物的亲和性(例如，其中捕获寡聚体具有比结合与捕获寡聚体相同的链的引物更长的THS，或者捕获寡聚体包含增强亲和性的修饰)。

[0129] 实施方案54为一种组合，其包含实施方案1至51中任一项所述的捕获寡聚体或组合以及扩增寡聚体，其中：

[0130] 捕获寡聚体包含位于靶杂交序列和内部延伸阻断子之间的第一衔接序列，以及

[0131] 扩增寡聚体包含(i)以相对于捕获寡聚体的反向取向结合靶多核苷酸的反向靶杂交序列和(ii)位于反向靶杂交序列的5'的第二衔接序列。

[0132] 实施方案55为前一个实施方案所述的组合，其中捕获寡聚体在其3'端包含阻断部分。

[0133] 实施方案56为实施方案54所述的组合，其中捕获寡聚体是可延伸的。

[0134] 实施方案57为实施方案54至56中任一项所述的组合，其中扩增寡聚体包含位于第二衔接序列和反向靶杂交序列之间的可逆延伸阻断子，任选地，其中捕获寡聚体进一步包含位于靶杂交序列和第一衔接序列之间的可逆延伸阻断子。

[0135] 实施方案58为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法，该方法包括：

[0136] 使靶多核苷酸与实施方案1至22或36至51中任一项所述的捕获寡聚体接触，其中在包含靶多核苷酸的3'端的位点处，捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火；

[0137] 用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸靶多核苷酸的3'端,从而形成捕获序列的互补序列的互补序列,其与捕获寡聚体退火,使得捕获寡聚体的捕获序列可用于结合;

[0138] 使捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0139] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0140] 实施方案59为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0141] 使组合物与实施方案28至30或34至51中任一项所述的组合接触,其中在包含靶多核苷酸的3'端的位点处,捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火;

[0142] 用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸靶多核苷酸的3'端,从而形成间隔序列的互补序列,该互补序列与捕获寡聚体退火,使得互补寡聚体被置换至足以使捕获寡聚体的捕获序列可用于结合的程度;

[0143] 使捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0144] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0145] 实施方案60为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0146] 使组合物与实施方案28至30或34至51中任一项所述的组合接触,其中在包含靶多核苷酸的3'端的位点处,捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火;

[0147] 用DNA聚合酶延伸靶多核苷酸的3'端,DNA聚合酶任选地具有链置换活性,从而形成间隔序列的互补序列,该互补序列与捕获寡聚体退火;

[0148] 使游离的捕获寡聚体与互补寡聚体接触,其中互补寡聚体与游离的捕获寡聚体退火并部分地占据其捕获序列,其中互补寡聚体不与包含与间隔序列的互补序列退火的捕获寡聚体的复合体退火;

[0149] 使与靶多核苷酸复合的捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体,其中在靶多核苷酸的3'端延伸之前、期间或之后,将互补寡聚体引入组合物中;以及

[0150] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0151] 实施方案61为前一个实施方案所述的方法,其中捕获寡聚体的靶杂交序列经过延伸,从而形成延伸的捕获寡聚体。

[0152] 实施方案62为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0153] 使组合物与实施方案28至30或34至51中任一项所述的组合接触,该组合进一步包含扩增寡聚体,扩增寡聚体包含被配置为以相对于捕获寡聚体的相反取向结合靶多核苷酸的反向靶杂交序列,并且任选地还包含位于反向靶杂交序列的5'的第二衔接序列,其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火并经过延伸,从而形成延伸的捕获寡聚体;

[0154] 使扩增寡聚体与延伸的捕获寡聚体退火;

[0155] 用DNA聚合酶延伸扩增寡聚体的3'端,DNA聚合酶任选地具有链置换活性,从而形成捕获寡聚体的至少靶杂交序列的互补序列,该互补序列与捕获寡聚体退火;

[0156] 使游离的捕获寡聚体与互补寡聚体接触,其中互补寡聚体与游离的捕获寡聚体退火并部分地占据其捕获序列,其中互补寡聚体不与包含与捕获寡聚体的靶杂交序列的互补序列退火的捕获寡聚体的复合体退火;

[0157] 使与靶多核苷酸复合的捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和 (i) 结合配偶体或 (ii) 固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体,其中在靶多核苷酸的3'端延伸之前、期间或之后,将互补寡聚体引入组合物中;以及

[0158] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0159] 实施方案63为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0160] 使靶多核苷酸与实施方案1至22、28至30或34至51中任一项所述的捕获寡聚体或组合接触,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'和捕获序列的互补序列或间隔序列的第二部分的3'的第三附加序列或第四附加序列;

[0161] 使靶多核苷酸与第二寡聚体接触,该第二寡聚体包含位于第三附加序列或第四附加序列的至少一部分的互补序列的5'的第二靶杂交序列,其中捕获寡聚体和第二寡聚体与靶多核苷酸形成三链连接;

[0162] 用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸第二寡聚体的3'端,从而形成捕获序列的互补序列的互补序列、或者间隔序列的互补序列,其与捕获寡聚体退火,使得捕获寡聚体的捕获序列可用于结合;

[0163] 使捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和 (i) 结合配偶体或 (ii) 固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0164] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0165] 实施方案64为前一个实施方案所述的方法,其中捕获寡聚体在其3'端包含阻断部分;和/或其中第二寡聚体在其5'端上包含阻断具有链置换活性的聚合酶的置换的部分。

[0166] 实施方案65为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0167] 使组合物与实施方案31至51中任一项所述的组合接触,其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火;

[0168] 在捕获寡聚体与靶多核苷酸退火之前或之后,使捕获寡聚体与互补寡聚体接触,其中互补寡聚体与游离的捕获寡聚体退火并部分地占据其捕获序列,其中互补寡聚体不与包含与捕获寡聚体的靶杂交序列的互补序列退火的捕获寡聚体的复合体退火,并且其中如果捕获寡聚体与互补寡聚体的接触发生在捕获寡聚体与靶多核苷酸退火之前,则靶杂交序列与靶多核苷酸的退火造成互补寡聚体从捕获寡聚体解离;

[0169] 使与靶多核苷酸复合的捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和 (i) 结合配偶体或 (ii) 固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0170] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0171] 实施方案66为实施方案58至65中任一项所述的方法,其中第二捕获试剂包含结合配偶体(例如生物素),并且分离包括使复合体与包含第二结合配偶体(例如链霉亲和素)的固体载体(例如珠粒)接触,第二结合配偶体被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合。

[0172] 实施方案67为实施方案58至66中任一项所述的方法,其中相对于第二捕获试剂,过量提供捕获寡聚体。

[0173] 实施方案68为实施方案58至67中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸由临床试样获得。

[0174] 实施方案69为实施方案58至68中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸来自病原体(细菌、病毒等)。

[0175] 实施方案70为实施方案58至69中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸是扩增产物。

[0176] 实施方案71为实施方案58至70中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸为测序文库的成员。

[0177] 实施方案72为实施方案58至71中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列和内部延伸阻断子之间的第三附加序列或第四附加序列。

[0178] 实施方案73为实施方案63至72中任一项所述的方法,其中通过使捕获寡聚体沿着靶多核苷酸延伸而形成延伸产物,并且方法还包括使延伸产物与包含第三附加序列或第四附加序列的不可延伸的阻断寡聚体接触,任选地,其中阻断寡聚体被配置为以比捕获寡聚体的第三附加序列或第四附加序列更高的亲和性结合第三附加序列或第四附加序列的互补序列,或与第三附加序列或第四附加序列的互补序列形成复合体,该复合体具有比捕获寡聚体的第三附加序列或第四附加序列与第三附加序列或第四附加序列的互补序列的复合体更高的解链温度。

[0179] 实施方案74为实施方案58至73中任一项所述的方法,其中方法进一步包括:

[0180] 使靶多核苷酸与扩增寡聚体接触,扩增寡聚体包含(i)以相对于捕获寡聚体的反向取向结合靶多核苷酸的反向靶杂交序列和(ii)位于第二靶杂交序列5'的附加序列,

[0181] 以及沿着靶多核苷酸延伸扩增寡聚体以形成反向延伸产物,

[0182] 其中捕获寡聚体的一部分与反向延伸产物退火。

[0183] 实施方案75为前一个实施方案所述的方法,其中捕获寡聚体在其3'端包含阻断部分。

[0184] 实施方案76为前一个实施方案所述的方法,其中该方法进一步包括分离复合体,该复合体包含与捕获寡聚体退火的反向延伸产物,其中延伸产物基本上是位于捕获寡聚体的靶杂交序列的5'的单链。

[0185] 实施方案77为实施方案74至76中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体是可延伸的,并且方法进一步包括沿着延伸产物延伸捕获寡聚体的一部分,从而形成第二延伸产物,该第二延伸产物包含第三附加序列或第四附加序列、以及扩增寡聚体的附加序列的互补序列。

[0186] 实施方案78为实施方案58至77中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列、以及不存在于靶生物体的DNA或RNA中的附加序列,并且捕获寡聚体的靶杂交序列被配置为与靶多核苷酸的附加序列退火。

[0187] 实施方案79为实施方案78所述的方法,其中组合物包含多个靶多核苷酸,靶多核苷酸包含(i)附加序列和(ii)来自靶生物体的DNA或RNA和/或不同样品的不同序列,并且方法包括捕获多个靶多核苷酸。

- [0188] 实施方案80为实施方案58至79中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子,并且方法包括:
- [0189] 在对可逆延伸阻断子解除阻断之前,拷贝或扩增靶多核苷酸;
- [0190] 对可逆延伸阻断子解除阻断;以及
- [0191] 进行另一个循环拷贝或扩增靶多核苷酸,
- [0192] 任选地,其中在捕获靶多核苷酸之前、对可逆延伸阻断子解除阻断之后,仅进行一个循环的扩增。
- [0193] 实施方案81为实施方案58至64或66至80中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体包含位于内部延伸阻断子和间隔序列的第一部分或捕获序列的互补序列之间的混合核苷酸区段,以及
- [0194] 方法包括沿着捕获寡聚体延伸靶多核苷酸的3'端直至内部延伸阻断子,从而形成在其3'端包含混合核苷酸区段的互补序列的延伸产物;
- [0195] 使延伸产物与夹板寡核苷酸接触,夹板寡核苷酸在5'至3'方向上包含:
- [0196] 延伸产物的5'末端区段的互补序列;
- [0197] 混合核苷酸区段;
- [0198] 捕获序列的互补序列;以及
- [0199] 任选地,与延伸产物中紧邻捕获序列的5'的区段互补的区段;以及
- [0200] 将延伸产物的5'端连接到延伸产物的3'端。
- [0201] 实施方案82为前一个实施方案所述的方法,其中延伸产物的5'末端区段为衔接序列。
- [0202] 实施方案83为实施方案81或82所述的方法,其中延伸产物中紧邻捕获序列5'的区段为衔接序列的互补序列。
- [0203] 实施方案84为实施方案81至83中任一项所述的方法,其中混合核苷酸区段包含5个核苷酸,其中每个核苷酸与其紧邻的核苷酸不相同。
- [0204] 实施方案85为实施方案81至84中任一项所述的方法,其中混合核苷酸区段不含重复的二核苷酸、重复的三核苷酸和/或相邻的重复序列。
- [0205] 实施方案86为实施方案58至85中任一项所述的方法,其进一步包括对靶多核苷酸测序。
- [0206] 实施方案87为实施方案58至86中任一项所述的方法,其进一步包括对捕获的靶多核苷酸进行克隆扩增。
- [0207] 实施方案88为前一个实施方案所述的方法,其进一步包括对克隆扩增的靶多核苷酸进行测序。
- [0208] 实施方案89为实施方案86或88中任一项所述的方法,其中测序为Sanger测序或下一代测序,任选地,其中下一代测序包括通过合成测序、连接法测序、杂交法测序或单分子测序。
- [0209] 实施方案90为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:
- [0210] 使靶多核苷酸与实施方案1至22、28至30或34至51中任一项所述的捕获寡聚体或组合接触,其中在靶多核苷酸的3'端上游的位点处,捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火;

- [0211] 沿着靶多核苷酸延伸捕获寡聚体的3'端,从而形成第一延伸链;
- [0212] 使靶多核苷酸与置换寡聚体接触,置换寡聚体包含置换靶杂交序列,置换靶杂交序列在捕获寡聚体的靶杂交序列的下游与靶多核苷酸退火;
- [0213] 沿着靶多核苷酸延伸置换寡聚体,从而置换靶多核苷酸的第一延伸链,
- [0214] 任选地,其中将捕获寡聚体和置换寡聚体同时或依次添加至组合物中。
- [0215] 实施方案91为前一个实施方案所述的方法,其进一步包括使第一延伸链与包含反向靶杂交序列的反向扩增寡聚体接触,反向靶杂交序列被配置为结合第一延伸链;以及延伸反向扩增寡聚体,从而形成第二延伸链。
- [0216] 实施方案92为前一个实施方案所述的方法,其中反向扩增寡聚体包含位于其靶杂交序列的5'的附加序列,任选地,其中第一延伸链的3'端进一步延伸,从而形成反向扩增寡聚体的附加序列的互补序列。
- [0217] 实施方案93为实施方案90至92中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体进一步包含位于靶杂交序列的5'的附加序列,任选地,其中如果存在第二延伸链的延伸,则形成捕获寡聚体的附加序列的互补序列。
- [0218] 实施方案94为前一个实施方案所述的方法,其中靶多核苷酸的第二链包含捕获寡聚体的附加序列的互补序列。
- [0219] 实施方案95为实施方案90或91所述的方法,其中靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列、以及不存在于靶生物体的DNA或RNA中的附加序列,并且捕获寡聚体的靶杂交序列被配置为与靶多核苷酸的附加序列的第一部分退火,并且置换寡核苷酸被配置为与靶多核苷酸的附加序列的第二部分退火,任选地,其中靶多核苷酸的附加序列还包含位于第一部分和第二部分之间的一个或以上核苷酸。
- [0220] 实施方案96为实施方案90或95所述的方法,其中第一延伸链包含位于来自靶生物体的DNA或RNA的序列近侧和捕获寡聚体的靶杂交序列远侧的第二附加序列,以及
- [0221] 该方法还包括:使第一延伸链与反向扩增寡聚体接触,反向扩增寡聚体包含被配置为与第二附加序列结合的反向靶杂交序列;以及延伸反向扩增寡聚体,从而形成第二延伸链,任选地,其中反向扩增寡聚体包含位于其靶杂交序列的5'的附加序列,并且方法还包括沿着反向扩增寡聚体进一步延伸第一延伸链。
- [0222] 实施方案97为一种组合,其包含捕获寡聚体和第二捕获试剂,其中捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:
- [0223] 第一自互补序列,
- [0224] 靶杂交序列,和
- [0225] 第二自互补序列,
- [0226] 其中第一自互补序列和第二自互补序列被配置为当靶杂交序列为单链时,第一自互补序列和第二自互补序列彼此退火,并且当靶杂交序列与其靶标退火时,第一自互补序列和第二自互补序列彼此不退火;
- [0227] 第二捕获试剂包含第一自互补序列和第二自互补序列的互补序列和结合配偶体;以及
- [0228] 捕获寡聚体在组合中的存在量大于第二捕获试剂。
- [0229] 实施方案98为前一个实施方案所述的组合,其中捕获寡聚体具有下式:

- [0230] 5'-SC1-THS2-THS1-L-THS2'-SC2-X-3'
- [0231] 或
- [0232] 5'-SC2-THS2'-L-THS1-THS2-SC1-X-3'
- [0233] 其中SC1为第一自互补序列，
- [0234] THS2和THS1分别为靶杂交序列的第二部分和第一部分，
- [0235] L为任选存在的接头，
- [0236] THS2'为靶杂交序列的第二部分的任选存在的互补序列，
- [0237] SC2为第二自互补序列，以及
- [0238] X为任选存在的阻断部分。
- [0239] 实施方案99为实施方案97或98中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的3'和第二自互补序列的5'的接头。
- [0240] 实施方案100为实施方案97至99中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的3'和第二自互补序列的5'的靶杂交序列的第二部分的互补序列。
- [0241] 实施方案101为实施方案97至100中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的3'的接头以及位于该接头的3'和第二自互补序列的5'的靶杂交序列的第二部分的互补序列。
- [0242] 实施方案102为实施方案97至101中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的5'和第二自互补序列的3'的接头。
- [0243] 实施方案103为实施方案97至102中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的5'和第二自互补序列的3'的靶杂交序列的第二部分的互补序列。
- [0244] 实施方案104为实施方案97至103中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的第一部分的5'的接头以及位于该接头的5'和第二自互补序列的3'的靶杂交序列的第二部分的互补序列。
- [0245] 实施方案105为实施方案97至104中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体和/或第二捕获试剂是不可延伸的。
- [0246] 实施方案106为实施方案97至105中任一项所述的组合，其中第一自互补序列或第二自互补序列包含poly A或poly T，并且自互补序列的互补序列包含poly T或poly A。
- [0247] 实施方案107为实施方案97至106中任一项所述的组合，其中捕获寡聚体包含一种或以上位于靶杂交序列中的增强亲和性的修饰(例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上)。
- [0248] 实施方案108为一种试剂盒，其包含实施方案1至22、28至51、54至57或97至107中任一项所述的组合或捕获寡聚体。
- [0249] 实施方案109为一种组合物，其包含实施方案1至22、28至51、54至57或97至107中任一项所述的组合或捕获寡聚体。
- [0250] 实施方案110为实施方案18至22、28至51、54至57或97至107中任一项所述的组合，其包含(i)第二捕获试剂，该第二捕获试剂包含结合配偶体，以及(ii)固体载体(例如，一个或以上珠粒)，该固体载体包含第二结合配偶体，该第二结合配偶体被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合，任选地，其中第二捕获试剂的结合配偶体为生物素，并且第二结合配偶体为生物素结合剂(例如链霉亲和素)。

- [0251] 实施方案111为一种反应混合物,其包含实施方案18至22、28至51、54至57、97至107或110中任一项所述的组合,并且进一步包含靶多核苷酸。
- [0252] 实施方案112为前一个实施方案所述的反应混合物,其中靶标在来自细胞、试样、病毒或生物样品的提取物中、或由来自细胞、试样、病毒或生物样品的提取物获得。
- [0253] 实施方案113为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:
- [0254] 使靶多核苷酸与实施方案97至107或110中任一项所述的组合接触,其中同时或依次添加捕获寡聚体和第二捕获试剂,并且其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火,并且第二捕获试剂与捕获寡聚体的自互补序列退火,从而形成复合体;
- [0255] 使复合体与第二结合配偶体接触,第二结合配偶体被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合,其中第二结合配偶体与固体载体缔合,其中第二结合配偶体与第二捕获试剂的结合配偶体结合;以及
- [0256] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。
- [0257] 实施方案114为前一个实施方案所述的方法,其中捕获寡聚体相对于靶多核苷酸是过量的。
- [0258] 实施方案115为实施方案113或114中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸相对于第二捕获试剂是过量的。
- [0259] 实施方案116为实施方案113至115中任一项所述的方法,其中仅捕获一部分靶多核苷酸。
- [0260] 实施方案117为实施方案113至116中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸由临床试样获得。
- [0261] 实施方案118为实施方案113至117中任一项所述的方法,靶多核苷酸来自病原体(细菌、病毒等)。
- [0262] 实施方案119为实施方案113至118中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸为扩增产物。
- [0263] 实施方案120为实施方案113至119中任一项所述的方法,其进一步包括扩增靶多核苷酸和/或将一个或以上附加序列附接至靶多核苷酸。
- [0264] 实施方案121为实施方案113至120中任一项所述的方法,其进一步包括制备测序文库,该测序文库包含靶多核苷酸。
- [0265] 实施方案122为实施方案113至121中任一项所述的方法,其进一步包括克隆扩增测序文库的成员和对测序文库的成员进行测序中的一者或两者,任选地,其中测序为Sanger测序或下一代测序,任选地,其中下一代测序包括通过合成测序、连接法测序、杂交法测序或单分子测序。
- [0266] 实施方案123为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:
- [0267] 使靶多核苷酸与捕获寡聚体接触,捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:
- [0268] 捕获序列,
- [0269] 任选的内部延伸阻断子,
- [0270] 任选的间隔序列,和
- [0271] 靶杂交序列,其被配置为与靶多核苷酸退火;
- [0272] 使捕获寡聚体与包含捕获序列的互补序列的第一捕获试剂接触(在使靶多核苷酸

与捕获寡聚体接触之前、同时或之后)；

[0273] 提供第二捕获试剂,其包含捕获寡聚体中的除捕获序列之外的序列的互补序列,其中如果一些或全部捕获寡聚体不与靶多核苷酸退火,则使第二捕获试剂接触不与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体；

[0274] 从组合物分离第一复合体和第二复合体,其中第一复合体包含靶多核苷酸,并且第二复合体包含未与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体；以及

[0275] 从第一复合体选择性洗脱靶多核苷酸或包含靶多核苷酸的亚复合体；

[0276] 任选地,其中 (a) 第一捕获试剂包含 (i) 结合配偶体和 (例如生物素) 或 (ii) 固体载体 (例如珠粒或表面) 和/或 (b) 第二捕获试剂包含 (i) 结合配偶体和 (例如生物素) 或 (ii) 固体载体 (例如珠粒或表面)。

[0277] 实施方案124为实施方案123所述的方法,其中使靶多核苷酸与过量的捕获寡聚体接触。

[0278] 实施方案125为实施方案123或124所述的方法,其中以相对于捕获寡聚体的限制性量提供第一捕获试剂。

[0279] 实施方案126为实施方案123至125中任一项所述的方法,其中以相对于靶多核苷酸的限制性量提供捕获寡聚体。

[0280] 实施方案127为实施方案123至126中任一项所述的方法,其中与第二捕获试剂接触的捕获寡聚体的一部分包含未与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体。

[0281] 实施方案128为实施方案123至127中任一项所述的方法,其中第一捕获试剂包含第一固体载体,该第一固体载体包含捕获序列的互补序列。

[0282] 实施方案129为实施方案123至128中任一项所述的方法,其中第二捕获试剂包含第二固体载体,该第二固体载体包含捕获寡聚体中除捕获序列之外的序列的互补序列。

[0283] 实施方案130为实施方案123至129中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列和内部延伸阻断子之间的间隔序列,任选地,其中第二捕获试剂包含间隔序列的互补序列。

[0284] 实施方案131为实施方案123至130中任一项所述的方法,其中在靶多核苷酸的3'端,靶杂交序列与靶多核苷酸退火。

[0285] 实施方案132为前一个实施方案所述的方法,其中该方法包括延伸靶多核苷酸的3'端。

[0286] 实施方案133为实施方案123至132中任一项所述的方法,其中第二捕获试剂对捕获寡聚体的亲和性大于第一捕获试剂对捕获寡聚体的亲和性,和/或第二捕获试剂被配置为与捕获寡聚体形成复合体,该复合体的解链温度高于第一捕获试剂和捕获寡聚体的复合体的解链温度。

[0287] 实施方案134为实施方案128至133中任一项所述的方法,包括:

[0288] 使靶多核苷酸与捕获寡聚体接触,捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0289] 第一捕获序列,

[0290] 内部延伸阻断子,

[0291] 第二捕获序列,和

[0292] 靶杂交序列,其被配置为与靶多核苷酸的3'端退火,

- [0293] 从而使捕获寡聚体与靶多核苷酸退火；
- [0294] 使靶多核苷酸的3'端通过第二捕获序列进行延伸；
- [0295] 使第一复合体与包含第一捕获序列的互补序列的第一固体载体接触，从而形成第一复合体；
- [0296] 使未结合的捕获寡聚体与包含第二捕获序列的互补序列的第二固体载体接触，从而形成第二复合体，其中第一捕获序列的互补序列的解链温度低于通过第二捕获序列与第二捕获序列的互补序列退火形成的第二复合体的解链温度，和/或第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性大于第一捕获序列的互补序列对第一捕获序列的亲合性；
- [0297] 将第一复合体和第二复合体与未结合至第一固体载体或第二固体载体的物质分离；以及
- [0298] 从第一复合体选择性洗脱靶多核苷酸。
- [0299] 实施方案135为实施方案123所述的方法，其中第一捕获试剂进一步包含与捕获寡聚体或靶多核苷酸不互补的第二捕获序列，并且方法包括：在使退火的捕获寡聚体与第一捕获试剂接触之后，使第二捕获序列与包含第二捕获序列的互补序列的固体载体退火。
- [0300] 实施方案136为实施方案123或135所述的方法，其中第二捕获试剂进一步包含与捕获寡聚体或靶多核苷酸不互补的第三捕获序列，并且方法包括：在使未结合的捕获寡聚体与第二捕获试剂接触之后，使第三捕获序列与包含第三捕获序列的互补序列的固体载体退火。
- [0301] 实施方案137为实施方案123所述的方法，其中第一捕获试剂进一步包含与捕获寡聚体或靶多核苷酸不互补的第二捕获序列，并且方法包括：在使退火的捕获寡聚体与第一捕获试剂接触之后，使第二捕获序列与包含第二捕获序列的互补序列的固体载体退火；并且第三捕获序列的互补序列对第三捕获序列的亲合性大于第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性，和/或第三捕获序列的互补序列被配置为与第三捕获序列形成复合体，该复合体的解链温度高于第二捕获序列的互补序列与第二捕获序列的复合体的解链温度。
- [0302] 实施方案138为一种组合，其包含捕获寡聚体、第一固体载体和第二固体载体，其中：
- [0303] 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含：
- [0304] 第一捕获序列，
- [0305] 任意的内部延伸阻断子，
- [0306] 任意的第二捕获序列，和
- [0307] 靶杂交序列；
- [0308] 第一固体载体包含第一捕获序列的互补序列；
- [0309] 第二固体载体包含第二捕获序列的互补序列；以及
- [0310] 通过第一捕获序列和第一捕获序列的互补序列退火形成的第一复合体的解链温度低于通过第二捕获序列和第二捕获序列的互补序列退火形成的第二复合体的解链温度，和/或第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性大于第一捕获序列的互补序列对第一捕获序列的亲合性。
- [0311] 实施方案139为一种组合，其包含捕获寡聚体、第一捕获试剂、第二捕获试剂、第一

固体载体和第二固体载体,其中:

[0312] 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0313] 第一捕获序列,

[0314] 任选的内部延伸阻断子,和

[0315] 靶杂交序列;

[0316] 第一捕获试剂包含第二捕获序列以及第一捕获序列的互补序列,其中第二捕获序列与捕获寡聚体不互补;

[0317] 第二捕获试剂包含第三捕获序列以及捕获寡聚体的除第一捕获序列之外的序列的互补序列,其中第三捕获序列与捕获寡聚体不互补;

[0318] 第一固体载体包含第二捕获序列的互补序列;

[0319] 第二固体载体包含第三捕获序列的互补序列;以及

[0320] 通过第二捕获序列与第二捕获序列的互补序列退火形成的第一复合体的解链温度低于通过第三捕获序列与第三捕获序列的互补序列退火形成的第二复合体的解链温度,和/或第三捕获序列的互补序列对第三捕获序列的亲合性大于第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性。

[0321] 实施方案140为一种组合,其包含捕获寡聚体和第二捕获试剂,其中捕获寡聚体包含:

[0322] 靶杂交序列,其包含一个或以上增强亲和性的核苷酸;和

[0323] 捕获序列;以及

[0324] 第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列以及结合配偶体。

[0325] 实施方案141为实施方案138至140中任一项所述的组合,其中捕获序列位于靶杂交序列的5'。

[0326] 实施方案142为实施方案138至141中任一项所述的组合,其中靶杂交序列被配置为与附加序列退火。

[0327] 实施方案143为实施方案138至142中任一项所述的组合,其中第二捕获试剂以比捕获寡聚体更低的量存在于组合中。

[0328] 实施方案144为实施方案138至144中任一项所述的组合,其中例如,捕获寡聚体包含一种或以上位于靶杂交序列中的增强亲和性的修饰(例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上)。

[0329] 实施方案145为实施方案138至145中任一项所述的组合,其中捕获序列包含poly A或poly T序列。

[0330] 实施方案146为一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0331] 使靶多核苷酸与实施方案138至145中任一项所述的组合接触,其中同时或依次添加捕获寡聚体和第二捕获试剂,并且其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火,并且第二捕获试剂与捕获寡聚体的捕获序列退火,从而形成复合体;

[0332] 使复合体与第二结合配偶体接触,第二结合配偶体被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合,其中第二结合配偶体与固体载体缔合,并且第二结合配偶体与第二捕获试剂的结合配偶体结合;以及

[0333] 从组合物分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0334] 实施方案147为前一个实施方案所述的方法,其中以比捕获寡聚体和/或靶多核苷酸更低的量提供第二捕获试剂。

[0335] 实施方案148为实施方案146或147所述的方法,其中以比靶多核苷酸更低的量提供捕获寡聚体,任选地,其中以比捕获寡聚体更低的量提供第二捕获试剂。

[0336] 实施方案149为实施方案146至148中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸包含附加序列,并且靶杂交序列与附加序列退火。

[0337] 实施方案150为实施方案146至149中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体的靶杂交序列包含增强亲和性的修饰(例如5-Me-C、2-氨基嘌呤、2'-氟、C-5-丙炔、LNA、PNA、ZNA、硫代磷酸酯、2'-OMe或受限的乙基(cEt)取代中的任意一种或以上)。

[0338] 实施方案151为实施方案146至150中任一项所述的方法,其中靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列,并且附加序列不存在于靶生物体的DNA或RNA中。

[0339] 实施方案152为实施方案58至96、113至137、或146至151中任一项所述的方法,其中捕获的靶多核苷酸的量小于或等于预定量,任选地,其中预定量对应于所提供的捕获寡聚体的摩尔量或所提供的第二捕获试剂的摩尔量。

[0340] 实施方案153为实施方案58至96、113至137、或146至152中任一项所述的方法,其中捕获寡聚体的存在量在 10^7 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、 10^9 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应、或 10^{10} 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应的范围内。

[0341] 实施方案154为实施方案58至96、113至137、或146至153中任一项所述的方法,其中如果存在第二捕获试剂,则存在的第二捕获试剂在 10^3 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 10^3 个分子/反应至 10^9 个分子/反应、或 10^5 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^5 个分子/反应至 10^8 个分子/反应、或 10^6 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^6 个分子/反应至 10^8 个分子/反应的范围内。

[0342] 实施方案155为实施方案58至96、113至137、或146至154中任一项所述的方法,其中如果存在阻断寡聚体,则存在的阻断寡聚体在 10^8 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、 10^{10} 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^{11} 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围内;并且其中如果存在第二寡聚体,则存在的第二寡聚体在 10^7 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应或 10^8 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围内。

[0343] 实施方案156为实施方案58至96、113至137、或146至155中任一项所述的方法,其中如果存在互补寡聚体,则存在的互补寡聚体在约 1.5×10^7 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应或约 1.5×10^9 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围内;并且其中如果存在夹板寡聚体,则存在的夹板寡聚体在 10^3 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 10^4 个分子/反应至 10^{10} 个分子/反应、或 2×10^5 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 10^6 个分子/反应至 10^9 个分子/反应、或 2×10^6 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 2×10^6 个分子/反应至 10^9 个分子/反应的范围内。

[0344] 实施方案157为实施方案58至96、113至137、或146至156中任一项所述的方法,其中如果存在扩增寡聚体,则存在的扩增寡聚体在约 10^7 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应或约 10^8 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围内;并且其中如果存在阻断寡聚体,则存在的阻断寡聚体在 10^8 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、 10^{10} 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^{11} 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围内。

[0345] 实施方案158为实施方案58至96、113至137、或146至157中任一项所述的方法,其中如果存在置换寡聚体,则存在的置换寡聚体在约 10^7 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应或约 10^8 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应的范围內。

[0346] 实施方案159为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果第一附加序列存在于捕获寡聚体中,则第一附加序列(任选地稳定序列)的长度为约2至15个核苷酸或约3至10个核苷酸。

[0347] 实施方案160为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中捕获序列的长度为约10至35个核苷酸或约10至25个核苷酸。

[0348] 实施方案161为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在接头,则接头的长度为约10至20个核苷酸,或者如果接头为非核苷酸基的,则接头的长度为约3至20个或更多个原子、或约2至15个或更多个重复单元。

[0349] 实施方案162为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在内部延伸阻断子,则内部延伸阻断子的长度为约1至20个核苷酸、或约1至8个核苷酸,或者如果内部延伸阻断子为非核苷酸基的,则内部延伸阻断子的长度为或约3至20个或更多个原子、或约1至8个或更多个重复单元。

[0350] 实施方案163为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在第二附加序列(任选地混合核苷酸序列),则第二附加序列的长度为约2至10个核苷酸或约4至8个核苷酸。

[0351] 实施方案164为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中捕获序列的互补序列的长度为约10至35个核苷酸或约10至25个核苷酸。

[0352] 实施方案165为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在第三附加序列(任选地稳定序列和/或衔接序列),则第三附加序列的长度为约2至50个核苷酸或约4至35个核苷酸,可逆延伸阻断子的长度为约1至20个或约1至8个核苷酸(天然或非天然的)。

[0353] 实施方案166为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在第四附加序列(任选地衔接序列),则第四附加序列的长度为约4至40个核苷酸或约6至25个核苷酸。

[0354] 实施方案167为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中靶杂交序列的长度为约10至60个核苷酸或约12至25个核苷酸。

[0355] 实施方案168为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在阻断部分,则阻断部分的长度为约1至10个或约1至5个核苷酸,或者如果阻断部分为非核苷酸基的,则阻断部分的长度为约3至20个原子或约1至5个重复单元。

[0356] 实施方案169为前述实施方案中任一项所述的捕获寡聚体、组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中捕获寡聚体的总长度为约40至200个核苷酸、或约40至150个核苷酸、或约60至140个核苷酸、或约60至130个核苷酸,任选地,其中捕获寡聚体进一步包含长度为约3至60个原子或5至28个重复单元的非核苷酸元件。

[0357] 实施方案170为实施方案18至169中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在第二捕获试剂,则第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列,该互补序列的长度为约10至35个核苷酸或约10至20个核苷酸。

[0358] 实施方案171为实施方案18至170中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在阻断寡聚体,则阻断寡聚体的长度为约10至35个核苷酸或约10至20个核苷酸,任选地,其中阻断寡聚体进一步包含长度为约3至20个原子或1至5个重复单元的非核苷酸元件。

[0359] 实施方案172为实施方案18至171中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中第二寡聚体的长度为约15至50个核苷酸或约20至40个核苷酸。

[0360] 实施方案173为实施方案18至172中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在互补寡聚体,则互补寡聚体的长度为约10至50个核苷酸或约15至35个核苷酸。

[0361] 实施方案174为实施方案18至173中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在夹板寡聚体,则夹板寡聚体的长度为约15至60个核苷酸或约20至50个核苷酸。

[0362] 实施方案175为实施方案18至174中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在置换寡聚体,则置换寡聚体的长度为约10至50个核苷酸或约20至40个核苷酸。

[0363] 实施方案176为实施方案18至175中任一项所述的组合、反应混合物、试剂盒、组合物或方法,其中如果存在扩增寡聚体,则扩增寡聚体的长度为约10至80个核苷酸或约20至60个核苷酸。

附图说明

[0364] 图1A至图1C示出了根据本公开的示例性捕获寡聚体,其包含捕获序列、阻断部分、捕获序列的互补序列(C')、附加序列(例如,第三附加序列或第四附加序列)和靶杂交序列、以及其他分子。在图1A中,捕获寡聚体与靶多核苷酸(靶标)退火,并且靶多核苷酸的3'端与靶杂交序列的5'端退火。使捕获序列与C'退火。在图1B中,靶标的3'端已延伸至阻断部分,并且所得的靶延伸序列与附加序列和C'退火,而捕获序列已被置换并已成为单链。捕获寡聚体的3'端也沿着靶多核苷酸延伸。在图1C中,图1B的复合体与包含捕获序列的互补序列以及结合配偶体或固体基质的第二捕获试剂退火。同时,过量的捕获寡聚体连同与捕获序列的互补序列退火的捕获序列一同保留,并且不与第二捕获试剂相互作用。

[0365] 图2A示出了本公开的一个实施方案,其中如图1B中的复合体与包含捕获序列的互补序列并与固体基质(在这种情况下,为链霉亲和素包被的磁珠)缔合的第二捕获试剂退火。固体基质可为第二捕获试剂的一部分,或者可以通过与第二捕获试剂的结合配偶体(例如生物素)相互作用而与第二捕获试剂缔合。

[0366] 图2B示出了本公开的一个实施方案,其中来自图2A的延伸的捕获寡聚体和靶标的复合体已经从第二捕获试剂洗脱。

[0367] 图3示出了根据本公开的捕获寡聚体的实施方案,其包含作为第一附加序列的稳定(夹)序列、捕获序列、接头、内部延伸阻断子、捕获序列的互补序列、作为第三附加序列的

稳定(夹)序列、第四附加序列和靶杂交序列。

[0368] 图4A示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。提供了一种靶分子,其中第一链在其5'端包含序列Sf并在其3'端包含Sr',并且第二链在其3'端包含序列Sf'并在其5'端包含Sr。在此处以及全文中,具有'的序列名称表示与名称没有'的序列互补。靶分子可以是(例如)来自先前使用具有序列Sf和Sr的引物进行的反应的扩增子。进行第一个循环延伸(循环1),其中根据本公开的捕获寡聚体与第一靶链1(+)退火,捕获寡聚体包含捕获序列C、内部延伸阻断子(实心圆)、捕获序列的互补序列C'、第四附加序列A4以及与Sr'互补的靶杂交序列THS。反向扩增寡聚体与第二靶链1(-)退火,反向扩增寡聚体包含附加序列A2以及与至少Sf'互补的靶杂交序列Sf*。Sf*可包含增强亲和性的修饰和/或与第二靶链互补的附加核苷酸,以增强其与靶标的亲和性,并促进与来自先前反应的具有序列Sf的引物(如果存在)的结合竞争。捕获寡聚体和反向扩增寡聚体的延伸分别产生产物2(-)和2(+),而第一链沿着捕获寡聚体延伸以产生产物1(+),e,并且第二链沿着反向扩增寡聚体延伸以产生产物1(-),e。基本上如图1B所述置换延伸的捕获寡聚体2(-)中的捕获序列。进行第二个循环反应(循环2),其中2(-)与反向扩增寡聚体退火,引起延伸以产生产物2(-),e和3.1(+)。同时,1(+),e与捕获寡聚体退火,并且后者延伸产生产物3.1(-)。1(-),e和2(+),以及2(-),e和3.1(+),的其他实例也由适当的杂交和延伸事件产生。该反应方案说明在靶标的每一端包括附加序列,以及通过以可用于结合的形式引入C,例如与第二捕获试剂结合,从而使靶标可捕获。

[0369] 图4B示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。提供了一种靶分子,其中第一链在其5'端包含序列Sf并在其3'端包含Sr'和A4',并且第二链在其3'端包含序列Sf'并在其5'端包含Sr和A4。靶分子可以是(例如)来自先前使用具有序列Sf和A4-Sr的引物进行的反应的扩增子,例如,其中A4是最初不存在于模板中的附加序列。进行第一个延伸循环(循环1),其中根据本公开的捕获寡聚体与第一靶链(未示出)退火,捕获寡聚体包含捕获序列C、内部延伸阻断子(实心圆)、捕获序列的互补序列C'、第四附加序列A4以及与A4'互补的靶杂交序列THS。反向扩增寡聚体与第二靶链(未示出)退火,反向扩增寡聚体包含附加序列A2和与至少Sf'互补的靶杂交序列Sf*。Sf*可包含增强亲和性的修饰和/或与第二靶链互补的附加核苷酸,以增强其与靶标的亲和性,并促进与来自先前反应的具有序列Sf的引物(如果存在)的结合竞争。这些复合体的延伸产生延伸的捕获寡聚体2(-)和延伸的第一靶链1(+),e、以及延伸的第二靶链1(-),e和延伸的反向扩增寡聚体2(+),e。基本上如图1B所述置换延伸的捕获寡聚体2(-)中的捕获序列。进行第二个反应循环(循环2),其中2(-)与反向扩增寡聚体退火,引起延伸以产生产物2(-),e和3.1(+),e。同时,1(+),e与捕获寡聚体退火,并且后者延伸产生产物3.1(-),e。1(-),e和2(+),e以及2(-),e和3.1(+),e的其他实例也由适当的杂交和延伸事件产生。该反应方案说明在远离捕获寡聚体结合位点的靶标末端包括附加序列,以及使用能够在前一步骤中附接到靶标(例如通过扩增或连接)的、可具有通用THS(即结合附加序列A4')的捕获寡聚体来引入C(以可用于结合的形式),从而使靶标可捕获。

[0370] 图5示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。提供了一种捕获寡聚体,其包括3'阻断部分和结合靶链中的序列A1'的靶杂交序列(THS)等。A1'可为在前一步骤中(例如,通过扩增或连接)附接至靶标的附加序列。捕获寡聚体还包含序列x,该序列x包含捕获寡聚体的捕获序列的互补序列,并且还可包含捕获序列的互补序列和THS之间的第三附加序列或第四附加序列。如别处所论述的,靶链可以沿着捕获寡聚体延伸以从捕获序列的

互补序列置换捕获序列。可以以相对于靶标(例如 10^{14} 个拷贝)的限制性量(例如 10^{12} 个拷贝)提供捕获寡聚体。还提供了超过靶标(例如 10^{15} 个拷贝)的引物,靶标包含序列A2和Sf。该引物的延伸产生在其5'端包含A2并在其3'端包含A1'的链。靶链也沿着引物延伸以包括序列A2'。如果进行第二个循环延伸(向下箭头),则形成产物的混合物,包括上述那些物质以及靶链与捕获寡聚体的复合物,其中靶链在其5'端包含A2,在其3'端附近包含A1'。该反应方案说明产生了单链可捕获产物,包括(当进行第二个延伸循环时)其中靶链中已包括附加序列的单链可捕获产物。

[0371] 图6示出了(在虚线上方)具有可延伸的3'端的捕获寡聚体与另一捕获寡聚体的杂交如何在延伸后产生二聚体,其中的捕获序列从C'置换。该二聚体为可捕获的,并且可能干扰下游过程,例如通过占据第二捕获试剂(未示出)进行与所需靶标的捕获竞争,随后分析干扰(例如,二聚体将变成测序文库的一部分,从而降低随后的测序运行的输出和质量)等。Sx'为靶杂交序列的一部分的互补序列,其他元件如前面的图中所示。在虚线下方,示出了在其3'端具有阻断部分的捕获寡聚体(带圆圈的x),其可阻止二聚体延伸产物的形成,使得任何二聚体都不会发生C的置换。

[0372] 图7A示出了一个实施方案,其中使用了包含捕获序列、各种中间元件(由“…”表示)、可逆延伸阻断子(实心圆)和靶杂交序列(THS)的捕获寡聚体。在对可逆延伸阻断子解除阻断之前,捕获序列和各种中间元件(如果存在)不是用于延伸(例如,靶链或扩增寡聚体的延伸)的模板。这可以通过在整个延伸或扩增过程中,避免在产物中(例如,在可能形成的任何错误引发的产物中)引入与捕获序列互补的附加序列和各种中间元件(如果存在)直至对可逆延伸阻断子解除阻断,从而促进更有效且更特异的延伸或扩增;在解除阻断后,可以引入捕获序列和各种中间元件(如果存在)。

[0373] 图7B图示了一个实施方案,其中使用了第一扩增寡聚体,该第一扩增寡聚体从3'至5'包含:靶杂交序列Sr、可逆延伸阻断子(实心正方形)、附加序列A1和任选的附加元件(由“…”表示),例如任选的捕获序列。任选地,使用第二扩增寡聚体,该第二扩增寡聚体从3'至5'包含:靶杂交序列Sf、可逆延伸阻断子(空心正方形;该序列可以与第一扩增寡聚体中的可逆延伸阻断子相同或不同)、附加序列A2和任选的附加元件(由“…”表示,这些附加元件可以与第一扩增寡聚体中的那些附加元件相同或不同)(如图中所示)。在一个或多个可逆延伸阻断子解除阻断之前,附加序列和任选的附加元件(如果存在)不是用于延伸(例如,靶链或扩增寡聚体的延伸)的模板。这可以通过在整个初始延伸或扩增过程中,避免在产物中(例如,在可能形成的任何错误引发的产物中)引入与附加序列互补的序列和其他各种元件(如果存在),从而促进更有效且更特异的延伸或扩增。可逆延伸阻断子是未阻断的(如果存在两个可逆延伸阻断子,则解除阻断可以同时或分开发生),并且可以在该方法的后阶段(例如后一个循环延伸)引入附加序列和存在的任何其他元件。

[0374] 图8A示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。初始靶链1(+)和1(-)与图4A中相同。在直的垂直箭头下方,提供了一种捕获寡聚体,其包含靶杂交序列THS、以及如图4A的寡聚体所述的附加元件A4、C'、内部延伸阻断子和C。THS结合于靶链的内部位点并经过延伸以产生产物2N(-)。提供了包含Sr的置换寡聚体,并且使其延伸,从而将2N(-)从1(+)置换并产生了2(-)。提供了如图4A中的反向扩增寡聚体,其沿着1(-)的延伸产生了2.1(+),而1(-)沿着反向扩增寡聚体的延伸产生了1(-)e。一旦2N(-)被置换(左边的曲线箭头),则

反向扩增寡聚体与2N(-)退火并各自延伸,从而产生产物2N(-)e和2.2(+),其现在包含A2'并且其中从C'置换C。该反应方案说明了置换寡聚体的使用,以促进仅在循环1中即产生靶序列的两端都包含附加序列(例如衔接子)的可捕获产物。此外,该反应方案示出了这样的实施方案,其中捕获寡聚体不结合包括靶链的3'端在内的位点。

[0375] 图8B示出了根据本公开的另外的示例性分子和另一示例性反应方案。反应方案基本上类似于图4A中描述的反应方案,不同之处在于以下1)和2)。1)初始靶链1(+)和1(-)包含附加序列,其包含靶杂交序列THS、任意的间隔序列S和置换寡聚体结合位点D。这些附加序列为用户定义的任意序列,并且可以引入靶标中,例如,通过使用包含Sr以及包含THS、S和D的序列标签的扩增寡聚体和包含Sf的扩增寡聚体的扩增反应进行引入。2)捕获寡聚体的THS结合至用户定义的THS位点。否则,如图8A所示进行反应,所得的产物示于图8B。任意的间隔序列可以用于改善置换寡聚体的延伸和随后的捕获寡聚体的置换。与图4A中所示的方案一样,该反应方案说明了置换寡聚体的使用,以促进(例如仅在循环1中)产生靶序列的两端都包含附加序列(例如衔接子)的可捕获产物。此外,该方案示出了附加的、用户定义的序列的使用,该序列可以作为捕获寡聚体和置换寡聚体这两者的结合位点。这种设计可以使该方法通用化,并且允许设计用于不同靶标的捕获寡聚体和置换寡聚体的更简单且更成本有效的手段,包括以多重形式。

[0376] 图9示出了阻断寡聚体如何阻止寡聚体中的附加序列与延伸产物中的其互补序列之间杂交的一般原理。用含有序列f的与靶链T(-)杂交的正向引物、以及含有序列A(靶标中不存在的附加序列)和序列r的与靶链T(+)杂交的反向引物进行扩增反应。延伸产生了产物1(-)和1(+)。提供了包含序列A和3'阻断部分的阻断寡聚体。在循环2中,正向引物沿着1(-)延伸,从而产生2(+),并且反向引物沿着1(+),从而产生2(-)。在循环3以及之后的循环中,阻断寡聚体与2(+)退火,这意味着r与r'的杂交对于反向引物引发沿着2(+)的延伸是必需的。这在发生任何错误引发事件的情况下是有益的,所述错误引发事件会产生少量具有r的不完全互补序列但延伸至包括A'的副产物。当没有阻断寡聚体时,由于反向扩增寡聚体的A与A'之间的相互作用,将更有利于反向扩增寡聚体与错误引发的副产物的结合,从而导致比具有阻断寡聚体时更多的副产物扩增。(同时,正向引物与2(-)退火并经过延伸)。

[0377] 图10A示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。提供了下列的组合:(i)捕获寡聚体,其包含捕获序列的第一部分和第二部分(C1和C2)、内部延伸阻断子(实心圆)、间隔序列的第一部分和第二部分(S1和S2)以及结合包含其3'端的靶链中的位点的靶杂交序列(THS)和(ii)互补寡聚体,其包含S1'和C2'。当捕获寡聚体与靶标杂交,并且靶标沿着捕获寡聚体延伸直至内部延伸阻断子,从而将S'引入靶链时,互补寡聚体被置换。捕获寡聚体也沿着靶标延伸(注意,在本文所述的其他实施方案中,捕获寡聚体可能被阻断,因而不会发生这种延伸)。提供了第二捕获试剂,该第二捕获试剂包含通过接头(锯齿形曲线)与捕获序列的互补序列C'连接的结合配偶体或固体载体(带圆圈的B)。第二捕获试剂与结合至延伸的靶标的捕获寡聚体退火,而不与结合至互补寡聚体的捕获寡聚体退火,因为后者占据了C2,其为足够量的捕获序列以基本上阻止第二捕获试剂与捕获寡聚体退火。

[0378] 图10B示出了一个实施方案,其中如果需要,寡聚体的组合可用于从组合物中捕获靶多核苷酸,组合物中包括一定量(例如,限制性量、或者小于或等于预定量的量)的靶多核苷酸。所述组合包含:捕获寡聚体,其从5'至3'包含捕获序列的第一部分C1、捕获序列的第

二部分C2、任选的间隔序列S、靶杂交序列的第二部分THS2、靶杂交序列的第一部分THS1、以及任选的阻断部分(带圆圈的X);单独的互补寡聚体,其从5'至3'包含THS2'、S'(任选的;当捕获寡聚体中存在S时可以使用或不使用)和C2'(其中元件的互补序列由“'”表示)以及位于3'端的任选的阻断部分(带圆圈的X);和第二捕获试剂,其包含捕获序列的互补序列,该互补序列从5'至3'包含C2'、C1'(C1'或C2'可以与C1和C2的全长互补或不互补)以及结合配偶体(在该图示中用生物素分子举例说明,表示为带圆圈的B)。在不存在靶多核苷酸的情况下,互补寡聚体结合捕获寡聚体,并阻断完整捕获序列的可接近性至足以阻断第二捕获试剂中捕获序列的互补序列的结合的程度(参见图顶部的互补寡聚体与捕获寡聚体的复合体)。当存在靶标时,捕获寡聚体的THS1区域结合至靶标,随后结合THS2区域(这在能量方面是有利的),因此从捕获寡聚体中置换了单独的互补寡聚体的THS2'区域。当发生这种情况时,单独的互补序列的C2'区域不再稳定到足以结合捕获寡聚体,因此变成未结合状态,从而产生如第一个箭头下方所示的可用于结合的完整捕获序列。然后,如第二个箭头下方所示,第二捕获试剂中捕获序列的互补序列结合至捕获寡聚体的捕获序列。然后可以从混合物中分离该复合体,例如,通过链霉亲和素包被的磁性微球(如本公开中别处所述),从而捕获并纯化靶多核苷酸。任选地,捕获寡聚体可以以比第二捕获试剂更大的量存在于组合中。这样的寡聚体和组合可用于从组合物中捕获一定量(例如,限制性量或小于或等于预定量的量)的靶多核苷酸。

[0379] 图11A至图11B示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。在图11A中,提供了一种捕获寡聚体,其包含基本上如图4A的捕获寡聚体所述的元件,不同之处在于THS结合至不包含3'端的靶链(其可为如图所示的环形,或为线形)中的位点。提供了一种互补寡聚体,其包含(i)与捕获寡聚体的THS相邻序列退火的靶杂交序列和(ii)A4的至少一部分的互补序列。在不存在靶链的情况下,A4的至少一部分的互补序列不足以与捕获寡聚体退火。在图11B中,互补寡聚体经过延伸,这将置换C并使其可使用第二捕获试剂(未示出)进行捕获。该方案可用于捕获环形分子和/或表示使用不在靶链3'端处结合的捕获寡聚体的另一种方法。

[0380] 图12示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。包含如图4A的捕获寡聚体中的元件且具有第二附加序列A2的捕获寡聚体在包含其3'端的位点处与靶链退火,所述第二附加序列可在C'与内部延伸阻断子之间包含混合核苷酸区段。靶链在其5'端还包含序列A5,序列A5可为任意序列、在之前的扩增反应中使用的引物结合位点、或在之前的步骤(例如,扩增或连接)中添加的序列。靶链沿着捕获寡聚体的延伸将序列A4'、C和A2'添加至靶链的3'端。捕获寡聚体中A4和延伸的靶链中A4'的存在是任选的。然后,可以使延伸的靶链与包含序列A5'、A2、C'和A4的夹板寡聚体退火,其中当使延伸的靶链与夹板寡聚体退火时,靶链5'端和3'端紧邻。然后,可以通过连接将延伸的靶链环化。A2和A2'序列用于确保延伸的靶链的5'端和3'端的正确并置。当C和C'是重复序列(例如,poly-A和poly-T或反之亦然)时,这可能是有帮助的,否则所述重复序列可能倾向于滑移,这将抑制用于连接的底物的形成。该方案可用于捕获并随后环化靶分子,例如用于滚环扩增过程。

[0381] 图13示出了根据本公开的示例性分子和示例性反应方案。提供了一种捕获寡聚体,其包含捕获序列C(包括第一部分C1第二部分和C2;未示出)、内部延伸阻断子(实心圆)、间隔序列S(包括第一部分S1和第二部分S2;未示出)和靶杂交序列THS,并且提供了包含序

列 S_2 的反向扩增寡聚体。THS和 S_2 用于产生扩增的靶标(例如,通过PCR)。添加互补寡聚体,其包含间隔序列的第一部分的互补序列 $S1'$ 和捕获序列的第二部分的互补序列 $C2'$ 。当 S' 与扩增靶标的另一条链 S 退火时, $C2'$ 不足以与扩增靶标的 C 退火。互补寡聚体退火以捕获未与扩增链退火的寡聚体。为了捕获扩增的靶标,添加包含 C' 和结合配偶体或固体载体(带圆圈的B)的第二捕获试剂。第二捕获试剂结合扩增的靶标,但不结合未与扩增链退火的捕获寡聚体,其中互补寡聚体的 $C2'$ 以足够的程度阻断 C 。

[0382] 图14示出了使用具有夹序列或没有夹序列的捕获寡聚体的方法的输出的倍数差异。

具体实施方式

[0383] A. 定义

[0384] 在详细描述本教导之前,应当理解,本公开不限于特定的组合物或方法步骤,因为这些可以变化。应当注意,如本说明书和所附权利要求书中所使用的,除非上下文另外明确地指明,否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,并且诸如“一个或以上项目”的表达包括单数指示物。因此,例如,提及“一个寡聚体”包括多个寡聚体等。连接词“或”应当以包含性意义来解释,即,等同于“和/或”,除非包含性意义在上下文中不合理。当存在类别(例如,寡聚体)的“至少一个”成员时,提及“所述”成员(例如,寡聚体)是指存在的成员(如果仅一个)或存在的成员(例如,多个寡聚体)中的至少一者(如果多于一个)。

[0385] 应当了解,在本公开中所论述的温度、浓度、量、时间等之前存在隐含的“约”,使得轻微且非实质性的偏差在本文教导的范围内。通常,术语“约”表示组合物的组分的量的非实质性变化,对组合物的活性或稳定性没有任何显著影响,例如在10%、5%、2%或1%内变化。因此,除非有相反的说明,否则在以下说明书和所附权利要求书中阐述的数值参数为近似值,其可以根据寻求获得的期望性质而变化。至少,并且不试图限制权利要求范围的等同原则的应用,每个数值参数应该至少考虑所述的有效数字的位数并通过应用常规舍入技术来解释。当没有诸如“不包括端点”之类的排除性表述时,所有范围应被解释为包括端点;因此,例如,“在10至15内”包括数值10和15以及所有中间整数和(在适当的情况下)非整数值。此外,“包含(comprise、comprises、comprising)”、“包括(contain、contains、containing)”和“含有(include、includes、including)”的使用不旨在限制。应当理解,前面的一般描述和详细描述都仅仅是示例性和说明性的,而不是对教导的限制。提供的段落标题仅仅是为了方便读者,而不是为了限制本公开。当通过引用并入的任何材料与本公开的表达内容不一致时,以本公开的表达内容为准。

[0386] 除非特别指出,否则说明书中叙述“包括”各种部件的实施方案也被认为是“由所叙述的部件组成”或“基本上由所叙述的部件组成”。“基本上由……组成”是指本文所述的组合物或方法中可以包括不会实质上改变那些组合物和方法的基本特征和颖特征的一个或多个附加的组分、成分或方法步骤。根据具体情况,这些特征包括(例如)如本文所述的与靶多核苷酸杂交并经过进一步结合和/或延伸反应的能力。

[0387] “样品”是指可包含靶多核苷酸的物质,包括但不限于生物样品、临床样品、环境样品和食物样品。环境样品包括环境材料,例如地表物质、土壤、水、空气和工业样品、以及从食品和乳品加工仪器、设备、装备、器皿、一次性和非一次性物品获得的样品。“生物”样品或

“临床”样品是指可包含靶多核苷酸的、来自活的或死的人、动物或其他生物体的组织或物质,包括(例如)拭子、洗液、抽吸物、渗出物、活检组织或体液如血液或尿液。可以对样品进行处理以物理或机械地破坏组织或细胞结构,从而将细胞内核酸释放到可能含有酶、缓冲液、盐、去污剂等的溶液中,以制备用于分析的样品。这些实例不应被解释为限制可应用于本公开的样品类型。

[0388] “核酸”和“多核苷酸”是指包含核苷或核苷类似物的多聚化合物,其具有连接在一起的含氮杂环碱基或碱基类似物以形成多核苷酸,包括常规的RNA、DNA、混合的RNA-DNA和作为它们的类似物的聚合物。核酸“骨架”可以由多种键组成,包括糖-磷酸二酯键、肽-核酸键(“肽核酸”或PNA;PCT No. WO 95/32305)、硫代磷酸酯键、甲基磷酸酯键或它们的组合中的一种或以上。核酸的糖部分可以是核糖、脱氧核糖或具有取代基(例如,2'甲氧基或2'卤素取代)的类似化合物。含氮碱基可以是常规碱基(A、G、C、T、U)、其类似物(例如肌苷或其他;参见The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams等人,第11版,1992)、嘌呤或嘧啶的衍生物(例如,N⁴-甲基脱氧鸟苷、脱氮嘌呤或氮杂嘌呤、脱氮嘧啶或氮杂嘧啶、在5或6位具有取代基的嘧啶碱基(例如5-甲基胞嘧啶)、在2、6或8位具有取代基的嘌呤碱基、2-氨基-6-甲基氨基嘌呤、0⁶-甲基鸟嘌呤、4-硫代嘧啶、4-氨基-嘧啶、4-二甲基胍-嘧啶和0⁴-烷基-嘧啶;美国专利No. 5,378,825和PCT No. WO 93/13121)。核酸可以包括一个或以上“无碱基”残基,其中主链包括聚合物的无碱基位点(美国专利No. 5,585,481)。核酸可以仅包含常规RNA或DNA糖、碱基和连接键,或可以包括常规组分和取代(例如,具有2'甲氧基连接键的常规碱基、或含有常规碱基以及一种或以上碱基类似物的聚合物)。核酸包括“锁核酸”(LNA),其为包含一个或以上LNA核苷酸单体的类似物,所述LNA核苷酸单体具有锁定在模拟糖构象的RNA中的双环呋喃糖单位,其可增强对互补RNA和DNA序列的杂交亲和性(Vester和Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41)。能够影响杂交复合体稳定性的寡聚体的实施方案包括PNA寡聚体、包含2'-甲氧基或2'-氟取代的RNA的寡聚体、或影响杂交复合体的总体电荷、电荷密度或空间关系的寡聚体,包括含有带电连接键(例如硫代磷酸酯)或中性基团(例如甲基磷酸酯)的寡聚体。除非另有说明,否则甲基化胞嘧啶如5-甲基胞嘧啶可以与任何前述骨架/糖/连接键、包括RNA或DNA骨架(或它们的混合物)结合使用。RNA和DNA等同物具有不同的糖部分(即,核糖相对于脱氧核糖),并且可以因RNA中存在尿嘧啶而DNA中存在胸腺嘧啶而不同。RNA和DNA等同物之间的差异不会造成同源性差异,因为等同物与特定序列具有相同程度的互补性。应当理解,当提及寡核苷酸、扩增子或其他核酸的长度范围时,该范围包括所有整数(例如,长度为19至25个相连的核苷酸包括19个、20个、21个、22个、23个、24个和25个)。除非另有说明,否则关于“SEQ ID NO: X”是指相应列表条目的碱基序列,并且不需要主链(例如RNA、2'-O-Me RNA或DNA)或碱基修饰(例如胞嘧啶残基的甲基化)的同一性。此外,除非另有说明,否则T残基被理解为可与U残基互换,反之亦然。

[0389] “靶多核苷酸”是指使用本文所述的组合物或方法寻求捕获、分离、扩增、检测和/或测序的多核苷酸。在一些实施方案中,靶多核苷酸包含来自生物体(例如,任何病毒、原核生物、真核生物、原生生物、植物、真菌、动物、哺乳动物或其他生物实体,其可以是活的或以前是活的)的DNA或RNA的序列。示例性DNA包括基因组DNA、游离型或质粒DNA以及线粒体DNA。示例性的RNA包括mRNA、更通常为转录的RNA、核糖体RNA、miRNA、非编码RNA等(并且在适用的情况下,为基因组RNA,例如在某些病毒的情况下)。靶多核苷酸还包括扩增子,其包

含上述核酸,其中可以添加附加序列(例如本文所述的任何附加序列)。在一些实施方案中,靶多核苷酸包含非天然存在的序列,例如,由体外合成、连接、定点诱变、重组等产生的序列。

[0390] “寡聚体”或“寡核苷酸”是指通常小于1,000个核苷酸(nt)的核酸,包括在下限为约2nt至5nt且上限为约500nt至900nt的尺寸范围内的那些核酸。一些具体实施方案为在下限为约5nt至15nt、16nt、17nt、18nt、19nt或20nt且上限为约50nt至600nt的尺寸范围内的寡聚体,并且其他具体实施方案为在下限为约10nt至20nt且上限为约30nt至100nt的尺寸范围内的寡聚体。寡聚体可以从天然存在的来源纯化,但可以通过使用任何熟知的酶促或化学方法合成。寡聚体可以用功能名称(例如捕获探针、引物或启动子引物)来表示,但是本领域技术人员将理解,这样的术语是指寡聚体。寡聚体可以通过自杂交或通过与其他多核苷酸杂交形成二级和三级结构。这样的结构可以包括但不限于双链体、发夹、十字型、弯曲型和三链体。可通过任何方式产生寡聚体,包括化学合成、DNA复制、逆转录、PCR或它们的组合。在一些实施方案中,在反应(例如,通过在酶促延伸反应中引物的延伸)中产生了形成侵入性酶切(invasive cleavage)结构的寡聚体。

[0391] “任意序列”是指由用户选择、选定、确定、设计等的任何序列,通常用于在下游过程中提供期望的功能或目的。在优选的模式中,任意序列被设计成在给定的方法条件下与靶序列不互补或不与其反应。在一些实施方案中,任意序列可以是随机产生的序列或序列的集合,例如用作独特的分子标识符。

[0392] “捕获寡聚体”、“捕获寡核苷酸”、“捕获探针”、“靶捕获寡聚体”和“捕获探针寡聚体”可互换使用,是指包含以下序列的核酸寡聚体:(i)能够特异性杂交靶核酸中的靶序列的靶杂交序列和(ii)能够杂交第二寡聚体的捕获序列,所述第二寡聚体例如固定在固体载体上或与结合配偶体连接以促进包含捕获寡聚体、靶标和第二寡聚体的复合体与组合物中的其他分子分离。

[0393] “扩增子”或“扩增产物”是指在核酸扩增反应中产生的核酸分子,其来源于模板核酸。扩增子或扩增产物包含扩增的核酸序列(例如,靶核酸),其可以与模板核酸同向或反向。在一些实施方案中,扩增子的长度为约100至30,000个核苷酸、约100至10,000个核苷酸、约100至5000个核苷酸、100至2000个核苷酸、约100至1500个核苷酸、约100至1000个核苷酸、约100至800个核苷酸、约100至700个核苷酸、约100至600个核苷酸或约100至500个核苷酸。

[0394] “扩增寡核苷酸”或“扩增寡聚体”是指与靶核酸或其互补序列杂交并参与核酸延伸或扩增反应的寡核苷酸,例如充当引物和/或启动子-引物的寡核苷酸。扩增寡聚体还包括启动子提供者,其包含可启动转录但不必通过DNA聚合酶延伸的启动子,并且可包含3'阻断部分。特定的扩增寡聚体包含至少约10个连续碱基、并且任选地至少11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个连续碱基的靶杂交序列,该序列与靶核酸序列或其互补链的区域互补。靶杂交序列的其他示例性长度或长度范围在本文的别处描述,并且可应用于扩增寡聚体。连续碱基可以与结合扩增寡聚体的靶序列至少约70%、至少约80%、至少约90%或完全互补。在一些实施方案中,扩增寡聚体包含位于互补序列的两个片段之间的中间接头或非互补序列,例如,其中寡聚体的两个互补片段共同包含至少约10个互补碱基,并且任选地共同包含至少11个、12个、13个、14个、15个、

16个、17个、18个、19个或20个互补碱基。在一些实施方案中，扩增寡聚体为约10至约60个碱基长，并且任选地可以包括经修饰的核苷酸。扩增寡聚体可以任选地被修饰，例如通过包括与靶序列非互补的5'区域进行修饰。这种修饰可以包括功能性添加，例如标签、启动子或用于操纵或扩增引物或靶寡核苷酸的其他序列。

[0395] “引物”是指与模板核酸杂交并具有通过聚合延伸的3'端的寡聚体。引物可以任选地被修饰，例如通过包括与靶序列不互补的5'区域进行修饰。这种修饰可包括功能性添加，例如标签、启动子或用于操纵或扩增引物或靶寡核苷酸的其他序列。

[0396] 第一序列为第二序列的“互补序列”（或相当于，“互补于”第二序列），其中第一序列具有足以在合理的结合条件下与第二序列退火的长度和含量，所述结合条件可以是但不必是本文所述的严格杂交条件，并且还包括（例如）标准PCR和涉及引物或探针结合和延伸的其他技术中所用的退火条件。

[0397] “标签”是指除靶杂交序列之外的可包含在寡聚体中的任何附加序列。除了靶杂交序列之外，存在的任何任意序列都可以用作标签。标签包括但不限于衔接子（见下文）。标签的其他实例为启动子、本文别处所述的混合核苷酸元件、以及包括夹在内的稳定序列。

[0398] “衔接子”是这样一种序列，其对添加该序列的分子进行调整以提供针对另一分子（例如，测序引物或捕获寡聚体的靶杂交序列（THS））的结合位点。结合位点可为通用结合位点（例如，以多重形式结合多个全部具有相同的THS的捕获寡聚体，或结合通用引物）。结合位点的其他实例为置换寡聚体、探针、捕获寡聚体或核酸修饰酶（例如RNA聚合酶、引发酶、连接酶、RNA酶（例如RNA酶H）或限制酶）的结合位点，或用于附接至固相（包括通过固相引物或捕获寡聚体进行附接）的结合位点，包括用于克隆扩增，或其他一种或多种用于下游应用（例如富集、文库制备、克隆扩增或测序）的功能元件。因此，样品条形码或索引序列、关键序列或校准序列、分子条形码（包括独特的分子标识物）、下游克隆的位点和靶分子环化的位点是可以包括在衔接子中的元件的其他实例。

[0399] “接头”是将寡聚体的一部分连接到另一部分的序列或非序列元件或它们的组合。在一些实施方案中，序列接头包含不与组合或组合物中的靶多核苷酸和/或其他寡聚体杂交的序列。在一些实施方案中，非序列接头包含烷基、烯基、酰氨基或聚乙二醇基团 $[-CH_2CH_2O-]_n$ 。

[0400] “稳定序列”为夹、混合核苷酸区域或功能为增加双链区的稳定性和/或控制杂交叠合（例如，当位于倾向于滑动的序列附近时，例如含有重复核苷酸的序列，例如poly-dA或poly-dT序列）的其他序列。“对准序列”为控制杂交叠合的稳定序列。除了本文别处所述的夹和混合核苷酸区域之外，稳定序列包括富含GC的序列和含有增强亲和性的经修饰的序列。

[0401] “内部延伸阻断子”是位于核酸序列内或与核酸结合的元件，其阻止互补链沿着核酸延伸。实例包括非核苷酸接头、或一个或以上脱碱基位点、非天然核苷酸或经化学修饰的天然核苷酸、以及下文论述的可逆延伸阻断子。

[0402] “可逆延伸阻断子”是内部延伸阻断子，其阻断功能可以逆转，即允许互补链延伸。示例性的可逆延伸阻断子为具有互补核苷酸的非天然核苷酸，所述互补核苷酸适合于聚合酶并且相对于天然核苷酸表现出特异性（即，聚合酶不会跨过可逆延伸阻断子而添加天然碱基）。提供互补核苷酸会逆转阻断功能。非天然碱基对的实例为Iso-dC或Iso-dG；黄嘌呤

或5-(2,4-二氨基嘧啶);2-氨基-6-(N,N-二甲基氨基)嘌呤或吡啶-2-酮;4-甲基苯并咪唑或2,4-二氟甲苯;7-氮杂吡啶或异喹啉酮;dMMO2或d5SICS;或dF或dQ,其中这些非天然碱基对的任一成员都可以作为可逆延伸阻断子。可逆延伸阻断子的其他实例为经化学修饰的核苷酸,其中所述修饰为通过可逆连接键进行附接,并且所述连接键可以通过提供以下任意一者或以上而逆转:化学品、酶、温度变化、试剂组成变化等;可逆的核酸结构特征;或与捕获寡聚体可逆结合的分子,任性地,其中所述可逆结合的分子为蛋白质、酶、脂质、碳水化合物或化学部分。

[0403] “核酸扩增”是指产生靶核酸序列或其互补序列或其片段(即,含有少于完整靶核酸的扩增序列)的多个拷贝的任何体外方法。核酸扩增方法的实例包括转录相关方法,例如转录介导的扩增(TMA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)和其他方法(例如美国专利No.5,399,491、No.5,554,516、No.5,437,990、No.5,130,238、No.4,868,105和No.5,124,246)、复制酶介导的扩增(例如美国专利No.4,786,600)、聚合酶链式反应(PCR)(例如美国专利No.4,683,195、No.4,683,202和No.4,800,159)、滚环扩增(RCA)(例如美国专利No.5,854,033和No.6,143,495)、重组酶聚合酶扩增(RPA)(例如美国专利No.7,666,598)、连接酶链式反应(LCR)(例如欧洲专利申请0320308)和链置换扩增(SDA)(例如美国专利No.5,422,252)。复制酶介导的扩增使用自我复制RNA分子和诸如QB复制酶之类的复制酶。PCR扩增使用DNA聚合酶、引物和热循环步骤来合成DNA或cDNA的两条互补链的多个拷贝。LCR扩增使用至少四个单独的寡核苷酸,通过使用多个杂交、连接和变性循环来扩增靶标及其互补链。SDA使用含有限制性内切核酸酶识别位点的引物,该酶将在包括靶序列的半修饰DNA双链体的一条链上产生切口,然后在一系列引物延伸和链置换步骤中进行扩增。具体实施方案使用PCR,但对于本领域普通技术人员显而易见的是,本文公开的寡聚体可容易地用作其他扩增方法中的引物。

[0404] “杂交(hybridization或hybridize)”是指两条完全或部分互补的核酸链在特定的杂交试验条件下以平行或反平行的方向聚集在一起,以形成具有双链区的稳定结构的能力。“杂交”与“退火(annealing或anneal)”同义。这种双链结构(有时称为杂合体)的两个组分链通过氢键结合在一起。尽管这些氢键最通常在单个核酸链上的含有碱基腺嘌呤和胸腺嘧啶或尿嘧啶(A和T或U)或胞嘧啶和鸟嘌呤(C和G)的核苷酸之间形成,但碱基配对也可在不是这些“规范”对的成员的碱基之间形成。非规范碱基配对是本领域公知的。(参见,例如R.L.P.Adams等人,The Biochemistry of the Nucleic Acids(第11版,1992))

[0405] 如本文所使用的,术语“特异性杂交”是指在给定杂交条件下,探针、引物或其他寡聚体(例如捕获寡聚体)基本上仅与包含一个或多个靶序列的样品中的其一个或多个靶序列可检测地杂交(即,与非靶序列几乎不发生杂交或没有可检测的杂交)。值得注意的是,寡聚体可以被配置为与一组靶标(例如,来自特定分类群(例如,属)的生物体的序列)中的一个靶标进行特异性杂交。在一些实施方案中,探针、引物或其他寡聚体(例如捕获寡聚体)可与其靶核酸杂交以形成稳定的寡聚体:靶标杂合体,但不形成足够数量的稳定的寡聚体:非靶标杂合体,以用于扩增或捕获,这视情况而定。与靶核酸特异性杂交的扩增寡聚体和捕获寡聚体可用于扩增和捕获靶核酸,但不可用于扩增和捕获非靶核酸,尤其是种系密切相关的生物体的非靶核酸。因此,寡聚体与靶核酸杂交的程度远大于寡聚体与非靶核酸杂交的程度,以使本领域普通技术人员能够准确地捕获、扩增和/或检测来源于特定靶标(例如,

特定病原体)的核酸的存在(或不存在)。通常,降低寡核苷酸序列和其靶序列之间的互补性程度将降低寡核苷酸与其靶区域的杂交程度或速率。然而,包含一个或以上非互补核苷或核碱基可促进寡核苷酸对于非靶核酸序列的区分能力。

[0406] “严格杂交条件”或“严格条件”是指这样的条件:(1)允许寡聚体优先与靶核酸杂交而不是与不同的核酸(例如,在同一性上,具有与靶核酸低至1个核苷酸差异的核酸)杂交或(2)仅允许具有较高亲和性的靶杂交序列的寡聚体(相对于具有较低亲和性的靶杂交序列的寡聚体)与靶标杂交,例如,其中较高亲和性的靶杂交序列比较低亲和性的靶杂交序列更长和/或较高亲和性的靶杂交序列包含增强亲和性的修饰而较低亲和性的靶杂交序列不包含该增强亲和性的修饰。虽然严格杂交条件的定义没有变化,但可用于严格杂交的实际反应环境可根据以下因素而变化,这些因素包括GC含量和寡聚体长度、寡聚体序列与测试样品中可能存在的靶核酸和非靶核酸序列之间的相似程度。杂交条件包括温度以及杂交试剂或溶液的组成。当单价阳离子浓度在约0.4M至1M的范围内、二价阳离子浓度在约0至10mM的范围内并且pH在约5至9的范围内时,使用本公开的寡聚体的示例性严格杂交条件对应于约40°C至75°C的温度,例如40°C至50°C、50°C至60°C或60°C至75°C。杂交条件的其他细节将在实施例部分中阐述。本领域普通技术人员可以容易地确定其他可接受的严格杂交条件。

[0407] “标记物”或“可检测标记物”是指直接或间接与被检测或产生可检测信号的探针连接的部分或化合物。可以使用任何可检测的部分,例如放射性核素、诸如生物素或亲和素之类的配体、酶、酶底物、反应性基团、诸如染料之类的发色团或赋予可检测的颜色的颗粒(例如胶乳或金属珠粒)、发光化合物(例如生物发光、发磷光或化学发光化合物)和荧光化合物(即,荧光团)。荧光团的实施方案包括吸收(例如,峰值吸收波长为)约495nm至690nm范围内的光并且发射(例如,峰值发射波长为)约520nm至710nm范围内的光的那些荧光团,其包括被称为FAMTM、TETTM、HEX、CAL FLUORTM(橙色或红色)、CY和QUASARTM化合物的荧光团。荧光团可以与猝灭剂分子组合使用,当与荧光团紧密接近时,猝灭剂分子吸收光以减弱背景荧光。这样的猝灭剂是本领域熟知的,并且包括(例如)BLACK HOLE QUENCHERTM(或BHQTM)、Blackberry Quencher[®](或BBQ-650[®])、Eclipse[®]或TAMRATM化合物。

[0408] “不可延伸的”寡聚体或包括“在其3'端的阻断部分”的寡聚体包括足够接近其3'末端(也称为3'端)以阻止延伸的阻断部分。出于本公开的目的,足够接近3'末端以阻断延伸的任何阻断部分被认为“位于”3'末端,即使其不与3'羟基或氧结合或代替3'羟基或氧存在。在一些实施方案中,靠近3'端的阻断部分在3'端的五个残基内,并且足够大以限制聚合酶与寡聚体的结合,并且其他实施方案包括共价连接至3'端的阻断部分。许多不同的化学基团可用于阻断3'端,例如烷基、非核苷酸接头、烷烃-二醇双脱氧核苷酸残基(例如3'-己二醇残基)和虫草素。阻断部分的其他实例包括3'-脱氧核苷酸(例如,2',3'-双脱氧核苷酸);3'-磷酸化核苷酸;荧光团、猝灭剂或干扰延伸的其他标记物;反向核苷酸(例如,通过3'-至-3'磷酸二酯与前一核苷酸连接,任选地具有暴露的5'-OH或磷酸酯);或与寡核苷酸连接从而阻止初期核酸链通过聚合酶进一步延伸的蛋白质或肽。本公开的不可延伸的寡核苷酸可以是至少10个碱基的长度,并且可以是多至15个、20个、25个、30个、35个、40个、50个或更多个核苷酸的长度。包含可检测标记物的不可延伸的寡核苷酸可以用作探针。

[0409] “结合配偶体”为可用于形成非共价结合的一对部分中的成员。结合配偶体的示例性组为生物素和生物素结合剂。结合配偶体的其他实例包括但不限于地高辛配基/抗地高

辛配基,并且更普遍地为抗体及其靶标。

[0410] “生物素结合剂”为能够特异性结合生物素的试剂(例如多肽)。链霉亲和素、亲和素和中性亲和素代表了生物素结合剂的实例。抗生物素抗体也被认为是生物素结合剂。

[0411] 术语“抗体”包括任何包含具有互补性决定区和框架区(例如VH和VL结构域)的功能性抗原结合区的多肽,包括但不限于scFv、Fab和全长抗体(例如IgA、IgG、IgD、IgE或IgM抗体)。

[0412] 如本文所使用的,“试剂盒”是试剂的包装组合,其包括(例如)本文公开的一种或以上寡核苷酸。例如,试剂盒可以包括一个或以上小瓶、管或筒的包装组合,所述一个或以上小瓶、管或筒具有多个腔室,腔室中包含用于分离靶多核苷酸的试剂。试剂可包括捕获寡核苷酸、引物寡核苷酸和探针寡核苷酸(例如本文所述的那些)、以及核苷酸聚合酶(例如,DNA聚合酶、逆转录酶、RNA聚合酶等)。在某些实施方案中,试剂可以是液体形式、固体形式(例如冻干物)或半固体形式(例如玻璃)。在一些实施方案中,寡核苷酸试剂和酶试剂作为单个冻干组合物(例如,球团)的组分存在于试剂盒中。在这种情况下,引物、探针和一种或以上酶(例如DNA聚合酶)可以冻干形式置于同一反应腔室或容器中,所述冻干形式可以用水性试剂进行重构,其中同一试剂盒中包括含有水性试剂的单独小瓶或管。试剂盒可以进一步包括许多任选的组分,例如其他寡聚体。试剂盒中可能存在的其他试剂包括适于进行体外扩增的试剂,例如缓冲液、盐溶液和/或适当的三磷酸核苷酸(例如dATP、dCTP、dGTP、dTTP;和/或ATP、CTP、GTP和UTP)。试剂盒可以进一步包括用于在样品制备程序中直接或间接固定寡聚体的固体载体材料(例如,可磁性吸引的颗粒,例如磁珠)。在某些实施方案中,试剂盒进一步包括用于实施根据本公开的方法的一组说明书,其中所述说明书可涉及包装插页和/或试剂盒或其组分的包装。

[0413] 如本文所使用的,寡聚体的“组合”是指彼此接近的任何多种寡聚体,例如在试剂盒中的不同容器或相同容器中、或在彼此并置的组合物或组合物组中,例如在板、架或其他容器中。

[0414] 除非另有定义,否则本文所使用的所有科学和技术术语的含义与相关领域技术人员通常理解的含义相同。一般定义可以在与分子生物学领域相关的技术书籍中找到,例如,第2版微生物学和分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed. (Singleton等人,1994, John Wiley&Sons, New York, NY))或哈珀柯林斯生物学词典(The Harper Collins Dictionary of Biology, (Hale&Marham,1991, Harper Perennial, New York, NY))。

[0415] B. 示例性组合物、试剂盒、方法和用途

[0416] 本公开提供了用于分离靶多核苷酸和/或衔接标签(诸如衔接子)的寡聚体、组合物和试剂盒。分离包括以有限量(有限捕获)和特定量(拷贝控制)进行分离。例如,在某些工作流程中,希望捕获(或扩增和捕获)靶多核苷酸(其例如可为天然DNA或RNA或扩增子)的量不大于预定量(例如,诸如测序文库制备之类的下游应用的最大期望值),但除此以外,希望捕获靶多核苷酸的量尽可能高。类似地,在某些工作流程中,期望捕获(或扩增和捕获)预定的特定量(例如,特定数量的分子或分子拷贝)的靶多核苷酸(其例如可为天然DNA或RNA、扩增子或测序文库),以用于下游应用(例如,克隆扩增,包括在下一代测序工作流程中)。此外,在某些工作流程中,期望将附加序列引入靶多核苷酸中,例如将衔接子引入测序文库

中。本文描述了包含各种元件的寡聚体。除非另有说明,否则在寡聚体的所述元件之前、之间或之后可以存在其他元件,只要这些其他元件不干扰所述元件的功能性即可。

[0417] 在一些实施方案中,例如,在试剂盒或组合物中提供寡聚体。寡聚体通常包含靶杂交区域,例如,靶杂交区域被配置为特异性杂交至靶多核苷酸。虽然可以使用不同长度和碱基组成的寡聚体,但在一些实施方案中,本公开中的寡聚体的靶杂交区域的长度阐述于论述靶杂交序列的段落中。在一些实施方案中,寡聚体包含如本文别处详细阐述的附加序列区域,其可以位于靶杂交区域的5'。在一些实施方案中,寡聚体不包含第二序列区域。在一些实施方案中,附加序列区域包含捕获序列。

[0418] 1. 用于拷贝控制和其他应用的捕获寡聚体和组合

[0419] a. 包含捕获序列及其互补序列的捕获寡聚体

[0420] 在一些实施方案中,提供了一种捕获寡聚体,其包含捕获序列、内部延伸阻断子、捕获序列的互补序列以及靶杂交序列,其中捕获序列的互补序列被配置为当不存在与靶杂交序列以及捕获序列的互补序列退火的延伸靶序列时与捕获序列退火。如图1A至图1C中示例性捕获寡聚体所示,可以以靶依赖性方式捕获此类捕获寡聚体,因为捕获序列最初与捕获序列的互补序列(C')退火(图1A),但在靶多核苷酸延伸后变得可通过C'进行结合(图1B)。内部延伸阻断子阻止靶标沿着捕获序列本身延伸。因此,靶标-捕获寡聚体延伸产物易于结合至第二捕获试剂,第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列和结合配偶体或固体基质(图1C)。同时,任何未结合的捕获寡聚体不作为延伸模板,使得C'保持与捕获序列退火,并且未结合的捕获寡聚体基本上不与第二捕获试剂相互作用。因此,在分离靶-捕获寡聚体延伸产物的复合体后,未结合的捕获寡聚体将基本上保留在原始溶液中,分离可以使用基于结合配偶体(例如生物素)或固体基质(例如磁珠)的特性的适当标准技术来完成。图2A示意性地示出了与珠粒结合的靶标和捕获寡聚体的复合体,并且图2B示出了靶标从珠粒的洗脱。

[0421] 这种捕获寡聚体及其与合适的第二捕获试剂的组合可用于需要捕获、限制性捕获或拷贝控制的任何应用,以及需要引入附加序列的任何应用。本文所述的具有可延伸的3'端的捕获寡聚体可以用作扩增寡聚体(例如引物),例如,连同具有捕获寡聚体的反向取向的扩增引物、靶链或扩增子链,以产生延伸产物或扩增子,然后可以通过使形成的复合体与第二捕获试剂接触并进行适当的分离步骤来分离所述延伸产物或扩增子。在其他实施方案中,捕获寡聚体不用作扩增寡聚体,或不用于多个循环延伸,并且扩增子或天然DNA或RNA可简单地通过与捕获寡聚体退火(并且任选地或在适当的情况下,本文论述的其他寡聚体,如互补寡聚体或置换寡聚体加上反向扩增寡聚体,可促进捕获序列的互补序列的靶依赖性置换,如本文别处详细论述的),用聚合酶进行延伸步骤,然后使延伸的复合体与第二捕获试剂接触,并进行适当的分离步骤,从而进行捕获。在任一情况中,可以选择第二捕获试剂的量以设定捕获所需的特定量或最大量。此外,可以选择捕获寡聚体以及第二捕获试剂这两者的量以设定捕获所需的特定量或最大量,例如捕获寡聚体的量可以小于靶多核苷酸的量,并且第二捕获试剂的量可以小于捕获寡聚体的量。

[0422] 根据本公开的捕获寡聚体的示例性式子为

[0423] 5'-A1-C-L-B-A2-C'-A3-RB-A4-THS-X-3'

[0424] 其中A1为任选存在的第一附加序列;

- [0425] C为捕获序列,
- [0426] L为任选存在的接头,
- [0427] B为内部延伸阻断子,
- [0428] A2为任选存在的第二附加序列,
- [0429] C'为捕获序列的互补序列,
- [0430] A3为任选存在的第三附加序列,
- [0431] RB为任选存在的可逆延伸阻断子,
- [0432] A4为任选存在的第四附加序列,
- [0433] THS为靶杂交序列;以及
- [0434] X为任选存在的阻断部分。

[0435] 在本文所述的包括但不限于根据上式的捕获寡聚体的实施方案中,在每个附加序列之前的序数(第一、第二、第三和第四)仅用于允许具体提及每个可能的单独的附加序列,并不一定暗示存在任何其他附加序列。因此,捕获寡聚体可包含任何一个附加序列、或者两个或更多个附加序列的任何组合,例如,仅第四附加序列;第三附加序列和第四附加序列;第一附加序列、第三附加序列和第四附加序列;等等。此外,任何附加序列可以包含多个元件(例如,条形码和引物结合位点,或这些中的任一者或两者加上另外的序列)或由单个元件组成。

[0436] 当存在第一附加序列时,第一附加序列可包含任意序列或一个或以上碱基,其可用于(例如)保护捕获序列的5'端或用作酶切位点、酶识别位点(例如,针对限制性内切核酸酶)或用于稳定双链体和/或对准双链体区域的叠合的稳定序列(例如,夹)。图3示出了包含夹序列的捕获寡聚体。

[0437] 捕获序列可以包括适合用作捕获序列的任何序列,例如本文所述的任何捕获序列实施方案,包括在上文和下文的寡聚体元件段落阐述的实施方案中。

[0438] 当存在接头时,接头可为序列或非序列元件或它们的组合。接头可以提供柔性以促进捕获序列的互补序列与捕获序列的自杂交,并且当捕获序列的互补序列与捕获序列杂交时可采用环形构象(例如,当接头为序列元件时,基本上为单链)。示例性的非序列接头包括烷基、烯基、酰氨基和聚乙二醇基团 $[(-CH_2CH_2O-)_n]$,其示例性长度为3个、6个、12个或18个或更多个原子。本文别处提供了另外的接头实施方案。

[0439] 内部延伸阻断子是不会被DNA聚合酶穿过的元件,因此阻止了与内部阻断延伸序列作为一部分的链互补的链的延伸。在一些实施方案中,内部延伸阻断子为脱碱基位点、经化学修饰的核苷酸、非天然核苷酸(例如isoC或isoG或本文别处所述的其他非天然核苷酸;为了使阻断子有效,反应混合物中必须不存在互补的非天然核苷酸,例如,如果isoC为阻断子,则不能具有isoG,反之亦然)、或非序列元件(例如,上述任何非序列接头)。非序列接头可以起到内部延伸阻断子的作用,或者可以存在单独的接头和内部延伸阻断子。当将诸如isoC或isoG之类非天然碱基用作内部延伸阻断子时,不具有互补碱基,从而使得DNA聚合酶不能穿过经修饰的碱基的位置。

[0440] 当存在第二附加序列时,第二附加序列可以包含标签,例如,如下所述的混合核苷酸元件。在一些实施方案中,例如,当与另一附加序列中的相应互补序列组合使用时,第二附加序列包含酶切位点或用于稳定和/或对准双链体区域的叠合的序列(例如,夹序列)。

[0441] 捕获序列的互补序列可包含适合用作捕获序列的任何序列的互补序列,例如本文所述的任何捕获序列实施方案的互补序列,包括在上文和下文的寡聚体元件段落阐述的实施方案中。在一些实施方案中,捕获序列的互补序列与捕获序列的互补水平为至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。此外,捕获序列的互补序列可仅与捕获序列的一部分互补,例如与捕获序列的50%、60%、70%、80%或90%互补。

[0442] 当存在第三附加序列时,例如当与第一附加序列中相应的互补序列组合使用时,第三附加序列可包含标签或酶切位点或用于稳定和/或对双链体区域的叠合的序列(例如,夹序列)。互补的夹序列可以使自杂交在能量上更有利和/或帮助互补区域C和C'保持在所需的叠合(对准)中,并且可以改善捕获寡聚体的性能,如实例中所证明的那样。图3中示出了包含夹序列的捕获寡聚体。在一些实施方案中,第三附加序列包含衔接子或标签,例如这样的序列,该序列可以用作引物(包括测序引物)的结合位点、后续反应或步骤中锚定寡聚体或探针结合位点、或酶切或酶(例如,限制性内切核酸酶)结合位点,或用作条形码或其他标签,例如,以鉴定样品或分子的来源并促进涉及诸如高度并行测序之类的混合测序(pooling)的方法。这样的序列可为第三附加序列的一部分、以及稳定(例如,夹)序列。

[0443] 当存在可逆延伸阻断子时,可逆延伸阻断子可用于在第一时间段内限制互补链沿着捕获寡聚体延伸,(例如)以在捕获寡聚体用作扩增寡聚体的情况下,保持靶杂交序列(THS)与靶多核苷酸结合的特异性。示例性的可逆延伸阻断子包括IsoG和IsoC以及本文别处描述的其他可逆延伸阻断子,可以通过添加互补核苷酸而解除阻断(例如IsoC用于IsoG的解除阻断,反之亦然)。当使用可逆延伸阻断子时,应当将不同于可逆延伸阻断子的元件用作捕获序列的互补序列的5'的内部延伸阻断子。可逆延伸阻断子也可以用于扩增寡聚体(例如,在延伸/扩增反应中,除了捕获寡聚体之外的反向扩增引物),置于THS的5'和存在的任何其他序列的3'。如上所述,除了其他优点之外,这可以在扩增过程中保持扩增寡聚体的THS对于靶多核苷酸的结合特异性。可逆延伸阻断子可以在扩增后逆转,并且可以用单个延伸步骤产生附加序列的互补序列,从而将附加序列引入扩增子中。如果捕获寡聚体还包含可逆延伸阻断子,则它也可以任选地被逆转,并且在扩增寡聚体中的类似过程的同时,产生直到内部延伸阻断子的捕获寡聚体的互补序列(如上所述)。该单个延伸步骤可以任选地在与扩增反应相同的反应混合物中进行。这代表了一种快速且简单的方法,以保持特异性,同时还将附加序列引入产物中(例如,可以用于在测序文库中添加衔接子)。

[0444] 当存在第四附加序列时,第四附加序列可包含衔接子或标签,例如,该衔接子或标签可充当引物、探针、锚定寡核苷酸等的结合位点序列,或充当条形码或其他标签,例如,以鉴定样品或分子的来源并促进涉及诸如高度并行测序之类的混合测序的方法。这样的序列可为第四附加序列的一部分、以及稳定序列、对准序列、酶切位点或酶结合位点。在一些实施方案中,第四附加序列包含稳定序列或对准序列。

[0445] 在任何前述实施方案中,其中任何所述的附加序列(或通过沿着附加序列延伸形成的其互补序列)包含对下游过程有用的标签(例如,添加对文库制备、克隆扩增、测序或数据分析有用的衔接子),将标签添加与靶捕获进行组合可以使总体工作流程更为高效。

[0446] 靶杂交序列可为具有足够长度和互补性以与给定靶标杂交的任何序列,例如本文所述的任何靶杂交序列实施方案,包括在上文和下文的寡聚体元件段落阐述的实施方案中。

[0447] 当存在阻断部分时,阻断部分可为阻止聚合酶延伸3'端的任何部分。在本文别处详细描述了示例性的阻断部分。阻断部分可以阻止捕获寡聚体的二聚体的延伸和随后的捕获,否则,例如,在捕获寡聚体的浓度高和/或靶杂交序列具有一定的二聚化潜力时,可能发生捕获寡聚体的二聚体的延伸和随后的捕获。参见图6。

[0448] i. 组合

[0449] 在一些实施方案中,提供了包含根据本公开的捕获寡聚体以及一种或以上另外的寡聚体的组合。另外的寡聚体可以包括以下物质中的任一种、或以下物质中的两种或以上的任何组合:互补寡聚体,其用于捕获靶分子(其可为环形),而不使捕获寡聚体结合至包含靶标的3'端的位点(关于说明该组合及其捕获环形靶分子的用途,参见图11A至图11B);扩增寡聚体,例如,其以相对于捕获寡聚体的反向方向结合靶多核苷酸;一对扩增寡聚体,例如,被配置为对靶标进行扩增;第二捕获试剂,例如包含捕获序列的互补序列和结合配偶体或固体载体;夹板寡聚体;阻断寡聚体;或置换寡聚体。在本文别处详细描述了这些另外的寡聚体。组合也可包含一种或以上另外的捕获寡聚体,例如用于进行多重靶多核苷酸的多重捕获。另外的捕获寡聚体可伴随有其他另外的寡聚体,例如适当的反向扩增寡聚体、置换寡聚体、阻断寡聚体等。当使用多种捕获寡聚体时,这些捕获寡聚体可具有相同或足够相似的捕获序列,以便可以使用单一的第二捕获试剂。可供选择地,这些捕获寡聚体可以具有不同的捕获序列,(例如)从而使得如果一个靶标以高丰度存在,则其所得的具有延伸的捕获寡聚体的复合体将不会使第二捕获试剂饱和以排除较低丰度的靶标复合体。

[0450] 在一些实施方案中,组合包含本文所述的捕获寡聚体和互补寡聚体,捕获寡聚体包括捕获序列的互补序列、至少一个第二、第三或第四附加序列以及其他元件,并且互补寡聚体在5'至3'方向上包含靶杂交序列和第二、第三或第四附加序列的至少一部分的互补序列。参见图11A。互补寡聚体的靶杂交序列应当结合至捕获寡聚体的靶杂交序列的靶标附近(根据靶标的取向,为3'侧)的靶标的一部分。第二或第三附加序列的至少一部分的互补序列应当被配置为使得其以靶依赖性方式与捕获寡聚体退火,即,不应当在不存在靶标时退火。靶标、捕获寡聚体和互补寡聚体的三元复合体是底物,以用于通过聚合酶延伸互补寡聚体3'端,并且通过这种延伸从捕获序列的互补序列置换捕获序列,使其可用于使用第二捕获试剂进行捕获。

[0451] b. 包含捕获寡聚体和互补寡聚体的组合

[0452] 在一些实施方案中,提供了包含捕获寡聚体和互补寡聚体的组合,其中:(a) 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:捕获序列,其包含第一部分和第二部分;内部延伸阻断子;间隔序列,其包含第一部分和第二部分;和靶杂交序列;以及(b) 互补寡聚体在3'至5'方向上包含:捕获序列的第二部分的互补序列、以及间隔序列的至少第一部分的互补序列,其中捕获序列的第二部分的互补序列和间隔序列的第一部分的互补序列被配置为当不存在间隔序列的互补序列时同时与捕获寡聚体退火。参见图10A,其示出了这种组合及其使用。

[0453] 这种捕获寡聚体可具有下式:

[0454] 5'-A1-C1-C2-B-A2-S1-S2-A3-RB-A4-THS-X-3'

[0455] 其中A1为任选存在的第一附加序列,

[0456] C1为捕获序列的第一部分,

[0457] C2为捕获序列的第二部分,

- [0458] B为内部延伸阻断子，
- [0459] A2为任选存在的第二附加序列，
- [0460] S1为间隔序列的第一部分，
- [0461] S2为间隔序列的第二部分，
- [0462] A3为任选存在的第三附加序列，
- [0463] RB为任选存在的可逆延伸阻断子，
- [0464] A4为任选存在的第四附加序列，
- [0465] THS为靶杂交序列，以及
- [0466] X为任选存在的阻断部分。
- [0467] 互补寡聚体可具有下式：
- [0468] 5'-S1'-A2'-L-C2'-X-3'
- [0469] 其中S1'为间隔序列的第一部分的互补序列，
- [0470] A2'为任选存在于捕获寡聚体中的第二附加序列的任选存在的互补序列；
- [0471] L为任选存在的接头，
- [0472] C2'为捕获序列第二部分的互补序列，以及
- [0473] X为任选存在的阻断部分。

[0474] 图10A示出了根据以上描述的捕获寡聚体的示例性组合。在不存在靶标的情况下，互补寡聚体与捕获寡聚体退火。在与靶标杂交、随后3'端延伸后，互补寡聚体被置换。由于互补寡聚体的延伸、置换和“S”区中双链体(其阻断互补寡聚体的再退火)的产生，捕获序列基本上保持单链，因此可以与包含捕获序列的互补序列和结合配偶体或珠粒的第二捕获试剂接触，从而便于随后的分离步骤。

[0475] 图13示出了使用根据以上描述的捕获寡聚体的组合的不同的示例性工作流程，其中在靶标沿着捕获寡聚体延伸之后，而不是在将捕获寡聚体与靶标退火之前，提供互补寡聚体。此外，在图13描述的示例性工作流程中，提供反向扩增寡聚体，其在扩增反应(例如PCR)中与捕获寡聚体结合使用，以产生将间隔区域引入扩增子的产物。该间隔区域是任意序列。在该工作流程的一些实施方案中，在扩增反应期间提供互补寡聚体。在这种模式中，通过在反应的退火阶段阻断至少一部分间隔序列和捕获序列，以及在扩增反应完成后在不存在间隔序列的互补序列的情况下仍与捕获寡聚体退火，从而提高扩增反应的特异性。

[0476] 当存在第一附加序列时，第一附加序列可以包含标签。在一些实施方案中，第一附加序列包含一个或以上碱基，其可用于(例如)保护捕获序列的5'端或用作酶切位点或酶识别位点(例如，限制性内切核酸酶)。

[0477] 捕获序列的第一部分和第二部分形成捕获序列，例如，适合用作捕获序列的任何序列，诸如本文所述的任何捕获序列实施方案，包括在上文和下文的寡聚体元件段落阐述的实施方案中。

[0478] 内部延伸阻断子是不会被DNA聚合酶穿过的元件。在一些实施方案中，内部延伸阻断子为脱碱基位点、经化学修饰的核苷酸、非天然核苷酸(例如isoC或isoG或本文所述的不以天然核苷酸为模板添加的任何其他非天然核苷酸)、或非序列元件(例如上文所述的任何非序列接头)。非序列接头可以起内部延伸阻断子的作用。当将诸如isoC或isoG之类的经修饰的碱基用作内部延伸阻断子时，不具有互补碱基，从而使得DNA聚合酶不能穿过经修饰的

碱基的位置。

[0479] 当存在第二附加序列时,第二附加序列包含衔接子或标签,例如,该衔接子或标签可充当引物、探针、锚定寡核苷酸等的结合位点序列,或充当条形码或其他标签,例如,以鉴定样品或分子的来源并促进涉及诸如高度并行测序之类的混合测序的方法。这样的序列可为第二附加序列的一部分、以及稳定序列、对准序列、酶切位点或酶结合位点。在一些实施方案中,第二附加序列包含稳定序列或对准序列。

[0480] 间隔序列的第一部分和第二部分形成间隔序列。间隔序列的至少第一部分负责结合互补寡聚体。当包括其3'端的靶多核苷酸与捕获寡聚体退火时,间隔序列被配置为充当用于延伸的模板,其中这样的延伸引起互补寡聚体的置换,从而使捕获序列可被第二捕获试剂利用。间隔序列不同于靶杂交序列、捕获序列以及它们的互补序列,即,间隔序列不应当与上述序列中的任何一种实质上发生杂交。间隔序列或其第一部分或第二部分也可包含上文关于第二附加序列所述的任何元件。

[0481] 当存在第三附加序列时,第三附加序列可包含衔接子或标签,例如,任意序列或充当靶结合位点序列,以在后续反应或步骤中可以用作引物或探针、锚寡核苷酸或类似结合位点(例如衔接子),或用作条形码或其他标签,例如,以鉴定样品或分子的来源并促进涉及诸如高度并行测序之类的混合测序的方法。这样的靶序列可为第三附加序列的一部分、以及夹稳定序列、对准序列、酶切位点或酶结合位点序列。在一些实施方案中,第三附加序列包含稳定或对准夹序列。

[0482] 当存在可逆延伸阻断子时,可逆延伸阻断子可用于在第一时间段内限制互补链沿着捕获寡聚体延伸,(例如)以在捕获寡聚体用作扩增寡聚体的情况下,维持靶杂交序列与靶多核苷酸结合的特异性。示例性的可逆延伸阻断子包括IsoG和IsoC以及本文别处描述的非天然核苷酸对的其他成员,可以通过添加互补核苷酸而解除阻断(例如IsoC用于IsoG的解除阻断,反之亦然)。当使用可逆延伸阻断子时,应当将不同于可逆延伸阻断子的元件用作捕获序列的互补序列的5'的内部延伸阻断子。

[0483] 当存在第四附加序列时,第四附加序列可包含衔接子或标签,例如,该衔接子或标签可充当引物、探针、锚定寡核苷酸等的结合位点序列,或充当条形码或其他标签,例如,以鉴定样品或分子的来源并促进涉及诸如高度并行测序之类的混合测序的方法。这样的序列可为第四附加序列的一部分、以及稳定序列、对准序列、酶切位点或酶结合位点。在一些实施方案中,第四附加序列包含稳定序列或对准序列。

[0484] 在任何前述实施方案中,其中任何所述的附加序列(或通过沿着附加序列延伸形成的其互补序列)包含对下游过程有用的标签(例如,添加对文库制备、克隆扩增、测序或数据分析有用的衔接子),将标签添加与靶捕获组合可以使总体工作流程更为高效。

[0485] 靶杂交序列可为具有足够长度和互补性以与给定靶标杂交的任何序列,例如本文所述的任何靶杂交序列实施方案,包括在上文和下文的寡聚体元件段落阐述的实施方案中。

[0486] 当存在阻断部分时,阻断部分可为阻止聚合酶延伸3'端的任何部分。在本文别处详细描述了示例性的阻断部分。阻断部分可以阻止捕获寡聚体的二聚体的延伸和随后的捕获,否则,例如,在捕获寡聚体的浓度高和/或靶杂交序列具有一定的二聚化潜力时,可能发生捕获寡聚体的二聚体的延伸和随后的捕获。参见图6。

[0487] 转向互补寡聚体,间隔序列的第一部分的互补序列用于稳定互补寡聚体与捕获寡聚体的复合体,所述捕获寡聚体不充当靶多核苷酸延伸的模板。尽管不是必需的,但互补寡聚体可包含整个间隔序列的互补序列。

[0488] 当互补寡聚体与包含第二附加序列的捕获寡聚体一起使用时,互补寡聚体中包含第二附加序列的互补序列对于促进互补寡聚体与捕获寡聚体的结合可能是有用的。

[0489] 当存在接头时,接头可为如上文关于接头所论述的序列或非序列元件,根据捕获寡聚体中的内部延伸阻断子的尺寸和性质,接头可以提供合适的间隔,以促进间隔序列第一部分的互补序列和捕获序列的第二部分的互补序列同时与捕获寡聚体的相应部分退火。

[0490] 捕获寡聚体第二部分的互补序列的长度和含量应当足以和间隔序列的第一部分的互补序列(以及,如果适用,互补寡聚体的与捕获寡聚体中序列互补的其他部分)一起与捕获寡聚体退火,但不足以独立于间隔序列的至少第一部分的互补序列退火。换句话说,在例如通过靶多核苷酸沿着间隔序列延伸而置换间隔序列的至少第一部分的互补序列时,捕获序列的第二部分的互补序列应当解离,因为在没有凭借寡聚体的其他部分的其他杂交的能量贡献的情况下,捕获序列的第二部分的互补序列缺乏足够的亲和性以结合捕获序列的第二部分。

[0491] 当存在阻断部分时,阻断部分可为阻止聚合酶延伸3'端的任何部分。在本文别处详细描述了示例性的阻断部分。阻断部分可以阻止互补寡聚体沿着其结合的任何序列延伸,这种延伸会产生不期望的副产物、引物二聚体等。

[0492] i. 其他组合;试剂盒和反应混合物

[0493] 在一些实施方案中,提供了包含一种或以上另外的寡聚体的其他组合。另外的寡聚体可以包括以下物质中的任一种、或以下物质中的两种或以上的任何组合:互补寡聚体,其用于捕获靶分子(其可为环形),而不使捕获寡聚体结合至包含靶标的3'端的位点;扩增寡聚体,例如,其以相对于捕获寡聚体的反向方向结合靶多核苷酸;一对扩增寡聚体,例如,被配置为对靶标进行扩增;第二捕获试剂,例如包含捕获序列的互补序列和结合配偶体或固体载体;夹板寡聚体;阻断寡聚体;或置换寡聚体。在本文别处详细描述了这些另外的寡聚体。组合也可包含一种或以上另外的捕获寡聚体,例如用于进行多种靶多核苷酸的多重捕获,其可伴随有一种或以上另外的适当的互补寡聚体(和/或可提供结合两种或以上、或所有捕获寡聚体的互补寡聚体)。另外的捕获寡聚体可伴随有其他另外的寡聚体,例如适当的反向扩增寡聚体、置换寡聚体、阻断寡聚体等。当使用多种捕获寡聚体时,这些捕获寡聚体可具有相同或足够相似的捕获序列,以便可以使用单一的第二捕获试剂。可供选择地,这些捕获寡聚体可以具有不同的捕获序列,(例如)从而使得如果一个靶标以高丰度存在,则其所得的具有延伸的捕获寡聚体的复合体将不会使第二捕获试剂饱和以排除较低丰度的靶标复合体。

[0494] 2. 寡聚体元件和其他试剂和组分的详细描述

[0495] a. 寡聚体元件

[0496] i. 捕获序列

[0497] 可以使用任何能被合适的互补序列结合的捕获序列。在一些实施方案中,捕获序列包含poly-A或poly-T序列(例如,至少10个、12个、15个、20个、25个或30个连续的A残基,或至少10个、12个、15个、20个、25个或30个连续的T残基)。在一些实施方案中,poly-A序列

包含25个或30个连续的A残基。在一些实施方案中,poly-T序列包含25个或30个连续的T残基。除非另有说明,否则为了作为合适的poly-T序列,T残基包括U残基。在一些实施方案中,捕获序列为没有出现在靶多核苷酸中的任意序列。对于给定的方法,可以选择或设计任意序列以产生所需性质,例如选择以产生所需的热稳定性、亲和性和动力学性质。在一些实施方案中,当靶多核苷酸为来自基因的序列或者包含来自基因的序列时,捕获序列为没有出现在基因的基因组中的任意序列。在一些实施方案中,当靶多核苷酸为来自生物体的序列或者包含来自生物体的序列时,捕获序列为没有出现在生物体的基因组中的任意序列。在一些实施方案中,捕获序列包含12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个或35个核苷酸。在一些实施方案中,捕获序列由12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个或35个核苷酸组成。

[0498] ii. 捕获序列的互补序列

[0499] 与捕获序列足够互补从而以适当水平的特异性和稳定性结合捕获序列的任何序列都可以用作捕获序列的互补序列。在一些实施方案中,捕获序列的互补序列包含与捕获序列的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%互补的残基。在一些实施方案中,捕获序列的互补序列被配置为在杂交条件下与解链温度在40°C至75°C范围内、例如40°C至50°C、50°C至60°C或60°C至75°C的捕获序列形成复合体,杂交条件例如为0.4M至1M单价阳离子、0至10mM二价阳离子(例如镁)、10mM至100mM缓冲液(例如柠檬酸盐、磷酸盐、Tris、硼酸盐)pH 5至9以及0至1mg/mL BSA。

[0500] iii. 附加序列

[0501] 如本文所述,捕获寡聚体可以包含一个或以上附加序列,例如,其为捕获寡聚体和/或相关延伸产物提供另外的功能性。

[0502] 捕获寡聚体可以包含(例如)位于捕获序列的5'和捕获序列的互补序列的3'的稳定(例如,夹)序列,其可使自杂交在能量上更有利和/或帮助将捕获寡聚体的序列和捕获寡聚体的互补序列对准,如期望的那样。在一些实施方案中,夹序列包含G和/或C残基,例如,交替的G和C残基。示例性的夹序列的长度为3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸。在一些实施方案中,夹序列包含一个或以上如本文别处所述的增强亲和性的修饰。

[0503] 在一些实施方案中,附加序列为标签。可以提供标签以在空间上分隔其他元件或赋予其他性质。

[0504] 在一些实施方案中,附加序列提供衔接子,例如探针或引物的结合位点。例如,附加序列(或通过沿着附加序列延伸而形成的其互补序列)可以充当通用引物或测序引物的结合位点。因此,包括附加序列可以使一些过程更为高效,例如其中需要通过将衔接子添加与靶标捕获进行组合来添加衔接序列的测序文库制备。

[0505] 在一些实施方案中,附加序列提供标签序列,例如,有助于对来自特定来源或已经以特定方式处理的分子进行鉴定的条形码序列。

[0506] 在一些实施方案中,附加序列提供一个或以上酶识别位点,例如限制性位点。因此,附加序列可促进酶切和随后的连接或分子克隆过程。酶识别位点的另一个实例是位点特异性重组酶识别的位点。

[0507] 在一些实施方案中,附加序列包含对准序列,例如混合核苷酸区段。混合核苷酸区段不是相同核苷酸的连续系列。在一些实施方案中,对准序列或混合核苷酸区段紧邻内部延伸阻断子的3',使得使用以相反方向结合包含对准序列的捕获寡聚体的扩增寡聚体形成的延伸产物将在其3'端具有混合核苷酸区段的互补序列。在一些实施方案中,对准序列或混合核苷酸区段包含4个、5个、6个、7个或8个核苷酸。在一些实施方案中,混合核苷酸区段中的每个核苷酸与其直接相邻的核苷酸中的每一个核苷酸不同(例如,具有不同的碱基配对特异性)。对准序列或混合核苷酸区段可用于制备如本文别处所述的环化反应的底物。

[0508] iv. 接头

[0509] 在一些实施方案中,接头包括序列。接头序列可为任意的,或者具有关于附加序列所论述的任何特征。在一些实施方案中,接头包含非序列元件。示例性的非序列接头元件包括烷基、烯基、酰氨基和聚乙二醇基团,其链长为3个至20个原子或以上(或3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个原子)或2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个重复单元,例如-CH₂CH₂O-单元。

[0510] v. 内部延伸阻断子

[0511] 本文所述的各种捕获寡聚体包含内部延伸阻断子。当存在于模板中时,阻止聚合酶沿着模板继续进行延伸反应的任何部分都可用作内部延伸阻断子。根据聚合酶,示例性的内部延伸阻断子可包括脱碱基位点、经化学修饰的核苷酸、诸如IsoG或IsoC之类的非天然核苷酸(为了使阻断子有效,反应混合物中不能存在互补的非天然核苷酸,例如,如果isoC为阻断子,则不能具有isoG,反之亦然)、如上所述的非序列接头元件或它们的组合。

[0512] 在一些实施方案中,内部延伸阻断子包含脱碱基位点。脱碱基位点是核酸中的一个位置,其中核碱基从其通常所处的位置缺失。

[0513] 在一些实施方案中,内部延伸阻断子包含经化学修饰的核苷酸。已知多种化学修饰的核苷酸可阻断通过DNA聚合酶进行的延伸,例如烷基化的核苷酸和通过核苷酸与某些DNA损伤剂(例如化疗药物)反应形成的经修饰的核苷酸。用作内部延伸阻断子的其他经修饰的核苷酸包括具有主链修饰、糖修饰、碱基修饰以及它们的组合的那些经修饰的核苷酸。

[0514] 在一些实施方案中,内部延伸阻断子包含非天然核苷酸,如IsoG(6-氨基-2-酮嘌呤)或IsoC(2-氨基-4-酮嘧啶)。IsoG和IsoC是不与四种天然DNA核苷酸中的任何一种形成沃森-克里克碱基对但彼此配对的核苷酸。参见,例如,Hirao等人,Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.2012;88(7):345-367。因此,如果(i)模板含有IsoG并且(ii)IsoC核苷酸不可用,或反之亦然,则延伸将被阻断,因为聚合酶不能将任何物质相对IsoG或IsoC引入。

[0515] 在一些实施方案中,内部延伸阻断子包含非序列接头元件,例如烷基、烯基、酰氨基和聚乙二醇基团,其链长为3个至20个原子或以上(或3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个原子)或2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个重复单元,例如-CH₂CH₂O-单元。

[0516] vi. 可逆延伸阻断子

[0517] 在一些实施方案中,捕获寡聚体包含可逆延伸阻断子。可逆延伸阻断子是这样一种元件,当该元件存在于模板中时,可阻止聚合酶沿着模板继续进行延伸反应直至阻断子

被逆转。可逆延伸阻断子的实例包括非天然碱基对的成员,如上文论述的IsoG和IsoC。参见,例如Hirao等人,见上文。基于IsoG的阻断可以通过提供IsoC三磷酸核苷而逆转,从而使延伸可以继续,反之亦然。图7A中提供了使用可逆延伸阻断子的一般性说明。在一些实施方案中,扩增寡聚体包含可逆延伸阻断子。这种扩增寡聚体可以在延伸或扩增反应中单独使用,或与没有可逆延伸阻断子的捕获寡聚体同时使用,或与具有可逆延伸阻断子的捕获寡聚体同时使用。如果在同一方法中使用均包含可逆延伸阻断子的扩增寡聚体和捕获寡聚体,则可同时或分开进行各自的反向步骤。

[0518] vii. 靶杂交序列

[0519] 根据本公开的各种捕获寡聚体包含靶杂交序列。靶杂交序列可以与(例如)生物体的核酸(例如DNA或RNA)中的天然存在的序列杂交,或者靶杂交序列可以与结合位点或(例如)使用包含衔接序列的扩增寡聚体或使用连接而添加到扩增子中的衔接序列杂交。在一些实施方案中,靶杂交序列的长度在约10个至60个碱基、约12个至50个核苷酸、约12个至40个核苷酸、约12个至35个核苷酸、约12个至30个核苷酸、约15个至30个核苷酸或约17个至25个核苷酸的范围内。本领域普通技术人员可以获得用于选择合适序列以用作靶杂交序列的各种算法。

[0520] 在一些实施方案中,靶杂交序列被配置为结合包含靶标的3'端的位点。这种结合产生用于3'端延伸的底物,对于本文所述的各种寡聚体和组合,这将引起链置换,该链置换使得捕获序列可用于结合第二捕获试剂,如本文别处更详细论述的那样。

[0521] 在一些实施方案中,靶杂交序列被配置为结合靶标内的内部位点。这种结合可以与置换序列或其他另外的寡聚体组合使用,或更一般地用于本文别处描述的不涉及延伸靶标的3'端的捕获方法中。

[0522] viii. 阻断部分

[0523] 在一些实施方案中,本文所述的捕获寡聚体或其他寡聚体在其3'端包含阻断部分。阻断部分可阻止寡聚体沿着模板延伸,其中阻断部分是寡聚体的一部分。示例性的阻断部分包括烷基、非核苷酸接头、烷烃-二醇(例如,3'-己二醇残基)和虫草素。阻断部分的其他实例包括3'-脱氧核苷酸(例如,2',3'-双脱氧核苷酸);3'-磷酸化核苷酸;荧光团、猝灭剂或干扰延伸的其他标记物;反向核苷酸(例如,通过3'-至-3'磷酸二酯与前一核苷酸连接,任选地具有暴露的5'-OH或磷酸酯);或与寡核苷酸连接以阻止延伸的蛋白质或肽。图5示意性地示出了在其3'端具有阻断部分的示例性捕获寡聚体的用途。这样的捕获寡聚体可以用于(例如)与适当的反向扩增寡聚体(其也可提供待引入靶标中的附加序列)组合,以分离单链靶标。在其3'端具有阻断部分的捕获寡聚体也可提供阻止二聚的捕获寡聚体延伸和随后捕获的益处。参见图6的示例性图示。

[0524] ix. 增强亲和性的修饰

[0525] 在一些实施方案中,捕获寡聚体或本文所述的其他寡聚体包含(例如)位于负责结合另一分子(例如靶多核苷酸或第二捕获试剂)的序列的部分中的一个或以上增强亲和性的修饰。即使当存在含有会结合相同靶标的序列的竞争性寡聚体时,增强亲和性的修饰也可用于确保寡聚体对于其靶标的有效竞争,竞争性寡聚体例如来自扩增反应的未引入的引物。竞争性寡聚体可以相对于捕获寡聚体和/或靶标过量存在,这意味着凭借对靶标的相对较高的亲和性的有效竞争将对有多少捕获寡聚体结合其靶标产生显著效果,而不会使捕获

寡聚体淘汰出局。

[0526] 示例性的增强亲和性的修饰包括胞嘧啶的5-甲基化;2-氨基嘌呤的使用;2'-氟修饰;2'-甲氧基修饰;C-5-丙炔;和受限的乙基(cEt)取代。影响杂交复合体稳定性的寡聚体的实施方案包括PNA寡聚体、LNA(锁核酸,其稳定某些构象中的核苷酸并降低熵减损杂交自由能的程度)、或影响杂交复合体的总电荷、电荷密度或空间缔合的寡聚体,包括ZNA(Zip核酸)、含有带电连接键(例如硫代磷酸酯)或中性基团(例如甲基膦酸酯)的寡聚体。

[0527] b. 第二捕获试剂

[0528] 在一些实施方案中,第二捕获试剂存在于组合中,或与本文所述的捕获寡聚体一起使用。第二捕获试剂可包含捕获寡聚体中的捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体,固体载体例如为珠粒(例如磁珠)、孔、平面、填充柱、纤维、树脂或凝胶,以促进包含第二捕获试剂和捕获寡聚体的复合体的分离,所述复合体可杂交至靶多核苷酸和/或已经历延伸以包括靶多核苷酸序列的拷贝。

[0529] 可以使用任何合适的结合配偶体,包括本文(例如)定义段落中描述的任何结合配偶体。在一些实施方案中,结合配偶体为生物素。

[0530] c. 阻断寡聚体

[0531] 在一些实施方案中,阻断寡聚体存在于组合中,或与本文所述的捕获寡聚体一起使用。阻断寡聚体通常包含附加序列的互补序列、或附加序列的至少一部分的互补序列,并且可以通过竞争与附加序列的互补序列的杂交(即,阻断捕获寡聚体中的附加序列与其互补序列杂交,或至少降低其杂交能力)而用于促进捕获寡聚体(或用于制备由捕获寡聚体捕获的扩增子的扩增寡聚体)的靶杂交序列与其靶标的特异性杂交。参见图9,其示出了在扩增反应中使用阻断寡聚体的一般原理。例如,当不希望阻断寡聚体延伸时,阻断寡聚体可以在其3'端包含阻断部分。使用阻断寡聚体可以降低任何错误引导产物在扩增反应期间经历进一步扩增的程度,因为基本上只有包含靶杂交序列的互补序列的靶标是与捕获寡聚体或扩增寡聚体杂交的良好底物,而不管是否存在附加序列的互补序列。

[0532] d. 夹板寡聚体

[0533] 在一些实施方案中,夹板寡聚体存在于组合中,或与本文所述的捕获寡聚体一起使用。夹板寡聚体可以用于促进延伸产物的连接以使其环化。参见图12。夹板寡聚体可包含:不存在于捕获寡聚体中的序列的互补序列;存在于捕获寡聚体中的第二附加序列;和捕获寡聚体的捕获序列的互补序列。任选地,夹板寡聚体可以进一步包含存在于捕获寡聚体中的第四附加序列。

[0534] 夹板寡聚体被配置为与靶多核苷酸退火,靶多核苷酸已经从其3'端沿着捕获寡聚体延伸,捕获寡聚体在3'至5'方向上包含任选的第四附加序列、捕获序列的互补序列和第二附加序列,随后是内部延伸阻断子。因此,第二附加序列的互补序列位于靶多核苷酸的3'端。

[0535] 夹板寡聚体中的在捕获寡聚体中不存在的序列的互补序列在靶多核苷酸的序列的5'端处与其互补(即,在捕获寡聚体结合的位点的远侧),其可为在扩增期间添加的衔接序列或可对应于用于扩增靶多核苷酸的扩增寡聚体的一些或全部。

[0536] 第二附加序列被配置为与位于靶多核苷酸的3'端的第二附加序列的互补序列退火。捕获序列的互补序列以及第四附加序列(如果存在)也与靶多核苷酸的3'端附近的相应

序列退火。当与夹板寡聚体退火时,靶多核苷酸成为用于通过连接而环化的底物。参见图12,其示出了根据本说明书的示例性夹板寡核苷酸及其用于环化的用途。环化靶分子可以是有用的,例如,用于制备滚环扩增程序中使用的靶标。

[0537] e. 置换寡聚体

[0538] 在一些实施方案中,置换寡聚体(例如,置换引物)存在于组合中,或与本文所述的捕获寡聚体一起使用。置换寡聚体可以用于从靶多核苷酸的模板链置换延伸的捕获寡聚体。例如,参见图8A和图8B。在一些实施方案中,以组合方式提供置换寡聚体和具有靶杂交序列的捕获寡聚体,靶杂交序列结合靶标内的内部位点(例如,靶多核苷酸内的位点、扩增子或在之前的延伸或扩增步骤期间引入的附加序列),其相对于置换寡聚体的结合位点定位以便促进通过置换寡聚体的延伸进行的置换。

[0539] 在一些实施方案中,包含置换寡聚体(例如置换引物)和捕获寡聚体的组合进一步包含扩增寡聚体(例如引物),扩增寡聚体被配置为结合延伸的捕获寡聚体(因此具有相对于捕获寡聚体和置换寡聚体相反的结合方向)。根据捕获寡聚体和/或组合的构型,扩增寡聚体的延伸可以引起互补寡聚体或捕获序列的置换,从而使得延伸的捕获寡聚体的捕获序列可用于与第二捕获试剂相互作用。如别处所述,扩增寡聚体也可用于在延伸的捕获寡聚体的末端上引入附加序列(例如标签,如衔接序列),该末端远离初始捕获寡聚体序列(例如,参见图8A,其中通过经延伸和置换的捕获寡聚体的进一步延伸产生扩增寡聚体的附加序列的互补序列)。因此,在可简单且快速进行的单步骤一锅法中,可以制备在两端包含附加序列以及可接近的捕获序列的产物。

[0540] f. 扩增寡聚体

[0541] 在一些实施方案中,扩增寡聚体(例如引物)存在于组合中,或与本文所述的捕获寡聚体一起使用。例如,扩增寡聚体可被配置为以相反取向与捕获寡聚体的靶杂交序列退火。例如,参见图4A。扩增寡聚体可包含靶杂交序列,并且任选地,包含位于靶杂交序列的5'的附加序列。使用扩增寡聚体的附加序列作为模板,在包含延伸的捕获寡聚体的链进一步延伸时,附加序列将被引入,从而可提供一个或以上标签,其可包含一个或以上衔接序列。在一些实施方案中,扩增寡聚体包含可逆内部延伸阻断子,例如位于除THS之外的一个或以上元件的3'端,例如位于靶杂交序列的5'端、在靶杂交序列与附加序列之间。例如,如本文别处所述,包含扩增寡聚体的组合可进一步包含一种或以上其他寡聚体,例如置换寡聚体、夹板寡聚体等。

[0542] g. 试剂盒

[0543] 在一些实施方案中,提供了试剂盒,其包含捕获寡聚体或其组合,例如本文所述的任何捕获寡聚体或组合,并且进一步包含一种或以上另外的元件,例如试剂、缓冲液或与捕获寡聚体或其组合一起使用的其他物质,和/或使用捕获寡聚体或其组合的说明书。示例性的试剂包括dNTP、DNA聚合酶、钠盐、镁盐和珠粒,所述珠粒(例如)包含捕获序列的互补序列或结合至第一结合配偶体的第二结合配偶体,该第一结合配偶体与第二捕获试剂中的捕获序列的互补序列一起存在。

[0544] 在一些实施方案中,试剂盒中的捕获寡聚体的含量在 10^7 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、 10^9 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应、或 10^{10} 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应的范围内。

[0545] 在一些实施方案中,试剂盒中的包含捕获寡聚体的互补序列的第二捕获试剂的含量在 10^3 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 10^3 个分子/反应至 10^9 个分子/反应、或 10^5 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^5 个分子/反应至 10^8 个分子/反应、或 10^6 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、或 10^6 个分子/反应至 10^8 个分子/反应的范围内。

[0546] 在一些实施方案中,试剂盒包含处于液体、冷冻或冻干状态的捕获寡聚体。

[0547] 在一些实施方案中,试剂盒包含至少第一容器和第二容器,这些容器分别包含捕获寡聚体和一种或以上如本文所述的另外的寡聚体(例如,互补寡聚体、第二捕获试剂或、扩增寡聚体、夹板寡聚体、阻断寡聚体、第二或置换寡聚体)。可供选择地,可以在单个容器中提供这种寡聚体的组合。

[0548] 在一些实施方案中,试剂盒包括固体载体/珠粒,其包括被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合的第二结合配偶体(例如,链霉亲和素)。

[0549] h. 组合物

[0550] 还提供了包含本文所述的捕获寡聚体或组合的组合物。本文所述的任何寡聚体或组合可存在于组合物中。在一些实施方案中,组合物为冻干物或溶液的形式。

[0551] 在一些实施方案中,提供了包含捕获寡聚体或其组合(例如本文所述的任何捕获寡聚体或组合)的反应混合物。反应混合物可进一步包含一种或以上靶多核苷酸和/或一种或以上试剂(例如,本文结合试剂盒或方法论述的任何试剂)。

[0552] 反应混合物可进一步包含一种或以上靶多核苷酸(例如,本文结合方法论述的任何靶标)。在一些实施方案中,靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA(例如基因组DNA或mRNA)的序列和附加序列,并且捕获寡聚体的靶杂交序列被配置为与靶多核苷酸的附加序列退火。附加序列可以在之前的反应中添加,例如延伸、连接或扩增反应。例如,附加序列可以是不存在于靶生物体的DNA或RNA中的序列。这种附加序列可在使用包含该附加序列的引物的早期延伸反应中添加。这种方法有助于多重捕获或重复使用已附接相同的附加序列的不同靶标的捕获寡聚体设计。在一些实施方案中,组合物包含多个靶多核苷酸,靶多核苷酸包含(i)附加序列和(ii)来自靶生物体的DNA或RNA的不同序列,并且方法包括捕获多个靶多核苷酸。

[0553] 3. 捕获多核苷酸的方法的详细描述

[0554] 本文提供了一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0555] 使靶多核苷酸与本文所述的包含捕获序列和捕获序列的互补序列的捕获寡聚体接触,其中在包含靶多核苷酸的3'端的位点处,捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火。该方法进一步包括用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸靶多核苷酸的3'端,从而形成捕获序列的互补序列的互补序列,其与捕获寡聚体退火,使得捕获寡聚体的捕获序列可用于结合;

[0556] 使捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。图4A至图4B示出了说明接触和延伸步骤的示例性方案,在图4A中,捕获寡聚体的THS结合靶标的3'端的序列。在图4B中,捕获寡聚体的THS结合靶标的3'端的附加序列,例如,可在较早的反应中添加该附加序列。

[0557] 本文还提供了一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0558] 使组合物与本文所述的包含捕获寡聚体和互补寡聚体的组合接触,其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸或在包含靶多核苷酸的3'端的位点处的附加序列退火;

[0559] 用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸靶多核苷酸的3'端,从而形成间隔序列的互补序列,该互补序列与捕获寡聚体退火,使得互补寡聚体被置换至足以使捕获寡聚体的捕获序列可用于结合的程度;

[0560] 使捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0561] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。在捕获寡聚体的捕获序列与第二捕获试剂接触之前的任何时间点,可将组合的互补寡聚体提供给组合物,例如与捕获寡聚体一起提供,或在靶标沿着捕获寡聚体延伸之后提供。参见图10和图13,以用于说明根据本说明书的示例性方法。

[0562] 本文还提供了一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0563] 使靶多核苷酸与本文所述的捕获寡聚体或组合接触,其中捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'和捕获序列的互补序列或间隔序列的第二部分的3'的第三附加序列或第四附加序列;

[0564] 使靶多核苷酸与第二寡聚体接触,第二寡聚体包含位于第三附加序列或第四附加序列的至少一部分的互补序列的5'的第二靶杂交序列,其中捕获寡聚体和第二寡聚体与靶多核苷酸形成三链连接;

[0565] 用具有链置换活性的DNA聚合酶延伸第二寡聚体的3'端,从而形成捕获序列的互补序列的互补序列、或间隔序列的互补序列,该序列与捕获寡聚体退火,使得捕获寡聚体的捕获序列可用于结合;

[0566] 使捕获寡聚体的所述捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0567] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。在该方法的一些实施方案中,靶多核苷酸为环形。关于说明根据本说明书的示例性方法,参见图11A至图11B。在一些实施方案中,靶多核苷酸不为环形。例如,靶多核苷酸可包含使捕获寡聚体和第二寡聚体的结合位点接近的易位连接(例如BCR-ABL,或任何其他易位)。在一些实施方案中,以高于捕获寡聚体的浓度向反应混合物提供第二寡聚体。在一些实施方案中,以低于捕获寡聚体的浓度向反应混合物提供第二寡聚体。

[0568] 以下进一步的实施方案适用于任何前述方法。在一些实施方案中,第二捕获试剂包含结合配偶体(例如,生物素),并且分离包括使复合体与包含第二结合配偶体(例如,链霉亲和素)的固体载体(例如,珠粒)接触,第二结合配偶体配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合。可相对于第二捕获试剂过量提供捕获寡聚体。

[0569] 在适用的情况下,捕获寡聚体、互补寡聚体和/或第二寡聚体的示例性浓度和数量范围包括:对于捕获寡聚体,为 10^7 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应、 10^9 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应、或 10^{10} 个分子/反应至 10^{12} 个分子/反应;对于互补寡聚体,为约 1.5×10^7 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或约 1.5×10^9 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应;并且对于第二

寡聚体,为 10^6 个分子/反应至 10^{14} 个分子/反应、或 10^8 个分子/反应至 10^{13} 个分子/反应。上文提供了第二捕获试剂的示例性范围。

[0570] 方法可用于捕获来自任何来源的靶多核苷酸。在一些实施方案中,靶多核苷酸的来源为临床试样、病原体或环境样品。在一些实施方案中,临床样品是来自患有或怀疑患有脓毒症的受试者的样品(例如,血液、血清或血浆样品),并且在一些实施方案中,临床样品是来自患有或怀疑患有癌症的患者的样品。在一些实施方案中,靶多核苷酸为延伸或扩增产物。

[0571] 在一些实施方案中,靶多核苷酸为测序文库的成员。

[0572] 在一些实施方案中,通过沿着靶多核苷酸延伸捕获寡聚体从而形成延伸产物(延伸的捕获寡聚体),并且捕获寡聚体包含第三附加序列或第四附加序列。在一些实施方案中,方法进一步包括使延伸产物与包含不可延伸的第三附加序列或第四附加序列的阻断寡聚体接触,任选地,其中阻断寡聚体被配置为以比捕获寡聚体的第三附加序列或第四附加序列更大的亲和性结合第三附加序列或第四附加序列的互补序列,或与第三附加序列或第四附加序列的互补序列形成的复合体的解链温度高于捕获寡聚体的第三附加序列或第四附加序列与该第三附加序列或第四附加序列的互补序列的复合体的解链温度。该方法可用于减少或避免非特异性延伸,例如,在捕获寡聚体的错误引发事件的产物可以通过第三附加序列或第四附加序列与反向延伸产物的杂交产生另外循环的扩增的情况中,其中若不存在阻断寡聚体,则会产生反向延伸产物。

[0573] 在一些实施方案中,该方法进一步包括:

[0574] 使靶多核苷酸与扩增寡聚体接触,扩增寡聚体包含(i)反向靶杂交序列,其以相对于捕获寡聚体的反向取向结合靶多核苷酸,以及(ii)附加序列,其位于第二靶杂交序列的5'。方法进一步包括沿着靶多核苷酸延伸扩增寡聚体以形成反向延伸产物,其中捕获寡聚体的一部分与反向延伸产物退火。此类实施方案可用于将附加序列(例如,标签,如衔接子)引入靶标的末端,该末端远离结合或引入捕获寡聚体的末端。如别处所论述的,沿着捕获寡聚体(例如,延伸的捕获寡聚体)的延伸可从捕获序列置换捕获序列的互补序列。扩增寡聚体也可用于引发这种延伸。

[0575] 在一些实施方案中,例如,其中捕获寡聚体在其3'端包含阻断部分,方法进一步包括分离包含与捕获寡聚体退火的反向延伸产物(例如,如上所述或使用不一定包含附加序列的扩增寡聚体所产生的反向延伸产物)的复合体,其中延伸产物基本上是捕获寡聚体的靶杂交序列的5'的单链,并且捕获寡聚体的捕获元件已经通过反向延伸产物的延伸而置换,例如,如图5中所示。如果至少一半的分子没有与另一条链杂交,则认为延伸产物基本上是单链的。因此,例如,自杂交核酸的短延伸段不能阻止分子或其部分成为基本上单链的。

[0576] 在其中产生反向延伸产物的一些实施方案中,捕获寡聚体为可延伸的,并且方法进一步包括沿着反向延伸产物延伸捕获寡聚体,从而形成包含扩增寡聚体的互补序列的第二延伸产物。第二延伸产物将包含存在于捕获寡聚体中的任何附加序列和存在于反向扩增寡聚体中的任何附加序列的互补序列。以这种方式,可以产生在一端或两端(例如,两端)附近或在一端或两端(例如,两端)处包含附加序列(例如标签,如一个或以上衔接子)的产物。

[0577] 在一些实施方案中,靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列和附加序列,并且捕获寡聚体的靶杂交序列被配置为与靶多核苷酸的附加序列退火。附加序列可以

在之前的反应中添加,例如延伸、连接或扩增反应。例如,附加序列可以是不存在于靶生物体的DNA或RNA中的序列。这种附加序列可在使用包含附加序列的引物的早期延伸反应中添加。这种方法有助于多重捕获或重复使用已附接相同的附加序列的不同靶标的捕获寡聚体设计。在一些实施方案中,组合物包含多个靶多核苷酸,靶多核苷酸包含(i)附加序列和(ii)来自靶生物体的DNA或RNA的不同序列,并且方法包括捕获多个靶多核苷酸。

[0578] 在一些实施方案中,捕获寡聚体包含位于靶杂交序列的5'的可逆延伸阻断子,并且方法包括:在对可逆延伸阻断子解除阻断之前,拷贝或扩增靶多核苷酸;对可逆延伸阻断子解除阻断;以及进行另一个循环或多个循环复制或扩增靶多核苷酸。在一些实施方案中,在捕获靶多核苷酸之前、对可逆延伸阻断子解除阻断之后,仅进行一个循环扩增/延伸。在一些实施方案中,扩增寡聚体包含可逆延伸阻断子,并且起到与上文所述相似的作用。在一些实施方案中,在相同的过程中一起使用均具有可逆延伸阻断子的扩增寡聚体和捕获寡聚体。在这种情况下,扩增捕获寡聚体的可逆延伸阻断子可以同时或在分开的步骤中逆转。在一些实施方案中,可逆延伸阻断子为非天然核苷酸对(例如,IsoC或IsoG)的成员,并且对可逆延伸阻断子解除阻断包括提供非天然核苷酸对的互补成员。

[0579] 在一些实施方案中,方法包括使靶多核苷酸的延伸产物环化。例如,当捕获寡聚体包含位于延伸阻断子和间隔序列的第一部分或捕获序列的互补序列之间(例如,紧接内部延伸阻断子的3')的混合核苷酸区段的情况。方法包括沿着捕获寡聚体延伸靶多核苷酸的3'端直至内部延伸阻断子,从而形成在其3'端包含混合核苷酸区段的互补序列的延伸产物。方法进一步包括使延伸产物与夹板寡核苷酸接触,夹板寡核苷酸在5'至3'方向上包含:延伸产物的5'末端区段的互补序列;混合核苷酸区段;捕获序列的互补序列;和任选地,与延伸产物中紧邻捕获序列的5'的片段互补的片段。方法进一步包括将延伸产物的5'端连接至延伸产物的3'端。在一些实施方案中,延伸产物的5'末端区段包含用于产生靶多核苷酸的扩增寡聚体的序列的至少一部分,例如,扩增寡聚体的靶杂交序列的至少一部分,或(在适用的情况下)扩增寡聚体的附加序列的至少一部分,其中附加序列为扩增寡聚体的靶杂交序列的5'。参见图12,其示出了根据本说明书的示例性方法。

[0580] 在一些实施方案中,任何前述方法包括在靶多核苷酸的一端或两端上添加附加序列。例如,这样的方法可以包括使靶多核苷酸与本文所述的捕获寡聚体接触,其中捕获寡聚体的靶杂交序列在靶多核苷酸的3'端上游的位点退火;

[0581] 沿着靶多核苷酸延伸捕获寡聚体的3'端,从而形成第一延伸链;

[0582] 使靶多核苷酸与置换寡聚体接触,置换寡聚体包含置换靶杂交序列,该置换靶杂交序列在捕获寡聚体的靶杂交序列下游与靶多核苷酸退火;

[0583] 使置换寡聚体沿着靶多核苷酸延伸,从而置换第一延伸链,

[0584] 任选地,其中将捕获寡聚体和置换寡聚体同时或依次添加至组合物中(例如,使得捕获寡聚体的延伸开始于由置换寡聚体的延伸所致的置换之前)。捕获寡聚体可进一步包含位于靶杂交序列的5'的附加序列(例如,第三附加序列或第四附加序列)。在一些实施方案中,捕获寡聚体的THS具有更高的 T_m ,或者与置换寡聚体THS和其互补序列的结合相比,捕获寡聚体的THS和其互补序列的结合具有更高的亲和性,或者以比置换寡聚体更高的浓度提供捕获寡聚体。这可以促进在置换寡聚体延伸之前通过捕获寡聚体的结合和捕获寡聚体的延伸(或至少延伸的开始)。当捕获寡聚体的 T_m 和/或亲和性较高时,可以通过首先在允许

捕获寡聚体的结合和延伸优先于置换寡聚体的结合和延伸的较高温度下,然后在允许置换寡聚体的结合和延伸的较低温度下孵育反应混合物,从而进一步促进该效果。

[0585] 在一些实施方案中,这样的方法进一步包括:使靶多核苷酸的第一延伸链与包含反向靶杂交序列的反向扩增寡聚体接触,反向靶杂交序列被配置为结合第一延伸链;以及延伸反向扩增寡聚体,从而形成第二延伸链。反向扩增寡聚体可包含其靶杂交序列的5'的附加序列。

[0586] 在一些实施方案中,这样的方法进一步包括:使第一延伸链与包含反向靶杂交序列的反向扩增寡聚体接触,反向靶杂交序列被配置为结合第一延伸链的3'端;以及延伸反向扩增寡聚体,从而形成第二延伸链。反向扩增寡聚体可在其靶杂交序列的5'包含附加序列,在这种情况下,使用附加序列作为模板进一步延伸第一延伸链,从而产生附加序列的互补序列。参见图8A。

[0587] 在一些实施方案中,靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列和不存在于靶生物体的DNA或RNA中的附加序列,并且捕获寡聚体的靶杂交序列被配置为与靶多核苷酸的前体的附加序列退火。置换寡聚体也被配置为与靶多核苷酸的前体的附加序列退火,其中,在附加序列中,置换寡聚体的结合位点在捕获寡聚体的靶杂交序列的结合位点下游(例如,参见图8B)。

[0588] 在一些实施方案中,靶多核苷酸的第一链包含第二衔接序列,第二衔接序列位于靶生物体的DNA或RNA的序列的近端和捕获寡聚体的靶杂交序列的远端,并且

[0589] 方法进一步包括:使靶多核苷酸的第一链与包含反向靶杂交序列的反向扩增寡聚体接触,反向靶杂交序列被配置为结合第二衔接序列;以及延伸反向扩增寡聚体,从而形成靶多核苷酸的第二链。

[0590] 在一些实施方案中,前述方法中的任一种还包括对捕获的靶多核苷酸进行克隆扩增。在一些实施方案中,这样的方法进一步包括对克隆扩增的靶多核苷酸进行测序。在一些实施方案中,前述方法中的任一种还包括对捕获的靶多核苷酸进行测序。在一些实施方案中,测序为Sanger测序或下一代测序,任选地,其中下一代测序包括通过合成测序、连接法测序、杂交法测序或单分子测序。与Sanger测序相比,下一代测序包括以显著并行的方式生成读数的任何形式的测序。

[0591] 4. 用于有限的捕获和其他应用的捕获寡聚体和组合

[0592] a. 包含自互补序列的捕获寡聚体

[0593] 在一些实施方案中,提供了一种捕获寡聚体,其包含第一自互补序列、靶杂交序列和第二自互补序列,

[0594] 其中第一自互补序列和第二自互补序列被配置为:当靶杂交序列为单链时,第一自互补序列和第二自互补序列彼此退火,并且当靶杂交序列与其靶标退火时,第一自互补序列和第二自互补序列彼此不退火。这样的捕获寡聚体可以与包含第一自互补序列或第二自互补序列的互补序列和结合配偶体的第二捕获试剂组合。捕获寡聚体可以以比第二捕获试剂更大的量存在于组合中。这样的寡聚体和组合可用于从组合物中捕获一定量(例如,有限量、或小于或等于预定量的量)的靶多核苷酸。

[0595] 在一些实施方案中,这样的捕获寡聚体具有下式:

[0596] 5'-SC1-THS2-THS1-L-THS2'-SC2-3'。

[0597] 在一些实施方案中,这样的捕获寡聚体具有下式:

[0598] 5'-SC2-THS2'-L-THS1-THS2-SC1-3'。

[0599] 在上述式子的每一个式子中,SC1为第一自互补序列;THS2和THS1分别为靶杂交序列的第二部分和第一部分;L为任选存在的接头;THS2'为靶杂交序列的第二部分的任选存在的互补序列;SC2为第二自互补序列。

[0600] 第一自互补序列和第二自互补序列中的任一个可以用作捕获序列。当第一自互补序列为捕获序列时,第二自互补序列为捕获序列的互补序列。当第二自互补序列为捕获序列时,第一自互补序列为捕获序列的互补序列。在本文别处详细讨论捕获序列和捕获序列的互补序列。可以使用任何合适的捕获序列及其互补序列。

[0601] 当存在接头时,接头可为任何合适的接头,例如本文别处描述的任何接头,包括序列和非序列接头。接头可以用作促进第一自互补序列和第二自互补序列的分子内杂交的柔性元件。当接头包含序列时,在一些实施方案中,序列是不存在于以下来源(例如,生物体、基因组、基因或其他核酸或它们的组合)中的序列:靶杂交序列源自该来源或与靶杂交序列互补。接头通常不应太长,从而即使当靶杂交序列与其靶标退火时,接头也能够使第一自互补序列和第二自互补序列的分子内杂交(参见下文的论述)。

[0602] 在本文别处详细讨论了靶杂交序列。可以使用任何合适的靶杂交序列(以及靶杂交序列的一部分的互补序列,如果存在的话)。

[0603] 在本文别处详细讨论了第二捕获试剂,并且第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列。可以使用任何合适的第二捕获试剂。

[0604] 在组合中,当捕获寡聚体的存在量大于第二捕获试剂时,比例可为约10,000比1、5000比1、2000比1、1000比1、500比1、200比1、100比1、50比1、20比1、10比1、5比1或2比1。

[0605] 这种捕获寡聚体可用于捕获靶多核苷酸的方法中。当不存在靶多核苷酸时,捕获寡聚体可以采取自杂交构象。自杂交构象涉及第一自互补序列和第二自互补序列彼此退火,因此使得捕获寡聚体基本上不能与第二捕获试剂的捕获序列的互补序列相互作用。然而,靶杂交序列至少部分是单链的。当存在靶多核苷酸时,靶杂交序列可与其杂交。当靶杂交序列因此基本上是双链时,不能发生第一自互补序列和第二自互补序列的分子内杂交,因为在其他潜在因素中,它们相距太远。因此,捕获序列(即,第一自互补序列和第二自互补序列之一)基本上是单链的,并且可以与第二捕获试剂杂交。可能有益的是,靶杂交序列的杂交比第一自互补序列和第二自互补序列的分子内杂交在能量上更有利,从而使得捕获寡聚体将优先与可用的靶多核苷酸杂交。过量的捕获寡聚体也可用于驱动与靶多核苷酸的复合体的形成。

[0606] 然后,例如,可以使用适合于第二捕获试剂的结合配偶体或固体载体的标准技术,分离第二捕获试剂、捕获寡聚体和靶标的复合体。捕获的多核苷酸的量可以被限制,或者通过第二捕获试剂的量或通过捕获寡聚体的量与第二捕获试剂的量的组合来确定。

[0607] b. 包含捕获寡聚体和与捕获序列的一部分互补的互补寡聚体的组合

[0608] 在一些实施方案中,提供了一种组合,其包含捕获寡聚体和互补寡聚体,其中:

[0609] (a) 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0610] 捕获序列,其包含第一部分和第二部分,和

[0611] 靶杂交序列,其包含第二部分和第一部分;以及

[0612] (b) 互补寡聚体在3'至5'方向上包含:

[0613] 捕获序列的第二部分的互补序列,和

[0614] 靶杂交序列的第二部分的互补序列,其中捕获序列的第二部分的互补序列和靶杂交序列的第二部分的互补序列被配置为当不存在靶杂交序列的互补序列时,同时与捕获寡聚体退火。图10B提供了根据这些实施方案的示例性寡聚体的图示。可以如上面列出的其他实施方案中所述和/或如图10B(例如,图10B中的任何单独元件或其任何组合)中所示,存在任选的附加元件。

[0615] 组合可以用于进行有限的捕获,因为互补寡聚体可以被配置为结合游离的捕获寡聚体,但不结合与靶多核苷酸结合的捕获寡聚体。例如,捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸的结合可以比捕获序列的第二部分的互补序列与靶杂交序列的第二部分的结合在能量上更有利。当不存在靶多核苷酸时,互补寡聚体结合至捕获寡聚体,并阻断捕获序列(图10B中的C1+C2)的可接近性至足以阻断捕获序列被第二捕获试剂中的捕获序列的互补序列结合的程度,第二捕获试剂可以是本文别处所述的任何第二捕获试剂。

[0616] 相应地,还提供了一种从组合物中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括:

[0617] 使组合物与上述组合或本文所述的其任何其他实施方案的组合接触,其中捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火;

[0618] 在捕获寡聚体与靶多核苷酸退火之前或之后,使捕获寡聚体与互补寡聚体接触,其中互补寡聚体与游离的捕获寡聚体退火并部分占据其捕获序列,其中互补寡聚体不与包含与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体的复合体退火,并且其中如果捕获寡聚体与互补寡聚体的接触发生在捕获寡聚体与靶多核苷酸退火之前,则靶杂交序列与靶多核苷酸的退火造成互补寡聚体从捕获寡聚体解离;

[0619] 使与靶多核苷酸复合的捕获寡聚体的捕获序列与包含捕获序列的互补序列和(i)结合配偶体或(ii)固体载体的第二捕获试剂接触,从而形成包含靶多核苷酸、捕获寡聚体和第二捕获试剂的复合体;以及

[0620] 从组合物中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。可以如上面列出的其他实施方案中所述和/或如图10B(例如,图10B中的任何单独元件或其任何组合)中所示,存在任选的附加元件。

[0621] 5. 差异性捕获方法和寡聚体组合

[0622] 本文还提供了基于捕获寡聚体是否与靶多核苷酸处于复合体中而差异性地(例如,利用不同的亲和性)捕获寡聚体的方法和寡聚体组合。这样的方法允许靶多核苷酸的洗脱,而基本上不洗脱不与靶多核苷酸缔合的捕获寡聚体。这样的组合和方法中的捕获序列、靶杂交序列和寡聚体的其他元件可为(例如)本文所述的与下文阐述的寡聚体、组合和方法的特征一致的任何捕获序列、靶杂交序列等。

[0623] 在一些实施方案中,这样的方法包括使靶多核苷酸与捕获寡聚体接触,捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:捕获序列;任选的内部延伸阻断子;任选的间隔序列;和靶杂交序列,其被配置为与靶多核苷酸退火。这种接触可由此使至少一些捕获寡聚体(即,捕获寡聚体群体的一部分)与靶多核苷酸退火。该方法进一步包括使捕获寡聚体与包含捕获序列的互补序列的第一捕获试剂接触(在使靶多核苷酸与捕获寡聚体接触之前、同时或之后);以及提供包含捕获寡聚体中除捕获序列之外的序列的互补序列的第二捕获试剂,其中如果一

些或全部捕获寡聚体不与靶多核苷酸退火,则第二捕获试剂接触不与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体。捕获寡聚体中的除捕获序列之外的序列可为一些或全部的靶杂交序列、或与靶杂交序列重叠的序列、或当捕获寡聚体与靶多核苷酸退火时以其他方式使得第二捕获试剂不可接近的序列。方法进一步包括:从组合物中分离第一复合体和第二复合体,其中第一复合体包含靶多核苷酸,并且第二复合体包含未与靶多核苷酸退火的捕获寡聚体;以及从第一复合体选择性洗脱靶多核苷酸或包含靶多核苷酸的亚复合体。

[0624] 在一些实施方案中,使靶多核苷酸与过量的捕获寡聚体接触。在一些实施方案中,以相对于捕获寡聚体的有限量提供第一捕获试剂。在一些实施方案中,以相对于靶多核苷酸的有限量提供捕获寡聚体。在一些实施方案中,与第二捕获试剂接触的捕获寡聚体的部分包含未结合的捕获寡聚体。

[0625] 在一些实施方案中,第一捕获试剂包含第一固体载体,其包含捕获序列的互补序列。这些实施方案的另外方面在本文别处阐述,包括在以上概述中阐述的方面。

[0626] 在一些实施方案中,第一捕获试剂还包含与捕获寡聚体或靶多核苷酸不互补的第二捕获序列,并且方法包括,在使退火的捕获寡聚体与第一捕获试剂接触后,使第二捕获序列与包含第二捕获序列的互补序列的固体载体退火。这些实施方案的另外方面在本文别处阐述,包括在以上概述中阐述的方面。

[0627] 本文还提供了一种组合,其包含捕获寡聚体、第一固体载体和第二固体载体。捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0628] 第一捕获序列、内部延伸阻断子、第二捕获序列和靶杂交序列。

[0629] 第一固体载体包含第一捕获序列的互补序列。第二固体载体包含第二捕获序列的互补序列。通过第一捕获序列和第一捕获序列的互补序列退火形成的第一复合体具有比通过第二捕获序列和第二捕获序列的互补序列退火形成的第二复合体更低的解链温度,和/或第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性高于第一捕获序列的互补序列对第一捕获序列的亲合性。

[0630] 本文还提供了一种组合,其包含捕获寡聚体、第一捕获试剂、第二捕获试剂、第一固体载体和第二固体载体。

[0631] 捕获寡聚体在5'至3'方向上包含:

[0632] 第一捕获序列、内部延伸阻断子和靶杂交序列。

[0633] 第一捕获试剂包含第二捕获序列和第一捕获序列的互补序列,其中第二捕获序列不与捕获寡聚体互补。第二捕获试剂包含第三捕获序列和不同于第一捕获序列的捕获寡聚体的序列的互补序列,其中第三捕获序列不与捕获寡聚体互补。第一固体载体包含第二捕获序列的互补序列。第二固体载体包含第三捕获序列的互补序列。通过第二捕获序列与第二捕获序列的互补序列退火形成的第一复合体具有比通过第三捕获序列与第三捕获序列的互补序列退火形成的第二复合体更低的解链温度,和/或第三捕获序列的互补序列对第三捕获序列的亲合性大于第二捕获序列的互补序列对第二捕获序列的亲合性。

[0634] 本文还提供了一种组合,其包含捕获寡聚体和第二捕获试剂。捕获寡聚体包含含有一个或以上增强亲和性的核苷酸的靶杂交序列以及捕获序列。第二捕获试剂包含捕获序列的互补序列和结合配偶体。在一些实施方案中,捕获序列位于靶杂交序列的5'。在一些实施方案中,靶杂交序列被配置为与衔接序列退火。在一些实施方案中,第二捕获试剂以比捕

获寡聚体更低的量存在于组合中。

[0635] 本文还提供了一种从组合中捕获靶多核苷酸的方法,该方法包括使靶多核苷酸与如上所述的此类组合接触。同时或依次添加捕获寡聚体和第二捕获试剂。捕获寡聚体的靶杂交序列与靶多核苷酸退火,并且第二捕获试剂与捕获寡聚体的捕获序列退火,从而形成复合体。

[0636] 方法进一步包括:使复合体与第二结合配偶体接触,第二结合配偶体被配置为与第二捕获试剂的结合配偶体结合,其中第二结合配偶体与固体载体缔合,并且第二结合配偶体与第二捕获试剂的结合配偶体结合;以及从组合中分离复合体,从而捕获靶多核苷酸。

[0637] 在一些实施方案中,第二捕获试剂以比捕获寡聚体和/或靶多核苷酸更低的量存在于组合中。在一些实施方案中,捕获寡聚体以比靶多核苷酸更低的量存在于组合中,并且第二捕获试剂以比捕获寡聚体更低的量存在于组合中。在一些实施方案中,靶多核苷酸包含衔接序列,并且靶杂交序列与衔接序列退火。在一些实施方案中,靶多核苷酸包含来自靶生物体的DNA或RNA的序列,并且衔接序列不存在于靶生物体的DNA或RNA中。

[0638] IV. 实施例

[0639] 提供以下实施例以说明某些公开的实施方案,但不应解释为以任何方式限制本公开的范围。

[0640] A. 利用包含捕获序列及其互补序列的捕获寡聚体捕获预定量的扩增子

[0641] 寡聚体。

[0642] 使用以下引物进行PCR以扩增来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的uidA基因的片段:

[0643] Ec_uidA_F:GTATCAGCGCGAAGTCTTTATAACC (SEQ ID NO:1)

[0644] Ec_uidA_R:GGCAATAACATACGGAGTGACATC (SEQ ID NO:2)

[0645] 设计引物以产生具有以下序列的扩增子:

GTATCAGCGCGAAGTCTTTATAACCGAAAGGTTGGGCGGGCCAG
CGTATTGTACTGCGTTTCGATGCGGTCCTCATTACGGCAAAGT

[0646] GTGGGTAAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTAT
ACGCCATTTGAAGCCGATGTCCTCCGTATGTTATTGCC (SEQ
ID NO: 3)

[0647] 提供了命名为uidA_PA_1.2的捕获寡聚体,其具有以下序列:AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAACCTCTA/iSp18/TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGACGCAAGC
TACTGGTGATTTGGCAATAACATACGGAGTGACATCGGCTTC (SEQ ID NO:4) (iSp18=六乙二醇 (HEG)
内部间隔子 (IDT))

[0648] 在该寡聚体中,5' poly-A序列为捕获序列。CCTCTA为接头序列。iSp18为内部延伸阻断子。iSp18之后的poly-T序列为捕获序列的互补序列。AGACGCAAGCTACTGGTGATTT (SEQ ID NO:5) 为第四附加序列。靶杂交序列 (THS) 为GGCAATAACATACGGAGTGACATCGGCTTC (SEQ ID NO:6), 其与靶扩增子中uidA基因序列的区段特异性杂交。在本实施例中,THS比与其重叠的反向PCR引物(见上述序列)长,以提高THS的T_m并使其在与靶标杂交方面具有超过反向引物的竞争优势。

[0649] 使用具有以下序列的第二捕获试剂:

[0650] dT₃₀-生物素:TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3'生物素 (SEQ ID NO:7)

[0651] 下列引物和探针用于拷贝控制产物的定量PCR (qPCR) 分析:

[0652] Ec_uidA_F GTATCAGCGCGAAGTCTTTATACC (SEQ ID NO:1)

[0653] uidA_探针

[0654] 5'FAM/TAGCCGCCCTGATGCTCCATCACTTCCTG/3'IowaBlack (SEQ ID NO:8)

[0655] TQ_R AGACGCAAGCTACTGGTGAT (SEQ ID NO:9)

[0656] 方案/反应条件。

[0657] (1) 利用上述引物产生靶标uidA的PCR扩增子;扩增子用AMPure XP (Beckman Coulter) 按照生产商推荐的方案纯化,并用uidA正向引物和反向引物以及uidA_探针通过qPCR进行定量。

[0658] (2) 捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸-将纯化的uidA扩增子稀释2倍、10倍或100倍。将20 μ L扩增子的每种稀释液的等分试样添加到由0.07U/ μ L SDPol (Bioron)、1 \times SDPol反应缓冲液、0.17mM dNTP's、3mM MgCl₂、1mg/ml BSA和5 \times 10¹⁰个拷贝的捕获寡聚体组成的最终体积为30 μ L的捕获寡聚体退火/延伸反应中。将捕获寡聚体退火至uidA扩增子的互补链的3'端,并且根据以下温控方式,使用热循环仪对扩增子链进行延伸:92 $^{\circ}$ C持续2分钟,54 $^{\circ}$ C持续2分钟,68 $^{\circ}$ C持续10分钟,54 $^{\circ}$ C持续2分钟,随后控制降温(0.3 $^{\circ}$ C/秒)至20 $^{\circ}$ C。在该实施例中,捕获寡聚体的3'端也被延伸。

[0659] (3) 捕获寡聚体的捕获序列的互补序列的杂交-将整个捕获寡聚体/扩增子延伸反应混合物添加至10 μ L的4X浓度的第二捕获试剂,从而获得最终浓度为125mM NaCl、0.25mg/ml BSA和10⁷个、10⁸个或10⁹个拷贝的捕获序列的互补序列(即,测试3个不同量)。通过将反应混合物在室温(20 $^{\circ}$ C至24 $^{\circ}$ C)孵育15分钟,从而进行杂交。

[0660] (4) 扩增子和捕获寡聚体延伸产物/捕获寡聚体复合体的捕获-将5 μ L等分试样(50 μ g)的在250mM NaCl和1mg/ml BSA中的MyOneC1链霉亲和素珠粒(ThermoFisher Scientific)添加至杂交混合物(上述步骤3),将捕获寡聚体/扩增子延伸产物/捕获序列的互补序列复合体捕获在珠粒上,并根据制造商的建议洗涤珠粒。

[0661] (5) 洗脱-在完成最后的洗涤并除去洗涤缓冲液后,将10 μ L的水添加至珠粒团中,将珠粒重悬并在70 $^{\circ}$ C孵育2分钟。利用磁铁使珠粒成团,并除去洗脱液。

[0662] (6) 定量-使用靶向uidA_F引物位点和TQ引物-衔接子位点的引物以及uidA_探针,通过qPCR对洗脱的产物以及捕获寡聚体延伸产物(参见上述步骤2)的量进行定量。

[0663] 结果和结论:

[0664] 使用10⁷个、10⁸个或10⁹个拷贝的捕获寡聚体,对靶向富集步骤(参见上述步骤1)中产生的扩增子的2倍稀释液、10倍稀释液和100倍稀释液进行拷贝控制过程(参见上述步骤2至5)。如表1所示,回收的扩增子的量与每种PCR稀释液中添加的捕获寡聚体的量成比例(大约以预期的比例;参见表中的“比例”栏)。每个数据点的重复数据之间的差异小(参见“标准偏差”栏)。

[0665] 表1

PCR 稀释液	第二 CO (#拷贝)	输出 (#拷贝*)	标准偏差	比例**
2 倍	1×10^7	9.8×10^8	6.1×10^7	1
	1×10^8	4.4×10^9	2.5×10^9	4.5
	1×10^9	8.0×10^{10}	4.5×10^9	82
10 倍	1×10^7	7.7×10^8	8.7×10^7	1
	1×10^8	5.7×10^9	1.2×10^8	7.4
	1×10^9	6.5×10^{10}	2.0×10^9	84
100 倍	1×10^7	4.4×10^8	8.3×10^7	1
	1×10^8	2.6×10^9	2.0×10^8	5.9
	1×10^9	2.8×10^{10}	2.7×10^9	64

[0667] *3次重复数据的平均值

[0668] **将2倍稀释液的值设定为等于1

[0669] 此外,尽管扩增子输入量存在50倍的差异,但对于 10^7 个、 10^8 个和 10^9 个拷贝的捕获寡聚体,输出量的变化分别为2.36倍、3.11倍和3.44倍(表1)。如上所述,重复数据之间的差异小。

[0670] 这些数据表明,本文所述的捕获寡聚体可以用于由一系列不同的靶标输入量产生预定量的目标输出。

[0671] 基本上如上所述,但以多重形式使用捕获寡聚体进行了另外的实验,其中THS区域被设计成靶向大肠杆菌的uidA基因、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的nuc基因、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的vanA基因或白色念珠菌(*Candida albicans*)的rpb7基因(即每个反应使用4个捕获寡聚体)。使用如上所示的针对uidA的引物以及针对nuc和vanA基因设计的其他引物,分别使用如上所述的PCR,各自扩增uidA、nuc和vanA基因。将所得的扩增子稀释10倍或100倍,并将各单独靶标的20 μ L等分试样的各稀释液添加至不同的捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸反应,该反应含有 5×10^{10} 个拷贝的上述4种捕获寡聚体中的每一种(即4重捕获寡聚体,但仅存在1个靶标)。反应条件与所描述的反应条件相同,不同之处在于使用以下温控方式:92 $^{\circ}$ C持续2分钟,64 $^{\circ}$ C持续2分钟,68 $^{\circ}$ C持续10分钟,98 $^{\circ}$ C持续2分钟,57 $^{\circ}$ C持续2分钟,随后控制降温(0.3 $^{\circ}$ C/秒)至20 $^{\circ}$ C。在该反应完成后,将 5×10^8 个拷贝的捕获寡聚体的捕获序列的互补序列添加至每个反应。随后进行如上所述的捕获、洗涤、洗脱和定量步骤。

[0672] 表2中示出了输入量相差10倍的扩增子捕获后的输出量,结果显示,对于以多重形式测试的3种单独的靶扩增子中的每一种,在控制拷贝后,扩增子输入水平的10倍差异被降低至平均输出水平的不超过1.4倍差异。此外,对于所有3种靶扩增子,控制拷贝后的平均输出水平范围跨度为约1.6倍,而它们的输入水平跨度超过270倍。

[0673] 表2

靶标	输入	输出*	标准偏差
[0674] nuc	1.6×10^8	1.5×10^7	9.0×10^5
	1.6×10^9	1.7×10^7	2.0×10^6
uidA	3.3×10^9	1.9×10^7	2.3×10^5
	3.3×10^{10}	1.9×10^7	3.4×10^6
vanA	1.2×10^8	1.2×10^7	1.3×10^6
	1.2×10^9	1.6×10^7	1.3×10^6

[0675] *3次重复数据的平均值

[0676] 基本上如上所述,以单重形式进行另外的实验,但是使用这样的捕获寡聚体,该捕获寡聚体中的THS退火至PCR扩增步骤期间引入目标靶标中的标签序列中的通用结合位点。设计引物以靶向细菌23S rRNA基因,并由细菌基因组DNA产生PCR扩增子。反向引物包含在PCR期间引入扩增子中的通用序列标签。如上所述进行捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸,不同之处在于,向包含0.02U/ μ L SD聚合酶(Bioron)、0.4x SD聚合酶反应缓冲液(Bioron)、0.012mM的4 dNTP's、1.8mM $MgCl_2$ 、0.6mg/mL BSA和 5×10^{10} 个拷贝的捕获寡聚体的最终反应体积为100 μ L的反应混合物中添加40 μ L纯的等分试样(即,无稀释;约 9×10^{12} 个拷贝)或50倍稀释液(约 2×10^{11} 个拷贝)。所使用的温控方式为92 $^{\circ}C$ 持续2分钟,54 $^{\circ}C$ 持续2分钟,68 $^{\circ}C$ 持续10分钟,54 $^{\circ}C$ 持续2分钟,随后控制降温(0.3 $^{\circ}C$ /秒)至20 $^{\circ}C$ 。将上述反应的全部体积添加至50 μ L含有1mg/ml BSA、125mM NaCl和 5×10^8 个拷贝的第二捕获试剂的3X退火混合物中。通过在25 $^{\circ}C$ 的热块(thermal block)上将反应混合物孵育10分钟来进行退火。将50 μ L体积(在该实验中为200 μ g)的在4X洗涤缓冲液中的MyOneC1链霉亲和素珠粒(ThermoFisher Scientific)添加至上述150 μ L反应中,所述4X洗涤缓冲液由4M NaCl、20mM Tris-HCl pH7.5、2mM EDTA、0.20% Tween20、2mg/mL BSA组成。将包括捕获寡聚体、扩增子延伸产物和捕获序列的互补序列的所得的复合体捕获在珠粒上,并按照制造商的建议洗涤珠粒(在这种情况下,使用1X洗涤缓冲液;参见上文的4X配方)。使用20 μ L体积的水进行洗脱(方案的其他方面与上述相同)。使用靶向通用标签的特异性正向引物和反向引物进行qPCR。

[0677] 尽管扩增子输入水平有50倍的差异,但在捕获寡聚体退火和扩增子链延伸步骤后,输出的变化仅为2.5倍,并且在与第二捕获试剂接触并分离所得的复合体后,输出的变化仅为1倍(即,完全归一化)(参见表3)。此外,这些结果证明了本公开的实施方案,其中THS结合至通用标签序列。

[0678] 表3

方法中的步骤	PCR 稀释液	输出 (#拷贝*)	#重复次数	标准偏差	比例**
[0679] 第一捕获寡聚体之后	0 倍(纯的)	2.1×10^{10}	4	4.5×10^8	2.5
	50 倍	8.3×10^9	4	1.8×10^8	
第二捕获寡聚体之后	0 倍(纯的)	1.7×10^7	6	3.6×10^5	1
	50 倍	1.6×10^7	9	3.5×10^5	

[0680] *重复次数的平均值 **纯的/50倍稀释液输出

[0681] 基本上如以上刚刚所述(单重,通用THS)但以多重形式使用捕获寡聚体以进行另外的实验,捕获寡聚体中的THS退火至PCR扩增步骤期间引入目标靶标中的通用标签序列。在八个单独的单重反应中,由肺炎克雷伯氏菌(K.pneumonia)基因组DNA产生靶向细菌16S

rRNA基因、23S rRNA基因和抗生素抗性标记KPC中的区域的八种不同的扩增子。还产生了靶向合成的内标 (Internal Control, IC) DNA的一种扩增子, 总共九种单独的扩增子。合并等量的所有9种扩增子, 并添加54 μ L纯的等分试样 (即无稀释; 约 1×10^{13} 个拷贝) 或10倍稀释液 (约 1×10^{12} 个拷贝) 以分开捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸反应混合物 (各自为100 μ L最终体积)。基本上与上述相同地进行工作流程的其余部分, 不同之处在于, 使用 5×10^{11} 个拷贝的捕获寡聚体和 5×10^9 个拷贝的第二捕获试剂。使用靶向通用标签的特异性正向引物和反向引物进行qPCR, 以定量每个靶标 (9次单独的PCR)。将每个单独的靶标的回收量相加以确定捕获过程的总回收率。

[0682] 尽管扩增子输入水平有10倍的差异, 但在捕获寡聚体退火和扩增子链延伸步骤后, 总输出的变化仅为2.5, 并且在与第二捕获试剂接触并分离所得的复合体后, 总输出的变化仅为1.6 (参见下表)。此外, 这些结果证明了本发明的实施方案, 其中THS以多重形式结合通用标签序列, 从而捕获混合物中存在的所有靶扩增子。

[0683] 表4

方法中的步骤	PCR 稀释液	输出 (#拷贝*)	#重复次数	标准偏差	比例**
第一捕获寡聚体之后	0 倍 (纯的)	2.6×10^{11}	32	1.9×10^{10}	2.5
	10 倍	1.1×10^{11}	31	7.7×10^9	
第二捕获寡聚体之后	0 倍 (纯的)	1.5×10^9	89	1.1×10^8	1.6
	10 倍	9.5×10^8	88	6.9×10^7	

*重复次数的
平均值

**纯的/50 倍稀释液输出

[0685] B. 利用包含捕获序列、其互补序列和夹序列的捕获寡聚体捕获预定量的扩增子

[0686] 基本上如上文关于uidA所述制备靶扩增子, 并用于没有或具有作为第一附加序列和第三附加序列嵌入的夹序列 (GCGCGC) 的捕获寡聚体的实验中 (参见图3)。基本上如上所述使用未稀释的、10X稀释的和100X稀释的扩增子进行捕获。基本上如上所述对捕获的产物的量进行定量。结果示于图14中。使用含有夹序列的捕获寡聚体改进了对于不同的扩增子稀释倍数跨度进行输出量归一化的能力。

[0687] C. 利用捕获寡聚体和互补寡聚体捕获预定量的扩增子

[0688] 寡聚体。

[0689] 使用以下引物进行PCR以扩增来自粪肠球菌的vanA基因的区段:

[0690] Efm_vanA_F:GGCTGCGATATTCAAAGCTCAG (SEQ ID NO:10)

[0691] Efm_vanA_R:CTGAACGCGCCGCTTAAC (SEQ ID NO:11)

[0692] 设计引物以产生具有以下序列的扩增子:

[0693] GGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGACAAATCGTT
GACATACATCGTTGCGAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCT
TTTGGGTTATTAATAAAGATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTT
ACCTATCCTGTTTTTTGTTAAGCCGGCGCGTTCAG (SEQ ID NO: 12)

[0694] 提供了命名为CC_Blo_vanA_001的捕获寡聚体,其具有以下序列:

[0695] AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA/iSp18/CTCCTCTGGCACCGTGCTGCCTTGGCTTCATTGTGGTCCTG AACGCGCCGGCTTAAC (SEQ ID NO:13) (iSp18=六乙二醇 (HEG) 内部间隔子 (IDT))

[0696] 该寡聚体包括图10A的示例性捕获寡聚体所示的元件。在该寡聚体中,5' poly-A序列为具有第一部分和第二部分的捕获序列。iSp18为内部延伸阻断子。CTCCTCTGGCACCGTGCTGCCTTGGCTTCATTGTGGTC (SEQ ID NO:14) 为具有第一部分和第二部分的间隔序列。靶杂交序列 (THS) 为CTGAACGCGCCGGCTTAAC (SEQ ID NO:15), 其与靶扩增子中的vanA基因序列的区段特异性杂交。

[0697] 提供了命名为阻断子_vanA_001的互补寡聚体,其包含图10A的示例性互补寡聚体所示的元件,具有下列序列:CGGTGCCAGAGGAGTTTTTTTTTT/invdt/ (SEQ ID NO:16), 其中invdt为反向的T核苷酸,其用作阻断部分。在该寡聚体中,CGGTGCCAGAGGAG (SEQ ID NO:17) 为捕获寡聚体的间隔序列的第一部分的互补序列,并且TTTTTTTTTT (SEQ ID NO:18) 为捕获序列的第二部分的互补序列。

[0698] 使用具有以下序列的第二捕获试剂:

[0699] dT₂₀-生物素:TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3'生物素 (SEQ ID NO:19)

[0700] 下列引物和探针用于拷贝控制产物的定量PCR (qPCR) 分析:

[0701] vanA_PCR2_Fwd TTGTATGGACAAATCGTTGACATACA (SEQ ID NO:20)

[0702] Efm_探针_FAM

[0703] 5'FAM/TGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGG/3' IowaBlack (SEQ ID NO:21)

[0704] CC_Univ_Inner_Rev ACCGTGCTGCCTTGGCTTC (SEQ ID NO:22)

[0705] 方案/反应条件。

[0706] (1) 利用以上示出的Efm_vanA_F和Efm_vanA_R引物产生靶标vanA的PCR扩增子;使用Agilent BioAnalyzer通过基于芯片的毛细管电泳对扩增子进行定量。

[0707] (2) 捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸-在未稀释 (纯的) 或稀释10倍 (分别为约 2×10^{13} 个拷贝和 2×10^{12} 个拷贝) 的情况下使用vanA扩增子。将80 μ L各扩增子量 (纯的和10倍稀释的) 的等分试样与20 μ L的捕获寡聚体退火/延伸反应混合物合并,从而产生由0.02U/ μ L Deep Vent (exo-) Pol (NEB)、0.4x Deep Vent Vent Pol反应缓冲液、0.012mM dNTP's、1.8mM MgCl₂、0.6mg/ml BSA、 1×10^{11} 个拷贝的捕获寡聚体 (CC_Blo_vanA_001) 和 1×10^{12} 个拷贝的互补寡聚体 (阻断子_vanA_001) 组成的最终混合物,最终体积为100 μ L。将捕获寡聚体退火至vanA扩增子的互补链的3'端,并且根据以下温控方式,使用热循环仪对扩增子链进行延伸:92 $^{\circ}$ C持续2分钟,64 $^{\circ}$ C持续2分钟,68 $^{\circ}$ C持续10分钟。在该实施例中,捕获寡聚体的3'端也被延伸。

[0708] (3) 捕获寡聚体的捕获序列的互补序列的杂交-向整个捕获寡聚体/扩增子延伸反应混合物添加50 μ L的3X浓度的第二捕获试剂,从而获得最终浓度为42mM NaCl,0.33mg/ml BSA和 10^9 个拷贝的捕获序列的互补序列 (dT₂₀-生物素)。通过将反应混合物在30 $^{\circ}$ C孵育10分钟,从而进行杂交。

[0709] (4) 扩增子和捕获寡聚体延伸产物/捕获寡聚体复合体的捕获-将50 μ L等分试样 (200 μ g) 链霉亲和素包被的磁珠添加至整个杂交混合物 (150 μ L),从而产生最终浓度为1M NaCl、5mM TrisHCl (pH 7.5)、0.5mM EDTA、0.05% Tween20和0.5mg/ml BSA的产物。在25 $^{\circ}$ C

将复合体捕获在珠粒上,使用具有与上文刚刚详述的相同组成的洗涤试剂洗涤珠粒。

[0710] (5) 洗脱-在完成最后的洗涤并除去洗涤缓冲液后,将30 μ L的水添加到珠粒团中,将珠粒重悬并在70 $^{\circ}$ C孵育2分钟。利用磁铁使珠粒成团,并除去洗脱液。

[0711] (6) 定量-使用靶向vanA_PCR2_Fwd引物位点和通用引物-衔接子位点(CC_Univ_Inner_Rev)的引物以及Efm_探针_FAM,通过qPCR对洗脱的产物以及捕获寡聚体延伸产物(参见上述步骤2)的量进行定量。

[0712] 结果和结论:

[0713] 使用 10^9 个拷贝的第二捕获寡聚体,对上述步骤1(PCR)中产生的扩增子的0倍(纯的)和10倍稀释液进行拷贝控制过程(参见上述步骤2至5)。如表5所示,尽管靶标输入量有10倍的差异,但输出水平基本上相同。

[0714] 表5

PCR稀释液	输出(#拷贝)	倍数差异
纯的	3.24E+08	-
10倍	3.14E+08	1.03

[0716] 这些数据表明,本文所述的捕获寡聚体和互补寡聚体可用于在靶标输入量跨越10倍差异时,产生预定的归一化的靶标输出量。

[0717] 基本上如上所述进行了另外的实验,其具有以下不同之处:

[0718] (1) 使用QIAGEN QIAquick PCR纯化试剂盒根据制造商的说明书纯化PCR扩增子,然后使用Agilent BioAnalyzer通过基于芯片的毛细管电泳进行定量。

[0719] (2) 捕获寡聚体退火和扩增子链的延伸-在未稀释(纯的)、10倍稀释和100倍稀释(分别为约 8×10^{11} 个拷贝、 8×10^{10} 个拷贝和 6×10^9 个拷贝)的情况下使用vanA扩增子。以 1×10^{12} 个拷贝/反应的捕获寡聚体使用捕获寡聚体(CC_Blo_vanA_001),并且以零或 1×10^{13} 个拷贝/反应使用互补寡聚体(阻断子_vanA_001)。将捕获寡聚体退火至vanA扩增子的互补链的3'端,并且根据以下温控方式,使用热循环仪对扩增子链进行延伸:95 $^{\circ}$ C持续2分钟,以及64 $^{\circ}$ C持续15分钟。该步骤中的所有其他条件与上述步骤2相同。

[0720] (3至6) 如以上步骤3至6所述进行步骤3至6,不同之处在于,在步骤4中,复合体在30 $^{\circ}$ C而不是25 $^{\circ}$ C被捕获在珠粒上。

[0721] 结果和结论:

[0722] 对上述步骤1(PCR)中产生的扩增子的0倍(纯的)、10倍和100倍稀释液进行拷贝控制过程(参见上述步骤2至5)。在该实验中,所用的各种核酸组分的量为大约 8×10^{11} 个、 8×10^{10} 个和 6×10^9 个拷贝的靶标、 1×10^{12} 个拷贝的捕获寡聚体、0或 1×10^{13} 个拷贝的互补寡聚体和 1×10^9 个拷贝的第二捕获寡聚体。表6示出了具有或没有互补寡聚体的结果。

[0723] 表6

输入* (#拷贝)	没有互补寡聚体		具有互补寡聚体	
	输出(#拷贝)	倍数差异	输出(#拷贝)	倍数差异
纯的	9.3×10^7	-	3.6×10^8	-
10倍	2.6×10^7	3.6	1.6×10^8	2.3
100倍	5.0×10^5	184	2.5×10^7	14.4

[0724]

[0725] *步骤1中产生的靶扩增子

[0726] 当缺乏互补寡聚体时,无论捕获寡聚体是否与靶标结合,第二捕获寡聚体(dT₂₀-生物素)均可与任何捕获寡聚体分子结合。在该实验中,使用 1×10^{12} 个拷贝的捕获寡聚体和 1×10^9 个拷贝的第二捕获寡聚体,即,在这些量中存在1000倍的差异。在最高的靶标水平(纯的)时,大部分捕获寡聚体将结合至靶标,因此大部分第二捕获寡聚体将结合至与靶标缔合的捕获寡聚体,并且捕获和洗脱后的输出拷贝将相对较高。这在纯的靶标输入(没有互补寡聚体)的数据中得到证实,其中观察到相对高的输出(9.3×10^7 个拷贝)。然而,对于靶标的10倍稀释液,将有过量的捕获寡聚体,因此不是所有的捕获寡聚体都将结合至靶标。一些第二捕获寡聚体将结合至与靶标缔合的捕获寡聚体,但一些第二捕获寡聚体将捕获未结合至靶标的寡聚体。因此,如实际上观察到的,输出将下降(输出= 2.6×10^7 个拷贝)。对于靶标的100倍稀释液,大部分捕获寡聚体将不与靶标结合,因此同样地,大部分第二寡聚体将与不和靶标缔合的捕获寡聚体结合。因此,在这些条件下的预期是显著降低的输出,这实际上被观察到(输出= 5.0×10^5 个拷贝)。

[0727] 在互补寡聚体的存在下,未结合至靶标的捕获寡聚体将与互补寡聚体结合,这进而将阻断第二捕获试剂的结合。相反地,已结合至靶标的捕获寡聚体将不与互补寡聚体结合(其已被置换),这进而将使得第二捕获试剂能够结合。因此,在本实验中测试的所有靶标输入水平下,预计在互补寡聚体的存在下的输出均高于不存在互补寡聚体时的输出(其结果如上所述)。这正是所观察到的(参见表6)。此外,数据证明发生了归一化,在纯的靶标水平的输出与10倍稀释靶标水平的输出之间仅具有约2倍的差异,并且在纯的靶标水平的输出与100倍稀释靶标水平的输出之间仅存在略微超过14倍的差异。100倍靶标稀释液的输出略低于理论值,因为由于靶标的低水平,结合动力学较慢。如果孵育时间更长,则输出将提高,并且归一化因子将得到改善。

[0728] 这些数据表明,本文所述的捕获寡聚体和互补寡聚体可用于在靶标输入量跨越100倍差异时,产生预定的归一化的靶标输出量。

[0729] D. 使用捕获寡聚体、互补寡聚体、置换寡聚体和正向引物生成在靶序列两端包含附加序列(例如,衔接子)的可捕获产物

[0730] 寡聚体。

[0731] 使用以下引物进行PCR以扩增来自粪肠球菌的vanA基因的片段:

[0732] Efm_vanA_F:GGCTGCGATATTCAAAGCTCAG (SEQ ID NO:23)

[0733] Efm_vanA_R:CTGAACGCGCCGGCTTAAC (SEQ ID NO:24)

[0734] 设计引物以产生具有以下序列的扩增子:

GGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGACAAATCGTT
GACATACATCGTTGCGAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCT
[0735] TTTGGGTTATTAATAAAGATGATAGGCCGGTGGCAGCTACGTTT
ACCTATCCTGTTTTTGTAAAGCCGGCGCGTTCAG (SEQ ID NO: 25)

[0736] 提供了命名为PCR2R_衔接子_CC的捕获寡聚体,其具有以下序列:

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA/iSp18/CTCCTCTGGCACCGTGCT

[0737] GCCTTGGCTTCATTGTGGTCGTAGCTGCCACCGGCCTAT (SEQ ID NO: 26)

[0738] (iSp18=六乙二醇(HEG)内部间隔子(IDT))

[0739] 该寡聚体包含图10A的示例性捕获寡聚体所示的元件。在该寡聚体中,5' poly-A序列为具有第一部分和第二部分的捕获序列。iSp18为内部延伸阻断子。CTCCTCTGGCACCGTGC TGCCTTGGCTTCATTGTGGTC (SEQ ID NO:27) 为具有第一部分和第二部分的间隔序列。靶杂交序列(THS)为GTAGCTGCCACCGGCCTAT (SEQ ID NO:28),其与靶扩增子中vanA基因序列的区段特异性杂交。

[0740] 提供了命名为阻断子_vanA_001的互补寡聚体,其包含图10A的示例性互补寡聚体所示的元件,具有下列序列:CGGTGCCAGAGGAGTTTTTTTTTT/invdt/(SEQ ID NO:29),其中 invdt为反向的T核苷酸,其用作阻断部分。在该寡聚体中,CGGTGCCAGAGGAG (SEQ ID NO:30) 为捕获寡聚体的间隔序列的第一部分的互补序列,并且TTTTTTTTTT (SEQ ID NO:31) 为捕获序列的第二部分的互补序列。

[0741] Efm_vanA_R(上述序列),其包含图8A的示例性置换寡聚体所示的元件。还提供了命名为PCR1F_衔接子的寡聚体,其包含图8A的具有衔接子的示例性正向引物所示的元件,PCR1F_衔接子具有以下序列:

[0742] AAAACGAGACATGCCGAGCATCCGCGGCTGCGATATTCAAAGC TCAG (SEQ ID NO: 32)。

[0743] 使用具有以下序列的第二捕获试剂:

[0744] dT₂₀-生物素:TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3'生物素 (SEQ ID NO:33)

[0745] 下列引物和探针用于拷贝控制产物的定量PCR (qPCR) 分析:

[0746] CCRPA_uni_F AAAACGAGACATGCCGAGCATC (SEQ ID NO:34)

[0747] Efm_探针_FAM5'FAM/TGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGG/3'IowaBlack (SEQ ID NO: 35)

[0748] CC_Univ_Inner_Rev ACCGTGCTGCCTTGGCTTC (SEQ ID NO:36)

[0749] 方案/反应条件(1)。

[0750] (1) 利用以上示出的Efm_vanA_F和Efm_vanA_R引物产生靶标vanA的PCR扩增子;使用QIAGEN QIAquick PCR纯化试剂盒根据制造商的说明书纯化扩增子,然后使用Agilent BioAnalyzer通过基于芯片的毛细管电泳进行定量。

[0751] (2) 捕获寡聚体、置换寡聚体和具有衔接子的正向引物的退火和延伸-将含有约 1×10^{12} 个拷贝的vanA扩增子的等分试样与退火/延伸反应混合物合并,从而产生由0.02U/ μ L Deep Vent (exo-) Pol (NEB)、0.4x Deep Vent Pol反应缓冲液、0.012mM dNTP's、1.8mM MgCl₂、0.6mg/ml BSA、 5×10^{13} 个拷贝的捕获寡聚体(PCR2R_衔接子_CC)、 $\pm 1 \times 10^{13}$ 个拷贝的置换寡聚体(Efm_vanA_R)和 5×10^{13} 个拷贝的具有衔接子的正向引物(PCR1F_衔接子)组成的最终混合物,最终体积为100 μ L。捕获寡聚体和置换寡聚体与输入的扩增子的退火和延伸以及具有衔接子的正向引物与捕获寡聚体的延伸产物的退火和延伸都发生在相同的退火/延伸反应中,其中使用热循环仪根据以下温控方式进行:95 $^{\circ}$ C持续5分钟,然后64 $^{\circ}$ C持续20

分钟。

[0752] (3) 定量-将每个退火延伸反应物的等分试样稀释100倍,并使用引物CCRPA_uni_F和CC_Univ_Inner_Rev(分别以正向和反向靶向通用衔接子[ZW1]区域)以及Efm_探针_FAM,通过qPCR对包含在每个试样中的产物的量进行定量。

[0753] 结果和结论:

[0754] 使用上述输入的靶标和寡聚体进行单循环退火和延伸反应(将单循环定义为仅1个变性步骤,例如在95°C孵育;另一个循环将以另一个热变性步骤开始)。如表7所示,如通过使用通用引物扩增所证明的,形成了在分子的两端含有通用衔接子的产物。

[0755] 表7

置换寡聚体	输出(#拷贝)
+	1.3E+11
-	2.8E+11

[0757] 这些数据证明图8A中描述的本发明的实施方案可以用于使用单循环退火/延伸产生在分子的两端具有衔接子(或其他期望的序列)的产物。此外,这些数据表明,至少一种引物-衔接子寡聚体(在该情况种为PCR2R_衔接子_CC)可以结合至靶标中的内部位点,而不仅仅是结合至末端。这些数据还表明,可以在没有置换寡聚体的情况下产生期望的产物。不希望受任何特定理论的束缚,不同的机制可以在所公开的实施方案中起作用以产生期望的产物是可能的。在置换寡聚体存在的情况下,多种机制可能正在发挥作用以产生观察到的结果。

[0758] 基本上如上所述进行了另外的实验,其具有以下不同之处:

[0759] (2) 捕获寡聚体、置换寡聚体和具有衔接子的正向引物的退火和延伸-将包含大约 1×10^{13} 个拷贝的vanA扩增子的等分试样与退火/延伸反应混合物混合,从而产生由0.02U/ μ L Deep Vent (exo-) Pol (NEB)、0.4x Deep Vent Pol反应缓冲液、0.012mM dNTP's、1.8mM MgCl₂、0.6mg/ml BSA、 5×10^{14} 个拷贝的捕获寡聚体(PCR2R_衔接子_CC)和 5×10^{14} 个拷贝的具有衔接子的正向引物(PCR1F_衔接子)组成的最终混合物,最终体积为100 μ L。使用热循环仪根据以下温控方式进行该混合物的退火和延伸:95°C持续5分钟,然后64°C持续15分钟。此时,将 5×10^{14} 个拷贝的置换寡聚体(Efm_vanA_R)添加至反应混合物的一些重复试样中,并且对于一些试样,仅添加缓冲液,并使用以下温控方式继续进行退火和延伸:64°C持续5分钟,75°C持续5分钟和72°C持续15分钟。

[0760] 结果和结论:

[0761] 使用上述输入的靶标和寡聚体进行单循环退火和延伸反应(将单循环定义为仅1个变性步骤,例如在95°C孵育;另一个循环将以另一个热变性步骤开始)。在整个过程的中途,将置换寡聚体添加至退火和延伸反应,以进一步优化性能。如表8所示,如通过使用通用引物扩增所证明的,形成了在分子的两端含有通用衔接子的产物。

[0762] 表7

置换寡聚体	输出(#拷贝)
+	3.2E+12
-	1.9E+12

[0764] 如上所述,这些数据表明,图8A中描述的本发明的实施方案可以用于使用单循环

退火/延伸产生在分子的两端具有衔接子(或其他期望的序列)的产物。同样如上所述,这些数据证明至少一个引物-衔接子寡聚体(在该情况中为PCR2R_衔接子_CC)可以结合至靶标中的内部位点,而不仅仅是结合至末端。此外,这些数据表明,通过调节退火和延伸温控方式,并且在该情况中通过在整个过程的中途添加置换寡聚体,可以改进总体性能。特别值得注意的是,在这些条件下,当置换寡聚体存在时,产生期望的产物的量大于当不存在置换寡聚体时产生期望的产物的量,从而表明置换方案如图8A所示运行。同样不希望受任何特定理论的束缚,不同的机制也可以在所公开的实施方案中起作用以产生期望的产物。

[0765] 方案/反应条件(2)。

[0766] (1) 利用以上示出的Efm_vanA_F和Efm_vanA_R引物产生靶标vanA的PCR扩增子;使用QIAGEN QIAquick PCR纯化试剂盒根据制造商的说明书纯化扩增子,然后使用Agilent BioAnalyzer通过基于芯片的毛细管电泳进行定量。

[0767] (2) 捕获寡聚体、置换寡聚体和具有衔接子的正向引物的退火和延伸-将含有约 1×10^{12} 个拷贝的vanA扩增子的等分试样与退火/延伸反应混合物合并,从而产生由0.02U/ μ L Deep Vent (exo-) Pol (NEB)、0.4x Deep Vent Pol反应缓冲液、0.012mM dNTP's、1.8mM $MgCl_2$ 、0.6mg/ml BSA、 5×10^{13} 个拷贝的捕获寡聚体(PCR2R_衔接子_CC)、 $\pm 5 \times 10^{12}$ 个拷贝的置换寡聚体(Efm_vanA_R)和 5×10^{13} 个拷贝的具有衔接子的正向引物(PCR1F_衔接子)组成的最终混合物,最终体积为100 μ L。捕获寡聚体和置换寡聚体与输入的扩增子的退火和延伸以及具有衔接子的正向引物与捕获寡聚体的延伸产物的退火和延伸都发生在相同的退火/延伸反应中,其中使用热循环仪根据以下温控方式进行:95 $^{\circ}C$ 持续5分钟,然后64 $^{\circ}C$ 持续20分钟。

[0768] (3) 捕获寡聚体的捕获序列的互补序列的杂交-向整个延伸反应混合物添加50 μ L的3X浓度的第二捕获试剂,从而获得最终浓度为42mM NaCl,0.33mg/ml BSA和 5×10^{14} 个拷贝的捕获序列互补序列(dT₂₀-生物素)。通过将反应混合物在30 $^{\circ}C$ 孵育10分钟,从而进行杂交。

[0769] (4) 扩增子和捕获寡聚体延伸产物/捕获寡聚体复合体的捕获-将50 μ L等分试样(200 μ g)链霉亲和素包被的磁珠添加至整个杂交混合物(150 μ L),从而产生最终浓度为1M NaCl、5mM TrisHCl (pH 7.5)、0.5mM EDTA、0.05% Tween20和0.5mg/ml BSA。在30 $^{\circ}C$ 将复合体捕获在珠粒上,使用具有与上文刚刚详述的相同组成的洗涤试剂洗涤珠粒。

[0770] (5) 洗脱-在完成最后的洗涤并除去洗涤缓冲液后,将30 μ L的水添加到珠粒团中,将珠粒重悬并在70 $^{\circ}C$ 孵育2分钟。利用磁铁使珠粒成团,并除去洗脱液。

[0771] (6) 定量-使用引物CCRPA_uni_F和CC_Univ_Inner_Rev(分别以正向和反向靶向通用衔接子区域)以及Efm_探针_FAM,通过qPCR对洗脱的产物进行定量。

[0772] 结果和结论:

[0773] 使用上述输入的靶标和寡聚体进行单循环退火和延伸反应,对产物进行捕获,洗涤,洗脱,然后使用qPCR进行定量。如表8所示,如通过使用通用引物扩增所证明的,形成了在被捕获和洗脱的分子的两端含有通用衔接子的产物。

[0774] 表8

[0775]

置换寡聚体	输出(#拷贝)
+	1.4E+09

-	1.5E+10
---	---------

[0776] 这些数据表明,图8A中描述的本发明的实施方案可以用于使用单循环退火/延伸产生在分子的两端具有衔接子(或其他期望的序列)的产物,并且该产物可以通过捕获至珠粒上、洗涤和洗脱,从而进行分离。此外,这些数据证明至少一个引物-衔接子寡聚体(在该情况中为PCR2R_衔接子_CC)可以结合至靶标中的内部位点,而不仅仅是结合至末端。这些数据还表明,当不存在置换寡聚体时,可以产生期望的产物。不希望受任何特定理论的束缚,不同的机制可以在所公开的实施方案中起作用以产生期望的产物是可能的。在置换寡聚体存在的情况下,多种机制可能正在发挥作用以产生观察到的结果。

[0777] 基本上如上所述进行了另外的实验,其具有以下不同之处:

[0778] (2) 捕获寡聚体、置换寡聚体和具有衔接子的正向引物的退火和延伸-退火/延伸反应混合物与上述相同,不同之处在于,添加了还含有 5×10^{14} 个拷贝的互补寡聚体(阻断子_vanA_001)的新样品。捕获寡聚体和置换寡聚体与输入的扩增子的退火和延伸、互补寡聚体与捕获寡聚体的退火以及具有衔接子的正向引物与捕获寡聚体的延伸产物的退火和延伸都发生在相同退火/延伸反应中,其中使用热循环仪根据以下表9中示出的温控方式进行。

[0779] 表9

温控方式	
温度	时间
95°C	5 分钟
75°C	30 秒
74°C	30 秒
73°C	30 秒
72°C	30 秒
71°C	30 秒
70°C	30 秒
69°C	2 分钟
68°C	2 分钟
67°C	2 分钟
66°C	2 分钟
65°C	2 分钟
65°C	10 分钟

[0781] (3) 捕获寡聚体的捕获序列的互补序列的杂交-条件与上述相同,不同之处在于,使用了 1×10^9 个拷贝的捕获序列的互补序列(dT₂₀-生物素)。

[0782] 结果和结论:

[0783] 使用上述输入的靶标和寡聚体进行单循环退火和延伸反应,使用预定量的捕获序列的互补序列(dT₂₀-生物素)捕获产物,洗涤,洗脱,然后使用qPCR进行定量。结果示于表10中。

[0784] 表10

PCR稀释液	输出 (#拷贝)	倍数差异
--------	----------	------

纯的	2.0E+06	-
10倍	4.3E+05	4.7

[0786] 这些数据表明,图8A中描述的本发明的实施方案可以用于使用单循环退火/延伸产生在分子的两端具有衔接子(或其他期望的序列)的产物,并且该产物可以通过捕获至珠粒上、洗涤和洗脱,从而进行分离。此外,将输入的靶标水平的10倍差异归一化为4.7倍差异,这超过2倍归一化因子。此外,这些数据证明至少一个引物-衔接子寡聚体(在该情况中为PCR2R_衔接子_CC)可结合至靶标中的内部位点,而不仅仅是结合至末端。

[0787] 基本上如上所述进行了另外的实验,其具有以下不同之处:

[0788] (2) 捕获寡聚体、置换寡聚体和具有衔接子的正向引物的退火和延伸-退火/延伸反应混合物与上述相同,不同之处在于,使用了 $1E+13$ 和 $1E+12$ (10倍稀释)个拷贝/反应的输入的靶标;添加了还含有 5×10^{14} 个拷贝的互补寡聚体(阻断子_vanA_001)的新样品。捕获寡聚体与输入的扩增子的退火和延伸、互补寡聚体与捕获寡聚体的退火以及具有衔接子的正向引物与捕获寡聚体的延伸产物的退火和延伸都发生在相同的退火/延伸反应中,其中使用热循环仪根据以下温控方式进行:95°C持续5分钟,然后64°C持续15分钟。

[0789] (3) 捕获寡聚体的捕获序列的互补序列的杂交-条件与上述相同,不同之处在于,使用了 1×10^9 个拷贝的捕获序列的互补序列(dT_{20} -生物素)。在30°C进行杂交30分钟。

[0790] 结果和结论:

[0791] 使用上述输入的靶标和寡聚体进行单循环退火和延伸反应,使用预定量的捕获序列的互补序列(dT_{20} -生物素)捕获产物,洗涤,洗脱,然后使用qPCR进行定量。结果如表10所示。

[0792] 表11

PCR 稀释液	具有互补寡聚体		没有互补寡聚体	
	输出 (#拷贝)	倍数差异	输出 (#拷贝)	倍数差异
纯的	1.8E+07	-	1.3E+06	-
10 倍	2.7E+07	0.67	2.0E+06	0.65

[0794] 这些数据表明,图8A中描述的本发明的实施方案可以用于使用单循环退火/延伸产生在分子的两端具有衔接子(或其他期望的序列)的产物,并且该产物可以通过捕获至珠粒上、洗涤和洗脱,从而进行分离。此外,当存在互补寡聚体时,将输入的靶标水平的10倍差异归一化为0.67倍差异(~ 1)。没有互补寡聚体,则产物的回收率降低超过10倍,正如预期的那样,而归一化是相似的。此外,这些数据证明至少一个引物-衔接子寡聚体(在该情况中为PCR2R_衔接子_CC)可以结合至靶标中的内部位点,而不仅仅是结合至末端。

SEQUENCE LISTING

<110> DNAe 诊断有限公司

<120> 用于分离靶多核苷酸的组合物、试剂盒和方法

<130> 01254-0001-00PCT

<150> US 62/961,816

<151> 2020-01-16

<150> GB 2000673.0

<151> 2020-01-16

<150> GB 2000672.2

<151> 2020-01-16

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 1

gtatcagcgc gaagtcttta tacc 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 2

ggcaataaca tacggagtga catc 24

<210> 3

<211> 169

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 3

gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcgggc cagcgtattg tactgcgttt 60
cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtaaataat caggaagtga tggagcatca 120
gggcggctat acgccatttg aagccgatgt cactccgtat gttattgcc 169

<210> 4
<211> 128
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (41) .. (42)
<223> iSp18(六乙二醇(HEG)内部间隔子)的位点
<400> 4
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacctct attttttttt tttttttttt 60
tttttttttt ttttttagac gcaagctact ggtgatttgg caataacata cggagtgaca 120
tcggcttc 128
<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 5
agacgcaagc tactggtgat tt 22
<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 6
ggcaataaca tacggagtga catcggcttc 30
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 3' 生物素

<400> 7
tttttttttt tttttttttt 20
<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 5' FAM, 3' IowaBlack
<400> 8
tagccgccct gatgctccat cacttctg 29
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 9
agacgcaagc tactggtgat 20
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 10
ggctgcgata ttcaaagctc ag 22
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 11
ctgaacgcgc cgcttaac 19
<210> 12
<211> 166

<212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 12
 ggctgcgata ttcaaagctc agcaatttgt atggacaaat cgttgacata catcgttgcg 60
 aaaaatgctg ggatagctac tcccgccttt tgggttatta ataaagatga taggccggtg 120
 gcagctacgt ttacctatcc tgtttttggt aagccggcgc gttcag 166
 <210> 13
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20) .. (21)
 <223> iSp18(六乙二醇 (HEG) 内部间隔子)的位点
 <400> 13
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctctctggc accgtgctgc cttggcttca ttgtggtcct 60
 gaacgcgccg gcttaac 77
 <210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 14
 ctctctggc accgtgctgc cttggcttca ttgtggtc 38
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 15
 ctgaacgcgc cggcttaac 19
 <210> 16
 <211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 3' invdt
<400> 16
cggtgccaga ggagtttttt tttt 24
<210> 17
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 17
cggtgccaga ggag 14
<210> 18
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 18
tttttttttt 10
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 3' 生物素
<400> 19
tttttttttt tttttttttt 20
<210> 20
<211> 26
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 20
ttgtatggac aaatcgttga cataca 26
<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 5' FAM, 3' IowaBlack
<400> 21
tgctgggata gctactcccg ccttttgg 28
<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 22
accgtgctgc cttggcttc 19
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 23
ggctgcgata ttcaaagctc ag 22
<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 24

ctgaacgcgc cggcttaac 19
<210> 25
<211> 166
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 25
ggctgcgata ttcaaagctc agcaatttgt atggacaaat cgttgacata catcgttgcg 60
aaaaatgctg ggatagctac tcccgccttt tgggttatta ataaagatga taggccggtg 120
gcagctacgt ttacctatcc tgtttttgtt aagccggcgc gttcag 166
<210> 26
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (20) .. (21)
<223> iSp18(六乙二醇 (HEG) 内部间隔子)的位点
<400> 26
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctctctggc accgtgctgc cttggcttca ttgtggtcgt 60
agctgccacc ggcctat 77
<210> 27
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 27
ctctctggc accgtgctgc cttggcttca ttgtggtc 38
<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 28

gtagctgccca cggcctat 19

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<223> 3' invdt

<400> 29

cggtgccaga ggagtttttt tttt 24

<210> 30

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 30

cggtgccaga ggag 14

<210> 31

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 31

tttttttttt 10

<210> 32

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的

<400> 32

aaaacgagac atgccgagca tccgcggetg cgatattcaa agctcag 47

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 3' 生物素
<400> 33
tttttttttt tttttttttt 20
<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 34
aaaacgagac atgccgagca tc 22
<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<223> 5' FAM, 3' IowaBlack
<400> 35
tgctgggata gctactcccg ctttttgg 28
<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的
<400> 36
accgtgctgc cttggettc 19

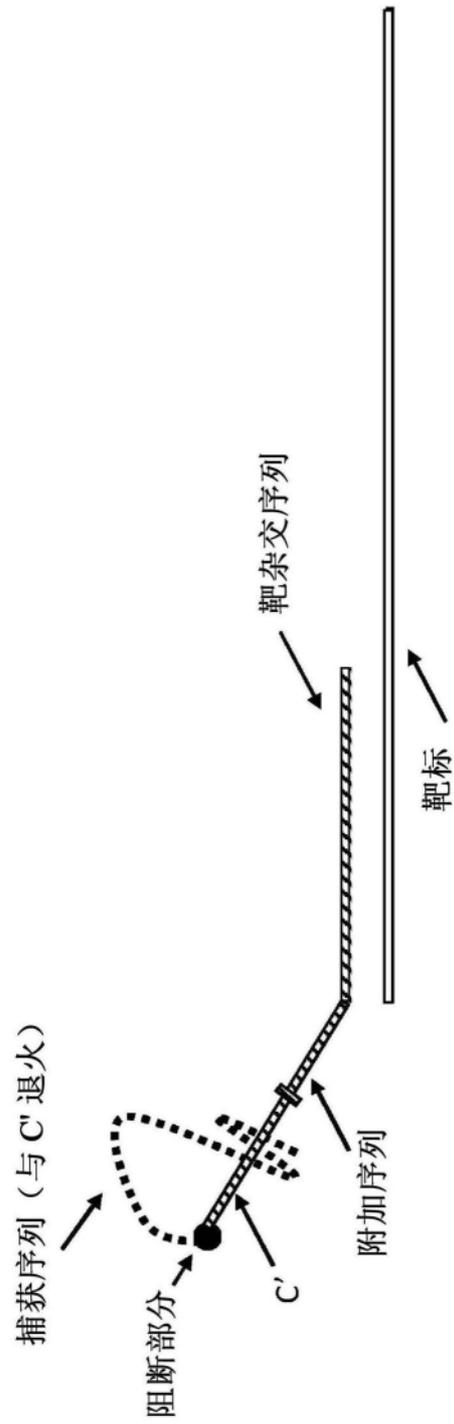


图1A

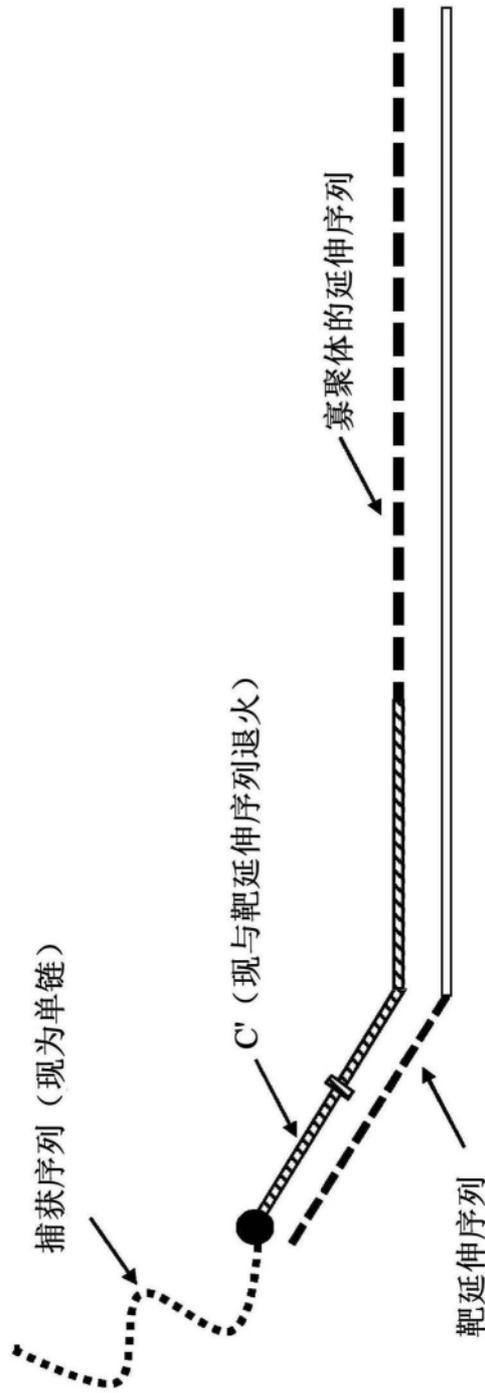


图1B

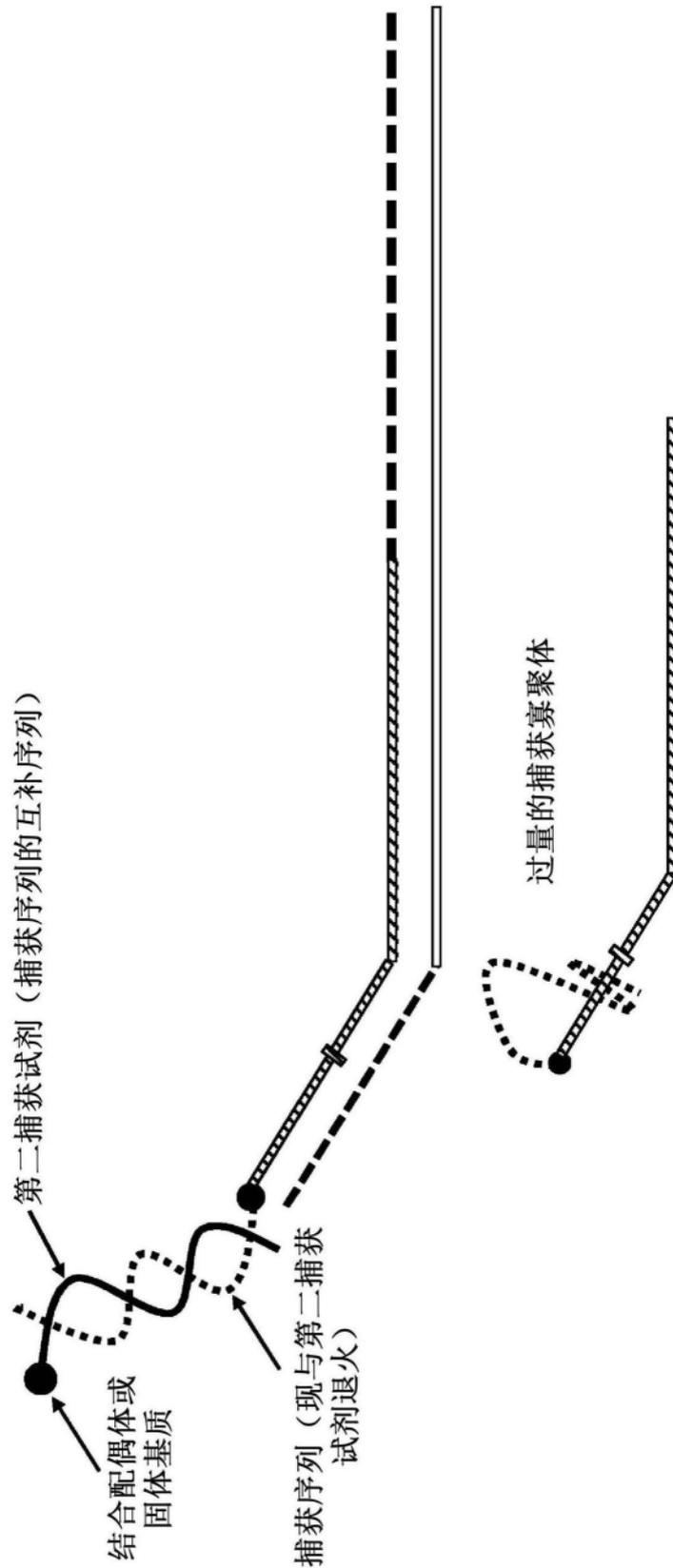


图1C

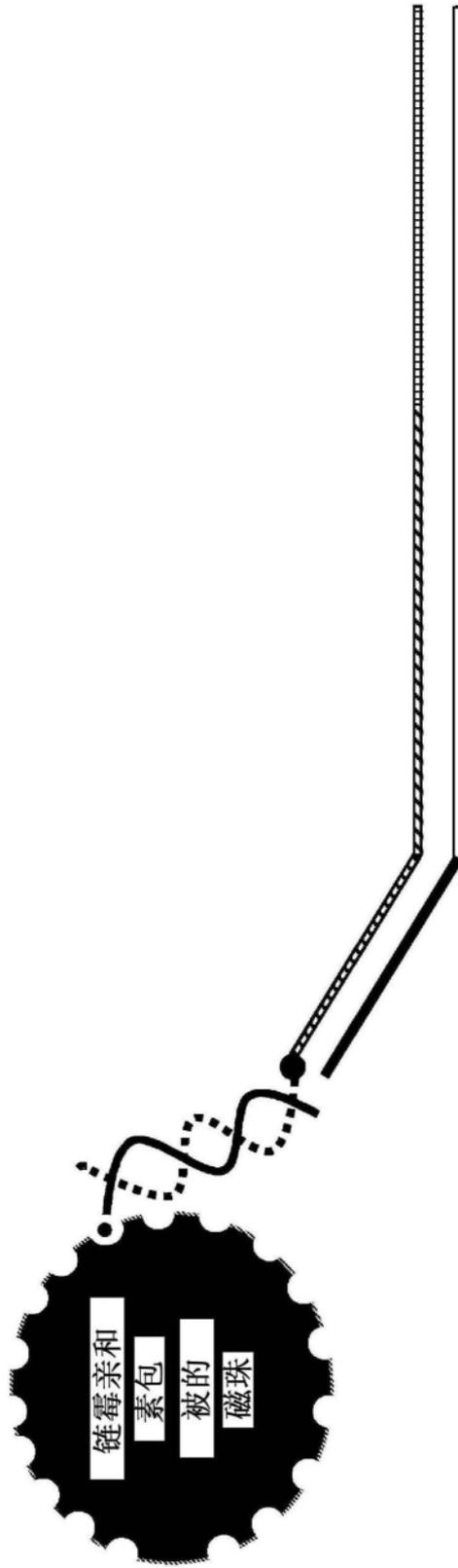


图2A

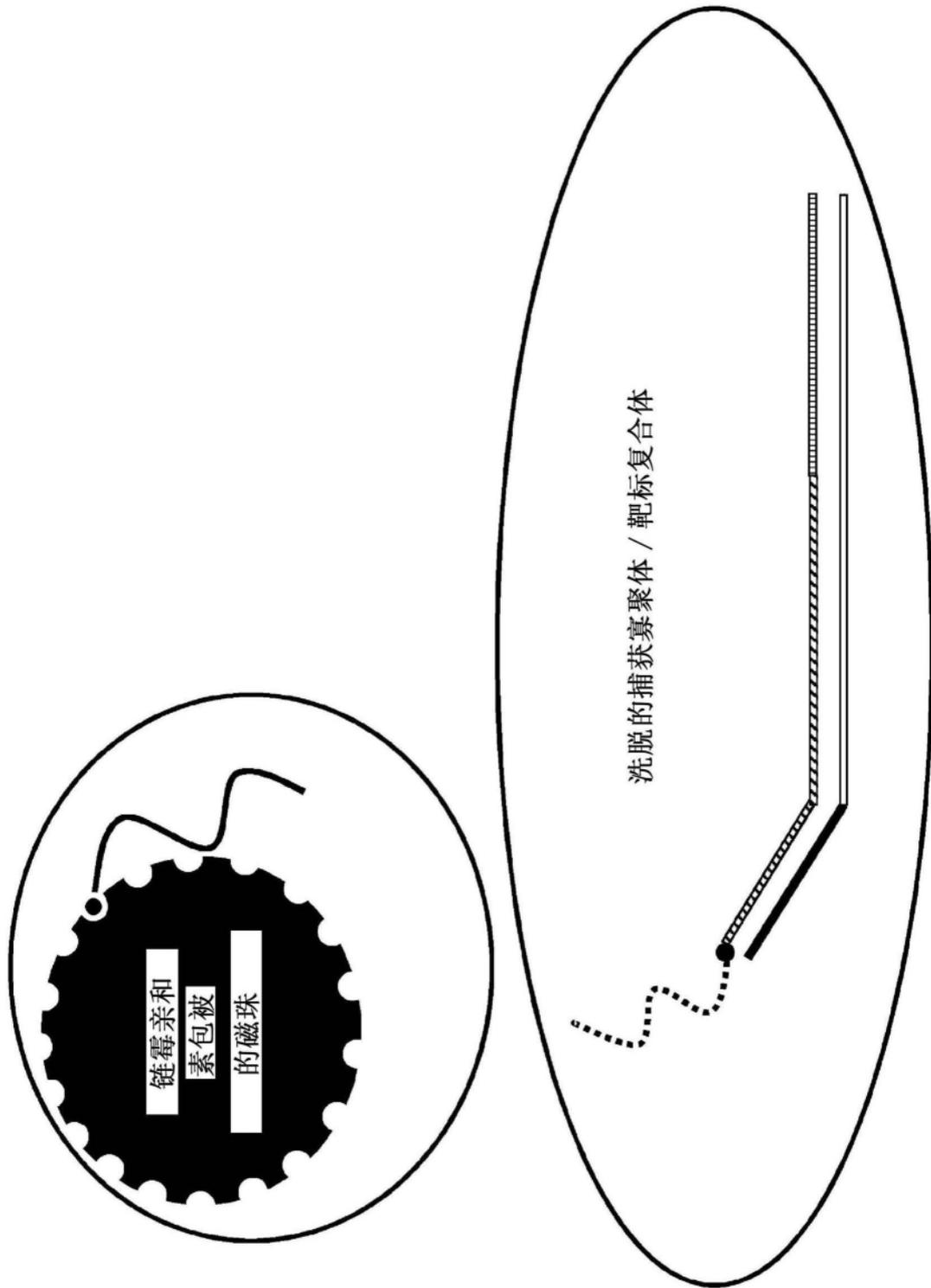


图2B

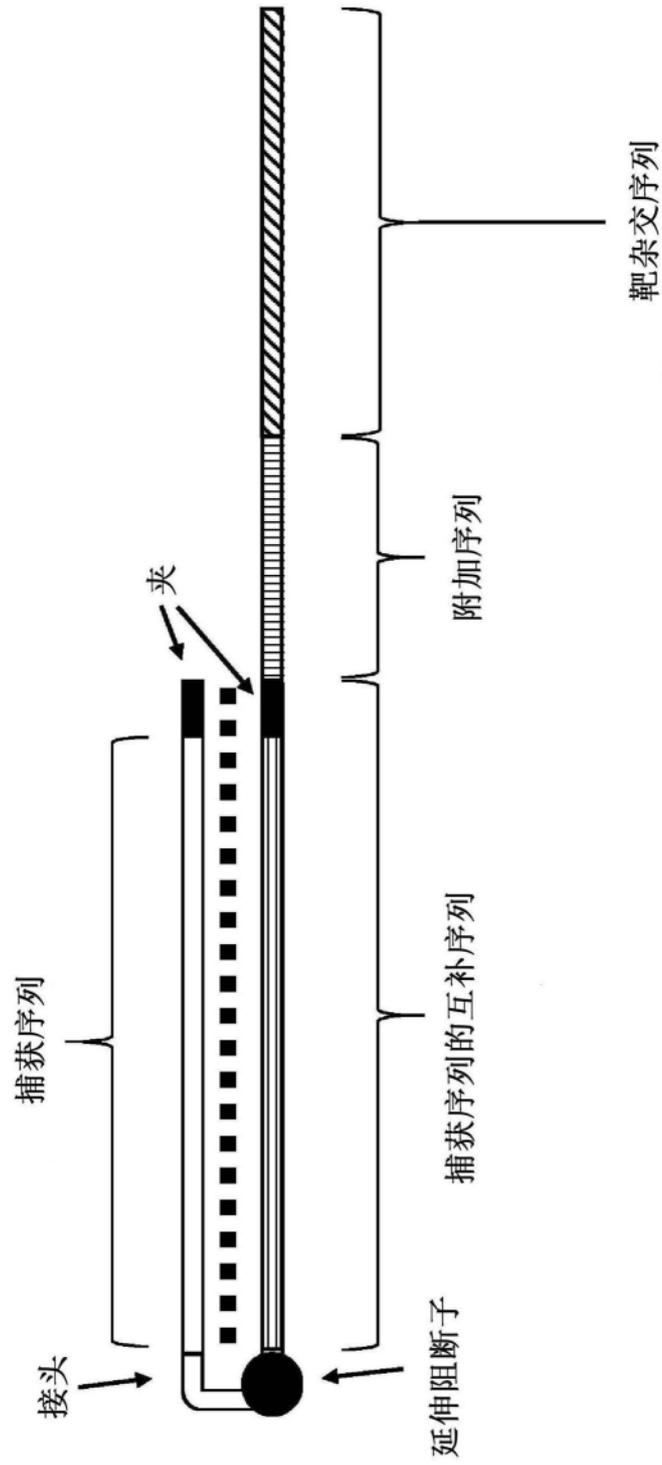


图3

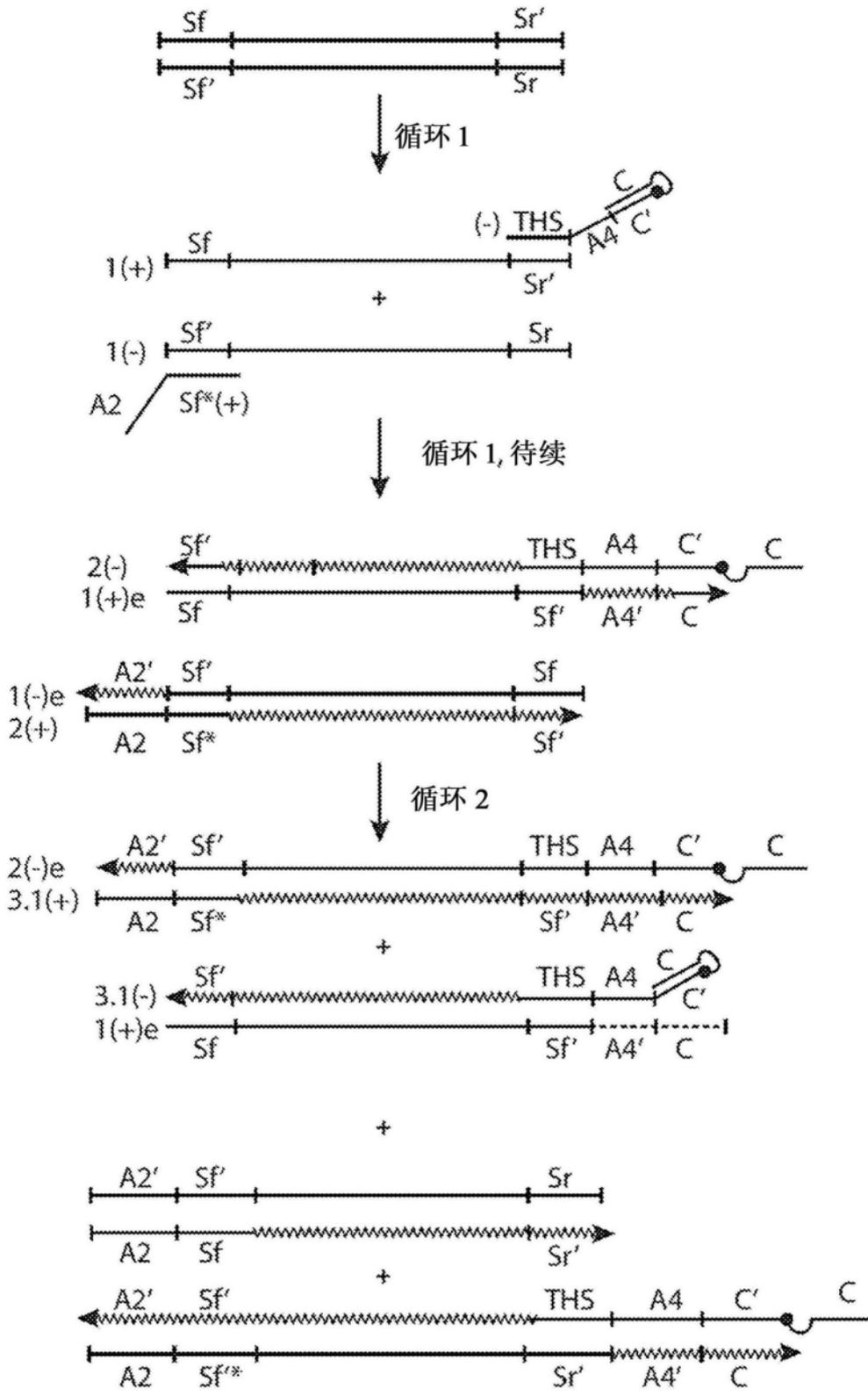


图4A

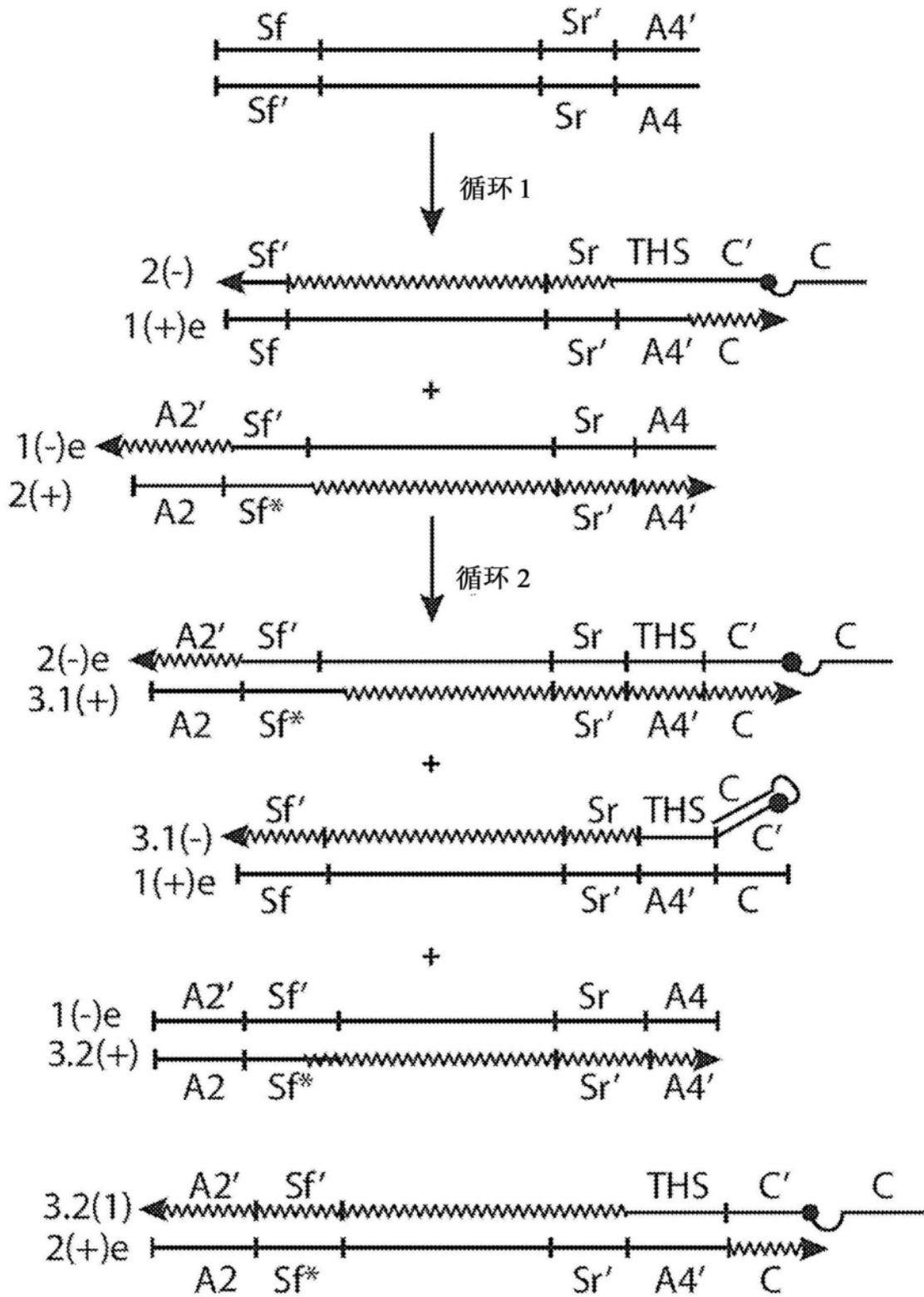


图4B

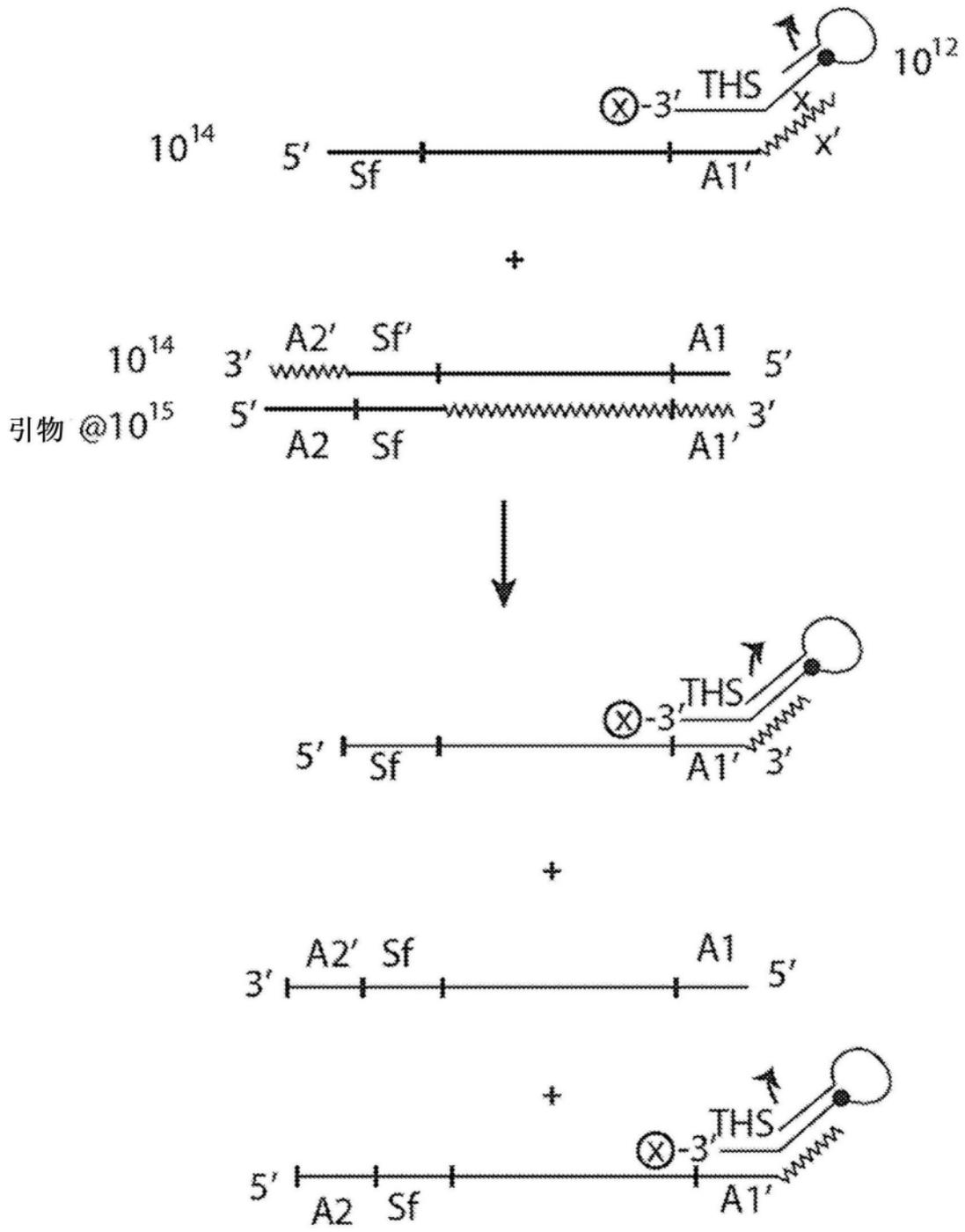


图5

阻断的 3' 端 (276-54)

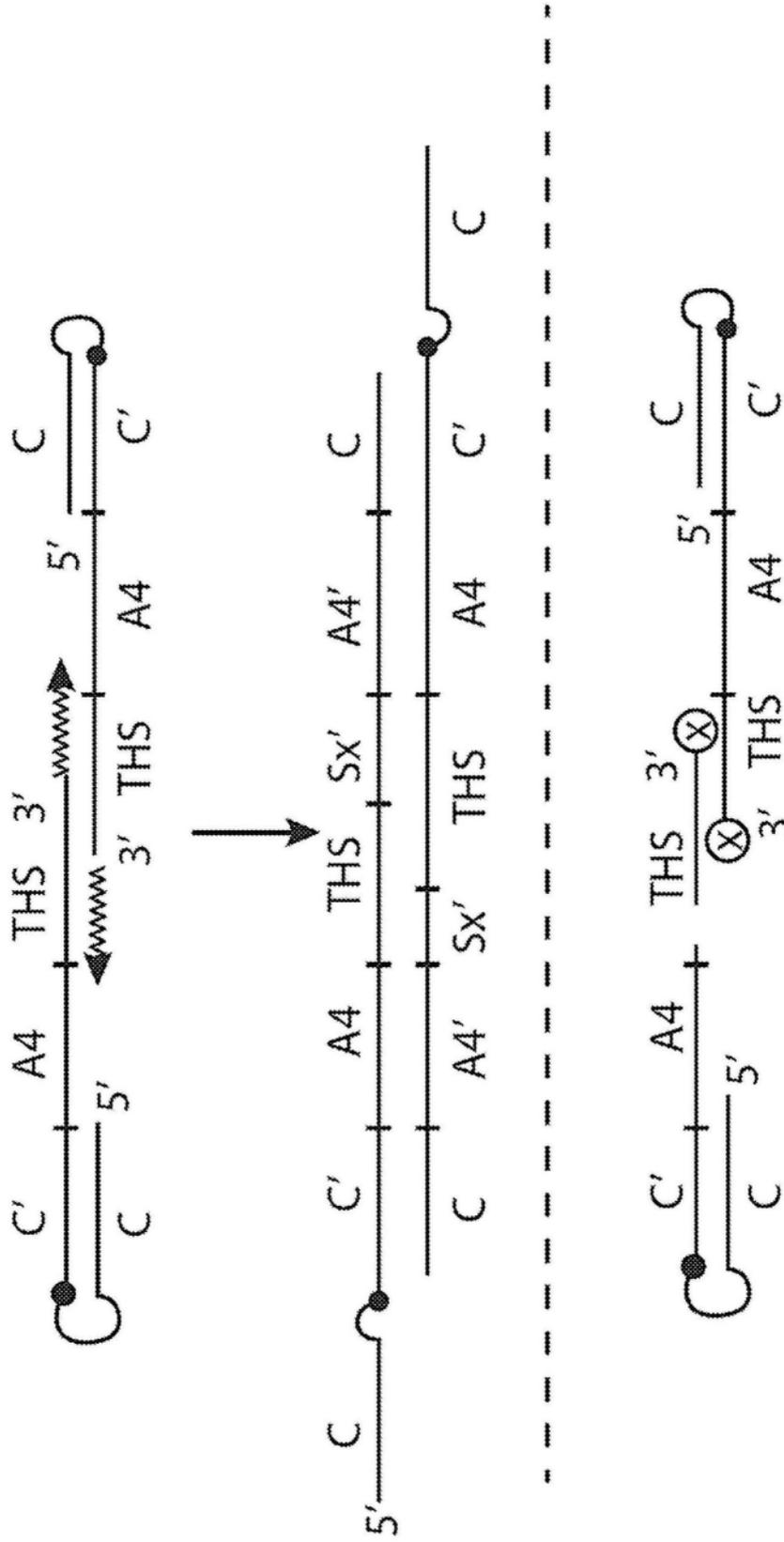


图6

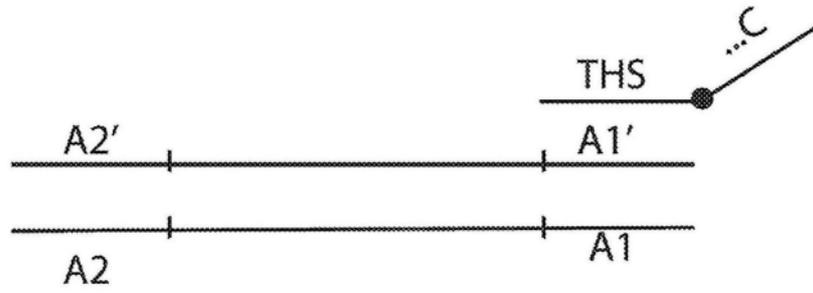


图7A

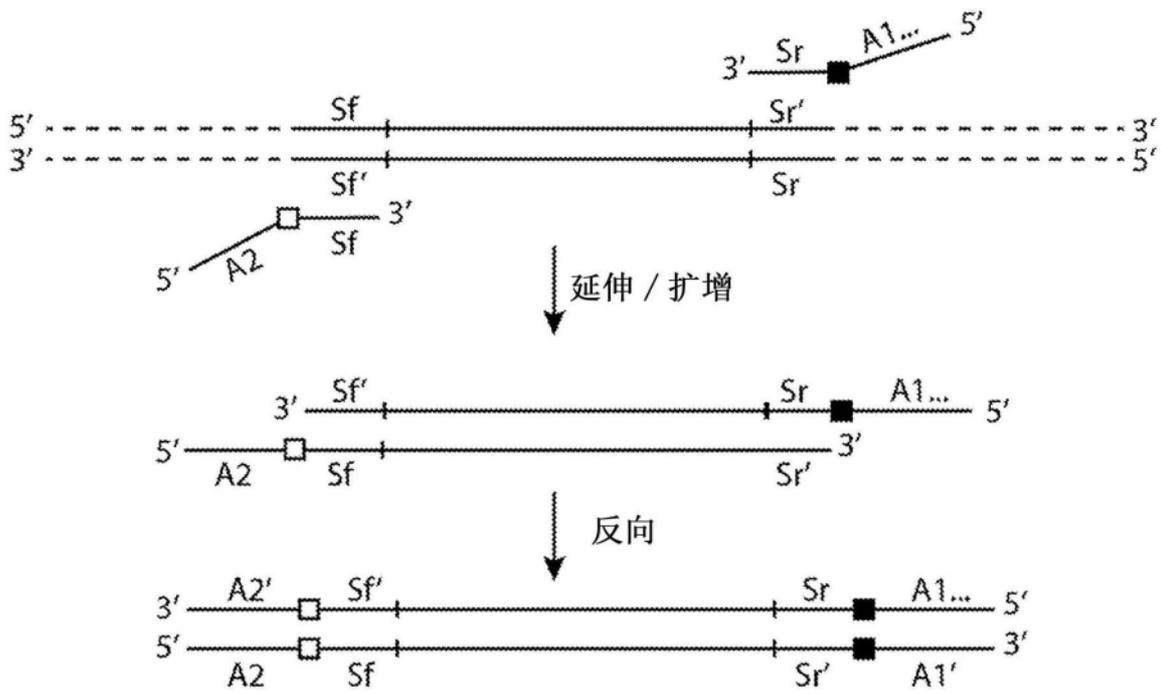


图7B

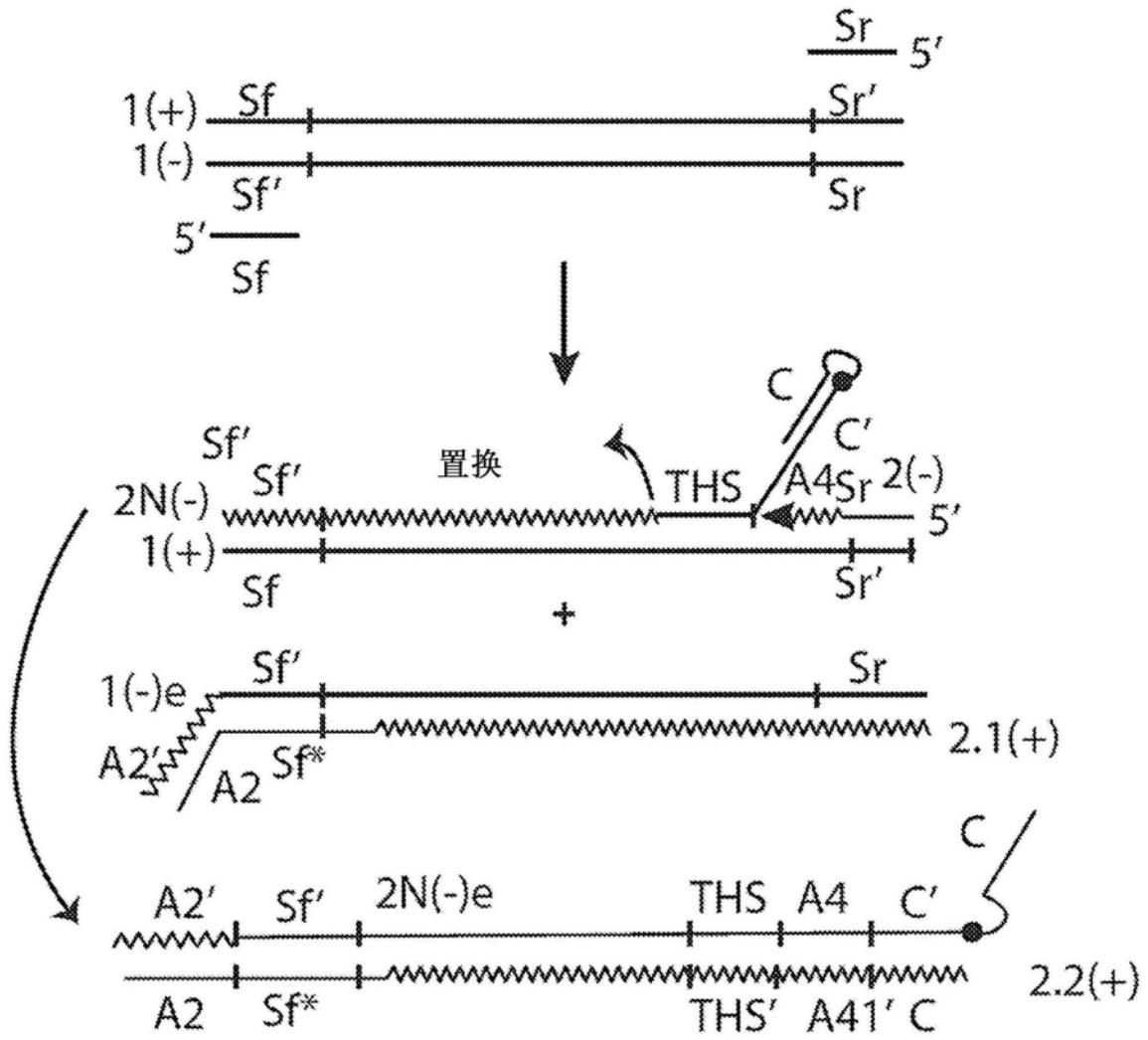


图8A

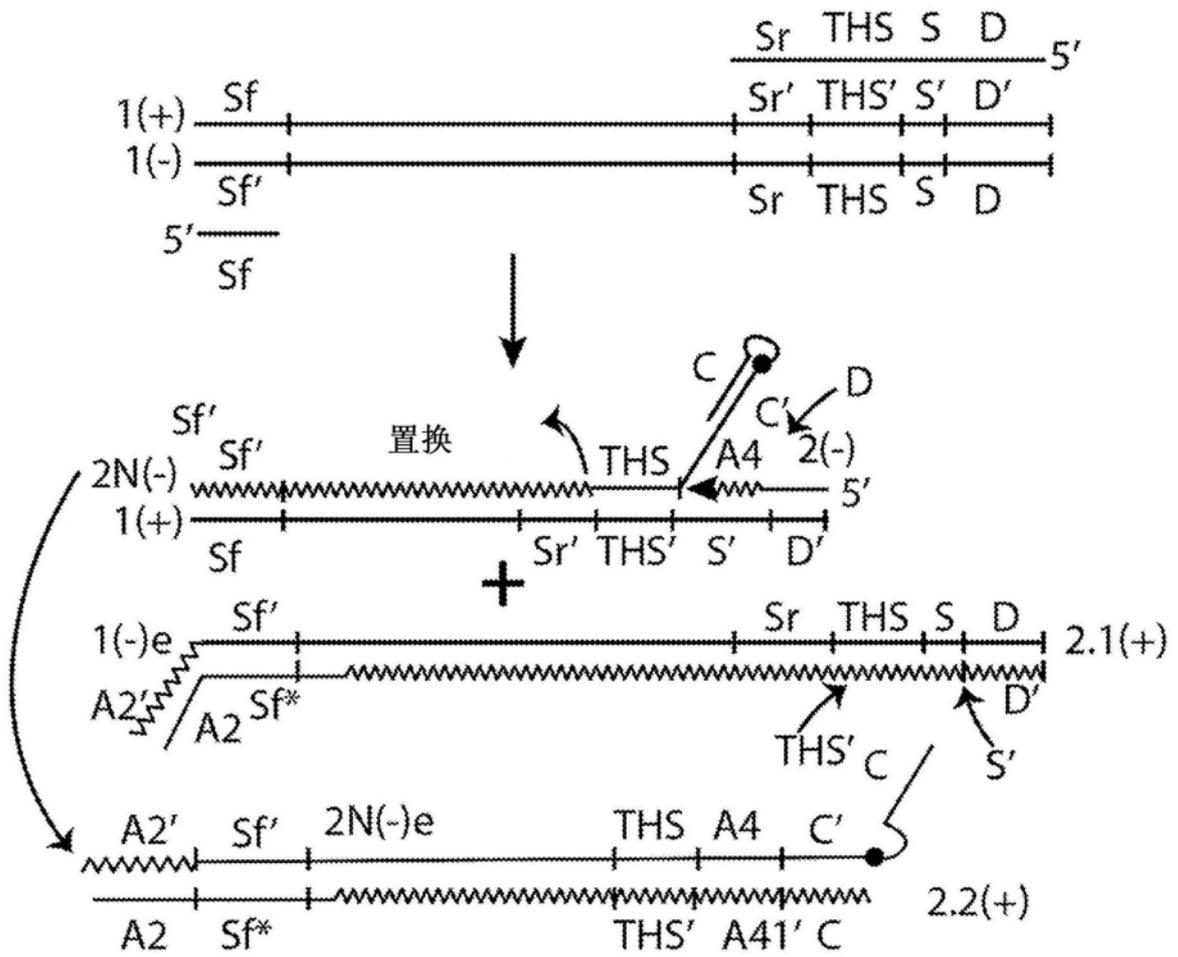


图8B

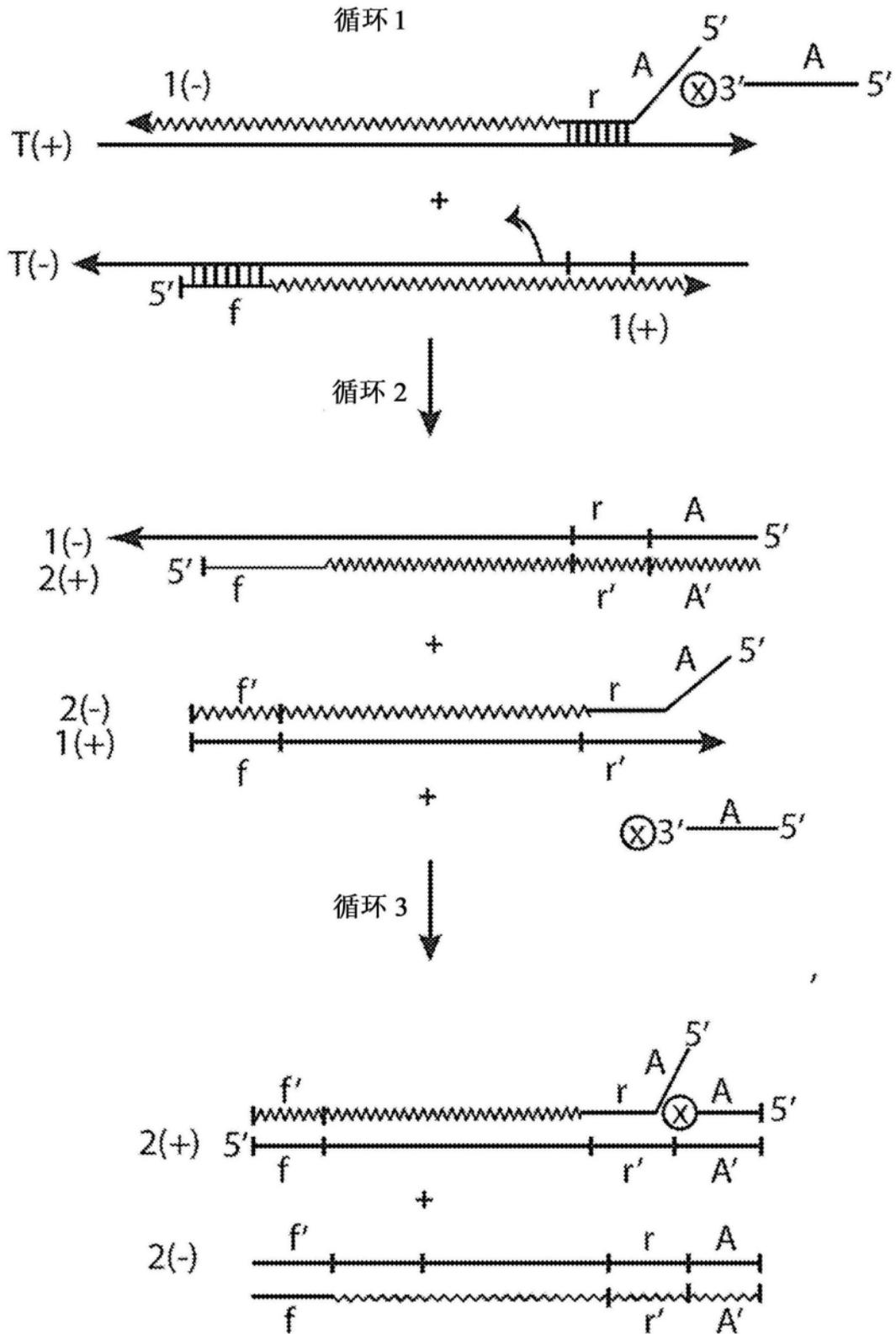


图9

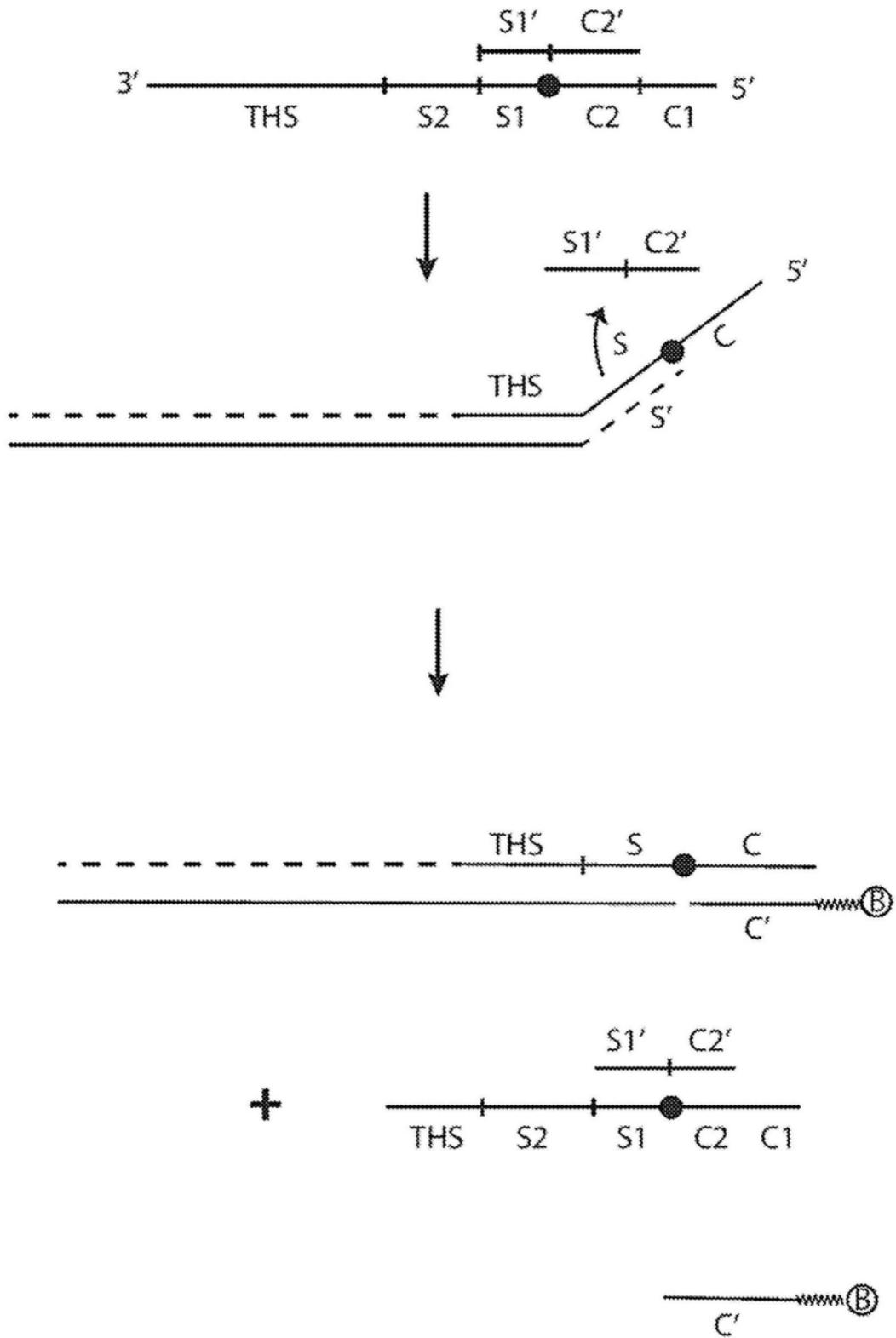


图10A

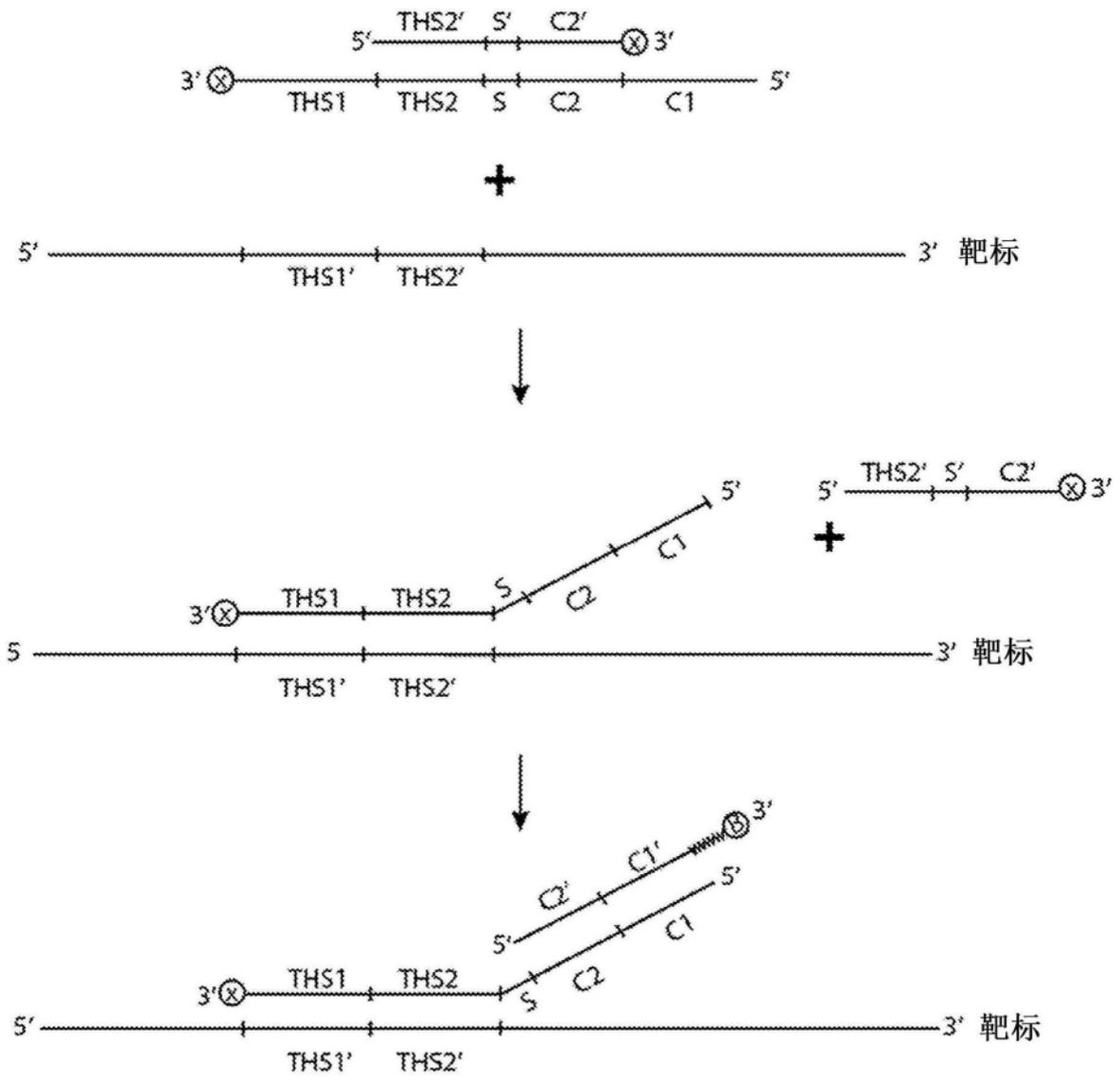


图10B

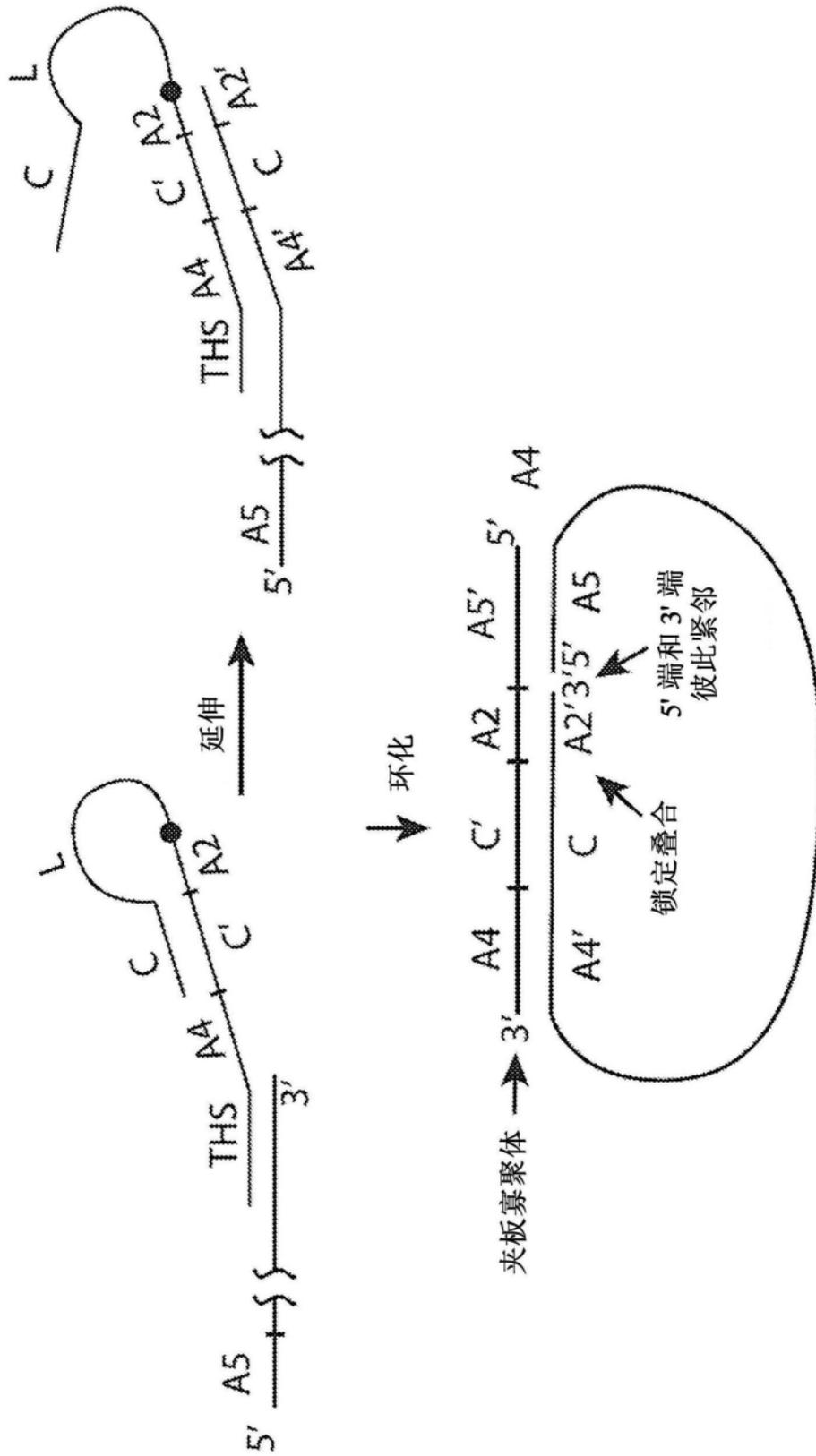


图12

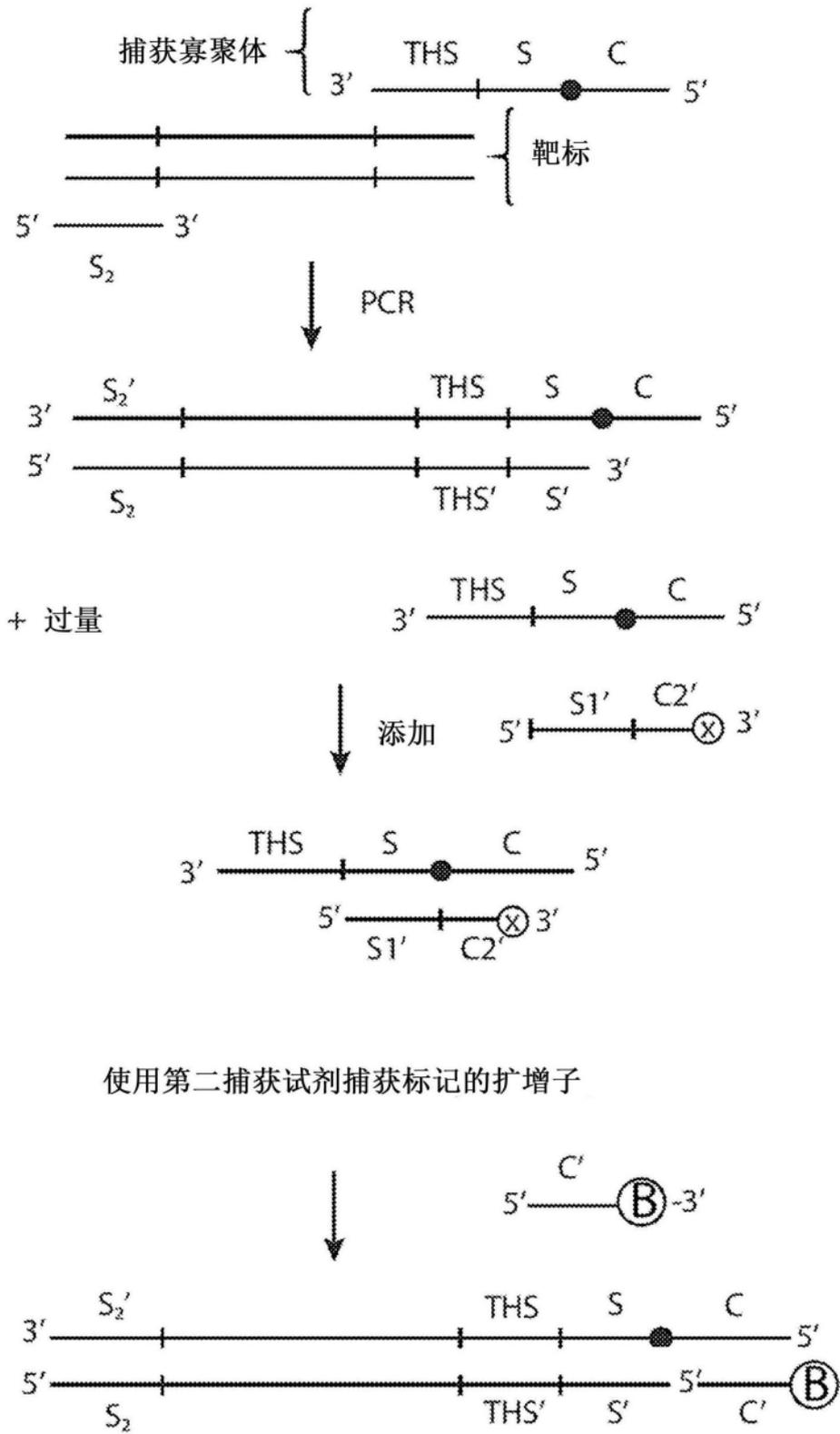


图13

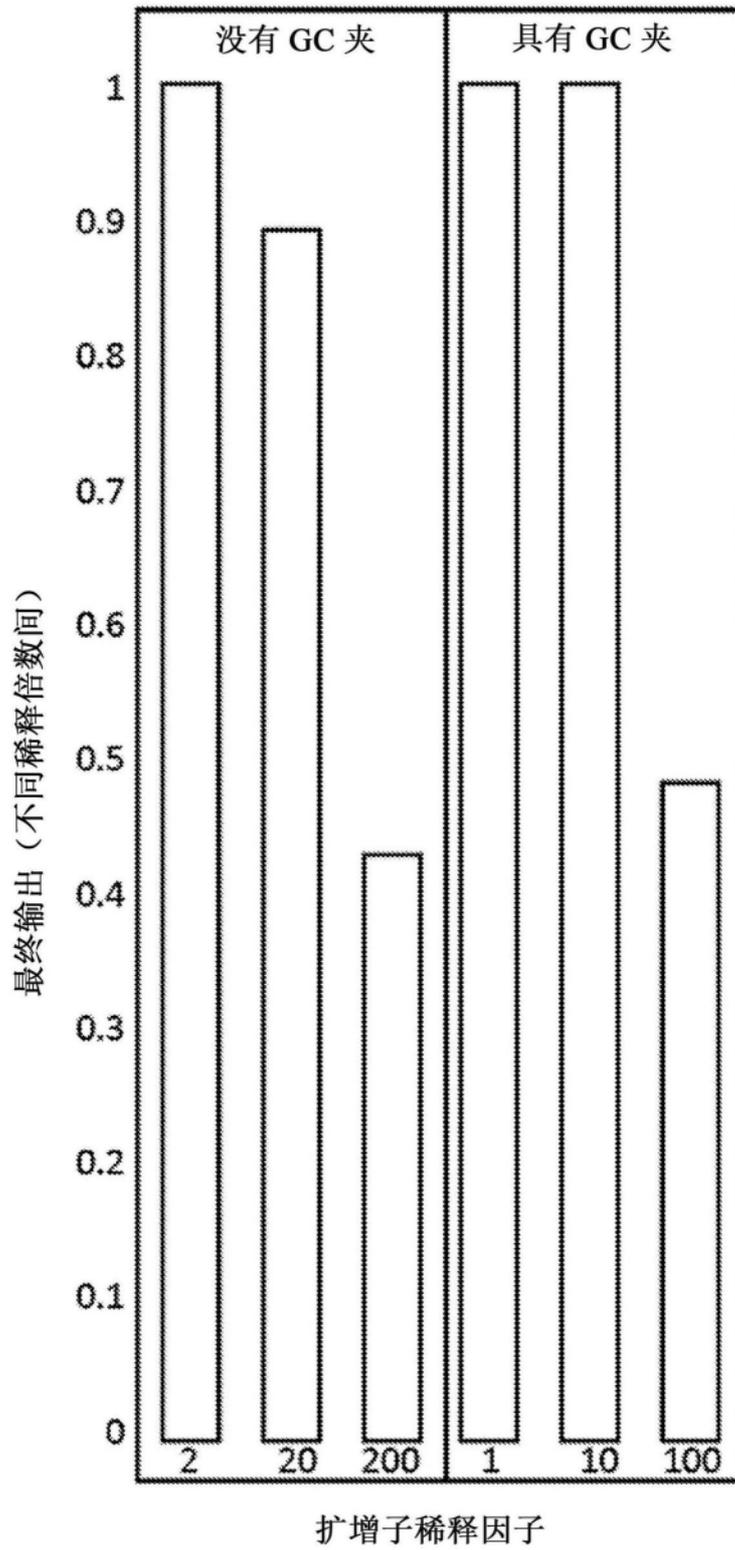


图14