



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118786224 A

(43) 申请公布日 2024.10.15

(21) 申请号 202380021560.2

(22) 申请日 2023.02.13

(30) 优先权数据

63/309,827 2022.02.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/062485 2023.02.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/154920 EN 2023.08.17

(71) 申请人 贝克顿迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 G·A·理查特

雪莉·布赖斯·图拉

伊扬·玛丽·泰勒 张红华

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 武晶晶

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6844 (2006.01)

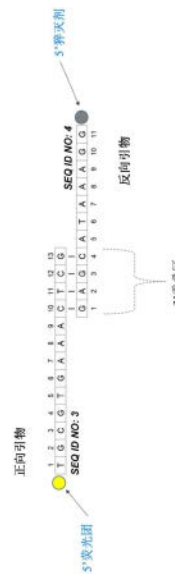
权利要求书5页 说明书32页
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

用于核酸扩增的内部对照

(57) 摘要

本文公开的内容包括适合用于在监测扩增反应中使用的方法、试剂盒和反应混合物。一些实施方案提供了能够彼此杂交并且各自包含可猝灭标记或猝灭剂的第一质量控制引物和第二质量控制引物。



1. 一种用于监测扩增反应的方法,包括:

(a) 提供第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;

(b) 使所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物接触,从而经由所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成双链体;

(c) 使所述双链体经历扩增条件,从而产生延伸的双链体;和

(d) 在所述扩增反应期间检测从所述第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号以确定所述延伸的双链体的产生,其中在所述扩增反应期间所述信号的降低指示所述延伸的双链体的产生。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述可猝灭标记是荧光团。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的3' 重叠区之外。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的5' 末端处。

5. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的3' 重叠区中。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述第二质量控制引物包含猝灭剂。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的3' 重叠区之外。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的5' 末端处。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的3' 重叠区中。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物、所述第二质量控制引物或两者包含一个或更多个修饰的核苷酸。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3' 重叠区的每一个包含一个或更多个修饰的核苷酸。

12. 根据权利要求10-11中任一项所述的方法,其中所述一个或更多个修饰的核苷酸包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2' -O-甲基化核苷酸及其任何组合。

13. 根据权利要求10-12中任一项所述的方法,其中所述一个或更多个修饰的核苷酸中的至少一个是2' -O-甲基化核苷酸。

14. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物、所述第二质量控制引物或两者包含一个或更多个聚合酶终止子。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3' 重叠区的每一个包含一个或更多个聚合酶终止子。

16. 根据权利要求14-15中任一项所述的方法,其中所述一个或更多个聚合酶终止子中的至少一个是2' -O-甲基化核苷酸。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区与所述第二质量控制引物的3'重叠区互补。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区与所述第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区和所述第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区和所述第二质量控制引物的3'重叠区中的一个或更多的长度是约2个至约10个核苷酸。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3'重叠区的长度是4个或5个核苷酸。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中(b)使所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物接触在所述扩增条件下进行。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中(d)在所述扩增反应期间检测从所述第一质量控制引物的所述可猝灭标记产生的所述信号包括在所述扩增反应期间在两个或更多个不同时间点检测所述信号。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中在所述扩增反应期间所述信号的降低包括在所述扩增反应期间随时间推移的降低。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中在所述扩增反应期间所述信号的降低包括在所述扩增反应期间在约10分钟的时间段内的降低。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述时间段在从所述扩增反应开始起约3分钟至约12分钟之间。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,包括在所述扩增反应之前、在所述扩增反应之后或两者检测所述第一质量控制引物的所述可猝灭标记的所述信号。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述扩增反应是实时扩增反应。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述扩增反应是PCR反应。

30. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述扩增反应包括以下中的一种或更多种:古细菌聚合酶扩增(APA)、环介导的等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、链置换扩增(SDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、转录介导的扩增(TMA)、切口酶扩增反应(NEAR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、分支扩增(RAM)、环状解旋酶依赖性扩增(cHDA)、单引物等温扩增(SPIA)、信号介导的RNA扩增技术(SMART)、自持序列复制(3SR)、基因组指数扩增反应(GEAR)和等温多重置换扩增(IMDA)。

31. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述扩增反应是等温扩增反应。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述扩增条件包括具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列,并且任选地所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

34. 根据权利要求31-33中任一项所述的方法,其中所述等温扩增反应包括约30°C至约72°C的恒定温度,并且任选地所述等温扩增反应包括约67°C的恒定温度。

35. 根据权利要求31-34中任一项所述的方法,其中所述等温扩增反应进行持续约5分钟至约60分钟的时间段。

36. 根据权利要求31-35中任一项所述的方法,其中所述等温扩增反应在无解旋酶、无单链结合蛋白、无裂解剂和无重组酶的等温扩增条件下进行。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法,其中检测从所述第一质量控制引物的所述可猝灭标记产生的所述信号不包括使用任何探针。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的方法,其中(c)使所述双链体经历所述扩增条件包括使靶核酸和对所述靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针经历所述扩增条件。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述第一质量控制引物在所述扩增条件下不与所述靶核酸杂交。

40. 根据权利要求38-39中任一项所述的方法,其中所述第二质量控制引物在所述扩增条件下不与所述靶核酸杂交。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述方法不包括使用能够与所述第一质量控制引物杂交的任何模板核酸。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述方法不包括使用能够与所述第二质量控制引物杂交的任何模板核酸。

43. 一种用于监测扩增反应的试剂盒,包括:

第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记。

44. 根据权利要求43所述的试剂盒,其中所述可猝灭标记是荧光团。

45. 根据权利要求43-44中任一项所述的试剂盒,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的3'重叠区之外。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的5'末端处。

47. 根据权利要求43-44中任一项所述的试剂盒,其中所述可猝灭标记位于所述第一质量控制引物的3'重叠区中。

48. 根据权利要求43-47中任一项所述的试剂盒,其中所述第二质量控制引物包含猝灭剂。

49. 根据权利要求48所述的试剂盒,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的3'重叠区之外。

50. 根据权利要求49所述的试剂盒,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的5'末端处。

51. 根据权利要求48所述的试剂盒,其中所述猝灭剂位于所述第二质量控制引物的3'重叠区中。

52. 根据权利要求43-51中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物、所述第二质量控制引物或两者包含一个或多个修饰的核苷酸。

53. 根据权利要求52所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3'重叠区的每一个包含一个或更多个修饰的核苷酸。

54. 根据权利要求52-53中任一项所述的试剂盒,其中所述一个或更多个修饰的核苷酸包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2'-O-甲基化核苷酸及其任何组合。

55. 根据权利要求43-51中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物、所述第二质量控制引物或两者包含一个或更多个聚合酶终止子。

56. 根据权利要求55所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3'重叠区的每一个包含一个或更多个聚合酶终止子。

57. 根据权利要求55-56中任一项所述的试剂盒,其中所述一个或更多个聚合酶终止子中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。

58. 根据权利要求43-57中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区与所述第二质量控制引物的3'重叠区互补。

59. 根据权利要求58所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区与所述第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。

60. 根据权利要求43-59中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区和所述第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。

61. 根据权利要求43-60中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物的3'重叠区和所述第二质量控制引物的3'重叠区中的一个或更多个的长度是约2个至约10个核苷酸。

62. 根据权利要求43-61中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的3'重叠区的长度是4个或5个核苷酸。

63. 根据权利要求43-62中任一项所述的试剂盒,包括具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。

64. 根据权利要求63所述的试剂盒,其中所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列,任选地所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

65. 根据权利要求43-64中任一项所述的试剂盒,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物呈冻干或冷冻干燥形式。

66. 根据权利要求63-65中任一项所述的试剂盒,其中具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种呈冻干或冷冻干燥形式。

67. 根据权利要求43-66中任一项所述的试剂盒,还包括对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

68. 一种反应混合物,包含:

第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;

靶核酸;和

对所述靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

69. 根据权利要求68所述的反应混合物, 包含通过所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成的双链体。

70. 根据权利要求68-69中任一项所述的反应混合物, 包含具有聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种; 并且任选地, 所述酶是具有超嗜热生物聚合酶活性的酶。

71. 根据权利要求70所述的反应混合物, 其中所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列, 并且任选地所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

72. 根据权利要求68-71中任一项所述的反应混合物, 其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物不能与所述靶核酸杂交。

73. 根据权利要求68-72中任一项所述的反应混合物, 其中所述一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针不能与所述第一质量控制引物、所述第二质量控制引物或两者杂交。

用于核酸扩增的内部对照

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2022年2月14日提交的美国临时专利申请序号63/309,827的权益,该相关申请的内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0003] 对序列表的引用

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表被提供为题号为68EB-317346-WO,创建于2023年2月13日,大小是8.0千字节的文件。电子格式的序列表的信息通过引用以其整体并入本文。

[0005] 背景

[0006] 领域

[0007] 本公开内容总体上涉及分子生物学。更具体地,本文公开的内容包括用于监测核酸扩增的方法和组合物。

[0008] 对相关技术的描述

[0009] 在核酸扩增测定中,内部对照(“IC”)采用了两种主要策略:竞争性和非竞争性内部对照方法。两种策略之间的主要差异在于内部对照组分是否共用一组共同引物用于内部对照和靶扩增。

[0010] 使用竞争性IC策略,靶与IC之间总是存在一些竞争,其中侧翼为相同引物的靶和IC片段同时扩增。IC扩增的竞争可以降低靶扩增效率,并且从而导致较低检测限。因此,竞争性IC方法需要对IC进行更多优化以实现灵敏的检测限。在非竞争性方法中,靶和IC各自使用不同的引物组扩增。虽然每个反应的动力学不受引物竞争的影响,但IC扩增必须受到IC特异性引物和/或IC模板的受控浓度的限制,以限制靶与IC反应之间对引物和DNA聚合酶的竞争。因此,必须仔细考虑IC的核苷酸组成、拷贝数和尺寸。

[0011] 对于克服当前竞争性和非竞争性IC方法中靶扩增的竞争所带来的挑战并降低对核酸扩增进行质量控制的复杂性存在需求。

[0012] 概述

[0013] 本文公开的内容包括用于监测扩增反应的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a)提供第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;(b)使所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物接触,从而经由所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成双链体;(c)使所述双链体经历扩增条件,从而产生延伸的双链体;和(d)在扩增反应期间检测从所述第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号以确定所述延伸的双链体的产生,其中在所述扩增反应期间所述信号的降低指示所述延伸的双链体的产生。

[0014] 可猝灭标记可以是荧光团。可猝灭物(quencher)在质量控制引物上的位置可以变化。在一些实施方案中,可猝灭标记位于第一质量控制引物的3'重叠区之外。在一些实施方案中,可猝灭标记位于第一质量控制引物的5'末端处。在一些实施方案中,可猝灭标记位

于第一质量控制引物的3'重叠区中。

[0015] 第二质量控制引物可以包含猝灭剂。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的3'重叠区之外。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的5'末端处。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的3'重叠区中。在一些实施方案中,第二质量控制引物不包含猝灭剂。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物均不包含猝灭剂。

[0016] 第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。例如,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,一个或更多个修饰的核苷酸包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2'-O-甲基化核苷酸及其任何组合。在一些实施方案中,一个或更多个修饰的核苷酸中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,一个或更多个聚合酶终止子中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。

[0017] 第一质量控制引物的3'重叠区可以与第二质量控制引物的3'重叠区互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区与第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区、第二质量控制引物的3'重叠区或两者的长度是约2个至约10个核苷酸,例如长度是4个或5个核苷酸。

[0018] 在一些实施方案中,(b)使第一质量控制引物和第二质量控制引物接触在扩增条件下进行。在一些实施方案中,(d)在扩增反应期间检测从第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号包括在扩增反应期间在两个或更多个不同时间点检测信号。在一些实施方案中,在扩增反应期间信号的降低包括在扩增反应期间随时间推移的降低。在一些实施方案中,在扩增反应期间信号的降低包括在扩增反应期间在约10分钟的时间段内的降低。在一些实施方案中,时间段在从扩增反应开始起约3分钟至约12分钟之间。该方法可以包括在扩增反应之前、扩增反应之后或两者检测第一质量控制引物的可猝灭标记的信号。

[0019] 扩增反应可以是例如实时扩增反应,包括PCR反应。在一些实施方案中,扩增反应包括以下中的一种或更多种:古细菌聚合酶扩增(APA)、环介导的等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、链置换扩增(SDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、转录介导的扩增(TMA)、切口酶扩增反应(NEAR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、分支扩增(RAM)、环状解旋酶依赖性扩增(cHDA)、单引物等温扩增(SPIA)、信号介导的RNA扩增技术(SMART)、自持序列复制(3SR)、基因组指数扩增反应(GEAR)和等温多重置换扩增(IMDA)。扩增反应可以是例如等温扩增反应。在一些实施方案中,扩增条件包括具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同或至少约95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0020] 等温扩增反应可以包括约30°C至约72°C的恒定温度,包括但不限于约67°C的恒定温度。等温扩增反应可以进行例如约5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20

分钟、30分钟、40分钟、50分钟或60分钟的时间段。在一些实施方案中,等温扩增反应在无解旋酶、无单链结合蛋白、无裂解剂和无重组酶的等温扩增条件下进行。

[0021] 在一些实施方案中,检测从第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号不包括使用任何探针。在一些实施方案中,(c)使双链体经历扩增条件包括使靶核酸和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针经历扩增条件。在一些实施方案中,第一质量控制引物在扩增条件下不与靶核酸杂交。在一些实施方案中,第二质量控制引物在扩增条件下不与靶核酸杂交。在一些实施方案中,该方法不包括使用能够与第一质量控制引物杂交的任何模板核酸。在一些实施方案中,该方法不包括使用能够与第二质量控制引物杂交的任何模板核酸。

[0022] 本文公开的内容包括用于监测扩增反应的试剂盒。例如,试剂盒可以包括:第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记。

[0023] 可猝灭标记可以是荧光团。在一些实施方案中,可猝灭标记位于第一质量控制引物的3'重叠区之外。在一些实施方案中,可猝灭标记位于第一质量控制引物的5'末端处。在一些实施方案中,可猝灭标记位于第一质量控制引物的3'重叠区中。在一些实施方案中,第二质量控制引物包含猝灭剂。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的3'重叠区之外。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的5'末端处。在一些实施方案中,猝灭剂位于第二质量控制引物的3'重叠区中。

[0024] 在一些实施方案中,第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者包含一个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个包含一个或更多个修饰的核苷酸。在一些实施方案中,一个或更多个修饰的核苷酸包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2'-O-甲基化核苷酸及其任何组合。在一些实施方案中,一个或更多个修饰的核苷酸中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,一个或更多个聚合酶终止子中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。

[0025] 在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区与第二质量控制引物的3'重叠区互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区与第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区中的一个或更多个的长度是约2个至约10个核苷酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的长度是4个或5个核苷酸。

[0026] 试剂盒可以包括具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同或至少约95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物呈冻干

(lyophilized) 或冷冻干燥 (freeze-dried) 形式。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种呈冻干或冷冻干燥形式。试剂盒可以包括对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

[0028] 本文公开的内容包括反应混合物。在一些实施方案中,反应混合物包含:第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;靶核酸;和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

[0029] 反应混合物可以包含通过第一质量控制引物与第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成的双链体。反应混合物可以包含具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,第一质量控制引物不能与靶核酸杂交。在一些实施方案中,第二质量控制引物不能与靶核酸杂交。在一些实施方案中,一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针不能与第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者杂交。

[0031] 附图简述

[0032] 图1是本文公开的由正向IC引物(在5' 末端处与荧光团相关联)和反向IC引物(在5' 末端处与猝灭剂相关联)形成的能够在3' 重叠区处彼此杂交以形成二聚体的DIMER内部对照 (DIMER-IC) 的非限制性示例性实施方案。

[0033] 图2描绘了本文公开的DIMER-IC方法的非限制性示例性实施方案,其中当古细菌聚合酶扩增 (APA) 反应进行以使用由正向IC引物和反向IC引物形成的二聚体作为模板产生延伸的双链体时,与正向IC引物相关的荧光随时间推移猝灭。

[0034] 图3A-图3B描绘了通过本文描述的DIMER-IC方法产生的反向扩增曲线。图3A描绘了使用HEX荧光团的结果 (FP1+RP2包含4-bp 3' 重叠。FP1+RP3包含5-bp 3' 重叠)。图3B描绘了使用Syto61嵌入染料的结果 (FP1+RP2包含4-bp 3' 重叠。FP1+RP3包含5-bp 3' 重叠)。

[0035] 图4描绘了非限制性示例性实施方案,其中正向IC引物和/或反向IC引物的3' -重叠区中的核苷酸中的一个或多个包含修饰(例如,2' -O-甲基化)。

[0036] 图5A-图5B示出了在一些实施方案中,正向IC引物和/或反向IC引物的3' -重叠区中的修饰的核苷酸如何能够抑制非预期的引物延伸。

[0037] 图6A-图6C描绘了示出与正向IC引物和/或反向IC引物相关联的可猝灭标记和猝灭剂的可选择的位置的非限制性图示:两者都位于重叠区之外(图6A),两者都位于重叠区内(图6B),或者一个(例如,猝灭剂)位于反向引物的5' 末端处,并且一个(例如,荧光团)位于内部位点(图6C)。

[0038] 详述

[0039] 在以下详述中,参考了构成本文的一部分的附图。在附图中,除非上下文另有指示,否则相似的符号通常标识相似的组分。在详述、附图和权利要求书中描述的说明性实施方案不意味着是限制性的。在不脱离本文提出的主题的精神或范围的情况下,可以利用其他实施方案,并且可以做出其他改变。将容易理解的是,如本文一般描述的以及附图中图示

的本公开内容的方面能够以各种不同的配置来布置、替换、组合、分离和设计,所有这些都

在本文中明确设想并且构成本公开内容的一部分。

[0040] 本文提及的本申请的所有优先权申请、专利、公布的专利申请、其他出版物和来自 GenBank 以及其他数据库的序列关于相关技术通过引用以其整体并入。

[0041] 本文公开的内容包括用于评价、监测、观察和/或追踪核酸扩增反应的进展的方法、组合物、试剂盒和反应混合物。

[0042] 本文公开的内容包括用于评价、监测、观察和/或追踪扩增反应的进展的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a) 提供第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区,其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;(b) 使所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物接触,从而经由所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成双链体;(c) 使所述双链体经历扩增条件,从而产生延伸的双链体;和(d) 在扩增反应期间检测从所述第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号以确定所述延伸的双链体的产生,其中在所述扩增反应期间所述信号的降低指示所述延伸的双链体的产生。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸。

[0043] 本文公开的内容包括用于评价、监测、观察和/或追踪扩增反应的进展的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括:第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记。

[0044] 本文公开的内容包括反应混合物。在一些实施方案中,反应混合物包含:第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记;靶核酸;和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

[0045] 本文描述的方法、组合物和试剂盒相对于当前可用的用于评价、监测、观察和/或追踪核酸扩增的进展的方法、组合物和试剂盒具有多种优点。优点包括但不限于:较低的寡核苷酸复杂性,不需要探针或靶模板,经由引物浓度和3' -重叠尺寸直接控制系统,对于通用IC系统是可能的(即更高层次的相容性);较少的抑制作用(例如,不需要一个或更多个分子信标探针,因此较少的聚合酶抑制),并且不太容易形成非特异性产物(例如,由于引物的2' -O-甲基(2' -OM)修饰)。

[0046] 定义

[0047] 除非另外定义,否则本文使用的技术术语和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的不同含义。参见例如,Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第2版,J.Wiley&Sons (New York, NY 1994); Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)。出于本公开内容的目的,以下术语在下文定义。

[0048] 如本文使用的,术语“引物”是指包含能够在特定感兴趣区域处或附近(例如,邻近)与靶核酸杂交或退火的核苷酸序列的寡核苷酸。

[0049] 如本文使用的,术语“可猝灭标记”是指能够产生可检测信号的分子,其中该信号可以被猝灭剂降低。如本文使用的,术语“猝灭剂”可以指干扰或吸收由附近的可猝灭标记(例如,荧光团)发射的荧光的分子。

[0050] 如本文使用的,术语“双链体”是指两个大体上互补或完全互补的多核苷酸中通过沃森-克里克碱基配对或允许在大体上互补或完全互补的多核苷酸链之间形成稳定化的双链体的任何其他方式彼此形成碱基对的区域(例如,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区)。例如,具有21个核苷酸单元的多核苷酸链可以与另一个具有21个核苷酸单元的多核苷酸链碱基配对,当两条链中的每一条上仅19个碱基可以形成沃森-克里克碱基配对(即,完全互补)时,使得“双链体”具有19个碱基对。剩余碱基可以例如作为5'和3'突出部分存在。此外,在双链体内,不需要完全(例如,100%)互补性。例如,由19个碱基对组成的双链体中的错配导致94.7%的互补性。在一些实施方案中,经由第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成双链体。在一些实施方案中,互补性包含第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区中的4-5个核苷酸。

[0051] 本文提供的内容包括方法、组合物、试剂盒和反应混合物,在一些实施方案中,为了实时分析物检测的目的,该方法、组合物、试剂盒和反应混合物可以使用古细菌聚合酶扩增(“APA”)来等温扩增靶核苷酸模板内的感兴趣区域。例如,本文公开的内容包括用于监测或评价扩增反应的方法,例如作为内部对照(“IC”)测定,该方法利用质量控制引物之间的3'重叠与无探针的“整合”检测形式联合来启动扩增(例如,有意的引物-二聚体形成)。

[0052] 如本文公开的,在一些实施方案中,质量控制正向引物和质量控制反向引物可以在3'端处包含互补性(例如,至少4(例如,4-6)个碱基对的重叠),在不存在任何其他靶模板的情况下,可以一致地产生这些引物之间的指数扩增。在一些实施方案中,该扩增的速度和稳健性与3'重叠区的尺寸(较长的碱基对重叠与扩增速度增加相关)以及这些引物在溶液中的总浓度(较高浓度与扩增速度增加相关)相关。

[0053] APA扩增子是短的,在一些实施方案中,总长度不大于35个碱基对(35bp)。这同样适用于上文描述的基于二聚体的内部对照结构。为了减少测定复杂性,在本文描述的一些实施方案中有利地消除对专用对照探针的需要。例如,通过用5'可猝灭标记(例如,荧光团)对引物中的一个加标签,并且用5'猝灭剂对另一个引物加标签,产生与扩增相关的信号响应(如通过在同一APA反应中包含DNA嵌入染料指示的)。不受任何特定理论的束缚,DIME-IC对照扩增子(例如,延伸的双链体)的产生可以使得荧光团和猝灭剂足够接近,以减少荧光输出(并且从而减少可观察到的扩增响应)。注意,与标准嵌入曲线响应相比,这产生“逆”指数放大曲线。

[0054] 使用本文描述的方法监测扩增反应的累积系统的优点之一是减少的测定复杂性:仅从两个引物产生信号(不需要探针或专用模板)。当质量控制引物和靶-分析物测定在共同反应容器中共扩增时,这种复杂性的减少可以有助于改进APA性能。

[0055] 本文公开的用于评价、监测、观察和/或追踪扩增反应的方法、组合物、试剂盒和反应混合物可以例如用于监测反应的扩增效率。如本文使用的,术语“扩增效率”应具有其普通含义,并且还指扩增反应合成核酸的能力的确定。扩增抑制剂的存在、缺失或有缺陷的扩增反应组分、核酸酶污染和有缺陷的设备构成扩增效率降低的原因的非限制性实例,并且可以通过本文公开的方法、组合物、试剂盒和反应混合物来检测。在一些实施方案中,本文

提供的方法、组合物、试剂盒和反应混合物可以用于定量目的,例如延伸的双链体的产生可以用作实时定量PCR或等温扩增应用中的定量标准品。

[0056] 质量控制引物

[0057] 本文提供的内容包括质量控制引物(也被称为“内部对照引物”或“IC引物”)。例如,一对质量控制引物可以包括第一质量控制引物(例如,正向引物)和第二质量控制引物(例如,反向引物),其各自包含能够彼此杂交的3'重叠区。如本文描述的,第一质量控制引物可以是正向引物或反向引物,并且同样地,第二质量控制引物可以是正向引物或反向引物。在引物对中,如果第一质量控制引物是正向引物,则第二质量控制引物是反向引物,并且反之亦然。质量控制引物的长度可以变化,例如,质量控制引物的长度可以不大于35个核苷酸。在一些实施方案中,质量控制引物(例如,正向引物)包含可猝灭标记。在一些实施方案中,本文描述的方法、组合物、试剂盒和反应混合物包括提供第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸,并且其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记。

[0058] 可猝灭标记可以是例如荧光团。如本文使用的,术语“荧光团”应赋予其普通含义,并且还指其存在可以通过其发光性质检测的任何报告基团。荧光团的非限制性实例包括: Cy2TM (506)、YO-PROTM-1 (509)、YOYOTM-1 (509)、钙黄绿素 (517)、FITC (518)、FluorXTM (519)、AlexaTM (520)、罗丹明110 (520)、Oregon GreenTM500 (522)、Oregon GreenTM488 (524)、RiboGreenTM (525)、Rhodamine GreenTM (527)、罗丹明123 (529)、Magnesium GreenTM (531)、Calcium GreenTM (533)、TO-PROTM-1 (533)、TOTO1 (533)、JOE (548)、BODIPY530/550 (550)、DiI (565)、BODIPY TMR (568)、BODIPY558/568 (568)、BODIPY564/570 (570)、Cy3TM (570)、AlexaTM546 (570)、TRITC (572)、Magnesium OrangeTM (575)、藻红蛋白R&B (575)、Rhodamine Phalloidin (575)、Calcium OrangeTM (576)、派洛宁Y (580)、罗丹明B (580)、TAMRA (582)、Rhodamine RedTM (590)、Cy3.5TM (596)、ROX (608)、Calcium CrimsonTM (615)、AlexaTM594 (615)、德克萨斯红 (615)、尼罗红 (628)、YO-PROTM-3 (631)、YOYOTM-3 (631)、R-藻蓝蛋白 (642)、C-藻蓝蛋白 (648)、TO-PROTM-3 (660)、TOTO3 (660)、DiD DiIC (5) (665)、Cy5TM (670)、硫二羰花菁 (Thiadicarbocyanine) (671)、Cy5.5 (694)、HEX (556)、TET (536)、Biosearch Blue (447)、CAL Fluor Gold 540 (544)、CAL Fluor Orange 560 (559)、CAL Fluor Red 590 (591)、CAL Fluor Red 610 (610)、CAL Fluor Red 635 (637)、FAM (520)、荧光素 (520)、荧光素-C3 (520)、Pulsar650 (566)、Quasar 570 (667)、Quasar 670 (705) 和 Quasar 705 (610) (括号中的数字是以纳米计的响应荧光团的最大发射波长)。在一些实施方案中,荧光团是 Cy5TM。在一些实施方案中,荧光团是六氯荧光素 (HEX)。

[0059] 在不同的实施方案中,可猝灭标记在质量控制引物中的位置可以变化。例如,可猝灭标记可以位于质量控制引物(例如,第一质量控制引物)的3'重叠区之外。在一些实施方案中,可猝灭标记位于质量控制引物的5'末端处。在一些实施方案中,可猝灭标记位于质量控制引物的3'重叠区中。

[0060] 第二质量控制引物可以包含猝灭剂。猝灭可以通过荧光共振能量转移 (FRET) 介导。FRET基于供体(例如,荧光团)与受体(例如,猝灭剂)的跃迁偶极之间的经典偶极-偶极相互作用,并且取决于供体-受体距离。FRET通常可以在高达100 Å的距离上发生。FRET还取

决于供体-受体光谱重叠以及供体和受体跃迁偶极矩的相对取向。荧光团的猝灭也可以由于在一个荧光团与另一个荧光团之间形成非荧光复合物或形成非荧光分子而发生。这种机制被称为“接触猝灭”、“静态猝灭”或“基态复合物形成”。不受任何特定理论的束缚,在本文公开的方法的一些实施方案中,认为不需要猝灭剂部分以便观察可检测的荧光变化,并且近端碱基猝灭效应足以产生可检测的荧光偏移以允许评价、监测、观察和/或追踪核酸扩增反应。在本文公开的一些实施方案中,猝灭剂部分不被需要以引发荧光猝灭。例如,荧光猝灭可以通过以下来实现:将荧光团附接至质量控制引物(例如,第一质量控制引物)中的胞嘧啶核苷酸(例如,5' 胞嘧啶),使得在扩增子形成时,互补鸟嘌呤核苷酸与荧光团标记的C碱基直接相对地掺入,从而经由“近端G碱基”猝灭来猝灭荧光信号。

[0061] 猝灭剂的实例包括但不限于Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、Black Hole Quencher-1 (BHQ-1)、Black Hole Quencher-2 (BHQ-2)、TMR、QSY-7和Dabcyl。猝灭剂在质量控制引物中的位置可以变化。例如,猝灭剂可以位于质量控制引物(例如,第二质量控制引物)的3' 重叠区之外。在一些实施方案中,猝灭剂位于质量控制引物的5' 末端处。在一些实施方案中,猝灭剂位于质量控制引物的3' 重叠区中。

[0062] 质量控制引物(例如,第一质量控制引物和第二质量控制引物)的长度可以变化,例如,约5个至约100个核苷酸,包括约8个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、50个、75个、100个核苷酸或这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物各自具有10个至约50个核苷酸的长度,例如,10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个核苷酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸。

[0063] 修饰

[0064] 质量控制引物可以包含一个或更多个修饰的核苷酸或由一个或更多个修饰的核苷酸组成。第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。例如,第一质量控制引物的3' 重叠区、第二质量控制引物的3' 重叠区或两者可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。在不同的实施方案中,修饰的位置可以是不同的。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3' 重叠区的每一个包含一个或更多个修饰的核苷酸。

[0065] 可以根据本文描述或本领域已知的任何修饰来修饰核苷酸(或碱基)。修饰可以包括在引物合成期间进行的修饰和/或可以包括合成后修饰。修饰可以包括内部修饰、在质量控制引物的3' 末端区处的修饰和/或在质量控制引物的5' 末端区处的修饰。在一些实施方案中,质量控制引物包含修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸的混合物。在一些实施方案中,质量控制引物包含未修饰的核苷酸。在一些实施方案中,质量控制引物基本上由修饰的核苷酸组成或由修饰的核苷酸组成。

[0066] 修饰和修饰的碱基可以包括例如磷酸化(例如,3' 磷酸化、5' 磷酸化);附接化学或接头修饰(例如,Acrydite™、腺苷酸化、叠氮化物(NHS酯)、地高辛(NHS酯)、胆固醇-TEG、I-Linker™、氨基修饰剂(例如,氨基修饰剂C6、氨基修饰剂C12、氨基修饰剂C6dT、Uni-Link™

氨基修饰剂)、炔烃(例如,5'己炔基、5-辛二炔基dU)、生物素化(例如,生物素、生物素(叠氮化物)、生物素dT、生物素-TEG、双生物素、PC生物素、脱硫生物素-TEG)、硫醇修饰(例如,硫醇修饰剂C3S-S、二硫醇、硫醇修饰剂C6S-S);间隔物(C3间隔物、PC间隔物、己二醇、间隔物9、间隔物18、1',2'-双脱氧核糖(dSpacer));修饰的碱基(例如,2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、5-溴dU、脱氧尿苷、反向dT、反向双脱氧-T、双脱氧-C、5-甲基dC、脱氧肌苷、SuperT[®]、SuperG[®]、锁核酸(LNA)、5-硝基吡啶、2'-O-甲基RNA碱基、羟甲基dC、UNA非锁核酸(例如,UNA-A、UNA-U、UNA-C、UNA-G)、异dC、异dG、氟C、氟U、氟A、氟G);硫代磷酸酯键修饰(例如,硫代磷酸化的DNA碱基、硫代磷酸化的RNA碱基、硫代磷酸化的2'-O-甲基碱基、硫代磷酸化的LNA碱基);和点击化学修饰。在一些实施方案中,修饰和修饰的碱基包括尿嘧啶碱基、核糖核苷酸碱基、0-甲基RNA碱基、硫代磷酸酯连键、3'磷酸基团、间隔物碱基(例如,C3间隔物碱基或其他间隔物碱基)。一个或多个修饰的核苷酸可以包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2'-O-甲基化核苷酸及其任何组合。

[0067] 可以直接合成包含2'-O-甲基RNA碱基的引物。2'-O-甲基RNA碱基可以被包含在引物中,例如,以抑制通过DNA聚合酶的通读。在一些实施方案中,质量控制引物包含一个或多个硫代磷酸酯(PS)连键(例如,硫代磷酸酯键修饰)。PS键用硫原子取代引物的磷酸主链中的非桥接氧,这通常使核苷酸间连键抵抗核酸酶降解。例如,硫代磷酸酯键可以引入到质量控制引物的5'-端或3'-端的约最后3个至5个核苷酸之间,以抑制核酸外切酶降解。在一些实施方案中,包含在整个引物中的硫代磷酸酯键可以帮助减少核酸内切酶的攻击。质量控制引物可以例如包含3'磷酸基团。在某些情况下,3'磷酸化可以抑制通过某些3'-核酸外切酶的降解,并且可以用于阻断通过DNA聚合酶的延伸。在一些实施方案中,质量控制引物包含一个或多个间隔物碱基(例如,一个或多个C3间隔物)。C3间隔物亚磷酰胺可以掺入引物内部或引物的5'端。例如,可以在引物的任一端添加多个C3间隔物,以引入长的亲水性间隔物臂,用于附接荧光团或其他悬垂基团。在一些实施方案中,一个或多个修饰的核苷酸中的至少一个是C3间隔物、己二醇、dSpacer、PC间隔物、间隔物9、间隔物18、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、双脱氧胞苷、反向dT、Iso-dG、Iso-dC、反向双脱氧-T和5-硝基吡啶。一个或多个修饰的核苷酸中的至少一个可以是2'-O-甲基化核苷酸。在一些实施方案中,2'-O-甲基化核苷酸包括2'-O-甲基尿苷、2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基胞苷和2'-O-甲基鸟苷水合物中的一个或多个。如图4-图5B中示出的,在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区中的核苷酸修饰可以抑制由于IC引物与随机寡核苷酸杂交所导致的非预期引物延伸。

[0068] 质量控制引物(例如,第一质量控制引物和/或第二质量控制引物)可以包含一个或多个聚合酶终止子。第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个可以包含一个或多个聚合酶终止子。如本文使用的,“聚合酶终止子”是能够终止或抑制聚合的分子(例如,修饰的核苷酸)。在一些实施方案中,一个或多个聚合酶终止子中的至少一个是2'-O-甲基化核苷酸。2'-O-甲基化核苷酸的非限制性实例包括2'-O-甲基尿苷、2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基胞苷和2'-O-甲基鸟苷。

[0069] 质量控制引物重叠、双链体和延伸的双链体

[0070] 在一些实施方案中,本文提供的方法、组合物、反应混合物和试剂盒包括第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含

能够彼此杂交的3'重叠区。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区与第二质量控制引物的3'重叠区互补。第一质量控制引物的3'重叠区可以与第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。

[0071] 关于序列的互补性通常是指将彼此杂交的核苷酸序列。如本文使用的,术语“退火”或“杂交”可以指在两个分子之间形成稳定的复合物。杂交条件的严格性可以改变,以容忍不同数量的序列错配。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区彼此至少75%互补。例如,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区可以彼此以下或至少以下互补:75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0072] 完全互补通常是指第一链中的核苷酸序列,例如,其中每个有序的碱基(例如,读段为5'至3')与第二链中对应的有序的碱基配对,并且在被认为是完全互补的序列中没有空位、另外的序列或不配对的碱基。如本文使用的,完全互补是指第一链中的核苷酸序列的所有连续碱基(例如,第一质量控制引物的3'重叠区)与第二链中的核苷酸序列的对应连续碱基(例如,第二质量控制引物的3'重叠区)互补。完全互补序列的长度可以是约5个至约25个连续碱基,包括长度是5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个连续碱基。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区、第二质量控制引物的3'重叠区或两者的长度是2个至约10个核苷酸(例如,约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸)。第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的长度可以是例如4个或5个核苷酸。

[0073] 在一些实施方案中,该方法包括以下中的一种或更多种:使第一质量控制引物和第二质量控制引物接触,从而经由所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成双链体;使所述双链体经历扩增条件,从而产生延伸的双链体;并且使第一质量控制引物和第二质量控制引物接触在扩增条件下进行。

[0074] 如本文描述的,质量控制引物可以用于本文公开的方法、组合物、试剂盒和反应混合物中,用于评价、监测、观察和/或追踪核酸扩增反应。核酸扩增反应可以是以下或包括以下:一个或多个扩增反应,涉及作为模板的靶核酸和对靶核酸特异性的一个或多个引物。在一些实施方案中,本文公开的方法(例如,在使双链体经历扩增条件的步骤中)包括使靶核酸和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针经历扩增条件。在一些实施方案中,第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者在扩增条件下不与靶核酸杂交是有利的。在一些实施方案中,该方法不包括使用能够与第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者杂交的任何核酸(例如,模板核酸)。例如,在一些实施方案中,该方法不包括使用与第一控制引物、第二控制引物或两者大体上互补或完全互补的任何模板核酸。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物与靶核酸不互补,并且不能引发来自靶核酸序列的扩增反应是有利的。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区与靶核酸不互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区与靶核酸不完全互补。例如,第一质量控制引物和第二质量控制引物可以包含不大于2个、3个、4个或5个与靶核酸序列互补的核苷酸。

[0075] 核酸扩增

[0076] 本文公开的内容包括用于评价、监测、观察和/或追踪扩增反应的方法。该方法可以包括：(a) 提供第一质量控制引物和第二质量控制引物，所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区，其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记；(b) 使所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物接触，从而经由所述第一质量控制引物与所述第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成双链体。在一些实施方案中，该方法包括使双链体经历扩增条件，从而产生延伸的双链体。在一些实施方案中，第一质量控制引物和第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸。

[0077] 本文公开的内容包括核酸扩增的反应混合物。在一些实施方案中，反应混合物包含：第一质量控制引物和第二质量控制引物，所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3' 重叠区，其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记；靶核酸；和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。如本文使用的，对靶核酸特异性的引物或探针是与靶核酸或其互补物或反向互补物的至少一部分互补或完全互补的引物或探针。在一些实施方案中，第一质量控制引物和第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸。反应混合物可以包含经由第一质量控制引物与第二质量控制引物的3' 重叠区之间的杂交形成的双链体。反应混合物可以包含具有DNA聚合酶活性的酶（例如，具有超嗜热生物聚合酶活性的酶）、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。在一些实施方案中，反应混合物包含逆转录酶。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，具有超嗜热生物聚合酶活性的酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。在一些实施方案中，第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者不能与靶核酸杂交。在一些实施方案中，一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针不能与第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者杂交。

[0078] 如本文使用的，核酸扩增可以指使用序列特异性方法获得靶核酸序列或其互补物或其片段的多个拷贝的任何已知程序。核酸扩增的实例包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、古细菌聚合酶扩增(APA)、环介导的等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)（例如，多重置换扩增(MDA)）、复制酶介导的扩增、免疫扩增、基于核酸序列的扩增(NASBA)、自持序列复制(3SR)、滚环扩增(RCA)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、切口酶扩增反应(NEAR)、分支扩增(RAM)、环状解旋酶依赖性扩增(cHDA)、单引物等温扩增(SPIA)、信号介导的RNA扩增技术(SMART)、基因组指数扩增反应(GEAR)和等温多重置换扩增(IMDA)以及转录介导的扩增(TMA)。在一些实施方案中，可以顺序进行上述核酸扩增方法中的两种或更多种。术语“等温扩增反应”应赋予其通常含义，并且还应包括其中在反应期间温度没有显著变化的反应。在一些实施方案中，在发生扩增的主要酶促反应步骤期间，等温扩增反应的温度偏差不大于10°C，例如不大于5°C或不大于2°C。根据核酸等温扩增的方法，可以使用不同的酶进行扩增。示例性等温扩增组合物和方法在W02017176404中描述，该文献的内容通过引用以其整体并入本文。

[0079] 扩增反应可以是实时扩增反应，例如实时PCR反应。PCR涉及使用两种或更多种位于靶序列侧翼的可延伸的序列特异性寡核苷酸引物来扩增靶序列（例如，靶核酸）。在存在引物、热稳定的DNA聚合酶（例如，Taq聚合酶）和各种dNTP的情况下，使包含感兴趣的靶序列

的核酸经历多轮热循环(变性、退火和延伸)程序,导致靶序列的扩增。PCR使用多轮引物延伸反应,其中DNA分子限定区域的互补链由热稳定的DNA聚合酶同时合成。在每个循环结束时,每个新合成的DNA分子充当下一个循环的模板。在这些反应的重复轮次期间,新合成的DNA链的数量指数地增加,使得在例如20个至30个反应循环之后,初始模板DNA将被复制几千倍或几百万倍。PCR可以产生适合于扩增后处理的双链扩增产物。可以例如通过琼脂糖凝胶电泳可视化、通过使用基于探针的比色检测的酶免疫测定形式、通过荧光发射技术或通过本领域技术人员已知的其他检测手段来检测扩增产物。PCR方法的实例包括但不限于实时PCR、终点PCR、扩增片段长度多态性PCR(AFLP-PCR)、Alu-PCR、不对称PCR、集落PCR、DD-PCR、简并PCR、热启动PCR、原位PCR、反向PCR、长PCR(Long-PCR)、多重PCR、巢式PCR、PCR-ELISA、PCR-RFLP、PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP)、定量竞争PCR(QC-PCR)、cDNA端快速扩增PCR(RACE-PCR)、多态性DNA随机扩增PCR(RAPD-PCR)、实时PCR、重复基因外回文PCR(Rep-PCR)、逆转录酶PCR(RT-PCR)、TAIL-PCR、降落PCR(Touchdown PCR)和Vectorette PCR。

[0080] 实时PCR又称定量实时聚合酶链式反应(QRT-PCR),可以用于同时定量和扩增给定核酸分子的特定部分。它可以用于确定样品中是否存在特定的序列;并且如果其存在,则确定存在的序列的拷贝数。术语“实时”可以指在PCR期间的周期性监测。某些系统,诸如ABI 7700和7900HT序列检测系统(Applied Biosystems,Foster City,Calif.)在每个热循环期间,在预先确定的或用户定义的点进行监测。具有荧光共振能量转移(FRET)探针的实时PCR分析测量循环到循环的荧光染料信号变化。实时程序按照PCR的一般模式,但核酸在每轮扩增后被定量。定量方法的两个实例是使用嵌入dsDNA的荧光染料(例如,SYBR Green)和当与互补DNA杂交时发荧光的修饰的DNA寡核苷酸探针。嵌入剂在未结合时具有相对低的荧光,并且在与双链核酸结合时具有相对高的荧光。因此,嵌入剂可以用于在核酸扩增反应期间监测双链核酸的累积。可用于本文公开的实施方案的这样的非特异性染料的实例包括嵌入剂,诸如SYBR Green I(Thermo Fisher)、碘化丙锭、溴化乙锭等。

[0081] 术语“扩增(amplify)”、“扩增(amplification)”、“扩增反应”或“扩增(amplifying)”是指任何用于使靶核酸拷贝倍增的体外过程。扩增有时是指靶核酸的指数增加。然而,“扩增”也可以指靶核酸数量的线性增加,但不同于一次、单一引物延伸步骤。在一些实施方案中,可以进行有限的扩增反应,也被称为预扩增。预扩增是其中由于进行了少量的循环,例如10个循环,所以发生了有限的扩增量的方法。预扩增可以允许一些扩增,但是在指数期之前停止扩增,并且通常产生约500个拷贝的期望的核苷酸序列。预扩增的使用可以限制在某些扩增反应中与耗尽的反应物相关的不准确性,并且还可以减少由于靶的核苷酸序列或物种丰度引起的扩增偏倚。在一些实施方案中,一次引物延伸作为线性或指数扩增的前序步骤(Prelude)来进行。

[0082] 在本文描述的方法的一些实施方案中,引物和它们对应的靶核酸接触,并且互补序列彼此退火或杂交。引物可以在感兴趣的序列处或附近(例如,邻近、邻接等)与靶核酸退火。与靶退火的引物可以被称为引物-靶杂合体、杂交的引物-靶或引物-靶双链体。当提及感兴趣的核苷酸序列时,术语“附近”或“邻近”是指引物端和靶的一个或更多个核苷酸(例如,核苷酸序列)之间的距离(例如,碱基数)或区域。通常,邻近是在距离感兴趣的核苷酸或核苷酸序列的约1个核苷酸至约50个核苷酸的范围内(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个或这些值中的任何两个之

间的数字或范围)。在一些实施方案中,一组引物(例如,一对引物、正向和反向引物、第一寡核苷酸和第二寡核苷酸)在距离感兴趣的核苷酸或核苷酸序列的约1个至20个核苷酸内退火,并产生扩增产物。在一些实施方案中,引物在感兴趣的核苷酸或核苷酸序列内退火。退火后,每个引物由聚合酶沿着靶(即,模板链)延伸,以产生互补链。例如,可以进行若干个循环的引物退火和延伸,直到产生可检测量的扩增产物。在一些实施方案中,当靶核酸是RNA时,在扩增步骤之前或期间通过逆转录合成靶RNA的DNA拷贝(cDNA)。在本文描述的方法的一些实施方案中,使质量控制引物接触并杂交以形成双链体。质量控制引物的每一个可以用作核酸延伸反应的模板以及引物。

[0083] 扩增反应的组分可以包含例如一种或更多种引物(例如,质量控制引物、另外的引物和/或探针,包括单独的引物、引物对、引物组、寡核苷酸、用于多重扩增的多个引物组等)、一个或更多个核酸靶(例如,来自样品的靶核酸)、一种或更多种聚合酶、核苷酸(例如,dNTP等)和合适的缓冲液(例如,包含洗涤剂、还原剂、单价离子和二价离子的缓冲液)。扩增反应还可以包含逆转录酶和/或逆转录引物。扩增反应还可以包含一种或更多种检测剂,诸如本文描述的检测剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,一种或更多种扩增试剂包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:引物、靶核酸、聚合酶、核苷酸和合适的缓冲液;和任选地检测剂。在一些实施方案中,一种或更多种扩增试剂包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:引物、靶核酸、聚合酶、逆转录酶、逆转录引物、核苷酸和合适的缓冲液;和任选地检测剂和/或逆转录引物。可以包括对扩增没有显著影响和/或对于产生可检测产物不是必需的另外的组分或特征。例如,可以包括对本文的组分和条件在等温条件下实现扩增并在约20、15或10分钟或更短时间内产生可检测扩增产物的能力没有显著影响的另外的组分或特征。这样的另外的组分或特征可以被称为非必需组分,并且可以包括典型的反应组分和/或常见的添加剂,诸如盐、缓冲剂、洗涤剂、离子、油、蛋白质、聚合物等。

[0084] 核酸扩增可以在存在天然核苷酸的情况下进行,例如dNTP和/或衍生的核苷酸。天然核苷酸通常是指腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸、胸苷酸或尿苷酸。衍生的核苷酸通常是不同于天然核苷酸的核苷酸。核苷酸通常如下指定。核糖核苷三磷酸被称为NTP或rNTP,其中N可以是A、G、C、U。脱氧核苷三磷酸底物被称为dNTP,其中N可以是A、G、C、T或U。单体核苷酸亚基在本文中 can 表示为A、G、C、T或U,没有特别提及DNA或RNA。在一些实施方案中,可以使用非天然存在的核苷酸或核苷酸类似物,诸如含有可检测标记(例如,荧光或比色标记)的类似物。例如,核酸扩增可以在存在标记的dNTP的情况下进行,例如放射性标记,诸如³²P、³³P、¹²⁵I或³⁵S;酶标记,诸如碱性磷酸酶;荧光标记,诸如异硫氰酸荧光素(FITC);或其他标记,诸如生物素、抗生物素蛋白、地高辛、抗原、半抗原或荧光染料。在一些实施方案中,核酸扩增在存在修饰的dNTP的情况下进行,例如,热激活的dNTP(例如,来自TriLink的CleanAmp™ dNTP)。

[0085] 一种或更多种扩增试剂可以包括非酶组分和酶组分。非酶组分可以包括例如引物、核苷酸、缓冲液、盐、还原剂、洗涤剂和离子;并且通常不包括蛋白质(例如,核酸结合蛋白)、酶或具有酶促活性的蛋白质,例如,聚合酶、逆转录酶、解旋酶、拓扑异构酶、连接酶、核酸外切酶、核酸内切酶、限制性内切酶(restriction enzyme)、切口酶、重组酶等。在一些实施方案中,酶组分排除其他蛋白质(例如,核酸结合蛋白和/或具有酶促活性的蛋白质),例如解旋酶、拓扑异构酶、连接酶、核酸外切酶、核酸内切酶、限制性内切酶、切口酶、重组酶

等。扩增条件可以包括酶促活性,例如由聚合酶提供的酶促活性。在一些实施方案中,酶促活性由聚合酶和逆转录酶提供。在一些实施方案中,酶促活性不包括由其他酶提供的酶促活性,例如解旋酶、拓扑异构酶、连接酶、核酸外切酶、核酸内切酶、限制性内切酶、切口酶、重组酶等。聚合酶活性和逆转录酶活性可以由不同的酶或不同的酶类型(例如,一种或更多种聚合酶和一种或更多种逆转录酶)提供,或者由单一的酶或酶类型(例如,一种或更多种聚合酶)提供。

[0086] 传统的核酸扩增方法通常需要热循环过程、核酸变性、促进链解链、链分离和/或链交换的蛋白质(例如,酶)(例如,解旋酶、重组酶)和/或核酸内切酶剂(例如,限制性内切酶、切口酶),并且通常需要20分钟至30分钟的最小反应时间。本文提供的核酸扩增方法可以在没有热循环、没有样品核酸的热变性和/或酶促变性、没有添加促进链解链、链分离和/或链交换的蛋白质(例如,酶)、没有核酸内切酶剂的情况下和/或在约10-15分钟的反应时间内进行。在本文描述的方法的一些实施方案中,扩增反应是等温扩增反应。在一些实施方案中,核酸的扩增包括非热循环类型的聚合酶链式反应(PCR)。在一些实施方案中,核酸的扩增包括等温扩增过程。在一些实施方案中,核酸的扩增包括等温聚合酶链式反应(iPCR)。

[0087] 等温扩增条件通常不包括扩增过程中的热循环(即,在较高温度与较低温度之间的循环)组分,并且因此在等温扩增反应期间,温度在反应期间没有显著变化(例如,在反应期间保持基本上相同的温度)。例如,在发生扩增的主要酶促反应步骤期间,等温扩增反应的温度偏差可以不大于10°C,例如不大于5°C或不大于2°C。根据等温扩增的方法,可以使用不同的酶进行扩增。核酸扩增通常涉及核酸扩增子(拷贝)的酶促合成,其包含与被扩增的核苷酸序列互补的序列。扩增方法可以例如在单个容器、单个腔室和/或单个体积(即,连续体积)中进行。在一些实施方案中,扩增和检测(例如,本文描述的检测步骤/方法)在单个容器、单个腔室和/或单个体积(即,连续体积)中(例如,同时)进行。扩增条件可以包含具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同或至少约95%相同的氨基酸序列。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0088] 等温扩增反应可以在基本上恒定的温度进行。在一些实施方案中,将扩增反应精确地维持在一个温度。在一些实施方案中,由于例如基于环境或设备的变量,在等温扩增过程中可能发生小的温度波动(例如±1°C至5°C)。在一些实施方案中,整个反应体积保持在基本上恒定的温度,并且本文的等温反应通常不包括依赖于反应容器内产生的温度梯度和/或基于对流的温度循环的扩增条件可以是有利的。在一些实施方案中,等温扩增反应在约30°C至约75°C之间的温度进行,包括约55°C的温度至约75°C的温度。例如,等温扩增反应可以在以下或约以下的温度进行:55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C或75°C或这些值中的任何两个之间的数字。在一些实施方案中,等温扩增反应在约55°C的温度至约65°C的温度进行,例如在约60°C或约65°C的温度进行。在一些实施方案中,温度要素(例如,热源)被保持在基本上恒定的温度,例如处于或低于约75°C、例如处于或低于约70°C、处于或低于约65°C或者处于或低于约60°C的基本上恒定的温度。等温扩增反应可以进行持续以下的时间段:约5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟

或60分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围。等温扩增反应可以在无解旋酶、无单链结合蛋白、无裂解剂和/或无重组酶的等温扩增条件下进行。

[0089] 本文描述的扩增过程(例如,等温扩增)可以在合适的持续时间内进行。在一些实施方案中,进行扩增过程直到产生可检测的核酸扩增产物。核酸扩增产物可以通过任何合适的检测过程和/或本文描述的检测过程来检测。在一些实施方案中,扩增过程在约30分钟、约20分钟或更短的时间长度内进行。例如,扩增过程可以在以下内或约以下内进行:1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟或20分钟。在一些实施方案中,扩增在以下内产生可检测的核酸扩增产物:约20分钟、19分钟、18分钟、17分钟、16分钟、15分钟、14分钟、13分钟、12分钟、11分钟、10分钟、9分钟、8分钟、7分钟、6分钟或5分钟或更短时间或在这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0090] 在一些实施方案中,可以在不暴露于使核酸变性的剂或条件下扩增核酸靶和双链体(例如,通过第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成的双链体)。在一些实施方案中,在扩增步骤(和/或其他步骤)期间,可以在不暴露于促进链分离的剂或条件的情况下扩增核酸靶和双链体。在一些实施方案中,在扩增步骤(和/或其他步骤)期间,可以在不暴露于促进解链的剂或条件的情况下扩增核酸靶和双链体。使核酸变性和/或促进链分离和/或促进解链的剂或条件包括但不限于热条件(例如,高温)、pH条件(例如,高或低的pH)、化学剂和蛋白质(例如,酶促剂)。

[0091] 在一些实施方案中,本文公开的方法(例如,扩增步骤)不包括核酸的热变性(例如,将包含核酸的溶液加热至升高的温度,例如高于75°C、高于80°C、高于90°C、高于95°C或更高的温度)或核酸的基于蛋白质(例如,酶促)的变性。基于蛋白质的(例如,酶促)变性可以包括使核酸与解旋酶、拓扑异构酶、连接酶、核酸外切酶、核酸内切酶、限制性内切酶、切口酶、重组酶、RNA复制酶和核酸结合蛋白(例如,单链结合蛋白)中的一种或更多种接触。在一些实施方案中,该方法不包括解旋酶、拓扑异构酶、连接酶、核酸外切酶、核酸内切酶、限制性内切酶、切口酶、重组酶、RNA复制酶和/或核酸结合蛋白(例如,单链结合蛋白)。在一些实施方案中,该方法不包括嵌入剂、烷基化剂和/或化学物质,诸如甲酰胺、甘油、尿素、二甲基亚砜(DMSO)和/或N,N,N-三甲基甘氨酸(甜菜碱)。在一些实施方案中,该方法不包括使核酸与变性剂(例如,甲酰胺)接触。在一些实施方案中,本文公开的方法(例如,扩增步骤)和组合物不包括使核酸变性(例如,促进链分离和/或促进解链)的剂和/或条件,或除了酸和/或低pH条件之外的剂和/或条件。在一些实施方案中,除了聚合酶(例如,超嗜热生物聚合酶)之外,扩增步骤不包括使核酸变性(例如,促进链分离和/或促进解链)的剂和/或条件。在一些实施方案中,除了聚合酶(例如,超嗜热生物聚合酶)和/或低pH条件(例如,与一种或更多种酸接触)之外,本文提供的方法和组合物不包括使核酸变性(例如,促进链分离和/或促进解链)的剂和/或条件。其中核酸链在低pH条件下解离(例如,经由与酸性裂解缓冲液接触)以促进随后的快速扩增和检测的用于核酸检测的组合物、试剂盒和方法在题为“METHOD FOR SEPARATING GENOMIC DNA FOR AMPLIFICATION OF SHORT NUCLEIC ACID TARGETS”并且于2023年2月3日提交的PCT专利申请第PCT/US23/61978号中描述,该PCT专利申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0092] 在一些实施方案中,核酸靶和双链体(例如,通过第一质量控制引物与第二质量控

制引物的3'重叠区之间的杂交形成的双链体)可以在扩增步骤(和/或其他步骤)期间在不暴露于促进链分离和/或解链的剂或条件的情况下扩增。例如,核酸可以在不暴露于解旋酶的情况下扩增。解旋酶是能够将双链核酸解链并分离为单链的酶。不包括使用解旋酶的扩增条件在本文中可以被称为无解旋酶扩增条件。

[0093] 在扩增反应之前和/或期间,核酸靶(包括通过第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成的双链体)可以在不接触或暴露于解旋酶、重组酶、核酸结合蛋白(例如,单链结合蛋白或单链DNA结合蛋白(SSB))、连接酶、RNA复制酶、限制性内切酶、切口酶、核酸外切酶、DNA酶、RNA酶和拓扑异构酶中的一种或更多种的情况下扩增。重组酶的非限制性实例包括Cre重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、FLP重组酶、RecA、RAD51、RadA、T4UvsX。在一些实施方案中,核酸可以在不暴露于重组酶辅助蛋白,例如重组酶加载因子(例如,T4UvsY)的情况下扩增。在一些实施方案中,扩增核酸而不暴露于SSB,例如,T4gp32。核酸外切酶的非限制性实例包括DNA酶、RNA酶(例如,RNA酶H)、5'至3'核酸外切酶(例如核酸外切酶II)、3'至5'核酸外切酶(例如核酸外切酶I)和聚(A)特异性3'至5'核酸外切酶。

[0094] 核酸靶(包括通过第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成的双链体)可以在暴露或不暴露于使核酸去稳定的剂或条件的情况下扩增。如本文使用的,术语“去稳定”应赋予其普通含义,并且还指由倾斜、滚动、扭曲、滑动和翻转效应中的一种或更多种对核酸分子(例如,双螺旋结构)的整体组织和几何取向的破坏。去稳定通常不是指核酸链的解链或分离(例如,变性)。核酸去稳定可以通过例如暴露于诸如嵌入剂或烷基化剂的剂和/或诸如甲酰胺、尿素、二甲基亚砜(DMSO)或N,N,N-三甲基甘氨酸(甜菜碱)的化学物质来实现。在一些实施方案中,本文提供的方法包括使用一种或更多种去稳定剂。在一些实施方案中,本文提供的方法排除了去稳定剂的使用。

[0095] 在一些实施方案中,核酸靶和双链体(例如,通过第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间杂交形成的双链体)可以作为模板核酸扩增而无裂解或消化。例如,扩增可以在不预先暴露于一种或更多种裂解剂的情况下发生,并且完整的核酸被扩增。在一些实施方案中,扩增可以在扩增期间不暴露于一种或更多种裂解剂的情况下发生。术语“裂解剂”是指可以在一个或多个特异性或非特异性位点裂解核酸的剂(例如,化学物质或酶)。特异性裂解剂通常根据在特定位点的特定核苷酸序列特异性裂解。裂解剂包括但不限于核酸内切酶(例如,限制性内切酶、切口酶等);核酸外切酶(DNA酶、RNA酶(例如RNA酶H)、5'至3'核酸外切酶(例如核酸外切酶II)、3'至5'核酸外切酶(例如核酸外切酶I)和聚(A)特异性3'至5'核酸外切酶);和化学裂解剂。

[0096] 扩增的核酸(例如,扩增的靶核酸和/或延伸的双链体)在本文中可以被称为核酸扩增产物或扩增子。扩增的双链体可以被称为延伸的双链体。扩增产物可以包括天然存在的核苷酸、非天然存在的核苷酸、核苷酸类似物及其组合。扩增产物通常具有与样品核酸(例如,靶核酸)中的序列或其互补物相同或大体上相同的核苷酸序列。扩增产物中“大体上相同”的核苷酸序列通常将与被扩增的核苷酸序列或其互补物具有高度的序列同一性(例如,约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%的序列同一性),并且变异有时是聚合酶不保真(infidelity)或其他变量的结果。

[0097] 在一些实施方案中,核酸扩增产物包含与样品核酸中的靶序列互补或完全互补的

多核苷酸。在一些实施方案中,核酸扩增产物包含与双链体部分互补或完全互补的多核苷酸。完全互补是指第一链中的核苷酸序列,例如,其中每个有序的碱基(例如,读段为5'至3')与第二链中对应的有序的碱基配对,并且在被认为是完全互补的序列中没有空位、另外的序列或不配对的碱基。换句话说,完全互补是指第一链中核苷酸序列的所有连续碱基与第二链中核苷酸序列的对应的连续碱基互补。核酸扩增产物可以包含与扩增反应中使用的一种或更多种引物完全互补或互补的序列。在一些实施方案中,核酸扩增产物包含与第一引物序列完全互补或相同的第一核苷酸序列,以及与第二引物序列完全互补或相同的第二核苷酸序列。

[0098] 核酸扩增产物的长度可以是至少50个碱基。在一些实施方案中,核酸扩增产物是约15个至约40个碱基长,例如是以下或约以下:15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个或40个碱基长。在一些实施方案中,扩增产物是约20个至约40个碱基长,例如约20个至约30个碱基长。在一些实施方案中,给定靶序列的核酸扩增产物具有相同的长度或大体上相同的长度(例如,在1个至5个碱基内)。因此,给定靶序列的核酸扩增产物可以产生单个信号(例如,电泳凝胶上的条带),并且通常不产生指示多个长度的多个信号(例如,电泳凝胶上的梯状物或拖尾)。对于多重反应,不同靶序列的核酸扩增产物可以具有不同的长度。

[0099] 核酸扩增产物可以包含间隔序列。如本文描述的,扩增产物中的间隔序列是与样品核酸中靶序列的一部分连续互补或大体上相同的序列(1个或更多个碱基),并且侧翼是扩增产物中与扩增反应中使用的一个或更多个引物互补或大体上相同的序列。侧翼为扩增产物中的序列的间隔序列通常位于第一序列(与第一引物互补或大体上相同)和第二序列(与第二引物互补或大体上相同)之间。因此,扩增产物通常包括第一序列,后跟间隔序列,后跟第二序列。间隔序列通常与引物中的序列不互补或大体上相同。间隔序列可以是以下或可以包括以下:约1个至10个碱基,包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个碱基。在一些实施方案中,核酸扩增产物由以下组成或基本上由以下组成:与第一引物序列连续互补或相同的第一核苷酸序列、与第二引物序列连续互补或相同的第二核苷酸序列和间隔序列。在一些实施方案中,核酸扩增产物不包含任何另外的序列(例如,在5'端和/或3'端;或在产物内),该另外的序列不与第一引物序列和第二引物序列连续互补或相同,并且不是间隔序列的一部分,例如,通过加尾或环化引物、连接或其他机制掺入扩增产物中的另外的序列。在一些实施方案中,核酸扩增产物通常不包含另外的序列(例如,在5'端和/或3'端;或在产物内),该另外的序列不与第一引物序列和第二引物序列连续互补或相同,并且不是间隔序列的一部分,例如,通过加尾或环化引物、连接或其他机制掺入扩增产物中的另外的序列。然而,在这样的实施方案中,核酸扩增产物可以包含例如通过扩增过程中的错误或混杂引入产物中的一些错配的(即,非互补的)碱基或一个或更多个额外碱基(例如,在5'端和/或3'端;或在产物内)。

[0100] 本文描述的方法和组分可以用于评价和/或监测多重扩增,其中发生多于一种感兴趣的核酸的扩增(例如,多于一种靶序列的扩增)。例如,多重扩增可以指来自同一样品的多个序列的扩增或样品中若干个序列之一的扩增。多重扩增也可以指同时或以逐步方式扩增存在于多个样品中的一个或更多个序列。在一些情况下,可以制备扩增反应以检测至少

两个靶序列,但是仅靶序列中的一个可以存在于被测试的样品中,使得虽然两个序列都能够被扩增,但是仅有一个序列被扩增。在一些情况下,当存在两个靶序列时,扩增反应可以导致两个靶序列的扩增。多重扩增反应可以导致一个、一些或所有靶序列的扩增,其中包含适当的引物和酶。在一些情况下,可以制备扩增反应以用一对引物检测两个序列,其中一个序列是靶序列,并且一个序列是对照序列(例如,能够被与靶序列相同的引物扩增并具有与靶不同的间隔碱基或序列的合成序列)。在一些实施方案中,对照序列包含通过第一质量控制引物和第二质量控制引物的杂交形成的双链体。在一些情况下,可以制备扩增反应以检测具有对应引物对的多组序列,其中每组序列包括靶序列和对照序列。

[0101] 引物

[0102] 在本文描述的方法的一些实施方案中,使双链体经历扩增条件可以包括使靶核酸和对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针经历扩增条件。

[0103] 核酸扩增通常在存在一个或更多个引物的情况下进行。引物(例如,一种或更多种另外的引物)通常被表征为寡核苷酸,其包括能够在特定感兴趣的区域(即,靶核酸)处或附近(例如,邻近)与靶核酸杂交或退火的核苷酸序列。例如,引物可以允许靶核酸核苷酸序列的特异性确定或靶核酸或其特征的检测(例如,序列的存在或不存在)。引物可以是天然存在的或合成的。术语特异,或特异性,通常是指一个分子与另一个分子的结合或杂交,诸如用于靶多核苷酸的引物。也就是说,特异或特异性是指两个分子之间稳定复合物的识别、接触和形成,相比之下,这两个分子中的任何一个与其他分子的识别、接触或复合物形成要少得多。术语退火或杂交通常是指两个分子之间稳定复合物的形成。当提及引物时,术语引物、寡聚物或寡核苷酸在本文中可互换地使用。

[0104] 引物可以使用合适的方法设计和合成,并且可以具有适合于与靶序列杂交并进行本文描述的扩增过程的任何长度。引物通常根据靶核酸中的序列设计。一些实施方案中的引物的长度可以是约5个碱基至约30个碱基,例如长度是5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个碱基。在一些实施方案中,引物的长度小于28个碱基,例如,长度是约8个至约16个碱基或约10个至约12个碱基。引物可以包含天然存在和/或非天然存在的核苷酸(例如,修饰的核苷酸、标记的核苷酸)或其混合物。可以使用任何合适的技术合成和标记适合用于与本文描述的方法一起使用的引物。例如,引物可以根据固相亚磷酰胺三酯方法,使用自动合成仪化学合成。引物的纯化可以例如通过天然聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换HPLC实现。

[0105] 引物可以包括修饰的核苷酸或由修饰的核苷酸组成。可以根据本文描述或本领域已知的任何修饰来修饰核苷酸(或碱基)。修饰可以包括在引物合成期间进行的修饰和/或可以包括合成后修饰。修饰可以包括内部修饰、引物的3'端处的修饰和/或引物的5'端处的修饰。在一些实施方案中,引物包括修饰的核苷酸和未修饰的核苷酸的混合物。在一些实施方案中,引物包括未修饰的核苷酸。修饰和修饰的碱基可以包括例如磷酸化(例如,3'磷酸化、5'磷酸化); 附接化学或接头修饰(例如,Acrydite™、腺苷酸化、叠氮化物(NHS酯)、地高辛(NHS酯)、胆固醇-TEG、I-Linker™、氨基修饰剂(例如,氨基修饰剂C6、氨基修饰剂C12、氨基修饰剂C6dT、Uni-Link™氨基修饰剂)、炔烃(例如,5'己炔基、5-辛二炔基dU)、生物素化(例如,生物素、生物素(叠氮化物)、生物素dT、生物素-TEG、双生物素、PC生物素、脱硫生物

素-TEG)、硫醇修饰(例如,硫醇修饰剂C3S-S、二硫醇、硫醇修饰剂C6S-S);荧光团(例如, FreedomTM染料、Alexa Fluor[®]染料, LI-COR IRDyes[®]、ATTOTM染料、罗丹明染料、WellRED染料, 6-FAM(叠氮化物)、Texas Red[®]-X (NHS酯)、Lightcycler[®] 640 (NHS酯)、Dy 750 (NHS酯); Iowa Black[®]暗猝灭剂修饰(例如, Iowa Black[®] FQ、Iowa Black[®] RQ)、暗猝灭剂修饰(例如, Black Hole Quencher[®]-1、Black Hole Quencher[®]-2、Dabcyl);间隔物(C3间隔物、PC间隔物、己二醇、间隔物9、间隔物18、1', 2'-双脱氧核糖(dSpacer));修饰的碱基(例如, 2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、5-溴dU、脱氧尿苷、反向dT、反向双脱氧-T、双脱氧-C、5-甲基dC、脱氧肌苷、Super T[®]、Super G[®]、锁核酸(LNA)、5-硝基吡啶、2'-O-甲基RNA碱基、羟甲基dC、UNA非锁核酸(例如, UNA-A、UNA-U、UNA-C、UNA-G)、Iso-dC、Iso-dG、Fluoro C、Fluoro U、Fluoro A、Fluoro G);硫代磷酸酯键修饰(例如,硫代磷酸化的DNA碱基、硫代磷酸化的RNA碱基、硫代磷酸化的2'-O-甲基碱基、硫代磷酸化的LNA碱基);和点击化学修饰。在一些实施方案中,修饰和修饰的碱基包括尿嘧啶碱基、核糖核苷酸碱基、O-甲基RNA碱基、硫代磷酸酯键、3'磷酸基团、间隔物碱基(诸如,C3间隔物碱基或其他间隔物碱基)。例如,引物可以包含一个或多个O-甲基RNA碱基(例如,2'-O-甲基RNA碱基)。2'-O-甲基RNA是通常在tRNA和其他小RNA中发现的RNA的转录后修饰。可以直接合成包含2'-O-甲基RNA碱基的引物。例如,这种修饰可以增加RNA:RNA双链体的T_m,并在存在单链核糖核酸酶和DNA酶的情况下提供稳定性。2'-O-甲基RNA碱基可以被包含在引物中,例如,以增加稳定性和与靶序列的结合亲和力。在一些实施方案中,引物可以包含一个或多个硫代磷酸酯键(例如,硫代磷酸酯键修饰)。硫代磷酸酯(PS)键用硫原子取代引物的磷酸主链中的非桥接氧。这种修饰通常使核苷酸间连键抵抗核酸酶降解。例如,硫代磷酸酯键可以被引入引物的5'端或3'端的约最后3个至5个核苷酸之间,以抑制核酸外切酶降解。在一些实施方案中,包含在整个引物中的硫代磷酸酯键可以帮助减少核酸内切酶的攻击。引物可以例如包含3'磷酸基团。在某些情况下,3'磷酸化可以抑制通过某些3'-核酸外切酶的降解,并且可以用于阻断通过DNA聚合酶的延伸。在一些实施方案中,引物包含一个或多个间隔物碱基(例如,一个或多个C3间隔物)。C3间隔物亚磷酰胺可以掺入引物内部或引物的5'端。例如,可以在引物的任一端添加多个C3间隔物,以引入长的亲水性间隔物臂,用于附接荧光团或其他悬垂基团。

[0106] 引物(例如,质量控制引物或靶序列特异性引物)可以包含DNA碱基、RNA碱基或两者。在一些实施方案中,引物包含DNA碱基和RNA碱基的混合物。DNA碱基和/或RNA碱基可以是修饰的或未修饰的。在一些实施方案中,引物由DNA碱基(例如,修饰的DNA碱基和/或未修饰的DNA碱基)组成。在一些实施方案中,引物由RNA碱基(例如,修饰的RNA碱基和/或未修饰的RNA碱基)组成。在一些实施方案中,引物不包含RNA碱基。在一些实施方案中,引物在3'端处不包含RNA碱基。在一些实施方案中,引物在3'端处包含DNA碱基(或修饰的DNA碱基)。在一些实施方案中,引物不是嵌合引物。嵌合引物是包含DNA碱基和RNA碱基的引物。在一些实施方案中,引物是均匀引物(homogeneous primer)(例如,均匀DNA引物)。均匀DNA引物可以包含未修饰的DNA碱基、修饰的DNA碱基或修饰的DNA碱基和未修饰的DNA碱基的混合物,并且不包含RNA碱基。

[0107] 在一些实施方案中,引物不包含裂解剂识别位点。例如,引物可以不包含切口酶识别位点。在一些实施方案中,引物不包含尾部。在一些实施方案中,引物不包含含有切口酶

识别位点的尾部。

[0108] 在一些实施方案中,引物序列的全部或部分可以与靶核酸互补或完全互补。关于序列的互补性通常是指将彼此杂交的核苷酸序列。杂交条件的严格性可以改变,以容忍不同数量的序列错配。在一些实施方案中,靶序列和引物序列彼此至少75%互补。例如,靶序列和引物序列可以彼此以下或至少以下互补:75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。与靶核酸序列互补的引物通常也与靶核酸序列的互补物(例如,反义链)互补或完全互补。与靶核酸的反义链互补的引物可以是彼此以下、约以下、至少以下或至少约以下相同的:75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。两个核苷酸序列是否互补可以通过共有的相同核苷酸序列的百分比来确定。

[0109] 如本文描述的,一对引物可以包括正向引物和反向引物(例如,与靶核酸的有义链和反义链结合的引物)。由于3'重叠区处的互补性,正向质量控制引物可以与对应的反向质量控制引物结合,并且正向质量控制引物和反向质量控制引物是一对质量控制引物。在一些实施方案中,引物由一对引物(即,正向引物和反向引物)组成。因此,在一些实施方案中,使用一对引物进行靶序列的扩增,并且在靶序列的扩增中不包括另外的引物或寡核苷酸(例如,扩增反应组分不包含给定靶序列的另外的引物对、不包含巢式引物、不包含缓冲引物(bumper primer)、不包含除引物以外的寡核苷酸、不包含探针等)。在一些实施方案中,引物由一对引物组成,然而,在一些实施方案中,扩增反应可以包含用于扩增不同靶序列的另外的引物对,诸如在多重扩增中。在一些实施方案中,引物由一对引物组成,然而,在一些实施方案中,扩增反应可以包含用于检测过程的另外的引物、寡核苷酸或探针,该检测过程不被认为是扩增的一部分。在一些实施方案中,引物成组使用。扩增引物组可以包括用于给定靶序列的一对正向引物和反向引物。对于多重扩增,扩增第一靶序列的引物被认为是引物组,并且扩增第二靶序列的引物被认为是不同的引物组。

[0110] 在一些实施方案中,扩增反应组分包含与样品核酸的第一链(例如,有义链、正向链)中的靶序列(例如,靶核酸)互补的第一引物(第一寡核苷酸)和与样品核酸的第二链(例如,反义链、反向链)中的靶序列互补的第二引物(第二寡核苷酸)。在一些实施方案中,第一引物(第一寡核苷酸)包含与样品核酸的第一链中的靶序列完全互补的第一多核苷酸,并且第二引物(第二寡核苷酸)包含与样品核酸的第二链中的靶序列完全互补的第二多核苷酸。引物-靶的完全互补通常是指引物中的核苷酸序列,其中每个有序的碱基与靶序列中对应的有序的碱基配对,并且在被认为是完全互补的序列中没有空位、另外的序列或不配对的碱基。换句话说,完全互补通常是指引物中核苷酸序列的所有连续碱基与靶中核苷酸序列的对应的连续碱基互补。

[0111] 引物可以包含不向引物添加功能特征的一个或多个另外的碱基(例如,在5'端和/或3'端处,或在引物内)。例如,存在于加尾引物或环状引物中的另外的序列通常添加功能特征,并且在这样的实施方案中将从引物中排除。在一些实施方案中,引物可以包含修饰,诸如一种或更多种肌苷、无碱基位点、锁核酸、小沟结合物、双链体稳定剂(例如,吡啶、亚精胺)、 T_m 修饰剂或改变引物的结合性质的任何修饰剂。在一些实施方案中,引物可以包含可检测的分子或实体(例如,荧光团、放射性同位素、比色剂、颗粒、酶等)。

[0112] 聚合酶

[0113] 在一些实施方案中,扩增反应包含一种或更多种聚合酶。聚合酶是能够针对核酸靶序列(例如,引物与其退火)催化核苷酸特异性掺入以延伸引物分子(例如,本文描述的扩增引物)的3' 羟基末端的蛋白质。聚合酶可以包括例如在升高的反应温度(例如,高于55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C或100°C)具有活性的嗜热或超嗜热的聚合酶。超嗜热的聚合酶可以被称为超嗜热生物聚合酶。聚合酶可以具有或不具有链置换能力。在一些实施方案中,聚合酶可以在单次合成中掺入约1个至约50个核苷酸,例如在单次合成中掺入5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个核苷酸,或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0114] 扩增反应条件可以包括一种或更多种DNA聚合酶,包括但不限于9°N DNA聚合酶; 9°Nm™DNA聚合酶;Therminator™DNA聚合酶;Therminator™IIDNA聚合酶;Therminator™IIIDNA聚合酶;Therminator™γ DNA聚合酶;Bst DNA聚合酶;Bst DNA聚合酶(大片段);Phi29DNA聚合酶、DNA聚合酶I(例如,大肠杆菌(E. coli))、DNA聚合酶I、大(Klenow)片段;Klenow片段(3' -5' 外切);T4DNA聚合酶;T7DNA聚合酶;Deep VentR™(外切)DNA聚合酶;Deep VentR™DNA聚合酶;DyNAzyme™EXT DNA;DyNAzyme™II热启动DNA聚合酶;Phusion™高保真DNA聚合酶;VentR®DNA聚合酶;VentR®(外切)DNA聚合酶;RepliPhi™Phi29DNA聚合酶;rBst DNA聚合酶,大片段(IsoTherm™DNA聚合酶);MasterAmp™AmpliTherm™DNA聚合酶;Tag DNA聚合酶;Tth DNA聚合酶;Tfl DNA聚合酶;Tgo DNA聚合酶;SP6DNA聚合酶;Tbr DNA聚合酶;DNA聚合酶β;和ThermoPhi DNA聚合酶。

[0115] DNA聚合酶可以是超嗜热生物DNA聚合酶,例如在高温稳定的超嗜热生物DNA聚合酶,或其变体或功能片段。例如,超嗜热生物DNA聚合酶可以具有在95°C约5小时至10小时的半衰期,和在100°C约1小时至3小时的半衰期。在一些实施方案中,扩增反应组分包含来自古细菌的一种或更多种超嗜热生物DNA聚合酶,例如来自嗜热球菌属(Thermococcus)(例如,Thermococcaceaeen archaean、火球菌属(Pyrococcus)、甲烷球菌科(Methanococcaceae)、一种或更多种甲烷球菌属(Methanococcus)、栖热菌属(Thermus)或其组合的DNA聚合酶。在一些实施方案中,扩增反应条件包含一种或更多种来自嗜热栖热菌(Thermus thermophiles)的超嗜热生物DNA聚合酶。

[0116] 超嗜热生物DNA聚合酶的功能片段通常保留全长聚合酶的一种或更多种功能,例如聚合DNA的能力(例如,在扩增反应中)。功能片段可以例如以全长聚合酶的功能水平的至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的水平执行功能(例如,扩增反应中聚合DNA)。聚合酶活性的水平可以例如使用可检测的核酸扩增方法来评估,诸如如本文公开的用于监测扩增反应的方法。在一些实施方案中,超嗜热生物DNA聚合酶包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的功能片段。在一些实施方案中,超嗜热生物DNA聚合酶包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或SEQ ID NO:2的功能片段。在一些实施方案中,扩增反应条件包括聚合酶,该聚合酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同、95%相同或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,扩增反应条件包括聚合酶,该聚合酶包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同、95%相同或99%相同的氨基酸序列。

[0117] 聚合酶可以具有逆转录能力。在这样的情况下,扩增反应可以在不使用单独的逆转录酶的情况下,例如在单个步骤中扩增RNA靶。具有逆转录酶能力的聚合酶的非限制性实

例包括Bst (大片段)、9°N DNA聚合酶、9°NmTMDNA聚合酶、TherminatorTM、TherminatorTMII等。在一些实施方案中,扩增反应条件包括一种或更多种单独的逆转录酶。在一些实施方案中,扩增反应中可以包含多于一种聚合酶。例如,扩增反应可以包含具有逆转录酶活性的聚合酶和不具有逆转录酶活性的第二聚合酶。

[0118] 在一些实施方案中,在扩增期间使用一种或更多种具有核酸外切酶活性的聚合酶。在一些实施方案中,在扩增期间使用一种或更多种不具有核酸外切酶活性或具有低核酸外切酶活性的聚合酶,例如聚合酶包含降低或消除聚合酶的核酸外切酶活性的一种或更多种修饰(例如,氨基酸取代)。例如,与未修饰的聚合酶相比,具有低核酸外切酶活性的修饰的聚合酶可以具有10%或更小的核酸外切酶活性。例如,与未修饰的聚合酶相比,具有低核酸外切酶活性的修饰的聚合酶可以具有小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的核酸外切酶活性。在一些实施方案中,聚合酶不具有5'至3'核酸外切酶活性或具有低5'至3'核酸外切酶活性,和/或不具有3'至5'核酸外切酶活性或具有低3'至5'核酸外切酶活性。在一些实施方案中,聚合酶不具有单链依赖性核酸外切酶活性或具有低单链依赖性核酸外切酶活性,和/或不具有双链依赖性核酸外切酶活性或具有低双链依赖性核酸外切酶活性。可以降低或消除聚合酶的核酸外切酶活性的修饰的非限制性实例包括在SEQ ID NO:1的一个或多个位置141、143和458处的一个或多个氨基酸取代。对应于SEQ ID NO:1中位置的氨基酸位置,例如,可以通过进行氨基酸序列比对来鉴定。一个或多个修饰可以包括将位置141处的天然氨基酸取代为丙氨酸,例如D141A;将位置143处的天然氨基酸取代为丙氨酸,例如E143A;将位置143处的天然氨基酸取代为天冬氨酸,例如E143D;将位置485处的天然氨基酸取代为亮氨酸,例如A485L;或其组合。在一些实施方案中,修饰包括D141A、E143A和A485L中的一个、两个或更多个。

[0119] 检测和定量

[0120] 本文公开的方法可以包括在扩增反应期间检测从第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号以确定延伸的双链体的产生,其中在扩增反应期间信号的降低指示延伸的双链体的产生。在一些实施方案中,在扩增反应期间检测从第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号可以包括在扩增反应期间在两个或多个不同时间点检测信号。在扩增反应期间信号的降低可以包括在扩增反应期间随时间推移的降低。在扩增反应期间信号的降低可以包括在扩增反应期间在约10分钟(例如,约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围)的时间段内的降低。该时间段可以在从扩增反应开始起约3分钟至约12分钟之间(例如,约3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围)。该方法可以包括在扩增反应之前、扩增反应之后或两者检测第一质量控制引物的可猝灭标记的信号。在一些实施方案中,检测从第一质量控制引物的可猝灭标记产生的信号不包括使用任何探针。本文描述的方法可以有利地提供在监测扩增反应中减少的复杂性,而不需要另外的引物和/或探针。

[0121] 本文描述的方法可以包括检测和/或定量扩增产物(例如,延伸的双链体和/或靶核酸扩增子)。扩增产物可以通过任何合适的检测和/或定量方法来检测和/或定量,包括例如本文描述的任何检测方法或定量方法。检测和/或定量方法的非限制性实例包括分子信标(例如,实时、终点)、侧向流、荧光共振能量转移(FRET)、荧光偏振(FP)、表面捕获、5'至3'

核酸外切酶水解探针(例如,TAQMAN)、嵌入/结合染料、吸光度法(例如,比色法、浊度法)、电泳(例如,凝胶电泳、毛细管电泳)、质谱法、核酸测序、数字扩增、引物延伸法(例如,iPLEX™)、来自Affymetrix的分子倒置探针(MIP)技术、限制性片段长度多态性(RFLP分析)、等位基因特异性寡核苷酸(ASO)分析、甲基化特异性PCR(MSPCR)、焦磷酸测序分析、acycloprime分析、反向斑点印迹、基因芯片微阵列、动态等位基因特异性杂交(DASH)、肽核酸(Peptide nucleic acid,PNA)和锁核酸(LNA)探针、AlphaScreen、SNPstream、遗传位分析(genetic bit analysis)(GBA)、多重微测序、SnaPshot、GOOD测定、微阵列微测序、阵列引物延伸(APEX)、微阵列引物延伸、Tag阵列、编码微球、模板指导的掺入(TDI)、比色寡核苷酸连接测定(OLA)、序列编码OLA、微阵列连接、连接酶链式反应、挂锁(padlock)探针、侵入物测定(invader assay)、使用至少一个探针的杂交、使用至少一个荧光标记的探针的杂交、克隆和测序、使用杂交探针和定量实时聚合酶链式反应(QRT-PCR)、纳米孔测序、芯片及其组合。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括使用实时检测方法(即,在扩增过程期间检测和/或连续监测产物)。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括使用终点检测方法(即,在完成或停止扩增过程后检测产物)。核酸检测方法也可以采用使用直接掺入靶序列中或含有靶互补序列的探针中的标记的核苷酸。这样的标记本质上可以为放射性的和/或荧光的,并且可以以本文讨论的任何方式来分辨。在一些实施方案中,核酸扩增产物的定量可以使用下文描述的一种或更多种检测方法来实现。在一些实施方案中,检测方法可以与信号强度的测量和/或用于定量核酸扩增产物的标准曲线和/或查找表的产生(或参考)联合使用。

[0122] 检测核酸扩增产物(例如,延伸的双链体)可以包括使用荧光共振能量转移(FRET)。FRET是供体与受体分子两个发色团之间的能量转移机制。简而言之,供体荧光团分子在特定的激发波长被激发。当供体分子返回到其基态时,供体分子随后的发射可以通过长程偶极-偶极相互作用将激发能量转移到受体分子。受体分子的发射强度可以被监测,并且随着供体和受体之间的距离、供体发射光谱和受体吸收光谱的重叠以及供体发射偶极矩和受体吸收偶极矩的取向而变化。FRET可以用于定量分子动力学,例如,在对分子信标描述的DNA-DNA相互作用中。为了监测特定产物的产生,探针可以在一端上用供体分子而在另一端上用受体分子标记。探针-靶杂交导致供体和受体的距离或取向发生变化,并且观察到FRET变化。在一些实施方案中,可猝灭标记是供体分子。在一些实施方案中,受体分子可以是猝灭剂。

[0123] 检测核酸扩增产物(例如,来自靶核酸的扩增的扩增产物)可以包括使用分子信标,例如发夹状寡核苷酸,其在一端包含荧光团,并且在相对端包含猝灭染料。发夹的环可以包含与靶序列互补的探针序列,而茎通过位于探针序列任一侧上的互补臂序列的退火形成。荧光团和猝灭分子可以在每个臂的相对端共价连接。在阻止寡核苷酸与其互补靶杂交的条件下,或者当分子信标在溶液中是游离的时,荧光分子和猝灭分子彼此接近,从而防止荧光共振能量转移(FRET)。当分子信标遇到靶分子(例如,核酸扩增产物)时,可以发生杂交,并且环结构转化为稳定的更刚性的构象,导致荧光团和猝灭剂分子分离,从而产生荧光。由于探针的特异性,荧光的产生通常完全是由于预期扩增产物的合成。在一些情况下,分子信标探针序列与扩增产物中的序列杂交,该扩增产物中的序列与靶核酸中的序列相同或互补。在一些情况下,分子信标探针序列与扩增产物中的序列杂交,该扩增产物中的序列

与靶核酸中的序列不相同或互补(例如,与通过加尾扩增引物或连接添加到扩增产物的序列杂交)。

[0124] 检测核酸扩增产物可以包括使用荧光偏振(FP)、表面捕获、5'至3'核酸外切酶水解探针(例如,TAQMAN)、嵌入和/或结合染料、质谱法、核酸测序、数字扩增(例如,数字PCR)和/或吸光度法(例如,比色法、浊度法)。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括使用特异性对核酸进行染色的染料。例如,嵌入染料在与DNA或RNA结合时表现出增强的荧光。染料可以包括嵌入DNA或RNA的荧光团,并且可以包括例如SYTO®82、吖啶橙、溴化乙锭、Hoechst染料、PicoGreen®、碘化丙锭、SYBR®I(不对称花菁染料)、SYBR®II、TOTO(噻唑橙二聚体)和YOYO(噻唑黄二聚体)。当与各种检测方法结合使用时,染料提供了增加核酸检测灵敏度的机会。例如,溴化乙锭可以用于在凝胶电泳之后对琼脂糖凝胶中的DNA进行染色;碘化丙锭和Hoechst 33258可以用于流式细胞术以确定细胞的DNA倍性;SYBR®Green1可以用于通过毛细管电泳与激光诱导荧光检测分析双链DNA;并且PicoGreen®可以用于增强匹配离子对多核苷酸色谱法之后的双链DNA的检测。

[0125] 本文提供了用于评价、监测、观察或追踪扩增反应的进展的方法、试剂盒和反应混合物。在另一个方面中,本文公开的方法、试剂盒和反应混合物可以用于确定反应的扩增效率。可以干扰扩增效率的因素的非限制性实例可以包括扩增抑制剂(例如,血红蛋白、腐殖酸、黄腐酸、二价阳离子、螯合分子)、不存在和/或有缺陷的扩增反应组分以及酶和其他蛋白质(例如,核酸酶)。

[0126] 本文描述的方法、试剂盒和反应混合物可以用于确定扩增反应组分的不存在和/或有缺陷的扩增反应组分的存在(例如,量)。组分的量可以因批次而异或随时间推移而异。因此,可以通过使用本文描述的方法评价每个批次中组分的性能,或通过评价批次中组分随时间推移的性能来控制组分的量。例如,可以使用公开的方法评价在参考批次和样品批次中产生的两种聚合酶的性能。可以将样品批次中的聚合酶的性能与参考批次中的聚合酶的性能进行比较,以确定样品批次中的聚合酶是否适合用于使用。可选择地,可以在到达预定时间之前和之后比较聚合酶的活性,以确定聚合酶的活性是否随时间推移降低。在一些实施方案中,公开的方法可以确定一种或更多种扩增组分的保质期。例如,聚合酶的活性在从初始生产开始的预定时间间隔进行评价。如果活性在一定时间段之后下降到低于预定水平,则该时间可以被确定为聚合酶的保质期。

[0127] 在一些实施方案中,本文公开的方法、试剂盒和反应混合物可以用于(例如,作为内部对照)监测扩增效率,例如干扰扩增效率的扩增抑制剂的存在。通常,内部对照用于监测样品的抑制活性(例如,扩增抑制剂的存在)。内部对照可以包括:(i)与被怀疑包含在样品中的靶核酸序列无关的模板和(ii)用于扩增和检测模板的引物和探针。有利的是,内部对照的扩增效率不受样品中包含的靶核酸序列的扩增的影响,并且反之亦然。内部对照的扩增指示样品对扩增反应没有抑制活性,即样品不包含抑制扩增反应的物质。

[0128] 本文描述的第一质量控制引物和第二质量控制引物可以替代常规内部对照的组分,即模板、引物对和探针。本文描述的第一质量控制引物和第二质量控制引物还可以被添加至样品中靶核酸序列的扩增反应中,使得由第一质量控制引物与第二质量控制引物的3'重叠区之间的杂交形成的双链体的扩增可以与靶核酸序列的扩增同时发生。延伸的双链体的产生可以允许确定样品中是否存在针对扩增反应的抑制物质。

[0129] 本文描述的方法、试剂盒和反应混合物可以用作定量标准品。例如,在定量实时PCR反应中,通过使用已知标准品的稀释系列进行扩增反应以获得标准曲线,其中靶核酸序列的初始量的对数值相对于Ct值作图,并且然后将从未知样品获得的Ct值与标准曲线进行比较以计算样品中靶核酸序列的量,从而实现靶核酸序列的定量。可以有利地使用第一质量控制引物和第二质量控制引物来代替标准品。

[0130] 靶核酸

[0131] 如本文使用的,靶核酸是在使用本文公开的质量控制方法和组合物评价和/或监测的扩增反应中经历扩增的感兴趣的核酸。术语“核酸”和“核酸分子”在本文中可互换地使用。该术语是指任何组成的核酸,诸如DNA(例如,互补DNA(cDNA)、基因组DNA(gDNA)等)、RNA(例如,信使RNA(mRNA)、短抑制性RNA(siRNA)、核糖体RNA(rRNA)、tRNA、微RNA和/或DNA或RNA类似物(例如,包含碱基类似物、糖类似物和/或非天然主链等)、RNA/DNA杂交体和聚酰胺核酸(polyamide nucleic acids,PNA),所有这些都可以呈单链或双链形式,并且除非另外限制,可以包括天然核苷酸的能够以与天然存在的核苷酸相似的方式起作用的已知类似物。核酸可以是或可以来自质粒、噬菌体、自主复制序列(ARS)、着丝粒、人工染色体、染色体或能够在体外或在宿主细胞、细胞、细胞核、线粒体或细胞的细胞质中复制或被复制的其他核酸。除非特别限定,否则该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,这些类似物具有与参考核酸相似的结合性质,并以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。

[0132] 靶核酸可以被称为靶序列、靶多核苷酸和/或靶多核苷酸序列,并且可以包括双链核酸分子和单链核酸分子。靶核酸可以是例如DNA或RNA。靶序列可以指核酸序列的有义链或反义链,并且也可以指存在于原始靶序列的靶核酸、扩增拷贝或扩增产物上的序列。靶序列可以是较大核苷酸内的子序列。例如,靶序列可以是靶向扩增的核酸片段、染色体、质粒内的短序列(例如,20个至50个碱基)。在一些实施方案中,靶序列是指靶核酸中与用于扩增核酸的寡核苷酸(例如,引物)互补的序列。因此,靶序列可以指被靶向进行扩增的整个序列,或者可以指靶核酸中寡核苷酸结合的子序列。扩增产物可以是包含靶序列以及至少一个其他序列或其他核苷酸的较大分子。在一些实施方案中,扩增产物与靶序列的长度约相同,或与靶序列的长度完全相同。在一些实施方案中,扩增产物包含靶序列。在一些实施方案中,扩增产物由靶序列组成。

[0133] 靶核酸可以包括例如基因组核酸、质粒核酸、线粒体核酸、细胞核酸、细胞外核酸、细菌核酸和病毒核酸。在一些实施方案中,靶核酸可以包括基因组DNA、染色体DNA、质粒DNA、线粒体DNA、基因、任何类型的细胞RNA、信使RNA、细菌RNA、病毒RNA或合成寡核苷酸。基因组核酸可以包括来自任何基因组的任何核酸,例如,包括动物、植物、昆虫、病毒和细菌基因组,包括例如存在于孢子中的基因组。在一些实施方案中,基因组靶核酸可以位于特定基因组基因座或多于一个基因组基因座内。基因组基因座可以包括以下中的任一种或组合:开放阅读框DNA、非转录DNA、内含子序列、外显子序列、启动子序列、增强子序列、侧翼序列,或被认为与给定基因组基因座相关的任何序列。靶核酸可以包括微RNA(miRNA)或短干扰RNA(siRNA)。

[0134] 核酸可以从任何合适的生物样本或样品获得,并且通常从获自受试者的样品中分离。受试者可以是任何活的或非活的生物体,包括但不限于人类、非人类动物、植物、细菌、真菌、病毒或原生生物。可以选择任何人类或非人类动物,包括但不限于哺乳动物、爬行动

物、鸟类、两栖动物、鱼类、有蹄类动物、反刍动物、牛科动物(例如,牛)、马科动物(例如,马)、山羊类(caprine)和绵羊类(ovine)(例如,绵羊、山羊)、猪类(swine)(例如,猪)、骆驼科(例如,骆驼、美洲驼、羊驼)、猴、猿(例如,大猩猩、黑猩猩)、熊科动物(例如,熊)、家禽、犬、猫、小鼠、大鼠、鱼、海豚、鲸鱼和鲨鱼。受试者可以是雄性或雌性,并且受试者可以是任何年龄(例如,胚胎、胎儿、婴儿、儿童、成人)。

[0135] 样品或测试样品可以是受试者或其部分分离或获得的任何样本,包括但不限于血液或血液制品(例如,血清、血浆等)、脐带血、骨髓、绒毛膜绒毛、羊水、脑脊液、脊髓液、灌洗液(例如,支气管肺泡、胃、腹膜、导管、耳、关节镜)、活检样品、腹腔穿刺术样品、细胞(例如,血细胞)或其部分(例如,线粒体、细胞核、提取物等)、女性生殖道的洗涤液、尿液、粪便、痰、唾液、鼻黏液、前列腺液、灌洗液、精液、淋巴液、胆汁、眼泪、汗液、母乳、乳腺液、硬组织(例如,肝、脾、肾、肺或卵巢)或其组合。术语血液包括全血、血液制品或血液的任何级分,诸如血清、血浆、血沉棕黄层或常规定义的类似物。血浆是指用抗凝剂处理的血液离心产生的全血级分。血清是指血液样品凝固后剩余的流体的含水部分。通常根据医院或诊所通常遵循的标准方案收集流体或组织样品。

[0136] 样品或测试样品可以包括含有孢子、病毒、细胞、来自原核生物或真核生物的核酸或任何游离核酸的样品。例如,本文描述的方法可以用于检测孢子外部的核酸(例如,不需要裂解)。样品可以从任何怀疑含有靶序列的材料分离,诸如从上文描述的受试者分离。在一些实施方案中,靶序列存在于空气、植物、土壤或其他怀疑包含生物有机体的材料中。

[0137] 任何合适的方法都可以用于从生物样品分离、提取和/或纯化核酸,其非限制性实例包括本领域的DNA制备方法,以及各种商业可得的试剂或试剂盒,诸如Qiagen的QIAamp循环核酸试剂盒、QiaAmp DNA微型试剂盒或QiaAmp DNA血液微型试剂盒(Qiagen,Hilden,Germany)、GenomicPrep™血液DNA分离试剂盒(Promega,Madison,Wis.)、GFX™基因组血液DNA纯化试剂盒(Amersham,Piscataway,N.J.)等或其组合。

[0138] 样品可以包含样品核酸(例如,多于一种样品核酸)。术语“多于一种”在本文用于意指两种或更多种。因此,在一些实施方案中,样品包含两种或更多种(例如,3种或更多种、5种或更多种、10种或更多种、20种或更多种、50种或更多种、100种或更多种、500种或更多种、1,000种或更多种或者5,000种或更多种)样品核酸(例如,DNA/RNA)。公开的方法可以用作检测样品中(例如,核酸诸如DNA/RNA的复杂混合物中)存在的靶核酸的非常灵敏的方式。在一些实施方案中,样品包含序列彼此不同的5种、10种、20种、25种、50种、100种、500种、 10^3 种、 5×10^3 种、 10^4 种、 5×10^4 种、 10^5 种、 5×10^5 种、 10^6 种或 10^7 种、50种或更多种DNA/RNA。在一些实施方案中,样品包含来自细胞(例如,真核细胞、哺乳动物细胞或人类细胞)或细胞裂解物(例如,真核细胞裂解物、哺乳动物细胞裂解物、人类细胞裂解物、原核细胞裂解物、植物细胞裂解物等)的DNA/RNA。

[0139] 本文使用的术语“样品”应被给予其普通含义,并且应包括包含RNA和/或DNA的任何样品(例如,为了确定靶DNA和/或靶RNA是否存在于RNA和/或DNA群体中)。样品可以来源于任何来源,例如,样品可以是纯化的DNA和/或RNA的合成组合;样品可以是细胞裂解物、富含DNA/RNA的细胞裂解物或从细胞裂解物分离和/或纯化的DNA/RNA。样品可以来自患者(例如,为了诊断的目的)。样品可以来自透化的细胞、交联的细胞、组织切片或其组合。样品可以来自通过交联然后通过去脂化和调节以形成均匀折射率来制备的组织。样品可以包含靶

核酸(例如,靶DNA/RNA)和多于一种非靶DNA/RNA。在一些实施方案中,靶DNA/RNA以每10个、20个、25个、50个、100个、500个、 10^3 个、 5×10^3 个、 10^4 个、 5×10^4 个、 10^5 个、 5×10^5 个、 10^6 个或 10^7 个非靶DNA/RNA一个拷贝存在于样品中。

[0140] 关于患者的样品包括生物来源的血液和其他液体样品、固体组织样品诸如活检样本或组织培养物或来源于其的细胞及其后代,以及在其获得之后以任何方式被操作(诸如通过用试剂处理)、洗涤或富集某些细胞群体(例如,癌细胞)或特定类型的分子(例如,RNA)的样品。样品可以包括以下或是以下:生物样品,包括但不限于临床样品,诸如血液、血浆、血清、抽吸物、脑脊液(CSF),并且还包括通过手术切除获得的组织、通过活检获得的组织、培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、组织样品、器官、骨髓等。生物样品可以包括来源于其(例如,癌性细胞、感染的细胞等)的生物流体,例如,从这样的细胞获得的包含RNA的样品(例如,包含RNA的细胞裂解物或其他细胞提取物)。

[0141] 样品的来源可以是(或被怀疑是)病变的细胞、流体、组织或器官;或正常(非病变)的细胞、流体、组织或器官。在一些实施方案中,样品的来源是(或被怀疑是)病原体感染的细胞、组织或器官。例如,样品的来源可以是可能被感染或可能未被感染的个体,并且样品可以从个体收集的任何生物样品(例如,血液、唾液、活检、血浆、血清、支气管肺泡灌洗液、痰、粪便样品、脑脊液、细针抽吸物、拭子样品(例如,口腔拭子、宫颈拭子、鼻拭子)、间质液、滑液、鼻涕、眼泪、血沉棕黄层、黏膜样品、上皮细胞样品(例如,上皮细胞刮擦)等)。样品可以是无细胞液体样品或包含细胞的液体样品。病原体可以是病毒、真菌、原生动物、疟原虫属(*Plasmodium*) 寄生虫、弓形虫(*Toxoplasma*) 属寄生虫、血吸虫属(*Schistosoma*) 寄生虫等。“蠕虫”包括蛔虫、心丝虫、和植食性线虫(线虫纲(*Nematoda*))、吸虫(吸虫纲(*Trematoda*))、棘头虫和绦虫(绦虫纲(*Cestoda*))。原生动物感染包括贾第鞭毛虫属种(*Giardia* spp.)、毛滴虫属种(*Trichomonas* spp.) 感染、非洲锥虫病、阿米巴痢疾、巴贝斯虫病、小袋虫性痢疾、查加斯氏病(*Chaga's disease*)、球虫病、疟疾和弓形虫病。病原体诸如寄生虫/原生动物病原体的实例包括但不限于:恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)。真菌病原体包括但不限于:新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)以及白色念珠菌(*Candida albicans*)。致病病毒包括例如免疫缺陷病毒(例如,HIV);流感病毒;登革热;西尼罗河病毒;疱疹病毒;黄热病病毒;丙型肝炎病毒;甲型肝炎病毒;乙型肝炎病毒;乳头瘤病毒等。致病病毒可以包括DNA病毒,诸如:乳多空病毒(例如,HPV、多瘤病毒);嗜肝DNA病毒属;疱疹病毒(例如,HSV(例如,HSV I、HSV II)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、嗜淋巴疱疹病毒(herpes lymphotropic virus)、玫瑰糠疹(Pityriasis Rosea)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒);腺病毒(例如,胸腺病毒属、禽腺病毒属、肌腺病毒属(ichadenovirus)、哺乳动物腺病毒属、唾液酸酶腺病毒属(sialadenovirus));痘病毒(例如,天花、痘苗病毒、牛痘病毒、猴痘病毒、羊痘病毒、假牛痘、牛丘疹性口炎病毒;塔纳痘病毒、亚巴猴肿瘤病毒(yaba monkey tumor virus);传染性软疣病毒(MCV));细小病毒(例如,腺相关病毒(AAV)、细小病毒B19、人类博卡病毒、布法病毒、人类细小病毒4G1);双生病毒科(Geminiviridae);矮化病毒科

(Nanoviridae);藻类DNA病毒科(Phycodnaviridae);等等。病原体的非限制性实例包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、乙型流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenzae B*)、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、狂犬病病毒、人类血清细小病毒样病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、腺病毒、人类T细胞白血病病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒(*Sindbis virus*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、刚地弓形虫、兰氏锥虫(*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫、罗得西亚锥虫(*Trypanosoma rhodesiense*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)、日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)、牛巴贝斯虫(*Babesia bovis*)、柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)、盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、热带利什曼原虫(*Leishmania tropica*)、旋毛虫(*Trichinella spiralis*)、微小泰勒虫(*Theileria parva*)、泡状带绦虫(*Taenia hydatigena*)、羊带绦虫(*Taenia ovis*)、牛带绦虫(*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫(*Mesocestoides corti*)、关节炎支原体(*Mycoplasma arthritidis*)、猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)、口腔支原体(*M. orale*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、莱氏无胆甾原体(*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体(*M. salivarium*)和肺炎支原体(*M. pneumoniae*)。

[0142] 试剂盒

[0143] 本文公开的内容包括用于评价、监测、观察或追踪扩增反应的进展的试剂盒。试剂盒可以包括第一质量控制引物和第二质量控制引物,所述第一质量控制引物和所述第二质量控制引物各自包含能够彼此杂交的3'重叠区,其中所述第一质量控制引物包含可猝灭标记。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的每一个的长度不大于35个核苷酸。

[0144] 可猝灭标记可以是荧光团。可猝灭标记可以位于第一质量控制引物的3'重叠区之外。可猝灭标记可以位于第一质量控制引物的5'末端处。可猝灭标记可以位于第一质量控制引物的3'重叠区中。第二质量控制引物可以包含猝灭剂。猝灭剂可以位于第二质量控制引物的3'重叠区之外。猝灭剂可以位于第二质量控制引物的5'末端处。猝灭剂可以位于第二质量控制引物的3'重叠区中。

[0145] 第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一个可以包含一个或更多个修饰的核苷酸。一个或更多个修饰的核苷酸可以包括间隔物、无碱基位点、未甲基化RNA碱基、2'-O-甲基化核苷酸及其任何组合。一个或更多个修饰的核苷酸中的至少一个可以是2'-O-甲基化核苷酸。第一质量控制引物、第二质量控制引物或两者可以包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的每一

个可以包含一个或更多个聚合酶终止子。在一些实施方案中,一个或更多个聚合酶终止子中的至少一个可以是2'-O-甲基化核苷酸。

[0146] 第一质量控制引物的3'重叠区可以与第二质量控制引物的3'重叠区互补。第一质量控制引物的3'重叠区可以与第二质量控制引物的3'重叠区完全互补。在一些实施方案中,第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区具有相同的长度。第一质量控制引物的3'重叠区和第二质量控制引物的3'重叠区中的一个或更多个的长度可以是约2个至约10个核苷酸。第一质量控制引物和第二质量控制引物的3'重叠区的长度可以是4个或5个核苷酸。

[0147] 试剂盒可以包括具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段可以至少约90%相同或至少约95%相同的氨基酸序列。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。试剂盒还可以包括例如用于反应的修饰的核苷酸、容器、比色皿或其他容器,或用于再水合冻干或热干燥的组分的水或缓冲液的小瓶。例如,所用的缓冲液可以适用于聚合酶和引物退火活性两者。试剂盒可以包括对靶核酸特异性的一种或更多种另外的引物和/或一种或更多种探针。

[0148] 试剂盒还可以包括任意数量的独立器皿、腔室、容器、小包、试管、小瓶、微量滴定板等中的一种或更多种组分,或者组分可以在这样的容器中以各种组合方式组合。例如,试剂盒的组分可以存在于一个或更多个容器中。在一些实施方案中,所有组分都在一个容器中提供。在一些实施方案中,酶(例如,一种或更多种聚合酶和/或一种或更多种逆转录酶)可以在与引物分开的容器中提供。组分可以例如是冻干的、热干燥的、冷冻干燥的或在稳定的缓冲液中。在一些实施方案中,一种或更多种聚合酶和/或一种或更多种逆转录酶以冻干形式或热干燥形式在单个容器中,并且引物是在不同容器中冻干的、热干燥的、冷冻干燥的或在缓冲液中。在一些实施方案中,聚合酶和/或逆转录酶以及引物以冻干形式或热干燥形式在单个容器中。

[0149] 本文描述的组合物(例如,干燥组合物)可以以“干燥形式”或不悬浮在液体介质中的形式提供。组合物的“干燥形式”可以包括干燥粉末、冻干组合物、喷雾干燥或沉淀的组合物。“干燥形式”组合物可以包含一种或更多种冻干保护剂,诸如糖及其对应的糖醇,诸如蔗糖、乳糖、海藻糖、右旋糖酐、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇;氨基酸,诸如精氨酸或组氨酸;感胶离子盐(lyotropic salt),诸如 $MgSO_4$;多元醇,诸如丙二醇、甘油、聚(乙二醇)或聚(丙二醇);及其组合。另外的示例性冻干保护剂包括明胶、糊精、改性淀粉和羧甲基纤维素。如本文使用的,术语“冻干”、“冻干的”和“冷冻干燥”是指首先冷冻待干燥的材料,然后通过真空环境中升华来去除冰或冷冻溶剂的过程。“冻干物”是指冻干的物质。如本文公开的,干燥的组合物可以包含一种或更多种添加剂和一种或更多种扩增试剂。

[0150] 干燥的组合物可以是冷冻的或冻干的或喷雾干燥的。干燥的组合物可以是热干燥的。干燥的组合物可以包含一种或更多种添加剂(例如,聚合物、糖或糖醇)。糖或糖醇可以包括蔗糖、乳糖、海藻糖、右旋糖酐、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇或其任何组合。聚合物可以包括聚乙二醇、右旋糖酐、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基纤维素、Ficoll、白蛋白、多肽、胶原肽或其任何组合。一种或更多种

添加剂可以包含一种或更多种氨基酸。一种或更多种添加剂可以包括吐温80、吐温20和/或Triton X-100。在一些实施方案中,一种或更多种添加剂有助于反应组合物的冻干和/或干燥的颗粒的溶解。一种或更多种添加剂可以包括在干燥的组合物(例如,干燥的颗粒)中浓度为约0.01%的非离子洗涤剂。

[0151] 冷冻或冻干或喷雾干燥或热干燥的组合物或用于制备冷冻或冻干或喷雾干燥的组合物的含水组合物可以包含以下中的一种或更多种:(i)非含水溶剂,诸如乙二醇、甘油、二甲基亚砷和二甲基甲酰胺。(ii)表面活性剂,诸如吐温80、Brij 35、Brij 30、Lubrol-px、Triton X-10;Pluronic F127(聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物)也称为泊洛沙姆、泊洛沙胺和SDS。(iii)二糖,诸如海藻糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖。(iv)聚合物(其可以具有不同的MW),诸如聚乙二醇、右旋糖酐、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基纤维素、Ficoll和白蛋白。(v)氨基酸,诸如甘氨酸、脯氨酸、4-羟脯氨酸、L-丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、赖氨酸、肌氨酸和 γ -氨基丁酸。第一质量控制引物和第二质量控制引物可以呈冻干或冷冻干燥形式。具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、dNTP和缓冲剂中的一种或更多种可以呈冻干或冷冻干燥形式。

[0152] 试剂盒可以包括用于进行本文描述的一种或更多种方法的使用说明和/或本文描述的一种或更多种组分的描述。使用说明和/或描述可以是印刷形式,并且可以被包含在试剂盒插页中。试剂盒还可以包含提供这样的使用说明或描述的因特网地址的书面描述。在一些实施方案中,试剂盒包含用于检测方法的试剂,例如用于FRET的试剂、侧向流装置、试纸条、荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标或聚苯乙烯珠。

实施例

[0153] 上文讨论的实施方案的一些方面在以下实例中进一步详细公开,其并非意图以任何方式限制本公开内容的范围。

[0154] 实施例1

[0155] DIMER内部对照

[0156] 本实施例描述了监测扩增反应。

[0157] 在扩增反应中使用正向IC引物和反向IC引物。正向IC引物在其5'端处具有相关联的荧光团,并且反向IC引物在5'端处与猝灭剂相关联(图1)。在反应开始时,正向IC引物和反向IC引物在溶液中是分开的,并且因此正向IC引物上的荧光团完全发射(产生高信号)(图2)。随着古细菌聚合酶扩增(APA)反应的进展,Dimer-IC扩增子(例如,延伸的双链体)使荧光团和猝灭剂非常接近,使得可以发生FRET猝灭,这引起信号降低。因此,最终产生“反向”扩增曲线,如图2中示出的。

[0158] 图3A-图3B示出了使用本文公开的Dimer-IC系统观察到的反向扩增曲线:

[0159] 正向引物(FP1)+反向引物(RP3)(5bp重叠),

[0160] 正向引物(FP1)+反向引物(RP2)(4bp重叠),

[0161] 仅正向引物对照(仅FP1)(预期无扩增)。

[0162] 嵌入染料信号(在相同反应中运行)展示扩增如预期的那样发生。

[0163] 图4示出了一对质量控制引物:(1)具有序列SEQ ID NO:3的序列和核苷酸位置10处的内部2' OM修饰的正向质量控制引物,和(2)具有SEQ ID NO:5的序列和核苷酸位置9处

的内部2' OM修饰的反向质量控制引物。

[0164] 在一些情况下,可以经由在质量控制引物中包含一个或更多个具有2' OM修饰的核苷酸来防止质量控制引物与其他寡核苷酸的非预期引物延伸。如图5A中示出的,由于DNA聚合酶不能通读FP3中位置10处的2' -OM修饰的核苷酸,来自正向质量控制引物(FP3)的核苷酸位置12-13处与非IC引物寡核苷酸发生的非预期杂交的核酸延伸被阻止。在一些实施方案中,经由在质量控制引物的一个或更多个位置处包含一个或更多个修饰的核苷酸(例如,具有2' OM修饰的核苷酸),同样可以防止(或显著减少)非预期引物延伸(例如,在人类gDNA上)和随后经由非预期的反向引发(经由反应中存在的其他引物之一)的扩增。如图5B中示出的,DNA聚合酶不能通读描绘的正向质量控制引物FP3中的核苷酸位置10,使得该质量控制引物更不易于非特异性扩增。

[0165] 如图6A-图6C中示出的,可猝灭标记和猝灭剂可以放置在质量控制引物的各个区域处,例如第一质量控制引物和第二质量控制引物的3' 重叠区之外和/或之内。不受任何特定理论的束缚,预期将可猝灭标记放置在正向质量控制引物的3' 重叠区中并将猝灭剂放置在反向质量控制引物的3' 重叠区中可以导致接触猝灭(与FRET猝灭相反),并且可以产生更大的信号变化(图6B)。

[0166] 在至少一些先前描述的实施方案中,在一种实施方案中使用的一个或更多个要素可以可互换地用于另一种实施方案中,除非这样的替换在技术上不可行。本领域技术人员将理解,在不脱离所要求保护的的主题的范围的情况下,可以对上文描述的方法和结构进行各种其他的省略、添加和修改。所有这样的修改和改变都意在落入由所附权利要求书限定的主题的范围之内。

[0167] 关于本文中基本上任何复数和/或单数术语,在对于背景和/或应用适当的情况下,本领域技术人员可以从复数转换为单数和/或从单数转换为复数。为了清楚起见,可以在本文明确阐述各种单数/复数排列。如本说明书和所附权利要求书中使用的,除非上下文另有清楚指示,否则单数形式“a(一)”、“an(一)”和“该(the)”包括复数的提示物。除非另外说明,否则在本文中对“或”的任何提及意在涵盖“和/或”。

[0168] 本领域技术人员将理解,一般来说,本文使用的术语,并且尤其是所附权利要求(例如,所附权利要求的主体)中的术语,通常意在作为“开放式”术语(例如,术语“包括(including)”应解释为“包括但不限于(including but not limited to)”,术语“具有(having)”应解释为“具有至少(having at least)”,术语“包括(includes)”应解释为“包括但不限于(includes but is not limited to)”等)。本领域技术人员还将理解,如果所引入的权利要求陈述的特定数量是所预期的,这样的预期将明确地陈述于权利要求中,并且在不存在这样的陈述的情况下,不存在这样的预期。例如,作为对理解的帮助,以下所附权利要求可以包含前置词“至少一个/至少一种(at least one)”和“一个或更多个/一种或更多种(one or more)”的使用,以引入权利要求陈述。然而,这样的短语的使用不应理解为暗含通过不定冠词“一(a)”或“一(an)”引入权利要求陈述会将包含这样的引入的权利要求陈述的任何具体权利要求限制到包含仅一个这样的陈述的实施方案中,甚至在相同的权利要求包括前置词“一个或更多个/一种或更多种”或“至少一个/至少一种”以及不定冠词诸如“一个”或“一种”时也是如此(例如,“一个”和/或“一种”应解释为意指“至少一个/至少一种”或“一个或更多个/一种或更多种”);这对于使用定冠词来引入权利要求陈述同样适用。

此外,即使明确地陈述了所引入的权利要求陈述的特定数量,本领域技术人员将认识到,这样的陈述应解释为意指至少所陈述的数量(例如,仅陈述“两个陈述”而没有其他修饰词意指至少两个陈述,或两个或更多个陈述)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的惯例的那些情况下,通常这样的句法结构以本领域技术人员将理解该惯例的意义被预期(例如,“具有A、B和C中的至少一个的系统”将包括但不限于仅具有A,仅具有B,仅具有C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。在使用类似于“A、B或C等中的至少一个”的惯例的那些情况下,通常这样的句法结构以本领域技术人员将理解该惯例的意义被预期(例如,“具有A、B或C中的至少一个的系统”将包括但不限于仅具有A,仅具有B,仅具有C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员还将理解,实际上,无论在说明书、权利要求书还是在附图中,呈现两个或更多个替代术语的任何转折性词语和/或短语应被理解为考虑到包括术语之一、任一术语或两个术语的可能性。

[0169] 此外,当本公开内容的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员将意识到,本公开内容还由此以马库什组的任何单独的成员或成员的子组描述。

[0170] 如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,诸如在提供书面描述方面,本文公开的所有范围还包括任何和所有可能的它的子范围和子范围的组合。任何列出的范围都可以容易地被识别为充分描述并使相同的范围能被分解为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还将理解的,所有语言,诸如“多达”、“至少”、“大于”、“小于”等包括所陈述的数字,并且指可以随后分解为如上文讨论的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组是指具有1个、2个或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组是指具有1个、2个、3个、4个或5个物品的组,等等。

[0171] 尽管本文已经公开了各种方面和实施方案,但其他方面和实施方案对本领域技术人员将是明显的。本文公开的各种方面和实施方案用于说明的目的而并不意图限制由所附权利要求书所指出的真实范围和精神。

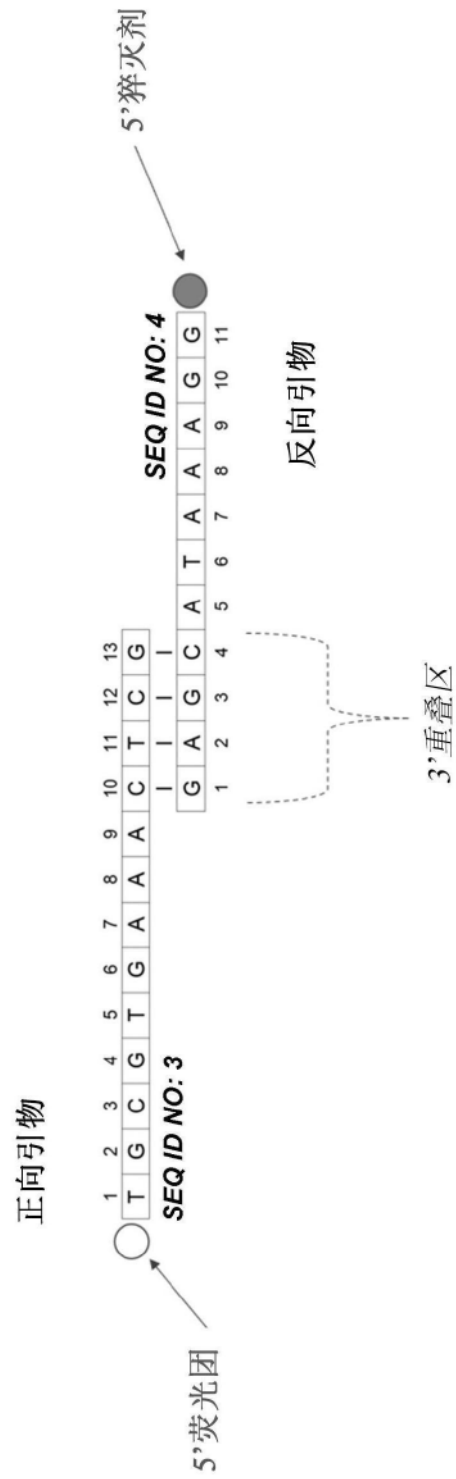


图1

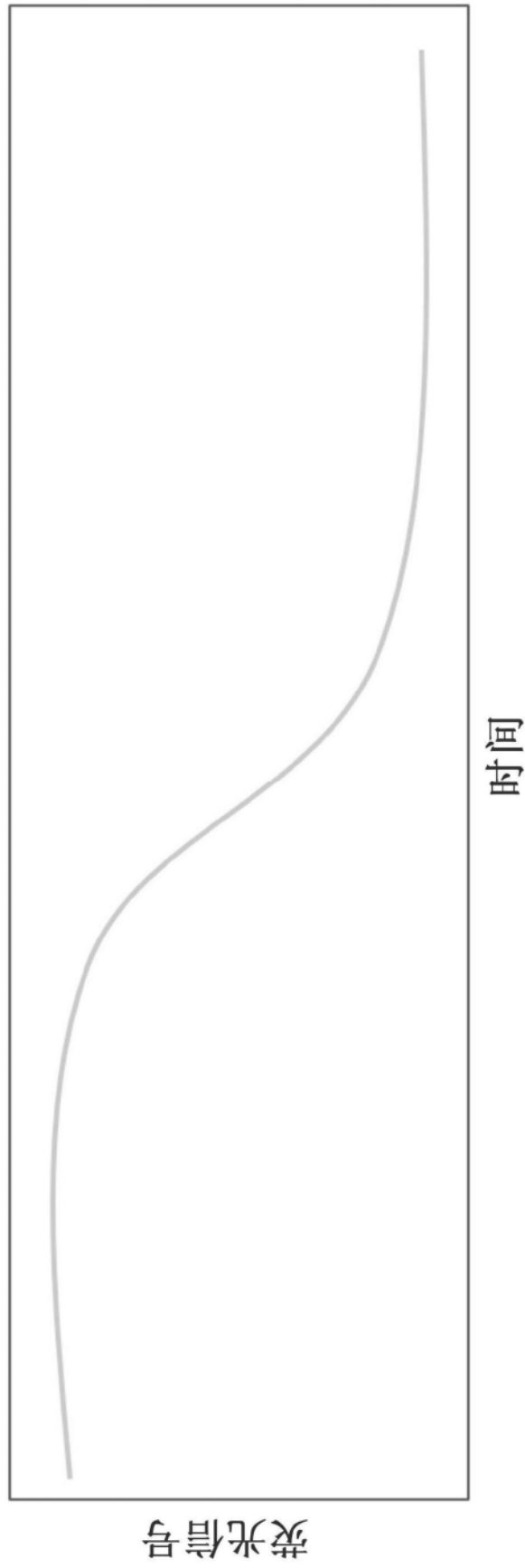


图2

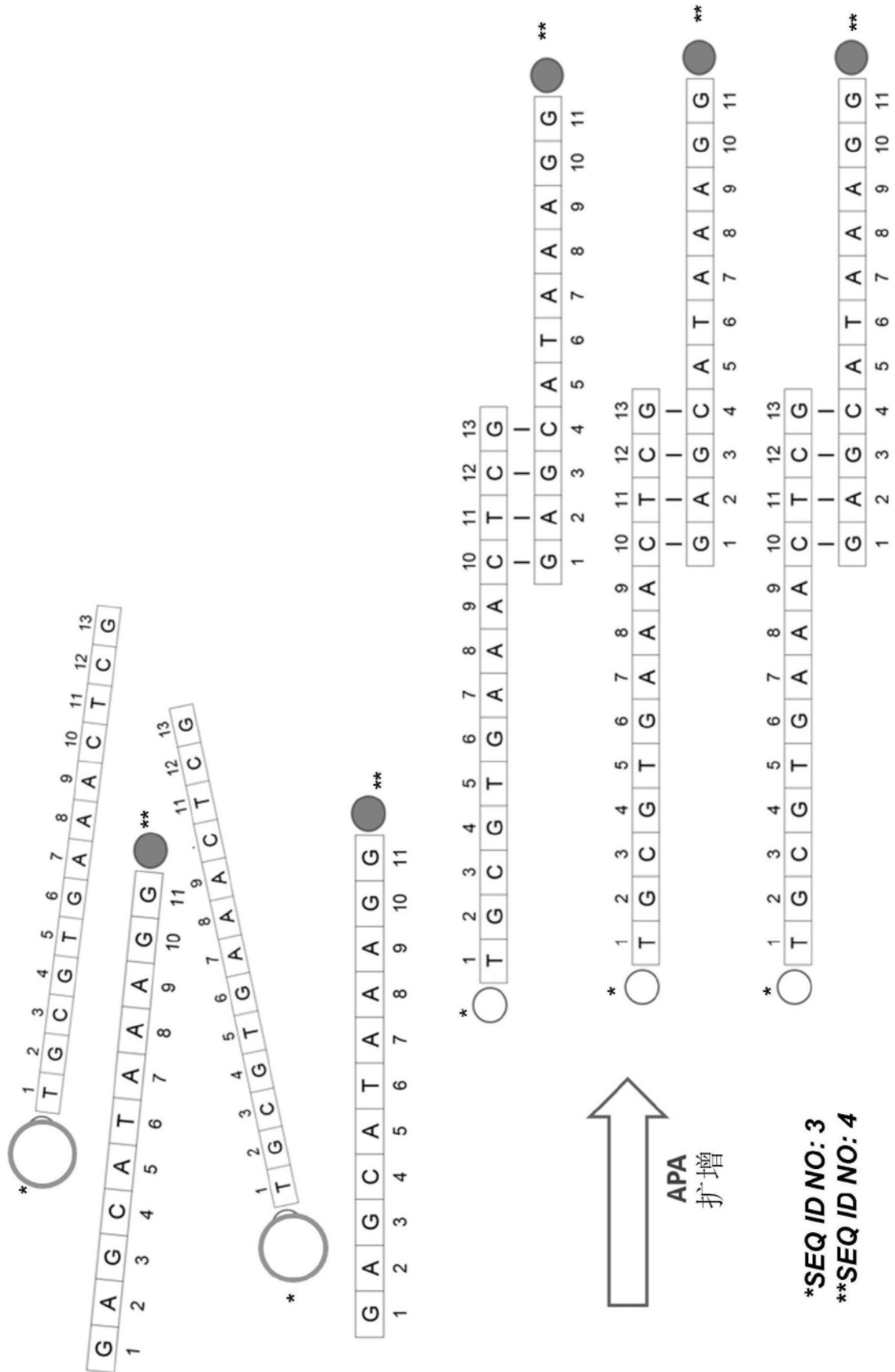


图2(续)

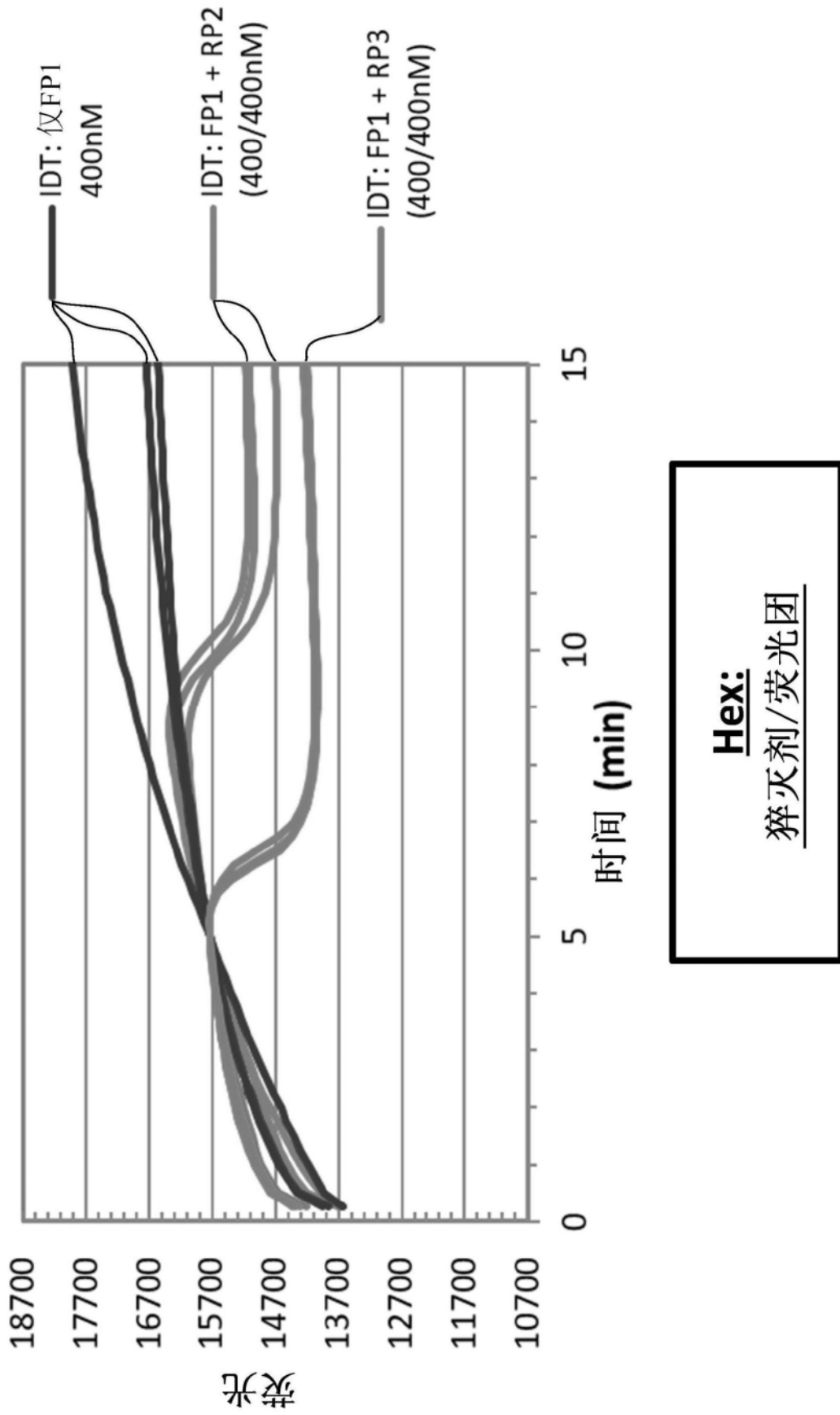


图3A

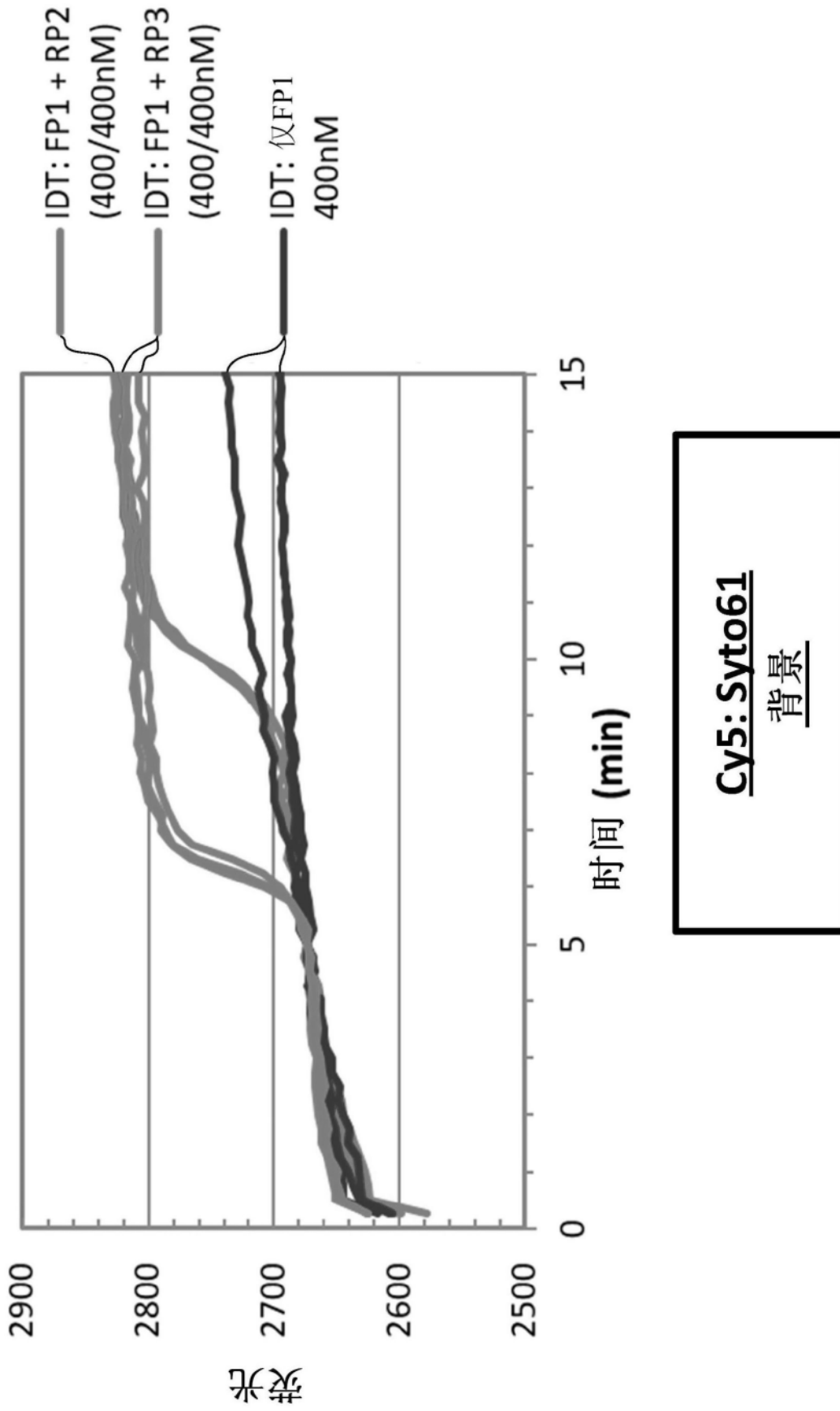


图3B

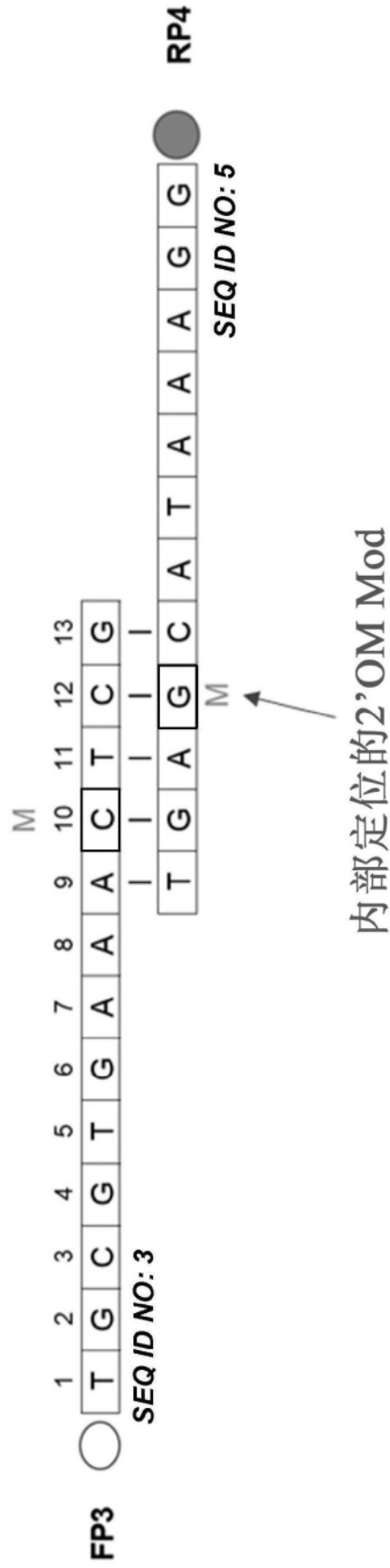


图4

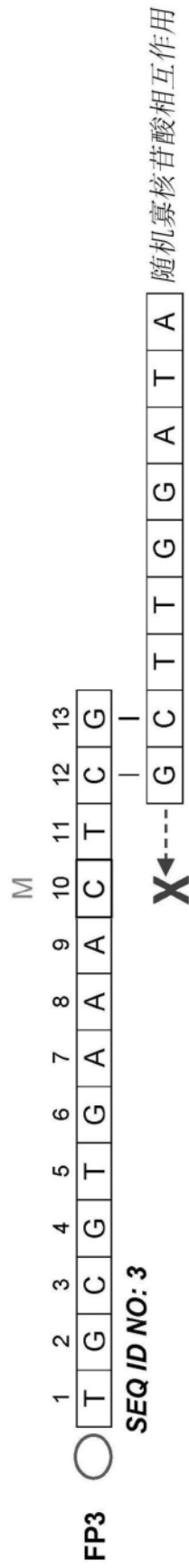


图5A

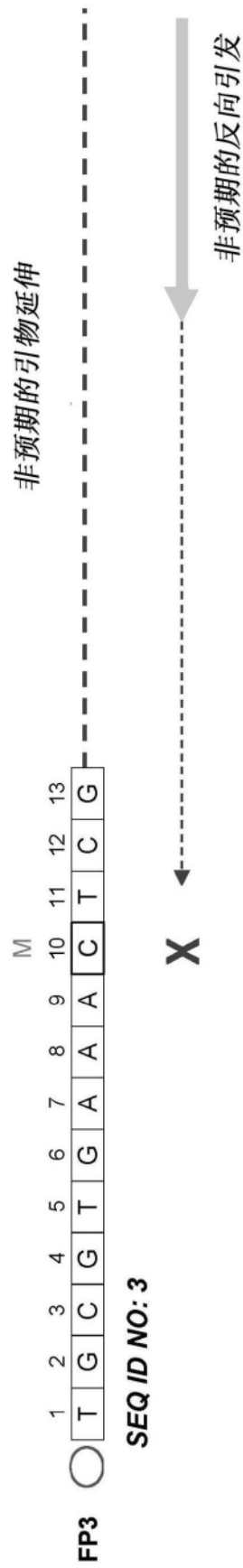


图5B

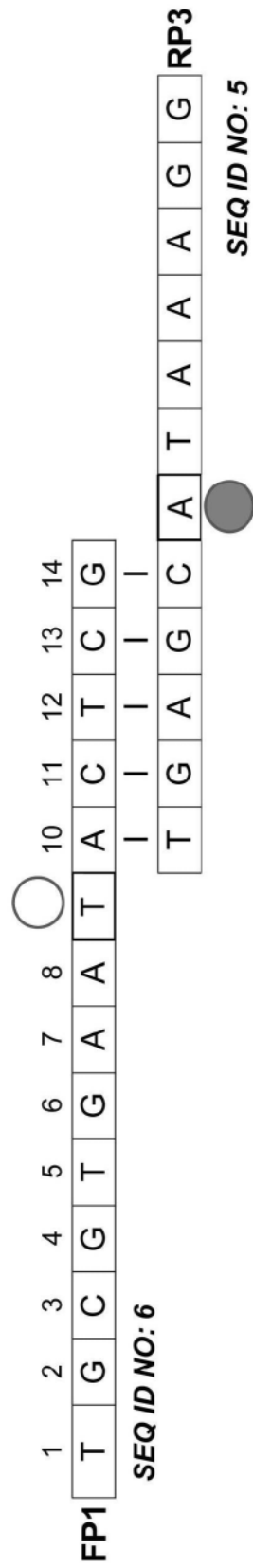


图6A

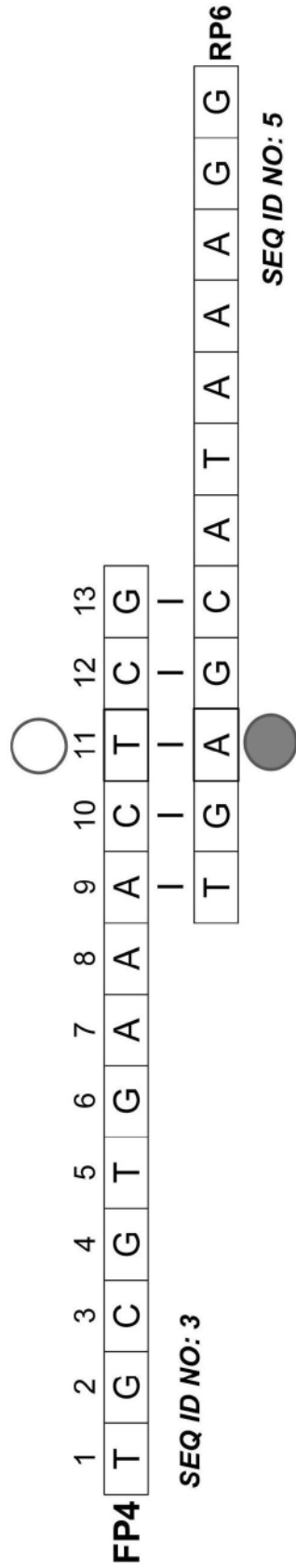


图6B

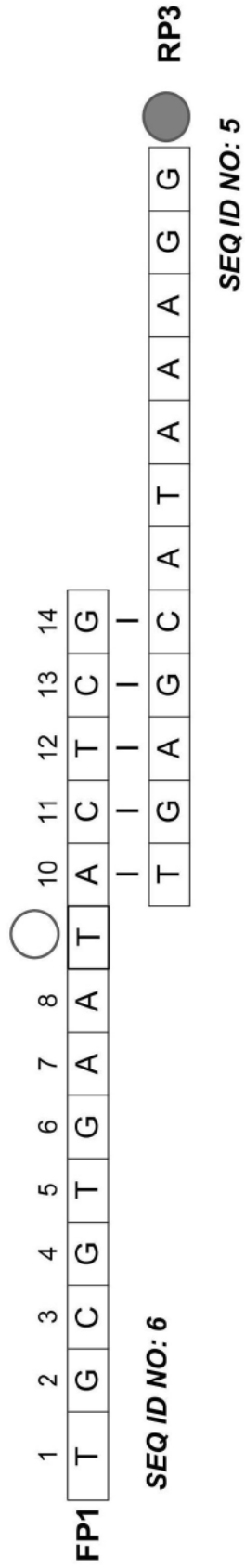


图6C