

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年12月30日 (30.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/259201 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 21/00 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/101244

(22) 国际申请日: 2021年6月21日 (21.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010576818.3 2020年6月22日 (22.06.2020) CN

(71) 申请人: 苏州新海生物科技股份有限公司(NUHIGH BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 何文龙(HE, Wenlong); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。 毕万里(BI, Wanli); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。 伏东科(FU, Dongke); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。 潘婕(PAN, Jie); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu

215123 (CN)。 邢亚东(XING, Yadong); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。 王志清(WANG, Zhiqing); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。 秦萍萍(QIN, Pingping); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米科技园C8楼301单元, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) Title: NUCLEIC ACID LIGAND AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种核酸配体及其应用

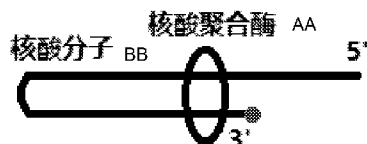


图 1

AA Nucleic acid polymerase
BB Nucleic acid molecule

(57) Abstract: Provided are a nucleic acid ligand (nucleic acid polymerase substrate analog), a mixture thereof, and the use thereof. The mixture of the nucleic acid polymerase substrate analog contains two or more nucleic acid polymerase substrate analogs. The nucleic acid polymerase substrate analog is a single nucleic acid molecule or nucleic acid molecule analog which forms complementary pairing within a molecule, or a single or two nucleic acid molecules or nucleic acid molecule analogs which form complementary pairing between molecules; and a structure formed thereby has the characteristics of a nucleic acid polymerase substrate. When an amplification reaction mixture is at or below a certain temperature, the enzyme activity of a nucleic acid polymerase is inhibited by means of the nucleic acid ligand and there is no residual enzyme activity. When the reaction mixture is heated, the nucleic acid polymerase is separated from the nucleic acid polymerase substrate analog to exert activity and form a primer extension product, thereby achieving the effect of inhibiting non-specific amplification. The nucleic acid polymerase substrate analog is suitable for all polymerases and can be widely used in the field of nucleic acid amplification. The 3' end of the nucleic acid ligand has a modification which inhibits the extension thereof.

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供了一种核酸配体(核酸聚合酶底物类似物)、其混合物及其应用。该核酸聚合酶底物类似物的混合物包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物。该核酸聚合酶底物类似物是在分子内形成互补配对的单个核酸分子或核酸分子类似物, 或者是在分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物, 其所形成的结构具备核酸聚合酶底物的特征。当扩增反应混合物保持或低于一定的温度时, 核酸聚合酶的酶活被核酸配体抑制, 没有残余酶活; 而当加热反应混合物时, 核酸聚合酶从所述核酸聚合酶底物类似物上脱离下来, 发挥活性, 形成引物延伸产物, 从而达到抑制非特异性扩增的作用。该核酸聚合酶底物类似物适用于所有的聚合酶, 可以广泛应用于核酸扩增领域。该核酸配体的3'端具有抑制其延伸的修饰。

一种核酸配体及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，更具体的说是涉及一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）及其应用，及一种核酸聚合酶底物类似物的混合物及其应用。

背景技术

聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术，它是生物体外的特殊 DNA 复制，能将微量的 DNA 大幅增加。PCR 由变性-退火-延伸三个基本反应步骤构成：①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；②模板 DNA 与引物的退火（复性）：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃ 左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；③引物的延伸：DNA 模板-引物结合物在 72℃、DNA 聚合酶（如 Taq DNA 聚合酶）的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基互补配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链，重复循环变性-退火-延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增大几百万~几十亿倍。

虽然 PCR 技术已经在生物医药领域得到广泛应用，但由于 PCR 副反应导致的非特异性扩增常常带来较大问题。特别是在临床诊断领域，需要在大量背景 DNA 下扩增微量的目的 DNA，此时的非特异性扩增会导致假阳性。而非特异性扩增产生的很大原因，是由于酶在室温下延伸了非特异性退火的引物。因此，抑制聚合酶在室温条件下的活力，可以很大程度上减少非特异性扩增。

为了减少甚至避免操作过程中产生非特异性扩增，人们发明了热启动聚合酶链式反应，开发并使用了热启动聚合酶，热启动酶是能够通过热启动的方式避免低温下体系中发生错配，原理就是采用化学修饰或者抗体修饰的方法封闭酶的活性中心，化学修饰是利用一些分子基团和酶活性中心结合，温度到达一定温度时（一般是退火温度之前），小分子离开酶的活性中心，酶

活性中心暴露，此时发挥活性，指导体系扩增，但化学修饰热启动酶性能不稳定；而抗体修饰是以所修饰的聚合酶为抗原免疫实验动物产生相对应的抗体，经过一系列的筛选后，通过单克隆抗体技术大规模制备该抗体，并利用抗体的蛋白生物活性使其在 PCR 反应高温条件下失活、脱落，从而达到热启动的效果，但特定抗体的产生需要非常长的筛选周期，而且抗体修饰易带来外源 DNA 的污染。抗体与聚合酶的解离通常在高温，因此不适用于不耐高温的聚合酶如反转录酶。

美国专利（US6183967、US6020130）公开了与热稳定 Taq 酶，Tth 酶，和 TZ05 酶特异性结合的寡核苷酸适配体，这些适配体能在室温下封闭聚合酶的活性。筛选适配体的过程一般包括五个基本的步骤，即：结合、分离、洗脱、扩增和调节，再通过迭代循环得到目标适配体，整个筛选需要非常长的周期，过程相对较慢和复杂。并且由特定方法筛选的适配体对相应的配体（聚合酶）具有高度专一性，因此不同的聚合酶需要不同的适配体。

因此需要一种更简便的可逆抑制核酸聚合酶的方法，使抑制核酸聚合酶酶活的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）更具通用性，能适用于更多的核酸聚合酶。本发明采用的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）及其混合物更好地抑制了核酸聚合酶在一定温度下的酶活性。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）及其混合物，使其能够有效减少室温下核酸聚合酶导致的非特异性扩增产物，并且适用于所有类型的核酸聚合酶，通用性更强。

本发明所述核酸聚合酶底物类似物通过模拟与核酸聚合酶结合的底物，与核酸聚合酶结合，因此称为核酸聚合酶底物类似物。其能在温度控制下，使核酸聚合酶失去或恢复活性，所述核酸聚合酶底物类似物能适用于所有核酸聚合酶。

其中，所述核酸聚合酶底物类似物是分子内形成互补配对的单个核酸分子或核酸分子类似物，与核酸聚合酶作用的示意图见图 1；所述核酸聚合酶底

物类似物是分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物的示意图见图 2。

本发明的另外一个目的在于提供上述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）在核酸扩增及其混合物、在核酸扩增试剂盒制备中以及在制备核酸延伸反应混合物中的应用；

本发明的另外一个目的在于提供一种核酸扩增的方法，其使用上述核酸聚合酶底物类似物或其混合物扩增待测样品的靶核酸；

本发明的另外一个目的在于提供含有上述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）或其混合物的核酸扩增试剂盒和核酸延伸反应混合物；

为实现上述发明目的，本发明提供如下技术方案：

本发明所述核酸配体是在分子内形成互补配对的单个核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸配体 3' 端具有抑制其延伸的修饰，当保持或低于一定温度时与核酸聚合酶形成稳定结构，此时核酸聚合酶的酶活被抑制，当高于所述一定温度时，核酸聚合酶从所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）上脱离下来，发挥活性。

本发明所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）通过模拟与核酸聚合酶结合的底物，与核酸聚合酶结合，因此也可以称为核酸聚合酶底物类似物。其能在温度控制下，使核酸聚合酶失去或恢复活性，所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）能适用于所有核酸聚合酶。

其中，所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）是分子内形成互补配对的单个核酸分子或核酸分子类似物，与核酸聚合酶作用的示意图见图 1；所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）是分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物的示意图见图 2。

作为优选，所述一定温度是所述核酸聚合酶发挥活性的温度；在本发明具体实施方式中，所述一定温度应显著低于反应温度。比如：对用于 PCR 的热稳定 DNA 聚合酶该温度为 50℃。

作为优选，所述互补配对的个数为 8-35，或 10-30，或 10-20；在本发明具体实施方式中，分子内互补配对的个数为 8-20，分子间的互补配对的个数为 10-32。

作为优选，所述核酸分子或核酸分子类似物的 3' 端抑制其延伸的修饰包括双脱氧修饰、或磷酸化修饰、或氨基修饰等。

在另一方面，本发明提供了一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的混合物，其中：

a. 包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物；

b. 所述核酸聚合酶底物类似物是在分子内形成互补配对的单个寡聚核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个寡聚核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸聚合酶底物类似物所形成的结构具备核酸聚合酶底物的特征；

c. 所述核酸聚合酶底物类似物的 3' 端具有抑制其延伸的修饰；

d. 所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度；

e. 当保持或低于第一温度时，所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶混合时，二者形成核酸聚合酶-底物类似物复合体，此时核酸聚合酶活性相对于无核酸聚合酶底物类似物存在时显著降低；

f. 当高于所述第一温度时，“e”中的所述核酸聚合酶-底物类似物复合体解体，核酸聚合酶活性全部或部分被释放出来。

本发明还提供了一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的混合物与核酸聚合酶的混合物，其中：

a. 包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物；

b. 所述核酸聚合酶底物类似物是在分子内形成互补配对的单个寡聚核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个寡聚核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸聚合酶底物类似物所形成的结构具备核酸聚合酶底物的特征并能与核酸聚合酶结合；每种核酸聚合酶底物类似物的分子数目大于核酸聚合酶分子数目，即每种核酸聚合酶底物类似物的摩尔浓度高于核酸聚合酶的摩尔浓度；

c. 所述核酸聚合酶底物类似物的 3' 端具有抑制其延伸的修饰；

d. 所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度;

e. 当保持或低于第一温度时, 所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶混合时, 二者形成核酸聚合酶-底物类似物复合物, 此时核酸聚合酶活性相对于无核酸聚合酶底物类似物存在时显著降低;

f. 当高于所述第一温度时, “e” 中的所述核酸聚合酶-底物类似物复合物解体, 核酸聚合酶活性全部或部分被释放出来。

在本发明的优选的实施方案中, g. 当保持或低于第二温度时, 温度适应范围宽的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合物, 温度适应范围窄的核酸聚合酶底物类似物不能与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合物;

所述第一温度高于所述第二温度。

在本发明中, 两种及以上核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度, 当保持或低于第一温度时, 两种及以上核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成稳定结构, 此时核酸聚合酶的酶活被抑制; 当保持或低于第二温度 (低于第一温度) 时, 温度适应范围宽的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成稳定结构, 但温度适应范围窄的核酸聚合酶底物类似物已不能与核酸聚合酶形成稳定结构, 即该核酸聚合酶底物类似物已经失去抑制核酸聚合酶的能力, 此时核酸聚合酶的酶活仅被另一种更为稳定的核酸聚合酶底物类似物所抑制; 当高于所述第一温度时, 所述两种及以上核酸聚合酶从核酸聚合酶底物类似物上脱离下来, 发挥活性。

在本发明中, 温度适应范围宽度是指核酸聚合酶底物类似物能够与核酸聚合酶形成稳定结构的温度范围 (例如 2~70°C, 5~65°C 等); 温度适应范围宽的核酸聚合酶底物类似物是指在第一温度和第二温度下, 均能够与核酸聚合酶形成稳定结构的核酸聚合酶底物类似物; 温度适应范围窄的核酸聚合酶底物类似物是指在第一温度下, 能够与核酸聚合酶形成稳定结构, 但在第二温度下, 已不能与核酸聚合酶形成稳定结构的核酸聚合酶底物类似物。

本发明的核酸聚合酶底物类似物通过模拟与核酸聚合酶结合的底物 (例如 NTP (核苷三磷酸) 或 dNTP (脱氧核苷三磷酸)), 与核酸聚合酶结合。

其能在温度控制下，使核酸聚合酶失去或恢复活性，核酸聚合酶底物类似物能适用于所有核酸聚合酶。

在本发明的优选的实施方案中，所述第一温度和第二温度具有温度差，所述温度差大于或等于 5 摄氏度。

举例说明，本发明的核酸聚合酶底物类似物的混合物与核酸聚合酶的具体作用过程：

当核酸聚合酶底物类似物的混合物包含两种核酸聚合酶底物类似物，即分别为第一种核酸聚合酶底物类似物和第二种核酸聚合酶底物类似物，第一温度为 50℃，第二温度为 4℃。当保持或低于 50℃ 时，两种核酸聚合酶底物类似物均能够与核酸聚合酶形成稳定结构，此时核酸聚合酶的酶活被抑制；但当保持或低于 4℃ 时，更为稳定的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成稳定结构，但较为不稳定的核酸聚合酶底物类似物已不能与核酸聚合酶形成稳定结构，即该核酸聚合酶底物类似物已经失去抑制核酸聚合酶的能力，此时核酸聚合酶的酶活仅被另一种更为稳定的核酸聚合酶底物类似物所抑制；当高于 50℃ 时，所述两种及以上核酸聚合酶从核酸聚合酶底物类似物上脱离下来，发挥活性。

发明人研究发现，核酸聚合酶底物类似物的温度适应范围宽度与其分子内或分子间互补配对的碱基数量有关，即在本发明的核酸聚合酶底物类似物的混合物中，两种及以上核酸聚合酶底物类似物的分子内或分子间互补配对的碱基数量不相同，当保持或低于第二温度时，互补配对碱基数量少的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成稳定结构，但互补配对碱基数量多的核酸聚合酶底物类似物已不能与核酸聚合酶形成稳定结构，即该核酸聚合酶底物类似物已经失去抑制核酸聚合酶的能力，此时核酸聚合酶的酶活仅被互补配对碱基数量少的核酸聚合酶底物类似物所抑制。但在保持或低于第一温度但高于第二温度时，两种及以上核酸聚合酶底物类似物就能够与核酸聚合酶形成稳定结构，抑制核酸聚合酶的活性。

本发明人研究了分子内或分子间互补配对的碱基数量对酶活的抑制作用。研究发现，随着配对的碱基数量增加，对酶活的抑制会逐渐增加随之降低。因此，在本发明的优选的实施方案中，互补配对碱基的个数为 8~35；

优选地，所述互补配对碱基的个数为 10~30；

更优选地，所述互补配对碱基的个数为 10~20；

进一步优选地，分子内互补配对碱基的个数为 8~20，分子间互补配对碱基的个数为 10~32。

由于核酸聚合酶底物类似物的温度适应范围宽度与其分子内或分子间互补配对的碱基数量有关，与其自身的核酸序列关联不大，而本发明正是利用不同温度下，核酸聚合酶底物类似物的温度适应范围宽度不同来实现对一定温度下（特别是低温时）的酶活性，从而实现对非特异性扩增的抑制。因此，基于本发明的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶的作用机理，本发明对核酸聚合酶底物类似物的核酸序列不作具体的限定。只要核酸聚合酶底物类似物的互补配对碱基的数量满足本发明的条件，且两种及以上核酸聚合酶底物类似物的分子内或分子间互补配对的碱基数量不相同即可。本发明在实施例中也验证了，在一种核酸聚合酶底物类似物中加入一种、两种、三种或四种核酸聚合酶底物类似物均能在一定温度下（特别是低温时）有效地抑制非特异性扩增，即验证了本发明非特异性扩增的抑制与核酸聚合酶底物类似物本身的序列关联不大，主要在于其分子内或分子间互补配对的碱基数量。

在本发明的优选的实施方案中，所述核酸聚合酶底物类似物的 3'端为非-OH 基团；原则是 3'端任何-OH 基团但能形成与核酸聚合酶的复合体；核酸聚合酶底物类似物的 3'端抑制其延伸的修饰包括但不限于双脱氧修饰、磷酸化修饰或氨基修饰等。

本发明人采用双脱氧方法进行 3'端修饰以终止末端延伸，同时把 3'端不修饰的核酸分子作为对照，测试 3'端不修饰的核酸分子是否也能抑制酶活。试验结果表明，加入对照核酸配体的酶活保持完全活力，增加很快；而加入经修饰的核酸配体的体系，酶活被大部分抑制，达到预期的结果，可以封闭体系。此试验说明核酸配体的 3'端修饰对于抑制核酸酶的酶活非常重要。

本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）及其混合物适用于所有的聚合酶，包括 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶。所述 DNA 聚合酶为热稳定 DNA 聚合酶如来自 Family A，如 *Thermus aquaticus*、*Thermus thermophilus*、*Thermus filiformis*、*Thermus flavu*、*Bacillus stearothermophilus* 等，以及来自 Family B，如 *Pyrococcus furiosus*、*Thermococcus Kodakaraensis* 等，所述 RNA 聚合酶来自 AMV、MMLV 等家族的逆转录酶。本发明的实施例也验证了核酸聚合酶

底物类似物的混合物能够在一定下温度下抑制反转录酶或 DNA 聚合酶的活性，在高于一定温度时，核酸聚合酶的活性被部分或全部释放出来。这表明本发明的核酸聚合酶底物类似物的混合物能够在一定温度下抑制所有类型的核酸聚合酶的酶活性，适用于所有类型的核酸聚合酶，通用性强。

采用本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）对目标基因进行扩增，与未加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的对照相比，能够显著抑制非特异性扩增，因此本发明还提供了所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）在核酸扩增、在制备核酸扩增试剂盒或在制备核酸延伸反应混合物中的应用。

本发明的核酸聚合酶底物类似物混合物包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物，并且至少两种核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度，与加入一种核酸聚合酶底物类似物的对照相比，能更好地抑制一定温度下核酸聚合酶的酶活，从而更好地抑制非特异性扩增。因此本发明还提供了所述核酸聚合酶底物类似物的混合物在核酸扩增、在制备核酸扩增试剂盒或在制备核酸延伸反应混合物中的应用。

根据上述应用，本发明提供了一种核酸扩增的方法，包括：

步骤1、将含有靶核酸的待测样品与以下扩增反应试剂接触，形成反应混合物；

- a) 可与靶核酸杂交的引物；
- b) 核酸聚合酶；
- c) 本发明所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）；
- d) 核苷三磷酸；

步骤2、加热所述反应混合物使所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的配对核苷酸解离成单链，核酸聚合酶从所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物。

作为优选，所述核苷三磷酸包括 dUTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP。

作为优选，所述扩增待测样品中靶核酸的方法，进一步包括检测引物延伸产物。

根据上述应用，本发明提供了一种核酸扩增的方法，其包括：

步骤 1、将含有靶核酸的待测样品与以下扩增反应试剂接触，形成反应混合物；

a) 可与靶核酸杂交的引物；

b) 核酸聚合酶；

c) 核酸聚合酶底物类似物的混合物；

d) 核苷三磷酸、脱氧核苷三磷酸或二者的混合物，或核苷/脱氧核苷三磷酸类似物；

步骤 2、加热所述反应混合物使所述核酸聚合酶底物类似物的配对核苷酸解离成单链，核酸聚合酶从所述核酸聚合酶底物类似物上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物。

在本发明的优选的实施方案中，所述核苷三磷酸包括 dUTP、dATP、dCTP、dGTP 或 dTTP。

在本发明的优选的实施方案中，所述核酸扩增的方法，进一步包括检测引物延伸产物的步骤。

此外，本发明还提供了一种核酸扩增试剂盒，包括本发明所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）。同时也提供了一种核酸延伸反应混合物，包含本发明所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）、核酸聚合酶、至少一种引物、核酸模板和三磷酸核苷。

此外，本发明还提供了一种核酸扩增试剂盒，其包括上述核酸聚合酶底物类似物混合物或上述核酸聚合酶底物类似物的混合物与核酸聚合酶的混合物。

同时，本发明还提供了一种核酸延伸反应混合物，其包含上述核酸聚合酶底物类似物混合物或含有上述核酸聚合酶底物类似物的混合物与核酸聚合酶的混合物、任选地核酸聚合酶、至少一种引物、核酸模板；以及核苷三磷酸、脱氧核苷三磷酸或二者的混合物，或核苷/脱氧核苷三磷酸类似物。

由以上技术方案可知，本发明提供了一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），当扩增反应混合物保持或低于一定的温度时，核酸聚合酶的酶活被核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）抑制，没有残余酶活。而当加热反应混合物时，核酸聚合酶从所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物，从而达到抑制非特异性扩增的作用。本发明

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）适用于所有的聚合酶，可以广泛应用于核酸扩增领域，从而减少非特异性扩增。

本发明提供了一种核酸聚合酶底物类似物的混合物，当扩增反应混合物保持或低于一定的温度时，核酸聚合酶的酶活被核酸聚合酶底物类似物混合物抑制，没有残余酶活。而当加热反应混合物时，核酸聚合酶从所述核酸聚合酶底物类似物混合物上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物，从而达到抑制非特异性扩增的作用。本发明核酸聚合酶底物类似物的混合物适用于所有的聚合酶，可以广泛应用于核酸扩增领域，从而减少非特异性反应。

附图说明

图 1 所示为本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（分子内互补配对）与核酸聚合酶作用的示意图；

图 2 所示为本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（分子间互补配对）与核酸聚合酶作用的示意图；

图 3 所示为测试方法中对照酶酶活标准曲线图；

图 4 所示为 70℃ 等温延伸扩增结果；其中左图为加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为扩增曲线，下为反应温度），右图为不加入核酸配体（上为扩增曲线，下为反应温度）；

图 5 所示为 60℃ 等温延伸扩增结果；其中左图为加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为扩增曲线，下为反应温度），右图为不加入核酸配体（上为扩增曲线，下为反应温度）；

图 6 所示为 50℃ 等温延伸扩增结果；其中左图为加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为扩增曲线，下为反应温度），右图为不加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为扩增曲线，下为反应温度）；

图 7 所示为 40℃ 等温延伸扩增结果；其中左图为加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为扩增曲线，下为反应温度），右图为不加入核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（上为位扩增曲线，下为反应温度）；

图 8 所示为核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）3'端修饰与不修饰的扩增对比结果；

图 9 所示为本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（分子内不同碱基数量互补配对/不同温度稳定性）对酶活的抑制效果；

图 10 所示为本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（分子间互补配对）对 Taq 酶酶活的抑制效果；

图 11 所示为本发明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（分子间互补配对）对 KOD DNA 聚合酶酶活的抑制效果；

图 12 所示为模板量为 0.025ng、0.05ng 的人基因组 9948 的扩增结果；其中，从上至下依次为不加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.025ng 模板量扩增结果、加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.025ng 模板量扩增结果、不加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.05ng 模板量扩增结果、加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.05ng 模板量扩增结果；

图 13 所示为模板量为 0.1ng、0.2ng 的人基因组 9948 的扩增结果；其中，从上至下依次为不加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.1ng 模板量扩增结果、加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.1ng 模板量扩增结果、不加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.2ng 模板量扩增结果、加核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的 0.2ng 模板量扩增结果。

图 14 所示为核酸配体 3'端不同修饰的对比。

图 15 所示为核酸配体 3'端不同修饰的对比。

图 16 所示为反转录酶（Reverse transcriptase）在未添加核酸聚合酶底物类似物和添加两种核酸聚合酶底物类似物，在 37℃ 等温延伸时的酶活；上图为未添加核酸聚合酶底物类似物和添加两种核酸聚合酶底物类似物的酶活曲线，下图为反应温度曲线；

图 17 所示为反转录酶（Reverse transcriptase）在未添加核酸聚合酶底物类似物和添加两种核酸聚合酶底物类似物，在 55℃ 等温延伸时的酶活；上图为未添加核酸聚合酶底物类似物和添加两种核酸聚合酶底物类似物的酶活曲线，下图为反应温度曲线；

图 18 所示为 DNA 聚合酶（BST DNA Polymerase）在未添加核酸聚合酶底物类似物和添加一种核酸聚合酶底物类似物，在 45℃ 等温延伸时的酶活；上图为未添加核酸聚合酶底物类似物和添加一种核酸聚合酶底物类似物的酶活曲线，下图为反应温度曲线；

图 19 所示为 DNA 聚合酶 (BST DNA Polymerase) 在未添加核酸聚合酶底物类似物和添加一种核酸聚合酶底物类似物, 在 65°C 等温延伸时的酶活; 上图为未添加核酸聚合酶底物类似物和添加一种核酸聚合酶底物类似物的酶活曲线, 下图为反应温度曲线;

图 20 所示为 TAQ 酶在未添加核酸聚合酶底物类似物、分别添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2, 在 30°C 等温延伸时的酶活;

图 21 所示为 TAQ 酶在未添加核酸聚合酶底物类似物、分别添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2, 在 40°C 等温延伸时的酶活;

图 22 所示为 TAQ 酶在未添加核酸聚合酶底物类似物、分别添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2, 在 50°C 等温延伸时的酶活;

图 23 所示为 TAQ 酶在未添加核酸聚合酶底物类似物、分别添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2, 在 60°C 等温延伸时的酶活;

图 24 所示为 TAQ 酶在未添加核酸聚合酶底物类似物、分别添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2, 在 70°C 等温延伸时的酶活;

图 25 所示为模板量 0.03125ng 的人基因组 M2 扩增结果; 从上至下依次为核酸聚合酶底物类似物 1 修饰 TAQ 酶的 0.03125ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 2 修饰 TAQ 酶的 0.03125ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 等比混合修饰 TAQ 酶的 0.03125ng 扩增结果;

图 26 所示为模板量 0.0625ng 的人基因组 M2 扩增结果; 从上至下依次为核酸聚合酶底物类似物 1 修饰 TAQ 酶的 0.0625ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 2 修饰 TAQ 酶的 0.0625ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 等比混合修饰 TAQ 酶的 0.0625ng 扩增结果;

图 27 所示为模板量 0.125ng 的人基因组 M2 扩增结果; 从上至下依次为核酸聚合酶底物类似物 1 修饰 TAQ 酶的 0.125ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 2 修饰 TAQ 酶的 0.125ng 扩增结果、核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 等比混合修饰 TAQ 酶的 0.125ng 扩增结果;

图 28 所示为模板量为 0.03125ng 的人类基因组基因, 添加不同的核酸聚合酶底物类似物, 4°C 下放置 1 天的扩增结果; 从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果;

图 29 所示为模板量为 0.0625ng 的人类基因组基因，添加不同的核酸聚合酶底物类似物，4℃下放置 1 天的扩增结果；从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果；

图 30 所示为模板量为 0.125ng 的人类基因组基因，添加不同的核酸聚合酶底物类似物，4℃下放置 1 天的扩增结果；从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果；

图 31 所示为模板量为 0.03125ng 的人类基因组基因，添加不同的核酸聚合酶底物类似物，未放置，直接扩增的结果；从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果；

图 32 所示为模板量为 0.0625ng 的人类基因组基因，添加不同的核酸聚合酶底物类似物，未放置，直接扩增的结果；从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果；

图 33 所示为模板量为 0.125ng 的人类基因组基因，添加不同的核酸聚合酶底物类似物，未放置，直接扩增的结果；从上至下依次为添加核酸聚合酶底物类似物 1 的扩增结果、添加核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 混合物的扩增结果以及添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 混合物的扩增结果；

图 34 所示为不同模板量的人类基因组基因，未添加核酸聚合酶底物类似物，4℃下放置 1 天的扩增结果；从上至下依次为模板量 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 的人类基因组基因的扩增结果；

图 35 所示为不同模板量的人类基因组基因，添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 和 4 的混合物，4℃下放置 1 天的扩增结果；从上至下依次为模板量 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 的人类基因组基因的扩增结果；

图 36 所示为不同模板量的人类基因组基因，添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3、4 和 5 的混合物，4℃下放置 1 天的扩增结果；从上至下依次为模板量 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 的人类基因组基因的扩增结果。

具体实施方式

本发明公开了一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）或其混合物及其应用，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）或其混合物及其应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）及其应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

在本发明具体实施方式中，所提供的对比试验各处理组所采用的原料均相同，且各组除去应有的区别外其他试验条件保持一致。本发明所涉及原料、试剂等，如无特殊说明均可通过市售途径获得。

除非特别定义，本专利所有的科学或技术专业词汇均与本领域大部分一般人员的普通理解一致。以下的文献中本领域中大部分专业名词的一般定义，本专利中所使用的专业名词与上述文献中对该专业名词描述一致。

名词“核苷酸”一般指的是一个核苷通过酯键与一个酸性分子或基团相连而形成的化合物，例如，核苷的磷酸酯，通常有一个、两个或三个磷酸基团共价连接在核苷的糖基团的 5 号位上。在一些情况下，核苷酸的定义还包括一些典型核苷酸的同系物或类似物。DNA 聚合酶通常利用三磷酸 2' 脱氧核苷酸合成 DNA。

名词“核酸”包括脱氧核糖核酸(DNA)，核糖核酸(RNA)，DNA-RNA 杂交体，寡聚核苷酸，适配体 (aptamers)，肽核酸 (PNAs)，PNA-DNA 杂交体，PNA-RNA 杂交体等等。包括一切线性形式（单链或双链）或分支状形式的共价相连的核苷酸。一个典型的核酸通常是单链或者双链的，并包含磷酸二酯键。

名词“扩增”指的是目的核酸片段在核酸聚合酶的作用下数目变多的过程，包括但不限于聚合酶链式反应 (PCR)，连接酶链式反应 (LCR)，核酸序列基础扩增 (NASBA) 等。

在本发明实施例中，扩增指的是聚合酶链式反应 (PCR)。模板变性解链，寡聚核苷酸引物与模板退火杂交，伴随着核苷酸加入的延伸，如此反复

循环一定轮数，实现目的核苷酸片段的增多。

名词“嗜热酶”指的是对于加热是稳定的促进核苷酸的聚合以形成多核苷酸延伸产物。通常，在热循环过程中嗜热稳定的聚合酶是常用的，在 PCR 循环过程中通过高温(如 95°C)使双链核苷酸变性。本文描述的有效用于 PCR 扩增反应的嗜热酶满足至少一个标准，当经受升高的温度为实现双链核苷酸变性所必需的时间时，该酶没有被变性。在一些实验体系中，90°C ---100°C 嗜热酶将不会变性。

如本文所用，“核酸配体”（核酸聚合酶底物类似物）是对核酸聚合酶具有期望作用的非天然存在的核酸。

“核酸聚合酶底物类似物”是对核酸聚合酶具有非共价结合作用的非天然存在的，且由寡聚核酸组成。在优选的实施方案中，该核酸聚合酶底物类似物对核酸聚合酶分子具有结合亲和力，其中核酸聚合酶底物类似物不是具有已知与靶分子结合的生理功能的核酸。

本文中用的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），通过模拟核酸聚合酶的底物与核酸聚合酶结合，是能在分子内或分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物，这些核酸分子或核酸分子类似物的 3' 端进行修饰，起到终止聚合酶延伸的作用，其结构在保持或低于一定温度时稳定，当在加热状态下，配对的核苷酸解离成单链，核酸聚合酶从核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）中脱离下来，让核酸聚合酶发挥其应有的作用。

“核酸”是指 DNA，RNA，单链或双链及其任何化学修饰。修饰包括但不限于那些提供其他化学基团的修饰，这些化学基团将附加电荷，极化性，氢键，静电相互作用和对核酸配体碱基或整个核酸配体的通量掺入。此类修饰包括但不限于 2'-位糖修饰，5-位嘧啶修饰，8-位嘌呤修饰，环外胺上的修饰，4-硫尿苷的取代，5-溴或 5-碘-的取代。尿嘧啶，主链修饰，甲基化，不同寻常的碱基配对组合，例如异碱基异胞苷和异脲等。修饰还可以包括 3'和 5'修饰，例如封端。

“等温延伸测酶活”方法涉及选择核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的性能评估，所述核酸配体以理想的方式与聚合酶相互作用。在本发明中，采用等温延伸测酶活方法来验证核酸聚合酶的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）。

如本文所用，“对于核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）”是通过等温延伸方法鉴定的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），其基于温度稳定参数调节对其 taq 酶的亲和力大小。在优选的实施方案中，主要考参数是温度，并且核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）在升高的温度下对其 taq 酶的亲和力降低。

如本文所用，“核酸聚合酶”是指通过使用 DNA 或 RNA（逆转录酶）作为模板通过将脱氧核糖核苷酸单元添加至 DNA 链来催化 DNA 合成的任何酶。

“开关”是指根据某些特定的反应条件起开启或关闭反应作用的任何化合物。在本发明中，核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的功能是根据以下情况将 PCR “打开”或“关闭”。

本发明的核酸聚合酶底物类似物的 3'端具有抑制其延伸的修饰，包括但不限于双脱氧修饰、磷酸化修饰或氨基修饰等。双脱氧修饰、磷酸化修饰或氨基修饰均可采用本领域已知的方法进行修饰。例如，双脱氧修饰可利用末端转移酶(TdT)催化脱氧核苷酸(dNTPs)或双脱氧核苷酸(ddNTPs)结合到 DNA 分子的 3'羟基端的特性，将引物与四种双脱氧核苷酸(ddATP, ddTTP, ddCTP 或 ddGTP)中的任何一种混合，TdT 可以将双脱氧核苷酸添加到引物的 3'端，所获得的这种被 ddNTP 修饰的引物不能被 DNA 聚合酶催化延伸。Invitrogen 提供 3'氨基修饰(AminolinkerC6/7/12)。使用磷酸盐-ON（也称为化学磷酸化试剂（CPR））常规地实现 3'末端的磷酸化，例如通过添加到任何支持物（例如 dT 柱）中掺入 3'磷酸。3'-磷酸化用于阻断酶活性。

在本发明具体实施方式中，本发明提供了多种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），其中分子内互补配对的核酸配体序列如 SEQ ID NO:1-11 所示，分子间互补配对的核酸配体其中一条链的序列如 SEQ ID NO:12 所示，另外一条链的序列如 SEQ ID NO:13-20 所示。本发明在具体实施方式中主要用了 Taq 聚合酶和 KOD 聚合酶进行说明，但是实际上本发明所述的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）可以适用于所有的核酸聚合酶，及核酸扩增反应。

在本发明其他具体实施方式中，本发明提供了多种核酸聚合酶底物类似物，如 SEQ ID NO: 21-28 所示。本发明在具体实施方式中主要用了反转录酶、

BST DNA 聚合酶和 TAQ 酶进行说明，但是实际上本发明所述的核酸聚合酶底物类似物可以适用于所有的核酸聚合酶，及核酸扩增反应。

下面结合具体的实施例对本发明提供的技术方案做进一步的描述。下述实施例仅用于对本发明进行说明，并不会对本发明的保护范围进行限制。

实施例 1: 核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）抑制聚合酶酶活的测定方法

利用单链延伸方法检测，使用购买的 NEB M13 单链 DNA 及相关引物进行测活，荧光定量方法实时检测，本发明使用的仪器为罗氏 LC480II。

引物 M13R 序列和扩增体系如下：

M13R 引物 1
ACGCTCGTCATCAA AATCACTCGCATCAACCAAACCGTTAT

表 1

组分	浓度	每份加入体积 ul
10x Buffer A	10 x	2.5
MgCl ₂	250mM	0.5
SG	100 x	0.4
M13ssDNA	0.73mg/ml	0.45
dNTP	100mM	0.2
M13R	100uM	0.1
taq 酶	/	1
ddH ₂ O	/	19.85

其中 10X bufferA 为 30mM, Tris 8.0; 50mM KCl; TWEEN20 0.05%; 10mM 巯基乙醇配制成的 Buffer。此反应体系在原酶酶量 0.04-0.008U 区间有重复性很高的准确度。

等温延伸反应的反应程序为：(72℃, 30s)*22 循环，反应体系设为 25ul。

聚合酶从 0.04U-0.008U 稀释如下表：

表 2

名称	酶量 U	母液体积 ul	1xbufferA 体积 ul
对照酶	0.04	4	96
	0.024	12	8
	0.02	10	10
	0.016	8	12
	0.012	6	14
	0.008	4	16

	0.004	2	18
--	-------	---	----

如图 3 结果所示, $R^2 > 0.99$, 符合线性理论, 此反应可以足够灵敏的测出在不同温度范围内对 DNA 聚合酶的封闭作用。

实施例 2: 聚合酶的封闭实验 (选择最优的等温延伸条件筛选核酸配体)

按照实施例 1 的方法进行 70°C、60°C、50°C、40°C 延伸来筛选哪些核酸配体达到预期的效果, 例如以下核酸配体:

核酸配体 (核酸聚合酶底物类似物) 1:

TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC (SEQ ID NO:1 所示), 3' 端双脱氧修饰。

先把 6U DNA 酶与上面核酸配体 1 混合, 再按照 100 uM 0.05ul 体系约加入 6U DNA 酶混合, -20 度过夜测试。同时将不加核酸配体的作为对照体系。按照实施例 1 的测活方法, 分别测试两组体系的酶活情况。

由图 4 -7 可以看出, 不加入核酸配体的体系, 聚合酶在 40°C, 50°C 的信号有明显提升, 而在加入核酸配体的体系中, 聚合酶部分活性受到抑制, 特别在 50°C 以下时完全没有活力。并且在 PCR 实验中一般 6U 的原酶加入量是偏大的, 实际 PCR 实验的加入量都会远小于 6U。此体系在温度 50°C 以下时, 可以完全封闭聚合酶活性, 使其没有残余酶活, 从而达到抑制非特异性扩增的作用。

所以最终确认以下实施例在 50°C 条件下进行实验测试, 来筛选测试核酸配体。

实施例 3: 聚合酶的封闭实验

核酸分子或核酸分子类似物的 3'端修饰可以采用常用的阻止扩增形式(双脱氧修饰、磷酸化修饰、氨基修饰等), 本实施例选择双脱氧方法进行终止终端延伸。同时把 3'端不修饰的核酸分子作为对照, 测试不修饰核酸分子是否也能抑制酶活。实验方法参考实施例 1, 两种核酸配体 (核酸聚合酶底物类似物) 序列如下:

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）1：
TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC（SEQ ID NO:1所示），3'端双脱氧修饰；

对照核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）：
TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC，3'端未修饰；

将6U DNA聚合酶分别与上面核酸分子2和核酸分子3混合的酶体系进行实验。按照100 uM 0.05ul体系约加入6U DNA酶混合，-20度过夜测试。

结果如图8所示，加入对照核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的酶活保持完全活力，增加很快；而加入经修饰的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）1的体系，酶活被大部分抑制，达到预期的结果，可以封闭体系。此实验说明核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）3'修饰（不限于双脱氧修饰，一切3'修饰后可以阻止DNA酶继续延伸的修饰）对于本发明非常重要。

实施例4：核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）3'端不同修饰对比

本实施例中，分别对核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）1的3'端最后一个碱基进行双脱氧修饰、磷酸化修饰和氨基修饰。测试3'端不同修饰在45℃，70℃等温延伸时能否抑制酶活。

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）1：
TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC（SEQ ID NO:1所示），3'端双脱氧修饰、磷酸化修饰、氨基修饰；

对照核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）：
TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC，3'端未修饰；

反应体系：

组分	每份加入体积 ul
10x bufferA	2.5
1M MgCl ₂	0.125
25mM each dNTPs	0.2
100x SG	0.4
100uM 引物	0.1
0.73mg/ml DNA	0.45
5U/ul TAQ酶	1
5uM 核酸配体（核酸聚合酶	1

底物类似物)	
ddH2O	19.225

实验结果如图 14 所示，从试验结果看出，加入对照核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）的酶活保持完全活力，增加很快；而加入 3'端经过双脱氧修饰或磷酸化修饰或氨基修饰的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），在 45℃ 等温延伸时，能有效抑制聚合酶的活力。

实验结果如图 15 所示，从试验结果看出，加入 3'端经过双脱氧修饰或磷酸化修饰或氨基修饰的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），在 70℃ 等温延伸时，能 100% 释放聚合酶活力。

实施例 5: 聚合酶结合序列筛选（分子内）

以下核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）（序列依次如 SEQ ID NO:2-11 所示）3' 端最后一个碱基进行修饰，本实施例采用 3'端双脱氧修饰。

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）2: TCGAACGGGTATACC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）3: TCGAACGGGATATATCC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）4: TCGAACGGGATTATAATCC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）5: TCGAACGGGATATATATATCC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）6:

TCGAACGGGATATACTATAGTATATCC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）7:

TCGAAGTGTATATACTATAGTATATAC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）8:

TCGGAGTGTATATACTATAGTATATACACTC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）9:

TCGGAGTGTATATACTATAGTATATACACTCC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）10:

TGAGAGTGTATATACTATAGTATATACACTCTC;

核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）11:

GGAGAGTGTATATACTATAGTATATACACTCTCC;

本实施例用一系列具有分子内发夹结构的核酸分子作为 DNA 聚合酶的核酸分子，来检测对 DNA 聚合酶的抑制效果，这些核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）从 4 个核苷酸互补到所有核苷酸完全互补（下划线为互补配对碱基）。采用实施例 1 的方法，在 50℃ 分析这些核酸分子对 DNA 聚合酶封闭作用。

由图 9 可以看出，从核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）2~11，随着配对的碱基数量增加，对酶活的抑制会逐渐增加随之降低。当碱基配对数从 4~80（但不限于此互补对数）时，都对酶有一定的抑制作用但抑制效果不相同，本实施例的图上只放了有代表规律的数据，此实验中优选碱基配对数为 8-20 配对数。

实施例 6: 聚合酶结合序列筛选（分子间）

本实施例将两个分子间能形成互补配对的 3' 修饰核酸分子作为 DNA 聚合酶的核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），来检测对 DNA 聚合酶的抑制效果。

以下核酸分子都进行 3' 修饰（双脱氧修饰）（序列依次如 SEQ ID NO:12-20 所示）

核酸分子 12:

GAGGAGTTCAGTAGCATGAGCTGTGTAGACGTATATAC;

核酸分子 13: TATATACGTC;

核酸分子 14: TATATACGTCTAC;

核酸分子 15: TATATACGTCTACAC;

核酸分子 16: TATATACGTCTACACAGC;

核酸分子 17: TATATACGTCTACACAGCTC;

核酸分子 18: TATATACGTCTACACAGCTCATGC;

核酸分子 19: TATATACGTCTACACAGCTCATGCTAC;

核酸分子 20: TATATACGTCTACACAGCTCATGCTACTGAAC;

将核酸分子 15~22 分别与核酸分子 14 混合，制成 10uM 与 10uM 混合，制成最后终浓度为 5uM 的核酸分子混合物，做为实验对象（即核酸配体（核酸聚合酶底物类似物）12-19）。按照实施例 2 的混合比例，参照实施例 1 反

应加入量,测试 50°C 下 DNA 聚合酶的酶活变化,本次使用的是 A 家族的 DNA 聚合酶 Taq 及去除 3-5' 外切活性的 B 家族酶 KOD 聚合酶。

如图 10 所示,随着两个核酸分子配对的核苷酸数量增加,酶活不断下降达到最低后又增加,说明两个核酸分子的部分核苷酸形成配对后,需要一定数量的配对碱基才可以发挥抑制酶活的作用,在此选择 10-32 个配对的碱基,都可以达到抑制酶活的作用,只是抑制作用大小不一样。

如图 11 所示,对 KOD 酶抑制的效果与对 Taq 酶的类似,规律一致,随着配对序列增加,酶活不断下降而后又增加。在一定区间内可以完全封闭酶活。

实施例 7: 功能性实验测试

将本发明所述的扩增待测靶核酸的方法,用于扩增不同模板量的人基因组模板的 18 个片段。在其中一组反应体系中加入核酸配体(核酸聚合酶底物类似物) 6,将另一组不加核酸配体(核酸聚合酶底物类似物)的反应体系设为对照,分别测试扩增目的片段的效果。

反应体系为:

2ul 18 位点引物;

5ul buffer(Tris-HCl 8.8 30mM、NaCl 30mM、MgCl₂ 2.0 mM、BSA 1mg/ml、brij58 0.5%、proclin950 0.05%);

dATP:dTTP:dCTP:dGTP 为 0.2 mM:0.2 mM: 0.2mM:0.2 mM;

0.4ul Taq 酶 10U/ul

5uM 核酸配体 (核酸聚合酶底物类似物) 6
(TCGAACGGGATATACTATAGTATATCC)

1ul 0.025ng/ul、0.05ng/ul、0.1ng/ul 和 0.2ng/ul 9948 (模板);

水补足到 10ul;

反应条件: 95°C, 10 分; 30cycles(95°C, 10s; 59 度 90S single)60 度 10 分;

图 12、13 是当模板量分别是 0.025ng、0.05ng、0.1ng、0.2ng 时,加核酸配体和加核酸配体(核酸聚合酶底物类似物)时的扩增结果,可以看出,当在低模板浓度范围内 0.025 和 0.05ng 模板扩增时,没有加入核酸配体(核酸

聚合酶底物类似物)的体系,前面圆圈部位出现一些非特异扩增条带,影响实验判读准确性;而加入核酸配体(核酸聚合酶底物类似物)的体系,非特异性扩增条带明显减少。本实施例说明加入核酸配体(核酸聚合酶底物类似物),可以极大减少非特异扩增。

实施例 8: 核酸聚合酶底物类似物的混合物对反转录酶 (Reverse transcriptase) 酶活的作用

使用两种核酸聚合酶底物类似物的混合物,核酸聚合酶底物类似物 6, 7 分子间形成配对,测试在 37°C 等温延伸时能否抑制酶活,以及在 55°C 等温延伸时,能够释放 RT (反转录酶) 酶活力。本实施例中核酸聚合酶底物类似物的混合物为核酸聚合酶底物类似物 6 和 7 的等摩尔的混合物。

核酸聚合酶底物类似物 6 (SEQ ID NO: 21)

TCGAACGGGACGGCTGGCTGTGTGTGT 3'端磷酸化修饰 RNA

核酸聚合酶底物类似物 7 (SEQ ID NO: 22)

CCAGCCGTCC 3'端双脱氧修饰 DNA

反应体系:

组分	每份加入体积 ul
5x RT buffer	5
25mM each dNTPs	0.2
100x SG	0.1
100uM 引物	0.1
0.8mg/ml RNA	0.3
25%甘油	5.1
200U/ul RT	0.1
40U/ul RNase inhibitor	0.1
6uM 核酸聚合酶底物类似物	1
ddH ₂ O	13

利用单链延伸方法检测,使用购买的 RNA 及相关引物进行测试,荧光定量方法实时检测,本发明使用的仪器为罗氏 LC480II。

上述反应体系分别在以下反应条件下进行等温延伸: (37°C, 30s) ×45 循环和 (55°C, 30s) ×45 循环。

37°C 下等温延伸时的酶活见图 16。从图 16 可以看出,在 37°C 等温延伸时,未添加核酸聚合酶底物类似物的 RT 酶 (反转录酶) 在第 14 个循环时曲

线开始变弯，选择前 14 个循环数据进行计算。以未添加核酸聚合酶底物类似物的 RT 酶残余酶活为 100% 作为参照，添加了核酸聚合酶底物类似物的混合物的 RT 酶残余酶活为 16%，表明添加核酸聚合酶底物类似物的混合物（核酸聚合酶底物类似物 6 和 7）能有效抑制 RT（反转录酶）酶活力。

名称	酶活信号增加值	残余酶活
未添加核酸聚合酶底物类似物	5.16	100%
添加核酸聚合酶底物类似物的混合物	0.82	16%

55℃ 下等温延伸时的酶活见图 17。从图 17 可以看出，在 55℃ 等温延伸时，添加核酸聚合酶底物类似物的混合物和未添加核酸聚合酶底物类似物的 RT 酶均在第 8 个循环时酶活曲线开始变弯，第 15 个循环时到达最高酶活信号值，表明添加核酸聚合酶底物类似物的混合物（核酸聚合酶底物类似物 6 和 7）能 100% 释放 RT（反转录酶）酶活力。

实施例 9: 核酸聚合酶底物类似物对 BST DNA 聚合酶 (DNA Polymerase) 酶活的作用

本实施例使用核酸聚合酶底物类似物 8，测试在 45℃ 等温延伸时能否抑制酶活，以及在 65℃ 等温延伸时，能够释放 BST DNA 聚合酶酶活力。

核酸聚合酶底物类似物 8 (SEQ ID NO: 23)

TTGATGACTGATCATGCATGATCAGTC

反应体系:

组分	每份加入体积 ul
10x bufferA	2.5
1M MgCl ₂	0.125
25mM each dNTP	0.2
100x SG	0.4
100uM 引物	0.1
0.73mg/ml DNA	0.45
100U/ul BST	0.05
2uM 核酸聚合酶底物类似物	1
ddH ₂ O	20.175

利用单链延伸方法检测，使用购买的 DNA 及相关引物进行测活，荧光定量方法实时检测，本发明使用的仪器为罗氏 LC480II。

上述反应体系分别在以下反应条件下进行等温延伸：（45℃，2s）×99 循环和（65℃，2s）×99 循环

45℃下等温延伸时的酶活见图 18。从图 18 可以看出，在 45℃等温延伸时，未添加核酸聚合酶底物类似物 8 的 BST 酶在第 48 个循环时曲线开始变弯，选择前 48 个循环数据进行计算。以未添加核酸聚合酶底物类似物 8 的 BST 酶残余酶活为 100%作为参照，添加了核酸聚合酶底物类似物 8 的 BST 酶残余酶活为 8%，表明核酸聚合酶底物类似物 8 能有效抑制 BST 酶活力。

名称	酶活信号增加值	残余酶活
未添加核酸聚合酶底物类似物	135	100%
添加核酸聚合酶底物类似物	11	8%

65℃下等温延伸时的酶活见图 19。从图 19 可以看出，在 65℃等温延伸时，添加核酸聚合酶底物类似物 8 和未添加核酸聚合酶底物类似物 8 的 BST 酶均在第 8 个循环时酶活曲线开始变弯，第 18 个循环时基本到达最高酶活信号值，表明添加核酸聚合酶底物类似物 8 能 100%释放 BST DNA 聚合酶酶活力。

实施例 10 不同核酸聚合酶底物类似物对 TAQ 酶酶活的作用不同

本实施例分别使用核酸聚合酶底物类似物 1 和 2，测试在不同温度下（30℃、40℃、50℃、60℃和 70℃）抑制和释放 TAQ 酶酶活力。

核酸聚合酶底物类似物 1 (SEQ ID NO: 24)

TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC

核酸聚合酶底物类似物 2 (SEQ ID NO: 25)

TCGAACGGATTACAGCTGTAATC

核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 均为 3'端双脱氧修饰。

（一）抑制与释放 TAQ 酶活力对比

反应体系：

组分	每份加入体积 ul
10x bufferA	2.5
1M MgCl ₂	0.125
25mM each dNTPs	0.2
100x SG	0.4
100uM 引物	0.1

0.73mg/ml DNA	0.45
5U/ul TAQ 酶	1
5uM 核酸聚合酶底物类似物 1/ 5uM 核酸聚合酶底物类似物 2/ddH ₂ O	1
ddH ₂ O	19.225

反应条件：（30/40/50/60/70℃，30s）×30 循环。

核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 在不同温度等温条件下，抑制和释放酶活力不一样，不同温度下等温延伸时的酶活分别见图 20~24。从图 20~24 可以看出，核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 在 30℃ 和 40℃ 时均能抑制 TAQ 酶活释放。添加了核酸聚合酶底物类似物 2 的 TAQ 酶，在 50℃ 时开始释放酶活，60℃ 及以上能完全释放酶活。而核酸聚合酶底物类似物 1 在 60℃ 时才开始释放酶活，到 70℃ 时，完全释放酶活。

实施例 11 2 种核酸聚合酶底物类似物混合修饰 TAQ 酶与单一核酸聚合酶底物类似物修饰 TAQ 酶的功能试验对比

实验方法：

分别将核酸聚合酶底物类似物 1、核酸聚合酶底物类似物 2、核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 的等摩尔比混合物，与 TAQ 酶混合进行 PCR 扩增，比较酶的扩增效果。

反应体系：

组分	每份加入体积 ul
5x Mix1 buffer	2
5x NH6A	2
M2 (0.03125/0.0625/0.125ng/ul)	1
NU-TAQ 8U/ul	1
ddH ₂ O	4

反应条件：

95℃，1min；（95℃，10s；59℃，1min；72℃，20s）×29 循环；60℃，10min

图 25~27 分别为模板量为 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 的人基因组 M2，添加不同的核酸聚合酶底物类似物的扩增结果。从图 25~27 可以看出，

单一核酸聚合酶底物类似物修饰 TAQ 酶体系扩增试验，小片段非特异扩增明显多于 2 种核酸聚合酶底物类似物的混合物修饰 TAQ 酶的体系，表示为单一核酸聚合酶底物类似物扩增时，前面圆圈部位出现的非特异扩增条带明显多于 2 种核酸聚合酶底物类似物扩增时的非特异性扩增条带。故混合核酸聚合酶底物类似物修饰酶效果好于单一核酸聚合酶底物类似物修饰酶。

实施例 12 低温和常温下，1 种、2 种和 3 种核酸聚合酶底物类似物的混合物与 Taq 酶混合进行 PCR 扩增的结果

分别将核酸聚合酶底物类似物 1, 核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 的混合物, 核酸聚合酶底物类似物 1、2 和 3 的混合物与 Taq 酶混合进行 PCR 扩增, 比较酶的扩增效果。核酸聚合酶底物类似物的 3' 端最后一个碱基进行修饰, 本实施例采用 3' 端双脱氧修饰。将 Taq DNA 聚合酶与核酸聚合酶底物类似物 1 混合, 作为对照。再将核酸聚合酶底物类似物 2 和核酸聚合酶底物类似物 3 分别与酶混合, 最后制成 4U 的酶量进行试验。核酸聚合酶底物类似物 1 和 2 的混合物的总浓度为 1U 酶在对照基础上多加 3 μ m (3 μ mol/L) 核酸聚合酶底物类似物 2; 核酸聚合酶底物类似物 1、2 和 3 的混合物的总浓度为 1U 酶在对照基础上分别多加 3 μ m (3 μ mol/L) 核酸聚合酶底物类似物 2 和 3 μ m (3 μ mol/L) 核酸聚合酶底物类似物 3。

核酸聚合酶底物类似物 1

TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC

核酸聚合酶底物类似物 2

TCGAACGGATTACAGCTGTAATC

核酸聚合酶底物类似物 3 (SEQ ID NO: 26)

TCGAACGGCTACAGCTGTAGC

反应条件及反应加入量为

NH25: 95°C, 1min; (95°C, 10s; 59°C, 1min; 72°C, 20s) ×29 循环;
60°C, 10min

组分	每份加入体积 ul
5x Mix1 buffer	2
5x NH25	2

M2 (0.03125/0.0625/0.125ng/ul)	1
NU-TAQ 12 4U/ul	2
ddH ₂ O	3

图 28~30 是将反应混合物在 4℃放置一天后的试验结果,从试验结果可以看出,当在模板浓度范围内 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 时,当不加入核酸聚合酶底物类似物 2,或不加入核酸聚合酶底物类似物 2 和 3 时,不同浓度的 DNA 扩增明显变差,表示为前面圆圈部位出现一些非特异扩增条带,甚至不能正确分型,影响试验判读准确性;而加入核酸聚合酶底物类似物 2 或核酸聚合酶底物类似物 2 和 3 的体系,非特异性扩增条带明显减少。本实施例说明加入 2 种或 3 种核酸聚合酶底物类似物的混合物,可以极大减少低温下的非特异扩增。

图 31~33 是反应混合物没有放置,直接试验的结果。从试验结果可以看出,当在模板浓度范围内 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 时,加入核酸聚合酶底物类似物 2,或者加入核酸聚合酶底物类似物 2 和 3,对正常试验并没有影响作用,可以正常分型。

实施例 13 低温下,4 种、5 种核酸聚合酶底物类似物的混合物与 Taq 酶混合进行 PCR 扩增的结果

分别将核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 和 4 的混合物,核酸聚合酶底物类似物 1、2、3、4 和 5 的混合物与酶混合进行 PCR 扩增,比较酶的扩增效果。核酸聚合酶底物类似物的 3'端最后一个碱基进行修饰,本实施例采用 3'端双脱氧修饰。

核酸聚合酶底物类似物 1

TCGAACGGTATATATATTAATATATATATAC

核酸聚合酶底物类似物 2 TCGAACGGATTACAGCTGTAATC

核酸聚合酶底物类似物 3 TCGAACGGCTACAGCTGTAGC

核酸聚合酶底物类似物 4 TCGAACGGGATATATCC (SEQ ID NO: 27)

核酸聚合酶底物类似物 5 TCGAACGGGTATACC (SEQ ID NO: 28)

实验方法同实施例 12。

图 34 是不添加核酸聚合酶底物类似物，将反应混合物 4℃放置一天后的试验结果。从图 34 的试验结果可以看出，当在模板浓度范围内 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 时，不加入核酸聚合酶底物类似物，扩增效果变差，不能正确分型。

图 35 是添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3 和 4 的混合物，4℃放置一天后的试验结果。从图 35 的试验结果可以看出，当在模板浓度范围内 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 时，加入 4 种核酸聚合酶底物类似物，对正常实验并没有影响作用，能正确分型。

图 36 是添加核酸聚合酶底物类似物 1、2、3、4、5 混合物，4℃放置一天后的试验结果。从图 36 的试验结果可以看出，当在模板浓度范围内 0.03125ng、0.0625ng 和 0.125ng 时，加入 5 种核酸聚合酶底物类似物，对正常实验并没有影响作用，能正确分型。

本实施例说明加入 4 种或 5 种核酸聚合酶底物类似物的混合物，可以极大减少低温下的非特异扩增。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种核酸配体（核酸聚合酶底物类似物），其特征在于，所述核酸配体是在分子内形成互补配对的单个核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸配体3'端具有抑制其延伸的修饰，当保持或低于一定温度时与核酸聚合酶形成稳定结构，此时核酸聚合酶的酶活被抑制，当高于所述一定温度时，核酸聚合酶从所述核酸配体上脱离下来，发挥活性。

2、根据权利要求1所述核酸配体，其特征在于，所述一定温度是所述核酸聚合酶发挥活性的温度。

3、根据权利要求1所述核酸配体，其特征在于，所述互补配对的个数为8-35。

4、根据权利要求1所述核酸配体，其特征在于，所述修饰为双脱氧修饰、磷酸化修饰或氨基修饰。

5、根据权利要求1所述核酸配体，其特征在于，所述核酸聚合酶为DNA聚合酶或RNA聚合酶。

6、根据权利要求5所述核酸配体，其特征在于，所述DNA聚合酶选自Family A或Family B的聚合酶。

7、根据权利要求5所述核酸配体，其特征在于，所述RNA聚合酶选自AMV家族或MMLV家族的逆转录酶。

8、权利要求1-7任意一项所述核酸配体在核酸扩增、在制备核酸扩增试剂盒或在制备核酸延伸反应混合物中的应用。

9、一种核酸扩增的方法，其特征在于，包括：

步骤1、将含有靶核酸的待测样品与以下扩增反应试剂接触，形成反应混合物；

- a) 可与靶核酸杂交的引物；
- b) 核酸聚合酶；
- c) 权利要求1-7任意一项所述核酸配体；
- d) 核苷三磷酸；

步骤2、加热所述反应混合物使所述核酸配体的配对核苷酸解离成单链，核酸聚合酶从所述核酸配体上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物。

10、一种核酸扩增试剂盒，其特征在于，包括权利要求1-7任意一项所述核酸配体。

11、一种核酸延伸反应混合物，其特征在于，包含权利要求1-7任意一项所述核酸配体、核酸聚合酶、至少一种引物、核酸模板和三磷酸核苷。

12. 一种核酸聚合酶底物类似物的混合物，其中：

a. 包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物；

b. 所述核酸聚合酶底物类似物是在分子内形成互补配对的单个寡聚核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个寡聚核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸聚合酶底物类似物所形成的结构具备核酸聚合酶底物的特征；

c. 所述核酸聚合酶底物类似物的3'端具有抑制其延伸的修饰；

d. 所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度；

e. 当保持或低于第一温度时，所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶混合时，二者形成核酸聚合酶-底物类似物复合体，此时核酸聚合酶活性相对于无核酸聚合酶底物类似物存在时显著降低；

f. 当高于所述第一温度时，“e”中的所述核酸聚合酶-底物类似物复合体解体，核酸聚合酶活性全部或部分被释放出来。

13. 一种核酸聚合酶底物类似物的混合物与核酸聚合酶的混合物，其中：

a. 包含两种及以上核酸聚合酶底物类似物；

b. 所述核酸聚合酶底物类似物是在分子内形成互补配对的单个寡聚核酸分子或核酸分子类似物，或者是在分子间形成互补配对的单个或两个寡聚核酸分子或核酸分子类似物；所述核酸聚合酶底物类似物所形成的结构具备核酸聚合酶底物的特征并能与核酸聚合酶结合；每种核酸聚合酶底物类似物的分子数目大于核酸聚合酶分子数目；

c. 所述核酸聚合酶底物类似物的3'端具有抑制其延伸的修饰；

d. 所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物具有不同的温度适应范围宽度；

e. 当保持或低于第一温度时，所述两种及以上核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶混合时，二者形成核酸聚合酶-底物类似物复合体，此时核酸聚合酶活性相对于无核酸聚合酶底物类似物存在时显著降低；

f. 当高于所述第一温度时，“e”中的所述核酸聚合酶-底物类似物复合体解体，核酸聚合酶活性全部或部分被释放出来。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的混合物，其中：

g. 当保持或低于第二温度时，温度适应范围宽的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合体，温度适应范围窄的核酸聚合酶底物类似物不能与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合体；

所述第一温度高于所述第二温度。

15. 根据权利要求 12-14 任一项所述的混合物，其中，所述第一温度和所述第二温度具有温度差，所述温度差大于或等于 5 摄氏度。

16. 根据权利要求 12-15 任一项所述的混合物，其中，所述核酸聚合酶底物类似物的温度适应范围宽度与其分子内或分子间互补配对的碱基数量有关；

优选地，当保持或低于第二温度时，互补配对碱基数量少的核酸聚合酶底物类似物与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合体，互补配对碱基数量多的核酸聚合酶底物类似物不能与核酸聚合酶形成核酸聚合酶-底物类似物复合体。

17. 根据权利要求 12-16 任一项所述的混合物，其中，互补配对碱基的个数为 8~35；

优选地，所述互补配对碱基的个数为 10~30；

更优选地，所述互补配对碱基的个数为 10~20；

进一步优选地，分子内互补配对碱基的个数为 8~20，分子间互补配对碱基的个数为 10~32。

18. 根据权利要求 12-17 任一项所述的混合物，其中，所述核酸聚合酶底物类似物的 3'端为非-OH 基团；

优选地，核酸聚合酶底物类似物的 3'端抑制其延伸的修饰包括双脱氧修饰、磷酸化修饰或氨基修饰。

19. 根据权利要求 12-18 任一项所述的混合物，其中，所述核酸聚合酶为 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶；

优选地，所述 DNA 聚合酶为热稳定 DNA 聚合酶；

所述 RNA 聚合酶为反转录酶。

20. 权利要求 12-19 任一项所述的混合物在核酸扩增、在制备核酸扩增试剂盒或在制备核酸延伸反应混合物中的应用。

21. 一种核酸扩增的方法，其包括：

步骤 1、将含有靶核酸的待测样品与以下扩增反应试剂接触，形成反应混合物；

a) 可与靶核酸杂交的引物；

b) 核酸聚合酶；

c) 核酸聚合酶底物类似物的混合物；

d) 核苷三磷酸、脱氧核苷三磷酸或二者的混合物，或核苷/脱氧核苷三磷酸类似物；

步骤 2、加热所述反应混合物使所述核酸聚合酶底物类似物的配对核苷酸解离成单链，核酸聚合酶从所述核酸聚合酶底物类似物上脱离下来，发挥活性，形成引物延伸产物。

22. 一种核酸扩增试剂盒，其包括权利要求 12-19 任一项所述的混合物。

23. 一种核酸延伸反应混合物，其包含权利要求 12-19 任一项所述的混合物、任选地核酸聚合酶、至少一种引物、核酸模板；以及核苷三磷酸、脱氧核苷三磷酸或二者的混合物，或核苷/脱氧核苷三磷酸类似物。

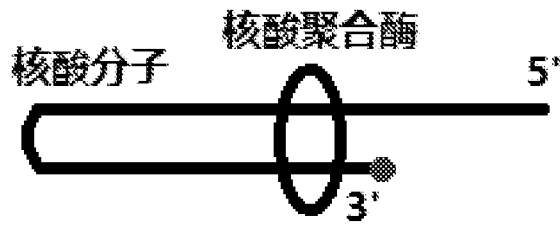


图 1

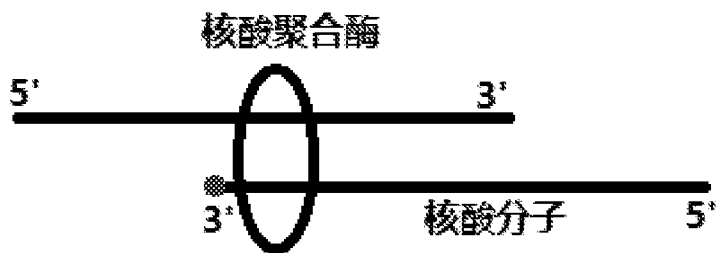
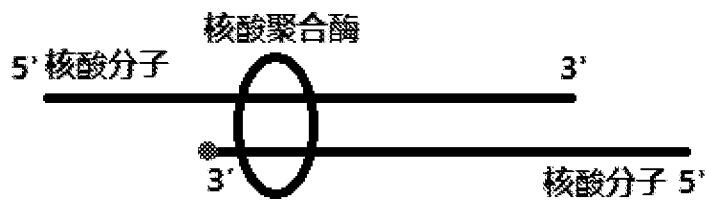
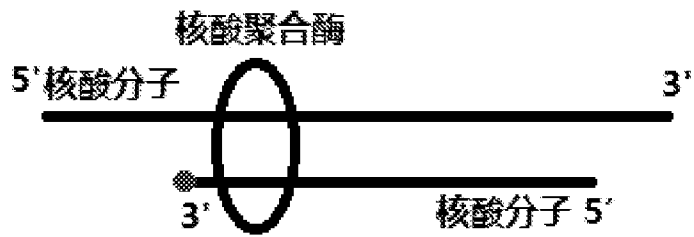
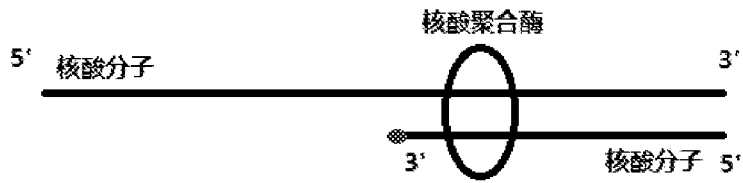


图 2

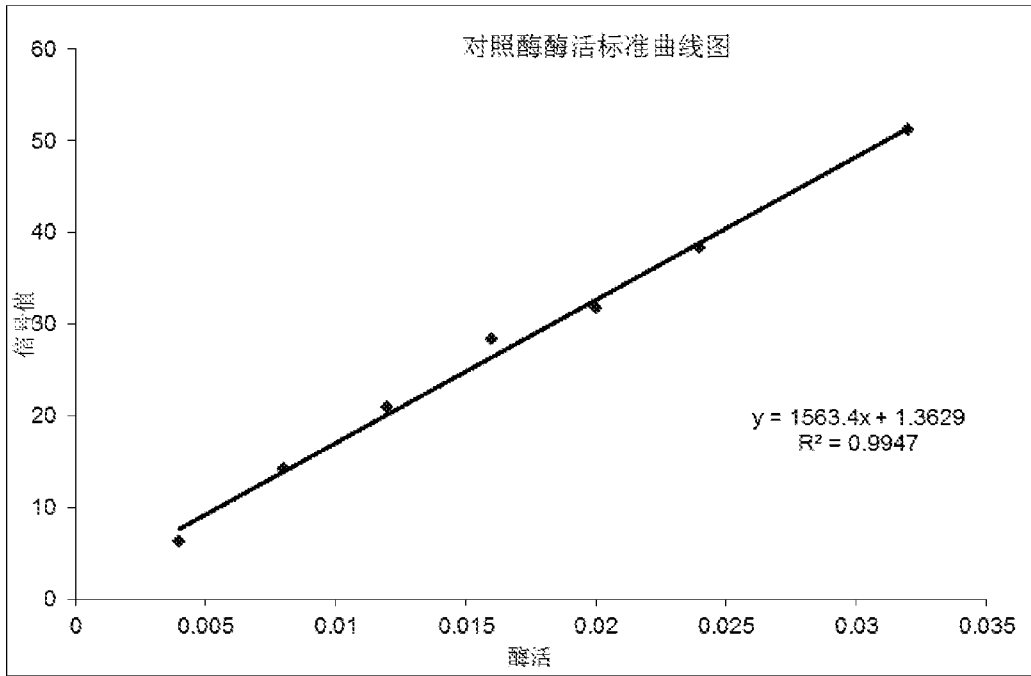


图 3

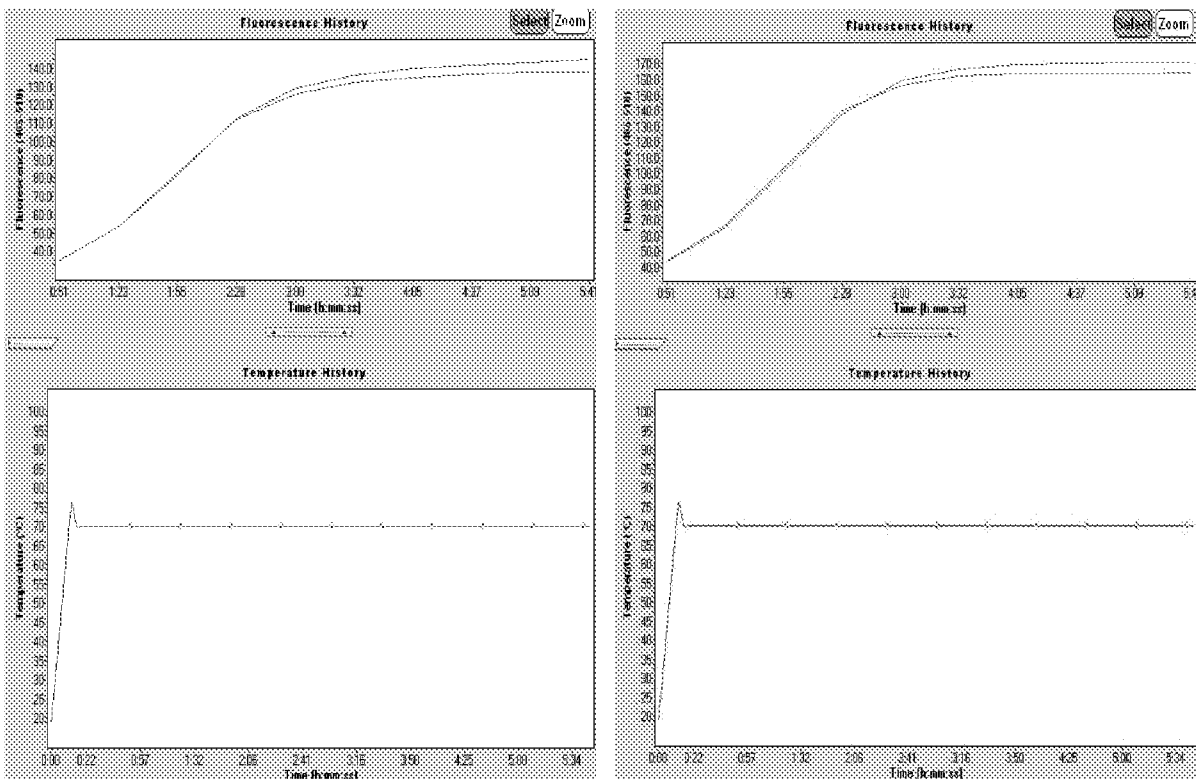


图 4

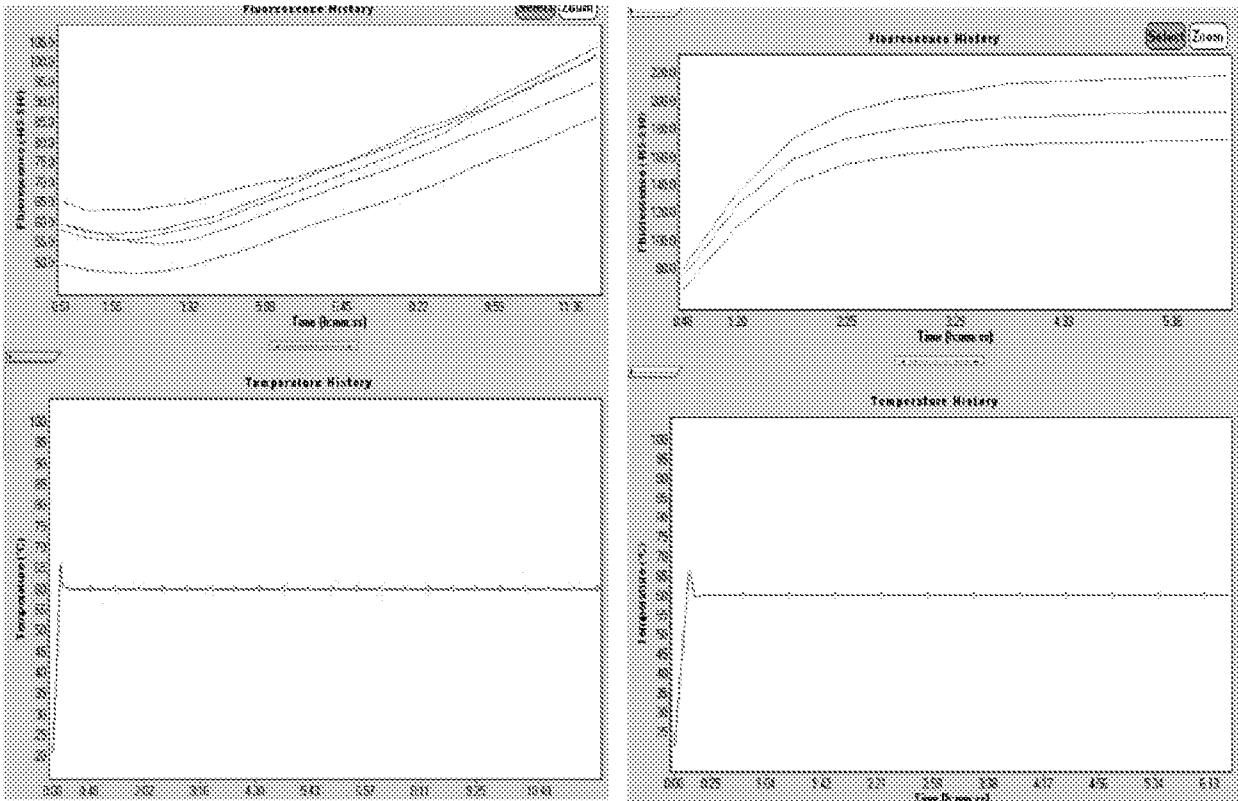


图 5

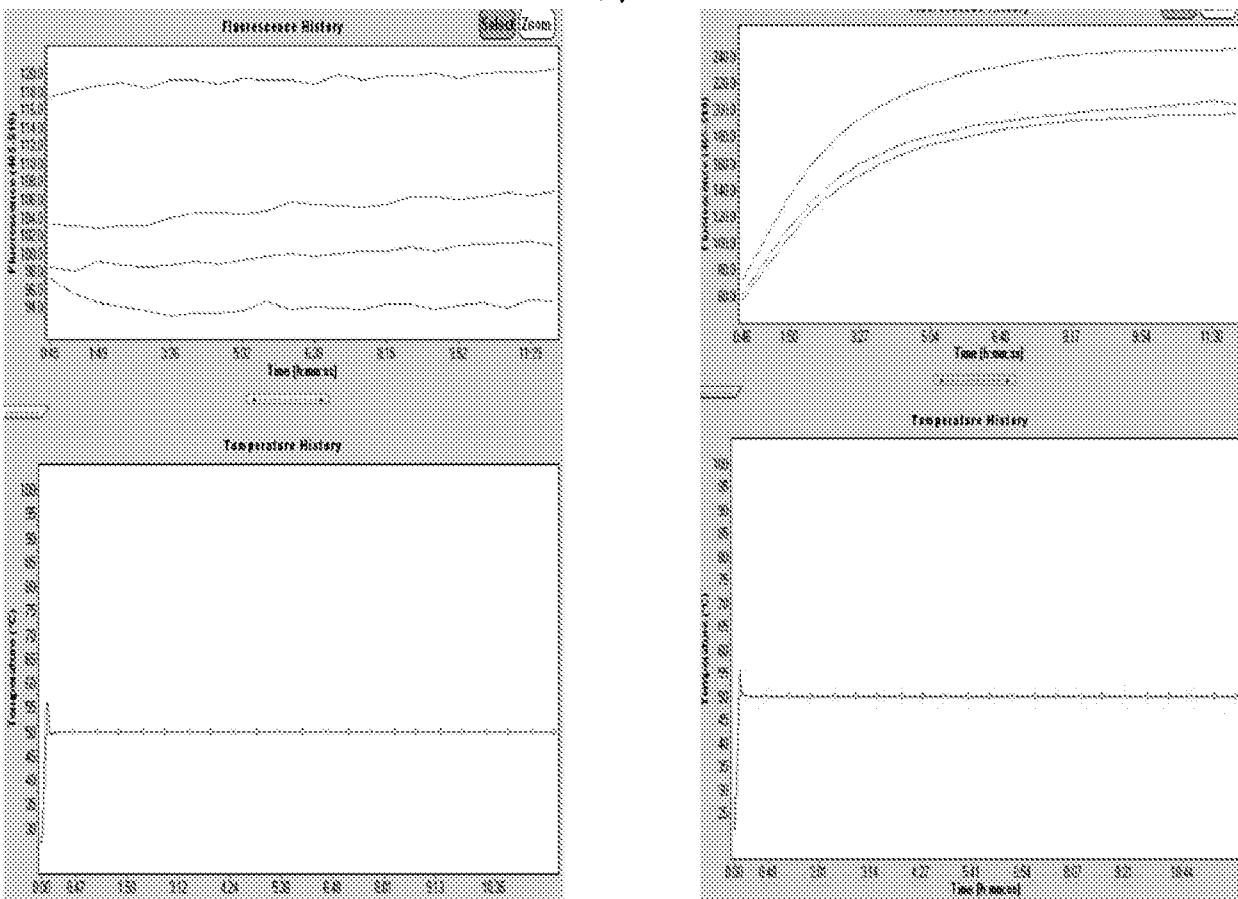


图 6

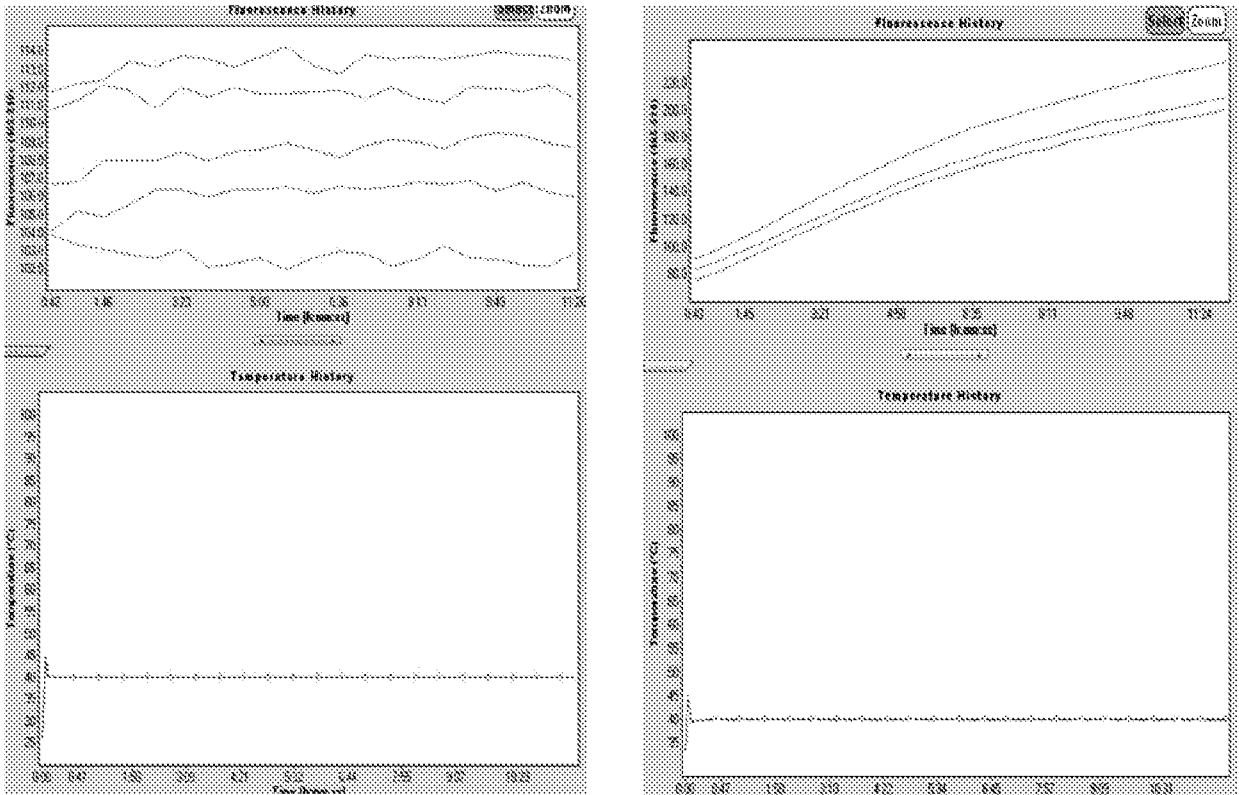


图 7

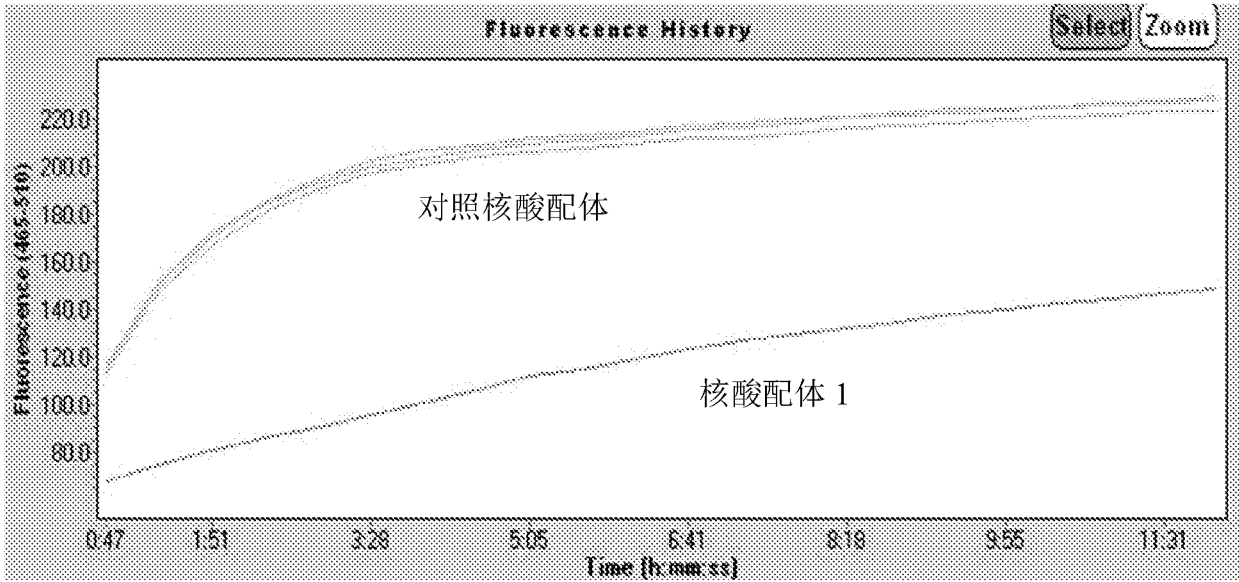


图 8

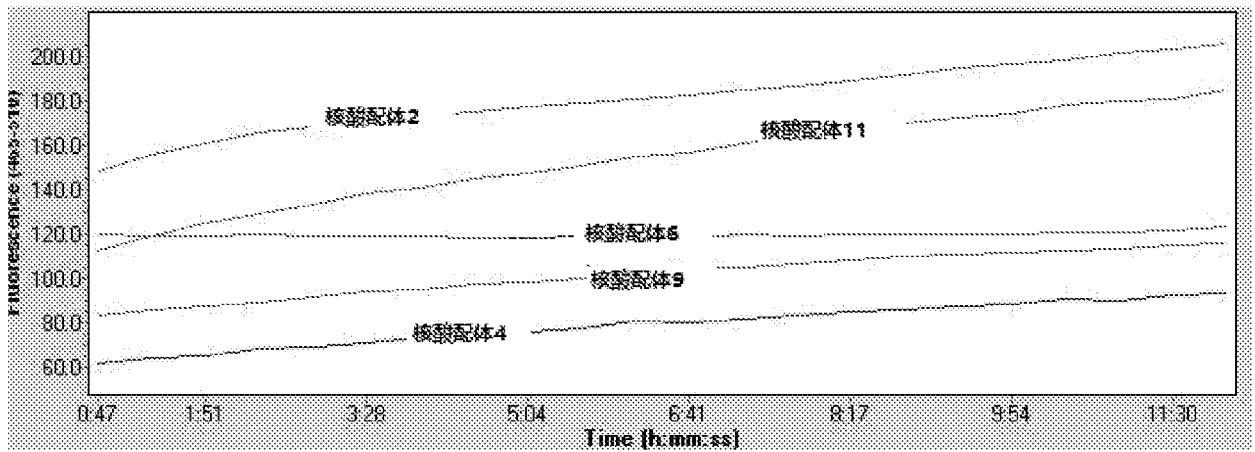


图 9

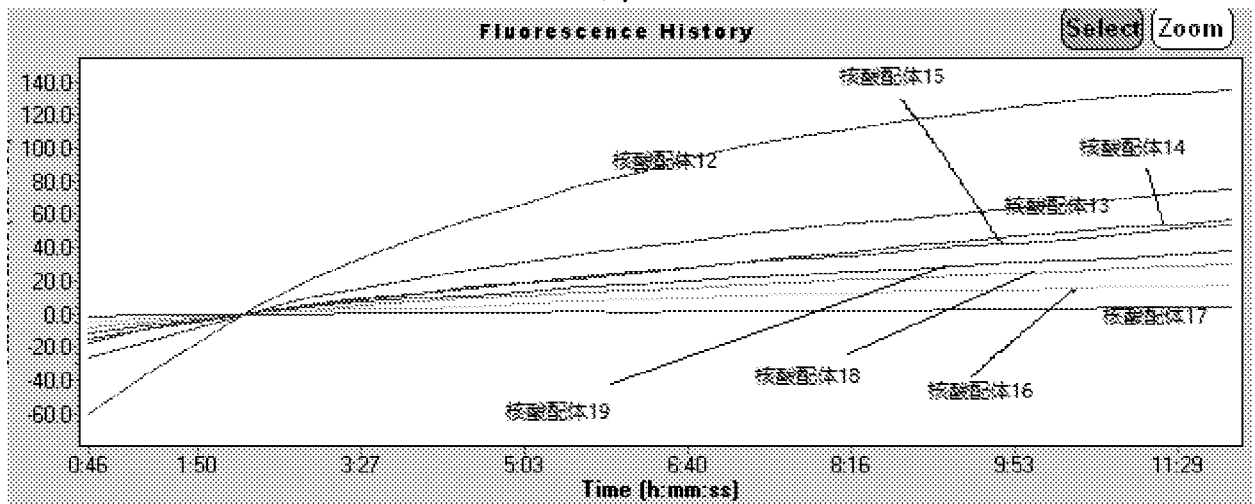


图 10

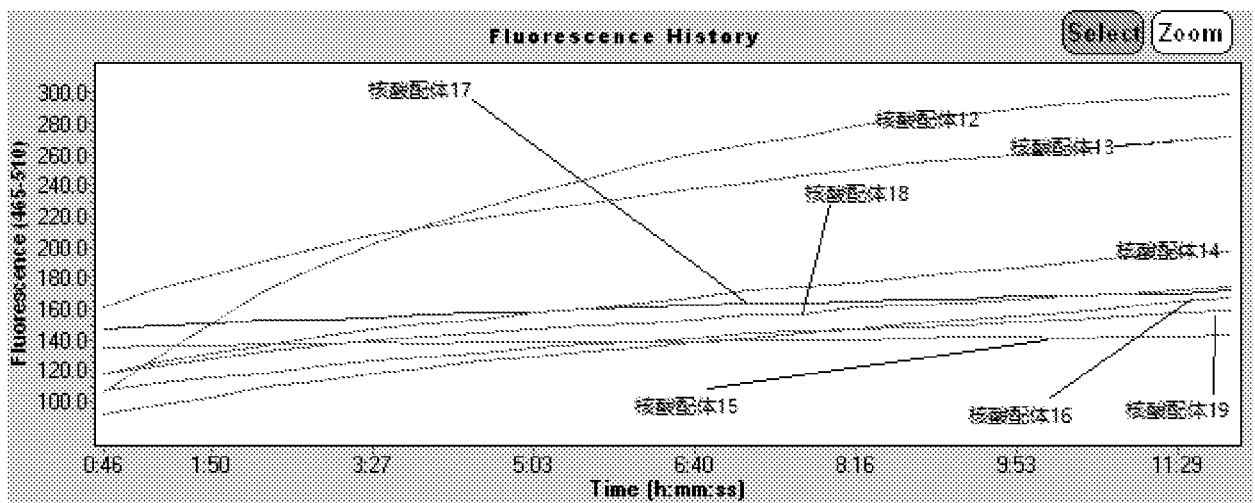


图 11

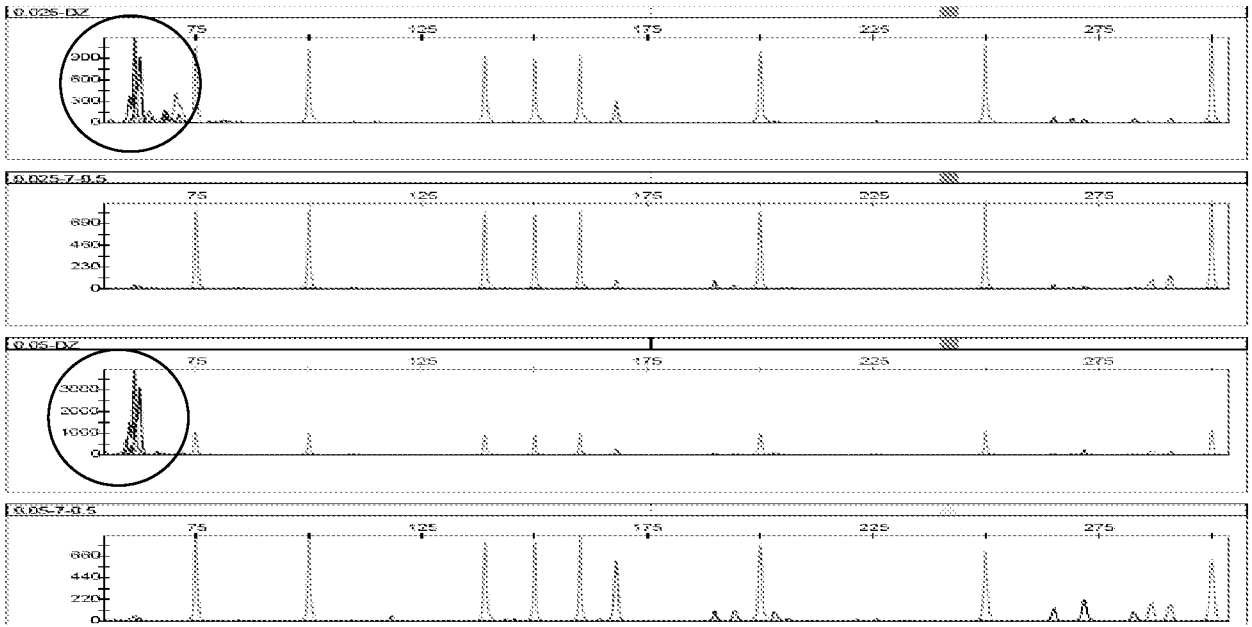


图 12

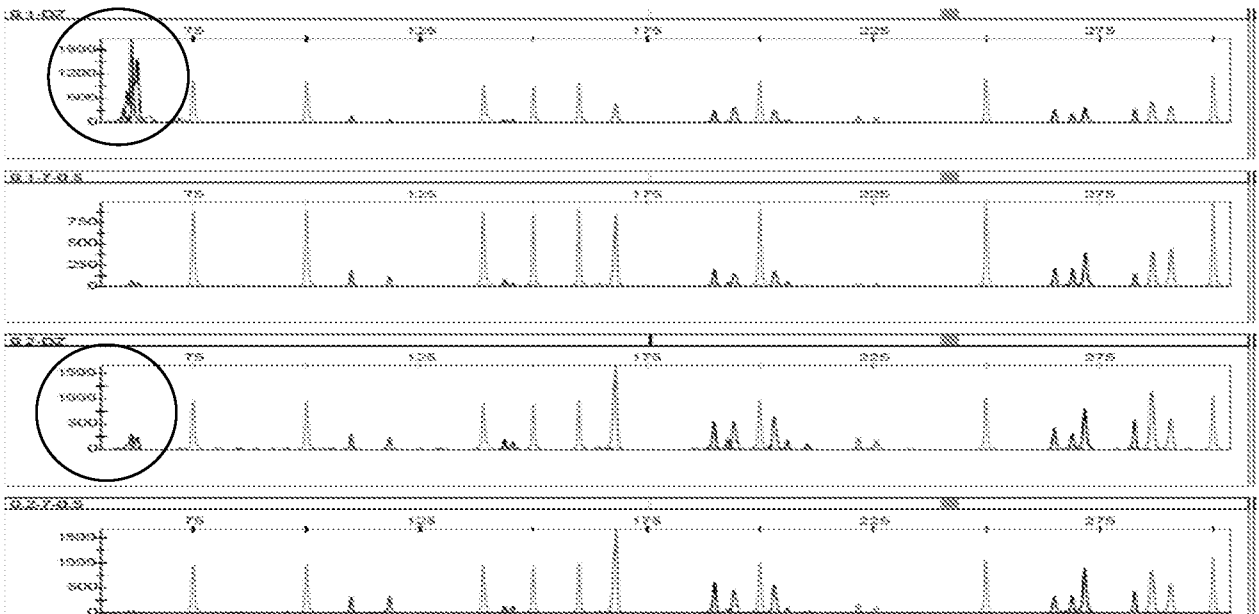


图 13

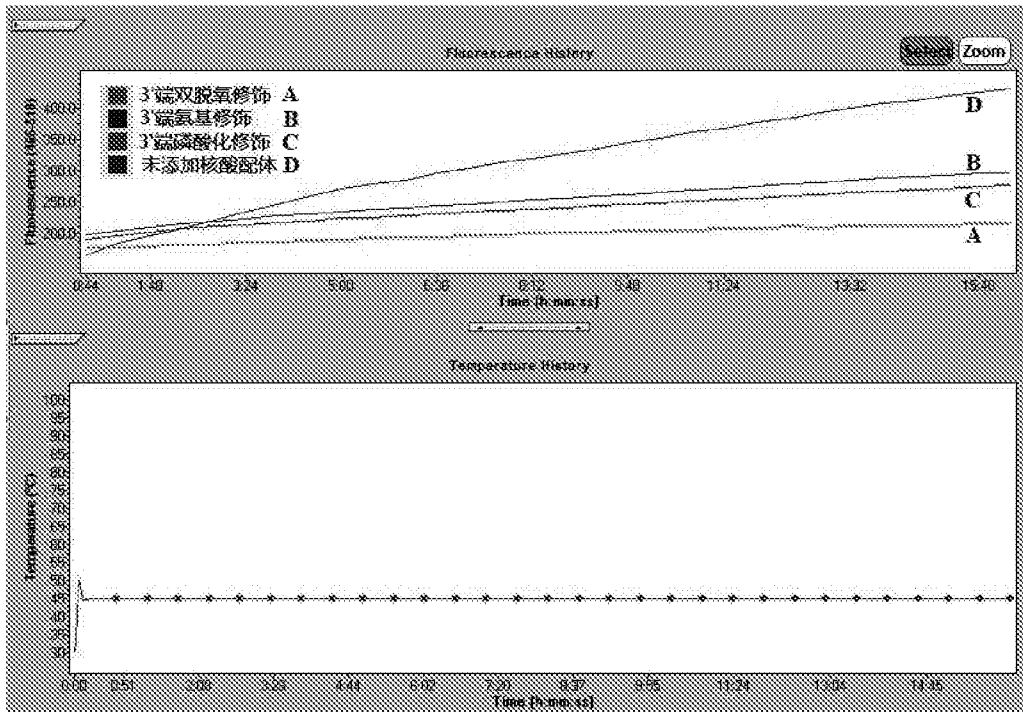


图 14

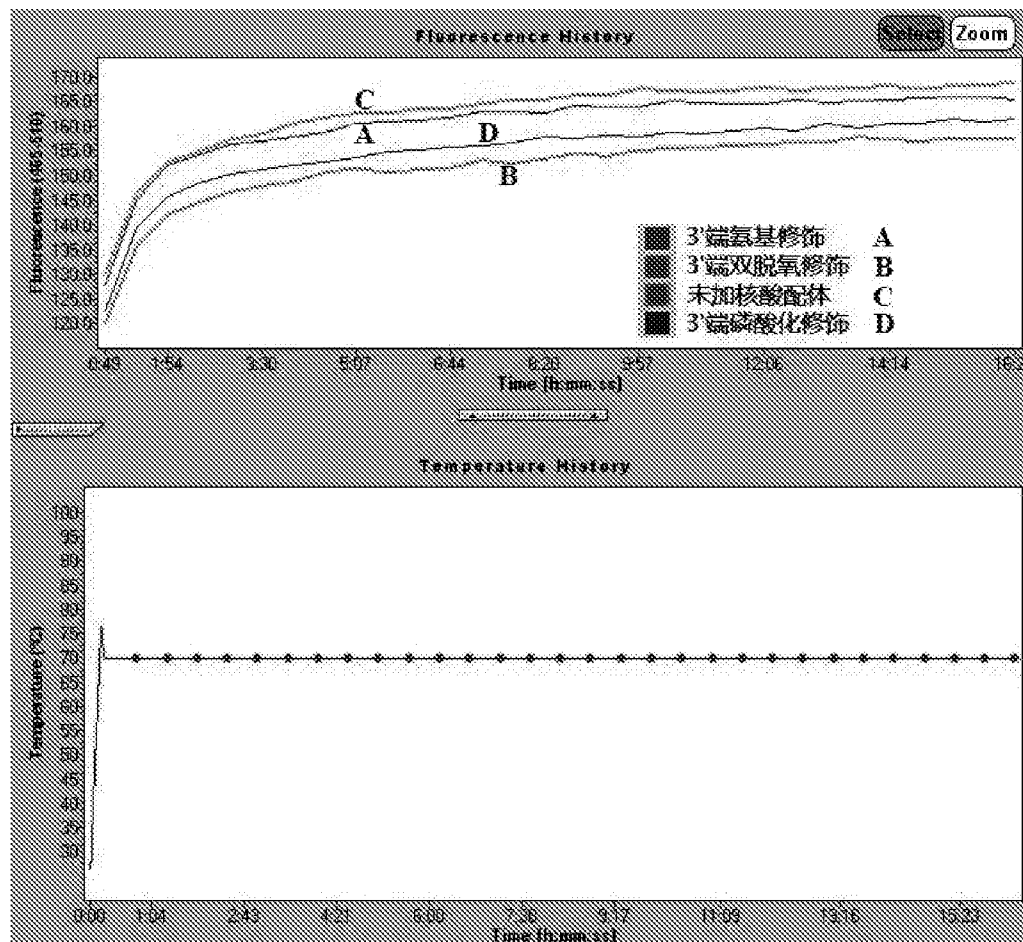


图 15

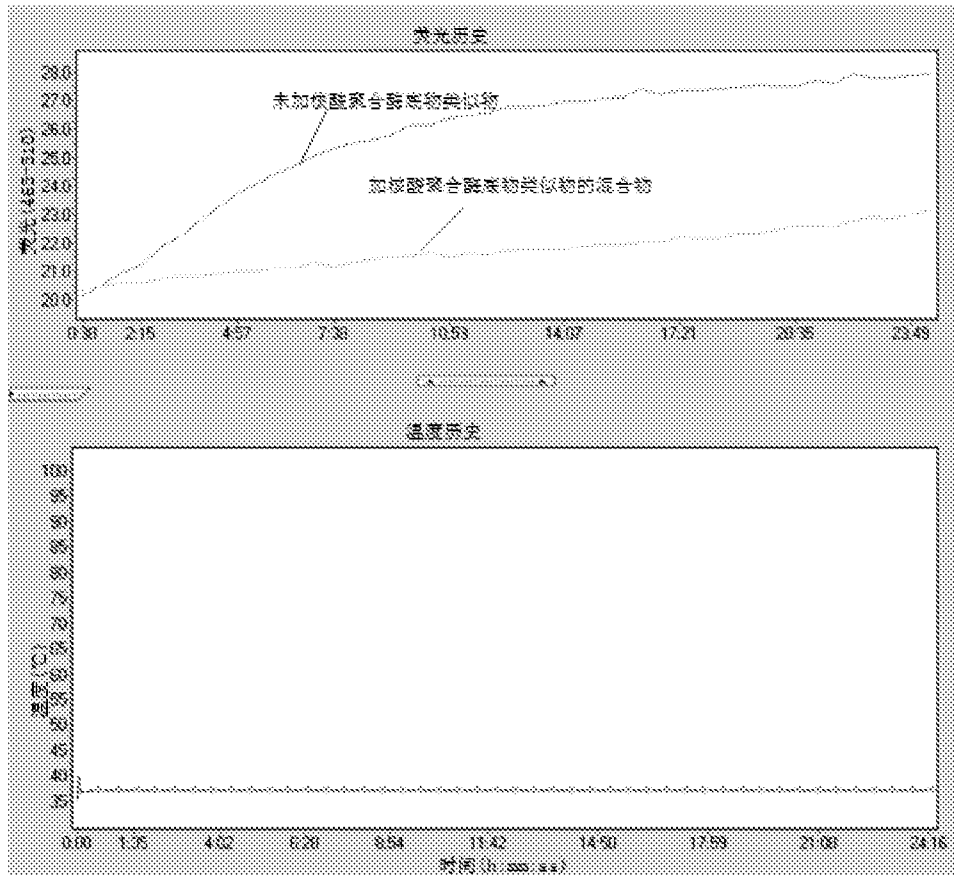


图 16

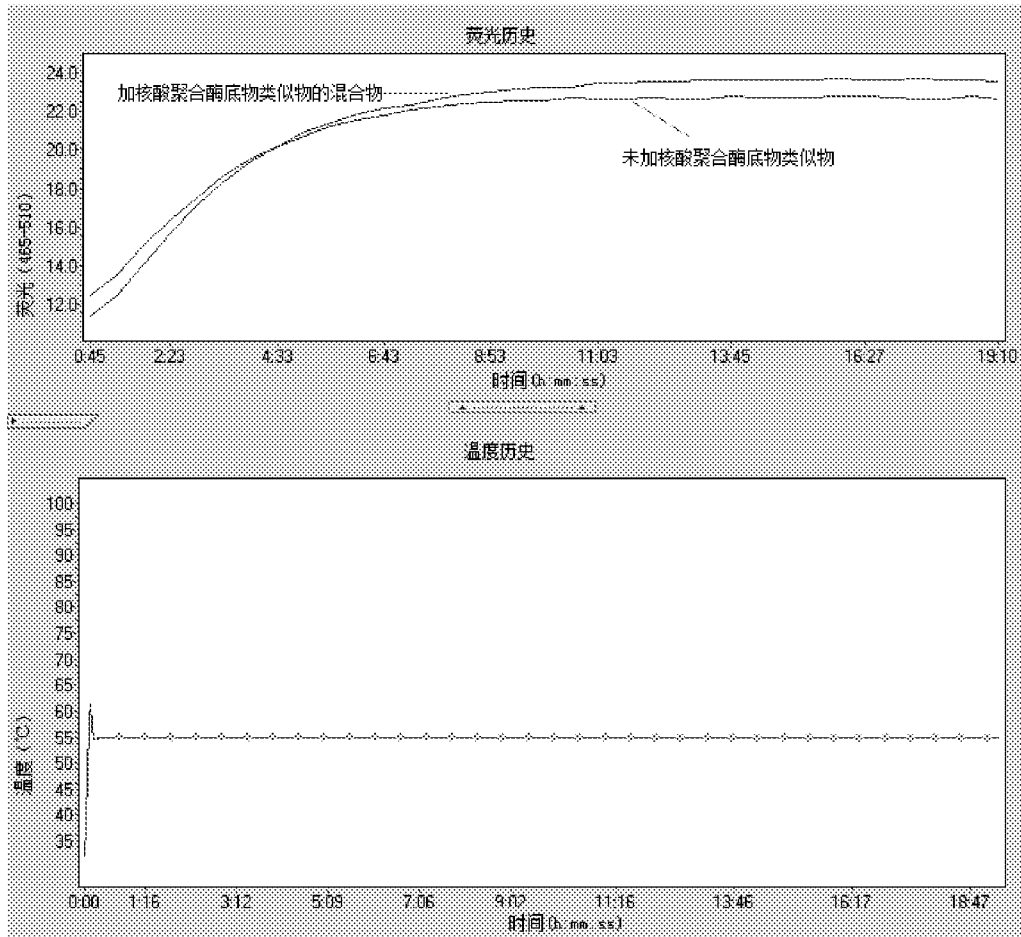


图 17

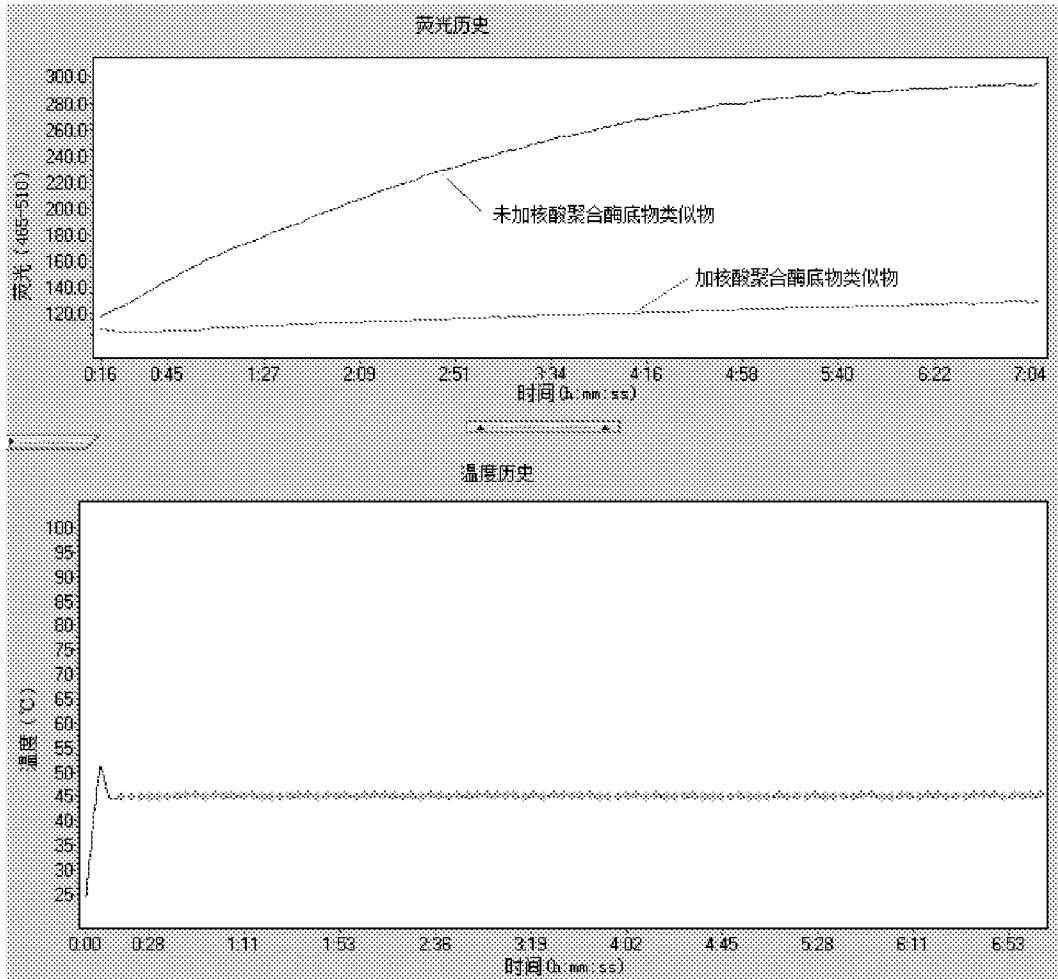


图 18

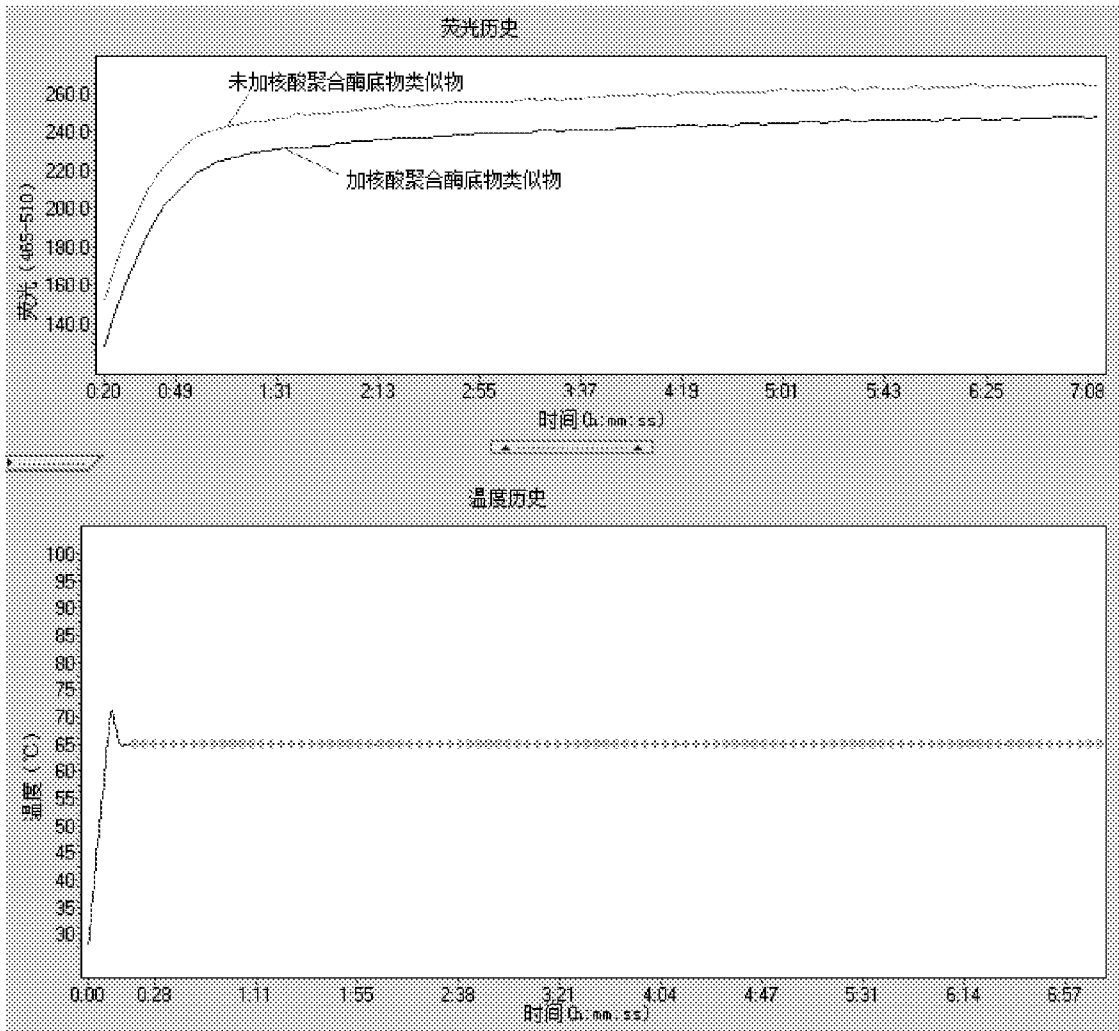


图 19

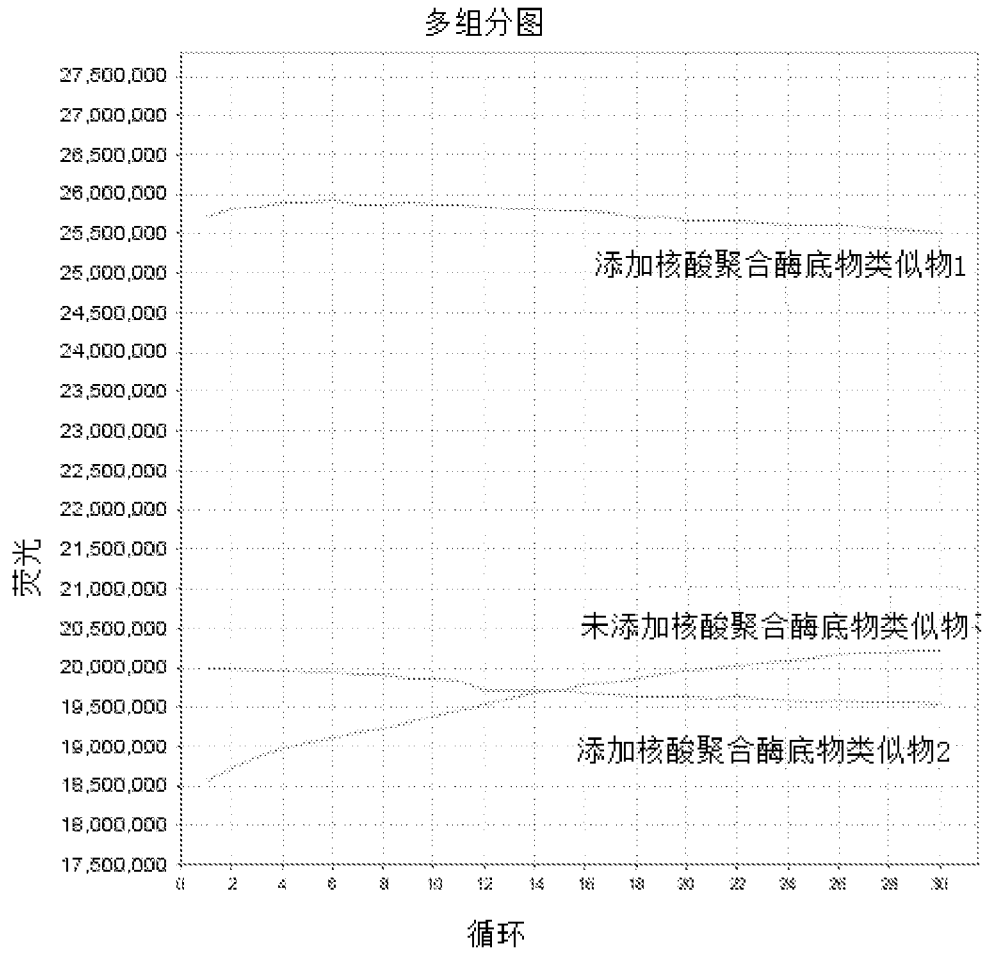


图 20

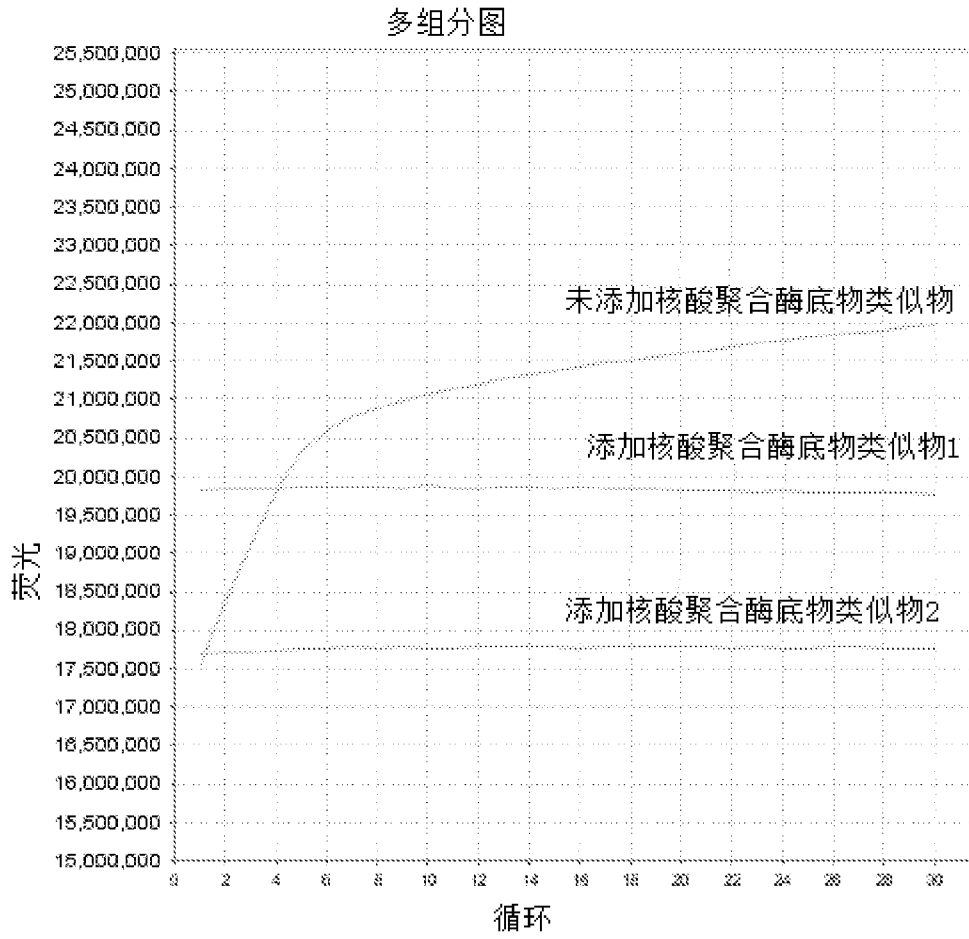


图 21

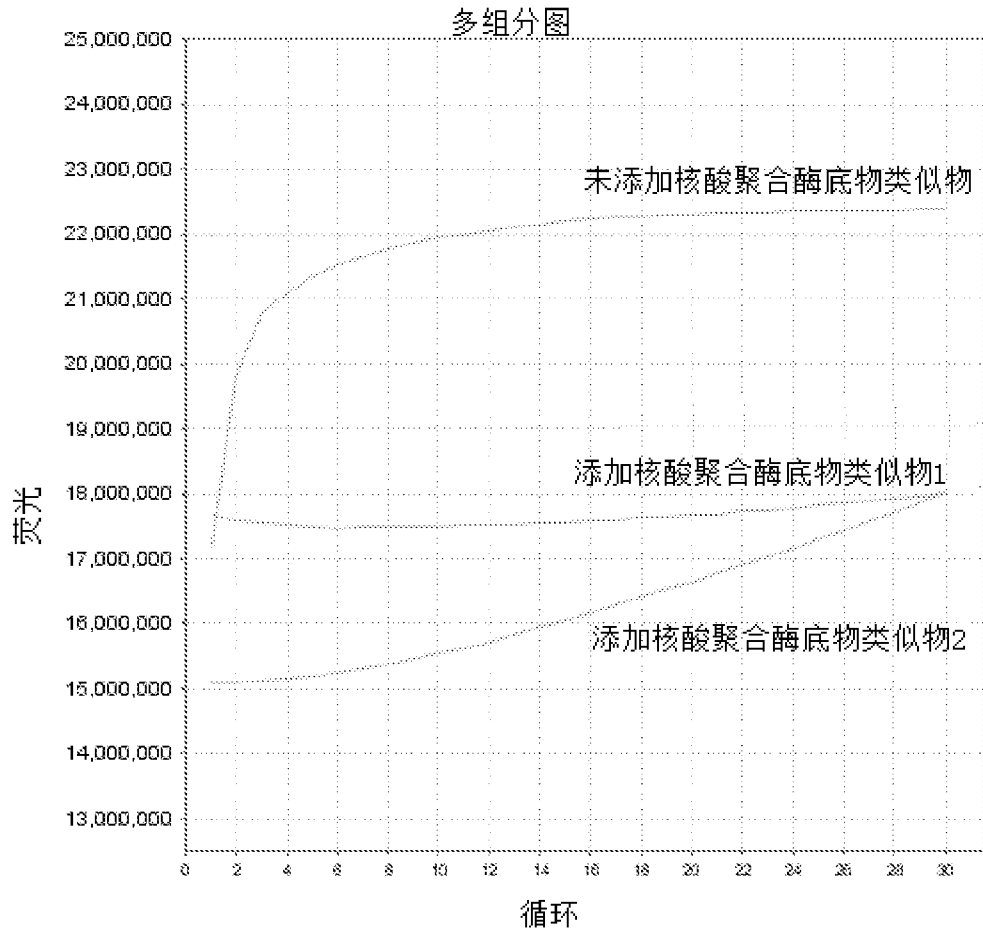


图 22

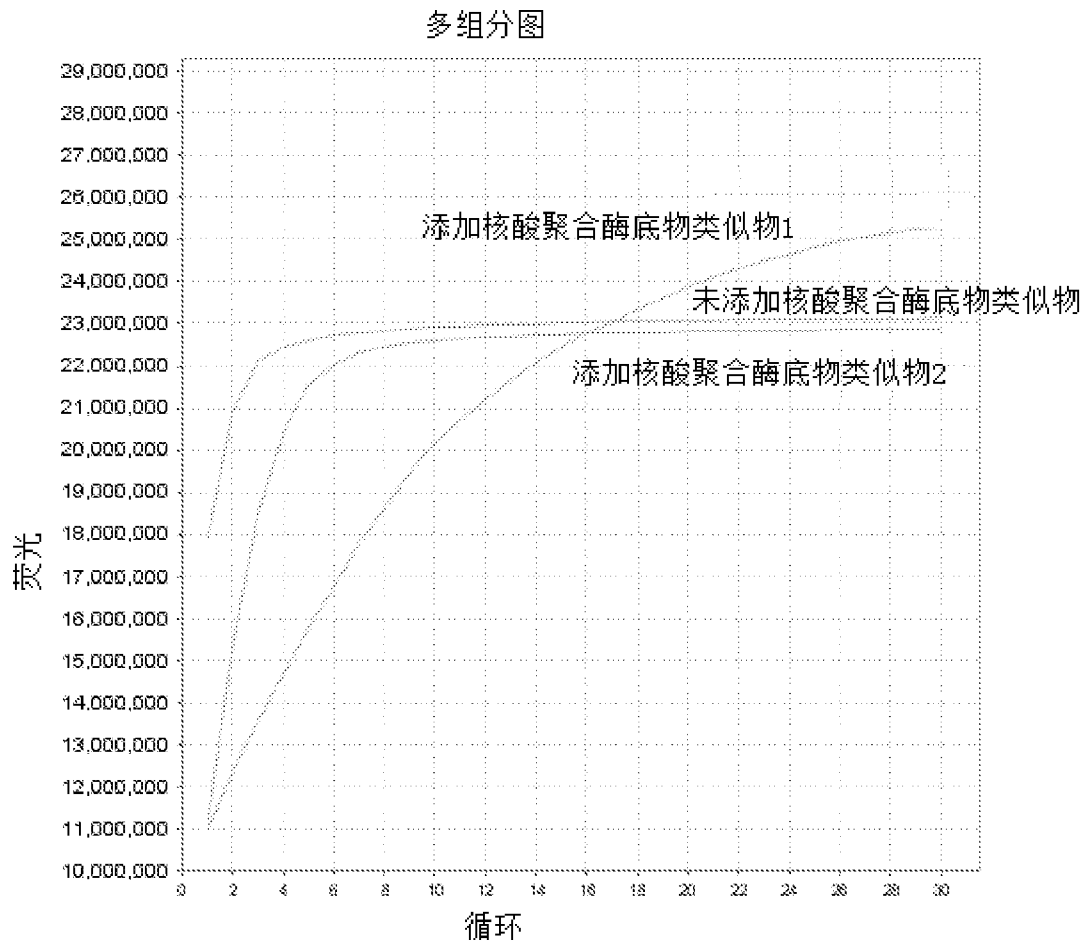


图 23

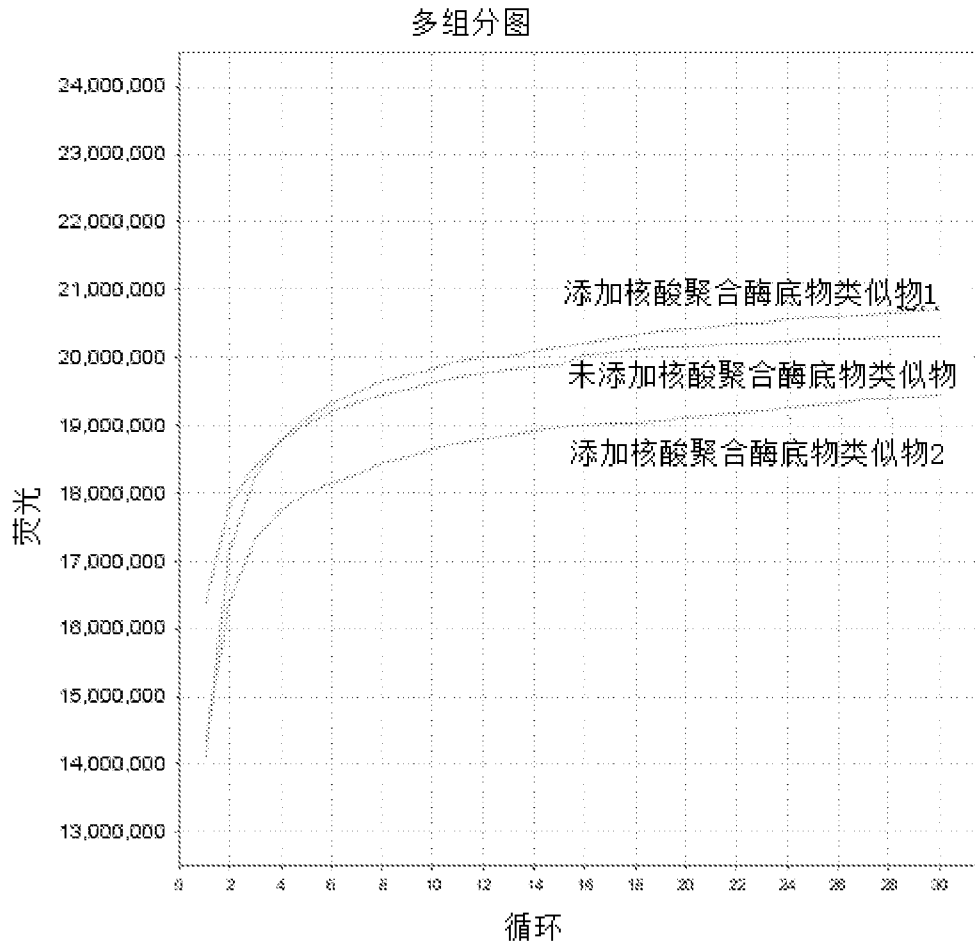


图 24

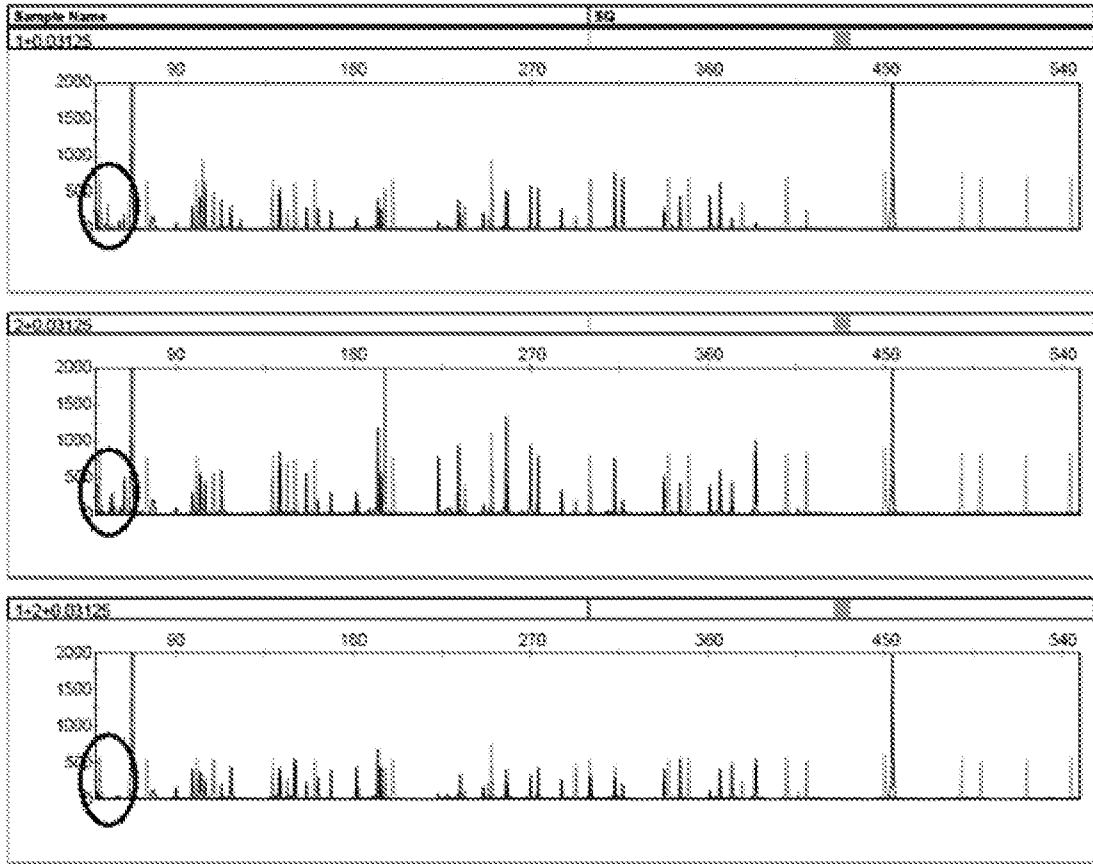


图 25

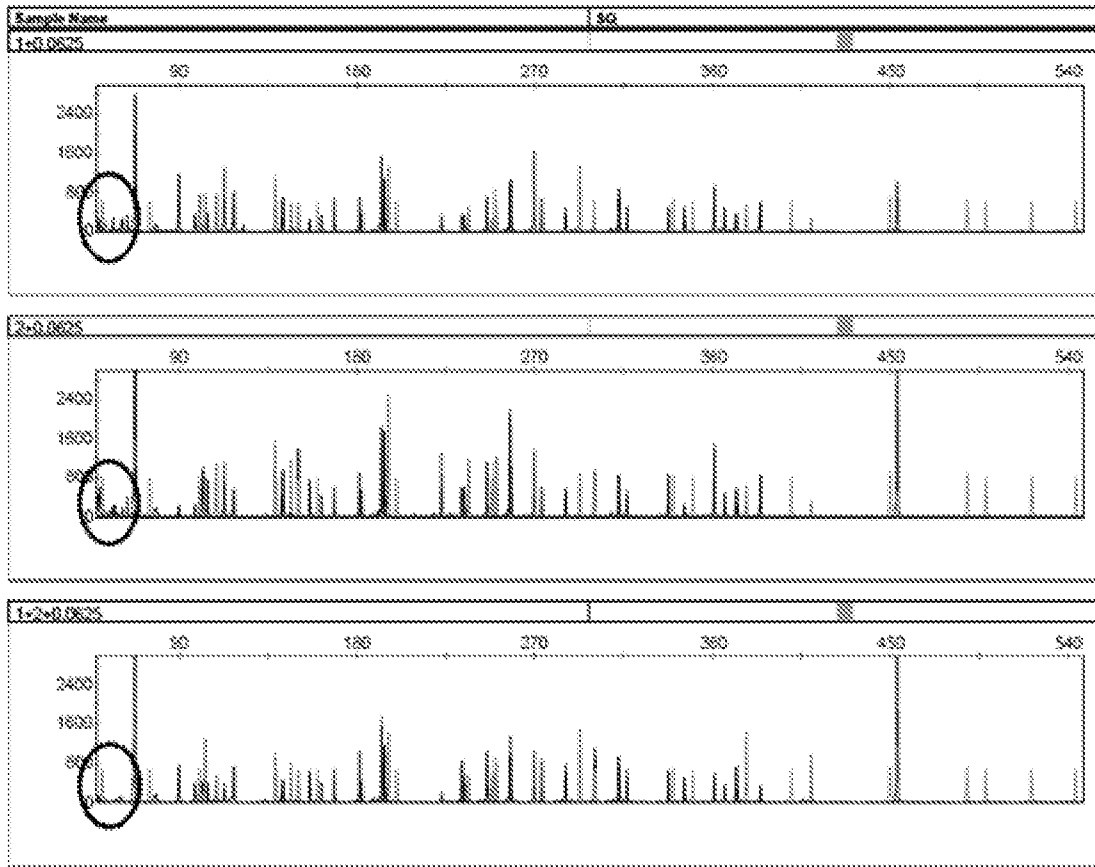


图 26

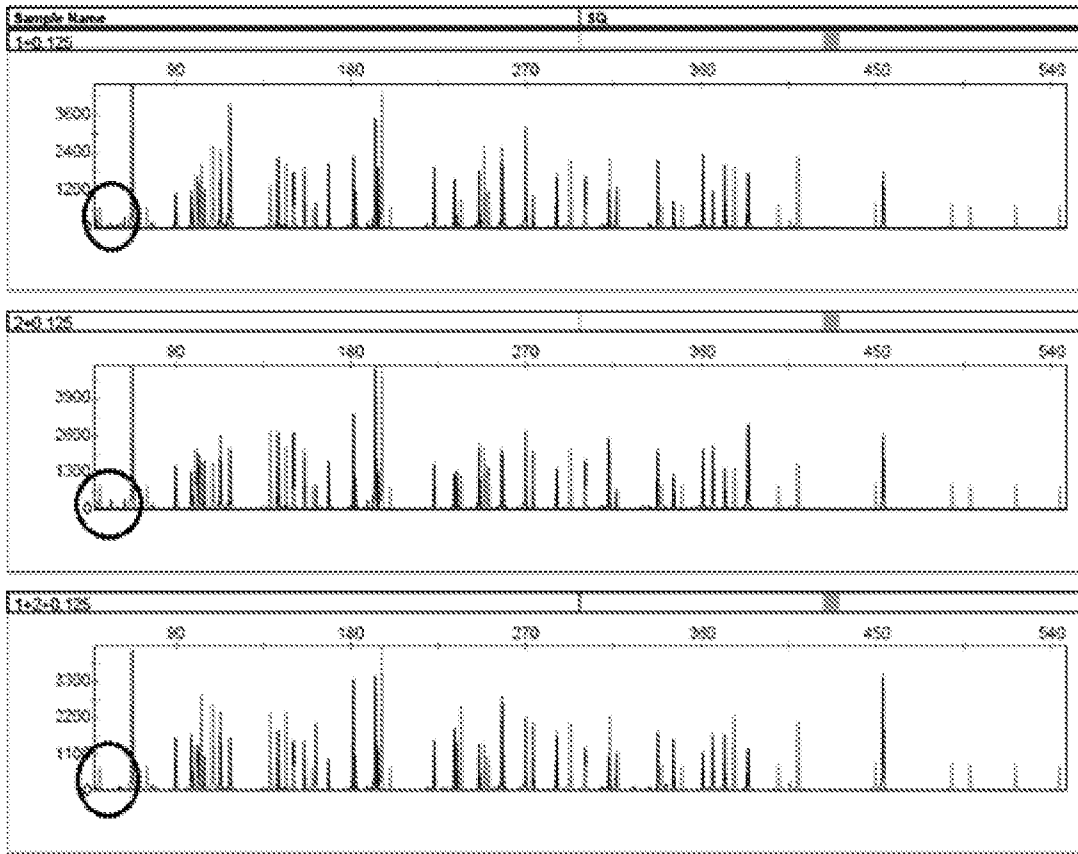


图 27

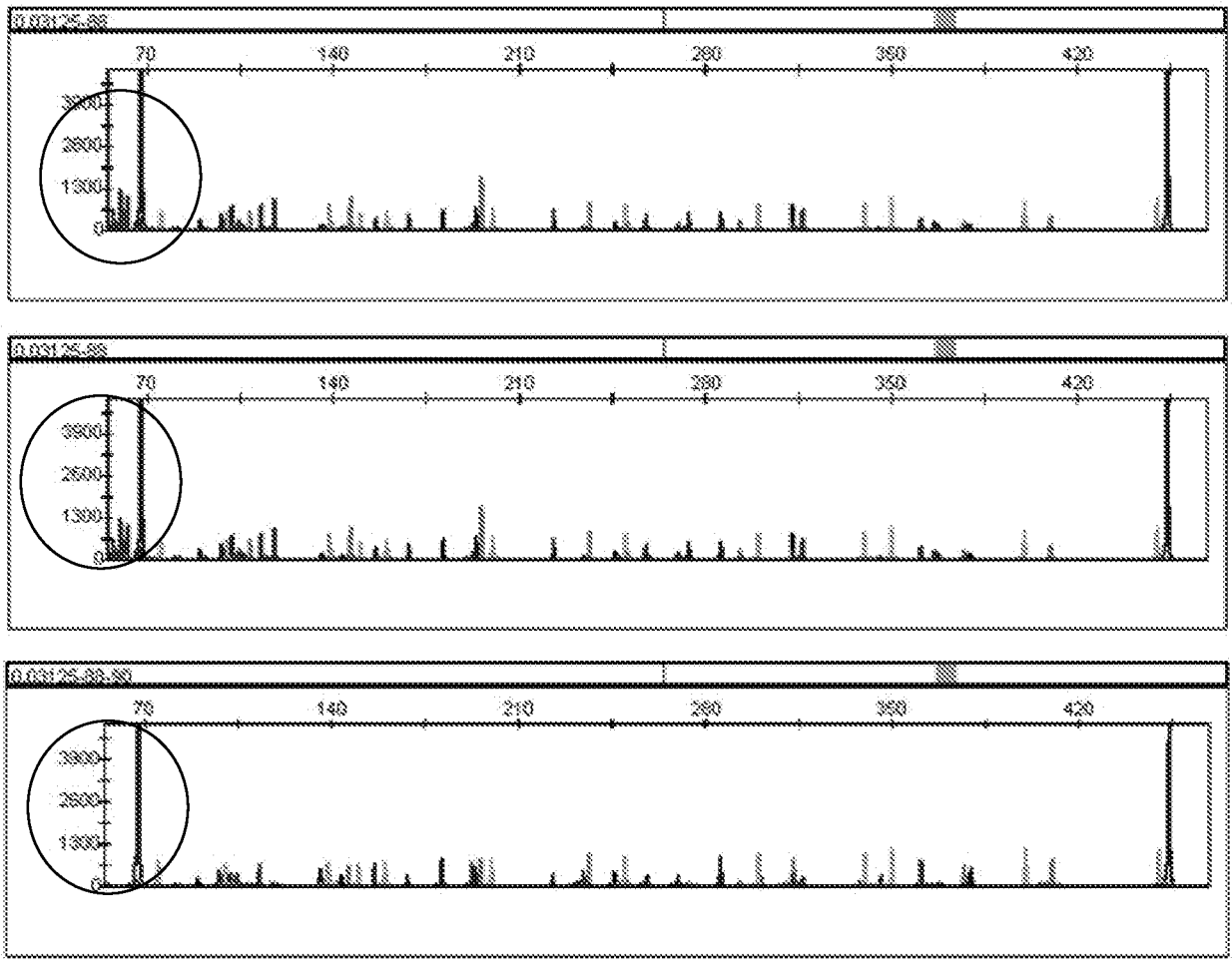


图 28

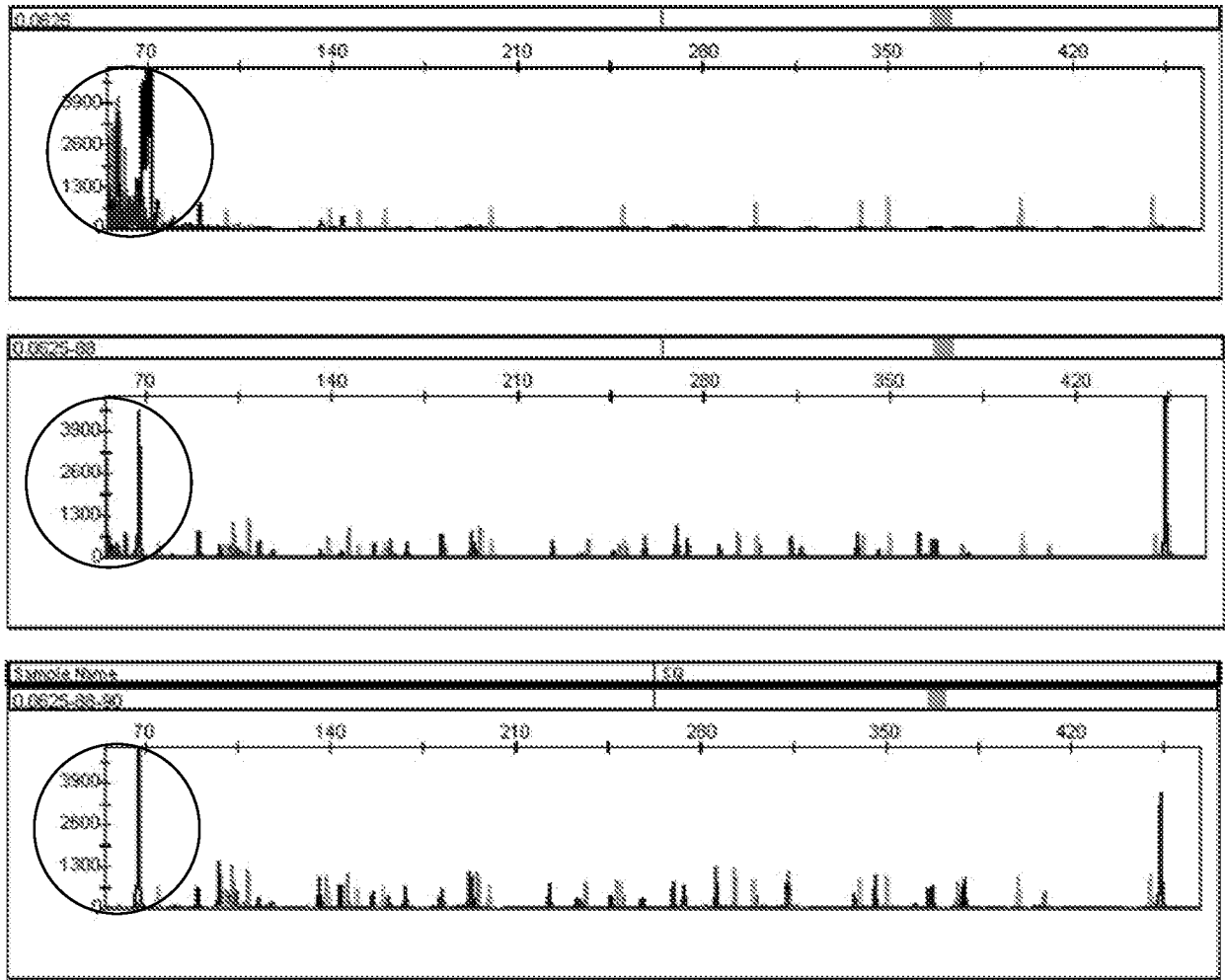


图 29

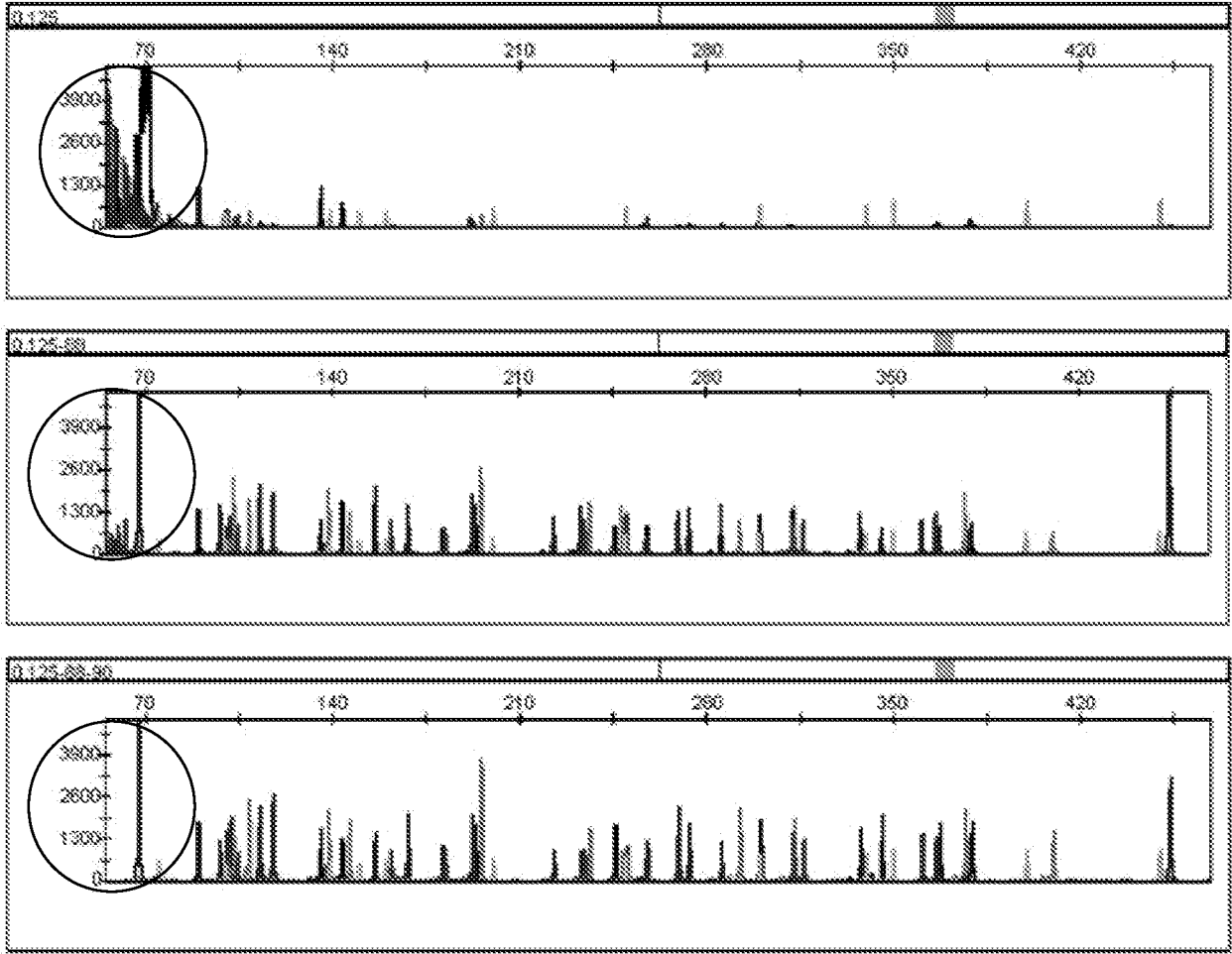


图 30

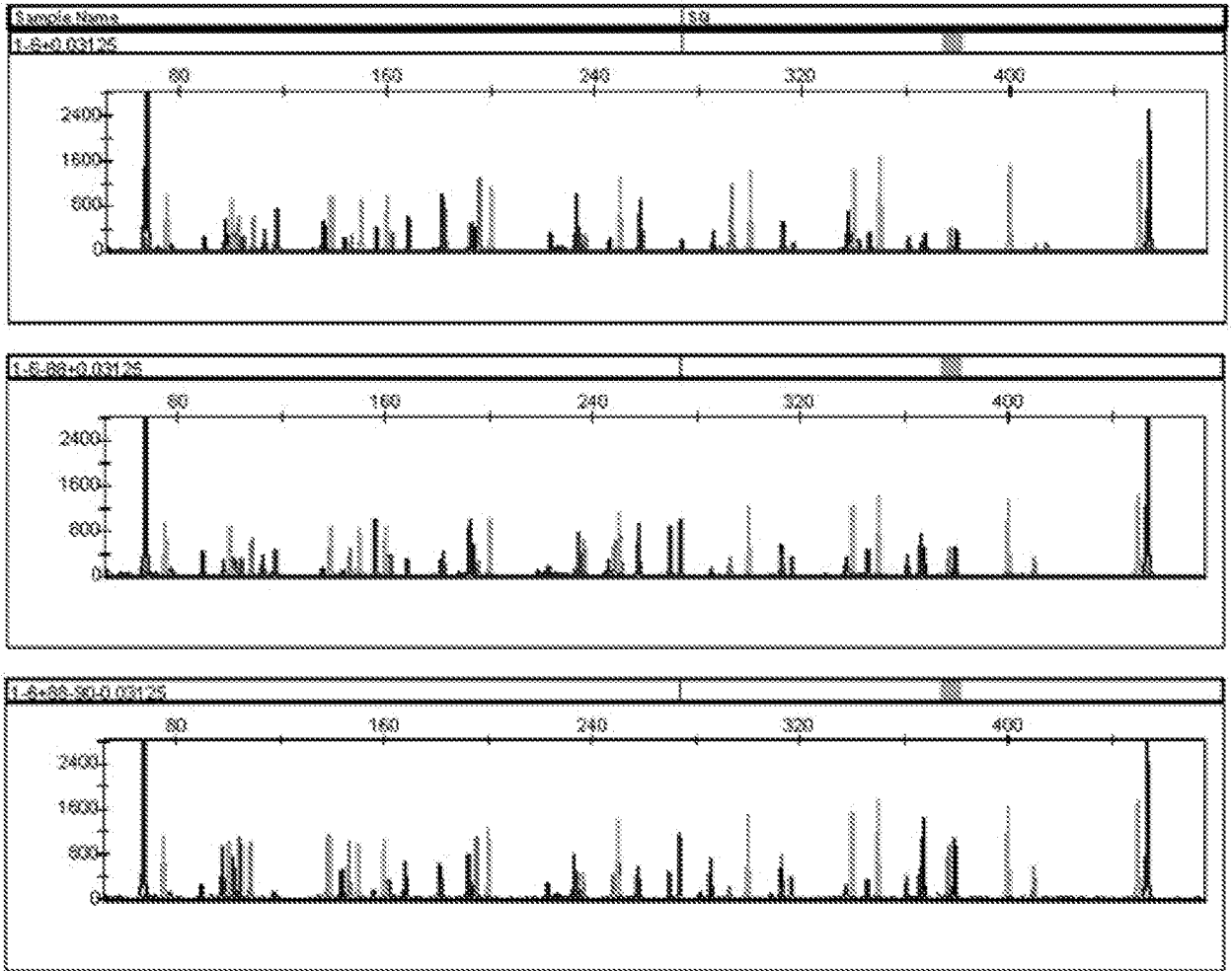


图 31

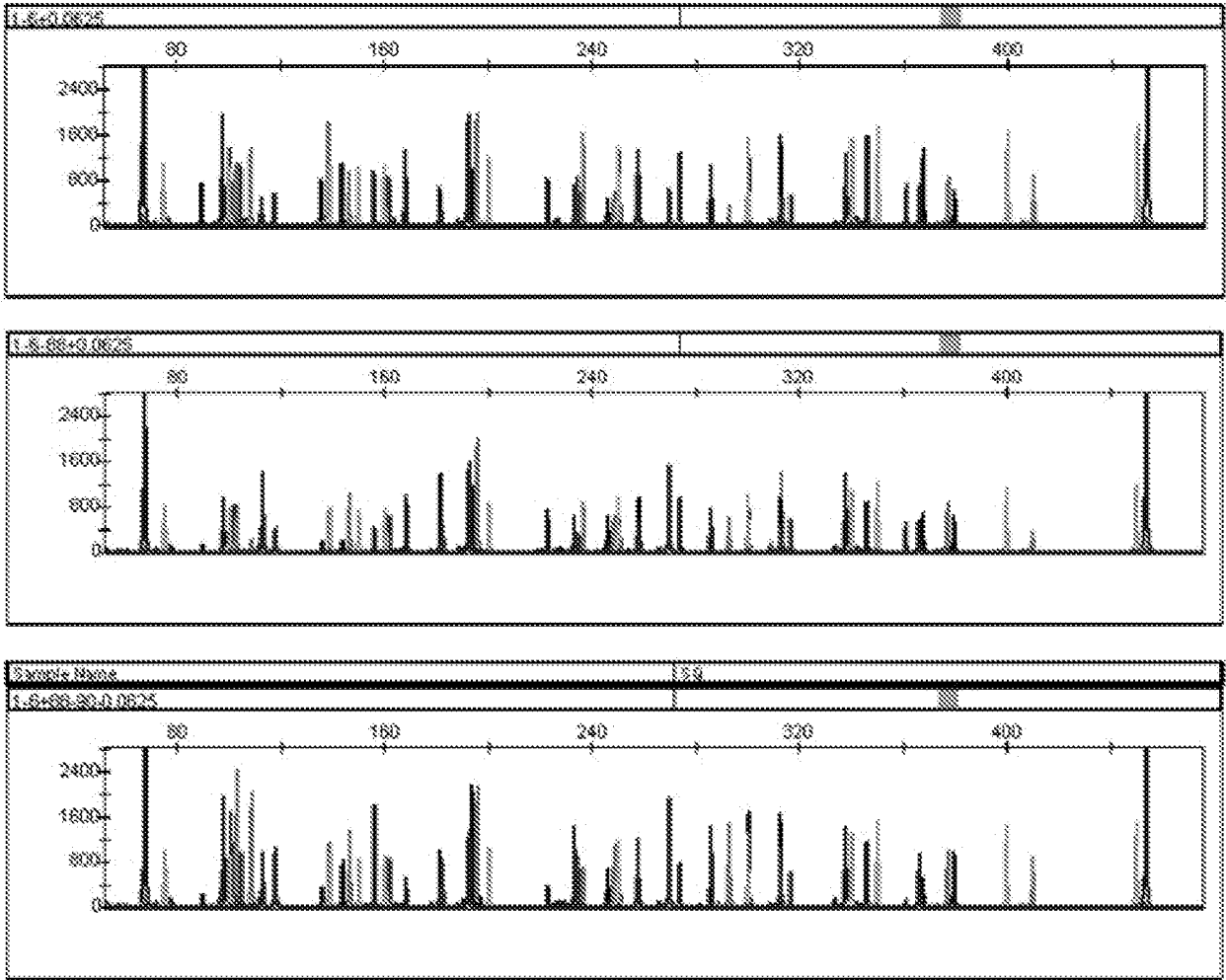


图 32

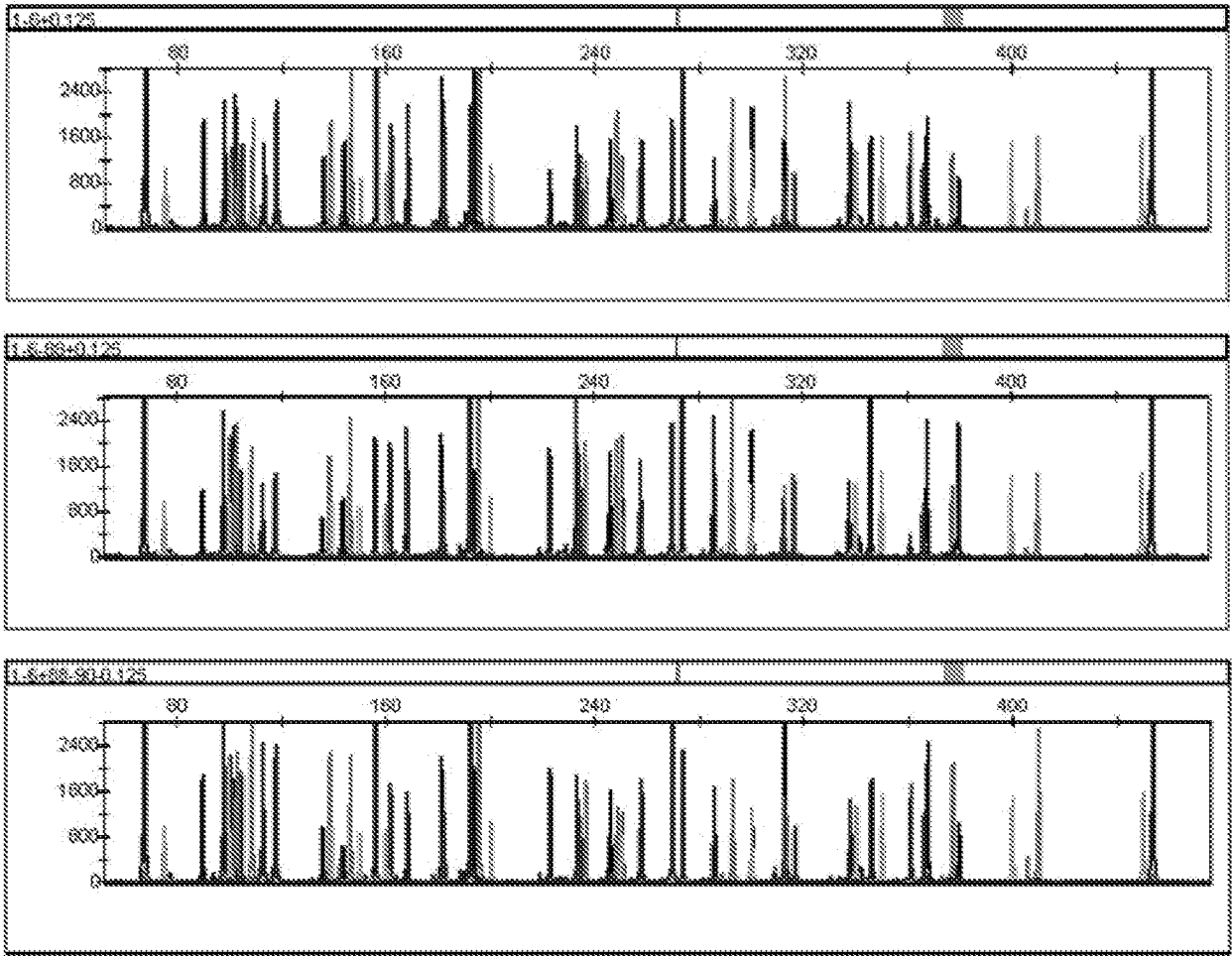


图 33

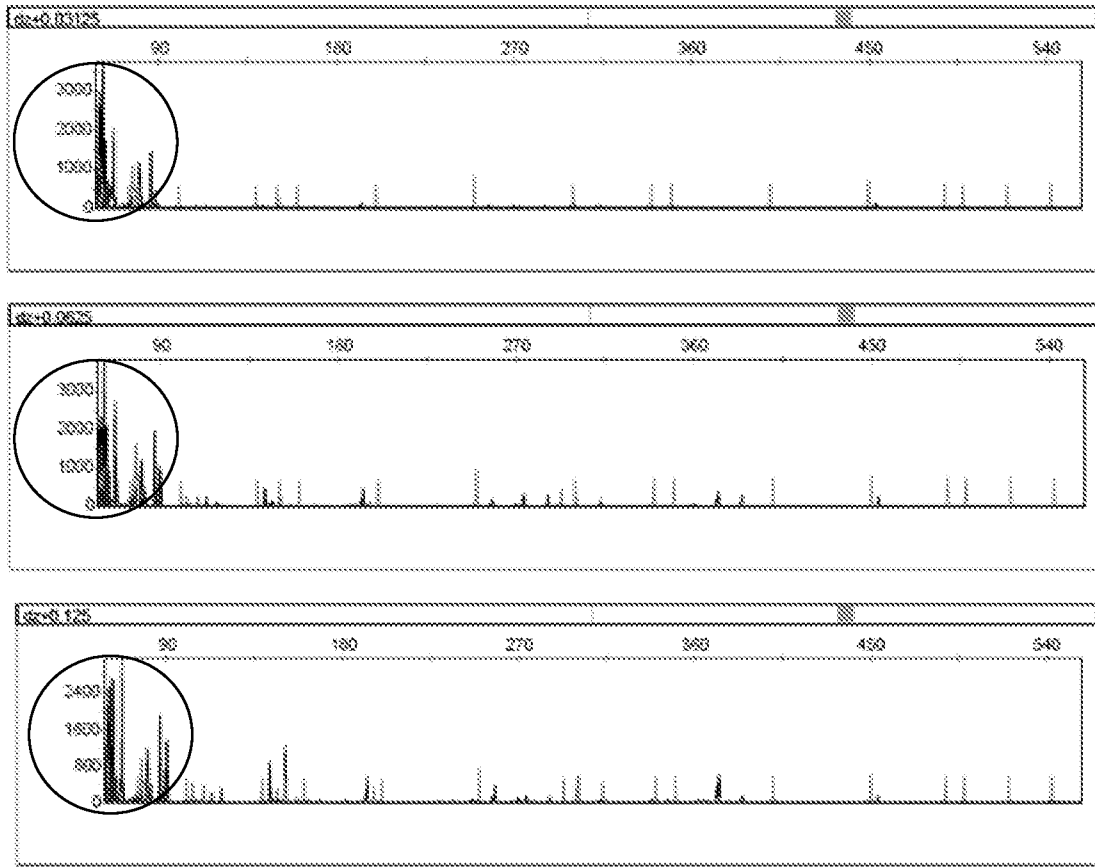


图 34

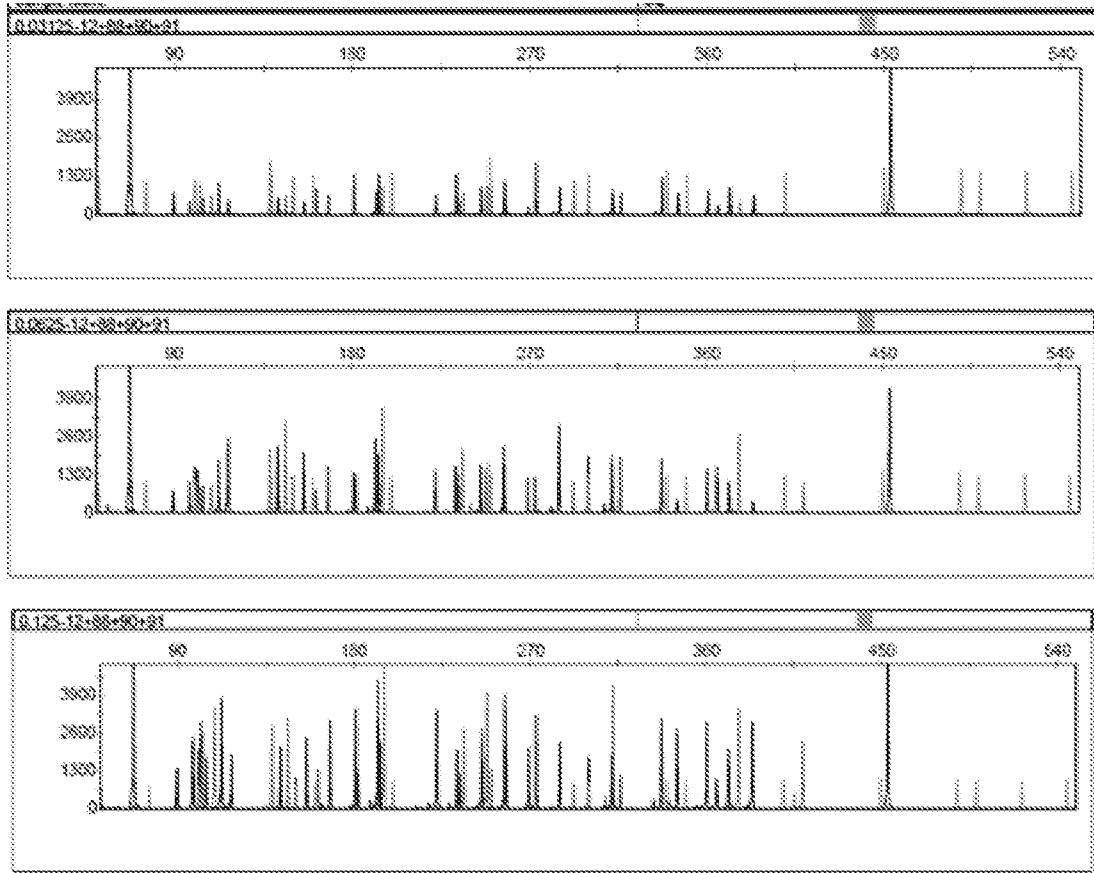


图 35

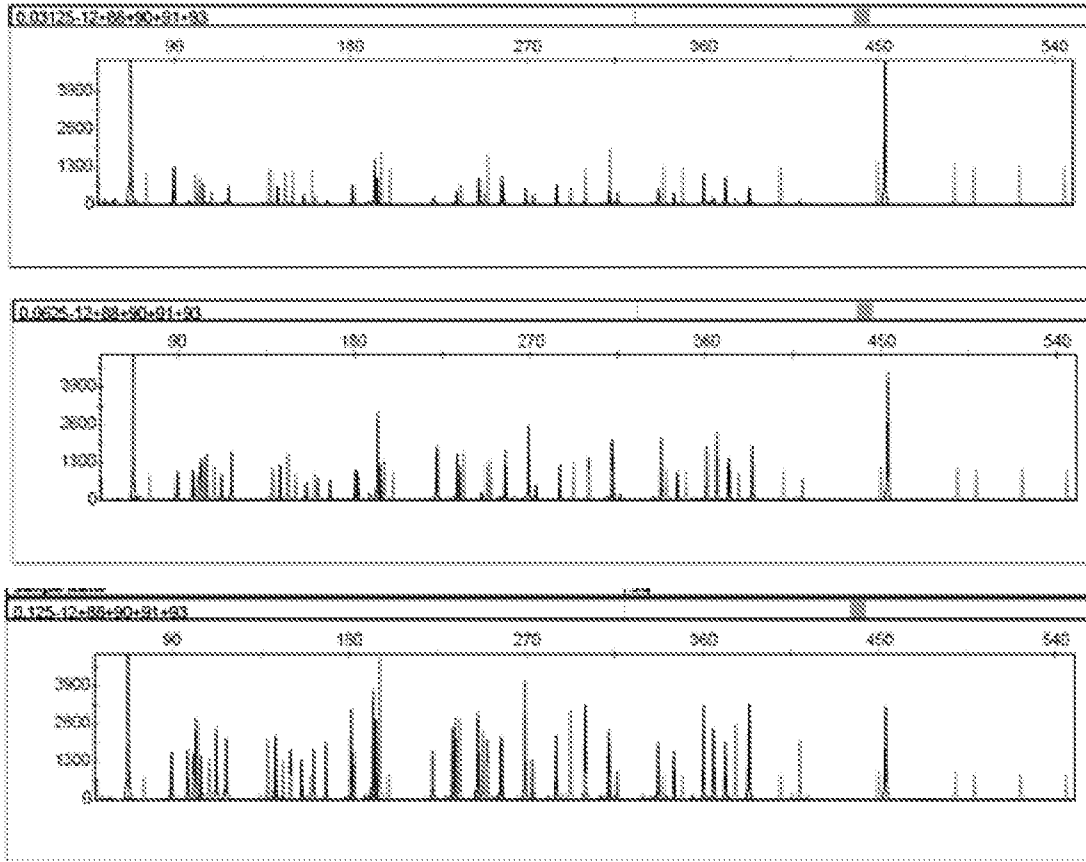


图 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/101244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07H 21/00(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H; C12N; C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; PUBMED; 万方数据库; 苏州新海, 类似物, 核酸, 配体, 抑制, 阻断, 核酸聚合酶, 修饰, 温度, 发卡结构, ligand, analog, inhibit, block, polymerase, modify, modification, temperature, hairpin; GENBANK+EMBL+STN+China Patents Biological Sequence Search System: sequence search for SEQ ID NOS: 1-28.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAINZ.P. et al. "Specificity-enhanced hot-start PCR: Addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature" <i>Bio Techniques</i> , Vol. 28, No. 2, 28 February 2000 (2000-02-28), ISSN: 0736-6205, pages 278-282, see abstract, pages 278-279, 281-282, table 1 figure 5	1-23
Y	US 6183967 B1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 06 February 2001 (2001-02-06) see abstract, claims 1-21, column 15	1-23
Y	US 6020130 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC.) 01 February 2000 (2000-02-01) see entire document	1-23
A	CN 104845967 A (SUZHOU NUHIGH BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 19 August 2015 (2015-08-19) see entire document	1-23
A	CN 1973048 A (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES CORP.) 30 May 2007 (2007-05-30) see entire document	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 September 2021		Date of mailing of the international search report 24 September 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/101244

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2018110590 A (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.) 19 July 2018 (2018-07-19) see entire document	1-23
A	US 6194141 B1 (UNIV NEW YORK STATE RES FOUND) 27 February 2001 (2001-02-27) see entire document	1-23
A	JIA Y.W.. et al. "Kinetic Hairpin Oligonucleotide Blockers for Selective Amplification of Rare Mutations" <i>SCIENTIFIC REPORTS</i> , Vol. 4, 01 August 2014 (2014-08-01), ISSN: 2045-2322, pp. 1-8, see entire document	1-23

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/101244

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	6183967	B1	06 February 2001	US	6183967	B2	06 February 2001
US	6020130	A	01 February 2000	EP	2080813	B1	05 January 2011
				EP	0833944	A1	08 April 1998
				JP	2009106277	A	21 May 2009
				DK	2080813	T3	28 March 2011
				PT	833944	E	14 April 2009
				AU	726844	B2	23 November 2000
				AT	420202	T	15 January 2009
				ES	2321243	T3	03 June 2009
				AT	494394	T	15 January 2011
				EP	2080813	A1	22 July 2009
				EP	0833944	B1	07 January 2009
				WO	9641010	A1	19 December 1996
				DK	0833944	T3	11 May 2009
				DE	69637805	D1	26 February 2009
				DE	69638318	D1	17 February 2011
				JP	4335975	B2	30 September 2009
				JP	H11507223	A	29 June 1999
				AU	6159896	A	30 December 1996
				CA	2223078	A1	19 December 1996
				EP	0833944	A4	01 December 1999
				CA	2223078	C	25 November 2008
CN	104845967	A	19 August 2015	EP	3283630	A4	14 November 2018
				WO	2016165210	A1	20 October 2016
				US	2018030523	A1	01 February 2018
				CN	104845967	B	11 December 2020
				US	2021040553	A1	11 February 2021
				JP	2017534246	A	24 November 2017
				JP	6417032	B2	31 October 2018
				EP	3283630	A1	21 February 2018
CN	1973048	A	30 May 2007	WO	2004072297	A2	26 August 2004
				JP	2007524358	A	30 August 2007
				CN	1973048	B	03 June 2015
				US	2003162213	A1	28 August 2003
				AU	2004211588	A1	26 August 2004
				US	7223541	B2	29 May 2007
				EP	1590475	A2	02 November 2005
				CA	2513672	A1	26 August 2004
				EP	1590475	A4	03 October 2007
				CA	2513672	C	14 January 2014
				WO	2004072297	A3	18 January 2007
JP	2018110590	A	19 July 2018	EP	2644709	B1	17 December 2014
				US	2014106433	A1	17 April 2014
				JP	2014014371	A	30 January 2014
				CA	2722541	A1	05 November 2009
				US	2019002865	A1	03 January 2019
				AU	2009242546	B2	22 January 2015
				WO	2009135093	A2	05 November 2009
				EP	2279263	A2	02 February 2011
				EP	2644710	A1	02 October 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/101244

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)	
		JP 2017104108 A	15 June 2017	
		EP 3150727 B1	10 July 2019	
		EP 2644707 A1	02 October 2013	
		EP 2644708 A1	02 October 2013	
		CA 2722541 C	10 January 2017	
		WO 2009135093 A3	15 April 2010	
		JP 2015221036 A	10 December 2015	
		US 2017355978 A1	14 December 2017	
		EP 2644709 A1	02 October 2013	
		JP 6453296 B2	16 January 2019	
		AU 2009242546 A1	05 November 2009	
		US 9644198 B2	09 May 2017	
		EP 3150727 A1	05 April 2017	
		DK 2279263 T3	11 November 2013	
		EP 2279263 B1	04 September 2013	
		US 2009325169 A1	31 December 2009	
		DK 2644707 T3	29 June 2015	
		JP 2017104109 A	15 June 2017	
		JP 5539325 B2	02 July 2014	
		EP 2644710 B1	21 December 2016	
		JP 6510695 B2	08 May 2019	
		EP 2644707 B1	03 June 2015	
		JP 2011521624 A	28 July 2011	
		JP 6276835 B2	07 February 2018	
		EP 2644708 B1	17 December 2014	
US	6194141	B1	27 February 2001	None

A. 主题的分类 C07H 21/00(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; C12P 19/34(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07H; C12N; C12P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;WEB OF SCIENCE;PUBMED;万方数据库:苏州新海, 类似物, 核酸, 配体, 抑制, 阻断, 核酸聚合酶, 修饰, 温度, 发卡结构, ligand, analog, inhibit, block, polymerase, modify, modification, temperature, hairpin; GENBANK+EMBL+STN+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID N0s:1-28的序列检索。		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	KAINZ.P. 等. "Specificity-enhanced hot-start PCR: Addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature" Bio Techniques, 第28卷, 第2期, 2000年 2月 28日 (2000 - 02 - 28), ISSN: 0736-6205, 第278-282页, 参见摘要, 第278-279, 281-282页, 表1图5	1-23
Y	US 6183967 B1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 2001年 2月 6日 (2001 - 02 - 06) 参见摘要, 权利要求1-21, 第15栏	1-23
Y	US 6020130 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 2000年 2月 1日 (2000 - 02 - 01) 参见全文	1-23
A	CN 104845967 A (苏州新海生物科技有限公司) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 参见全文	1-23
A	CN 1973048 A (通用电气医疗集团生物科学公司) 2007年 5月 30日 (2007 - 05 - 30) 参见全文	1-23
A	JP 2018110590 A (INTEGRATED DNA TECH INC) 2018年 7月 19日 (2018 - 07 - 19) 参见全文	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2021年 9月 6日	2021年 9月 24日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	李肖堃 电话号码 62411615	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 6194141 B1 (UNIV NEW YORK STATE RES FOUND) 2001年 2月 27日 (2001 - 02 - 27) 参见全文	1-23
A	JIA Y.W..等. "Kinetic Hairpin Oligonucleotide Blockers for Selective Amplification of Rare Mutations" SCIENTIFIC REPORTS, 第4卷, 2014年 8月 1日 (2014 - 08 - 01), ISSN: 2045-2322, 第1-8页, 参见全文	1-23

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/101244

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	6183967	B1	2001年 2月 6日	US	6183967	B2	2001年 2月 6日
US	6020130	A	2000年 2月 1日	EP	2080813	B1	2011年 1月 5日
				EP	0833944	A1	1998年 4月 8日
				JP	2009106277	A	2009年 5月 21日
				DK	2080813	T3	2011年 3月 28日
				PT	833944	E	2009年 4月 14日
				AU	726844	B2	2000年 11月 23日
				AT	420202	T	2009年 1月 15日
				ES	2321243	T3	2009年 6月 3日
				AT	494394	T	2011年 1月 15日
				EP	2080813	A1	2009年 7月 22日
				EP	0833944	B1	2009年 1月 7日
				WO	9641010	A1	1996年 12月 19日
				DK	0833944	T3	2009年 5月 11日
				DE	69637805	D1	2009年 2月 26日
				DE	69638318	D1	2011年 2月 17日
				JP	4335975	B2	2009年 9月 30日
				JP	H11507223	A	1999年 6月 29日
				AU	6159896	A	1996年 12月 30日
				CA	2223078	A1	1996年 12月 19日
				EP	0833944	A4	1999年 12月 1日
				CA	2223078	C	2008年 11月 25日
CN	104845967	A	2015年 8月 19日	EP	3283630	A4	2018年 11月 14日
				WO	2016165210	A1	2016年 10月 20日
				US	2018030523	A1	2018年 2月 1日
				CN	104845967	B	2020年 12月 11日
				US	2021040553	A1	2021年 2月 11日
				JP	2017534246	A	2017年 11月 24日
				JP	6417032	B2	2018年 10月 31日
				EP	3283630	A1	2018年 2月 21日
CN	1973048	A	2007年 5月 30日	WO	2004072297	A2	2004年 8月 26日
				JP	2007524358	A	2007年 8月 30日
				CN	1973048	B	2015年 6月 3日
				US	2003162213	A1	2003年 8月 28日
				AU	2004211588	A1	2004年 8月 26日
				US	7223541	B2	2007年 5月 29日
				EP	1590475	A2	2005年 11月 2日
				CA	2513672	A1	2004年 8月 26日
				EP	1590475	A4	2007年 10月 3日
				CA	2513672	C	2014年 1月 14日
				WO	2004072297	A3	2007年 1月 18日
JP	2018110590	A	2018年 7月 19日	EP	2644709	B1	2014年 12月 17日
				US	2014106433	A1	2014年 4月 17日
				JP	2014014371	A	2014年 1月 30日
				CA	2722541	A1	2009年 11月 5日
				US	2019002865	A1	2019年 1月 3日
				AU	2009242546	B2	2015年 1月 22日
				WO	2009135093	A2	2009年 11月 5日
				EP	2279263	A2	2011年 2月 2日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/101244

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		EP 2644710 A1	2013年 10月 2日
		JP 2017104108 A	2017年 6月 15日
		EP 3150727 B1	2019年 7月 10日
		EP 2644707 A1	2013年 10月 2日
		EP 2644708 A1	2013年 10月 2日
		CA 2722541 C	2017年 1月 10日
		WO 2009135093 A3	2010年 4月 15日
		JP 2015221036 A	2015年 12月 10日
		US 2017355978 A1	2017年 12月 14日
		EP 2644709 A1	2013年 10月 2日
		JP 6453296 B2	2019年 1月 16日
		AU 2009242546 A1	2009年 11月 5日
		US 9644198 B2	2017年 5月 9日
		EP 3150727 A1	2017年 4月 5日
		DK 2279263 T3	2013年 11月 11日
		EP 2279263 B1	2013年 9月 4日
		US 2009325169 A1	2009年 12月 31日
		DK 2644707 T3	2015年 6月 29日
		JP 2017104109 A	2017年 6月 15日
		JP 5539325 B2	2014年 7月 2日
		EP 2644710 B1	2016年 12月 21日
		JP 6510695 B2	2019年 5月 8日
		EP 2644707 B1	2015年 6月 3日
		JP 2011521624 A	2011年 7月 28日
		JP 6276835 B2	2018年 2月 7日
		EP 2644708 B1	2014年 12月 17日
US	6194141	B1	2001年 2月 27日
			无