



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201925480 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：107141708

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 22 日

(51)Int. Cl. : **C12Q1/686 (2018.01)**

(30)優先權：2017/11/22 美國

15/820,475

(71)申請人：英商安全保護生技系統公司 (英國) SAFEGUARD BIOSYSTEMS HOLDINGS LTD
(GB)

英國

(72)發明人：史密特 尼可拉斯 SMIT, NICOLAAS (US)；班納 索妮雅 BEDNAR, SONJA
(DE)；克拉普 侯格 KLAPPROTH, HOLGER (DE)；博毅特恩 凱文 BOYNTON,
KEVIN (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：9 共 45 頁

(54)名稱

非對稱 P C R 方法、引子及套組

ASYMMETRIC PCR METHODS, PRIMERS AND KITS

(57)摘要

本發明提供一種用於製備單股產物之非對稱 PCR 擴增方法及適用於其的引子及套組。

The disclosure provides an asymmetric PCR amplification method for preparation of single-stranded product and primers and kits useful therefor.

指定代表圖：

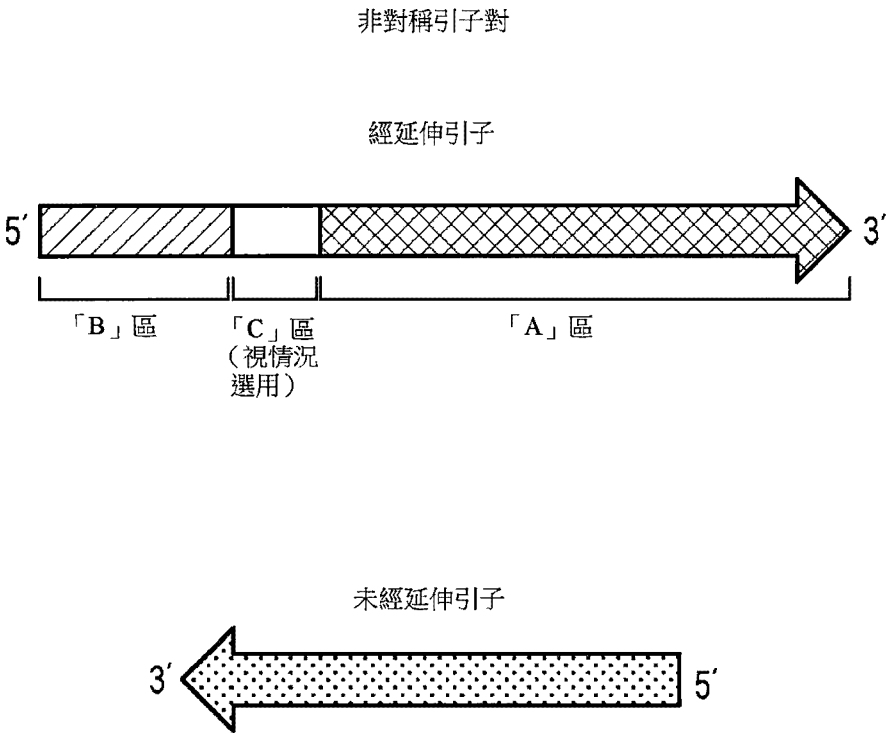


圖1

【發明說明書】

【中文發明名稱】 非對稱PCR方法、引子及套組

【英文發明名稱】 ASYMMETRIC PCR METHODS, PRIMERS AND KITS

【0001】

【背景】

【0002】 聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction；PCR）廣泛用於擴增DNA片段，包括染色體組DNA以及自RNA反轉錄之cDNA，以用於診斷及其他目的之分析。PCR為以下步驟之重複系列：變性或解鏈以產生單股模板；引子黏合；及藉由諸如水生棲熱菌（*Thermus aquaticus*；Taq）DNA聚合酶之熱穩定DNA聚合酶進行之引子延伸。

【0003】 典型三步驟PCR方案（參見PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications, Innis等人編, Academic Press (San Diego, Calif. (USA) 1990, 第1章）可包括在93至95°C下變性或解鏈大於5秒，在55至65°C下引子黏合10至60秒及在聚合酶高度活性之溫度（例如對於TaqDNA聚合酶而言72°C）下引子延伸15至120秒。典型二步驟PCR方案之不同之處在於用於引子黏合之溫度與用於引子延伸之溫度相同，例如60°C或72°C。對於三步驟PCR或二步驟PCR任一者而言，擴增涉及將反應混合物通過前述步驟系列循環許多次，典型地25至40次。在反應過程中，反應中之單獨步驟之時間及溫度可在循環之間保持不變，或其可在反應過程中之一或多個點處改變以提高效率或增強選擇性。

【0004】 除了引子對及目標核酸之外，PCR反應混合物典型地含有典型

地處於等莫耳濃度之四種去氧核糖核苷酸5'三磷酸（deoxyribonucleotide 5' triphosphate；dNTP）中之每一者、熱穩定聚合酶、二價陽離子（典型地 Mg^{2+} ）及緩衝劑。除非聚合酶具有反轉錄酶活性，否則典型地包括反轉錄酶以用於RNA目標。此類反應之體積典型地為25至100 μl 。可在相同反應中擴增多個目標序列。在cDNA擴增之情況下，除非PCR中所用之聚合酶具有反轉錄酶活性，否則PCR之前為用於將RNA反轉錄成cDNA之獨立反應。特定PCR擴增之循環的數目取決於數個因素，包括：a)起始物質之量，b)反應效率及c)偵測或對產物之後續分析之方法及靈敏度。用於典型循環擴增反應之循環條件、試劑濃度、引子設計及適當設備為此項技術中所熟知（參見例如Ausubel, F. Current Protocols in Molecular Biology (1988)第15章：「The Polymerase Chain Reaction」, J. Wiley (New York, N.Y. (USA))）。

【0005】 理想地，每一擴增子分子之每一股在一端與引子雜交（被稱作「結合」至引子），且充當用於後續輪之合成的模板。引子延伸產物或擴增子之產生速率由此係指數的，在每一循環期間倍增。擴增子包括正（+）股及負（-）股，其彼此雜交，形成雙股。

【0006】 PCR反應典型地設計成對稱，亦即，藉由利用設計成彼此「解鏈溫度」或「 T_m 」相同或在數 $^{\circ}C$ 內之正向引子及反向引子製造雙股複本。通常用於引子設計之電腦軟體程式警告使用者避免高 T_m 差值，且具有自動 T_m 匹配特徵。

【0007】 為區分典型PCR與本文所述之非對稱PCR方法，典型PCR在本文中被稱作「對稱」PCR。對稱PCR由此引起一或多種雙股擴增子分子之指數增加，且在每一輪複製期間每一擴增子之兩股以等量累積。經由對稱PCR之指數擴增的效率最終降低，且擴增子累積速率減緩且停止。對對稱PCR之動力分析展現反應由以下構成：a) 未偵測到之擴增期（初始循環），在此期間目標

序列之兩股按指數律增加，但迄今所累積之產物之量小於使用中之特定偵測方法的可偵測量；b) 偵測到之擴增期（額外循環），在此期間目標序列之兩股繼續平行地增加且產物之量可偵測；c) 平台期（末端循環），在此期間擴增子之兩股的合成逐漸停止且產物之量不再增加。對稱反應減緩且停止，因為濃度增加之互補擴增子股彼此雜交（再黏合），且此在競爭中超過獨立引子與其對應目標股雜交之能力。典型地，使反應進行足夠長以保證累積可偵測量之產物，而不用考慮實現該目的所需的精確循環數目。

【0008】 對直接在PCR反應中製造單股DNA具有有限用途之技術係「非對稱PCR。（asymmetric PCR.）」Gyllensten及Erich, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988)；Gyllensten及Erich, 1991, 美國專利案第5,066,584號。傳統非對稱PCR不同於對稱PCR，此係因為引子中之一者以限制量添加，典型地另一引子之濃度的一百分之一至五分之一。如同對稱PCR，雙股擴增子在早期溫度循環期間積聚，但取決於起始模板之數目，典型地在15至25個PCR循環之後，一種引子耗乏。一股之線性擴增在後續循環期間利用未耗乏引子進行。文獻中所報告之非對稱PCR反應中所用之引子通常與已知用於對稱PCR之引子相同。Podar (Podar, 2000, Mol. Cell Probes 14: 25-32) 包括40個熱循環之端點分析比較用於擴增腺病毒受質的對稱及非對稱PCR。其報告50:1之引子比率最佳且非對稱PCR分析具有較好靈敏度，然而，該靈敏度對於推測上含有較低數目之目標分子的稀釋受質溶液顯著下降。

【0009】 因此，需要能夠例如在診斷應用中偵測以低量存在於樣品中之目標分子的經改良非對稱PCR擴增方法。

【概述】

【0010】 本發明係關於經改良非對稱PCR方法及適用於其的引子及套

組。

【0011】 本發明之非對稱PCR方法包括指數期及線性期。在指數期期間，目標核酸之兩股經擴增。在線性期期間，股中僅一者經擴增，得到過量之目標核酸之單股。

【0012】 非對稱PCR方法經由使用具有不同長度及解鏈溫度之引子對實現過量之單股，其中較長引子在本文中被稱作「經延伸引子」且較短引子在本文中被稱作「未經延伸引子」。經延伸引子之解鏈溫度比未經延伸引子高，且可用以使用PCR循環選擇性擴增目標核酸之單股，在該等PCR循環中，黏合步驟在高於未經延伸引子之解鏈溫度但低於經延伸引子之解鏈溫度的溫度下進行。選擇性擴增產生PCR產物混合物，該PCR產物混合物富含欲在後續偵測分析中探測之目標股。

【0013】 除了與目標核酸互補之序列之外，經延伸引子含有5'延伸部分，其含有與相同引子之目標結合部分互補之序列。在不受理論束縛之情況下，諸位發明人認為使用5'延伸部分允許經延伸引子分子之分子內或分子間雜交，且在PCR反應開始時防止此等較長引子與存在於PCR反應中之DNA分子的任意或非特異性結合。此進而防止非特異性DNA擴增且防止PCR產物中之「雜訊」，當擴增以低量存在於生物樣品中之目標時，PCR產物中之「雜訊」可能成問題。

【0014】 本發明之另一方面係用於執行本文所述之非對稱PCR程序之試劑套組。

【圖式簡單說明】

【0015】

圖1：示出適用於本發明之非對稱PCR方法的引子對，其包含可為對稱PCR

方法中所用之傳統引子的未經延伸引子，及由以下構成之經延伸引子：「A」區，其與目標核酸互補；「B」區，其包括「A」區之至少一部分的直接重複序列或反向重複序列；及視情況選用之「C」區，其可包括間隔區序列及/或全部限制性核酸內切酶識別位點之一部分。

圖2A至2C。圖2A示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之反向重複序列時出現的經延伸引子之分子間雜交。圖2B示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之直接重複序列時出現的經延伸引子之分子內雜交。圖2C示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之反向重複序列時出現的經延伸引子之分子內雜交。較佳地，「A」區與「B」區之間的互補區處於或接近於「A」區之5'端。

圖3示出本發明之非對稱PCR反應中之變性步驟。在變性步驟中，將PCR反應混合物（典型地含有生物樣品，該生物樣品含有以下或具有含有以下之風險：目標核酸、非對稱引子對、熱穩定DNA聚合酶及PCR試劑）加熱至高於目標核酸之解鏈溫度，引起目標核酸（若存在）及非對稱引子對中之經延伸引子變性以便形成單股。

圖4示出本發明之非對稱PCR反應之指數期的黏合步驟，其在低於未經延伸引子之解鏈溫度進行。非對稱引子對中之未經延伸引子及經延伸引子均與其對應的互補股雜交。圖4展示如在PCR之初始循環中出現的與目標DNA之黏合（亦被稱作雜交或結合），但在後續循環中黏合可能在引子與PCR產物中之互補序列之間出現。如圖5B及圖6中所描繪，歸因於經延伸引子中之「B」區及視情況選用之「C」區，PCR產物將具有彼等序列或其等之互補序列。

圖5A至5B：圖5A及圖5B示出本發明之非對稱PCR反應之指數期的延伸步驟，在此期間熱穩定DNA聚合酶使用互補DNA作為模板延伸引子DNA。延伸區以短劃線描繪。圖5A中之模板為目標DNA之股，且在圖5B中之模板為使用

非對稱引子對及目標DNA產生之PCR產物的股。

圖6示出本發明之非對稱PCR反應之線性期的同時黏合及延伸步驟，其在高於未經延伸引子之解鏈溫度及低於經延伸引子之解鏈溫度使用PCR產物股2作為模板進行。此引起PCR產物股2之非對稱擴增，截至PCR反應結束，得到相對於PCR產物股1分子過量之PCR產物股2分子。

圖7A至7B：圖7A展示番茄 (*Solanum lycopersicum*) 17S核糖體RNA序列，其具有使用圖7B中所展示之非對稱引子對擴增的以粗體展示之160鹼基目標區。圖7B展示適用於擴增圖7A中以粗體展示之160鹼基區的非對稱引子對，其中經延伸引子之「A」區以普通字展示且「B」區（其為「A」區加雙下劃線之部分的反向重複序列）以粗體字展示。此經延伸引子不含有視情況選用之「C」區。

圖8展示最佳化使用金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 引子及探針的本發明之非對稱PCR方法中之指數循環及線性循環之數目之研究的結果。信號強度以任意單位（「a.u.」）量測。

圖9展示比較使用金黃色葡萄球菌引子及探針經由本發明之非對稱PCR方法對比傳統（對稱）PCR之低複本數目標偵測極限之研究的結果。信號強度以任意單位（「a.u.」）量測。

【詳述】

4.1.定義

【0016】 經延伸引子：PCR引子，其含有：（a）在其3'端之「A」區，該區具有與對應區目標股1至少75%序列一致性或與目標股2中之對應區至少75%序列互補性；（b）在其5'端之「B」區，該區包含與「A」區之至少一部分互補的序列；及（c）視情況選用之「C」區，該區定位於「A」區與「B」區

之間。

【0017】 未經延伸引子：PCR引子，其基本上由具有與目標股2中之對應區至少75%序列一致性或與目標股1中之對應區至少75%序列互補性的核苷酸序列組成。參考未經延伸引子的術語「基本上由……組成」意謂核苷酸序列在與目標序列具有（至少75%）互補性之區的5'可含有不大於3個額外核苷酸。

【0018】 引子對：正向及反向引子對（其每一者可為具有說明目標序列中之可能變異的序列變異之引子的混合物），其能夠與在小於5,000個鹼基對之區內之相同核酸分子的不同股雜交且自該等股起始DNA聚合反應。在某些具體實例中，引子對能夠與在小於2,500個鹼基對或小於1,500個鹼基對之區內之相同核酸分子的不同股雜交且自其起始DNA聚合反應。

【0019】 非對稱引子對：由經延伸引子及未經延伸引子組成之引子對。

【0020】 解鏈溫度（ T_m ）：DNA雙螺旋之一半將解離變成單股時之溫度。由去氧核糖核苷酸（deoxyribonucleotide；DNA）構成之線性引子的 T_m 通常由以下計算：「GC百分比（percent GC）」方法（PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications, Innis等人編, Academic Press (San Diego, Calif. (USA) 1990)或「 $2(A+T) + 4(G+C)$ （ $2(A+T) + 4(G+C)$ ）」方法（Wallace等人, 1979, Nucleic Acids Res. 6 (11):3543-3557)或「最近鄰（Nearest Neighbor）」方法（Santa Lucia, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1460-1465; Allawi及Santa Lucia, 1997, Biochem. 36:10581-10594）。出於申請專利範圍之目的，DNA之 T_m 根據「最近鄰」方法計算，且非天然存在之鹼基（例如2-去氧肌苷）視為腺嘌呤。

【0021】 引子：在其3'端具有自由羥基之具有至少12個核苷酸的DNA寡核苷酸。引子可包括天然存在之核苷酸及非天然存在之核苷酸（例如含有諸如3-硝基吡咯、5-硝基吡咯或2-去氧肌苷，較佳2-去氧肌苷之通用鹼基的核苷

酸)。除非上下文規定，否則術語「引子」亦指當引子設計及建構中包括混合鹼基以允許其與目標核酸分子中之變異體序列雜交時所產生之引子分子的混合物。目標序列變異體可為物種間或物種內變異體。混合鹼基之標準命名法展示於表1：

表 1 混合鹼基命名法	
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

較佳地，每一引子在與目標核酸具有互補性之區中含有不超過三個混合鹼基。在一些具體實例中，引子在與目標核酸具有互補性之區中含有零、一、二或三個混合鹼基。

【0022】 通用引子：序列基本上由經延伸引子之「B」區組成的引子。較佳地，在不存在通用引子之情況下進行本發明之非對稱DNA擴增方法。

【0023】 直接重複序列：在經延伸引子之「B」區之上下文中，「直接重複序列」意謂與「A」區之一部分直接互補（亦即，具有相同5'至3'順序之互補序列）的核苷酸序列。

【0024】 反向重複序列：在經延伸引子之「B」區之上下文中，「反向重複序列」意謂與「A」區之一部分反向互補（亦即，具有相反5'至3'順序之互補序列）的核苷酸序列。

【0025】 PCR試劑：除非上下文規定，否則術語「PCR試劑」係指除模板核酸、熱穩定聚合酶及引子外之PCR反應之組分。PCR試劑典型地包括dNTP（且除了未經標記dNTP之外，可包括經標記（例如經螢光標記）之dNTP）、

緩衝劑及含有二價陽離子之鹽（例如 $MgCl_2$ ）。

【0026】 **目標股1**：目標股1係指雙股目標核酸中與非對稱引子對中之未經延伸引子互補之股。

【0027】 **目標股2**：目標股2係指雙股目標核酸中與非對稱引子對中之經延伸引子之「A」區互補的股。

【0028】 **PCR產物股1**：PCR產物股1係指由目標核酸及非對稱引子對產生之雙股PCR產物中之股，其與非對稱引子對中之未經延伸引子互補。

【0029】 **PCR產物股2**：PCR產物股1係指由目標核酸及非對稱引子對產生之雙股PCR產物中之股，其與非對稱引子對中之經延伸引子互補。

【0030】 **相對應**：相對於共有序列一致性或互補序列之具有不同長度的兩個核酸股，術語「相對應」係指如上下文規定存在於兩股中之序列重疊或互補性區。

【0031】 **近似**：參考整數，術語「近似」擴增該整數以包括至多0.50較低且至多0.49較高之分數值。舉例而言，「近似 $68^{\circ}C$ 」意謂 $67.50^{\circ}C$ 至 $68.49^{\circ}C$ 之溫度，且「近似95%」之序列一致性意謂94.50%至95.49%之序列一致性百分比。

【0032】 **約**：當用於定量上下文中時，術語「約」應視為包括至多超過所述值10%且下至所述值減10%。在範圍之上下文中，術語「約」應視為包括至多超過所述範圍之上限10%且下至低於所述範圍之下限10%的值。

【0033】 **核酸樣品**：意謂可為目標核酸之來源的樣品或用作含有非目標核酸或不含核酸（例如以量測或偵測污染或非特異性擴增）之陰性對照的虛設樣品。核酸樣品不一定含有目標DNA，例如在診斷樣品之情況下，樣品可為疑似含有目標核酸或具有含有目標核酸之風險的生物樣品，例如如4.3節中所描述。

4.2.引子設計

4.2.1.經延伸引子

【0034】 經延伸引子之「A」區具有與目標股1中之對應區至少75%之序列一致性。在某些具體實例中，引子之「A」區與目標股1中之對應區至少80%、至少85%、至少90%或至少95%一致。在其他具體實例中，引子之「A」區具有與目標股1中之對應區100%之序列一致性。

【0035】 換言之，在各種具體實例中，經延伸引子之「A」區具有與目標股2中之對應區之互補序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%或100%之序列一致性。典型地，在引子序列與目標序列之間的任何錯配定位於5'愈多，其愈有可能在PCR反應期間被容許。熟習此項技術者能夠容易地設計具有與目標股小於100%之序列一致性但仍可有效擴增目標DNA之引子序列。

【0036】 「B」區中與「A」區之至少一部分互補的序列可為直接重複序列或反向重複序列。在「B」區含有「A」區之一部分的直接重複序列時，不同經延伸引子分子可與彼此分子間雜交，如圖2B中所展示。在「B」區含有「A」區之一部分的反向重複序列時，經延伸引子分子可以分子內雜交，如圖2C中所展示，或與彼此分子間雜交，如圖2A中所展示。

【0037】 與「B」區中之序列互補的「A」區之部分較佳處於或接近於（例如相隔1、2或3個核苷酸內）「A」區之5'端，亦即，處於或接近於「A」區鄰接「B」區之位置（或當「C區」存在時之「C區」）。

【0038】 經延伸引子之「B」區長度較佳為6至12個核苷酸，亦即，長度為較佳6、7、8、9、10、11或12個核苷酸。在特定具體實例中，經延伸引子之「B」區長度為8至10個核苷酸，亦即，長度為8、9或10個核苷酸。

【0039】 若「C」區存在於經延伸引子中，則其長度較佳為1至6個核苷酸，亦即，長度為較佳1、2、3、4、5或6個核苷酸。

【0040】 經延伸引子之 T_m 較佳（但不必）在近似68°C與近似80°C之間。在特定具體實例中，未經延伸引子之 T_m 在近似72°C與近似78°C之間，例如近似72°C、近似73°C、近似74°C、近似75°C、近似76°C、近似77°C或近似78°C。

【0041】 定位於「A」區與「B」區之間的視情況選用之「C」區可充當「A」區與「B」區之間の間隔區，以允許經延伸引子形成髮夾環及/或將限制性核酸內切酶序列（較佳6剪切序列）引入至PCR產物。限制性核酸內切酶序列可整體在「C」區內或由「C」區之全部或一部分連同分別來自「B」區及「A」區之側接5'及/或3'序列形成。為將對與目標核酸之雜交的干擾減到最小，「C」區較佳與目標股1或目標股2不互補。

【0042】 經延伸引子之 T_m 較佳高於未經延伸引子之 T_m 至少近似6°C。較佳地，經延伸引子之 T_m 高於未經延伸引子之 T_m 近似15°C至30°C。

【0043】 經延伸引子之「A」區之 T_m 較佳不高於或低於與目標（除任何5'延伸部分外）（至少75%）互補之未經延伸引子之部分的 T_m 超過近似3°C，亦即，與目標雜交之正向引子之區的 T_m 較佳不高於或低於與目標雜交之反向引子之區的 T_m 超過近似3°C，且反之亦然。

【0044】 經延伸引子之「A」區長度較佳為至少12個核苷酸，且較佳在12至30個核苷酸之範圍內且更佳為14至25個核苷酸。在某些具體實例中，經延伸引子之「A」區長度為14、15、16、17、18、19或20個核苷酸。

4.2.2.未經延伸引子

【0045】 未經延伸引子具有與目標股2中之對應區至少75%序列一致性的核苷酸序列。在某些具體實例中，未經延伸引子具有與目標股2中之對應區至

少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列一致性的核苷酸序列。在其他具體實例中，未經延伸引子具有與目標股2之對應區100%序列一致性的核苷酸序列。

【0046】 換言之，在各種具體實例中，未經延伸引子具有與目標股2之相對應1區之互補序列最少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%或100%序列一致性的核苷酸序列。典型地，在引子序列與目標序列之間的任何錯配定位於5'愈多，其愈有可能在PCR反應期間被容許。熟習此項技術者能夠容易地設計具有與目標股小於100%之序列一致性但仍可有效擴增目標DNA之引子序列。

【0047】 未經延伸引子可進一步具有1、2或3個核苷酸之5'尾。

【0048】 未經延伸引子之 T_m 較佳（但不必）在近似50°C與近似62°C之間。在特定具體實例中，未經延伸引子之 T_m 在近似59°C與近似62°C之間，例如近似59°C、近似60°C、近似61°C或近似62°C。

【0049】 未經延伸引子之 T_m 較佳比經延伸引子之 T_m 低至少近似6°C。較佳地，未經延伸引子之 T_m 比經延伸引子之 T_m 低近似15°C至30°C。

【0050】 與目標（除任何5'延伸部分外）（至少75%）互補之未經延伸引子之區的 T_m 較佳不高於或低於經延伸引子之「A」區的 T_m 超過近似3°C，亦即，與目標雜交之正向引子之區的 T_m 較佳不高於或低於與目標雜交之反向引子之區的 T_m 超過近似3°C，且反之亦然。

【0051】 未經延伸引子長度較佳為至少12個核苷酸，且較佳在12至30個核苷酸之範圍內且更佳為14至25個核苷酸。在某些具體實例中，未經延伸引子長度為14、15、16、17、18、19或20個核苷酸。

4.2.3.通用引子

【0052】 在例如如美國專利第No. 8,735,067 B2號中所描述之一些非對稱PCR方法中，除了正向及反向引子對之外，使用第三「通用」引子，其具有類似於被添加至引子中之一者中之5'寡核苷酸尾的序列。預期通用引子在初始PCR循環之後參與擴增反應以「平衡」多重擴增反應中之不同目標的擴增效率。

【0053】 在不受理論束縛之情況下，諸位發明人認為包括如美國專利第8,735,067號中所描述之通用引子將降低使用本發明之非對稱引子對的擴增效率，該等通用引子在本發明之上下文中將具有基本上由經延伸引子之「B」區之序列組成的序列（此類通用引子在本文中稱作「通用引子」）。因此，較佳在不存在通用引子之情況下進行本發明之非對稱DNA擴增方法。

【0054】 在一相關具體實例中，本發明之非對稱DNA擴增方法利用每目標區單一非對稱引子對，亦即，不包括任何額外引子，應認識到單獨的引子可為引子分子與由在引子中特定位置處包括混合鹼基產生之緊密相關序列的混合物。出於明晰且避免疑惑之目的，此具體實例並未排除在多重擴增反應中使用複數個非對稱引子對，其限制條件為單一非對稱引子對用於每一擴增子。

4.3.目標序列及樣品製備

【0055】 本發明之PCR方法可用於擴增來自生物或環境來源之核酸。目標分子可以來自所有分類學類別之細胞及組織，包括所有門及綱之病毒、細菌及真核生物、原核生物、原生生物、植物、真菌及動物。動物可為脊椎動物、哺乳動物、靈長類動物且尤其為人類。血液、血清、血漿、組織、細胞、唾液、痰、尿、腦脊髓液、胸膜液、乳汁、眼淚、大便、汗、精液、全細胞、細胞成分及細胞抹片為目標分子之適合來源。

【0056】 在某些特定具體實例中，目標核酸分子來自可見於人類血液、

尿或腹膜液中之病原體，例如細菌、病毒或真菌。此類病原體之實例包括（但不限於）結核分支桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、鳥分枝桿菌副結核亞種（*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*）、金黃色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）（包括對二甲氧苯青黴素敏感之金黃色葡萄球菌及對二甲氧苯青黴素具有抗性之金黃色葡萄球菌（methicillin resistant *Staphylococcus aureus*；MRSA））、化膿性鏈球菌（*Streptococcus pyogenes*）、肺炎鏈球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、無乳鏈球菌（*Streptococcus agalactiae*）、流感嗜血桿菌（*Haemophilus influenzae*）、副流感嗜血桿菌（*Haemophilus parainfluenzae*）、黏膜炎莫拉氏菌（*Moraxella catarrhalis*）、肺炎克雷伯氏桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、大腸桿菌（*Escherichia coli*）、綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、不動桿菌（*Acinetobacter* sp.）、百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）、腦膜炎奈瑟氏菌（*Neisseria meningitidis*）、炭疽芽孢桿菌（*Bacillus anthracis*）、諾卡菌（*Nocardia* sp.）、放線菌（*Actinomyces* sp.）、肺炎黴漿菌（*Mycoplasma pneumoniae*）、肺炎披衣菌（*Chlamydia pneumoniae*）、軍團桿菌（*Legionella species*）、傑氏肺囊蟲（*Pneumocystis jiroveci*）、A型流感病毒、細胞巨大病毒、鼻病毒、屎腸球菌（*Enterococcus faecium*）、鮑氏不動桿菌（*Acinetobacter baumannii*）、無枝菌酸棒狀桿菌（*Corynebacterium amycolatum*）、產氣腸桿菌（*Enterobacter aerogenes*）、糞腸球菌CI 4413（*Enterococcus faecalis* CI 4413）、黏質沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）、馬鏈球菌（*Streptococcus equi*）及白色念珠菌（*Candida albicans*）。

【0057】 目標核酸分子較佳為DNA但亦可為RNA。在RNA模板之情況下，PCR反應之前可以為反轉錄反應，以產生用作PCR反應中之目標分子的cDNA分子。反轉錄反應可在相同反應混合物中或與PCR反應分開之反應混合

物中進行。反轉錄方法在此項技術中已熟知。

【0058】 在併入至初始PCR混合物中之前，目標核酸分子可自生物或環境樣品經反轉錄（若為RNA）、提取及/或純化。

【0059】 在一些具體實例中，藉由如美國專利公開案第20170218356號中所描述之珠粒攪打程序（bead beating process）提取目標核酸分子，該公開案之內容以全文引用之方式併入本文中。

4.4.PCR反應

4.4.1.初始反應混合物

【0060】 初始PCR反應混合物包括：

- 核酸樣品；
- 非對稱引子對；
- 熱穩定DNA聚合酶；及
- PCR試劑。

【0061】 **核酸樣品：**樣品核酸可包括生物樣品或環境樣品或由其衍生之樣品，例如自其提取或純化之DNA。生物樣品可為例如血液、血清、血漿、組織、細胞、唾液、痰、尿、腦脊髓液、胸膜液、乳汁、眼淚、大便、汗、精液、全細胞、細胞成分、細胞抹片或其提取物或衍生物。樣品核酸亦可為陽性或陰性對照樣品。陰性對照核酸樣品可能不含核酸或含有已知不含與非對稱引子對雜交之序列的核酸。

【0062】 **非對稱引子對：**PCR反應中之經延伸引子及未經延伸引子之初始濃度可各自在200 nM至6 μ M範圍內。經延伸引子及未經延伸引子可以等莫耳量包括於初始PCR反應中，例如各自處於約200 nM與1 μ M之間範圍內的濃度，例如各自處於500 nM之濃度。可替代地，經延伸引子及未經延伸引子可以非等

莫耳量包括於初始PCR反應中。在某些具體實例中，經延伸引子之初始濃度較佳超過未經延伸引子之濃度，例如約2倍至30倍莫耳過量。因此，在某些方面中，經延伸引子濃度在約1 μM 與6 μM 之間範圍內，且未經延伸引子濃度在約50 nM與200 nM之間範圍內。

【0063】 非對稱引子對可經設計以擴增來自任何來源之核酸，且對於診斷應用，非對稱引子對可經設計以擴增來自諸如4.3節中所標識之彼等病原體的DNA。

【0064】 非對稱引子對可經設計以便能夠同時擴增存在於多個物種中之保守核酸序列，例如細菌中之高度保守16S核糖體序列。

【0065】 **熱穩定DNA聚合酶**：可用於本發明之非對稱PCR之熱穩定聚合酶包括（但不限於）Vent（Tli/嗜熱熱球菌（*Thermococcus Litalis*））、Vent外切、Deep Vent、Deep Vent外切、Taq（水生棲熱菌（*Thermus aquaticus*））、Hot Start Taq、Hot Start Ex Taq、Hot Start LA Taq、DreamTaq™、TopTaq、RedTaq、Taqurate、NovaTaq™、SuperTaq™、Stoffel片 段、Discoverase™ dHPLC、9°Nm、Phusion®、LongAmp Taq、LongAmp Hot Start Taq、OneTaq、Phusion® Hot Start Flex、Crimson Taq、Hemo KlenTaq、KlenTaq、Phire Hot Start II、DyNAzyme I、DyNAzyme II、M-MulV Reverse Transcript、PyroPhage®、Tth（嗜熱棲熱菌（*Thermos termophilus*）HB-8）、Tfl、Amlitherm™、Bacillus DNA、DisplaceAce™、Pfu（強烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*））、Pfu Turbot、Pfund、ReproFast、PyroBest™、VeraSeq、Mako、Manta、Pwo（沃氏火球菌（*pyrococcus, woesei*））、ExactRun、KOD（小寶熱球菌（*thermococcus kodakkaraensis*））、Pfx、ReproHot、Sac（嗜酸熱硫化葉菌（*Sulfolobus acidocaldarius*））、Sso（硫磺礦硫化葉菌（*Sulfolobus solfataricus*））、Tru（紅色棲熱菌（*Thermus ruber*））、Pfx50™（澤里格氏

熱球菌 (*Thermococcus zilligi*))、AccuPrime™ GC-Rich (煙孔火葉菌 (*Pyrolobus fumarius*))、火球菌GB-D、Tfi (絲狀棲熱菌 (*Thermus filiformis*))、Tfi 外切、ThermalAce™、Tac (嗜酸熱原體 (*Thermoplasma acidophilum*))、(Mth (熱自養甲烷桿菌 (*M. thermoautotrophicum*))、Pab (阿比西火球菌 (*Pyrococcus abyssi*))、Pho (堀越氏火球菌 (*Pyrococcus horikosihi*))、B103 (小短尾噬菌體 (Picovirinae Bacteriophage) B103)、Bst (嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*))、Bst大片段、Bst 2.0、Bst 2.0 WarmStart、Bsu、Therminator™、Therminator™ II、Therminator™ III及Therminator™ T。在一較佳具體實例中，DNA聚合酶為Taq聚合酶，諸如Taq、Hot Start Taq、Hot Start Ex Taq、Hot Start LA Taq、DreamTaq™、TopTaq、RedTaq、Taqurate、NovaTaq™或SuperTaq™。

【0066】 **PCR試劑**：PCR試劑 (dNTP、緩衝劑、鹽) 為熟習此項技術者所熟知。可將其分別地添加至初始PCR反應混合物或整體或部分預混合，例如作為PCR主混合物之一部分。

【0067】 適宜地，可將PCR主混合物在初始化反應之前製備且儲存以供使用。PCR主混合物可包括DNA聚合酶、dNTP (包括必要時視情況選用之經螢光標記之dNTP)、緩衝劑及/或鹽，及視情況選用之反轉錄酶及諸如防腐劑的各種添加劑。引子及樣品核酸典型地不併入至PCR主混合物中，但在起始PCR反應之前不久併入至初始PCR反應混合物中。

【0068】 本發明之方法進一步包括以下視情況選用之步驟：藉由將初始反應混合物之組分在PCR容器 (諸如PCR管) 中合併在起始熱循環之前形成初始反應混合物。

4.4.2.PCR反應條件

【0069】 用於本發明之非對稱PCR方法之非對稱循環的說明性集合在表2中說展示。

表 2				
階段	步驟	溫度	時間	循環數
初始變性	初始變性	90 至 100℃，較佳 95℃	0 至 5 分鐘，較佳 2 分鐘	0 至 1
指數期	變性	90 至 100℃，較佳 95℃	15 至 25 秒，較佳 20 秒	20 至 40，較佳 30 至 37（例如 35）
	黏合	58℃	12 至 18 秒，較佳 15 秒	
	延伸	72℃	30 至 50 秒，較佳 40 秒	
線性期	變性	90 至 100℃，較佳 95℃	15 至 25 秒，較佳 20 秒	15 至 25，較佳 20
	同時黏合及延伸	72℃	40-60 秒，較佳 50 秒	
經延長之延伸	經延長之延伸	72℃	0 至 5 分鐘，較佳 2 分鐘	0 至 1

【0070】 表2中所展示之循環數的範圍可用於任何非對稱引子對，且最佳循環數將取決於初始PCR混合物中目標DNA之複本數：初始複本數愈大，指數期中需要愈少循環數以產生足夠數量之充當線性期模板之PCR產物。對循環數之最佳化係熟習此項技術者之日常工作。

【0071】 在經延伸引子之T_m高於72℃（例如75至80℃）且未經延伸引子之T_m高於58℃且低於72℃（例如60至62℃）之情況下且當熱穩定DNA聚合酶在72℃下具有活性時，表2中所展示之溫度尤其適用。

【0072】 可根據引子之解鏈溫度及PCR產物長度改變循環時間，特定而言延伸時間，其中較長PCR產物需要較長延伸時間。經驗法則（rule of thumb）係延伸步驟應為每1,000個擴增子鹼基至少60秒。可在線性期中延長延伸步驟以提供用於黏合之額外時間。

4.5.PCR產物之偵測

【0073】 可用螢光標記對藉由本文所述之方法產生之富含單股PCR產物的PCR產物股2進行標記以用於偵測。

【0074】 螢光標記可藉由在PCR期間併入經螢光標記之核苷酸及/或藉由使用用於PCR之經標記引子來達成。

【0075】 適合螢光部分之實例包括FITC、EDANS、德克薩斯紅 (Texas red)、6-joe、TMR、Alexa 488、Alexa 532、「BODIPY FL/C3」、「BODIPY R6G」、「BODIPY FL」、Alexa 532、「BODIPY FL/C6」、「BODIPY TMR」、5-FAM、「BODIPY 493/503」、「BODIPY 564」、「BODIPY 581」、Cy3、Cy5、R110、TAMRA、德克薩斯紅Texas red及x-若丹明 (x-Rhodamine)。

【0076】 可將螢光部分連接至dNTP，特定言之含有胞嘧啶作為鹼基之彼等（胞苷酸、胞苷5'-磷酸、胞苷5'-二磷酸、胞苷5'-三磷酸或其聚合物或含有胞苷酸之聚合物）。

【0077】 dNTP標記之位置可以在鹼基（胺基）、磷酸基（OH基團）或去氧核苷部分（2'-或3'-OH基團）處。較佳位置係在鹼基處。

【0078】 如其他核苷酸，經螢光標記之dNTP可在隨機位點（典型地dC位點）併入至PCR擴增子之兩股中，且由DNA聚合酶延伸。

【0079】 螢光dNTP可以高度濃縮形式商購且可在不調節各未經標記dNTP之濃度的情況下添加至PCR反應混合物中。對於大部分PCR擴增而言，dNTP與螢光dNTP之典型比率在100:1與1000:1之間。因此，PCR試劑中可以未經標記dNTP之0.1%至1%（莫耳）量包括經螢光標記之dNTP。

【0080】 可經由與探針分子（例如結合至微陣列之探針分子）雜交實現對經螢光標記之PCR產物（例如在本發明之方法中過量產生之單股產物股2）的偵測。如美國專利第9,738,926號中所描述，適合微陣列系統利用三維交聯聚合

物網路，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

4.6.套組

【0081】 本發明進一步提供適於進行本文所述之非對稱PCR方法的套組。套組典型地包括至少一個非對稱引子對。此外，本發明之套組可包括探針分子、DNA聚合酶、未經標記dNTP、經標記dNTP、緩衝劑、鹽溶液或其任何組合。可將試劑（例如DNA聚合酶、dNTP、鹽及/或緩衝劑）中之一些以主混合物形式預合併。

5.實施例

【0082】 使用經延伸引子作為正向引子且使用未經延伸引子作為反向引子，用設計成擴增來自金黃色葡萄球菌16S基因（不包括引子序列）之506-bp區的非對稱引子對創建初始PCR反應。核酸樣品為人類DNA外加已知複本數之金黃色葡萄球菌染色體組DNA（此等研究之目標DNA）。正向引子（計算 T_m 為68.1°C）在5'末端經Cy5標記且含有「A」區（計算 T_m 為64.09°C）、與「A」區之5'端互補之「B」區，且不含作為在「A」區與「B」區之間間隔區之「C」區。反向引子包括可與目標序列中之任何其他鹼基進行鹼基配對之肌苷。取決於互補目標鹼基，反向引子之 T_m 的範圍為60至61.9°C。使初始PCR反應經歷以下PCR循環：

- 在95°C下之2分鐘之初始變性期，
- 各自由在95°C下變性20 s、在58°C下黏合15 s及在72°C下延伸40 s組成之指數循環；
- 各自由在95°C下變性20 s及隨後在72°C下同時黏合/延伸組成之線性循環，及

- 最後在72℃下之2分鐘經延長之延伸期。

【0083】 在實驗1中，改變目標DNA分子數及指數及線性循環數，以使對該目標核酸之複本數的指數及線性循環數最佳化。測定所包括之反向（未經延伸引子）之量，使得截至指數期結束，未經延伸引子將被耗竭或幾乎耗竭，且截至非對稱PCR之線性期，極少未經延伸引子之分子將繼續存在。此等計算之結果在表3中所展示：

表 3					
反向引子濃度	每公升中反向引子分子	20 μ l 反應物中反向引子分子	完全用盡引子所需的循環數		
			1 個染色體組複本	10 個染色體組複本	100 個染色體組複本
0.1	6.02^{+16}	1.20^{+12}	40.1	36.8	33.5
0.2	1.20^{+17}	2.41^{+12}	41.1	37.8	34.5
0.5	3.01^{+17}	6.02^{+12}	42.4	39.1	35.8

【0084】 藉由與微陣列雜交對實驗1中所產生之PCR產物之量進行定量。結果展示於圖8中。

【0085】 在實驗2中，使用各自500 nM之正向探針及反向探針在PCR反應中對使用非對稱PCR及對稱PCR由不同模板濃度產生之PCR產物的量進行比較。對於非對稱反應，所使用的指數循環及線性循環數分別為35及20。在對稱反應中，不使用線性循環。

【0086】 藉由與微陣列雜交偵測PCR產物之量。結果展示於圖9中。大於0.95之R²值指示在各種情況下回歸線係對數據之有效擬合。

6.特定具體實例

【0087】 本發明藉由下文之特定具體實例例示。

1. 一種用於經由非對稱聚合酶鏈反應（PCR）產生單股DNA擴增子之方法，該方法包含以下步驟：

（a）使初始混合物在擴增PCR條件下經歷熱循環之第一階段，該初始混合

物包含：

- (i) 核酸樣品；
- (ii) 非對稱引子對，
- (iii) 熱穩定DNA聚合酶，及
- (iv) PCR試劑，

其中該熱循環之第一階段包含循環通過至少三個溫度，該三個溫度包含：

(1) 用於變性之高於目標核酸之 T_m 的第一溫度、(2) 用於引子黏合之低於未經延伸引子之 T_m 的第二溫度、及(3) 適用於由該熱穩定DNA聚合酶進行之延伸的第三溫度，

由此產生中間混合物，若該目標核酸存在於該樣品中，則該中間混合物包含由未經延伸引子及經延伸引子二者延伸之DNA擴增子；

(b) 使該中間混合物經歷熱循環之第二階段，該之第二階段包含循環通過：(1) 用於變性之高於該等DNA擴增子之 T_m 的第四溫度、(2) 第五溫度，其(i) 低於經延伸引子之 T_m ，(ii) 高於未經延伸引子之 T_m 且(iii) 適用於由該熱穩定DNA聚合酶進行之延伸，

由此產生最終混合物，若該目標核酸存在於該樣品中，則該最終混合物包含單股DNA擴增子。

2. 如具體實例1之方法，其中步驟(a)之前為初始變性期。
3. 如具體實例2之方法，其中初始變性在第一溫度下進行。
4. 如具體實例1至3中任一項之方法，其中步驟(b)之後為額外延伸期。
5. 如具體實例4之方法，其中額外延伸在第五溫度下進行。
6. 如具體實例1至5中任一項之方法，其中第一溫度與第四溫度相同。
7. 如具體實例1至6中任一項之方法，其中第三溫度與第四溫度相同。
8. 如具體實例1至7中任一項之方法，其中經延伸引子之「B」區為「A」區

之至少一部分之反向重複序列的互補序列。

9. 如具體實例8之方法，其中「B」區長度為至少4個核苷酸。

10. 如具體實例8或具體實例9之方法，其中「B」區比「A」區短3個核苷酸。

11. 如具體實例1至7中任一項之方法，其中經延伸引子之「B」區為「A」區之至少一部分之直接重複序列的互補序列。

12. 如具體實例11之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為至少4個核苷酸。

13. 如具體實例11或具體實例12之方法，其中經延伸引子之「B」區比「A」區短3個核苷酸。

14. 如具體實例1至11中任一項之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為7至15個核苷酸。

15. 如具體實例14之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為6至12個核苷酸。

16. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為8至10個核苷酸。

17. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為6個核苷酸。

18. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為7個核苷酸。

19. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為8個核苷酸。

20. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為9個核苷酸。

21. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為10個核苷酸。

22. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為11個核苷酸。

23. 如具體實例15之方法，其中經延伸引子之「B」區長度為12個核苷酸。

24. 如具體實例1至23中任一項之方法，其中未經延伸引子不具有5'尾延伸

部分。

25. 如具體實例1至23中任一項之方法，其中未經延伸引子具有3個核苷酸或更短之5'尾延伸部分。

26. 如具體實例1至25中任一項之方法，其中未經延伸引子長度為12至35個核苷酸。

27. 如具體實例26之方法，其中未經延伸引子長度為15至25個核苷酸。

28. 如具體實例26之方法，其中未經延伸引子長度為18至20個核苷酸。

29. 如具體實例1至28中任一項之方法，其中經延伸引子之「A」區長度為12至35個核苷酸。

30. 如具體實例29之方法，其中經延伸引子之「A」區長度為15至25個核苷酸。

31. 如具體實例29之方法，其中經延伸引子之「A」區長度為18至20個核苷酸。

32. 如具體實例1至31中任一項之方法，其中經延伸引子包含「C」區。

33. 如具體實例32之方法，其中「C」區長度為1至8個核苷酸。

34. 如具體實例32或具體實例33之方法，其中單獨或與側接「A」區核苷酸及/或「B」區核苷酸組合之「C」區形成限制性核酸內切酶之識別位點。

35. 如具體實例34之方法，其中限制性核酸內切酶為6剪切。

36. 如具體實例1至35中任一項之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高至少8°C。

37. 如具體實例36之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高10°C至30°C。

38. 如具體實例37之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高15°C至30°C。

39. 如具體實例38之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高12°C至20°C。

40. 如具體實例39之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高13°C至17°C。

41. 如具體實例1至40中任一項之方法，其中經延伸引子之 T_m 範圍在68°C與80°C之間。

42. 如具體實例41之方法，其中經延伸引子之 T_m 在73°C與77°C之間。

43. 如具體實例42之方法，其中經延伸引子之 T_m 為75°C。

44. 如具體實例1至43中任一項之方法，其中未經延伸引子之 T_m 範圍在50°C與62°C之間。

45. 如具體實例44之方法，其中未經延伸引子之 T_m 範圍在58°C與62°C之間。

46. 如具體實例45之方法，其中未經延伸引子之 T_m 為60°C。

47. 如具體實例1至46中任一項之方法，其中經延伸引子之「A」區的 T_m 範圍在50°C與62°C之間。

48. 如具體實例47之方法，其中經延伸引子之「A」區的 T_m 範圍在58°C與62°C之間。

49. 如具體實例48之方法，其中經延伸引子之「A」區的 T_m 為60°C。

50. 如具體實例1至49中任一項之方法，其中經延伸引子之「A」區的 T_m 與未經延伸引子之 T_m 相差不超過3°C。

51. 如具體實例1至50中任一項之方法，其中第一溫度為95°C。

52. 如具體實例1至51中任一項之方法，其中第二溫度為58°C。

53. 如具體實例1至52中任一項之方法，其中第三溫度為72°C。

54. 如具體實例1至53中任一項之方法，其中第四溫度為95°C。

55. 如具體實例1至54中任一項之方法，其中第五溫度為72°C。
56. 如具體實例1至55中任一項之方法，其中使由中間混合物中未經延伸引子及經延伸引子二者延伸之DNA擴增子彼此雜交以形成雙股DNA擴增子。
57. 如具體實例1至56中任一項之方法，其中藉由PCR反應產生之DNA擴增子長度在100至2,500個核苷酸之範圍內。
58. 如具體實例57之方法，其中藉由PCR反應產生之DNA擴增子長度在200至2,000個核苷酸之範圍內。
59. 如具體實例57之方法，其中藉由PCR反應產生之DNA擴增子長度在250至1,500個核苷酸之範圍內。
60. 如具體實例57之方法，其中藉由PCR反應產生之DNA擴增子長度在300至1,000個核苷酸之範圍內。
61. 如具體實例1至60中任一項之方法，其中核酸樣品為測試核酸樣品。
62. 如具體實例61之方法，其中測試核酸樣品含有以下或具有含有以下之風險或疑似含有以下：目標核酸分子。
63. 如具體實例1至60中任一項之方法，其中核酸樣品為對照核酸樣品。
64. 如具體實例63之方法，其中對照核酸樣品為已知含有一或多種目標核酸分子之陽性對照樣品。
65. 如具體實例63之方法，其中對照核酸樣品為已知含有目標核酸分子之陽性對照樣品。
66. 如具體實例1至65中任一項之方法，其為多重PCR反應。
67. 如具體實例66之方法，其中初始混合物包含至少兩個非對稱引子對。
68. 如具體實例67之方法，其中初始混合物包含兩個、三個或四個非對稱引子對。
69. 如具體實例61至68中任一項之方法，其中初始混合物進一步包含對照

引子。

70. 如具體實例69之方法，其中對照引子與目標序列互補，該目標序列不同於與非對稱引子對互補之目標序列。

71. 如具體實例69或具體實例70之方法，其中對照引子為標準引子。

72. 如具體實例69或具體實例70之方法，其中對照引子為非對稱引子對。

73. 如具體實例1至72中任一項之方法，其中在不存在通用引子之情況下進行PCR。

74. 如具體實例1至73中任一項之方法，其中第一階段包含20至40輪之熱循環。

75. 如具體實例74之方法，其中第二階段包含30至37輪之熱循環。

76. 如具體實例1至75中任一項之方法，其中第一階段引起目標核酸之兩股的指數擴增。

77. 如具體實例1至76中任一項之方法，其中第二階段包含15至25輪之熱循環。

78. 如具體實例1至77中任一項之方法，其中第二階段引起目標核酸之單股的線性擴增。

79. 如具體實例1至78中任一項之方法，其中初始混合物中經延伸引子及未經延伸引子中之每一者的濃度範圍在200 nM至6 μ M之間。

80. 如具體實例1至79中任一項之方法，其中初始混合物中經延伸引子及未經延伸引子中之每一者的濃度相同。

81. 如具體實例80之方法，其中初始混合物中經延伸引子及未經延伸引子中之每一者的濃度範圍在100 nM與1000 nM之間。

82. 如具體實例81之方法，其中初始混合物中經延伸引子及未經延伸引子中之每一者的濃度範圍在250 nM與750 nM之間。

83. 如具體實例82之方法，其中初始混合物中經延伸引子及未經延伸引子中之每一者的濃度為近似500 nM。

84. 如具體實例1至79中任一項之方法，其中初始混合物中經延伸引子與未經延伸引子之濃度不同。

85. 如具體實例84之方法，其中初始混合物中經延伸引子之濃度範圍在1 μ M與6 μ M之間。

86. 如具體實例84或具體實例85之方法，其中初始混合物中未經延伸引子之濃度範圍在50 nM與200 nM之間。

87. 如具體實例1至86中任一項之方法，其中經延伸引子經標記。

88. 如具體實例87之方法，其中經延伸引子在其5'端經標記。

89. 如具體實例87或具體實例88之方法，其中標記為螢光團。

90. 如具體實例1至89中任一項之方法，其中非對稱引子對包含與細菌序列互補之序列。

91. 如具體實例90之方法，其中細菌序列為16S DNA序列。

92. 如具體實例90之方法，其中細菌序列為細菌內部經轉譯區DNA序列。

93. 如具體實例1至89中任一項之方法，其中非對稱引子對包含與真菌DNA序列互補之序列。

94. 如具體實例1至93中任一項之方法，其中樣品為生物樣品。

95. 如具體實例94之方法，其中生物樣品為血液或自其加工、提取或部分分離（fractionated）之樣品。

96. 如具體實例94之方法，其中生物樣品為腹膜透析液或自其加工、提取或部分分離之樣品。

97. 如具體實例94之方法，其中生物樣品為尿或自其加工、提取或部分分離之樣品。

98. 如具體實例94之方法，其中生物樣品為痰或自其加工、提取或部分分離之樣品。

99. 如具體實例94之方法，其中生物樣品為傷口拭子或自其加工、提取或部分分離之樣品。

100. 如具體實例1至93中任一項之方法，其中樣品為環境樣品。

101. 如具體實例1至100中任一項之方法，其進一步包含偵測單股PCR擴增子。

102. 如具體實例101之方法，其包含使單股PCR擴增子與探針分子雜交及偵測擴增子與探針分子之雜交。

103. 如具體實例102之方法，其中探針分子經標記。

104. 如具體實例103之方法，其中探針分子經螢光團標記。

105. 如具體實例102至104中任一項之方法，其中探針分子與經延伸引子之至少一部分互補。

106. 如具體實例105之方法，其中探針分子長度為至少15個核苷酸。

107. 如具體實例105或具體實例106之方法，其中探針分子具有與經延伸引子之「A」區的至少8個核苷酸互補的區。

108. 如具體實例102至104中任一項之方法，其中探針分子與未經延伸引子之至少一部分互補。

109. 如具體實例108之方法，其中探針分子長度為至少15個核苷酸。

110. 如具體實例108或具體實例109之方法，其中探針分子具有與經延伸引子之「A」區的至少8個核苷酸互補的區。

【0088】 雖然已說明且描述各種特定具體實例，但應瞭解可在不偏離本發明之精神及範疇的情況下做出各種改變。

7.參考文獻之引用

【0089】 本申請案中所引用之所有公開案、專利、專利申請案及其他文獻均出於所有目的特此以全文引用之方式併入，引用的程度就如同個別地指示將各個別公開案、專利、專利申請案及其他文獻以引用之方式併入以用於所有目的一樣。在併入本文中之一或多個文獻之教示內容與本發明不一致之情況下，以本說明書之教示內容為準。

【符號說明】

無

【發明摘要】

【中文發明名稱】 非對稱PCR方法、引子及套組

【英文發明名稱】 ASYMMETRIC PCR METHODS, PRIMERS AND KITS

【中文】

本發明提供一種用於製備單股產物之非對稱PCR擴增方法及適用於其的引子及套組。

【英文】

The disclosure provides an asymmetric PCR amplification method for preparation of single-stranded product and primers and kits useful therefor.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用於經由非對稱聚合酶鏈反應（PCR）產生單股DNA擴增子之方法，該方法包含以下步驟：

（a）使初始混合物在擴增PCR條件下經歷熱循環之第一階段，該初始混合物包含：

- （i）核酸樣品；
- （ii）非對稱引子對，
- （iii）熱穩定DNA聚合酶，及
- （iv）PCR試劑，

其中該熱循環之第一階段包含循環通過至少三個溫度，該三個溫度包含：

（1）用於變性之高於目標核酸之 T_m 的第一溫度、（2）用於引子黏合之低於未經延伸引子之 T_m 的第二溫度、及（3）適用於由該熱穩定DNA聚合酶進行之延伸的第三溫度，

由此產生中間混合物，若該目標核酸存在於該樣品中，則該中間物包含由未經延伸引子及經延伸引子二者延伸之DNA擴增子；

（b）使該中間混合物經歷熱循環之第二階段，該之第二階段包含循環通過：（1）用於變性之高於雙股DNA擴增子之 T_m 的第四溫度、（2）第五溫度，其（i）低於經延伸引子之 T_m ，（ii）高於未經延伸引子之 T_m 且（iii）適用於由該熱穩定DNA聚合酶進行之延伸，

由此產生最終混合物，若該目標核酸存在於該樣品中，則該最終混合物包含單股DNA擴增子。

【第2項】如請求項1所述之方法，其中步驟（a）之前為初始變性期，視情況其中在該第一溫度下進行初始變性。

【第3項】如請求項1所述之方法，其中步驟（b）之後為額外延伸期，視

情況其中在該第五溫度下進行該額外延伸。

【第4項】如請求項1所述之方法，其中該第一溫度與該第四溫度相同及/或該第三溫度與該第五溫度相同。

【第5項】如請求項1所述之方法，其中經延伸引子之「B」區為「A」區之至少一部分之反向重複序列的互補序列，或為「A」區之至少一部分之直接重複序列的互補序列。

【第6項】如請求項1所述之方法，其中未經延伸引子不具有5'尾延伸部分或具有3個核苷酸或更短之5'尾延伸部分。

【第7項】如請求項1所述之方法，其中經延伸引子包含「C」區，視情況其中單獨或與側接「A」區核苷酸及/或「B」區核苷酸組合之該「C」區形成限制性核酸內切酶之識別位點。

【第8項】如請求項1所述之方法，其中經延伸引子之 T_m 比未經延伸引子之 T_m 高至少8°C。

【第9項】如請求項1所述之方法，其中經延伸引子之「A」區的 T_m 與未經延伸引子之 T_m 相差不超過3°C。

【第10項】如請求項1所述之方法，其中

- (a) 該第一溫度為95°C；
- (b) 該第二溫度為58°C；
- (c) 該第三溫度為72°C；
- (d) 該第四溫度為95°C；
- (e) 該第五溫度為72°C；或
- (f) (a) 至 (e) 之任何組合。

【第11項】如請求項1所述之方法，其中使由該中間混合物中未經延伸引子及經延伸引子二者延伸之DNA擴增子彼此雜交以形成雙股DNA擴增子。

【第12項】如請求項1所述之方法，其中該核酸樣品為測試核酸樣品。

【第13項】如請求項1所述之方法，其中該核酸樣品為對照核酸樣品。

【第14項】如請求項1所述之方法，其為多重PCR反應。

【第15項】如請求項1所述之方法，其中在不存在通用引子之情況下進行該PCR。

【第16項】如請求項1所述之方法，其中該第一階段引起該目標核酸之兩股的指數擴增及/或該第二階段引起該目標核酸之單股的線性擴增。

【第17項】如請求項1所述之方法，其中該非對稱引子對包含與細菌序列或真菌DNA序列互補之序列。

【第18項】如請求項1所述之方法，其中該樣品為生物樣品，視情況其中該生物樣品為：

- (a) 血液或自其加工、提取或部分分離（fractionated）之樣品；
- (b) 腹膜透析液或自其加工、提取或部分分離之樣品；
- (c) 尿或自其加工、提取或部分分離之樣品；
- (d) 痰或自其加工、提取或部分分離之樣品；或
- (e) 傷口拭子或自其加工、提取或部分分離之樣品。

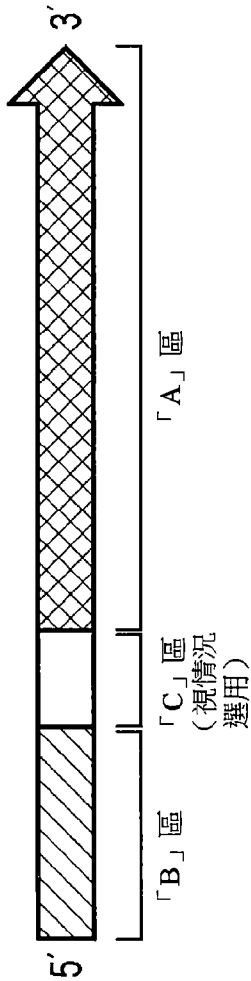
【第19項】如請求項1所述之方法，其中該樣品為環境樣品。

【第20項】如請求項1所述之方法，其進一步包含偵測該單股PCR擴增子。

【發明圖式】

非對稱引子對

經延伸引子



未經延伸引子

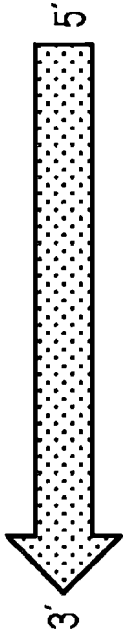
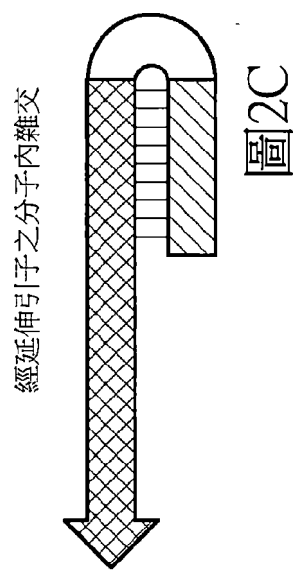
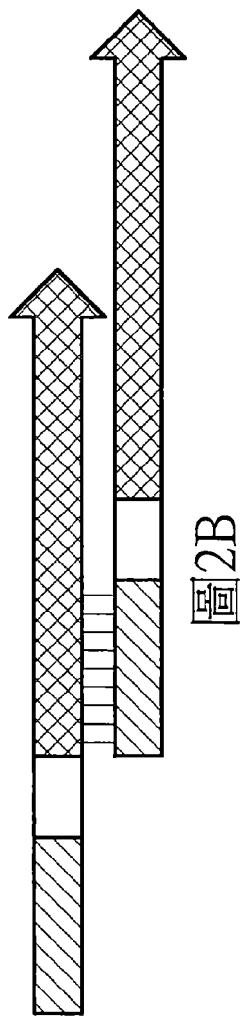
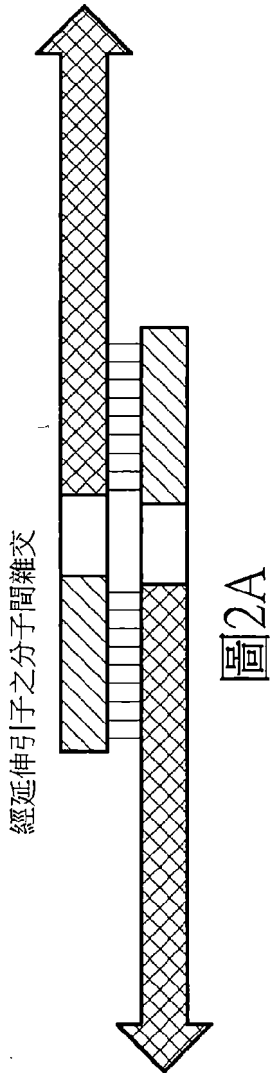


圖1



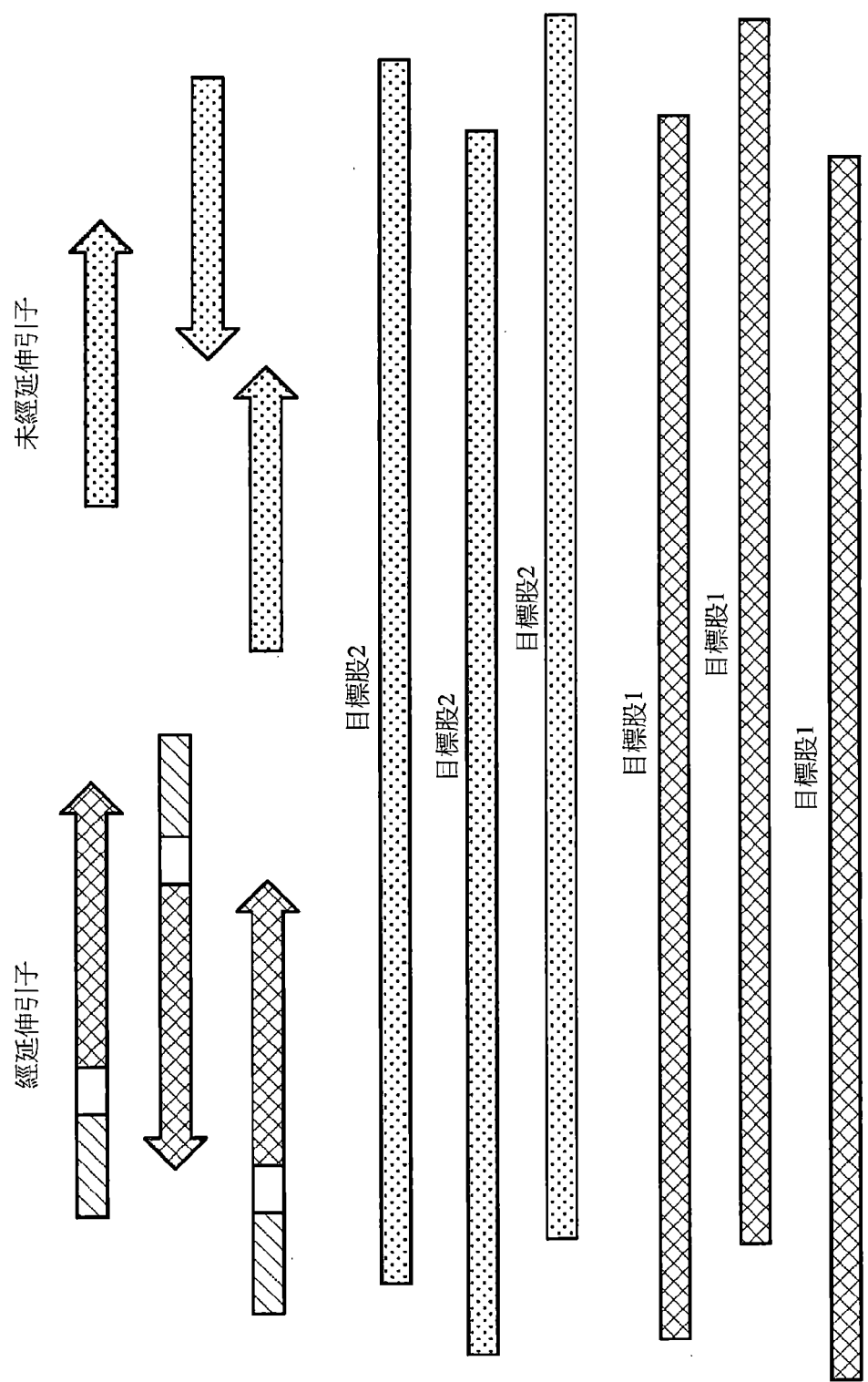
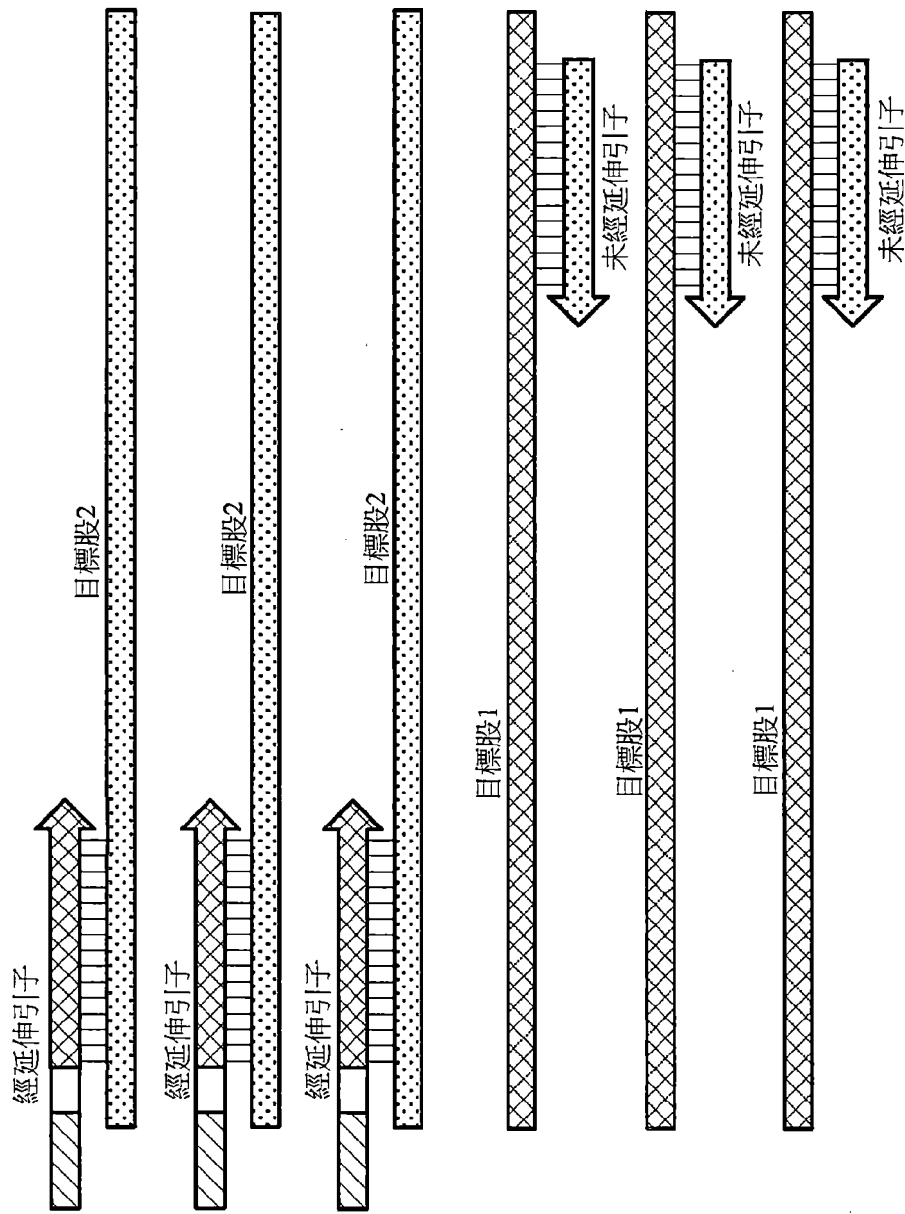
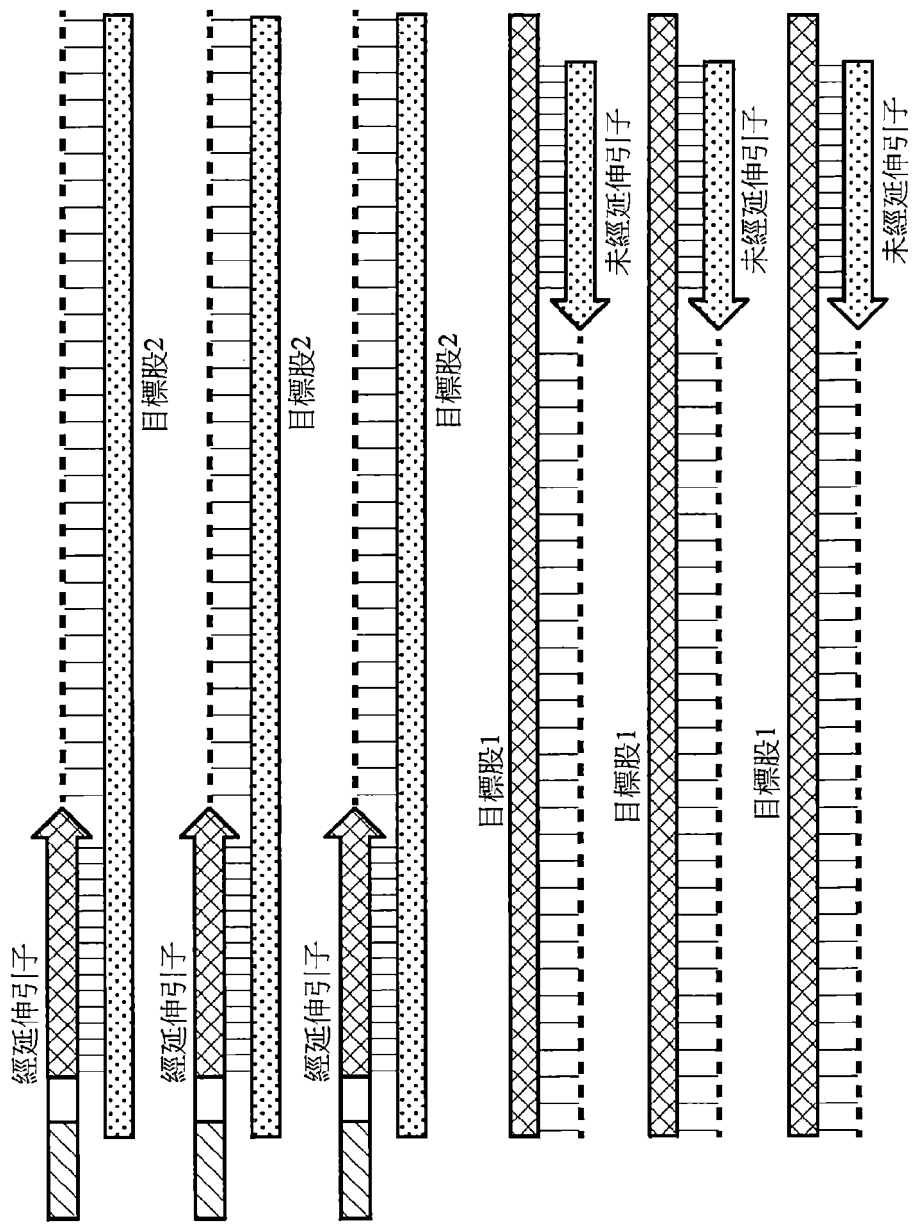


圖3



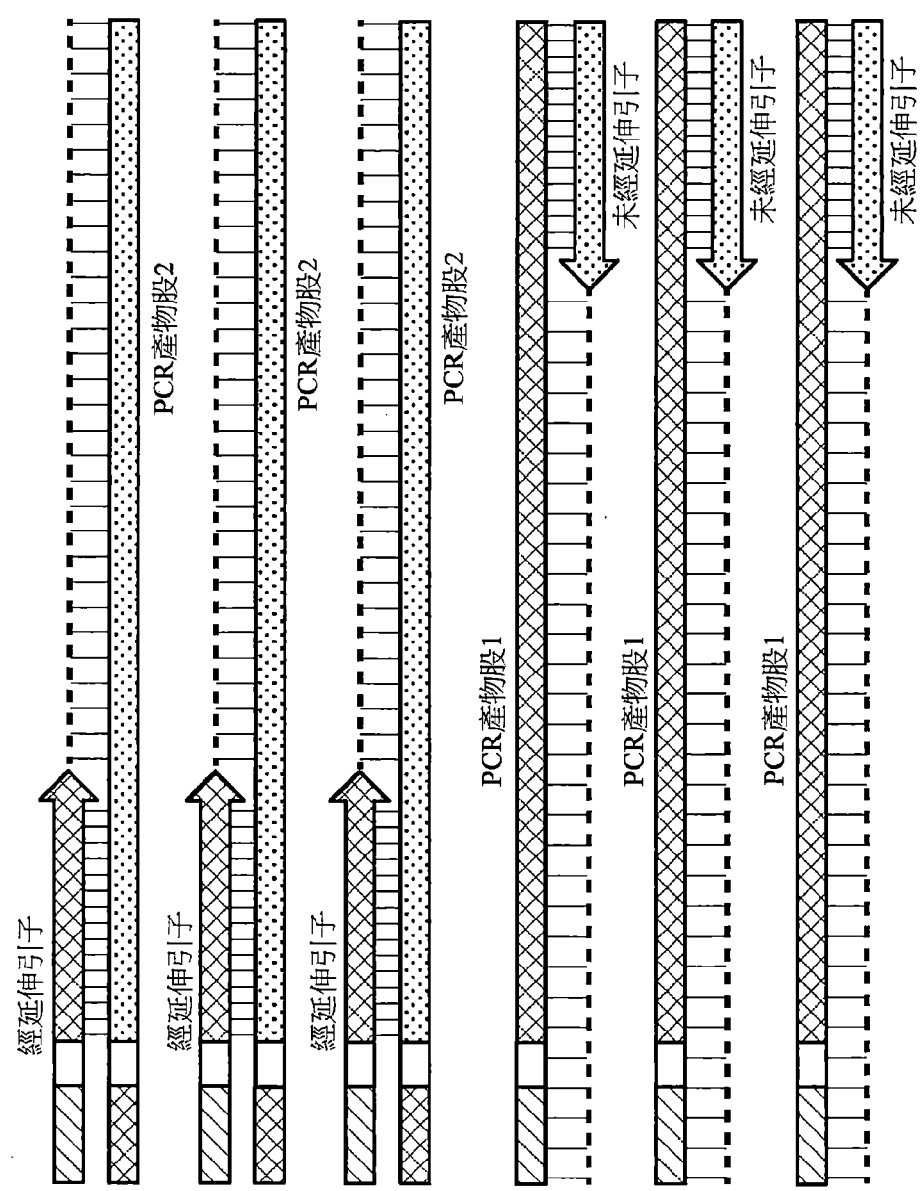
黏合-指數期

圖4



延伸-指數期 (來自目標核酸)

圖5A



延伸-指數期 (來自PCR產物)

圖5B

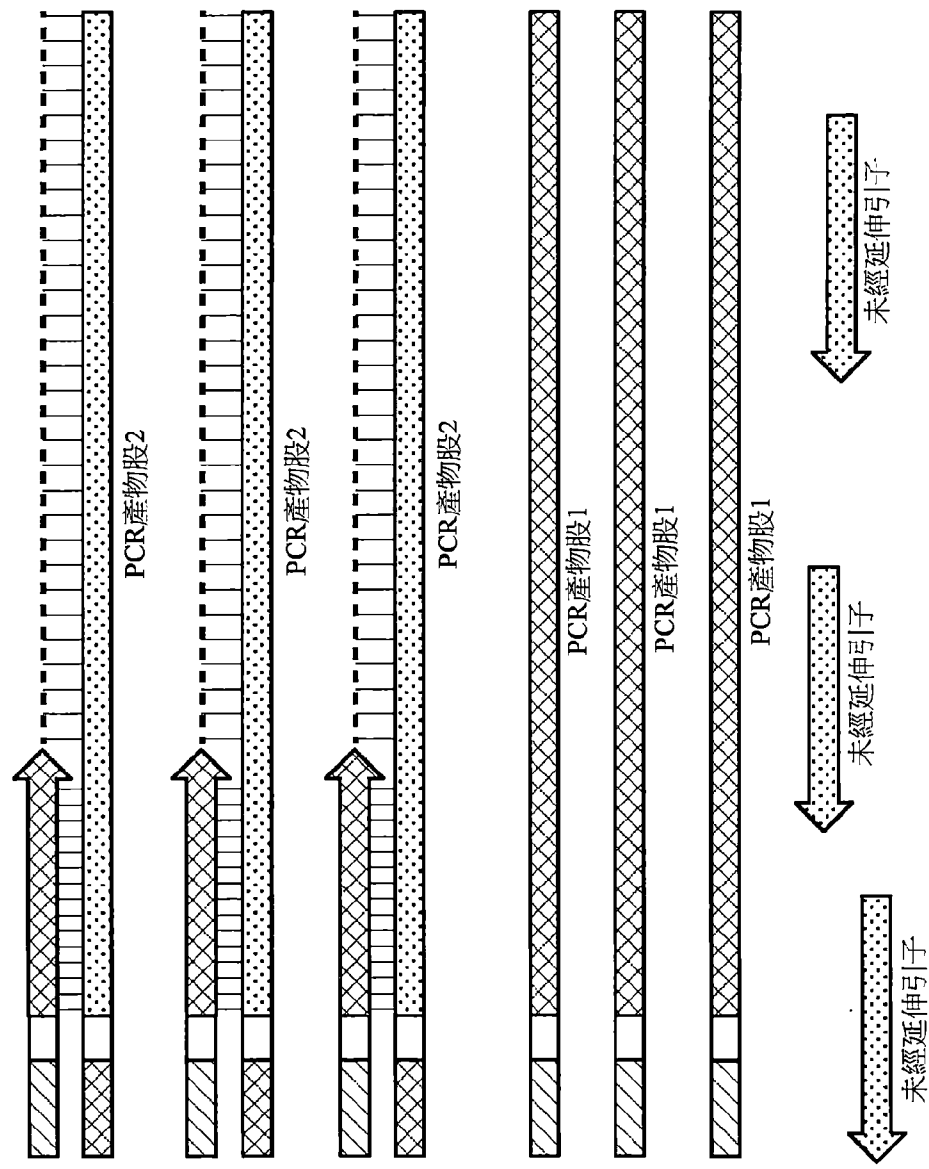


圖6

TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGTGTAGTATGAAC
AAATTCAGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTT**TGTTGATGGTATCTACTACTC**
GGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCAACAAACCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTATTA
GATAAAAGGTCGACGGGGCTCTGCTGCGATGATTCATGATAACTC**GACGGATCGCACGGCCATCGT**
GCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGG
TGACGGGTGACGGAGAAATTAGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACACATCCAAAGGA
AGGCAGCAGCGCGCAAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAAATAAATAACCAATACCGGGCT
CTATGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTG
GTGCCAGCAGCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGACTTTGGGATGGCCGGCGGTCCGCCCTAGGTGTGCACCGGTCTCGTCCCTTCTGTGGCGGA
TGCGCTCCTGGCCTTAATTGGCCGGTCTGTCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAA
AGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATTATAGGATTTTCGGTCTCTATTACGTTGGCCT
TCGGGATCGGAGTAATGATTAAACAGGGACAGTCGGGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAATTTCT
TGGATTTATGAAAGACGAACAACCTGCGAAAGCATTTTGCCAAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGT
TGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCCGA
TGTTTGCTTTTAGGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTC
GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACAGGAGTGGAGCTGCGGCTTAATTTGACT
CAACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTCTTGATTCTA
TGGGTGGTGGTGCAATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGTTAATTCGTTAAACGAACGAGA
CCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGTATCCCTTCGGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTAGCCTTTTA
GGCCGCGGAAGTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCACGCGCGCTACAC
TGATGTATTCACGAGCTTATAGCCTTGCCGACAGGCCCGGGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGG
ATAGATCATTGCAATTGTTGCTTTCAACGAGGAATTCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC
TAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCTACCGATTGAATGATCCGGTGAAATGTTCCGGAT
CGCGGACGTGGCGGTTTCGCTGCCCGACGTGCGGAGAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAA
GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT

圖7A

經延伸正向引子

CAT CAA ACA TG TTT GAT GGT ATC TAC TAC TCG GAT AAC CG

未經延伸反向引子

GCG ATC CGT CGA GTT ATC ATG AAT C

圖7B

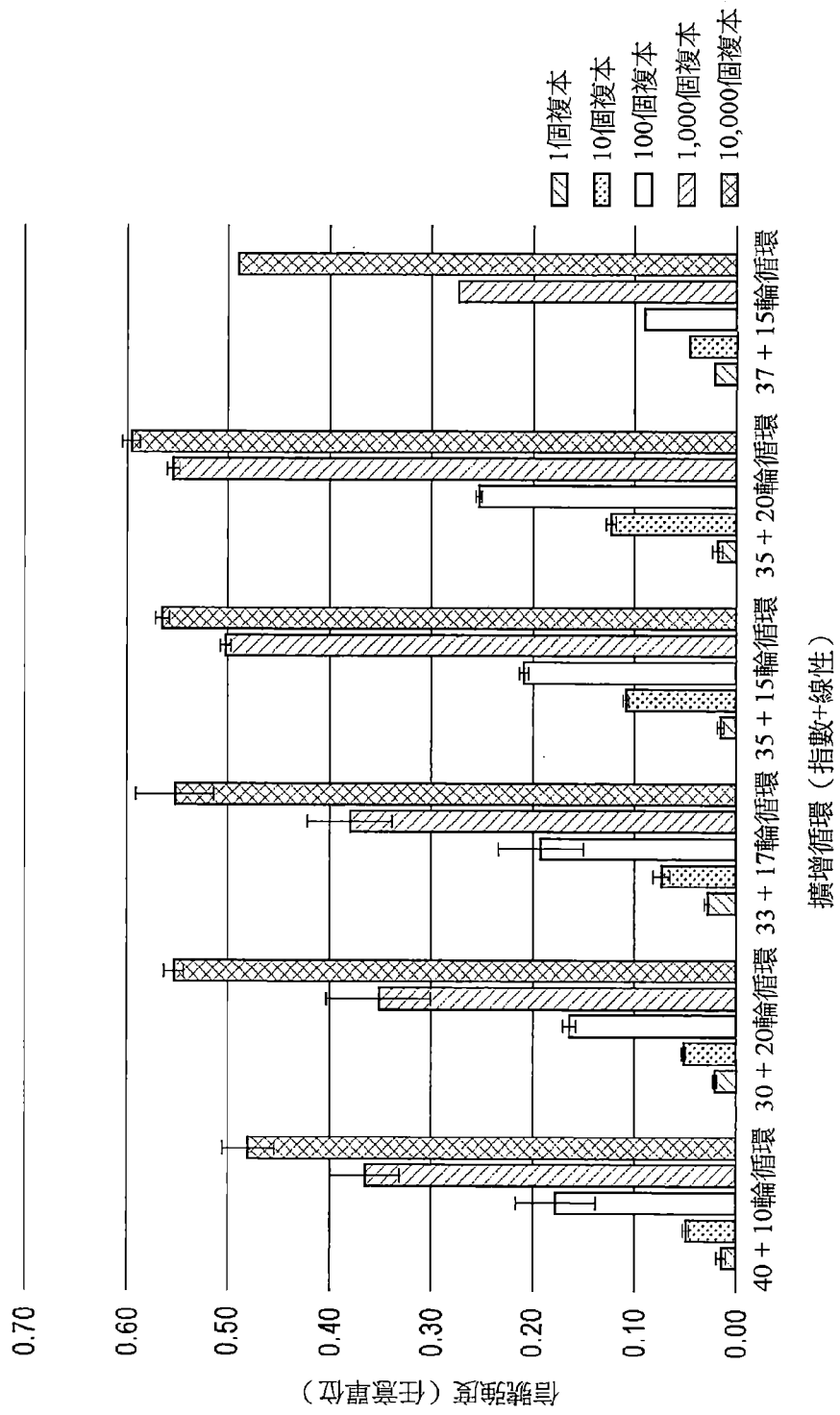


圖8

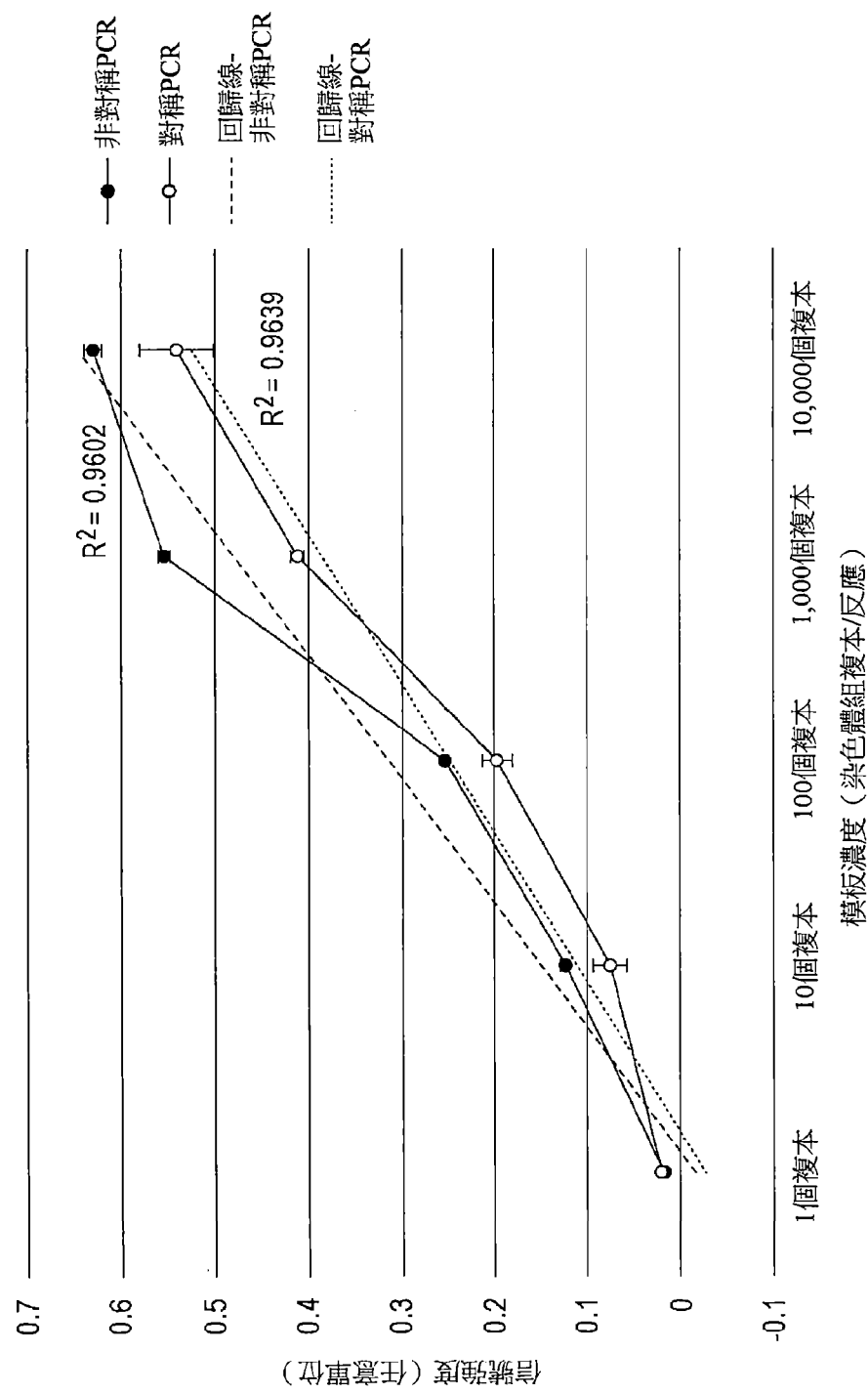


圖9

【發明說明書】

【中文發明名稱】 非對稱PCR方法、引子及套組

【英文發明名稱】 ASYMMETRIC PCR METHODS, PRIMERS AND KITS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於製備單股產物之非對稱PCR擴增方法及適用於其的引子及套組。

【先前技術】

【0002】 聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction；PCR）廣泛用於擴增DNA片段，包括染色體組DNA以及自RNA反轉錄之cDNA，以用於診斷及其他目的之分析。PCR為以下步驟之重複系列：變性或解鏈以產生單股模板；引子黏合；及藉由諸如水生棲熱菌（*Thermus aquaticus*；Taq）DNA聚合酶之熱穩定DNA聚合酶進行之引子延伸。

【0003】 典型三步驟PCR方案（參見PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications, Innis等人編, Academic Press (San Diego, Calif. (USA) 1990, 第1章）可包括在93至95℃下變性或解鏈大於5秒，在55至65℃下引子黏合10至60秒及在聚合酶高度活性之溫度（例如對於TaqDNA聚合酶而言72℃）下引子延伸15至120秒。典型二步驟PCR方案之不同之處在於用於引子黏合之溫度與用於引子延伸之溫度相同，例如60℃或72℃。對於三步驟PCR或二步驟PCR任一者而言，擴增涉及將反應混合物通過前述步驟系列循環許多次，典型地25至40次。在反應過程中，反應中之單獨步驟之時間及溫度可在循環之間保持不變，或其可在反應過程中之一或多個點處改變以提高效率或增強選擇性。

【0004】 除了引子對及目標核酸之外，PCR反應混合物典型地含有典型

地處於等莫耳濃度之四種去氧核糖核苷酸5'三磷酸（deoxyribonucleotide 5' triphosphate；dNTP）中之每一者、熱穩定聚合酶、二價陽離子（典型地 Mg^{2+} ）及緩衝劑。除非聚合酶具有反轉錄酶活性，否則典型地包括反轉錄酶以用於RNA目標。此類反應之體積典型地為25至100 μl 。可在相同反應中擴增多個目標序列。在cDNA擴增之情況下，除非PCR中所用之聚合酶具有反轉錄酶活性，否則PCR之前為用於將RNA反轉錄成cDNA之獨立反應。特定PCR擴增之循環的數目取決於數個因素，包括：a)起始物質之量，b)反應效率及c)偵測或對產物之後續分析之方法及靈敏度。用於典型循環擴增反應之循環條件、試劑濃度、引子設計及適當設備為此項技術中所熟知（參見例如Ausubel, F. Current Protocols in Molecular Biology (1988)第15章：「The Polymerase Chain Reaction」, J. Wiley (New York, N.Y. (USA))）。

【0005】 理想地，每一擴增子分子之每一股在一端與引子雜交（被稱作「結合」至引子），且充當用於後續輪之合成的模板。引子延伸產物或擴增子之產生速率由此係指數的，在每一循環期間倍增。擴增子包括正（+）股及負（-）股，其彼此雜交，形成雙股。

【0006】 PCR反應典型地設計成對稱，亦即，藉由利用設計成彼此「解鏈溫度」或「 T_m 」相同或在數 $^{\circ}C$ 內之正向引子及反向引子製造雙股複本。通常用於引子設計之電腦軟體程式警告使用者避免高 T_m 差值，且具有自動 T_m 匹配特徵。

【0007】 為區分典型PCR與本文所述之非對稱PCR方法，典型PCR在本文中被稱作「對稱」PCR。對稱PCR由此引起一或多種雙股擴增子分子之指數增加，且在每一輪複製期間每一擴增子之兩股以等量累積。經由對稱PCR之指數擴增的效率最終降低，且擴增子累積速率減緩且停止。對對稱PCR之動力分析展現反應由以下構成：a)未偵測到之擴增期（初始循環），在此期間目標

序列之兩股按指數律增加，但迄今所累積之產物之量小於使用中之特定偵測方法的可偵測量；b) 偵測到之擴增期（額外循環），在此期間目標序列之兩股繼續平行地增加且產物之量可偵測；c) 平台期（末端循環），在此期間擴增子之兩股的合成逐漸停止且產物之量不再增加。對稱反應減緩且停止，因為濃度增加之互補擴增子股彼此雜交（再黏合），且此在競爭中超過獨立引子與其對應目標股雜交之能力。典型地，使反應進行足夠長以保證累積可偵測量之產物，而不用考慮實現該目的所需的精確循環數目。

【0008】 對直接在PCR反應中製造單股DNA具有有限用途之技術係「非對稱PCR。（asymmetric PCR.）」Gyllensten及Erich, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988)；Gyllensten及Erich, 1991, 美國專利案第5,066,584號。傳統非對稱PCR不同於對稱PCR，此係因為引子中之一者以限制量添加，典型地另一引子之濃度的一百分之一至五分之一。如同對稱PCR，雙股擴增子在早期溫度循環期間積聚，但取決於起始模板之數目，典型地在15至25個PCR循環之後，一種引子耗乏。一股之線性擴增在後續循環期間利用未耗乏引子進行。文獻中所報告之非對稱PCR反應中所用之引子通常與已知用於對稱PCR之引子相同。Poddar (Poddar, 2000, Mol. Cell Probes 14: 25-32) 包括40個熱循環之端點分析比較用於擴增腺病毒受質的對稱及非對稱PCR。其報告50:1之引子比率最佳且非對稱PCR分析具有較好靈敏度，然而，該靈敏度對於推測上含有較低數目之目標分子的稀釋受質溶液顯著下降。

【0009】 因此，需要能夠例如在診斷應用中偵測以低量存在於樣品中之目標分子的經改良非對稱PCR擴增方法。

【發明內容】

【0010】 本發明係關於經改良非對稱PCR方法及適用於其的引子及套

組。

【0011】 本發明之非對稱PCR方法包括指數期及線性期。在指數期期間，目標核酸之兩股經擴增。在線性期期間，股中僅一者經擴增，得到過量之目標核酸之單股。

【0012】 非對稱PCR方法經由使用具有不同長度及解鏈溫度之引子對實現過量之單股，其中較長引子在本文中被稱作「經延伸引子」且較短引子在本文中被稱作「未經延伸引子」。經延伸引子之解鏈溫度比未經延伸引子高，且可用以使用PCR循環選擇性擴增目標核酸之單股，在該等PCR循環中，黏合步驟在高於未經延伸引子之解鏈溫度但低於經延伸引子之解鏈溫度的溫度下進行。選擇性擴增產生PCR產物混合物，該PCR產物混合物富含欲在後續偵測分析中探測之目標股。

【0013】 除了與目標核酸互補之序列之外，經延伸引子含有5'延伸部分，其含有與相同引子之目標結合部分互補之序列。在不受理論束縛之情況下，諸位發明人認為使用5'延伸部分允許經延伸引子分子之分子內或分子間雜交，且在PCR反應開始時防止此等較長引子與存在於PCR反應中之DNA分子的任意或非特異性結合。此進而防止非特異性DNA擴增且防止PCR產物中之「雜訊」，當擴增以低量存在於生物樣品中之目標時，PCR產物中之「雜訊」可能成問題。

【0014】 本發明之另一方面係用於執行本文所述之非對稱PCR程序之試劑套組。

【圖式簡單說明】

【0015】

圖1：示出適用於本發明之非對稱PCR方法的引子對，其包含可為對稱PCR

方法中所用之傳統引子的未經延伸引子，及由以下構成之經延伸引子：「A」區，其與目標核酸互補；「B」區，其包括「A」區之至少一部分的直接重複序列或反向重複序列；及視情況選用之「C」區，其可包括間隔區序列及/或全部限制性核酸內切酶識別位點之一部分。

圖2A至2C。圖2A示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之反向重複序列時出現的經延伸引子之分子間雜交。圖2B示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之直接重複序列時出現的經延伸引子之分子內雜交。圖2C示出當「B」區含有「A」區之至少一部分之反向重複序列時出現的經延伸引子之分子內雜交。較佳地，「A」區與「B」區之間的互補區處於或接近於「A」區之5'端。

圖3示出本發明之非對稱PCR反應中之變性步驟。在變性步驟中，將PCR反應混合物（典型地含有生物樣品，該生物樣品含有以下或具有含有以下之風險：目標核酸、非對稱引子對、熱穩定DNA聚合酶及PCR試劑）加熱至高於目標核酸之解鏈溫度，引起目標核酸（若存在）及非對稱引子對中之經延伸引子變性以便形成單股。

圖4示出本發明之非對稱PCR反應之指數期的黏合步驟，其在低於未經延伸引子之解鏈溫度進行。非對稱引子對中之未經延伸引子及經延伸引子均與其對應的互補股雜交。圖4展示如在PCR之初始循環中出現的與目標DNA之黏合（亦被稱作雜交或結合），但在後續循環中黏合可能在引子與PCR產物中之互補序列之間出現。如圖5B及圖6中所描繪，歸因於經延伸引子中之「B」區及視情況選用之「C」區，PCR產物將具有彼等序列或其等之互補序列。

圖5A至5B：圖5A及圖5B示出本發明之非對稱PCR反應之指數期的延伸步驟，在此期間熱穩定DNA聚合酶使用互補DNA作為模板延伸引子DNA。延伸區以短劃線描繪。圖5A中之模板為目標DNA之股，且在圖5B中之模板為使用

非對稱引子對及目標DNA產生之PCR產物的股。

圖6示出本發明之非對稱PCR反應之線性期的同時黏合及延伸步驟，其在高於未經延伸引子之解鏈溫度及低於經延伸引子之解鏈溫度使用PCR產物股2作為模板進行。此引起PCR產物股2之非對稱擴增，截至PCR反應結束，得到相對於PCR產物股1分子過量之PCR產物股2分子。

圖7A至7B：圖7A展示番茄 (*Solanum lycopersicum*) 17S核糖體RNA序列，其具有使用圖7B中所展示之非對稱引子對擴增的以粗體展示之160鹼基目標區。圖7B展示適用於擴增圖7A中以粗體展示之160鹼基區的非對稱引子對，其中經延伸引子之「A」區以普通字展示且「B」區（其為「A」區加雙下劃線之部分的反向重複序列）以粗體字展示。此經延伸引子不含有視情況選用之「C」區。

圖8展示最佳化使用金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 引子及探針的本發明之非對稱PCR方法中之指數循環及線性循環之數目之研究的結果。信號強度以任意單位（「a.u.」）量測。

圖9展示比較使用金黃色葡萄球菌引子及探針經由本發明之非對稱PCR方法對比傳統（對稱）PCR之低複本數目標偵測極限之研究的結果。信號強度以任意單位（「a.u.」）量測。

【實施方式】

4.1.定義

【0016】 經延伸引子：PCR引子，其含有：（a）在其3'端之「A」區，該區具有與對應區目標股1至少75%序列一致性或與目標股2中之對應區至少75%序列互補性；（b）在其5'端之「B」區，該區包含與「A」區之至少一部分互補的序列；及（c）視情況選用之「C」區，該區定位於「A」區與「B」區