



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101613730 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 200910146289.7

(22) 申请日 2009.06.26

(30) 优先权数据

61/076111 2008.06.26 US

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 R·博亨兹基 A·古普塔

J·蒙蒂尔 S·G·威尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 1038974 A1, 2000.09.27, 全文.

EP 1041159 A2, 2000.10.04, 全文.

US 6190865 B1, 2001.02.20, 全文.

US 6287823 B1, 2001.09.11, 全文.

WO 02090536 A2, 2002.11.14, 全文.

Vera Steullet 等. Cleavage of abasic sites in DNA by intercalator-amines. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》. 1999, 第 7 卷 2531-2540.

审查员 韦炜

权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

用于预防核酸扩增技术中遗留污染的改良方法

(57) 摘要

改良的预防扩增反应中遗留污染的方法, 包括用尿嘧啶-N-DNA 糖基化酶处理含尿嘧啶 DNA, 在聚胺(例如亚精胺、精胺等)存在下加热 DNA。可选择地, 用尿嘧啶-N-DNA 糖基化酶处理后, 反应物进一步与具有 AP 裂解酶活性的酶孵育。

1. 在核酸的通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增期间减少遗留污染的方法, 包括步骤:
  - a. 提供包含所述核酸的样品溶液;
  - b. 在具有 DNA 糖基化酶活性的酶存在的条件下扩增所述核酸以产生具有至少一个脱碱基位点的 DNA, 其中所述 DNA 糖基化酶活性是尿嘧啶 -N- DNA 糖基化酶活性;
  - c. 提供至少一种促脱碱基 DNA 降解的试剂, 其中所述试剂是聚胺;
  - d. 在适于使所述具有至少一个脱碱基位点的 DNA 降解的条件下孵育所述样品溶液。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚胺是嵌入剂聚胺。
3. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚胺选自亚精胺、精胺、三亚乙基四胺和三亚甲基二胺。
4. 预防在核酸的通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增期间遗留污染的反应混合物, 包含:  
用于扩增核酸的试剂, 其中所述试剂包括一种或更多种寡核苷酸引物、核酸聚合酶、缓冲剂、盐和三磷酸核苷, 所述三磷酸核苷包括 dATP、dCTP、dGTP、以及 dTTP 和 dUTP 中的一种或更多种,  
适于产生具有至少一个脱碱基位点的 DNA 的试剂, 所述试剂为具有 DNA 糖基化酶活性的酶, 所述 DNA 糖基化酶活性是尿嘧啶 -N- 糖基化酶活性, 以及  
促脱碱基 DNA 降解的试剂, 其中所述试剂是聚胺。
5. 用于实施预防在核酸的通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增期间遗留污染的方法的试剂盒, 包括:
  - a) 具有 DNA 糖基化酶活性的试剂, 所述试剂为具有尿嘧啶 -N- 糖基化酶活性的酶;
  - b) 能降解脱碱基 DNA 的试剂, 其中所述试剂是聚胺, 和
  - c) 用于扩增核酸的试剂, 其中所述用于扩增核酸的试剂包括一种或更多种寡核苷酸引物、核酸聚合酶、缓冲剂、盐和三磷酸核苷, 所述三磷酸核苷包括 dATP、dCTP、dGTP、以及 dTTP 和 dUTP 中的一种或更多种。

## 用于预防核酸扩增技术中遗留污染的改良方法

### 发明领域

[0001] 本发明一般地涉及核酸扩增的方法,更具体的,涉及核酸扩增中遗留污染的控制。

[0002] 发明背景

[0003] 聚合酶链式反应 (PCR) 能特异扩增少至单拷贝的靶核酸序列。已证实 PCR 的高敏感性和特异性在需要检测少量靶核酸的诊断学、法医学和其他应用中很有价值。不幸地, PCR 测定的所述高灵敏度使其易受污染和假阳性结果的影响。在法医学和疾病筛查 (例如 HIV 检测) 中,假阳性结果可能带来破坏性的后果。

[0004] 假阳性结果的最通常来源是“遗留污染”,其中先前测定中的 PCR 产物 (扩增子) 污染后续的 PCR 测定。污染物可由技术人员、仪器甚至经气雾剂传播。在一个“阴性”的样本中 (无靶核酸存在),污染物造成了假阳性结果。在一个“阳性”的样本中 (存在靶核酸),污染物与真实的靶标共扩增。该共扩增会歪曲定量测定 (其中必须确定真实靶标的确切量) 的结果。

[0005] 预防遗留扩增的广泛且有效的途径包括使用尿嘧啶 DNA 糖基化酶,尤其是 UNG (EC 3. 2. 2. 3)。这些酶类识别单链或双链 DNA 中存在的尿嘧啶,并切割尿嘧啶碱基和脱氧核糖之间的 N-糖苷键,留下脱碱基位点。例如参见美国专利号 6, 713, 294。尿嘧啶 -DNA 糖基化酶,缩写为“UDG”或“UNG”,包括线粒体 UNG1、核 UNG2、SMUG1 (单链选择性尿嘧啶 -DNA 糖基化酶)、TDG (TU 错配 DNA 糖基化酶)、MBD4 (带甲基结合区域的尿嘧啶 -DNA 糖基化酶) 和其他原核和真核酶类 (参见 Krokan H. E. 等“Uracil in DNA-occurrence, consequences and repair”, *Oncogene* (2002) 21 :8935-9232)。

[0006] 尿嘧啶 -DNA 糖基化酶是预防由于胞嘧啶脱氨基转化为尿嘧啶导致的 G 至 A 的转换突变等等的 DNA 修复酶类。如果胞嘧啶 (C) 脱氨基为尿嘧啶 (U) 并且 DNA 经历复制的话, A 将掺入 U 的对面 (先前 G 位于 C 的对面)。如果尿嘧啶碱基在复制前被糖基化酶切除,脱碱基位点由小补缀或大补缀 DNA 修复途径修复,包括核酸内切酶和 DNA 聚合酶活性。除了 DNA 损伤修复外, DNA 糖基化酶活性在体细胞突变中起作用,包括抗体亲和力成熟过程中的免疫球蛋白类转变和体细胞高度突变。参见 Bransteitter R. 等,“First AID (Activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies”, *J. Bio. Chem.* (2007) 281 :16833-16836。

[0007] 优化用于控制扩增反应中遗留污染的尿嘧啶 -N-DNA 糖基化酶 (UNG) 的制备已公开于诸如美国专利号 6, 187, 575 中。UNG 预防遗留污染的用途也已被描述,参见 Longo 等“Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction” (1990) *Gene*, 93 :125-128。使用 UNG 控制遗留污染方法的现有技术描述于美国专利号 6, 287, 823 和 6, 518, 026 以及美国公开号 2003/0077637 中。

[0008] 通常,该方法包括 2 步。首先, PCR 测定必须包括 dUTP,从而潜在的遗留污染物扩增子含有尿嘧啶。该方法包括在扩增反应中用 dUTP 部分或全部取代 dTTP。可选择地 (或另外地),可将一个或更多个尿嘧啶掺入扩增引物中。然而应当注意的是,如果引物中的尿嘧啶离 5' 端太近,该方法预防随后扩增的效力将下降。使用 dUTP 并不干扰 PCR 测定。尽管

用尿嘧啶代替了胸腺嘧啶,当产生含尿嘧啶的扩增子后,可通过标准方法对其检测和分析。

[0009] 下一步,将尿嘧啶-N-DNA 糖基化酶加入到随后的 PCR 中,方便地,UNG 在含有所有 PCR 成分的标准反应混合物中是活性的。这使得能够向组合 PCR 反应物或甚至 PCR 主混合物中加入 UNG。在热循环开始前,反应混合物在为 PCR 主混合物背景中的 UNG 活性优化的温度(约 50°C)或 UNG 为活性的温度范围内孵育。如果来自先前反应的含尿嘧啶污染物存在,UNG 将切除尿嘧啶,留下脱碱基位点。已知含脱碱基位点的 DNA 在高温和高 pH 条件下不稳定。当热循环开始时,这些 DNA 降解。高温也失活了 UNG 酶,允许产生新的含尿嘧啶的 DNA 扩增子。

[0010] 用 UNG 处理后,脱碱基 DNA 必须在脱碱基位点有效切割。如果不被切除,脱碱基 DNA 成为随后扩增中聚合酶的模板。例如,已知 Taq DNA 聚合酶通过在缺失碱基的对面掺入腺苷绕过脱碱基位点。该聚合酶产生的单个旁路产生了用于随后扩增的完美模板(参见 Sikorsky, J. A. 等,“DNA damage reduces Taq polymerase fidelity and PCR amplification efficiency”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007) 355 :431-437 或 Kobayashi, A. 等. “Novel PCR-mediated mutagenesis employing DNA containing a natural abasic site as a template and translesional Taq DNA polymerase”, *J. Biotech.* (2005) 116 :227-232)。因此,在脱碱基位点有效切割 DNA 的能力对于基于 UNG 的预防遗留污染方法的完全成功是必需的。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及使用 DNA 糖基化酶的改良的遗留污染控制的方法。发明人确定成功消除遗留污染的限制因素是有效降解脱碱基 DNA。已接受的观点是限制步骤是酶消化产生脱碱基 DNA。而下一步脱碱基 DNA 的非酶降解被认为是简单、有效和不需要改进的。现有的改进污染控制方法的努力集中于加入更多的糖基化酶以增加孵育时间。本发明人发现与现有的观点相反,酶步骤是非常有效的。同时,非酶降解步骤效率不够,可能成为持续污染源。如果污染物在 PCR 的起始循环不被降解,其通过聚合酶被拷贝,不再被消除。

[0013] 发明人发现可通过提供降解或利于样品中脱碱基 DNA 降解的试剂显著地改善污染控制。最有效的这类试剂是那些与随后扩增相容的试剂。在一些例子中,所述样品与聚胺接触。在某些实施方案中,所述聚胺是亚精胺、精胺或嵌入剂胺。在高温和高 pH 下,聚胺在不抑制 PCR 的情况下显著地改善了脱碱基 DNA 的降解。在其他实施方案中,所述样品与酶接触,催化脱碱基 DNA 骨架的切割。公开了使用这些和类似试剂的组合物和方法。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1A 和 B 显示了在不存在或存在增加浓度的精胺的情况下,具有脱碱基位点的寡核苷酸的降解产物的 HPLC 色谱图谱。图 1A 显示了 50°C 下的降解,图 1B 显示了 50°C 后进行 2 分钟的 95°C 加热峰 (heatspike) 的降解。

[0016] 图 2A 和 B 显示了在不存在或存在精胺的情况下,不同数量 DNA 和 RNA 靶标的扩增结果。图 2A 显示了用或不用 100  $\mu$  M 精胺时不同数量的 HCV DNA 输入拷贝的扩增。图 2B 显示了在 50  $\mu$  M 精胺存在下不同数量的 HCV DNA 输入拷贝的扩增。

[0017] 图 3 显示了单独使用 dUTP 或 dUTP 和 dTTP 组合扩增靶序列的结果。

[0018] 图 4 显示了用增加量的 UNG 预处理后的扩增结果。

[0019] 图 5 显示了用或不用 UNG 预处理含有 dU 和 dU/dT 的序列扩增的结果。

[0020] 图 6 显示了在精胺存在下,用 UNG 预处理后扩增的结果。

[0021] 图 7 显示了在不同温度下,用 UNG 预处理后扩增的结果。

[0022] 定义

[0023] 为了便于理解本发明公开的内容,下列定义可能是有帮助的。

[0024] 本文中,术语“聚胺”表示具有超过一个氨基的有机化合物或该种化合物的盐。聚胺非限制性地包括二胺、三胺、四胺以及具体为亚精胺、精胺、腐胺、胍和二亚乙基三胺。

[0025] 本文中,术语“扩增子”表示 DNA 分子群,其由模板扩增产生,例如通过 PCR。

[0026] 本文中,术语“靶序列”表示特别感兴趣的核酸序列,其可能存在于样品中。

[0027] 本文中,术语“脱碱基 DNA”或“具有脱碱基位点的 DNA”指单链或双链的 DNA 分子,其含有至少一个脱碱基核苷酸(有时称为“脱碱基位点”)。“脱碱基核苷酸”是在脱氧核糖的 1' 位缺乏碱基的核苷酸。

[0028] 本文中,术语“AP 核酸内切酶”或“AP 裂解酶”表示能够打破核酸的磷酸二酯骨架的酶。该术语包括能够在脱碱基位点 5' 端和 3' 端打破骨架的酶类。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明涉及控制或减少核酸扩增反应遗留污染的改良方法,其使用具有 DNA 糖基化酶活性的酶。作为例子,本发明使用 DNA 糖基化酶或尿嘧啶-DNA 糖基化酶。所述方法通常始于产生含有稀有碱基的扩增子。作为例子,本发明使用尿嘧啶。这可以通过在 dUTP 存在下进行核酸扩增、向扩增引物中掺入脱氧尿苷或对 DNA 中的胞嘧啶脱氨基完成。第一步扩增反应产生含有尿嘧啶的扩增子后,任何后续的扩增反应均用具有尿嘧啶-DNA 糖基化酶活性的酶(例如 UNG 酶)预处理。如果存在来自先前扩增的污染扩增子,UNG 将切割所述扩增子中的尿嘧啶,产生脱碱基位点。

[0031] 虽然尿嘧啶和 UNG 最常用于控制污染,应当注意以同样方式起作用的备选酶/底物系统也是可用的。本领域已知特异性 DNA 修复酶类识别并从 DNA 中切除不同的非天然碱基,剩下脱碱基位点。这种非天然碱基和特异性酶的组合可用于控制遗留污染,只要聚合酶能够将该非天然碱基掺入潜在污染扩增子,或替代地,潜在污染扩增子可被以某种方式处理以产生非天然碱基。这类酶/底物对的例子包括 MutY 或 MutM 和 8-氧代鸟苷, hOGG1 和 8-氧代鸟苷,人 MBD4 和尿苷,大肠杆菌(E. coli)Endo VIII 和胸腺嘧啶乙二醇或其他氧化的嘧啶类和大量的其他类似的,例如在 Hitomi 等.(2007)DNA Repair 6:410-428 中所描述的。

[0032] 依照传统的方法,用 UNG 孵育后,下一步骤是使反应混合物进行热循环。扩增反应例如聚合酶链式反应(PCR)或连接酶链式反应(LCR)包括起始的加热或“变性步骤”。该起始加热步骤被认为足以使脱碱基 DNA 降解,因为已知脱碱基 DNA 在高温高 pH 条件下不稳定。如果该方法不能消除污染(sterilization),从业者会怀疑使用 UNG 的酶步骤的失败。通常认为酶类对反应条件敏感。从最适条件最微小的偏差就可使酶失去大量或全部活性。因此当某一方法失败时,酶通常是最先受到怀疑的。另一方面,认为非酶化学反应更为有效(robust)。例如, Kleiboeker (“Quantitative detection of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription PCR”, Virology Journal (2005) 2:29) 报道了消除多种模板的不良结果。为改善效率, Kleiboeker 教导增加 UNG 的量、孵育的时间和升高孵育的温度。然

而,已知过量 UNG 的存在对于 PCR 是有害的。尽管 UNG 最后被热灭活,其在热循环中长时间保留了的基本活性。由于温度周期性的接近于最佳的 50°C (PCR 退火步骤中),UNG 具有部分活性,开始消化新产生的含尿嘧啶扩增子。因此不能加入更多量的 UNG。

[0033] 令人惊讶地,本发明人发现 UNG 并非消除污染方法失败的原因。与预期相反,消除污染方法中的限制因素不是酶步骤,而是随后的链切割步骤。通过用 HPLC 分析 UNG 方法的中间产物,本发明人确定 UNG 将 DNA 中超过 95% 的尿嘧啶转化为脱碱基位点。然而,所得的脱碱基 DNA 仅有 6% 在 50°C 下被切割,仅有约 10% 在 95°C 下被切割。因此发明人开发了 UNG 消除污染方法的有效改进,包括添加利于脱碱基 DNA 降解的试剂。特别有效的改进包括不干扰后续扩增反应的此类试剂。

[0034] 在一个实施方案中,此类促脱碱基 DNA 降解试剂是聚胺。一般而言,聚胺是线性的烃分子,包括至少两个氨基,每端一个氨基。某些线性聚胺被非线性或环状部分取代。除了末端的氨基外,某些聚胺还在链内具有一个或更多个内部氨基。在某些实施方案中,聚胺具有这样的结构:其中相邻的氨基被三个碳原子相互隔开。大量聚胺的比较分析揭示该结构能最佳切割脱碱基位点,参见 Steullet 等。“Cleavage of abasic sites in DNA by intercalator amines,”*Bioorg. Medic. Chem.* 1999 (7), 2531-2540。不论聚胺中原子的总数和氨基的总数,该法则均适用。有效的聚胺例子包括:

[0035] 亚精胺,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH})(\text{CH}_2)_4(\text{NH}_2)$  ;

[0036] 精胺,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH})(\text{CH}_2)_4(\text{NH})(\text{CH}_2)_3(\text{NH}_2)$  ;和

[0037] 三亚甲基二胺,  $(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3(\text{NH}_2)$ 。

[0038] 优选地,根据本发明向反应中加入一种或更多种聚胺,至浓度为 0.01mM 至 1mM 之间。

[0039] 在某些实施方案中所述聚胺是嵌入剂胺。该类聚胺具有嵌入部分,能嵌入核酸中的碱基对或碱基之间。聚胺上嵌入部分的例子包括芳烃和聚芳烃(例如萘和蒽醌)。在某些实施方案中,嵌入剂部分本身也可被一个或更多个聚胺侧链所取代,嵌入剂胺通常在降解脱碱基核酸方面比线性胺类更有效。不受特定理论的限制,可认为该效应可能是源于嵌入作用,其使得聚胺分子的活性部分接近其靶脱碱基位点。

[0040] 已知聚胺能改善多种包括核酸的酶反应效率。例如,已发现一种或更多种聚胺(乙二胺、三亚甲基二胺、亚精胺和精胺)有时能够改善使用不纯样品(例如血液和植物或动物组织)的 PCR 扩增效率(参见日本申请公开 JP11113573、JP2001008680、JP8009997 和 JP6277061 的英文摘要)。一般而言,已发现多种聚胺在辅助酶反应方面的能力非常相似。美国专利号 6,413,747 “Enhancement of nucleic acid amplification by the addition of a polyamine” 公开了 9 种不同的聚胺的使用,每种均能增加 PCR 的效率。另一个研究组发现聚胺在增加效率的同时降低了使用从冰冻大麦种子中提取的 DNA 所进行 PCR 的特异性,参见 Ahokas H. 和 M. J. Erkkila “Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine”, (1993) *PCR Methods Appl.*, 3:65-68。该研究组发现,将反应中聚胺的浓度从 0.6mM 增加至 0.8mM 导致同一模板-引物组合出现了 4 种额外的 PCR 产物。

[0041] 不受特定理论的限制,根据已有的数据可认为聚胺改进了损伤 DNA 的扩增。可能聚胺增强了聚合酶绕过 DNA 损伤位点(例如脱碱基位点)的能力。根据该思路,可以预期

PCR 过程中聚胺以同种方式允许 UNG 消化的污染物在降解之前扩增。这样就得出聚胺将抵抗基于 UNG 的预防遗留污染的方法,进而不能与该方法结合使用的结论。相反,已发现聚胺实际上通过增强在脱碱基位点 DNA 的降解改进了基于 UNG 的污染控制。根据本发明,包含促脱碱基 DNA 降解试剂(例如聚胺)的样品溶液优选在适于引起具有至少一个脱碱基位点的各自 DNA 降解的条件下孵育,更优选在 30°C 至 95°C 的温度范围内。

[0042] 应当理解,成功除去遗留污染物与所要消除的扩增子碱基组成有关。在 dUTP 存在下,待拷贝链的低脱氧腺苷成分导致了扩增产物中低脱氧尿苷成分。因此 UNG 处理后,此类扩增产物将具有最少的脱碱基位点,并经历最少的骨架断裂。还应当理解的是,如果尿苷不对称地分布于扩增子的两条链中,尿苷很少的链将在消除污染过程中幸存,并保证了整个污染扩增子的幸存。在以下的实施例,使用具有不同数目和比例胸苷的靶标。如表 1 所示,靶链的 dT(dU) 含量范围为 15% 至 35%。选择靶序列靶 2 用于下述的实施例。该靶序列在双链形式中具有最低绝对数量的胸苷(66),在单链形式(正向链)中具有最低绝对和相对的胸苷含量。

[0043] 表 1

[0044] 不同靶序列的 dT(dU) 含量

[0045]

靶	靶 1	靶 2	靶 3	靶 4	靶 5	内部对照
大小, bp	154	141	157	132	241	124
总 dTs	79 (25%)	66 (23%)	79 (25%)	72 (27%)	95 (20%)	61(25%)
正向链 dT <sub>s</sub>	32 (21%)	22 (15%)	47 (30%)	46 (35%)	51 (21%)	32(26%)
反向链 dT <sub>s</sub>	47 (31%)	44 (31%)	32 (20%)	26 (20%)	44 (18%)	29(23%)

[0046] 虽然用尿嘧啶替换所有的胸苷保证了 UNG 对于扩增子的最大活性,可能需要产生具有胸苷和尿嘧啶混合物的扩增子。这是因为许多本领域已知的 DNA 聚合酶对 dUTP 作为底物具有更低的偏好性。如下述实施例中所示,在 dUTP 单独存在下的扩增效率通常要比在 dUTP 和 dTTP 均存在下低。应当理解,效率的差异根据不同的靶序列和反应混合物中 dTTP 和 dUTP 的量而不同。因此对于某些靶序列,推荐向反应混合物中加入不同量的 dTTP。在某些实施方案中,扩增反应中 dTTP : dUTP 的摩尔比是 1 : 10。在某些实施方案中, dUTP 的浓度高于 dATP、dCTP 和 dGTP。在一个实施例中,扩增反应中核苷酸的浓度可为各 0.3mM 的 dATP、dCTP 和 dGTP,0.5mM dUTP 和 0.05mM dTTP。

[0047] 在其他实施例中,有助于脱碱基 DNA 降解的试剂为酶类,例如核酸内切酶 IV、核酸外切酶 III 或 AP 裂解酶。

[0048] 试剂盒

[0049] 本发明还提供了用于应用本发明方法的试剂盒。该试剂盒包括本文中所述一种或更多种试剂,具有 DNA 糖基化酶活性的试剂和能够降解脱碱基 DNA 的试剂。任选地,所述试剂盒可包括纸质或电子的使用说明。

[0050] 在某些实施例中,所述试剂盒可包括适于辅助脱碱基 DNA 非酶降解的聚胺。在其他实施例中,所述试剂盒可包括能降解脱碱基 DNA 的酶。试剂盒中的其他试剂可包括用于扩增核酸的试剂。这些试剂非限制性地包括一种或更多种寡核苷酸引物、核酸聚合酶、缓冲剂、盐类和三磷酸核苷以及具有 DNA 糖基化酶活性(例如尿嘧啶-N-糖基化酶活性)的酶。三磷酸核苷包括 dATP、dCTP、dGTP,以及 dUTP 和 dTTP 中的一种或更多种。可加入另一适当的非常规三磷酸核苷代替 dUTP。如果使用另一非常规三磷酸核苷,常规三磷酸核苷的组成将因此改变。试剂盒中的其他试剂可以是用于检测扩增的核酸的试剂。这些试剂非限制性地包括一种或更多种标记的探针,例如放射性或荧光标记探针、TaqMan™ 探针和其他实时 PCR 探针。

#### [0051] 反应混合物

[0052] 本发明还提供了反应混合物。典型的反应混合物包括用于扩增核酸的成分,以及一种或更多种利于产生和降解脱碱基 DNA 的试剂。在某些实施方案中,所述反应混合物将包含用于检测核酸的试剂。在某些实施方案中,所述反应混合物将包含用于预防另外的遗留污染的试剂。示范性的反应混合物包含一种或更多种寡核苷酸引物、核酸聚合酶、缓冲剂、盐类、三磷酸核苷和具有 DNA 糖基化酶活性(例如尿嘧啶-N-糖基化酶活性)的酶。在某些实施方案中,所述反应混合物还包括聚胺。在某些实施方案中,所述反应混合物还包括能切割脱碱基 DNA 的酶。在某些实施方案中,所述反应混合物还包含一种或更多种标记探针。

[0053] 应当注意,本发明的范围包括任何易受遗留污染影响的扩增方法。这些扩增方法非限制性地包括聚合酶链式反应(PCR)、实时 PCR、终点 PCR、不对称 PCR 和连接酶链式反应(LCR)。

#### [0054] 实施例

[0055] 以下实施例说明了本发明的方法

#### [0056] 实施例 1

[0057] 精胺对具有脱碱基位点的寡核苷酸降解的影响

[0058] 在溶液中孵育含脱氧尿嘧啶的 DNA 寡核苷酸 SEQ ID NO :1 :

[0059] 5' -TTTGCATGGCTGCUTGATGTCCCCCACT-3'

[0060] 所述溶液通过混合 10  $\mu$  L 整分部分的 100  $\mu$  M 溶液与 10  $\mu$  L 模拟 RT-PCR 主混合物溶液制备。该模拟主混合物溶液含有 50-mM 两性离子缓冲剂(tricine)(pH 8.3),90mM 乙酸钾,dATP、dCTP 和 dGTP 各 200  $\mu$  M,400  $\mu$  M dUTP,4mM 乙酸锰,5% DMSO 和 5% 甘油。此外,所述反应混合物含有 2.5  $\mu$  L 水或适当浓度的精胺溶液,以及 2  $\mu$  L 的 4 单位/ $\mu$  L 的 UNG。在 50°C 孵育 30 分钟,有或者没有另外的在 95°C 下 2 分钟的加热峰(heat spike)步骤。使用电喷雾电离源的 Agilent1100MSD 检测系统通过 HPLC-MS 分析反应。质谱(MS)数据(未显示)清楚地表明在所有的条件下尿嘧啶被完全去除(至检测方法的极限)。HPLC 结果如图 1A 和 1B 所示。图 1A 显示在 100  $\mu$  M、1mM 和 10mM 精胺存在下,在 50°C 的降解。在 100  $\mu$  M 时,仍可检测到全长的寡核苷酸。图 1B 显示了在 95°C 下暴露 2 分钟后,同样在 100  $\mu$  M、1mM



和 10mM 精胺存在下的降解。在 95°C,甚至在 100  $\mu$  M 也检测不到全长的寡核苷酸。结果表明,随着精胺量的增加,全长寡核苷酸更为有效地降解成片段。在较高温度下,所述效果在更低的精胺浓度下即可获得。然而,结果显示单独的较高温度对于引起脱碱基 DNA 降解是不够的。

[0061] 实施例 2

[0062] 在精胺的存在下扩增 DNA 和 RNA

[0063] 对于 DNA,进行聚合酶链式反应以扩增 241-bp 的 DNA 模板 (靶 5,用于双链 DNA 的 20% dT)。反应混合物含有 40 个单位的 Z05 DNA 聚合酶,50mM 两性离子缓冲剂 (pH 8.3),90mM 乙酸钾,dATP、dCTP 和 dGTP 各 200  $\mu$  M,400  $\mu$  M dUTP,上游和下游引物各 0.1  $\mu$  M,4mM 乙酸锰,5% DMSO 和 5% 甘油,2  $\mu$  M SYTO-16 嵌入染料以及任选的 100  $\mu$  M 精胺。扩增在 Roche LightCycler 480 仪中进行,采用以下温度分布:50°C 5 分 (UNG 步骤),两个循环的 94°C 15 秒 (变性) 和 59°C 40 秒 (退火和延伸),48 个循环的 91°C (变性) 和 59°C 40 秒 (退火和延伸)。在最后 48 个循环的退火 / 延伸步骤中采用分别用于激发和发射的 483nm/533nm 滤波器组合收集荧光数据。结果示于图 2A 和表 2A。实线簇表示不含精胺的扩增反应,一式三份。虚线簇表示在精胺存在下的扩增反应,一式三份。这些结果显示扩增未被精胺显著抑制。

[0064] 表 2A

[0065] 存在或不存在精胺下的 DNA PCR 扩增 (Ct 值)

[0066]

模板拷贝 #	无精胺	100 $\mu$ M 精胺	Ct 差值
10 <sup>6</sup>	18.8	19.0	+0.2
10 <sup>4</sup>	25.7	25.9	+0.2
10	36.6	36.1	-0.5

[0067] 对于 RNA,进行逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增 0-10<sup>6</sup> 个拷贝的靶 5 的 RNA 等价物。反应混合物和温度分布与 DNA 模板相同,除了加入逆转录酶以及在起始的 UNG 步骤后,反应物在 66°C 下孵育 30 分钟 (逆转录)。结果示于图 2B 和表 2B。像图 2A 一样,实线簇表示不含精胺的扩增反应,一式三份。虚线簇表示在精胺存在下的扩增反应,一式三份。这些结果显示 RT-PCR 未被精胺显著抑制。

[0068] 表 2B

[0069] 不存在或存在 100  $\mu$  M 精胺的情况下对 10、10<sup>4</sup> 或 10<sup>6</sup> 拷贝的 RNA 靶的扩增 (平均 Ct 值)。

[0070]

拷贝数	无精胺	有精胺	Ct 差值

10	34.4	34.0	-0.3
10 <sup>4</sup>	23.8	23.5	-0.3
10 <sup>6</sup>	16.8	16.6	-0.2

[0071] 实施例 3

[0072] 仅存在 dUTP 或存在 dUTP 和 dTTP 组合情况下扩增的效率。

[0073] 进行逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 以扩增 100,000 拷贝的 141-nt RNA 模板 (表 1 中的靶 2)。该靶的 dU 含量很低。相应的双链 DNA 具有 23% dT (表 1)。当扩增在 dTTP 和 dUTP 存在下进行, DNA 扩增子的 dU 含量会更低。反应混合物包括 0.5M 甜菜碱, pH 6.3; 68mM 乙酸钾, pH 7.0; 2.8% 甘油; 3mM 乙酸锰, pH 6.1; 0.07% 叠氮化钠; 5% DMSO; 50mM 两性离子缓冲剂, pH 8.3; dATP、dCTP 和 dGTP 各 0.3mM; 0.5mM dUTP; 以及明示时 0.05mM dTTP; 40 单位的 Z05DNA 聚合酶; 0.2 μM 适配体, 正向和反向引物各 0.2 μM 以及 0.1 μM 探针。温度分布为: 94°C 30 秒, 58°C 30 分 (逆转录), 5 个循环的 95°C 15 秒和 59°C 21 秒, 另外 52 个循环的 91°C 15 秒和 52°C 33 秒, 随后 72°C 5 分钟, 最后 40°C 2 分钟。结果示于图 3 和表 3。在该试验中, 在 dUTP 存在下的扩增大约与在 dUTP 和 dTTP 存在下的扩增效率相同。

[0074] 表 3

[0075] 单独存在 dUTP 或存在 dUTP 和 dTTP 混合物情况下对 100,000 拷贝的靶 2 的扩增 (Ct 值)。

[0076]

	dUTP	dUTP+ dTTP
平均 *Ct	26.2	25.9
标准偏差	0.05	0.2

[0077] \*5 个试验的平均值

[0078] 实施例 4

[0079] 增加 UNG 浓度对于 dT (dU) 很少的扩增子的影响

[0080] 在本例中, 如实施例 3 中所述的使用含 0.5mM dUTP 和 0.05mM dTTP 的核苷酸混合物产生的靶 2 扩增子作为扩增的靶 (23% 总 dU+T)。扩增子采用 QIAQUICK® PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 纯化, 并通过分光光度法定量。扩增采用掺入健康供体人血浆的 1000 或 10,000 拷贝的扩增子进行, 用 COBAS AmpliPrep 仪 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) 处理。反应在增加量的 UNG 存在或不存在情况下进行。RT-PCR 扩增采用实施例 3 中所述的引物和靶序列、试剂和温度分布进行, 除了加入标定量的 UNG。扩增和检测在 COBAS TaqMan® 仪中进行, 采用以下温度分布: 50°C 2 分钟 (UNG 步骤), 94°C 30 秒, 58°C 30 分钟 (RT 步骤), 5 个循环的 95°C 15 秒 (变性) 和 59°C 21 秒 (退火和延伸), 55 个循环的 91°C 15 秒 (变性) 和 52°C 33 秒 (退火和延伸)。结果示于图 4 和表 4。如图 4

和表 4 中的数据显示, dU 很少的扩增子在甚至 60 单位 /100  $\mu$  L 的 UNG (6 倍推荐量) 处理中幸存下来。

[0081] 表 4

[0082] 用增加量的 UNG 预处理后 10,000 拷贝的 dT (dU) 很少的扩增子的扩增。

[0083]

无 UNG	10u UNG	20u UNG	30u UNG	40u UNG	50u UNG	60u UNG
23.2*	35.6	37.3	36.6	41.9	40.0	41.6

[0084] \* 每个值均为 2 次单独试验的平均值

[0085] 实施例 5

[0086] 用 UNG 预处理后含有 dU 和 dT 的序列的扩增

[0087] 在本例中, UNG 预处理和实时 RT-PCR 扩增按照实施例 4 中所述进行。结果示于图 5 和表 5。这些结果表明同时具有 dT 和 dU 的扩增子更为持久, 即, 比仅含 dU 的扩增子更难以消除。

[0088] 表 5

[0089] 用或不用 UNG 预处理的含 dU 和 dT+dU 序列的扩增

[0090]

加入的扩增 子拷贝数	仅含 dU 的扩增子		含 dT 和 dU 的扩增子	
	+ UNG	无 UNG	+ UNG	无 UNG
100,000	31.8*	20.3	28.0	19.9
10,000	34.5	23.9	31.5	23.4
1,000	37.2**	27.3	43.7	27.0
100	ND***	31.1	39.7**	29.7
10	ND	ND	49.7**	35.9

[0091] \* 每个值均为 2 次单独试验的平均值

[0092] \*\* 表示单独的值, 两次试验中的另一个具有 ND 结果

[0093] \*\*\*ND- 未检测到

[0094] 实施例 6

[0095] 用 UNG 预处理后并在精胺存在下的扩增

[0096] 在本例中, 如实施例 4 中所述在用 UNG 预处理后扩增含有 dT 和 dU 的靶, 除了扩增反应混合物还含有 100  $\mu$  M 精胺。结果示于图 6 和表 6。与表 5 相比, 数据显示在控制污染方面 1000 倍或更多的改善。

[0097] 表 6

[0098] 用 UNG 预处理后并在 100  $\mu$  M 精胺存在下扩增含 dT+dU 的序列

[0099]

加入的扩增子拷贝数	无 UNG	20u UNG
1,000,000	16.1*	38.7
100,000	19.7	41.4**
10,000	23.3	ND***
1,000	26.7	ND
100	30	ND

[0100] \* 每个值均为 2 次单独试验的平均值

[0101] \*\* 表示单独的值,两次试验中的另一个具有 ND 结果

[0102] \*\*\*ND- 未检测到

[0103] 实施例 7

[0104] 不同温度下用 UNG 预处理后在精胺存在下的扩增

[0105] 在本例中,对含有 dT 和 dU 的靶的扩增按照实施例 6 中所述进行,除了 UNG 预处理在 45°C 或 50°C 下进行。对照反应物不含 UNG 和精胺。试验反应物含有 UNG 和精胺。结果显示于图 7 和表 7。在该试验中,所述方法在 50°C 下比 45°C 下更佳。

[0106] 表 7

[0107] 在 50°C 和 45°C 下用 UNG 预处理后扩增含 dT 和 dU 的序列

[0108]

加入的扩增子拷贝数	50°C		45°C	
	无 UNG 无精胺	20 u UNG 100 μM 精胺	无 UNG 无精胺	20 u UNG 100 μM 精胺
1,000,000	16.4*	38.0	16.2	39.7
100,000	20.0	ND***	19.8	46.5
10,000	23.4	ND	23.3	ND
1,000	27.1	ND	27.1	ND

[0109] \* 每个值均为 2 次单独试验的平均值

[0110] \*\*\*ND- 未检测到

[0111] 根据特定的实施例,本发明已被详细的描述,在本发明的范围内可进行多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的。因此本发明的范围不应当受此处描述的任何实施例的限制,而由下列权利要求确定。

[0112] 序列表

[0113] SEQ ID NO 1:

- [0114] 人工序列
- [0115] 5' -TTGCATGGCTGCUTGATGTCCCCCACT-3'
- [0116] 序列表
- [0117] <110>F. Hoffmann-La Roche AG
- [0118] <120> 用于预防核酸扩增技术中遗留污染的改良方法
- [0119] <130>24623-KOE
- [0120] <160>1
- [0121] <170>PatentIn version 3.5
- [0122] <210>1
- [0123] <211>29
- [0124] <212>DNA
- [0125] <213> 人工序列
- [0126] <220>
- [0127] <223> 含脱氧尿嘧啶的 DNA 寡核苷酸
- [0128] <400>1
- [0129] tttgcatggc tgcutgatgt cccccact 29

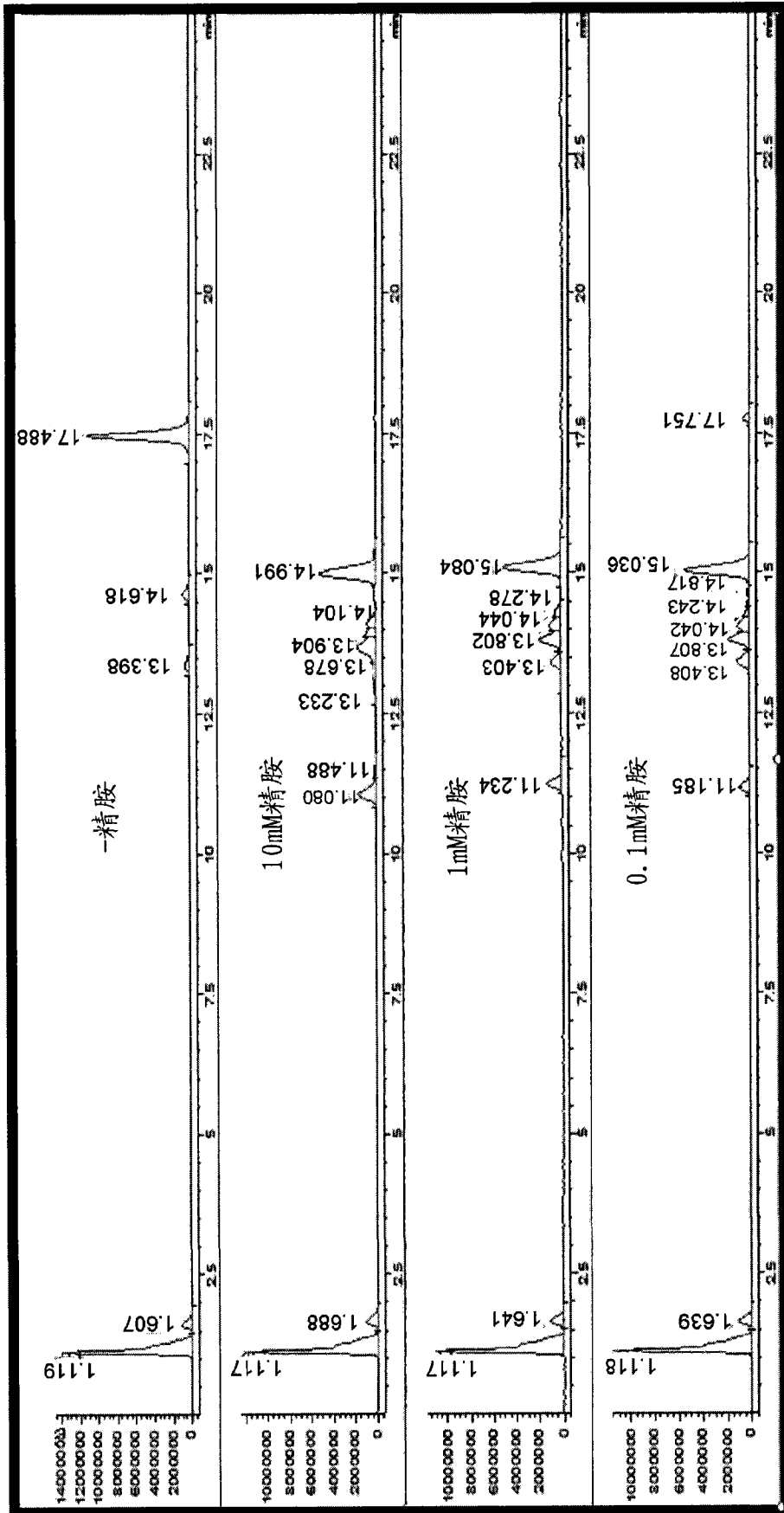


图 1A

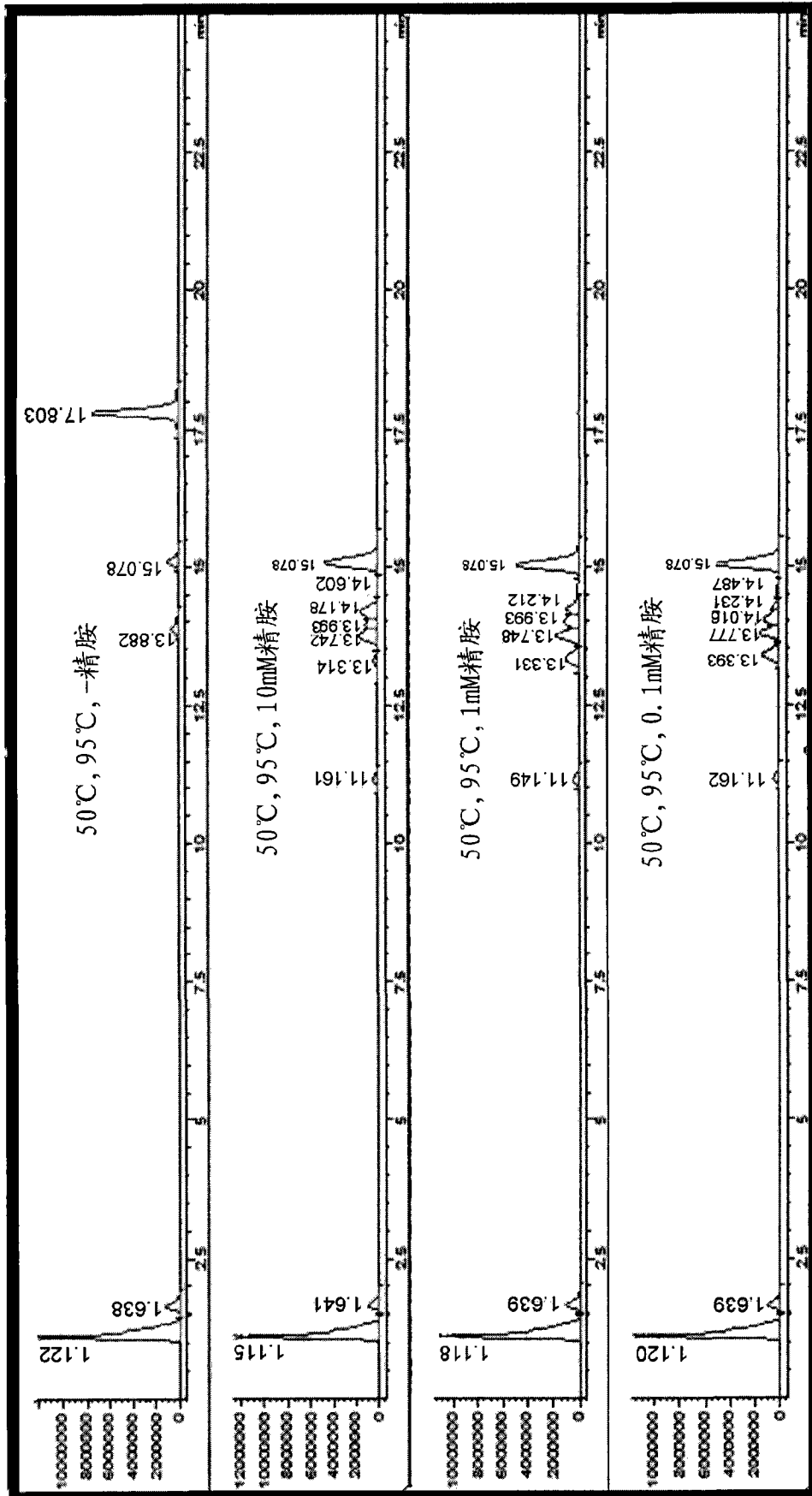


图 1B

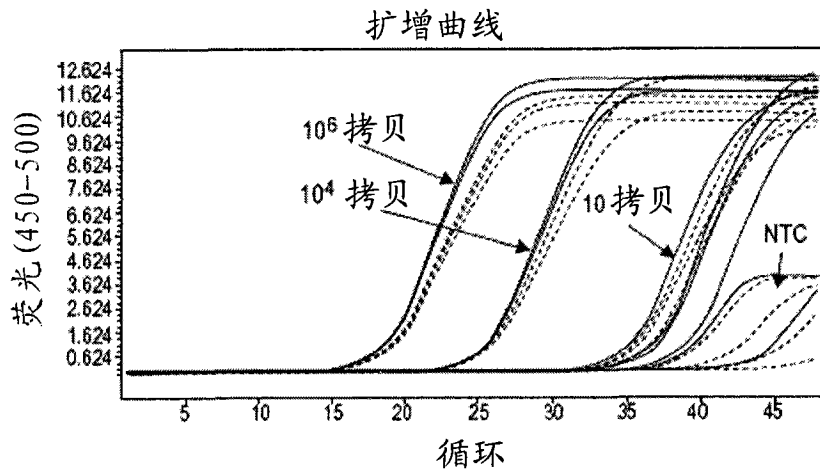


图 2A

NTC: 无模板对照

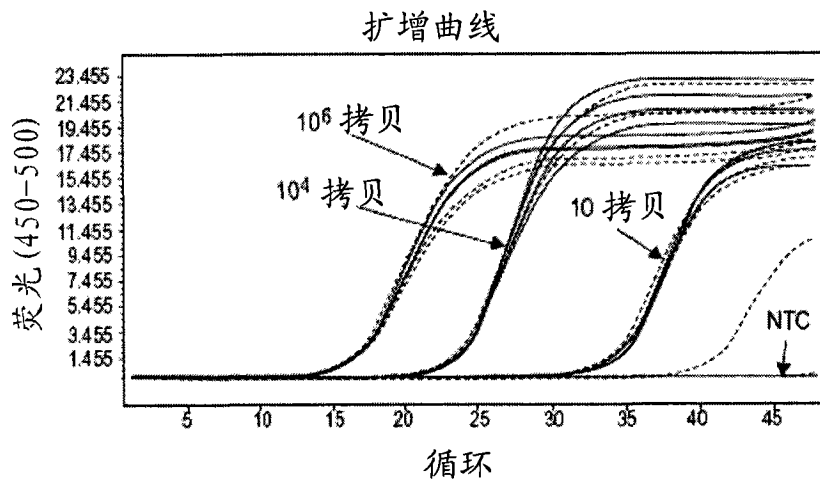


图 2B



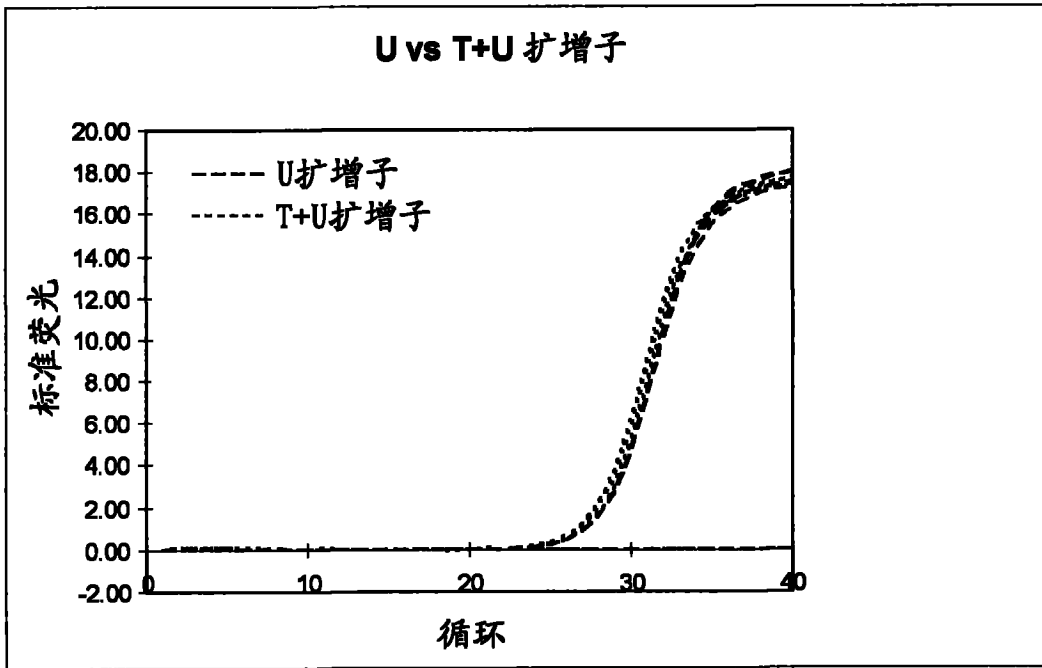


图 3

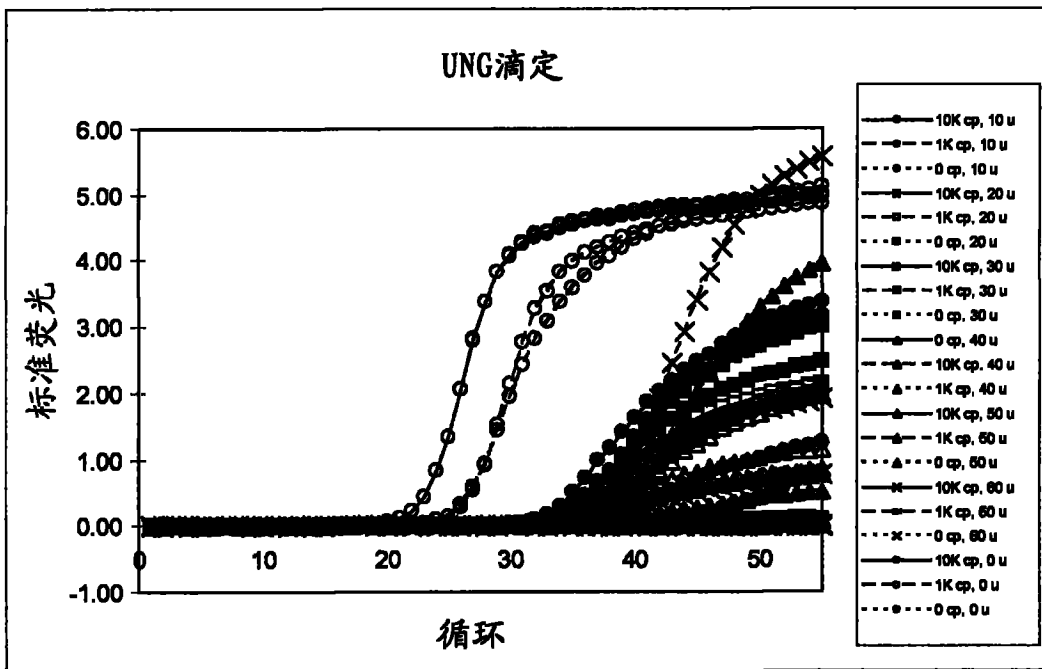


图 4

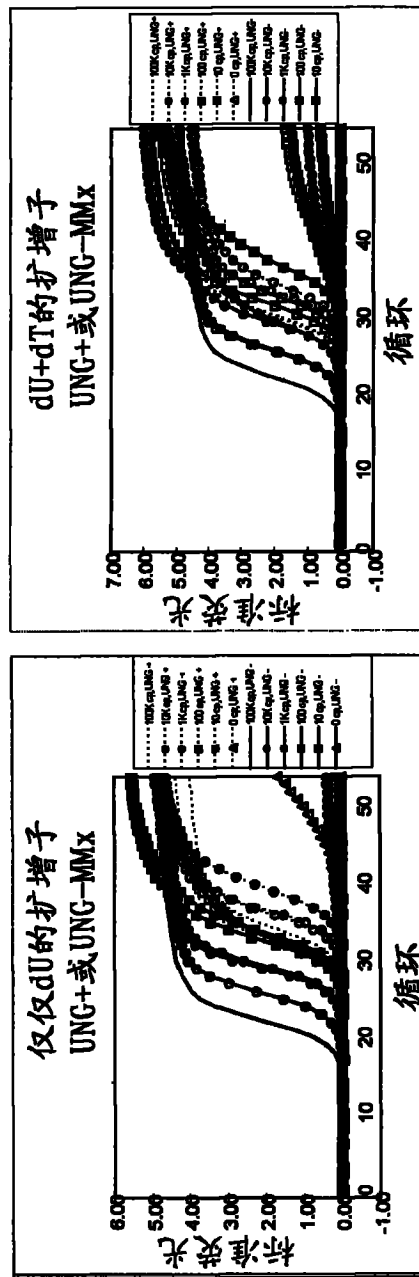


图 5

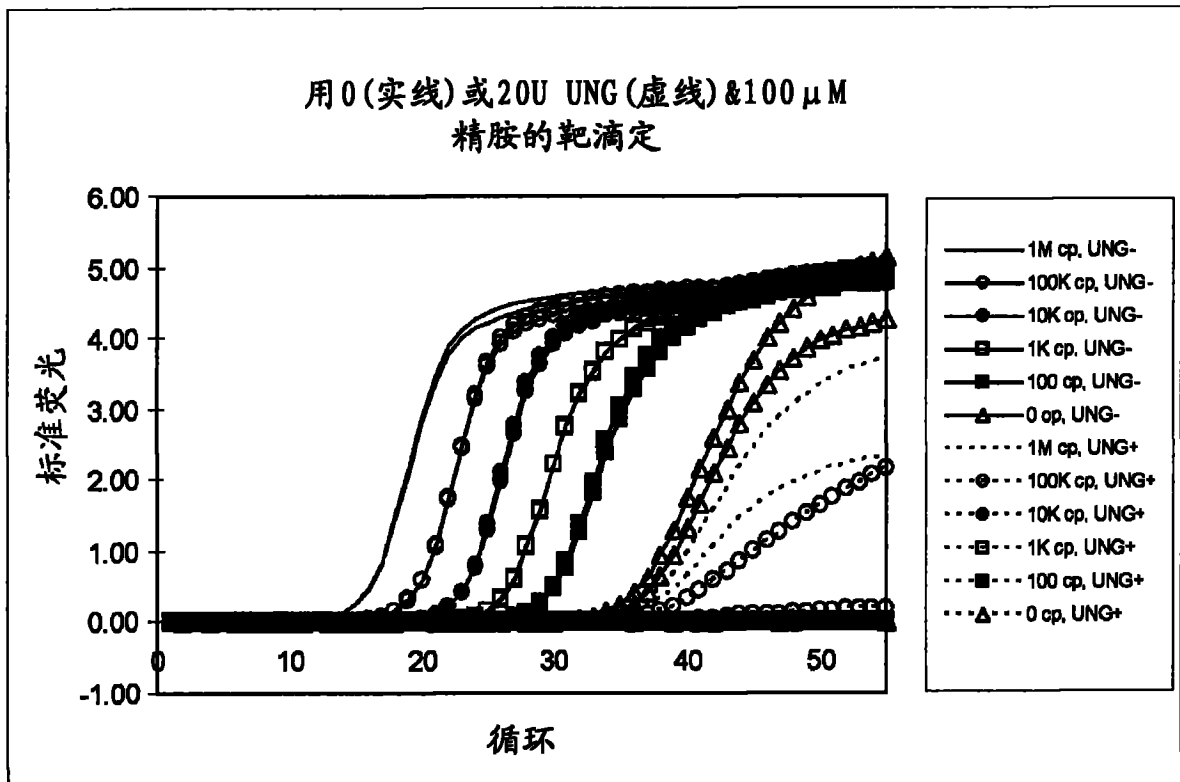


图 6

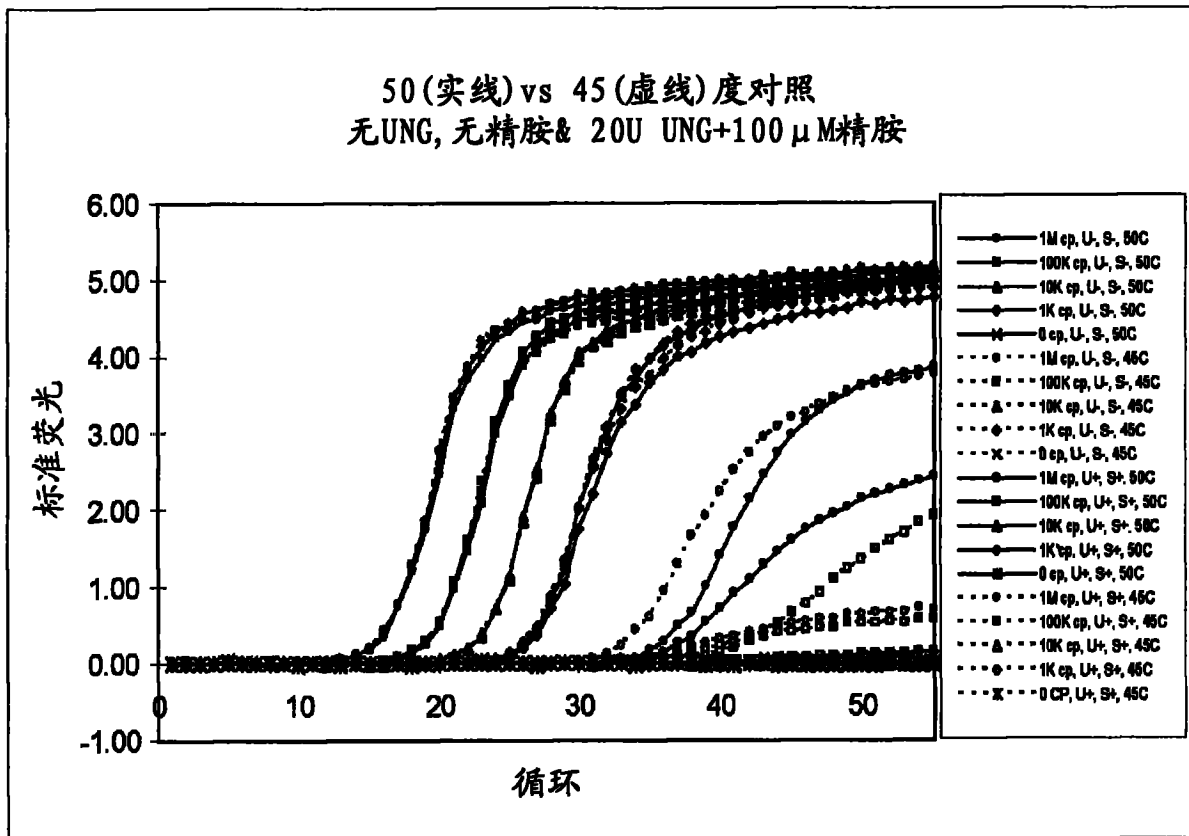


图 7