



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109790588 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780053321.X

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

(22)申请日 2017.08.29

代理人 金辉

(30)优先权数据

16186104.2 2016.08.29 EP

(51)Int.Cl.

C12Q 1/689(2018.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/071658 2017.08.29

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/041828 EN 2018.03.08

(71)申请人 梅塔系统因迪戈有限责任公司

地址 德国旧卢斯海姆

(72)发明人 W·冯施泰因 M·施坦格

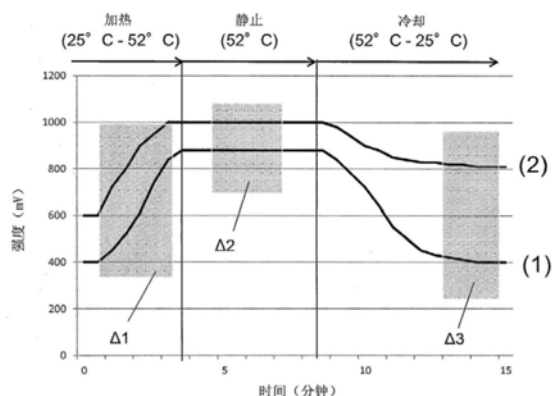
权利要求书2页 说明书9页 附图7页

(54)发明名称

用于检测样品中微生物的方法

(57)摘要

公开了一种用于检测样品中至少一种特定微生物的方法,其中提供了探针核酸序列,其包含至少一种能够发射至少一种可检测信号的可检测标记,其中当探针序列未与靶序列结合时,可检测信号取第一值,当探针序列与靶序列结合时,可检测信号取第二值。测量和分析了探针核酸序列的可检测信号的至少一个值,其中如果测量值对应于可检测信号的第二值,则表明样品含有微生物。可以检测与靶序列(信号(2))杂交的探针序列和与任何靶标(信号(1))结合的对照序列之间的显著差异。在杂交过程的所有阶段(加热、静止和冷却)中,可检测信号(2)的值高于对照信号(1)的值,其中可以在冷却阶段(Δ3)结束时观察到最显著的差异,使得在此期间测量和分析可检测信号(2)提供最可靠的结果。可替代地或可选地,可以设置其他阶段(Δ1和/或Δ2)中的附加测量点以增强结果的可靠性。



1. 用于检测样品中至少一种特定微生物的方法,其中至少一种探针核酸序列能够与所述微生物的至少一种靶核酸序列杂交,所述探针核酸序列包含至少一种能够发射至少一种可检测信号的可检测标记,其中当探针序列未与靶序列结合时,可检测信号取第一值,当探针序列与靶序列结合时,可检测信号取第二值,其中与可检测信号的第一值相比,可检测信号的第二值减小、增加或改变,所述方法包括:

a) 提供怀疑为包含微生物的样品;
b) 穿孔或裂解样品内的微生物;
c) 在允许探针序列与靶序列体外杂交的条件下将探针核酸序列添加到样品中;
d) 在一个或多个时间点测量样品中探针核酸序列的可检测信号的至少一个值;以及
e) 分析探针核酸序列的可检测信号的测量值,其中如果测量值对应于可检测信号的第二值,则表明样品含有微生物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述条件,其允许探针序列与靶序列的体外杂交,包括将样品的温度至少暂时升高至高于室温的预定温度。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,步骤d)中样品中的可检测信号的值的测量,和步骤e)中测量值的分析都可以连续完成,其中一旦步骤e)中的分析表明样品含有微生物,就可以停止测量。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,至少步骤d)和e)自动进行,并且测量值以电子方式读出并以数字方式处理。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在步骤c)之后,在预定的时间段内将温度保持恒定。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,在温度保持恒定的同时测量样品中可检测信号的至少一个值。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在步骤c)之后,冷却样品。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,在冷却期间和/或冷却之后测量样品中可检测信号的至少一个值。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中,探针核酸序列是线性核酸或分子导标。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中,靶核酸序列是DNA序列或RNA序列,特别是rRNA序列。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中,在步骤c)中额外地将至少一种第一对照核酸序列添加至样品,在步骤d)中测量第一对照核酸序列的可检测信号的至少一个值,以及其中步骤e)中的分析包括探针核酸序列的可检测信号的测量值与第一对照核酸序列的可检测信号的测量值的比较,其中如果针对探针核酸序列测量的值不同于针对第一对照核酸序列测量的值,并且所比较的值之间的差异超过预定阈值,则表明样品含有微生物。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,第一对照核酸序列是不与任何核酸序列结合的序列。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中,在步骤c)中向样品中另外添加至少一种与所有微生物的核酸序列结合的第二对照核酸序列。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中,可检测标记是发光标记,特别是荧

光标记,或其中可检测标记是报告酶,优选地选自由酪氨酸酶、过氧化物酶、亚硫酸盐氧化酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、鸟嘌呤氧化酶组成的组。

15. 用于检测样品中至少一种特定微生物的组合物,所述组合物包括:

- a) 至少一种穿孔或裂解试剂,用于穿孔或裂解微生物;
- b) 至少一种探针核酸序列,其能够与所述微生物的至少一种靶核酸序列杂交,所述探针核酸序列包括至少一种能够发射至少一种可检测信号的可检测标记,其中当探针序列未与靶序列结合时,可检测信号取第一值,当探针序列与靶序列结合时,可检测信号取第二值,其中可检测信号的第二值与可检测信号的第一值相比降低、增加或改变;以及
- c) 至少一种缓冲液和/或增强剂物质,用于调节允许探针序列与靶序列进行体外杂交的条件。

用于检测样品中微生物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测样品中至少一种特定微生物的方法,其中至少一种探针核酸序列能够与所述微生物的至少一种靶核酸序列杂交,所述探针核酸序列包含至少一种能够发射至少一种可检测信号的可检测标记,其中当探针序列未与靶序列结合时,可检测信号取第一值,当探针序列与靶序列结合时,可检测信号取第二值,其中与可检测信号的第一值相比,可检测信号的第二值减小、增加或改变。本发明进一步涉及用于检测样品中至少一种特定微生物的组合物和试剂盒。

背景技术

[0002] 快速和可靠地检测生物样品(例如血液、痰和其他分泌物)中的微生物(例如病原体细菌)仍然是人类健康护理中的问题,特别是在医院中。然而,在护理时快速诊断传染病是非常重要的,以便快速启动或适用抗生素治疗并从而改善患者护理。由于住院时间较短,对危重传染病的快速诊断也有助于大幅节省成本。

[0003] 例如,社区获得性肺炎(CAP)仍然是全世界发病率和死亡率的主要原因。肺炎链球菌、肺炎支原体、甲型流感病毒(InfA)、呼吸道合胞病毒(RSV)和腺病毒(AdV)等被认为是CAP的重要原因。尽管努力寻找细菌和病毒病原体作为CAP患者的病原因子的证据,但在高达50%的患者中病因仍然难以捉摸,影响了有效治疗。在国家 and 卫生保健机构之间观察到致病病原体的差异,但用于鉴定致病因子的方法的差异也导致不同数量的患病率。缺乏鉴定病原体的敏感方法增加了问题。

[0004] 在医院获得性肺炎中,非常需要一种即时诊断设备(POC),因为没有经典鉴定方法的良好替代品。金标准是培养,它没有显示出非常好的灵敏度并且是耗时的。希望获得患者实际情况的准确、最新详情,特别是在重症监护病房。已知引起细菌的问题可以相当快速地变换,必须基于患者的当前情况做出治疗决定。

[0005] 基于自动化PCR的诊断工具,如Unyvero®(Curetis AG,霍尔茨格尔林根,德国)或FilmArray®系统(Biofire Diagnostics,盐湖城,美国)需要高额资本投资,成本非常高,仅限于所需的样品材料(例如:仅拭子),因此不太可能用于常规诊断。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种用于检测样品中的特定微生物的快速且低成本的方法,其允许直接从多种样品材料(例如血液培养物或痰液)中非侵入性地检测微生物,而无需扩增或培养。

[0007] 该目的通过最初指定的方法实现,包括:

[0008] a) 提供怀疑包含微生物的样品;

[0009] b) 穿孔或裂解样品内的微生物;

[0010] c) 在允许探针序列与靶序列体外杂交的条件下将探针核酸序列添加到样品中;

[0011] d) 在一个或多个时间点测量样品中探针核酸序列的可检测信号的至少一个值;以

及e)分析探针核酸序列的可检测信号的测量值,其中如果测量值对应于可检测信号的

[0012] 第二值,则表明样品含有微生物。

[0013] 根据本发明的方法提供了一种有利的解决方案,其可以直接在例如呼吸道样品的样品中(即,限定体积的水溶液或悬浮液)非侵入性地检测和鉴定特定微生物,而无需扩增或培养。例如,使用荧光标记的探针,根据本发明的方法不仅可以在一个简单的多重测试中区分和鉴定多个细菌菌株,而且还可以通过使用充当阳性对照的通用探针排除细菌感染。整个测试过程仅需约15分钟即可完成,分析灵敏度非常高(检出限约为 10^4 - 10^6 cfu/ml,cfu为菌落形成单位)。根据本发明的方法简单且成本有效,并且不需要高技能化人员。此外,根据本发明的方法可以开辟对多种(例如,多达20种)不同细菌菌株的细菌负荷进行半定量化的可能性(至少在检出限的较高端),从而允许在护理时监测患者。

[0014] 在本发明的示例性和有利的实施例中,所述条件,其允许探针序列与靶序列的体外杂交,包括将样品的温度至少暂时升高至高于室温的预定温度。例如,步骤c)中的体外杂交可以在约30°C至约65°C之间的温度下进行,特别是在约35°C至约59°C之间。特别地,温度可以是约52°C。

[0015] 如本文所用,“加热”或“将样品的温度升高至高于室温的温度”是指其中将热能转移至样品以使其温度从约20-25°C(室温或环境温度)升高至30°C以上的温度的过程。这种过程可以例如使用能够将热量传递到包括样品的容器的加热装置(例如,散热器组)来实现。

[0016] 步骤c)中体外杂交的温育时间可以是约1至约30分钟,特别是至多15分钟或至多10分钟,特别是约15分钟或约10分钟。优选的温育时间为约2-约6分钟。更优选地温育约4分钟。

[0017] 步骤d)中样品中的可检测信号的值的测量和步骤e)中测量值的分析都可以连续完成,其中一旦步骤e)中的分析表明样品含有微生物,就可以停止测量。例如,可以在分析的信号产生反应过程中的某些时刻或在分析的反应结束时指示微生物的检测。在任何情况下,如本文所用的连续测量是指沿着分析的信号产生反应的过程在多个测量点处实时确定可检测标记的值。

[0018] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,至少步骤d)和e)自动进行,并且测量值以电子方式读出并以数字方式处理。例如,根据本发明的方法适合于通过自动读取器系统实现,例如ESEQuant Tube Scanner(Qiagen,希尔登,德国)或AXXIN T 16-ISO荧光检测系统(AXXIN,费尔菲尔德,澳大利亚)。因此,根据本发明的方法非常适合于自动化并且可以在没有高技能化人员的情况下执行。自动化使诊断方法不仅容易而且速度非常快。例如,在制备样品之后,其可以包括用裂解缓冲液液化和/或稀释样品并且仅花费约1分钟,可以在仅15分钟内完成从自动读取器系统读出结果。因此,可以在护理时非常快速地进行特定微生物的检测和鉴定,从而可以在感染的早期阶段开始对患者的有效治疗。

[0019] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,在步骤c)之后在预定的一段时间(温育期)内将温度保持恒定,以确定尽可能多的探针核酸序列准备与靶核酸序列杂交。为了确保分析的准确性和可靠性,可以在温度保持恒定的同时测量样品中可检测信号的至少一个值。

[0020] 如本文所用,“保持温度恒定”是指控制样品温度,使得其温度在一定时间内不会

变化超过约1°C或2°C的过程

[0021] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,在步骤c)之后,冷却样品。可以在冷却期间和/或冷却之后测量样品中可检测信号的至少一个值。通过在冷却期间或之后测量信号来增加分析的准确性和可靠性,因为至少在使用分子导标探针时,在较低温度下,从未结合的探针发射的信号被消除或至少降低。

[0022] 如本文所用,“冷却”是指从样品中抽出热能以使其温度从高于30°C的温度降低至较低温度,特别是约20-25°C的过程。例如,可以使用能够从包括样品的容器中抽出热量的冷却装置(例如,散热器组)来实现这种过程。

[0023] 基本上,在整个过程中的任何时间点测量可检测信号的一个值应该足以获得可靠的结果。然而,测量样品中可检测信号的至少一个附加值可以进一步增强该方法的可靠性和准确性。而且,该实施例使得可以在分析的信号产生反应完全完成之前停止测量。

[0024] 例如,探针核酸序列可以是线性核酸或分子导标。探针核酸序列尤其可以是能够在体外条件下与微生物中的靶核酸序列特异性杂交的寡核苷酸。本领域技术人员知道探针核酸序列与靶序列选择性杂交的合适条件。寡核苷酸可具有至多50个核苷酸的长度,例如10至50个核苷酸。寡核苷酸可以是线性寡核苷酸。可替代地,寡核苷酸可以是分子导标,例如在W02008/043543 A2中描述的,其公开内容通过引用并入本文中。分子导标杂交的合适条件也在W0 2008/043543 A2中示例性地描述。

[0025] 如本文所用,分子导标可以是能够与靶核酸序列形成杂交体并且如果不与靶序列形成杂交体则能够形成茎-环结构的核酸,所述核酸可以包括:

[0026] -包括与靶核酸序列互补的序列(a1)的核酸部分,和能够形成茎和位于序列(a1)侧翼

[0027] 的一对两个互补序列(a2),以及

[0028] -效应物和抑制剂,其中当核酸形成茎-环结构时,抑制剂抑制效应物,并且当核酸不形

[0029] 成茎-环结构时,效应物是有活性的。

[0030] 分子导标也可以称为“导标”、“发夹”或“发夹环”,其中包括“打开”形式(没有形成茎)以及“闭合”形式(导标形成茎)。打开形式包括不与靶序列形成杂交体的导标和与靶序列形成杂交体的导标。分子导标的细节在W0 2008/043543 A2中公开。

[0031] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,靶核酸序列是DNA序列或RNA序列,特别是rRNA序列。例如,通过根据本发明的方法,可以通过探针序列与rRNA的杂交来可靠地检测到约 10^4 - 10^6 cfu/ml,至少 10^6 - 10^8 cfu/ml,而无需事先扩增。

[0032] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,在步骤c)中额外地将至少一种第一对照核酸序列添加至样品,在步骤d)中测量第一对照核酸序列的可检测信号的至少一个值,并且步骤e)中的分析包括探针核酸序列的可检测信号的测量值与第一对照核酸序列的可检测信号的测量值的比较,其中如果针对探针核酸序列测量的值不同于针对第一对照核酸序列测量的值,并且所比较的值之间的差异超过预定阈值,则表明样品含有微生物。第一对照序列是不互补的核酸序列,因此不能与微生物的任何潜在核酸靶序列结合。使用与微生物的任何靶序列结合的第一对照核酸序列作为分析信号值的参考,进一步提高了根据本发明的方法的准确性和可靠性。

[0033] 第一对照核酸序列可以是,例如,不与任何核酸序列结合的序列。这种无义序列代表用于验证测试结果的合适的阴性对照,即不预期该对照序列的信号。

[0034] 此外,可以在步骤c)中向样品中另外添加至少一种与所有微生物的核酸序列结合的第二对照核酸序列。这种通用序列表示用于验证测试结果的合适的阳性对照,利用其可以预期已知信号。这种阳性对照也可用于排除患者被微生物感染。

[0035] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,在步骤a)之后和/或在步骤b)期间将样品液化和/或稀释。如果样品是粘性呼吸样品(例如痰),则重要的是液化并甚至稀释样品以使其适合于杂交步骤c)。例如,1.0:0.5和1.0:5.0之间的稀释比,特别是1:1或1:2,可适用于全血样品或痰样品。在一个示例性实施例中,通过以1:1的比例添加特定的水性缓冲溶液来液化样品。

[0036] 在根据本发明的方法的步骤b)中,可以例如通过酶促、机械、超声和/或化学处理对微生物进行穿孔或裂解,以获得可重复且可靠的结果。为此,酶促裂解通常是最有效的选择,即使酶通常不会损害后续的杂交过程。然而,特别重要的是细胞足够穿孔以使探针可以进入细胞进行杂交反应,或者裂解细胞并释放rRNA。

[0037] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,可检测标记是发光标记,特别是荧光标记。例如,根据本发明的方法可以基于众所周知的荧光原位杂交(FISH)技术。为此,探针核酸序列可以与合适的荧光团偶联,例如非蛋白质有机化合物,例如ATTO(ATTO-TEC GmbH,锡根,德国),FAMTM(荧光素)或HEXTM。每个多重测试可以例如在8场或12场条带或8或12腔室盒上进行,其中第一场/腔室是阳性对照。当然,也可以使用96孔或384孔板或任何其他合适的形式来实现根据本发明的方法。在大多数情况下,这是足够的,因为样品材料是已知的,因此临床相关细菌的数量是有限的。可以设计所有测试用于检测至少90%的相关细菌。

[0038] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,可检测标记是报告酶,优选地选自由酪氨酸酶、过氧化物酶、亚硫酸盐氧化酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、鸟嘌呤氧化酶组成的组。

[0039] 在本发明的另一个示例性和有利的实施例中,样品是选自由全血、血液培养物、液体、痰和其他分泌物、人和/或兽医临床样品和工业样品如食物、饮料和水组成的组中的至少一种样品。因此,根据本发明的方法可用于若干应用,例如医院和实验室中的大多数危重传染病的诊断、工业生产中的食品和饮料的测试、水测试或兽医测试。

[0040] 通过用于检测样品中的至少一种特定微生物的组合物进一步实现该目的,所述组合物包含:

[0041] a) 至少一种穿孔或裂解试剂,用于穿孔或裂解微生物;

[0042] b) 至少一种探针核酸序列,其能够与所述微生物的至少一种靶核酸序列杂交,所述探针

[0043] 核酸序列包含至少一种能够发射至少一种可检测信号的可检测标记,其中当探针序列未

[0044] 与靶序列结合时,可检测信号取第一值,当探针序列与靶序列结合时,可检测信号取第

[0045] 二值,其中可检测信号的第二值与可检测信号的第一值相比降低、增加或改变;以

及

[0046] c) 至少一种缓冲液和/或增强剂物质,用于调节允许探针序列与靶序列进行体外杂交的条件。

[0047]

[0048] 通过该组合物,提供了一体化的即用型解决方案,其使得所述组合物的用户能够在没有特定技能和大强度训练的情况下执行快速且容易的诊断测试。使用所述组合物可以容易地实现根据本发明的方法,所述组合物也非常适合于自动化过程。特别地,穿孔或裂解试剂应包括能够(完全)裂解或至少穿孔样品中的微生物的组分,例如裂解酶,例如溶菌酶。可以使用常见的杂交缓冲液,其可以包含例如合适的缓冲物质,例如 NaH_2PO_4 、甲酰胺、表面活性剂,例如十二烷基硫酸钠(SDS)和/或至少一种盐,例如 NaCl 。为了快速分析,探针核酸序列应该与合适的标记偶联,例如可以容易地检测到的荧光基团。

[0049] 可选地,根据本发明的组合物可另外包含对照核酸序列,其与可检测标记偶联,该可检测标记可容易地与探针序列的标记区分开。

[0050] 在根据本发明的组合物中,探针核酸序列可以是线性核酸或分子导标。探针核酸序列尤其可以是能够在体外条件下与微生物中的靶核酸序列特异性杂交的寡核苷酸。寡核苷酸可以是线性寡核苷酸或分子导标,例如WO 2008/043543 A2中描述的那种。例如,与寡核苷酸偶联的可检测标记是发光标记,特别是荧光标记。探针核酸序列可以与合适的荧光团偶联,例如非蛋白质有机化合物,例如ATTO(ATTO-TEC GmbH, 锡根, 德国), FAM^{TM} (荧光素)或 HEX^{TM} 。

[0051] 根据本发明的组合物中的裂解试剂可以是确保(完全)裂解或至少穿孔细胞的酶,并且不损害探针序列与靶序列的杂交。

[0052] 本发明包括用于实施如上所述的根据本发明的方法的试剂盒,其中所述试剂盒包含如上所述的根据本发明的组合物。

[0053] 本发明进一步包括用于检测在根据本发明的方法的样品中至少一种特定微生物的试剂盒的用途。

[0054] 参考附图进一步详细描述本发明。

附图说明

[0055] 图1示出了使用荧光显微镜使用1000倍放大率拍摄的样品读数,特别是来自板、阳性血液培养瓶(BCB)和直接来自呼吸道样品的读数。将样品与用荧光团标记的分子导标一起温育。

[0056] A-来自培养物的肺炎克雷伯菌,

[0057] B-来自阳性血液培养瓶(BCB)的大肠杆菌,以及

[0058] C-来自痰的肺炎链球菌。

[0059] 图2示出了(1)不具有和(2)具有靶标的探针序列动力学的图示(荧光信号强度[mV]随时间(t)[min])。在方案的前4分钟内,将管加热至 52°C ,然后温育5分钟并再次冷却至室温。在整个过程中,测量荧光。称为 $\Delta 1$ - $\Delta 3$ 的灰色区域表示潜在的测量点。

[0060] 图3示出了具有和不具有靶标的探针序列动力学的图示(荧光信号强度[mV]随时间(t)[min],标记为 FAM) ;

[0061] ➤管1和4(下图):不具有靶标(管1)或具有“假靶标”(管4:金黄色葡萄球菌)的特异于大肠杆菌(5pmol)的探针序列;

[0062] ➤管2(上图):具有靶标(大肠杆菌)的探针序列(大肠杆菌,5pmol),靶标量高(15pmol); ➤管3(中图):具有靶标(大肠杆菌)的探针序列(大肠杆菌,5pmol),靶标量低(7pmol)。

[0063] 图4示出了具有和不具有靶标的探针序列动力学的图示(荧光信号强度[mV]随时间(t)[min],标记为FAM);

[0064] ➤管3和5(下图):没有靶标的探针序列;

[0065] ➤管4和6(上图):具有靶标的探针序列。

[0066] 图5示出了没有靶标但具有不同标记(HEX而不是FAM)的探针序列动力学的图示,荧光信号强度[mV]随时间(t)[min];管11和12;

[0067] 图6示出了探针(导标)RNA杂交动力学的图示,荧光信号强度[mV]随循环次数[每个循环=30秒]。

[0068] 图7示出了大肠杆菌导标浓度测定的图示,荧光信号强度[mV]随循环次数[每个循环=30秒]。

具体实施方式

[0069] 根据本发明的方法可以基于例如众所周知的荧光原位杂交(FISH)技术,该技术通过例如消除易出错的洗涤步骤或将杂交时间急剧缩短至不到10分钟而改进。除了其他因素之外,通过使用分子导标和新开发的方法来设计所用的探针序列(如WO 2008/043543 A2中所述),实现了这些改进。

[0070] 图1中示出了用荧光显微镜使用1000倍放大率拍摄的样品读数。染色的细菌显示出高而稳健的强信噪比,无论材料是否取自培养物(图1A)、阳性血液培养瓶(图1B)或直接取自呼吸道分泌物(图1C)。即使在呼吸道样本的情况下,信号的强度和清晰度也允许自动读出。

[0071] 例如,Qiagen的ESEQuant管式扫描仪可以用作根据本发明的方法的自动化的工具。该设备是一种易于使用的小型荧光测量系统,其非常灵敏,稳健且经济有效。但是,如果需要,存在替代品。在第一示例性方法中,ESEQuant TS2系统用于执行根据本发明的方法。各实验的条件示于表1和2中。

[0072] 在第一步骤中,监测导标本身的打开和关闭,并且由于导标处于其闭合构造而不发出信号,因此预期在室温下的低强度。加热后,导标打开,猝灭剂和荧光团分离并发出光。冷却后,导标返回其闭合构造,这可以通过减少的荧光信号看出。应注意,对于这些实验,将管式扫描仪的灵敏度设定为最小值,并使用标准导标浓度。扫描仪灵敏度和导标浓度的增加也应该增加后续应用的信号强度。还显示探针特异性靶标的存在与不存在之间存在明显差异:在存在特定靶标的情况下,信号保持在较高水平。在没有任何靶标存在的情况下,信号返回到基线。

[0073] 图2(信号(1),没有靶标的探针)显示,在没有靶分子的情况下,导标在加热阶段打开并发出荧光信号。在静止阶段期间,导标处于打开和闭合构造的平衡状态,“寻找”它们的靶标。荧光信号在此阶段保持恒定。冷却后,导标恢复其原始的闭合构造,荧光信号停止。图

2(信号(2),具有靶标的探针)进一步显示,在加热阶段,探针在靶分子存在下快速打开($\Delta 1$)。在静止阶段期间,平衡发生偏移。也就是说,大量探针与靶序列结合,而其余探针仍处于50%平衡($\Delta 2$)。冷却后,与靶分子结合的探针保持打开并仍然发光($\Delta 3$)。

[0074] 图2显示与靶序列(信号(2))杂交的探针序列与不与任何靶标(信号(1))结合的对照序列之间存在明显且稳健的差异。在整个杂交过程期间的任何时间,即在所有阶段(加热、静止和冷却)期间,可检测信号(2)的值高于对照信号(1)的值。然而,在冷却阶段($\Delta 3$)结束时可以观察到最显著的差异,因此在此期间测量和分析可检测信号(2)提供了最可靠的结果。可选地,可以设置其他阶段($\Delta 1$ 和/或 $\Delta 2$)中的附加测量点,以便验证结果并提供关于最终结论的更多确定性和可靠性。用于确定微生物是否存在的阈值可以是探针信号的特定值(例如,荧光强度)或探针序列与合适的对照序列的信号之间的预定差异。在任何情况下,根据本发明的方法允许快速和可靠地检测样品中的微生物。

[0075] 图3(表1)再次显示了没有靶标的导标探针在加热期间打开并且在冷却期间闭合(管1和4)。靶序列的添加使探针序列保持打开(管2和3),其中与具有较低靶浓度的样品(管3)相比,更多靶标(更高的靶浓度)增加了可检测信号(管2)。

[0076] 图4(表2)显示,包含靶序列的样本的可检测信号以平滑曲线延伸(管3和5),而包含靶序列的样本(管4和6)中可以观察到具有更高强度的清晰可检测信号。

[0077] 图5(表2)显示用不同荧光团(HEX而不是FAM)标记的探针序列也是清楚地可检测的(管11和12)。

[0078] 进一步的测试证实可以检测几种微生物的荧光信号。表3显示了分离自三种不同的微生物的RNA的量,这是建立探针与RNA分子结合所必需的。图6中描绘了ATTO标记的导标探针与分离的RNA的结合的示例性动力学。对于金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌也可以检测到荧光信号的显著变化。因此,使用根据本发明的方法和组合物,可以以快速且可靠的方式检测几种不同微生物的RNA。

[0079] 图7显示了优化的探针浓度的示例性确定。对于所有ATTO和FAM标记的探针,确定了在展开后提供清晰但不太高信号的浓度。浓度为 $1\text{pmol}/\mu\text{L}$ (ATTO)和 $5\text{pmol}/\mu\text{L}$ (FAM)结果提供最具可比性的信号。表4表示以这种方式确定的最适合的探针浓度的总结,其可用于检测特定微生物的可比较的荧光信号变化(使用ATTO和/或FAM)。

[0080] 结果,实验结果表明,可以检测到特定的荧光信号,可以区分病原体/探针特异性信号,可以快速可靠地检测出几种不同的微生物,可以实时监测探针的打开和闭合,并且信噪比足以进行自动分析。

[0081] 表1:运行2(52°C -5分钟, 30°C -2分钟)

[0082]

管	探针 (μl)	靶标 (μl)	辅助	RNA (10 μl)
1	大肠杆菌 5pmol	/	/	/
2	大肠杆菌 5pmol	大肠杆菌 15pmol	/	/
3	大肠杆菌 5pmol	大肠杆菌 7pmol	/	/
4	大肠杆菌 5 pmol	/	/	50 ng
5	大肠杆菌 5pmol	/	/	200 ng
6	金黄色葡萄球菌 5pmol	/	/	/
7	金黄色葡萄球菌 5pmol	金黄色葡萄球菌 10pmol	/	/
8	金黄色葡萄球菌 5 pmol	金黄色葡萄球菌 5 pmol	/	/
9	屎肠球菌 5pmol	/	/	/
10	屎肠球菌 5pmol	屎肠球菌 30pmol	/	/
11	屎肠球菌 5pmol	屎肠球菌 15pmol	/	/

[0083] 表2: 运行3 (52°C-5分钟, 30°C-2分钟)

[0084]

管	探针 (μl)	靶标 (μl)	辅助	RNA (10 μl)
1	大肠杆菌5pmol	/	/	/
2	大肠杆菌5pmol	大肠杆菌15pmol	/	/
3	屎肠球菌5pmol	/	/	/
4	屎肠球菌5pmol	屎肠球菌15pmol	/	/
5	屎肠球菌5pmol	/	是	/
6	屎肠球菌5pmol	屎肠球菌15pmol	是	/
7	屎肠球菌ATTO	/	是	/
8	屎肠球菌ATTO	/	是	/

9	尿肠球菌ATTO	尿肠球菌15pmol	是	/
10	尿肠球菌ATTO	尿肠球菌15pmol	是	/
11	阳性对照Hex	/	是	/
12	阳性对照Hex	/	是	/

[0085] 表3:

微生物	导标浓度 (pmol/ μ L)	RNA 量 (μ g)	导标类型
大肠杆菌	1	7,5	ATTO
	2	11	FAM
鲍氏不动杆菌	2	$\geq 2,5$	ATTO
	2	10	FAM
肺炎克雷伯菌	2	≥ 5	ATTO

[0087] 表4:

微生物	导标浓度 (pmol/ μ L)	
	ATTO	FAM
阳性对照	5	-/-
阴性对照	-/-	15
葡萄球菌属	2	-/-
链球菌属	2	10
金黄色葡萄球菌	2	5
肺炎链球菌	5	15
尿肠球菌	2	10
粪肠球菌	5	15
肠杆菌科	5	10
铜绿假单胞菌	5	15
大肠杆菌	1	5
奇异变形菌	5	15
肺炎克雷伯菌	2	10
不动杆菌属	5	10

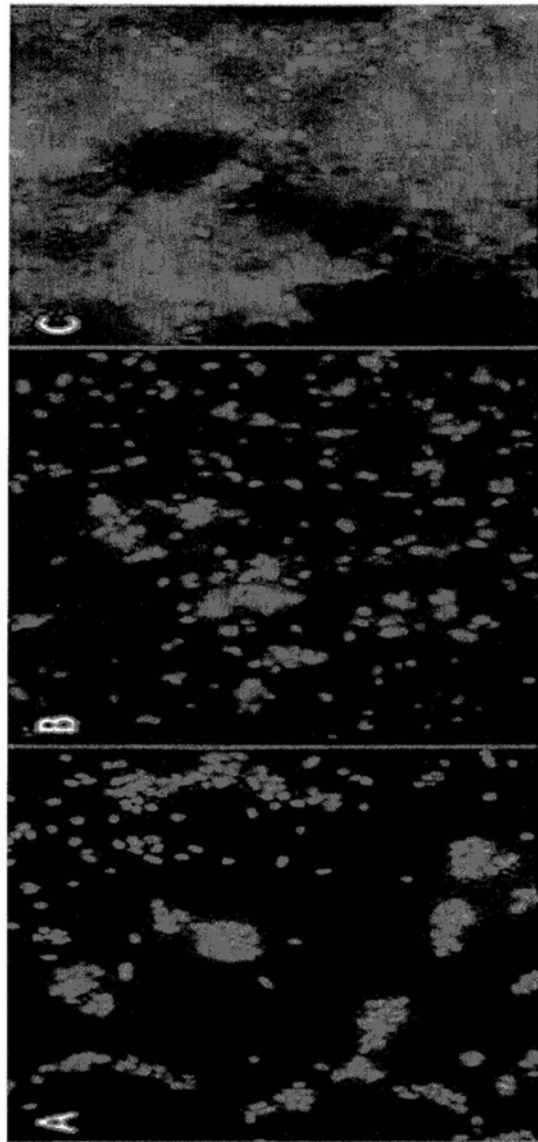


图1

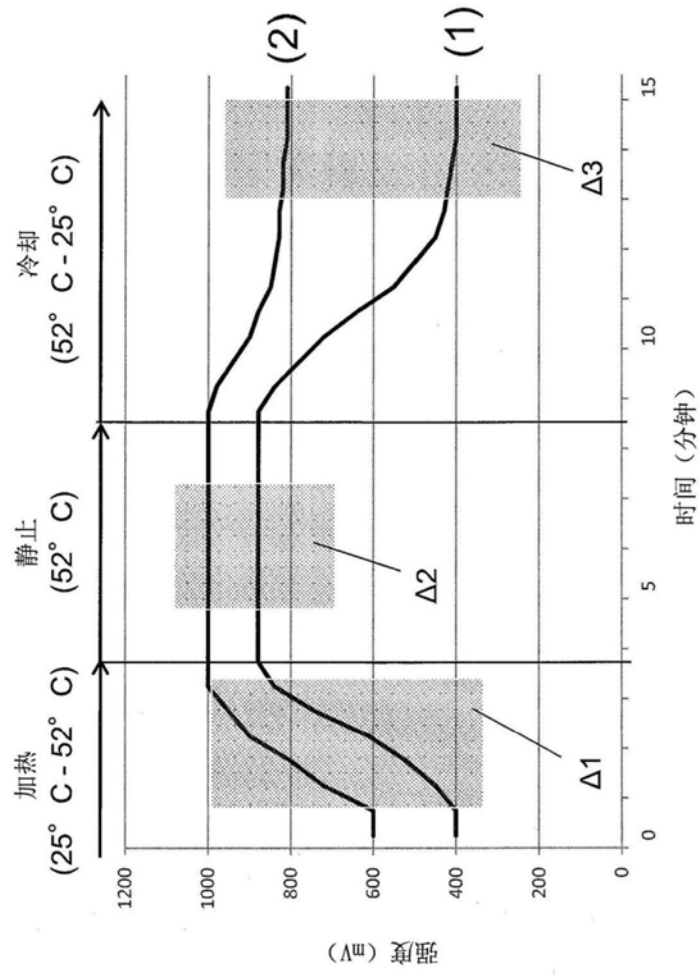


图2

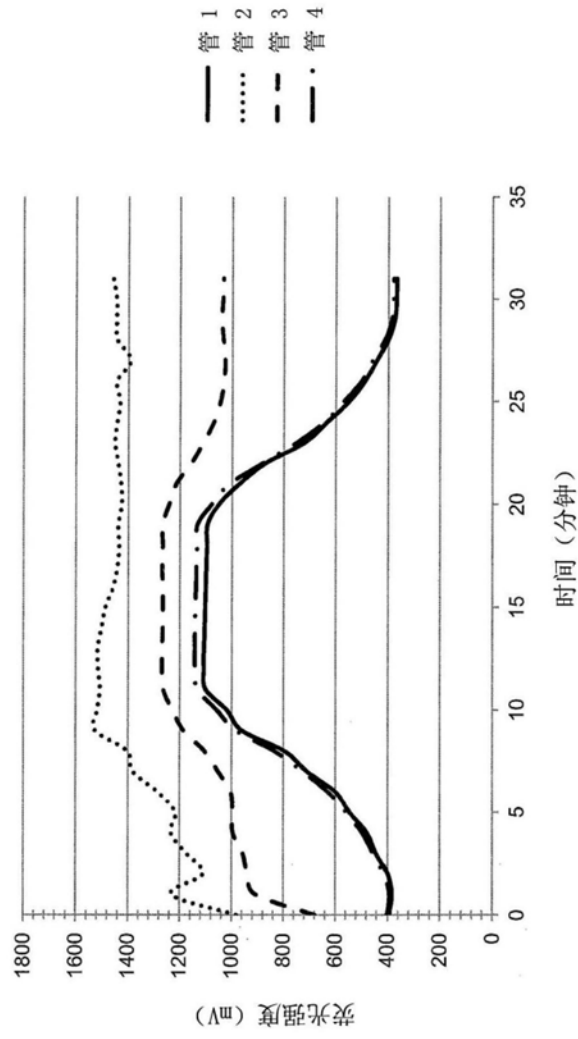


图3

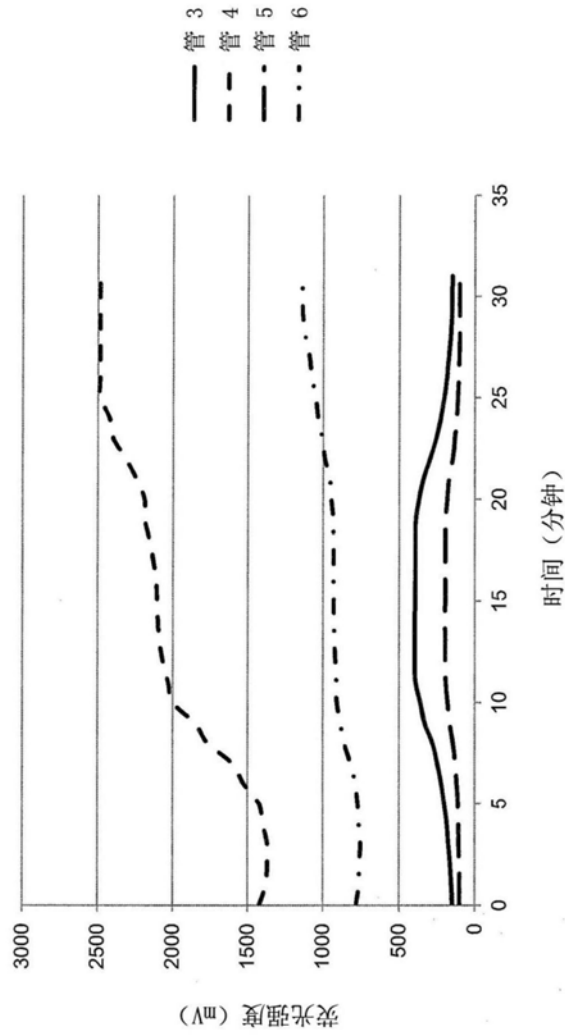


图4

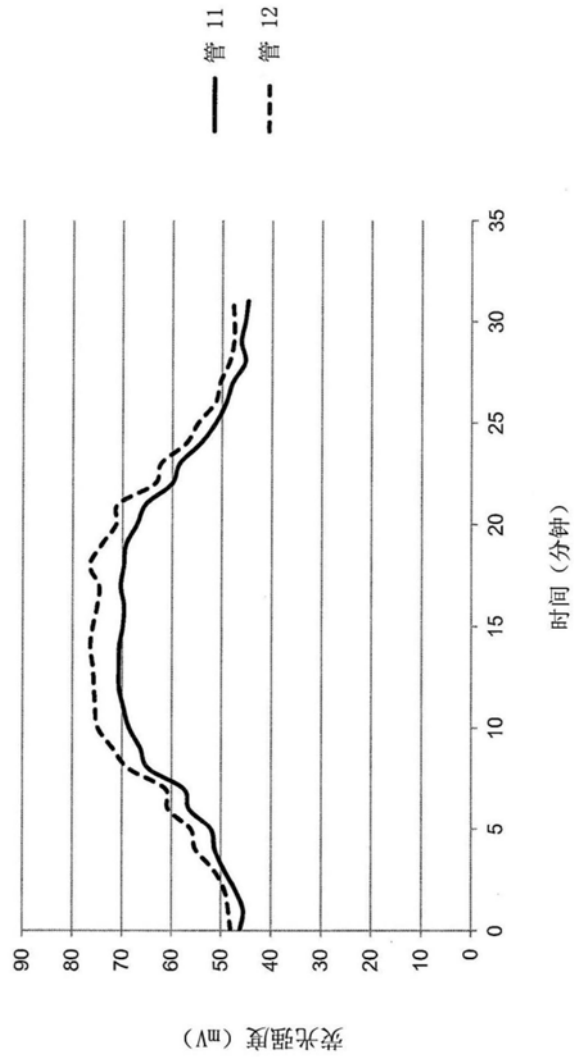


图5

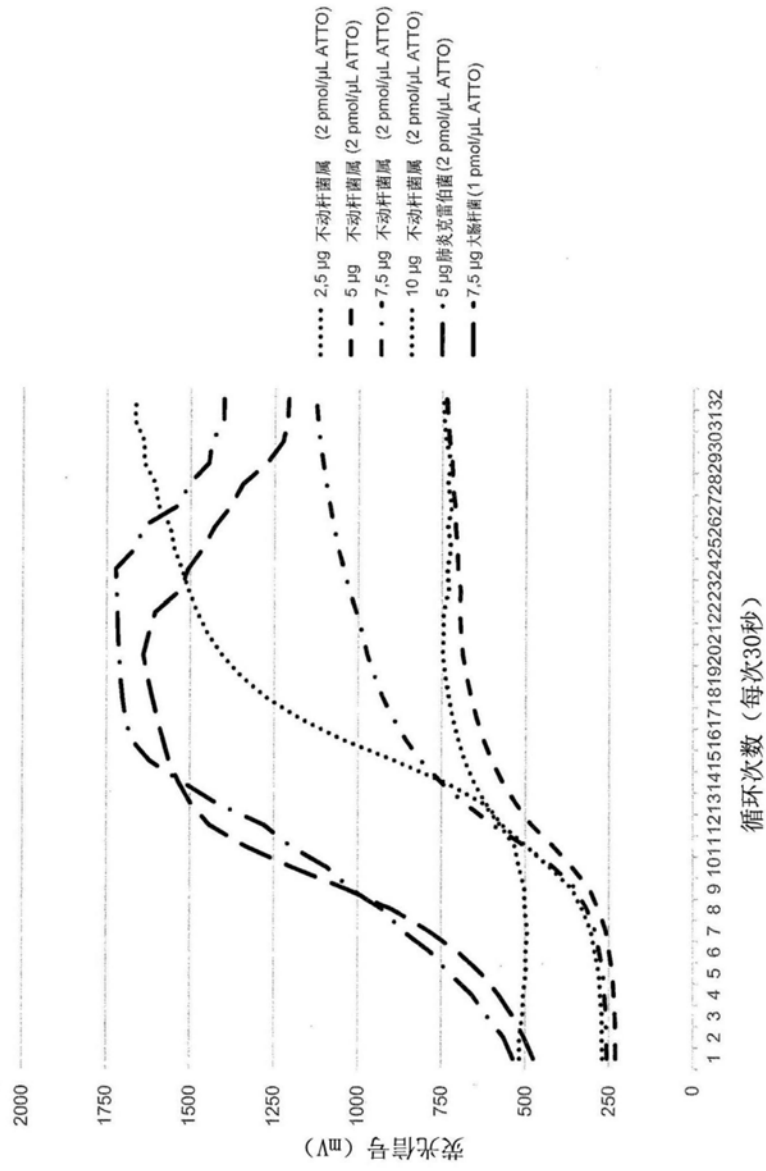


图6

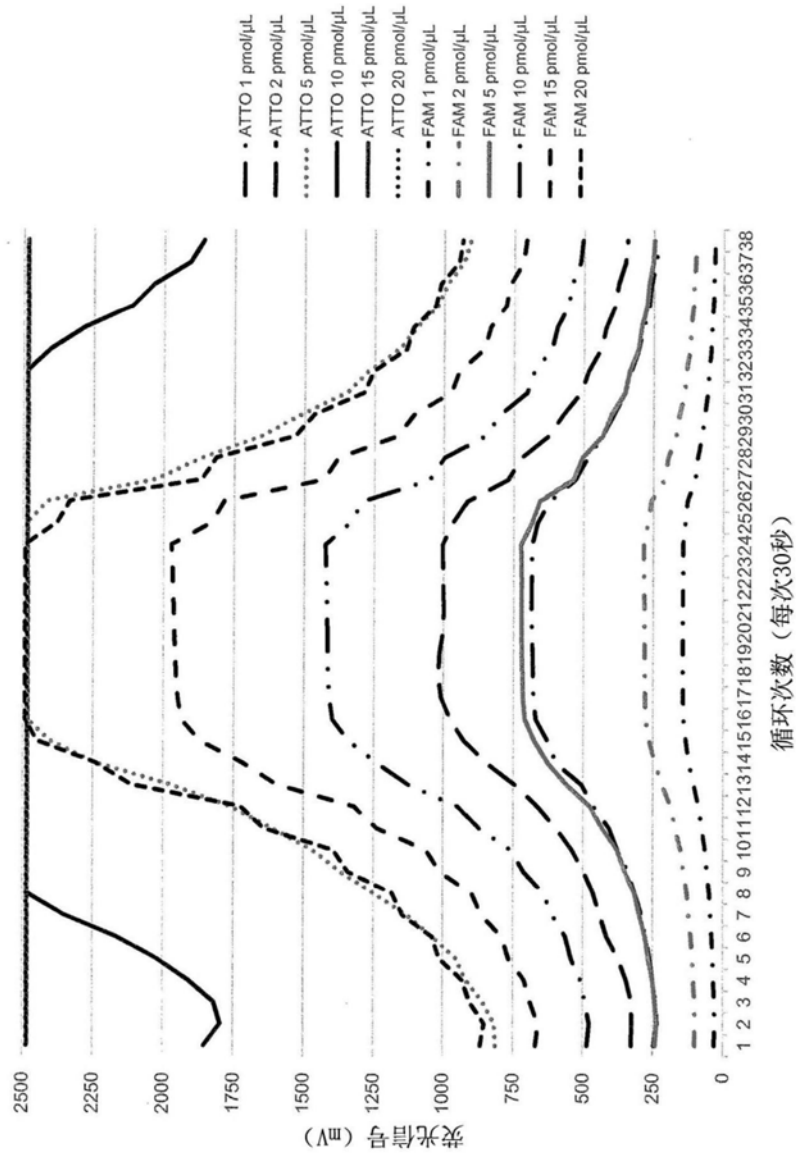


图7