(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101952459 A
(43)申请公布日 2011.01.19

(21)申请号 200880105424.7
(22)申请日 2008.07.14
(30)优先权数据
11/778,018 2007.07.14 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.03.03
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/070023 2008.07.14
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/012246 EN 2009.01.22
(71)申请人 爱奥尼安技术公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 布莱恩·K·梅普尔斯
里贝卡·C·霍姆伯格
安德鲁·P·米勒
雅罗德·普罗文斯 理查德·罗思
杰弗里·曼代利
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 沈锦华
(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

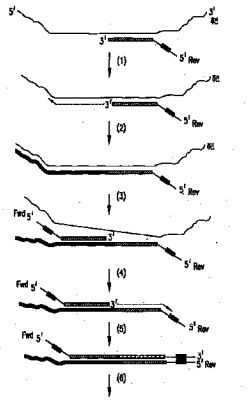
权利要求书 10 页 说明书 49 页 附图 31 页

(54)发明名称

用于核酸指数式扩增的切口和延长扩增反应

(57)摘要

本发明一般来说涉及短 DNA 或 RNA 序列在恒温下的快速指数式扩增。



CN 101952459 A

1. 一种扩增核苷酸序列的方法，其包含：

合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与所述靶核苷酸序列的第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与所述靶核苷酸序列第一链的互补链杂交的第二模板核酸，

在所述聚合酶可延长所述模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子；其中：

所述靶核苷酸序列的长度介于 20 与 40 个核苷酸之间；

所述靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上；并且

上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

2. 一种扩增核苷酸序列的方法，其包含：

合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与所述靶核苷酸序列的第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与所述靶核苷酸序列第一链的互补链杂交的第二模板核酸，

在所述聚合酶可延长所述模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子；其中：

所述靶核苷酸序列的长度介于 20 与 40 个核苷酸之间；

所述第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的 3’末端互补或实质上互补的第一模板识别区域；

所述第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的互补链的 3’末端互补或实质上互补的第二模板识别区域；

所述靶核苷酸序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；

所述靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上；并且上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

3. 一种扩增核苷酸序列的方法，其包含：

合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与所述靶核苷酸序列的第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与所述靶核苷酸序列第一链的互补链杂交的第二模板核酸，

在所述聚合酶可延长所述模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子；其中：

所述第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的 3’末端互补或实质上互补的第一模板识别区域，其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸；

所述第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的互补链的 3’末端互补或实质上互补的第二模板识别区域，其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸；

所述靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上；并且上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中

所述第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的 3’末端互补或实质上互补的第一模板识别区域；并且

所述第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶核苷酸序列第一链的互补链的 3’末端互补或实质上互补的第二模板识别区域。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述靶核苷酸序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

6. 如权利要求 2、3、4 或 5 中任一权利要求所述的方法，其中所述第一模板和第二模板包含位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点，并且所述扩增反应另外包含一或多种能在所述正向和所述反向模板的所述切口位点处切口的切口酶，其中任一种切口酶都能对所述两个模板进行切口，或每个模板都能通过至少一种所述切口酶进行切口，并且其中所述一或多种切口酶不能在所述靶序列内切口。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述靶核苷酸序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 个。

8. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述靶核苷酸序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 2 个。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述靶核苷酸序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 3 个。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核酸是双链或单链核酸。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述靶核酸是双链 DNA。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述靶核酸是单链 DNA。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述靶核酸是 RNA。

14. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述靶核酸选自由以下组成的群组 ：基因组 DNA、质粒 DNA、病毒 DNA、线粒体 DNA 和合成双链 DNA。

15. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述靶核酸选自由以下组成的群组 ：病毒 DNA、cDNA 和合成单链 DNA。

16. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述靶核酸选自由以下组成的群组 ：信使 RNA、病毒 RNA、核糖体 RNA、转移 RNA、微小 RNA、微小 RNA 前体、和合成 RNA。

17. 如权利要求 1 至 16 中任一权利要求所述的方法，其中所述 DNA 聚合酶是耐热性聚合酶。

18. 如权利要求 1 至 16 中任一权利要求所述的方法，其中所述聚合酶选自由以下组成的群组 ：Bst（大片段）、9° N、温特$(Vent_R)^{®}$（外）DNA 聚合酶、热启动酶 (Therminator)、和热启动酶 II。

19. 如权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的方法，其中所述聚合酶是 Bst（大片段）。

20. 如权利要求 6 至 12 中任一权利要求所述的方法，其中所述第一和第二模板包含可通过相同切口酶识别的多个切口酶结合位点，并且所述第一与所述第二切口酶相同。

21. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述切口酶选自由以下组成的群组 ：Nt.BspQI、Nb.BbvCi、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.Bpu10I、和 Nt.Bpu10I。

22. 如权利要求 1 至 20 中任一权利要求所述的方法，其中所述第一链核酸序列中与所述靶核苷酸序列第一链互补或实质上互补的部分长 8 至 15 个核苷酸，并且其中所述第二链中与所述靶核苷酸序列互补或实质上互补的部分长 8 至 15 个核苷酸。

23. 如权利要求 1 至 22 中任一权利要求所述的方法，其中所提供的所述第一模板的浓

度与所述第二模板相同。

24. 如权利要求 1 至 22 中任一权利要求所述的方法，其中所提供的所述第一或第二模板中的一者与另一模板的比率在 1 ： 100 至 100 ： 1 的比率范围内。

25. 如权利要求 1 至 25 中任一权利要求所述的方法，其另外包含第二聚合酶。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述第一或第二聚合酶中至少一者具有逆转录酶活性。

27. 如权利要求 1 至 26 中任一权利要求所述的方法，其中所述扩增是在 54℃与 60℃之间实施。

28. 如权利要求 1 至 26 中任一权利要求所述的方法，其中所述扩增是在 56℃与 58℃之间实施。

29. 如权利要求 1 至 28 中任一权利要求所述的方法，其中将所述扩增反应物在恒温下保持 1 至 10 分钟。

30. 如权利要求 1 至 28 中任一权利要求所述的方法，其中将所述扩增反应物在恒温下保持 1 至 20 分钟。

31. 如权利要求 1 至 30 中任一权利要求所述的方法，其另外包含检测所述扩增产物。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述扩增产物是通过选自由以下组成的群组的检测方法来检测 ：凝胶电泳、质谱、SYBR I 荧光法、SYBR II 荧光法、SYBR 金、Pico 绿、TOTO-3、嵌入染料检测、荧光共振能量转移 (FRET)、分子信标检测、表面捕获、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获来检测、荧光偏振、和侧向流动捕获。

33. 如权利要求 1 至 32 中任一权利要求所述的方法，其中能扩增至少两个靶序列。

34. 如权利要求 1 至 33 中任一权利要求所述的方法，其中在固体表面上检测所述扩增产物。

35. 如权利要求 1 至 34 中任一权利要求所述的方法，其中将至少一种捕获探针固定在固体表面上。

36. 如权利要求 1 至 35 中任一权利要求所述的方法，其中所述模板中的至少一者包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

37. 如权利要求 1 至 36 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+6 倍或以上。

38. 如权利要求 1 至 36 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核苷酸序列在约 2.5 分钟内扩增 1E+6 倍或以上。

39. 如权利要求 1 至 36 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+7 倍或以上。

40. 如权利要求 1 至 36 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+8 倍或以上。

41. 如权利要求 1 至 36 中任一权利要求所述的方法，其中所述靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+9 倍或以上。

42. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中

i) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸 ；

ii) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与所述靶序列有义链的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸 ；

b) 提供能在所述正向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶 ；

c) 提供能在所述反向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶 ；和

d) 提供 DNA 聚合酶 ；

其中扩增是通过多次如下循环来实施 ：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

43. 一种扩增单链核酸靶序列的方法，其包含

a) 使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核酸序列包含位于 3’ 末端且与所述靶序列的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸 ；

b) 提供能在所述反向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶 ；

c) 提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板 ；

d) 使所述经延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’ 末端且与所述经延长反向模板的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸 ；

e) 提供能在所述正向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内或在所述靶序列的互补链内切口的第二切口酶 ；

其中所述扩增是在基本等温的条件下实施，其中扩增是通过多次如下循环来实施 ：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。

44. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述 DNA 聚合酶是耐热性聚合酶。

45. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述聚合酶选自由以下组成的群组 ：Bst（大片段）、9° N、温特 R® （外）DNA 聚合酶、热启动酶、和热启动酶 II。

46. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述聚合酶是 Bst（大片段）。

47. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述切口酶在所述切口酶结合位点下游切口。

48. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述正向和反向模板包含可通过相同切口酶识别的切口酶结合位点，并且所述第一与所述第二切口酶相同。

49. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述切口酶选自由以下组成的群组：Nt.BspQI、Nb.BbvCi、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.Bpu10I 和 Nt.Bpu10I。

50. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

51. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 个。

52. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 2 个。

53. 如权利要求 42 所述的方法，其中所述靶 DNA 分子选自由以下组成的群组：基因组 DNA、质粒、线粒体和病毒 DNA。

54. 如权利要求 43 所述的方法，其中所述靶核酸选自由以下组成的群组：病毒 DNA、信使 RNA、微小 RNA、和微小 RNA 前体。

55. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所提供的所述正向模板的浓度与所述反向模板相同。

56. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所提供的所述正向或反向模板中的一者与另一模板的比率在 1 ： 100 至 100 ： 1 的比率范围内。

57. 如权利要求 43 所述的方法，其另外包含第二聚合酶。

58. 如权利要求 57 所述的方法，其中所述聚合酶中至少一者具有逆转录酶活性。

59. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述扩增是在 54℃与 60℃之间实施。

60. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中将所述扩增反应物在恒温下保持 1 至 10 分钟。

61. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其另外包含检测所述扩增产物。

62. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述扩增产物是通过选自由以下组成的群组的方法来检测：凝胶电泳、质谱、SYBR I 荧光法、SYBR II 荧光法、SYBR 金、Pico 绿、TOTO-3、嵌入染料检测、FRET、分子信标检测、表面捕获、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获来检测、荧光偏振、和侧向流动捕获。

63. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中能扩增至少两个靶序列。

64. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中在固体表面上检测所述扩增产物。

65. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中将至少一种捕获探针固定在固体表面上。

66. 如权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述模板中的至少一者包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

67. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中

i) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上

游的稳定区域；

ii) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与所述靶序列有义链的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；并且

iii) 所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；

b) 提供能在所述正向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

c) 提供能在所述反向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和

d) 提供 DNA 聚合酶；

其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

68. 一种扩增单链核酸靶序列的方法，其包含

a) 使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核酸序列包含位于 3’ 末端且与所述靶序列的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸；

b) 提供能在所述反向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

c) 提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板；

d) 使所述经延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’ 末端且与所述经延长反向模板的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；

e) 提供能在所述正向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内或在所述靶序列的互补链内切口的第二切口酶；

其中所述扩增是在基本等温的条件下实施，其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。

69. 如权利要求 67 或 68 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 个。

70. 如权利要求 67 或 68 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 2 个。

71. 如权利要求 67 或 68 所述的方法，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 3 个。

72. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接

触，其中

b) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

c) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

d) 提供能在所述正向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

e) 提供能在所述反向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和

f) 提供 DNA 聚合酶；

其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

73. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中

b) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

ii) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与所述靶序列有义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

c) 提供能在所述正向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

d) 提供能在所述反向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和

e) 提供 DNA 聚合酶；

其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

74. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中

b) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

c) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链的 3’末

端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

d) 提供能在所述正向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

e) 提供能在所述反向模板的所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和

f) 提供 DNA 聚合酶；

其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物，其中当使所述扩增反应进行 12 分钟时，长 22 至 35 个核苷酸的靶序列获得至少 1E+7 倍的扩增。

75. 一种扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温的条件下

a) 使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中

b) 所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸；

c) 所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸；

d) 提供能在所述正向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；

e) 提供能在所述反向模板的所述切口位点上游、下游或所述切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和

f) 提供 DNA 聚合酶；

其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物，其中当使所述扩增反应进行 12 分钟时，长 22 至 35 个核苷酸的靶序列获得至少 1E+7 倍的扩增。

76. 一种用于扩增核酸靶序列的试剂盒，其包含

a)DNA 聚合酶；

b) 用于核酸扩增的第一模板，其包含位于 3’ 末端且与靶序列有义链的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列有义链的 3’ 末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸；

c) 用于核酸扩增的第二模板，其包含位于 3’ 末端且与所述靶序列有义链的互补链的 3’ 末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口

位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列有义链的互补链的 3’末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸；和

d) 一种或两种热稳定切口酶，其中任一种酶都能在所述第一和所述第二模板的所述切口位点处切口，或第一酶能在所述第一引物的所述切口位点处切口并且第二酶能在所述第二引物的所述酶位点处切口。

77. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

78. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板存于一个容器中。

79. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板存于两个容器中。

80. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述聚合酶和切口酶存于第一容器中，并且所述模板存于第二容器中。

81. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板经冻干。

82. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其另外包含实施所述扩增方法的说明书。

83. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其另外包含试管。

84. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其另外包含侧向流动装置或试条。

85. 如权利要求 84 所述的试剂盒，其中所述侧向流动装置或试条另外包含捕获探针。

86. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其另外包含选自由以下组成的群组的检测部分：荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标和聚苯乙烯珠粒。

87. 如权利要求 76 所述的试剂盒，其中所述模板中的至少一者包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

88. 一种用于扩增核酸靶序列的试剂盒，其包含

a)DNA 聚合酶；

b) 用于核酸扩增的第一模板，其包含位于 3’末端且与靶序列有义链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；

c) 用于核酸扩增的第二模板，其包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链的互补链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；和

d) 一种或两种热稳定切口酶，其中任一种酶都能在所述第一和所述第二模板的所述切口位点处切口，或第一酶能在所述第一引物的所述切口位点处切口并且第二酶能在所述第二引物的所述酶位点处切口。

89. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述第一模板核酸序列中与所述靶序列有义链的 3’末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸，并且所述第二模板核酸序列中与所述靶序列有义链的互补链的 3’末端互补的部分长 8 至 15 个核苷酸。

90. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板存于一个容器中。

91. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板存于两个容器中。

92. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述聚合酶和切口酶存于第一容器中，并且所述模板存于第二容器中。

93. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述聚合酶、切口酶、和模板经冻干。

94. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其另外包含实施所述扩增方法的说明书。

95. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其另外包含试管。

96. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其另外包含侧向流动装置或试条。

97. 如权利要求 96 所述的试剂盒，其中所述侧向流动装置或试条另外包含捕获探针。

98. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其另外包含选自由以下组成的群组的检测部分：荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标和聚苯乙烯珠粒。

99. 如权利要求 88 所述的试剂盒，其中所述模板中的至少一者包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

用于核酸指数式扩增的切口和延长扩增反应

[0001] 相关申请案交叉参考

[0002] 本发明主张优先于 2007 年 7 月 14 日申请并且标题为“用于核酸指数式扩增的切口和延长扩增反应 (Nicking and Extension Amplification Reaction for the ExponentialAmplification of Nucleic Acids)”的美国专利申请案第 11/778,018 号，其是全文以引用方式而提及并纳入本文中。

技术领域

[0003] 本发明一般来说涉及短 DNA 或 RNA 序列在恒温下的快速指数式扩增。

背景技术

[0004] 随着人们对可快速检测有害物种的存在或确定目标区域遗传序列的系统的需要指数式增大，体外诊断学领域快速扩展。现有分子诊断学主要检测生物标记物并且包括小分子检测、基于免疫的分析和核酸测试。两个互补或实质上互补的核酸链之间的固有特异性使得可使用单一 DNA 或 RNA 序列进行快速特异性识别，其简单性使得核酸测试具有诱人前景。用于疾病管控的对细菌和病毒威胁剂、遗传修饰食品、和单核苷酸多态性的鉴定只是这些分子诊断工具的进展极为有利的少数领域。为满足这些不断增长的需求，人们已针对这些特异性和灵敏性需求研发并调整核酸扩增技术。

[0005] 历史上，最常用的扩增技术是聚合酶链反应 (PCR)，所述技术因其可靠性和特异性已在许多情况下成为检测方法的黄金标准。此技术需要使各种温度循环以进行以下步骤：dsDNA 变性，短寡核苷酸引物复性，以及通过热稳定聚合酶沿模板来延长引物。尽管工程中的许多新进展已成功地将这些反应的时间缩短至 20-30 分钟，但仍然需要极高功率才能满足这些热循环单元的需求。

[0006] 人们已研发出各种等温扩增技术来避免温度循环的需求。出于此需求，出现了 DNA 和 RNA 等温扩增两种技术。

[0007] 转录介导扩增 (TMA) 采用具有 RNA 酶活性的逆转录酶、RNA 聚合酶、和在 5’末端具有启动子序列的引物。逆转录酶自引物合成 cDNA，降解 RNA 靶，并在反向引物结合后合成第二链。随后 RNA 聚合酶结合至 dsDNA 的启动子区域并转录新 RNA 转录物，所述转录物可用作进一步逆转录的模板。反应可在 20-30 分钟内产生十亿倍扩增。此系统不如其它 DNA 扩增技术稳定，并且因此不是现场可部署测试，因为在无菌实验室外普遍存在 RNA 酶。此扩增技术非常类似于自我持续序列复制 (3SR) 和基于核酸序列的扩增 (NASBA)，但其所用酶不同。

[0008] 单引物等温扩增 (SPIA) 也涉及多种聚合酶和 RNA 酶 H。首先，逆转录酶沿 RNA 靶延长嵌合引物。RNA 酶 H 降解 RNA 靶并且使得 DNA 聚合酶可合成 cDNA 的第二链。随后 RNA 酶 H 降解一部分嵌合引物以释放一部分 cDNA 并开放结合位点以供下一嵌合引物结合，并且扩增过程再次进行所述循环。线性扩增系统可在约 3.5hr 内扩增极低水平的 RNA 靶。

[0009] Q-β 复制酶系统是探针扩增方法。将与所选靶互补或实质上互补的探针区域插入

MDV-1RNA 中，所述 RNA 是 Q-β 复制酶的天然存在的模板。Q-β 复制 MDV-1 质粒以使得合成产物是 Q-β 复制酶模板自身，从而导致指数式扩增，只要针对模板的复制酶过量即可。因为 Q-β 复制工艺如此灵敏并且不论是否存在靶都可扩增，因此需要多个洗涤步骤来清洗非特异性结合复制质粒的样品。指数式扩增耗时约 30 分钟；然而，包括所有洗涤步骤在内的总时间为约 4 小时。

[0010] 也已研发出多种等温 DNA 扩增技术。滚环扩增 (RCA) 是基于质粒和病毒的自然复制来研发。引物沿环形模板延长，从而导致合成单链串联重复。捕获、洗涤和连接步骤对在靶存在下优先环化模板和减少背景扩增是必需的。分枝扩增 (RAM) 添加级联引物以供额外几何扩增。此技术涉及非特异性尺寸链的扩增，所述链为双链或单链。

[0011] 解旋酶依赖性扩增 (HDA) 利用热稳定解旋酶 (Tte-UvrD) 来解开 dsDNA 以产生单链，所述单链随后可用于引物通过聚合酶进行的杂交和延长。热稳定 HAD 方法不需要非热稳定 HAD 所需要的辅助蛋白。所述反应可在单一温度下实施，但结合引物的初始热变性可生成更多产物。据报告，扩增长 70-120 个碱基对的产物的反应时间超过 1 小时。

[0012] 环介导扩增 (LAMP) 是灵敏特异性等温扩增方法，其采用具有链置换能力的热稳定聚合酶和四种或以上种引物。所述引物设计为沿靶在正向和反向上连续复性。外引物的延长置换已延长内引物以释放单链。各引物设计为具有发夹末端，其在置换后立即咬合成发夹以促进自身引发和进一步聚合酶延长。其它环状引物可减少扩增时间，但会使反应混合物变复杂。总之，LAMP 是较难多重化（也就是说同时扩增不止一个靶序列）的扩增方法，但据报导其由于具有多个必须与靶复性的引物而具有极高特异性，从而可促进扩增过程。尽管反应是在等温条件下进行，但双链靶需要初始热变性步骤。扩增在 25 至 50 分钟内进行并且产生不同长度的梯形产物。

[0013] 链置换扩增 (SDA) 是由沃克 (Walker) 等人在 1992 年所研发。此扩增方法使用两组引物、链置换聚合酶、和限制性内切核酸酶。使用缓冲引物来置换首先延长的引物以产生供下一引物结合的单链。限制位点存于引物的 5’区域。将经硫醇修饰的核苷酸纳入合成产物中以抑制合成链的裂解。此修饰在链中聚合酶可延长的引物侧产生切口位点。对于双链靶来说，此方法需要初始热变性步骤。则在低于双链靶区域解链温度的温度下进行反应。使用此方法通常在 30-45 分钟内扩增长 60 至 100 个碱基的产物。

[0014] 这些和其它扩增方法论述于（例如）以下文献中：范尼斯，J(VanNess，J) 等人，PNAS2003，第 100 卷，第 8 册，第 4504-4509 页；陈，E.(Tan，E.) 等人，分析化学 (Anal.Chem.)2005,77,7984-7992；利兹德，P.(Lizard，P.) 等人，自然生物技术 (Nature Biotech.)，1998,6,1197-1202；纳富，T.(Notomi，T.) 等人，NAR 2000,28,12,e63；和科恩，N.(Kurn，N.) 等人，临床化学 (Clin.Chem.)2005,51：10,1973-1981。关于这些一般扩增技术的其它参考文献包括（例如）美国专利第 7112423 号；第 5455166 号；第 5712124 号；第 5744311 号；第 5916779 号；第 5556751 号；第 5733733 号；第 5834202 号；第 5354668 号；第 5591609 号；第 5614389 号；第 5942391 号；和美国专利公开案第 US20030082590 号；第 US20030138800 号；第 US20040058378 号；和第 US20060154286 号。

发明内容

[0015] 本文提供扩增核酸靶序列的方法，所述方法依赖于切口和延长反应以在短于传统

扩增反应（例如链置换扩增反应）的时间范围内扩增较短序列。本发明实施例包括（例如）仅使用两个用来扩增靶序列的模板、一种或两种切口酶和聚合酶的在等温条件下进行的反应。在实例性实施例中，聚合酶和切口酶具有耐热性，并且反应温度显著低于杂交靶区域的解链温度。切口酶仅在双链二倍体中的一个链上切口，从而使得不需要像在习用链置换扩增情形中那样纳入经修饰核苷酸。本发明方法不需要初始热变性步骤。在实例性实施例中，由于反应简单，反应极易进行，不需要特殊设备（例如温度循环器），并且可仅在约 2.5 至约 10 分钟内自基因组 DNA 将 20-30 聚体产物扩增 10^8 至 10^{10} 倍。此外，在其它实例性实施例中，所述方法能不实施单独逆转录步骤即扩增 RNA。

[0016] 因此，本发明第一实施例中提供扩增双链核酸靶序列的方法，所述方法包含使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。

[0017] 在本发明某些实施例中，DNA 聚合酶是耐热性聚合酶。在本发明其它实例中，聚合酶和所述切口酶在最高 37℃、42℃ 2、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、或 85℃的温度下稳定。在某些实施例中，聚合酶在最高 60℃下稳定。聚合酶可选自（例如）由以下组成的群组：Bst（大片段）、9° N、温特$(Vent_R)^{®}$（外）DNA 聚合酶、热启动酶 (Therminator)、和热启动酶 II。

[0018] 切口酶可在（例如）切口酶结合位点上游切口，或在实例性实施例中，切口酶可在切口酶结合位点下游切口。在某些实施例中，正向和反向模板包含可通过相同切口酶识别的切口位点，并且所述第一与所述第二切口酶相同。切口酶可选自（例如）由以下组成的群组：Nt.BspQI、Nb.BbvCi、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、NtAlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.Bpu10I、和 Nt.Bpu10I。

[0019] 在本发明某些方面中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

[0020] DNA 分子可为（例如）基因组 DNA。DNA 分子可选自（例如）由以下组成的群组：质粒、线粒体和病毒 DNA。在某些实施例中，以与反向模板相同的浓度提供正向模板。在其它实例中，所提供正向模板与反向模板的比率在 1 ： 100 至 100 ： 1 比率范围内。

[0021] 在本发明其它实例中，所述方法另外包含使用第二聚合酶。扩增可在（例如）恒温下实施。此温度可为（例如）54℃至 60℃。对于进行反应的时间长度，在某些实例中，可将扩增反应物在恒温下保持 1 至 10 分钟。

[0022] 本发明另外包含通过（例如）选自由以下组成的群组的方法来检测扩增产物：凝

胶电泳、质谱、SYBR I 荧光法、SYBR II 荧光法、SYBR 金、Pico 绿、TOTO-3、嵌入染料检测、FRET、分子信标检测、表面捕获、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获来检测、荧光偏振、和侧向流动捕获。可使用（例如）固体表面方法来检测扩增产物，例如其中至少一个捕获探针固定在结合所扩增序列之固体表面上。

[0023] 本发明可用于多重扩增。因此，例如，在本发明某些实施例中，能扩增至少两个靶序列。“能扩增”意指扩增反应包含可扩增至少两个靶序列的适宜模板和酶。因此，例如，可预备能检测至少两个靶序列的扩增反应，但可能实际上仅一个靶序列存于所测试样品中，从而使得即使可能实际上仅一个序列进行了扩增，但两个序列都能扩增。或者，倘若存在两个靶序列，则扩增反应可导致两个靶序列都扩增。多重扩增反应可导致其所包含适宜模板和酶所针对的一个、某些、或所有靶序列发生扩增。

[0024] 例如，至少一个模板可包含间隔子、阻断基团或经修饰核苷酸。

[0025] 也提供扩增单链核酸靶序列的方法来作为本发明一实施例，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板；使所述经延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’末端且与靶序列 5’末端相同的识别区域，所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。

[0026] 所属领域技术人员应理解，本文所述涉及双链核酸靶序列扩增和扩增产物检测的实例也适用于单链核酸靶序列的扩增和扩增产物的检测。此外，在本发明各实例中，靶序列可为（例如）RNA，例如（但不限于）信使 RNA(mRNA)、核糖体 RNA(rRNA)、病毒 RNA、微小 RNA、微小 RNA 前体、或 siRNA。在（例如）靶序列为 RNA 的本发明实例性实施例中，聚合酶具有逆转录活性。在本发明另一实例中，靶序列为 DNA，例如基因组 DNA，或例如靶序列选自由以下组成的群组：质粒、线粒体、和病毒 DNA、或甚至 PCR 产物。

[0027] 倘若在实例性实施例中本发明方法涉及不止一种聚合酶的使用，则所述聚合酶中至少一种可具有逆转录酶活性。

[0028] 在本发明其它实施例中，提供一组寡核苷酸模板，其包含核酸扩增用第一模板，所述第一模板包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；和核酸扩增用第二模板，所述第二模板包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链 5’末端相同的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；其中所述靶序列在所述反义链的所述 3’末端与所述反义链的所述 5’末端之间包含 1 至 5 个不结合任一模板的间隔子碱基。

[0029] 在其它实施例中，提供用于实施本发明核酸扩增方法的试剂盒，其包含 DNA 聚合

酶；核酸扩增用第一模板，其包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；核酸扩增用第二模板，其包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；一种或两种热稳定切口酶，其中任一种酶都能在所述第一和所述第二模板的切口位点处切口，或第一酶能在所述第一引物的切口位点处切口并且第二酶能在所述第二引物的酶位点处切口。

[0030] 试剂盒可在一个容器中提供（例如）所述聚合酶、切口酶、和模板。试剂盒可在两个容器中提供（例如）所述聚合酶、切口酶、和模板。在某些实例中，聚合酶和切口酶都在第一容器中，并且所述模板位于第二容器中。在某些实例中，聚合酶和切口酶经冻干。试剂盒可另外包含（例如）实施本发明扩增方法的说明书。试剂盒可另外包含（例如）试管。试剂盒可另外包含（例如）侧向流动装置或试条。侧向流动装置或试条可另外包含（例如）捕获探针，其中所述捕获探针结合扩增产物。试剂盒可另外包含（例如）检测部分，例如选自由以下组成的群组者：荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标、聚苯乙烯珠粒和诸如此类。在其它实例中，试剂盒中至少一个模板可包含间隔子、阻断基团或经修饰核苷酸。

[0031] 在扩增反应中包括三磷酸脱氧核苷 (dNTP)。如本文所述，一或多个 dNTP 可经修饰或经标记，然而，在本发明方法中不需要使用经修饰 NTP。如下所述命名核苷酸。三磷酸核糖核苷称作 NTP 或 rNTP；其中 N 可为 A、G、C、U 或 m5U 来表示特定核糖核苷酸。三磷酸脱氧核苷底物表示为 dNTP，其中 N 可为 A、G、C、T 或 U。在整篇文章中，在不特别提及 DNA 或 RNA 的情况下单体核苷酸亚单元可表示为 A、G、C 或 T。

[0032] 在另一实施例中，提供核酸扩增方法，其包含形成以下物质的混合物：包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶核酸；正向模板，其所包含核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；反向模板，其所包含核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；和耐热性聚合酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。在某些实施例中，正向和反向模板上的切口酶结合位点可由相同切口酶来识别，并且反应中仅使用一种切口酶。

[0033] 在另一实施例中，提供核酸扩增方法，其包含形成以下物质的混合物：包含单链靶序列的靶核酸；反向模板，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列 3’末端互补或实质上互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口酶结合位点和所述切口位点上游的稳定区域；能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；耐热性聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板；正向模板，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列 5’末端相同或实质上相同的识别区域；以及能在所述正

向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。在某些实施例中，正向和反向模板上的切口酶结合位点可由相同切口酶来识别，并且反应中仅使用一种切口酶。

[0034] 在本发明其它实施例中提供通过本发明扩增方法获得的扩增核酸的分离方法。在本发明其它实施例中提供检测和/或分析通过本发明扩增方法获得的扩增核酸的方法，包括（例如）使用SYBR I、II、SYBR金、Pico绿、TOTO-3、和大多数嵌入染料的方法、分子信标、FRET、使用具有荧光的固定探针的表面捕获、电化学或比色检测、质谱、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获或荧光偏振来检测、侧向流动、和其它涉及捕获探针的方法。

[0035] 使用捕获探针的检测方法包括（例如）使用核酸分子（捕获探针），其包含与扩增产物链互补或实质上互补的序列从而使得捕获探针可结合扩增核酸。在某些实施例中，可使探针连接可检测标记并且可根据探针中与扩增产物特异性杂交的可检测标记来检测扩增产物。反应可另外包含（例如）针对纳入或附接至捕获探针的分子的抗体。或者，例如，捕获探针或与捕获探针结合的分子可纳入（例如）酶标记，例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、或β-半乳糖苷酶；荧光标记，例如荧光素或罗丹明(rhodamine)，或例如具有化学发光或生物发光活性的其它分子。在某些实施例中，在所属领域技术人员已知并选择的条件下使探针连接至固体载体上，并且可使扩增产物链特异性固定至与所述固体载体连接的捕获探针上。在后一情况的实施例中，可对固体载体固定的扩增产物实施处理步骤，例如洗涤、离子交换、自固体载体释放、或其它处理步骤。在某些实施例中，可在扩增产物固定至固体载体上时对其进行检测。本发明实施例也包含这些检测和分析方法的组合。

附图说明

[0036] 图1A-D是绘示本发明反应机制的草图。图1D是图1的图例。

[0037] 图2.来自DNA NEAR™分析的反应产物的20％聚丙烯酰胺凝胶。

[0038] 根据本发明方法在56℃下使反应进行2.5分钟，然后在94℃下经4分钟热变性。在20％聚丙烯酰胺凝胶上以160V使6微升反应物运行约2.5hr。用SYBR II凝胶染色剂对凝胶实施染色。泳道1：25聚体分析的无靶对照。泳道2：27聚体分析的无靶对照。泳道3：用3.5E+5拷贝枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)基因组DNA进行25聚体分析。泳道4：用1.1E+6拷贝枯草芽孢杆菌基因组DNA进行27聚体分析。

[0039] 图3.来自使用本发明方法的RNA分析的反应产物的20％聚丙烯酰胺凝胶。

[0040] 在56℃下使反应进行12分钟，然后在94℃下经4分钟热变性。在20％聚丙烯酰胺凝胶上以160V使6微升反应物运行约2.5hr。用SYBR II凝胶染色剂对凝胶实施染色。泳道1和2：用1E+6拷贝埃博拉(Ebola)披甲RNA(安宾(Ambion))进行25聚体分析的反应。泳道3和4：25聚体分析的无靶对照反应。25聚体反应产物划在白框中。

[0041] 图4.炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)DNA分析产物的质谱。

[0042] 将A)0拷贝靶或B)5E+5拷贝基因组DNA添加至反应中。使反应进行10分钟，然后在94℃下经4分钟热变性。将10微升样品注入LC/ESI-MS中。(-4)电荷态的26聚体产物和其互补序列划在黑框中。较小相邻峰是主产物的钠加合物。

[0043] 图 5.MS2 基因组 RNA 分析产物的质谱。

[0044] 将 A)0 拷贝靶、B)1E+6 拷贝 MS2 基因组 RNA、或 C)1E+6 拷贝合成靶 DNA 添加至反应中。使反应进行 10 分钟，然后在 94℃下经 4 分钟热变性。将 10 微升样品注入 LC/ESI-MS 中。(-4) 电荷态的 27 聚体产物和其互补链序列划在黑框中。较小相邻峰是主产物的钠加合物。

[0045] 图 6. 使用嵌入式荧光染料对扩增实施实时检测。

[0046] 比较 500 拷贝鼠疫耶尔森菌 (Yersinia pestis) 基因组 DNA(正方形) 与无靶对照 (NTC，空心三角形) 的实时扩增。在 58℃下使反应进行 10 分钟并用 SYBR II 通过实时荧光进行监测 (n = 5)。

[0047] 图 7. 使用荧光共振能量转移 (FRET) 对扩增进行实时检测。

[0048] 比较 10,000 拷贝鼠疫耶尔森菌合成 DNA(正方形) 与无靶对照 (NTC，空心三角形) 的实时扩增。在 57℃下使反应进行 10 分钟，n = 3。

[0049] 图 8. 使用分子信标实时检测土拉热弗朗西斯菌 (Francisella tularensis)DNA 扩增。

[0050] 将 0 拷贝 (空心三角形) 或 1E+5 拷贝 (正方形) 添加至反应混合物中并在 57.5℃下反应 10 分钟。

[0051] 图 9. 比较假阳性率测试结果的平均 AUC 值。

[0052] 误差棒表示一倍标准误差。在 55℃下于存在和不存在枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的情况下使枯草芽孢杆菌分析进行 10min。在 94℃下经 4min 使酶热变性。将 10μL 样品注入 LC/ESI-MS 中并分析产物峰的曲线下面积 (AUC)。真阳性物含有 10,000 拷贝枯草芽孢杆菌 DNA 以及 990,000 拷贝近邻苏云金芽孢杆菌 (Bacillus thuringiensis)DNA。真阴性物含有 10,000 拷贝大肠杆菌 (E.coli)DNA 和 990,000 拷贝近邻 DNA，并且水阴性物作为对照不含 DNA。

[0053] 图 10. 重复实施使用分子信标检测的研究，其中由不同的操作者在不同的两天实施实验。

[0054] 在 57.5℃下 (在存在和不存在 500 拷贝土拉热弗朗西斯菌基因组 DNA 的情况下) 使反应进行 10 分钟，并且在 94℃下实施 4min 的热杀灭。添加 300nM 分子信标并在 45、50 和 57℃下进行监测 (n = 24)。

[0055] 图 11. 使用分子信标检测的反应的灵敏性。

[0056] 在 57.5℃下使分析进行 10 分钟。在 94℃下通过 4min 的热失活步骤终止反应。添加 300nM 分子信标并在 57.5℃下监测荧光 (n = 3)。监测在用 1E+6、5E+5、5E+4、5E+2、50、和 0(NTC) 输入拷贝的土拉热弗朗西斯菌基因组 DNA 扩增的反应物存在下开放的信标的荧光，并将其与信标 (MB) 单独存在时的荧光作比较。

[0057] 图 12. 扩增产物在 NEAR 反应中的终浓度。

[0058] 在 55℃下用不同拷贝的枯草芽孢杆菌基因组 DNA 使 NEAR™ 反应物进行 10min。在 94℃下经 4 分钟的热失活步骤来终止反应。将 10 微升样品注入 LC/ESI-MS 中，并分析 1944 道尔顿处产物峰的 AUC 且将其与标准曲线相比较。

[0059] 图 13. 输入 RNA 靶拷贝数与扩增产物终浓度的关联。

[0060] 在 55℃下用不同拷贝的对应于埃博拉基因组 DNA 的合成 RNA 使埃博拉 NEAR™ 分析

进行 12min。在 94℃下经 4 分钟的热失活步骤来终止反应。将 10 微升样品注入 LC/ESI-MS 中，并且分析 1936 道尔顿处产物峰的 AUC 并且与 AUC 值的标准曲线相比较。(n = 3)

[0061] 图 14. 证实 NEAR 反应特异性的质谱产物分析。

[0062] 在多拷贝苏云金芽孢杆菌稀释物存在下于 56℃下使炭疽芽孢杆菌 NEAR™ 反应进行 10min(n = 3)，然后在 94℃下经 4 分钟热变性。将 10μL 样品注入 LC/ESI-MS 中并分析产物峰的 AUC 值。

[0063] 图 15. 干扰物组对扩增的效应。

[0064] 在 55℃下使枯草芽孢杆菌 DNA 反应进行 10min，并将其加热至 94℃并且保持 4 分钟以终止反应。在 1E+5 拷贝枯草芽孢杆菌基因组 DNA(“1E+5”) 存在下或无靶 DNA 存在下 (″ 0″) 使反应重复进行三次。样品 x 是未添加干扰物的对照分析。以 50％反应体积将干扰物 A 至 F 添加至枯草芽孢杆菌分析中。使用二因子 ANOVA 和邦弗朗尼 (Bonferroni) t- 测试来分析质谱产物峰的 AUC。(图例 :A = 无 ;B = 室尘、脱脂乳 ;C = AZ 测试用粉尘、腐殖酸 ;D = 柴油烟粒 ;E = 脱脂乳 ;F = 霉菌孢子)

[0065] 图 16. 枯草芽孢杆菌 / 炭疽芽孢杆菌 DNA 双重反应的凝胶电泳结果。

[0066] NEAR™ 反应包括对枯草芽孢杆菌 (Bs) 和炭疽芽孢杆菌 (Ba)DNA 二者具有特异性的模板，在不存在靶 DNA 的情况下 (阴性)、在枯草芽孢杆菌单独存在下 (27 聚体产物为阳性)、以及在枯草芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌二者存在下 (27 聚体和 25 聚体产物分别为阳性) 进行反应。此分析中所用靶拷贝数为 500,000 拷贝。在 57℃下使分析进行 10min。改变各分析中的模板浓度以控制扩增 (对于炭疽芽孢杆菌为 100nM 并且对于枯草芽孢杆菌为 50nM)。在 20％聚丙烯酰胺凝胶上以 160V 使样品运行约 2 小时。用 SYBR II 荧光染料对凝胶实施染色并使其成像。以积分光密度 (IOD) 对荧光带实施量化和分析 (n = 8)。

[0067] 图 17. 通过凝胶电泳显示枯草芽孢杆菌 / 炭疽芽孢杆菌 DNA 双重反应的特异性结果。

[0068] NEAR™ 反应包括针对枯草芽孢杆菌 (Bs) 和炭疽芽孢杆菌 (Ba)DNA 二者的模板，在无靶 DNA 存在下 (阴性)、在枯草芽孢杆菌 DNA 单独存在下 (27 聚体产物)、以及在枯草芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌 DNA 二者存在下 (各自为 27 聚体和 25 聚体产物) 进行反应。此分析中所存在各基因组的靶拷贝数为 500,000 拷贝。所有反应物都含有 500,000 拷贝苏云金芽孢杆菌作为外源核酸。改变各分析中的模板浓度以控制扩增。在 57℃下使分析进行 10min，在 94℃下经 4min 热变性，并且将 6 微升分析物装载至 20％凝胶上以 160V 运行约 2 小时。用 SYBR II 荧光染料对凝胶实施染色并使其成像。以积分光密度 (IOD) 对荧光带实施量化和分析。

[0069] 图 18.MS2/ 埃博拉 RNA 双重反应的凝胶电泳结果。

[0070] NEAR™ 反应包括针对 MS2 和埃博拉分析物二者的模板，在无靶 RNA 存在下 (阴性，泳道 2-5)、在 MS2 单独存在下 (27 聚体产物，泳道 6 和 7)、以及在 MS2 和埃博拉 RNA 二者存在下 (各自为 27 聚体和 25 聚体产物，泳道 8 和 9) 进行反应。此分析中所用靶拷贝数为 1E+6 拷贝。在 57℃下使分析进行 10min。改变各分析中的模板浓度以控制扩增。在 20％聚丙烯酰胺凝胶上以 160V 使样品运行约 2.5 小时。用 SYBRII 荧光染料对凝胶实施染色并使其成像。以积分光密度 (IOD) 对荧光带实施量化和分析。

[0071] 图 19. 经溶解孢子的 DNA 扩增的质谱分析。

[0072] 比较经溶解与未溶解样品的扩增产物质量的平均 AUC 值。然后将经溶解孢子样品添加至母混合物 (master mix) 中并在 55℃下反应 10 分钟，在 94℃下经 4 分钟热变性，并在质谱上运行以供分析。取产物峰 AUC 值的平均值并加以比较 (n = 3)。

[0073] 图 20. 展示用于表面检测的捕获和延长方法。

[0074] 比较 A.）一般结合（未添加聚合酶的阳性反应产物）、B.）500,000 靶（添加有聚合酶的阳性反应产物），与 C.）无靶（添加有聚合酶的阴性反应物）。在 55℃下使 NEAR™ 分析进行 10 分钟，在 94℃下经 4 分钟热变性，然后将其添加至具有以 5' 末端与表面结合的捕获探针的板中。将聚合酶添加至阳性反应物的一孔中。在 55℃下将板培养 30min，洗涤，添加 SYBR II，洗涤 3 次，并在帝肯 (Tecan) 板读取器 (495nm 激发 /530nm 发射) 上进行读取。

[0075] 图 21. 在存在（正方形）和不存在（空心三角形）1E+6 拷贝基因组 DNA 的情况下对单一模板固定在表面上的 NEAR™ FRET 分析实施伪实时荧光检测。

[0076] 在覆盖有中性链亲和素 (neutravidin) 的平底 96 孔板中实施反应。在缓慢搅拌和 37℃下将 1 微摩尔 FRET 标记反向模板溶液培养 1hr。用 PBS- 吐温 (Tween) 溶液将各孔洗涤 3 次以释放未结合模板。将本发明方法的 NEAR™ 反应混合物添加至各孔中（所取每个时间点添加一孔）并在 58℃下于设定为 135RPM 的震荡培养器的加热模块上培养。在所取各时间点处通过将 1 微升 EDTA 添加至孔中以终止反应。自底部使用帝肯 100 板读取器来读取荧光。

[0077] 图 22. 沙眼衣原体 (Chlamydia trachomatis) 分析的检测限。使用衣原体靶的 2 倍稀释物实施一系列分析。A) 以 3 次分析的平均值显示检测限的荧光检测的条形图。B) 显示单次分析结果的条形图。

[0078] 图 23. 单核细胞增生利斯特菌 (Listeria monocytogenes) 与无害利斯特菌 (L. innocua) 的区分。展示一系列分析的结果的条形图，实施所述系列分析来确定所述分析区分两种不同细菌的能力。

[0079] 图 24. 用病毒 RNA 实施的分析。展示以不同稀释度病毒 RNA 靶实施本发明方法的一系列分析的结果的条形图。

[0080] 图 25. 展示 bar 基因靶序列检测分析结果的条形图。

[0081] 图 26. 展示检测 miRNA 靶序列的本发明方法的分析结果的条形图。

[0082] 图 27. Gc 分析 :LOD。A) 展示检测基因组靶序列的一系列分析的平均值的条形图。B) 单次分析的结果，每次分析包括 50 个基因组拷贝。

[0083] 图 28. 枯草芽孢杆菌 NEAR™ 分析。A) 确定添加至样品中的参照寡核苷酸的量与曲线下面积 (AUC) 之间关联的标准曲线。B) 展示测定所生成特定产物量的本发明方法的分析结果的条形图。C) 展示分析结果的表。

[0084] 图 29. 间隔子长度研究。A) 展示确定不同间隔子长度的效应的本发明方法分析结果的条形图。B) 用于获得不同间隔子长度的模板序列。

[0085] 图 30. 用于图 29 中所示分析的模板设计。

[0086] 图 31. 稳定区域的效应。A) 使用包括或不包括稳定区域的寡核苷酸模板实施的本发明方法的分析结果图。B)A) 图中一部分的扩展。

[0087] 图 32. Mg^{+2} 浓度的滴定。A) 展示使用不同 Mg^{+2} 量实施的一系列 NEAR 分析结果的

条形图。B) 展示分析中各组份的图表。

[0088] 图 33. 绘示本发明方法反应机制的草图。

[0089] 图 34. 靶序列和寡核苷酸模板序列的实例列表。

具体实施方式

[0090] 本文提供指数式扩增短 DNA 或 RNA 序列的方法。

[0091] 本发明靶核酸包括双链和单链核酸分子。核酸可为（例如）DNA 或 RNA。倘若靶核酸为 RNA 分子，则所述分子可为（例如）双链、单链，或 RNA 分子可包含单链靶序列。倘若靶核酸为 RNA 分子，则所述分子可为双链或单链，或可包含单链靶序列。靶核酸包括（例如）基因组、质粒、线粒体、细胞、和病毒核酸。靶核酸可为（例如）基因组、染色体、质粒 DNA、基因、任一类型的细胞 RNA、或合成寡核苷酸。“基因组核酸”意指来自任一基因组的任一核酸，包括（例如）动物、植物、昆虫、和细菌基因组，包括（例如）存于孢子中的基因组。双链 DNA 靶核酸包括（例如）基因组 DNA、质粒 DNA、线粒体 DNA、病毒 DNA、和合成双链 DNA 或本文所述或业内已知的其它类型的 DNA。单链 DNA 靶核酸包括（例如）病毒 DNA、cDNA、和合成单链 DNA、或本文所述或业内已知的其它类型的 DNA。RNA 靶核酸包括（例如）信使 RNA、病毒 RNA、核糖体 RNA、转移 RNA、微小 RNA 和微小 RNA 前体、以及 siRNA 或本文所述或业内已知的其它 RNA。

[0092] 微小 RNA、miRNA、或小短暂 RNA(stRNA) 是单链短 RNA 序列，其长约 21-23 个核苷酸并且与基因调节有关。微小 RNA 被认为可干扰信使 RNA 的转译，因为其与信使 RNA 部分互补。（例如，参见鲁昆，G1(Ruvkun，G1)，科学 (Science)，294 :797-99(2001) ；拉各斯 - 金塔纳，M.(Lagos-Quintana，M.) 等人，科学，294 :854-58(2001) ；刘，N.C.(Lau，N.C.) 等人，科学，294 :858-62(2001) ；李，R.C.(Lee，R.C.) 和安布罗斯，V.(Ambros，V.)，科学，294 :862-64(2001) ；鲍尔库姆，D.(Baulcombe，D.) 等人，科学，297 :2002-03(2002) ；莱伍，C(Llave，C)，科学，297 :2053-56(2002) ；哈特瓦格纳，G.(Hutvagner，G.) 和萨莫勒，P.D.(Zamore，P.D.)，科学，297 :2056-60(2002))。根据近期所报导在基因剔除小鼠中的研究，微小 RNA 可能在免疫系统中也具有一定作用。（例如，参见韦德，N.(Wade，N.)，“研究启示和免疫系统调节剂 (Studies Reveal andImmune System Regulator)”，纽约时报 (New York Times)，2007 年 4 月 27 日）。也可使用本发明方法检测的微小 RNA 前体包括（例如）初级转录物（初级 miRNA) 和前体 miRNA（经进一步处理后变为 miRNA 的茎 - 环结构 RNA)。

[0093] 短干扰 RNA（或 siRNA) 为具有至少部分双链并且长约 20-25 个核苷酸的 RNA 分子，人们发现其与 RNA 干扰有关，例如与病毒复制或基因表达的减量调节有关（例如，参见萨莫勒等人，2000，细胞 (Cell)，101，25-33 ；巴斯 (Bass)，2001，自然 (Nature)，411，428-429 ；Elbashir 等人，2001，自然，411，494-498 ；和克拉萨 (Kreutzer) 等人，国际 PCT 公开案第 WO 00/44895 ；泽内卡 - 戈茨 (Zernicka-Goetz) 等人，国际 PCT 公开案第 WO 01/36646 ；法尔 (Fire)，国际 PCT 公开案第 WO 99/32619 号 ；普雷汀科 (Plaetinck) 等人，国际 PCT 公开案第 WO 00/01846 号 ；米洛 (Mello) 和法尔，国际 PCT 公开案第 WO 01/29058 号 ；迪甘斯 - 德帕里 (Deschamps-Depaillette)，国际 PCT 公开案第 WO99/07409 号 ；和李 (Li) 等人，国际 PCT 公开案第 WO 00/44914 号 ；奥舍尔 (Allshire)，2002，科学，297，1818-1819 ；沃尔皮 (Volpe) 等人，2002，科学，297，1833-1837 ；基纽文 (Jenuwein)，2002，科学，297，2215-2218 ；和霍尔

(Hall) 等人,2002,科学,297,2232-2237 ;哈特瓦格纳和萨莫勒,2002,科学,297,2056-60 ;麦克曼纽斯 (McManus) 等人,2002, RNA,8,842-850 ;雷哈特 (Reinhart) 等人,2002,基因与发育 (Gene & Dev.),16,1616-1626 ;以及雷哈特和巴特尔 (Bartel),2002,科学,297,1831)。

[0094] 术语“靶序列”的使用可意指序列的有义或反义链,并且也可意指初始靶序列的靶核酸、扩增拷贝、或扩增产物上存在的序列。扩增产物可为较大分子,其包含靶序列以及至少一个其它序列或其它核苷酸。靶序列的长度以及鸟苷 :胞嘧啶 (GC) 浓度 (百分比) 取决于进行反应的温度 ;此温度取决于反应中所用聚合酶和切口酶的稳定性。所属领域技术人员可实施样品分析来确定适合于反应条件的长度和 GC 浓度。例如,倘若聚合酶和切口酶在最高 60℃下稳定,则靶序列长度可为 (例如)19 至 50 个核苷酸,或长度可为 (例如)20 至 45、20 至 40、22 至 35、或 23 至 32 个核苷酸。在这些条件下 GC 浓度可 (例如) 小于 60%、小于 55%、小于 50%、或小于 45%。所选靶序列和切口酶应使得靶序列不含反应混合物中将包括的任一切口酶的切口位点。

[0095] 靶序列可自多种类型的样品来扩增,包括 (但不限于) 含有来自原核生物或真核生物的孢子、病毒、细胞、核酸或任何游离核酸的样品。例如,所述分析不需溶解即可检测位于孢子外的 DNA。可自怀疑含有靶序列的任何材料分离样品。例如,对于动物 (例如哺乳动物,例如人类) 来说,样品可包含血液、骨髓、粘液、淋巴液、硬组织 (例如肝、脾、肾、肺、或卵巢)、活检样品、痰、唾液、泪液、粪便、或尿液。或者,靶序列可存于怀疑含有生物有机体的空气、植物、土壤、或其它材料中。

[0096] 靶序列也可存于也含有环境污染物 (例如粉尘、花粉和烟粒 (例如来自柴油排放) 或临床相关基质 (例如尿液、粘液或唾液) 的样品中。靶序列也可存于废水、饮用水、空气、乳汁、或其它食物中。根据这些污染物的浓度,可能需要所属领域技术人员已知的样品纯化方法来移除成功扩增的抑制剂。纯化可涉及 (例如) 洗涤剂溶解产物、超声处理、玻璃珠涡旋或法氏压机 (French press) 的使用。此纯化也可导致样品靶的浓缩。也可通过 (例如) 过滤、酚提取、色谱法、离子交换、凝胶电泳、或密度依赖性离心对样品实施进一步纯化。在具体实施例中,可直接将样品添加至反应混合物中或在预稀释后将样品添加至反应混合物中而不事先纯化靶核酸。

[0097] 寡核苷酸是包含两个或以上个 (例如三个以上) 脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的分子。寡核苷酸的长度可取决于其使用方式。寡核苷酸可以合成方式或通过克隆来获得。

[0098] 术语“互补”在描述两个核酸序列时一般是指两个序列在两个核酸之间形成足够氢键以稳定通过两个核酸杂交形成的双链核苷酸序列的能力。在两个序列中,一个序列中的所有核苷酸可都与另一序列中的对应核苷酸互补。在某些实施例中,两个序列中的对应核苷酸之间可能存在一些失配 (即非互补核苷酸),例如 10 个核苷酸中存在 1 处失配、20 个核苷酸中存在 1 处失配、或 30 个核苷酸中存在 1 处失配,所述序列在本文中称作“实质上互补”。如图 1A-1D 中所示,各模板核酸经常包括与模板核酸所杂交的靶核酸链 (或其互补链) 互补或实质上互补的识别区域。同样如图 1A-1D 中所示,各模板核酸经常包括位于识别区域 5’ 端的稳定区域和不与靶核酸序列或其互补链互补或实质上互补的切口剂识别区域。

[0099] 本文所用“杂交”和“结合”可互换使用并且是指互补核酸序列相互之间的非共价

结合或“碱基成对”。特定探针是否与多核苷酸序列保持碱基成对取决于互补度、探针长度、以及结合条件的严苛性。严苛性越高，互补度必须越高，和 / 或欲保持稳定结合或碱基成对的探针越长。

[0100] 本文所用“严苛性”是指对核酸所施加的可导致双链核酸离解为组成单链的条件组合，例如极端 pH、高温和盐浓度。词组“高严苛性”是指杂交条件的严苛性或限制性高至足以使得仅可进行特异性碱基成对。特异性应高至足以使得可根据标准南方 (Southern) 杂交方案（如分子生物学杂志 (J.Mol.Biol.)，98 :503(1975) 中所述）使用寡核苷酸探针或密切相关序列来检测单一序列。

[0101] 模板定义为与靶序列识别区域结合并且也含有位于识别区域上游的切口酶结合区域和位于切口酶结合区域上游的稳定区域的寡核苷酸。

[0102] “识别区域”意指模板上与靶序列上的核酸序列互补或实质上互补的核酸序列。“靶序列上的识别区域”意指靶序列上与模板互补或实质上互补或与模板结合的核苷酸序列。

[0103] “稳定区域”意指具有（例如）约 50％ GC 含量的核酸序列，其设计为可稳定用于（例如）切口和 / 或延长反应的分子。

[0104] 在描述某些序列在核酸分子、例如在靶序列或模板中的定位时，所属领域技术人员应理解，术语“3’”和“5’”是指特定序列或区域相对于另一序列或区域的位置。因此，在一序列或区域位于或为另一序列或区域的 3’时，所述位置介于所述序列或区域与所述核酸链 3’羟基之间。在核酸中的位置位于或为另一序列或区域的 5’时，此意指所述位置介于所述序列或区域与所述核酸链的 5’磷酸根之间。

[0105] 聚合酶是能催化根据核酸靶序列纳入特定核苷酸来延长引物分子（例如模板寡核苷酸）3’羟基末端的蛋白质。聚合酶可为（例如）耐热酶从而使得其在升高反应温度下也具有活性。例如，其也可具有链置换能力。然而，其不需要极高持续性（单次合成 30-40 个核苷酸已足够）。所用聚合酶通常不具有 5’-3’外切核酸酶活性。若聚合酶也具有逆转录酶活性（例如 Bst（大片段）、9° N、热启动酶、热启动酶 II 等），则反应不使用单独的逆转录酶也可在单一步骤中扩增 RNA 靶。反应中可包括不止一种聚合酶，在一实例中一种聚合酶可具有逆转录酶活性并且另一种聚合酶可缺少逆转录酶活性。在实例性实施例中，聚合酶是 BST（大片段）。聚合酶可选自（例如）由表 1 中所列一或多种聚合酶组成的群组。

[0106] 表 1

[0107]

聚合酶
Bst DNA 聚合酶
Bst DNA 聚合酶（大片段）
9°Nm DNA 聚合酶
Phi29 DNA 聚合酶
DNA 聚合酶 I（大肠杆菌）
DNA 聚合酶 I，大（克列诺(Klenow)）片段
克列诺片段（3'-5'外切酶活性）
T4 DNA 聚合酶
T7 DNA 聚合酶
迪普温特(Deep Vent)$_R$™（外）DNA 聚合酶
迪普温特 $_R$™ DNA 聚合酶
DyNAzyme™ EXT DNA
DyNAzyme™ II 热启动 DNA 聚合酶
富申(Phusion)™高保真 DNA 聚合酶
热启动™ DNA 聚合酶
热启动™ II DNA 聚合酶
温特 $_R$® DNA 聚合酶
温特 $_R$®（外）DNA 聚合酶
RepliPHI™ Phi29 DNA 聚合酶

[0108]

rBst DNA 聚合酶
rBst DNA 聚合酶，大片段（IsoTherm™ DNA 聚合酶）
MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA 聚合酶
Taq DNA 聚合酶
Tth DNA 聚合酶
Tfl DNA 聚合酶
Tgo DNA 聚合酶
SP6 DNA 聚合酶
Tbr DNA 聚合酶
DNA 聚合酶 β
ThermoPhi DNA 聚合酶
耐热噬菌体(Pyrophage) 3173（路茨根(Lucigen)）

[0109] 在本发明方法的反应中可使用以下逆转录酶 (RT) 的非限制性实例来改良检测 RNA 序列时的表现 :OmniScript(凯杰 (Qiagen))、SensiScript(凯杰)、MonsterScript(艾比森 (Epicentre))、Transcriptor(罗氏 (Roche))、HIV RT(安宾)、Superscript III(英杰 (Invitrogen))、ThermoScript(英杰)、Thermo-X(英杰)、ImProm II(普洛麦格 (Promega))。

[0110] 这些不同的 RT 在标准反应缓冲液中以不同水平进行反应，并且此效能评定列述如下。“+”指示扩增反应产生特定产物。更多“+”指示反应效果更佳，并且“+++++”指示结果极佳。“-”指示反应没有产生特定产物，或没有产生超过背景的特定产物。

[0111] 表 2

[0112]

OmniScript**(凯杰)	+++++
SensiScript(凯杰)	+++
MonsterScript(艾比森)	+++
Transcriptor(罗氏)	++
HIV RT*(安宾)	+
SuperscriptIII(英杰)	-
ThermoScript(英杰)	-
Thermo-X(英杰)	-
ImProm II(普洛麦格)	-

[0113] “切口”是指全双链或部分双链核酸中的双链部分仅一条链发生裂解。核酸发生切口的位置称作切口位点或切口位点。切口酶所识别的识别序列称作切口酶结合位点。“能切口”是指切口酶的酶促能力。

[0114] 切口酶是结合双链 DNA 并裂解双链二倍体中的一条链的蛋白质。切口酶可在结合位点或切口酶识别位点的上游或下游进行裂解。在实例性实施例中，反应包含使用在结合位点下游裂解或切口的切口酶（顶端链切口酶）从而使得产物序列不含切口位点。使用在结合位点下游进行裂解的酶使得聚合酶可更容易地进行延长而不需要置换切口酶。切口酶必须可在与聚合酶相同的反应条件下发挥作用，因此需要在两种酶的两种理想条件之间进行优化。切口酶可得自（例如）新英格兰生物实验室 (New EnglandBiolabs)(NEB) 和富美泰斯 (Fermentas)。切口酶可选自（例如）由表 3 中所列一或多种切口酶组成的群组。

[0115] 表 3

[0116]

切口酶	又名
Nb.BbvCI	
Nb.Bpu10I	
Nb.BsaI	
Nb.BsmI	
Nb.BsrDI	
Nb.BstNBIP	
Nb.BstSEIP	
Nb.BtsI	
Nb.SapI	
Nt.AlwI	
Nt.BbvCI	
Nt.BhaIIIP	
Nt.Bpu10I	

Nt.Bpu10IB	
Nt.BsaI	
Nt.BsmAI	
Nt.BsmBI	
Nt.BspD6I	
Nt.BspQI	
Nt.Bst9I	
Nt.BstNBI	N.BstNB I
Nt.BstSEI	
Nt.CviARORFMP	
Nt.CviFRORFAP	
Nt.CviPII	Nt.CviPIIm
Nt.CviQII	
Nt.CviQXI	
Nt.EsaSS1198P	
Nt.MlyI	
Nt.SapI	

[0117]

[0118] 切口酶可选自（例如）由以下组成的群组：Nt.BspQI(NEB)、Nb.BbvCI(NEB)、Nb.BsmI(NEB)、Nb.BsrDI(NEB)、Nb.BtsI(NEB)、Nt.AlwI(NEB)、Nt.BbvCI(NEB)、Nt.BstNBI(NEB)、Nt.CviPII(NEB)、Nb.Bpu10I（富美泰斯）、和Nt.Bpu10I（富美泰斯）。在某些实施例中，切口酶选自由以下组成的群组：Nt.NBst.NBI、Nb.BsmI、和Nb.BsrDI。所属领域技术人员应了解，在本发明方法中可使用除本文中特别提及的切口酶外的各种切口酶。

[0119] 本发明方法中的切口酶和聚合酶可在（例如）室温下保持稳定，所述酶也可在

（例如）最高37℃、42℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃或85℃的温度下保持稳定。在某些实施例中，所述酶可在最高60℃下保持稳定。

[0120] 当酶在最高37℃、42℃、50-60℃、54-60℃、56-58℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、或85℃的温度下保持稳定时，所述酶具有“耐热性”。

[0121] 产物或扩增产物定义为沿经切口和释放的靶延长模板的最终产物。然后可将此产物反馈回扩增循环中，或可使其与其互补链或分子信标复性。

[0122] “天然核苷酸”是指腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸、胸苷酸、或尿苷酸。“衍生核苷酸”是除天然核苷酸以外的核苷酸。

[0123] 反应可在天然核苷酸存在下实施，例如双脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）。反应也可在经标记dNTP存在下实施，例如放射性标记（例如^{32}P、^{33}P、^{125}I、或^{35}S）、酶标记（例如碱性磷酸酶）、荧光标记（例如异硫氰酸荧光素（FITC））、生物素、抗生物素蛋白、地高辛(digoxigenin)、抗原、半抗原、或荧光染料。这些衍生核苷酸可任选地存于模板中。

[0124] “恒温”、“等温条件”、“基本等温”或“等温地”意指一组反应条件，其中在扩增反应过程期间反应温度保持基本上或实质上恒定。本发明方法的扩增方法的优势在于，温度不需要在较高温度与较低温度之间循环。切口和延长反应可在相同温度下或在相同狭窄温度范围内进行。然而，不需要将温度精确维持在一种温度下。若用来维持升高温度的设备使得反应混合物的温度可在几度或十分之几度（例如小于1度、0.8度、0.6度、0.4度、或0.2度）范围内变化，此对扩增反应无害，并且仍可视为等温反应。

[0125] 术语“多重扩增”是指不止一种目标核酸的扩增。例如，其可意指来自同一样品的多个序列的扩增样品中若干个序列中的一个序列的扩增，如美国专利第5,422,252号和第5,470,723号所论述，所述专利提供多重链置换扩增的实例。所述术语也意指同时或以逐步方式对存于多个样品中的一或多个序列实施的扩增。

[0126] 模板设计

[0127] 正向和反向模板、以及第一和第二模板设计为在5’末端具有稳定区域，在稳定区域下游具有切口酶结合位点和切口位点，并且在寡核苷酸3’末端切口酶结合位点和切口位点的下游具有识别区域。根据每个单独区域的长度、温度、靶序列的长度、以及GC浓度，总寡核苷酸长度可为19至40、例如19-40、23-40、20-30、20-24、23-24、23-32、25-40、27-40、或27-35个核苷酸。所属领域技术人员应了解如何平衡模板的这些特征。模板的设计应使得其可一起结合少于或等于100％的靶序列，一种模板结合有义链，并且另一种结合反义链。每种模板的长度不需要与另一种模板相同。例如，倘若正向模板结合约60％的靶反义链，则反向模板可结合（例如）约40％的靶有义链。模板的设计容许在靶序列上存在不与任一模板结合的间隔子碱基。因此可将模板设计为可结合约30％、约40％、约50％、或约60％的靶序列。

[0128] 正向模板的识别区域设计为与靶有义链的5’区域实质上相同或相同并且与靶位点反义链的3’末端互补或实质上互补。正向模板的识别区域具有任何适宜长度，例如长约8、9、10、11、12、13、14、15或16个碱基，并且有时长8-16、9-16、10-16、8-12、8-15、9-15、10-15、或11-14个核苷酸。在实例性实施例中，长度为11-13、11-12、12、或12-13个核苷酸。反向模板的识别区域设计为与靶位点有义链的3’末端实质上互补或互补。反向模板的识别区域具有任何适宜长度，例如长约8、9、10、11、12、13、14、15或16个碱基，并且有时

长 8-16、9-16、10-16、8-12、8-15、9-15、10-15、或 11-14 个核苷酸。在实例性实施例中，长度为 11-13、11-12、12、或 12-13 个核苷酸。第一模板的识别区域的长度可与第二模板的识别区域相同或不同。

[0129] 模板的识别序列经常与有机体中的单一序列、或实质上单一的序列互补或实质上互补。本文所用术语“单一序列”是指有机体中不为任何其它已知有机体所共有的核苷酸序列。本文所用“实质上单一的序列”是指存于特定有机体家族中或最多仅存于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种其它有机体中的核苷酸序列。在某些实施例中，单一序列或实质上单一的序列存于核糖体 RNA 中或编码核糖体 RNA 的 DNA 的有义或反义链中。

[0130] 所属领域技术人员能确定用于最佳有效扩增的适宜识别区域长度。在某些实施例中，为提供适宜特异性，模板识别区域的长度下限是 8 个碱基。反应的分析特异性与两个模板（正向和反向模板）中的识别区域总长度有关。例如，若每个模板具有 8 个核苷酸的识别区域，则可使分析能检测 8+8 = 16 个核苷酸的单一序列组合，此称作“靶尺寸”。对于给定 DNA 链来说，16 个核苷酸的靶尺寸具有 $4.29x10^9$ 个可能组合。人类基因组长 $3.3x10^9$ 个核苷酸。因此，在统计学上，预计 16 个核苷酸的特定序列在人类基因组中大约出现一次。若靶尺寸降低至（例如）15 个核苷酸，则预计其在人类基因组中平均出现 3 次（在 $3.3x10^9$ 个核苷酸中有 $1.07x10^9$ 次出现可能性），并且因此其特异性可能不如 16 个核苷酸的靶尺寸高。对于具有 7 个核苷酸的识别区域（使分析靶尺寸为 14 个碱基）的分析来说，预计其在人类基因组中出现 12 次（在 $3.3x10^9$ 个核苷酸中有 $2.68x10^8$ 次出现可能性）。此可使分析的特异性降低，从而使得其在诊断领域中价值降低。因此，每个模板具有 8 个碱基的识别区域经常被视为某些分析的下限。

[0131] 表 4

分析靶尺寸	单一序列的可能性数量
N	4^N
14	2.68E+08
15	1.07E+09
16	4.29E+09
17	1.72E+10
18	6.87E+10
19	2.75E+11
20	1.10E+12
21	4.40E+12
22	1.76E+13
23	7.04E+13
24	2.81 E+14
25	1.13E+15
26	4.50E+15

[0132]

[0133] 实施本发明扩增分析来确定最佳识别区域长度。在 10 分钟的分析中，在使用 0 或

100,000 拷贝靶 DNA 时，20 聚体识别区域模板组不产生可检测特定产物，而在使用 12 聚体识别区域模板组时检测到特定产物。使用 16 聚体识别区域模板组产生特定可检测产物，但所检测到的特定产物比使用 12 聚体识别区域模板组的分析少四分之三。在某些实施例中，使用 15 聚体识别区域模板组生成的特定产物多于 16 聚体识别区域模板组。

[0134] 因此，在某些实例性实施例中，提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域（其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸）、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域（其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸）、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物。因此，在某些实施例中，正向或反向模板的识别区域或正向和反向模板中每一者的识别区域长 8、9、10、11、12、13、14 或 15 个核苷酸。在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

[0135] 在另一实例性实施例中，提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列 3’末端互补或实质上互补的识别区域（其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸）、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿靶序列延长反向模板；使所延长反向模板与正向模板接触，其中正向模板包含位于 3’末端且与靶序列 5’末端相同的识别区域（其中所述识别区域长 8 至 15 个核苷酸）、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物。因此，在某些实施例中，正向或反向模板的识别区域或正向和反向模板中每一者的识别区域长 8、9、10、11、12、13、14 或 15 个核苷酸。在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。

[0136] 在某些实施例中，实施扩增反应的温度低于模板和靶的解链温度（T_m）。在某些实施例中，反应温度比模板和靶的 T_m 低（例如）1℃ -10℃、1℃ -8℃、1℃ -6℃、1℃ -4℃、1℃ -2℃、2℃ -10℃、2℃ -8℃、2℃ -6℃、2℃ -4℃、2℃ -2℃、2℃ -4℃或 2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、或 8℃。反应温度通常也低于反应产物（例如图 1B 和图 1C 中所示步骤 9A 后扩增二倍体的切口产物和聚合酶延长产物）的 T_m。反应温度可高于初始模板 / 靶序列复合体

（绘示于图 1A 的步骤 (1) 上方）的 T_m。一旦模板延长而形成稳定复合体，稳定复合体的 T_m 即高于反应温度。

[0137] 因此，模板 / 靶核酸靶的 T_m 经常高于反应温度，并且有时 T_m 比反应温度高 5℃或更高，或例如比反应温度高约 1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、或 8℃或更高。在切口后经切口链中每一部分的 T_m 通常都高于反应温度，并且有时每一经切口部分的 T_m 比反应温度高 5℃或更高，或例如比反应温度高约 1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、或 8℃或更高。可使用（例如）万维网 (World Wide Web)URLidtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/ 中所提供用于 IDT 寡核苷酸分析软件 (Oligo Analyzer)（集成 DNA 技术公司 (Integrated DNA Technologies)）的程序来计算模板和靶的 T_m，所述程序考虑反应条件中的盐浓度。如 IDT 网站中所述，使用所述分析软件实施的 T_m 计算是如下所述来进行：

[0138] 解链温度 (T_M) 是寡核苷酸双倍体中 50％呈单链形式并且 50％呈双链形式时的温度。所述寡核苷酸分析软件根据适用于短 DNA 二倍体的最近邻两态模型估算 T_M，

[0139]

$$T_M(^\circ C)=\frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + R\ln[\text{寡核苷酸}]}-273.15$$

[0140] 其中 ΔH°（焓）和 AS°（熵）是根据序列和所公开最近邻热力学参数计算的解链参数，R 是理想气体常数 (1.987 卡 K^{-1} 摩尔 $^{-1}$)，[寡核苷酸] 是寡核苷酸的摩尔浓度，并且 -273.15 的常数将温度自开尔文温度 (Kelvin) 转换为摄氏度。最准确的最近邻参数得自以下出版物：关于 DNA/DNA 碱基对（阿拉维，H.(Allawi，H.)，桑塔露琪亚，J.，Jr.(SantaLucia，J.，Jr.)，生物化学 (Biochemistry)，36，10581)、关于 RNA/DNA 碱基对（衫本，N.(Sugimoto，N.）等人，生物化学，34，11211)、关于 RNA/RNA 碱基对（夏，T.(Xia，T.）等人，生物化学，37，14719)、和关于 LNA/DNA 碱基对（麦克蒂格，P.M.(McTigue，P.M.）等人，生物化学，43，5388)。

[0141] T_M 取决于溶剂的单价盐浓度 ([Na^+])。线性 T_M 校正是业内已知方法。如 IDT 网站中所述，IDT 的科学家在各种钠缓冲液中对约 100 个短 DNA 双倍体实施了大量 UV 解链实验（约 3000 次测量），并且确定此线性函数不准确。寡核苷酸分析软件采用经改良的二次 T_M 盐校正函数（欧扎泽，R.(Owczarzy，R.）等人，生物化学，43，3537)，

[0142] $$\frac{1}{T_M(Na^+)}=\frac{1}{T_M(1M\ Na^+)}+(4.29f(GC)-3.95)\times10^{-5}\ln[Na^+]+9.40\times10^{-6}\ln^2[Na^+]$$

[0143] 其中 f(GC) 是 GC 碱基对的分数。

[0144] 在某些实施例中，调节识别区域的长度以使得靶序列中有至少一个核苷酸不在正向模板的识别区域中并且在反向模板的识别区域中也不具有互补链。这些间隔子碱基（其形成“间隔子区域”）是靶序列内所含位于正向和反向模板的 3’末端之间的核苷酸。间隔子碱基展示于（例如）图 30 中，其中其显示为介于正向和反向模板 3’末端之间的靶有义和反义序列的区段，也显示在“间隔子区域”内。例如，当将图 30 中的模板 T2 和 T1 与靶一起使用时，靶有义链具有 1 个间隔子碱基 (1 个核苷酸的间隙)-T，并且靶反义链具有 1 个间隔子碱基（或 1 个核苷酸的间隙)-A。在某些实施例中，靶序列中存在 5 个或更少间隔子碱基。在实例性实施例中，间隔子碱基数为 2 至 3。在某些实施例中，间隔子碱基数为 1、2 或 3。在其它实施例中，存在 1 个间隔子碱基。在其它实施例中，存在 2 个间隔子碱基。在其它实施例中，存在 3 个间隔子碱基。在其它实施例中，间隔子碱基数为 1、2、3、4 或 5。

[0145] 因此，在本发明方法的实例性实施例中，靶序列在与第一模板 3’ 末端杂交的靶序列核苷酸以及第一链中与第二模板 3’ 末端杂交的互补链核苷酸的对应核苷酸之间包含 1 至 5 个核苷酸。“对应核苷酸”意指在靶核苷酸序列中的一链与靶核苷酸序列的互补链对准时所述链上与互补链杂交的核苷酸。这 1 至 5 个核苷酸也称作间隔子碱基。

[0146] 这些间隔子碱基使得可区分真实扩增产物与任何由于以与引物二聚体类似的方式重叠模板而通过延长扩增的背景产物。此考虑因素使得可改良对背景噪音与靶序列扩增的区分。然而，进行扩增时不需要这些间隔子碱基。

[0147] 因此，在某些实例性实施例中，提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’ 末端且与靶序列反义链 3’ 末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与靶序列有义链 3’ 末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中所述靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。因此，在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1、2、3、4 或 5 个。

[0148] 在另一实例性实施例中，提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与靶序列 3’ 末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿靶序列延长反向模板；使所延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’ 末端且与靶序列 5’ 末端相同的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中所述靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。因此，在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比正向模板识别区域和反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1、2、3、4 或 5 个。

[0149] 模板的切口酶结合位点序列取决于所选用于各模板的切口酶。在单一分析中可使用不同切口酶，但简单扩增中两种模板可采用（例如）单一切口酶。因此，本发明方法的实施例包括两种模板包含针对相同切口酶的识别位点的实施例，并且反应中仅使用一种切口酶。在这些实施例中，第一和第二切口酶二者相同。本发明也包括各模板包含针对不同切

口酶的识别位点的实施例，并且在反应中使用两种切口酶。

[0150] 例如，在 Nt.BstNBI 情况下，酶结合位点为 5'-GAGTC-3'并且酶在此位点下游 4 个核苷酸处（即 GAGTCNNNN^）对顶端链进行切口。扩增反应对这 4 个核苷酸 (N) 的序列几乎不显示依赖性，但此区域的最佳序列是 GC 含量为 25％或更低并且具有与结合区域 5' 核苷酸相邻的胸腺嘧啶。后一约束使得通过聚合酶添加有额外腺嘌呤的产物具有引发能力。可根据应用优化所述 4 个核苷酸的序列，以产生或消除发夹、自身二聚体或异二聚体的存在。

[0151] 位于模板寡核苷酸 5' 末端的稳定区域设计为具有大约 50％ GC。因此，GC 含量可为（例如）约 40％ -60％、约 42％ -58％、约 44％ -56％、约 46％ -54％、约 48％ -52％、或约 49％ -51％。这些参数使针对 Nt.BstNBI 酶的稳定区域长度为 8-11 个核苷酸，但人们已测试短至 6 个核苷酸并且长至 15 个核苷酸的长度并且显示此长度在此扩增方法中可用。较长稳定区域或使 GC％升高至大于 50％可在较高反应温度下进一步稳定切口和延长反应。正向和反向模板 5' 稳定区域的序列通常相同，但若目标是独立捕获各产物链则所述序列可不同。此区域的序列应不干扰切口位点或识别区域，但模板序列内的较短内部发夹已显示可具有经改良的实时结果。

[0152] 在某些实施例中，扩增工艺中包括一或多种使核酸交互作用（例如链间或链内交互作用）去稳定的试剂；并且在替代性实施例中，扩增方法中不包括一或多种所述试剂。使核酸交互作用去稳定的试剂的实例是那些可使双链结构（例如双链 DNA）和 / 或链内结构（例如 RNA 中的二级或三级结构）去稳定的试剂，并且其包括（但不限于）甜菜碱和其它四铵化合物、甲酰胺、甘油、山梨醇、高氯酸钠、二甲亚砜 (DMSO)、低碳烷基醇（例如乙醇、1-4 碳醇）、尿素、三烷基铵盐（例如三乙基氯化铵）、单链结合 (ssb) 蛋白（例如大肠杆菌 ssb)、解旋酶（例如大肠杆菌 DNA 解旋酶 I、II、或 IV)、低碳烷基 (1-4C) 醇和诸如此类。不期望受限于理论，所述试剂降低核酸交互作用的解链温度 (T_m)（例如降低二倍体 T_m）。所属领域技术人员可根据（例如）去稳定程度以及维持酶促活性的需要来确定反应的适宜去稳定剂和适宜去稳定剂浓度。浓度的实例包括约 10％甘油、约 10％高氯酸钠、约 10％ DMSO、约 10％山梨醇、约 2.4 摩尔三乙基氯化铵、和大约大于 1、2、3、4、或 5 摩尔的甜菜碱（例如约 5-6 摩尔甜菜碱）。甜菜碱或 N，N，N- 三甲基甘氨酸可购自（例如）西格玛 - 奥德里奇 (Sigma-Aldrich)，例如目录号为 B2629 或 B0300。其可与（例如）低浓度的 DMSO 组合使用，例如约 1-2、或约 1.3％ DMSO 与约 1M 甜菜碱组合。

[0153] 本发明方法的模板可包括（例如）间隔子、阻断基团、和经修饰核苷酸。经修饰核苷酸是组成和 / 或结构与天然核苷酸和核苷酸三磷酸不同的核苷酸或核苷酸三磷酸。本文所用经修饰核苷酸或核苷酸三磷酸的修饰方式可使得当修饰位于双链核酸中存在限制性内切核酸酶识别位点的一链上时，经修饰核苷酸或核苷酸三磷酸可保护经修饰链免受限制性酶裂解。因此，经修饰核苷酸或核苷酸三磷酸的存在促进双链核酸发生切口而非裂解。阻断基团可添加至模板以抑制聚合酶实施靶序列依赖性核酸聚合的化学部分。阻断基团通常位于模板的 3' 末端。阻断基团的实例包括（例如）烷基、非核苷酸连接子、硫代磷酸酯、烷二醇残基、肽核酸、和缺少 3'-OH 的核苷酸衍生物（包括（例如）蛹虫草菌素 (cordycepin)）。间隔子的实例包括（例如）C3 间隔子。间隔子可用于（例如）模板内，并且也可用于（例如）5' 末端以连接其它基团，例如标记。

[0154] 经常提供未修饰核苷酸用于模板延长。经常不提供未修饰核苷酸和核苷酸衍生物

用于纳入经延长模板中。然而，在某些实施例中，可提供一或多个经修饰核苷酸或核苷酸衍生物并将其纳入经延长模板中。

[0155] 扩增反应也可包括辅助寡核苷酸。辅助寡核苷酸是长（例如）5-10、5-15、5-20 个核苷酸的寡核苷酸。辅助寡核苷酸的存在可提高扩增反应的速率、数量或灵敏性。辅助寡核苷酸并不纳入终产物中。所属领域技术人员能确定添加至反应中的适宜辅助寡核苷酸以及应添加的数量。确定适宜辅助寡核苷酸的方式的一个实例是合成与靶核酸或其互补链中的各区域互补的寡核苷酸，并以不同数量将其添加至分析中，比较使用辅助寡核苷酸的分析与作为对照的不使用辅助寡核苷酸的分析。可合成与识别区域或其互补链的上游或下游区域互补的辅助寡核苷酸。例如，可合成长约 10 个碱基的辅助寡核苷酸组，其与识别区域上游或下游相互间隔 5-10 个碱基的多个区域互补，然后成对测试其增强扩增反应的能力。

[0156] 扩增的具体机制

[0157] 本发明方法的扩增反应需要核酸靶、至少两个模板寡核苷酸、切口酶（例如耐热性切口酶）、耐热性聚合酶、和缓冲组份的存在，其皆保持在反应温度下。模板的识别区域与互补或实质上互补的靶序列交互作用。由于靶与模板中互补或实质上互补区域的解链温度显著低于反应温度，因此两条核酸链之间的交互作用较短暂，但却容许耐热性聚合酶有足够的时间自模板的 3’末端沿靶链延长。实验已显示，某些聚合酶与单链寡核苷酸结合。此复合体的预形成可促进扩增过程的速率。

[0158] 对于双链靶来说，在双链 DNA 的正常呼吸期间两个模板都可同时与对应靶链交互作用（正向模板与反义链交互作用并且反向模板与有义链交互作用）。也可通过基因组序列内的单或双切口位点来生成靶。对于单链靶 (RNA 或 DNA) 来说，反向模板结合并延长第一（图 1，步骤 1 和 2）。所延长序列含有正向模板的互补链。然后正向模板置换靶区域并结合与正向模板的识别区域互补或实质上互补的 3’合成区域（步骤 3）。或者，另一反向模板也可在识别区域置换最初延长的反向模板以产生单链延长的反向模板以供结合正向模板。可通过延长较短 DNA 链的非持续性聚合酶来促进模板的初始结合和延长，从而使得合成产物的解链温度高于反应温度。然后单链产物可用于与下一模板识别位点结合并通过聚合酶来延长。

[0159] 将正向模板延长至反向模板的 5’末端，从而产生用于反向模板的双链切口酶结合位点（步骤 5）。然后切口酶结合二倍体并直接在反向模板链的识别序列上游进行切口（在顶端链切口酶情况下）（步骤 6）。切口下游的核酸序列被释放（若解链温度接近反应温度）和 / 或通过聚合酶自 3’-OH 切口位点合成来置换。聚合酶沿正向模板延长至正向模板的 5’末端（步骤 8）。通过两个模板的延长形成的双链在二倍体的任一末端上产生切口酶结合位点。此双链称为 NEAR™ 扩增二倍体。当切口酶结合并进行切口时，释放位于两个切口位点之间的靶产物（具有 5’- 磷酸酯和 3’-OH），其长度通常介于（但不限于）23 至 29 个碱基之间（步骤 9-11A）；或释放单一切口产物，其含有靶产物和切口位点的反向互补链以及模板的稳定区域（通常长 36 至 48 个碱基）（步骤 9-11B）。关于反应机制的另一绘示展示于图 33 中。

[0160] 可通过改变模板浓度来调节产物 1 与 2 的比率。正向 :反向模板比率可自（例如）100 ： 1、75 ： 1 ;50 ： 1、40 ： 1、30 ： 1、20 ： 1、10 ： 1、5 ： 1、2.5 ： 1、1 ： 1、1 ： 2.5、1 ： 5、1 ： 10、1 ： 20、1 ： 30、1 ： 40、1 ： 50、1 ： 75 或 1 ： 100 的摩尔比变化。产物比

率 (A ： B) 取决于切口酶与聚合酶的比率，即较高聚合酶浓度可产生更多长度较长的产物 (B)，这是因为存在相对较少切口酶在聚合酶延长之前对两条链同时进行切口。由于将反向模板的置换 / 释放产物进给至正向模板中并且反之亦然，因此可达成指数式扩增。切口酶 :聚合酶比率可自 (例如)20 ： 1、15 ： 1 ;10 ： 1、5 ： 1、4 ： 1、3 ： 1、2 ： 1、1.5 ： 1、1 ： 1、1 ： 1.5、1 ： 2、1 ： 3、1 ： 4、1 ： 5、1 ： 10、1 ： 15、1 ： 20 的酶单位比变化。在某些实施例中，切口酶与聚合酶的比率可为 (例如)1 ： 3、1 ： 2、1 ： 1.5、或 1 ： 0.8。所属领域技术人员应了解，这些比率可代表舍入值。此切口和聚合酶延长过程继续进行直至一种资源 (通常为 dNTP 或酶) 耗尽。

[0161] 如各实例中所述，反应进行时间可在 (例如) 约 1 分钟内、或在约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 分钟内变化。较长反应时间可产生可接受的结果，其中速率并不重要。在某些实施例中，反应时间介于 1-20 分钟、1-15 分钟之间，或在某些实施例中介于 1-10、1-8、1-5、1-2.5、2.5-5、2.5-8、2.5-10 或 2.5-20 分钟之间。本文所述扩增工艺是有效的，并且在某些实施例中 (如例如各实例中所述)，在反应时间范围内 (例如在 5 或 10 分钟内) 扩增约 $1x10^6$ 倍或以上，扩增约 $1x10^7$ 倍或以上，扩增约 $1x10^8$ 倍或以上，扩增约 $1x10^9$ 倍或以上，或扩增约 $1x10^{10}$ 倍或以上。所述反应具有高灵敏性，并且能检测 (例如) 样品中的低至约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 100 或以上拷贝、样品中的多至 200、500、1,000、5,000、或 10,000 或以上拷贝，或可检测 (例如) 以诸如以下等浓度存在的靶 :约 3.32E-13 微摩尔至约 3.32E-8 微摩尔、约 1.66E-12 微摩尔至约 3.32E-8 微摩尔、约 3.32E-13 微摩尔至约 3.32E-7 微摩尔、或约 3.32E-13 微摩尔至约 3.32E-6 微摩尔。

[0162] 在某些实例性实施例中，提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域 ;所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域 ;提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶 ;提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶 ;以及提供 DNA 聚合酶 ;其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施 :聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中在 10 分钟内于等温条件下产生约 10^6(IE+06) 拷贝的靶序列。在其它实施例中，在 10 分钟内产生约 10^7(IE+07) 拷贝。对于多重分析来说，产生等量拷贝的时间可延长至 (例如) 约 12、14、15、18、或 20 分钟。出于计算效率的目的，这些分析中的靶序列的尺寸可为 (例如) 约 20 至约 40 个核苷酸、20 至 30 个核苷酸、或 (例如) 约 20 至约 33 个核苷酸。自所有反应产物出现在同一器皿、容器或类似物中从而使得扩增反应可以开始的时间至加热或添加化学试剂以终止反应的时间来计算反应时间。

[0163] 在另一实例性实施例中，提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且

与靶序列 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿靶序列延长反向模板；使所延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’末端且与靶序列 5’末端相同的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中在 10 分钟内于等温条件下产生约 10^6(IE+06) 拷贝的靶序列。在其它实施例中，在 10 分钟内产生约 10^7(IE+07) 拷贝。对于多重分析来说，产生等量拷贝的时间可延长至（例如）约 12、14、15、18、或 20 分钟。出于计算效率的目的，这些分析中的靶序列尺寸可为（例如）约 20 至约 40 个核苷酸、或（例如）约 20 至约 33 个核苷酸。自所有反应产物出现在同一器皿、容器或类似物中从而使得扩增反应可以开始的时间来计算反应时间。

[0164] 本发明方法不需要使用温度循环，而在多种扩增方法中通常需要温度循环来离解自扩增核酸靶序列。反应温度可根据序列长度和 GC 浓度来改变，但根据所属领域技术人员所理解，温度应高至足以使非特异性结合最小化。温度也应适合于反应中的酶，即切口酶和聚合酶。例如，反应可在约 52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、或 60℃下进行。在某些实施例中，反应是在约 37℃ -85℃、37℃ -60℃、54℃ -60℃、55℃ -60℃、58℃ -60℃下进行，并且在实例性实施例中，是在 56℃ -58℃下进行。在某些实施例中，所述工艺中没有变性步骤。在本发明方法的某些实施例中，整个扩增过程（包括使模板与靶核酸交互作用在内）是在实质上等温的条件下实施，并且不具有变性步骤（例如无显著温度升高（例如温度未上升至 90-110℃））。

[0165] 因此，在某些实例性实施例中，提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶序列反义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列有义链 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供能在反向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中以上各步骤是在等温条件下实施。

[0166] 在另一实例性实施例中，提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶序列 3’末端互补或实质上互补的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在反向模

板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿靶序列延长反向模板；使所延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’末端且与靶序列 5’末端相同的识别区域、位于所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及位于所述切口酶结合位点和切口位点上游的稳定区域；提供能在正向模板的切口位点处切口但不能在靶序列内切口的第二切口酶；其中扩增在一定条件下通过多次如下循环来实施：聚合酶沿靶序列延长正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且切口酶在切口位点处切口，从而产生扩增产物，其中以上各步骤是在等温条件下实施。

[0167] 可在切口酶与靶核酸分子混合之前、之后或同时将聚合酶与靶核酸分子混合。在实例性实施例中，将反应缓冲液优化至适用于切口酶和聚合酶二者。

[0168] 当一种资源耗尽时，可使反应完成。或者，可使用所属领域技术人员已知的方法来终止反应，例如热失活、或添加EDTA、大量盐或洗涤剂。在实例性实施例中，倘若在扩增后使用质谱，则可使用 EDTA 来终止反应。

[0169] 反应组份

[0170] 在 1.5mL 埃彭道夫 (Eppendorf) 管中按照自上到下的顺序合并以下试剂：

[0171]

所添加试剂：	微升 / 反应
H_2O	31.4
10X Thermopol 缓冲液 (NEB)	5
10X NEB 缓冲液 3	2.5
100mM $MgSO_4$	4.5
10mM dNTP	1.5
8U/ 微升 BstPol	0.6
10U/ 微升 N.BstNBI	1.5
20 微摩尔正向模板	0.25
20 微摩尔反向模板	0.25
总反应混合物	47.5
靶样品	2.5
总反应体积	50 微升

[0172]

[0173] 在此实例中用于反应条件中的各组份的浓度如下所述：

[0174] 浓度 组份

[0175] 45.7mM Tris-HCl

[0176] 13.9mM KCl

[0177] 10mM $(NH_4)_2SO_4$

[0178] 50mM NaCl

[0179] 0.5mM DTT

[0180] 15mM $MgCl_2$

[0181] 0.10％ 曲拉通 (Triton)X-100

[0182] 0.008mM EDTA

[0183] 6μg/mL BSA

[0184] 3.90％ 甘油（若使用更浓的酶原液则可能更低）

[0185] 0.3U/微升 Nt.BstNBI

[0186] 0.1-0.4U/微升 Bst 聚合酶（大片段）

[0187] 0.1 微摩尔 正向模板

[0188] 0.1 微摩尔 反向模板

[0189] 缓冲条件、$MgSO_4$ 浓度、聚合酶浓度、和模板浓度的改变都可根据分析序列和期望检测方法来优化。若使用更浓的酶原液，则可（例如）降低甘油数量。在某些实施例中，作为反应物添加的 Mg^{2+} 离子的浓度为（例如）约 9mM 至约 25mM、约 9mM 至 21mM、约 9 至 21mM、约 9 至 20mM、约 9 至 15mM，并且在实例性实施例中，为约 10mM 至约 18mM、约 10mM 至约 25mM、约 10mM 至 21mM、约 12 至 21mM、约 10 至 20mM、约 10 至 15mM、约 10.3mM 至约 20mM、约 10.3mM 至约 14.9mM、或约 15mM。同样，所属领域技术人员应了解，可在无 EDTA 或 BSA 的情况下进行反应；这些组份可作为酶的储存缓冲液的一部分存于反应中。可成比例改变各体积以获得较大或较小总反应体积。所述体积通常介于 5μL 与 100μL 之间。

[0190] 模板浓度通常超过靶浓度。正向和反向模板的浓度可相同或不同以使一种产物的扩增超过另一产物。各自的浓度通常介于 10nM 与 1μM 之间。

[0191] 可包括诸如 BSA、非离子型洗涤剂（例如曲拉通 X-100 或吐温 -20）、DMSO、DTT、和 RNA 酶抑制剂等添加剂以达成优化目的并且对扩增反应无不利影响。

[0192] 制备 / 添加靶

[0193] 可在 1x Thermopol 缓冲液 II、1x TE(pH 7.5) 或 H_2O 中稀释靶。热启动条件使得可实施更快、特异性更高的扩增。在此情况下，将反应混合物（不含酶或模板和靶）加热至反应温度并保持 2 分钟，之后将反应混合物添加至另一组份（酶或模板 / 靶）中。可以任何体积添加靶，最多等于反应中所需要的水的总量。在此情况下，可在水中稀释靶。在上述 50 微升总反应体积的实例中，每次反应应添加 2.5 微升制备靶以使总反应体积达到 50 微升。根据使用者的需要，可增加或减少本发明方法的反应体积。在本发明方法中可使用（例如）5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 微升或更大的反应体积、或使用（例如）75、100、150、200、300、400、500 微升的较大反应体积。

[0194] 进行反应

[0195] 反应是在恒温下进行，对于 Bst 聚合酶（大片段）与 Nt.Bst.NB1 切口酶的酶组合

来说通常介于54℃与60℃之间。可使用其它酶组合，并且最适反应温度可取决于切口酶和聚合酶二者可同时生效的最适温度以及反应产物的解链温度。例如，将反应物在一定温度下保持2.5至10分钟，直至达成期望量的扩增。可通过任一热失活步骤使酶失活（在使用可热失活的酶时）来终止反应。或者，可通过将EDTA添加至反应物中来终止反应。

[0196] 读数

[0197] 可通过所属领域技术人员已知的任何方法来检测所扩增靶序列。本文藉助非限制性实例来阐述这些已知方法中的若干种。在一种方法中，可通过凝胶电泳来检测扩增产物，由此检测具有特定长度的反应产物。例如，可用（例如）生物素对核苷酸实施标记。可使用与信号生成酶（例如过氧化物酶）结合的抗生物素蛋白来捕获生物素标记扩增序列。

[0198] 核酸检测方法可采用对双链DNA特异性染色的染料。在与DNA或RNA结合后表现增强荧光的嵌入染料是分子和细胞生物学中的基础工具。染料可为（例如）DNA或RNA嵌入荧光团并且可包括（但不限于）以下实例：吖啶橙、溴乙啶、赫斯特(Hoechst)染料、Pico绿、碘化丙啶、SYBR I（非对称花青染料）、SYBR II、TOTO（噻唑橙二聚体）和YOYO（噁唑黄二聚体）和诸如此类。在结合各种检测方法使用时染料提供提高核酸检测灵敏性的机会并且可具有不同的最适使用参数。例如，溴乙啶常用于在凝胶电泳后和PCR期间在琼脂糖凝胶中对DNA染色（希古奇(Hiquchi)等人，自然生物技术，10：413-417，1992年4月），碘化丙啶和赫斯特33258在流式细胞术中用于确定细胞的DNA倍数，SYBR绿1一直用于通过毛细管电泳以激光诱导荧光检测来分析双链DNA，并且Pico绿一直用于在实施匹配离子对多核苷酸色谱法后促进双链DNA的检测（辛格(Singer)等人，分析生物化学(Analytical Biochemistry)，249，229-238，1997）。

[0199] 核酸检测方法也可采用经标记核苷酸，将其直接纳入靶序列中或纳入含有与目标靶互补或实质上互补的序列的探针中。所述标记的性质可为放射性和/或荧光性并且可以本文所述任一方式来分解。应区分可检测并且可用作天然核苷酸的经标记核苷酸与不能用作天然核苷酸的经修饰核苷酸。

[0200] 检测和/或连续监测核酸产物扩增的方法也为所属领域技术人员所熟知并且下文阐述其若干实例。

[0201] 可通过分子信标来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。分子信标是发夹形寡核苷酸，其在一末端上含有荧光团并且在相对末端上含有猝灭染料。发夹中的环含有与靶序列互补或实质上互补的探针序列，并且茎部是通过使位于探针序列两侧的互补或实质上互补的臂序列复性来形成。荧光团和猝灭分子在每一臂中的相对末端处共价连接。在防止寡核苷酸与其互补或实质上互补的靶杂交的条件下或在分子信标游离于溶液中时，荧光和猝灭分子位于彼此的近端，从而防止荧光共振能量转移(FRET)。在分子信标遇到靶分子时发生杂交；环结构转化为稳定的更牢固的构象，从而导致荧光团与猝灭剂分子分离，并产生荧光（泰亚吉(Tyagi)等人，自然生物技术，14：1996年3月，303-308）。由于探针具有特异性，荧光的生成只能是由于合成了既定扩增产物所致。

[0202] 分子信标的特异性极高并且可辨别单核苷酸多态性。分子信标也可用不同颜色的荧光团和不同的靶序列来合成，从而使得可同时量化同一反应中的若干种产物。对于定量扩增工艺，分子信标可在每一扩增循环后特异性结合至经扩增靶上，并且由于未杂交分子信标较暗，因此不需要分离探针-靶杂合体才能定量地测定扩增产物的数量。所得信号与

扩增产物的数量成正比。此可实时进行。对于其它实时模式，必须优化每一引物 / 探针组的特定反应条件以确保准确性和精确性。

[0203] 也可通过荧光共振能量转移 (FRET) 来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。FRET 是两种生色团（供体和受体分子）之间的能量转移机制。简单来说，供体荧光团分子在特定激发波长下激发。随后在供体分子返回其基态时来自供体分子的发射可通过远程偶极 - 偶极交互作用将激发能转移至受体分子。可监测受体分子的发射强度并且其随供体与受体之间的距离、供体发射光谱与受体吸收光谱的重叠、以及供体发射偶极矩和受体吸收偶极矩的取向而变化。FRET 是量化分子动力学的有用工具，例如用分子信标所观察到的 DNA-DNA 交互作用。对于监测特定产物的产生来说，可在探针的一末端用供体分子标记并且在另一末端用受体分子标记。探针 - 靶杂交使得供体与受体的距离或取向改变并且观察到 FRET 变化。（约瑟夫 R. 拉科维兹 (Joseph R.Lakowicz)，“荧光光谱学原理 (Principles of Fluorescence Spectroscopy)”，普莱南出版公司 (Plenum Publishing Corporation)，第 2 版 (1999 年 7 月 1 日））。

[0204] 也可通过质谱来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。质谱是分析性技术，其可用于测定靶核酸物质的结构和数量并且可用于提供复合体混合物的快速分析。在实施所述方法后，将样品离子化，在电场和 / 或磁场中根据所得离子的质荷比将其分离，并且用检测器测量离子的质荷比。（克雷恩，P.F.(Crain，P.F.) 和麦克洛斯基，J.A.(McCloskey，J.A.)，生物技术新见 (Current Opinion in Biotechnology)，9：25-34(1998))。质谱法包括（例如）MALDI、MALDI/TOF 或电喷雾。这些方法可与气相色谱法 (GC/MS) 以及液相色谱法 (LC/MS) 组合。MS 一直用于 DNA 和 RNA 寡核苷酸的序列测定（林伯赫 P.(Limbach P.)，质谱综述 (MassSpectrom.Rev.)，15：297-336(1996)；默里 K.，J.(Murray K.，J.)，质谱 (Mass Spectrom.)，31：1203-1215(1996))。MS（并且更具体来说基质辅助激光脱附 / 离子化 MS(MALDI MS)）由于高速信号采集和脱离固体表面的自动化分析而具有极高处理量潜力。人们已指出，MS 除节省时间外也可测量分子的内在特性，并且由此产生信息量显著较大的信号（克斯特 H.(Koster H.）等人，自然生物技术，14：1123-1128(1996))。

[0205] 也可通过各种凝胶电泳方法来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。凝胶电泳涉及通过基质（一般为交联聚合物）使用推动分子通过基质的电动势来分离核酸。分子以不同速率移动通过基质，从而导致各种产物分离，此可通过多种方法中的任一种来可视化和说明，所述方法包括（但不限于）：放射自显影、磷光成像、和用核酸螯合染料实施染色。

[0206] 也可通过毛细管凝胶电泳来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。毛细管凝胶电泳 (CGE) 是传统凝胶电泳与液相色谱法的组合，其在狭窄内径毛细管中采用诸如聚丙烯酰胺等介质来达成核酸分子的快速高效分离，其分辨率可高至单个碱基。CGE 通常与激光诱导荧光 (LIF) 检测组合，其中可检测少至六个经染色 DNA 分子。CGE/LIF 检测一般涉及荧光 DNA 嵌入染料的使用，所述染料包括溴乙啶、YOYO 和 SYBR 绿 1，但也可涉及荧光 DNA 衍生物的使用，其中荧光染料与 DNA 共价键结。使用此方法可达成若干个不同靶序列的同时鉴定。

[0207] 也可通过各种表面捕获方法来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。此是

通过将特定寡核苷酸固定在表面上从而产生兼具高灵敏性和高选择性的生物传感器来达成。此方法中所用表面可包括（但不限于）金和碳并且可使用多种共价或非共价偶联方法来将探针连接至表面上。随后对靶 DNA 的检测可通过多种方法来监测。

[0208] 电化学方法一般涉及测量 DNA 探针电极上的嵌入剂（例如亚甲蓝）的阴极峰并且用方波伏安图将其可视化。可通过在亚甲蓝以不同方式与 dsDNA 和 ssDNA 交互作用时反映杂合体形成程度的亚甲蓝伏安还原信号量值的降低来观察靶序列的结合。

[0209] 也可使用表面等离子共振 (SPR) 来监测探针连接的动力学以及靶捕获过程。SPR 不需要使用荧光探针或其它标记。SPR 依赖于光在两种具有不同折射率的透明介质的界面上发生反射和折射的原理。在使用单色光和 p- 偏振光以及界面包含金薄层的两种透明介质时，观察到光的总反射超出临界角，然而光的电磁场分量穿入具有较低折射率的介质中，从而产生消散波和清晰阴影（表面等离子共振）。这是由于共振能在波与表面等离子之间转移所致。共振条件受薄金属膜上所吸附材料的影响，并且能根据共振单位与质量浓度之间的关联来测量核酸分子、蛋白质和糖的浓度。

[0210] 也可通过侧向流动装置来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。侧向流动装置为人所熟知。这些装置一般包括固相流体可渗透流动路径，流体通过毛细管力流经所述路径。实例包括（但不限于）试条分析和具有各种适宜涂层的薄层色谱板。将各种用于样品的结合试剂、用于样品的结合配偶体或包括结合配偶体的偶联物以及信号产生系统固定在流动路径上。可以若干种方式达成样品检测：例如酶促检测、纳米颗粒检测、比色检测、和荧光检测。酶促检测可涉及酶标记探针，其与互补或实质上互补的核酸靶在侧向流动装置表面上杂交。可用适宜标记物处理所得复合体以产生可读信号。纳米颗粒检测涉及珠粒技术，其可使用胶体金、胶乳和顺磁纳米颗粒。在一实例中，可使珠粒与抗生物素抗体偶联。可直接使靶序列生物素化，或可使靶序列与序列特异性生物素化探针杂交。在磁场中激发时，金和胶乳产生肉眼可见的比色信号，并且顺磁颗粒产生不可见信号，并且可通过专门读取器来说明。

[0211] 基于荧光的侧向流动检测方法也为人所知，例如荧光素和生物素双重标记寡核苷酸探针法、采用由包埋于晶体中的镧系元素组成的上转换磷光体报告分子的 UPT-NALF（克斯特廷斯 (Corstjens) 等人，临床化学，47：10，1885-1893，2001）、以及量子点的使用。

[0212] 也可在侧向流动装置上捕获核酸。捕获方式可包括抗体依赖性和非抗体依赖性方法。抗体依赖性捕获一般包含抗体捕获线和经标记探针，所述探针是与靶互补或实质上互补的序列。非抗体依赖性捕获一般利用两种结合配偶体之间的非共价交互作用，例如生物素化探针与抗生蛋白链菌素类之间的高亲力和不可逆连接。可将捕获探针直接固定在侧向流动膜上。抗体依赖性和非抗体依赖性方法二者都可用于多重分析中。

[0213] 也可通过多重 DNA 测序来检测并监测靶核酸和核酸序列的产生或存在。多重 DNA 测序是自 DNA 库鉴定靶 DNA 序列的方式。所述技术使得可同时处理多个测序模板。在处理完成时可将所汇集的多个模板分解成单个序列。简单来说，汇集 DNA 分子，将其扩增并以化学方式使其破碎。在测序凝胶上根据尺寸将产物分级并将其转移至尼龙膜上。使用与标准 DNA 测序技术中所用类似的方法用探针检测所述膜并实施放射自显影（丘奇 (Church) 等人，科学，1998 年 4 月 8 日；240(4849)：185-188）。可评估放射自显影照片并量化靶核酸序列的存在。

[0214] 试剂盒

[0215] 如本文所述，用于本发明方法中的试剂盒可包含（例如）一或多种聚合酶、正向和反向模板、和一或多种切口酶。倘若欲扩增一个靶，则在试剂盒中可包括一种或两种切口酶。倘若欲扩增多个靶序列，并且所设计用于那些靶序列的模板包含相同切口酶的多个切口酶结合位点，则可包括一种或两种切口酶。或者，倘若可通过不同切口酶识别所述模板，则试剂盒中可包括更多切口酶，例如 3 种或以上种。

[0216] 用于本发明方法中的试剂盒也可在任一数量的单独容器、封包、小管、小瓶、微量滴定板和类似物中包含一或多种组份，或在所述容器中可以各种组合合并所述组份。

[0217] 试剂盒中的各组份可存于（例如）一或多个容器中，例如所有组份可都存于一个容器中，或者例如酶可存于与模板不同的单独容器中。例如，所述组份可冻干、冷冻干燥、或存于稳定缓冲液中。在一实例中，聚合酶和切口酶以冻干形式存于单一容器中，并且模板以冻干、冷冻干燥、或存于缓冲液中的形式存于不同容器中。或者，在另一实例中，聚合酶、切口酶、和模板以冻干形式存于单一容器中。或者，可将聚合酶和切口酶分离至不同容器中。

[0218] 试剂盒可另外包含（例如）反应中所用 dNTP、或经修饰核苷酸、试管或用于反应的其它容器、或含有用于使冻干组份再水合的水或缓冲液的小瓶。所用缓冲液可（例如）既适合于聚合酶活性也适合于切口酶活性。

[0219] 用于本发明方法的试剂盒也可包含实施本文所述一或多种方法的说明书和 / 或本文所述一或多种组合物或试剂的说明。说明书和 / 或说明可呈印刷品形式并且可包括于试剂盒插入物中。试剂盒也可包括对提供所述说明书或说明的网址的书面描述。

[0220] 试剂盒可另外包含用于检测方法的试剂，例如用于以下方法的试剂 :FRET、侧向流动装置、试条、荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标、或聚苯乙烯珠粒。

[0221] 本发明方法和本发明试剂盒的优势在于其可用于可提供恒温的任一装置中，包括温度循环器、培养箱、水浴、和加热模块。

[0222] 因此，本发明方法中提供扩增核苷酸序列的方法，其包含 :合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与靶核苷酸序列第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与靶核苷酸序列的第一链的互补链杂交的第二模板核酸 ;在所述聚合酶可延长所述模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子 ;其中 :靶核苷酸序列长度介于 20 与 40 个核苷酸之间 ;靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上 ;并且上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

[0223] 也提供扩增核苷酸序列的方法，其包含 :合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与靶核苷酸序列第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与靶核苷酸序列的第一链的互补链杂交的第二模板核酸 ;在所述聚合酶可延长所述模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子 ;其中 :靶核苷酸序列的长度介于 20 与 40 个核苷酸之间 ;第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’ 末端且与靶核苷酸序列的第一链的 3’ 末端互补或实质上互补的第一模板识别区域 ;第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与靶核苷酸序列的第一链的互补链的 3’ 末端互补或实质上互补的第二模板识别区域 ;靶核苷酸序列所包含的核苷酸比第一模板识别区域与第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个 ;靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上 ;并且上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

[0224] 也提供扩增核苷酸序列的方法，其包含：合并具有靶核苷酸序列的靶核酸与 (i) 聚合酶、(ii) 与靶核苷酸序列第一链杂交的第一模板核酸、和 (iii) 与靶核苷酸序列的第一链的互补链杂交的第二模板核酸；在所述聚合酶可延长模板核酸的条件下使其发生扩增反应，由此生成经延长模板核酸扩增子；其中：第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’ 末端且与靶核苷酸序列的第一链的 3’ 末端互补或实质上互补的第一模板识别区域，其中识别区域长 8-15 个核苷酸；第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’ 末端且与靶核苷酸序列的第一链的互补链的 3’ 末端互补或实质上互补的第二模板识别区域，其中识别区域长 8-15 个核苷酸；靶核苷酸序列在约 10 分钟内扩增 1E+6 倍或以上；并且上述步骤是在实质上等温的条件下实施。

[0225] 在本发明方法的某些方面中，第一模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与靶核苷酸序列的第一链的 3’ 末端互补或实质上互补的第一模板识别区域；并且第二模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与靶核苷酸序列的第一链的互补链的 3’末端互补或实质上互补的第二模板识别区域。在某些方面中，靶核苷酸序列所包含的核苷酸比第一模板识别区域与第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。在其它方面中，第一模板和第二模板包含位于识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点，并且扩增反应另外包含一或多种能在所述正向和所述反向模板的切口位点处切口的切口酶，其中任一种切口酶都能对所述两种模板进行切口，或每个模板都能通过至少一种切口酶进行切口，并且其中所述一或多种切口酶不能在所述靶序列内切口。

[0226] 在某些实施例中，靶核苷酸序列所包含的核苷酸比第一模板识别区域与第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 个。在其它实施例中，靶核苷酸序列所包含的核苷酸比第一模板识别区域与第二模板识别区域中的核苷酸总数多 2 个。在其它实施例中，靶核苷酸序列所包含的核苷酸比第一模板识别区域与第二模板识别区域中的核苷酸总数多 3 个。

[0227] 在本发明方法的某些方面中，靶核酸是双链或单链核酸。在某些方面中，靶核酸是双链 DNA。在其它方面中，靶核酸是单链 DNA。在其它方面中，靶核酸是 RNA。靶核酸可选自 (例如) 由以下组成的群组：基因组 DNA、质粒 DNA、病毒 DNA、线粒体 DNA、和合成双链 DNA。靶核酸可选自 (例如) 由以下组成的群组：病毒 DNA、cDNA 和合成单链 DNA。靶核酸可选自 (例如) 由以下组成的群组：信使 RNA、病毒 RNA、核糖体 RNA、转移 RNA、微小 RNA、微小 RNA 前体和合成 RNA。

[0228] 在本发明方法中，DNA 聚合酶可为 (例如) 耐热性聚合酶。聚合酶可选自例如由以下组成的群组：Bst(大片段)、9° N、温特$_{R}^{®}$ (外)DNA 聚合酶、热启动酶和热启动酶 II。在某些方面中，聚合酶为 Bst(大片段)。

[0229] 在某些实施例中，第一和第二模板包含可通过相同切口酶识别的多个切口酶结合位点，并且所述第一与所述第二切口酶相同。切口酶可选自 (例如) 由以下组成的群组：Nt.BspQI、Nb.BbvCi、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.Bpu10I、和 Nt.Bpu10I。

[0230] 在本发明方法的某些方面中，第一链核酸序列中与靶核苷酸序列第一链互补或实质上互补的部分长 8-15 个核苷酸，并且其中第二链中与靶核苷酸序列互补或实质上互补的部分长 8-15 个核苷酸。在某些方面中，所提供第一模板的浓度与第二模板相同。在其它方面中，所提供第一或第二模板中的一者与另一模板的比率在 1 ： 100 至 100 ： 1 的比率

范围内。本发明方法的反应可另外包含第二聚合酶。在某些方面中，第一或第二聚合酶中至少一种包含逆转录酶活性。

[0231] 在本发明方法的某些实施例中，扩增是在 54℃与 60℃之间实施。在其它实施例中，扩增是在 56℃与 58℃之间实施。在某些实施例中，其中将扩增反应物在恒温下保持 1 至 10 分钟。在其它实施例中，将扩增反应物在恒温下保持 1 至 20 分钟。

[0232] 本发明方法可另外包含检测扩增产物。因此，在某些方面中，扩增产物是通过选自由以下组成的群组的检测方法来检测：凝胶电泳、质谱、SYBR I 荧光法、SYBR II 荧光法、SYBR 金、Pico 绿、TOTO-3、嵌入染料检测、荧光共振能量转移 (FRET)、分子信标检测、表面捕获、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获来检测、荧光偏振、和侧向流动捕获。

[0233] 在某些方面中，能扩增至少两个靶序列。在某些方面中，在固体表面上检测扩增产物。在某些方面中，将至少一种捕获探针固定在固体表面上。在某些实施例中，所述模板中的至少一种包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

[0234] 在本发明方法的某些实施例中，靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+6 倍或以上。在其它实施例中，靶核苷酸序列在约 2.5 分钟内扩增 1E+6 倍或以上。在其它实施例中，靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+7 倍或以上。在其它实施例中，靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+8 倍或以上。在其它实施例中，其中靶核苷酸序列在约 5 分钟内扩增 1E+9 倍或以上。

[0235] 本发明方法也包括扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；提供能在所述正向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

[0236] 也提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供 DNA 聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板；使所述经延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于 3’末端且与所述经延长反向模板 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核

苷酸；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内或在所述靶序列互补链内切口的第二切口酶；其中扩增是在基本等温条件下实施，其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。在本发明方法的某些方面中，DNA 聚合酶是耐热性聚合酶。例如，聚合酶可选自由以下组成的群组：Bst（大片段）、9° N、温特$_R^®$（外）DNA 聚合酶、热启动酶、和热启动酶 II。在某些方面中，聚合酶为 Bst（大片段）。

[0237] 在某些方面中，切口酶在切口酶结合位点下游切口。在其它方面中，正向和反向模板包含可通过相同切口酶识别的切口酶结合位点，并且所述第一与所述第二切口酶相同。在某些方面中，切口酶选自由以下组成的群组：Nt.BspQI、Nb.BbvCi、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.Bpu10I、和 Nt.Bpu10I。

[0238] 在本发明方法的某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 个。在其它实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 2 个。

[0239] 在某些方面中，靶 DNA 分子选自由以下组成的群组：基因组 DNA、质粒、线粒体和病毒 DNA。在其它方面中，靶核酸选自由以下组成的群组：病毒 DNA、信使 RNA、微小 RNA、和微小 RNA 前体。在其它方面中，所提供正向模板的浓度与反向模板相同。在其它方面中，所提供正向或反向模板中的一个模板与另一模板的比率在 1 ： 100 至 100 ： 1 的比率范围内。

[0240] 在某些实施例中，本发明方法另外包含第二聚合酶。例如，聚合酶中的至少一种可包含逆转录酶活性。在某些方面中，扩增是在 54℃与 60℃之间实施。在其它方面中，将扩增反应物在恒温下保持 1 至 10 分钟。

[0241] 本发明方法可另外包含检测扩增产物。例如，扩增产物可通过选自由以下组成的群组的方法来检测：凝胶电泳、质谱、SYBR I 荧光法、SYBR II 荧光法、SYBR 金、Pico 绿、TOTO-3、嵌入染料检测、FRET、分子信标检测、表面捕获、毛细管电泳、纳入经标记核苷酸以容许通过捕获来检测、荧光偏振、和侧向流动捕获。

[0242] 在某些方面中，能扩增至少两个靶序列。在其它方面中，在固体表面上检测扩增产物。在某些方面中，将至少一种捕获探针固定在固体表面上。在其它方面中，所述模板中的至少一种包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

[0243] 本发明方法也包括扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；并且所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列

内切口的第二切口酶；以及提供DNA聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

[0244] 也提供扩增单链核酸靶序列的方法，其包含使包含单链靶序列的靶核酸与反向模板接触，其中所述反向模板所包含的核酸序列包含位于3’末端且与所述靶序列3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列3’末端互补的部分长8-15个核苷酸；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供DNA聚合酶，其中所述聚合酶在一定条件下沿所述靶序列延长所述反向模板；使所述经延长反向模板与正向模板接触，其中所述正向模板包含位于3’末端且与所述经延长反向模板3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域和所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多1至5个；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内或在所述靶序列互补链内切口的第二切口酶；其中扩增是在基本等温条件下实施，其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处切口，从而产生扩增产物。

[0245] 在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多1个。在其它实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多2个。在其它实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述正向模板识别区域与所述反向模板识别区域中的核苷酸总数多3个。

[0246] 也提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶DNA分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于3’末端且与所述靶序列反义链3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于3’末端且与所述靶序列有义链3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供DNA聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

[0247] 也提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶DNA分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于3’末端且与所述靶序列反义链3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于3’末端且与所述靶序列有义链3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；提

供能在所述正向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物。

[0248] 也提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；提供能在所述正向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物，其中当使扩增反应进行 12 分钟时，长 22-35 个核苷酸的靶序列获得至少 1E+7 倍的扩增。

[0249] 本发明也提供扩增双链核酸靶序列的方法，其包含在基本等温条件下使包含具有有义链和反义链的双链靶序列的靶 DNA 分子与正向模板和反向模板接触，其中所述正向模板所包含的核酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列反义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；所述反向模板所包含的核苷酸序列包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶反义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；提供能在所述正向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第一切口酶；提供能在所述反向模板的切口位点上游、下游或切口位点处切口但不能在所述靶序列内切口的第二切口酶；以及提供 DNA 聚合酶；其中扩增是通过多次如下循环来实施：所述聚合酶沿所述靶序列延长所述正向和反向模板，从而产生双链切口位点，并且所述切口酶在所述切口位点处或所述位点的扩增拷贝处切口，从而产生扩增产物，其中当使扩增反应进行 12 分钟时，长 22-35 个核苷酸的靶序列获得至少 1E+7 倍的扩增。

[0250] 也提供扩增核酸靶序列的试剂盒，其包含 DNA 聚合酶；核酸扩增用第一模板，其包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列有义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；核酸扩增用第二模板，其包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链互补链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述核酸序列中与所述靶序列有义链互补链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸；和一种或两种热稳定切口酶，其中任一种酶都能在所述第一和所述第二模板的切口位点处切口，或第一酶能在所述第一引物

的切口位点处切口并且第二酶能在所述第二引物的酶位点处切口。

[0251] 在某些实施例中，靶序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个。在某些实施例中，聚合酶、切口酶和模板存于一个容器中。在某些实施例中，聚合酶、切口酶和模板存于两个容器中。在其它实施例中，聚合酶和切口酶存于第一容器中，并且所述模板存于第二容器中。在某些方面中，聚合酶、切口酶和模板经冻干。在某些方面中，试剂盒另外包含实施扩增方法的说明书。试剂盒可另外包含试管。或者，例如，试剂盒可另外包含侧向流动装置或试条。在某些方面中，侧向流动装置或试条另外包含捕获探针。在某些方面中，试剂盒另外包含选自由以下组成的群组的检测部分：荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标和聚苯乙烯珠粒。在试剂盒的某些方面中，所述模板中的至少一种包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

[0252] 也提供扩增核酸靶序列的试剂盒，其包含 DNA 聚合酶；核酸扩增用第一模板，其包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域；核酸扩增用第二模板，其包含位于 3’末端且与所述靶序列有义链互补链的 3’末端互补的识别区域、所述识别区域上游的切口酶结合位点和切口位点、以及所述切口位点上游的稳定区域，其中所述靶序列所包含的核苷酸比所述第一模板识别区域与所述第二模板识别区域中的核苷酸总数多 1 至 5 个；和一种或两种热稳定切口酶，其中任一种酶都能在所述第一和所述第二模板的切口位点处切口，或第一酶能在所述第一引物的切口位点处切口并且第二酶能在所述第二引物的酶位点处切口。在试剂盒的某些方面中，所述第一模板核酸序列中与所述靶序列有义链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸，并且所述第二模板核酸序列中与所述靶序列有义链互补链 3’末端互补的部分长 8-15 个核苷酸。

[0253] 在某些实施例中，聚合酶、切口酶和模板存于两个容器中。在其它实施例中，聚合酶和切口酶存于第一容器中，并且所述模板存于第二容器中。在某些方面中，聚合酶、切口酶和模板经冻干。在某些方面中，试剂盒另外包含实施扩增方法的说明书。所述试剂盒可另外包含试管。或者，例如，试剂盒可另外包含侧向流动装置或试条。在某些方面中，侧向流动装置或试条另外包含捕获探针。在某些方面中，试剂盒另外包含选自由以下组成的群组的检测部分：荧光染料、胶体金颗粒、胶乳颗粒、分子信标和聚苯乙烯珠粒。在试剂盒的某些方面中，所述模板中的至少一种包含间隔子、阻断基团、或经修饰核苷酸。

[0254] 实例

[0255] 实例 1：样品 NEAR™ 扩增分析

[0256] 此实例提供本发明方法中典型 DNA 湿法分析的实例。所属领域技术人员应理解，可对反应体积和模式、实施分析的时间长度、以及各反应物的数量进行多种改变。

[0257] 使用两个 96 孔微量滴定板来建立“湿法”分析，所述两个板为模板 / 靶板和主混合物板。将 5 微升模板等分至模板 / 靶板上的适宜孔中以开始分析。对于“- 靶”孔（无靶对照孔），添加 5 微升 dH_2O。通过在单一管中将缓冲液、盐、dNTP、酶和 dH_2O 合并在一起来产生试剂主混合物，其中根据所测试样品数来使用各自的适宜体积（参见此实例内的表）。将 40 微升试剂主混合物等分至主混合物板的“- 靶”和“+ 靶”（有靶对照孔）孔中，并且用热密封剂将板密封。上述所有步骤都是在扩增前室中完成，并且随后的所有步骤都是在扩增后室中完成。自模板 / 靶板移除热密封剂，其中仅自将添加靶的孔中移除，使“- 孔”保持密

封以避免可能的污染。将 5 微升靶等分至适宜“+ 靶”孔中。用热密封剂再次将模板 / 靶板密封。将模板 / 靶板和主混合物板二者在分析温度下（例如在 56℃、57C 或 58℃下，使用热循环）培养 2-3 分钟。自两个板移除热密封剂。将 40 微升试剂主混合物自主混合物板孔转移至模板 / 靶板上的适宜孔中，并且用热密封剂再次将模板 / 靶板密封。将样品在分析温度下培养 5-10 分钟。根据开始培养的时间来计算反应时间，在将试剂主混合物转移至模板 / 靶板上的孔中后立即将板密封，并将其置于温度循环器中。通过添加 0.1％或以上 SDS 来终止反应，或通过将样品在 80℃下培养 2 分钟来终止反应。

[0258] 为检测扩增产物，例如将 3-5 微升、5 微摩尔分子信标添加至各孔中并通过上下抽吸若干次来混合。在分析温度下培养 1 分钟后，根据存于分子信标上的荧光团在适宜波长下实施荧光读取。

[0259] 单一 50 微升 DNA 反应的典型试剂明细（所有体积都以微升来表示）

[0260]

试剂	靶	+ 靶	终浓度
5X IB2 缓冲液	10.0	10.0	1X
100mM $MgSO_4$	2.5	2.5	10+5mM
10mM dNTP	1.5	1.5	0.3mM
8U/ 微升 Bst Pol	2.4	2.4	19.2 单位
10U/ 微升 N.BstNBl	1.50	1.50	15 单位
模板 1	2.5	2.5	10-1000nM
模板 2	2.5	2.5	10-1000nM
靶	0	5.0	
H_2O	27.1	22.1	
总量	50.0	50.0	

[0261] 5X IB2 缓冲液由以下组成：

[0262] 250mM Tris-HCl(pH8.0)

[0263] 75mM$(NH_4)_2SO_4$

[0264] 75mMNa_2SO_4

[0265] 50mM $MgSO_4$

[0266] 5mM DTT

[0267] 0.5％曲拉通 X-100。

[0268] 典型反应不具有标准靶浓度，但每次反应中的靶拷贝可介于（例如）10-50 的下限与（例如）1E+6 拷贝或以上的上限之间。对于摩尔浓度来说，具有 10 拷贝靶的 50 微升分

析物为 3.32e-13 微摩尔，而具有 50 拷贝靶的 50 微升分析物为 1.66e-12 微摩尔，并且具有 1e6 拷贝靶的 50 微升分析物为 3.32e-8 微摩尔。

[0269] 靶样品可由（例如）已再悬浮于 dH2O 或 TE 中的纯化 DNA 或 RNA 或尚未纯化的样品组成。例如，收集子宫颈内拭子临床样品，并且使用皮尔斯溶解 -N-Go(Pierce' sLyse-N-Go)PCR 试剂（目录号 78882）自拭子洗脱并溶解样品。溶解 -N-Go 是基于非离子型洗涤剂的专卖调配物。然后将经洗脱 / 溶解样品的各等份直接添加至分析物中，并且结果表明未损失分析活性。也已使用在病毒运输介质 (VTM)(M4 或 M5) 中收集的临床样品来实施分析。将在 VTM 中收集的样品与皮尔斯溶解 -N-Go PCR 试剂混合以溶解靶细胞，并且随后将这些样品的等份添加至分析物中而不损失活性。最后，已在各种可能抑制剂的存在下实施分析，例如沙子、土壤、粘土、尿液和血清，并且这些抑制剂各自具有良好耐受性。

[0270] 实例 2 :通过凝胶电泳检测 DNA NEAR™ 分析产物

[0271] 可通过凝胶电泳使扩增反应产物可视化。在不存在靶时，模板（具有互补或实质上互补的 3' 碱基）重叠一或多个碱基，聚合酶在各方向上延长以生成 NEAR™ 扩增二倍体（图 1B）；并且扩增继续以类似机制进行至 NEAR™ 扩增，以扩增比靶扩增产物短两个碱基的产物。在模板末端为 A 和 T 的 25 聚体分析情况下，所得背景产物为 23 个碱基。27 聚体分析也形成 23 聚体背景和 27 聚体产物。同样扩增较长反应产物。根据图 1C 中的步骤 9B，假定这一系列产物是在切口酶可在 NEAR™ 扩增二倍体两侧切口之前通过聚合酶延长所形成的。图 2 显示通过凝胶电泳可容易地区分 NEAR™ 反应产物与背景产物。

[0272] 实例 3 :通过凝胶电泳检测 RNA 分析产物

[0273] 本发明方法的反应也可扩增 RNA 靶。在此情况下，靶为埃博拉披甲 RNA，其为约 600 个碱基的 RNA 链，通过 MS2 噬菌体外壳蛋白将其封装以模拟病毒颗粒。反应设计为可扩增封装 RNA 序列内所含埃博拉基因组中的 25 个碱基的区域。在 20％聚丙烯酰胺凝胶上运行反应产物（图 3），展示经扩增 25 聚体产物以及 23 聚体和 20 聚体背景产物。此实例证实反应具有扩增自病毒样颗粒释放的 RNA 的能力。

[0274] 实例 4 :通过质谱检测 DNA 和 RNA 分析产物

[0275] 本发明方法的反应扩增产物也可使用具有前端 LC 的 ESI/TOF 系统通过质谱来检测。所观察到的反应产物是多电荷离子物质。通常，-3 或 -4 电荷态是波谱中的主峰（在 1000-3000AMU 范围内），根据寡核苷酸产物而定。波谱中通常存在钠加合物作为与主峰相邻的峰，其强度为约 20-25％。在靶存在下阳性反应的独特峰可见于分别针对 DNA 和 RNA 反应的图 4 和图 5 二图中。在这些反应中形成的背景产物未显示于这些波谱的质量范围中。

[0276] 实例 5 :分析扩增的实时检测

[0277] 如图 6 中所示，也可用 SYBR II 荧光法实时监测本发明方法的扩增反应。荧光随 SYBR II 嵌入经扩增双链产物中而增强。背景产物也生成荧光，但速率慢于真实产物。需要优化扩增序列、反应温度和反应缓冲条件以使阳性反应与阴性对照之间的特征性区别可视化。

[0278] 实例 6 :实时 NEAR™ 分析扩增的 FRET 检测

[0279] NEAR ™ 扩增也可通过荧光共振能量转移 (FRET) 来监测，如图 7 中所示。使用双重标记模板来进行扩增，每个末端上有一个标记 (5'-FAM,3'-BHQ)。在模板变成双链时，在

通过切口酶裂解模板后，自 FAM 标记寡核苷酸生成荧光。由于荧光是通过初始切口反应来产生，因此此检测方法极为灵敏。由于猝灭标记阻断模板 3’ 末端的延长，因此抑制了背景荧光的产生。

[0280] 实例 7 ：实时 NEAR™ 扩增的分子信标检测

[0281] 第三种监测实时扩增的方法是使用分子信标，如图 8 中所示。在此情况下，扩增产物与分子信标中的环区域杂交，从而导致因位于发夹茎各个末端上的荧光团与猝灭剂的分离而产生的荧光增强。由于此交互作用在扩增后发生，因此将其视为伪实时并且其反应相对于 FRET 方法稍慢。

[0282] 实例 8 ：假阳性率测试

[0283] 此实验设计为用探针检测本发明方法的扩增反应在阴性反应中产生真实产物或假阳性的可能性。在存在 (n ＝ 120) 和不存在 (n ＝ 320) 枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的情况下实施对枯草芽孢杆菌基因组具有特异性的 25 聚体区域的特异性扩增反应。终点反应是在质谱仪上进行并且分析质谱中产物质量峰的曲线下面积 (AUC)。如图 9 中所示，结果显示 320 个阴性反应都不产生 AUC 值等于水对照的假阳性。真阳性 AUC 值与真阴性相差至少 3 倍标准误差。总之，这些结果证实本发明方法的分析具有再现性。

[0284] 实施枯草芽孢杆菌分析以靶向 mobA-nprE 基因区域中的 25 个核苷酸的区域，其具有序列 5’-TTAACGTCTCTAATTTCAGCTTTTG-3’。用于扩增此区域的模板为 T15’-ATGCATGCATGAGTCACATTTAACGTCTCTA-3’和 T25’-ATGCATGCATGAGTCACATCAAAAGCTGAAA-3’。基本上如实例 1 中所述实施分析，并且在此处具有以下修改 ：在 56℃下经 4 分钟用 10,000 拷贝枯草芽孢杆菌基因组 DNA 加上 100,000 拷贝苏云金芽孢杆菌基因组 DNA（真阳性）、10,000 拷贝大肠杆菌 (Escherichia coli) 基因组 DNA 加上 100,000 拷贝苏云金芽孢杆菌基因组 DNA（真阴性）、或无靶（水对照）来实施。然后通过电喷雾离子化质谱来分析各样品的各等份，以使用曲线下面积 (AUC) 计算来确定各反应中产生的特定产物量。

[0285] 实例 9 ：信标检测 ：使用信标检测的分析的再现性

[0286] 本发明方法的反应产物的分子信标检测也可用作终点读取。如图 10 中所示，可通过改变正向与反向模板的输入比来操纵各反应产物的比率。改变各种模板的比率以偏向一种反应产物的产生，从而使得单链产物可用于与分子信标杂交。开放的信标生成荧光信号。此检测方法再现性极高。在此研究中，两个操作者在不同的两天重复实施相同分析。此研究的结果证实分析在相邻两天之间具有再现性，并且在各操作者之间也具有再现性。

[0287] 实例 10 ：使用信标检测的分析的灵敏性

[0288] 使用土拉热弗朗西斯菌基因组 DNA 的稀释物来测试使用信标读数的分析的灵敏性。如图 11 中所示，所检测拷贝数仅高出无靶对照 50 拷贝。

[0289] 实例 11 ：DNA 扩增的扩增产物浓度

[0290] 也可使用反应产物的质谱检测来研究分析的灵敏性。图 12 显示高出无靶对照的信号低达 100 拷贝。使用此研究的数据来关联输入拷贝数与最终扩增产物量。在此研究中，将质谱产物峰的 AUC 值拟合至标准曲线以获得分析中扩增产物的终浓度估算值。1E+2 和 1E+5 拷贝的扩增产物数量分别介于约 250nM 至接近 1 μ M 之间。此产物数量产生 1E+8 至 7E+10 倍的扩增。这些反应是在非热启动条件下实施，事实上已显示热启动条件可显著提高扩增产物量，从而达成扩增的进一步增强。零拷贝扩增反应由于标准曲线方程中的 y- 截距

值而具有阳性终浓度。

[0291] 实例 12 :RNA 分析的扩增产物浓度

[0292] 对使用本发明方法的 RNA 扩增实施类似研究。通过本发明方法的分析来扩增 RNA 靶的稀释物。在质谱上运行产物并且根据标准曲线分析产物峰的 AUC 值以确定终产物的浓度，如图 13 中所示。始于 30 和 30,000 拷贝初始靶的 12 分钟的扩增分别产生 3E+9 至 1E+7 倍扩增。与 DNA 扩增相比较低的扩增程度可归因于聚合酶的逆转录酶能力与其复制能力相比效率较低。同样，在延长反向模板后形成的 RNA:DNA 杂合体与正常 DNA:DNA 杂合体相比具有较强交互作用并且可具有较弱呼吸作用，从而使得正向模板或另一反向模板可置换一链。然而，据检测 RNA 反应的扩增产物低至＜ 100 拷贝。

[0293] 实例 13 :NEAR™ 反应对 DNA 的特异性

[0294] 由于反应产物长度通常介于 20 与 30 个碱基之间，因此产生了关于这些短扩增分析物的特异性是否足以将单一序列区域靶向所存在的其它近邻基因组的问题。通过在存在和不存在不同数量的近邻基因组 DNA 的情况下进行扩增反应来测试反应的特异性（图 14）。在此情况下，分析检测炭疽芽孢杆菌 pXO2 质粒中的特定序列，并且近邻基因组为苏云金芽孢杆菌（库斯塔克亚种 (kurstaki)）。通过产物峰的 AUC 值来分析反应。下图证实，在不存在正确靶（炭疽芽孢杆菌）时，不扩增真实产物（含量低至在照片比例下不可见）。阳性反应的扩增量恒定，但由于三次重复反应中有一次反应具有单一较低值，因此对于 0 和 5E+5 拷贝苏云金芽孢杆菌 (5E+4 拷贝炭疽芽孢杆菌）具有较大误差棒。总之，实验证实当所设计分析物在基因组的独特区域内时，反应对靶序列的特异性极高。

[0295] 实例 14 :干扰物测试

[0296] 测试一组干扰物以监测其各自对扩增的效应。图 15 证实，本发明方法的分析在干扰物存在下具有稳定性。某些已知可抑制 PCR 的干扰物（例如腐殖酸）似乎不抑制分析，但各干扰物的数量是未知的。根据统计分析，仅干扰物 B、C 和 E 在统计上与对照分析物 x 不同。在 B、C、和 E 情况下，所述差异导致产物扩增增强。

[0297] 实例 15 :利用 DNA 分析对两个序列的多重化

[0298] 设计 DNA 二倍体用于毛细管电泳 (CE) 检测。扩增产物长度为 25 个碱基（炭疽芽孢杆菌分析，Ba) 和 27 个碱基（枯草芽孢杆菌分析，Bs)，并且背景产物为 23 聚体。在存在或不存在 5E+5 拷贝的各基因组 DNA 靶的情况下使反应进行 10 分钟。在 20％聚丙烯酰胺凝胶上运行样品以使反应产物可视化。图 16 表明，当仅存在枯草芽孢杆菌时以及存在枯草芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌二者时，存在阳性产物扩增。

[0299] 实例 16 :DNA 分析的双重特异性

[0300] 显示使用枯草芽孢杆菌 (Bs) 和炭疽芽孢杆菌 (Ba) 的 DNA 双重反应对各基因组具有特异性。在近邻苏云金芽孢杆菌存在下进行分析，如图 17 中所示。在存在两个模板组以及苏云金芽孢杆菌基因组 DNA 的阴性反应中，在 25 或 27 聚体区域无产物区带。仅在存在特定基因组靶时出现产物区带，此证实所述双重反应具有特异性。

[0301] 实例 17 :利用 RNA 分析的多重化

[0302] 实施并多重化扩增 27 聚体产物的 MS2 分析和扩增 25 聚体产物的埃博拉分析，从而使得各分析中存在所有模板并且产物的扩增依赖于所存在的靶。此模板组合形成长 23 个碱基和 20 个碱基的背景产物。图 18 中所示凝胶证实，本发明方法的反应具有在单一反

应中扩增多个 RNA 靶的能力。

[0303] 实例 18 :自经溶解孢子扩增

[0304] 对半处理样品实施扩增以确定是否可扩增通过溶解自孢子释放的 DNA。阴性对照反应含有经 DNA 酶处理的未溶解孢子,因此应不存在可扩增 DNA。阳性对照反应含有纯化基因组 DNA,其浓度与可通过溶解释放的 DNA 数量估算值大致相等。图 19 中的结果显示,如人们所预期,用经 DNA 酶处理的未溶解孢子实施扩增不产生产物扩增,而在扩增前溶解的三种样品产生在理论数量范围内的产物数量。

[0305] 实例 19 :捕获和延长

[0306] 也可在固体表面上检测本发明方法的反应产物。5'末端通过生物素 / 抗生蛋白链菌素连接而连接至表面的捕获探针可与反应产物结合,聚合酶自此延长以形成 SYBR 和任何嵌入染料可检测的稳定二倍体。捕获探针设计为偏向通过结合真实产物而非背景产物来延长,因为捕获探针的 3' 碱基与产物中的中间间隔子碱基互补,所述中间间隔子碱基在模板或背景产物中不存在。图 20 证实,在捕获探针和聚合酶存在下产物的荧光相对于一般结合(在不存在聚合酶时进行相同反应以排除捕获探针的延长)和无靶对照(其中仅扩增背景产物,但不能与聚合酶欲延长的捕获探针形成稳定二倍体)有所增强。

[0307] 实例 20 :表面 NEAR™ FRET DNA 分析

[0308] 也可使用固定在表面上的模板实施本发明方法的反应。用于表面扩增 FRET 检测的模板通常具有三个修饰 :一个具有 TEG 间隔子的 5' 生物素、一个位于所述生物素内侧的 FAM 荧光团、和 3' 末端上用于阻断背景扩增以及猝灭 FAM 荧光团的猝灭剂。通过生物素 / 抗生蛋白链菌素连接将模板固定在表面上。图 21 显示,在使用两种固定模板以及额外混合时,反应进行速率显著慢于溶液扩增速率(对 1E+6 拷贝基因组 DNA 扩增 16 分钟)。当单一模板固定在表面上并且另一模板游离于溶液中时,扩增反应加快到 10 分钟检测 1E+6 拷贝的基因组 DNA。在产物信号后约 3.5 分钟观察到来自背景产物的荧光,此与溶液相动力学观察结果相似,但显著减慢。

[0309] 实例 21 :健康实例

[0310] 沙眼衣原体 (Ct) 分析

[0311] 实施本发明方法的分析来检测沙眼衣原体 (Ct) 靶序列的存在。使用用于 Ct P2_2 分析的含有靶序列的合成 DNA 的 2 倍系列稀释物来确定分析检测限。基本上如实例 1 中所述来实施反应,但如此实例中所述进行某些修改。系列稀释物始于 10,000 拷贝靶 DNA,并且稀释至每次反应小于 1 拷贝。在此实验中也包括‘无靶’对照样品。在 96 孔微量滴定板上以 50 微升体积于如下缓冲液中实施反应 :50mM Tris-HCl, pH 8.0,30mM NaCl, 15mM $(NH_4)_2(SO_2)$,15mM Mg_2SO_4,1mM DTT,0.1% 曲拉通 X-100,其含有 0.3mM dNTP、19.2 单位 Bst DNA 聚合酶和 15 单位 Nt.BstNBI 切口酶。以 200nM : 100nM(模板 1 : 模板 2) 的比率添加模板。如下所述实施反应 :在板 1 上,于扩增前室中将 5 微升模板混合物添加至各孔中,并将其密封。在板 2 上,于扩增前室中将 40 微升主混合物添加至各孔中,并将其密封。主混合物由 dH_2O 以及上文所列除模板外的所有分析组份组成。然后将两个板转移至扩增后室中,其中将 5 微升靶添加至板 1 的各孔中(‘无靶’对照孔除外)。然后将两个板转移至预加热至 56℃的热循环器上以在 56℃下实施 2-3 分钟的预培养。然后将板 2 的内容物转移至板 1 中,然后在 56℃下将其培养 5 分钟(扩增步骤)。在此培养后,通过在 80℃下

保持 2 分钟使酶失活来终止反应。随后，将对扩增 Ct P2_2 产物具有特异性的分子信标添加至 300nM 的终浓度并在 56℃下检测荧光。所有样品都重复分析三次，并且用误差棒来显示标准误差。使用两个模板、即模板 1(5'-ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG-3') 和模板 2(5'-ATGCATGCATGAGTCACATTTATACCGCTTA-3') 以 200nM ： 100nM 的最终模板浓度来实施 Ct P2_2 分析。用于荧光检测的分子信标 MB 5.18 含有 5'-FAM 荧光团和 3'-BHQ1 猝灭剂，其具有以下序列 ：5'-ctggcTACCGCTTAACTCCATAAgccag-3'。

[0312] 结果展示于图 22 中，并且表明所述分析可有效检测样品中少于 10 拷贝的靶。图 22B 表明，甚至可检测约 1-2 拷贝，但由于稀释实验，某些孔可能在统计学上不含任何靶 DNA(比较图 22b 中的条棒 1.2a、b 与 c)。

[0313] Ct P2_2 分析的靶序列为 5' AGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAA-3'。可制备临床样品用于如下分析中，所述样品为 (例如) 在子宫颈内拭子或阴道拭子上收集的样品、或在拭子上收集并且随后转移至诸如 M4 或 M5 等病毒运输介质中的样品。将各拭子置于含有 300 微升至 1 毫升皮尔斯溶解 -N-Go PCR 试剂 (目录号 78882) 的 1.5 毫升或 2.0 毫升埃彭道夫管中。在室温下将混合物培养 5-10 分钟，并且不时加以搅拌。然后将一等份经洗脱和溶解的样品直接添加至分析中。对于存于病毒运输介质中的样品来说，可将一等份样品转移至含有相等或较大体积的皮尔斯溶解 -N-Go PCR 试剂的埃彭道夫管中 (样品 ：溶解 -N-Go 比率为 1 ： 1、1 ： 2、1 ： 10、1 ： 20 等) 并且将其在室温下培养 5-10 分钟，并且不时加以搅拌。然后将一等份经洗脱和溶解的样品直接添加至分析中。

[0314] 实例 22 ：食物安全应用

[0315] 单核细胞增生利斯特菌分析

[0316] 为证实本发明方法的分析可有效地特异性检测食物病原体，对单核细胞增生利斯特菌实施分析，所述细菌是对即食食品的食物安全最大的威胁之一。基本上如实例 1 中所述实施分析，但如此实例中所述进行某些修改。将单核细胞增生利斯特菌 EGD-e 株基因组 DNA 与递增量的紧密相关非病原性物种无害利斯特菌 Clip11262 株的基因组 DNA 一起分析。如图 23 中所示，不存在 DNA 的阴性对照反应仅显示背景水平的荧光，并且最高每 50 微升反应物一百万基因组当量的递增量的无害利斯特菌 DNA 显示不使背景荧光显著增强。然而，可通过荧光的显著增强容易地检测到 1,000 基因组当量的单核细胞增生利斯特菌的添加，并且此荧光增强不受无害利斯特菌的存在的影响，甚至当非病原性无害利斯特菌以 1000 倍过量 (即每 50 微升反应物一百万基因组当量) 存在时也是如此。各反应物由以下组成 ：46mM Tris 缓冲液，pH 8.5 ；50mM NaCl ；10mM KCl ；10mM $(NH_4)_2SO_4$ ；5mM $MgCl_2$ ；10mM $MgSO_4$ ；0.5mM 二硫苏糖醇 ；0.1％曲拉通 X-100 ；0.01mM EDTA ；0.3mM 的各种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP ；得自新英格兰生物实验室公司的 19.2 单位 Bst DNA 聚合酶 ；得自新英格兰生物实验室公司的 15 单位 Nt.BstNBI 切口内切核酸酶 ；200nM 第一寡核苷酸 ；和 2 微摩尔的第二寡核苷酸。在 56℃下将寡核苷酸和利斯特菌属 (Listeria) 基因组 DNA 与酶缓冲液混合物分开培养，然后将 5 微升的此混合物添加至 45 微升酶缓冲液混合物中。在 56℃下将反应物培养 10 分钟，然后在 80℃下培养 2 分钟。此后，将 3.2 微升分子信标的 5μM 溶液添加至各反应物中。分子信标的序列对扩增单核细胞增生利斯特菌序列具有特异性，所述分子信标在 5' 和 3' 末端上分别具有荧光团和猝灭剂。在添加分子信标后，在 56℃下将反应物培养 1 分钟，然后实施荧光测量。将各分析条件重复测试两次，并展示平均荧光值。单核细胞

增生利斯特菌分析的靶序列为 5’-AAAGCAAGAGAAAGTTATCGTGTAT-3’。模板序列如下所述：T15’-ATGCATGCATGAGTCACATAAAGCAAGAGAA-3’和 T25’-ATGCATGCATGAGTCACATATACACGATAAC-3’。

[0317] 实例 23：病毒 RNA 实例

[0318] 使用来自病毒阳性临床样品的纯化病毒 RNA 的 10 倍系列稀释物来确定分析的检测限。使用市售病毒 RNA 纯化试剂盒来纯化病毒 RNA。包括‘无靶’阴性对照样品。在 96 孔微量滴定板上以 50 微升体积于以下缓冲液中实施反应：50mM Tris-HCl，pH8.0，30mM NaCl，15mM $(NH_4)_2(SO_2)$，10mM Mg_2SO_4，1mM DTT，0.1％曲拉通 X-100，其含有 0.1mM dNTP、19.2 单位 Bst DNA 聚合酶、7.5 单位 Nt.BstNBI 切口酶和 4 单位 OmniScript 逆转录酶。以 400nM ： 20nM（模板 1 ：模板 2）的比率添加模板。如下所述实施反应：在板 1 上，于扩增前室中将 5 微升模板混合物添加至各孔中，并将其密封。在板 2 上，于扩增前室中将 40 微升主混合物添加至各孔中，并将其密封。主混合物由水以及上文所列除模板外的所有分析组份组成。然后将两个板转移至扩增后室中，其中将 5 微升靶添加至板 1 的各孔中（‘无靶’对照孔除外）。然后将两个板转移至预加热至 56℃的热循环器上以在 56℃下实施 2-3 分钟的预培养。然后将板 2 的内容物转移至板 1 中，然后在 56℃下将其培养 5 分钟（扩增步骤）。在此培养后，通过在 80℃下保持 2 分钟使酶失活来终止反应。随后，将对扩增产物具有特异性的分子信标添加至 300nM 的终浓度并在 56℃下检测荧光。所有样品都重复分析三次，并且用误差棒来显示标准误差。结果展示于图 24 中。

[0319] 使用两个模板（模板 1：长 31 个核苷酸；和模板 2：长 31 个核苷酸）以 400nM ： 20nM 的最终模板浓度来实施病毒 RNA 分析。用于荧光检测的分子信标（MB）含有 5’-FAM 荧光团和 3’-BHQ1 猝灭剂，其序列长 29 个核苷酸。靶序列的长度为 26 个核苷酸。

[0320] 实例 24：农业应用：遗传修饰（GMO）和普通（非 GMO）玉米的作物分析样品制剂中遗传修饰性征的检测：

[0321] 在农业应用中可使用本发明方法的分析来检测遗传修饰有机体（GMO）。使用所述分析来检测在未经修饰玉米 DNA 背景下插入玉米基因组中的 bar 基因的存在。bar 基因可赋予针对广谱除草剂草丁膦的抗性。基本上如实例 1 中所述来实施分析，但如此处所述进行某些修改。将遗传修饰和普通（未经修饰）玉米种子研磨至适宜粗糙水平，并使用标准缓冲液来提取核酸。根据制造商说明书使用尺寸排除管柱来纯化所提取材料。合并经纯化核酸以在普通背景下产生 5％终浓度的 bar 经修饰玉米（例如，合并 5 微升 bar 玉米 DNA 提取物与 95 微升普通玉米 DNA 提取物），或在 100％普通玉米情况下使用未混合形式的纯化核酸。用于检测 bar 基因的寡核苷酸序列列述如下。

[0322] 模板 1：ATGCATGCATGAGTCACATCATCGTCAACCA

[0323] 模板 2：ATGCATGCATGAGTCACATTGTCTCGATGTA

[0324] 模板设计为可产生以下产物：

[0325] 产物 1：CATCGTCAACCACTACATCGAGACA

[0326] 产物 2：TGTCTCGATGTAGTGGTTGACGATG

[0327] 所用分析试剂为：9.6 单位 Bst. 聚合酶（NEB）、15 单位 N.BstNBI 切口酶（NEB）、5 微升 Thermopol I 缓冲液（NEB）、2.5 微升 NEB 缓冲液 3、12mM $MgSO_4$、0.3mM dNTP、2.5％ DMSO（二甲亚砜）、5 微升样品、模板和水。寡核苷酸以 10nM（模板 1）和 100nM（模板 2）的

初始浓度存在。使用水将终体积调节至50微升，并且在56℃下实施10分钟的分析，随后在94℃下培养2分钟以使酶失活，之后在56℃下用特异性分子信标以300nM的终浓度检测。此分子信标的序列为：

[0328] 5’FAM-CCTCGCCGTCAACCACTACATCGAGCGAGG-BHQ 1-3’。

[0329] 结果展示于图25中。

[0330] 实例25：微小RNA(miRNA)的检测

[0331] 来自MDA-MB-231人乳癌细胞的微小RNA的分析样品制剂：

[0332] 已知MDA-MB-231人乳癌细胞(ATCC号HTB-26)可表达升高水平的微小RNA-21(约瑞欧，M.V.(Iorio，M.V.)等人，2005，人类乳癌中的微小RNA基因表达脱调节(MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer)，癌症研究(CancerRes.)，65：7065-7070)。实施对miR-21的分析，其检测成熟微小RNA-21序列：

[0333] 5’UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA 3’

[0334] 所用模板序列为（切口酶序列加下划线）：

[0335] 模板1：ATGCATGCATGAGTCACATTAGCTTATCA

[0336] 模板2：ATGCATGCATGAGTCACATTCAACATCAG

[0337] 模板设计为可产生以下产物：

[0338] 产物1：TAGCTTATCAGACTGATGTTGA

[0339] 产物2：TCAACATCAGTCTGATAAGCTA

[0340] 基本上如实例1中所述来实施分析，但如此处所述进行某些修改。为获得RNA，使用所属领域技术人员熟知的标准方法在补加有10％胎牛血清、葡萄糖和抗生素的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco′ s Modified Eagle′ s Medium)（英杰）中对MDA-MB-231细胞实施繁殖和继代培养，。在达到铺满前，通过用胰蛋白酶处理自板中移出细胞，并且随后在磷酸盐缓冲盐水中洗涤，之后在-80℃下冷冻。随后使细胞解冻，并且一部分用于根据制造商说明书用TRI试剂（分子研究中心(Molecular ResearchCenter)公司）来分离RNA。使用在260nm下的UV吸光度来量化纯化RNA。

[0341] 根据分子研究中心TRI试剂手册，1ng纯化RNA对应于约100个细胞的起始材料。在包括以下试剂的分析中使用不同量的纯化RNA：50mM Tris-HCl(pH 8.0)、30mM$(NH_4)_2SO_4$、30mM Na_2SO_4、1mM DTT、0.1％曲拉通X-100、10mM $MgSO_4$、0.1mMdNTP、19.2单位Bst.聚合酶（新英格兰生物实验室）、7.5单位N.BstNBI切口酶（新英格兰生物实验室）、7.4单位Omniscript逆转录酶（凯杰）、各自为100nM的两种寡核苷酸、样品和水。使用水将终体积调节至50微升，并且在56℃下实施20分钟分钟的分析，之后在94℃下培养2分钟以使酶失活。使用电喷雾离子化质谱来测量产物，并且通过计算曲线下面积来量化产物数量。所述分析的结果展示于图26中。

[0342] 实例26：基因组DNA靶的检测

[0343] 基本上如实例1中所述使用设计为可结合基因组靶的寡核苷酸模板来实施本发明方法的分析。实施稀释实验来确定检测下限。如图27中所示，在50个基因组拷贝下检测值恒定。在所稀释样品含有10个基因组拷贝时可以检测到，然而，在统计学上所述检测值不恒定。

[0344] 实例26(图27)绘示淋病奈瑟球菌(Neisseria gonorrhoeae)分析。所述分析靶

向 pilQ 基因，特别是序列 5’-ACTCTACCAACACGGAACTCAAAAA-3’。用于扩增此靶的模板序列为 :T15’-ATGCATGCATGAGTCACATTTTTTGAGTTCC-3’、和 T25’-ATGCATGCATGAGTCACATACTCTACCAACA-3’。基本上如实例 1 中所述来实施分析，但在此处进行某些修改。简单来说，在 56℃下实施 5 分钟的分析，随后在 80℃下实施 2 分钟的热失活步骤以终止反应。在 56℃下培养 1 分钟后，使用 300 纳摩尔含有 5’ - 荧光团和 3’ - 猝灭剂并且对扩增特定产物具有特异性的分子信标来实施经扩增特定产物的终点检测。分子信标序列为 :5’-CGCATGGAGTTCCGTGTTGGTAGACATGCG-3’。

[0345] 实例 27 :枯草芽孢杆菌分析中生成的特定产物的计算

[0346] 基本上如实例 1 中所述使用设计为可结合枯草芽孢杆菌靶序列的寡核苷酸模板来实施本发明方法的分析，所述靶为 ppsA 基因 :

[0347] 靶序列 (25 聚体)5’-CCAAGCTCAAAAAAGGAATCGTGAA-3’

[0348] T15’-ATGCATGCATGAGTCACATCCAAGCTCAAAA-3’

[0349] T25’-ATGCATGCATGAGTCACATTTCACGATTCCT-3’

[0350] 如图 28 中所示，线性回归显示添加至样品中的参照寡核苷酸的数量与曲线下面积 (AUC) 之间具有极佳关联。使用此方程来确定在将 50 或 500 拷贝基因组 DNA 靶添加至反应中时生成的特定产物量。使反应进行 5 分钟。计算扩增倍数并将其展示于下表中。

[0351] 表 5

[0352] 特定产物 1944 的产率 (x = y-b/m)

[0353]

样品	AUC 信号	产物 (nM)	产物 (50 微升反应物,以皮摩尔计)	扩增倍数
50-1	1394	2851	0.1426	1.72E+09
50-2	1495	3049	0.1525	1.84E+09
50-3	1175	2421	0.1211	1.46E+09
50-4	1072	2219	0.1110	1.34E+09
500-1	1799	3645	0.1823	2.20E+08
500-2	1837	3720	0.1860	2.24E+08
500-3	1472	3004	0.1502	1.81E+08
500-4	1438	2937	0.1469	1.77E+08

[0354] 根据以下来计算:枯草芽孢杆菌基因组=4214814个核苷酸,分子量(g/摩尔)为2781777240。阿伏伽德罗数(Avogadro' s number)(分子/摩尔)=6.02E+23。对于50基因组拷贝来说(以摩尔计),此产生8.30E-23;对于500基因组拷贝来说(以摩尔计),此产生8.30E-22。

[0355] 实例28:不同间隔子长度的效应

[0356] 基本上如实例 1 和 21 中所述使用图 29 和 30 中所示的各种模板来实施一系列沙眼衣原体 (Ct) 分析。图 29 展示反应结果，图 30 提供关于模板设计的更多细节。使用 0 或 100 拷贝靶使反应进行 10 分钟。制备一系列寡核苷酸目标，其中间隔子区域长度（若结合模板，则是指靶序列上介于寡核苷酸模板结合位点之间的核苷酸数）介于 1 至 11 之间。此实验的最适间隔子长度为 1、2、3 或 4。

[0357] 基本上遵循与实例 23 中所述相同的方法使用 2、5、6、7 和 8 的间隔子长度对病毒 RNA 靶实施类似的一组实验。如通过质谱所测定，发现最适特定产物检测使用 2 和 5 的间隔子长度，并且在间隔子长度为 6 或更大并且使反应进行 20 分钟时在此分析中未检测到特定产物。

[0358] 也使用其它靶进行类似实验。对于某些靶（例如 miR-21）来说，当模板设计中不包括间隔子核苷酸时，不论反应中是否存在靶序列都可检测到产物。不论分析中是否存在靶 DNA 都可检测到产物，此表明模板组不需要靶存在也可产生特定产物。在其它实验中，0 个核苷酸的间隔子区域确实产生特定产物。因此，在设计本文所述分析的模板时，应制备不止一组模板，以确定最适于自特定靶产生特定产物的间隔子区域长度。

[0359] 实例 29 :稳定区域的效应

[0360] 基本上如实例 1 和 21 中所述来实施一组沙眼衣原体 (Ct) 分析。制备包括或不包括稳定区域 (5'ATGCATGCAT) 的模板。用 0 或 100 拷贝靶 DNA 使反应进行 10 分钟。使用实时 Sybr 绿荧光检测来实施分析。如图 31 中所示，含有不具有稳定区域的模板的样品不显示扩增。在另一组分析中，使用病毒 RNA，分析中包括 0 或 1000 拷贝靶。含有不具有稳定区域的模板的样品不显示扩增，而具有稳定区域的样品显示快速扩增。

[0361] 实例 30 :Mg^{+2} 浓度的效应

[0362] 基本上如实例 1 和 21 中所述来实施一组沙眼衣原体 (Ct) 分析。所述分析是使用不同浓度的 Mg^{+2} 来实施。如图 32 中所示，对于此组分析来说，当存在 6mM Mg^{+2} 时发现活性完全丧失，并且当存在 9mM Mg^{+2} 时活性显著下降。在 12mM 至 21mM 的 Mg^{+2} 浓度下，所实施分析最佳。

[0363] 实例 31 :其它模板 / 靶组合的实例

[0364] 本发明方法并不限于本发明实施例和实例中所提供的特定模板和靶。可使用其它靶和模板来实施本文所述的等温扩增方法。其它靶和模板的实例包括（但不限于）图 34 中所示者。所属领域技术人员应了解，可设计图中所示靶的其它模板，反应中可使用图中所示靶的相关靶序列，并且图中未包括的靶序列也在本发明方法的范围内。

[0365] 每个专利、专利申请案、出版物和本文所提及的文献都是全文以引用方式并入本文中。上述专利、专利申请案、出版物和文献的引用并不代表认可上述任一文献是相关的先前技术，也不代表对这些出版物或文献中的内容或日期的认可。

[0366] 除非上下文另外明确说明，否则单数形式“一 (a、an)”和“所述”包括复数含义。因此，例如，在提及“一亚组”时包括复数个所述亚组，在提及“一核酸”时包括一或多种核酸和所属领域技术人员已知的核酸等效物，等等。术语“或”对其所指代的一或多个术语并无排他性。例如，在具有结构“A 或 B”的词组中使用时，可表示单独的 A、单独的 B、或 A 和 B 二者。

[0367] 除非另有说明，否则本文所用所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域技术

人员通常所理解相同的含义。尽管在本发明实践或测试中可使用与本文所述类似或等效的任何方法和系统，但现在阐述所述方法、装置和材料。本文所提及的所有出版物都是以引用方式并入本文中，以达成阐述和揭示可结合本发明使用的出版物中所报导的工艺、系统和方法的目的。绝不能由于此揭示内容为先前发明而理解为承认本发明无权先于所述揭示内容。

[0368] 可在不背离本发明基本方面的情况下对上文加以修改。尽管已参照一或多个具体实施例十分详细地阐述了本发明，但所属领域技术人员应了解，可对本申请案中具体揭示的实施例进行改变，并且这些修改和改良都在本发明范围和精神内。可在不存在本文未特别揭示的任何要素的情况下以适宜方式实践本文说明性阐述的本发明。因此，例如，在本文中每一情形中，术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任一者都可用其它两个术语中的任一者来替代。因此，使用已采用的术语和表达作为说明而非限制的术语，不排除所展示和阐述的特征的等效内容或其各部分，并且应了解可在本发明范围内作出各种修改。在以下权利要求书中阐述本发明各实施例。

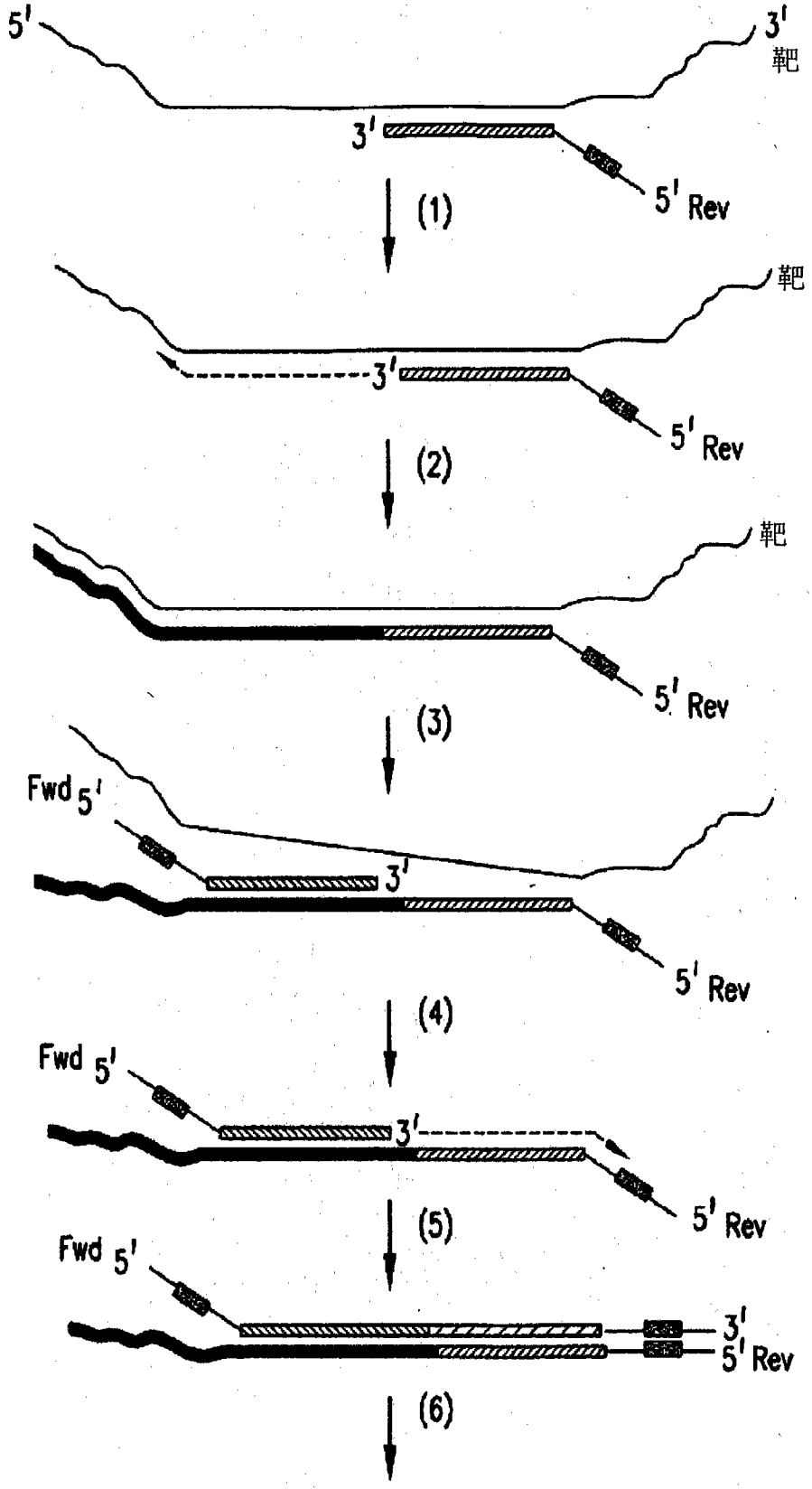

5'
3'
靶
3'
5' Rev
(1)
靶
3'
5' Rev
(2)
靶
5' Rev
(3)
Fwd 5'
3'
5' Rev
(4)
Fwd 5'
3'
5' Rev
(5)
Fwd 5'
3'
5' Rev
(6)

图 1A

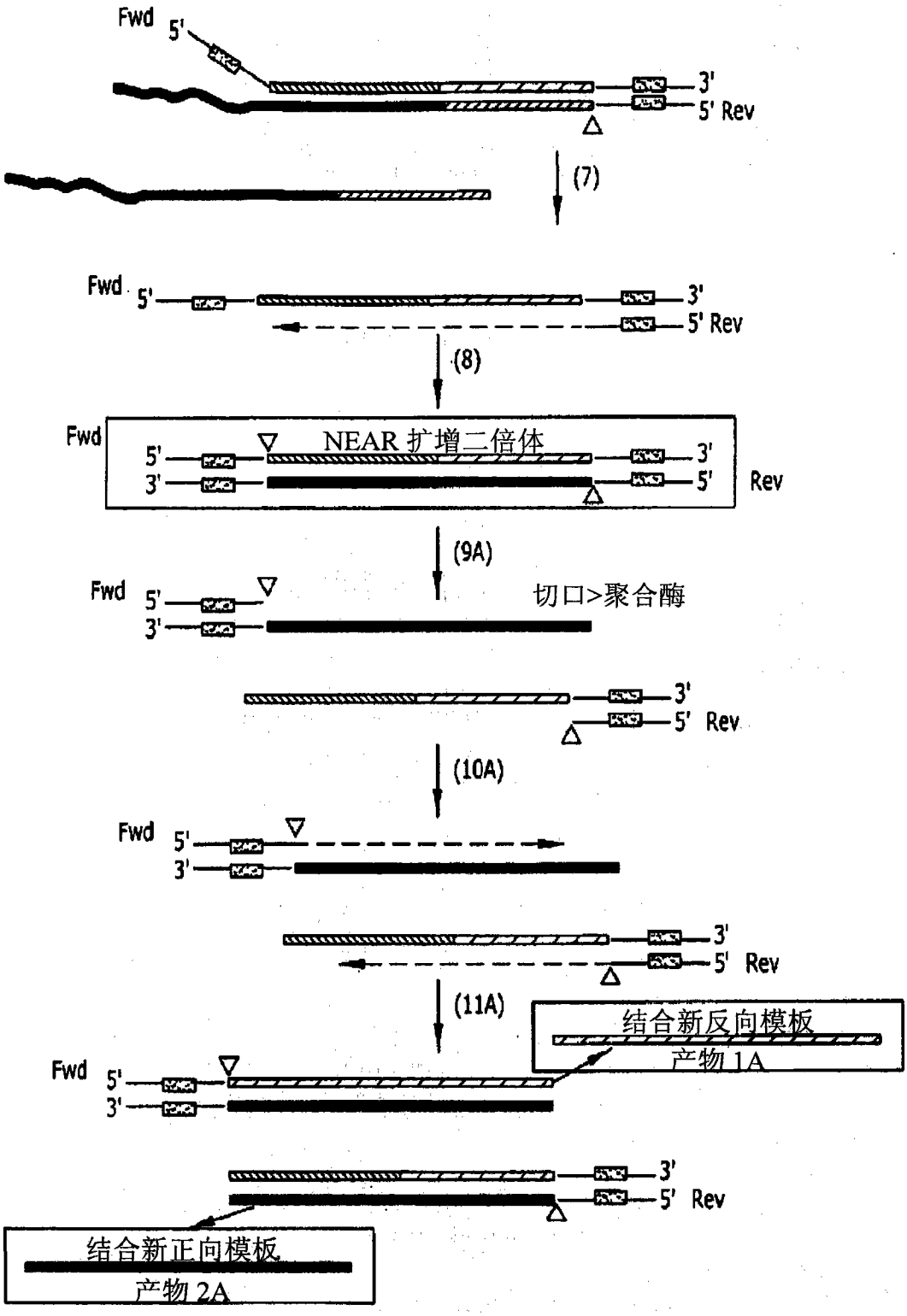

Fwd
5'
3'
5' Rev
(7)
Fwd
5'
3'
5' Rev
(8)
Fwd
NEAR 扩增二倍体
5'
3'
3'
5'
Rev
(9A)
Fwd
5'
3'
切口>聚合酶
3'
5' Rev
(10A)
Fwd
5'
3'
3'
5' Rev
(11A)
结合新反向模板
产物 1A
Fwd
5'
3'
3'
5' Rev
结合新正向模板
产物 2A

图 1B

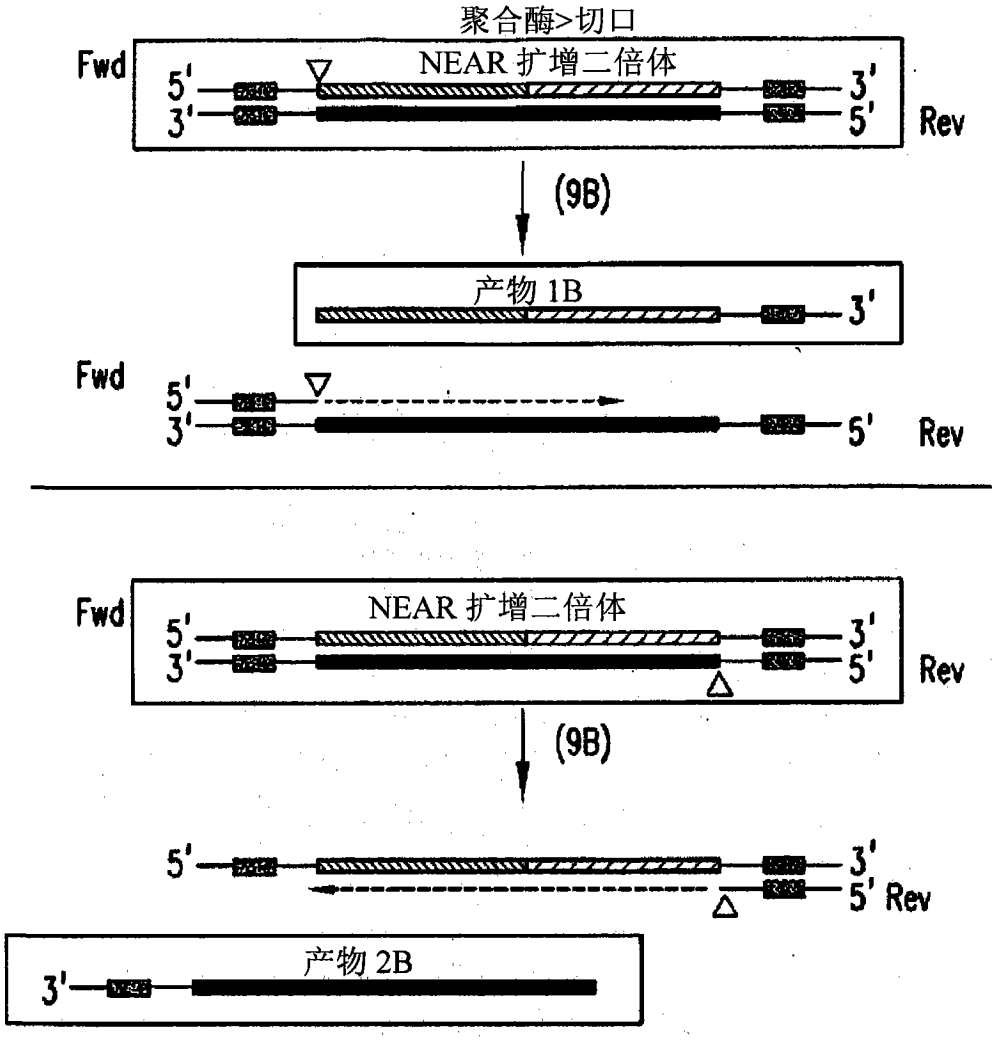

聚合酶>切口
Fwd
NEAR 扩增二倍体
5'
3'
3'
5'
Rev
(9B)
产物 1B
3'
Fwd
5'
3'
5'
Rev
Fwd
NEAR 扩增二倍体
5'
3'
3'
5'
Rev
(9B)
5'
3'
5'
Rev
产物 2B
3'

图 1C

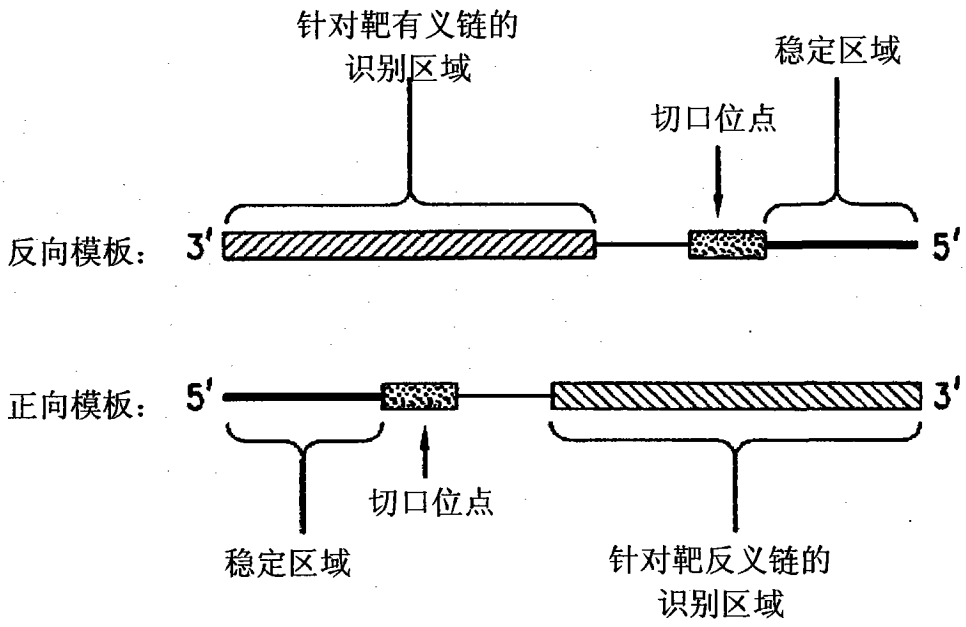

针对靶有义链的
识别区域
稳定区域
切口位点
反向模板：
3′
5′
正向模板：
5′
3′
切口位点
稳定区域
针对靶反义链的
识别区域

图 1D

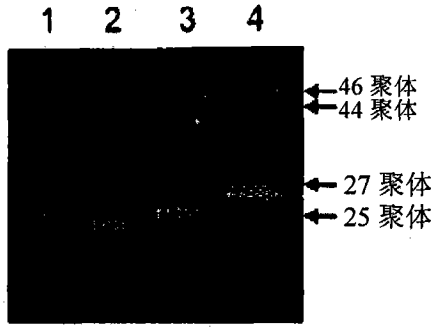

1 2 3 4
46 聚体
44 聚体
27 聚体
25 聚体

图 2

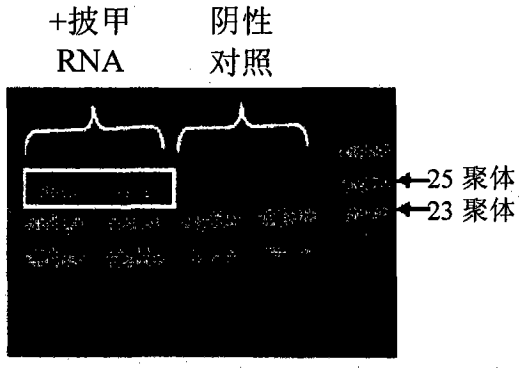

+披甲
RNA
阴性
对照
25 聚体
23 聚体

图 3

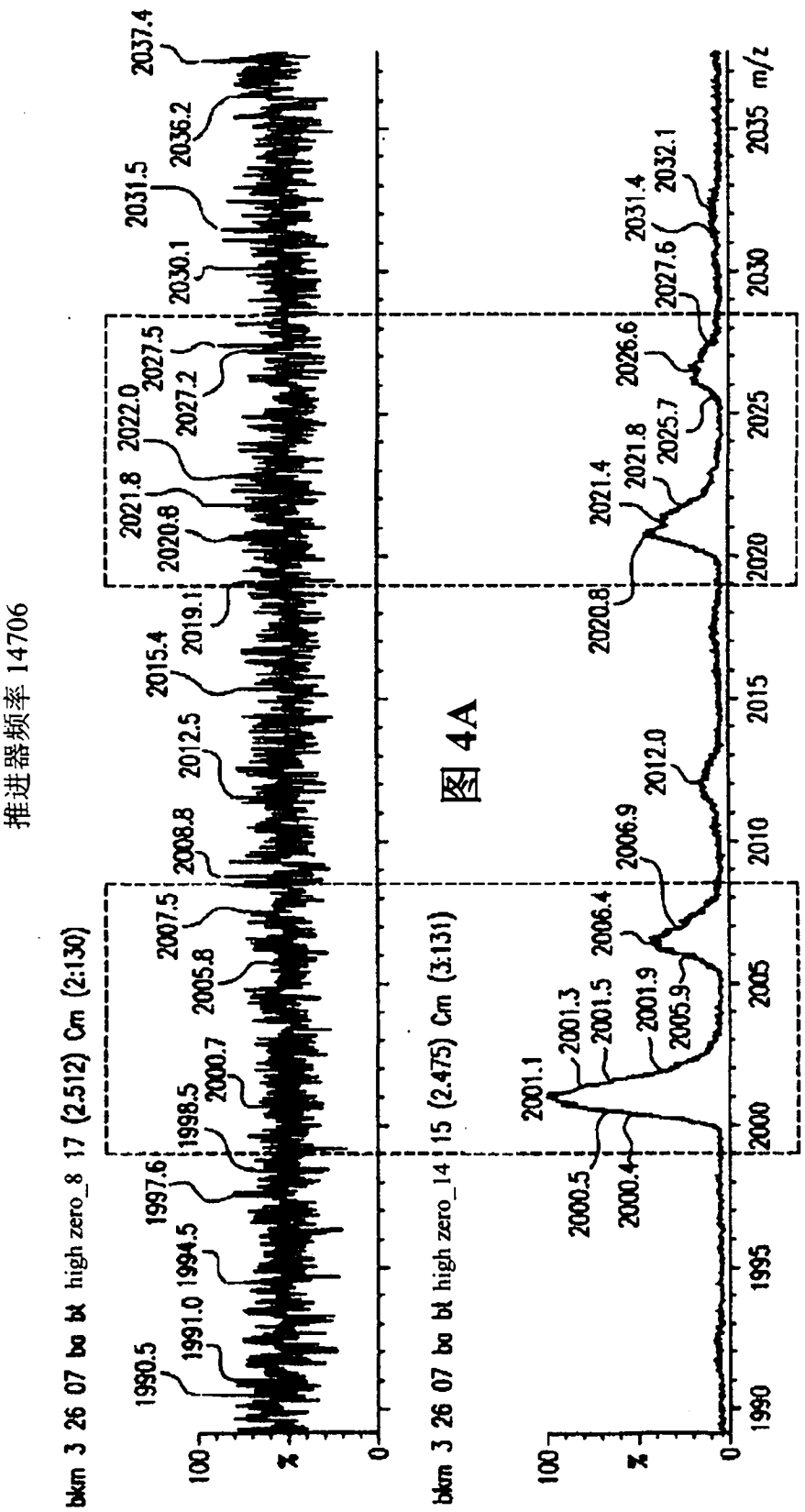
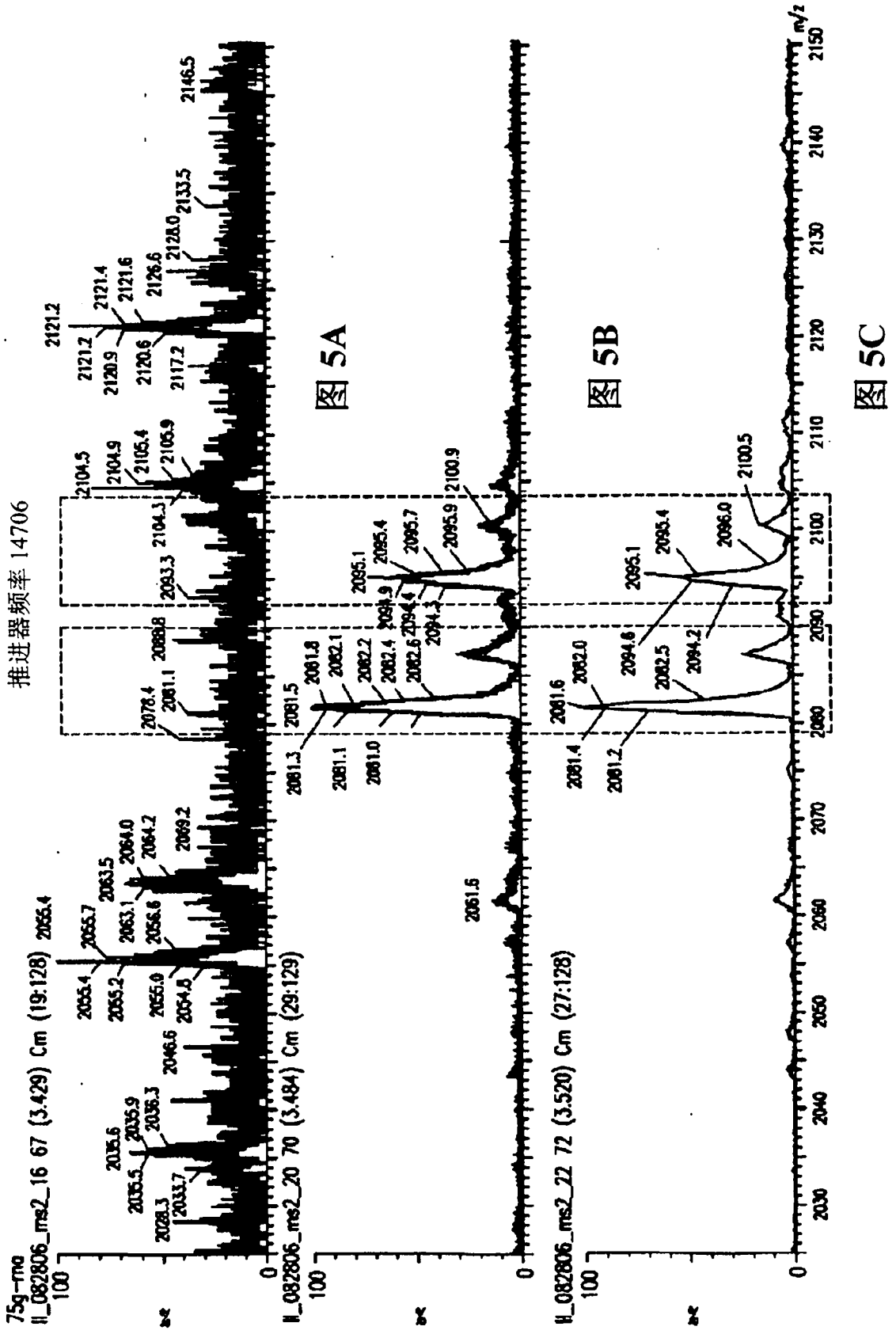

推进器频率 14706
bkm 3 26 07 bo bt high zero_8 17 (2.512) Cm (2:130)
1990.5
1991.0
1994.5
1997.6
1998.5
2000.7
2005.8
2007.5
2008.8
2012.5
2015.4
2019.1
2020.8
2021.8
2022.0
2027.2
2027.5
2030.1
2031.5
2036.2
2037.4
100
%
0
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035 m/z
bkm 3 26 07 bo bt high zero_14 15 (2.475) Cm (3:131)
2000.4
2000.5
2001.1
2001.3
2001.5
2001.9
2005.9
2006.4
2006.9
2012.0
2020.8
2021.4
2021.8
2025.7
2026.6
2027.6
2031.4
2032.1
100
%
0
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035 m/z

图 4A

图 4B


推进器频率 14706
75g-ms
ll_082806_ms2_16 67 (3.429) Cm (19:128)
ll_082806_ms2_20 70 (3.484) Cm (29:129)
ll_082806_ms2_22 72 (3.520) Cm (27:128)
m/z
图 5A
图 5B
图 5C

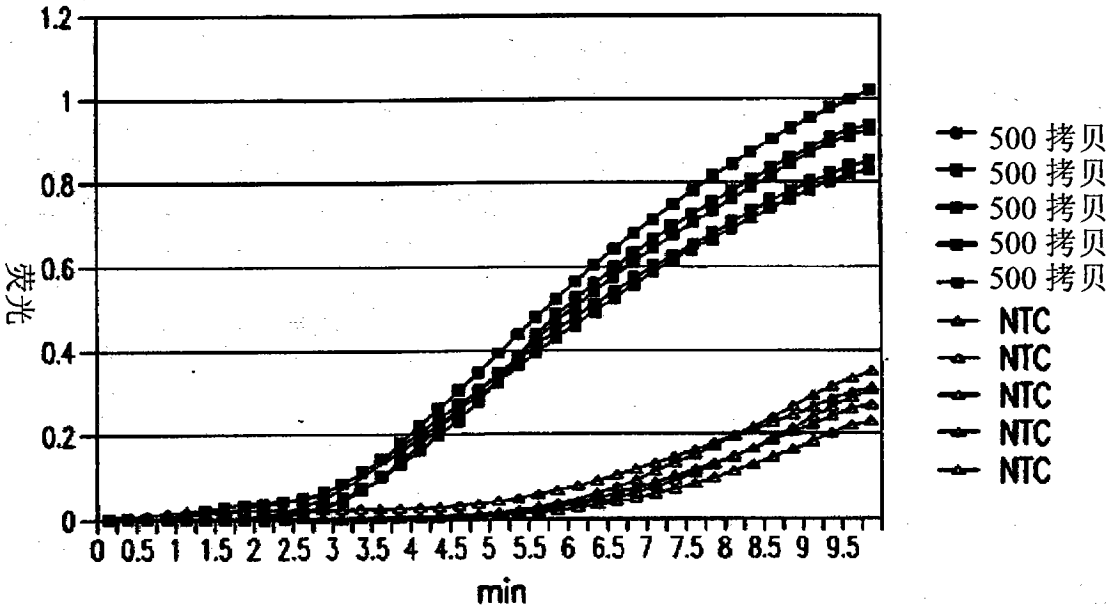

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
荧光
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 9.5
min
500 拷贝
500 拷贝
500 拷贝
500 拷贝
500 拷贝
NTC
NTC
NTC
NTC
NTC

图 6

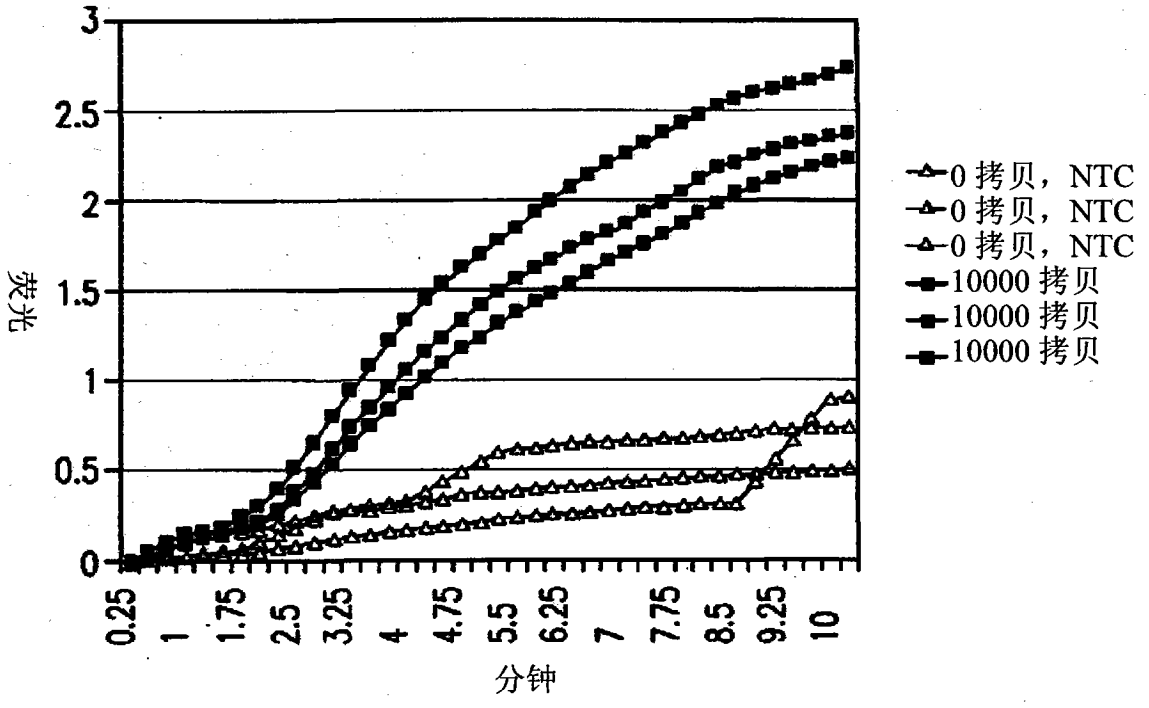

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
荧光
0.25 1 1.75 2.5 3.25 4 4.75 5.5 6.25 7 7.75 8.5 9.25 10
分钟
0 拷贝，NTC
0 拷贝，NTC
0 拷贝，NTC
10000 拷贝
10000 拷贝
10000 拷贝

图 7

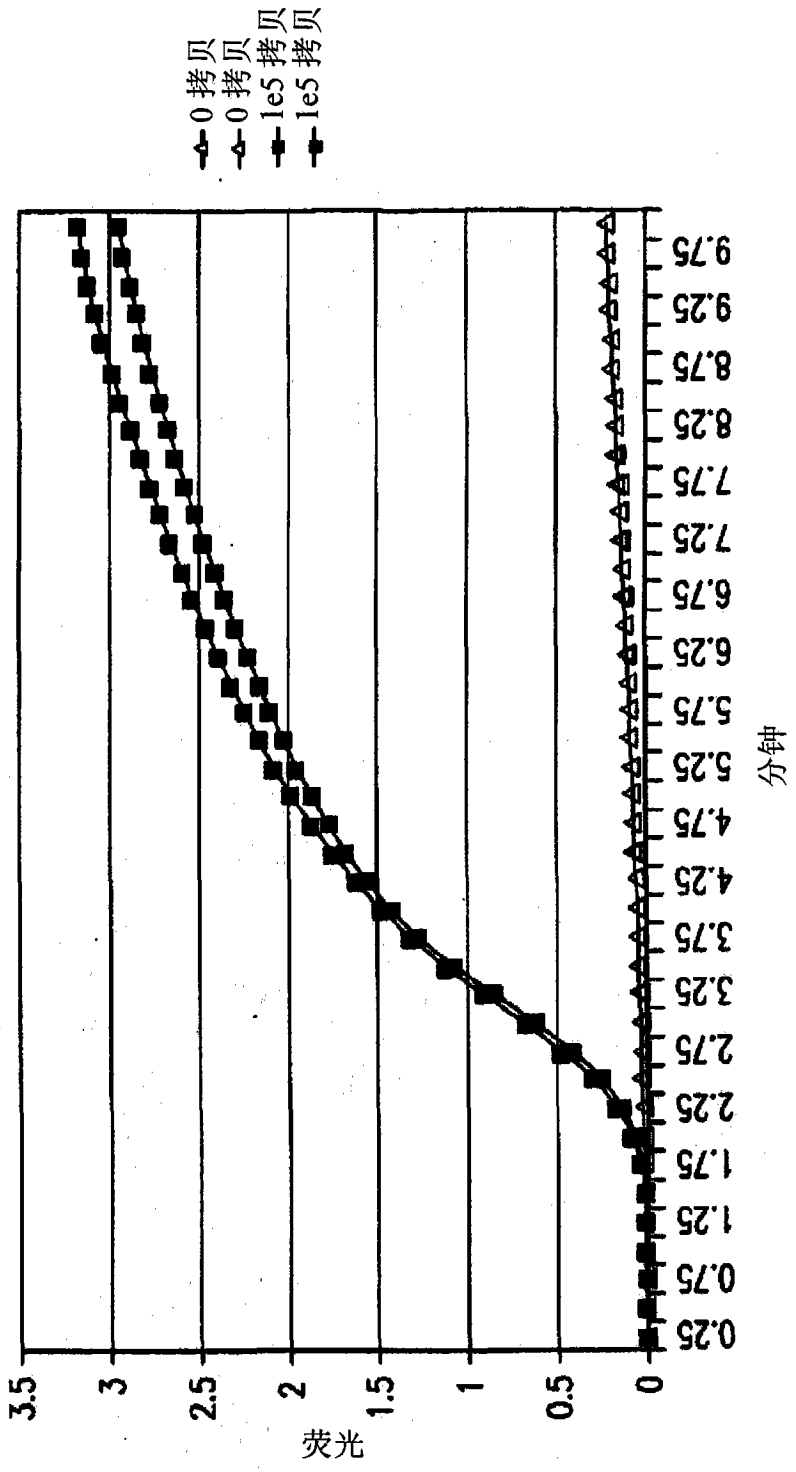

0 拷贝
0 拷贝
1e5 拷贝
1e5 拷贝
荧光
分钟
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.25
0.75
1.25
1.75
2.25
2.75
3.25
3.75
4.25
4.75
5.25
5.75
6.25
6.75
7.25
7.75
8.25
8.75
9.25
9.75

图 8

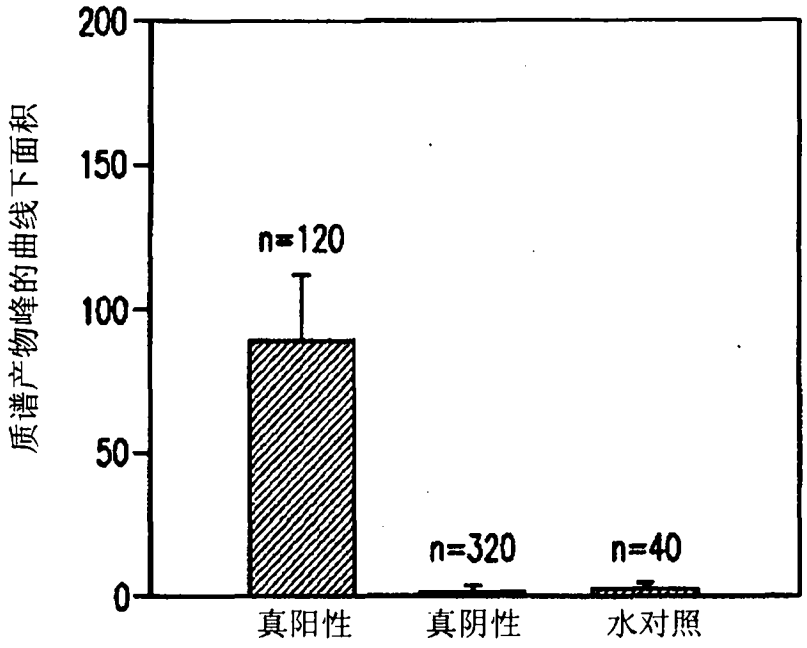


图 9

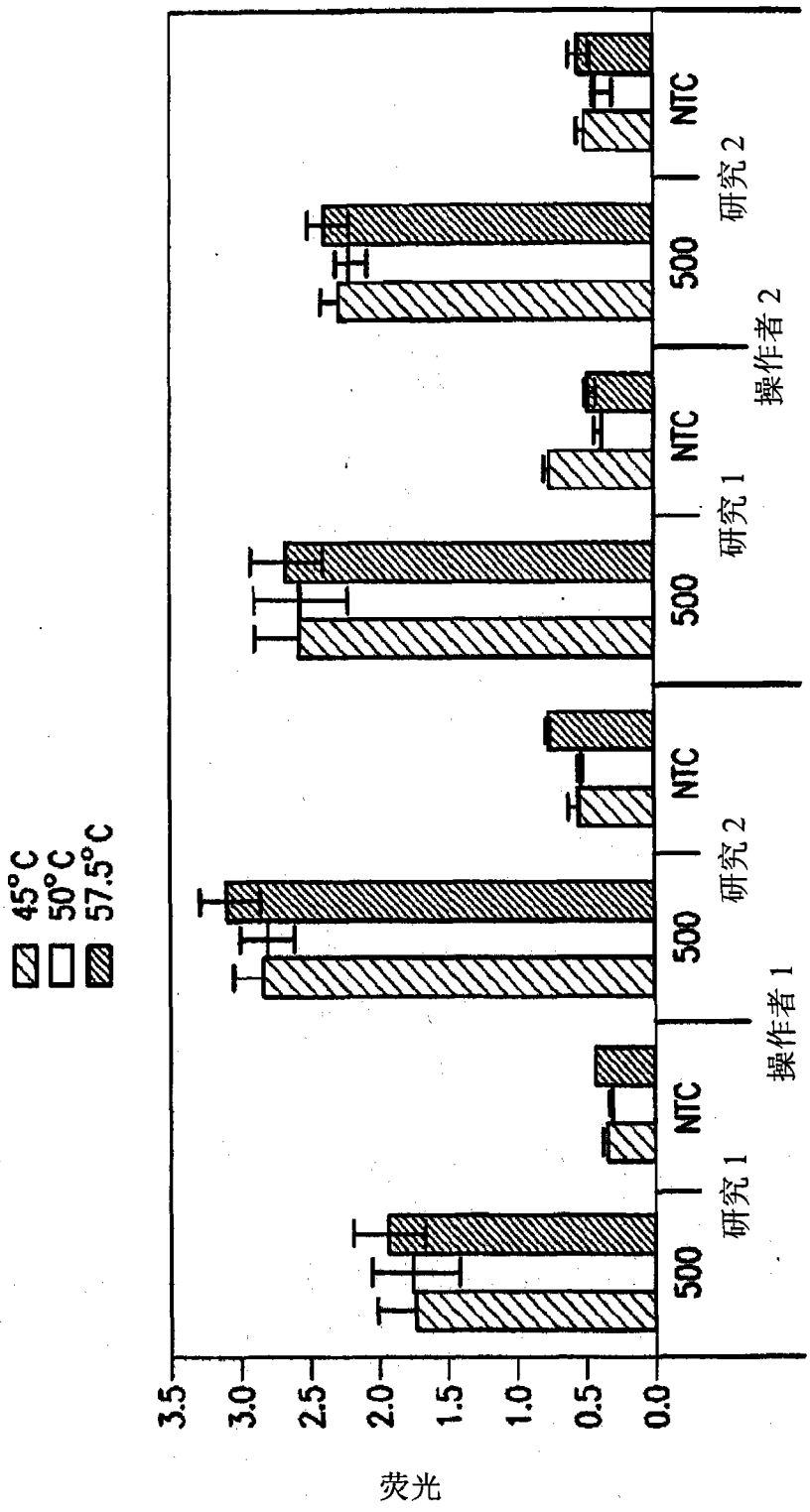


图 10

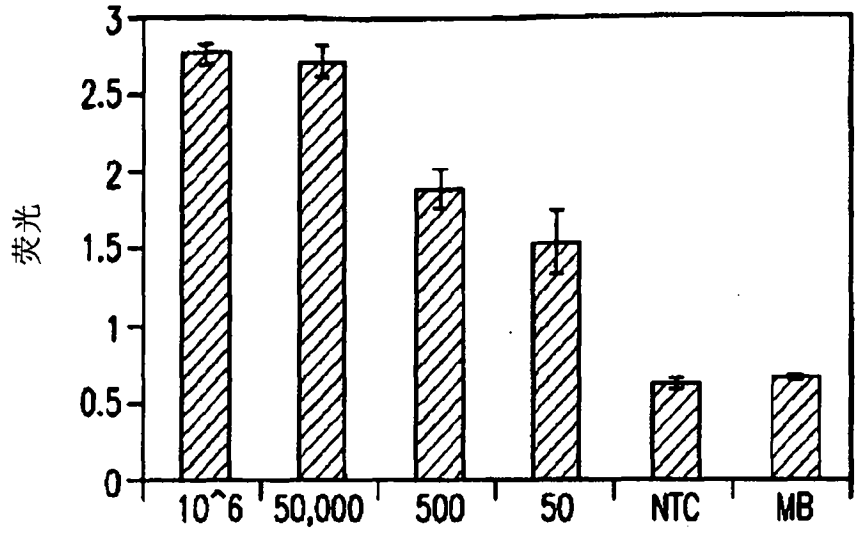

荧光
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10^6
50,000
500
50
NTC
MB

图 11

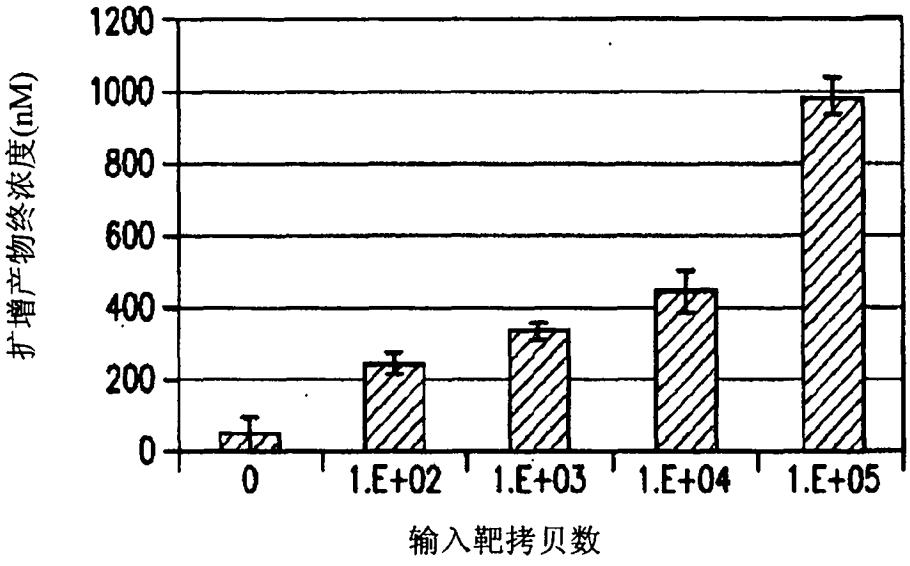

扩增产物终浓度(nM)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
1.E+02
1.E+03
1.E+04
1.E+05
输入靶拷贝数

图 12

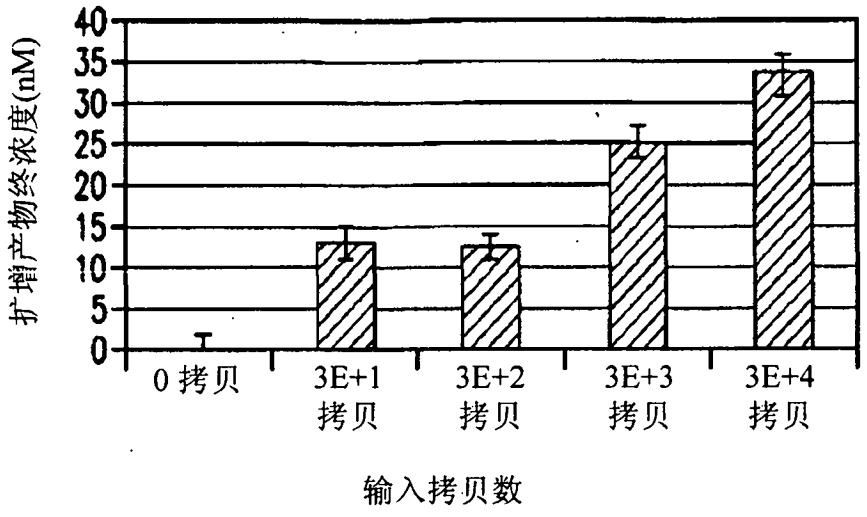

扩增产物终浓度(nM)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0 拷贝
3E+1 拷贝
3E+2 拷贝
3E+3 拷贝
3E+4 拷贝
输入拷贝数

图 13

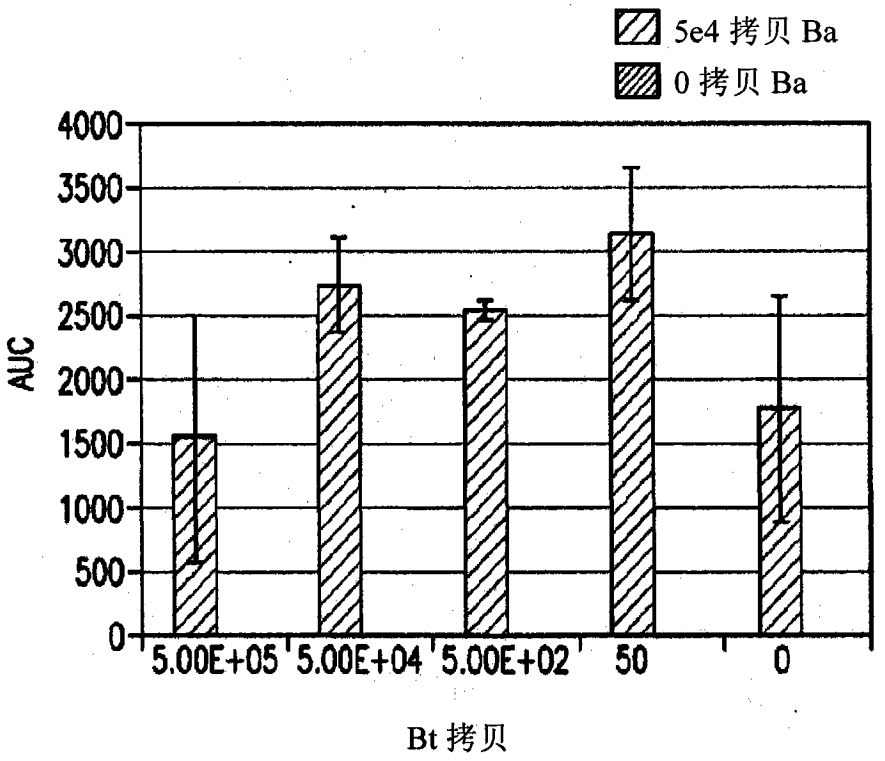

5e4 拷贝 Ba
0 拷贝 Ba
AUC
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5.00E+05
5.00E+04
5.00E+02
50
0
Bt 拷贝

图 14

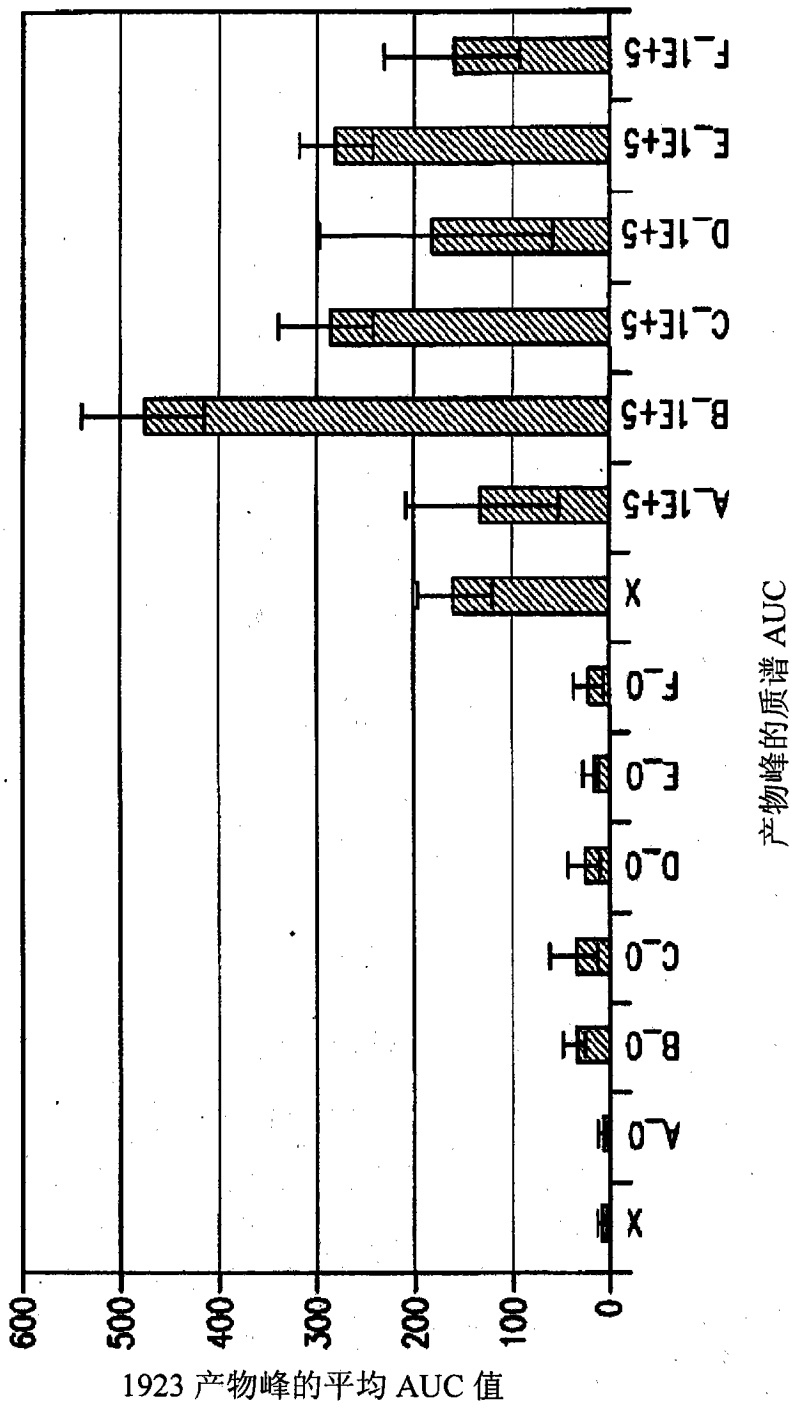

F_1E+5
E_1E+5
D_1E+5
C_1E+5
B_1E+5
A_1E+5
X
F_0
E_0
D_0
C_0
B_0
A_0
X
600
500
400
300
200
100
0
产物峰的质谱 AUC
1923 产物峰的平均 AUC 值

图 15

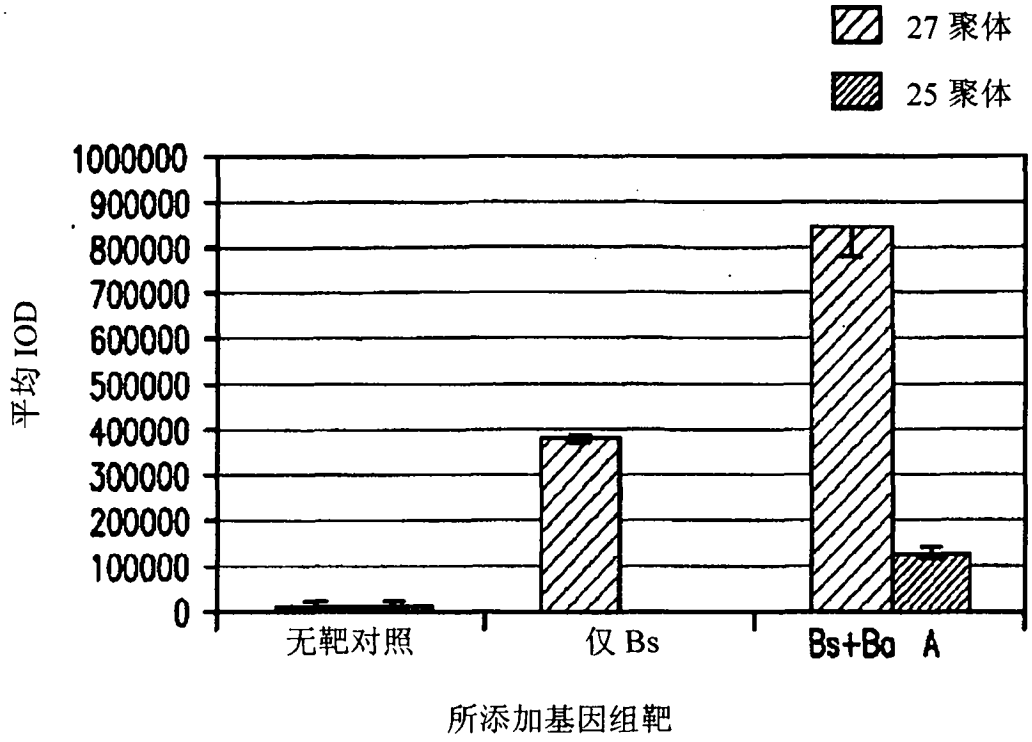

27 聚体
25 聚体
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
平均 IOD
A
无靶对照
仅 Bs
Bs+Bo A
所添加基因组靶

图 16

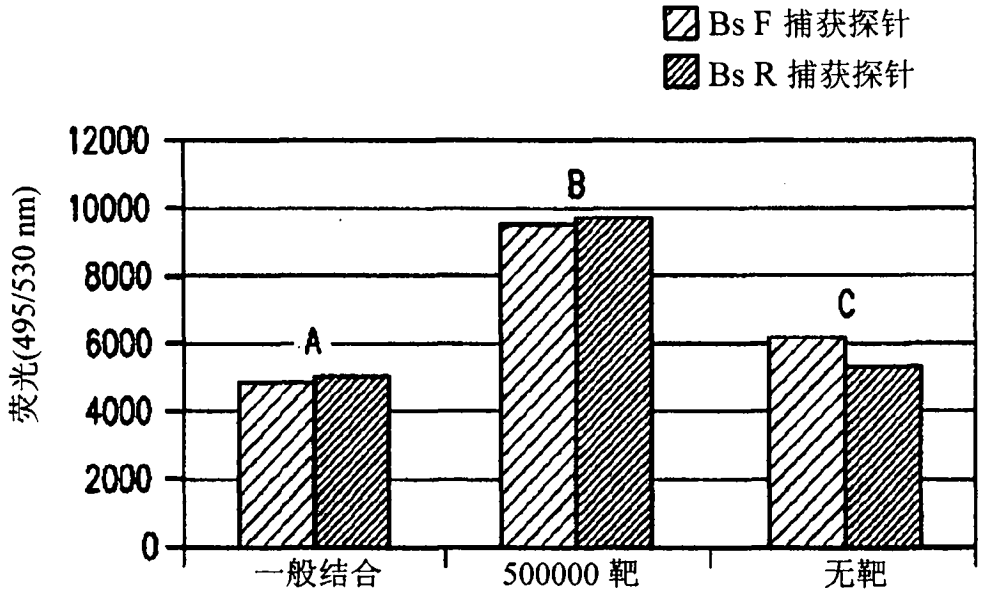

Bs F 捕获探针
Bs R 捕获探针
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
荧光(495/530 nm)
A
B
C
一般结合
500000 靶
无靶

图 20

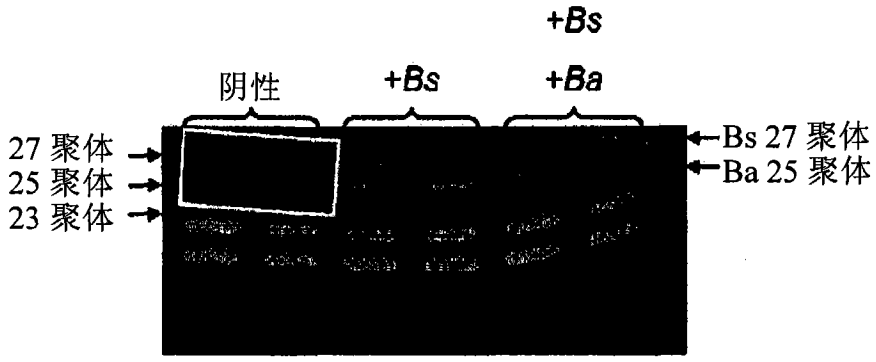

+Bs
阴性
+Bs
+Ba
27 聚体
25 聚体
23 聚体
Bs 27 聚体
Ba 25 聚体

图 17

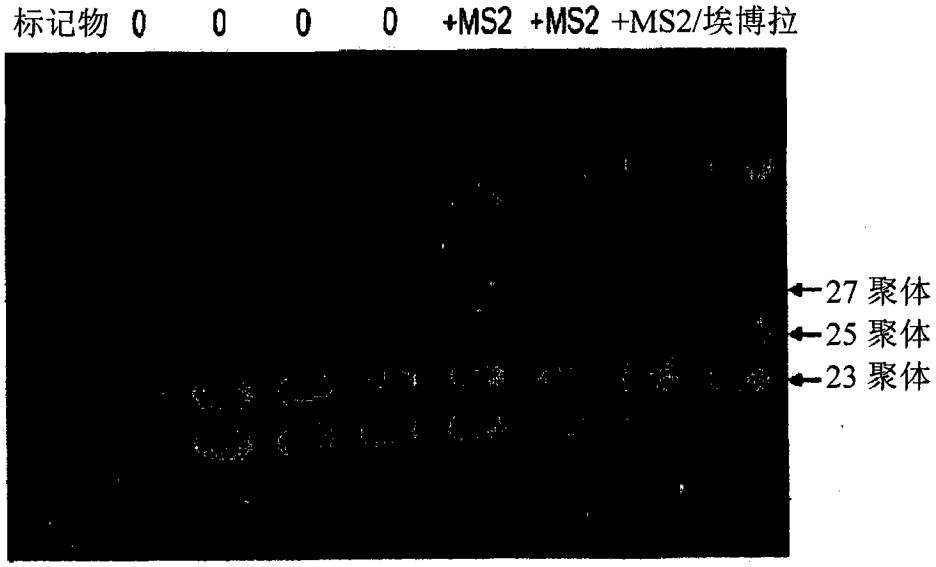

标记物 0 0 0 0 +MS2 +MS2 +MS2/埃博拉
27 聚体
25 聚体
23 聚体

图 18

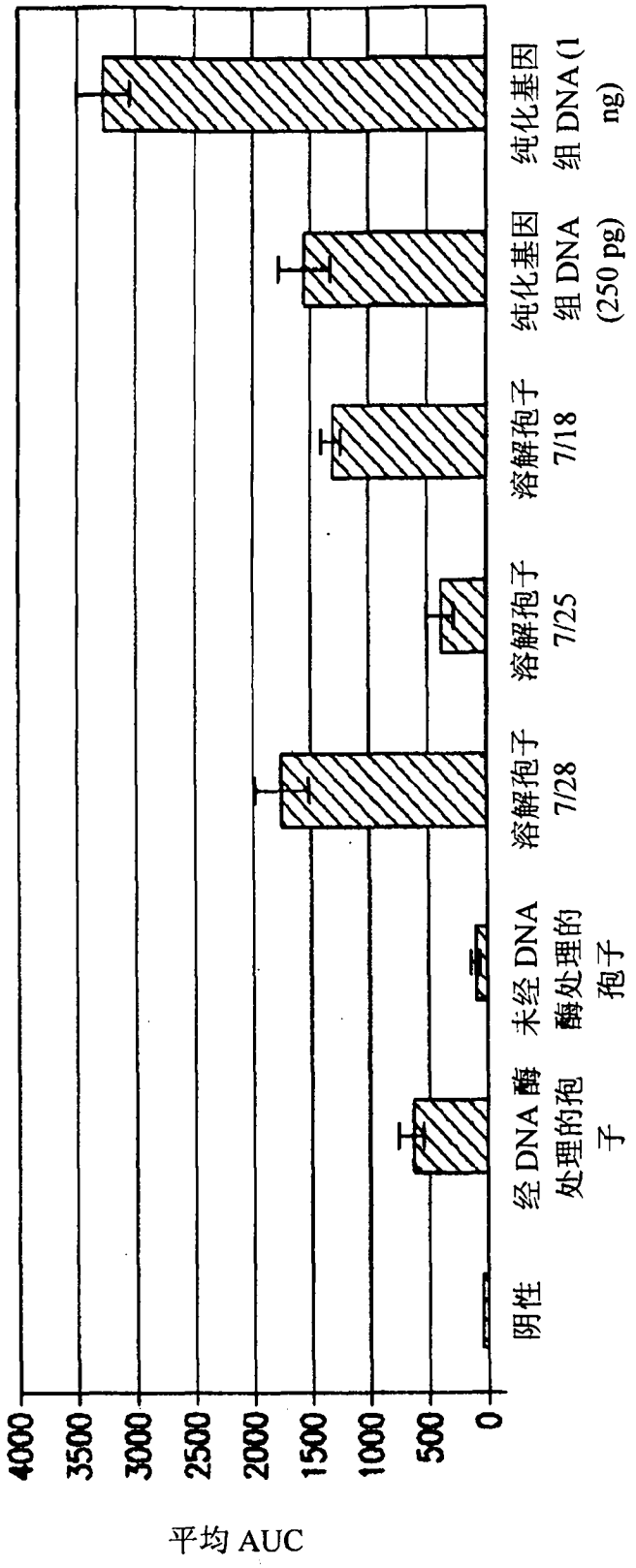

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
平均 AUC
阴性
经 DNA 酶处理的孢子
未经 DNA 酶处理的孢子
溶解孢子 7/28
溶解孢子 7/25
溶解孢子 7/18
纯化基因组 DNA (250 pg)
纯化基因组 DNA (1 ng)

图 19

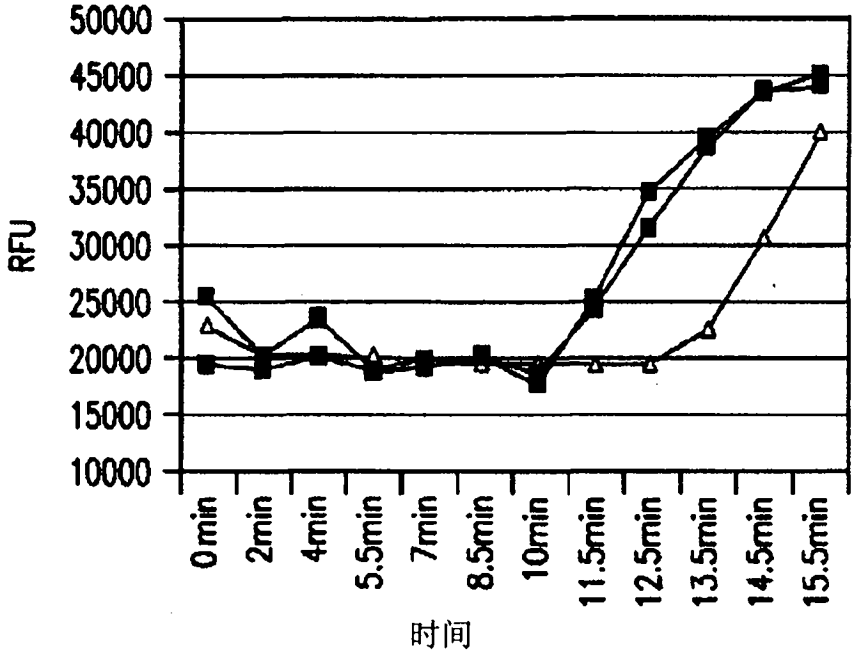

50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
RFU
0min
2min
4min
5.5min
7min
8.5min
10min
11.5min
12.5min
13.5min
14.5min
15.5min
时间

图 21

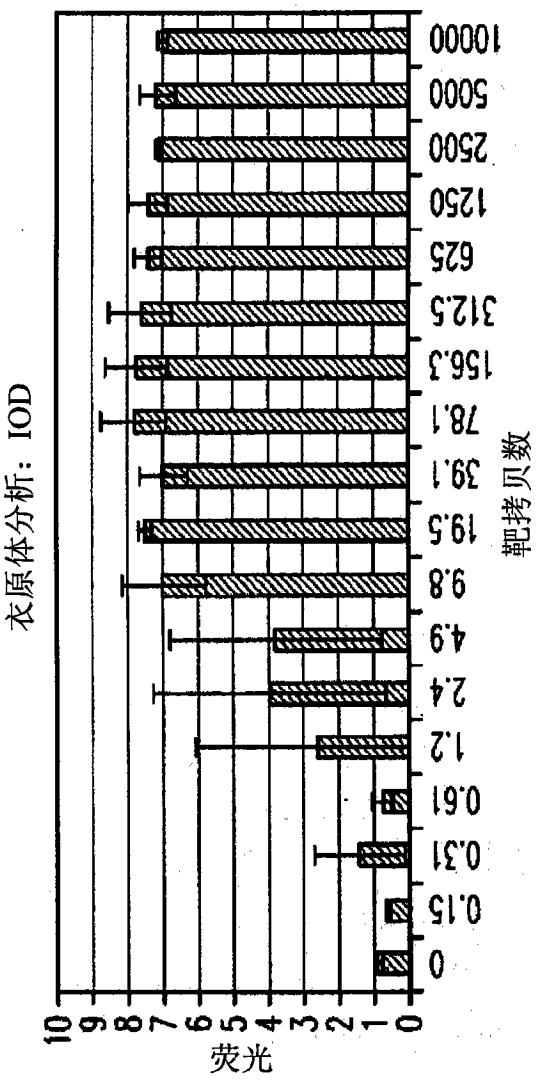

衣原体分析：IOD
荧光
靶拷贝数
10000
5000
2500
1250
625
312.5
156.3
78.1
39.1
19.5
9.8
4.9
2.4
1.2
0.61
0.31
0.15
0

图 22A

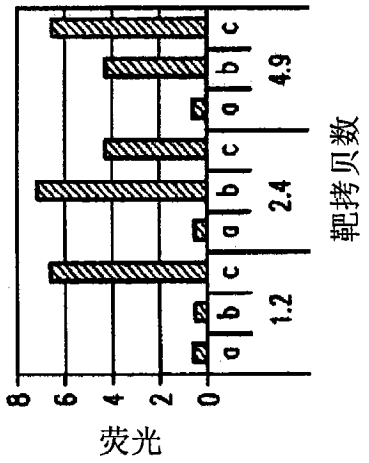

荧光
靶拷贝数
1.2
2.4
4.9
a
b
c

图 22B

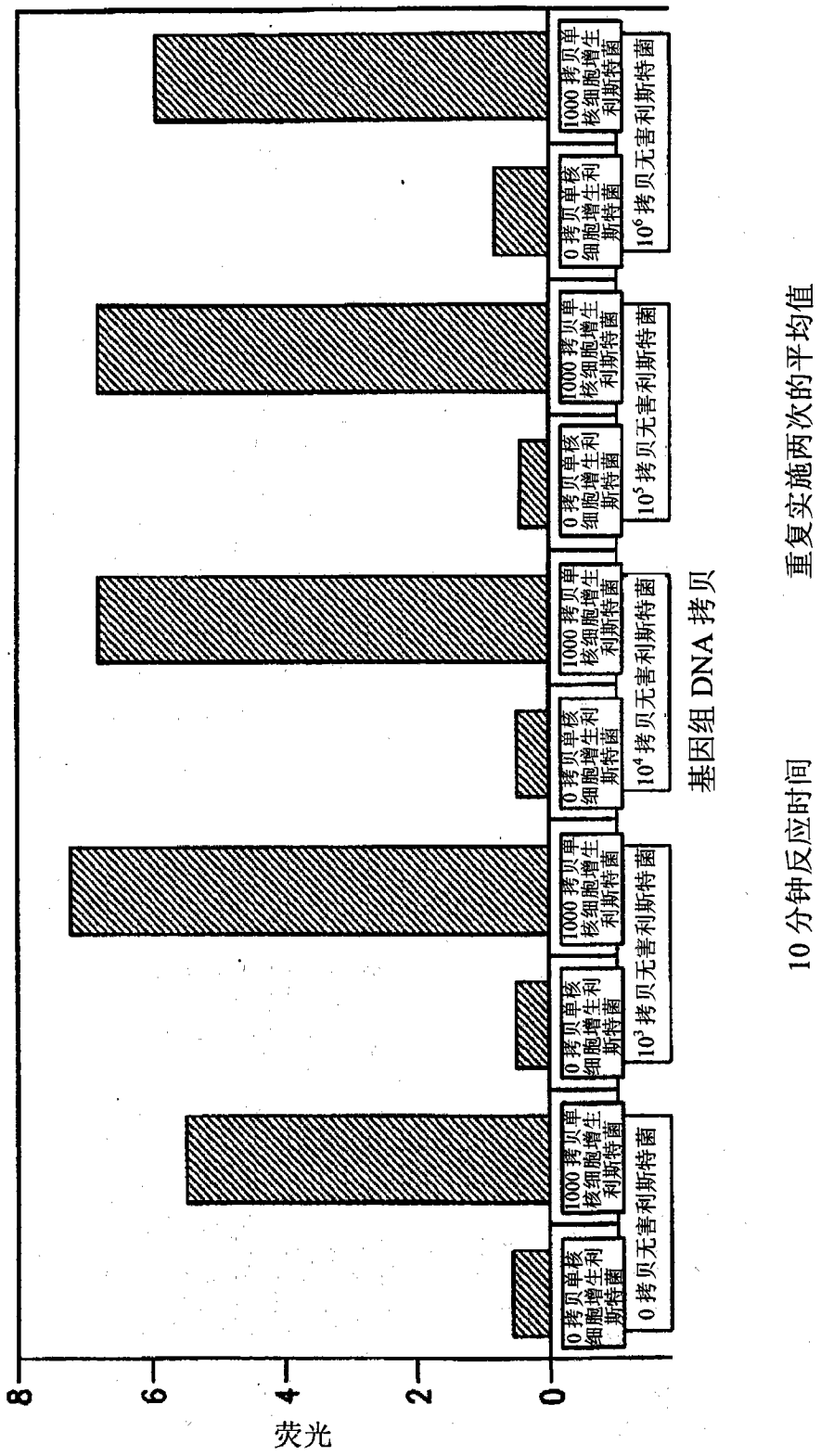

单核细胞增生利斯特菌(Listeria monocytogenes)与无害利斯特菌(L. innocua)的区分
荧光
8
6
4
2
0
0 拷贝单核细胞增生利斯特菌
1000 拷贝单核细胞增生利斯特菌
0 拷贝无害利斯特菌
0 拷贝单核细胞增生利斯特菌
1000 拷贝单核细胞增生利斯特菌
10^3 拷贝无害利斯特菌
0 拷贝单核细胞增生利斯特菌
1000 拷贝单核细胞增生利斯特菌
10^4 拷贝无害利斯特菌
0 拷贝单核细胞增生利斯特菌
1000 拷贝单核细胞增生利斯特菌
10^5 拷贝无害利斯特菌
0 拷贝单核细胞增生利斯特菌
1000 拷贝单核细胞增生利斯特菌
10^6 拷贝无害利斯特菌
基因组 DNA 拷贝
10 分钟反应时间
重复实施两次的平均值

图 23

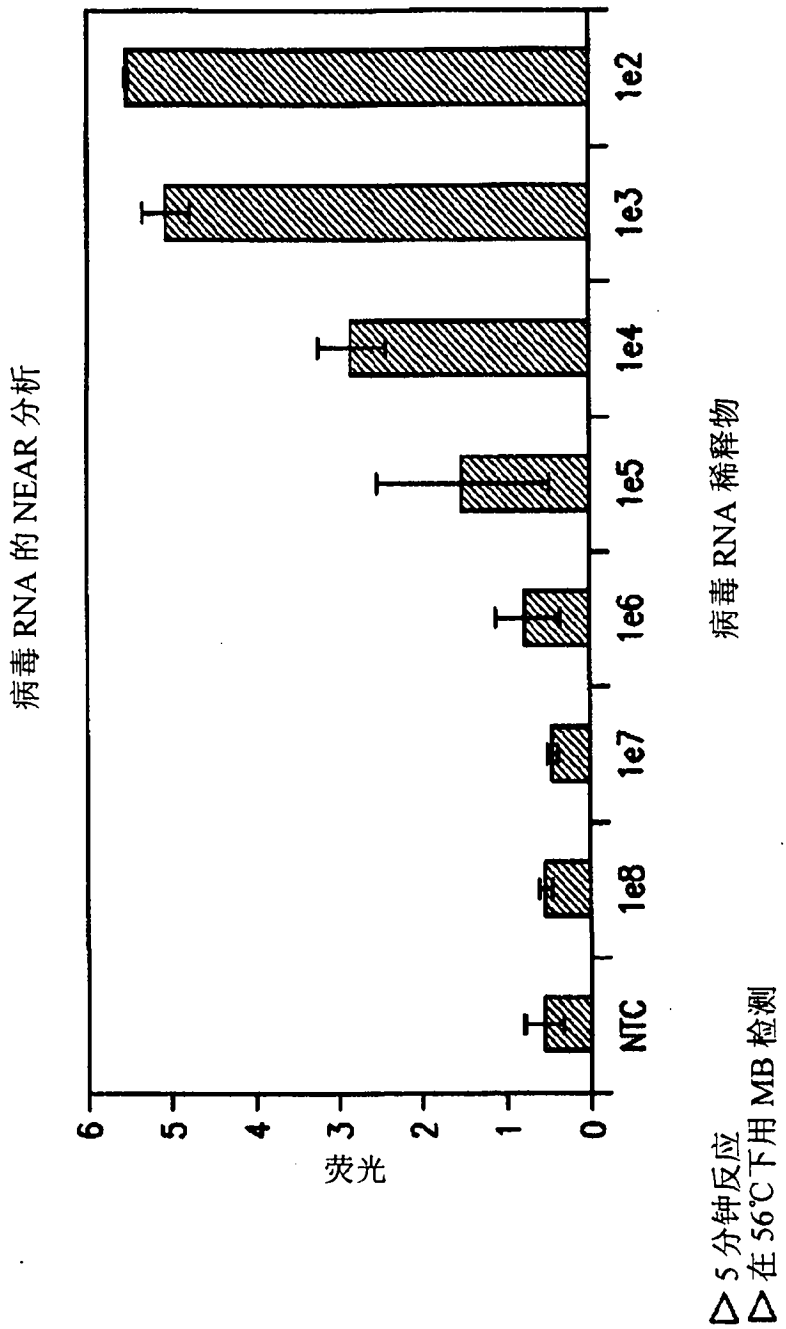

病毒 RNA 的 NEAR 分析
荧光
0
1
2
3
4
5
6
NTC
1e8
1e7
1e6
1e5
1e4
1e3
1e2
病毒 RNA 稀释物
Δ 5 分钟反应
Δ 在 56℃下用 MB 检测

图 24

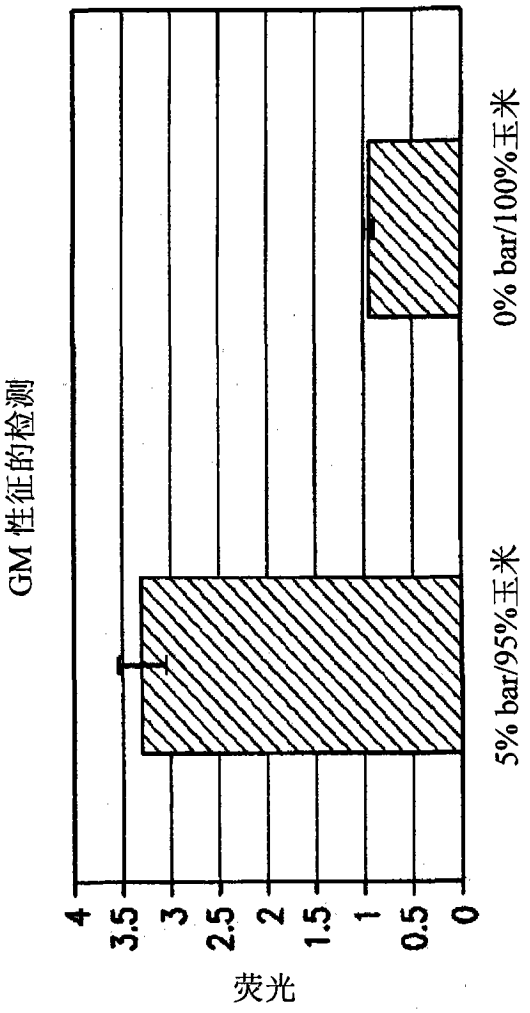

GM 性征的检测
0% bar/100%玉米
5% bar/95%玉米
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
荧光

图 25

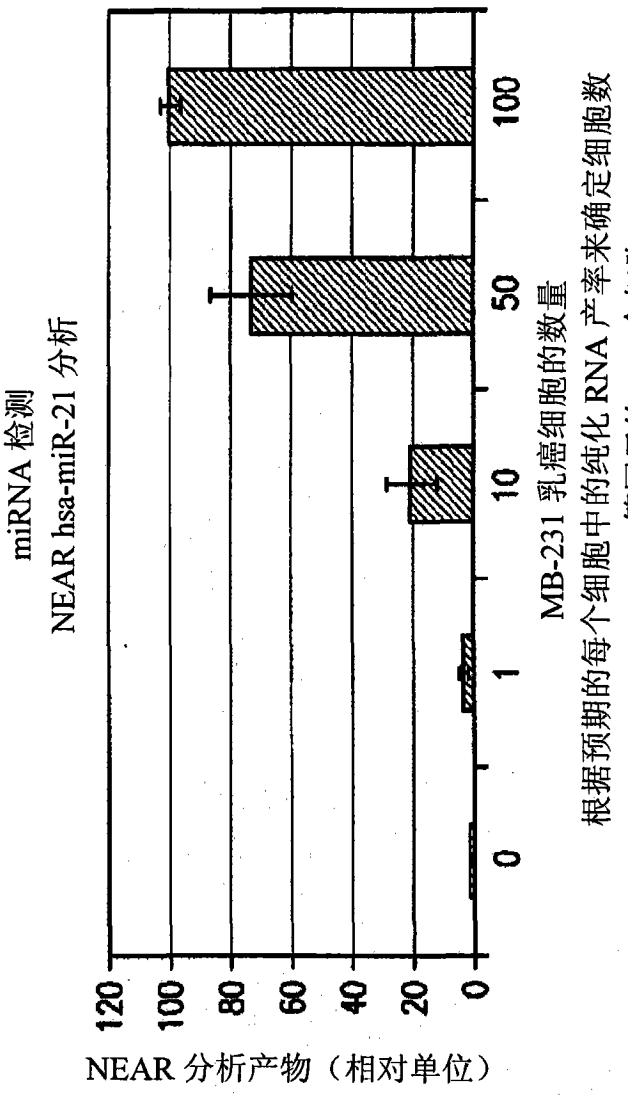

miRNA 检测
NEAR hsa-miR-21 分析
120
100
80
60
40
20
0
NEAR 分析产物（相对单位）
0
1
10
50
100
MB-231 乳癌细胞的数量
根据预期的每个细胞中的纯化 RNA 产率来确定细胞数
1 ng RNA 等同于约 100 个细胞

图 26

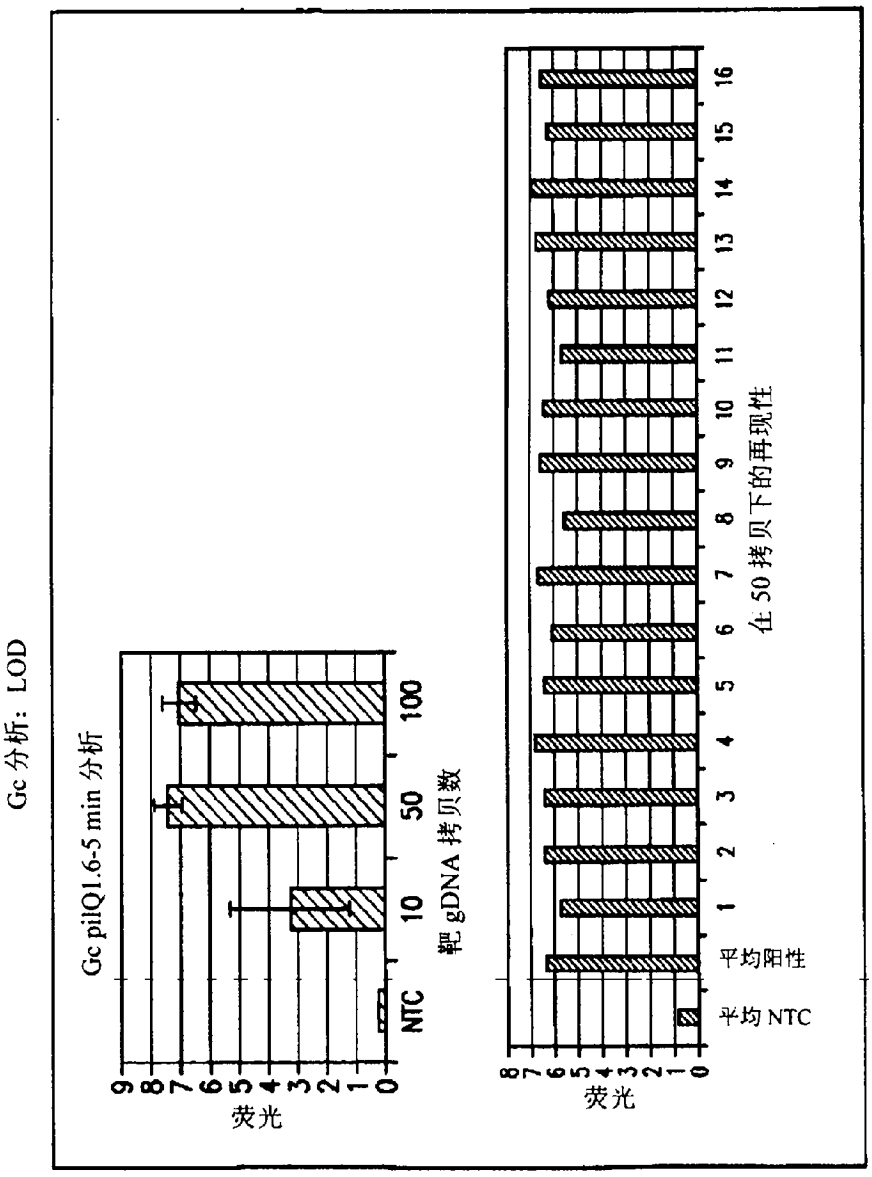

Gc 分析：LOD
Gc pilQ1.6-5 min 分析
荧光
NTC
10
50
100
靶 gDNA 拷贝数
在 50 拷贝下的再现性
平均阳性
平均 NTC
荧光

图 27

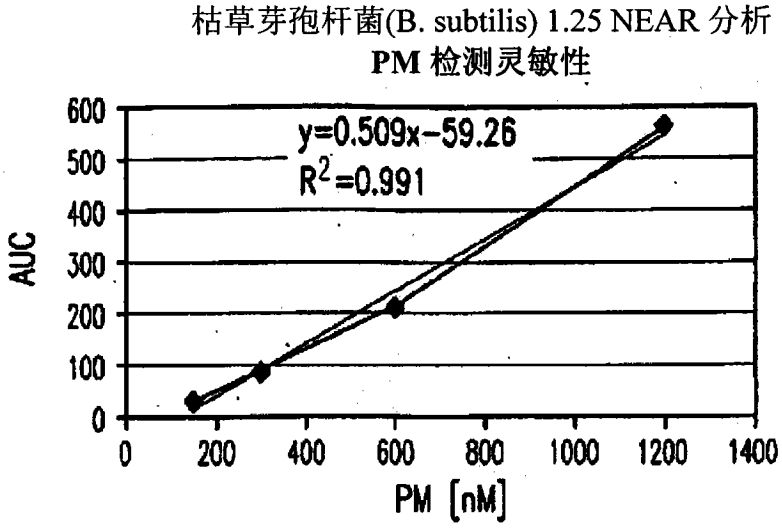

枯草芽孢杆菌(B. subtilis) 1.25 NEAR 分析
PM 检测灵敏性
y=0.509x-59.26
R2=0.991
AUC
PM [nM]
0
100
200
300
400
500
600
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

图 28A

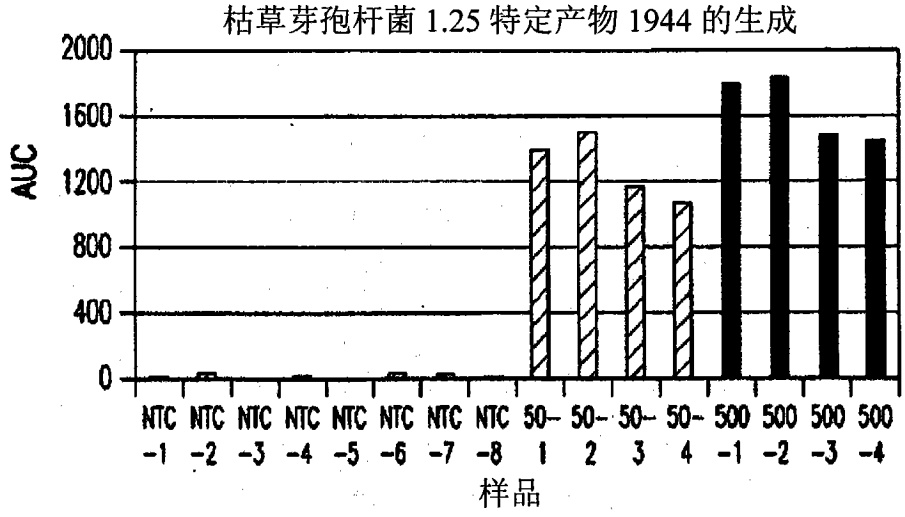

枯草芽孢杆菌 1.25 特定产物 1944 的生成
AUC
样品
0
400
800
1200
1600
2000
NTC -1
NTC -2
NTC -3
NTC -4
NTC -5
NTC -6
NTC -7
NTC -8
50-1
50-2
50-3
50-4
500-1
500-2
500-3
500-4

图 28B

特定产物 1944 的产率(x=y-b/m)		
样品	AUC 信号	产物[nM]
50-1	1394	2851
50-2	1495	3049
50-3	1175	2421
50-4	1072	2219
500-1	1799	3645
500-2	1837	3720
500-3	1472	3004
500-4	1438	2937

图 28C

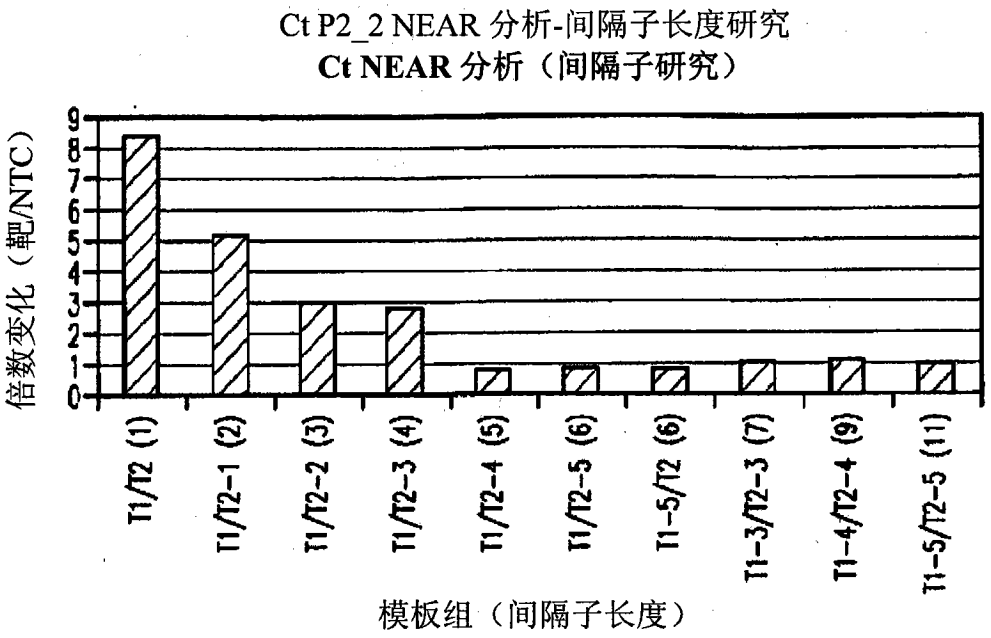


图 29A

模板 1	12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG
模板 1	-1 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATgAGGCTTATGGA
模板 1	-2 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATagAGGCTTATGG
模板 1	-3 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATtagAGGCTTATG
模板 1	-4 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATttagAGGCTTAT
模板 1	-5 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATcttagAGGCTTA
模板 2	12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATTTATACCGCTTA
模板 2	-1 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATtTTATACCGCTT
模板 2	-2 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATttTTATACCGCT
模板 2	-3 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATgttTTATACCGC
模板 2	-4 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATtgttTTATACCG
模板 2	-5 12 聚体	ATGCATGCATGAGTCACATatgttTTATACC

图 29B

Ct NEAR 分析-分析间隔子长度效应的模板设计

序列 ID	序列取向	序列
T2-5	3'/5'	CCATATTtlgtaTACACTGAGTACGTACGTA
T2-4	3'/5'	GCCATATTtlgTACACTGAGTACGTACGTA
T2-3	3'/5'	CGCCATTtlgTACACTGAGTACGTACGTA
T2-2	3'/5'	TCGCCATATTtlTACACTGAGTACGTACGTA
T2-1	3'/5'	TTCGCCATATTtlTACACTGAGTACGTACGTA
T2	3'/5'	ATTCGCCATATTTACACTGAGTACGTACGTA
靶有义链	5'/3'	cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat
靶反义链	3'/5'	gaatcTCCGAATACCTCAATTCGCCATATTttgta
T1	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATAGGCTTATGGAG
T1-1	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATgAGGCTTATGGA
T1-2	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATagAGGCTTATGG
T1-3	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATtagAGGCTTATG
T1-4	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATttagAGGCTTAT
T1-5	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATcttagAGGCTTA

实例-11 聚体间隔子

T2-5	3'/5'	CCATATTtlgtaTACACTGAGTACGTACGTA
靶有义链	5'/3'	cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat
靶反义链	3'/5'	gaatcTCCGAATACCTCAATTCGCCATATTttgta
T1-5	5'/3'	ATGCATGCATGAGTCACATcttagAGGCTTA
产物（35 聚体）	5'/3'	cttagAGGCTTATGGAGTTAAGCGGTATAAaacat

图 30

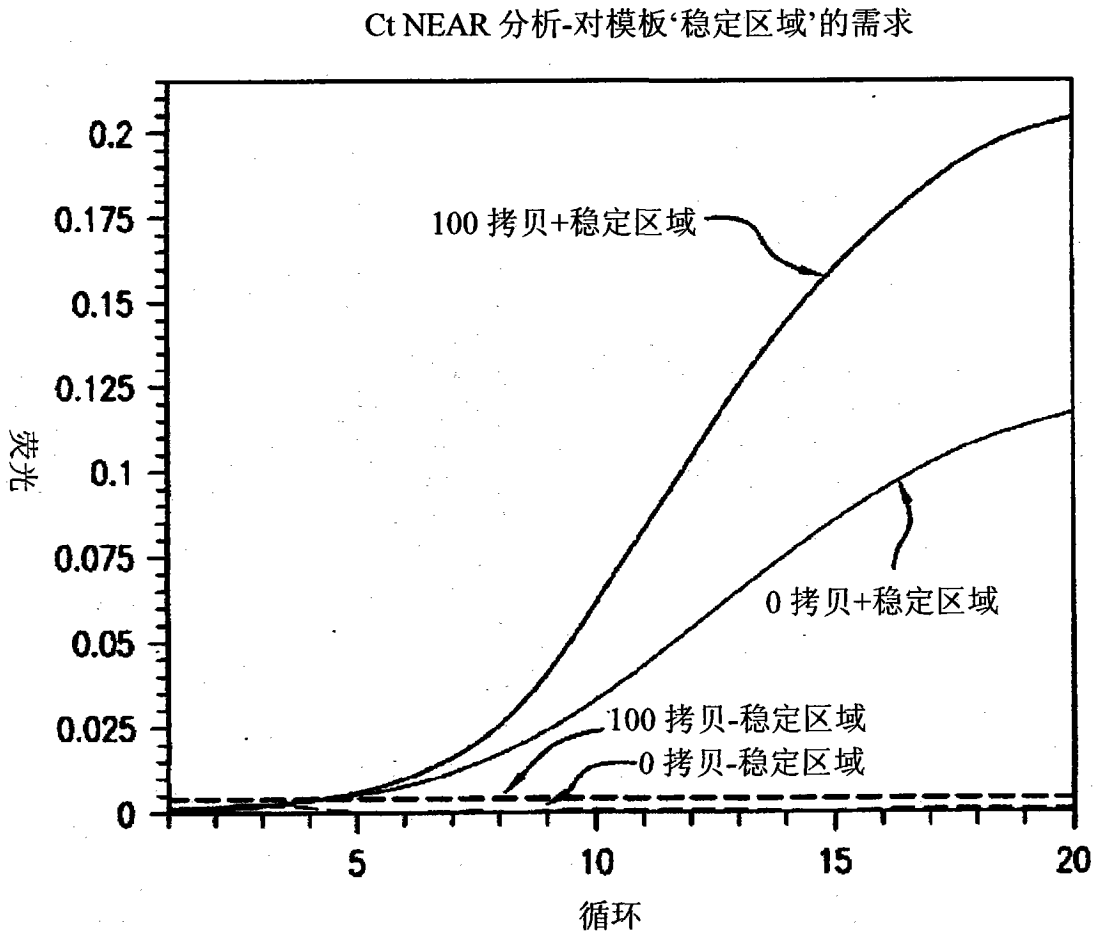

Ct NEAR 分析-对模板'稳定区域'的需求
0.2
0.175
0.15
0.125
0.1
0.075
0.05
0.025
0
荧光
100 拷贝+稳定区域
0 拷贝+稳定区域
100 拷贝-稳定区域
0 拷贝-稳定区域
5
10
15
20
循环

图 31A

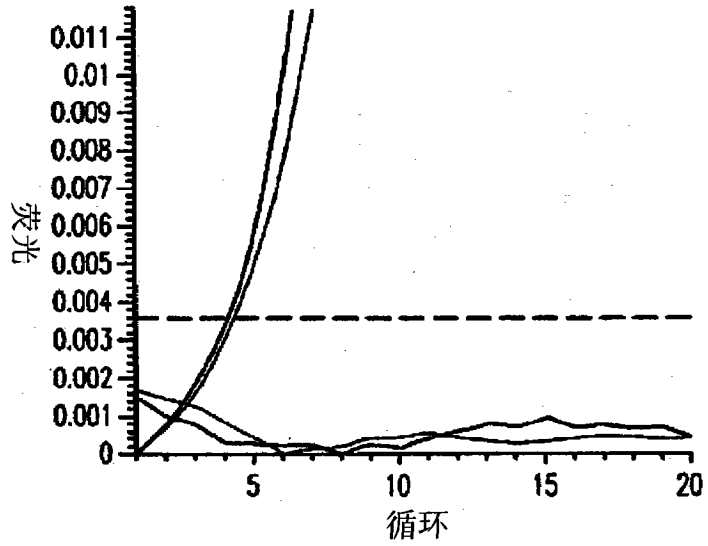

0.011
0.01
0.009
0.008
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
荧光
5
10
15
20
循环

图 31B

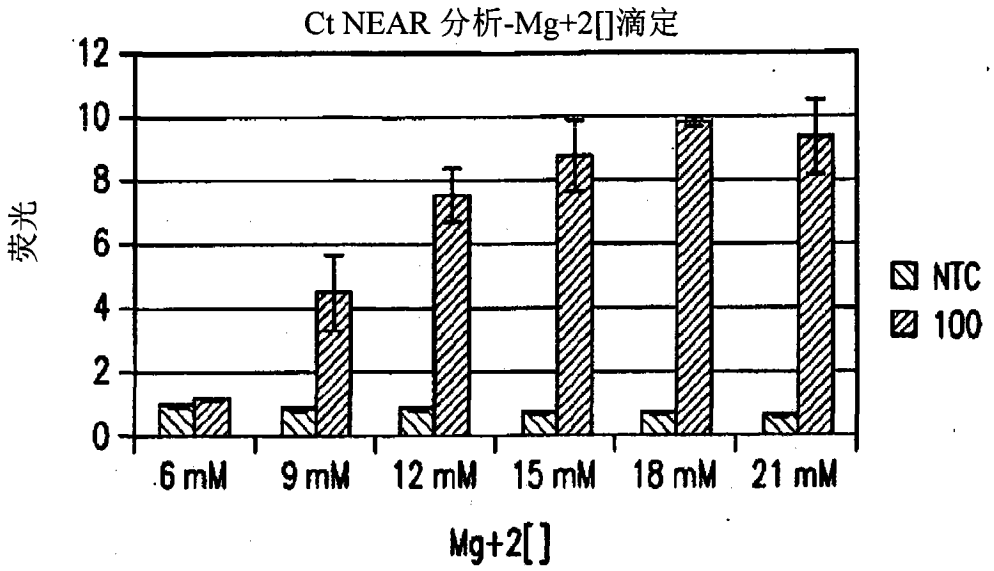
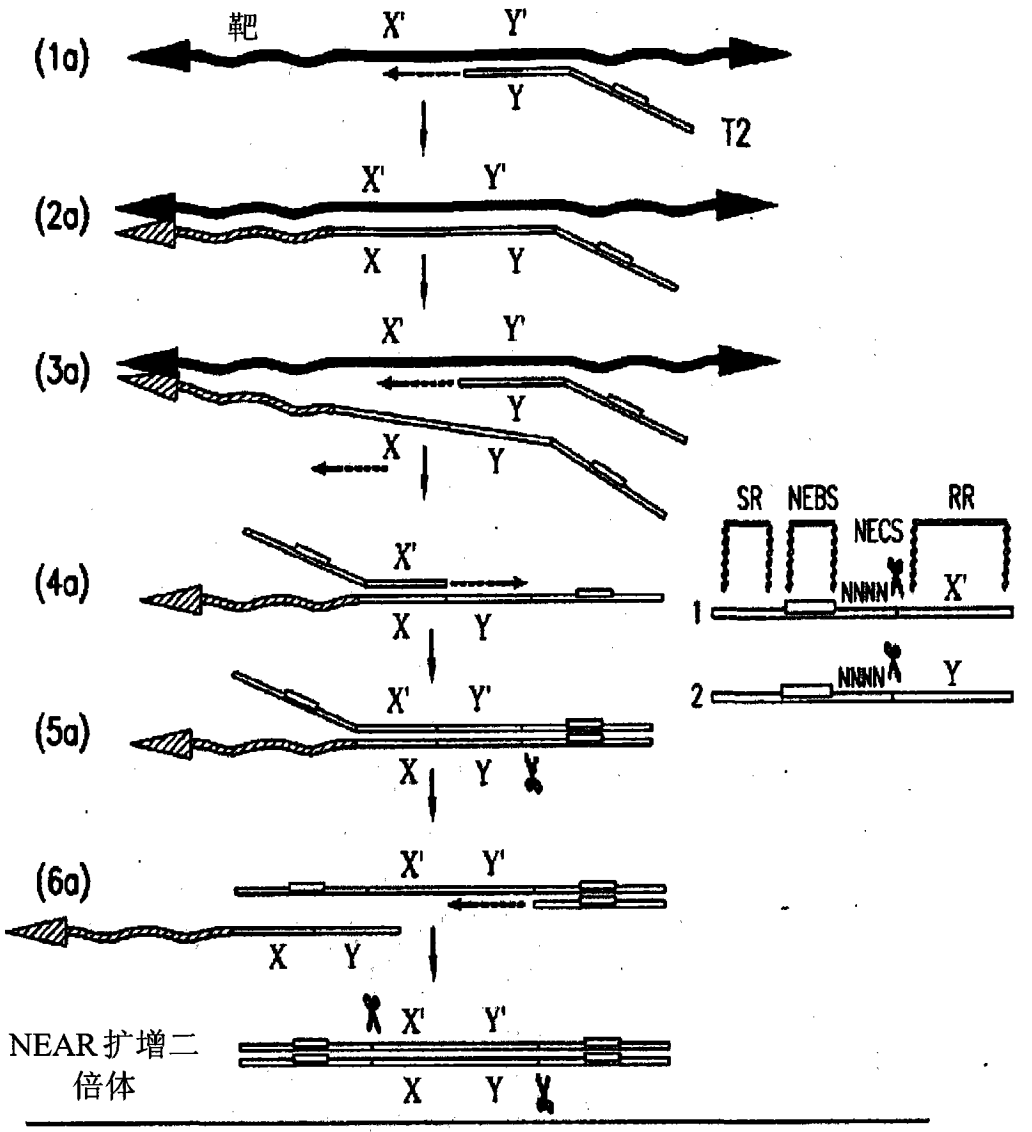


图 32A

分析 ID	Ct Ps_2	
靶	*沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)*	
	合成	
MB ID/[nM]	MB5.18/400	
模板比率[nM]	200:100	
重复次数	2	
实验日期	1/14/2008	
步骤	时间(min)	温度(℃)
反应	5	56
酶失活	2	80
读数	1	56
注释：使用自制缓冲液：50 mM Tris-HCl，pH8.6，1 mM DTT，0.1% Tx-100		

图 32B



NEAR 扩增二倍体

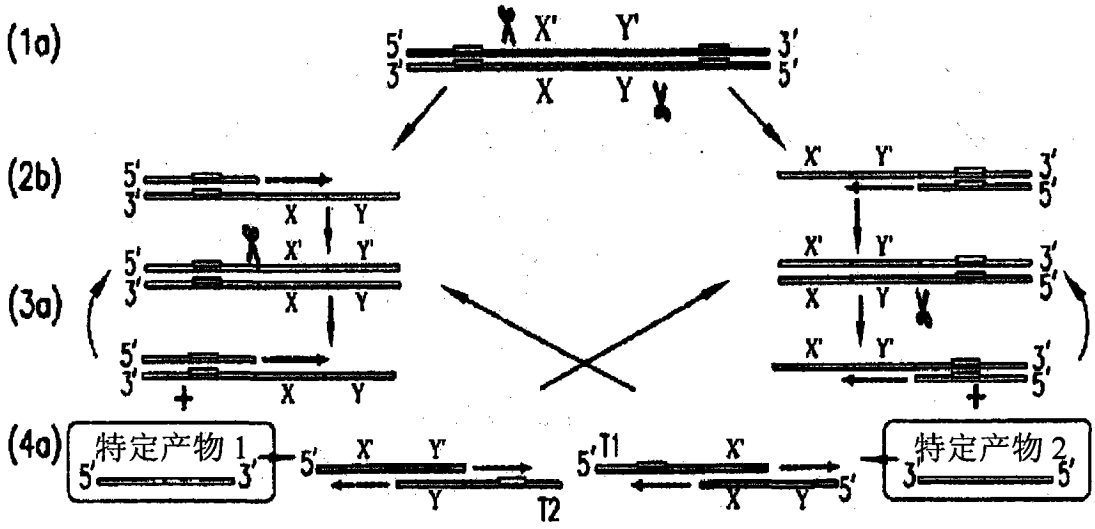
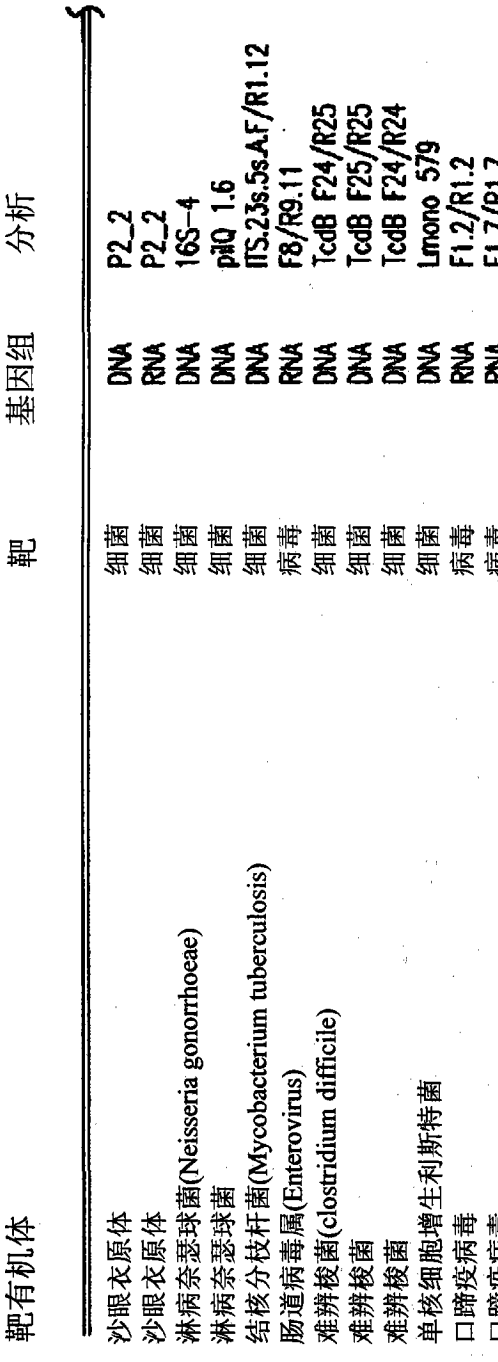


图 33



靶有机体	靶	基因组	分析
沙眼衣原体	细菌	DNA	P2_2
沙眼衣原体	细菌	RNA	P2_2
淋病奈瑟球菌(Neisseria gonorrhoeae)	细菌	DNA	16S-4
淋病奈瑟球菌	细菌	DNA	pilQ 1.6
结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)	细菌	DNA	ITS.23s.5s.A.F/R1.12
肠道病毒属(Enterovirus)	病毒	RNA	F8/R9.11
难辨梭菌(clostridium difficile)	细菌	DNA	TcdB F24/R25
难辨梭菌	细菌	DNA	TcdB F25/R25
难辨梭菌	细菌	DNA	TcdB F24/R24
单核细胞增生利斯特菌	细菌	DNA	Lmono 579
口蹄疫病毒	病毒	RNA	F1.2/R1.2
口蹄疫病毒	病毒	RNA	F1.7/R1.7
人类 miRNA	真核生物	RNA	miRNA 21
人类 miRNA	真核生物	RNA	miRNA 335
枯草芽孢杆菌	细菌	DNA	ppsA 1.25
枯草芽孢杆菌	细菌	RNA	ppsA 1.25
腺病毒 5	病毒	DNA	E1A 1.11
抗甲氧西林(methicillin)金黄色葡萄球菌(staphylococcus aureus)	细菌	DNA	mecA 1359
MRSA	细菌	DNA	mecA 1520
MRSA	细菌	DNA	SA_nuc 355
MRSA	细菌	DNA	SA_nuc 368
MRSA	细菌	DNA	SA_nuc 662
沙门菌属(Salmonella spp)	细菌	DNA	spoO 4
鲍氏不动杆菌(acinetobacter baumanii)	细菌	DNA	A.ba.gyrB.A.12.F9/R9
大肠杆菌(Escherichia coli)	细菌	DNA	大肠杆菌4.F/R

图 34A

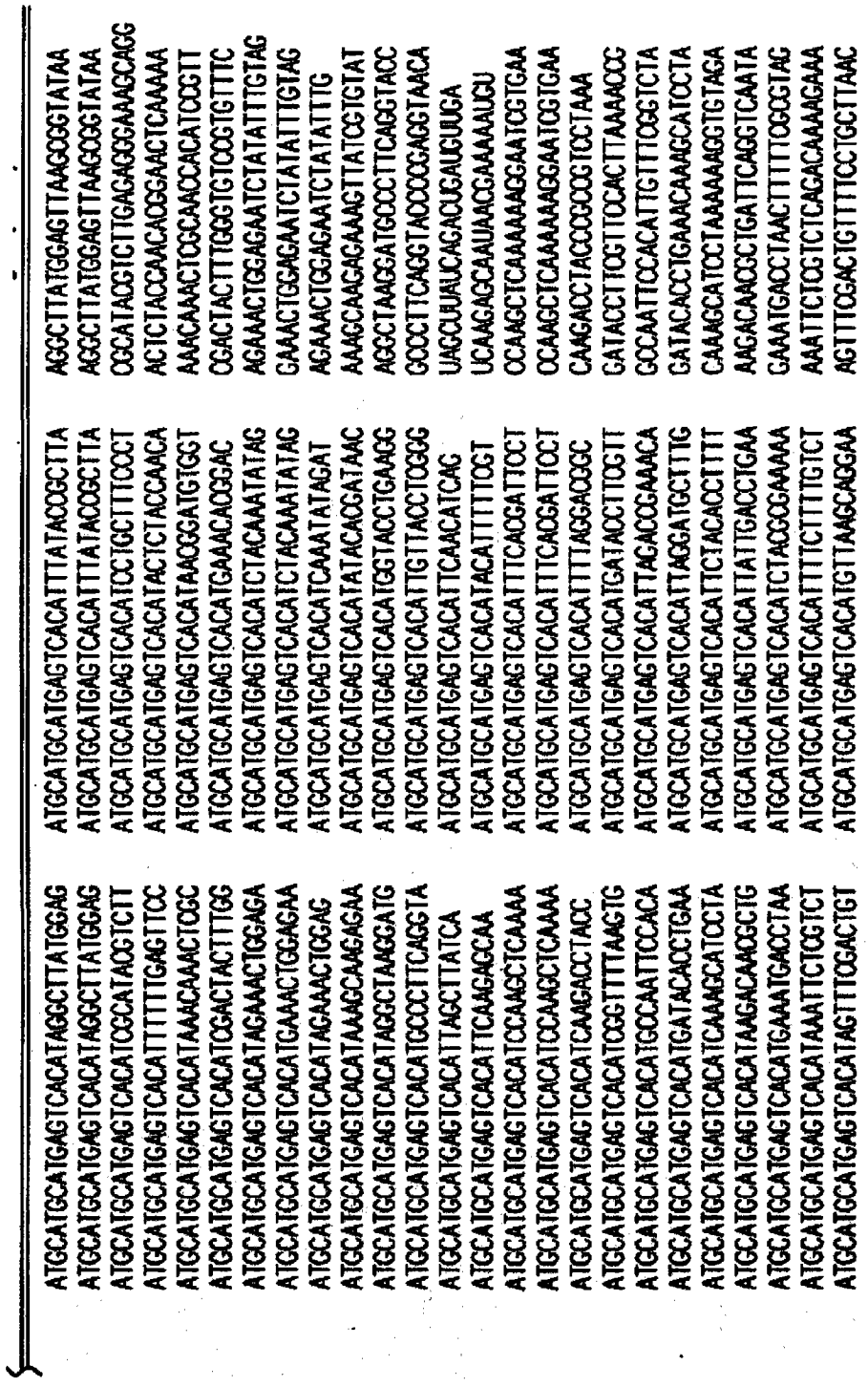


图 34B