

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780017119.8

[51] Int. Cl.

*C12Q 1/68 (2006.01)*  
*G01N 33/50 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*G01N 33/543 (2006.01)*  
*G01N 33/558 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年5月27日

[11] 公开号 CN 101443456A

[22] 申请日 2007.3.12

[21] 申请号 200780017119.8

[30] 优先权

[32] 2006.3.11 [33] GB [31] 0604973.8

[86] 国际申请 PCT/GB2007/000865 2007.3.12

[87] 国际公布 WO2007/104962 英 2007.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.11

[71] 申请人 英国环境食物及农村事务部中央科学  
实验室

地址 英国约克郡

[72] 发明人 C·丹克斯 N·布恩汉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 刘冬 韦欣华

权利要求书4页 说明书27页 附图5页

[54] 发明名称

纯化方法和试剂盒

[57] 摘要

用于从液体样品中分离核酸的方法，所述方法包括使包含或疑似包含所述核酸的液体样品沿吸水膜、例如常规侧流装置的吸水膜流动，使得核酸沿所述膜的纵向分布的步骤。可在所述膜上检测所述核酸。

1. 用于从液体样品中分离核酸的方法，所述方法包括下述步骤：使包含或疑似包含所述核酸的液体样品沿吸水膜流动，使所述核酸沿所述膜的纵向分布。

2. 权利要求 1 的方法，其中在后续的步骤中检测所述膜上核酸的存在情况或从所述膜上回收核酸。

3. 权利要求 1 的方法，其中在所述液体沿该膜流动后将所述膜干燥或让所述膜干燥。

4. 权利要求 3 的方法，其中保存所述干燥膜，并在后续的步骤中检测所述膜上核酸的存在情况或从所述膜上回收核酸。

5. 上述权利要求中任一项的方法，其中对所分离的核酸进行进一步分析。

6. 权利要求 5 的方法，其中使用所述膜的样品进行所述进一步分析。

7. 权利要求 5 的方法，其中在所述进一步分析之前从所述膜上洗脱核酸。

8. 权利要求 5-7 中任一项的方法，其中所述进一步分析包括 SNP 分型、DNA 指纹测定或测序。

9. 权利要求 5-8 中任一项的方法，其中检测特定靶核酸。

10. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述膜是硝化纤维素膜。

11. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述膜是液流装置的部件。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述液流装置包括样品接收部分和位于所述膜上的远离所述样品接收部分的吸收部分。

13. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述膜安置于固体罩中，或层压所述膜。

14. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述膜经过处理，以增强对沿该膜流动的液体的芯吸作用。

15. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述样品是生理或临床样品、或组织提取物。

16. 权利要求 12 的方法，其中所述样品是植物或动物组织的提取物。

17. 权利要求 12 的方法，其中所述样品是血液、血清、尿、乳或唾液或排泄物提取物。

18. 权利要求 1-14 中任一项的方法，其中所述样品是环境样品。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述样品是水样或土壤提取物。

20. 权利要求 1 的方法，所述方法用于检测样品中靶核酸存在情况的测定，所述方法包括以下步骤：使疑似包含所述核酸的液体样品沿液流装置的膜流动，并检测所述膜特定核酸的存在情况。

21. 上述权利要求中任一项的方法，其中让样品沿所述膜展开后取下该膜的一部分，并在所述部分上检测核酸的存在情况。

22. 权利要求 21 的方法，其中使用核酸扩增反应检测所述核酸。

23. 权利要求 22 的方法，其中在样品沿所述膜流动后，可用于所述核酸扩增反应的试剂存在于该膜中。

24. 权利要求 23 的方法，其中在加载所述样品之前，所述试剂已存在于所述膜中。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述试剂存在于样品接收部分，并与所述样品一起沿所述膜移动。

26. 权利要求 23-25 中任一项的方法，其中所述试剂是扩增引物。

27. 权利要求 22-26 中任一项的方法，其中所述扩增反应是聚合酶链反应(PCR)。

28. 权利要求 27 的方法，其中对 PCR 的进程进行实时监测。

29. 权利要求 28 的方法，其中已知加载于所述膜的样品量，并将监测结果用于对存在的核酸量进行定量。

30. 上述权利要求中任一项的方法，其中检测所述膜上不止 1 种核酸的存在情况。

31. 权利要求 30 的方法，其中使用所述膜的相同或不同的样品进行多个 PCR 反应。

32. 权利要求 30 的方法，其中进行多重 PCR 反应，以在单个 PCR 中检测不止 1 种核酸。

33. 权利要求 1-29 中任一项的方法，其中从所述膜上回收不止 1 种核酸。

34. 上述权利要求中任一项的方法，其中所述膜是液流装置的部分，所述装置用于对另外的分析物进行测定。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述测定是免疫测定。

36. 用于检测液体样品中分析物存在情况的两步测定，所述测定还任选检测液体样品中核酸的存在情况，所述方法包括如下步骤：(i) 使疑似包含所述分析物和核酸的液体样品沿液流装置的膜流动，所述装置能进行检测所述另外的分析物的存在情况的测定和，(ii) 根据步骤(i)的结果检测所述膜上所述核酸的存在情况。

37. 权利要求 36 的测定，其中步骤(i)的测定是免疫测定。

38. 权利要求 36 或 37 的测定，其中所述分析物和核酸来源于相同的生物体、或所述生物体的特定种或基因型。

39. 权利要求 38 的测定，其中所述分析物是一种类型生物体特有的，而所述核酸是所述生物体的特定种特有的。

40. 权利要求 36 或 37 的测定，其中所述分析物或核酸之一是特定感染性生物体特有的，而另一个是所述生物体的宿主特有的。

41. 权利要求 40 的测定，其中所述分析物是感染性生物体特有的，而所述核酸存在于影响宿主对所述生物体的易感性和抗性的宿

主基因中。

42. 权利要求 36 或 37 的测定，其中所述分析物是可用于植物的杀虫剂，而所述核酸存在于所述植物的基因中。

43. 用于进行权利要求 1-35 中任一项的方法或权利要求 36-42 中任一项的测定的试剂盒，所述试剂盒包含吸水膜和至少 1 种用于检测核酸的试剂。

44. 权利要求 43 的试剂盒，其中当样品沿所述膜流动后，所述试剂存在于该膜中。

45. 权利要求 44 的试剂盒，其中在加载所述样品之前，所述试剂已存在于所述膜中。

46. 权利要求 44 的试剂盒，其中所述试剂存在于样品接收部分，并与所述样品一起沿所述膜移动。

47. 权利要求 43-46 中任一项的试剂盒，其中所述至少 1 种试剂包括适于扩增靶核酸序列的引物。

48. 权利要求 43 或权利要求 47 中任一项的试剂盒，其中所述吸水膜是液流装置的部件。

49. 权利要求 48 的试剂盒，其中所述液流装置用于进行检测另外的分析物的测定。

50. 权利要求 49 的试剂盒，其中所述另外的分析物是多肽，并且所述测定是免疫测定。

51. 参考实施例并基本上如上文所述的用于从液体样品分离核酸的方法。

## 纯化方法和试剂盒

本发明涉及新颖的纯化方法以及可用于该方法中的试剂和试剂盒，所述方法可用于多种测定。

多种测定方法已应用于诊断或检测。对分析物(例如在各种固相支持体上的蛋白)的检测在本领域为人所熟知。许多这样的检验以“试纸条(dipstick)”测定的形式进行，所述测定依靠包含所述分析物的液体样品沿膜的侧流，在所述膜上所述分析物依次遇到标记、标记的结合配偶体(binding partner)和/或固定化结合配偶体，借此在该膜上产生可检测的可见信号。这种方法的优势在于：它们提供快速测定结果，而且可以在几乎任何地方由非专业的人员使用。

例如，它们可用于农业以检测农作物上特定的害虫或病原体，例如真菌抗原或病毒感染。

在某些情况下，所需要的只是指示分析物存在与否的简单的阳性或阴性结果。例如，这样的测定通常用于妊娠检验，而且仅需存在特定的激素，例如 HCG，即可表明所述受试者已怀孕。

然而，在许多情况下，这种类型的检验仅可给出可能存在的问题或病症的初步诊断。对于许多微生物而言，例如，存在特定蛋白可表明存在特定种类的生物体，例如现存的普通细菌、真菌或病毒，但是通过这种方法不能检测出所述生物体的准确的菌株/毒株。因为在确定任何特殊情况的危险性的准确水平时，准确的菌株/毒株常常是关键，因此需要进一步的研究。例如，某种特定细菌(例如大肠杆菌)或病毒(例如流感病毒)有许多的菌株/毒株，但是仅有特定的菌株/毒株会造成重大健康危害，例如大肠杆菌 O157 或禽流感 H5N1 毒株。对这些菌株/毒株准确的诊断可能是困难的，因为用于诊断技

术的抗体可与源自多种菌株/毒株的蛋白反应或交叉反应。

可替代的检测或诊断方法在核酸水平起作用。在这些方法中，在样品中检测特定核酸序列例如 DNA 序列或 RNA 序列，并且所述结果指示特定生物体的存在情况。这些技术非常灵敏，而且通过选择合适的特征性靶核酸，可检测准确的菌株/毒株或甚至准确的特定基因的等位基因形式或基因组形式，所述菌株/毒株或所述形式可能是基因组疾病(genomic disease)特有的或对特定疾病状态的诱因。

扩增技术例如聚合酶链反应(PCR)或逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)意味着：即使测定中存在或可能存在的核酸量非常少，仍可使用上述技术。

因此，在检测和诊断领域，所述技术是强有力的工具。

然而，所述技术普遍需要一些重要的样品制备方法。为了除去样品中可能妨碍核酸检测方法或掩盖结果的部分，通常需要进行大量的样品纯化或制备，所述样品是例如来自植物或动物组织等的组织或者血液或尿等样品的粗提取物。所以，常常难以在实验室环境之外进行所述检验，故而必须运送所取的样品用于进一步的分析。

含有遗传物质的液体样品可能难于运送，要求对采集的所述样品灭菌和/或冷冻样品。已知暂时储存干燥于固相支持体、特别膜(例如滤纸等)上核酸的含遗传物质的样品，例如的血液。然而，通常认为这类储存的物质的稳定性可能存在问题，而已提出用于改进所述问题的方法，所述方法包括用包括弱碱和螯合剂在内的各种化学试剂中浸渍所述固相支持体(参见例如美国专利第 5,756,126 号)。

用于进行某些初步样品制备步骤诸如细胞溶解和蛋白变性的储存卡(Storage card)和可用于后续分析的可能添加的试剂如 PCR 引物等也公开于美国专利第 5,756,126 号中，并且所述产品有 Whatman 的 FTA 卡。所述产品载有例如螯合剂、碱和离子型去污剂的特定试剂以增进储存能力。

业已尝试使用复杂的装置和系统直接在膜上检测核酸，所述装

置和系统利用针对特定核酸、半抗原和/或标记部分的结合剂来产生信号，与用于常规蛋白分析物的类似(参见例如 WO 00/29112 和 Dinerva 等, J. of Clin. Microbiol. (2005) p4015-4021)。通常在这些情况下，为了得到足够的样品中的靶 DNA 以提供可检测的信号，需要进行扩增，例如使用聚合酶链反应进行扩增。

然而，本申请人发现，用于例如试纸条型免疫测定的常规液体侧流装置可提供可用于后续的分析优良的核酸纯化和储存的方法。

根据本发明，提供了用于从液体样品分离核酸的方法，所述方法包括下述步骤：使包含或疑似包含所述核酸的液体样品沿吸水膜流动，以使核酸沿所述膜的纵向分布。

本申请人发现：当沿吸水膜流动时(包括在液流装置所用的条件下)，核酸与所述膜(特别是用于这些装置的纤维素膜或硝化纤维素膜)结合。似乎通过使液体样品沿吸水膜流动，任何存在的核酸都被优先地保留在所述膜上，因此可与样品中的其它成分分离。在这些情况下，所述核酸以稳定的形式沿所述膜的纵向分布，特别是沿所述膜的几乎全部的和适当的长度分布。无需在所述膜上提供特定的结合剂以确保所述核酸被保留或集中在特定区域、或防止所述核酸从所述膜上完全洗脱。这可使所述装置的制造更简单和更经济。可使用任何常规的检测方法来检测所述膜上核酸的存在情况。

随后可检测在所述膜上核酸的存在情况，或随后可从所述膜上回收核酸，所述检测或回收在所述膜被干燥的前后均可。

因此，这些膜提供易于得到且易于使用的纯化方法，该方法可用于多种应用中。可应用所述方法的领域包括食品和农业检验、诊断学(包括人类、动物诊断学)、环境监测(包括水和土壤监测)、法医学、转基因学、输血医学(transfusion medicine)、质粒筛选、药物研发、基因组学、植物或动物鉴别或分类、药物遗传学、STR 分析和分子生物学研究。

例如，本发明的方法可作为可用于疾病诊断或病原体检测的任

何形式或遗传分析(例如 SNP 分型、DNA 指纹测定或核酸测序)以及特定核酸检测的预备步骤。

一旦将所述核酸在所述膜上分离,则可对该核酸进行进一步的原位分析,或者如有需要,可使用合适的缓冲液将核酸从所述膜洗脱或提取,并对所述洗出液或提取物进行分析。

所述膜可用于替代常规的纯化柱,提供了更加经济和易用的选择。

本申请人还发现,在已被干燥的膜上所述核酸可更长时间地(包括多年)保持其位置并且保持稳定。因此,在分析前可更长时间的储存样品或甚至将其存档。

所述膜适合作为常规的液流装置的部件。

当用于本文时,术语“液流装置”是指包含液体样品和试剂(在某些情况下包括标记试剂)可通过的多孔膜或吸水膜的装置。这些装置可包括公知的侧流装置(LFD)。

被回收或被检测的核酸可为例如特定生物体(例如病毒、真菌或细菌等病原生物体)特有的核酸,或更适合为特定病原菌株/毒株或这种生物体种特有的核酸。

或者,为了诊断目的,所述核酸可包括植物或动物(包括人)遗传疾病或病症特有的特定核酸序列、或遗传疾病或病症之诱因特有的特定核酸序列,在所述情况下,可能需要检测更多的核酸序列或所述序列中的更多多态性或变异的存在情况。

如上所述,用于分析目的的核酸分离广泛地用于许多领域,而本发明可用于任何的所述领域。

可在所述膜上检测或从所述膜中回收多种核酸序列。根据检验目的,这些核酸序列可以来自于相同或不同的来源。例如,如果寻求鉴定样品中感染性生物体的存在情况,那么可能希望不仅检测所述生物体特有的核酸,而且还检测宿主生物体特有的核酸,以便证实所述样品的真实性。

这可例如通过如下方式进行：在所述膜的特定样品上检测不止 1 种核酸(例如使用多重 PCR)，或对所述膜的不同样品进行不同的检测反应。

当用于本文时，术语“膜”是指通常是平坦且多孔的固体基质。合适的基质或膜可包括：基于纤维素的材料，例如纤维素、硝化纤维素或羧甲基纤维素；亲水性聚合物，包括合成亲水性聚合物，例如聚酯、聚酰胺、碳水化合物聚合物；疏水性聚合物，例如卤代聚合物，例如聚四氟乙烯；玻璃纤维；或多孔陶瓷。

特别合适的膜包括纤维膜，特别是硝化纤维素膜，所述膜可被层压，例如可从 Millipore 得到的膜。这些膜可支持在基材上，例如塑料衬底膜，例如聚酯(Mylar®)或 PET 衬底纤维素膜上。所述膜的孔径可大范围变化。本申请人发现，孔径似乎对于核酸的保留或其它作用并不关键。可得到在 35-240 秒范围、宜在 65-180 秒范围内通过 4 cm 长度的侧流流速的膜，在本发明的方法中所述膜有效。所述流速通常与孔径和/或所述膜材料(例如硝基纤维素)的配方相关，这在本领域中可以理解。

所述装置可采用多种形式，但是通常，所述装置包括样品接收部分，该部分或者为所述膜本身的部分或者为吸收垫，该部分与所述膜存在液体接触。膜本身适于为长条状的形式，储存在样品接收部分的液体能够沿着所述膜移动。为了吸收过量的样品、也为了有效地吸引液体样品沿所述膜流动，吸收垫可位于所述膜中远离样品接收部分的末端。

所述膜至少适于安置在固体罩(例如塑料罩)中，当用于常规免疫测定程序中时，所述罩可配备 1 个以上用于样品传输和/或用于读取结果的开口或窗口。或者，可将所述样品接收部分安置于所述罩外部。

然而，在某些情况下，特别是对于实验室应用，可优选无罩的试纸条结构，特别是当层压以获得支持和保护时。

在一个实施方式中，所述方法可在用于检测液体样品中特定核酸存在情况的测定中使用。

所加载的样品适于为任何包含或疑似包含核酸序列的液体样品。因此，样品包括已经溶解、悬浮、混合或以其它方式含有核酸(包括 DNA 和/或 RNA)、或者含有 DNA 和/或 RNA 的细胞、细胞成分或细胞提取液的液体。

这种性质的样品可由很多种来源获得。这包括：例如生理、病理或临床体液，例如人类或动物的分泌物、排泄物、溢泌物和渗出液；以及细胞悬液，例如取自包括人类在内的动物的血液、血清、淋巴、滑液、精液、唾液(特别是含有口腔细胞的唾液)、皮肤屑和毛根细胞。其它的样品包括：植物的生理或病理液体或细胞悬液；液体制品，例如细菌、真菌、质粒或病毒等的提取物或悬液；和例如蠕虫、原生动物、螺旋体的寄生物的液体制品、提取液或悬液。还可形成通过形成组织提取液(例如植物或动物组织)而得到的液体样品。然而，样品还可包含源自 DNA 或 RNA 合成的介质、或化学或生物合成的 DNA 或 RNA 的混合物。

特别是，样品包括生理或临床样品，例如血液、尿、乳或唾液以及血清，或所述样品可包括组织提取液，例如植物组织提取液(例如叶、茎、树皮或块茎提取液)、或动物组织(包括血液、骨、肝、肾等)或排泄物的提取液。

所述样品优选包含来自例如植物或动物的生物体的组织提取液，所述生物体可例如被微生物(特别是病原微生物)感染，或为了分类或其它目的，需要对所述生物体进行遗传分析。适于通过将所述样品提取入合适的缓冲溶液以制备提取液。本申请人发现，用于提取免疫测定所用蛋白样品的缓冲液还可提取出核酸，因此所述缓冲液可用于本方法中。在任何特定情况下所使用的准确缓冲溶液将取决于所检验的样品的性质。但是，对于从植物或动物样品中提取核酸而言，合适的缓冲液可包含易于得到的缓冲液，例如磷酸缓冲盐

水(PBS)或 Tris 缓冲盐水(TBS)。

缓冲液可适于包含防腐剂，例如叠氮钠、福尔马林或硫柳汞。在任何情况下所加入的防腐剂的量取决于所使用的特定防腐剂以及相关的缓冲液的类型和体积，但是以叠氮钠为例，可将其适宜地以 0.2-1.5%重量的量、例如约 0.5%重量加入。

适于将待检验的组织样品与提取缓冲液混合均匀，任选使用机械破碎方法。例如，已经通过如下方法制备用于免疫测定程序的组织样品、特别是植物组织样品：将所述组织置于包含提取缓冲液和滚珠的小瓶并且剧烈摇动所述小瓶，以使滚珠冲击样品并促进细胞结构的破坏。

可对组织或或其它样品进行不同的处理，但是本领域的技术人员可确定将核酸提取入提取物的准确方法。

一旦在样品接收区将样品加载于所述膜上，则由于吸水性流动所述样品会沿所述膜移动。根据所述样品和所述膜的性质，该过程可迅速发生并且仅需最小限度的操作技术和干预。

此后，在例如实验室环境中将所述膜或更适于将所述膜的一部分(例如从所述膜提取的条带或圆片)取出，并用于进一步的分析。所述分析可包括如上所述的遗传分析，例如 SNP 分型或 DNA 指纹测定，以及核酸检测测定。

可从所述膜的任意部分取得所述部分，但是可优选从与样品接收部分隔离的区域提取样品。这在样品包含例如特别大的蛋白或分子的情况下尤其重要，所述蛋白或分子不能沿所述膜被很好地洗出的，因此它们可在样品接收部分聚集并且妨碍任何后续的检测方法，例如 PCR。可能这样受影响的具体样品包括植物提取物，其中大分子例如叶绿素倾向于在所述装置上膜的样品接收部分聚集。

如有需要，可标记所述膜以显示合适部分的尺寸和位置。用于提取膜样品的具体部位可在常规免疫测定 LFD 的检测区和对照区的区域中。在测定过程中形成的对照线，特别是通过免疫测定技术形

成的对照线(control lines, which are developed in the course of the assay, in particular by immunoassay techniques, in which labelled)可用于在其所标记的膜中为样品提取部分划界。这提供了进一步的优点,即证实所述测定已适当地进行。如果需要核酸定量,则用于检验的所述膜的所述部分的尺寸特别重要。

可通过任何常规的技术实现核酸检测或分析。如有必要或有需要,可首先用水从膜上洗下储存或保留在膜上的核酸,或者如有必要,可使用常规的洗脱缓冲液洗脱,并且分析清洗液或洗出液。在从室温至例如高达 100°C 的升高的温度范围内清洗 10 min,通常可使核酸从所述膜上释放。

然而,优选在所述膜的一部分上直接进行分析。

如果预先知道将采用何种形式的核酸分析,则可方便法地在使用前,向所述膜、例如干燥形式的膜中加入 1 种以上的可用于该分析的试剂。这些试剂可以或者沿所述膜的纵向定位,或者,如果它们可以在所述膜中移动但是又至少在一定程度上保留于膜上,则它们可以可扩散的方式定位于所述膜上的样品接收部分或垫上,它们与液体样品一起沿所述膜的纵向运送。

例如,为了检测所述膜上特定核酸的存在情况,将所述膜或膜的部分浸渍于 PCR 混合物中。在本领域中,PCR 混合物为人所熟知。所述混合物适于包含诸如核酸、聚合酶和一组 PCR 引物的试剂,其中所述引物设计用于扩增作为特定生物体之特征的特定核酸序列。PCR 反应物可进一步包含缓冲液、镁盐等。

如有需要,可将 1 种以上进行 PCR 所必需的试剂“预先加载”于所述膜上,或者沿该膜的纵向或者以扩散的方式加载于所述膜的样品接收部分或垫上。在后一种情况下,可将 1 种以上所述试剂特异性的合适“捕获”试剂(例如抗体或抗体的结合片段)固定于所述膜中待用于后续分析的部分,以便将这些试剂浓缩于该部分,为后续使用做准备。当所述试剂是多肽或蛋白例如聚合酶时,所述情况

特别的可取且方便。

以这种方式包含的特别合适的试剂包括进行扩增或检测特定核酸可能需要的任何引物或探针。通过将这种类型的特定试剂加入所述膜，有可能将预混合的扩增混合物或部分(例如准备好的 PCR 珠 (PCR ready bead))用于所述分析。

在所述膜上存在核酸的情况下，PCR 混合物一经形成，就对所述混合物进行多个热循环，在每个循环中，使样品中存在的核酸变性，让引物退火至反应混合物中存在的任何靶序列上，随后通过聚合酶延伸。

在一个特定实施方式中，以定量方式进行 PCR 反应。为此，可在 PCR 反应中包括标记试剂，例如标记探针和/或 DNA 结合剂例如嵌入染料。特定定量测定类型是 TAQMAN™测定，在所述测定中探针用通过 FET 或 FRET 彼此相互作用的 2 种荧光部分标记。在所述 PCR 过程中，探针与所扩增的序列杂交，随后所述聚合酶的 5'→3' 外切核酸酶活性消化所述探针，从而将所述两种荧光部分分离，一旦所述部分之间的物理距离增加，所述部分就会产生不同的荧光并因此也不再产生所述相互作用。荧光的变化可易于检测并且因此可监测到所扩增的核酸序列量的增加。通过在扩增循环中监测所述变化，可确定所述样品中的核酸量。

为了将所述膜上存在的核酸量与所述样品中包含的核酸量相互关联，可能需要或有必要确定最初加载于所述膜上的精确的或测量过的样品量，并且小心地控制所述膜中用于该分析的任何部分的尺寸。

可得到其它的定量 PCR 方法，例如在欧洲专利第 1049802B 号中所描述的方法(通过参考将其内容引入本文中)，以及通过使用 Scorpion™探针 (<http://www.dxsgenotyping.com/technology.htm>)和使用环介导的等温扩增方法(LAMP) (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>)的方法。

在特定实施方式中，本发明提供用于检测样品中靶核酸存在情况的测定方法，所述方法包括下述步骤：使疑似包含所述核酸的液体样品沿膜(例如液流装置的膜)流动，并且在所述膜上检测所述靶核酸的存在情况。

似乎通过在宽广的区域有效地“展开”所述核酸，所述核酸可与样品中的其它成分充分地分离，使得可以使用常规的核酸检测方法(例如 PCR)对所述核酸的检测，比例如使用所述方法对样品本身进行分析的情况迅速和容易得多。实际上，似乎核酸被保留在所述膜结构中，且所述情况具有纯化效果。

如上所述，这代表了用于在任何分析中进行简单的纯化步骤的高成本效率的有效方法，尤其是对于涉及可在膜材料存在下进行而不被明显抑制的核酸扩增例如聚合酶链反应(PCR)而言。

上述方法的进一步的优点是：可“现场”进行所述纯化步骤，例如在野外或使用可在家庭使用或可在诊所(包括医疗诊所和兽医诊所)使用的试剂盒。仅需将所述膜或包含所述膜的装置而非液体样品送至实验室进行分析，因此几乎消除了实验室仪器和人员的污染危险。

然而，可在现场进行核酸分析的便携装置还可用于进行整个分析过程而无需运送样品。所述装置正逐渐可以获得，但迄今为止的问题是对复杂样品制备程序的需要限制了其可用性和便携性。

如有需要，在所述装置中可包含所述膜或适合保存膜的可为一次性的盒、小柱等。这允许在“野外”情况下在进行现场分析之前进行快速和简易的纯化。

如上所述检测的核酸可为任何所需的靶核酸。然而，在一个实施方式中，通常要求检测植物或动物的特定病原生物体(例如细菌、病毒或真菌)特有的核酸，特别是可对所述生物体进行菌株/毒株分型或血清分型的核酸。

如上所述，所述方法可用于为任何目的而纯化核酸，所述目的

包括测序或包括基因分型或 SNP 分析的遗传分析。许多所述技术使用扩增反应，例如 PCR，并且上述方法可与任何所述技术联用。

在一个特别优选的实施方式中，用于上述方法或测定的所述膜是液流装置的部件，所述装置可对不同分析物进行测定，例如对特定多肽分析物(例如蛋白或肽分析物)的免疫测定，但是在所述情况下，其它分析物例如杀虫剂或杀虫剂残基的化学药物可包含所述不同分析物。所述不同分析物可为也可指示被检验的特定病原体或病症的分析物。

这样，所述免疫测定方法可作为在所述测定程序中的预备步骤。若免疫测定步骤的结果为阴性，则可能不需在进行更复杂的核酸检测步骤。然而，若所述结果为阳性，例如表明存在特定生物体类型，则第二个步骤检测作为所述生物体特征的核酸，可确认所述结果，并且根据靶核酸序列的性质还可进一步澄清所述生物体的性质、物种或菌株/毒株。

然而，并不需要不同分析物以及所述核酸或每种核酸均源自相同的来源或生物体。例如，可取的是所述分析物或核酸中的 1 个是特定感染性生物体特有的，而其它是所述生物体的宿主特有的。特别是当所述分析物是感染性生物体特有的时，检测在宿主基因中发现的、影响宿主对所述生物体的易感性或抗性的核酸可能是有用的。例如，当不同的分析物是例如杀虫剂或杀虫剂残基时，检测在宿主植物中发现的、影响宿主对杀虫剂抗性的基因是有用的。

其它的分析物可包括例如针对对特定病原体并且由宿主生物体产生的抗体。然而，寻找病原生物体本身特有的或减毒疫苗株或亚单位疫苗特有的核酸，包括例如标志序列，随后检测所述核酸，这样的核酸分析可提供有关动物是否已暴露于疾病或已接种疫苗的指示。本发明的方法可使这种联合分析迅速且简便地进行，并且可提供关于动物的疫苗接种状态的信息。这在需要追踪已接种动物的疾病(例如 TB 或狂犬病)的情况下特别重要。

可使用本发明的方法检验的植物病原体的例子包括疫霉 (*Phytophthora* spp.) 或 PVY, 所述疫霉可能是例如杜鹃花属 (*Rhododendrum*) 植物的特定病害, 可专门感染叶, 而 PVY 是烟叶特有的问题, 但是本发明还有许多其它的应用。

在动物健康领域, 可使用本方法方便地检测例如口蹄疫、猪霍乱和禽流感的动物疫病。至于人类健康方面, 可使用本方法诊断细菌感染(例如大肠杆菌或沙门氏菌感染)和病毒感染(例如流感, 特别是禽流感)。所述方法可用于检测感染性生物体的特定菌株/毒株, 而且当不同的菌株/毒株的致病性变化非常大且预后或治疗结果因此而变化时, 这一点可非常重要。

因此, 在进一步的实施方式中, 本发明提供用于检测液体样品中分析物和任选的核酸的存在情况的两步测定法, 所述方法包括如下步骤: (i) 使疑似包含所述分析物和核酸的液体样品沿液流装置的膜流动, 其中所述装置能进行检测所述进一步的分析物的存在情况的测定, 例如免疫测定, 和(ii) 根据步骤(i)的结果检测所述膜上所述核酸的存在情况。

当以所述方式使用时, 所述液流装置的膜可适于进一步包含以可扩散的方式分布在膜上的标记结合剂。所述标记结合剂适于位于样品接收区或该区的一部分, 因此所述结合剂可与液体样品一起沿所述膜移动。

例如, 所述标记结合剂可加载于位于样品接收区且与所述膜有液体接触的吸收垫, 例如玻璃纤维垫。所述标记结合剂例如包括乳胶标记的抗体或乳胶标记的分析物类似物, 适于在含有强封闭剂(例如下文所述的蛋白封闭剂)的缓冲液中加载于所述垫。缓冲液可包含其它常规试剂, 例如蛋白稳定剂、粘度调节剂或防腐剂, 特别例如下文所述的试剂的例子。

如上所述, 所述垫还可容纳 1 种以上用于后续核酸分析的试剂, 例如引物、探针或聚合酶。

另外，所述膜可配备有第二特异性结合剂，所述第二特异性结合剂固定于膜上样品接收区下游的检测区。当样品沿所述膜流动时，所存在的任何分析物都会与标记结合剂和/或第二特异性结合剂反应，因而导致在检测区中产生表明样品中是否存在分析物的信号(或缺乏信号)。

标记结合剂和固定化的第二结合剂可遵循已建立的免疫测定原理与分析物特异性结合或相互特异性结合。

例如，在所谓的“夹心测定”中，标记结合剂可与样品中的任何分析物特异性结合，形成标记复合体。第二结合剂也特异性地结合所述分析物，因此标记复合体浓缩于检测区，造成可见信号产生。这有时被称为“检验线(test line)”。

在竞争测定中，标记结合剂或者为所述分析物的结合配偶体，或者为所述分析物的标记类似物。在这种情况下，在检测区内第二结合剂和分析物竞争性地与所述标记结合剂特异性结合。因此，例如当标记结合剂是所述分析物的标记结合配偶体时，将靶分析物的类似物固定于检测区。当所述样品通过检测区时，任何游离的标记结合剂(即未与分析物结合的)将与固定化的结合剂结合并且产生可见信号。然而，若分析物存在于样品中，则所述分析物在到达检测区前，会与标记结合配偶体结合，从而阻止上述结合。因此，检测区中信号的缺失表明分析物存在于样品中。

类似的，当标记结合剂是所述分析物的标记类似物时，固定化的第二结合剂为所述分析物的结合配偶体和所述分析物的标记类似物。在这种情况下，分析物和标记类似物都会竞争检测区中的结合位点。仅当标记类似物结合时会产生信号，因此在这种情况下，所存在的分析物越多，在检测区所累积的信号就越少。

当用于本文时，“分析物的类似物”的表述是指在测定系统中与分析物具有相似行为的部分。因此，所述类似物可包括分析物本身、或可如同所述分析物一样与用于测定所用的特异性结合剂相互

作用的所述分析物的变体或片段，例如表位片段。

本申请入业已发现：液流装置不仅可提供迅速且简便的检测样品中特定蛋白的方法，而且样品所经受的条件似乎是捕获核酸有用的方法，且所述核酸呈可例如使用核酸扩增方法例如聚合酶链反应或“PCR”而被容易地检测的形式。通过组合这2种技术，可产生明显的优势。

标记结合剂上所用的标记优选为可见标记，所述标记可用于产生或者用肉眼或者用反射读出器、更优选便携式或台式反射读出器可读出的信号。所述标记的例子有颗粒标记，例如乳胶、金和二氧化硅。

可使用其它的可见标记，例如可分别使用荧光计或发光计检测的荧光标记或化学发光标记。

或者，所述标记可包括可使用放射检测器检测的放射性标记。

然而，如上所述，本发明的方法可在无任何用于核酸分析或检测的可见检测仪器的情况下使用。

适用于上述方法的膜，例如用于液流装置的膜、特别是硝化纤维素膜，是天然疏水性的，产生必需的芯吸作用。然而，在所述膜用于常规的免疫测定程序的情况下，所述疏水性可产生问题，因为。用于所述装置的所述膜宜用常规封闭剂封闭。封闭剂是可减少样品中任何蛋白和所述膜之间的非特异性相互作用或增加所述样品的芯吸速度的试剂。它们通常在加载固定化结合剂之后加载，通常选自包括蛋白、表面活性剂和合成聚合物的3种试剂。

可作为封闭剂使用的蛋白的具体例子包括牛血清白蛋白(BSA)或脱脂奶粉成分，例如酪蛋白。

可作为封闭剂使用的表面活性剂包括非离子型表面活性剂，例如以商品名 Tween™ 20 (吐温 20)出售的聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯和例如由 Dow 出售的 Triton X™系列的辛基酚乙氧基化合物，例如 Triton X-100。

用作封闭剂的合适的合成聚合物包括聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯啉(PVP)、聚乙二醇(PEG)和聚氧乙烯脂肪醚,例如从月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇衍生的聚氧乙烯脂肪醚以及以商品名 Brij™(布里杰)出售的聚氧乙烯脂肪醚。所述聚合物的分子量可根据所用聚合物的性质而改变,但是通常在 5-50kDa 的范围内,例如 8-15kDa。

通常认为,可特别使用 2 种以上的所述类型或类别的封闭剂的混合物,例如包括如上所述的表面活性剂和合成聚合物的混合物。

本申请人注意到,某些封闭剂例如上述封闭剂的存在似乎并不妨碍核酸的纯化。

本申请人已经发现,上述的常规封闭膜也适用于核酸的非特异性结合。因此,可制备免疫测定用膜并且保留本发明的优点。

通常以缓冲液的形式将封闭剂加载于所述膜,在使用前将该膜干燥。本申请人发现,合适的缓冲液具有的 pH 值在 8-9 范围内,优选 8.5。具有这种性质的多种缓冲液对于技术人员而言是显而易见的。可以包括常规的缓冲液,例如基于 Tris、磷酸盐、邻苯二甲酸氢钾、硼氢化钠或碳酸氢钾或碳酸氢钠的缓冲液,所述缓冲液可以适宜地为酸性或碱性,而且它们似乎不减弱对核酸的保留。

另外或可替代的,封闭剂可与标记试剂组合,以确保它们可沿所述膜扩散。

用于将所述封闭剂加载于所述膜或将标记试剂加载于样品传送区的缓冲液可适于另外包含蛋白稳定剂,例如蔗糖或海藻糖。这些试剂还可调整所述缓冲液的粘度,使封闭剂通过简单的浸渍就足以结合于所述膜上。包含于缓冲液中的稳定剂的量随缓冲液的性质和稳定剂或粘度调节剂的准确性质而变。

如有需要,可再次将防腐剂如上述用于所述提取缓冲液的防腐剂加入包含封闭剂的缓冲液。

如有需要,所述免疫测定可包含本领域中可了解的另外的试剂或成分。例如,可以有固定于“对照”区的针对标记结合剂的结合

配偶体，“对照”区适于位于检测区的下游。任何残留的标记结合剂将结合于这种第二区域，适于产生表明标记结合剂流动良好的“对照线”。或者，可将特定的标记对照试剂以可扩散的方式加在所述膜上，例如与第一标记结合剂混合，而针对标记对照试剂的特异性结合剂固定于对照区中，以产生对照线，从而可确定免疫测定的进展良好。

如有需要，所述免疫测定可使用例如在 WO2006003394 中所描述的定量或半定量方法，在此通过参考将该文献的内容引入本文。

制定了一项研究，以确定是否可以用 PCR 从 LFD 条带上的阳性检测线扩增信号。预期为了通过切下检验线并在实验室进行 PCR 而确证阳性 LFD 结果，具有所述能力是有用的。进一步预期，这一技术可使区别存在于样品中的目标菌株/毒株或种成为可能，而 LFD 检验不能进行所述区别，例如在疫霉测定或禽流感测定的情况下。

下文所报道的具体研究的结果表明，确实能通过 PCR 确证得自检测线的结果。所述结果进一步表明，能对取自使用过的 LFD 条带上任意区域的 DNA 进行阳性 PCR 分析(positive PCR analysis)。成功地检测了检测线上游和下游的区域。

而且，对来自 LFD 膜的 DNA 的 PCR 分析所得的 Ct 值与使用标准复杂纯化和/或存储方法的分析所得到的结果相当。这表明：用于 LFD 分析的提取缓冲液和/或膜处理系统对于 DNA 的纯化和污染物/抑制剂的去除与标准方法同样有效。

如上所述，将现有技术和专业知识用于研制基于标准夹心测定模式的侧流装置(LFD)，其原理在于在硝化纤维素膜上的靶特异抗体的固定化线(检验线)和有色胶乳-抗体缀合物(抗靶小鼠抗体)之间捕获靶，显示靶存在的可见确证。将抗小鼠抗体线加入所述装置，提供乳胶流(对照线)的可见验证，产生作为表明阳性检测的 2 条线和阴性结果的信号线。将乳胶缀合物加载于玻璃纤维释放垫，产生稳定的粒子贮库，并且与所述膜和吸收垫一起被组装到保护性塑料罩中。

向样品孔加入 75 $\mu$ l (约 2-3 滴)的样品提取液, 在所述膜上释放出乳胶缀合物, 所述提取液开始向吸收垫流动。若靶抗原存在于样品提取液中, 则发生抗体结合从而产生乳胶-抗体复合体, 随后所述复合体被检验线捕获; 因此产生可见的沉积乳胶线。抗小鼠抗体捕获任何过量的乳胶缀合物, 产生乳胶流的可见确证。

通过实时 PCR 测定沿所述膜纵向对膜中样品的后续分析表明, 可沿所述膜的纵向可检测目标生物体的特定种(在此情况下为枝干疫霉(*Phytophthora ramorum*))的特征性核酸。对所述膜的进一步分析揭示: 所述样品还包含源自宿主杜鹃花的 COX DNA。

如上所述, 可以想象: 一般而言, 在使用中, 所述检验的任何免疫测定部件均可在野外情况下使用, 而且所述液流装置一经使用, 则可提供将核酸运送到实验室环境进行进一步分析的便利工具。然而, 可制备试剂盒用于进行所述测定。

因此在另一方面, 本发明提供用于进行本发明任一前述权利要求的测定的试剂盒, 所述试剂盒包含吸水膜(例如形成液流装置的部件的吸水膜)和至少 1 种用于核酸检测的试剂。

适用于核酸检测的试剂包括 1 种以上适用于扩增靶核酸序列的引物, 但是其它试剂可包括: 探针, 特别是荧光标记探针, 例如用于 TAQMAN™测定的探针, 所述探针对靶核酸是特异性的; 以及酶(例如 DNA 聚合酶)、缓冲液和盐等。

适当地安置所述液流装置, 以进行免疫测定来检测分析物, 特别是来源于与靶核酸相同物种的多肽分析物。如上所述, 所述测定可以采用夹心测定或竞争测定模式。

本发明将通过实施例进行具体描述, 同时参考随附的示意图, 在所述图中:

图 1 图示了可用于本发明方法的液流装置;

图 2 例示了可用于本发明方法的膜取样方案;

图 3 例示了在本发明的实施方式中进行的 PCR 反应的结果;

图 4 是显示对所提取的枝干疫霉 DNA 的系列稀释液进行 TaqMan™扩增的 Ct 值与在 LFD 的膜上进行的 TaqMan™扩增的 Ct 值比较的图，其中沿所述 LFD 的膜已经展开了枝干疫霉感染的杜鹃花(rhododendron sp.)的粗提液样品；

图 5 是显示与图 4 所相关的测定相同的测定的 Ct 值图，但在粗提液制备后直接对所述粗提液进行测定(粗提液)以及对经所述粗提液处理的 LFD 膜在其制备后直接进行测定(装置)；

图 6 是显示类似于图 6 中对 Ct 值进行比较的图，所述比较使用的是相同的粗提液和膜，但所述测定在粗提液和膜在室温下存储了 7 个月之后进行；

图 7 是图 6 所示结果的 TaqMan 扩增图；

图 8 是对普通小鼠血清中的 18S rRNA 进行 TaqMan™检测的 TaqMan 扩增图；阴性对照=水；

图 9 显示对接种的烟草中的 PVY 进行 TaqMan™检测的扩增图；

图 10 显示对接种的烟草中的 PVX 进行 TaqMan™检测的扩增图；

图 11 显示由对枝干疫霉进行常规 PCR 反应后获得的凝胶。

## 实施例 1

### 枝干疫霉检测

用手术刀片将枝干疫霉感染的杜鹃花叶(1-2 cm<sup>2</sup>)的样品切为小片，置于含有提取缓冲液的 LFD 试剂盒的 LFD 提取瓶中，所述试剂盒得自 Pocket Diagnostics™ (CSL, York, UK)。

将所述瓶振摇约 2 min，随后将 2 滴样品传送至试剂盒中所含有的疫霉 LFD 的样品孔中。在此情况下，所述 LFD 包含如图 1 所示的常规夹心测定模式。

所述样品一经吸收，则将所述膜从塑料罩取下，并沿所述膜的

纵向切成 8 条 1-2 mm 宽的条带(图 2)。将每个条带对半切开, 且将每半条带置于 96 孔板的单独的孔中, 所述孔中含有用于对枝干疫霉和 COX 进行多重实时 PCR (Taqman)的 25  $\mu$ l 主混合物(master-mix) (1  $\times$  PCR 缓冲液(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.001%明胶), 0.025 U/ $\mu$ l Hot Taq, 0.2 mM 各种 dNTP, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\times$  ROX 非活性对照染料(passive reference dye), 300 nM 各种枝干疫霉引物, 200 nM 各种 COX 引物和 100 nM 各种枝干疫霉和 COX 探针)。

在 ABI 7900HT 上进行实时 PCR, 循环条件为: 在 95 $^{\circ}$ C 进行 10 min, 随后进行 40 个 2 步循环, 每个 2 步循环为 95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min。

## 结果

每个条带的枝干疫霉和 COX 的 Ct 值显示于图 3 (误差棒显示重复反应(每个条带的 2 半)的标准差)。使用 PVY LFD 得到了非常相近的 Ct 值(数据未显示)。

所述 Ct 值表明, 从 LFD 膜上既可鉴定出宿主 DNA (COX), 又可鉴定出靶 DNA (枝干疫霉), 而不必考虑样品位置。使用 PVY LFD 上的枝干疫霉样品的结果非常类似, 表明 LFD 的特异性(即特异单克隆抗体)对于核酸提取不重要。

## 实施例 2

### PVY 分析

除了使用对 PVY 抗原特异性的抗体外, 如上述实施例 1 制备马铃薯 Y 病毒(PVY) LFD, 所述 LFD 已经接触了受 PVY 感染的植物(马铃薯)提取液(且因此显示阳性结果), 在密封的塑料袋中在室温下存储该 LFD 超过 6 年。将所述膜从所述 LFD 取下并切成若干 1-2 mm 宽的条带。将每个条带对半切开, 且将每半条带置于 96 孔板的单独的孔中, 所述孔中含有用于对 PVY 进行多重实时 PCR (Taqman)

的 25  $\mu$ l 主混合物(1 $\times$ PCR 缓冲液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.001% 明胶), 0.02 U/ $\mu$ l M-MLV 逆转录酶, 0.025 U/ $\mu$ l Hot Taq, 0.2 mM 各种 dNTP, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$ ROX 无活性对照染料, 300 nM 各种 PVY 引物和 100 nM PVY 探针), 或对植物细胞色素氧化酶 (COX)基因的实时 PCR (Taqman)的 25  $\mu$ l 主混合物(1 $\times$ PCR 缓冲液, 0.025 U/ $\mu$ l Hot Taq, 0.2 mM 各种 dNTP, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$ ROX 无活性对照染料, 300 nM 各种 COX 引物和 100 nM COX 探针)。在 ABI 7900HT 上进行实时 PCR, 循环条件为: 在 48 $^{\circ}$ C 进行 30 min, 随后在 95 $^{\circ}$ C 进行 10 min, 然后进行 40 个 2 步循环, 每个 2 步循环为 95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min。

### 结果

分别使用 RT-PCR 和 PCR 成功地检测出 PVY 和 COX。在表 1 中显示 PVY 和 COX 的 Ct 值。

	Ct 值(2 个重复反应)
PVY (RNA 靶标)	28.56, 26.14
COX (DNA 靶标)	31.54, 31.45

这一结果表明, 侧流装置或 LFD 以稳定的方式较长时间保存了核酸。

同样对新鲜的 PVY 样品以及对 PVX 使用实时测定也获得了类似的良好结果(分别参见图 9 和图 10)。

### 实施例 3

#### 膜/LFD 的效果

使用接种了枝干疫霉的杜鹃花的提取液作为样品和如下的一系列不同的市售膜, 重复实施例 1 描述的试验对枝干疫霉进行检测:

- 1 Millipore Corp. HiFlow 180

- 2 Millipore Corp. HiFlow 135
- 3 Millipore Corp. HiFlow 120
- 4 Millipore Corp. HiFlow 90
- 5 Millipore Corp. HiFlow 75
- 6 Millipore Corp. HiFlow 65
- 7 Schleicher & Schuell Prima 40

使用 LFD 制造中所用的常规封闭溶液处理各种膜，并且使用或不使用用于应用常规 LFD 的乳胶标记系统的常规缓冲液。在随后的试验中，还使用未经处理的 Millipore Corp. HiFlow 75 和 Millipore Corp. HiFlow 180 膜样品。

对许多市售 LFD 进行如实施例 1 所述的处理。这些 LFD 包括“Clearblue™”妊娠检验试剂盒、Tesco 家庭妊娠检验试剂盒、用于检测禽流感病毒的得自 Anigen 的市售试剂盒和 Agdia 生产的黄瓜花叶病毒(CMV)检测 ImmunoStrip。部分所述试剂盒使用金标记作为蛋白信号机制，而其它试剂盒使用乳胶。

无论何种孔径或所述膜的预处理方案存在与否或该方法的性质如何，在从上述列出所有膜和 LFD 取得的样品中均成功地检测到枝干疫霉的核酸。

#### **实施例 4**

##### **与纯 DNA 检测对比**

如实施例 1 所述，对纯枝干疫霉 DNA 样品和对也如实施例 1 所述的用健康杜鹃花(healthy rhododendron to which *P. ramorum*)的粗提液处理的 LFD 的膜进行 TaqMan™测定，以检测枝干疫霉。随后在进行 TaqMan™之前，向所述样品掺加等量的枝干疫霉 DNA。将所述结果在表 1 中显示并在图 4 中例示。

表 1

	斜率	扩增效率
仅 DNA	-3.5139	0.93
膜	-3.451	0.95

(效率使用标准曲线的斜率以 $(10^{(-1/\text{斜率})}-1)$ 计算得到)。

从所述结果可见：所述膜的存在对扩增反应效率的影响可忽略不计。而且，杜鹃花 DNA 的存在对所述测定的效率没有任何抑制。

### 实施例 5

#### 存储试验

在制备后，直接对如实施例 3 所述的粗提液进行如实施例 1 所述的 TaqMan 测定。还将所述粗提液如实施例 1 所述的加载于 LFD，并且在所述粗提液展开后立刻对取自所述装置的膜进行类似的测定。结果(图 5)显示：在制备后立刻进行测定时，这 2 种样品均给出阳性结果。

随后将所述粗提液和所述膜都存储在室温下 7 个月并且重复分析。结果显示于图 6 和图 7，图 7 是图 6 所示结果的 TaqMan 扩增图。

所述结果显示，所述膜充当了有效的核酸存储装置。

### 实施例 6

#### 其它样品类型的核酸检测

将小鼠血清加入 LFD，并沿该装置展开。所述样品一经吸收，就将所述膜从塑料罩中取出，并进行 TaqMan 实时 PCR 测定，用于检测真核生物 18S rRNA 基因。这是可得自 Applied Biosystems 的预先展开的(pre-developed)内源对照测定。还将阴性对照(水)加载于第二个 LFD。

所述结果显示于图 8。血清显然是用于与本方法结合使用的样品

类型。

(所述 18S rRNA 基因在所有真核生物都存在, 这种情况也许可解释所述阴性对照中的轻度污染)。

## 实施例 7

### 不同的检测方法

进行了一系列的不同的测定, 其中样品如实施例 1 所述的沿 LFD 装置的所述膜展开, 随后用实时 PCR (特别是 TaqMan 测定)或常规 PCR 以及 LAMP 测定来检测存在于所述样品中的核酸。

TaqMan PCR 反应通常包含 1×Applied Biosystems 缓冲液 A (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, carboxy-X-罗丹明(ROX)无活性对照染料), 0.025 U/μl Applied Biosystems AmpliTaq Gold, 0.2 mM 各种 dNTP, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300nM 各种引物和 100nM TaqMan 探针。用于检测 RNA 病毒的 TaqMan 逆转录 PCR (RT-PCR)还包含 0.02U/μl M-MLV 逆转录酶。循环条件为: 在 95°C 进行 10 min, 随后进行 40 个 95°C 15 s 和 60°C 1 min 的 2 步循环。对于 RT-PCR, 在所述步骤之前还需在 48°C 进行 30 min 的逆转录步骤。在 ABI 7900 HT 上进行实时 PCR。

结果以 Ct 值解释, Ct 值即当荧光超过阈值时的循环数。

LAMP 反应包含 0.32 U/μl Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs, Ipswich, MA), 1×Thermopol 缓冲液, 1.4 mM 各种 dNTP, 6 mM MgCl<sub>2</sub>(在 Thermopol 缓冲液中包含 2 mM), 1.2 M 甜菜碱, 200 nM 各种外部引物(F3 和 B3), 2 μM 各种内部引物(FIP 和 BIP)和 1 μM 各种环引物(F 环和 B 环)。在 65°C 温育反应物 40 min, 随后在 80°C 温育 5 min, 以失活 Bst 聚合酶。通过加入 2 μl Quant-iT PicoGreen dsDNA 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)并观察颜色变化(从橙变黄)而使扩增产物显色。

PCR 反应包含 1×Fermentas PCR 缓冲液(10 mM Tris-HCl (在

25°C时 pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 0.025 U/ $\mu$ l Fermentas Taq 聚合酶, 0.2 mM 各种 dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 nM 各种引物。循环条件为: 在 95°C 进行 2 min, 随后进行 30 个 3 步循环, 每个所述循环为 95°C 30s、57°C 30s 和 72°C 30s。通过凝胶电泳 (1.2% 琼脂糖凝胶) 并随后用溴化乙锭染色将产物显色 (图 11)。

在所有情况下, 发现在所述膜上成功地检测到核酸。

所述测定和所述扩增子尺寸总结于表 2。

表 2

测定	扩增子(碱基对)
COX TaqMan	~79
枝干疫霉 TaqMan	77
PVY TaqMan	67
PVX TaqMan	71
枝干疫霉常规 PCR	~700
根瘤土壤杆菌( <i>A. tumefaciens</i> ) TaqMan	60
18S rRNA TaqMan	<80
枝干疫霉 LAMP	240

在所述膜上检测到各种各样的不同扩增子尺寸, 表明对于确定所述核酸是否被保留在所述膜上而言, 所述核酸的尺寸并不重要。

### 实施例 8

#### 通过将 DNA 提取至 LFD 和 Whatman FTA 卡以及后续的实时 PCR 检验东非玫瑰材料中是否存在冠瘿病原体 - 根瘤土壤杆菌

最近在整个东非的玫瑰作物受到了称为冠瘿的疾病的严重影响。这种疾病由细菌根瘤土壤杆菌的菌株引起, 所述菌株具有被称为 Ti 质粒的小环状 DNA 片段。由于这些质粒包含于所述细菌内部, 并且还由于自然界中存在许多无毒土壤杆菌属菌株, 所以检测

所述病原体的唯一方法是通过分离细菌 DNA、随后检验所述 DNA 中是否存在 Ti 质粒。

最近旅行去了肯尼亚玫瑰养殖场。从受感染的玫瑰植物取得了样品并且将所述样品加载于基于 Millipore Hiflow 75 膜的 LFD，也加载于 Whatman FTA 卡。随后将这些装置送到英国，使用称为 T-DNA 测定的 Ti 质粒特异性实时 PCR 测定或 COX 植物 DNA 实时 PCR 测定来检验，其中前一种测定检测土壤杆菌属病原体，而后一种测定用作内部对照，以确保 DNA 提取方法生效。

### 膜处理

- (a) LFD 装置。使用 Harris Unicore 打孔器从各个接种的 LFD 膜取得  $2 \times 1.25$  mm 直径的圆片。将这些圆片直接置于 96 孔 PCR 板的 1 个孔中。对所有膜取样完毕后，向每个含有圆片的孔加入 25  $\mu$ L 的实时 PCR 主混合物。将 PCR 板短暂离心以确保圆片和主混合物均位于各孔的底部。将所述板直接置于实时 PCR 仪器中，开始循环反应。
- (b) Whatman FTA 卡。使用 Harris Unicore 打孔器从各个接种的 FTA 卡取得  $2 \times 1.25$  mm 直径的圆片。将这些圆片直接置于 96 孔 PCR 板的 1 个孔中。对所有膜取样完毕后，向每个孔加入 200  $\mu$ L Whatman 纯化缓冲液，并将所述板在室温下温育 5 min。5 min 后，从各孔中将所述缓冲液移除，小心确保圆片保留在孔中。再重复所述纯化步骤 2 次。在第 3 次纯化步骤后，将 200  $\mu$ L 的 1 $\times$ TE 缓冲液加入各孔并将所述板在室温下温育 5 min。5 min 后，从各孔中将所述缓冲液移除，小心确保圆片保留在孔中。再重复该步骤 1 次。在从孔中移除最后等份的 1 $\times$ TE 缓冲液后，使用 PCR 仪加热块在 56 $^{\circ}$ C 干燥所述板 20 min。所述圆片一经干燥就向各包含圆片的孔加入 25  $\mu$ L 的实时 PCR 主混合物。将 PCR 板短

暂离心以确保圆片和主混合物均位于各孔的底部。将所述板直接置于实时 PCR 仪器中，开始循环反应。

## 结果

从玫瑰植物的各个不同部位取得样品。发现茎部、特别是开花品种与根状茎品种融合的嫁接部是最可能检测到冠瘿病原体的部位，这是因为由嫁接造成的创口吸引致病性土壤杆菌(*Agrobacterium spp.*)，因此所述病原体在所述部位聚集。

下文给出的结果来自使用 2 minute DNA 试剂盒的瓶中提供的缓冲液浸渍并加载于所述 2 种装置的 10 个不同的 1-2 cm 茎切片。这些样品中有 4 个是在嫁接部采集的。

表 3. 对 10 个玫瑰茎切片的 T-DNA 和 COX 实时 PCR 测定的结果

样品	实时 PCR 结果和 Ct 值			
	LFD 试剂盒样品		Whatman FTA 卡样品	
	T-DNA PCR	COX-PCR	T-DNA PCR	COX-PCR
茎 1	阴性	+ve (25.62)	阴性	+ve (24.47)
茎 2	阴性	阴性	阴性	阴性
茎 3	阴性	+ve (25.82)	阴性	+ve (32.86)
茎 4	阴性	阴性	阴性	+ve (30.44)
茎 5	阴性	+ve (27.56)	阴性	阴性
茎 6	阴性	+ve (27.63)	阴性	+ve (27.10)
茎 7	+ve (34.75)	+ve (26.74)	+ve (37.11)	+ve (27.98)
(GU) <sup>1</sup>				
茎 8	+ve (39.51)	+ve (27.35)	阴性	+ve (27.09)
(GU)				
茎 9	+ve (39.81)	+ve (26.82)	+ve(39.63)	+ve (26.40)
(GU)				
茎 10	阴性	+ve (25.46)	阴性	+ve (26.58)
(GU)				

<sup>1</sup> GU-包含嫁接部的茎切片

上表显示：可由本发明方法得到的结果即便不比使用 Whatman FTA 卡得到的结果好，也至少一样好。但由所述方案可知，本方法的操作简单得多。

而且，LFD 的使用提供了另外的好处，即可同时进行初步的蛋白诊断测定。

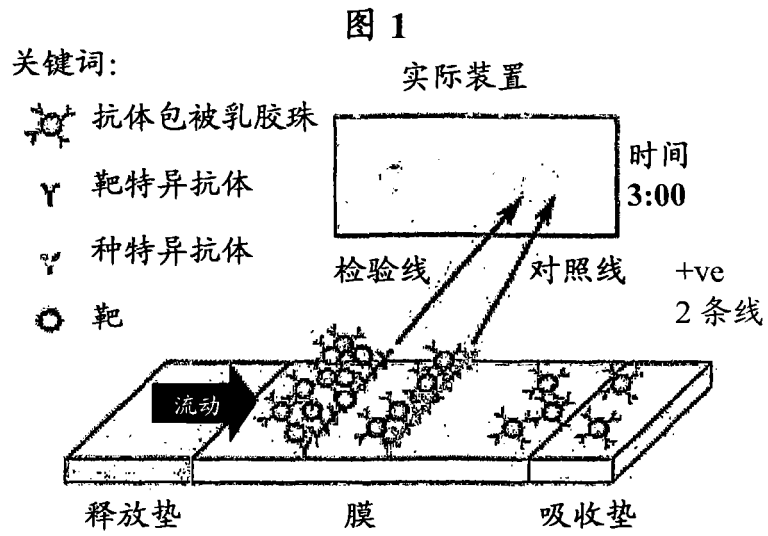


图 2

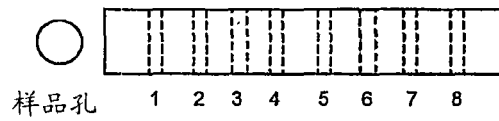


图 3

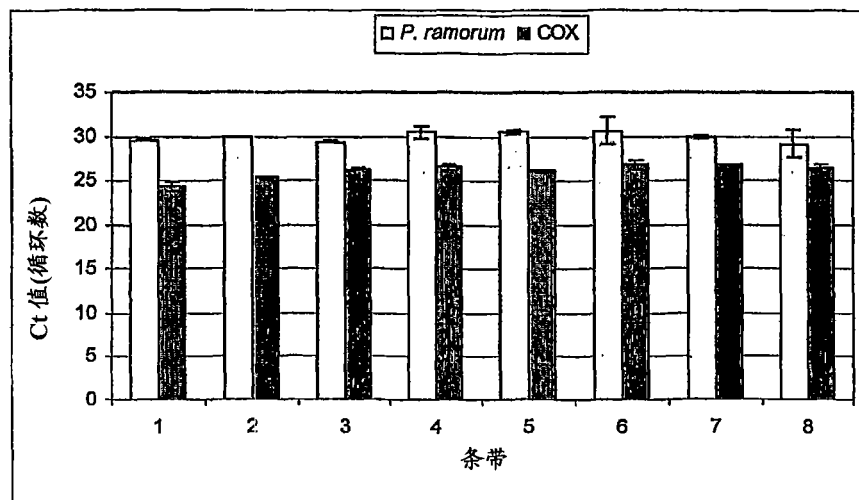


图 4

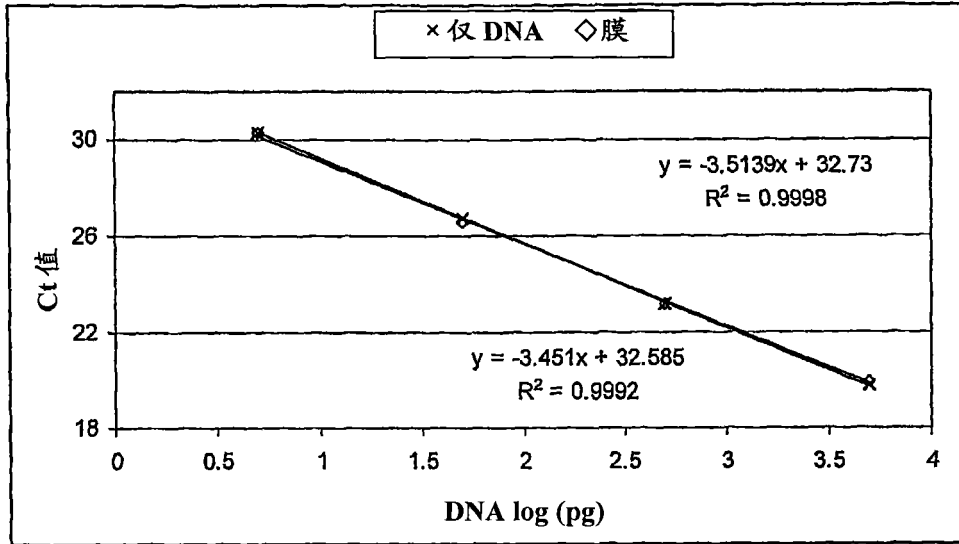


图 5

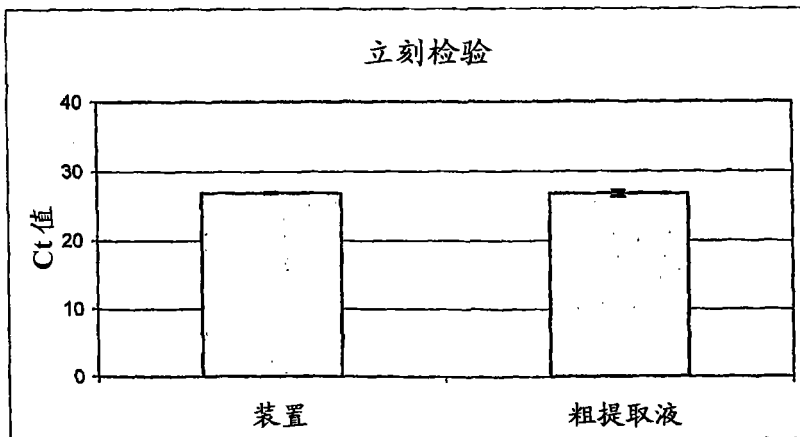


图 6

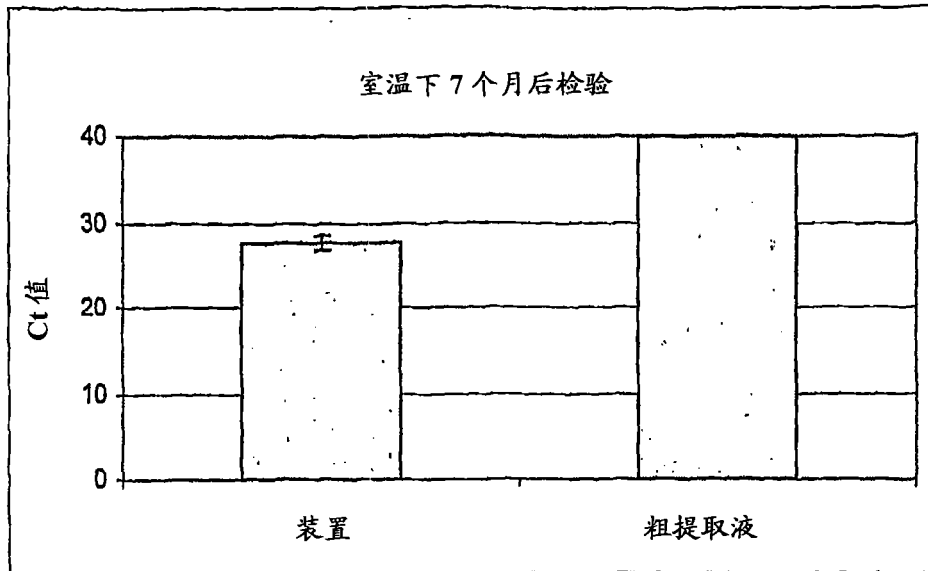


图 7

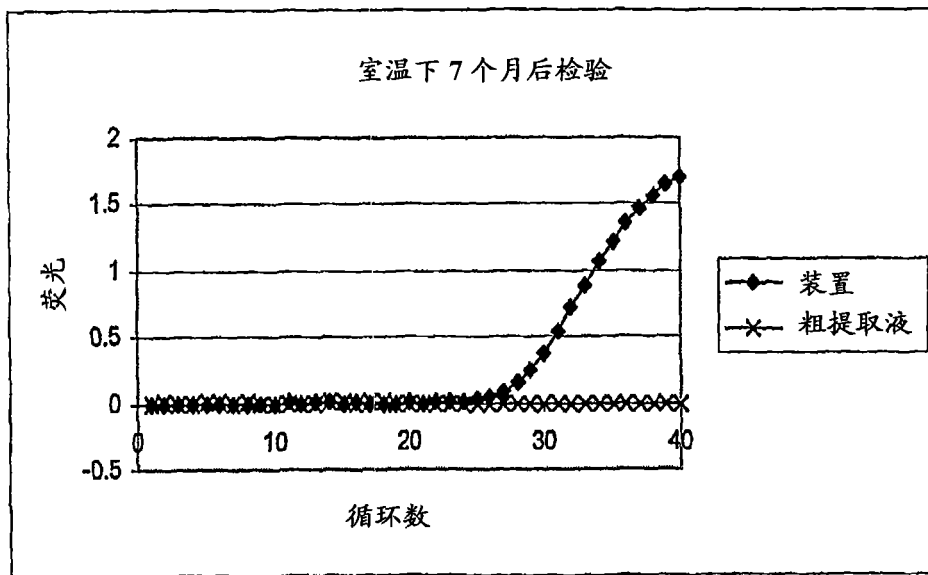


图 8

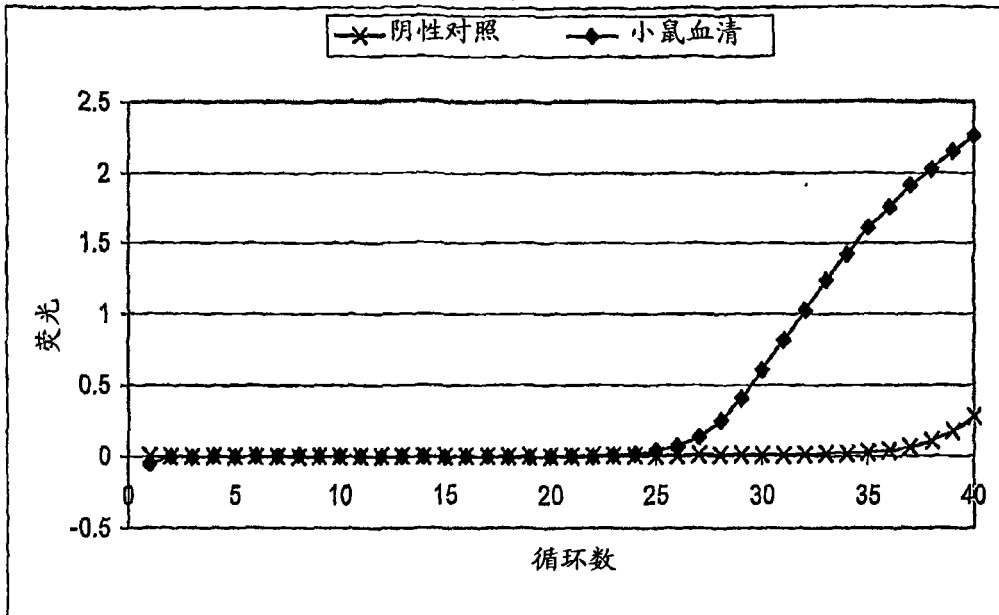


图 9

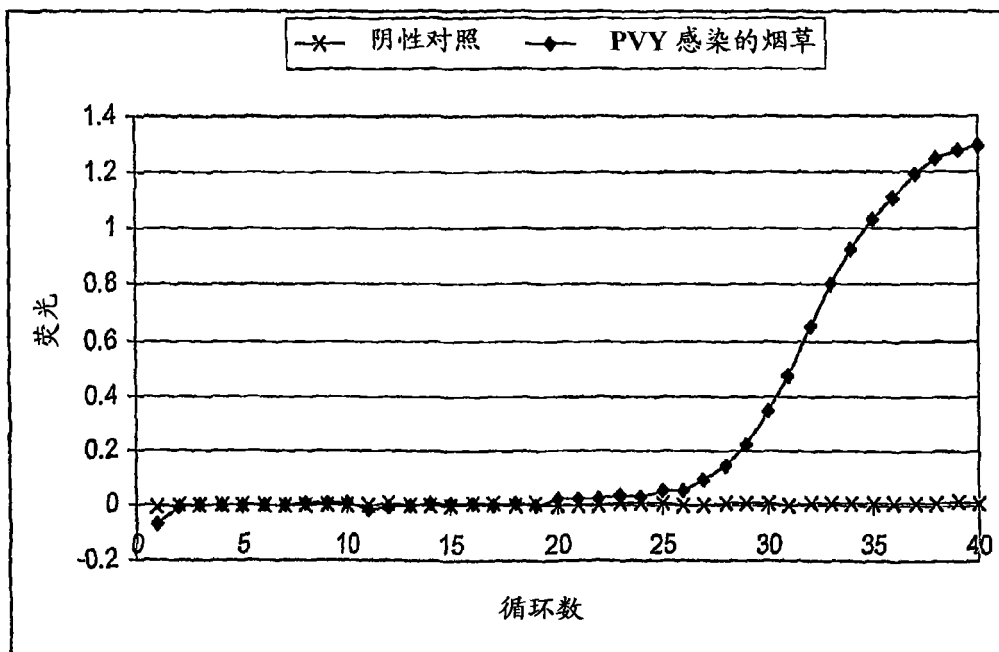


图 10

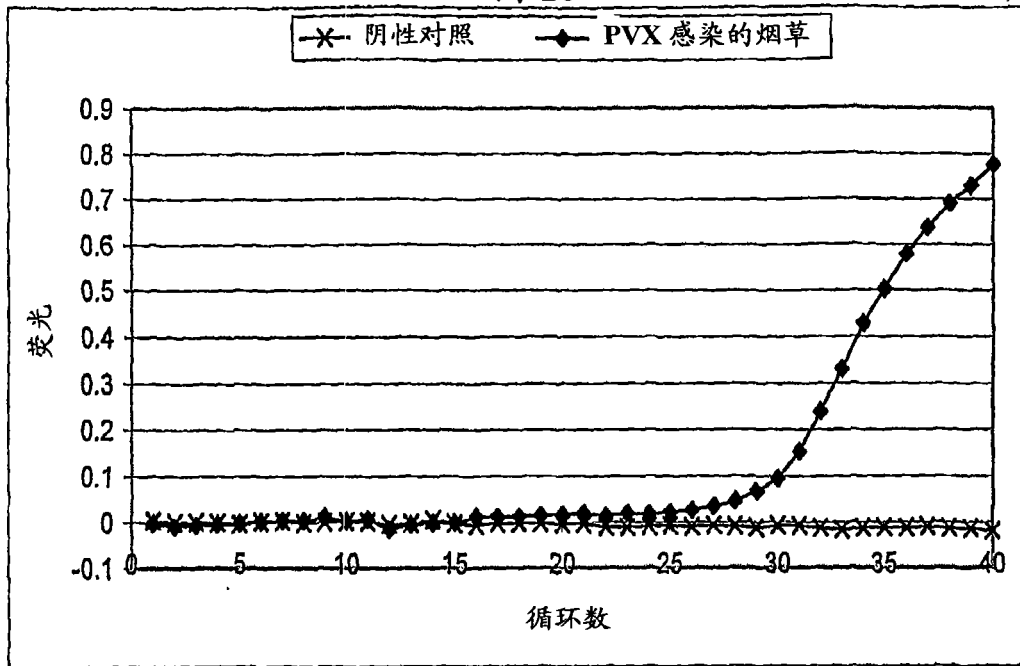
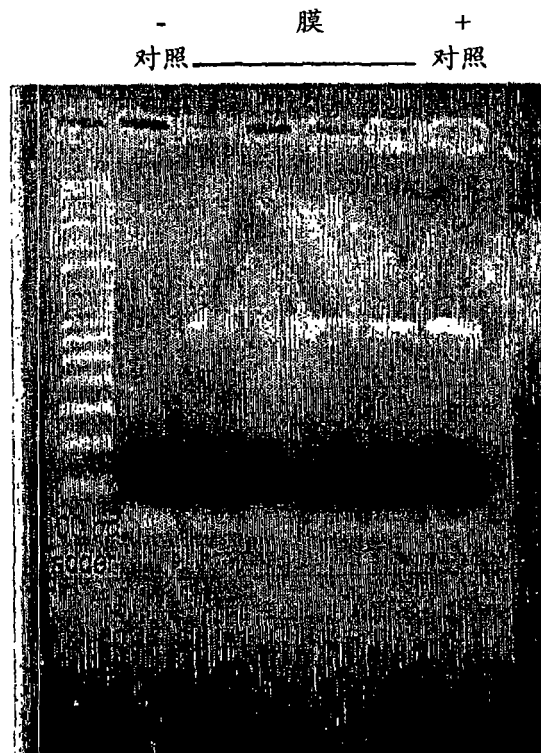


图 11



专利名称(译)	纯化方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101443456A</a>	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	CN200780017119.8	申请日	2007-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	英国环境食物及农村事务部中央科学实验室		
申请(专利权)人(译)	英国环境食物及农村事务部中央科学实验室		
当前申请(专利权)人(译)	英国环境食物及农村事务部中央科学实验室		
[标]发明人	C丹克斯 N布恩汉		
发明人	C·丹克斯 N·布恩汉		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	C12N15/1017 C12N15/1003 C12N15/101 C12Q1/68 C12Q1/6806 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558		
代理人(译)	刘冬		
优先权	2006004973 2006-03-11 GB		
其他公开文献	CN101443456B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

用于从液体样品中分离核酸的方法，所述方法包括使包含或疑似包含所述核酸的液体样品沿吸水膜、例如常规侧流装置的吸水膜流动，使得核酸沿所述膜的纵向分布的步骤。可在所述膜上检测所述核酸。

Ct值(2个重复反应)

PVY (RNA 靶标)	28.56, 26.14
COX (DNA 靶标)	31.54, 31.45