

(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
2024 年 12 月 26 日 (26.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/259848 A1

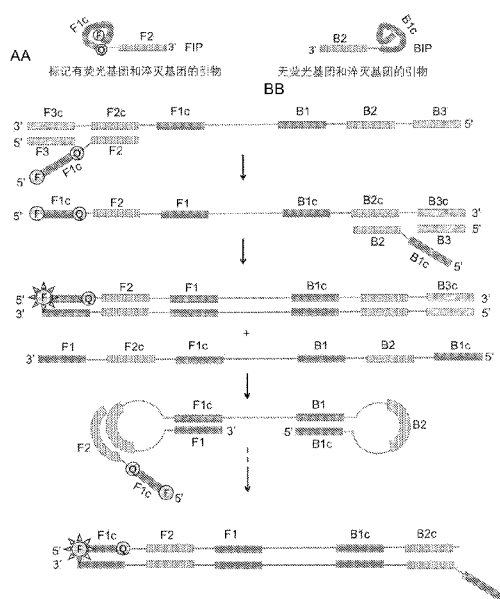
- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6844 (2018.01) **C12Q 1/689** (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/128187
- (22) 国际申请日: 2023 年 10 月 31 日 (31.10.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310740901.3 2023年6月21日 (21.06.2023) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 吴坚 (WU, Jian); 中国浙江省杭州市西湖
区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 陈艳
菊 (CHEN, Yanju); 中国浙江省杭州市西湖区余
杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司
(HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO., LTD.);

中国浙江省杭州市西湖区古墩路701号紫金广
场C座1506室/林超, Zhejiang 310030 (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,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, 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, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

(54) **Title:** REAL-TIME FLUORESCENCE LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION DETECTION METHOD

(54) 发明名称: 一种实时荧光环介导等温核酸扩增检测方法



(57) **Abstract:** The present invention provides a real-time fluorescence loop-mediated isothermal nucleic acid amplification detection method. On the basis of a universal loop-mediated isothermal amplification system, one or more of inner primers (FIP/BIP) and loop primers (LF/LB) are labeled with a fluorescent group and a quenching group. The fluorescent group and quenching group are attached at any position of the primer except the 3' end. The primer is used for nucleic acid amplification, and fluorescence generated by interaction between the fluorescent group and the quenching group is detected, to achieve nucleic acid amplification detection.

(57) 摘要: 本发明提供了一种实时荧光环介导等温核酸扩增检测方法。在通用环介导等温扩增体系的基础上, 在内引物 (FIP/BIP)、环引物 (LF/LB) 中的一条或多条进行荧光基团和淬灭基团的标记; 荧光基团和淬灭基团标记在所述引物除3'端的任何位置; 利用所述引物进行核酸扩增, 针对其中的荧光基团和淬灭基团之间相互作用产生的荧光进行检测, 实现核酸扩增检测。

[图1]

- AA Primer labeled with a fluorescent group
and a quenching group
- BB Primer having no fluorescent group and
quenching group

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))。

一种实时荧光环介导等温核酸扩增检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种实时核酸扩增方法，尤其是涉及了一种实时、单一或多重的特异性环介导等温核酸扩增引物及其扩增检测方法，可应用于基因检测、医学诊断、食品安全、分析化学等领域。

背景技术

[0002] 核酸扩增检测方法通过对目标核酸分子进行扩增达到检测的目的，具有灵敏度高的特点，因此被广泛应用于食品安全、疾病诊断、环境监测等领域。常见的核酸扩增检测方法有聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）和恒温扩增反应。环介导等温扩增反应（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）是最常用的恒温扩增反应之一。LAMP反应体系中包含外引物（F3/B3）、内引物（FIP/BIP）和环引物（LF/LB），通过内引物形成自身环结构，使其在恒温条件（65° C）下就能实现扩增，可用于现场检测。

[0003] 扩增后的核酸样本需要通过扩增产物检测来判定其是否为目标产物，常见的检测方法可分为终点检测法和实时检测法。

[0004] 终点检测法在扩增结束后对扩增产物进行检测，例如凝胶电泳法、浊度法等，这些检测方法是而非特异性的，难以辨别假阳性的检测结果。实时检测法通过在扩增体系中加入嵌入式染料（如SYBR Green, SYTO 9等）或者序列特异性探针对扩增过程进行实时监测。基于嵌入式染料的实时扩增检测方法特异性差，难以实现多重检测。

[0005] 基于序列特异性探针的实时扩增检测方法特异性较高，通过在不同的LAMP体系中加入修饰不同荧光基团的序列特异性探针，即可实现实时多重检测。以LAMP扩增为例，有研究者在LAMP扩增体系中引入一条和内引物（FIP/BIP）5'端互补配对的序列（c-FIP/c-BIP），分别在内引物的5'端和内引物互补配对序列的3'端修饰荧光基团和猝灭基团，其形成双链复合物时荧光基团被猝灭，扩增过程中，内引物互补配对序列被置换下来，使得实时扩增的信号

被检测，该方法被称为DARQ（detection of amplification by release of quenching, DARQ）。DARQ方法可实现实时LAMP检测，但内引物互补配对序列的引入明显降低了LAMP反应的速度，且在LAMP扩增前，需要通过高温变性-退火步骤使内引物和内引物互补配对序列形成双链复合物，这使得反应过程复杂化。也有研究者在内引物（FIP/BIP）或者环引物(LF/LB)的5'端添加一段特异性的内酶切序列，在内切序列的两端修饰荧光基团和猝灭基团，使得LAMP扩增产物可以被特定的内切酶切割，从而达到实时检测的目的，但此方法需要在扩增体系中引入一种新的酶，这增加了反应体系的复杂性。

[0006] 有研究者在扩增体系加入一段分子信标，使得分子信标和扩增片段上的序列特异性识别时打开茎环结构，产生荧光信号，但此方法要求分子信标序列和目标结合序列区域有合适T_m值（熔解温度，temperature of melting, T_m），这使得此方法存在一定的局限性。

[0007] 综上所述，当前基于序列特异性探针的实时环介导核酸扩增检测方法仍存在一定的局限性。因此，急需发展一种设计简便、无需额外酶、快速、实时的多重环介导等温核酸扩增检测方法。

发明内容

[0008] 为解决上述问题和背景技术的缺陷，基于LAMP技术，本发明提供了一种设计简便的核酸扩增引物、序列和检测方法，可实现单一或者多重实时LAMP扩增检测，具有设计简便、无需额外酶、快速、实时的特点等。

[0009] 本发明方法只需要Bst扩增酶，这是本发明的优势。而其他的方法除了扩增酶，可能需要别的酶，因此本发明具有简便快捷、无需额外酶的优点。

[0010] 本发明技术方案和情况是：

[0011] 首先在通用环介导等温扩增体系/方法基础上，以环介导等温扩增体系的内引物（FIP/BIP）、环引物（LF/LB）中的一条或多条引物作为标记引物，在标记引物上进行荧光基团和猝灭基团的标记/修饰，且荧光基团和猝灭基团标记/修饰在所述标记引物除3'端的任何位置；

[0012] 然后利用所述标记引物进行环介导等温核酸扩增，在核酸扩增过程中，对荧光基团所发出的荧光进行实时检测，根据所得到的荧光情况以及曲线对核酸扩增

情况进行实时判断。或者在核酸扩增后，对荧光基团所发出的荧光进行检测，根据所得到的荧光情况以及曲线对核酸扩增结果进行判断。

[0013] 所述环介导等温扩增体系/方法中不含有任何能对含有荧光标记的引物本身及其生成的双链进行切割、断裂等的功能酶。

[0014] 所述标记引物具有5'端延长段，所述荧光基团和猝灭基团分别或全部标记在所述5'端延长段。

[0015] 所述的5'端延长段是指5'端的序列按照常规设计进行延长设计而形成的一段。

[0016] 所述5'端延长段选用包含有胸腺嘧啶（T）碱基的合适长度的任意序列，并且不要求延长段本身或延长段和所连接引物形成茎环等二级结构。

[0017] 具体而言，所述荧光基团和猝灭基团的标记/修饰可以是以下几种：

[0018] 所述荧光基团和猝灭基团同时修饰在标记引物的中间；

[0019] 或者荧光基团和猝灭基团中的任意其中一个修饰在标记引物的中间、另一个修饰在标记引物的5'端；

[0020] 或者荧光基团和猝灭基团中的任意其中一个修饰在标记引物的5'端延长段、另一个修饰在标记引物的中间、5'端或者5'端延长段。

[0021] 所选标记引物上，所述荧光基团和所述猝灭基团之间的间距在9-35个碱基之间。

[0022] 在进行环介导等温核酸扩增时，当存在目标核酸片段时，标记引物和其互补片段结合，并在仅具有链置换功能的核酸扩增酶作用下，沿目标核酸片段延伸形成稳定双链。

[0023] 在进行环介导等温核酸扩增时，当存在多个目标核酸片段时，对不同目标核酸片段的扩增引物标记/修饰上不同发射波长的荧光基团，实现实时多重核酸检测。

[0024] 由此，本发明提供一种可实现单一或者多重实时核酸扩增检测体系，在扩增体系的一个或多个引物上修饰荧光基团和猝灭基团。

- [0025] 荧光基团和猝灭基团同时修饰在引物的序列上，既可以把这两个基团修饰在引物的中间，也可以把其中一个基团修饰在引物的5'端；也可以将引物的5'端进行延长，将一个或两个基团修饰在引物5'端延长的序列上。
- [0026] 在核酸扩增时存在多个引物，也可以在多个引物上修饰相同或不同的荧光基团及对应猝灭基团，增强信号。
- [0027] 在无扩增反应时，该引物为单链DNA，“蜷缩”状态的单链DNA使得荧光基团和猝灭基团在空间上较近，荧光信号被猝灭；发生扩增反应后，修饰有荧光基团和猝灭基团的引物与目标核酸结合，并根据目标核酸序列进行延伸形成双链DNA，由于双链DNA的刚性比单链大，双链中的荧光基团和猝灭基团远离，荧光猝灭效应减弱，使得体系中产生的荧光信号增强。
- [0028] 在本发明核酸扩增时，修饰有荧光基团和猝灭基团的所述引物和目标片段的序列结合后，将从3'端开始延伸，这一延伸，也使得标记有荧光基团和猝灭基团的引物的长度增加，并且引物的碱基和目标片段的序列相互互补，从而可以自然形成稳定的双链，而不需要其他手段，这也大大降低了修饰荧光基团和猝灭基团的引物由于体系中其他引物的扩增而被替换下来的可能性，能够形成稳定的双链，实现了高效率、简单便捷的核酸扩增检测。
- [0029] 并且本发明相比于采用四氢呋喃、内切酶等现有技术的其他手段将带有荧光基团和猝灭基团的序列切割，从而使得两者完全分离的情况，本发明中只是由于单链变成双链所带来的荧光信号增强要弱一些，但是采用目前常见的荧光扩增仪，如赛默飞实时荧光定量QuantStudio3PCR仪等，扩增过程中由于形成双链所带来的实时荧光信号的增强是清晰可见的，因此能够带来高效率、简单便捷的核酸扩增检测。
- [0030] 当荧光基团和猝灭基团其中至少一个修饰到酸扩增引物的5'端延长段时，引物和目标片段的序列结合后，将使得核酸扩增引物变成产物的一部分，这样目标检测更简易，提升了荧光检测效果，使得检测结果更准确。
- [0031] 相比于现在的技术，本发明具有如下优势：
- [0032] 1) 实用性强。本发明利用通用LAMP扩增体系，只需要在现有引物的基础上，选择其中一个引物或多个引物，将其修饰上荧光基团和猝灭基团即可。不需要

为了实现特异性荧光检测而对引物及反应体系进行额外的优化，也不需要增加额外的酶。

[0033] 2) 序列依赖性低。荧光基团和猝灭基团可修饰在引物的5'端和除3'端外的中间区域。

[0034] 若所选引物上的碱基序列对荧光基团的信号有影响，可将引物5'端进行延长，并将荧光基团和猝灭基团中的一个或全部都标记在延长段，从而避免影响。

[0035] 若所选引物中间区域没有胸腺嘧啶T，也可将引物5'端进行延长，引入T碱基，进行标记。

[0036] 引物的5'端延长段选用包含有胸腺嘧啶(T)碱基的合适长度的任意序列，并且不要求延长段本身或延长段和所连接引物形成茎环等二级结构。

[0037] 任意随机序列的选取可以避免其与检测目标序列的互补，避免对扩增反应的影响。

[0038] 因此该方法理论上可用于任何扩增体系的检测。

[0039] 3) 操作简便：本发明所提出的扩增检测方法的检测步骤与普通扩增反应步骤一样，无需额外的操作步骤，节约时间。

[0040] 4) 节约成本：本发明所提出的扩增检测方法无需额外酶制剂的参与。

[0041] 5) 特异性高：可以避免内，外引物二聚体等导致的非特异性扩增。

附图说明

[0042] 图1是本发明提出的LAMP等温扩增荧光检测原理图；

[0043] 图2是本发明提出的单重实时LAMP扩增检测400 (a)，40 (b)，4 (c)，0 copies/ μ L (d) 的副溶血性弧菌DNA。

[0044] 图3是本发明提出的实时LAMP反应检测400 copies/ μ L副溶血性弧菌DNA；

[0045] 图4是本发明提出的单重实时LAMP扩增检测600 (a)，60 (b)，6 (c)，0 copies/ μ L (d) 的沙门氏菌DNA；

[0046] 图5是本发明提出的实时LAMP反应检测4 (a)，0 copies/ μ L (b) 副溶血性弧菌DNA；

[0047] 图6是本发明提出的双重实时LAMP扩增同时检测副溶血性弧菌和沙门氏菌DNA。a) 40 copies/ μ L 副溶血性弧菌DNA; b) 60 copies/ μ L 沙门氏菌DNA; c) 0 copies/ μ L 沙门氏菌DNA; d) 0 copies/ μ L副溶血性弧菌DNA。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体的实施例和附图来对本发明做进一步地解释。下列实施例仅用于说明本发明，并不用来限定本发明的实施范围。

[0049] 具体实施以LAMP扩增为例，所述体系包括：

[0050] 1) 在正常LAMP扩增体系中，选取需要修饰荧光基团和猝灭基团的一条或多条引物进行修饰。

[0051] 修饰荧光基团和猝灭基团的引物：该引物可为内引物（FIP/BIP），也可以为环引物（LB/LF）。

[0052] 可以在内引物（FIP/BIP）/环引物（LB/LF）其中之一引物序列按照上述要求修饰上荧光基团和猝灭基团，也在内引物（FIP/BIP）/环引物（LB/LF）的两个或多个引物序列均按照上述要求修饰上荧光基团和猝灭基团。

[0053] 荧光基团和猝灭基团可修饰在引物的5'端和中间区域。若中间区域没有碱基T，可将引物5'端进行延长，掺入T碱基；

[0054] 若所选引物上的碱基序列对荧光基团的信号有影响，也可以可将引物5'端进行延长，并将荧光基团和猝灭基团中的一个或全部都标记在延长段，从而避免影响。

[0055] 引物的5'端延长段选用包含有胸腺嘧啶（T）碱基的合适长度的任意序列，并且不要求延长段本身或延长段和所连接引物形成茎环等二级结构。

[0056] 上述引物及其延伸段均采用普通dNTP即可，无需利用锁核酸等特殊基团修饰。利用锁核酸等修饰基团，虽然可以提高相应双链的熔点，但引物的设计、后续的扩增等会带来一定的影响。本发明中，只需对正常设计的LAMP引物进行荧光基团和猝灭基团的修饰即可。

[0057] 在引物上标记时，当荧光基团和猝灭基团之间的间距过大时，荧光的猝灭效应较差，会有较大的本底信号；而当荧光基团和猝灭基团之间的间距过近时，即

使形成双链也无法有较好的荧光信号增强。优选的两者之间的间距为9-35个碱基之间。

[0058] 2) 其他引物:

[0059] LAMP扩增体系需要的其他引物, 如外引物(F3/B3)、内引物(FIP/BIP)、环引物(LB/LF)等, 若没有选择进行荧光修饰, 则与普通LAMP扩增中的引物保持一致即可。

[0060] 在多重扩增中也可以根据实际需要对各引物浓度的反应浓度进行调整。

[0061] 这里充分体现出了本发明的优势, 也即除了在需要修饰的引物上进行荧光及猝灭基团的标记外, 其他和普通的LAMP扩增反应完全一样, 即不需要增加额外的酶, 也不会对已确定的LAMP反应体系产生任何影响, 不存在会抑制扩增速度等问题。

[0062] 3) 聚合酶: 具有链置换活性的聚合酶, 例如Bst DNA聚合酶、Bst 2.0 DNA聚合酶等。在本发明中, 不需要任何额外的工具酶来对荧光标记的引物或由其生成的双链进行切割。

[0063] 4) 缓冲液: 根据体系中的聚合酶类型选择合适的缓冲液。

[0064] 5) 硫酸镁: 体系中硫酸镁的含量可为2 mM, 或者大于2 mM。

[0065] 6) 脱氧核苷酸: 可以选用dNTPs, 也可以选择dNTPs/dUTPs。

[0066] 7) 扩增增强剂: 可在扩增体系中加入扩增增强剂, 如甜菜碱、海藻糖等。

[0067] 8) 靶标分子: 可以为RNA, 也可以为DNA。若靶标分子为RNA, 则可加入逆转录酶将其转化为DNA。

[0068] 当核酸扩增体系溶液中存在靶标分子时, 发生正常的LAMP扩增, 修饰荧光基团和猝灭基团的引物和目标片段结合。由于其3'端没有修饰有任何基团, 所以引物和目标序列结合后可以从3'端开始进行延伸, 形成双链DNA。这样生成的长双链, 有助于带有荧光标记引物和目标链结合, 避免脱落。相比于单链, 双链DNA序列有更大的刚性从而使得修饰的荧光基团和猝灭基团相互远离, 荧光信号增强。

[0069] 同时，这里的标记引物正常参与扩增，所以LAMP中的Bst扩增酶虽然有链置换活性，但在后续扩增中，也不会把标记引物单独置换下来。标记引物对扩增效率的影响也很小。

[0070] 若进行多重扩增检测时，可根据需要，正常调整体系中的不同靶标引物组浓度之间的浓度，且不同引物组上要修饰不同的荧光基团，以实现多重检测。

[0071] 这样，无需常用的嵌入式荧光染料，就可以实现扩增过程的实时荧光检测。通过在不同靶标的引物上修饰不同的荧光基团，就可以实现单管内的多重检测。

[0072] 本发明方案下的LAMP扩增检测过程如图1所示，具体如下：

[0073] 正常设计LAMP扩增的引物后，这里以在FIP上进行荧光标记为例进行本发明检测方法的图示说明。图中F为荧光基团，Q为相应的猝灭基团，其中荧光基团标记在FIP引物的5'端，猝灭基团标记在引物的中间。在这里只是在FIP上进行了标记，在实际中，也可以在BIP引物，或是环引物上进行标记。

[0074] 利用了标记引物后，LAMP的具体扩增过程和通用的LAMP扩增方式一样。首先，FIP中的F2片段和目标核酸中的F2c结合并延伸。然后，在外引物F3的作用下，在Bst酶的链置换活性作用下被置换下来。置换下来的单链被BIP作为模板，进行扩增。这样就形成了包含有荧光标记基团的双链。相比于卷曲的单链，双链刚性较强，因此增大了荧光基团和猝灭基团之间的距离，猝灭作用减弱，从而荧光信号增大。

[0075] 在后续的正常LAMP扩增过程中，将不断形成这样含有荧光基团的双链，从而可以通过实时检测荧光信号，就可以实现LAMP扩增过程的检测。也可以在扩增结束后，对荧光信号进行检测。

[0076] 本发明的实施例如下：

实施例1：

[0077] 本实施例提供一种实时单重LAMP扩增检测方法，在环引物LB上修饰荧光基团和猝灭基团（FQ-VP-LB），其间距为9个碱基，具体序列信息如表1所示。

[0078] 以提取的副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 DNA为检测对象，该LAMP扩增体系包含：1.6 μM FIP, 1.6 μM BIP, 0.4 μM LF, 0.4 μM FQ-LB, 0.2 μM

F3, 0.2 μM B3, 1 × isothermal amplification buffer, 0.8 M 甜菜碱, 1.4 mM dNTPs, 8U Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶, 2 mM 硫酸镁, 靶标DNA。

[0079] 将一系列浓度的核酸样本加入LAMP扩增体系中, 利用赛默飞实时荧光定量QuantStudio3 PCR仪65° C实时采集TexasRed通道的荧光。检测结果如图2所示, 该反应能检测低至4 copies/μL的目标DNA, 且最低浓度DNA样本的扩增曲线在40分钟内也可以达到荧光平台期, 说明该反应速度较快。0 copies/μL的样本无扩增曲线, 说明该反应无非特异性扩增。

[0080] 在上述反应体系中, 除了LB中标记荧光信号, 也可以进一步在LF上标记荧光信号, 这样检测体系会有更强的实时荧光信号图3中, 检测对象仍为副溶血弧菌, 靶标浓度为400 copies/μL, 除了LB上修饰了荧光和猝灭基团外, 在LF上也修饰了同样的荧光和猝灭基团。相比于图2中只在LB上修饰了荧光基团的荧光信号, 可以看到修饰2条环引物的荧光信号更强。

[0081] 表1 副溶血性弧菌LAMP扩增序列

[0082] [表1_sm_0001]

名称	序列 (5' 到3')
VP-F3	ATCGCACCACTACTCGA
VP-B3	CGGCGAAGAACGTAATGTCT
VP-FIP	CCACCAGTAGCCGTCAATGGTGAA GATGATCCAGCGACCGAT
VP-BIP	ACACCAACACGTCGCAAAACGCGT TCTCGTTCGCCAAAT
VP-LB	TTATCCGTCAGCGTTGTGAAGCA
FQ-VP-LB	5' TexasRed-TTATCCGTCAGCG/iB HQ2dT/TGTGAAGCA
VP-LF	TCGTTTTTTGCCATTCCCA

实施例2:

[0083] 本实施例提供一种实时单重LAMP扩增检测方法，将环引物LF的5’端延长（加粗碱基为延长序列），并在延长的LF上修饰荧光基团和猝灭基团（FQ- St-LF），其间距为9个碱基，具体序列信息如表2所示。

[0084] 以提取的沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* DNA为检测对象，该LAMP扩增体系包含：1.6 μM FIP, 1.6 μM FIP, 0.4 μM FQ-LF, 0.4 μM LB, 0.2 μM F3, 0.2 μM B3, 1 × isothermal amplification buffer, 0.8 M 甜菜碱，1.4 mM dNTPs, 8U Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶，2 mM 硫酸镁，靶标DNA。将一系列浓度的核酸样本加入LAMP扩增体系中，65° C实时采集荧光曲线。检测结果如下图4所示，该反应能检测低至6 copies/μL的目标DNA，且最低浓度样本的扩增曲线在35分钟内也可以达到荧光平台期，说明该反应速度较快。0 copies/μL的样本无扩增曲线，说明该反应无非特异性扩增。

[0085] 表2 沙门氏菌LAMP扩增序列

[0086] [表1_sm_0002]

名称	序列（5’ 到3’ ）
St-F3	CGGCCCGATTTTCTCTGG
St-B3	CGGCAATAGCGTCACCTT
St-FIP	GCGCGGCATCCGCATCAATATGCC CGGTAAACAGATGAGT
St-BIP	GCGAACGGCGAAGCGTACTGTCTG CACCGTCAAAGGAAC
FQ- St-LF	5-HEX- TGCAATGATAiBHQ1dTGG CCTTCAAATCGGCATCAAT
St-LF	GGCCTTCAAATCGGCATCAAT
St-LB	GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG
St-F3	CGGCCCGATTTTCTCTGG

实施例3：

[0087] 本实施例提供一种实时单重LAMP扩增检测方法，将内引物BIP 5’端延长（加粗碱基为延长序列），并在延长的BIP上修饰荧光基团和猝灭基团（FQ-VP-BIP），其间距为35个碱基，具体序列信息如表3所示。

[0088] 以提取的副溶血性弧菌*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 DNA为检测对象，该LAMP扩增体系包含：1.6 μM FIP, 1.6 μM FQ-VP-BIP, 0.4 μM LF, 0.4 μM LB, 0.2 μM F3, 0.2 μM B3, 1 × isothermal amplification buffer, 0.8 M 甜菜碱，1.4 mM dNTPs, 8U Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶，2 mM 硫酸镁，靶标DNA。

[0089] 将不同浓度的核酸样本加入LAMP扩增体系中，利用赛默飞实时荧光定量QuantStudio3PCR仪65° C实时采集TexasRed通道的荧光。检测结果如图5所示，该反应能检测低至4 copies/μL的目标DNA，且在40分钟内也可以达到荧光平台期，说明该反应速度较快。0 copies/μL的样本无扩增曲线，说明该反应无非特异性扩增。

[0090] 表3 副溶血性弧菌LAMP扩增序列

[0091] [表1_sm_0003]

名称	序列（5’到3’）
VP-F3	ATCGCACCACTACTCGA
VP-B3	CGGCGAAGAACGTAATGTCT
VP-FIP	CCACCAGTAGCCGTCAATGGTGAA GATGATCCAGCGACCGAT
FQ-VP-BIP	5’ TexasRed- TGCAATGACACCAA CACGTCGCAAAACGCGTTCTCG/iB HQ2dT/TCGCCAAAT
VP-BIP	ACACCAACACGTCGCAAAACGCGT TCTCGTTTCGCCAAAT
VP-LB	TTATCCGTCAGCGTTGTGAAGCA
VP-LF	TCGTTTTTTGCCCATTCCCA

实施例4:

[0092] 本实施例提供一种实时双重LAMP扩增检测方法，同时检测提取的副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 DNA 和沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* DNA，两扩增反应用到的序列如前述实施例中的表1和表2所示。该LAMP扩增体系包含：1 × isothermal amplification buffer, 0.8 M 甜菜碱, 1.4 mM dNTPs, 8U Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶, 2 mM 硫酸镁, 两种靶标DNA。该双重LAMP扩增体系引物总浓度为：1.6 μM FIP, 1.6 μM BIP, 0.4 μM LF, 0.4 μM LB, 0.2 μM F3, 0.2 μM B3。其中副溶血性弧菌LAMP引物组浓度占30%，沙门氏菌LAMP引物组浓度占70%。利用赛默飞实时荧光定量QuantStudio3PCR仪65° C实时采集TexasRed通道和HEX通道的荧光。检测结果如图6所示，该反应能同时检测40 copies/μL的 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 DNA 和60 copies/μL *Salmonella typhimurium* DNA，两荧光通道检测信号无相互干扰。

序列表自由内容

[0093] 本发明涉及的基因序列如下：

[0094] SEQ ID No.1；

[0095] 名称：VP-F3引物基因序列

[0096] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct

[0097] ATCGCACCAGCTACTCGA

[0098] SEQ ID No.2；

[0099] 名称：VP-B3引物基因序列

[0100] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct

[0101] CGGCGAAGAACGTAATGTCT

[0102] SEQ ID No.3；

[0103] 名称：VP-FIP引物基因序列

[0104] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct

[0105] CCACCAGTAGCCGTCAATGGTGAAGATGATCCAGCGACCGAT

[0106] SEQ ID No.4；

- [0107] 名称：VP-BIP引物基因序列
- [0108] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0109] ACACCAACACGTCGCAAAACGCGTTCTCGTTCGCCAAAT
- [0110] SEQ ID No.5;
- [0111] 名称：VP-LB引物基因序列
- [0112] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0113] TTATCCGTCAGCGTTGTGAAGCA
- [0114] SEQ ID No.6;
- [0115] 名称：FQ-VP-LB引物基因序列
- [0116] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0117] TTATCCGTCAGCGTTGTGAAGCA (5' 端修饰TexasRed; 中间加粗T碱基修饰BHQ2)
- [0118] SEQ ID No.7;
- [0119] 名称：VP-LF引物基因序列
- [0120] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0121] TCGTTTTTTTGCCCATTCCCA
- [0122] SEQ ID No.8;
- [0123] 名称：St-F3引物基因序列
- [0124] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0125] CGGCCCGATTTTCTCTGG
- [0126] SEQ ID No.9;
- [0127] 名称：St-B3引物基因序列
- [0128] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0129] CGGCAATAGCGTCACCTT
- [0130] SEQ ID No.10;
- [0131] 名称：St-FIP引物基因序列
- [0132] 生物体来源：人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0133] GCGCGGCATCCGCATCAATATGCCCGGTAAACAGATGAGT

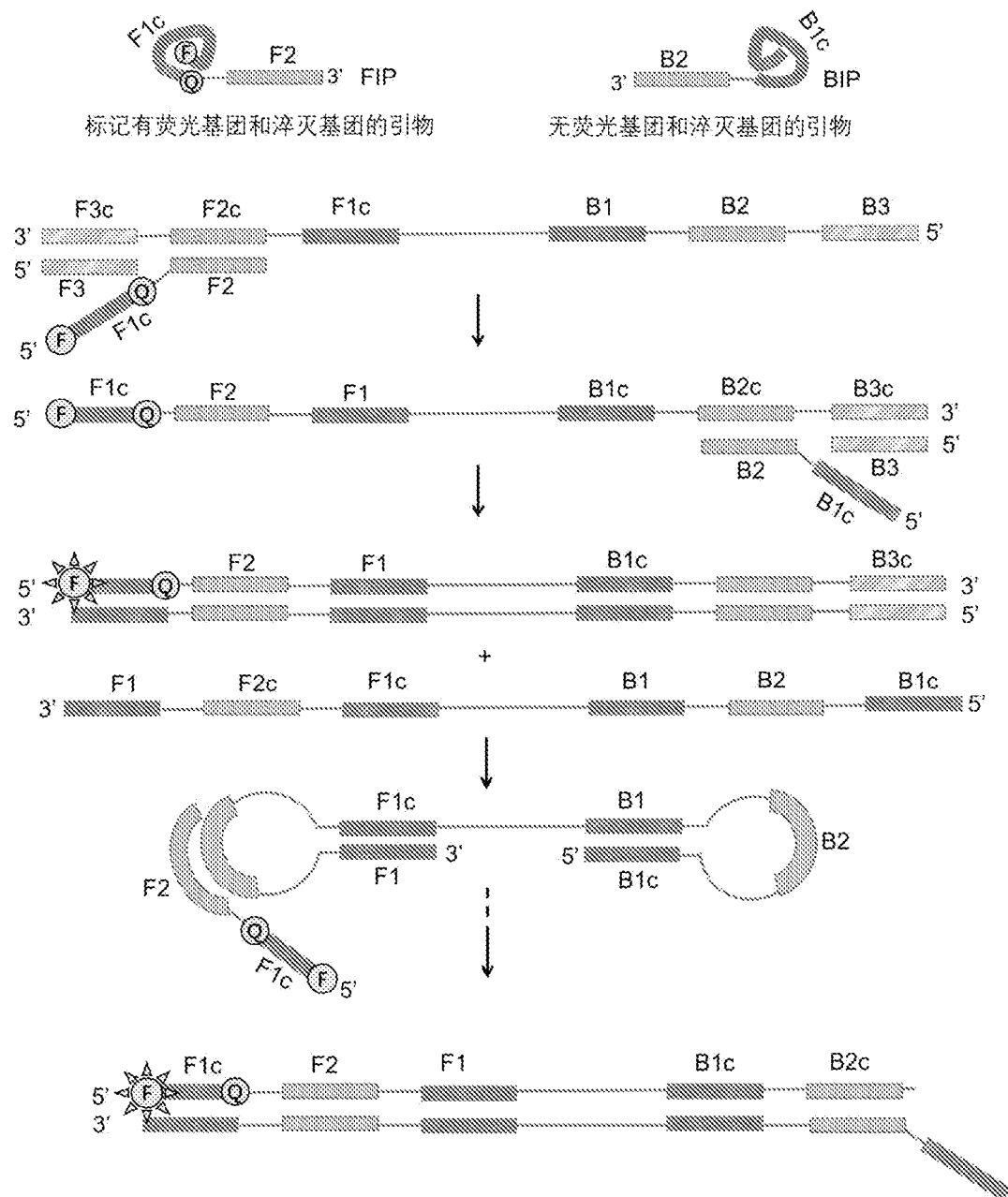
- [0134] SEQ ID No.11;
- [0135] 名称: St-BIP引物基因序列
- [0136] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0137] GCGAACGGCGAAGCGTACTGTCTGCACCGTCAAAGGAAC
- [0138] SEQ ID No.12;
- [0139] 名称: FQ- St-LF引物基因序列
- [0140] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0141] TGCAATGATATGGCCTTCAAATCGGCATCAAT (5' 端修饰HEX; 中间加粗T碱基修饰BHQ1)
- [0142] SEQ ID No.13;
- [0143] 名称: St-LF引物基因序列
- [0144] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0145] GGCCTTCAAATCGGCATCAAT
- [0146] SEQ ID No.14;
- [0147] 名称: St-LB引物基因序列
- [0148] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0149] GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG
- [0150] SEQ ID No.15;
- [0151] 名称: St-F3引物基因序列
- [0152] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0153] CGGCCCCGATTTTCTCTGG
- [0154] SEQ ID No.16;
- [0155] 名称: FQ-VP-BIP引物基因序列
- [0156] 生物体来源: 人工序列(Artificial Sequence)/ synthetic construct
- [0157] TGCAATGACACCAACACGTCGCAAAACGCGTTCT
CGTTCGCCAAAT (5' 修饰TexasRed, 中间加粗碱基T修饰BHQ2) 。

权利要求书

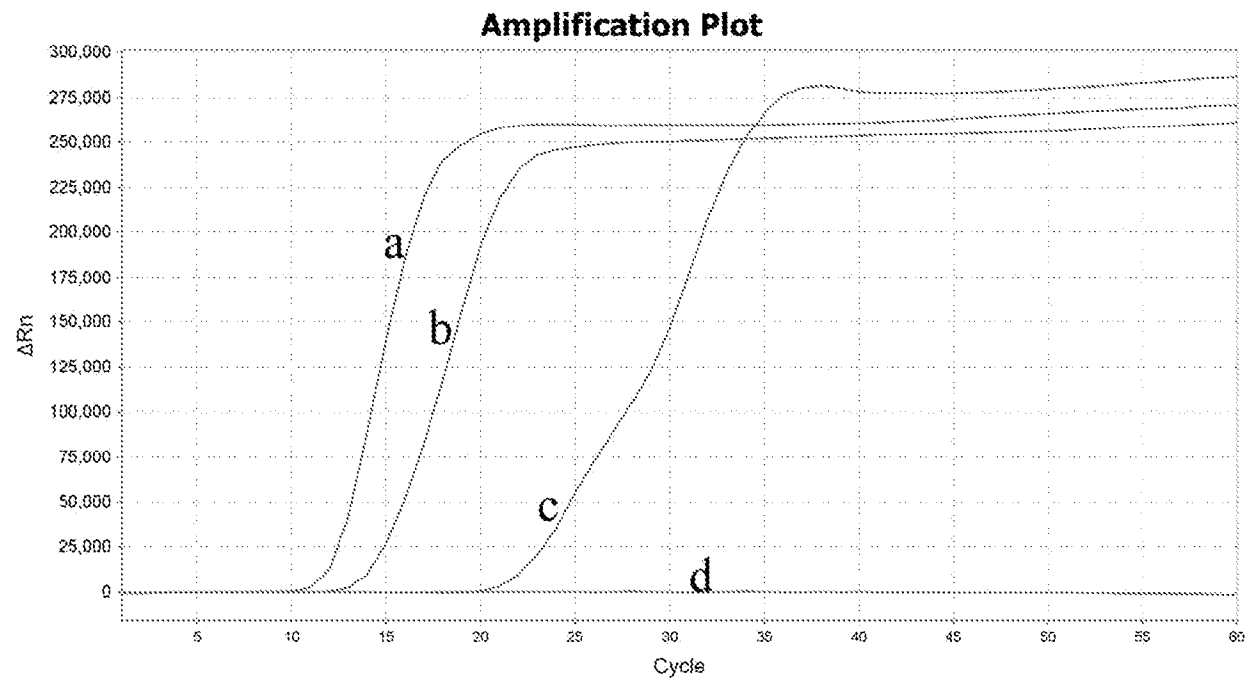
- [权利要求 1] 一种实时荧光环介导等温核酸扩增检测方法，其特征如下：
首先在环介导等温扩增体系基础上，以内引物、环引物中的一条或多条引物作为标记引物，在标记引物上进行荧光基团和猝灭基团的标记/修饰，且荧光基团和猝灭基团标记/修饰在所述标记引物除3'端的任何位置；
然后利用所述标记引物进行核酸扩增，在核酸扩增过程中，对荧光基团所发出的荧光进行实时检测，根据所得到的荧光情况对核酸扩增情况进行判断。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的核酸扩增方法，其特征在于：
所述环介导等温扩增体系中不含有任何能对含有荧光标记的引物本身及其生成的双链进行切割、断裂等的功能酶。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的核酸扩增方法，其特征在于：
所述标记引物具有5'端延长段，所述荧光基团和猝灭基团分别或全部标记在所述5'端延长段。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的核酸扩增方法，其特征在于：
所述5'端延长段选用包含有胸腺嘧啶（T）碱基的任意序列，并且不要求延长段本身或延长段和所连接引物形成茎环等二级结构。
- [权利要求 5] 根据权利要求1-4任一所述的核酸扩增方法，其特征在于：
所选标记引物上，所述荧光基团和所述猝灭基团之间的间距在9-35个碱基之间。
- [权利要求 6] 根据权利要求1-4任一所述的核酸扩增方法，其特征在于：
在进行核酸扩增时，当存在目标核酸片段时，标记引物和其互补片段结合，并在具有链置换功能的核酸扩增酶作用下，沿目标核酸片段延伸形成双链。
- [权利要求 7] 根据权利要求1-4任一所述的核酸扩增方法，其特征在于：

在进行核酸扩增时，当存在多个目标核酸片段时，对不同目标核酸片段的扩增引物标记/修饰上不同发射波长的荧光基团及对应的猝灭基团，实现实时多重核酸检测。

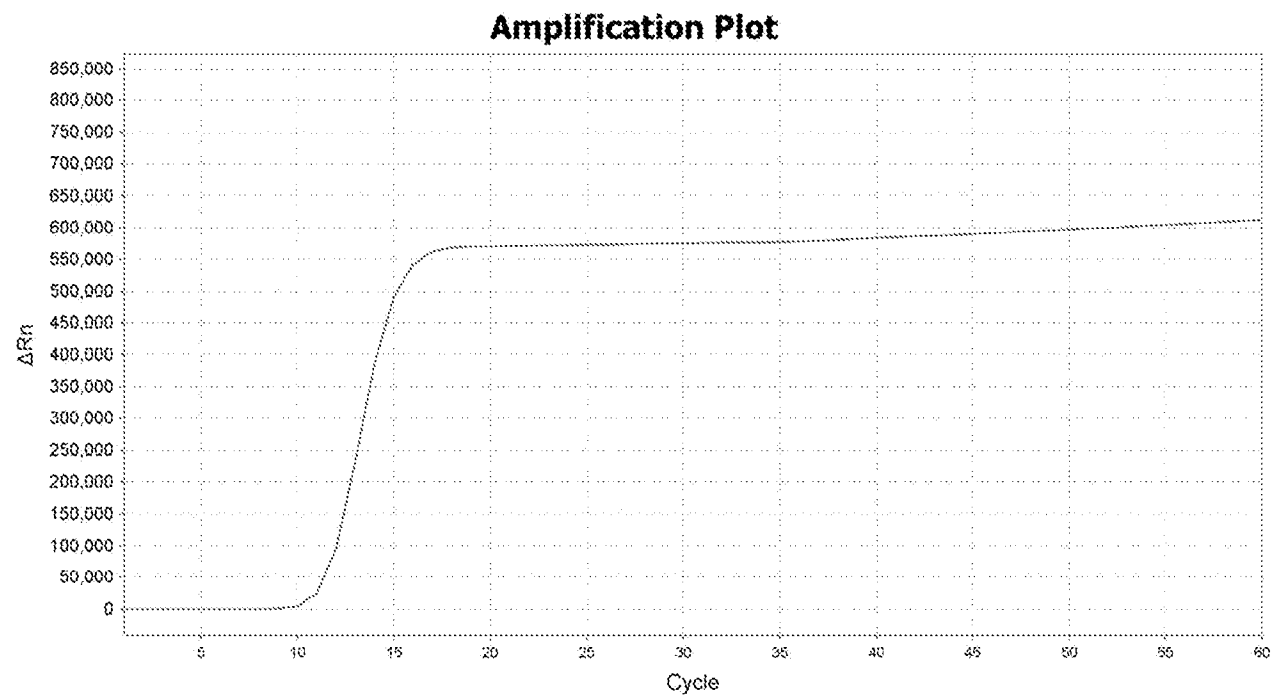
[图1]



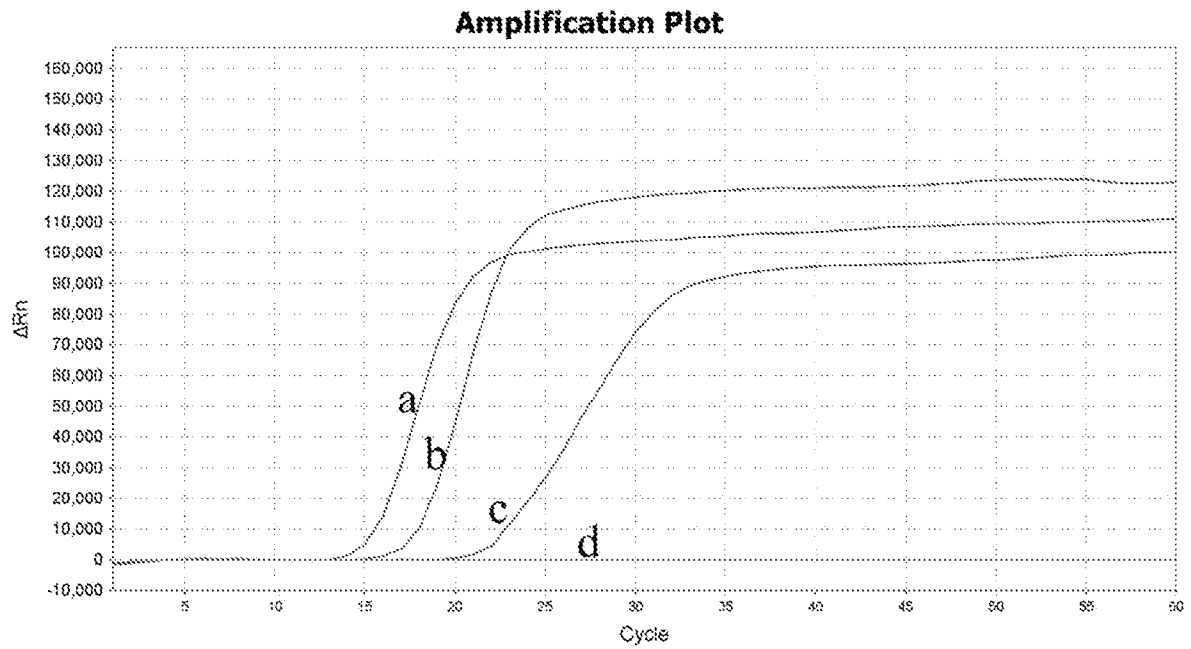
[图2]



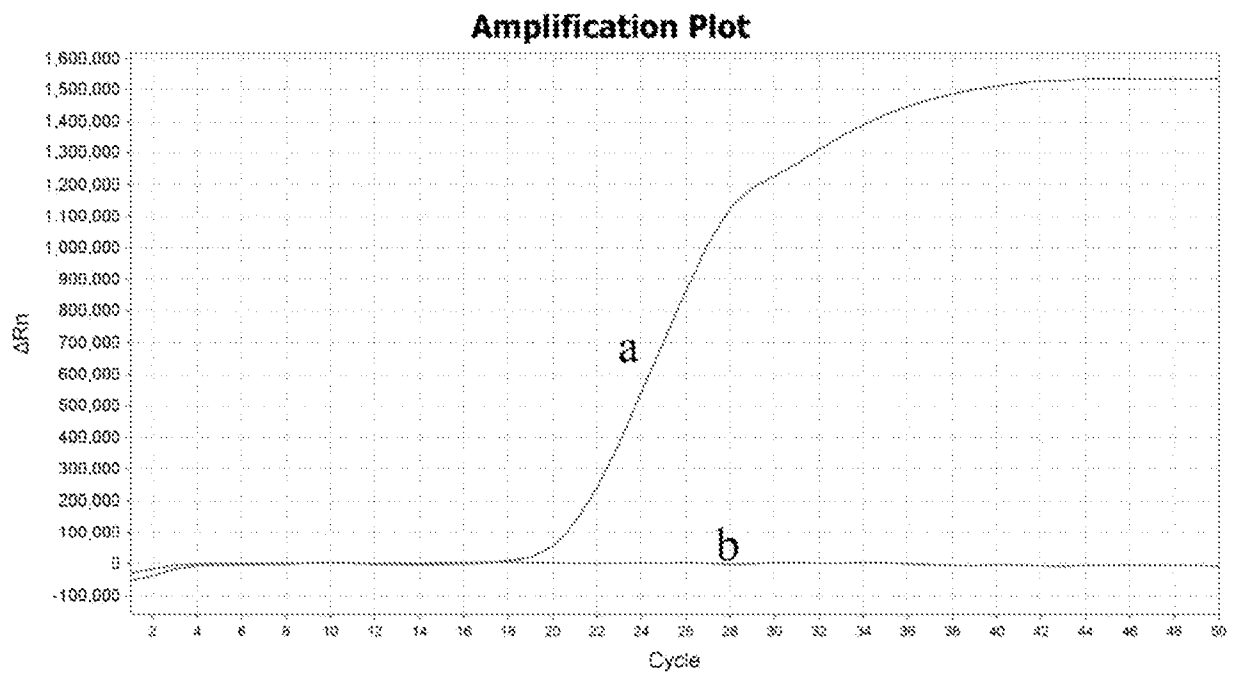
[图3]



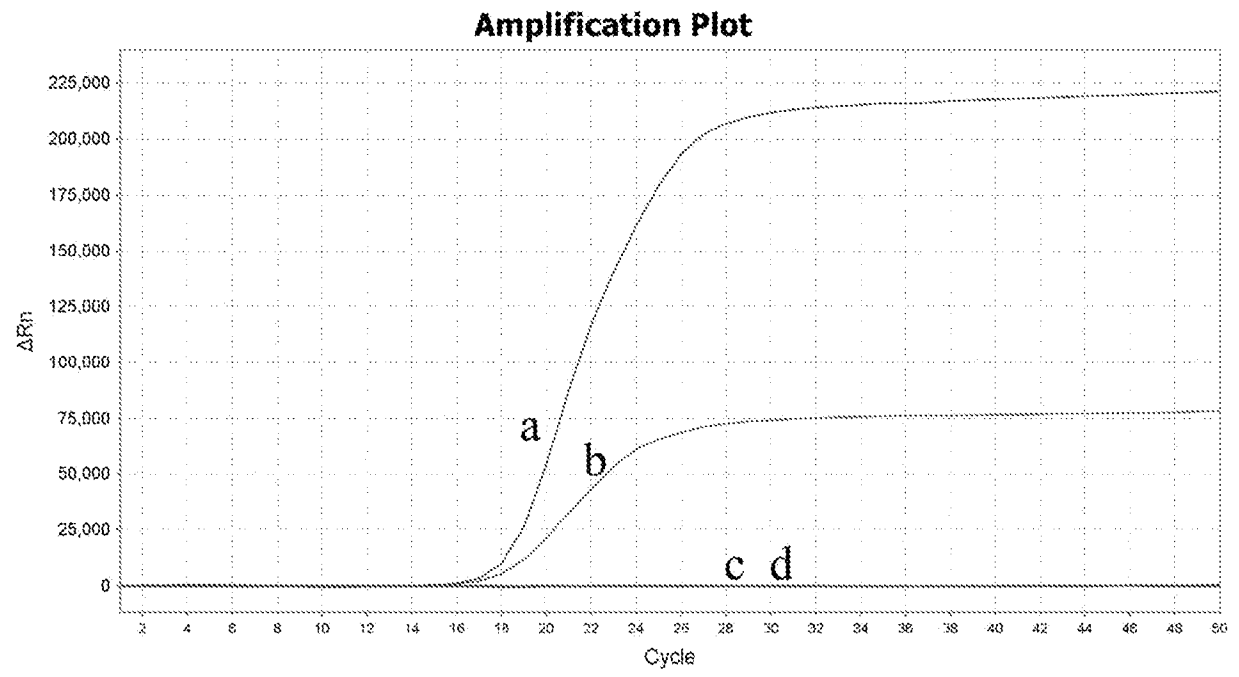
[图4]



[图5]



[图6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/128187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/689(2018.01)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)

IPC: C12Q

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, WPABSC, CNTXT, ENTXTC, DWPL, WPABS, VEN, ENTXT, CJFD, CNKI, 万方, PubMed, Genbank, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, REGISTRY: 实时, 扩增, 环介导等温扩增, 荧光基团, 荧光团, 荧光, 淬灭基团, 淬灭, 引物, 标记, real-time, amplif+, PCR, LAMP, fluorescen+, fluorophore, quench+, primer, mark, marker, label+, SEQ ID NO: 1-16的序列检索, sequence search of SEQ ID NOs: 1-16

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116875664 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 13 October 2023 (2023-10-13) see claims 1-7	1-7
X	CN 116179655 A (BEIJING XUNSHI TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 30 May 2023 (2023-05-30) see abstract, claims 1-11, description, paragraphs [0017], [0035]-[0036], [0046], [0062], [0064]-[0087], and [0093]-[0095], and figure 1	1-7
A	CN 104962607 A (NATIONAL INSTITUTE FOR COMMUNICABLE DISEASE CONTROL AND PREVENTION CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) 07 October 2015 (2015-10-07) see claims 1-15	1-7
A	US 2020248241 A1 (LGC GENOMICS LTD.) 06 August 2020 (2020-08-06) see claims 1-17	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “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

11 March 2024

Date of mailing of the international search report

21 March 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/128187

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN, J. et al. "Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping" <i>NATURE PROTOCOLS</i> , Vol. 2, No. 1, 22 February 2007 (2007-02-22), 50-58 see abstract	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/128187

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/128187

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116875664	A	13 October 2023	None			
CN	116179655	A	30 May 2023	None			
CN	104962607	A	07 October 2015	None			
US	2020248241	A1	06 August 2020	WO	2019034898	A1	21 February 2019
				PL	3668999	T3	22 January 2024
				DK	3668999	T3	18 September 2023
				CA	3072538	A1	21 February 2019
				BR	112020003339	A2	25 August 2020
				GB	201713251	D0	04 October 2017
				PT	3668999	T	23 October 2023
				LT	3668999	T	10 October 2023
				EP	3668999	A1	24 June 2020
				EP	3668999	B1	26 July 2023

A. 主题的分类

C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/689(2018.01)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)

IPC: C12Q

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, WPABSC, CNTXT, ENTXTC, DWPI, WPABS, VEN, ENTXT, CJFD, CNKI, 万方, PubMed, Genbank, 中国专利生物序列检索系统, REGISTRY: 实时, 扩增, 环介导等温扩增, 荧光基团, 荧光团, 荧光, 淬灭基团, 淬灭, 引物, 标记, real-time, amplif+, PCR, LAMP, fluorescen+, fluorophore, quench+, primer, mark, marker, label+, SEQ ID NO: 1-16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
PX	CN 116875664 A (浙江大学) 2023年10月13日 (2023 - 10 - 13) 参见权利要求1-7	1-7
X	CN 116179655 A (北京迅识科技有限公司等) 2023年5月30日 (2023 - 05 - 30) 参见摘要, 权利要求1-11, 说明书第[0017]、[0035]-[0036]、[0046]、[0062]、 [0064]-[0087]、[0093]-[0095]段, 说明书附图1	1-7
A	CN 104962607 A (中国疾病预防控制中心传染病预防控制所) 2015年10月7日 (2015 - 10 - 07) 参见权利要求1-15	1-7
A	US 2020248241 A1 (LGC GENOMICS LTD) 2020年8月6日 (2020 - 08 - 06) 参见权利要求1-17	1-7
A	Jin Li等. "Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping" NATURE PROTOCOLS, 第2卷, 第1期, 2007年2月22日 (2007 - 02 - 22), 50-58 参见摘要	1-7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 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

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"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

2024年3月11日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月21日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

幸颖

电话号码 (+86) 010-62411044

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I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表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

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/CN2023/128187

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)
CN	116875664	A	2023年10月13日	无			
CN	116179655	A	2023年5月30日	无			
CN	104962607	A	2015年10月7日	无			
US	2020248241	A1	2020年8月6日	WO	2019034898	A1	2019年2月21日
				PL	3668999	T3	2024年1月22日
				DK	3668999	T3	2023年9月18日
				CA	3072538	A1	2019年2月21日
				BR	112020003339	A2	2020年8月25日
				GB	201713251	D0	2017年10月4日
				PT	3668999	T	2023年10月23日
				LT	3668999	T	2023年10月10日
				EP	3668999	A1	2020年6月24日
				EP	3668999	B1	2023年7月26日