

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815605.6

[51] Int. Cl.

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379879C

[22] 申请日 2002.6.14 [21] 申请号 02815605.6

[30] 优先权

[32] 2001.6.14 [33] US [31] 60/297,773

[86] 国际申请 PCT/SE2002/001155 2002.6.14

[87] 国际公布 WO2002/103039 英 2002.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.9

[73] 专利权人 卡维迪技术有限公司

地址 瑞典乌普萨拉

[72] 发明人 C·凯兰德 I·彼得松

S·格罗诺维茨 邵兴无

[56] 参考文献

WO0101129A2 2001.1.4

审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于测量 DNA 聚合作用的方法及其应用

[57] 摘要

描述了一种用于测量生物样品中依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的方法。所述方法包括下述步骤：提供一种与固相结合的引物，所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对；使所述引物构建体与含有其序列的一部分与所述引物互补的单链脱氧核苷酸模板和四种脱氧核苷三磷酸的反应混合物接触，其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别；向所述混合物中加入包含所述 DNA 聚合酶例如逆转录病毒逆转录酶(RT)的生物样品；让所述聚合酶反应进行；将所述固定化反应产物与所述标记抗体一起温育；检测结合标记抗体的量；并且测量掺入的修饰脱氧核苷三磷酸的量，作为所述 DNA 聚合作用的测量结果，可将其用于药物敏感性测试。也公开了一种商业成套试

1. 一种用于测量生物样品中依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的方法，所述方法包括下述步骤：

a) 提供一种与固相结合引物，所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对，

b) 使所述引物构建体与含有单链脱氧核苷酸模板构建体和四种脱氧核苷三磷酸的反应混合物接触，其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别，其中单链脱氧核苷酸模板构建体从 5' 端起由重复的腺嘌呤序列、可变部分和与所述引物互补的序列组成，所述可变部分含有胞嘧啶-胸腺嘧啶-鸟嘌呤重复序列或胞嘧啶-胸腺嘧啶-鸟嘌呤-腺嘌呤重复序列，

c) 向 b) 的混合物中加入包含所述 DNA 聚合酶的生物样品，

d) 让所述聚合酶反应进行，

e) 将由 d) 产生的固定化反应产物与所述标记抗体一起温育，

f) 借助所用的标记检测结合的标记抗体的量，和

g) 借助所述结合抗体的标记测量掺入的修饰脱氧核苷三磷酸的量，作为所述 DNA 聚合作用的测量结果。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 DNA 聚合酶是逆转录病毒逆转录酶。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述逆转录病毒 RT 是人免疫缺陷病毒。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述经修饰的脱氧核苷三磷酸是 5-溴脱氧尿苷 5'-三磷酸，而所述标记抗体是碱性磷酸酶缀合的抗 BrU 单克隆抗体。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中将所测量的 DNA 聚合作用用于药物敏感性测试。

6. 一种商业成套试剂，所述商业成套试剂包括依照权利要求 1-

4 中任一项用于测量依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的书面说明和/或数据载体说明, 所述商业成套试剂包括下列组分:

a) 一种与固相结合引物, 所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对,

b) 一种单链脱氧核苷酸模板构建体, 所述模板构建体从 5'端起由重复的腺嘌呤序列、可变部分和与 a) 中的引物互补的序列组成, 所述可变部分含有胞嘧啶-胸腺嘧啶-鸟嘌呤重复序列或胞嘧啶-胸腺嘧啶-鸟嘌呤-腺嘌呤重复序列,

c) 四种脱氧核苷三磷酸, 其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别, 和

d) 标记抗体, 所述标记抗体识别 c) 中的修饰脱氧核苷三磷酸。

## 用于测量 DNA 聚合作用的方法及其应用

本发明涉及一种用于测量 DNA 聚合作用的方法及其应用。更准确地讲，本发明涉及一种用于测量依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的方法。

### 背景

近几十年来用于测量逆转录即依赖 RNA 的 DNA 聚合作用的新方法已经历了快速演变。迄今为止，关于定量测定依赖 DNA 的 DNA 聚合作的更复杂问题，受到的关注却少得多。

经典 DNA 聚合酶活性测定涉及用 DNA 酶处理的 DNA (“活化 DNA”)作为引物/模板并将放射性标记核苷酸掺入到 DNA 中(Aposhian 和 Kornberg, 1962)。对酸可沉淀的放射性的测量使得可以计算出所掺入的核苷酸量和存在的酶单位数。然而，放射性的应用目前在许多实验室受到限制并感到悲观，这是由于摆脱基于放射性的技术的总倾向而造成的。

对于 DNA 聚合酶，一种基于 ELISA 来检测掺入到新制备的 DNA 的毛地黄毒苷标记核苷酸的商业测定是可利用的(Roche Molecular Biochemicals Cat. no 1468120, US5635350)。该测定由于要使用两种不同的具有大基团的核苷酸底物类似物—作为标记的毛地黄毒苷和用于产物固定化的生物素而受到阻碍。结果，聚合反应速度和后续检测灵敏度均降低。高度偏离动力学特性的底物类似物的应用使该系统与对不同聚合酶药物敏感性研究的相关性降低。

另一个更有吸引力的替代方法是 DNA 聚合酶全酶的基于荧光的测定，该测定基于染料 PicoGreen 与双链 DNA 的特异性反应(Seville 等, 1996)。后一方法最近已加以改进，使其适合于范围更宽的不同 DNA 聚合酶(Tveit 和 Kristensen, 2001)。该测定技术上简单并且基于

天然核苷酸的应用。然而,检测灵敏度仍在与经典放射性 DNA 聚合酶测定的灵敏度相同的范围内,并且已描述的应用证明,检测范围为 0.05-0.5 U DNA 聚合酶/样品。

当前的 HIV 疗法基于多药疗法。治疗方案基于所有三种可利用药物—核苷类似物、非核苷类似物和蛋白酶抑制剂的组合。该策略是将突变病毒存活概率减至最小。

逆转录酶(RT)抑制剂或者是核苷类似物,或者是非核苷类似物。所述非核苷抑制剂与 RT 酶中活性部位附近但并不与其相邻的疏水性口袋结合。HIV-1 复制由于取代了与聚合酶结合部位相关的催化性天冬氨酸残基而在变构水平上受到抑制。

当前所用的核苷抑制剂由于其缺乏 3'-羟基而终止 DNA 链的延伸。用核苷抑制剂的长期疗法通常导致产生抗性病毒。该方法与病毒 pol 基因中不断出现的突变相关,每一突变都导致已确定氨基酸的取代(有关综述参见 Vandamme 等, 1998)。这些取代在酶水平上的作用是复杂的并且包括增强原始 DNA 的编辑功能。该反应是核苷酸依赖性的并且产生多磷酸二核苷和可延伸的 DNA 3'端(Arion 等 1998, Meyer 等 1999)。

所述 HIV-1 RT 以及其它逆转录酶进行三种不同的酶促反应: 依赖 RNA 的 DNA 聚合作用、依赖 DNA 的 DNA 聚合作用和 DNA-RNA 杂合体中 RNA 的降解(RNA 酶 H)。由 pol 基因编码的 HIV 逆转录酶是一种由一个 p66 亚基和一个 p51 亚基组成的异二聚体。依赖 RNA 的 DNA 聚合作用和依赖 DNA 的 DNA 聚合作用均通过位于所述 p66 亚基的同一活性部位进行(有关综述参见 Goff 等, 1990)。这些药物的反应机制主要根据其对依赖 RNA 的 DNA 聚合作用的作用来确定。对依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的作用研究得比较少。

假如反应机制和有效代谢药物是已知和可利用的,则病毒药物的表型敏感性可以在酶水平上进行确定。依靠酶测定的能力和所用的病毒分离技术,药物敏感性测试在理论上可以用来自病毒培养繁

殖的上清液、原代病毒分离物或者直接从患者中回收的病毒制备物来进行。常规 RT 活性测定是通过利用人工模板-引物的构建和标记脱氧核苷三磷酸作为核苷酸底物来进行的。所述模板/引物对 poly(rA)/oligo(dT)是用于测定 HIV 以及其它逆转录病毒 RT 的最有效最常用的组合。当涉及药物敏感性测试时该测定类型的一个缺点是仅可测试非核苷类似物或可以与 rA 碱基配对的类似物。其它核苷酸碱基的类似物将需要基于可变聚合物模板的测定。含有嘧啶碱基的 RNA 聚合物对 RNA 酶敏感是众所周知的,因而实际上不适合于生物样品。因此,最好是以对可变 DNA 模板计划用于药物敏感性测试的聚合酶测定为根据,前提是所述测定系统得到的结果与抑制逆转录和药物经典表型抗性试验的那些结果有关。

当前所用的 HIV 疗法是 DNA 聚合酶抑制剂效力的唯一实例。目前的情况是,涉及细菌和其它微生物中的抗性产生推动对新类别的抗微生物药物的研究。DNA 聚合酶是该项研究工作中的主要目标之一。因此,十分需要技术上简单的聚合酶测定,而不引起潜在环境危险并且可以适用于针对各种各样微生物 DNA 聚合酶同工酶的药物筛选。药物的毒性导致发现必须对相应的哺乳动物 DNA 聚合酶进行进一步评价。

可以用增殖相关聚合酶例如聚合酶- $\alpha$ 和聚合酶- $\delta$ 的定量测定来监测细胞增殖。在正文中可列举目前用胸苷激酶—另一种细胞增殖相关酶的血清水平对恶性疾病进行预后和分类(US4637977)。胸苷的磷酸化正是为 DNA 合成提供胸苷三磷酸的两种胞内合成途径之一。与胸苷激酶活性或胸苷掺入相比,对 DNA 聚合酶本身的测量可能得到对总 DNA 合成给出更准确的估计。

## 发明的描述

本发明提供一种微量滴定板形式的非放射性 DNA 聚合酶测定,使得能够进行产物的比色或荧光检测。

在一个优选的实施方案中,本发明利用作为核苷三磷酸底物的 5-溴脱氧尿苷 5'-三磷酸(BrdUTP)。BrdUTP 中 5'位溴和胸苷三磷酸中 5'位甲基之间的范德华半径的差异最小(1.95 Å 和 2.0 Å 相近),并且这两种核苷酸的酶动力学特性十分相似。所述方法可以芳构化并且其检测范围低至 3nU 聚合酶活性/样品。

本发明的应用之一是药物敏感性测试。迄今所批准的所有抗逆转录病毒药物都干扰病毒蛋白酶或 RT 的酶促反应。另外在计划中还有影响逆转录病毒整合酶功能的候选药物。

具体地说,本发明提供一种测定各种各样不同的依赖 DNA 的 DNA 聚合酶的方法。尽管所用的模板比较短,但是已证明甚至对于研究高度加工的 DNA 聚合酶系统也是适合的。证明了测定细菌聚合酶 I 和 III 的活性、哺乳动物 DNA 聚合酶 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 的活性、人血清中增殖相关聚合酶活性和 HIV RT 的依赖 DNA 的 DNA 聚合作用反应的有效性,但所述方法可以用于研究基本上所有病毒和细胞的 DNA 聚合酶。其特征之一是本发明的 DNA 聚合酶测定与现有技术的区别在于其突出的灵敏度,使检测出低至 3nU 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 活性成为可能。

因此,本发明的一方面涉及一种用于测量生物样品中依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的方法,所述方法包括下述步骤:

a) 提供一种与固相结合引物,所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对,

b) 使所述引物构建体与含有其序列的一部分与所述引物互补的单链脱氧核苷酸模板和四种脱氧核苷三磷酸的反应混合物接触,其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别,

c) 向 b)的混合物中加入包含所述 DNA 聚合酶的生物样品,

d) 让所述聚合酶反应进行,

e) 将由 d)产生的固定化反应产物与所述标记抗体一起温育,

f) 借助所用的标记检测结合的标记抗体的量,和

g) 借助所述结合抗体的标记测量掺入的修饰脱氧核苷酸的量，作为所述 DNA 聚合作用的测量结果。

在一个实施方案中，通过逆转录病毒逆转录酶(RT)例如人免疫缺陷病毒(HIV) RT，进行所述 DNA 聚合反应。

在另一个实施方案中，所述经修饰的脱氧核苷三磷酸是 5-溴脱氧尿苷 5'-三磷酸(BrdUTP)，而所述标记抗体是碱性磷酸酶(Ap)缀合的抗 BrdU 单克隆抗体。

在依照本发明方法的一个优选实施方案中，将所测量的 DNA 聚合作用用于药物敏感性测试。

进行所述药物敏感性测试以评价某一药物在哺乳动物个体中是否有效，并且可以用测试结果来选择该个体的药物治疗法。实际上，对所述个体在数个时间点进行测试，以监控所述个体中药物治疗的发展。

本发明也涉及一种商业成套试剂(package)，所述商业成套试剂包括按照本发明用于测量依赖 DNA 的 DNA 聚合作用的书面说明和/或数据载体说明。所述成套试剂至少包括下列成分：

a) 一种与固相结合的引物，所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对，

b) 一种单链脱氧核苷酸模板，所述模板具有与 a)中的引物互补的序列的一部分，

c) 四种脱氧核苷三磷酸，其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别，和

d) 标记抗体，所述标记抗体识别 c)中的修饰脱氧核苷三磷酸。

现在，通过下面非限制性描述本发明的实施方案和附图，举例说明本发明。

所引用文献的公开内容通过引用结合到本文中。

## 附图简述

图 1 证明模板序列的变异对 DNA 聚合酶 III 被 TMAU 抑制的影响。

图 2 举例说明 DNA 聚合酶测定的检测灵敏度。HIV-1 野生型 RT (◆), 哺乳动物 DNA 聚合酶 $\beta$  (●)和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (▲)。

图 3 证明所述 DNA 聚合酶测定测量所述双脱氧类似物抑制所有四种 DNA 碱基的能力。符号说明: ddATP (■), ddGTP (◆), ddCTP (●) 和 ddTTP (▲)。

图 4 显示作为对抗病毒药替诺福韦的抗性基础的生化机制基于增强依赖 ATP 的磷酸解反应。符号说明: 标准反应溶液中的 HIV-1 野生型 RT (○)。含有 ATP 的反应溶液中的 HIV-1 野生型 RT (●), 标准反应溶液中的 HIV-1 突变型 RT (◇), 含有 ATP 的反应溶液中的 HIV-1 突变型 RT (◆)。

图 5 举例说明用从 HIV 感染个体血浆中分离的 RT 测定对抗病毒药奈韦拉平的敏感性。符号说明: (□)、(■) 和 (▲) 来自感染个体的 RT, (●) 由重组 HIV-1 野生型 RT 组成的对照, (◆) 具有中等奈韦拉平抗性的由突变型(L100I)重组 HIV-1 RT 组成的对照。

## 实施方案的描述

### 引物包被的微量滴定板的产生

将 1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)羧二酰亚胺盐酸盐(终浓度 10 mg/ml)加入到 100 mM 1-甲基咪唑缓冲液(pH 7.0)中, 并用所述混合物稀释所述引物构建体至终浓度为 1  $\mu$ g/ml。将 100  $\mu$ l 该引物缓冲液等分至由 Nalge Nunc NucleoLink®透明纸条(Cat no 248259)组成的微量滴定板的各孔中。将该板于 37°C 温育 6-8 小时, 用含有 2 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)的 2 M NaOH 溶液充分洗涤, 然后浸泡在三个装有水的 5L 管形瓶中。通过使板正面朝下放在吸水布或吸水纸上, 除去各孔中的残留液体。让板在室温下干燥 30 分钟, 最后于 -20°C 冷冻贮存。

### DNA-聚合酶测定的方案

所述 DNA-聚合酶测定基于一种具有与 96 孔微量滴定板各孔共价结合的特异性序列的短引物。所述反应混合物含有其序列的一部分与所述引物互补的单链脱氧核苷酸模板和四种脱氧核苷三磷酸。然而，胸苷三磷酸被 5-溴脱氧尿苷 5'-三磷酸(BrdUTP)取代。在所述聚合酶反应期间掺入到 DNA 中的溴脱氧尿苷一磷酸(BrdUMP)的量用碱性磷酸酶(Ap)缀合的抗 BrdU 单克隆抗体进行检测。用 Ap 底物 4-甲基伞形基磷酸酯进行荧光产物检测。

向引物包被的微量滴定板的各孔中加入 100  $\mu$ l DNA 聚合酶反应混合物。样品用 DNA 聚合酶碱性缓冲液稀释，通过将 50  $\mu$ l 样品稀释液转移到板的各孔中，起始聚合酶反应。将微量滴定板于 33℃温育规定时间后，通过用含有 1.5% (v/v) 辛基苯氧基聚乙氧乙醇(Triton X-100)的 3 mM 硼酸盐缓冲液(pH 8.9)洗涤该板，而终止反应。通常温育 2 次即 4 小时和过夜(16 小时)，以检查聚合反应的线性化程度。该板用含有 2 mM EDTA 的 2 M NaOH 溶液充分洗涤，然后浸泡在三个装有水的 5L 管形瓶中。

接着，将该板与以下组分于 33℃温育 90 分钟：100  $\mu$ l 碱性磷酸酶(Ap)缀合的抗 BrdU 单克隆抗体(用含有 50 mM NaCl 的 25 mM (双[2-羟乙基]亚氨基三[羟甲基]甲烷、2-双[2-羟乙基]氨基-2-[羟甲基]-1,3-丙二醇) (Bis Tris)缓冲液(pH 7.2)稀释至 4.8  $\mu$ g/ml)、37.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 mg/ml 硫酸葡聚糖、1% Triton X-100 和 25 mg/ml Sigma 脱脂奶粉。

此后，该板再次用含有 1.5% (v/v) Triton X-100 的 3 mM 硼酸盐缓冲液(pH 8.9)洗涤，以除去未结合的标记抗体。用溶于 Tris 缓冲液(pH 8.9)中的 4-甲基伞形基磷酸酯底物测定所述碱性磷酸酶活性。用 Wallac Victor 2 读出仪，在规定间隔读出 460 nm 的荧光(激发波长 355 nm)。

### 抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案

在改进的 DNA 聚合酶测定中进行所述抑制研究。所述药物分 5 个步骤进行连续稀释，且将 25  $\mu\text{l}$  等份样品转移至微量滴定板的各孔中，与 100  $\mu\text{l}$  DNA 聚合酶反应混合物混合，通过加入 25  $\mu\text{l}$  酶稀释液起始酶反应。在标准反应条件下对非核苷类似物进行研究，而在 dNTP 竞争性抑制剂的研究中，将所有四种脱氧核苷三磷酸(dNTP)的浓度降至 1 $\mu\text{M}$ 。让所述聚合酶反应进行过夜(16-24 小时，33 $^{\circ}\text{C}$ )。此后，通过洗涤所述板终止反应。将  $\text{IC}_{50}$  值定义为所研究的聚合酶活性达到 50%抑制的药物浓度。

### RT 活性的测定方案

用改进的比色 RT 测定(Cavidi® Lenti RT 活性试剂盒) (可得自 Cavidi Tech, Uppsala, 瑞典)，测定在所研究的病毒制剂中的 RT 活性水平。所述方法已有描述(Ekstrand 等, 1996)。简而言之，用与 96 孔微量滴定板各孔共价结合的 poly(rA)作为模板，从而在逆转录步骤中于 33 $^{\circ}\text{C}$  掺入 5-溴脱氧尿苷 5'-三磷酸(BrdUTP)。用碱性磷酸酶(Ap)缀合的抗 BrdU 单克隆抗体检测掺入到 DNA 中的溴脱氧尿苷一磷酸(BrdUMP)的量。最后，用 Ap 底物 4-甲基伞形基磷酸酯进行荧光检测。

### 抑制逆转录的测定方案

在改进的 Cavidi HS-kit Lenti RT 测定中进行所述抑制研究。所述抑制剂分 5 个步骤进行连续稀释，然后将 25  $\mu\text{l}$  等份样品转移至微量滴定板的各孔中，与 100  $\mu\text{l}$  RT 反应混合物混合，通过加入 50  $\mu\text{l}$  酶稀释液起始酶反应。所述核苷三磷酸底物(BrdUTP)的终浓度为 16  $\mu\text{M}$ ，而引物(odT<sub>22</sub>)的含量为 12 ng/孔。让所述 RT 反应进行过夜(16-24 小时，33 $^{\circ}\text{C}$ )。此后，通过洗涤所述板而终止反应。将  $\text{IC}_{50}$  值定义为所研究的 RT 活性达到 50%抑制的药物浓度。

基于可溶性细胞酶破坏后从微型柱中分离病毒 RT 而从含有 RT 封闭性抗体的材料中分离病毒 RT 的方案

1) 标记要使用的 4.5ml 塑料管。将其置于 Nalgene 盒中。向每支标记管中加入 1 ml 样品(例如来自 HIV 感染个体的 EDTA 血浆)。加入 100  $\mu$ l 66 mM 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)的缓冲水溶液, 涡旋混合, 将所述样品在室温下温育 1 小时。

游离的血浆酶活性在该步骤中遭到破坏, 而病毒体内所含的酶则仍保持完整。然后通过几个分离步骤, 从 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)、酶活性封闭性抗体和其它可能干扰病毒 RT 定量的物质中纯化所述病毒体。下述方案基于 Fractogel® EMD TMAE Hicap 凝胶的应用。

2) 小心地悬浮分离胶, 并转移 1500  $\mu$ l 凝胶浆至每支样品预处理管中。

3) 将样品与凝胶浆在室温下温育 90 分钟, 其中将所述管以水平方向放在定轨摇床上。

4) 标记所需数目的 10 ml 塑料微型柱, 以识别要分析的样品。将该柱固定在柱洗涤装置即 Supelco Visiprep 固相抽真空歧管上。转移结合管中的内容物至其相应的柱中。转移前, 将管涡旋一会儿, 以使凝胶均匀分布。

5) 当所有的柱都填满时, 抽真空并将凝胶吸干。关掉真空, 并通过将每个柱装入 9 ml 缓冲液 A 开始洗涤。当所有的柱已装满时, 抽真空并将凝胶吸干。

6) 重复步骤 5 三次以上, 总共洗涤 4 次。每次洗涤后都将凝胶吸干。在第 4 次洗涤后且将凝胶吸干后, 关掉真空, 进行步骤 7。

所述洗涤步骤除去系统中未结合的 RT 封闭性抗体和 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)。

7) 向所有干凝胶中加入 9 ml 调节缓冲液(B)。1 分钟后, 抽真空

并将凝胶吸干。

8) 重复步骤 7, 在关掉真空之前, 检查是否已从所有凝胶中除去所有调节缓冲液(B)。

9) 卸下柱洗涤装置的上层部分。将装有标记管的管固定器固定在清洁的容器中。重新装上该装置的上层部分。控制各柱的小管落入其相应管中。

10) 向每个柱中加入 600  $\mu$ l 裂解缓冲液(C)。让所述缓冲液在所述柱中停留 5 分钟。然后缓慢抽真空并将凝胶吸干。这将在每支管中得到来自相关凝胶的约 600  $\mu$ l 病毒裂解液。

从步骤 10 的裂解液中回收的 RT 活性基本上无 RT 封闭性抗体、药物和细胞聚合酶活性, 并且可以用灵敏的 RT 活性测定, 即基于 Ekstrand 等人描述的方法的 Cavidil HS-kit Lenti RT [7]进行定量。按照所述方法获得的 25  $\mu$ l 裂解液足以测定所述样品中的 RT 活性。余下的 575  $\mu$ l 样品应于-70 $^{\circ}$ C或-70 $^{\circ}$ C以下冷冻贮存, 以供以后用于药物敏感性试验。

请注意: 对半胱氨酸修饰剂不敏感的 RT 酶例如野生型 HIV 1 RT 可以任选地在存在高达 5 mM 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)的情况下进行测定。另一方面, 敏感酶例如 MULV RT 和来自某些疗法的 HIV 1 抗性株(含有例如突变 Y181C)的 RT 要求向所述裂解缓冲液中加入巯基还原剂即半胱氨酸或半胱胺。

## 材料

### 用于 DNA 聚合酶测定的引物/模板

引物序列是 18 个碱基的 5'-GTC-CCT-GTT-CCG-GCG-CCA-3' (SEQ ID NO: 12)且在 5'端通过 C6 间隔臂与伯胺连接。

模板构建体含有三个不同的功能部分。从 5'端起: 一种(A)<sub>n</sub> 聚合物, 用于扩增 BrdU 信号; 一个可变部分(CTGA)<sub>m</sub>, 以获得依赖于四种脱氧核苷三磷酸的聚合酶反应; 和一个与所述引物互补的序列。

在本实验中，实施例中包含  $n=12$  且  $m=5$ ，除非另有说明。

### 核苷、酶抑制剂和抗病毒药物

ddATP，2'3'双脱氧腺苷三磷酸；ddGTP，2'3'双脱氧鸟苷三磷酸；ddCTP，2'3'双脱氧胞苷三磷酸；ddTTP，2'3'双脱氧胸苷三磷酸。TMAU，6-([3,4-亚丙基]苯胺基)尿嘧啶。

替诺福韦，(R)-9-(2-磷酸甲氧基-丙基)腺嘌呤；奈韦拉平，(11-环丙基-5,11-二氢-4-甲基-6H-吡啶并[3,2-b:2',3'-f]二氮杂草-6-酮)(NVP)；和依法韦仑，(-)-6-氯-4-环丙基乙炔基-4-三氟甲基-1,4-二氢-2H-3,1-苯并噁嗪-2-酮)(EFV)。

### 酶

DNA 聚合酶 I (大肠杆菌)购自 Amersham Bioscience。来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的重组 DNA 聚合酶 III 如已描述的方法(Brown 等, 1998)生产。哺乳动物 DNA 聚合酶 $\alpha$  (小牛胸腺)和 $\beta$  (人)购自 CHIMERx (Milwaukee)。DNA 聚合酶 $\gamma$ 如已描述的方法(Pileur 等, 2000)从牛心中纯化。

产生 NNRTI 抗性突变形式的 HIV-1 RT (L100I, K103N, L100I/K103N, Y181C)。用从 BH10 分离株构建的 pETRT 表达载体作为突变模板。用市售定点诱变试剂盒 QuikChange (Stratagene)产生各种突变。所述突变通过 DNA 序列分析加以证实。突变形式和天然形式的 RT 如先前描述的方法(Lindberg 等, 2000)进行分离。

产生重组 HIV-1 RT 的方法与 AZT 特定突变的方法是相似的，只是将突变引入 HXB2-D 分离株的 RT 编码区中。

### 来自 HIV 感染个体的血浆样品

追溯既往地选出来自治疗原初患者的血浆样品或用常规联合疗法治疗的患者的血浆样品。通过标准 HIV 1 RNA PCR (Cobas, Roche Diagnostics)，测量各样品中的 HIV-1 RNA 含量。罹患淋巴组织增生

性疾病的患者血清样品得自 the Department of Internal Medicine, Uppsala University, Akademiska sjukhuset, Uppsala.

分离胶: 例如 Fractogel® EMD TMAE 或 Fractogel® EMD TMAE Hicap, 在 314 mM (2-(N-吗啉代)乙磺酸) (MES) pH 5.1、413 mM 碘化钾和 0.5 mg/ml 肝素溶液中。

微型柱, 例如 Biorad Poly-Prep® (7311553)

微型柱洗涤装置, 即 Supelco Visiprep 固相抽真空歧管。

塑料管, 例如 Nunc 4.5 ml 低温管。

具有固定化 prA 的微量滴定板, 即 Nalge Nunc NucleoLinck®。

半胱氨酸修饰剂, 例如用 0.87 M 三羟甲基氨基甲烷(pH 8.3)缓冲的 66 mM 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)水溶液。

温和巯基还原剂, 例如 33 mM 半胱胺水溶液。

#### 所用的缓冲液:

A) 洗涤缓冲液: 20 mM MES pH 5.4, 500 mM 醋酸钾(KAc)

B) 调节缓冲液: 适合于 RT 测定的缓冲液, 例如 50 mM (N-(2-羟乙基哌嗪-N'-(2-乙磺酸)) (Hepes) pH 7.6, 25 mM KAc, 20 mM 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM 乙二醇-双(β-氨基乙醚)N,N,N',N'-四乙酸(EGTA), 2 mM 精胺和 0.5 mg/ml 热灭活牛血清白蛋白(BSA)。

C) 裂解缓冲液: 适合于 RT 测定的缓冲液, 包含去污剂如 1.25% 聚氧乙烯 4 十二烷基醚(Brij 30), 13 ng/ml odT<sub>22</sub> 和与调节缓冲液(B)中组分相同的组分。巯基还原剂, 即当用对 SH 氧化/修饰敏感的 RT 加工病毒时任选加入 0.2 mM 半胱胺。

RT 反应混合物: 11.7 mM (N-(2-羟乙基哌嗪-N'-(2-乙磺酸)) (Hepes) pH 7.6, 28.3 μM BrdUTP, 120 ng/ml odT<sub>22</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 g/l 硫酸葡聚糖, 2 mM 精胺, 0.5% (v/v) Triton-X 100, 0.2 mM 乙二醇-双(β-氨基乙醚)N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)和 0.5 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)。

DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液: 50 mM Hepes pH 8.0, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5  $\mu\text{g/l}$  硫酸葡聚糖, 1 mM 精胺, 0.5% (v/v) Triton-X 100, 0.2 mM EGTA, 1.5 mM 二硫苏糖醇(DTT)和 0.5 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)。

DNA 聚合酶 III 碱性缓冲液: 40 mM (2-(N-吗啉代)乙磺酸) (MES) pH 6.8, 40 mM 醋酸钾(KAc), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM 精胺, 0.5% (v/v) 聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(Tween 20), 0.1 mM EDTA, 1 mM 二硫苏糖醇和 50  $\mu\text{g/ml}$  牛血清白蛋白(BSA)。

DNA 聚合酶 $\beta$ 碱性缓冲液: 20 mM 3-[(1,1-二甲基-2-羟乙基)氨基]-2-羟基-1-丙磺酸(AMPSO) pH 8.3, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM 亚精胺, 1  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 0.1 mM DTT, 0.01% Tween 20。

DNA 聚合酶反应混合物。补充的 24  $\mu\text{M}$  BrdUTP, 49.5  $\mu\text{M}$  dGTP, 49.5  $\mu\text{M}$  dATP, 49.5  $\mu\text{M}$  dCTP 和 500 ng 模板/ml 的 DNA 聚合酶碱性缓冲液。

含有 ATP 的逆转录 DNA 聚合酶反应混合物。所述 DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶的反应混合物补充 3.2 mM ATP 且将 pH 调至 7.1。

## 实施例

### 实施例 1. 利用不同的模板通过 HIV RT 进行第二链合成

按照“引物包被的微量滴定板的产生”，具有固定化引物的微量滴定板各孔中包含始于 200 ng/ml 的指定模板构建体的两步稀释系列。向各孔中加入 100 fg 重组 HIV 1 RT，且所述 RT 反应的持续时间为 18 小时。按照“DNA-聚合酶测定的方案”，使用 DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液，测定各模板的聚合酶活性。在抗 BrdU 单克隆抗体结合期间使用 50 mM NaCl 或者使用 100 mM NaCl。将所获得的活性对模板浓度作图，根据各图平稳段的值，计算出各模板类型所达到的最大信号。

结果概述于表 1 中。发现 A-尾的长度和所述聚合酶测定中可获得的最大信号之间存在明确的相关性。A-尾的长度在离子强度增加的情况下的确影响产物检测所用的抗体结合的能力。

### 实施例 2. 模板序列对用 TMAU 抑制 DNA 聚合酶 III 的影响

6-苯胺基尿嘧啶是来自革兰氏阳性菌的 DNA 聚合酶 III 选择性抑制剂。所述苯胺基尿嘧啶分子通过将其螯合成无活性 DNA-药物-蛋白复合物而抑制其聚合酶 III 靶(Tarantino 等, 1990)。所述药物 TMAU 可以被认为是 GTP 的类似物。按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”，用或者(CTGA)6-A12 (SEQ ID NO: 10) (■)或者(CTG)6-A3 (SEQ ID NO: 11) (▲)作为模板，测定指定浓度的 TMAU 对 1.25 ng/孔重组 DNA 聚合酶 III 的抑制能力。该聚合酶反应时间为 1 小时，并将所述 DNA 聚合酶 III 反应混合物中的 GTP 浓度降至 2.5  $\mu$ M。将指定模板上所获得的聚合酶活性换算成在没有抑制剂的情况下与同一聚合酶一起温育所获得活性的百分比(%)。

结果示于图 1。这种高特异性抑制剂根据所用的模板序列而表现出不同的抑制能力。本发明提供的一个容易改变所用 DNA 模板的系统，以计算出所研究的酶或抑制剂所需的特异性条件。

### 实施例 3. DNA 聚合酶测定的检测灵敏度

按照“DNA-聚合酶测定的方案”，利用最适于指定酶的碱性缓冲液，测量连续稀释的 HIV 1 野生型 RT (◆)、哺乳动物 DNA 聚合酶 $\beta$  (●)和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (▲)的活性。所用的聚合酶反应时间为过夜(18 小时)。结果示于图 2。这三种酶制剂中的每种在所用的酶量和所回收的产物量之间都表现出线性关系。所述测定的本底为 3800 rfu/小时。用双本底作为明显信号检测的截止值，有可能检测出低至 10 nU HIV 1 野生型 RT、6 nU 哺乳动物 DNA 聚合酶 $\beta$ 和 3 nU 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I。

#### 实施例 4. 5 种 DNA 聚合酶在不同的测定系统中的活性

按照“DNA-聚合酶测定的方案”和“RT 活性的测定方案”，使用基于指定聚合酶碱性缓冲液的反应溶液，测量连续稀释的 DNA 聚合酶 $\alpha$ 、DNA 聚合酶 $\beta$ 、DNA 聚合酶 $\gamma$ 、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)患者血清和 HIV-1 RT 的活性。所用的聚合酶反应时间为 2 小时。将所获得的活性换算成每种酶在最适反应条件下于可变 DNA 模板上的活性的百分比(%)。结果示于表 2。所研究的五种酶制剂中的每种对与最适反应条件有其独特的偏爱。然而，DNA 聚合酶 $\alpha$ 和人血清聚合酶均表现出相似的模式。仅 HIV-1 RT 和 DNA 聚合酶 $\gamma$ 在所述逆转录酶测定中得到显著性活性。

#### 实施例 5. 证明 DNA 聚合酶测定测量双脱氧类似物抑制所有四种 DNA 碱基的能力

按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”，测定指定浓度的 ddATP (■)、ddGTP (◆)、ddCTP (●)和 ddTTP (▲)对 80 fg 重组野生型 HIV 1 RT 活性的抑制能力。将在不同抑制剂浓度下的聚合酶活性换算成在没有抑制剂的情况下对照活性的百分比(%)。结果示于图 3。

发现用模板(CTGA)<sub>6</sub>-A<sub>12</sub> (SEQ ID NO: 10)的聚合酶反应对双脱氧类似物抑制所有四种 DNA 碱基敏感。所获得的 IC<sub>50</sub> 值在对于 ddCTP 为 20 nM 至对于 ddATP 为 80 nM 的范围内变动。

#### 实施例 6. 非核苷抑制剂对第一链和第二链 DNA 合成受 HIV 1 RT 的影响的比较

分别按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”和“抑制逆转录的测定方案”，使用 DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液，测定 3 种非核苷抑制剂对指定重组 HIV 1 RT 的影响。聚合反应的持续时间分别是：对于在(CTGA)<sub>6</sub>-A<sub>12</sub> (SEQ ID NO: 10)上的第二链合成为 19 小时，而对于在 prA 上的第一链合成为 2 小时。将

所获得的 RT 活性换算成在没有抑制剂的情况下与同一 RT 一起温育所获得的活性的百分比(%)。

结果概述于表 3。两个测定系统均具有鉴别抗性 RT (Y181C, V179D)和敏感 RT 的能力。任何抑制剂的  $IC_{50}$  值在这两个测定系统的任一个中不因为所用酶量的 5 倍差异而被显著影响。此外, 通过测量对第一链或第二链 DNA 合成的抑制, 所获得的  $IC_{50}$  值之间没有显著性差异。

### 实施例 7. 证明作为对抗病毒药替诺福韦的抗性基础的生化机制

用核苷类似物长期治疗 HIV 感染个体导致产生抗性病毒。该过程与不断出现的病毒 pol 基因突变相关。这些取代在酶水平上的影响是复杂的并且包括增强原始 DNA 的编辑功能。该反应是核苷酸依赖性的并且产生二核苷多磷酸和可延伸的 DNA 3'端。

按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”, 使用基于 DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液的标准反应溶液和补充 ATP 的相同反应溶液, 测定连续稀释的三磷酸替诺福韦对 4 pg/孔指定重组 HIV 1 RT 的影响。聚合反应的持续时间为 19 小时。将所获得的 RT 活性换算成在没有抑制剂的情况下温育的同一 RT 活性的百分比(%)。图 4 显示所得结果。

符号说明: 标准 DNA 聚合酶反应溶液中的 HIV-1 野生型 RT (○)。含有 ATP 的 DNA 聚合酶反应溶液中的 HIV-1 野生型 RT (●), 标准 DNA 聚合酶反应溶液中的 T69S→SS/L210W/T215Y HIV-1 突变型 RT (◇), 含有 ATP 的 DNA 聚合酶反应溶液中的 T69S→SS/L210W/T215Y HIV-1 突变型 RT (◆)。

图 4 所示的结果证明, 当使用能够支持 ATP 依赖性磷酸解反应的反应溶液时, 野生型 RT 和突变型 RT 之间的药物敏感性差异大约增加 10 倍。

### 实施例 8. 用血浆源性 RT 测定对奈韦拉平的敏感性

按照“基于可溶性细胞酶破坏后从微型柱中分离病毒 RT 而从含有 RT 封闭性抗体的材料中分离病毒 RT 的方案”，处理来自瑞典斯德哥尔摩(Stockholm, Sweden)的 3 位 HIV 感染个体的血浆样品各 1 ml。按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”，使用“DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液”，让每种血浆 RT 和两种对照酶对一组连续稀释的奈韦拉平溶液进行滴定。参见图 5。

符号说明：(□)患者 1 的 RT，140000 基因组拷贝/ml；(■)患者 2 的 RT，180000 基因组拷贝/ml；(▲)患者 3 的 RT，390000 基因组拷贝/ml；(●)由重组 HIV-1 野生型 RT 组成的对照；和(◆)具有中等奈韦拉平抗性的重组 HIV-1 突变型 RT (L100I)组成的对照。

发现患者 RT 对奈韦拉平的 IC<sub>50</sub> 值的变动范围为 0.7-1.2  $\mu$ M。将对照野生型 RT 的 0.5  $\mu$ M 和具有中等奈韦拉平抗性的突变型 RT (L100I)的 > 10  $\mu$ M 进行比较。

**实施例 9. 淋巴组织增生性疾病患者血清中 DNA 聚合酶活性的检测**

4 位非霍奇金淋巴瘤患者血清和 6 位健康供血者血清用 DNA 聚合酶 III 碱性缓冲液连续稀释。按照“DNA-聚合酶测定的方案”，使用 2 小时和 6 小时的聚合酶反应时间，测量各稀释步骤的聚合酶活性。

计算出所述稀释范围的 DNA 聚合酶活性/ $\mu$ l 血清样品和小时聚合酶测定，在该范围内，在所形成的产物量和加入到所述测定中的血浆量之间存在线性关系(参见表 4)。

非霍奇金淋巴瘤患者的每个血清样品都含有不同量的 DNA 聚合酶活性，其特性与 DNA 聚合酶 $\alpha$ 相似(参见表 3)。活性量的范围为健康供血者中所获得的平均值的约 2-190 倍。

**表 1. 用不同的模板通过 HIV RT 进行第二链合成**

| 100 mM NaCl <sup>a</sup> |    |
|--------------------------|----|
| 最大信号*                    | 本底 |

| 所用的模板        | (rfu/小时) | (rfu/小时) | 的信号(最大<br>信号的%) | SEQ ID NO:    |
|--------------|----------|----------|-----------------|---------------|
| (CTGA)5      | 89444    | 1629     | 20              | SEQ ID NO: 1  |
| (CTGA)5-A    | 63694    | 1958     | 25              | SEQ ID NO: 2  |
| (CTGA)5-AA   | 184421   | 613      | 33              | SEQ ID NO: 3  |
| (CTGA)5-AAAA | 239688   | 2565     | 44              | SEQ ID NO: 4  |
| (CTGA)5-A8   | 198894   | 1544     | 58              | SEQ ID NO: 5  |
| (CTGA)6      | 60627    | 1285     | 22              | SEQ ID NO: 6  |
| (CTGA)6-AAA  | 83555    | 1009     | ND              | SEQ ID NO: 7  |
| (CTGA)6-A5   | 119326   | 914      | ND              | SEQ ID NO: 8  |
| (CTGA)6-A9   | 202668   | 963      | ND              | SEQ ID NO: 9  |
| (CTGA)6-A12  | 226062   | 726      | ND              | SEQ ID NO: 10 |
| (CTG)6-A3    | 124334   | 814      | ND              | SEQ ID NO: 11 |

\*具有固定化引物的微量滴定板各孔中包括从 200 ng/ml 开始的两步稀释系列的指定模板。向各孔中加入 100 fg 重组 HIV 1 RT 且 RT 反应的持续时间为 18 小时。在抗 BrdU 单克隆抗体结合期间使用 50 mM。将所获得的活性对模板浓度作图，并计算各模板所达到的最大信号。

<sup>a</sup>RT 反应条件和计算与“最大信号”中的相同，但在抗体结合期间使用 100 mM NaCl。

表 2. 4 种哺乳动物 DNA 聚合酶和 HIV RT 在不同测定系统中的表现活性

| 碱性缓冲液                  | DNA 聚合酶同工酶在指定测定中的活性(%*) |                 |                  |         |        |
|------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|---------|--------|
|                        | DNA pol $\alpha$        | DNA pol $\beta$ | DNA pol $\gamma$ | 血清 DNAp | HIV RT |
| Pol III                | 100                     | 17              | 0                | 100     | 0      |
| DNA pol $\beta$        | 40                      | 100             | 5                | 30      | 33     |
| DNA pol $\gamma^a$     | 1                       | 13              | 100              | 9       | 100    |
| prA/Lenti <sup>b</sup> | 0                       | 0               | 10               | 0       | 2175   |

\*用指定同工酶的最适碱性缓冲液对可变 DNA 模板活性的百分比(%)

<sup>a</sup> DNA 聚合酶 $\gamma$ 和逆转录 DNA 聚合酶碱性缓冲液。

<sup>b</sup> 在 RT 测定中用 prA/odT 作为引物模板的活性。

表 3. 非核苷抑制剂对第一链和第二链 DNA 合成受 HIV 1 RT 的影响的比较

| 抑制剂  | 类型    | RT 酶   | 模板的 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ m)*     |      |
|------|-------|--------|--------------------------------------|------|
|      |       | 含量(fg) | (CTGA) <sub>6</sub> -A <sub>12</sub> | prA  |
| 奈韦拉平 | wt    | 100    | 2.0                                  | 2.2  |
|      | wt    | 20     | 2.0                                  | 2.5  |
|      | Y181C | 100    | > 500                                | 200  |
|      | Y181C | 20     | > 500                                | 180  |
|      | V179D | 100    | 8                                    | 7    |
|      | V179D | 20     | 12                                   | 8    |
| 依法韦仑 | wt    | 100    | 0.04                                 | 0.02 |
|      | wt    | 20     | 0.03                                 | 0.02 |
|      | Y181C | 100    | 0.12                                 | 0.15 |
|      | Y181C | 20     | 0.14                                 | 0.13 |
|      | V179D | 100    | 0.5                                  | 0.7  |
|      | V179D | 20     | 0.4                                  | 0.6  |
| 膦甲酸  | wt    | 100    | 0.5                                  | 0.7  |
|      | wt    | 20     | 0.5                                  | 0.6  |

\*分别按照“抑制可变 DNA 模板上第二链合成的测定方案”和“抑制逆转录的测定方案”，测定 3 种非核苷抑制剂对指定重组 HIV 1 RT 的影响。聚合反应的持续时间分别是对于在(CTGA)<sub>6</sub>-A<sub>12</sub> (SEQ ID NO: 10)上进行第二链合成为 19 小时，而对于在 prA 上进行第一链合成为 2 小时。将所获得的 RT 活性换算成在没有抑制剂的情况下与同一 RT 一起温育所获得的活性的百分比(%)。

表 4. 淋巴组织增生性疾病患者血清中 DNA 聚合酶活性的检测

| 血清编号  | 血清来源                | 聚合酶活性(rfu/小时/ $\mu$ l 血清<br>/小时聚合酶反应) |
|-------|---------------------|---------------------------------------|
| T1    | NHL 患者 <sup>a</sup> | 158521                                |
| T2    | NHL 患者              | 1305                                  |
| T3    | NHL 患者              | 3405                                  |
| T4    | NHL 患者              | 16619                                 |
| B1-B6 | 供血者                 | 841 $\pm$ 180                         |

<sup>a</sup>非霍奇金淋巴瘤患者。

\* NS, 无显著性。

4 位非霍奇金淋巴瘤患者血清和 6 位健康供血者血清用 DNA 聚合酶 III 碱性缓冲液连续稀释。按照“DNA-聚合酶测定的方案”，测量各稀释步骤的聚合酶活性。根据稀释范围计算出列入表的 DNA 聚合酶活性，在该范围内，在所形成的产物量和加入的血浆量之间存在线性关系。所有值都减去测定的本底 854 flu/h。

### 参考文献

1. Aposhian HV, Kornberg A. J. Biol. Chem. 1962, 237, 519
2. Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase (HIV-1 抗 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)的表型机制: 突变型病毒逆转录酶的聚合反应的持续合成能力增强及对焦磷酸酯敏感性增加). Biochemistry. 1998 Nov 10;37 (45):15908-17.
3. Barnes MH, Leo CJ, Brown NC. DNA polymerase III of Gram-positive eubacteria is a zinc metalloprotein conserving an essential finger-

like domain (革兰氏阳性真细菌 DNA 聚合酶 III 是一种保持必需指样结构域的锌金属蛋白). *Biochemistry*. 1998 Nov 3;37(44):15254-60

4. Eberle J, Seibl R, Kessler, C, Konig, Bernhard B. Reagents and kits for determining polymerase activity (用于测定聚合酶活性的试剂和试剂盒). 1997 US5635350:

5. Ekstrand DH, Awad RJ, Källander CF, Gronowitz JS. A sensitive assay for the quantification of reverse transcriptase activity based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-product detection, with special reference to human-immunodeficiency-virus isolation (一种灵敏的基于使用结合载体的模板和非放射性产物检测的逆转录酶活性定量测定, 有关人免疫缺陷病毒分离的特别报导). *Biotechnol Appl Biochem*. 1996 Apr; 23 (Pt 2): 95-105.

6. Goff, S.P. (1990) Retrovirus reverse transcriptase: Synthesis, Structure, and Function (逆转录病毒逆转录酶: 合成、结构和功能). Review (综述). *J Acquir Imm Defic Syndr* 3: 817-831.

7. Gronowitz; J S, Källander, C F R Method of determining dTk isoenzyme activity and the use thereof (dTk 同工酶活性的测定方法及其应用). 1987 US4637977:

8. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. Related Articles. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase (一种 AZT 抗性机制: 不为突变型 HIV-1 逆转录酶所阻断的核苷酸依赖性引物的增加). *Mol Cell*. 1999 Jul; 4(1):35-43

9. Pileur F, Toulme JJ, Cazenave C. Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic hydrolytic patterns on DNA-RNA hybrids: further evidence that mitochondrial RNase H is an RNase HII (真核生物核糖核酸酶 HI 和 HII 对 DNA-RNA 杂合体产生特征性水解模式: 线粒体 RNA 酶 H 是 RNA 酶 HII 的又一证据). *Nucleic Acids Res*. 2000 Sep 15; 28(18):3674-83

10. Seville M, West AB, Cull MG, McHenry CS. Fluorometric assay

for DNA polymerases and reverse transcriptase (DNA 聚合酶和逆转录酶的荧光测定). *Biotechniques*. 1996 Oct;21(4):664, 666, 668, 670, 672.

11. Tarantino PM Jr, Zhi C, Wright GE, Brown NC. Related Inhibitors of DNA polymerase III as novel antimicrobial agents against gram-positive eubacteria (作为抗革兰氏阳性真细菌的新型抗微生物剂的 DNA 聚合酶 III 相关抑制剂). *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Aug;43(8):1982-7.

12. Tveit H, Kristensen T. Fluorescence-based DNA polymerase assay (基于荧光的 DNA 聚合酶测定). *Anal Biochem*. 2001 Feb 1; 289(1):96-8.

13. Vandamme AM, Van Vaerenbergh K, De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies (抗人免疫缺陷病毒药物联合策略). *Antivir Chem Chemother*. 1998 May;9(3):187-203.

---

## 序 列 表

---

<110> Cavid Tech AB

<120> 用于测量 DNA 聚合作用方法及其应用

<130> 110063501

<140>

<141>

<150> US 60/297,773

<151> 2001-06-14

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：模板

<400> 1

ctgactgact gactgactga

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：模板

<400> 2

ctgactgact gactgactga a

21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：模板

<400> 3

---

ctgactgact gactgactga aa 22

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 4  
ctgactgact gactgactga aaaa 24

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 5  
ctgactgact gactgactga aaaaaaaaa 28

<210> 6  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 6  
ctgactgact gactgactga ctga 24

<210> 7  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 7  
ctgactgact gactgactga ctgaaaa 27

<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 8  
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaa 29

<210> 9  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 9  
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaaaa aaa 33

<210> 10  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 10  
ctgactgact gactgactga ctgaaaaaaaa aaaaaa 36

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：模板

<400> 11  
ctgctgctgc tgctgctgaa a 21

<210> 12  
<211> 18

---

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：引物

<400> 12

gtccctgttc cggcgcca

18

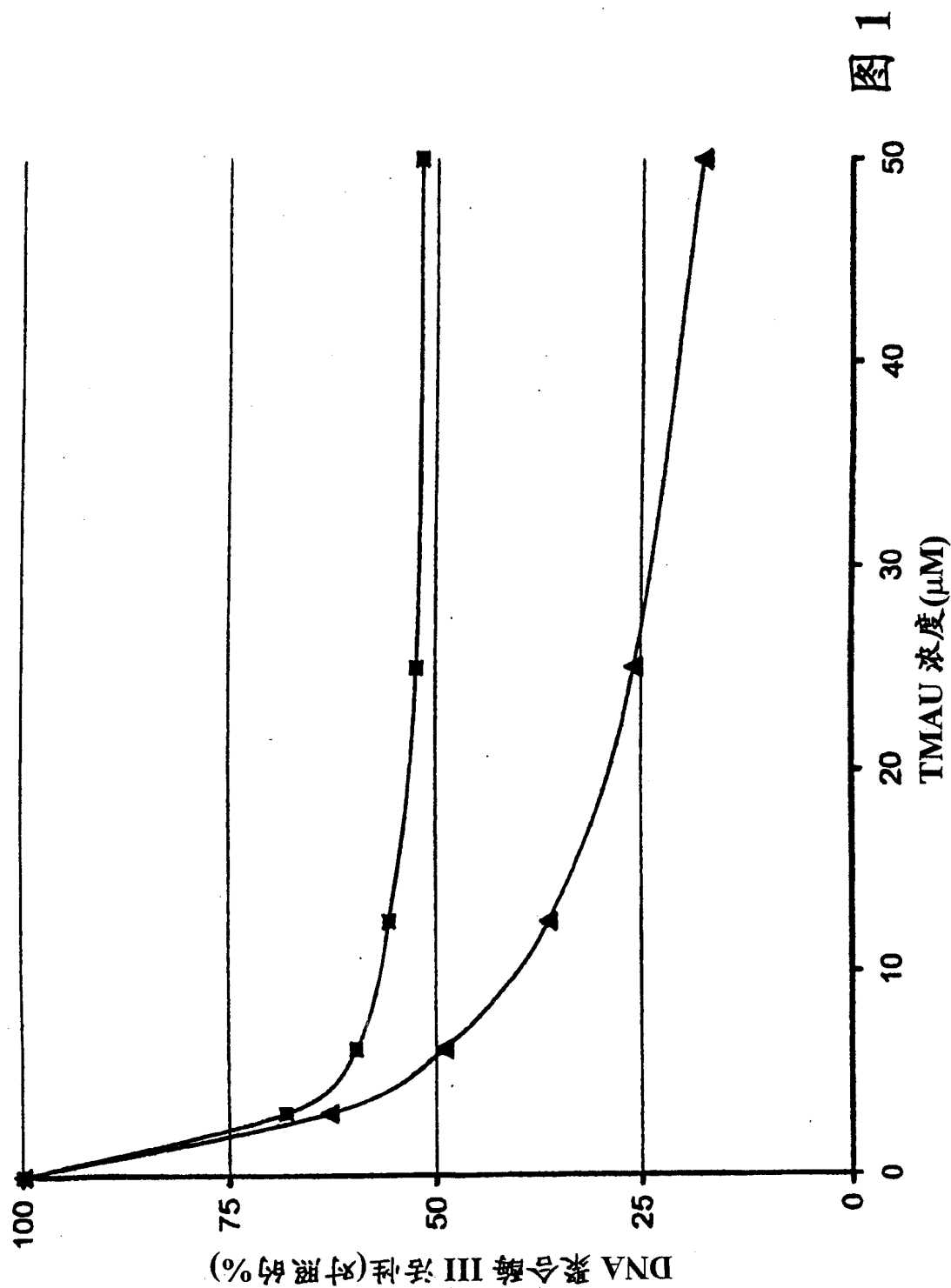


图 1

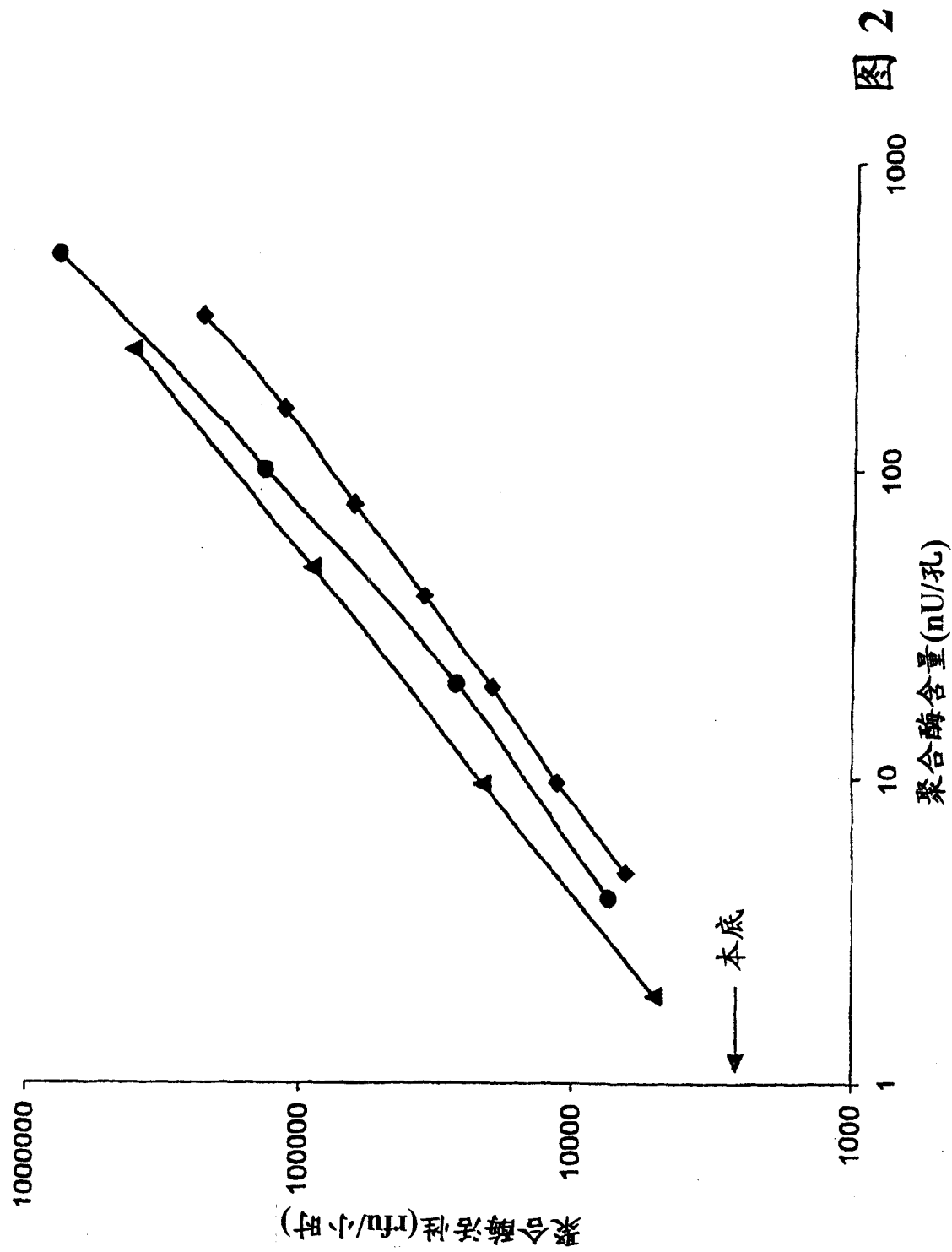


图 2

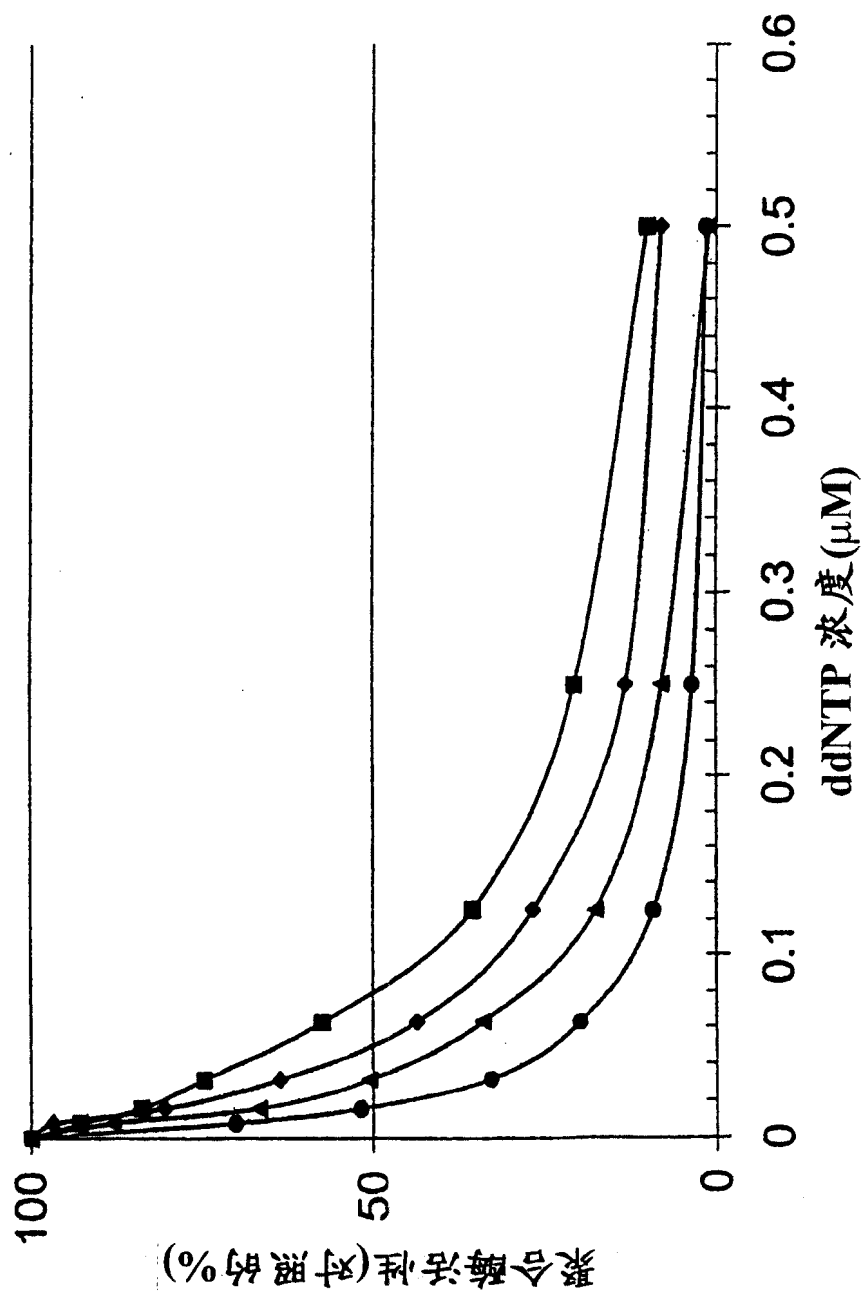


图 3

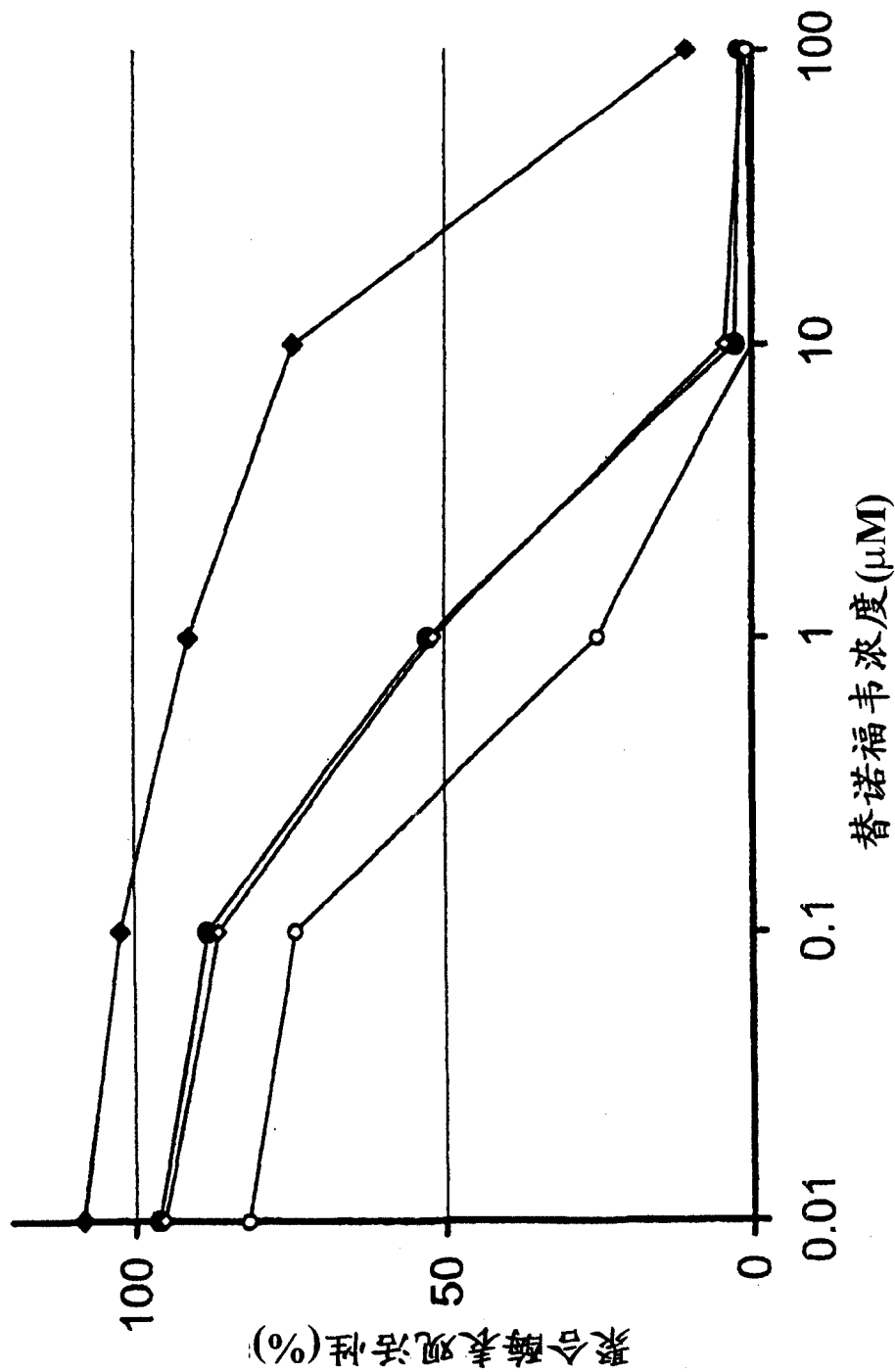


图 4

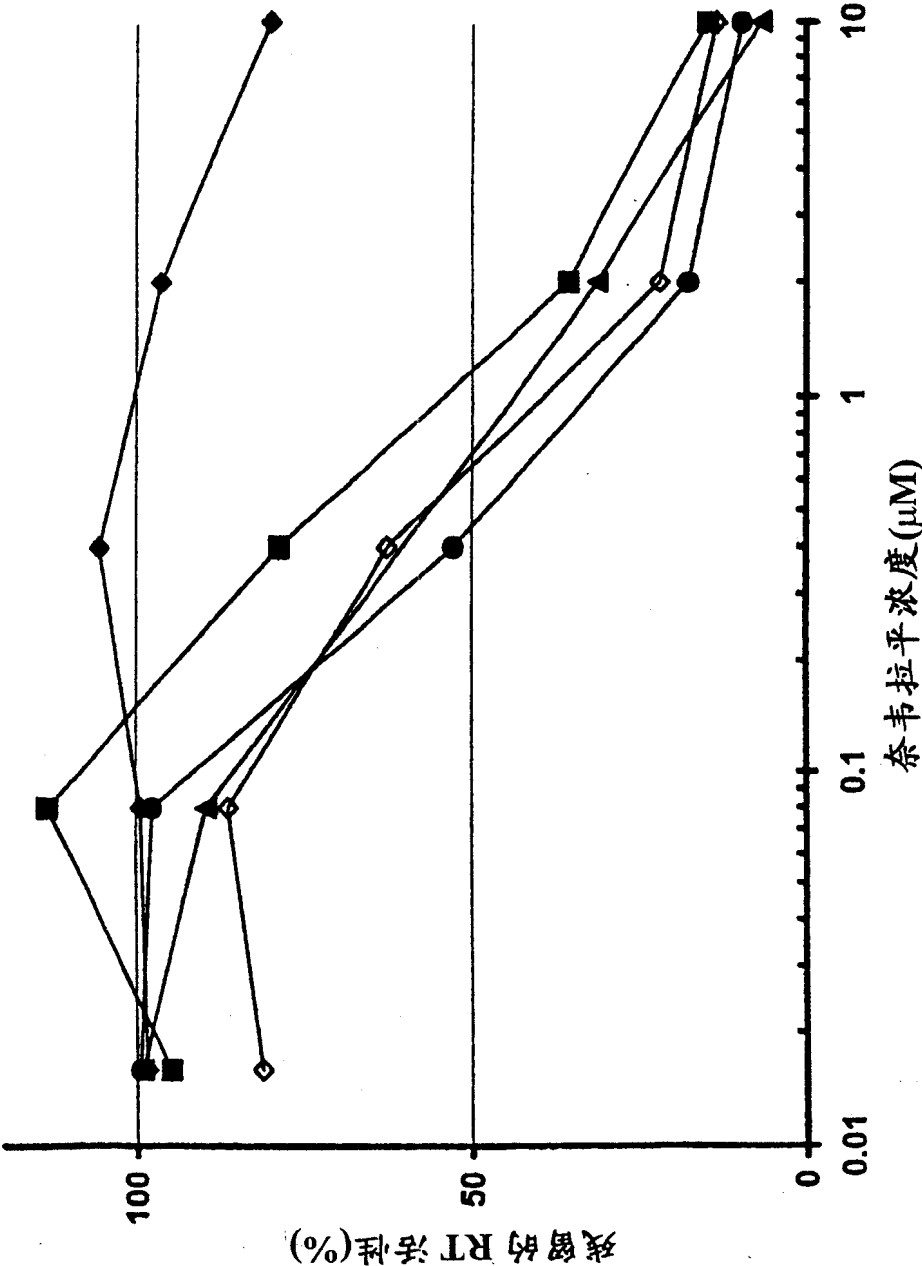


图 5

|                |                                                                                                   |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于测量DNA聚合作用的方法及其应用                                                                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN100379879C</a>                                                                      | 公开(公告)日 | 2008-04-09 |
| 申请号            | CN02815605.6                                                                                      | 申请日     | 2002-06-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 卡维迪技术有限公司                                                                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 卡维迪技术有限公司                                                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 卡维迪技术有限公司                                                                                         |         |            |
| [标]发明人         | C凯兰德<br>I彼得松<br>S格罗诺维茨<br>邵兴无                                                                     |         |            |
| 发明人            | C·凯兰德<br>I·彼得松<br>S·格罗诺维茨<br>邵兴无                                                                  |         |            |
| IPC分类号         | C12Q1/48 C12Q1/70 C12Q1/68 C12N9/12 G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/6834 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 |         |            |
| CPC分类号         | C12Q1/6834 C12Q1/703 G01N33/5308 C12Q2563/131 C12Q2533/101 C12Q2525/117                           |         |            |
| 审查员(译)         | 李岚                                                                                                |         |            |
| 优先权            | 60/297773 2001-06-14 US                                                                           |         |            |
| 其他公开文献         | CN1541276A                                                                                        |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                    |         |            |

#### 摘要(译)

描述了一种用于测量生物样品中依赖DNA的DNA聚合作用的方法。所述方法包括下述步骤：提供一种与固相结合的引物，所述引物具有单链特异性短序列且不能进行内部碱基配对；使所述引物构建体与含有其序列的一部分与所述引物互补的单链脱氧核苷酸模板和四种脱氧核苷三磷酸的反应混合物接触，其中一种脱氧核苷三磷酸经修饰致使其为标记抗体所特异性识别；向所述混合物中加入包含所述DNA聚合酶例如逆转录病毒逆转录酶(RT)的生物样品；让所述聚合酶反应进行；将所述固定化反应产物与所述标记抗体一起温育；检测结合标记抗体的量；并且测量掺入的修饰脱氧核苷三磷酸的量，作为所述DNA聚合作用的测量结果，可将其用于药物敏感性测试。也公开了一种商业成套试剂。

#### DNA聚合酶同工酶在指定测定中的活性(%\*)

| 碱性缓冲液                  | DNA pol $\alpha$ | DNA pol $\beta$ | DNA pol $\gamma$ | 血清 DNAp | HIV RT |
|------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------|--------|
| Pol III                | 100              | 17              | 0                | 100     | 0      |
| DNA pol $\beta$        | 40               | 100             | 5                | 30      | 33     |
| DNA pol $\gamma^a$     | 1                | 13              | 100              | 9       | 100    |
| prA/Lenti <sup>b</sup> | 0                | 0               | 10               | 0       | 2175   |