



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111492067 A

(43)申请公布日 2020.08.04

(21)申请号 201880081239.2

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2018.10.15

代理人 武晶晶

(30)优先权数据

62/573,046 2017.10.16 US

15/892,245 2018.02.08 US

(51)Int.Cl.

C12Q 1/686(2018.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/055927 2018.10.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/079204 EN 2019.04.25

(71)申请人 克罗玛科德公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 阿迪蒂亚·拉贾戈帕

克里斯多佛·麦克唐纳

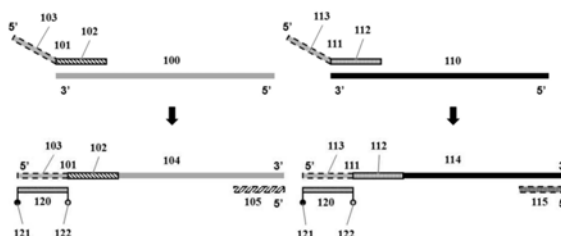
权利要求书6页 说明书34页 附图8页

(54)发明名称

用于核酸检测的方法和组合物

(57)摘要

本公开提供了用于核酸检测的方法和组合物。核酸可以来自于任何来源,包括,例如,病毒、细菌细胞和真核细胞。本公开的方法可以用来检测样品中是否存在多个核酸的至少一个成员。本公开的方法可以用来检测多个核酸的第一和第二成员是否都存在于样品中。可以通过使用例如聚合酶链反应生成一个或多个信号来检测核酸。



1. 一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:
 - (a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;
 - (b) 形成混合物,其包含样品和
 - (i) 信号寡核苷酸探针;
 - (ii) 第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员的第一区域互补的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针互补或同源的所述第二区域;
 - (iii) 第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的所述第二区域互补的区域;
 - (iv) 第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员的第一区域互补的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针互补或同源的所述第二区域;以及
 - (v) 第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的所述第二区域互补的区域;
 - (c) 在适于通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增所述多个靶核酸的每个成员的条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员,则所述信号寡核苷酸探针降解并生成信号;以及
 - (d) 检测所述信号的存在与否。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述混合物进一步包含核酸酶。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,在(c)中,所述信号是由所述信号标签生成的。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述信号标签在所述信号寡核苷酸探针降解时生成所述信号。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第一正向寡核苷酸引物的所述第一区域与所述第一靶核酸退火和所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其进一步包括将所述信号的存在与所述多个靶核酸的至少一个成员的存在相关联,或将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的每个成员的不存在相关联。
8. 一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:
 - (a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;
 - (b) 形成样品与以下成分的混合物
 - (i) 信号寡核苷酸探针;
 - (ii) 第一正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第一成员具有互补性的区域;
 - (iii) 第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;
 - (iv) 第二正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第二成员具有互补性的区域;以及
 - (v) 第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;

(c) 在适于通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增所述多个靶核酸的每个成员的条件下对所述混合物进行热循环, 并且如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员, 则生成信号; 以及

(d) 检测所述信号的存在与否。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述混合物进一步包含核酸酶。

10. 根据权利要求8或9所述的方法, 其中所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的附加区域。

11. 根据权利要求8-10中任一项所述的方法, 其中所述第二正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的附加区域。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中, 在(c)中, 每个热循环在适合于所述第二正向寡核苷酸引物的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火和所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。

13. 根据权利要求8-12中任一项所述的方法, 其中在(b)中形成的混合物进一步包含:

(a) 第 n 个正向寡核苷酸引物, 其包含: 与所述多个靶核酸的第 n 个成员具有互补性的第一区域; 以及

(b) 第 n 个反向寡核苷酸引物, 其包含与所述多个靶核酸的第 n 个成员的区域具有互补性的区域;

其中 n 为大于2的整数。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述第 n 个正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。

15. 根据权利要求13或14所述的方法;

其中在(b)中形成的混合物进一步包含:

(a) 第 x 个信号寡核苷酸探针;

(b) 第 y 个正向寡核苷酸引物, 其包含与所述多个靶核酸的第 y 个成员具有互补性的第一区域; 以及

(c) 第 y 个反向寡核苷酸引物, 其包含与所述多个靶核酸的所述第 y 个成员的第二区域具有互补性的区域;

其中, 在(c)中, 所述第 x 个信号寡核苷酸探针被核酸聚合酶降解, 使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个所述第 y 个成员, 则生成第 x 个信号;

其中(e)进一步包括将所述第 x 个信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一个所述第 y 个成员的存在相关联; 并且

其中 x 为大于1的整数, 且 y 为大于 n 的整数。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述第 y 个正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。

17. 根据权利要求15或16所述的方法, 其中所述第 y 个正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。

18. 一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的试剂盒, 其包含:

(a) 信号寡核苷酸探针;

(b) 第一正向寡核苷酸引物, 其包含: 与所述多个靶核酸的第一成员具有互补性的第一

区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的第二区域;

(c) 第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;

(d) 第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的第二区域;以及

(e) 第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域。

19. 一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:

(a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品;

(b) 形成混合物,其包含样品和

(i) 模板核酸;

(ii) 与所述模板核酸具有互补性的信号寡核苷酸探针;

(iii) 第一寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;以及

(iv) 第二寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;

(c) 使所述混合物经受足以使所述第一寡核苷酸引物与所述多个靶核酸的所述第一成员退火并且使所述第二寡核苷酸引物与所述多个靶核酸的所述第二成员退火的条件,使得所述第一和第二寡核苷酸引物降解;

(d) 在适于通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;以及

(e) 检测所述信号的存在与否。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述第一寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第二区域具有互补性的附加区域。

21. 根据权利要求19或20所述的方法,其中所述第二寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第三区域具有互补性的附加区域。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,在(c)中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域和所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的方法,其中所述混合物进一步包含一种或多种核酸酶。

24. 根据权利要求19-23中任一项所述的方法,其中所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。

25. 根据权利要求19-24中任一项所述的方法,其进一步包括(f) 将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。

26. 根据权利要求19-25中任一项所述的方法,其中(b)中的混合物进一步包含(vi) 第三寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;和(vii) 第四寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域。

27. 根据权利要求19-26中任一项所述的方法,其进一步包括,在(c)中,在适于通过聚合酶链反应扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环。

28. 一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:

(a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品

(b) 形成混合物,其包含样品和

(i) 模板核酸;

(ii) 与所述模板核酸具有互补性的信号寡核苷酸探针;

(iii) 第一正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;

(iv) 第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;

(v) 第二正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的第一区域;以及

(vi) 第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;

(c) 在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得所述第一正向寡核苷酸引物和所述第二正向寡核苷酸引物降解;

(d) 在适于通过PCR扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;以及

(e) 检测所述信号的存在与否。

29. 根据权利要求28所述的方法,其进一步包括(f)将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。

30. 根据权利要求28或29所述的方法,其中所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。

31. 根据权利要求28-30中任一项所述的方法,其中所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第二区域具有互补性的附加区域。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中,在(c)中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。

33. 根据权利要求28-32中任一项所述的方法,其中所述第二正向寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第三区域具有互补性的附加区域。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中,在(c)中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。

35. 根据权利要求28-34中任一项所述的方法,其中混合物进一步包含核酸酶。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中,在(c)中,所述第一和第二寡核苷酸引物被所述核酸酶降解。

37. 一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的试剂盒,其包含:

(a) 模板核酸;

(b) 与所述模板核酸的第一区域具有互补性的信号寡核苷酸探针;

(c) 第一寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第一成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第二区域具有互补性的第二区域;以及

(d) 第二寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第二成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第三区域具有互补性的第二区域。

38. 一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:

(a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;

(b) 形成样品与以下成分的混合物

(i) 包含信号标签的信号寡核苷酸探针;

(ii) 多个第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;

(iii) 多个第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;

(iv) 多个第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;

(v) 多个第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域;以及

(vi) 核酸酶;

(c) 在适于通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增所述多个靶核酸的每个成员的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员,则所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶降解,从而生成信号;

(d) 检测所述信号的存在与否;以及

(e) 将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一个所述成员的存在相关联。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中在 (b) 中形成的混合物进一步包含:

(c) 多个第n个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第n个成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;以及

(d) 多个第n个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第n个成员的第二区域具有互补性的区域;

其中n为大于2的整数。

40. 根据权利要求39所述的方法;

其中在 (b) 中形成的混合物进一步包含:

(d) 包含第x个信号标签的第x个信号寡核苷酸探针;

(e) 多个第y个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第y个成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述第x个信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;以及

(f) 多个第y个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性的区域;

其中,在 (c) 中,所述第x个信号寡核苷酸探针被所述核酸聚合酶降解,使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个所述第y个成员,则生成第x个信号;

其中 (e) 进一步包括将所述第x个信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一

个所述第 y 个成员的存在相关联;并且
其中 x 为大于1的整数,且 y 为大于 n 的整数。

用于核酸检测的方法和组合物

交叉引用

[0001] 本申请是2018年2月8日提交的第15/892,245号美国专利申请的继续申请;并且要求2017年10月16日提交的第62/573,046号美国临时专利申请的权益;这些申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 实时聚合酶链反应(PCR)是通过记录每个循环由嵌入染料如SYBR Green或报告探针生成的荧光来监测PCR反应的过程。这通常在实时PCR仪上进行,该PCR仪执行样品的热循环以完成PCR循环,并且在每个循环中的指定点通过一系列激发/发射滤光器组来测量每个通道中的样品的荧光。

发明内容

[0003] 定量实时PCR(qPCR)是一种用于测量样品中有限数目的目标分析物的有用技术。标准qPCR仪器当前的局限性在于无法在单个反应中准确测量不同的分析物。多重qPCR技术允许使用单独的荧光报告分子在反应中检测有限数目的分析物。可以通过以不同的浓度使用相同的荧光报告分子来测量其他分析物,但是对这种荧光信号进行去卷积的要求将单个反应中可以测量的分析物数目保持在最小值。因此,仍然需要从单个样品中检测是否存在大量目标分析物的任何子集的方法。

[0004] 本文公开了用于检测来自样品的一种或多种核酸分析物的方法和组合物。在一些方面,可以使用单个荧光信号来检测来自单个样品的大量目标分析物的一个或多个子集。这是与当前的多路化技术相比的关键改进。

[0005] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:(a)提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;(b)形成混合物,其包含样品和(i)信号寡核苷酸探针;(ii)第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员的第一区域互补的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针互补或同源的第三区域;(iii)第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第三区域互补的区域;(iv)第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员的第一区域互补的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针互补或同源的第三区域;以及(v)第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第三区域互补的区域;(c)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的每个成员的条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员,则所述信号寡核苷酸探针降解并生成信号;以及(d)检测所述信号的存在与否。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的第三区域和所述第二正向寡核苷酸引物的第三区域中的一个或两个与所述信号寡核苷酸探针互补。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的第三区域和所述第二正向寡核苷酸引物的第三区域中的至少一个与所述信号寡核苷酸探针同源。在一些实施方案中,所述混合物进一步包含通用寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所

述第一正向寡核苷酸引物和所述第二正向寡核苷酸引物各自进一步包含与所述通用寡核苷酸引物互补的第三区域。在一些实施方案中,所述混合物进一步包含核酸酶。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶降解。在一些实施方案中,该核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,该核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶的外切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述核酸酶是脱氧核糖核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,在(c)中,所述信号是由所述信号标签生成的。在一些实施方案中,所述信号标签在所述信号寡核苷酸探针降解时生成所述信号。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的第一区域相对于所述第一正向寡核苷酸引物的第二区域处于5'侧。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第一正向寡核苷酸引物的所述第一区域与所述第一靶核酸退火和所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的第一区域相对于所述第二正向寡核苷酸引物的第二区域处于5'侧。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的第二区域具有约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%、约99%至约100%或约100%的同一性。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第二正向寡核苷酸引物的所述第一区域与所述第二靶核酸退火和所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的存在与所述多个靶核酸的至少一个成员的存在相关联,或将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的每个成员的不存在相关联。

[0006] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:(a)提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;(b)形成样品与以下成分的混合物:(i)信号寡核苷酸探针;(ii)第一正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第一成员具有互补性的区域;(iii)第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;(iv)第二正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第二成员具有互补性的区域;以及(v)第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;(c)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的每个成员的条件对所述混合物进行热循环,并且如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员,则生成信号;以及(d)检测所述信号的存在与否。在一些实施方案中,所述混合物包含多个所述第一和第二正向寡核苷酸引物以及多个所述第一和第二寡核苷酸反向引物。在一些实施方案中,所述混合物进一步包含核酸酶。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶降解。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,在(c)中,所述信号是由所述信号标签生成的。在一些实施方案中,所述信号标签在所述信号寡核苷酸探针降解时生成所述信号。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的附加区域。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有互补

性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有同源性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述区域相对于所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域处于5'侧。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第一正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火和所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的附加区域。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有同源性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述区域相对于所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域处于5'侧。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,

所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约50%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约50%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约60%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约70%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约80%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约90%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约95%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约99%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域具有约100%的同一性。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第二正向寡核苷酸引物的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火和所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶的外切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的每个成员的不存在相关联。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何成员不具有互补性。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的存在与所述多个靶核酸的至少一个成员的存在相关联。在一些实施方案中,所述核酸酶是脱氧核糖核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述脱氧核糖核酸聚合酶是Taq聚合酶。在一些实施方案中,所述一个或多个靶核酸是脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述一个或多个靶核酸是核糖核酸。在一些实施方案中,所述信号是荧光信号。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述混合物进一步包含通用寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述通用寡核苷酸引物具有互补性或同源性的区域。在一些实施方案

中,所述第二正向寡核苷酸引物进一步包含与所述通用寡核苷酸引物具有互补性或同源性的区域。在一些实施方案中,在(b)中形成的混合物进一步包含:第n个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第n个成员具有互补性的第一区域;以及第n个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第n个成员的区域具有互补性的区域;其中n为大于2的整数。在一些实施方案中,所述混合物包含多个第n个正向寡核苷酸引物和第n个反向寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述第n个正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第n个成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第n个反向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第n个成员的第二区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第n个正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,所述第n个正向寡核苷酸引物的所述区域相对于所述第n个正向寡核苷酸引物的所述附加区域处于5'侧。在一些实施方案中,在(b)中形成的混合物进一步包含:第x个信号寡核苷酸探针;第y个正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第y个成员具有互补性的第一区域;以及第y个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性的区域;在(c)中,所述第x个信号寡核苷酸探针被所述核酸聚合酶降解,使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个所述第y个成员,则生成第x个信号;(e)进一步包括将所述第x个信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一个所述第y个成员的存在相关联;并且x为大于1的整数,且y为大于n的整数。在一些实施方案中,所述第x个信号寡核苷酸探针包含第x个信号标签。在一些实施方案中,所述混合物包含多个所述第y个正向寡核苷酸引物和第y个反向寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述第y个正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第y个反向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第y个正向寡核苷酸引物进一步包含与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,所述多个第y个正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域相对于所述多个第y个正向寡核苷酸引物中每一个的所述附加区域处于5'侧。在一些实施方案中,所述信号标签是不同的。在一些实施方案中,所述信号标签是相同的。在一些实施方案中,所述信号是不同的信号类型。在一些实施方案中,所述信号是不同强度的相同的信号类型。

[0007] 一方面,本公开提供了一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的试剂盒,其包含:(a)信号寡核苷酸探针;(b)第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的第二区域;(c)第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;(d)第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性或同源性的第二区域;以及(e)第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域。在一些实施方案中,所述试剂盒包含多个所述第一和第二正向寡核苷酸引物以及多个所述第一和第二寡核苷酸反向引物。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有同源性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区

域与所述信号寡核苷酸探针具有互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有同源性。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含通用寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述通用寡核苷酸引物具有互补性或同源性的区域。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述通用寡核苷酸引物具有互补性或同源性的区域。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含:多个第n个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第n个成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;以及多个第n个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第n个成员的第二区域具有互补性的区域;其中n为大于2的整数。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含:包含第x个信号标签的第x个信号寡核苷酸探针;多个第y个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第y个成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述第x个信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;以及多个第y个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性的区域;其中n为大于1的整数,且y为大于n的整数。在一些实施方案中,所述信号标签是不同的。在一些实施方案中,所述信号标签是相同的。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针以不同浓度存在。在一些实施方案中,至少一个所述寡核苷酸引物被冻干。在一些实施方案中,每个所述寡核苷酸引物均被冻干。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被冻干。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正

向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约50%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约50%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约60%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约70%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约80%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约90%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约95%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约99%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域具有约100%的同一性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。

[0008] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:(a)提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品;(b)形成混合物,其包含样品和(i)模板核酸;(ii)与所述模板核酸具有互补性的信号寡核苷酸探针;(iii)第一寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;以及(iv)第二寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;(c)使所述混合物经受足以使所述第一寡核苷酸引物与所述多个靶核酸的所述第一成员退火并且使所述第二寡核苷酸引物与所述多个靶核酸的所述第二成员退火的

条件,使得所述第一和第二寡核苷酸引物降解;(d)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;以及(e)检测所述信号的存在与否。在一些实施方案中,所述混合物包含多个所述第一和第二寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第二成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述模板核酸的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第二区域具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域包含脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件不足以使所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第三区域具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域包含脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件不足以使所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述第二区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。

[0009] 在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域不相同。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,在(c)中,所述第一寡核苷酸引物的所述附加区域和所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。在一些实施方案中,所述混合物进一步包含一种或多种核酸酶。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,所述方法进一步包括(f)将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。在一些实施方案中,在(c)中,所述第一和第二寡核苷酸引物被所述一种或多种核酸酶降解。在一些实施方案中,在(d)中,所述信号是由所述信号标签生成的。在一些实施方案中,所述信号标签在所述信号寡核苷酸探针降解时生成所述信号。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述一种或多种核酸酶降解。在一些实施方案中,(b)中的混合物进一步包含(vi)第三寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;和(vii)第四寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域。在一些实施方案中,所述混合物包含多个所述第三和第四寡核苷酸引物。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件足以使所述多个靶核酸变性。在一些实施方案中,所述方法进一步包括,在(c)中,在适于通过聚合酶链反应扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包括核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述一种或多种核酸酶的外切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物和第二寡核苷酸引物被所述一种或多种核酸酶的内切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述多个靶核酸包含多个脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个靶核酸包含多个核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个核糖核酸包含多个信使核糖核酸。在一些实施方案中,所述模板核酸是脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述模板核酸是核糖核酸。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶具有RNA酶活性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物和第二寡核苷酸引物被所述一种或多种核酸酶的RNA酶活性降解。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包含RNA酶H。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包含RNA酶III。在一些实施方案中,该RNA酶

III是切酶。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包含内切核酸酶I。在一些实施方案中,该内切核酸酶I是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶能够降解包含非天然核苷酸的核酸。在一些实施方案中,所述一种或多种核酸酶包含内切核酸酶V。在一些实施方案中,该内切核酸酶V是大肠杆菌内切核酸酶V。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述区域包含一个或多个核糖核苷酸碱基。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述区域包含一个或多个核糖核苷酸碱基。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物进一步包含至少一个非天然核苷酸。在一些实施方案中,该非天然核苷酸是脱氧肌苷。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物进一步包含至少一个非天然核苷酸。在一些实施方案中,该非天然核苷酸是脱氧肌苷。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的不存在相关联。

[0010] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:(a)提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品;(b)形成混合物,其包含样品和(i)模板核酸;(ii)与所述模板核酸具有互补性的信号寡核苷酸探针;(iii)第一正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;(iv)第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员具有互补性的区域;(v)第二正向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的第一区域;以及(vi)第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员具有互补性的区域;(c)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得所述第一正向寡核苷酸引物和所述第二正向寡核苷酸引物降解;(d)在适于通过PCR扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;以及(e)检测所述信号的存在与否。在一些实施方案中,所述方法进一步包括(f)将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,在(d)中,所述信号是由所述信号标签生成的。在一些实施方案中,所述信号标签在所述信号寡核苷酸探针降解时生成所述信号。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述模板核酸的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第二区域具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,在(c)中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第一正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火并且不适合于所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述

模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物进一步包含与所述模板核酸的第三区域具有互补性的附加区域。在一些实施方案中,在(c)中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域得到释放。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第二正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火并且不适合于所述第二寡核苷酸引物的所述附加区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述附加区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述附加区域与所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域不相同。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸

引物的所述附加区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第一反向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第二正向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第二成员的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述第二反向寡核苷酸引物的所述区域与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性。在一些实施方案中,混合物进一步包含核酸酶。在一些实施方案中,在(c)中,所述第一和第二寡核苷酸引物被所述核酸酶降解。在一些实施方案中,在(d)中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶降解。在一些实施方案中,(c)和(d)基本上同时进行。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物和第二正向寡核苷酸引物被所述核酸酶的内切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述信号是荧光信号。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的不存在相关联。一方面,本公开提供了一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的试剂盒,其包含:(a)模板核酸;(b)与所述模板核酸的第一区域具有互补性的信号寡核苷酸探针;(c)第一寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第一成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第二区域具有互补性的第二区域;以及(d)第二寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第二成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第三区域具有互补性的第二区域。在一些实施方案中,所述试剂盒包含多个所述第一和第二寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针包含信号标签。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述模板核酸的第一区域具有互补性。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含(e)第三寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的附加区域具有互补性的区域;和(f)第四寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的附加区域具有互补性的区域。在一些实施方案中,所述混合物包含多个所述第三和第四寡核苷酸引物。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含核酸酶。在一些实施方案中,该核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,该核酸酶是RNA酶。在一些实施方案中,该RNA酶是RNA酶III。在一些实施方案中,该RNA酶III是切酶。在一些实施方案中,该核酸酶是内切核酸酶。在一些实施方案中,该内切核酸酶是内切核酸酶I。在一些实施方案中,该内切核酸酶I是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述第二区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具

有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域不相同。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,至少一个所述寡核苷酸引物被冻干。在一些实施方案中,每个所述寡核苷酸引物均被冻干。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被冻干。在一些实施方案中,所述模板核酸被冻干。

[0011] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的方法,该方法包括:(A) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的至少一个成员的样品;(b) 形成样品与以下成分的混合物:(i) 包含信号标签的信号寡核苷酸探针;(ii) 多个第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及

与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域；(iii) 多个第一反向寡核苷酸引物，其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域；(iv) 多个第二正向寡核苷酸引物，其包含：与所述多个靶核酸的第二成员的第一区域具有互补性的第一区域；以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域；(v) 多个第二反向寡核苷酸引物，其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域；以及(vi) 核酸酶；(c) 在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的每个成员的反应条件下对所述混合物进行热循环，使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个成员，则所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶降解，从而生成信号；(d) 检测所述信号的存在与否；以及(e) 将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一个所述成员的存在相关联。在一些实施方案中，在(b)中形成的混合物进一步包含：多个第n个正向寡核苷酸引物，其包含：与所述多个靶核酸的第n个成员的第一区域具有互补性的第一区域；以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域；以及多个第n个反向寡核苷酸引物，其包含与所述多个靶核酸的第n个成员的第二区域具有互补性的区域；其中n为大于2的整数。在一些实施方案中，在(b)中形成的混合物进一步包含：包含第x个信号标签的第x个信号寡核苷酸探针；多个第y个正向寡核苷酸引物，其包含：与所述多个靶核酸的第y个成员的第一区域具有互补性的第一区域；和与所述第x个信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域；以及多个第y个反向寡核苷酸引物，其包含与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性的区域；在(c)中，所述第x个信号寡核苷酸探针被所述核酸聚合酶降解，使得如果所述混合物中存在所述多个靶核酸的至少一个所述第y个成员，则生成第x个信号；(e)进一步包括将所述第x个信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的至少一个所述第y个成员的存在相关联；并且x为大于1的整数，且y为大于n的整数。在一些实施方案中，所述核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中，所述核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中，所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶的外切核酸酶活性降解。在一些实施方案中，所述核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中，所述方法进一步包括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的每个成员的不存在相关联。在一些实施方案中，所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何成员不具有互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域相对于所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域处于5'侧。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域相对于所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域处于5'侧。在一些实施方案中，所述多个第n个正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域相对于所述多个第n个正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域处于5'侧。在一些实施方案中，所述多个第y个正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域相对于所述多个第y个正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域处于5'侧。在一些实施方案中，在(c)中，每个热循环在适合于所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火和所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中，在(c)中，每个热循环在适合于所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火和所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针退火的退火温度下进行。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区

[illegible]

中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述核酸酶是脱氧核糖核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述脱氧核糖核酸聚合酶是Taq聚合酶。在一些实施方案中,所述一个或多个靶核酸是脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述一个或多个靶核酸是核糖核酸。在一些实施方案中,所述信号是荧光信号。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述信号标签是不同的。在一些实施方案中,所述信号标签是相同的。在一些实施方案中,所述信号是不同的信号类型。在一些实施方案中,所述信号是不同强度的相同的信号类型。

[0012] 一方面,本公开提供了一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的试剂盒,其包含:(a) 包含信号标签的信号寡核苷酸探针;(b) 多个第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第一成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;(c) 多个第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;(d) 多个第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第二成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;(e) 多个第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含:多个第n个正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的第n个成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域;以及多个第n个反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的第n个成员的第二区域具有互补性的区域;其中n为大于2的整数。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含:包含第x个

信号标签的第x个信号寡核苷酸探针；多个第y个正向寡核苷酸引物，其包含：与所述多个靶核酸的第y个成员的第一区域具有互补性的第一区域；以及与所述第x个信号寡核苷酸探针具有互补性的第二区域；以及多个第y个反向寡核苷酸引物，其包含与所述多个靶核酸的所述第y个成员的第二区域具有互补性的区域；其中n为大于1的整数，且y为大于n的整数。在一些实施方案中，所述信号标签是不同的。在一些实施方案中，所述信号标签是相同的。在一些实施方案中，所述信号寡核苷酸探针以不同浓度存在。在一些实施方案中，至少一个所述寡核苷酸引物被冻干。在一些实施方案中，每个所述寡核苷酸引物均被冻干。在一些实施方案中，所述信号寡核苷酸探针被冻干。在一些实施方案中，所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中，所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述信号寡核苷酸探针具有约100%的互补性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约50%至约100%的同一性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约50%的同一性。在一些实施方案中，所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约60%至约100%的同一性。在一些实施方案

中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约70%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约80%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约90%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约95%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约99%至约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域具有约100%的同一性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。

[0013] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:(a) 提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品;(b) 形成混合物,其包含样品和(i) 模板核酸;(ii) 与所述模板核酸的第一区域具有互补性的信号寡核苷酸探针,该信号寡核苷酸探针包含信号标签;(iii) 多个第一寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第一成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第二区域具有互补性的第二区域;(iv) 多个第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第二成员的区域具有互补性的第一区域;和与所述模板核酸的第三区域具有互补性的第二区域;以及(v) 一种或多种核酸酶;(c) 使所述混合物经受足以使所述第一寡核苷酸引物与所述多个靶核酸的所述第一成员退火并且使所述第二寡核苷酸引

物与所述多个靶核酸的所述第二成员退火的条件,使得所述第一和第二寡核苷酸引物被所述酶降解,从而释放所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域和所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域;(d)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得所述信号寡核苷酸探针被降解,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;(e)检测所述信号的存在与否;以及(f)将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。在一些实施方案中,(b)中的混合物进一步包含(vi)多个第三寡核苷酸引物,后者包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;和(vii)多个第四寡核苷酸引物,后者包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件足以使所述多个靶核酸变性。在一些实施方案中,所述方法进一步包括,在(c)中,在适于通过聚合酶链反应扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环。在一些实施方案中,所述核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被所述核酸酶的外切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物和第二寡核苷酸引物被所述核酸酶的内切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述多个靶核酸包含多个脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个靶核酸包含多个核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个核糖核酸包含多个信使核糖核酸。在一些实施方案中,所述模板核酸是脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述模板核酸是核糖核酸。在一些实施方案中,所述核酸酶具有RNA酶活性。在一些实施方案中,所述第一寡核苷酸引物和第二寡核苷酸引物被所述核酸酶的RNA酶活性降解。在一些实施方案中,该核酸酶是RNA酶H。在一些实施方案中,该核酸酶是RNA酶III。在一些实施方案中,该RNA酶III是切酶。在一些实施方案中,该核酸酶是内切核酸酶I。在一些实施方案中,该内切核酸酶I是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中,所述核酸酶能够降解包含非天然核苷酸的核酸。在一些实施方案中,所述酶是内切核酸酶V。在一些实施方案中,该内切核酸酶V是大肠杆菌内切核酸酶V。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域包含一个或多个核糖核苷酸碱基。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域包含脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第一区域包含一个或多个核糖核苷酸碱基。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域包含脱氧核糖核酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物进一步包含至少一个非天然核苷酸。在一些实施方案中,该非天然核苷酸是脱氧肌苷。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物进一步包含至少一个非天然核苷酸。在一些实施方案中,该非天然核苷酸是脱氧肌苷。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件不足以使所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火。在一些实施方案中,在(c)中,所述条件不足以使所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述第二区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案

[illegible]

一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的不存在相关联。

[0014] 一方面,本公开提供了一种检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的方法,该方法包括:(a)提供包含或可能包含所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的样品;(b)形成混合物,其包含样品和(i)模板核酸;(ii)与所述模板核酸的第一区域具有互补性的信号寡核苷酸探针,该信号寡核苷酸探针包含信号标签;(iii)多个第一正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第一成员的第一区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第二区域具有互补性的第二区域;(iv)多个第一反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;(v)多个第二正向寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第二成员的第一区域具有互补性的第一区域;和与所述模板核酸的第三区域具有互补性的第二区域;(vi)多个第二反向寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域;(c)在适于通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述多个靶核酸的所述第一和第二成员的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得所述第一正向寡核苷酸引物和第二正向寡核苷酸引物被所述核酸酶降解,从而释放与所述模板核酸的所述第二区域具有互补性的所述第二区域和与所述模板核酸的所述第三区域具有互补性的所述第二区域;(d)在适于通过PCR扩增所述模板核酸的反应条件下对所述混合物进行热循环,使得所述信号寡核苷酸探针被降解,使得如果所述多个靶核酸的所述第一和第二成员均存在于所述混合物中,则生成信号;(e)检测所述信号的存在与否;以及(f)将所述信号的存在与所述样品中所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的存在相关联。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第一寡核苷酸引物的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火并且不适合于所述第一寡核苷酸引物的所述第二区域与所述多个靶核酸的所述第一成员退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,在(c)中,每个热循环在适合于所述第二寡核苷酸引物的所述第一区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火并且不适合于所述第二寡核苷酸引物的所述第二区域与所述多个靶核酸的所述第二成员退火的退火温度下进行。在一些实施方案中,(c)和(d)基本上同时进行。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述第二区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,所述核酸酶具有外切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述核酸酶具有内切核酸酶活性。在一些实施方案中,所述第一正向寡核苷酸引物和第二正向寡核苷酸引物被所述核酸酶的内切核酸酶活性降解。在一些实施方案中,所述信号是荧光信号。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一正向寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补

[illegible]

括将所述信号的不存在与所述多个靶核酸的所述第一和第二成员两者的不存在相关联。

[0015] 一方面,本公开提供了一种用于检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员的试剂盒,其包含:(a)模板核酸;(b)与所述模板核酸的第一区域具有互补性的信号寡核苷酸探针,该信号寡核苷酸探针包含信号标签;(c)多个第一寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第一成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第二区域具有互补性的第二区域;以及(d)多个第二寡核苷酸引物,其包含:与所述多个靶核酸的所述第二成员的区域具有互补性的第一区域;以及与所述模板核酸的第三区域具有互补性的第二区域。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含(e)多个第三寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第一成员的第二区域具有互补性的区域;和(f)多个第四寡核苷酸引物,其包含与所述多个靶核酸的所述第二成员的第二区域具有互补性的区域。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含核酸酶。在一些实施方案中,该核酸酶是核酸聚合酶。在一些实施方案中,该核酸酶是RNA酶。在一些实施方案中,该RNA酶是RNA酶III。在一些实施方案中,该RNA酶III是切酶。在一些实施方案中,该核酸酶是内切核酸酶。在一些实施方案中,该内切核酸酶是内切核酸酶I。在一些实施方案中,该内切核酸酶I是T7内切核酸酶I。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针与所述多个靶核酸的任何靶核酸不具有互补性。在一些实施方案中,所述模板核酸的所述第一区域位于所述模板核酸的所述第二区域的3'侧和所述模板核酸的所述第三区域的5'侧。在一些实施方案中,所述信号标签包含荧光团和猝灭剂。在一些实施方案中,所述荧光团是FAM、TET、HEX、JOE、Cy3、Cy5或其任何组合。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约50%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约60%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约70%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约80%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约90%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约95%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约99%至约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷

酸引物中每一个的所述第二区域与所述模板核酸具有约100%的互补性。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域与所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域不相同。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第一寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约500个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约300个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述多个第二寡核苷酸引物中每一个的所述第二区域的长度为约5个核苷酸至约15个核苷酸。在一些实施方案中,至少一个所述寡核苷酸引物被冻干。在一些实施方案中,每个所述寡核苷酸引物均被冻干。在一些实施方案中,所述信号寡核苷酸探针被冻干。在一些实施方案中,所述模板核酸被冻干。

附图说明

[0016] 图1显示了用于生成信号的示例方法,该信号用于检测是否存在多个靶核酸的多个成员中的一个或多个成员。

[0017] 图2显示了用于生成信号的示例方法,该信号用于检测是否存在多个靶核酸的一个成员。

[0018] 图3显示了用于生成信号的示例方法,该信号用于检测是否存在多个靶核酸的第一和第二成员。

[0019] 图4显示了用于生成信号的另一示例方法,该信号用于检测是否存在多个靶核酸的第一和第二成员。

[0020] 图5示出了本公开的示例分析。

[0021] 图6显示了使用通用引物生成信号的示例方法,该信号用于检测是否存在多个靶核酸中的一个或多个靶核酸。

[0022] 图7显示了来自测量是否存在两个靶标中的至少一个靶标的示例定量聚合酶链反应实验的结果。

[0023] 图8显示了来自图7示出的示例实验的峰值荧光强度结果。

具体实施方式

[0024] 聚合酶链反应 (PCR) 是在具有核酸聚合酶和引物的反应混合物中指数扩增特定靶核酸的方法。引物是短的单链寡核苷酸,其互补于靶序列的正链和负链的3' 序列。该反应混合物在重复的加热和冷却步骤中循环。加热循环使双链核酸靶标变性或分成单链模板。在冷却循环中,引物与模板上的互补序列结合。在模板被引发后,核酸聚合酶产生原始模板的拷贝。重复循环在每个循环中以指数方式将靶标扩增2倍,导致靶序列在30个循环中增加大约10亿倍 (Saiki等人,1988)。

[0025] 实时PCR是通过记录每个循环由嵌入染料如SYBR Green或靶标特异性报告探针生成的荧光来监测PCR反应的过程。这通常在实时PCR仪上进行,该PCR仪执行样品的热循环以完成PCR循环,并且在每个循环中的指定点通过一系列激发/发射滤光器组来测量每个通道中的样品的荧光。

[0026] 通常,靶标特异性报告探针是与所扩增的靶标的一条链互补的短寡核苷酸。该探针缺少3' 羟基,因此无法被DNA聚合酶延伸。TaqMan (ThermoFisher Scientific) 化学法是用多重实时PCR的常见的报告探针方法 (Holland等人,1991)。TaqMan寡核苷酸探针用荧光团和猝灭标签 (即,猝灭剂) 共价修饰。在这种构造中,由荧光团生成的荧光被猝灭,并且无法被实时PCR仪检测到。当存在目的靶标时,探针寡核苷酸与扩增的靶标发生碱基配对。当结合时,其被Taq聚合酶的5' →3' 外切核酸酶活性消化,从而将荧光团与猝灭剂物理分离并释放信号以供实时PCR仪检测。

[0027] 当前的方法对每个目的靶标使用独特的探针,这限制了可以在单个反应中测量的靶标数目。尽管当前的多路化技术允许使用多个独特的探针测量多个靶标,但该技术成本高昂,并受到可用荧光通道数目的限制。仍然需要允许测量单个样品中若干靶标的任何子集的方法。本文公开了用于检测样品中是否存在多个靶核酸的一个或多个成员的方法和组合物。

[0028] 在一个实例中,提供了多组PCR引物,每组对不同的靶核酸具有特异性。每组中的一个引物 (例如,正向引物) 包含与独特靶核酸互补的第一区域和与单个通用探针互补的第二区域 (参见图1)。在适于进行靶标扩增的条件下,对可能包含一个或多个靶标的样品进行热循环。如果存在与提供的任何引物互补的至少一个靶核酸,则所述引物的第二区域并入扩增产物中,并且通用探针与该区域结合,从而生成信号。信号的存在用来确定样品中至少一个靶标的存在。

[0029] 在另一个实例中,提供了两组PCR引物,每组对两个靶核酸之一具有特异性。每组中的一个引物 (例如,正向引物) 包含与靶核酸互补的第一区域和与单个模板核酸互补的第二区域 (参见图4)。在适于进行靶标扩增的条件下,对可能包含靶核酸的样品进行热循环。如果样品中同时存在两个靶标,则所述两个引物的第二区域通过酶消化而释放。一旦释放,第二区域就结合并能够扩增模板核酸 (即,充当正向和反向引物)。提供与模板核酸互补的报告探针。在报告探针的存在下模板核酸的扩增生成信号。信号的存在可用来确定样品中两个靶标的存在。

定义

[0030] 如本文所用的,术语“互补性”或“互补的”可指核酸或核酸区域的性质,其中该核酸在给定的一组条件下能够结合、退火或以其他方式附接至另一核酸。与另一核酸的区域

具有互补性的核酸区域可以包含与另一核酸上的核苷酸互补的核苷酸。互补性可以具有不同的程度。例如,核酸区域可以与另一核酸的区域具有约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%、约99%至约100%或约100%的互补性。互补性的程度可以描述在适当条件下能够与另一核酸附接的核酸的部分。互补性的程度可以描述包含与另一核酸上的核苷酸互补的核苷酸的核酸或核酸区域的量。具有互补性的核酸可以是双链核酸。具有互补性的核酸可以是单链核酸。与另一单链核酸互补的单链核酸在适当条件下能够与另一单链核酸的区域结合。一种互补核酸与另一种互补核酸结合的适当条件可以包括适当的缓冲液条件和适当的温度条件。适当的缓冲液条件可以包括适当的盐浓度,如钠盐、镁盐或钾盐的浓度。适当的温度条件可以包括适合于一种核酸与另一种核酸结合的退火温度。尽管与另一核酸具有互补性的核酸在适当的条件下可以与所述另一核酸结合,但是在不合适的条件下,例如在不合适的盐浓度或温度条件下,同一核酸可能无法结合。

[0031] 如本文所用的,术语“同源的”或“同源性”可指核酸或核酸区域的性质,其中该核酸包含与另一核酸中包含的核苷酸相同的核苷酸。与另一核酸同源的核酸可以包含一个或多个与所述另一核酸上的核苷酸相同的核苷酸。同源性可以具有不同的程度,这取决于相同核苷酸的数目。与另一核酸的区域同源的核酸区域可以具有一定程度的同源性。例如,核酸区域可以与另一核酸的区域具有约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%、约99%至约100%或约100%的同源性。

[0032] 如本文所用的,术语“引物”可指能够与另一核酸结合并促进转录和/或核酸合成的寡核苷酸或核酸。引物可以是双链的。引物可以是单链的。引物可以是正向引物或反向引物。正向引物和反向引物可以是与双链核酸的相对链结合的引物。例如,正向引物可以结合源自核酸的第一链(例如,Watson链)的区域,而反向引物可以结合源自核酸的第二链(例如,Crick链)的区域。正向引物相对于反向引物可以结合更靠近基因起始位点的区域,或者相对于反向引物可以结合更靠近基因末端位点的区域。正向引物可以结合核酸的编码链,或者可以结合核酸的非编码链。反向引物可以结合核酸的编码链,或者可以结合核酸的非编码链。

核酸检测

[0033] 在第一个宽泛的方面,本公开提供了用于检测样品中是否存在至少一个靶核酸的方法。该样品可以包含一个或多个靶核酸,或者不包含靶核酸。方法可以包括形成样品、信号寡核苷酸探针和多组寡核苷酸引物的混合物。图1显示了示例混合物,其包含靶核酸100和110,信号寡核苷酸探针120,以及寡核苷酸引物101、111、105和115。图6显示了另一种示例混合物,其包含靶核酸600和610,信号寡核苷酸探针660,以及寡核苷酸引物601、611、605和615。每组寡核苷酸引物可包含正向寡核苷酸引物和反向寡核苷酸引物。每个寡核苷酸引物可包含与靶核酸具有互补性的区域。图1显示了示例性的两组寡核苷酸引物。第一组寡核苷酸引物包括正向引物101和反向引物105,正向引物101包含与第一靶核酸100具有互补性的区域102。第二组寡核苷酸引物包括正向引物111和反向引物115,正向引物111包含与第二靶核酸110具有互补性的区域112。图6显示了示例性的另外两组寡核苷酸引物。第一组寡核苷酸引物包括正向引物601和反向引物605,正向引物601包含与第一靶核酸600具有互补

性的区域603。第二组寡核苷酸引物包括正向引物611和反向引物615,正向引物611包含与第二靶核酸610具有互补性的区域613。一旦形成,就可以在适合于从样品中扩增每个靶核酸的条件下对混合物进行热循环。扩增可通过例如聚合酶链反应(PCR)进行。在热循环之后或与之同时,如果混合物中存在至少一个靶核酸,则可以生成信号。可以检测该信号,从而检测样品中是否存在至少一个靶核酸。

[0034] 每个正向寡核苷酸引物可包含与信号寡核苷酸探针具有互补性的附加区域。图1显示了区域103和113,它们各自与信号寡核苷酸探针120具有互补性。在适当的条件下,第一寡核苷酸引物可以并入可以由核酸酶产生的靶核酸的扩增产物中。图1显示了并入扩增产物104中的正向引物101和并入扩增产物114中的正向引物111。一旦并入,混合物中的信号寡核苷酸探针就可以与正向寡核苷酸引物的所述附加区域结合,从而允许信号生成。图1显示了与正向引物103的区域103结合的信号寡核苷酸探针120的一个拷贝和与正向引物111的区域113结合的信号寡核苷酸探针120的第二拷贝。信号寡核苷酸探针可包含信号标签。信号标签可包含荧光团和猝灭剂,其可以在荧光信号的抑制和生成中起作用。图1显示了包含荧光团122和猝灭剂121的信号探针120。图6显示了包含荧光团662和猝灭剂661的信号寡核苷酸探针。核酸酶(例如,核酸聚合酶)可用来降解信号寡核苷酸探针并释放猝灭剂,从而生成信号。

[0035] 备选地或另外,每个正向寡核苷酸引物可包含与信号寡核苷酸探针同源(即,具有同源性)的附加区域。图6显示了区域602和612,它们各自与信号寡核苷酸探针660同源。在一些情况下,混合物可进一步包含通用引物。每个正向寡核苷酸引物可包含与通用引物同源的第三区域。图6显示了区域604和614,它们各自与通用引物650互补。在适当的条件下,第一正向寡核苷酸引物可以并入可以由核酸酶产生的靶核酸的扩增产物中。图6显示了并入扩增产物620中的正向引物601和并入扩增产物630中的正向引物611。一旦并入,反向引物就可以用来生成反向互补产物。图6显示了用来从产物620和630生成反向互补产物640和650的反向引物605和615。产物640包含从区域602、603和604生成的反向互补序列622、623和624。产物650包含从区域612、613和614生成的反向互补序列632、633和634。通用引物650可以与序列624和634结合。信号寡核苷酸探针660可以与序列622和632结合。图6显示了与产物640的序列622结合的信号寡核苷酸探针660的一个拷贝和与产物650的序列632结合的信号寡核苷酸探针660的第二拷贝。通用引物可以用来扩增反向互补产物,从而允许生成信号,例如,通过降解信号寡核苷酸探针以释放猝灭剂。

[0036] 图2显示了本公开的另一示例混合物,其包含靶核酸200、第一正向寡核苷酸引物201,后者包含与靶核酸200具有互补性的第一区域202和与信号寡核苷酸探针220具有互补性的第二区域203。该混合物还包含第二正向寡核苷酸引物211,后者包含与第二成员(不存在于该混合物中)具有互补性的第一区域212和与信号寡核苷酸探针220具有互补性的第二区域213。第一正向寡核苷酸引物201并入扩增产物204中。包含猝灭剂221和荧光团222的信号寡核苷酸探针220与第一正向寡核苷酸引物的第二区域203结合。反向寡核苷酸引物205用来使用核酸聚合酶(图2中未示出)延伸第一核酸产物204。信号寡核苷酸探针220被该核酸聚合酶的外切核酸酶活性降解,从而释放猝灭剂221并生成信号。

[0037] 在另一个宽泛的方面,本公开提供了用于检测样品中是否存在两个靶核酸的方法。该样品可以包含一个、两个靶核酸,或者不包含任一靶核酸。方法可以包括形成样品、模

板核酸、信号寡核苷酸探针和两个寡核苷酸引物的混合物。图3显示了示例混合物,其包含靶核酸300和310,信号寡核苷酸探针320,寡核苷酸引物301和311,以及模板核酸330。该信号寡核苷酸探针可以与模板核酸互补。每个寡核苷酸引物可包含与两个靶核酸之一具有互补性的区域。该区域可包含一个或多个非天然核苷酸。图3显示两个示例性引物。引物301包含与靶核酸300具有互补性的区域302。引物311包含与靶核酸310具有互补性的区域312。一旦形成,就可以使混合物经受足以使寡核苷酸引物与其互补靶核酸退火的条件,如图3所示。这些条件可以使引物降解。可以在适合于扩增模板核酸的条件下对混合物进行热循环。扩增可通过例如聚合酶链反应(PCR)进行。在热循环之后或与之同时,如果两个靶核酸均存在于混合物中,则可以生成信号。可以检测该信号,从而检测样品中是否存在两个靶核酸。

[0038] 每个寡核苷酸引物中与靶核酸具有互补性的区域可以包含一个或多个非天然核苷酸。非天然核苷酸可以是,例如,脱氧肌苷。图3显示了包含非天然核苷酸304的引物301和包含非天然核苷酸314的引物311。每个寡核苷酸引物可包含与模板核酸具有互补性的附加区域。图3显示了区域303和313,它们各自与模板核酸330具有互补性。在适当的条件下,寡核苷酸引物中与靶核酸具有互补性的区域可以与靶标退火,如图3所示。条件可以使得与模板核酸具有互补性的区域不与靶标退火。图3显示了与靶核酸300和310退火的区域302和312。一旦退火,引物就可以被例如核酸酶降解。核酸酶可能能够降解非天然核苷酸。核酸酶可以是内切核酸酶V,例如大肠杆菌内切核酸酶V。引物降解可以释放与模板核酸具有互补性的附加区域。来自两个引物的区域可以与模板核酸退火,并且在适当条件下,用来扩增模板核酸(例如,可以充当正向和反向引物)。信号寡核苷酸探针可以与模板核酸结合。图3显示了与模板核酸330结合的信号探针320。信号寡核苷酸探针可以包含荧光团和猝灭剂,其可以在荧光信号的抑制或生成中起作用。核酸酶(例如,核酸聚合酶)可用来降解信号寡核苷酸探针并释放猝灭剂,从而生成信号。

[0039] 在另一个宽泛的方面,本公开提供了用于检测样品中是否存在两个靶核酸的方法。该样品可以包含一个、两个靶核酸,或者不包含任一靶核酸。方法可以包括形成样品、模板核酸、信号寡核苷酸探针和两组寡核苷酸引物的混合物。图4显示了示例混合物,其包含靶核酸400和410,信号寡核苷酸探针420,寡核苷酸引物401、404、411和414,以及模板核酸430。每组寡核苷酸引物可包含正向寡核苷酸引物和反向寡核苷酸引物。该信号寡核苷酸探针可以与模板核酸具有互补性。每个寡核苷酸引物可包含与两个靶核酸之一具有互补性的区域。图4显示了两个示例性引物。引物401包含与靶核酸400具有互补性的区域402。引物411包含与靶核酸410具有互补性的区域412。一旦形成,就可以在足以扩增靶核酸的条件下对混合物进行热循环。这些条件可以使引物降解。可以在适合于扩增模板核酸的条件下对混合物进行热循环。扩增可通过例如聚合酶链反应(PCR)进行。在热循环之后或与之同时,如果两个靶核酸均存在于混合物中,则可以生成信号。可以检测该信号,从而检测样品中是否存在两个靶核酸。

[0040] 每个寡核苷酸引物可包含与模板核酸具有互补性的附加区域。图4显示了区域403和413,它们各自与模板核酸430具有互补性。在适当的条件下,寡核苷酸引物中与靶核酸具有互补性的区域可以与靶标退火,如图4所示。条件可以使得与模板核酸具有互补性的区域不与靶标退火。图4显示了与靶核酸400和410退火的区域402和412。一旦退火,就可以扩增靶核酸。在扩增过程中,寡核苷酸引物可以被降解,从而释放与模板核酸互补的区域。引物

可以被核酸聚合酶的内切核酸酶活性降解。来自两个引物的区域可以与模板核酸退火,并且在适当条件下,用来扩增模板核酸(例如,可以充当正向和反向引物)。信号寡核苷酸探针可以与模板核酸结合。图4显示了与模板核酸430结合的信号探针420。信号寡核苷酸探针可以包含荧光团和猝灭剂,其可以在荧光信号的抑制或生成中起作用。核酸酶(例如,核酸聚合酶)可用来降解信号寡核苷酸探针并释放猝灭剂,从而生成信号。

寡核苷酸探针

[0041] 本公开的混合物和组合物可以包含信号寡核苷酸探针。信号寡核苷酸探针的浓度可以使其相对于该混合物中的其他组分过量。混合物可以包含超过一个信号寡核苷酸探针。多个信号寡核苷酸探针可以相同,或者可以不同。在一些实例中,混合物包含第一信号寡核苷酸探针和一个或多个另外的信号寡核苷酸探针。另外的信号寡核苷酸探针可以是第x个信号寡核苷酸探针。x可以是将信号寡核苷酸探针描述为多个信号寡核苷酸探针之一的任何数字。x可以是大于1的整数。x可以是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20或更高。x可以是至多20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2。在一个实例中,x可以是2,使得第x个信号寡核苷酸探针是第二个信号寡核苷酸探针。信号寡核苷酸探针可以是核酸(例如,DNA、RNA等)。信号寡核苷酸探针的长度可以是至少5、10、15、20、30或50个或更多个核苷酸。信号寡核苷酸探针的长度可以是至多50、30、20、15、10或5个核苷酸。信号寡核苷酸探针可以与所述多个靶核酸的任何成员具有小于50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%的互补性。信号寡核苷酸探针可以与多个靶核酸的任何成员不具有互补性(即,与任何靶核酸无互补性)。信号寡核苷酸探针可包含信号标签。信号标签可以包含生成信号的手段(means),例如荧光团。荧光团可以是,例如,FAM、TET、HEX、JOE、Cy3或Cy5。信号标签可以进一步包含一种或多种猝灭剂。猝灭剂可以抑制从荧光团生成信号。猝灭剂可以是,例如,TAMRA、BHQ-1、BHQ-2或Dabcyl。

寡核苷酸引物

[0042] 本公开的寡核苷酸引物可以是脱氧核糖核酸。寡核苷酸引物可以是核糖核酸。寡核苷酸引物可以包含一个或多个非天然核苷酸。非天然核苷酸可以是,例如,脱氧肌苷。寡核苷酸引物可以是正向引物。寡核苷酸引物可以是反向引物。寡核苷酸引物的长度可以是约5个至约100个核苷酸。寡核苷酸引物的长度可以是至少5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100个或更多个碱基对。寡核苷酸引物的长度可以是至多100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或5个核苷酸。

[0043] 寡核苷酸引物可包含一个或多个区域。在一些情况下,寡核苷酸引物具有两个区域。在一些情况下,寡核苷酸引物具有三个区域。区域的长度可以是约5个至约50个核苷酸。区域的长度可以是至少5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个或更多个核苷酸。区域的长度可以是至多50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或5个核苷酸。区域可以与靶核酸的区域具有互补性。区域可以与信号寡核苷酸探针具有互补性。区域可以与信号寡核苷酸探针同源。区域可以与通用引物具有互补性。区域可以与通用引物同源。与通用引物区域具有互补性或同源性的区域可以与靶核酸的区域或信号寡核苷酸探针具有极低的或没有互补性或同源性。区域可以与模板核酸的区域具有互补性。第一正向寡核苷酸引物的第一区域可以相对于第一正向寡核苷酸引物的第二区域处

于5'侧。第二正向寡核苷酸引物的第一区域可以相对于第二正向寡核苷酸引物的第二区域处于5'侧。第一正向寡核苷酸引物的第三区域可以相对于第一正向寡核苷酸引物的第一和第二区域处于5'侧。第二正向寡核苷酸引物的第三区域可以相对于第二正向寡核苷酸引物的第一和第二区域处于5'侧。

[0044] 本公开的混合物可以包含一个或多个寡核苷酸引物。寡核苷酸引物可以是第n个寡核苷酸引物。n可以是将寡核苷酸引物描述为多个寡核苷酸引物之一的任何数字。n可以是大于2的整数。n可以是至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更高。n可以是至多20、15、10、9、8、7、6、5、4或3。在一个实例中，n可以是3，使得第n个寡核苷酸引物是第3个寡核苷酸引物。寡核苷酸引物可以是第y个寡核苷酸引物。y可以是将寡核苷酸引物描述为多个寡核苷酸引物之一的任何数字。y可以是大于n的整数。y可以是至少4、5、6、7、8、9、10、11、15、20或更高。y可以是至多20、15、10、9、8、7、6、5或4。在一个实例中，y可以是4，使得第y个寡核苷酸引物是第4个寡核苷酸引物。

核酸酶

[0045] 本公开的混合物和组合物可以包含一种或多种核酸酶。核酸酶可以具有外切核酸酶活性。核酸酶可以具有内切核酸酶活性。核酸酶可以具有RNA酶活性。核酸酶可能能够降解包含一个或多个核糖核苷酸碱基的核酸。核酸酶可以是例如RNA酶H或RNA酶III。RNA酶III可以是例如切酶。核酸酶可以是内切核酸酶I，例如T7内切核酸酶I。核酸酶可能能够降解包含非天然核苷酸的核酸。核酸酶可以是内切核酸酶V，例如大肠杆菌内切核酸酶V。核酸酶可以是聚合酶（例如，DNA聚合酶）。聚合酶可以是Taq聚合酶。核酸酶在适当条件下可能能够降解信号寡核苷酸探针。例如，核酸酶可能能够通过外切核酸酶活性从信号寡核苷酸探针释放猝灭剂。

热循环

[0046] 本公开的方法可以包括热循环。热循环可以包括一个或多个热循环。可以在适合于扩增一种或多种核酸（例如，多个靶核酸的一个或多个成员、一个或多个靶核酸等）的反应条件下进行热循环。扩增可以包括，例如，聚合酶链反应（PCR）。适当的反应条件可以包括适当的温度条件、适当的缓冲液条件和适当试剂的存在。适当的温度条件可以使得每个热循环在所需的退火温度下进行。所需的退火温度可能足以使寡核苷酸引物的区域与靶核酸退火。所需的退火温度可能足以使寡核苷酸引物的区域与信号寡核苷酸探针退火。所需的退火温度可能不足以使区域（例如，与模板核酸具有互补性的区域）与靶核酸退火。适当的缓冲液条件可以使得在热循环过程中使用的缓冲液中存在适当的盐。适当的盐可以包括镁盐、钾盐、铵盐。适当的缓冲液条件可以使得适当的盐以适当的浓度存在。用于通过PCR扩增多个靶核酸的每个成员的适当试剂可以包括脱氧三磷酸（dNTP）。dNTP可以包括天然或非天然dNTP，包括例如dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP及其变体。

[0047] 在一些方面，可以在适合于扩增模板核酸的反应条件下对混合物进行热循环。扩增可以包括，例如，PCR。模板核酸的扩增可能需要从第一寡核苷酸释放的区域和从第二寡核苷酸引物释放的区域均与模板核酸结合或退火。从寡核苷酸引物释放的区域可以通过充当PCR扩增的正向和反向引物而能够扩增模板核酸。

信号生成和检测

[0048] 本公开的方法可以使得一个或多个信号寡核苷酸探针被核酸酶降解。信号寡核苷酸

酸探针可以被核酸酶的外切核酸酶活性降解。信号寡核苷酸探针可以在降解时生成信号。在一些情况下,只有在混合物中存在多个靶核酸的至少一个成员时,信号寡核苷酸探针才可以生成信号。例如,信号寡核苷酸探针仅在与寡核苷酸引物的区域(例如,正向寡核苷酸引物的第二区域)结合(即退火)时才可降解。在一些情况下,只有在多个靶核酸的第一和第二成员均存在于混合物中时,信号寡核苷酸探针才可以生成信号。例如,信号寡核苷酸探针仅在与模板核酸的区域结合(即退火)时才可降解。在信号寡核苷酸探针包含信号标签的情况下,信号寡核苷酸探针当与寡核苷酸引物的区域结合时可以被降解,从而生成信号。信号可以是荧光信号。信号标签可包含猝灭剂和荧光团,使得猝灭剂在信号寡核苷酸探针降解时从信号标签释放,从而生成荧光信号。本公开的热循环可生成一个信号或超过一个信号。热循环可以生成至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号。热循环可以生成至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个信号。多个信号可以是相同的类型或不同的类型。不同类型的信号可以是具有不同荧光波长的荧光信号。不同类型的信号可以由包含不同荧光团的信号标签生成。相同类型的信号可以具有不同的强度(例如,相同荧光波长的不同强度)。相同类型的信号可以由包含相同荧光团的信号标签生成。包含相同荧光团的信号标签可以通过处于不同浓度的性质而生成不同的信号,从而生成相同信号类型的不同强度。

[0049] 可以检测一个或多个信号的存在或不存在。可以检测一个信号,或者可以检测多个信号。可以同时检测多个信号。或者,可以顺序检测多个信号。可以通过任何手段来检测信号,包括例如荧光信号的检测。可以在整个热循环过程中,例如在每个热循环结束时检测信号。在一些情况下,信号强度随每个热循环而增加。信号强度可以以S形的方式增加。

[0050] 信号的存在可以与多个靶核酸的至少一个成员的存在相关联。或者,信号的存在可以与多个靶核酸的第一和第二成员两者的存在相关联。将信号的存在与一个或多个靶核酸的存在相关联可以包括建立信号强度阈值。对于不同的信号,信号强度阈值可以不同。进行关联可以包括确定信号的强度是否增加超过信号强度阈值。信号的存在可以与多个靶核酸的所有成员中至少一个成员的存在相关联。第一信号的存在可以与多个靶核酸的成员的子集中至少一个的存在相关联,而第二信号的存在可以与多个靶核酸的成员的子集中至少一个的存在相关联。可以检测多个信号,并且可以将每个信号的存在与多个靶核酸的成员的子集中至少一个的存在相关联。至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号的存在可以与多个靶核酸分子的成员的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个子集中至少一个的存在相关联。

[0051] 信号的不存在可以与多个靶核酸的成员的至少一个子集中每一个的不存在相关联。或者,信号的不存在可以与多个靶核酸的第一或第二成员的不存在相关联。信号的不存在可以与所述多个靶核酸的每个成员的不存在相关联。第一信号的不存在可以与多个靶核酸的成员的子集中每一个的不存在相关联,而第二信号的不存在可以与多个靶核酸的成员的子集中每一个的不存在相关联。可以检测多个信号,并且可以将每个信号的不存在与多个靶核酸的成员的子集中每一个的不存在相关联。至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个信号的不存在可以与多个靶核酸分子的成员的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个子集中每一个的不存在相关联。

[0052] 一个或多个信号的检测和分析在例如确定样品中是否存在大量靶标方面可能是有用的。这些方法的分析在检测受试者中的一个或多个靶标可指导临床决策的临床应用中

可能是有用的。图5显示了可以进行的示例分析的示意图。在操作500中如本文所述提供靶核酸。在操作501中检测核酸,从而生成荧光读出。在操作502中,对荧光读出进行的分析导致基于一个或多个靶标的存在与否来确定给定病毒病原体的存在与否。基于一种或多种病毒病原体的存在或不存在,在操作503中采取临床行动,例如用临床上合适的药物治疗受试者。

样品和靶标

[0053] 本公开的靶核酸可以来自于任何来源,包括,例如,病毒、细菌细胞和真核细胞。靶核酸可以来源于一个或多个细胞。细胞可以是肿瘤细胞。细胞可以是疑似包含病毒病原体的细胞。在一些情况下,靶核酸来源于无细胞样品(例如,血浆)。靶核酸可以是无细胞核酸。无细胞核酸可以是,例如,无细胞肿瘤DNA、无细胞胎儿DNA、无细胞RNA等。靶核酸可包括脱氧核糖核酸(DNA)。靶核酸可包括核糖核酸(RNA)。RNA可以是任何种类的RNA,包括信使RNA、转移RNA、核糖体RNA和微小RNA。RNA可以是病毒RNA。靶核酸样品可包含一个或多个成员(例如,可包含一个或多个靶核酸)。成员可以是靶核酸的任何区域。成员可以具有任何长度。成员的长度可以是,例如,至多1、2、3、4、5、10、20、50、100、500、1000、5000、10000、50000、100000个或更多个核苷酸。在一些情况下,成员可以是基因。成员可以是目的靶核酸的任何区域。例如,成员可以是其检测可用于诊断一种或多种疾病的基因。基因可以是其检测可用于确定受试者中是否存在病原体的病毒基因或细菌基因。

模板核酸

在一些方面,本公开提供了一种或多种模板核酸。如本文所述,可以将模板核酸添加至样品。模板核酸可用于例如仅在第一和第二靶核酸均存在于样品中时确保信号的生成,从而使用单个信号验证两个靶标在单个样品中的存在。模板核酸可以包括DNA、RNA或其组合。模板核酸可以包含第一区域、第二区域和第三区域。第一区域相对于第二区域可以处于3'侧。第一区域相对于第三区域可以处于5'侧。模板核酸可以来自于任何来源(即天然来源)。模板核酸可以通过合成方式生成,例如通过化学合成生成。

试剂盒

[0054] 本文还提供了用于检测样品中是否存在多个靶核酸的至少一个成员的试剂盒。试剂盒可以用于检测样品中是否存在多个靶核酸的第一和第二成员。试剂盒可包含一个或多个信号寡核苷酸探针。信号寡核苷酸探针可以被冻干。信号寡核苷酸探针可以以不同的浓度存在。信号寡核苷酸探针可包含信号标签,该信号标签可包含,例如,荧光团和一种或多种猝灭剂。试剂盒可包含一个或多个如本文所述的寡核苷酸引物,包括例如第一寡核苷酸引物(例如,第一正向寡核苷酸引物)、第二寡核苷酸引物(例如第二正向寡核苷酸引物)、第三寡核苷酸引物(例如,第一反向寡核苷酸引物)和/或第四寡核苷酸引物(例如,第二反向寡核苷酸引物)。寡核苷酸引物可包含本文公开的各个区域。一个或多个所述寡核苷酸引物可以被冻干。在一些情况下,所有寡核苷酸引物都可以被冻干。试剂盒可包含一种或多种核酸酶。核酸酶可以是核酸聚合酶。核酸聚合酶可以是脱氧核糖核酸聚合酶。核酸酶可以是RNA酶。RNA酶可以是RNA酶III。RNA酶III可以是切酶。核酸酶可以是内切核酸酶。内切核酸酶可以是内切核酸酶I。内切核酸酶I可以是T7内切核酸酶I。试剂盒可以包含关于在本文所述的方法中使用任何前述物质的说明书。

实施例

实施例1

[0055] 从怀疑具有人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和/或丙型肝炎病毒 (HCV) 的受试者获得生物样品。将该样品与TaqMan信号寡核苷酸探针、两组正向和反向引物以及Taq DNA聚合酶混合。

[0056] 第一正向引物包含两个区域：与HIV互补的第一区域和与信号寡核苷酸探针互补的第二区域。第一反向引物互补于HIV。第二正向引物包含两个区域：与HCV的区域互补的第一区域和与信号寡核苷酸探针互补的第二区域。第二反向引物互补于HCV。

[0057] 在适当的缓冲液条件和温度条件下对混合物进行热循环，并且包含适当的试剂，以使引物与其各自的靶标退火，通过聚合酶链反应扩增所述靶标。在该过程中，与信号寡核苷酸探针互补的区域并入扩增产物中。信号寡核苷酸探针通过与正向引物的互补区域退火而与扩增产物结合。Taq聚合酶通过其外切核酸酶活性降解信号寡核苷酸探针，从而释放猝灭剂。猝灭剂释放时，由荧光团生成荧光信号。检测到荧光信号，表明样品中含有HIV、HCV或两者。

实施例2

[0058] 从怀疑具有人类免疫缺陷病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、乙型肝炎病毒 (HBV) 和/或甲型肝炎病毒的受试者获得生物样品。将该样品与两种不同的TaqMan信号寡核苷酸探针、四组正向和反向引物以及Taq DNA聚合酶混合。

[0059] 第一正向引物包含两个区域：与HIV互补的第一区域和与第一信号寡核苷酸探针互补的第二区域。第一反向引物互补于HIV。第二正向引物包含两个区域：与HCV的区域互补的第一区域和与第一信号寡核苷酸探针互补的第二区域。第二反向引物互补于HCV。第三正向引物包含两个区域：与HBV的区域互补的第一区域和与第二信号寡核苷酸探针互补的第二区域。第三反向引物互补于HBV。第四正向引物包含两个区域：与HCV的区域互补的第一区域和与第二信号寡核苷酸探针互补的第四区域。第二反向引物互补于HCV。

[0060] 在适当的缓冲液条件和温度条件下对混合物进行热循环，并且包含适当的试剂，以使引物与其各自的靶标退火，通过聚合酶链反应扩增所述靶标。在该过程中，与信号寡核苷酸探针互补的区域并入扩增产物中。信号寡核苷酸探针通过与正向引物的相应互补区域退火而与扩增产物结合。Taq聚合酶通过其外切核酸酶活性降解信号寡核苷酸探针，从而释放猝灭剂。猝灭剂释放时，荧光团生成给定强度的荧光信号。检测到从两种探针生成的荧光信号，表明样品中含有HIV、HCV或两者以及HBV、HAV或两者。

实施例3

[0061] 从怀疑具有人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 的受试者获得生物样品。将该样品与TaqMan信号寡核苷酸探针、两组正向和反向引物、化学合成的模板核酸以及Taq DNA聚合酶混合。

[0062] 信号寡核苷酸探针与模板核酸互补。第一正向引物包含两个区域：与HIV互补的第一区域和与模板核酸互补的第二区域。第一反向引物互补于HIV。第二正向引物包含两个区域：与HCV的区域互补的第一区域和与模板核酸互补的第二区域。第二反向引物互补于HCV。

[0063] 在适当的缓冲液条件和温度条件下对混合物进行热循环，并且包含适当的试剂，以使引物与其各自的靶标退火，通过聚合酶链反应扩增所述靶标。Taq聚合酶通过其内切核酸酶活性释放第一正向寡核苷酸引物的第二区域和第二寡核苷酸引物的第二区域。第一正

向寡核苷酸引物的第二区域和第二寡核苷酸引物的第二区域用作正向和反向引物,以通过在足以进行模板核酸扩增的反应条件下对混合物进行热循环来扩增模板核酸。该信号寡核苷酸探针与模板核酸结合。Taq聚合酶通过其外切核酸酶活性降解信号寡核苷酸探针,从而释放猝灭剂。猝灭剂释放时,由荧光团生成荧光信号。检测到荧光信号,表明样品中存在HIV和HCV两者。

实施例4

[0064] 生成了包含来自甲型流感 (FluA) 或乙型流感 (FluB) 的序列的合成DNA。生成了三种混合物,其包含10⁵个拷贝的单独的FluA、10⁵个拷贝的单独的FluB或10⁵个拷贝的FluA和FluB两者。向这些混合物的每一个中,添加具有与FluA或FluB互补的区域的引物对。引物对中的每个第一正向引物除了与靶标互补的区域外,还包含与信号寡核苷酸探针(通用探针)互补的区域。也将信号寡核苷酸探针(通用探针)添加到每种混合物中。表1显示了每种引物和通用探针的添加浓度。最后,加入进行聚合酶链反应所必需的试剂。

表1:反应组分

试剂	浓度
具有通用探针的反向互补序列的 FluA 正向引物	10nM
FluA 反向引物	100nM
具有通用探针的反向互补序列的 FluB 正向引物	10nM
FluB 反向引物	100nM
包含 FAM 荧光团的通用探针	50nM

[0065] 使用Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR系统,在适合通过聚合酶链反应扩增每个靶核酸的条件下,对每种混合物进行热循环。每种混合物在95℃下经受60秒,然后进行一系列的四十五次热循环,每次热循环包括在95℃下30秒,随后在57℃下120秒。在每次热循环结束时测量荧光,并将其绘制在图7中。图7显示,来自三种混合物中每一种的信号 的放大和测量导致在相同区域(“FluA/FluB接受带”)中的最终荧光强度。图8显示了来自图7的峰值荧光强度的条形图。误差条表示95%置信区间。在荧光测量之后,将混合物中信号的存在与混合物中FluA或FluB之一或两者的存在相关联。

[0066] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。并非打算用本说明书中提供的具体实例来限制本发明。尽管已经参照上述说明书对本发明进行了描述,但并不意味着对本文实施方案的描述和说明以限制性的意义来解释。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到许多变化、改变和替代。此外,应当理解,本发明的所有方面均不限于本文所阐述的具体描述、配置或相对比例,其取决于多种条件和变量。应当理解,在实施本发明中可以采用本文所述本发明实施方案的各种替代方案。因此可以预期,本发明还应涵盖任何这类替代、改变、变化或等同物。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

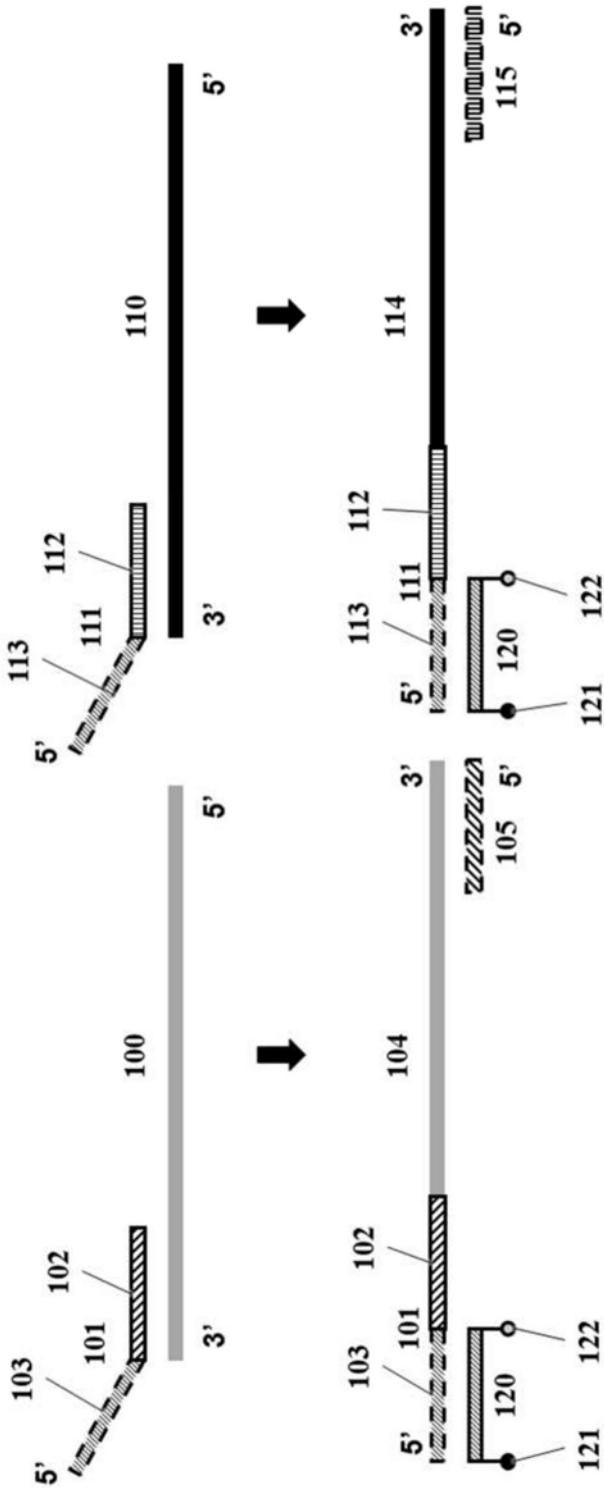


图1

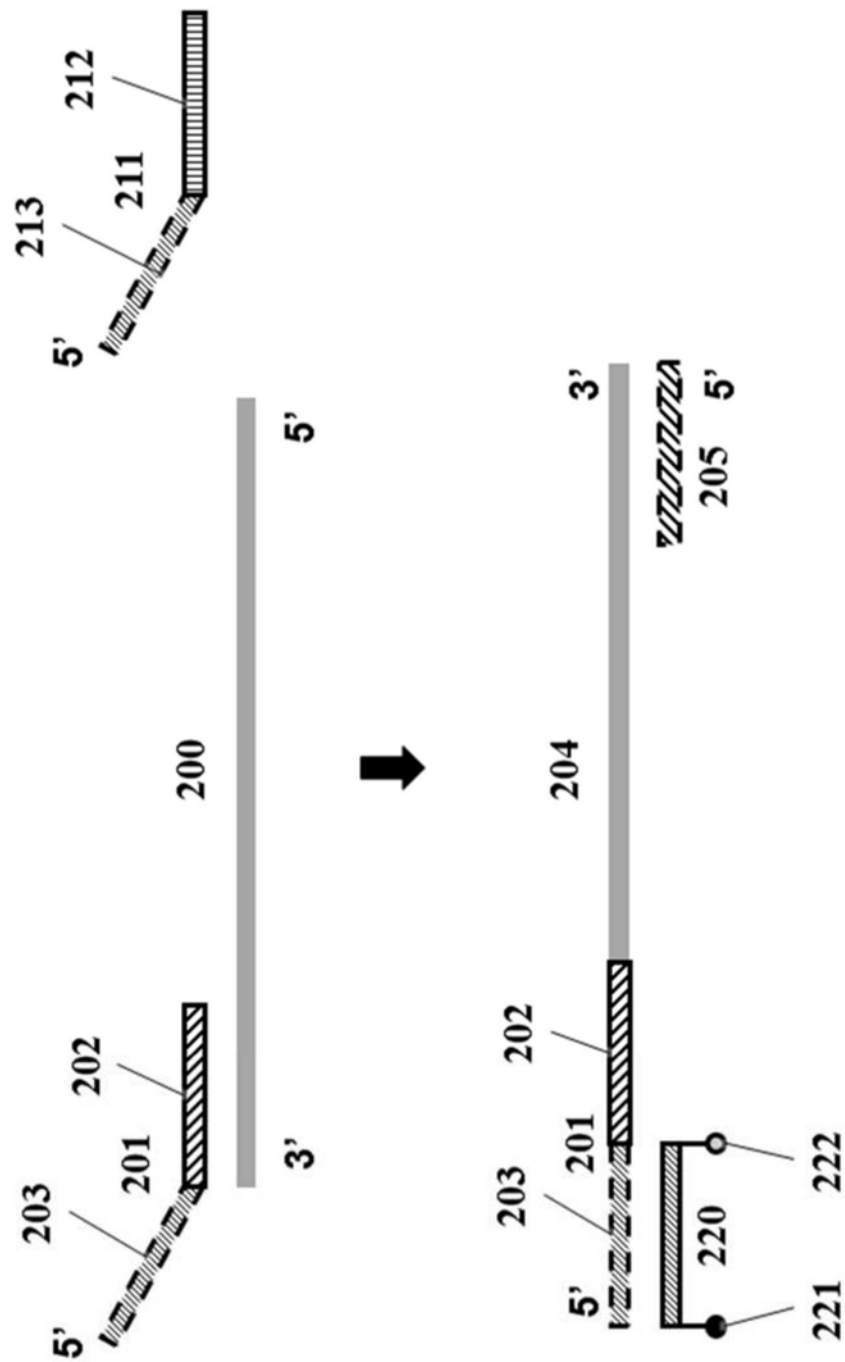


图2

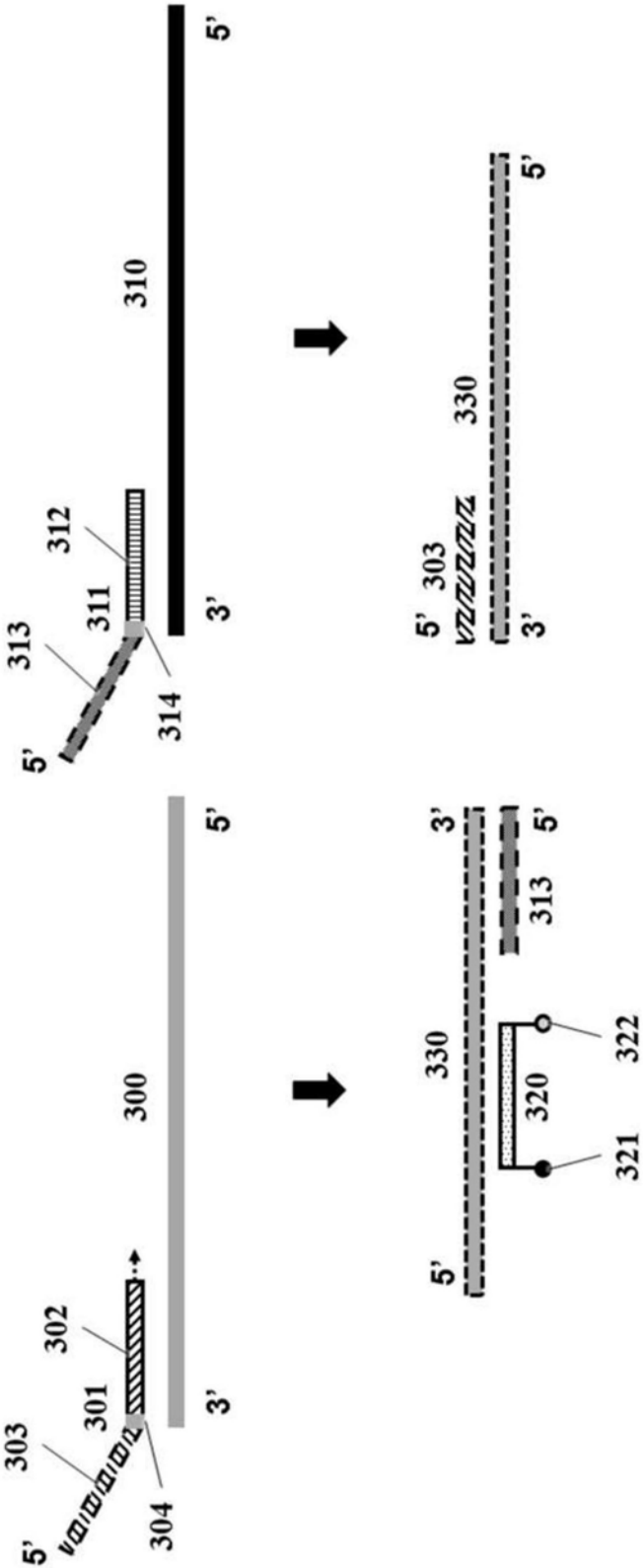


图3

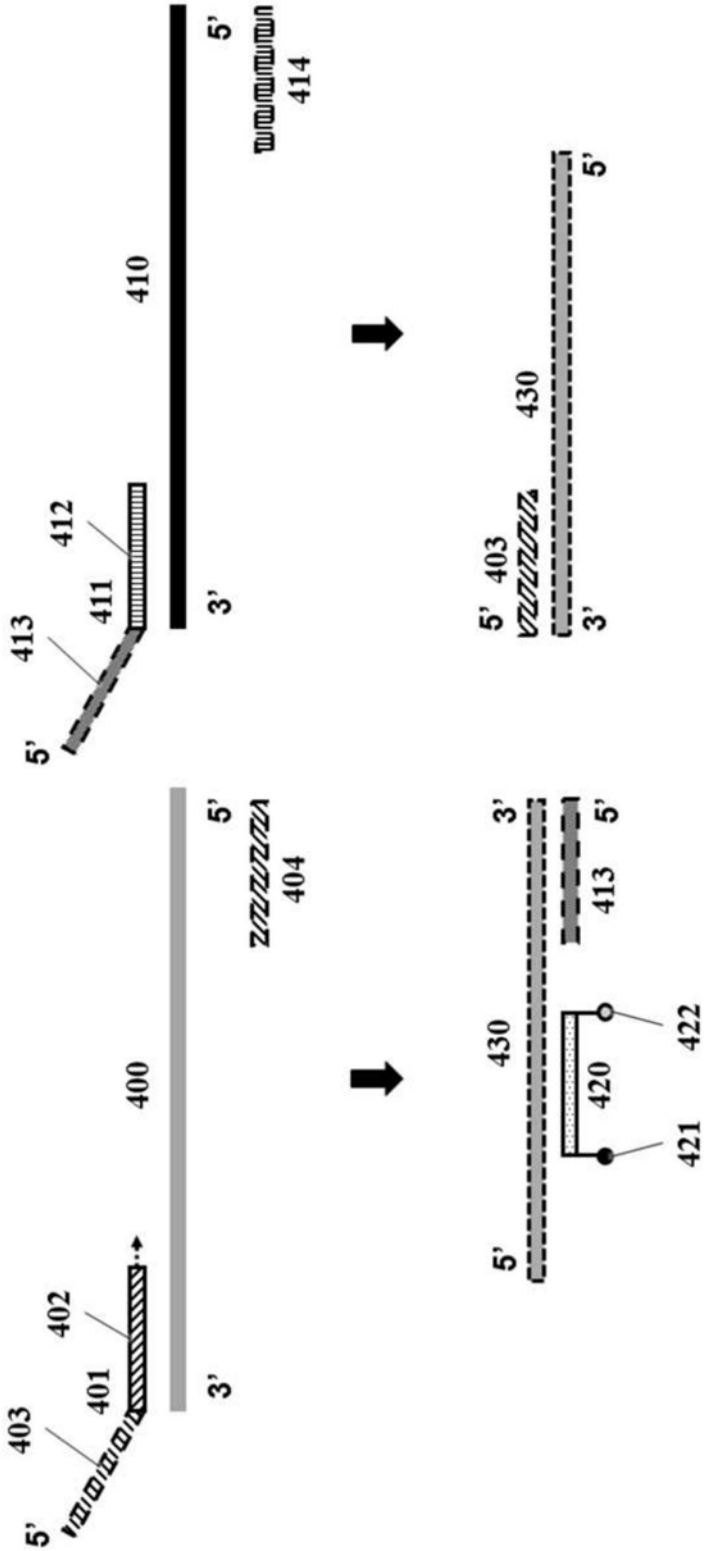


图4

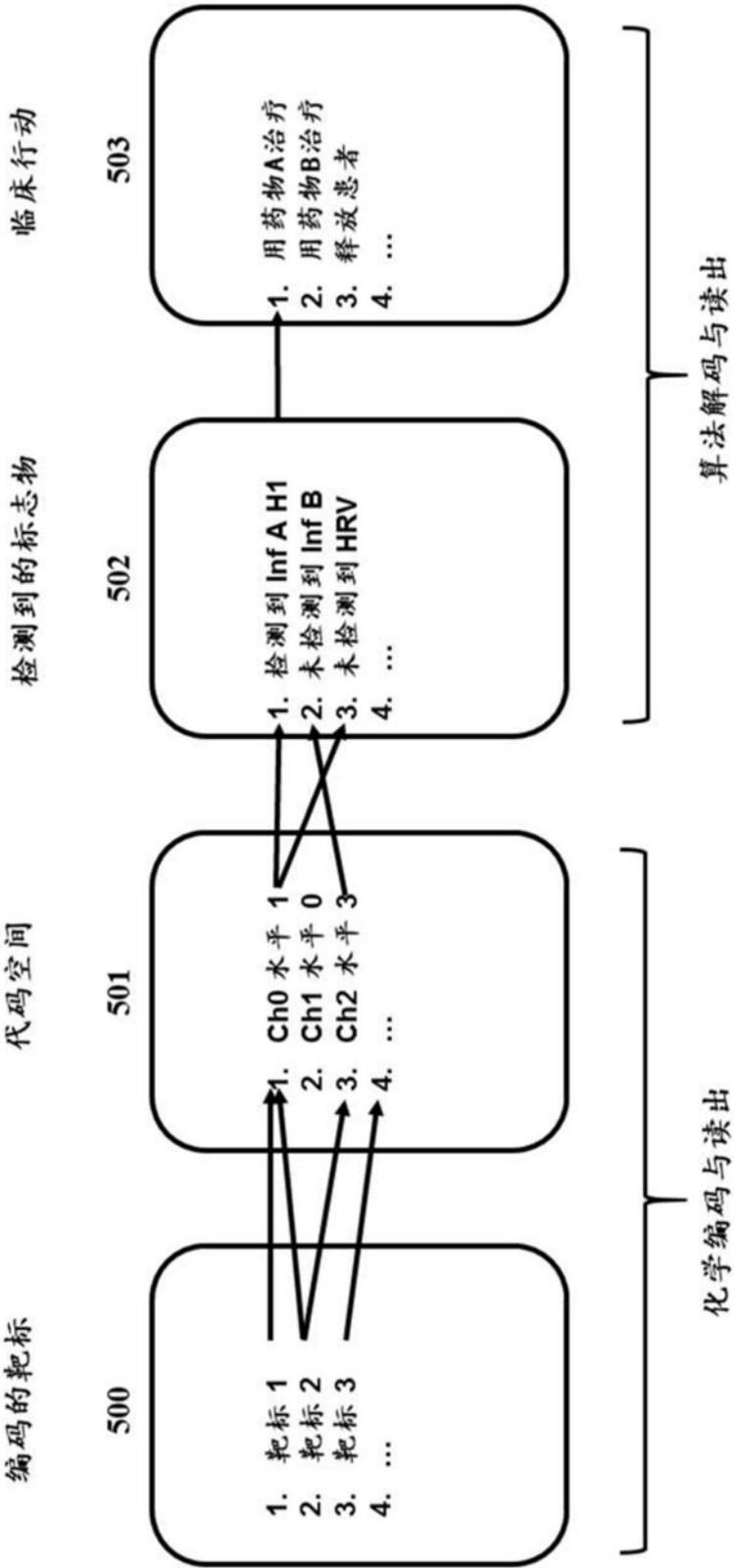


图5

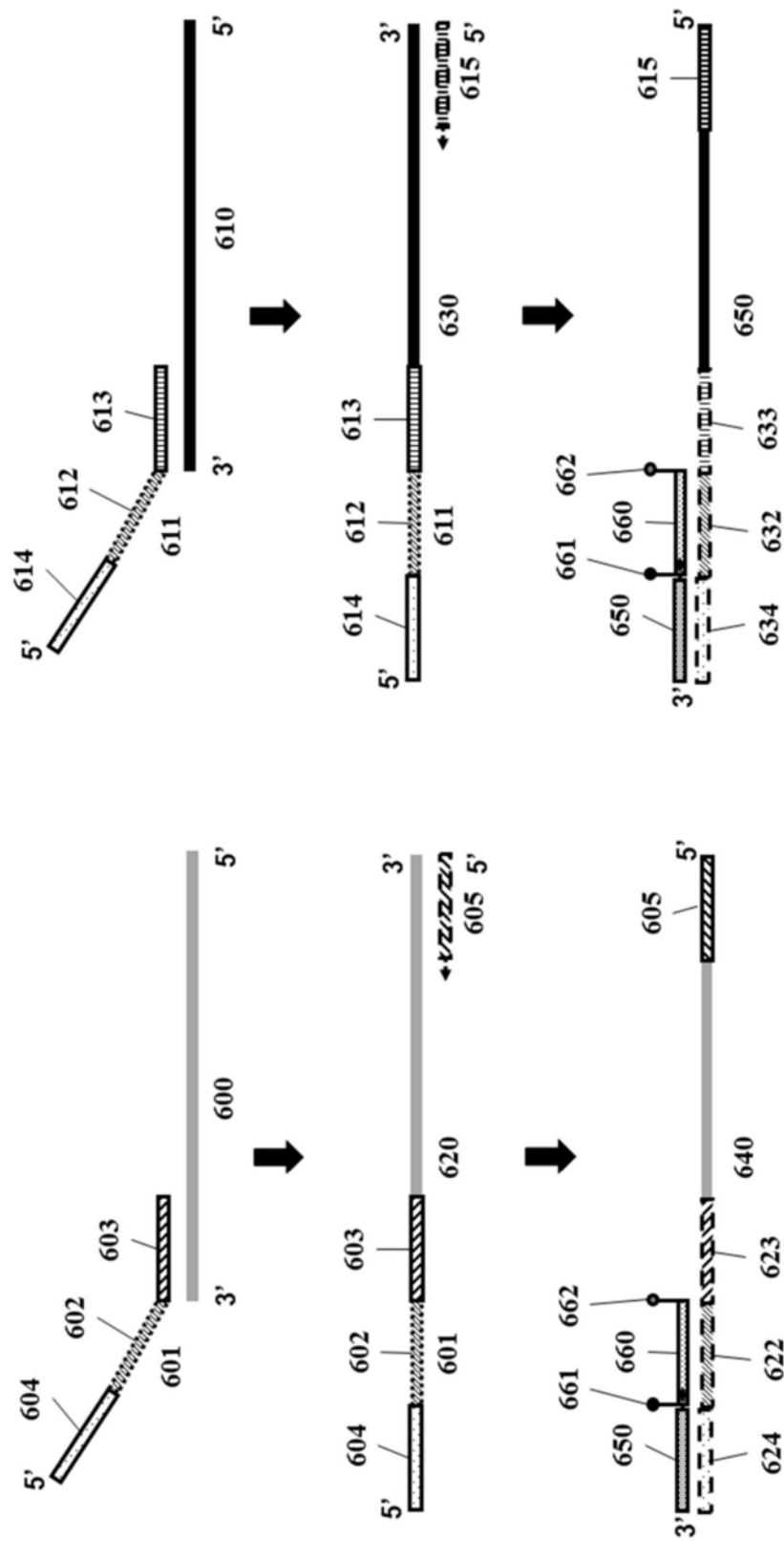


图6

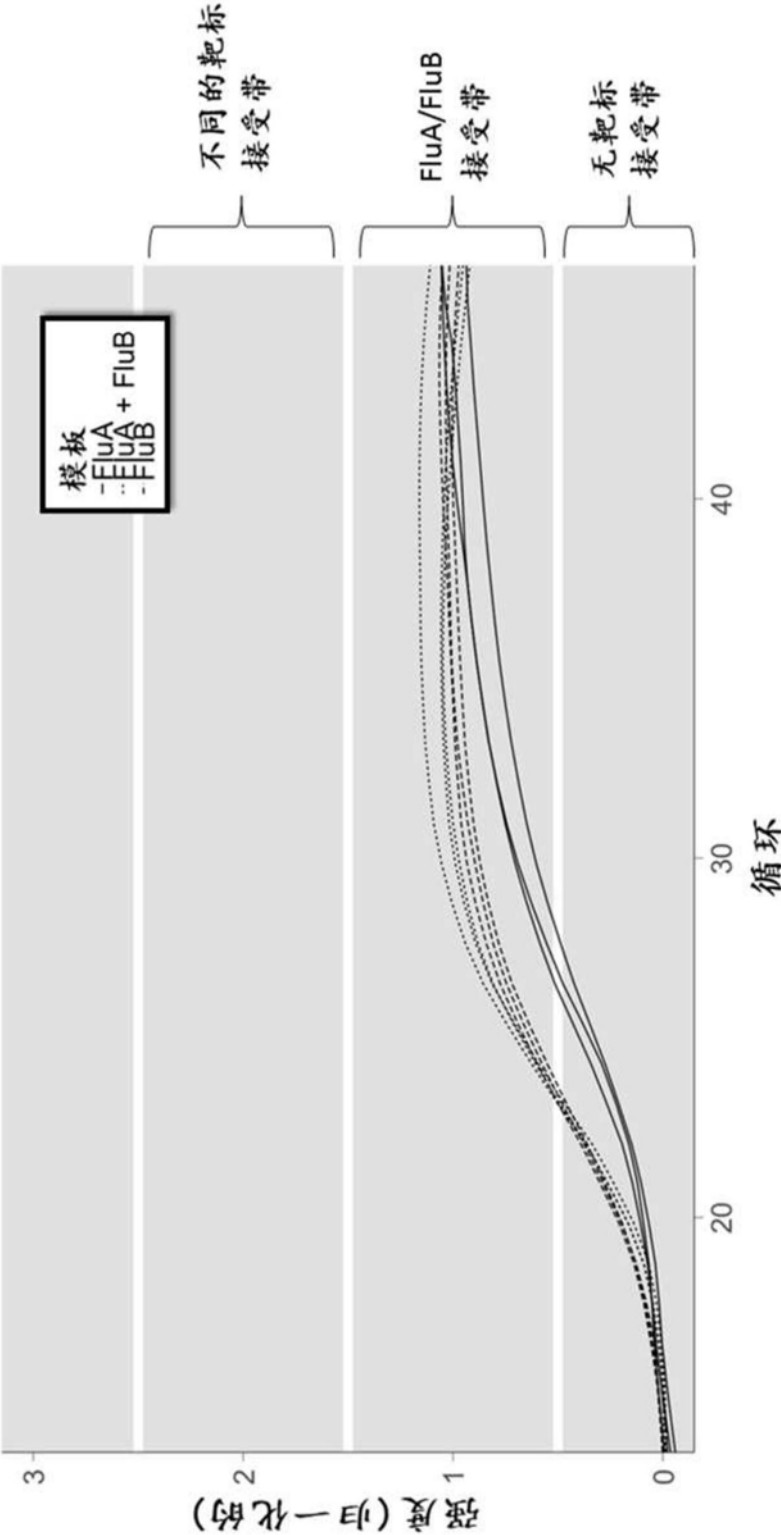


图7

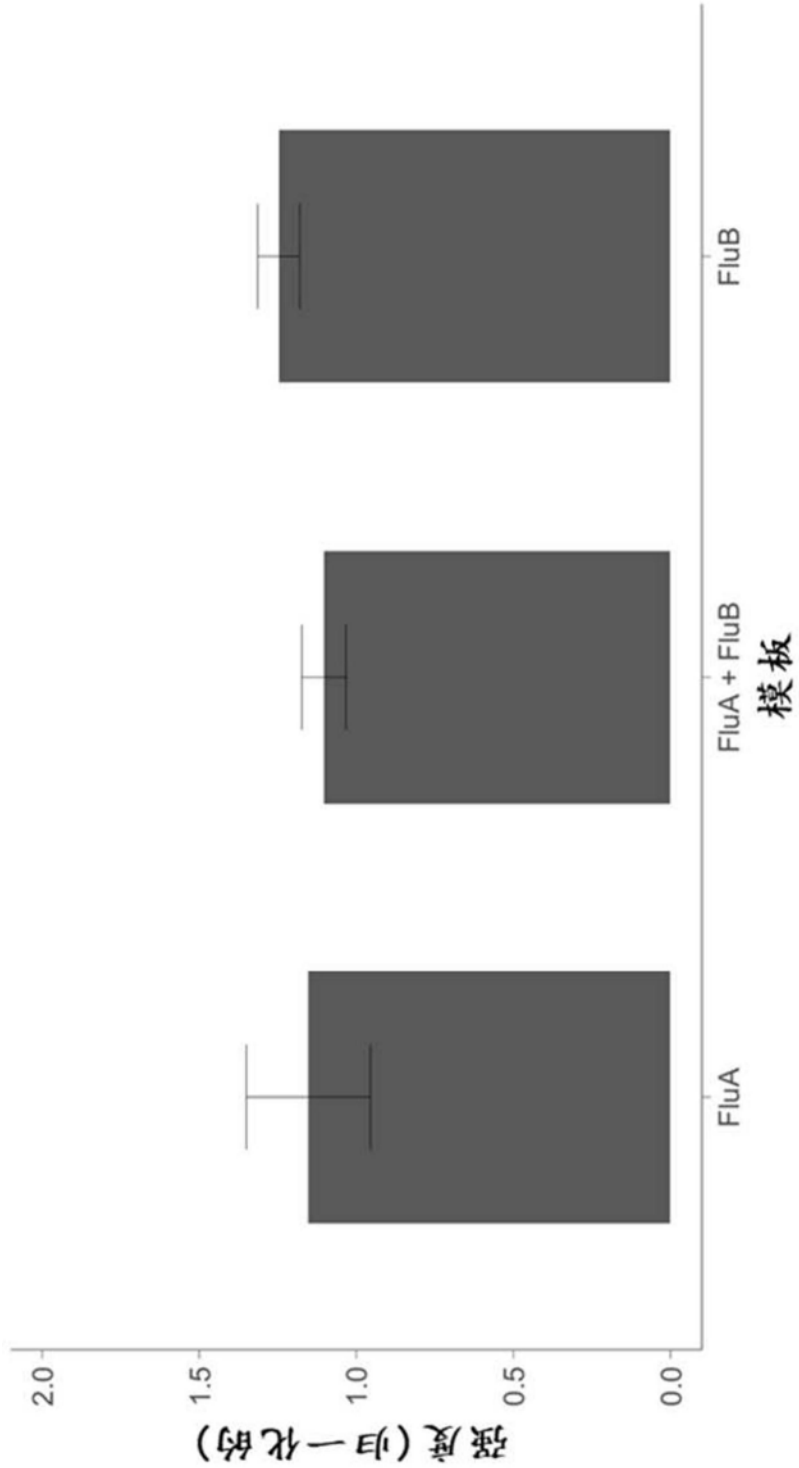


图8