



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119753103 A

(43) 申请公布日 2025.04.04

(21) 申请号 202510021594.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2020.05.07

C12Q 1/6844 (2018.01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/6825 (2018.01)

1906461.7 2019.05.08 GB

(62) 分案原申请数据

202080034226.7 2020.05.07

(71) 申请人 DNAE诊断有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 大卫·艾伦·戴维森

格雷厄姆·沃斯利

贾勒特·基尔帕克 赛缪尔·里德

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

有限公司 11112

专利代理师 麦善勇 张天舒

权利要求书2页 说明书13页
序列表(电子公布) 附图33页

(54) 发明名称

组合的液相和固相DNA扩增

(57) 摘要

本申请涉及组合的液相和固相DNA扩增,具体描述了用于有效扩增并检测群体中的某些核酸序列的方法。可以(例如)通过测序进一步表征所选择的群体。该方法包括组合的液相和固相扩增。

1. 一种用于对来自更广泛的核酸序列的群体中的核酸片段的亚群的多重序列特异性扩增的方法,包括:

使具有液体部分的系统与固体载体接触,其中所述液体部分包含核酸样品、两对或以上非固定化的扩增引物和用于核酸扩增的试剂,其中所述固体载体具有两种或以上固定化的扩增引物,其被配置为扩增两种或以上不同的序列,其中将不同序列的扩增引物固定在已知的位置,并且其中所述系统包括能够辨别所述固定引物的位置的检测系统;

a. 使用所述非固定化的扩增引物进行核酸扩增反应,以产生第一非固定化的核酸扩增产物;

b. 使用所述两种或以上固定化的扩增引物进一步扩增所述第一非固定化的核酸扩增产物,以产生固定化的第二核酸扩增产物;

以下两者中的一者

i. 实时查询在所述固定化的第二核酸扩增产物处产生的定位信号,或者

ii. 除去所述液体部分和第一非固定化的扩增产物,并替换为具有与所述固定化的第二核酸扩增产物杂交的引物的新液体部分,以及以下两者中的一者

直接检测所述杂交引物;或者

使包含至少一种核苷酸的溶液流过所述固定化的第二扩增产物以延伸所述杂交引物,以及

检测所述第二核酸扩增产物的存在、不存在或序列。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述固定化的引物位于开放微阵列上或位于单独的孔中。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述固定化的引物位于单独的孔中,并且将所述单独的孔同时暴露于相同试剂部分中。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中在扩增之前从所述固相中释放所述液体部分中的所述非固定化的扩增引物。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过热循环进行所述扩增。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述扩增为等温扩增。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中通过实时查询产生的定位信号进行所述固定化的第二核酸扩增产物的检测。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中溶液中的两种引物以不同的浓度存在从而产生不对称扩增。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中与所述第二核酸扩增产物杂交的引物是经荧光标记的。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中通过检测核苷酸掺入时释放的质子检测所述扩增产物。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述检测使用ISFET传感器。

12. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述扩增产物的检测包括荧光报告探针和随后的荧光测定。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中使用具有相同核酸序列的扩增引物获得所述第一扩增产物和所述第二扩增产物。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述固定化的扩增引物扩增所述第一扩增产物的内部段, 使得所述第二扩增产物比所述第一扩增产物短。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述两种或以上固定化的扩增引物相差单个碱基, 从而检测所述第一核酸扩增产物中的单碱基变体。

组合的液相和固相DNA扩增

[0001] 本专利申请是申请号为2020800342267、申请日为2020年5月7日、发明名称为“组合的液相和固相DNA扩增”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于序列特异性扩增来自更广泛的核酸序列的群体中的核酸片段亚群的方法。本发明明确地仅检测所需的靶序列。本发明的方面涉及用于此类方法的核酸构建体。本发明描述了用于有效靶向扩增并检测群体中的特定核酸序列的方法。

背景技术

[0003] 鉴定血液和其他生物样品中的病原体对于有效治疗包括脓毒症的多种疾病状态至关重要。在英国,每小时有5人死于脓毒症,并且全部脓毒症幸存者中有25%的患者遭受永久的、改变人生的后果。早期检测并鉴定细菌感染的病原体对于预防脓毒症的发作和成功治疗脓毒症是必要的。检测并鉴定血源性感染的现有方法包括血液培养和使用抗生素敏感性试验。这些方法包括细胞的培养,这在时间和金钱这两者上都是昂贵的。通常,在可以获得细胞培养结果之前,将发生脓毒性休克。

[0004] 诸如PCR之类可以通过分析病原体的核酸鉴定样品中病原体的现有分子检测方法的应用受到低的总灵敏度水平的限制。当分析人类样品时,由于存在大量的非靶(人类)核酸,因此这尤其是个问题。这些非靶核酸可以抑制靶(病原体)核酸的下游纯化和扩增,导致假阴性结果,或由于非特异性扩增而给出病原体核酸的假阳性读数。

[0005] 例如,存在几种抗生素抗性基因,其由于点突变或其他多态性而具有多种变体,并且其中特定突变的存在可以引起与另一突变相比不同的治疗策略。因此,重要的是,以及时和成本有效的方式进行这些多态性的鉴定。使用PCR和其他扩增反应的现有鉴定策略能力有限,并且实验室可以采用测序以阐明内部序列并鉴定多态性--其实施时耗时且昂贵。因此,相对于非靶核酸,选择性扩增靶核酸的群体对于医药行业和研究具有重大价值。

[0006] 扩增反应通常依赖于用于待扩增的各所需序列的一对扩增引物。虽然可以组合几对非固定化的引物,但是由于引物之间的交叉杂交,组合大量引物对通常是不可行的。因此,通常使用单独溶液部分中的单独引物进行多重PCR,从而需要大量的样品。本发明描述了对扩增反应的改进,该扩增反应的改进能够在单个样品量中对多种不同的引物进行序列选择性扩增。

[0007] 还公开了用于乳液PCR的方法,其中稀释单个模板,使得油乳液中的水泡平均每个水泡包含少于一个模板分子。可以包括具有单个固定化的引物的水珠,第二引物在溶液中。因此,使用两种引物的混合物进行扩增,其中一种引物是固定化的,并且另一种引物在溶液中。然而,与本文所述方法中进一步扩增第一扩增产物的情况相反,其仅在每个反应部分中产生单个扩增产物。

[0008] 还已知其中两种引物都是固定化的扩增方法,例如基于Illumina簇的桥接扩增。在这种情况下,在游离溶液中没有引物。

发明内容

[0009] 本发明提供了双相扩增反应,包括固相和液相这两者的(热循环或等温)扩增反应,该扩增反应可以使用固定化的和非固定化的引物以及靶DNA模板的组合,以在溶液中和表面上同时生成DNA扩增子。可以在扩增后的终点试验中或实时检测扩增子的存在或不存在。这种双相方法不同于包括乳液PCR的现有技术,因为它包括固相(即基于表面的)扩增和液相扩增。

[0010] 可以使用一种或以上非固定化的引物扩增核酸样品。该液相生成的DNA以及靶DNA模板也可以作为或随后作为在固相上用于附加反应的模板,由此,作为DNA扩增反应的一部分,一个或以上固定化的引物与液相模板相互作用。通过将不同序列的引物固定在已知位置,并使用能够辨别该位置的检测系统(例如,使用CMOS IC芯片上的ISFET或基于荧光/光学成像系统的阵列),读数为系统提供了进一步的辨别能力。

[0011] 在此,我们提出了一种新方法,以实现来自更广泛的核酸序列的群体中的核酸片段的亚群的多重序列特异性扩增。

[0012] 本申请描述了一种方法,包括用于扩增并分析核酸序列的方法,该方法包括:

[0013] a.使具有液体部分(liquid volume)的系统与固体载体接触,其中该液体部分包含核酸样品、两种或以上非固定化的扩增引物和用于核酸扩增的试剂,并且固体载体具有一种或以上固定化的扩增引物;

[0014] b.使用非固定化的扩增引物进行核酸扩增反应,以产生第一非固定化的核酸扩增产物;

[0015] c.使用一种或以上固定化的扩增引物进一步扩增第一非固定化的核酸扩增产物,以产生固定化的第二核酸扩增产物;

[0016] d.以下两者中的一者

[0017] i.实时查询在固定化的第二核酸扩增产物处产生的定位信号,或者

[0018] ii.除去液体部分和第一非固定化的扩增产物,并替换为具有与固定化的第二核酸扩增产物杂交的引物的新液体部分,以及以下两者中的一者

[0019] 1.直接检测杂交引物,或者

[0020] 2.使包含至少一种核苷酸的溶液流过固定化的第二扩增产物,以延伸杂交引物,以及

[0021] e.检测第二核酸扩增产物的存在、不存在或序列。

[0022] 可以如下进行该方法,其中在扩增之前,从固相释放液体部分中的非固定化的扩增引物。使用非固定化的引物的核酸扩增反应可以使用两对或以上非固定化的引物。任何阶段的核酸扩增都可以是等温的,或者可以通过热循环进行任何阶段的核酸扩增。

[0023] 根据该方法,与第二核酸扩增产物杂交的引物可以是经荧光标记的,并且可以实现随后的荧光测定。可供选择地,可以如下进行该方法,其中由(例如)ISFET传感器通过检测核苷酸掺入时释放的质子检测扩增产物。

[0024] 可以以这种方式进行该方法,使用具有相同核酸序列的扩增引物获得第一扩增产物和第二扩增产物。

[0025] 该方法还可以包括固定化的扩增引物扩增第一扩增产物的内部段,使得第二扩增产物比第一扩增产物短。

[0026] 该方法还可以包括将相同的第一液体部分暴露于两种或以上固定化的扩增引物中,其中各引物扩增不同的序列。两种或以上固定化的扩增引物可以相差单个碱基,从而检测第一核酸扩增过程中的单碱基变体。

[0027] 该方法的固定化的引物可以位于开放微阵列上或位于单独的孔中。可以将单独的孔同时暴露于相同试剂部分中。如果孔包含具有不同序列的固定化的引物,则可以在不同的孔中生成不同的扩增子,从而能够在单一液体部分内实现多重扩增。

[0028] 本发明的另一方面提供了一种用于扩增并检测核酸序列的系统,包括与固体载体接触的液体部分,其中液体部分包含核酸样品、两种或以上非固定化的扩增引物和用于核酸扩增的试剂,并且固体载体具有一种或以上固定化的扩增引物,其中所述系统包括用于检测扩增产物的传感器。

[0029] 可以用光学或电学方法检测扩增产物。为了进行光学检测,需要用荧光标记物标记扩增产物,然后通过光学方案检测标记物。

[0030] 无论检测到光输出还是电输出,都可以经由诸如场效应晶体管(FET)之类的硅基传感器的阵列进行感测。所选择的FET可以是任何合适的CMOS芯片,包括(但不限于)离子敏感场效应晶体管(ISFET)。将传感器配置成对在时间或空间这两者中的一者上或两者上检测到的信号进行整合,以确定扩增产物的存在或不存在,或在一些情况下确定存在的扩增产物的量。与光学阵列的一些部署不同,不将传感器配置成输出成像。

附图说明

[0031] 图1:示出了单一定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)的示意图。

[0032] 图2:示出了多重定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)的示意图。

[0033] 图3:示出了实施洗脱的示意图。发生在需要芯片上的流动能力的开放系统上。在扩增反应期间,液相中的产物扩增子落在固相引物上,固相引物延伸以在芯片表面上产生许多经延伸的扩增子。扩增后,将扩增产物和试剂洗掉,以在芯片表面留下单链扩增子。将洗脱的引物和酶上样到芯片上,并且在短的杂交步骤后,全部四种核苷酸一起流入,在具有延伸的寡核苷酸的那些ISFET上产生质子的突发脉冲(burst)。在最简化的数据处理中非常清楚地观察到这种质子突发脉冲。

[0034] 图4示出了洗脱工作流程和由此获得的数据。第一行代表试验的扩增阶段,在芯片表面上产生一簇经延伸的扩增子。随后为(例如)使用加热的去杂交(dehybridisation)步骤,以在芯片表面产生单链扩增子,而在液相中没有产物。在洗脱引物和酶杂交后,全部四种核苷酸流过芯片,并且在已经特异性延伸的那些ISFET上生成信号。

[0035] 图5示出了样品ISFET数据,该数据示出了在PCR之后,三个靶模板生成的洗脱信号。所示数据为大肠杆菌(*E. coli*) (80个碱基的产物,因此最多60个碱基洗脱)、粪肠球菌(*E. faecalis*)和粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)在相关靶特异性扩增后的数据。未修改数据,示出了全部ISFET。

[0036] 图6示出了用三个锚定引物和阳性模板对照点样的多重芯片。用Ef模板进行PCR,然后洗脱。热图示出了在核苷酸流后~15秒测定的ISFET电压。可以看到ISFET与点样图案匹配,并且对应于Ef和阳性对照这两者。右边的迹线示出了各ISFET组的ISFET响应的实例。

[0037] 图7示出了测序实施方案。不是加入全部四种核苷酸以用于洗脱,而是依次加入核

昔酸。发生在需要芯片上的流动能力的开放系统上。在扩增反应期间,液相中的产物扩增子落在固相引物上,固相引物延伸以在芯片表面上产生许多经延伸的扩增子。扩增后,将扩增产物和试剂洗掉,以在芯片表面留下单链扩增子。将测序引物和酶上样到芯片上,并且在短的杂交步骤后,全部四种核苷酸单独流入,在具有扩增产物和正确模板碱基的那些ISFET上产生质子的突发脉冲。可以实现单碱基分辨率。

[0038] 图8示出了测序工作流程和由此获得的数据。第一行代表试验的扩增阶段,在芯片表面上产生一簇经延伸的扩增子。随后为(例如)使用加热的去杂交步骤,以在芯片表面产生单链扩增子,而在液相中没有产物。在洗脱引物和酶杂交后,全部四种核苷酸单独地流过芯片,并且在掺入核苷酸的那些ISFET上生成信号,并且对应于生成扩增产物的情况。

[0039] 图9示出了实时检测工作流程。可以发生在芯片扩增后没有流体流动、或者具有最少的流体流动的平台上。可以在永久密封的一个或多个反应室中进行反应。在扩增反应期间,液相中的产物扩增子落在固相寡聚物上,对特定寡聚物进行修饰和延伸。在具有低缓冲作用的密封系统中,在扩增反应的各个循环的延伸阶段期间,将在接近固相处产生质子。推动不对称性以在液相中产生显著过量的正向引物将在各个循环中有效地生成质子的“微小洗脱”突发脉冲,这应当在后续循环中可检测到。作为在扩增反应开始时引物不对称性的替代物,可以在扩增反应期间或在设定的时间点释放或添加额外的引物。将在低缓冲液中进行扩增反应以能够实时检测pH信号。

[0040] 图10示出了实时检测的数据。用多个锚定的引物整批对芯片点样,PCR(3:1不对称)具有6个室垫片(3个室流体密封),在具有单个室的流动台中洗脱。液相示出了实时pH信号,表明反应正在进行。作为PCR后扩增的确认,用靶向扩增子远端的荧光标签作为芯片的探针,并表明锚定的引物在PCR反应期间延伸。

[0041] 图11示出了对于实施例1的ISFET的平均 δ 信号。

[0042] 图12示出了对于实施例1的锚定引物靶阳性的全部ISFET的 δ 信号。

[0043] 图13示出了对于实施例1的锚定引物靶阴性的全部ISFET的 δ 信号。

[0044] 图14示出了对于实施例1的锚定引物对照的全部ISFET的 δ 信号。

[0045] 图15示出了对于实施例1的阳性、阴性和对照引物的平均ISFET信号结果。

[0046] 图16为示出了对于实施例1的粘质沙雷氏菌在PCR后生成液相扩增子的凝胶电泳图。

[0047] 图17示出了对于实施例1的Sensospot荧光图像。

[0048] 图18示出了对于实施例2的ISFET的平均 δ 信号。

[0049] 图19示出了对于实施例2的锚定引物靶1至4阳性的 δ 信号。

[0050] 图20示出了对于实施例2的锚定引物阴性的全部ISFET的 δ 信号。

[0051] 图21示出了对于实施例2的锚定引物对照的全部ISFET的 δ 信号。

[0052] 图22示出了对于实施例2的阳性、阴性和对照的平均ISFET信号结果。

[0053] 图23为对于实施例2的凝胶电泳图像。

[0054] 图24为对于实施例2的Sensospot荧光图像。

具体实施方式

[0055] 本申请描述了具有从相同反应部分产生不同序列的读数的能力的系统。

[0056] 简言之,该系统包括双相扩增反应,其中在进一步参与产生扩增反应产物的固相上的固定化的引物存在的情况下,发生液相(PCR或等温)扩增反应。液相(PCR或等温)扩增反应可以使用一种或以上引物和靶核酸模板以在溶液中生成核酸扩增产物,当已经产生足够的产物时,系统检测到相应的信号。这种液相生成的核酸扩增产物以及靶核酸模板还可以作为或随后作为固相上进行的额外反应的模板,由此,作为扩增反应的一部分,一种或以上固定化的引物与液相模板相互作用,并生成随后可由系统检测的核酸序列。通过将引物固定在已知的位置,并使用能够辨别该位置的检测系统(例如,使用CMOS IC芯片上的ISFET或阵列型光学成像系统),所得读数使得能够在同一装置中选择性扩增并检测许多扩增子。

[0057] 在固定于固相上的一种或以上其他引物的存在下,在液相中进行扩增反应。固定化的引物可以是与一个或以上液相引物相同的序列,也可以是对应于在液相中生成的核酸模板的内部序列。与一个或以上液相引物相同的序列能够由相同的反应组分进行第二次调用(call),而对应于在液相中生成的核酸模板的内部序列进行第二次调用,增加了确认性并提高了置信度,即正确的扩增反应产物已经生成和/或进一步给出靶模板的内部序列的信息。

[0058] 本文所述的检测模式可以使用ISFET CMOS技术,但是也适用于现有的核酸扩增反应和微阵列方法,以及集成液相和固相反应这两者的实时检测的定制系统。ISFET CMOS的重复性潜力允许各试验的大量重复,以及各靶的多个靶基因,从而通过依赖于各靶的多个读数提高系统的置信度。通过这种设计,也有利于在各反应容器中掺入阳性和阴性对照,从而确保当对照根据需要进行时进行正确的裁定。

[0059] 下面是组合液相和固相扩增反应的不同实施方案。

[0060] DNA扩增读数

[0061] 所述的固定化的引物可以与一种或以上液相引物相同或相似,并且参与扩增反应,使得与不存在液相引物的情况下进行的扩增相比,固定化的引物生成的信号增加,从而增加结果的置信度,但是不向生成的序列进一步添加信息。例如,通过使液相中消耗的引物存在于固相上,可以补偿液相中的不对称PCR。随着扩增反应的进行,促使生成的液相产物与固相相互作用,从而生成液相扩增子和固相扩增子这两者。可以检测固定化的扩增子。在固定引物的多个位置上存在这种读数,使得随后扩增的物质明确存在于样品中的置信度增加。如果具有不同序列的固定化的引物不能给出阳性结果,那么该结果的置信度增加。

[0062] 具有内部确认的DNA扩增

[0063] 所述的固定化的引物可以对应于在液相中生成的DNA模板的内部序列,使得在固相上生成的任何信号都为阳性确认,即已经在液相中产生正确的产物。这种确认证明了不是由诸如引物二聚体、错配引物或其他非特异性反应(例如,当目的靶标是宿主样品中的病原体时,通过与宿主(人)DNA相互作用生成生的信号)的物质生成液相扩增子,并且相对于诸如解链曲线分析和电泳凝胶成像之类的标准确认测试提供了显著的益处,因为在读数中推断出了其他序列信息。

[0064] 内部确认信号类似于标准实验室确认程序,例如解链曲线分析、电泳凝胶成像等。

[0065] 使用对应于靶模板中的内部序列的固定化的引物使得给予系统进一步的特异性,由此,液相反应和固相反应的组合比单独的液相反应鉴定出更多的序列信息,从而与单独的液相相比提高了结果的置信度。

[0066] 具有内部序列信息的DNA扩增

[0067] 除了已经鉴定的确认步骤之外,还可能具有以下潜力:允许存在对应于液相扩增产物的不同区域的多个固定化的引物,使得除了仅仅确认已经在液相中产生正确的产物之外,一个或以上固定化的引物可用于提供内部信息。

[0068] 这可以采用来自扩增产物的多个内部引物的简单形式,各内部引物通过提供多于一个序列比对增加推断结果的置信度,或者在更先进的版本中,可以用于鉴定靶基因内对应于点突变和其他多态性的内部变体。例如,存在几种抗生素抗性基因,其由于点突变或其他多态性而具有多种变体,并且其中特定突变的存在可以导致与另一突变相比不同的治疗策略。因此,重要的是,以及时和成本有效的方式进行这些多态性的鉴定。使用PCR和其他扩增反应的现有鉴定策略能力有限,并且实验室可以采用测序以阐明内部序列并鉴定多态性,实施时这是耗时且昂贵的,并且通常不能完成。

[0069] 在该实施方案中,可以在液相中使用单引物对以扩增基因的全部变体,其中可以在固相上使用对应于点突变或多态性的一个或以上固定化的引物以鉴定一个或以上变体。各内部固定化的引物的组合为使用者提供了扩增基因的总序列的丰富信息,并且可以使得更容易且更快速地进行临床决策。

[0070] 洗脱(包括多次洗脱)

[0071] 通常在高离子强度缓冲液中进行扩增反应。对于测定掺入的核苷酸的质子释放的测序系统,如果用具有低缓冲能力的缓冲液替代扩增缓冲液,则能够检测扩增产物。可供选择地,可以使用经荧光标记的引物或经由使用荧光标记的核苷酸检测扩增产物。

[0072] 洗脱发生在需要芯片上的流动能力的开放系统上。在扩增反应期间,液相中的产物扩增子落在固相引物上,固相引物延伸以在芯片表面上产生许多经延伸的扩增子。扩增后,洗掉扩增产物和试剂,以在芯片表面留下单链扩增子。将洗脱的引物和酶上样到芯片上,并且在短的杂交步骤后,全部四种核苷酸一起流入,在具有延伸的寡核苷酸的那些ISFET上产生质子的突发脉冲。在最简化的数据处理中非常清楚地观察到这种质子突发脉冲。

[0073] 为了进行电子/质子检测,在所述具有液相和固相反应这两者的扩增阶段结束时,将液相组分冲出柱体并用具有低缓冲能力的溶液替代。然后,依次是引物和酶、或引物和酶的组合,然后是核苷酸流,这将使得在掺入核苷酸时释放质子,以及在检测平台上产生相应的信号,例如相关ISFET上出现mV变化。用于洗脱的引物可以对应于扩增模板内的任何位置,包括在早期扩增反应期间添加的通用序列。使用溶液内部的扩增子特异性引物,通过确认已经在固相上产生了正确的物质,扩增产物在结果中提供了增加的置信度,但是由于具有更高的多重性,可能增加系统的复杂性。如果在早期的扩增反应中加入了通用序列,则可能限制液相多重扩增的规模,从而提高反应的效率。然而,由于通用序列可能存在失灵(misfiring),所以这可能限制读数置信度。

[0074] 通过已知特定固定化的引物的位置,当在洗脱反应期间生成的质子在固定有特定引物的特定ISFET传感器上产生信号时,可以确定靶的鉴定。在该实施方案中,多次重复各试验靶是可能的,其中多重性的规模受到空间分离、每个装置的孔和传感器的数目以及生物信息学挑战的限制。

[0075] 该系统可以利用单次洗脱反应或多次洗脱反应,在每次运行之间有或没有去杂交

步骤。可以将额外洗脱用于查询较早的信号,使得可以增加内部序列的置信度。例如,如果在早期扩增反应中使用通用序列,那么第一次洗脱可以使用通用序列以鉴定哪些试验已经生成信号,随后使用对应于那些特定试验的特异性引物进行洗脱以确认产生了正确的产物。

[0076] 由于不同序列的引物可以固定在固体载体的不同位置,因此可以平行分析多个靶序列。

[0077] 序列信息(一次一个或多个碱基)

[0078] 在上述扩增阶段结束时,可以将液相组分冲出柱体并用具有低缓冲作用的溶液替代,如洗脱工作流程一样。然后,依次是引物和酶、或引物和酶的组合,然后是单个核苷酸流、或者两个或以上核苷酸的组合流,当正确的互补核苷酸流过芯片并掺入时,将释放出质子。该工作流程提供了全部实施方案的最丰富的信息,因为它给出了序列信息,而不是仅依赖于引物与其相应模板的比对。该工作流程不仅确认已经发生了正确的比对以及已经在固相上产生正确的产物,而且还通过推断或通过直接鉴定指示了内部序列。如在洗脱实施方案中已经讨论的,本文可以使用类似的方法,其中多次运行可以提供进一步的信息,以及将洗脱与所使用的一种或以上核苷酸的这种方法组合的工作流程。

[0079] 实时检测

[0080] 通过测定固定化的引物的延伸,可以实时检测扩增过程。可以在永久密封的一个或多个反应室中进行反应。在扩增反应期间,液相中的产物扩增子落在固相寡聚物上,对特定寡聚物进行修饰和延伸。在具有低缓冲作用的密封系统中,在扩增反应各循环的延伸阶段期间,将在接近固相处产生质子,并且可检测到这些质子。

[0081] 扩增可以是不对称的,其中溶液中的两种引物以不同的浓度存在,由于缺乏针对它们延伸的互补引物,产生主要为单链的扩增产物。推动不对称性以在液相中产生显著过量的正向引物将在各循环中有效地生成质子的“微小洗脱”突发脉冲,这应当在后续循环中可检测到。作为在扩增反应开始时引物不对称性的替代物,可以在扩增反应期间或在设定的时间点释放或添加额外的引物。将在低缓冲液中进行扩增反应以能够实时检测pH信号。

[0082] 源核酸可为基因组多核苷酸。源物质可为真核的、原核的或古细菌的。可以提供一种或以上源物质。源核酸可以代表基因组的片段;例如单个染色体或单个基因组基因座(例如,用于等位基因多态性的快速测序)。在特定实施例中,样品中的致病物质的扩增是特异性的。例如,可以选择存在于人类样品中的细菌或病毒核酸进行扩增。模板可为DNA、RNA或其cDNA拷贝。

[0083] 在进行所要求保护的扩增反应之前,可以在溶液中扩增生物物质。因此,在进行本发明之前,物质可能已经经历了基于序列的扩增步骤。可供选择地,可以对样品进行处理以连接样品的全部链的一端或两端所共有的通用序列。通用序列可用作与可为非天然存在的共用引物杂交的通用序列。

[0084] 本文所述的发明可以允许四种或以上水平的扩增特异性。可以在溶液中进行第一次扩增。可以使用非固定化的引物进行第二次扩增。可以使用与第二次扩增引物的序列不同的固定化的引物进行第三次扩增。可以使用对由固定化的引物生成的扩增子的引物特异性检测扩增子的存在。因此,可以使用四种水平的扩增特异性,从而确保只有当起始序列绝对明确地存在于样品中时才检测到最终扩增子。因此,可以消除来自密切相关但不期望的

序列的检测的假阳性结果。

[0085] 将核酸固定到表面上是常规的。可以使用共价或非共价固定化的任何方法。理想地,对于热循环至引起核酸链分离的温度的多个循环,固定化是稳定的。固定化的具体方法包括UV诱导的交联或经由形成酰胺键或硫代磷酸酯键的固定化。

[0086] 实施例

[0087] 已经收集了在单个靶区域的粘质沙雷氏菌(供应商:NCTC,目录编号27137)的单一位置锚定引物扩增和检测(LAPAD)和在多个靶区域的粟酒裂殖酵母(供应商:ATCC,目录编号:26189)的多重位置锚定引物扩增和检测(LAPAD)的实验数据。

[0088] 单一LAPAD和多重LAPAD这两者的示意图如图1和图2所示。

[0089] 实施例1:单一定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)

[0090] 在单个靶区域扩增并检测粘质沙雷氏菌。位于扩增模板DNA的3'端的靶区域与互补锚定引物靶杂交。在扩增过程中,延伸该锚定引物靶,并且在下一阶段,在延伸期间检测到相同的靶区域。所使用的引物/寡核苷酸序列如表1所示。

[0091] 表1:寡核苷酸序列

寡核苷酸类型	寡核苷酸名称	序列(5' → 3')
单一 LAPD		
过量引物	Ser.marcescens_23s_F	AGCCCAGAACCTGAATCG
限制性引物	Ser.marcescens_23s_R	CCCTACTCATCGAACTCACG
锚定引物靶 阳性	NH2_iSp18_SmR	/5AmMC6//iSp18/CCCTACTCATCGA ACTCACG
锚定引物阴性	NH2_iSp18_SmIntRof	/5AmMC6//iSp18/TGTGTGTTAGTGG AAGCGTC
	NH2_iSp18_EfR	/5AmMC6//iSp18/GGGAGGTTTCAGTT ACTAACG
	NH2_iSp18_EfIntRof	/5AmMC6//iSp18/GATCGTAAAACCTC TGTTGTT
锚定引物对照	NH2_ddl_5'+T15	/5AmMC6/TTTTTTTTTTTTTTTCGC GCTTCAATTCCTTGTCAACGATT GCTCGAGAATCATACTGATAGGCT GTTGCTAAAGCATTTTGCAGCTCT TCTCGGTTT
洗脱引物	SM_IntRof_Cy3	/5Cy3/TGTGTGTTAGTGAAGCGTC
多重 LAPAD		
过量引物	Spom_gp_1_608_23_PAr	TTCAGTGAGTTCTCCTGTTGATTG
限制性引物	Spom_gp_1_270_24_IDf	AACGTTGGTATAGGAGAATGAAG
锚定引物靶 1 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_33 8+19_5'_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/A ATACTATTAATATCACCTCAGTTT CAGCTGGGACTAATGAA
锚定引物靶 2 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_36 9+24_5'_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/G GGACTAATGAATTGTTTTTACCTA CTTTATCCCATGCTCACG
锚定引物靶 3 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_43 6+15_5'_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/C CATAACAGACATAAGATAAAC GGCTTCCCAAGAAC
锚定引物靶 4 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_49 5+ 20_5'_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/G AGCATATTATCCTTTAATACCATT CGTTAATCCCGTCCA
锚定引物阴性	T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_18 6+19_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/A GTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCAT CACAAACAGATAACGGC
	T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_22 0+18_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/G ATAACGGCGTAAATAGAAGTGGT TCTGAAGATCCAACAGT
	T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_36 9+20_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/T TAGACTATTATTGGTTGATACACC TGAAACAAAGCATCCTAA
	T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_41 5+19_Rof	TTTTTTTTTCCCCCCCCC/isp18/A GGTGTAGAGAAATATGGTCCTGA AGCAAGTGCATTTACGAA
锚定引物对照	T10C10_ddl_5'-5	TTTTTTTTTCCCCCCCCCCTTCAA TTCCTTGTTCAACGATTGCTCGAG AATCATACTGATAGGCTGTTGCTA AAGCATTTTGCAGCTCTTCTCGGT TT
洗脱引物	Spo_gp_1_578_23_Cy3P_RC	/5Cy3/CTGCGCGTTTACCTACTTTG ACT

[0093] 实施例2:多重定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)

[0094] 在多个靶区域扩增并检测粟酒裂殖酵母。

[0095] 将在扩增模板DNA的3'端的几个核苷酸碱基之后的靶区域1杂交至互补锚定引物

靶1。将在靶区域1的几个碱基之后并朝向扩增模板DNA的5'端的靶区域2杂交至互补锚定引物靶2。将在靶区域2的几个碱基之后并朝向扩增模板DNA的5'端的靶区域3杂交至互补锚定引物靶3。将在靶区域3的几个碱基之后并朝向扩增模板DNA的5'端的靶区域4杂交至互补锚定引物靶4。在扩增过程中,将这些具有杂交DNA模板的4个锚定引物靶延伸,然后在下一个阶段,在延伸过程中检测相同的靶区域。所用的引物/寡核苷酸序列如表1所示。

[0096] 实验方法

[0097] 将结合由ISFET组成的'004'Ta₂O₅ CMOS芯片并封闭在SU-8孔中的芯片平台与使用基于UV的交联表面化学的引物锚定。将歧管安装在芯片表面以包括用于在芯片表面上发生反应的流体。

[0098] 进行PCR以生成检测用DNA,PCR试剂配方,最终体积为50μl,示于表2。所使用的热循环条件示于表3。

[0099] 表2:PCR试剂配方

试剂	供应商	目录编号	最终	单位
无 DNA 的水	Roche	03315932001	-	-
10X 钛 Taq PCR 缓冲液	Clontech	639209	1	X
氯化钾	Sigma Aldrich	60142	34	mM
甜菜碱	Sigma Aldrich	B0300	0.5	M
牛血清蛋白	Sigma Aldrich	B8667-5ML	1	mg/mL
[0100] 甘油	Sigma Aldrich	G5516-100ML	5	%
Triton X-100	Sigma Aldrich	T8787	0.1	%
dNTP (每个)	Thermo Fisher	R0186	0.06	mM
过量引物	IDT	定制	0.5	μM
限制性引物	IDT	定制	0.15	μM
50x 钛 Taq DNA 聚合酶	Clontech	639209	2.5	X
基因组 DNA	见下文	见下文	10,000	拷贝数/μL

[0101] 表3:热循环条件

温度 (°C)	时间 (s)	循环
95	60	1
95	5	40
59	10	
72	5	
95-60	2°C/分钟	1
60	120	
72	5	

[0102]

[0103] PCR后,用洗涤缓冲液(0.06x盐水-柠檬酸钠,0.06%吐温20)洗涤芯片,然后用20mM NaOH将DNA化学去杂交5分钟,然后再次用洗涤缓冲液洗涤。

[0104] 然后将洗脱的引物混合物(序列示于表1)加入到芯片表面。将3.33 μ M的荧光标记的(Cy3)引物加入至退火缓冲液(5mM醋酸镁,150mM氯化钠,20mM Tris pH 7.5,0.01%吐温20)。

[0105] 然后将具有洗脱引物混合物的芯片在95 $^{\circ}$ C加热2分钟,然后在58 $^{\circ}$ C加热5分钟,并在室温孵育15分钟。然后用酶上样缓冲液(1xThermopol[®],0.06%吐温20)洗涤芯片。

[0106] 然后将酶混合物添加到芯片的表面,通过将25单位/ μ L的定制Bst大片段DNA聚合酶添加到酶上样缓冲液中以产生该酶混合物。然后将芯片在室温孵育5分钟。

[0107] 经由使用能使dNTP在芯片表面上流动的定制流动系统实现脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)的掺入。将各12.5 μ M的脱氧腺苷三磷酸、脱氧胸腺嘧啶三磷酸、脱氧鸟苷三磷酸和脱氧胞苷三磷酸添加到非碳酸RMD缓冲液(10mM氯化镁、25mM氯化钠、0.025% Tergitol)中。将dNTP混合物的pH调节至pH 8,并通过将流体保持在氮气下进行维持。

[0108] ISFET传感器检测

[0109] 将原始ISFET传感器电压输出数据和锚定引物点样图一起通过定制数据分析管道(Galaxy洗脱管道v1.3.15)进行处理。检测ISFET的电压信号峰高,并从相邻上游空白ISFET的电压信号峰高中减去锚定引物ISFET电压信号峰高。这样做是为了从流体流中除去包括可能掩盖检测结果的噪声的系统噪声。将全部特异性锚定引物传感器的这种 δ ISFET传感器电压输出取平均以确定信号检测结果。

[0110] E-gel电泳分析

[0111] 将已制成的E-gel(用溴化乙锭染色的48孔2%琼脂糖凝胶)用于液相PCR的定性分析。PCR后从芯片表面收集样品,并在上样至E-gel孔之前,将1 μ L样品加入到1x E-gel上样染料中。也进行了梯度上样,以比较扩增子的大小。凝胶在提供电场的E-gel基底上运行10分钟,以使DNA扩增子根据其大小迁移。

[0112] Sensospot荧光成像

[0113] 运行后,在绿光下在Sensospot荧光扫描仪中扫描芯片,以照射已杂交到芯片上生成的扩增子的Cy3洗脱引物上。基于荧光强度,可以定性确定芯片上的扩增。

[0114] 结果

[0115] 通过 δ ISFET传感器电压输出定量地建立两种试验的检测。通过E-gel分析以及Sensospot荧光成像的芯片表面扩增定性评价液相PCR扩增。

[0116] 实施例1:单一定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)

[0117] 靶:粘质沙雷氏菌

[0118] 芯片ID:NM-248-0214

[0119] 用于实施例1的锚定引物序列可以参见表4。

[0120] 表4:用于实施例1的锚定引物序列

	锚定引物靶阳性	NH2_iSp18_SmR
[0121]	锚定引物阴性	NH2_iSp18_SmIntRof
		NH2_iSp18_EfR
		NH2_iSp18_EfIntRof
	锚定引物对照	NH2_ddl_5'+T15

[0122] ISFET的平均 δ 信号可以参见图11。

[0123] 对于锚定引物靶阳性的全部ISFET的 δ 信号可以参见图12。

[0124] 对于锚定引物靶阴性的全部ISFET的 δ 信号可以参见图13。

[0125] 对于锚定引物靶对照的全部ISFET的 δ 信号可以参见图14。

[0126] 对于阳性、阴性和对照引物的平均ISFET信号结果可以参见图15。对于阳性锚定引物NH2_iSp18_SmR,检测到平均36.2dmV的ISFET信号,该信号甚至大于对照锚定引物NH2_ddl_5'+T15的23.4dmV的平均ISFET信号。

[0127] PCR后,粘质沙雷氏菌生成的液相扩增子参见凝胶电泳图像(图16)。对于阳性锚定引物NH2_iSp18_SmR,生成的芯片上扩增子可以与对照锚定引物一起参见sensospot荧光图像(图17)。

[0128] 证实了粘质沙雷氏菌在单个靶区域的扩增和检测。检测到明显的 δ ISFET电压信号,该信号甚至大于对照锚定引物。

[0129] 实施例2:多重定位锚定引物扩增和检测(LAPAD)

[0130] 靶:粟酒裂殖酵母

[0131] 芯片ID:NM-248-0172

[0132] 用于实施例2的锚定引物序列可以参见表5。

[0133] 表5:用于实施例2的锚定引物序列。

	锚定引物靶 1 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_338+19_5'_Rof
	锚定引物靶 2 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_369+24_5'_Rof
	锚定引物靶 3 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_436+15_5'_Rof
	锚定引物靶 4 阳性	T10C10_iSp18_Spo_gp_1_495+20_5'_Rof
[0134]	锚定引物阴性	T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_186+19_Rof
		T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_220+18_Rof
		T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_369+20_Rof
		T10C10_iSp18_Sa_nuc_1_415+19_Rof
	锚定引物对照	T10C10_ddl_5'-5

[0135] 对于实施例2的ISFET的平均 δ 信号可以参见图18。

[0136] 对于锚定引物靶1至4阳性的全部ISFET的 δ 信号可以参见图19。

[0137] 对于锚定引物阴性的全部ISFET的 δ 信号可以参见图20。

[0138] 对于锚定引物对照的全部ISFET的 δ 信号可以参见图21。

[0139] 对于阳性、阴性和对照引物的平均ISFET信号结果可以参见图22。对于四种阳性锚定引物,检测到1.5dmV至4.4dmV的ISFET信号。这比以前的信号强度和为34.6dmV的对照锚定引物的平均ISFET信号低得多。

[0140] PCR后,粟酒裂殖酵母生成的液相扩增子参见凝胶电泳图像(图23)。在Sensospot荧光图像上,对于阳性锚定引物,不能观察到生成的芯片上扩增子(图24)。然而,可以观察到对照锚定引物。

[0141] 证实了粟酒裂殖酵母在多个靶区域的扩增和检测。

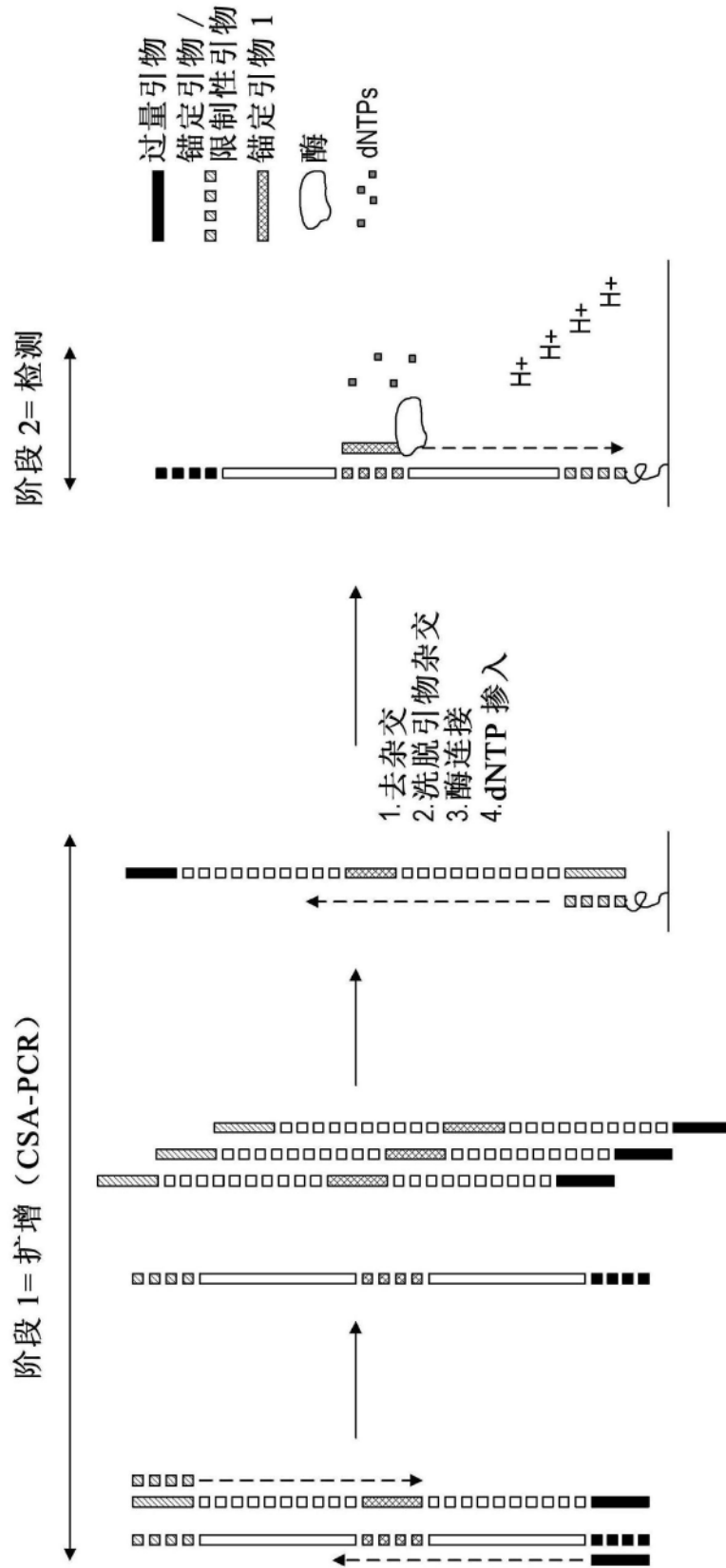


图1

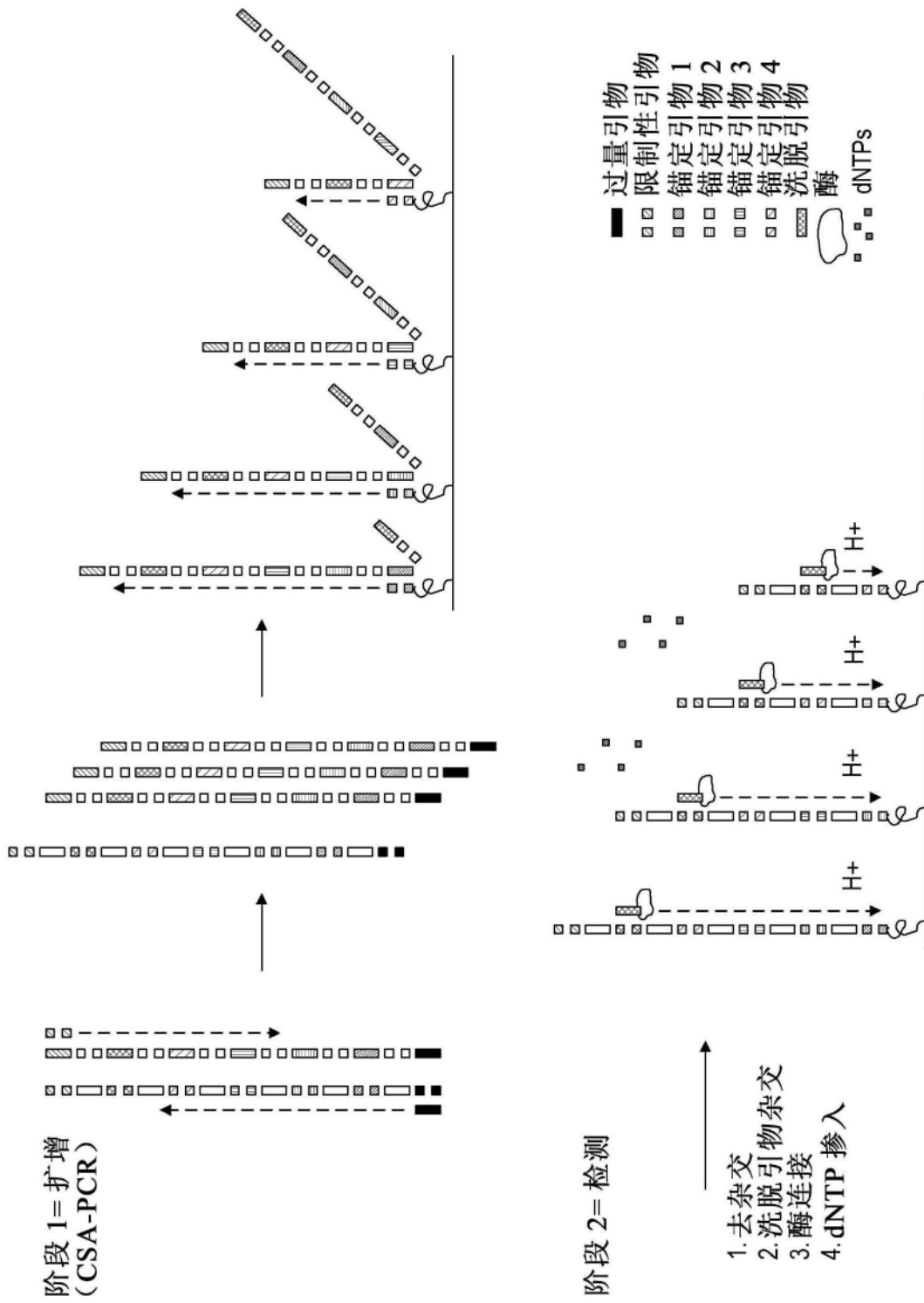


图2

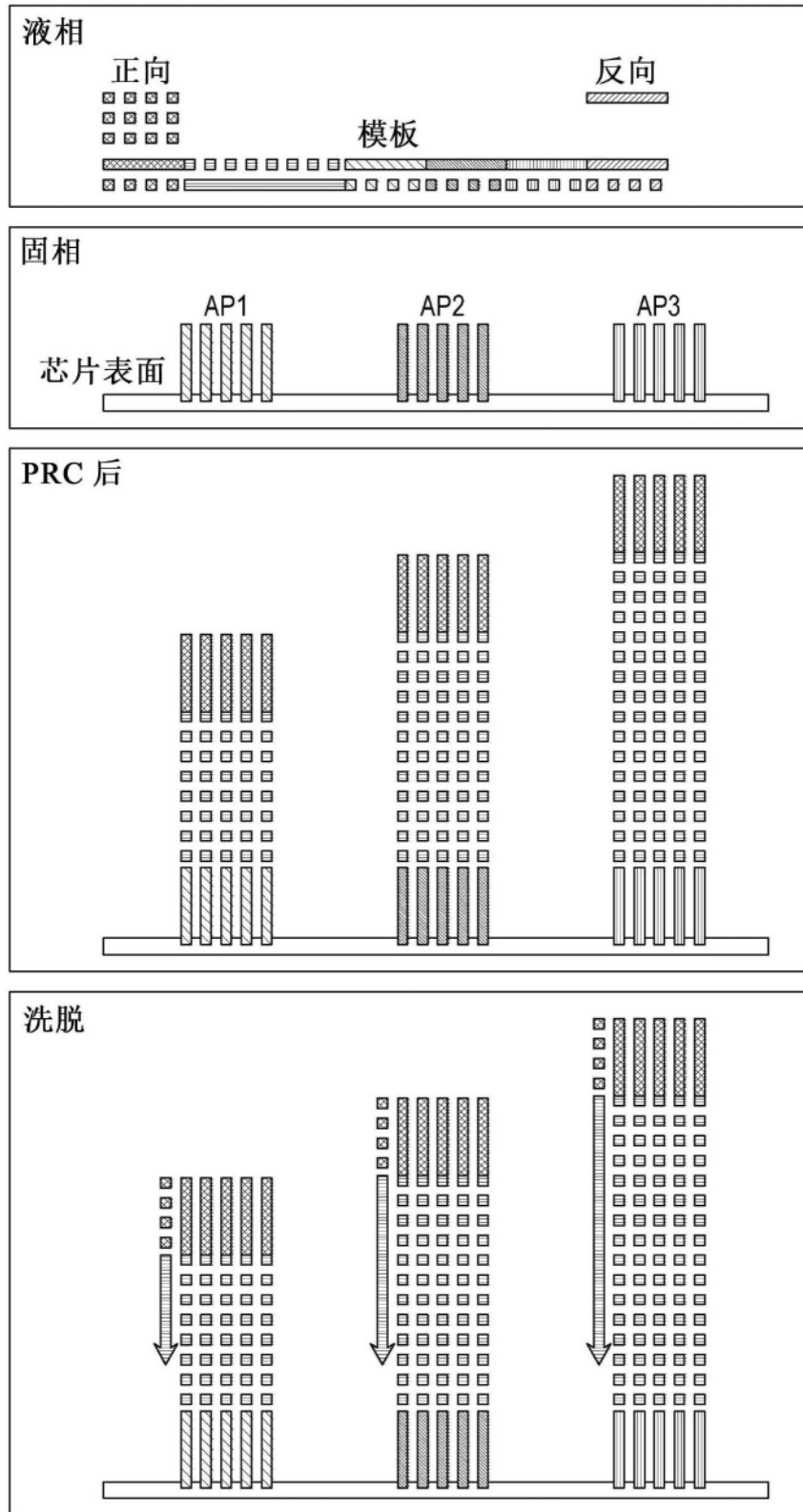


图3

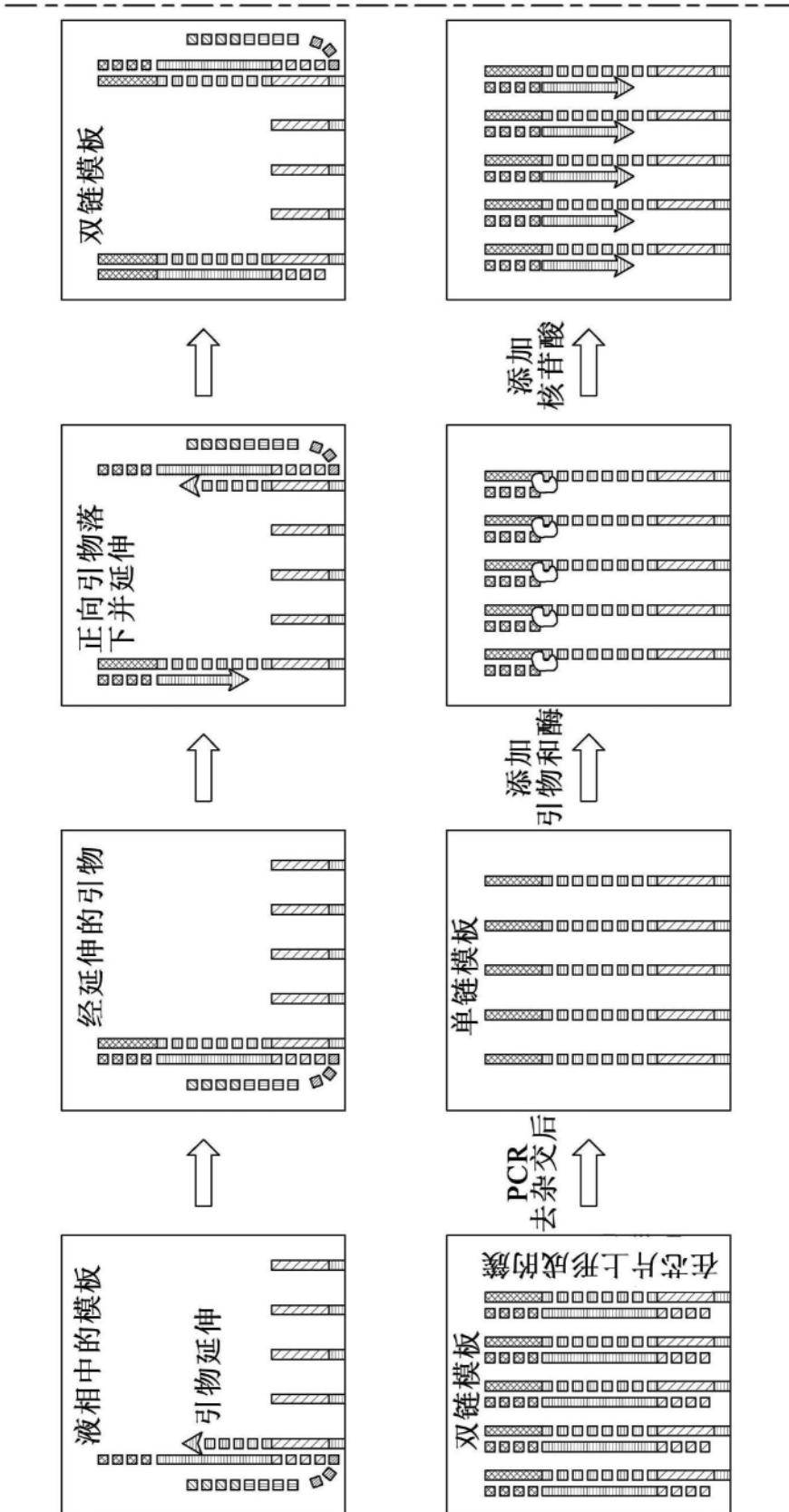


图4

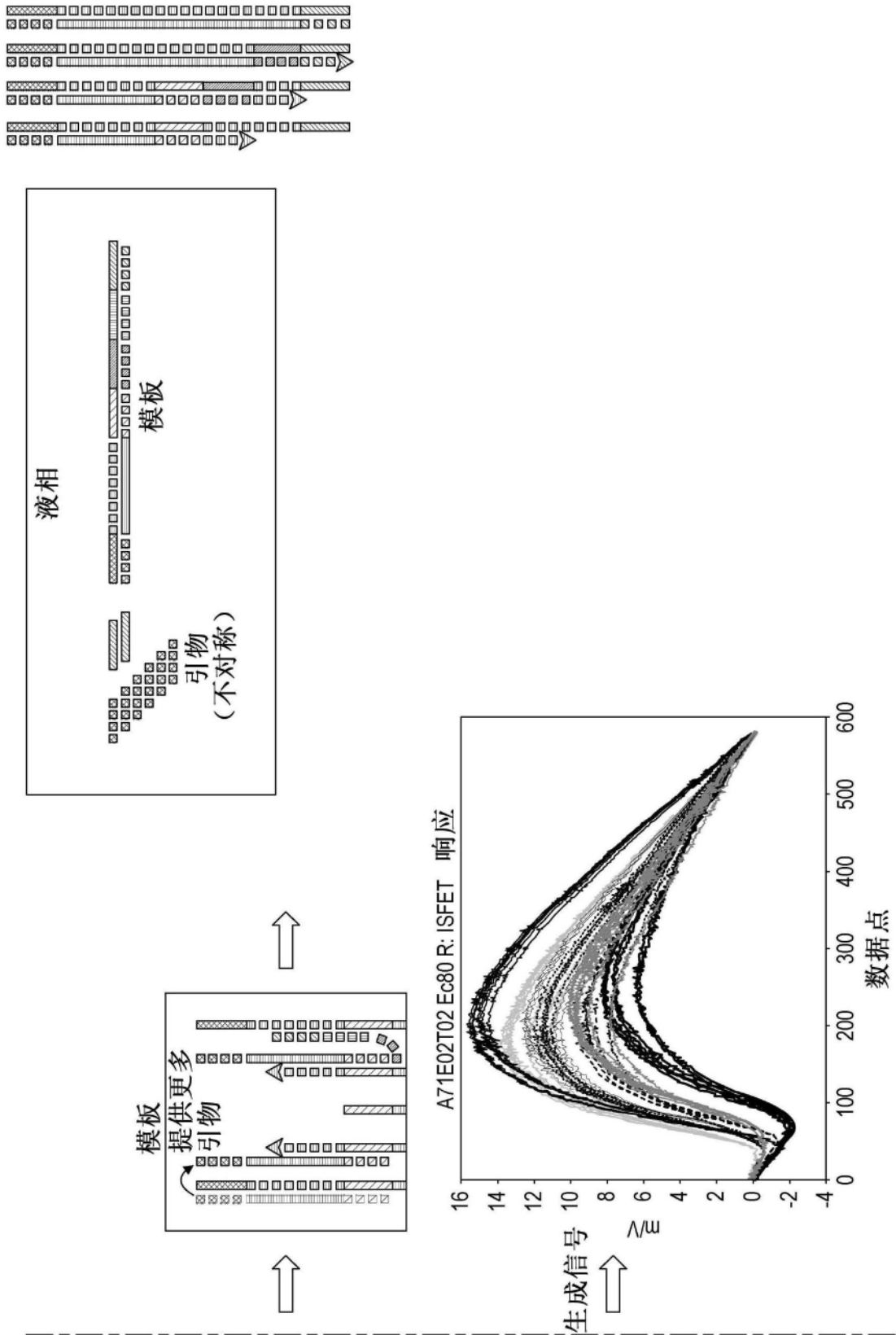


图4 (续)

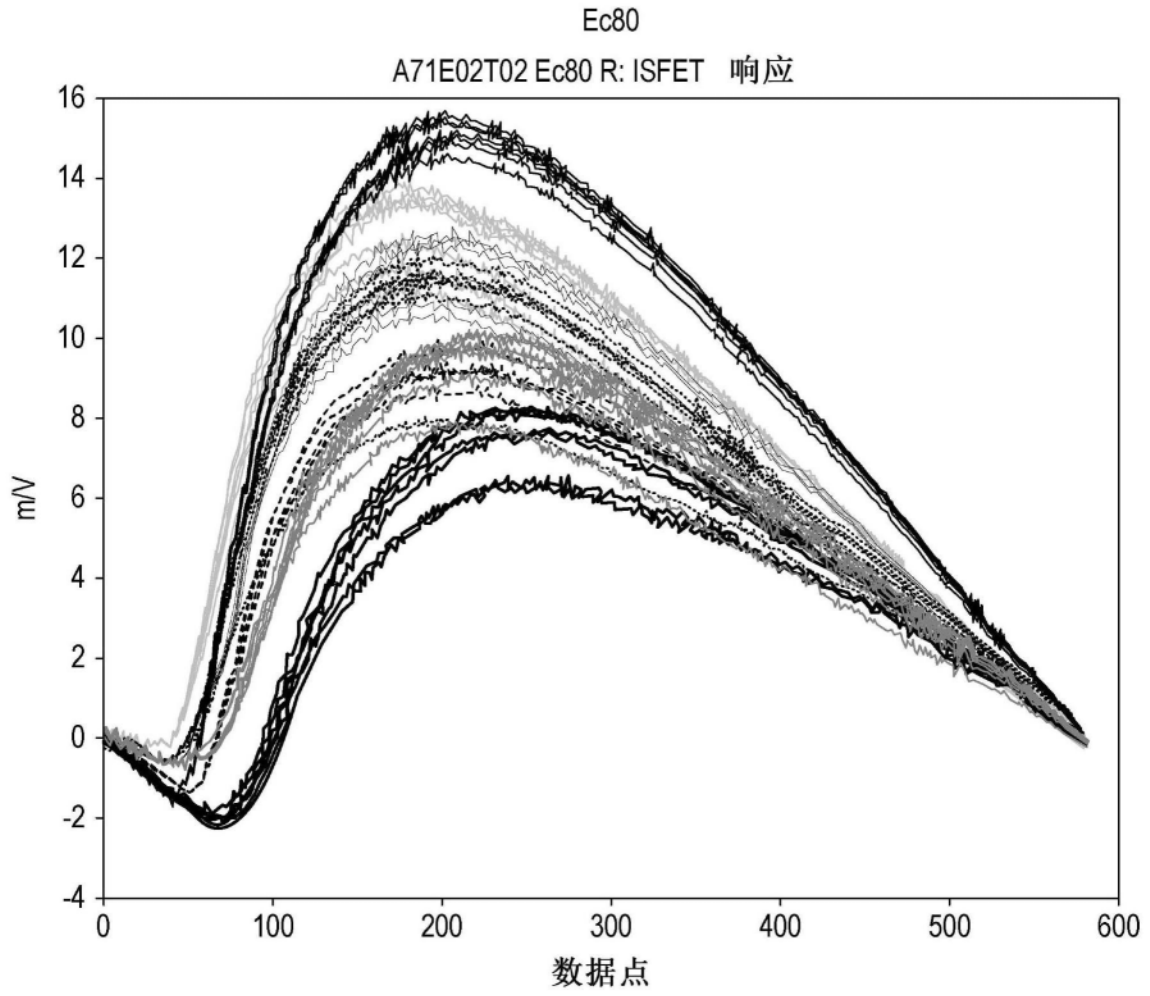


图5

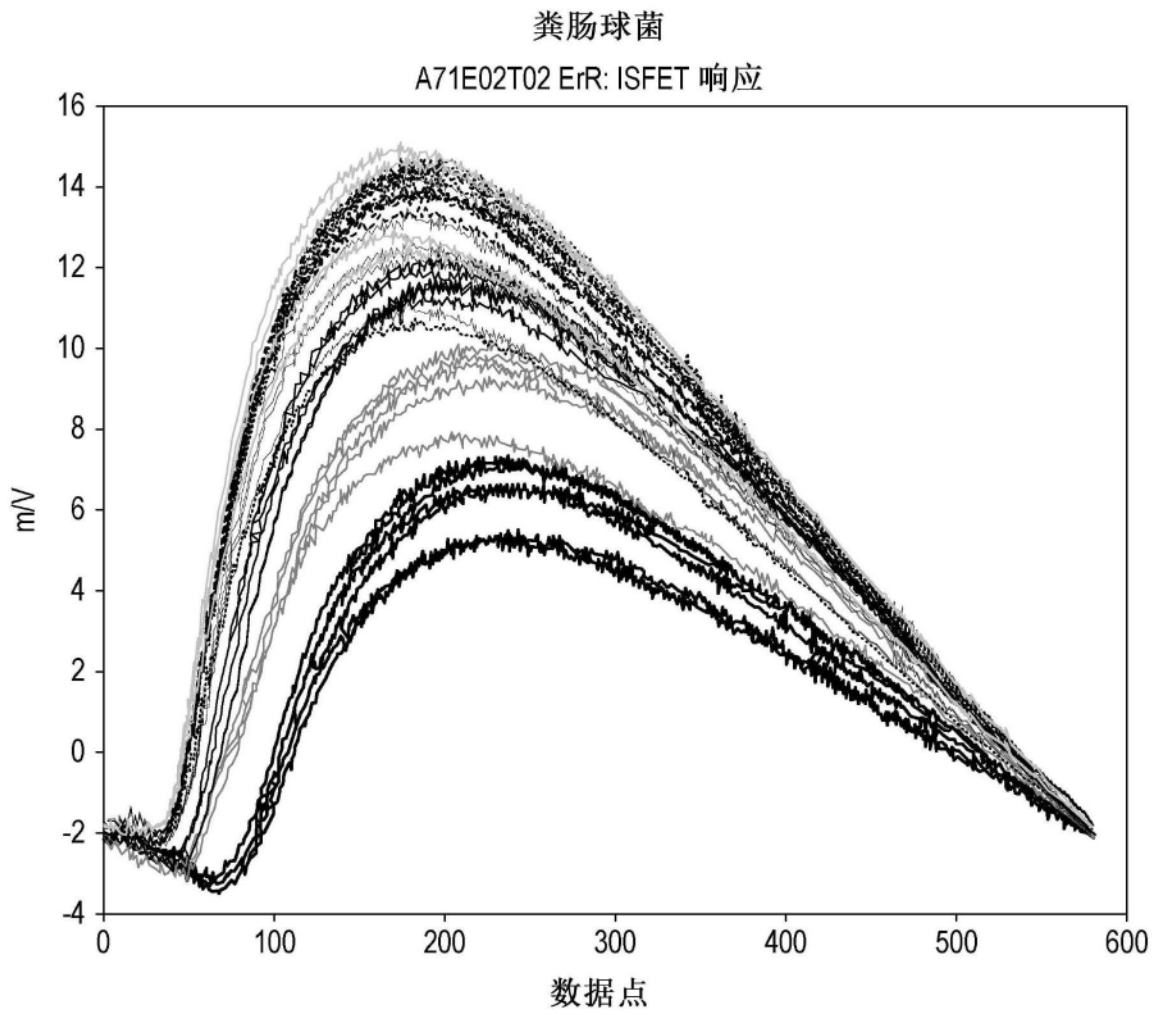


图5(续)

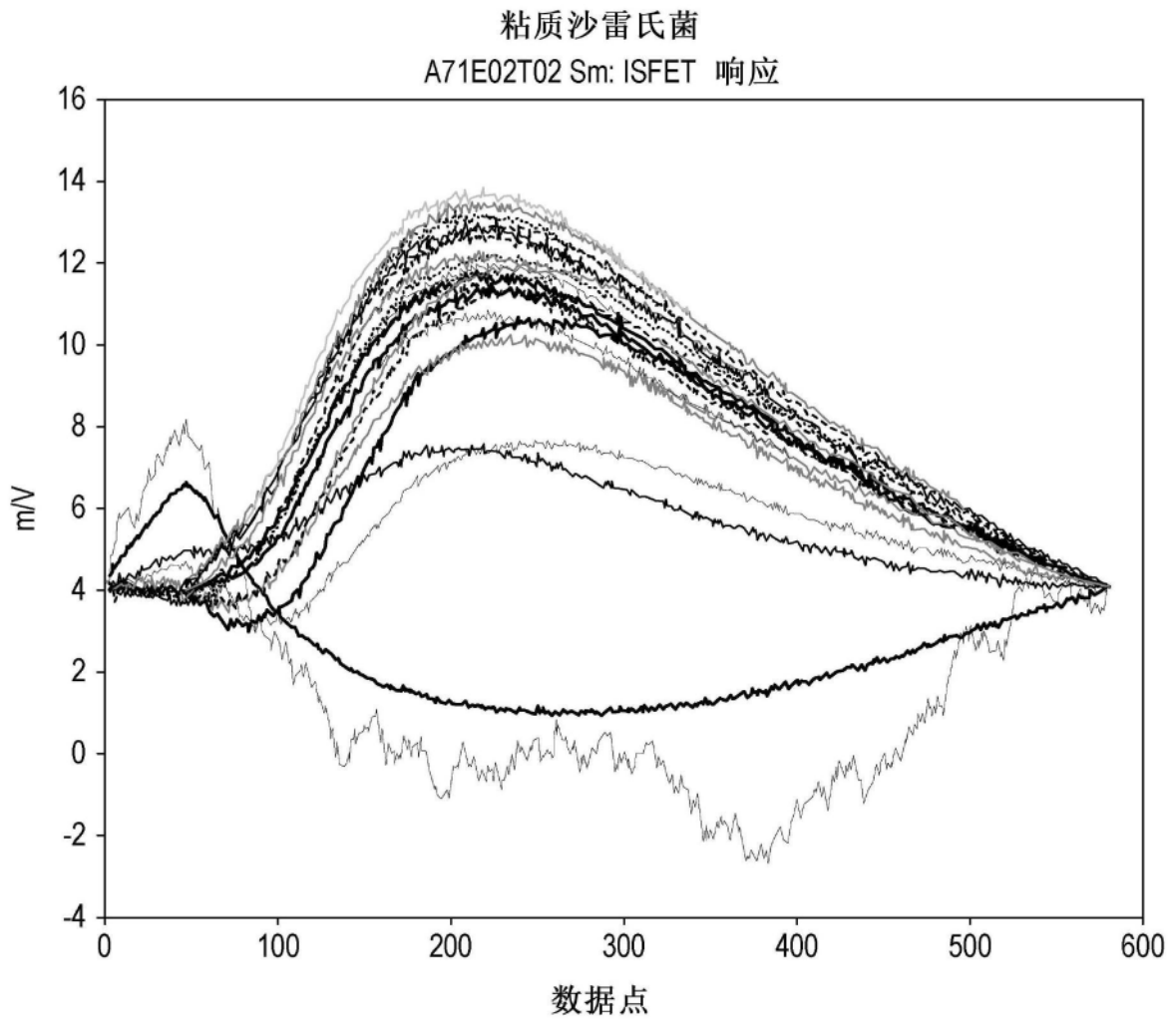


图5(续)

- ▨ Ec80 阴性
- ▤ Ef 阳性
- ▧ Sm 阴性
- ▩ MM 120+ 对照

点样图

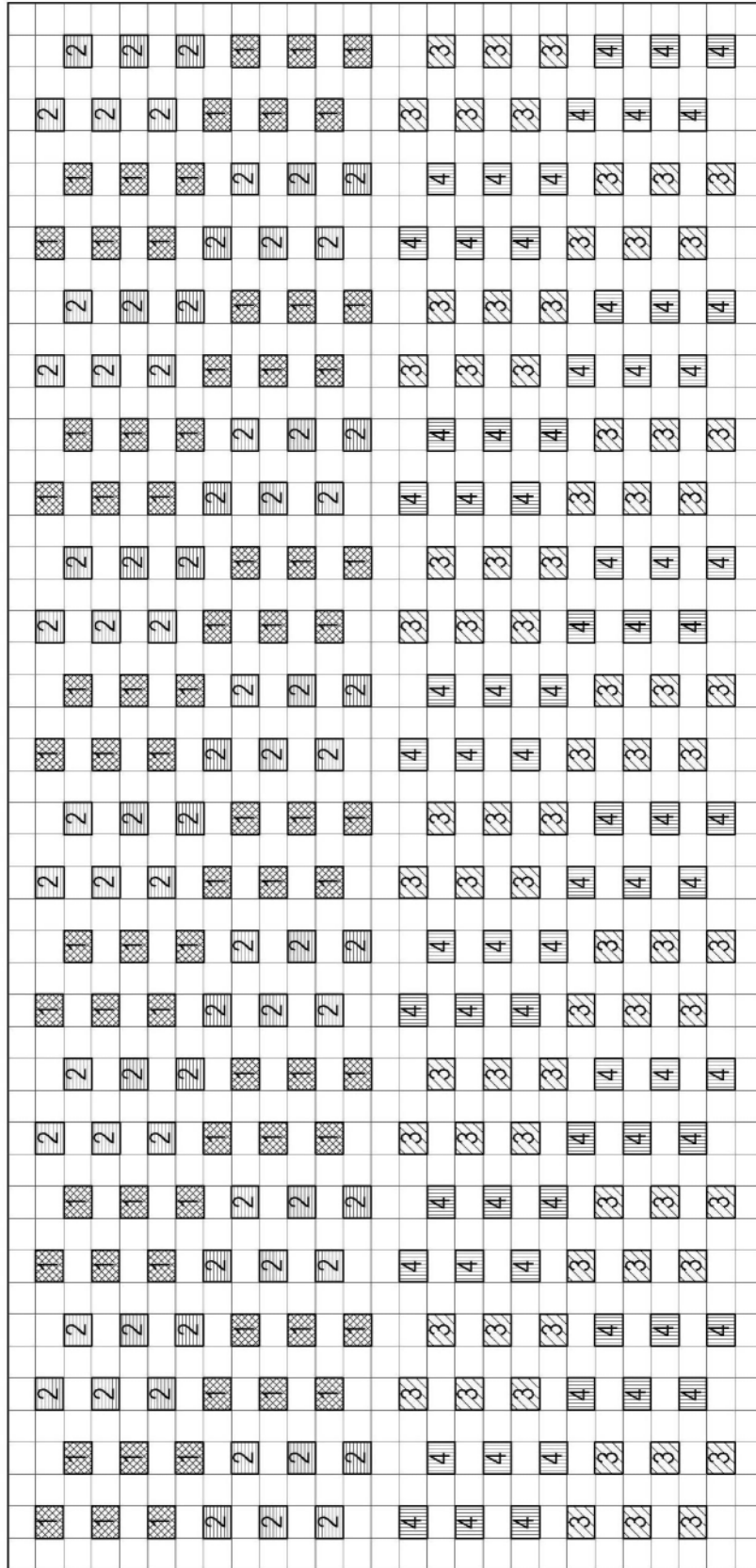


图6

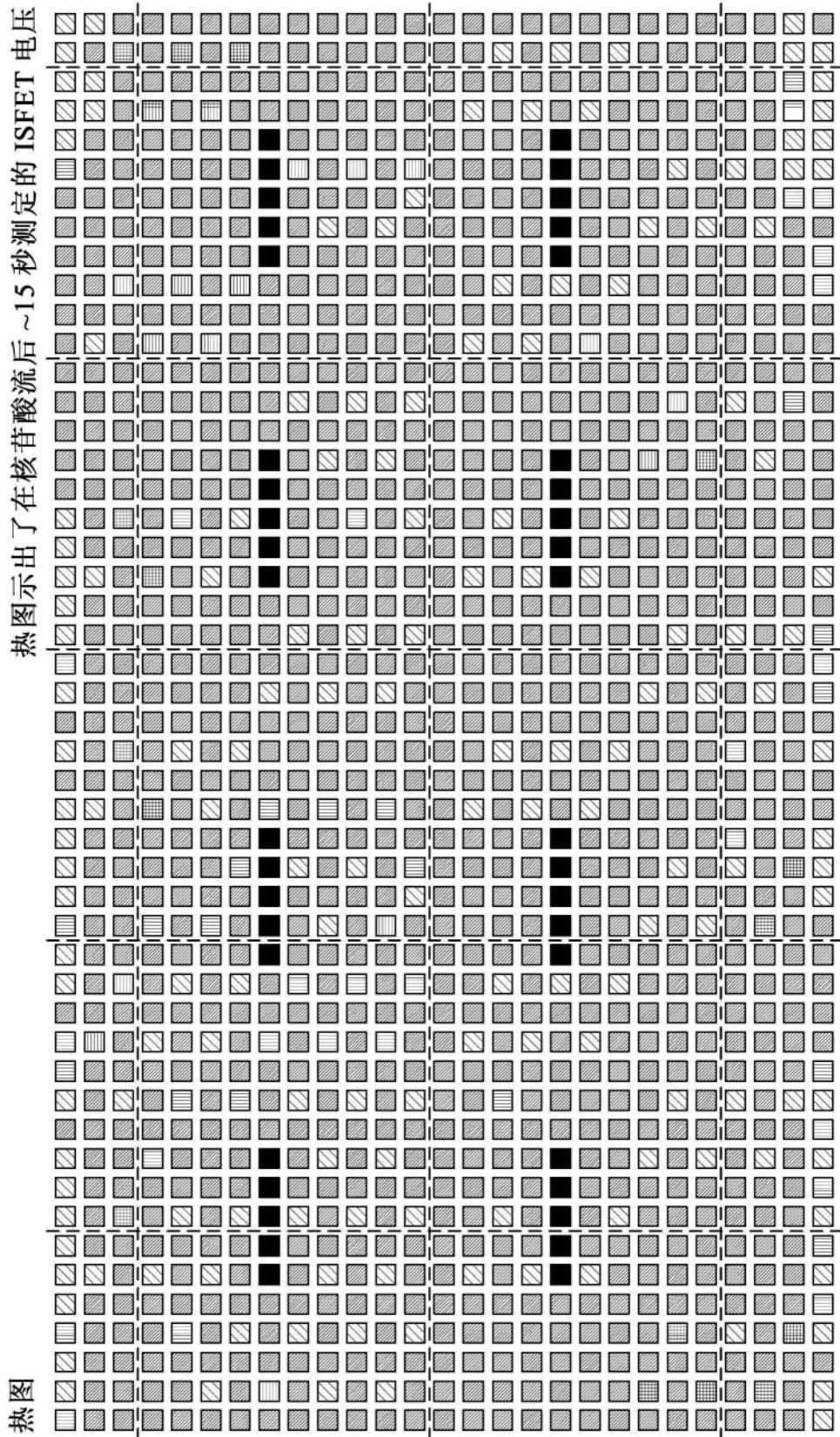


图6(续)

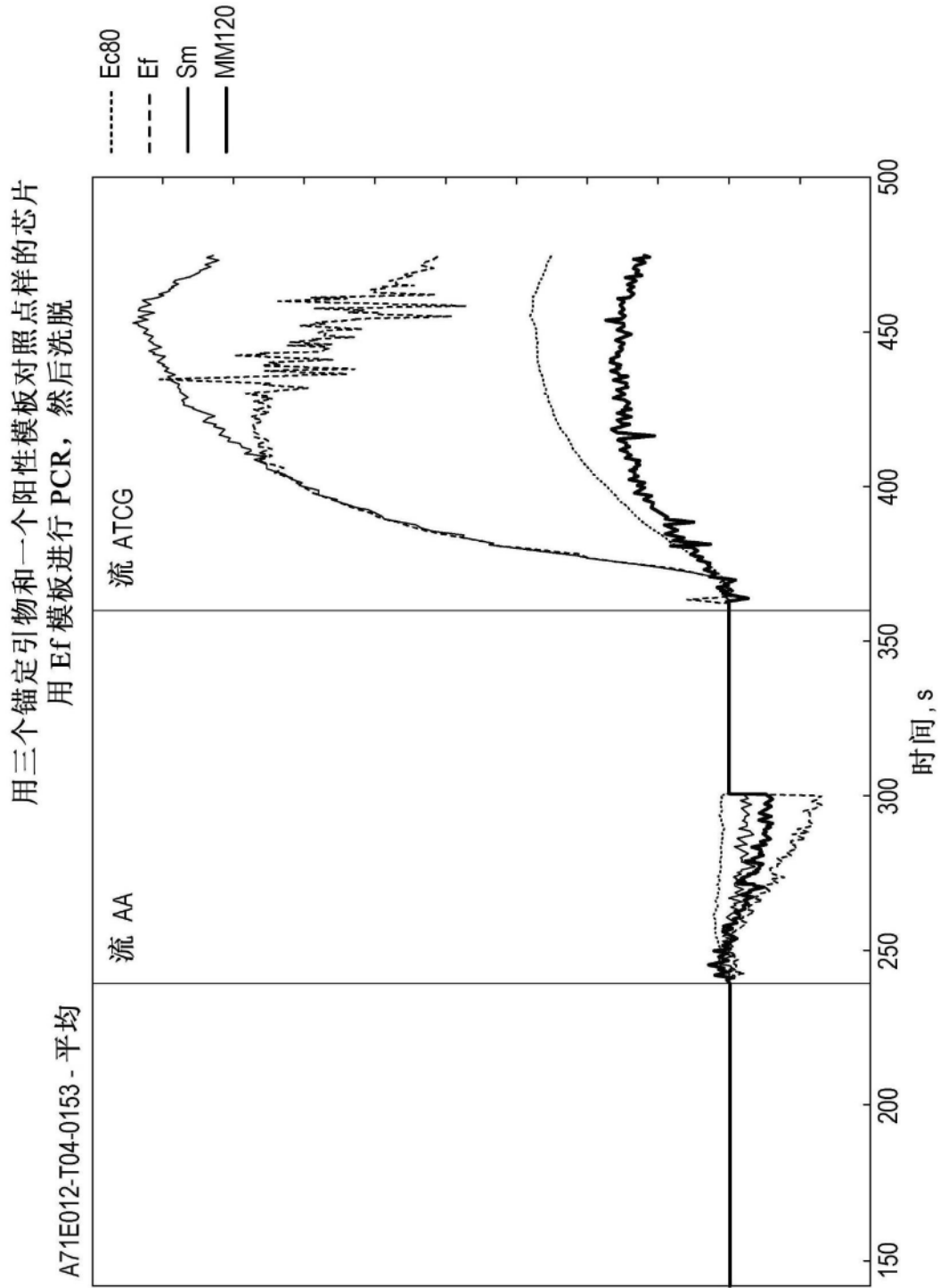


图6 (续)

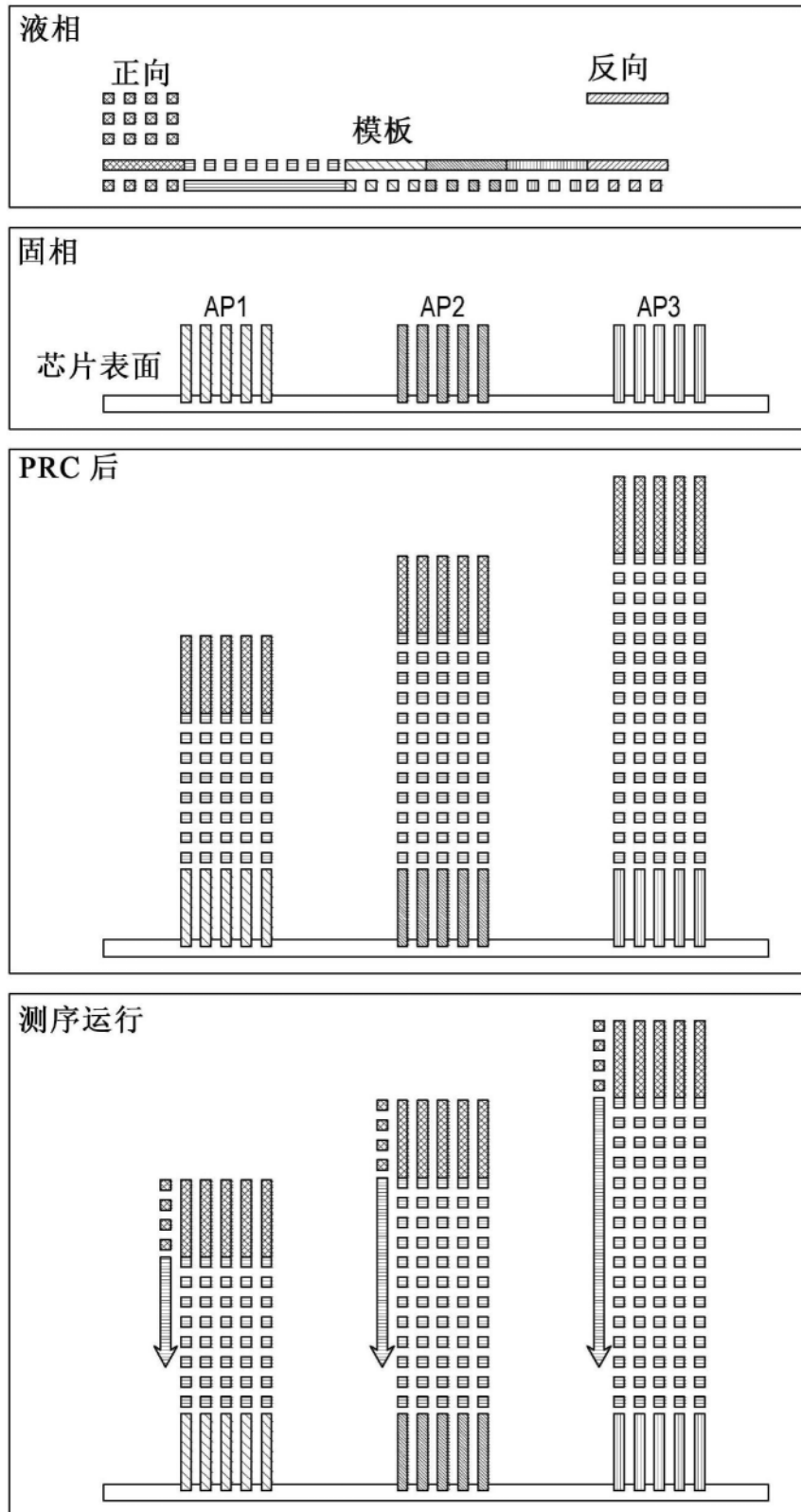


图7

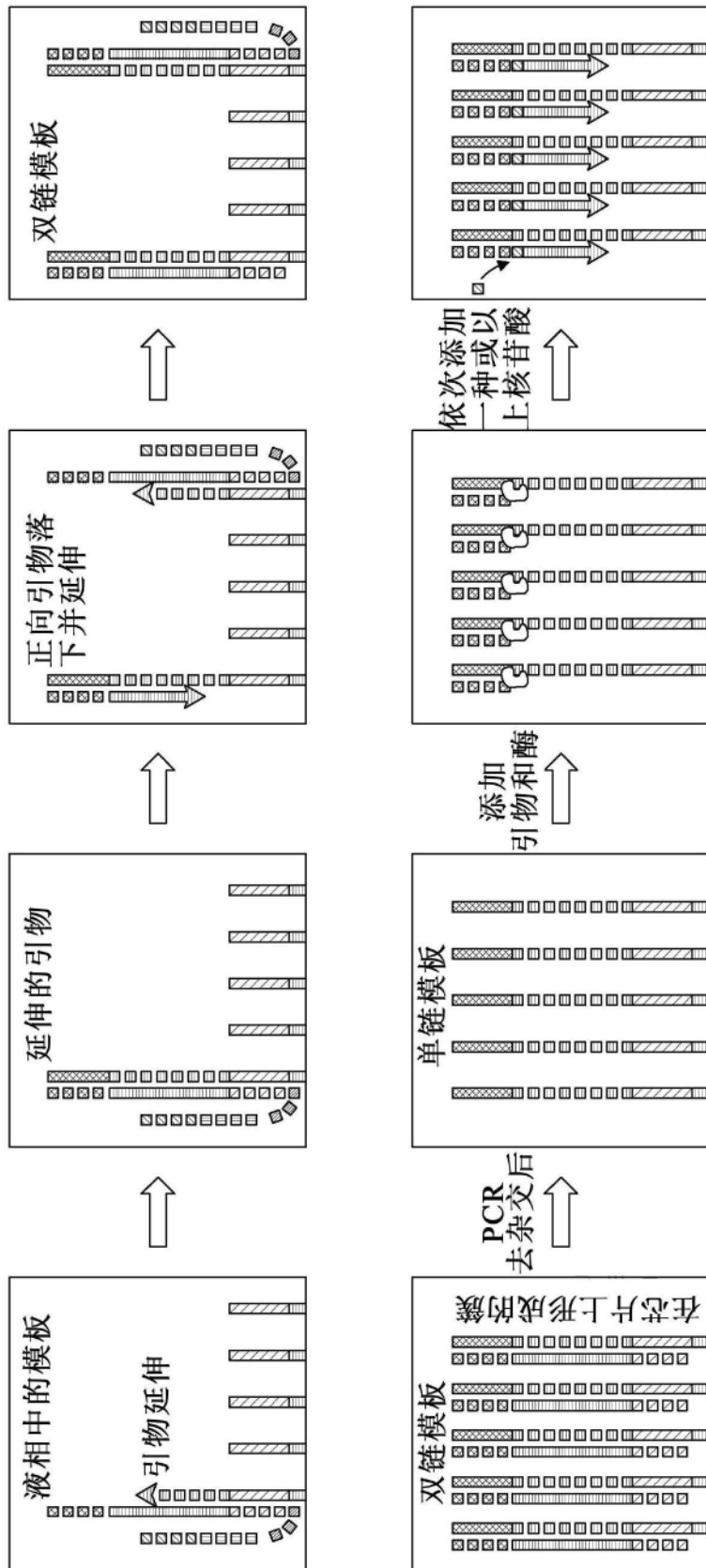


图8

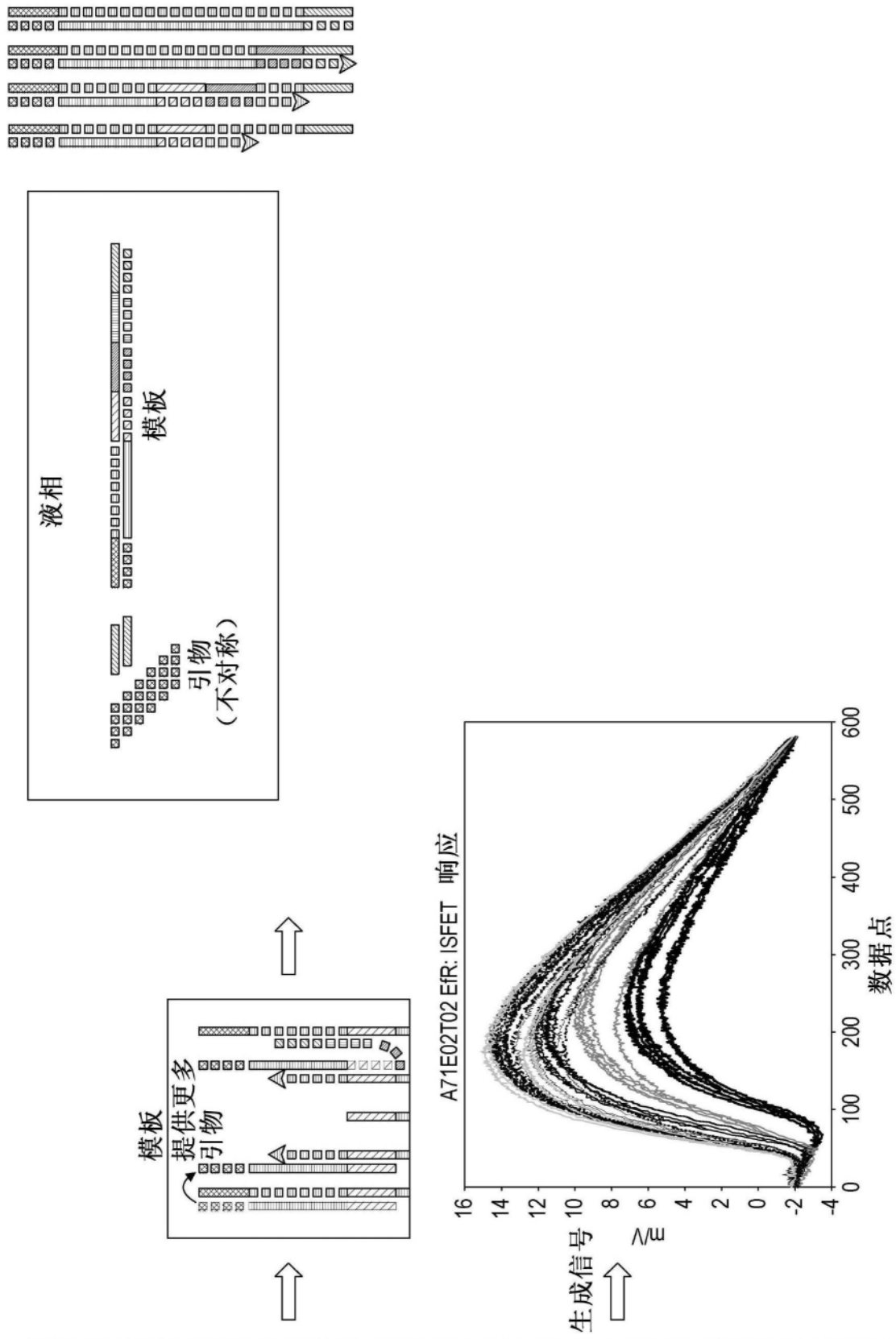


图8 (续)

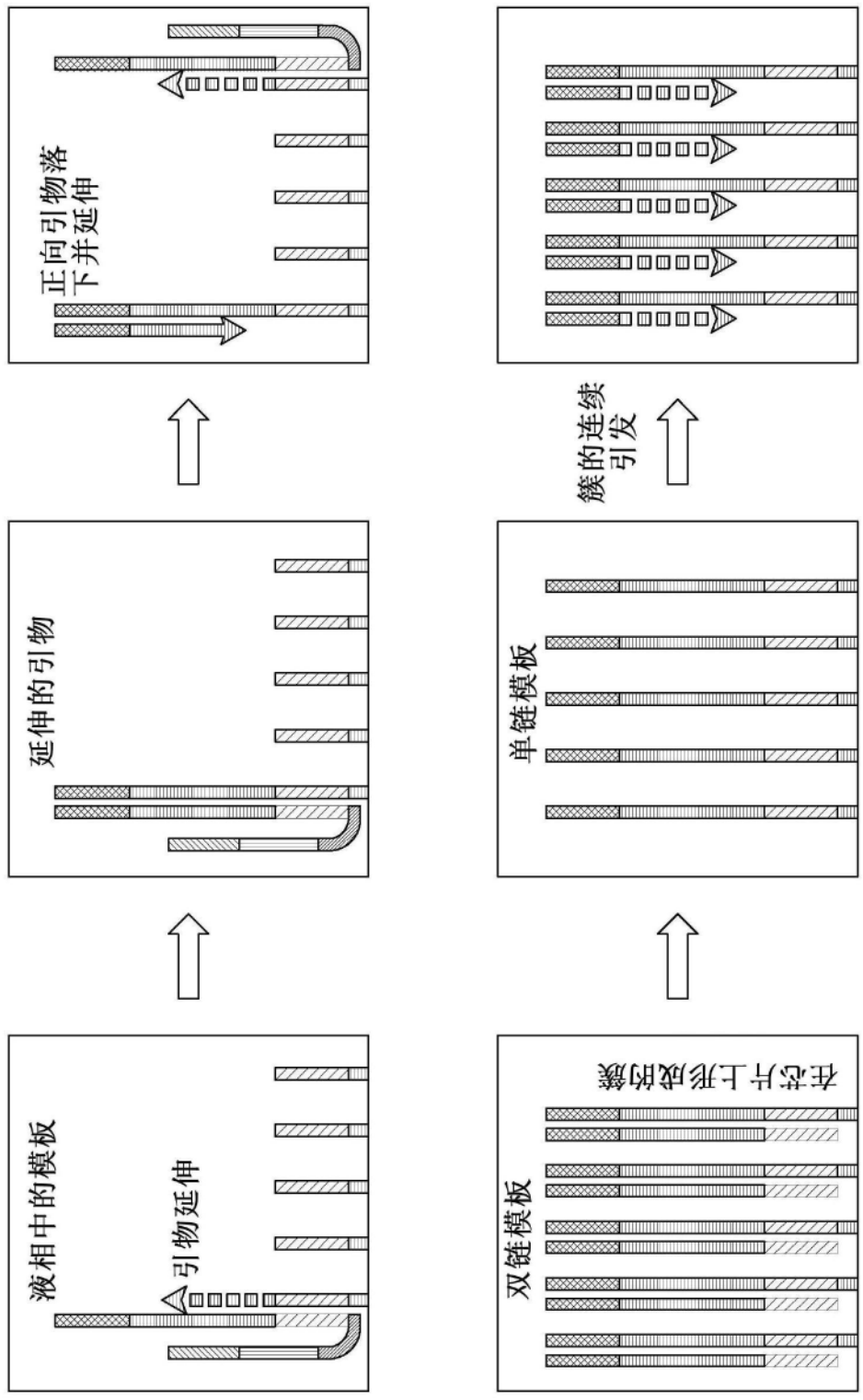


图9

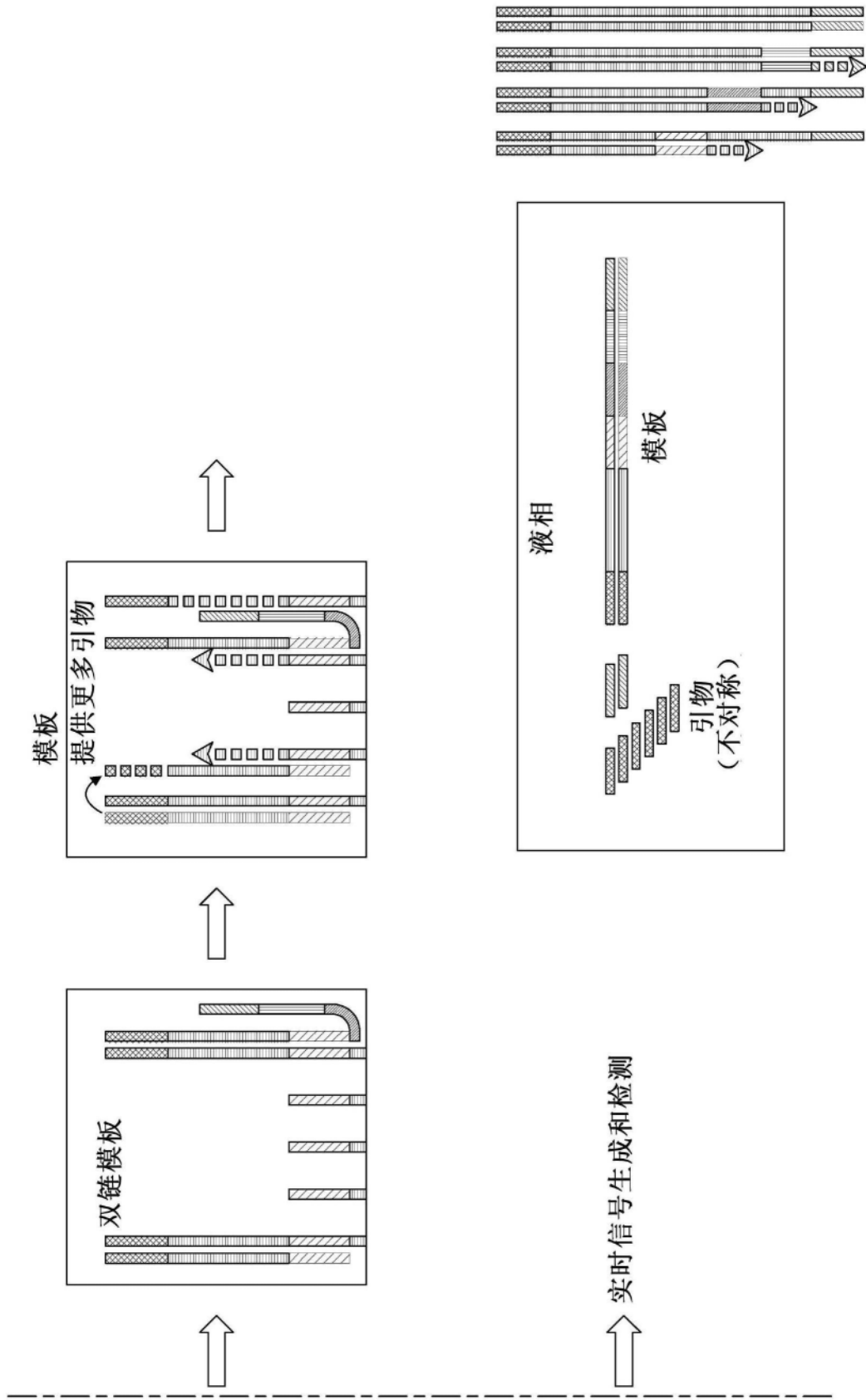
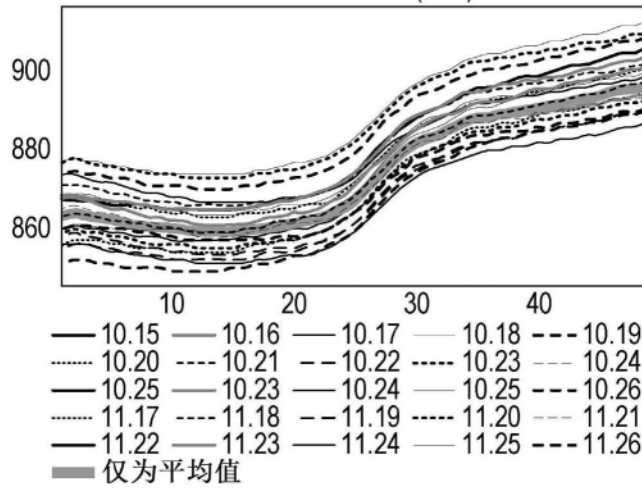


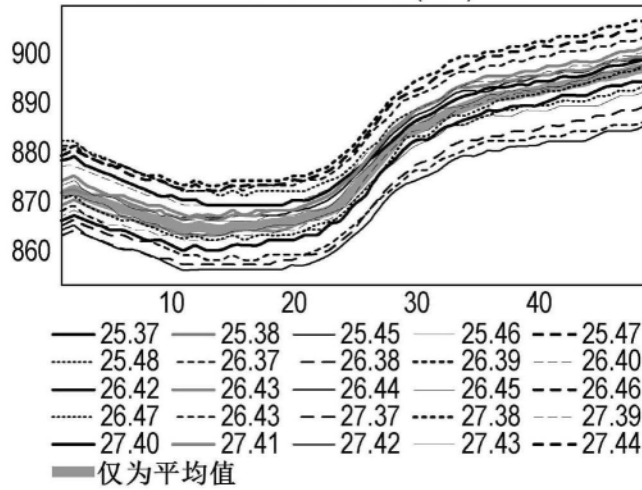
图9 (续)

PCR 期间的实时液相信号

NL-117-0093:B1 (F6A)



NL-117-0093:A2 (F6A)



NL-117-0093:A3 (F6A)

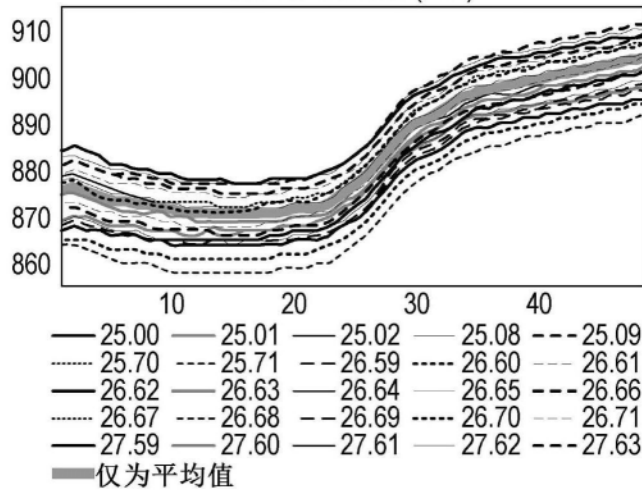


图10

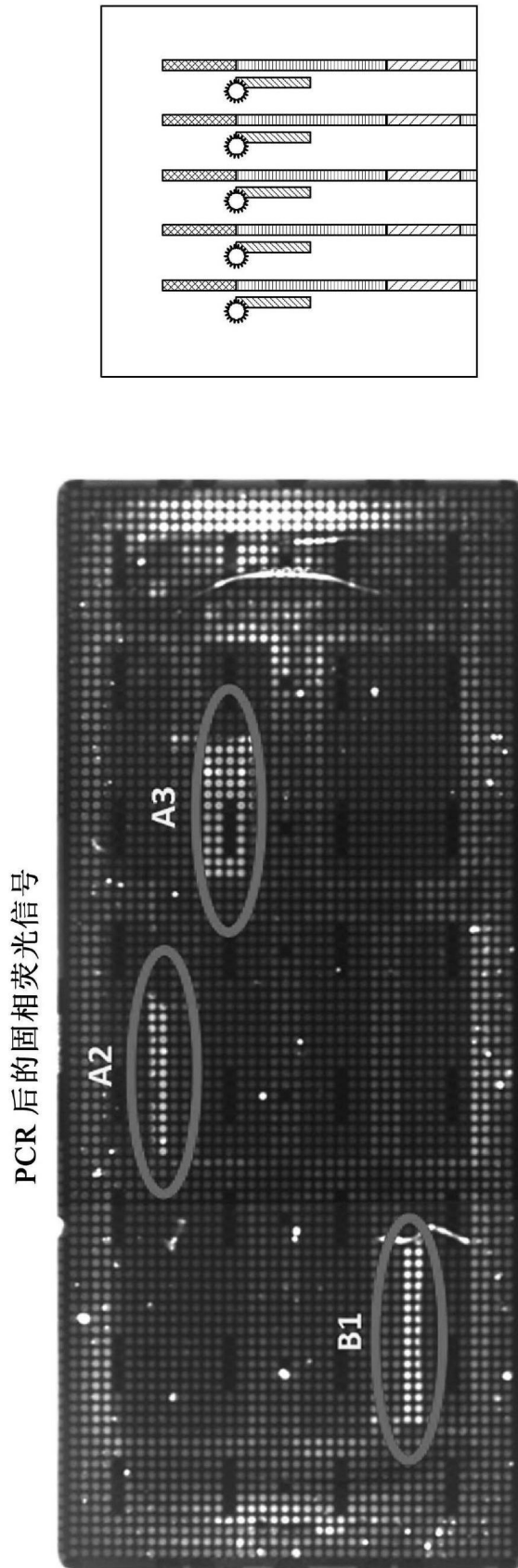


图10(续)

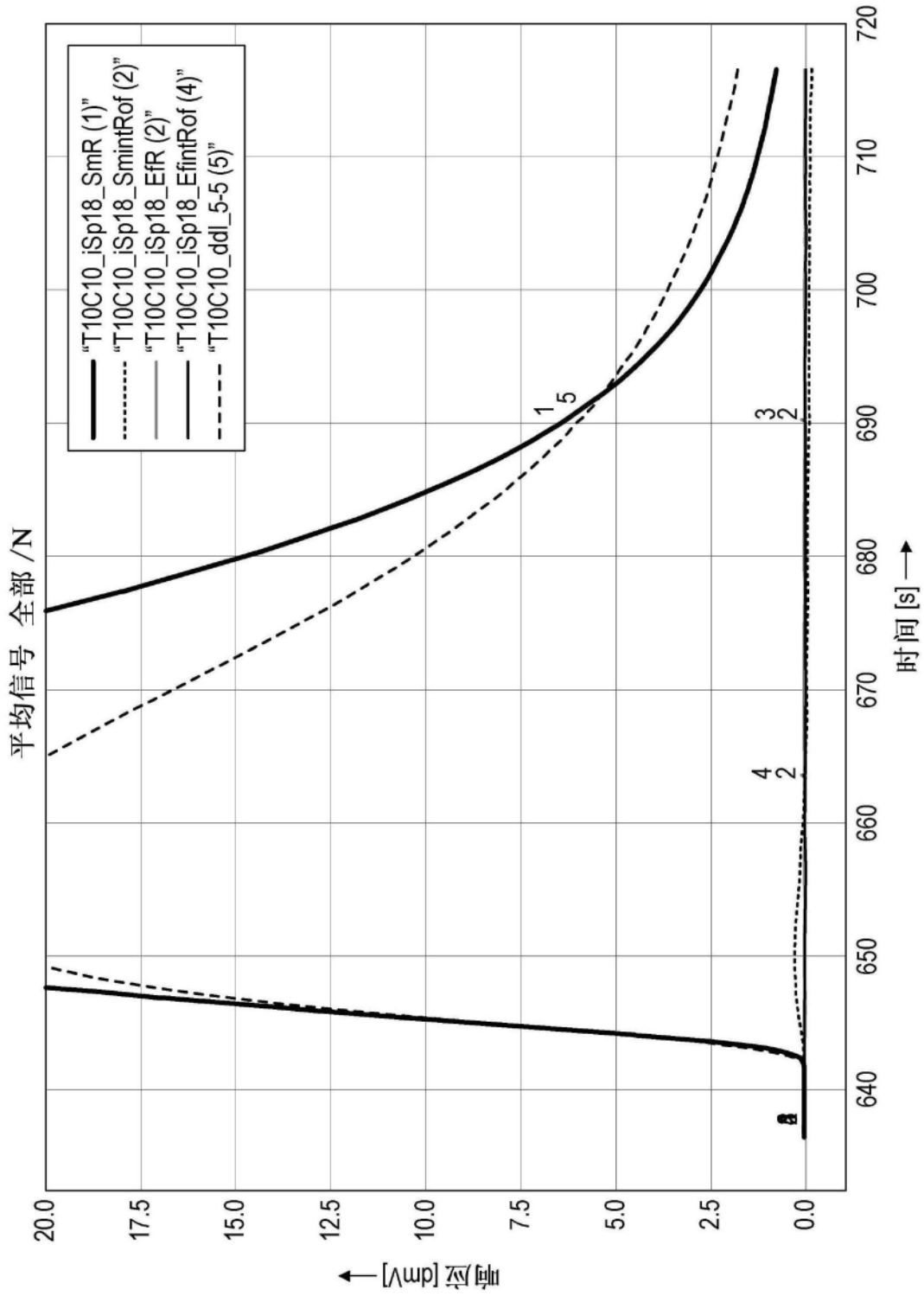


图11

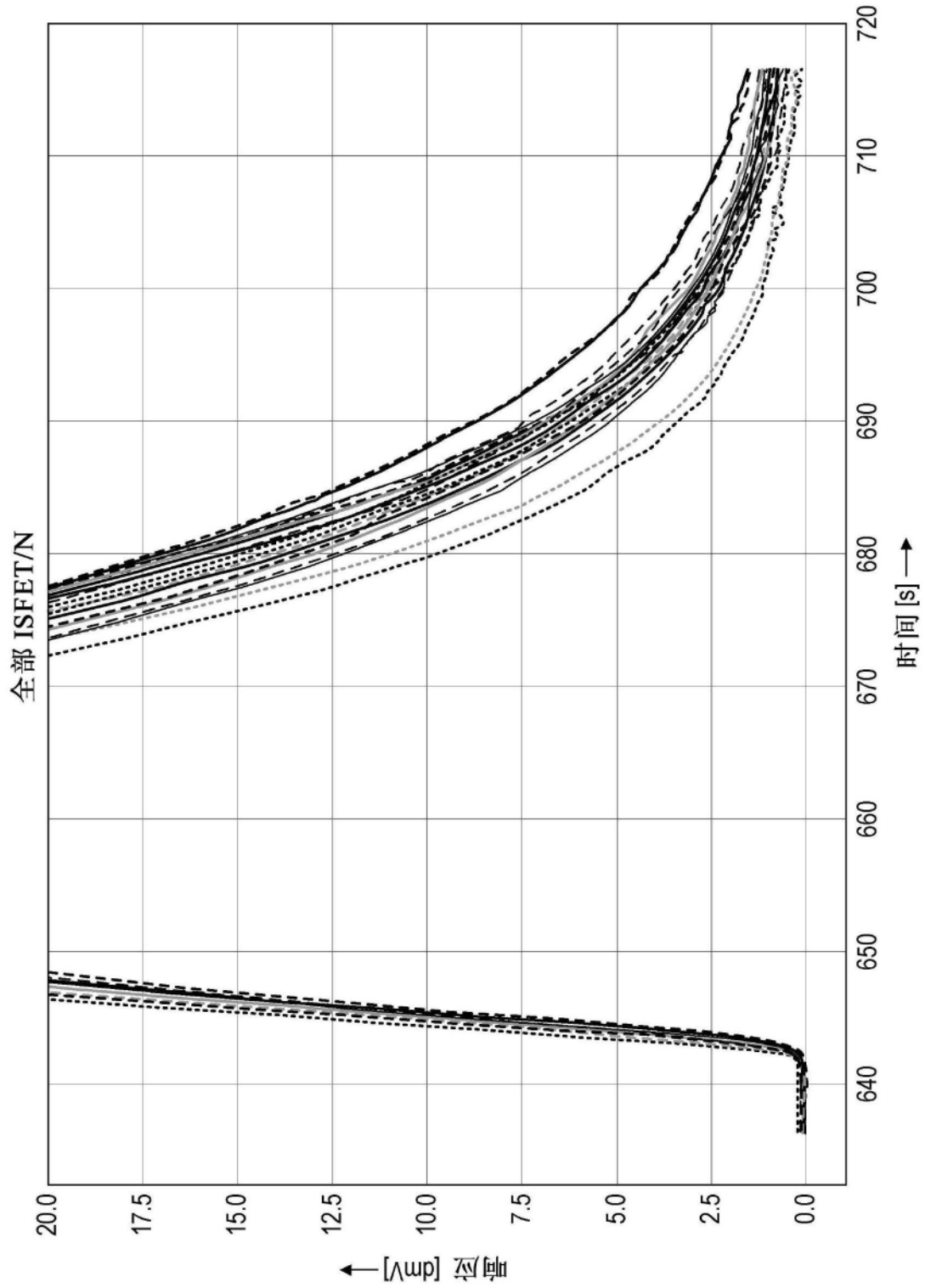


图12

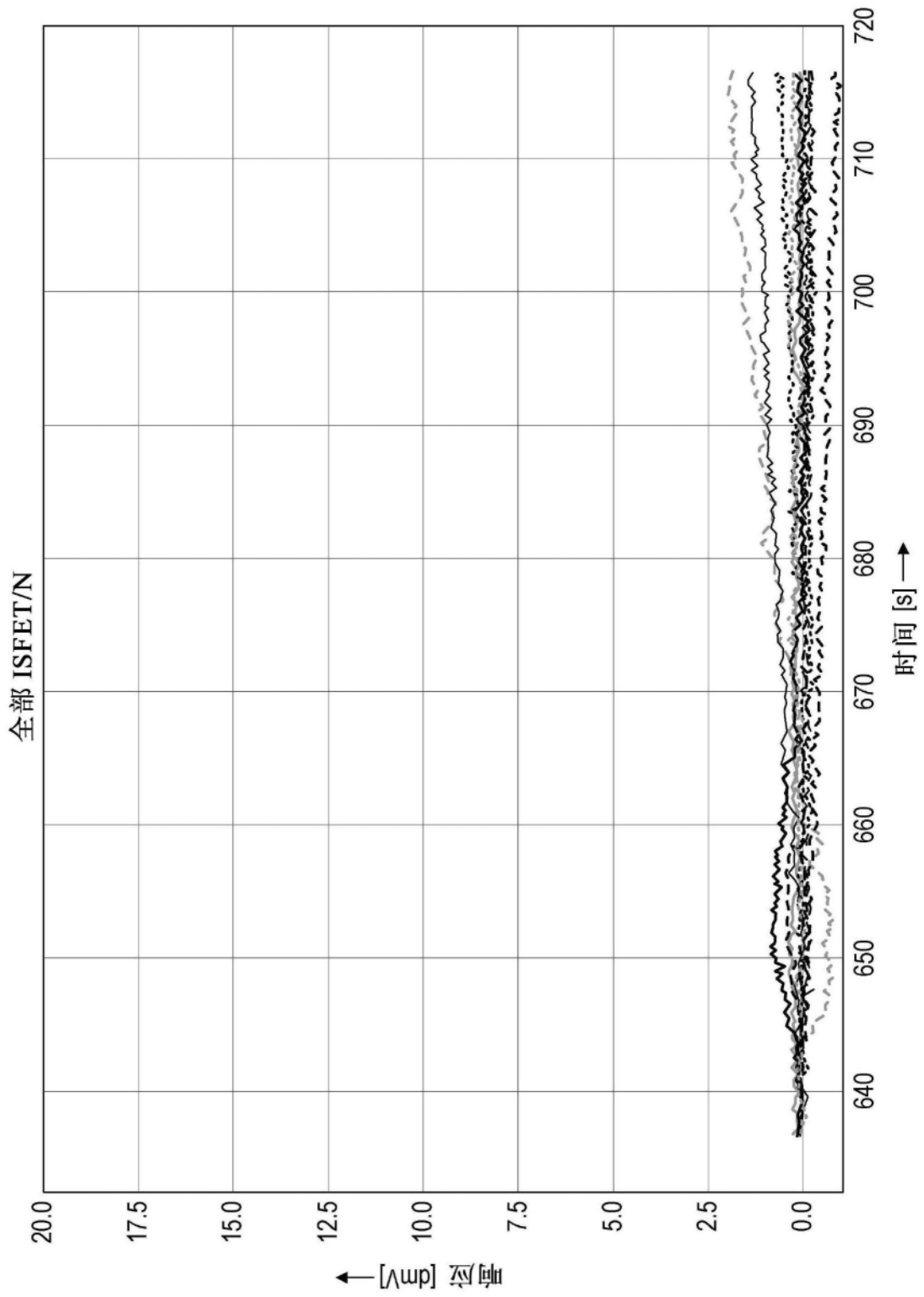


图13

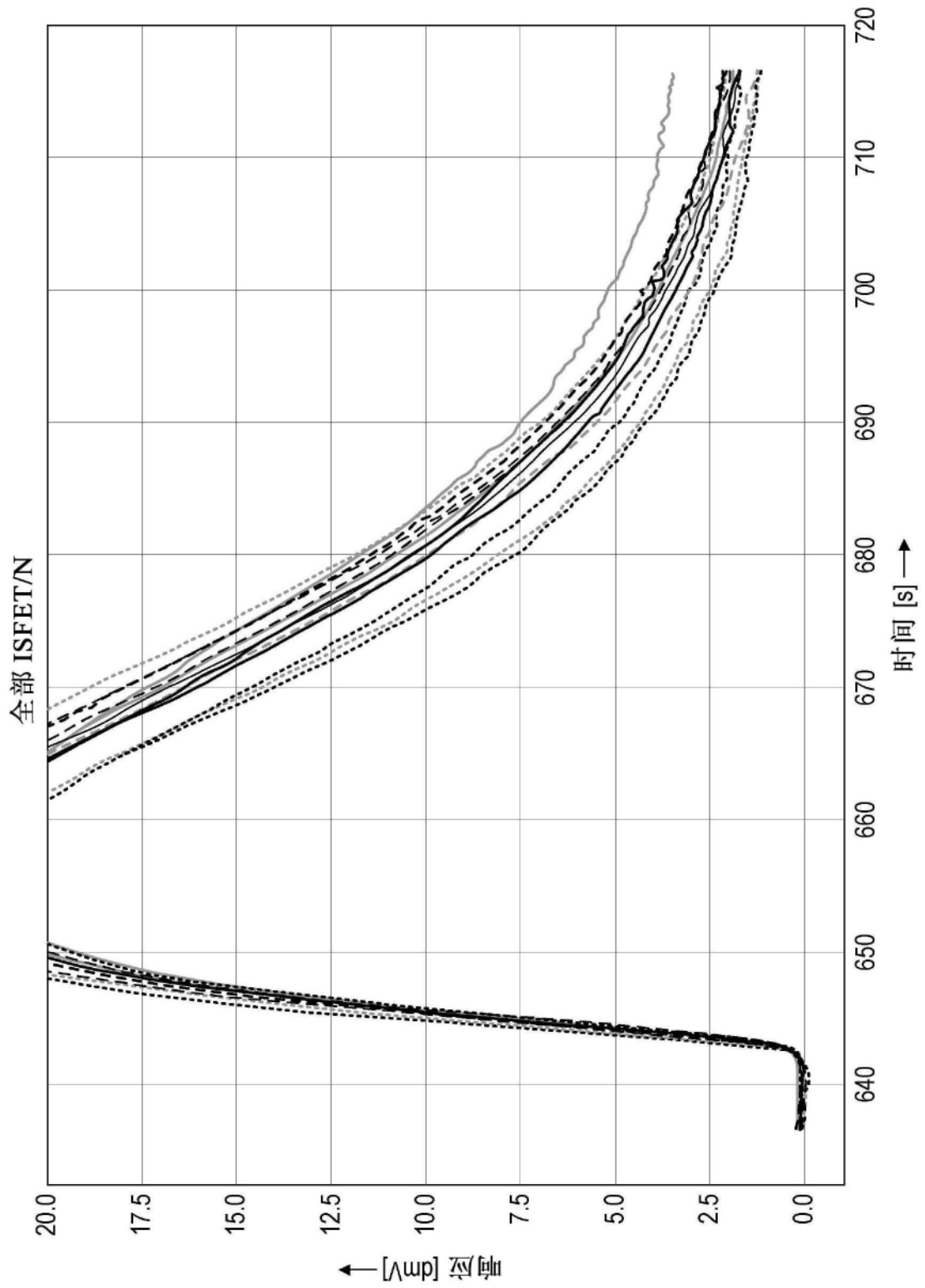


图14

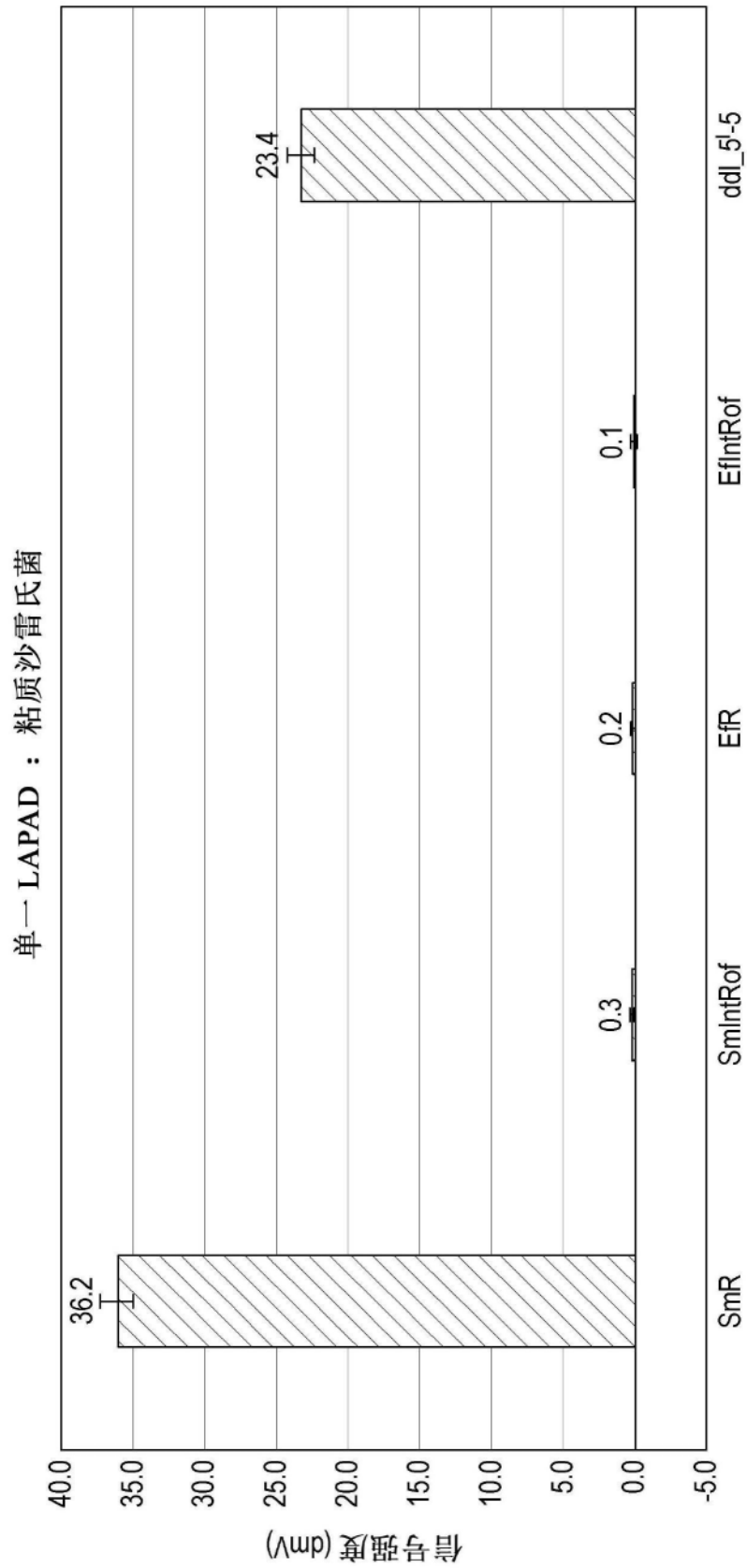


图15

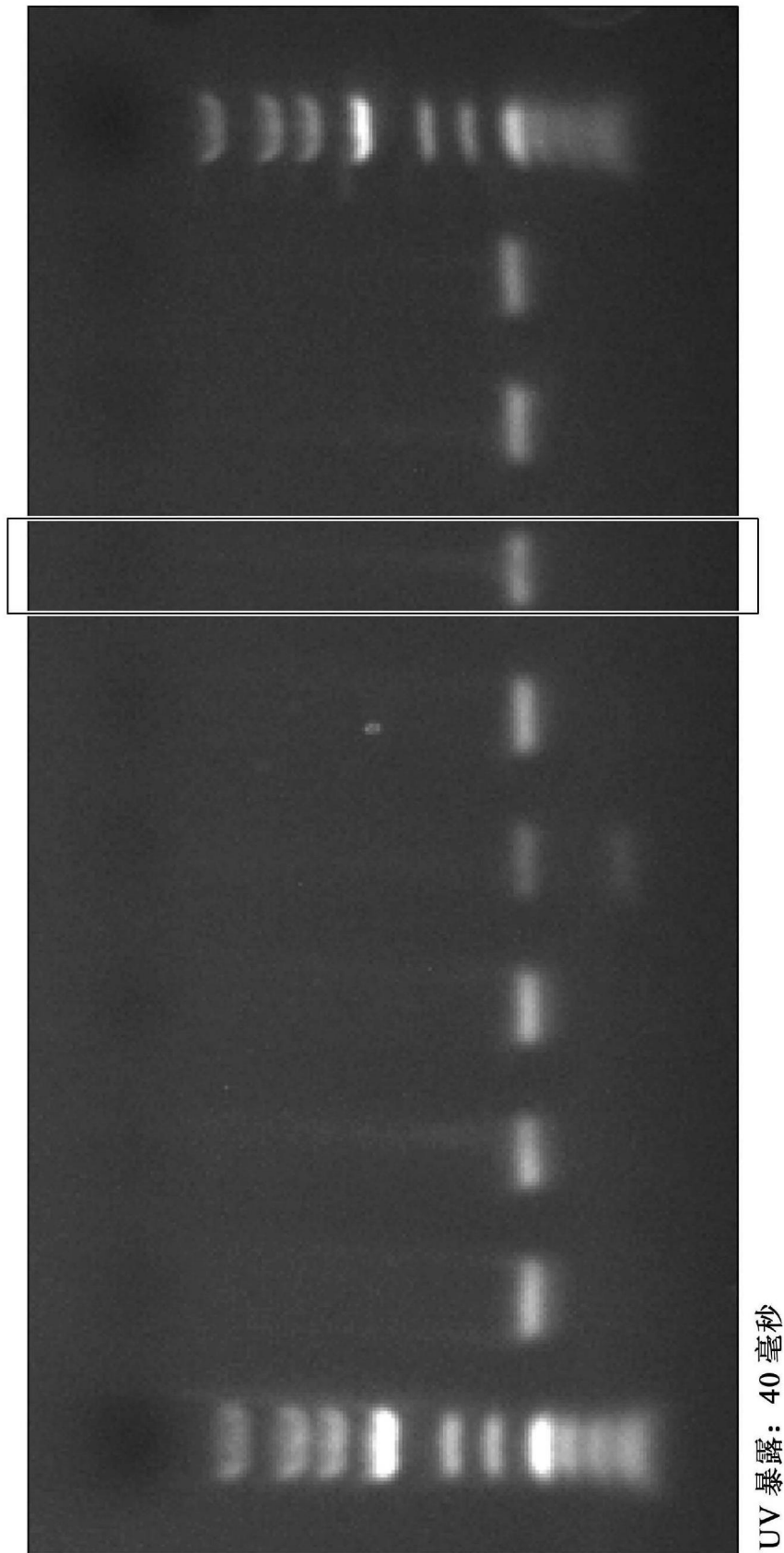
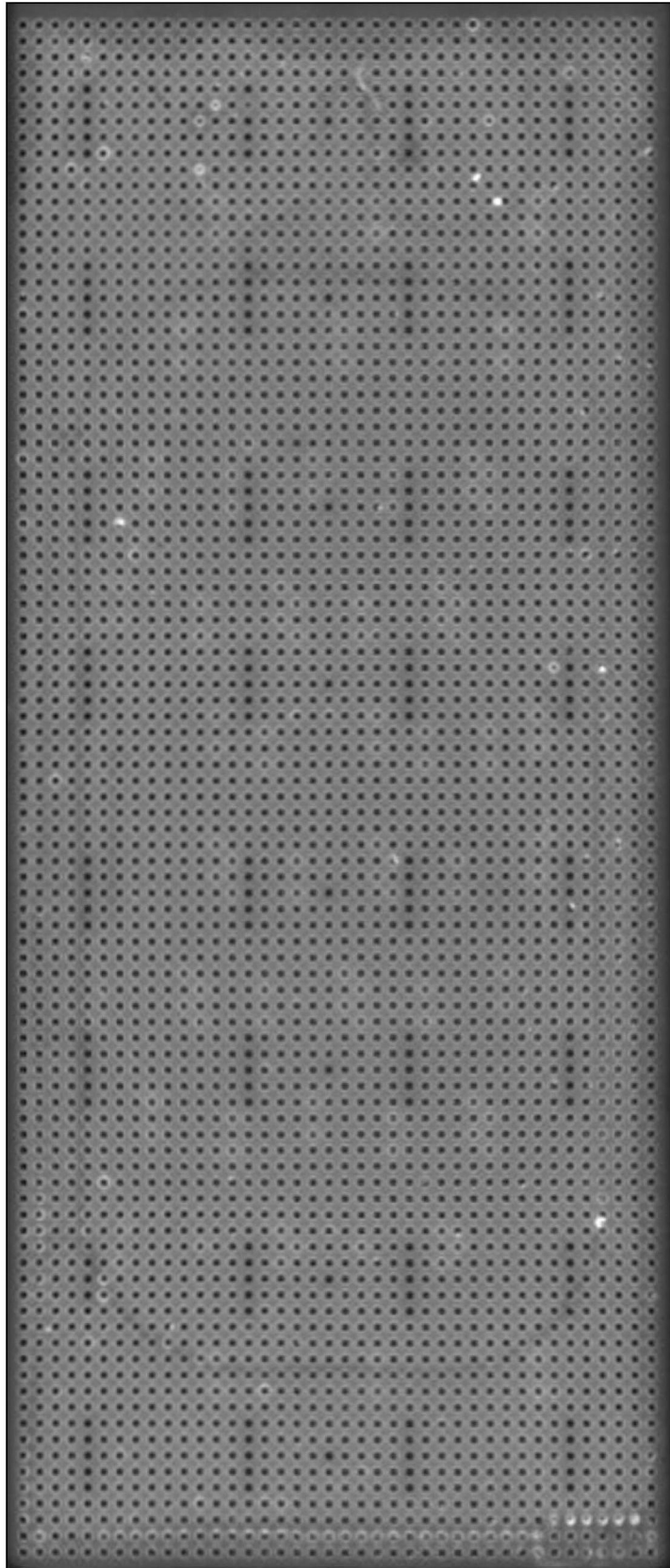


图16



绿光暴露: 6 毫秒

图17

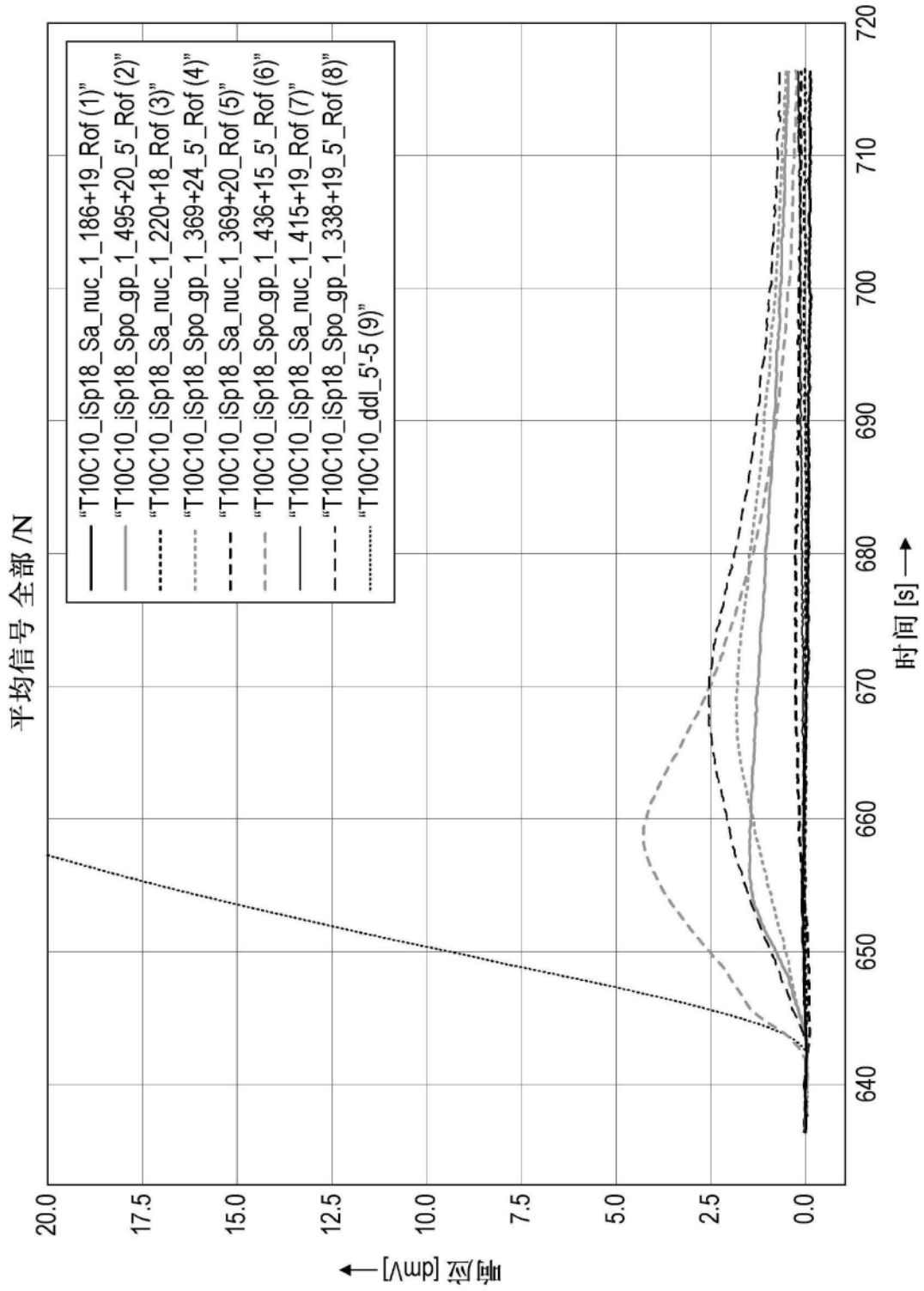


图18

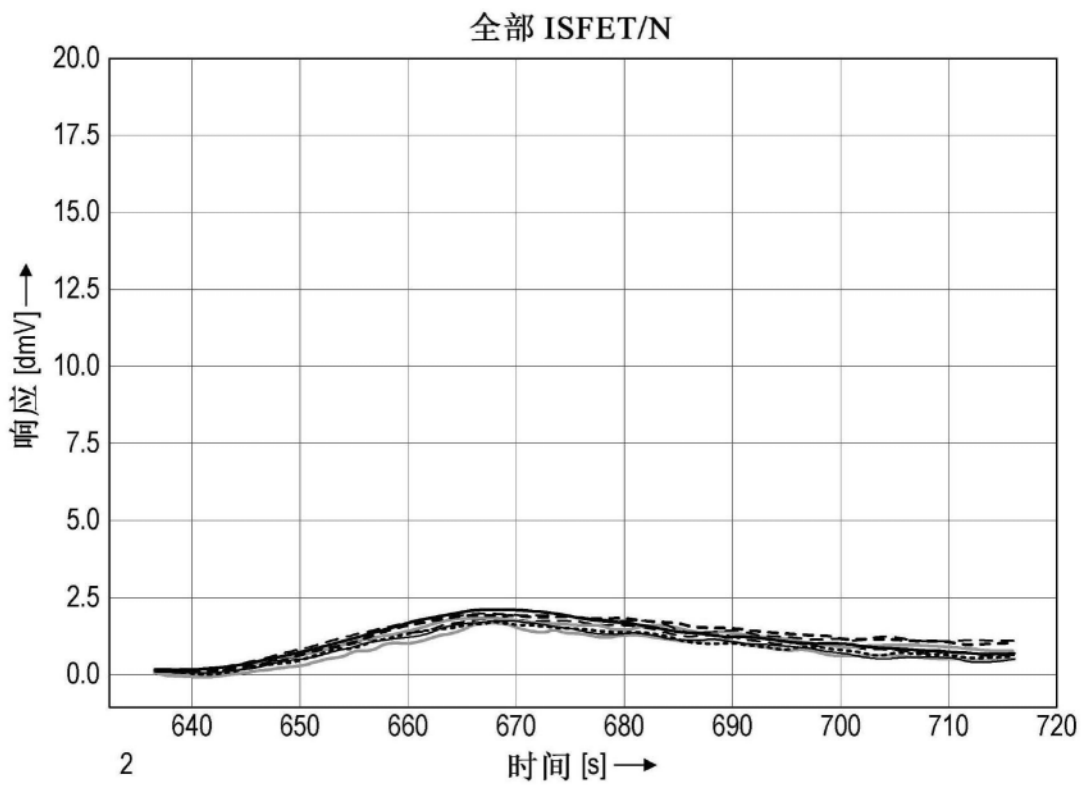
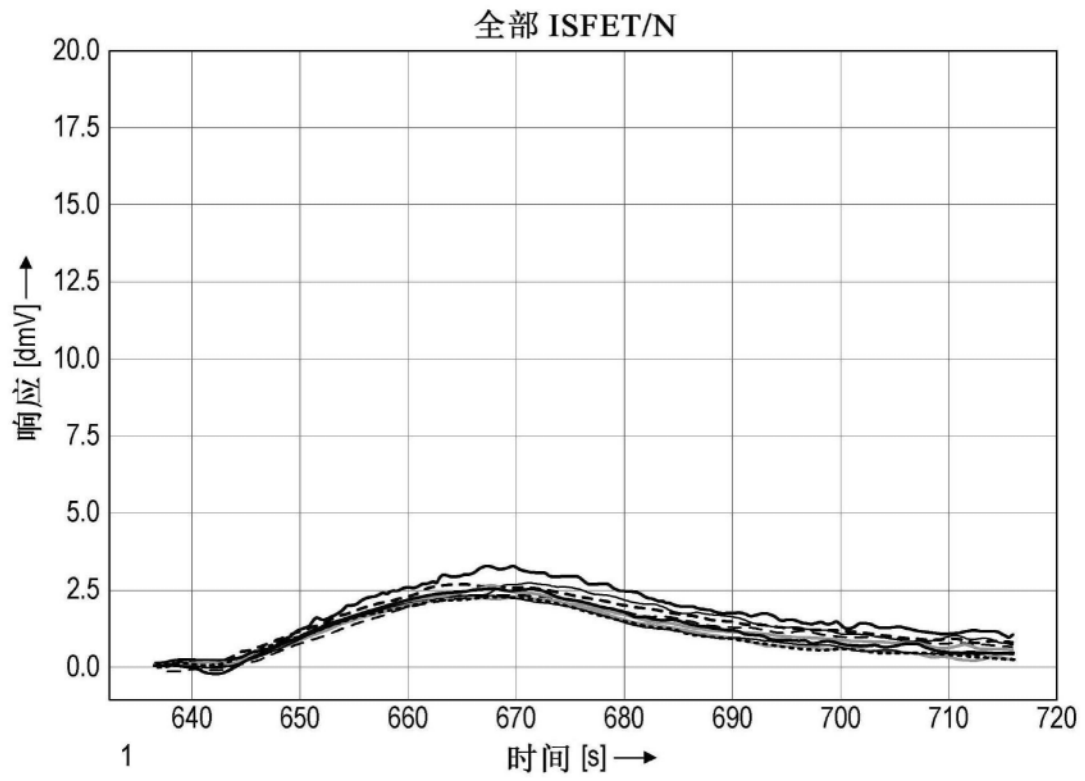


图19

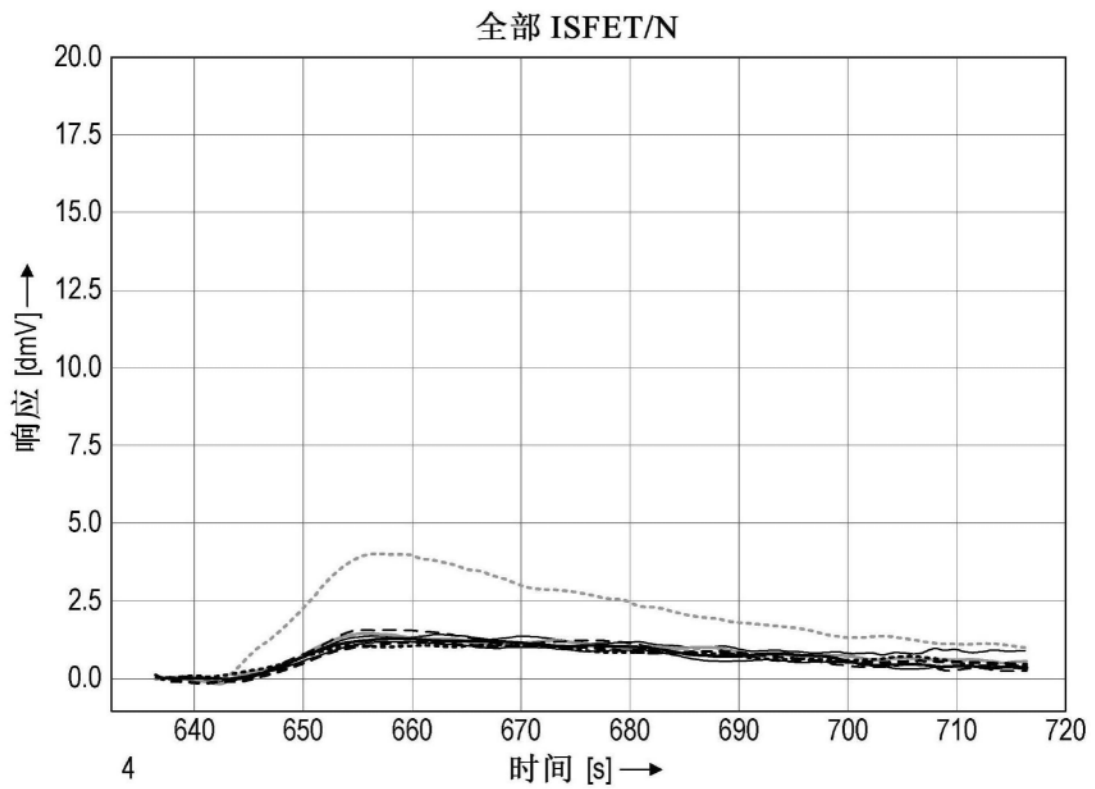
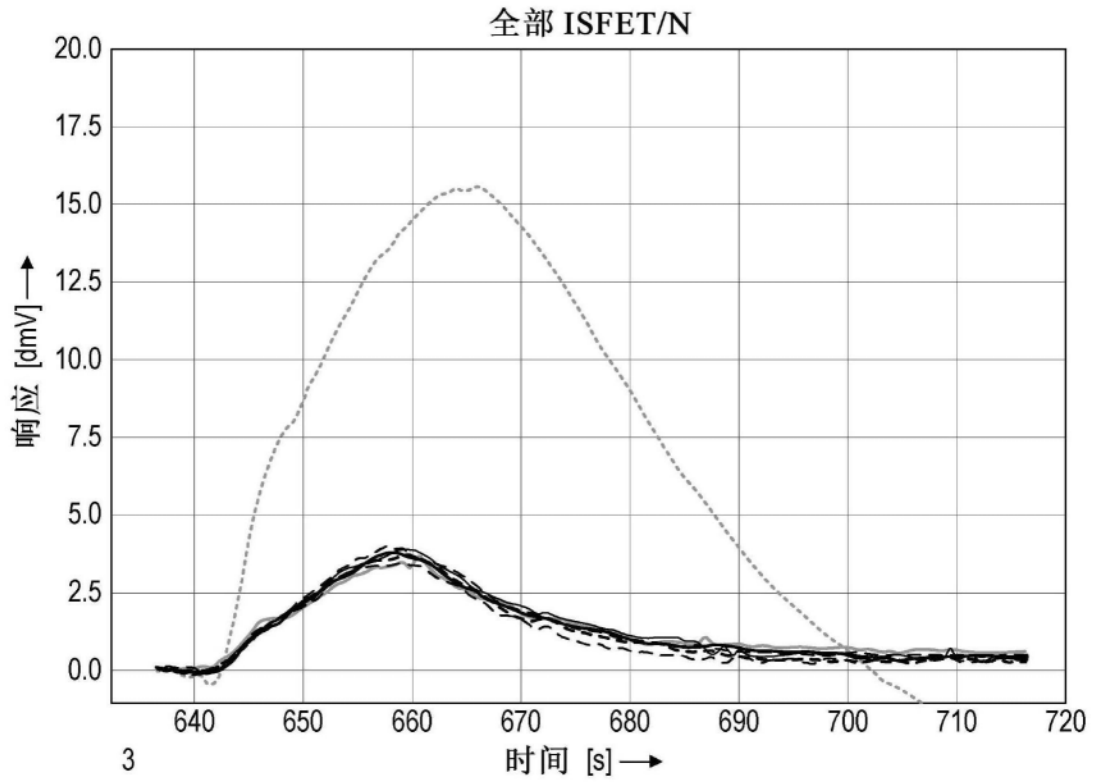


图19(续)

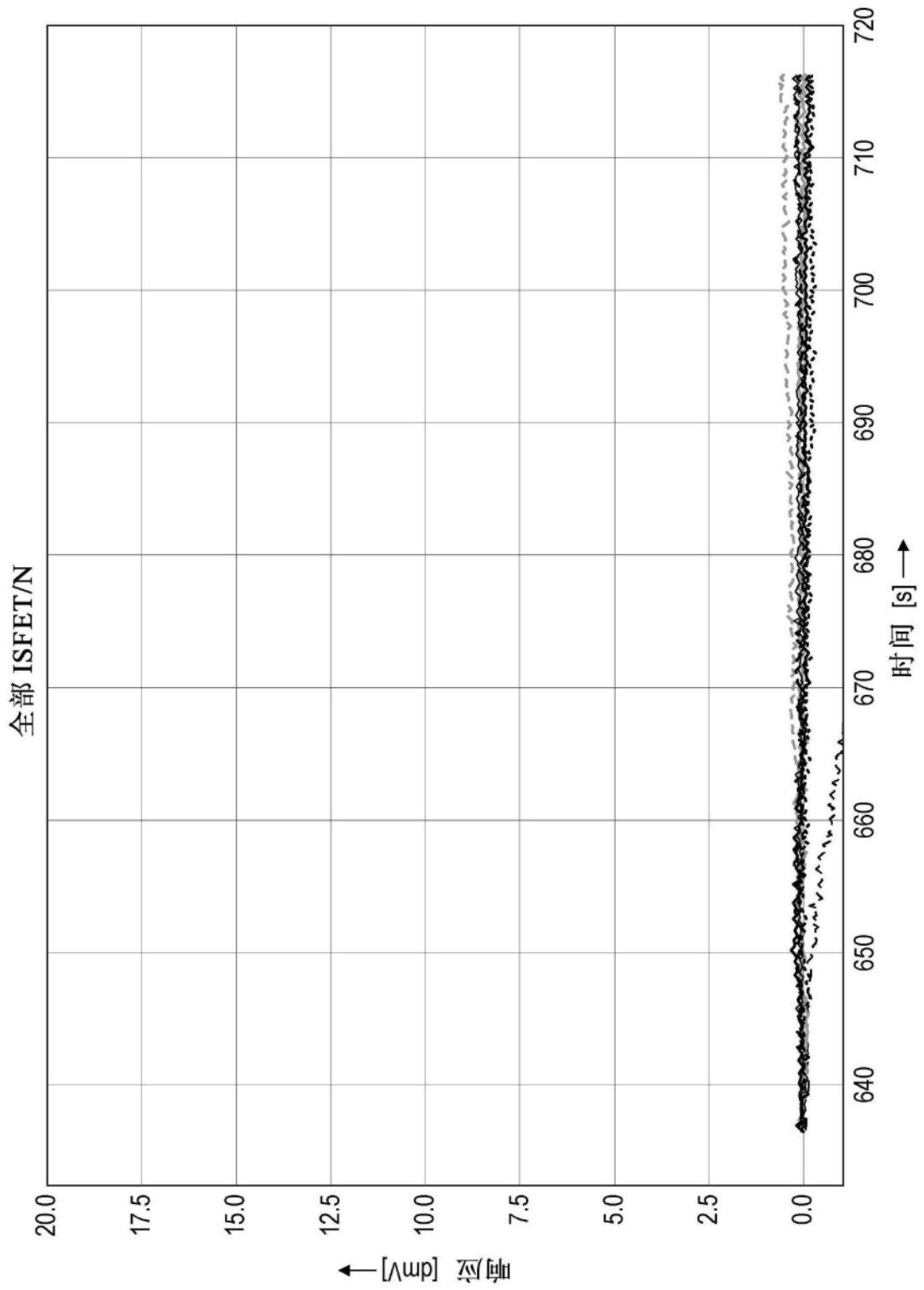


图20

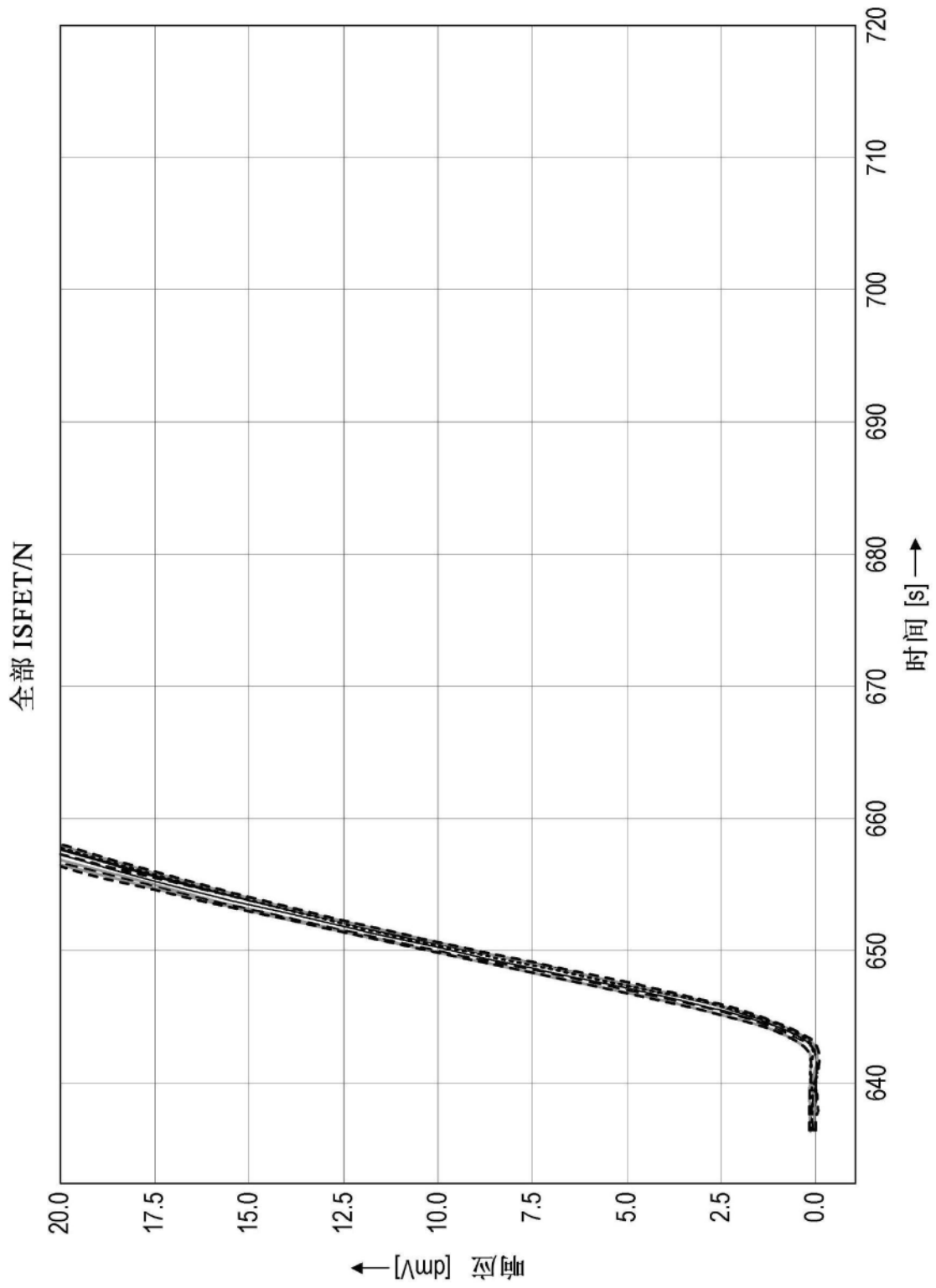


图21

多重 LAPAD: 粟酒裂殖酵母

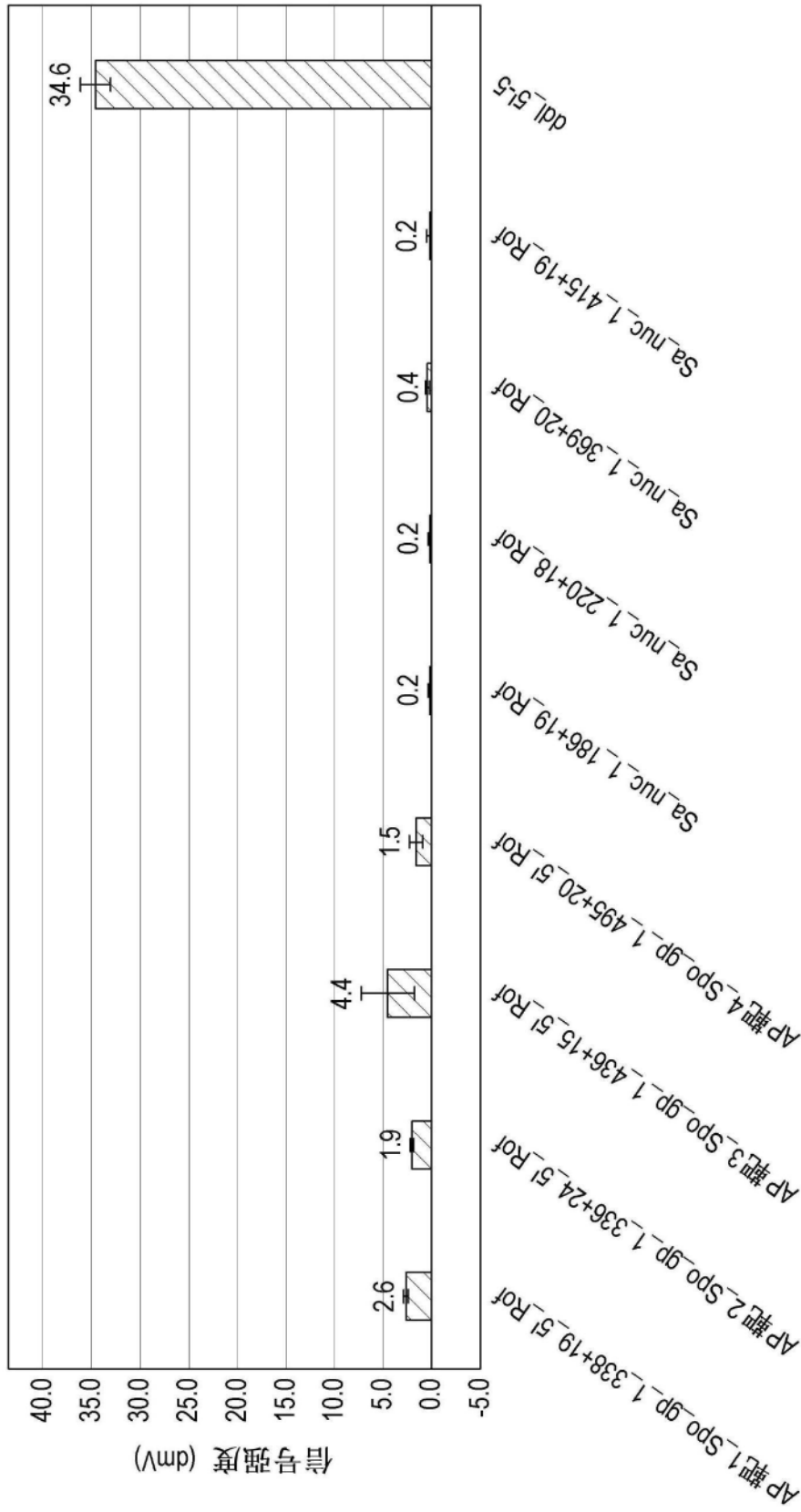


图22

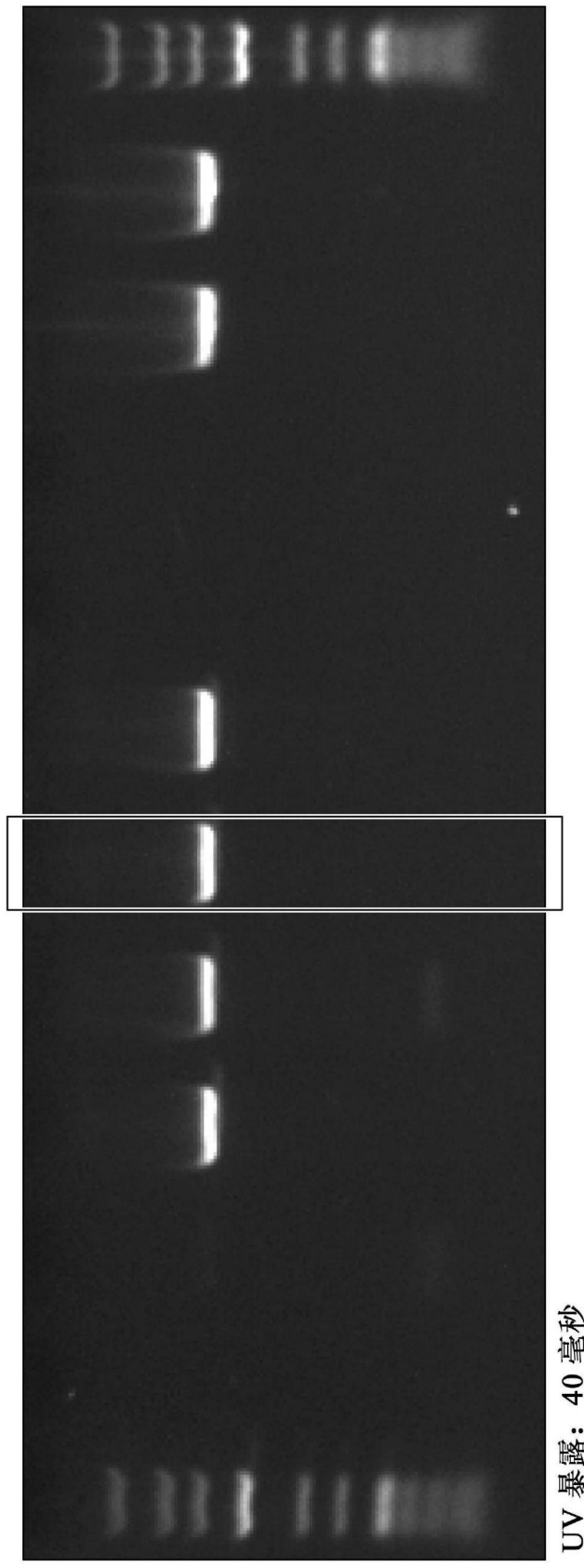
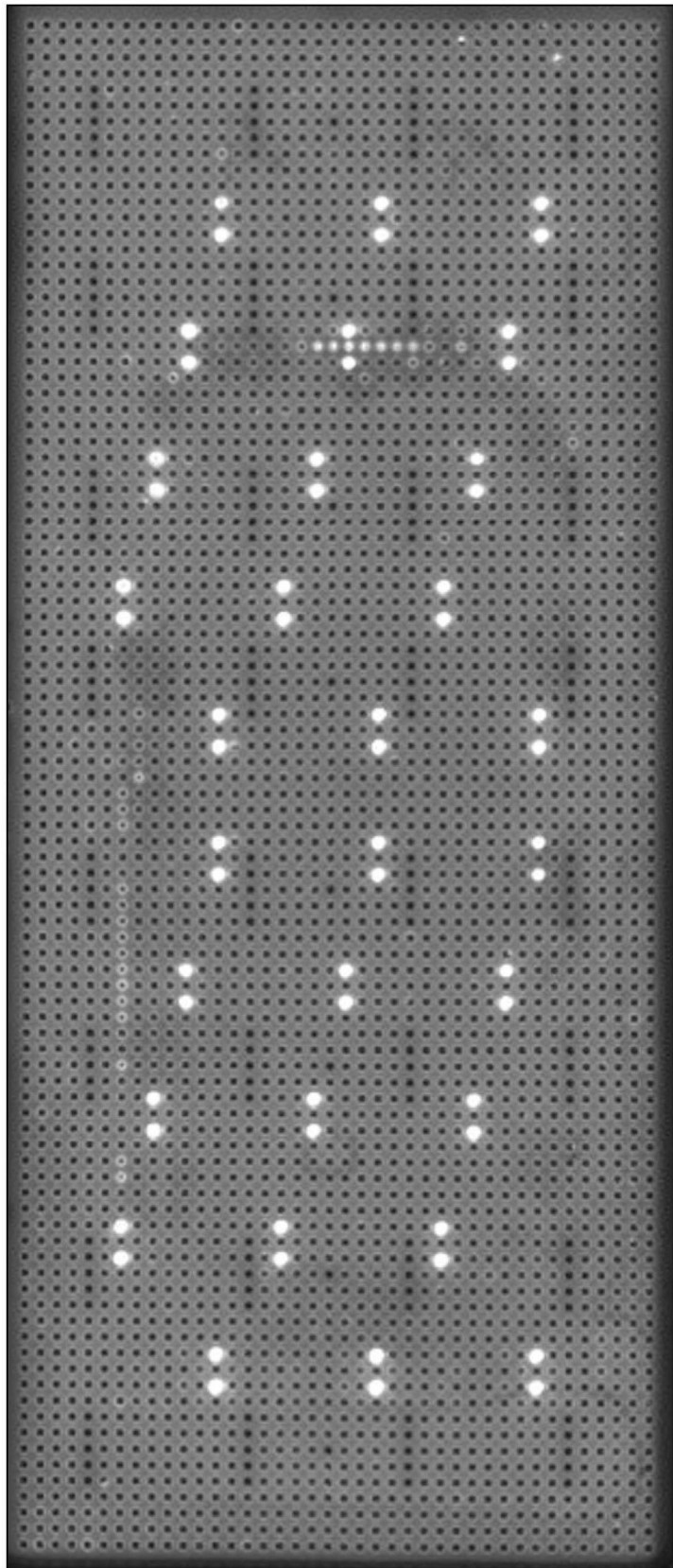


图23



绿光暴露: 6 毫秒

图24