



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111406107 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 201880076253.3

吉姆·肖瓦普恩

(22)申请日 2018.09.26

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30)优先权数据

62/563,314 2017.09.26 US

62/609,086 2017.12.21 US

代理人 武晶晶

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.05.26

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

G01N 35/00(2006.01)

G01N 35/08(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/052891 2018.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/067567 EN 2019.04.04

(71)申请人 朱诺诊断学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 迪尔克·万登博姆

马蒂亚斯·埃里克 保罗·厄特

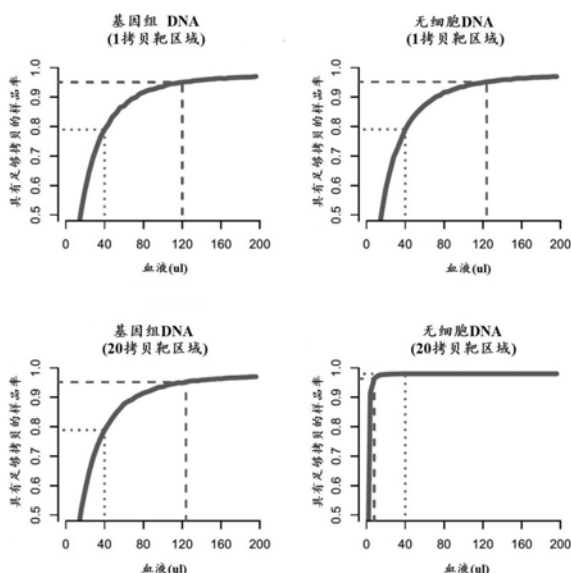
权利要求书3页 说明书89页 附图15页

(54)发明名称

用于生物标志物分析的设备、系统和方法

(57)摘要

本文提供了用于使用少量母体生物样品中的无细胞胎儿核酸预测或确定胎儿性别的设备、系统、试剂盒和方法。设备可以在妊娠早期在需求点处使用,并且与通信设备兼容。



1. 一种设备, 包含:
  - a) 用于从生物流体样品去除细胞以产生细胞去除样品的样品纯化器; 以及
  - b) 检测试剂和信号检测器中的至少一种, 以检测所述细胞去除样品中的多个无细胞DNA片段。
2. 根据权利要求1所述的设备, 其中第一序列存在于所述多个无细胞DNA片段中的第一无细胞DNA片段上, 并且第二序列存在于所述多个无细胞DNA片段中的第二无细胞DNA片段上, 并且其中所述第一序列与所述第二序列至少80%相同。
3. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述设备包含至少一种核酸扩增试剂和单对能够扩增所述第一序列和所述第二序列的引物。
4. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在受试者的基因组中重复至少两次。
5. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述第一序列和所述第二序列的长度各自为至少10个核苷酸。
6. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述第一序列在第一染色体上, 并且所述第二序列在第二染色体上。
7. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述第一序列和所述第二序列在同一染色体上, 但被至少1个核苷酸隔开。
8. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述第一序列和所述第二序列功能连接。
9. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述样品纯化器包括过滤器, 并且其中所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。
10. 根据权利要求9所述的设备, 其中所述过滤器是垂直过滤器。
11. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述样品纯化器包含结合部分, 其选自抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子及其组合。
12. 根据权利要求11所述的设备, 其中所述结合部分能够与细胞外囊泡结合。
13. 根据权利要求2所述的设备, 其中所述至少一种核酸扩增试剂包括等温扩增试剂。
14. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述信号检测器是侧流条。
15. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述设备包含在单个壳体中。
16. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述设备在室温下运行。
17. 根据权利要求1所述的设备, 其中所述设备能够在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述细胞去除样品中的多种生物标志物。
18. 根据权利要求1所述的设备, 包含通信连接。
19. 根据权利要求1所述的设备, 包含经皮穿刺装置。
20. 一种方法, 包括:
  - a) 从受试者获得流体样品, 其中生物样品的体积不大于约120微升;
  - b) 使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触, 所述寡核苷酸引物退火至与感兴趣序列相对应的序列, 以产生扩增产物; 以及
  - c) 检测所述扩增产物的存在或不存在, 其中所述存在或不存在指示所述受试者的健康状态。
21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述流体样品是血液样品。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述流体样品是来自血液的血浆样品。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述血浆样品的体积不大于50 $\mu$ l。
24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述血浆样品的体积为约10 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。
25. 根据权利要求20所述的方法,其中所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。
26. 根据权利要求20所述的方法,其中所述样品含有所述感兴趣序列的约5至约100个拷贝。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述拷贝彼此至少90%相同。
28. 根据权利要求20所述的方法,其中所述感兴趣序列的长度为至少10个核苷酸。
29. 根据权利要求20所述的方法,其中接触包括执行等温扩增。
30. 根据权利要求20所述的方法,其中接触在室温下发生。
31. 根据权利要求20所述的方法,其中所述方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物,并且其中检测所述扩增产物的存在包括检测所述标签。
32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述标签不包含核苷酸。
33. 根据权利要求31所述的方法,其中检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签相互作用的结合部分接触。
34. 根据权利要求33所述的方法,包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。
35. 根据权利要求20所述的方法,其中步骤(a)至(c)在少于十五分钟内执行。
36. 根据权利要求20所述的方法,其中所述方法由所述受试者执行。
37. 根据权利要求20所述的方法,其中所述方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。
38. 根据权利要求20所述的方法,其中使用单个手持式设备执行获得、接触和检测。
39. 根据权利要求20所述的方法,其中所述健康状态选自妊娠的存在或不存在。
40. 根据权利要求20所述的方法,其中所述健康状态选自神经性病症、代谢性病症、癌症、自身免疫性病症、变态反应和感染的存在或不存在。
41. 根据权利要求20所述的方法,其中所述健康状态是对药物或治疗的响应。
42. 一种设备,包含:
  - a) 样品纯化器,其从女性受试者的流体样品去除细胞;
  - b) 至少一种核酸扩增试剂;
  - c) 包含与Y染色体相对应的序列的至少一种寡核苷酸,其中所述至少一种寡核苷酸和核酸扩增试剂能够产生扩增产物;以及
  - d) 用于检测所述扩增产物的检测试剂或信号检测器中的至少一种。
43. 根据权利要求11所述的设备,其中所述寡核苷酸包含与选自DYS14或TTY22的基因相对应的序列。
44. 一种方法,包括:
  - a) 从女性妊娠受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约300微升;
  - b) 使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与性染色体相对应的序列;以及

c) 检测扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述女性妊娠受试者的胎儿的性别。

- 45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述流体样品是血液样品。
- 46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述血液样品的体积不大于120 $\mu$ l。
- 47. 根据权利要求43所述的方法,其中所述流体样品是来自血液的血浆样品。
- 48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述血浆样品的体积不大于50 $\mu$ l。
- 49. 根据权利要求46所述的方法,其中所述血浆样品的体积为约10 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。
- 50. 根据权利要求43-48中任一项所述的方法,其中获得包括执行手指针刺。

## 用于生物标志物分析的设备、系统和方法

### 相关申请

[0001] 本申请要求于2017年9月26日提交的美国临时专利申请号62/563,314和于2017年12月21日提交的美国临时专利申请号62/609,086的优先权。根据35U.S.C. §119要求优先权。以上提到的专利申请通过引用而并入,如同在本文完整阐述。

### 背景技术

[0002] 基因测试是获得关于受试者的DNA和/或该DNA的表达的信息的手段。为获得关于受试者的生物信息,基因测试正在不断发展。该生物信息有许多用途,包括确定个体的健康状况、诊断个体患有感染或疾病、确定适合于个体的治疗方法、解决犯罪问题以及确定亲子关系。目前,基因测试主要由经训练的人员使用昂贵且庞大的设备在诊所和实验室进行,这些设备需要技术训练和专业知识才能使用。从获得来自患者的生物样品的时间开始,通常需要几天至几周来为患者提供基因测试的结果。

[0003] 例如,许多意识到妊娠的人渴望尽快知道孩子的性别(在整个本申请中称为性别)。有一些测试允许从母体血液中的DNA获得性别信息。从母亲获得的血液必须由训练有素的技术人员使用精密的设备进行分析。如果血液在远离进行DNA分析的实验室的位置获得,样品必须及时储存、装运和分析,否则会有样品降解的风险。

### 发明内容

[0004] 本文公开了用于分析生物样品的组分(例如,核酸、蛋白质)的设备、系统、试剂盒和方法,该生物样品包括来自动物(人类或非人类)、环境(例如,水、土壤)、植物、细菌和食物的样品。通常,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法能够通过利用无细胞DNA片段化,从极低体积的样品提供遗传信息。无细胞DNA片段化产生来自重复区域(例如,具有共同序列的区域)和/或沿靶区域的多个检测区域的统计上独立的标志物。举非限制性实例而言,来自重复区域(例如,含有相同或相似序列的多个拷贝的基因组区域)的无细胞DNA片段相对于具有不以多个拷贝存在的序列的DNA片段在样品中以更高的有效浓度存在。有利地,来自重复区域的片段可以用单一引物对扩增或用单个探针检测。然而,多个检测区域不必共享相似的序列。此类片段还可以在小体积中检测,例如,用通用引物对它们进行标记和扩增或者用多个引物对(例如,以多重化形式)扩增。

[0005] 无细胞循环核酸的分析面临许多技术挑战。例如,血液中循环核酸的扩增可以被全血中的一些组分(例如,血红蛋白和相关的铁)抑制。本文公开的所述设备、系统、试剂盒和方法旨在克服许多这些技术挑战。此外,所述设备、系统、试剂盒和方法提供以下优势:(1)微创,(2)适用于很少或没有技术训练的家庭(例如,不需要复杂的设备);以及(3)在病况的早期阶段提供信息(例如,妊娠、感染)。此外,避免为了抽血和集中测试的目的反复进行医生/医院就诊可以改善患者依从性,并允许更频繁的监测,最终以较低的医疗保健系统成本导致改善的健康结果。

[0006] 在一些方面,本文公开了设备,包含用于从生物流体样品去除细胞以产生细胞去

除样品的样品纯化器;以及检测试剂和信号检测器中的至少一种,以检测所述细胞去除样品中的多种生物标志物。在一些情况下,多种生物标志物包含多个无细胞DNA片段。在一些情况下,所述多个无细胞片段中的每一个包含由第一序列或与所述第一序列至少90%同源的所述第二序列表示的区域。在一些情况下,所述第一序列与所述第二序列在物理上足够远,使得所述第一序列存在于所述受试者的第一无细胞核酸上,并且所述第二序列存在于所述受试者的第二无细胞核酸上。在一些情况下,所述设备包含至少一种核酸扩增试剂和单对能够扩增所述第一序列和所述第二序列的引物。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在所述受试者的所述基因组中重复至少两次。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在所述受试者的所述基因组中重复至少三次。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在所述受试者的所述基因组中重复至少四次。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在所述受试者的所述基因组中重复至少五次。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列的长度各自为至少10个核苷酸。在一些情况下,所述第一序列在第一染色体上,并且所述第二序列在第二染色体上。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列在同一染色体上,但被至少1个核苷酸隔开。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列功能连接。在一些情况下,所述第一序列与所述第二序列至少80%相同。在一些情况下,所述样品纯化器包括过滤器。在一些情况下,所述样品纯化器包含芯吸材料或毛细管装置,用于推动所述生物流体通过所述过滤器。在一些情况下,所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。在一些情况下,所述样品纯化器包含结合部分,所述结合部分与所述流体样品中的核酸、蛋白质、细胞表面标志物或微泡表面标志物结合。在一些情况下,所述结合部分包括抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子或其组合。在一些情况下,所述结合部分能够与细胞外囊泡结合,其中所述细胞外囊泡从所述女性受试者的胎儿细胞或胎盘细胞释放。在一些情况下,所述至少一种核酸扩增试剂包括至少一种等温扩增试剂。在一些情况下,所述至少一种等温扩增试剂包含重组酶聚合酶、单链DNA结合蛋白、链置换聚合酶或其组合。在一些情况下,所述信号检测器包含固体支持物。在一些情况下,所述固体支持物是柱。在一些情况下,所述固体支持物包含与所述扩增产物结合的结合部分。在一些情况下,所述结合部分是寡核苷酸。在一些情况下,所述信号检测器是侧流条。在一些情况下,设备包含检测试剂,其中所述检测试剂包含金颗粒或荧光颗粒。在一些情况下,所述样品纯化器从血液去除细胞,并且所述细胞去除样品为血浆。在一些情况下,所述设备包含在单个壳体中。在一些情况下,所述设备在室温下运行。在一些情况下,所述设备能够在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述细胞去除样品中的多种生物标志物。在一些情况下,设备包含运输或储存隔室。在一些情况下,所述运输或储存隔室包含吸收垫或流体容器。在一些情况下,设备包含通信连接。在一些情况下,所述通信连接是无线通信系统、线缆或线缆端口。在一些情况下,设备包含经皮穿刺装置。

[0007] 在一些方面,本文进一步公开了方法,包括从受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约300 $\mu$ L;使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与感兴趣序列相对应的序列;以及检测扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述受试者的健康状态。在一些情况下,所述流体样品是血液样品。在一些情况下,所述血液样品的体积不大于120 $\mu$ L。在一些情况下,所述流

体样品是来自血液的血浆样品。在一些情况下,所述血浆样品的体积不大于50 $\mu$ l。在一些情况下,所述血浆样品的体积为约5 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。在一些情况下,所述血浆样品的体积为约10 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。在一些情况下,获得包括执行手指针刺。在一些情况下,方法包括挤取刺破的手指以增加来自手指针刺的血液。在一些情况下,获得所述血液样品不包括执行静脉切开术。在一些情况下,所述流体样品是尿液样品。在一些情况下,所述流体样品包括泪腺分泌物(泪液)。在一些情况下,所述流体样品包括组织液。在一些情况下,所述流体样品包括唾液。在一些情况下,方法包括从所述流体样品去除细胞、细胞片段和微粒中的至少一种。在一些情况下,所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。在一些情况下,所述样品包含具有长度为约20个碱基对至约160个碱基对的长度的无细胞DNA片段。在一些情况下,所述样品包含具有长度为约20个碱基对至约250个碱基对的长度的无细胞DNA片段。在一些情况下,所述样品含有感兴趣序列的约5至约100个拷贝。在一些情况下,所述感兴趣序列的长度为至少10个核苷酸。在一些情况下,所述拷贝至少90%相同。在一些情况下,扩增包括等温扩增。在一些情况下,扩增在室温下发生。在一些情况下,所述方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物中,并且其中检测所述至少一种扩增产物包括检测所述标签。在一些情况下,所述标签不包含核苷酸。在一些情况下,检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签相互作用的结合部分接触。在一些情况下,方法包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。在一些情况下,方法在少于15分钟内执行。在一些情况下,方法在少于30分钟内执行。在一些情况下,方法在少于60分钟内执行。在一些情况下,方法由所述受试者执行。在一些情况下,方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。在一些情况下,方法包括用单个手持式设备获得、接触和检测。在一些情况下,所述受试者通过将其皮肤压靠手持式设备的经皮穿刺装置来执行所述获得。在一些情况下,所述受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过一次。在一些情况下,所述受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过两次。在一些情况下,所述健康状态选自妊娠的存在或不存在。在一些情况下,所述健康状态是存在神经性病症。在一些情况下,所述健康状态是不存在神经性病症。在一些情况下,所述健康状态是存在代谢性病症。在一些情况下,所述健康状态是不存在代谢性病症。在一些情况下,所述健康状态是存在癌症。在一些情况下,所述健康状态是不存在癌症。在一些情况下,所述健康状态是存在自身免疫性病症。在一些情况下,所述健康状态是不存在自身免疫性病症。在一些情况下,所述健康状态是存在变态反应。在一些情况下,所述健康状态是不存在变态反应。在一些情况下,所述健康状态是存在感染。在一些情况下,所述健康状态是不存在感染。在一些情况下,所述健康状态是存在遗传性或表观遗传性疾病。在一些情况下,所述健康状态是不存在遗传性或表观遗传性疾病。在一些情况下,所述健康状态是对药物或治疗的响应。

[0008] 举非限制性实例而言,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于确定胎儿的性别。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法允许在家庭私密地进行性别确定,而不需要实验室设备并且没有样品交换的风险。这些设备、系统、试剂盒和方法通常分析无细胞胎儿DNA和/或无细胞胎儿RNA。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可以在妊娠早期有利地确定所述胎儿的性别,因为它们需要很少的胎儿核酸材料。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可以从非常小体积的样品提供性别状态,因为所述设备、系统、试剂盒和方法能够检测Y染色体的片段,其包含基因或可以独特鉴别生物样品中所述Y染色体的存在或不存在的任

何可扩增区域,通常在所述Y染色体上以多个拷贝存在。在大多数情况下,这些片段的有效浓度高于不以多个拷贝存在的那些基因片段。

[0009] 在一些方面,本文公开了设备,包含:样品纯化器,其从女性受试者的流体样品去除细胞;至少一种核酸扩增试剂;包含与Y染色体相对应的序列的至少一种寡核苷酸,其中所述至少一种寡核苷酸和核酸扩增试剂能够产生扩增产物;以及用于检测所述扩增产物的检测试剂或信号检测器中的至少一种。在一些情况下,所述流体样品是血液。在一些情况下,所述样品纯化器包括过滤器。在一些情况下,所述样品纯化器包含芯吸材料或毛细管装置,用于推动所述生物流体通过所述过滤器。在一些情况下,所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。在一些情况下,所述样品纯化器包含结合部分,所述结合部分与所述生物样品中的核酸、蛋白质、细胞表面标志物或微泡表面标志物结合。在一些情况下,所述结合部分包括抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子或其组合。在一些情况下,所述结合部分能够与细胞外囊泡结合,其中所述细胞外囊泡从所述女性受试者的胎儿细胞或胎盘细胞释放。在一些情况下,所述结合部分与人绒毛膜促性腺激素蛋白或人绒毛膜促性腺激素编码基因的转录物结合。在一些情况下,所述至少一种寡核苷酸包含与Y染色体序列杂交的引物。在一些情况下,所述至少一种寡核苷酸包含与Y染色体序列杂交的探针,并且其中所述探针包含寡核苷酸标签。在一些情况下,所述寡核苷酸标签对Y染色体序列不具有特异性。在一些情况下,所述设备包含至少一种引物,所述引物与所述寡核苷酸标签杂交,并且在所述扩增试剂的存在下产生扩增产物。在一些情况下,所述至少一种核酸扩增试剂包括至少一种等温扩增试剂。在一些情况下,所述至少一种等温扩增试剂包含重组酶聚合酶、单链DNA结合蛋白、链置换聚合酶或其组合。在一些情况下,所述信号检测器包含固体支持物。在一些情况下,所述固体支持物是珠子。在一些情况下,所述固体支持物包含与所述扩增产物结合的结合部分。在一些情况下,所述结合部分是寡核苷酸。在一些情况下,所述信号检测器是侧流条。在一些情况下,所述检测试剂包含金颗粒。在一些情况下,所述检测试剂包含荧光颗粒。在一些情况下,所述设备包含在单个壳体中。在一些情况下,所述设备在室温下运行。在一些情况下,所述设备在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述扩增产物。在一些情况下,所述设备包含运输或储存隔室。在一些情况下,所述运输或储存隔室包含吸收垫或流体容器。在一些情况下,所述设备包含通信连接。在一些情况下,所述通信连接是无线通信系统、线缆或线缆端口。在一些情况下,所述设备包含经皮穿刺装置。

[0010] 在一些方面,本文公开了试剂盒,包含本文公开的设备 and 经皮穿刺装置。在一些情况下,所述经皮穿刺装置是刺血针。在一些情况下,所述设备包含用于从经皮穿刺抽取血液的毛细管。在一些情况下,所述试剂盒包含用于加热或冷却所述设备的其组件的容器、小袋、电线或线缆。

[0011] 在一些方面,本文公开了方法,包括:从女性妊娠受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约300 $\mu$ L;使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与性染色体相对应的序列;以及检测扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述女性妊娠受试者的胎儿的性别。在一些情况下,所述流体样品是血液样品。在一些情况下,获得包括执行手指针刺。在一些情况下,获得包括挤取刺破的手指以增加来自手指针刺的血液。在一些情况下,获得所述血液样品不



包括执行静脉切开术。在一些情况下,所述流体样品是尿液样品。在一些情况下,所述流体样品是唾液样品。在一些情况下,方法包括从所述流体样品去除细胞、细胞片段和微粒中的至少一种。在一些情况下,所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。在一些情况下,所述无细胞核酸包括无细胞胎儿DNA片段。在一些情况下,所述无细胞胎儿DNA片段的长度为约20个碱基对至约160个碱基对。在一些情况下,与所述性染色体相对应的所述序列是以至少两个拷贝存在于所述Y染色体上的Y染色体序列。在一些情况下,Y染色体序列是存在于DYS14基因或TTY22基因中的序列。在一些情况下,所述样品不含所述无细胞核酸的多于约100个拷贝。在一些情况下,所述样品含有所述无细胞核酸的约5至约100个拷贝。在一些情况下,所述女性妊娠受试者为不超过8周妊娠。在一些情况下,扩增包括等温扩增。在一些情况下,扩增在室温下发生。在一些情况下,扩增包括使所述循环无细胞核酸与重组酶聚合酶接触。在一些情况下,方法包括用寡核苷酸标签标记所述无细胞核酸。在一些情况下,扩增包括使所述无细胞核酸与至少一种寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物具有与所述寡核苷酸标签相对应的序列。在一些情况下,所述寡核苷酸引物包含封闭基团,所述封闭基团防止所述寡核苷酸引物的延伸,直至提供扩增条件和扩增试剂中的至少一种。在一些情况下,方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物中,并且其中检测所述至少一种扩增产物包括检测所述标签。在一些情况下,检测所述扩增产物包括检测扩增的寡核苷酸标签。在一些情况下,所述标签包含核苷酸。在一些情况下,所述标签不包含核苷酸。在一些情况下,检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签或寡核苷酸标签相互作用的结合部分接触。在一些情况下,方法包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。在一些情况下,步骤(a)至(c)在少于十五分钟内执行。在一些情况下,所述方法由所述受试者执行。在一些情况下,方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。在一些情况下,所述体积不大于120 $\mu$ L。

[0012] 在一些方面,本文公开了方法,包括用手持式设备从女性妊娠受试者获得流体样品,其中所述流体样品的体积不大于约300 $\mu$ L;用所述手持式设备对所述流体样品中的至少一种无细胞核酸测序;通过所述手持式设备中的显示器检测与Y染色体相对应的序列的存在或不存在,从而确定所述女性妊娠受试者体内的胎儿的性别;以及用所述手持式设备将所述性别传递至另一受试者。在一些情况下,检测和传递同时发生。在一些情况下,所述体积不大于120 $\mu$ L。在一些情况下,获得不包括静脉切开术。在一些情况下,所述女性妊娠受试者通过将其皮肤压靠所述手持式设备的经皮穿刺装置来执行所述获得。在一些情况下,所述女性妊娠受试者将手指压靠所述经皮穿刺装置。在一些情况下,所述女性妊娠受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过一次。在一些情况下,所述女性妊娠受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过两次。

[0013] 在一些方面,本文公开了设备,其包含用于从生物流体样品去除细胞以产生细胞去除样品的样品纯化器;以及检测试剂和信号检测器中的至少一种,以检测所述细胞去除样品中的多个无细胞DNA片段。在一些情况下,第一序列存在于所述多个无细胞DNA片段中的第一无细胞DNA片段上,并且第二序列存在于所述多个无细胞DNA片段中的第二无细胞DNA片段上,并且其中所述第一序列与所述第二序列至少80%相同。在一些情况下,所述设备包含至少一种核酸扩增试剂和单对能够扩增所述第一序列和所述第二序列的引物。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在受试者的基因组中重复至少两

次。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列的长度各自为至少10个核苷酸。在一些情况下,所述第一序列在第一染色体上,并且所述第二序列在第二染色体上。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列在同一染色体上,但被至少1个核苷酸隔开。在一些情况下,所述第一序列和所述第二序列功能连接。在一些情况下,所述样品纯化器包括过滤器,并且其中所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。在一些情况下,所述过滤器是垂直过滤器。在一些情况下,所述样品纯化器包含结合部分,其选自抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子及其组合。在一些情况下,所述结合部分能够与细胞外囊泡结合。在一些情况下,所述至少一种核酸扩增试剂包括等温扩增试剂。在一些情况下,所述信号检测器是侧流条。在一些情况下,所述设备包含在单个壳体中。在一些情况下,所述设备在室温下运行。在一些情况下,所述设备能够在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述细胞去除样品中的多种生物标志物。在一些情况下,所述设备包含通信连接。在一些情况下,所述设备包含经皮穿刺装置。

[0014] 在一些方面,本文进一步公开了方法,包括从受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约120微升;使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与感兴趣序列相对应的序列,以产生扩增产物;以及检测所述扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述受试者的健康状态。在一些情况下,所述流体样品是血液样品。在一些情况下,所述流体样品是来自血液的血浆样品。在一些情况下,所述血浆样品的所述体积不大于50 $\mu$ l。在一些情况下,所述血浆样品的所述体积为约10 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。在一些情况下,所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。在一些情况下,所述样品含有所述感兴趣序列的约5至约100个拷贝。在一些情况下,所述拷贝彼此至少90%相同。在一些情况下,所述感兴趣序列的长度为至少10个核苷酸。在一些情况下,接触包括执行等温扩增。在一些情况下,接触在室温下发生。在一些情况下,所述方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物,并且其中检测所述扩增产物的存在包括检测所述标签。在一些情况下,所述标签不包含核苷酸。在一些情况下,检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签相互作用的结合部分接触。在一些情况下,方法包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。在一些情况下,步骤(a)至(c)在少于十五分钟内执行。在一些情况下,所述方法由所述受试者执行。在一些情况下,所述方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。在一些情况下,使用单个手持式设备执行获得、接触和检测。在一些情况下,所述健康状态选自妊娠的存在或不存在。在一些情况下,所述健康状态选自神经性病症、代谢性病症、癌症、自身免疫性病症、变态反应和感染的存在或不存在。在一些情况下,所述健康状态是对药物或治疗的响应。

#### 援引并入

[0015] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每一个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

#### 附图说明

[0016] 本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的新颖特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用到本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的特征和优

点的更好的理解,在这些附图中:

[0017] 图1示出了以(未片段化的)基因组DNA和无细胞DNA的形式对单个靶序列和多拷贝靶序列的成功扩增和检测。

[0018] 图2示出了使用本文公开的设备、系统和试剂盒的方法的示例性工作流程。

[0019] 图3示出了使用80 $\mu$ l全血施加于本文公开的设备而从Y染色体的DNA扩增。

[0020] 图4示出了通过在聚丙烯酰胺凝胶上的重组酶聚合酶扩增所扩增的Y染色体DNA。具体的引物序列和扩增子序列列于表3和表4中。预期的大小、扩增子和引物如下:泳道1:LMW梯,泳道2:NTC TwistDx,泳道3:PosCon TwistDx (143bp);泳道4:SRY 6-NTC,引物未示出;泳道5:SRY 6-男性 (370bp),引物未示出;泳道6:DYS14-Amp10 (134bp),引物DYS14\_1\_F\_Long和DYS14\_5\_R\_Long;泳道7:DYS14-Amp 11 (148bp),引物DYS14\_5\_F\_Long和DYS14\_4\_R\_Long;泳道8:TTY22-Amp 10 (118bp),引物TTY22\_1\_F\_Long和TTY22\_2\_R\_Long;泳道9:TTY22-Amp 11 (121bp),引物TTY22\_7\_F\_Long和TTY22\_6\_R\_Long;泳道10:TTY22-Amp 12 (123bp),引物TTY22\_6\_F-Long和TTY22\_4\_R\_Long;泳道11:SRY-Amp 10 (178bp),引物未示出;泳道12:SRY-Amp 11 (213bp),引物未示出;泳道13:SRY-Amp12 (161bp),引物未示出;泳道14:LMW梯。

[0021] 图5示出了来自重组酶聚合酶扩增的DYS14 Y-染色体扩增产物的实时检测。

[0022] 图6示出来自重组酶聚合酶扩增的DYS14 Y染色体扩增产物与女性对照样品的实时检测。

[0023] 图7示出Y-染色体DYS14重组酶聚合酶扩增产物的侧流检测。

[0024] 图8示出了可以如何使用移动设备以显示、解释和/或共享从本文公开的设备和方法获得的结果的实例。图8A示出了可以与本文公开的设备、系统和试剂盒连接使用的移动应用程序的功能的概述。图8B示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面提供逐步流程 (walkthrough) 以指导用户使用本文公开的设备、系统和试剂盒。图8C示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面提供主屏幕,允许用户访问本文公开的移动应用程序功能。图8D示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面提供进度图,告知用户过程的状态,从而连接至本文公开的设备、系统或试剂盒以接收信息。图8E示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面向用户提供性别测试报告。图8F示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面提供社交共享屏幕,允许用户访问特征以共享性别测试结果。图8G示出了用于移动应用程序的图形用户界面的非限制性实例;在这种情况下,界面提供主屏幕,允许用户访问其他特性,如妊娠日志和重要的妊娠相关事件的时间线。

[0025] 图9示出了针对Y染色体上的TSPY1 (DYS14) 基因座生成的RPA产物的琼脂糖凝胶。

[0026] 图10示出了具有人TSPY1 (DYS14) Y染色体RPA-LF产物的核酸侧流免疫测定条。

[0027] 图11示出,用来自男性人类的样品生成来自高度重复的Y染色体区域 (HRYR) 的扩增子。

[0028] 图12示出,用来自女性人类的样品未生成来自高度重复的Y染色体区域 (HRYR) 的扩增子。

[0029] 图13示出了使用Vivid™膜与标准离心方法从少于50微升 ( $\mu$ l) 的男性全血分离的

血浆之间的比较。

[0030] 图14示出了使用20 $\mu$ l人血浆作为输入以从男性和女性受试者进行提取的基于珠子和基于柱的纯化的产率。

[0031] 图15A-图15C示出了本文公开的示例性设备。图15A示出了示例性设备的侧视图。图15B示出了示例性设备的俯视图。图15C示出了示例性设备的前视图。

#### 某些术语

[0032] 提供以下描述以帮助理解本文公开的方法、系统和试剂盒。本文使用的以下术语描述并非旨在限制这些术语的定义。这些术语在整个本申请中被进一步描述和例示。

[0033] 通常,术语“无细胞多核苷酸”和“无细胞核酸”在本文可互换使用,是指可以在不从细胞提取多核苷酸或核酸的情况下从样品分离的多核苷酸或核酸。无细胞核酸是不包含在细胞膜内的核酸,即它未被包封在细胞区室内。在一些实施方案中,无细胞核酸是不受细胞膜限制并且在血液或其他流体中循环或存在的核酸。在一些实施方案中,无细胞核酸在收集含有它的生物样品之前和/或之后是无细胞的,并且不由于人为、有意或其他方式的样品操作,包括在收集样品时或之后的操作,而从细胞释放。在一些情况下,无细胞核酸在细胞中产生,并通过生理手段从细胞释放,该生理手段包括例如,凋亡和非凋亡性细胞死亡、坏死、自噬、自发释放(例如,DNA/RNA-脂蛋白复合物的自发释放)、分泌和/或有丝分裂崩溃。在一些实施方案中,无细胞核酸包括通过生物机制(例如,凋亡、细胞分泌、囊泡释放)从细胞释放的核酸。在进一步或附加的实施方案中,无细胞核酸不是通过对细胞或样品处理的人为操作(例如,细胞膜破坏、裂解、涡旋、剪切等)从细胞提取的核酸。

[0034] 在一些情况下,无细胞核酸是无细胞胎儿核酸。通常,如本文所用的术语“无细胞胎儿核酸”是指如本文所述的无细胞核酸,其中所述无细胞核酸来自包含胎儿DNA的细胞。通常,由于在妊娠受试者的妊娠期间胎盘组织定期脱落,因此在母体生物样品中发现很大一部分无细胞胎儿核酸。通常,胎盘组织脱落物中的许多细胞都是含有胎儿DNA的细胞。因此,在一些情况下,无细胞胎儿核酸是从胎盘细胞释放的核酸。

[0035] 在一些情况下,通过本文公开的设备和方法有意或无意地从细胞释放细胞核酸(细胞所含的核酸)。然而,这些不被认为是“无细胞核酸”,如该术语在本文所用的。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法提供了用于分析生物样品中的无细胞核酸,并且在该过程中同样分析细胞核酸。

[0036] 如本文所用,术语“细胞核酸”是指细胞中含有的多核苷酸。细胞核酸可以被描述为由于生物样品的操作而可以从细胞释放的核酸。生物样品的操作的非限制性实例包括离心、涡旋、剪切、混合、裂解,以及向生物样品添加在获得时不存在于生物样品中的试剂(例如,洗涤剂、缓冲液、盐、酶)。细胞核酸可以被描述为可由于裂解条件(例如,剪切、裂解缓冲液)而从细胞释放的核酸。细胞核酸可以被描述为可由于使生物样品与裂解试剂接触而从细胞释放的核酸。示例性的裂解试剂在本文公开。在一些情况下,细胞核酸是由于机械、人或机器人对细胞的破坏或裂解而从细胞释放的核酸。

[0037] 如本文所用,术语“生物标志物”通常是指受试者的生物学或状况的任何标志物。生物标志物可以是疾病或状况的指示物或结果。生物标志物可以是健康的指示物。生物标志物可以是遗传异常或遗传病况的指示物。生物标志物可以是循环生物标志物(例如,在生物流体如血液中发现)。生物标志物可以是组织生物标志物(例如,在实体器官如肝脏或骨

髓中发现)。生物标志物的非限制性实例包括核酸、表观遗传修饰、蛋白质、肽、抗体、抗体片段、脂质、脂肪酸、甾醇、多糖、碳水化合物、病毒颗粒、微生物颗粒。在一些情况下,生物标志物甚至可以包括全细胞或细胞片段。

[0038] 如本文所用,术语“遗传信息”通常是指一个或多个核酸序列。在一些情况下,遗传信息可以是单个核苷酸或氨基酸。例如,遗传信息可以是单核苷酸多态性的存在(或不存在)。除非另有说明,否则术语“遗传信息”也可以指表观遗传修饰模式、基因表达数据和蛋白质表达数据。在一些情况下,生物标志物的存在、不存在或数量提供遗传信息。例如,胆固醇水平可以指示高胆固醇血症的遗传形式。因此,遗传信息不应限于核酸序列。

[0039] 如本文所用,术语“基因组当量”通常是指为了保证所有基因都将存在而在纯化样品中必须存在的DNA量。

[0040] 如本文所用,术语“临床”、“临床环境”、“实验室”或“实验室环境”是指医院、诊所、药房、研究机构、病理实验室、或者其他在该处聘请经训练的人员以处理和/或分析生物和/或环境样品的商业环境。这些术语与照护点(point of care)、远程位置、家庭、学校以及其他非商业、非机构的环境形成对比。

[0041] 如本文所用,关于数字的术语“约”指示包括该数字加上或减去该数字的10%的范围。关于数值范围的术语“约”是指该范围减去其最低值的10%和加上其最大值的10%。

[0042] 如本文所用,术语“具有特异性”是指仅在该序列或生物标志物具有特异性的事物之中、之上或之处发现的序列或生物标志物。例如,如果序列对Y染色体具有特异性,这意味着其仅在Y染色体上发现,而不在另一条染色体上发现。

[0043] 如说明书和权利要求书中所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。例如,术语“样品”包括多个样品,包括其混合物。

[0044] 如本文所用,术语“同源物”、“同源的”、“同源性”或“同源性百分比”描述了第一氨基酸序列或核酸序列相对于第二氨基酸序列或核酸序列的序列相似性。在一些情况下,可以使用Karlin和Altschul (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268,1990,如在Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877,1993中修改)描述的公式确定同源性。这样的公式被并入Altschul等人的基本局部比对搜索工具(BLAST)程序中(J.Mol.Biol.215:403-410,1990)。序列的同源性百分比可以使用截至本申请的提交日期最新版本的BLAST确定。在一些情况下,当两个或更多个序列在比较窗口或指定区域比较或比对最大对应时,如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的,如果它们共享至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%的同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性,则它们可以是同源的。在一些情况下,如果两个或更多个序列共享至多20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%的同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性,则它们可以是同源的。优选地,%同一性或同源性存在于长度为至少10个氨基酸或核苷酸的区域上。在一些情况下,%同一性或同源性存在于长度为约25至约100个氨基酸或核苷酸的区域上。在一些情况下,%同一性或同源性存在于长度为约50至约100个氨基酸或核苷酸的区域上。在一些情况下,%同一性或同源性存在于长度为约100至约1000个氨基酸或核苷酸的区域上。在一些情况下,两个或更多个序列可以是同源的,并且在序列中的至少100个氨基酸上共享至少20%的同一性。在一

些情况下,两个或更多个序列可以是同源的,并且在序列中的至少100个氨基酸上共享至少50%的同一性。为了进行序列比较,通常一个序列用作参考序列,测试序列可以与之进行比较。当使用序列比较算法时,可以将测试序列和参考序列输入计算机,必要时可以指定后续坐标,并可以指定序列算法程序参数。可以使用任何合适的算法,包括但不限于Smith-Waterman比对算法、维特比 (Viterbi)、贝叶斯 (Bayesians)、隐马尔可夫 (Hidden Markov) 等。可以使用默认程序参数,也可以指定替代参数。然后,基于程序参数,可以使用序列比较算法计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。可以使用任何合适的算法,由此计算同一性百分比。例如,一些程序将同一性百分比计算为相同残基的比对位置的数目除以比对位置的总数目。如本文所用,“比较窗口”包括对可在10至600个位置的范围内的连续或非连续位置的数目中的任一个的区段的引用。在一些情况下,比较窗口可以包含至少10、20、50、100、200、300、400、500或600个位置。在一些情况下,比较窗口可以包含至多10、20、50、100、200、300、400、500或600个位置。在一些情况下,比较窗口可以包括至少50至200个位置,或者至少100至至少150个位置,其中在两个序列最佳比对之后,可以将序列与相同数目的连续或非连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的搜索相似性方法,通过这些算法的计算机实现 (Wisconsin遗传软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis) 或者通过手动比对和目视检查 (参见例如, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编著, 1995补编)) 来进行。在一些情况下,比较窗口可以包含总比对的任何子集,或者是一级序列中的连续位置、在三级空间中相邻但在一级序列中不连续的位置,或者是比对中1个至所有残基的任何其他子集。

[0045] 在整个申请中,叙述了短语“与染色体相对应的核酸”和“与染色体相对应的序列”,例如,“与Y染色体相对应的核酸”和“与Y染色体相对应的序列”。如本文所用,这些短语旨在表达,“与染色体相对应的核酸”由与该染色体中发现的序列相同或同源的核酸序列表示。术语“同源的”在前述描述中描述。

[0046] 在整个申请中,叙述了染色体位置。这些位置编号参考基因组版本 (Genome Build) hg38 (UCSC) 和GRCh38 (NCBI)。基因组版本在本领域也可以称为参考基因组或参考组件。其可以衍生自多个受试者。应当理解,存在多个可用的参考组件,并且随着时间的推移可以产生更多的参考组件。然而,本领域技术人员将能够确定在另一基因组版本或参考基因组中本文提供的相对位置。

## 具体实施方式

[0047] 基因测试传统上是在实验室或临床环境中进行的。然而,在基因测试可能有用的许多情况下,进入实验室或诊所无法进行或不切实际。因此,期望在需求点 (point of need) (例如,远离实验室和诊所的位置) 处可操作的基因测试。用于在需求点 (例如,家庭、学校、农场) 处执行的基因测试优选是成本有效的,并且对于未经训练的人员的操作而言是简单的。在需求点处的基因测试优选只需要少量的生物样品。传统上,基因测试需要静脉抽

血(静脉切开术)以获得含有足够DNA的血液毫升数以进行分析。然而,静脉切开术在需求点处是不切实际的。理想地,基因测试仅需要通过提取毛细血管血液,例如通过手指针刺而获取的血量。这意味着需要设计用于基因测试的需求点设备和方法,以在样品输入较低且打算进行检测的靶分子丰度较低时发挥作用。

[0048] 为了例示使用家用或需求点设备分析毛细血管血液中循环核酸的规模挑战,可以针对确定胎儿性别的目的使用无细胞DNA分析。传统上,这通过抽取八毫升血液的静脉血来完成。从八毫升的抽血可以获得至多四毫升的血浆。来自手指针刺的毛细血管血液的量(约20 $\mu$ l)为抽血的约1/400。平均而言,在四毫升血浆中表现出以循环无细胞DNA的形式存在四千个基因组当量(或基因组拷贝)。相应地,手指针刺量将仅含有约十个基因组当量(或拷贝)。在妊娠女性中,平均10%的循环无细胞DNA来源于胎儿。因此,静脉血液样品将具有平均四百个胎儿基因组拷贝,并且手指针刺样品将仅具有平均1个胎儿基因组拷贝。从这些计算明显看出,针对单个基因组区域的任何测定的测定性能(例如,灵敏度)将受到统计采样的限制。例如,试图使用仅出现一次且为单个靶区域的基因组区域(例如,使用SRY基因)从手指针刺量的血液检测妊娠女性体内的胎儿性别将需要至少120 $\mu$ l毛细血管血液,以在所有测试样品的95%中表现出靶区域的至少1个拷贝。

[0049] 除了适应样品的低输入之外,还期望具有能够分析循环无细胞核酸(DNA和RNA)的基因测试,例如,循环无细胞胎儿DNA、循环肿瘤DNA、来自移植的供体器官的循环DNA以及作为健康相关问题、疾病进展或治疗响应的一部分从特定组织释放的循环DNA。然而,由于循环无细胞核酸较短的半衰期和随之而来的较低丰度,因此对循环无细胞核酸的分析具有挑战性。此外,如果没有注意样品而避免白细胞裂解,白细胞释放的DNA可能稀释血液中的循环无细胞核酸。白细胞DNA在检测循环无细胞核酸的过程中产生背景噪音,这降低了测定的灵敏度和特异性。

[0050] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法通过将小样品体积(例如,小于1ml)的温和且有效的处理与独特的靶区域选择和测定设计相结合来克服这些挑战,该测定设计利用了循环无细胞DNA(cfDNA)的高度片段化性质。例如,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可从单次手指针刺提供可靠的遗传信息。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法提供了沿靶基因的多个靶区域的分析,该靶区域间隔足够远以使得当靶基因在循环中片段化时,靶区域可能在物理上分离。因此,尽管对于在基因测试中传统分析的单个长DNA片段存在上述统计采样的限制,但对于cfDNA片段,采样统计的变化是有利的。尽管在毛细血管血液样品中可以仅存在总计1个基因组当量,但有许多单独的cfDNA片段。因此,如果分析单独的无细胞片段上的多个靶区域,就可以从低输入量实现灵敏扩增。

[0051] 图1示出了检测或扩增基因组DNA与循环无细胞DNA时检测多个靶区域的成功率。如果仅扩增单个拷贝区域或靶序列,则需要相对较高量的血液以确保至少95%的样品具有1个拷贝(这是需要有任何扩增或检测机会的最低限度)。如果扩增靶序列的多拷贝区域或多个拷贝(例如,20个拷贝),但它们以长DNA分子如基因组DNA的形式存在于样品中,则仍需要相对较高量的血液来检测靶序列的至少1个拷贝。相反,来自相对较低量样品的无细胞DNA中靶区域的扩增和检测的成功率显著提高。举非限制性实例而言,相对较低的量将是来自手指针刺的血流量,而相对较高的量将是来自静脉切开术的血流量。

[0052] 作为实例,如果沿基因组区域存在二十个靶区域,并且它们间隔开足够远,使得它



们在DNA片段化时可以被独立地分析和检测,则在所有样品的95%中至少有1个靶区域所需的输入体积从140 $\mu$ l (基因组DNA) 变为少于25 $\mu$ l (cfDNA),显著提高了灵敏度。在一些情况下,靶区域含有相同序列或相似序列。这些靶区域可以被称为拷贝。其非限制性实例是Y染色体上的TTTSY区域,其具有约20个同源物。这是高度重复区域的实例,在本文进一步描述。有利地,可以用相同的引物对扩增所有二十个区域。含有靶区域的片段的浓度比未片段化的Y染色体或未重复的Y染色体的片段高20倍。因此,来自TTTSY区域的信号将比从未片段化的Y染色体或Y染色体的未重复区域得到的信号多二十倍。另一种看待方式是,在低体积的样品中存在靶区域的一个拷贝的可能性比未重复或与另一区域不共享一些可检测的共性的非靶区域大二十倍。

[0053] 在其他情况下,靶区域可以不共享相似的序列,但共享另一特性如相似的表观遗传状态。例如,多个靶区域可以具有不同的序列,然而它们都被过度甲基化。无论表观遗传修饰的具体类型如何,表观遗传修饰的位点都被适当间隔,以利用循环无细胞DNA的片段化模式,该片段化模式产生许多循环cfDNA片段,其中至少一个片段可以在小体积中被检测到。举非限制性实例而言,可以用亚硫酸氢盐测序检测选择的靶区域,该靶区域彼此足够远以位于分开的cfDNA片段上,并且在受试者患有癌症时全部被过度甲基化。在小样品体积(例如,手指针刺血液)中,存在所有这些片段(等同于未片段化的DNA)的可能性较低,然而存在至少一个片段的可能性较高,并且可以检测到癌症。

[0054] 在其他情况下,靶区域可以不含相似的序列,并且可以不含相似的表观遗传状态。在这种情况下,检测可能需要多个引物组或文库制备,然后用通用引物扩增以检测几个不同的靶区域。举非限制性实例而言,通过使用多组引物检测无细胞胎儿DNA片段中RHD基因的多个不同外显子可以实现从手指针刺量的血液检测RHD阴性妊娠女性体内的胎儿RHD基因。通过使用二十组引物,可以实现与在上述TTTSY区域的实例中使用二十个重复序列实现的相同的灵敏度。通过选择扩增在RHD基因中物理上较远因此可能存在于不同的无细胞DNA片段上的区域的引物可以提高灵敏度。检测RHD阴性妊娠女性中的胎儿RHD基因对防止母亲对孩子血液具有抗体而导致的新生儿溶血性疾病很重要。目前,RHD测试现今由全血抽取(八毫升血液)进行,以实现适当的可靠结果。该体积被认为是实现可靠结果所必需的,因为其基于整个RHD基因将存在于样品中的可能性。基于该假设,在手指针刺量的血液中获取完整的RHD基因的可能性很低,并且将容易导致假阴性结果。

[0055] 无论如何选择靶区域,当对无细胞片段化DNA执行扩增或检测时,这些区域作为单独的生物标志物存在于样品中。含有靶区域的片段的浓度大于相应的未片段化DNA或无法作为组被测定的片段的浓度。因此,相比于从未片段化DNA或从测定靶区域的一个拷贝获得的信号,将会有更多来自靶区域的信号。相比于未重复或与另一区域不共享一些共性的非靶区域,更有可能在低体积样品中检测到存在靶区域。通过测定多个DNA片段中的多个靶区域,测定灵敏度相对于传统测试得以提高。

[0056] 血液是无细胞核酸的可靠来源。大多数用于分析来自血液的无细胞核酸的方法涉及分离含有无细胞核酸的血浆或血清组分。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法允许在需求点处温和处理血液样品。这可以避免、防止或减少白细胞裂解。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法允许在需求点处快速处理血液样品。这避免了可能导致血细胞裂解的样品的延长的储存和装运。在一些情况下,本文公开的设备执行集成分离,例如,通过过滤立即分离



血浆,以避免、减少或防止细胞裂解。当试剂(例如,探针、引物、抗体)或检测方法不提供太多特异性时,可能期望立即将细胞与cfDNA分离。在一些情况下,用全血执行方法以避免任何白细胞裂解。当可以实现相对较高的特异性时,从全血进行分析可能更为理想。

[0057] 除了仅需要较小体积的样品之外,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法出于至少以下原因是高度期望的。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法通常只需要很少或不需要技术训练。因此,相对于由经训练的人员执行的测试成本,执行基因测试的成本降低,并且该测试可用于无法接触经训练的人员的受试者。此外,可以在几分钟(例如,小于一小时)内获得结果。这在测试感染时可能尤其重要。可以快速隔离和治疗对感染测试呈阳性的个体或动物,以防止感染扩散。此外,可以私下获得结果。在一些情况下,只有接受检测的患者才能获知所获得的遗传信息。本文公开的设备、系统和试剂盒通常是轻量级的和手持式的,使它们适合并可用于远程位置。因此,它们可以在家里、学校、战场上、农场上或任何其他不实际或不方便访问实验室或临床环境的地点使用。此外,由于样品可以在照护点处进行分析,因此不需要存储或装运样品,降低了样品降解和错误识别(例如,样品交换)的风险。

[0058] 在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法是期望的,因为遗传信息可以对用户保密。实际上,即使设备的使用也可以保密。备选地,设备、系统、试剂盒和方法被配置为与其他人共享信息,或者可以被用户容易地调整以共享信息(例如,打开蓝牙信号)。例如,信息可以容易地与护士或医生共享。在一些情况下,设备或系统可以通过安全门户或应用编程接口(API)向办公室或医院处的医疗从业者或工作人员发送/共享测试结果。在一些情况下,用户可以选择在接收结果后亲自与医疗从业者共享信息。在一些情况下,信息甚至可以实时共享。例如,性别确定可以经由设备、系统和试剂盒的通信组件与家人和朋友实时共享。这种通信对于例如因军事任务、就业义务、移民政策或健康问题而分离的夫妇或家庭而言是期望的。在上文提供的性别确定的实例中,妊娠女性在自己家中的隐私下可以能够与她在海外的丈夫进行视频会议(例如,Skype、Face Time),以同时确定其孩子的性别。

[0059] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法有许多应用。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法允许诊断和监测医疗状况。医疗状况的非限制性实例包括自身免疫性病况、代谢性病况、癌症和神经性病况。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法允许个性化用药,包括微生物组测试、确定适当的个人医疗剂量以及/或者检测对药物或其剂量的反应。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法还允许检测食物过敏原和检测食物/水污染。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法提供对病原体的感染和/或受试者对可用于治疗感染的药物的耐药性的检测。在几乎所有情况下,需要很少或不需要技术训练或者大型、昂贵的实验室仪器。

#### I. 设备、系统和试剂盒

[0060] 在一些方面,本文公开了用于获得遗传信息的设备、系统和试剂盒。如本文所述,本文公开的设备、系统和试剂盒允许用户在选择的位置收集和测试样品,以确定样品中靶分析物的存在和/或数量。样品可以是来自受试者的样品,诸如生物流体(例如,血液、尿液)。样品可以是环境样品(例如,废水、土壤、食物/饮料)。

[0061] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含从受试者的生物流体样品去除至少一种生物组分的样品纯化器;至少一种核酸扩增试剂;包含对应于感兴趣区域的序列的至少一种寡核苷酸,其中所述至少一种寡核苷酸和核酸扩增试剂能够产生扩增产物;以及用于检测扩增产物的检测试剂或信号检测器中的至少一种。在一些情况下,所述至少

一种生物组分是细胞、细胞片段、微粒、外来体、核小体、蛋白质或其组合。举非限制性实例而言,所述受试者可以是妊娠受试者,并且所述感兴趣区域可以是Y染色体上的区域。举非限制性实例而言,感兴趣区域可以是牵涉癌症、自身免疫性病况、神经性病况、代谢性病况、心血管疾病、免疫力(例如,感染易感性或耐药性)和药物代谢的基因。牵涉疾病、病症或病况的基因被认为是这样一种基因,当其突变、缺失、复制、被表观遗传修饰、表达不足或过表达时,改变该疾病、病症或病况的症状、结果、持续时间或发作中的至少一种。

[0062] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含从受试者的生物流体样品去除细胞的样品纯化器;至少一种核酸扩增试剂;包含对应于感兴趣区域的序列的至少一种寡核苷酸,其中所述至少一种寡核苷酸和核酸扩增试剂能够产生扩增产物;以及用于检测扩增产物的检测试剂或信号检测器中的至少一种。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含小型化数字核酸扩增平台。举非限制性实例而言,小型化核酸扩增平台可以位于本文公开的设备内的芯片上,从而将整个设备或系统保持在手持大小(例如,类似于手机)。在一些情况下,小型化核酸扩增平台并入或伴随数字输出,以便于显示测试结果。

[0063] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含从受试者的生物样品去除细胞的样品纯化器;用于从生物样品中的核酸获得测序读取的核酸测序仪;以及用于检测测序读取的检测试剂或信号检测器中的至少一种。核酸测序仪的非限制性实例包括下一代测序机器、纳米孔测序仪、单分子计数器(例如,计数标有条形码/标记的序列)。

[0064] 通常,本文公开的设备、系统和试剂盒整合了多种功能,例如,靶分析物(包括其扩增产物)的纯化、扩增、检测和测定及其组合。在一些情况下,多种功能在单个测定组装件单元或单个设备中执行。在一些情况下,所有功能都发生在单个单元或设备之外。在一些情况下,至少一种功能发生在单个单元或设备之外。在一些情况下,仅一种功能发生在单个单元或设备之外。在一些情况下,样品纯化器、核酸扩增试剂、寡核苷酸和检测试剂或组件被容纳在单个设备中。通常,本文公开的设备、系统和试剂盒包含显示器,与显示器的连接或与显示器的通信,用于将关于生物样品的信息转接给一个或多个人。

[0065] 在一些情况下,设备、系统和试剂盒包含本文公开的附加组件。附加组件的非限制性实例包括样品运输隔室、样品储存隔室、样品和/或试剂接受器、温度指示器、电子端口、通信连接、通信设备、样品收集设备和壳体单元。在一些情况下,附加组件与设备集成。在一些情况下,附加组件不与设备集成。在一些情况下,附加组件与样品纯化器、核酸扩增试剂、寡核苷酸以及检测试剂或组件被容纳在单个设备中。在一些情况下,附加组件不被容纳在单个设备中。

[0066] 在一些情况下,设备、系统和试剂盒包含用于接收生物样品的接受器。接受器可以被配置为容纳1 $\mu$ l至1ml的生物样品。接受器可以被配置为容纳1 $\mu$ l至500 $\mu$ l的生物样品。接受器可以被配置为容纳1 $\mu$ l至200 $\mu$ l的生物样品。接受器可以具有与用于由其余设备/系统组件进行处理的样品的合适体积相同的限定体积。这将排除对设备、系统或试剂盒的用户测量出样品的指定体积的需要。用户将仅需要填充接受器,由此确保适当体积的样品被递送至设备/系统。在一些情况下,设备、系统和试剂盒不包含用于接收生物样品的接受器。在一些情况下,样品纯化器直接接收生物样品。与上述对接受器的描述相似,样品纯化器可具有适于由其余设备/系统组件进行处理的限定体积。

[0067] 通常,本文公开的设备、系统和试剂盒旨在完全在照护点使用。然而,在一些情况

下,用户可能希望将经分析的样品保存或送至另一个位置(例如,实验室、诊所)以对在照护点获得的结果进行附加的分析或确认。在一些情况下,出于这些目的,设备、系统和试剂盒包含运输隔室或储存隔室。运输隔室或储存隔室可以能够含有生物样品、其组分或其部分。运输隔室或储存隔室在运送到远离直接用户的地点期间可以能够含有生物样品、其部分或其组分。当直接用户在家时,远离直接用户的地点的非限制性实例可以是实验室或诊所。在一些情况下,家庭没有机器或另外的设备来对生物样品执行另外的分析。运输隔室或储存隔室可以能够含有在设备中发生的反应或过程的产物。在一些情况下,反应或过程的产物是核酸扩增产物或逆转录产物。在一些情况下,反应或过程的产物是与本文所述的结合部分结合的生物样品组分。生物样品组分可以包括核酸、细胞片段、细胞外囊泡、蛋白质、肽、甾醇、脂质、维生素或葡萄糖,其任一种都可以在用户的远程位置处进行分析。在一些情况下,运输隔室或储存隔室包含吸收垫、纸、玻璃容器、塑料容器、聚合物基质、液体溶液、凝胶、防腐剂或其组合。在一些情况下,该设备、系统或试剂盒包含在储存和/或运输过程中降低酶活性的稳定剂(化学物质或结构(例如,基质))。

[0068] 通常,本文公开的设备 and 系统对于单个人而言是便携式的。在一些情况下,设备和系统是手持式的。在一些情况下,设备和系统具有最大长度、最大宽度或最大高度。在一些情况下,设备和系统被容纳在具有最大长度、最大宽度或最大高度的单个单元中。在一些情况下,最大长度不大于12英寸。在一些情况下,最大长度不大于10英寸。在一些情况下,最大长度不大于8英寸。在一些情况下,最大长度不大于6英寸。在一些情况下,最大宽度不大于12英寸。在一些情况下,最大宽度不大于10英寸。在一些情况下,最大宽度不大于8英寸。在一些情况下,最大宽度不大于6英寸。在一些情况下,最大宽度不大于4英寸。在一些情况下,最大高度不大于12英寸。在一些情况下,最大高度不大于10英寸。在一些情况下,最大高度不大于8英寸。在一些情况下,最大高度不大于6英寸。在一些情况下,最大高度不大于4英寸。在一些情况下,最大高度不大于2英寸。在一些情况下,最大高度不大于1英寸。

#### 样品收集

[0069] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含样品收集器。在一些情况下,样品收集器与设备、系统或试剂盒的其余部分分别提供。在一些情况下,样品收集器与设备、系统或试剂盒或其组件物理集成。在一些情况下,样品收集器与本文所述的接受器集成。在一些情况下,样品收集器可以是用于施加生物流体的杯、管、毛细管或孔。本文及全文中描述了生物流体。在一些情况下,样品收集器可以是用于施加尿液的杯。在一些情况下,样品收集器可以包含用于将杯中的尿液施加到设备、系统或试剂盒的移液管。在一些情况下,样品收集器可以是与本文公开的设备集成的用于施加血液的毛细管。在一些情况下,样品收集器可以是与本文公开的设备集成的用于施加唾液的管、孔、垫或纸。在一些情况下,样品收集器可以是用于施加汗液的垫或纸。

[0070] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含经皮穿刺装置。经皮穿刺装置的非限制性实例是针和刺血针。在一些情况下,样品收集器包含经皮穿刺装置。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含微针、微针阵列或微针贴片。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含中空微针。举非限制性实例而言,经皮穿刺装置与孔或毛细管集成,使得当受试者刺穿其手指时,血液被释放到孔或毛细管中,在该孔或毛细管中血液将可用于系统或设备以分析其组分。在一些情况下,经皮穿刺装置是在凹表面中具有针或刺

血针的按钮设备。在一些情况下,针是微针。在一些情况下,经皮穿刺装置包含微针阵列。通过按压凹表面的非针侧上的致动器、按钮或位置,针以比刺血针更受控的方式刺穿受试者的皮肤。此外,按钮设备可以包含真空源或柱塞,以帮助从穿刺部位抽血。

[0071] 在一些情况下,本文公开的设备包含经皮穿刺装置,其中该设备稳定血液。含有稳定血液的设备或其部分(例如,储存/装运室、过滤垫或纸)可以送至实验室以供附加处理和分析。在一些情况下,本文公开的设备包含经皮穿刺装置,其中该设备包含将血浆与红细胞分离的样品纯化器。含有血浆的设备或其部分可以被送至实验室以供附加处理和分析。

#### 样品纯化

[0072] 本文公开了包含样品纯化器的设备、系统和试剂盒,以去除生物样品的不需要的物质或非靶标组分,从而修饰样品。根据生物样品的来源,不需要的物质可以包括但不限于蛋白质(例如,抗体、激素、酶、血清白蛋白、脂蛋白)、游离氨基酸和其他代谢物、微泡、核酸、脂质、电解质、尿素、尿胆素、药物、粘液、细菌和其他微生物及其组合。在一些情况下,样品纯化器分离本文公开的生物样品的组分。在一些情况下,本文公开的样品纯化器去除将会抑制、干扰或以其他方式对诸如核酸扩增或检测等后续处理步骤有害的样品组分。在一些情况下,所得的修饰样品针对靶分析物进行富集。这可以被认为是靶分析物的间接富集。备选地或附加地,可以直接捕获靶分析物,这被认为是靶分析物的直接富集。

[0073] 在一些情况下,样品纯化器包含分离材料,用于从生物样品去除患者细胞以外的不需要的物质。有用的分离材料可以包括与物质结合或缔合的特定结合部分。结合可以是共价的或非共价的。可以使用本领域已知的用于去除特定物质的任何合适的结合部分。例如,通常使用抗体及其片段从样品去除蛋白质。在一些情况下,本文公开的样品纯化器包含结合部分,该结合部分与生物样品中的核酸、蛋白质、细胞表面标志物或微泡表面标志物结合。在一些情况下,结合部分包含抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子或其组合。

[0074] 在一些情况下,本文公开的样品纯化器包含过滤器。在一些情况下,本文公开的样品纯化器包含膜。通常,过滤器或膜能够从本文公开的生物样品分离或去除细胞、细胞颗粒、细胞片段、除无细胞核酸之外的血液组分或其组合。

[0075] 在一些情况下,样品纯化器在开始分子扩增反应之前促进血浆与血液样品的细胞组分的分离。血浆分离可以通过几种不同的方法实现,诸如离心、沉降或过滤。在一些情况下,本文公开的样品纯化器包含过滤器。在一些情况下,样品纯化器采用垂直过滤。垂直过滤是由毛细管力驱动过的过滤,用于将血浆从血液分离。在一些情况下,样品纯化器包含用于接收全血的过滤基质,该过滤基质具有阻止细胞通过的孔径,而血浆可以不受抑制地通过该过滤基质。在一些情况下,过滤基质将过滤器顶部处的大孔径与过滤器底部处的小孔径相结合,导致对细胞非常温和的处理,防止过滤过程中的细胞降解或裂解。这是有利的,因为细胞降解或裂解将导致核酸从血细胞或母体细胞释放,这将污染靶无细胞核酸。这样的过滤器的非限制性实例包括Pall Vivid™ GR膜、Munktell Ahlstrom滤纸(参见例如, W02017017314),TeraPore Technologies过滤器。

[0076] 在一些情况下,样品纯化器包含适当的分离材料,例如过滤器或膜,其从生物样品去除不需要的物质而不去除无细胞核酸。在一些情况下,分离材料基于大小分离生物样品中的物质,例如,分离材料具有排除细胞但可渗透无细胞核酸的孔径。因此,当生物样品是

血液时,血浆和/或血清可以比血细胞更快地移动通过样品纯化器中的分离材料,并且含有任何无细胞核酸的血浆或血清渗透到分离材料的孔中。在一些情况下,生物样品是血液,并且在分离材料中减慢和/或捕获的细胞是红细胞、白细胞或血小板。在一些情况下,细胞来自与体内的生物样品接触的组织,包括但不限于膀胱或尿道上皮细胞(在尿液中)或口腔细胞(在唾液)。在一些情况下,细胞是细菌或其他微生物。

[0077] 在一些情况下,样品纯化器能够减慢和/或捕获细胞而不损伤细胞,从而避免释放包括细胞核酸和其他蛋白质或细胞片段在内的细胞内容物,这些内容物可能会干扰无细胞核酸的后续评估。这可以例如通过孔径沿侧流条的路径逐渐、渐进的减小或其他合适的测定形式来实现,以允许细胞移动温和地减慢,从而使对细胞的力最小化。在一些情况下,当在分离材料中捕获时,生物样品中至少95%、至少98%、至少99%或100%的细胞保持完整。除大小分离之外或独立于大小分离,分离材料可以基于除大小以外的细胞性质捕获或分离不需要的物质,例如,分离材料可以包含与细胞表面标志物结合的结合部分。在一些情况下,结合部分是抗体或抗原结合抗体片段。在一些情况下,结合部分是针对血细胞或微泡上受体的配体或受体结合蛋白。

[0078] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒采用垂直过滤,垂直过滤由毛细管力驱动以从样品中分离组分或级分(例如,从血液分离血浆)。举非限制性实例而言,垂直过滤可以包括重力辅助的血浆分离。高效超疏水性血浆分离器在例如Liu等人,A High Efficiency Superhydrophobic Plasma Separation,Lab Chip 2015中描述。

[0079] 样品纯化器可以包含侧向过滤器(例如,样品不沿重力方向移动或样品垂直于重力方向移动)。样品纯化器可以包含垂直过滤器(例如,样品在重力方向上移动)。样品纯化器可以包含垂直过滤器和侧向过滤器。样品纯化器可被配置为通过垂直过滤器,随后通过侧向过滤器来接收样品或其部分。样品纯化器可被配置为通过侧向过滤器,随后通过垂直过滤器来接收样品或其部分。在一些情况下,垂直过滤器包含过滤基质。在一些情况下,垂直过滤器的过滤基质包含孔,该孔具有阻止细胞通过的孔径,而血浆可以不受抑制地通过该过滤基质。在一些情况下,过滤基质包含特别适合于该应用的膜,因为其将过滤器顶部处的大孔径与过滤器底部处的小孔径相结合,这导致对细胞非常温和的处理,防止过滤过程中的细胞降解。

[0080] 在一些情况下,本文公开的设备包含分离材料,该分离材料通过样品纯化器、过滤器和/或膜来移动、抽取、推动或拉动生物样品。在一些情况下,该材料是芯吸材料。在样品纯化器中用于去除细胞的适当分离材料的实例包括但不限于聚偏二氟乙烯、聚四氟乙烯、乙酸纤维素、硝化纤维素、聚碳酸酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚乙烯、聚丙烯、玻璃纤维、硼硅酸盐、氯乙烯、银。合适的分离材料的特征可以在于防止细胞通过。在一些情况下,分离材料可以防止红细胞通过。在一些情况下,分离材料是疏水过滤器,例如玻璃纤维过滤器、复合材料过滤器,例如Cytosep(例如,Ahlstrom Filtration,或Pall Specialty Materials, Port Washington, NY),或亲水过滤器,例如纤维素(例如,Pall Specialty Materials)。在一些情况下,可以使用可商购的试剂盒(例如,Arrayit®血卡血清分离试剂盒,Cat. ABCS, Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA)根据本文公开的方法设备、系统和试剂盒将全血分为红细胞、白细胞和血清组分,以供进一步处理。

[0081] 在一些情况下,样品纯化器包含以至少一种孔径为特征的至少一个过滤器或至少

一个膜。在一些情况下,样品纯化器包含多个过滤器和/或膜,其中至少第一过滤器或膜的孔径不同于第二过滤器或膜的孔径。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约10微米。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约8微米。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约6微米。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约4微米。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约2微米。在一些情况下,至少一个过滤器/膜的至少一种孔径为约0.05微米至约1微米。

[0082] 温和的样品纯化器,如包含过滤基质、垂直过滤器、芯吸材料或带有不允许细胞通过的孔的膜的那些纯化器,特别适用于分析无细胞核酸。例如,母体血液中无细胞胎儿核酸的产前应用面临着额外挑战,即在存在无细胞母体核酸的情况下分析无细胞胎儿核酸,后者对前者产生较大的背景信号。举非限制性实例而言,当在不因样品收集方法引起细胞裂解或其他细胞破坏的情况下获得样品时,母体血液样品可含有每毫升全血约500至750个基因组当量的总无细胞DNA(母体和胎儿)。从妊娠女性采样的血液中的胎儿部分可以为约10%,约每毫升50至75个基因组当量。获得无细胞核酸的过程通常涉及从血液获得血浆。如果不仔细操作,母体白细胞可能被破坏,向样品中释放额外的细胞核酸,对胎儿无细胞核酸产生大量背景噪音。典型的白细胞计数为每毫升血液约 $4 \times 10^6$ 至 $10 \times 10^6$ 个细胞,并且因此可用的核DNA比总无细胞DNA(cfDNA)大约4,000至10,000倍。因此,即使仅一小部分母体白细胞被破坏,向血浆中释放核DNA,胎儿部分也会大幅降低。例如,0.01%的白细胞降解可以将胎儿部分从10%降低至约5%。本文公开的设备、系统和试剂盒旨在减少这些背景信号。

[0083] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于产生修饰的样品的结合部分,所述修饰的样品去除了不需要或不感兴趣的细胞、细胞片段、核酸或蛋白质。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于减少生物样品中不需要或不感兴趣的细胞、细胞片段、核酸或蛋白质的结合部分。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于产生修饰的样品的结合部分,所述修饰的样品富集了靶细胞、靶细胞片段、靶核酸或靶蛋白。

[0084] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够结合核酸、蛋白质、肽、细胞表面标志物或微泡表面标志物的结合部分。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于捕获生物样品中的细胞外囊泡或细胞外微粒的结合部分。在一些情况下,细胞外囊泡含有DNA和RNA中的至少一种。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于分析细胞外囊泡中含有的DNA或RNA的试剂或组件。在一些情况下,结合部分包含抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、蛋白质、肽、小分子或其组合。

[0085] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够与细胞释放的细胞外囊泡相互作用或捕获该细胞外囊泡的结合部分。在一些情况下,该细胞是胎儿细胞。在一些情况下,该细胞是胎盘细胞。胎儿细胞或胎盘细胞可以在女性妊娠受试者的生物流体(例如,血液)中循环。在一些情况下,细胞外囊泡从器官、腺体或组织释放。举非限制性实例而言,器官、腺体或组织可以是患病的、衰老的、感染的或生长的。器官、腺体和组织的非限制性实例是大脑、肝脏、心脏、肾脏、结肠、胰腺、肌肉、脂肪、甲状腺、前列腺、乳腺组织和骨髓。

[0086] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够捕获和丢弃来自母体样品的细胞外囊泡或细胞外微粒,以富集胎儿/胎盘核酸样品。在一些情况下,细胞外囊泡起源于

胎儿/胎盘。在一些情况下,细胞外囊泡起源于胎儿细胞。在一些情况下,细胞外囊泡由胎儿细胞释放。在一些情况下,细胞外囊泡由胎盘细胞释放。胎盘细胞可以是滋养层细胞。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于捕获胎盘培养的血小板的细胞结合部分,其可以含有胎儿DNA或RNA片段。这些可以用抗体或其他方法(低速离心)捕获/富集。在这样的情况下,可以如本文所述分析胎儿DNA或RNA片段以确定或指示染色体信息(例如,性别)。备选地或附加地,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于捕获来自母体细胞的生物样品中的细胞外囊泡或细胞外微粒的结合部分。

[0087] 在一些情况下,结合部分附接至固体支持物,其中在结合部分已经与生物样品接触后,可以将固体支持物与其余的生物样品分离,或者可以将生物样品与固体支持物分离。固体支持物的非限制性实例包括珠子、纳米颗粒、磁性颗粒、芯片、微芯片、纤维条、聚合物条、膜、基质、柱、板或其组合。

[0088] 本文公开的设备、系统和试剂盒可以包含细胞裂解试剂。细胞裂解试剂的非限制性实例包括洗涤剂如NP-40,十二烷基硫酸钠,以及包含铵、氯化物或钾的盐溶液。本文公开的设备、系统和试剂盒可以具有细胞裂解组分。细胞裂解组分可以是结构的或机械的,并且能够裂解细胞。举非限制性实例而言,细胞裂解组分可以剪切细胞以释放细胞内组分,如核酸。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒不包含细胞裂解试剂。本文公开的一些设备、系统和试剂盒旨在分析无细胞核酸。

#### 核酸扩增

[0089] 通常,本文公开的设备、系统和试剂盒能够扩增核酸。在一些情况下,核酸包括DNA。DNA可以是基因组的。DNA可以是线粒体的。在一些情况下,核酸包括RNA。在一些情况下,核酸包括无细胞DNA。在一些情况下,核酸包括无细胞基因组DNA。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含逆转录酶,以从本文公开的生物样品中的RNA产生互补DNA(cDNA),其中该cDNA可以与本文所述的基因组DNA类似地扩增和/或分析。RNA可以包括循环无细胞RNA。该核酸可以是无细胞的胎儿核酸。

[0090] 在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法包含至少一种核酸扩增试剂或其用途。核酸扩增试剂的非限制性实例是聚合酶、引物、核酸扩增缓冲液和游离核苷酸。

[0091] 传统的聚合酶链反应需要热循环。这将是可能的,但对于没有热循环仪机器的典型家庭用户而言不方便。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够在不改变设备或系统或其组件的温度的情况下扩增核酸。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够等温扩增核酸。等温扩增的非限制性实例如下:环介导等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、切口酶扩增反应(NEAR)和重组酶聚合酶扩增(RPA)。因此,本文公开的设备、系统和试剂盒可以包含执行等温扩增所必需的试剂。等温扩增试剂的非限制性实例包括重组酶聚合酶、单链DNA结合蛋白和链置换聚合酶。通常,使用重组酶聚合酶扩增(RPA)的等温扩增采用三种核心酶,即重组酶、单链DNA结合蛋白和链置换聚合酶,以(1)将寡核苷酸引物与DNA中的同源序列配对,(2)稳定置换的DNA链以防止引物置换,以及(3)使用链置换DNA聚合酶延伸寡核苷酸引物。使用配对的寡核苷酸引物,可通过在室温下(最佳在37°C下)温育而发生指数DNA扩增。

[0092] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够在单一温度下扩增核酸。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒可以有利地在室温下操作。在一些情况下,本文



公开的设备、系统和试剂盒能够在约20℃至约65℃的温度下等温扩增核酸。在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒能够在约23℃至约27℃下等温扩增核酸。在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒能够在不超过两个温度下扩增核酸。在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒能够在不超过三个温度下扩增核酸。在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要起始加热设备、系统或试剂盒的一种试剂或组件。

[0093] 在一些情况下，本文公开的设备、系统、试剂盒和方法包含带有脱碱基位点的杂交探针、荧光团和猝灭剂，以监测扩增。可以包含内切核酸酶或外切核酸酶如内切核酸酶IV或外切核酸酶III以切割脱碱基位点并释放猝灭剂，以允许荧光激发。在一些情况下，通过将捕获分子（例如，生物素）附接至扩增引物之一上并用5'-抗原分子（例如，荧光素衍生物FAM）标记杂交引物进行捕获以允许检测，从而通过侧流检测或监测扩增产物。这样，在一些情况下，本文公开的设备、系统、试剂盒和方法提供了在侧流装置上的核酸和扩增产物的检测。本文描述了侧流装置。

[0094] 在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够扩增基因组中的第一序列和基因组中的第二序列的至少一种核酸扩增试剂和至少一种寡核苷酸引物，其中所述第一序列和所述第二序列相似，并且其中所述第一序列与所述第二序列在物理上足够远，使得第一序列存在于受试者的第一无细胞核酸上，并且第二序列存在于受试者的第二无细胞核酸上。在一些情况下，所述至少两个序列紧邻。在一些情况下，所述至少两个序列被至少一个核苷酸隔开。在一些情况下，所述至少两个序列被至少两个核苷酸隔开。在一些情况下，所述至少两个序列被至少约5个、至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约30个、至少约40个、至少约50个或至少约100个核苷酸隔开。在一些情况下，所述至少两个序列至少约50%相同。在一些情况下，所述至少两个序列至少约60%相同、至少约60%相同、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%相同。在一些情况下，第一序列和第二序列的长度各自为至少10个核苷酸。在一些情况下，第一序列和第二序列的长度各自为至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约30个、至少约50个或至少约100个核苷酸。在一些情况下，第一序列和第二序列在同一染色体上。在一些情况下，第一序列在第一染色体上，并且第二序列在第二染色体上。在一些情况下，第一序列和第二序列功能连接。例如，基因A0X1的启动子区域中的所有CpG位点在前列腺癌中均显示相同的过度甲基化，因此这些位点功能连接，因为它们在功能上携带相同的信息但位于间隔一个或多个核苷酸。

[0095] 在一些情况下，本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针或寡核苷酸引物中的至少一种，其中所述无细胞核酸包含对应于感兴趣区域或其部分的序列。在一些情况下，感兴趣区域是Y染色体的区域。在一些情况下，感兴趣区域是X染色体的区域。在一些情况下，感兴趣区域是常染色体的区域。在一些情况下，感兴趣区域或其部分包含如本文所述的重复序列，其在基因组中存在多于一次。

[0096] 在一些情况下，本文公开的感兴趣区域的长度为约10个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下，感兴趣区域的长度为至少10个核苷酸。在一些情况下，感兴趣区域的长度为至少100个核苷酸。在一些情况下，该区域的长度为至少1000个核苷酸。在一些情况下，感兴趣区域的长度为约10个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下，感兴趣区域的长度为约10个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下，感兴趣区域的长度为约



100个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约100个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约100个核苷酸至约300,000个碱基对。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约1000个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约1000个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约1000个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约10,000个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约10,000个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约10,000个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下,感兴趣区域的长度为约300,000个核苷酸。

[0097] 在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约5个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约8个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约10个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约15个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约20个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约50个核苷酸。在一些情况下,对应于感兴趣区域的序列的长度为至少约100个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约5个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约500个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约400个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约300个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约50个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约50个核苷酸至约500个核苷酸。

[0098] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于本文公开的感兴趣子区域的序列。在一些情况下,该子区域由在感兴趣区域中存在多于一次的序列表示。在一些情况下,该子区域的长度为约10至约1000个核苷酸。在一些情况下,该子区域的长度为约50至约500个核苷酸。在一些情况下,该子区域的长度为约50至约250个核苷酸。在一些情况下,该子区域的长度为约50至约150个核苷酸。在一些情况下,该子区域的长度为约100个核苷酸。

[0099] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含至少一种寡核苷酸引物,其中所述寡核苷酸引物具有与Y染色体序列互补或相对应的序列。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含寡核苷酸引物对,其中所述寡核苷酸引物对具有与Y染色体序列互补或相对应的序列。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含至少一种寡核苷酸引物,其中所述寡核苷酸引物包含与Y染色体序列互补或相对应的序列。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含寡核苷酸引物对,其中所述寡核苷酸引物对包含与Y染色体序列互补或相对应的序列。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含至少一种寡核苷酸引物,其中所述寡核苷酸引物由与Y染色体序列互补或相对应的序列组成。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含寡核苷酸引物对,其中所述寡核苷酸引物对由与Y染色体序列互补或相对应的序列组成。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少75%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少80%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少85%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对

应的序列与野生型人Y染色体序列至少80%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少90%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少95%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列至少97%相同。在一些情况下,与Y染色体序列互补或相对应的序列与野生型人Y染色体序列100%相同。

[0100] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体区域或其部分的序列,其中其部分具有给定的长度。在一些情况下,其部分的长度为约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约100个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约1000个核苷酸至约10,000个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约10,000个核苷酸至约100,000个核苷酸。

[0101] 在一些情况下,感兴趣区域是Y染色体区域或其部分,其包含在Y染色体上存在多于一次的序列。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20500000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置20500000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置20250000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20250000与位置20500000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20500000与位置20750000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20750000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20080000与位置20400000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20082000与位置20351000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间。

[0102] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体子区域的序列。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,对应是至少99%相同。在一些情况下,对应是至少98%相同。在一些情况下,对应是至少95%相同。在一些情况下,对应是至少90%相同。

[0103] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0104] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的

寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20349236与终止位置20349318之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0105] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350231与终止位置20350323之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0106] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20350601与终止位置20350699之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0107] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000

个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0108] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体子区域的序列,其中所述序列选自表1中所示的SEQ ID NO.:1-5。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少60%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少65%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少70%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少75%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少80%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少85%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少90%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少95%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少98%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5的序列至少99%相同。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:1-5的至少10个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:1-5的至少15个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:1-5的至少20个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:1-5的至少25个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:1-5的至少50个连续核苷酸。

表1.Y染色体子区域的序列

<b>SEQ ID NO. 1</b>	TTACAGCAGTTAAAGGTGTTATGTCCAGAGTTTGTCTGCAGAT GTGTCCAGAGTTTCTTCCTTCTGGCAGGTTTCATGGTCTTTCTCACT TCAAGAATGA
<b>SEQ ID NO. 2</b>	TTCTGGCAGGTTTCATGGTCTTGCTCACTTCAAGAATGAAGCTGCA GACTTTTGTGGTGAGTGTTACAGCAGTTAAAGTTGTTATGTC
<b>SEQ ID NO. 3</b>	TCTTCCTTCTGGCAGGTTTCATGGTCTTGCTCACTTCACTAATGAAG GTGCAGACCTTACTGGTGAGTGTTACAGCACTTAAAGGTGTTATG TCC
<b>SEQ ID NO. 4</b>	AGTTTCTTCCTTCTGGCAGGTTTCATGGTCTTGTTCACTTCAAGAAT GAAGCTGCAGACCTTAGTGGTGAGTGTTACAGCACTTAAAGGTG TTATGTCCAGAGTT
<b>SEQ ID NO. 5</b>	TAACACCTTTAAGTGCTGTAACACTCACCCTAAATTCTGCAGCT TCACTCTTGAAGTGAGCAAGACCATGAACCTGCCAGAAGGAAGA AACTCTGAACACATCTG

[0109] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体子区域的序列,其中所述序列选自表3中所示的SEQ ID NO.:30-34。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少60%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少65%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少70%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少75%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少80%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少85%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少90%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少95%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少98%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:30-34的序列至少99%相同。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:30-34的至少10个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:30-34的至少15个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:30-34的至少20个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:30-34的至少25个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:30-34的至少50个连续核苷酸。实施例3描述了分析具有选自SEQ ID NO.:30-34的序列的Y染色体子区域的测定的结果。

[0110] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含chrY:56672250与chrY:56772489之间的序列(根据基因组版本38)。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含chrY:56673250与chrY:56771489之间的序列。(根据基因组构建38)。实施例4显示了使用扩增此类序列的引物对(表5中所示)的结果。该引物对可以选自自由选自以下的两个序列表示的引物:SEQ ID NO.:37和38、39和40、41和42、43和44、45和46、47和48、49和50、51和52、53和54、55和56、57和58、59和60、61和62、63和64、65和66、67和68、69和70、71和72、73和74、75和76、77和78、79和80、81和82、83和84、85和86、87和88、89和90、91和92、93和94、95和96、97和98、99和100、101和102、103和104、105和106、107和108、109和110、

111和112、113和114、115和116、117和118、119和120、121和122、123和124、125和126、127和128、129和130、131和132、133和134、135和136、137和138以及139和140。在一些情况下,该引物对由与表5中的有义引物至少80%相同和与表5中的反义引物至少90%相同的序列表示。在一些情况下,该引物对由与表5中的有义引物至少90%相同和与表5中的反义引物至少90%相同的序列表示。

[0111] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含能够退火至无细胞核酸链的寡核苷酸探针和寡核苷酸引物中的至少一种,其中所述无细胞核酸包含对应于Y染色体子区域的序列,其中所述序列选自表5中所示的SEQ ID NO.:141-192。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少60%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少65%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少70%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少75%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少80%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少85%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少90%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少95%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少98%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:141-192的序列至少99%相同。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:141-192的至少10个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:141-192的至少15个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:141-192的至少20个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:141-192的至少25个连续核苷酸。在一些情况下,该序列包含SEQ ID NO.:141-192的至少50个连续核苷酸。实施例4描述了分析具有选自SEQ ID NO.:141-192的序列的Y染色体子区域的测定的结果。

#### 核酸测序

[0112] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含核酸测序仪。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒被配置用于扩增核酸并对所得扩增核酸进行测序。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒被配置用于对核酸进行测序而不扩增核酸。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含核酸测序仪,但不包含核酸扩增试剂或核酸扩增组件。在一些情况下,核酸测序仪包含信号检测器,其检测反映成功扩增或不成功扩增的信号。在一些情况下,核酸测序仪是信号检测器。在一些情况下,信号检测器包含核酸测序仪。

[0113] 在一些情况下,核酸测序仪与分析来自核酸测序仪的测序读取的电子设备具有通信连接。在一些情况下,通信连接是硬连线的。在一些情况下,通信连接是无线的。例如,如本文公开的那些手机应用程序或计算机软件可以接收测序读取,并且基于测序读取显示或报告关于样品的遗传信息(例如,疾病/感染的存在、对药物的响应、胎儿的性别)。

[0114] 在一些情况下,核酸测序仪包括纳米孔测序仪。在一些情况下,纳米孔测序仪包含纳米孔。在一些情况下,纳米孔测序仪包含膜和溶液,所述溶液产生跨膜的电流并驱动带电分子(例如,核酸)移动通过纳米孔。在一些情况下,纳米孔测序仪包含跨膜蛋白、其部分或其修饰。在一些情况下,跨膜蛋白是细菌蛋白。在一些情况下,跨膜蛋白不是细菌蛋白。在一些情况下,纳米孔是合成的。在一些情况下,纳米孔执行固态纳米孔测序。在一些情况下,纳

米孔测序仪被描述为口袋大小的、便携式的或大致为手机大小的。在一些情况下,纳米孔测序仪被配置用于对RNA和DNA中的至少一种进行测序。纳米孔测序设备的非限制性实例包括Oxford Nanopore Technologies MinION和SmidgION纳米孔测序USB设备。这两种设备都足够小,可以手持。纳米孔测序设备和组件在Howorka (Nat Nanotechnol. 2017年7月6日;12(7):619-630)和Garrido-Cardenas等人 (Sensors (Basel). 2017年3月14日;17(3))的综述中进一步描述,两者均通过引用并入本文。纳米孔测序设备的其他非限制性实例由Electronic Biosciences、Two Pore Guys、Stratos和Agilent (最初来自Genia的技术)提供。

[0115] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含亚硫酸氢盐测序所必需的试剂和组件以检测表观遗传修饰。例如,具有许多甲基化标志物的长区域可以被片段化。此处,每个携带甲基化标志物的片段可以是独立的信号。来自所有片段的信号的组合足以获得有用的遗传信息。

#### 捕获与检测

[0116] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于检测生物样品中的核酸的捕获组件、信号检测器和检测试剂中的至少一种。在一些情况下,捕获组件和信号检测器是集成的。在一些情况下,捕获组件包含固体支持物。在一些情况下,固体支持物包括珠子、芯片、条、膜、基质、柱、板或其组合。在一些情况下,捕获组件包含本文公开的结合部分。

[0117] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含针对具有感兴趣序列的核酸的至少一种探针。在一些情况下,感兴趣序列对Y染色体具有特异性。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含针对在母体DNA中不存在的父体遗传序列的至少一种探针。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含针对父体遗传的单核苷酸多态性的至少一种探针。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含针对染色体或其片段的表观遗传修饰区域的至少一种探针。在一些情况下,染色体的表观遗传修饰区域的表观遗传修饰指示性别或性别的标志物。在一些情况下,染色体是Y染色体。在一些情况下,染色体是X染色体。在一些情况下,染色体是常染色体。在一些情况下,探针包括肽、抗体、抗原结合抗体片段、核酸或小分子。

[0118] 在一些情况下,捕获组件包含本文所述的结合部分。在一些情况下,结合部分存在于侧流测定中。在一些情况下,在将样品添加至侧流测定之前将结合部分添加至样品。在一些情况下,结合部分包含信号分子。在一些情况下,结合部分与信号分子物理缔合。在一些情况下,结合部分能够与信号分子物理缔合。在一些情况下,结合部分连接至信号分子。信号分子的非限制性实例包括金颗粒、荧光颗粒、发光颗粒和染料分子。在一些情况下,捕获组件包含能够与本文所述的扩增产物相互作用的结合部分。在一些情况下,捕获组件包含能够与本文所述的扩增产物上的标签相互作用的结合部分。

[0119] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含检测系统。在一些情况下,检测系统包含信号检测器。信号检测器的非限制性实例包括荧光读取器、比色计、传感器、电线、电路、接收器。在一些情况下,检测系统包含检测试剂。检测试剂的非限制性实例包括荧光团、化学物质、纳米颗粒、抗体和核酸探针。在一些情况下,检测系统包含pH传感器和互补金属氧化物半导体,可用于检测pH的变化。在一些情况下,通过本文公开的设备、系统、试剂盒或方法产生扩增产物改变pH,从而指示性别。

[0120] 在一些情况下,检测系统包括信号检测器。在一些情况下,信号检测器是检测光子的光检测器。在一些情况下,信号检测器检测荧光。在一些情况下,信号检测器检测化学物质或化合物。在一些情况下,信号检测器检测在产生扩增产物时释放的化学物质。在一些情况下,信号检测器检测在将扩增产物添加至检测系统时释放的化学物质。在一些情况下,信号检测器检测在产生扩增产物时产生的化合物。在一些情况下,信号检测器检测在将扩增产物添加至检测系统时产生的化合物。

[0121] 在一些情况下,信号检测器检测电信号。在一些情况下,信号检测器包含电极。在一些情况下,信号检测器包含电路、电流或电流发生器。在一些情况下,电路或电流由两种或更多种溶液或聚合物的梯度提供。在一些情况下,电路或电流由能量源(例如,电池、电源插座的电线)提供。在一些情况下,本文公开的核酸、扩增产物、化学物质或化合物通过干扰电流提供电信号,并且信号检测器检测电信号。在一些情况下,信号检测器检测光。在一些情况下,信号检测器包含光传感器。在一些情况下,信号检测器包含照相机。在一些情况下,信号检测器包含手机照相机或其组件。

[0122] 在一些情况下,信号检测器包含检测核酸中不同碱基的电荷的纳米线。在一些情况下,纳米线具有约1nm至约99nm的直径。在一些情况下,纳米线具有约1nm至约999nm的直径。在一些情况下,纳米线包含无机分子,例如镍、铂、硅、金、锌、石墨烯或钛。在一些情况下,纳米线包含有机分子(例如,核苷酸)。

[0123] 在一些情况下,检测系统包含测定组装件,其中所述测定组装件能够检测靶分析物(例如,核酸扩增产物)。在一些情况下,测定组装件包含侧流条,在本文以及在本领域中也称为侧流测定、侧流测试或侧流装置。在一些情况下,侧流测定提供了快速、廉价且技术简单的方法来检测本文公开的扩增产物。通常,本文公开的侧流测定包含运输流体的多孔材料或多孔基质,以及当存在扩增产物时对其进行检测的检测器。多孔材料可以包括多孔纸、聚合物结构、烧结聚合物或其组合。在一些情况下,侧流测定运输生物流体或其部分(例如,血液样品的血浆)。在一些情况下,侧流测定运输含有生物流体或其部分的溶液。例如,方法可包括在将样品添加至设备或系统之前或期间向生物流体添加溶液。溶液可以包含盐、聚合物或促进样品和/或扩增产物通过侧流测定运输的任何其他组分。在一些情况下,核酸在行进通过侧流条后被扩增。

[0124] 在一些情况下,设备、检测系统包含侧流装置,其中所述侧流装置包含多个区段或区域,其中每个期望的功能可存在于单独的区段或区域中。通常,在侧流装置中,含有靶分析物的液体样品例如本文所述的体液样品在有或没有外力帮助的情况下移动通过侧流装置的区段或区域。在一些情况下,靶分析物在没有外力帮助的情况下移动,例如,通过毛细管作用。在一些情况下,靶分析物在外力帮助的情况下移动,例如,通过侧流装置的移动对毛细管作用的促进。移动可以包括由外部输入引起的任何运动,例如,晃动、转动、离心、施加电场或磁场、施加主动泵、施加真空或侧流装置的摇摆。

[0125] 在一些情况下,侧流装置是侧流测试条,包含位于侧向的区域或区段,例如,在彼此的后面或前面。通常,由于每个功能区域或区段的较大表面积暴露,侧流测试条允许从测试条的每一侧(例如,上方和下方)进入功能区域或区段。这有助于添加试剂,包括用于样品纯化或者靶分析物扩增、检测和/或测定的那些试剂。

[0126] 考虑将本领域技术人员已知的任何合适的侧流测试条检测格式用于本文公开的



方法、设备、系统和试剂盒的测定组装件中。侧流测试条检测格式是公知的,并且已经在文献中描述。侧流测试条测定格式一般地由例如Sharma等人,(2015) Biosensors 5:577-601 描述,其通过引用整体并入本文。使用侧流测试条夹心测定格式的核酸检测由例如美国专利号9,121,849,“侧流测定(Lateral Flow Assays)”描述,其通过引用整体并入本文。使用侧流测试条竞争测定格式的核酸检测由例如美国专利号9,423,399,“标记分析物的侧流测定(Lateral Flow Assays for Tagged Analytes)”描述,其通过引用整体并入本文。

[0127] 在一些情况下,侧流测试条使用夹心格式、竞争格式或多重检测格式来检测测试样品中的靶分析物。在传统的夹心测定格式中,检测到的信号与样品中存在的靶分析物的量成正比,因此靶分析物的量增加导致信号强度增加。在传统的竞争测定格式中,检测到的信号与存在的分析物的量呈相反关系,并且增加分析物的量导致信号强度降低。

[0128] 在侧流夹心格式中,通常将测试样品施加于测试条一端的样品施加垫。所施加的测试样品从样品施加垫流过测试条,到达位于邻近样品施加垫的缀合垫,其中缀合垫在样品流动方向的下游。在一些情况下,缀合垫包含标记的、可逆固定的探针,例如,用例如,染料、酶或纳米颗粒标记的抗体或适体。如果测试样品中存在靶分析物,则形成标记探针-靶分析物复合物。然后,该复合物流至包含对靶分析物具有特异性的固定的第二探针的第一测试区域或区段(例如,测试线),从而捕获任何标记探针-靶分析物复合物。在一些情况下,使用第一测试区域或区段处的信号(例如,颜色)的强度或大小来指示测试样品中靶分析物的存在或不存在、数量或者存在和数量。第二测试区域或区段可以包含与过量的标记探针结合的第三探针。如果所施加的测试样品包含靶分析物,则在靶分析物在缀合垫上被标记探针捕获后,测试条上将存在很少或不存在过量的标记探针。因此,第二测试区域或区段将不结合任何标记探针,并且预计在第二测试区域或区段观察到很少或没有信号(例如,颜色)。因此,在第二测试区域或区段处不存在信号可以提供在第一测试区域或区段中观察到的信号是由于靶分析物的存在的保证。

[0129] 在一些情况下,本文公开的设备 and 系统包含夹心测定。在一些情况下,夹心测定被配置为接收本文公开的生物样品并保留样品组分(例如,核酸、细胞、微粒)。在一些情况下,夹心测定被配置为接收冲洗生物样品的非核酸组分(例如,蛋白质、细胞、微粒),留下生物样品的核酸的流动溶液。在一些情况下,夹心测定包含与核酸结合的膜,以在施加流动溶液时帮助保留核酸。与核酸结合的膜的非限制性实例包括壳聚糖修饰的硝化纤维素。

[0130] 类似地,在侧流竞争格式中,将测试样品施加于测试条一端的样品施加垫,并且在样品施加垫下游的缀合垫中靶分析物与标记探针结合以形成探针-靶分析物复合物。在竞争格式中,第一测试区域或区段通常包含靶分析物或靶分析物的类似物。第一测试区域或区段的靶分析物与在缀合垫中未结合测试分析物的任何游离的标记探针结合。因此,当施加的测试样品中不存在靶分析物时,与存在靶分析物时相比,在第一测试区域或区段中观察到的信号量更高。第二测试区域或区段包含与探针-靶分析物复合物特异性结合的探针。当靶分析物存在于施加的测试样品中时,在该第二测试区域或区段中观察到的信号量更高。

[0131] 在侧流测试条多重检测格式中,通过使用包含例如对每种靶分析物具有特异性的探针的额外的测试区域或区段,使用测试条检测多于一种靶分析物。

[0132] 在一些情况下,侧流装置是层状侧流装置,包含存在于位于中间(例如,在彼此的

上方或下方)的各层中的区域或区段。在一些情况下,给定层中存在一个或多个区域或区段。在一些情况下,每个区域或区段存在于单独的层中。在一些情况下,层包含多个区域或区段。在一些情况下,层是层压的。在层状侧流装置中,受扩散控制且受浓度梯度引导的过程是可能的驱动力。例如,用于对样品液体中含有的分析物进行荧光测定或荧光定量分析的多层分析元件在EP0097952“多层分析元件(Multilayer analytical element)”中描述,其通过引用并入本文。

[0133] 侧流装置可包含一个或多个功能区域或区段。在一些情况下,测试组装件包含1至20个功能区域或区段。在一些情况下,功能区域或区段包含至少一个样品纯化区域或区段、至少一个靶分析物扩增区域或区段、至少一个靶分析物检测区域或区段、以及至少一个靶分析物测定区域或区段。

[0134] 在一些情况下,靶分析物是核酸序列,并且侧流装置是核酸侧流测定。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含核酸侧流测定,其中所述核酸侧流测定包含核酸扩增功能。在一些情况下,通过核酸扩增功能执行的靶核酸扩增在扩增的核酸种类的检测之前或同时进行。在一些情况下,检测包含对靶分析物的存在的定性、半定量或定量测定中的一种或多种。

[0135] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含测定组件,其中在侧流测试条中扩增靶核酸分析物以生成标记的扩增产物,或者可以在扩增后被标记的扩增产物。在一些情况下,标记存在于一种或多种扩增引物上,或者在扩增后随后与一种或多种扩增引物缀合。在一些情况下,在侧流测试条上检测到至少一种靶核酸扩增产物。例如,侧流测试条上的一个或多个区域或区段可以包含对靶核酸扩增产物具有特异性的探针。

[0136] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含检测器,其中所述检测器包含石墨烯生物传感器。石墨烯生物传感器由例如Afsahi等人在题为“Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection, Biosensor and Bioelectronics,” (2018) 100:85-88的文章中进行了描述。

[0137] 在一些情况下,本文公开的检测器包含纳米孔、纳米传感器或纳米开关。例如,检测器可以能够进行纳米孔测序,纳米孔测序是基于跨膜电流将核酸运输通过纳米孔的方法,该检测器测量对应于特定核苷酸的电流干扰。纳米开关或纳米传感器在暴露于可检测信号时经历结构变化。参见例如,Koussa等人,“DNA nanoswitches: A quantitative platform for gel-based biomolecular interaction analysis,” (2015) Nature Methods, 12 (2): 123-126。

[0138] 在一些情况下,检测器包含快速多重生物标志物测定,其中针对感兴趣分析物的探针在用于实时检测的芯片上产生。因此,不需要标签、标记或报道分子。分析物与这些探针的结合引起对应于分析物浓度的折射率的变化。所有步骤可以是自动化的。可以不必要进行温育。结果可以在小于一小时(例如,10-30分钟)内获得。这样的检测器的非限制性实例是Genalyte Maverick检测系统。

#### 附加测试

[0139] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于检测或分析除核酸以外的生物组分的附加特征、试剂、测试或测定。举非限制性实例而言,生物组分可以选自蛋白质、肽、脂质、脂肪酸、甾醇、碳水化合物、病毒组分、微生物组分及其组合。这些附加测定可

以能够检测或分析本文以及全文公开的小体积或样品大小中的生物组分。附加测试可以包含能够与感兴趣的生物组分相互作用的试剂。这样的试剂的非限制性实例包括抗体、肽、寡核苷酸、适体和小分子,及其组合。试剂可以包含可检测标记。试剂可以能够与可检测标记相互作用。试剂可以能够提供可检测信号。

[0140] 附加测试可能需要一种或多种抗体。例如,附加测试可以包含提供用于执行免疫PCR (IPCR) 的试剂或组件。IPCR是这样的方法,其中将针对感兴趣蛋白质的第一抗体固定并暴露于样品。如果样品含有感兴趣的蛋白质,则它将被第一抗体捕获。然后将所捕获的感兴趣蛋白质暴露于与感兴趣蛋白质结合的第二抗体。该第二抗体已与能够被实时PCR检测的多核苷酸耦合。备选地或附加地,附加测试可以包含提供用于执行邻位连接技术 (PLA) 的试剂或组件,其中样品暴露于对感兴趣蛋白质具有特异性的两种抗体,每种抗体包含寡核苷酸。如果两种抗体均与感兴趣蛋白质结合,则每种抗体的寡核苷酸将足够接近以被扩增和/或检测。

[0141] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒在针对对应于Y染色体的核酸的测定之外包含附加测试或测定。在一些情况下,本文公开的方法包括在测试Y染色体的存在(性别测试)之外测试生物样品。在一些情况下,本文公开的方法包括在测试Y染色体的存在之外表征生物样品。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含针对蛋白质或肽的测试。在一些情况下,该蛋白质是激素。在一些情况下,本文公开的方法包括测试、测定或定量蛋白质。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含对核酸的存在或数量以及蛋白质或肽的存在或数量的测定。在一些情况下,附加测试是针对孕龄的测试。在一些情况下,针对孕龄的测试确保在可以进行准确的性别检测的孕龄时执行性别测试。在一些情况下,附加测试是妊娠测试。在一些情况下,如果通过本文公开的设备、系统或试剂盒无法检测或辨别性别和/或孕龄,则妊娠测试确认女性为受试者。

[0142] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含妊娠测试,用于指示、确定或验证女性受试者妊娠。在一些情况下,妊娠测试包含用于测量妊娠相关因子的试剂或组件。举非限制性实例而言,妊娠相关因子可以是人绒毛膜促性腺激素蛋白 (hCG) 以及包含抗hCG抗体的针对hCG的试剂或组件。同样举非限制性实例而言,妊娠相关因子可以是hCG转录物,并且用于测量hCG转录物的试剂或组件是与hCG转录物杂交的寡核苷酸探针或引物。在一些情况下,妊娠相关因子是热休克蛋白10kDa蛋白1,也称为早孕因子 (EPF)。

[0143] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够传达胎儿的年龄。例如,可以从设备或系统生成信号,其中信号的水平对应于来自受试者的样品中hCG的量。该信号的水平或强度可以翻译或另外表示 (equivocate) 成表示样品中hCG量的数值。hCG的量可以指示胎儿的大致年龄。

[0144] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒提供妊娠的指示或验证、孕龄的指示或验证以及性别的指示或验证。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒以至少约90%的置信度(例如,在90%的情况下,指示是准确的) 提供妊娠、孕龄和/或性别的指示。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒以至少约95%的置信度提供妊娠、孕龄和/或性别的指示。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒以至少约99%的置信度提供妊娠、孕龄和/或性别的指示。

性能参数

[0145] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒在一个或多个温度下可操作。在一些情况下,需要改变设备系统或试剂盒的组件或试剂的温度,以使设备系统或试剂盒可操作。通常,当设备、系统和试剂盒提供由生物样品中的生物标志物(例如, RNA/DNA、肽)传达的信息(例如,性别、感染、污染)时,其被认为是可操作的。在一些情况下,设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂在其下可操作的温度在普通家庭中获得。举非限制性实例而言,在普通家庭获得的温度可以由室温、冷藏箱、冷冻箱、微波炉、炉、电火锅、热/冷水浴或烤箱提供。

[0146] 在一些情况下,本文所述的设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂在单一温度下可操作。在一些情况下,本文所述的设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂仅需要单个温度而可操作。在一些情况下,本文所述的设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂仅需要两个温度而可操作。在一些情况下,本文所述的设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂仅需要三个温度而可操作。

[0147] 在一些情况下,设备、系统、试剂盒、其组件或其试剂在其下可操作的温度在一定温度范围内或在落入温度范围内的至少一个温度下。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约90℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约70℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约50℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约30℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约20℃。在一些情况下,温度范围为约-50℃至约10℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约90℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约70℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约50℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约30℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约20℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约10℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约90℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约70℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约50℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约30℃。在一些情况下,温度范围为约10℃至约30℃。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒,包括其所有组件及其所有试剂,在室温下完全可操作,不需要冷却、冷冻或加热。

[0148] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含加热设备或冷却设备,以允许用户获得至少一个温度或温度范围。加热设备和冷却设备的非限制性实例是可以在冷藏箱或冷冻箱中冷却,或者用微波炉、烤箱或炉面加热的小袋或包。在一些情况下,加热或冷却设备被插入电源插座,并且随后应用于本文公开的设备或其组件,从而将热量传递至设备或其组件或者冷却该设备或其组件。加热设备的另一非限制性实例是穿过该设备或其部分的电线或线圈。电线或线圈可以由外部(例如,太阳能、插座)或内部(例如,电池)电源激活,以将热量传送至设备或其部分。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒包含温度计或温度指示器,以帮助用户确定已为该设备、系统或其组件获得合适的温度或温度范围。备选地或附加地,用户使用在典型家庭环境中的设备(例如,温度计、手机等)来评估温度。

[0149] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒在接收生物样品的时间范围内检测生物样品或其产物(例如,扩增产物、缀合产物、结合产物)的组分。在一些情况下,检测通过本文所述的信号分子发生。在一些情况下,时间范围为约1秒至约1分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约1分钟。在一些情况下,时间范围为约20秒至约1分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约1分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约2分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约3分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约5分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约10分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约15分钟。在一些情况下,时间范围为约10秒至约20分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约2分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约5分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约10分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约15分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约20分钟。在一些情况下,时间范围为约30秒至约30分钟。在一些情况下,时间范围为约1分钟至约2分钟。在一些情况下,时间范围为约1分钟至约5分钟。在一些情况下,时间范围为约1分钟至约10分钟。在一些情况下,时间范围为约1分钟至约20分钟。在一些情况下,时间范围为约1分钟至约30分钟。在一些情况下,时间范围为约5分钟至约10分钟。在一些情况下,时间范围为约5分钟至约15分钟。在一些情况下,时间范围为约5分钟至约20分钟。在一些情况下,时间范围为约5分钟至约30分钟。在一些情况下,时间范围为约5分钟至约60分钟。

[0150] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒在少于给定的时间量内检测生物样品或其产物(例如,扩增产物、缀合产物、结合产物)的组分。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒在少于给定的时间量内提供对生物样品或其产物的组分的分析。在一些情况下,时间量少于1分钟。在一些情况下,时间量少于5分钟。在一些情况下,时间量少于10分钟。在一些情况下,时间量少于15分钟。在一些情况下,时间量少于20分钟。在一些情况下,时间量少于30分钟。在一些情况下,时间量少于60分钟。在一些情况下,时间量少于2小时。在一些情况下,时间量少于8小时。

#### 通信与信息存储

[0151] 优选地,本文公开的设备、系统和试剂盒包含通信连接或接口,使得获得的遗传信息可以与物理上不在场的其他人共享。通信连接或接口也可以允许来自其他来源的输入。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含用于接收基于获得的遗传信息的信息的接口。接口或通信连接也可以接收来自用户的非遗传信息(例如,病史、医疗状况、年龄、体重等)。接口或通信连接还可以接收除用户之外的其他人或其他事物提供的信息。举非限制性实例而言,这包括基于网络的信息、来自医疗从业者的信息以及来自保险公司的信息。例如,本文公开的设备、系统和试剂盒可以包含人工智能接口或与人工智能接口通信,该人工智能接口基于该测试的性别结果向妊娠受试者销售与性别相关或性别特异性产品。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含信息存储单元,例如,计算机芯片。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含安全存储遗传信息的手段。例如,本文公开的设备、系统和试剂盒可以包含数据芯片或与硬盘、服务器、数据库或云的连接(有线的或无线的)。

[0152] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够将关于生物样品中的生物标志物的信息传递至通信设备。在一些情况下,通信设备连接至互联网。在一些情况下,通信设备未连接至互联网。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够通过通信设备将

关于生物样品中的生物标志物的信息传递至互联网。通信设备的非限制性实例是手机、电子笔记本和计算机。

[0153] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒能够识别和存储相应测试的中间结果。中间结果可以指示哪些测试参数(例如,分析物、试剂、标记、方法或设备组件)有用或准确。该信息对于开发使用本文公开的设备、系统和试剂盒的测试或测定的团队可以有用的反馈。接收该反馈的团队可以基于该信息选择新的、更好的或最佳的参数,或者可以再次确保他们已选择了最佳参数。

[0154] 在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含通信连接或通信接口。在一些实施方案中,通信接口提供有线接口。在进一步的实施方案中,有线通信接口利用通用串行总线(USB)(包括迷你USB、微型USB、USB Type A、USB Type B和USB Type C)、IEEE1394(FireWire)、Thunderbolt、以太网和光纤互连。

[0155] 在一些实施方案中,通信接口提供无线接口。在进一步的实施方案中,无线通信接口利用无线通信协议,如红外、近场通信(NFC)(包括RFID)、蓝牙、低功耗蓝牙(BLE)、ZigBee、ANT、IEEE802.11(Wi-Fi)、无线局域网(WLAN)、无线个人局域网(WPAN)、无线广域网(WWAN)、WiMAX、IEEE 802.16(微波接入全球互通(WiMAX))或3G/4G/LTE/5G蜂窝通信方法。

[0156] 在一些实施方案中,本文所述的设备、系统、试剂盒和方法包括数字处理设备或其使用。在进一步的实施方案中,数字处理设备包括执行设备功能的一个或多个硬件中央处理单元(CPU)或通用图形处理单元(GPGPU)。在进一步的实施方案中,数字处理设备进一步包含被配置用于执行可执行指令的操作系统。在一些实施方案中,数字处理设备包含用于与一个或多个外围设备、一个或多个不同的数字处理设备、一个或多个计算系统、一个或多个计算机网络以及/或者一个或多个通信网络进行通信的通信接口(例如,网络适配器)。

[0157] 在一些实施方案中,数字处理设备借助于通信接口通信耦合至计算机网络(“网络”)。合适的网络包括个人局域网(PAN)、局域网(LAN)、广域网(WAN)、内联网、外联网、因特网(提供对万维网的访问)及其组合。在一些情况下,网络是电信和/或数据网络。在各种情况下,网络包括一个或多个计算机服务器,这些服务器实现分布式计算,诸如云计算。在一些情况下,网络借助于设备实现对等网络,该对等网络使与该设备耦合的设备能够充当客户端或服务器。

[0158] 根据本文的描述,举非限制性实例而言,合适的数字处理设备包括服务器计算机、台式计算机、膝上型计算机、笔记本计算机、小型笔记本计算机、上网本计算机、上网平板计算机、机顶盒计算机、媒体流设备、掌上计算机、因特网设备、移动智能手机、平板计算机和个人数字助理。本领域技术人员将认识到,许多智能手机适于在本文所述的系统中使用。本领域技术人员还将认识到,具有可选的计算机网络连通性的选定电视、视频播放器和数字音乐播放器适于在本文所述的系统中使用。合适的平板计算机包括本领域技术人员已知的具有手册、平板和可转换配置的那些平板计算机。

[0159] 在一些实施方案中,数字处理设备包括被配置用于执行可执行指令的操作系统。操作系统是例如包括程序和数据的软件,该软件管理设备的硬件并为应用程序的执行提供服务。本领域技术人员将认识到,举非限制性实例而言,合适的服务器操作系统包括FreeBSD、OpenBSD、NetBSD<sup>®</sup>、Linux、Apple<sup>®</sup> Mac OS XServer<sup>®</sup>、Oracle<sup>®</sup> Solaris<sup>®</sup>、

Windows Server<sup>®</sup>和Novell<sup>®</sup> NetWare<sup>®</sup>。本领域技术人员将认识到,举非限制性实例而言,合适的个人计算机操作系统包括Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>、Apple<sup>®</sup> Mac OS X<sup>®</sup>、UNIX<sup>®</sup>和类似UNIX的操作系统,如GNU/Linux<sup>®</sup>。在一些实施方案中,操作系统由云计算提供。本领域技术人员还将认识到,举非限制性实例而言,合适的移动智能手机操作系统包括Nokia<sup>®</sup> Symbian<sup>®</sup> OS、Apple<sup>®</sup> iOS<sup>®</sup>、Research In Motion<sup>®</sup> BlackBerry OS<sup>®</sup>、Google<sup>®</sup> Android<sup>®</sup>、Microsoft<sup>®</sup> Windows Phone<sup>®</sup> OS、Microsoft<sup>®</sup> Windows Mobile<sup>®</sup> OS、Linux<sup>®</sup>和Palm<sup>®</sup> WebOS<sup>®</sup>。本领域技术人员还将认识到,举非限制性实例而言,合适的媒体流设备操作系统包括Apple TV<sup>®</sup>、Roku<sup>®</sup>、Boxee<sup>®</sup>、Google TV<sup>®</sup>、Google Chromecast<sup>®</sup>、Amazon Fire<sup>®</sup>和Samsung<sup>®</sup> HomeSync<sup>®</sup>。在一些情况下,操作系统包含物联网(IoT)设备。IoT设备的非限制性实例包括Amazon的Alexa<sup>®</sup>、Microsoft的Cortana<sup>®</sup>、Apple Home Pod<sup>®</sup>和Google Speaker<sup>®</sup>。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒包含虚拟现实和/或增强现实系统。

[0160] 在一些实施方案中,本文公开的设备、系统和试剂盒包含存储和/或存储器设备。该存储和/或存储器设备是一个或多个物理装置,用于临时或永久地存储数据或程序。在一些实施方案中,该设备是易失性存储器,并且需要电力来维持存储的信息。在一些实施方案中,该设备是非易失性存储器,并且在数字处理设备不通电时保留存储的信息。在进一步的实施方案中,非易失性存储器包括闪存。在一些实施方案中,非易失性存储器包括动态随机存取存储器(DRAM)。在一些实施方案中,非易失性存储器包括铁电随机存取存储器(FRAM)。在一些实施方案中,非易失性存储器包括相变随机存取存储器(PRAM)。在其他实施方案中,该设备是存储设备,举非限制性实例而言,包括CD-ROM、DVD、闪存设备、磁盘驱动器、磁带驱动器、光盘驱动器和基于云计算的存储。在进一步的实施方案中,存储和/或存储器设备是诸如本文所公开的那些设备的组合。

[0161] 在一些实施方案中,数字处理设备包括显示器,以将视觉信息发送至用户。在一些实施方案中,显示器是液晶显示器(LCD)。在进一步的实施方案中,显示器是薄膜晶体管液晶显示器(TFT-LCD)。在一些实施方案中,显示器是有机发光二极管(OLED)显示器。在各种进一步的实施方案中,在OLED显示器上是无源矩阵OLED(PMOLED)或有源矩阵OLED(AMOLED)显示器。在一些实施方案中,显示器是等离子显示器。在其他实施方案中,显示器是视频投影仪。在其他实施方案中,显示器是与数字处理设备通信的头戴式显示器,如VR头戴式耳机。

[0162] 在一些实施方案中,数字处理设备包括用于从用户接收信息的输入设备。在一些实施方案中,输入设备是键盘。在一些实施方案中,输入设备是定点设备(pointing device),举非限制性实例而言,包括鼠标、轨迹球、轨迹板、操纵杆、游戏控制器或触控笔。在一些实施方案中,输入设备是触摸屏或多点触摸屏。在其他实施方案中,输入设备是麦克风,以捕获语音或其他声音输入。在其他实施方案中,输入设备是摄像机或其他传感器,以

捕获运动或视觉输入。在其他实施方案中,输入设备是Kinect、Leap Motion等。在其他实施方案中,输入设备是诸如本文所公开的那些设备的组合。

#### 移动应用程序

[0163] 在一些实施方案中,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法包含数字处理设备或其使用,其中数字处理设备提供有移动应用程序形式的可执行指令。在一些实施方案中,移动应用程序在制造时被提供给移动数字处理设备。在其他实施方案中,通过本文所述的计算机网络将移动应用程序提供给移动数字处理设备。

[0164] 鉴于本文提供的公开内容,通过本领域技术人员已知的技术使用本领域已知的硬件、语言和开发环境创建移动应用程序。本领域技术人员将认识到,移动应用程序用若干语言编写的。举非限制性实例而言,合适的编程语言包括C、C++、C#、Objective-C、Java™、Javascript、Pascal、Object Pascal、Python™、Ruby、VB.NET、WML和带有或不带有CSS的XHTML/HTML,或其组合。

[0165] 合适的移动应用程序开发环境可以从若干来源获得。举非限制性实例而言,可商购的开发环境包括AirplaySDK、alcheMo、**Appcelerator**®、Celsius、Bedrock、Flash Lite、.NET Compact Framework、Rhomobile和WorkLight Mobile Platform。其他开发环境可免费获得,举非限制性实例而言,包括Lazarus、MobiFlex、MoSync和Phonegap。此外,移动设备制造商还分配软件开发人员工具包,举非限制性实例而言,包括iPhone和iPad (iOS) SDK、Android™SDK、BlackBerry® SDK、BREW SDK、**Palm**® OS SDK、Symbian SDK、webOS SDK和**Windows**® Mobile SDK。

[0166] 本领域技术人员将认识到,可以使用若干商业论坛来分配移动应用程序,举非限制性实例而言,包括**Apple**® App Store、**Google**® Play、Chrome WebStore、BlackBerry® App World、用于Palm设备的App Store、用于webOS的App Catalog、用于移动设备的**Windows**® Marketplace、用于**Nokia**®设备的Ovi Store和**Samsung**® Apps。

[0167] 参考图8A,在特定实施方案中,移动应用程序被配置为与本文公开的设备、系统和试剂盒连接、通信并从其接收遗传信息和其他信息。图8A是描绘移动应用程序可选地提供给用户的各种功能的图。在该实施方案中,移动应用程序可选地提供:1) 基于用户的个人信息和偏好的个性化、定制的用户体验(UX);2) 交互式的文本、音频和/或视频驱动的教学经历,以告知用户如何使用设备、系统和试剂盒;3) 内容平台,向用户提供对文章、新闻、媒体、游戏等的访问;以及4) 用于跟踪和共享信息、测试结果和事件的工具。

[0168] 参考图8B,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括交互式界面,其提供逐步流程以指导用户使用本文公开的设备、系统和试剂盒。在各种实施方案中,交互式流程包括文本、图像、动画、音频、视频等,以告知和指导用户。

[0169] 参考图8C,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括主屏幕,其允许用户访问本文公开的移动应用程序功能。在该实施方案中,主屏幕包括个性化的问候以及允许用户启动测试、查看当前和历史测试结果、共享测试结果以及与更大的用户社区交互的界面元素。

[0170] 参考图8D,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括进度图,其告知用户用于



连接至本文公开的设备、系统或试剂盒的过程的状态。在该实施方案中,该图示出所有步骤并指示当前步骤。这些步骤是:1) 通过例如蓝牙与设备配对;2) 检测设备中的样品;以及3) 等待样品被处理。在一些实施方案中,该图是交互式的、动画的或者用媒体或其他内容增强的。

[0171] 参考图8E,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括测试报告,其提供给用户以传达测试结果。在该实例中,向用户提供报告,以使她知道她怀了女儿。在一些实施方案中,该报告是交互式的、动画的或者用媒体或其他内容增强的,其可以基于测试结果而进行个性化。

[0172] 参考图8F,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括社交共享屏幕,其允许用户访问特征以共享测试结果。许多服务、平台和网络适合于共享测试结果以及其他信息和事件。举非限制性实例而言,合适的社交网络和共享平台包括Facebook、YouTube、Twitter、LinkedIn、Pinterest、Google Plus+、Tumblr、Instagram、Reddit、VK、Snapchat、Flickr、Vine、Meetup、Ask.fm、Classmates、QQ、WeChat、Foursquare的Swarm、Kik、Yik Yak、Shots、Periscope、Medium、Soundcloud、Tinder、WhatsApp、Snap Chat、Slack、Musical.ly、Peach、Blab、Renren、Sina Weibo、Renren、Line和Momo。在一些实施方案中,测试结果由SMS、MMS或即时消息共享。在一些实施方案中,测试结果通过电子邮件共享。

[0173] 参考图8G,在特定实施方案中,移动应用程序可选地包括主屏幕,其允许用户访问附加功能,如与测试结果相关的重要信息和事件的网络日志和时间线,该附加功能可选地被共享。在各种实施方案中,合适的信息和事件包括与临床试验结果、新上市的疗法、营养、锻炼、胎儿发育、健康等相关的那些信息和事件。在妊娠受试者的情况下,信息和事件基于妊娠的时间点(例如,周数)组织到时间线界面中。在该实施方案中,主屏幕还包括对用户偏好和设置的访问。

[0174] 在一些情况下,根据以下方法使用本文公开的设备、系统和试剂盒。

## II. 方法

[0175] 在一些方面,以下公开的方法采用先前描述的设备、系统和试剂盒。通常,本文公开的方法包括获得生物样品并检测其组分。获得生物样品可以发生在临床或实验室环境中。或者,获得可以发生在远离临床或实验室环境的位置,举非限制性实例而言,诸如家庭、学校、农场或战场。在一些情况下,检测发生在临床或实验室环境中。在其他情况下,检测发生在远离临床或实验室环境的位置。本文公开的方法的其他步骤(例如,扩增核酸)可以发生在临床/实验室环境中或远程位置处。

[0176] 通常,本文公开的方法包括收集和分析相对较小体积的生物样品。举非限制性实例而言,本文公开了包括以下的方法:在非实验室环境中从女性受试者获得样品,其中所述生物样品的体积不大于约300 $\mu$ l;扩增样品中的至少一种循环无细胞核酸以产生至少一种扩增产物;检测包含对应于Y染色体的序列的扩增产物的存在或不存在。

[0177] 图2示出了具有本文公开的方法、设备和系统可以遵循的各种路线的总体流程图。最初,在步骤210中获得样品。必须获得最少量的样品以从样品收集有用的信息。样品可以是本文公开的生物样品。样品可以是原始的、未加工的样品(例如,全血)。样品可以是经处理的样品(例如,血浆)。样品量可能基于样品类型。通常,在步骤220中,处理样品或从样品纯化分析物(例如,核酸或其他生物标志物),以产生可以被扩增和/或检测的分析物。处理

可以包括过滤样品、结合含有分析物的样品的组分、结合分析物、稳定分析物、纯化分析物或其组合。样品组分的非限制性实例是细胞、病毒颗粒、细菌颗粒、外来体和核小体。在一些情况下,分析物是核酸,并且在步骤240中将其扩增以产生扩增子以供分析。在其他情况下,分析物可以是或可以不是核酸,但无论如何都不被扩增。在步骤260和270中分别进行检测和分析之前,可选地对分析物或扩增子进行修饰(250)。在一些情况下,修饰在扩增期间发生(未示出)。例如,分析物或扩增子可以被加上标签或标记。检测可以涉及测序、靶标特异性探针、等温扩增和检测方法、定量PCR或单分子检测。提供图2作为本文公开的设备和方法的宽泛概述,但本文公开的设备和方法不受图2的限制。设备和方法可以分别包含在图2中未示出的附加组件和步骤。

#### 样品收集

[0178] 在一些情况下,本文公开的方法包括获得本文所述的生物样品。生物样品的非限制性实例包括血液、血浆、尿液、唾液、阴道液、组织液。在一些情况下,本文公开的方法包括获得本文所述的环境样品。环境样品的非限制性实例包括废水、海水、食物和饮料。

[0179] 在一些情况下,本文公开的方法在单个地点执行,例如,从获得至检测。在一些情况下,单个地点是家庭。在一些情况下,单个地点不是医学、技术或病理实验室。在一些情况下,本文公开的方法完全由女性受试者执行。在一些情况下,本文公开的方法由未接受执行该方法的任何技术训练的受试者执行。在一些情况下,本文公开的方法由除了提供有用用于执行该方法的设备的指令集之外未接受执行该方法的任何技术训练的受试者执行。

[0180] 在一些情况下,本文公开的方法用本文所述的设备、系统或试剂盒执行。在一些情况下,本文所公开的方法在远离临床环境的情况下执行,举非限制性实例而言,该临床环境诸如医疗诊所、医院、科学研究实验室、病理实验室或临床测试实验室。在一些情况下,本文公开的方法在家庭、学校或计划生育中心执行。在一些情况下,该方法可以由受试者执行。在一些情况下,本文公开的方法由未接受执行该方法所必需的任何技术训练的用户执行。

[0181] 通常,本文公开的方法包括获得、处理和/或分析相对较小体积的生物样品。小体积也可以称为小输入、低输入或低体积。在一些情况下,本文公开的方法包括获得一定体积的生物样品,其中所述体积小于1毫升。在一些情况下,本文公开的方法用不超过1毫升的生物样品执行。在一些情况下,本文公开的方法用不超过100 $\mu$ l的生物样品执行。在一些情况下,本文公开的方法包括获得一定体积的生物样品,其中所述体积落入一定范围的样品体积内。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约1毫升。在一些情况下,样品体积的范围为约5 $\mu$ l至约1毫升。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约900 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约800 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约700 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约600 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约500 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约400 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约300 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约200 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约150 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为1 $\mu$ l至约100 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约90 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约85 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约80 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约75 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约70 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约65 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约60 $\mu$ l。在一些情况

下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约55 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约1 $\mu$ l至约50 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约5 $\mu$ l至约45 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约5 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约150 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为15 $\mu$ l至约100 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约90 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约85 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约80 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约75 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约70 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约65 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约60 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约55 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约15 $\mu$ l至约50 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约10 $\mu$ l至约45 $\mu$ l。在一些情况下,样品体积的范围为约10 $\mu$ l至约40 $\mu$ l。

[0182] 在一些方面,本文所述的方法包括:用手持式设备从受试者获得流体样品,其中所述流体样品的体积不大于约300 $\mu$ L;用手持式设备对流体样品中的至少一种无细胞核酸进行测序;通过手持式设备中的显示器检测与感兴趣序列相对应的序列的存在或不存在,从而确定关于受试者的遗传信息;以及用手持式设备将遗传信息传递至另一个受试者。在一些情况下,检测和传递同时发生。在一些情况下,体积不大于250 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于200 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于150 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于140 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于130 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于120 $\mu$ L。在一些情况下,体积不大于100 $\mu$ L。

[0183] 在一些情况下,本文公开的方法包括获得血液样品。在一些情况下,获得血液不包括静脉切开术。在一些情况下,受试者通过将其皮肤压靠手持式设备的经皮穿刺装置来获得。通常,经皮穿刺装置包含针、微针或针阵列中的至少一种。在一些情况下,受试者将手指、脚趾、手臂、肩膀或手掌压靠经皮装置。在一些情况下,受试者将手指压靠经皮穿刺装置。在一些情况下,受试者将其皮肤压靠经皮穿刺装置不超过一次。在一些情况下,受试者将其皮肤压靠经皮穿刺装置不超过两次。在一些情况下,方法包括获得血液样品并将血液样品或其组分(例如,血浆/血清)送至远离获得步骤的地点(例如,实验室、诊所或研究中心)的位置,以进行附加处理和分析。在其他情况下,该方法包括使用例如本文公开的设备在获得步骤的地点处检测测试结果。

[0184] 在一些情况下,本文公开的方法包括通过手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括通过多次手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括从不超过2次手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括从不超过3次手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括通过单次手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括通过不超过单次手指针刺获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法包括获得毛细血管血液(例如,从手指获得的血液)。在一些情况下,方法包括从针刺挤压或挤出血液以获得期望的血液体积。尽管手指针刺是获得毛细血管血液的常用方法,但身体上的其他部位也将是合适的,例如,脚趾、手掌、脚后跟、手臂、肩膀。在一些情况下,本文公开的方法包括不经静脉切开术获得血液样品。在一些情况下,本文公开的方法不包括获得静脉血(例如,从静脉获得的血液)。

[0185] 在一些情况下,本文公开的方法包括获得至少约1 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约5 $\mu$

L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约15 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约15 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。

[0186] 在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品分离细胞。在一些情况下,本文公开的方法包括将不含细胞的样品的一部分从含有细胞的样品的一部分分离。方法可以包含处理细胞和/或分析细胞的内容物。处理或分析可以在本文公开的设备或系统内发生。在一些情况下,保留或保存细胞以供在设备或系统之外进行后续分析。

[0187] 在一些情况下,本文公开的方法包括获得血浆。血浆约占全血的55%。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约3 $\mu$ L血浆从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约8 $\mu$ L血浆从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约8 $\mu$ L血浆从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约12 $\mu$ L血浆从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约12 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约12 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约12 $\mu$ L至约60 $\mu$ L血浆从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约12 $\mu$ L至约60 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约12 $\mu$ L至约60 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。

[0188] 在一些情况下,使用本文公开的方法、设备、系统和试剂盒评估的生物样品是尿液,并且所用尿液的体积为约0.25 $\mu$ l至1毫升。在一些情况下,所用尿液的体积为约0.25 $\mu$ l至约1毫升。在一些情况下,所用尿液的体积为至少约0.25 $\mu$ l。在一些情况下,所用尿液的体积为至多约1毫升。在一些情况下,所用尿液的体积为约0.25 $\mu$ l至约0.5 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约0.75 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约1 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约5 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约10 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约0.25 $\mu$ l至约1毫升、约0.5 $\mu$ l至约0.75 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约1 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约5 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约10 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l至约1毫升、约0.75 $\mu$ l至约1 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约5 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约10 $\mu$ l、约

0.75 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l至约1毫升、约1 $\mu$ l至约5 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约10 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约1 $\mu$ l至约1毫升、约5 $\mu$ l至约10 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约5 $\mu$ l至约1毫升、约10 $\mu$ l至约50 $\mu$ l、约10 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约10 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约10 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约10 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约10 $\mu$ l至约1毫升、约50 $\mu$ l至约100 $\mu$ l、约50 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约50 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约50 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约50 $\mu$ l至约1毫升、约100 $\mu$ l至约150 $\mu$ l、约100 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约100 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约100 $\mu$ l至约1毫升、约150 $\mu$ l至约200 $\mu$ l、约150 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约150 $\mu$ l至约1毫升、约200 $\mu$ l至约500 $\mu$ l、约200 $\mu$ l至约1毫升或约500 $\mu$ l至约1毫升。在一些情况下,所用尿液的体积为约0.25 $\mu$ l、约0.5 $\mu$ l、约0.75 $\mu$ l、约1 $\mu$ l、约5 $\mu$ l、约10 $\mu$ l、约50 $\mu$ l、约100 $\mu$ l、约150 $\mu$ l、约200 $\mu$ l、约500 $\mu$ l或约1毫升。

[0189] 在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有一定量的无细胞核酸。在一些情况下,无细胞核酸包括DNA。在一些情况下,无细胞核酸包括RNA。在一些情况下,无细胞核酸包括DNA和RNA。在一些情况下,无细胞核酸包括无细胞胎儿核酸。在一些情况下,无细胞核酸的量落入一定范围内。在一些情况下,该范围为约1pg至约10pg。在一些情况下,该范围为约1pg至约50pg。在一些情况下,该范围为约1pg至约100pg。在一些情况下,该范围为约1pg至约1ng。在一些情况下,该范围为约2pg至约10pg。在一些情况下,该范围为约1pg至约1ng。在一些情况下,该范围为约2pg至约100pg。在一些情况下,该范围为约3pg至约10pg。在一些情况下,该范围为约3pg至约30pg。在一些情况下,该范围为约3pg至约100pg。在一些情况下,该范围为约3pg至约300pg。在一些情况下,该范围为约3pg至约1ng。在一些情况下,该范围为约3pg至约2ng。在一些情况下,该范围为约3pg至约3ng。在一些情况下,该范围为约3pg至约4ng。在一些情况下,该范围为约3pg至约5ng。在一些情况下,该范围为约3pg至约10ng。在一些情况下,方法包括获得少于约10ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得少于约7ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得少于约5ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得少于约1ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得不超过约10ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得不超过约7ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得不超过约5ng的无细胞胎儿核酸。在一些情况下,方法包括获得不超过约1ng的无细胞胎儿核酸。

[0190] 在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有至少一种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有约1至约5种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有约1至约15种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有约1至约25种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有约1至约100种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品含有约5至约100种无细胞胎儿核酸,所述核酸包含Y染色体独特的序列。

[0191] 举非限制性实例而言,方法可以包括使用手持式设备从女性妊娠受试者获得流体样品,其中所述流体样品的体积不大于约300 $\mu$ L;用手持式设备对流体样品中的至少一种无细胞核酸进行测序;通过手持式设备中的显示器检测对应于Y染色体的序列的存在或不存在,从而确定女性妊娠受试者体内的胎儿的性别;以及通过手持式设备将性别传递至另一受试者。在一些情况下,生物样品的体积不大于约120 $\mu$ L。在一些情况下,该方法包括检测对应于Y染色体的测序读取。

[0192] 同样举非限制性实例而言,方法可以包括从女性受试者获得生物样品,其中所述生物样品的体积不大于约120 $\mu$ L;使样品与包含对应于Y染色体的序列的寡核苷酸引物接触,以扩增样品中的至少一种循环无细胞核酸;检测扩增产物的不存在,从而指示胎儿是女性。获得、接触和检测可以用单个设备进行。

#### 分离和纯化核酸及其他生物标志物

[0193] 在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品的一种或多种非核酸组分分离或纯化核酸。非核酸组分也可以被认为是不需要的物质。非核酸组分的非限制性实例包括细胞(例如,血细胞)、细胞片段、细胞外囊泡、脂质、蛋白质或其组合。另外的非核酸组分在本文和全文中描述。应当注意,尽管方法可以包括分离/纯化核酸,但它们也可以包括分析在核酸纯化步骤中被认为是不需要的物质的样品的非核酸组分。分离或纯化可以包括去除将会抑制、干扰或以其他方式对诸如核酸扩增或检测等后续处理步骤有害的生物样品的组分。

[0194] 分离或纯化可以用本文公开的设备或系统进行。分离或纯化可以在本文公开的设备或系统内进行。分离和/或纯化可以通过使用本文公开的样品纯化器进行。在一些情况下,分离或纯化核酸包括从本文所述的生物样品去除非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化核酸包括从生物样品丢弃非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括收集、处理和分析非核酸组分。在一些情况下,非核酸组分可以被认为是生物标志物,因为它们提供了有关受试者的附加信息。

[0195] 在一些情况下,分离或纯化核酸包括裂解细胞。在一些情况下,分离或纯化核酸避免细胞裂解。在一些情况下,分离或纯化核酸不包括裂解细胞。在一些情况下,分离或纯化核酸不包括旨在裂解细胞的主动步骤。在一些情况下,分离或纯化核酸不包括有意裂解细胞。有意裂解细胞可以包括机械破坏细胞膜(例如,剪切)。有意裂解细胞可以包括使细胞与裂解试剂接触。本文描述了示例性裂解试剂。

[0196] 在一些情况下,分离或纯化核酸包括在溶液中裂解并用“诱饵”执行靶核酸的序列特异性捕获,然后将“诱饵”结合至固体支持物如磁珠,例如,Legler等人,Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma, Transfusion and Apheresis Science 40(2009),

153-157。在一些情况下,方法包括在重组酶或解旋酶存在下执行序列特异性捕获。重组酶或解旋酶的使用可以避免核酸热变性的需要,并且加快检测步骤。

[0197] 在一些情况下,分离或纯化包括分离本文公开的生物样品的组分。举非限制性实例而言,分离或纯化可以包括从血液分离血浆。在一些情况下,分离或纯化包括离心生物样品。在一些情况下,分离或纯化包括过滤生物样品,以分离生物样品的组分。在一些情况下,分离或纯化包括过滤生物样品,以从生物样品去除非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化

包括过滤生物样品,以从生物样品捕获核酸。

[0198] 在一些情况下,生物样品是血液,并且分离或纯化核酸包括从血液获得或分离血浆。获得血浆可以包括从血液样品的细胞组分分离血浆。获得血浆可以包括离心血液、过滤血液或其组合。获得血浆可以包括使血液经受重力(例如,沉降)。获得血浆可以包括使血液经历从血液的非核酸组分芯吸走血液的一部分的材料。在一些情况下,方法包括使血液经历垂直过滤。在一些情况下,方法包括使血液经历样品纯化器,该纯化器包含用于接收全血的过滤基质,该过滤基质具有阻止细胞通过的孔径,而血浆可以不受抑制地通过该过滤基质。针对本文公开的设备描述了这样的垂直过滤和过滤基质。

[0199] 在一些情况下,分离或纯化包括使生物样品或其部分或其修饰形式经历结合部分。结合部分可以能够结合生物样品的组分并将其去除以产生修饰的样品,该样品去除了不需要或不感兴趣的细胞、细胞片段、核酸或蛋白质。在一些情况下,分离或纯化包括使生物样品经历结合部分,以减少生物样品中不需要的物质或非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括使生物样品经历结合部分,以产生富集了靶细胞、靶细胞片段、靶核酸或靶蛋白质的修饰的样品。举非限制性实例而言,分离或纯化可以包括使生物样品经历用于捕获胎盘培养的血小板的结合部分,该血小板可以含有胎儿DNA或RNA片段。所得的细胞结合的结合部分可以用抗体或其他方法捕获/富集,例如,低速离心。

[0200] 分离或纯化可以包括用结合部分捕获生物样品中的细胞外囊泡或细胞外微粒。在一些情况下,细胞外囊泡含有DNA和RNA中的至少一种。在一些情况下,细胞外囊泡起源于胎儿/胎盘。方法可以包括捕获来自母体细胞的生物样品中的细胞外囊泡或细胞外微粒。在一些情况下,本文公开的方法包括从母体细胞捕获和丢弃细胞外囊泡或细胞外微粒,以富集样品的胎儿/胎盘核酸。

[0201] 在一些情况下,方法包括捕获生物样品中的核小体并分析附接至核小体的核酸。在一些情况下,方法包括捕获生物样品中的外来体并分析附接至外来体的核酸。捕获核小体和/或外来体可以排除对裂解步骤或试剂的需要,从而简化方法并减少从样品收集到检测的时间。

[0202] 在一些情况下,方法包括使生物样品经历细胞结合部分,以捕获胎盘培养的血小板,其可含有胎儿DNA或RNA片段。捕获可以包括使胎盘培养的血小板与结合部分(例如,针对细胞表面标志物的抗体)接触,使生物样品经受低速离心,或其组合。在一些情况下,结合部分附接至本文公开的固体支持物,并且方法包括在结合部分与生物样品接触后,将固体支持物与其余的生物样品分离。

[0203] 在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品减少不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品去除不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品去除至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品去除至少95%的不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品中去除至少97%的不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品去除至少98%的不需要的非核酸组分。在一些情况下,分离或纯化包括从生物样品去除至少99%的不需要的非核酸组分。

[0204] 在一些情况下,本文公开的方法包括纯化样品中的核酸。在一些情况下,纯化包括

用洗涤缓冲液洗涤核酸。在一些情况下,纯化不包括用洗涤缓冲液洗涤核酸。在一些实施方案中,纯化包括用核酸捕获部分捕获核酸以产生捕获的核酸。核酸捕获部分的非限制性实例是二氧化硅颗粒和顺磁性颗粒。在一些实施方案中,纯化包括使含有捕获的核酸的样品通过疏水相(例如,液体或蜡)。疏水相将杂质保留在样品中,否则该杂质将抑制核酸的进一步操作(例如,扩增、测序)。

[0205] 在一些情况下,本文公开的方法包括从本文所述的生物样品去除核酸组分。在一些情况下,丢弃去除的核酸组分。举非限制性实例而言,方法可以包括仅分析DNA。因此,RNA是不需要的,并且产生不期望的背景噪音或对DNA的污染。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除RNA。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除mRNA。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除微小RNA。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除母体RNA。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除DNA。在一些情况下,本文公开的方法包括从妊娠受试者的生物样品去除母体DNA。在一些情况下,去除核酸组分包括使核酸组分与能够与核酸杂交的寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸缀合、附接或结合至捕获装置(例如,珠子、柱、基质、纳米颗粒、磁性颗粒等)。

[0206] 在一些情况下,去除核酸组分包括按大小分离凝胶上的核酸组分。例如,循环无细胞胎儿DNA片段小于循环母体DNA片段。循环无细胞胎儿DNA片段的长度通常小于200个碱基对。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品去除无细胞DNA,其中所述无细胞DNA具有最小长度。在一些情况下,最小长度为约50个碱基对。在一些情况下,最小长度为约100个碱基对。在一些情况下,最小长度为约110个碱基对。在一些情况下,最小长度为约120个碱基对。在一些情况下,最小长度为约140个碱基对。在一些情况下,本文公开的方法包括从生物样品选择无细胞DNA,其中所述无细胞DNA具有最大长度。在一些情况下,最大长度为约180个碱基对。在一些情况下,最大长度为约200个碱基对。在一些情况下,最大长度为约220个碱基对。在一些情况下,最大长度为约240个碱基对。在一些情况下,最大长度为约300个碱基对。在一些情况下,最大长度为约400个碱基对。在一些情况下,最大长度为约500个碱基对。基于大小的分离对于具有有限的大小范围的其他类别的核酸将是有益的,这些核酸是本领域公知的(例如,微小RNA)。

#### 扩增核酸

[0207] 在一些情况下,本文公开的方法包括扩增样品中的至少一种核酸以产生至少一种扩增产物。所述至少一种核酸可以是无细胞核酸。样品可以是本文公开的生物样品或者其级分或部分。样品可以是环境样品。在一些情况下,方法包括产生样品中核酸的拷贝并且扩增该拷贝以产生至少一种扩增产物。在一些情况下,方法包括产生样品中核酸的逆转录物并且扩增该逆转录物以产生至少一种扩增产物。

[0208] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测包含感兴趣序列的循环无细胞核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括定量包含感兴趣序列的循环无细胞核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括扩增包含感兴趣序列的循环无细胞核酸。在一些情况下,扩增包括用退火至对应于感兴趣序列的有义链和反义链的引物进行的聚合酶介导的扩增。在一些情况下,检测或定量包括将包含感兴趣序列的循环无细胞核酸与寡核苷酸探针杂交。寡核苷酸探针可以退火至感兴趣序列或其补体的至少一部分。举非限制性实例而言,感兴趣序列可以是重复区域的序列(例如,感兴趣序列的多个拷贝)或Y染色体特异的序列。



[0209] 在一些情况下,本文公开的方法包括至少在一个温度下扩增核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括在单个温度下扩增核酸(例如,等温扩增)。在一些情况下,本文公开的方法包括扩增核酸,其中所述扩增发生在不超过两个温度下。扩增可以发生在一个步骤或多个步骤中。扩增步骤的非限制性实例包括双链变性、引物杂交和引物延伸。

[0210] 在一些情况下,扩增的至少一个步骤发生在室温下。在一些情况下,扩增的所有步骤发生在室温下。在一些情况下,扩增的至少一个步骤发生在温度范围内。在一些情况下,扩增的所有步骤发生在温度范围内。在一些情况下,温度范围为约0℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约25℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约35℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约55℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约65℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约25℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约35℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约55℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约65℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约25℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约35℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约-20℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约-20℃至约90℃。在一些情况下,温度范围为约-20℃至约50℃。在一些情况下,温度范围为约-20℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约-20℃至约10℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约40℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约30℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约20℃。在一些情况下,温度范围为约0℃至约10℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约100℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约90℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约80℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约70℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约60℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约50℃。在一些情况下,温度范围为约15℃至约30℃。在一些情况下,温度范围为约10℃至约30℃。在一些情况下,本文公开的方法在室温下执行,不需要冷却、冷冻或加热。

[0211] 在一些情况下,扩增核酸包括使核酸与随机寡核苷酸引物接触。用多个随机引物扩增通常导致不同序列的多个核酸的非靶向扩增或样品中大多数核酸的整体扩增。在一些情况下,扩增包括使本文公开的无细胞核酸分子与随机寡核苷酸引物接触。在一些情况下,扩增包括使本文公开的无细胞胎儿核酸分子与随机寡核苷酸引物接触。在一些情况下,扩增包括使本文公开的标记的核酸分子与随机寡核苷酸引物接触。

[0212] 在一些情况下,扩增包括靶向扩增(例如,选择器方法(在US6558928中描述)、分子倒置探针)。在一些情况下,扩增核酸包括使核酸与具有与靶染色体序列相对应的序列的至少一种引物接触。本文公开了示例性的染色体序列。在一些情况下,扩增包括使核酸与至少一种具有与非靶染色体序列相对应的序列的引物接触。在一些情况下,扩增包括使核酸与不超过一对引物接触,其中该对引物中的每个引物包含与本文公开的靶染色体上的序列相对应的序列。在一些情况下,扩增包括使核酸与多组引物接触,其中第一组中的第一对中的每一个和第二组中的对中的每一个均不同。

[0213] 在一些情况下,扩增包括多重化(在一个反应中对多个核酸进行核酸扩增)。在一些情况下,多重化包括使生物样品的核酸与多个寡核苷酸引物对接触。在一些情况下,多重化包括接触第一核酸和第二核酸,其中第一核酸对应于第一序列,第二核酸对应于第二序

列。在一些情况下,第一序列和第二序列是相同的。在一些情况下,第一序列和第二序列是不同的。在一些情况下,扩增不包括多重化。在一些情况下,扩增不需要多重化。在一些情况下,扩增包括嵌套式引物扩增。

[0214] 在一些情况下,方法包括扩增样品中的核酸,其中扩增包括使样品与至少一种寡核苷酸引物接触,其中所述至少一种寡核苷酸引物直到与样品接触才是活性的或可延伸的。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种寡核苷酸引物接触,其中所述至少一种寡核苷酸引物直到暴露于选定温度才是活性的或可延伸的。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种寡核苷酸引物接触,其中所述至少一种寡核苷酸引物直到与活化试剂接触才是活性的或可延伸的。举非限制性实例而言,至少一种寡核苷酸引物可以包含封闭基团。使用这样的寡核苷酸引物可以使引物二聚体最小化,允许识别未使用的引物,以及/或者避免未使用的引物造成的错误结果。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物包含与本文公开的靶染色体上的序列相对应的序列。

[0215] 在一些情况下,扩增包括使用寡核苷酸引物和一个或多个标签。一个或多个标签的使用可以增加本文公开的方法的有效性、速度和准确性中的至少一种。在一些情况下,寡核苷酸引物包含标签。在一些情况下,标签包括核苷酸,并且寡核苷酸引物包含标签。在一些情况下,寡核苷酸引物附接至标签。在一些情况下,寡核苷酸引物与标签缀合。标签可以包含寡核苷酸、小分子、肽或其组合。在一些情况下,标签包含核苷酸。在一些情况下,标签不包含寡核苷酸。在一些情况下,标签包含氨基酸。在一些情况下,标签不包含氨基酸。在一些情况下,标签包含肽。在一些情况下,标签不包含肽。在一些情况下,标签不是序列特异性的。在一些情况下,标签包含具有不对应于任何特定靶序列的通用序列的多核苷酸。在一些情况下,当产生扩增产物时,无论扩增的序列如何,标签都是可检测的。在一些情况下,寡核苷酸引物和标签中的至少一种包含肽核酸(PNA)。在一些情况下,寡核苷酸引物和标签中的至少一种包含锁核酸(LNA)。

[0216] 在一些情况下,寡核苷酸引物包含寡核苷酸标签,所述寡核苷酸标签具有对Y染色体上的序列不具有特异性的序列。这样的标签可以被称作通用标签。在其他情况下,其中靶序列或感兴趣序列对应于除Y染色体以外的染色体,标签可以对Y染色体上的序列具有特异性。在一些情况下,标签对除感兴趣序列之外的序列具有特异性,但与感兴趣序列对应于相同的染色体。在一些情况下,标签对人类染色体上的序列不具有特异性。备选地或附加地,寡核苷酸引物包含具有对Y染色体上的序列具有特异性的序列的寡核苷酸标签。在一些情况下,方法包括使样品与标签和至少一种寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物包含与Y染色体上的序列相对应的序列,其中所述标签与寡核苷酸引物分离。在一些情况下,在寡核苷酸引物与Y染色体片段杂交后,将标签掺入通过寡核苷酸引物的延伸所产生的扩增产物中。

[0217] 在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列相对应的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列互补的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列相同的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列至少90%相同的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列至少75%相同的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与至少一种引物接触,所述引物具有与Y染色体上的序列至少

60%相同的序列。在一些情况下,扩增包括使样品与不超过一对引物接触,其中该对引物中的每个引物包含与Y染色体上的序列相对应的序列。

[0218] 在一些情况下,本文公开的方法包括使用多个标签,从而增加方法的准确性、方法的速度和通过方法获得的信息中的至少一种。在一些情况下,本文公开的方法包括使用多个标签,从而减少获得可靠结果所需的样品体积。在一些情况下,多个标签包括至少一个捕获标签。在一些情况下,多个标签包括至少一个检测标签。捕获标签通常用于将特定序列或区域与其他区域分离或分开。捕获标签的典型实例是生物素(可以使用例如链霉亲和素包被的表面捕获生物素)。检测标签的实例是洋地黄毒苷和荧光标签。检测标签可以直接检测(例如,激光照射和/或测量发射的光)或者通过携带次级检测系统如发光测定或酶促测定或与之相互作用的抗体间接检测。在一些情况下,多个标签包括至少一个捕获标签(用于分离分析物的标签)和至少一个检测标签(用于检测分析物的标签)的组合。在一些情况下,单个标签作为检测标签和捕获标签。

[0219] 在一些情况下,方法包括使样品中的至少一个循环无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签包含与循环无细胞核酸的有义链互补的第一寡核苷酸,并且第二捕获标签包含与循环无细胞核酸的反义链互补的第二寡核苷酸。在一些情况下,方法包括使样品中的至少一种循环无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签携带与第二标签相同的标记。在一些情况下,方法包括使样品中的至少一种循环无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签携带与第二标签不同的标记。在一些情况下,标签是相同的,并且存在单个定性或定量信号,所述信号是检测到的所有探针/区域的集合。在一些情况下,标签是不同的。一种标签可以用于纯化,并且一种标签可以用于检测。在一些情况下,第一寡核苷酸标签对区域(例如,cfDNA片段)具有特异性且携带荧光标记,而第二寡核苷酸对相邻区域具有特异性且携带相同的荧光标记,因为仅需要集合信号。在其他情况下,第一寡核苷酸标签对区域(例如,cfDNA片段)具有特异性的且携带荧光标记,而第二寡核苷酸对相邻区域具有特异性且携带不同的荧光标记,以检测两个不同的区域。

[0220] 考虑到将本领域已知的任何适当的核酸扩增方法用于本文所述的设备和方法。在一些情况下,使用等温扩增。在一些情况下,除了等温扩增开始之前的初始加热步骤之外,扩增是等温的。许多等温扩增方法是本领域已知的,每种方法具有不同的考虑因素并提供不同的优势,并且在文献中进行了讨论,例如,Zanolli和Spoto,2013,“Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices,”Biosensors 3:18-43,以及Fakruddin,等人,2013,“Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction(PCR),”Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 5(4):245-252,其各自通过引用整体并入本文。在一些情况下,使用任何适当的等温扩增方法。在一些情况下,所用的等温扩增方法选自:环介导等温扩增(LAMP);基于核酸序列的扩增(NASBA);多重置换扩增(MDA);滚环扩增(RCA);解旋酶依赖性扩增(HDA);链置换扩增(SDA);切口酶扩增反应(NEAR);分支扩增法(RAM);以及重组酶聚合酶扩增(RPA)。

[0221] 在一些情况下,所用的扩增方法是LAMP(参见例如,Notomi,等人,2000,“Loop Mediated Isothermal Amplification”NAR 28(12):e63i-vii,以及美国专利号6,410,278,“用于合成核酸的过程(Process for synthesizing nucleic acid)”,其各自通过引

用整体并入本文)。LAMP是使用自动循环链置换脱氧核糖核酸(DNA)合成的一步扩增系统。在一些情况下,LAMP在热稳定的聚合酶例如嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) (Bst) DNA聚合酶I、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、特异性引物和靶DNA模板的存在下于60–65℃执行45–60min。在一些情况下,模板是RNA,并且使用具有逆转录酶活性和链置换型DNA聚合酶活性的聚合酶,例如Bca DNA聚合酶,或者将具有逆转录酶活性的聚合酶用于逆转录酶步骤,并且将不具有逆转录酶活性的聚合酶用于链置换–DNA合成步骤。

[0222] 在一些情况下,使用LAMP在约55℃至约70℃进行扩增反应。在一些情况下,LAMP反应在55℃或更高的温度下进行。在一些情况下,LAMP反应在70℃或更低的温度下进行。在一些情况下,LAMP反应在约55℃至约57℃、约55℃至约59℃、约55℃至约60℃、约55℃至约61℃、约55℃至约62℃、约55℃至约63℃、约55℃至约64℃、约55℃至约65℃、约55℃至约66℃、约55℃至约68℃、约55℃至约70℃、约57℃至约59℃、约57℃至约60℃、约57℃至约61℃、约57℃至约62℃、约57℃至约63℃、约57℃至约64℃、约57℃至约65℃、约57℃至约66℃、约57℃至约68℃、约57℃至约70℃、约59℃至约60℃、约59℃至约61℃、约59℃至约62℃、约59℃至约63℃、约59℃至约64℃、约59℃至约65℃、约59℃至约66℃、约59℃至约68℃、约59℃至约70℃、约60℃至约61℃、约60℃至约62℃、约60℃至约63℃、约60℃至约64℃、约60℃至约65℃、约60℃至约66℃、约60℃至约68℃、约60℃至约70℃、约61℃至约62℃、约61℃至约63℃、约61℃至约64℃、约61℃至约65℃、约61℃至约66℃、约61℃至约68℃、约61℃至约70℃、约62℃至约63℃、约62℃至约64℃、约62℃至约65℃、约62℃至约66℃、约62℃至约68℃、约62℃至约70℃、约63℃至约64℃、约63℃至约65℃、约63℃至约66℃、约63℃至约68℃、约63℃至约70℃、约64℃至约65℃、约64℃至约66℃、约64℃至约68℃、约64℃至约70℃、约65℃至约66℃、约65℃至约68℃、约65℃至约70℃、约66℃至约68℃、约66℃至约70℃或约68℃至约70℃下进行。在一些情况下,LAMP反应在约55℃、约57℃、约59℃、约60℃、约61℃、约62℃、约63℃、约64℃、约65℃、约66℃、约68℃或约70℃下进行。

[0223] 在一些情况下,扩增反应使用LAMP进行约30至约90分钟。在一些情况下,LAMP反应进行至少约30分钟。在一些情况下,LAMP反应进行至多约90分钟。在一些情况下,LAMP反应进行约30分钟至约35分钟、约30分钟至约40分钟、约30分钟至约45分钟、约30分钟至约50分钟、约30分钟至约55分钟、约30分钟至约60分钟、约30分钟至约65分钟、约30分钟至约70分钟、约30分钟至约75分钟、约30分钟至约80分钟、约30分钟至约90分钟、约35分钟至约40分钟、约35分钟至约45分钟、约35分钟至约50分钟、约35分钟至约55分钟、约35分钟至约60分钟、约35分钟至约65分钟、约35分钟至约70分钟、约35分钟至约75分钟、约35分钟至约80分钟、约35分钟至约90分钟、约40分钟至约45分钟、约40分钟至约50分钟、约40分钟至约55分钟、约40分钟至约60分钟、约40分钟至约65分钟、约40分钟至约70分钟、约40分钟至约75分钟、约40分钟至约80分钟、约40分钟至约90分钟、约45分钟至约50分钟、约45分钟至约55分钟、约45分钟至约60分钟、约45分钟至约65分钟、约45分钟至约70分钟、约45分钟至约75分钟、约45分钟至约80分钟、约45分钟至约90分钟、约50分钟至约55分钟、约50分钟至约60分钟、约50分钟至约65分钟、约50分钟至约70分钟、约50分钟至约75分钟、约50分钟至约80分钟、约50分钟至约90分钟、约55分钟至约60分钟、约55分钟至约65分钟、约55分钟至约70分钟、约55分钟至约75分钟、约55分钟至约80分钟、约55分钟至约90分钟、约60分钟至约65分

钟、约60分钟至约70分钟、约60分钟至约75分钟、约60分钟至约80分钟、约60分钟至约90分钟、约65分钟至约70分钟、约65分钟至约75分钟、约65分钟至约80分钟、约65分钟至约90分钟、约70分钟至约75分钟、约70分钟至约80分钟、约70分钟至约90分钟、约75分钟至约80分钟、约75分钟至约90分钟或约80分钟至约90分钟。在一些情况下,LAMP反应进行约30分钟、约35分钟、约40分钟、约45分钟、约50分钟、约55分钟、约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约80分钟或约90分钟。

[0224] 在一些情况下,扩增方法是基于核酸序列的扩增(NASBA)。NASBA(也称为3SR和转录介导扩增)是基于等温转录的RNA扩增系统。使用三种酶(禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶、RNA酶H和T7DNA依赖性RNA聚合酶)生成单链RNA。在某些情况下,NASBA可以用于扩增DNA。扩增反应在41℃下进行,维持恒温,通常持续约60至约90分钟(参见例如,Fakruddin,等人,2012,“Nucleic Acid Sequence Based Amplification(NASBA)Prospects and Applications,”Int.J.of Life Science and Pharma Res.2(1):L106-L121,通过引用并入本文)。

[0225] 在一些情况下,NASBA反应在约40℃至约42℃下进行。在一些情况下,NASBA反应在41℃下进行。在一些情况下,NASBA反应在至多约42℃下进行。在一些情况下,NASBA反应在约40℃至约41℃、约40℃至约42℃或约41℃至约42℃下进行。在一些情况下,NASBA反应在约40℃、约41℃或约42℃下进行。

[0226] 在一些情况下,扩增反应使用NASBA进行约45至约120分钟。在一些情况下,NASBA反应进行约30分钟至约120分钟。在一些情况下,NASBA反应进行至少约30分钟。在一些情况下,NASBA反应进行至多约120分钟。在一些情况下,NASBA反应进行长达180分钟。在一些情况下,NASBA反应进行约30分钟至约45分钟、约30分钟至约60分钟、约30分钟至约65分钟、约30分钟至约70分钟、约30分钟至约75分钟、约30分钟至约80分钟、约30分钟至约85分钟、约30分钟至约90分钟、约30分钟至约95分钟、约30分钟至约100分钟、约30分钟至约120分钟、约45分钟至约60分钟、约45分钟至约65分钟、约45分钟至约70分钟、约45分钟至约75分钟、约45分钟至约80分钟、约45分钟至约85分钟、约45分钟至约90分钟、约45分钟至约95分钟、约45分钟至约100分钟、约45分钟至约120分钟、约60分钟至约65分钟、约60分钟至约70分钟、约60分钟至约75分钟、约60分钟至约80分钟、约60分钟至约85分钟、约60分钟至约90分钟、约60分钟至约95分钟、约60分钟至约100分钟、约60分钟至约120分钟、约65分钟至约70分钟、约65分钟至约75分钟、约65分钟至约80分钟、约65分钟至约85分钟、约65分钟至约90分钟、约65分钟至约95分钟、约65分钟至约100分钟、约65分钟至约120分钟、约70分钟至约75分钟、约70分钟至约80分钟、约70分钟至约85分钟、约70分钟至约90分钟、约70分钟至约95分钟、约70分钟至约100分钟、约70分钟至约120分钟、约75分钟至约80分钟、约75分钟至约85分钟、约75分钟至约90分钟、约75分钟至约95分钟、约75分钟至约100分钟、约75分钟至约120分钟、约80分钟至约85分钟、约80分钟至约90分钟、约80分钟至约95分钟、约80分钟至约100分钟、约80分钟至约120分钟、约85分钟至约90分钟、约85分钟至约95分钟、约85分钟至约100分钟、约85分钟至约120分钟、约90分钟至约95分钟、约90分钟至约100分钟、约90分钟至约120分钟、约95分钟至约100分钟、约95分钟至约120分钟或约100分钟至约120分钟。在一些情况下,NASBA反应进行约30分钟、约45分钟、约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约80分钟、约85分钟、约90分钟、约95分钟、约100分钟、约120分钟、约150分钟或约180分

钟。

[0227] 在一些情况下,扩增方法是链置换扩增(SDA)。SDA是使用四种不同引物的等温扩增方法。将含有限制酶切位点(HincII外切核酸酶的识别序列)的引物退火至DNA模板。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DNA聚合酶1的外切核酸酶缺陷片段(exo-Klenow)伸长引物。每个SDA循环由以下组成:(1)引物与置换的靶标片段结合,(2)通过exo-Klenow延伸引物/靶标复合物,(3)切开生成的半硫代磷酸酯HincII位点,(4)HincII与切口解离,以及(5)切口延伸和通过exo-Klenow置换下游链。

[0228] 在一些情况下,方法包括使样品中的DNA与解旋酶接触。在一些情况下,扩增方法是解旋酶依赖性扩增(HDA)。HDA是等温反应,因为使用解旋酶使DNA变性,而不是加热。

[0229] 在一些情况下,扩增方法是多重置换扩增(MDA)。MDA是一种等温的链置换方法,其基于使用来自噬菌体Ø29的高度加工和链置换的DNA聚合酶,结合修饰的随机引物,以高保真性扩增整个基因组。其已被开发用于从非常少量的起始材料扩增样品中的所有DNA。在MDAØ29中,将DNA聚合酶与dNTP、随机六聚体和变性的模板DNA在30℃下温育16至18小时,并且酶必须在高温(65℃)下灭活10分钟。不需要重复循环,但需要短的初始变性步骤、扩增步骤和酶的最终灭活。

[0230] 在一些情况下,扩增方法是滚环扩增(RCA)。RCA是一种等温核酸扩增方法,允许在单个温度(通常约30℃)下将探针DNA序列扩增 $10^9$ 倍以上。多轮的等温酶促合成由Ø29 DNA聚合酶进行,该聚合酶通过在环状DNA探针周围不断前进来延伸环-杂交引物。在一些情况下,扩增反应使用RCA在约28℃至约32℃下进行。

[0231] 可以在本领域中发现可以并入本文公开的设备和方法的附加扩增方法。理想地,扩增方法是等温的,并且相对于传统PCR而言是快速的。在一些情况下,扩增包括进行指数扩增反应(EXPAR),这是等温分子链反应,因为一个反应的产物催化产生相同产物的进一步反应。在一些情况下,扩增在内切核酸酶存在下发生。内切核酸酶可以是切口内切核酸酶。参见例如,Wu等人,“Aligner-Mediated Cleavage of Nucleic Acids,”*Chemical Science* (2018)。在一些情况下,扩增不需要靶DNA的初始热变性。参见例如,Toley等人,“Isothermal strand displacement amplification(iSDA): a rapid and sensitive method of nucleic acid amplification for point-of-care diagnosis,”*The Analyst* (2015)。超快速扩增方法中的脉冲控制扩增由GNA Biosolutions GmbH开发。

## 测序

[0232] 在一些情况下,本文公开的方法包括对核酸进行测序。核酸可以是本文公开的核酸,如标记的核酸、扩增的核酸、无细胞核酸、无细胞胎儿核酸、具有对应于靶染色体的序列的核酸、具有对应于靶染色体区域的序列的核酸、具有对应于非靶染色体的序列的核酸或其组合。在一些情况下,核酸是DNA。在一些情况下,核酸是RNA。在一些情况下,核酸包括DNA。在一些情况下,核酸包括RNA。在一些情况下,方法包括亚硫酸氢盐测序,以检测表观遗传修饰。

[0233] 在一些情况下,测序包括靶向测序。在一些情况下,测序包括全基因组测序。在一些情况下,测序包括靶向测序和全基因组测序。在一些情况下,全基因组测序包括大规模平行测序,在本领域也称为下一代测序或第二代测序。在一些情况下,全基因组测序包括随机大规模平行测序。在一些情况下,测序包括从整个基因组文库捕获的靶区域的随机大规模

平行测序。

[0234] 在一些情况下,方法包括对本文公开的扩增核酸进行测序。在一些情况下,扩增的核酸通过靶向扩增产生(例如,使用对感兴趣的靶序列具有特异性的引物)。在一些情况下,扩增的核酸通过非靶向扩增产生(例如,使用随机寡核苷酸引物)。在一些情况下,方法包括对扩增的核酸进行测序,其中所述测序包含大规模平行测序。

#### 文库制备

[0235] 在一些情况下,本文公开的方法包括修饰生物样品中的核酸以产生用于检测的核酸文库。在一些情况下,方法包括修饰用于核酸测序的核酸。在一些情况下,方法包括修饰用于检测的核酸,其中检测不包括核酸测序。在一些情况下,方法包括修饰用于检测的核酸,其中检测包括基于标签检测的发生计数标记的核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括修饰生物样品中的核酸以产生核酸文库,其中所述方法包括扩增核酸。在一些情况下,修饰发生在扩增之前。在一些情况下,修饰发生在扩增之后。

[0236] 在一些情况下,本文公开的方法包括制备非选择性文库(例如,将所有或许多可用的cfDNA或DNA分析物片段并入文库制备中)。在其他情况下,本文公开的方法包括制备靶向文库或选择性文库,其中在文库制备之前或期间选择感兴趣的核酸。举非限制性实例而言,可以制备Y染色体特异性文库(例如,具有仅在Y染色体上发现的序列的DNA片段)。类似地,可以制备X染色体特异性文库、常染色体特异性文库或具有特定序列、基因或感兴趣基因区域的定制文库。

[0237] 在一些情况下,修饰核酸包括修复是核酸片段的核酸的末端。举非限制性实例而言,修复末端可以包括将5'磷酸基团、3'羟基基团或其组合恢复至核酸。在一些情况下,修复可以包括去除突出端。在一些情况下,修复可以包括用互补核苷酸填充突出端。

[0238] 在一些情况下,为制备文库而修饰核酸包括衔接子的使用。衔接子在本文也可以称为测序衔接子。在一些情况下,衔接子有助于测序。通常,衔接子包括寡核苷酸。举非限制性实例而言,衔接子可以简化方法中的其他步骤,如扩增、纯化和测序,因为它是修饰后样品中多种(如非全部)核酸的普遍序列。在一些情况下,修饰核酸包括将衔接子连接至核酸。连接可以包括平端连接。在一些情况下,修饰核酸包括使衔接子与核酸杂交。

[0239] 在一些情况下,为制备文库而修饰核酸包括标签的使用。标签在本文也可以称为条形码。在一些情况下,本文公开的方法包括用对应于感兴趣的染色体区域的标签修饰核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括用对不感兴趣的染色体区域具有特异性的标签修饰核酸。在一些情况下,本文公开的方法包括用对应于至少一个感兴趣的染色体区域的第一标签修饰核酸的第一部分,并且用对应于至少一个不感兴趣的染色体区域的第二标签修饰核酸的第二部分。在一些情况下,修饰核酸包括将标签连接至核酸。连接可以包括平端连接。在一些情况下,修饰核酸包括使标签与核酸杂交。在一些情况下,标签包括寡核苷酸。在一些情况下,标签包括可以通过除核酸分析以外的手段检测的非寡核苷酸标志物或标记。举非限制性实例而言,非寡核苷酸标志物或标记可以包括荧光分子、纳米颗粒、染料、肽或其他可检测/可量化的小分子。

[0240] 在一些情况下,为制备文库而修饰核酸包括样品索引的使用,在本文也简称为索引。举非限制性实例而言,索引可以包括寡核苷酸、小分子、纳米颗粒、肽、荧光分子、染料或其他可检测/可定量的部分。在一些情况下,来自第一生物样品的第一组核酸用第一索引标

记,并且来自第一生物样品的第一组核酸用第二索引标记,其中所述第一索引和所述第二索引不同。因此,当一次分析多个样品时,多个索引允许将核酸与多个样品区分。在一些情况下,方法公开了扩增核酸,其中用于扩增核酸的寡核苷酸引物包含索引。

[0241] 在一些情况下,方法包括检测扩增产物,其中所述扩增产物通过扩增本文公开的靶染色体的至少一部分或其片段而产生。靶染色体的部分或片段可以包含至少5个核苷酸。靶染色体的部分或片段可以包含至少约10个核苷酸。靶染色体的部分或片段可以包含至少约15个核苷酸。在一些情况下,检测本文公开的扩增产物不包括对扩增产物加标签或标记。在一些情况下,方法基于扩增产物的量检测扩增产物。例如,该方法可以检测样品中双链DNA量的增加。在一些情况下,检测扩增产物至少部分基于其大小。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至约500个碱基对的长度。

[0242] 在一些情况下,检测扩增产物包括使扩增产物与标签接触。在一些情况下,标签包含与扩增产物的序列互补的序列。在一些情况下,标签不包含与扩增产物的序列互补的序列。标签的非限制性实例在所述和以下公开内容中描述。

[0243] 在一些情况下,检测标记的或未标记的扩增产物包括使扩增产物经历本文公开的设备、系统或试剂盒的信号检测器或测定组装件。在一些情况下,方法包括在本文公开的设备、系统或试剂盒的测定组装件上扩增和检测。在一些情况下,测定组装件包含扩增试剂。

[0244] 在一些方面,本文公开的方法包括:从女性妊娠受试者获得流体样品;使样品中的至少一种循环无细胞核酸与至少一个标签接触,以产生标记的核酸,其中所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的序列;以及检测标记的核酸。在一些情况下,方法进一步包括扩增标记的核酸以产生多个标记的核酸并检测多个标记的核酸。在一些情况下,标签能够实现捕获循环无细胞核酸或其扩增产物。在一些情况下,标签能够实现检测循环无细胞核酸或其扩增产物。在一些情况下,循环无细胞核酸是双链DNA,并且方法包括在使样品中的至少一种循环无细胞核酸与至少一个标签接触之前,分离双链DNA的至少一部分以产生单链DNA。在一些情况下,分离包括向无细胞核酸施加加热。在一些情况下,分离包括向无细胞核酸施加酶。在一些情况下,标签包括寡核苷酸。在一些情况下,标签包括肽或蛋白质。在一些情况下,标签包括小分子。小分子可以是有机或无机的。

[0245] 在一些情况下,本文公开的方法包括使生物样品中的至少一种核酸与标记的寡核苷酸引物接触。在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸引物和寡核苷酸标签。在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸引物和标签,其中所述标签不包含核苷酸。在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸引物和标签,其中所述标签不包含寡核苷酸。在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸引物和肽标签。在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸引物和小分子标签。在一些方面,本文公开了包括以下的方法:从女性妊娠受试者获得流体样品;使样品中的至少一种循环无细胞核酸与至少一种标记的寡核苷酸引物接触,其中所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的序列;通过使延伸的循环无细胞核酸与聚合酶和游离核苷酸接触来扩增循环无细胞核酸,从而产生标记的扩增产物;以及检测标记的扩增产物的标签部分。在一些情况下,循环无细胞核酸是双链DNA,并且方法包括在使样品中的至少一种循环无细胞核酸与至少一种标记的寡核苷酸引物接触之前,分离双链DNA的至少一部分以产生单链DNA。在一些情况下,分离包括向无细胞核酸施加加热。在一些情况下,分离包括向无细胞核酸施加酶。



[0246] 在一些情况下,标记的寡核苷酸引物包含寡核苷酸标签,其中所述寡核苷酸标签不对应于Y染色体上的序列。在一些情况下,方法包括用对Y染色体上的序列不具有特异性的寡核苷酸标签标记样品中的Y染色体或其片段。在一些情况下,寡核苷酸标签对人类染色体上的序列不具有特异性。备选地或附加地,方法包括使样品与寡核苷酸标签以及至少一种寡核苷酸引物接触,其中所述寡核苷酸引物包含与Y染色体上的序列相对应的序列,其中所述寡核苷酸标签与所述寡核苷酸引物分离。在一些情况下,在寡核苷酸引物与Y染色体片段杂交后,寡核苷酸标签掺入通过寡核苷酸引物的延伸所产生的扩增产物。在一些情况下,当产生扩增产物时,无论扩增的序列如何,寡核苷酸标签是可检测的。在一些情况下,寡核苷酸引物和寡核苷酸标签中的至少一种包含肽核酸(PNA)。在一些情况下,寡核苷酸标签包含锁核酸(LNA)。

[0247] 在一些情况下,本文公开的方法包括多个标签的使用,从而增加方法的准确性、方法的速度和通过该方法获得的信息中的至少一种。在一些情况下,本文公开的方法包括使用多个标签,从而减少获得可靠结果所需的样品体积。在一些情况下,本文公开的方法包括使具有多个标签的生物样品中的核酸与Y染色体的多个区域接触。在一些情况下,本文公开的方法包括使具有多个标签的生物样品中的核酸与Y染色体的多个区域接触,从而标记整个Y染色体。在一些情况下,本文公开的方法包括使具有多个标签的生物样品中的核酸与Y染色体的多个区域接触,从而标记一定百分比的Y染色体。在一些情况下,该百分比为约1%至约99%。在一些情况下,该百分比为约10%至99%。在一些情况下,该百分比为约10%至约99%。在一些情况下,该百分比为约20%至99%。在一些情况下,该百分比为约30%至约99%。在一些情况下,该百分比为约40%至约99%。在一些情况下,该百分比为约50%至约99%。在一些情况下,该百分比为约60%至约99%。在一些情况下,该百分比为约70%至约99%。在一些情况下,该百分比为约80%至约99%。在一些情况下,该百分比为约90%至约99%。在一些情况下,该百分比为约1%至约99%。在一些情况下,该百分比为约10%至约20%。在一些情况下,该百分比为约10%至约30%。在一些情况下,该百分比为约10%至约40%。在一些情况下,该百分比为约10%至约50%。在一些情况下,该百分比为约10%至约60%。在一些情况下,该百分比为约10%至约70%。在一些情况下,该百分比为约60%至约99%。在一些情况下,该百分比为约10%至约80%。在一些情况下,该百分比为约80%至约99%。在一些情况下,该百分比为约10%至约90%。

[0248] 在一些情况下,多个标签包括至少一个捕获标签。在一些情况下,多个标签包括至少一个检测标签。在一些情况下,多个标签包括至少一个捕获标签和至少一个检测标签的组合。在一些情况下,方法包括使样品中的至少一种循环无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签包含与循环无细胞核酸的有义链互补的第一寡核苷酸,并且第二捕获标签包含与循环无细胞核酸的反义链互补的第二寡核苷酸。在一些情况下,方法包括使样品中的至少一种循环细胞无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签携带与第二标签相同的标记。在一些情况下,方法包括使样品中的至少一种循环细胞无细胞核酸与第一标签和第二标签接触,其中所述第一标签携带与第二标签不同的标记。

#### 检测和确定遗传信息

[0249] 通常,本文公开的方法包括检测生物标志物、分析物或其修饰形式。方法可以包括检测共享共同特征的多种分析物。在一些情况下,分析物是核酸,共同特征是序列,并且检

测包括对核酸或其扩增子进行测序。在一些情况下,共同特征是表观遗传状态,如甲基化状态。在一些情况下,方法包括检测靶分析物上的标签或信号。

[0250] 在一些情况下,方法包括检测核酸。在一些情况下,方法包括检测无细胞核酸。在一些情况下,方法包括检测已与核酸连接或杂交的标签。在一些情况下,方法包括检测核酸的扩增子。备选地或附加地,方法包括检测非核酸组分。举非限制性实例而言,非核酸组分可以选自蛋白质、肽、脂质、脂肪酸、甾醇、碳水化合物、病毒组分、微生物组分及其组合。在病毒组分或微生物组分的情况下,方法可以包括在检测之前从病毒或细菌释放、纯化和/或扩增核酸。

[0251] 方法可以包括检测核酸或非核酸组分的可检测标记或可检测信号。方法可以包括检测与核酸或非核酸组分结合的结合部分(例如,小分子、肽、适体、抗体或其抗原结合片段)的可检测标记或可检测信号。举非限制性实例而言,可检测标记或信号可以是荧光分子、生物发光分子、发光分子、放射性信号、磁信号、电信号或染料。例如,方法可以包括检测结合部分与感兴趣蛋白质之间的相互作用。举非限制性实例而言,检测可以包括执行IPCR或PLA。

[0252] 本文公开的方法可以包括检测和/或监测来自少量生物样品的表观遗传变化。方法可以包括检测来自一个或多个靶区域的多个无细胞DNA片段的表观遗传状态。方法可以包括检测来自一个或多个靶区域的多个胞嘧啶的表观遗传状态,所述靶区域彼此足够远以存在于分离的无细胞DNA片段上。例如,评估来自INS1基因座的循环无细胞DNA中的胞嘧啶甲基化可以指示在自身免疫性1型糖尿病中发现的B细胞降解,并且因此可以作为1型糖尿病风险的生物标志物。类似地,编码髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、髓鞘碱性蛋白(MBP)、巨球蛋白血症、瓦尔登斯特伦易感性蛋白1(WM1)或其组合的基因的胞嘧啶甲基化状态可以作为多发性硬化症(MS)的非侵入性生物标志物。作为另一个实例,评估AOX1基因启动子的CpG岛中的胞嘧啶甲基化可以帮助诊断前列腺癌(PCa),并且可以允许监测进展和治疗成功。AOX1基因位于2号染色体上。启动子CpG岛位于碱基位置200,585,800与200,586,350之间,跨度为约500bp。其含有至少34个CpG核苷酸,这些核苷酸在前列腺癌中全部过度甲基化,但在正常样品中未甲基化。可以使用本申请中描述的设备、系统和方法对循环无细胞DNA中的这些特定的CpG核苷酸作为组、亚组或以单个水平进行分析。

[0253] 如本文所述,检测可以包括扩增。例如,扩增可以包括qPCR,其中基于靶分析物的存在或不存在生成信号。在一些情况下,方法包括通过检测LAMP反应容器中的浊度来检测来自LAMP反应的核酸扩增产物(Mori等人(2004) 59:145-147将其称为实时浊度计)。LAMP快速产生大量特定的扩增子,同时形成焦磷酸镁沉淀。这些沉淀物产生浑浊,作为成功扩增的迹象。因此,可以实时检测扩增子,而不实际探测扩增子或需要单独的可检测信号。

[0254] 在一些情况下,方法包括检测扩增产物,其中所述扩增产物通过扩增靶区域的至少一部分来产生。靶区域可以包含至少5个核苷酸。靶区域可以包含至少约10个核苷酸。靶区域可以包含至少约15个核苷酸。在一些情况下,检测本文公开的扩增产物不包括对扩增产物加标签或标记。在一些情况下,方法基于扩增产物的量检测扩增产物。例如,该方法可以检测样品中双链DNA量的增加。在一些情况下,检测扩增产物至少部分基于其大小。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至约250个碱基对的长度。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至约300个碱基对的长度。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至

约400个碱基对的长度。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至约500个碱基对的长度。在一些情况下,扩增产物具有约50个碱基对至约1000个碱基对的长度。

[0255] 在一些情况下,检测扩增产物包括使扩增产物与标签接触。在一些情况下,标签包含与扩增产物的序列互补的序列。在一些情况下,标签不包含与扩增产物的序列互补的序列。标签的非限制性实例在前述和以下公开内容中描述。

[0256] 在一些情况下,检测标记的或未标记的扩增产物包括使扩增产物经历本文公开的设备、系统或试剂盒的信号检测器或测定组装件。在一些情况下,方法包括在本文公开的设备、系统或试剂盒的测定组装件上扩增和检测。在一些情况下,测定组装件包含扩增试剂。

[0257] 在一些情况下,检测核酸不包括扩增核酸或其部分。在一些情况下,检测核酸不包括对核酸或其部分进行测序。在一些情况下,检测核酸不包括对核酸或其部分进行测序或扩增。例如,在一些情况下,核酸可以用标记的探针标记,并且对标记的探针的检测足以检测核酸的不存在、存在或数量。因此,本文公开的能够执行此类方法的设备和系统可以不包含扩增试剂、测序装置或其组合。

[0258] 在一些情况下,检测包括使生物标志物经历侧流测定。检测可以进一步包括将仪器或试剂施加于侧流测定以通过侧流测定控制生物样品、溶液或其组合的流动。在一些情况下,仪器是真空、泵、移液管或其组合。

[0259] 在一些情况下,方法包括检测高度重复的区域(例如,HRR)。高度重复的区域可以是包含至少两个至少50%相同的序列的区域。在一些情况下,高度重复区域包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个至少50%相同的序列。在一些情况下,至少两个区域至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%相同。在一些情况下,所述至少两个序列应相距足够远,以使其出现在两个单独的无细胞DNA片段中。在一些情况下,所述至少两个序列被至少一个核苷酸隔开。在一些情况下,所述至少两个序列被至少两个核苷酸隔开。在一些情况下,所述至少两个序列被至少约5、至少约10、至少约15、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50个核苷酸隔开。在一些情况下,所述至少两个序列被至多约200个核苷酸隔开。举非限制性实例而言,HRR可以是高度重复的Y染色体区域(HRYR)。

[0260] 在一些情况下,方法包括检测感兴趣序列的多个拷贝。在一些情况下,拷贝数为1至约50,000。在一些情况下,拷贝数为约1至约50。在一些情况下,拷贝数为1至约500。在一些情况下,拷贝数为1至约1,000。在一些情况下,拷贝数为1至约2,000。在一些情况下,拷贝数为1至约5,000。在一些情况下,拷贝数为小于约10,000。在一些情况下,拷贝数为小于约5,000。在一些情况下,拷贝数为4至约20,000。在一些情况下,拷贝数为4至约10,000。在一些情况下,拷贝数为4至约5,000。在一些情况下,拷贝数为4至约1,000。在一些情况下,拷贝数为小于约1,000。在一些情况下,拷贝数为小于约500。在一些情况下,拷贝数为小于约200。在一些情况下,拷贝数为小于约100。在一些情况下,拷贝数为小于约50。在一些情况下,拷贝数为小于约40。在一些情况下,拷贝数为小于约20。在一些情况下,拷贝数为至少1。在一些情况下,拷贝数为至少2。在一些情况下,拷贝数为至少4。在一些情况下,拷贝数为至少5。在一些情况下,拷贝数为至少10。在一些情况下,感兴趣序列是对Y染色体具有特异性的序列。举非限制性实例而言,方法可以包括检测男性胎儿,只要样品中存在Y染色体区域的一个拷贝或者包含感兴趣序列的Y染色体的一个片段。

[0261] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测对应于Y染色体区域的循环无细胞核酸。在一些情况下,无细胞核酸包含在Y染色体上发现的序列。在一些情况下,无细胞核酸包含仅在Y染色体上发现的序列。在一些情况下,无细胞核酸包含未在X染色体或任何常染色体上发现的序列。在一些情况下,Y染色体序列是在Y染色体上出现多于一次的序列。在一些情况下,Y染色体序列是第一序列,其位第二序列的同源物,其中第二序列也在Y染色体上发现。在一些情况下,第一序列与第二序列至少80%相同。在一些情况下,第一序列与第二序列至少85%相同。在一些情况下,第一序列与第二序列至少90%相同。在一些情况下,第一序列与第二序列至少95%相同。在一些情况下,第一序列和第二序列的长度为至少15个核苷酸。在一些情况下,第一序列和第二序列的长度为至少25个核苷酸。在一些情况下,第一序列和第二序列的长度为至少50个核苷酸。在一些情况下,第一序列和第二序列的长度为至少100个核苷酸。

[0262] 在一些情况下,方法包括检测对应于Y染色体区域或其部分的核酸,该核酸包含在Y染色体上存在多于一次的序列。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20500000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置20500000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20000000与位置20250000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20250000与位置20500000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20500000与位置20750000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20750000与位置21000000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20080000与位置20400000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20082000与位置20351000之间。在一些情况下,Y染色体区域位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,对应是至少99%相同。在一些情况下,对应是至少98%相同。在一些情况下,对应是至少95%相同。在一些情况下,对应是至少90%相同。

[0263] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测或定量循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于位于Y染色体的位置20000000与位置21000000之间的Y染色体区域或其部分的序列,其中Y染色体区域具有给定长度。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约100个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约100个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约100个核苷酸至约300,000个碱基对。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约1000个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约1000个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约1000个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10,000个核苷酸至约1,000,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10,000个核苷酸至约500,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约10,000个核苷酸至约300,000个核苷酸。在一些情况下,Y染色体区域的长度为约300,000个核苷酸。

[0264] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测或定量循环无细胞核酸,所述循环无细

胞核酸包含对应于位于Y染色体的位置20000000与位置21000000之间的Y染色体区域或其部分的序列,其中该序列具有给定长度。在一些情况下,本文公开的方法包括检测包含对应于Y染色体区域的序列的循环无细胞核酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约1,000个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约500个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约400个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约10个核苷酸至约300个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约50个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列的长度为约50个核苷酸至约500个核苷酸。

[0265] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测或定量循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体区域或其部分的序列,其中其部分具有给定长度。在一些情况下,其部分的长度为约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约100个核苷酸至约1000个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约1000个核苷酸至约10,000个核苷酸。在一些情况下,其部分的长度为约10,000个核苷酸至约100,000个核苷酸。

[0266] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测至少一种循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于本文公开的Y染色体区域的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该子区域由在Y染色体区域中存在多于一次的序列表示。在一些情况下,对应是100%相同。在一些情况下,对应是至少99%相同。在一些情况下,对应是至少98%相同。在一些情况下,对应是至少95%相同。在一些情况下,对应是至少90%相同。

[0267] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少100个核苷酸的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少200个核苷酸的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20350799与终止位置20350897之间的Y染色体子区域的至少500个核苷酸的序列。

[0268] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的序列。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少10个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少50个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约10至至少约1000个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约500个核苷酸。在一些情况下,该序列对应于Y染色体的起始位置56673250与终止位置56771489之间的Y染色体子区域的至少约50至至少约150个核苷酸。

[0269] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸



述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少200个核苷酸的序列。在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体的起始位置20082183与终止位置20082281之间的Y染色体子区域的至少500个核苷酸的序列。

[0273] 在一些情况下,本文公开的方法包括检测循环无细胞核酸,所述循环无细胞核酸包含对应于Y染色体子区域的序列,其中该序列选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少60%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少65%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少70%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少75%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少80%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少85%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少90%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少95%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少98%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少99%相同。在一些情况下,该序列与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列100%相同。

[0274] 在一些情况下,方法包括检测对应于Y染色体序列的核酸,该Y染色体序列在Y染色体上具有存在于Y染色体基因中的序列的同源物或拷贝。在一些情况下,Y染色体序列位于Y染色体的重复区域中。在一些情况下,重复区域包含假基因、基因的近乎精确的拷贝(当比对最大同源性时>90%同源)、基因间区或微卫星重复或其可识别部分(例如,至少10个核苷酸)。Y染色体基因的非限制性实例是Y连锁睾丸特异性蛋白1(TSPY1)(别名DYS14)、Y连锁睾丸特异性蛋白2(TSPY2)、DYZ1、Y连锁睾丸特异性转录物22(TTTY22)、性别决定区Y(SRY)、核糖体蛋白S4 Y连锁1(RPS4Y1)、Y连锁锌指蛋白(ZFY)、TGIF2LY。在一些情况下,Y染色体序列包含选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列。在一些情况下,Y染色体序列包含与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列至少90%相同的序列。在一些情况下,Y染色体序列包含与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列的至少10个连续核苷酸相同的至少10个连续核苷酸。在一些情况下,Y染色体序列包含与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列的至少20个连续核苷酸相同的至少20个连续核苷酸。在一些情况下,Y染色体序列包含与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列的至少50个连续核苷酸相同的至少50个连续核苷酸。在一些情况下,Y染色体序列包含与选自SEQ ID NO.:1-5、30-34和141-192的序列的至少100个连续核苷酸相同的至少100个连续核苷酸。

[0275] 检测可以包括查看本文公开的设备或系统的界面,其中显示测试结果。检测可以包括在侧流装置上查看颜色外观或荧光信号。检测可以包括在本文公开的设备上接收测试结果。检测可以包括在与本文公开的系统的设备通信的移动设备、计算机、笔记本或其他电子设备上接收测试结果。

[0276] 通常,本文公开的方法、试剂盒、系统和设备能够在短时间内提供遗传信息(例如,胎儿性别)。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约1分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约2分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约5



分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约10分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约15分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约20分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约30分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约45分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约60分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约90分钟内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约2小时内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约3小时内执行。在一些情况下,本文公开的方法可以在少于约4小时内执行。

[0277] 本文公开的方法、试剂盒、系统和设备的使用通常不需要任何技术训练。例如,本文公开的试剂盒、系统和设备可以由妊娠受试者在其家中使用,而无技术人员或医疗提供者的帮助。在一些情况下,本文公开的方法可以由没有医疗训练或技术训练的用户执行。在一些情况下,本文公开的方法、试剂盒、系统和设备仅需要用户将生物样品添加至系统或设备,可选地开启系统或设备的电源,并查看结果以获得遗传信息。

### III. 与设备、系统、试剂盒和方法有关的方面

[0278] 以下方面涉及本文公开的设备、系统、试剂盒和方法。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法通常被设计用于处理和分析动物受试者的生物样品、植物和环境样品中的生物标志物和核酸。生物样品、无细胞核酸和受试者的以下描述可以帮助理解本文公开的设备、系统、试剂盒和方法的效用。

#### 生物样品

[0279] 本文公开了用于分析生物样品中的生物标志物和核酸的设备、系统、试剂盒和方法。通常,生物样品包括动物样品、植物样品和环境样品。动物样品的非限制性实例是血液和尿液。植物样品的非限制性实例是多叶物质和种子。环境样品的非限制性实例是水体(例如,海洋、湖泊、河流、溪流)中的水样品、经处理的水、工业废物、土壤样品、食物样品。在一些情况下,生物样品在能够由本文公开的设备、系统、试剂盒或方法使用之前,必须以流体溶液的形式制备。

[0280] 在一些情况下,生物样品是生物流体样品。生物流体样品的非限制性实例包括全血、血浆、血清、唾液、尿液、汗液、泪液、直肠排出液、脑脊液、淋巴液、滑液、间质液和阴道液的样品。在一些情况下,生物样品包括全血。与血浆形成对比,全血几乎不需要处理。可能有过滤步骤来从血液样品去除一些碎片,而不分离红细胞与白细胞。在一些情况下,生物样品是拭子,例如颊拭子或阴道拭子。

[0281] 本文所述的生物样品包括基本上无细胞的生物流体,或者可以被改性为无细胞生物流体。例如,无细胞核酸可以在受试者的血流中循环,因此检测试剂可以用于检测或定量来自受试者的血液或血清样品中的标志物。除非另有说明,否则术语“血浆”和“血清”在本文可互换使用。然而,在一些情况下,它们被包含在单个样品种类列表中,以指示这两种描述都包含在说明书或权利要求书中。

[0282] 在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法能够从生物样品去除细胞。所得样品可以被称为细胞去除样品。细胞去除样品可具有比生物样品少至少95%的完全、完整细胞。细胞去除样品可具有比生物样品少至少90%的完全、完整细胞。细胞去除样品可具有比生物样品少至少80%的完全、完整细胞。细胞去除样品可具有比生物样品少至少约75%、至少约70%、至少约60%、至少约50%、至少约40%或至少约25%的完全、完整细胞。



细胞去除样品可完全不含任何完全、完整细胞。

[0283] 在一些情况下,生物样品包含毛细血管血液。在一些情况下,生物样品包含静脉血。从毛细血管(例如,诸如手指、脚趾等末端的血管)获得的血液在本文可以被称为“毛细血管血液”。从静脉(例如,手臂、手的中部)获得的血液在本文可以被称为“静脉血”。用于静脉穿刺以获得静脉血的常见静脉是肘正中静脉、头静脉、贵要静脉和掌背静脉。在一些情况下,生物样品基本上由毛细管血液组成。在一些情况下,生物样品由毛细血管血液组成。在一些实施方案中,生物样品不包含静脉血。在一些情况下,生物样品包含血浆。在一些情况下,生物样品基本上由血浆组成。在一些情况下,生物样品由血浆组成。在一些情况下,生物样品包含血清。在一些情况下,生物样品基本上由血清组成。在一些情况下,生物样品由血清组成。在一些情况下,生物样品包含尿液。在一些情况下,生物样品基本上由尿液组成。在一些情况下,生物样品由尿液组成。在一些情况下,生物样品包含唾液。在一些情况下,生物样品基本上由唾液组成。在一些情况下,生物样品由唾液组成。在一些情况下,生物流体包含阴道液。在一些情况下,生物流体基本上由阴道液组成。在一些情况下,生物流体由阴道液组成。在一些情况下,通过对妊娠受试者进行阴道擦拭获得阴道液。在一些情况下,生物样品包含组织液。在一些情况下,生物样品基本上由组织液组成。在一些情况下,生物样品由组织液组成。

[0284] 在一些情况下,生物样品是全血。通常,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法能够从非常小的全血样品分析无细胞核酸。在一些情况下,可以用手指针刺获得较小的全血样品,诸如用刺血针或大头针/针进行。在一些情况下,可以在静脉切开术的条件下获得较小的全血样品。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法能够分析全血中的无细胞核酸而不将全血分离成血液级分(血清、血浆、细胞级分)。

[0285] 在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约30 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约40 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约50 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约60 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约70 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约40 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约60 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约80 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约100 $\mu$ L血液从而以至少约90%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,该方法包括仅获得约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂

盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约98%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以约99.5%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约100 $\mu$ L血液从而以约99.9%的置信度或准确性提供测试结果。

[0286] 在一些情况下,生物样品是血浆。血浆约占全血的55%。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约10 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约30 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约40 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约50 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约10 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约20 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约30 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约40 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒需要至少约50 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约10 $\mu$ L至约50 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约20 $\mu$ L至约60 $\mu$ L血浆从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统和试剂盒仅需要约10 $\mu$ L至约50 $\mu$ L血浆从而以至少约99%的置信度或准确性提供测试结果。

[0287] 在一些情况下,生物样品是唾液。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约100 $\mu$ L唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约200 $\mu$ L唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约500 $\mu$ L唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约1ml唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约2ml唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约3ml唾液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。

[0288] 在一些情况下,生物样品是阴道液。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约50 $\mu$ L阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约100 $\mu$ L阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约200 $\mu$ L阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,

本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约500 $\mu$ L阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约1ml阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约2ml阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。在一些情况下,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法需要至少约3ml阴道液从而以至少约95%的置信度或准确性提供测试结果。

### 无细胞核酸

[0289] 在一些情况下,本文公开的方法、设备、系统和试剂盒可用于评估生物样品中的无细胞核酸。在一些情况下,无细胞核酸是DNA(cf-DNA)或RNA(cf-RNA)。在一些情况下,无细胞核酸是胎儿核酸。在一些情况下,无细胞胎儿核酸是无细胞胎儿DNA(cff-DNA)或无细胞胎儿RNA(cff-RNA)。在一些情况下,cf-DNA或cff-DNA是基因组DNA或cDNA。在一些情况下,cf-DNA包括线粒体DNA。在一些情况下,cf-RNA或cff-RNA是信使RNA(mRNA)、微小RNA(miRNA)、线粒体RNA或天然反义RNA(NAS-RNA)。在一些情况下,无细胞核酸是母体和胎儿核酸的混合物。在母体血流中循环无细胞胎儿核酸可以被称为“循环无细胞核酸”或“循环性细胞外DNA”。在一些情况下,无细胞核酸包含表观遗传修饰。在一些情况下,无细胞核酸包含表观遗传修饰的模式,其对应于性别或感兴趣的其他遗传信息。在一些情况下,无细胞核酸包含甲基化胞嘧啶。在一些情况下,无细胞核酸包含胞嘧啶甲基化模式,其对应于性别或感兴趣的其他遗传信息。

[0290] 在一些情况下,本文公开的方法、设备、系统和试剂盒被配置用于检测或定量细胞核酸,诸如来自破坏的细胞或裂解的细胞的核酸。在一些情况下,细胞核酸来自有意地破坏或裂解的细胞。在一些情况下,细胞核酸来自无意地破坏或裂解的细胞。本文公开的方法、设备、系统和试剂盒可以被配置用于分析有意地破坏或裂解的细胞,而不是无意地破坏或裂解的细胞。在一些情况下,生物样品中少于约0.1%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约1%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约5%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约10%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约20%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约30%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约40%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约50%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约60%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约70%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约80%的总核酸是细胞核酸。在一些情况下,生物样品中少于约90%的总核酸是细胞核酸。

### 实验对照

[0291] 在一些情况下,设备、系统、试剂盒和方法包含实验对照或其使用。在一些情况下,实验对照包括核酸、蛋白质、肽、抗体、抗原结合抗体片段、结合部分。在一些情况下,实验对照包含用于检测实验对照的信号。信号的非限制性实例是荧光分子、染料分子、纳米颗粒和比色指示剂。在一些情况下,实验对照包括无细胞核酸。在一些情况下,无细胞核酸包括无细胞胎儿核酸。在一些情况下,无细胞核酸包括母体无细胞核酸。在一些情况下,无细胞核酸包括母体无细胞核酸(例如,以评估在样品处理期间发生的细胞破坏/裂解的量)。在一些情况下,无细胞核酸包含对应于Y染色体的序列。在一些情况下,无细胞核酸包含对应于X染

色体的序列。在一些情况下,无细胞核酸包含对应于常染色体的序列。在一些情况下,实验对照是胎儿核酸对照。在一些情况下,存在DNA的差异甲基化的区域,其指示存在胎儿DNA。在一些情况下,胎儿DNA对照提供妊娠的确认。举非限制性实例而言,据报道,RASSF1A基因在胎盘细胞中过度甲基化而在母体血细胞中甲基化不足。

[0292] 在一些情况下,生物样品是从妊娠受试者、疑似妊娠受试者或最近(例如,在过去一天之内)生育的受试者获得的母体体液样品。在一些情况下,母体体液样品包括血液,例如全血、外周血样品或血液部分(血浆、血清)。在一些情况下,母体体液样品包括汗液、泪液、痰液、尿液、耳液、淋巴液、唾液、脑脊液、骨髓悬浮液、阴道液、经宫颈灌洗液、脑液、腹水、乳汁、呼吸道、肠道和泌尿生殖道分泌物、羊水或白细胞分离术(leukopheresis)样品。在一些情况下,生物样品是可以通过非侵入性手术容易地获得的母体体液样品,例如血液、血浆、血清、汗液、泪液、痰液、尿液、耳液或唾液。在一些情况下,样品是至少两种体液样品的组合。在一些情况下,无细胞胎儿核酸源自母体胎盘,例如来自凋亡的胎盘细胞。在一些情况下,生物样品是胎盘血液。

[0293] 在一些情况下,通过本文公开的设备、系统、试剂盒和方法评估或分析的核酸具有优选的长度。在一些情况下,核酸是无细胞胎儿DNA片段。在一些情况下,无细胞胎儿DNA片段来自Y染色体。在一些情况下,核酸的长度为约15bp至约500bp。在一些情况下,核酸的长度为约50bp至约200bp。在一些情况下,核酸的长度为至少约15bp。在一些情况下,核酸的长度为至多约500bp。在情况下,核酸的长度为约15bp至约50bp、约15bp至约75bp、约15bp至约100bp、约15bp至约150bp、约15bp至约200bp、约15bp至约250bp、约15bp至约300bp、约15bp至约350bp、约15bp至约400bp、约15bp至约450bp、约15bp至约500bp、约50bp至约75bp、约50bp至约100bp、约50bp至约150bp、约50bp至约200bp、约50bp至约250bp、约50bp至约300bp、约50bp至约350bp、约50bp至约400bp、约50bp至约450bp、约50bp至约500bp、约75bp至约100bp、约75bp至约150bp、约75bp至约200bp、约75bp至约250bp、约75bp至约300bp、约75bp至约350bp、约75bp至约400bp、约75bp至约450bp、约75bp至约500bp、约100bp至约150bp、约100bp至约200bp、约100bp至约250bp、约100bp至约300bp、约100bp至约350bp、约100bp至约400bp、约100bp至约450bp、约100bp至约500bp、约150bp至约200bp、约150bp至约250bp、约150bp至约300bp、约150bp至约350bp、约150bp至约400bp、约150bp至约450bp、约150bp至约500bp、约200bp至约250bp、约200bp至约300bp、约200bp至约350bp、约200bp至约400bp、约200bp至约450bp、约200bp至约500bp、约250bp至约300bp、约250bp至约350bp、约250bp至约400bp、约250bp至约450bp、约250bp至约500bp、约300bp至约350bp、约300bp至约400bp、约300bp至约450bp、约300bp至约500bp、约350bp至约400bp、约350bp至约450bp、约350bp至约500bp、约400bp至约450bp、约400bp至约500bp或约450bp至约500bp。在一些情况下,核酸的长度为约15bp、约50bp、约75bp、约100bp、约150bp、约200bp、约250bp、约300bp、约350bp、约400bp、约450bp或约500bp。

[0294] 使用本文公开的方法、设备、系统和试剂盒评估的无细胞核酸的大小可以根据例如使用的特定体液样品而变化。例如,已经观察到cff-DNA序列比母体cf-DNA序列更短,并且尿液中的cff-DNA和母体cf-DNA都比血浆样品中的更短。

[0295] 在一些情况下,尿液中评估的cff-DNA序列的长度为约20bp至约300bp。在一些情况下,尿液样品中评估的cff-DNA序列的长度为约15bp至约300bp。在一些情况下,尿液样品

中评估的cff-DNA序列的长度为至少约15bp。在一些情况下,尿液样品中评估的cff-DNA序列的长度为至多约300bp。在一些情况下,尿液样品中评估的cff-DNA序列的长度为约15bp至约20bp、约15bp至约30bp、约15bp至约60bp、约15bp至约90bp、约15bp至约120bp、约15bp至约150bp、约15bp至约180bp、约15bp至约210bp、约15bp至约240bp、约15bp至约270bp、约15bp至约300bp、约20bp至约30bp、约20bp至约60bp、约20bp至约90bp、约20bp至约120bp、约20bp至约150bp、约20bp至约180bp、约20bp至约210bp、约20bp至约240bp、约20bp至约270bp、约20bp至约300bp、约30bp至约60bp、约30bp至约90bp、约30bp至约120bp、约30bp至约150bp、约30bp至约180bp、约30bp至约210bp、约30bp至约240bp、约30bp至约270bp、约30bp至约300bp、约60bp至约90bp、约60bp至约120bp、约60bp至约150bp、约60bp至约180bp、约60bp至约210bp、约60bp至约240bp、约60bp至约270bp、约60bp至约300bp、约90bp至约120bp、约90bp至约150bp、约90bp至约180bp、约90bp至约210bp、约90bp至约240bp、约90bp至约270bp、约90bp至约300bp、约120bp至约150bp、约120bp至约180bp、约120bp至约210bp、约120bp至约240bp、约120bp至约270bp、约120bp至约300bp、约150bp至约180bp、约150bp至约210bp、约150bp至约240bp、约150bp至约270bp、约150bp至约300bp、约180bp至约210bp、约180bp至约240bp、约180bp至约270bp、约180bp至约300bp、约210bp至约240bp、约210bp至约270bp、约210bp至约300bp、约240bp至约270bp、约240bp至约300bp或约270bp至约300bp。在一些情况下,尿液样品中评估的cff-DNA序列的长度为约15bp、约20bp、约30bp、约60bp、约90bp、约120bp、约150bp、约180bp、约210bp、约240bp、约270bp或约300bp。

[0296] 在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为至少约20bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为至少约40bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为至少约80bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为至多约500bp。在一些情况下,血浆或血清中评估的cff-DNA序列的长度为约100bp至约500bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为约50bp至约500bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估的cff-DNA序列的长度为约80bp至约100bp、约80bp至约125bp、约80bp至约150bp、约80bp至约175bp、约80bp至约200bp、约80bp至约250bp、约80bp至约300bp、约80bp至约350bp、约80bp至约400bp、约80bp至约450bp、约80bp至约500bp、约100bp至约125bp、约100bp至约150bp、约100bp至约175bp、约100bp至约200bp、约100bp至约250bp、约100bp至约300bp、约100bp至约350bp、约100bp至约400bp、约100bp至约450bp、约100bp至约500bp、约125bp至约150bp、约125bp至约175bp、约125bp至约200bp、约125bp至约250bp、约125bp至约300bp、约125bp至约350bp、约125bp至约400bp、约125bp至约450bp、约125bp至约500bp、约150bp至约175bp、约150bp至约200bp、约150bp至约250bp、约150bp至约300bp、约150bp至约350bp、约150bp至约400bp、约150bp至约450bp、约150bp至约500bp、约175bp至约200bp、约175bp至约250bp、约175bp至约300bp、约175bp至约350bp、约175bp至约400bp、约175bp至约450bp、约175bp至约500bp、约200bp至约250bp、约200bp至约300bp、约200bp至约350bp、约200bp至约400bp、约200bp至约450bp、约200bp至约500bp、约250bp至约300bp、约250bp至约350bp、约250bp至约400bp、约250bp至约450bp、约250bp至约500bp、约300bp至约350bp、约300bp至约400bp、约300bp至约450bp、约300bp至约500bp、约350bp至约400bp、约350bp至约450bp、约350bp至约500bp、约400bp至约450bp、约400bp至约500bp或约450bp至约500bp。在一些情况下,血浆或血清样品中评估

的cff-DNA序列的长度为约80bp、约100bp、约125bp、约150bp、约175bp、约200bp、约250bp、约300bp、约350bp、约400bp、约450bp或约500bp。

[0297] 在一些情况下,除非另有说明,否则无细胞核酸包含存在于人Y染色体中的序列,在本文被称为“Y染色体序列”。在一些情况下,无细胞核酸包含仅在Y染色体上发现的序列。在一些情况下,无细胞核酸包含在X染色体或任何常染色体上未发现的序列。在一些情况下,在Y染色体蛋白质编码基因中发现Y染色体序列的至少一部分。在一些情况下,在Y染色体非编码区中发现Y染色体序列的至少一部分。在一些情况下,在Y染色体蛋白质编码基因外显子中发现Y染色体序列的至少一部分。在一些情况下,在Y染色体蛋白质编码基因内含子中发现Y染色体序列的至少一部分。在一些情况下,Y染色体序列的至少一部分在Y染色体上具有至少一个同源物。在一些情况下,Y染色体序列在Y染色体上具有至少两个同源物。在一些情况下,Y染色体序列以至少一个拷贝存在于Y染色体上。在一些情况下,Y染色体序列以至少两个拷贝存在于Y染色体上。在一些情况下,Y染色体序列是在Y染色体上重复至少一次的序列。在一些情况下,Y染色体序列是在Y染色体上重复至少两次的序列。在一些情况下,Y染色体序列在除Y染色体以外的任何其他染色体上均未发现。在一些情况下,在X染色体上未发现Y染色体序列。在Y染色体上具有至少一个同源物、拷贝或重复的Y染色体上的区域或基因的非限制性实例是TSPY(别名DYS14)、DYZ1、HSAY、TTY22、SRY、RPS4Y1、ZFY和TGIF2LY。本文公开了在Y染色体上具有至少一个同源物、拷贝或重复的Y染色体上的其他区域或基因。

#### 受试者

[0298] 本文公开了用于分析来自受试者的样品中的生物组分的设备、系统、试剂盒和方法。受试者可以是人类。受试者可以是非人类。受试者可以是非哺乳动物(例如,鸟、爬行动物、昆虫)。在一些情况下,受试者是哺乳动物。在一些情况下,哺乳动物是雌性。在一些情况下,受试者是人类受试者。在一些情况下,哺乳动物是灵长类动物(例如,人类、大猿、小猿、猴)。在一些情况下,哺乳动物是犬科动物(例如,狗、狐狸、狼)。在一些情况下,哺乳动物是猫科动物(例如,家猫、大型猫科动物)。在一些情况下,哺乳动物是马科动物(例如,马)。在一些情况下,哺乳动物是牛科动物(例如,奶牛、水牛、野牛)。在一些情况下,哺乳动物是绵羊。在一些情况下,哺乳动物是山羊。在一些情况下,哺乳动物是猪。在一些情况下,哺乳动物是啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。

[0299] 在一些情况下,本文所述的受试者受疾病或病况的影响。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试疾病或病况、检测疾病或病况以及/或者监测疾病或病况。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试遗传性状的存在、监测适应性并确定家庭联系。

[0300] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测受试者中的癌症。癌症的非限制性实例包括乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肺癌、结直肠癌/结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病。

[0301] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测受试者中的免疫性疾病或自身免疫性疾病。自身免疫和免疫病症包括但不限于1型糖尿病、类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化症、狼疮、炎性肠病、艾迪生病、格雷夫斯病、克罗恩病和乳糜泻。

[0302] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测与受试者的衰老相关的疾病或病况。与衰老相关的疾病和状况包括但不限于癌症、骨质疏松、痴呆、黄斑

变性、代谢病况和神经退行性病症。

[0303] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测血液病症。血液病症的非限制性实例是贫血、血友病、凝血和血栓形成倾向。例如,检测血栓形成倾向可以包括检测选自因子V Leiden (FVL)、凝血酶原基因 (PT G20210A) 和亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 的基因中存在的多态性。

[0304] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测受试者中的神经性病症或神经退行性病症。神经退行性病症和神经性病症的非限制性实例是阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、运动神经元疾病、慢性疼痛和脊髓性肌萎缩。本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测受试者中的精神障碍和/或对治疗精神障碍的药物的反应。

[0305] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测代谢病况或疾病。代谢病况和疾病包括但不限于肥胖症、甲状腺病症、高血压、1型糖尿病、2型糖尿病、非酒精性脂肪肝炎、冠状动脉疾病和动脉粥样硬化。

[0306] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测对食物、液体或药物的变态反应或不耐受。举非限制性实例而言,受试者可能对乳糖、小麦、大豆、乳制品、咖啡因、酒精、坚果、贝类和鸡蛋具有变应性或不耐受。受试者还可能对药物、补品或化妆品具有变应性或不耐受。在一些情况下,方法包括分析预测皮肤类型或皮肤健康的遗传标志物。

[0307] 在一些情况下,病况与变态反应有关。在一些情况下,受试者未诊断有疾病或病况,而是正在经历指示存在疾病或病况的症状。在其他情况下,受试者已经被诊断患有疾病或病况,并且本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于监测疾病或病况,或者药物对疾病或病况的作用。

[0308] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于测试、检测和/或监测妊娠。在一些情况下,受试者是在妊娠的前三个月、中间三个月或末三个月的妊娠受试者。在一些情况下,妊娠受试者处于小于约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周、约13周、约14周、约15周、约16周、约17周、约18周、约19周、约20周、约21周、约22周、约23周、约24周、约25周、约26周、约27周、约28周、约29周、约30周、约31周、约32周、约33周、约34周、约35周、约36周、约37周、约38周、约39周或约40周的妊娠。

[0309] 在一些情况下,妊娠受试者妊娠约2周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约3周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约4周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约5周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约6周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约7周至妊娠约42周。在一些情况下,妊娠受试者妊娠约8周至妊娠约42周。

[0310] 在一些情况下,妊娠受试者已经达到至少约5周、至少约6周、至少约7周或至少约8周的妊娠。在一些情况下,妊娠受试者已达到至少约5周至约8周的妊娠。在一些情况下,妊娠受试者已经达到至少约5周至约8周、至少约5周至约12周、至少约5周至约16周、至少约5周至约20周、至少约6周至约21周、至少约6周至约22周、至少约6周至约24周、至少约6周至约26周、至少约6周至约28周、至少约6周至约9周、至少约6周至约12周、至少约6周至约16周、至少约6周至约20周、至少约6周至约21周、至少约6周至约22周、至少约6周至约24周、至

少约6周至约26周或至少约6周至约28周的妊娠。在一些情况下,妊娠受试者已经达到至少约7周至约8周、至少约7周至约12周、至少约7周至约16周、至少约7周至约20周、至少约7周至约21周、至少约7周至约22周、至少约7周至约24周、至少约7周至约26周、至少约7周至约28周、至少约8周至约9周、至少约8周至约12周、至少约6周至约16周、至少约8周至约20周、至少约8周至约21周、至少约6周至约22周、至少约8周至约24周、至少约8周至约26周或至少约8周至约28周的妊娠。在一些情况下,从末次月经时间的第一天开始测量来确定妊娠时间。

[0311] 本文公开的设备、系统、试剂盒和方法不限于医学或健康相关的应用。例如,本文公开的设备、系统、试剂盒和方法可用于法医学领域或检测通过输血进行的血液回输(blood doping)。

#### 编号实施方案

[0312] 通过综述本文列举的编号实施方案进一步理解本公开内容。1.一种设备,包含:用于从生物流体样品去除细胞以产生细胞去除样品的样品纯化器;检测试剂和信号检测器中的至少一种,以检测所述细胞去除样品中的多种生物标志物。2.根据实施方案1所述的设备,其中所述多种生物标志物包含多个无细胞DNA片段。3.根据实施方案2所述的设备,其中所述多个无细胞片段中的每一个包含由第一序列或与所述第一序列至少90%同源的所述第二序列表示的区域。4.根据实施方案1所述的设备,其中所述多个生物标志物是核酸,并且其中所述设备包含至少一种核酸扩增试剂和至少一种具有与靶核酸相对应的序列的寡核苷酸。5.根据实施方案4所述的设备,其中所述至少一种核酸扩增试剂包含寡核苷酸引物,所述寡核苷酸引物能够扩增具有第一序列的染色体的区域,所述第一序列与受试者基因组中的第二序列相似,并且其中所述第一序列与所述第二序列在物理上足够远,使得所述第一序列存在于所述受试者的第一无细胞核酸上,并且所述第二序列存在于所述受试者的第二无细胞核酸上。6.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列和所述第二序列中的至少一种在所述受试者的所述基因组中重复至少五次。7.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列和所述第二序列的长度各自为至少10个核苷酸。8.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列在第一染色体上,并且所述第二序列在第二染色体上。9.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列和所述第二序列在同一染色体上,但被至少1个核苷酸隔开。10.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列和所述第二序列功能连接。11.根据实施方案5所述的设备,其中所述第一序列与所述第二序列至少80%相同。12.根据实施方案1所述的设备,其中所述生物标志物是无细胞核酸。13.根据实施方案1所述的设备,其中聚集体含有至少两种生物标志物。14.根据实施方案1所述的设备,其中所述样品纯化器包括过滤器。15.根据实施方案14所述的设备,其中所述样品纯化器包含芯吸材料或毛细管装置,用于推动所述生物流体通过所述过滤器。16.根据实施方案14所述的设备,其中所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。17.根据实施方案1所述的设备,其中所述样品纯化器包含结合部分,所述结合部分与所述流体样品中的核酸、蛋白质、细胞表面标志物或微泡表面标志物结合。18.根据实施方案17所述的设备,其中所述结合部分包括抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子或其组合。19.根据实施方案17所述的设备,其中所述结合部分能够与细胞外囊泡结合,其中所述细胞外囊泡从所述女性受试者的胎儿细胞或胎盘细胞释放。20.根据实施方案4所述的设备,其中所述至少一种核酸扩增试剂包括至少一种等温扩



增试剂。21. 根据实施方案20所述的设备,其中所述至少一种等温扩增试剂包含重组酶聚合酶、单链DNA结合蛋白、链置换聚合酶或其组合。22. 根据实施方案1所述的设备,其中所述信号检测器包含固体支持物。23. 根据实施方案22所述的设备,其中固体支持物是柱。24. 根据实施方案22所述的设备,其中所述固体支持物包含与所述扩增产物结合的结合部分。25. 根据实施方案24所述的设备,其中所述结合部分是寡核苷酸。26. 根据实施方案1所述的设备,其中所述信号检测器是侧流条。27. 根据实施方案26所述的设备,其中所述检测试剂包含金颗粒或荧光颗粒。28. 根据实施方案1所述的设备,所述样品纯化器从血液去除细胞,并且所述细胞去除样品为血浆。29. 根据实施方案1所述的设备,其中所述设备包含在单个壳体中。30. 根据实施方案1所述的设备,其中所述设备在室温下运行。31. 根据实施方案4所述的设备,其中所述设备在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述扩增产物。32. 根据实施方案1所述的设备,包含运输或储存隔室。33. 根据实施方案32所述的设备,其中所述运输或储存隔室包含吸收垫或流体容器。34. 根据实施方案1所述的设备,包含通信连接。35. 根据实施方案34所述的设备,其中所述通信连接是无线通信系统、线缆或线缆端口。36. 根据实施方案1所述的设备,包含经皮穿刺装置。37. 一种方法,包括:从受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约300 $\mu$ L;使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与感兴趣序列对应的序列;以及检测扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述受试者的健康状态。38. 根据实施方案37所述的方法,其中所述流体样品是血液样品。39. 根据实施方案38所述的方法,其中所述血液样品的体积不大于120 $\mu$ L。40. 根据实施方案37所述的方法,其中所述流体样品是来自血液的血浆样品。41. 根据实施方案40所述的方法,其中所述血浆样品的所述体积不大于50 $\mu$ L。42. 根据实施方案40所述的方法,其中所述血浆样品的所述体积为约10 $\mu$ L至约40 $\mu$ L。43. 根据实施方案37-42中任一项所述的方法,其中获得包括执行手指针刺。44. 根据实施方案43所述的方法,其包含挤取刺破的手指以增加来自手指针刺的血液。45. 根据实施方案38所述的方法,其中获得所述血液样品不包括执行静脉切开术。46. 根据实施方案37所述的方法,其中所述流体样品是尿液样品。47. 根据实施方案37所述的方法,其中所述流体样品是唾液样品。48. 根据实施方案37-47中任一项所述的方法,包括从所述流体样品中去除细胞、细胞片段和微粒中的至少一种。49. 根据实施方案37所述的方法,其中所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。50. 根据实施方案49所述的方法,样品包含具有长度为约20个碱基对至约160个碱基对的长度的无细胞DNA片段。51. 根据实施方案37所述的方法,其中所述样品含有感兴趣序列的约5至约100个拷贝。52. 根据实施方案51所述的方法,其中所述感兴趣序列的长度为至少10个核苷酸。53. 根据实施方案51所述的方法,其中所述100个拷贝彼此至少90%相同。54. 根据实施方案37所述的方法,其中扩增包括等温扩增。55. 根据实施方案37所述的方法,其中扩增在室温下发生。56. 根据实施方案37所述的方法,其中所述方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物中,并且其中检测所述至少一种扩增产物包括检测所述标签。57. 根据实施方案56所述的方法,其中所述标签不包含核苷酸。58. 根据实施方案57所述的方法,其中检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签相互作用的结合部分接触。59. 根据实施方案58所述的方法,包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。60. 根据实施方案37所述的方法,其中步骤(a)至(c)在少于十五分钟内执行。61. 根据实施方案37所述的方法,其中所述方法由所述受试者执

行。62. 根据实施方案37所述的方法,其中所述方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。63. 根据实施方案37所述的方法,包括用单个手持式设备获得、接触和检测。64. 根据实施方案63所述的方法,其中所述受试者通过将其皮肤压靠手持式设备的经皮穿刺装置来执行所述获得。65. 根据实施方案64所述的方法,其中所述受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过一次。66. 根据实施方案64所述的方法,其中所述受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置上不超过两次。67. 根据实施方案37所述的方法,其中所述健康状态选自妊娠的存在或不存在。68. 根据实施方案37所述的方法,其中所述健康状态选自神经性疾病、代谢性疾病、癌症、自身免疫性疾病、变态反应和感染的存在或不存在。69. 根据实施方案37所述的方法,其中所述健康状态是对药物或治疗的响应。70. 一种设备,包含:样品纯化器,其从女性受试者的流体样品去除细胞;至少一种核酸扩增试剂;至少一种包含与Y染色体序列相对应的寡核苷酸,其中所述至少一种寡核苷酸和核酸扩增试剂能够产生扩增产物;以及用于检测所述扩增产物的检测试剂或信号检测器中的至少一种。71. 根据实施方案70所述的设备,其中所述流体样品是血液。72. 根据实施方案70所述的设备,其中所述样品纯化器包括过滤器。73. 根据实施方案72所述的设备,其中所述样品纯化器包含芯吸材料或毛细管装置,以推动所述生物流体通过所述过滤器。74. 根据实施方案72所述的设备,其中所述过滤器具有约0.05微米至约2微米的孔径。75. 根据实施方案70所述的设备,其中所述样品纯化器包含结合部分,所述结合部分与所述流体样品中的核酸、蛋白质、细胞表面标志物或微泡表面标志物结合。76. 根据实施方案75所述的设备,其中所述结合部分包括抗体、抗原结合抗体片段、配体、受体、肽、小分子或其组合。77. 根据实施方案76所述的设备,其中所述结合部分能够与细胞外囊泡结合,其中所述细胞外囊泡从所述女性受试者的胎儿细胞或胎盘细胞释放。78. 根据实施方案76所述的设备,其中所述结合部分与人绒毛膜促性腺激素蛋白或人绒毛膜促性腺激素编码基因的转录物结合。79. 根据实施方案70所述的设备,其中所述至少一种寡核苷酸包含与Y染色体序列杂交的引物。80. 根据实施方案70所述的设备,其中所述至少一种寡核苷酸包含与由Y染色体序列或其转录物表示的核酸杂交的探针,并且其中所述探针包含寡核苷酸标签。81. 根据实施方案80所述的设备,其中所述寡核苷酸标签对Y染色体序列不具有特异性。82. 根据实施方案80或81所述的设备,其中所述设备包含至少一种引物,所述引物与所述寡核苷酸标签杂交,并且在所述扩增试剂的存在下产生扩增产物。83. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间的序列。84. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20350799与位置20350897之间的序列。85. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20349236与位置20349318之间的序列。86. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间的序列。87. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20350601与位置20350699之间的序列。88. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20082281之间的序列。89. 根据实施方案80所述的设备,其中所述Y染色体序列是位于选自DYS14基因或TTY22的基因中的序列。90. 根据实施方案83-89中任一项所述的设备,其中所述序列的长度为至少约10个核苷酸。91. 根据实施方案70所述的设备,其中所述至少一种核酸扩增试剂包括至少一种等温扩增试剂。92. 根据实施方案83所述的设备,其中所述至少一种等温扩增试剂包含重组酶

聚合酶、单链DNA结合蛋白、链置换聚合酶或其组合。93. 根据实施方案70所述的设备,其中所述信号检测器包含固体支持物。94. 根据实施方案93所述的设备,其中所述固体支持物是柱。95. 根据实施方案93所述的设备,其中所述固体支持物包含与所述扩增产物结合的结合部分。96. 根据实施方案95所述的设备,其中所述结合部分是寡核苷酸。97. 根据实施方案70所述的设备,其中所述信号检测器是侧流条。98. 根据实施方案97所述的设备,其中所述检测试剂包含金颗粒。99. 根据实施方案97所述的设备,其中所述检测试剂包含荧光颗粒。100. 根据实施方案70所述的设备,其中所述设备包含在单个壳体中。101. 根据实施方案70所述的设备,其中所述设备在室温下运行。102. 根据实施方案70所述的设备,其中所述设备在接收所述生物流体的约五分钟至约二十分钟内检测所述扩增产物。103. 根据实施方案70所述的设备,包含运输或储存隔室。104. 根据实施方案103所述的设备,其中所述运输或储存隔室包含吸收垫或流体容器。105. 根据实施方案70所述的设备,包含通信连接。106. 根据实施方案105所述的设备,其中所述通信连接是无线通信系统、线缆或线缆端口。107. 根据实施方案70所述的设备,包含经皮穿刺装置。108. 一种试剂盒,包含根据实施方案70-107中任一项所述的设备,以及选自用于获得样品、纯化所述样品中的分析物、扩增所述分析物和检测所述分析物的结构或试剂的组分。109. 根据实施方案108所述的试剂盒,其中用于获得样品的组分是经皮穿刺装置。110. 根据实施方案109所述的试剂盒,包含用于从经皮穿刺抽取血液的毛细管。111. 根据实施方案108所述的试剂盒,包含用于加热或冷却所述设备的其组件的容器、小袋、电线或线缆。112. 一种方法,包括:从女性妊娠受试者获得流体样品,其中生物样品的体积不大于约300 $\mu$ L;使所述流体样品中的至少一种无细胞核酸与扩增试剂和寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物退火至与性染色体相对应的序列;以及检测扩增产物的存在或不存在,其中所述存在或不存在指示所述女性妊娠受试者的胎儿的性别。113. 根据实施方案112所述的方法,其中所述流体样品是血液样品。114. 根据实施方案113所述的方法,其中所述血液样品的体积不大于120 $\mu$ L。115. 根据实施方案112所述的方法,其中所述流体样品是来自血液的血浆样品。116. 根据实施方案115所述的方法,其中所述血浆样品的体积不大于50 $\mu$ L。117. 根据实施方案115所述的方法,其中所述血浆样品的体积为约10 $\mu$ L至约40 $\mu$ L。118. 根据实施方案112-117中任一项所述的方法,其中获得包括执行手指针刺。119. 根据实施方案118所述的方法,包括挤取刺破的手指以增加来自手指针刺的血液。120. 根据实施方案113所述的方法,其中获得所述血液样品不包括执行静脉切开术。121. 根据实施方案112所述的方法,其中所述流体样品是尿液样品。122. 根据实施方案112所述的方法,其中所述流体样品是唾液样品。123. 根据实施方案112-122中任一项所述的方法,包括从所述流体样品去除细胞、细胞片段和微粒中的至少一种。124. 根据实施方案112所述的方法,其中所述样品含有约25pg至约250pg的总循环无细胞DNA。125. 根据实施方案112所述的方法,其中所述无细胞核酸包括无细胞胎儿DNA片段。126. 根据实施方案125所述的方法,其中所述无细胞胎儿DNA片段的长度为约20个碱基对至约160个碱基对。127. 根据实施方案112所述的方法,其中与所述性染色体相对应的所述序列是以至少两个拷贝存在于所述Y染色体上的Y染色体序列。128. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间的序列。129. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20350799与位置20350897之间的序列。130. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20349236与位置

20349318之间的序列。131. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20350897之间的序列。132. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20350601与位置20350699之间的序列。133. 根据实施方案127所述的方法,其中所述Y染色体序列是位于Y染色体的位置20082183与位置20082281之间的序列。134. 根据实施方案127所述的方法,其中Y染色体序列是存在于DYS14基因或TTY22基因中的序列。135. 根据实施方案127-134中任一项所述的方法,其中所述序列的长度为至少约10个核苷酸。136. 根据实施方案112所述的方法,其中所述样品不含所述无细胞核酸的多于约100个拷贝。137. 根据实施方案112所述的方法,其中所述样品含有所述无细胞核酸的约5至约100个拷贝。138. 根据实施方案112所述的方法,其中所述女性妊娠受试者为不超过8周妊娠。139. 根据实施方案112所述的方法,其中扩增包括等温扩增。140. 根据实施方案112所述的方法,其中扩增在室温下发生。141. 根据实施方案112所述的方法,其中扩增包括使所述循环无细胞核酸与重组酶聚合酶接触。142. 根据实施方案112所述的方法,包括用寡核苷酸标签标记所述无细胞核酸。143. 根据实施方案112所述的方法,其中扩增包括使所述无细胞核酸与至少一种寡核苷酸引物接触,所述寡核苷酸引物具有与所述寡核苷酸标签相对应的序列。144. 根据实施方案143所述的方法,其中所述寡核苷酸引物包含封闭基团,所述封闭基团防止所述寡核苷酸引物的延伸,直至提供扩增条件和扩增试剂中的至少一种。145. 根据实施方案112所述的方法,其中所述方法包括在所述扩增发生时将标签掺入所述扩增产物中,并且其中检测所述至少一种扩增产物包括检测所述标签。146. 根据实施方案145所述的方法,其中检测所述扩增产物包括检测扩增的寡核苷酸标签。147. 根据实施方案145所述的方法,其中所述标签包含核苷酸。148. 根据实施方案145所述的方法,其中所述标签不包含核苷酸。149. 根据实施方案145所述的方法,其中检测所述扩增产物包括使所述扩增产物与能够与所述标签或寡核苷酸标签相互作用的结合部分接触。150. 根据实施方案149所述的方法,包括使所述扩增产物与侧流装置上的所述结合部分接触。151. 根据实施方案112所述的方法,其中步骤(a)至(c)在少于十五分钟内执行。152. 根据实施方案112所述的方法,其中所述方法由所述受试者执行。153. 根据实施方案112所述的方法,其中所述方法由未接受用于执行所述方法的技术训练的个体执行。154. 一种方法,包括:用手持式设备从女性妊娠受试者获得流体样品,其中所述流体样品的体积不大于约300  $\mu$ L;用所述手持式设备对所述流体样品中的至少一种无细胞核酸测序;通过所述手持式设备中的显示器检测与Y染色体相对应的序列的存在或不存在,从而确定所述女性妊娠受试者体内的胎儿的性别;以及用所述手持式设备将所述性别传递至另一受试者。155. 根据实施方案154所述的方法,其中检测和传递同时发生。156. 根据实施方案154所述的方法,其中所述体积不大于120  $\mu$ L。157. 根据实施方案154所述的方法,其中获得不包括静脉切开术。158. 根据实施方案154所述的方法,其中所述女性妊娠受试者通过将其皮肤压靠所述手持式设备的经皮穿刺装置来执行所述获得。159. 根据实施方案158所述的方法,其中所述女性妊娠受试者将手指压靠所述经皮穿刺装置。160. 根据实施方案158所述的方法,其中所述女性妊娠受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过一次。161. 根据实施方案158所述的方法,其中所述女性妊娠受试者将其皮肤压靠所述经皮穿刺装置不超过两次。

#### 实施例

[0313] 给出以下实施例是为了说明本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的各种实施方

案的目的,而不意在以任何方式限制本发明的方法、设备、系统和试剂盒。本实施例以及本文描述的方法是当前代表性的优选实施方案,是示例性的,并且不旨在限制本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的范围。本领域技术人员将想到其变化和其他用途,这些变化和用途包含在由权利要求的范围所定义的本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的精神内。

#### 实施例1:用于分析来自全血的无细胞核酸的设备

[0314] 为了分析无细胞胎儿核酸的目的,构建了从母体全血分离血浆的纯化设备。该设备由6层组成。从下到上分别是:

[0315] (1) 下粘合片

[0316] (2) 下分离盘:粘合片材料(对DNA或血浆呈惰性的聚合物材料)的16mm直径的圆盘,面向下粘合片的一侧带有胶。

[0317] (3) 各种大小的聚醚砜(PES)膜,通常在6至16mm之间,优选设计特征为10mm PES膜。该膜用作芯吸材料,其通过毛细管力从过滤器吸引血浆。

[0318] (4) 滤盘(例如, Pall Vivid™膜),直径16mm,粗糙面向上,光面朝向PES膜。

[0319] (5) 上分离盘:与下分离盘的材料相同,大小为12或14mm直径,中间含有4mm孔。当使用粘合片材料时,现在胶面向上以与上粘合片接触。上分离盘的直径小于滤盘的直径。这允许来自上粘合片的胶与滤盘的边缘相互作用,从而在边缘处将其密封。

[0320] (6) 上粘合片,在设备中心将位于的位置穿刺有6mm的孔。

[0321] 所有层在其中心对准,然后使用标准的办公室层压机进行层压。

[0322] 为了评估血浆向PES膜上的转移,在将血浆施加到滤盘之前和之后对膜进行称重。设备结构略有改变,以允许快速移取PES膜。代替将从上分离盘至下分离盘的层夹在粘合片之间,将一组同心的间隔盘施加于设备的顶部,以确保过滤器与PES膜之间的紧密配合。下分离盘被石蜡膜层代替。通过上粘合片中的孔和上分离盘中的孔将80μl全血施加到设备的中心。选择该体积以使转移到PES膜上的血浆量最大化。然而,用10μl的血液可以获得一定体积的血浆(0.5μl至1μl),这足以用于Y染色体检测。血液通过毛细管力向心地分布在整个滤盘上。血浆还被毛细管力通过滤盘芯吸到PES膜中。约两分钟后,平均6.3μg血浆转移到PES膜,这表明约6至7μl血浆已转移到PES膜,如以下表2中所示。

施加于 Vivid™ 过滤器的血液体 积	过滤后的 PES/ 下盘重量 (μg)	过滤后的 PES/ 下盘重量 (μg)	PES 膜中的血浆 (μg)
80	46.7	51	4.3
80	52	61	9
80	53.5	59.3	5.8
80	59	65.3	6.3
平均值	52.8	59.15	6.35

[0323] 考虑到上述结果,将40μl男性全血转移到具有12mm上盘配置的设备上。将含有血浆的PES膜转移到Eppendorf管(0.5ml)中,并添加100μl EB缓冲液(QGEN)以洗脱PES膜上的DNA。在DNA从膜洗脱后,将10μl含有洗脱的cfDNA的缓冲液直接用于分子扩增反应。如实施

例3所述,用对Y染色体上的标志物具有特异性的引物对洗脱的cfDNA执行实时重组酶聚合酶扩增。图3示出了约12分钟开始的Y染色体区域的阳性扩增。

#### 实施例2:用于分析来自母体血液的胎儿无细胞核酸的设备

[0324] 该设备由多层组成,如实施例1所例示的。

[0325] 对设备的血液施加和过滤进行如下:

[0326] 通过上粘合片中的孔和上分离盘中的孔将40 $\mu$ l至60 $\mu$ l的全血施加到设备的中心。血液通过毛细管力向心地分布在整个滤盘上。血浆还被毛细管力通过滤盘芯吸到PES膜中。约两分钟后,最大量的血浆已转移到PES膜中。

[0327] 含有无细胞核酸的PES膜回收如下:

[0328] 将设备在PES膜的边缘周围切开。膜很容易地与过滤器和下盘分离。

[0329] DNA从膜洗脱如下:

[0330] 将含有血浆的PES膜转移到Eppendorf管(0.5ml)中,并添加100 $\mu$ l洗脱缓冲液(洗脱缓冲液可以是H<sub>2</sub>O、EB缓冲液(QGEN)、PBS、TE或其他适合于后续分子分析的缓冲液)。在DNA从膜洗脱后,将含有洗脱的cfDNA的缓冲液直接用于分子扩增反应。

[0331] 根据实施例3中所述的方法执行洗脱的cfDNA的扩增和所得扩增产物的检测。

#### 实施例3.使用重组酶聚合酶扩增检测人Y染色体DNA

[0332] 血浆样品中人Y染色体DNA的扩增和检测通过各种方法执行:

使用RPA和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测Y染色体靶标:

[0333] 按照标准方案,使用TwistAmp基础试剂盒(TwistDx,Cambridge,UK)进行50ng(15151个拷贝)的男性基因组DNA的重组酶聚合酶扩增。简而言之,将29.5 $\mu$ l的再水化缓冲液与3 $\mu$ l的每种扩增引物(10 $\mu$ M)(IDT,Coralville,IA)、2 $\mu$ l的水和10 $\mu$ l的DNA模板混合。将47.5 $\mu$ l的该混合物与所提供的冻干RPA酶(uvsX、uvsY、gp32、Bsu)混合。在冻干RPA酶重悬后,将反应混合物添加至2.5 $\mu$ l的280mM乙酸镁,并充分混合以激活RPA反应。反应在37摄氏度下温育20分钟,每5分钟进行搅拌以重新分散PEG聚集的试剂。在RPA温育后,立即按照制造商说明使用Qiagen MinElute柱(Qiagen Corporation,Valencia,CA)通过在10 $\mu$ l缓冲液EB中洗脱来纯化产物。然后使用Invitrogen NuPAGE凝胶和Mini Gel Tank系统(以1xTBE作为运行缓冲液(Thermo Fisher,Carlsbad,CA))在150V(恒定)下对纯化的RPA产物进行10%TBE PAGE处理约1小时。凝胶泳道含有2 $\mu$ l纯化的RPA产物或低分子量DNA的梯(NEB,Ipswich,MA)、6 $\mu$ l蒸馏水和2 $\mu$ l 5x Novex加样染料(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)。在室温、搅拌下,在200ml 1xTBE缓冲液(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)中使用20 $\mu$ l SyberSafe染料进行凝胶染色20分钟。染色后,凝胶被可视化,并使用蓝光E-Gel Safe成像仪实时透照仪(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA.)捕获图像。表3列出了针对特定RPA反应的引物序列。结果示于图4中。

表3.用于扩增Y染色体序列的引物

基因	寡核苷酸 ID	序列 (5'-3')	取向	检测方法
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_1 _F_Long	CTTCGGCCTTTCTAGTGGA GAGGTGCTCTCG (SEQ ID NO. 6)	有义	RPA、 PCR、 RPA-Exo 、RPA-LF
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_5 _R_Long	CCTGCTCCGGCTTTCCACA GCCACACTGGT (SEQ ID NO. 7)	反义	RPA、 PCR、 RPA-Exo
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_5 _R_long_ _LF_BioT EG	BioTEG- CCTGCTCCGGCTTTCCACA GCCACACTGGT (SEQ ID NO. 8)	反义	RPA-LF
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_1 0_Exo-P- 1	ACCGATGGGCAGCTCGGC GTCGATGTGACTCT[FAM][ dSpacer]T[BHQ1]GGGGAAC AAAGGG-C3 (SEQ ID NO. 9 )	有义	RPA-Exo
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_1 0_LF-P-1	FAM- ACCGATGGGCAGCTCGGC GTCGATGTGACTCT[dSpace r]TGGGGAACAAAGGG-C3 (SEQ ID NO. 10)	有义	RPA-LF
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_5 _F_long	TCTTTGGGGAACAAAGGG GAGTTGCCACGG (SEQ ID NO. 11)	有义	RPA、 PCR
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	DYS14_4 _R_long	CTTCTGCTCTTCAAAAAGA TGCCCCAAACGT (SEQ ID NO. 12)	反义	RPA、 PCR
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	RPA_TSP Y1_2_F2	GAGCGGAAGAGGTTTTTC AGTGAATGAAGC (SEQ ID NO. 13)	有义	RPA、 PCR
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	RPA_TSP Y1_2_R2	GTCTGAGGAGTGGCAGAA TCTGCTTATAGC (SEQ ID NO. 14)	反义	RPA、 PCR
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	LF_TSPY 1_2_F2	Bio- GAGCGGAAGAGGTTTTTC	有义	RPA-LF

		AGTGAATGAAGC (SEQ ID NO. 15)		
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	LF_TSPY 1_2_R2	DigN- GTCTGAGGAGTGGCAGAA TCTGCTTATAGC (SEQ ID NO. 16)	反义	RPA-LF
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	RPA_TSP Y1_3_F3	TTGTCCTGCATGCGGCAGA GAAACCCTTGG (SEQ ID NO. 17)	有义	RPA、 PCR
<i>TSPY</i> <i>1/DYS</i> <i>14</i>	RPA_TSP Y1_3_R3	ATAGCTTCATTCACTGAAA AACCTCTTCCG (SEQ ID NO. 18)	反义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 1_F_long	GCTAATGTCTGTCCTCTCC TAGAACTATGG (SEQ ID NO. 19)	有义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 2_R_long	CTGCCATAAGGTAGAGAA GTAGCCCTTCGT (SEQ ID NO. 20)	反义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 7_F_long	CGCTAGGCAATGGTGGCA TTCATTGTGATGC (SEQ ID NO. 21)	有义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 6_R_long	GACAGCTCTGACAACAGG ACACCAGAGCCT (SEQ ID NO. 22)	反义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 6_F-long	CCTGAGACTAGTGCATTGC ATTGGTGAGGC (SEQ ID NO. 23)	有义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 4_R_long	GCATCATTTTTTTTGACAT CAGGCCACTACTGC (SEQ ID NO. 24)	反义	RPA、 PCR
<i>TTY</i> <i>22</i>	TTY22_ 12_Exo_P -1	ATATTTTCCTCTGTTTAGG AAGGCTGACAGCT[TAMRA ][[dSpacer]T[BHQ2]GACAAC AGGACACC (SEQ ID NO. 25)	反义	RPA-Exo
<i>DYZ1</i>	RPA- DYZ1-F1	GTAGCATTCCACTTTATTC CAGGCCTGTCC (SEQ ID NO. 26)	有义	RPA、 PCR



<i>DYZ1</i>	RPA-DYZ1-R1	AAGAGAATAGAATGGAAT GCAAGCGAAAGG (SEQ ID NO. 27)	反义	RPA、 PCR
<i>DYZ1</i>	LF-DYZ1-F1	Bio- GTAGCATTCCACTTTATTC CAGGCCTGTCC (SEQ ID NO. 28)	有义	RPA、 PCR
<i>DYZ1</i>	LF-DYZ1-R1	6FAM- AAGAGAATAGAATGGAAT GCAAGCGAAAGG (SEQ ID NO. 29)	反义	RPA、 PCR

表4. 通过RPA或PCR检测Y染色体的扩增子序列

基因	扩增子	序列 (5'-3')
<i>TSPY1/DYS14</i>	DYS14-Amp10	CTTCGGCCTTTCTAGTGGAGAGGTGCTCTCGGGG AAGTGTAAGTGACCGATGGGCAGCTCGGCGTCG ATGTGACTCTTTGGGGAACAAAGGGGAGTTGCC ACGGACCAGTGTGGCTGTGGAAAGCCGGAGCAG G (SEQ ID NO. 30)
<i>TSPY1/DYS14</i>	DYS14-Amp11	TCTTTGGGGAACAAAGGGGAGTTGCCACGGACC AGTGTGGCTGTGGAAAGCCGGAGCAGGCGTGGG TACTATTGTCCTGCATGCGGCAGAGAAACCCTTG GTGATGCCGAGCAGCAGACGTTTGGGGCATCTTT TTGAAG AGCAGAAG (SEQ ID NO. 31)
<i>TTY2</i>	TTY22-Amp10	GCTAATGTCTGTCCTCTCCTAGAACTATGGGAAT ATCCTGTGGACCCACACAGAAGAAGGCAAGAA TCCATGGTCTGTGCACCTCCACGAAGGGCTACTT CTCTACCTTATGGCAG (SEQ ID NO. 32)
<i>TTY2</i>	TTY22-Amp11	CGCTAGGCAATGGTGGCATTTCATTGTGATGCTAG CCAGAGCTCACAGCTCAGGCCTGGTGGCCTGAG ACTAGTGCATTGCATTGGTGAGGCAGGCTCTGGT GTCCTGTTGTCAGAGCTGTC (SEQ ID NO. 33)
<i>TTY2</i>	TTY22-Amp12	CCTGAGACTAGTGCATTGCATTGGTGAGGCAGG CTCTGGTGTCTCTGTTGTCAGAGCTGTCAGCCTTC CTAAACAGAGGAAAATATTATAGGCAGTAGTGG CCTGATGTCAAAAAAATGATGC (SEQ ID NO. 34)

使用RPA和琼脂糖凝胶电泳检测Y染色体靶标：

[0334] 按照标准方案,使用TwistAmp基础试剂盒 (TwistDx, Cambridge, UK) 进行重组酶聚合酶扩增。简而言之,将29.5μl的再水化缓冲液与3μl的每种扩增引物 (10uM)、2μl的水和10μl的DNA模板混合。将47.5μl的该混合物与所提供的冻干RPA酶 (uvsX、uvsY、gp32、Bsu) 混合。在冻干RPA酶重悬后,将反应混合物添加至2.5μl的280mM乙酸镁,并充分混合以激活RPA反应。或者,使用RPA酶 (uvsX、uvsY、gp32、Bsu DNA聚合酶 (大片段) 和由New England Biolabs (Ipswich, MA) 制造的缓冲液进行RPA反应。此处,将以下试剂混合至终浓度为:在

50ul反应中,2x NEB缓冲液4,200ng/ul uvsX、40ng/ul uvsY、300ng/ul gp32,7.5U、300nM 基因座特异性引物、200uM dNTP (Life Technologies,Carlsbad,CA.)、3mM ATP、50mM磷酸肌酸(Sigma-Aldrich)、100ng/ul肌酸激酶(Sigma-Aldrich)、5%聚乙二醇(Sigma-Aldrich)。反应在37摄氏度下温育20分钟,每5分钟进行搅拌以重新分散PEG聚集的试剂。然后使用MinElute反应清洁试剂盒(Qiagen Corporation,Valencia,CA)纯化RPA产物,并使用Invitrogen E-Gel EZ和E-Gel iBase(Thermo Fisher,Carlsbad,CA)对其进行4%琼脂糖凝胶电泳15分钟。凝胶泳道含有5-10μl纯化的RPA产物或低分子量25bp DNA的梯(Thermo Fisher,Carlsbad,CA)、8-13μl蒸馏水和2μl 5x Qiagen加样染料(Qiagen Corporation,Valencia,CA)。凝胶被可视化,并使用蓝光E-Gel Safe成像仪实时透照仪(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA.)捕获图像。表3列出了针对特定RPA反应的引物序列。

[0335] 图9示出了使用NEB制造的酶、自组装的ATP再生试剂和PEG,针对Y染色体上的TSPY1 (DYS14) 基因座生成的RPA产物的4%琼脂糖凝胶。加样如下:

泳道M: 梯

泳道1:RPA-DYS14-3 (118bp) -NTC

泳道2:RPA-DYS14-3 (118bp) -女性gDNA (Promega)

泳道3:RPA-DYS14-3 (118bp) -女性gDNA (Zyagen)

泳道4:RPA-DYS14-3 (118bp) -女性ccfDNA

泳道5:RPA-DYS14-3 (118bp) -男性gDNA (Promega)

泳道6:RPA-DYS14-3 (118bp) -男性gDNA (Zyagen)

泳道7:RPA-DYS14-3 (118bp) -男性ccfDNA

凝胶清楚地显示预期的产物仅存在于含有男性DNA的反应中,因此存在于RPA反应的Y染色体靶标中。

使用实时RPA (RPA-Exo) 检测Y染色体靶标:

[0336] 按照标准方案,使用TwistAmp Exo试剂盒(TwistDx,Cambridge,UK) 进行重组酶聚合酶扩增。简而言之,将29.5μl的再水化缓冲液与2.1μl的每种扩增引物(10uM)、0.6μl的探针引物(10uM)、2μl的水和10μl的DNA模板混合。将47.5μl的该混合物与所提供的冻干RPA酶(uvsX、uvsY、gp32、Bsu、外切核酸酶III)混合。在冻干的RPA酶重悬后,将反应混合物添加至2.5μl的280mM乙酸镁,并充分混合以激活RPA反应。将反应在OneStep实时PCR循环仪(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)中于37摄氏度下温育20+分钟,并使用StepOne软件v2.3(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)分析数据。表3列出了针对特定RPA实时反应的引物序列。用于实时检测的探针引物具有内部荧光团(例,如FAM),其通过脱碱基位点和3'帽与黑洞猝灭剂(BHQ)部分隔开,以防止在RPA期间延伸。FAM荧光团在靠近BHQ时被猝灭。当探针与其模板结合时,外切核酸酶III可以切割脱碱基位点,随后释放BHQ,产生FAM荧光,该荧光可以在实时循环仪上读取。

[0337] 如图5所示,可以使用从男性供体全血分离的循环无细胞DNA来检测人Y染色体,因为可以以低至10个拷贝的各种拷贝水平的男性基因组DNA的信号可随输入拷贝的增加而相应增加。内部FAM标记的杂交探针的荧光信号显示为荧光信号与时间(循环)的函数。红线代表ROX信号。由于RPA是等温反应,因此在OneStep实时PCR循环仪上将循环定义为30秒间隔以收集荧光信号。温育在37摄氏度下进行20分钟,这在X轴上显示为40个循环。如图所示,对

于含有人Y染色体模板的RPA反应,在5-20分钟之间发生FAM标记的探针结合、切割和信号(Y轴)的增加。阴性对照模板(水)和女性基因组DNA均如预期未显示检测。

[0338] 通过从约1000个拷贝到10个拷贝的ccfDNA的输入量的连续稀释,进一步评估使用RPA通过ccfDNA中的DYS14基因座检测人Y染色体的能力。如图6所示,基于FAM的荧光信号随着男性人ccfDNA和男性人gDNA的输入量增加而增加。内部FAM标记的杂交探针的荧光信号显示为荧光信号与时间(循环)的函数。底部两条线(平的)代表ROX信号。由于RPA是等温反应,因此在OneStep实时PCR循环仪上将循环定义为30秒间隔以收集荧光信号。温育在37摄氏度下进行40分钟,这在X轴上显示为80个循环。如图所示,对于含有增加量的人类男性ccfDNA模板的RPA反应,发生增加的FAM标记的探针结合、切割和信号(Y轴)。ccfDNA的信号比gDNA的信号强,这可能是由于高度片段化的ccfDNA中重组酶的可及性更高。女性ccfDNA在输入水平为100拷贝时显示无信号,而在1000输入拷贝时显示极低的信号。通过实时检测,使用RPA借助ccfDNA和gDNA以特定的方式清楚地检测人男性Y染色体。

使用RPA和侧流(RPA-LF)检测Y染色体靶标:

[0339] 按照标准方案,使用TwistAmp® nfo试剂盒(TwistDx,Cambridge,UK)进行重组酶聚合酶扩增。简而言之,将29.5 $\mu$ l的再水化缓冲液与2.1 $\mu$ l的每种扩增引物(10uM)、0.6 $\mu$ l的探针引物(10uM)、2 $\mu$ l的水和10 $\mu$ l的DNA模板混合。将47.5 $\mu$ l的该混合物与所提供的冻干RPA酶(uvsX、uvsY、gp32、Bsu、内切核酸酶IV(nfo))混合。在冻干的RPA酶重悬后,将反应混合物添加到2.5 $\mu$ l的280mM乙酸镁,并充分混合以激活RPA反应。或者,使用RPA酶(uvsX、uvsY、gp32、Bsu DNA聚合酶(大片段)和由New England Biolabs(Ipswich,MA)制造的缓冲液进行RPA反应。此处,将以下试剂混合至终浓度为:在50 $\mu$ l反应中,2x NEB缓冲液4、200ng/ $\mu$ l uvsX、40ng/ $\mu$ l uvsY、300ng/ $\mu$ l gp32、7.5U、300nM基因座特异性引物、200uM dNTP(Life Technologies,Carlsbad,CA.)、3mM ATP、50mM磷酸肌酸(Sigma-Aldrich)、100ng/ $\mu$ l肌酸激酶(Sigma-Aldrich)、5%聚乙二醇(Sigma-Aldrich)。反应在37摄氏度下温育20分钟,每5分钟进行搅拌以重新分散PEG聚集的试剂。在RPA温育后,立即通过核酸测流免疫测定(NALFIA)(例如,HybriDetect 2T测流试剂盒(Milenia Biotec,Giessen,Germany)或PCRD核酸检测器测流试剂盒(Abingdon,York,Great Britain))对产物进行可视化。对于Hybridetect 2T条,将RPA产物在测定缓冲液2中按1:50稀释,然后将10 $\mu$ l稀释的RPA产物施加到侧流条,并将条在200 $\mu$ l的测定缓冲液2中温育5分钟以使FAM/生物素标记的RPA产物可视化。对于PCRD条,将5 $\mu$ l RPA产物与70 $\mu$ l PCRD提取缓冲液混合,然后将75 $\mu$ l直接施加于检测器。然后在2-5分钟之间使产物可视化。表3列出了针对特定RPA侧流反应的引物序列。这样的RPA产物的侧流检测需要使用生物素标记扩增引物之一,以及使用抗原部分(在这些情况下为FAM或DIG)标记杂交引物(探针)。该探针含有内部脱碱基位点(此处为dSpacer),并进行3'加帽(此处为C3间隔区)以防止延伸,直至与期望的RPA产物发生杂交;从理论上讲,这增加了反应的特异性。然而,高度特异性的产物允许在无需内部探针的条件下标记扩增引物。

[0340] 图7示出了侧流条,其中在0-20分钟以5分钟时间间隔将人DYS14 Y染色体RPA-LF产物施加到侧流条,以确定是否以及何时出现Y染色体信号。示出了来自HybriDetect 2T的侧流测试条(涂有生物素-配体和金缀合物中的抗FITC抗体的膜)。用FAM和生物素标记的复合RPA分析物在测试条的样品施加中首先与金标记的FITC特异性抗体结合(底部),然后通

过毛细管力在膜上扩散。当捕获有分析物的金颗粒溢出固定的生物素-配体分子时,它们在各异的测试带位置处结合,并随时间生成红-蓝带(下方的带)。未捕获的金颗粒在上方的对照带上流动,并将通过种类特异性抗体固定在那里(上方的带)。随着温育时间的增加,出现了强烈着色的对照带的形成。在施加10 $\mu$ l RPA-LF产物后,将所有测试条在测定缓冲液(Tris缓冲盐水)中温育5分钟。RPA反应的温育时间如下:条1:0分钟;条2:5分钟;条3:10分钟;条4:20分钟。可以看出,DYS14特异性(FAM/生物素捕获的)产物在10分钟处出现,并且在20分钟处也存在。在时间0或时间5分钟处不存在信号,而在所有条上都存在侧流对照信号,这说明了其功能性。

[0341] 图10示出了使用NEB制造的酶、自组装ATP再生试剂和PEG,具有人TSPY1 (DYS14) Y染色体RPA-LF产物的PCRD侧流条。引物用洋地黄毒苷(DIG)和生物素标记,以进行捕获和检测。“C”注释处的线表示与对照缀合物的结合,并且预期是所有样品。DIG缀合物在“1”注释附近结合,而FAM在“2”注释附近结合。从顶部到底部,侧流检测器为:

[0342] 顶部:DYS14 Bio/DIG-NTC

[0343] 中间:DYS14 Bio/DIG-女性gDNA

[0344] 底部:DYS14 BioDIG男性gDNA

[0345] 侧流检测器清楚地证明了用生物素和洋地黄毒苷标记的标记DYS14 RPA产物的特异性结合。

实施例4. 针对Y染色体区域的选定测定设计:

表5-来自高度重复的Y染色体区域(HRYR)的测定序列:

测定ID	有义引物	反义引物	共有靶标序列(扩增子)
Seq01	GAATTCATT GGAAGGAA TGTAAGTA ATGG (SEQ ID NO. 37)	ATTCCATACA TTTTTATTCC ATTCGAGAC C (SEQ ID NO. 38)	TGGAATTCATTGGAATGGAA GGGAATGTAGTGTAATGGA CAGGCCTGGAATAAAGTGG AATGCTACGGTCTCGAATGG AATAAAAATGTATGGAAT (SEQ ID NO. 141)
Seq02	AATCGAAT GGAAAGAT CCAATGGA ATAGAA (SEQ ID NO. 39)	TTACATTCTA CTCTATCTGA GTCGATTTTA (SEQ ID NO. 40)	TAATCGAATGGAAAGTAATC CAATGGAATAGAATCTAATG CAATAAAATCGACTCAGATA GAGTAGAATGTAATGGAAT (SEQ ID NO. 142)
Seq03	AGTAATCCA ATGGAATA GATTCTAAT	CATTACATTC TACTCTATCT GAGTCGATTT	CGAATGGAAAGTAATCCAA TGGAATAGATTCTAATGCAA TAAATCGACTCAGATAGA

	GCAA (SEQ ID NO. 41)	(SEQ ID NO. 42)	GTAGAATGTAATGGAAT (SEQ ID NO. 143)
Seq04	AAACGGAA TGGAATGTA GTGCAATCA AATG (SEQ ID NO. 43)	GATTCAATTC CATTTGATTC TCTTTCATTC (SEQ ID NO. 44)	CTGGAATCAAACGGAATGG AATGTAGTGCAATCAAATGG CATGGAATAAAATAGAATG AAAGAGAATCAAATGGAAT TGAATCGA (SEQ ID NO. 144)
Seq05	AATGGAAA GGACTCGA ATGGAAAT CACTCG (SEQ ID NO. 45)	CATTTGATCC TATTTTATTA AATTGCATTC (SEQ ID NO. 46)	AATGGAAAGGACTCGAATG GAAATCACTCGAATAGAAT GCAATTTAATAAAAATAGGAT CAAATGTAATGGAATG (SEQ ID NO. 145)
Seq06	ATTGGATGG GATTGGAAT GAAATGTA CTGG (SEQ ID NO. 47)	ATTCCATTCC GTTTCATGAA ATTCGAGTCC (SEQ ID NO. 48)	AGATGGGATTGGATGGGATT GGAATGAAATGTACTGGAA AGGACTCGAATTTTCATGAAA CGGAATGGAATGAATTG (SEQ ID NO. 146)
Seq07	AATGAACTC CTTTGGAAT GGTGTAGTA TGC (SEQ ID NO. 49)	ATTACATTCC TTTTGATTCC CTGCCAGTC G (SEQ ID NO. 50)	AGAATGGAATGAACTCCTTT GGAATGGTGTAGTATGCAAT GCAATCGACTGGCAGGGAA TCAAAAGGAATGTAATC (SEQ ID NO. 147)
Seq08	ATGGAATG CAAAAAA TGGAATCCA AAATC (SEQ ID NO. 51)	GAGTCAATT CCTTTCGACA CCCAGCCTTT C (SEQ ID NO. 52)	TGTCATAGAATGTAATGGAA TGCAAAAAAATGGAATCCA AAATCATTGACTGGAAAGG CTGGGTGTCGAAAGGAATTG ACTCCAATGGAA (SEQ ID NO. 148)
21255	AATGGACA GGCCTGGA ATAAAGTG GAATGC (SEQ ID NO. 53)	ATTCCATTCC ATACATTTT ATTCCATTCCG (SEQ ID NO. 54)	AATGGACAGGCCTGGAATA AAGTGGAATGCTACGGTCTC GAATGGAATAAAAATGTAT GGAATGGAATGCAAT (SEQ ID NO. 149)
20202	AATGGAAT GTACTCGAA TGGATTCGA	ATTCCATTGG AGTCCATTCA CTTCCAGAA	AATGGAATGTACTCGAATGG ATTCGACTGGAATGGAATGT TCTGGAAGTGAATGGACTCC

	CTGG (SEQ ID NO. 55)	C (SEQ ID NO. 56)	AATGGAATGGATT (SEQ ID NO. 150)
19805	GATGGACT GGAATCAA ACGGAATG GAATGC (SEQ ID NO. 57)	CATTCTATTT TATTCCATGC CATTTGATTG (SEQ ID NO. 58)	GAACTTTCTTGGATGGACTG GAATCAAACGGAATGGAAT GCARTGCAATCAAATGGCAT GGAATAAAATAGAATGAAA GAGAAT (SEQ ID NO. 151)
18104	AATGGATTG GAATGGAA TGGAATTCA TTGG (SEQ ID NO. 59)	AGGCCTGTC CATTACACTA CATTCCCTTC C (SEQ ID NO. 60)	AATGGATTGGAATGGAATG GAATTCATTGGAATGGAAG GGAATGTAGTGTAATGGAC AGGCCTGGAAT (SEQ ID NO. 152)
17131	ATATAATGG ACTGGAAT GGAATGAA ATCAC (SEQ ID NO. 61)	TTCCATTCC ATTCCATTCC TTCCCATTC (SEQ ID NO. 62)	AGTGGAGTGGACTCGAATAT AATGGACTGGAATGGAATG AAATCACATGGAATGGGAA CGAATGGAATGGAATGGAA A (SEQ ID NO. 153)
15595	AATCGTATG GAATGGCA TCAAACGG AATGG (SEQ ID NO. 63)	ATTCGAGTG CATTCCATT CGTGGCTGTC C (SEQ ID NO. 64)	AATCGTATGGAATGGCATCA AACGGAATGGAATGGACAG CCACGGAATGGAATGCACTC GAATGCAAT (SEQ ID NO. 154)
21099	AATGGATTG GAATGGAA TGGAATTCA TTGG (SEQ ID NO. 65)	AGGCCTGTC CATTACACTA CATTCCCTTC C (SEQ ID NO. 66)	AATGGATTGGAATGGAATG GAATTCATTGGAATGGAAG GGAATGTAGTGTAATGGAC AGGCCTGGAA (SEQ ID NO. 155)
14192	AATGGAATT GAATGGAA AGTAATGC AATGG (SEQ ID NO. 67)	GTTTGATTCC ATTCCGTGA AATTTCGTT C (SEQ ID NO. 68)	AATGGAATGGAATTGAATG GAAAGTAATGCAATGGAAT AGAATGGAACGAAATTTCA CGGAATGGAATCAAAC (SEQ ID NO. 156)
n-mer2	AATGGAAG GGAATGTA GTGTAATGG ACAGG	ATACATTTTT ATTCCATTCC AGACCGTAG	AATGGAAGGGAATGTAGTG TAATGGACAGGCCTGGAAT AAAGTGAATGCTACGGTCT CGAATGGAATAAAATGTA

	(SEQ ID NO. 69)	C (SEQ ID NO. 70)	T (SEQ ID NO. 157)
n-mer11	AAAATCATT GACTGGAA AGGCTGGG TGTCG (SEQ ID NO. 71)	TATCAATTCC ATTCCATTCC ATTAGTTCG (SEQ ID NO. 72)	AAAATCATTGACTGGAAAG GCTGGGTGTCGAAAGGAATT GACTCCAATGGAATGGAATC GAATGGAATGGAAGTGAAT AGAATCGAACTAAATCGAA TGGAATGGAATTGATA (SEQ ID NO. 158)
n-mer22	ACTAGAGT GAAATGGA ATCGAACC ACAAGG (SEQ ID NO. 73)	AGTGCATTCC ATTCCGTGGC TGTCCATTCC (SEQ ID NO. 74)	ACTAGAGTGAAATGGAATC GAACCACAAGGAATGGACA GGAATAGAATGGTCTCGAAT TGAATGGAATCGTATGGAAT GGCATCAAACGGAATGGAA TGGACAGCCACGGAATGGA ATGCACT (SEQ ID NO. 159)
n-mer30	GCATCAAA CGGAATGG AATGGACA GCCACG (SEQ ID NO. 75)	ATTCCATTCC ATTGGAGTC CGTACCAGT CG (SEQ ID NO. 76)	GCATCAAACGGAATGGAAT GGACAGCCACGGAATGGAA TGCACTCGAATGCAATGGAG TCGAAACTAATGGACTGGA ATAGAATGGACTCGACTGGT ACGGACTCCAATGGAATGG AAT (SEQ ID NO. 160)
n-mer43	AATAGAAT GGACTCGA CTGGTACGG ACTCC (SEQ ID NO. 77)	AGACCTTTCC ATTGCAGTCT TTTCCCTTCG (SEQ ID NO. 78)	AATAGAATGGACTCGACTG GTACGGACTCCAATGGAATG GAATCGAATGGAAGGGAAT CGAACGGAAGGAATCGAA CGGAATGGACTCGAAGGGA AAAGACTGCAATGGAAGG TCT (SEQ ID NO. 161)
n-mer52	AATGCATTG GAATGGAA TGTCCTCTA ATGG (SEQ ID NO. 79)	ATTCCAGTAT ATTCCATTGT ATTCGATCCC (SEQ ID NO. 80)	AATGCATTGGAATGGAATGT CCTCTAATGGAATGGATTCTG AGTGGAATGGAATTGAATAT AATGGAGTCGAATGAAATG GAATTGAAAGGAATGGGAT CGAATACAATGGAATATACT GGAAT (SEQ ID NO. 162)
n-mer57	AATGGGCT GGAATGGA AAGGAATC GAAACG (SEQ ID NO. 81)	AGTGCATTCC ATTCCAGTCT CTTCAGTTCG (SEQ ID NO. 82)	AATGGGCTGGAATGGAAAG GAATCGAAACGAATGGAAT GGAATCGAACTGAAGAGAC TGGAATGGAATGCACT (SEQ ID NO. 163)



	NO. 81)		
n-mer66	AGTGGAAT GGAATTGA ATATAATGG AGTCG (SEQ ID NO. 83)	CATTCCAGTA TATTCCATTG TATTCGATCC (SEQ ID NO. 84)	AGTGGAATGGAATTGAATAT AATGGAGTCGAATGAAATG GAATTGAAAGGAATGGGAT CGAATACAATGGAATATACT GGAATG (SEQ ID NO. 164)
n-merP3-1	ATGGGCTG GAATGGAA AGGAATCG AAACG (SEQ ID NO. 85)	GTGCATTCCA TTCCAGTCTC TTCAGTTCG (SEQ ID NO. 86)	ATGGGCTGGAATGGAAAGG AATCGAAACGAATGGAATG GAATCGAACTGAAGAGACT GGAATGGAATGCAC (SEQ ID NO. 165)
n-merP3-2	AAGGAATG GAATCGAA TGGCAAGA AATCG (SEQ ID NO. 87)	TTCCATTCCG TTCCGTTCAC ATCAATTCC (SEQ ID NO. 88)	AAGGAATGGAATCGAATGG CAAGAAATCGAATGTAATG GAATCGCCAGGAATTGATGT GAACGGAACGGAATGGAAT (SEQ ID NO. 166)
n-merP3-3	AGTGGAAT GGAATTGA ATATAATGG AGTCG (SEQ ID NO. 89)	CATTCCAGTA TATTCCATTG TATTCGATCC (SEQ ID NO. 90)	AGTGGAATGGAATTGAATAT AATGGAGTCGAATGAAATG GAATTGAAAGGAATGGGAT CGAATACAATGGAATATACT GGAATG (SEQ ID NO. 167)
n-merP3-4	AAACGGAA TCGAATGTC ATAGAATGT AATGG (SEQ ID NO. 91)	ACACCCAGC CTTTCCAGTC AATGATTTTG G (SEQ ID NO. 92)	AGTGGAATGGAATTGAATAT AATGGAGTCGAATGAAATG GAATTGAAAGGAATGGGAT CGAATACAATGGAATATACT GGAATG (SEQ ID NO. 168)
n-merP3-5	ATGGAAAG GACTCGAAT GGAAATCA CTCG (SEQ ID NO. 93)	CTTTCCATTG CATTCCATTA CATTTGATCC (SEQ ID NO. 94)	ATGGAAAGGACTCGAATGG AAATCACTCGAATAGAATGC AATTTAATAAAATAGGATCA AATGTAATGGAATGGAATG GAAAG (SEQ ID NO. 169)
u15pp005	AATGGGCT GGAATGGA AAGGAATC GAAACG (SEQ ID	AGTGCATTCC ATTCCAGTCT CTTCASTTCG (SEQ ID NO. 96)	AATGGGCTGGAATGGAAAG GAATCGAAACGAATGGAAT GGAATCGAACTGAAGAGAC TGGAATGGAATGCACT (SEQ ID NO. 170)



	NO. 95)		
u15pp 001	AATGGAAT GGAATGGA AAGGAATC GAAACG (SEQ ID NO. 97)	ATTCCATTCT ATACCATTGC TCTCTGTTCC (SEQ ID NO. 98)	AATGGAATGGAATGGAAAG GAATCGAAACGAAAGGAAT GGAGACAGATGGAATGGAA TGGAACAGAGAGCAATGGT ATAGAATGGAAT (SEQ ID NO. 171)
u15pp 004	AATGGRMT GGAATGGA AAGGAATS GAAWCG (SEQ ID NO. 99)	ATTCMATTY CAKTCYCTTC MMTTCGATT CC (SEQ ID NO. 100), 其 中 M=A 或 C; K=G 或 T; 并 且 Y=C 或 T。	AATGGGCTGGAATGGAAAG GAATCGAAACGAATGGAAT GGAATCGAACTGAAGAGAC TGGAATGGAAT (SEQ ID NO. 172)
u15pp 024	AATGGGAA CGAATGGA GTGAAATTG TATGC (SEQ ID NO. 101)	TTCCATTCCA ATCCATTCTT TTCCTTTCGC (SEQ ID NO. 102)	AATGGGAACGAATGGAGTG AAATTGTATGCAGTAGAAG AGAATAGAATGGAATGCAA GCGAAAGGAAAGGAATGGA TTGGAATGGAA (SEQ ID NO. 173)
u15pp 021	AATGGGAA CGAATGGA GTGAAATTG TATGC (SEQ ID NO. 103)	AGTCCGTTCC ATAACACTC CATTCAATTC G (SEQ ID NO. 104)	ATAAAATGGAAGAAAACCTG GCAAGAAATGGAATCGAAA TGAATGGAGTGTTATGGAAC GGACT (SEQ ID NO. 174)
u15pp 022	ATAAAATG GAAGAAAA CTGGCAAG AAATGG (SEQ ID NO. 105)	ATTACATTCA ATTCCTTTTG AGTCCGTTCC (SEQ ID NO. 106)	ATAAAATGGAAGAAAACCTG GCAAGAAATGGAATCGAAA TGAATGGAGTGTTATGGAAC GGACTCAAAAGGAATTGAA TGTAAT (SEQ ID NO. 175)
u15pp 019	CGGAATGG AATAAAAT GGAAGAAA ACTGGC (SEQ ID NO. 107)	AGTCCGTTCC ATAACACTC CATTCAATTC G (SEQ ID NO. 108)	CGGAATGGAATAAAATGGA AGAAAACCTGGCAAGAAATG GAATCGAAATGAATGGAGT GTTATGGAACGGACT (SEQ ID NO. 176)
u15pp 012	AAAAAAAT GGAATCCA	ATTCCATTGG AGTCAATTCC	AAAAAAATGGAATCCAAAA TCATTGACTGGAAAGGCTGG

	AAATCATTG ACTGG (SEQ ID NO. 109)	TTTCGACACC (SEQ ID NO. 110)	GTGTCGAAAGGAATTGACTC CAATGGAAT (SEQ ID NO. 177)
u15pp 052	AATGTAATG AACTTTAAT GGAATGTA CTCG (SEQ ID NO. 111)	ATTGGAGTC CATTCACTTC CAGAACATT CC (SEQ ID NO. 112)	AATGTAATGAACTTTAATGG AATGTACTCGAATGGATTTCG ACTGGAATGGAATGTTCTGG AAGTGAATGGACTCCAAT (SEQ ID NO. 178)
u15pp 111	AATGGAAA GGAATTGA ATGGAGTA GATGGG (SEQ ID NO. 113)	TTTCCAGTAC ATTTCAATTCC AATCCCATCC (SEQ ID NO. 114)	AATGGAAAGGAATTGAATG GAGTAGATTGGATTGGATGG GATTGGAATGAAATGTACTG GAAA (SEQ ID NO. 179)
u15pp 084	AATGGAAT GGAATTGA ATGGAATG GGAACG (SEQ ID NO. 115)	ATTCTCTTCT ACTGCATAC AATTTCACTC C (SEQ ID NO. 116)	AATGGAATGGAATTGAATG GAATGGGAACGAATGGAGT GAAATTGTATGCAGTAGAA GAGAAT (SEQ ID NO. 180)
u15pp 104	CAATGGAA TAGAATGG AACGAAAT TTCACG (SEQ ID NO. 117)	CATTTGATTT GATTCCATTG ATTTGATTCC (SEQ ID NO. 118)	CAATGGAATAGAATGGAAC GAAATTTACGGAATGGAAT CAAATGAATGGAATCAAA TCAATGGAATCAAATCAAAT G (SEQ ID NO. 181)
u15pp 077	TGGAAAGG AATGGACTC AAATTGAA AGGGC (SEQ ID NO. 119)	ATTACATTCG TGTTCAATTCC ATTCCAGAC C (SEQ ID NO. 120)	TGGAAAGGAATGGACTCAA ATTGAAAGGGCTCGAAAGG AATGGAGTCAAATGGAATG GTCTGGAATGGAATGAACA CGAATGTAAT (SEQ ID NO. 182)
u15pp 129	ATTGGAATG GAAGGGAA TGTAAGTGA ATGG (SEQ ID NO. 121)	ATTCGAGAC CGTAGCATTG CACTTTATTG C (SEQ ID NO. 122)	ATTGGAATGGAAGGGAATG TAGTGTAATGGACAGGCCTG GAATAAAGTGAATGCTAC GGTCTCGAAT (SEQ ID NO. 183)
u15pp 137	AATGGAAT GCAAGCGA AAGGAAAG GAATGG	AGGCCTGTC CATTACACTA CATTCCCTTC	AATGGAATGCAAGCGAAAG GAAAGGAATGGATTGGAAT GGAATGGAATTCATTGGAAT GGAAGGGAATGTAGTGTA

	(SEQ ID NO. 123)	C (SEQ ID NO. 124)	TGGACAGGCCT (SEQ ID NO. 184)
u15pp 131	ATTGGAATG GAAGGGAA TGTAAGTGA ATGG (SEQ ID NO. 125)	CGAGACCGT AGCATTCCA CTTTATTCCA GG (SEQ ID NO. 126)	ATTGGAATGGAAGGGAATG TAGTGTAATGGACAGGCCTG GAATAAAGTGGGAATGCTAC GGTCTCG (SEQ ID NO. 185)
u15pp 132	ATTGGAATG GAAGGGAA TGTAAGTGA ATGG (SEQ ID NO. 127)	GAGACCGTA GCATTCCACT TTATTCCAGG C (SEQ ID NO. 128)	ATTGGAATGGAAGGGAATG TAGTGTAATGGACAGGCCTG GAATAAAGTGGGAATGCTAC GGTCTC (SEQ ID NO. 186)
u15pp 145	ATTGGAATG GAAGGGAA TGTAAGTGA ATGG (SEQ ID NO. 129)	AGACCGTAG CATTCCACTT TATTCCAGGC C (SEQ ID NO. 130)	ATTGGAATGGAAGGGAATG TAGTGTAATGGACAGGCCTG GAATAAAGTGGGAATGCTAC GGTCT (SEQ ID NO. 187)
u15pp 187	AATGGACA GGCCTGGA ATAAAGTG GAATGC (SEQ ID NO. 131)	ATTCCATACA TTTTTATTCC ATTCGAGAC C (SEQ ID NO. 132)	AATGGACAGGCCTGGAATA AAGTGGGAATGCTACGGTCTC GAATGGAATAAAAAATGTAT GGAAT (SEQ ID NO. 188)
u15pp 183	AATGGAAT GGTCTGGA ATGGAATG AACACG (SEQ ID NO. 133)	ATTCCATTTC TTTATATTCC ATGCCATTCC (SEQ ID NO. 134)	AATGGAATGGTCTGGAATG GAATGAACACGAATGTAAT GCAACCCAATAGAATGGAA TCGAATGGCATGGAATATAA AGAAATGGAAT (SEQ ID NO. 189)
u15pp 207	AGTGGAAT GGAATTGA ATATAATGG AGTCG (SEQ ID NO. 135)	ATTGTATTTCG ATCCCATTTCC TTTCAATTCC (SEQ ID NO. 136)	AGTGGAATGGAATCGAATA TAATGGAGTCGAATGAAAT GGAATTGAAAGGAATGGGA TCGAATACAAT (SEQ ID NO. 190)
u15pp 176	AATGCAAT GGAATCTA ATGAAACG GAAAGG (SEQ ID NO. 137)	CCATTCGTTT CGATTCTTT CCATTCCAGC (SEQ ID NO. 138)	AATGCAATGGAATCTAATGA AACGGAAAGGAAAGGAATG GAATGGAATGGAATGGGCT GGAATGGAAAGGAATCGAA ACGAATGG (SEQ ID NO. 191)

ul5pp 177	AATGGCATC AAACGGAA TGGAATGG ACAGC (SEQ ID NO. 139)	ATTCCAGTCC ATTAGTTTCG ACTCCATTGC (SEQ ID NO. 140)	AATGGCATCAAACGGAATG GAATGGACAGCCACGGAAT GGAATGCACTCGAATGCAAT GGAGTCGAAACTAATGGAC TGGAAT (SEQ ID NO. 192)
--------------	---	---	--

[0346] 使用UCSC公共浏览器软件 (<https://genome.ucsc.edu>) ,将来自表5的扩增子Seq02与相应的人类基因组参考序列进行比对。可视化的是与所选比对序列Seq02相关的Y染色体区域,该序列位于Y染色体的q臂上。该可视化表明Seq02扩增子序列在Y染色体上出现至少16次。重要的是,注意当选择重复多次但也是Y染色体独特的区域时,这些区域通过生物信息学鉴定。出乎意料的是,在以下实施例中获得实验数据显示,该区域的重复比与参考序列的比对所表明的高得多。部分原因可能是由于重复区域非常难以作图,因此参考基因组在这些区域中的准确性较低。

#### 实施例5.从具有靶序列的多个拷贝的区域进行实时测定

[0347] 为了确定是否将高度重复的Y染色体区域(HRYR)的扩增转化为更高的扩增效率,特别是在涉及循环无细胞DNA(ccfDNA)的情况下,使用定量实时PCR检查来自HRYR的几种扩增子。使用基因组当量(GE)来描述每个基因座扩增的物质质量。使用单拷贝性别决定区Y基因(SRY)来定义基因组当量,用于在样品与测定之间进行比较。来自Y染色体特异性重复DNA家族(DYZ1)区域的测定也纳入Y染色体作为参考。确定该区域的扩增效率比SRY大50-100倍(例如,每1GE的SRY生成90GE的DYZ1)。图11示出了几个HRYR基因座的发现,这些发现基于用男性ccfDNA对GE(100-1)的连续滴定。如图11中所示,正如真实的定量测量的预期,四个基因座均显示GE随着输入的减少而明显减少,DYZ1也是如此。此外,HRYR的所有四种测定显示相对于DYZ1的GE扩增增加了30-40倍,相当于相对于SRY增加了1500倍以上。

[0348] 还通过比较从男性或女性ccfDNA样品生成的GE来测试HRYR基因座的特异性,从而确定HRYR对于Y染色体是真正独特的。如图12中所示,使用1个SRY GE当量作为模板,对于女性样品没有生成GE,而男性样品正如预期生成1800-2600个GE。

#### 实施例6.使用Pall Vivid™膜分离的来自至少50μl血液的与区域无关的数据

[0349] 示例性装置的一个重要功能是从全血分离血浆,以使宿主DNA(或在产前检查的情况下为母体DNA)的背景最小化。这种分离改善了灵敏度和特异性。在妊娠初期为了以无创方式确定胎儿性别,该设备可从ccfDNA特异性检测胎儿Y染色体拷贝。测试了多个膜从人全血过滤血浆组分的能力。发现最有效的是Pall Corporation Vivid™血浆分离膜(以下称为Vivid™膜)。图13示出了使用Vivid™膜与标准用于测量ccfDNA生物标志物的标准离心方法从少于50微升(μl)的男性全血分离的血浆之间的比较。基于通过DYZ1经由qPCR测定的Y染色体ccfDNA的量来测量血浆的活力。使用被修饰用于使用这样的低血浆量的基于顺磁性珠子方法(来自Ambion/Thermo Fisher的MagMax™试剂盒,按比例缩小至使用10μl样品)从10μl血浆分离并纯化核酸(ccfDNA)。如图13中所示,经离心的血浆和Vivid™膜分离的血浆均产生了500或更高的DYZ1的GE,其相对于1GE SRY归一化。根据两种方法的配对t检验,两种方法产生的平均拷贝显示无差异(p值0.087,接受零假设)。

[0350] 本实施例显示,可以通过过滤步骤产生血浆。实验中使用的血液的量很小(50μl),

因此这证明了无需离心即可从低输入量的血液有效地获得少量血浆。这很重要,因为离心机不能用作照护点(也称为需求点)设备的方法。

实施例7. 来自少量血浆(10  $\mu$ l至40  $\mu$ l)的DNA提取的数据:基于珠子与基于柱

[0351] 从较低体积的血浆(10 $\mu$ l至40 $\mu$ l)稳健地分离和纯化ccfDNA是胎儿性别测定设备的重要特征。对两种主要的核酸分离方法进行了修改和测试,以适应这样的低体积,该方法为基于柱和基于顺磁性珠子的。这些方法的商业版本用于原理验证(proof-of-principal)目的。使用Qiagen Investigator试剂盒进行基于柱的提取,使用ThermoFisher MagMax试剂盒进行基于珠子的提取。使用qPCR通过针对DYZ1的引物测量提取可扩增ccfDNA的方法的效率。图14示出了两种方法相比较的产率,其中20 $\mu$ l人血浆作为输入以从男性和女性受试者进行提取。可以看出,通过相对于1GE SRY归一化的DYZ1所测量的,两种方法均产生1500GE以上。基于配对t检验,在两种方法之间未观察到差异(p值0.732,接受零假设)。水或女性血浆样品的提取产生可忽略量的可扩增靶标。数据表明,从非常低的血浆体积(10 $\mu$ l至20 $\mu$ l)提取可扩增的ccfDNA是可以实现的,诸如从20 $\mu$ l至40 $\mu$ l血液样品所预计的。图13还证明了在血浆膜分离40 $\mu$ l血液后,从10 $\mu$ l血浆提取的ccfDNA的活力。

[0352] 虽然本文已经示出并描述了本文公开的本发明方法、设备、系统和试剂盒的优选实施方案,但对于本领域技术人员将会显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本文公开的方法、设备、系统和试剂盒的情况下现将想到多种变化、改变和替换。应当理解,本文所述的方法、设备、系统和试剂盒的实施方案的各种替代方案可以用于实践使用本文公开的设备、系统和试剂盒的方法。旨在涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同项。

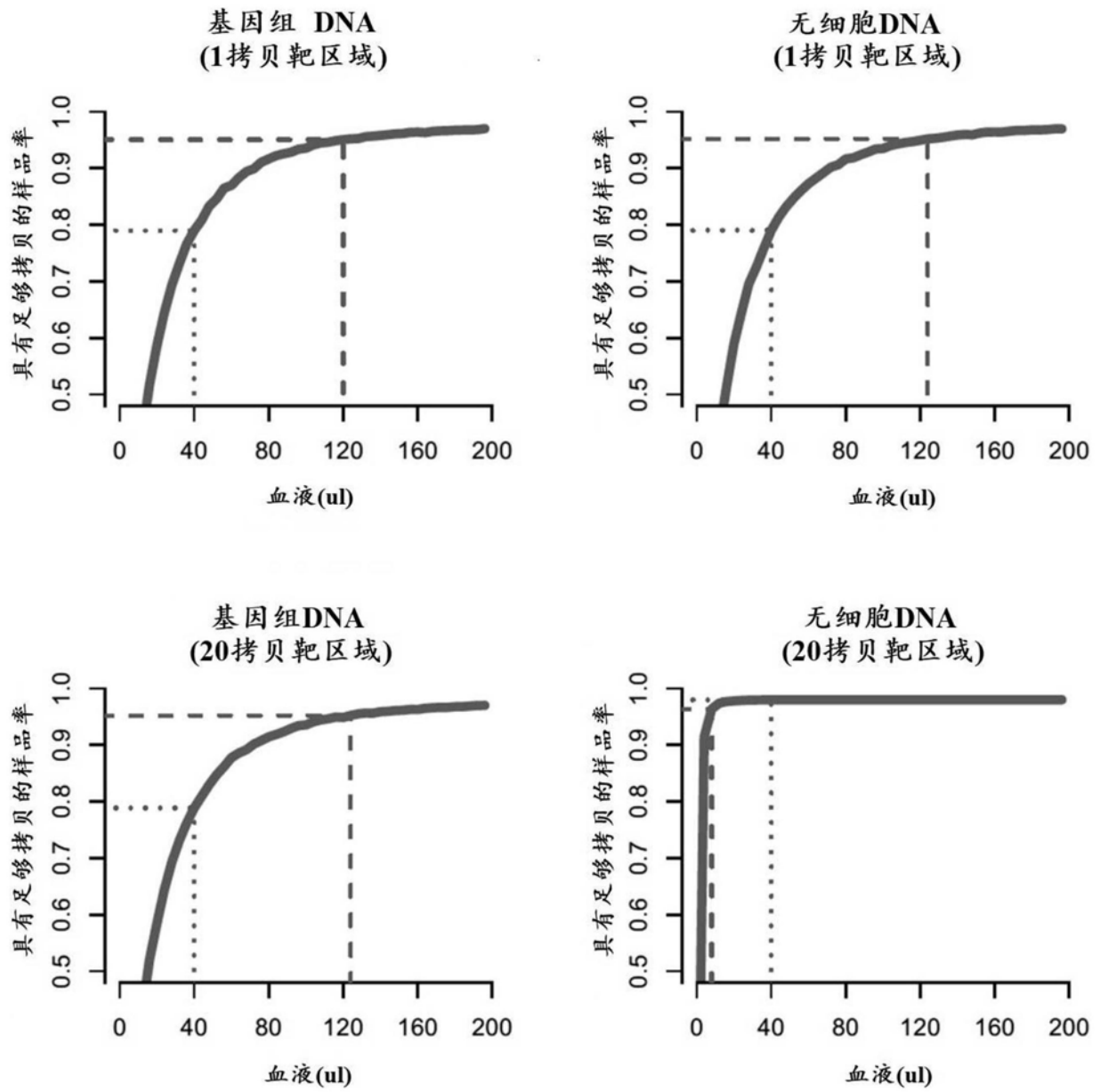


图1

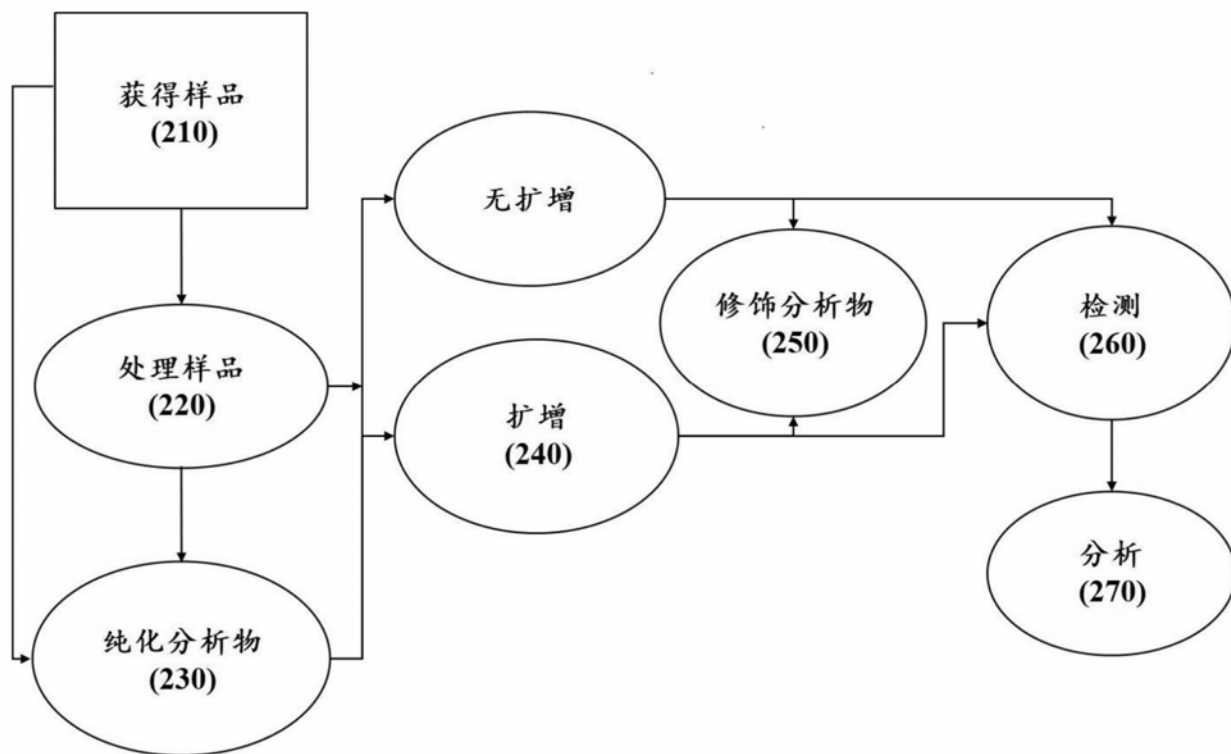


图2

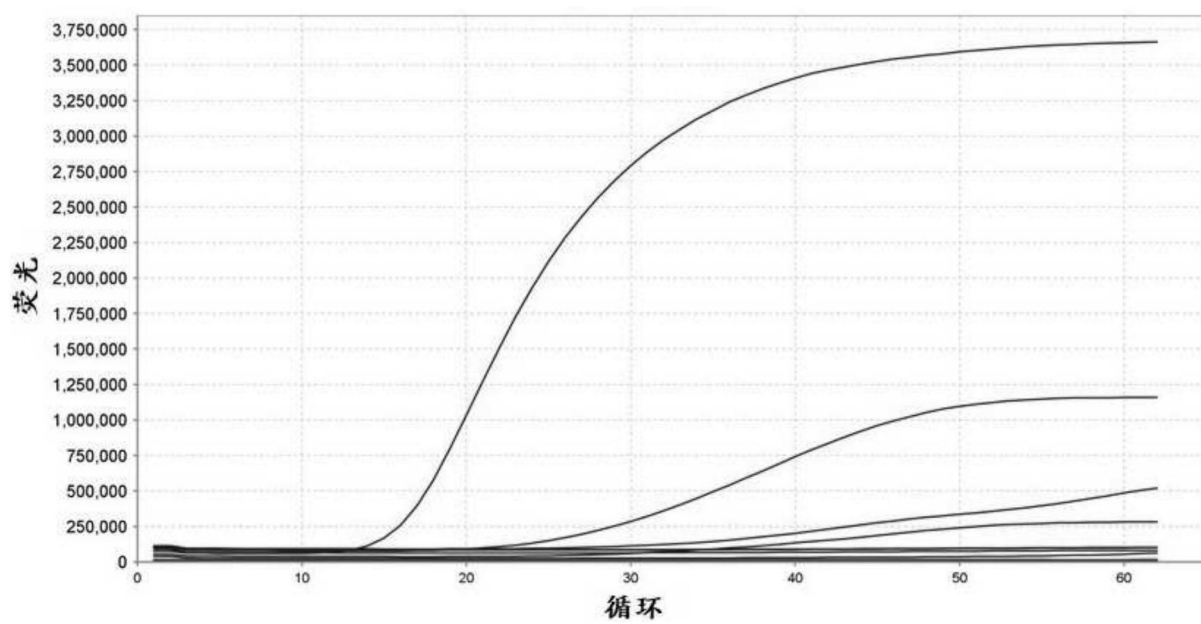


图3

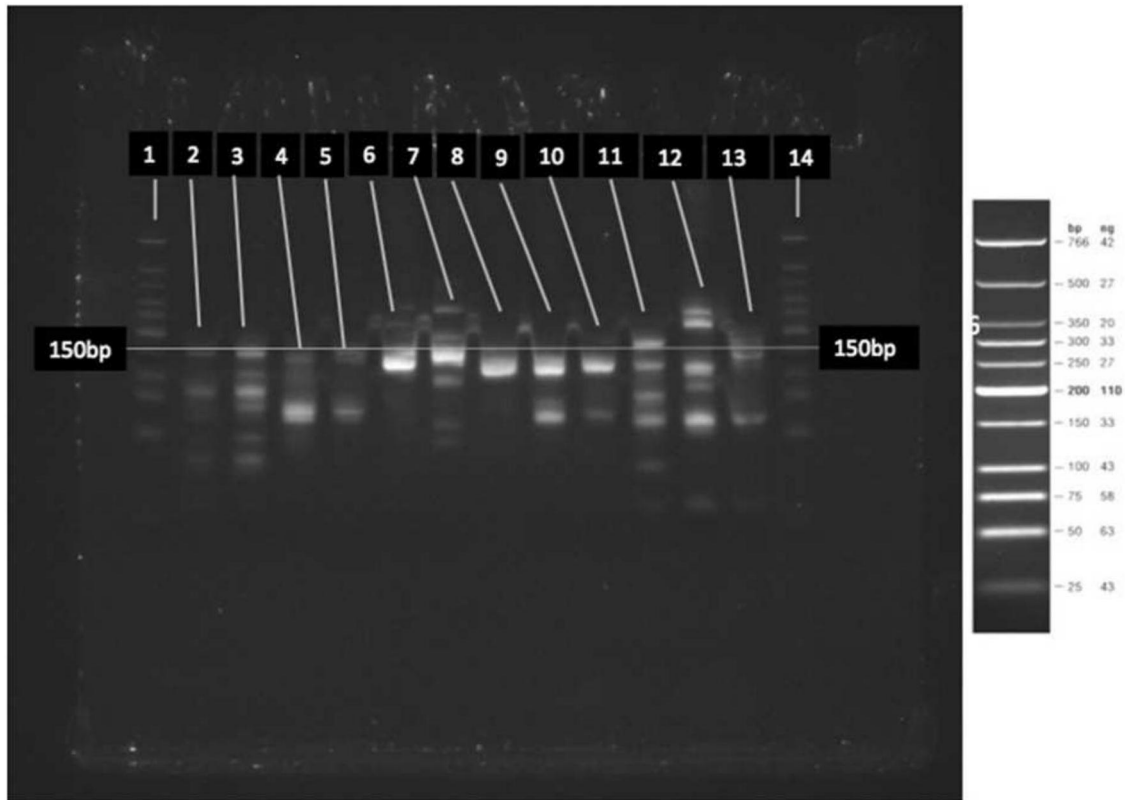


图4

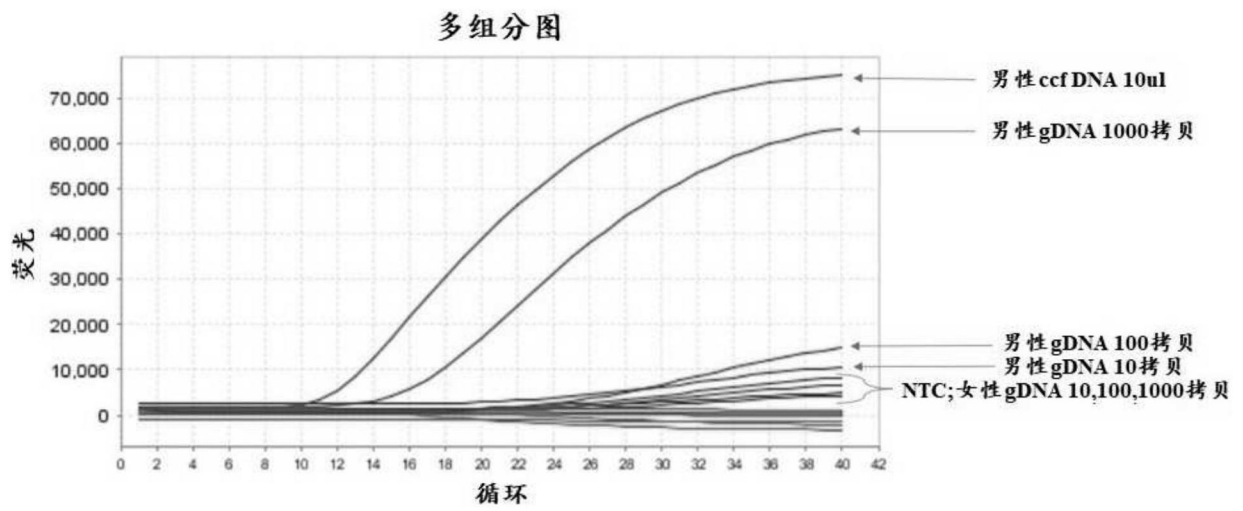


图5



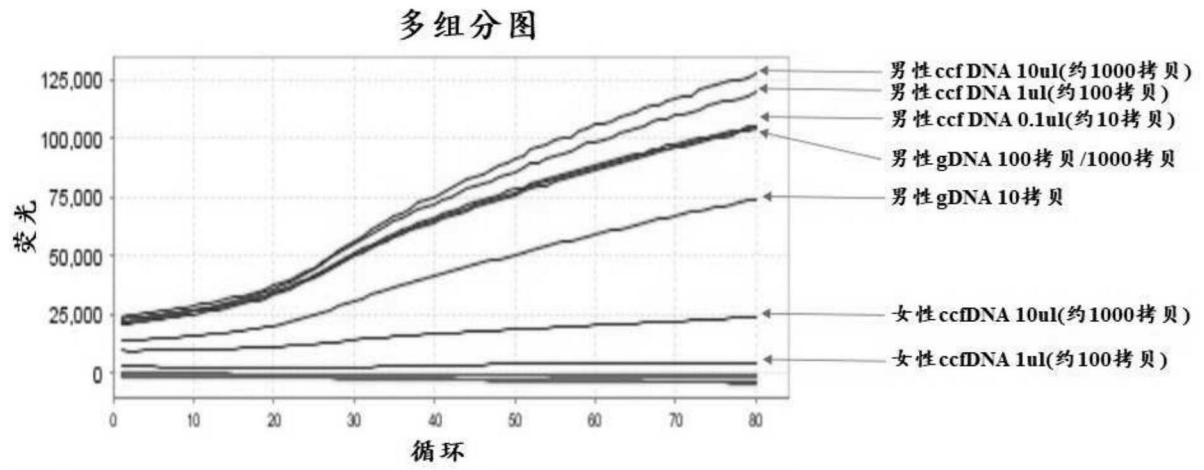


图6

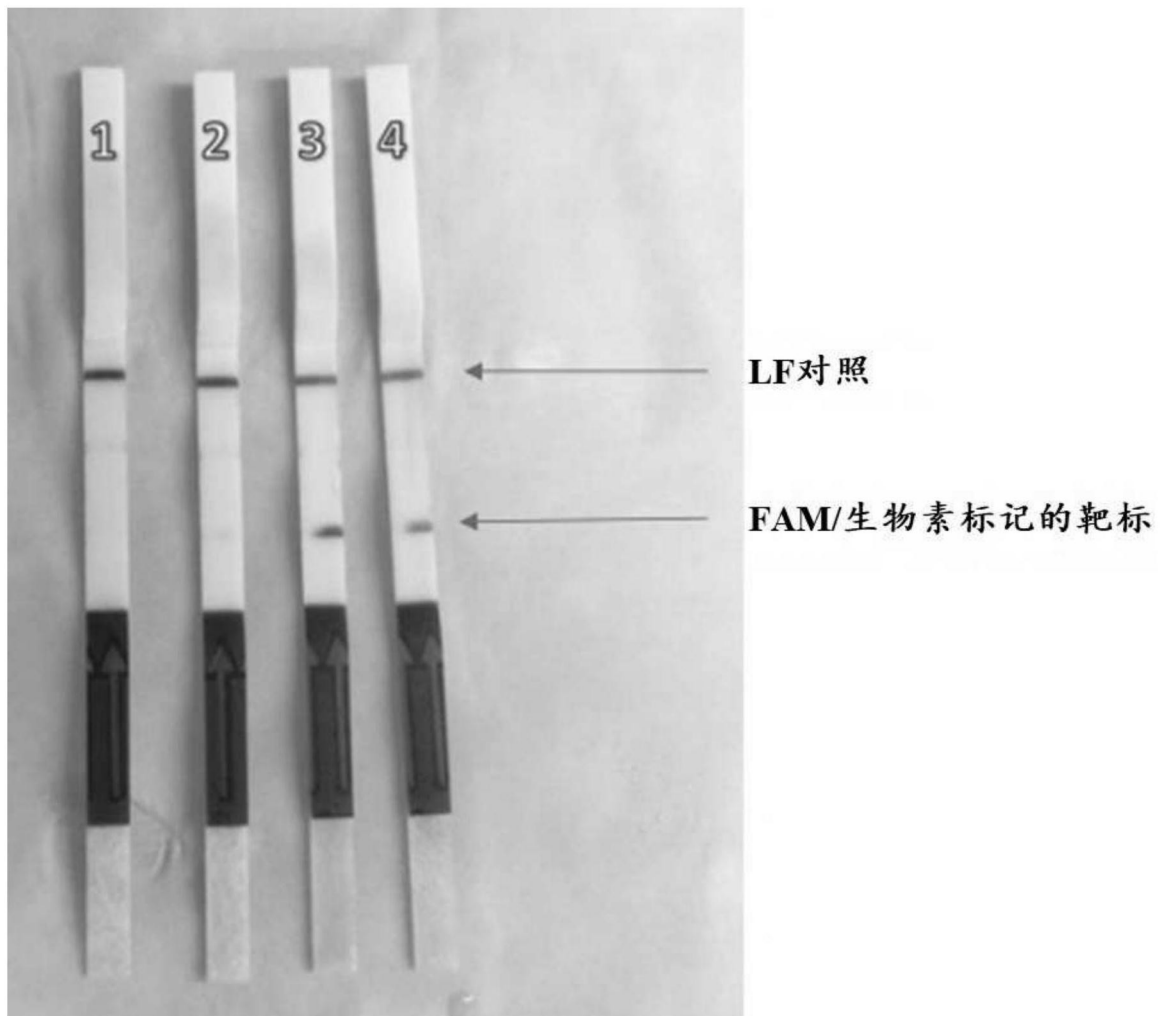


图7



图8A



图8B



图8C



图8D



图8E



图8F



图8G



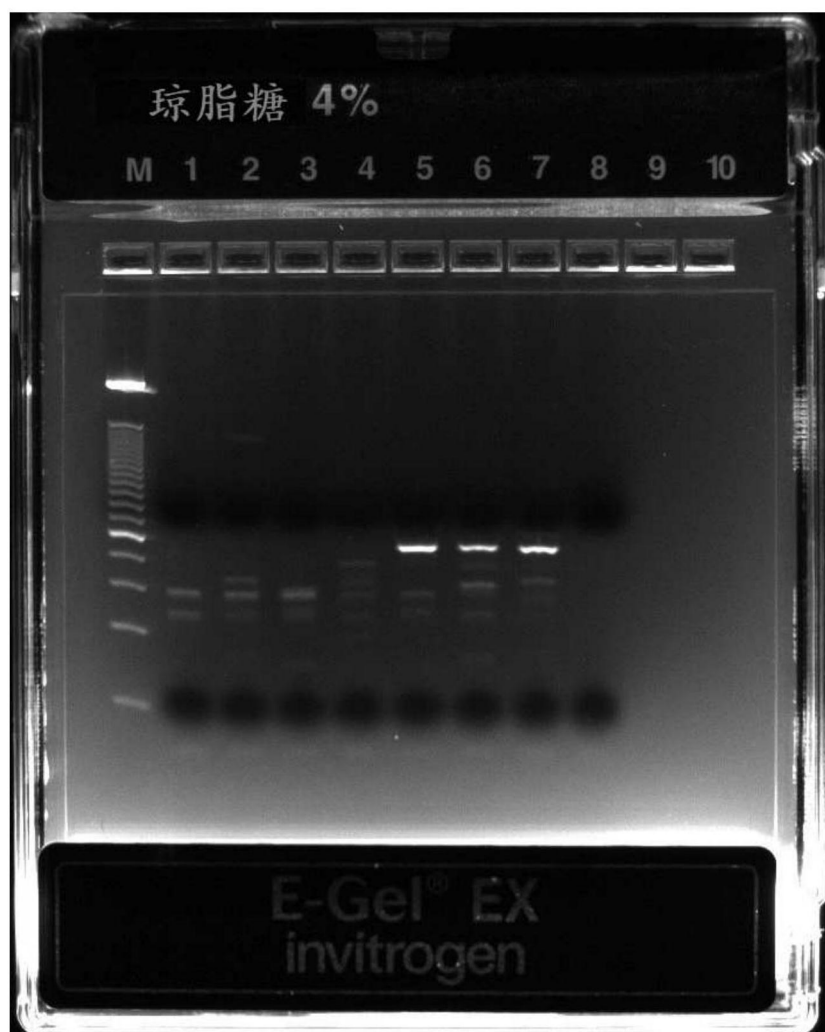


图9

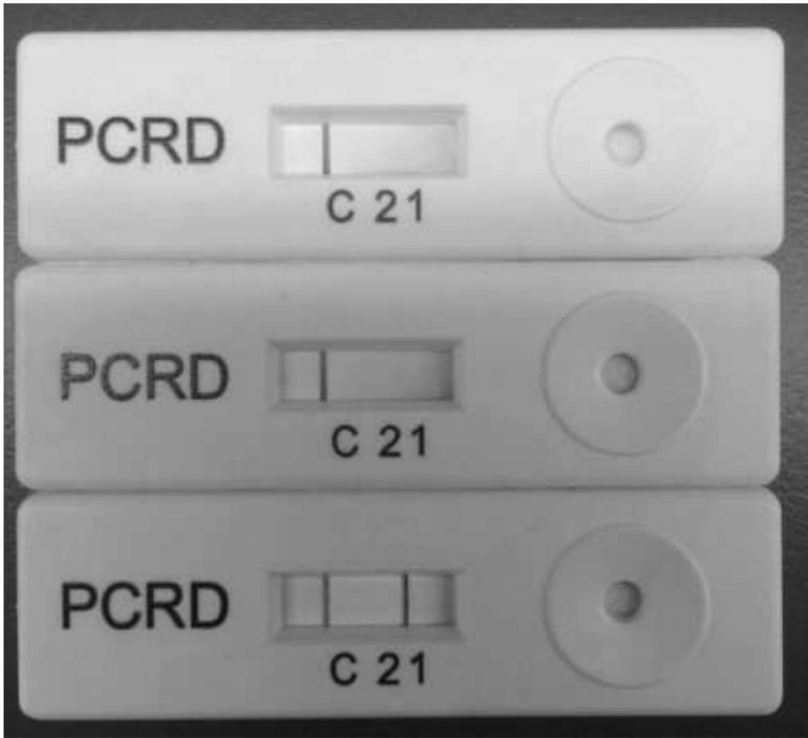


图10

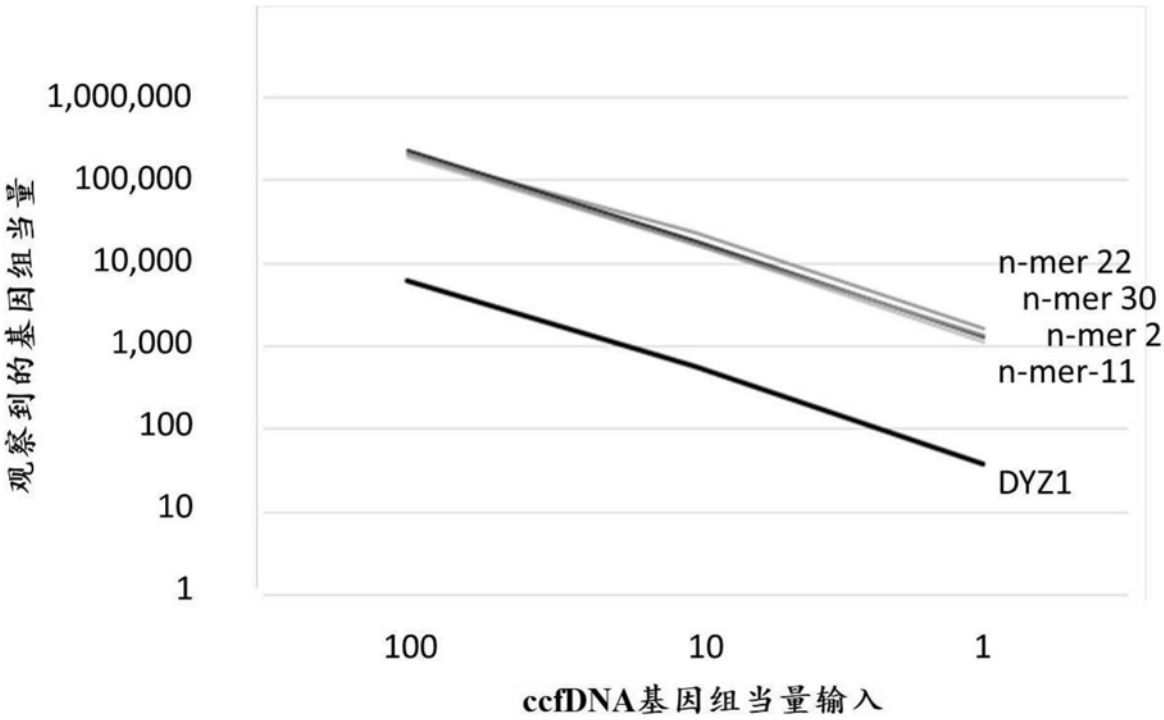


图11

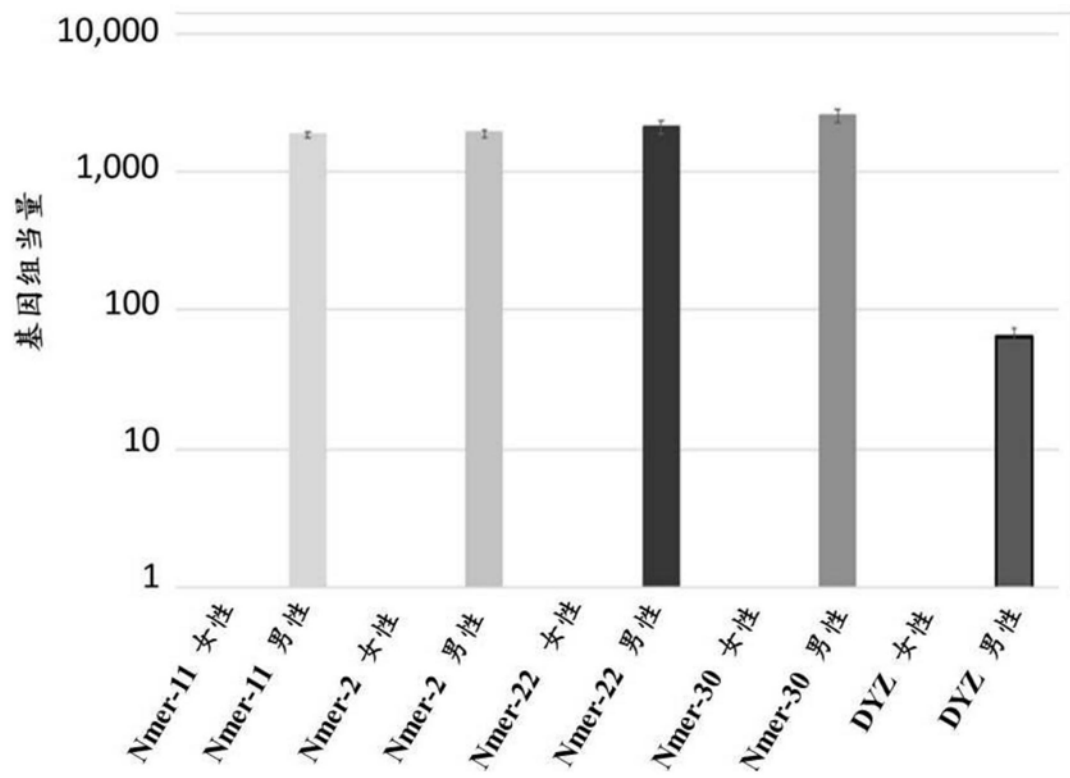


图12

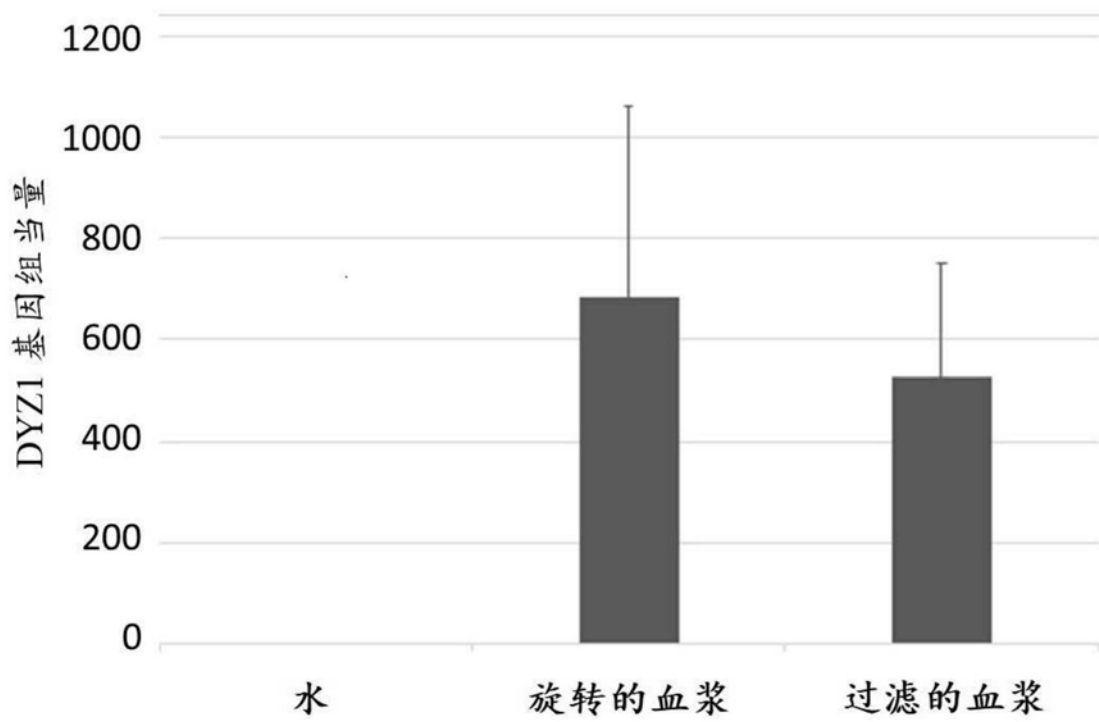


图13

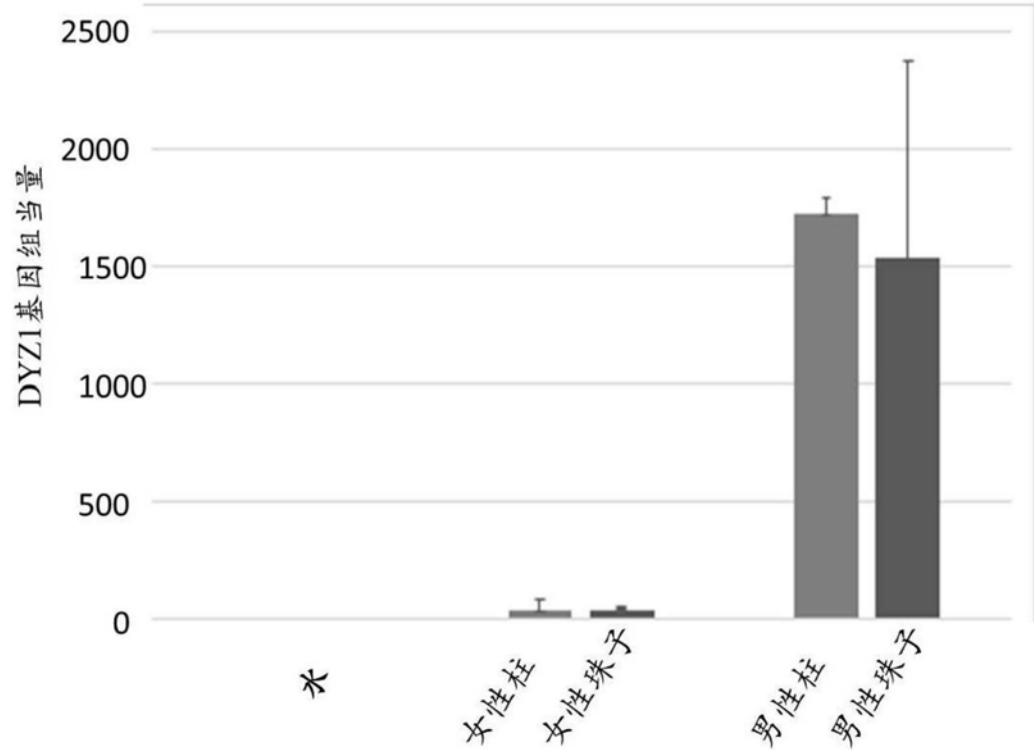


图14

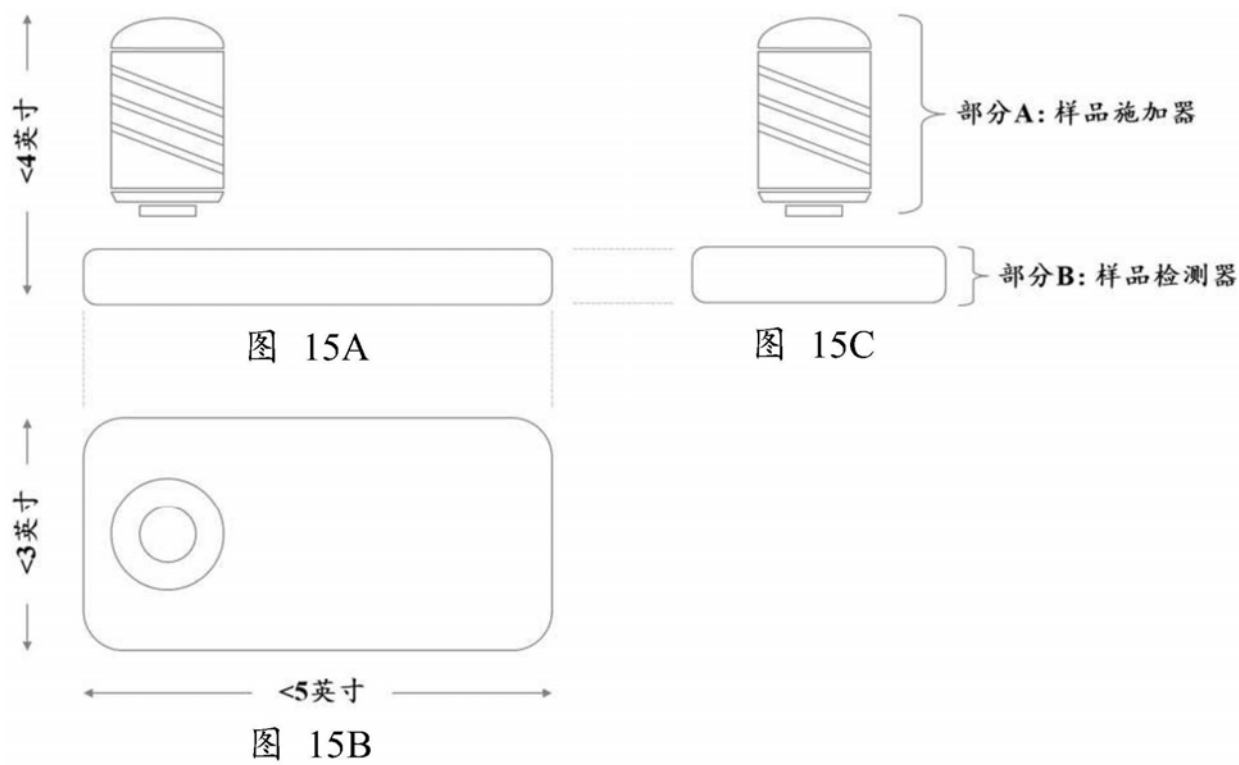


图15