

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 11 月 1 日 (01.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/196879 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/088121
- (22) 国际申请日: 2018 年 5 月 24 日 (24.05.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201710291332.3 2017 年 4 月 28 日 (28.04.2017) CN
- (71) 申请人: 利多 (香港) 有限公司 (LEADWAY (HK) LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区上环德辅道中 199 号无限极广场 12 楼 55 室王中平, Hong Kong 999077 (CN)。
- (72) 发明人: 张太松 (ZHANG, Taisong); 中国浙江省杭州市西湖区科技园振中路 210 号王中平, Zhejiang 310030 (CN)。 陈斐斐 (CHEN, Feifei); 中国浙江

省杭州市西湖区科技园振中路 210 号王中平, Zhejiang 310030 (CN)。 张盼 (ZHANG, Pan); 中国浙江省杭州市西湖区科技园振中路 210 号王中平, Zhejiang 310030 (CN)。 王善辰 (WANG, Shanchen); 中国浙江省杭州市西湖区科技园振中路 210 号王中平, Zhejiang 310030 (CN)。

(74) 代理人: 浙江杭州金通专利事务所有限公司 (ZHEJIANG HANGZHOU JINTONG PATENT AGENCY CO., LTD.); 中国浙江省杭州市武林广场 8 号省科协大楼 3 楼黄素萍, Zhejiang 310003 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: SAMPLE NUCLEIC ACID MEASUREMENT TEST KIT, REAGENT, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种样本核酸检测试剂盒、试剂及其应用

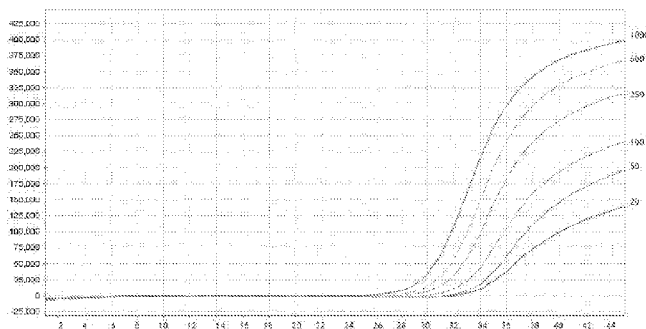


图 1

(57) Abstract: Provided are a reagent, method, and test kit for measuring sample nucleic acid. A highly alkaline nucleic acid extraction liquid (the pH value being 10.5 to 12.5) is used to extract the nucleic acid in the sample; add directly the extracted nucleic acid into a PCR reaction liquid (the pH value being 8.0 to 9.0) for neutralization; at the same time, conducting nucleic acid amplification and measurement. The present invention can measure the nucleic acid in different types of samples such as blood, blood plasma, whole blood, reproductive tract secretion, sputum, or urine. In the present invention, the extracted sample nucleic acid is neutralized in a PCR reaction liquid instead of being neutralized during nucleic acid extraction, thereby effectively enhancing the nucleic acid extraction efficiency and PCR amplification efficiency, and substantially improving the accuracy and sensitivity of the sample nucleic acid measurement.

(57) 摘要: 本发明提供一种检测样本核酸的试剂、方法和试剂盒, 采用强碱性的核酸提取液 (pH 值为 10.5~12.5) 提取样本中的核酸, 然后将提取出的核酸加入到 PCR 反应液 (pH 值为 8.0~9.0) 中进行中和, 同时进行核酸扩增和检测。本发明可以检测血液、血浆、全血、生殖道分泌物、痰液或尿液等不同类型样本中的核酸。本发明通过在 PCR 反应液中对提取出的样本核酸进行中和, 而不是在核酸提取时进行中和, 可有效提高核酸提取效率和 PCR 扩增效率, 显著提高样本核酸检测的准确性和灵敏度。

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该
修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息
(细则26之二.3和48.2(b)(vi))。

一种样本核酸检测试剂盒、试剂及其应用

技术领域

本发明属于生物科学和生物技术领域，特别涉及一种检测样本核酸的试剂、方法和试剂盒。

背景技术

随着分子生物学技术的快速发展，它已经渗透到生物学、医学、植物学、遗传学和动物学等各个方面。作为分子生物学技术的一项重大突破，聚合酶链式反应（PCR）技术具有高灵敏度、高特异性和省时快速等特点，已广泛地运用于人类和动物的疾病诊断（如产前诊断、新生儿筛查以及遗传代谢疾病检测）、法医侦检、亲缘关系分析、种子纯度鉴定、分子标记辅助育种、基因定位和转基因生物检测等等。

运用 PCR 技术进行检测主要涉及到三个方面：核酸提取、核酸扩增和扩增产物检测。核酸提取的质量与数量通常直接决定着 PCR 反应的成败。因此，大量基于 PCR 技术的检验方法（如荧光 PCR、DNA 测序和 RNA 测序等）需要在扩增前提取与纯化生物样本（如血清、血浆、全血、尿液、阴道分泌物、唾液、粪便、棉拭子、上皮脱落细胞、新鲜组织和石蜡组织切片等）中的 DNA 和/或 RNA 核酸分子。

长期以来，生物样本中核酸的提取和纯化一直是耗时、繁琐的过程，严重减慢了检测速度。尤其是对极其微量的生物样本而言，常规的核酸提取方法对样本中微量 DNA 的提取回收率低是导致后续 PCR 扩增效果差的主要原因。因此，建立一种快速的 DNA 提取方法对提高 PCR 检测效率是至关重要的。

根据核酸的不同性质，有非常多的提取方法，其中一种比较常用的方法就是基于 Chelex-100 的煮沸法，即 Chelex-100 煮沸法。在这种煮沸法中，Chelex-100 是一种苯乙烯和苯二乙烯共聚体组成的化学离子螯合树脂，其悬液在碱性环境（pH 10~14）和 100℃的条件下，可导致细胞膜破裂，并使 DNA 变性后从细胞核中释放出来，并且 Chelex-100 可高选择性地结合多价阳离子，去除样本和缓冲液中的多价金属离子，避免煮沸过程中核酸模板发生降解，此外它还能够有效除去非核酸有机物，具有经济、简便、高效等优点，可以减少提取过程中核酸的损失，目前已被广泛用于微量血液、组织斑块、精斑、毛发和骨骼等法医物证检材的核酸提取中。

Chelex-100 煮沸法主要分为三个步骤：生物样本浓缩；加入裂解液，高温煮沸；高速离

心，取上清液，即为所提取的核酸溶液。在煮沸法中，裂解液除了含有 Chelex-100 之外，还含有 NaOH 或 KOH，从而确保它的 pH 值保持在 10~14。这也因此导致所提取的核酸溶液维持较强的碱性。这种较强的碱性如果不加以中和的话，直接与 PCR 反应液混合在一起进行扩增反应，那么会导致 PCR 扩增反应效率低下。为了解决这个问题，中国专利申请 CN201110295395.9 在加入裂解液进行高温煮沸后，加入 200mM Tris-HCl 缓冲液（pH 6.8~7.5）进行中和，从而降低所提取的核酸溶液中的 pH 值。然而，当利用这种方法提取生物样本中的核酸时，需要手工加入中和液进行中和，操作步骤有些繁琐，如果操作人员忘记加入的话，将会降低 PCR 扩增效率，影响检测结果。

此外，还有一种常用的核酸提取方法就是碱裂解法。中国专利申请 CN201210242862.6 利用强碱溶液（如 NaOH 或 KOH 溶液）在高温下让生物样本中的细胞发生裂解，释放出核酸，然后加入酸性缓冲液进行中和，进行离心，获得所提取的核酸溶液。同样地，当利用这种方法提取生物样本中的核酸时，需要手工加入中和液进行中和，操作步骤有些繁琐，如果操作人员忘记加入的话，将会降低 PCR 扩增效率，影响检测结果。

不论采用 Chelex-100 煮沸法还是碱裂解法，利用现有技术提取和检测样本中的核酸时，都会存在一个问题：以检测临床血液或血浆样本中可能存在的 HBV DNA 为例进行说明，利用强碱性的核酸提取液对临床血液或血浆样本中的核酸进行提取，获得提取出的核酸溶液，随后加入 2~5 μ l 提取出的核酸溶液到 35 μ l 左右的 PCR 反应液中进行混合，这是由于加入的提取出的核酸溶液的体积较小，对混合后的 PCR 反应液的影响不大，但是当加入的提取出的核酸溶液的体积较大时，如将加入 20 μ l 提取出的核酸溶液到 20 μ l PCR 反应液中进行混合时，虽然总体积仍然是 40 μ l，但是提取出的核酸溶液所占的体积比例显著增加，这会影响混合后的 PCR 反应液，导致 pH 值偏高，从而影响后续的 PCR 扩增反应效率，降低样本核酸的检测灵敏度和准确性。

此外，利用常规的弱碱性核酸裂解液提取样本中的核酸后，当往 PCR 反应液中加入的提取出的核酸溶液体积较小（通常为 2~5 μ l）时，虽能检测出样本中的核酸，但是检测灵敏度较低；然而当加入的提取出的核酸溶液体积较大时，如将加入 20 μ l 提取出的核酸溶液到 20 μ l PCR 反应液中进行混合，这时因弱碱性核酸裂解液提取样本核酸的效率较差，而且所加入的体积较大的核酸溶液很可能含有较多的杂质和 PCR 扩增反应抑制剂，会导致 PCR 扩增反应往往无法正常进行，或者虽能进行 PCR 扩增反应，但会降低样本核酸的检测灵敏度和准确性。

发明内容

针对现有技术的不足之处，本发明提供一种检测样本核酸的试剂、方法和试剂盒，所述试剂、方法和试剂盒均是利用强碱性的核酸提取液提取样本中的核酸，然后将提取出的样本核酸加入 PCR 反应液中进行中和，同时进行核酸扩增和检测，这样就不需在样本核酸提取时再增加一个对提取出的样本核酸进行中和的步骤，从而极大地节省检测时间，而且也便于进行半自动化或全自动化处理，提高 PCR 扩增反应效率，增加样本核酸检测的灵敏度和提高核酸检测的准确性。

由于血清、血浆、全血、痰液、尿液、生殖道分泌物、泪液、粪便、脊髓液新鲜组织、石蜡组织切片等样本中的成分非常复杂，直接对样本中的核酸进行检测，会受到其他成分的干扰，因此需要对一些样本进行前处理和保存，然后对提取出的样本核酸进行检测。

针对不同的样本，它们的前处理方法各有不同，比如，全血含有红细胞，故在核酸提取时，可利用常见的红细胞裂解液进行处理，然后再用本发明的核酸提取液进行样本核酸提取；痰液含有大量的粘蛋白和杂质，故在核酸提取时，对该样本进行前处理，通常用 NaOH 液化、柠檬酸钠、0.5% N-乙酰-L-半胱氨酸（NALC）或二硫苏糖醇（DTT）去除粘蛋白，然后再用本发明的核酸提取液进行样本核酸提取；新鲜组织的预处理方法是先用生理盐水清洗，然后将其捣碎或剪碎，加蛋白酶 K 消化后，再用本发明的核酸提取液进行样本核酸提取；石蜡组织切片的预处理方法是先用二甲苯等脱蜡剂脱蜡，加蛋白酶 K 消化后，再用本发明的核酸提取液进行样本核酸提取。

本发明提供一种样本核酸检测试剂，所述样本核酸检测试剂包括核酸提取液和 PCR 反应液，所述核酸提取液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM，Tris-HCl 1mM~25mM，Chelex-100 2%~5% (w/v)，EDTA 0.1%~0.4% (w/v)，所述核酸提取液的 pH 值为 10.5~12.5；所述 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM~75mM，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.0~9.0。

进一步地，所述碱金属氢氧化物为 NaOH 或 KOH。

进一步地，所述样本核酸检测试剂还包括浓缩液。

进一步地，所述浓缩液包括 NaCl 2.5%~4.5% (w/w)，PEG6000 10%~13% (w/v)。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.7。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.5。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

进一步地，所述样本核酸检测试剂在检测 HBV 核酸中的应用。

进一步地,所述样本核酸包括 HBV、人 B27 基因、HPV 6/11、TB 或 HCMV 核酸。

进一步地,所述样本核酸包括 HBV 核酸;在所述核酸提取液中,碱金属氢氧化物浓度为 25mM、Tris-HCl 的浓度为 1mM、Chelex-100 的浓度为 2% (w/v)、EDTA 的浓度为 0.1% (w/v),所述核酸提取液的 pH 值为 11.5;在所述 PCR 反应液中,Tris-HCl 的浓度为 10mM,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

本发明还提供一种样本核酸检测方法,所述样本核酸检测方法包括(1)利用核酸提取液提取样本中的核酸,获得样本核酸溶液;(2)将(1)中获得的样本核酸溶液与 PCR 反应液混合在一起得到混合液,利用所述混合液进行扩增反应,检测样本中的核酸,所述核酸提取液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM,Tris-HCl 1mM~25mM,Chelex-100 2%~5% (w/v),EDTA 0.1%~0.4% (w/v),所述核酸提取液的 pH 值为 10.5~12.5;所述 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM~75mM,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.0~9.0;所述混合液的 pH 值为 8.0~9.0。

进一步地,所述碱金属氢氧化物为 NaOH 或 KOH。

进一步地,在步骤(1)之前,利用浓缩液对样本进行浓缩。

进一步地,所述浓缩液包括 NaCl 2.5%~4.5% (w/w),PEG6000 10%~13% (w/v)。

进一步地,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.7。

进一步地,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.5。

进一步地,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

进一步地,所述样本核酸包括 HBV、人 B27 基因、HPV 6/11、TB 或 HCMV 核酸。

进一步地,所述样本核酸包括 HBV 核酸;在所述核酸提取液中,碱金属氢氧化物浓度为 25mM、Tris-HCl 的浓度为 1mM、Chelex-100 的浓度为 2% (w/v)、EDTA 的浓度为 0.1% (w/v),所述核酸提取液的 pH 值为 11.5;在所述 PCR 反应液中,Tris-HCl 的浓度为 10mM,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

本发明还提供一种样本核酸检测试剂盒,所述核酸检测试剂盒包括核酸提取液和 PCR 反应液,所述核酸提取液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM,Tris-HCl 1mM~25mM,Chelex-100 2%~5% (w/v),EDTA 0.1%~0.4% (w/v),所述核酸提取液的 pH 值为 10.5~12.5;所述 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM~75mM,所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.0~9.0。

进一步地,所述碱金属氢氧化物为 NaOH 或 KOH。

进一步地,所述核酸检测试剂盒还包括浓缩液。

进一步地,所述浓缩液包括 NaCl 2.5%~4.5% (w/w),PEG6000 10%~13% (w/v)。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.7。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.5。

进一步地，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

进一步地，所述样本核酸包括 HBV、人 B27 基因、HPV 6/11、TB 或 HCMV 核酸。

进一步地，所述样本核酸包括 HBV 核酸；在所述核酸提取液中，碱金属氢氧化物浓度为 25mM、Tris-HCl 的浓度为 1mM、Chelex-100 的浓度为 2% (w/v)、EDTA 的浓度为 0.1% (w/v)，所述核酸提取液的 pH 值为 11.5；在所述 PCR 反应液中，Tris-HCl 的浓度为 10mM，所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。

本发明还提供所述核酸检测试剂盒在检测样本中的 HBV、人 B27 基因、HPV 6/11 型、结核分枝杆菌或人巨细胞病毒中的应用。

有益效果：先将一定量的样本加入到强碱性的核酸提取液中，将样本中的核酸提取出，然后将提取出的样本核酸溶液加入到 PCR 反应液（其 pH 值比核酸提取液中的 pH 值低）中进行中和，同时还可进行样本核酸扩增和检测，这样就可省去在样本核酸提取时对提取出的样本核酸溶液进行中和这一步骤，从而有效地节省检测时间，降低因步骤繁多增加人工出错的机会，便于进行半自动化或全自动化处理，而且这还会提高样本核酸的 PCR 扩增反应效率，增加样本核酸的检测灵敏度和准确性。以检测临床血液或血浆样本中可能存在的 HBV DNA 为例进行说明，本发明通过对现有技术中的核酸提取液和 PCR 反应液进行改进，利用本发明的核酸提取液（pH 值为 10.5~12.5）对临床血液或血浆样本中的核酸进行提取，获得提取出的样本核酸溶液，将提取出的样本核酸溶液加入到本发明的 PCR 反应液（pH 值为 8.0~9.0）中进行混合，这时不论加入的提取出的样本核酸溶液为 2~5 μ l 还是 20 μ l，都不会影响混合后的 PCR 反应液的 pH 值，即仍然保持在合适的 pH 值范围，从而不会影响后续的 PCR 扩增反应效率，同时还会增加样本核酸的检测灵敏度和准确性。此外，相比于利用常规的弱碱性核酸裂解液提取样本中的核酸，利用本发明的核酸提取液可提高样本核酸的提取效率，降低提取出的样本核酸溶液中可能存在的杂质和 PCR 反应抑制剂。而且当将本发明的核酸提取液与本发明的 PCR 反应液配合使用时，往 PCR 反应液中加入的提取出的样本核酸溶液体积较小（通常为 2~5 μ l）时，也能检测出样本中的核酸，而且具有较高的检测灵敏度；当加入的提取出的样本核酸溶液体积较大时，如将加入 20 μ l 提取出的样本核酸溶液到 20 μ l PCR 反应液中进行混合，也能够高灵敏地和高准确性地检测出样本核酸。

附图说明

图 1 为 PCR 反应液 pH 值为 8.1 时，不同浓度 HBV 阳性样本的荧光 PCR 检测结果。

图 2 为 PCR 反应液 pH 值为 8.9 时，不同浓度 HBV 阳性样本的荧光 PCR 检测结果。

图 3 为 HBV 阳性样本浓度为 20 IU/ml，改变 PCR 反应液 pH 值，当 pH 值分别为 8.1、8.3、8.5、8.7 和 8.9 时的荧光 PCR 检测结果。

具体实施方式

为了提取样本中的核酸，本发明先将一定量的样本加入到强碱性的核酸提取液中，让样本中的细胞或病毒发生裂解，将它们携带的核酸释放出来，从而被提取出来，这时提取出的样本核酸溶液 pH 值比较高，会影响后续的核酸 PCR 扩增反应，甚至会导致核酸扩增反应无法启动。为此，为了降低这种影响，发明人将提取出的样本核酸溶液加入到 pH 值较低的 PCR 反应液中进行中和，同时还可进行样本核酸扩增和检测，这样就可省去样本核酸提取时对提取出的样本核酸进行中和这一步骤，可有效地节省检测时间，降低因步骤繁多增加人工出错的机会，便于进行半自动化或全自动化处理，而且这还会提高样本核酸的 PCR 扩增反应效率，增加样本核酸的检测灵敏度和准确性。

在本发明中，用于提取样本中的核酸的核酸提取液可选自高浓度的强碱溶液或含 Chelex-100 的强碱性溶液，而且核酸提取液的 pH 值 ≥ 10 ，优选为 10.5~12.5，可有效提取出样本中的核酸。其中，高浓度的强碱溶液可选自为 0.05M~0.6M 的碱金属氢氧化物溶液，优选为 0.05M~0.6M 的 NaOH 溶液或 KOH 溶液；含 Chelex-100 的强碱性溶液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM，Tris-HCl 1mM~25mM，Chelex-100 2%~5%，EDTA 0.1%~0.4%，所述碱金属氢氧化物优选为 NaOH 或 KOH。

另外，当样本中的所要检测的靶核酸分子浓度比较低时，可优选在核酸提取之前将样本加入浓缩液中进行浓缩，然后再利用本发明的核酸提取液提取浓缩后的样本中的核酸。其中，作为浓缩液的第一个具体的例子，浓缩液可包括 NaCl 2.5%~4.5%，PEG6000 10%~13%；作为浓缩液的第二个具体的例子，浓缩液可包括 PEG8000 20%，NaCl 13.5%。

当利用本发明的核酸提取液将样本中的核酸提取出后，将提取出的样本核酸溶液以合适的体积用量比例添加到较低 pH 值的 PCR 反应液中，将提取出的样本核酸溶液的 pH 值降低到适合开展 PCR 扩增反应的水平。在本发明中，PCR 反应液的 pH 值优选为 8.0~9.0，其值太高或太

低,都会影响 PCR 扩增反应的效率,降低检测灵敏度和准确性。PCR 反应液含有 Tris-HCl, KCl, dNTPs 和 Mg^{2+} 等,其中 Tris-HCl 可用 Tris-Acetate、Tris-Borate 等缓冲系统替换,而且当 PCR 反应液与提取出的样本核酸溶液混合后,确保 Tris-HCl 的浓度为 5mM~75mM。此外,PCR 反应液还可包括 Taq 酶等用于进行核酸扩增反应的 DNA 聚合酶、引物和 SYBR Green 等荧光染料或者 TaqMan 探针、双杂交探针、分子信标探针或 MGB 探针等荧光探针。当然,也可在需要进行核酸扩增反应时,才将 DNA 聚合酶、荧光染料或荧光探针加入到 PCR 反应液中。

在本发明中,为了进一步降低 PCR 扩增时可能产生的非特异性扩增,在 PCR 反应液中加入抗 Taq 酶抗体,该抗体可结合 Taq 酶的活性位点,从而使得 Taq 酶不能发挥作用,只有在变性阶段,抗 Taq 酶抗体在高温下失活而不能结合到 Taq 酶的活性位点上,从而使得 Taq 酶能够发挥催化作用,合成出新的 DNA 链。

当利用本发明的核酸提取液将样本中的核酸提取出后,利用 PCR 扩增反应检测样本中的核酸时,事先要选择该样本核酸中的特定 DNA 或 RNA 片段,然后针对这种 DNA 或 RNA 片段设计至少一对特异性引物,若进行荧光 PCR 扩增时,可选择加入 SYBR Green 等荧光染料,或者针对所选择的特定 DNA 或 RNA 片段,设计至少一条荧光探针,这样就可根据扩增时产生的荧光强度,检测样本中的特定 DNA 或 RNA 片段。

以下实施例进一步说明本发明。这些实施例不是用来限制本发明范围,而是提供对本发明的进一步理解。

实施例 1: 核酸检测试剂

本实施例中的样本核酸检测试剂包括核酸提取液和 PCR 反应液,其组成如下所示:

核酸提取液: NaOH 10mM~100mM, Tris-HCl 1mM~25mM, Chelex-100 2%~5% (w/v), EDTA 0.1%~0.4% (w/v), pH=10.5~12.5。

PCR 反应液 (pH=8.0~9.0), 包括 Tris-HCl 5mM~75mM, 此外还包括 dNTPs、KCl、 Mg^{2+} 和一对引物。当采用荧光 PCR 检测时,PCR 反应液还包括 SYBR Green 等荧光染料,或 TaqMan 等荧光探针,优选为 TaqMan 荧光探针。PCR 反应液还可包括酶混合液。当然,也可将酶混合液和 PCR 反应液独自保存,在需要进行核酸扩增反应时,才将酶混合液加入到 PCR 反应液中。当检测样本中的核酸是 DNA 时,酶混合液主要包括一种 DNA 聚合酶,所述 DNA 聚合酶可选自 Taq DNA 聚合酶 (简称为 Taq 酶)、Vent DNA 聚合酶、Deep DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、Tgo DNA 聚合酶和 KOD1 DNA 聚合酶等,优选为 Taq 酶。当检测样本中的核酸是 RNA 时,酶混合液

主要包括 MMLV 逆转录酶、Taq 酶和 RNase 抑制剂。当所选择的 DNA 聚合酶是 Taq 酶时，不论检测样本中的核酸是 DNA 或 RNA，酶混合液还可包括抗 Taq 酶抗体。

进一步地，所述样本核酸检测试剂还包括浓缩液：NaCl 2.5%~4.5% (w/v)、PEG6000 10%~13% (w/v)。

当检测血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒 (HBV) 时，浓缩液：NaCl 2.5% (w/v)、PEG6000 10% (w/v)；核酸提取液：NaOH 25mM、Tris-HCl 1mM、Chelex-100 2% (w/v)、EDTA 0.1% (w/v)，pH=11.5；PCR 反应液，pH 8.1，其中 PCR 反应液包括 Tris-HCl 10mM，此外还包括 KCl，dNTPs，Mg²⁺，BSA，引物和 TaqMan 探针，优选地还包括 Taq 酶。

当检测全血样本中的人 B27 基因时，浓缩液：NaCl 2.5% (w/v)、PEG6000 13% (w/v)；核酸提取液：NaOH 25mM、Tris-HCl 10mM、Chelex-100 3% (w/v)、EDTA 0.1% (w/v)，pH=12.0；PCR 反应液，pH 8.8，其中 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM，此外还包括 KCl，dNTPs，Mg²⁺，BSA，引物和 TaqMan 探针，优选地还包括 Taq 酶。

当检测生殖道内分泌物样本中的人乳头瘤病毒 6/11 型 (HPV 6/11) 时，核酸提取液：NaOH 10mM、Tris-HCl 10mM、Chelex-100 2% (w/v)、EDTA 0.1% (w/v)，pH=10.5；PCR 反应液，pH 9.0，其中 PCR 反应液包括 Tris-HCl 75mM，此外还包括 KCl，dNTPs，Mg²⁺，BSA，引物和 TaqMan 探针，优选地还包括 Taq 酶溶液。

当检测痰液样本中的结核分枝杆菌 (TB) 时，浓缩液：NaCl 2.5% (w/v)、PEG6000 10% (w/v)；核酸提取液：NaOH 25mM、Tris-HCl 25mM；Chelex-100 2% (w/v)；EDTA 0.2% (w/v)，pH=11.5；PCR 反应液，pH 8.0，其中 PCR 反应液包括 Tris-HCl 50mM，此外还包括 KCl，dNTPs，Mg²⁺，BSA，引物和 TaqMan 探针，优选地还包括 Taq 酶。

当检测尿液样本中的人巨细胞病毒 (HCMV) 时，浓缩液：NaCl 4.5% (w/v)、PEG6000 13% (w/v)；核酸提取液：NaOH 100mM、Tris-HCl 10mM；Chelex-100 5% (w/v)、EDTA 0.4% (w/v)，pH=12.5；PCR 反应液，pH 8.9，其中 PCR 反应液包括 Tris-HCl 10mM，此外还包括 KCl，dNTPs，Mg²⁺，BSA，引物和 TaqMan 探针，优选地还包括 Taq 酶。

其中上述核酸提取液中的 NaOH 可用 KOH 等其他碱金属氢氧化物替换。

实施例 2：样本核酸提取步骤

利用实施例 1 中的核酸检测试剂进行如下的样本核酸提取，根据样本的不同可分为以下两种样本核酸提取方法：

方案 1:

1. 取待测样本 200 μ l, 加入 200 μ l 浓缩液, 振荡混匀后 12,000rpm 离心 10min;
2. 弃上清液, 沉淀中加入 50 μ l 核酸提取液;
3. 振荡混匀, 100℃水浴或干浴 10min, 然后 12,000rpm 离心 10min, 取上清液, 即为所提取出的样本核酸溶液, 供 PCR 扩增用, 或-20℃ $\pm$ 5℃储存备用。

方案 2:

1. 取待测样本 100 μ l, 振荡混匀后, 12,000rpm 离心 10min, 弃上清液, 往沉淀中加入 50 μ l 核酸提取液;
2. 振荡混匀, 100℃水浴或干浴 10min, 然后 12,000rpm 离心 10min, 取上清液, 即为所提取出的样本核酸溶液, 供 PCR 扩增用, 或-20℃ $\pm$ 5℃储存备用。

在实际情形中, 根据检测所用的样本和检测对象的不同, 具体的核酸提取步骤略有不同。比如, 当检测血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒 (HBV) 时, 其核酸提取步骤为本实施例的方案 1; 当检测全血样本中的人 B27 基因时, 其核酸提取步骤为本实施例的方案 1; 当检测生殖道内分泌物样本中的人乳头瘤病毒 6/11 型 (HPV 6/11) 时, 其核酸提取步骤为本实施例的方案 2; 当检测痰液样本中的结核分枝杆菌 (TB) 时, 其核酸提取步骤为本实施例的方案 1; 当检测尿液样本中的人巨细胞病毒 (HCMV) 时, 其核酸提取步骤为本实施例的方案 1。

实施例 3: 荧光 PCR 检测

PCR 检测体系 40 μ l, 将 PCR 反应液按每人份量分装到 PCR 反应管中, 转移至样本处理区。对应的反应管中分别加入实施例 2 中所提取出的样本核酸溶液 4~20 μ l, 盖紧反应管, 转移至检测区进行 PCR 扩增。将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上, 设置检测 PCR 程序和检测荧光, 进行荧光 PCR 扩增。

当检测血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒 (HBV) 时, PCR 检测体系 40 μ l, 其中所提取出的样本核酸溶液 20 μ l, PCR 反应液 20 μ l。

当检测全血样本中的人 B27 基因时, PCR 检测体系 40 μ l, 其中所提取出的样本核酸溶液 4 μ l, PCR 反应液 36 μ l。

当检测生殖道内分泌物样本中的人乳头瘤病毒 6/11 型 (HPV 6/11) 时, PCR 检测体系 40 μ l,

其中所提取出的样本核酸溶液 4 μ l, PCR 反应液 36 μ l。

当检测痰液样本中的结核分枝杆菌 (TB) 时, PCR 检测体系 40 μ l, 其中所提取出的样本核酸溶液 10 μ l, PCR 反应液 30 μ l。

当检测尿液样本中的人巨细胞病毒 (HCMV) 时, PCR 检测体系 40 μ l, 其中所提取出的样本核酸溶液 4 μ l, PCR 反应液 36 μ l。

实施例 4: 临床样本 HBV 检测

样本类型为血清或血浆, 以检测乙型肝炎病毒 (HBV) 为例进行说明。按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测, 对 20 例临床已确认阴阳性的临床样本进行检测。

对照方法: 取待测样本 50 μ l 加入 50 μ l 核酸提取液 (NaCl 2M、Tris-HCl (pH 8.1) 50mM、巯基乙醇 1% (v/v)、Chelex-100 5% (w/v), pH 8.59), 振荡混匀 15sec, 100°C 水浴或干浴 10min, 然后 12,000rpm 离心 10min, 分别取上清液 4 μ l 和 20 μ l 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 PCR 反应液 (含 TAKARA PCR buffer, dNTPs, Mg^{2+} , 引物和 TaqMan 探针, pH 9.05) 和 Taq 酶。这种对照方法的检测灵敏度为 500 IU/ml。

表 1 是血清或血浆样本中的 HBV 检测结果, 其中 “+” 表示阳性结果, “-” 表示阴性结果。

表 1 血清或血浆样本中的 HBV 检测结果

样本编号	本发明检测结果	对照方法检测结果		临床样本信息
		4 μ l	20 μ l	
1	+	+	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	-	+
4	+	-	-	+
5	+	+	-	+
6	+	+	-	+
7	+	+	-	+
8	+	+	-	+
9	+	+	-	+
10	+	+	-	+

11	+	+	-	+
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-

实验结果显示，在这 20 例检测样本中，采用本发明所采用的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，共检测出 11 例 HBV 阳性，9 例 HBV 阴性。对对照方法而言，当取 4 μ l 上清液用于检测时，检测出 10 例 HBV 阳性，10 例 HBV 阴性，对照检测有 1 例与临床样本信息不一致；当取 20 μ l 上清液用于检测时，这 20 例检测样本的检测结果全为阴性，这是因为相对于本发明方法，对照方法中的核酸提取试剂的 pH 值是非强碱性的，核酸提取效率不高。另外，当样本量增加到 20 μ l 时，也可能同时增加了抑制 PCR 扩增的物质。

实施例 5：PCR 反应液 pH 值对 HBV 检测灵敏度的影响

按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，检测 HBV 阳性样本：分别将高浓度 HBV 阳性样本进行梯度稀释，获得一系列低浓度 HBV 阳性样本，浓度从高到低分别为 1000 IU/ml、500 IU/ml、250 IU/ml、100 IU/ml、50 IU/ml 和 20 IU/ml。

调节 PCR 反应液的 pH 值到 8.1，针对这些 HBV 阳性样本的荧光 PCR 检测结果如图 1 所示。结果显示，这 6 个低浓度 HBV 阳性样本都具有明显的 S 形扩增曲线，都能稳定地检出。

调节 PCR 反应液的 pH 值到 8.9 时，针对这些 HBV 阳性样本的荧光 PCR 检测结果如图 2 所示。结果显示，在这 6 个低浓度 HBV 阳性样本中，浓度为 1000 IU/ml、500 IU/ml 和 250 IU/ml 的阳性样本能够稳定检出，而浓度为 100 IU/ml、50 IU/ml 和 20 IU/ml 的阳性样本不能够稳定检出。可知，本发明的 PCR 反应液 pH 值为 8.9 时，它的检测灵敏度为 250 IU/ml，也要优于对照方法的 500IU/ml。

此外，针对浓度为 20 IU/ml 的 HBV 阳性样本，调节 PCR 反应液的 pH 值，使之分别为 8.1、

8.3、8.5、8.7 和 8.9，荧光 PCR 检测结果如图 3 所示。结果显示，随着 PCR 反应液 pH 值下降，对浓度为 20 IU/ml 的 HBV 阳性样本的扩增效率显著增加，当 pH 值为 8.1 时，扩增效率最佳。结果还显示，PCR 反应液的 pH 值分别为 8.1、8.3、8.5 和 8.7 时，均能检测 20 IU/ml 的阳性样本，但是 pH 值分别为 8.1、8.3 和 8.5 时的扩增效率、S 型扩增曲线的线性及荧光值显著优于 pH 值为 8.7 的；pH 值为 8.1 的扩增效率、S 型扩增曲线的线性及荧光值显著优于 pH 值为 8.3 和 8.5 的。由此可见，在其他检测条件相同的情况下，改变 pH 值能够对扩增效率和 S 型扩增曲线的线性及荧光值造成非常大的影响，而扩增效率和 S 型扩增曲线的荧光值提高能增加检测的灵敏度，因此 pH 值为 8.1、8.3 和 8.5 时的检测灵敏度明显优于 pH 值为 8.7 时的；pH 值为 8.1 时的检测灵敏度明显优于 pH 值为 8.3 和 8.5 时的。这意味着 pH 值逐渐降低的同时，检测灵敏度逐渐增大。

在检测血清或血浆中的 HBV DNA 时，本发明意外地发现调整 PCR 反应液的 pH 值，即从 8.9 调整到 8.7，从 8.7 调整到 8.3~8.5，从 8.3 调整到 8.1 时，取得了意想不到的扩增效果，从而显著提高了检测准确性。

实施例 6：临床样本人 B27 基因检测

样本类型为全血的临床检测，以人 B27 基因检测为例。按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，对 13 例临床已确认阴阳性的临床样本进行检测。

对照方法：先将 500 μ l 全血样本用红细胞裂解液(NH_4Cl 15mM, NaHCO_3 1mM, EDTA-2Na 0.1mM) 进行预处理，离心后，去除上清液，保留沉淀；往沉淀中加入 100 μ l 核酸提取液 (Tris-HCl (pH 8.0) 100mM, Chelex-100 5%, EDTA (pH 8.0) 10mM, NaCl 50mM, SDS 2% (w/v), pH 8.2)，振荡混匀 15sec, 100℃ 水浴或干浴 10min，然后 12,000rpm 离心 10min，取上清液 4 μ l 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 PCR 反应液（含 TAKARA PCR buffer, dNTPs, Mg^{2+} ，引物和 TaqMan 探针，pH 9.05）和 Taq 酶。

表 2 是全血样本中的人 B27 基因检测结果，其中“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

表 2 全血样本中的人 B27 基因检测结果

样本编号	本发明检测结果	对照方法检测结果	临床样本信息
1	+	+	+
2	+	+	+

3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	-	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-

实验结果显示，在这 13 例检测样本中，采用本发明所采用的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，共检测出 6 例人 B27 基因阳性，7 例人 B27 基因阴性；对照方法检测出 5 例人 B27 基因阳性，8 例人 B27 基因阴性，对照检测有 1 例与临床样本信息不一致。

实施例 7：临床样本 HPV6/11 检测

样本类型为生殖道分泌物的临床检测，以人乳头瘤病毒 6/11 型（HPV 6/11）检测为例。按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，对 15 例临床已确认阴阳性的临床样本进行检测。

对照方法：取待测样本 50 μ l 加入 50 μ l 核酸提取液（NaCl 2M、Tris-HCl (pH 8.0) 50mM、巯基乙醇 1% (v/v)、Chelex-100 5% (w/v)，pH 8.59)，振荡混匀 15sec，100℃水浴或干浴 10min，然后 10,000rpm 离心 5min，取上清液 4 μ l 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 PCR 反应液（含 TAKARA PCR buffer, dNTPs, Mg^{2+} ，引物和 TaqMan 探针，pH 9.05）和 Taq 酶。

表 3 是生殖道分泌物样本中的 HPV 检测结果，其中“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

表 3 生殖道分泌物样本中的 HPV 基因检测结果

样本编号	本发明检测结果	对照方法检测结果	临床样本信息
1	+	+	+
2	+	-	+

3	+	+	+
4	+	-	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-

实验结果显示：在这 15 例检测样本中，采用本发明所采用的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，共检测出 10 例 HPV 阳性，5 例 HPV 阴性；对照方法检出 8 例阳性，7 例阴性，对照有 2 例结果与临床样本信息不一致。

实施例 8：临床样本 TB 检测

样本类型为痰液的临床检测，以结核分枝杆菌（TB）检测为例。按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，对 10 例临床上已确认阴阳性的临床样本进行检测。

对照方法：500 μ l 痰液样本，加入 5ml 1M NaOH 溶液，振摇液化 30min 后，14,000 离心 5min，去除上清液，保留沉淀；往沉淀中加入 50 μ l 核酸提取液（SDS 0.1% (w/v)，NP40 1% (v/v)，Tween-20 1% (v/v)，Chelex-100 15% (w/v)，pH 5.02），振荡混匀 15sec，100℃水浴或干浴 30min，然后 12,000rpm 离心 10min，取上清液 10 μ l 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 PCR 反应液（含 TAKARA PCR buffer, dNTPs, Mg^{2+} ，引物和 TaqMan 探针，pH 9.05）和 Taq 酶。

表 4 是痰液样本中的 TB 检测结果，其中“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

表 4 痰液样本中的 TB 检测结果

样本编号	本发明检测结果	对照方法检测结果	临床样本信息
1	+	+	+
2	+	-	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

实验结果显示：在这 10 例检测样本中，采用本发明所采用的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，共检测出 5 例 TB 阳性，5 例 TB 阴性；对照方法检测 4 例阳性，6 例阴性，对照有 1 例样本结果与临床样本信息不一致。

实施例 9：临床样本 HCMV 检测

样本类型为尿液的临床检测，以人巨细胞病毒检（HCMV）测为例。按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，对 10 例临床已确认阴阳性的临床样本进行检测。

对照方法：收集待测尿液样本 250 μ l，14,000 离心 5min，去除上清液，保留沉淀；往沉淀中加入 250 μ l 核酸提取液（Tris-HCl (pH 8.0) 100mM, Chelex-100 5%, EDTA (pH 8.0) 10mM, NaCl 50mM, SDS 2% (w/v), pH 8.2），振荡混匀 15sec，100℃水浴或干浴 10min 然后 13,000rpm 离心 10min，取上清液 4 μ l 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 PCR 反应液（含 TAKARA PCR buffer, dNTPs, Mg^{2+} , 引物和 TaqMan 探针, pH 9.05）和 Taq 酶。

表 5 是尿液样本中的 HCMV 检测结果，其中“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

表 4 尿液样本中的 HCMV 检测结果

样本编号	本发明检测结果	对照方法检测结果	临床样本信息
1	+	+	+
2	+	+	+

3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

实验结果显示：10 例检测样本中，采用本发明所采用的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，共检测出 5 例 HCMV 阳性，5 例 HCMV 阴性；对照方法检测出 5 例阳性，5 例阴性；两种检测结果相一致。

实施例 10：灵敏度检测结果

按实施例 1、实施例 2 和实施例 3 的核酸检测试剂、核酸提取方法和荧光 PCR 检测，检测 HBV、人 B27 基因、HPV、TB、HCMV 阳性标样本：分别将阳性标样本进行稀释，浓度分别按照表 6 稀释，每个浓度重复 8 次。测试结果如表 6 所示，其中“+”表示阳性结果，“-”表示低于试剂检测下限。

表 6 灵敏度检测结果

样 本	灵敏度检测														
	HBV (IU/ml)			B27 基因(ng/反应)			HPV 6/11(copies/ml)			TB (个菌/ml)			HCMV (copies/ml)		
浓 度	50	20	10	10	5	2.5	500	400	250	10	5	1	1000	500	250
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
6	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

以上结果显示本发明的HBV检测灵敏度为20 IU/ml，人B27基因检测灵敏度为5ng/反应，HPV 6/11检测灵敏度为250 copies/ml，TB检测灵敏度为5个菌/ml，HCMV检测灵敏度为500 copies/ml。

1. 一种样本核酸检测试剂, 所述样本核酸检测试剂包括核酸提取液和 PCR 反应液, 其特征在于, 所述核酸提取液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM, Tris-HCl 1mM~25mM, Chelex-100 2%~5% (w/v), EDTA 0.1%~0.4% (w/v), 所述核酸提取液的 pH 值为 10.5~12.5; 所述 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM~75mM, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.0~9.0。
2. 如权利要求 1 所述的样本核酸检测试剂, 其特征在于, 所述碱金属氢氧化物为 NaOH 或 KOH。
3. 如权利要求 1 所述的样本核酸检测试剂, 其特征在于, 所述样本核酸检测试剂还包括浓缩液, 所述浓缩液包括 NaCl 2.5%~4.5% (w/w), PEG6000 10%~13% (w/v)。
4. 如权利要求 1 所述的样本核酸检测试剂, 其特征在于, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.7。
5. 如权利要求 4 所述的样本核酸检测试剂, 其特征在于, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.5。
6. 如权利要求 5 所述的样本核酸检测试剂, 其特征在于, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1。
7. 如权利要求 1~6 之一所述的样本核酸检测试剂在检测 HBV 核酸中的应用。
8. 一种样本核酸检测试剂盒, 所述样本核酸检测试剂盒包括核酸提取液和 PCR 反应液, 其特征在于, 所述核酸提取液包括碱金属氢氧化物 10mM~100mM, Tris-HCl 1mM~25mM, Chelex-100 2%~5% (w/v), EDTA 0.1%~0.4% (w/v), 所述核酸提取液的 pH 值为 10.5~12.5; 所述 PCR 反应液包括 Tris-HCl 5mM~75mM, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.0~9.0。
9. 如权利要求 8 所述的样本核酸检测试剂盒, 其特征在于, 所述碱金属氢氧化物为 NaOH 或 KOH。
10. 如权利要求 8 所述的样本核酸检测试剂盒, 其特征在于, 所述样本核酸检测试剂盒还包括浓缩液, 所述浓缩液包括 NaCl 2.5%~4.5% (w/w), PEG6000 10%~13% (w/v)。
11. 如权利要求 8 所述的样本核酸检测试剂盒, 其特征在于, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.7。
12. 如权利要求 8 所述的样本核酸检测试剂盒, 其特征在于, 所述 PCR 反应液的 pH 值为 8.1~8.5。

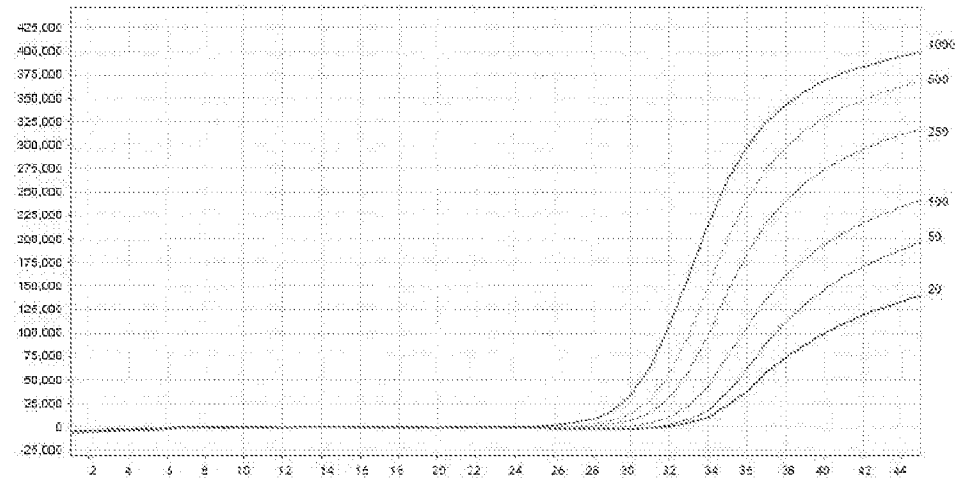


图 1

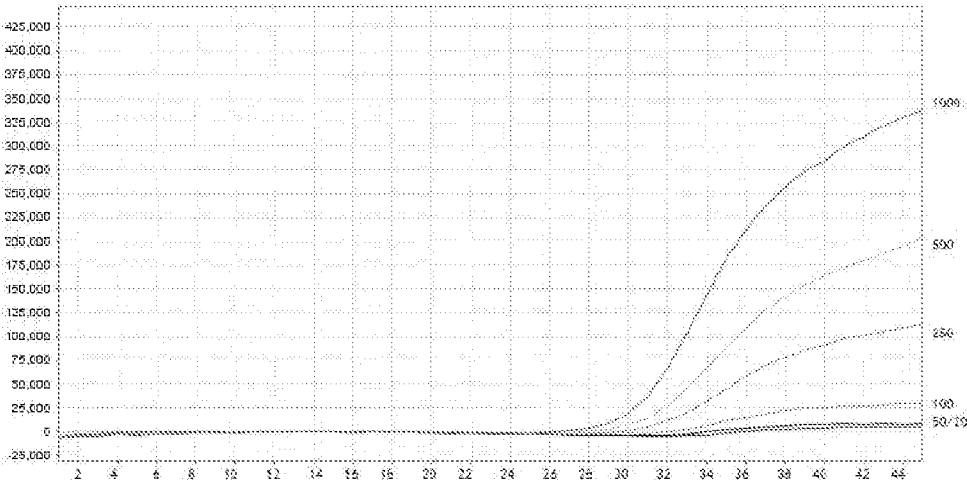


图 2

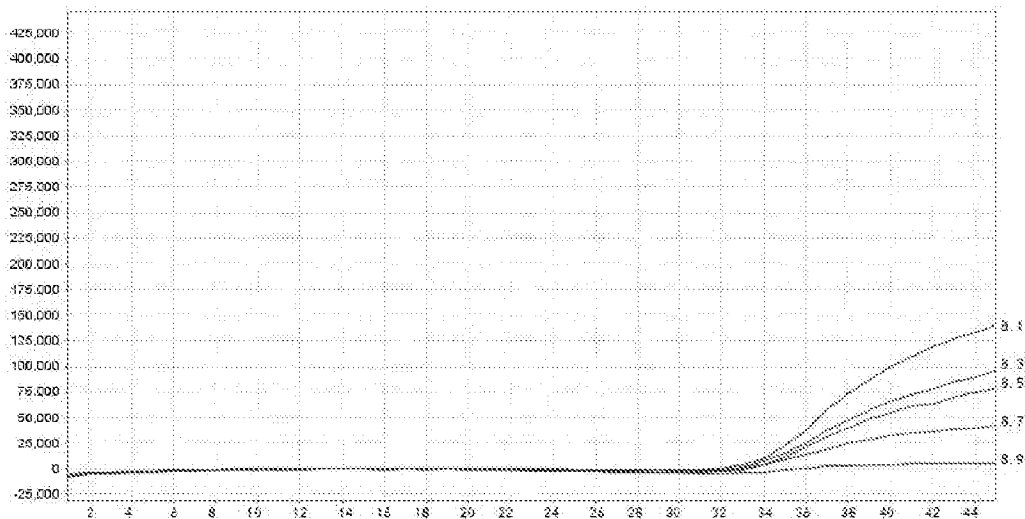


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, WEB OF SCIENCE, CA, PubMed: 碱金属, 氢氧化物, 氢氧化钠, 氢氧化钾, 核酸, 提取, TRIS HCL, CHELEX, EDTA, NaOH, KOH, PH, DNA, RNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102559933 A (TRIPLEX INTERNATIONAL BIOSCIENCES (CHINA) CO., LTD.) 11 July 2012 (2012-07-11) see description, embodiment 2	1-12
A	CN 102242192 A (RESEARCH INSTITUTE OF MILITARY MEDICAL SCIENCES COMBINED SERVICE DEPARTMENT OF PLA NANJING MILITARY REGION) 16 November 2011 (2011-11-16) see claim 8	1-12
A	CN 104293913 A (GUANGZHOU HEAS BIOTECH CO., LTD.) 21 January 2015 (2015-01-21) see description, embodiment 1	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2018

Date of mailing of the international search report

05 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/088121

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102559933	A	11 July 2012	None			
CN	102242192	A	16 November 2011	CN	102242192	B	15 May 2013
CN	104293913	A	21 January 2015	CN	106148521	A	23 November 2016
				CN	104293913	B	30 November 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/088121

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2018.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, WEB OF SCIENCE, CA, PubMed: 碱金属, 氢氧化物, 氢氧化钠, 氢氧化钾, 核酸, 提取, TRIS HCL, CHELEX, EDTA, NaOH, KOH, PH, DNA, RNA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102559933 A (泰普生物科学中国有限公司) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 参见说明书实施例2	1-12
A	CN 102242192 A (中国人民解放军南京军区军事医学研究所) 2011年 11月 16日 (2011 - 11 - 16) 参见权利要求8	1-12
A	CN 104293913 A (广州和实生物技术有限公司) 2015年 1月 21日 (2015 - 01 - 21) 参见说明书实施例1	1-12

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 8月 14日

国际检索报告邮寄日期

2018年 9月 5日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

赵彦豪

电话号码 62411043

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/088121

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102559933	A	2012年 7月 11日	无			
CN	102242192	A	2011年 11月 16日	CN	102242192	B	2013年 5月 15日
CN	104293913	A	2015年 1月 21日	CN	106148521	A	2016年 11月 23日
				CN	104293913	B	2016年 11月 30日