



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I805672 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 21 日

(21) 申請案號：108100164

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 01 月 03 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/6853 (2018.01)

(30) 優先權：2018/01/04 英國

1800109.9

(71) 申請人：英商盧米瑞德克斯英國有限公司 (英國) LUMIRADX UK LTD (GB)
英國(72) 發明人：克尼克 布萊恩 KRAYNACK, BRYAN (US)；申 大偉 SHEN, DAIWEI (US)；佩
瑞茲 維客多 PEREZ, VICTOR (US)；普維恩斯 賈洛德 PROVINS, JARROD (US)

(74) 代理人：閻啓泰；林景郁

(56) 參考文獻：

US 20170183714A1

WO 2017/027835A1

審查人員：吳佩諄

申請專利範圍項數：45 項 圖式數：16 共 79 頁

(54) 名稱

核酸擴增中的改良或與核酸擴增相關的改良

(57) 摘要

本發明揭示一種進行非等溫核酸擴增反應之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 將目標序列與一或多個互補單股引子在允許該等引子雜交至目標之雜交事件之條件下混合，該雜交事件直接或間接引起雙螺旋體結構之形成，該雙螺旋體結構包含位於雙螺旋體之相對端處或附近之兩個切口位點；且藉由以下進行擴增方法；

(b) 使用切口酶在該雙螺旋體之股中之該等切口位點的每一者處產生切口；

(c) 使用聚合酶來延伸切口股以形成新合成之核酸，利用該聚合酶之該延伸重新產生切口位點；

(d) 視需要重複步驟 (b) 及 (c) 以產生該新合成之核酸之多個複本；

其特徵在於進行該方法之溫度非等溫，且在步驟 (b) - (d) 之擴增方法期間，在較高溫度與較低溫度之間進行複數次往復，其中在該較高溫度下，該聚合酶或切口酶中之一者比該等酶中之另一者活性更好，使得酶活性存在差異，且在該較低溫度下，該酶活性之差異減小或逆轉。

Disclosed is a method of performing a non-isothermal nucleic acid amplification reaction, the method comprising the steps of:

(a) mixing a target sequence with one or more complementary single stranded primers in conditions which permit a hybridisation event in which the primers hybridise to the target, which hybridisation event, directly or indirectly, leads to the formation of a duplex structure comprising two nicking sites disposed at or near opposite ends of the duplex; and performing an amplification process by;

(b) using a nicking enzyme to cause a nick at each of said nicking sites in the strands of the duplex;

(c) using a polymerase to extend the nicked strands to as to form newly synthesised nucleic acid, which extension with the polymerase recreates nicking sites;

(d) repeating steps (b) and (c) as desired so as to cause the production of multiple copies of the newly synthesised nucleic acid;

characterised in that the temperature at which the method is performed is non-isothermal, and subject to shuttling, a plurality of times, between an upper temperature and a lower temperature during the amplification process of steps (b)-(d), wherein at the upper temperature, one of said polymerase or nicking enzyme is more active than the other of said enzymes, such that there is a disparity in the activity of the enzymes, and at the lower temperature the disparity in the activity of the enzymes is reduced or reversed.

指定代表圖：

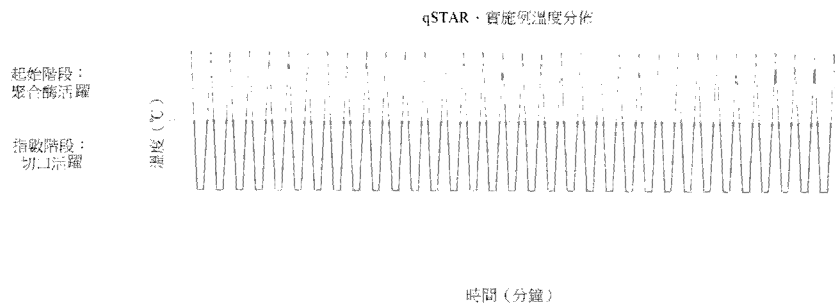


圖2



I805672

【發明摘要】

【中文發明名稱】 核酸擴增中的改良或與核酸擴增相關的改良

【英文發明名稱】 IMPROVEMENTS IN OR RELATING TO
AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

【中文】

本發明揭示一種進行非等溫核酸擴增反應之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 將目標序列與一或多個互補單股引子在允許該等引子雜交至目標之雜交事件之條件下混合，該雜交事件直接或間接引起雙螺旋體結構之形成，該雙螺旋體結構包含位於雙螺旋體之相對端處或附近之兩個切口位點；且藉由以下進行擴增方法；

(b) 使用切口酶在該雙螺旋體之股中之該等切口位點的每一者處產生切口；

(c) 使用聚合酶來延伸切口股以形成新合成之核酸，利用該聚合酶之該延伸重新產生切口位點；

(d) 視需要重複步驟 (b) 及 (c) 以產生該新合成之核酸之多個複本；

其特徵在於進行該方法之溫度非等溫，且在步驟 (b) - (d) 之擴增方法期間，在較高溫度與較低溫度之間進行複數次往復，其中在該較高溫度下，該聚合酶或切口酶中之一者比該等酶中之另一者活性更好，使得酶活性存在差異，且在該較低溫度下，該酶活性之差異減小或逆轉。

【英文】

Disclosed is a method of performing a non-isothermal nucleic acid amplification reaction, the method comprising the steps of:

(a) mixing a target sequence with one or more complementary single stranded primers in conditions which permit a hybridisation event in which the primers hybridise to the target, which hybridisation event, directly or indirectly, leads to the formation of a duplex structure comprising two nicking sites disposed at or near opposite ends of the duplex; and performing an amplification process by;

(b) using a nicking enzyme to cause a nick at each of said nicking sites in the strands of the duplex;

(c) using a polymerase to extend the nicked strands to as to form newly synthesised nucleic acid, which extension with the polymerase recreates nicking sites;

(d) repeating steps (b) and (c) as desired so as to cause the production of multiple copies of the newly synthesised nucleic acid;

characterised in that the temperature at which the method is performed is non-isothermal, and subject to shuttling, a plurality of times, between an upper temperature and a lower temperature during the amplification process of steps (b)-(d), wherein at the upper temperature, one of said polymerase or nicking enzyme is more active than the other of said enzymes, such that there is a disparity in the activity of the enzymes, and at the lower temperature the disparity in the activity of the enzymes is reduced or reversed.

【指定代表圖】 圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 核酸擴增中的改良或與核酸擴增相關的改良

【英文發明名稱】 IMPROVEMENTS IN OR RELATING TO
AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於尤其以定量方式擴增核酸分子之方法。

【先前技術】

【0002】 聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction，PCR）為人所熟知且係用於擴增核酸分子之標準技術。在反應結束時偵測PCR之擴增產物。產物量傾向於達到穩定水準，該穩定水準在反應混合物靜置更長時間之情況下並未提高。因此，在習知PCR中，產物量不必與開始時存在於混合物中之擴增目標序列之濃度相關。

【0003】 為了獲得定量資料，進行定量PCR（「qPCR」），其中實時監測或偵測所製備之擴增產物的量（因此qPCR亦稱作「實時PCR」或甚至「RT-PCR」，但此後一縮寫因可能與逆轉錄酶-PCR混淆而為無益的），而反應仍有效擴增目標序列。

【0004】 典型地，擴增核酸係藉由其與標籤實體（通常標籤係螢光團）之相互作用偵測。此相互作用可為非特異性的（亦即標籤實體與基本上任何雙股DNA分子結合）或特異性的（亦即標籤實體以核苷酸序列依賴性方式優先與所需擴增產物中存在之特定核酸序列相互作用）。非特異性標籤實體之實例係染料SYBR Green。特異性標籤實體（例如經標記之探針分子）可係例如「分子信標（molecular beacon）」，其在經歷由與目標序列雜交誘導之構形變化時發

螢光。

【0005】 因此，監測在PCR期間實時觀測到之螢光水準允許產生定量資料，其中擴增產物之量（例如，如藉由螢光偵測所量測）與樣品中之擴增目標分子之濃度相關。

【0006】 如美國專利6,814,943中所描述之qPCR利用用於循環之溫度範圍。典型地，對於qPCR，進行以下程序：在約95°C變性，在約55°C黏接，在約70°C延伸。此等係較大的溫度變化（最大溫度與最小溫度之間約有40°C差異）。因此qPCR，如「正常」非定量PCR需要使用相對尖端之熱循環設備。因此，儘管qPCR極其適用於研究情形（例如基因表現之量化），但其不易適用於定點照護（point-of care，「PoC」）診斷性測試及類似者。

【0007】 已設計許多核酸擴增技術，其等溫進行，以避免對熱循環之需求。該等技術之非窮盡性清單包括：信號介導RNA擴增技術（「SMART」；WO 99/037805）；基於核酸序列之擴增（「NASBA」Compton 1991 Nature 350, 91-92）；滾環擴增（「RCA」例如，參見Lizardi等人, 1998 Nature Genetics 19, 225-232）；環介導擴增（「LAMP」參見Notomi等人, 2000 Nucl. Acids Res. 28, (12) e63）；重組酶聚合酶擴增（「RPA」參見Piepenberg等人, 2006 PLoS Biology 4 (7) e204）；股置換擴增（「SDA」）；解螺旋酶依賴性擴增（「HDA」Vincent等人, 2004 EMBO Rep. 5, 795-800）；轉錄介導擴增（「TMA」）、單引子等溫擴增（「SPIA」參見Kurn等人, 2005 Clinical Chemistry 51, 1973-81）；自動維持序列擴增（「3SR」）；及缺口酶擴增反應（「NEAR」）。

【0008】 SDA係涉及使用一對引子之技術（由Walker等人, 1992 Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696所揭示），該等引子包含目標互補部分及目標互補部分之5'、核酸內切酶之識別及切割位點。引子雜交至對應互補單股目標分子。使

用包括DNA聚合酶及至少一個經修飾之三磷酸核苷酸之反應混合物延伸目標股之3'端，使用引子作為模板（且同樣，使用目標作為模板延伸引子之3'端。）

【0009】 目標股之延伸產生核酸內切酶之雙股識別位點。然而，因為使用經修飾之三磷酸延伸目標，所以核酸內切酶不使兩個股裂解而是在引子中生成單股切口。在切口處之3'端隨後藉由DNA聚合酶（典型地為缺乏外切核酸酶活性之DNA聚合酶I之克列諾（Klenow）片段）延伸。隨著使切口引子延伸，其取代最初產生之延伸產物。因為取代產物基本上複製相反引子之目標序列，所以其隨後自由雜交至相反引子。以此方式，實現目標序列之兩個股之指數擴增。

【0010】 SDA方法之擴增階段基本上等溫-典型地在37°C下進行，此溫度對於核酸內切酶及聚合酶而言為最佳溫度。然而，在到達擴增階段以前，需要使雙股目標完全解離為其構成單股，以允許引子對雜交至其互補目標股。

【0011】 此解離或「熔融」通常藉由將雙股目標加熱至高溫-通常約90°C以使目標之兩個股之間的氫鍵斷裂而實現。隨後使反應混合物冷卻以允許添加對擴增反應必要之酶。由於使用高溫產生單股目標，SDA技術並非理想地適合於PoC環境。

【0012】 US 6,191,267揭示N.BstNBI切口酶之選殖及表現及其替代限制性核酸內切酶及經修飾之三磷酸鹽在SDA中之用途。

【0013】 另一類似於SDA之擴增技術為缺口酶擴增反應（或「NEAR」）。

【0014】 在『NEAR』（例如，如US2009/0017453及EP 2,181,196中所揭示）中，正向及反向引子（在US 2009/0017453及EP 2,181,196中稱為「模板」）雜交至雙股目標之各別股且延伸。正向及反向引子（過量存在）之進一步複本雜交至相反引子之延伸產物且自身延伸，從而產生「擴增雙螺旋體」。

因此形成之各擴增雙螺旋體包含朝向各股之5'端的切口位點，該切口位點由切口酶切刻，從而允許合成進一步延伸產物。先前合成之延伸產物可同時與互補引子之進一步複本雜交，從而使引子延伸且藉此產生「擴增雙螺旋體」之進一步複本。以此方式，可實現指數擴增。

【0015】 NEAR與SDA之不同之處尤其在於不需要初始熱解離。儘管目標仍實質上為雙股，但仍發生觸發擴增方法所需之初始引子/目標雜交事件：認為初始引子/目標雜交利用目標股之局部解離-稱為「呼吸」之現象（參見Alexandrov等人, 2012 Nucl. Acids Res.及由Von Hippel等人, 2013 Biopolymers 99 (12), 923-954所回顧）。呼吸為DNA股之間的鹼基配對之局部及暫時鬆動。初始引子/目標異雙螺旋之熔融溫度（ T_m ）典型地遠低於反應溫度，因此引子傾向於解離，但對於聚合酶而言，短暫雜交持續足夠長時間而使引子延伸，此提高異雙螺旋之 T_m 且使其穩定。

【0016】 NEAR中之擴增階段在恆溫下等溫進行。實際上，習知在通常在 54°C 至 56°C 範圍內之相同恆溫下進行初始目標/引子雜交與後續各輪擴增。

【0017】 避免對熱循環之需求意謂在PoC環境中NEAR可能比PCR更加有用。另外，即使在以極低複本數之目標分子（例如少至10雙股目標分子）為起始物質時，仍可實現大量擴增產物之合成。

【0018】 WO 2011/030145（Enigma Diagnostics有限公司）揭示最初在預定溫度下進行之「等溫」核酸擴增（專門提及NASBA、SDA、TMA、LAMP、Q- β 複製酶、滾環擴增及3SR）的構思，從而改變反應溫度，且隨後使該溫度在反應期間至少一次返回至預定溫度。更具體而言，文件表明在擴增反應期間造成溫度振盪或「擺動」，稱其「提高分析之總體完成時間及信號雜訊比[比率]」。使用TMA擴增技術擴增細菌RNA以實驗方式探索該構思。結果表明，儘管「擺動」反應開始擴增目標之時間早於真實地等溫反應，但在螢光信號上

升至高於初始背景水準之前仍存在約13分鐘之延遲。

【0019】 本發明旨在提供一種新穎的核酸擴增技術，其相比於現有技術具有一或多個優勢且尤其能夠產生定量資料。

【發明內容】

【0020】 在第一態樣中，本發明提供一種進行非等溫核酸擴增反應之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 將目標序列與一或多個互補單股引子在允許該等引子雜交至目標之雜交事件之條件下混合，該雜交事件直接或間接引起雙螺旋體結構之形成，該雙螺旋體結構包含位於雙螺旋體之相對端 (opposite ends) 處或附近之兩個切口位點；且藉由以下進行擴增方法；

(b) 使用切口酶在該雙螺旋體之股中之該等切口位點的每一者處產生切口；

(c) 使用聚合酶來延伸切口股以形成新合成之核酸，利用該聚合酶之該延伸重新產生切口位點；

(d) 視需要重複步驟 (b) 及 (c) 以產生該新合成之核酸之多個複本；

其特徵在於進行該方法之溫度非等溫，且在步驟 (b) - (d) 之擴增方法期間，在較高溫度與較低溫度之間進行複數次往復 (shuttling)，其中在該較高溫度下，該聚合酶或切口酶中之一者比該等酶中之另一者活性更好，使得酶活性存在差異，且在該較低溫度下，該酶活性之差異減小或逆轉。

【0021】 切口酶及聚合酶將具有一定催化活性之速率。此等將隨溫度變化。酶活性之各別速率 (根據在給定基質濃度下反應基質之莫耳量/單位時間/毫克酶) 通常在特定溫度下將不同。各種酶將具有最佳溫度，在該最佳溫度下，活性速率最大。一般而言，反應混合物之溫度距酶之最佳溫度愈遠，酶活

性之速率愈慢。

【0022】 藉由使用容許該等酶中之一者之活性大於另一者之活性的溫度條件，或藉由使用酶中之一者的有利性低於另一者之溫度條件可獲得一種酶相比於另一種之相對有利性（以實現聚合酶與切口酶之活性速率之間的差異）。

【0023】 藉助於解釋，若在較高溫度下，酶中之一者具有高於該等酶中之另一者之活性，而在較低溫度下，該等酶之另一者具有較高活性，則視為酶活性之差異「逆轉」。

【0024】 在其他具體實例中，在較高及較低溫度下酶活性之差異未逆轉，而僅減小。典型地，酶之間的活性差異在該較高或較低溫度中之一者處視需要在該較低或較高溫度下減小至少5%。更佳地，差異減小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%。最佳地，差異減小至少50%或至少75%。

【0025】 為避免疑問，「酶活性」在此上下文中係指針對聚合酶及切口酶在相同條件下量測之「特異性酶活性」（反應基質毫莫耳數/分鐘/毫克酶）。

【0026】 在一個較佳具體實例中，本發明之第一態樣之方法包含使用一組溫度條件，其中在該等較高及較低溫度中之一者下，切口酶及聚合酶兩者實質上具有活性（亦即出於本發明用途，在以下速率下起作用：該速率為酶在其最佳溫度下，在其他方面相同之條件下起作用之速率的至少50%或更高；較佳地在酶在其最佳溫度下之活性速率之60%或更高下，更佳地在65%或更高下；及最佳地在70%或更高下）；而同時該等較低及較高溫度之另一者下（視具體情況），切口酶或聚合酶中之至少一者實質上受抑制（亦即在以下速率下起作用：該速率為酶在其最佳溫度下，在其他方面相同之條件下起作用之速率的至少49%或更低；較佳地在酶在其最佳溫度下之活性速率之小於45%，更佳地小

於40%；及最佳地在小於35%下）。在一些具體實例中，切口酶在較高或較低溫度中之一者下實質上受抑制。在一些具體實例中，切口酶在較高溫度下實質上受抑制。

【0027】 在一些具體實例中，聚合酶在較高或較低溫度中之一者下實質上受抑制。在一些具體實例中，聚合酶在較低溫度下實質上受抑制；在其他具體實例中，聚合酶在較高溫度下實質上受抑制。

【0028】 反應混合物在較高溫度下或在較低溫度下保持常數之時間長度可稱為「停留時間 (dwell time)」，且為了區分，吾人可稱為「較高溫度停留時間」及「較低溫度停留時間」。較高溫度停留時間及較低溫度停留時間可相同，或可不同。若不同，則較高溫度停留時間可比較低溫度停留時間更長或更短。

【0029】 定量分析之關鍵參數係所產生資料擬合回歸線之程度，稱為決定係數 (R^2)。若資料具有較差決定係數，則不視為定量。出於本發明用途，若資料之決定係數等於或大於0.850、典型地等於或大於0.900、較佳地等於或大於0.950、更佳地等於或大於0.975、且最佳地等於或大於0.990，則視為定量的。決定係數 (R^2) 宜使用由Pfaffl (2001, Nucl. Acids Res. 29 (9) e45) 描述之方法計算。

【0030】 因此，若進行核酸擴增反應及/或藉助於此類反應分析樣品之方法產生根據前述定義定量之資料，則視為定量的。意外地，本發明之方法能夠產生定量資料。

【0031】 本發明之擴增反應較佳以一般表面上類似於稱為「NEAR」且揭示於EP 2,181,196中之反應的方式進行。然而，重要地且與NEAR技術極其不同，本發明方法非等溫進行且涉及在較高與較低溫度之間的重複往復。

【0032】 在一些具體實例中，較高溫度對聚合酶之活性相比切口酶之活

性可相對有利的，且較低溫度對切口酶之活性相比聚合酶之活性將相對有利。然而，意外地，本發明人已發現「溫度優選」可完全逆轉，使得在一些具體實例中，較高溫度對切口酶之活性相比聚合酶之活性可相對有利且較低溫度對聚合酶之活性相比切口酶之活性可相對有利。

【0033】 不受任何特定理論束縛，似乎藉由合適地選擇具有不同溫度最佳值之聚合酶及切口酶，有可能具有對聚合酶或切口酶相對有利的擴增反應之較高溫度，且相對於擴增反應之較低溫度反之亦然。

【0034】 不受任何特定理論束縛，本發明人進一步假設，引用藉由本發明方法來達成之快速擴增之可能機制，其藉由使用對於酶顯著次最佳之溫度，造成一種或其他切口酶或聚合酶之活性降低，從而導致潛在基質分子之積聚。在將反應混合物之溫度調節至更接近相關酶之最佳溫度之溫度時，酶活性顯著提高，其結合相對較高濃度之積累基質導致反應速率極大加速。在過分簡單化術語中，此「快速/緩慢」型式之反應之平均速率超過可使用具有恆定或變化相對緩慢之溫度之「穩態」系統達成的反應之平均速率。

【0035】 對於熟習此項技術者將顯而易見的係，可能需要切口酶之最佳溫度不同於（比其更高或更低）本發明之方法中所用之聚合酶的最佳溫度。

【0036】 典型地，切口酶及聚合酶之各別最佳溫度應相差至少1°C、較佳至少3°C、更佳至少5°C、且最佳至少10°C。適宜地，各別最佳溫度將相差在10-30°C範圍內，更典型地在10-25°C範圍內之量。

【0037】 聚合酶之最佳溫度高於切口酶之最佳溫度並非絕對需求。因此，舉例而言，存在本發明之具體實例，其中反應利用具有比切口酶之最佳溫度更低之最佳溫度的聚合酶（例如獲自嗜冷源），而在其他具體實例中，聚合酶具有比切口酶之最佳溫度更高之最佳溫度。

【0038】 因此，一般而言，較佳選擇較高溫度以相對有利於序列特異性

聚合酶介導之延伸階段（亦即在聚合酶與雜交之初始引子/目標雙螺旋體之間形成複合物，之後為聚合酶介導之引子延伸；以及幾乎在其之後緊接雜交至延伸之初始引子之相反引子的延伸）。使用高溫傾向於減少引子二聚體形成及非所需錯誤雜交之雙螺旋體之異常擴增。適宜地選擇聚合酶以在較高溫度下足夠穩定，從而在反應之整個持續時間期間進行引子延伸，而無活性之顯著降低。出於本發明目的，「顯著減弱」意謂聚合酶之特異性酶活性減弱50%或更大。

【0039】 較佳選擇較低溫度以容許切口酶在雙螺旋體切割切口位點。切口酶典型地（但不必）具有低於聚合酶之最佳溫度的最佳溫度，因此向較低溫度之轉變典型地使反應溫度移動以更接近於切口酶之最佳溫度。

【0040】 在如本文中例示之本發明方法之具體實例中，較高溫度較佳在50.0-64.0°C範圍內，更佳地在55.0-63.0°C範圍內。然而，熟習此項技術者將瞭解，較佳之「較高溫度（upper temperature）」可視所存在酶之身分以及可能地引子及/或所需擴增目標之長度及序列而變化。

【0041】 舉例而言，在一些具體實例中，較高溫度可高至68°C但在彼等條件中：

(a) 吾人一般將希望使用在較高溫度下具有減少之停留時間之熱往復輪廓（例如每次往復不超過約1-2秒）；且

(b) 此類高較高溫度僅在樣品中相對較高之複本數之目標序列情況下作用良好（例如約 10^3 個複本或更高）。

【0042】 在如本文中例示之本發明方法中，較低溫度較佳在20.0-58.5°C範圍內，更佳地在35.0-57.9°C範圍內。另外，然而，如上文所提及，熟習此項技術者將瞭解，較佳之「較低溫度（lower temperature）」可視所存在之酶身分，以及可能地引子及/或所需擴增目標之長度及序列而變化。

【0043】 一般情況下，如熟習此項技術者所熟知，雜交之嚴格度隨溫度

提高而增加（在限值內），使得較高之溫度一般將降低諸如樣品中存在之錯配引子與非互補聚核苷酸序列之間的非特異性相互作用。因此，雜交反應之較高溫度一般將傾向於較低溫度，只要溫度不超過特異性引子/目標序列雜交之熔融溫度即可。

【0044】 期望地，在較佳具體實例中，較高溫度與較低溫度之間的溫度差異將在4-12°C範圍內，更佳地在4-10°C範圍內，且最佳地在4-8°C範圍內。

【0045】 一般而言，儘管非必需地，但反應混合物較佳在較高溫度下保持之時間段短於在較低溫度下保持之時間段，儘管在較高及較低溫度下之「停留時間」可相等或甚至在其他具體實例中，在較高溫度下之停留時間可比在較低溫度下之停留時間更長-儘管此一般並非較佳的。

【0046】 據設想，在某些限值內，一般而言，熱往復之頻率愈高，擴增反應將進行地愈快。因此，一個完整熱往復之持續時間較佳地將少於3.0分鐘，更佳地少於2.0分鐘，且最佳地少於1.0分鐘。最有利地，熱往復之持續時間將少於45秒且最佳少於30秒。熱往復之最少持續時間典型地將為至少1秒，較佳至少2秒，且更佳至少5秒。一個完整的熱往復之典型的較佳持續時間將在5與30秒之間，較佳地在5與20秒之間，且最佳地在5與15秒之間。

【0047】 在較高溫度下之典型的較佳停留時間可在1與10秒之間，較佳地在1-5秒之間，且最佳地在1-3秒之間。

【0048】 在較低溫度下典型的較佳停留時間可在2與40秒之間，更佳地在3與30秒之間，且最佳地在3與15秒之間。

【0049】 在較高溫度與較低溫度之間往復所花費之時間較佳實質上保持至最小值。據設想，擴增反應混合物之典型體積將小於500 μl ，可能小於250 μl 且鑒於較高溫度及較低溫度將典型地相隔少於10°C，其應可能且較佳在約0.5-10.0秒，更佳地在1-5秒範圍內自較低溫度轉變至較高溫度（或反之亦然）。

【0050】 適宜地，複數個往復中之每一者之持續時間/溫度分佈基本上相同-此簡化方法之執行。因此，舉例而言，複數個熱往復中之每一者將適宜地具有相同的總體持續時間、相同的在較高溫度下之停留時間、相同的在較低溫度下之停留時間等。

【0051】 然而，在一些具體實例中（尤其存在對擴增反應之直接或間接產物實時偵測之彼等具體實例中），可能需要改變反應過程期間熱往復之分佈，使得並非全部往復皆相同。更具體而言，若擴增反應產物（直接或間接）之實時定量表明反應進行地比期望的慢，則可將此資訊反饋回到熱調節設備，該熱調節設備調節反應混合物之溫度，使得該設備調節熱往復之分佈，以提高反應速率。若例如目標序列以極低複本數存在，則可能對其需要。該設備可藉由提高或降低較高及/或較低溫度，及/或增加或減少較高及/或較低溫度下之停留時間來調節熱往復分佈。亦可實行的係該設備可增加或減少在較高溫度與較低溫度之間轉變所耗費之時間（亦即增加或減少向上溫度轉變，或向下溫度轉變或兩者之時間）。

【0052】 熱往復可實質上緊接在反應混合物之所有所需組分已結合在一起之後開始。

【0053】 可替代地，熱往復可在延遲時間間隔之後開始。舉例而言，有可能且可能期望反應混合物可保持在高溫（其可與用於熱往復之較高溫度相同或與其不同）下。作為說明，此類延遲時間間隔可為例如5秒至1或2分鐘。

【0054】 另外，熱往復在擴增反應期間宜實質上連續進行，或可進行一或多次暫停。典型地，且更佳地，在開始後，熱往復將不會中斷直至擴增反應已達到所需時間點，典型地到已獲得可偵測之螢光（或其他）信號及允許有利地定量測定樣品中之目標序列之量及/或濃度時。

【0055】 擴增反應混合物之熱往復可適宜地使用自動化熱調節設備（諸

如市售以用於進行PCR中之熱循環)進行。明顯地，由該設備產生之溫度分佈將需要與可適用於執行本發明之較佳條件相匹配。

【0056】 在第二態樣中，本發明提供用於進行核酸擴增之反應混合物，該混合物包含待擴增之目標序列、兩種或更多種引子(該等引子中之一者與目標之第一股互補且該等引子中之另一者與目標之第二股互補)、DNA聚合酶及切口酶；該反應混合物與可編程溫度調節構件熱調節相關，該溫度調節構件經程式化以進行在較高溫度與較低溫度之間的熱往復，如上文關於本發明之第一態樣所定義。

【0057】 在第三態樣中，本發明提供一種測定樣品中目標聚核苷酸之量及/或濃度的方法，該方法包含以下步驟：根據如上文所定義之本發明之第一態樣進行擴增反應以擴增目標及以定量方式偵測擴增反應之直接或間接產物，以允許測定樣品中目標聚核苷酸之量及/或濃度。

【0058】 本發明之方法之擴增方法可應用於利用聚合酶及切口酶之一般已知及習知的擴增技術，包括SDA及NEAR。

【0059】 因此，舉例而言，擴增方法可基於股置換擴增中所採用之擴增方法，或基於NEAR或實際上依賴於產生單股切口及自切口股之3'端後續延伸之任何其他核酸擴增方法中所用的擴增方法。與擴增期間維持恆溫相關之先前技術之教示內容除外，與SDA或NEAR之擴增階段相關之先前技術的教示內容大體將同等適用於本發明之方法之擴增方法。

【0060】 本發明之方法係WO2018/002649中所描述之稱為選擇性溫度擴增反應(Selective Temperature Amplification Reaction)(或「STAR」)之擴增技術的改進。本發明之方法在較佳具體實例中允許靶標序列之即時定量偵測，且在本文中稱為「qSTAR」，儘管此並非意欲指示本發明之方法將在所有條件下提供定量的實時結果。

【0061】 較佳地，步驟（a）包含將含有雙股目標之樣品與兩個單股引子混合，該等引子中之一者與目標之第一股互補，且該等引子中之另一者與目標之第二股互補，使得兩個引子雜交至目標且該等引子之自由3'端面向彼此。

【0062】 該兩個引子可便利地描述為『正向』及『反向』引子。

【0063】 合乎需要地，正向及反向引子二者均將包含切口酶識別位點之序列。典型地，由切口酶產生之切口將僅在外部且典型地在切口酶識別位點之3'。

【0064】 在一較佳具體實例中，正向引子將在其3'端處或附近包含與目標序列反義股之3'端互補且可與其雜交之部分，而反向引子在其3'端處或附近包含與目標序列有義股之3'端互補且可與其雜交之反向引子之部分。

【0065】 以此方式，在目標序列之相反端處引入切口酶識別位點，且目標序列（連同切口位點下游之引子之介入序列）之擴增藉由以下實現：進行正向及反向引子之聚合酶延伸之多個循環以形成雙股切口酶識別位點，及用切口酶切刻位點，使得藉由聚合酶等進一步延伸切口引子，基本上如例如US 2009/0017453中所揭示，其內容以引用的方式併入本文中。

【0066】 目標可為單股、雙股或包含該等兩種股之混合物。目標可包含RNA、DNA或二者之混合物。詳言之，目標可併有一或多個經修飾之三磷酸核苷酸（亦即通常在天然產生之核酸中未發現之三磷酸核苷酸），不過此並非必要且實際上並非較佳。

【0067】 目標可選自以下非窮盡性清單：基因體核酸（該術語涵蓋任何動物、植物、真菌、細菌或病毒之基因體核酸）、質體DNA、粒線體DNA、cDNA、mRNA、rRNA、tRNA或合成寡核苷酸或其他核酸分子。

【0068】 詳言之，方法可另外包含初始逆轉錄步驟。舉例而言，RNA（例如病毒基因體RNA，或細胞mRNA，或來自一些其他來源之RNA）可用於

根據熟習此項技術者熟知之方法使用逆轉錄酶合成DNA或cDNA。DNA隨後可在本發明之方法中用作目標序列。原始RNA將典型地藉由逆轉錄酶之核糖核酸酶活性降解，但必要時可在完成逆轉錄之後添加其他RNase H。RNA分子常常以大於對應（例如基因體）DNA序列之複本數存在於樣品中，因此，宜自RNA分子製備DNA轉錄本以有效增加DNA序列之複本數。

【0069】 「目標序列」為目標核酸中之鹼基序列，且可指代雙股目標之有義及/或反義股，且除非上下文另外指示，否則亦涵蓋與在初始目標核酸之擴增複本、延伸產物或擴增產物中再生或複製之鹼基序列相同的鹼基序列。

【0070】 目標序列可存在於任何種類之樣品中，例如生物或環境（水、空氣等）。生物樣品可為例如食物樣品或臨床樣品。臨床樣品可包括以下：尿、唾液、血液、血清、血漿、黏液、痰、淚液或糞便。

【0071】 樣品在與引子接觸之前可經受或可不經受處理。此類處理可包括以下各者中之一或多者：過濾、濃縮、部分純化、音波處理、溶解及類似處理。此類方法已為熟習此項技術者所熟知。

【0072】 本發明之方法涉及使用切口位點及用於在切口位點處產生切口之構件。「切口」為完整或至少部分雙股核酸分子之僅一個股之磷酸二酯主鏈的裂解。切口位點為其中產生切口之分子中之位置。

【0073】 在較佳具體實例中，「切口識別位點」將存在於切口位點處、切口位點內或切口位點附近。（在此上下文中「附近」意謂切口識別位點之最近鹼基在切口位點之10個鹼基內，較佳在切口位點之5個鹼基內）。

【0074】 切口識別位點可包含限制性核酸內切酶之識別位點之至少一個股，且切口位點可包含當作為雙股分子存在時經限制性核酸內切酶切割之核酸鹼基序列之至少一個股。典型地，限制性核酸內切酶將切割雙股核酸分子之兩個股。在本發明中，可藉由在切口位點處或附近合併一或多個修飾鹼基來避免

雙股斷裂，該等修飾鹼基使核酸之股不易由限制性核酸內切酶裂解。以此方式，通常切割雙股核酸分子之兩個股之限制性核酸內切酶可用於將單股切口引入雙股分子。修飾鹼基及適合於實現此之類似物為熟習此項技術者所熟知且包括例如所有 α 磷酸修飾之三磷酸核苷及 α 硼烷修飾之三磷酸核苷；具體而言，2'-去氧腺苷5'-O-(硫代三磷酸酯)、5-甲基去氧胞嘧啶核苷5'-三磷酸酯、2'-去氧尿苷5'-三磷酸酯、7-去氫-2'-去氧鳥苷5'-三磷酸酯、2'-去氧鳥苷-5'-O-(1-硼烷三磷酸酯)等等。包括修飾鹼基之三磷酸酯可存在於用於進行擴增方法之反應混合物內，使得在後續數輪擴增期間在相關位置處併入修飾鹼基以防止形成可由核酸內切酶裂解之雙股位點。

【0075】 然而，在較佳具體實例中，切口在切口位點處藉助於切口酶製得。切口酶為在正常環境下僅使雙股核酸分子中之單股斷裂之酶。切口酶典型地具有切口識別位點且切口位點可在切口識別位點內或可為識別位點之5'或3'。許多切口酶為熟習此項技術者已知且為可購得的。切口酶之實例之非窮盡性清單包括：Nb.BsmI、Nb.Bts、Nt.AlwI、Nt.BbvC、Nt.BstNBI及Nt.Bpu101。後一酶可購自ThermoFisher Scientific；其他酶購自例如New England Biolabs。

【0076】 在較佳具體實例中，切口酶在方法開始時（例如在樣品與引子及DNA聚合酶接觸之1分鐘內）引入反應混合物中。然而，在一些情況下，需要在較長延遲之後（例如使溫度降低至更接近於切口酶之最佳溫度）將切口酶引入反應混合物中。

【0077】 本發明之方法涉及使用DNA聚合酶。較佳地但非必要地，本發明之方法可包含使用至少一種嗜熱性DNA聚合酶（亦即具有超過60°C之最佳溫度）。較佳地，DNA聚合酶為股置換聚合酶。較佳地，DNA聚合酶不具有外切核酸酶活性。較佳地，DNA聚合酶為不具有外切核酸酶活性之股置換聚合酶且亦較佳為嗜熱的。

【0078】 較佳DNA聚合酶之實例包括Bst聚合酶、Vent® DNA聚合酶、9°N聚合酶、Manta 1.0聚合酶 (Qiagen)、BstX聚合酶 (Qiagen)、SD聚合酶 (Bioron GmbH)、Bsm DNA聚合酶、大片段 (ThermoFisher Scientific)、Bsu DNA聚合酶、大片段 (NEB) 及「Isopol」™聚合酶 (來自ArcticZymes)。

【0079】 下表提供切口酶及DNA聚合酶之組合，以及用以使用例示之酶組合進行本發明之方法的所建議之較高及較低溫度的實例。儘管該表列出特異性DNA聚合酶，但此等聚合酶僅藉助於實例且任何設置換外切核酸酶-，在所陳述溫度範圍中具有活性之聚合酶將滿足，諸如：Deep Vent (exo-)，Bst DNA聚合酶I、II及III，Manta 1.0 DNA聚合酶，Bst X DNA聚合酶、Bsm DNA聚合酶、IsoPol DNA聚合酶。

所建議之切口酶	所建議之DNA聚合酶	所建議之較高溫度 (°C)	所建議之較低溫度 (°C)
Nt.BstNBI	Bst DNA聚合酶，大片段	62°C	57°C
Nt.BstNBI	Bsu DNA聚合酶，大片段	45°C	38°C
Nt.AlwI	Bst DNA聚合酶，大片段	62°C	57°C
Nt.AlwI	Bsu DNA聚合酶，大片段	45°C	38°C
Nt.BsmAI	Bst DNA聚合酶，大片段	60°C	55°C
Nt.BsmAI	Bsu DNA聚合酶，大片段	44°C	37°C
Nt.BspQ1	Bst DNA聚合酶，大片段	62°C	52°C
Nt. BspQ1	Bsu DNA聚合酶，大片段	44°C	37°C

【0080】 在一些具體實例中，本發明之方法宜包含預擴增或富集步驟。此為其中目標序列與正向及反向引子及DNA聚合酶接觸但不與切口酶接觸之步驟。此步驟典型地持續約1-5分鐘且產生約1,000倍之目標序列之初始 (線性) 擴增，其可尤其適用於目標序列以低複本數存在於樣品中時。

【0081】 在一些具體實例中，在低於50°C之溫度下使用諸如Exo-Minus克

列諾DNA聚合酶之嗜溫性DNA聚合酶或來自Cenarchaeum symbiosum之Exo-Minus嗜冷DNA聚合酶進行預擴增或富集步驟，且混合物隨後加熱至超過50°C以使不耐熱性DNA聚合酶變性或不活化，且接著添加嗜熱性DNA聚合酶以進行下游擴增。

【0082】 典型地，本發明之方法包含偵測步驟，其中擴增方法之一或多個直接或間接產物經偵測且視情況定量，此指示樣品中目標之存在及/或量。存在許多已知之合適偵測及/或定量技術，包括：凝膠電泳、質譜分析、橫流（lateral flow）捕獲、標記核苷酸之合併、嵌入或其他螢光染料、酶標籤、電化學偵測技術、分子信標及其他探針，尤其具體而言雜交寡核苷酸或其他含有核酸之分子。

【0083】 在偵測步驟中所偵測之產物（product或products）在本文中可稱作「偵測目標」。關於偵測步驟之『目標』不一定與擴增方法中之『目標』相同且實際上兩個分子通常將至少在一定程度上不同，不過其可具有某些共同序列（典型地10-20個鹼基），其中偵測目標包含核酸分子或寡核苷酸。

【0084】 核酸偵測方法可採用使用允許雙股DNA之特定偵測之染料。在結合至DNA或RNA時呈現增強之螢光的嵌入染料為熟知的。染料可為例如DNA或RNA嵌入螢光團且可尤其包括以下：吡啶橙、溴化乙錠、Pico Green、碘化丙錠、SYBR I、SYBR II、SYBR Gold、TOTO-3（噻啞橙二聚體）Oli Green及YOYO（噻啞黃二聚體）。

【0085】 核酸偵測方法亦可採用使用直接併入偵測目標序列或含有與相關偵測目標互補或實質上互補之序列之探針中的標記核苷酸。合適標記可為放射性及/或螢光性的且可以此項技術中習知之任何方式解析。可偵測但另外充當天然核苷酸之標記核苷酸（例如由天然酶識別且可充當其受質）區別於不充當天然核苷酸之經修飾之核苷酸。

【0086】 可使用分子信標偵測及監測目標核酸及核酸序列之存在及/或量。分子信標為在一個末端處含有螢光團且在相反末端處含有淬滅（quenching）染料（「淬滅劑」）之髮夾形寡核苷酸。髮夾環含有與偵測目標序列互補或實質上互補之探針序列且莖藉由位於探針序列任一側之自互補或實質上自互補序列之黏接形成。

【0087】 螢光團及抑止劑結合在信標之相對端處。在防止分子信標雜交至其目標之條件下或當分子信標在溶液中游離時，螢光團與淬滅劑彼此接近，防止發出螢光。當分子信標遭遇偵測目標分子時，發生雜交；環結構轉換為穩定的更加剛性之構形，從而致使螢光團與淬滅劑分離，允許發出螢光（Tyagi等人, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 303-308）。因為探針之特異性，所以螢光之產生由於預期擴增產物/偵測目標之存在而實質上為唯一的。

【0088】 一般情況下，分子信標在較低雜交溫度下工作更佳，信雜比隨溫度提高而降低。此係因為在較低溫度下，分子信標之自互補「莖」部分保持牢固雜交，使得淬滅劑淬滅螢光團，但隨著溫度升高，分子之莖部分可開始融化，使得非特異性螢光背景「雜訊」增加。

【0089】 分子信標具有高度特異性且可藉由單鹼基區分核酸序列不同（例如單核苷酸多態性）。分子信標可用不同著色螢光團及不同偵測目標互補序列合成，使相同反應中之若干不同偵測目標能夠同時進行偵測及/或定量，從而允許單一PoC分析「多工」偵測複數個不同病原體或生物化學標記物。對於定量擴增方法，分子信標可在擴增後特異性結合於擴增偵測目標，且因為未雜交之分子信標不發出螢光，所以對於定量測定擴增產物之量而言無需分離探針-目標雜交體。所產生之信號與擴增產物之量成比例。此可實時進行。如同其他實時格式，必須針對各引子/探針組優化特定反應條件以確保準確度及精確度。

【0090】 亦可藉由螢光共振能量轉移（FRET）偵測及監測偵測目標核酸

及核酸序列之產生或存在。FRET為供體與受體分子兩個螢光團之間的能量轉移機制。簡言之，在特定激發波長下激發供體螢光團分子。在供體分子返回至其基態時自其之後續發射可將激發能轉移至受體分子（藉由長程偶極子-偶極子相互作用）。FRET為一種如分子信標下所見，可用於定量例如DNA-DNA相互作用中之分子動力學之有用工具。為監測特異性產物之產生，可在一個末端用供體分子標記探針且在另一末端用受體分子標記探針。探針-偵測目標雜交引起供體及受體之距離或方向之變化且觀察到FRET特性之變化。（Joseph R. Lakowicz. 「Principles of Fluorescent Spectroscopy」, Plenum Publishing Corporation, 第2版(1999年7月1日)）。

【0091】 亦可藉由橫流裝置偵測及監測偵測目標核酸之產生或存在。橫流裝置為熟知的。此等裝置一般包括流體可穿透之固相流徑，流體藉由毛細管力流過該流徑。實例包括但不限於試紙分析法及具有不同合適塗層之薄層層析板。樣品之各種結合試劑、樣品之結合搭配物或涉及結合搭配物之結合物及信號產生系統固定於流徑中或流徑上。可以包括以下之若干不同方式實現分析物之偵測：酶偵測、電化學偵測、奈米粒子偵測、比色偵測及螢光偵測。酶偵測可涉及酶標記探針，該等探針雜交至橫流裝置之表面上之互補或實質上互補核酸偵測目標。所產生之複合物可用合適標記物處理以產生可讀信號。奈米粒子偵測涉及珠粒技術，該技術可使用膠體金、乳膠及順磁奈米粒子。在一個實例中，珠粒可結合至抗生物素抗體。目標序列可直接經生物素標記，或目標序列可雜交至序列特異性生物素標記探針。金及乳膠產生肉眼可見之比色信號且順磁粒子在磁場中經激發時產生不可見信號且可藉由專用讀取器解譯。

【0092】 基於螢光之橫流偵測方法亦為已知的，例如雙螢光素及生物素標記之寡核苷酸探針方法或量子點之使用。

【0093】 亦可在橫流裝置上捕獲核酸。捕獲手段可包括抗體依賴性及非

抗體依賴性方法。非抗體依賴性捕獲一般使用兩個結合搭配物之間的非共價相互作用，例如生物素標記探針與抗生蛋白鏈菌素捕獲分子之間的高親和力及不可逆鍵。捕獲探針可直接固定於橫流膜上。

【0094】 本發明之整個方法或至少方法之擴增方法部分可在反應容器（諸如例如來自Eppendorf[®]之習知實驗室塑膠試劑管）中進行或可在固體支撐物中及/或固體支撐物上進行。固體支撐物可為多孔或無孔的。在一特定具體實例中，固體支撐物可包含多孔膜材料（例如硝化纖維或類似物）。更尤其，固體支撐物可包含或形成多孔橫流分析裝置之一部分，如上文所述。可替代地，固體支撐物可包含或形成微流體型分析之一部分，其中一或多個固體窄孔毛細管套管用於沿分析裝置輸送液體。

【0095】 在較佳具體實例中，本發明之方法之所有或至少部分可使用定點照護（PoC）分析裝置進行。PoC裝置典型地具有以下特徵：造價便宜，在單次使用後拋棄，一般為整裝，不需要任何其他裝置或設備進行或解譯分析且理想地，使用不需要臨床知識或培訓。

【0096】 本發明之方法尤其適用於使用PoC型裝置之執行，因為在典型具體實例中，熱往復之較高溫度與較低溫度之間的溫度差異極小。因此，相比之下而言，相對簡單的熱往復/溫度調節足以進行qPCR。

【0097】 然而，本發明之擴增方法亦可代替qPCR用於基於實驗室之系統，而非PoC裝置，且可典型地比可藉由進行qPCR來達成之定量結果更加快速地實現定量結果。

【0098】 本文揭示適用於本發明之引子之實例。可適用於本發明之方法之其他實例尤其揭示於US 2009/0017453、US2013/0330777及EP 2,181,196中，其內容以引用的方式併入本文中。熟習此項技術者將容易能夠在無過度試驗下設計適合於其他目標序列之擴增之其他引子。

【0099】 如其他地方所解釋，本發明中使用之引子將較佳不僅包含目標互補部分，且亦包含切口核酸內切酶結合位點及切口位點，以及穩定部分。

【0100】 本發明之方法中使用之引子可包含經修飾之核苷酸（亦即在天然存在之核酸分子中未發現之核苷酸）。此類經修飾之核苷酸宜存在於引子之目標互補部分，及/或引子中之其他地方。經修飾之核苷酸之較佳實例為2'-修飾核苷酸，尤其2'O-甲基修飾核苷酸，儘管許多其他經修飾之核苷酸為熟習此項技術者所知。

【圖式簡單說明】

【0101】 現將藉助於說明性實例且參考附圖描述本發明之特徵，其中：

圖1A及圖1B為適合於進行本發明之方法之核酸擴增反應的分別起始階段及指數擴增階段之示意圖；

圖2係說明在執行本發明之方法期間反應混合物之典型的溫度分佈曲線之圖（以°C為單位之溫度相對於以分鐘為單位之時間）；

圖3係適用於執行本發明之方法之引子寡核苷酸分子的典型具體實例之示意圖；

圖4-5C係使用不含或包含不同數目個2'O-甲基化鹼基之引子分子，根據本發明之方法進行之擴增反應的（減去背景之）螢光（任意單位）對時間（秒）之圖。

圖6係散佈圖，其展示針對根據本發明之方法（左側曲線），及根據揭示於WO2018/002649中之STAR方案進行之方法（中間曲線），或等溫反應方案（右側曲線），如藉由產生高於背景臨限值之螢光信號判斷，實現擴增之平均時間（ A_T ，以分鐘為單位）；

圖7及8係分別用於表徵本發明之方法之聚合酶活性分析及切口活性分析的

示意性圖示；

圖9A及圖9B係在各種溫度下進行之聚合酶活性分析（圖9A）或切口活性分析（圖9B）之相對螢光（任意單位）對時間（以分鐘為單位）的（三種複製物）平均值之圖；

圖10A-11D係使用習知PCR條件（圖10A、10B）或根據本發明之「qSTAR」熱往復條件但在無切口酶存在下（圖11A-11D），相對螢光（任意單位）對使用各種不同聚合酶嘗試之擴增反應之循環次數之圖；

圖12及13展示使用未知濃度之起始樣品，執行習知qPCR擴增（圖12）或根據本發明之方法之「qSTAR」擴增（圖13）獲得的資料，其中結果概述在圖13B中；

圖14A-14D係螢光（任意單位）對時間（秒）之圖，其展示在不同溫度範圍內根據本發明之方法進行之擴增反應的結果；

圖15係螢光（任意單位）對時間（分鐘）之圖，其展示在38-45°C範圍內之溫度下根據本發明之方法進行的擴增反應之結果；且

圖16係螢光（任意單位）對時間（分鐘）之圖，其展示使用逆轉錄RNA目標序列，根據本發明之方法進行之擴增反應的結果。

【實施方式】

實施例

實施例1：用於測試定量選擇性溫度擴增反應（qSTAR）之方案

【0102】 藉由如WO2018/002649中所描述之選擇性溫度擴增反應（STAR），或其他類似地相關DNA/RNA擴增技術（諸如PCR、SDA或等溫擴增技術）定量基因表現最多將為不可靠的。所產生之產物量將達到平穩段，其不與初始起始樣品中之目標DNA量直接相關。藉由建立受控制之溫度往復對擴

增反應之區域性影響，定量擴增可利用股置換聚合酶及切口核酸內切酶實現，其中擴增產物與DNA、RNA或其他已知核酸之初始起始量直接相關。根據本發明之基於切口酶之選擇性溫度擴增反應在本文中稱為定量選擇性溫度擴增反應（qSTAR）。除非另外指出，否則下文進一步描述方案。

酶、寡核苷酸及目標

【0103】 沙眼披衣菌 (*Chlamydia trachomatis*) (Ct) 用作用於研發STAR機制之初始目標。沙眼披衣菌血清變型J (ATCC VR-886) 基因體DNA自美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 獲得。隱蔽性質體之開放閱讀框架6區用引子qSTARctF61a (SEQ ID NO:1 5'-CGACTCCATATGGAGTCGATTTCCCCGAATTA-3') 及qSTARctR61c (SEQ ID NO: 2 5'-GGACTCCACACGGAGTCTTTTTCCTTGTTTAC-3') 擴增。所產生之DNA模板使用分子信標qSTARctMB1 (SEQ ID NO:3, 5'-FAM/ccattCCTTGTTTACTCGTATTTTTAGGaatgg/BHQ1-3') 偵測，如EP第0728218號中所描述。Bst X DNA聚合酶購自Qiagen (Beverly, MA)。Nt.BstNBI切口核酸內切酶購自New England BioLabs (Ipswich, MA) 且描述於美國專利第6,191,267中。除非另外說明，否則亦將相同聚合酶及切口核酸內切酶用於本文中所述之其他實例中。

【0104】 寡核苷酸及分子信標藉由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 及Bio-Synthesis (Lewisville, TX) 合成。用於qSTAR反應之引子之一般特徵如WO2018/002649中所描述。

【0105】 在本發明之一個具體實例中之反應中發現的寡核苷酸及擴增機制之概述包含 (i) 目標核酸分子；(ii) 兩個或更多個引子寡核苷酸分子，其包含一定數目之與目標核酸分子互補之寡核苷酸及 (iii) 可由切口酶切刻之引

子內的位點。該方法涉及使目標核酸分子與聚合酶、兩個或更多個引子寡核苷酸（其各自特異性結合於目標核苷酸分子上之互補序列）及切口酶在選擇性溫度擴增條件下接觸，從而產生包含與引子寡核苷酸結合之目標序列之至少一部分的可偵測擴增子。可理解總體qSTAR反應經歷兩個不同階段：起始及指數擴增，其分別在圖1A及1B中示意性地說明。起始階段為蛋白質-引子雙螺旋體之初始形成，自蛋白質-引子雙螺旋體中可出現指數擴增之初始延伸。指數階段係切口酶以及聚合酶變得具有活性從而導致指數擴增之時間。在圖1A中，發生引子與目標核酸之初始接觸（步驟a），之後為聚合酶延伸（步驟b），其產生正向起始模板（c）。相反股引子結合（步驟d）至新產生之正向起始模板，沿朝向起始模板之切口位點之方向延伸（步驟e）且穿過起始模板之切口位點。此起始可在正向及反向股兩者上同時發生。此起始方法可理解為主要涉及聚合酶延伸，但基本上很少或不涉及切口酶。

【0106】 在圖1A中，目標展示為係單股。此係出於清楚及簡化之目的。實際上，在無需使用高溫『熔融』或分離雙股目標聚核苷酸之股的情況下進行本發明之方法-相反地，引子能夠藉由利用股之間的氫鍵鍵合之局部弛豫與（雙股）目標分子締合-稱為「呼吸」之現象。

【0107】 在（在此具體實例中，較低的）第二選擇性溫度下，切口對任一股有利，使得股置換聚合酶朝向相反引子延伸且穿過切口位點。此切口/聚合酶延伸之循環導致形成指數雙螺旋體（圖1B）。在由切口及延伸產生之各新模板變為另一引子之目標時，此指數雙螺旋體隨後饋入雙向擴增。溫度往復回到聚合酶特異性延伸之起始階段，從而限制背景擴增且控制離散階段中之指數擴增。

【0108】 藉由控制溫度，及因此激活聚合酶及切口核酸內切酶，本申請人已實現一種用於快速及受控制之擴增，以允許定量未知之目標輸入之方法。

【0109】 圖2展示根據本發明之擴增反應之一個具體實例之典型的溫度分佈（對以分鐘為單位之時間之 $^{\circ}\text{C}$ ）。在所說明之具體實例中，聚合酶之最佳溫度高於切口酶之最佳溫度。較高溫度係 63°C ，較低溫度係 57°C 。在較低溫度下之停留時間（約5秒）長於在較高溫度下之停留時間（約2秒）。各完整的溫度往復持續約8至9秒，使得每分鐘完成大約7次熱往復。在往復之一半較高溫度（ $>60^{\circ}\text{C}$ ）下，反應之起始階段（參見圖1B）係有利及佔優勢的。熟習此項技術者將瞭解，擴增反應之兩個階段之間不存在明顯的溫度區別，且圖2中所說明之分隔線僅幫助理解。

【0110】 定量選擇性溫度擴增之方法意外導致定量、快速、特異性及高產率擴增反應，性能顯著高於先前之現有方法，如下文將更詳細地解釋及說明。

擴增條件

【0111】 基礎qSTAR混合物含有兩個引子、聚合酶及切口酶（參考上文）。以 $25\ \mu\text{l}$ 之最終體積進行反應，該最終體積包括 $1.0\ \mu\text{M}$ 正向引子、 $0.5\ \mu\text{M}$ 反向引子、 $0.25\ \mu\text{M}$ 分子信標、 $10\ \mu\text{l}$ qSTAR主混合物及 $5\ \mu\text{l}$ DNA樣品。qSTAR主混合物含有以下試劑： $12.5\ \text{mM}$ MgSO_4 、 $90\ \text{mM}$ Tris-HCl（pH 8.5）、 $300\ \mu\text{M}$ 各種dNTP、 $20\ \text{mM}$ NH_4OAc 、 $30\ \text{mM}$ NaOAc 、 $2\ \text{mM}$ DTT、 0.02% Triton X-100、 $15\ \text{U}$ 切口核酸內切酶及 $60\ \text{U}$ 聚合酶。控制兩個離散溫度階段之間的反應溫度以利用固有的酶活性。主要由聚合酶活性組成之起始階段處於 62°C 之高溫下持續兩秒。（在此溫度下，切口酶受到很大程度的抑制-參見圖9B）。其中聚合酶及切口酶兩者具有中度或高度活性之指數階段保持在 57°C 下持續五秒。完整往復的總時間為15秒。此因設備改變溫度之限制係使各種溫度下之停留時間的超過兩倍（反應更快的儀器將允許較高溫度與較低溫度之間更快的往復）。

擴增及qSTAR產物偵測係使用Agilent Mx3005 P qPCR設備（Agilent）進行。

【0112】 每個反應具有預培育以允許試劑達到反應溫度且測試溫度對擴增動力學、酶性能及信號螢光之影響。

擴增程序

【0113】 進行擴增反應之確切步驟如下：1) 製備主混合物；2) 製備具有目標或不具有目標之引子；3) 視每個板將進行之反應數目而定，將引子混合物添加至96孔板之列A至列G；4) 將主混合物添加至同一96孔板之列H；5) 密封板且進行預反應培育，持續15秒；6) 將主混合物自列H轉移至各引子混合物列；7) 密封且起始預先選擇之溫度分佈曲線及收集資料。

【0114】 在反應期間，使用如下所述之分子信標在每個指數階段結束時量測擴增產物。監測反應混合物中之分子信標之螢光以量測在反應期間產生之特異性產物的量，該特異性產物與使螢光團與淬滅劑分離之分子信標結合，從而產生螢光。

實施例2：使用未經修飾之引子之結果

【0115】 為證明此新穎的擴增技術之可能性，在6對數之基因體DNA輸入中使用每種目標稀釋液之四種複製物，及對應無目標對照物（NTC）之兩種複製物進行qSTAR。使用未經修飾之引子（亦即不含任何經化學修飾之異常核酸鹼基的引子分子）之實驗的結果展示於圖4中。「無目標對照」之信號（減去背景之螢光）量藉由黑線（「ntc」）指示。在20 cp、200 cp、2 k、20 k、200 k及2M目標（沙眼衣原體之基因體DNA）複本存在下產生之信號量藉由各別線指示。

【0116】 qSTAR反應呈現目標輸入之線性決定係數，同時亦顯示速度、

靈敏性及總螢光之改善。出人意料且未預期地，目標輸入之間的此類改善及分離可藉由控制兩個閉合但顯著不同的溫度區之間的反應溫度來達成。

【0117】 部將本發明人限制於任何特定理論，感信擴增改善可歸因於至少兩個特徵。在大多數核酸擴增反應中，最終形成引子二聚體，競爭有限試劑且在低目標濃度時，引子二聚體可變為反應之主要擴增途徑。限制或延遲引子二聚體之形成，即使較少量，亦提供顯著益處。由於擴增反應之快速性，所以延遲引子-二聚體形成允許較佳擴增途徑成為有利的（亦即模板產生），改良擴增之所有態樣。藉由在高溫下起始反應，此等模板途徑變為有利的且甚至較佳。此體現在qSTAR方法中提高之靈敏度、提高之螢光信號、更緊密之複製物及提高之速度。

【0118】 在起始階段期間，反應在高溫62°C下進行。此高溫選擇性地抑制切口酶而在功能上不會對其持久性損壞（如在其他地方描述，結合擴增及圖9B所展示）。在此起始階段期間，聚合酶為相對有利的，其允許快速及特異性延伸，因為反應溫度相對接近於聚合酶之最佳溫度。

【0119】 在反應之起始階段之後，溫度降低至更接近切口酶之最佳溫度之溫度，造成效率提高並允許模板之產生增加。因為所需模板路徑相比於錯誤路徑有利，所以特異性及靈敏性極大提高，其藉由qSTAR之溫度往復及酶之選擇性活性調節進一步促進。

【0120】 反應混合物在62與57°C之間連續往復，以得到可用於精確定量之受控制之快速擴增技術。

【0121】 本發明之新穎的非等溫擴增方法相比於許多類型之現有擴增反應（包括等溫反應及依賴於雙螺旋體解離之高溫之彼等擴增反應）提供顯著改善。藉由「溫度閘控」控制酶活性及優化反應動力學，本發明之方法具有改善之擴增一致性及控制，同時提高偵測之靈敏性，以允許可靠及精確定量。

實施例3：使用經2' O-甲基修飾之引子之結果

【0122】 如美國專利6,794,142及6,130,038中所描述，已知使用2' O-甲基修飾之引子可減少擴增期間之引子二聚體形成。US 2005-0059003描述位於SDA引子之3'端處之2' O-甲基修飾的使用，表明Bst DNA聚合酶I及衍生物可將2'修飾核糖核苷酸有效作用於DNA合成之引子。包含一或多個2'修飾核苷酸（例如2'-O-甲基、2'-甲氧基乙氧基、2'-氟基、2'-烯丙基、2'-O-[2(甲胺基)-2-側氧基乙基]、2'-羥基(RNA)、4'-硫基、4'-CH₃-O-2'-橋、4'-(CH₃)₃-O-2'-橋、2'-LN A及2'-O-(N-胺基甲酸甲酯2'-Suc-OH)之目標特異性引子區應提高擴增反應。使用如前述實施例中所描述之酶選擇性溫度往復（62-57°C）以及朝向引子之3'定位之單一2'-O-甲基化鹼基或一串2'-O-甲基化鹼基進行反應（在圖3中示意性地說明）。

【0123】 使用包含在3'端處之一或多個經2'修飾之核苷酸的引子之擴增結果展示於圖5A-5C中。在所有五種對數輸入gDNA濃度內使用最少四種複製物，連同無目標對照反應進行反應。如所顯示，反應在整個五對數範圍內為定量的，決定係數超過0.99（為簡潔起見忽略資料）。藉由使用如Pfaffl在「A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR」，（2001, Nucl. Acids Res. 29 (9) e45）中所描述之類似方法計算決定係數。擴增之指數階段EP之起點係藉由鑑別EP開始高於背景螢光之位置測定。背景螢光係藉由對各反應之前三個讀數取平均值來計算。隨後基於各反應之相對螢光達到2,000之時間判定EP。使用各反應之已知輸入，使用線性回歸演算法以測定所有對數值之決定係數來評估EP。產生此標準曲線且計算線性，典型地qSTAR反應產生值為99或更大之R²。

【0124】 資料顯示（圖5A），使用合併單一2'O-甲基化核苷酸之引子阻

止擴增反應，從而減緩反應速度，實現在所有輸入濃度內更佳的解析度。另外，使用qSTAR方法不僅改善2' O-甲基擴增之使用，而且其說明利用已知擴增修飾之方法之功能性。如圖5B及5C中所示，沿引子合併額外的2'O-甲基化鹼基促進擴增之分離，或自基線之上升，從而允許較大的解析度，提高技術之定量能力。本質上，各濃度之間的分離藉由減緩由使用2'O -甲基化鹼基引起之反應來改善：例如，在使用未經修飾之引子時自基線之上升具有一個循環分離的反應在使用併入2'o-甲基化鹼基之引子時展示2個循環分離。此表明儘管2' O-甲基修飾減少本發明之例示方法中之非特異性錯誤擴增的產生，此等修飾之更大益處為控制反應速率以容許更大的解析度及更多的定量擴增。

【0125】 不將申請人限制於任何特定理論，假設藉由在引子區中使用一或多個2'修飾核苷酸所獲得之潛在改良主要是因為擴增之起始階段之增強。在起始延伸階段期間，兩個事件有助於解釋在本發明之擴增反應中2'修飾核苷酸之活性。首先，已知2'O-甲基化鹼基降低DNA/DNA雙螺旋體之熔融溫度，導致因傾向於抑制模板:模板相互作用而更加受控之起始，藉此降低由引子之間的相互作用形成之非特異性複合物之聚合酶延伸的機率。其次，聚合酶有可能在核苷酸進入結合袋時停止。在非產生性反應（亦即，脫靶或引子二聚體形成）中，因為模板結合接近其熔融溫度，所以停止效應足以使異常延伸最小化。因此，因為反應已陷入困境，所以2'修飾能夠限制不合需要之擴增途徑。qSTAR能夠利用2'修飾且更佳地調節目標擴增以調節反應，從而實現提高的定量能力。此聚合酶停止進一步解釋qSTAR結合2' O-甲基修飾改良彼此之原因。在本發明之例示方法中發現之起始聚合酶溫度區除減少引子二聚體形成以外，亦以受控及可靠之方式減緩起始。此外，因為qSTAR重複往復至較低溫度，所以由2'修飾引起之熔融溫度之降低可隨著反應進行而削減。

實施例4：可再生性

【0126】 為了驗證qSTAR技術，進行大型複製研究，比較qSTAR性能對STAR之性能以及如美國專利9,562,263中所描述之其他公開之等溫條件。對於含有目標之反應使用100+複製物且對於不含目標之對照反應混合物使用16個複製物來進行擴增（qSTAR對比STAR對比等溫）。所有條件均使用相同緩衝液、聚合酶、切口酶及目標。如圖6中之散佈圖所示，qSTAR及STAR擴增展示：相比於等溫擴增反應，實現擴增至螢光之臨限值準（TL）之平均時間（ A_T ）明顯提高、靈敏度提高及複製物之間的標準差減小。根據本發明進行之反應之 A_T 時間為2.38分鐘，而根據習知等溫方案進行之反應之 A_T 值為4.12分鐘，該差值為統計學上顯著的（雙尾檢驗）。（注意-失敗反應展示為具有10分鐘之擴增時間-反應進行之最大時間）。此外，qSTAR方法就速度而言係相比於STAR方法之改善。qSTAR技術展現最緊密之複製物、最高的靈敏性、最快的擴增以及最少的離群值數目。不將申請人限制於任何特定理論，認為擴增時間之顯著降低係由於反應之起始得到改善，從而允許更有效之低複本擴增，最小化引子-二聚體事件，及增加之特異性產物延伸，其允許產物產生比先前所揭示之方法更快。更緊密之複製物係藉由利用切口酶及聚合酶之活性來達成，該切口酶及聚合酶之活性產生所需模板之特異性、快速及受控擴增之多倍幾率。

實施例5：qSTAR功能性

【0127】 本發明方法之典型特徵包含藉由在擴增方法期間使用較小溫度變化調節酶活性，該等溫度變化遠小於比如在qPCR運行期間進行之變化。為了驗證切口酶在起始階段期間具有降低之活性，而又在指數階段期間具有高活性，本發明人已開發兩個獨特的蛋白質活性分析：聚合酶活性分析（polymerase activity assay，「PAA」），及切口活性分析（nicking activity

assay, 「NAA」)。

聚合酶活性分析設計、酶及寡核苷酸：

【0128】 用於PAA之合成寡核苷酸係藉由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 合成。設計由三種寡核苷酸組成：模板寡核苷酸 (NEF)，(SEQ ID NO: 3 5'-/56-FAM/ACCGCGCGCACCGAGTCTGTCGGCAGCACCGCT-3')；啟動寡核苷酸 (priming oligo, PO)，(SEQ ID NO: 4 5'-AGCGGTGCTGCCGACA-3')；及淬滅寡核苷酸 (quenching oligo, POQ)，(SEQ ID NO: 5 5'-GGTGCGCGCGGT/3BHQ_1/-3')。此等三種寡核苷酸共同在溶液中形成複合物，其各自具有獨特的官能團，如圖7中所示。NEF具有5'螢光團，POQ具有3'淬滅部分，其吸收由5'模板寡核苷酸螢光團釋放之光子。PO充當股置換聚合酶之起始位點以延伸且取代淬滅寡核苷酸，從而允許因淬滅寡核苷酸不再接近模板寡核苷酸而產生螢光。高活性股置換聚合酶相比於活性較小之聚合酶或缺乏立置換活性之彼等以提高之速率產生螢光信號。

聚合酶活性分析條件

【0129】 基礎聚合酶活性分析 (PAA) 混合物含有具有5'-FAM修飾之模板寡核苷酸 (NEF)、黏接至模板之3-端之啟動寡核苷酸 (PO)、黏接至模板之5'-端之具有3'-BHQ1修飾的淬滅寡核苷酸 (POQ)，及受測試之聚合酶 (參考上文)。在25 μ l之最終體積中進行反應，該最終體積包括0.2 μ M NEF、0.3 μ M PO、0.7 μ M POQ及1X PAA主混合物。在1 \times 濃度下，PAA主混合物含有以下試劑：12.5 mM MgSO₄、90 mM Tris-HCl (pH 8.5)、300 μ M各種dNTP、15 mM NH₄CH₃CO₂、15 mM Na₂SO₄、5 mM DTT、0.2 mg/ml BSA、0.02% Triton X-100、20 mM Rb₂SO₄、10 mM L-蘇胺酸及0.03 U/ μ l聚合酶。等溫進行反應以

測定在特定溫度下所選擇酶之活性。使用Mx3005P qPCR設備 (Agilent) 進行PAA。各反應具有反應前培育以使試劑達到溫度從而測試所選擇溫度之影響且防止隨反應加熱而出現任何變化。各反應評定擴增動力學、酶性能及信號螢光。

切口活性分析 (NAA) 設計、酶及寡核苷酸：

【0130】 用於NAA之合成寡核苷酸係藉由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 合成。該分析涉及兩種寡核苷酸：模板寡核苷酸 (NEQ)，(SEQ ID NO: 6 5'-ACCGCGCGCACCGAGTCTGTCTGGCA/3BHQ_1/-3') 及啟動寡核苷酸 (POF, SEQ ID NO: 7 5'-/56-FAM/CTGCCGACAGACTCGGTGCGCGCGGT-3')。此等寡核苷酸共同在溶液中形成複合物，其各自具有獨特的官能團，如圖8中所示。模板寡核苷酸具有實現切口核酸內切酶活性之切口位點及位於下游的3'淬滅劑。啟動寡核苷酸具有互補切口位點序列及5'螢光團。在溶液中時，兩者形成複合物，其完成允許切割切口核酸內切酶之切口結合位點。切口位點之寡核苷酸淬滅劑3' (之後為藉由切口核酸內切酶產生之切口) 現在具有低熔點溫度。因為在高於此熔融溫度下進行反應，所以自複合物釋放含有淬滅劑之截短片段，產生未淬滅之螢光。切口酶活性愈高，產生螢光信號愈快且愈強。

切口活性分析條件

【0131】 基礎NAA混合物含有具有3'-BHQ1修飾之模板寡核苷酸 (NEQ)，及黏接至模板之具有5'-FAM修飾之啟動寡核苷酸 (POF)，及待測試之切口核酸內切酶。在25 μ l之最終體積中進行反應，該最終體積包括1.3 μ M NEQ、1.6 μ M POF及1X NAA主混合物。在1 \times 濃度下，NAA主混合物含有以下

試劑：12.5 mM MgSO₄、90 mM Tris-HCl (pH 8.5)、15 mM NH₄CH₃CO₂、15 mM Na₂SO₄、5 mM DTT、0.2 mg/ml BSA、0.02% Triton X-100、20 mM Rb₂SO₄、10 mM L-蘇胺酸及0.008 U/μl切口核酸內切酶。等溫進行反應以測定在特定溫度下所選擇酶之活性。使用Agilent Mx3005P qPCR設備 (Agilent) 進行NAA。各反應具有反應前培育以使試劑達到溫度從而測試所選擇溫度之影響且防止隨反應加熱而出現任何變化。各反應評定擴增動力學、酶性能及信號螢光。

酶之溫度分佈

【0132】 圖9A展示六種等溫條件之聚合酶活性分析。在63°C下，聚合酶具有最強的活性及動力學，如藉由螢光曲線之斜率及總螢光所測定。在溫度60°C、55°C、50°C及45°C下之各後續下降展示活性之降低，直至在40°C下為止。在此低溫下，聚合酶之活性表現為實質上不存在的。

【0133】 圖9B展示六種等溫條件之切口活性分析。聚合酶分析展示朝向qSTAR方法之溫度之較佳範圍的頂端之明顯的最佳溫度，不同於該聚合酶分析，切口活性分析展示朝向qSTAR方法之溫度之較佳範圍的下端之最佳值（約55°C），同時在63°C下顯示極小活性或無活性。所有其他溫度展示切口酶之一定水準之活性。

【0134】 此等分析之資料顯示qSTAR技術之獨特性質。不同於依賴於股置換及/或溫度分離之其他擴增方法，qSTAR獨特地使用「溫度閘控」調節酶活性且控制快速擴增。識別此等酶之獨特特徵及有活性之溫度依賴性，本發明人已開發一種可在六分鐘下定量未知樣品輸入之新型快速、特異性、受控之擴增技術。

【0135】 不受任何特定理論束縛，咸信在此實施例中，qSTAR涉及切口

酶在兩個溫度之間擴增時之活性調節。63°C及57°C係上文所描述之例示系統中之較佳溫度選擇（基於當前蛋白質活性特徵），因為其允許受控之擴增，此為任何定量技術之需求。進一步咸信，需要控制任一酶之活性以控制已知的有效擴增事件，用以定量未知的核酸材料。

實施例6：使用qPCR聚合酶之qSTAR擴增結果

【0136】 為說明qSTAR相比於其他擴增技術（諸如PCR）之未預期特性，進行常見PCR聚合酶之比較，顯示常見PCR聚合酶及方法在qSTAR方法中不活化。將四種PCR聚合酶：Vent、Deep Vent、Taq及Phusion用於如下所述之qPCR方法中之擴增，且比較qSTAR方法。因為分子信標僅量測特異性單股DNA產物之總量之增加，所以未量測與預期擴增產物無關之非特異性擴增產物。為量測所有擴增產物（例如包括由引子二聚體形成產生之彼等）之產生，在SYBR Green I存在下進行反應。SYBR Green I為已知用於偵測單股DNA、RNA及雙股DNA之最敏感染料之一。因為SYBR Green I具有低內源螢光，所以偵測反應中之總特異性及非特異性擴增係良好選擇，以表明常見PCR聚合酶在qSTAR方法中不活化。

qPCR/qSTAR分析設計、主混合物及寡核苷酸：

【0137】 用於自產qPCR分析（Ctx）之合成寡核苷酸係藉由Integrated DNA Technologies（Coralville, IA）合成且設計用於沙眼披衣菌基因體DNA之擴增。該設計由兩種寡核苷酸組成：正向啟動寡核苷酸（Ctx_L.F1, SEQ ID NO: 8 AAAAAGATTTCCCCGAATTAG），及反向啟動寡核苷酸（Ctx_L.R1_3'(-2), SEQ ID NO: 9 AGTTACTTTTTTCCTTGTTT）。寡核苷酸係藉由Integrated DNA Technologies（Coralville, IA）合成。使用SYBR Green I核酸染色（Lonza

Rockland公司 P/N 50513) 作為用於偵測雙股DNA (dsDNA) 產物之嵌入染料。所使用之PCR主混合物及聚合酶來自新英格蘭生物實驗室 (Ipswich, MA) ; 10X Thermopol反應緩衝液、Vent (exo-) DNA聚合酶 (P/N M0257S) 、Deep Vent (exo-) (P/N M0257S) 及Taq DNA聚合酶 (P/N M0267S) 、5X Phusion HF緩衝液，及Phusion HFDNA聚合酶 (P/N M0530S) 。沙眼披衣菌 (菌株: UW-36/Cx) (P/N VR-886D) 之基因體DNA經由ATCC (弗吉尼亞州馬納薩斯) 購得。

qPCR/qSTAR分析條件

【0138】 基礎自產qPCR分析 (Ctx) 混合物含有正向引子寡核苷酸、反向引子寡核苷酸、dsDNA嵌入染料、已知濃度之基因體DNA模板、1X濃度之商業PCR主混合物及其對應的聚合酶 (上文所提及) 。在25 μ l之最終體積中進行反應，該最終體積包括0.3 μ M F1、0.3 μ M R1、0.1X SYBR Green I、1X商業PCR主混合物、0.03 U/ μ l及5,000複本之基因體DNA模板。

【0139】 使用2種方法進行自產的qPCR分析：溫度分佈複製qSTAR技術或習知qPCR之彼者。在qSTAR方法中，控制兩個離散溫度之間的反應溫度以利用酶活性。起始階段實質上 (僅聚合酶活性) 處於62°C之高溫下持續兩秒。指數階段 (聚合酶及切口酶活性) 更接近在57°C下之切口酶之活性之最佳溫度，持續五秒。完整往復之總時間為15秒，該總時間因設備在改變溫度方面之限制超過在最大溫度及最小溫度下之停留時間的兩倍。使用2步驟程序進行qPCR反應；在95°C下持續十五秒，之後為在60°C下持續六十秒，循環50次。擴增及qSTAR產物偵測係使用Agilent Mx3005 P qPCR設備 (Agilent) 進行。

結果

【0140】 在圖10A-B中展示五千個複本之基因體沙眼披衣菌DNA相比於無目標對照（「ntc」）之qPCR擴增之實時資料。明顯發現使用此qPCR方法之所有聚合酶之擴增或活性。亦應注意，四種聚合酶中之三種在無目標條件下展示活性，此可能歸因於引子二聚體形成。若qSTAR方法類似於qPCR或先前報導之熱循環擴增技術，則吾人將預期使用qSTAR方法，所有或此等聚合酶中之最少一者具有活性。

【0141】 在圖11A-11D中，實時資料顯示在qSTAR溫度往復方案下，所有四種前述聚合酶在不含目標或使用10個、100個、1K個、10K個複本之基因體沙眼披衣菌DNA之反應中無法展示任何活性。出人意料地，此等聚合酶中無一者（所有者均在其最佳溫度範圍下使用）能夠在培育過程期間展示即使少量之活性。不將本發明人限制於任何特定理論，咸信此歸因於以下各者：（a）qSTAR條件需要設置換聚合酶結合切口酶起作用；在無此酶組合下，擴增無法進行，因為產物轉化無法進行；及（b）PCR及其他循環方法依賴於高溫（約95℃）以股分離擴增子從而實現擴增進展；因為qSTAR方法不使用此類高溫且實際上使用更加適中之溫度往復以控制酶活性（而非股分離），所以其可幫助解釋此等酶中任一者在qSTAR方案條件中無法展示任何活性。

實施例7：qSTAR相比於qPCR結果

【0142】 為說明qSTAR之定量性質，使其與qPCR進行比較。若qSTAR為定量的，則吾人將預期該技術具有高決定係數，且相比於qPCR能夠正確預測盲目樣品中之基因體DNA量。

沙眼衣原體qPCR分析設計、主混合物及寡核苷酸：

【0143】 設計（1）用於沙眼衣原體qPCR分析（CtP）之合成寡核苷酸以

用於擴增沙眼披衣菌基因體DNA。該分析涉及使用三種寡核苷酸：正向啟動寡核苷酸、反向啟動寡核苷酸及雙重標記探針。寡核苷酸係藉由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 合成。所使用之PCR主混合物PrimeTime基因表現主混合物 (P/N 1055770) 購自Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)。沙眼披衣菌 (菌株：UW-36/Cx) (P/N VR-886D) 之基因體DNA經由ATCC (弗吉尼亞州馬納薩斯) 購得。

沙眼衣原體qPCR分析條件

【0144】 基礎qPCR分析 (CtP) 混合物含有兩種引子-聚合酶及基因體DNA。在25 μ l之最終體積中進行反應，該最終體積包括0.3 μ M正向引子、0.3 μ M反向引子、0.1 μ M雙重標記探針、1X商業PCR主混合物及各種濃度之以100,000個複本為起始物質之基因體DNA模板。使用基因體DNA之10倍稀釋液產生標準曲線。連同以上標準曲線如先前描述進行qSTAR。使用2步驟程序進行qPCR反應；在95°C下持續十五秒，之後為在60°C下持續六十秒，循環50次。

結果

【0145】 圖12展示標準曲線及5種未知樣品之qPCR實時資料。在5對數範圍內，標準曲線之決定係數為0.9984。qPCR能夠正確識別所有五種未知樣品。圖13展示標準曲線及五種未知樣品之qSTAR實時資料。在6對數範圍內，標準曲線之決定係數為0.9981。qSTAR能夠正確識別所有五種未知樣品。表2展示兩種技術之概述比較，自概述顯而易見的，當使用該技術定量時，qSTAR與qPCR相當。

表2

樣品	添加之複本數	qPCR估計之複本數	qSTAR估計之複本數
UNK01	250	114	276
UNK02	50000	45848	75699
UNK03	0	0	0
UNK04	100000	96886	140611
UNK05	8000	5816	10630

實施例8：qSTAR高溫範圍

【0146】 qSTAR技術之另一益處係能夠在各種溫度範圍內擴增。如美國專利第5,712,124號、第9,562,263號、第5,399,391號及第6,814,943號中所描述，大多數技術具有緊密的可發生擴增之溫度範圍，且偏離此等範圍會抑制反應。為表明qSTAR之通用性，如下表3中所描述進行擴增。

表3

qSTAR條件 起始階段	時間	指數階段	時間
63°C	1秒	57°C	5秒
64°C	1秒	57°C	5秒
65°C	1秒	57°C	5秒
66°C	1秒	57°C	5秒

【0147】 圖14A、14B、14C及14D為螢光（任意單位）對時間（分鐘）之曲線。圖14A展示在63°C下開始之反應的結果。圖14B展示在64°C下開始之反應的結果。圖14C展示在65°C下開始之反應的結果且圖14D展示在66°C下開始之反應的結果。在所有情況下，「無目標」陰性對照反應未產生任何螢光信號，而對於10個、100個及1,000個複本存在良好的擴增。儘管63°C反應之螢光信號略微較高，但所有溫度條件皆在少於3分鐘內展現強烈的擴增。只要實現酶調節，qSTAR方法即可良好擴增。感信高於62°C之任何溫度顯著降低切口酶活性（就例示切口酶Nt. Bst NBI而言）。

實施例9：已知溫度範圍外之qSTAR

【0148】 如美國專利6,814,943中所描述之定量聚合酶鏈反應（qPCR）描述用於熱循環之溫度範圍。典型地，對於qPCR，進行以下程序：在約95°C變性，在約55°C黏接，在約70°C延伸。若技術可在明顯不同的溫度區中擴增，則將為出人意料且未預期的。此外，瞭解此項技術中之個體不會預期所研究之技術之此類較大溫度窗口。WO 2011/030145A1描述「擺動」，其中分析溫度圍繞所公開之等溫溫度設定點不超過15°C，但更佳地約5°C振盪。一些等溫技術之此溫度「振盪」允許提高之擴增動力學。若qSTAR能夠在顯著不同的溫度範圍內起作用且仍實現擴增，則將為出人意料的。

擴增條件

【0149】 低溫qSTAR混合物含有兩種引子（SEQ ID NO. 10（5'-tGACTCCAcAcGGAGTCataaATCCTGCTGCMUA-3'）及SEQ ID NO. 11（5'-TGACTCCAcAcGGAGTCAGAACCAACAAGAAGA-3'）），由ArticZymes（Tromso, Norway）供應之Isopol聚合酶及切口酶（先前提及）。在25 µl之最終體積中進行反應，該最終體積包括1.0 µM之正向引子、0.5 µM之反向引子、0.25 µM分子信標（SEQ ID NO. 12（5'-/56-FAM/tgaggTGCTGCTATGCCTCA/3IABkFQ/-3'））、10 µl qSTAR主混合物及5 µl DNA樣品。qSTAR主混合物含有以下試劑：12.5 mM MgSO₄、90 mM Tris-HCl（pH 8.5）、300 µM各種dNTP、20 mM NH₄OAc、30 mM NaOAc、2 mM DTT、0.02% Triton X-100、12.5U切口核酸內切酶及75U聚合酶。控制兩個離散溫度階段之間的反應溫度以利用固有的酶活性。主要由聚合酶及切口活性組成之指數階段處於45°C之高溫下，持續兩秒。其中聚合酶具有高活性且切口酶具有極大降低之活性之起始階段保持在38°C下持續五秒。完整往復之總時間為15秒，該總時間因設備在改變溫度方面之限制超過在最大溫度及最小溫度下中之

每一者下之停留時間的兩倍。擴增及qSTAR產物偵測係使用Agilent Mx3005 P qPCR設備（Agilent）進行。

結果

【0150】 圖15展示在上文參考之範圍內qSTAR擴增之實時定量資料。應注意到之第一件事係，在此實施例中，相比於前述實施例，溫度階段已轉換：較高之溫度階段對應於指數擴增，其中兩種酶具有活性，而較低溫度對應於起始，其中聚合酶具有高活性且切口酶相對受到抑制。qSTAR與此類「低溫」qSTAR之間的溫度差為24°C。出人意料且未預期地，該技術可在此類較大溫度範圍內起作用且進一步說明此擴增方法不同於據本發明所知先前已知之任何擴增方法。

【0151】 不將本發明人限制於任何特定理論，咸信qSTAR在此等低溫下仍能夠實現擴增，因為切口酶活性在較低溫度下極大降低。此酶閘控允許模板之受控及精確的擴增且本發明人可設想許多方式，其中複合酶、引子及溫度流程可用於單一反應以獲得新型、快速及定量的結果。

實施例10：使用核糖核酸之結果

【0152】 qSTAR可使用DNA（cDNA及gDNA）、RNA（mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、微RNA）、RNA/DNA類似物、糖類似物、雜交體、聚醯胺核酸及其他已知類似物之任何組成，自任何核酸擴增。如下所述進行核糖體核糖核酸之擴增。

酶、寡核苷酸及目標：

【0153】 單核球增多性李氏菌（*Listeria monocytogenes*）用作用於發展

STAR RNA分析之目標。單核球增多性李氏菌（ATCC VR-886）基因體DNA自美國菌種保存中心（Manassas, VA）獲得。對gDNA進行初步篩選，且發現核糖體RNA之23S區用引子LMONF72 ACAC 5-OM（SEQ ID NO: 14，5'-GGACTCGACACCGAGTCCAGTTACGATTmTmGmTmTmG-3'）及LMONR86 ATAT（SEQ ID NO: 15，5'-gGACTCCATATGGAGTCCTACGGCTCCGCTTTT-3'）擴增。所產生之DNA模板使用分子信標LMONMB1（SEQ ID NO: 16，5'-FAM/gctgcGTTCCAATTCGCCTTTTTCGCagc/BHQ1-3'）偵測，如EP第0728218號中所描述。

【0154】 總RNA使用RNeasy Plus微型套組Qiagen（Hilden, Germany）組合Mini Bead Mill 4（VWR）上之快速機械溶解來分離。單核球增多性李氏菌（ATCC BAA-2660）自美國菌種保存中心（Manassas, VA）獲得，且藉由塗鋪在腦心浸液瓊脂板（BHI）上來再生。單菌落用於接種25 mL BHI培養基，其在37°C下生長18小時以達至生長停滯期。培養物隨後經反向稀釋於BHI於250 mL燒瓶中之兩個50 mL份中且在收穫之前生長另外四個小時。在5,000×g下持續15 min，自反向稀釋培養物之兩個30 mL等分試樣中收穫細菌。將丸粒再懸浮且合併於5 mL之RNAlater RNA穩定劑（Qiagen）中，且使其在室溫下培育10 min。收集細菌且再懸浮於5 mL之RLT溶解緩衝液細菌中，且在設定5（在脈衝之間3×30秒，一分鐘在冰上）下在Mini Bead Mill（VWR）上均質化。

【0155】 根據製造商之說明（Qiagen）純化總RNA。藉由使溶解產物通過設置於RNeasy Plus純化套組中之DNA結合管柱來移除基因體DNA。藉由在RNeasy RNA結合管柱上樣品進行管柱上核糖核酸酶游離DNA酶I（Qiagen）消化使基因體DNA污染進一步減少。Bst X DNA聚合酶購自Beverly Qiagen(Beverly, MA)。逆轉錄酶Omniscrypt購自Qiagen（Hilden, Germany）。Nt.BstNBI切口核酸內切酶購自New England BioLabs（Ipswich, MA），如美國

專利案第6,191,267中所描述。寡核苷酸及分子信標藉由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) 合成。

擴增條件：

【0156】 基礎qSTAR混合物含有如上文實施例1中所描述之所有事物，以及額外包括以下：4U之逆轉錄酶（參考上文）。

結果

【0157】 結果展示於圖16中，其為螢光（任意單位）對時間（分鐘）之圖。陰性對照反應未產生任何螢光信號，而100個、1,000個、10,000個、100,000個、1,000,000個複本數目標反應產生高於臨限值之螢光信號。結果展示qSTAR可自逆轉錄RNA靶中有效擴增。此外，資料指示其可用以定量未知之RNA樣品輸入。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 英商盧米瑞德克斯英國有限公司 (LumiraDx UK Ltd)

<120> 核酸擴增中的改良或與核酸擴增相關的改良

<130> MJL-774.01-L

<140> TW 108100164

<141> 2019-01-03

<150> GB1800109.9

<151> 2018-01-04

<160> 16

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

cgactccata tggagtcgat ttccccgaat ta

32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 2

ggactccaca cggagtccttt ttccttgttt ac

32

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 3
ccattccttg tttactcgta tttttaggaa tgg 33

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 4
accgcgcgca ccgagctctgt cggcagcacc gct 33

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 5
agcggtgctg ccgaca 16

<210> 6
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 6
ggtgcgcgcg gt 12

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 7

accgcgcgca ccgagtcctgt cggca 25

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 8

ctgccgacag actcgggtgcg cgcggt 26

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 9

aaaaagattt ccccgatta g 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 10

agttactttt tccttgttt 19

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 11

tgactccaca cggagtcata aatcctgctg cmua 34

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 12
tgactccaca cggagtcaga accaacaaga aga 33

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 13
tgaggtgctg ctatgcctca 20

<210> 14
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 14
ggactcgaca ccgagtcag ttacgatmt mgmtmtmg 38

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 15
ggactccata tggagtccta cggctccgct ttt 33

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 16

gctgcgttcc aattgcctt tttgcagc

29

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種進行非等溫核酸擴增反應之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 將目標序列與一或多個互補單股引子在允許該等引子雜交至目標之雜交事件之條件下混合，該雜交事件直接或間接引起雙螺旋體結構之形成，該雙螺旋體結構包含位於雙螺旋體之相對端 (opposite ends) 處或附近之兩個切口位點；且藉由以下進行擴增方法；

(b) 使用切口酶在該雙螺旋體之股中之該等切口位點的每一者處產生切口；

(c) 使用聚合酶來延伸切口股以形成新合成之核酸，利用該聚合酶之該延伸重新產生切口位點；

(d) 重複步驟 (b) 及 (c) 以產生該新合成之核酸之多個複本；

其特徵在於進行該方法之溫度非等溫，且在步驟 (b) - (d) 之擴增方法期間，在較高溫度與較低溫度之間進行複數次往復 (shuttling)，其中在該較高溫度下，該聚合酶或切口酶中之一者比該等酶中之另一者活性更好，使得該等酶之活性存在差異，且在該較低溫度下，該等酶活性之差異減小或逆轉。

【第2項】如請求項1所述之方法，其中步驟 (a)，該目標包含兩個核酸互補股，且該引子包含與該目標之各別股分別互補之正向及反向引子，使得該等正向及反向引子3'端之方向為朝向彼此。

【第3項】如請求項1或2所述之方法，其中步驟 (b) - (d) 實質上緊接在步驟 (a) 之後進行。

【第4項】如請求項3所述之方法，其中步驟 (a) - (d) 在相同反應容器中或相同固體支撐物上進行。

【第5項】如請求項1或2所述之方法，其進一步包含直接或間接偵測該新合成之核酸之步驟。

【第6項】如請求項5所述之方法，其中該偵測步驟包含使用分子信標或螢光染料、橫流（lateral flow）標記探針，或催化電化學反應之酶。

【第7項】如請求項1或2所述之方法，其中新合成之核酸之量係在執行該擴增反應期間定量或量測。

【第8項】如請求項7所述之方法，其中該新合成之核酸之量用於以定量方式測定該目標序列之量及/或濃度。

【第9項】如請求項1或2所述之方法，其中該較高溫度對該聚合酶之活性相對有利。

【第10項】如請求項1或2所述之方法，其中該較高溫度對該切口酶之活性相對有利。

【第11項】如請求項1或2所述之方法，其中該聚合酶之最佳溫度不同於該切口酶之最佳溫度，差異量在10-30°C之範圍內。

【第12項】如請求項11所述之方法，其中該聚合酶之最佳溫度不同於該切口酶之最佳溫度，差異量在10-25°C之範圍內。

【第13項】如請求項1或2所述之方法，其中該較高溫度在50-64°C之範圍內。

【第14項】如請求項13所述之方法，其中該較高溫度在55-63°C之範圍內。

【第15項】如請求項1或2所述之方法，其中該較低溫度在20.0-58.5°C之範圍內。

【第16項】如請求項15所述之方法，其中該較低溫度在35.0-57.9°C之範圍內。

【第17項】如請求項15所述之方法，其中該較低溫度在36.0-57.9°C之範圍內。

【第18項】如請求項15所述之方法，其中該較低溫度在37.0-57.9°C之範圍內。

內。

【第19項】如請求項1或2所述之方法，其中連續進行該溫度往復複數次往復。

【第20項】如請求項19所述之方法，其中連續進行該溫度往復歷經至少兩分鐘之時段。

【第21項】如請求項19所述之方法，其中連續進行該溫度往復歷經至少三分鐘之時段。

【第22項】如請求項19所述之方法，其中該複數次往復中之每一者實質上相同。

【第23項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者的持續時間在5-60秒之範圍內。

【第24項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者的持續時間在5-45秒之範圍內。

【第25項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者的持續時間在5-30秒之範圍內。

【第26項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者的持續時間在5-20秒之範圍內。

【第27項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具有在該較高溫度下在1-10秒範圍內之停留時間。

【第28項】如請求項27所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具有在該較高溫度下在1-5秒範圍內之停留時間。

【第29項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具有在該較低溫度下在2-40秒範圍內之停留時間。

【第30項】如請求項29所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具

有在該較低溫度下在2-30秒範圍內之停留時間。

【第31項】如請求項19所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具有在該較低溫度與該較高溫度之間在0.5-10秒範圍內之轉變時間。

【第32項】如請求項31所述之方法，其中該複數次溫度往復中之每一者具有在該較低溫度與該較高溫度之間在1-5秒範圍內之轉變時間。

【第33項】如請求項1或2所述之方法，其中步驟(a)之前為進行逆轉錄步驟，該逆轉錄步驟包含使相關RNA分析物與逆轉錄酶接觸以形成該相關RNA分析物之DNA轉錄物。

【第34項】如請求項33所述之方法，其進一步包含自該DNA轉錄物製備雙股DNA之步驟。

【第35項】如請求項1或2所述之方法，其進一步包含預擴增或富集步驟。

【第36項】如請求項1或2所述之方法，其中該等引子中之一或多者包含經修飾之核苷酸。

【第37項】如請求項36所述之方法，其中該經修飾之核苷酸是在該引子之目標互補部分中。

【第38項】如請求項36所述之方法，其中該一或多個引子包含經2'修飾之核苷酸。

【第39項】如請求項38所述之方法，其中該一或多個引子包含經2' O-甲基修飾之核苷酸。

【第40項】如請求項39所述之方法，其中該一或多個引子包含複數個經2' O-甲基修飾之核苷酸。

【第41項】如請求項40所述之方法，其中該一或多個引子包含達至7個經2' O-甲基修飾之核苷酸。

【第42項】如請求項1或2所述之方法，其中該等引子中之一或多者包含自

互補部分。

【第43項】如請求項42所述之方法，其中該自互補部分形成髮夾結構。

【第44項】如請求項43所述之方法，其中該髮夾包含5個至10個鹼基對。

【第45項】一種測定樣品中目標聚核苷酸之量及/或濃度的方法，該方法包含以下步驟：執行如請求項1或2所述之擴增反應以擴增該樣品中之該目標聚核苷酸；及以定量方式偵測該擴增反應之直接或間接產物，以允許測定該樣品中之該目標聚核苷酸之量及/或濃度。

【發明圖式】

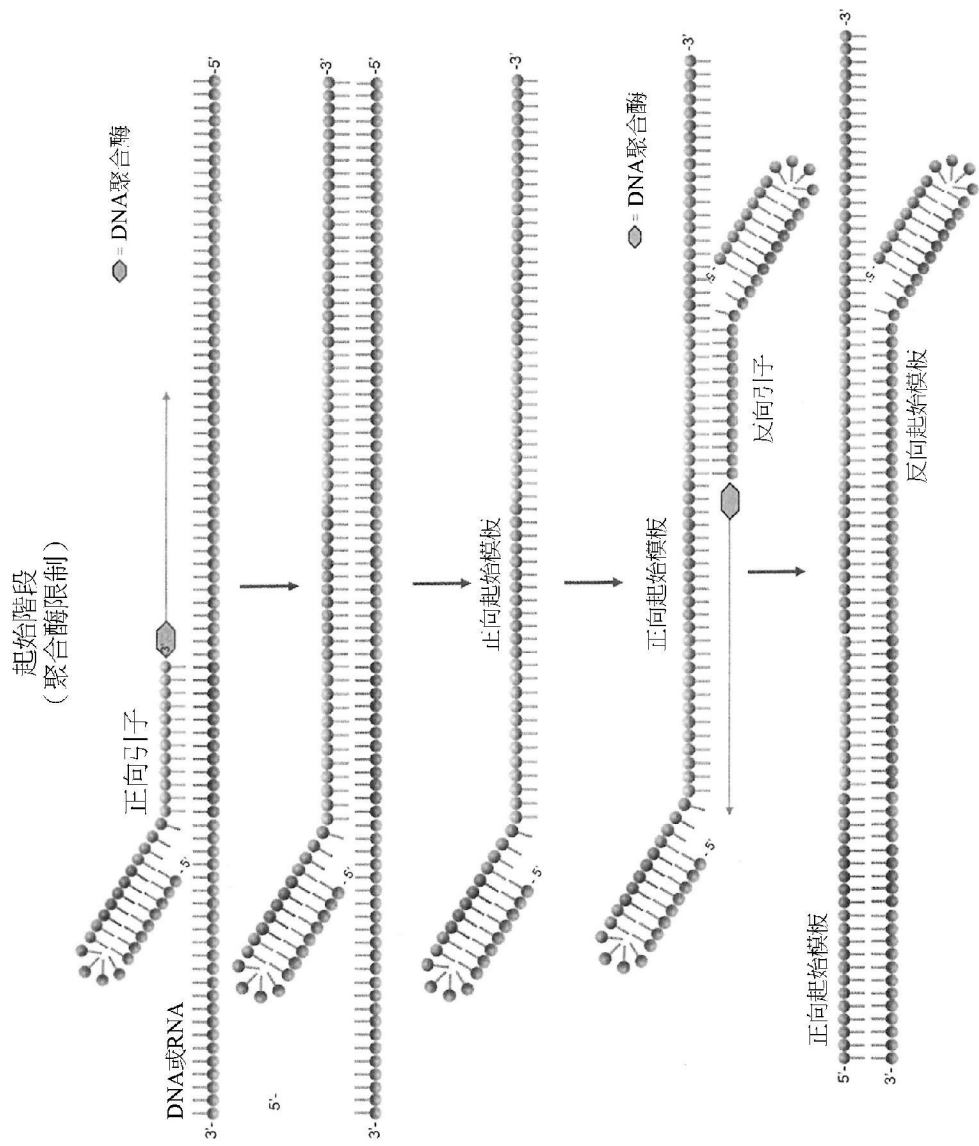


圖1A

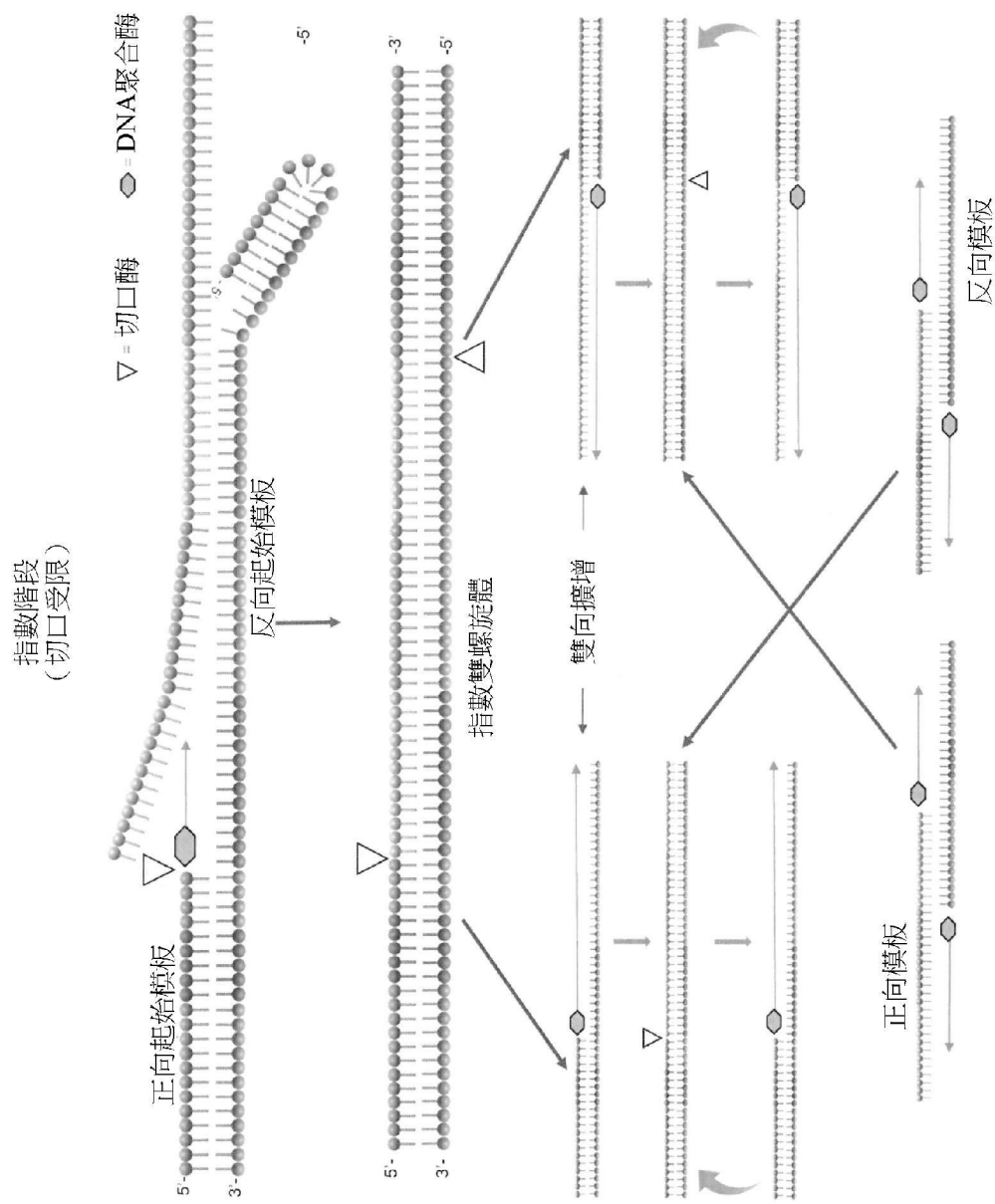


圖1B

qSTAR、實施例溫度分佈

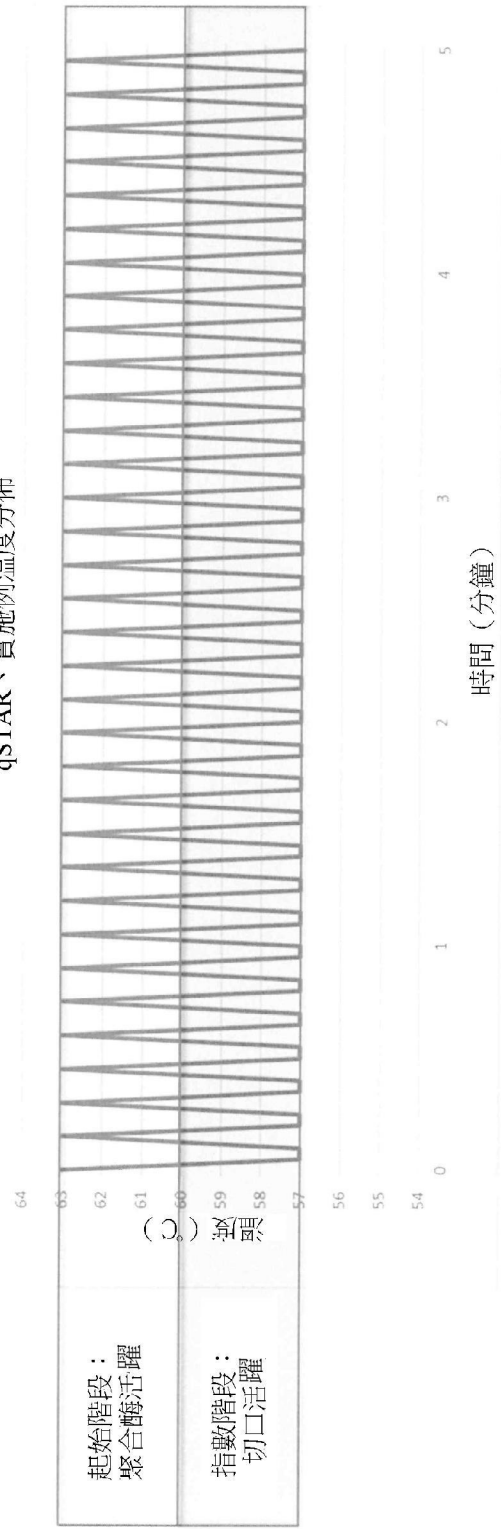
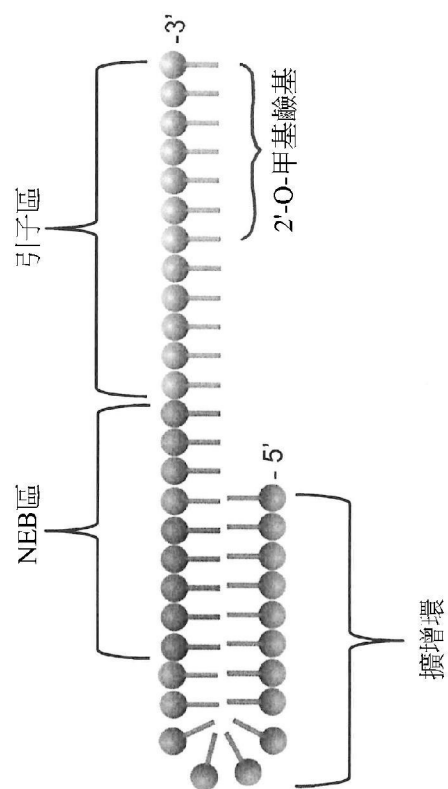


圖2



上圖展示典型的具有註釋的修飾鹼基位置之7個2'-O-甲基STAR引子

圖3

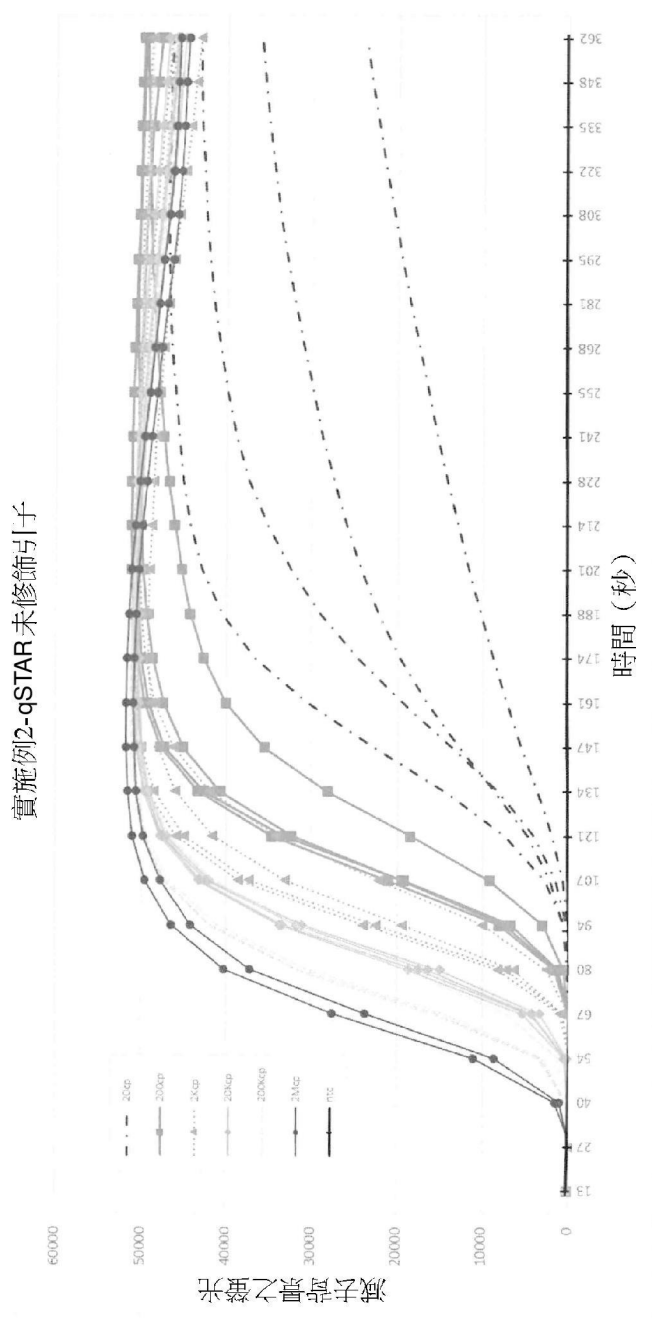


圖4

實施例3--鹼基2'-O-甲基引子

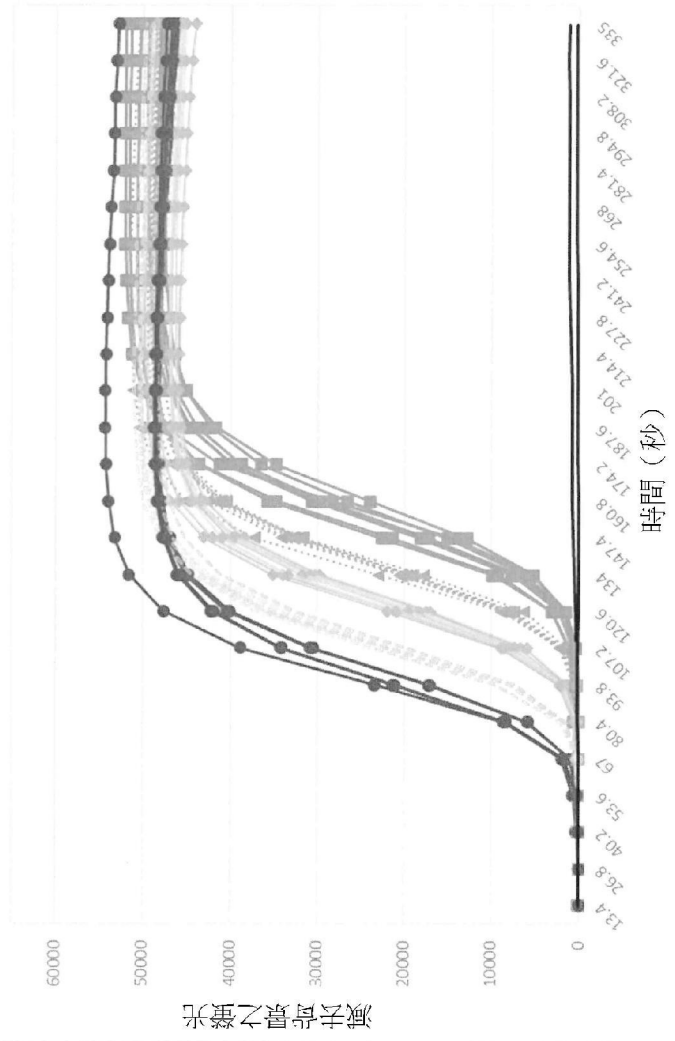


圖5A

實施例3-六鹼基2'-O-甲基引子

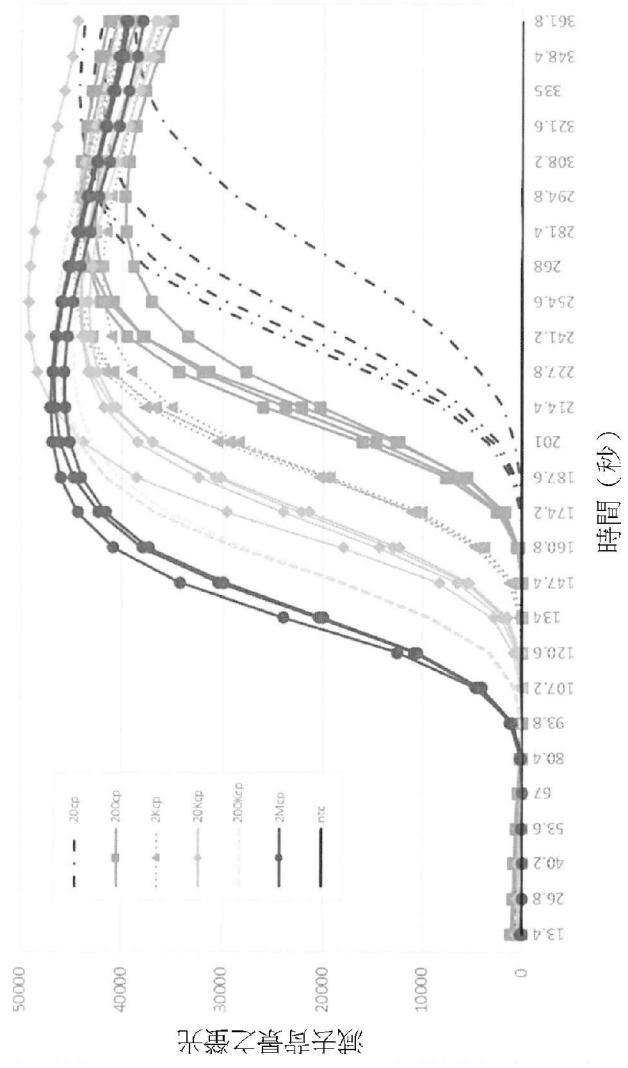


圖5B

實施例3-七鹼基2'-O-甲基引子

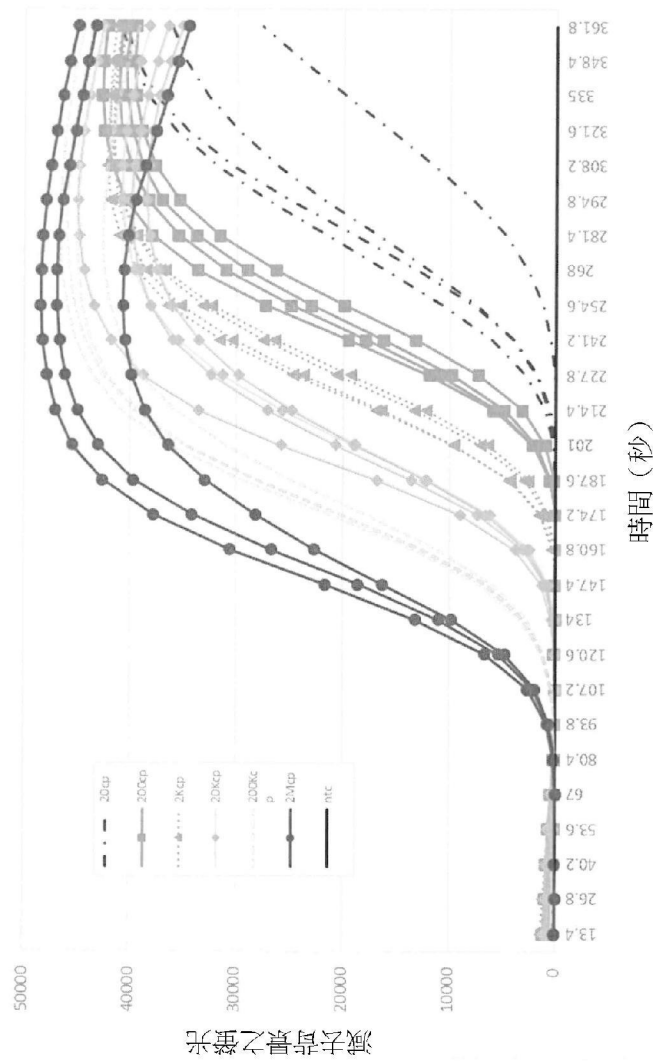


圖5C

10 複本擴增比較



圖6

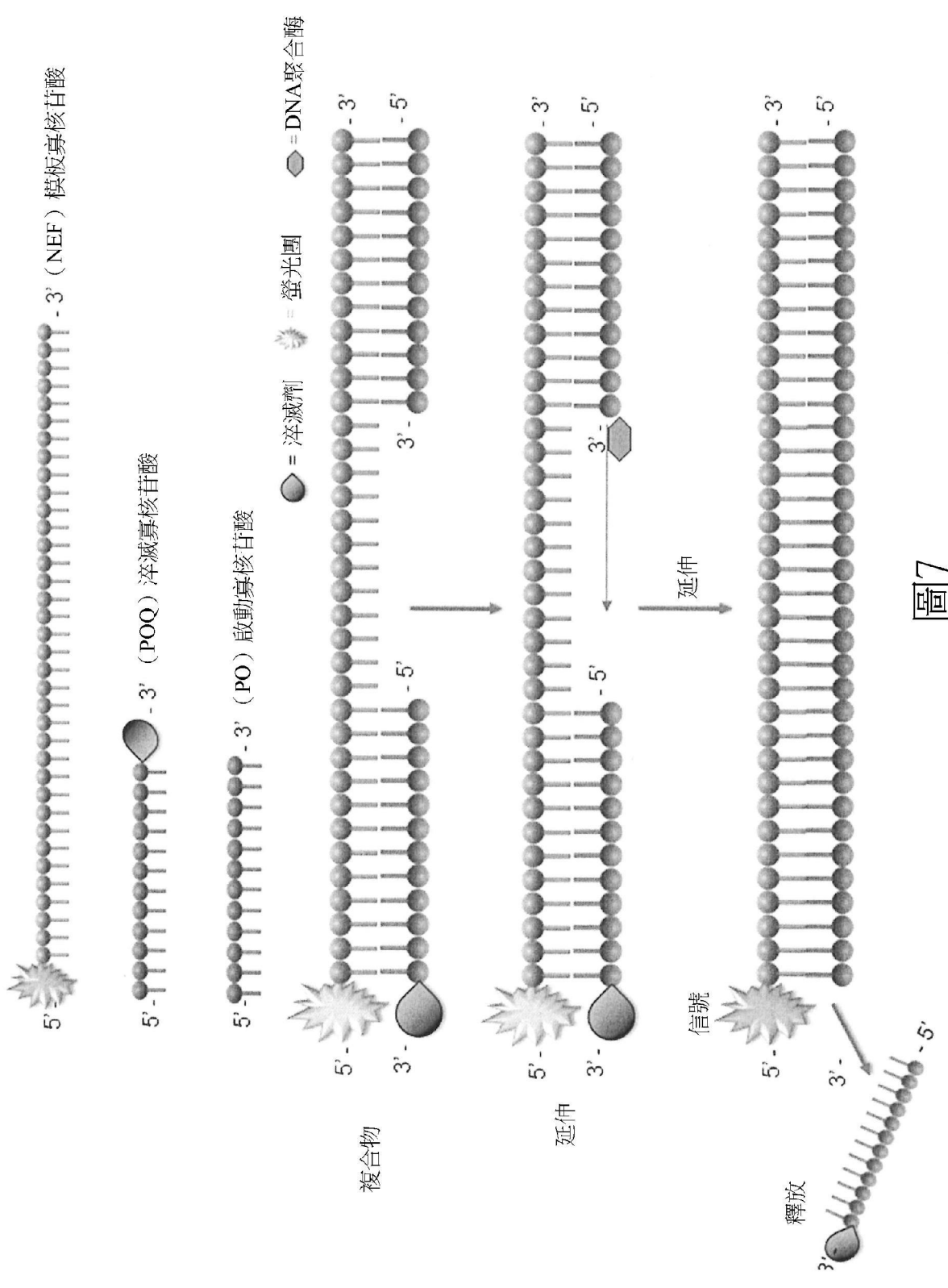


圖7

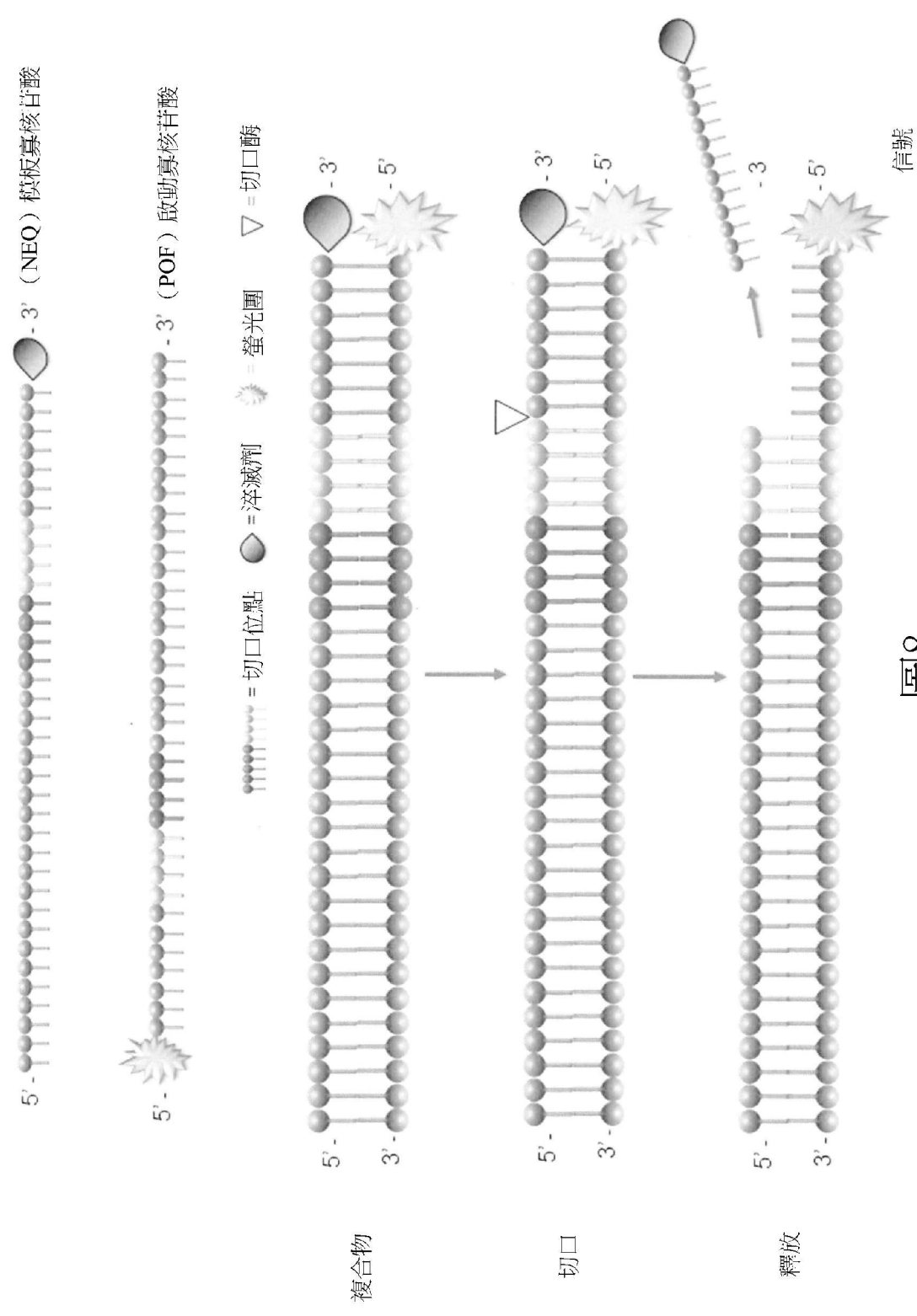


圖8

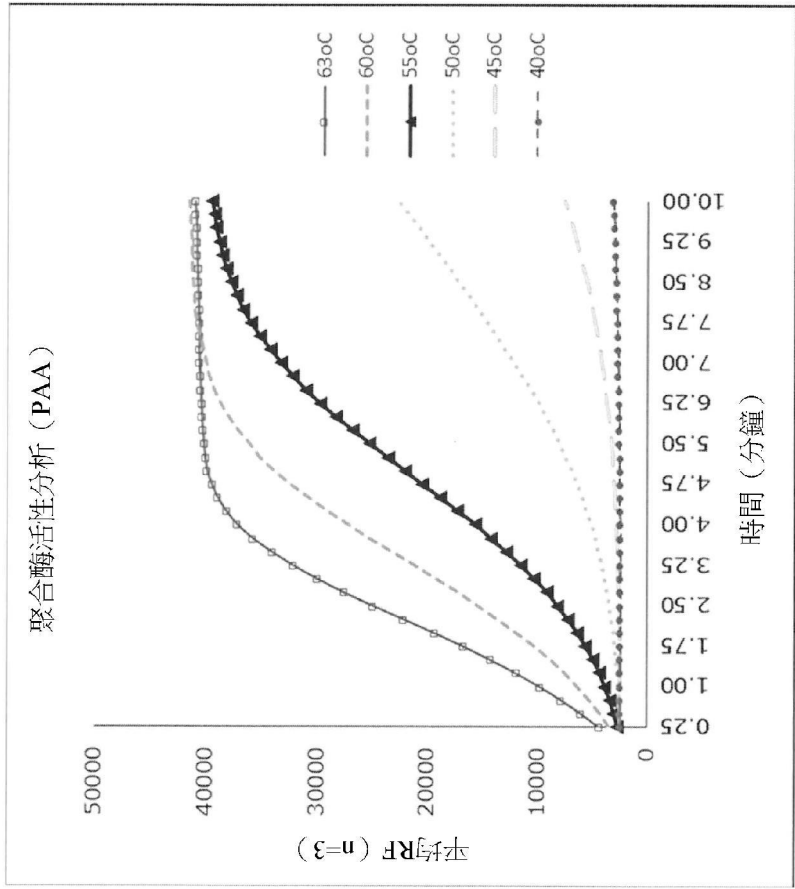


圖9A

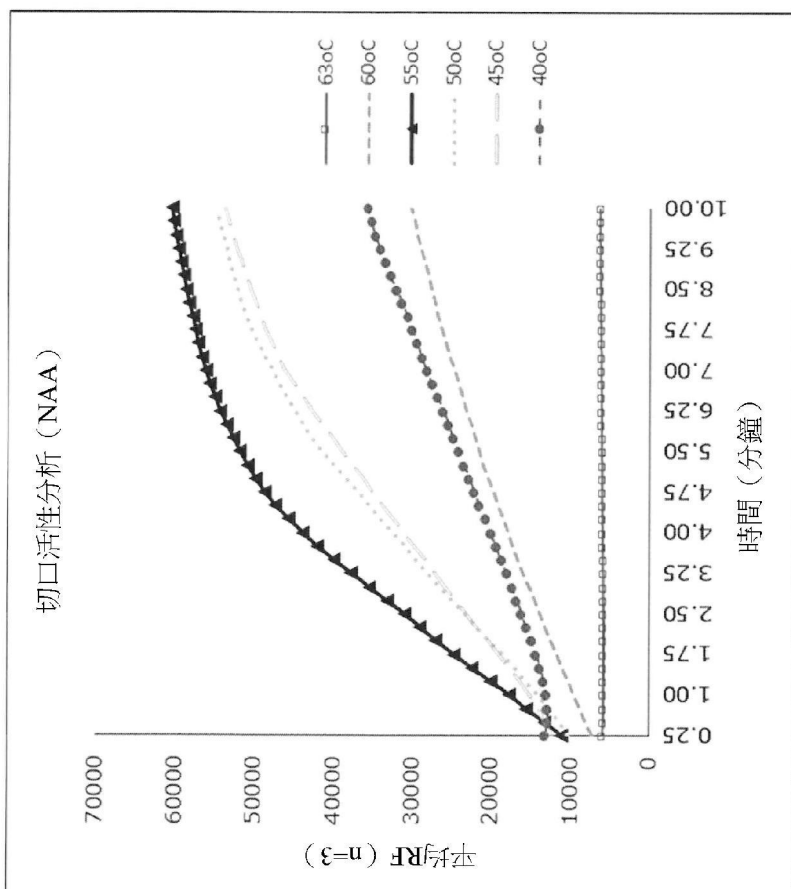


圖9B

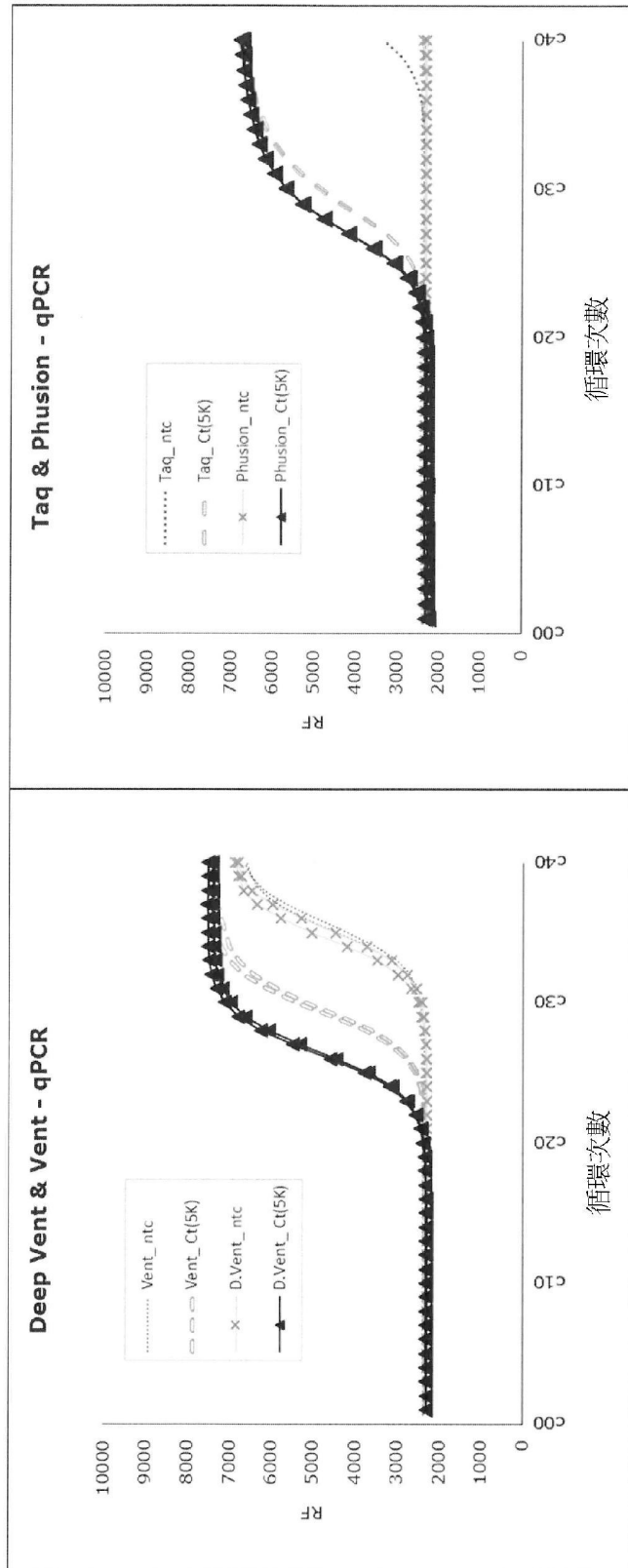


圖10B

圖10A

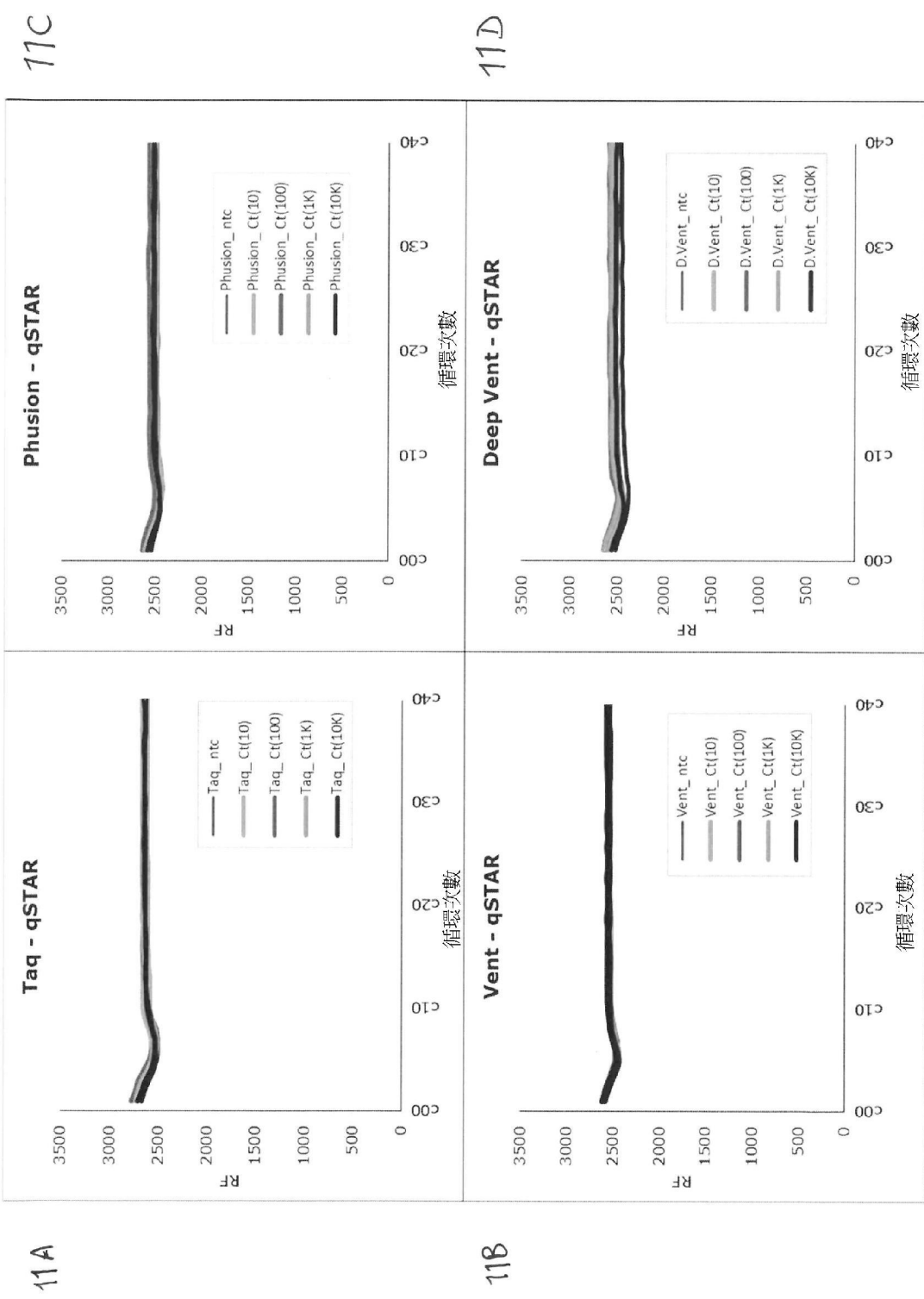


圖11

qPCR 實施例定量測試未知樣品

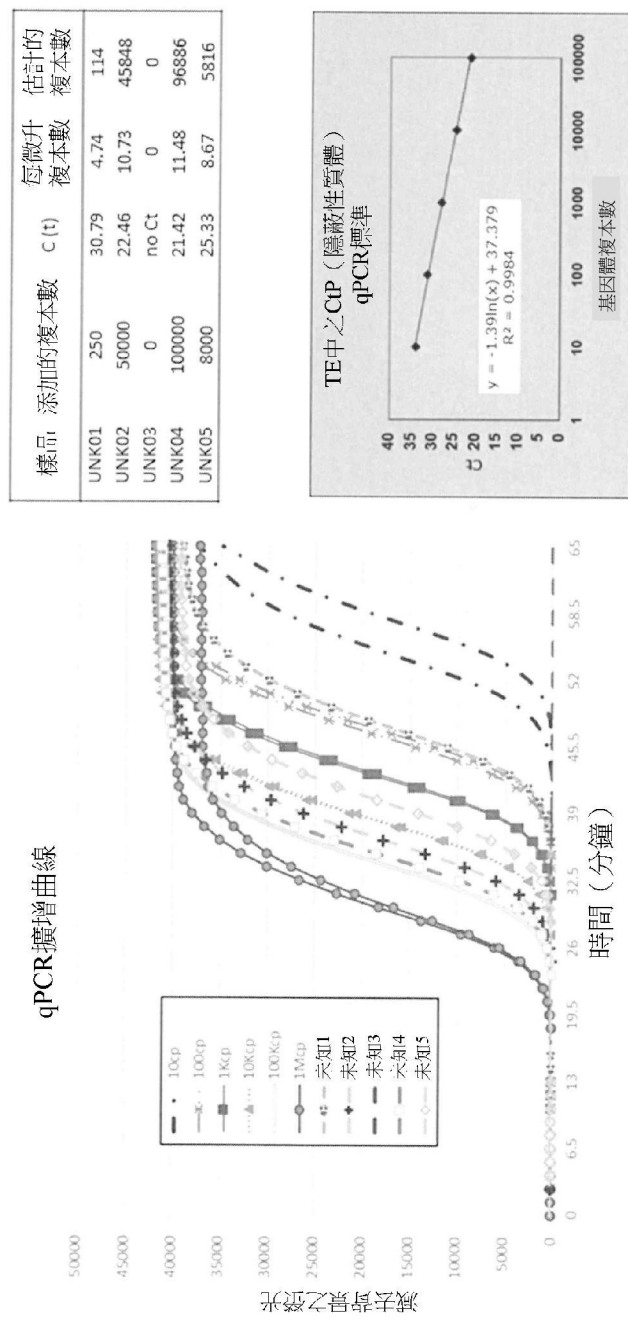


圖12

qSTAR實施例定量測試未知樣品

樣品	添加的複本數	C (t)	每微升 複本數	估計的 複本數
UNK01	250	14.55	5.62	276.4
UNK02	50000	10.29	11.23	75698.9
UNK03	0	no Ct	0	0
UNK04	100000	9.82	11.85	140611.3
UNK05	8000	11.78	9.27	10629.7

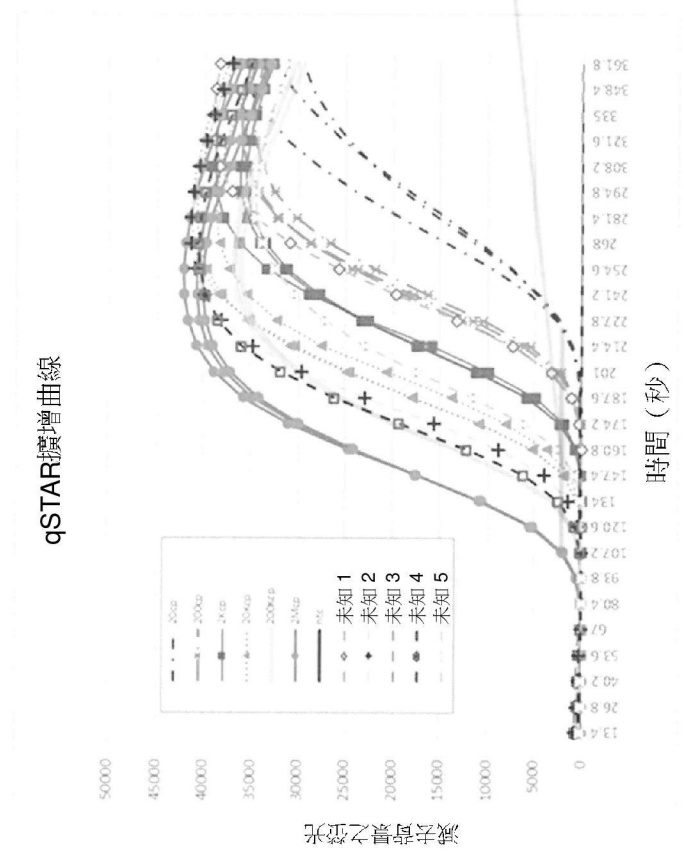


圖13

實施例定量測試未知樣品概述

表2

樣品	添加的 複本數	qPCR估計 的複本數	qSTAR估計 的複本數
UNK01	250	114	276
UNK02	50000	45848	75699
UNK03	0	0	0
UNK04	100000	96886	140611
UNK05	8000	5816	10630

圖13B

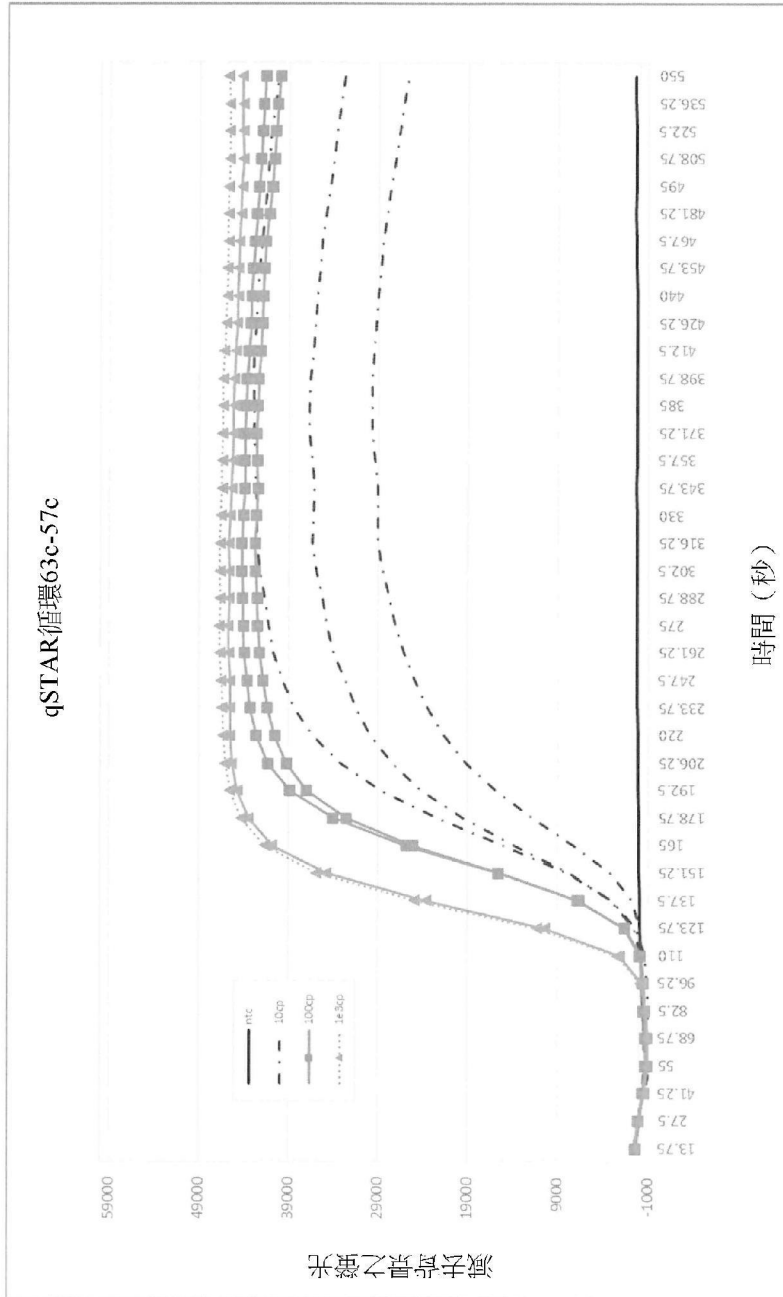


圖14A

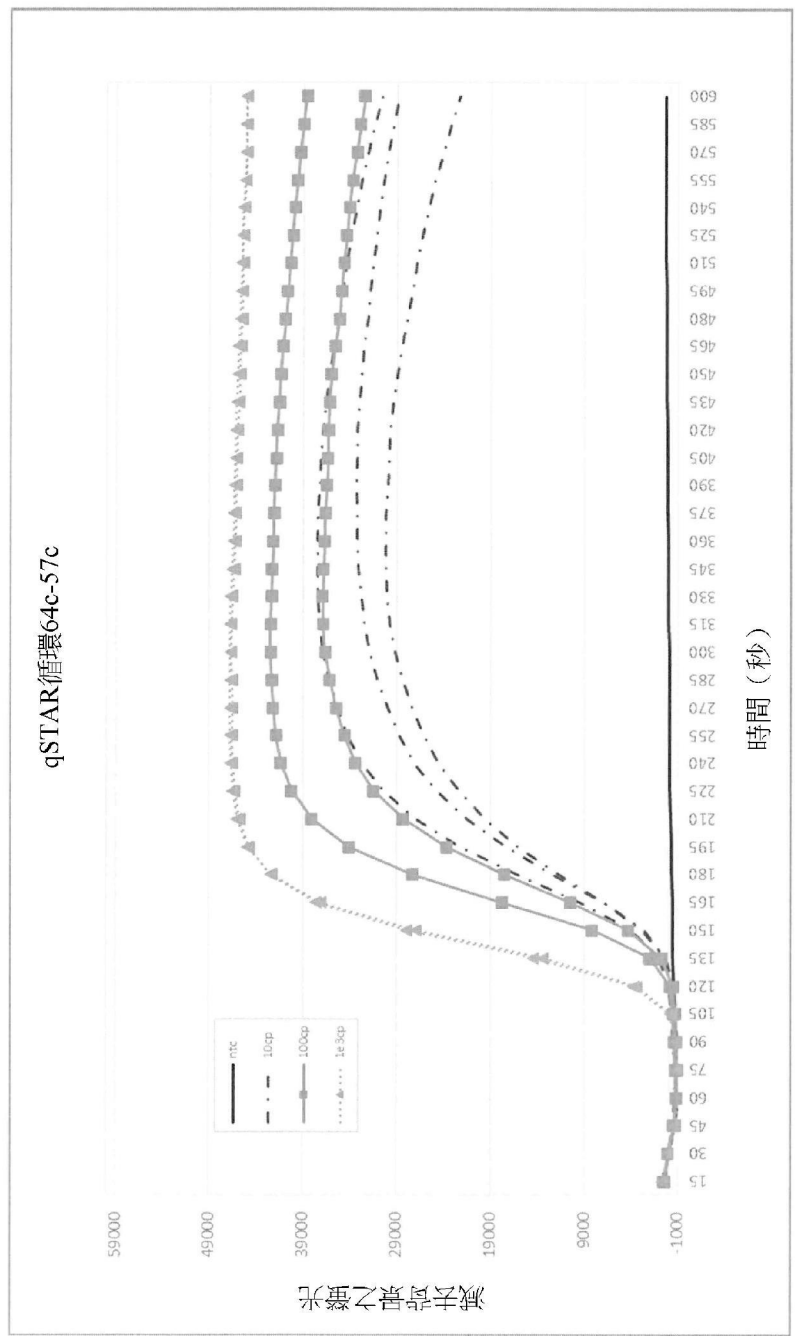


圖14B

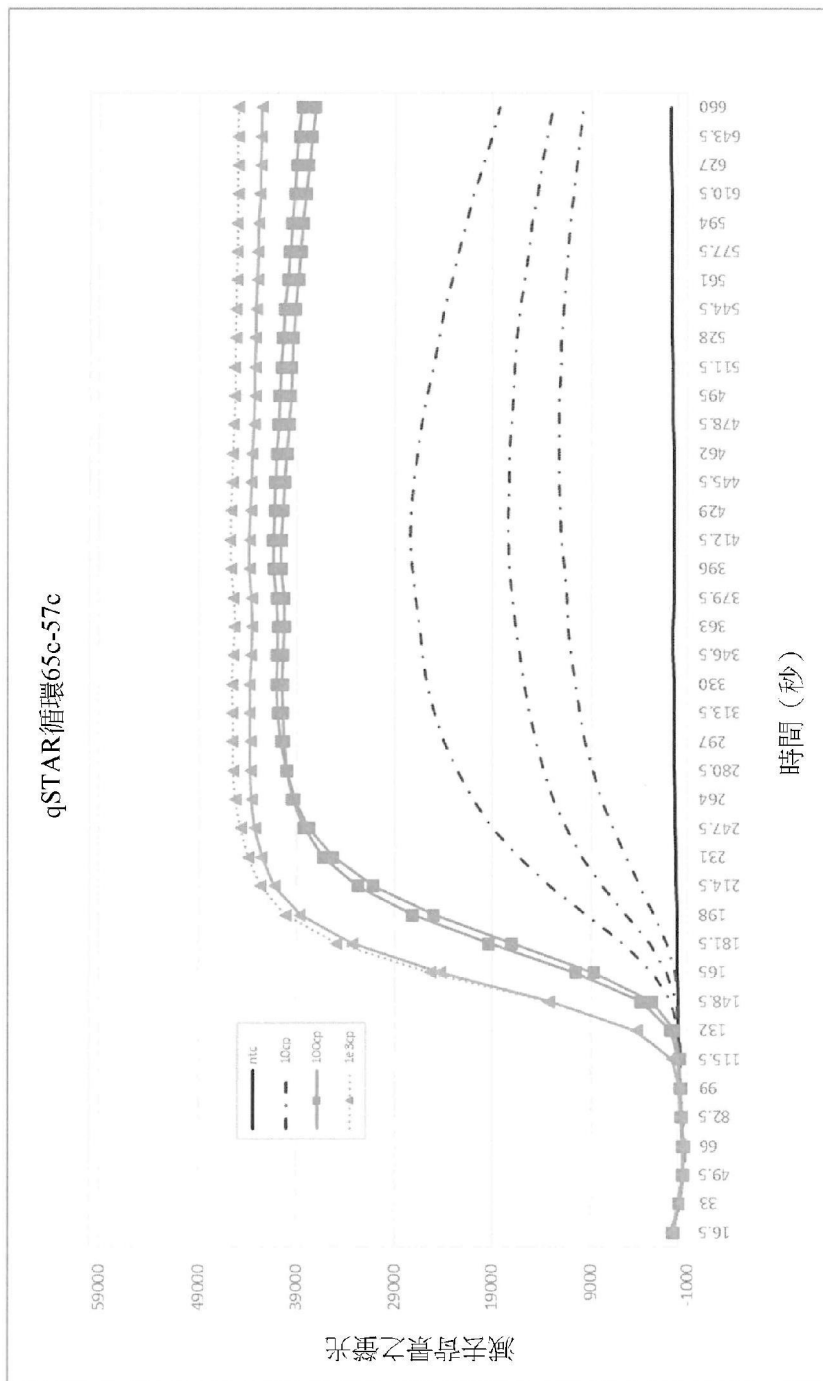


圖 14C

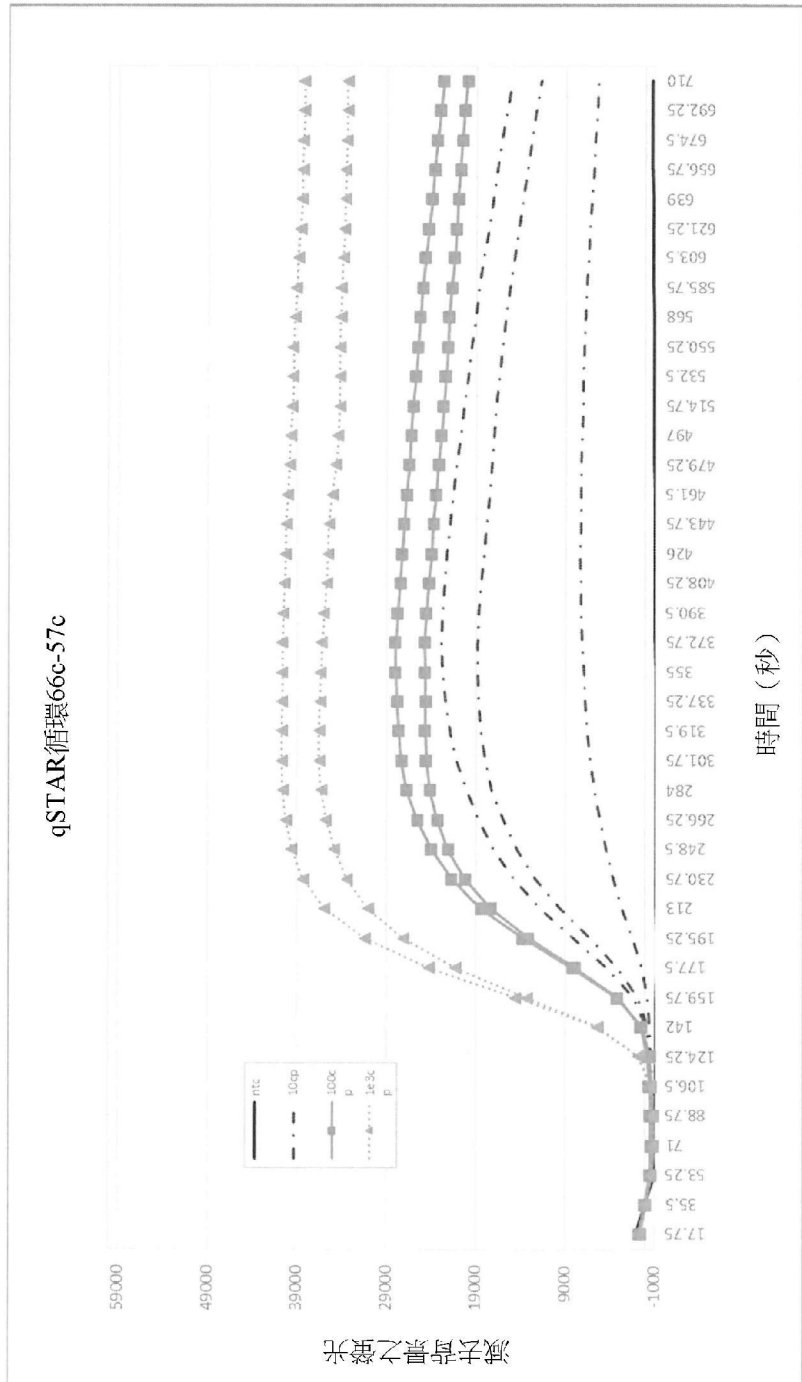


圖14D

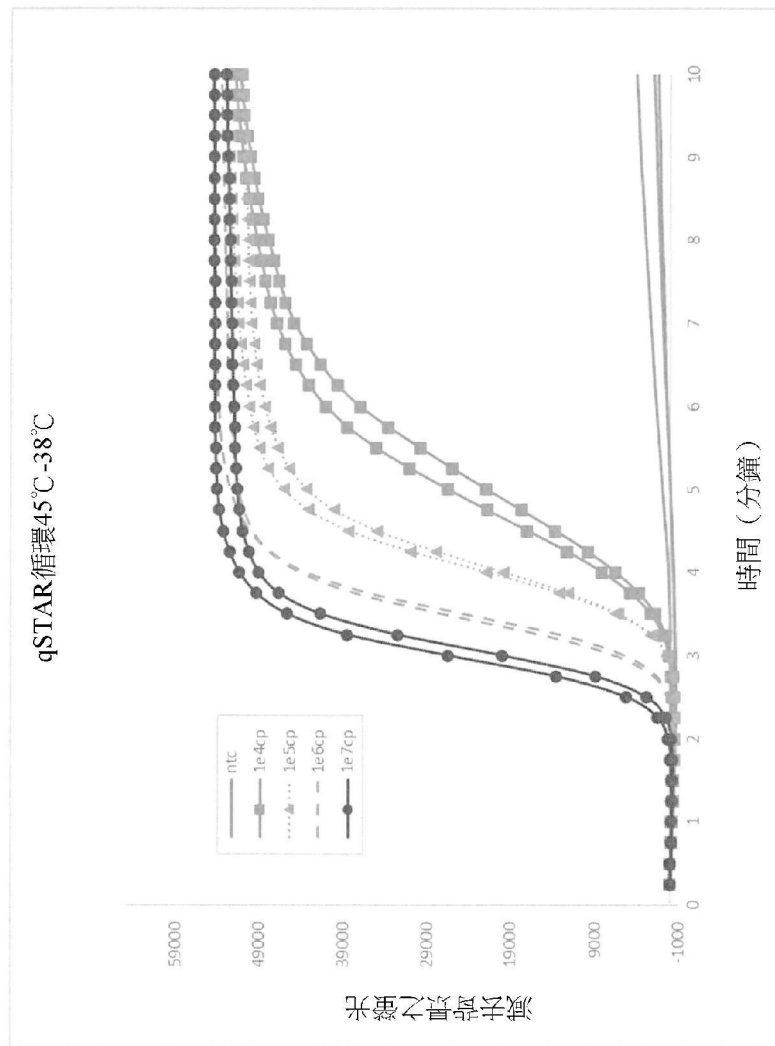


圖15

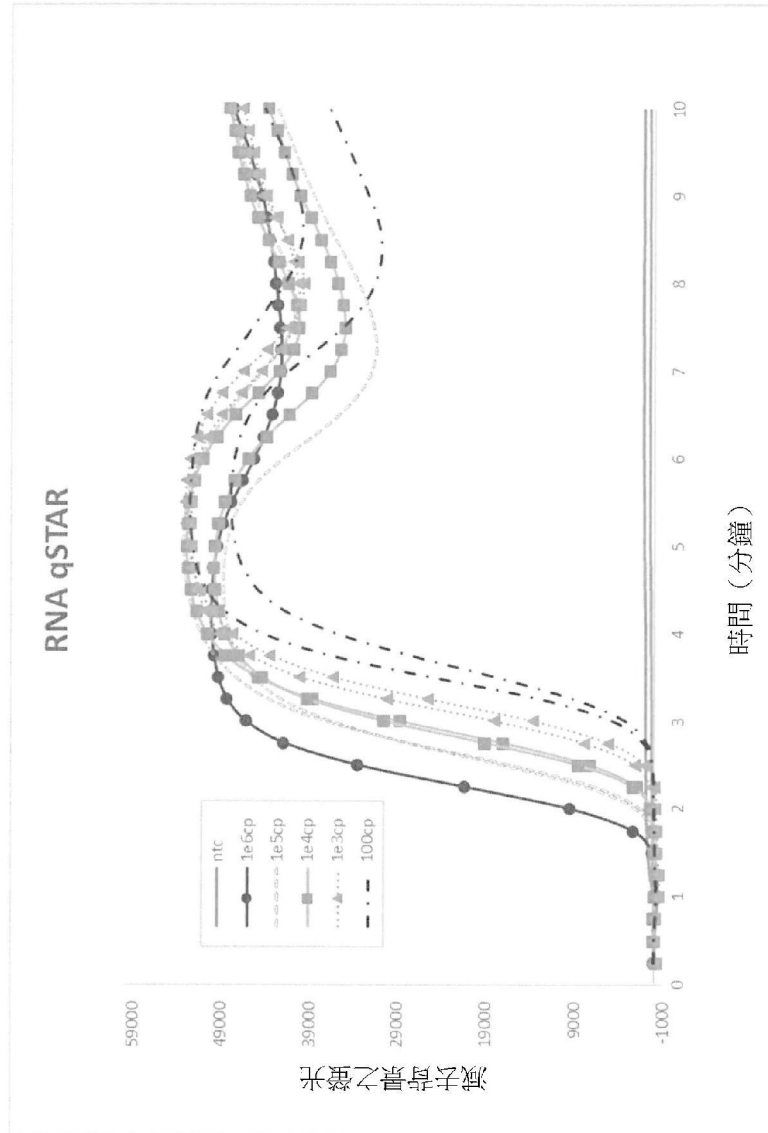


圖16