



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104662159 B

(45) 授权公告日 2021.10.26

(21) 申请号 201380029231.9

(22) 申请日 2013.06.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104662159 A

(43) 申请公布日 2015.05.27

(30) 优先权数据
61/657,227 2012.06.08 US
61/782,199 2013.03.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/044796 2013.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/185081 EN 2013.12.12

(73) 专利权人 爱奥尼安技术公司
地址 美国加利福尼亚州圣地亚哥市

(72) 发明人 张宏华 佳露·蒲伟德
瑞查德·若斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 任晓华 周齐宏

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6844 (2018.01)

(56) 对比文件
US 20090081670 A1, 2009.03.26
审查员 肖西祥

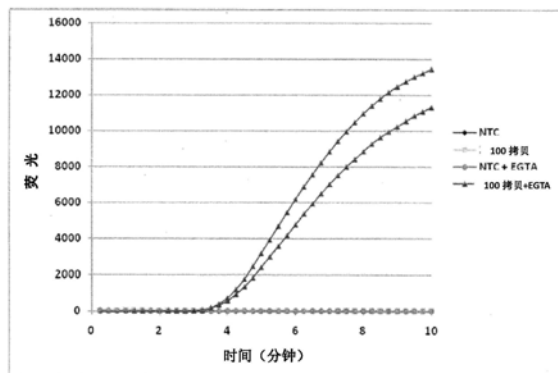
权利要求书4页 说明书22页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

核苷酸扩增反应

(57) 摘要

方法包括使一种多核苷酸与一种扩增试剂混合物混合形成一种反应混合物,其中反应混合物包括在溶解状态下的能可逆结合的二价离子,和调节反应混合物的pH来释放可逆结合的二价离子,从而启动多核苷酸的扩增。



1. 方法,其包括:

(a) 使一种多核苷酸与一种扩增试剂混合物在第一温度下混合形成一种反应混合物,其中,

(i) 该反应混合物包括pH敏感螯合剂,二价离子,切口内切核酸酶,和一种DNA或RNA的聚合酶,和

(ii) 在所述第一温度下,该二价离子在溶解状态下,能可逆结合所述的pH敏感螯合剂,从而,在该第一温度下,使得所述多核苷酸的扩增被抑制;和

(b) 通过将反应混合物的温度从第一温度改变至第二温度来调节反应混合物的pH来释放可逆结合的二价离子,从而起始多核苷酸的扩增;

其中所述第一温度为10°C至30°C之间且所述第二温度为40°C至70°C之间;

其中pH敏感螯合剂浓度与二价离子浓度的比值为0.5至2;

其中第一温度下游离二价离子的浓度为0至10mM之间;和

其中第二温度下游离二价离子的浓度为5至50mM之间;

其中所述pH敏感螯合剂是浓度为14 mM或15 mM的EGTA,所述二价离子是浓度为15 mM的硫酸镁,且其中扩增试剂混合物包括一种温度敏感缓冲液,所述温度敏感缓冲液包含三(羟甲基)氨基甲烷。

2. 权利要求1的方法,其中反应混合物的pH根据温度敏感缓冲液的pH被调节。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中反应混合物的pH通过改变反应混合物的温度来调节,反应混合物的温度从第一温度变为第二温度。

4. 权利要求3的方法,其中第二温度时温度敏感缓冲液的pKa值低于第一温度时温度敏感缓冲液的pKa值的至少0.4。

5. 权利要求1-2中任一项的方法,其中温度敏感缓冲液的 ΔpK_a 值在 $-0.04^{\circ}\text{C}_{-1}$ 和 $-0.015^{\circ}\text{C}_{-1}$ 之间。

6. 权利要求1-2中任一项的方法,其中第一温度为0°C至10°C之间,为10°C至20°C之间,或为20°C至30°C之间。

7. 权利要求1-2中任一项的方法,其中第二温度为30°C至40°C之间,为40°C至50°C之间,为50°C至60°C之间,为60°C至70°C之间,为70°C至80°C之间,为80°C至90°C之间,或为90°C至100°C之间。

8. 权利要求1-2中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种切口内切核酸酶。

9. 权利要求1-2中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种DNA或RNA聚合酶。

10. 权利要求1-2中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种反转录酶。

11. 权利要求1-2中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种或多种冻干形式的组分。

12. 权利要求11的方法,其中扩增试剂混合物包括冻干形式的镁盐。

13. 权利要求11的方法,其中扩增试剂混合物包括一种冻干形式的pH敏感螯合剂。

14. 权利要求12的方法,其中冻干的镁盐被重溶在缓冲液中形成溶解状态的镁离子。

15. 权利要求13的方法,其中冻干形式的pH敏感螯合剂被重溶在缓冲液中。

16. 权利要求14或15的方法,其中溶解状态的镁离子与pH敏感螯合剂可逆结合。

17. 权利要求14或15的方法,其中该缓冲液是温度敏感缓冲液。

18. 权利要求14-15中任一项的方法,其中缓冲液的pH对于pH敏感螯合剂可逆结合溶液中的游离镁离子是可操控的。

19. 权利要求1-2中任一项的方法,其中多核苷酸的扩增在等温条件下进行。

20. 权利要求1-2中任一项的方法,其中多核苷酸在与扩增试剂混合物混合前不被变性。

21. 权利要求1-2中任一项的方法,其中在温度处于0℃至10℃之间,10℃至20℃之间,或20℃至30℃之间,进行混合步骤。

22. 权利要求1-2中任一项的方法,其中多核苷酸的扩增直到反应混合物的温度处于30℃至40℃之间,40℃至50℃之间,50℃至60℃之间,60℃至70℃ 之间,70℃至80℃之间,80℃至90℃之间,或90℃至100℃之间时才发生扩增。

23. 权利要求1-2中任一项的方法,其中,在反应混合物处于第一温度和第二温度之间没有重复循环下,多核苷酸的扩增可以发生。

24. 权利要求1-2中任一项的方法,其中一种或多种扩增试剂混合物的组分被提供在适宜流体装置,盒式或横向流装置使用的容器中。

25. 权利要求1-2中任一项的方法,其中,在没有额外的试剂添加到混合步骤(a)中形成的反应混合物中时,多核苷酸的扩增可以发生。

26. 权利要求1-2中任一项的方法,进一步包括步骤(c):检测扩增的多核苷酸。

27. 权利要求26的方法,其中,在没有额外的试剂添加到在混合步骤(a)中形成的反应混合物中时,扩增多核苷酸的检测可以发生。

28. 权利要求1-2中任一项的方法,其中至少50%,至少60%,至少70%,至少 80%,至少90%,至少95%,或反应混合物中的所有二价离子是可溶形式的。

29. 权利要求28的方法,其中二价离子可以与一种pH敏感螯合剂可逆结合。

30. 权利要求28的方法,其中二价离子包括游离的二价离子。

31. 权利要求28的方法,其中二价离子同时包括被结合的和游离的二价离子。

32. 权利要求1-2中任一项的方法,其中可溶状态的二价离子不是从沉淀的溶解中形成。

33. 权利要求1-2中任一项的方法,其中,在多核苷酸扩增之前,少于20%,少于15%,少于10%,少于5%,少于1%,或没有二价离子形成沉淀物。

34. 权利要求26的方法,其中,在扩增的多核苷酸检测之前,少于20%,少于15%,少于10%,少于5%,少于1%,或没有二价离子形成沉淀物。

35. 权利要求1-2中任一项的方法,其中,反应混合物不包括以沉淀形式结合的二价离子。

36. 方法,其包括:

(a) 将多核苷酸与扩增试剂混合物混合来形成一种反应混合物,其中扩增试剂混合物包括可溶状态的可逆结合的镁离子、温度敏感缓冲液和pH敏感螯合剂;和

(b) 调节反应混合物的温度,从(i)第一温度,在该温度下,温度敏感缓冲液的pH对于pH敏感螯合剂可逆结合可溶状态的游离镁离子是可操控的,使得多核苷酸的扩增被抑制,到(ii)第二温度,在该温度下,温度敏感缓冲液的pH对于从pH敏感螯合剂释放结合的镁离子是可操控的,使得多核苷酸的扩增可以进行,从而起始多核苷酸的扩增;其中,

在所述方法中混合物不经历在所述第一温度和第二温度之间的重复循环,其中,在所述第一温度下,存在于混合物中的双链多核苷酸被退火,和在所述第二温度下,存在于混合物中的双链多核苷酸被变性;

其中所述第一温度为10°C至30°C之间且所述第二温度为40°C至70°C之间;

其中pH敏感螯合剂浓度与镁离子浓度的比值为0.5至2;

其中第一温度下游离的镁离子的浓度为0至10mM之间;和

其中第二温度下游离的镁离子的浓度为5至50mM之间;

其中所述pH敏感螯合剂是浓度为14 mM或15 mM的EGTA,所述镁离子是浓度为15 mM的硫酸镁,且其中所述温度敏感缓冲液包含三(羟甲基)氨基甲烷。

37. 权利要求36的方法,其中在第二温度时温度敏感缓冲液的pKa 值少于第一温度时温度敏感缓冲液的pKa值的至少0.4。

38. 权利要求36-37中任一项的方法,其中温度敏感缓冲液的 ΔpKa 值在 $-0.04^{\circ}C_{-1}$ 和 $-0.015^{\circ}C_{-1}$ 之间。

39. 权利要求36-37中任一项的方法,其中第一温度在0°C至10°C之间,10°C 至20°C之间,或20°C至30°C之间。

40. 权利要求36-37中任一项的方法,其中第二温度在30°C至40°C之间,40°C 至50°C之间,50°C至60°C之间,60°C至70°C之间,70°C至80°C之间,80°C 至90°C之间,或90°C至100°C之间。

41. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种切口内切核酸酶。

42. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种DNA或RNA聚合酶。

43. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种逆转录酶。

44. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种或多种冻干形式的组分。

45. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括冻干形式的镁盐。

46. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物包括一种冻干形式的pH敏感螯合剂。

47. 权利要求45的方法,其中冻干的镁盐被重新溶解在缓冲液中形成溶解状态的镁离子。

48. 权利要求46的方法,其中冻干的pH敏感螯合剂被重新溶解在缓冲液中。

49. 权利要求47的方法,其中溶解状态的镁离子被可逆结合在pH敏感螯合剂上。

50. 权利要求47或48的方法,其中缓冲液是一种温度敏感缓冲液。

51. 权利要求47-49中任一项的方法,其中缓冲液的pH对于pH敏感螯合剂可逆结合溶液中的游离镁离子是可操控的。

52. 权利要求36-37中任一项的方法,其中多核苷酸的扩增在等温条件下进行。

53. 权利要求36-37中任一项的方法,其中多核苷酸在与扩增试剂混合物混合之前不被变性。

54. 权利要求36-37中任一项的方法,其中混合步骤发生在温度处于0°C至10°C之间,10°C至20°C之间,或20°C至30°C之间。

55. 权利要求36-37中任一项的方法,其中,多核苷酸的扩增直到反应混合物的温度为

30℃至40℃之间,40℃至50℃之间,50℃至60℃之间,60℃至70℃之间,70℃至80℃之间,80℃至90℃之间,或90℃至100℃之间才发生扩增。

56. 权利要求36-37中任一项的方法,其中在反应混合物的温度没有在第一温度和第二温度之间重复循环时,多核苷酸的扩增可以进行。

57. 权利要求36-37中任一项的方法,其中扩增试剂混合物的一种或多种组分被提供在适宜流体装置、盒式或横向流动装置中使用的容器中。

58. 权利要求36-37中任一项的方法,其中,在没有额外的试剂添加到在混合步骤(a)中形成的反应混合物中时,多核苷酸的扩增可以发生。

59. 权利要求36-37中任一项的方法,进一步包括步骤(c):检测扩增的多核苷酸。

60. 权利要求59的方法,其中在没有额外的试剂加入混合步骤(a)中形成的反应混合物时,扩增的多核苷酸的检测可以进行。

61. 权利要求36-37中任一项的方法,其中至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或反应混合物中的所有二价离子是可溶形式的。

62. 权利要求61的方法,其中镁离子被可逆结合到一种pH敏感螯合剂上。

63. 权利要求61的方法,其中镁离子包括游离的镁离子。

64. 权利要求61的方法,其中镁离子同时包括游离的和被结合的镁离子。

65. 权利要求36-37中任一项的方法,其中可溶形式的镁离子不是从沉淀的溶解中形成。

66. 权利要求36-37中任一项的方法,其中,在多核苷酸扩增前,少于20%,少于15%,少于10%,少于5%,少于1%,或没有镁离子形成沉淀。

67. 权利要求59的方法,其中在检测扩增的多核苷酸前,少于20%,少于15%,少于10%,少于5%,少于1%,或没有镁离子形成沉淀。

68. 权利要求36-37中任一项的方法,其中反应混合物不包括以沉淀形式结合的镁离子。

核苷酸扩增反应

技术领域

[0001] 本发明涉及核苷酸扩增反应。

[0002] 背景知识

[0003] 很多酶,几乎囊括了所有与核苷酸和大多数蛋白酶互作的酶,都需要二价离子的辅助。例如包含在核苷酸扩增反应中的酶通常需要二价镁离子(Mg⁺⁺)作为辅助剂。

[0004] 核苷酸扩增能够产生非特异性的扩增产物。在很多情况下,这是由于在扩增程序发生之前,非特异的寡核苷酸就可以启动和随后的引物延伸,这是因为所用的酶在室温时通常是有活性的。例如,由于引物二聚体和随后的延伸导致的扩增产物可以经常被观察到。用于克服这个问题的常用方法包括所谓的“热启动”反应,其中被包括在扩增反应中(如酶或二价镁离子辅助因子)的至少一种成分要么与反应混合物分开,要么保持失活状态,直到反应混合物的温度达到适宜的温度。

发明内容

[0005] 本发明是基于,至少部分基于,控制酶促反应改进的方法。

[0006] 本发明也基于,至少部分基于,核苷酸扩增方法和组成成分的改进,该核苷酸扩增具有利用简单试剂进行热启动的优势。

[0007] 一方面,本发明提供了一种方法包括:(a)使多(聚)核苷酸和扩增试剂混合形成反应混合物,其中,反应混合物包括当处于溶液中的可逆结合的二价离子,和(b)调节反应混合物中的pH值来释放该可逆结合的二价离子,从而启动多核苷酸的扩增。

[0008] 在一些实施例中,二价离子从下列组合中选择:镁、钙、铜、锌、锰、铁、镉和铅。

[0009] 在一些实施例中,二价离子是镁。

[0010] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种pH敏感螯合剂。这种pH敏感螯合剂可以从下列组合中选择:乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA),EGTA的衍生物,和EDTA的衍生物。优选的溶液中的二价离子能与pH敏感螯合剂可逆结合。优选的pH敏感螯合剂是乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。

[0011] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种温度敏感缓冲液。在一些实施例中,温度敏感缓冲液可以包括三(羟甲基)氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane)。

[0012] 在本发明的任意实施例中,反应混合物的pH可以通过温度敏感缓冲液的pH而被调节。

[0013] 在本发明的任意实施例中,通过改变反应混合物的温度从第一温度到第二温度,反应混合物的pH可以被调节。

[0014] 在本发明的任意实施例中,在第二温度时温度敏感缓冲液的pKa的值至少低于在第一温度时温度敏感缓冲液的pKa值的0.4。

[0015] 在本发明的任意实施例中,温度敏感缓冲液的 ΔpK_a 值在 $-0.04^{\circ}\text{C}^{-1}$ 和 $-0.015^{\circ}\text{C}^{-1}$ 之间。

[0016] 在本发明的任意实施例中,第一温度在约0°C和10°C之间,约10°C和20°C之间,或约20°C和30°C之间。优选的第一温度在约20°C和30°C之间。

[0017] 在本发明的任意实施例中,第二温度在约30°C和40°C之间,约40°C和50°C之间,约50°C和60°C之间,约60°C和70°C之间,约70°C和80°C之间,约80°C和90°C之间,或约90°C和100°C之间。优选的第二温度在约50°C和60°C之间。

[0018] 在本发明的一些特异实施例中,第一温度在约20°C和30°C之间,第二温度在约50°C和60°C之间。

[0019] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合液包括一种切口内切酶,一种DNA或RNA聚合酶,一种重组酶和/或一种逆转录酶。在一些特异实施例中,扩增试剂混合液包括一种切口内切酶和一种DNA或RNA聚合酶。在另一个实施例中,扩增试剂混合液包括一种重组酶和一种DNA或RNA聚合酶。这些实施例可选择性的包括一种逆转录酶。

[0020] 在本发明的任意实施例中,螯合物试剂浓度与二价离子浓度的比值为约0.5至约2。

[0021] 在本发明的任意实施例中,在第一温度时游离的二价离子浓度为约0至约10mM之间。

[0022] 在本发明的任意实施例中,在第二温度时游离的二价离子浓度为约5mM至约50mM之间。

[0023] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合物包括一种或多种冻干形式的组分。在特异实施例中,扩增试剂混合物可以包括冻干形式的镁盐。冻干的镁盐可以在缓冲液中复原来形成溶液中的镁离子。在另一些实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种冻干的pH敏感螯合剂。pH敏感螯合剂可以在缓冲液中被复原。根据这些实施例,缓冲液可以是一种温度敏感缓冲液。在一些实施例中,溶液中的镁离子被pH敏感螯合剂可逆结合。根据任意上述的实施例,缓冲液的pH值为了让pH敏感螯合剂与溶液中的游离镁离子可逆结合而为可以控制的。优选的,扩增试剂混合物包括溶液中与pH敏感螯合剂可逆结合的镁离子,其中溶液中的镁离子来自冻干镁盐在温度敏感缓冲液的重新复原。

[0024] 在本发明的任意实施例中,多核苷酸的扩增可以在基本等温的条件下进行。

[0025] 在本发明的任意实施例中,多核苷酸在与扩增试剂混合物混合之前不被变性。

[0026] 在本发明的任意实施例中,混合的步骤可以当温度处于约0°C至10°C之间,约10°C至20°C之间,约20°C至30°C之间进行。优选的混合的步骤在温度处于约20°C至30°C之间进行。

[0027] 在本发明的任意实施例中,多核苷酸的扩增直到反应混合物的温度处于约30°C至40°C之间,约40°C至50°C之间,约50°C至60°C之间,约60°C至70°C之间,约70°C至80°C之间,约80°C至90°C之间,或约90°C至100°C之间才能发生。优选的多核苷酸的扩增直到反应混合物的温度处于约50°C至60°C之间才能发生。

[0028] 在本发明的任意实施例中,多核苷酸的扩增可以在没有重复循环处于第一温度和第二温度之间的反应混合物温度时发生。

[0029] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合物的一种或多种成分可以被提供在适宜流体装置、盒式或横向流动装置中使用的容器中。

[0030] 在本发明的任意实施例中,在没有额外的试剂加入到混合步骤(a)中形成的反应

混合物,多核苷酸的扩增可以发生。

[0031] 在本发明的任意实施例中,该方法可以进一步包括步骤(c):检测扩增的多核苷酸。在本方法的进一步的实施例中包括步骤(c),在没有额外试剂加入在混合步骤(a)中形成的反应混合物中,扩增的多核苷酸的检测可以进行。

[0032] 在本发明的任意实施例中,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或基本上所有反应混合物中的二价离子都是可溶形式的。在进一步的实施例中,二价离子被pH敏感螯合剂可逆结合。在进一步的实施例中,二价离子包括游离的二价离子。在另一个实施例中,二价离子包括结合的和游离的二价离子。

[0033] 在本发明的任意实施例中,在溶解状态的二价离子不能由沉淀物的解离形成。

[0034] 在本发明的任意实施例中,在多核苷酸扩增之前,低于20%,低于15%,低于10%,低于5%,低于1%,或基本上没有二价离子形成沉淀物。

[0035] 在进一步的实施例中,方法包括步骤(c),在检测扩增的多核苷酸之前,低于20%,低于15%,低于10%,低于5%,低于1%,或基本上没有二价离子形成沉淀物。

[0036] 在本发明的任意实施例中,反应混合物不包括以沉淀形式被结合的二价离子。

[0037] 在本发明的任意实施例中,多核苷酸不预热,例如在混合或结合步骤(a)之前,温度就高于30°C,高于40°C,高于50°C,或高于60°C。

[0038] 在本发明的任意实施例中,扩增试剂混合物不预热,例如在混合或结合步骤(a)之前,温度就高于30°C,高于40°C,高于50°C,或高于60°C。

[0039] 在本发明的任意实施例中,步骤(a)中与多核苷酸混合的扩增试剂混合物的温度处于约0°C和10°C之间,约10°C和20°C之间,约20°C和30°C之间。优选的,步骤(a)中与多核苷酸混合的扩增试剂混合物的温度约为20°C和30°C之间。

[0040] 另一方面,本发明提供的方法包括:(a)使一种多核苷酸和一种扩增试剂混合物混合或结合(combining)来形成反应混合物,其中扩增试剂混合物包括溶液状态下的可逆结合的镁离子,温度敏感缓冲液和pH敏感螯合剂;和(b),从(i)第一温度到(ii)第二温度的调节,在第一温度下,温度敏感缓冲液的pH为了让pH敏感螯合剂可逆结合溶解的游离镁离子而成为可控的,那样多核苷酸的扩增被抑制;在第二温度下,温度敏感缓冲液的pH是可控的来调节反应混合物温度,从而从pH敏感螯合剂中释放结合的镁离子,那样多核苷酸的扩增能够继续进行,从而启动多核苷酸的扩增。

[0041] 在上述方法的任意实施例中,pH敏感螯合剂可以从下列组合中选择:乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸(ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid), EGTA衍生物,和EDTA衍生物。优选的pH敏感螯合剂是乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。

[0042] 在上述方法的任意实施例中,温度敏感缓冲液可以包括三(羟甲基)氨基甲烷(tris(hydroxymethyl) aminomethane)。

[0043] 在上述方法的任意实施例中,处于第二温度的温度敏感缓冲液的pKa值至少低于第一温度的温度敏感缓冲液的pKa值的0.4。

[0044] 在上述方法的任意实施例中,温度敏感缓冲液的 ΔpKa 值在 $-0.04^{\circ}\text{C}^{-1}$ 至 $-0.015^{\circ}\text{C}^{-1}$ 之间。

[0045] 在上述方法的任意实施例中,第一温度为约0°C至10°C之间,约10°C至20°C之间,约20°C至30°C之间。优选的第一温度为约20°C至30°C之间。

[0046] 在上述方法的任意实施例中,第二温度是约30°C至40°C之间,约40°C至50°C之间,约50°C至60°C之间,约60°C至70°C之间,约70°C至80°C之间,约80°C至90°C之间,或约90°C至100°C之间。优选的第二温度是约50°C至60°C之间。

[0047] 在上述方法的任意实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种切口内切酶,一种DNA或RNA聚合酶,一种重组酶,和/或一种逆转录酶。在特定的实施例中,扩增试剂混合物包括一种切口内切酶,一种DNA或RNA聚合酶。在其他实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种重组酶和一种DNA或RNA聚合酶。这些实施例可以根据情况所需包括一种逆转录酶。

[0048] 在上述方法的任意实施例中,螯合剂浓度与镁离子浓度的比值约为0.5至2。

[0049] 在上述方法的任意实施例中,处于第一温度的游离镁离子浓度约为0至10mM。

[0050] 在上述方法的任意实施例中,处于第二温度的游离镁离子浓度约为5mM至50mM。

[0051] 在上述方法的任意实施例中,扩增试剂混合物可以包括一种或多种冻干形式的组分。在特定的实施例中,扩增试剂混合物包括冻干形式的镁盐。冻干的镁盐可以在缓冲液中被重新溶解来形成溶解状态的镁离子。在其他实施例中,扩增试剂混合物包括冻干形式的pH敏感螯合剂。冻干pH敏感螯合剂可以在缓冲液中被重新溶解。根据这些实施例,缓冲液可以是温度敏感缓冲液。在一些实施例中,溶解的镁离子可逆结合到pH敏感螯合剂。根据任意上述的实施例,缓冲液的pH对于能可逆结合溶解状态的游离镁离子的pH敏感螯合剂是可控的。优选的,扩增试剂混合物包括被pH敏感螯合剂可逆结合的溶解状态的镁离子,其中溶解状态的镁离子产生自于重新溶解在温度敏感缓冲液中的冻干镁盐。

[0052] 在上述方法的任意实施例中,多核苷酸的扩增基本上可以在等温条件下进行。

[0053] 在上述方法的任意实施例中,多核苷酸在与扩增试剂混合物混合前不被变性。

[0054] 在上述方法的任意实施例中,混合步骤在温度处于约0°C至10°C之间,约10°C至20°C之间,约20°C至30°C之间时进行。优选的混合步骤在温度处于约20°C至30°C之间时进行。

[0055] 在上述方法的任意实施例中,多核苷酸直到反应混合物的温度处于约30°C至40°C之间,约40°C至50°C之间,约50°C至60°C之间,约60°C至70°C之间,约70°C至80°C之间,约80°C至90°C之间,或约90°C至100°C之间才能进行扩增。优选的多核苷酸的扩增直到反应混合物的温度处于约50°C至60°C之间才进行扩增。

[0056] 在上述方法的任意实施例中,在没有处于第一温度和第二文件之间反应物温度的重复循环时,多核苷酸的扩增进行。

[0057] 在上述方法的任意实施例中,扩增试剂混合物的一种或多种成分可以被提供在适宜流体装置、盒式或横向流动装置中使用的容器中。

[0058] 在上述方法的任意实施例中,多核苷酸的扩增可以在没有额外试剂添加到混合步骤(a)中形成的反应混合物中时进行。

[0059] 在上述方法的任意实施例中,该方法可以进一步包括步骤(c):检测扩增的多核苷酸。在包括步骤(c)的方法的进一步的实施例中,扩增的多核苷酸的检测可以在没有额外试剂添加到在结合步骤(a)中行程单反应混合物中发生或进行。

[0060] 在上述方法的任意实施例中,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或基本上所有反应混合物中的二价离子都是可溶形式的。在进一步的实施例中,二价离子被pH敏感螯合剂可逆结合。在一个进一步的实施例中,二价离子包括游离的二价离子。在另一个实施例中,二价离子同时包括结合的和游离的二价离子。

- [0061] 在上述方法的任意实施例中,溶解的二价离子不能由沉淀解离形成。
- [0062] 在上述方法的任意实施例中,低于20%,低于15%,低于10%,低于5%,低于1%,或基本上没有二价离子在多核苷酸扩增前形成沉淀物。
- [0063] 在包含步骤(c)的上述方法的任意实施例中,低于20%,低于15%,低于10%,低于5%,低于1%,或基本上没有二价离子在检测扩增的多核苷酸之前形成沉淀物。
- [0064] 在上述方法的任意实施例中,反应混合物不包括以沉淀形式结合的二价离子。
- [0065] 另一方面,本发明提供一种组分,其包括用于核苷酸扩增的一种或多种试剂和溶解状态下的依赖pH的可逆结合的镁离子。
- [0066] 在上述组分的任意实施例中,该组分可以进一步包括一种温度敏感缓冲试剂和一种pH敏感螯合剂。在特定的实施例中,温度敏感缓冲试剂可以包括三(羟甲基)氨基甲烷。在另一个特定实施例中,pH敏感螯合剂可以包括乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。优选的,该组分进一步包括三(羟甲基)氨基甲烷和乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。
- [0067] 在上述组分的任意实施例中,温度敏感缓冲试剂的 ΔpK_a 值为 -0.04°C^{-1} 和 $-0.015^\circ\text{C}^{-1}$ 之间。
- [0068] 在上述组分的任意实施例中,用于核苷酸扩增的一种或多种试剂可以包括一种切口内切酶,一种DNA或RNA聚合酶,一种重组酶,和/或一种逆转录酶。在特定的实施例中,一种或多种试剂包括一种切口内切酶和一种DNA或RNA聚合酶。在其他实施例中,一种或多种试剂包括一种重组酶和一种DNA或RNA聚合酶。这些实施例可以根据情况所需包括一种逆转录酶。
- [0069] 在上述组分的任意实施例中,用于核苷酸扩增的一种或多种试剂包括一种或多种冻干形式的组分。在特定的实施例中,一种或多种试剂可以包括冻干形式的镁盐。冻干的镁盐可以在缓冲液中重新溶解来形成溶解状态的镁离子。在其他实施例中,一种或多种试剂可以包括冻干形式的pH敏感螯合剂。优选的,上述组分包括溶解状态的能可逆结合的pH依赖的镁离子,其中溶解状态的镁离子由冻干的镁盐在温度敏感缓冲液中重新溶解形成。
- [0070] 在上述组分的任意实施例中,溶解的镁离子不能由沉淀的解离形成。
- [0071] 在上述组分的任意实施例中,组分不包括以沉淀形式结合的镁离子。
- [0072] 在上述组分的任意实施例中,一种或多种组分可以被提供在适宜流体装置、盒式或横向流动装置中使用的容器中。
- [0073] 在另一方面,本发明提供一种组分,该组分包括一种或多种用于核苷酸扩增的试剂、温度敏感缓冲液,pH敏感螯合剂和镁盐。
- [0074] 在上述组分的任意实施例中,温度敏感缓冲液可以包括三(羟甲基)氨基甲烷。
- [0075] 在上述组分的任意实施例中,温度敏感缓冲液的 ΔpK_a 值在 -0.04°C^{-1} 和 $-0.015^\circ\text{C}^{-1}$ 之间。
- [0076] 在上述组分的任意实施例中,pH敏感螯合剂可以包括乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。
- [0077] 优选的,该组分包括三(羟甲基)氨基甲烷和乙二醇-双(2-氨基乙醚)四乙酸。
- [0078] 在上述组分的任意实施例中,用于核苷酸扩增的一种或多种试剂可以包括一种切口内切酶,一种DNA或RNA聚合酶,一种重组酶,和/或一种逆转录酶。在特定的实施例中,一种或多种试剂包括一种切口内切酶和一种DNA或RNA聚合酶。在其他实施例中,一种或多种

试剂包括一种重组酶和一种DNA或RNA聚合酶。这些实施例可以根据情况所需包括一种逆转录酶。

[0079] 在上述组分的任意实施例中,一种或多种试剂包括一种或多种冻干形式的组分。在特定的实施例中,一种或多种试剂可以包括冻干形式的镁盐。冻干的镁盐可以在缓冲液中重新溶解来形成溶解状态的镁离子。在其他实施例中,一种或多种试剂可以包括冻干形式的pH敏感螯合剂。冻干的pH敏感螯合剂可以在缓冲液中被重新溶解。根据这些实施例,缓冲液可以是一种温度敏感缓冲液。优选的,上述组分包括冻干的镁盐,该镁盐在温度敏感缓冲液中被重新溶解,形成溶解状态的pH依赖可逆结合镁离子。

[0080] 在上述组分的任意实施例中,溶解的镁离子不能由沉淀溶解形成。

[0081] 在上述组分的任意实施例中,该组分不包括以沉淀形式被结合的镁离子。

[0082] 在上述组分的任意实施例中,一种或多种组分可以被提供在适宜流体装置、盒式或横向流动装置中使用的容器中。

[0083] 另一方面,本发明提供的方法包括:(a)使一种酶和一种试剂混合物混合来形成反应混合物,其中反应混合物包括溶解状态的能可逆结合的二价离子,和(b)调节反应混合物的pH来释放可逆结合的二价离子,从而激活酶。

[0084] 在上述方法的任意实施例中,二价离子从下列组合中选择:镁、钙、铜、锌、锰、铁、镉和铅。

[0085] 在上述方法的任意实施例中,试剂混合物可以包括一种pH敏感螯合剂。

[0086] 在上述方法的任意实施例中,试剂混合物可以包括一种温度敏感缓冲液。

[0087] 在上述方法的任意实施例中,反应混合物的pH值可以根据温度敏感缓冲液的pH值被调节。

[0088] 在上述方法的任意实施例中,反应混合物的pH值可以通过改变反应混合物的温度来调节,从第一温度变为第二温度。

[0089] 在上述方法的任意实施例中,酶可以是一种DNA或RNA聚合酶。

[0090] 在上述方法的任意实施例中,该酶可以是一种切口内切酶。

[0091] 本发明的方法可以包括扩增多核苷酸的反应,例如在基本等温条件下或非等温条件下。例如扩增反应可以包括切口和延伸扩增反应(NEAR),或重组聚合酶扩增(RPA)。

[0092] 另一方面,本发明的特点是组分(如干燥的组分),这些组分包括切口内切酶(如N.BstNBI),DNA聚合酶(如嗜热DNA聚合酶),和pH敏感螯合剂(如EGTA)。在一些实施例中,这些组分进一步包括温度敏感缓冲液(如Tris)。在实施例中,组分进一步包括逆转录酶。在一些实施例中,本发明的这些组分或方法可以包括(i)正向模板,包括在3'端具有可识别区域的与靶标序列的反义链的3'端互补的核苷酸序列,切口酶结合位点,识别区域的上游的切口位点,和上述切口位点上游的稳定区域,和/或(ii)反向模板,该反向模板在3'端具有一个与靶标序列有义链的3'端互补的可识别位点的核苷酸序列,(如互补的靶标序列反义链),切口酶结合位点,可识别区域上游的切口位点,和上述切口位点上游的稳定区域。在一些实施例中,这些组分能进一步包括镁盐或镁离子。

[0093] 在一些实施例中,本发明的这些组分或方法可以包括一种或多种切口酶,例如,选自下列组合:Nt.BspQI,Nb.BbvCI,Nb.BsmI,Nb.BsrDI,Nb.BtsI,Nt.AlwI,Nt.BbvCI,Nt.BstNBI,Nt.CviPII,Nb.Bpu10I,Nt.Bpu10I,和N.BspD6I。在某些实施例中,切口酶可以

选自由Nt.NBst.NBI, Nb.BsmI, 和Nb.BsrDI组成的组合。优选的切口酶是Nt.BstNBI或N.BspD6I。本领域的这些普通技术人员都知道除了这里特别提到的切口酶, 其他各种切口酶都可以在本发明的方法和组分中使用。

[0094] 在本发明的方法和组分的一些实施例中可以包括模板, 该模板可以是寡核苷酸, 其可以与靶标的可识别区域结合, 也可以包含可识别区域上游的切口酶结合区域和切口酶结合区域上游的稳定区域。这个“可识别区域”可以是模板上与靶标序列的核苷酸序列互补的核苷酸序列。这个靶序列上的可识别区域可以是靶序列上与模板互补, 结合的核苷酸序列。这个“稳定区域”可以是一个核苷酸序列, 该序列具有, 例如约50%GC含量, 被设计来用来, 例如, 在切口和/或扩增反应中来稳定分子。

[0095] 另一方面, 本发明的特定在于组分(如干燥的组分)包括一种重组酶(如UvsX), 一种DNA聚合酶, 和pH敏感螯合剂(如EGTA)。在一些实施例中, 组分进一步包括一种温度敏感缓冲液(如Tris)。本发明的这些组分或方法可以包括一种或多种(i)单链DNA结合蛋白(如gp32), (ii)UvsY, 和(iii)拥挤试剂(如聚乙二醇(PEG))。在一些实施例中, 这些组分进一步包括镁盐或镁离子。在一些实施例中优选的本发明的组分和方法包括工程化的和修饰过的重组酶的同工酶, 例如大肠杆菌recA和T4噬菌体uvsX, 聚合酶包括大肠杆菌DNA聚合酶IKlenow片段, Bst聚合酶, Phi-29聚合酶, 枯草杆菌Pol I (Bsu), PolV和来自大肠杆菌和T4(如gp32蛋白)的单链DNA结合蛋白。

[0096] 标记的探针能与多核苷酸或扩增的多核苷酸产物有效的互补和杂交, 这些探针被用于本发明的任何方面或实施例中。

[0097] 另一方面, 横向流动装置被提供, 其包含多核苷酸扩增试剂例如DNA或RNA聚合酶, 切口酶, 重组酶, 和/或用于核苷酸扩增的逆转录酶, 和一种或多种温度敏感pH缓冲液, 一种或多种pH敏感螯合剂, 和一种或多种二价离子例如镁离子和/或一种或多种二价金属盐, 例如镁盐或硫酸镁。在一些实施例中, 一种或多种这些组分可以被以冻干形式被提供。

[0098] 另一方面, 微流体装置被提供, 其包含多核苷酸扩增试剂例如DNA或RNA聚合酶, 切口酶, 重组酶, 和/或用于核苷酸扩增的逆转录酶, 和一种或多种温度敏感pH缓冲液, 一种或多种pH敏感螯合剂, 和一种或多种二价离子, 例如镁离子, 和/或一种或多种二价金属盐, 例如镁盐或硫酸镁。在一些实施例中, 一种或多种这些组分可以被冻干提供。

[0099] 另一方面, 一个装置(cartridge)被提供, 其包含多核苷酸扩增试剂, 例如用于核苷酸扩增的DNA或RNA聚合酶, 切口酶, 重组酶, 和/或逆转录酶, 并且一种或多种温度敏感pH缓冲液, 一种或多种pH敏感螯合剂, 和一种或多种二价离子, 例如镁离子, 和/或一种或多种二价金属盐, 例如镁盐或硫酸镁。在一些实施例中一种或多种这样的组分可以是冻干的。

[0100] 另一方面, 样品制备和转运装置中包含多核苷酸扩增试剂例如用于核苷酸扩增的DNA或RNA聚合酶, 切口酶, 重组酶, 和/或逆转录酶, 并且一种或多种温度敏感pH缓冲液, 一种或多种pH敏感螯合剂, 和一种或多种二价离子, 例如镁离子, 和/或一种或多种二价金属盐, 例如镁盐或硫酸镁。在一些实施例中一种或多种这样的组分可以是冻干的。

[0101] 这里描述的方法和组分可以用于核苷酸扩增反应, 不需要预热反应来达到反应温度。不预热, 他们也可以用来增加核苷酸扩增反应的选择性、敏感性和重复性。

[0102] 另一方面, 本发明提供了一种方法, 该方法包括: 形成一种混合物, 其包括: (a) 包含靶标的样品和 (b) 包含结合试剂的试剂, 被该结合试剂结合的离子, 缓冲液, 和包含至少

一种组分的扩增试剂,当离子被结合试剂结合时,该组分在离子存在情况下具有第一种活性,当离子从结合试剂中释放时,在离子存在的情况下该组分具有第二种活性;并且,通过对混合物的温度从第一温度到第二温度的增加,来从结合试剂一定数量离子的释放足够对至少一种扩增试剂组分的活性从第一种活性变为第二种活性的改变。

[0103] 上述方法的任意实施例中,该样品可以是一种样品,如液体,例如来自人类或动物的血液、血浆、血清、痰、鼻拭物、阴道拭物、唾液、分泌粘液、或脊髓液。

[0104] 上述方法的任意实施例中,靶标可以是多核苷酸,如来自病原物,如细菌或病毒的多核苷酸。靶标,如样品中存在的,可以是双链多核苷酸或单链多核苷酸。

[0105] 上述方法的任意实施例中,靶标是双链多核苷酸,该方法可以不用从多核苷酸的温度升高到让双链多核苷酸完全变性时另一个温度时执行,该另一个温度够约使50%,约35%,约25%,约15%,约7.5%,约5%,约2.5%的双链多核苷酸完全变性。例如,在温度没有升高超过基本上所有双链多核苷酸的退火温度时,该方法也可以被执行。

[0106] 上述方法的任意实施例中,当至少一种组分的活性在第二种状态时,扩增试剂可以扩增靶标。扩增步骤可以进行,在混合物形成步骤之后,混合物没有跟参与扩增和/或检测靶标的额外试剂结合的情况下。

[0107] 上述方法的任意实施例中,该方法可以进一步包括检测靶标存在和/或存在的数量。检测可以在扩增靶标的数量至少约 10^6 倍后进行,如至少约 10^7 倍,至少约 10^8 倍,至少约 10^9 倍,至少约 10^{10} 倍,至少约 10^{11} 倍,至少约 10^{12} 倍之后进行。

[0108] 在上述包括扩增方法的任意实施例中,当温度在约第二温度时,如在第二温度的约 15°C 内,在第二温度的约 10°C 内,在第二温度的约 7.5°C 内,在第二温度的约 5°C 内,在第二温度的约 2.5°C 内,或基本在第二温度内,扩增总量的至少约50%,至少约75%,至少约90%,至少约95%或基本上所有的扩增可以被执行。

[0109] 在上述方法的任意实施例中,形成混合物的步骤可以包括使样品与试剂接触,其中当试剂被样品接触时,试剂是冻干形式的。

[0110] 在上述方法的任意实施例中包括检测,检测的步骤可以在样品与试剂接触后少于约25分钟,少于约20分钟,少于约17.5分钟时进行。在上述方法的任意实施例中,形成混合物的步骤可以在混合物的温度没有增加超过混合物附近环境温度的约 30°C ,超过约 25°C ,超过约 20°C ,超过约 15°C ,超过约 10°C ,超过约 5°C 时进行。例如形成混合物的步骤可以在试剂处于约试剂附近的环境温度时进行。

[0111] 在上述方法的任意实施例中,在混合物形成步骤前的瞬间没有大幅增加试剂的温度到超过试剂温度时,形成混合物的步骤可以进行。混合物形成之前瞬间的试剂温度可以约等于试剂的环境温度。

[0112] 在上述方法的任意实施例中,该方法可以在不使混合物与(a)具有参与靶标的扩增和/或检测的额外的试剂接触,或与(b)在混合物温度已经被增加到高于第一温度后的不同情况下的任何额外试剂接触下进行。

[0113] 在上述方法的任意实施例中,在没有添加(a)具有参与靶标的扩增和/或检测的额外试剂的情况下,或(b)在释放离子的步骤后的不同情况下的任何额外试剂下,该方法可以被进行。

[0114] 在上述方法的任意实施例中,在没有使至少一种组分从第二种状态回复到第一种

状态时该方法可以被执行。

[0115] 在上述方法的任意实施例中,在没有使超过约25%,超过约15%,超过约10%,超过约5%的被释放的离子同时重新在结合的情况下,该方法可以被执行。

[0116] 在上述方法的任意实施例中,样品和/或靶标不与一种含有一定数量离子的不溶沉淀物接触,这些一定数量的离子足够使扩增试剂中的至少一种组分的活性从第一活性变为第二活性,这个方法也可以进行。

[0117] 在上述方法的任意实施例中,样品和/或靶标不与一种含有一定数量离子的不溶沉淀物接触,这些一定数量的离子足够使扩增试剂中的至少一种组分的活性从第一活性变为第二活性,接着沉淀溶解,这个方法也可以进行。

[0118] 在上述方法的任意实施例中,从混合物中释放的超过约25%,超过约15%,超过约10%,超过约5%,超过约2.5%的离子数量的没有被沉淀时,该方法可以被进行。

[0119] 在上述方法的任意实施例中,不使一定数量的离子沉淀从而足够改变扩增试剂中至少一种组分的活性从第二活性变为第一活性下,该发明的方法可以执行。

[0120] 在上述方法的任意实施例中,第一温度可以是混合物附近的环境温度。

[0121] 在上述方法的任意实施例中,没有使混合物的温度升高到大于80°C的温度,到大于70°C的温度,到大于65°C的温度,或到大于60°C的温度时,第一种方法可以被执行。

[0122] 在上述方法的任意实施例中,第一温度可以低于约40°C,低于约35°C,低于约30°C,或低于约27.5°C。

[0123] 在上述方法的任意实施例中,第二温度可以是至少约40°C,至少约45°C,至少约50°C,或至少约55°C。

[0124] 在上述方法的任意实施例中,第二温度可以低于约75°C,低于约67.5°C,低于约62.5°C,或低于约60°C,或约56.5°C或更少。

[0125] 在包括检测的上述方法的任意实施例中,当温度处于约第二温度时,如在第二温度的约15°C内,在第二温度的约10°C内,在第二温度的约7.5°C内,在第二温度的约5°C内,在第二温度的约2.5°C内,或基本上相同的温度,该检测可以被执行。

[0126] 在上述方法的任意实施例中,混合物温度没有在第一和第二温度间循环时,该方法可以被执行。

[0127] 在上述方法的任意实施例中,混合物的温度没有在更低的温度和第二温度之间循环时,该方法可以被执行,在该较低温度时混合物中存在的双链多核苷酸基本上被退火,在第二温度时混合物中存在的双链多核苷酸基本上被变性。

[0128] 在上述方法的任意实施例中,(混合物)的形成和混合步骤可以在壳体内部的流体网络中进行。壳体可以是便携式的,如手持式。壳体可以是单独使用的,包含储藏试剂的壳体,第一种方法包括导入样品进入壳体的流体网络。壳体可以包括一个内部电源例如电池和一个由电池供应的加热器,并且足够增加混合物的温度到第二温度。

[0129] 在上述方法的任意实施例中,试剂可以在形成混合物前被冻干。

[0130] 在上述方法的任意实施例中,结合试剂可以是pH敏感结合试剂,并且缓冲液可以是一种温度敏感缓冲液,其中,使混合物从第一温度增加到第二温度的增加改变缓冲液的缓冲作用,那样混合物的pH从第一pH变为第二pH,不同的pH,以及其中,在第二pH时,结合试剂释放足够数量的离子。

[0131] 在上述方法的任意实施例中,至少一种组分可以是一种酶例如DNA聚合酶,RNA聚合酶,切口内切酶,或重组酶。例如这些酶可以是切口酶,例如Nt.BstNBI或N.BspD6I。

[0132] 在上述方法的任意实施例中,结合试剂可以是一种螯合剂,例如乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸,EGTA衍生物,和EDTA衍生物。在上述方法的任意实施例中,离子可以是镁、钙、铜、锌、锰、铁、镉和铅。在上述方法的任意实施例中,缓冲液可以是三(羟甲基)氨基甲烷。在任意上述方法的实施例中,这些扩增试剂可以包括一定数量的试剂足够通过NEAR来扩增靶标。例如,螯合剂可以是乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸,离子可以是镁,缓冲液可以是三(羟甲基)氨基甲烷,至少一种组分可以是DNA聚合酶,RNA聚合酶,Nt.BstNBI或N.BspD6I,并且扩增试剂可以包括足够通过NEAR来扩增靶标的一定数量的试剂。

[0133] 在上述方法的任意实施例中,在已被释放一定数量离子存在的条件下,至少一种组分的活性比一定数量的离子被结合试剂结合时至少高约10倍,在已被释放一定离子存在的条件下,至少一种组分的活性比一定数量的离子被结合试剂结合时至少高约20倍,在已被释放一定离子存在的条件下,至少一种组分的活性比一定数量的离子被结合试剂结合时至少高约50倍,在已被释放一定离子存在的条件下,至少一种组分的活性比一定数量的离子被结合试剂结合时至少高约100倍。这种活性可以针对靶标的扩增。

[0134] 在靶标被扩增的上述方法的任意实施例中,存在已释放离子的情况下,扩增的比值可以比在如果离子数量被结合试剂结合的情况下时至少高约10倍,存在已释放离子的情况下,扩增的比值可以比在如果离子数量被结合试剂结合的情况下至少高约20倍,在存在已释放离子的情况下,扩增的比值可以比在如果离子数量被结合试剂结合的情况下至少高约50倍,或在存在已释放离子的情况下,扩增的比值可以比在如果离子数量被结合试剂结合的情况下至少高约100倍。

[0135] 在靶标被扩增的上述方法的任意实施例中,至少一种组分处于第二状态时扩增的比值比相比于第一组分在第一状态时至少高约10倍,在至少一种组分处于第二状态时的扩增比值相比于最初组分在第一状态时扩增的比值至少高约20倍,在至少一种组分处于第二状态时的扩增比值相比于最初组分在第一状态时扩增的比值至少高约50倍,或在至少一种组分处于第二状态时的扩增比值相比于最初组分在第一状态时扩增的比值至少高约100倍。

[0136] 在上述方法任意包含扩增的实施例中,在混合物的温度没有升高到一个温度,在这个温度下,超过50%,超过30%,超过20%,超过10%,或超过5%的存在于混合物中的双链多核苷酸被全部变性的情况下,至少约50%,至少约75%,至少约90%,至少约95%,或基本是所有扩增总量可以被执行。例如,第一种方法可以通过扩增被执行,最初在混合物中存在双链多核苷酸的超过50%,超过30%,超过20%,超过10%,或超过5%时没有完全变性的情况下,至少约50%,至少约75%,至少约90%,至少约95%,或基本上所有扩增总数被执行。

[0137] 本发明所公开的所有范围,例如“X和Y之间”是包括端点的。

[0138] 本发明中一个或多个实施例在附图和下列说明中被详细阐述。本发明的其他特征、目的和优点在本文的描述、附图和权利要求中是显而易见。

附图说明

[0139] 图1是包括没有模板 (NTC), 100个拷贝的模板 (100cp), 具有EGTA但没有模板 (NTC+EGTA), 和具有EGTA和100个模板拷贝 (100cp+EGTA) 的NEAR反应的荧光图。

[0140] 图2是NEAR反应的荧光图, 包括没有模板 (ntc) 的, 20个模板拷贝 (20cp), 和200个模板拷贝 (200cp), 在所有情况下都具有EGTA。实线是罗红霉素标记的分子信标荧光数据, 虚线是SyBr II荧光数据。

[0141] 详细描述

[0142] 本发明是基于, 至少部分基于, 发现需要一种二价离子辅助因子的酶的活性可以通过可逆结合反应混合物中的二价离子来被控制。在典型方法中, 反应混合物通过使一种酶与试剂混合物的混合来制备, 其中反应混合物包括溶解状态的可逆结合的二价离子。然后反应混合物的pH可以被调节来释放可逆结合的二价离子, 从而激活酶。

[0143] 本发明也适用于任何涉及到需要二价离子辅因子的酶反应。酶所必需的二价离子辅助因子包括镁, 钙, 铜, 锌, 锰, 铁, 镉, 和铅。

[0144] 一个典型应用就是所谓的“热启动”的反应, 其特征在于, 直到混合物的温度达到适当的温度之前, 参与反应中所涉及的至少一个组分 (如, 酶或二价离子的辅助因子) 要么从反应混合物被分开, 要么保持在非活动状态。

[0145] 本发明涉及新的“热启动”核苷酸扩增反应, 该反应包括一种温度敏感缓冲液和一种pH敏感螯合剂。在典型方法中, 反应混合物在第一温度 (如室温) 被制备, 在该温度下, 对于可逆结合游离的镁离子的pH敏感螯合剂, 温度敏感缓冲液的pH为可操控的, 这些可逆结合的游离的镁离子是反应的一种或多种酶组分必须的辅助因子, 反应的进程被抑制了。接着反应混合物的温度被调节到第二温度, 在这个温度下, 敏感缓冲液的pH被操控来从pH敏感螯合剂中释放结合的二价镁离子, 和让反应继续进行。

[0146] 由于本发明, 一般技术人员可以根据所用的特定核苷酸扩增方法的属性选择第一温度, 第二温度, 温度敏感缓冲液条件和pH敏感螯合剂。当升高到所需的反应温度时, 所用的酶可以来自耐热种类的酶 (如Thermus aquaticus)。

[0147] 例如, 切口和延伸扩增反应 (NEAR) 可以在56°C时运作。反应混合物一般在室温制备, 并且包括靶标核苷酸, 寡核苷酸, DNA聚合酶, 切口内切酶, 三 (羟甲基) 氨基甲烷缓冲液 (pH=8), 乙二醇双 (2-氨基乙醚) 四乙酸 (EGTA), 一种或多种盐 (例如, 一个或多个一价和/或二价镁盐), 和dNTP。在这个pH时, EGTA与镁离子结合相对牢固, 然后阻止了镁离子与切口酶和聚合酶结合。一般来说, 反应中没有镁离子, 酶不能展现酶活力并且反应被有效暂停。温度增加到56°C时, 在该温度下, 温度敏感缓冲液的pH值降低到小于pH7.4。在这个pH值, EGTA与镁离子的有效结合被降低了, 导致镁离子从EGTA-镁复合物中解离。镁离子是游离的, 与切口和聚合酶互作形成全酶, 扩增反应继续进行。

[0148] 这里所用的缓冲液或缓冲试剂是一种弱酸或碱, 被用来调节溶液的pH。缓冲液包括那些一般与核苷酸扩增反应兼容的缓冲液, 是本领域公知的。很多缓冲液的pH部分依赖溶液的温度, 例如可以预见缓冲溶液的pH将随温度改变。三 (羟甲基) 氨基甲烷 (TRIS) 缓冲液与温度的关系如表1所示。

[0149] 表1. Tris缓冲液温度与pH的关系

Tris 缓冲液 (0.05M) 的 pH			
5°C	25°C	37°C	56°C
7.76	7.20	6.86	6.33
7.89	7.33	6.99	6.46
7.97	7.41	7.07	6.54
8.07	7.51	7.17	6.64
8.18	7.62	7.28	6.75
8.26	7.70	7.36	6.83
8.37	7.81	7.47	6.94
8.48	7.92	7.58	7.05
8.58	8.02	7.68	7.15
8.68	8.12	7.78	7.25
8.78	8.22	7.88	7.35
8.88	8.32	7.98	7.45
8.98	8.42	8.08	7.55
9.09	8.53	8.19	7.66
9.18	8.62	8.28	7.75
9.28	8.72	8.38	7.85

[0150]

[0151] 市购缓冲液的典型属性如表2所示,这些缓冲液包括3- {[三(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸(TAPS) (3- {[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} propanesulfonic acid), 双甘氨酸(glycylglycine), N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(Bicine) (N,N-bis(2-hydroxyethyl) glycine), tris, 甘氨酸胺(glycinamide), N-三(羟甲基)甲基(曲辛) (N-tris (hydroxymethyl) methylglycine), 4-2羟乙基-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES) (4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethane-sulfonic acid), 2 {[三(羟甲基)甲基]氨基}乙磺酸(TES) (2- {[tris (hydroxymethyl) methyl] amino} ethanesulfonic acid), 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS) (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid), N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES) (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES) (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), 哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES) (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)), 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES) (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)。

[0152] 表2. 缓冲液属性

常用名	pKa (20°C)	pKa (25°C)	pKa (37°C)	温度的影响 $dpKa/dT$ (1/°C)	摩尔分子 量
TAPS	8.49	8.40	8.18	-0.018	243.3
双甘氨酸 (Glycylglycine)	8.40	8.25	7.95	-0.028	132.1
N-二甘氨酸 (Bicine)	8.35	8.26	8.04	-0.018	163.2
Tris	8.30	8.06	7.82	-0.031	121.14
甘氨酸胺 (Glycinamide)	8.20	8.10	7.86	-0.020	110.54
三甲基甘氨酸 (Tricine)	8.15	8.05	7.79	-0.021	179.2
HEPES	7.55	7.48	7.31	-0.014	238.3
TES	7.50	7.40	7.16	-0.020	229.20
MOPS	7.28	7.20	7.02	-0.015	209.3
BES	7.17	7.09	6.90	-0.016	213.25
ACES	6.90	6.78	6.56	-0.020	182.2
PIPES	6.80	6.76	6.66	-0.0085	302.4
MES	6.16	6.10	5.97	-0.011	195.2

[0155] 在一些实施例中, 温度敏感缓冲液包括一种或多种温度敏感缓冲液, 如甘氨酸, 甘氨酸胺, N-二羟乙基甘氨酸, 甘氨酸甘氨酸, TES (三羟甲基) 甲基-氨基乙磺酸), ACES ((N-2-乙酰胺-2-氨基乙磺酸), 和三(羟甲基)氨基甲烷。

[0156] 在一些实施例中, 第二温度时温度敏感缓冲液的pKa值小于第一温度时温度敏感缓冲液的pKa值的至少为1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 或0.4。在一些实施例中, 第二温度时反应混合物的pH值小于第一温度时反应混合物在的pH值的至少为1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 或0.4。

[0157] 在一些实施例中, 温度敏感缓冲液的 ΔpKa ((如在第一温度和第二温度之间)) 为-

0.010°C⁻¹或更少,如-0.015°C⁻¹或更少,-0.020°C⁻¹或更少,-0.025°C⁻¹或更少,-0.030°C⁻¹或更少。在一些实施例中,温度敏感缓冲液的 ΔpK_a (如在第一温度和第二温度之间)为-0.040°C⁻¹与-0.010°C⁻¹,-0.015°C⁻¹,-0.020°C⁻¹,-0.025°C⁻¹,和-0.030°C⁻¹中任意一个数之间。

[0158] 这里使用的pH敏感螯合剂是一种化学物品,能与二价离子形成可溶性的复合物,如镁离子,那样二价离子不能参与化学反应,如作为酶的辅助剂。那奎尔等(Maguire et al.,2002,Biometals,15:203-210)提供了镁的生物化学的观点。很多能与镁离子结合后的pH敏感螯合剂在本领域是已知的。pH敏感螯合剂的典型种类包括聚氨基羧酸(例如,乙二醇四乙酸(EGTA),乙二胺四乙酸(EDTA),次氨基三乙酸(NTA),NTA衍生物,亚氨基二乙酸(IDA),IDA的衍生物,柠檬酸,草酸酰胺,N- β -羟基乙基乙二胺三乙酸(HEDTA),和二乙基三胺五乙酸(DTPA)),偶氮苯(参见,例如,Momotake et al.,2003,Tetrahedron Lett.,44:7277-80),和烷氧基乙酸(alkoxy acetic)(参见,如,Starek et al.,2006,Acta Pol.Pharm.,63:89-94)。这里描述了pH敏感的螯合剂的非限制性实施例。大多数pH敏感螯合剂与镁离子的结合是依赖于溶液的pH。随着pH值的降低,氢离子成功地与镁离子竞争结合螯合剂(例如,随着pH的降低,pH依赖的螯合剂与镁的复合物的有效稳定常数或条件稳定常数减小)

[0159] 在一些实施例中,pH依赖的螯合剂是pH依赖的单配体螯合剂(如,这里所描述或本领域已知的任意单配体pH依赖螯合剂)。在一些实施例中,pH依赖的单配体螯合剂是柠檬酸。

[0160] 在一些实施例中,pH依赖的螯合剂是pH依赖的多配体螯合剂(如,这里所描述或本领域已知的任意pH依赖的多配体螯合剂)。pH敏感多配体螯合剂与通常比那些类似的pH敏感单配体螯合剂可以与镁离子形成更多的稳定的复合物,并且由于存在多个pH敏感功能团更依赖pH。当pH改变时,这些功能团形成不同的质子化状态。因此有效的稳定常数或条件稳定常数随pH值的减小而减小。在一些实施例中,pH敏感多配体螯合剂包括一个或多个(如至少2个,3个或4个)羧酸盐和/或氨基官能团(例如,乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA),乙二胺四乙酸(EDTA),EGTA衍生物,EDTA衍生物,N-甲基亚氨基二乙酸,次氨基三乙酸(NTA),NTA衍生物,DL-2-(2-甲硫基乙基)次氨基乙酸,(2-羟基三亚)二胺四乙酸((2-hydroxytrimethylene)dinitrilotetraacetic acid),DL-1-丁烯二胺四乙酸N,N-二甲酰胺(DL-1-ethylethylenedinitrilotetraacetic acid N,N-diamide),DL-1-甲基乙二胺四乙酸N,N-二甲酰胺(DL-1-methylethylenedinitrilotetraacetic acid N,N-diamide),乙二胺二丙二酸(EDDM)(ethylenediiminodipropanedioic acid),亚乙基二胺二乙酸(EDDA),N-(2-吡啶基甲基)亚氨基二乙酸,1,3-亚苯二胺四乙酸(1,3-phenylenedinitrilotetraacetic acid),乙二胺四(3-丙酸)(ethylenedinitrilotetra(3-propanoic acid)),亚氨基二乙酸(IDA),IDA的衍生物,草酸,邻,对-EDDHA(乙二胺-N-(邻羟基苯基)-N-(对-羟基苯基)膦酸)(o,p-EDDHA(Ethylenediamine-N-(o-hydroxyphenylacetic)-N-(p-hydroxyphenylacetic) acid)),邻,邻-EDDHA(o,o-EDDHA)和对,对-EDDHA(p,p-EDDHA))。

[0161] 表3显示了pH敏感螯合剂的一些非限制性实例的镁-配合基的稳定常数和酸解离常数的对数。

[0162] 表3. 典型的pH敏感多配体螯合剂的镁-配合基的稳定常数和酸解离常数的对数。

H 敏感配体	log K	pKa ¹	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₄	pKa ₅
乙二胺四(3-丙酸) (Ethylene dinitrilotetra(3-propanoic acid))	1.8 ¹					
1,3 亚苯二胺四乙酸(1,3-Phenylene dinitrilotetra acetic acid)	2					
N-(2-吡啶甲基)亚氨基二乙酸 (N-(2-Pyridylmethyl)iminodiacetic acid)	4					
[0163] EDDA (乙二亚氨基二乙酸)	4					
乙二亚氨基-2-二丙酸 (Ethylenediiminodi-2-propanoic acid)	2.8					
EDDM (乙二胺二丙二酸)	4.9					
DL-1-甲基乙二胺四乙酸 N,N-二酰胺 (DL-1-Methylethylenedinitrilotetraacetic acid N,N-diamide)	5.1					
DL-1-丁二胺四乙酸 N,N-二酰胺 (DL-1-Ethylethylenedinitrilotetraacetic acid N,N-diamide)	4.9					
(2-羟三甲烯)二胺四乙酸 ((2-Hydroxytrimethylene)dinitrilotetraacetic acid)	5.3					
DL-2-(2-甲硫乙烷)胺乙酸 (DL-2-(2-Methylthioethyl)nitrioloacetic acid)	1.5					
[0164] EDTA (乙二胺四乙酸)	8.8	1.5	2	2.69	6.13	10.4
EGTA (乙二醇二乙醚二胺四乙酸)	5.3	<2	2.7	8.8	9.5	
IDA(亚氨基二乙酸)	2.9	1.8	2.6	9.5		
MIDA (N-甲基亚氨基二乙酸)	3.4	1.4	2.1	9.6		
柠檬酸	3.4	3.1	4.8	6.4		
NTA (次氨基三乙酸)	5.4	1.9	2.5	9.7		

[0165] ${}^1K_{a1} = [HL]/[H^+][L]$, $K_{a2} = [H_2L]/[H^+][HL]$, $K_{a3} = [H_3L]/[H^+][H_2L]$, $K_{a4} = [H_4L]/[H^+][H_3L]$, $K_{a5} = [H_5L]/[H^+][H_4L]$ 。

[0166] ²这些数据从以下文献中汇编而成: IUPAC (Smith and Martell, 1976&2001; 2005IUPAC), 化学纯化和引用 (Pure and Applied Chemistry 77, 1445-1495); 和化学纯化和引用 (Pure Appl. Chem., 1982, Vol. 54, No. 12, pp. 2693-2758)。

[0167] 在一些实施例中, 镁离子与pH敏感螯合剂的复合物的稳定常数的对数在1-9之间 (如, 在2与9之间, 在2与6之间, 在3与6之间)。

[0168] 在一些实施例中, 第一温度在约0°C和30°C之间 (如, 在约10°C和30°C之间, 在约0°C和5°C之间, 在约5°C和10°C之间, 在约10°C和15°C之间, 在约15°C和20°C之间, 在约20°C和25°C之间, 或在约25°C和30°C之间)。在一些实施例中, 第二温度在约30°C和100°C之间 (如, 在约30°C和40°C之间, 在约40°C和50°C之间, 在约50°C和60°C之间, 在约60°C和70°C之间, 在约70°C和80°C之间, 在约80°C和90°C之间, 或在约90°C和100°C之间)。

[0169] 考虑到本发明的内容, 一个普通技术人员能够选择一个或多个温度敏感缓冲液中和一个或多个pH依赖螯合剂配对来提供想要的镁离子数量, 使其在第一温度和第二温度结

合,那样在核苷酸扩增反应中一个或多个酶反应在第一温度时被抑制,在第二温度时被允许。帮助预测结合的镁离子和游离的镁离子浓度的算法,该算法是基于一些如依赖pH的螯合剂的pH值和浓度等因素,如Schoenmakers et al.,1992,Biotechniques,12:870-874和Fujishiro et al.,1995,

[0170] Comput.Biol.Med.,25:61-80)中描述的。这些算法的版本可以从

[0171] www.ru.nl/organphy/chelator/Chelmain.html和maxchelator.stanford.edu中获得。

[0172] 在一些实施例中,螯合剂浓度与镁离子浓度的比值约为0.1至10(如,约0.1至0.5,约0.2至1,约0.5至2,约1至5,或约2至10)。

[0173] 在一些实施例中,第一温度时游离镁离子的浓度在约0至约10mM(如,在约0至0.1mM之间,在约0至0.2mM之间,在约0至0.5mM之间,在约0至1mM之间,在约0至2mM之间,或在约0至5mM之间)。

[0174] 在一些实施例中,处于第二温度时游离的镁离子浓度约为5至50mM之间(如约为5至10mM之间,约为5至20mM之间,约为10至20mM之间,或约为10至50mM之间)。

[0175] 很多等温核苷酸扩增技术是已知的,包括,例如,切口和延伸扩增反应(NEAR),重组聚合酶扩增(RPA),等温和嵌合引物核苷酸扩增(ICAN),转录介导扩增(TMA),依赖核酸序列的扩增(NASBA),RNA介导的信号扩增技术(SMART),链置换扩增(SDA),滚环扩增(RCAT),连接酶扩增反应,环介导等温扩增(LAMP),等温多重置换扩增,解旋酶依赖性扩增(HDA),单引物等温扩增(SPIA),和循环旋酶依赖性扩增(circular helicase-dependent amplification)。聚合酶链反应和它们的变异也可使用。这些非等温反应中通常需要热循环引起的核酸链的分离。等温及非等温扩增方法在下列文献中进行了讨论,例如Gill et al.,Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 200827:224-243;Mukai et al.,2007,J.Biochem.142:273-281;Van Ness et al.,PNAS 2003100:4504-4509;Tan et al.,Anal.Chem.2005,77:7984-7992;Lizard et al.,Nature Biotech.1998,6:1197-1202;Mori et al.,J.Infect.Chemother.200915:62-69;Notomi et al.,NAR 2000,28:e63;和Kurn et al.,Clin.Chem.2005,51:10,1973-1981.其他可以参考的普通扩增技术包括,例如,美国专利号7,112,423;5,455,166;5,712,124;5,744,311;5,916,779;5,556,751;5,733,733;5,834,202;5,354,668;5,591,609;5,614,389;和5,942,391;和美国专利申请公开号US20030082590;US20030138800;US20040058378;US20060154286;US20090081670;and US 20090017453.上述所有文献都被参考引用在本文中。

[0176] 上述的扩增反应一般使用一种或多种酶,这些酶需要二价镁离子作为辅助因子,如DNA聚合酶,限制性内切酶II型(如IIS型或切口内切酶),重组酶(如,RecA,UvsX),逆转录酶,DNA指导的RNA聚合酶,RNA指导的RNA聚合酶,核糖核酸H酶,或DNA连接酶。因此,由于pH依赖螯合剂的作用让镁离子减少时,反应可以被抑制。

[0177] 本发明所提供的扩增反应包括那些在基本为等温条件下发生的反应。本发明也包括那些扩增反应即多核苷酸在与扩增试剂混合物结合前不变性的反应。另外,反应混合物的温度没有在第一温度和第二温度间重复循环,多核苷酸可以被扩增的反应也被包括在内。

[0178] 没有额外试剂加入由多核苷酸与扩增试剂混合物混合形成的最初的反应混合物

中时多核苷酸的扩增可以进行。在一些情况下没有额外的试剂添加到最初的反应混合物中时,扩增的多核苷酸可以被检测。

[0179] NEAR是核苷酸等温扩增方法一个典型案例。NEAR反应使用与链置换DNA聚合酶结合的切口内切酶(也被认为是切口限制性内切酶或切口酶)来扩增短的靶标序列。NEAR方法被公开在如美国专利2009/0017453和US 2009/0081670中,它们都被引用在本文中作为参考文献。

[0180] RPA是核苷酸等温扩增方法的一个典型案例。RPA采用被称为重组酶的酶,该重组酶使寡核苷酸引物与双螺旋DNA中的同源序列配对。以这种方式,DNA合成针对靶双链DNA上的被定义的点。如果存在靶标基因,用两个基因特异引物,启动指数式扩增反应。反应进展快速并且特异扩增的结果导致仅少数靶标拷贝到可检测水平。RPA方法被公开在美国专利如7,270,981,7,399,590,7,777,958,7,435,561,2009/0029421和WO 2010/141940,上述所有专利都被引用在此作为参考文献。

[0181] 等温扩增反应的组分可以以溶液状态和/或干燥的形式(如冻干的)被提供。当一种或多种组分以干燥形式被提供时,重悬浮或重新溶解的缓冲液(如温度敏感缓冲液)也需要被提供。

[0182] 基于扩增反应的特殊类型,反应混合物可以包括缓冲液(如温度敏感缓冲液),盐,核苷酸和其他反应进行所必须的组分。

[0183] 镁可以以盐的形式被提供,例如硫酸镁和氯化镁。镁,例如以盐的形式,也可以用溶液和/或以干燥的形式(如冻干)被提供。当其被一种缓冲液重新溶时,冻干的镁盐解离形成游离的镁离子(Mg^{++}),其能够作为酶的辅助因子。

[0184] 在一些实施例中,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或基本上所有的二价离子,例如镁离子,在反应混合物中都是溶解状态的。可溶的二价离子可以是游离的或与pH敏感螯合剂可逆结合的。

[0185] 这是已知的,即溶解状态的二价离子,例如溶解状态的镁离子,加入酸后到溶液中,例如磷酸,可以像固体一样沉淀。在室温中,这个沉淀反应一般用来“热启动”PCR来隔绝PCR所需的镁离子。当在PCR的启动步骤中,基于让温度升高到95°C或更高,镁沉淀被溶解,游离的镁离子作为酶的辅助因子。

[0186] 在本发明的任意组分和方法中,溶解状态的二价离子(如镁离子)不能来自沉淀的重新溶解,例如那些在酸性条件下形成的镁离子的沉淀。在本发明的任意组分和方法中,反应混合物不包括以沉淀形式被结合的二价离子。在进一步的实施例中,在多核苷酸扩增之前,少于20%,少于15%,少于10%,少于5%,少于1%,或基本上没有二价离子形成沉淀。为了本发明的目的,以干燥或冻干形式提供的试剂混合物的组分不是沉淀,并且冻干形式不是沉淀的形式,例如以冻干形式提供的镁盐。

[0187] 靶标核苷酸可以是哺乳动物(如人类)、植物、真菌(如酵母)、原生动物、细菌或病毒中存在的一种核苷酸。例如靶标核苷酸可以存在于目的组织(如在染色体上)中的基因组中或在染色体外的核苷酸上。在一些实施例中,靶标核苷酸是一种RNA,如mRNA。在一些实施例中,靶标核苷酸是一种DNA(如双链DNA)。特别的实施例中,靶标核苷酸是目的的组织特异的,例如靶标核苷酸在其他组织中没有发现或在类似目的组织中没有发现。

[0188] 靶标核苷酸可以存在于细菌中,如格兰仕阳性或格兰仕阴性细菌。细菌种类的非

限制性实例包括不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 菌株 ATCC 5459, 醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 绿色气球菌 (*Aerococcus viridans*), 脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*), 百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*), 副百日咳杆菌 (*Bordetella parapertussis*), 空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*), 艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*), 产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*), 棒状杆菌属 (*Corynebacterium* spp.), 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*), 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*), 弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*), 产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*), 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*), 乳酸肠杆菌 (*Enterobacter faecalis*) (如, ATCC 29212), 大肠杆菌 (*Escherichia coli* 如 ATCC 25927), 阴道加德菌 (*Gardnerella vaginalis*), 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*), 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae* 如 ATCC 49247), 克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila* (如 ATCC 33495)), 李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* (如 ATCC 7648)), 微球菌属 (*Micrococcus* sp. 菌株 ATCC 14396), 卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*), 堪萨斯分支杆菌 (*Mycobacterium kansasii*), 戈氏分支杆菌 (*Mycobacterium goodii*), 偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*), 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*), 人型支原体 (*Mycoplasma hominis*), 脑膜炎 (*Neisseria meningitidis* (如 ATCC 6250)), 淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 尿道寡养杆菌 (*Oligella urethralis*), 多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*), 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa* (如 ATCC 10145)), 痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*), 奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*), 普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*), 沙门氏菌属 (*Salmonella* sp. 菌株 ATCC 31194), 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*), 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* (如 ATCC 8101)), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* (如 ATCC 25923)), 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis* (如 ATCC 12228)), 路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*), 腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae* (如 ATCC 49619)), 化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*), 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae* (如 ATCC 13813)), 苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*), 草绿色链球菌 (*Viridans group streptococci*) (如 ATCC 10556), 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*), 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 蜃楼弗兰西斯菌 (*Francisella philomiragia*) (GA01-2810), 土拉弗朗西斯菌 (LVSB) (*Francisella tularensis* (LVSB)), 假结核耶尔森菌 (PB1/+) (*Yersinia pseudotuberculosis* (PB1/+)), 小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 血清型 (*Yersinia enterocolitica*, 0:9 serotype), 以及鼠疫杆菌 (P14-) (*Yersinia pestis* (P14-))。

[0189] 在一些实施例中, 靶标核苷酸存在于下列细菌种属: 不动杆菌 (*Acinetobacter*), 气球菌属 (*Aerococcus*), 拟杆菌属 (*Bacteroides*), 博代氏杆菌属 (*Bordetella*), 弯曲杆菌 (*Campylobacter*), 梭菌 (*Clostridium*), 棒状杆菌 (*Corynebacterium*), *Chlamydia*, 柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*), 肠杆菌 (*Enterobacter*), 肠球菌 (*Enterococcus*), *Escherichia*, 螺杆菌 (*Helicobacter*), 嗜血杆菌 (*Haemophilus*), 克雷伯氏菌 (*Klebsiella*), 军团菌 (*Legionella*), 李斯特菌 (*Listeria*), 微球菌 (*Micrococcus*), 莫比氏菌 (*Mobilicoccus*), 莫拉氏菌 (*Moraxella*), 分枝杆菌 (*Mycobacterium*), 支原体 (*Mycoplasma*), 奈瑟菌 (*Neisseria*),

巴氏杆菌 (*Oligella*), 巴斯德菌 (*Pasteurella*), 普氏菌 (*Prevotella*), 卟啉单胞菌属 (*Porphyromonas*), 假单胞菌 (*Pseudomonas*), 丙酸菌 (*Propionibacterium*), 变形杆菌 (*Proteus*), 沙门氏菌 (*Salmonella*), 沙雷氏菌 (*Serratia*), 葡萄球菌 (*Staphylococcus*), 链球菌 (*Streptococcus*), 密螺旋体 (*Treponema*), 芽孢杆菌 (*Bacillus*), 弗朗西斯氏菌 (*Francisella*), 或耶尔森菌 (*Yersinia*)。在一些实施例中, 靶标核苷酸在A型链球菌或B型链球菌中被发现。

[0190] 衣原体靶标核苷酸的实例包括在衣原体隐蔽性质粒中发现的序列。

[0191] 肺结核靶标核苷酸的实例包括在IS6110 (参见US 5,731,150) 和/或IS1081 (参见, 如Bahador et al., 2005, Res. J. Agr. Biol. Sci., 1:142-145) 中发现的序列。

[0192] 淋病靶标核苷酸的实例包括在NG00469 (参见, 如Piekarowicz et al., 2007, BMC Microbiol., 7:66) 和NG00470中发现的序列。

[0193] A型链球菌的靶标核苷酸的实例包括在Spy1258 (参见如Liu et al., 2005, Res. Microbiol., 156:564-567), Spy0193, *lytA*, *psaA*, 和 *ply* (参见, 美国专利申请第2010/0234245) 中发现的序列。

[0194] B型链球菌的靶标核苷酸的实例包括在 *cfb* 基因 (参见如Podbielski et al., 1994, Med. Microbiol. Immunol., 183:239-256) 中发现的序列。

[0195] 在一些实施例中, 靶标核苷酸是病毒核苷酸。例如病毒核苷酸可以在人类的免疫缺损病毒 (HIV)、流感病毒 (如甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒) 或登革病毒中发现。HIV靶标核苷酸的典型的实例包括在 *Po1* 区域发现的序列。

[0196] 在一些实施例中, 靶标核苷酸是原生动物的核苷酸。例如, 原生动物的核苷酸可以在 *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba* spp., *Toxoplasma* spp., *Trichomonas vaginalis*, 和 *Giardia duodenalis* 中发现。

[0197] 在一些实施例中, 靶标核苷酸是哺乳动物 (如人类) 的核苷酸。例如, 哺乳动物的核苷酸可以在循环肿瘤细胞、上皮细胞或纤维细胞中发现。

[0198] 在一些实施例中, 靶标核苷酸是真菌 (如酵母) 核苷酸。例如, 真菌核苷酸可以在假丝酵母 (如白色念珠菌) 中发现。

[0199] 在本发明的任意部分以及实施例中扩增产物的检测一般包括标记探针的使用, 这些探针与靶标核苷酸对应的扩增产物充分互补杂交。因此扩增产物的存在、存在数量和/或识别可以通过与扩增产物互补的标记探针的杂交被检测到, 例如荧光标记探针。在一些实施例中, 目的靶标核苷酸序列的检测包括等温扩增方法和标记探针的混合使用, 那样产物可以被实时测量。在另一个实施例中, 被扩增的目的靶标核苷酸序列的检测包括把扩增的靶标核苷酸转移到固体支持物上, 例如膜, 用探针探测膜, 例如与扩增的靶标核苷酸序列互补标记探针。在另一个实施例中, 扩增目的靶标核苷酸序列的检测包括探针与标记扩增靶标核苷酸的杂交, 探针被排列在预定的可寻址位置的列阵中, 并与扩增的靶标核苷酸互补。

[0200] 一般, 一种或多种引物被用于扩增反应。靶标核苷酸的扩增包括使靶标核苷酸与一种或多种引物接触, 这些引物能与靶标核苷酸杂交并指导它们的扩增。在一些实施例中, 样品与一对引物接触, 这对引物包括同时与靶标核苷酸杂交的正向和反向引物。

[0201] 实时扩增检测在反应过程中发出的荧光作为扩增子产生的指示器对于于末端检

测。反应的实时进程可以在一些系统中进行查看。一般,实时方法包括荧光报告基因的检测。一般,荧光报告基因信号与反应中扩增产物的数量增加呈正比。通过记录每一个循环发射出的荧光数量,检测指数期的扩增反应就成为可能,在这个指数期过程中扩增产物数量的第一次显著增加对应于最初的靶标模板数量。靶标核苷酸初始拷贝数量越高,荧光的显著增长越快被观察到。

[0202] 在一些实施例中,荧光标记探针依赖于荧光能量共振的转移(FRET),或样品的荧光发射波长的改变,作为一种实时检测DNA标记与扩增的靶标核苷酸杂交的方法。例如,发生在不同探针的荧光标记(例如,使用HybProbes)间或同一探针的荧光和非荧光淬灭剂间(如使用分子信标或TAQMAN®探针)的FRET能识别与目的DNA序列特异杂交的探针,并且以这种方式检测在样品中存在和/或存在的靶标核苷酸数量。

[0203] 在一些实施例中,被用于识别扩增产物的荧光标记的DNA探针具有独特的发射波长,着使得他们在同样的反应管中被区分出来,例如在多重反应中。例如,多重反应允许两种或多种靶标核苷酸的扩增产物的同步检测,例如对照核苷酸。

[0204] 在一些实施例中,靶标核苷酸特异的探针是被标记成可检测的,或者用同位素或非同位素标记;在可选择的实施例中,扩增的靶标核苷酸被标记。探针可以作为靶标核苷酸种类的指示剂被检测,如靶标核苷酸种类的扩增产物。非同位素标记可以,例如,包含一种荧光或发光基因,或一种酶,辅助因子,酶底物,或半抗原。探针可以与RNA,DNA或这两者的混合物的单链或双链的制备物,一起孵育,并杂交确定。在一些样品中,杂交导致检测的信号改变,例如信号增强或减弱,例如由于标记的探针。因此杂交检测包括相比于杂交前,标记探针的信号在杂交过程中或之后的信号的变化。

[0205] 在一些实施例中,扩增产物可以用流动试纸条检测。在一些实施例中,一种可检测标记产生颜色并且第二种标记是由免疫抗体或抗体片段识别的抗原表位。同时含有两种标记的产物将会依附到免疫抗体上并产生在免疫抗体的位置产生颜色。基于这种检测方法的测定可以是,例如,被用于全等温扩增反应的流动试纸条(拭子)。阳性扩增会在流动试纸条上产生一条带作为靶标核苷酸扩增的指示剂,阴性扩增不产生任何颜色条带。

[0206] 在一些实施例中,靶标核苷酸的数量(如拷贝数)可以用这里描述的方法大概的定量。例如已知数量的靶标核苷酸可以在平行反应中被扩增,比较从样品中获得扩增产物的数量与从平行反应中获得的扩增产品的数量。在一些实施例中,寄主已知数量的靶标核苷酸可以用多个平行反应扩增,比较从样品中获得的扩展产物的数量与从平行反应中获得的扩增反物的数量。假设样品中靶标核苷酸对于反应组分是同样有效的,与平行反应中的靶标核苷酸一样,那么样品中靶标核苷酸的数量可以用这些方法被大概的定量。

[0207] 本发明公开的方法中所用的反应组分可以以试剂盒的形式在靶标核苷酸的检测中被提供。在这样的试剂盒中一个或多个适当数量的反应组分被提供在一个或多个容器或保持在基质上(如通过静电作用或共价键)。靶标核苷酸特异的核苷酸探针和/或引物也可以被提供。反应组分,核苷酸探针,和/或引物可以被悬浮在水溶液或作为冷冻干燥的或冻干的粉末,小球,或珠子。这里提供的含有这些组分等的容器(一些容器)可以是任何适宜的能够保持那些供给形式的容器,例如,微离心管,安瓶,瓶子或积分检测装置,例如流体装置,盒式,横向流动或其他类似的装置。试剂盒可以包括被标记的或未标记的核苷酸探针用于检测靶标核苷酸。在一些实施例中,试剂盒可以进一步包括一些仪器用于这里所述的任

何方法中的组分,如应用没有核苷酸提取和/或纯化的粗基质。

[0208] 在一些应用中,一种或多种反应组分可以被放置在预量过的单独使用的单个管子或等量的容器中,一般是一次性的。有了这样的准备,用于测量靶标核苷酸存在的待测样品被加入单个管子中并直接进行扩增。

[0209] 试剂盒提供的组分数量可以是任何适宜的数量,并且取决于产物针对的靶标量。用于确定合适数量的通用指南可以在,例如Joseph Sambrook和David W.Russell的分子克隆中找到(Joseph Sambrook and David W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;and Frederick M.Ausubel,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,2003)。

[0210] 实施例子

[0211] 实例1.具有EGTA的扩增反应

[0212] NEAR扩增在热启动条件下进行,具有或不具有pH依赖螯合剂EGT。测定被设定用0至100个拷贝的纯化的流行感冒A病毒RNA和150nM正向模板,250nM反向模板,和200nM分子信标探针。模板序列和分子信标探针如下所示:正向模板,5' -

[0213] AGACTCCACACGGAGTCTACTGACAGCCAGACA-3' (SEQ ID NO:1);反向模板,

[0214] 5' -AGACTCCATATGGAGTCTTGATGGCCATCCGAA' (SEQ ID NO:2);和分子信标探针,

[0215] 5' -6-Fam-CTGGTAGCCAGGCAGCGACCAG-BHQ1-3' (SEQ ID NO:3)。反应在下列条件下进行:100mM Tris-Cl (pH7.9,在20°C时),15mM Na₂SO₄,15mM (NH₄)₂SO₄,15mM MgSO₄,14mM EGTA,1mM DTT,0.1%Triton X-100,0.3mM of each dNTP,19.2U Bst DNA聚合酶,和15U Nt.BstNBI切口酶。检测组分在室温混合并在室温保持约20分钟,然后反应被置于56°C。反应应用实时荧光监测10分钟,扩增仅在同时包括EGTA和100个病毒RNA拷贝的反应中被观察到(图1)。

[0216] 这个实施例证明,在扩增反应中包括温度敏感缓冲液和pH依赖螯合剂能促进在热启动条件下的扩增。

[0217] 实例2.具有EGTA和冻干组分的扩增

[0218] NEAR反应在热启动条件下用冻干组分完成。50μL含有50mM Tris-HCl (pH7.75at 20°C),15mM (NH₄)₂SO₄,15mM MgSO₄,和15mM EGTA的重新溶解的缓冲液加入冻干反应物小球。重新溶解后,50μL溶液中来自冻干小球的组分包括50nM正向模板,750nM反向模板,300nM分子信标探针,50mM海藻糖,225mM甘露醇,50mM Tris-HCl (pH8.5,20°C时),1mM DTT,5mM Na₂SO₄,0.1%Triton X-100,0.3mM每一种dNTP,0.2X SYBR Green I,120U鲑鱼DNA聚合酶,和15U Nt.BstNBI切口酶。模板序列和分子信标探针如下所述、正向模板,

[0219] 5' -CGACTCCATATGGAGTCTCGTCAGACCCAAAA-3' (SEQ ID NO:4),反向模板,

[0220] 5' -TGACTCCATATGGAGTCTCATCTTTCCGTCCCC-3' (SEQ ID NO:5),和分子信标,

[0221] 5' -Rox-TCGGGGCAGACCCAAAACCCCGA-BHQ2-3' (SEQ ID NO:6)。用来自Mycobacterium bovis BCG (ATCC菌株190115)的20至200个拷贝的基因组DNA进行扩增反应。混合物在室温下放置15分钟。室温孵育后,反应被移到56°C,用实时荧光检测反应40分钟。当反应中存在EGTA时,相比没有模板的对照反应,用20至200个模板DNA的反应中可以观察到明显的扩增,(图2)。

[0222] 这个实施例证明,在热启动条件下,扩增反应中包括温度敏感缓冲液和pH依赖螯

合剂扩增反应被允许进行。

[0223] 其他实施例

[0224] 本发明已经描述了一些实施例。然而,可以理解很多变化可以在不违背本发明的精髓和权利要求范围下进行。同样,其他的实施方式位于如下权利要求的范围内。

[0001] Sequence list
 [0002] <110> 艾奥尼安技术公司
 [0003] <120> 核苷酸扩增反应
 [0004] <150> 61/657,227
 [0005] <151> 2012-06-08
 [0006] <150> 61/782,199
 [0007] <151> 2013-03-14
 [0008] Sequence
 [0009] -----
 [0010] <213> OrganismName : Artificial
 [0011] <400> PreSequenceString :
 [0012] agactccaca cggagtctac tgacagccag aca 33
 [0013] <212> Type : DNA
 [0014] <211> Length : 33
 [0015] SequenceName : 1
 [0016] SequenceDescription :
 [0017] Sequence
 [0018] -----
 [0019] <213> OrganismName : Artificial
 [0020] <400> PreSequenceString :
 [0021] agactccata tggagtcttg atggccatcc gaa 33
 [0022] <212> Type : DNA
 [0023] <211> Length : 33
 [0024] SequenceName : 2
 [0025] SequenceDescription :
 [0026] Sequence
 [0027] -----
 [0028] <213> OrganismName : Artificial
 [0029] <400> PreSequenceString :
 [0030] ctggtagcca ggcagcgacc agbh 24
 [0031] <212> Type : DNA
 [0032] <211> Length : 24
 [0033] SequenceName : 3
 [0034] SequenceDescription :
 [0035] Sequence
 [0036] -----
 [0037] <213> OrganismName : Artificial
 [0038] <400> PreSequenceString :

[0039]	cgactccata tggagtcctc gtcagaccca aaa	33
[0040]	<212> Type : DNA	
[0041]	<211> Length : 33	
[0042]	SequenceName : 4	
[0043]	SequenceDescription :	
[0044]	Sequence	
[0045]	-----	
[0046]	<213> OrganismName : Artificial	
[0047]	<400> PreSequenceString :	
[0048]	tgactccata tggagtctca tctttccgtc ccc	33
[0049]	<212> Type : DNA	
[0050]	<211> Length : 33	
[0051]	SequenceName : 5	
[0052]	SequenceDescription :	
[0053]	Sequence	
[0054]	-----	
[0055]	<213> OrganismName : Artificial	
[0056]	<400> PreSequenceString :	
[0057]	tcggggcaga cccaaaaccc cga	23
[0058]	<212> Type : DNA	
[0059]	<211> Length : 23	
[0060]	SequenceName : 6	
[0061]	SequenceDescription :	

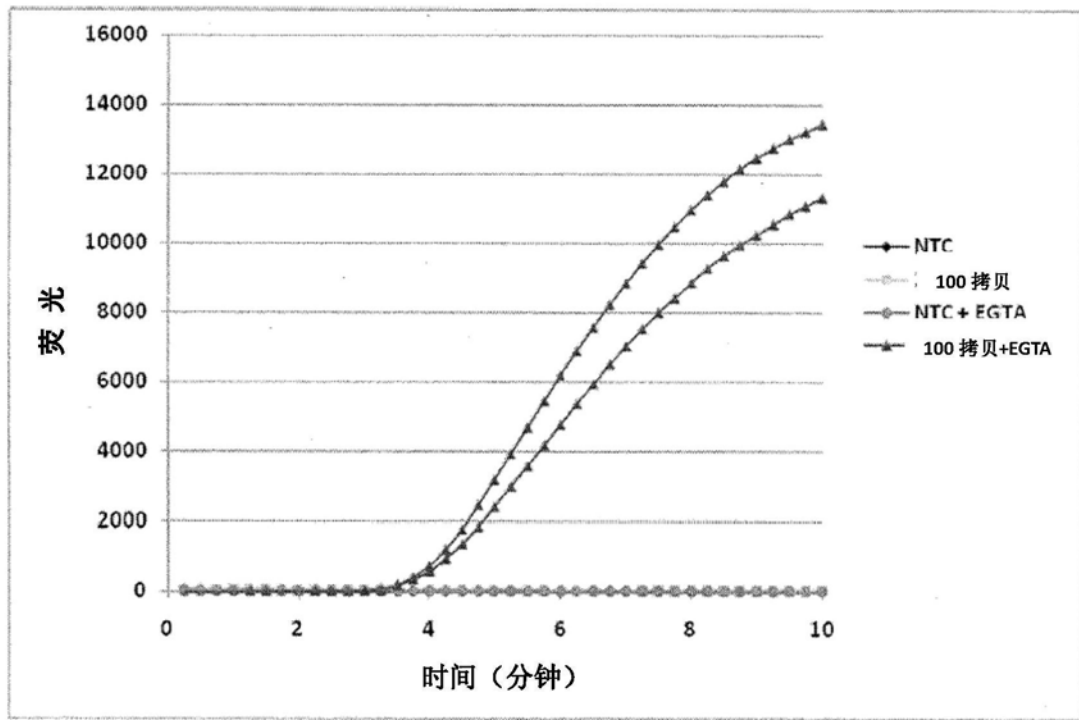


图1

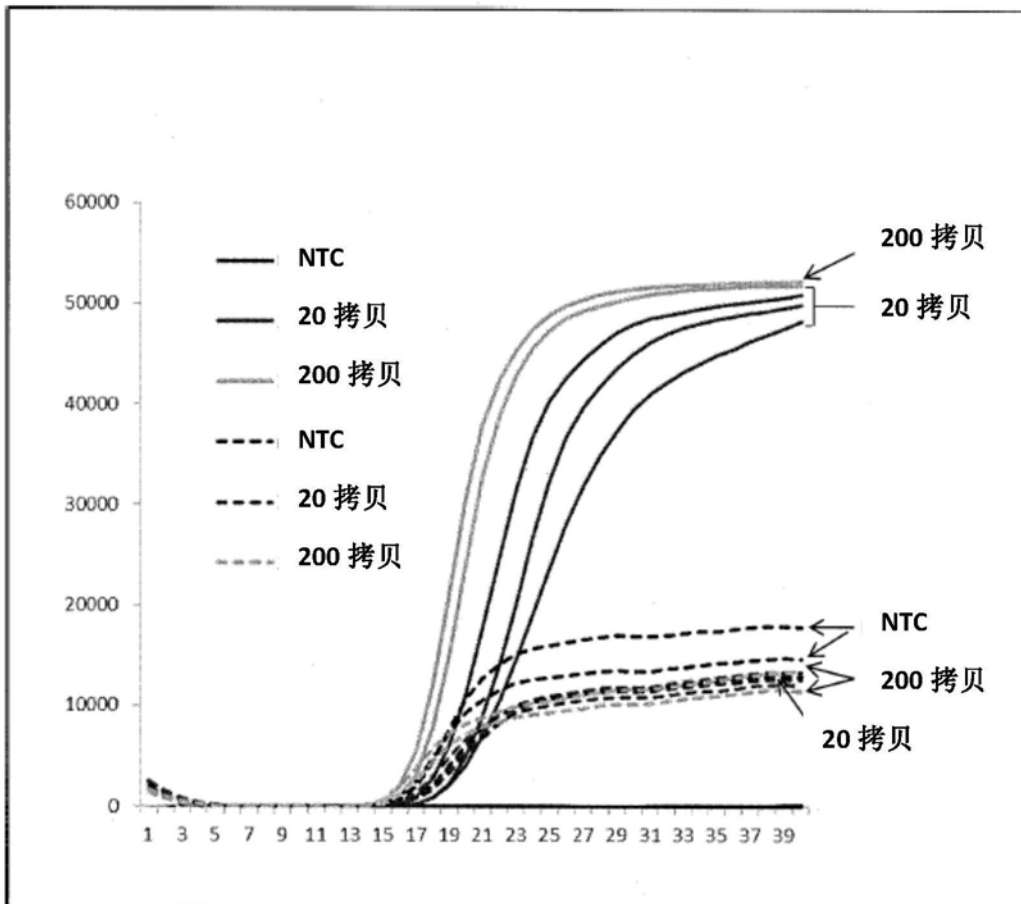


图2