



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109072286 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 11

(21) 申请号 201780022472.9

(22) 申请日 2017.03.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109072286 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(30) 优先权数据
62/319,876 2016.04.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.10.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/023951 2017.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/176469 EN 2017.10.12

(73) 专利权人 3M创新有限公司
地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 格雷戈里·W·西顿 尼尔·帕西

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
专利代理师 杨青 穆德骏

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

(56) 对比文件
JP H08149974 A, 1996.06.11
US 5620869 A, 1997.04.15
US 5726021 A, 1998.03.10
US 2015056624 A1, 2015.02.26
CN 105462957 A, 2016.04.06

审查员 张蕾

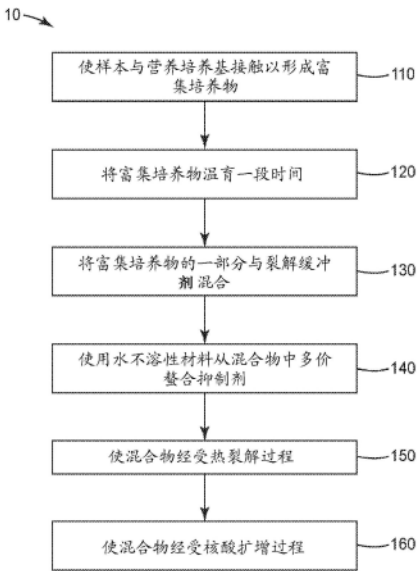
权利要求书2页 说明书23页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

细胞裂解和核酸扩增的方法

(57) 摘要

本公开提供了一种核酸扩增方法。所述方法包括通过使样本与配方不包含磷酸盐缓冲剂组分的营养培养基接触来形成富集培养物；在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间；在保持所述富集培养物之后，通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合来形成含水组合物；使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触，所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质；使所述含水组合物经受热裂解过程；以及，在使所述含水组合物经受热裂解过程之后，使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。还公开了用于裂解缓冲剂的组合物。



1. 一种核酸扩增方法,所述方法包括:

通过使样本与配方不包含磷酸盐缓冲剂组分的营养培养基接触来形成富集培养物,其中所述营养培养基包含第一缓冲剂;

在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间;

在保持所述富集培养物之后,通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合以形成第三体积的含水组合物来形成含水组合物,

其中将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合;

其中所述裂解缓冲剂包含第二缓冲剂;

其中所述裂解缓冲剂包含有机多价阳离子螯合试剂,其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁的大于或等于 $10^{4.2}$ 的第一亲和常数以及相对于镁的小于 $10^{3.8}$ 的第二亲和常数,其中所述第一亲和常数和所述第二亲和常数是在pH 8.45下的20℃去离子水中测定的;

其中所述裂解缓冲剂在25℃下具有大于8.6的pH;

其中所述含水组合物在25℃下具有8.45至8.85的pH;

其中所述含水组合物中的第一缓冲剂和第二缓冲剂的组合浓度为至少15mM;

其中所述第一体积与所述第二体积的比率大于或等于3:1,并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:4;

使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质;

使所述含水组合物经受热裂解过程;以及

在使所述含水组合物经受热裂解过程之后,使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述裂解缓冲剂还包含三价铁。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述裂解缓冲剂还包含选自由以下项构成的组的试剂:纳米粒子分散稳定剂、具有11至16的亲水-亲脂平衡的非离子表面活性剂、聚乙烯吡咯烷酮、七水合硫酸镁、含氟表面活性剂、指示剂染料以及上述试剂中的任何两种或更多种的组合。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述富集培养物保持一段时间包括将所述富集培养物保持4小时至24小时的时间段。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一体积与所述第二体积的比率大于或等于5:1,并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:6。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中通过将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合来形成所述含水组合物包括与所述水不溶性材料形成所述含水组合物,所述水不溶性材料将设置在其中的干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质从所述含水组合物中提取出来。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水不溶性材料包含多个氧化锆粒子。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述多个氧化锆粒子在所述第三体积中具有 $10\text{m}^2/\text{L}$ 至 $600\text{m}^2/\text{L}$ 的表面积。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程包括使所述含水组合物的所述部分经受环介导的等温扩增过程。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程包括使所述含水组合物的所述部分经受热循环聚合酶链反应过程。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中形成所述含水组合物基本上由将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合组成。

12. 根据权利要求1所述的方法, 所述方法还包括:

在使所述含水组合物经受热裂解过程之后, 并且在使所述含水组合物的所述部分经受核酸扩增过程之前, 使用所述含水组合物的所述部分再水合用于核酸扩增的脱水了的试剂。

细胞裂解和核酸扩增的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2016年4月8日的美国临时专利申请62/319,876的优先权,该临时专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 本申请已与其序列表(文件名为Sequence_Listing_77512W0003.TXT,2017年3月9日创建)相关联。此序列表文件包含722字节并且其全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0004] 用于检测病原体和其它微生物的常规方法是基于培养的方法,但是这些方法是耗时的、费力的,并且不再符合质量控制和诊断实验室提供快速的结果的需求。

[0005] 克服检测病原微生物的困难(例如,培养微生物所涉及的长时间延迟)的努力已经引起了诸如基于DNA的诊断方法或核酸增殖方法的基因测试的开发。使用基于DNA的方法来源于每种病原体物种携带将其与其它生物体区分开的独特的DNA或RNA标记的前提。这些技术是最有前途的,并且越来越多地用于微生物的快速、敏感和特异性检测。

[0006] 生物技术的进步已经引起各种各样的用于有效的核酸扩增的测定的开发。

[0007] 含有微生物/病原体的样本的有效基因检测需要快速敏感的测定方法,其给出即时或实时的结果。分析和抑制由样本中的抑制物质引起的核酸扩增的时间和敏感性与基因测试的有用性有某些限制。

[0008] 希望具有有效地且快速地减少或消除预期靶的核酸扩增的抑制的组合物和方法。

发明内容

[0009] 本公开提供了一种改进的核酸扩增方法,其消除了由于样本中抑制性物质而对核酸扩增反应的抑制。有利的是,改进的方法避免了在核酸扩增反应中使用样本之前稀释该样本的需要,从而允许核酸扩增过程的敏感性增加。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种核酸扩增方法。所述方法可包括通过使样本与实质上不含水溶性磷酸根离子的营养培养基接触来形成富集培养物,其中所述营养培养基包含第一缓冲剂;在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间;在保持所述富集培养物之后,通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合以形成第三体积的含水组合物来形成所述含水组合物,其中将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合;使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质;使所述含水组合物经受热裂解过程;以及在使所述含水组合物经受热裂解过程之后,使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。所述裂解缓冲剂实质上不含水溶性磷酸根离子并且包含第二缓冲剂。所述裂解缓冲剂可包含有机多价阳离子螯合试剂,其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁的大于或等于 $10^{4.2}$ 的第一亲和常数以及相对于镁的小于 $10^{3.8}$ 的第二亲和常数,其中所述第一亲和常数和所述第二亲和常数是在pH 8.45下的20℃去离子水中测定的。裂

解缓冲剂在25℃下可具有大于8.6的pH。所述含水组合物在25℃下可具有约8.45至8.85的pH。所述含水组合物中的第一缓冲剂和第二缓冲剂的组合浓度可为至少约15mM。所述第一体积与所述第二体积的比率可大于或等于3:1,并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:4。

[0011] 在另一个方面,本公开提供了一种核酸扩增方法。所述方法可包括通过使样本与配方不包含磷酸盐缓冲剂组分的营养培养基接触来形成富集培养物,其中所述营养培养基包含第一缓冲剂;在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间;在保持所述富集培养物之后,通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合以形成第三体积的含水组合物来形成所述含水组合物,其中将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合;使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质;使所述含水组合物经受热裂解过程;以及在使所述含水组合物经受热裂解过程之后,使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。所述裂解缓冲剂包含第二缓冲剂。所述裂解缓冲剂可包含有机多价阳离子螯合试剂,其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁的大于或等于 $10^{4.2}$ 的第一亲和常数以及相对于镁的小于 $10^{3.8}$ 的第二亲和常数,其中所述第一亲和常数和所述第二亲和常数是在pH 8.45下的20℃去离子水中测定的。裂解缓冲剂在25℃下可具有大于8.6的pH。所述含水组合物在25℃下可具有约8.45至8.85的pH。所述含水组合物中的第一缓冲剂和第二缓冲剂的组合浓度可为至少约15mM。所述第一体积与所述第二体积的比率可大于或等于3:1,并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:4。

[0012] 在上述实施方案中的任一个中,在使含水组合物经受热裂解过程之后,并且在使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程之前,所述方法还可包括使用所述含水组合物的一部分再水合用于核酸扩增的脱水了的试剂。

[0013] 在上述实施方案中的任一个中,形成含水组合物可基本上由将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合组成。

[0014] 在另一方面,本公开提供了一种裂解缓冲剂。所述裂解缓冲剂可包含水、水不溶性材料(所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质)、有机多价阳离子螯合剂、至少一种非离子表面活性剂、三价铁、用于促进聚合酶活性的试剂、以及包含N-环己基-3-氨基丙磺酸或其盐的缓冲剂。裂解缓冲剂可包含小于1mM的磷酸或其盐。所述裂解缓冲剂在25℃下可具有约9.8至10.5(包括端值)的pH。

[0015] 如本文所用,单数形式“一”和“所述”包括指代复数,除非上下文另有清晰的表示。术语“和/或”意指所列要素中的一个或全部,或者所列要素中的任意两个或更多个的组合。

[0016] 当术语“约”用于描述值或范围的端值时,本公开应被理解为包括所提及的具体值和端值两者。

[0017] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“涵盖”、“内含”、“含有”、“其特征在于”、“具有”或它们的任何其它变型旨在涵盖非排它性的包含之意。

[0018] 前面已经概述了本公开的一些相关目的。这些目的应该被解释为仅仅是对本公开的一些更突出特征和应用的说明。本公开包括从以下对实施方案的更详细描述中将描述或将变得显而易见的其它特征和优点。

[0019] 本发明的上述发明内容并非旨在描述本发明的每个公开的实施方案或每种实施方式。以下描述更为具体地举例说明了例示性实施方案。在本申请全文的若干处,通过实施例列表提供了指导,这些实施例能够以各种组合使用。在每种情况下,所引用的列表都只用作代表性的组,并且不应被理解为排它性列表。

[0020] 这些及其它实施方案的附加细节在下文附图和描述中示出。通过具体实施方式、附图和权利要求书,其它特征、目标和优点将变得显而易见。

附图说明

[0021] 图1为根据本公开的方法的一个实施方案的框图。

具体实施方式

[0022] 在详细解释本公开的任一实施方案之前,应当了解,本发明在其应用中不仅限于下文说明中所提及或下文附图所示出的构造细节和部件布置方式。本发明能够具有其它的实施方案,并且能够以多种方式进行实践或实施。而且,应当理解,本文使用的措辞和术语是用于说明目的而不应视为限制性的。本文中“包括”、“包含”或“具有”以及其变型的使用意指涵盖其后所列举的项目及其等同形式以及附加的项目。应当理解,在不偏离本公开范围的情况下,可采用其它实施方案并且可进行结构变化或逻辑变化。现在将在下文中更全面地描述本公开。为了下列详细说明的目的,除了有明确相反规定之外,应该理解的是本公开可假定各种替代的改变和步骤顺序。因此,在详细地描述本公开之前,应当理解,本公开并不限于具体例举说明的系统或实施方案,所述系统或实施方案当然可变化。在本说明书中的任何地方使用示例,包括本文所讨论的任何术语的示例仅是例示性的,并且绝不限制本公开或任何示例术语的范围和含义。同样,本公开不限于本说明书中给定的各种实施方案。

[0023] 本公开提供一种用于消除来自微生物富集肉汤培养物的样本的核酸扩增反应中的样本抑制的方法。与常规方法相比,本发明方法不需要在细胞裂解步骤和/或核酸扩增步骤之前立即大量稀释(即,不需要>1:1稀释)富集肉汤。有利的是,所述方法的该特征使得能够检测样本中较低浓度的靶核酸。

[0024] 如本文所用,短语“核酸”和“核酸序列”是可互换的,且并非旨在限制性的。“核酸”应具有本领域已知的含义,并指DNA(例如基因组DNA、cDNA或质粒DNA)、RNA(例如,mRNA、tRNA或rRNA)和PNA。其可以是多种形式,包括但不限于双链或单链构形、圆形形式、质粒、相对短的寡核苷酸、也称为PNA的肽核酸等。核酸可以是基因组DNA,其可以包括整个染色体或染色体的一部分。DNA可以包括编码(例如,用于编码mRNA、tRNA和/或rRNA)和/或非编码序列(例如着丝粒、端粒、基因间区域、内含子、转座子和/或微卫星序列)。核酸可以包括任何天然存在的核苷酸以及人造或化学改性的核苷酸、突变核苷酸等。核酸可以包括非核酸组分,例如肽(如在PNA中)、标记(放射性同位素或荧光标记物)等。

[0025] 如本文所用,“扩增了”和“扩增”是指线性或指数增加多核苷酸序列的广泛范围的技术。示例性的扩增技术包括但不限于聚合酶链反应(PCR)或采用引物延伸步骤的任何其它方法。扩增的其它非限制性示例包括但不限于连接酶检测反应(LDR)和连接酶链反应(LCR)。扩增方法可以包括热循环或可以等温进行,诸如环介导的等温扩增(LAMP-BART)。在

各种实施方案中,术语“扩增产物”或“扩增的产物”包括来自任意数量的扩增反应循环的产物。

[0026] 如本文所用,“聚合酶链反应”或PCR是由以下组成的核酸扩增:初始变性步骤,所述初始变性步骤将双链核酸样本的链分离,然后重复以下:(i)退火步骤,所述退火步骤允许扩增引物对侧接靶序列的位置进行特异性退火;(ii)延伸步骤,所述延伸步骤将引物在5'至3'方向上延伸,从而形成与靶序列互补的扩增子多核苷酸,和(iii)使扩增子与靶序列分离的变性步骤。上述各步骤可以在不同的温度下进行,优选地使用自动热循环仪。

[0027] 如本文所用,“等温扩增的”或“等温扩增”等类似术语是指与常规PCR反应不同,与需要在高温和低温之间循环的扩增相比,而在恒定温度下进行扩增核酸的方法。这需要DNA聚合酶是具有链置换活性的DNA聚合酶。等温扩增通常在基本上单一温度下进行,因为引物与经置换的DNA链结合。在等温扩增中,可以将包含核酸样本和任选的所有引物的反应混合物加热到变性温度,在该变性温度下,在扩增前以及任选地当DNA聚合酶在变性温度下失活时加入DNA聚合酶之前,反应混合物中的双链核酸变性为单链(例如,至少85°C至90°C)。

[0028] 如本文所用,术语“预期靶”、“靶核酸区域”、“靶特异性核酸”、“靶区域”、“靶标记序列”、“一个或多个靶核酸”、“靶核酸序列”、“靶”或“靶多核苷酸序列”是指感兴趣的核酸。

[0029] 如本文所用,“检测了”或“检测”是指靶多核苷酸序列或扩增的靶多核苷酸序列产物的样本中存在或不存在的公开或揭示。检测可以通过终点、实时、酶促,并且通过在凝胶上解析(resolving)扩增产物并确定预期的扩增产物是否存在,或本领域的技术人员已知的其它方法。

[0030] 如本文所用,术语“样本”是指怀疑含有核酸的原料。检测样本中的核酸使人们能够检测例如靶微生物的存在。样本的示例包括但不限于食品样本(包括但不限于旨在用于人或动物消费的食品的样本,诸如加工食品、食品原料、农产品(例如水果和蔬菜)、豆类、肉类(来自牲畜和/或狩猎动物)、鱼、海产食品、坚果、饮料、酒水、发酵液和/或包含任意以上所列食物的选择性富集的食物基质)、水样、环境样本(例如土壤样本、污垢样本、垃圾样本、污水样本、工业废水样本、空气样本或来自各种水体诸如湖泊、河流、池塘等的水样)、空气样本(来自环境或来自室内或建筑物)、临床样本,从怀疑患有疾病或病症的人获得的样本、兽医样本、法医样本、农业样本、药物样本、生物制药样本,来自食品加工和制造表面的样本,和/或生物样本。根据本公开的非食品样本的示例可以是培养液。如本文所用的“培养液”是指用于培养微生物的液体培养基。

[0031] 如本文所用,“靶微生物”是指被预选的微生物或微生物组,所述微生物组的每个成员具有与该组的其它成员相同或实质上相同的遗传因子(例如,基因组或基因组外核酸(如质粒))的多核苷酸部分。在任一实施方案中,靶微生物可以为病原性微生物。

[0032] 特定关注的靶微生物包括原核微生物(尤其是革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和支原体)、丝状真菌和酵母。具体地讲,相关的生物体包括以下科或属的成员:肠杆菌科、或微球菌科或葡萄球菌属、链球菌属、假单胞菌属、肠球菌属、沙门氏菌属、军团杆菌属、志贺菌属、耶尔森氏鼠疫杆菌属、肠杆菌属、大肠杆菌属、芽孢杆菌属、李斯特菌属、弧菌属、棒状杆菌属、以及曲霉菌属、镰刀菌属和假丝酵母属。具体地讲,致命生物体包括:金黄色葡萄球菌(包括耐药菌株,诸如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA))、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、无乳链球菌、化脓性链球菌、粪肠球菌、耐万古霉素肠球菌(VRE)、耐万古霉素金黄色葡

萄球菌 (VRSA)、万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌 (VISA)、炭疽杆菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、黑曲霉菌、烟曲霉菌、棒曲霉菌、腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌、厚孢镰刀菌、单增李斯特菌、绵羊李斯特菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、猪霍乱沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、克柔氏念珠菌、阪崎肠杆菌、大肠杆菌0157以及多种耐药革兰氏阴性杆菌 (MDR)。

[0033] 如本文所用,“抑制剂”意指任何化合物、物质或组合物或其组合,其作用是相对于当抑制剂不存在时测定的活性、精确度或准确性,直接或间接地降低测定的活性、精确度或准确性。抑制剂可以是分子、原子,或者分子或原子的组合,而不受限制。

[0034] 如本文所用,术语“抑制剂”是指例如用于扩增反应中的酶的抑制剂。此类抑制剂的示例通常包括但不限于蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、多酚、血红素及其降解产物、尿素、胆汁酸、腐殖酸、多糖、细胞膜和胞质组分。可影响PCR的血液中的主要抑制剂是分别存在于红细胞、白细胞和血浆中的血红蛋白、乳铁蛋白和IgG。抑制剂的示例还包含铁离子或其盐,其它金属盐诸如碱金属离子、过渡金属离子等,以及存在于生长培养基中的一些指示剂染料。

[0035] 如本文所用,“表面活性剂”的含义是由本领域的普通技术人员容易认识到的最宽泛的定义。也就是说,表面活性剂是降低液体的表面张力和/或降低两种液体之间的界面张力的润湿剂。在水中不具有正电荷或负电荷但仍溶于水的表面活性剂是“非离子表面活性剂”。

[0036] 如本文所用,“非离子表面活性剂”是指其极性基团未带电荷的表面活性剂分子。两种或更多种非离子表面活性剂的组合涵盖在术语“非离子表面活性剂”内。在某些实施方案中,可以使用一种或多种表面活性剂。

[0037] 如本文所用,聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 是由单体N-乙烯基吡咯烷酮制成的水溶性聚合物。聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 是PVP的高度交联改性。如本文所述,聚乙烯吡咯烷酮或其改性物可以包括在扩增反应混合物中,以便减少或消除抑制物质。改性PVP包括但不限于为PVP的不溶性高度交联改性的聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)。应当理解,本文涉及PVP的公开内容可以适用于PVPP。

[0038] 在一个实施方案中,组合物可以包含非离子聚合物含氟化合物表面活性剂,其属于一类涂料添加剂,该涂料添加剂在用于热处理应用时提供低表面张力并且表现出良好的热稳定性。根据本公开的某些实施方案的非离子聚合物含氟化合物表面活性剂可以是作为3MTM NovecTM含氟表面活性剂的FC-4430。

[0039] 如本文所用,术语“乙二醇四乙酸”和“EGTA”是指为螯合剂的乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸。EGTA是对镁具有较低亲和力的无色固体,使其对钙离子更有选择性。如在活细胞中发现的,当钙离子浓度低于镁时,EGTA可用于制备缓冲剂以螯合钙离子。EGTA也可用于酶测定。

[0040] 如本文所用,术语“细胞裂解”是指通过破坏细胞膜和/或渗透细胞外膜来释放细胞中材料的过程,使得核酸扩增反应的酶和其它组分能够进入细胞的核酸,具体地讲,在扩增之前从细胞提取细胞内材料以分离DNA或RNA的过程,如PCR、LAMP-BART方法等等。

[0041] 根据本公开的实施方案,细胞裂解可以通过热方法进行。根据细胞样本的形式和反应容器的特性,本领域的技术人员可以适当地选择热方法。

[0042] 如本文所用,术语“微生物”或“微菌”是指任何微观生物体,其可以是单细胞或多细胞生物体。该术语通常用于指能够在合适的培养基中生长和繁殖的任何原核或真核微生物体,包括但不限于细菌中的一种或多种。本发明范围涵盖的微生物包括原核生物,即细菌和古细菌;以及各种形式的真核生物,包括原生动物、真菌、藻类等。如本文所用,微生物的术语“培养”或“生长”是指通过使微生物体在预定培养基中在有助于其生长的条件下繁殖来使其倍增的方法。更具体地,其为提供合适的培养基和条件以有利于微生物的至少一个细胞分裂的方法。培养基可为包含微生物生长所需的所有营养物和必需物理生长参数的固体、半固体或液体介质。术语“靶微生物”是指期望被检测的任何微生物。

[0043] 如本文所用,术语“富集”是指通过以下方式富集特定微生物的生长的培养方法:提供具有有利于具体微生物的生长的特定的和已知属性的培养基和条件。富集培养的环境将支持所选微生物的生长,且任选地抑制其它微生物的生长。

[0044] 常规的基于DNA的方法的使用在某种程度上受限于抑制剂的存在。包含对核酸增殖反应具有负面作用的所有物质的此类所谓的抑制剂的出现是基因检测的缺点中的一个。这些抑制剂可以源于样本本身,或者可以在样本处理或核酸提取期间被引入。部分或全部核酸增殖反应的抑制后果分别是灵敏度降低或假阴性结果。

[0045] 尽管有许多基于基因的方法的可用性,但是不存在单一的快速、灵敏、廉价和更少费力的方法来有效和快速地减少或消除对预期靶的核酸扩增的抑制。为了迅速确定靶样本中病原体的存在,需要开发可靠和准确的测定方法,该方法可以满足越来越多的寻找更快、准确和更少耗时且更少费力的测定技术的需求。

[0046] 在某些PCR系统中,妨碍它们易于使用的是包含蛋白酶步骤在内。该蛋白酶步骤用于通过消化食物蛋白质(尤其是红肉)和/或来自微生物生长的蛋白胨以及裂解细胞来减少样本抑制。令人惊讶的是,已发现通过根据本公开的方法形成的含水组合物消除了对样本进行蛋白酶化的需要。根据本公开的方法,使含水组合物与水不溶性材料(例如,氧化锆粒子)接触,所述水不溶性材料与有机多价阳离子螯合试剂组合多价螯合含水组合物中会干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质(例如,来自样本和/或来自富集培养基的多肽),以中和抑制蛋白。如本文所用,术语“多价螯合”是指干扰物质(即,原本干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质)从含水组合物的功能性单离或分离,使得降低或消除所述物质的干扰活性。有利的是,本公开消除了单离/纯化从裂解细胞释放的核酸的步骤,这使得本公开的方法更快且更简单。

[0047] 本公开描述了一种核酸扩增方法,其消除了对蛋白酶或以其它方式从样本中(例如,经由稀释)降低背景蛋白质的需要。这继而也引起消除常规核酸扩增方法中的至少一个测定步骤。此外,本公开的方法提供了检测以低于常规方法(即,需要蛋白酶处理或稀释以除去干扰物质)可检测的浓度存在的细胞(例如,微生物)的能力。

[0048] 本公开一般涉及用于样本的核酸增殖的方法,其包括细胞裂解步骤和核酸扩增步骤,而不需要在其间的单离/纯化步骤,诸如色谱法、离心法以及类似方法。

[0049] 本公开提供了一种方法。所述方法可用于扩增样本中存在的核酸。在任何实施方案中,所述方法可用于检测与存在于样本中的靶微生物(例如病原性微生物)相关联的核酸。图1为示出根据本发明的扩增核酸的方法10的一个实施方案的框图。

[0050] 方法10包括通过使样本与营养培养基接触来形成富集培养物的步骤110。营养培

培养基实质上不含水溶性磷酸根离子(即磷酸盐的无机盐不是培养基配方的组分)。此外,营养培养基包含第一缓冲剂。第一缓冲剂不是可被靶微生物代谢以产生生物质或能量的营养物质。

[0051] 特别关注的样本为可包含相对较小数量的靶微生物的样本(例如加工食品样本)。在任一实施方案中,将样本(例如,胴体淋洗液、工业用水、来自环境(例如食品加工设备)拭子或海绵的残留物)悬浮在含水液体(例如用于生长靶微生物的含水营养培养基)中。

[0052] 营养培养基促进靶微生物的生长并且实质上不含可能干扰酶介导的核酸扩增过程的水溶性磷酸根离子。在任一实施方案中,所述营养培养基配方不包括磷酸盐缓冲组分(例如,营养培养基的配方的组分不包括 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 或 K_3PO_4)。如本文所用,术语“配方”是指根据具体配方制备的材料或混合物。此外,营养培养基包含第一缓冲剂。第一缓冲剂不含或实质上不含水溶性磷酸根离子。第一缓冲剂以第一浓度(例如,至少约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM,大于30mM)存在于营养培养基中。第一缓冲剂可在促进靶微生物生长的pH(例如,在25℃下约7.0至约7.6)下缓冲营养培养基。

[0053] 营养培养基可包含本领域已知的营养物质的组合,前提条件是所述培养基不包括以将抑制所述方法的酶介导的核酸扩增步骤的浓度的磷酸根离子。例如,可商购获得的ISO缓冲蛋白胨水是本领域已知的用于从食品和环境样本预富集沙门氏菌和其它肠道细菌物种(例如,大肠杆菌、克洛诺菌属)的非选择性营养培养基。ISO缓冲蛋白胨水包含蛋白胨、氯化钠和磷酸盐缓冲剂。可商购获得的ISO缓冲蛋白胨水中的磷酸盐缓冲剂以抑制例如环介导的等温核酸扩增的浓度(约35mM)存在。因此,根据本公开的检测沙门氏菌的方法可使用例如改进的缓冲蛋白胨水营养培养基,所述营养培养基包含不含磷酸盐的第一缓冲剂(例如,包含三(羟甲基)氨基甲烷的缓冲剂(“Tris缓冲剂”)或包含N-环己基-3-氨基丙磺酸的缓冲剂(“CAPS缓冲剂”))代替本领域已知的用于ISO缓冲蛋白胨水配方中的磷酸盐缓冲剂。本领域的普通技术人员将认识到其它不含磷酸盐的缓冲剂(例如,3-(N-吗啉基)丙磺酸,“MOPS缓冲剂”;4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸,“HEPES缓冲剂”;2-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]乙磺酸,“TES缓冲剂”;2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙-1,3-二醇,“双-tris缓冲剂”;或3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸,“CAPSO缓冲剂”),其可用于在适于促进靶微生物生长的pH下缓冲营养培养基。

[0054] 再次参见图1,使样本与营养培养基接触形成富集培养物,可用于在与营养培养基接触时使样本中存在的靶微生物繁殖。靶微生物在营养培养基中的繁殖可有利于通过增加营养培养基中的靶微生物(和与其相关联的核酸分子)的数量(和浓度)来检测靶微生物。

[0055] 因此,方法10包括温育富集培养物(即,在有利于靶微生物生长的温度下保持富集培养物一段时间)的步骤120。本领域的普通技术人员将认识到保持富集培养物的合适的温度以促进靶微生物的生长。在任一实施方案中,富集培养物可在介于25℃和44.5℃(包括端值)之间的温度下进行温育。对于人类为病原性的许多靶微生物在35℃至37℃之间(包括端值)的温度下最佳生长。

[0056] 将富集培养物保持一段时间可包括将富集培养物保持一段适合允许在富集培养物中靶微生物(若存在的话)的一次或多次细胞分裂的时间。因此,将富集培养物保持一段时间可包括将富集培养物保持约30分钟至至少24小时。在任一实施方案中,将富集培养物保持一段时间可包括将富集培养物保持约2小时至约18-24小时。在任一实施方案中,将富

集培养物保持一段时间可包括将富集培养物保持约2小时至约6小时。在任一实施方案中，将富集培养物保持一段时间可包括将富集培养物保持约2小时至约4小时。

[0057] 在保持富集培养物一段时间之后，方法10包括通过将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合以形成含水组合物(例如，第三体积的含水组合物)来形成含水组合物的步骤130。在该步骤中，将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合。因此，如果富集培养物含有可能干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质，则这些物质在将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合之前未稀释。有利的是，所述方法的该特征避免了存在于富集培养物中的靶微生物的潜在不必要稀释，因此提供了(相比需要额外稀释富集培养物的方法)更大的检测富集培养物中的低数量靶微生物的能力。

[0058] 裂解缓冲剂是包含第二缓冲剂的含水缓冲剂，所述第二缓冲剂与第一缓冲剂协同作用，以将含水组合物的pH调整至适于酶介导的核酸扩增过程的pH。裂解缓冲剂不含或实质上不含水溶性磷酸根离子。在任一实施方案中，裂解缓冲剂可配方不包括磷酸盐缓冲组分(例如，裂解缓冲剂的配方的组分不包括 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 或 K_3PO_4)。如本文所用，术语“配方”是指根据具体配方制备的材料或混合物。裂解缓冲剂包含第二缓冲剂，所述第二缓冲剂可包含与第一缓冲剂相同的缓冲试剂，或者其可包含与第一缓冲剂不同的缓冲试剂。第二缓冲剂以第二浓度(例如，至少约10mM；约10mM、约20mM、约25mM、约30mM、约40mM、约50mM、大于50mM、约10mM至约50mM、约10mM至约25mM、约25mM至约50mM)存在于裂解缓冲剂中。

[0059] 在任一实施方案中，裂解缓冲剂具有以下pH：在25℃下大于或等于8.6，在25℃下大于或等于9.0、在25℃下大于或等于9.2、在25℃下大于或等于9.5、在25℃下约8.8、在25℃下约9.0、在25℃下约9.2、在25℃下约9.4、在25℃下约9.6、在25℃下约9.8、在25℃下约8.6-10.0、在25℃下约8.6至9.8、在25℃下约9.0-10.0、或在25℃下约9.2-9.8。因此，当含水组合物通过将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合形成时，所述含水组合物在25℃下具有约8.45至约8.85(包括端值)范围内的pH。

[0060] 将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合以形成所述含水组合物。因此，营养培养基的第一缓冲剂和裂解缓冲剂的所有组分(例如，第二缓冲剂)以所选浓度存在于其各自的溶液中，使得当形成含水组合物时，它们是用于裂解步骤(下文所述)和核酸扩增步骤(下文所述)的适当浓度。

[0061] 根据本公开的方法，存在第一体积的富集培养物与第二体积的裂解溶液的第一比率，所述第一体积和第二体积组合以形成第三体积的所述含水组合物。此外，存在第一体积与第三体积的第二比率。在任一实施方案中，第一比率大于或等于3:1，并且第二比率小于或等于1:4。在任一实施方案中，第一比率大于或等于4:1，并且第二比率小于或等于1:5。在任一实施方案中，第一比率大于或等于5:1，并且第二比率小于或等于1:6。在任一实施方案中，第一比率大于或等于6:1，并且第二比率小于或等于1:7。在任一实施方案中，第一比率大于或等于7:1，并且第二比率小于或等于1:8。在任一实施方案中，第一比率大于或等于8:1，并且第二比率小于或等于1:9。在任一实施方案中，第一比率大于或等于9:1，并且第二比率小于或等于1:10。在任一实施方案中，第一比率大于或等于10:1，并且第二比率小于或等于1:11。在任一实施方案中，第一比率大于或等于14:1，并且第二比率小于或等于1:15。在

任一实施方案中,第一比率大于或等于19:1,并且第二比率小于或等于1:20。在任一实施方案中,第一比率大于或等于24:1,并且第二比率小于或等于1:25。

[0062] 形成所述含水组合物包括组合包含第一缓冲剂的富集培养基与包含第二缓冲剂的裂解缓冲剂,两者如上文所述。在任一实施方案中,形成含水组合物基本上由将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合组成。

[0063] 当形成含水组合物时,其具有组合的缓冲浓度,其等于第一缓冲剂和第二缓冲剂的摩尔数的和除以含水组合物的体积。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于15mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于20mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于25mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于30mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于40mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度大于或等于50mM。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度为约15mM至约50mM(包括端值)。在任一实施方案中,含水组合物中的组合缓冲剂浓度为约15mM至约25mM(包括端值)。

[0064] 返回图1,方法10包括使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触的步骤140,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质。有利的是,该多价螯合避免了在所述方法的细胞裂解步骤和/或核酸扩增之前对稀释步骤(即,降低样本中干扰物质浓度)的需要。在任一实施方案中,水不溶性材料可包含粒子。合适的粒子包括例如氧化锆粒子、羟基磷灰石粒子以及它们的混合物。在任一实施方案中,水不溶性材料可悬浮和/或分散在裂解缓冲剂中。因此,在任一实施方案中,形成含水组合物包括形成包含水不溶性材料的含水组合物。

[0065] 在任一实施方案中,水不溶性材料(例如,氧化锆粒子和/或羟基磷灰石粒子)可包含纳米粒子(例如,氧化锆粒子或羟基磷灰石粒子具有约100nm至小于1.0 μ m的中值粒度)。在任一实施方案中,氧化锆粒子或羟基磷灰石粒子可具有约100nm至约200nm的平均粒度。在任一实施方案中,氧化锆粒子或羟基磷灰石粒子可具有约100nm至约250nm的平均粒度。在任一实施方案中,氧化锆粒子或羟基磷灰石粒子可具有约100nm至约500nm的平均粒度。如本文所公开,这些纳米粒子可通过将柠檬酸盐加入到含水组合物中以稳定分散体存在于在如上所示的pH下的含水组合物中。

[0066] 纳米粒子(例如,氧化锆纳米粒子或羟基磷灰石纳米粒子)的分散体可通过其表面积/单位体积来表征。在任一实施方案中,在形成本公开的组合物之后,含水组合物可包含具有至少10m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有约10m²/L至约600m²/L(包括端值)的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约25m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约50m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约100m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约200m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约300m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含具有至少约400m²/L至约600m²/L的表面积的纳米粒子。在任一实施方案中,本公开的含水组合物可包含

具有约 $600\text{m}^2/\text{L}$ 的面积的纳米粒子。

[0067] 包含氧化锆纳米粒子的本公开的含水组合物可经稳定化,使得粒子在长时间(例如,数月、和/或数年)中实质上保留在悬浮液中,和/或以最小努力重悬浮。这可通过向组合物中加入分散稳定剂来实现。稳定剂可例如在如本文所述的裂解缓冲剂中提供。可用于本公开的含水组合物中的尤其优选的分散稳定剂包括多元羧酸化合物,诸如2-羟基丙烷-1,2,3-三甲酸(柠檬酸)或其盐,诸如例如柠檬酸钾、柠檬酸铁铵。

[0068] 因此,在本公开的方法的任一实施方案中,通过将第一体积的富集培养物与第二体积的裂解缓冲剂混合来形成所述含水组合物包括与水不溶性材料形成所述含水组合物,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质。

[0069] 通过本公开的方法形成的含水组合物还可包含有机多价阳离子螯合试剂。有机多价阳离子螯合试剂可在裂解缓冲剂中以某一浓度提供,所述浓度当稀释进富集培养基中以形成含水组合物时,有效地螯合可能原本抑制核酸扩增反应的三价铁离子。

[0070] 有机多价阳离子螯合试剂对于三价铁(Fe^{+3})的铁离子具有预定义的亲和常数。在pH 8.45和 20°C 下的去离子水中,有机多价阳离子螯合试剂的亲和常数相对于三价铁离子大于或等于 $10^{4.2}$ 。有机多价阳离子螯合试剂对于镁(Mg^{+2})离子还具有预定义的亲和常数。在pH 8.45和 20°C 下的去离子水中,有机多价阳离子螯合试剂的亲和常数相对于镁离子小于 $10^{3.8}$ 。因此,在本公开的含水组合物中,在pH 8.45下,有机多价阳离子螯合试剂对于三价铁离子比对于镁离子具有更高的亲和力。

[0071] 合适的多价阳离子螯合试剂包含有机分子。在任一实施方案中,有机多价阳离子螯合试剂是水溶性的。在任一实施方案中,有机多价阳离子螯合试剂包含多个羧酸根基团。合适的有机多价阳离子螯合试剂的非限制性示例包括乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA);N,N,N',N'-四(2-吡啶基甲基)乙-1,2-二胺(TPEN);1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA);N-(2-羟乙基)乙二胺-N,N',N'-三乙酸(HEDTA);及其盐。

[0072] 通过本公开的方法形成的含水组合物还可包含三价铁。有机多价阳离子螯合试剂可在裂解缓冲剂中提供。因此,本公开的含水组合物可以包含三价铁离子。在任一实施方案中,可以通过柠檬酸铁铵在组合物中提供三价铁。因此,所述组合物还可包含柠檬酸根离子。有利的是,柠檬酸根离子可有利于和/或稳定水不溶性材料(例如,粒子)在本公开的方法中形成的含水组合物中的分散体。

[0073] 在任一实施方案中,三价铁可以约 $55\mu\text{M}$ 至 $385\mu\text{M}$ 的铁离子浓度(即,溶解的三价铁)存在于根据本公开的方法中形成的含水组合物中。在任一实施方案中,可在例如裂解缓冲剂中提供三价铁。在某些实施方案中,铁离子的浓度可以为至少 $110\mu\text{M}$,在某些其它实施方案中,其可以是至少 $165\mu\text{M}$ 。在其它实施方案中,铁离子的浓度可以为至少 $220\mu\text{M}$,并且在其它实施方案中,其可以为至少 $275\mu\text{M}$ 或至少 $330\mu\text{M}$ 。根据本公开,在其中有机多价阳离子螯合试剂包括EGTA的含水组合物中,所述含水组合物的溶解的三价铁/EGTA的摩尔比为约0.04至约0.28。在某些优选实施方案中,含水组合物的溶解的三价铁/EGTA的摩尔比为约0.14至约0.18。

[0074] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,三价铁(例如,被提供为柠檬酸铁铵)以约 $50\mu\text{M}$ 至 $350\mu\text{M}$ 的铁离子浓度存在于含水组合物中。因此,选择裂解缓冲剂中的三价铁浓

度,使得当与富集培养基混合时,其在含水组合物中提供前述浓度的铁离子。在某些实施方案中,含水组合物中的铁离子的浓度可以为至少100 μ M,在某些其它实施方案中,其可以是至少150 μ M。在其它实施方案中,铁离子的浓度可以为至少200 μ M,并且在其它实施方案中,其可以为至少250 μ M或至少300 μ M。根据本公开,在其中有机多价阳离子螯合试剂包括EGTA的含水组合物中,所述含水组合物形成时的Fe³⁺/EGTA的摩尔比为约0.04至约0.28。在某些优选的实施方案中,含水组合物形成时的Fe³⁺/EGTA的摩尔比为约0.14至约0.18。

[0075] 通过本公开的方法形成的含水组合物还可包含用于促进聚合酶活性的试剂,诸如例如,七水合硫酸镁。用于促进聚合酶活性的试剂可在裂解缓冲剂中以某一浓度提供,所述浓度当稀释进富集培养基中以形成含水组合物时,有效地促进核酸扩增反应中的聚合酶活性。

[0076] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,所述含水组合物包含至少一种非离子表面活性剂。在任一实施方案中,可在裂解缓冲剂中提供非离子表面活性剂。因此,含水组合物形成时可以包含任何非离子表面活性剂中的一种或多种。优选地,非离子表面活性剂的亲水-亲脂平衡为约11至约16。具有在该范围内的亲水-亲脂平衡的表面活性剂允许DNA聚合酶在PCR和LAMP核酸扩增反应中的足够活性以及允许荧光素酶和ATP硫素酶在BART报告子技术中的足够活性。合适的非离子表面活性剂的示例包括但不限于TRITON™系列的洗涤剂,其包括但不限于TRITON X-100(叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)及其衍生物、TRITON X-114、TRITON X-405、TRITON X-101、TRITON N-42、TRITON N-57、TRITON N-60、TRITON X-15、TRITON X-35、TRITON X-45、TRITON X-102、TRITON X-155、TRITON X-165、TRITON X-207、TRITON X-305、TRITON X-705-70和TRITON B-1956;脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯(POE)脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如Tween)、POE烷基醚(例如Brij)、壬基酚、月桂醇、聚乙二醇、聚氧乙烯·聚氧丙烯嵌段聚合物、POE烷基胺和POE脂肪酸二苯醚和含氟表面活性剂,诸如3M Novec™工程化液体表面活性剂FC-4430和FC4432,以及陶氏化学FS系列含氟表面活性剂,举例而言。

[0077] 在通过根据本公开的方法所形成的含水组合物的任一实施方案中,含水组合物中此类非离子表面活性剂的浓度没有具体限制,只要可以实现本发明的有益效果(即相对于促进核酸扩增)即可。在任一实施方案中,通过本公开的方法所形成的含水组合物包含约0.005% (w/v) 至约0.3% (w/v) 的表面活性剂。因此,在任一实施方案中,含水组合物包含至多约0.3% (w/v) 的表面活性剂。在某些实施方案中,表面活性剂的浓度可以为至少0.01% (w/v),并且在某些其它实施方案中其可以为至少0.025% (w/v),且在另一个实施方案中为0.032% (w/v)。

[0078] 任选地,在本公开的方法的任一实施方案中,当形成时,含水组合物包含标称分子量为30KDa至1.3MDa的PVP。PVP可在裂解缓冲剂中提供。在本公开的一个方面,PVP的标称分子量为360KDa。

[0079] 在本公开的方法的一个实施方案中,当使用少量的非离子表面活性剂时,PVP可以包含在含水组合物中。在任一实施方案中,可在例如裂解缓冲剂中提供PVP。有利的是,PVP可多价螯合抑制剂(例如多酚),从而防止它们干扰核酸扩增测定。在一个实施方案中,当形成时,含水组合物包含0%w/v上至约0.043%w/v的PVP。当非离子表面活性剂以0.005%至0.01%w/v的浓度存在于组合物中时,组合物可以包含约0.01%w/v至约0.043%w/v的PVP。

上述浓度中的每个也应用于改性PVP。

[0080] 在本公开的某些实施方案中(例如,当含水组合物中的非离子表面活性剂浓度 $>0.01\%w/v$ 时),PVP可不包含在含水组合物中。检查一下看PVP可在裂解缓冲剂中提供。

[0081] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,当存在于含水组合物中时,有机多价阳离子螯合剂包括EGTA。在任一实施方案中,有机多价阳离子螯合试剂可以以盐的形式提供给组合物。在某些实施方案中,组合物可以包含例如EGTA的钠盐。在本公开的另一个实施方案中,含水组合物可以包含例如EGTA的钾盐。

[0082] 在本公开的方法的任一实施方案中,含水组合物在形成时可包含 Fe^{3+} (例如,在裂解缓冲剂中作为柠檬酸铁铵提供)和乙二醇四乙酸(例如,在裂解缓冲剂中作为乙二醇四乙酸的盐(例如,一价阳离子盐)提供)。因此,在含水组合物中,可以存在乙二醇四乙酸和 Fe^{3+} 的摩尔比。在任一实施方案中,含水组合物中的乙二醇四乙酸与 Fe^{3+} 的摩尔比为约0.04至约0.28。

[0083] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,所述含水组合物当可包含以0.5mM至5mM浓度的EGTA。在任一实施方案中,可在例如裂解缓冲剂中提供EGTA。

[0084] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,当形成时,含水组合物任选地可包含镁或其盐和/或钾或其盐。因此,含水组合物可包含镁离子或钾离子。可在例如裂解缓冲剂中提供这些。它们可存在于含水组合物中以有利于样本制备步骤之后的核酸扩增反应(例如,PCR(例如,qPCR)、LAMP)。在任一实施方案中,根据本公开的含水组合物可包含约1mM至约15mM的镁离子和/或约5mM至约500mM的钾离子。在任一实施方案中,含水组合物可包含约20mM至约60mM的钾离子。可在例如裂解缓冲剂中提供镁离子或钾离子。

[0085] 在根据本公开的方法的任一实施方案中,当形成时,含水组合物任选地可包含指示剂染料以监测包含所述组合物的含水溶液的近似温度。可在例如裂解缓冲剂中提供指示剂染料。有利地,指示剂染料可以提供第一视觉指示(例如,第一可观察到的颜色),以指示包含组合物的含水混合物已达到大约在适于与组合物接触的微生物细胞的热裂解的范围内的温度(例如约 $100^{\circ}C$)。此外,指示剂染料可以提供第二视觉指示(例如,第二种颜色),以指示包含组合物的含水混合物已经冷却到适合于去除一部分混合物并将其置于核酸扩增反应中的温度(例如, $\leq 45^{\circ}C$)。当在加热和冷却步骤期间含水混合物的pH改变时,可以容易地监测某些pH指示剂(例如,具有至少部分在约8.8至约7.2的pH范围内延伸的过渡范围的那些)。

[0086] 合适的可见染料包括例如甲酚红,当pH高于8.8时,其为红紫色,且当pH小于7.2时为黄色。因此,在本公开的方法的任一实施方案中,指示剂染料可以是甲酚红。

[0087] 返回图1,方法10包括使含水组合物经受热裂解过程的步骤150。热裂解方法通常是本领域已知的,并且用于核酸扩增方法中以破坏细胞(如果存在于样本中),使得存在于细胞中的核酸可进入扩增反应的组分(例如,聚合酶、引物、dNTP的)。一般来讲,将本公开的方法的含水组合物置于与热源(例如,加热块、水浴、油浴)接触的容器(例如,反应管、多孔板)中,所述热源将容器的内容物(即,含水组合物)加热至约 $95^{\circ}C$ 至约 $102^{\circ}C$ (包括端值)的预定温度一段时间(例如,约5分钟至约30分钟(包括端值))。在该时间段之后,将容器从与热源接触移除,并使其冷却(例如,至低于或等于 $45^{\circ}C$ 的温度)。

[0088] 在使含水组合物经受热裂解过程后,方法10包括使含水组合物的一部分经受核酸

扩增过程的步骤160。核酸扩增过程任选地包括扩增反应的实时检测。例如,可以使用对一种或多种微菌核酸序列(例如,独特核酸序列)特异的适当寡核苷酸引物,通过LAMP-BART使含水组合物的一部分经受核酸扩增,所述微菌核酸序列指示样本中靶微生物的存在。除此之外或另选地,然后可以使扩增产物进一步经受用特异性探针(或报告探针)的测试,以允许检测已经从样本中扩增的微生物核酸序列。在一些实施方案中,如果从样本中扩增微生物核酸序列,则可以对扩增产物执行进一步分析,以进一步鉴定、定量和分析所检测的微菌(例如,确定参数,诸如但不限于微生物菌种或菌株、病原性、数量等)。

[0089] 根据本公开的方法中使用的核酸扩增方法可以等温方式或通过使用热循环过程(例如聚合酶链反应(PCR))进行。等温技术包括但不限于环介导的等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA),基于核酸序列的扩增(NASBA)。使用链置换反应在恒定温度下进行反应。扩增可以在单个步骤中完成,例如,通过将含水组合物的一部分与引物、具有链置换活性的DNA聚合酶和脱氧核糖核苷酸三磷酸在恒温下温育来完成。除了增加靶核酸序列的拷贝数的步骤或反应之外,扩增方法任选地可包括检测扩增的靶核酸序列的步骤或反应。此类检测步骤或反应是本领域的普通技术人员所熟知的,并且包括例如生物发光实时报告(BART)步骤或反应。

[0090] 在本公开的一个实施方案中,等温扩增反应是环介导的等温扩增(LAMP-BART)方法。LAMP可以在等温条件下以高特异性、高效率 and 快速性扩增DNA。LAMP方法可包括使用Bst DNA聚合酶和一组四至六个特异性设计的引物,其识别靶DNA的总共六个独特序列并具有链置换活性。在环介导的等温扩增(LAMP)中,通过使用具体设计用于分别识别靶基因上6至8个不同区域的4至6种不同引物来实现靶特异性扩增。此类方法通常在15分钟至60分钟内扩增核酸拷贝 10^9 至 10^{10} 次。此外,扩增反应中例如ATP-硫酸化酶、腺苷-5'-0-过硫酸盐、虫荧光素和荧光素酶的存在准许经由生物发光(即BART反应)检测LAMP介导的扩增反应。

[0091] 除了引物之外,LAMP-BART技术还使用Tris、硫酸盐化合物(诸如 $MgSO_4$ 、 NH_4SO_4)和氯化钾来保持酶功能性。因此,此类化合物充当促进LAMP-BART偶联反应的增强剂。Tris是有机化合物(更形式地称为三(羟甲基)氨基甲烷,具有式 $(HOCH_2)_3CNH_2$)。链置换技术,诸如LAMP,使用Tris作为缓冲剂,其保持反应在最佳pH下以使反应发生。

[0092] 使用LAMP,使用两对或三对引物以及除了复制活性之外具有高链置换活性的聚合酶,在60℃至65℃的恒温下扩增靶核酸序列。环介导的等温扩增(LAMP)反应是高度特异性、敏感的等温核酸扩增反应。LAMP采用被称为正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP)、正向置换引物(F3)和反向置换引物(B3)的四个引物组。这四种不同的引物用于鉴定靶基因上的6个不同区域,这高度增加特异性。由于这些引物的作用的具体性质,LAMP中所产生的DNA的量显著高于基于PCR的扩增。此外,可包括两种可有效加速反应的任选的引物;这些称为正向环引物(LF)和反向环引物(LB)。内引物(FIP和BIP)含有靶DNA的有意链和反意义链的序列,而置换引物(F3和B3)和环引物(LF和LB)各含有单个靶序列。当反应中包含环引物(LF和LB)时,总共识别出八个靶序列。DNA聚合酶用于扩增感兴趣的靶序列。可以使用许多不同的DNA聚合酶,包括非天然存在的工程化DNA聚合酶,最常见的是Bst DNA聚合酶,而常常较少使用土芽孢杆菌大片段(GspSSD)DNA聚合酶。

[0093] LAMP反应通过由内引物(FIP和BIP)所引发的DNA合成发起。之后进行通过释放单链DNA的置换引物(F3或B3)所引发的DNA合成。该单链DNA用作DNA合成的模板,DNA合成由与

靶的另一端杂交的第二内引物和置换引物引发。这产生了茎环DNA结构。在随后的LAMP循环中,一个内引物与产物上的环杂交,并发起置换DNA合成。这产生了初始茎环DNA以及具有两倍长的茎的新的茎环DNA。循环反应在不到一小时内继续积聚约 10^9 份靶拷贝。除了通过内引物杂交以及引发链置换DNA合成的环之外,包含一个或两个环引物(LF和/或LB)通过与茎环杂交来加速LAMP反应。存在各种LAMP扩增检测方法。非特异性靶检测可以通过视觉鉴定浑浊样本获得,因为焦磷酸镁在阳性LAMP反应中沉淀。为了阳性反应的更好的可视性,可以向反应中加入各种试剂,诸如羟基萘酚蓝或钙黄绿素。另选地,可以使用DNA嵌入染料诸如甲酚红、SYBR绿、Picogreen或碘化丙啶来实现荧光检测,将DNA嵌入染料加入到反应试剂中或在用于终点分析的反应完成后加入。

[0094] 在任一实施方案中,使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程包括使所述含水组合物的所述部分与针对靶核酸物质(例如,与靶微生物相关联的靶核酸物质)的等温核酸扩增反应的组分接触,从而提供扩增反应混合物;在足以使核酸扩增反应继续的条件下温育所述扩增反应混合物,从而提供产物;以及确定所述靶核酸物质的指示剂是否存在于所述产物中。

[0095] 扩增反应的组分可以以溶液和/或干燥(例如冻干)的形式提供。当以干燥形式提供一种或多种组分时,还可以使用再悬浮或重构缓冲剂。另选地,在形成包含样本的含水混合物之后,且在使含水混合物经受热裂解过程之后,可以使用含水混合物来重构等温反应的组分。

[0096] 基于具体类型的扩增反应,反应混合物可以含有缓冲剂、盐、核苷酸以及对于进行反应所需的其它组分。反应混合物可以在适于反应的特定温度下温育。

[0097] 在另一方面,本公开提供了一种含水裂解缓冲剂。当与预定体积的含水样本组合时,裂解缓冲剂提供促进微生物细胞裂解的组分、多价螯合原本会干扰核酸扩增反应的物质的组分、以及促进核酸扩增反应的组分。因此,在另一方面,本公开提供了一种裂解缓冲剂。

[0098] 含水裂解缓冲剂包含(例如分散和/或悬浮)其中的水不溶性材料(例如,氧化锆或羟基磷灰石粒子),所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质,如本文所述;如本文所述的有机多价阳离子螯合剂(例如EGTA);如本文所述的至少一种非离子表面活性剂(例如,TRITON™ X-100洗涤剂);如本文所述的三价铁(例如,柠檬酸铁铵);如上文所述的用于促进聚合酶活性的试剂(例如,七水合硫酸镁)和如上文所述的实质上不含磷酸盐的缓冲剂(例如,CAPS缓冲剂)。优选地,裂解缓冲剂基本上不含磷酸盐。然而,因为裂解缓冲剂是作为旨在被稀释(例如,1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:25、1:30)进入到含水样本中的浓缩物提供的,裂解缓冲剂可包含可检测量的磷酸盐(例如, $\leq 10\text{mM}$ 、 $\leq 5\text{mM}$ 、 $\leq 2\text{mM}$ 、 $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 0.5\text{mM}$ 、 $\leq 0.2\text{mM}$ 、 $\leq 0.1\text{mM}$ 、或 $\leq 0.01\text{mM}$ 的组合物包含磷酸盐)。所述裂解缓冲剂具有以下pH:在 20°C 下大于或等于8.6,在 25°C 下大于或等于9.0,在 25°C 下大于或等于9.2、在 25°C 下大于或等于9.5、在 25°C 下大于或等于约9.8、在 25°C 下大于或等于约9.9、在 25°C 下约8.8、在 25°C 下约9.0、在 25°C 下约9.2、在 25°C 下约9.3、在 25°C 下约9.4、在 25°C 下约9.6、在 25°C 下约9.8、在 25°C 下约9.9、在 25°C 下约10.0、在 25°C 下约10.1、在 25°C 下约10.2、在 25°C 下约10.3、在 25°C 下约10.5、在 25°C 下约8.6-10.0、在 25°C 下约8.6-9.8、在 25°C 下约9.0-10.5、在 25°C 下约9.3-10.5、在 25°C 下约9.8-10.5、在 25°C 下约9.9-10.5、或在 25°C 下约

9.2-9.8,如上文所述。

[0099] 任选地,裂解缓冲剂可包含聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP),如本文所述;如本文所述,促进聚合酶介导的核酸扩增的试剂(例如,硫酸铵、氯化钾);如本文所述,促进纳米粒子分散的试剂(例如柠檬酸或其盐);和如本文所述的指示剂染料(例如甲酚红);如本文所述的防腐剂(例如PROCLIN[®]950生物杀灭剂);或前述任选组分中的任何两种或更多种的组合。

[0100] 实施例部分中的表1显示了根据本公开的用于裂解缓冲剂的组合物的一个实施方案的配方。选择表1中列出的浓度用于其中将一份裂解缓冲剂与10份含水样本混合的方法(如实施例1中所述),得到具有每种组分的适当最终浓度的混合物,以促进热裂解和核酸扩增(例如,使用LAMP-BART扩增技术)。本领域的普通技术人员将认识到,裂解缓冲剂的每种组分的浓度可根据裂解缓冲剂:样本的所需比率而变化,以便在任何给定方案中实现每种组分的适当最终浓度。

[0101] 示例性实施方案

[0102] 实施方案A是一种核酸扩增方法,所述方法包括:

[0103] 通过使样本与实质上不含水溶性磷酸根离子的营养培养基接触来形成富集培养物,其中所述营养培养基包含第一缓冲剂;

[0104] 在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间;

[0105] 在保持所述富集培养物之后,通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的所述裂解缓冲剂混合以形成第三体积的含水组合物来形成含水组合物。

[0106] 其中将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合;

[0107] 其中所述裂解缓冲剂实质上不含水溶性磷酸根离子并且包含第二缓冲剂;

[0108] 其中所述裂解缓冲剂包含有机多价阳离子螯合试剂,其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁的大于或等于 $10^{4.2}$ 的第一亲和常数以及相对于镁的小于 $10^{3.8}$ 的第二亲和常数,其中所述第一亲和常数和所述第二亲和常数是在pH 8.45下的20℃去离子水中测定的;

[0109] 其中所述裂解缓冲剂在25℃下具有大于8.6的pH;

[0110] 其中所述含水组合物在25℃下具有约8.45至8.85的pH;

[0111] 其中所述含水组合物中的第一缓冲剂和第二缓冲剂的组合浓度为至少约15mM;

[0112] 其中所述第一体积与所述第二体积的比率大于或等于3:1,并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:4;

[0113] 使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质;

[0114] 使所述含水组合物经受热裂解过程;以及

[0115] 在使所述含水组合物经受热裂解过程之后,使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。

[0116] 实施方案B为一种核酸扩增方法,所述方法包括:

[0117] 通过使样本与配方不包含磷酸盐缓冲剂组分的营养培养基接触来形成富集培养物,其中所述营养培养基包含第一缓冲剂;

- [0118] 在促进靶微生物生长的温度下保持所述富集培养物一段时间；
- [0119] 在保持所述富集培养物之后，通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的所述裂解缓冲剂混合以形成第三体积的含水组合物来形成所述含水组合物。
- [0120] 其中将所述第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合包括将未稀释的第一体积的所述富集培养物与所述第二体积的所述裂解缓冲剂混合；
- [0121] 其中所述裂解缓冲剂包含第二缓冲剂；
- [0122] 其中所述裂解缓冲剂包含有机多价阳离子螯合试剂，其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁的大于或等于 $10^{4.2}$ 的第一亲和常数以及相对于镁的小于 $10^{3.8}$ 的第二亲和常数，其中所述第一亲和常数和所述第二亲和常数是在pH 8.45下的20℃去离子水中测定的；
- [0123] 其中所述裂解缓冲剂在25℃下具有大于8.6的pH；
- [0124] 其中所述含水组合物在25℃下具有约8.45至8.85的pH；
- [0125] 其中所述含水组合物中的第一缓冲剂和第二缓冲剂的组合浓度为至少约15mM；
- [0126] 其中所述第一体积与所述第二体积的比率大于或等于3:1，并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:4；
- [0127] 使所述含水组合物与有效量的水不溶性材料接触，所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质；
- [0128] 使所述含水组合物经受热裂解过程；以及
- [0129] 在使所述含水组合物经受热裂解过程之后，使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程。
- [0130] 实施方案C为根据实施方案A或实施方案B所述的方法，其中所述营养培养基的所述配方的组分不包括 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 或 K_3PO_4 。
- [0131] 实施方案D为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述营养培养基的所述配方的组分不包括 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_3PO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 或 K_3PO_4 。
- [0132] 实施例E为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述裂解缓冲剂还包含三价铁。
- [0133] 实施方案F为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述裂解缓冲剂还包含选自以下项构成的组的试剂：纳米粒子分散稳定剂、具有约11至约16的亲水-亲脂平衡的非离子表面活性剂、聚乙烯吡咯烷酮、七水合硫酸镁、含氟表面活性剂、指示剂染料以及上述试剂中的任何两种或更多种的组合。
- [0134] 实施方案G为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中将所述富集培养物保持一段时间可包括将所述富集培养物保持约4小时至约24小时。
- [0135] 实施方案H为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述第一体积与所述第二体积的比率大于或等于5:1，并且所述第二体积与所述第三体积的比率小于或等于1:6。
- [0136] 实施方案I为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中通过将第一体积的所述富集培养物与第二体积的所述裂解缓冲剂混合形成所述含水组合物包括形成具有设置在其中的多个氧化锆粒子的含水组合物。
- [0137] 实施方案J为根据前述实施方案中任一项所述的方法，其中所述水不溶性材料包

含多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质的水不溶性材料。

[0138] 实施方案K为根据实施方案J所述的方法,其中多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质的所述水不溶性材料包括多个氧化锆粒子、羟基磷灰石粒子或它们的混合物。

[0139] 实施方案L为根据实施方案K所述的方法,其中所述多个粒子包括多个具有小于或等于100nm的平均粒度的氧化锆粒子。

[0140] 实施方案M为根据实施方案L所述的方法,其中所述多个氧化锆粒子在所述第三体积中具有约 $10\text{m}^2/\text{L}$ 至约 $600\text{m}^2/\text{L}$ 的表面积。

[0141] 实施方案N为根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中使所述含水组合物经受热裂解过程包括将所述含水组合物暴露于约 95°C 至约 102°C 的温度。

[0142] 实施方案O为根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程包括使所述含水组合物的一部分经受环介导的等温扩增过程。

[0143] 实施方案P为根据实施方案A至N中任一项所述的方法,其中使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程包括使所述含水组合物的一部分经受热循环聚合酶链反应过程。

[0144] 实施方案Q为根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中形成所述含水组合物基本上由将第一体积的所述富集培养物与第二体积的所述裂解缓冲剂混合组成。

[0145] 实施方案R是根据前述实施方案中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[0146] 在使所述含水组合物经受热裂解过程之后,并且在使所述含水组合物的一部分经受核酸扩增过程之前,使用所述含水组合物的一部分再水合用于核酸扩增的脱水了的试剂。

[0147] 实施方案S为一种裂解缓冲剂,所述裂解缓冲剂包含:

[0148] 水不溶性材料,所述水不溶性材料多价螯合干扰聚合酶介导的核酸扩增反应的物质;

[0149] 有机多价阳离子螯合试剂;

[0150] 至少一种非离子表面活性剂;

[0151] 三价铁;

[0152] 用于促进聚合酶活性的试剂;

[0153] 缓冲剂;和

[0154] 水;

[0155] 其中所述裂解缓冲剂包含小于1mM的磷酸或其盐;

[0156] 其中所述裂解缓冲剂在 25°C 下具有约9.8至10.5的pH,包括端值。

[0157] 实施方案T为根据实施方案S所述的裂解缓冲剂,其中所述缓冲剂包含N-环己基-3-氨基丙磺酸或其盐。

[0158] 实施方案U为根据实施方案S或实施方案T所述的裂解缓冲剂,其中所述水不溶性材料包含多个氧化锆粒子、多个羟基磷灰石粒子、或它们的混合物。

[0159] 实施方案V为根据实施方案S或实施方案T所述的裂解缓冲剂,其中所述有机多价阳离子螯合试剂具有相对于三价铁离子的大于或等于 $10^{4.2}$ 的亲合常数以及相对于镁离子的小于 $10^{3.8}$ 的亲合常数,其中所述第一亲合常数和所述第二亲合常数是在pH 8.45下的20

℃去离子水中测定的。

[0160] 实施方案W是根据实施方案S至V中任一项所述的裂解缓冲剂,其中所述至少一种非离子表面活性剂具有约11至约16的亲水-亲脂平衡。

[0161] 实施方案X是根据实施方案S和U至W中任一项所述的裂解缓冲剂,其中所述缓冲剂选自自由以下项构成的组:三(羟甲基)氨基甲烷、N-环己基-3-氨基丙磺酸、3-(N-吗啉基)丙磺酸、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸、2-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]乙磺酸、2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙-1,3-二醇、以及它们的组合。

[0162] 实施方案Y是根据实施方案S至X中任一项所述的裂解缓冲剂,所述裂解缓冲剂还包含聚乙烯吡咯烷酮或聚乙烯聚吡咯烷酮。

[0163] 实施方案Z是根据实施方案S至Y中任一项所述的裂解缓冲剂,所述裂解缓冲剂还包含氯化钾。

[0164] 实施方案AA是根据实施方案S至Z中任一项所述的裂解缓冲剂,所述裂解缓冲剂还包含硫酸铵。

[0165] 实施方案AB是根据实施方案S至AA中任一项所述的裂解缓冲剂,所述裂解缓冲剂还包含促进纳米粒子分散的试剂。

[0166] 实施方案AC是根据实施方案S至AB中任一项所述的裂解缓冲剂,还包含指示剂染料。

[0167] 实施方案AD为根据实施方案AC所述的裂解缓冲剂,其中所述指示剂染料被选择用于监测所述裂解缓冲剂的温度。

[0168] 实施方案AE是根据实施方案S至AD中任一项所述的裂解缓冲剂,其中所述裂解缓冲剂在25℃下具有约10.0至10.2的pH,包括端值。

[0169] 实施例

[0170] 下面的实施例对本发明的目的和有益效果作出更进一步的解释,但这些实施例中列举的具体材料和用量以及其它条件和细节不应解释为是对本发明不当的限制。除非另外指明,否则所有的份数和百分比均以重量计,所有的水为蒸馏水,并且所有的分子量为重均分子量。

[0171] 材料和试剂。

[0172] 氧化锆纳米粒子分散体(10%w/w的水溶液;<100nm粒度(BET);部件号643025)可购自西格玛化工有限公司(Sigma Chemical Co)。TRITON™ X-100洗涤剂和Proclin®950生物杀灭剂可购自密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich(St.Louis,MO))。根据表1中指定的顺序将每种组分加入到去离子水中来制备测试组合物。

[0173] 表1:裂解缓冲剂。用于实施例中的裂解缓冲剂的组成。还示出了所述组合物的每种组分的添加顺序。

[0174]

添加至水的顺序	组分	浓度
1	柠檬酸铁铵	657mg/L
2	柠檬酸钾	972mg/L
3	TRITON™ X-100 洗涤剂	10g/L
4	PVP	4.3g/L
5	氧化锆分散体 (10% w/w)	20mL/L
6	甲酚红	100mg/L
7	七水合硫酸镁	738mg/L
8	N-环己基-3-氨基丙磺酸	22.1g/L
9	氢氧化钾	100mM
10	氢氧化铵	14.1g/L
11	EGTA	4.75g/L
12	Proclin® 950 生物杀灭剂	5.26mL/L

[0175] 表2:富集培养基。用于实施例中的富集培养基的组成。

[0176]

组分	浓度
Tris HCl	3.51g/L
Tris碱	0.34g/L
氯化钾	3g/L
葡萄糖	5g/L
酵母提取物	5g/L
蛋白胨	10g/L

[0177] 表3:用于比较例的替代裂解缓冲剂。调节每种组分的浓度,使得当根据常规方法与样本混合时,每种组分处在用于核酸扩增步骤的适当最终浓度下。

[0178]	添加至水的顺序	组分	浓度
	1	柠檬酸铁铵	200mg/L
	2	TRITON™ X-100 洗涤剂	320mg/L
	3	PVP	430mg/L
	4	氧化锆分散体(10% w/w)	2mL/L
	5	甲酚红	10mg/L
	6	七水合硫酸镁	73.8mg/L
	7	氯化钾	3.19g/L
	8	Tris 碱	2.72g/L
	9	硫酸铵	1.41g/L
	10	EGTA	475mg/L
	11	Proclin® 950 生物杀灭剂	0.526mL/L

[0179] 实施例1:使用非稀释样本制备方法检测沙门氏菌微生物。

[0180] 将大肠杆菌(ATCC 25922)和沙门氏菌(ATCC 6962)的过夜培养物分别通过采集来自血琼脂平板的每种微生物的分离菌落,将菌落悬浮在包含10mL表2中所述的富集培养基的单独管中,并且在37℃下温育每个管18小时来生长。温育期后,将沙门氏菌培养物计数并连续稀释到大肠杆菌培养物中以获得混合的培养物,各自管中的所述混合的培养物具有约 5×10^9 CFU/mL大肠杆菌混合约 5×10^6 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^5 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^4 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^3 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^2 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^1 CFU/mL沙门氏菌、约 5×10^0 CFU/mL沙门氏菌和约 5×10^{-1} CFU/mL沙门氏菌的沙门氏菌亚群。

[0181] 将裂解缓冲剂(表1)的55μL等分试样移液入裂解管(Axygen Minitube 1.1mL Fisher目录号:14-222-202)中。向每个单独的裂解管中加入500μL大肠杆菌和沙门氏菌的混合培养物(上文所述)各者中的一者。然后将裂解管通过将它们放置成与设定为100℃的热块接触15分钟来处理。然后将管通过将它们放置成与室温金属块接触5分钟来冷却5分钟。

[0182] 在热裂解和冷却步骤之后,从每个裂解管中取出五个20μL的溶胞产物等分试样,并使用每个等分试样在各个反应管中重构3M MDS沙门氏菌试剂沉淀物(目录号:MDA2SAL96;明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company;St Paul,MN)。因此,分析来自每个裂解管的大约100μL溶胞产物(约90μL混合培养物)沙门氏菌微生物的存在。将反应管置于3M分子检测系统仪器(目录号MDS100;明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company;St.Paul,MN)中并且根据制造商的说明操作仪器,以检测沙门氏菌DNA的扩增。结果报告于表4中。

[0183] 比较例1:使用常规方法检测沙门氏菌微生物。

[0184] 利用3M分子检测系统试剂盒(目录号:MDA2SAL96),使用检测沙门氏菌微生物的常规方法(描述于制造商说明书中),测试实施例1中制备的大肠杆菌和沙门氏菌的每个混合培养物。简而言之,将20μL的每个样本加入包含580μL替代裂解缓冲剂(表3)的各个裂解管

中。然后将裂解管加热15分钟,并且如实施例1中所述冷却5分钟。

[0185] 在热裂解和冷却步骤之后,从每个裂解管中取出五个20 μ L的溶胞产物等分试样,并使用每个等分试样在各个反应管中重构3M MDS沙门氏菌试剂沉淀物(目录号:MDA2SAL96;明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company;St Paul,MN)。因此,分析来自每个裂解管的大约100 μ L溶胞产物(约3 μ L混合培养物)沙门氏菌微生物的存在。将反应管置于3M分子检测系统仪器(目录号MDS100;明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company;St.Paul,MN)中并且根据制造商的说明操作仪器,以检测沙门氏菌DNA的扩增。结果报告于表4中。

[0186] 表4:来自大肠杆菌和沙门氏菌的混合培养物的沙门氏菌DNA的扩增。阴性(“-”)结果指示五个反应管中无一个显示沙门氏菌微生物DNA的扩增。阳性(“+”)结果指示五个反应管中的至少一个显示沙门氏菌微生物DNA的扩增。

[0187]

沙门氏菌含量 (CFU/mL)	比较例 1	实施例 1
5×10^6	+	+
5×10^5	+	+
5×10^4	+	+
5×10^3	-	+
5×10^2	-	+
5×10^1	-	+
5×10^0	-	-
5×10^{-1}	-	-

[0188] 实施例2:使用非稀释样本制备方法检测弯曲杆菌微生物。

[0189] 将大肠杆菌(ATCC 25932)和空肠弯曲菌(ATCC 33291)的过夜培养物分别通过采集来自血琼脂平板的每种微生物的分离菌落,将菌落悬浮在包含10mL表2中所述的富集培养基的单独管中,并且分别在37 $^{\circ}$ C下(大肠杆菌)或在41.5 $^{\circ}$ C下(空肠弯曲菌)温育每个管18小时来生长。温育期后,将弯曲杆菌培养物计数并连续稀释到大肠杆菌培养物中以获得混合的培养物,各自管中的所述混合的培养物具有约 5×10^9 CFU/mL大肠杆菌混合约 5×10^6 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^5 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^4 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^3 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^2 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^1 CFU/mL弯曲杆菌、约 5×10^0 CFU/mL弯曲杆菌和约 5×10^{-1} CFU/mL弯曲杆菌的弯曲杆菌亚群。

[0190] 如实施例1中所述,裂解大肠杆菌和弯曲杆菌的每种混合培养物的等分试样(500 μ L)。对于各个反应管,将每个溶胞产物的五微升等分试样加入qPCR主混合物,所述qPCR主混合物由PCR缓冲剂和以下组分中的每个组成:0.2mM dNTP,3mM MgCl₂,2.5U的Taq DNA聚合酶,0.625 μ M正向引物[SEQ ID NO:1(CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG)],0.625 μ M反向引物[SEQ ID NO:2(TTCCTTAGGTACCGTCAGAA)],Brilliant III主混合物(部件编号600880,安捷伦科技公司(Agilent Technologies)),和0.156 μ M弯曲杆菌探针[SEQ ID NO:3(FAM-

TGTCATCCTCCACGCGGCGTTGCTGC-TAMRA)]。将上述浓度的每一种报告为在添加溶胞产物后混合物中的浓度(即,“最终”浓度)。在Applied Biosystems 7500热循环仪中处理每个反应管。

[0191] 使用以下方案运行40个循环的热循环反应:(1)变性(95℃,30秒), (2)退火(58℃,30秒),和(3)延伸(72℃,60秒)。

[0192] 比较例2:使用常规方法检测弯曲杆菌微生物。

[0193] 使用常规PCR方法测试实施例1中制备的大肠杆菌和弯曲杆菌的每种混合培养物。为了制备PCR反应的溶胞产物,将20μL的每个样本加入包含580μL裂解缓冲剂的各个裂解管中,所述裂解缓冲剂来自3M分子检测系统试剂盒(目录号:MDA2SAL96)。然后将裂解管加热15分钟,并且如实施例1中所述冷却5分钟。

[0194] 如实施例2中所述,对每个溶胞产物的五微升等分试样进行DNA扩增。

[0195] 表5:热循环弯曲杆菌扩增反应的半定量检测结果。结果显示为在所测试的总PCR反应的数目中阳性PCR反应(即,其中检测到弯曲杆菌DNA)的数目。

[0196]	弯曲杆菌含量 (CFU/mL)	实施例 2	比较例 2
	5×10^7	3/3	3/3
	5×10^6	3/3	3/3
	5×10^5	3/3	3/3
	5×10^4	3/3	3/3
	5×10^3	3/3	2/3
	5×10^2	3/3	2/3
	5×10^1	3/3	1/3
	5×10^0	2/3	0/3

[0197] 数据显示,本公开的方法(例如,如实施例2中所执行)能可靠地检测样本中比常规方法(例如,比较例2)更低的微生物浓度。

[0198] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物的全部公开内容以及可供使用的电子版材料均以引用的方式并入。在本申请的公开内容和以引用的方式并入本文的任何文献的公开内容之间存在任何不一致的情况下,应以本申请的公开内容为准。前述详细描述和实施例仅为了清楚地理解本发明而给出。但它们不应被理解为不必要的限制。本发明不限于示出的和描述的具体细节,对本领域的技术人员而言显而易见的变型形式将包括在由权利要求书所限定的本发明中。

[0199] 所有的标题是为了阅读者方便,而不应该用于限制该标题后面的正文的含义,除非如此规定。

[0200] 在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可做出各种修改。这些实施方案以及其他实施方案均在以下权利要求书的范围内。

- [0201] 序列表
- [0202] SEQ ID NO:1CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG
- [0203] SEQ ID NO:2TTCCTTAGGTACCGTCAGAA
- [0204] SEQ ID NO:3TGTCATCCTCCACGCGCGTTGCTGC

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 3M创新有限公司
- [0003] 格雷戈里·西顿(Sitton, Gregory)
- [0004] 尼尔·帕西(Percy, Neil)
- [0005] <120> 细胞裂解和核酸扩增的方法
- [0006] <130> 77512W0003
- [0007] <160> 3
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 23
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> *Campylobacter* spp.
- [0013] <400> 1
- [0014] ctgcttaaca caagttgagt agg 23
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 20
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> *Campylobacter* spp.
- [0019] <400> 2
- [0020] ttccttaggt accgtcagaa 20
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 26
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> *Campylobacter* spp.
- [0025] <400> 3
- [0026] tgtcatcctc cacgcggcgt tgctgc 26

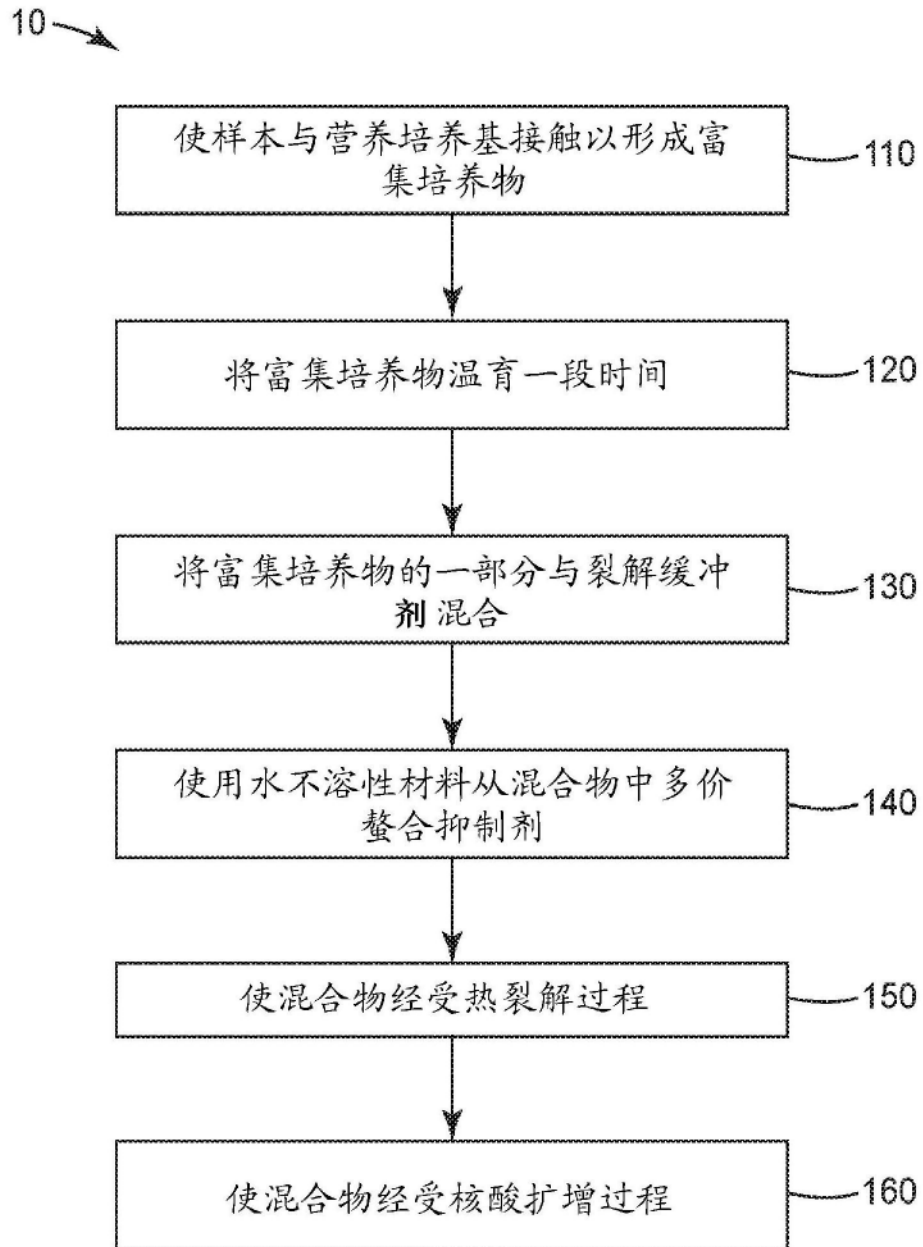


图1