



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118339310 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 12

(21) 申请号 202280063016.X

(22) 申请日 2022.08.02

(30) 优先权数据

63/228,527 2021.08.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/039194 2022.08.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/014729 EN 2023.02.09

(71) 申请人 生命科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·L·孔 S·M·利欧 A·应

M·弗尔塔多 G·Y·H·王

D·肯尼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陶家蓉 陈扬扬

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6851 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

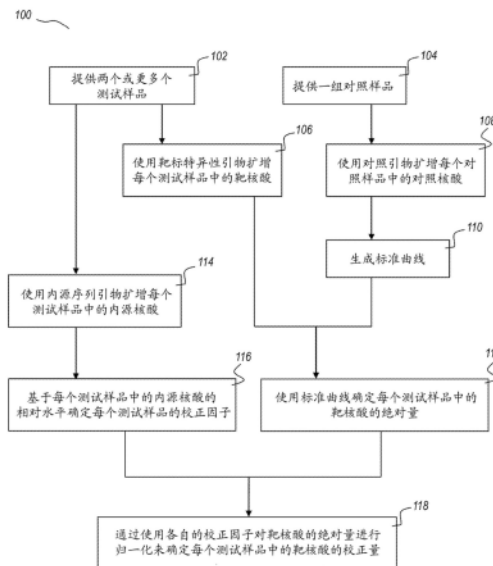
权利要求书4页 说明书30页 附图9页

(54) 发明名称

用于检测核酸序列负荷的组合物、试剂盒和方法

(57) 摘要

公开了用于定量来自样品的靶核酸的组合物、试剂盒和方法。组合物、试剂盒和方法使得能够通过根据每个测试样品中的内源核酸的相对水平归一化每个样品中的靶核酸的测量水平(使用标准曲线)来比较两个或更多个测试样品之间的靶核酸负荷。



1. 一种用于定量多个样品中的靶核酸的方法,所述方法包括:
  - (a) 提供两个或更多个各自包含所述靶核酸的测试样品;
  - (b) 提供一组对照样品,每个对照样品具有已知浓度的对照核酸;
  - (c) 通过使所述测试样品中的每个测试样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶核酸的至少一部分;
  - (d) 通过使所述对照样品中的每个对照样品在对照引物的存在下经受扩增条件来扩增所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸的至少一部分;
  - (e) 使用扩增所述对照核酸的结果生成标准曲线;
  - (f) 使用所述标准曲线确定所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶核酸的绝对量(AQ);
  - (g) 通过使所述测试样品中的每个测试样品在内源序列引物的存在下经受扩增条件来扩增所述测试样品中的每个测试样品中的内源对照核酸;
  - (h) 基于所述测试样品中的相应一个测试样品中的内源核酸的相对水平来确定所述测试样品中的每个测试样品的校正因子(RQ);以及
  - (i) 通过使用所述测试样品中的所述相应一个测试样品的所述校正因子对所述靶核酸的绝对量进行归一化来确定所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶核酸的校正量(校正的AQ)。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述两个或更多个测试样品各自来源于相同受试者。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述两个或更多个测试样品是在不同时间和/或从受试者的不同位置获得的。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述不同时间中的至少两者被1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周、二周、三周、四周、六周、八周、十周、三个月、四个月、五个月、六个月的时间段或具有由任何两个前述值定义的端点的时间段范围分隔开。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述靶核酸是病毒核酸。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶核酸是SARS-CoV-2核酸。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述测试样品来源于拭子样品。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述拭子样品是鼻拭子样品。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述鼻拭子样品中的每个鼻拭子样品来自所述受试者的相同鼻孔。
10. 根据权利要求7至9中任一项所述的方法,所述方法还包括在使所述测试样品中的每个测试样品经受扩增条件之前从所述拭子样品中提取所述靶核酸。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中在所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸包含有所述靶核酸的核酸。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中在所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸包含完整或部分病毒基因组。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中在所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸能够用所述靶标特异性引物进行扩增。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述对照引物与所述靶标特异性引物是相同的。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述内源序列引物对RNA酶P有特异性。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述靶标特异性引物对SARS-CoV-2的0rf1a基因、0rf1b基因、N基因或S基因中的一者或多者有特异性。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述测试样品不包括血液样品。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述测试样品是鼻咽或口咽样品。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,所述方法还包括为与第一时间点相关的第一测试样品建立基线校正因子,并且相对于所述基线校正因子确定后续测试样品的后续校正因子。

20. 根据权利要求19所述的方法,所述方法还包括相对于所述第一测试样品确定所述后续测试样品的校正量,以说明所述测试样品的靶核酸负荷随时间的相对变化。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中扩增所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中扩增所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸的至少一部分包括逆转录反应。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中扩增所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源核酸不包括逆转录反应。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸的扩增与所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源对照核酸的扩增具有大体上相似的效率。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸的扩增与所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源对照核酸的扩增具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的效率。

26. 根据权利要求24或权利要求25所述的方法,其中所述对照样品中的每个对照样品中的所述对照核酸的扩增效率图与所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源对照核酸的扩增效率图具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的斜率(Cq/量)。

27. 一种用于定量来自样品的靶病毒核酸的方法,所述方法包括:

(a) 提供两个或更多个各自包含所述靶病毒核酸的测试样品;

(b) 提供一组对照样品,每个对照样品具有已知浓度的所述靶病毒核酸;

(c) 通过使所述测试样品中的每个测试样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶病毒核酸的至少一部分;

(d) 通过使所述对照样品中的每个对照样品在所述靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增所述对照样品中的每个对照样品中的所述靶病毒核酸的至少一部分;

(e) 使用扩增所述对照样品中的每个对照样品中的所述靶病毒核酸的结果生成标准曲线;

(f) 使用所述标准曲线确定所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶病毒核酸的绝对量;

(g) 通过使所述测试样品中的每个测试样品在内源序列引物的存在下经受扩增条件来扩增所述测试样品中的每个测试样品中的内源核酸;

(h) 基于所述测试样品中的相应一个测试样品中的内源核酸的相对水平确定所述测试样品中的每个测试样品的校正因子;以及

(i) 通过使用所述测试样品中的所述相应一个测试样品的所述校正因子对所述靶病毒核酸的绝对量进行归一化来确定所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶病毒核酸的校正量。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述两个或更多个测试样品各自来源于相同受试者。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述两个或更多个测试样品是在不同时间获得的。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述不同时间中的至少两者被1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周、二周、三周、四周、六周、八周、十周、三个月、四个月、五个月、六个月的时间段或具有由任何两个前述值定义的端点的时间段范围分隔开。

31. 根据权利要求27至30中任一项所述的方法, 其中所述靶病毒核酸是SARS-CoV-2核酸。

32. 根据权利要求27至31中任一项所述的方法, 其中所述测试样品来源于拭子样品。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述拭子样品是鼻拭子样品。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述鼻拭子样品中的每个鼻拭子样品来自所述受试者的相同鼻孔。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述的方法, 所述方法还包括: 在使所述测试样品中的每个测试样品经受所述扩增条件之前, 从所述拭子样品中提取所述靶核酸。

36. 根据权利要求27至35中任一项所述的方法, 其中所述内源序列引物对RNA酶P有特异性。

37. 根据权利要求27至36中任一项所述的方法, 其中所述靶标特异性引物对SARS-CoV-2的所述Orf1a基因、所述Orf1b基因、所述N基因或所述S基因中的一者或多者有特异性。

38. 根据权利要求27至37中任一项所述的方法, 其中所述测试样品不包括血液样品。

39. 根据权利要求27至38中任一项所述的方法, 其中所述测试样品是鼻咽或口咽样品。

40. 根据权利要求27至39中任一项所述的方法, 所述方法还包括: 为与第一时间点相关的第一测试样品建立基线校正因子; 以及相对于所述基线校正因子确定后续和/或额外测试样品的后续校正因子。

41. 根据权利要求40所述的方法, 所述方法还包括: 相对于所述第一测试样品确定所述后续测试样品的校正量, 以说明所述测试样品的靶核酸负荷随时间的相对变化。

42. 根据权利要求27至41中任一项所述的方法, 其中扩增所述测试样品中的每个测试样品中的所述靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

43. 根据权利要求27至42中任一项所述的方法, 其中扩增所述对照样品中的每个对照样品中的所述靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

44. 根据权利要求27至43中任一项所述的方法, 其中扩增所述测试样品中的每个测试

样品中的所述内源核酸不包括进行逆转录反应。

45. 根据权利要求27至44中任一项所述的方法,其中所述对照样品中的每个对照样品中的所述靶核酸的扩增与所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源核酸的扩增具有大体上相似的效率。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述对照样品中的每个对照样品中的所述靶核酸的扩增效率图与所述测试样品中的每个测试样品中的所述内源核酸的扩增效率图具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的斜率(Cq/量)。

## 用于检测核酸序列负荷的组合物、试剂盒和方法

[0001] 优先权

[0002] 本PCT申请要求于2021年8月2日提交的美国临时专利申请序列号63/228,527的优先权和权益。前述申请的内容通过全文引用的方式并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于定量来自样品的靶核酸的组合物、试剂盒和方法。具体来说,本文所述的实施方案使得能够通过根据每个测试样品中内源核酸的相对水平归一化每个样品中靶核酸的测量水平来比较两个或更多个测试样品之间的靶核酸“负荷”。

### 背景技术

[0004] 检测感兴趣的靶核酸序列的测定广泛用于分子生物学和医学。临床应用通常涉及从受试者收集样品,提取核酸,并在靶标特异性引物的存在下使提取的样品经受扩增条件。因此,扩增产物的存在表明靶核酸存在于样品中,而未能测量到扩增产物则表明靶核酸不存在或以对于检测而言太低的水平存在。因此,此类测定可用于检测和监测病原性疾病。

[0005] 在一些应用中,此类测定中使用的样品来源于受试者的血液。然而,血液样品相对难以获得。例如,在病原性疾病监测的应用中,如果样品收集涉及抽血,则受试者不太可能遵守待测试的建议或待测试的志愿者。此外,尽管如在血清中测量的病毒负荷与疾病严重性之间可能存在正相关,但血液中病原性核酸(例如病毒RNA)的存在似乎仅在少数患者中出现,并且当其存在时,在研究中通常存在显著的异质性。因此,在一些情况下,如果样品是从血液中提取的,则没有确凿的证据表明这种相关。因此,许多测定被设计成利用唾液样品或经由拭子收集的样品(例如,口咽或鼻咽)。

[0006] 虽然基于唾液和/或拭子的样品更容易获得,但是存在与它们的使用相关的缺点。具体来说,基于唾液或拭子的样品中有机物质的量和浓度可在样品与样品之间变化很大,甚至在相同个体中变化也很大。例如,差异是由于不同的样品收集技术、在样品与样品之间收集的不同的总质量或体积、受试者生理或解剖结构的差异以及样品收集设备的差异。

[0007] 样品之间有机物质水平的不一致性使得难以产生样品间靶核酸总负荷的有意义的比较,甚至对于来自单个受试者的样品来说也是如此。在许多应用中,测定受试者中靶核酸的负荷如何随时间变化将是有用的,诸如用于监测病原性疾病的进展。然而,在现有技术中,由于样品之间的差异过大,无法进行这种类型的有意义的比较。例如,如果两种不同样品的测试得到靶核酸的测量绝对量,则不能推断一种样品实际上比另一种样品表现出更低或更高的靶核酸水平,因为任何差异(或甚至一致的相似性)实际上可能是由样品中收集的有机物质的量或浓度的差异引起的。

[0008] 因此,存在对定量来自样品的靶核酸并且使得能够比较两个或更多个测试样品之间的靶核酸负荷的系统、方法、试剂盒和其他实施方案的持续需要。

## 发明内容

[0009] 本发明的一个实施方案包括一种用于定量多个样品中的靶核酸的方法,该方法包括提供两个或更多个各自包含靶核酸的测试样品;提供一组对照样品,每个对照样品具有已知浓度的对照核酸;通过使测试样品中的每个测试样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的至少一部分;通过使对照样品中的每个对照样品在对照引物的存在下经受扩增条件来扩增对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的至少一部分;使用扩增对照核酸的结果生成标准曲线;使用标准曲线确定测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的绝对量(AQ);通过使测试样品中的每个测试样品在内源序列引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的内源对照核酸;基于测试样品中的相应一个测试样品中的内源核酸的相对水平确定测试样品中的每个测试样品的校正因子(RQ);以及通过使用测试样品中的相应一个测试样品的校正因子对靶核酸的绝对量进行归一化来确定测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的校正量(校正的AQ)。

[0010] 在示例性实施方案中,两个或更多个测试样品各自来源于相同受试者。

[0011] 在示例性实施方案中,两个或更多个测试样品在不同时间和/或从受试者的不同位置获得。

[0012] 在示例性实施方案中,不同时间中的至少两者被1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周、二周、三周、四周、六周、八周、十周、三个月、四个月、五个月、六个月的时间段或具有由任何两个前述值定义的端点的时间段范围分隔开。

[0013] 在示例性实施方案中,靶核酸是病毒核酸。在另一个示例性实施方案中,靶核酸是SARS-CoV-2核酸。

[0014] 在示例性实施方案中,测试样品可以来源于拭子样品。在示例性实施方案中,拭子样品是鼻拭子样品。在另一个示例性实施方案中,鼻拭子样品中的每个鼻拭子样品来自受试者的相同鼻孔。

[0015] 在示例性实施方案中,该方法还包括在使测试样品中的每个测试样品经受扩增条件之前从拭子样品中提取靶核酸。

[0016] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸包含含有靶核酸的核酸。

[0017] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸包含完整或部分病毒基因组。

[0018] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸能够用靶标特异性引物扩增。

[0019] 在示例性实施方案中,对照引物和靶标特异性引物是相同的。

[0020] 在示例性实施方案中,内源序列引物对RNA酶P有特异性。

[0021] 在示例性实施方案中,靶标特异性引物对SARS-CoV-2的0rf1a基因、0rf1b基因、N基因或S基因中的一者或多者有特异性。

[0022] 在示例性实施方案中,测试样品不包括血液样品。

[0023] 在示例性实施方案中,测试样品是鼻咽或口咽样品。

[0024] 在示例性实施方案中,该方法还包括为与第一时间点相关的第一测试样品建立基

线校正因子,并且相对于该基线校正因子确定后续测试样品的后续校正因子。

[0025] 在示例性实施方案中,该方法还包括相对于第一测试样品确定后续测试样品的校正量,以说明测试样品的靶核酸负荷随时间的相对变化。

[0026] 在示例性实施方案中,扩增测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

[0027] 在示例性实施方案中,扩增对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的至少一部分包括逆转录反应。

[0028] 在示例性实施方案中,扩增测试样品中的每个测试样品中的内源核酸不包括逆转录反应。

[0029] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的扩增与测试样品中的每个测试样品中的内源对照核酸的扩增具有大体上相似的效率。

[0030] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的扩增与测试样品中的每个测试样品中的内源对照核酸的扩增具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的效率。

[0031] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的扩增效率图与测试样品中的每个测试样品中的内源对照核酸的扩增效率图具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的斜率( $C_q$ /量)。

[0032] 本发明的另一个实施方案包括一种用于定量来自样品的靶病毒核酸的方法,该方法包括提供两个或更多个各自包含靶病毒核酸的测试样品;提供一组对照样品,每个对照样品具有已知浓度的靶病毒核酸;通过使测试样品中的每个测试样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的靶病毒核酸的至少一部分;通过使对照样品中的每个对照样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增对照样品中的每个对照样品中的靶病毒核酸的至少一部分;使用扩增对照样品中的每个对照样品中的靶病毒核酸的结果生成标准曲线;使用标准曲线确定测试样品中的每个测试样品中的靶病毒核酸的绝对量;通过使测试样品中的每个测试样品在内源序列引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的内源核酸;基于测试样品中的相应一个测试样品的内源核酸的相对水平确定测试样品中的每个测试样品的校正因子;以及通过使用测试样品中的相应一个测试样品的校正因子对靶病毒核酸的绝对量进行归一化来确定测试样品中的每个测试样品中的靶病毒核酸的校正量。

[0033] 在示例性实施方案中,两个或更多个测试样品各自来源于相同受试者。

[0034] 在示例性实施方案中,两个或更多个测试样品在不同时间获得。

[0035] 在示例性实施方案中,不同时间中的至少两者被1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周、二周、三周、四周、六周、八周、十周、三个月、四个月、五个月、六个月的时间段或具有由前述值中任意两个限定的端点的时间段范围分隔开。

[0036] 在示例性实施方案中,靶病毒核酸是SARS-CoV-2核酸。

[0037] 在示例性实施方案中,测试样品来源于拭子样品。

[0038] 在示例性实施方案中,拭子样品是鼻拭子样品。

[0039] 在示例性实施方案中,鼻拭子样品中的每个鼻拭子样品来自受试者的相同鼻孔。

[0040] 在示例性实施方案中,该方法还包括在使测试样品中的每个测试样品经受扩增条



件之前,从拭子样品中提取靶核酸。

[0041] 在示例性实施方案中,内源序列引物对RNA酶P有特异性。

[0042] 在示例性实施方案中,靶标特异性引物对SARS-CoV-2的0rf1a基因、0rf1b基因、N基因或S基因中的一者或多者有特异性。

[0043] 在示例性实施方案中,测试样品不包括血液样品。

[0044] 在示例性实施方案中,测试样品是鼻咽或口咽样品。

[0045] 在示例性实施方案中,该方法还包括为与第一时间点相关的第一测试样品建立基线校正因子;以及相对于基线校正因子确定后续和/或额外测试样品的后续校正因子。

[0046] 在示例性实施方案中,该方法还包括相对于第一测试样品确定后续测试样品的校正量,以说明测试样品的靶核酸负荷随时间的相对变化。

[0047] 在示例性实施方案中,扩增测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

[0048] 在示例性实施方案中,扩增对照样品中的每个对照样品中的靶核酸的至少一部分包括逆转录反应。

[0049] 在示例性实施方案中,扩增测试样品中的每个测试样品中的内源核酸不包括进行逆转录反应。

[0050] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的靶核酸的扩增与测试样品中的每个测试样品中内源核酸的扩增具有大体上相似的效率。

[0051] 在示例性实施方案中,对照样品中的每个对照样品中的靶核酸的扩增效率图与测试样品中的每个测试样品中的内源核酸的扩增效率图具有相差不超过约6%、不超过约5%或不超过约4%的斜率( $C_q$ /量)。

## 附图说明

[0052] 图1A是SARS-CoV-2病毒体结构的示意图。

[0053] 图1B是SARS-CoV-2的RNA基因组的示意图,图示了本文所述的测定可靶向的潜在靶区域。

[0054] 图2图示了用于定量来自样品的靶核酸的方法。

[0055] 图3是扩增效率图,图示了使用TaqCheck™SARS-CoV-2快速PCR测定试剂盒得到的在N/S SARS-CoV-2基因靶标与RNA酶P靶标之间相似的PCR效率。

[0056] 图4A和图4B分别是使用TaqCheck™SARS-CoV-2快速PCR测定试剂盒得到的N/S基因和RNA酶P的各种对照样品稀释液的扩增图。

[0057] 图5A至图5D分别图示了使用TaqMan™SARS-CoV-2和RNA酶P测定2.0得到的N基因、0rf1a基因、0rf1b基因靶标和RNA酶P靶标的各种对照样品稀释液的扩增图。

[0058] 图5E和图5F分别是0rf1a基因和RNA酶P靶标的不同对照样品稀释液的平均 $C_q$ 值的变异图,显示了在高拷贝数样品下染料通道之间的潜在串扰。

[0059] 图6图示了用于从PCR产生的 $C_q$ 值获得“COVID AQ”值的标准曲线。

[0060] 图7图示了从初始 $T_0$ 时间段开始的Log(定量)随时间的变化。

## 具体实施方式

[0061] 本文引用的所有出版物和专利申请以及本文所附的附录出于所有目的而以相同程度以引用方式整体并入本文,其引用程度如同每个单独的附录、出版物或专利申请被具体且个别地指出以如此引用的方式并入一样。尽管本文所附的附录可包括涉及特定靶核酸、制剂和方法步骤的具体示例,但应理解,可通过使用本文别处所述的任何制剂、组分和/或方法步骤来修改这些示例。

[0062] 当本文描述示例性“实施方案”或具体“测定”时,应理解,这些实施方案的特征可酌情应用于组合物(例如,测定的具体物理组分,诸如引物和/或探针)、试剂盒(例如,引物和/或探针以及另外的缓冲液、试剂等)或方法(例如,用于检测和/或定量靶核酸的过程)。为简单起见,通过描述“测定”来呈现许多实施方案,但应理解,使用这些测定的相关方法也意在形成本公开的一部分。

### [0063] 用于定量靶核酸的组合物、试剂盒和方法的概述

[0064] 如上所述,存在与比较在不同样品之间测量到的靶核酸量相关的挑战,即使当样品来源于相同受试者时也如此。这些挑战在利用非血液临床样品的应用中特别突出,诸如在样品收集期间利用口咽和/或鼻咽拭子的应用中。例如,挑战包括难以监测受试者中靶核酸负荷随时间的变化。尽管关于负荷随时间变化的信息在许多应用中(例如,在诊断和/或监测病原性疾病的进展中)是有用的,但伴随的困难迄今阻碍了容易获得和利用这种信息的能力。难以跨不同样品进行有意义的比较,因为靶核酸的实际水平的变化可能会被所收集的有机物质(例如,受试者的细胞)的量或浓度的样品间差异混淆。因此,受试者中靶核酸水平的任何实际变化都被样品之间的差异所混淆。

[0065] 本文描述了组合物、试剂盒和方法,其被配置为通过根据每个测试样品中的内源核酸的相对水平归一化每个样品中的靶核酸的测量水平来定量靶核酸并使得能够在多个测试样品之间进行有意义的比较。本文所述的实施方案有利地能够改善受试者中疾病进展随时间的诊断和/或监测,从而允许医学专业人员更好地确定与病原体相关的靶核酸是否在受试者内随时间增加、减少或保持不变。例如,该信息可以通过更好地说明治疗效果、突出风险阈值和/或指示结果概率来改善疾病诊断、治疗和/或预后。

### [0066] 靶核酸

[0067] 如本文所公开,靶核酸可以是病毒、细菌、真菌或真核生物。靶核酸可以来自病原体。在涉及病原性疾病的诊断和/或监测的实施方案中,靶病原体可以是由于受试者的感染而在受试者内留下可检测水平的核酸的任何病原体。病原体可以是病毒、细菌、真菌或真核寄生虫。当与病原体相关的靶核酸可通过唾液收集和/或通过基于拭子的收集方法获得时,本文所述的实施方案特别有用。基于拭子的收集方法通常涉及鼻咽拭子或口咽拭子,尽管某些实施方案适用于其他类型的拭子样品,诸如面颊拭子、伤口拭子、皮肤拭子、耳拭子、肛门拭子、阴道拭子或其他解剖位置的拭子。

[0068] 具体地,可以使用基于拭子的样品收集方法(通常为鼻咽拭子或口咽拭子)来诊断和/或监测呼吸道病原体。可被靶向的呼吸道微生物的示例列于下表1中。靶向以下生物体(和/或其他生物体)中的一种或多种生物体的测定包括使得能够扩增与病原体相关的靶核酸序列的适当引物,以及帮助检测靶向一种或多种新出现的感兴趣的病原体或微生物的扩增产物的可选的一种或多种探针。

[0069] 表1: 示例性呼吸道微生物

[0070]	AdV 1 HBoV HHV3 HHV4 HHV5 HHV6 FluA (pan) FluA (H1) FluA (H3)	FluB (pan) hPIV1 hPIV2 hPIV3 hPIV4 RSVA RSVB hMPV 麻疹 CoV 229E	CoV HKU1 CoV NL63 CoV OC43 腮腺炎 MERS-CoV SARS-CoV SARS-CoV-2 EnteroV (pan) EnteroV D68 RhinoV 1of2 RhinoV 2of2	ParechoV 博德特氏菌属 ( <i>Bordetella spp.</i> ) 霍氏博德特氏菌( <i>B. holmesii</i> ) 百日咳博德特氏菌( <i>B. pertussis</i> ) 肺炎衣原体( <i>C. pneumoniae</i> ) 流感嗜血杆菌( <i>H. influenzae</i> ) 肺炎克雷伯氏菌( <i>K. pneumoniae</i> ) 嗜肺军团菌( <i>L. pneumophila</i> )	卡他莫拉菌( <i>M. catarrhalis</i> ) 肺炎支原体( <i>M. pneumoniae</i> ) 金黄色葡萄球菌( <i>S. aureus</i> ) 肺炎链球菌( <i>S. pneumoniae</i> ) 耶氏肺孢子菌( <i>P. jirovecii</i> )
--------	---	--	---	--	--

[0071] 对于选定的病原体或其他靶生物体,可通过设计靶标特异性引物来靶向一种或多种核酸,当样品和靶标特异性引物经历扩增条件时,该靶标特异性引物能够扩增靶核酸。配备本领域技术人员来设计适当的引物。这类方法描述于Basu, Chhandak (编)“PCR引物设计(PCR Primer Design)”(《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》)第2版(2015)中。

[0072] 尽管不限于任何特定病原体或病原体组,但某些实施方案被配置用于定量与冠状病毒,特别是SARS-CoV-2相关的靶核酸。SARS-CoV-2病毒(也被称为2019-nCoV)与人类呼吸道疾病COVID-19相关联。从COVID-19的早期病例中分离的病毒被临时命名为2019-nCoV。国际病毒分类委员会的冠状病毒研究组随后正式将其命名为SARS-CoV-2。出于本公开的目的,SARS-CoV-2和2019-nCoV被认为是指相同种病毒。

[0073] 最初表征的SARS-CoV-2的“参考”形式的基因序列基于与NCBI登录号NC\_045512.2(参见GenBank:MN908947.3)相关的序列,其描述了29,903个碱基对的基因组。因为SARS-CoV-2是RNA病毒,所以它可以相对较高的频率突变,这导致新变体的出现,并且很可能另外的变体将随时间继续出现。

[0074] 图1A是SARS-CoV-2病毒体的示意图,而图1B是SARS-CoV-2 RNA基因组的图,显示了可通过选择合适的靶标特异性引物来靶向的特定区域。如图所示,潜在的靶基因包括Orf1a、Orf1b、S、E、M和N基因以及几种其他辅助蛋白。SARS-CoV-2基因组编码两个大基因Orf1a和Orf1b,它们编码16种非结构蛋白(NSP1-NSP16)。处理这些NSP以形成参与基因组转录和复制的复制-转录复合物(RTC)。结构基因编码结构蛋白刺突(S)、包膜(E)、膜(M)和核衣壳(N)。辅助蛋白在数目、基因组组织、序列和功能方面对于SARS-CoV-2是独特的。

[0075] 表2示出了已经在SARS-CoV-2基因组中发生的一些突变,以及它们的相关作用和流行病学影响(如果已知的话)。用于指定这些突变的编号系统是基于如上定义的“参考”序列。例如,突变“S.N501Y.A\_T”是指刺突(S)蛋白的突变形式,其中501号氨基酸残基从天冬酰胺(N)变为酪氨酸(Y)。标记“A\_T”的后一部分说明突变也与从腺嘌呤(A)到胸腺嘧啶(T)的变化相关。注意,RNA包括尿嘧啶(U),但本文所包括的符号有时可简单地指对应的DNA碱

基对胸腺嘧啶(T)。为了方便起见,对所涉及的蛋白质有特异性的标记的起始部分和/或对核苷酸突变有特异性的标记的后一部分有时可以从标记上去除。本领域技术人员将易于认识到本文使用的突变命名法。

[0076] 表2:SARS-CoV-2突变

突变描述	基因	对病毒的作用	流行病学影响
S.delH69V70	S	构象刺突蛋白; 刺突的 N 端结构域	1)逃避免疫应答, 2)靶向 S 基因的测定可能不挑出
S.N501Y.A_T	S	位于受体结合结构域内, 6 个关键接触残基中的一个关键接触残基	1)快速生长谱系, 2)细胞中对 hACE2 受体的结合亲和力增加
S.E484K.G_A	S	RBD 区域中的突变	减少抗体识别; 与 ACE2 受体相互干扰
S.K417N.G_C	S	RBD 区域的突变(在南非变体中)	在 UK 菌株中不存在的 RBD 区域中的突变可能影响疫苗效力
S.N439K.C_A	S	影响逃避抗体介导的免疫的能力	1)增加对 hACE2 受体的结合亲和力, 2)逃避一些 Mab
S.D614G.A_G	S	更快的流传能力	遗传性影响适中
S.A222V.C_T	S	20A.EU1 SARS-CoV-2 簇(谱系 B.1.177)	1)快速生长谱系, 2)没有来自突变的影响
S.Y453F.A_T	S	与貂相关	1)增加对 hACE2 受体的结合亲和力, 2)逃避一些 Mab

[0077]

[0078]

S.P681H.C_A	S	靠近高度可变的 S1/S2 弗林蛋白酶切割位点	靠近弗林蛋白酶 S1/S2 切割位点。被认为是主要的全局变体。
orf8.Q27stop	Orf*	Q27 终止密码子	截短的 Orf8 基因; 允许下游突变积累
S.delY144	S	构象刺突蛋白; 刺突的 N 端结构域	1) 逃避免疫应答, 2) 靶向 S 基因的测定可能不挑出
S.A570D.C_A	S	位于受体结合结构域内; 6 个关键接触残基中的一个	1) 快速生长谱系, 2) 细胞中对 hACE2 受体的结合亲和力增加
S.T716I.C_T	S	RBD 区域中的突变	减少抗体识别; 与 ACE2 受体相互干扰
S.S982A.T_G	S	南非变体中 RBD 区域的突变	在 UK 菌株中不存在的 RBD 区域中的突变可能影响疫苗效力。
S.D1118H.G_C	S	影响逃避抗体介导的免疫的能力	1) 增加对 hACE2 受体的结合亲和力, 2) 逃避一些 Mab
orf1.A1708D.C_A	Orf1a	更快的流传能力	遗传性影响适中
S.A701V.C_T	S	20A.EU1 SARS-CoV-2 簇(谱系 B.1.177)	1) 快速生长谱系, 2) 没有来自突变的影响

[0079]	S.del22286_9bp	S	1)增加对 hACE2 受体的结合亲和力, 2)逃避一些 Mab
	S.D80A.A_C	S	靠近弗林蛋白酶 S1/S2 切割位点。被认为是主要的全局变体。
	S.D215G.A_G	S	截短的 Orf8 基因; 允许下游突变积累
	S.L18F.C_T	S	1)逃避免疫应答, 2)靶向 S 基因的测定可能不挑出
	S.R246I.G_T	S	1)快速生长谱系, 2)细胞中对 hACE2 受体的结合亲和力增加

[0080] 某些实施方案涉及定量靶 SARS-CoV-2 核酸。在一些实施方案中, 一种或多种靶标特异性引物靶向对应于参考 SARS-CoV-2 的 SARS-CoV-2 核酸。在一些实施方案中, 一种或多种靶标特异性引物靶向对应于 SARS-CoV-2 的现有或将来变体形式的 SARS-CoV-2 核酸。实施方案可以靶向与本文所述的任何 SARS-CoV-2 基因相关的一个 (例如, 在单重反应中) 或多个 (例如, 在多重反应中) 核酸序列。通常, 实施方案靶向与 Orf1a、Orf1b、S 或 N 基因相关的一个或多个核酸序列。

[0081] 适用于靶向 SARS-CoV-2 的示例性测定包括 TaqCheck™ SARS-CoV-2 快速 PCR 测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 目录号 A47693)、TaqPath™ COVID-19 Combo 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific)、TaqPath™ COVID-19 Combo 试剂盒高级版 (Thermo Fisher Scientific, 目录号 A47814)、TaqMan™ SARS-CoV-2 和 RNA 酶 P 测定 2.0 (Thermo Fisher Scientific, 目录号 A51121)、TaqMan™ SARS-CoV-2 RNA 酶 P 测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific)、CoviPath™ COVID-19 RT PCR 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 和 TaqMan™ SARS-CoV-2 快速 PCR Combo 试剂盒 2.0 (Thermo Fisher Scientific, 目录号 A51607)。

[0082] 示例性测定 1

[0083] 第一示例性测定是用于检测样品中的病毒 RNA 的多重实时 RT-PCR 测定。多重实时 RT-PCR 测定可用于检测人原始唾液样品中的 SARS-CoV-2 病毒 RNA, 例如, TaqCheck™ SARS-CoV-2 快速 PCR 测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific)。

[0084] 第一示例性测定包括对靶病毒核酸 (例如, N/S SARS-CoV-2 基因靶标) 和内源核酸

(例如, RNA酶P基因靶标) 有特异性的正向和反向引物。第一示例性测定还包括用于检测靶病毒核酸的荧光或其他可检测标记(例如, VIC染料), 和用于检测内源核酸的另一荧光或其他可检测标记(例如, FAM染料)。第一示例性测定还包括用于淬灭荧光或其他可检测标记(例如VIC染料)的淬灭剂(例如QSY淬灭剂), 和用于淬灭其他荧光或可检测标记(例如FAM染料)的另一淬灭剂(例如QSY淬灭剂)。由VIC染料与QSY淬灭剂的组合形成对靶病毒核酸有特异性的探针。同样, 由FAM染料与QSY淬灭剂的组合形成对内源核酸有特异性的探针。

[0085] 用于进行第一示例性测定的测定试剂盒包括PCR测定混合物、RNA对照、对照稀释缓冲液和主混合物。PCR测定混合物包括对靶病毒核酸(例如, N/S SARS-CoV-2基因靶标) 和内源核酸(例如, RNA酶P基因靶标) 有特异性的正向和反向引物, 例如TaqCheck™SARS-CoV-2快速PCR测定(Thermo Fisher Scientific)。RNA对照是含有对靶病毒核酸和内源核酸有特异性的模板的对照, 例如TaqCheck™SARS-CoV-2对照(Thermo Fisher Scientific)。对照稀释缓冲液是用于稀释RNA对照的缓冲液, 例如TaqCheck™SARS-CoV-2对照稀释缓冲液(Thermo Fisher Scientific)。主混合物是例如TaqPath 1步RT-qPCR主混合物, CG(Thermo Fisher Scientific)。

[0086] 缓冲液-洗涤剂混合物的制备: 根据下表A1, 用TBE缓冲液(10X)、Tween-20洗涤剂(10%) 和无核酸酶水在无DNA酶和RNA酶的管中制备TBE-T混合物:

[0087] 表A1

	体积/孔	体积/96孔板 <sup>[1]</sup>	体积/四个96孔板 <sup>[1]</sup>
[0088] TBE缓冲液(10X) <sup>[2]</sup>	20μL	2.4mL	9.6mL
Tween <sup>®</sup> -20洗涤剂(10%) <sup>[3]</sup>	10μL	1.2mL	4.8mL
无核酸酶水	70μL	8.4mL	33.6mL
总体积	100μL	12.0mL	48.0mL

[0089] [1] 包括25%过量。

[0090] [2] TBE缓冲液在TBE-T混合物中的最终浓度为2X。

[0091] [3] Tween<sup>®</sup>-20洗涤剂在TBE-T混合物中具有1%的最终浓度。

[0092] 将TBE-T混合物(100μL) 添加到板的每个孔中。

[0093] 样品的制备: 将样品(例如唾液样品) 在95℃下加热30分钟, 然后使其在室温下平衡。将每个热处理的样品(100μL) 转移到板的指定孔中。

[0094] RT-PCR反应的制备: 通过两步稀释制备RNA对照的工作储备液。步骤(a) 包括将95.0μL对照稀释缓冲液移液到微量离心管中, 然后添加5.0μL的RNA对照。步骤(b) 包括将95.0μL对照稀释缓冲液添加到第二微量离心管中, 然后添加5.0μL步骤(a) 中产生的稀释液。

[0095] 反应混合物的制备: 通过将足以用于RNA样品数目、一个阳性对照和一个“无模板”对照的量的主混合物, PCR测定混合物, 无核酸酶水组合来制备反应混合物。例如, 表A2用于96孔板。

[0096] 表A2

组分	体积/样品	$n$ 个样品加 2 个对照的体积 <sup>[1]</sup>	94 个样品加 2 个对照的体积 <sup>[1]</sup>
	或对照		
[0097] 主混合物(4X)	2.5 $\mu$ L	$2.75 \times (n + 2) \mu$ L	264.0 $\mu$ L
PCR 测定混合物	0.5 $\mu$ L	$0.55 \times (n+2) \mu$ L	52.8 $\mu$ L
无核酸酶水	2.0 $\mu$ L	$2.2 \times (n+2) \mu$ L	211.2 $\mu$ L
总反应混合物体积	5.0 $\mu$ L	—	528.0 $\mu$ L

[0098] [1]所有体积因移液管误差而包括10%过量。

[0099] 根据表A3设置反应板。

[0100] 表A3

组分	体积/反应		
	样品反应	阳性对照反应	无模板对照反应
[0101] 反应混合物	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
制备的样品(唾液+TBE-T)	5.0 $\mu$ L	—	—
阳性对照(来自步骤 3 的稀释对照)	—	2.0 $\mu$ L	—
无核酸酶水	—	3.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
总体积	10.0 $\mu$ L	10.0 $\mu$ L	10.0 $\mu$ L

[0102] PCR设置和热方案:分析类型是标准曲线,运行模式是快速,且被动参考是ROX。设置FAM作为内源核酸(例如RNA酶P)的报告染料,且设置VIC作为靶病毒核酸的报告染料。

[0103] 根据所使用的仪器设置并运行热方案(例如,参见表A4和A5)。

[0104] 表A4-7500快速实时PCR仪

步骤	温度	缓变率	时间	循环次数
[0105] 逆转录	50°C	100%	4 分钟	1
活化	95°C	100%	2 分钟	1
变性	95°C	100%	1 秒	40
退火/延伸	60°C	100%	24 秒	

[0106] 表A5-QuantStudio™5实时PCR仪,96-孔,0.2-mL块

步骤	温度	缓变率	时间	循环次数
[0107] 逆转录	50°C	3.49°C/秒	4 分钟	1
活化	95°C	3.49°C/秒	2 分钟	1
变性	95°C	3.49°C/秒	1 秒	40
退火/延伸	60°C	2.7°C/秒	20 秒	

[0108] 示例性测定2

[0109] 第二示例性测定是用于检测样品中的病毒RNA的多重实时RT-PCR测定。多重实时RT-PCR测定可用于检测来自疑似患有COVID-19的个体的上呼吸道样品(诸如鼻咽、口咽、鼻和鼻中区拭子以及鼻咽吸出物)和支气管肺泡灌洗(BAL)样品中的SARS-CoV-2的RNA,例如TaqPath™COVID-19 Combo试剂盒(Thermo Fisher Scientific)。



[0110] 第二示例性测定包括对不同靶基因组区域(例如,ORF1ab、N基因、S基因、MS2基因靶标)和内源核酸(例如,噬菌体MS2)有特异性的正向和反向引物。第二示例性测定还包括用于检测第一靶核酸(例如ORF1ab)的荧光或其他可检测标记(例如FAM染料)、用于检测第二靶核酸(例如N基因)的荧光或其他可检测标记(例如VIC染料)、用于检测第三靶核酸(例如S基因)的荧光或其他可检测标记(例如ABY染料)、以及用于检测内源核酸(例如噬菌体MS2)的荧光或其他可检测标记(例如JUN染料)。第二示例性测定还可包括一种或多种淬灭剂(例如QSY淬灭剂),用于淬灭荧光或其他可检测标记。

[0111] 用于进行第二示例性测定的测定试剂盒包括PCR测定多重混合物、RNA对照和对照稀释缓冲液。PCR测定多重混合物包括对靶核酸(例如ORF1ab、N基因、S基因、MS2基因靶标)和内源核酸(例如噬菌体MS2)有特异性的正向和反向引物,例如,TaqPath™COVID-19 RT-PCR试剂盒(Thermo Fisher Scientific)。RNA对照是含有对靶病毒核酸和内源核酸有特异性的模板的对照,例如,TaqPath™COVID-19对照(Thermo Fisher Scientific)。对照稀释缓冲液是用于稀释RNA对照的缓冲液,例如,TaqPath™COVID-19对照稀释缓冲液(Thermo Fisher Scientific)。主混合物是例如TaqPath 1步多重主混合物(无ROX)(Thermo Fisher Scientific)。

[0112] RNA提取:RNA可以使用自动方法(如下详述)或手动来提取。可以从200μL的样品输入体积或使用MagMAX™病毒/病原体核酸分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)或MagMAX™病毒/病原体II核酸分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行手动RNA提取。

[0113] 处理板的制备:根据表B1制备处理板。

[0114] 表B1

板 ID	板位置	板类型	试剂	体积/孔
[0115] 洗涤 1 板	2	KingFisher™深孔 96 板	洗涤溶液	500μL
洗涤 2 板	3		80%乙醇	1,000μL
洗脱板	4		洗脱溶液	50μL
尖梳板	5	将用于 DW 磁体的 KingFisher™ 96 尖梳置于 KingFisher™ 96 KF 微板中。		

[0116] 结合珠粒混合物的制备:根据表B2制备结合珠粒混合物。

[0117] 表B2

组分	体积/孔 <sup>[1]</sup>
结合溶液	265μL
总核酸磁珠粒	10μL
总体积/孔	275μL

[0119] [1]当制备用于多重反应的结合珠粒混合物时,包括10%过量。

[0120] 样品板的制备:向96孔板的每个孔中添加蛋白酶K(5μL)。

[0121] 将样品(200μL)添加到每个样品孔中。

[0122] 向阴性对照孔中添加无核酸酶水(未用DEPCT处理)(200μL)。

[0123] 将结合珠粒混合物(275μL)添加到样品孔和阴性对照孔中。

[0124] 将MS2噬菌体对照(5μL)添加到每个样品孔和阴性对照孔中。

[0125] 过程样品:在磁性颗粒处理器(例如KingFisher™Flex磁性颗粒处理器)上处理样

品。将样品在50 $\mu$ L的洗脱溶液中洗脱。

[0126] RT-PCR反应的制备:通过两步稀释制备RNA对照的工作储备液。步骤(a)包括将98.0 $\mu$ L对照稀释缓冲液移液到微量离心管中,然后添加2.0 $\mu$ L的RNA对照。步骤(b)包括将87.5 $\mu$ L对照稀释缓冲液添加到第二微量离心管中,然后添加12.5 $\mu$ L步骤(a)中产生的稀释液。

[0127] 反应混合物的制备:通过将足以用于RNA样品数目、一个阳性对照和一个阴性对照的量的主混合物、PCR测定混合物和无核酸酶水组合来制备反应混合物。例如,表B3用于96孔板。

[0128] 表B3

组分	体积/RNA 样品或对照	$n$ 个 RNA 样品加 2 个对照的体积	94 个 RNA 样品加 2 个对照的体积
[0129] 主混合物(无 ROX™)(4X)	6.25 $\mu$ L	$6.875 \times (n+2)$ $\mu$ L	660 $\mu$ L
PCR 测定多重混合物	1.25 $\mu$ L	$1.375 \times (n+2)$ $\mu$ L	132 $\mu$ L
无核酸酶水	7.50 $\mu$ L	$8.25 \times (n+2)$ $\mu$ L	792 $\mu$ L
总反应混合物体积	15.0 $\mu$ L	—	1584 $\mu$ L

[0130] 根据表B4设置反应板。

[0131] 表B4

组分	体积/反应		
	RNA 样品反应	阳性对照反应	阴性对照反应
反应混合物	15.0 $\mu$ L	15.0 $\mu$ L	15.0 $\mu$ L
[0132] 纯化的样品 RNA(来自 RNA 提取)	10.0 $\mu$ L	—	—
阳性对照(稀释的对照)	—	2.0 $\mu$ L	—
无核酸酶水	—	8.0 $\mu$ L	—
纯化的阴性对照(来自 RNA 提取)	—	—	10.0 $\mu$ L
总体积	25.0 $\mu$ L	25.0 $\mu$ L	25.0 $\mu$ L

[0133] PCR设置和热方案:分析类型是标准曲线,运行模式是标准,且被动参考是无。将JUN设置为内源核酸(例如MS2)的报告染料,将FAM设置为第一靶核酸(例如ORF1ab)的报告染料,将VIC设置为第二靶病毒核酸(例如N基因)的报告染料,将ABY设置为第三靶病毒核酸(例如S基因)的报告染料。

[0134] 根据所使用的仪器设置并运行热方案(例如,参见表B5)。

[0135] 表B5

步骤	温度	时间	循环次数
UNG 孵育	25°C	2 分钟	1
[0136] 逆转录	53°C	10 分钟	1
活化	95°C	2 分钟	1
变性	95°C	3 秒	40
退火/延伸	60°C	30 秒	

## [0137] 示例性测定3

[0138] 第三示例性测定是用于检测样品中的病毒RNA的多重实时RT-PCR测定。多重实时RT-PCR测定可以用于检测来自人样品中的SARS-CoV-2的RNA,例如,TaqMan™SARS-CoV-2和RNA酶P测定2.0(Thermo Fisher Scientific)。

[0139] 第三示例性测定包括对不同靶基因组区域(例如ORF1a、N基因、S基因、RNA酶P基因靶标)和内源核酸(例如RNA酶P)有特异性的正向和反向引物。第三示例性测定还包括用于检测第一靶核酸(例如ORF1a)的荧光或其他可检测标记(例如FAM染料)、用于检测第二靶核酸(例如N基因)的荧光或其他可检测标记(例如VIC染料)、用于检测第三靶核酸(例如S基因)的荧光或其他可检测标记(例如ABY染料)、以及用于检测内源核酸(例如RNA酶P)的荧光或其他可检测标记(例如JUN染料)。第三示例性测定还包括淬灭剂(例如QSY淬灭剂),用于淬灭荧光或其他可检测标记。第三示例性测定中的淬灭剂不发荧光。

[0140] 用于进行第三示例性测定的测定试剂盒包括PCR测定多重混合物、RNA对照和对照稀释缓冲液。PCR测定多重混合物包括对靶核酸(例如ORF1a、N基因和ORF1b基因靶标)和内源核酸(例如RNA酶P)有特异性的正向和反向引物,例如,TaqMan™SARS-CoV-2和RNA酶P测定2.0(Thermo Fisher Scientific)。RNA对照是含有对靶病毒核酸和内源核酸有特异性的模板的对照,例如TaqMan™SARS-CoV-2 Plus对照(Thermo Fisher Scientific)。对照稀释缓冲液是用于稀释RNA对照的缓冲液,例如TaqMan™对照稀释缓冲液(Thermo Fisher Scientific)。主混合物是例如TaqPath 1步多重主混合物(无ROX)(Thermo Fisher Scientific)。

## [0141] RNA提取

[0142] 处理板的制备:根据表C1制备处理板。

## [0143] 表C1

板 ID	板位置	板类型	试剂	体积/孔
[0144] 洗涤 1 板	2	KingFisher™ 96 深孔板	洗涤溶液	500μL
洗涤 2 板	3		80%乙醇	1,000μL
洗脱板	4		洗脱溶液	50μL
尖梳板	5	将用于 DW 磁体的 KingFisher™ 96 尖梳置于 KingFisher™ 96 KF 微板中。		

[0145] 结合珠粒混合物的制备:根据表C2制备结合珠粒混合物。

## [0146] 表C2

组分	体积/孔 <sup>[1]</sup>	体积/96孔板
[0147] 结合溶液	265μL	28.0mL

总核酸磁珠粒	10 $\mu$ L	1.1mL
总体积	275 $\mu$ L	29.1mL

[0148] [1]当制备用于多重反应的结合珠粒混合物时,包括10%过量。

[0149] 样品板的制备:将结合珠粒混合物(275 $\mu$ L)添加到样品孔和阴性对照孔中。将样品(200 $\mu$ L)添加到每个样品孔中。

[0150] 向阴性对照孔中添加无核酸酶水(未用DEPCT处理)(200 $\mu$ L)。

[0151] 将蛋白酶K(5 $\mu$ L)添加到96孔板的每个孔中。

[0152] 过程样品:在磁性颗粒处理器(例如KingFisher Flex磁性颗粒处理器)上处理样品。将样品在50 $\mu$ L的洗脱溶液中洗脱。

[0153] RT-PCR反应的制备:通过两步稀释制备RNA对照的工作储备液。步骤(a)包括将100.0 $\mu$ L对照稀释缓冲液移液到微量离心管中,然后添加2.0 $\mu$ L RNA对照。步骤(b)包括将110.0 $\mu$ L对照稀释缓冲液添加到第二微量离心管中,然后添加2.0 $\mu$ L步骤(a)中产生的稀释液。

[0154] 反应混合物的制备:通过将足以用于RNA样品数目、一个阳性对照和一个阴性对照的量的主混合物与PCR测定混合物组合来制备反应混合物。例如,表C3用于96孔板。

[0155] 表C3

组分	体积/RNA样品或对照	$n$ 个RNA样品加2个对照的体积	94个RNA样品加2个对照的体积
[0156] 主混合物(无 ROX™)(4X)	6.25 $\mu$ L	6.875 x ( $n + 2$ ) $\mu$ L	660 $\mu$ L
RNA 酶 P 测定混合物	1.25 $\mu$ L	1.375 x ( $n + 2$ ) $\mu$ L	132 $\mu$ L
总反应混合物体积	7.5 $\mu$ L	—	792 $\mu$ L

[0157] 根据表C4设置反应板。

[0158] 表C4

	体积/反应		
	RNA 样品反应	阳性对照反应	阴性对照反应
[0159] 反应混合物(来自步骤 3)	7.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L	7.5 $\mu$ L
纯化的样品 RNA(来自 RNA 提取)	17.5 $\mu$ L	—	—
阳性对照(稀释的对照)	—	17.5 $\mu$ L	—
阴性对照(来自 RNA 提取)	—	—	17.5 $\mu$ L
总体积	25.0 $\mu$ L	25.0 $\mu$ L	25.0 $\mu$ L

[0160] PCR设置和热方案:分析类型是标准曲线,运行模式是标准。设置JUN作为内源核酸(例如,RNA酶P)的报告染料,设置FAM作为第一靶核酸(例如,ORF1a)的报告染料,设置VIC作为第二靶病毒核酸(例如,N基因)的报告染料,设置ABY作为第三靶病毒核酸(例如,ORF1b)的报告染料。

[0161] 根据所使用的仪器设置并运行热方案(例如,参见表C5)。

[0162] 表C5

	步骤	温度	缓变率	时间	循环次数
[0163]			1.6°C/秒	2 分钟	1
	逆转录	53°C		10 分钟	1
	预孵育	85°C		10 分钟	1
[0164]	活化	95°C		2 分钟	1
	变性	95°C		3 秒	40
	退火/延伸	60°C		30 秒	

## [0165] 示例性测定4

[0166] 第四示例性测定是用于检测样品中的病毒RNA的多重实时RT-PCR测定。多重实时RT-PCR测定可以用于检测来自人原始唾液样品中的SARS-CoV-2的RNA,例如,TaqMan™SARS-CoV-2快速PCR Combo试剂盒2.0(Thermo Fisher Scientific)。

[0167] 第四示例性测定包括对不同靶基因组区域(例如ORF1a、N基因、ORF1b基因靶标)和内源核酸(例如RNA酶P)有特异性的正向和反向引物。第四示例性测定还包括用于检测第一靶核酸(例如ORF1a)的荧光或其他可检测标记(例如FAM染料)、用于检测第二靶核酸(例如N基因)的荧光或其他可检测标记(例如VIC染料)、用于检测第三靶核酸(例如ORF1b基因)的荧光或其他可检测标记(例如ABY染料)、以及用于检测内源核酸(例如RNA酶P)的荧光或其他可检测标记(例如JUN染料)。第四示例性测定还包括淬灭剂(例如QSY淬灭剂),用于淬灭荧光或其他可检测标记。第四示例性测定中的淬灭剂不发荧光。

[0168] 用于进行第四示例性测定的测定试剂盒包括PCR测定多重混合物、RNA对照、裂解缓冲液和对照稀释缓冲液。PCR测定多重混合物包括对靶核酸(例如ORF1a、N基因和ORF1b基因靶标)和内源核酸(例如RNA酶P)有特异性的正向和反向引物,例如TaqMan™SARS-CoV-2快速PCR测定2.0(Thermo Fisher Scientific)。RNA对照是含有对靶病毒核酸和内源核酸有特异性的模板的对照,例如TaqMan™SARS-CoV-2 Plus对照(Thermo Fisher Scientific)。对照稀释缓冲液是用于稀释RNA对照的缓冲液,例如TaqMan™SARS-CoV-2对照稀释缓冲液(Thermo Fisher Scientific)。裂解缓冲液是例如SalivaReady™溶液(Thermo Fisher Scientific)。主混合物是例如TaqPath 1步多重主混合物(无ROX)(Thermo Fisher Scientific)。

[0169] 样品的制备:在室温下将裂解溶液(20μL)添加到96孔板的每个孔中,然后将测试样品(20μL)添加到含有裂解溶液的每个孔中。

[0170] 使用表D1中所示的热条件在热循环仪中加热该板。

## [0171] 表D1

步骤	温度	时间	循环次数
1	62°C	5分钟	1
2	92°C	5分钟	1
3	4°C	保持 <sup>[1]</sup>	1

[0173] [1]热循环仪可在4°C下停止一次。

[0174] RT-PCR反应的制备:通过两步稀释制备RNA对照的工作储备液。步骤(a)包括将

120.0 $\mu$ L对照稀释缓冲液移液到微量离心管中,然后添加2.0 $\mu$ L RNA对照。步骤(b)包括将120.0 $\mu$ L对照稀释缓冲液添加到第二微量离心管中,然后添加2.0 $\mu$ L步骤(a)中产生的稀释液。

[0175] 反应混合物的制备:通过将足以用于RNA样品数目、一个阳性对照和一个阴性对照的量的主混合物与PCR测定混合物组合来制备反应混合物。例如,表D2用于96孔板。

[0176] 表D2

组分	体积/样品或对照	$n$ 个样品加 2 个对照	94 个样品加 2 个对照
		的体积 <sup>[1]</sup>	的体积 <sup>[1]</sup>
[0177] 主混合物(无 ROX™)(4X)	5.0 $\mu$ L	$5.5 \times (n + 2)\mu$ L	528.0 $\mu$ L
PCR 测定混合物(20X)	1.0 $\mu$ L	$1.1 \times (n + 2)\mu$ L	105.6 $\mu$ L
总反应混合物体积	6.0 $\mu$ L	—	633.6 $\mu$ L

[0178] [1]所有体积因移液管误差而包括10%过量。

[0179] 根据表D3设置反应板。

[0180] 表D3

组分	体积/反应		
	样品反应	阳性对照反应	阴性对照反应
[0181] 反应混合物	6.0 $\mu$ L	6.0 $\mu$ L	6.0 $\mu$ L
制备的样品(样品加裂解溶液)	14.0 $\mu$ L	—	—
阳性对照(稀释的对照)	—	14.0 $\mu$ L	—
[0182] 无核酸酶水	—	—	14.0 $\mu$ L
总体积	20.0 $\mu$ L	20.0 $\mu$ L	20.0 $\mu$ L

[0183] PCR设置和热方案:分析类型是标准曲线,运行模式是标准,且被动参考是无。设置JUN作为内源核酸(例如, RNA酶P)的报告染料,设置FAM作为第一靶核酸(例如, ORF1a)的报告染料,设置VIC作为第二靶病毒核酸(例如, N基因)的报告染料,设置ABY作为第三靶病毒核酸(例如, ORF1b)的报告染料。

[0184] 根据所使用的仪器设置并运行热方案(例如,参见表D4)。

[0185] 表D4-QuantStudio™5实时PCR仪器,96-孔,0.2-mL块

步骤	温度	缓变率	时间	循环次数
[0186] 逆转录	53°C	3.2°C/秒	5分钟	1
预孵育	85°C	3.2°C/秒	5分钟	1
活化	95°C	3.2°C/秒	2分钟	1
变性	95°C	3.2°C/秒	1秒	40
退火/延伸	62°C	2.5°C/秒	30秒	

[0187] 尽管使用96孔反应板描述示例性测定,但实施方案不限于此,并且示例性测定可针对在包括多于96孔的仪器(例如,QuantStudio™5实时PCR仪,384孔块,和QuantStudio™7 Flex实时PCR仪,384孔块)上的性能进行优化。

[0188] TaqCheck™ SARS-CoV-2快速PCR测定用户指南(修订版B或更高版本)、TaqPath™ COVID-19 Combo试剂盒和TaqPath™ COVID-19 Combo试剂盒高级使用说明(修订版J或更高版本)、TaqMan™ SARS-CoV-2和RNA酶P测定2.0用户指南(修订版B或更高版本)以及TaqMan™ SARS-CoV-2快速PCR Combo试剂盒2.0用户指南(修订版A或更高版本)以引用方式并入本文中。

[0189] 如本文别处更详细地描述,某些测定可以比其他测定执行得更好。例如,优选的实施方案使染料通道之间的串扰量最小化,特别是影响内源对照诸如RNA酶P的串扰量最小化。

[0190] 用于定量多个样品中的靶核酸的方法

[0191] 图2图示了用于定量靶核酸并使得能够比较多个样品之间的核酸水平的示例性方法100。方法100包括提供两个或更多个测试样品的步骤(步骤102)。测试样品中的每个测试样品包括或疑似包括靶核酸。如本文所公开,靶核酸可以是病毒、细菌、真菌或真核生物。靶核酸可以来自病原体。靶核酸可以来自呼吸道病原体。在一些实施方案中,靶核酸来自SARS-CoV-2。一些实施方案定量单个靶核酸(例如,单重反应),而其他实施方案定量多个靶核酸(例如,多重反应)。在一些实施方案中,靶核酸可以是人工的、合成的或外源核酸。

[0192] 在一些实施方案中,两个或更多个测试样品来源于相同受试者。在一些实施方案中,两个或更多个测试样品来源于相同受试者的相同位置(例如,来源于相同或不同鼻孔,诸如来源于右鼻孔、左鼻孔或两个鼻孔)。其他实施方案可以定量和比较从不同受试者获得的样品,或者可以定量和比较从相同受试者的不同位置获得的样品,但是存在与比较在不同时间段从相同受试者获得的样品相关的特定益处,以使得能够监测靶核酸水平的进展。可以在由任何适当时间段分隔开的不同时间段获得样品。例如,样品收集可以被1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、一周、两周、三周、四周、六周、八周、十周、三个月、四个月、五个月、六个月的时间段或具有由任何两个前述值定义的端点的时间段范围分隔开。样品收集之间的时间可取决于特定的核酸靶标、预期的致病性、预期的孵育期、预期的感染期等。

[0193] 在一些实施方案中,该测定可以使用鼻拭子从三个部位-右鼻孔、左鼻孔和两个鼻孔-中的至少一者收集样品。在一些实施方案中,从相同鼻孔或从不同鼻孔收集拭子样品。在一些实施方案中,该测定可以使用如下所述的一种或多种鼻拭子收集方案:

[0194] 右鼻孔样品

[0195] a. 移除样品收集管的盖子

[0196] i. 将盖子和收集管保持在患者旁

[0197] b. 打开拭子包装

[0198] i. 从拭子包装的手柄端开始,剥开纸背衬。通过手柄将拭子从包装中拉出

[0199] ii. 不要用手接触柔软的尖端或将其置于任何表面上。

[0200] c. 将拭子尖端在右鼻孔中旋转4次

[0201] i. 将柔软的尖端插入到右鼻孔中直到看不见为止。在整个过程中,对鼻孔内侧使用中等压力,以圆周运动擦拭拭子至少4次。

[0202] ii. 拭子不应超过1/2英寸。

[0203] d. 将拭子放入收集管中

- [0204] i. 进入鼻中的拭子的柔软的尖端应当首先进入管中
- [0205] e. 将收集管的盖子压紧
- [0206] f. 将收集管放入生物危害品袋中。
- [0207] 左鼻孔样品
- [0208] a. 移除样品收集管的盖子
- [0209] i. 将盖子和收集管保持在患者旁
- [0210] b. 打开拭子包装
- [0211] i. 从拭子包装的手柄端开始, 剥开纸背衬。通过手柄将拭子从包装中拉出
- [0212] ii. 不要用手接触柔软的尖端或将其置于任何表面上。
- [0213] c. 将拭子尖端在左鼻孔中旋转4次
- [0214] i. 将柔软的尖端插入到左鼻孔中直到看不见为止。在整个过程中, 对鼻孔内侧使用中等压力, 以圆周运动擦拭拭子至少4次。
- [0215] ii. 拭子不应超过1/2英寸。
- [0216] d. 将拭子放入收集管中
- [0217] i. 进入鼻中的拭子的柔软的尖端应当首先进入管中
- [0218] e. 将收集管的盖子压紧
- [0219] f. 将收集管放入生物危害品袋中。
- [0220] 两个鼻孔样品
- [0221] a. 移除样品收集管的盖子
- [0222] i. 将盖子和收集管保持在患者旁
- [0223] b. 打开拭子包装
- [0224] i. 从拭子包装的手柄端开始, 剥开纸背衬。通过手柄将拭子从包装中拉出
- [0225] ii. 不要用手接触柔软的尖端或将其置于任何表面上。
- [0226] c. 将拭子尖端在右鼻孔中旋转4次
- [0227] i. 将柔软的尖端插入到右鼻孔中直到看不见为止。在整个过程中, 对鼻孔内侧使用中等压力, 以圆周运动擦拭拭子至少4次。
- [0228] ii. 拭子不应超过1/2英寸。
- [0229] d. 将拭子尖端在左鼻孔中旋转4次
- [0230] i. 将柔软的尖端插入到左鼻孔中直到看不见为止。在整个过程中, 对鼻孔内侧使用中等压力, 以圆周运动擦拭拭子至少4次。
- [0231] e. 将拭子放入收集管中
- [0232] i. 进入鼻中的拭子的柔软的尖端应当首先进入管中
- [0233] f. 将收集管的盖子压紧
- [0234] g. 将收集管放入生物危害品袋中。
- [0235] h. 密封生物危害品袋
- [0236] 测试样品可以从任何合适的来源收集。在一些实施方案中, 测试样品不是血液样品。在一些实施方案中, 测试样品是唾液样品。在一些实施方案中, 测试样品是拭子样品。如本文所用, 术语“拭子样品”、“基于拭子的样品”和类似术语是指包括拭子本身的样品和从拭子获得的流体和/或细胞生物质样品。该术语包括其中拭子本身直接经受随后的提取和/



或定量过程的样品,以及其中在靶核酸的提取、扩增和/或定量之前利用一个或多个中间过程步骤的样品。如本文别处所述,拭子样品可从与靶核酸相关的任何解剖位置处获得。对于呼吸道病原体,口咽或鼻咽拭子是典型的。

[0237] 方法100还包括提供一组对照样品的步骤,每个对照样品具有已知浓度的对照核酸(步骤104)。对照样品可以包括,例如,已知量的对照核酸的系列稀释液。在一些实施方案中,对照核酸大体上与靶核酸相同或包括靶核酸。例如,可通过扩增靶核酸以获得高拷贝数浓度,然后进行连续稀释以形成对照样品来制备对照核酸。在一些实施方案中,对照核酸包含靶微生物或病毒的全部或部分基因组。在一些实施方案中,该方法可生成标准曲线以报告出以IU/mL和/或拷贝数/mL计的病毒负荷值。

[0238] 方法100还包括通过使每个测试样品在靶标特异性引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的靶核酸的至少一部分的步骤(步骤106)和通过使每个对照样品在对照引物的存在下经受扩增条件来扩增对照样品中的每个对照样品中的对照核酸的至少一部分的步骤(步骤108)。这些步骤可以同时进行或以任何顺序依次进行。在一些实施方案中,经由PCR进行扩增。在一些实施方案中,靶核酸和/或对照核酸的扩增包括逆转录反应。关于扩增的额外细节在本文别处提供,并且应理解,那些细节适用于方法100。

[0239] 在一些实施方案中,对照引物和靶标特异性引物是相同的。在一些实施方案中,对照核酸能够用靶标特异性引物扩增,即使对照核酸与靶核酸不一定相同。在一些实施方案中,靶核酸是SARS-CoV-2核酸,并且靶标特异性引物对SARS-CoV-2的0rf1a基因、0rf1b基因、N基因或S基因中的一者或多者有特异性。

[0240] 图示的方法100还包括使用扩增对照核酸的结果生成标准曲线的步骤(步骤110)和使用标准曲线确定每个测试样品中的靶核酸的绝对量(AQ)的步骤(112)。可以如本领域已知的那样利用标准曲线来提供绝对量。例如,绝对量可以经由从一个或多个对照序列标准的数学外推或在两个或更多个对照序列标准之间的内插来确定,或通过参考标准曲线的存储(例如,数字拷贝)来确定。如上所述,每个单独的测试样品的“绝对量”或“AQ”受样品中有机物质的量的影响,该量随样品而变化,特别是对于基于拭子的样品。

[0241] 方法100还包括通过使每个测试样品在内源序列引物的存在下经受扩增条件来扩增测试样品中的每个测试样品中的内源核酸的步骤(步骤114)。此步骤可以在步骤106和步骤108之前、之后或期间进行。内源核酸存在于测试样品的有机物质(例如,细胞和/或细胞外物质,诸如粘液或细胞碎片)中,因此预期与样品中有机物质的量成比例的量存在。也就是说,靶标和内源对照的检测可能受到试样的生物物质的量的影响。例如,不充分的取样可能导致生物物质的收集不足,而当存在靶标时,所收集的生物质可能携带成比例量的传染因子和内源对照。

[0242] 优选的内源核酸在测试样品中稳定表达,并且受测试条件、提取过程和受试者差异的影响最小。一些实施方案利用编码蛋白质的内源核酸,诸如 $\beta$ -肌动蛋白或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。更优选的实施方案通常利用编码核糖体RNA分子而不是蛋白质的序列。例如,在一些优选实施方案中,内源核酸是RNA酶P序列。其他示例包括:18S核糖体RNA;肽基脯氨酰异构酶A(亲环蛋白A);核糖体蛋白L13a;核糖体蛋白大P0; $\beta$ -2-微球蛋白;酪氨酸3-单加氧酶/色氨酸5-单加氧酶活化蛋白, $\zeta$ 多肽;琥珀酸脱氢酶;转铁蛋白受体(p90,CD71);氨基乙酰丙酸盐, $\delta$ -合成酶1;葡糖醛酸糖苷酶, $\beta$ ;羟甲基-胆色烷合成酶;次黄嘌呤磷酸核

糖转移酶1;TATA盒结合蛋白;以及微管蛋白, $\beta$ 多肽。

[0243] 方法100还包括基于每个测试样品中的内源核酸的相对水平确定每个测试样品的校正因子("RQ")的步骤(步骤116)。在一些实施方案中,该方法包括建立与第一时间点相关的第一测试样品的基线校正因子,并相对于该基线校正因子确定后续测试样品的后续校正因子。例如,基于在第一时间点测量的靶核酸与测量的内源核酸的比率,可以将第一时间点的第一测试样品的第一校正因子设定为1(或一些其他适当的值)。可以基于在后续时间点测量的靶核酸与测量的内源核酸的不同比率,从基线调整后续的校正值。

[0244] 在一些实施方案中,每个第n个样品的校正因子(RQ)可被计算为:

$$[0245] \quad RQ(n) = \frac{2^{-(Cq(n)-Cq(0))_{\text{靶标}}}}{2^{-(Cq(n)-Cq(0))_{\text{对照}}}}$$

[0246] 其中  $(Cq(n)-Cq(0))_{\text{靶标}}$  是在第n个样品的靶核酸的测量的Cq与在初始" $T_0$ "样品的靶核酸的Cq之间的差,并且  $(Cq(n)-Cq(0))_{\text{对照}}$  是在第n个样品的内源对照核酸的测量的Cq与在初始" $T_0$ "样品的对照核酸的Cq之间的差。上述公式的数学等效形式为:

$$[0247] \quad RQ(n) = \frac{2^{-\left(Cq(\text{靶标})-Cq(\text{对照})\right)_n}}{2^{-\left(Cq(\text{靶标})-Cq(\text{对照})\right)_0}}$$

[0248] 其中  $(Cq(\text{靶标})-Cq(\text{对照}))_n$  是给定测试样品在第n时间点测量的靶核酸的Cq与对照核酸的Cq之间的差,并且  $(Cq(\text{靶标})-Cq(\text{对照}))_0$  是初始" $T_0$ "测试样品的靶核酸的测量的Cq与对照核酸的Cq之间的差。

[0249] 在以上RQ(n)的等式中,数字2被用作分子和分母两者中的基数。这对于大多数情况是足够的。在某些实施方案中,数字2可由靶核酸(分子)和/或内源对照核酸(分母)的扩增效率测量值代替。例如,每个第n个样品的校正因子(RQ)可被计算为:

$$[0250] \quad RQ(n) = \frac{\left(1 + \text{靶标效率}\right)^{-(Cq(n)-Cq(0))_{\text{靶标}}}}{\left(1 + \text{对照效率}\right)^{-(Cq(n)-Cq(0))_{\text{对照}}}}$$

[0251] 其中"靶标效率"是靶核酸的PCR效率,"对照效率"是对照核酸的PCR效率,  $(Cq(n)-Cq(0))_{\text{靶标}}$  是第n个样品的靶核酸的测量的Cq与初始" $T_0$ "样品的靶核酸的Cq之间的差,并且  $(Cq(n)-Cq(0))_{\text{对照}}$  是第n个样品的内源对照核酸的测量的Cq与初始" $T_0$ "样品的对照核酸的Cq之间的差。

[0252] 该方法还包括通过使用各自的校正因子归一化靶核酸的绝对量来确定每个测试样品中靶核酸的校正量(即,"nQuant"、"校正的Quant"或"校正的AQ")的步骤(步骤118)。在一些实施方案中,每个第n个样品的靶核酸的校正量可被计算为:

$$[0253] \quad n\text{Quant} = AQ_n * RQ_n$$

[0254] 方法100还可以包括相对于第一测试样品确定后续测试样品的校正量的步骤,以说明测试样品的靶核酸负荷随时间的相对变化。

[0255] 在一些实施方案中,该方法可使用1-基因、2-基因、3-基因或4-基因qPCR测定来检测上呼吸道样品中的SARS-CoV-2,并使用RNA酶P的额外通道来确保样品充足和归一化。在一些实施方案中,1-基因、2-基因、3-基因或4-基因选自SARS-CoV-2的0rf1a基因、0rf1b基

因、N基因或S基因。

[0256] 在优选的实施方案中,靶核酸与内源核酸的扩增效率大体上相似。否则,使用它们的定量比率作为有用的校正因子的能力便会下降。在一些实施方案中,对照样品中对照核酸(其对应于已知量的靶核酸)的扩增(以生成标准曲线)与内源核酸的扩增具有相差不超过约10%、不超过约8%、不超过约6%或不超过约4%的效率。在一些实施方案中,对照样品中对照核酸的扩增效率图与测试样品中内源核酸的扩增效率图具有相差不超过约10%、不超过约8%、不超过约6%或不超过约4%的斜率( $C_q$ /量)。效率测定通常固有地在92% - 108% (例如,约80% - 130%或约85% - 120%)之间变化。

[0257] 样品收集

[0258] 在大多数情况下,样品是拭子样品。示例包括咽喉拭子(即,口咽拭子)、鼻拭子(即,鼻咽拭子)、面颊拭子、唾液拭子或其他拭子,但是应当理解,SARS-CoV-2或其他靶标也可以通过分析其他拭子类型和其他样品类型(诸如尿液样品、唾液样品或其他临床样品)来检测。此类样品可以用收集装置诸如管、皿、袋、板或任何其他适当的容器来收集。尽管这些类型的样品可能不像拭子样品那样广泛地变化,但它们仍然具有以有机物质的量或浓度在样品之间变化的潜力,并且因此,所公开的实施方案的原理和益处也可以有益地应用于这些类型的样品。

[0259] 样品可以是兽医样品、临床样品、食物样品、法医样品、环境样品(例如,土壤、污垢、垃圾、污水、空气或水),包括食物加工和制造表面,或生物样品。在一些实施方案中,样品是人样品。在一些实施方案中,样品是非人样品。例如,样品可以来自非人物种,诸如狗、猫、貂、家畜动物(例如猪、牛、绵羊、山羊)等。

[0260] 在医疗保健环境中,样品可以由医疗保健专业人员收集,但在一些情况下,样品也可以由患者自己收集或者由协助患者自行收集的个体收集。在一些实施方案中,样本是在无菌管或专门设计的唾液收集装置中收集的原始唾液样本—无论是通过自我收集还是辅助/监督收集。唾液收集管/装置可以是具有使用说明(例如样本收集说明、样本制备或储存说明和/或运输说明)的自行收集试剂盒的部件。在容器内接收唾液样品之前或作为封闭/密封容器的结果,可以将原始唾液样品直接收集到可密封容器中,而在容器中没有任何保存溶液或其他流体或物质。

[0261] 在一些实施方案中,在对其中的靶核酸进行任何检测之前,样品的从样品中提取或纯化样品的核酸级分—无论是经由拭子、原始唾液还是其他体液获得。在利用一种或多种基于拭子的样品的一些实施方案中,相关的拭子可以在提取和/或扩增之前干燥,或者可以储存在收集介质中。收集介质可包括在储存期间和/或在供体与测试地点之间运输期间保存拭子的液体。直接测试或在提取和纯化核酸靶标后测试收集介质。

[0262] 另选地,某些实施方案可以适于直接从原始样品中检测靶核酸,而在其用于下游检测测定(例如,RT-qPCR)之前无需特定的核酸纯化和/或提取步骤。在一些实施方案中,样品在使用前预处理。这可以包括例如加热样品,诸如通过将原始样品放置在设置为一定加热温度(例如,约95°C)的加热块/水浴上持续一段预处理期(例如,约30分钟),然后将样品与缓冲液或裂解溶液合并。缓冲液或裂解溶液可以包括例如任何适合核酸的缓冲液,诸如三硼酸-EDTA(TBE),并且可以进一步包括洗涤剂 and/或乳化剂,诸如聚山梨醇酯型非离子表面活性剂,Tween-20。缓冲液或裂解溶液可包括离液剂和/或一种或多种酶,诸如蛋白酶,以

通过分解生物材料并释放分析物以使它们更可用于检测而保留核酸靶标来帮助改进分析物检测。

[0263] 预热步骤可提供许多益处,包括例如分解黏液、使样品更易于用实验室设备诸如移液管来操作。高热还可引起样品中存在的任何原核细胞和真核细胞的热破坏,并且还可以破坏样品中存在的靶生物体或病毒体,从而增加对任何靶核酸的可及性。

[0264] 热处理的样品还可以在将热处理样品平衡至室温之前和/或之后混合(例如,经由将样品涡旋持续至少10秒)。然后可以制备裂解溶液并与热处理的样品合并(例如,以1:1的比例)以生成验证性的模板溶液,用于经由核酸扩增反应(例如,PCR、RT-PCR、qPCR、RT-qPCR等)检测样品中靶核酸的存在。裂解溶液可包括与洗涤剂 and/或乳化剂诸如Tween-20、聚山梨酯型非离子表面活性剂(和/或本领域已知的合适替代物)组合的适合核酸的缓冲液,诸如TBE(和/或本领域已知的合适替代物)。洗涤剂和/或乳化剂可以促进试剂更好地混合并且还可以用于增加对样品内的任何靶核酸的可及性(例如,通过从病毒体中去除脂质包膜)。

[0265] 应当理解,在一些实施方案中,所公开的组合物可以包括与缓冲液和洗涤剂/乳化剂混合的样本。可以将样本添加到缓冲液/洗涤剂混合物中,或者反之亦然。在一些实施方案中,将样品与缓冲液合并,然后将洗涤剂添加到唾液/缓冲液混合物中。在其他实施方案中,样品直接与缓冲液/洗涤剂混合物合并。作为非限制性示例,通过将用于每个患者的一定体积的热处理的样品添加到多孔板中的一个(或多个)孔中,可以将一组患者样品制备成用于下游分析和检测病毒序列的组合物。然后将一定体积的缓冲液/洗涤剂混合物(例如TBE+Tween-20)添加到含有患者样品的每个孔中。另选地,多孔板可以装载有一定体积的缓冲液/洗涤剂混合物,其中加入一定体积的热处理的唾液。一旦结合,这种验证性的模板溶液可以立即使用或储存供以后分析。这类验证性的模板溶液也可以在储存之前或之后与PCR试剂(例如,缓冲液、dNTP、主混合物等)组合。

#### [0266] 核酸扩增与检测

[0267] 使用本文所述的一个或多个实施方案产生的扩增产物("扩增子")可使用任何合适的方法和在任何合适的平台上产生、检测和/或分析。在一些实施方案中,核酸靶标可以是单链、双链或任何大小或构象的任何其他核酸分子。本文所述的核酸测定可包括聚合酶链式反应(PCR)测定(参见,例如美国专利号4,683,202)、环介导的等温扩增("LAMP") (参见,例如美国专利号6,410,278)和本文所述的用于检测样品中的核酸靶标的其他方法。在一些实施方案中,PCR测定可以是实时PCR或定量(qPCR)测定。在一些实施方案中,PCR测定可以是终点PCR测定。

[0268] 在一些实施方案中,本文所述的引物以约100nM至1nM(例如,300nM、400nM、500nM等)的浓度(包括由选自任何两个前述值的端点定义的中间浓度量和范围)用于核酸测定中。在一些实施方案中,本文所述的探针也用于核酸测定中并且以约50nM至500nM(例如,75nM、125nM、250nM等)的浓度(包括由选自任何两个前述值的端点定义的中间浓度量和范围)提供。

[0269] 本文所述的引物和/或探针还可包含荧光或其他可检测标记。在一些实施方案中,引物和/或探针还可包含淬灭剂,并且在其他实施方案中,探针还可包含小沟结合剂(MGB)部分。合适的荧光标记包括但不限于6FAM、ABY、VIC、JUN、FAM。合适的淬灭剂包括但不限于

QSY (例如QSY7和QSY21)、BHQ (黑洞淬灭剂) 和DFQ (暗荧光淬灭剂)。

[0270] 在一些多重测定实施方案中,检测各种基因组区域。当SARS-CoV-2为靶标时,示例包括被配置来检测Orf区域(例如Orf1a、Orf1b、Orf1ab、Orf8)、N蛋白区域、S蛋白区域、其他基因组区域和/或它们的组合的测定。为了检测和/或区分SARS-CoV-2变体,这种多重测定实施方案可包括用于相同靶基因组区域的多个不同探针。例如,在S蛋白基因组区域中包括靶标的多重测定可以包括针对靶向的S蛋白基因组区域的不同变体形式的多个不同探针(各自被差异标记)。其他靶区域(包括N蛋白和/或Orf区域)也可包括对应于此类靶区域的不同变体形式的多个探针。任选地,在一些实施方案中,诸如用于噬菌体MS2或人RNA酶P对照序列的扩增和/或检测的对照序列引物和/或探针(例如,JUN标记的探针)被包括在使用合适的引物/探针序列的多重测定中(并且也可以作为单重测定被包括)。

[0271] 任选地,可以将不同的qPCR测定铺于单个阵列或多孔板的各个孔中,例如TaqMan Array Card(参见,例如Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA;目录号4346800和4342265)或MicroAmp多孔(例如96孔、384孔)反应板(参见,例如Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA;目录号4346906、4366932、4346907、4306737、4326659、4316813、N8010560、4309849、4326270、4343814和4343370)。任选地,阵列或板的不同孔中存在的不同qPCR测定可以原位干燥或冷冻干燥,并且阵列或板可以在使用前被储存或运输。在一些实施方案中,本文所述的概念可用于不一定与PCR相关的原位杂交应用中。例如,这样的应用包括组织切片中的HER2/neu基因拷贝半定量检测,或分析物的RNA表达。

[0272] 在所公开的方法中使用的引物和/或探针不需要与它们的靶标具有100%的同源性才有效,尽管在一些实施方案中,同源性大体上为100%。在一些实施方案中,本文所用的引物和/或探针与它们相应的靶标具有约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%、约99.9%或高达大体上100%的同源性。引物和/或探针的一些组合可以包括这样的引物和/或探针,每个这样的引物和/或探针与它们相应的靶具有不同的同源性,并且同源性可以在例如由任何两个前述值定义的端点的范围内。

[0273] PCR和相关方法是核酸扩增的常用方法。PCR是用于扩增核酸测试样本的核酸聚合酶反应方法的一个但不是唯一的示例,包含使用已知的核酸作为引物和核酸聚合酶以扩增或产生特定的靶核酸。通常,PCR利用由正向引物和反向引物组成的引物对,该正向引物和反向引物被配置为扩增核酸模板的靶区段。通常,但不总是,正向引物与靶序列的5'端杂交,并且反向引物将与靶序列的3'端存在的序列相同。反向引物通常会与靶序列的互补序列杂交,例如正向引物的延伸产物和/或反之亦然。PCR方法通常在多个不同的温度下进行,导致PCR反应期间的反复温度变化("热循环")。其他扩增方法,诸如例如环介导的等温扩增("LAMP"),以及其他等温方法,诸如表3中列出的那些,可能比PCR需要更少或更少广泛的热循环,或者不需要热循环。这类等温扩增方法也被考虑用于本文所述的测定组合物、试剂盒和方法中。

[0274] 表3:任选的等温扩增方法的概述

	NASBA 基于核酸序列的扩增(NASBA)是一种用于扩增 RNA 的方法。
	LAMP 环介导的等温扩增(LAMP)是一种用于扩增 DNA 的单管技术。它通常使用 4-6 个引物, 这些引物形成环状结构以促进随后几轮的扩增。
	HDA 解旋酶依赖性扩增(HDA)使用解旋酶的双链 DNA 解旋活性来分离链, 以便在恒定的温度下进行体外 DNA 扩增。
[0275]	RCA 滚环扩增(RCA)从环状 DNA 模板和短 DNA 或 RNA 引物开始以形成长的单链分子。
	MDA 多重置换扩增(MDA)是一种在多个随机引物与 DNA 模板退火并且聚合酶在恒定的温度下扩增 DNA 时启动的技术。
	WGA 当 MDA 用于从细胞的全基因组扩增 DNA 时, 其被称为全基因组扩增(WGA)。(WGA 的其他方法包括 MALBAC、LIANTI、DOP-PCR。)
	RPA 重组酶聚合酶扩增(RPA)是一种低温 DNA 和 RNA 扩增技术。

[0276] 进行PCR的方法是本领域公知的;然而,PCR和其他方法的进一步讨论可见于例如“分子克隆:格林和萨姆布鲁克的实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual by Green and Sambrook)”,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第4版2012中,该文献以引用方式整体并入本文中。

[0277] 某些实施方案靶向RNA病毒,诸如SARS-CoV-2。SARS-CoV-2具有单链正义RNA基因组。因此,在一些实施方案中,扩增反应(例如LAMP或PCR)可以与逆转录(RT)反应组合,诸如在RT-LAMP或RT-PCR中,以将RNA基因组转化为cDNA模板。然后使用cDNA模板在随后的扩增反应中创建靶序列的扩增子。在一些实施方案中,RT-PCR可以是使用如本文所述的一种或多种引物和一种或多种探针的一步程序。在一些实施方案中,RT-PCR可以在单个反应管、反应容器中进行(例如,“单管”或“1管”或“单管”反应)。在一些实施方案中,RT-PCR可以在多位点反应容器(例如多孔板或阵列)中进行。在一些实施方案中,RT和PCR在相同的反应容器或反应位点中进行,例如在1步或1管RT-qPCR中。合适的示例性RT可以包括例如莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶、SuperScript逆转录酶(Thermo Fisher Scientific)、SuperScript IV逆转录酶(Thermo Fisher Scientific)或Maxima逆转录酶(Thermo Fisher Scientific)或任何此类RT的修饰形式。

[0278] 在一些实施方案中,不同的测定产物(例如,来自不同变体的扩增子)可以被独立地检测或至少彼此区分。例如,可用光学方式区分不同的测定产物(例如,对于每个qPCR测定使用光学上不同的标记),或者可以使用一些其他合适的方法来区分,包括如美国专利公布号2019/0002963(其以引用方式整体并入本文)中所述的方法。

[0279] 在一些实施方案中,扩增步骤可以包括进行qPCR,如本文所定义的该术语。qPCR是一种灵敏且特异性的方法,用于检测和任选地定量样本中起始核酸模板(例如,冠状病毒核酸)的量。qPCR方法是本领域公知的;一种主要的方法涉及使用与引物对结合的特异性水解探针。水解探针可以包括在一端处的光学标记(例如,荧光团)和在另一端处淬灭光学标记的淬灭剂。其他变化包括位于探针内部(即,不一定在末端)的光学标记和/或淬灭剂。一些探针可以包括多于一个光学标记和/或多于一种淬灭剂。在一些实施方案中,标记位于探针的5'端,当核酸聚合酶将正向引物朝向靶序列内的探针结合位点延伸时,经由探针的5'水

解发生5'标记的切割。通过探针的切割(或解折叠)将探针标记从探针淬灭剂中分离出来,导致光学信号的增强,该信号可以被检测并任选地被定量。可以随时间监测光学信号并对其进行分析以确定样品中存在的起始核酸模板的相对或绝对量。适用于如本文所述的用途的聚合和/或扩增和检测核酸的示例性方法可作为TaqMan测定商购(参见,例如美国专利号4,889,818;5,079,352;5,210,015;5,436,134;5,487,972;5,658,751;5,210,015;5,487,972;5,538,848;5,618,711;5,677,152;5,723,591;5,773,258;5,789,224;5,801,155;5,804,375;5,876,930;5,994,056;6,030,787;6,084,102;6,127,155;6,171,785;6,214,979;6,258,569;6,814,934;6,821,727;7,141,377;和/或7,445,900,所有这些专利均据此以引用方式整体并入本文中)。

[0280] TaqMan测定通常通过使用具有5'至3'核酸酶活性的核酸聚合酶、能够与靶多核苷酸杂交的引物和能够相对于引物与该靶多核苷酸3'杂交的寡核苷酸探针对靶多核苷酸进行核酸扩增来进行。寡核苷酸探针通常包括可检测标记(例如荧光报告分子)和能够淬灭报告分子的荧光的淬灭剂分子。通常,可检测标记和淬灭剂分子是单个探针的一部分。随着扩增进行,聚合酶消化探针以从淬灭剂分子中分离可检测标记。在反应期间监测可检测标记,其中标记的检测与核酸扩增的发生相对应(例如,信号越高,扩增的量越大)。TaqMan测定的变化在本领域中是已知的并且将适用于本文中所述的方法中。

[0281] 例如,单重或多重qPCR可以包括与基因座特异性序列缔合的单一TaqMan测定或分别与多重形式的多个基因座缔合的多重TaqMan测定。作为非限制性示例,4重反应可以包括FAM(发射峰约517nm)、VIC(发射峰约551nm)、ABY(发射峰约580nm)和JUN(发射峰约617nm)染料。在一些实施方案中,每种染料与一种或多种靶序列相关。在一些实施方案中,一种或多种染料通过QSY淬灭剂(例如,QSY21)淬灭。在一些实施方案中,每个多重反应允许在单个反应容器内实时扩增和跟踪多达12个靶标。在一些实施方案中,使用本文公开的或本领域技术人员已知的可检测标记的任何组合,在单个反应容器内实时扩增和跟踪多达2、4、6、8、10或12个靶标。上述这些报告染料被优化以与最小的光谱重叠在一起工作,以便于提高性能。本文所述的染料的任何组合可另外与其他染料(例如,Mustang Purple(发射峰约654nm)或一种或多种Alexa Fluors(例如,AF647和AF676))组合,用于监测对照的荧光或用于非发射光谱重叠5重测定。此外,QSY淬灭剂与具有小沟结合剂淬灭剂的探针完全兼容。

[0282] 在利用多个检测通道的情况下,期望最小化荧光报告分子之间的串扰并且选择避免过度光谱重叠的报告分子。包括5个检测通道的测定的一个示例掺入染料FAM、ABY、VIC和JUN,以及例如Mustang Purple(发射峰约654nm)或适当的Alexa Fluor。染料可以与对应的引物和/或与测定的探针结合,如本文所述。其他实施方案可根据特定偏好或应用需要利用染料的其他组合来限定不同组的检测通道(包括在具有多于5个检测通道的测定中)。

[0283] 检测器探针可以与替代的淬灭剂缔合,包括但不限于暗荧光淬灭剂(DFQ)、黑洞淬灭剂(BHQ)、Iowa Black、QSY淬灭剂和Dabsyl和Dabcyl磺酸盐/羧酸盐淬灭剂。检测器探针也可以包括两个探针,其中,例如,荧光团与一个探针缔合,并且淬灭剂与互补探针缔合,使得两个探针在靶上的杂交淬灭荧光信号,或者靶上的杂交通过荧光的变化改变信号特征。检测器探针还可以包括用SO<sub>3</sub>代替羧酸根基团的荧光素染料的磺酸盐衍生物、荧光素的亚磷酰胺形式、Cy5的亚磷酰胺形式。

[0284] 应当理解,当使用多于一种可检测标记时,特别是以多重形式使用时,每种可检测

标记优选在其光谱特性上不同于与其一起使用的其他可检测标记,使得这些标记可以彼此区分,或者使得这些可检测标记一起发出由单独的任一可检测标记所不能发出的信号。示例性的可检测标记包括例如荧光染料或荧光团(例如,可以通过光激发以发射荧光或磷光的化学基团)、能够淬灭来自荧光供体染料的荧光信号的“受体染料”等,如上所述。合适的可检测标记可包括,例如,荧光素(例如,5-羧基-2,7-二氯荧光素;5-羧基荧光素(5-FAM);5-羟基色胺(5-HAT);6-JOE;6-羧基荧光素(6-FAM);Mustang Purple、VIC、ABY、JUN;FITC;6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基-荧光素(JOE));6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯-荧光素(TET);6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四-氯荧光素(HEX);Alexa Fluor荧光团(例如,350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750);BODIPY荧光团(例如,492/515、493/503、500/510、505/515、530/550、542/563、558/568、564/570、576/589、581/591、630/650-X、650/665-X、665/676、FL、FLATP、FI-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X缀合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE)、级联蓝、级联黄;Cy<sup>TM</sup>染料(例如3、3.18、3.5、5、5.18、5.5、7)、青色GFP、环AMP氟传感器(FiCRhR)、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(例如GFP、EGFP)、蓝色荧光蛋白(例如,BFP、EBFP、EBFP2、蓝铜矿、mKalama1)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、浅蓝、CyPet)、黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus、YPet)、FRET供体/受体对(例如,荧光素/荧光素、荧光素/四甲基罗丹明、IAEDANS/荧光素、EDANS/dabcyl、BODIPY FL/BODIPY FL、荧光素/QSY 7和QSY9)、LysoTracker和LysoSensor(例如,LysoTracker Blue DND-22、LysoTracker Blue-White DPX、LysoTracker Yellow HCK-123、LysoTracker Green DND-26、LysoTracker Red DND-99、LysoSensor Blue DND-167、LysoSensor Green DND-189、LysoSensor Green DND-153、LysoSensor Yellow/Blue DND-160、LysoSensor Yellow/Blue 10,000MW葡聚糖)、Oregon绿(例如,488、488-X、500、514);罗丹明(例如,110、123、B、B 200、BB、BG、B extra、5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基罗丹明6G、丽丝胺、丽丝胺罗丹明B、Phallicidine、Phalloidine、Red、Rhod-2、ROX(6-羧基-X-罗丹明)、5-ROX(羧基-X-罗丹明)、磺酰罗丹明B can C、磺酰罗丹明G Extra、TAMRA(6-羧基四甲基罗丹明)、四甲基罗丹明(TRITC)、WT)、Texas Red、Texas Red-X,以及本领域技术人员已知的其他物质。在某些实施方案中,ROX染料的使用通过减少PCR检测板中与主混合物体积(和/或对不精确性的其他贡献者)的孔与孔的差异来提高定量的精确性。

[0285] 除了标记探针之外或作为标记探针的替代物,可以使用其他可检测标记。例如,引物可以被标记并用于产生扩增子和检测反应中产生的扩增子的存在(或浓度),并且这类引物可以被用作本文描述的标记的探针的补充或替代物。作为另外的示例,引物可以如Nazarenko等人.《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》2002年5月1日;30(9):e37, Hayashi等人.《核酸研究》1989年5月11日;17(9):3605和/或Neilan等人.《核酸研究》第25卷,第14期,1997年7月1日,第2938-39页)中所述来标记和利用。本领域技术人员还将理解并能够利用Zhu等人.《生物技术(Biotechniques.)》,2020年7月:10.2144/btn-2020-0057)描述的PCR过程(以及相关的探针和引物设计技术)。

[0286] 可以使用这些系统和可检测标记以及许多其他系统和可检测标记中的任一者来检测扩增的靶核酸。在一些实施方案中,使用插入标记,诸如溴化乙锭、SYBR绿色I、SYBR绿色ER和PicoGreen(生命技术公司(Life Technologies Corp.),加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad,CA)),由此允许在不存在检测器探针的情况下实时可视化或在扩增产物的终点



可视化。在一些实施方案中,实时可视化可以包括插入检测器探针和基于序列的检测器探针。在一些实施方案中,检测器探针在扩增反应中未杂交到互补序列时被至少部分地淬灭,并且在扩增反应中杂交到互补序列时被至少部分地未淬灭。在一些实施方案中,探针可以进一步包含各种修改,例如小沟结合剂,以进一步提供期望的热力学特征。

[0287] 标记的扩增子(或其标记的衍生物)可使用任何合适的方法诸如电泳、基于杂交的检测(例如微阵列、分子信标等)、色谱、NMR等来检测。在一个示例性实施方案中,使用毛细管电泳检测标记的扩增子。在另一个实施方案中,使用qPCR检测标记的扩增子。

[0288] 在一些实施方案中,如本文所述的核酸扩增测定使用实时PCR(qPCR)仪器进行,包括例如QuantStudio实时PCR系统,诸如QuantStudio 5实时PCR系统(QS5)、QuantStudio 7实时PCR系统(QS7)和/或QuantStudio 12K Flex系统(QS12K)或7500实时PCR系统,诸如来自Fisher Scientific的7500 Fast Dx系统。

[0289] 一些实施方案涉及含有本文公开的引物和探针的试剂盒。任选地,该试剂盒还可包括主混合物。在一些实施方案中,主混合物是TaqMan快速病毒1步主混合物(Thermo Fisher Scientific,目录号44444432、44444434、44444436)。在一些实施方案中,主混合物是TaqPath 1步RT-qPCR主混合物,CG(Thermo Fisher Scientific,目录号A15299、A15300)。在其他实施方案中,主混合物是TaqPath™1步多重主混合物(无ROX™)(Thermo Fisher Scientific,目录号A48111、A28521、A28522、A28523)。在一些实施方案中,该试剂盒包括足以构成支持从SARS-CoV-2扩增一个或多个靶区域的反应混合物的引物、探针和主混合物。

#### [0290] 实施例

[0291] 以下实施例可涉及特定的靶核酸、组合物、制剂和/或方法步骤。然而,应理解,这些实施例可通过使用本文别处所述的任何替代组分进行修改。

#### [0292] 实施例1:SARS-CoV-2和RNA酶P扩增效率的共线性

[0293] 利用TaqCheck™SARS-CoV-2快速PCR测定试剂盒生成N/S基因和RNA酶P的标准曲线图。样品(2个复制品)由加标样品生成,并且包含每个反应 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^1$ 拷贝的N/S基因IVT RNA和每个反应 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^1$ 拷贝的RNA酶P IVT RNA。

[0294] 结果示于图3中。如图所示,N/S基因与RNA酶P靶标具有相似的PCR效率。PCR效率的相似性有利地允许靶核酸(例如,N/S基因)与内源核酸(例如,RNA酶P)的定量比率有效地用于靶标滴度校正。如图所示,N/S基因与RNA酶P的效率仅相差约3%-4%。类似地,N/S基因与RNA酶P的斜率(Cq/量)仅相差约3%-4%。

#### [0295] 实施例2:NP样品基质的制备

[0296] 收集、合并鼻咽("NP")样品,并用作样品基质,将已知浓度的病毒体拷贝掺入该样品基质中以生成样品。NP样品购自多个不同供应商。样品体积范围为1ml-3ml。当从供应商处获得样品的预合并收集物时,任何池的总体积不超过20ml。

[0297] 测试每个样品(3个复制品)以确认样品对于靶标SARS-CoV-2、Flu A、Flu B、RSV A和RSV B呈阴性。将对所有靶标测试呈阴性的样品合并以制备一系列200ml池。合并后,对200ml池的每个池的20个复制品再测试,以确认样品对于所有靶标都呈阴性。TaqPath™ COVID-19,FluA/B\_RSV Combo试剂盒使用说明(Thermo Fisher Scientific,MAN0019583)自动400μL样品输入体积工作流程用于提取RNA。向每个孔中添加MS2作为阳性对照,并且每个RT-PCR板包括5个阴性对照。使用Applied Biosystems™7500快速实时PCR仪,应用表4的

扩增条件(1.4°C/秒缓变率)。

[0298] 表4:热方案

	温度	时间	
[0299]	25°C	保持 2 分钟	
	53°C	保持 10 分钟	
	85°C	保持 2 分钟	
[0300]	95°C	3 秒	46 个循环
	60°C	30 秒	

[0301] 对结果进行分析以确认所有靶标的阴性结果。具有明显的MS2阳性对照扩增且没有任何靶标信号的样品孔被指定为阴性。显示明显的MS2扩增和明显或不确定的多种靶标扩增的样品孔被认为是阳性结果。仅将对所有靶标确认为阴性的样品用作样品基质。还需要样品产生小于28的MS2 Ct值。然后标记经验证的样品并储存在-80°C下。

[0302] 实施例3:使用实施例测定的SARS-CoV-2系列稀释液的qPCR扩增

[0303] 将实施例2中形成的NP样品基质用于形成SARS-CoV-2的系列稀释液。使用TaqCheck™SARS-CoV-2快速PCR测定试剂盒进行扩增。使用类似于实施例2中使用的方案进行扩增,但热方案保持在85°C持续10分钟。N/S基因靶标和RNA酶P对照的结果分别示于图4A和4B中。结果说明从 $1.02 \times 10^8$ 至 $1.33 \times 10^1$ 个拷贝/mL的有效扩增(每个稀释液有6个复制品)。在稀释系列的至少7个数量级上检测是有效的。RNA酶P是恒定的。检测限(LoD)为约 $1 \times 10^2$ 个拷贝/mL(100%检测率在此水平或高于此水平)。定量范围为约 $2 \times 10^2$ 至 $4 \times 10^7$ 个拷贝/mL(上限为测试的最高水平)。

[0304] 使用TaqMan™SARS-CoV-2和RNA酶P测定2.0进行类似的测试。扩增结果示于图5A至图5D中。结果表明,在较高拷贝数时,ABY染料通道(对应于Orf1b)与JUN染料通道(对应于RNA酶P)之间存在串扰。图5E和图5F的变异图进一步说明了这点。具有这种串扰的测定较不优选,因为串扰影响旨在用于归一化所测量的靶核酸的比率。

[0305] 实施例4:所测量的SARS-CoV-2量的归一化

[0306] 在四个时间点(T0、T1、T2和T3)从受试者采集拭子样品。处理测试样品并进行扩增。每个测试样品中SARS-CoV-2的绝对量(AQ)通过与使用具有已知水平的SARS-CoV-2的对照样品的系列稀释液生成的标准曲线比较来确定。还测定了每个测试样品中的RNA酶P水平。为每个测试样品测定代表SARS-CoV-2与RNA酶P之比率的RQ值。T0测试样品的RQ设定为1,并且后续测试样品基于它们各自的RQ值的差异从T0基线进行调整。结果示出于表5中。

[0307] 表5:基于RNA酶P归一化校正的靶标定量

	平均 COVID C <sub>q</sub>	平均 RNA 酶 P C <sub>q</sub>	$\delta$ C <sub>q</sub>	RQ	COVID AQ(拷贝 /mL)	校正的 COVID 定量 (拷贝/mL)	Log(定量) 差异	与参考 的 Log 差异	
[0308]	T <sub>0</sub>	25.12	27.87	-2.74	1.00	1.33E+05	1.33E+5	0.00	0.00
	T <sub>1</sub>	25.68	28.07	-2.38	0.78	8.82E+04	1.04E+5	0.07	-0.11
	T <sub>2</sub>	25.04	28.38	-3.35	1.52	1.63E+05	2.02E+5	0.09	0.18
	T <sub>3</sub>	29.96	29.15	0.82	0.09	4.63E+03	1.15E+4	0.40	-1.06

[0309] 在表5中,RQ表示所测量的SARS-CoV-2与所测量的RNA酶P的比率。图6示出了用于从PCR产生的C<sub>q</sub>值获得"COVID AQ"值的标准曲线。图7示出了从初始T<sub>0</sub>时间段开始的Log(定量)随时间的变化。如图所示,随着时间的推移,本文所述的方法能够更好地定量,从而更好地监测病毒负荷随时间的变化(或其他靶核酸的变化)。

[0310] 在此特定实施例中,对于给定时间点(n),RQ(n)被计算为:

$$[0311] \quad RQ(n) = \frac{(1 + \text{靶标效率})^{-(Cq(n) - Cq(0))_{\text{靶标}}}}{(1 + \text{对照效率})^{-(Cq(n) - Cq(0))_{\text{对照}}}}$$

[0312] 其中"靶标效率"是靶核酸的PCR效率,"对照效率"是对照核酸的PCR效率,(C<sub>q</sub>(n)-C<sub>q</sub>(0))<sub>靶标</sub>是第n个样品的靶核酸的测量的C<sub>q</sub>与初始"T<sub>0</sub>"样品的靶核酸的C<sub>q</sub>之间的差,并且(C<sub>q</sub>(n)-C<sub>q</sub>(0))<sub>对照</sub>是第n个样品的内源对照核酸的测量的C<sub>q</sub>与初始"T<sub>0</sub>"样品的对照核酸的C<sub>q</sub>之间的差。

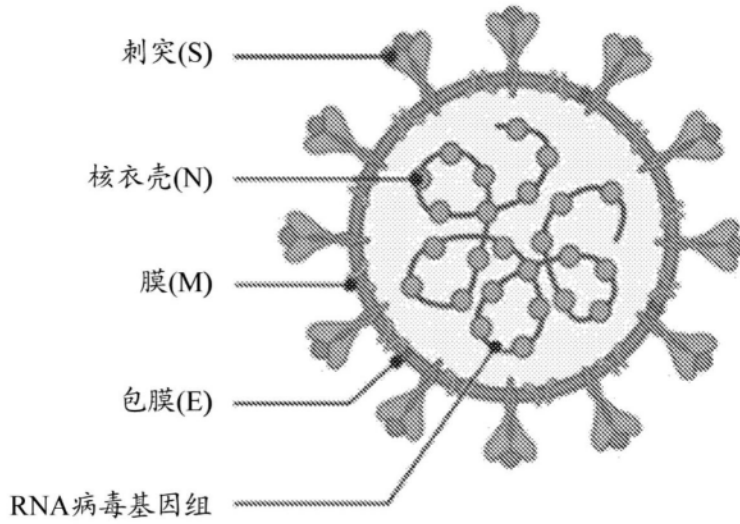


图1A

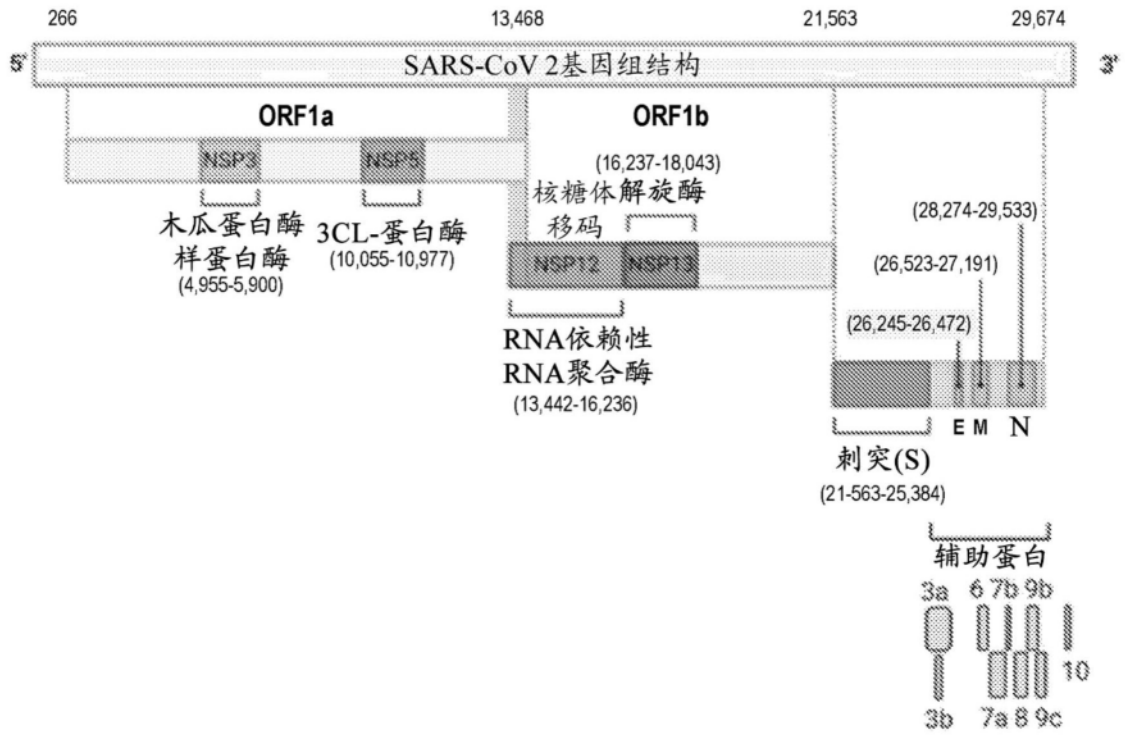


图1B

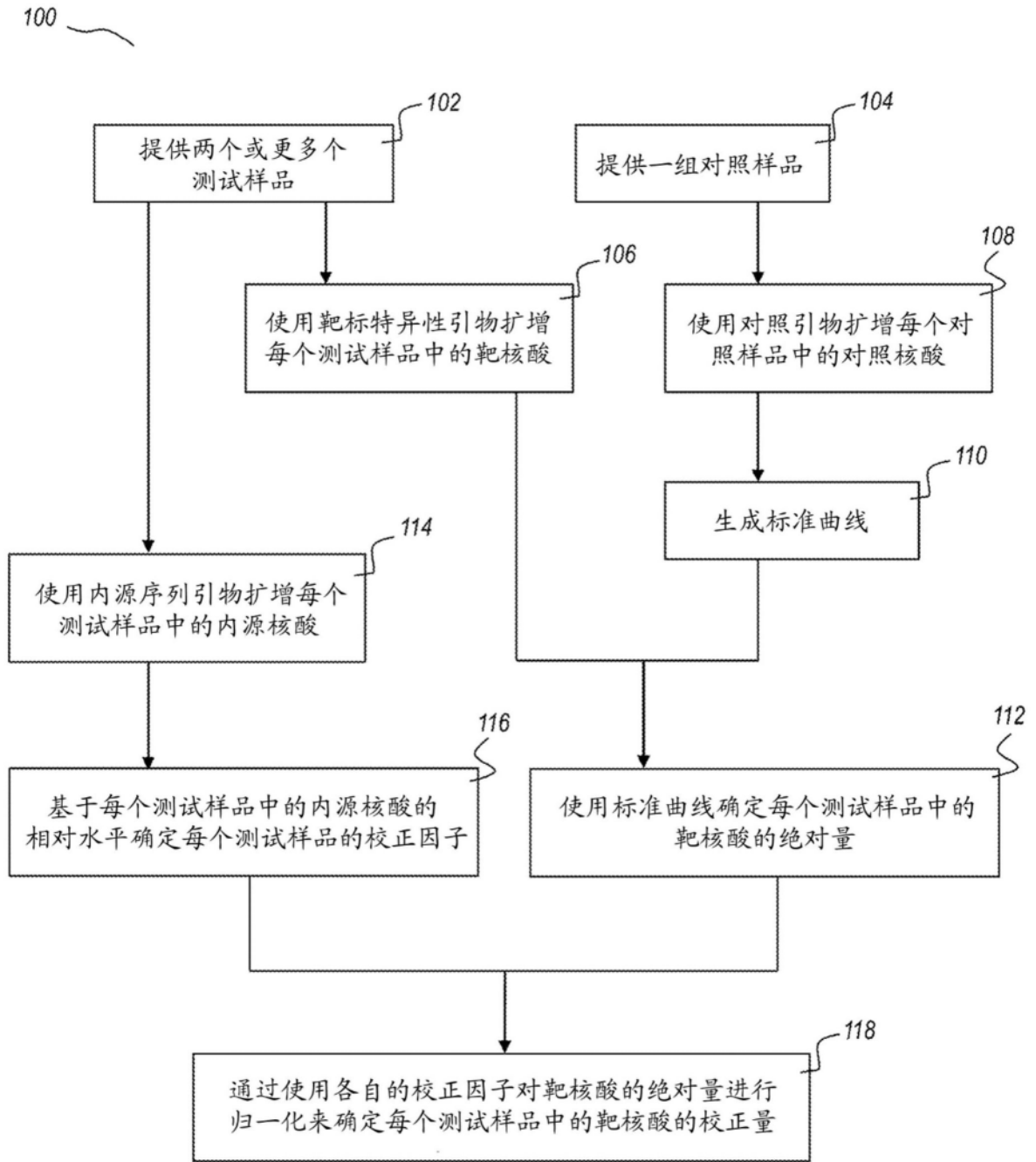


图2

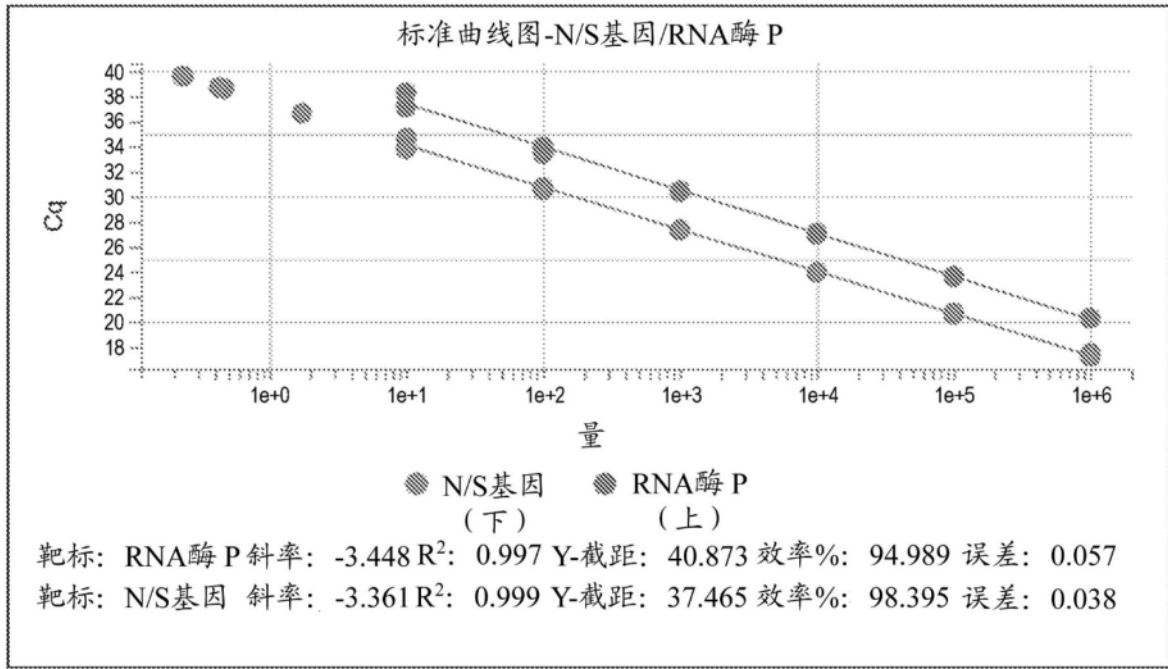


图3

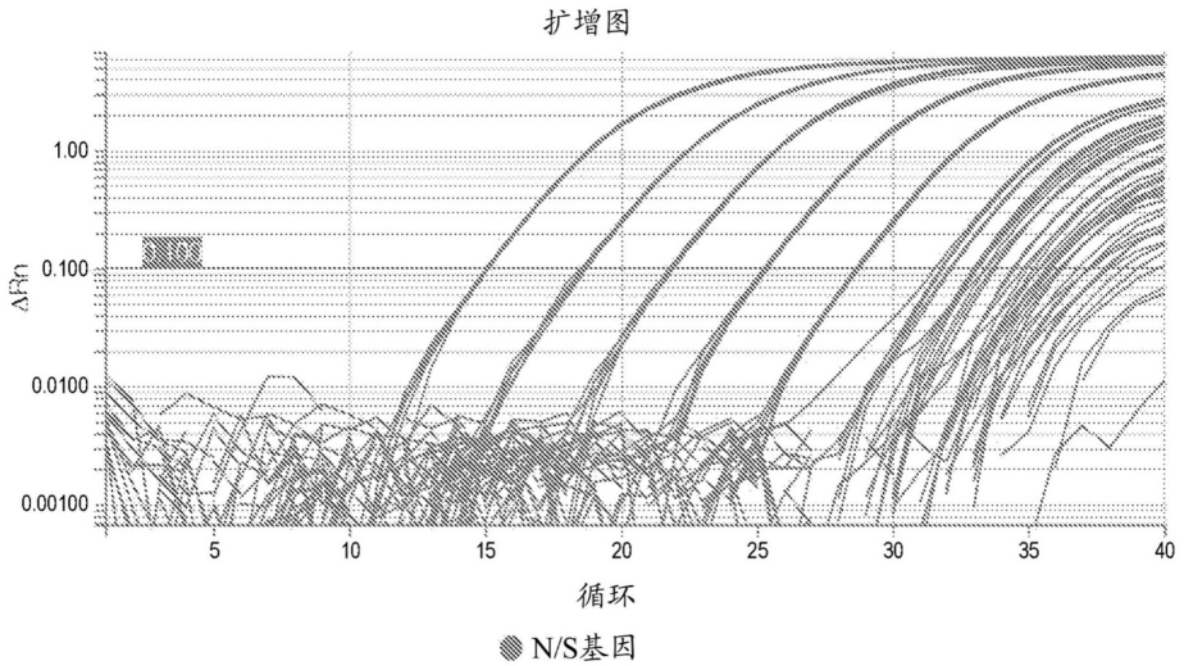


图4A

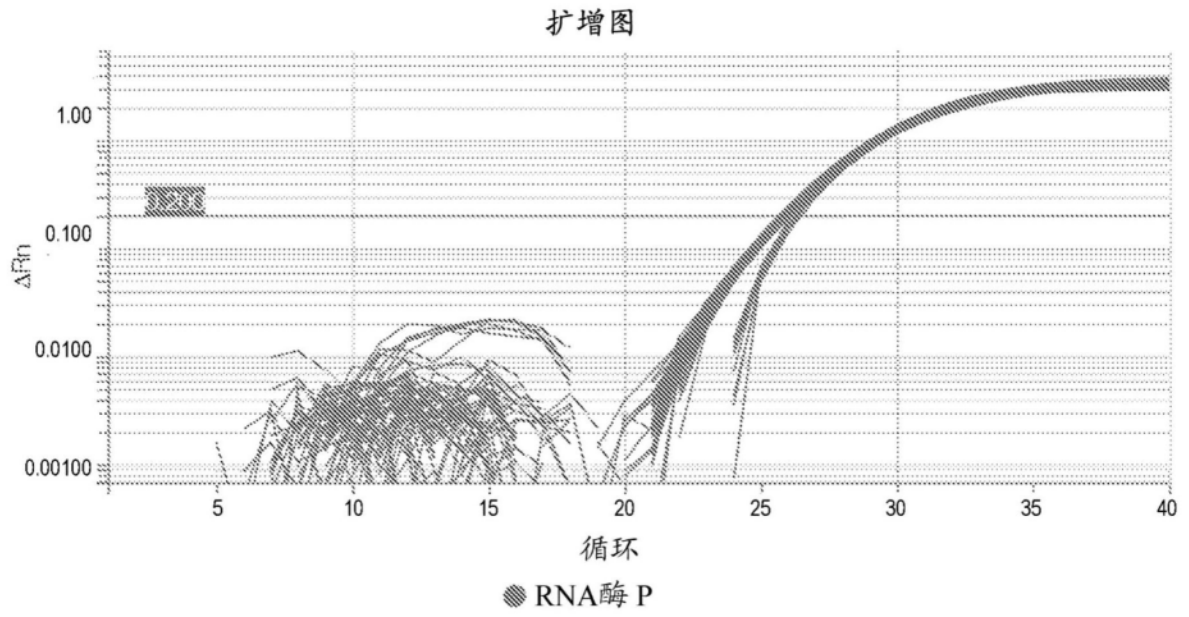


图4B

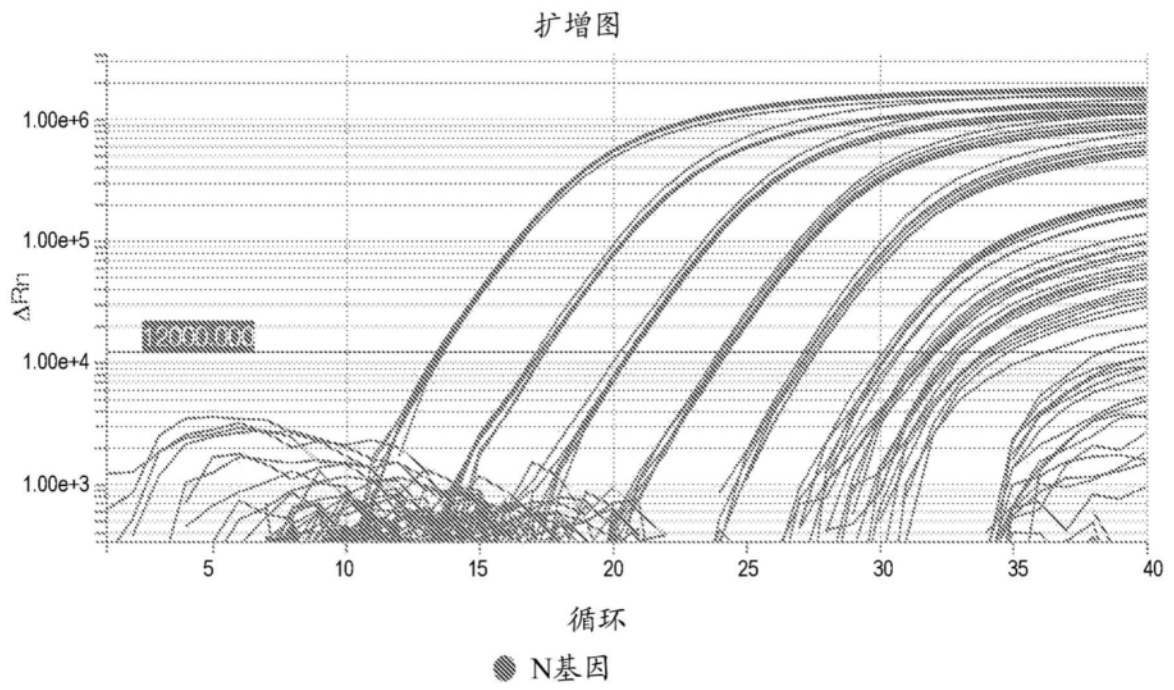


图5A

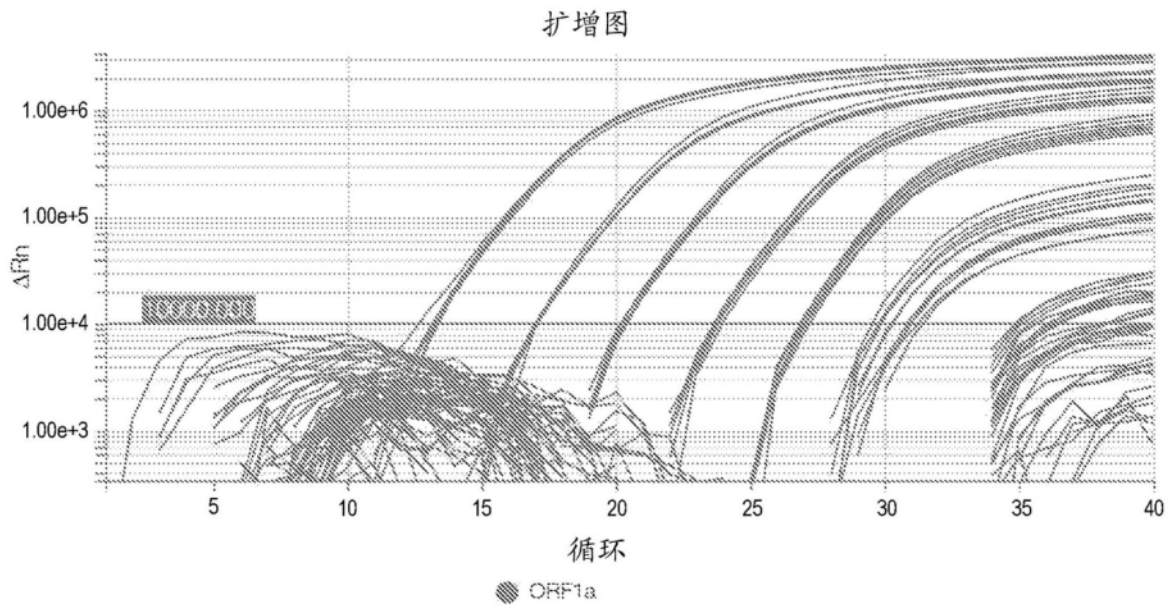


图5B

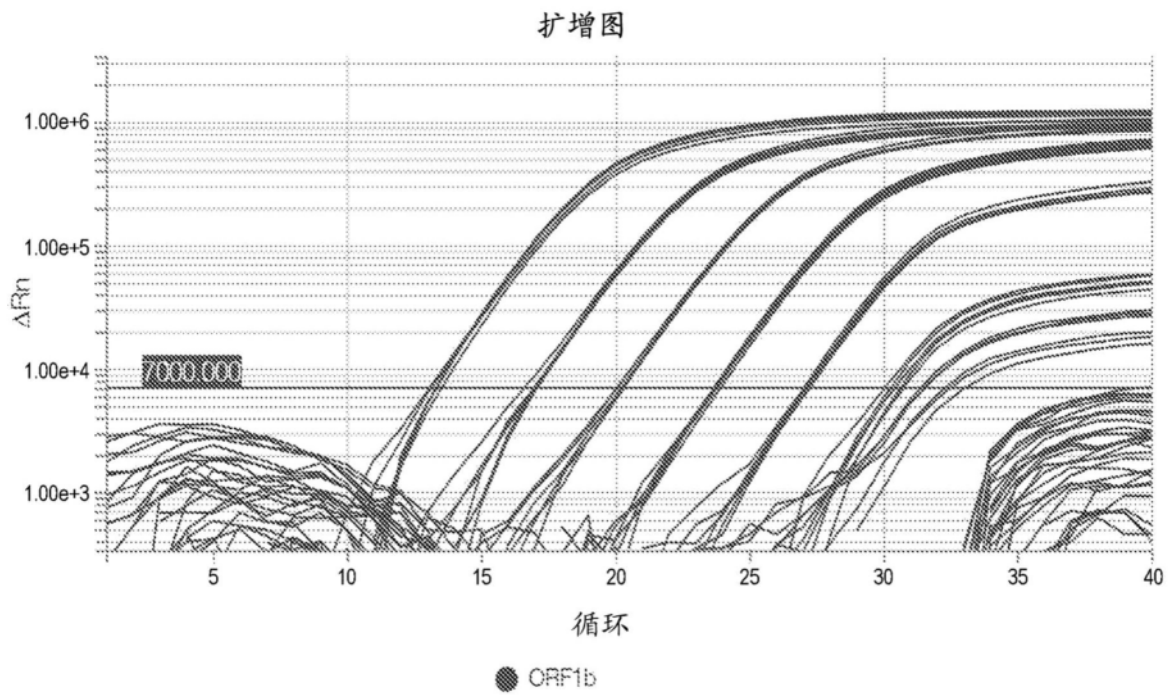


图5C



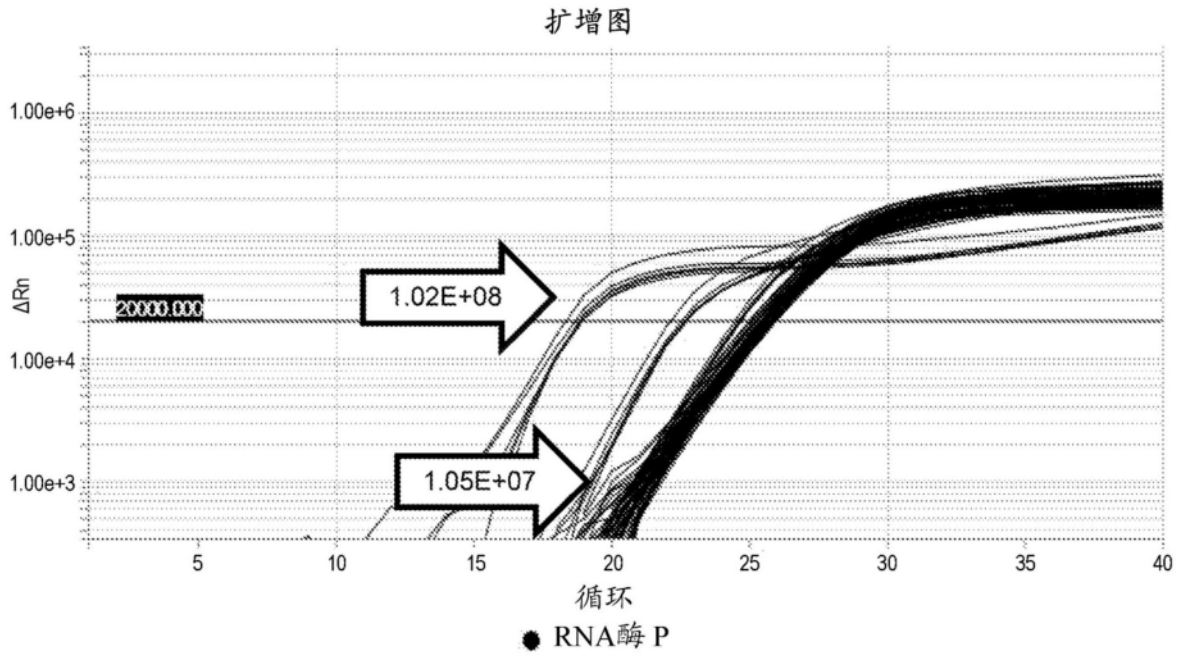


图5D

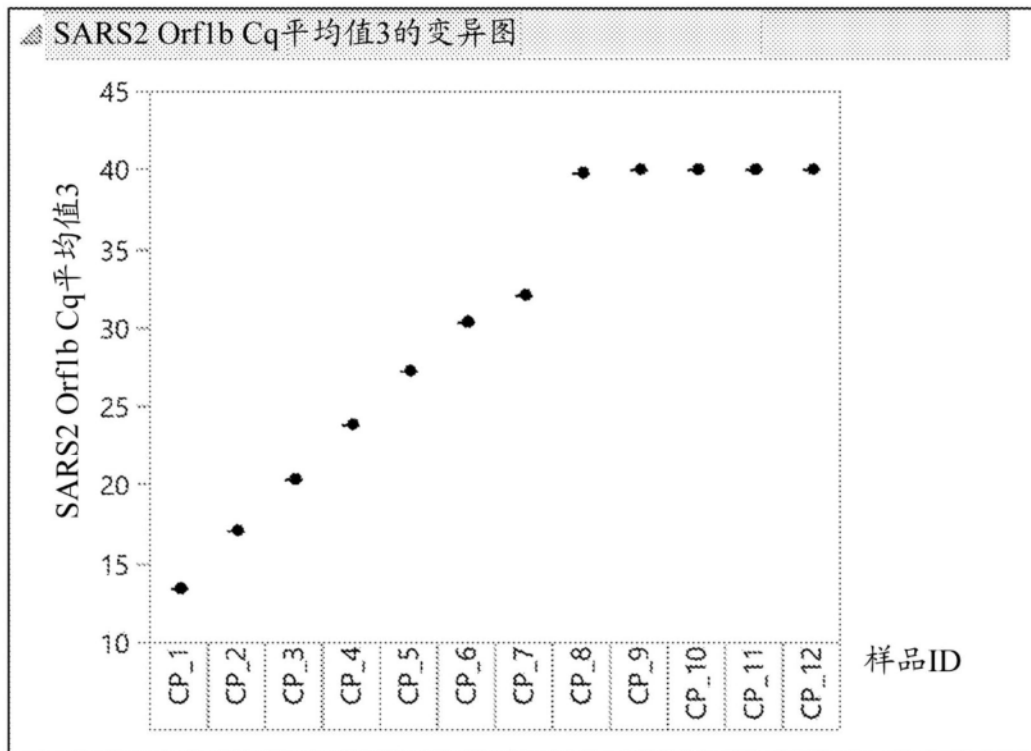


图5E

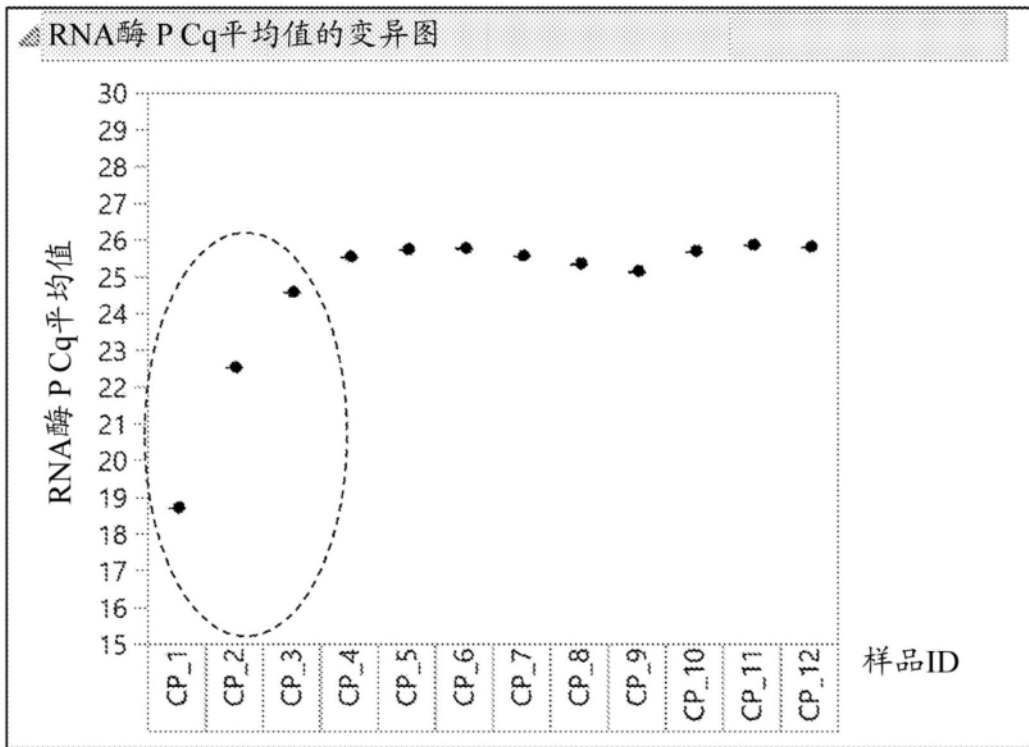
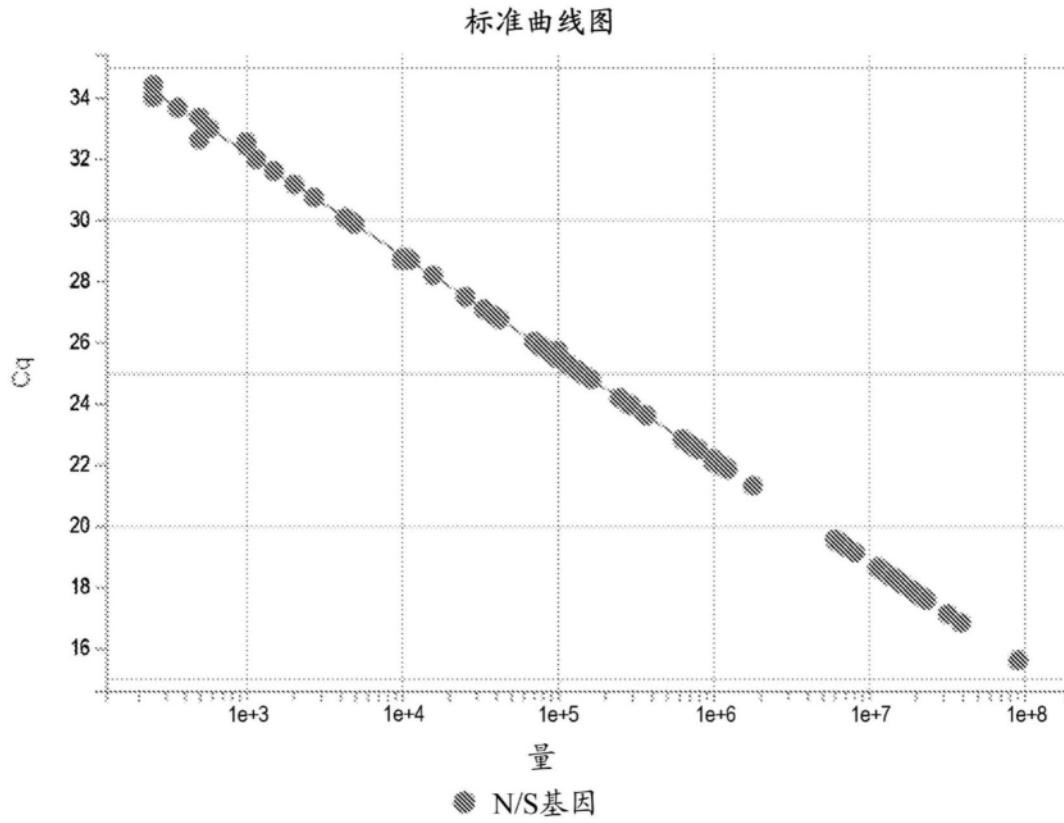


图5F



靶标: N/S-基因 斜率: -3.343 R<sup>2</sup>: 0.997 Y-截距: 42.214 效率%: 99.138 误差: 0.058

图6

从T0的Log定量变化

—— 样品8B

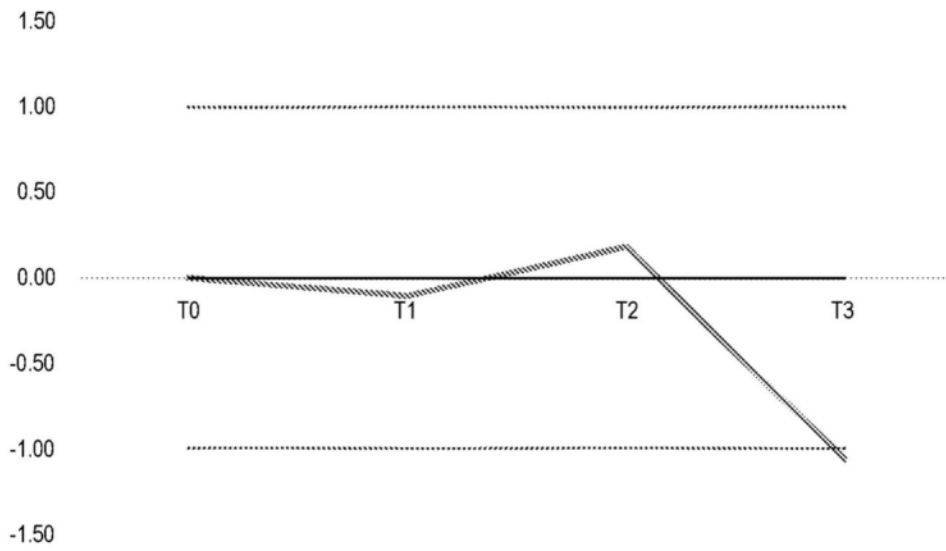


图7