



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111727261 B

(45) 授权公告日 2024.10.29

(21) 申请号 201880075613.8

(22) 申请日 2018.11.21

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111727261 A

(43) 申请公布日 2020.09.29

(30) 优先权数据  
15/820,475 2017.11.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2018/082086 2018.11.21

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/101796 EN 2019.05.31

(73) 专利权人 保障生物系统控股有限公司  
地址 英国伦敦

(72) 发明人 N·斯密特 S·贝德纳  
H·克拉普罗斯 K·伯恩顿

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038  
专利代理人 郑天松

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/686 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 1629305 A, 2005.06.22  
CN 104293794 B, 2017.04.12

审查员 李谦

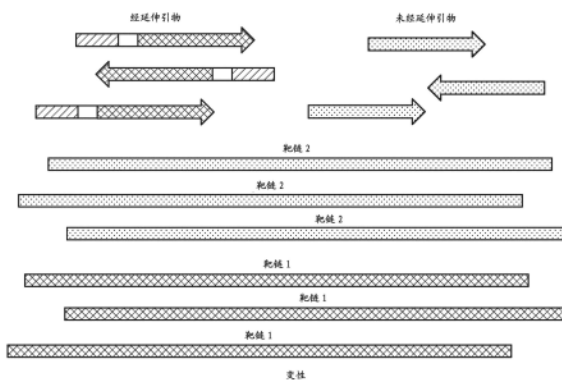
权利要求书2页 说明书16页 附图13页

(54) 发明名称

非对称PCR方法

(57) 摘要

本发明提供用于制备单链产物的非对称PCR  
扩增方法及适用于其的引物及试剂盒。



1. 用于经非对称聚合酶链反应 (PCR) 产生单链DNA扩增子的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 使初始混合物在扩增PCR条件下经历热循环的第一阶段, 所述初始混合物包含:

(i) 核酸样品;

(ii) 非对称引物对, 其由下列 (1) 和 (2) 的引物组成:

(1) 经延伸引物, 其包含位于其3'端的“A”区和位于其5'端的“B”区, 其中所述“A”区与靶核酸的第一链的对应区具有至少75%序列互补性, 且

所述“B”区是6~12个核苷酸长, 且是所述“A”区的至少一部分的反向重复序列, 和

(2) 未经延伸引物, 其基本上由与所述靶核酸的第二链中的对应区具有至少75%序列互补性的核苷酸序列组成,

(iii) 热稳定DNA聚合酶, 及

(iv) PCR试剂,

其中所述热循环的第一阶段包含循环通过至少3个温度, 所述3个温度包含:

(1) 用于变性的高于靶核酸的 $T_m$ 的第一温度、

(2) 用于引物退火的低于未经延伸引物的 $T_m$ 的第二温度、及

(3) 适用于由所述热稳定DNA聚合酶进行的延伸的第三温度,

由此产生中间混合物, 若所述靶核酸存在于所述样品中, 则所述中间混合物包含由未经延伸引物及经延伸引物二者延伸的DNA扩增子;

(b) 使所述中间混合物经历热循环的第二阶段, 所述第二阶段包含循环通过:

(1) 用于变性的高于双链DNA扩增子的 $T_m$ 的第四温度、

(2) 第五温度, 其

i. 低于经延伸引物的 $T_m$ ,

ii. 高于未经延伸引物的 $T_m$ 且

iii. 适用于由所述热稳定DNA聚合酶进行的延伸,

由此产生最终混合物, 若所述靶核酸存在于所述样品中, 则所述最终混合物包含单链DNA扩增子。

2. 权利要求1的方法, 其中步骤(a)之前是初始变性期。

3. 权利要求2的方法, 其中在所述第一温度下进行初始变性。

4. 权利要求1的方法, 其中步骤(b)之后是额外延伸期。

5. 权利要求4的方法, 其中在所述第五温度下进行所述额外延伸。

6. 权利要求1的方法, 其中

所述第一温度与所述第四温度相同, 和/或

所述第三温度与所述第五温度相同。

7. 权利要求1的方法, 其中未经延伸引物

不具有5'尾延伸部分, 或

具有3个核苷酸或更短的5'尾延伸部分。

8. 权利要求1的方法, 其中经延伸引物包含“C”区。

9. 权利要求8的方法, 其中所述“C”区单独或与侧接“A”区核苷酸和/或“B”区核苷酸组合形成限制性核酸内切酶的识别位点。

10. 权利要求1的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高至少8°C。
11. 权利要求1的方法,其中经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 与未经延伸引物的 $T_m$ 相差不超过3°C。
12. 权利要求1的方法,其中
  - (a) 所述第一温度是95°C;
  - (b) 所述第二温度是58°C;
  - (c) 所述第三温度是72°C;
  - (d) 所述第四温度是95°C;
  - (e) 所述第五温度是72°C;或
  - (f) (a) ~ (e) 之任何组合。
13. 权利要求1的方法,其中使由所述中间混合物中未经延伸引物及经延伸引物二者延伸的DNA扩增子彼此杂交以形成双链DNA扩增子。
14. 权利要求1的方法,其中所述核酸样品是测试核酸样品。
15. 权利要求1的方法,其中所述核酸样品是对照核酸样品。
16. 权利要求1的方法,其为多重PCR反应。
17. 权利要求1的方法,其中在不存在通用引物的情况下进行所述PCR。
18. 权利要求1的方法,其中所述“A”区中与所述“B”区中的序列互补的部分与所述“A”区的5'端相隔1、2或3个核苷酸内。
19. 权利要求1的方法,其中  
所述第一阶段引起所述靶核酸的两条链的指数扩增,和/或  
所述第二阶段引起所述靶核酸的单链的线性扩增。
20. 权利要求1的方法,其中所述非对称引物对包含与细菌序列或真菌DNA序列互补的序列。
21. 权利要求1的方法,其中所述样品是生物样品。
22. 权利要求21的方法,其中所述生物样品是:
  - (a) 血液或自其加工、提取或分级分离的样品;
  - (b) 腹膜透析液或自其加工、提取或分级分离的样品;
  - (c) 尿或自其加工、提取或分级分离的样品;
  - (d) 痰或自其加工、提取或分级分离的样品;或
  - (e) 伤口拭子或自其加工、提取或分级分离的样品。
23. 权利要求1的方法,其中所述样品是环境样品。
24. 权利要求1的方法,其进一步包含检测所述单链PCR扩增子。

## 非对称PCR方法

### 【1. 背景技术】

[0001] 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction; PCR) 广泛用于扩增DNA片段, 包括基因组DNA以及自RNA反转录的cDNA, 以用于诊断及其他目的的分析。PCR为以下步骤的重复系列: 变性或解链以产生单链模板; 引物退火; 及由诸如水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*; Taq) DNA聚合酶的热稳定DNA聚合酶进行的引物延伸。

[0002] 典型三步骤PCR方案 (参见PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications, Innis等人编, Academic Press (San Diego, Calif. (USA) 1990, 第1章) 可包括在93~95℃下变性或解链大于5秒, 在55~65℃下引物退火10~60秒及在聚合酶高度活性的温度 (例如对于TaqDNA聚合酶而言72℃) 下引物延伸15~120秒。典型二步骤PCR方案的不同之处在于用于引物退火的温度与用于引物延伸的温度相同, 例如60℃或72℃。对于三步骤PCR或二步骤PCR任一者而言, 扩增涉及将反应混合物通过前述步骤系列循环许多次, 典型地25~40次。在反应过程中, 反应中的单独步骤的时间及温度可在循环之间保持不变, 或其可在反应过程中之一或多个点处改变以提高效率或增强选择性。

[0003] 除了引物对及靶核酸之外, PCR反应混合物典型地含有典型地处于等摩尔浓度的四种脱氧核糖核苷酸5'三磷酸 (deoxyribonucleotide 5' triphosphate; dNTP) 中的每一者、热稳定聚合酶、二价阳离子 (典型地 $Mg^{2+}$ ) 及缓冲剂。除非聚合酶具有反转录酶活性, 否则典型地包括反转录酶以用于RNA靶。此类反应的体积典型地为25~100 $\mu$ l。可在相同反应中扩增多个靶序列。在cDNA扩增的情况下, 除非PCR中所用的聚合酶具有反转录酶活性, 否则PCR之前为用于将RNA反转录成cDNA的独立反应。特定PCR扩增的循环的数目取决于数个因素, 包括: (a) 起始物质的量, (b) 反应效率及 (c) 对产物检测或后续分析的方法及灵敏度。用于典型循环扩增反应的循环条件、试剂浓度、引物设计及适当设备为此项技术中所熟知 (参见例如Ausubel, F. Current Protocols in Molecular Biology (1988) 第15章: "The Polymerase Chain Reaction", J. Wiley New York, N.Y. USA)。

[0004] 理想地, 每一扩增子分子的每一链在一端与引物杂交 (被称作“结合”), 且充当用于后续轮的合成的模板。引物延伸产物或扩增子的产生速率由此是指数的, 在每一循环期间倍增。扩增子包括正 (+) 链及负 (-) 链, 其彼此杂交, 形成双链。

[0005] PCR反应典型地设计成对称, 也即, 由利用设计成彼此“解链温度”或“ $T_m$ ”相同或在数℃内的正向引物及反向引物制造双链复本。通常用于引物设计的计算机软件程序警告用户避免高 $T_m$ 差值, 且具有自动 $T_m$ 匹配特征。

[0006] 为区分典型PCR与本文所述非对称PCR方法, 典型PCR在本文中被称作“对称”PCR。对称PCR由此引起一或多种双链扩增子分子的指数增加, 且在每一轮复制期间每一扩增子的两条链以等量累积。经对称PCR的指数扩增的效率最终降低, 且扩增子累积速率减缓且停止。对对称PCR的动力学分析展现反应由以下构成: (a) 检测不到的扩增期 (初始循环), 在此期间靶序列的两条链指数增加, 但迄今所累积的产物的量小于使用中的特定检测方法的可检测量; (b) 检测到的扩增期 (额外循环), 在此期间靶序列的两条链继续平行地增加且产物的量可检测; (c) 平台期 (终末循环), 在此期间扩增子的两条链的合成逐渐停止且产物的量不

再增加。对称反应减缓且停止,因为浓度增加的互补扩增子链彼此杂交(再退火),且此在竞争中超过独立引物与其对应靶链杂交的能力。典型地,使反应进行足够长以保证累积可检测量的产物,而不用考虑实现该目的所需的精确循环数目。

[0007] 对直接在PCR反应中制造单链DNA具有有限用途的技术是“非对称PCR(asymmetric PCR.)”(Gyllensten及Erlich,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)85:7652-7656(1988); Gyllensten及Erlich,1991,美国专利第5,066,584号)。传统非对称PCR不同于对称PCR,这是因为引物中之一者以限量添加,典型地另一引物的浓度的一百分之一~五分之一。如同对称PCR,双链扩增子在早期温度循环期间积聚,但取决于起始模板的数目,典型地在15~25个PCR循环之后,一种引物耗尽。一条链的线性扩增在后续循环期间利用未耗尽引物进行。文献中所报告的非对称PCR反应中所用的引物通常与已知用于对称PCR的引物相同。Poddar(Poddar,2000,Mol.Cell Probes 14:25-32)通过包括40个热循环的端点分析比较了用于扩增腺病毒受质的对称及非对称PCR。其报告50:1的引物比率最佳且非对称PCR分析具有较好灵敏度,然而,所述灵敏度对于推测上含有较低数目的靶分子的稀释受质溶液显著下降。

[0008] 因此,需要能够例如在诊断应用中检测以低量存在于样品中的靶分子的经改良非对称PCR扩增方法。

## 【2. 发明内容】

[0009] 本发明涉及经改良非对称PCR方法及适用于其的引物及试剂盒。

[0010] 本发明的非对称PCR方法包括指数期及线性期。在指数期期间,靶核酸的两条链经扩增。在线性期期间,链中仅一者经扩增,得到过量的靶核酸的单链。

[0011] 非对称PCR方法经使用具有不同长度及解链温度的引物对实现过量的单链,其中较长引物在本文中被称作“经延伸引物”,且较短引物在本文中被称作“未经延伸引物”。经延伸引物的解链温度比未经延伸引物高,且可用以使用PCR循环选择性扩增靶核酸的单链,在该等PCR循环中,退火步骤在高于未经延伸引物的解链温度但低于经延伸引物的解链温度的温度下进行。选择性扩增产生PCR产物混合物,所述PCR产物混合物富含欲在后续检测分析中探测的靶链。

[0012] 除了与靶核酸互补的序列之外,经延伸引物含有5'延伸部分,其含有与相同引物的靶结合部分互补的序列。在不受理论束缚的情况下,发明人认为使用5'延伸部分允许经延伸引物分子的分子内或分子间杂交,且在PCR反应开始时防止此等较长引物与存在于PCR反应中的DNA分子的任意或非特异性结合。此进而防止非特异性DNA扩增且防止PCR产物中的“噪声”,当扩增以低量存在于生物样品中的靶时,PCR产物中的“噪声”可能成问题。

[0013] 本发明的另一方面是用于执行本文所述非对称PCR程序的试剂盒。

## 【3. 附图简述】

[0014] 图1:示出适用于本发明的非对称PCR方法的引物对,其包含可为对称PCR方法中所用的传统引物的未经延伸引物,及由以下构成的经延伸引物:“A”区,其与靶核酸互补;“B”区,其包括“A”区的至少一部分的直接重复序列或反向重复序列;及任选的“C”区,其可包括间隔区序列和/或全部限制性核酸内切酶识别位点的一部分。

[0015] 图2A~2C。图2A示出当“B”区含有“A”区的至少一部分的反向重复序列时出现的经延伸引物的分子间杂交。图2B示出当“B”区含有“A”区的至少一部分的直接重复序列时出现的经延伸引物的分子内杂交。图2C示出当“B”区含有“A”区的至少一部分的反向重复序列时出现的经延伸引物的分子内杂交。优选地，“A”区与“B”区之间的互补区处于或接近于“A”区的5'端。

[0016] 图3示出本发明的非对称PCR反应中的变性步骤。在变性步骤中,将PCR反应混合物(典型地含有生物样品,所述生物样品含有以下或具有含有以下的风险:靶核酸、非对称引物对、热稳定DNA聚合酶及PCR试剂)加热至高于靶核酸的解链温度,引起靶核酸(若存在)及非对称引物对中的经延伸引物变性以便形成单链。

[0017] 图4示出本发明的非对称PCR反应的指数期的退火步骤,其在低于未经延伸引物的解链温度进行。非对称引物对中的未经延伸引物及经延伸引物均与其对应的互补链杂交。图4展示如在PCR的初始循环中出现的与靶DNA的退火(亦被称作杂交或结合),但在后续循环中退火可能在引物与PCR产物中的互补序列之间出现。如图5B及图6中所描绘,归因于经延伸引物中的“B”区及任选的“C”区,PCR产物将具有那些序列或它们的互补序列。

[0018] 图5A~5B:图5A及图5B示出本发明的非对称PCR反应的指数期的延伸步骤,在此期间热稳定DNA聚合酶使用互补DNA作为模板延伸引物DNA。延伸区以虚线描绘。图5A中的模板为靶DNA的链,且在图5B中的模板为使用非对称引物对及靶DNA产生的PCR产物的链。

[0019] 图6示出本发明的非对称PCR反应的线性期的同时退火及延伸步骤,其在高于未经延伸引物的解链温度及低于经延伸引物的解链温度使用PCR产物链2作为模板进行。此引起PCR产物链2的非对称扩增,截至PCR反应结束,得到相对于PCR产物链1分子过量的PCR产物链2分子。

[0020] 图7A~7B:图7A展示番茄(*Solanum lycopersicum*)17S核糖体RNA序列,其具有使用图7B中所展示的非对称引物对扩增的以粗体展示的160碱基靶区。图7B展示适用于扩增图7A中以粗体展示的160碱基区的非对称引物对,其中经延伸引物的“A”区以普通字展示且“B”区(其为“A”区加双下划线的部分的反向重复序列)以粗体字展示。此经延伸引物不含有任选的“C”区。

[0021] 图8展示优化使用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)引物及探针的本发明的非对称PCR方法中的指数循环及线性循环的数目的研究的结果。信号强度以任意单位(“a.u.”)量测。

[0022] 图9展示比较使用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)引物及探针经本发明的非对称PCR方法对比传统(对称)PCR的低复本数靶检测极限的研究的结果。信号强度以任意单位(“a.u.”)量测。

#### **【4. 实施方式】**

##### **【4.1. 定义】**

[0024] 经延伸引物:PCR引物,其含有:(a)在其3'端的“A”区,所述区具有与对应区靶链1至少75%序列一致性或与靶链2中的对应区至少75%序列互补性;(b)在其5'端的“B”区,所述区包含与“A”区的至少一部分互补的序列;及(c)任选的“C”区,所述区定位于“A”区与“B”区之间。

[0025] 未经延伸引物:PCR引物,其基本上由具有与靶链2中的对应区至少75%序列一致

性或靶链1中的对应区至少75%序列互补性的核苷酸序列组成。参考未经延伸引物的术语“基本上由……组成”意谓核苷酸序列在与靶序列具有(至少75%)互补性的区的5'可含有不大于3个额外核苷酸。

[0026] 引物对:正向及反向引物对(其每一者可为具有说明靶序列中的可能变异的序列变异的引物的混合物),其能够与在小于5,000个碱基对的区内的相同核酸分子的不同链杂交且自该链起始DNA聚合反应。在某些实施方式中,引物对能够与在小于2,500个碱基对或小于1,500个碱基对的区内的相同核酸分子的不同链杂交且自其起始DNA聚合反应。

[0027] 非对称引物对:由经延伸引物及未经延伸引物组成的引物对。

[0028] 解链温度( $T_m$ ):DNA双螺旋的一半将解离变成单链时的温度。由脱氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotide;DNA)构成的线性引物的 $T_m$ 通常由以下计算:“GC百分比(percent GC)”方法(PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications, Innis等人编, Academic Press (San Diego, Calif. (USA) 1990))或“2(A+T)加4(G+C) (2(A+T) plus 4(G+C))”方法(Wallace等人, 1979, Nucleic Acids Res. 6(11):3543-3557)或“最近邻(Nearest Neighbor)”方法(Santa Lucia, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1460-1465; Allawi及 Santa Lucia, 1997, Biochem. 36:10581-10594)。出于申请专利范围的目的, DNA的 $T_m$ 根据“最近邻”方法计算,且非天然存在的碱基(例如2-脱氧肌苷)视为腺嘌呤。

[0029] 引物:在其3'端具有自由羟基的具有至少12个核苷酸的DNA寡核苷酸。引物可包括天然存在的核苷酸及非天然存在的核苷酸(例如含有诸如3-硝基吡咯、5-硝基吡咯或2-脱氧肌苷, 优选2-脱氧肌苷的通用碱基的核苷酸)。除非上下文规定, 否则术语“引物”亦指当引物设计及建构中包括混合碱基以允许其与靶核酸分子中的变异体序列杂交时所产生的引物分子的混合物。靶序列变异体可为物种间或物种内变异体。混合碱基的标准命名法展示于表1:

[0030] 【表1:混合碱基命名法】

[0031] R	A、G
Y	C、T
M	A、C
K	G、T
S	C、G
W	A、T
H	A、C、T
B	C、G、T
V	A、C、G
D	A、G、T
N	A、C、G、T

[0032] 优选地,每一引物在与靶核酸具有互补性的区中含有不超过3个混合碱基。在一些实施方式中,引物在与靶核酸具有互补性的区中含有0、1、2或3个混合碱基。

[0033] 通用引物:序列基本上由经延伸引物的“B”区组成的引物。优选地,在不存在通用引物的情况下进行本发明的非对称DNA扩增方法。

[0034] 直接重复序列:在经延伸引物的“B”区之上下文中,“直接重复序列”意谓与“A”区

的一部分直接互补(也即,具有相同5'至3'顺序的互补序列)的核苷酸序列。

[0035] 反向重复序列:在经延伸引物的“B”区之上下文中,“反向重复序列”意谓与“A”区的一部分反向互补(也即,具有相反5'至3'顺序的互补序列)的核苷酸序列。

[0036] PCR试剂:除非上下文规定,否则术语“PCR试剂”是指除模板核酸、热稳定聚合酶及引物外的PCR反应的组分。PCR试剂典型地包括dNTP(且除了未经标记dNTP之外,可包括经标记(例如经荧光标记)的dNTP)、缓冲剂及含有二价阳离子(例如MgCl<sub>2</sub>)的盐。

[0037] 靶链1:靶链1是指双链靶核酸中与非对称引物对中的未经延伸引物互补的链。

[0038] 靶链2:靶链2是指双链靶核酸中与非对称引物对中的经延伸引物的“A”区互补的链。

[0039] PCR产物链1:PCR产物链1是指由靶核酸及非对称引物对产生的双链PCR产物中的链,其与非对称引物对中的未经延伸引物互补。

[0040] PCR产物链2:PCR产物链1是指由靶核酸及非对称引物对产生的双链PCR产物中的链,其与非对称引物对中的经延伸引物互补。

[0041] 相对应:相对于共有序列一致性或互补序列的具有不同长度的2个核酸链,术语“相对应”是指如上下文规定存在于两条链中的序列重迭或互补性区。

[0042] 大致:参考整数,术语“大致”扩增该整数以包括至多0.50较低且至多0.49较高的分数值。举例而言,“大致68°C”意谓67.50°C~68.49°C的温度,且“大致95%”的序列一致性意谓94.50%~95.49%的序列一致性百分比。

[0043] 约:当用于定量上下文中时,术语“约”应视为包括至多超过所述值10%且下至所述值减10%。在范围之上下文中,术语“约”应视为包括至多超过所述范围之上限10%且下至低于所述范围之下限10%的值。

[0044] 核酸样品:意谓可为靶核酸的来源的样品或用作含有非靶核酸或不含核酸(例如以量测或检测污染或非特异性扩增)的阴性对照的虚设样品。核酸样品不一定含有靶DNA,例如在诊断样品的情况下,样品可为疑似含有靶核酸或具有含有靶核酸的风险的生物样品,例如如4.3节中所描述。

[0045] **【4.2. 引物设计】**

[0046] **【4.2.1. 经延伸引物】**

[0047] 经延伸引物的“A”区具有与靶链1中的对应区至少75%的序列一致性。在某些实施方式中,引物的“A”区与靶链1中的对应区至少80%、至少85%、至少90%或至少95%一致。在其他实施方式中,引物的“A”区具有与靶链1中的对应区100%的序列一致性。

[0048] 换言之,在各种实施方式中,经延伸引物的“A”区具有与靶链2中的对应区的互补序列至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%或100%的序列一致性。典型地,在引物序列与靶序列之间的任何错配定位于5'愈多,其愈有可能在PCR反应期间被容许。本领域技术人员能够容易地设计具有与靶链小于100%的序列一致性但仍可有效扩增靶DNA的引物序列。

[0049] “B”区中与“A”区的至少一部分互补的序列可为直接重复序列或反向重复序列。在“B”区含有“A”区的一部分的直接重复序列时,不同经延伸引物分子可与彼此分子间杂交,如图2B中所展示。在“B”区含有“A”区的一部分的反向重复序列时,经延伸引物分子可以分子内杂交,如图2C中所展示,或与彼此分子间杂交,如图2A中所展示。

[0050] 与“B”区中的序列互补的“A”区的部分优选处于或接近于(例如相隔1、2或3个核苷酸内)“A”区的5'端,也即,处于或接近于“A”区邻接“B”区的位置(或当“C区”存在时的“C区”)。

[0051] 经延伸引物的“B”区长度优选为6~12个核苷酸,也即,长度为优选6、7、8、9、10、11或12个核苷酸。在特定实施方式中,经延伸引物的“B”区长度为8~10个核苷酸,也即,长度为8、9或10个核苷酸。

[0052] 若“C”区存在于经延伸引物中,则其长度优选为1~6个核苷酸,也即,长度为优选1、2、3、4、5或6个核苷酸。

[0053] 经延伸引物的 $T_m$ 优选(但不必)在大致68°C与大致80°C之间。在特定实施方式中,未经延伸引物的 $T_m$ 在大致72°C与大致78°C之间,例如大致72°C、大致73°C、大致74°C、大致75°C、大致76°C、大致77°C或大致78°C。

[0054] 定位于“A”区与“B”区之间的任选的“C”区可充当“A”区与“B”区之间的间隔区,以允许经延伸引物形成发夹环和/或将限制性核酸内切酶序列(优选6剪切序列)引入至PCR产物。限制性核酸内切酶序列可整体在“C”区内或由“C”区的全部或一部分连同分别来自“B”区及“A”区的侧接5'和/或3'序列形成。为将对与靶核酸的杂交的干扰减到最小,“C”区优选与靶链1或靶链2不互补。

[0055] 经延伸引物的 $T_m$ 优选高于未经延伸引物的 $T_m$ 至少大致6°C。优选地,经延伸引物的 $T_m$ 高于未经延伸引物的 $T_m$ 大致15°C~30°C。

[0056] 经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 优选不高于或低于与靶(除任何5'延伸部分外)(至少75%)互补的未经延伸引物的部分的 $T_m$ 超过大致3°C,也即,与靶杂交的正向引物的区的 $T_m$ 优选不高于或低于与靶杂交的反向引物的区的 $T_m$ 超过大致3°C,且反的亦然。

[0057] 经延伸引物的“A”区长度优选为至少12个核苷酸,且优选在12~30个核苷酸的范围内且更优选为14~25个核苷酸。在某些实施方式中,经延伸引物的“A”区长度为14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。

#### [0058] 【4.2.2. 未经延伸引物】

[0059] 未经延伸引物具有与靶链2中的对应区至少75%序列一致性的核苷酸序列。在某些实施方式中,未经延伸引物具有与靶链2中的对应区至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列一致性的核苷酸序列。在其他实施方式中,未经延伸引物具有与靶链2的对应区100%序列一致性的核苷酸序列。

[0060] 换言之,在各种实施方式中,未经延伸引物具有与靶链2的相对应1区的互补序列最少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%或100%序列一致性的核苷酸序列。典型地,在引物序列与靶序列之间的任何错配定位于5'愈多,其愈有可能在PCR反应期间被容许。本领域技术人员能够容易地设计具有与靶链小于100%的序列一致性但仍可有效扩增靶DNA的引物序列。

[0061] 未经延伸引物可进一步具有1、2或3个核苷酸的5'尾。

[0062] 未经延伸引物的 $T_m$ 优选(但不必)在大致50°C与大致62°C之间。在特定实施方式中,未经延伸引物的 $T_m$ 在大致59°C与大致62°C之间,例如大致59°C、大致60°C、大致61°C或大致62°C。

[0063] 未经延伸引物的 $T_m$ 优选比经延伸引物的 $T_m$ 低至少大致6°C。优选地,未经延伸引物

的 $T_m$ 比经延伸引物的 $T_m$ 低大致 $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

[0064] 与靶(除任何5'延伸部分外)(至少75%)互补的未经延伸引物的区的 $T_m$ 优选不高于或低于经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 超过大致 $3^{\circ}\text{C}$ ,也即,与靶杂交的正向引物的区的 $T_m$ 优选不高于或低于与靶杂交的反向引物的区的 $T_m$ 超过大致 $3^{\circ}\text{C}$ ,且反的亦然。

[0065] 未经延伸引物长度优选为至少12个核苷酸,且优选在12~30个核苷酸的范围且更优选为14~25个核苷酸。在某些实施方式中,未经延伸引物长度为14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。

#### [0066] 【4.2.3.通用引物】

[0067] 在例如如美国专利第No.8,735,067B2号中所描述的一些非对称PCR方法中,除了正向及反向引物对之外,使用第三“通用”引物,其具有类似于被添加至引物中之一者中的5'寡核苷酸尾的序列。预期通用引物在初始PCR循环之后参与扩增反应以“平衡”多重扩增反应中的不同靶的扩增效率。

[0068] 在不受理论束缚的情况下,发明人认为包括如美国专利第8,735,067号中所描述的通用引物将降低使用本发明的非对称引物对的扩增效率,所述等通用引物在本发明之上下文中将具有基本上由经延伸引物的“B”区的序列组成的序列(此类通用引物在本文中被称作“通用引物”)。因此,优选在不存在通用引物的情况下进行本发明的非对称DNA扩增方法。

[0069] 在一相关实施方式中,本发明的非对称DNA扩增方法利用每靶区单一非对称引物对,也即,不包括任何额外引物,应认识到单独的引物可为引物分子与由在引物中特定位置处包括混合碱基产生的紧密相关序列的混合物。出于明晰且避免疑惑的目的,此实施方式并未排除在多重扩增反应中使用复数个非对称引物对,其限制条件为单一非对称引物对用于每一扩增子。

#### [0070] 【4.3.靶序列及样品制备】

[0071] 本发明的PCR方法可用于扩增来自生物或环境来源的核酸。靶分子可以来自所有分类学类别的细胞及组织,包括所有门及纲的病毒、细菌及真核生物、原核生物、原生生物、植物、真菌及动物。动物可为脊椎动物、哺乳动物、灵长类动物且尤其为人类。血液、血清、血浆、组织、细胞、唾液、痰、尿、脑脊髓液、胸膜液、乳汁、眼泪、大便、汗、精液、全细胞、细胞成分及细胞抹片为靶分子的适合来源。

[0072] 在某些特定实施方式中,靶核酸分子来自可见于人类血液、尿或腹膜液中的病原体,例如细菌、病毒或真菌。此类病原体的实例包括(但不限于)结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鸟分枝杆菌副结核亚种(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (包括对二甲氧苯青霉素敏感的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 及对二甲氧苯青霉素具有抗性的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*; MRSA))、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、百日咳博德特氏菌

(*Bordetella pertussis*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、诺卡菌属(*Nocardia* sp.)、放线菌属(*Actinomyces* sp.)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、军团菌属(*Legionella*)物种、杰氏肺囊虫(*Pneumocystis jiroveci*)、A型流感病毒、巨细胞病毒、鼻病毒、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、无枝菌酸棒状杆菌(*Corynebacterium amycolatum*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) CI 4413、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、马链球菌(*Streptococcus equi*)及白色假丝酵母(*Candida albicans*)。

[0073] 靶核酸分子优选为DNA但亦可为RNA。在RNA模板的情况下,PCR反应之前可以为反转录反应,以产生用作PCR反应中的靶分子的cDNA分子。反转录反应可在相同反应混合物中或与PCR反应分开的反应混合物中进行。反转录方法在此项技术中已熟知。

[0074] 在并入至初始PCR混合物中之前,靶核酸分子可自生物或环境样品经反转录(若为RNA)、提取和/或纯化。

[0075] 在一些实施方式中,由如美国专利公开第20170218356号中所描述的珠粒搅打程序(*bead beating process*)提取靶核酸分子,所述公开案的内容以全文引用的方式并入本文中。

#### [0076] 【4.4.PCR反应】

##### [0077] 【4.4.1.初始反应混合物】

[0078] 初始PCR反应混合物包括:

- [0079] • 核酸样品;
- [0080] • 非对称引物对;
- [0081] • 热稳定DNA聚合酶;及
- [0082] • PCR试剂。

[0083] 核酸样品:样品核酸可包括生物样品或环境样品或由其衍生的样品,例如自其提取或纯化的DNA。生物样品可为例如血液、血清、血浆、组织、细胞、唾液、痰、尿、脑脊髓液、胸膜液、乳汁、眼泪、大便、汗、精液、全细胞、细胞成分、细胞抹片或其提取物或衍生物。样品核酸亦可为阳性或阴性对照样品。阴性对照核酸样品可能不含核酸或含有已知不含与非对称引物对杂交的序列的核酸。

[0084] 非对称引物对:PCR反应中的经延伸引物及未经延伸引物的初始浓度可各自在200nM~6 $\mu$ M范围内。经延伸引物及未经延伸引物可以等摩尔量包括于初始PCR反应中,例如各自处于约200nM与1 $\mu$ M之间范围内的浓度,例如各自处于500nM的浓度。可替代地,经延伸引物及未经延伸引物可以非等摩尔量包括于初始PCR反应中。在某些实施方式中,经延伸引物的初始浓度优选超过未经延伸引物的浓度,例如约2倍~30倍摩尔过量。因此,在某些方面中,经延伸引物浓度在约1 $\mu$ M与6 $\mu$ M之间范围内,且未经延伸引物浓度在约50nM与200nM之间范围内。

[0085] 非对称引物对可经设计以扩增来自任何来源的核酸,且对于诊断应用,非对称引物对可经设计以扩增来自诸如4.3节中所标识的那些病原体的DNA。

[0086] 非对称引物对可经设计以便能够同时扩增存在于多个物种中的保守核酸序列,例如细菌中的高度保守16S核糖体序列。

[0087] 热稳定DNA聚合酶:可用于本发明的非对称PCR的热稳定聚合酶包括(但不限于)Vent(Tli/嗜热热球菌(Thermococcus Litalis))、Vent外切、Deep Vent、Deep Vent外切、Taq(水生栖热菌(Thermus aquaticus))、Hot Start Taq、Hot Start Ex Taq、Hot Start LA Taq、DreamTaq™、TopTaq、RedTaq、Taqurate、NovaTaq™、SuperTaq™、Stoffel片段、Discoverase™ dHPLC、9°Nm、**Phusion®**、LongAmp Taq、LongAmp Hot Start Taq、OneTaq、**Phusion®** Hot Start Flex、Crimson Taq、Hemo KlenTaq、KlenTaq、Phire Hot Start II、DyNAzyme I、DyNAzyme II、M-MulV Reverse Transcript、Pyro**Phage®**、Tth(嗜热栖热菌(Thermos termophilus)HB-8)、Tfl、Amlitherm™、Bacillus DNA、DisplaceAce™、Pfu(强烈火球菌(Pyrococcus furiosus))、Pfu TurboTaq、PfuTurbo、ReproFast、PyroBest™、VeraSeq、Mako、Manta、Pwo(沃氏火球菌(Pyrococcus woesei))、ExactRun、KOD(小宝热球菌(Thermococcus kodakaraensis))、Pfx、ReproHot、Sac(嗜酸热硫化叶菌(Sulfolobus acidocaldarius))、Sso(硫磺矿硫化叶菌(Sulfolobus solfataricus))、Tru(红色栖热菌(Thermus ruber))、Pfx50™(泽里格氏热球菌(Thermococcus zilligi))、AccuPrime™ GC-Rich(烟孔火叶菌(Pyrolobus fumarius))、火球菌GB-D、Tfi(丝状栖热菌(Thermus filiformis))、Tfi外切、ThermalAce™、Taq(嗜酸热原体(Thermoplasma acidophilum))、Mth(热自养甲烷杆菌(M. thermoautotrophicum))、Pab(阿比西火球菌(Pyrococcus abyssi))、Pho(堀越氏火球菌(Pyrococcus horikosihi))、B103(小短尾噬菌体(Picovirinae Bacteriophage) B103)、Bst(嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus))、Bst大片段、Bst 2.0、Bst 2.0WarmStart、Bsu、Therminator™、Therminator™ II、Therminator™ III及Therminator™ T。在一优选实施方式中,DNA聚合酶为Taq聚合酶,诸如Taq、Hot Start Taq、Hot Start Ex Taq、Hot Start LA Taq、DreamTaq™、TopTaq、RedTaq、Taqurate、NovaTaq™或SuperTaq™。

[0088] PCR试剂:PCR试剂(dNTP、缓冲剂、盐)为本领域技术人员所熟知。可将其分别地添加至初始PCR反应混合物或整体或部分预混合,例如作为PCR主混合物的一部分。

[0089] 适宜地,可将PCR主混合物在初始化反应之前制备且储存以供使用。PCR主混合物可包括DNA聚合酶、dNTP(包括必要时任选的经荧光标记的dNTP)、缓冲剂和/或盐,及任选的反转录酶及诸如防腐剂的各种添加剂。引物及样品核酸典型地不并入至PCR主混合物中,但在起始PCR反应之前不久并入至初始PCR反应混合物中。

[0090] 本发明的方法进一步包括以下任选的步骤:由将初始反应混合物的组分在PCR容器(诸如PCR管)中合并并在起始热循环之前形成初始反应混合物。

[0091] **【4.4.2.PCR反应条件】**

[0092] 用于本发明的非对称PCR方法的非对称循环的说明性集合在表2中展示。

[0093] **【表2】**

阶段	步骤	温度	时间	循环数	
[0094]	初始变性	90 ~ 100°C, 优选 95°C	0 ~ 5 分钟, 优选 2 分钟	0 ~ 1	
	指数期	变性	90 ~ 100°C, 优选 95°C	15 ~ 25 秒, 优选 20 秒	20 ~ 40, 优选 30 ~ 37 (例如 35)
		退火	58°C	12 ~ 18 秒, 优选 15 秒	
		延伸	72°C	30 ~ 50 秒, 优选 40 秒	
线性期	变性	90 ~ 100°C, 优选 95°C	15 ~ 25 秒, 优选 20 秒	15 ~ 25, 优选 20	
	同时退火及延伸	72°C	40 ~ 60 秒, 优选 50 秒		
经延长的延伸	经延长的延伸	72°C	0 ~ 5 分钟, 优选 2 分钟	0 ~ 1	

[0095] 表2中所展示的循环数的范围可用于任何非对称引物对,且最佳循环数将取决于初始PCR混合物中靶DNA的复本数:初始复本数愈大,指数期中需要愈少循环数以产生足够数量的充当线性期模板的PCR产物。对循环数的优化是本领域技术人员的日常工作。

[0096] 在经延伸引物的 $T_m$ 高于72°C(例如75~80°C)且未经延伸引物的 $T_m$ 高于58°C且低于72°C(例如60~62°C)的情况下且当热稳定DNA聚合酶在72°C下具有活性时,表2中所展示的温度尤其适用。

[0097] 可根据引物的解链温度及PCR产物长度改变循环时间,特定而言延伸时间,其中较长PCR产物需要较长延伸时间。经验法则(rule of thumb)是延伸步骤应为每1,000个扩增子碱基至少60秒。可在线性期中延长延伸步骤以提供用于退火的额外时间。

#### [0098] 【4.5.PCR产物的检测】

[0099] 可用荧光标记对由本文所述方法产生的富含单链PCR产物的PCR产物链2进行标记以用于检测。

[0100] 荧光标记可由在PCR期间并入经荧光标记的核苷酸和/或由使用用于PCR的经标记引物来达成。

[0101] 适合荧光部分的实例包括FITC、EDANS、得克萨斯红(Texas red)、6-joe、TMR、Alexa 488、Alexa 532、“BODIPY FL/C3”、“BODIPY R6G”、“BODIPY FL”、Alexa 532、“BODIPY FL/C6”、“BODIPY TMR”、5-FAM、“BODIPY 493/503”、“BODIPY 564”、“BODIPY 581”、Cy3、Cy5、R110、TAMRA、得克萨斯红(Texas red)及x-若丹明(x-Rhodamine)。

[0102] 可将荧光部分连接至dNTP,特别是含有胞嘧啶作为碱基的那些(胞苷酸、胞苷5'-磷酸、胞苷5'-二磷酸、胞苷5'-三磷酸或其聚合物或含有胞苷酸的聚合物)。

[0103] dNTP标记的位置可以在碱基(胺基)、磷酸基(OH基团)或脱氧核苷部分(2'-或3'-OH基团)处。优选位置是在碱基处。

[0104] 如其他核苷酸,经荧光标记的dNTP可在随机位点(典型地dC位点)并入至PCR扩增子的两条链中,且由DNA聚合酶延伸。

[0105] 荧光dNTP可以高度浓缩形式商购且可在不调节各未经标记dNTP的浓度的情况下添加至PCR反应混合物中。对于大部分PCR扩增而言,dNTP与荧光dNTP的典型比率在100:1与1000:1之间。因此,PCR试剂中可以未经标记dNTP的0.1%~1%(摩尔)量包括经荧光标记的dNTP。

[0106] 可经与探针分子(例如结合至微阵列的探针分子)杂交实现对经荧光标记的PCR产物(例如在本发明的方法中过量产生的单链产物链2)的检测。如美国专利第9,738,926号中

所描述,适合微阵列是统利用三维交联聚合物网络,所述专利之内容以全文引用的方式并入本文中。

#### [0107] 【4.6. 试剂盒】

[0108] 本发明进一步提供适于进行本文所述非对称PCR方法的试剂盒。试剂盒典型地包括至少一个非对称引物对。此外,本发明的试剂盒可包括探针分子、DNA聚合酶、未经标记dNTP、经标记dNTP、缓冲剂、盐溶液或其任何组合。可将试剂(例如DNA聚合酶、dNTP、盐和/或缓冲剂)中的一些以主混合物形式预合并。

#### [0109] 【5. 实施例】

[0109] 使用经延伸引物作为正向引物且使用未经延伸引物作为反向引物,用设计成扩增来自金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 16S基因(不包括引物序列)的506bp区的非对称引物对创建初始PCR反应。核酸样品为人类DNA外加已知复本数的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)基因组DNA(此等研究的靶DNA)。正向引物(计算 $T_m$ 为68.1°C)在5'末端经Cy5标记且含有“A”区(计算 $T_m$ 为64.09°C)、与“A”区的5'端互补的“B”区,且不含作为在“A”区与“B”区之间的间隔区的“C”区。反向引物包括可与靶序列中的任何其他碱基进行碱基配对的肌苷。取决于互补靶碱基,反向引物的 $T_m$ 的范围为60~61.9°C。使初始PCR反应经历以下PCR循环:

[0110] • 在95°C下的2分钟的初始变性期,

[0111] • 各自由在95°C下变性20s、在58°C下退火15s及在72°C下延伸40s组成的指数循环;

[0112] • 各自由在95°C下变性20s及随后在72°C下同时退火/延伸组成的线性循环,及

[0113] • 最后在72°C下的2分钟经延长的延伸期。

[0114] 在实验1中,改变靶DNA分子数及指数及线性循环数,以使对该靶核酸的复本数的指数及线性循环数优化。测定所包括的反向(未经延伸引物)的量,使得截至指数期结束,未经延伸引物将被耗尽或几乎耗尽,且截至非对称PCR的线性期,极少未经延伸引物的分子将继续存在。此等计算的结果在表3中所展示:

#### [0115] 【表3】

反向引物浓度	反向引物分子/L	20 $\mu$ l 反应中反向引物分子	完全用尽引物所需的循环数		
			1 个基因组复本	10 个基因组复本	100 个基因组复本
0.1	6.02 <sup>+16</sup>	1.20 <sup>+12</sup>	40.1	36.8	33.5
0.2	1.20 <sup>+17</sup>	2.41 <sup>+12</sup>	41.1	37.8	34.5
0.5	3.01 <sup>+17</sup>	6.02 <sup>+12</sup>	42.4	39.1	35.8

[0116] 由与微阵列杂交对实验1中所产生的PCR产物的量进行定量。结果展示于图8中。

[0117] 在实验2中,使用各自500nM的正向探针及反向探针在PCR反应中对使用非对称PCR及对称PCR由不同模板浓度产生的PCR产物的量进行比较。对于非对称反应,所使用的指数循环及线性循环数分别为35及20。在对称反应中,不使用线性循环。

[0118] 由与微阵列杂交检测PCR产物的量。结果展示于图9中。大于0.95的 $R^2$ 值指示在各种情况下回归线是对数据的有效拟合。

#### [0119] 【6. 特定实施方式】

- [0121] 本发明由下文的特定实施方式例示。
- [0122] 1. 用于经非对称聚合酶链反应 (PCR) 产生单链DNA扩增子的方法, 所述方法包括以下步骤:
- [0123] (a) 使初始混合物在扩增PCR条件下经历热循环的第一阶段, 所述初始混合物包含:
- [0124] (i) 核酸样品;
- [0125] (ii) 非对称引物对,
- [0126] (iii) 热稳定DNA聚合酶, 及
- [0127] (iv) PCR试剂,
- [0128] 其中所述热循环的第一阶段包含循环通过至少3个温度, 所述3个温度包含: (1) 用于变性的高于靶核酸的 $T_m$ 的第一温度、(2) 用于引物退火的低于未经延伸引物的 $T_m$ 的第二温度、及 (3) 适用于由该热稳定DNA聚合酶进行的延伸的第三温度,
- [0129] 由此产生中间混合物, 若该靶核酸存在于该样品中, 则该中间混合物包含由未经延伸引物及经延伸引物二者延伸的DNA扩增子;
- [0130] (b) 使该中间混合物经历热循环的第二阶段, 所述第二阶段包含循环通过: (1) 用于变性的高于该等DNA扩增子的 $T_m$ 的第四温度、(2) 第五温度, 其 (i) 低于经延伸引物的 $T_m$ , (ii) 高于未经延伸引物的 $T_m$ 且 (iii) 适用于由该热稳定DNA聚合酶进行的延伸,
- [0131] 由此产生最终混合物, 若该靶核酸存在于该样品中, 则该最终混合物包含单链DNA扩增子。
- [0132] 2. 实施方式1的方法, 其中步骤 (a) 之前为初始变性期。
- [0133] 3. 实施方式2的方法, 其中初始变性在第一温度下进行。
- [0134] 4. 实施方式1~3之任一项的方法, 其中步骤 (b) 之后为额外延伸期。
- [0135] 5. 实施方式4的方法, 其中额外延伸在第五温度下进行。
- [0136] 6. 实施方式1~5之任一项的方法, 其中第一温度与第四温度相同。
- [0137] 7. 实施方式1~6之任一项的方法, 其中第三温度与第五温度相同。
- [0138] 8. 实施方式1~7之任一项的方法, 其中经延伸引物的“B”区为“A”区的至少一部分的反向重复序列的互补序列。
- [0139] 9. 实施方式8的方法, 其中“B”区长度为至少4个核苷酸。
- [0140] 10. 实施方式8或实施方式9的方法, 其中“B”区比“A”区短3个核苷酸。
- [0141] 11. 实施方式1~7之任一项的方法, 其中经延伸引物的“B”区为“A”区的至少一部分的直接重复序列的互补序列。
- [0142] 12. 实施方式11的方法, 其中经延伸引物的“B”区长度为至少4个核苷酸。
- [0143] 13. 实施方式11或实施方式12的方法, 其中经延伸引物的“B”区比“A”区短3个核苷酸。
- [0144] 14. 实施方式1~11之任一项的方法, 其中经延伸引物的“B”区长度为7~15个核苷酸。
- [0145] 15. 实施方式14的方法, 其中经延伸引物的“B”区长度为6~12个核苷酸。
- [0146] 16. 实施方式15的方法, 其中经延伸引物的“B”区长度为8~10个核苷酸。
- [0147] 17. 实施方式15的方法, 其中经延伸引物的“B”区长度为6个核苷酸。

- [0148] 18.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为7个核苷酸。
- [0149] 19.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为8个核苷酸。
- [0150] 20.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为9个核苷酸。
- [0151] 21.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为10个核苷酸。
- [0152] 22.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为11个核苷酸。
- [0153] 23.实施方式15的方法,其中经延伸引物的“B”区长度为12个核苷酸。
- [0154] 24.实施方式1~23之任一项的方法,其中未经延伸引物不具有5'尾延伸部分。
- [0155] 25.实施方式1~23之任一项的方法,其中未经延伸引物具有3个核苷酸或更短的5'尾延伸部分。
- [0156] 26.实施方式1~25之任一项的方法,其中未经延伸引物长度为12~35个核苷酸。
- [0157] 27.实施方式26的方法,其中未经延伸引物长度为15~25个核苷酸。
- [0158] 28.实施方式26的方法,其中未经延伸引物长度为18~20个核苷酸。
- [0159] 29.实施方式1~28之任一项的方法,其中经延伸引物的“A”区长度为12~35个核苷酸。
- [0160] 30.实施方式29的方法,其中经延伸引物的“A”区长度为15~25个核苷酸。
- [0161] 31.实施方式29的方法,其中经延伸引物的“A”区长度为18~20个核苷酸。
- [0162] 32.实施方式1~31之任一项的方法,其中经延伸引物包含“C”区。
- [0163] 33.实施方式32的方法,其中“C”区长度为1~8个核苷酸。
- [0164] 34.实施方式32或实施方式33的方法,其中“C”区单独或与侧接“A”区核苷酸和/或“B”区核苷酸组合形成限制性核酸内切酶的识别位点。
- [0165] 35.实施方式34的方法,其中限制性核酸内切酶为6剪切。
- [0166] 36.实施方式1~35之任一项的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高至少8°C。
- [0167] 37.实施方式36的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高10°C~30°C。
- [0168] 38.实施方式37的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高15°C~30°C。
- [0169] 39.实施方式38的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高12°C~20°C。
- [0170] 40.实施方式39的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 比未经延伸引物的 $T_m$ 高13°C~17°C。
- [0171] 41.实施方式1~40之任一项的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 范围在68°C与80°C之间。
- [0172] 42.实施方式41的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 在73°C与77°C之间。
- [0173] 43.实施方式42的方法,其中经延伸引物的 $T_m$ 为75°C。
- [0174] 44.实施方式1~43之任一项的方法,其中未经延伸引物的 $T_m$ 范围在50°C与62°C之间。
- [0175] 45.实施方式44的方法,其中未经延伸引物的 $T_m$ 范围在58°C与62°C之间。
- [0176] 46.实施方式45的方法,其中未经延伸引物的 $T_m$ 为60°C。
- [0177] 47.实施方式1~46之任一项的方法,其中经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 范围在50°C与62°C之间。
- [0178] 48.实施方式47的方法,其中经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 范围在58°C与62°C之间。
- [0179] 49.实施方式48的方法,其中经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 为60°C。

- [0180] 50.实施方式1~49之任一项的方法,其中经延伸引物的“A”区的 $T_m$ 与未经延伸引物的 $T_m$ 相差不超过3°C。
- [0181] 51.实施方式1~50之任一项的方法,其中第一温度为95°C。
- [0182] 52.实施方式1~51之任一项的方法,其中第二温度为58°C。
- [0183] 53.实施方式1~52之任一项的方法,其中第三温度为72°C。
- [0184] 54.实施方式1~53之任一项的方法,其中第四温度为95°C。
- [0185] 55.实施方式1~54之任一项的方法,其中第五温度为72°C。
- [0186] 56.实施方式1~55之任一项的方法,其中使由中间混合物中未经延伸引物及经延伸引物二者延伸的DNA扩增子彼此杂交以形成双链DNA扩增子。
- [0187] 57.实施方式1~56之任一项的方法,其中由PCR反应产生的DNA扩增子长度在100~2,500个核苷酸的范围内。
- [0188] 58.实施方式57的方法,其中由PCR反应产生的DNA扩增子长度在200~2,000个核苷酸的范围内。
- [0189] 59.实施方式57的方法,其中由PCR反应产生的DNA扩增子长度在250~1,500个核苷酸的范围内。
- [0190] 60.实施方式57的方法,其中由PCR反应产生的DNA扩增子长度在300~1,000个核苷酸的范围内。
- [0191] 61.实施方式1~60之任一项的方法,其中核酸样品为测试核酸样品。
- [0192] 62.实施方式61的方法,其中测试核酸样品含有以下或具有含有以下的风险或疑似含有以下:靶核酸分子。
- [0193] 63.实施方式1~60之任一项的方法,其中核酸样品为对照核酸样品。
- [0194] 64.实施方式63的方法,其中对照核酸样品为已知含有一或多种靶核酸分子的阳性对照样品。
- [0195] 65.实施方式63的方法,其中对照核酸样品为已知含有靶核酸分子的阳性对照样品。
- [0196] 66.实施方式1~65之任一项的方法,其为多重PCR反应。
- [0197] 67.实施方式66的方法,其中初始混合物包含至少2个非对称引物对。
- [0198] 68.实施方式67的方法,其中初始混合物包含2个、3个或4个非对称引物对。
- [0199] 69.实施方式61~68之任一项的方法,其中初始混合物进一步包含对照引物。
- [0200] 70.实施方式69的方法,其中对照引物与靶序列互补,所述靶序列不同于与非对称引物对互补的靶序列。
- [0201] 71.实施方式69或实施方式70的方法,其中对照引物为标准引物。
- [0202] 72.实施方式69或实施方式70的方法,其中对照引物为非对称引物对。
- [0203] 73.实施方式1~72之任一项的方法,其中在不存在通用引物的情况下进行PCR。
- [0204] 74.实施方式1~73之任一项的方法,其中第一阶段包含20~40轮的热循环。
- [0205] 75.实施方式74的方法,其中第二阶段包含30~37轮的热循环。
- [0206] 76.实施方式1~75之任一项的方法,其中第一阶段引起靶核酸的两条链的指数扩增。
- [0207] 77.实施方式1~76之任一项的方法,其中第二阶段包含15~25轮的热循环。

- [0208] 78.实施方式1~77之任一项的方法,其中第二阶段引起靶核酸的单链的线性扩增。
- [0209] 79.实施方式1~78之任一项的方法,其中初始混合物中经延伸引物及未经延伸引物中的每一者的浓度范围在200nM~6 $\mu$ M之间。
- [0210] 80.实施方式1~79之任一项的方法,其中初始混合物中经延伸引物及未经延伸引物中的每一者的浓度相同。
- [0211] 81.实施方式80的方法,其中初始混合物中经延伸引物及未经延伸引物中的每一者的浓度范围在100nM与1000nM之间。
- [0212] 82.实施方式81的方法,其中初始混合物中经延伸引物及未经延伸引物中的每一者的浓度范围在250nM与750nM之间。
- [0213] 83.实施方式82的方法,其中初始混合物中经延伸引物及未经延伸引物中的每一者的浓度为大致500nM。
- [0214] 84.实施方式1~79之任一项的方法,其中初始混合物中经延伸引物与未经延伸引物的浓度不同。
- [0215] 85.实施方式84的方法,其中初始混合物中经延伸引物的浓度范围在1 $\mu$ M与6 $\mu$ M之间。
- [0216] 86.实施方式84或实施方式85的方法,其中初始混合物中未经延伸引物的浓度范围在50nM与200nM之间。
- [0217] 87.实施方式1~86之任一项的方法,其中经延伸引物经标记。
- [0218] 88.实施方式87的方法,其中经延伸引物在其5'端经标记。
- [0219] 89.实施方式87或实施方式88的方法,其中标记为荧光团。
- [0220] 90.实施方式1~89之任一项的方法,其中非对称引物对包含与细菌序列互补的序列。
- [0221] 91.实施方式90的方法,其中细菌序列为16S DNA序列。
- [0222] 92.实施方式90的方法,其中细菌序列为细菌内部经转录区DNA序列。
- [0223] 93.实施方式1~89之任一项的方法,其中非对称引物对包含与真菌DNA序列互补的序列。
- [0224] 94.实施方式1~93之任一项的方法,其中样品为生物样品。
- [0225] 95.实施方式94的方法,其中生物样品为血液或自其加工、提取或分级分离的样品。
- [0226] 96.实施方式94的方法,其中生物样品为腹膜透析液或自其加工、提取或分级分离的样品。
- [0227] 97.实施方式94的方法,其中生物样品为尿或自其加工、提取或分级分离的样品。
- [0228] 98.实施方式94的方法,其中生物样品为痰或自其加工、提取或分级分离的样品。
- [0229] 99.实施方式94的方法,其中生物样品为伤口拭子或自其加工、提取或分级分离的样品。
- [0230] 100.实施方式1~93之任一项的方法,其中样品为环境样品。
- [0231] 101.实施方式1~100之任一项的方法,其进一步包含检测单链PCR扩增子。
- [0232] 102.实施方式101的方法,其包含使单链PCR扩增子与探针分子杂交及检测扩增子

与探针分子的杂交。

[0233] 103.实施方式102的方法,其中探针分子经标记。

[0234] 104.实施方式103的方法,其中探针分子经荧光团标记。

[0235] 105.实施方式102~104之任一项的方法,其中探针分子与经延伸引物的至少一部分互补。

[0236] 106.实施方式105的方法,其中探针分子长度为至少15个核苷酸。

[0237] 107.实施方式105或实施方式106的方法,其中探针分子具有与经延伸引物的“A”区的至少8个核苷酸互补的区。

[0238] 108.实施方式102~104之任一项的方法,其中探针分子与未经延伸引物的至少一部分互补。

[0239] 109.实施方式108的方法,其中探针分子长度为至少15个核苷酸。

[0240] 110.实施方式108或实施方式109的方法,其中探针分子具有与经延伸引物的“A”区的至少8个核苷酸互补的区。

[0241] 虽然已说明且描述各种特定实施方式,但应了解可在不偏离本发明的精神及范畴的情况下做出各种改变。

[0242] **【7.参考文献的引用】**

[0243] 本申请案中所引用的所有公开案、专利、专利申请案及其他文献均出于所有目的特此以全文引用的方式并入,引用的程度就如同个别地指示将各个别公开案、专利、专利申请案及其他文献以引用的方式并入以用于所有目的一样。在并入本文中之一或多个文献的教导内容与本发明不一致的情况下,以本说明书的教导内容为准。

非对称引物对

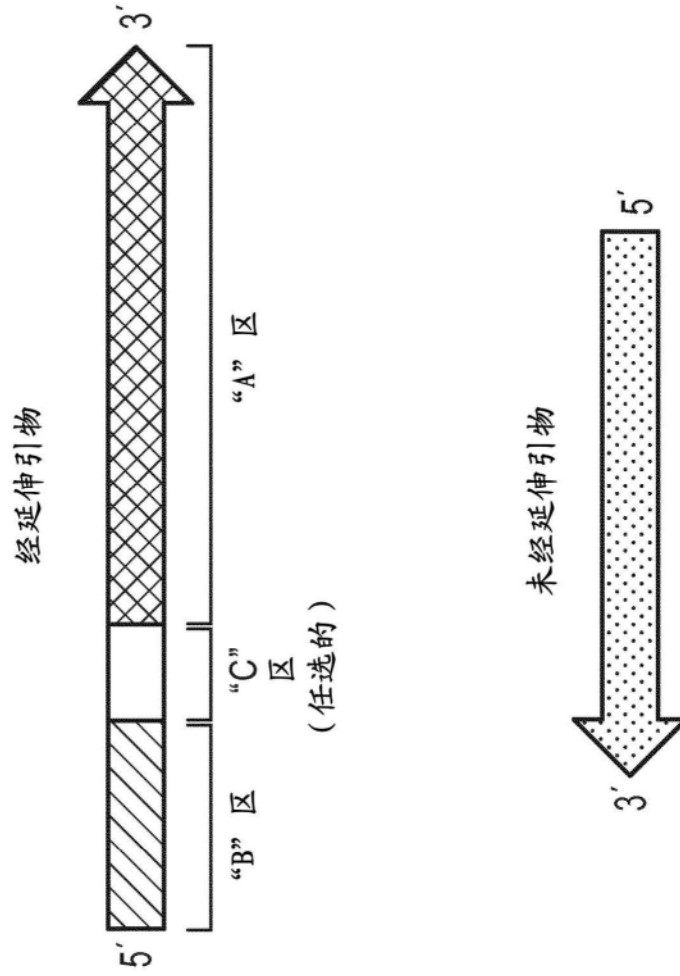
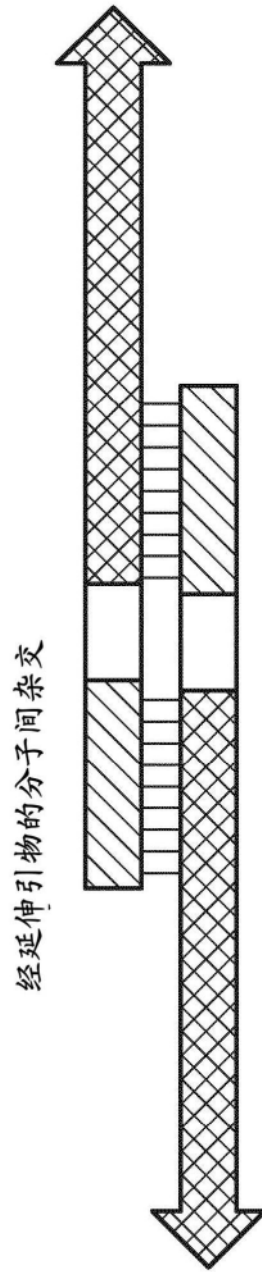


图1



经延伸引物的分子间杂交

图2A

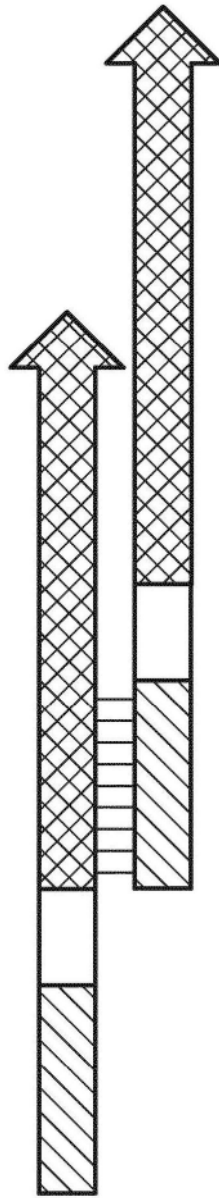


图2B

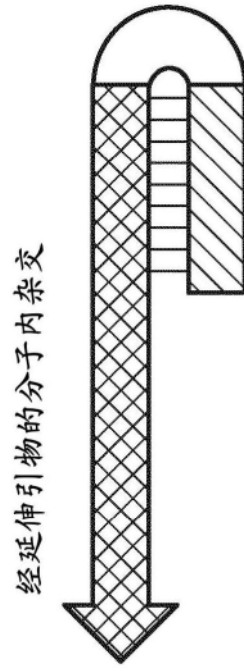


图2C

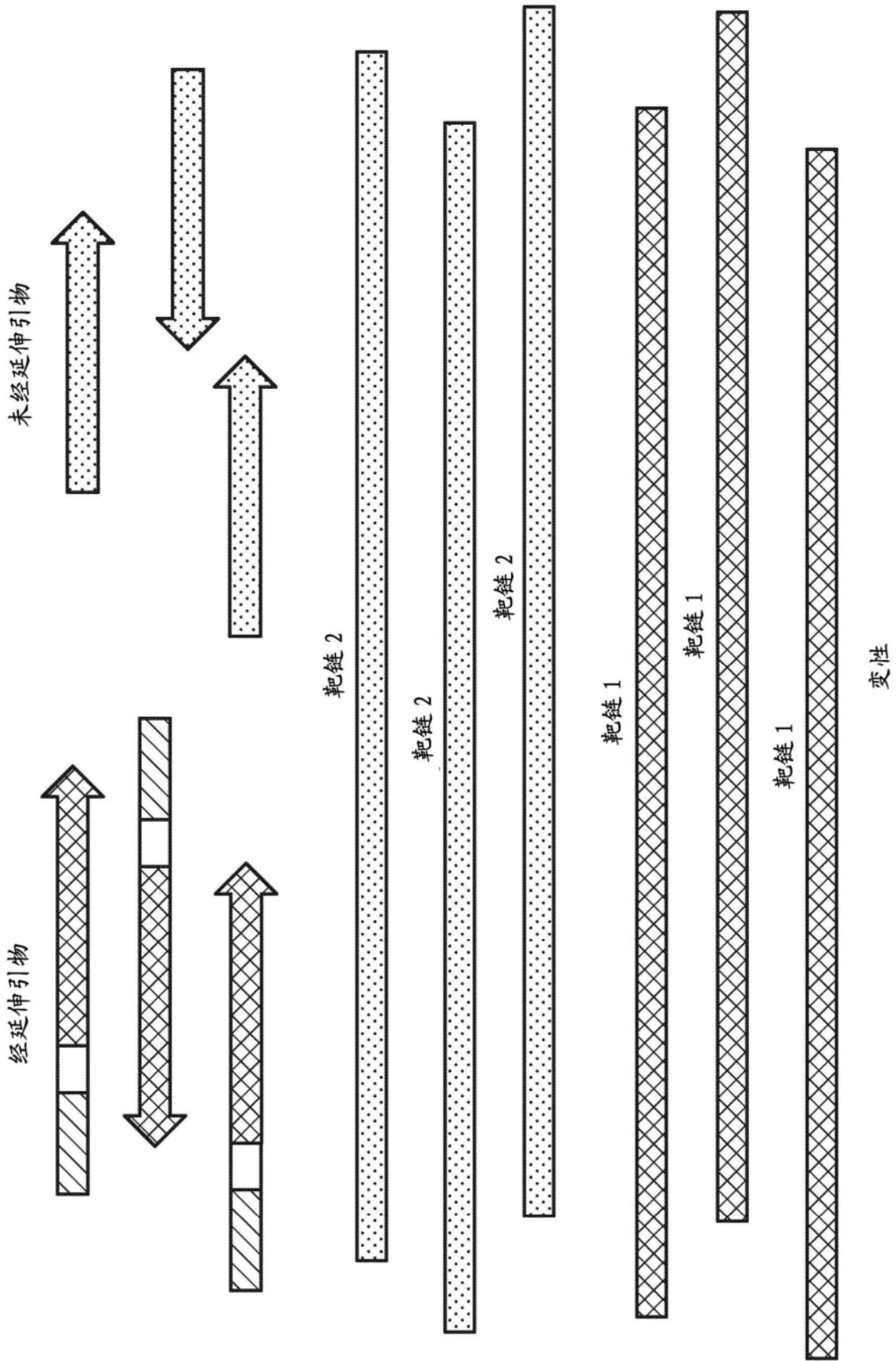


图3

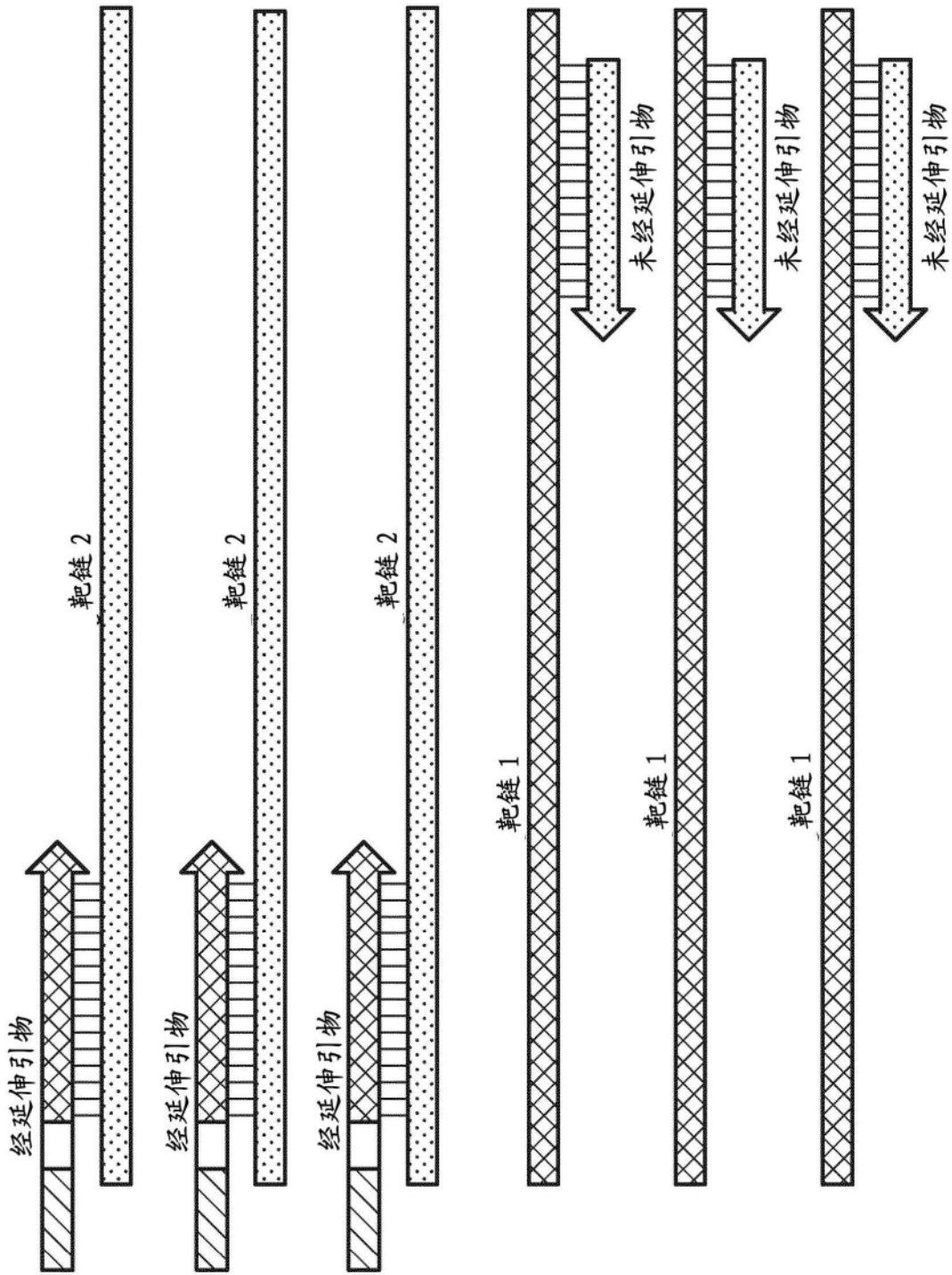
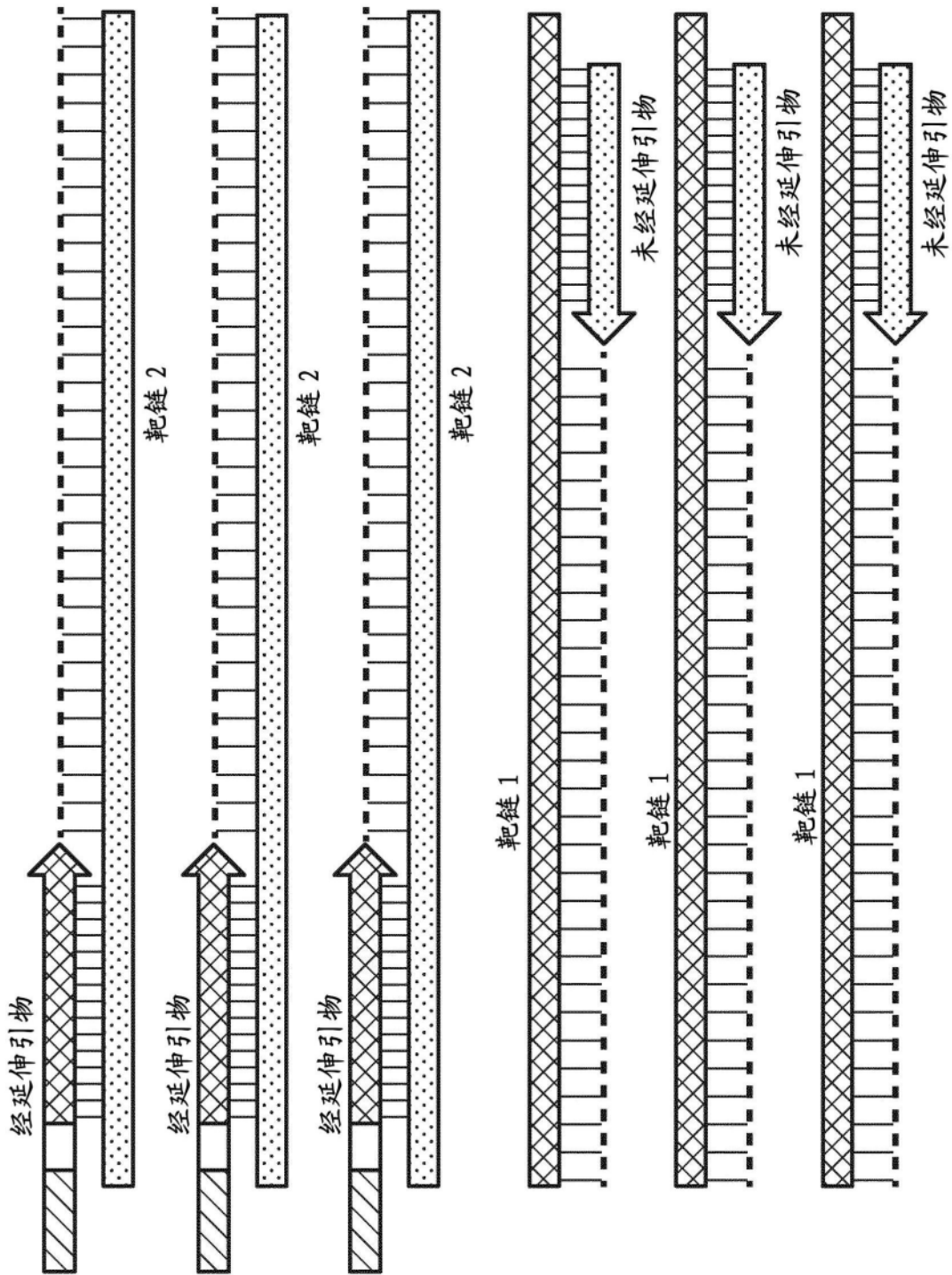
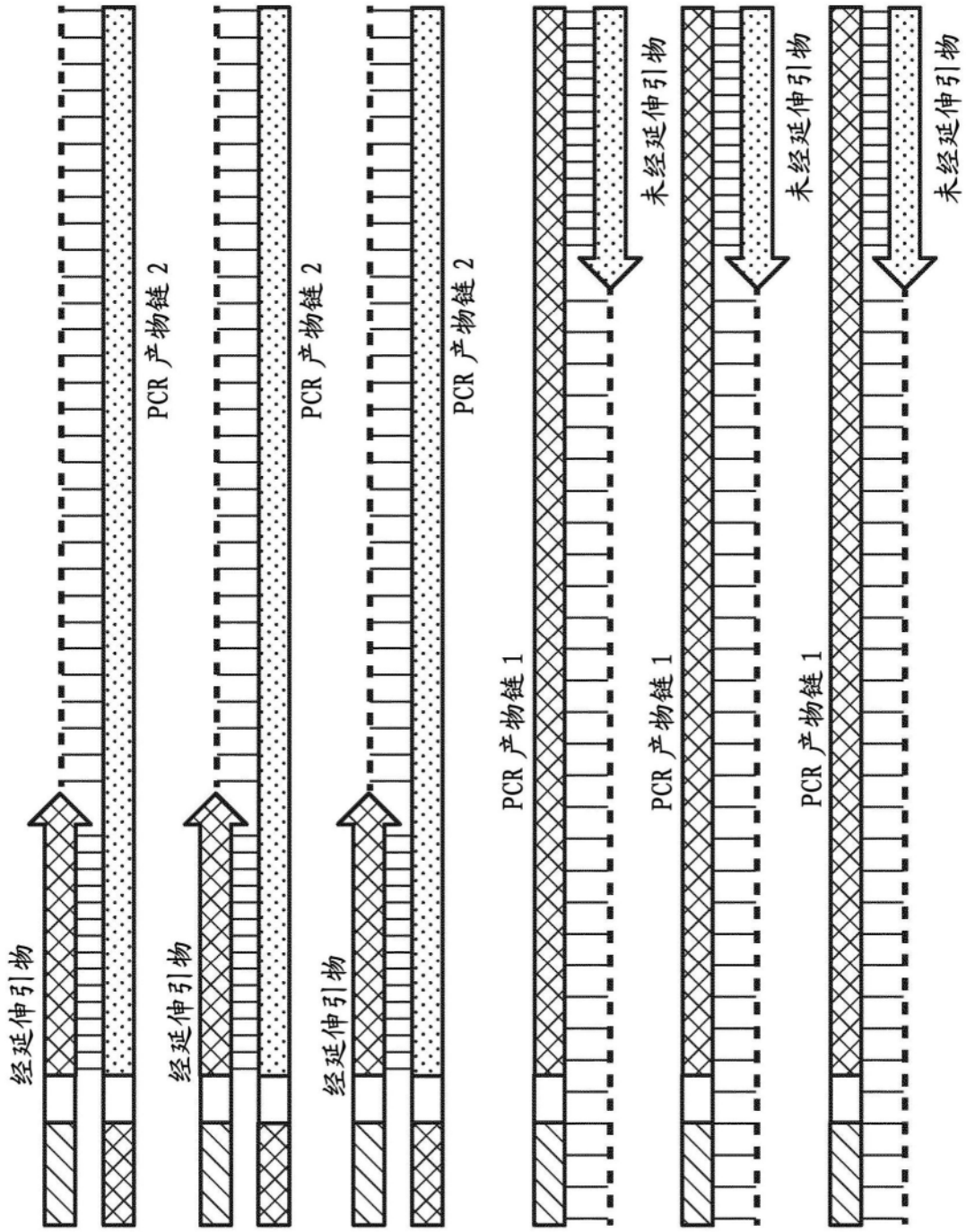


图4



延伸—指数期 (自靶核酸)

图5A



延伸—指数期 (自 PCR 产物)

图5B

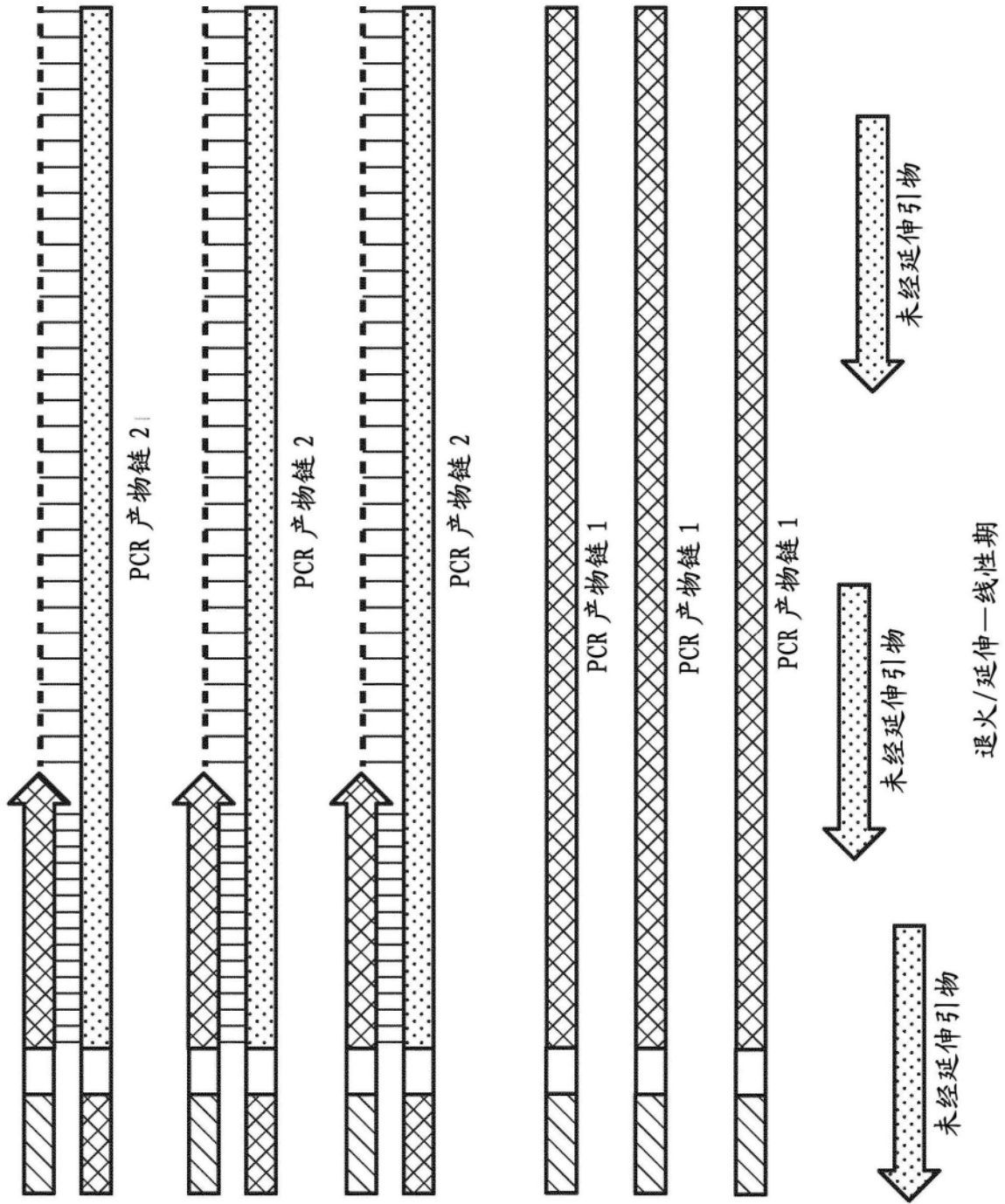


图6

TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAATGCTAAGTATGAAC  
 AAATTCAGACTGTGAAACTGCCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTT**TGTTTGATGGTACTACTCTC**  
**GGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCAACAACCCCGACTTCTGGAAAGGATGCATTTATTA**  
**GATAAAAGGTCGACCGGGCTCTGCTGCGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCATCGT**  
 GCCGGCAGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCTTACCATGGTGG  
 TGACGGGTGACGGAGAAATTAGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCCACATCCAAGGA  
 AGGCAGCAGCGCGCAAAATTACCCAAATCCTGACACGGGAGGTAGTGACAAATAAATAACAATACCGGGCT  
 CTATGAGTCTGGTAATTGGAAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAAACGAGGATCCATTTGGAGGGCAAGTCTG  
 GTGCCAGCAGCCGGTAAATTCAGCTCCAAATAGCGTATAATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAAGCTCGTAG  
 TTGGACTTTGGGATGGGCCGGCCGGTCCGCCCTAGGTGTGCACCCGGTCTCGTCCCTTCTGTCCGGCGA  
 TGGCTCCTGGCCTTAATTGGCCGGGTCTGGCCCTCCGGCGCTGTACTTTGAAGAAATTAGAGTGTCAA  
 AGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGATAACATATAGGATTTCCGGTCCATATTACGTTGGCCT  
 TCGGGATCGGAGTAATGATTAACAGGACAGTCCGGGCAATTCGATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTC  
 TGGATTTATGAAAGACGAACAACCTGCGAAAGCAATTGCCAAGGATGTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGT  
 TGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTAGTCTCAACCAATAACGATGCCGACCCAGGGATCGCGGA  
 TGTGCTTTTAGGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTCCCGGGGGAGTATGGTC  
 GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAAATGACGGAAAGGCACCCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAAATTTGACT  
 CAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATGACACAGACTGAGAGCTCTTCTTGATTC  
 TGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGA  
 CCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGTATCCCTTCGCGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTAGCCCTTTA  
 GGCCCGGAAAGTTTGAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCTGGGCCACCGCGCTACAC  
 TGAATGATTCAACGAGCTTATAGCCTTTGCCGACAGGCCGGTAATCTTTGAAATTTCAATCGTGAATGGG  
 ATAGATCATTGCAAATTGTTGGTCTTCAACGAGGAAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCAATCAGCTCGCGTTGAC  
 TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCCTCCATCCGATTTGAAATGATCCGGTGAAATGTTCCGGAT  
 CGCGGCACGTGGCGGTTTCGCTGCCCGCAGCTCGCGGAAAGTCCATTTGAAACCTTATCATTTAGAGGAA  
 GGAGAGTCTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTCGGGAAGGATCAT

图7A

经延伸正向引物

**CAT CAA ACA** TG TTT GAT GGT ATC TAC TAC TCG GAT AAC CG

未经延伸反向引物

GCG ATC CGT CGA GTT ATC ATG AAT C

图7B

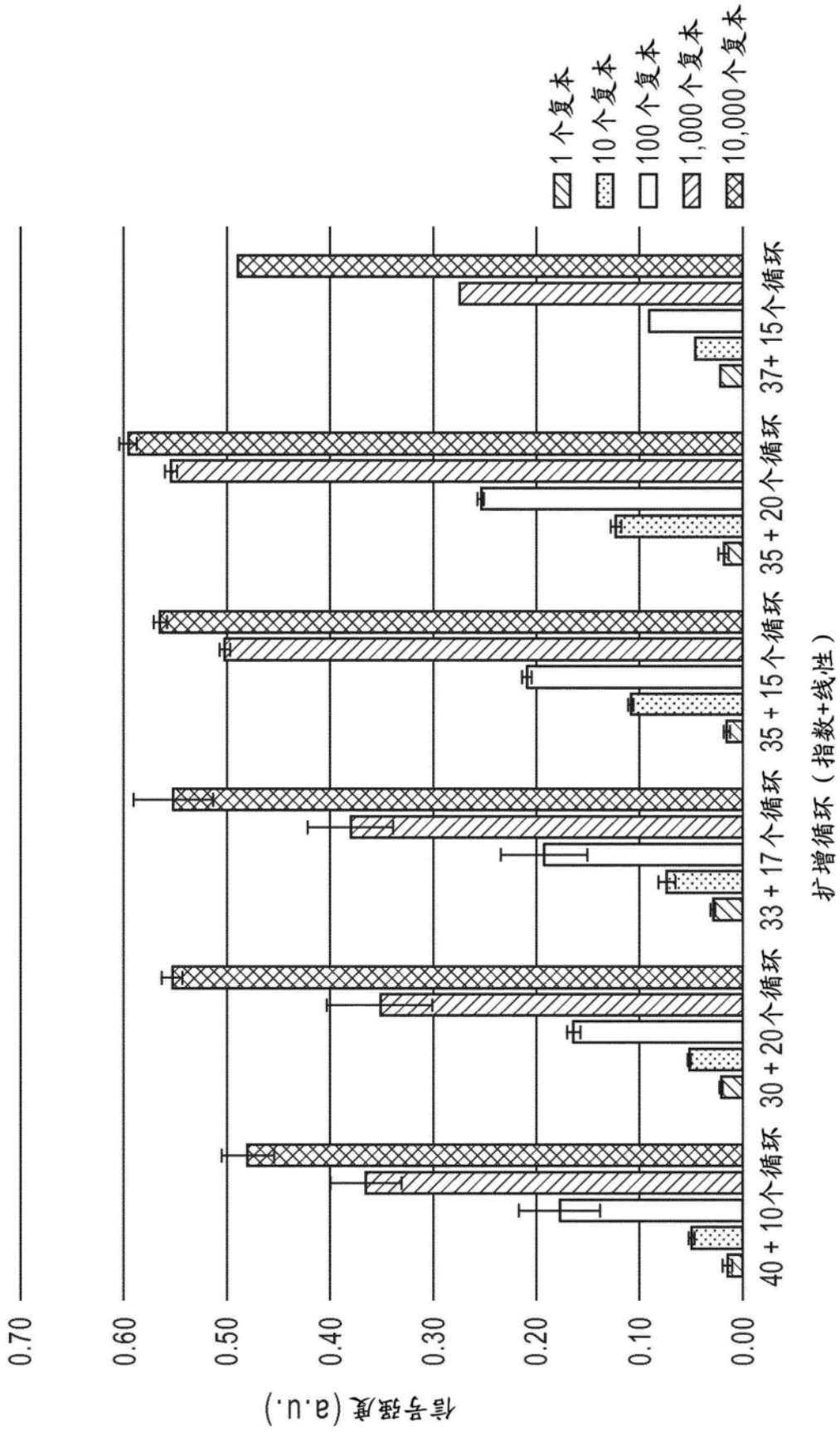


图8

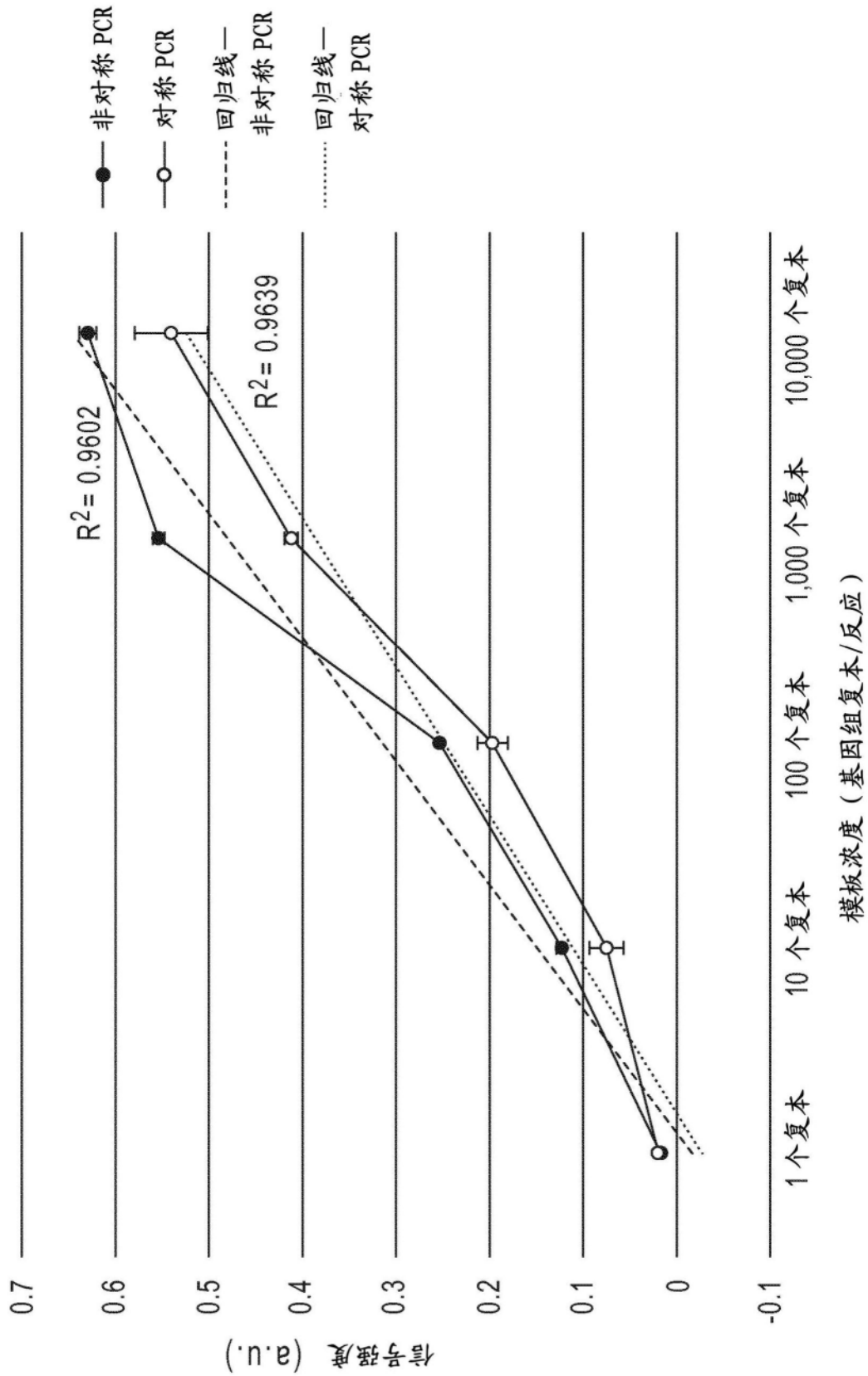


图9