

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2012 年 5 月 18 日 (18.05.2012)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/062200 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/081946

(22) 国际申请日: 2011 年 11 月 8 日 (08.11.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201010538264.4 2010 年 11 月 10 日 (10.11.2010) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **张庆辉 (ZHANG, Qinghui)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **陈敏峰 (CHEN, Minfeng)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **黄业博 (HUANG, Yebo)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **陈城超 (CHEN, Chengchao)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **孙勇 (SUN, Yong)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **张秀清 (ZHANG, Xiuqing)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **杨焕明 (YANG, Huanming)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: **北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC)**; 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼 301 室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: FLUORESCENCE QUANTITATIVE PCR REACTION SOLUTION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 荧光定量 PCR 反应液及其用途

(57) Abstract: Disclosed are a fluorescence quantitative PCR reaction solution, kit, fluorescence quantitative PCR method and method for quantifying nucleic acid. The fluorescence quantitative PCR reaction solution comprises a PCR reaction enhancer selected from at least one of dimethyl sulfoxide, glycerine, bovine serum albumin, formamide, non-ionic detergent, polyethylene glycol, spermidine, ammonium sulfate and betaine.

(57) 摘要:

提供了一种荧光定量 PCR 反应液、一种试剂盒、一种荧光定量 PCR 方法以及一种对核酸进行定量的方法。其中, 所述荧光定量 PCR 反应液包含 PCR 反应增强剂, 其中, PCR 反应增强剂为选自二甲亚砜、甘油、牛血清白蛋白、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵和甜菜碱的至少一种。

WO 2012/062200 A1

荧光定量 PCR 反应液及其用途

优先权信息

本申请请求 2010 年 11 月 10 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 201010538264.4 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

技术领域

本发明涉及分子生物学领域，特别是涉及分子生物学技术及实验方法领域，具体地，本发明涉及荧光定量 PCR 反应液及其用途。更具体地，本发明提供了一种荧光定量 PCR 反应液、一种试剂盒、一种荧光定量 PCR 方法以及一种对核酸进行定量的方法。

背景技术

荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, 也称为定量 PCR, 简称为 QPCR) 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对待测样品模板进行定量分析的方法。

荧光定量 PCR 在临床疾病诊断、动物疾病检测、食品安全、科学研究以及各种应用行业中都发挥着重要作用。

然而, 目前的荧光定量 PCR 方法仍有待改进。

发明内容

本发明是基于发明人的下列发现完成的:

根据化学原理的不同, 荧光定量 PCR 可分为探针法和染料法, 其中, 探针法例如 20 荧光定量 PCR Taqman 水解探针法, 是常用的荧光定量 PCR 技术。荧光定量 PCR Taqman 水解探针法以 Taqman 荧光探针 (也称为水解探针) 为基础, 该探针是这样的一种寡核苷酸, 在该寡核苷酸的两端分别标记了一个荧光发射基团和一个荧光淬灭基团。在进行荧光定量 PCR 反应的过程中, 当探针与靶序列配对时, 探针完整, 荧光发射基团发射的荧光信号因与 3' 端的荧光淬灭基团接近而被吸收淬灭, 荧光监测系统无法接收检测到 25 到荧光信号; 在进行延伸反应时, Taq 聚合酶的 5' - 3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使得荧光发射基团与荧光淬灭基团分离, 荧光基团发射的荧光信号不会被荧光淬灭基团吸收淬灭, 从而荧光监测系统就可以接收到荧光信号, 而且一分子 PCR 扩增产物的生成伴随一分子荧光信号的产生, 随着扩增产物的增加, 可检测到的荧光增强 (可以参见 Heid, C.A., J. Stevens, K. J. Livak, et al. Real time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 30 6: 986 - 994., 通过参照将其全文并入本文)。但是, 目前的荧光定量 PCR 方法对模板的长度要求较高, 模板的长度在 50-150bp 内时扩增效率最好, 超过 400bp 就无法达到

理想的扩增效率(90%~110%)，因此长片段的模板采用荧光定量 PCR 方法进行定量就受到了很大的限制，无法保证扩增效率，从而可能会严重影响后续实验的精确性、重复性和灵敏度。

本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为了提高荧光定量 PCR 反应扩增核苷酸片段的效率，发明人进行了大量的实验，针对可能的影响因素对荧光定量反应液进行了优化，并完成了本发明。

根据本发明的实施例，本发明提供了一种荧光定量 PCR 反应液及其用途，用以提高目前的荧光定量 PCR 反应技术的扩增效率，尤其是针对长片段的模板。

根据本发明的一个方面，本发明提供了一种荧光定量 PCR 反应液。根据本发明的实施例，该荧光定量 PCR 反应液包含 PCR 反应增强剂，其中，所述 PCR 反应增强剂为选自二甲亚砜、甘油、牛血清白蛋白、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵和甜菜碱的至少一种。发明人发现，采用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 反应液对待测样本进行荧光定量 PCR 反应时，能够有效地增强 PCR 扩增效率，且实验的重复性非常好、定量结果准确、灵敏度高。

由此，根据本发明的又一方面，基于上述荧光定量 PCR 反应液，本发明还提供了一种试剂盒，其包含根据本发明实施例的荧光定量 PCR 反应液。利用该试剂盒，能够方便有效地对待测样本进行荧光定量 PCR，且定量结果准确、可重复性好。

根据本发明的再一方面，本发明还提供了一种荧光定量 PCR 方法，该方法包括使用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 反应液。发明人惊奇地发现，利用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 方法对待测样本进行荧光定量 PCR 反应时，相对于传统的荧光定量 PCR 方法，其扩增效率显著提高，定量的精度也明显增强，而且结果可重复性非常好，从而，所得的定量的扩增产物能够方便有效地应用于后续的多种研究中。

根据本发明的另一方面，本发明还提供了一种对核酸进行定量的方法，其包括利用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 方法对所述核酸进行定量。根据本发明的一些具体示例，利用该方法对核酸进行定量，由于对待测核酸样本的起始量要求低，使得较少量的核酸样本也能得到有效地扩增，扩增效率高，由此，也能方便准确地对核酸进行荧光定量，且定量结果精确、可重复性好。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明

显和容易理解，其中：

图 1：显示了根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线图。

A：使用商品化荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）进行荧光定量 PCR 反应的扩增曲线；

5 B：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 1（实验例 1）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线；

C：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 2（实验例 2）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线；

10 D：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 3（实验例 3）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线。

图 2：显示了根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应的标准曲线图。

A：使用商品化荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）进行荧光定量 PCR 反应的标准曲线；

15 B：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 1（实验例 1）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线；

C：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 2（实验例 2）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线；

D：使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 3（实验例 3）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线，以及

20 图 3：显示了标准差与 CT 的关系图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。在本文所使用的浓度表示方法，如果没有特别指出，是指分子生物学领域中常用的浓度表示方法。

为了提高荧光定量 PCR Taqman 水解探针法扩增长核苷酸片段的效率，发明人进行了大量的实验，针对可能的影响因素采取相应的措施对目前的荧光定量 PCR 反应液进行了优化，由此完成了本发明。

30 根据本发明的一个方面，本发明提供了一种荧光定量 PCR 反应液。根据本发明的实施例，荧光定量 PCR 反应液包含 PCR 反应增强剂，其中，PCR 反应增强剂为选自二甲亚砜、

甘油、牛血清白蛋白、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵和甜菜碱的至少一种。根据本发明的一些具体示例，PCR 反应增强剂包括但不限于二甲亚砜（DMSO）、甘油、牛血清白蛋白（BSA）、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵和甜菜碱（Betaine）中的一种或多种，例如可以包括二甲亚砜、牛血清白蛋白或甜菜碱中的一种或多种。根据本发明的实施例，聚乙二醇的类型并不受特别限制，根据本发明的具体示例，可以采用聚乙二醇 6000。根据本发明的一个实施例，PCR 反应增强剂包含二甲亚砜、牛血清白蛋白和甜菜碱，利用该 PCR 反应增强剂的荧光定量 PCR 反应扩增效率较高。

另外，发明人惊奇地发现，二甲亚砜、甘油、牛血清白蛋白、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵或甜菜碱等在荧光定量 PCR 反应中，作为 PCR 反应增强剂能够促进各种耐热 DNA 聚合酶对许多复杂结构 DNA 模板（如高 GC 含量）的有效扩增，增加 PCR 反应的灵敏度和特异性。其原理包括通过提高 DNA 聚合酶的热稳定性，降低模板 DNA 的二级结构等机制提高目的片段的产量。具体地，发明人进一步发现：1 质量%-10 质量%的二甲亚砜能够改变引物模板配对反应的溶解温度，从而改善 GC 含量高的 DNA 的变性情况，使聚合酶更容易在二级结构处延伸；5 质量%-20 质量%的甘油能够提高产量，增加酶的稳定性；0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的牛血清白蛋白能提高 PCR 反应的效率，同时减少体系中 PCR 抑制物对反应的影响；1.25 质量% - 10 质量%的甲酰胺可促进某些“引物 - 模板”退火，降低带有二级结构的 DNA 的变性温度；硫酸铵能增加反应体系的离子强度，改变 DNA 的变性及退火温度，调节酶活；0.5-2M 的甜菜碱有助于高 GC 含量和长 DNA 片段的 PCR 反应。可以根据实际需要，选择其中的一种或多种作为荧光定量 PCR 反应液的 PCR 反应增强剂。

根据本发明的一个实施例，PCR 反应增强剂为：5 质量%的二甲亚砜，0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 BSA，1M 的甜菜碱，由此，采用该 PCR 反应增强剂的荧光定量 PCR，扩增效率显著增强。

根据本发明的一些具体示例，荧光定量 PCR 反应液，进一步包含耐热 DNA 聚合酶，该耐热 DNA 聚合酶具有 5'-3'聚合酶活性和 5'-3'外切酶活性。根据本发明的实施例，该耐热 DNA 聚合酶可以进一步具有 3'-5'外切酶活性，以增加反应的灵敏度和特异性等。根据本发明的一个实施例，该耐热 DNA 聚合酶可以为 Ex TaqTM DNA 聚合酶或 LA TaqTM DNA 聚合酶，其中优选 Ex TaqTM DNA 聚合酶。根据本发明的实施例，该耐热 DNA 聚合酶可以为热启动（hot start）DNA 聚合酶。在本说明书中，表达方式“热启动 DNA 聚合酶”是指在高热状况下会活化的聚合酶，其可以为经过化学分子修饰的聚合酶，高热下结构改变而启动；或者带有针对聚合酶的免疫抗体，高热下使抗体分离而启动；或者改良自抗体型，使用小分子的化合物封闭聚合酶的作用位置，高温下分离而启动，由此，热启动 DNA 聚合酶可以避免 DNA 模板在未达到设定温度前就开始进行聚合反应。发明人发现，利用热启动 DNA

聚合酶进行荧光定量 PCR 反应,可以防止在 PCR 反应的第一步因引物错配或引物二聚体的形成而导致的非特异性扩增,从而能够提高目的 DNA 片段的扩增效率。根据本发明的一个实施例,热启动 DNA 聚合酶为 Ex Taq™ 热启动 DNA 聚合酶(Ex Taq™ DNA Polymerase Hot Start Version)。

5 根据本发明的实施例,荧光定量 PCR 反应液可以包含 10-67 mM pH 8.2-9.0 Tris-HCl、25-50 mM KCl、1.5-5.0 mM Mg^{2+} 、0.2-0.4mM dNTP、0.05 质量%-0.1 质量% Tween 20、1 质量%-10 质量%二甲亚砜、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 牛血清白蛋白、0.5-2M 甜菜碱和 0.04-0.2U/ μl 热启动 DNA 聚合酶。由此,利用上述荧光定量 PCR 反应液进行光定量 PCR 反应,可以有效地缩短反应时间,提高扩增效率,并能够实现对 DNA 模板的精确定量。根据本发明的一些
10 具体示例,荧光定量 PCR 反应液可以包含 2.5-3 mM Mg^{2+} 、1.2 质量%-5 质量%二甲亚砜、0.1-0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 牛血清白蛋白、1-1.2M 甜菜碱和 0.05-0.07U/ μl 热启动 DNA 聚合酶。由此,利用该荧光定量 PCR 反应液进行光定量 PCR 反应,可以有效地提高扩增效率,并能够准确地对 DNA 模板进行定量,且整个反应过程所需的时间大大缩短,即提高了实验的效率。具体地,根据本发明的一个实施例,在对长片段进行荧光定量 PCR 时,采用本发明的荧光定量
15 PCR 反应液,相对于使用目前的商业化荧光定量 PCR 反应体系,其扩增效率显著提高,可以将扩增效率从 85%提高到 95%以上。解决了目前长片段定量 PCR 扩增效率偏低的问题。并且,根据本发明实施例的荧光定量 PCR 反应液既可以应用于长核苷酸片段的定量,也可以应用于长片段文库的定量。

根据本发明的又一方面,本发明还提供了一种试剂盒,其包含根据本发明实施例的荧光
20 定量 PCR 反应液。由此,利用该试剂盒,能够方便有效地对待测样本进行荧光定量 PCR 反应,并且反应需时少,扩增效率高,定量精确。关于荧光定量 PCR 反应液,前面已经进行了详细描述,此处不再赘述。本领域技术人员可以理解,试剂盒中还可以包含进行荧光定量 PCR 所需要的其他组分,在此也不再赘述。

根据本发明的再一方面,本发明还提供了一种荧光定量 PCR 方法,其包括使用根据本
25 发明实施例的荧光定量 PCR 反应液。利用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 方法对样本进行荧光定量 PCR 反应,样本能够有效地进行扩增和被定量,且扩增效率高,用时短,定量结果精确,可重复性好。关于荧光定量 PCR 反应液,前面已经进行了详细描述,此处不再赘述。本领域技术人员可以根据需要,调整荧光定量 PCR 方法的具体条件和所使用的其他试剂,在此不再赘述。

30 根据本发明的另一方面,本发明还提供了一种对核酸进行定量的方法,其包括利用根据本发明实施例的荧光定量 PCR 方法对核酸进行定量。在本说明书中,术语“核酸”可以

是任何包含核酸如脱氧核糖核酸和/或核糖核酸的聚合物，包括但不限于经过修饰或未经修饰的 DNA 和/或 RNA。本领域的技术人员可以理解，利用该方法对 RNA 进行定量时，可以是直接将 RNA 进行荧光定量 PCR 反应，也可以将 RNA 反转录为相应的 DNA 后再进行荧光定量 PCR。采用根据本发明实施例的对核酸进行定量的方法，能够方便准确地对核酸样
5 本进行定量，PCR 定量用时短，扩增效率高，定量结果精确度高且重复性好。本领域技术人员可以根据需要，调整核酸定量方法的具体条件和所使用的其他试剂，在此不再赘述。

需要说明的是，根据本发明实施例的荧光定量 PCR 反应液及其用途是本申请的发明人经过艰苦的创造性劳动和优化工作才完成的。

10 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

15 实施例 1：本发明和现有商品化荧光定量 PCR 反应体系的效果比较

实施例中涉及的各实验材料：

1) 模板、探针和引物

模板的制备：从一名男性黄种人的血液中提取基因组 DNA，构建 DNA 文库（参见《Preparing 2–5kb Samples for Mate Pair Library Sequencing Part # 1005363 Rev. B》（Part #
20 1005363 Rev. B，通过参照将其全文并入本文），其中，该 DNA 文库含有长度不同的 DNA 片段，经 Agilent 2100 Bioanalyzer 测定文库浓度为 18.7 nM，其所含 DNA 片段的长度范围为 391bp-637bp，平均长度为 557 bp。利用构建好的 DNA 文库制备 5 种浓度的标准品，具体地，分别取 1nM 的 DNA 文库用去离子水稀释为 5 种浓度：0.1pM、1pM、10pM、100pM 和 1000pM，作为标准品，用作荧光定量 PCR 反应的反应模板。其中 1nM=10⁻⁹mol/L，
25 1pM=10⁻¹²mol/L。

水解探针序列：5'CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'（SEQ ID NO: 1），在其 5'端带有荧光基团 5-FAM（5-羧基荧光素），3'端带有淬灭基团 6-TAMRA（6-羧基四甲基罗丹明）。

引物 1.1: 5'AATGATACGGCGACCAACGAGATC 3'（SEQ ID NO: 2）

30 引物 2.1: 5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT 3'（SEQ ID NO: 3）

2) 试剂

其中 10×PCR 缓冲液 (Takara 公司) 含 100mM Tris-HCl、500mM KCl 和 15mM MgCl₂, Ex Taq hot start version DNA 聚合酶为 5U/μL, 购自 Takara, dNTP 购自 Takara, MgSO₄ 和牛血清蛋白 (BSA) 购自 New England Biolabs, 二甲亚砜 (DMSO) 购自上海生工, 甜菜碱 (Betaine) 购自 Sigma, 50×ROX 参比染料 (6-羧基-X-罗丹明, 6-carboxyl-X-rhodamine) 购自 Invitrogen, 引物和探针由上海生工合成。作为对比比例的商品化试剂的反应预混液, 购自 Applied Biosystems, 货号为 4304473, 成分为 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶、AmpErase UNG、dNTPs、Rox 参比荧光及优化的缓冲液组分 (具体可参见产品说明书)。

1、含有本发明荧光定量 PCR 反应液的反应体系

10 1) 荧光定量 PCR 反应体系 1 (实验例 1):

	10×PCR 缓冲液	2.5μL
	2.5 mM dNTP	2μL
	100 mM MgSO ₄	0.25μL
	10 mg/mL BSA	0.25μL
15	10 质量% Tween-20	0.25μL
	100% DMSO	1.25μL
	5M Betaine (甜菜碱)	5μL
	10μM 引物 1.1	0.75μL
	10μM 引物 2.1	0.75μL
20	10μM 水解探针	0.625μL
	50×ROX 参比染料	0.5 μL
	DNA 聚合酶	0.25μL
	模板	1μL
	去离子水	9.625μL
25	合计	25μL

采用荧光定量 PCR 反应体系 1, 对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应, 每种浓度的标准品重复 2 次。

2) 荧光定量 PCR 反应体系 2 (实验例 2):

	10×PCR 缓冲液	2.5μL
30	2.5 mM dNTP	2μL
	100 mM MgSO ₄	0.25μL

	10 mg/mL BSA	2 μ L
	10 质量% Tween-20	0.25 μ L
	100% DMSO	0.3 μ L
	5M Betaine (甜菜碱)	6 μ L
5	10 μ M 引物 1.1	0.75 μ L
	10 μ M 引物 2.1	0.75 μ L
	10 μ M 水解探针	0.625 μ L
	50 $\times$ ROX 参比染料	0.5 μ L
	DNA 聚合酶	0.25 μ L
10	模板	1 μ L
	去离子水	7.825 μ L
	合计	25 μ L

采用荧光定量 PCR 反应体系 2, 对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应, 每种浓度的标准品重复 2 次。

15	3) 荧光定量 PCR 反应体系 3 (实验例 3):	
	10 $\times$ PCR 缓冲液	2.5 μ L
	2.5 mM dNTP	2 μ L
	100 mM MgSO ₄	0.375 μ L
	10 mg/mL BSA	0.25 μ L
20	10 质量% Tween-20	0.25 μ L
	100% DMSO	1.25 μ L
	5M Betaine (甜菜碱)	5 μ L
	10 μ M 引物 1.1	0.75 μ L
	10 μ M 引物 2.1	0.75 μ L
25	10 μ M 水解探针	0.625 μ L
	50 $\times$ ROX 参比染料	0.5 μ L
	DNA 聚合酶	0.35 μ L
	模板	1 μ L
	去离子水	9.4 μ L
30	合计	25 μ L

采用荧光定量 PCR 反应体系 3, 对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应, 每种浓

度的标准品重复 2 次。

2. 商品化的荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）为：

	反应预混液	12.5 μ L
	10 μ M 引物 1.1	0.75 μ L
5	10 μ M 引物 2.1	0.75 μ L
	10 μ M 水解探针	0.625 μ L
	模板	1 μ L
	去离子水	9.375 μ L
	合计	25 μ L

10 采用商品化的荧光定量 PCR 反应体系，对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应，每种浓度的标准品重复 2 次。

3. 反应条件

上述荧光定量 PCR 反应均在荧光定量 PCR 仪 StepOne Plus（ABI 公司）中进行。

15 采用含有本发明荧光定量 PCR 反应液的 3 种反应体系（即实验例 1、2、3），分别对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应，其 PCR 条件为：95℃ 预变性 10 S；95℃ 变性 30 S、60℃ 退火 30 S、72℃ 延伸 45 S，共 40 个循环。

采用商品化的荧光定量 PCR 反应体系（即对比例 1），分别对 5 种浓度的标准品进行荧光定量 PCR 反应时，PCR 条件为：95℃ 预变性 10 min；95℃ 变性 30 S、60℃ 退火 30 S、72℃ 延伸 45 S，共 40 个循环。

20 4. 实验结果

反应结束后，利用 StepOne v2.0 软件进行分析，结果表明，采用荧光定量 PCR 反应体系 1（实验例 1）进行的荧光定量 PCR 反应，其扩增效率为 99.31%，采用荧光定量 PCR 反应体系 2（实验例 2）进行的荧光定量 PCR 反应，其扩增效率为 97.96%，采用荧光定量 PCR 反应体系 3（实验例 3）进行的荧光定量 PCR 反应，其扩增效率为 99.49%，而采用商品化
25 的荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）进行的荧光定量 PCR 反应，其扩增效率为 86.73%。

具体实验结果见表 1-表 4，以及图 1 和图 2。图 3 显示了标准差与 CT 的关系图。

表 1 采用商品化荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）的荧光定量 PCR 结果

浓度（pM）	Ct 1	Ct 2	平均 Ct	标准偏差	变异系数(%)
1000	13.2534	13.2442	13.2488	0.0065	0.0492
100	17.1752	17.2782	17.2267	0.0729	0.4231
10	20.8095	20.8827	20.8461	0.0518	0.2483

1	24.4600	24.3748	24.4174	0.0602	0.2466
0.1	28.0799	28.0995	28.0897	0.0138	0.0493

表 2 采用荧光定量 PCR 反应体系 1 (实验例 1) 的荧光定量 PCR 结果

浓度 (pM)	Ct 1	Ct 2	平均 Ct	标准偏差	变异系数(%)
1000	12.9046	12.9299	12.9172	0.0178	0.1381
100	16.1706	16.1793	16.1750	0.0061	0.0378
10	19.4299	19.4734	19.4516	0.0308	0.1581
1	22.6603	22.8567	22.7585	0.1389	0.6101
0.1	26.3319	26.3066	26.3192	0.0179	0.0679

表 3 采用荧光定量 PCR 反应体系 2 (实验例 2) 的荧光定量 PCR 结果

浓度 (pM)	Ct 1	Ct 2	平均 Ct	标准差	变异系数(%)
1000	12.6027	12.6569	12.6298	0.0383	0.3036
100	15.8991	15.9597	15.9294	0.0429	0.2691
10	19.5051	19.5223	19.5137	0.0121	0.0621
1	22.9249	23.0240	22.9744	0.0701	0.3050
0.1	25.9567	25.9777	25.9672	0.0148	0.0571

5

表 4 采用荧光定量 PCR 反应体系 3 (实验例 3) 的荧光定量 PCR 结果

浓度 (pM)	Ct 1	Ct 2	平均 Ct	标准差	变异系数(%)
1000	13.3488	13.3876	13.3682	0.0274	0.2049
100	16.6618	16.7310	16.6964	0.0490	0.2932
10	19.9321	20.0173	19.9747	0.0602	0.3015
1	23.3494	23.3351	23.3423	0.0101	0.0434
0.1	26.6832	26.7498	26.7165	0.0471	0.1763

5. 结果分析

图 3 显示了标准差与 CT 的关系。在图 3 中, σ 为标准差, X 为样品的某浓度, Y 为 X 的 1/10。由图 3 可知, 标准差越小, 表明两者之间的差异越小, 则测量的准确度越高, 具体来说, 如果定量 PCR 的扩增效率是 100%, 那么 10 倍稀释点 (X 与 Y 浓度) 之间

10

的平均 CT 间隔应该恰为 3.32 个 CT 值。要以 99.7% 的几率分辨 10 倍稀释的浓度，标准差就必须小于等于 $3.32/6=0.553$ 。标准差越大，分辨 10 倍稀释的能力就越低。由此，根据表 1-表 4 并结合图 3 的结果可以看出，使用商品化荧光定量 PCR 反应液和本发明的荧光定量 PCR 反应液进行荧光定量 PCR 的 Ct 值（或表示为 CT 值，Ct 值的含义是：每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数）、标准差均较小，反映出测量的准确度较高。表 1-表 4 中的标准差均小于 0.5，说明分辨 10 倍稀释浓度的能力很强，反映出定量 PCR 反应的效果较好。

图 1 显示了根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线图，其中图 1A 显示了使用商品化荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）进行荧光定量 PCR 反应的扩增曲线，图 1B 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 1（实验例 1）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线，图 1C 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 2（实验例 2）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线，图 1D 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 3（实验例 3）的荧光定量 PCR 反应的扩增曲线。在图 1 中，横坐标均为循环数，纵坐标均为荧光强度。从图 1 可以看出，扩增曲线拐点清楚，指数期明显，扩增曲线整体平行性很好，基线平稳。但是，图 1B、C、D 扩增曲线指数期的斜率比图 1A 扩增曲线指数期的斜率要大。曲线指数期斜率，反应了扩增效率，越大说明扩增效率越高，扩增曲线从侧面反映了本发明的荧光定量 PCR 反应液的有益效果。

图 2 显示了根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应的标准曲线图，其中，图 2A 显示了使用商品化荧光定量 PCR 反应体系（对比例 1）进行荧光定量 PCR 反应的标准曲线，图 2B 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 1（实验例 1）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线，图 2C 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 2（实验例 2）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线，图 2D 显示了使用根据本发明一个实施例的荧光定量 PCR 反应体系 3（实验例 3）的荧光定量 PCR 反应的标准曲线。在图 2 中，横坐标均为样品起始浓度（单位是 pM），纵坐标均为 CT 值。图 2 是经过软件 StepOne Plus（ABI 公司）计算得到的结果，由图 2 可知采用商品化荧光定量 PCR 反应体系的荧光定量 PCR 扩增效率为 86.73%，采用含有本发明荧光定量 PCR 反应液的 3 种反应体系 1、2、3（即实验例 1、2、3）的荧光定量 PCR 扩增效率分别为 99.31%、97.96% 和 99.49%，接近 100%。说明本发明的荧光定量 PCR 反应液能够有效地提高扩增效率。

工业实用性

本发明的一种荧光定量 PCR 反应液、一种试剂盒、一种荧光定量 PCR 方法以及一

种对核酸进行定量的方法，能够有效地应用于荧光定量 PCR 反应，并能够对核酸进行精确定量。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范

5 围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语

10 的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

1、一种荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，包含 PCR 反应增强剂，
其中，

5 所述 PCR 反应增强剂为选自二甲亚砜、甘油、牛血清白蛋白、甲酰胺、非离子去污剂、聚乙二醇、亚精胺、硫酸铵和甜菜碱的至少一种。

2、根据权利要求 1 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，所述聚乙二醇为聚乙二醇 6000。

3、根据权利要求 1 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，其包含二甲亚砜、牛血
10 清白蛋白和甜菜碱。

4、根据权利要求 1 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，进一步包含耐热 DNA 聚合酶，所述耐热 DNA 聚合酶具有 5'-3'聚合酶活性和 5'-3'外切酶活性。

5、根据权利要求 4 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，所述耐热 DNA 聚合酶进一步具有 3'-5'外切酶活性。

15 6、根据权利要求 4 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，所述耐热 DNA 聚合酶为 Ex TaqTM DNA 聚合酶。

7、根据权利要求 4 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，所述耐热 DNA 聚合酶为热启动 DNA 聚合酶。

8、根据权利要求 7 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，所述热启动 DNA 聚合
20 酶为 Ex TaqTM 热启动 DNA 聚合酶。

9、根据权利要求 1 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于，包含：

10-67 mM pH 8.2-9.0 Tris-HCl；

25-50 mM KCl；

1.5-5.0 mM Mg²⁺；

25 0.2-0.4mM dNTP；

0.05 质量%-0.1 质量% Tween 20；

1 质量%-10 质量%二甲亚砜；

0.1 µg/µl - 1 µg/µl 牛血清白蛋白；

0.5-2M 甜菜碱；和

30 0.04-0.2U/µl 热启动 DNA 聚合酶。

10、根据权利要求 9 所述的荧光定量 PCR 反应液，其特征在于， 包含：

2.5-3 mM Mg^{2+} ;

1.2 质量%-5 质量%二甲亚砷;

0.1-0.8 μ g/ μ l 牛血清白蛋白;

1-1.2M 甜菜碱; 和

5 0.05-0.07U/ μ l 热启动 DNA 聚合酶。

11、一种试剂盒,其特征在于,包含权利要求 1-10 任一项所述的荧光定量 PCR 反应液。

12、一种荧光定量 PCR 方法,其特征在于,所述方法包括使用权利要求 1-10 任一项所述的荧光定量 PCR 反应液。

13、一种对核酸进行定量的方法,其特征在于,包括:

10 利用权利要求 12 所述的荧光定量 PCR 方法对所述核酸进行定量。

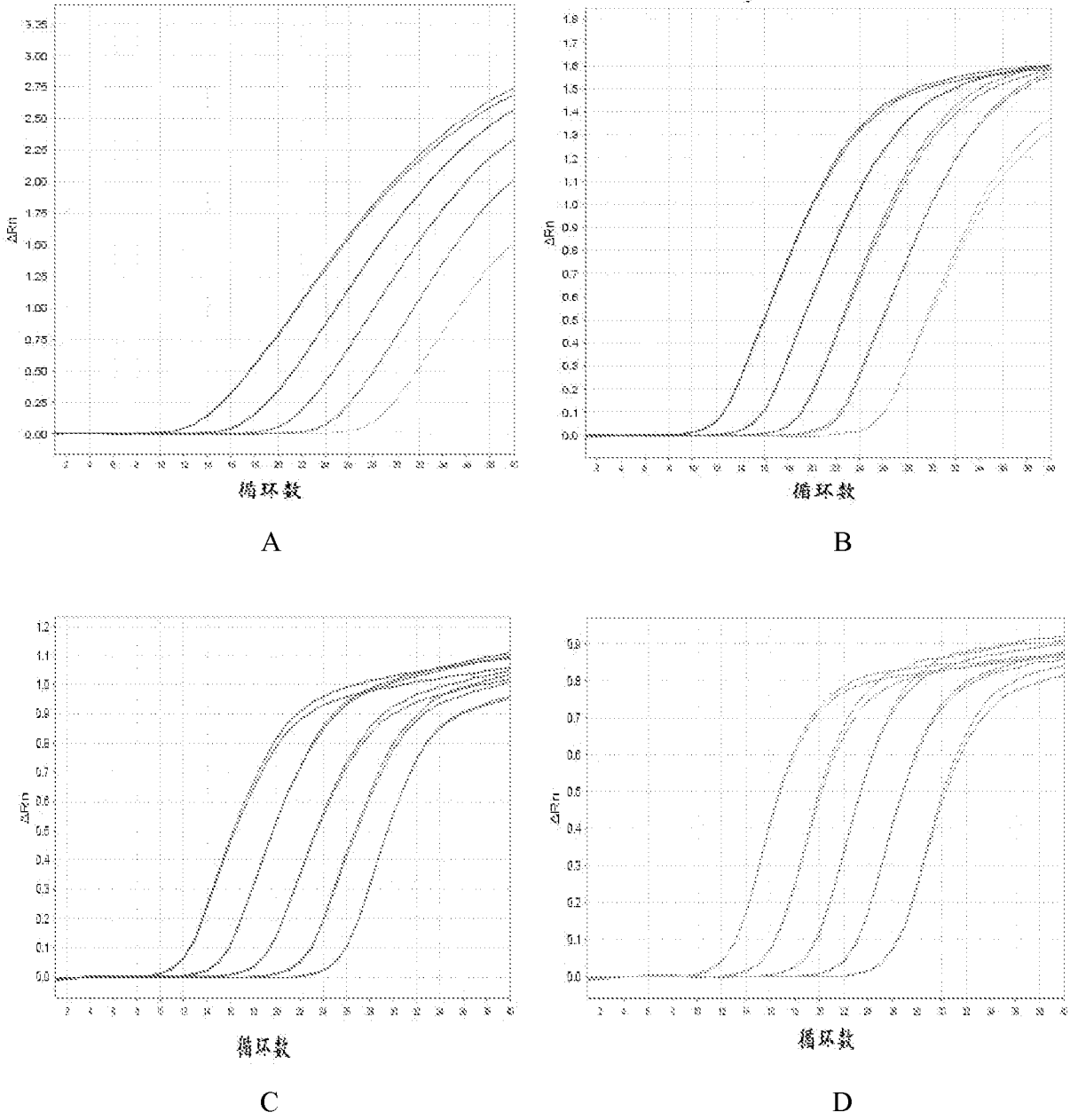


图 1

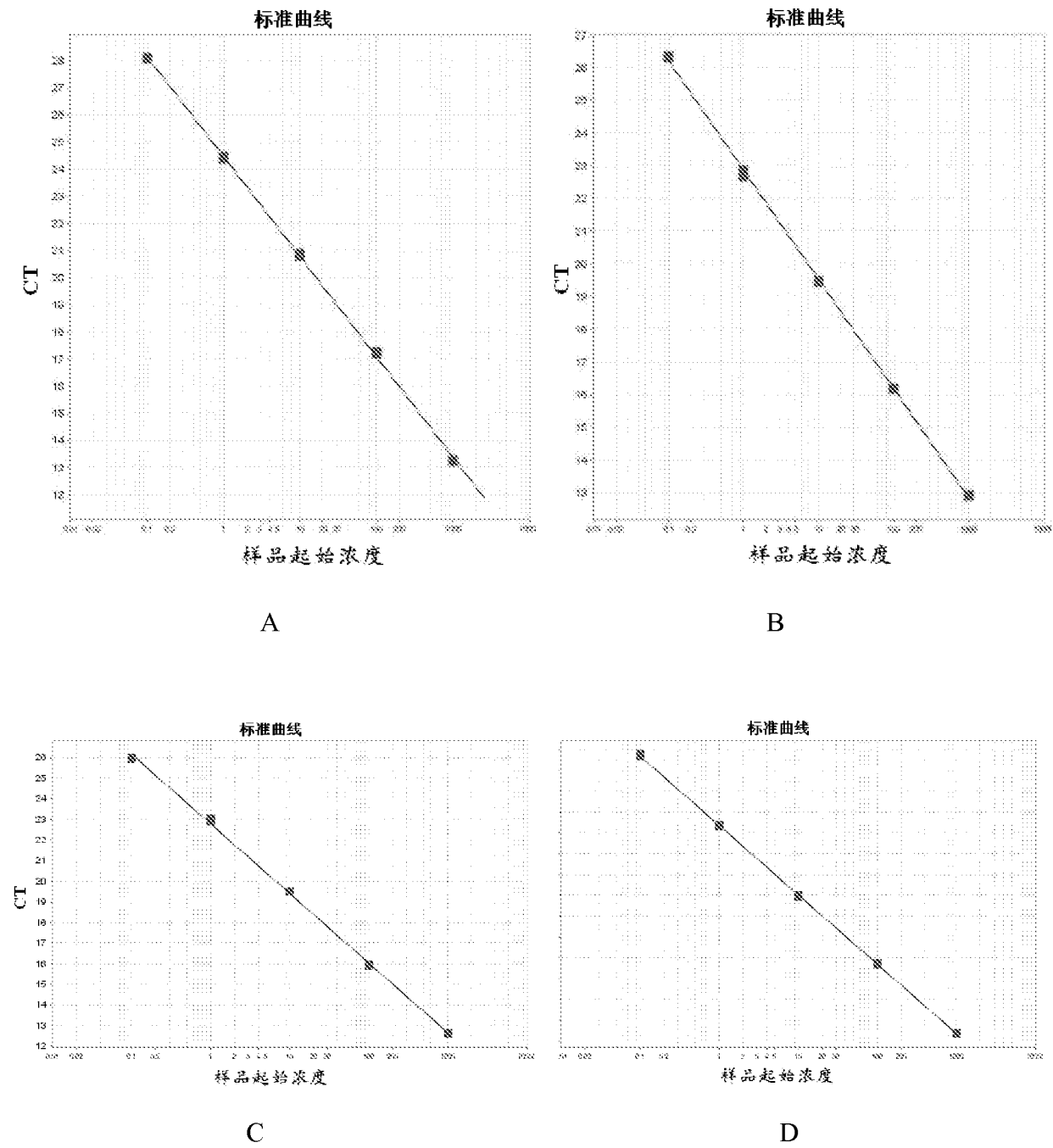


图 2

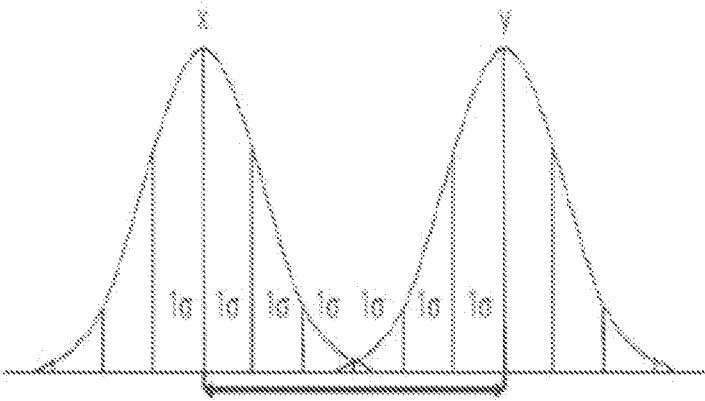


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/081946**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; EPODOC; CNKI; CNABS; NCBI; EMBASE; ISI-WEB OF KNOWLEDGE; GOOGLE SCHOLAR: fluorescent quantitation PCR, PCR reaction solution, buffer solution, synergist, accelerant, DMSO, dimethyl sulfoxide, BSA, bovine serum albumin, polyethylene glycol, PEG, ammonium sulfate, exonuclease, Ex Taq, real-time, quantitative, fluorescence, betaine, formamide, glycerol, spermidine, enhancer, additive, adjuvant, PCR, hot start, nonionic detergents, Triton, ammonium sulfate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHAMMAS, F. V. et al., Improvement of quantitative PCR reproducibility by betaine as determined by fluorescence-based method. BIO TECHNIQUES. May 2001, volume 30, no. 5, pages 950, 952, and 954, see the whole document, particularly page 950, table 1, and figure 1	1, 4, 6-8, 12-13
X	SHAMMAS, F. V. et al., Fluorescence-based method for measuring and determining the mechanisms of recombination in quantitative PCR. CLIN CHIM ACTA. February 2001, volume 304, no. 1-2, pages 19-28, see the whole document, particularly pages 22 and 26	1, 4, 6-8, 12-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 February 2012 (03.02.2012)	Date of mailing of the international search report 23 February 2012 (23.02.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Yuan Telephone No.: (86-10) 62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/081946**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRAMER, M. F., et al. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. Current Protocols in Molecular Biology. November 2001, 56, sections 15.1.1-15.1.14, see the whole document	1, 4, 5, 7
X	RALSER, M. et al., An efficient and economic enhancer mix for PCR. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. September 2006, volume 347, no. 3, pages 741-751, and 748	1, 3, 4, 7, 9-10
X	WAN, C. Y. et al., Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. PCR METHODS APPL. December 1993, volume 3, no. 3, pages 208-210, see the whole document, particularly page 209	1, 4, 7
X	ROUX, K. H., Optimization and Troubleshooting in PCR. PCR METHODS APPL. 1995, volume 4, pages S185-S194, see pages S185 and S188	1, 2, 4, 7, 11
PX	CN 101967525 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY), 09 February 2011 (09.02.2011), see the whole document	1, 4, 7, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/081946

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/081946

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101967525 A	09.02.2011	None	

A. 主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI; EPODOC; CNKI; CNABS; NCBI; EMBASE; ISI-WEB OF KNOWLEDGE; GOOGLE SCHOLAR; 荧光定量 PCR, PCR 反应液, 缓冲液, 增强剂, 增效剂, 促进剂, DMSO, 二甲基亚砷, 二甲亚砷, BSA, 牛血清白蛋白, 甘油, 甲酰胺, 非离子去污剂, 聚乙二醇, PEG, 亚精胺, 硫酸铵, 甜菜碱, 外切酶、Ex Taq, 热启动, real-time , quantitative, fluorescence, betaine, formamide, glycerol, spermidine, enhancer, additive, adjuvant, PCR, hot start, nonionic detergents, Triton, ammonium sulfate

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Shammas FV等.Improvement of quantitative PCR reproducibility by betaine as determined by fluorescence-based method. BioTechniques. 5 月 2001, 第 30 卷, 第 5 期, 第 950, 952, 954 页 参见全文, 尤其第 950 页、表 1 和图 1	1、4、6-8、12-13
X	Shammas FV等.Fluorescence-based method for measuring and determining the mechanisms of recombination in quantitative PCR. Clin Chim Acta.2 月 2001, 第 304 卷, 第 1-2 期, 第 19-28 页 参见全文, 尤其第 22 页和第 26 页	1、4、6-8、12-13

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

03.2 月 2012 (03.02.2012)

国际检索报告邮寄日期

23.2 月 2012 (23.02.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

田园

电话号码: (86-10) 62411047

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	MF Kramer 等.Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. Current Protocols in Molecular Biology.11 月 2001, 56, 第 15.1.1-15.1.14 节 参见全文	1、4、5、7
X	Ralser M 等.An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochem Biophys Res Commun.9 月 2006, 第 347 卷, 第 3 期, 第 741-751 页 参见 748 页	1、3、4、7、9-10
X	C Y Wan 等.Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA.PCR Methods Appl.12 月 1993, 第 3 卷, 第 3 期, 第 208-210 页 参见全文, 特别是 209 页	1、4、7
X	K H Roux. Optimization and Troubleshooting in PCR. PCR Methods Appl.1995, 第 4 期, 第 S185-S194 页 参见 S185 页, S188 页	1、2、4、7、11
PX	CN101967525 A (重庆医科大学) 09.2 月 2011 (09.02.2011) 参见全文	1、4、7、11

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第 1 页第 1.c 项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☒ 包含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2011/081946

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101967525 A	09.02.2011	无	