

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2018 年 1 月 25 日 (25.01.2018)

(10) 国际公布号
WO 2018/014799 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/093088

本国际公布:

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 17 日 (17.07.2017)

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610587482.4 2016 年 7 月 22 日 (22.07.2016) CN

(71) 申请人: 广州康昕瑞基因健康科技有限公司 (GUANGZHOU CONSIDERIN GENE & HEALTH TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省广州市萝岗区玉岩路 12 号冠昊生物产业园区实验楼六楼, Guangdong 510000 (CN)。

(72) 发明人: 盛司潼 (SHENG, Sitong); 中国广东省深圳市南山区高新区科技中二路软件园二期 11 栋 4 楼, Guangdong 518000 (CN)。 龚敬文 (GONG, Jingwen); 中国广东省深圳市南山区高新区科技中二路软件园二期 11 栋 4 楼, Guangdong 518000 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION REAGENT KIT, AMPLIFICATION METHOD, AND AMPLIFICATION REAGENT

(54) 发明名称: 重组酶聚合酶扩增试剂盒、扩增方法及扩增试剂

(57) Abstract: A recombinase polymerase amplification reagent kit, comprising: E. coli RecA protein; λ phage Orf protein; E. coli SSB protein, and DNA polymerase; also provided are a recombinase polymerase amplification method and amplification reagent.

(57) 摘要: 一种重组酶聚合酶扩增试剂盒, 包括: E. coli RecA 蛋白; λ phage Orf 蛋白; E. coli SSB 蛋白及 DNA 聚合酶; 还提供一种重组酶聚合酶扩增方法及扩增试剂。



WO 2018/014799 A1

重组酶聚合酶扩增试剂盒、扩增方法及扩增试剂

技术领域

本发明涉及一种恒温扩增技术，更具体地说，涉及一种重组酶聚合酶扩增（RPA）试剂盒、扩增方法及扩增试剂。

背景技术

传统的体外DNA扩增主要是采用聚合酶链式反应（PCR）的方法，目前已经广泛应用于生物学等领域。PCR由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成：（1）模板DNA的变性，模板DNA经加热至90–95℃一定时间后，使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；（2）模板DNA与引物的退火，模板DNA经加热变性成单链后，温度降至55–60℃，引物与模板DNA单链的互补序列配对结合；（3）引物的延伸，DNA模板—引物结合物在DNA聚合酶的作用下，于70–75℃条件下，以dNTP为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板DNA链互补的半保留复制链，重复循环变性—退火—延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需2–4分钟，2–3小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。PCR技术的优点显而易见，但由于其需要精密的温度循环仪器才能完成扩增过程，对仪器的依赖程度较高，加之成本高、反应耗时长，这些局限性使其应用大多限制于条件良好的实验室内，难以广泛应用于现场检测。

因此，需要一种提供不依赖于PCR仪等温度循环仪器的扩增方法。

发明内容

本发明的目的在于提供一种重组酶聚合酶扩增试剂盒、扩增方法及扩增试剂，在恒温条件下实现对特定核酸序列的高效扩增，使得核酸扩增的过程可以直接在无需PCR仪等温度循环仪器的条件下完成。

本发明提供了一种重组酶聚合酶扩增试剂盒，所述试剂盒包括以下组分：Ecoli RecA蛋白、λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白及DNA聚合酶。

优选的，所述试剂盒还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。

优选的，所述试剂盒还包括镁离子制剂。

本发明还提供了一种重组酶聚合酶扩增方法，所述方法包括以下步骤：

A、配置反应体系，所述反应体系包括：模板核酸分子、引物组、Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白、DNA聚合酶、dNTP、ATP及扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液；

B、向所述反应体系中加入镁离子制剂；

C、在20至65℃条件下进行扩增反应。

优选的，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。

优选的，所述引物组包括一对引物，所述引物的长度为30至65bp。

优选的，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白的浓度为200至1000ng/ μ L。

本发明还提供了一种重组酶聚合酶扩增试剂，所述试剂包括：Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白及DNA聚合酶。

优选的，所述扩增试剂还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液；所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。

优选的，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白浓度为200至1000ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L。

本发明的重组酶聚合酶扩增试剂盒，采用Ecoli RecA蛋白、Ecoli SSB蛋白及 λ phage Orf蛋白协同作用的扩增体系，扩展了重组酶聚合酶扩增的应用范围；与传统PCR技术相比，本发明的重组酶聚合酶扩增反应在恒温条件下即可进行，无需PCR仪等温度循环仪器，不受实验空间限制；本发明的扩增反应在10至60分钟即可完成，远快于PCR技术或其他等温扩增技术。

附图说明

图1是第一具体实施例中重组酶聚合酶扩增及对照PCR扩增的琼脂糖凝胶电泳检测图。

图2是第二具体实施例中重组酶聚合酶扩增的毛细管电泳检测图。

图3是第三具体实施例中重组酶聚合酶扩增的琼脂糖凝胶电泳检测图。

图4是第四具体实施例中重组酶聚合酶扩增的琼脂糖凝胶电泳检测图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。

本发明提出第一实施例，一种重组酶聚合酶扩增试剂盒，包括以下组分：Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白及DNA聚合酶。

需要说明的是，本发明的重组酶聚合酶扩增是基于生物体内同源重组原理的恒温扩增技术：在适宜温度下，重组酶Ecoli RecA蛋白和 λ phage Orf蛋白共同作用，与引物结合形成酶和引物的复合体，复合体定位到模板核酸分子同源靶序列上并形成链置换；单链结合蛋白与被置换的核苷酸链结合，防止进一步置换；在DNA聚合酶的作用下启动DNA链合成，对模板核酸分子上的目标区域进行扩增。

本发明重组酶聚合酶扩增试剂盒中，所述Ecoli RecA蛋白和Ecoli SSB蛋白来源于大肠杆菌， λ phage Orf蛋白来源于 λ 噬菌体。本发明的 λ phage Orf蛋白与Ecoli RecA蛋白和Ecoli SSB蛋白的种属来源不同，但可以在同一体系中共同作用并实现重组酶聚合酶扩增，从而大大扩展了重组酶聚合酶扩增技术的应用范围。需要说明的是，本文所称的“来源”仅指其种类，而不是指蛋白的制备来源。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶优选为在20至65℃条件下有链置换活性的DNA聚合酶。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶优选为Sau DNA聚合酶、Bsu DNA聚合酶或Bst DNA聚合酶。

本发明一实施方式中，所述试剂盒还包括dNTP，所述dNTP为dTTP、dATP、dGTP和dCTP的等摩尔比混合液；在扩增过程中，所述dNTP用作DNA链合成的底物。

本发明一实施方式中，所述试剂盒还包括ATP；在扩增过程中，所述ATP为模板核酸分子和复合体之间的链置换过程提供能量。

本发明一实施方式中，所述试剂盒还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris缓冲液；所述Tris缓冲液用于维持反应体系的pH值。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇；向反应体系中加入聚乙二醇后，聚乙二醇作为高分子物质，占据了反应体系中体积的很大部分，同时排斥其他组分进入此空间，从而使得扩增体系中其他组分更充分地接触，进而提高扩增效率。

本发明一实施方式中，所述聚乙二醇的平均分子量为3000至20000；该分子量范围内的聚乙二醇，对反应体系中其他组分的排斥作用更明显。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括二硫苏糖醇；所述二硫苏糖醇可以有

效防止Ecoli RecA蛋白和DNA聚合酶被氧化。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括磷酸肌酸和肌酸激酶；所述磷酸肌酸和肌酸激酶用于催化ATP再生，这一过程可以不断重复，从而可以保证高效扩增。

需要说明的是，本发明试剂盒中Tris 缓冲液、聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶还可以分开储存，在试剂盒使用时再加以混合。

本发明一实施方式中，所述试剂盒还包括镁离子制剂，所述镁离子制剂用于激活DNA聚合酶，从而缩短反应时间。

需要说明的是，试剂盒中镁离子制剂与其他组分分开储存，试剂盒使用过程中，将试剂盒中其他组分充分混合后，再向其中加入镁离子制剂，能够避免出现非特异性扩增。

本发明一实施方式中，所述镁离子制剂为醋酸镁或氯化镁。

本发明提出了第二实施例，一种重组酶聚合酶扩增方法，包括以下步骤：

A、配置反应体系，所述反应体系包括：模板核酸分子，引物组，Ecoli RecA蛋白， λ phage Orf蛋白，Ecoli SSB蛋白，DNA聚合酶，dNTP、ATP及扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液；

B、向所述反应体系中加入镁离子制剂。

C、在20至65℃条件下进行扩增反应。

所述模板核酸分子可以是双链DNA分子、也可以是由RNA反转录合成的cDNA分子。

本发明所述Tris 缓冲液用于维持反应体系的pH值，本实施例的pH范围在7.0至8.0。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇；向反应体系中加入聚乙二醇后，聚乙二醇作为高分子物质，占据了反应体系中体积的很大部分，同时排斥其他组分进入此空间，从而使得扩增体系中其他组分更充分地接触，进而提高扩增效率。

本发明一实施方式中，所述聚乙二醇的平均分子量为3000至20000；该分子量范围内的聚乙二醇，对反应体系中其他组分的排斥作用更明显。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括二硫苏糖醇；所述二硫苏糖醇可以有效防止混合液中的Ecoli RecA蛋白和DNA聚合酶被氧化。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括磷酸肌酸和肌酸激酶；所述磷酸肌酸和肌酸激酶用于催化ATP再生，这一过程可以不断重复，从而可以保证核酸分子的高效扩增。

所述镁离子制剂用于激活DNA聚合酶，从而缩短反应时间，所述反应体系制备完成后再向其中加入镁离子制剂，能够避免出现非特异性扩增。本发明一实施方式中，所述镁离子制剂为醋酸镁或氯化镁。

本发明一实施方式中，所述模板核酸分子为双链DNA分子。

本发明一实施方式中，以人类全血DNA作为模板核酸分子。

本发明一实施方式中，所述引物组包括一对引物；所述引物的长度30至65bp，本方案能够保证链置换过程中识别的特异性。

本发明一实施方式中，分别以actinRPA-0_F (SEQ ID NO:1)、actinRPA-0_R (SEQ ID NO:2)；actinRPA-1_F (SEQ ID NO:3)、actinRPA-1_R (SEQ ID NO:4)；actinRPA-2_F (SEQ ID NO:5)、actinRPA-2_R (SEQ ID NO:6)；或actinRPA-3_F (SEQ ID NO:7)、actinRPA-3_R (SEQ ID NO:8)作为引物组，对所述模板核酸分子进行重组酶聚合酶扩增。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶为在20至65℃条件下有链置换活性的DNA聚合酶，本方案的DNA聚合酶应用于重组酶聚合酶扩增过程中，使得扩增反应在常温下能够快速进行。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶为Sau DNA聚合酶、Bsu DNA聚合酶或Bst DNA聚合酶。

本发明一实施方式中，所述模板核酸分子的浓度为10pg/ μ L至100ng/ μ L；在本方案的浓度范围内，模板核酸分子的扩增反应能够高效进行。

本发明一实施方式中，所述引物组中每种引物的浓度为0.1至1.0 μ M；在本方案的浓度范围内，模板核酸分子的扩增反应能够高效进行。

本发明一实施方式中，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白浓度为200至1000ng/ μ L；在本方案的浓度范围内，Ecoli RecA蛋白、Ecoli SSB蛋白和 λ phage Orf蛋白能够更好地发挥协同作用，从而使得扩增效率更高。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶浓度为5至120ng/ μ L；在本方案的浓度范围内，模板核酸分子的聚合反应能够高效进行。

本发明一实施方式中，所述dNTP为dTTP、dATP、dGTP和dCTP的等摩尔比混合液；所述dNTP的浓度优选为0.1至3mM；所述dNTP用作聚合反应合成DNA链的底物。

本发明一实施方式中，所述ATP的浓度为1至10mM；在扩增过程中，所述ATP为模板核酸分子和复合体之间的链置换过程提供能量，在本方案的浓度范围内，有利于促进扩增反应的进行。

本发明一实施方式中，所述Tris 缓冲液浓度为20至500mM；本方案的pH范围在7.0至8.0；本方案有利于扩增反应的进行。

本发明一实施方式中，所述聚乙二醇的浓度为2.5至10mM；在本方案的浓度范围内，有利

于扩增反应的进行。

本发明一实施方式中，所述磷酸肌酸浓度为20至100mM；所述肌酸激酶浓度为10至1000ng/ μ L；在本方案的浓度范围内，有利于促进ATP的再生。

本发明一实施方式中，所述二硫苏糖醇的浓度为2.5至10mM；在本方案的浓度范围内，有利于避免Ecoli RecA蛋白和DNA聚合酶被氧化。

优选的，所述镁离子制剂在反应混合液中的浓度为5至30mM；在本方案的浓度范围内，有利于激活DNA聚合酶作用。

本发明提出了第三实施例，一种重组酶聚合酶扩增试剂，包括以下组分：Ecoli RecA蛋白； λ phage Orf蛋白；Ecoli SSB蛋白；DNA聚合酶。

本发明一实施方式中，所述试剂还包括dNTP；所述dNTP为dTTP、dATP、dGTP和dCTP的等摩尔比混合液，所述dNTP用作DNA链合成的底物。本发明一实施方式中，所述试剂还包括ATP；所述ATP为模板核酸分子和复合体之间的链置换过程提供能量。

本发明一实施方式中，所述试剂还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris缓冲液；所述Tris缓冲液用于维持反应体系的pH值，本实施例的pH范围在7.0至8.0。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括磷酸肌酸和肌酸激酶；所述磷酸肌酸和肌酸激酶用于催化ATP再生，这一过程可以不断重复，从而可以保证核酸分子的高效扩增。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇；向反应体系中加入聚乙二醇后，聚乙二醇作为高分子物质，占据了反应体系中体积的很大部分，同时排斥其他组分进入此空间，从而使得扩增体系中其他组分更充分地接触，进而提高扩增效率。

本发明一实施方式中，所述聚乙二醇的平均分子量为3000至20000；该分子量范围内的聚乙二醇，对反应体系中其他组分的排斥作用更明显。

本发明一实施方式中，所述扩增反应缓冲液还包括二硫苏糖醇；所述二硫苏糖醇可以有效防止Ecoli RecA和DNA聚合酶被氧化。

本发明一实施方式中，所述试剂还包括引物组，所述引物组包括一对引物；所述引物的长度为30至65bp，本方案能够保证链置换过程中识别的特异性。

本发明一实施方式中，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白浓度为200至1000ng/ μ L。

本发明一实施方式中，所述DNA聚合酶浓度为5至120ng/ μ L。

本发明一实施方式中，所述引物组中每种引物的浓度为0.1至1.0 μ M。

本发明一实施方式中，所述dNTP的浓度范围为0.1至3mM。

本发明一实施方式中，所述ATP的浓度为1至10mM。

本发明一实施方式中，所述Tris 缓冲液浓度为20至500mM。

本发明一实施方式中，所述聚乙二醇的浓度为2.5至10mM。

本发明一实施方式中，所述磷酸肌酸浓度为20至100mM；所述肌酸激酶浓度为10至1000ng/μL。

本发明一实施方式中，所述二硫苏糖醇的浓度为2.5至10mM。

以下通过具体实施例对本发明进行进一步的详细说明。

本发明第一具体实施例，提供了一种重组酶聚合酶扩增方法，本实施例在配置反应体系之前还包括提取核酸分子的步骤A0，扩增步骤如下：

A0、提取核酸分子，本实施例按血液基因组提取试剂盒的方法提取人类全血DNA分子；

A、配置反应体系：模板核酸分子、引物组、Ecoli RecA蛋白、λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白、DNA聚合酶、dNTP、ATP及Tris 缓冲液。具体的，本实施例中配置以下浓度的2×预混液：200ng/μL Ecoli RecA蛋白、50ng/μL λ phage Orf蛋白、508ng/μL Ecoli SSB蛋白、160ng/μL Bsu蛋白、5mM ATP、4mM dNTP、100mM Tris 缓冲液（pH 7.5）、10mM 二硫苏糖醇、100mM 磷酸肌酸、200ng/μL 肌酸激酶、10.92%(w/v) 聚乙二醇。

在200 μL离心管中分别加入：1 μL浓度为9 μg/μL的人类全血DNA；上述引物组：5 μL浓度为10 μM的上游引物actinRPA-4_F（SEQ ID NO:9）、5 μL浓度为10 μM的下游引物actinRPA-4_R（SEQ ID NO:10）；25 μL 2×预混液；9 μL去离子水；混匀并离心。

B、向上述反应体系中加入镁离子制剂：具体的，本实施例中向步骤A的反应体系中加入5 μL浓度为140mM的醋酸镁溶液，充分混匀并离心。

C、在20至65℃条件下进行扩增反应：本实施例将离心管置于37℃的恒温金属浴中保温4min；取出反应管，充分地上下颠倒4-5次，混匀并离心，再进行同样条件的孵育，保温20min。

反应结束后，取出离心管，取样并进行琼脂糖凝胶电泳检测，检测结果如图1中5-8泳道所示。

作为对照实验，本发明还对人类全血DNA分子进行了PCR扩增，扩增步骤如下：

A'、按血液基因组提取试剂盒的方法提取人类全血DNA分子；

B'、在200 μL离心管中分别加入：1 μL浓度为9 μg/μL的人类全血DNA；5 μL浓度为10 μM的上游引物actinRPA-4_F（SEQ ID NO:9）；5 μL浓度为10 μM的下游引物actinRPA-4_R（SEQ ID NO:10）；和9 μL去离子水；25 μL 2×Taq mix，混匀并离心；

C'、将离心管置于PCR仪中,设置反应程序:95℃条件下持续1分钟,60℃条件下持续30秒,72℃条件下持续30秒,一共30个循环,开始PCR反应;

反应结束后,取出反应管,取样并进行琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果如图1中1-4泳道所示。

图1中泳道1-3为PCR扩增情况,泳道4为PCR扩增的阴性对照,泳道5为重组酶聚合酶扩增的阴性对照,泳道6-8为重组酶聚合酶扩增情况,0为分子大小标记物。从实验结果中可以看出,本实施例的重组酶聚合酶扩增与PCR扩增所获得的产量相差不大。这说明本实施例的重组酶聚合酶扩增方法能够有效对模板核酸分子进行扩增;但与常规PCR技术相比,操作简便,大大缩短了扩增时间,不需要精密的温度仪器即可实现。

本发明第二具体实施例,与第一具体实施例的区别在于,本实施例分别以上游引物actinRPA-0_F(SEQ ID NO:1)和下游引物actinRPA-0_R(SEQ ID NO:2);上游引物actinRPA-1_F(SEQ ID NO:3)和下游引物actinRPA-1_R(SEQ ID NO:4);上游引物actinRPA-2_F(SEQ ID NO:5)和下游引物actinRPA-2_R(SEQ ID NO:6);上游引物actinRPA-3_F(SEQ ID NO:7)和下游引物actinRPA-3_R(SEQ ID NO:8)作为引物组,构成四个反应体系。对人类全血DNA进行重组酶聚合酶扩增。扩增反应结束后取样并进行第二毛细管电泳检测,结果如图2所示。

图2中泳道1-3为actin RPA-0为引物的扩增情况,泳道4-6为actin RPA-01为引物的扩增情况,泳道7-9为actin RPA-02为引物的扩增情况,泳道10-12为actin RPA-03为引物的扩增情况。结果表明,本实施例actin RPA-0、actin RPA-01、actin RPA-02、actin RPA-03均能顺利扩增,获得目的产物。本实施例说明本实施例的重组酶聚合酶扩增方法能够有效对人类全血DNA分子进行扩增。

本发明第三具体实施例,扩增步骤如下:

A0、提取核酸分子,本实施例按血液基因组提取试剂盒的方法提取人类全血DNA分子;

A、配置三个包括不同引物组的反应体系:模板核酸分子、引物组、Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白、DNA聚合酶、dNTP、ATP及Tris 缓冲液。具体的,本实施例中配置以下浓度的2 $\times$ 预混液:40ng/ μ L Ecoli RecA蛋白、160ng/ μ L λ phage Orf蛋白、400ng/ μ L Ecoli SSB蛋白、10ng/ μ L Sau蛋白、0.2mM dNTP、2mM ATP、40mM Tris 缓冲液、40mM磷酸肌酸、20ng/ μ L肌酸激酶、4%(w/v)聚乙二醇。

在200 μ L离心管中分别加入:1 μ L浓度为0.45pg/ μ L的人类全血DNA;上述不同引物组:5 μ L浓度为0.9 μ M的上游引物、5 μ L浓度为0.9 μ M的下游引物;25 μ L 2 $\times$ 预混液;9 μ L去离子水,混匀并离心;

上述不同引物组分别为上游引物CFTRRPA-5_F (SEQ ID NO:11) 和下游引物CFTRRPA-5_R (SEQ ID NO:12); 上游引物CFTRRPA-6_F (SEQ ID NO:13) 和下游引物CFTRRPA-6_R (SEQ ID NO:14); 上游引物CFTRRPA-7_F (SEQ ID NO:15) 和下游引物CFTRRPA-7_R (SEQ ID NO:16)。

B、向上述反应体系中加入镁离子制剂: 具体的, 本实施例中向步骤A的反应体系中加入5 μ L浓度为270 mM的氯化镁溶液, 充分混匀并离心。

C、在20至65℃条件下进行扩增反应: 将离心管置于20℃的恒温金属浴中保温4min; 取出反应管, 充分地上下颠倒4-5次, 混匀并离心, 再进行同样条件的孵育, 保温20min。

反应结束后, 取出离心管, 取样并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖凝胶电泳检测如图3所示, 图3中泳道0为分子大小标记物, 泳道1-2为CFTRRPA-5为引物的扩增情况, 泳道3-4为CFTRRPA-6为引物的扩增情况, 泳道5-6为CFTRRPA-7为引物的扩增情况。结果表明, 本实施例的重组酶聚合酶扩增方法能够有效对人类全血DNA分子进行扩增。

本发明第四具体实施例, 提供了一种重组酶聚合酶扩增方法, 扩增步骤如下:

A0、提取核酸分子, 本实施例按血液基因组提取试剂盒的方法提取人类全血DNA;

A、配置六个包括不同引物组的反应体系: 模板核酸分子、引物组、Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白、DNA聚合酶、dNTP、ATP及Tris 缓冲液。具体的, 本实施例中配置以下浓度的2 $\times$ 预混液: 500ng/ μ L Ecoli RecA蛋白; 40ng/ μ L λ phage Orf蛋白; 2000ng/ μ L Ecoli SSB蛋白; 240ng/ μ L Bst蛋白; 6mM dNTP; 20mM ATP; 1000mM Tris 缓冲液; 40mM磷酸肌酸; 2000ng/ μ L肌酸激酶; 20%(w/v) 聚乙二醇。

在200 μ L离心管中分别加入: 1 μ L浓度为4.5mg/ μ L的人类全血DNA; 上述不同引物组: 5 μ L浓度为0.9 μ M的上游引物、5 μ L浓度为0.9 μ M的下游引物; 25 μ L 2 $\times$ 预混液; 9 μ L去离子水, 混匀并离心。

其中上述不同引物组分别为上游引物lambdaRPA-8_F (SEQ ID NO:17) 和下游引物lambdaRPA-8_R (SEQ ID NO:18); 上游引物lambdaRPA-9_F (SEQ ID NO:19) 和下游引物lambdaRPA-9_R (SEQ ID NO:20); 上游引物lambdaRPA-10_F (SEQ ID NO:21) 和下游引物lambdaRPA-10_R (SEQ ID NO:22); 上游引物lambdaRPA-11_F (SEQ ID NO:23) 和下游引物lambdaRPA-11_R (SEQ ID NO:24); 上游引物lambdaRPA-12_F (SEQ ID NO:25) 和下游引物lambdaRPA-12_R (SEQ ID NO:26); 上游引物lambdaRPA-13_F (SEQ ID NO:27) 和下游引物lambdaRPA-13_R (SEQ ID NO:28)。

B、向上述反应体系中加入镁离子制剂: 具体的, 本实施例向步骤A的反应体系中加入5 μ L

浓度为45 mM的氯化镁溶液，充分混匀并离心。

C、在20至65℃条件下进行扩增反应：将离心管置于65℃的恒温金属浴中保温4min；取出反应管，充分地上下颠倒4-5次，混匀并离心，再进行同样条件的孵育，保温20min。

反应结束后，取出离心管，取样并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖凝胶电泳检测如图4所示，图4中泳道0为分子大小标记物，泳道1-2为lambdaRPA-8为引物的扩增情况，泳道3-4为lambdaRPA-9为引物的扩增情况，泳道5-6为lambdaRPA-10为引物的扩增情况，泳道7-8为lambdaRPA-11为引物的扩增情况，泳道9-10为lambdaRPA-12为引物的扩增情况，泳道11-12为lambdaRPA-13为引物的扩增情况。结果表明，本实施例的重组酶聚合酶扩增方法能够有效对人类全血DNA分子进行扩增。

结果表明本实施例的重组酶聚合酶扩增方法能够有效对人类全血DNA分子进行扩增。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种重组酶聚合酶扩增试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括以下组分：Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白及DNA聚合酶。
2. 根据权利要求1所述的重组酶聚合酶扩增试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。
3. 根据权利要求2所述的重组酶聚合酶扩增试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括镁离子制剂。
4. 一种重组酶聚合酶扩增方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：
 - A、配置反应体系，所述反应体系包括：模板核酸分子、引物组、Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白、DNA聚合酶、dNTP、ATP及扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液；
 - B、向所述反应体系中加入镁离子制剂；
 - C、在20至65℃条件下进行扩增反应。
5. 根据权利要求4所述的重组酶聚合酶扩增方法，其特征在于，所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。
6. 根据权利要求4所述的重组酶聚合酶扩增方法，其特征在于，所述引物组包括一对引物，所述引物的长度为30至65bp。
7. 根据权利要求4所述的重组酶聚合酶扩增方法，其特征在于，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白浓度为200至1000ng/ μ L。
8. 一种重组酶聚合酶扩增试剂，其特征在于，所述试剂包括：Ecoli RecA蛋白、 λ phage Orf蛋白、Ecoli SSB蛋白及DNA聚合酶。
9. 根据权利要求8所述的重组酶聚合酶扩增试剂，其特征在于，所述扩增试剂还包括扩增反应缓冲液，所述扩增反应缓冲液包括Tris 缓冲液；所述扩增反应缓冲液还包括聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸和肌酸激酶中的一种或多种。
10. 根据权利要求8所述的重组酶聚合酶扩增试剂，其特征在于，所述Ecoli RecA蛋白浓度为20至250ng/ μ L；所述Ecoli SSB蛋白的浓度为200至1000ng/ μ L；所述 λ phage Orf蛋白浓度为20至80ng/ μ L。

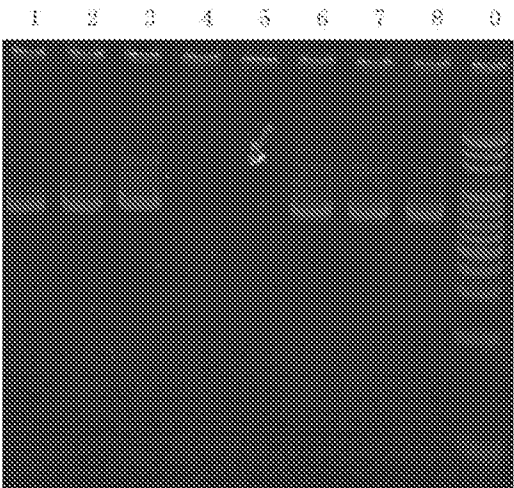


图1

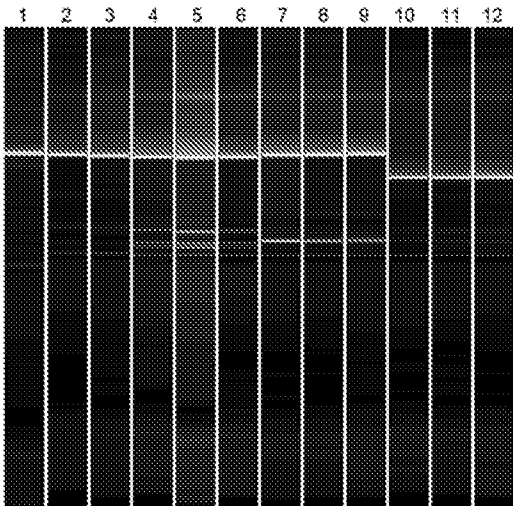


图2

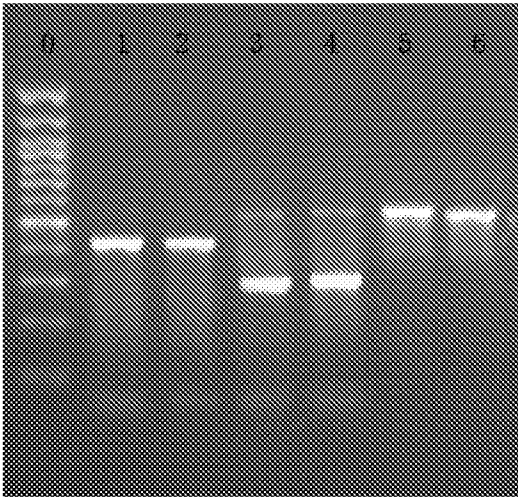


图3

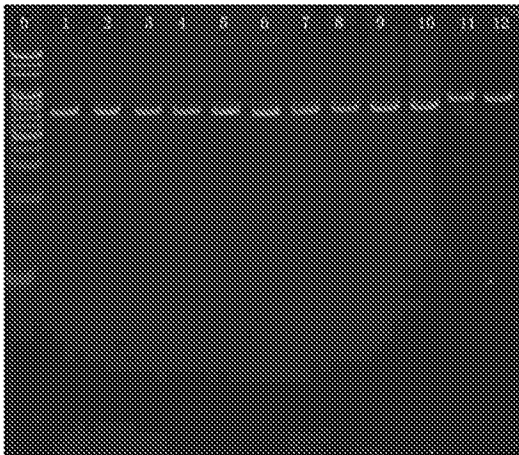


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/093088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

USTXT; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; DWPI; NCBI; PUBMED; CNKI; GOOGLE; WANFANG; DUXIU; ISI Web of knowledge: considerin gene, sheng sitong, gong jingwen, recombinase polymerase amplification, orf, RPA, lambda phage, reca, SSB, Single-stranded DNA-binding protein, ecoli, E. coli, λ phage, ORF albumen, constant temperature, recombinase, strand displacement

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104694662 A (DU, Wenhong) 10 June 2015 (10.06.2015) claims 1, 4, 6, 7 and 9	1-10
Y	CURTIS, F. A. et al. "The C-terminus of the phage λ Orf recombinase is involved in DNA binding" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 24, 13 December 2010 (13.12.2010), the abstract	1-10
Y	CURTIS, F. A. et al. "Phage Orf Family Recombinases: Conservation of Activities and Involvement of the Central Channel in DNA Binding" PLOS ONE, vol. 9, no. 8, 01 August 2014 (01.08.2014), the abstract	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search 18 September 2017	Date of mailing of the international search report 10 October 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanqing Telephone No. (86-10) 010-61648130

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/093088

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105567866 A (SZ DMD BIOMED CO., LTD.) 11 May 2016 (11.05.2016) the whole document	1-10
A	WO 2008035205 A2 (ASM SCIENTIFIC INC.) 27 March 2008 (27.03.2008) the whole document	1-10
A	GAO, Weifang et al. " Recombinase Polymerase Amplification: A New DNA/RNA Amplification Strategy " Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 32, no. 6, 30 June 2016 (30.06.2016), pp. 627-634	1-10
A	JING, Zhigang et al. " Research Progress on Recombinase Polymerase Amplification " Biotechnology Bulletin, vol. 32, no. 6, 26 June 2016 (26.06.2016), pp. 47-53	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/093088

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104694662 A	10 June 2015	None	
CN 105567866 A	11 May 2016	None	
WO 2008035205 A2	27 March 2008	JP 2014233293 A	15 December 2014
		EP 2029782 B1	26 November 2014
		US 2012258499 A1	11 October 2012
		US 2016326502 A1	10 November 2016
		EP 3088533 A1	02 November 2016
		WO 2008035205 A3	15 January 2009
		JP 2009535053 A	01 October 2009
		AU 2007298650 B2	17 October 2013
		EP 2426221 B1	22 June 2016
		US 8071308 B2	06 December 2011
		US 8637253 B2	28 January 2014
		CA 2650993 C	16 June 2015
		AU 2007298650 A1	27 March 2008
		EP 2029782 A2	04 March 2009
		US 2009029421 A1	29 January 2009
		JP 2017035114 A	16 February 2017
		EP 2426221 A2	07 March 2012
		JP 5832403 B2	16 December 2015
		CA 2650993 A1	27 March 2008
		JP 5166620 B2	21 March 2013
		EP 2426221 A3	10 October 2012
		JP 2012143236 A	02 August 2012
		JP 2012249640 A	20 December 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/093088

A. 主题的分类 C12Q 1/68(2006.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) USTXT;EPTXT;CNTXT;CNABS;WOTXT;DWPI;NCBI;PUBMED;CNKI;GOOGLE;万方;读秀;ISI Web of knowledge;康昕瑞基因, 盛司潼, 龚敬文, recombinase polymerase amplification, orf, RPA, λ phage, lambda phage, reca, 单链结合蛋白, SSB, 单链DNA结合蛋白, 大肠杆菌, ecoli, E.coli, λ 噬菌体, ORF蛋白, 恒温, recombinase, 重组酶聚合酶扩增, 链置换, strand displacement																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104694662 A (杜文红) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 权利要求1、4、6、7、9</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CURTIS, F.A. 等. "The C-terminus of the phage λ Orf recombinase is involved in DNA binding" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 第24卷, 2010年 12月 13日 (2010 - 12 - 13), 摘要</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CURTIS, F.A. 等. "Phage Orf Family Recombinases: Conservation of Activities and Involvement of the Central Channel in DNA Binding" PLOS ONE, 第9卷, 第8期, 2014年 8月 1日 (2014 - 08 - 01), 摘要</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105567866 A (苏州达麦迪生物医学科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008035205 A2 (ASM SCIENTIFIC INC.) 2008年 3月 27日 (2008 - 03 - 27) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 104694662 A (杜文红) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 权利要求1、4、6、7、9	1-10	Y	CURTIS, F.A. 等. "The C-terminus of the phage λ Orf recombinase is involved in DNA binding" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 第24卷, 2010年 12月 13日 (2010 - 12 - 13), 摘要	1-10	Y	CURTIS, F.A. 等. "Phage Orf Family Recombinases: Conservation of Activities and Involvement of the Central Channel in DNA Binding" PLOS ONE, 第9卷, 第8期, 2014年 8月 1日 (2014 - 08 - 01), 摘要	1-10	A	CN 105567866 A (苏州达麦迪生物医学科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 全文	1-10	A	WO 2008035205 A2 (ASM SCIENTIFIC INC.) 2008年 3月 27日 (2008 - 03 - 27) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	CN 104694662 A (杜文红) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 权利要求1、4、6、7、9	1-10																		
Y	CURTIS, F.A. 等. "The C-terminus of the phage λ Orf recombinase is involved in DNA binding" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 第24卷, 2010年 12月 13日 (2010 - 12 - 13), 摘要	1-10																		
Y	CURTIS, F.A. 等. "Phage Orf Family Recombinases: Conservation of Activities and Involvement of the Central Channel in DNA Binding" PLOS ONE, 第9卷, 第8期, 2014年 8月 1日 (2014 - 08 - 01), 摘要	1-10																		
A	CN 105567866 A (苏州达麦迪生物医学科技有限公司) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 全文	1-10																		
A	WO 2008035205 A2 (ASM SCIENTIFIC INC.) 2008年 3月 27日 (2008 - 03 - 27) 全文	1-10																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期 2017年 9月 18日		国际检索报告邮寄日期 2017年 10月 10日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张艳青 电话号码 (86-10)010-61648130																		

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	高威芳等. “重组酶聚合酶扩增技术：一种新的核酸扩增策略” 中国生物化学与分子生物学报，第32卷，第6期，2016年 6月 30日（2016 - 06 - 30）， 第627-634页	1-10
A	景志刚等. “重组酶聚合酶扩增技术研究进展” 生物技术通报，第32卷，第6期，2016年 6月 26日（2016 - 06 - 26）， 第47-53页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/093088

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104694662	A	2015年 6月 10日	无			
CN	105567866	A	2016年 5月 11日	无			
WO	2008035205	A2	2008年 3月 27日	JP	2014233293	A	2014年 12月 15日
				EP	2029782	B1	2014年 11月 26日
				US	2012258499	A1	2012年 10月 11日
				US	2016326502	A1	2016年 11月 10日
				EP	3088533	A1	2016年 11月 2日
				WO	2008035205	A3	2009年 1月 15日
				JP	2009535053	A	2009年 10月 1日
				AU	2007298650	B2	2013年 10月 17日
				EP	2426221	B1	2016年 6月 22日
				US	8071308	B2	2011年 12月 6日
				US	8637253	B2	2014年 1月 28日
				CA	2650993	C	2015年 6月 16日
				AU	2007298650	A1	2008年 3月 27日
				EP	2029782	A2	2009年 3月 4日
				US	2009029421	A1	2009年 1月 29日
				JP	2017035114	A	2017年 2月 16日
				EP	2426221	A2	2012年 3月 7日
				JP	5832403	B2	2015年 12月 16日
				CA	2650993	A1	2008年 3月 27日
				JP	5166620	B2	2013年 3月 21日
				EP	2426221	A3	2012年 10月 10日
				JP	2012143236	A	2012年 8月 2日
				JP	2012249640	A	2012年 12月 20日