(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118647731 A
(43)申请公布日 2024.09.13

(21)申请号 202380020203.4
(22)申请日 2023.02.03
(30)优先权数据
63/307,085 2022.02.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/061978 2023.02.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/150708 EN 2023.08.10
(71)申请人 贝克顿迪金森公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 张红华
丹尼尔·雅各布·科斯洛弗
(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 1/6806(2006.01)
C12Q 1/6844(2006.01)

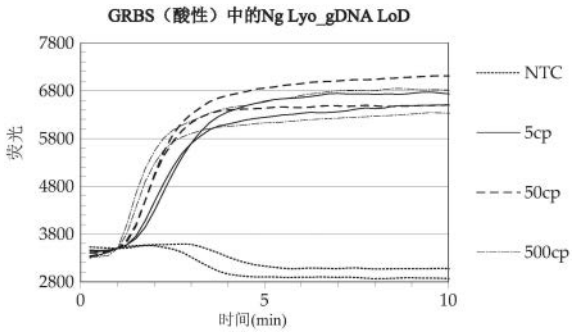
权利要求书9页 说明书50页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于分离基因组DNA以扩增短核酸靶的方法

(57)摘要

本文公开的内容包括用于检测样品中的靶核酸序列的方法、组合物和试剂盒。提供的内容包括用于分离dsDNA的酸性组合物。在一些实施方案中，酸性组合物包含单价盐和/或二价盐、一种或更多种表面活性剂和酸性剂。在一些实施方案中，酸性组合物的pH小于4。本文还提供了包含缓冲剂和一种或更多种扩增剂的试剂组合物。



CN 118647731 A

1.一种用于扩增样品中的靶核酸序列的方法,所述方法包括:

(a)使包含生物实体的样品与酸性组合物接触以产生酸性混合物,

其中所述酸性组合物能够裂解所述生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中所述样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的双链DNA(dsDNA),其中所述靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸,

其中所述酸性组合物具有小于4的pH并且包含(i)单价盐和/或二价盐,(ii)一种或更多种表面活性剂,和(iii)酸性剂,从而使所述dsDNA变性以产生单链DNA(ssDNA);

(b)使包含缓冲剂的试剂组合物与所述酸性混合物接触以产生中性混合物,其中所述中性混合物包含所述ssDNA,其中所述试剂组合物包含一种或更多种扩增试剂;和

(c)扩增所述中性混合物中的所述靶核酸序列,从而产生核酸扩增产物,任选地,所述试剂组合物是干燥的组合物或湿组合物。

2.根据权利要求1所述的方法,其中扩增所述靶核酸序列包括在约20分钟内以可检测的水平产生所述核酸扩增产物。

3.根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述酸性组合物具有约1至约6.9的pH,任选地约1至约3.9的pH,并且还任选地约2.2的pH。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述中性混合物具有约7至约9的pH,任选地所述中性混合物具有约8.8的pH。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,所述方法还包括检测所述样品中的所述靶核酸序列,其中检测所述样品中的所述靶核酸序列包括:

(d)检测所述核酸扩增产物,其中所述检测在从所述试剂组合物与所述酸性混合物接触的时间起少于约20分钟、少于约15分钟、少于约10分钟或少于约5分钟内进行。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中使所述试剂组合物与所述酸性混合物接触包括将所述试剂组合物溶解在所述酸性混合物中。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述一种或更多种扩增试剂包含具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、第一引物、第二引物和dNTP中的一种或更多种。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述试剂组合物是冻干的和/或热干燥的并且包含一种或更多种添加剂,其中所述一种或更多种添加剂包括:

氨基酸;

糖或糖醇,任选地所述糖或糖醇包括蔗糖、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;和/或

聚合物,任选地所述聚合物包括聚乙二醇、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。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中被怀疑包含所述靶核酸序列的所述dsDNA包含彼此互补的第一链和第二链。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中扩增所述靶核酸序列包括:

在等温扩增条件下扩增所述靶核酸序列,其中所述扩增包括使所述ssDNA与以下接触:

i)第一引物和第二引物,其中所述第一引物能够与所述靶核酸序列的所述第一链的序列杂交,并且所述第二引物能够与所述靶核酸序列的所述第二链的序列杂交;和

ii)具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,由此产生核酸扩增产物,其中所述核酸扩增产物

包含:

(1)所述第一引物的序列及其反向互补物,

(2)所述第二引物的序列及其反向互补物,以及

(3)间隔序列,其侧翼为(1)所述第一引物的序列及其反向互补物和(2)所述第二引物的序列及其反向互补物,其中所述间隔序列长1个至10个碱基。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,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,任选地所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少约95%相同的氨基酸序列,还任选地,所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有低核酸外切酶活性或没有核酸外切酶活性。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述第一引物和/或所述第二引物长约8个至16个碱基,任选地所述第一引物和/或所述第二引物包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述核酸扩增产物长约20个至40个碱基。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述间隔序列包含所述靶核酸序列的一部分,任选地所述间隔序列长1个至10个碱基。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述dsDNA包括基因组DNA(gDNA)、质粒DNA或两者。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,

其中所述生物实体包括原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、外泌体、原生质体和微泡中的一种或更多种;和/或

其中所述生物实体包括病毒、细菌、真菌、原生动物、其部分或其任何组合。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述靶核酸序列是病毒、细菌、真菌或原生动物的核酸序列,任选地所述样品核酸来源于病毒、细菌、真菌或原生动物。

19.根据权利要求18所述的方法,

其中所述病毒是SARS-CoV-2、人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)、人类T细胞淋巴营养病毒1型(HTLV-1)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、单纯疱疹、疱疹病毒6、疱疹病毒7、EB病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、JC病毒、细小病毒B19、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、轮状病毒、人类腺病毒、风疹病毒、人类肠道病毒、生殖器人类乳头瘤病毒(HPV)和汉坦病毒;

其中所述细菌包括结核分枝杆菌(Mycobacteria tuberculosis)、立氏立克次体(Rickettsia rickettsii)、查菲埃立克体(Ehrlichia chaffeensis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、支原体属种(Mycoplasma sp.)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、杜莫夫军团菌(Legionella dumoffii)、发酵支原体

(Mycoplasma fermentans)、埃立克体属种(Ehrlichia sp.)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumonia)、无乳链球菌(S.agalactiae)、以及单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)中的一种或更多种;

其中所述真菌包括新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、卡氏肺孢菌(Pneumocystis carinii)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)和红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)中的一种或更多种;和/或

其中所述原生动物包括克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)、利什曼原虫属种(Leishmania sp.)、疟原虫属(Plasmodium)、溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、田鼠巴贝斯虫(Babesia microti)、蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)、环孢子虫属种(Cyclospora sp.)、以及艾美耳球虫属种(Eimeria sp.)中的一种或更多种。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述样品是生物样品或环境样品,

其中所述环境样品是以下或从以下获得:食品样品、饮料样品、纸张表面、织物表面、金属表面、木材表面、塑料表面、土壤样品、淡水样品、废水样品、盐水样品、暴露于大气空气或其他气体的样品、其培养物或其任何组合;和/或

其中所述生物样品是以下或从以下获得:组织样品、唾液、血液、血浆、血清、粪便、尿液、痰、黏液、淋巴、滑液、脑脊液、腹水、胸腔积液、血清肿、脓、皮肤或黏膜表面的拭子、其培养物或其任何组合。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述酸性剂包括有机酸、无机酸或两者。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述酸性剂选自由以下组成的组:盐酸、甘氨酸盐酸盐、硫酸、乙酸、柠檬酸和磷酸。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述酸性剂以小于约100mM的浓度,任选地在约1mM至约100mM的范围内的浓度,并且还任选地以约10mM的浓度存在于所述酸性组合物中。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述单价盐和/或所述二价盐包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其任何组合。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述单价盐选自由以下组成的组:硫酸铵、氟化钠、氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟化钾、氯化钾、溴化钾和碘化钾。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述二价盐选自由以下组成的组:硫酸镁、氯化钙、氯化镁、氯化铜(II)、氯化锌、氧化钙、氧化镁、氧化钡、硫酸钠、硫酸钙、硫酸铜(II)、碳酸钾和碳酸钠。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述单价盐和/或所述二价盐以约1mM至约14mM的范围内的浓度,并且任选地以约5mM或约4mM的浓度存在于所述酸性组合物中。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述一种或更多种表面活性剂包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述一种或更多种表面活性剂以所述酸性组合物的约0.01%至约2%的重量/体积(%w/v)的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中,任选地所述一种或更多种表面活性剂以所述酸性组合物的约0.1%的重量/体积(%w/v)的浓度存在于所述酸性组合物中。

30.根据权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述酸性组合物还包含螯合剂,任选地所述螯合剂选自由以下组成的组:乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)和Tris。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述螯合剂以约0.1mM至约14mM的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中使所述样品与所述酸性组合物接触在约18℃至约99℃的范围内的温度进行,任选地使所述样品与所述酸性组合物接触在约78℃的温度进行。

33.根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中使所述样品与所述酸性组合物接触在约18℃至约25℃的范围内的温度进行。

34.根据权利要求1-33中任一项所述的方法,其中使所述样品与所述酸性组合物接触进行持续约5秒至约60分钟的时间段。

35.根据权利要求1-34中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂或其任何组合。

36.根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述中性混合物具有在约7至约9的范围内的pH,任选地所述中性混合物具有约8.8的pH。

37.根据权利要求1-36中任一项所述的方法,其中所述靶核酸序列包含不长于约90个核苷酸的长度,任选地所述靶核酸序列包含约30个核苷酸的长度。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的方法,其中所述扩增在等温扩增条件下进行,任选地,所述等温扩增条件包括约30℃至约72℃的恒定温度,还任选地,所述等温扩增条件包括约67℃的恒定温度。

39.根据权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述扩增进行持续约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约40分钟、约50分钟或约60分钟的时间段,任选地,所述扩增进行持续约15分钟的时间段。

40.根据权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述扩增在无解旋酶、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。

41.根据权利要求1-40中任一项所述的方法,其中步骤(d)还包括确定所述样品中包含所述靶核酸序列的所述dsDNA的量。

42.根据权利要求1-41中任一项所述的方法,其中检测所述核酸扩增产物包括使用实时检测方法。

43.根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中检测所述核酸扩增产物包括使所述核酸扩增产物与能够与所述核酸扩增产物杂交的信号产生寡核苷酸接触,其中所述信号产生寡核苷酸包含荧光团、猝灭剂或两者。

44.根据权利要求1-43中任一项所述的方法,其中检测所述核酸扩增产物包括检测荧光信号,任选地所述荧光信号来自分子信标。

45.根据权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述方法在单个反应容器中进行。

46.根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述扩增包括两个或更多个靶核酸序列的多重扩增,并且其中所述检测包括对衍生自所述两个或更多个靶核酸序列的两种或更多种核酸扩增产物的多重检测,任选地所述两个或更多个靶核酸序列是两种或更多种不同生物体特异性的。

47.根据权利要求1-46中任一项所述的方法,其中所述扩增不包括使用除具有超嗜热生物聚合酶活性的酶之外的任何酶。

48.根据权利要求1-47中任一项所述的方法,其中所述扩增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)。

49.根据权利要求1-48中任一项所述的方法,其中所述扩增不包括以下中的一种或更多种:古细菌聚合酶扩增(APA)、LAMP、HDA、RPA、SDA、NASBA、TMA、NEAR、RCA、MDA、RAM、cHDA、SPIA、SMART、3SR、GEAR和IMDA,并且任选地所述扩增不包括LAMP。

50.根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其中所述方法不包括以下中的一种或更多种:(i)所述酸性混合物的稀释;(ii)所述中性混合物的稀释;(iii)所述酸性混合物的热变性;(iv)所述酸性混合物的超声处理;(v)所述中性混合物的超声处理;(vi)向所述酸性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(vii)向所述中性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(viii)所述样品的纯化;(ix)所述样品核酸的纯化;(x)所述核酸扩增产物的纯化;(xi)从所述酸性混合物或所述中性混合物中去除一种或更多种表面活性剂;(xii)在扩增之前和/或期间对所述样品核酸进行加热变性和/或酶促变性;(xiii)向所述酸性混合物或所述中性混合物中加入核糖核酸酶H;(xiv)使所述样品、所述酸性混合物或所述中性混合物与解旋酶、单链结合蛋白、切口酶、限制性内切酶或重组酶接触;(xv)使所述样品、所述酸性混合物或所述中性混合物与甘油、甲酰胺或尿素接触;(xvi)从所述酸性混合物或所述中性混合物中纯化所述ssDNA;(xvii)热变性步骤;和(xviii)富集、纯化和/或分离所述dsDNA。

51.根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述酸性组合物和/或所述试剂组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。

52.根据权利要求51所述的方法,

其中所述螯合剂选自包含以下的组:乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris或其任何组合;和/或

其中所述还原剂选自以下的组:2-巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫赤藓糖醇(DTE)、还原型谷胱甘肽、半胱胺、三-正丁基膦(TBP)、二硫赤藓糖醇、三(3-羟丙基)膦(THPP)、2-巯基乙胺-HCl、二硫丁胺(DTBA)、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸和羟乙基二硫化物(HED)或其任何组合。

53.根据权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述酸性组合物不包含阴离子型表面活性剂和阳离子型表面活性剂两者。

54.根据权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述酸性组合物还包含吐温表面活

性剂,任选地所述吐温表面活性剂选自由以下组成的组:吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85,还任选地所述吐温表面活性剂占所述酸性组合物的约0.01%(w/v)。

55.一种酸性组合物,用于裂解生物实体并使其中包含的双链DNA(dsDNA)变性,所述酸性组合物包含:

单价盐和/或二价盐,所述单价盐在所述酸性组合物中的浓度小于30mM所述二价盐在所述酸性组合物中的浓度小于15mM;

一种或更多种表面活性剂;和

酸性剂,以小于100mM的浓度存在于所述酸性组合物中,并且

其中所述酸性组合物具有小于4的pH。

56.根据权利要求55所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。

57.根据权利要求56所述的酸性组合物,

其中所述螯合剂选自包含以下的组:乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris或其任何组合;和/或

其中所述还原剂选自以下的组:2-巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫赤藓糖醇(DTE)、还原型谷胱甘肽、半胱胺、三-正丁基膦(TBP)、二硫赤藓糖醇、三(3-羟丙基)膦(THPP)、2-巯基乙胺-HCl、二硫丁胺(DTBA)、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸和羟乙基二硫化物(HED)或其任何组合。

58.根据权利要求55-57中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物不包含阴离子型表面活性剂和阳离子型表面活性剂两者。

59.根据权利要求55-58中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物不包含甘油、甲酰胺或尿素。

60.根据权利要求55-59中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物具有在约1至约3.9的范围内的pH,任选地所述酸性组合物具有约2的pH。

61.根据权利要求55-60中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性剂包括有机酸和/或无机酸。

62.根据权利要求55-61中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性剂选自由以下组成的组:盐酸、甘氨酸盐酸盐、乙酸、柠檬酸和磷酸。

63.根据权利要求55-62中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性剂以在约1mM至约100mM的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中,任选地所述酸性剂以约10mM的浓度存在于所述酸性组合物中。

64.根据权利要求55-63中任一项所述的酸性组合物,其中所述单价盐和/或所述二价盐包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其任何组合。

65.根据权利要求55-64中任一项所述的酸性组合物,其中所述单价盐选自由以下组成的组:硫酸铵、氯化铵、氟化钠、氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟化钾、氯化钾、溴化钾和碘化钾。

66.根据权利要求55-65中任一项所述的酸性组合物,其中所述二价盐选自由以下组成的组:硫酸镁、氯化钙、氯化镁、氯化铜(II)、氯化锌、氧化钙、氧化镁、氧化钡、硫酸钠、硫酸钙、硫酸铜(II)、碳酸钾和碳酸钠。

67.根据权利要求55-66中任一项所述的酸性组合物,其中所述单价盐和/或所述二价盐以约1mM至约14mM的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中,任选地所述单价盐和/或所述二价盐以约5mM或约4mM的浓度存在于所述酸性组合物中。

68.根据权利要求55-67中任一项所述的酸性组合物,其中所述一种或更多种表面活性剂包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。

69.根据权利要求55-68中任一项所述的酸性组合物,其中所述一种或更多种表面活性剂以所述酸性组合物的约0.01％至约2％的重量/体积(％w/v)的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中,任选地其中所述一种或更多种表面活性剂以所述酸性组合物的约0.1％的重量/体积(％w/v)的浓度存在于所述酸性组合物中。

70.根据权利要求55-69中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物还包含吐温表面活性剂,任选地所述吐温表面活性剂选自由以下组成的组:吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85,还任选地所述吐温表面活性剂占所述酸性组合物的约0.01％(w/v)至约1％(w/v)。

71.根据权利要求55-70中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物还包含螯合剂,任选地所述螯合剂选自包含以下的组:乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris或其任何组合,还任选地所述螯合剂以约0.1mM至约14mM的范围内的浓度存在于所述酸性组合物中。

72.一种用于检测样品中的靶核酸序列的试剂盒,所述试剂盒包含:

(a)权利要求55-71中任一项所述的酸性组合物,其中所述酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中所述样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的双链DNA(dsDNA),其中所述靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸;和

(b)试剂组合物,所述试剂组合物包含缓冲剂和用于在等温扩增条件下扩增所述靶核酸序列的一种或更多种扩增试剂,其中所述一种或更多种扩增试剂包含:

(i)第一引物和第二引物,其中所述第一引物能够与所述靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且所述第二引物能够与所述靶核酸序列的第二链的序列杂交;和

(ii)能够产生核酸扩增产物的具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,

任选地,所述试剂组合物是干燥的组合物或湿组合物。

73.根据权利要求72所述的试剂盒,其中所述缓冲剂选自包含以下的组:MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂或其任何组合。

74.根据权利要求72-73中任一项所述的试剂盒,还包含为核酸扩增产物提供实时检测活性的至少一种组分,任选地所述实时检测活性由分子信标提供。

75.根据权利要求72-74中任一项所述的试剂盒,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具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少约95％相同的氨基酸序列,还任选地,所述具有超嗜热生物聚合酶活性的酶是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。

76.根据权利要求72-75中任一项所述的试剂盒,其中所述核酸扩增产物长约20个至40个碱基,并且其中所述核酸扩增产物包含:

(1)所述第一引物的序列及其反向互补物,

(2)所述第二引物的序列及其反向互补物,以及

(3)间隔序列,其侧翼为(1)所述第一引物的序列及其反向互补物和(2)所述第二引物的序列及其反向互补物,其中所述间隔序列长1个至10个碱基。

77.根据权利要求72-76中任一项所述的试剂盒,其中所述生物实体包括原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、外泌体、原生质体和微泡中的一种或更多种,任选地,所述生物实体包括病毒、细菌、真菌、原生动物、其部分或其任何组合。

78.根据权利要求72-77中任一项所述的试剂盒,其中所述靶核酸序列是病毒、细菌、真菌或原生动物的核酸序列,任选地所述样品核酸来源于病毒、细菌、真菌或原生动物。

79.根据权利要求78所述的试剂盒,

其中所述病毒是SARS-CoV-2、人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)、人类T细胞淋巴营养病毒1型(HTLV-1)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、单纯疱疹、疱疹病毒6、疱疹病毒7、EB病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、JC病毒、细小病毒B19、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、轮状病毒、人类腺病毒、风疹病毒、人类肠道病毒、生殖器人类乳头瘤病毒(HPV)和汉坦病毒;

其中所述细菌包括结核分枝杆菌、立氏立克次体、查菲埃立克体、伯氏疏螺旋体、鼠疫耶尔森菌、梅毒螺旋体、沙眼衣原体、肺炎衣原体、肺炎支原体、支原体属种、嗜肺军团菌、杜莫夫军团菌、发酵支原体、埃立克体属种、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、以及单核细胞增生李斯特菌中的一种或更多种;

其中所述真菌包括新型隐球菌、卡氏肺孢菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌、粗球孢子菌和红色毛癣菌中的一种或更多种;和/或

其中所述原生动物包括克氏锥虫、利什曼原虫属种、疟原虫属、溶组织内阿米巴、田鼠巴贝斯虫、蓝氏贾第鞭毛虫、环孢子虫属种、以及艾美耳球虫属种中的一种或更多种。

80.根据权利要求72-79中任一项所述的试剂盒,其中所述第一引物和/或所述第二引物长约8个至16个碱基,任选地所述第一引物和/或所述第二引物包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。

81.根据权利要求72-80中任一项所述的试剂盒,其中所述试剂组合物是冻干的和/或热干燥的并且包含一种或更多种添加剂,其中所述一种或更多种添加剂包括:

氨基酸;

糖或糖醇,任选地所述糖或糖醇包括蔗糖、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;和/或

聚合物,任选地所述聚合物包括聚乙二醇、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。

82.根据权利要求72-81中任一项所述的试剂盒,其中所述酸性组合物和所述试剂组合物的混合物具有约7至约9的pH,任选地约8.8的pH。

83.根据权利要求72-82中任一项所述的试剂盒,其中所述样品、所述酸性组合物和所述试剂组合物的混合物具有约7至约9的pH,任选地约8.8的pH。

84.根据权利要求72-83中任一项所述的试剂盒,其中所述缓冲剂包含Tris,并且其中所述样品、所述酸性组合物和所述试剂组合物的混合物包含浓度在约30mM Tris至约50mM

Tris的范围内的Tris。

85.根据权利要求72-84中任一项所述的试剂盒,其中所述试剂盒包含容纳所述酸性组合物和所述试剂组合物的无菌容器。

用于分离基因组DNA以扩增短核酸靶的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2022年2月5日提交的美国临时专利申请序号63/307,085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。序列表被提供为题为68EB-317333-WO,创建于2023年2月2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用于核酸的扩增(例如,等温扩增)的方法和组合物。

[0008] 对相关技术的描述

[0009] 基于核酸的诊断可以用于快速检测感染、疾病和/或遗传变异。例如,样品中细菌或病毒核酸的鉴定可以用于诊断特定类型的感染。其他实例包括用于疾病管理或法医学的单核苷酸多态性的鉴定,以及指示遗传修饰的食品产品的遗传变异的鉴定。通常,基于核酸的诊断测定需要扩增样品中核酸的特定部分。用于核酸扩增的常用技术是聚合酶链式反应(PCR)。该技术通常需要温度循环(即,热循环)以进行变性(例如,双链DNA(dsDNA)复合物中的链的分离)、寡核苷酸引物(互补DNA序列的短链)的退火和通过聚合酶沿着互补靶延伸引物的步骤。这样的热循环可能是耗时的过程,通常需要专门的机器。因此,对于无需热循环即可进行的更快的核酸扩增方法存在需求。这样的方法对于例如现场测试和即时诊断(point-of-care diagnostic)可以是有用的。

[0010] 大多数等温扩增方法需要独特的热变性步骤或存在解旋酶、单链DNA结合蛋白(SSB)或切口酶来分离基因组DNA链。由于这些要求通常给仪器和/或消耗品增加额外的步骤或相当大的费用,因此它们不如纯化学方法合意。先前已经确定了许多化学方法,包括碱处理、甲酰胺、甘油和DMSO,用于分离在下游应用中使用的DNA的链。然而,在任何扩增之前,必须从溶液中去除诸如尿素和甲酰胺的变性剂,这可能是一个耗时且昂贵的步骤。虽然碱性溶液的pH可以被容易地调节,而无需化学纯化,但其应用受到镁离子不容易溶于碱性足以支持DNA链分离的水溶液这一事实的限制。对核酸检测的组合物和方法存在需求,其中化学变性提供DNA的简单且快速的变性(不需要样品分离、纯化或提取步骤)并且与下游扩增和检测步骤相容。

[0011] 概述

[0012] 本文公开的内容包括用于扩增样品中的靶核酸序列的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a)使包含生物实体的样品与酸性组合物接触以产生酸性混合物,其中酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的双链DNA(dsDNA),其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸,其中酸性组合物包含(i)单价盐和/或二价盐,(ii)一种或更多种表面活性剂,(iii)一种或更多种螯合剂,和(iv)酸性剂,并且其中酸性组合物具有小于4的pH,从而使dsDNA变性以产生单链DNA

(ssDNA);(b)使包含缓冲剂的试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触以产生中性混合物,其中中性混合物包含ssDNA,其中试剂组合物包含一种或更多种扩增试剂;和(c)扩增中性混合物中的靶核酸序列,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA的长度不长于100个碱基对。在一些实施方案中,样品核酸中的一种或更多种的长度不长于100个碱基对。

[0013] 扩增靶核酸序列可以包括在约20分钟、约15分钟、约10分钟或约5分钟内以可检测的水平产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,酸性组合物具有约1至约6.9的pH,例如约1至约3.9的pH或约2的pH。在一些实施方案中,中性混合物具有约7至约9的pH,例如约8.8的pH。该方法可以包括:检测样品中的靶核酸序列,其中检测样品中的靶核酸序列包括:(d)检测核酸扩增产物,其中检测在从试剂组合物与酸性混合物接触的时间起少于约20分钟、少于约15分钟、少于约10分钟或少于约5分钟内进行。

[0014] 使试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触可以包括将试剂组合物溶解在酸性混合物中。试剂组合物可以是湿组合物或干燥的组合物。在一些实施方案中,一种或更多种扩增试剂包含具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、第一引物、第二引物和dNTP中的一种或更多种。在一些实施方案中,试剂组合物是湿组合物(例如,以悬浮在液体介质中的形式的含水组合物)。在一些实施方案中,试剂组合物是冻干的和/或热干燥的(例如,干燥的组合物)并且包含一种或更多种添加剂,其中一种或更多种添加剂包括:氨基酸;糖或糖醇。在一些实施方案中,糖或糖醇包括蔗糖、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。在一些实施方案中,一种或更多种添加剂包括聚合物。在一些实施方案中,聚合物包括聚乙二醇、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。

[0015] 在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA包含彼此互补的第一链和第二链。在一些实施方案中,扩增靶核酸序列包括:在等温扩增条件下扩增靶核酸序列,其中扩增包括使ssDNA与以下接触:i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和ii)具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,由此产生核酸扩增产物,其中该核酸扩增产物包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1个至10个碱基。

[0016] 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。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有低核酸外切酶活性或没有核酸外切酶活性。

[0017] 在一些实施方案中,第一引物和/或第二引物长约8个至16个碱基。在一些实施方案中,第一引物和/或第二引物包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。在一些实施方案中,核酸扩增产物长约20个至40个碱基。在一些实施方案中,间隔序列包含靶核酸序列的一部分。在一些实施方案中,间隔序列长1个至10个碱基。dsDNA可以包括基因组DNA(gDNA)、质粒DNA或两者。

[0018] 样品可以是例如,生物样品或环境样品。在一些实施方案中,环境样品是以下,或从以下获得:食品样品、饮料样品、纸张表面、织物表面、金属表面、木材表面、塑料表面、土壤样品、淡水样品、废水样品、盐水样品、暴露于大气空气或其他气体的样品、其培养物或其任何组合。在一些实施方案中,生物样品是以下,或从以下获得:组织样品、唾液、血液、血浆、血清、粪便、尿液、痰、黏液、淋巴、滑液、脑脊液、腹水、胸腔积液、血清肿、脓、皮肤或黏膜表面的拭子、其培养物或其任何组合。

[0019] 在一些实施方案中,酸性剂包括有机酸、无机酸或两者。在一些实施方案中,酸性剂选自盐酸、甘氨酸盐酸盐、乙酸、柠檬酸和磷酸。在一些实施方案中,酸性剂以小于约20mM的浓度存在于酸性组合物中。例如,酸性剂可以以约1mM至约100mM的范围内的浓度,例如约10mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0020] 单价盐和/或二价盐可以包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其任何组合。在一些实施方案中,单价盐选自硫酸铵、氟化钠、氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟化钾、氯化钾、溴化钾和碘化钾。在一些实施方案中,二价盐选自由以下组成的组:硫酸镁、氯化钙、氯化镁、氯化铜(II)、氯化锌、氧化钙、氧化镁、氧化钡、硫酸钠、硫酸钙、硫酸铜(II)、碳酸钾和碳酸钠。在一些实施方案中,单价盐和/或二价盐以约1mM至约14mM的范围内的浓度,例如约5mM或约4mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0021] 一种或更多种表面活性剂可以包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,一种或更多种表面活性剂以酸性组合物的约0.01%至约2%的重量/体积(%w/v)的范围内的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,一种或更多种表面活性剂以酸性组合物的约0.1%的重量/体积(%w/v)的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,酸性组合物还包含螯合剂。在一些实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)和Tris。在一些实施方案中,螯合剂以约0.1mM至约14mM的范围内的浓度存在于酸性组合物中。

[0022] 在一些实施方案中,使样品与酸性组合物接触在约18℃至约99℃的范围内的温度进行,例如在约78℃的温度进行。在一些实施方案中,使样品与酸性组合物接触在约18℃至约25℃的范围内的温度进行。在一些实施方案中,使样品与酸性组合物接触进行持续约5秒、约10秒、约20秒、约30秒、约40秒、约50秒、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约40分钟、约50分钟或约60分钟的时间段。在一些实施方案中,缓冲剂包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂或其任何组合。在一些实施方案中,中性混合物具有在约7至约9的范围内的pH,例如约8.8的pH。

[0023] 在一些实施方案中,靶核酸序列包含不长于约20个核苷酸、不长于约30个核苷酸、不长于约40个核苷酸、不长于约50个核苷酸、不长于约60个核苷酸或不长于约90个核苷酸的长度。在一些实施方案中,靶核酸序列包含约30个核苷酸的长度。在一些实施方案中,扩增在等温扩增条件下进行。在一些实施方案中,等温扩增条件包括约30℃至约72℃的恒定温度,例如约67℃的恒定温度。在一些实施方案中,扩增进行持续约5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟或60分钟的时间段,例如约15分钟的时间段。

[0024] 扩增可以在无解旋酶、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。在一些实施方案中,步骤(d)还包括确定样品中包含靶核酸序列的dsDNA的量。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。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括使核酸扩增产物与能够与核酸扩增产物杂交的信号产生寡核苷酸接触,其中信号产生寡核苷酸包含荧光团、猝灭剂或两者。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括检测荧光信号。在一些实施方案中,荧光信号来自分子信标。在一些实施方案中,该方法在单个反应容器中进行。在一些实施方案中,扩增包括两个或更多个靶核酸序列的多重扩增。在一些实施方案中,检测包括对衍生自所述两个或更多个靶核酸序列的两种或更多种核酸扩增产物的多重检测。在一些实施方案中,两种或更多种靶核酸序列是两种或更多种不同生物体特异性的。

[0025] 在一些实施方案中,扩增不包括使用除具有超嗜热生物聚合酶活性的酶以外的任何酶。在一些实施方案中,扩增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)。在一些实施方案中,扩增不包括以下中的一种或更多种:古细菌聚合酶扩增(APA)、LAMP、HDA、RPA、SDA、NASBA、TMA、NEAR、RCA、MDA、RAM、cHDA、SPIA、SMART、3SR、GEAR和IMDA。在一些实施方案中,扩增不包括LAMP。

[0026] 在一些实施方案中,该方法不包括以下中的一种或更多种:(i)酸性混合物的稀释;(ii)中性混合物的稀释;(iii)酸性混合物的热变性;(iv)酸性混合物的超声处理;(v)中性混合物的超声处理;(vi)向酸性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(vii)向中性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(viii)样品的纯化;(ix)样品核酸的纯化;(x)核酸扩增产物的纯化;(xi)从酸性混合物或中性混合物中去除一种或更多种表面活性剂;(xii)在扩增之前和/或期间对样品核酸进行加热变性和/或酶促变性;(xiii)向酸性混合物或中性混合物中加入核糖核酸酶H;(xiv)使样品、酸性混合物或中性混合物与解旋酶、单链结合蛋白、切口酶、限制性内切酶或重组酶接触;(xv)使样品、酸性混合物或中性混合物与甘油、甲酰胺或尿素接触;(xvi)从酸性混合物或中性混合物中纯化ssDNA;(xvii)热变性步骤;和(xviii)富集、纯化和/或分离dsDNA。

[0027] 在一些实施方案中,酸性组合物和/或试剂组合物包含还原剂、螯合剂或两者。在一些实施方案中,酸性组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。在一些实施方案中,螯合剂是乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris或其任何组合。在一些实施方案中,还原剂是2-巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫赤藓糖醇(DTE)、还原型谷胱甘肽、半胱胺、三正丁基膦(TBP)、二硫赤藓糖醇、三(3-羟丙基)膦(THPP)、2-巯基乙胺-HCl、二硫丁胺(DTBA)、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸、羟乙基二硫化物(HED)或其任何组合。在一些实施方案中,酸性组合物不包含阴离子型表面活性剂和阳离子型表面活性剂两者。在一些实施方案中,酸性组合物还包含吐温表面活性剂,包括但不限于吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85。在一些实施方案中,吐温表面活性剂占酸性组合物的

约0.01％(w/v)。

[0028] 本文公开的内容包括用于裂解生物实体并使其中包含的dsDNA变性的酸性组合物。在一些实施方案中,酸性组合物包含:单价盐和/或二价盐;一种或更多种表面活性剂;和酸性剂,其中酸性剂以小于100mM的浓度存在于酸性组合物中,并且其中酸性组合物具有小于4的pH。单价盐可以以小于30mM的浓度存在于酸性组合物中。二价盐可以以小于15mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0029] 在一些实施方案中,酸性组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。在一些实施方案中,螯合剂是EDTA、EGTA、NTA、Tris或其任何组合。在一些实施方案中,还原剂选自2-巯基乙醇、DTT、TCEP、DTE、还原型谷胱甘肽、半胱胺、TBP、THPP、2-巯基乙胺-HCl、DTBA、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸、HED或其任何组合。在一些实施方案中,酸性组合物不包含阴离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂。在一些实施方案中,酸性组合物不包含甘油、甲酰胺或尿素。

[0030] 在一些实施方案中,酸性组合物具有在约1至约3.9的范围内的pH,例如约2的pH。在一些实施方案中,酸性剂包括有机酸和/或无机酸。在一些实施方案中,酸性剂选自盐酸、甘氨酸盐酸盐、乙酸、柠檬酸、硫酸和磷酸。在一些实施方案中,酸性剂以在约1mM至约100mM的范围内的浓度,例如以约10mM的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,单价盐和/或二价盐包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其任何组合。在一些实施方案中,单价盐选自硫酸铵、氯化铵、氟化钠、氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟化钾、氯化钾、溴化钾和碘化钾。在一些实施方案中,二价盐选自硫酸镁、氯化钙、氯化镁、氯化铜(II)、氯化锌、氧化钙、氧化镁、氧化钡、硫酸钠、硫酸钙、硫酸铜(II)、碳酸钾和碳酸钠。在一些实施方案中,单价盐和/或二价盐以约1mM至约14mM的范围内的浓度,例如约5mM或约4mM的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,一种或更多种表面活性剂包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,一种或更多种表面活性剂以酸性组合物的约0.01％至约2％的重量/体积(％w/v)的范围内的浓度,例如酸性组合物的约0.1％的重量/体积(％w/v)的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,酸性组合物还包含吐温表面活性剂。在一些实施方案中,吐温表面活性剂选自吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85。在一些实施方案中,吐温表面活性剂占酸性组合物的约0.01％至约1％(w/v)。在一些实施方案中,酸性组合物还包含选自乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris及其任何组合的螯合剂。在一些实施方案中,螯合剂以约0.1mM至约14mM的范围内的浓度存在于酸性组合物中。

[0031] 本文公开的内容包括用于检测样品中的靶核酸序列的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含:(a)如本文提供的酸性组合物,其中酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA,其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸;和(b)试剂组合物,该试剂组合物包含缓冲剂和用于在等温扩增条件下扩增靶核酸序列的一种或更多种扩增试剂,其中所述一种或更多种扩增试剂包含:(i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和(ii)能够产生核酸扩增产物的具有超嗜热生物聚合酶活性的酶。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA的长度不长

于100个碱基对。在一些实施方案中,样品核酸中的一种或更多种的长度不长于100个碱基对。

[0032] 在一些实施方案中,缓冲剂选自MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂及其任何组合。试剂盒可以包含:为核酸扩增产物提供实时检测活性的至少一种组分。在一些实施方案中,实时检测活性由分子信标提供。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是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。在一些实施方案中,核酸扩增产物长约20个至40个碱基。在一些实施方案中,核酸扩增产物包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1个至10个碱基。

[0033] 在一些实施方案中,第一引物和/或第二引物长约8个至16个碱基。在一些实施方案中,第一引物和/或第二引物包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。在一些实施方案中,试剂组合物是冻干的和/或热干燥的(例如,干燥的组合物)并且包含一种或更多种添加剂。一种或更多种添加剂可以包含:氨基酸;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。在一些实施方案中,一种或更多种添加剂包括聚合物。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。

[0034] 在一些实施方案中,酸性组合物和试剂组合物的混合物具有约7至约9的pH,例如约8.8的pH。在一些实施方案中,样品、酸性组合物和试剂组合物的混合物具有约7至约9的pH,例如约8.8的pH。在一些实施方案中,缓冲剂包含Tris。在一些实施方案中,样品、酸性组合物和试剂组合物的混合物包含浓度在约30mM Tris至约50mM Tris的范围内的Tris。在一些实施方案中,试剂盒包含容纳酸性组合物和试剂组合物的无菌容器。

[0035] 在本文公开的方法、组合物、试剂盒和系统中,生物实体可以包括原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、外泌体、原生质体和微泡中的一种或更多种。在一些实施方案中,生物实体包括病毒、细菌、真菌、原生动物、其部分或其任何组合。在一些实施方案中,靶核酸序列是病毒、细菌、真菌或原生动物的核酸序列。在一些实施方案中,样品核酸来源于病毒、细菌、真菌或原生动物。病毒的非限制性实例包括乙型肝炎病毒、单纯疱疹、疱疹病毒6、疱疹病毒7、EB病毒(Epstein-Barr Virus)、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、JC病毒、细小病毒B19、轮状病毒、人类腺病毒和生殖器人类乳头瘤病毒(HPV)。细菌的非限制性实例包括肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)、化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、结核分枝杆菌(Mycobacteria tuberculosis)、立氏立克次体(Rickettsia rickettsii)、查菲埃立克体(Ehrlichia chaffeensis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、支原体属种(Mycoplasma sp.)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、杜

莫夫军团菌(Legionella dumoffii)、发酵支原体(Mycoplasma fermentans)、埃立克体属种(Ehrlichia sp.)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumonia)、无乳链球菌(S.agalactiae)或单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)。在一些实施方案中,真菌是波萨达斯球孢子菌(Coccidioides posadasii)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、卡氏肺孢菌(Pneumocystis carinii)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)或红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)。在一些实施方案中,原生动物是阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)、利什曼原虫属种(Leishmania sp.)、疟原虫属(Plasmodium)、溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、田鼠巴贝斯虫(Babesia microti)、蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)、环孢子虫属种(Cyclospora sp.)和艾美耳球虫属种(Eimeria sp.)。

[0036] 附图简述

[0037] 图1A-图1B示出了与非酸性对照(TE溶液;图1A)相比,低pH溶液(ARBT溶液;图1B)对古细菌聚合酶扩增(APA)的gDNA的解离的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示样品中靶序列拷贝的数目。NTC,无靶对照。LOD,检测限。

[0038] 图2示出了与预孵育温度对gDNA解离的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示样品中靶序列拷贝的数目和预孵育温度。NTC,无靶对照。LOD,检测限。

[0039] 图3A-图3B示出了用酸性洗脱缓冲液(图3B)与非酸性对照洗脱缓冲液(图3A)相比时,与洗脱缓冲液pH对淋病奈瑟菌(N.gonorrhoeae)(Ng)gDNA检测(在湿反应中)的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示样品中靶序列拷贝的数目。NTC,无靶对照。LOD,检测限。

[0040] 图4A-图4B示出了用酸性洗脱缓冲液(图4B)与非酸性对照洗脱缓冲液(图4A)相比时,与洗脱缓冲液pH(图4B)对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA检测(在使用干燥的冻干的沉淀的反应中)的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示样品中靶序列拷贝的数目。NTC,无靶对照。LOD,检测限。

[0041] 图5A-图5B示出了孵育在室温(RT;图5A)或在78℃(图5B)在与扩增组分混合之前进行时,与温度和pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示具有指示的孵育时间和温度的在酸性(ARBT)或非酸性(TE)条件下的孵育。

[0042] 图6A-图6B示出了孵育在室温(RT;图6B)或在78℃(图6A)在与扩增组分混合之前进行时,与温度和pH对10%尿液基质中淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响相关的非限制性示例性数据。图例指示具有指示的孵育时间和温度的在酸性(ARBT)或非酸性(TE)条件下的孵育。NTC,无靶对照。

[0043] 图7示出了与温度和pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响相关的非限制性示例性数据(以干反应形式)。图例指示孵育时间和温度。NTC,无靶对照。

[0044] 图8示出了λDNA作为pH的函数的非限制性示例性解链曲线(改编自Biophys J.2001年2月;80(2):874-881.Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA:evidence of force-induced DNA melting)。

[0045] 详述

[0046] 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内的情况下,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。

[0047] 本文提及的所有专利、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。

[0048] 本文公开的内容包括用于裂解生物实体并分离其中包含的双链多核苷酸以扩增和检测一个或更多个靶核苷酸序列的方法、组合物和试剂盒。

[0049] 本文公开的内容包括用于扩增样品中的靶核酸序列的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a)使包含生物实体的样品与酸性组合物接触以产生酸性混合物,其中酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA,其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸,其中酸性组合物包含(i)单价盐和/或二价盐,(ii)一种或更多种表面活性剂,和(iii)酸性剂,并且其中酸性组合物具有小于4的pH,从而使dsDNA变性以产生单链DNA(ssDNA);(b)使包含缓冲剂的试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触以产生中性混合物,其中中性混合物包含ssDNA,其中试剂组合物包含一种或更多种扩增试剂;和(c)扩增中性混合物中的靶核酸序列,从而产生核酸扩增产物。

[0050] 本文公开的内容包括用于裂解生物实体并使其中包含的dsDNA变性的酸性组合物。在一些实施方案中,酸性组合物包含:单价盐和/或二价盐;一种或更多种表面活性剂;和酸性剂,其中酸性剂以小于100mM的浓度存在于酸性组合物中,并且其中酸性组合物具有小于4的pH。单价盐可以以小于30mM的浓度存在于酸性组合物中。二价盐可以以小于15mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0051] 本文公开的内容包括用于检测样品中的靶核酸序列的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含:(a)如本文提供的酸性组合物,其中酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA,其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸;和(b)试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物),该试剂组合物包含缓冲剂和用于在等温扩增条件下扩增靶核酸序列的一种或更多种扩增试剂,其中所述一种或更多种扩增试剂包含:(i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和(ii)能够产生核酸扩增产物的具有超嗜热生物聚合酶活性的酶。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA的长度不长于100个碱基对。

[0052] 定义

[0053] 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相同含义。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。

[0054] 如本文使用的,术语"酸"应被赋予其普通含义,并且在一些实施方案中,"酸"可以是阿伦尼乌斯酸(Arrhenius acid)、布朗斯特-劳里酸(Brønsted-Lowry acid)或路易斯酸(Lewis acid)。阿伦尼乌斯酸是增加溶液中水合氢离子(H_3O^+)浓度的物质或流体。布朗斯特-劳里酸是一种可以充当质子供体的物质。路易斯酸是电子对受体。如本文使用的,术语"碱"是指可以接受氢阳离子(质子)或更一般地提供一对价电子的物质。如果可溶性碱定量地含有和释放氢氧根离子(OH^-),则被称为碱。布朗斯特-劳里理论将碱定义为质子(氢离子)受体,而更一般的路易斯理论将碱定义为电子对供体,允许包括质子以外的其他路易斯酸。

[0055] 如本文使用的,术语"缓冲液"应被赋予其普通含义,并且还应指当向溶液或组合物中添加酸或碱时抵抗pH变化的含水溶液或组合物。这种对pH变化的抵抗力是由于这样的溶液的缓冲性质。因此,表现出缓冲活性的溶液或组合物被称为缓冲剂或缓冲溶液。缓冲液通常不具有无限的维持溶液或组合物的pH的能力。相反,它们通常能够将pH维持在一定范围内,例如在pH 7和pH 9之间。通常,缓冲液能够将pH维持在高于和低于其pKa的一个对数内。缓冲剂和缓冲溶液通常由缓冲盐或由非离子缓冲组分如TRIS和HEPES制成。缓冲剂的非限制性实例包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和铵缓冲剂以及这些缓冲剂的组合。

[0056] 本文提供了用于扩增核酸的方法和组合物。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并且在约10-15分钟的反应时间内进行。

[0057] 用于分离DNA的基因组链以扩增短核酸靶的化学方法

[0058] 本文提供的内容包括用于临床样品中直接病原体裂解的方法和组合物,以实现使用古细菌聚合酶的等温扩增和核酸的实时检测。可以开发不需要样品纯化的快速即时(POC)诊断。病毒颗粒、细菌细胞或其他病原体仍然需要裂解,以便它们的DNA和/或RNA可以从细胞中释放,并且可用于扩增反应。常规的化学裂解方法(例如,使用强碱、离子洗涤剂和离液剂)与酶的功能不相容,因为这些剂也将使任何DNA聚合酶或其他酶失活。因此,与酶功能相容且不需要任何核酸纯化步骤来去除裂解试剂的有效化学裂解方法具有重要价值。

[0059] 本文提供的内容包括用于分离dsDNA(例如,基因组DNA(gDNA))的互补链以用于随后在例如扩增反应中靶向短序列延伸的快速且简单的方法。在一些实施方案中,链的分离通过使用酸性剂(例如,无机酸)诸如HCl来完成,并且可以与样品裂解同时进行。不受任何特定理论的束缚,当裂解释放dsDNA时,质子化和互补碱基之间氢键的自发丧失使得DNA链能够在裂解溶液(例如,酸性组合物)中解离。在一些实施方案中,将变性的DNA样品与反应组分(例如,试剂组合物)混合,用于随后在恒温扩增,而无需任何分离或纯化步骤。在一些实施方案中,扩增反应组分包括扩增缓冲液(例如,试剂组合物),其具有足够的能力中和酸并将pH升高至快速扩增所需要的pH。在一些实施方案中,扩增反应含有高浓度的与靶gDNA互补的引物,以确保gDNA-引物复合物的形成比原始双链gDNA的自发再形成发生得更快和

更频繁。在一些实施方案中,扩增可以由通过一种或更多种DNA聚合酶掺入核苷酸对gDNA靶进行引物延伸来引发。

[0060] 本文公开的内容包括令人惊讶的发现,即将基因组DNA暴露于低pH溶液作为古细菌聚合酶扩增的初始步骤不会像通常认为的那样对扩增产生不利影响。相反,如实施例中示出的,这种方法可以提高等温扩增的速度,以及使基因组DNA检测的灵敏度产生高达100倍的提高。本文提供的方法、组合物和试剂盒可以有利地提供临床样品中对病原体(例如,DNA病原体)的即时分子诊断。在病原体裂解后,基因组DNA链被分离,在一些实施方案中,不需要单独的热或酶促步骤。

[0061] 在一些实施方案中,提供了采用酸解离用于古细菌聚合酶扩增(APA)的样品制备方法。不受任何特定理论的束缚,在一些实施方案中,酸性条件用于使基因组DNA材料变性或解离以促进等温APA扩增。在一些实施方案中,本文公开的酸性组合物(例如,重悬缓冲液、洗脱缓冲液、裂解缓冲液)中酸性剂的存在也可以提高生物实体裂解效率(例如,细胞裂解效率)。所公开的酸解离方法可以被用于多种核酸检测方法中的DNA变性,诸如等温扩增方法,包括LAMP、NEAR、RCA、MDA和RPA,以改善基因组DNA上的起始,从而提高扩增效率。本文提供的方法、组合物和试剂盒不限于等温扩增方法,并且它们可以应用于需要单链DNA或DNA解离的应用,诸如法医分析。

[0062] 目前可用的方法在针对用于直接DNA扩增的DNA解离或病原体裂解的样品制备过程中不采用酸性条件。大多数等温扩增方法需要预先的热变性步骤、化学变性或使基因组DNA解链的酶。它们不太适合即时环境。因此,需要一种简单且快速的变性方法,这通过本文提供的组合物和方法来解决。

[0063] 尽管已知dsDNA在酸性溶液中自发地分离,但由于水解脱嘌呤产生的有害影响,其使用被广泛认为与随后的DNA扩增不相容。脱嘌呤是Thomas Lindahl获得2015年诺贝尔化学奖的发现之一,是生理条件下自然发生的过程。它是嘌呤脱氧核糖核苷的化学反应,其中嘌呤碱基鸟嘌呤或腺嘌呤与脱氧核糖部分之间的β-N-糖苷键被水解裂解。碱基-糖键的裂解导致遗传信息的丢失和DNA中无碱基位点的形成,以及DNA结构的改变。脱嘌呤引起的DNA损伤已被证明对于PCR产物的扩增是成问题的,因为模板内的单个DNA损伤足以使PCR酶(例如,DNA聚合酶)停滞。

[0064] 本文公开的方法、组合物和试剂盒通过将酸性分离的使用与短DNA序列(例如,长度约30个核苷酸)的扩增的配对来解决上文提及的需求并克服由酸催化的DNA损伤带来的挑战。在一些实施方案中,酸性剂被包含在洗脱/裂解溶液中,其在生物实体裂解(例如,病原体细胞壁的裂解)时解离基因组DNA。在扩增步骤中包含本文提供的高容量缓冲液可以确保酸被中和并保持最佳pH条件。在一些实施方案中,酸性组合物(例如,重悬缓冲液、洗脱溶液、裂解溶液)还含有低浓度的单价盐和/或二价镁,据报道,单价盐和/或二价镁可能地并且不受任何特定理论的束缚,通过中和DNA主链上磷酸基团上的负电荷来抑制脱嘌呤。与镁在高pH不溶的碱性处理不同,镁在酸性pH容易溶解。

[0065] 本文公开的内容包括用于扩增样品中的靶核酸序列的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a)使包含生物实体的样品与酸性组合物接触以产生酸性混合物,其中酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA,其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸,其中酸性组合物包含(i)单价盐

和/或二价盐,(ii)一种或更多种表面活性剂,和(iii)酸性剂,并且其中酸性组合物具有小于4的pH,从而使dsDNA变性以产生单链DNA(ssDNA);(b)使包含缓冲剂的试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触以产生中性混合物,其中中性混合物包含ssDNA,其中试剂组合物包含一种或更多种扩增试剂;和(c)扩增中性混合物中的靶核酸序列,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA的长度不长于100个碱基对。在一些实施方案中,样品核酸中的一种或更多种的长度不长于100个碱基对。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA的长度长于100个碱基对。在一些实施方案中,样品核酸中的一种或更多种的长度长于100个碱基对。被怀疑包含靶核酸序列的样品核酸和/或dsDNA的长度可以是约100nt、500nt、1kb、5kb、10kb、50kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1Mb、2Mb、3Mb、4Mb、5Mb、6Mb、7Mb、8Mb、9Mb、10Mb、20Mb、30Mb、40Mb、50Mb、60Mb、70Mb、80Mb、90Mb或100Mb,或这些值中的任何两个之间的数字或范围的核苷酸。被怀疑包含靶核酸序列的样品核酸和/或dsDNA可以在与酸性组合物接触后完全变性。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的样品核酸分子和/或dsDNA分子的一部分在与酸性组合物接触后变性(例如,局部变性)。在一些实施方案中,被怀疑包含靶核酸序列的样品核酸分子和/或dsDNA分子的一部分在酸性混合物中变性(例如,局部变性),并且所述分子的一部分保持双链形式。

[0066] 扩增靶核酸序列可以包括在约20分钟、15分钟或约10分钟内(例如,在约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、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、1分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围)以可检测的水平产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,同时进行步骤(b)和(c)(例如,当发生试剂组合物和酸性混合物的接触时,扩增就开始)。在一些实施方案中,试剂组合物包含两种或更多种干燥的组合物(包含相同或不同的组分)或两种或更多种湿组合物(包含相同或不同的组分)。在一些实施方案中,酸性组合物包含两种或更多种酸性剂(包含相同或不同的组分)。

[0067] 酸性组合物可以具有约1至约6.9(例如,约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或这些值中的任何两个之间的数字或范围)的pH。在一些实施方案中,酸性组合物具有约1至约3.9的pH,例如约2的pH或约2、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4和约2.5的pH。在一些实施方案中,酸性组合物具有约2.2的pH。在一些实施方案中,中性混合物具有约7至约9(例如,约7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0或这些值中的任何两个之间的数字或范围)的pH。在一些实施方案中,中性混合物具有约8.8的pH。

[0068] 该方法可以包括:检测样品中的靶核酸序列,其中检测样品中的靶核酸序列包括:(d)检测核酸扩增产物,其中检测在从试剂组合物与酸性混合物接触的时间起少于约20分钟、少于约15分钟或少于约10分钟(例如,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、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、1分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围)内进行。

[0069] 使试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触可以包括将试

剂组合物溶解在酸性混合物中。一种或更多种扩增试剂可以包含具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、第一引物、第二引物和dNTP中的一种或更多种。

[0070] 在一些实施方案中,试剂组合物(例如,干燥的组合物)是冻干的和/或热干燥的并且包含一种或更多种添加剂,其中一种或更多种添加剂包括:氨基酸;糖或糖醇。在一些实施方案中,糖或糖醇包括蔗糖、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。在一些实施方案中,一种或更多种添加剂包括聚合物。在一些实施方案中,聚合物包括聚乙二醇、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。

[0071] 被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA可以包含彼此互补的第一链和第二链。在一些实施方案中,扩增靶核酸序列包括:在等温扩增条件下扩增靶核酸序列,其中扩增包括使ssDNA与以下接触:i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和ii)具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,由此产生核酸扩增产物,其中该核酸扩增产物包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1个至10个碱基。

[0072] 具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以具有与SEQ ID NO:1的序列或其功能片段至少约90%或95%相同的氨基酸序列,例如,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶可以是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有低核酸外切酶活性或没有核酸外切酶活性。

[0073] 第一引物和/或第二引物可以长约8个至16个碱基。第一引物和/或第二引物可以包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。核酸扩增产物可以长约20个至40个碱基(例如,长约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)。间隔序列可以包含靶核酸序列的一部分。间隔序列可以长1个至10个碱基。dsDNA可以包括基因组DNA(gDNA)、质粒DNA或两者。

[0074] 生物实体可以包括原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、外泌体、原生质体和微泡中的一种或更多种。在一些实施方案中,生物实体包括病毒、细菌、真菌、原生动物、其部分或其任何组合。靶核酸序列可以是病毒、细菌、真菌或原生动物的核酸序列。在一些实施方案中,样品核酸来源于病毒、细菌、真菌或原生动物。病毒可以是乙型肝炎病毒、单纯疱疹、疱疹病毒6、疱疹病毒7、EB病毒、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、JC病毒、细小病毒B19、轮状病毒、人类腺病毒或生殖器人类乳头瘤病毒(HPV)。细菌可以是肠道沙门氏菌、化脓性链球菌、艰难梭菌、无乳链球菌、结核分枝杆菌、立氏立克次体、查菲埃立克体、伯氏疏螺旋体、鼠疫耶尔森菌、梅毒螺旋体、沙眼衣原体、肺炎衣原体、肺炎支原体、支原体属种、嗜肺军团菌、杜莫夫军团菌、发酵支原体、埃立克体属种、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、肺炎链球菌、无乳链球菌(S.agalactiae)或单核细胞增生李斯特菌。真菌可以是波萨达斯球孢子菌、新型隐球菌、卡氏肺孢菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌、粗球孢子菌或红色毛癣菌。原生动物可以是阴道毛滴虫、克氏锥虫、利什曼原虫属种、疟原虫属、溶组织内阿米巴、田鼠巴贝斯虫、蓝氏贾第鞭毛虫、环孢子虫属种或艾美耳球虫属种。

[0075] 样品可以是生物样品或环境样品。环境样品可以是以下或可以从以下获得:食品样品、饮料样品、纸张表面、织物表面、金属表面、木材表面、塑料表面、土壤样品、淡水样品、废水样品、盐水样品、暴露于大气空气或其他气体的样品、其培养物或其任何组合。生物样品可以是以下,或可以从以下获得:组织样品、唾液、血液、血浆、血清、粪便、尿液、痰、黏液、淋巴、滑液、脑脊液、腹水、胸腔积液、血清肿、脓、皮肤或黏膜表面的拭子、其培养物或其任何组合。

[0076] 使样品与酸性组合物接触可以在约18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、81.5℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃或者这些值中的任何两个之间的数字或范围的温度进行。使样品与酸性组合物接触可以在约78℃的温度进行。使样品与酸性组合物接触可以在约18℃至约25℃的范围内的温度(例如,室温)进行。使样品与酸性组合物接触可以进行持续约5秒、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、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、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟或约60分钟,或这些值中的任何两个之间的数字或范围的时间段。

[0077] 缓冲剂可以包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂或其任何组合。在一些实施方案中,中性混合物具有在约7至约9的范围内(例如,约7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9或这些值中的任何两个之间的数字或范围)的pH。在一些实施方案中,中性混合物具有约8.8的pH。缓冲剂可以以约0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM、30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、50mM、51mM、52mM、53mM、54mM、55mM、56mM、57mM、58mM、59mM、60mM、61mM、62mM、63mM、64mM、65mM、66mM、67mM、68mM、69mM、70mM、71mM、72mM、73mM、74mM、75mM、76mM、77mM、78mM、79mM、80mM、81mM、82mM、83mM、84mM、85mM、86mM、87mM、88mM、89mM、90mM、91mM、92mM、93mM、94mM、95mM、96mM、97mM、98mM、99mM、100mM或这些值中的任何两个之间的数字或范围的浓度存在于中性混合物中。存在于本文提供的试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)和中性混合物中的缓冲剂可以变化,并且可以包括例如,柠檬酸盐缓冲剂、马来酸盐、磷酸盐、甘氨酸、甘氨酰甘氨酸、碳酸盐、乙醇胺、ADA、咪唑、肼、HEPBS、TABS、硼酸盐、N-(2-乙酰氨基)-氨基乙磺酸(ACES)、乙酸的盐(乙酸盐)、N-(2-乙酰氨基)-亚氨基二乙酸(ADA)、2-氨基乙磺酸、牛磺酸(AES)、氨、2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇、(Ammediol或AMPD)、N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸(AMPSO)、N,N-双-(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、碳酸氢钠、N,N’-双(2-羟乙基)-甘氨酸(Bicine)、[双-(2-羟乙基)-亚氨基]-三-(羟甲基甲烷)(BIS-Tris)、1,3-双[三(羟甲基)-甲基氨基]丙烷)(BIS-Tris-Propane)、硼酸、二甲基肿酸(Cacodylate)、3-(环己基氨基)-丙磺酸(CAPS)、3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸(CAPSO)、碳酸钠、环己基氨基乙磺酸

(CHES)、柠檬酸的盐(柠檬酸盐)、3-[N-双(羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸(DIPSO)、甲酸盐即甲酸的盐、甘氨酸、甘氨酰甘氨酸、N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-乙磺酸(HEPES)、N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-3-丙磺酸(HEPPS,EPPS)、N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸(HEPPSO)、苹果酸的盐(苹果酸盐)、马来酸盐即马来酸的盐、2-(N-吗啉代)-乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)-丙磺酸(MOPS)、3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)、磷酸的盐(磷酸盐)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸)(POPSO)、吡啶、琥珀酸的盐(琥珀酸盐)、3-{[三(羟甲基)-甲基]-氨基}-丙磺酸(TAPS)、3-[N-三(羟甲基)-甲基氨基]-2-羟基丙磺酸(TAPSO)、三乙醇胺(TEA)、2-[三(羟甲基)-甲基氨基]-乙磺酸(TES)、N-[三(羟甲基)-甲基]-甘氨酸(Tricine)和三(羟甲基)-氨基甲烷(Tris),或其任何组合。

[0078] 本文公开的方法、组合物和试剂盒可以将酸性分离的使用与短靶核酸序列(例如,长度约30个核苷酸)的扩增配对。靶核酸序列可以具有不长于约20个核苷酸、不长于约30个核苷酸、不长于约40个核苷酸、不长于约50个核苷酸、不长于约60个核苷酸或不长于约100个核苷酸(例如,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、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个或100个核苷酸)的长度。靶核酸序列可以具有约30个核苷酸的长度。

[0079] 扩增可以在等温扩增条件进行。等温扩增条件可以包括约30℃至约72℃的恒定温度。等温扩增条件可以包括约67℃的恒定温度。扩增可以进行持续约5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟或约60分钟,或这些值中的任何两个之间的数字或范围的时间段。扩增可以进行持续约15分钟的时间段。扩增可以在无解旋酶、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。

[0080] 在一些实施方案中,步骤(d)还包括确定样品中包含靶核酸序列的dsDNA的量。检测核酸扩增产物可以包括使用实时检测方法。检测核酸扩增产物可以包括使核酸扩增产物与能够与核酸扩增产物杂交的信号产生寡核苷酸接触,其中信号产生寡核苷酸包含荧光团、猝灭剂或两者。检测核酸扩增产物可以包括检测荧光信号。荧光信号可以来自分子信标。该方法可以在单个反应容器中进行。

[0081] 扩增可以包括两个或更多个靶核酸序列的多重扩增。检测可以包括对衍生自所述两个或更多个靶核酸序列的两种或更多种核酸扩增产物的多重检测。在一些实施方案中,两种或更多种靶核酸序列是两种或更多种不同生物体特异性的。在一些实施方案中,两种或更多种不同生物体包括沙眼衣原体和淋病奈瑟菌。

[0082] 在本文描述方法的一些实施方案中,扩增(amplifying)/扩增(amplification)不包括使用除具有超嗜热生物聚合酶活性的酶之外的任何酶。扩增可以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)。在一些实施方案中,扩增不包括以下中的一种或更多种:古细菌聚合酶扩增(APA)、LAMP、HDA、RPA、SDA、NASBA、TMA、NEAR、RCA、MDA、RAM、cHDA、SPIA、SMART、3SR、GEAR和IMDA。

[0083] 在一些实施方案中,该方法不包括以下中的一种或更多种:(i)酸性混合物(例如,经处理的样品)的稀释;(ii)中性混合物(例如,扩增反应混合物)的稀释;(iii)酸性混合物的热变性;(iv)酸性混合物的超声处理;(v)中性混合物的超声处理;(vi)向酸性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(vii)向中性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(viii)样品的纯化;(ix)样品核酸的纯化;(x)核酸扩增产物的纯化;(xi)从酸性混合物或中性混合物中去除一种或更多种表面活性剂;(xii)在扩增之前和/或期间对样品核酸进行加热变性和/或酶促变性;(xiii)向酸性混合物或中性混合物中加入核糖核酸酶H;(xiv)使样品、酸性混合物或中性混合物与解旋酶、单链结合蛋白、切口酶、限制性内切酶或重组酶接触;(xv)使样品、酸性混合物或中性混合物与甘油、甲酰胺或尿素接触;(xvi)从酸性混合物或中性混合物中纯化ssDNA;(xvii)热变性步骤;和(xviii)富集、纯化和/或分离dsDNA。

[0084] PCT专利申请公布第WO2022198086A1号中描述了用于核酸检测的组合物、试剂盒和方法,其中用于裂解生物实体(例如,病毒颗粒、细菌)的裂解性剂被阻止使扩增试剂(例如,聚合酶)失活,并且其中核糖核酸酶的有害活性在一些或所有阶段被抑制,该PCT专利申请公布的内容通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,本文提供的酸性组合物(例如,裂解缓冲液)包含如本文描述的一种或更多种还原剂(例如,DTT)和/或本文提供的试剂组合物包含如本文描述的一种或更多种保护剂(例如,环糊精化合物)。在一些实施方案中,所公开的方法和组合物能够实现核酸的等温扩增和实时检测,而不需要用于临床样品中的直接病原体裂解的即时分子诊断的样品分离或纯化。在一些实施方案中,提供了包含可以用于裂解临床样品中的病原体的强效离子洗涤剂的酸性组合物(例如,裂解缓冲液)。在一些实施方案中,酸性组合物(例如,裂解缓冲液)可以包含螯合剂。扩增试剂可以包含针对裂解试剂的保护剂,并且可以被干燥(例如,冻干、热干燥)并用于在即时环境中扩增释放的核酸。

[0085] 本文提供的方法和组合物可以应用于用于样品制备的其他扩增方法而无纯化或分离,例如PCR、RT-PCR或其他等温扩增方法。本文提供的方法和组合物也可以应用于需要样品制备步骤的基因组测序方法或任何核酸(DNA或RNA)扩增或检测方法。本文提供的方法和组合物也可以用于基因分型、诊断和法医学。所公开的方法和组合物不限于等温扩增方法,而是可以应用于其他扩增/检测方法,例如RT-PCR、WGS测序,并且也可以应用于RNA纯化/提取而无分离。

[0086] 本文公开的内容包括用于检测样品中的靶核酸序列的方法。在一些实施方案中,该方法包括:(a)使包含生物实体的样品与本文提供的裂解缓冲液(例如,酸性组合物)接触以产生酸性混合物(例如,经处理的样品),其中裂解缓冲液能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸被怀疑包含靶核酸序列。该方法可以包括:(b)使试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物接触以产生中性混合物(例如,扩增反应混合物),其中试剂组合物包含一种或更多种扩增试剂。该方法可以包括:(c)扩增中性混合物中的靶核酸序列,从而产生核酸扩增产物。该方法可以包括:(d)检测核酸扩增产物,其中检测在从试剂组合物与酸性混合物接触的时间起小于或小于约20分钟(例如,小于或小于

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、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、1分钟或这些值中的任何两个之间的数字或范围)内进行。在一些实施方案中,同时进行步骤(b)和(c)(例如,当发生试剂组合物和酸性混合物的接触时,扩增就开始)。在一些实施方案中,试剂组合物包含两种或更多种干燥的组合物(包含相同或不同的组分)或两种或更多种湿组合物(包含相同或不同的组分)。在一些实施方案中,裂解缓冲液包括两种或更多种裂解缓冲液(包含相同或不同的组分)。

[0087] 样品核酸可以包括样品核糖核酸和/或样品脱氧核糖核酸。样品核糖核酸可以包括细胞RNA、mRNA、微RNA、细菌RNA、病毒RNA或其任何组合。一种或更多种扩增试剂可以包含逆转录酶和/或具有超嗜热生物聚合酶活性的酶。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有逆转录酶活性。使试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)与酸性混合物(例如,经处理的样品)接触可以包括将试剂组合物溶解在酸性混合物中。试剂组合物可以包含逆转录酶、具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、第一引物、第二引物和逆转录引物中的一种或更多种。扩增可以在等温扩增条件进行。检测核酸扩增产物可以包括使用实时检测方法。样品核酸可以包含含有靶核酸序列的核酸。靶核酸序列可以包含彼此互补的第一链和第二链。

[0088] 扩增靶核酸序列可以包括:在等温扩增条件下扩增包含彼此互补的第一链和第二链的靶核酸序列,其中扩增包括使包含靶核酸序列的核酸与以下接触:i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和ii)具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,由此产生核酸扩增产物,其中该核酸扩增产物包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1个至10个碱基。

[0089] 在一些实施方案中,扩增不包括使用除具有超嗜热生物聚合酶活性的酶之外的任何酶,并且扩增步骤不包括使核酸变性。在一些实施方案中,该方法不包括在步骤(c)之前或期间使核酸与单链DNA结合蛋白接触。在一些实施方案中,该方法不包括样品核酸的热变性或酶促变性。

[0090] 核酸可以是dsDNA。核酸可以是逆转录反应的产物。核酸可以是从样品核糖核酸产生的逆转录反应的产物。步骤(c)可以包括通过逆转录反应产生核酸。

[0091] 样品核酸可以包括样品核糖核酸。该方法可以包括使样品核糖核酸与逆转录酶和/或逆转录引物接触以产生cDNA。扩增靶核酸序列可以包括:(c1)使样品核糖核酸与逆转录酶和/或逆转录引物接触以产生cDNA;(c2)使cDNA与具有超嗜热生物聚合酶活性的酶接触以产生dsDNA,其中dsDNA包含靶核酸序列,并且其中靶核酸序列包含彼此互补的第一链和第二链;(c3)在等温扩增条件下扩增靶核酸序列,其中扩增包括使dsDNA与以下接触:(i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和(ii)具有超嗜热生物聚合酶活性的酶,由此产生核酸扩增产物,其中该核酸扩增产物包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1个至10个碱基。

[0092] 在一些实施方案中,该方法不包括使用除逆转录酶和具有超嗜热生物聚合酶活性的酶之外的任何酶。步骤(d)还可以包括确定样品中包含靶核酸序列的dsDNA和/或核酸的量。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%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是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶,或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的聚合酶。在一些实施方案中,具有超嗜热生物聚合酶活性的酶具有低核酸外切酶活性或没有核酸外切酶活性。

[0093] 扩增靶核酸序列可以在约55℃至约75℃,例如约65℃的恒定温度进行。第一引物、第二引物或两者可以长约8个至16个碱基。第一引物、第二引物或两者可以包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。核酸扩增产物可以长约20个至40个碱基。间隔序列可以包含靶核酸序列的一部分。间隔序列可以长1个至10个碱基。

[0094] 在一些实施方案中,该方法包括:使核酸扩增产物与能够与扩增产物杂交的信号产生寡核苷酸接触。信号产生寡核苷酸可以包含荧光团、猝灭剂或两者。检测核酸扩增产物可以包括检测荧光信号。荧光信号可以来自分子信标。该方法可以在单个反应容器中进行。样品核糖核酸可以同时与逆转录酶和具有超嗜热生物聚合酶活性的酶接触。样品核糖核酸可以同时与逆转录酶、具有超嗜热生物聚合酶活性的酶以及第一引物和第二引物接触。在一些实施方案中,样品核糖核酸同时与逆转录酶、具有超嗜热生物聚合酶活性的酶、第一引物、第二引物和逆转录引物接触。样品核糖核酸的逆转录可以通过添加逆转录引物而发生。在一些实施方案中,逆转录引物是寡(dT)引物、随机六核苷酸引物或靶特异性寡核苷酸引物。在一些实施方案中,寡(dT)引物的长度是12-18个核苷酸,并且与mRNA的3'端的内源多(A)+尾结合。随机六核苷酸引物可以在多个互补位点与样品核糖核酸结合。靶特异性寡核苷酸引物通常选择性地引发感兴趣的样品核糖核酸。在一些实施方案中,第一引物和/或第二引物是逆转录引物。

[0095] 扩增步骤可以包括两个或更多个靶核酸序列的多重扩增。检测步骤可以包括对衍生自所述两个或更多个靶核酸序列的两种或更多种核酸扩增产物的多重检测。两个或更多个靶核酸序列可以是两种或更多种不同生物体特异性的。本文提供的裂解缓冲液(例如,酸性组合物)可以在多种扩增反应(诸如,例如,等温扩增反应)的上游使用。

[0096] 在一些实施方案中,该方法不包括以下中的一种或更多种,或任何:(i)酸性混合物(例如,经处理的样品)的稀释;(ii)中性混合物(例如,扩增反应混合物)的稀释;(iii)酸性混合物的热变性;(iv)酸性混合物的超声处理;(v)中性混合物的超声处理;(vi)向酸性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(vii)向中性混合物中加入核糖核酸酶抑制剂;(viii)样品的纯化;(ix)样品核酸的纯化;(x)核酸扩增产物的纯化;(xi)从酸性混合物或中性混合物中去除一种或更多种裂解性剂(例如,一种或更多种表面活性剂);(xii)在扩增之前或期间对样品核酸进行加热变性和/或酶促变性;和(xiii)向酸性混合物或中性混合物中加入核糖核酸酶H。在一些实施方案中,样品保持在扩增温度(例如,67℃)。在一些实施方案中,在扩增反应之前,将样品(例如包含RNA的样品)在室温和反应温度之间的温度保持持续1-2分钟以促进逆转录反应。

[0097] 在一些实施方案中,步骤(a)、步骤(b)、步骤(c)和/或步骤(d)进行持续约20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、2.5分钟或约1分钟的时间段。在一些实施方案中,步骤(a)、步骤

(b)、步骤(c)和/或步骤(d)包括超声处理、渗透性休克、化学处理、加热或其任何组合。

[0098] 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超过10℃,例如不超过5℃或不超过2℃。根据核酸的等温扩增的方法,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描述于WO2017176404中,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0099] 本文公开的内容包括用于扩增核酸的方法。在一些实施方案中,该方法包括:在等温扩增条件下使样品核酸与组分接触,该组分包含a)至少一种寡核苷酸,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,该方法包括:在等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:a)包含至少一种寡核苷酸的非酶组分,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)由超嗜热生物聚合酶或包含与超嗜热生物聚合酶至少约90%相同或至少95%相同的氨基酸序列的聚合酶组成的酶组分,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,该方法包括:在等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:a)包含至少一种寡核苷酸的非酶组分,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)酶活性,所述酶活性由以下组成:i)超嗜热生物聚合酶活性和任选地ii)逆转录酶活性,从而产生核酸扩增产物。

[0100] 本文公开的内容包括用于加工核酸的方法。在一些实施方案中,该方法包括:扩增核酸,其中所述扩增包括在等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:a)至少一种寡核苷酸,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,用于加工核酸的方法包括:扩增核酸,其中所述扩增包括在等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:a)包含至少一种寡核苷酸的非酶组分,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)由超嗜热生物聚合酶或包含与超嗜热生物聚合酶至少约90%相同或至少95%相同的氨基酸序列的聚合酶组成的酶组分,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,用于加工核酸的方法包括:扩增核酸,其中所述扩增包括在等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:a)包含至少一种寡核苷酸的非酶组分,所述至少一种寡核苷酸包含与样品核酸中的靶序列互补的多核苷酸,和b)酶活性,所述酶活性由以下组成:i)超嗜热生物聚合酶活性和任选地ii)逆转录酶活性,从而产生核酸扩增产物。在一些实施方案中,酶活性由以下组成:i)超嗜热生物聚合酶活性,和ii)逆转录酶活性。

[0101] 本文公开的内容包括用于确定样品核酸中靶序列的存在、不存在或量的方法。在一些实施方案中,该方法包括:a)扩增样品核酸中的靶序列,其中:靶序列包含第一链和第二链,第一链和第二链彼此互补,并且扩增包括在无解旋酶的等温扩增条件下使样品核酸与以下接触:i)第一寡核苷酸和第二寡核苷酸,其中第一寡核苷酸包含与第一链中的序列连续互补的第一多核苷酸或由其组成,并且第二寡核苷酸包含与第二链中的序列连续互补的第二多核苷酸或由其组成;和ii)至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分,从而产生核酸扩增产物,其中所述核酸扩增产物包含以下或由以下组成:1)与第一寡核苷酸的第一多核苷酸连续互补或大体上相同的第一核苷酸序列,2)与第二寡核苷酸的第二多核苷酸连续互补或大体上相同的第二核苷酸序列,和3)包含1个至10个碱基的间隔序列,并且间隔序

列的侧翼是第一核苷酸序列和第二核苷酸序列;和b)检测核酸扩增产物,其中检测核酸扩增产物包括使用实时检测方法,并且在从样品核酸与(a)(i)和(a)(ii)接触的时间起10分钟或更短时间内进行,由此确定样品核酸中靶序列的存在、不存在或量。

[0102] 本文公开的内容包括用于确定样品核酸中靶序列的存在、不存在或量的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含:a)用于在无解旋酶的等温扩增条件下扩增样品核酸中的靶序列的组分,该组分包含:i)第一寡核苷酸和第二寡核苷酸,其中第一寡核苷酸包含与靶序列的第一链中的序列连续互补的第一多核苷酸或由其组成,并且第二寡核苷酸包含与靶序列的第二链中的序列连续互补的第二多核苷酸或由其组成,靶序列的第一链和第二链彼此互补;和ii)至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分;和b)至少一种对核酸扩增产物提供实时检测活性的组分。

[0103] 酶活性可以包含以下或由以下组成:i)超嗜热生物聚合酶活性,和ii)逆转录酶活性。在一些实施方案中,该方法不包括在扩增之前或期间样品核酸的酶促变性和/或热变性。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前或期间不与核酸内切酶接触。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前或期间不与解链剂接触。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前或期间不与解旋酶接触。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前或期间不与重组酶接触。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前或期间不与单链DNA结合蛋白接触。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前是未修饰的。在一些实施方案中,未修饰的样品核酸来自破碎的细胞。在一些实施方案中,样品核酸包含DNA。在一些实施方案中,样品核酸包含基因组DNA。在一些实施方案中,样品核酸包含RNA。在一些实施方案中,样品核酸包含病毒RNA。在一些实施方案中,样品核酸包含细菌RNA。样品核酸可以包含单链核酸、双链核酸或两者。例如,双链核酸可以包含第一链和第二链。在一些实施方案中,至少一种寡核苷酸包含第一寡核苷酸和第二寡核苷酸或由其组成。在一些实施方案中,第一寡核苷酸和第二寡核苷酸各自包含8个至16个碱基。在一些实施方案中,第一寡核苷酸包含与样品核酸的第一链中的靶序列互补的第一多核苷酸或由其组成,并且第二寡核苷酸包含与样品核酸的第二链中的靶序列互补的第二多核苷酸。在一些实施方案中,样品核酸在扩增之前从受试者获得。在一些实施方案中,扩增未纯化的样品核酸。在一些实施方案中,扩增纯化的样品核酸。在一些实施方案中,该方法还包括在扩增之前纯化样品核酸。

[0104] 在一些实施方案中,超嗜热生物聚合酶活性由超嗜热生物聚合酶或其功能片段提供。在一些实施方案中,超嗜热生物聚合酶活性由包含与超嗜热生物聚合酶或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列的聚合酶提供。在一些实施方案中,超嗜热生物聚合酶活性由古细菌超嗜热生物聚合酶或其功能片段提供。在一些实施方案中,超嗜热生物聚合酶活性由以下提供:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段的聚合酶,或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列的聚合酶。在一些实施方案中,超嗜热生物聚合酶活性由具有低核酸外切酶活性或没有核酸外切酶活性的聚合酶提供。在一些实施方案中,扩增在约55℃至约75℃的恒定温度进行,例如在约55℃至约65℃或约65℃或约60℃的恒定温度进行。

[0105] 在一些实施方案中,核酸扩增产物在20分钟、15分钟、14分钟、13分钟、12分钟、11分钟或10分钟或更短时间内是可检测的。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连续互补或大体上相同的多核苷酸或由其组成。核酸扩增产物可以长约20个

至40个碱基。在一些实施方案中,核酸扩增产物包含以下或由以下组成:i)与第一寡核苷酸的第一多核苷酸连续互补或大体上相同的第一核苷酸序列,ii)与第二寡核苷酸的第二多核苷酸连续互补或大体上相同的第二核苷酸序列,和iii)间隔序列,其中间隔序列的侧翼是第一核苷酸序列和第二核苷酸序列。在一些实施方案中,间隔序列包含1个至10个碱基,例如1个至5个碱基。在一些实施方案中,间隔序列与第一寡核苷酸的第一多核苷酸不互补或不与之相同,并且与第二寡核苷酸的第二多核苷酸不互补或不与之相同。在一些实施方案中,间隔序列与样品核酸中的靶序列的一部分连续互补或大体上相同。

[0106] 在一些实施方案中,该方法还包括检测核酸扩增产物。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物在从样品核酸与提供超嗜热生物聚合酶活性的组分和至少一种寡核苷酸接触的时间起10分钟或更短时间内进行。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。在一些实施方案中,检测核酸扩增产物包括检测荧光信号。在一些实施方案中,荧光信号来自分子信标。在一些实施方案中,该方法还包括使核酸扩增产物与信号产生寡核苷酸接触,该信号产生寡核苷酸包含i)与扩增产物中的序列互补的多核苷酸,和ii)荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,至少一种寡核苷酸中的一种或更多种包含与样品核酸中与信号产生寡核苷酸杂交的序列不互补的多核苷酸,并且其中该方法还包括使扩增产物与包含荧光团和猝灭剂的信号产生寡核苷酸接触。在一些实施方案中,该方法在单一反应体积中进行。在一些实施方案中,该方法在单个反应容器中进行。在一些实施方案中,该方法包括多重扩增。

[0107] 在一些实施方案中,酶活性由以下组成:i)超嗜热生物聚合酶活性,和ii)逆转录酶活性。在一些实施方案中,第一寡核苷酸包含与样品核酸的第一链中的靶序列互补的第一多核苷酸或由其组成,并且第二寡核苷酸包含与样品核酸的第二链中的靶序列互补的第二多核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸包含与样品核酸的第一链中的靶序列连续互补的第一多核苷酸或由其组成,并且第二寡核苷酸包含与样品核酸的第二链中的靶序列连续互补的第二多核苷酸。

[0108] 在一些实施方案中,扩增包括在无解旋酶和无重组酶的等温扩增条件下接触样品核酸。在一些实施方案中,至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分包含以下或由以下组成:超嗜热生物聚合酶或其功能片段,或包含与超嗜热生物聚合酶或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列或由其组成的聚合酶。在一些实施方案中,部分(a)(ii)还包含至少一种提供逆转录酶活性的组分。在一些实施方案中,至少一种提供超嗜热生物聚合酶活性的组分还提供逆转录酶活性。在一些实施方案中,样品核酸在无解旋酶和无重组酶的等温扩增条件下扩增。在一些实施方案中,实时检测活性由分子信标提供。在一些实施方案中,试剂盒还包含用于进行本文提供的用于确定样品核酸中靶序列的存在、不存在或量的方法的使用说明。

[0109] 在一些实施方案中,本文描述的方法和组分包括储存稳定的裂解缓冲液。在一些实施方案中,裂解缓冲液在储存条件(例如,储存稳定的裂解缓冲液)下在一段时间抵抗沉淀的形成。其中裂解缓冲液抵抗沉淀的组合物、试剂盒和方法描述于2022年2月5日提交的标题为“NON-OPAQUE LYTIC BUFFER COMPOSITION FORMULATIONS”的美国专利申请第63/307,092号中,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0110] 核酸、受试者、样品和核酸处理

[0111] 本文提供了用于扩增核酸的方法和组合物。术语“核酸”和“核酸分子”在本文中可互换地使用。该术语是指任何组合物的核酸,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,含有碱基类似物、糖类似物和/或非天然主链等)、RNA/DNA杂合体和聚酰胺核酸(PNA),所有这些都可以是单链或双链形式,并且除非另有限制,可以包括可以以与天然存在的核苷酸相似的方式起作用的天然核苷酸的已知类似物。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。除非另有指示,否则特定的核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、种间同源物、单核苷酸多态性(SNP)、和互补序列以及明确指示的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或更多个所选(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现。术语核酸可以与基因座、基因、cDNA和由基因编码的mRNA可互换地使用。作为等同物,该术语还可以包括从核苷酸类似物合成的RNA或DNA的衍生物、变体和类似物、单链(“有义”或“反义”、“正”链或“负”链、“正向”阅读框或“反向”阅读框、“正向”链或“反向”链)和双链多核苷酸。术语“基因”意指参与产生多肽链的DNA的区段;并且通常包括参与基因产物的转录/翻译和转录/翻译调节的编码区(前导区和尾区)之前和之后的区域,以及单独的编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。核苷酸或碱基通常是指核酸的嘌呤和嘧啶分子单元(例如,腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C))。对于RNA,碱基胸腺嘧啶被尿嘧啶取代。核酸长度或尺寸可以表示为碱基的数目。

[0112] 在本文提供的方法的一些实施方案中,一种或更多种核酸靶被扩增。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,并且可以包括双链和单链核酸分子。例如,靶核酸可以是DNA或RNA。当靶核酸是RNA分子时,例如,该分子可以是双链的、单链的,或者RNA分子可以包含单链的靶序列。在靶核酸是双链的情况下,靶核酸通常包括第一链和第二链。第一链和第二链可以被称为正向链和反向链,并且通常彼此互补。在靶核酸是单链的情况下,可以例如通过聚合和/或逆转录产生互补链,使得靶核酸是双链的并且具有第一/正向链和第二/反向链。

[0113] 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靶核酸、原始靶序列的扩增拷贝或扩增产物上的序列。靶序列可以是较大多核苷酸内的子序列。例如,靶序列可以是核酸片段、染色体、质粒内的短序列(例如,20个至50个碱基),该短序列被靶向用于扩增。在一些实施方案中,靶序列可以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用于扩增的整个序列,或者可以是指寡核苷酸结合的靶核酸中的子序列。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。扩增产物可以是与靶序列约相同的长度,例如与靶序列完全相同的长度。扩增产物可以包含靶序列或由靶序列组成。

[0114] 靶序列的长度和/或鸟苷胞嘧啶(GC)浓度(百分比)可以部分取决于扩增反应运行的温度,并且该温度可以部分取决于反应中使用的聚合酶的稳定性。可以进行样品测定以确定一组反应条件的适当靶序列长度和GC浓度。例如,当聚合酶在高达60℃至65℃稳定时,

则靶序列的长度可以为例如从19个至50个核苷酸,或者长度可以为例如从约40个至50个、20个至45个、20个至40个或20个至30个核苷酸。在这些条件下的GC浓度可以是例如,小于60%、小于55%、小于50%或小于45%。

[0115] 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,动物、植物、昆虫、病毒和细菌基因组(例如,存在于孢子中的基因组)。在一些实施方案中,基因组靶核酸在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中的任一种或其组合。

[0116] 靶序列可以包含一个或更多个重复元件(例如,多重复序列、反向重复序列、回文序列、串联重复、微卫星、小卫星等)。在一些实施方案中,靶序列作为重复元件(例如,多重复序列、反向重复序列、回文序列、串联重复、微卫星重复、小卫星重复等)存在于样品核酸内(例如,核酸片段、染色体、基因组、质粒内)。例如,靶序列可以作为重复元件出现多次,并且可以使用本文描述的方法(例如,使用单对引物)扩增重复元件内靶序列的一次、一些或所有出现。在一些实施方案中,靶序列作为重复和/或种内同源物存在于样品核酸内(例如,在核酸片段、染色体、基因组、质粒内)。

[0117] 靶核酸可以包括微RNA。微RNA、miRNA或小时序RNA(small temporal RNAs,stRNA)是参与基因调控的短(例如,约21个至23个核苷酸长)和单链的RNA序列。微RNA可以干扰信使RNA的翻译,并且与信使RNA部分互补。靶核酸可以包括微RNA前体,诸如初级转录物(pri-miRNA)和被进一步加工成miRNA的前miRNA茎环结构RNA。靶核酸可以包括短干扰RNA(siRNA),短干扰RNA是参与RNA干扰(例如,病毒复制或基因表达的下调)的短的(例如,约20个至25个核苷酸长)和至少部分双链的RNA分子。

[0118] 本文描述的方法中使用的核酸可以从任何合适的生物样本或样品获得,例如,从获自受试者的样品分离。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、狗、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)。

[0119] 样品或测试样品可以是从受试者或其部分分离或获得的任何样本。样本的非限制性实例包括来自受试者的流体或组织,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)、血清、血浆、尿液、抽吸物(aspirate)、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)等或其组合。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。对于血液,通常收集适量的外周血(例如,在3-40毫升之间),并且可以在制备之前或之后根据标准程序储存。

[0120] 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、土壤或其他怀疑含有生物有机体的材料中。

[0121] 核酸可以通过本领域已知的方法从一个或更多个来源衍生(例如,分离、提取、纯化)。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,包括本领域的DNA制备方法,以及多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。美国专利第7,888,006号提供了DNA纯化方法,并且没有公开本文提供的组合物(例如,裂解缓冲液、保护剂)和方法。

[0122] 在一些实施方案中,进行细胞裂解程序。细胞裂解可以在开始本文描述的扩增反应之前进行(例如,以从细胞释放DNA和/或RNA用于扩增)。细胞裂解程序和试剂是本领域已知的,并且可以通过化学(例如,洗涤剂、低渗溶液、酶促程序等,或其组合)、物理(例如,弗氏细胞压碎(French press)、超声处理等)或电解裂解方法来进行。例如,化学方法通常使用裂解剂来破坏细胞并从细胞提取核酸,然后用离液盐处理。在一些实施方案中,细胞裂解包括使用洗涤剂(例如,离子、非离子、阴离子、两性离子)。在一些实施方案中,细胞裂解包括使用离子洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂基硫酸钠(SLS)、脱氧胆酸盐、胆酸盐、sarkosyl)。物理方法诸如冷冻/解冻后研磨、使用细胞压碎等也可以是有用的。也可以使用高盐裂解程序。例如,可以使用碱裂解程序。后一种程序传统上包括使用苯酚-氯仿溶液,并且可以使用涉及三种溶液的可选择的不含苯酚-氯仿的程序。在后一种程序中,一种溶液可以含有15mM Tris,pH 8.0;10mM EDTA和100μg/ml RNA酶;第二种溶液可以含有0.2N NaOH和1% SDS;并且第三溶液例如可以包含3M KOAc,pH 5.5。在一些实施方案中,细胞裂解缓冲液与本文描述的方法和组分联合使用。

[0123] 可以提供核酸用于进行本文描述的方法,而不加工含有核酸的样品。例如,可以提供核酸用于进行本文描述的扩增方法,而无需预先进行核酸纯化。在一些实施方案中,直接从样品扩增靶序列(例如,不执行任何核酸提取、分离、纯化和/或部分纯化步骤)。在一些实施方案中,在加工含有核酸的样品后,提供核酸用于进行本文描述的方法。例如,可以从样品提取、分离、纯化或部分纯化核酸。术语“分离的”通常指从其原始环境(例如,如果它是天然存在的,则为自然环境,如果是外源表达的,则为宿主细胞)取出的核酸,并且因此通过人类干预(例如,“通过人类的手”)从其原始环境中改变。术语“分离的核酸”可以指从受试者(例如,人类受试者)取出的核酸。分离的核酸可以提供比源样品中存在的组分量更少的非核酸组分(例如,蛋白质、脂质、碳水化合物)。包含分离的核酸的组合物可以约50%至大于99%不含非核酸组分。包含分离的核酸的组合物可以约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%不含非核酸组分。术语“纯化的”通常是指提供的核酸包

含的非核酸组分(例如,蛋白质、脂质、碳水化合物)少于对核酸进行纯化程序之前存在的非核酸组分的量。包含纯化的核酸的组合物可以约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%不含其他非核酸组分。

[0124] 可以提供核酸用于进行本文描述的方法,而不修饰核酸。修饰可以包括例如变性、消化、切口、解链、异源序列的掺入和/或连接、添加表观遗传修饰、添加标记(例如,放射性标记诸如^{32}P、^{33}P、^{125}I或^{35}S;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、荧光染料)等。因此,在一些实施方案中,扩增未修饰的核酸。

[0125] 本文公开的用于检测样品中的靶核酸序列(单链或dsDNA和/或RNA)的方法可以以高度的灵敏度检测靶核酸序列(例如,DNA或RNA)。在一些实施方案中,该方法可以用于检测存在于包含多于一种RNA/DNA(包括靶RNA/DNA和多于一种非靶RNA/DNA)的样品中的靶DNA/RNA,其中靶RNA/DNA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中一个或更多个拷贝存在。如本文使用的,术语"RNA/DNA"和"RNAs/DNAs"应被赋予其普通含义,并且还应指DNA、或RNA、或DNA和RNA的组合。

[0126] 对于检测样品中的靶RNA/DNA的方法,检测阈值可以是,例如10nM或更小。术语"检测阈值"应被赋予其普通含义,并且还应描述为了进行检测而必须存在于样品中的靶RNA/DNA的最小量。作为说明性实例,当检测阈值为10nM时,则当靶RNA/DNA以10nM或更高的浓度存在于样品中时,可以检测到信号。在一些实施方案中,所公开的方法具有5nM或更少、1nM或更少、0.5nM或更少、0.1nM或更少、0.05nM或更少、0.01nM或更少、0.005nM或更少、0.001nM或更少、0.0005nM或更少、0.0001nM或更少、0.00005nM或更少、0.00001nM或更少、10pM或更少、1pM或更少、500fM或更少、250fM或更少、100fM或更少、50fM或更少、500aM(attomolar,渺摩尔/升)或更少、250aM或更少、100aM或更少、50aM或更少、10aM或更少或1aM或更少的检测阈值。本文公开的组合物或方法可以具有渺摩尔/升(aM)检测灵敏度、飞摩尔/升(fM)检测灵敏度、皮摩尔/升(pM)检测灵敏度或纳摩尔/升(nM)检测灵敏度。

[0127] 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种或更多种在序列上彼此不同的DNA/RNA。在一些实施方案中,样品包括来自细胞(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。

[0128] 本文使用的术语"样品"应具有其普通含义,并应包括包含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。样品可以包括靶核酸(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中一个拷贝存在于样品中。

[0129] 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由其衍生的细胞及其后代,以及在其获得后以任何方式操作(诸如通过用试剂处理)的样品;洗涤过的;或富集了某些细胞群体(例如,癌细胞)或特定类型的分子(例如,RNA)。样品可以包括或是生物样品,包括但不限于临床样品,诸如血液、血浆、血清、抽吸物(aspirate)、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”可以包括从其(例如,癌性细胞、感染的细胞等)衍生的生物流体,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)。

[0130] 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,并且样品可以是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、蠕虫、原生动物、疟疾寄生虫、疟原虫属(Plasmodium)寄生虫、弓形虫属(Toxoplasma)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)、克氏锥虫和刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)。真菌病原体包括但不限于:新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌、皮炎芽生菌、沙眼衣原体和白色念珠菌(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)、EB病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、嗜淋巴疱疹病毒、玫瑰糠疹(Pityriasis Rosea)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒);腺病毒(例如,腺胸腺病毒属(atadenovirus)、禽腺病毒属(aviadenovirus)、肌腺病毒属(ichtadenovirus)、哺乳动物腺病毒属(mastadenovirus)、唾液酸酶腺病毒属(siadenovirus));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(tanapox virus)、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(bufavirus)、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、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌(Escherichia coli)、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、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(Lyme disease spirochetes)、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、辛德毕斯病毒(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)。

[0131] 扩增

[0132] 本文提供的内容包括用于扩增核酸的方法。在一些实施方案中,使用合适的扩增方法扩增核酸。核酸扩增涉及核酸扩增子(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。扩增可以在单个容器、单个室和/或单个体积(即,连续体积)中进行。在一些实施方案中,扩增方法和检测方法(例如,本文描述的检测方法)在单个容器、单个室和/或单个体积(即,连续体积)中进行。

[0133] 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。“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,一次引物延伸可以作为线性或指数扩增的前序步骤(prelude)来进行。

[0134] 本文呈现了扩增过程的一般性描述。引物(例如,本文描述的寡核苷酸)和靶核酸接触,并且例如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末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,邻近是距离感兴趣的核苷酸或核苷酸序列约1个核苷酸至约50个核苷酸的范围(例如,约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个或50个核苷酸)。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)。

[0135] 扩增反应的组分(例如,一种或更多种扩增试剂)可以包括例如一种或更多种引物(例如,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)、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)。扩增反应还可以包括以下中的一种或更多种:逆转录酶、逆转录引物和一种或更多种检测剂。

[0136] 核酸扩增可以在存在天然核苷酸的情况下进行,例如双脱氧核糖核苷三磷酸(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可以表示为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^{32}P、^{33}P、^{125}I或^{35}S;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,核酸扩增可以在存在修饰的dNTP的情况下进行,例如,热激活的dNTP(例如,来自TriLink的CleanAmp™dNTP)。

[0137] 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。在一些实施方案中,非酶组分不包括蛋白质(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、切口酶、重组酶等。在一些实施方案中,酶组分由聚合酶组成或由聚合酶和逆转录酶组成。因此,这样的酶组分将排除其他蛋白质(例如,核酸结合蛋白和/或具有酶活性的蛋白质),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。

[0138] 在一些实施方案中,扩增条件包括酶促活性(例如,由聚合酶提供的酶促活性或由聚合酶和逆转录酶提供的酶促活性)。在一些实施方案中,酶促活性不包括由聚合酶和/或逆转录酶以外的酶,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、重组酶等提供的酶促活性。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,聚合酶和逆转录酶)提供,或者由单一的酶或酶类型(例如,聚合酶)提

供。

[0139] 核酸的扩增可以包括非热循环类型的PCR。在一些实施方案中,核酸的扩增包括等温扩增过程,例如等温聚合酶链式反应(iPCR)。等温扩增通常是在恒定温度进行的扩增过程。诸如等温条件、等温地和恒定温度的术语通常是指在扩增反应过程期间反应温度基本保持恒定的反应条件。等温扩增条件通常不包括扩增过程中的热循环(即,在较高温度和较低温度之间循环)组分。当在等温条件下扩增时,反应可以保持在基本恒定的温度,这意味着温度可以不精确地维持在一个温度。例如,在等温扩增过程中,由于例如环境或基于设备的变量,可能会出现温度的小波动(例如±1℃至5℃)。通常,整个反应体积保持在基本恒定的温度,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。

[0140] 本文的等温扩增反应可以在基本恒定的温度进行。在一些实施方案中,本文的等温扩增反应在约55℃的温度至约75℃的温度进行,例如在以下的温度或在约以下的温度进行:55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃或约75℃,或在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,温度元件(例如,热源)保持在基本恒定的温度,例如处于或低于约75℃、处于或低于约70℃、处于或低于约65℃、或处于或低于约60℃的基本恒定的温度。

[0141] 本文的扩增过程可以进行一定时间长度,例如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。扩增过程可以进行约20分钟或更短时间、或者约10分钟或更短时间内的时间长度。例如,扩增过程可以进行约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、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分钟内,或者在这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0142] 在一些实施方案中,核酸靶可以在不暴露于使核酸变性的剂或条件的情况下被扩增。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。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。使核酸变性和/或促进链分离和/或促进解链的剂或条件可以包括例如热条件(例如,高温)、pH条件(例如,高或低pH)、化学剂、蛋白质(例如,酶促剂)等。

[0143] 在一些实施方案中,本文公开的方法不包括核酸的热变性(例如,将含有核酸的溶液加热到高温,诸如例如高于75℃、80℃、90℃或95℃或更高的温度)或基于蛋白质的(例如,酶促)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,本文提供的组合物不包含解旋酶、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,本文提供的组合物和方法不包括嵌入剂、烷基化剂和/或化学品,诸如甲酰胺、甘油、尿素、二甲基亚砜(DMSO)或N,N,N-三甲基甘氨酸(甜菜碱)。在一些实施方案中,公开的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,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)之外,扩增步骤(例如,步骤(c))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。

[0144] 核酸靶可以在不暴露于促进链分离和/或解链的剂或条件的情况下被扩增,所述剂例如解旋酶、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、RNA复制酶、核酸结合蛋白(例如,单链结合蛋白)或其任何组合。例如,核酸靶可以在不暴露于解旋酶的情况下被扩增,解旋酶包括但不限于DNA解旋酶和RNA解旋酶。不包括使用解旋酶的扩增条件是无解旋酶的扩增条件。

[0145] 核酸靶可以在不暴露于重组酶的情况下被扩增,重组酶包括但不限于Cre重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、FLP重组酶、RecA、RAD51、RadA、T4 uvsX。在一些实施方案中,核酸靶在不暴露于重组酶辅助蛋白,例如重组酶加载因子(例如,T4 uvsY)的情况下被扩增。核酸靶可以在不暴露于核酸结合蛋白(例如,单链结合蛋白或单链DNA结合蛋白(SSB)),例如T4 gp32的情况下被扩增。在一些实施方案中,核酸靶在不暴露于拓扑异构酶的情况下被扩增。核酸靶可以在暴露于或不暴露于使核酸去稳定的剂或条件下被扩增。如本文使用的,术语“去稳定”应赋予其普通含义,并且还应指由倾斜、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(例如,如Lenglet等人,(2010)Journal of Nucleic Acids Volume 2010,Article ID 290935,17页中描述的)。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、DMSO或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。在一些实施方案中,核酸靶在不暴露于连接酶和/或RNA复制酶的情况下被扩增。

[0146] 在一些实施方案中,核酸靶可以在没有裂解或消化的情况下被扩增。例如,核酸靶可以在不预先暴露于一种或更多种裂解剂的情况下被扩增,并且完整的核酸被扩增。在一些实施方案中,核酸靶在扩增期间不暴露于一种或更多种裂解剂的情况下被扩增。在一些实施方案中,核酸靶在扩增后不暴露于一种或更多种裂解剂的情况下被扩增。不包括使用裂解剂的扩增条件在本文中可以被称为无裂解剂扩增条件。术语“裂解剂”通常是指可以在一个或更多个特异性或非特异性位点裂解核酸的剂,有时是化学物质或酶。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。裂解剂可以包括核酸内切酶(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)和多(A)特异性3’至5’核酸外切酶);和化学裂解剂。

[0147] 核酸靶可以在不使用限制性内切酶和/或切口酶的情况下被扩增。在一些实施方案中,核酸在没有预先暴露于限制性内切酶和/或切口酶的情况下被扩增。在一些实施方案中,核酸在扩增期间不暴露于限制性内切酶和/或切口酶的情况下被扩增。在一些实施方案中,核酸在扩增后不暴露于限制性内切酶和/或切口酶的情况下被扩增。核酸靶可以无核酸外切酶处理地扩增。核酸外切酶包括例如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)和多(A)特异性3’至5’核酸

外切酶。在一些实施方案中,核酸在扩增之前、期间和/或之后没有核酸外切酶处理的情况下被扩增。不包括使用核酸外切酶的扩增条件是无核酸外切酶的扩增条件。在一些实施方案中,核酸在没有DNA酶处理和/或RNA酶处理的情况下被扩增。

[0148] 扩增的核酸在本文中可以被称为核酸扩增产物或扩增子。在一些实施方案中,扩增产物包含天然存在的核苷酸、非天然存在的核苷酸、核苷酸类似物等以及前述的组合。扩增产物通常具有与样品核酸中的序列(例如,靶序列)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。

[0149] 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连续互补或大体上相同的多核苷酸。连续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,并且在被认为是连续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,连续互补通常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。例如,具有序列5'-ATGCATGCATGC-3'(SEQ ID NO:3)的第一链将被认为与具有序列5'-GCATGCATGCAT-3'(SEQ ID NO:4)的第二链连续互补,其中第一链中的所有连续碱基与第二链中的所有对应的连续碱基互补。然而,具有序列5'-ATGCATAAAAAAGCATGC-3'(SEQ ID NO:5)的第一链将不被认为与具有序列5'-GCATGCATGCAT-3'(SEQ ID NO:4)的第二链连续互补,因为第一链中间的六个腺嘌呤(6个A)的序列将不与第二链中的碱基配对。连续互补序列有时长度为约5个至约25个连续碱基,例如长度为约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个连续碱基,或这些值中的任何两个之间的范围。在一些实施方案中,核酸扩增产物由与样品核酸中的靶序列连续互补或大体上相同的多核苷酸组成。因此,在一些实施方案中,核酸扩增产物不包含与靶序列不连续互补或大体上相同的任何另外的序列(例如,在5'端和/或3'端,或在产物内),例如,通过加尾引物或连接掺入扩增产物中的另外的序列,和/或提供裂解剂识别位点(例如,切口酶识别位点)的另外的序列。通常,除非靶序列包含串联重复,否则扩增产物不包含串联重复形式的产物。

[0150] 核酸扩增产物可以包含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。在一些实施方案中,核酸扩增产物包含与第一引物序列连续互补或相同的第一核苷酸序列,以及与第二引物序列连续互补或相同的第二核苷酸序列。

[0151] 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含以下: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)。

[0152] 核酸扩增产物的长度可以多达50个碱基,包括10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个碱基,或者长这些值中的任何两个之间的数字或范围的碱基。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10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。

[0153] 本文描述的方法和组分可以用于多重扩增,其通常是指多于一个感兴趣的核酸的扩增(例如,多于一个靶序列的扩增)。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。例如,多重扩增可以用于扩增至少两个能够被扩增的靶序列(例如,扩增反应包括合适的引物和酶来扩增至少两个靶序列)。在一些实施方案中,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,但是只有一个序列被扩增。在一些实施方案中,当存在两个靶序列时,扩增反应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。在一些实施方案中,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,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。

[0154] 引物

[0155] 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,靶序列)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以可互换地使用。

[0156] 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长度可以是约5个至约30个碱基,例如长度为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。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。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C6 dT、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C3 S-S、二硫醇、硫醇修饰剂C6 S-S));荧光团(例如,Freedom™染料、Alexa Fluor®染料,LI-COR IRDyes®、ATTO™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-硝基吲哚、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、硫代磷酸酯连键、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更多个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。这种修饰可以例如增加RNA:RNA双链体的Tm并在单链核糖核酸酶和DNA酶存在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,以增加稳定性和对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更多个硫代磷酸酯连键(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,被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,引物包含一个或更多个间隔物碱基(例如,一个或更多个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。

[0157] 引物可以包含DNA碱基、RNA碱基或两者,其中一个或更多个DNA碱基和RNA碱基是修饰的或未修饰的。例如,引物可以是DNA碱基和RNA碱基的混合物。引物可以由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,引物由未修饰的DNA碱基组成。在一些实施方案中,引物由修饰的DNA碱基组成。引物可以由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,引物由未修饰的RNA碱基组成。在一些实施方案中,引物由修饰的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,引物不包含DNA碱基。在一些实施方案中,引物不包含裂解剂识别位点(例如,不包含切口酶识别位点)。在一些实施方案中,引物不包含尾(例如,没有包含切口酶识别位点的尾)。

[0158] 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大体上互补。关于序列的大体上互补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。靶序列和引物序列可以例如彼此至少75%互补,包括彼此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%互补。与靶核酸序列大体上互补的引物通常也与靶核酸序列的互补物(即,靶核酸的反义链的序列)大体上相同。引物和靶核酸的反义链在序列上可以至少75%相同,例如彼此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%相同。

[0159] 在一些实施方案中,引物包括一对引物。一对引物可以包括正向引物和反向引物(例如,与靶核酸的有义和反义链结合的引物)。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。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。

[0160] 扩增反应组分可以包含以下或由以下组成:与样品核酸的第一链(例如,有义链、正向链)中的靶序列互补的第一引物(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连续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连续互补的第二多核苷酸。引物-靶的连续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,并且在被认为是连续互补的序列中没有空位、另外的序列或不配对的碱基。在一些实施方案中,引物不包含与靶序列不连续互补的任何另外的序列(例如,在5'端和/或3'端,或在引物内),例如,存在于加尾引物或环化引物中的另外的序列,和/或提供裂解剂识别位点(例如,切口酶识别位点)的另外的序列。在一些实施方案中,扩增反应组分不包含含有另外的序列(即,除了与靶序列连续互补的序列之外的序列)的引物,例如,加尾引物、

环化引物、能够形成茎环结构的引物、发夹结构和/或提供裂解剂识别位点(例如,切口酶识别位点)的另外的序列等。

[0161] 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、小沟结合剂、双链体稳定剂(例如,吖啶、亚精胺)、Tm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)。

[0162] 聚合酶

[0163] 在一些实施方案中,扩增反应组分(例如,一种或更多种扩增试剂)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。聚合酶的非限制性实例包括在升高的反应温度(例如,高于55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃或100℃)可以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。聚合酶可以具有或可以不具有链置换能力。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约1个、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。

[0164] 扩增反应组分可以包括选自以下的一种或更多种DNA聚合酶: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™γDNA聚合酶;Bst DNA聚合酶;Bst DNA聚合酶(大片段);Phi29 DNA聚合酶,DNA聚合酶I(大肠杆菌(E.coli)),DNA聚合酶I,大(Klenow)片段;Klenow片段(3'-5'外切);T4 DNA聚合酶;T7 DNA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™Phi29 DNA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;SP6 DNA聚合酶;Tbr DNA聚合酶;DNA聚合酶β;和ThermoPhi DNA聚合酶。

[0165] 在一些实施方案中,扩增反应组分包含一种或更多种超嗜热生物DNA聚合酶(例如,在高温热稳定的超嗜热生物DNA聚合酶)。超嗜热生物DNA聚合酶可以具有在95℃约5小时至10小时的半衰期,和在100℃约1小时至3小时的半衰期。例如,扩增反应组分可以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)的超嗜热生物DNA聚合酶,或来自热球菌科古细菌(Thermococcaceaen archaean)的超嗜热生物DNA聚合酶)。在一些实施方案中,扩增反应组分包含来自火球菌属(Pyrococcus)、甲烷球菌科(Methanococcaceae)、甲烷球菌属(Methanococcus)或栖热菌属(Thermus)的一种或更多种超嗜热生物DNA聚合酶。在一些实施方案中,扩增反应组分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。

[0166] 在一些实施方案中,扩增反应组分包含超嗜热生物DNA聚合酶或其功能片段。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)。在一些情况下,功能片段以全长聚合酶的功能水平的至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%的水平执行功能(例如,在扩增反应中聚合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,诸如本文描述的可检测的核酸扩增方法来评估。在一些

实施方案中,扩增反应组分包含超嗜热生物DNA聚合酶,超嗜热生物DNA聚合酶包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列或SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的功能片段。

[0167] 在一些实施方案中,扩增反应组分(例如,一种或更多种扩增试剂)包含聚合酶,该聚合酶包含与超嗜热生物聚合酶或其功能片段至少约90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,扩增反应组分包含聚合酶,该聚合酶包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其功能片段至少约90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

[0168] 聚合酶可以具有逆转录能力。在这样的实施方案中,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°Nm™DNA聚合酶、Therminator™、Therminator™II等。在一些实施方案中,扩增反应组分包含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。

[0169] 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。在一些实施方案中,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%或更少的核酸外切酶活性,例如与未修饰的聚合酶相比,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的位置141和/或143和/或458处的一个或更多个氨基酸取代(例如,D141A、E143A、E143D和A485L)或者在对应于SEQ ID NO:1的位置141和/或143和/或458的位置处的一个或更多个氨基酸取代。

[0170] 检测和定量

[0171] 本文描述的方法可以包括检测和/或定量核酸扩增产物。例如,可以通过本文描述的任何合适的检测和/或定量方法来检测和/或定量扩增产物。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(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、杂交探针的使用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。

[0172] 检测核酸扩增产物可以包括使用分子信标技术。术语分子信标通常是指一种可检测的分子,其中分子的可检测性质在某些条件下是可检测的,从而使分子能够作为特定的和提供信息的信号发挥作用。可检测性质的非限制性实例包括光学性质(例如,荧光)、电性质、磁性质、化学性质和通过已知尺寸开口的时间或速度。用于检测核酸分子的分子信标可以是例如发夹状寡核苷酸,其一端含有荧光团,并且另一端含有猝灭染料。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)。分子信标是高度特异性的,并且可以辨别单核苷酸多态性。分子信标也可以用不同颜色的荧光团和不同的靶序列合成,从而能够在同一反应中(例如,在多重反应中)同时检测若干种产物。对于定量扩增过程,分子信标可以在每个扩增周期后特异性结合到扩增的靶,并且因为未杂交的分子信标是暗的,所以没有必要分离探针-靶杂合体来定量地确定扩增的产物的量。产生的信号与扩增的产物的量成正比。使用分子信标的检测可以实时完成,或可以作为终点检测方法。

[0173] 检测核酸扩增产物可以包括使用侧向流。侧向流的使用通常包括侧向流装置的使用,该装置包括但不限于试纸条测定和具有各种适当涂层的薄层色谱板。固定在流动路径上的是用于样品的各种结合试剂、结合配偶体或涉及用于样品和信号产生系统的结合配偶体的缀合物。检测可以通过例如酶检测、纳米颗粒检测、比色检测和荧光检测来实现。核酸可以例如通过抗体依赖性和/或抗体非依赖性方法在侧向流装置上捕获。抗体依赖性捕获包括抗体捕获线和具有靶的互补序列的标记的探针。抗体非依赖性捕获使用两个结合配偶体之间的非共价相互作用,例如,生物素化探针和链霉亲和素线之间的高亲和力和不可逆连键。捕获探针可以直接固定在侧向流膜上。抗体依赖性方法和抗体非依赖性方法两者可以用于例如检测在多重反应中产生的扩增产物。

[0174] 检测核酸扩增产物可以包括使用FRET,FRET是两个发色团(供体和受体分子)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。

[0175] 检测核酸扩增产物可以包括使用荧光偏振(FP)。FP技术是基于这样的原理,即当被线性偏振光激发时,荧光标记的化合物将发射荧光,其偏振度与其旋转速率成反比。因此,当具有荧光标记的分子诸如示踪剂-核酸缀合物被线性偏振光激发时,发射的光保持高偏振,因为荧光团在光被吸收和发射的时间之间受到限制而无法旋转。当游离示踪剂化合物(即,未与核酸结合)被线性偏振光激发时,其旋转比对应的示踪剂-核酸缀合物快得多,并且分子更随机取向,因此,发射的光被去偏振。因此,荧光偏振提供了一种定量方法,用于测量扩增反应中产生的示踪剂-核酸缀合物的量。

[0176] 检测核酸扩增产物可以包括使用表面捕获,例如通过将特定寡核苷酸固定到表面来实现,从而产生高度灵敏和选择性两者的生物传感器。可以使用的示例性表面包括金和碳,并且表面捕获方法可以使用多种共价或非共价偶联方法以将探针附接至表面。检测核酸扩增产物可以包括使用5’至3’核酸外切酶水解探针(例如,TAQMAN)。例如,TAQMAN探针是可以增加定量扩增方法(例如,定量PCR)的特异性的水解探针。TAQMAN探针原理依赖于1)Taq聚合酶的5’至3’核酸外切酶活性,以在与互补靶序列杂交期间裂解双重标记的探针和2)基于荧光团的检测。产生的荧光信号允许在扩增的指数阶段期间定量测量扩增产物的积累,并且TAQMAN探针可以显著增加检测的特异性。

[0177] 检测核酸扩增产物可以包括使用嵌入和/或结合染料,例如特异性染色核酸的染料(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DNA或RNA嵌入荧光团,包括但不限于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(噁唑黄二聚体)。检测核酸扩增产物可以包括使用吸光度法(例如,比色法、浊度法)。在一些实施方案中,核酸的检测和/或定量可以通过将吸光度(例如,260nm处的UV吸光度测量值)直接转换为浓度来实现。核酸的直接测量值可以使用Beer Lambert定律转换为浓度,该定律使用测量的路径长度和消光系数将吸光度与浓度相关联。检测核酸扩增产物可以包括使用电泳(例如,凝胶电泳、毛细管电泳)和/或使用质谱法。质谱法是一种分析技术,可以用于确定核酸的结构和量,并可以用于提供复杂混合物的快速分析。扩增后,可以将样品离子化,产生的离子根据它们的质荷比在电场和/或磁场中分离,并且检测器测量离子的质荷比。质谱方法包括例如MALDI、MALDI-TOF和电喷雾。这些方法可以与气相色谱法(GC/MS)和液相色谱法(LC/MS)组合。质谱法(例如,基质辅助激光脱附/离子化质谱法(MALDI MS))由于高速信号采集和脱离固体表面的自动化分析而可以具有高通量。

[0178] 检测核酸扩增产物可以包括使用核酸测序。可以确定扩增产物的整个序列或部分序列,并且确定的核苷酸序列可以被称为读段。例如,可以直接分析线性扩增产物,而无进

一步扩增(例如,通过使用单分子测序方法)。在一些实施方案中,线性扩增产物进行进一步扩增,并且然后进行分析(例如,使用连接测序或焦磷酸测序方法)。测序方法的非限制性实例包括单端测序、成对端测序、基于可逆终止子的测序、连接测序、焦磷酸测序、合成测序、单分子测序、多重测序、固相单核苷酸测序和纳米孔测序。检测核酸扩增产物可以包括使用数字扩增(例如,数字PCR)。用于核酸的数字扩增和分析的系统是可用的(例如,Fluidigm®公司)。

[0179] 酸性组合物

[0180] 本文公开的用于解离dsDNA的酸性组合物(例如,裂解缓冲液、洗脱缓冲液、重悬缓冲液)可以用低浓度的酸性剂,诸如10mM-20mM HCl制备。也可以使用本领域已知的其他无机酸或有机酸。用于中和pH的扩增反应缓冲液可以是30mM-50mM Tris pH 8.8缓冲液。在一些实施方案中,酸性组合物可以包含酸性缓冲液,诸如甘氨酸/-HCl,以增加酸性缓冲容量并补偿临床样品(例如,尿液或鼻拭子)中发现的pH变化。不受任何特定理论的束缚,在一些实施方案中,在低pH时,高浓度的带正电荷的氢离子通过破坏非共价氢键合和疏水性相互作用来破坏核酸的二级结构,使双螺旋结构去稳定并导致链分离。

[0181] 本文公开的内容包括用于裂解生物实体并使其中包含的dsDNA变性的酸性组合物。在一些实施方案中,酸性组合物包含:单价盐和/或二价盐;一种或更多种表面活性剂;和酸性剂,其中酸性剂以小于100mM的浓度存在于酸性组合物中,并且其中酸性组合物具有小于4的pH。单价盐可以以小于30mM的浓度存在于酸性组合物中。二价盐可以以小于15mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0182] 在一些实施方案中,酸性组合物具有约1至约3.9(例如,约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或这些值中的任何两个之间的数字或范围)的范围内的pH。在一些实施方案中,酸性组合物具有约2的pH。在一些实施方案中,酸性组合物具有约2、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4和约2.5的pH。如本文所使用的pH可以通过计算或测量水溶液的pH的任何已知方法来确定。在一些实施方案中,酸性组合物不包含甘油、甲酰胺或尿素。

[0183] 在其他实施方案中,本文公开的酸性组合物组分的百分比被提供为%w/w、%m/v、%v/v、%m/w、%w/v或其变形。在一些实施方案中,本文公开的酸性组合物组分(例如,一种或更多种表面活性剂)在酸性组合物中的百分比(%w/w、%m/v、%v/v、%m/w、%w/v或其变型)可以是,或可以是约0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.10%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%、0.15%、0.16%、0.17%、0.18%、0.19%、0.20%、0.21%、0.22%、0.23%、0.24%、0.25%、0.26%、0.27%、0.28%、0.29%、0.30%、0.31%、0.32%、0.33%、0.34%、0.35%、0.36%、0.37%、0.38%、0.39%、0.40%、0.41%、0.42%、0.43%、0.44%、0.45%、0.46%、0.47%、0.48%、0.49%、0.50%、0.51%、0.52%、0.53%、0.54%、0.55%、0.56%、0.57%、0.58%、0.59%、0.60%、0.61%、0.62%、0.63%、0.64%、0.65%、0.66%、0.67%、0.68%、0.69%、0.70%、0.71%、0.72%、0.73%、0.74%、0.75%、0.76%、0.77%、0.78%、0.79%、0.80%、0.81%、0.82%、0.83%、0.84%、0.85%、0.86%、0.87%、0.88%、0.89%、0.90%、0.91%、0.92%、0.93%、0.94%、0.95%、0.96%、0.97%、0.98%、0.99%、1.0%、1.01%、1.02%、1.03%、1.04%、1.05%、1.06%、

1.07%、1.08%、1.09%、1.10%、1.11%、1.12%、1.13%、1.14%、1.15%、1.16%、1.17%、1.18%、1.19%、1.20%、1.21%、1.22%、1.23%、1.24%、1.25%、1.26%、1.27%、1.28%、1.29%、1.30%、1.31%、1.32%、1.33%、1.34%、1.35%、1.36%、1.37%、1.38%、1.39%、1.40%、1.41%、1.42%、1.43%、1.44%、1.45%、1.46%、1.47%、1.48%、1.49%、1.50%、1.51%、1.52%、1.53%、1.54%、1.55%、1.56%、1.57%、1.58%、1.59%、1.60%、1.61%、1.62%、1.63%、1.64%、1.65%、1.66%、1.67%、1.68%、1.69%、1.70%、1.71%、1.72%、1.73%、1.74%、1.75%、1.76%、1.77%、1.78%、1.79%、1.80%、1.81%、1.82%、1.83%、1.84%、1.85%、1.86%、1.87%、1.88%、1.89%、1.90%、1.91%、1.92%、1.93%、1.94%、1.95%、1.96%、1.97%、1.98%、1.99%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%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,本文公开的酸性组合物组分的百分比是关于酸性组合物与包含生物实体的样品接触后的最终浓度描述的。另外,虽然在一些实施方案中,本文公开的酸性组合物组分是关于酸性组合物的工作浓度(例如,1×)来描述的,但本公开内容还考虑了所公开的酸性组合物的浓缩版本(例如,2×酸性组合物)。

[0184] 酸性剂

[0185] 本文公开的组合物(例如,酸性组合物)可以包含一种或更多种酸性剂。酸性剂可以包含有机酸、无机酸或两者。酸性剂可以是盐酸、甘氨酸盐酸盐、乙酸、柠檬酸、磷酸或其组合。

[0186] 酸性剂可以根据实施方案而变化。无机酸可以是盐酸(HCl)。无机酸可以包括氢氟酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、亚硝酸、磷酸、次膦酸、膦酸、磺酸、硫酸、亚硫酸、二硫酸、碳酸和硼酸中的一种或更多种。有机酸可以包括乙酸、C_2H_5COOH、C_3H_7COOH、C_4H_9COOH、$(COOH)_2$、$CH_2(COOH)_2$、$C_2H_4(COOH)_2$、$C_3H_6(COOH)_2$、$C_4H_8(COOH)_2$、$C_5H_{10}(COOH)_2$、富马酸、马来酸、丙二酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、草酸、抗坏血酸、苯甲酸、水杨酸、邻苯二甲酸、丙酮酸、L-天冬氨酸、D-天冬氨酸、碳酸、甲酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、葡萄糖胺硫酸盐、L-苏氨酸、樟脑酸、葡萄糖酸、L-谷氨酸、D-谷氨酸、三氟乙酸或雷奈酸(ranelic acid)中的一种或更多种。

[0187] 在一些实施方案中,酸性剂是酸性缓冲剂(例如,酸性缓冲溶液)。酸性缓冲溶液可以是pH小于7的缓冲溶液。酸性缓冲溶液可以由弱酸及其盐之一(例如,钠盐)制备,或者可以从商业来源获得。实例是乙酸和乙酸钠在溶液中的混合物。在这种情况下,如果溶液含有等摩尔浓度的酸和盐两者,则溶液将具有4.76的pH。因此,如本文使用的,术语“酸性缓冲剂”应被赋予其普通含义,并且还应指这样的一种或更多种化合物:当其被添加到水溶液中时,降低pH,并且当溶液与较低或较高pH的溶液混合时,使所得到的溶液抵抗pH的变化。酸性缓冲剂可以具有低于约7的pKa。酸性缓冲剂可以具有低于约7、低于约6、低于约5、低于约4和低于约3的pKa。具有低于约7的pKa的所有单独的值和范围的酸性缓冲剂被包括在本公开内容中。适合用于本文描述的酸性组合物的酸性缓冲剂的实例包括但不限于磷酸盐、柠

檬酸盐、异柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸、甲酸、乳酸、硫酸、盐酸、硝酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、癸酸、辛酸、碳酸、羧酸、草酸、丙酮酸、邻苯二甲酸、己二酸、柠苹酸(citramalic)、富马酸、乙醇酸、酒石酸、异酒石酸、月桂酸、马来酸、异苹果酸、丙二酸、乳清酸、丙酸、甲基丙酸、聚丙烯酸、琥珀酸、水杨酸、5-磺基水杨酸、戊酸、异戊酸、尿酸及其组合,诸如具有约2.2的pH的盐酸和甘氨酸的组合,以及如本领域已知的其他合适的酸和碱。其他合适的酸性缓冲剂是酸和一种或更多种盐或缓冲剂的混合物。例如,适合用于本文使用的酸性缓冲剂可以使用甘氨酸与适当浓度的盐酸的组合来制备。酸性缓冲剂可以包括甘氨酸-HCl。酸性缓冲剂可以包括10.0mM甘氨酸、8.8mM HCl或两者。酸性缓冲剂的pH可以为约1.0至约6.0(例如,2.2)。

[0188] 存在于酸性组合物中的酸性剂的浓度可以变化。酸性剂可以以小于约0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM、30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、50mM、51mM、52mM、53mM、54mM、55mM、56mM、57mM、58mM、59mM、60mM、61mM、62mM、63mM、64mM、65mM、66mM、67mM、68mM、69mM、70mM、71mM、72mM、73mM、74mM、75mM、76mM、77mM、78mM、79mM、80mM、81mM、82mM、83mM、84mM、85mM、86mM、87mM、88mM、89mM、90mM、91mM、92mM、93mM、94mM、95mM、96mM、97mM、98mM、99mM、100mM或这些值中的任何两个之间的数字或范围的浓度存在于酸性组合物中。酸性剂可以以约1mM至约100mM的范围内,例如约10mM或约8.8mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0189] 盐

[0190] 酸性组合物(例如,裂解缓冲液)可以包含单价盐和/或二价盐(例如,镁),其在不受任何特定理论束缚的情况下可以在一些实施方案中抑制脱嘌呤。在一些实施方案中,酸性组合物包含低浓度的单价盐和/或二价盐。不受任何特定理论的束缚,这可能是由于中和DNA主链上磷酸基团上的负电荷。

[0191] 本文提供的酸性组合物(例如,裂解缓冲液)的单价盐和/或二价盐可以包括钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其任何组合。单价盐可以选自由以下组成的组:硫酸铵、氯化铵、氟化钠、氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟化钾、氯化钾、溴化钾和碘化钾。二价盐可以选自由以下组成的组:硫酸镁、氯化钙、氯化镁、氯化铜(II)、氯化锌、氧化钙、氧化镁、氧化钡、硫酸钠、硫酸钙、硫酸铜(II)、碳酸钾和碳酸钠。在一些实施方案中,单价盐是硫酸铵。在一些实施方案中,二价盐是硫酸镁。

[0192] 在一些实施方案中,单价盐和/或二价盐以小于15mM的浓度存在于酸性组合物中,例如约0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM、29.9mM或这些值中的任何两个之间的数字或范围的浓度。单价盐和/或二价盐可以以约1mM至约14mM的范围内的浓度,例如约5mM或约4mM的浓度存在于酸性组合物中。

[0193] 表面活性剂

[0194] 本文提供的酸组合物(例如,裂解缓冲液)可以包含一种或更多种裂解性剂(例如,

表面活性剂、洗涤剂),诸如,例如,阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂。阴离子型表面活性剂可以包含NH_4^+、K^+、Na^+或Li^+作为抗衡离子。阳离子型表面活性剂可以包含I^-、Br^-或Cl^-作为抗衡离子。

[0195] 阴离子型表面活性剂可以选自由以下组成的组:月桂酸钾、硬脂酸三乙醇胺、月桂基硫酸铵、十二烷基硫酸锂、月桂基硫酸钠、烷基硫酸钠(C_8-C_{16})、SDS、烷基聚氧乙烯硫酸盐、海藻酸钠、磺基琥珀酸二辛基钠、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸及其盐、甘油酯、羧甲基纤维素钠、胆汁酸及其盐、烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、烷基磷酸盐、烷基磺酸盐、硬脂酸及其盐、硬脂酸钙、磷酸盐、羧甲基纤维素钠、磺基琥珀酸二辛基盐、磺基琥珀酸钠的二烷基酯、磷脂和羧甲基纤维素钙。

[0196] 阳离子型表面活性剂可以是,例如季铵化合物、苯扎氯铵、鲸蜡基三甲基溴化铵、脱水-甘露糖酸(chitonic acid)、月桂基二甲基苄基氯化铵、酰基肉碱盐酸盐、烷基卤化吡啶、鲸蜡基氯化吡啶(cetylpyridinium chloride)、阳离子脂质、聚甲基丙烯酸甲酯三甲基溴化铵、锍化合物、聚乙烯吡咯烷酮-2-二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯二甲基硫酸酯、十六烷基三甲基溴化铵、鏻化合物、季铵化合物、苄基-二(2-氯乙基)乙基溴化铵、椰油基三甲基氯化铵、椰油基三甲基溴化铵、椰油基甲基二羟乙基氯化铵、椰油基甲基二羟乙基溴化铵、癸基三乙基氯化铵、癸基二甲基羟乙基氯化铵、癸基二甲基羟乙基氯化溴化铵、C_{12}-C_{15}-二甲基羟乙基氯化铵、C_{12}-C_{15}-二甲基羟乙基氯化溴化铵、椰油基二甲基羟乙基氯化铵、椰油基二甲基羟乙基溴化铵、肉豆蔻基三甲基铵甲基硫酸盐、月桂基二甲基苄基氯化铵、月桂基二甲基苄基溴化铵、月桂基二甲基(乙氧基)4氯化铵、月桂基二甲基(乙氧基)4溴化铵、N-烷基(C_{12}-C_{18})二甲基苄基氯化铵、N-烷基(C_{14}-C_{18})二甲基苄基氯化铵、N-十四烷基二甲基苄基氯化铵一水合物、二甲基二癸基氯化铵、N-烷基(C_{12}-C_{14})二甲基1-萘基甲基氯化铵、三甲基卤化铵烷基三甲基铵盐、二烷基二甲基铵盐、月桂基三甲基氯化铵、乙氧基化烷基酰氨基烷基二烷基铵盐、乙氧基化三烷基铵盐、二烷基苯二烷基氯化铵、N-二癸基二甲基氯化铵、N-十四烷基二甲基苄基氯化铵一水合物、N-烷基(C_{12-14})二甲基1-萘基甲基氯化铵、十二烷基二甲基苄基氯化铵、二烷基苯烷基氯化铵、月桂基三甲基氯化铵、烷基苄基甲基氯化铵、烷基苄基二甲基溴化铵、C_{8-16}三甲基溴化铵、C_{8-16}三甲基氯化铵、C_{15}三甲基溴化铵、C_{17}三甲基溴化铵、十二烷基苄基三乙基氯化铵、聚二烯丙基二甲基氯化铵、二甲基氯化铵、烷基二甲基卤化铵、三鲸蜡基甲基氯化铵、癸基三甲基溴化铵、十二烷基三乙基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、甲基三辛基氯化铵、POLYQUAT 10、四丁基溴化铵、苄基三甲基溴化铵、胆碱酯、苯扎氯铵、司拉氯铵(stearalkonium chloride)、鲸蜡基溴化吡啶(cetyl pyridinium bromide)、鲸蜡基氯化吡啶、季铵化聚氧乙基烷基胺的卤化物盐、MIRAPOL Alkaquat、烷基吡啶盐、胺、胺盐、酰亚胺唑鎓盐(imide azolinium salt)、质子化季丙烯酰胺、甲基化四元聚合物、阳离子瓜尔胶、苯扎氯铵、十二烷基三甲基溴化铵、三乙醇胺或泊洛沙胺(poloxamine)。

[0197] 非离子型表面活性剂可以是,例如,聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、脱水山梨糖醇酯、甘油酯、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、聚丙二醇、聚丙二醇酯、鲸蜡醇、鲸蜡硬脂醇、硬脂醇、芳基烷基聚醚醇、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、泊洛沙姆、泊洛沙胺、甲基纤维素、羟基纤维素、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯

二甲酸酯、非晶纤维素、多糖、淀粉、淀粉衍生物、羟乙基淀粉、聚乙烯醇、硬脂酸三乙醇胺、氧化胺、右旋糖酐、甘油、阿拉伯树胶、胆固醇、黄蓍胶、聚乙烯吡咯烷酮、烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、脂肪酸皂、羟基脂肪酸盐、氢过氧脂肪酸盐、多羟基脂肪酸盐、环氧脂肪酸盐、单羧酸盐和多羧酸盐、前列腺烷酸(prostanoic acid)和前列腺素、白三烯和lipoxine、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、二烷基磺基琥珀酸钠、正烷基乙氧基化硫酸盐、胆汁盐的胆酸盐和脱氧胆酸盐、全氟羧酸、氟脂肪族膦酸盐或氟脂肪族硫酸盐。

[0198] 本文提供的裂解性剂能够充当变性剂。如本文使用的“变性剂(denaturingagent)”或“变性剂(denaturant)”应赋予其普通含义,并包括将导致蛋白质可逆解折叠的任何化合物或材料。变性剂(denaturing agent)或变性剂(denaturant)的强度将由特定变性剂(denaturing agent)或变性剂(denaturant)的性质和浓度两者决定。合适的变性剂(denaturing agent)或变性剂(denaturant)可以是离液剂、洗涤剂、有机溶剂、水混溶性溶剂、磷脂或两种或更多种这样的剂的组合。合适的离液剂包括但不限于尿素、胍和硫氰酸钠。有用的洗涤剂可以包括但不限于强洗涤剂,诸如SDS或聚氧乙烯醚(例如,吐温或Triton洗涤剂)、sarkosyl、温和的非离子洗涤剂(例如,毛地黄皂苷)、温和的阳离子洗涤剂(诸如N->2,3-(二油基氧基)-丙基-N,N,N-三甲基铵)、温和的离子洗涤剂(例如,胆酸钠或脱氧胆酸钠)或两性离子洗涤剂,包括但不限于磺基甜菜碱(Zwittergent)、3-(3-氯酰氨基丙基)二甲基铵基-1-丙烷硫酸盐(CHAPS)和3-(3-氯酰氨基丙基)二甲基铵基-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPSO)。有机的、可与水混溶的溶剂诸如乙腈、低级烷醇(尤其是C_2-C_4烷醇,诸如乙醇或异丙醇),或低级烷二醇(尤其是C_2-C_4烷二醇诸如乙二醇)可以用作变性剂。磷脂可以是天然存在的磷脂,诸如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇,或者是合成的磷脂衍生物或变体,诸如二己酰基磷脂酰胆碱或二庚酰基磷脂酰胆碱。

[0199] 一种或更多种表面活性剂可以包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。在一些实施方案中,酸性组合物不包含阴离子型表面活性剂和阳离子型表面活性剂两者。一种或更多种表面活性剂可以以酸性组合物的约0.01%至约2%的重量/体积(%w/v)的范围内的浓度存在于酸性组合物中。一种或更多种表面活性剂可以以酸性组合物的约0.1%的重量/体积(%w/v)的浓度存在于酸性组合物中。在一些实施方案中,酸性组合物还包含吐温表面活性剂,例如选自吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85的吐温表面活性剂。吐温表面活性剂可以占酸性组合物的约0.01%(w/v)。

[0200] 本文中有用的阴离子型表面活性剂包括烷基中具有10个至18个碳原子的烷基硫酸盐和烷基醚硫酸盐的水溶性盐,以及具有10个至18个碳原子的脂肪酸的磺化单甘油酯的水溶性盐。月桂基硫酸钠和椰油酸单甘油酯磺酸钠是这种类型的阴离子型表面活性剂的实例。

[0201] 合适的阳离子型表面活性剂可以广义地定义为具有含有约8个至18个碳原子的一个长烷基链的脂肪族季铵化合物的衍生物,诸如月桂基三甲基氯化铵;鲸蜡基氯化吡啶;苯扎氯铵;CTAB;二异丁基苯氧基乙基二甲基苄基氯化铵;椰油基烷基三甲基亚硝酸铵;鲸蜡基氟化吡啶(cetyl pyridinium fluoride);等等。在本文公开的组合物中,某些阳离子型表面活性剂也可以充当杀菌剂。

[0202] 可以用于本公开内容的组合物、方法和试剂盒中的合适的非离子型表面活性剂可

以广义地定义为通过氧化亚烷基基团(本质上是亲水性的)与本质上可以是脂肪族和/或芳香族的有机疏水性化合物缩合产生的化合物。合适的非离子型表面活性剂的实例包括泊洛沙姆;脱水山梨糖醇衍生物,诸如脱水山梨糖醇二异硬脂酸酯;氢化蓖麻油的环氧乙烷缩合物,诸如PEG-30氢化蓖麻油;脂肪醇或烷基酚的环氧乙烷缩合物;环氧乙烷与环氧丙烷和乙二胺的反应产物缩合产生的产物;长链叔胺氧化物;长链叔膦氧化物;长链二烷基亚砜及这些材料的混合物。这些材料可用于稳定泡沫,而不会对消费产品组合物造成过高的黏度。

[0203] 两性离子型表面活性剂可以广义地描述为脂肪族季铵、鏻和锍化合物的衍生物,其中脂肪族基团可以是直链或支链的,并且其中脂肪族取代基中的一个包含约8个至18个碳原子,并且一个包含阴离子水溶性基团,例如羧基、磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐或膦酸盐。

[0204] 示例性的阴离子、单链表面活性剂包括烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基苯磺酸盐和饱和或不饱和脂肪酸及其盐。阳离子型表面活性剂中包含极性头基团的部分可以包括例如季铵、吡啶鎓、锍和/或鏻基团。例如,极性头基团可以包括三甲基铵。示例性阳离子、单链表面活性剂包括烷基三甲基卤化铵、烷基三甲基甲苯磺酸铵和N-烷基卤化吡啶。

[0205] 烷基硫酸盐可以包括辛基硫酸钠、SDeS、SDS和十四烷基硫酸钠。烷基磺酸盐可以包括辛基磺酸钠、癸基磺酸钠和十二烷基磺酸钠。烷基苯磺酸盐可以包括辛基苯磺酸钠、癸基苯磺酸钠和十二烷基苯磺酸钠。脂肪酸盐可以包括辛酸钠、癸酸钠、十二酸钠和油酸的钠盐。

[0206] 烷基三甲基卤化铵可以包括辛基三甲基溴化铵、癸基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵、肉豆蔻基三甲基溴化铵和CTAB。烷基三甲基甲苯磺酸铵可以包括辛基三甲基甲苯磺酸铵、癸基三甲基甲苯磺酸铵、十二烷基三甲基甲苯磺酸铵、肉豆蔻基三甲基甲苯磺酸铵和鲸蜡基三甲基甲苯磺酸铵。例如,N-烷基卤化吡啶可以包括癸基氯化吡啶、十二烷基氯化吡啶、鲸蜡基氯化吡啶、癸基溴化吡啶、十二烷基溴化吡啶、鲸蜡基溴化吡啶、癸基碘化吡啶、十二烷基碘化吡啶、鲸蜡基碘化吡啶。

[0207] 阳离子表面活性剂可以包括十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、鲸蜡基三甲基溴化铵、鲸蜡基二甲基乙基溴化铵、(C_1至C_{30}烷基)-三甲基溴化铵、(C_1至C_{30}烷基)胺、(C_1至C_{30}烷基)咪唑啉、乙氧基化胺、季化合物、季酯、(C_1至C_{30}烷基)氧化胺、月桂胺氧化物、二鲸蜡基二甲基氯化铵(dicetyldimonium chloride)、西曲氯铵(cetrimonium chloride)、伯聚乙氧基化脂肪胺盐、仲聚乙氧基化脂肪胺盐、叔聚乙氧基化脂肪胺盐、季铵盐、四(C_1至C_{30}烷基)卤化铵、(C_1至C_{30}烷基)酰胺-(C_1至C_{30}烷基)卤化铵、三(C_1至C_{30}烷基)苄基卤化铵、三(C_1至C_{30}烷基)羟基-(C_1至C_{30}烷基)卤化铵、(C_1至C_{30}烷基)氯化吡啶、(C_1至C_{30}烷基)溴化吡啶、氧化胺或其组合。

[0208] 阴离子型表面活性剂可以包括SDS、(C_6至C_{30}烷基)苯磺酸盐、C_6至C_{30}α烯烃磺酸盐、石蜡磺酸盐、(C_6至C_{30}烷基)酯磺酸盐、(C_6至C_{30}烷基)硫酸盐、(C_6至C_{30}烷基烷氧基)硫酸盐、(C_6至C_{30}烷基)磺酸盐、(C_6至C_{30}烷基烷氧基)羧酸盐、(C_6至C_{30}烷基烷氧基化)硫酸盐、单(C_1至C_{30}烷基)(醚)磷酸盐、二(C_6至C_{30}烷基)(醚)磷酸盐、(C_6至C_{30}烷基)肌氨酸盐、磺基琥珀酸盐、双(2-乙基已基)磺基琥珀酸钠、乙氧基化4-壬基苯基醚乙醇酸、(C_1至C_{30}烷基)羟乙基磺酸盐、牛磺酸盐、月桂基硫酸铵、月桂醇聚醚硫酸铵(ammonium laureth sulfate)、三乙胺月桂基硫酸盐、三乙胺月桂醇聚醚硫酸盐(triethylamine laureth sulfate)、三乙醇胺月桂基硫酸盐、三乙醇胺月桂醇聚醚硫酸盐(triethanolamine laureth sulfate)、单乙醇胺

月桂基硫酸盐、单乙醇胺月桂醇聚醚硫酸盐(monoethanolamine laureth sulfate)、二乙醇胺月桂基硫酸盐、二乙醇胺月桂醇聚醚硫酸盐(diethanolamine laureth sulfate)、月桂单甘油酯硫酸钠、月桂基硫酸钠、月桂醇聚醚硫酸钠(sodium laureth sulfate)、月桂基硫酸钾、月桂醇聚醚硫酸钾(potassium laureth sulfate)、月桂基磷酸钠、十三烷基磷酸钠、山嵛基磷酸钠、月桂醇聚醚-2磷酸钠(sodium laureth-2phosphate)、鲸蜡醇聚醚-3磷酸钠(sodium ceteth-3phosphate)、十三烷醇聚醚-4磷酸钠(sodium trideceth-4phosphate)、二月桂基磷酸钠、二(十三烷基)磷酸钠、二(十三烷醇聚醚)-6磷酸钠(sodium ditrideceth-6phosphate)、月桂酰肌氨酸钠、月桂酰肌氨酸、椰油酰肌氨酸、椰油酰硫酸铵、椰油酰硫酸钠、十三烷醇聚醚硫酸钠(sodium trideceth sulfate)、十三烷基硫酸钠、十三烷醇聚醚硫酸铵(ammonium trideceth sulfate)、十三烷基硫酸铵、椰油酰羟乙基磺酸钠、月桂醇聚醚磺基琥珀酸二钠(disodium laureth sulfosuccinate)、甲基油酰牛磺酸钠、月桂醇聚醚羧酸钠(sodium laureth carboxylate)、十三烷醇聚醚羧酸钠(sodium trideceth carboxylate)、月桂基硫酸钠、椰油酰硫酸钾、月桂基硫酸钾、单乙醇胺椰油酰硫酸盐、十三烷基苯磺酸钠、十二烷基苯磺酸钠或其组合。

[0209] 非离子型表面活性剂可以包括,例如,C_6至C_{18}烷基醇、(C_6至C_{18}烷基)苯酚、(C_6至C_{18}烷基)乙氧基化物、(C_6至C_{18}烷基)苯酚(C_1至C_3烷氧基化物)、C_6至C_{18}烷基苯酚的嵌段氧基(C_1至C_3亚烷基)缩合物、烷醇的氧基(C_1至C_3亚烷基)缩合物、氧乙烯/氧丙烯嵌段共聚物、氧化胺、氧化膦、具有8个至50个碳原子的烷基胺氧化物、单或二(C_8至C_{30})烷基烷醇酰胺、(C_6至C_{30}烷基)多糖、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇酯、聚氧乙烯壬基苯基醚、聚氧乙烯酸、聚氧乙烯醇、椰油基单乙醇酰胺、椰油基二乙醇酰胺、椰油基二糖苷、(C_8至C_{30}烷基)多糖苷、椰油酰氨基丙基、月桂胺氧化物、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯、乙氧基化线性C_8至C_{30}醇、鲸蜡硬脂醇、羊毛脂醇、硬脂酸、硬脂酸甘油酯、聚乙二醇100硬脂酸酯、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基聚乙二醇、聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚、二十乙二醇十八烷基醚和$HO(CH_2CH_2O)_{20}(CH_2CH(CH_3)O)_{70}(CH_2CH_2O)_{20}H$。

[0210] 一种或更多种表面活性剂可以占酸性组合物(例如,裂解缓冲液)的约0.001%(w/v)至约2.0%(w/v)。一种或更多种表面活性剂能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸。一种或更多种表面活性剂可以占酸性组合物的约0.001%(w/v)、0.01%(w/v)、0.1%(w/v)、1%(w/v)、2%(w/v)、3%(w/v)、4%(w/v)、5%(w/v)、6%(w/v)、7%(w/v)、8%(w/v)、9%(w/v)、10%(w/v)或这些值中的任何两个之间的数字或范围。本文公开的一种或更多种表面活性剂可以包括阳离子型表面活性剂、阴离子型表面活性剂、非离子型表面活性剂和两性型表面活性剂中的一种或更多种。酸性组合物还可以包含吐温表面活性剂。吐温表面活性剂可以选自吐温20、吐温40、吐温45、吐温60、吐温65、吐温80、吐温81和吐温85。吐温表面活性剂可以占酸性组合物的约0.01%(w/v)至约1.0%(w/v)。在一些实施方案中,酸性组合物包含约0.2%(w/v)SDS,并且$(NH_4)_2SO_4$的浓度约小于5mM。在一些实施方案中,酸性组合物还包含$MgSO_4$。

[0211] 一种或更多种表面活性剂可以包括Triton X-100。Triton X-100表面活性剂可以占酸性组合物的约0.01%(w/v)至约1.0%(w/v)。在一些实施方案中,酸性组合物包含约0.1% Triton X-100。在一些实施方案中,酸性组合物包含约0.1% Triton X-100和小于约5mM硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)和/或硫酸镁($MgSO_4$)。在一些实施方案中,酸性组合物包含约

0.1% Triton X-100、约5mM硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)和约4mM硫酸镁($MgSO_4$)。

[0212] 螯合剂和还原剂

[0213] 在一些实施方案中,酸性组合物包含螯合剂、还原剂或两者。在一些实施方案中,酸性组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。螯合剂可以是乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇双(氨基乙基)N,N'-四乙酸盐(EGTA)、次氮基三乙酸盐(NTA)、Tris或其组合。二价离子(例如,镁离子)-螯合剂的实例包括但不限于1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸、EDTA、乙二醇-双(2-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸、EGTA、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、含有柠檬酸盐的缓冲液、N,N-双(2-(双-(羧甲基)氨基)乙基)-甘氨酸(DTPA)、NTA、从样品中沉淀钙离子的缓冲液(例如,磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、柠檬酸及其盐、葡萄糖酸及其盐、碱金属焦磷酸盐、碱金属多磷酸盐、六偏磷酸钠、三亚乙基四胺、二亚乙基三胺、邻菲咯啉、草酸或其任何组合。还原剂可以是2-巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫赤藓糖醇(DTE)、还原型谷胱甘肽、半胱胺、三-正丁基膦(TBP)、二硫赤藓糖醇、三(3-羟丙基)膦(THPP)、2-巯基乙胺-HCl、二硫丁胺(DTBA)、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸和羟乙基二硫化物(HED)或其任何组合。

[0214] 螯合剂和/或还原剂可以以约0.1mM至约14mM的范围内的浓度存在于酸性组合物中,例如约0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM或14mM,或这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0215] 试剂组合物

[0216] 本文描述的试剂组合物(例如,干燥的组合物)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);以及它们的组合。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,并且然后通过在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。本文描述的组合物(例如,湿组合物)可以以"湿形式"或以悬浮在液体介质中的形式提供。

[0217] 干燥的组合物可以是冷冻或冻干或喷雾干燥的。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/或干燥的沉淀的溶解。一种或更多种添加剂可以包含在干燥的组合物(例如,干燥的沉淀)中浓

度为约0.01％的非离子洗涤剂。

[0218] 冷冻的或冻干的或喷雾干燥的或热干燥的组合物或用于制备冷冻的或冻干的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、二甲基亚砜和二甲基甲酰胺。(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。

[0219] 试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物)可以包含一种或更多种扩增试剂。在一些实施方案中,试剂组合物可以包含还原剂、螯合剂或两者。在一些实施方案中,试剂组合物不包含还原剂、螯合剂或两者。螯合剂可以是EDTA、EGTA、NTA、Tris或其任何组合。还原剂可以是DTT、TCEP、DTE、还原型谷胱甘肽、半胱胺、TBP、二硫赤藓糖醇、THPP、2-巯基乙胺-HCl、DTBA、半胱氨酸、半胱氨酸-巯基乙酸酯、亚硫酸的盐、巯基乙酸、HED或其任何组合。

[0220] 试剂盒

[0221] 本文提供了用于等温扩增和检测生物样品中基因组DNA的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒含有酸性组合物(例如,洗脱/裂解溶液),该酸性组合物包含裂解试剂、镁、以及酸或者例如低pH缓冲液诸如pH 2.2的甘氨酸/HCl。在一些实施方案中,试剂盒还包含试剂反应组分,该试剂反应组分包含引物、酶、dNTP、检测探针和缓冲剂,该缓冲剂在与酸性组合物(例如,洗脱/裂解溶液)混合后具有足够能力维持扩增的最佳pH。

[0222] 本文公开的内容包括用于检测样品中的靶核酸序列的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含:(a)如本文提供的酸性组合物,其中该酸性组合物能够裂解生物实体以释放其中包含的样品核酸,其中样品核酸包含被怀疑包含靶核酸序列的dsDNA,其中靶核酸序列的长度不长于100个核苷酸。在一些实施方案中,试剂盒包含:(b)试剂组合物(例如,干燥的组合物、湿组合物),该试剂组合物包含缓冲剂和用于在等温扩增条件下扩增靶核酸序列的一种或更多种扩增试剂,其中所述一种或更多种扩增试剂包含:(i)第一引物和第二引物,其中第一引物能够与靶核酸序列的第一链的序列杂交,并且第二引物能够与靶核酸序列的第二链的序列杂交;和(ii)能够产生核酸扩增产物的具有超嗜热生物聚合酶活性的酶。

[0223] 缓冲剂可以是MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、铵缓冲剂或其任何组合。试剂盒可以包含:为核酸扩增产物提供实时检测活性的至少一种组分。实时检测活性可以由分子信标提供。试剂盒可以包含对照多核苷酸,并且在扩增多个靶序列的情况下,试剂盒中可以包含多于一个对照多核苷酸。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％或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是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的聚合酶。

[0224] 核酸扩增产物可以长约20个至40个碱基。核酸扩增产物可以包含:(1)第一引物的序列及其反向互补物,(2)第二引物的序列及其反向互补物,和(3)间隔序列,其侧翼为(1)第一引物的序列及其反向互补物和(2)第二引物的序列及其反向互补物,其中间隔序列长1

个至10个碱基。

[0225] 生物实体可以包括原核细胞、真核细胞、病毒颗粒、外泌体、原生质体和微泡中的一种或更多种。生物实体可以包括病毒、细菌、真菌、原生动物、其部分或其任何组合。靶核酸序列可以是病毒、细菌、真菌或原生动物的核酸序列。样品核酸可以衍生自如本文公开的病毒、细菌、真菌或原生动物。

[0226] 第一引物和/或第二引物可以长约8个至16个碱基。第一引物和/或第二引物可以包含DNA碱基、修饰的DNA碱基或其组合中的一个或更多个。

[0227] 试剂组合物(例如,干燥的组合物)可以是冻干的和/或热干燥的,并且可以包含一种或更多种添加剂。一种或更多种添加剂包括:氨基酸;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。一种或更多种添加剂可以包括聚合物。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。

[0228] 酸性组合物和试剂组合物的混合物可以具有约7至约9的pH,例如,约8.8的pH。在一些实施方案中,样品、酸性组合物和试剂组合物的混合物具有约7至约9的pH,例如,约8.8的pH。缓冲剂可以包括Tris。样品、酸性组合物和试剂组合物的混合物可以包含浓度在约30mM Tris至约50mM Tris的范围内的Tris。试剂盒可以包含容纳酸性组合物和试剂组合物的无菌容器。

[0229] 试剂盒还可以包含任何数量的单独的器皿、室、容器、小包、管、小瓶、微量滴定板等中的组分中的一种或更多种,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,聚合酶和/或逆转录酶)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缓冲液中。在一些实施方案中,聚合酶和/或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。

[0230] 试剂盒还可以包含反应中使用的dNTP,或用于反应的修饰的核苷酸、器皿、比色皿或其他容器,或用于再水合冻干的或热干燥的组分的水或缓冲液的小瓶。例如,使用的缓冲液可以适用于聚合酶和引物退火活性两者。

[0231] 试剂盒还可以包含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位置的书面描述。

[0232] 试剂盒还可以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

[0233] 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。

[0234] 实施例1

[0235] 酸性溶液中DNA解离的研究

[0236] 本实施例展示了本文提供的用于与本文公开的扩增和检测方法一起使用的酸性组合物中的dsDNA分离。

[0237] 研究了使用低pH溶液用于解离gDNA进行APA扩增。图1A示出了将靶基因组DNA(gDNA)在78℃在TE溶液(10mM Tris,pH 8.0,0.1mM EDTA)中预孵育持续2分钟,然后冷却并添加到主混合物中的实验结果。在不存在酸性组分的情况下,仅5/6曲线在200个拷贝(cps)/反应的靶输入示出扩增,并且对于每个反应50个拷贝,仅2/6曲线具有扩增。图1B示出了将靶gDNA在78℃在酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.1% Tx-100和10mM HCl)中预孵育持续2分钟,然后冷却并添加到主混合物中的实验结果。发现该方法产生低至5个拷贝的良好检测。

[0238] 研究了预孵育温度对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA检测的影响(图2)。该测试比较了在扩增前将50个拷贝的Ng gDNA在酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.1% Triton X-100和10mM HCl)中加热相对于不加热孵育持续2分钟。结果表明,初始预热对于酸性溶液中的DNA解离不是必需的。事实上,发现仅仅在室温预孵育gDNA就足以看到效果。

[0239] 接下来,研究在湿反应(图3A-图3B)中以及在与干燥的反应组分混合之前(图4A-图4B)洗脱缓冲液pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA检测的影响。在68℃湿反应中进行古细菌聚合酶扩增(APA)10分钟之前,将淋病奈瑟菌(Ng)gDNA在酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.1% Tx-100和10mM HCl;图3B)或对照溶液(TE;pH 8;10mM Tris,pH 8.0,0.1mM EDTA;图3A)中稀释。在与含有pH 8.8的Tris缓冲液的干燥反应组分混合以在68℃扩增持续10分钟之前,将淋病奈瑟菌(Ng)gDNA在中性pH洗脱缓冲液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$和0.2% SDS;图4A)或酸性洗脱缓冲液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、10mM甘氨酸/8.8mM HCl(甘氨酸/HCl缓冲液)和0.2% SDS;图4B)中在室温稀释。

[0240] 还研究了温度和pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响。在与含有pH 8.8的Tris缓冲液的扩增组分混合以在68℃扩增持续15分钟之前,将每个反应5000个拷贝的Ng gDNA在酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.1% Tx-100和10mM HCl)或TE溶液(pH 8;10mM Tris,pH 8.0,0.1mM EDTA)中在78℃(图5B)或室温(图5A)孵育持续2分钟相对于1小时。

[0241] 接下来研究在10%尿液基质中温度和pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响。在与含有Tris缓冲液(pH 8.8)的扩增组分混合以在68℃扩增持续15分钟之前,将每个反应5000个拷贝的Ng gDNA在含有10%尿液的酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.1%Tx-100和8.8mM HCl)或TE溶液(10mM Tris,pH 8.0,0.1mM EDTA)中在78℃(图6A)或室温(RT;图6B)孵育持续2分钟或1小时。

[0242] 还研究了在干燥反应形式中温度和pH对淋病奈瑟菌(Ng)gDNA稳定性的影响(图7)。在与干燥的反应组分混合以在68℃扩增持续15分钟之前,将每个反应5000个拷贝的Ng gDNA在酸性溶液(5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、10mM甘氨酸/8.8mM HCl(甘氨酸/HCl缓冲液)和0.2% SDS)中在78℃或室温孵育持续2分钟相对于1小时。冻干的(lyo)沉淀被包含在pH 8.8的Tris缓冲液中。

[0243] 总之,这些结果产生了令人惊讶的发现,即将基因组DNA暴露于低pH溶液作为古细菌聚合酶扩增的初始步骤不会像通常认为的那样对扩增产生不利影响。因此,本文提供的方法、组合物和试剂盒可以有利地提供对临床样品中DNA病原体的即时分子诊断。在病原体

裂解后,基因组DNA链可以被分离,而不需要单独的热或酶促步骤。

[0244] 实施例2

[0245] gDNA检测的测定LOD的提高

[0246] 本实施例提供了使用所公开的方法和组合物提高用于检测gDNA的测定的检测限(LOD)的方法。

[0247] 在一些实施方案中,对于冻干的沙眼衣原体(C.trachomatis)/淋病奈瑟菌(Ct/Ng)和标准dNTP,干燥形式检测的当前检测限(LOD)是>50拷贝的gDNA。不受任何特定理论的束缚,实现低LOD可以包括使重悬缓冲液中的gDNA去稳定,并且实施方案可以涉及限制Mg^{2+}和单价盐的影响,以及将pH增加至>9.5,或将pH降低至<4。本文提供的方法和组合物的一些实施方案可以克服多种问题,诸如重悬缓冲液稳定性、如果在高pH溶液中时Mg^{2+}沉淀、以及重悬缓冲液(例如,5mM$(NH_4)_2SO_4$、4mM $MgSO_4$、0.2% SDS(7mM Na^+、7mM DS^-))中可能已经存在低盐的事实。

[0248] 在一些实施方案中,鉴定为影响DNA双链体稳定性的因素包括:%GC、dsDNA长度、序列依赖性、镁和单价阳离子的影响(例如,Mg^{2+}在典型PCR条件下的Tm方面相对单价阳离子占优势,10mM Mg^{2+}相当于1M Na^+,10mM Tris相当于5mM Na^+)、极端pH和添加剂。

[0249] 如图8可见(改编自Biophys J.2001年2月;80(2):874-881.Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA:evidence of force-induced DNA melting),示出了作为pH的函数的λDNA(48502bps)的非限制性示例性解链曲线,观察到在极端pH(>pH 9.7和<pH 3.9)时显著的Tm降低。在本文提供的一些实施方案中,低pH比高pH对于λDNA解链更有效。在一些实施方案中,与低pH RBS(RBS/10mM HCl,pH 2-3)相比,可以通过降低重悬缓冲液(例如,重悬缓冲液RBS(5mM$(NH_4)_2SO_4$,4mM $MgSO_4$,0.2% SDS,pH~7)中的pH来提高LOD。在室温三天没有观察到明显的RBS/10mM HCl的沉淀。可以优化本文提供的组合物和方法的实施方案以解决可能出现的问题,诸如质子和Mg^{2+}之间的竞争(例如,Mg^{2+}抑制低pH溶液中的DNA解离)以及低pH溶液中DNA脱嘌呤的速度和程度。

[0250] 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内。

[0251] 关于本文中使用基本上任何复数和/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”。

[0252] 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目是所预期的,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目,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目(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。

[0253] 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。

[0254] 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。

[0255] 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。

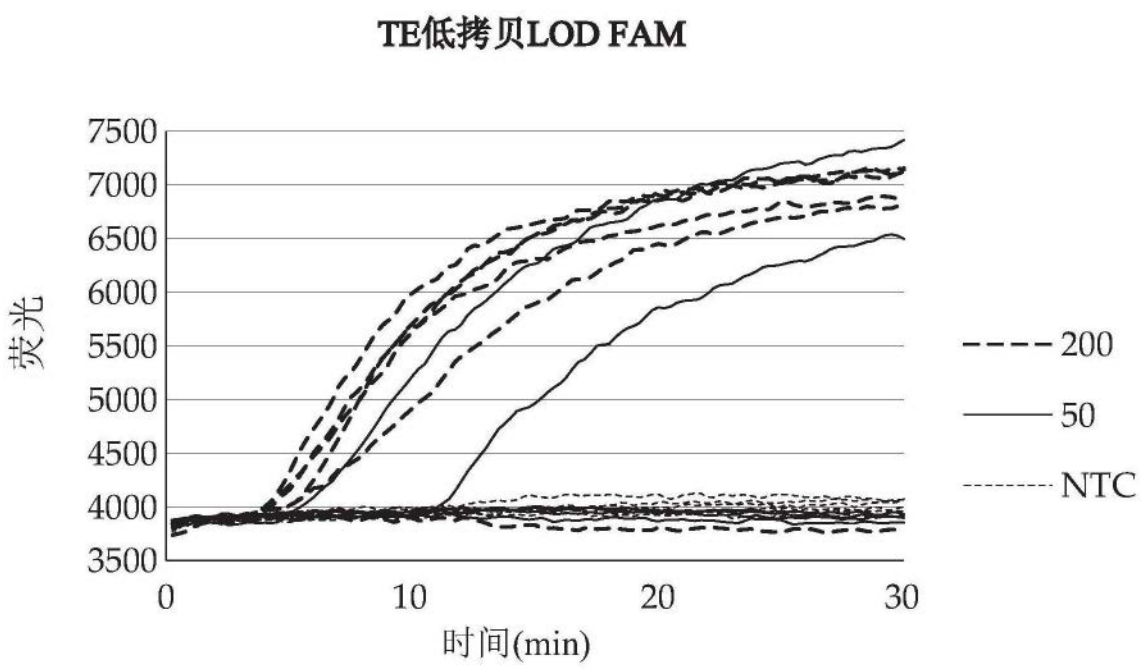

TE低拷贝LOD FAM
荧光
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
0
10
20
30
时间(min)
200
50
NTC

图1A

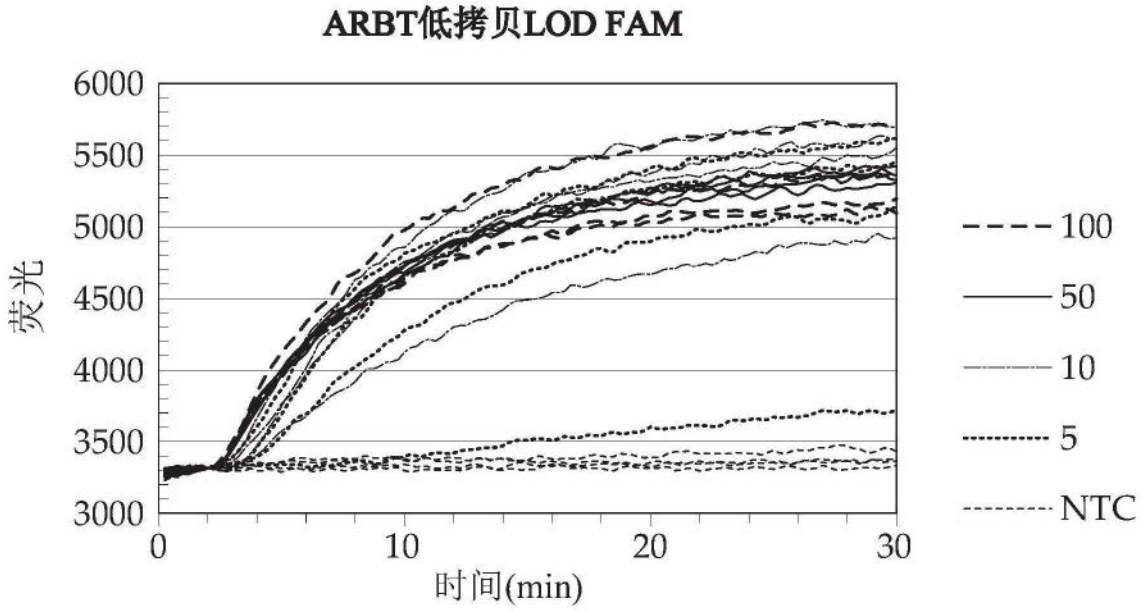

ARBT低拷贝LOD FAM
荧光
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
0
10
20
30
时间(min)
100
50
10
5
NTC

图1B

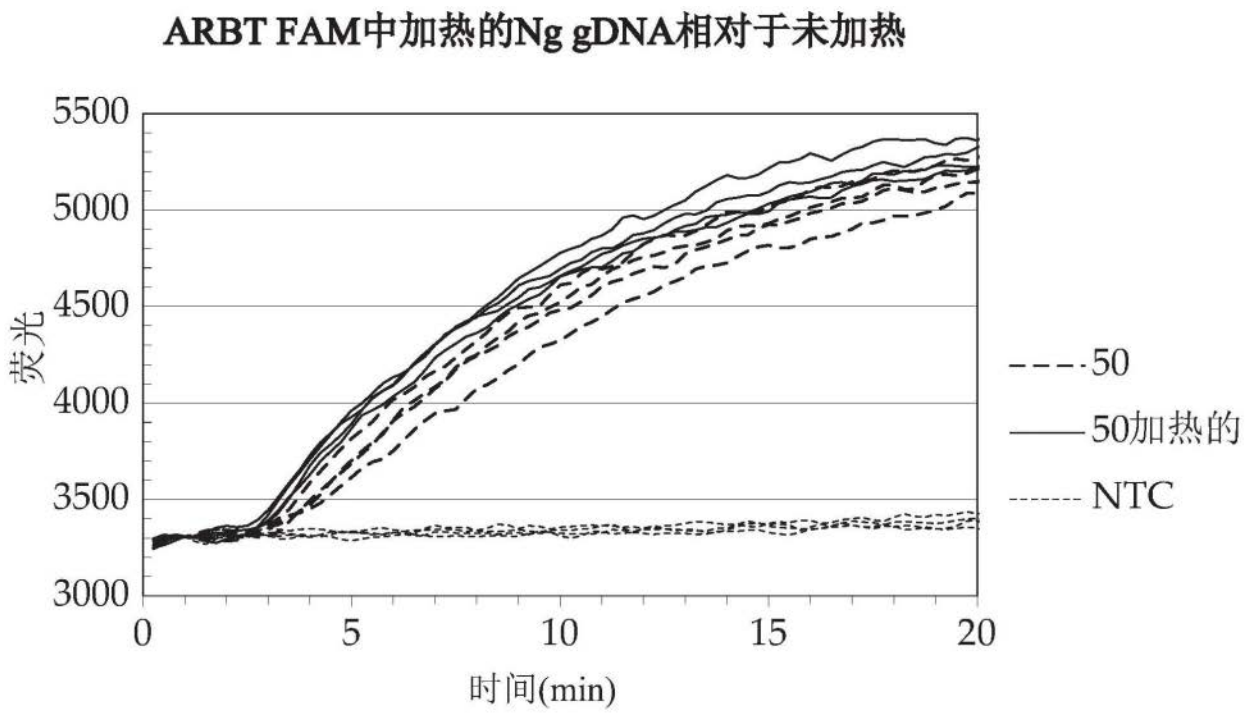

ARBT FAM中加热的Ng gDNA相对于未加热
5500
5000
4500
4000
3500
3000
荧光
0
5
10
15
20
时间(min)
50
50加热的
NTC

图2

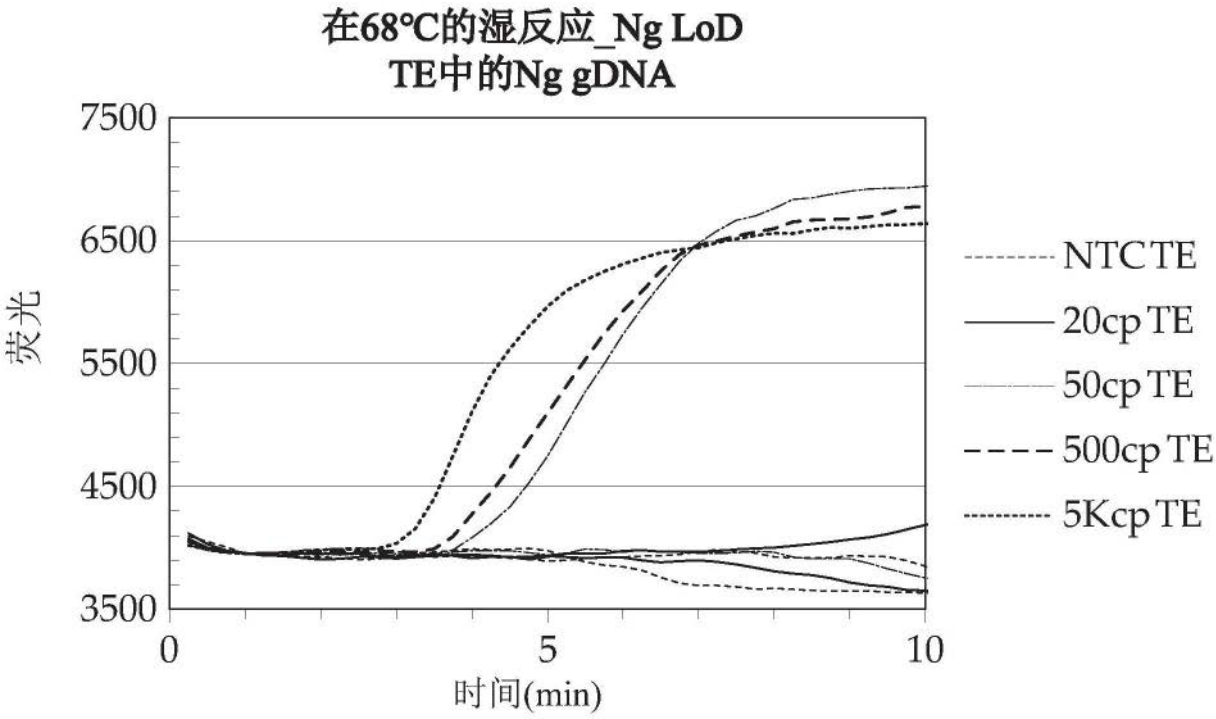

在68°C的湿反应_Ng LoD
TE中的Ng gDNA
7500
6500
5500
4500
3500
荧光
0
5
10
时间(min)
NTC TE
20cp TE
50cp TE
500cp TE
5Kcp TE

图3A

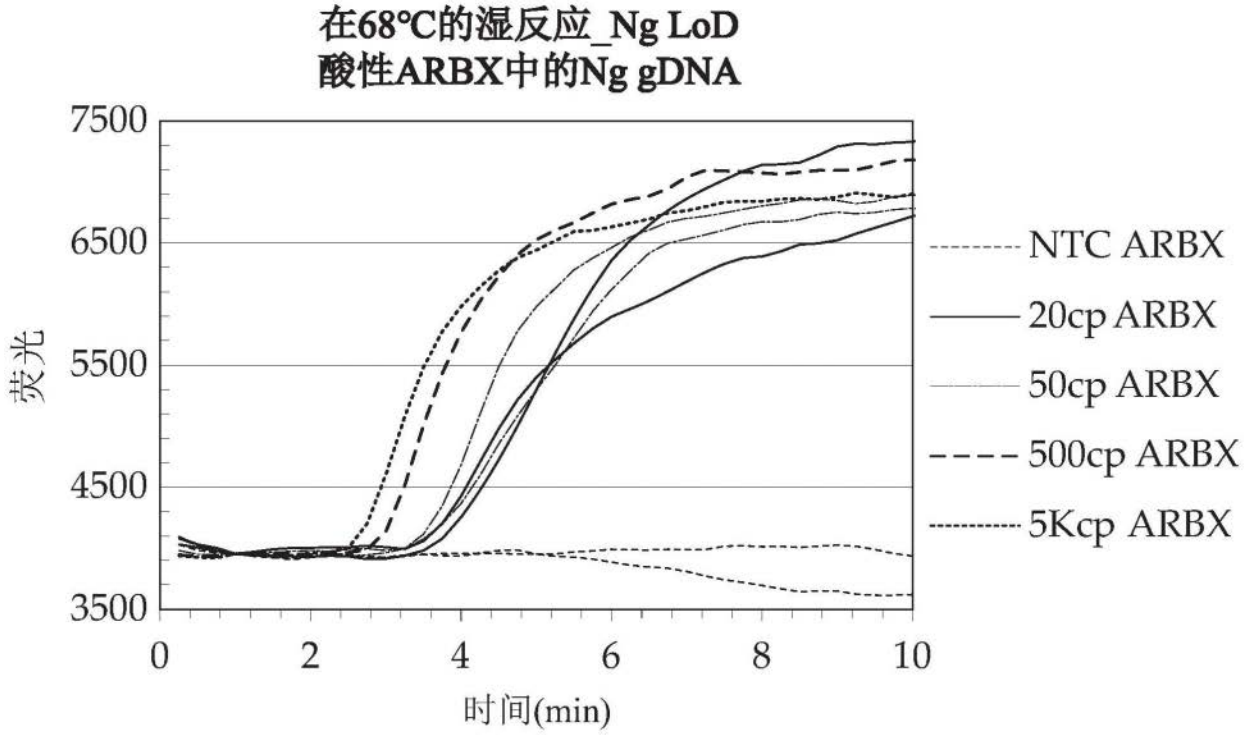

在68℃的湿反应_Ng LoD
酸性ARBX中的Ng gDNA
荧光
7500
6500
5500
4500
3500
0
2
4
6
8
10
时间(min)
NTC ARBX
20cp ARBX
50cp ARBX
500cp ARBX
5Kcp ARBX

图3B

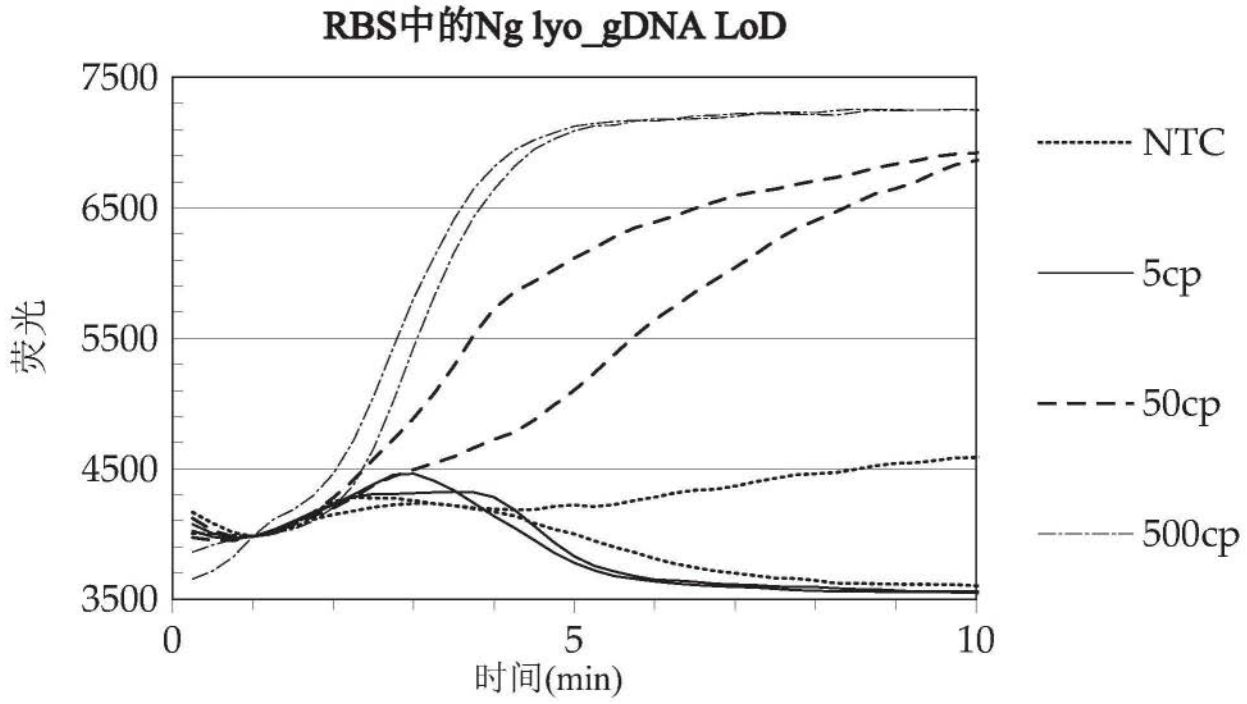

RBS中的Ng lyo_gDNA LoD
荧光
7500
6500
5500
4500
3500
0
5
10
时间(min)
NTC
5cp
50cp
500cp

图4A

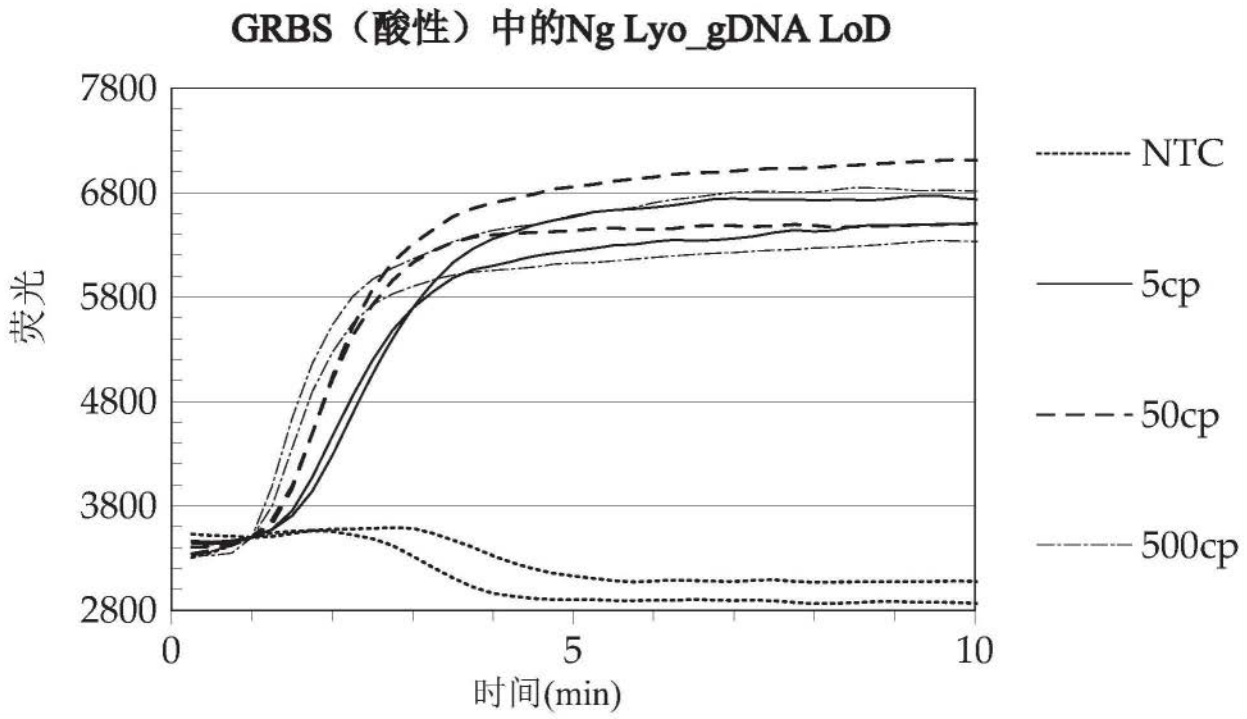

GRBS（酸性）中的Ng Lyo_gDNA LoD
荧光
7800
6800
5800
4800
3800
2800
0
5
10
时间(min)
NTC
5cp
50cp
500cp

图4B

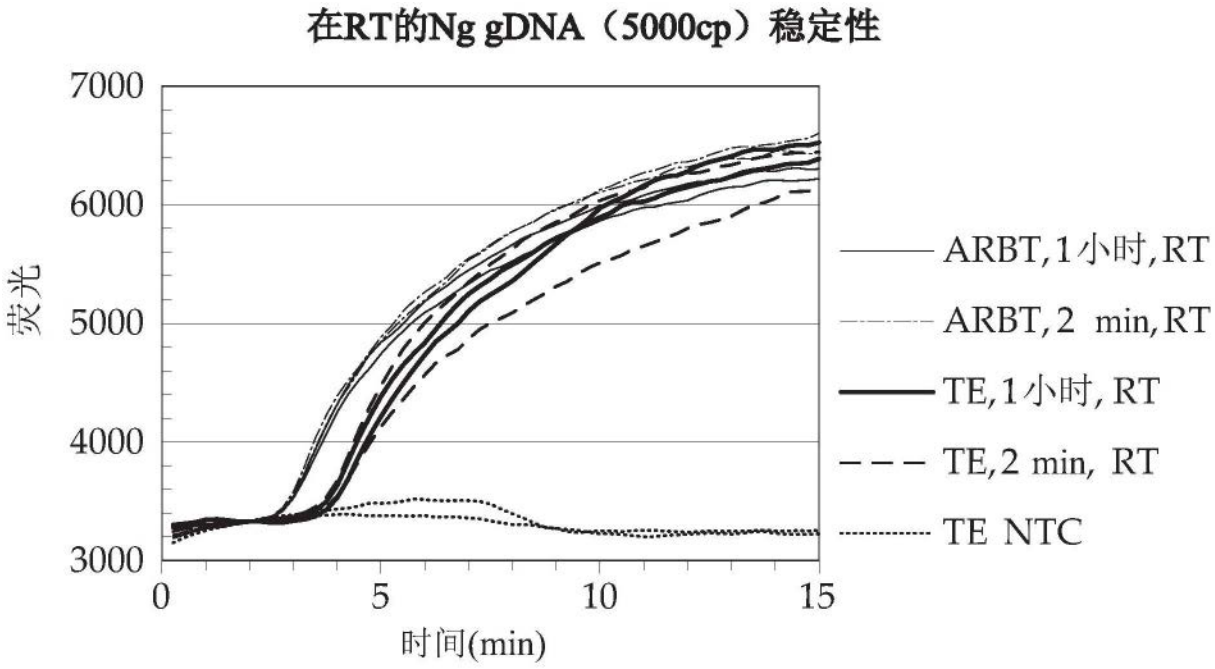

在RT的Ng gDNA（5000cp）稳定性
荧光
7000
6000
5000
4000
3000
0
5
10
15
时间(min)
ARBT,1小时,RT
ARBT,2 min,RT
TE,1小时, RT
TE,2 min, RT
TE NTC

图5A

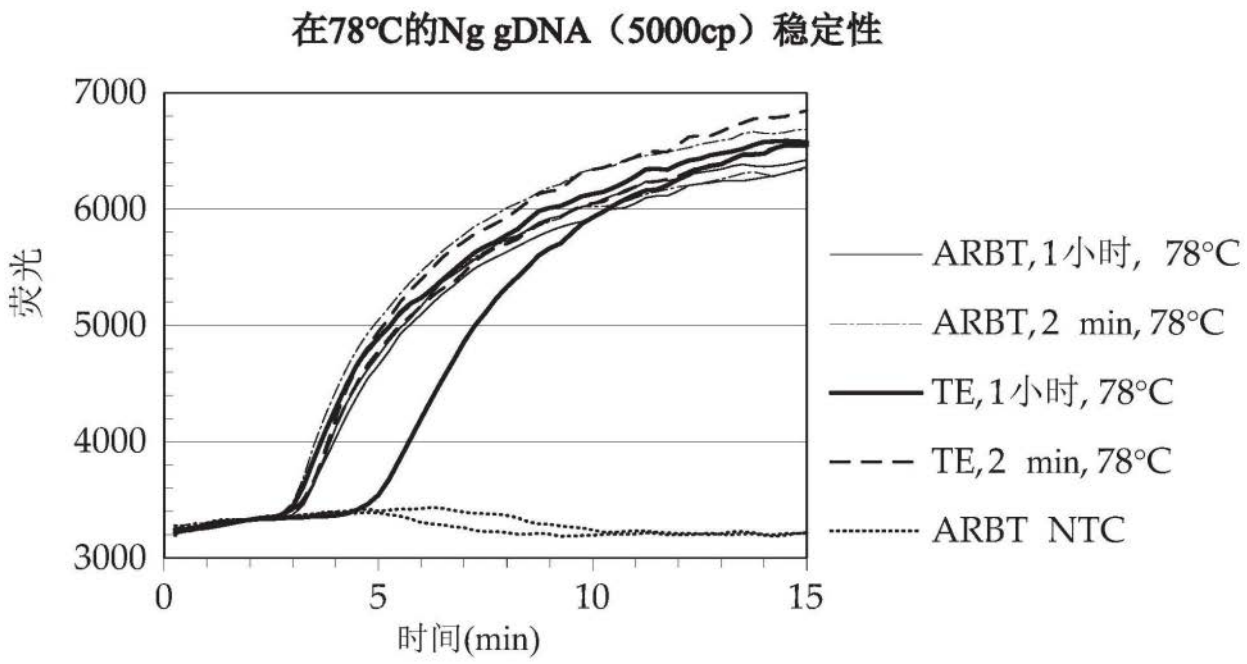

在78℃的Ng gDNA（5000cp）稳定性
7000
6000
5000
4000
3000
荧光
0
5
10
15
时间(min)
ARBT,1小时, 78°C
ARBT,2 min,78°C
TE,1小时,78°C
TE,2 min,78°C
ARBT NTC

图5B

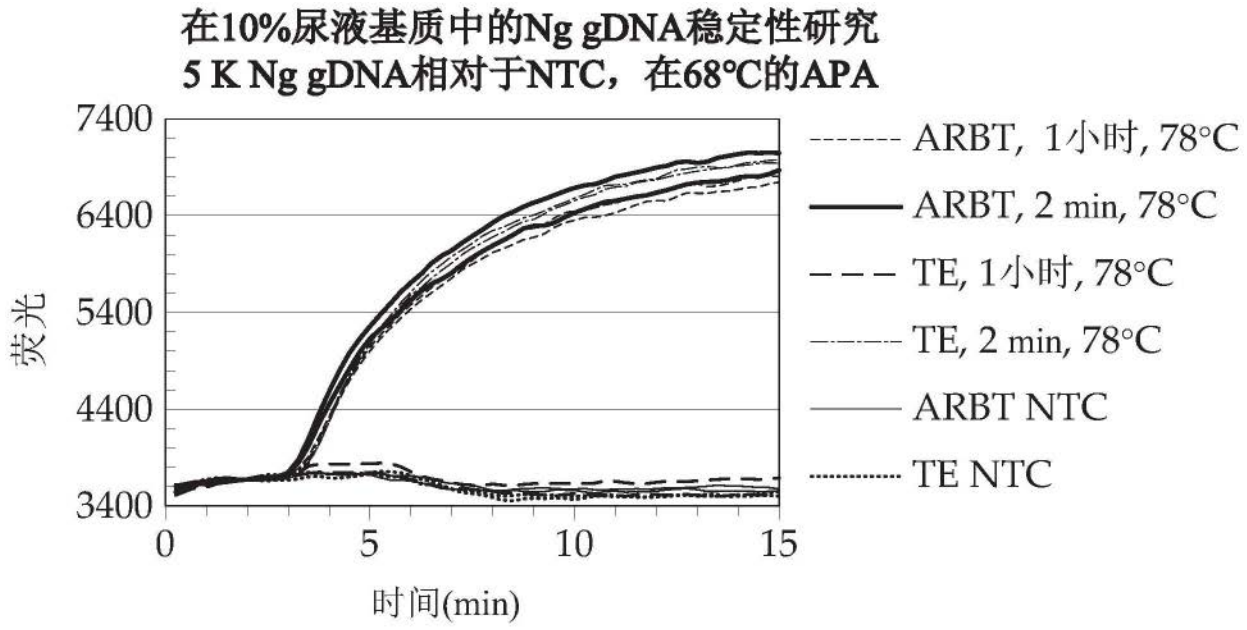

在10%尿液基质中的Ng gDNA稳定性研究
5 K Ng gDNA相对于NTC，在68℃的APA
7400
6400
5400
4400
3400
荧光
0
5
10
15
时间(min)
ARBT, 1小时, 78°C
ARBT, 2 min, 78°C
TE, 1小时, 78°C
TE, 2 min, 78°C
ARBT NTC
TE NTC

图6A

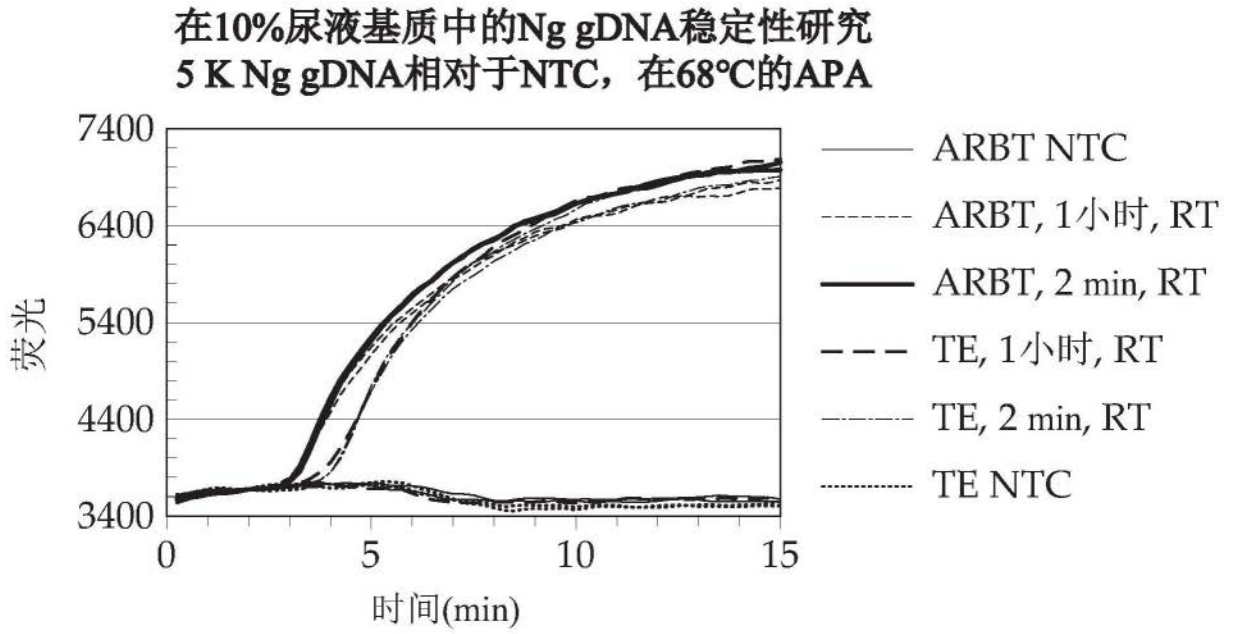

在10%尿液基质中的Ng gDNA稳定性研究
5 K Ng gDNA相对于NTC，在68℃的APA
荧光
7400
6400
5400
4400
3400
0
5
10
15
时间(min)
ARBT NTC
ARBT, 1小时, RT
ARBT, 2 min, RT
TE, 1小时, RT
TE, 2 min, RT
TE NTC

图6B

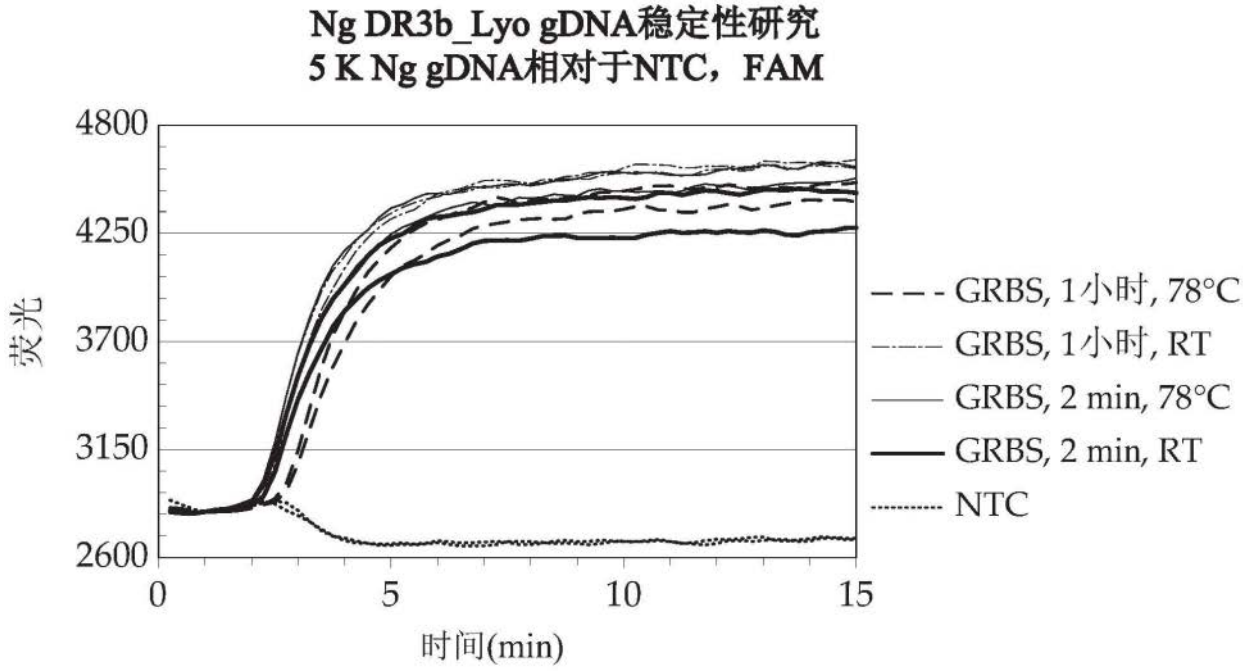

Ng DR3b_Lyo gDNA稳定性研究
5 K Ng gDNA相对于NTC，FAM
荧光
4800
4250
3700
3150
2600
0
5
10
15
时间(min)
GRBS, 1小时, 78°C
GRBS, 1小时, RT
GRBS, 2 min, 78°C
GRBS, 2 min, RT
NTC

图7

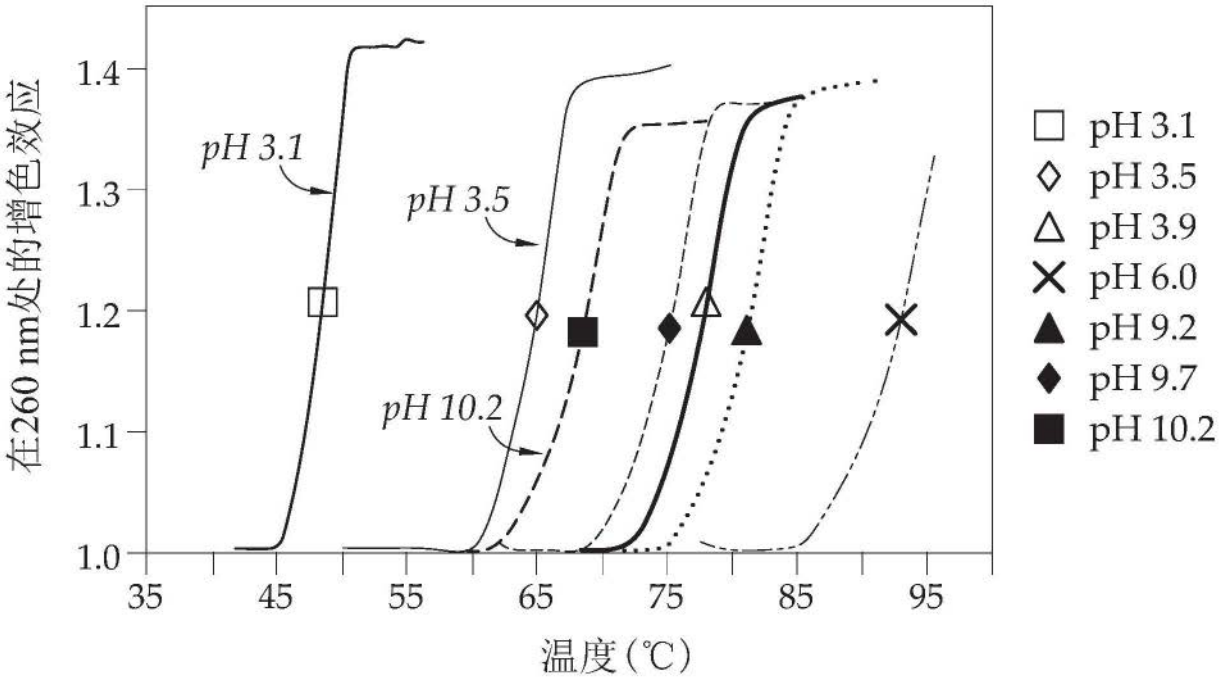

在260 nm处的增色效应
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
35
45
55
65
75
85
95
温度(℃)
pH 3.1
pH 3.5
pH 10.2
pH 3.1
pH 3.5
pH 3.9
pH 6.0
pH 9.2
pH 9.7
pH 10.2

图8