



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108699597 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680080249.5

(22)申请日 2016.11.23

(30)优先权数据

1520883.8 2015.11.26 GB

1605055.1 2016.03.24 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/053649 2016.11.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/089767 EN 2017.06.01

(71)申请人 DNAe集团控股有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 布莱恩·麦考恩

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 刘小立 郑霞

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6851(2018.01)

C12Q 1/6834(2018.01)

权利要求书4页 说明书18页 附图11页

(54)发明名称

单分子对照

(57)摘要

公开了用于获得在其中具有预定拷贝数诸如单拷贝的已知核酸分子的反应体积的方法。此类反应体积可用作于核酸扩增反应的对照。还描述了在此类方法中有用的核酸构建体。构建体包括第一区域和第二区域,其中第二区域侧翼为第一和第二引物结合位点以允许跨第二区域的扩增,且其中选择性地可裂解的区域位于第一区域和第二区域之间,选择性地可裂解的区域侧翼为第三和第四引物结合位点以允许跨该选择性地可裂解的区域的扩增。第二区域用作报告物以指示整个核酸分子的存在;且选择性地可裂解的区域可被裂解以从第二区域分离第一区域,留下分离的第一区域的拷贝。

1. 一种核酸盒,所述核酸盒包括核酸分子,所述核酸分子包括第一区域和第二区域,其中所述第二区域侧翼为第一引物结合位点和第二引物结合位点以允许跨所述第二区域的扩增,且其中选择性地可裂解的区域位于所述第一区域和所述第二区域之间,所述选择性地可裂解的区域侧翼为第三引物结合位点和第四引物结合位点以允许跨所述选择性地可裂解的区域的扩增。

2. 根据权利要求1所述的核酸盒,其中所述第一区域侧翼为第五引物结合位点和第六引物结合位点以允许跨所述第一区域扩增。

3. 根据权利要求2所述的核酸盒,其中所述第五引物结合位点和第六引物结合位点对应于期望的测试核酸侧翼的引物结合位点。

4. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,其中所述选择性地可裂解的区域是限制酶结合和/或裂解位点。

5. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,包括多个第二区域,每个第二区域侧翼为引物结合位点。

6. 根据权利要求5所述的核酸盒,其中每个第二区域与其邻近区域通过选择性地可裂解的区域隔开。

7. 根据权利要求6所述的核酸盒,其中每个选择性地可裂解的区域是相同的。

8. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,包含多个第一区域。

9. 根据权利要求8所述的核酸盒,其中所述多个第一区域的每个是不同的。

10. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,其中所述第一区域是模拟区域,其序列被选择为具有模拟期望的测试核酸序列的特性的特性。

11. 根据权利要求10所述的核酸盒,其中所述模拟期望的测试核酸序列的特性的特性包括选自由以下组成的组的一种或更多种特性:长度、G/C组成、不存在重复序列和形成二级结构的能力。

12. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,其中所述第二区域是报告物区域。

13. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,其中所述盒在所述第一区域附近,优选地在所述盒的末端用反应性基团官能化。

14. 根据任一前述权利要求所述的核酸盒,其中所述盒被固定在固体支持物上。

15. 一种反应混合物,包含根据任一前述权利要求所述的核酸盒。

16. 一种用于获得预定拷贝数的已知核酸分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 制备包含根据权利要求1至13的任一项所述的核酸盒的多个反应混合物体积,使得所述体积中的至少一些在统计上可能包含期望的预定拷贝数的所述盒;

(b) 将(a)的多个体积的每一个与能够裂解所述盒的所述选择性地可裂解的区域的剂组合,从而使所述第一区域和所述第二区域分离;

(c) 将(b)的多个体积的每一个与能够结合所述盒的所述选择性地可裂解的区域侧翼的所述第三引物结合位点和所述第四引物结合位点的核酸引物组合,并进行扩增反应,从而在那些未发生裂解的体积中扩增跨所述选择性地可裂解的区域的序列;并丢弃那些发生扩增的体积;

(d) 将(c)的其余多个体积的每一个与能够结合所述第二区域侧翼的所述第一引物结合位点和所述第二引物结合位点的核酸引物组合,并进行扩增反应,从而扩增跨所述第二

区域的序列;并丢弃那些未发生扩增的体积;

(e) 从而提供其余的多个体积,每个体积包含预定拷贝数的包含所述第一区域的核酸分子。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中(a)的所述多个反应混合物体积被制备为包含所述盒的水性溶液的油包水乳液。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述水性溶液的浓度被选择为使得这在体积内产生使得大多数体积将不包含盒,而至少一些体积包含期望拷贝数的盒的统计分布。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法,其中所述核酸分子的期望拷贝数是一。

20. 根据权利要求16至19中任一项所述的方法,其中(a)中的大多数反应混合物体积不包括所述盒的拷贝。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的方法,其中一个或更多个,且优选所有的组合步骤通过融合或组合两个或更多个反应混合物体积进行。

22. 根据权利要求16至21中任一项所述的方法,其中所述反应混合物体积是以液滴的形式。

23. 根据权利要求16至22中任一项所述的方法,其中核酸扩增是聚合酶链式反应(PCR)扩增。

24. 根据权利要求16至23中任一项所述的方法,其中步骤(d)还包括对扩增的第二区域进行定量,并丢弃扩增的核酸的量高于和/或低于预定阈值的那些反应混合物。

25. 根据权利要求16至24中任一项所述的方法,还包括使被包含在(e)的体积中的包含所述第一区域的核酸分子结合到固体支持物的步骤。

26. 根据权利要求25所述的方法,还包括将所述固体支持物与含有测试核酸的反应混合物体积组合,并允许所述测试核酸与所述固体支持物上的结合核酸杂交的步骤。

27. 根据权利要求25所述的方法,所述方法还包括以下步骤:

a') 将i) 具有与其结合的包含所述第一区域的核酸分子的固体支持物与ii) 包含多个核酸分子的溶液接触,所述多个核酸分子的至少一个是靶核酸分子,其中所述靶核酸分子的至少一部分与附着于所述固体支持物的核酸分子的部分互补;

b') 允许附着于所述固体支持物的核酸分子与所述靶核酸分子杂交;和

c') 从所述溶液取出所述固体支持物;

从而分离所杂交的已知拷贝数的靶核酸分子。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中包含所述第一区域的所述核酸分子是双链的,且其中所述双链分子的仅单条链被附着于所述固体支持物。

29. 根据权利要求27或28所述的方法,其中包含所述第一区域的核酸分子的至少一部分与所述靶核酸分子的相应部分不互补。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中包含所述第一区域的所述核酸分子的非互补部分在所述分子不与所述固体支持物附着的末端。

31. 根据权利要求27至30中任一项所述的方法,其中所述溶液包括比所述已知拷贝数显著更多拷贝的所述靶核酸分子。

32. 根据权利要求27至31中任一项所述的方法,其中所述固体支持物为聚合物珠。

33. 根据权利要求27至32中任一项所述的方法,还包括步骤d') 将所述固体支持物和所

述靶核酸分子递送至反应容器或反应体积。

34. 根据权利要求33所述的方法,还包括步骤e')使用包含所述第一区域的核酸分子作为模板通过聚合反应延伸捕获的靶核酸分子,由此将另外的序列掺入所述捕获的靶核酸分子。

35. 根据权利要求33或34所述的方法,还包括步骤f')扩增所述靶核酸分子的至少一部分以提供多个拷贝的被扩增的部分。

36. 根据权利要求16至24中任一项所述的方法,还包括使被包含在(e)的体积中的包含所述第一区域的核酸分子吸附到固体支持物之上或吸附到固体支持物之中的步骤。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述固体支持物为亲水性的和疏脂性的。

38. 根据权利要求36或37所述的方法,其中所述固体支持物是基于纤维素的基质。

39. 根据权利要求16至24或36至38的任一项所述的方法,其中所述第一区域侧翼为对应于期望的测试分析物核酸序列侧翼的引物结合位点的第五引物结合位点和第六引物结合位点;所述方法还包括以下步骤:将(e)中获得的体积与含有测试核酸和引物对的反应混合物体积组合,所述引物对将结合所述第五引物结合位点和所述第六引物结合位点;对组合的反应混合物进行核酸扩增;并确定i)包含所述第一区域的核酸分子;和/或ii)所述测试核酸的部分是否发生了核酸扩增。

40. 根据权利要求16至24的任一项所述的方法,还包括将(e)中获得的体积与具有不同物理性质的另外的反应混合物组合的步骤。

41. 一种用于进行核酸测定以检测样品中测试核酸的存在的方法,所述方法包括:

(a) 将包含测试核酸的样品与具有侧翼为第五引物结合位点和第六引物结合位点的第一区域的已知拷贝数的核酸分子组合,所述第五引物结合位点和第六引物结合位点对应于期望的测试核酸序列侧翼的引物结合位点;并与结合所述第五引物结合位点和第六引物结合位点的引物对组合;

(b) 对组合的样品和反应混合物进行核酸扩增反应;

(c) 确定i)包含所述第一区域的核酸分子;和/或ii)所述测试核酸的部分是否已经发生核酸扩增。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述已知拷贝数的核酸分子根据权利要求12至38或40的任一项所述的方法制备。

43. 根据权利要求41或42所述的方法,其中所述已知拷贝数是一。

44. 一种产品,包含其上吸附有已知拷贝数的核酸分子的亲水性和疏脂性固体支持物。

45. 根据权利要求44所述的产品,其中所述固体支持物包括基于纤维素的基质。

46. 根据权利要求44所述的产品,其中所述固体支持物包括聚合物珠。

47. 根据权利要求44至46所述的产品,其中所述核酸分子包括侧翼为第五引物结合位点和第六引物结合位点的第一区域,所述第五引物结合位点和第六引物结合位点对应于期望的测试核酸序列侧翼的引物结合位点。

48. 根据权利要求44至47的任一项所述的产品,其中所述已知拷贝数的核酸分子根据权利要求12至38或40的任一项所述的方法制备。

49. 一种用于分离已知拷贝数的靶核酸分子的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 将i)具有与其附着的已知拷贝数的核酸分子的固体支持物与ii)包含多个核酸分子

的溶液接触,所述多个核酸分子的至少一个是靶核酸分子,其中所述靶核酸分子的至少一部分与附着于所述固体支持物的核酸分子的部分互补;

b) 允许附着于所述固体支持物的核酸分子与所述靶核酸分子杂交;和

c) 从所述溶液取出所述固体支持物;

从而分离所杂交的已知拷贝数的靶核酸分子。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中具有与其附着的已知拷贝数的核酸分子的所述固体支持物根据权利要求14或25至38的任一项制备。

51. 根据权利要求49或50的任一项所述的方法,其中所述已知拷贝数的核酸分子是双链的,且其中所述双链分子的仅单条链被附着于所述固体支持物。

52. 根据权利要求49至51的任一项所述的方法,其中所述已知拷贝数的核酸分子的至少一部分与所述靶核酸分子的相应部分不互补。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述已知拷贝数的核酸分子的非互补部分在所述分子不与所述固体支持物附着的末端。

54. 根据权利要求52或53所述的方法,其中所述已知拷贝数的核酸分子的非互补部分在所述分子与所述固体支持物附着的末端。

55. 根据权利要求49至54中任一项所述的方法,其中所述溶液包括比所述已知拷贝数显著更多拷贝的所述靶核酸分子。

56. 根据权利要求49至55中任一项所述的方法,其中所述固体支持物为聚合物珠。

57. 根据权利要求49至56中任一项所述的方法,还包括步骤d) 将所述固体支持物和所述靶核酸分子递送至反应容器或反应体积。

58. 根据权利要求57所述的方法,还包括步骤e) 使用所述已知拷贝数的核酸分子作为模板通过聚合反应延伸捕获的靶核酸分子,由此将另外的序列掺入所述捕获的靶核酸分子。

59. 根据权利要求57或58所述的方法,还包括步骤f) 扩增所述靶核酸分子的至少一部分以提供多个拷贝的扩增部分。

单分子对照

发明领域

[0001] 本发明涉及用于获得在其中具有预定拷贝数的已知核酸分子的反应体积的方法。此类反应体积可用于核酸扩增反应的对照。本发明的方面涉及在此类方法中可能有用的核酸分子。本发明的另外方面在本文描述。

[0002] 发明背景

[0003] 分子诊断测试(Molecular Diagnostic Testing)是以高灵敏度和特异性证实某一DNA序列(或其他分子种类诸如蛋白)存在(或不存在)的方法。灵敏度是甚至在物质上存在非常少拷贝的分析物时也能检测分析物的能力。特异性是可靠地检测分析物而不会错误地检测存在的任何其他物质的能力,所述任何其他物质可能仅与感兴趣的分析物略有不同。当以极大的精确性检测到稀有物质且该稀有物质存在于其中存在许多其它非常相似的分子种类的测试样品中时,灵敏度和特异性的理想组合得以实现。高灵敏度和高特异性通常难以实现,并且是判断技术是否适合目的的关键考虑因素。假阴性可能由具有低灵敏度的测试(不管测试的特异性如何)产生,而假阳性可能是具有低特异性的测试的结果,即使使用高灵敏度测试来检测测试样品中不存在的分析物。

[0004] 在医学调查中经常使用分子诊断测试,且假阴性结果或假阳性结果的后果可能不利于临床决策制定和对患者合适的治疗的选择。

[0005] 任何充分优化的分子诊断测试的目标应该是在设定参数内执行时,返回可靠且可再现的结果。这种保证通常是通过与测试样品同时分析对照样品获得的。这些对照样品的内含物是已知的,且因此对这些对照进行的分子测试的结果是可预测的。从已知的对照产生预期结果的失败,无论它们是阳性还是阴性,会使从同时运行的测试样品产生的任何结果无效。好的对照被有意识地设计成比实际的测试样品更容易失败,从而在从测试样品产生阳性结果的情况下,如果阳性对照也产生阳性结果,这才是可信的。通过设计,好的阳性对照在标准测试条件下比真正阳性的测试样品更可能失败。这可能是由于,例如,对照包含的分析物呈现数(representation)比测试样品中存在的少,使得对对照的灵敏度要求比测试样品更大。提供有意义的对照方案是组装设计良好且可靠的分子诊断测试的关键。

[0006] 在分子诊断领域,需要精确地测试可能与人类基因组一样复杂的测试样品中存在的拷贝数非常低的DNA分析物(可能低至单分子DNA)。在测试分析物(DNA序列)以低的个位数拷贝存在并且可能存在大量其他(类似)DNA物质的情况下,需要提供低拷贝数阳性对照,该阳性对照将使得测试样品的阳性结果的产生是有效的,并且在某种程度上使得测试样品阴性结果的产生是有效的。

[0007] 对照,特别是这里公开的生成手段,对于证明许多基于扩增的反应的灵敏度具有广泛的实用性,并且例如可以在法医学中具有实用性,展示了使用特定法医DNA扩增技术检测特定法医目标的效率。许多其他应用也将通过提供已知数量的对照,尤其是单分子对照来实现。正是在医学研究领域,例如在检测血流感染(Blood Stream Infection)或分析驱动癌变的体细胞突变方面,预期到本发明的最大应用。

[0008] 提供人工的且可操作的对照DNA分析物在本发明多个方面的目的之中,使用与询

问测试样品是否存在测试分析物相同的测试组分(例如DNA引物),所述DNA分析物可以与测试样品共同扩增。因为对照DNA分析物与测试分析物(如果存在)同时扩增,所以对照DNA分析物的检测提供了可靠的验证,即所组装的测试能够扩增测试分析物,即使该测试分析物本身仅以非常低的拷贝数并且可能低至单拷贝存在。然而,该系统的灵敏度也提供了对阴性测试结果的某种程度的验证:如果人工引入的单拷贝对照以极大的确定性被检测到,则测试设计的特征提供了某种程度的置信度,即阴性测试样品结果确实是由于测试样品中的测试分析物分子少于一个引起的,并且因此测试样品真的不含测试分析物。

[0009] 发明概述

[0010] 根据本发明的第一方面,提供了核酸盒,所述核酸盒包括核酸分子,所述核酸分子包括第一区域和第二区域,其中第二区域侧翼为第一和第二引物结合位点以允许跨第二区域的扩增,且其中选择性地可裂解的区域位于第一区域和第二区域之间,选择性地可裂解的区域侧翼为第三和第四引物结合位点以允许跨选择性地可裂解的区域的扩增。

[0011] 如将从以下详述明显的,该核酸盒允许制备在其中具有预定拷贝数的包含第一区域的核酸分子的反应体积。然而,简要地说,第二区域用作报告物以指示完整核酸分子(也称为核酸盒)的存在;选择性地可裂解的区域可被裂解以从第二区域分离第一区域,留下分离的第一区域的拷贝。第二区域在本文可称为报告物区域。第一区域在本文可称为模拟区域(因为其意图模拟测试序列)。

[0012] 第一区域侧翼可以为第五和第六引物结合位点以允许跨第一区域扩增。在优选的实施方案中,第五和第六引物结合位点对应于期望的测试核酸序列侧翼的引物结合位点。“对应于”意味着,能够结合核酸分子中给定引物结合位点的引物也将能够结合测试核酸序列中对应的引物结合位点。这意味着,相同的引物可用于测定中以扩增测试序列和第一(模拟)区域二者。因此,第一区域可以作为对照来确认核酸扩增已经成功。在某些实施方案中,第五和第六引物结合位点与所述对应的引物结合位点相同,而在其他实施方案中,第五和第六引物结合位点与所述对应的引物结合位点不相同(例如,它们可能因1、2、3、4、5或更多核苷酸而不同)。在引物结合位点不相同的情况下,这降低了第一区域的核酸扩增效率,这在第一区域用作对照时可能是期望的。

[0013] 选择性地可裂解的区域可以是天然核酸酶结合位点;例如,限制酶位点(其不应在盒中除了在可裂解区域中之外的区域存在)。合成的核酸酶,诸如金属络合物,或工程化的核酸酶活性,诸如CRISPR Cas9及衍生物,也可以实现定向链断裂。可选地,选择性地可裂解的区域可以是化学可裂解或光可裂解的,或者两者的组合;其可以包含可被选择性裂解的修饰的核苷酸或非核苷酸部分。例如使核酸光不稳定的邻硝基苄基修饰,或允许光活化和随后的温和碱性裂解或热裂解的7-硝基吡啶修饰。

[0014] 盒可以包括多个报告物区域,每个侧翼为引物结合位点。每个报告物区域可以通过选择性地可裂解的区域与其邻近区域隔开。多个报告物区域优选是相同的,多个选择性地可裂解的区域也如此。然而,在某些实施方案中,多个报告物区域可以是不同的。

[0015] 盒可包括多个模拟区域。每个模拟区域侧翼可以为引物结合位点。在某些实施方案中,多个模拟区域是不同的,而在其他实施方案中,多个模拟区域是相同的。类似地,多个引物结合位点可以不同,以使得每个模拟区域可以用不同的引物对扩增。

[0016] 在盒包括多个报告物区域和/或模拟区域的情况下,这些区域不必以任何特定的

顺序。例如,所有报告物区域可以被归聚在一起,或者它们可以与模拟区域交替,或者可以使用任何其他顺序。

[0017] 核酸分子可以是线性的,或者其可以是圆形的,例如质粒。

[0018] 可以选择模拟区域以具有某些期望的特性;例如长度、G/C组成、不存在重复序列和/或形成二级结构的能力。所需的性质可以根据核酸分子的期望用途而变化;例如,当用作对照时,模拟区域的长度可被选择为与期望的测试分析物序列相似但不一定相同,允许如果两者在一个测定中被扩增容易地区分两者。也可以选择所需的性质,以便模拟测试分析物区域,使得允许对照扩增的条件也将被预期为允许测试分析物序列的扩增。

[0019] 报告物区域可以包含修饰的核苷酸;例如,某些核苷酸可以用可检测的标记物来标记。这可以有助于其作为报告物的用途。可选地,报告物区域不需要被标记,而可以以一些其他方式检测,例如通过使用检测dsDNA的染料。

[0020] 核酸分子优选地是DNA。

[0021] 核酸分子可被固定在固体支持物上。固体支持物可以是珠、膜、吸附表面等。

[0022] 还提供了其上固定有本文定义的核酸盒的固体支持物。

[0023] 本发明的另一方面提供了一种用于获得预定拷贝数的已知核酸分子的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] (a) 制备包含本文所述核酸盒的多个反应混合物体积,使得至少一些所述体积在统计上可能包含期望的预定拷贝数的所述盒;

[0025] (b) 将(a)的多个体积的每一个与能够裂解盒的选择性地可裂解的区域的剂组合,从而使第一区域和第二区域分离;

[0026] (c) 将(b)的多个体积的每一个与能够结合盒的选择性地可裂解的区域侧翼的第三和第四引物结合位点的核酸引物组合,并进行扩增反应,从而在那些未发生裂解的体积中扩增跨选择性地可裂解的区域的序列;并丢弃那些发生扩增的体积;

[0027] (d) 将(c)的其余多个体积的每一个与能够结合报告物区域侧翼的第一和第二引物结合位点的核酸引物组合,并进行扩增反应,从而扩增跨报告物区域的序列;并丢弃那些未发生扩增的体积;

[0028] (e) 从而提供其余的多个体积,每个体积包含预定拷贝数的包含第一区域的核酸分子。

[0029] 在其中核酸盒在第一区域侧翼包括第五和第六引物结合位点的实施方案中,则(e)中多个体积中的核酸分子也将包括引物结合位点。

[0030] (a)的多个反应混合物体积可以制备为包含盒的水性溶液的油包水乳液。每个乳液液滴代表反应体积。乳液优选地通过将包含盒的水性溶液与油组合来制备。乳液可以通过混合、超声处理或向油中注入水性溶液来实现。后者是优选的,因为它允许更好地控制液滴体积。液滴可以是纳升、皮升或飞升级体积。乳液可以含有去垢剂,以帮助保持液滴分离。

[0031] 在制备乳液时,可以通过在水性溶液中使用相对低浓度的盒来获得所需的拷贝数。可以选择浓度,使得这导致体积内的统计分布,使得大多数体积将不包括盒,而至少一些体积包括期望拷贝数的盒(并且一些体积可能包括多于期望的拷贝数)。

[0032] 优选地,盒的期望拷贝数是一。

[0033] 核酸分子的期望拷贝数可以与盒的期望拷贝数相同。优选地,这是一,并且这可以

通过使用具有单个第一区域的盒来实现。可选地,核酸分子拷贝数可以大于盒的拷贝数;可以使用具有多于一个相同的第一区域的盒来获得是盒的拷贝数的倍数的拷贝数。例如,在盒具有两个第一区域并且盒拷贝数为一的情况下,则核酸分子的拷贝数将为二。

[0034] 优选地,(a)中的大多数反应混合物体积不包括盒的拷贝。包含盒的期望拷贝数的体积的“至少一些”是指至少10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、0.001%的体积包含期望拷贝数。

[0035] 一个或更多个,且优选所有的组合步骤可以通过融合两个或更多个反应混合物体积进行。这些体积可以以液滴形式,例如油包水液滴。液滴的融合可以使用微流体系统用已知技术进行。例如,合适的技术包括微通道内的强制合并(在Hung等人,Lab Chip,2006,6,174-178中描述)或通过电介质上电润湿(EWOD)的液滴之间的碰撞(在Fan等人Lab Chip,2009年5月7日;9(9):1236-42中描述)。在替代实施方案中,反应混合物体积可以被包含在反应容器例如多孔板内。在这些实施方案中,可以将反应混合物连续加入到反应容器中以使它们组合。任一种方法允许例如通过热循环反应原位进行核酸扩增。

[0036] 核酸扩增优选包括聚合酶链式反应(PCR)扩增。用于核酸扩增的必要试剂可以在每个步骤与反应混合物体积组合,或者可以被包含在初始反应混合物体积中,使得在每个步骤仅添加必要的引物。必要的试剂可以包括DNA聚合酶、缓冲液、dNTP等。技术人员将知晓如何进行核酸扩增,以及哪些试剂是必要的。

[0037] 核酸扩增可以被标记。这允许容易地确定是否已发生扩增。可以用染料如荧光染料进行标记,以定量反应混合物中核酸的量。例如,可以使用与dsDNA结合的染料(例如SYBR green)。不同的扩增可以使用不同的染料,以允许区分每个扩增。可选地,标记的核苷酸可以被掺入到每个扩增中。

[0038] 步骤(d)还可包括定量扩增的报告物区域,并丢弃扩增核酸的量高于和/或低于预定阈值的那些反应混合物。例如,这可用于指示盒的起始拷贝数大于期望拷贝数,在这种情况下,报告物区域的起始拷贝数将高于预期,并且扩增的报告物的最终量也将高于预期。

[0039] 方法还可包括使被包含在(e)的体积中的包含第一区域的核酸分子结合到固体支持物的步骤。例如,支持物可以是微珠、膜、吸附材料等。每个体积可以结合到独立的固体支持物,或固体支持物的独立的区域。通过这种方式,单个(或期望拷贝数的)核酸分子可以结合到固体支持物上。方法还可包括将固体支持物与含有测试核酸的反应混合物体积组合,并允许测试核酸与固体支持物上结合的核酸杂交的步骤。通过这种方式,结合的核酸分子(已知拷贝数)可用于分离含有互补序列的测试核酸。重要的是,这将以已知的拷贝数分离。可选地,包含第一区域的核酸分子可被吸附到固体支持物(例如亲水性和疏脂性材料,例如基于纤维素的滤纸)中。亲水性和疏脂性材料的使用允许含有核酸的油包水液滴的水相被吸附(优选全部)到材料中,而油相不被吸附,并且可被去除。

[0040] 方法还可包括将(e)中获得的体积与含有测试核酸和引物对的反应混合物体积组合,所述引物对将结合第五和第六引物结合位点;对组合的反应混合物进行核酸扩增;并确定i)包含第一区域的核酸分子;和/或ii)测试核酸的部分是否发生了核酸扩增的步骤。由此,第一区域充当对照以指示扩增反应正在进行。

[0041] 方法还可包括将(e)中获得的体积与具有不同物理性质的另外的反应混合物组合的步骤。例如,另外的反应混合物可具有更大的体积、更大的粘度或两者。

[0042] 本发明的另一方面提供了一种用于进行核酸测定以检测样品中测试核酸的存在的方法,测试核酸侧翼为第五和第六引物结合位点,对应于如上所定义的核酸分子的第一区域侧翼的第五和第六引物结合位点;该方法包括:

[0043] (a) 将含有测试核酸的样品与按如上所述制备的反应体积、并与结合第五和第六引物结合位点的引物对组合;

[0044] (b) 对组合的样品和反应体积进行核酸扩增反应;

[0045] (c) 确定 i) 包含第一区域的核酸分子;和/或 ii) 测试核酸的是否已经发生核酸扩增。

[0046] 本发明的又另一个方面提供了一种包含亲水性和疏脂性材料的固体支持物,其上吸附有已知拷贝数的核酸分子。

[0047] 本发明的仍另一方面提供了一种用于分离已知拷贝数的靶核酸分子的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] a) 将 i) 具有与其附着的已知拷贝数的核酸分子的固体支持物与 ii) 包含多个核酸分子的溶液接触,多个核酸分子的至少一个是靶核酸分子,其中靶核酸分子的至少一部分与附着于固体支持物的核酸分子的部分互补;

[0049] b) 允许附着于固体支持物的核酸分子与靶核酸分子杂交;和

[0050] c) 从溶液取出固体支持物;

[0051] 从而分离所杂交的已知拷贝数的靶核酸分子。

[0052] 具有与其附着的已知拷贝数的核酸分子的固体支持物可以如本文所述和如参考本发明的前述方面所述的来制备。已知拷贝数的核酸分子可以如参考本发明的前述方面所述的来制备。

[0053] 已知拷贝数的核酸分子可以是双链的或单链的。在双链的情况下,方法还可包括使双链核酸分子变性以允许杂交的步骤。而且,在双链的情况下,优选地双链分子的仅单条链附着到固体支持物上。

[0054] 分子的互补部分的长度优选地至少10、15、20、25、30、35或40个核苷酸。互补部分优选地至少85%、90%、95%、97%、99%或100%互补。

[0055] 优选地已知拷贝数的核酸分子的至少一部分不与靶核酸分子的相应部分互补。也就是说,两个分子具有互补部分,并且与分子的这些互补部分相邻的部分不互补,从而分子将不会在非互补部分杂交。已知拷贝数的核酸分子的非互补部分优选地在分子的不与固体支持物附着的末端;优选地是3'末端。另一个非互补部分还可存在于或替代性地存在于分子与固体支持物附着的末端;这部分可以被掺入任何由已知拷贝数的核酸分子产生的扩增产物中,并且可以用于例如掺入特定序列标签或另外的结合位点。

[0056] 优选地已知拷贝数是1。

[0057] 优选地该溶液包含多个拷贝的靶核酸分子;更优选地存在比已知拷贝数显著更多拷贝的靶核酸分子。

[0058] 固体支持物优选地是聚合物珠。

[0059] 优选地提供了多个固体支持物,每个固定支持物具有与其附着的已知拷贝数的核酸分子。

[0060] 方法还可包括步骤d) 将固体支持物和靶核酸分子递送至反应容器或反应体积。反

应容器可以是孔。优选地孔的尺寸被设计成能够容纳仅单个固体支持物。方法还可包括或可选地包括步骤e) 使用已知拷贝数的核酸分子作为模板通过聚合反应延伸捕获的靶核酸分子,由此将另外的序列掺入捕获的靶核酸分子。另外的序列优选地是并非在被捕获的靶附近自然存在的序列;这可以用于例如将已知的引物结合位点或通用引物位点掺入靶分子中。方法还可以仍包括步骤f) 扩增靶核酸分子的至少一部分以提供多个拷贝的被扩增的部分。

[0061] 附图概述

[0062] 图1代表含有靶分析物序列的测试核酸。

[0063] 图2显示核酸盒。

[0064] 图3显示了图2的核酸盒和识别盒内引物结合位点的引物。

[0065] 图4显示了含有图2的核酸盒的油包水乳液微液滴的制备。

[0066] 图5显示了核酸盒上的扩增被阻断的位置。

[0067] 图6显示了核酸盒上易感位点的位置,以及跨该位点扩增的引物的使用。

[0068] 图7示出裂解的盒的产生。

[0069] 图8显示了跨盒的易感位点的尝试性扩增。

[0070] 图9显示了含有期望序列的液滴和不含有期望序列的那些液滴的辨别。

[0071] 图10显示了用于获得含有已知拷贝数的已知核酸序列的反应体积的方法的概述。

[0072] 图11显示了操作作为方法的结果获得的反应混合物液滴的不同方式。

[0073] 图12显示了使用反应体积的诊断测试。

[0074] 图13显示了扩增反应体积的结果。

[0075] 图14显示了替代的核酸盒。

[0076] 图15显示了替代的核酸盒。

[0077] 图16图解了样品中多个拷贝的报告物序列的检测。

[0078] 图17显示了替代的核酸盒。

[0079] 图18是被吸附到固体支持物之中的已知拷贝数的核酸分子的示意图。

[0080] 图19显示了确认对照模拟核酸序列的存在或不存在的方法。

[0081] 图20图解了将对照模拟核酸分子附着到固体支持物之上。

[0082] 图21显示了替代的核酸盒。

[0083] 图22显示由图21的盒产生的与互补核酸分子杂交的单分子对照模拟核酸。

[0084] 图23显示带有与核酸的互补链杂交的稳定附着的单链核酸的聚合物珠。

[0085] 图24图解了促使能够使用图23的聚合物珠从多个核酸链回收单个核酸链的工作流程。

[0086] 图25显示了将特异性杂交的互补核酸链与非特异性吸附的核酸链区相区分的过程。

[0087] 图26显示捕获的互补回收的核酸链的链延伸以在其中掺入新的序列。

[0088] 图27描绘了扩增捕获的互补回收的核酸链并拉拢(co-opt)到表面上用于测序。

[0089] 发明详述

[0090] 本发明旨在允许产生含有受控拷贝数(通常为一个)的已知和确定的核酸序列的反应混合物或反应体积。该体积可以用作分子诊断测定中的对照。虽然本发明在本文主要

就提供人工对照样品方面进行了描述,但是应理解的是,存在可能期望产生含有已知拷贝数的已知核酸的样品的其他领域;因此本发明不限于产生对照序列。

[0091] DNA测试技术的灵敏度和特异性近年来已经增加,使得现在通过许多方法检测单分子测试分析物DNA序列,包括克隆扩增该测试分析物DNA序列和通过例如下一代序列分析对扩增产物进行质量检测是可能的。

[0092] 然而,检测单分子(或非常低的个位数拷贝)是挑战性的。任何充分开发的测定必须具有非常高的灵敏度和非常高的特异性,但经常地,使其中一种最大化则损害另一种。在对血流感染(BSI)的研究中,例如,当每毫升全血中存在低至1个病原体的菌落形成单位(CFU)时,可能具有临床意义(且患者可能病得很重)。必须迅速鉴定病原体 and 可能赋予对特定种类抗生素的抗性的可能的抗微生物抗性(AMR)基因。以10ml的最小抽血量和对于从病原体制备DNA将导致损失该DNA的部分的认同,认为分子诊断测试将必须能够精确地在大量(物质和序列含量两方面)“污染性”DNA的背景中检测到低的个位数拷贝的靶分析物,并报告临床医生在选择适当疗法时可依赖的结果并非是不合理的。

[0093] 使用与测试样品一起运行的对照一直是一种提供诊断测试在预期的验证参数内执行的可信度的公认手段。虽然这在证明测定的灵敏度正在测试样品中低的单分子的挑战性水平下体现时具有特别的相关性,但直到现在还没有简单可靠的方法使得能够生成对照样品以准确反映在测试样品中可能会遇到的非常低的拷贝数。

[0094] 本文公开的发明使得能够提供可靠地模拟测试分析物的非常低的拷贝数和序列背景的人工测试样品。提供与测试分析物共同扩增的这种对照,使得能够证实测定的性能,并证实产生的任何测试结果的准确性。即使在存在阴性测试结果的情况下,如果该对照在仅单个分子的水平下运行时的确产生令人信服的阳性结果,这种对照作为“真实阴性”的准确性在更大程度上被确认。

[0095] 尽管扩增非常少量的DNA在早期循环中容易产生随机变异,但是在与测试分析物相同的管中,使用与测试分析物相同的扩增引物序列运行产生输出的对照,提供许多实验变量的有效‘归一化’,否则这些变量可能会影响测试测定的效率。当对照物和测试物在相同的反应容器中运行时,此类变量例如试剂的绝对浓度、移液误差(pipetting errors)和温度波动、塑料制品和操作员变量被自动控制。这些变量如果在与测试测定分开的反应容器中进行可能会使对照的有用性难辨。可被设计以确保对照和测试序列以相同效率扩增的其他因素是例如扩增子长度,因为对于以较大效率扩增短扩增子存在选择性偏误(selective bias)。间插序列(intervening sequence)的‘GC’含量也可能影响相同长度的序列如何被有效扩增。这些和其他因素可能被有意设计到对照中,其中如同任何良好的对照应该的那样,使对照稍微“难以扩增”,并因此更容易失败可以是有益的。如果被设计为尽可能在功能上等效,那么引物结合位点、长度和GC含量和分布可以与其他序列考虑因素例如均聚物的运行(runs of homopolymer)和形成二级结构的能力一起被归一化。

[0096] 现在仅为了说明的目的提供对本发明的详细描述。在这个实例中,血流感染病原体的检测被用作示例,其中可能预期到的是,指示感染的任何病原体核酸可能以非常低(个位数)的拷贝数存在。该实例还设想使用微液滴作为反应体积,并包含核酸盒;这种微液滴能够接受通过使用微流体技术进行操作和组合。第一液滴与另外试剂的组合可相对直接地通过两个液滴的融合实现。然而,再次地,本发明不限于使用微液滴。

[0097] 图1显示了测试核酸。指示感染的DNA部分(并且是分子诊断测试的靶)被标记为灰色阴影框101。该测试分析物101可以被认为是提供信息的标志物,并且被例如被表示为白色方块箭头102和103的PCR引物特异性靶向的DNA序列区域界定或侧接。PCR引物将结合测试核酸内的合适的引物结合位点,并且(在合适的试剂例如DNA聚合酶、核苷酸和缓冲液的存在下)允许扩增引物102、103内的区域。除了这些方块箭头的方向之外,不再对正向102和反向103进一步区分;在当前文件涉及“引物”或“引物结合位点”的情况下,应该理解的是,这样的引物或位点通常指的是待扩增的序列侧翼的一对这样的引物或位点。用于扩增靶DNA的引物对的设计、选择和使用是被充分理解的,并且在技术人员的能力范围内。从临床样品制备的模板DNA将被诊断测试询问以确定该提供信息的标志物的存在(并且可能是半定量性的存在)或不存在。

[0098] 为了提供用于测试分析物101的诊断检测的对照,提供了人工核酸构建体。这一人工构建体被称为对照盒200,如图2所示。对照盒200包括三个共价连接的、单独的区域/特征:

[0099] ●模拟分析物201

[0100] ●报告物202

[0101] ●易感位点203

[0102] 重要的是,易感位点203位于模拟分析物201与报告物202之间。易感位点203可以是,例如,限制性内切核酸酶裂解识别序列。模拟分析物201和报告物202的序列不一定来源于任何天然存在的序列,且因此可以是任何优化设计的序列。然而,典型地,虽然模拟分析物201将被选择为与测试分析物101具有至少一些相似性(例如,长度、G/C含量等),但是当两个序列被扩增时其能够等同地被从中辨别。

[0103] 尽管模拟分析物201和报告物202的DNA序列在它们的选择上是不受约束的,但是易感位点203的DNA序列和所有三个区域201、202和203侧翼的序列受到限制,使得可以提供与这些位点杂交的特异性扩增引物。图3显示,三个区域201、202和203可以使用彼此不同的引物来靶向。但是注意,靶向扩增模拟分析物201的引物与图1中能够扩增测试分析物101的引物102和103相同(或至少基本相同)。因此,在测试分析物101和模拟分析物201都存在的样品中,这些不同的DNA序列都将由相同的正向引物102和反向引物103扩增。在本发明的某些实施方案中,模拟分析物201的扩增可能不是必需的;在这样的实施方案中,在模拟分析物201侧翼并且对应于引物102和103的引物结合位点的存在不是必需的。例如,如果模拟物201不是意图用作扩增反应中的对照,而是用于杂交到期望的靶,那么包含引物结合位点就不是必需的。

[0104] 引物301和302被设计为扩增报告物202,且引物303和304被设计为扩增通过易感位点203,条件是核酸盒是完整的。在某些实施方案中,引物303和304中的一个或另一个或两者可包含非模板核苷酸的5'尾部,以在退火时帮助这些引物的链置换。然而,这不被认为是必需的,并且在优选的实施方案中,引物不包括尾部。

[0105] 引物102和103被选择为允许与盒和测试样品二者杂交,并因此是基于在测试样品中发现的DNA序列。然而,引物301、302、303和304不一定来自任何天然存在的序列,并且可以自由优化。具体而言,引物301、302、303和304可以被设计为使得在这些引物与引物102和103的靶位点之间,或者实际上在这些引物和它们各自的非靶位点之间不存在(或存在最小

的)不期望的杂交。这种设计策略减少了不想要的扩增模拟分析物201的可能性;具体而言,引物应不能够在任何可能导致模拟区域201的不希望的复制的地方杂交,因为这可能明显损害在最终产物中产生单拷贝的那个区域的能力。类似地,模拟区域201的序列也可以被设计成减少或消除不想要的杂交。因此将理解的是,只有引物102和103的序列及其各自的结合位点受到期望的靶序列的约束;在某些实施方案中可以自由设计其他序列以优化性能。在某些实施方案中,引物与其靶的各自的解链温度也可以或者替代地被设计以达到不同引物:靶杂交的解链温度的优选范围。例如,引物301和302可以具有比引物303和304低的解链温度。这样的布置可以允许进一步检查在本方法的执行期间针对不希望的区域的扩增。

[0106] 本发明提供了一种方法,藉以可以将单拷贝(或其它已知拷贝数)的模拟分析物201递送至反应体积,并且该方法因此可以用作其中测试分析物101的存在正在被评估的诊断测定中的对照。这种方法的第一步骤是将对照盒200构建体分配到分离的体积,诸如通过形成‘油包水’液滴乳液,或其他小体积反应室。‘油包水’液滴的形式将用作图4以及此后的示例。

[0107] 已知浓度的对照盒200在水性溶液中制备,使得当与油组合时,产生小体积(纳升、皮升或飞升范围)液滴。对照盒在初始溶液中的浓度足够低,以致绝大多数所形成的“油包水”液滴完全不含对照盒200;这些液滴在图4中标识为402。然而,非常少量的液滴将包含对照盒200,标识为401,但实际上这些401种类都将不包含多于一个拷贝的对照盒200。利用泊松分布,大多数401液滴将只包含一个拷贝的对照盒200。因此,统计学上,至少一些液滴将包含期望拷贝数的对照盒。初始溶液的浓度和使用的油的体积可以变化,以实现盒在液滴中的期望的最终分布。

[0108] 有许多方法可以形成“油包水”液滴,包括剧烈混合、超声处理或通过窄通道(narrow constriction)将水性溶液直接注入油中。最后这种方法是优选的,因为它提供了控制所得液滴的体积均匀的最大可能性。无论选择哪种方法,该过程的最终结果是保持独立于彼此(例如通过在水性溶液中包含去垢剂)的非常大量的液滴。

[0109] 液滴401和402的混合群体现在必须被单独识别和分离,这通过顺序性使用与对照盒200上的模拟分析物201连接的易感位点203和报告物202实现。

[0110] 如果401/402群体将直接被分析,例如通过扩增报告物202,那么这将冒不希望地扩增与报告物202仍然在同一分子上的模拟物201的风险。例如,确认报告物202的存在的一种可能方法是,将401/402混合物的单个液滴与装入包括引物301和302在内的生物化学物质的单独种类的液滴组合,并且对组合的液滴进行扩增反应。然后报告物202的存在可以通过(例如)监测报告物202扩增子的积累来证实。这可以通过包括在增加的dsDNA积累存在下增加荧光的染料来实现。然而,如果这是在完整的盒上完成的,那么存在这样的可能:引物302将延伸通过报告物202,通过引物301的结合位点,通过引物304的结合位点,通过完整的易感位点203及其引物位点303,并继续通过由模拟分析物201表示的区域及其相关的引物结合位点102和103。这种不希望的复制将意味着,模拟分析物201将不再作为液滴内的单拷贝存在。对模拟分析物201的这种不希望的复制将是线性的(与指数相对),并且将仅在一条链上复制模拟分析物201。因此必须通过引入针对主动延伸引物302的通过的物理阻塞来防止对模拟分析物201的复制。图5描绘了该阻塞在模拟分析物201和报告物202之间的定位。

[0111] 阻止延伸引物302通过的阻塞的本质可以是,例如;

[0112] ●必须在从反向引物302延伸的起始之前,使高亲和力5'磷酸化的(或其他5'-3'外切核酸酶消化耐受性修饰)寡核苷酸与链分离的模板DNA的杂交;

[0113] ●掺入或产生无碱基位点;

[0114] ●包括'PCR终止物'诸如HEG(六乙二醇);

[0115] ●在DNA中产生链缺口或物理断裂。

[0116] 然而,依赖于阻断分子杂交的系统不能保证100%有效,且依赖于直接纳入无碱基位点、HEG或其他化学阻断物的系统意味着对照DNA不再是“自然的”并且不太适合未来的操作,因为可能需要为新的靶向测试分析物引入新的对照序列或需要为了制造目的生成序列的拷贝。

[0117] 本发明因此利用了一种方法,藉以在检测报告物202之前物理地分开模拟物201和报告物202。这确保,报告物202的扩增不会无意地还带来扩增模拟物201的风险。在聚合酶驱动的报告物202的鉴定期间防止反向引物302通过模拟分析物201延伸的最有吸引力和有效的方法将是,必须在完整的对照盒200已被递送到特定的液滴401之后,物理断裂模拟分析物201和报告物202的共价键。这种物理断裂可以通过在模拟分析物201和报告物202之间包含易感位点203(但确认为在对照盒200内的任何其他区域内不存在)来实现。使用在易感位点203处识别或切割的酶对盒200进行限制酶消化将盒200裂解成两部分。由于易感位点203侧翼为可支持寡核苷酸引物303和304杂交的DNA序列,则跨该区域的扩增可用于确认是否发生了裂解。参见图6。

[0118] 最初,为了确定401和402液滴的混合物内的哪些液滴确实的确包含对照盒200,必须如同这些液滴的每一个确实含有该构建体那样对这些液滴的每一个进行处理,并必须进行使易感位点失活的尝试(例如通过限制性消化)。因此,被包含在混合物401和402内的液滴单独与包含必要的生物化学物质以实现易感位点203的失活(裂解)的另一种类的液滴701合并,如图7所示。将每个合并的液滴温育,使得灭活生物化学物质具有足够的机会来灭活易感位点203,如果该位点存在的话。以这种方式,液滴401(其确实包含对照盒200)将产生两种可能的液滴种类:其中易感位点203的失活是无效的并且模拟分析物201和报告物202保持连接的液滴702和其中失活是有效的并且模拟分析物201和报告物202彼此分开的液滴703。不包含对照盒200的液滴402产生液滴种类704。液滴704将是占大多数的种类。注意,在液滴703中,尽管模拟分析物201和报告物202不再通过功能性连接相关联,但这两个序列以1:1的摩尔比存在,并且最可能作为单拷贝的两个序列存在。

[0119] 为了区分液滴702、703和704,实施了用引物303和304跨易感位点203的聚合(参见图8)。这要求将每个独立的液滴702、703和704与包含能够实现跨易感位点203(如果仍然完整)扩增的生物化学物质的液滴种类801合并。液滴801可包括例如聚合酶、核苷酸、缓冲液和诸如SYBR Green荧光染料的dsDNA染料以允许监测扩增子的积累。在本发明的一些实施方案中,具备生物化学特性的一些组分可以已经存在于最初产生的液滴401、402中(例如,通过在对照盒的起始溶液中包含聚合酶和核苷酸,但不包括引物)。对液滴种类802、803和804进行热循环以允许发生DNA聚合,并且对单独液滴进行实时或固定点/终点、荧光评估。阳性扩增,被评估为液滴802内荧光增加,指示完整的易感位点203,并且鉴定该液滴源自种类702。用引物303和304进行热循环后,液滴703和704两者都未能产生荧光增加,并且这两个种类803和804都可以用于进一步分析。将种类802分离到废料区。

[0120] 注意,优选首先评估易感位点203的失活,而不是先鉴定包含报告物202区域的(相对少量的)液滴。这是因为评估报告物202然后评估易感位点203,将需要根据以前的阳性荧光结果来分辨阳性荧光结果。虽然并非不可能,但是在阴性结果(来自未能跨易感位点203扩增)之后产生阳性结果(来自对报告物202的评估)将是更清楚且更优选的。然而,这种策略要求评估非常大量的大部分液滴物质不含对照盒200的种类704的液滴。

[0121] 然而,在本发明的某些实施方案中,如果使用两种不同的染料(例如,在不同波长处发荧光)来评估报告物202和易感位点203,先评估报告物202可以是可能的。这可例如通过使用TaqMan探针来实现,TaqMan探针在Taq聚合酶延伸期间在探针裂解后产生荧光。TaqMan探针可针对报告物靶向(波长1,指示存在的阳性结果)且然后针对易感位点203(波长2,未能产生指示易感位点203的成功裂解的阳性响应)靶向。

[0122] 现在必须通过评估报告物202的存在来辨别液滴803和804,它们不能跨易感位点203扩增。将这些液滴单独地与液滴种类901合并(参见图9),液滴种类901包含必要的生物化学物质(例如聚合酶、核苷酸等)以及引物301和302,可能有另外的SYBR Green dsDNA染料。图9显示了这些液滴的合并。液滴902(含报告物)将支持报告物202的扩增,但是对照盒的这个片段也可支持从分析的早期阶段携带的易感位点203反向引物304的(无效)杂交。然而,如上所述,引物结合位点可以被优化以防止或减少引物“串扰(crosstalk)”或不需要的杂交。在这种情况下,选择引物结合位点使得引物304(易感位点引物)和引物302(报告物202正向引物)不重叠,并且因此不相互干扰。类似地,引物303(易感位点203正向引物)将从之前的分析继续留存,并且可无效地与模拟分析物201杂交,但是再次地,此引物被设计为使其不与引物103(模拟分析物201反向引物)重叠。

[0123] 一旦合并,液滴902和903在将扩增报告物202区域(如果存在的话)的条件下进行热循环。由于SYBR Green染料结合所产生的扩增子,只有液滴902将显示这种扩增并产生荧光增加。

[0124] 因此液滴902已经从祖先液滴产生,液滴902相继地;

[0125] ●不能显示完整易感位点203;

[0126] ●阳性显示报告物202的存在。

[0127] 因此,该液滴902确信地被确定为包括包含模拟分析物201和侧翼引物结合位点的核酸分子,其通过易感位点203的裂解而与报告物202分离。该液滴将包含单拷贝的模拟分析物201(在大多数情况下),这是由于模拟分析物201在对照盒200的原始液滴内的低起始浓度和分布,并且该液滴还将包含用于证明其身份的各种分析的碎片。考虑到该液滴可以被操纵到试图通过用引物102和103扩增来确认测试分析物101的存在的诊断测定,并且考虑到继续留存的生物化学液滴902包含物(harbour)不干扰引物102和103的性能,该液滴902提供了单拷贝的模拟分析物201,适合通过引物102和103扩增。

[0128] 图10给出了液滴流动、合并和抛弃的概述。将液滴401和402(起始液滴群体,其中的一些包含对照盒200)单独地与液滴701合并,液滴701提供生物化学物质以裂解易感位点203。将如此产生的白色方框内的所有液滴(702、703和704)温育一段给定的时间,使得易感位点203的失活完全。然后所有液滴702、703和704向前流动,在那里每个液滴单独地与灰色圆圈内的液滴801合并,形成液滴802、803和804。当热循环在灰色方框内进行时,液滴801提供生物化学物质以跨易感位点203扩增。在热循环之后,评估液滴802、803和804(灰色菱

形), 802因为跨未裂解的易感位点扩增而鉴定为发荧光的, 并被抛弃。液滴803和804(它们没有显示扩增并且因此包含已裂解的易感位点203或不包含对照盒) 向前流动。黑色圆圈内, 液滴803和804单独地与液滴901合并。黑色方框内, 液滴901提供生物化学物质以扩增报告物202。在热循环之后, 由于报告物扩增, 液滴902被鉴定(在黑色菱形内) 为发荧光的, 并且作为该过程的最终产物被收获。保持无荧光且因此不含报告物202的液滴903被丢弃至废料区。

[0129] 作为该方案有效性的最终示范, 提供被设计为与对照模拟物201序列杂交的TaqMan探针和生物化学物质以扩增该区域(引物102和103) 可用于区分液滴902和液滴903: 只有种类902应该支持阳性TaqMan反应, TaqMan反应的荧光发射必须与已用于确认报告物202存在的染料(例如SybrGreen) 处于不同通道中。图19中描述了这种确认性测试, 但仅是该方案的成功的一个示范: 该确认结果显然依赖于液滴902内的201对照模拟序列的扩增, 消除了其“单分子”认证(credentials)。

[0130] 在制造期间, 将不执行TaqMan测定来确认对照模拟物201的存在; 对照模拟物201将保持为单个分子。调整液滴902的物理性质是期望的以使其能够被操纵, 使得其内含物容易被引入到诊断测定中。图11演示了这种操作的三种替代方案, 但是将存在很多其他方案。选项1: 将液滴902的内容物直接递送到最终诊断测定的反应室可以是可能的。选项2: 液滴902的物理性质可以通过将其与另一液滴1101合并(呈现为物理上更大的体积, 但也许还呈现或者转而呈现更高的粘度/固体性) 或允许合并的液滴1102被“处理”(即, 容易被进一步操作, 例如移液到或流入另外的反应室或容器中) 的其他特征来改变。选项3显示了一个优选的实施方案, 其中含水液滴902的全部内容物被吸附到以稳定形式保持单拷贝的模拟分析物201的疏脂性、亲水性固体支持物基质1103中, 并允许(可能是干燥的) 产物1104被操纵到诊断测定中, 在诊断测定中吸附的单拷贝的模拟分析物201可用于该测定的生物化学。固体支持物基质1103可以例如包括纤维素或基于纤维素的基质等等。该方法的示意图在图18中示出, 其从左至右示出了含有单拷贝核酸分子的液滴, 该液滴沿着其中具有孔的通道通过。与孔相邻的是纤维素基质; 从该图可以看出, 液滴全部被吸附到基质中(通过毛细作用和适合的亲水性的组合) 且核酸保留在其上。由于基质是疏脂性的, 来自油包水乳液的任何油将不会被吸附并将保留在通道内。这得到油的更大粘度的进一步辅助, 油的更大粘度将阻滞通过孔的离开。该基质容易被处理和运输。

[0131] 进一步可能的操作可包括干燥液滴以形成可再水化的小球, 每个小球仅含有模拟分析物201的单一呈现。从最终期望的单分子液滴中去除某些(或全部) 先前分析物的碎屑可以是有益的, 以防万一这些组分干扰最终分子诊断测试, 但是在优选实施方案中, 这些继续留存的组分在最终的诊断测定中被耐受且不需要去除。

[0132] 在其他实施方案中, 单拷贝核酸可以与固体支持物结合(而不是简单地被吸附); 例如, 固体支持物可以是聚苯乙烯珠、衍生的玻璃表面等。这可以允许核酸例如充当核酸探针的替代用途。在本发明的某些实施方案中, 此类固体支持物可用于分离单拷贝核酸可杂交的单拷贝的另一核酸。单拷贝核酸可以充当分子“钩”或“钓鱼竿”并被置于含有期望靶的反应混合物中; 靶将与钩杂交, 而固体支持物允许杂交的核酸此后被操作。参考图20至27, 本文件中在其他地方描述了使用单拷贝核酸作为“钓鱼竿”的另外的细节。

[0133] 虽然诊断测定可以在许多反应容器中进行(与基于油包水的液滴相反), 但此处公

开的是基于PCR扩增的系统：该测定将要求提取的测试样品（模板DNA）、扩增测试分析物101所需的生物化学物质和模拟分析物（以本文公开的至少三种格式之一）的组合。这一组合在图12中图解展示。

[0134] 液滴902、“修饰的”液滴1102或基质1104将各自包含单拷贝的模拟分析物201。当这些种类中的一种（并且仅一种）与测试模板1201和生物化学物质1202组合以支持测试分析物101/模拟分析物201的扩增时，反应容器1203将能够同时扩增测试分析物101（灰色阴影方框）和模拟分析物201（黑色方框）。随后通过任何合适的方式对扩增的种类的检测/区分允许预期的阳性对照模拟分析物201告知由测试分析物101产生的阳性或阴性结果的显著性。

[0135] 通过例如热循环在容器1203内扩增之后，该容器可能包含多个拷贝的测试分析物101和模拟分析物201。这些扩增子种类将在它们的末端具有共同序列（由于两者都是通过引物102和103的延伸产生的），但是将具有不同的核心序列。图13表明扩增后，每个种类可存在很多拷贝。预计，会存在多个拷贝的模拟分析物201种类，但它们的绝对数量将是扩增早期循环期间的随机波动的函数。因此，对模拟分析物201扩增子和测试分析物101扩增子的拷贝数量的考虑最多将是半定量的。这种随机波动因测试分析物101本身可能以非常低的拷贝数存在并且可能作为低至一个呈现的低拷贝数存在的可能性而复杂化。只有当测试样品1201中不存在测试分析物101时，结果在某种意义上才是定量的。

[0136] 无论容器1203中存在或不存在测试分析物101，模拟分析物201都可信地存在，并且应被扩增以在容器1301中提供多个拷贝。如果测试分析物101也存在，其将扩增，但如果其不存在，其当然不能扩增。模拟分析物201扩增子和测试分析物101的拷贝数的比较可以给出测试样品中测试分析物101的相对丰度的一些印象，但是这种比较将至多是半定量的。

[0137] 图19描述了最终的确认：被鉴定为种类902的液滴或其他受限制的反应体积确实的确包含一个拷贝的对照模拟物201，并且液滴种类903确实不含该对照模拟物201。通过对一个最终液滴种类融合或其他生物化学物质的递送，在用引物102和103扩增后，随着探针荧光团（F）和猝灭剂（Q）由于PCR期间DNA聚合酶的5'至3'外切核酸酶活性而彼此分离，被设计为杂交于对照模拟物201序列内的‘TaqMan’探针1901将产生荧光信号。被附着到TaqMan探针的荧光团被特别选择为（光谱发射）不同于用来最初将种类902与种类903区分开的dsDNA结合染料的荧光团。这是必要的，因为，由于报告物202区域的成功扩增和检测，液滴种类902将已经是发荧光的。液滴种类902中荧光团F的荧光响应的监测和检测全面地证实，检测系统正确地鉴定了种类902液滴。当然，这最后的确认扩增了对照模拟物201序列，并且仅用于验证产生模式：在产生液滴种类902期间和以极低拷贝，可能单拷贝呈现的分离对照模拟物902期间，该最后的确认常规地不被使用。

[0138] 设想了系统的增强方案，其允许该系统用于在多重分子诊断测试分析中对多于一种测试分析物进行对照。图14图解了在替代的对照盒1400内包括另外的模拟分析物1401，该替代的对照盒仍包括单一报告物202。注意，两个不连续的模拟分析物201和1401彼此隔开，并且通过相同（共同）易感位点203（其每个侧翼为共同引物结合位点，此处未示出）与报告物202隔开。如果对通过限制性消化裂解易感，则相同的限制性酶将在图14所示的位点处实现将对照盒裂解成三部分。每个模拟分析物201、1401侧翼为不同的引物结合位点，所述不同的引物结合位点对应于每个模拟物所模拟的测试分析物侧翼的那些引物结合位点。因

此,可以通过使用适当的引物对分别扩增每个模拟分析物201、1401。

[0139] 该盒1400在两个易感位点203处的完全消化对于证明已经阻止了模拟分析物201和1401中的一个或另一个或两者的复制是必要的。失活后检测到完整的易感位点203(通过跨位点203的扩增)不能揭示哪个易感位点203保持完整,因为它们是相同的。无论如何,完整的位点203将导致该液滴被丢弃。可能在某些实施方案中,只有位于模拟分析物1401和报告物202之间的易感位点203是防止在分析报告物202期间对模拟分析物的复制绝对需要的(并且因此两个模拟分析物201、1401不被易感位点隔开,并且在最后的液滴中不会被分开)。然而,为了确定性并且在存在所述引物扩增两种模拟分析物的情况下为了防止扩增子的混淆,优选地将易感位点203定位在模拟分析物201和1401之间。

[0140] 为了更确定地确保仅单拷贝的对照盒200存在于液滴401中,提供了该系统的另一种增强方案(如图15所示)。该增强方案旨在通过包括多个拷贝的该报告物202来限制在扩增报告物202的早期循环期间可能的随机可变性。图15示出了对照盒1500,包括两个相同拷贝的报告物202,每个拷贝通过易感位点203与其邻近拷贝隔开。这种双重报告物202的扩增更有可能产生可定量的响应,并且在分析开始时存在的报告物202的呈现数目越大,随机效应将越不可能影响提供可定量结果的能力。鉴于具有报告物202的单一呈现的原始对照盒200在分析报告物202时将产生幅度(magnitude)N的响应,两个拷贝的该对照盒200将产生幅度2N的响应。使用对照盒1500的相同场景将产生2N(单拷贝的盒)和4N(两个拷贝的盒)的响应,因此差异幅度更大,所以更容易区分。这种相应的阶跃变化在分析期间的固定点(相对于终点)处可能更加可定量,并且与鉴定多拷贝相比,能够在鉴定单拷贝的对照盒的存在时实现更大的置信度。

[0141] 比较来自不同呈现的液滴401的固定点(相对于终点)响应将使得能够考虑响应的分布,以及响应的二次分离消除响应中的任何重叠的可能性,其中最高响应、连同灰色区域中的任何响应的分离可被消除。图16图示地描绘了可能观察到的响应的分布。如果多拷贝的对照盒200(或1500)存在于液滴内,这将增强在有限的扩增程度之后(可能是中点,而不是“归一化”的终点)返回的信号强度。由于扩增的随机性质,可能的是,与液滴内存在对照盒的1、2和3(和更大)拷贝相关的峰将重叠,且因此,图16中的虚线表示一个水平,表现出比这个水平更大的信号的所有液滴401将因为包含多于一个的对照盒呈现数而被抛弃。注意,这些事件将是很罕见的,且可能是因为这些液滴401的拷贝不足以促使产生如此处所描绘的钟形曲线。对于包含3个或更多个对照盒呈现数的液滴,这种情况将更加极端。

[0142] 如图17所示,系统的最终增强方案是在单个盒上提供多个、不同的模拟分析物201和多个、相同的报告物202区域。这可在环状DNA系统上,例如质粒,如图17所示。提供多个模拟分析物(单拷贝)允许将相同的液滴902用于同一测定中对几种不同测试分析物101的多重分析。还表明提供数量大得多的拷贝的报告物202,对照盒的单拷贝的存在与多于一个或多个拷贝的存在之间的区别越清楚。图17中的示例构建体具有5个不同的模拟分析物201(由不同的阴影区示出)的单拷贝,其中这些的每个侧翼为(相同的)易感位点203和来源于适当的测试分析物101的(不同的)引物结合位点。对照盒还展示了5个相同的报告物202(白色方框),类似地其侧翼为易感位点203和(相同)引物结合位点(黑色方块箭头301和302)。如图所示,每个易感位点(203)侧翼为引物结合位点303和304(灰色方块箭头)。这种布置是灵活的,并且可容纳另外的期望的模拟分析物201以及可能需要的另外的报告物202区域。

[0143] 以上详细描述展示了本发明提供可用于以使得能够检测待评估的分析物的形式提供单拷贝的分析物模拟物的系统的灵活性和可靠性。

[0144] 虽然已经从制备液滴的角度描述了所例示的实施方案,但是液滴本身的使用可以是不被需要的,因为存在执行依赖于非常小的反应室(纳升孔;例如Wafergen或Life Technologies QuantStudio DX)的“数字PCR”的方法,可以向所述非常小的反应室中依次添加另外的组分。例如,在最初稀释的对照盒200泊松分布到数字PCR芯片的孔中后,可将易感位点203失活生物化学物质、易感位点203扩增生物化学物质和报告物202扩增生物化学物质引入这些孔。然而,这不是优选的,因为设想到在鉴定包含单拷贝对照盒的那些孔之后回收孔的全部内容物可能是非常困难的。但是,如果不需要这种回收和在同一孔中进行另外的反应,这种方法可以是有用的。该顺序添加方案也可以用来展示连续的生物化学物质如预期地表现。

[0145] 可能期望的另一种增强是,在有限和可定量水平的扩增之后不评估报告物202序列的扩增程度,单个液滴将最有利地在允许大规模平行扩增和同步实时PCR评估的装置中扩增,可能允许更可靠地定量报告物202区域的存在。

[0146] 如以上提到的,单拷贝核酸序列可以附着到珠或其他固体支持物上,以用作分子“钩”或“钓鱼竿”。以下部分更详细地描述了这方面。

[0147] 受控的拷贝数作为单分子捕获媒介物

[0148] 除了用作灵敏的对照体系之外,可靠地分离单分子核酸的能力的一个有吸引力的应用是将其(以其单链形式)用作种类特异性分子“钓鱼钩”的潜力。如果连接到固体表面,例如聚合物珠,则单条所连接的DNA序列的特异性杂交能力使得能够从含有多条DNA链的溶液回收第二单DNA链(带有互补序列)。多条DNA链可以都携带互补序列,或者多条DNA链中的仅一部分可以携带互补序列。理想情况下,为了使珠连接的单分子在合理的时间范围内遇到并捕获互补DNA链的可能性最大化,具有互补序列的溶液中DNA链的数量与连接到珠的单分子相比将大大过量。互补序列可以设计为最有利地允许高特异性,而珠连接的捕获序列与可能存在于多条DNA链之内的任何其他DNA链序列的串扰杂交的可能性很小或没有这种可能性。一旦被捕获,从溶液回收的DNA链然后可以作为非共价附着的‘载客’在聚合物珠上被操作。

[0149] 上述系统可以有利地用于接种地理学上独立的克隆扩增的单独的分子(第二单DNA链)作为NGS反应的起始步骤。已经将仅一个非共价附着的载客DNA链递送至特定地理区域,可以生成具有相同序列的多个(克隆)拷贝。对这些拷贝的碱基的同步NGS询问使得在DNA链的每个独立碱基位置产生的信号输出最大化。

[0150] 凭借在每个珠上捕获仅一条DNA链的能力,以及在不连续的地理位置仅容纳单个聚合物珠的几何能力,确保了单拷贝待测序DNA链的递送。例如,在从多条DNA链捕获单条DNA链之后,携带DNA链的珠可以被递送到不连续的孔结构,其中该孔具有足够大以容纳单个珠,但是不够大到容纳多于一个珠的尺寸。这种几何限制确保,永远将只有一个珠被加载到孔,并且随后每个孔只加载一个载客DNA链。例如,该系统被描述于DNA Electronics Ltd的W02014/013263中。具体参考第15页第25行至第16页第12行;和第39页第6行到第43页第15行。这些段落描述了用于获得每孔有限数量的珠并使用与核酸复合的此类珠用于序列扩增和/或测序的方法和系统。

[0151] 可能的是,从溶液中的多条DNA链非特异性地吸附DNA链到聚合物珠表面上会使确保单链(载客)DNA被递送到测序系统的地理上不同的区域的吸入混乱。这种可能性可通过严格的捕获后洗涤和/或选择限制任何这种非特异性吸附的聚合物珠/表面化学处理被最小化。此外,区分合理捕获的DNA链(杂交捕获的)和非特异性吸附的序列是可能的,仅凭借前者具有潜在的DNA聚合酶可延伸的、杂交的3' OH末端;附着于珠的捕获序列可以被特别设计成包括不可杂交的(即未用于捕获)元件,该不可杂交的元件在合理捕获的DNA链3'末端延伸后将驱动DNA聚合酶介导的与该不杂交的元件互补的序列(未用于捕获)被掺入到捕获的DNA链3'末端。合理捕获的DNA链在其掺入该另外的序列的能力方面是独特的,随后可以将其用作克隆扩增策略的基本要素(下文)。

[0152] 以上详细描述的系统现在使用示意图呈现阐述。

[0153] 图20继续之前建议的对油包水液滴的操作,将图9中最终的'902液滴'种类与包含单个反应性表面聚合物珠的新液滴种类融合。促进了存在于液滴902*('*',因为该902种类的内容物在化学上与之前稍有不同;参见下文)中的单个DNA分子的5'末端与液滴2001内包含的聚合物珠的表面之间的化学反应,共价连接902*液滴中含有的(双链)单分子DNA的化学活性5'末端。在液滴2002中如此创建的珠/DNA杂合体是一种制造品(an article of manufacture),并可以完全独立于其后续使用而产生。图21呈现了先前描述的'对照盒',使得能够鉴定和分离单拷贝的DNA序列,201。虽然该序列先前侧翼为用于扩增引物102和103的结合位点(这里显示为灰色),扩增引物102和103模拟某些测试分析物101侧翼的引物,但在“单分子捕获序列”实施方案中并不要求使这个201序列侧翼为任何特定的扩增引物序列,因为这个“捕获序列”本身将永远不会被扩增。而是,201捕获序列在这里充当“钓鱼钩”,其可以连接至固体表面,如聚合物珠。因此,盒DNA的这个元件在一条链的5'末端被官能化(注定保留单拷贝),其化学性质将使得能够共价连接聚合物珠上的表面化学。这个官能化在图21中由星号2101表示。可能的官能化包括但不限于胺、硫醇和炔烃。珠表面(或其它固体表面)可能的相应官能化是NHS酯、马来酰亚胺或叠氮化物基团,但不限于这些化学基团。

[0154] 一旦对照盒通过限制性消化(例如)被裂解并通过报告物202的扩增被确认,那么被释放的单分子组分201可以类似于图22中呈现的DNA元件。这包括反应性链2201和非反应性链2202。含有反应性化学修饰的2201的5'末端不必如此处呈现的单链,但关键的是浅灰色链2202不具有与化学反应性珠表面反应并变得稳定附着至化学反应性珠表面的能力,且因此它可以在附着较深色的反应性链2201之后被洗掉或以其他方式移除。然而,为了促进重要的、已附着的链2201的稳定性,容忍2202链的持久存在可以是有益的。

[0155] 图23说明了制造品2301:具有稳定附着的单链核酸2201的聚合物珠的一个实施方案。通过容忍互补2202链(浅灰色线)的持久存在,直到附着至珠/DNA杂合体的dsDNA变性,在含有2201的互补序列的多个DNA链的存在下,可以促进附着的2201链更大的完整性;竞争将有利于珠连接的2201捕获序列与多个DNA链中的单个成员杂交而不与最初杂交的2202残余物(浅灰线)杂交。解离后,附着的核酸暴露特异性但人工的(即不一定与任何天然存在的核酸有关)序列。理想情况下,这一2301制造品将大量生成,并在环境温度下稳定很长一段时间。有利的是,附着的2201单链核酸的3'末端将不会有助于从多条DNA链捕获单链DNA,而是将有意地在少量碱基上不互补,足以阻止DNA聚合酶介导的核苷酸掺入该3'末端(也参见图25)。

[0156] 图24图示了使得能够从多条DNA链回收单条DNA链,并将其随后递送到受限制的地理位置的工作流程。制造品2301*(I)被表示为带有具有特异性杂交能力的单分子(以该'*'表示的单链)核酸的聚合物珠。将该珠在变性条件(例如升高的温度)与多个DNA链(II)组合,使得珠和附着的单链DNA存在于单链DNA的'汤'中,其一部分可以承载至少部分地并且理想地完全和鉴别性地与珠上附着的2201核酸(灰色实线)互补的序列,且其一部分可以不承载该互补序列(灰色虚线)。当变性条件放松时(例如较低温度),这促进了dsDNA形成(III),且单链核酸基于它们的互补程度形成双链缔合物。鉴于存在足够过量的带有DNA序列的DNA链,所述DNA序列至少部分地并且理想地完全和鉴别性地与附着于珠的核酸序列互补,该珠序列将有利地与存在的多个DNA链的一个(且仅一个)杂交。在该特异性杂交之后,所有其他核酸,无论是dsDNA、ssDNA还是某些杂合形式可以通过用适当的严格性洗涤珠(IV)以除去未附着的核酸而被去除,但不破坏单一的被回收的DNA链与珠附着的序列的结合。最后,将2401珠(共价附着的捕获序列和杂交的单分子的被捕获DNA)沉积到地理上分离的尺寸受限的位置(V)中,在那里杂交的单分子可被克隆扩增以产生足够的相同拷贝以完全支持同时的NGS碱基询问。

[0157] 图25描绘了一种手段,通过该手段,只有从多个DNA链捕获的合理杂交的DNA链可以与通过非特异性吸附捕获到珠上的任何DNA链区分开。这些非特异性吸附的DNA链中的至少一些可以带有与附着到珠的序列2201至少部分地互补的序列。在图25(I)中,存在与黑色的与珠连接的捕获链2201附着的一条合理捕获的链2501(浅灰色实线,来自图24的多条链)。该捕获的链2501具有接合的3' OH末端,其被标记为'可延伸的3'末端';这是此图像中唯一可延伸的3'末端,因为2201捕获序列的3'末端在设计上是不可延伸的。这最容易地通过确保2201的3'末端和捕获链2501的与捕获区域相邻的区域之间的非互补性来实现,但是也可以通过放置例如HEG间隔物或在PCR期间不被DNA聚合酶接受(entertain)的其他物质来实现。其他可变得与珠表面非特异性结合的DNA链以浅灰色实线或虚线示出,且具体地,这些序列将(即使在它们延伸的不太可能的情况下)不能掺入与DNA捕获序列2201的在珠表面近端的序列互补的序列,并且不被包括在2501分子从多个DNA片段的最初杂交捕获中。该序列(与珠近端的DNA捕获序列互补)显示为被添加到图25(II)的捕获链的可延伸的3'末端的带箭头的灰色虚线延长线。该被添加的序列只能有效地附着到合理捕获的链2501上,形成种类2502,并且该添加的序列可以在此后被用作'单分子捕获'系统在克隆扩增这一合理捕获的'单分子'期间的基本属性。

[0158] 图26描绘了,当待捕获的(2202猎物)序列,例如核酸序列文库的成员,与捕获(2201饵/钩)序列杂交时,待捕获的序列2202的杂交的3'末端可被延伸,产生不共价附着到珠并且包括新的3'末端的产物2502,该新的3'末端是珠附着的捕获序列2201的在珠近端的互补段。这种新的3'序列现在可用来担当文库分子的克隆扩增期间的基本要素,并允许仅扩增单个捕获的文库代表,使得能够对浅灰色点划线区域进行NGS分析,例如使用通用测序引物。有利地,2202的捕获和杂交的3'末端的DNA聚合酶延伸在相对低的 T_m 进行。这是为了确保,只有正确杂交的2202将被延伸,因为通过在随后轮的扩增中提高 T_m ,捕获序列(饵)与待捕获的序列(猎物)之间的关联是不利的,使得可能存在于珠上的任何剩余的非特异性结合的链取代最初的、合理杂交的2202分子并且支持这些链的延伸的可能性最小化。这种取代将可能允许引入合理的2501的3'末端的重要序列被引入到闯入者2501种类,挫败扩增期

间对从多个DNA链捕获的仅一个分子的随后扩增。选择捕获和初始延伸的 T_m (低 T_m) 以不同于新的3'末端序列的后续克隆扩增的 T_m (高 T_m) 确保了该可能性被最小化。

[0159] 图27描绘,使用灰色方块箭头引物2701扩增(珠捕获和3'延伸的;灰色点线部分)文库分子的2502单分子,所述灰色方块箭头引物2701将仅扩增已合理杂交的图26的产物。使用与在PCR驱动的靶向文库生成期间引入的通用序列杂交的相对引物2702(黑色方块箭头),单分子2502可以在地理区域(例如微孔)的约束内有效扩增。一旦发生充分的溶液相扩增,这一溶液相扩增的产物将被附着在表面的引物2701*所接纳,使得这些表面附着的引物(与溶液相中扩增(in-solution phase amplification)的灰色方块箭头2701基本上或完全相同)将延伸并创建物理附着于地理上受限制区域的表面的文库扩增子的拷贝。在PCR驱动的原始文库片段的创建期间,提供测序引物杂交区的通用序列可以已经被掺入,并且该序列现在对于测序引物2703的附着以及使用相同的通用测序引物2703对在一个特定的地理上受限制的区域以及同时的许多独立的地理上受限制的区域(每个含有不同原始文库分子的拷贝)内的许多克隆扩增的靶分子进行同时的NGS反应是可用的。

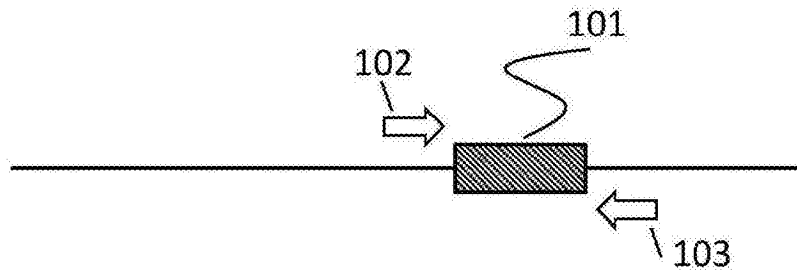


图1

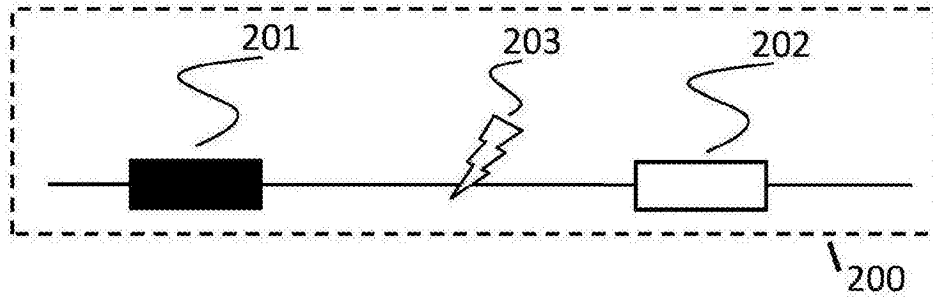


图2

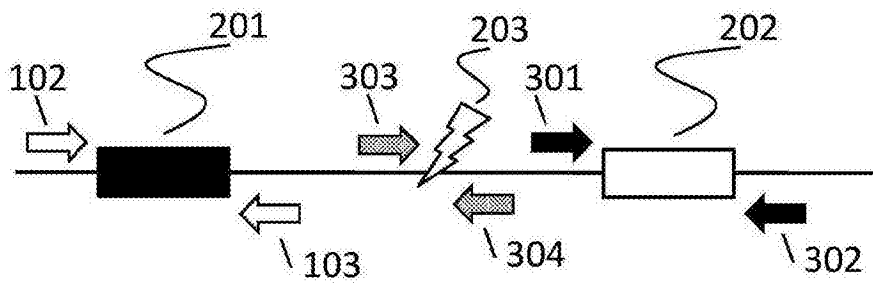


图3

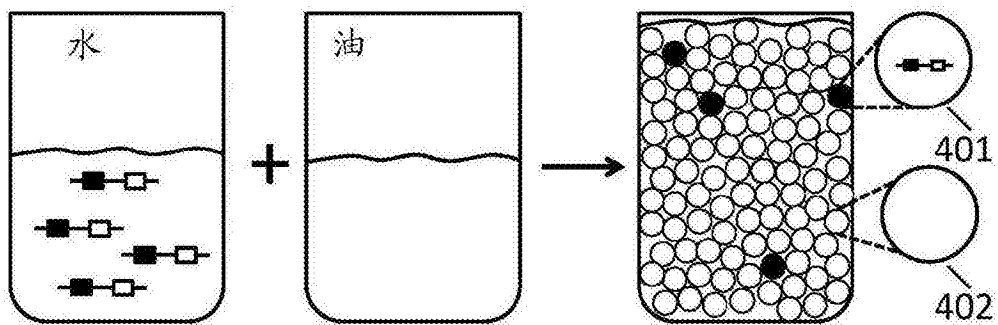


图4

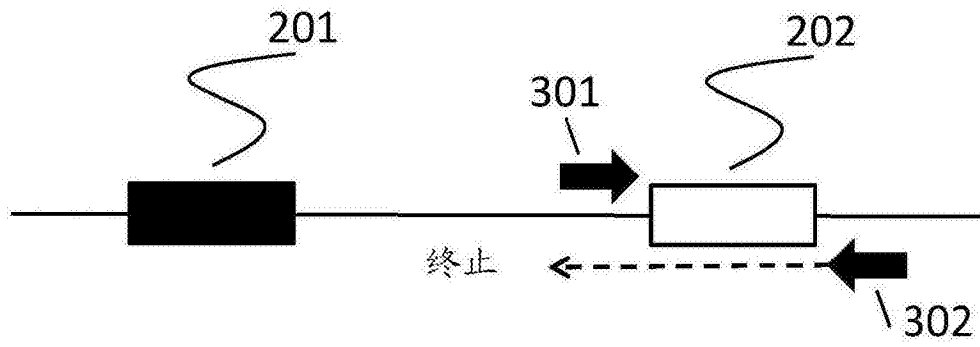


图5

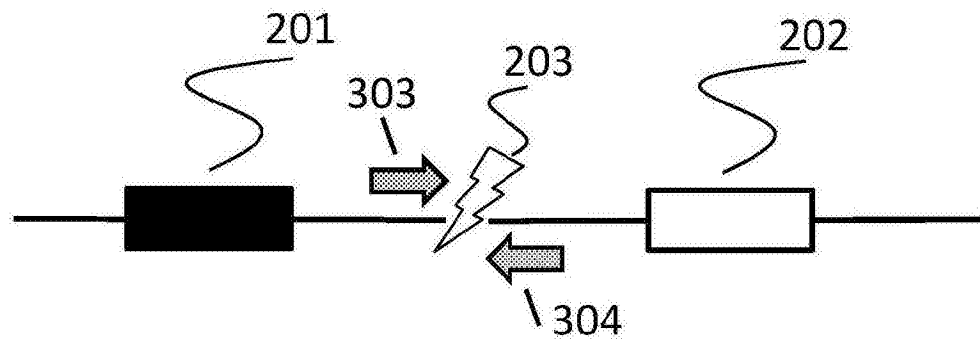


图6

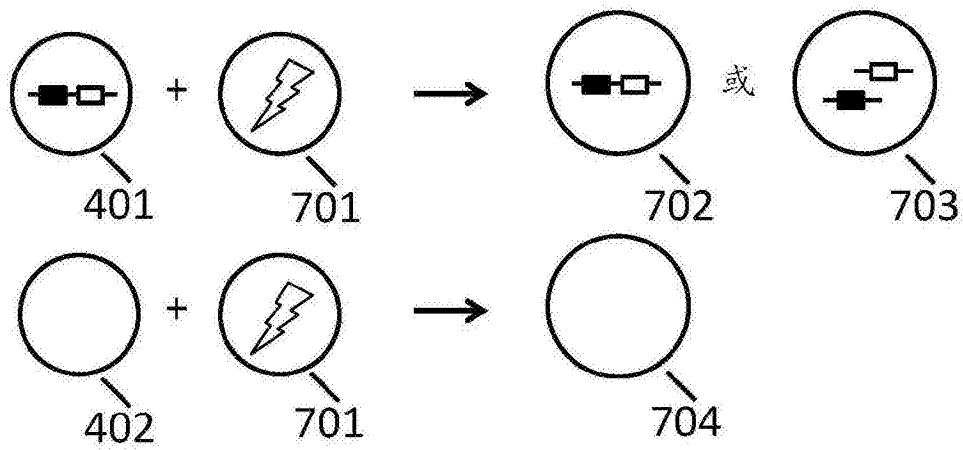


图7

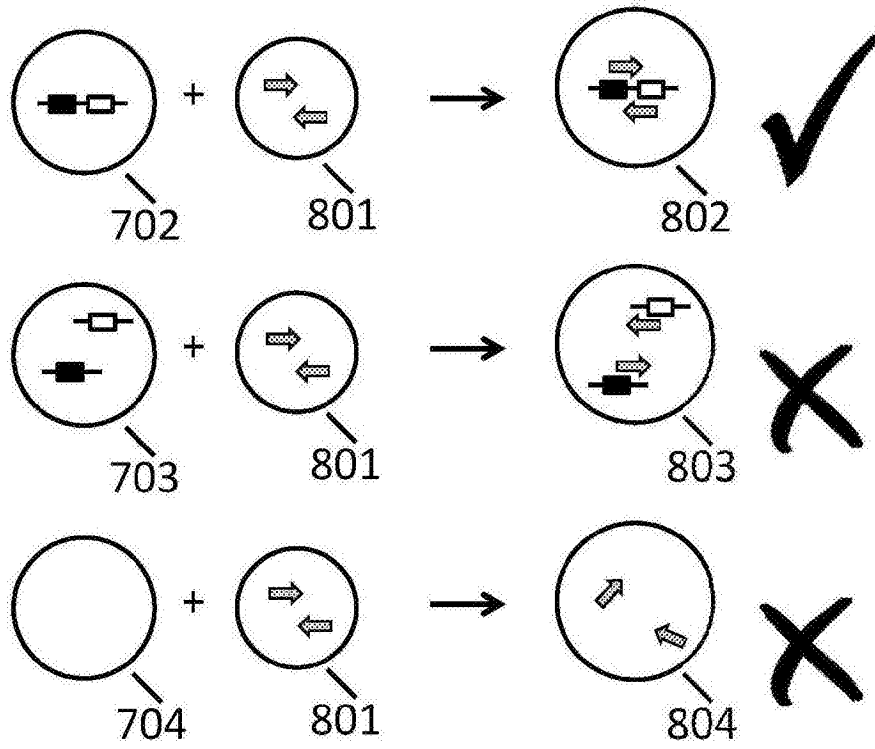


图8

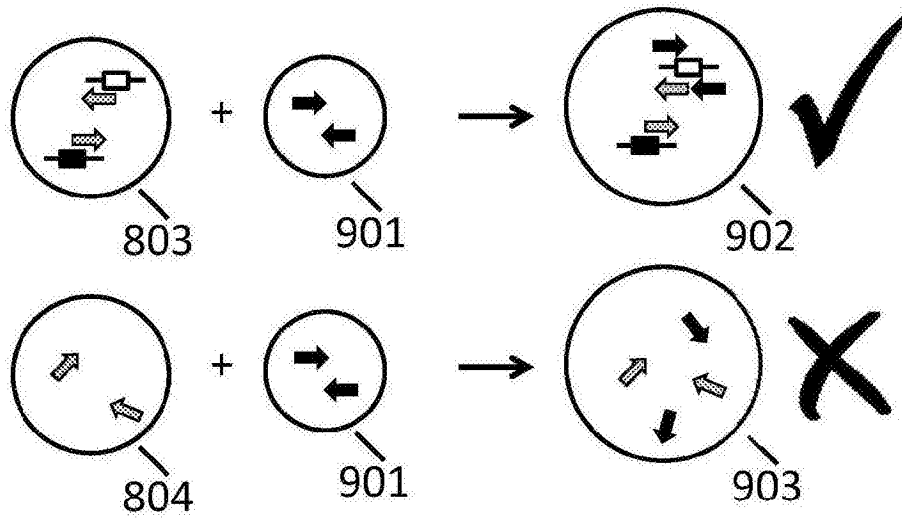


图9

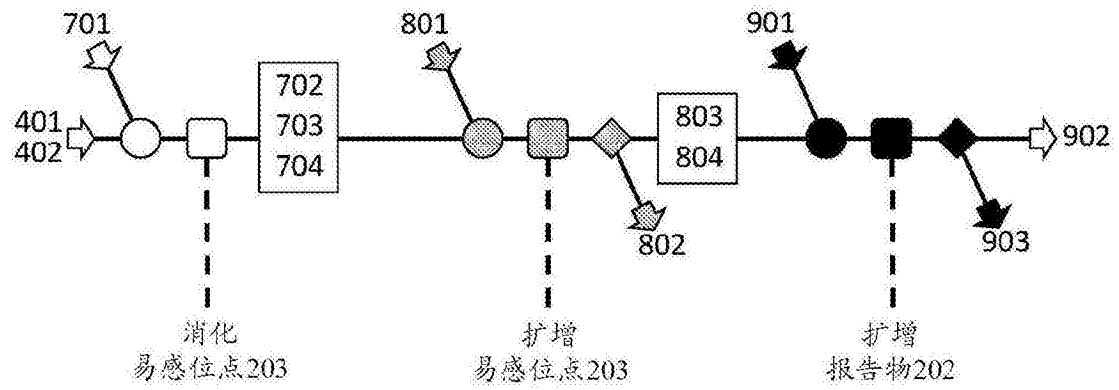


图10

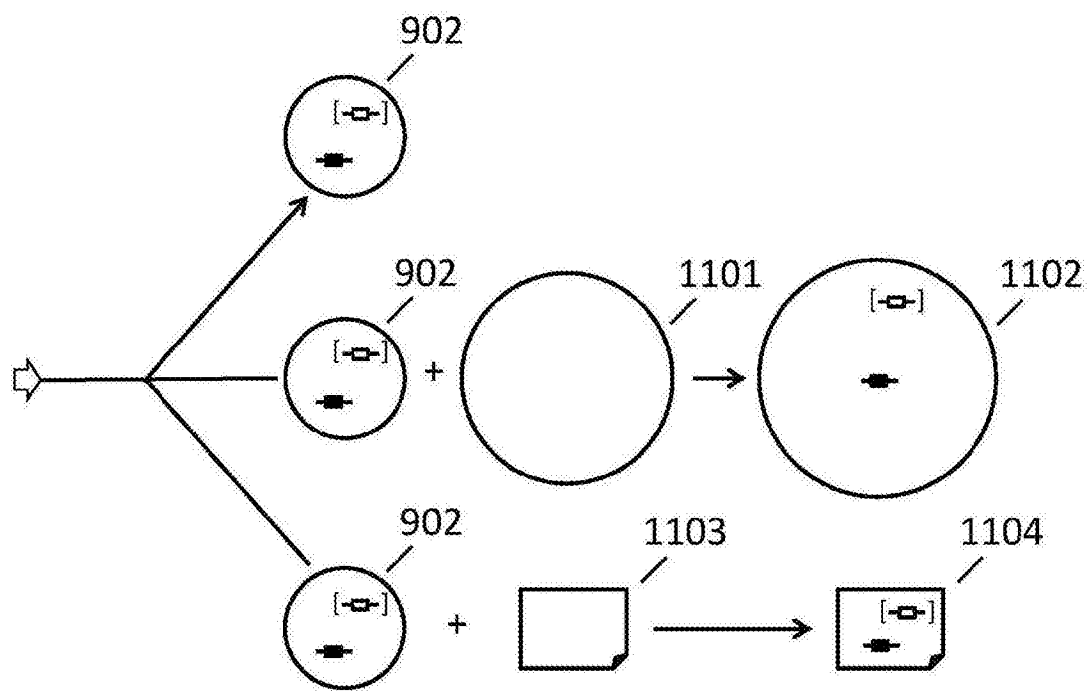


图11

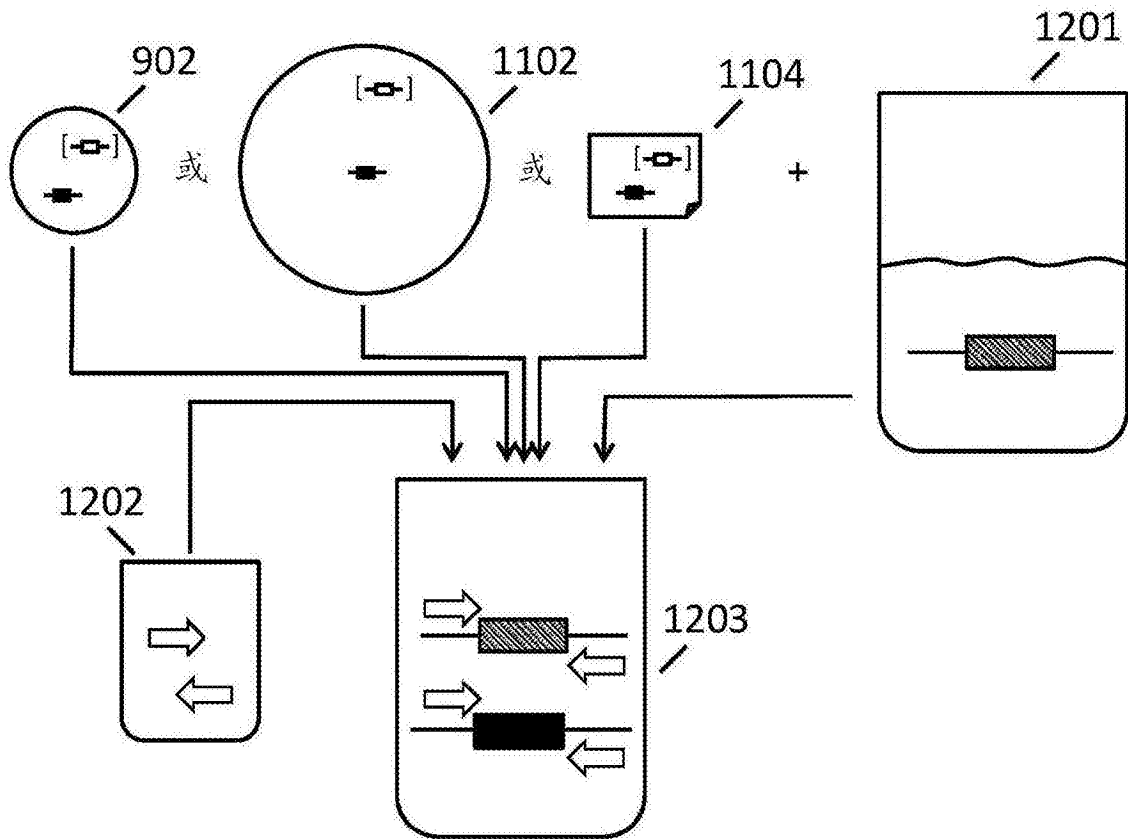


图12

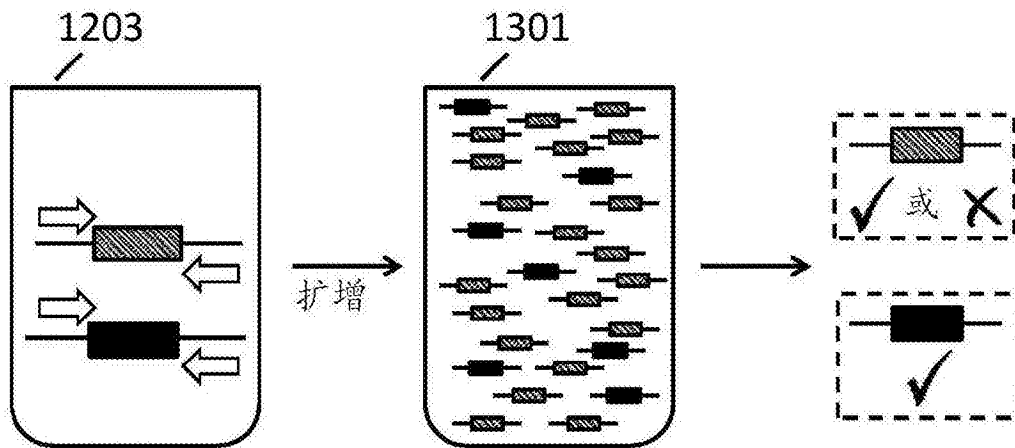


图13

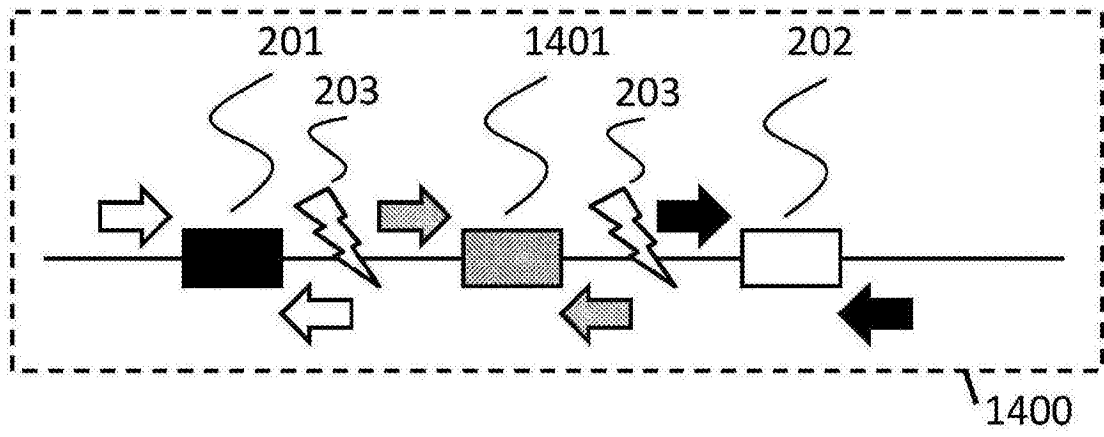


图14

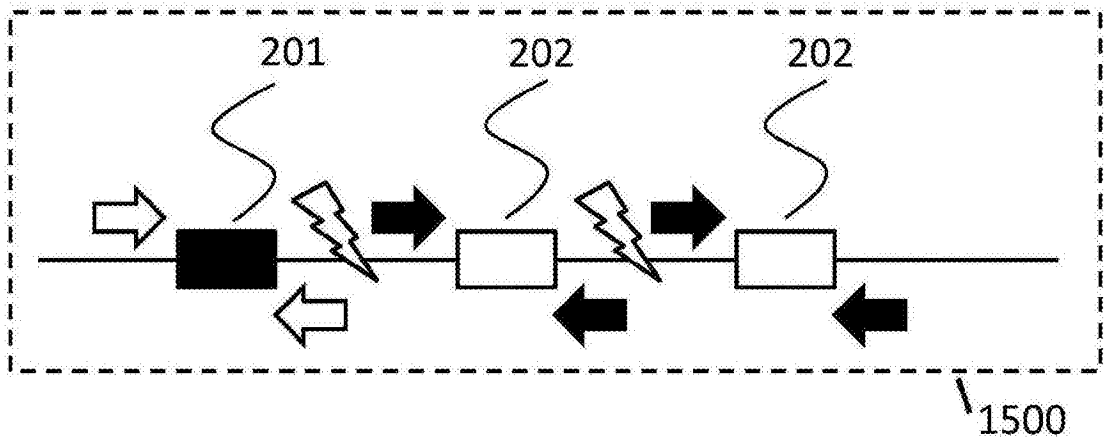


图15

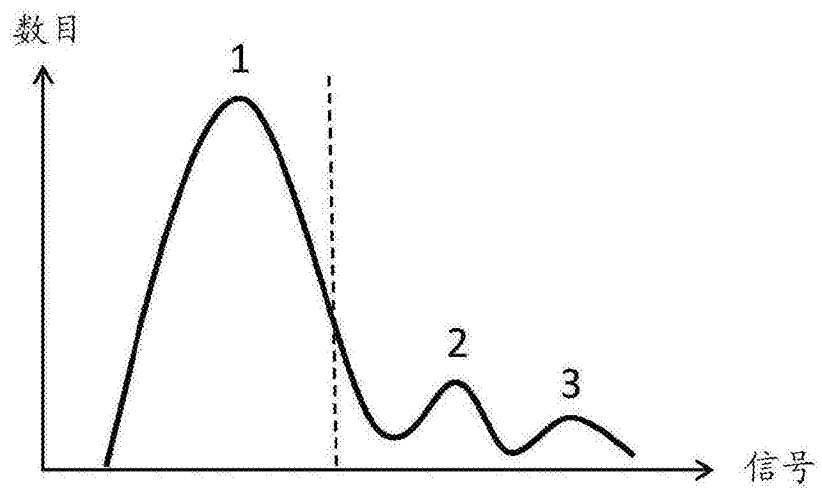


图16

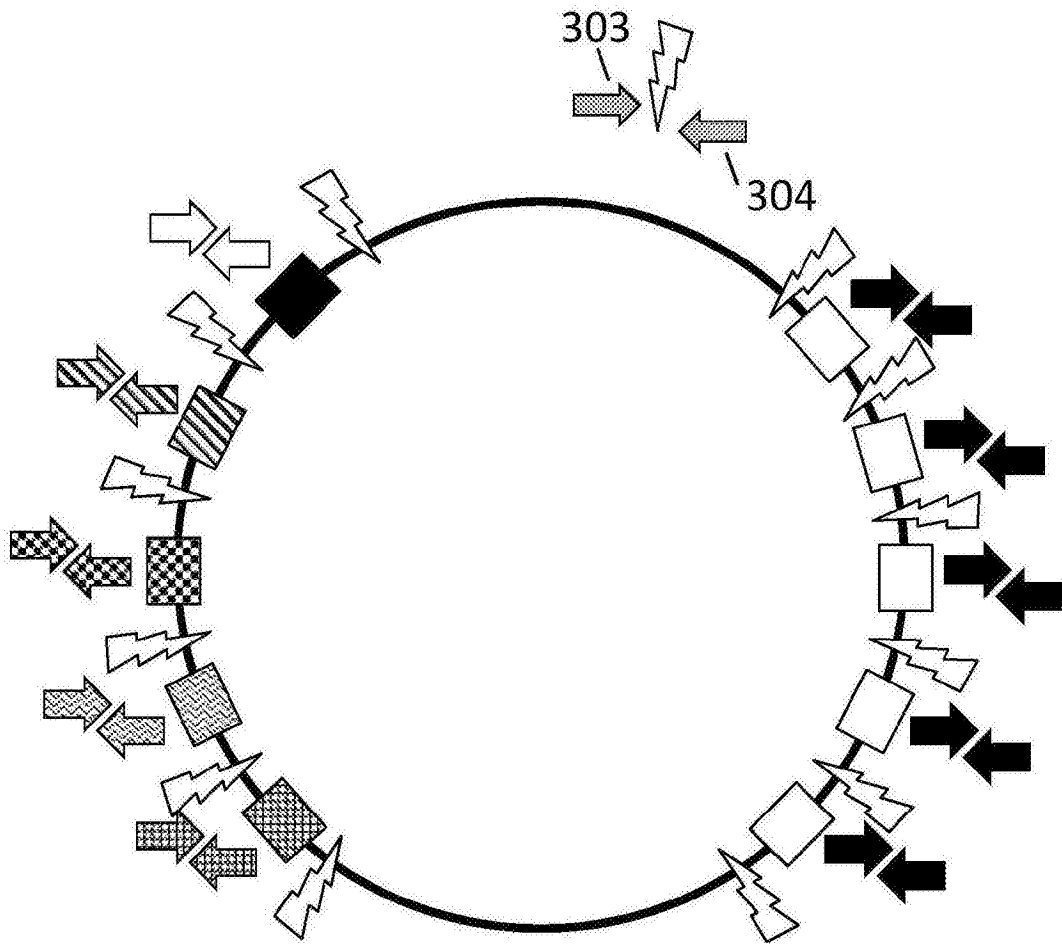


图17

图18

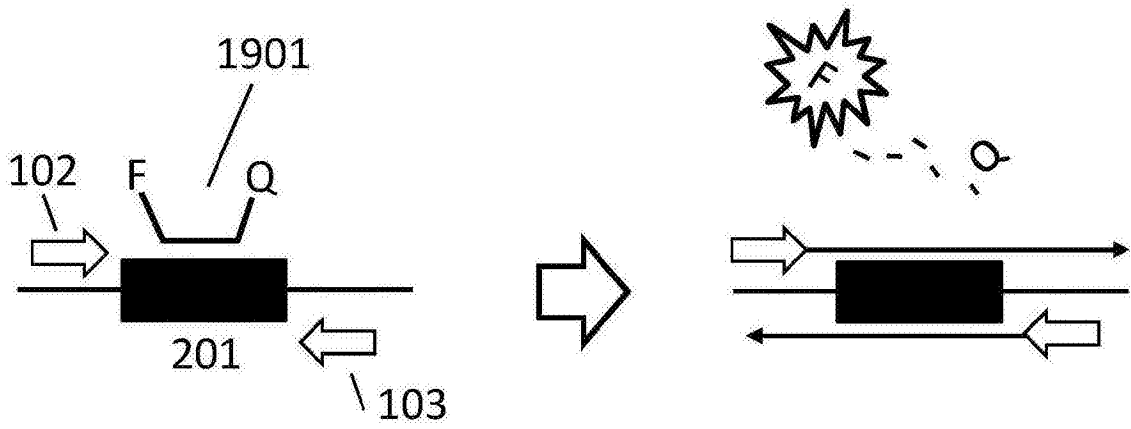


图19

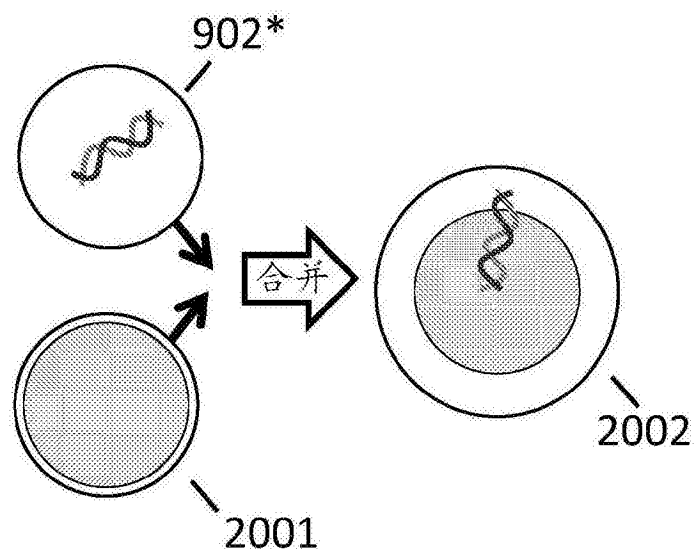


图20

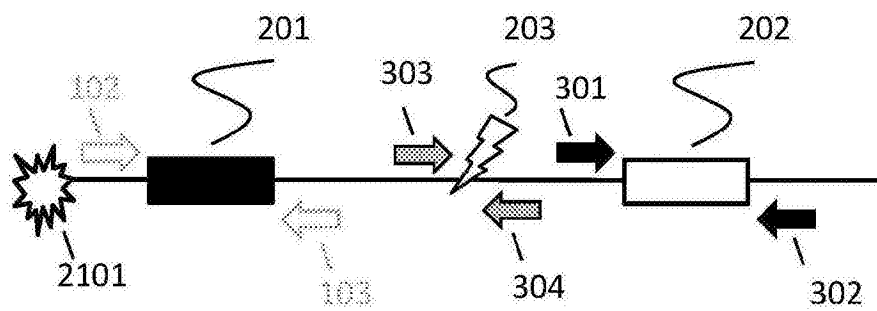


图21

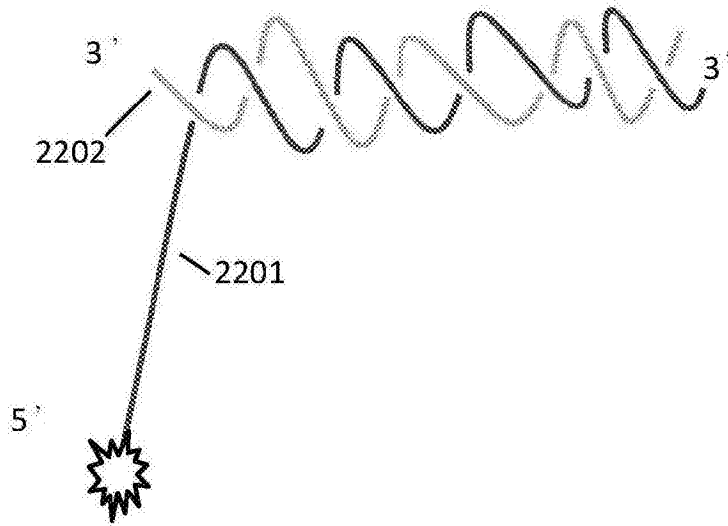


图22

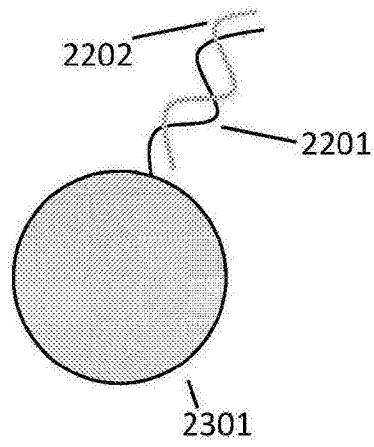


图23

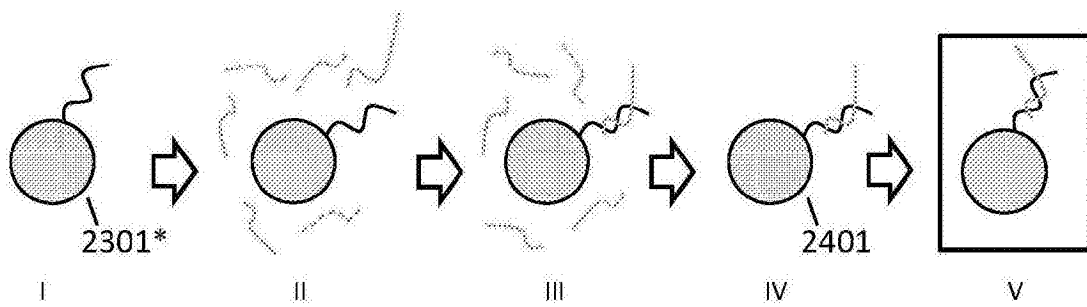


图24

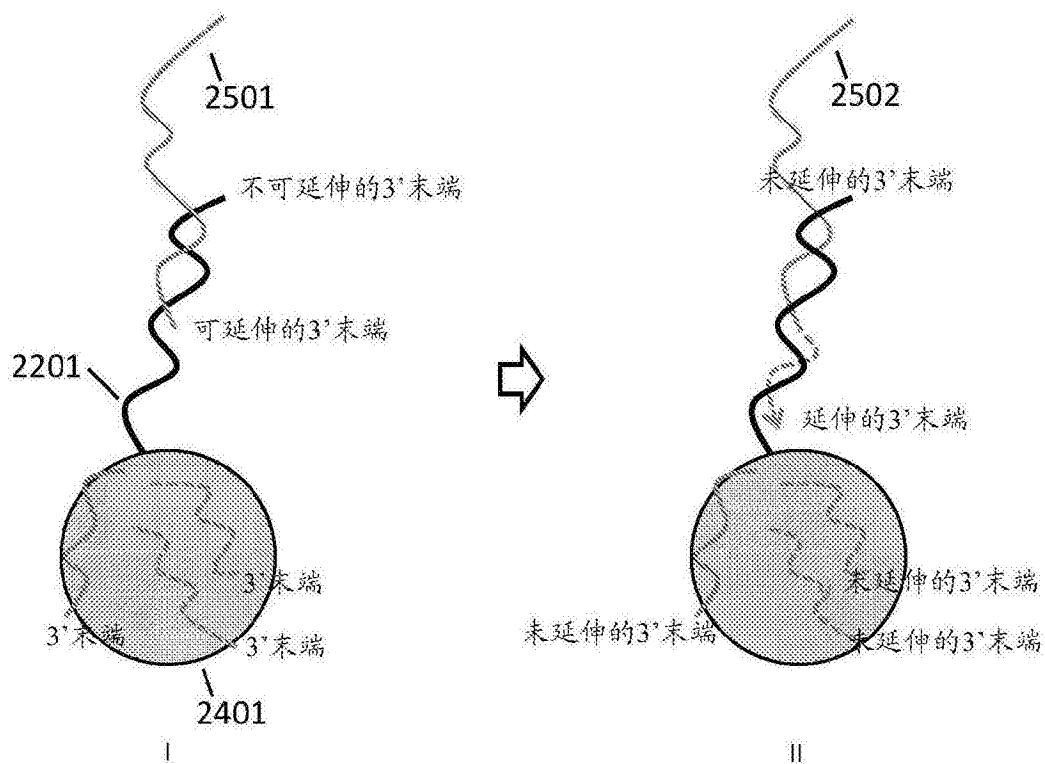


图25

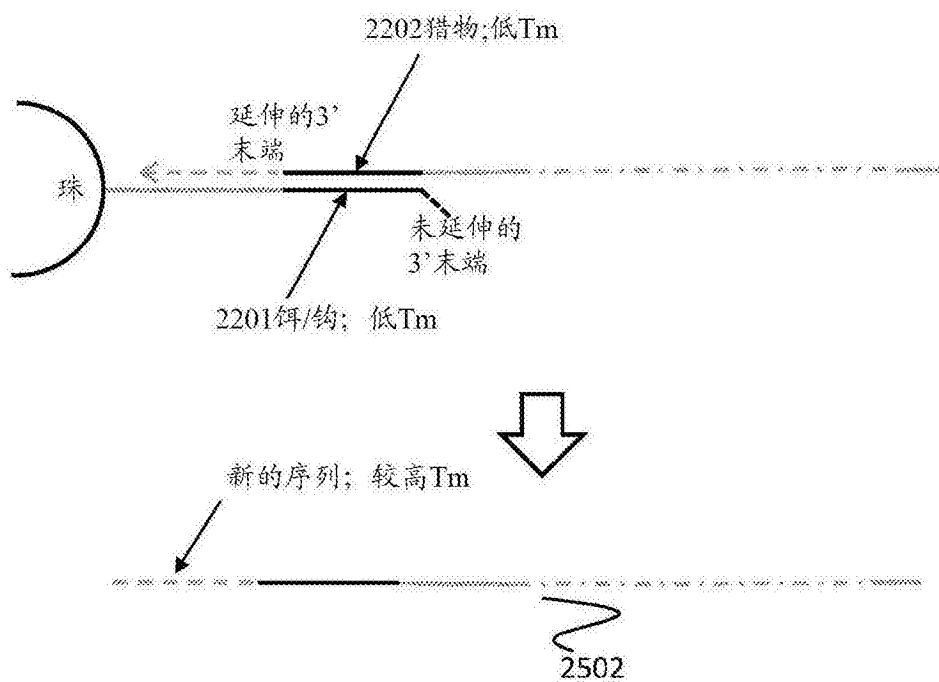


图26

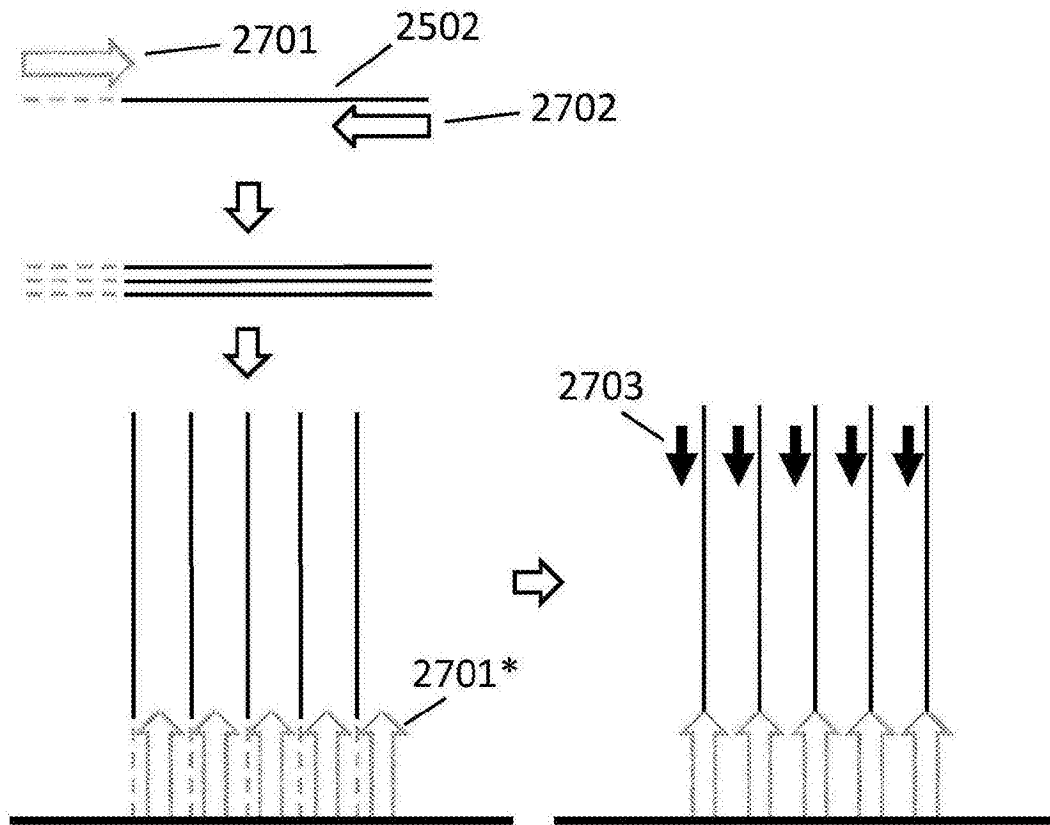


图27