



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114502747 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(21) 申请号 202080053433.7

赫迪亚·曼玛尔

(22) 申请日 2020.07.24

达纳·凯利·瓦纳塔

(30) 优先权数据

62/878,639 2019.07.25 US

16/523,609 2019.07.26 US

16/719,744 2019.12.18 US

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.24

(51) Int.Cl.

G12Q 1/689 (2018.01)

G12Q 1/6844 (2018.01)

G12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/36 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/043620 2020.07.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/016602 EN 2021.01.28

(71) 申请人 达丽斯生物医学公司

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书2页 说明书16页

序列表16页

(72) 发明人 安德里亚·C·迪登

(54) 发明名称

用于淋病奈瑟氏菌的扩增和检测的多核苷酸

(57) 摘要

本文公开了与通过核酸扩增测试 (NAAT) 检测淋病奈瑟氏菌相关的引物和探针, 例如以扩增测试样品中存在的淋病奈瑟氏菌核酸以及确定测试样品中存在的淋病奈瑟氏菌核酸的存在。具体而言, 本公开描述了用于通过环介导等温扩增 (LAMP) 和分子信标杂交进行检测的与淋病奈瑟氏菌的细胞色素C或ccpA基因结合的引物和探针。

1. 一种组合物,其包含选自由组-1至组-15组成的组的序列特异性引物组。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述序列特异性引物组选自由以下组成的组:组-5、组-11、组-13、组-14和组-15。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述序列特异性引物组是组-15。
4. 如权利要求1所述的组合物,其还包含探针。
5. 如权利要求4所述的组合物,其中所述探针包含标记物。
6. 如权利要求5所述的组合物,其中所述探针是标记的多核苷酸。
7. 如权利要求6所述的组合物,其中所述标记的多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:73的核苷酸6-22、SEQ ID NO:74的核苷酸5-24、SEQ ID NO:75的核苷酸3-21和SEQ ID NO:76的核苷酸3-24。
8. 如权利要求6所述的组合物,其中所述标记的多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:76。
9. 如权利要求6所述的组合物,其中所述标记物是荧光团。
10. 如权利要求9所述的组合物,其中所述荧光团共价附接至所述多核苷酸的末端。
11. 如权利要求4所述的组合物,其中所述探针是包含荧光团、淬灭剂和多核苷酸的分子信标。
12. 如权利要求11所述的组合物,其中所述分子信标包含选自由SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:76组成的组的序列。
13. 如权利要求12所述的组合物,其中所述多核苷酸序列由SEQ ID NO:75。
14. 一种检测测试样品中的淋病奈瑟氏菌的方法,所述方法包括:
从所述测试样品中提取核酸;
通过使步骤(a)中提取的所述核酸与包含链置换DNA聚合酶和序列特异性引物组的反应混合物反应来扩增靶序列,其中所述序列特异性引物组选自由组-1至组-15组成的组;以及
检测步骤(b)的扩增产物的存在或不存在,其中所述扩增产物的存在指示所述测试样品中淋病奈瑟氏菌的存在。
15. 如权利要求14所述的方法,其中进行所述扩增步骤少于15分钟。
16. 如权利要求14所述的方法,其中进行所述扩增步骤少于10分钟。
17. 如权利要求14所述的方法,其中所述反应混合物还包含逆转录酶。
18. 如权利要求14所述的方法,其中检测所述扩增产物的存在或不存在包括使所述扩增产物与探针杂交,所述探针包含附接至标记物的多核苷酸。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述标记的多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:73的核苷酸6-22、SEQ ID NO:74的核苷酸5-24、SEQ ID NO:75的核苷酸3-21和SEQ ID NO:76的核苷酸3-24。
20. 如权利要求19所述的方法,其中所述标记的多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:76。
21. 如权利要求14所述的方法,其中所述序列特异性引物组选自由以下组成的组:组-5、组-11、组-13、组-14和组-15。
22. 如权利要求21所述的方法,其中所述序列特异性引物组是组-15。

23. 如权利要求14所述的方法,其中所述淋病奈瑟氏菌以 ≤ 100 CFU/mL的浓度存在于所述测试样品中。

24. 如权利要求23所述的方法,其中淋病奈瑟氏菌以 ≤ 10 CFU/mL的浓度存在于测试样品中。

25. 如权利要求24所述的方法,其中淋病奈瑟氏菌以 ≤ 10 CFU/mL的浓度存在于所述测试样品中,并且进行所述扩增反应少于15分钟。

26. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1的组合物。

27. 如权利要求26所述的试剂盒,其还包含链置换聚合酶。

28. 如权利要求27所述的试剂盒,其还包含逆转录酶。

用于淋病奈瑟氏菌的扩增和检测的多核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2019年12月18日提交的美国专利申请第16/719,744号的部分接续申请,所述美国专利申请第16/719,744号是2019年7月26日提交的美国专利申请第16/523,609号的接续申请,所述美国专利申请第16/523,609号要求2019年7月25日提交的美国临时申请第62/878,639的权益,所述申请的内容各自通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子地提交并且据此通过引用整体并入的序列表。所述ASCII副本创建于2020年7月23日,命名为TSM-052WO_SL.txt,大小为17,533字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及分子生物学和核酸化学领域。本发明提供了用于检测病原体诸如淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)的方法和试剂,因此,还涉及医学诊断和预后领域。特别地,本发明涉及用于扩增和检测淋病奈瑟氏菌的多核苷酸和方法。

技术背景

[0006] 淋病的病原体淋病奈瑟氏菌感染泌尿生殖道,其中淋病的临床体征经常与其它性传播疾病(STD)的体征重叠。感染通常在女性中无症状,如果不治疗,则会导致更严重和永久性的健康相关并发症,诸如盆腔炎性疾病(PID)、慢性盆腔疼痛、输卵管不孕和危及生命的异位妊娠。在男性中,大多数尿道感染会导致尿道炎,偶尔会导致附睾炎,如果不治疗,则会导致不育。虽然不常见,但男性中无症状感染率也很高。在新生儿中,结膜炎会导致失明。在所有三组中,未经治疗的淋病奈瑟氏菌可传播导致急性皮炎、腱鞘炎综合征和与关节炎、脑膜炎或心内膜炎相关的败血症。

[0007] 淋病奈瑟氏菌的全球影响估计为每年1.06亿新病例。在世界范围内,淋病奈瑟氏菌是第二大流行性细菌性STD,也是美国第二大常见的法定报告传染病。WHO估计,淋病奈瑟氏菌感染的发病率自1995年以来一直在稳步上升,其中从2005年至2008年增加了11.7%。将淋病奈瑟氏菌归类为与其抗生素耐药性特征谱相关的直接公共健康威胁,使临床和发病率增加的担忧变得复杂,其中估计30%的菌株对一种或多种治疗抗生素具有耐药性。

[0008] 预防和减少传染病的主要公共卫生战略之一是通过筛查、及时识别和有效治疗来减少人与人之间的传播。这一策略的当务之急是进行特异且灵敏的诊断。

[0009] 如通过灵敏度、特异度和样本运输便利性所测量的核酸扩增测试(NAAT)的性能超过了目前可用于诊断淋球菌感染的任何其它测试诊断的性能。美国疾病控制中心(CDC)特别建议临床和疾病控制实验室使用NAAT来检测淋病,除少数例外。沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和淋病奈瑟氏菌的基于实验室的检测的建议—2014.MMWR 2014;63(RR-2号)。与灵敏度和特异度相关,这些测定使用侵入性较小的样本收集,这更有利于传染病筛查。NAAT的最佳推荐样本类型包括来自男性的先接尿(first catch urine)和来自女性的阴道拭子。

[0010] FDA批准的NAAT包括Abbott RealTimeCT/NG (Abbott m2000系统平台)、Aptima COMBO或个体CT或GC测定 (Hologic Panther系统平台)、BD ProbeTec测定 (ET CT/GC扩增DNA测定和Q^x CT或GC扩增DNA测定和BD Viper系统平台)、Cepheid Xpert CT/NG测定 (GeneXpert IV护理点设备)和Roche Diagnostics CT/NG测试 (cobas 4800系统平台)。Abbott、Aptima、BD和Roche测定都包括样品制备、靶扩增和检测的自动化。虽然这得益于样品制备和有限的实际操作时间,但每个系统平台都会转化为大量的资本设备投资,并且需要至少3个小时才能得出诊断结果。Cepheid测定及其配套装置是唯一的护理点仪器,具有降低的成本和空间指纹,但仍需要约90分钟才能产生诊断结果。

[0011] 因此,需要的是与护理点装置兼容的新测定法,所述测定法提供了高灵敏度、显著缩短的应答时间、降低的设备成本以及样品应答利用的潜力。

发明内容

[0012] 在一些实施方案中,本文提供了包含一组选自自由组1-至组-27组成的组的多核苷酸的组合物。在一些实施方案中,组合物还包含探针。在一些实施方案中,探针包含标记物。在一些实施方案中,探针是标记的多核苷酸。

[0013] 在一些实施方案中,探针是具有选自自由SEQ ID NO:73-76组成的组的序列的标记的多核苷酸并且所述多核苷酸组的组选自组12-15。

[0014] 在一些实施方案中,标记物是荧光团。在一些实施方案中,荧光团共价附接至多核苷酸的末端。在一些实施方案中,探针是包含淬灭剂的分子信标。在一些实施方案中,荧光团是FAM,并且淬灭剂是BHQ1。在其它实施方案中,荧光团是ATTO 565或Alexa 594,并且淬灭剂是BHQ1或BHQ2。

[0015] 本文还提供了包含荧光团、淬灭剂和多核苷酸的分子信标,其中所述多核苷酸选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:73-75-76,并且所述多核苷酸组选自组12-15。在一些实施方案中,荧光团是FAM,并且淬灭剂是BHQ1。在其它实施方案中,荧光团是ATTO 565或Alexa 594,并且淬灭剂是BHQ1或BHQ2。

[0016] 本文还提供了检测测试样品中淋病奈瑟氏菌的方法,所述方法包括:(a)从测试样品中提取核酸;(b)通过使步骤(a)中提取的核酸与包含链置换DNA聚合酶和序列特异性引物组的反应混合物反应来扩增靶序列,其中所述序列特异性引物组选自自由组-1至组-27组成的组,以及(c)检测步骤(b)的扩增产物的存在或不存在;其中所述扩增产物的存在指示测试样品中淋病奈瑟氏菌的存在。

[0017] 在检测测试样品中淋病奈瑟氏菌的方法的一些实施方案中,步骤(b)中靶序列的扩增在约60°C和67°C之间进行,持续时间少于30分钟。在一些实施方案中,进行扩增步骤少于15分钟。在一些实施方案中,进行扩增步骤少于10分钟。

[0018] 在检测测试样品中的淋病奈瑟氏菌的方法的一些实施方案中,检测扩增产物的存在或不存在包括使扩增产物与探针杂交,所述探针包含附接至标记物的多核苷酸。

[0019] 在检测测试样品中的淋病奈瑟氏菌的方法的一些实施方案中,多核苷酸包含选自自由SEQ ID NO:73-76组成的组的序列,并且序列特异性引物组选自组12-15。

[0020] 在检测测试样品中的淋病奈瑟氏菌的方法的一些实施方案中,探针是分子信标。在一些实施方案中,反应混合物还包含逆转录酶。在一些实施方案中,淋病奈瑟氏菌以 \leq

100CFU/mL的浓度存在于测试样品中。在一些实施方案中,淋病奈瑟氏菌以 ≤ 10 CFU/mL的浓度存在于测试样品中。

[0021] 根据本发明的一些实施方案,本文还提供了包括组合物的试剂盒,所述组合物包含一组选自由组-1至组-27组成的组的多核苷酸和扩增试剂。在一些实施方案中,扩增试剂包含链置换聚合酶。在一些实施方案中,试剂盒还包括探针。

[0022] 本文还提供了检测测试样品中的淋病奈瑟氏菌的方法,所述方法包括:(a)从测试样品中提取核酸;(b)通过使步骤(a)中提取的核酸与包含链置换DNA聚合酶和序列特异性LAMP引物组的反应混合物反应少于20分钟来扩增靶序列;以及(c)检测步骤(b)的扩增产物的存在或不存在;其中所述扩增产物的存在指示测试样品中淋病奈瑟氏菌的存在。

[0023] 在所述方法的一些实施方案中,核酸与反应混合物反应少于15分钟。在所述方法的一些实施方案中,靶序列位于淋病奈瑟氏菌的细胞色素C过氧化物酶(ccpA)基因中。

[0024] 在所述方法的一些实施方案中,淋病奈瑟氏菌以 ≤ 100 CFU/mL的浓度存在于测试样品中。在所述方法的一些实施方案中,淋病奈瑟氏菌以 ≤ 10 CFU/mL的浓度存在于测试样品中。

[0025] 在所述方法的一些实施方案中,测试样品除了淋病奈瑟氏菌以外还包含一种或多种其它微生物,并且其中来自淋病奈瑟氏菌的靶序列优先于来自所述一种或多种其它微生物的多核苷酸序列被扩增。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供了与SEQ ID NO 1-76具有至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%同一性的核酸序列,以及使用这些核酸序列检测测试样品中淋病奈瑟氏菌的方法。

具体实施方式

[0027] 在医学领域,检测低浓度的物种(低至样品中的少量分子或微生物)是一项挑战。本发明涉及淋病奈瑟氏菌的选择性检测。特别地,基于利用核酸扩增,特别是RT-LAMP和分子信标检测的新检测策略,可使用本文所述的方法和试剂来诊断淋病奈瑟氏菌感染。使用RNA(核糖体RNA(rRNA)或信使RNA)作为靶区域为每个淋病奈瑟氏菌基因组提供了多个拷贝的靶标。因此,即使当每个基因组以多个拷贝存在时,这也相对于靶向基因组DNA的技术,利用本文所述的方法促进了样品中淋病奈瑟氏菌的检测。另外,本文所述的分子信标检测试剂提供了额外的特异性,在大多数情况下不能与脱靶的扩增DNA结合,从而使例如假阳性的发生降至最低。该特异性尤其在下面提供的实施例3(表4和表5)中进行说明。本文还描述了本发明的许多其它特征。

[0028] 如本文中所示,“核酸”包括DNA和RNA,包括含有非标准核苷酸的DNA和RNA。“核酸”包含至少一个多核苷酸(“核酸链”)。“核酸”可以是单链或双链的。术语“核酸”是指构成例如脱氧核糖核酸(DNA)大分子和核糖核酸(RNA)大分子的核苷酸和核苷。最常见的核酸是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。应当进一步理解,本发明可用于包含人工核苷酸的生物序列,所述人工核苷酸为诸如肽核酸(PNA)、吗啉代、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)和蔗糖核酸(TNA),等等。优选地,人工核苷酸为锁核酸分子,包括 $[\alpha]$ -L-LNA。LNA包含核糖核酸类似物,其中核糖环被2'-氧与4'-碳之间的亚甲基桥“锁定”,即含有至少一个LNA单体(即,

一个2'-O,4'-C-亚甲基-β-D-呋喃核糖基核苷酸)的寡核苷酸。LNA碱基形成标准的Watson-Crick碱基对,但锁定构型增加了碱基配对反应的速率和稳定性(Jepsen等人, *Oligonucleotides*, 14, 130-146 (2004))。

[0029] 如本文中所示,“多核苷酸”是指包含两个或更多个核苷酸的聚合物链,其包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物,诸如含有经修饰的主链(例如肽核酸(PNA)或硫代磷酸酯)或经修饰的碱基的那些。“多核苷酸”包括引物、寡核苷酸、核酸链等。多核苷酸可以包含标准或非标准核苷酸。因此,该术语包括mRNA、tRNA、rRNA、核酶、DNA、cDNA、重组核酸、支链核酸、质粒、载体、探针、引物等。通常,多核苷酸在链的一个末端(“5'末端”)包含5'磷酸并且在另一末端(“3'末端”)包含3'羟基。多核苷酸的最5'核苷酸在本文中可称为多核苷酸的“5'末端核苷酸”。多核苷酸的最3'核苷酸在本文中可称为多核苷酸的“3'末端核苷酸”。当本发明的核酸采取RNA形式时,其可具有或不具有5'帽。

[0030] LAMP是依赖于由Bst DNA聚合酶或另一种链置换聚合酶进行的自循环链置换DNA合成的核酸扩增方法。扩增产物是具有几个靶标的重复序列和多个环的茎环结构。该方法的主要优点是不需要DNA模板的变性,因此LAMP反应可在等温条件(范围为60至67°C)下进行。LAMP只需要一种酶和四种类型的引物,所述引物可识别靶序列中六个不同的杂交位点。可通过添加两个额外的引物来加速反应。所述方法产生大量扩增产物,导致更容易检测,诸如通过目视判断反应混合物的浊度或荧光进行检测。

[0031] 简言之,通过一对“成环”引物(分别为正向和反向内部引物FIP和BIP)的退火和延伸,然后一对侧翼引物(F3和B3)的退火和延伸来引发反应。这些引物的延伸导致成环元件的链置换,所述成环元件折叠形成末端发夹环结构。一旦出现了这些关键结构,扩增过程便会自我维持,并在恒定温度下以连续和指数方式(而不是像PCR那样以循环方式)进行,直至反应混合物中的所有核苷酸(dATP、dTTP、dCTP及dGTP)已被掺入扩增的DNA中,或者化学反应以其它方式耗尽。任选地,可包括另外一对引物以加速反应。这些引物,称为“环引物”,与内部引物哑铃状产物的非内部引物结合的末端环杂交。

[0032] 如本文中所示,术语“引物”是指寡核苷酸,所述寡核苷酸当被置于诱导与核酸链(模板)互补的引物延伸产物合成的条件下时,即在核苷酸和聚合试剂诸如DNA聚合酶存在的情况下并且在合适的温度和pH下,能够充当合成起始点。

[0033] LAMP允许以比PCR更高的灵敏度和特异性扩增靶DNA序列,通常反应时间少于30分钟,这相当于最快的实时PCR测试。被扩增的靶序列的长度通常为200-300个碱基对(bp),并且反应依赖于在扩增过程中由几个引物同时识别该序列的120bp至180bp。这种高水平严格性使扩增具有高度特异性,使得只有当最初存在整个靶序列时,才会在反应中出现扩增的DNA。

[0034] LAMP的应用已被进一步扩展到包括通过添加逆转录酶(RT)来检测RNA分子。通过包括RNA检测,LAMP可应用的靶标类型也得以扩展,并增加了额外靶向基于RNA的病毒、重要的调控性非编码RNA(sRNA、miRNA)和与特定疾病或生理状态相关的RNA分子的能力。检测RNA的能力还具有例如在选择高表达的、稳定的和/或丰富的信使RNA(mRNA)或核糖体RNA(rRNA)靶标方面提高测定灵敏度的潜力。扩增的初步阶段涉及将RNA分子逆转录为互补DNA(cDNA)。然后,cDNA充当链置换DNA聚合酶的模板。使用热稳定的RT酶(即NEB RTx)可以使反应能够在单一温度下并在一步、单一混合反应中完成。

[0035] 如本文中所示，“靶序列”意指使用本文提供的一种或多种多核苷酸扩增、检测或者扩增并检测的淋病奈瑟氏菌的核酸序列或其互补序列。另外，虽然术语靶序列有时指双链核酸序列，但本领域技术人员将认识到靶序列也可以是单链的，例如，RNA。可选择对特定生物体或多或少具有特异性的靶序列。例如，靶序列可以对整个属、一个以上的属、物种或亚种、血清群、营养型、血清型、菌株、分离物或其它生物体的亚组具有特异性。

[0036] 本文描述的引物/探针组合物和方法的速度、特异性和灵敏度由几个方面决定。用于根据本发明的组合物和方法的示例性引物包括：

[0037] 表1-LAMP引物

Seq ID	序列(5'至3')
SEQ ID NO: 1	CATAAGGAATACACGATGTCTTTC
SEQ ID NO: 2	GATTTTCTGCATTTCTTCGACA
SEQ ID NO: 3	AAGCAGGAGAAGCATCGCCTATTGGCATTGTCTTCA CTGT

Seq ID	序列(5'至3')
SEQ ID NO: 4	CGCCCGAAGACCAAGACCGTCGGCAAAGGTTGGAA TA
SEQ ID NO: 5	GCCGCAGACTTTTCCTGA
SEQ ID NO: 6	TTTGAAACGCGCGCAAG
SEQ ID NO: 7	AAGGCAACGTCAACGC
SEQ ID NO: 8	GTCAGCACGGCCTTTG
SEQ ID NO: 9	CACCGTTGTGGCAGGCACTGAGCGAACAGGAACG
SEQ ID NO: 10	CAACCTTGGAGGCACGACCTGAATTTCCAATACGGC CC
SEQ ID NO: 11	GTTGTCCATGAACGCGC
SEQ ID NO: 12	CAGAAATTCGGTCTGGTCCA
SEQ ID NO: 13	TATTCCAACCTTTGCCGAC
SEQ ID NO: 14	GCCGAACTGCCCTTTG
SEQ ID NO: 15	CTTTGGAAAGGCGTGGTTCATACCCGTTTACCGAAG AACAGG
SEQ ID NO: 16	CAAAGGCAATACCGTAAGCTGCCATATTGTCCACAC CGGC
SEQ ID NO: 17	CAGAGTTGGTGTCCGAGTT
SEQ ID NO: 18	CTTGCCACAACCTTGCTTC
SEQ ID NO: 19	TATTTCCACAACGGCAGC
SEQ ID NO: 20	GGCTTAGATTCCATCGGTG
SEQ ID NO: 21	CCACATCTTCTTTCGGAATGTCTTTGGGAGCTGGAT AAGGC
SEQ ID NO: 22	GTGGATAACATCGTCGTATTCCTGACAGTTCCGGCAT CGTG
SEQ ID NO: 23	CAATTGCGCCTTACCCATG
SEQ ID NO: 24	CTTCCGGCAATGTTCCG
SEQ ID NO: 25	TTGTCGCGTTTCGGATC
SEQ ID NO: 26	CCAACCTTTGCCGACTG
SEQ ID NO: 27	CATCACTACCGCATTGGG
SEQ ID NO: 28	CAGACCGAATTTCTGGAAGG
SEQ ID NO: 29	GCTCAGGGCGTTGACGTGTTTGAGCGTACCCTGC
SEQ ID NO: 30	GCGCGTTCATGGACAACGCGTGCCTCCAAGGTTG
SEQ ID NO: 31	CCATTGGTTCGGCGTCA
SEQ ID NO: 32	GCTGTATTGCCTGCCACA
SEQ ID NO: 33	CTTAGATTCCATCGGTGCG
SEQ ID NO: 34	GGCAATGTTTCCGAATCAGC
SEQ ID NO: 35	GCGATGCTTCTCCTGC
SEQ ID NO: 36	GTGTCCGAGTTTGACCTG
SEQ ID NO: 37	GAAGCGGAAGGAACGGCTTTTCCGAGACCGAAGCG
SEQ ID NO: 38	CTCGCCGAAGACCAAGACTCTGCATTTCTTCGACA GTC
SEQ ID NO: 39	GGCCTGTACTTGGGAAGC
SEQ ID NO: 40	GCGCAAGGTGTATTCCAAC
SEQ ID NO: 41	GTGTCCGAGTTTGACCTGT
SEQ ID NO: 42	CAACCTTGCTTCCGCC
SEQ ID NO: 43	TCATTCGCCATTTCCACC

[0039]

Seq ID	序列(5'至3')
SEQ ID NO: 44	ATGCGGTAGGCGAGTTGCGTGGACAATATGCCGACC
SEQ ID NO: 45	GGGCAGCCAGTTTTGGGAGATTCACCAAAGGCCCG
SEQ ID NO: 46	CCCTTTGTGCCCTGAC
SEQ ID NO: 47	GTGCCGCCGATGTTGA
SEQ ID NO: 48	AACTCGGACACCAACTC
SEQ ID NO: 49	CATTCAATGCGGTAGGC
SEQ ID NO: 50	AGCAAGGTTGTGGCAAGAGGGTATGAACCACGCCT T
SEQ ID NO: 51	CGCCGGTGTGGACAATGAACTGCCCTTTGTGC
SEQ ID NO: 52	CAGCTTACGGTATTGCCTT
SEQ ID NO: 53	ATGCCGACCAGTCAGG
SEQ ID NO: 54	ATATGCCGACCAGTCAG
SEQ ID NO: 55	GGGAACTTTGGCGATT
SEQ ID NO: 56	AGCAGCGCAGCATTCAATGCACAAAGGGCAGTTC
SEQ ID NO: 57	TGTTGAAGAACAGGCTGGCGCGAATCATTGCGCATT
SEQ ID NO: 58	GTAGGCGAGTTGCGTC
SEQ ID NO: 59	TTGGTGAATCCGGTGGA
SEQ ID NO: 60	GAGTTGCGTCCGCCGAACTGCCTCTTGCCACAACCT TGCTTCCG
SEQ ID NO: 61	ACCGCATTGAATGCTGCGCTGCTGCCCGCCAGCCTG TTCTTC
SEQ ID NO: 62	TGACTGGTCGGCATATTGTCCACAC
SEQ ID NO: 63	CGGACGTGCCGCCGATGTT
SEQ ID NO: 64	CCTTTCAAAGGCAATACCGTAAGC
SEQ ID NO: 65	TCGCCATTTCCACCGGATTCAC
SEQ ID NO: 66	TGCGGTAGGCGAGTTGCGGGACAATATGCCGACCAG T
SEQ ID NO: 67	TTGAATGCTGCGCTGCTGGCAGCCTGTTCTTCAACA TCG
SEQ ID NO: 68	CGAACTGCCCTTTGTGCC
SEQ ID NO: 69	TTGGGACGGACGTGCC
SEQ ID NO: 70	TGCCACAACCTTGCTTCC
SEQ ID NO: 71	CGAATCATTGCGCATTTC
SEQ ID NO: 72	CTTTGGAAAGGCGTGTTTCATACAAATCCGTCCGTT TACCG

[0041] LAMP扩增的产物的检测可通过多种方法实现。在优选实施方案中,通过向引物混合物中添加荧光标记的探针来进行产物的检测。如本文中所示,术语“探针”是指包含与靶序列互补或基本上互补的一个或多个部分的单链核酸分子。在某些实现方式中,荧光标记的探针为分子信标。

[0042] 如本文中所示,“分子信标”是指被设计成报告溶液中特定核酸存在的单链发夹形寡核苷酸探针。分子信标由四个组分组成:茎、发夹环、末端标记的荧光团和相反末端标记的淬灭剂(Tyagi等人,(1998) Nature Biotechnology 16:49-53)。当发夹样信标不与靶结合时,荧光团和淬灭剂紧密地靠在一起,荧光被抑制。在互补的靶核苷酸序列存在的情况下,信标的茎打开与靶杂交。这将荧光团和淬灭剂分开,使荧光团发出荧光。或者,分子信标还包括在末端标记的供体附近发射的荧光团。“波长转换分子信标”结合了额外的捕获荧光团(harvester fluorophore),使荧光团能够更强地发射。目前关于分子信标的综述包括

Wang等人,2009,Angew Chem Int Ed Engl,48(5):856-870;Cissell等人,2009,Anal Bioanal Chem 393(1):125-35;Li等人,2008,BiochemBiophys Res Comm 373(4):457-61;以及Cady,2009,Methods Mol Biol 554:367-79。

[0043] 在一个实现方式中,分子信标包含荧光团、淬灭剂和多核苷酸,其中多核苷酸包括选自SEQ ID NOS:73-76组成的组的序列。在一个实施方案中,多核苷酸包含选自SEQ ID NO:73的核苷酸6-22、SEQ ID NO:74的核苷酸5-24、SEQ ID NO:75的核苷酸3-21和SEQ ID NO:76的核苷酸3-24组成的组的序列。具有上述序列的多核苷酸可包括一个或多个非天然核苷或键联,诸如肽核酸(PNA)、吗啉代、锁定核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA),等等。在一些实施方案中,分子信标的多核苷酸包含一至六个锁核酸。在优选实施方案中,分子信标的多核苷酸包含三个锁核酸。在另一个优选实施方案中,分子信标的多核苷酸包含四个锁核酸。

[0044] 如本文中所示,术语“标记物”意指具有能够检测和任选地定量的性质或特征分子或部分。标记物可以是可直接检测的,例如(但不限于)放射性同位素、荧光团、化学发光体、酶、胶体颗粒、荧光微粒等;或者标记物可以是用例如特异性结合成员可间接检测的。应当理解,可直接检测的标记物可能需要额外的组分,例如底物、触发试剂、淬灭部分、光等,以使得能够检测和/或定量标记物。当使用可间接检测的标记物时,它们通常与“缀合物”结合使用。缀合物通常是已经附接至或偶联至可直接检测的标记物的特异性结合成员。用于合成缀合物的偶联化学在本领域中是公知的,并且可以包括例如不破坏特异性结合成员的特异性结合性质或标记物的可检测性质的任何化学手段和/或物理手段。如本文中所示,“特异性结合成员”意指结合对的成员,即两个不同的分子,其中所述分子之一通过例如化学或物理手段与另一个分子特异性结合。除了抗原和抗体特异性结合对以外,其它特异性结合对包括但不限于抗生物素蛋白和生物素;半抗原和对半抗原具有特异性的抗体;互补核苷酸序列;酶辅助因子或底物和酶;等等。

[0045] 分子信标可仅由核酸诸如DNA或RNA组成,或者其可由肽核酸(PNA)缀合物组成。荧光团可以是任何荧光有机染料或单个量子点。淬灭部分理想地淬灭荧光团的发光。可以使用任何合适的淬灭荧光团发光的淬灭部分。荧光团可以是本领域已知的任何荧光标记物/染料。合适的荧光标记物的实例包括但不限于Fam、Hex、Tet、Joe、Rox、Tamra、Max、Edans、Cy染料诸如Cy5、荧光素、香豆素、曙红、罗丹明、Bodipy、Alexa、Cascade Blue、Yakima Yellow、Lucifer Yellow、Texas Red和ATTO染料家族。淬灭剂可以是本领域已知的任何淬灭剂。淬灭剂的实例包括但不限于Dabcyl、Dark Quencher、Eclipse Dark Quencher、ElleQuencher、Tamra、BHQ和QSY(它们均为商品名)。当设计探针时,技术人员将知道染料/淬灭剂的哪些组合是合适的。在示例性实施方案中,将荧光素(FAM)与Blackhole Quencher™(BHQ™)(Novato, Calif.)结合使用。随后可直接目测评估分子信标与扩增产物的结合。或者,荧光水平可通过光谱学来测量,以提高灵敏度。

[0046] 各种商业供应商生产标准和定制分子信标,包括Abingdon Health(UK; www.abingdonhealth.com)、Attostar(US, MN; www.attostar.com)、Biologio(NLD; www.biologio.com)、Biomers.net(DEU; www.biomers.net)、Biosearch Technologies(US, CA; www.biosearchtech.com)、Eurogentec(BEL; www.eurogentec.com)、Gene Link(US, NY; www.genelink.com)、Integrated DNA Technologies(US, IA; www.idtdna.com)、Isogen

Life Science (NLD;www.isogen-lifescience.com)、Midland Certified Reagent (US,TX;www.oligos.com)、Eurofins (DEU;www.eurofinsgenomics.eu)、Sigma-Aldrich (US,TX;www.sigmaaldrich.com)、Thermo Scientific (US,MA;www.thermoscientific.com)、TIB MOLBIOL (DEU;www.tib-molbiol.de)、TriLink Bio Technologies (US,CA;www.trilinkbiotech.com)。利用分子信标的各种试剂盒也是商购可得的,诸如来自Stratagene (La Jolla,Calif.)的Sentinel™Molecular Beacon Allelic Discrimination试剂盒和来自Eurogentec SA (Belgium,eurogentec.com)和Isogen Bioscience BV (The Netherlands,isogen.com)的各种试剂盒。

[0047] 本发明的寡核苷酸探针和引物任选地使用本领域已知的基本上任何技术来制备。例如,在某些实施方案中,本文所述的寡核苷酸探针和引物使用基本上任何核酸合成方法来化学合成,所述方法包括,例如,根据Beaucage和Caruthers (1981),Tetrahedron Setts.22 (20):1859-1862 (其通过引用并入)所述的固相亚磷酰胺三酯法,或本领域已知的另一种合成技术,例如使用自动合成仪,如Needham-VanDevanter等人 (1984)Nucleic Acids Res.12:6159-6168 (其通过引用并入)中所述的。用于自动化寡核苷酸合成的非常多种类的设备可商购获得。还可任选地使用多核苷酸合成方法 (例如,三核苷酸合成等)。此外,本文描述的引物核酸任选地包含各种修饰。为了进一步说明,还可任选地修饰引物,以提高扩增反应的特异性,如在例如1999年12月14日发布的美国专利第6,001,611号 (其通过引用并入)中所述的。引物和探针还可用本文所述或其它本领域中所知晓的各种其它修饰来合成。

[0048] 另外,基本上任何核酸 (以及实际上任何标记的核酸,无论是标准的还是非标准的)都可从各种商业来源的任何来源定制或标准订购,所述商业来源为诸如Integrated DNA Technologies、the Midland Certified Reagent Company、Eurofins、Biosearch Technologies、Sigma Aldrich和许多其它公司。

[0049] 测试样品通常源自或分离自被怀疑患有淋病奈瑟氏菌感染的受试者,通常为哺乳动物受试者,更常见地为人受试者。示例性样品或样本包括血液、血浆、血清、尿液、滑液、精液、精浆、前列腺液、阴道液、宫颈液、子宫液、宫颈碎屑、羊水、肛门碎屑、粘液、痰、组织等。基本上用于采集这些样品的任何技术都可以任选地使用,包括例如刮擦、静脉穿刺、擦拭、活组织检查或本领域已知的其它技术。

[0050] 如本文中所示,术语“测试样品”意指从怀疑含有或可能含有靶序列的生物体或生物流体中采集的样品。测试样品可以取自任何生物来源,诸如组织、血液、唾液、痰、粘液、汗液、尿液、尿道拭子、宫颈拭子、阴道拭子、泌尿生殖器或肛门拭子、结膜拭子、眼球晶状体液、脑脊液、乳汁、腹水、滑液、腹膜液、羊水、发酵液、细胞培养物、化学反应混合物等。可以 (i) 直接使用从来源获得的测试样品或 (ii) 在预处理 (以改变样品的特征) 后使用测试样品。因此,可通过例如从血液中制备血浆或血清、破碎细胞或病毒颗粒、从固体材料中制备液体、稀释粘性液体、过滤液体、蒸馏液体、浓缩液体、灭活干扰组分、添加试剂、纯化核酸等来在使用前预处理测试样品。

[0051] 有利的是,本发明使得能够可靠地快速检测临床样品诸如尿样中的淋病奈瑟氏菌。

[0052] 为了进一步说明,在分析本文所述的靶核酸之前,可从通常包括不同组分的复杂

混合物的样品中纯化或分离这些核酸。通常裂解收集的样品中的细胞以释放细胞内容物。例如,特定样品中的淋病奈瑟氏菌和其它细胞可通过将它们与各种酶、化学物质接触来裂解,和/或通过本领域已知的其它方法裂解,所述方法降解例如细菌细胞壁。在一些实施方案中,直接在细胞裂解物中分析核酸。在其它实施方案中,在检测之前,从细胞裂解物中进一步纯化或提取核酸。基本上任何核酸提取方法都可用于纯化本发明方法中使用的样品中的核酸。可用于纯化核酸的示例性技术包括例如亲和色谱、与固定在固体载体上的探针杂交、液-液提取(例如苯酚-氯仿提取等)、沉淀(如使用乙醇)、用滤纸提取、用胶束形成试剂(例如,十六烷基-三甲基-溴化铵等)提取、与固定的嵌入染料(例如,溴化乙锭、吖啶等)结合、在离液条件下至硅胶或双原子土的吸附、至磁性玻璃颗粒或有机硅烷颗粒的吸附和/或类似技术。例如,在美国专利第5,155,018号、第6,383,393号和5,234,809号中也描述了样品处理,所述专利中各自通过引用并入。

[0053] 测试样品可以任选地根据本领域技术人员已知的任何技术进行处理和/或纯化,以提高扩增效率和/或定性准确性和/或定量准确性。因此,无论是通过纯化、分离还是通过化学合成获得,样品都可仅由或基本上由一种或多种核酸组成。各种手段对于想从测试样品中分离或纯化核酸诸如DNA,例如从宫颈刮屑中分离或纯化DNA的本领域技术人员来说是可获得的(例如,QIAamp-DNA Mini试剂盒;Qiagen,Hilden,Germany)。

[0054] 实施例:

[0055] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是他们的发明的范围,也不旨在表示下面的实验是执行的所有或唯一实验。已努力确保所用数字的准确性(例如量、温度等),但应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,压力为大气压或接近大气压。

[0056] 实施例1:靶标选择、序列分析和测定设计

[0057] 淋病奈瑟氏菌和包括脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、乳糖奈瑟氏菌(*Neisseria lactamica*)、干燥奈瑟氏菌(*Neisseria sicca*)和灰色奈瑟氏菌(*Neisseria cinerea*)在内的密切相关物种的序列可从国家生物技术信息中心(NCBI)或病理系统资源整合中心(PATRIC)数据库获得。使用Clustal Omega(Sievers等人(2011).*Molecular Systems Biology* 7:539)或MAFFT(Katoh,Standley 2013.*Molecular Biology and Evolution* 30:772-780)比对序列,并将对于淋病奈瑟氏菌特有的区域选择用于引物和分子信标探针设计。

[0058] 基于引物/探针的检测测定被设计成通过向反应中添加逆转录酶(RT-LAMP)来利用等温环介导的靶向RNA的扩增。包括具有5'荧光团/3'淬灭剂修饰、6-羧基荧光素和Black Hole淬灭剂1的分子信标探针,以提供靶特异性荧光检测。使用包括PremierBiosoft's LAMP Designer、Beacon Designer、内部脚本和手动设计在内的软件程序的组合设计淋病奈瑟氏菌RT-LAMP引物组(表1和表2)。另外将所得的预测扩增子与NCBI核苷酸数据库(包括人转录组)和奈瑟菌属中的单个非淋病奈瑟氏菌物种进行了基本局部比对,以进一步预测检测特异性。

[0059] 表2概述了本发明的引物组,其最少包括正向内引物(FIP)和反向内引物(BIP)。另外,引物组通常还包括至少两个选自正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向环引物(LF)和

反向环引物 (LB) 的附加引物。

[0060] 表2-LAMP引物组

[0061]

组	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
组-1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
组-2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
组-3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
组-4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
组-5	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
组-6	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
组-7	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32

[0062]

组	F3	B3	FIP	BIP	LF	LB
组-8	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 34
组-9	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
组-10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 18
组-11	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47
组-12	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
组-13	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59
组-14	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63
组-15	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69

[0063] 通常,3至5 μ L提取的核酸材料或阴性对照 (NU=阴性尿液;NTC=不含核酸酶的水或Tris缓冲液,无模板对照) 用作RT-LAMP反应的模板。将10-25 μ L总体积的反应物在冰上制备为包含制剂的混合物,所述制剂包含1x扩增缓冲液,所述扩增缓冲液包含10-40mM Tris-HCl、0-0.5% Tween 20、0-300mM海藻糖、5-70mM KCl、4-10mM MgSO₄、10-20mM (NH₄)₂SO₄、0-

2mM TCEP和各自为1.6-2mM的dCTP、dGTP、dATP和dTTP。NEB Bst2聚合酶(NEB CN#M0537L)和RTx Warmstart逆转录酶(NEB CN#M0380S)。根据实验设计的要求,将引物(2 μ M内引物、0.2 μ M外引物和0.8 μ M环引物)添加到单个反应中或直接添加到预混合物中。如下面实施例所示,分子信标(0.2 μ M)或200nM Yo-Pro-1、Yo-Pro-3或To-Pro染料也添加到预混合物中。用标准6-引物混合物或7-引物混合物(如所指示的(组16至组27))制备扩增反应。将预混合物分配到单个样品模板中,涡旋并短暂离心,将每个反应装载到96孔板或384孔板(Roche CN#4729692001或BioRad CN#hsI9605)的单个孔中。反应在60-67 $^{\circ}$ C的温度范围内进行,并在Roche LightCycler 96实时PCR仪或BioRad CFX96实时循环仪上监测荧光。通过嵌入染料或与靶标结合的分子信标探针导致分子信标荧光分子内淬灭的释放来监测靶标扩增。

[0064] 实施例2:利用染料检测的LAMP

[0065] 阴性尿基质中加标了滴定的淋病奈瑟氏菌(于PBS中连续稀释的,Zeptometrix CN#0801482、ATCC CN#19424或ATCC Cn#49226)。使用标准提取方法从加标的样品中提取核酸,并使用LAMP引物(如表2所述)扩增样品。YoProTM染料或同一染料组家族中的兼容波长形式(Life Technologies;绿色荧光碳菁核酸染色)用于检测扩增产物。如实施例1所述制备预混合物。结果概述于表3中。NT表示未测试的条件。“无Amp”表示未检测到扩增。

[0066] 表3-至最性的时间(染料检测)

组	5x10 ³ CFU/mL	5 CFU/mL	NTC	NU
组-12	12.89	21.66	无 Amp	无 Amp
组-13	6.28±0.18	9.22±0.26	42.2 (1 of 2)	无 Amp
组-14	7.55	10.93	29.03	34.98
组-15	4.68	6.88	39.71	42.84
组-2	5.5±0.099	7.94±0.13	26.36±1.46	45.18±1.95
组-3	9.47±0.11	13.64±0.37	无 Amp	无 Amp
组-4	5.90±0.03	8.63±0.20	33.09±5.23	34.87±4.18
组-5	5.15±0.15	7.57±0.16	29.72±10.81	24.31±4.96
组-6	9.58±0.01	14.10±1.00	无 Amp	无 Amp
组-7	6.59±0.01	9.42±0.09	无 Amp	35.84±3.22
组-8	5.26±0.19	7.57±0.01	36.17±1.19	29.5±1.53
组-1	12.56±0.94* (*5x10 ² CFU/mL)	无 Amp	无 Amp	NT
组-9	4.25 (*5x10 ² CFU/mL)	5.00±0.68	37.31 (3 个中的 1 个)	NT
组-10	7.42 (*5x10 ² CFU/mL)	11.18±0.25	无 Amp	NT
组-11	4.90 (*5x10 ² CFU/mL)	5.92±1.15	25.522.15 (3 个中的 3 个)	NT

[0068] 实施例3:特异性

[0069] 通过比较利用 5×10^3 和5CFU/mL提取的淋病奈瑟氏菌核酸模板(NG)的反应与利用 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ CFU/mL提取的来自密切相关的奈瑟菌属物种(活的经滴定的原液购自Zeptomatrix)脑膜炎奈瑟氏菌(NM)、乳糖奈瑟氏菌(NL)和干燥奈瑟氏菌(NS)、阴性尿液提取物的核酸模板或无模板对照(NTC)的反应,另外测试了实施例2中描述的引物组的亚组的特异性。当如实施例1中所述进行扩增反应时,许多测试的引物组显示出针对另外的奈瑟菌属物种的一定水平的交叉反应性(表4)。

[0070] 表4-交叉反应性(染料检测)

组	T _p NG 5x10 ³ CFU/mL	NL	NS	NM	NTC	阴性尿液
组-12	12.89	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp
组-13	6.28±0.18	无 Amp	无 Amp	无 Amp	42.2 (2个中的 1个)	无 Amp
组-14	7.55	30.88	37.03	无调用	29.03	34.98
组-15	4.68	35.38	49.98	47.75	39.71	42.84
组-2	5.5±0.099	29.87± 13.72	44.95±3.7 5	28.41±11. 02	26.36±1.4 6	45.18± 1.95
组-3	9.47±0.11	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp
组-4	5.90±0.03	18.46± 4.28	18.53± 7.46	18.48± 7.55	33.09±5.2 3	34.87± 4.18
组-5	5.15±0.15	34.5±0.55	22.10±2.3 8	35.98±9.9 6	29.72±10. 81	24.31± 4.96
组-6	9.58±0.01	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp
组-7	6.59±0.01	26.3 (2个中的 1个)	无 Amp	无 Amp	无 Amp	35.84± 3.22
组-8	5.26±0.19	30.18±3.0 0	30.45±3.9 7	33.53±5.5 4	36.17±1.1 9	29.5±1. 53
组-1	12.56±0.94 * (*5x10 ² CFU/mL)	无 Amp	无 Amp	24.33±0.5 2	无 Amp	NT
组-9	4.25 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	37.31 (3个中的 1个)	NT
组-10	7.42 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	无 Amp	NT
组-11	4.90 (*5x10 ² CFU/mL)	NT	NT	NT	25.522.15 (3个中的 3个)	NT

[0073] 实施例4:分子信标检测

[0074] 为了对扩增产物提供额外水平的基于序列的直接检测(与间接染料检测相反),分子信标MB1至MB4(分别为SEQ ID NO:73-76)被设计用于检测从活细菌提取的核酸的扩增(表5),所述分子信标靶向具有与灵敏度组合的有希望的Tp的引物组的淋病奈瑟氏菌扩增子内的独特核苷酸。分子信标探针被设计成具有被包括来提供靶特异性荧光检测的5' 荧光团/3' 淬灭剂修饰(6-羧基荧光素(FAM))和Black Hole淬灭剂1(BHQ1)。

[0075] 表5-探针序列

ID	Fluor	淬灭	序列(5'至3')	序列ID
MB1	FAM	BHQ1	CCGCAACGTGCCGCCGATGTTGCGG	SEQ ID NO: 73
MB2	FAM	BHQ1	GCGTGACGGACGTGCCGCCGATGTACGC	SEQ ID NO: 74
MB3	FAM	BHQ1	CGTTGGGACGGACGTGCCGCCAACG	SEQ ID NO: 75
MB4	FAM	BHQ1	CGGGGACGGACGTGCCGCCGATGTCCCCG	SEQ ID NO: 76

[0077] 根据实施例1中描述的方法,使用来自5至 5×10^3 CFU/mL的淋病奈瑟氏菌的提取物的洗脱物作为模板输入,评价10-25 μ l总体积反应。虽然使用分子信标进行检测导致反应Tp略有增加,基于序列直接检测扩增产物从而区分密切相关物种的能力是理想的结果。

[0078] 表6-达到阳性交叉反应性的时间(探针检测)

引物	信标	5x10 ³ CFU/ mL	5 CFU/m L	NL	NS	NM	NC	NU	NTC
组-13	MB1	9.49	13.61	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp	无 Amp
组-13	MB2	8.42	12.01	NT	NT	NT	NT	NT	无 Amp
组-13	MB3	8.82± 0.71	12.54± 0.81	无 Amp	无 Amp	无 Amp	19.8	无 Amp	无 Amp
Xeg 13	MB4	8.25± 0.89	11.72± 0.60	无 Amp	无 Amp	无 Amp	22.01	无 Amp	无 Amp
组-14	MB1	10.55 ±0.03	14.47± 0.39	无 Amp	无 Amp	无 Amp	21.32	无 Amp	无 Amp
组-14	MB2	12.44 ±0.04	16.94± 0.11	无 Amp	无 Amp	无 Amp	25.14	无 Amp	无 Amp
组-14	MB3	10.95 ±0.16	14.71	无 Amp	无 Amp	无 Amp	23.04	无 Amp	无 Amp
组-14	MB4	11.15 ±0.06	14.94± 0.03	无 Amp	无 Amp	无 Amp	24.01	无 Amp	无 Amp
组-15		4.74± 0.60	7.76±0. 73	无 Amp	无 Amp	无 Amp	18.16	13.48	无 Amp
组-15	MB2	8.09± 0.06	11.26± 0.11	无 Amp	无 Amp	无 Amp	31.33	无 Amp	无 Amp
组-15	MB3	7.43± 0.12	10.18± 0.47	无 Amp	无 Amp	无 Amp	24.17	32.86	无 Amp
组-15	MB4	7.97± 0.13	10.4±0. 10	35.2 3	无 Amp	无 Amp	27.53	无 Amp	无 Amp

[0079] 用来自3CFU/mL的淋病奈瑟氏菌的提取物的洗脱物作为模板输入制备了25μl总体积反应。根据实施例1中所述的方法进行反应。

[0080] 表7-至时间的时间(探针检测)

引物	信标	3CFU/mL	阳性的频率	NTC
组-13	SEQ ID NO:75	18.76±2.34	67%	无Amp
组-15	SEQ ID NO:75	18.28±0.21	67%	无Amp

[0081] 实施例5:扩展台灵敏度评估

[0082] 对来自多个匿名供体的尿液基质混合物进行筛选,以确认淋病奈瑟氏菌阴性状态,等分并在-80℃下储存。将淋病奈瑟氏菌(ATCC CN#19424)在Mueller Hinton培养基和解冻的加标有淋病奈瑟氏菌的混合尿液等分试样中连续稀释至如通过台式提取和和湿台式RT-LAMP估计的测定灵敏度的10X、3X、1X、0.5X或0.25X的终浓度。在含有或不含有稳定溶液的情况下制备样品。也包括具有或不具有稳定溶液的阴性尿液对照。关于具体样品和稳定剂体积输入,参见表8。

[0085] 如实施例2所述,使用标准提取方法从加标样品中提取核酸,并使用LAMP引物组-15扩增样品。分子信标SEQ ID NO.75用于检测扩增产物。如实施例1所述制备预混合物。结果概述于表9中。NT表示未测试的条件。“无Amp”表示未检测到扩增。

[0086] 表8-用于样品制备的尿液和稳定剂的体积

样品	样品制备		测试
	稳定剂(mL)	加标尿液(mL)	处理体积(mL)
纯尿, 无稳定剂	0	1	1
尿液+稳定剂	3	6	1

[0088] 表9-至阳性的时间(探针检测)

浓度(CFU/mL)	稳定剂? Y/N	Tp (分钟)	阳性的频率
2	N	8.43±0.37	20/20
0.6		8.79±0.29	45/45
0.2		9.80±1.16	38/45
0.1		10.51±1.31	45/45
0.05		11.08±1.11	43/45
0		无 Amp	0/5

[0091] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过图示和示例的方式稍详细地描述了前述发明,但根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可对其进行某些改变和修改。还应当理解,本文使用的术语仅仅是为了描述特定的实施方案,而不是旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求来限定。

[0092] 因此,前面仅举例说明了本发明的原理。应当理解,本领域的技术人员将能够设计各种布置,尽管本文中并没有明确描述或示出,但所述布置体现了本发明的原理,并且包括在本发明的精神和范围内。此外,本文列举的所有实例和条件语言主要是为了帮助读者理解本发明的原理和发明人为推进本领域所贡献的概念,并且被解释为不限于此类具体列举的实施例和条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其特定实施例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等同物。另外,此类等同物旨在包括当前已知的等同物和将来开发的等同物,即,无论结构如何,开发的执行相同功能的任何元件。因此,本发明的范围并不指在局限于本文所示和所述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。

序列表

<110> 达丽斯生物医学公司 (TALIS BIOMEDICAL CORPORATION)

<120> 用于淋病奈瑟氏菌的扩增和检测的多核苷酸

<130> TSM-052W0

<140>

<141>

<150> 16/719,744

<151> 2019-12-18

<150> 16/523,609

<151> 2019-07-26

<150> 62/878,639

<151> 2019-07-25

<160> 76

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 1

cataaggaat acacgatgtc tttc 24

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 2

gattttctgc atttcttcga ca 22

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 3

aagcaggaga agcatcgcct attggcattg tcttactgt 40

<210> 4
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 4
cgcccgaaga ccaagaccgt cggcaaaggt tggaata 37
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 5
gccgcagact tttcctga 18
<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 6
tttgaaacgc gcgcaag 17
<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 7
aaggcaacgt caacgc 16
<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 8

gtcagcacgg cctttg 16

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 9

caccgttgtg gcaggcactg agcgaacagg aacg 34

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 10

caaccttgga ggcacgacct gaatttccaa tacggccc 38

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 11

gttgtccatg aacgcgc 17

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 12

cagaaattcg gtctggcca 20

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 13
tattccaacc tttgccgac 19

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 14
gccgaactgc cctttg 16

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 15
ctttggaaag gcgtggttca tacccgttta ccgaagaaca gg 42

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 16
caaaggcaat accgtaagct gccatattgt ccacaccggc 40

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 17
cagagttggt gtccgagtt 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 18
cttgccacaa ccttgcttc 19
<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 19
tatttccaca acggcagc 18
<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 20
ggcttagatt ccatcgggtg 19
<210> 21
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 21
ccacatcttc tttcggaatg tcttttggga gctggataag gc 42
<210> 22
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 22
gtggataaca tcgtcgtatt cctgacagtt ccggcatcgt g 41
<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 23
caattgcgcc ttacccatg 19
<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 24
ctttccggca atgtttccg 19
<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 25
ttgtcgcgtt tcggatc 17
<210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 26
ccaacctttg ccgactg 17
<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 27
catcactacc gcattggg 18
<210> 28
<211> 20
<212> DNA

- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 28
cagaccgaat ttctggaagg 20
<210> 29
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 29
gctcagggcg ttgacgtgtt tgagcgtacc ctgc 34
<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 30
gcgcgttcat ggacaacgcg tgcctccaag gttg 34
<210> 31
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 31
ccatttggtc ggcgtca 17
<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 32
gctgtattgc ctgccaca 18
<210> 33
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 33
cttagattcc atcgggtgcg 19
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 34
ggcaatgttt ccgaatcagc 20
<210> 35
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 35
gcgatgcttc tcctgc 16
<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 36
gtgtccgagt ttgacctg 18
<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 37
gaagcggaag gaacggcttt tccgagaccg aagcg 35
<210> 38

<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 38
ctcgcccgaa gaccaagact ctgcatttct tcgacagtc 39
<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 39
ggcctgtact tgggaagc 18
<210> 40
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 40
gcgcaaggtg tattccaac 19
<210> 41
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 41
gtgtccgagt ttgacctgt 19
<210> 42
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 42
caaccttgct tccgcc 16

<210> 43
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 43
tcattcgcca tttccacc 18
<210> 44
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 44
atgcggtagg cgagttgcgt ggacaatatg ccgacc 36
<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 45
gggcagccag ttttgggaga ttcaccaaag gcccg 35
<210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 46
ccctttgtgc ccctgac 17
<210> 47
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 47

- gtgccgccga tgttga 16
<210> 48
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 48
- aactcggaca ccaactc 17
<210> 49
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 49
- cattcaatgc gtaggc 17
<210> 50
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 50
- agcaagggttg tggcaagagg gtatgaacca cgcctt 36
<210> 51
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 51
- cgccggtgtg gacaatgaac tgccctttgt gc 32
<210> 52
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物

<400> 52
cagcttacgg tattgcctt 19
<210> 53
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 53
atgccgacca gtcagg 16
<210> 54
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 54
atatgccgac cagtcag 17
<210> 55
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 55
gggaactttg gcgattt 17
<210> 56
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 56
agcagcgcag cattcaatgc acaaaggca gttc 34
<210> 57
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 57
tgttgaagaa caggctggcg cgaatcattc gccatt 36
<210> 58
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 58
gtaggcgagt tgcgtc 16
<210> 59
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 59
ttggtgaatc cgttga 17
<210> 60
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 60
gagttgcgtc cgccgaactg cctcttgcca caaccttgc tccg 44
<210> 61
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 61
accgcattga atgctgcgct gctgccccgcc agcctgttct tc 42
<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 62
tgactggtcg gcatattgtc cacac 25
<210> 63
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 63
cggacgtgcc gccgatggt 19
<210> 64
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 64
cctttcctaaa ggcaataccg taagc 25
<210> 65
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 65
tcgccatttc caccgattc ac 22
<210> 66
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 66
tgcgtaggc gaggtaggg acaatatgcc gaccagt 37
<210> 67
<211> 39
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 67
ttgaatgctg cgctgctggc agcctgttct tcaacatcg 39
<210> 68
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 68
cgaactgccc ttgtgcc 18
<210> 69
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 69
ttgggacgga cgtgcc 16
<210> 70
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 70
tgccacaacc ttgcttcc 18
<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 71
cgaatcattc gccatttcca 20
<210> 72
<211> 41

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成引物
<400> 72
ctttggaag gcgtggttca tacaaatccg tccgtttacc g 41
<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成探针
<400> 73
ccgcaacgtg ccgccgatgt tgcgg 25
<210> 74
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成探针
<400> 74
gcgtgacgga cgtgccgccg atgtcacgc 29
<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成探针
<400> 75
cgttgggacg gacgtgccgc caacg 25
<210> 76
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成探针
<400> 76
cggggacgga cgtgccgccg atgtccccg 29