



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849019 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 200880104327. 6

(22) 申请日 2008. 07. 09

(30) 优先权数据

0713255. 8 2007. 07. 09 GB

0713972. 8 2007. 07. 18 GB

0719785. 8 2007. 10. 10 GB

0802857. 3 2008. 02. 15 GB

0807054. 2 2008. 04. 17 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 02. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/002354 2008. 07. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02009/007719 EN 2009. 01. 15

(71) 申请人 微敏医疗技术有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 克里斯托弗·约翰·斯坦利

斯图尔特·威尔逊

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/25(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

C12Q 1/18(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

C12N 9/52(2006. 01)

A61K 38/48(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 28 页 序列表 4 页

附图 3 页

(54) 发明名称

基于其 NAD 依赖性 DNA 连接酶活性来检测微生物

(57) 摘要

NAD 依赖性连接酶被鉴定可作为样品中微生物的指示物。检测样品中表达 NAD 依赖性连接酶之微生物存在的方法,其包括以下步骤:(a) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;(b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品;以及(c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的存在。所述方法有多种应用,还提供了用于实施所述方法的试剂盒。基本不含核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂通过加热含有核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂而获得,其在降低核酸酶和/或连接酶的活性而基本不影响溶葡萄球菌素之内肽酶活性的条件下进行。

步骤1: 选择性裂解金黄色葡萄球菌细胞
并连接DNA底物: 30分钟(室温)

步骤2: 去除未被连接的DNA底物
(使用选择性特异性核酸酶): 30分钟, 37℃

步骤3: 使核酸酶失活: 5分钟, 95℃

步骤4: 加至PCR混合物并进行扩增(Taq-Man): 60分钟

1. 检测样品中表达 NAD 依赖性连接酶之微生物存在的方法,其包括:
 - (a) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;
 - (b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及
 - (c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对所述底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的存在。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中以大大超过样品中可能存在的 NAD 依赖性连接酶的摩尔数使用作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的所述核酸分子。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中作为 NAD 依赖性连接酶活性之底物的所述核酸分子与表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的基因组核酸缺乏核苷酸序列同一性,以确保检测经连接核酸分子的特异性。
4. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述表达 NAD 依赖性连接酶的微生物是细菌。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述细菌是真细菌。
6. 前述权利要求任一项所述的方法,其中适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件包括向所述样品提供额外的 NAD。
7. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其依赖于内源性 NAD⁺ 来支持 NAD 依赖性连接酶活性。
8. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述样品中的 ATP 依赖性连接酶活性被抑制。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中 ATP 依赖性连接酶活性通过从样品中消耗 ATP 来抑制。
10. 前述权利要求任一项所述的方法,其还包括选择性裂解样品中表达 NAD 依赖性连接酶的微生物,以释放 NAD 依赖性连接酶。
11. 前述权利要求任一项所述的方法,其还包括从所述样品中捕获 NAD 依赖性连接酶。
12. 权利要求 11 所述的方法,其中使用经固定的核酸分子从所述样品中捕获 NAD 依赖性连接酶。
13. 权利要求 12 所述的方法,其中所述经固定的核酸分子是作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子。
14. 前述权利要求任一项所述的方法,其中作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的所述核酸分子包括带有缺口的双链核酸分子。
15. 权利要求 1 至 13 中任一项所述的方法,其中所述作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子包括可连接在一起的两种核酸分子。
16. 前述权利要求任一项所述的方法,作为预备步骤,其包括从起始样品中特异性捕获表达 NAD 依赖性连接酶的微生物以得到测试样品,其中只有表达 NAD 依赖性连接酶的特异性目的微生物存在。
17. 前述权利要求任一项所述的方法,其包括从所选的表达 NAD 依赖性连接酶的目的微生物中特异性捕获 NAD 依赖性连接酶。
18. 前述权利要求任一项所述的方法,其用来检测血小板样品的污染。
19. 前述权利要求任一项所述的方法,其中使用核酸扩增技术来测定经连接核酸分子的存在。

20. NAD 依赖性连接酶活性作为样品中存在表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的指示物的用途。

21. 权利要求 20 所述的用途,其中所述表达 NAD 依赖性连接酶的微生物是细菌。

22. 筛选细菌细胞或其它表达 NAD 依赖性连接酶的微生物针对所述细胞、细菌或其它微生物之试剂的抗性的方法,该方法包括以下步骤:在样品中,

(a) 使细菌细胞或微生物暴露于所述试剂;

(b) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

(c) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及

(d) 特异性检测是否存在由 NAD 依赖性连接酶针对所述底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子,其中如果存在抗性,则会检测到或者会以较高水平检测到经连接的核酸分子。

23. 筛选能够杀死或阻止一种或多种细菌细胞或其它表达 NAD 依赖性连接酶之微生物生长的试剂的方法,该方法包括以下步骤:在样品中,

(a) 使细菌细胞或微生物暴露于所述试剂;

(b) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

(c) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及

(d) 特异性检测由 NAD 依赖性连接酶针对所述底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子是否存在,其中如果所述试剂能够杀死或阻止细菌或微生物生长,则不会检测到或者会以较低水平检测到新的核酸分子。

24. 诊断对象中感染或与存在细菌细胞或表达 NAD 依赖性连接酶之其它微生物有关疾病的方法,其包括以下步骤:在得自所述对象的样品中,

(a) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

(b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及

(c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对所述底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,用以表明作为感染或疾病之指示的细菌或其它微生物的存在。

25. 检测含有血小板的样品中细菌污染之存在的方法,其包括:

(a) 将血小板样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

(b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及

(c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对所述底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示所述含有血小板的样品中细菌污染的存在。

26. 权利要求 22 至 25 中任一项所述的方法,其包括权利要求 1 至 19 中任一项所述的方法。

27. 测定样品中目的细菌之存在的方法,所述目的细菌对特定抗菌剂具有抗性,该方法包括:

(a) 使用特异性捕获试剂捕获目的细菌;

(b) 在包含所述特定抗菌剂的孵育介质中孵育如上捕获的目的细菌;

(c) 将经孵育的目的细菌暴露于能够导致细菌裂解或增加细菌细胞壁通透性至一定程度以使目的细菌细胞内物质之存在可被测定的试剂;以及

(d) 测定来自目的细菌之细胞内物质的存在。

28. 权利要求 27 所述的方法,其中测定来自目的细菌之细胞内物质的存在包括实施权利要求 1 至 19 中任一项所述的方法。

29. 测定样品中目的细菌之存在的方法,所述目的细菌对特定抗菌剂具有抗性,该方法包括:

- (a) 在包含特定抗菌剂的孵育介质中孵育目的细菌;
- (b) 使用特异性捕获试剂捕获经孵育的目的细菌;
- (c) 将经孵育的目的细菌暴露于能够导致细菌裂解或增加细菌细胞壁通透性至一定程度以使来自细菌之 NAD 依赖性连接酶的存在可被测定的试剂;以及
- (d) 测定样品中(抗性)目的细菌的存在,其通过以下来实现:
 - (i) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;
 - (ii) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;以及
 - (iii) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示(表达 NAD 依赖性连接酶的)目的细菌的存在。

30. 权利要求 29 所述的方法,其中步骤 (d) 包括实施权利要求 2 至 19 中任一项所述的方法。

31. 权利要求 1 至 30 中任一项所述的方法,其中在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育所述样品之后,进行处理步骤以除去残余的未连接核酸分子。

32. 用于实施权利要求 1 至 31 中任一项所述方法的试剂盒,其包含:

(a) 至少一种作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子,其中所述至少一种核酸分子被固定在固体支持物上或者与用于将所述底物核酸分子固定在所述固体支持物上的工具一起提供,和

(b) 用于特异性检测由样品中 NAD 依赖性连接酶活性(针对所述底物核酸分子)产生的经连接核酸分子的引物。

33. 用于实施权利要求 27 至 31 中任一项所述方法的试剂盒,其包含:

- (a) 特异性捕获试剂,其用以捕获对特定抗菌剂具有抗性的目的细菌,
- (b) 目的细菌的孵育介质,其任选地包含目的细菌对其具有抗性的所述特定抗菌剂,
- (c) 能够导致目的细菌细胞裂解或增加细菌细胞壁通透性至一定程度以使目的细菌中 NAD 依赖性连接酶的存在可被测定的合适试剂,和
- (d) 至少一种作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子。

34. 用于产生基本不含核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂的方法,其包括在特定条件下加热含有核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂,在所述条件下核酸酶和/或连接酶活性降低,而溶葡萄球菌素的内肽酶活性基本不受影响。

35. 基本不含核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂。

36. 根据权利要求 34 所述方法产生的溶葡萄球菌素制剂。

基于其 NAD 依赖性 DNA 连接酶活性来检测微生物

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测领域,特别是细菌检测。本发明的方法高度灵敏且具有许多应用。所述方法和试剂盒依赖于一种新的细菌生存力指示物。

背景技术

[0002] 测量与细胞生存力相关的特定分子的存在及水平在许多情形下都是重要的。例如,测量哺乳动物细胞中 ATP 的水平可用于生长分析和毒理学目的。

[0003] 培养方法可用于检测少量的细菌,但是这种技术需要几天时间才能完成,尤其是当试图检测少量细菌时以及当检测生长缓慢的微生物时更是如此。

[0004] 作为替代,测试可基于测量分子的存在来进行,所述分子可与样品中污染细胞或生物体的存在相关。最常检测的分子是三磷酸腺苷 (ATP)。也有人提议检测 DNA 和 RNA,但是鉴于细胞死亡后核酸的可变存在形式, DNA 和 RNA 的存在与生存力之间的关联性还不明晰 (Keer & Birch, Journal of Microbiological Methods 53(2003)175-183)。还有人提议检测腺苷酸激酶作为生存力指示物 (Squirrell DJ, Murphy MJ, Leslie RL, Green JCD : A comparison of ATP and adenylate kinase as bacterial cell markers : correlation with agar plate counts. In Bioluminescence and chemiluminescence progress and current applications. Stanley RA, Kricka LJ. John Wiley and Sons, 2002 以及 WO 96/02665)

[0005] 常规使用的测定 ATP 水平的方法包括使用生物发光。该方法使用 ATP 依赖性的反应,其中发光萤光素酶催化萤光素氧化。该方法可用于测量相对低浓度的 ATP。可用于利用生物发光来检测 ATP 的试剂盒在 Roche, New Horizons Diagnostics Corp, Celsis 等有售。

[0006] 在生物发光检测方面存在许多问题。例如,在存在非微生物来源之 ATP 时仅检测微生物来源的 ATP 可能会出现。通过使用可将细菌与非细菌来源的 ATP 分离的滤器,这个问题已在一定程度上得到解决,因此提供了更精确的信号。

[0007] 此外,样品中的化学制剂和 / 或金属可干扰生物发光反应。特别是在例如用清洁剂清理表面后测量表面污染的情形中。化学清洁剂干扰萤光素酶催化的反应,并因此在某些情形中导致假阴性结果,即,存在微生物或其它污染的 ATP,但生物发光反应无效。

[0008] 连接酶是催化核酸分子连接的酶。取决于连接酶,连接反应需要 ATP 或 NAD⁺ 作为辅因子。

发明内容

[0009] 本发明鉴定了连接酶 (特别是 NAD 依赖性连接酶) 作为 (活的) 微生物存在的有用指示物。

[0010] 因此,本发明提供了使用 NAD 依赖性连接酶活性作为样品中 (活的) 微生物存在的指示物。NAD 依赖性连接酶活性与生存力之间的联系是本发明的核心所

在 (Korycka-Machala 等 人, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007 年 8 月, 2888-2897 页), 这是因为它允许将这种酶的活性用作样品中活的微生物细胞 (特别是细菌来源的细胞) 的指示物。

[0011] 类似地, 本发明提供了检测 NAD 依赖性连接酶作为样品中微生物存在之指示物的方法, 其包括:

[0012] (a) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触,

[0013] (b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品;

[0014] (c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在 (和 / 或量), 以指示微生物的存在。

[0015] 因此, 本发明的方法可用于鉴定所有表达 NAD 依赖性连接酶的微生物。因此, 该方法可设计为检测样品中表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的方法。在某些实施方案中, 本发明的方法用于检测活的微生物, 因而可视为是检测样品中活微生物的方法。特别地, 所述方法可用于鉴定 NAD 依赖性连接酶基因对其存活力是必需的细菌或微生物。然而, 微生物例如不久前使之丧失生存力的细菌 (例如通过本文所述的抗细菌处理来实现) 可保留可检测的 NAD 依赖性连接酶活性, 直至该酶被降解。因此, 需酌情考虑到, 微生物可包括不久前活着的微生物, 直至 NAD 依赖性连接酶被降解时。如果需要区分活的微生物与不久前活着的微生物, 在适当条件下进行简单的时程实验 (time course) 或者对两个或更多时间点之间 NAD 依赖性连接酶活性进行比较就应该足以确定 NAD 依赖性连接酶活性是否随时间增加、保持不变、或降低。如果 NAD 依赖性连接酶活性在一段延长的时间内或在之后的时间点处 (与初始测量相比) 保持不变或增加, 则可指示微生物是活的。如果 NAD 依赖性连接酶活性在之后的时间点降低, 则可指示所检测的活性来自不久前活着的微生物。本文中详细描述了检测方法。在一些具体实施方案中, 所述微生物为细菌。所有 (真) 细菌据信都含有至少一个编码 NAD 依赖性 (DNA) 连接酶的基因。在一个更具体的实施方案中, 所述细菌为真细菌。但是, NAD 依赖性连接酶也在嗜热和抗寒细菌中发现, 因此, 本发明的方法可更普遍地应用 (Wilkinson 等人, Molecular Microbiology (2001) 40 (6), 1241-1248)。因此, 例如所述细菌可以是嗜中温细菌和 / 或嗜热细菌。

[0016] 本发明中的“样品”被定义为包括适于测试表达 NAD 依赖性连接酶之微生物 (特别是细菌) 存在的任何样品。因此, 例如, 所述样品可包含临床样品或体外测定系统, 或者基本由其组成或由其组成。样品可包含以下产品或者基本由其组成或由其组成: 饮料或食物样品或者其制备物, 或者药物产品或化妆品 (例如个人护理产品, 包括洗发水、护发素、保湿霜等), 上述所有产品均需要进行常规的微生物污染测试。例如, 所述样品可包含组织或细胞或者基本由其组成或由其组成, 并且可包含痰或血液样品或血小板样品或者基本由其组成或由其组成。此外, 本发明的方法和试剂盒可用于监测表面污染, 例如制备食物的区域。存在 NAD 依赖性连接酶活性指示存在污染。污染可来自任何微生物来源, 特别是细菌污染。此外, 本发明也可用于监测环境状况, 例如水源、废水、海洋环境等。本发明还可用于监测发酵过程中和空气采样中 (可评估医院、工业设施中或生物防护应用中的细菌或孢子含量) 的细菌生长。

[0017] “NAD 依赖性连接酶”是指活性依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 辅因子的 DNA 连接酶。NAD 依赖性连接酶有别于 ATP 依赖性连接酶, 后者的活性依赖于 ATP 辅因子。NAD

依赖性连接酶的活性是在核酸分子的 5' 端和核酸分子的 3' 端之间形成磷酸二酯键。

[0018] 本发明的方法依赖于样品中是否存在一种或多种存在 NAD 依赖性连接酶的（活的）微生物（特别是细菌）。因而，在适当的条件下，这种酶可催化连接反应以产生新的可检测的核酸分子（在随后的步骤中）。所述新的核酸分子可通过任意合适的方法进行检测，从而确定被测样品中是否存在微生物。

[0019] 因此，如果样品中不存在微生物，则样品中不会有 NAD 依赖性连接酶活性，从而不会产生所述新的可检测的核酸分子。

[0020] 本发明的方法提供了显著的技术优势，这大多归因于该方法中产生了新的核酸分子。在本发明的方法中，未反应的核酸分子不会产生信号，从而在实施本方法时不会产生假阳性信号。

[0021] 此外，所述方法高度灵敏，其提供了对样品中低至飞克（femtogram）可能甚至阿克（attogram）水平的 NAD 依赖性连接酶进行检测的方法。其灵敏度源于每个细菌细胞都含有数以千计的酶分子，因此每个酶分子可在合适的条件下催化多个连接事件。每个细菌细胞必须产生连接酶活性来修复持续发生的基因组损伤，而这一必需活性使其可用作指示活的微生物细胞存在的标志物。因此，与 PCR 方法不同的是，PCR 方法必须靶向每个细胞中基因的一个或几个拷贝，或使用另外的步骤或试剂来检测核糖体 RNA 或信使 RNA，而本文所述的方法以一种简单的测定方式靶向检测每个细胞中 NAD 依赖性连接酶的多个拷贝。与其它方法相比其灵敏度增强的原因还在于，连接酶的每个拷贝都能够修饰多个（成百或上千）底物核酸分子，这些核酸分子随后被检测。

[0022] 与 ATP 检测技术相比，另外的优势在于 ATP 在细菌、真菌和哺乳动物细胞中普遍存在，有必要区分人类和细菌的 ATP，例如，当进行细菌检测或生存力测试时。通过靶向细菌特异性酶——NAD 依赖性连接酶，对检测细菌具有特异性。与需要 NAD⁺ 作为辅因子的细菌连接酶不同，哺乳动物和真菌的连接酶需要 ATP。由于本测定中可提供 NAD⁺（特别是摩尔数大大过量时），因此可避免哺乳动物连接酶和真菌连接酶的干扰。

[0023] 如本文所述，所述方法的第一步包括将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触，或者基本由其组成或由其组成。本发明的方法中可使用一经连接便可被特异性检测的任何合适的可连接分子。

[0024] 为了避免质疑，在此声明，经连接的核酸分子通常是新的可检测核酸分子，其具有不同于最初（底物）核酸分子的整体结构。因此，所述新的可检测核酸分子可包含额外的核苷酸，从而使新的核酸分子可被唯一地鉴定，例如使用经连接的核酸分子作为模板、利用只能结合以及产生扩增产物的引物、通过扩增来实现。但是，与（最初）底物核酸分子相比，可能只有一条链被延长，例如，所述连接酶可在双链底物分子的一条链上封闭缺口。

[0025] 本发明方法中使用的底物核酸分子和本发明试剂盒中的内容物的序列和结构必须使得 NAD 依赖性连接酶可作用于该分子以产生可检测的经连接（新的）核酸分子。

[0026] 可用于本发明的合适的底物核酸分子列于 SEQ ID No 1 至 4、7 和 8 中，并在下文实验部分中有详细描述。值得注意的是，这些序列的变体均可用于本发明。例如，可添加额外的侧翼序列。变体序列可与 SEQ ID No 1 至 4、7 和 8 中所示的底物核酸分子的核苷酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的核苷酸序列同一性。所述核酸分子可酌情掺入合成的核苷酸

类似物,或者例如可以是以 RNA 或 PNA 为基础的,或它们的混合物。在某些实施方案中,为了便于检测,所述核酸分子可被标记,例如使用荧光标记或 FRET 对。本文中描述了合适的检测方法。

[0027] 本文中定义的“核酸”包括任何天然核酸以及能够被 NAD 依赖性连接酶连接以产生经连接的(新的可检测)核酸分子的天然或合成的类似物。连接反应可包括例如两种 DNA 分子的结合或者封闭核酸分子中的缺口以产生可检测的经连接核酸分子。合适的核酸分子可以由例如双链或单链 DNA 以及双链或单链 RNA 组成。本发明某些实施方案中也可考虑使用部分双链、部分单链的核酸分子。在某些实施方案中,底物核酸分子包括 dsDNA(包括有缺口的 dsDNA)或者基本由其组成或由其组成。术语“核酸”包括能够以类似于天然核酸的方式被样品中的 NAD 依赖性连接酶连接的合成类似物,例如掺入了非天然碱基或衍生碱基的核酸类似物,或具有经修饰骨架的核酸类似物。特别地,术语“双链 DNA”或“dsDNA”被解释为包括含有非天然碱基的 dsDNA。

[0028] 尽管核酸底物可包含平端双链 DNA 分子或者基本由其组成或由其组成,然而,在一个单独的实施方案中, NAD 依赖性连接酶的核酸底物包含两种在待结合的末端带有互补突出端和 5' 磷酸基团的双链 DNA 分子,或者基本由其组成或由其组成。在一个具体实施方案中,所述互补突出端为 2 ~ 10 个碱基对,例如 3 或 5 个碱基对。在一个替代实施方案中,核酸底物包含带有含 5' 磷酸之缺口的部分双链 DNA 分子。合成的核酸分子已有市售,并且可订购带有末端 5' 磷酸基团的核酸分子。这在技术上具有优势,因为用于本发明方法中的 100% 的核酸分子会被 5' 磷酸基团标记。此外,核酸底物可根据要求来设计,例如在需要时包含生物素分子以用于随后的连接后捕获,如本文所述地。

[0029] 因此,在本发明的一些实施方案中,被检测的新的核酸分子通过连接核酸分子的 3' 端和另一核酸分子的 5' 端而产生。在这些实施方案中,如果样品中存在连接酶,它将催化所述连接,并形成经连接的核酸分子(合并成整体上新的序列),其可被本文详述的随后步骤(例如核酸扩增步骤)检测到。

[0030] 因此,事实上,底物核酸分子可酌情包含两种或更多种核酸分子,或者基本由其组成或由其组成。这一般性地应用于本发明的方法和试剂盒中。

[0031] 在某些实施方案中,核酸底物包含两种带有单链互补突出端的双链核酸分子,或者基本由其组成或由其组成。

[0032] 可使用合适的封闭基团对不连接以形成随后被检测到之连接产物的核酸底物分子的 3' 端进行封闭,以确保它们不参与连接反应。可使用任何合适的封闭基团。

[0033] 在一些具体的实施方案中,作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子包含有缺口的双链核酸分子,或者基本由其组成或由其组成。在一些具体的实施方案中,整个底物可以由三种特异性单链 DNA(ssDNA) 分子构成。其中两种或更多种 ssDNA 分子可具有一致的序列。一种 ssDNA 分子可与另两种核酸分子杂交,以形成含有缺口的双链区域。如果样品中存在 NAD 依赖性连接酶活性的话,其可封闭缺口,从而产生可根据本文所述方法进行的双链 DNA 分子。此类安排的合适实例包括 SEQ ID No :7 和 8(两个拷贝)所示的核酸分子,如本文所述地。

[0034] 在另一具体实施方案中,作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子包含两种可连接在一起的核酸分子,或者基本由其组成或由其组成。

[0035] 优选地,与样品中的连接酶相比,所述核酸底物过量存在,特别是摩尔数大大过量。这是与现有技术方法的重要技术区别。因为只有样品中存在的新的经连接核酸分子对于检测方法有效进行来说是必需时,才检测到新的经连接核酸分子。因此,如果样品中存在其它核酸分子,对于本发明的方法也是无害的,例如来自待检测细菌的其它核酸分子或者在待测试样品中发现的来自哺乳动物或真菌来源的其它核酸分子。

[0036] 优选地,设计底物核酸分子使其与样品中待检测的一种或多种产生 NAD 依赖性连接酶的细菌或其它微生物的基因组不具有高水平的同源性。这意味着,即使存在污染的核酸分子,也只有新连接的核酸分子可以被检测到。因此,底物应该与待检测细菌的基因组 DNA 具有足够低水平的序列同一性,以防止基因组 DNA 的非特异性扩增产生假阳性结果。因此,可根据靶细菌来设计底物序列。特别地,设计特异性扩增新的经连接核酸分子的引物,使它们不针对细菌基因组 DNA 产生扩增产物。例如,底物和引物中可掺入可碱基配对的互补的非天然分子,从而使得特异性地扩增细菌基因组 DNA。例如,可酌情将 pyDAD 和 puADA 掺入引物和底物分子中 (Sismour 等人, *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 卷, No. 2 : 728-735)。

[0037] 优选地,与样品中待检测的一种或多种产生 NAD 依赖性连接酶的细菌或其它微生物的相应核苷酸序列具有低于约 5%、低于约 10%、低于约 12.5%、低于约 15%、低于约 20%、低于约 30%、低于约 40%、50%、60%、70% 或 80% 的序列同一性。在一个实施方案中,在一段约 10 个、20 个、30 个、40 个或 50 个相邻核苷酸中,与样品中待检测的一种或多种产生 NAD 依赖性连接酶的细菌或其它微生物的相应核苷酸序列不具有序列同一性。在另一实施方案中,在约 10 个、20 个、30 个、40 个或 50 个相邻核苷酸中,与样品中待检测的一种或多种产生 NAD 依赖性连接酶的细菌或其它微生物的相应核苷酸序列具有低于约 10% 或低于约 12.5%、15%、20%、30%、40%、50% 或 60% 的序列同一性。

[0038] 本发明方法的第二步包括在适于 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育样品,或者基本由其组成或由其组成。可使用任何合适的条件,本领域技术人员可容易地确定。例如,取决于所涉及连接酶,连接可在约 4~80℃ 之间的任意温度下进行 (例如,嗜热细菌可在比嗜中温细菌更高的温度下孵育的反应来检测)。优选的孵育温度为约 4~40℃,更优选为约 20~37℃,对于一般的 (活的) 细菌检测,最优选采用室温。合适的孵育时间可以约 10 分钟至 10 小时,例如约 30 分钟、1 小时或 2 小时至 5、6、7、8 或 9 小时。可以在合适的缓冲液中进行孵育。市售的连接酶缓冲液包括 NEB 提供的 *E. coli* 连接酶缓冲液。适合连接酶使用的孵育条件是本领域熟知的,并且在市售连接酶中有所推荐。

[0039] 在一些具体实施方案中,适于 NAD 依赖性连接酶活性的条件包括为样品提供额外的 NAD⁺。该方法中添加 NAD⁺ 的原理是它提供了 NAD 依赖性连接酶活性的最佳条件。因此,样品中 NAD 依赖性连接酶的活性比样品中其它任何酶的活性 (例如 ATP 依赖性连接酶的活性) 都更为有利。这特别涉及到当样品中可能含有另外的酶活性 (例如 ATP 依赖性连接酶活性) 时的情形,其可导致即使样品中不存在活的细菌仍产生经连接的核酸分子 (即假阳性结果)。因此,通过积极地促进样品中的 NAD 依赖性连接酶活性 (如果存在的话),就可能鉴定样品中活的微生物 (特别是细菌) 的存在,即使在存在潜在的竞争性酶活性时也是如此。如下文实验部分中所示,向样品中添加 NAD⁺ 提高了检测的灵敏度。

[0040] 在一些替代实施方案中,不向样品中添加额外的 NAD⁺。相应地,该方法依赖于内

源 NAD⁺ 来支持 NAD 依赖性连接酶活性。在不存在（活的）细菌细胞时，可能没有可检测的 NAD 依赖性连接酶活性。如果样品中存在细菌细胞，则内源 NAD⁺ 允许 NAD 依赖性连接酶作用于底物核酸分子，从而形成随后被检测到的经连接核酸分子。如本说明书实验部分所示，这样的方法可允许更大的信号区别度，这是因为非存活的细胞具有更低水平的 NAD⁺。

[0041] 取决于本发明方法使用的样品类型和特定应用；理想的是抑制样品中任何 ATP 依赖性连接酶活性。特别是，样品可能包含表达 ATP 依赖性连接酶的真核细胞和 / 或原核细胞。这种 ATP 依赖性连接酶能够作用于底物核酸分子以产生经连接的核酸分子，导致假阳性结果产生。因此，本发明的方法包括抑制样品中 ATP 依赖性连接酶活性的步骤。ATP 依赖性连接酶活性的抑制可通过任何适当的手段来实现。在一个实施方案中，ATP 依赖性连接酶活性通过减少样品中的 ATP（其辅因子）来抑制。这可通过消耗样品中的 ATP 来实现，例如在向样品中加入底物核酸之前使用酶（例如萤光素酶）来实现。ATP 依赖性连接酶活性可例如通过加入竞争性底物被直接抑制。合适的竞争性底物可包括 dATP 或者基本由其组成或由其组成（Wood WB 等人（1978）*J. Biol. Chem.* 253, 2437）。也可改变孵育条件来抑制 ATP 依赖性连接酶活性，而不会不利影响样品中 NAD 依赖性连接酶活性。例如，使用高浓度的单价阳离子（例如大于约 200mM）可允许选择性抑制 ATP 依赖性连接酶活性（Okazaki, R. 等人, (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 598 和 Edwards, JB 等人, (1991) *Nucl Acids Res.* 19, 5227）。

[0042] 在另一些实施方案中，本发明的方法包括在测定 NAD 依赖性连接酶活性之前捕获样品中的任何 ATP 依赖性连接酶。这是另一种防止 ATP 依赖性活性影响所得结果的方法。可通过任何合适的手段从样品中捕获 ATP 依赖性连接酶。例如，可使用特异性试剂或与 ATP 依赖性连接酶结合的捕获试剂来捕获 ATP 依赖性连接酶。这种结合可酌情选择性针对 ATP 依赖性连接酶和 / 或特定来源的 ATP 依赖性连接酶。在一个特定实施方案中，使用固定化核酸分子从样品中捕获 ATP 依赖性连接酶。替代性捕获试剂包括抗体（和本文所定义的其衍生物和变体）、凝集素、受体等。

[0043] 在一个实施方案中，用于捕获连接酶（视情况可为 ATP 依赖性连接酶或 NAD 依赖性连接酶）的试剂可固定在固体支持物上。可使用任何合适的固体支持物。只要连接酶可以有效地固定于固体支持物上（针对 NAD 依赖性连接酶时，不会不利影响酶活性），则固体支持物的性质对于本发明的效果来说不是关键的。固体支持物的非限制性实例包括任何珠子（例如聚苯乙烯珠及其衍生物和顺磁性珠）、亲和柱、微量滴定板等。如果需要，可使用生物素和链霉亲和素以有利于固定。固定方法是本领域熟知的，并在本文有所描述。

[0044] 在一些特定的实施方案中，本发明的方法还包括裂解样品中的微生物 / 细菌以释放 NAD 依赖性连接酶。裂解优选是选择性的，从而使非微生物（特别是非细菌细胞）保持完整。这有利于检测样品中的 NAD 依赖性连接酶活性。这一步骤优选在样品与核酸底物接触之前进行，但这不是必需的。选择性裂解细菌细胞的合适试剂是本领域已知的，包括细菌蛋白质提取试剂，例如 B-PER（Pierce）。其它条件可包括例如超声处理或 French Press（细胞破碎仪）处理。但是，裂解在本发明的所有具体实施方案中并不是必需的。特别地，在某些实施方案中，提高细菌细胞壁和 / 或膜的通透性可足以根据本发明的方法进行 NAD 依赖性连接酶活性的检测。提高通透性的合适的试剂和方法是本领域已知的。

[0045] 可用于本发明多种应用的另一种试剂是溶葡萄球菌素（AMBI）。溶葡萄球菌素是特

异性针对葡萄球菌细胞壁肽聚糖的内肽酶,并因此可用于特异性裂解葡萄球菌细胞。

[0046] 溶葡萄球菌素基因已被克隆并可进行重组生产。但是,发现市售的重组形式(商品名 AMBICIN® L) 含有许多对本发明来说很关键的杂质。特别地,市售的重组溶葡萄球菌素既包含核酸酶活性也包含连接酶活性。这对于依赖检测 NAD 依赖性连接酶对基于核酸之底物的活性的本发明之效果是不利的。

[0047] 为了克服市售溶葡萄球菌素的问题,本发明人想出一种方法,使制备物中连接酶和/或核酸酶活性失活,而保留溶葡萄球菌素的内肽酶活性。因此,本发明提供了溶葡萄球菌素制备物,其完全不含核酸酶和/或连接酶污染(并保持内肽酶活性)。本发明还提供了用于制备完全不含核酸酶和/或连接酶污染的溶葡萄球菌素制备物的方法,其包括在使核酸酶和/或连接酶活性被抑制和/或降低的条件下加热含有核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制备物,而使溶葡萄球菌素的活性基本不受影响。因此,本发明的另一方面提供了基本不含核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制备物,其通过以下方法制备:在使核酸酶和/或连接酶活性被抑制和/或降低的条件下加热含有核酸酶和/或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制备物,而使溶葡萄球菌素的活性基本不受影响。

[0048] 所述加热可达约 50 ~ 60℃ 的温度。在一些特定实施方案中,溶葡萄球菌素制备物被加热至约 55℃ 的温度,这是因为已显示该温度对于去除污染的连接酶和/或核酸酶活性同时保持溶葡萄球菌素的(内肽酶)活性特别有效。

[0049] 可使所述制备物加热合适的时间段。例如,所述制备物可加热 1 ~ 30 分钟,例如 5 ~ 20 分钟。当使用较低的加热温度时,较长的处理时间是理想的;反之亦然。一种特别合适的处理进行约 5 分钟。在一些具体实施方案中,这可以为约 55℃。

[0050] 在某些实施方案中,合适的连接酶缓冲液中可包含溶葡萄球菌素。这样的连接酶缓冲液对于本发明的方法是特别有用的,并可包含标准组分例如盐、去垢剂、蛋白质等。本文的实验部分中描述了一个特定的实施例,其包含 $MgCl_2$ 、DTT、BSA、 NAD^+ 和 Tris(pH8)。因此,本发明的一个方面提供了含有 NAD^+ 和溶葡萄球菌素(特别是本发明所述的溶葡萄球菌素)的缓冲液。向缓冲液中补充 NAD^+ 对于促进本文所述的 NAD 依赖性连接酶活性是有利的。

[0051] 在另一些实施方案中,本发明的方法包括捕获样品中的 NAD 依赖性连接酶。这提供了样品中 NAD 依赖性连接酶活性的浓缩,并且还可除去样品中可能发现的任何酶活性抑制剂(例如通过清洗)。可通过任何合适的方法从样品中捕获 NAD 依赖性连接酶。优选地,使用结合 NAD 依赖性连接酶的特异性试剂来捕获 NAD 依赖性连接酶。这种结合可酌情特异性针对 NAD 依赖性连接酶和/或特定来源的 NAD 依赖性连接酶。在一些具体实施方案中,使用固定化核酸分子从样品中捕获 NAD 依赖性连接酶。更具体地,所述固定化核酸分子可以是作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子。

[0052] 在另一些实施方案中,可使用固定于固体表面上的核酸底物从样品中捕获细菌连接酶。例如,在一种方法中,可将 DNA 底物固定在链霉亲和素上,这通过形成核酸底物的一条或多条 DNA 链 3' 端的生物素来实现。给定溶液中的任何细菌连接酶均可共价结合固定化 DNA 底物的 3' 羟基,并可被捕获用于随后的连接。这种实施方案的优势在于连接酶可从摩尔数大大过量的溶液中被捕获并浓缩,可增强检测的灵敏度。因此,本发明的方法可有利地用于鉴定或检测大体积和/或稀释样品中的细菌。此外,从细菌提取物中纯化连接酶,可

增强酶的活性。当底物核酸分子包含两种或更多种核酸分子时,可酌情固定每种分子。根据需要,每种分子可固定在同一个或分别的固体表面上。

[0053] 在另一些实施方案中,可使用例如可基于蛋白质和 / 或核酸的试剂来捕获 NAD 依赖性连接酶。所述试剂可以是抗体、凝集素、受体和 / 或基于核酸的分子。术语“抗体”包括保留抗原(NAD 依赖性连接酶)结合能力的所有衍生物和变体。可使用单克隆和多克隆抗体。还考虑使用衍生化的抗体,例如可以是人源化的非人抗体。衍生物包括但不限于重链抗体、单结构域抗体、纳米抗体、Fab 片段、scFv 等。

[0054] 由于 NAD 依赖性连接酶彼此之间具有高水平的同源性,而与 ATP 依赖性连接酶不相似(Wilkinson 等人, *Molecular Microbiology* (2001) 40 (6), 1241-1248),因此使用 NAD 依赖性连接酶特异性试剂来捕获 NAD 依赖性连接酶成为解决 ATP 依赖性连接酶活性问题(其可能存在于原始样品中)的有用方法。另外,由于高同源性水平所致,还可以使用可一般性捕获 NAD 依赖性连接酶的一般性试剂。这可以是如上文所述的任何种类的试剂,但优选基于核酸的试剂,例如经连接的底物或抗体及其衍生物。例如,抗体可特异性针对含有 NAD 依赖性连接酶氨基酸序列之保守基序的抗原而产生(例如参见图 2, Wilkinson 等人, *Molecular Microbiology* (2001) 40 (6), 1241-1248)。

[0055] 在另一些实施方案中,取决于本发明方法的应用,优选地可区分 NAD 依赖性连接酶的来源。根据这样的实施方案,使用具有足够高特异性的试剂来捕获目的 NAD 依赖性连接酶。可使用任何基于蛋白质或核酸的特异性试剂。实例包括凝集素、受体、抗体、DNA 和 RNA。例如,抗体可针对取自目的 NAD 依赖性连接酶之非保守区域的抗原而产生,尤其是因为许多连接酶的氨基酸序列在公开领域中(例如,参见图 2, Wilkinson 等人, *Molecular Microbiology* (2001) 40 (6), 1241-1248)。

[0056] 在一个实施方案中,可将用于捕获 NAD 依赖性连接酶的试剂固定在固体支持物上。可采用任何合适的固体支持物。只要 NAD 依赖性连接酶可以固定于固体支持物上而不会不利影响酶活性,则固体支持物的性质对于本发明的效果来说不是关键的。固体支持物的非限制性实例包括任何珠子(例如聚苯乙烯珠及其衍生物和顺磁性珠)、亲和柱、微量滴定板等。根据需要,可使用生物素和链霉亲和素以有利于固定。

[0057] 类似地,固定化学反应可由本领域人员常规完成。只要固定对本发明的方法没有不利影响(尤其是对于检测作为样品中存在活微生物之指示物的经连接核酸分子的特异性和灵敏度来说),则可采用任何固定方式。

[0058] NAD 依赖性连接酶一经捕获,可清洗被固定的酶以除去可影响随后检测步骤的抑制性物质。因此,在某些实施方案中,所述方法在检测新的(经连接)核酸分子之前还包括清洗步骤,或者基本由其组成或者由其组成。清洗可使用任何合适的缓冲液或洗涤液,可包括例如 EDTA 和 Tris-HCl 等组分。合适的洗涤液是本领域技术人员熟知的。

[0059] 在另一些实施方案中,本发明的方法作为预备步骤包括从起始样品中特异性捕获微生物(特别是细菌)以得到测试样品(其中只有特异性目的细菌存在)。在某些实施方案中,本发明提供了一种方法,其中样品首先被过滤以浓缩一种或多种细菌细胞或其它微生物(如上文所述)。更加特异性的检测某些细菌细胞或微生物需要特异性过滤,从而将这些细胞与其它产生(NAD 依赖性或 ATP 依赖性)连接酶的细胞分离。这样的滤器和过滤系统以及方法是本领域熟知的并有市售(例如来自 NewHorizons Diagnostics Inc.)。特异

性地捕获还可通过合适的试剂来实现。可使用任何可基于蛋白质或核酸的特异性试剂。实例包括凝集素、受体、抗体（及其衍生物）、DNA 和 RNA，如本文所述地，其经必要修正应用于此。

[0060] 本发明的方法可包括在检测之前进行（新的）经连接核酸分子的纯化。可使用本领域熟知的任何合适的纯化技术。例如，在检测之前，可分离核酸并在凝胶上进行电泳，并纯化预期大小的产物。由于经连接核酸分子也会被固定，因此本文所述的底物核酸分子固定也可促进经连接核酸分子的纯化。

[0061] 在某些实施方案中，在对经连接的核酸分子进行检测之前，从样品中选择性除去未经连接的底物分子，或者另外加以修饰（以防止检测到它们）。进行上述步骤可以防止未经连接的底物影响经连接核酸分子之检测的灵敏度和 / 或特异性。在一些具体实施方案中，这通过使用选择性核酸酶的处理步骤来实现。特别地，可使用一种或多种核酸外切酶来除去未经连接的底物分子。在一些具体实施方案中，使用 3'-5' 核酸外切酶（例如 ExoIII、ExoI 和 / 或 ExoT）来消化未经连接的底物分子。通过控制孵育条件，特别是孵育温度和时间，未经连接的底物可被消化，而经连接的核酸分子（结合两种或更多种连接底物）则保持完整从而可被检测到，尤其是处于本文所述的连接边界时。当经连接的核酸分子由至少三种底物核酸分子形成时（其一起形成包含缺口的、由样品中的 NAD 依赖性连接酶活性连接的双链区域），可有利地使用 dsDNA 特异性的 3'-5' 核酸外切酶（例如 ExoIII）以及一种或多种 ssDNA 特异性的 3'-5' 核酸外切酶（例如 ExoI 和 / 或 ExoT）。dsDNA 3'-5' 核酸外切酶可用于消化 dsDNA 部分以产生 ssDNA。如果缺口还未被 NAD 依赖性连接酶封闭，ssDNA 3'-5' 核酸外切酶可随后在连接位点处开始消化，从而除去可能影响检测反应的未经连接的底物。由于 ExoIII 在 3' 突出端不能有效地起始，因此它可以是特别有用的（参见 Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook 和 Russell (2001) (Cold Spring Harbour Laboratory Press)。通过适当的底物设计，例如使用本文所述的底物，例如包含 SEQ ID No 7 和 8 所示的核苷酸序列或者基本由其组成或由其组成的底物，可有效并特异性地除去未经连接的底物分子。

[0062] 核酸酶处理可进行合适的时间，例如在 10 分钟至 1 小时之间（特别是 30 分钟），并在合适的温度下进行，例如 20°C ~ 40°C（特别是在 37°C）。然后，可将核酸酶失活，以防止经连接的核酸分子被消化。可使用任何合适的条件。例如，可通过在高温下处理使核酸酶失活，例如高于 60°C 或者在 50°C 至 100°C 之间，特别是在 95°C。这可以在任何合适的时间段内进行，例如 2 ~ 10 分钟，特别是约 5 分钟。

[0063] 本发明的方法可包括适当的对照。这可与某些灵敏的检测技术例如核酸扩增技术（如本文所述）联用，以确保获得精确的结果。例如，对照可包括测试已知存在 NAD 依赖性连接酶活性的样品。如果向该样品中加入底物而未产生经连接的核酸分子，则很明显存在问题，例如方法中使用的试剂存在问题或者检测技术存在问题。合适的阴性对照可以是已知没有 NAD 依赖性连接酶活性的样品。与在测试样品中发现的相似水平的阳性结果 / 检测指示存在问题。也可使用未添加基于核酸之底物的对照，以确保所述方法不会检测不相关的连接反应。本发明中涵盖合适对照的所有排列组合。在本发明的一些具体实施方案中，使用用于核酸扩增反应的合适对照，如本文所述。

[0064] 在本发明的一些优选实施方案中，使用核酸扩增技术来检测新的核酸分子，其取

决于样品中 NAD 依赖性连接酶活性的存在而产生（作为样品中一种或多种（活的）微生物（特别是细菌）存在的指示物）。

[0065] 这使得本发明方法的灵敏度最大化。这样的扩增技术是本领域熟知的，包括例如 PCR、NASBA(Compton, 1991)、3SR(Fahy 等人, 1991)、滚环复制、转录介导的扩增 (TMA)、链置换扩增 (SDA)(Clinical Chemistry 45 :777-784, 1999)、US6261846 中所述的 DNA 寡聚物自组装方法（通过引用并入本文）、连接酶链式反应 (LCR)(Barringer 等人, 1990)、靶多核苷酸序列的选择性扩增 (US 6410276)、随机引物 PCR(WO 90/06995)、共有序列引物 PCR(US 4437975)、侵入者技术 (invader technology)、链置换技术和缺口置换扩增 (WO 2004/067726)。以上列表不旨在穷举。只要特异性扩增出合适的核酸产物，可使用任何核酸扩增技术。

[0066] 使用特异性针对待检测的新 / 经连接的核酸分子序列的扩增引物来实现扩增。为了提供针对核酸分子的特异性，可选择对应于所述序列适当区域的引物结合位点。本领域技术人员会理解，除了引物结合位点以外，核酸分子还可包含检测由样品中 NAD 依赖性连接酶活性产生的新的核酸分子必需的序列，例如 RNA 聚合酶结合位点或启动子序列可以是等温扩增技术（例如 NASBA、3SR 和 TMA）所需的。

[0067] 例如，一个或多个引物结合位点可跨越底物核酸分子的连接边界，从而使只有在发生连接时才产生扩增产物。作为替代，引物可结合连接边界的任意一侧并且跨越边界同向扩增，从而使只有经连接核酸分子形成时才产生（指数式）扩增产物。如上文所述，可设计引物和底物核酸分子以避免细菌基因组 DNA 的非特异性扩增。

[0068] 用于本发明方法中的合适引物分别表示为 SEQ ID No 5 和 6 或者 9 和 10，并在下文实验部分中更详细地描述。这些引物形成本发明的单独方面。应当注意，这些序列的变体可用于本发明中。特别地，可根据需要添加额外的序列特异性侧翼序列，例如用以提高结合特异性。变体序列与 SEQ ID No 5 和 6 或者 9 和 10 所示的引物核苷酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的核苷酸序列同一性。例如所述引物可酌情包含合成的核苷酸类似物或者可以是基于 RNA 或 PNA 的引物，或其混合物。取决于所采用的检测模式，所述引物可被标记，例如使用荧光标记和 / 或 FRET 对。

[0069] 可使用探针，同样其可以根据需要被标记。

[0070] 因此，在某些方面，本发明的方法采用核酸扩增技术来进行，从而检测新的核酸分子，所述新的核酸分子的产生是 NAD 依赖性连接酶活性作用于底物核酸分子的结果，这表明样品中存在细菌细胞或其它表达 NAD 依赖性连接酶的微生物。在某些实施方案中，所使用的方法选自 PCR、NASBA、3SR、TMA、SDA 和 DNA 寡聚物自组装。对扩增产物的检测可通过常规方法（例如凝胶电泳）来实现，然而优选使用实时或终点检测法来进行。

[0071] 许多用于实时或终点检测扩增反应产物的技术是本领域已知的。这些包括使用嵌入荧光染料例如 SYBR Green I (Sambrook 和 Russell, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第三版)，其允许基于所产生荧光的量来估计经扩增 DNA 的产量。许多实时检测方法产生可连续监测的荧光读数，具体实例包括分子信标和荧光共振能量转移探针。实时和终点技术是有利的，因为它们使反应在“单管”中进行。这意味着不需要下游分析以获得结果，可更快地获得结果。此外，使反应在“单管”环境中进行降低了交叉污染的风险，允许根

据本发明的方法获得定量结果。这对于本发明来说特别重要,因为涉及健康和安全是极其重要的(例如,检测血小板样品中可能的细菌污染)。

[0072] 可使用 TaqMan® 系统 (Applied Biosystems) 来实现 PCR 反应的实时和终点定量,参见 Holland 等人, Detection of specific polymerase chainreaction product by utilising the 5' -3' exonuclease activity of Thermusaquaticus DNA polymerase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,7276-7280(1991);Gelmini 等人, Quantitative polymerase chain reaction-basedhomogeneous assay with flurogenic probes to measure C-Erb-2 oncogeneamplification. Clin. Chem. 43,752-758(1997) 以及 Livak 等人, Towardsfully automated genome wide polymorphism screening. Nat. Genet. 9,341-342(1995) (通过引用并入本文)。这种类型的探针一般称为水解探针。还提供了用于实时或终点检测的合适的水解/Taqman 探针。它们可包含 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列,或者基本由其组成或由其组成。将所述探针进行适当标记,例如使用下文所详述的标记物。

[0073] 在分子信标系统中,参见 Tyagi 和 Kramer. Molecular beacons-probes that fuoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol. 14,303-308(1996) 和 Tyagi 等人, Multicolor molecular beacons for allelediscrimination. Nat. Biotechnol. 16, 49-53(1998) (通过引用并入本文),信标是具有内部猝灭荧光团的发夹形探针,其荧光在结合其靶标后会恢复。这些探针可称为发夹探针。

[0074] 本发明方法中可涵盖的另一种基于实时荧光的系统是 Zeneca'sScorpion system, 参见 Whitcombe 等人的 Detection of PCR productsusing self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotechnology 17,804-807(1999 年 8 月 1 日)。本领域技术人员熟知并且有市售的另一些实时或终点检测技术包括 Lightcycler® 技术、Amplifluour® 引物技术、DzyNA 引物 (Todd 等人, Clinical Chemistry 46:5, 625-630(2000)) 或 Plexor™ qPCR 和 qRT-PCR 系统。

[0075] 因此,在本发明的另一些方面,使用实时或终点技术来检测核酸扩增的产物。在本发明的一些具体实施方案中,实时技术包括使用以下任意一种:水解探针 (Taqman® system)、FRET 探针 (Lightcycler® system)、发夹引物 (Amplifluour® system)、发夹探针 (the Molecular beaconssystem)、并入发夹探针的引物 (the Scorpion® probe system)、并入脱氧核酶 (DNAzyme) 之互补序列和可切割荧光脱氧核酶底物 (DzYNA) 的引物、Plexor qPCR 和寡核苷酸封闭系统。

[0076] 在某些实施方案中,反应混合物包含以下所有这些:待测试样品、底物核酸分子、试剂、缓冲液和扩增新的(经连接)核酸分子所需的酶,任选地还有实时或终点检测扩增产物所需的试剂。因此,NAD 依赖性连接酶(来自一种或多种目的细菌细胞或微生物)的整个检测方法可在单个反应中进行,并得到定量结果,无需任何中间清洗步骤。使用“单管”反应是有利的,这是因为不需要下游分析来获得结果,可更快地获得结果。此外,使反应在“单管”环境中进行降低了交叉污染的风险,允许根据本发明的方法获得定量结果。同时,单管反应也更易于进行自动操作,例如在高通量背景下。

[0077] 作为替代,本发明的方法可以逐步方式完成。因此,在第一步中,首先有必要制备适合用于本发明方法中的样品。例如,如本文中所述,可能需要选择性细胞裂解或增加细胞通透性。如本文所述,捕获 NAD 依赖性连接酶也可以是优选的。ATP 依赖性连接酶活性可以

被抑制等。

[0078] 本发明的方法有多种应用。例如，它们可用于微生物对现有治疗具有抗性的重要领域。目前许多细菌对大量现有的抗微生物治疗具有抗性，并且某些菌株（例如甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌（MRSA））具有危险的健康风险，特别是在临床方面。

[0079] 为此，需要技术和测定试剂盒来容易地确定抗微生物剂的抗性。

[0080] 因此，根据另一方面，本发明提供了筛选细菌细胞或其它微生物对于针对该细胞、细菌或其它微生物之试剂的抗性的方法，该方法包括以下步骤或者基本由其组成或由其组成，在样品中：

[0081] (a) 使细菌细胞或微生物暴露于所述试剂；

[0082] (b) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触；

[0083] (c) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品；

[0084] (d) 特异性检测由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的（新的）经连接核酸分子的存在（和 / 或量），其中如果存在抗性，则会检测到（或者会以较高水平检测到）（新的）经连接核酸分子。

[0085] 还可使用同样的方法作为化合物筛选方法，以确定新的化合物、试剂或分子是否对特定的一种或多种表达 NAD 依赖性连接酶（作为必需酶）的靶细菌细胞或其它微生物具有作用。

[0086] 因此，在又一方面，本发明提供了筛选能够杀死或阻止一种或多种细菌细胞或其它有关微生物生长之试剂的方法，该方法包括以下步骤或者基本由其组成或由其组成，在样品中：

[0087] (a) 使细菌细胞或微生物暴露于所述试剂；

[0088] (b) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触；

[0089] (c) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品；

[0090] (d) 特异性检测由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的（新的）经连接核酸分子的存在（和 / 或量），其中如果所述试剂能够杀死或阻止细菌或微生物生长，则不会检测到（或者会以较低水平检测到）新的核酸分子。

[0091] 本发明的该方面还可用作化合物筛选中的快速生存力测试。因此，可根据所述方法来筛选化合物、试剂或分子，以确定其是否对有关细胞具有毒性。因此，该方法中检测新核酸分子的阳性结果表明化合物对细胞具有低毒性。本发明的方法还被证明具有诊断用途，由此当只有表达 NAD 依赖性连接酶的低水平感染细菌细胞或其它微生物存在时的早期阶段也可特异性且灵敏地检测到感染。

[0092] 因此，在另一方面，本发明提供了诊断对象中感染或与存在细菌细胞或其它微生物有关之疾病的方法，其包括以下步骤或者基本由其组成或由其组成，在得自对象的样品中：

[0093] (a) 使样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触；

[0094] (b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品；以及

[0095] (c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在（和 / 或量），用以表明作为感染或疾病之指示的（活的）细菌或其它微生物的存在。

[0096] 在这种情形下，“样品”通常是临床样品。所使用的样品取决于测试条件。可使用的典型样品（但不旨在限制本发明）包括取自患者（最优选人类患者）的全血、血清、血浆、血小板和尿样品等。

[0097] 在一个优选的实施方案中，所述测试是针对取自对象之样品进行的体外测试。

[0098] 在另一实施方案中，上述诊断方法还可包括从对象获取样品的步骤。从对象获取合适样品的方法是本领域熟知的。作为替代，可使用已通过分离步骤从患者中分离的样品来开始进行所述方法。所述诊断方法最优选针对来自人的样品进行，但本发明的方法可对许多动物具有诊断作用。

[0099] 本发明的诊断方法可用于补充任何已有的诊断技术，有潜力作为验证最初诊断的方法。作为替代，所述方法本身可用作初步诊断方法，因为该方法提供了快速且便利的诊断手段。此外，由于它们固有的灵敏性，本发明的诊断方法只需要很少样品，从而避免不必要的侵入手术。同时，根据本发明的方法，大量但未经浓缩的样品也可被有效检测到。

[0100] 因此，除了检测样品中污染生物以外，本发明的方法还具有多种应用。上文有关本发明第一方面的描述在应用时可根据本发明的另一些方面进行必要修正，为简要起见不再赘述。例如，本发明的这些方法中包括适当的对照。

[0101] 在一些具体的实施方案中，NAD 依赖性连接酶来自病原微生物，特别是病原细菌。

[0102] 所述细菌可以是能够导致对象（优选人类对象）感染或疾病的任何细菌。在一个实施方案中，所述细菌包括任意一种或多种葡萄球菌（特别是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）并优选甲氧西林抗性菌株）、肠球菌、链球菌、分枝杆菌（特别是结核杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*））、弧菌（特别是霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*））、沙门氏菌和 / 或大肠杆菌（*Escherichia coli*）等，或者基本上由其组成或由其组成。在一些特定实施方案中，所述细菌可包括梭菌特别是艰难梭菌（*C. difficile*）。艰难梭菌是抗生素相关腹泻和结肠炎（主要影响患有其它潜在疾病之老年患者的保健相关肠内感染）的主要原因。

[0103] 在一些实施方案中，根据本发明的这些进一步的方面，在所述方法中被测试的分子（针对抗性或者治疗感染或对细胞之毒性）是抗微生物化合物。在所述化合物筛选方法中，可测试任何分子。实例包括抗微生物剂、包括 siRNA (dsRNA) 分子和反义分子的核酸分子、小分子、抗体及其所有衍生物（例如包括 Fab 片段、可变区域片段和单结构域抗体，只要它们保留结合亲和力即可）。所述方法可以高通量方式进行，从而在短时间内筛选大量分子。

[0104] 在一个实施方案中，所述抗微生物剂可取自两种主要类型的抗微生物剂——抗生素（由微生物产生的天然物质）和化学治疗剂（化学合成的），或者可以是两种例如半合成抗生素（随后经修饰的天然产生抗生素）或合成抗生素（合成的天然抗生素）的混合物。

[0105] 合适的候选抗微生物剂可在本发明的方法中得到阳性结果（针对杀死或阻止细菌或细菌细胞或其它合适的待检微生物生长方面）是由于具有至少以下一种或多种特性：

[0106] (1) 所述试剂对对象来说应为无毒的，并且无不利的副作用，

[0107] (2) 所述试剂应不会引起对象过敏，

[0108] (3) 所述试剂不应除去对象的天然菌群，

[0109] (4) 所述试剂应为稳定的，

[0110] (5) 所述试剂应优选为便宜并易于获得 / 易于制备的 ; 并且

[0111] (6) 所述试剂应充分有效, 不发生病原体抗性 (至任何可评估的程度) 。该特征可根据上文所述方法来测试。

[0112] 在一个实施方案中, 可测试多种合适的抗微生物剂之组合治疗感染的能力和 / 或针对其的抗性。

[0113] 可用于测试抗性并且还可用于测试其治疗某些感染之新能力的抗生素或其衍生物可选自下面的组, 例如但不限于: β -内酰胺类例如青霉素 (特别是青霉素 G 或 V) 和头孢菌素类例如头孢噻吩、半合成的青霉素类 (例如氨苄青霉素、甲氧西林和阿莫西林) 、优选与半合成的青霉素制剂联合使用的克拉维酸 (例如 clavamox 或奥格门汀 (augmentin)) 、单环内酰胺类例如氨曲南, 羧基青霉烯类 (carboxypenem) 例如亚胺培南 (imipenem) , 氨基糖苷类 (例如链霉素、卡那霉素、妥布霉素和庆大霉素) 、糖肽类 (例如万古霉素、林可霉素和克林霉素) 、大环内酯类例如红霉素和竹桃霉素、多肽类例如多粘霉素和杆菌肽、多烯类例如两性霉素和制霉菌素、利福霉素类例如利福平、四环素类例如四环素、半合成四环素类 (例如强力霉素、金霉素、氯霉素) 、喹诺酮类 (例如萘啶酮酸和氟喹诺酮) 以及竞争性抑制剂例如磺胺类 (如磺胺乙酰异噁唑和甲氧苄胺嘧啶) 。还可使用头孢曲松和 / 或呋喃西林 (nitroflurazone) 。

[0114] 本发明的方法还可用于测定对指定或特定抗菌剂具有抗性之目的细菌的存在。因此, 本发明提供了用于测定样品中对特定抗菌剂具有抗性之目的细菌存在的方法, 该方法包括 (以下步骤, 特别是以特定的顺序) 或者基本由其组成或由其组成:

[0115] (a) 在培养之前用特异性捕获试剂捕获目的细菌,

[0116] (b) 在包含特定抗菌剂的孵育介质中孵育如上捕获的目的细菌,

[0117] (c) 将经孵育的目的细菌暴露于能够导致细菌裂解或者增加细菌细胞壁通透性至一定程度 (使得可鉴定细菌的细胞内物质的存在) 的试剂, 以及

[0118] (d) 确定来自目的细菌 (其通透性已增加或已被裂解) 之细胞内物质的存在。

[0119] 目的细菌可以是已知对特定抗菌剂具有抗性的任何细菌。典型地, 所述细菌可以是导致感染或疾病的细菌, 已知其对一种或多种特定抗菌剂具有抗性。在某些实施方案中, 所述细菌包括任意一种或多种葡萄球菌 (特别是金黄色葡萄球菌, 最特别地是甲氧西林抗性菌株) 、肠球菌、链球菌、分枝杆菌 (特别是结核杆菌) 、弧菌 (特别是霍乱弧菌) 、沙门氏菌和 / 或大肠杆菌等, 或者基本上由其组成或由其组成。在某些实施方案中, 所述细菌可包括梭菌特别是艰难梭菌。

[0120] 目的细菌对其具有抗性的特定抗菌剂可以是任何特定的抗菌剂。有利地, 将所述试剂用于步骤 (b) 以阻止、抑制或限制可在步骤 (a) 中捕获的敏感细菌生长。所述试剂可导致敏感细菌的裂解, 尽管这并不必需。所述试剂可以是抗生素或化学治疗剂, 或者可以是两者 (半合成或合成抗生素) 的混合物, 如本文所述。特定细菌对其具有抗性并因而可用于本发明方法的抗生素或其衍生物可选自本文列出的那些, 该列表可作必要的修正。

[0121] 在某些实施方案中, 所述方法中使用 β -内酰胺抗生素 (例如氨苄青霉素、甲氧西林和阿莫西林, 特别是甲氧西林) 。本文中, 所述细菌可以是金黄色葡萄球菌, 特别地, 所述方法可用于检测样品中的 MRSA。

[0122] 在这种背景下, “样品”通常是指临床样品。所使用的样品可取决于所测试抗性细

菌的类型。可使用的典型但不旨在限制本发明的样品包括取自患者（特别是取自人类患者）的鼻拭子、腹股沟拭子和腋窝拭子等。一般地，本发明该方面的方法是利用取自对象的样品来进行的体外测试。

[0123] 在另一些实施方案中，上述方法还可包括从对象获得样品的步骤。从对象获得合适样品的方法是本领域熟知的。或者，所述方法可利用已在单独程序中从患者分离的样品开始进行。所述方法通常利用来自人的样品进行，但本发明的方法可对多种动物具有诊断应用。

[0124] 设计步骤 (a) 以从一般（临床）样品中捕获目的细菌，所述样品可包含其它细胞类型（例如哺乳动物细胞和其它细菌细胞）。任何合适的特异性捕获试剂可用于此目的。在某些实施方案中，特异性捕获试剂仅特异性针对特定细菌种类。在另一些实施方案中，特异性捕获试剂可特异性针对特定的细菌菌株。例如，特异性捕获试剂可一般性地允许捕获葡萄球菌，或者更特异性地允许捕获金黄色葡萄球菌，或者甚至仅为抗生素抗性菌株（例如仅为金黄色葡萄球菌的 MRSA）。例如，特异性捕获试剂可以是基于蛋白质和 / 或核酸的试剂。例如，所述试剂可以是基于抗体、凝集素、受体和 / 或核酸的分子。术语“抗体”包括保留抗原结合能力的所有衍生物和变体。可使用单克隆和多克隆抗体。还考虑使用衍生化的抗体，例如可以是人源化的非人抗体。衍生物包括但不限于重链抗体、单结构域抗体、纳米抗体、Fab 片段、scFv 等。

[0125] 在一些具体实施方案中，所述特异性捕获试剂可固定在固体支持物上。可使用任何合适的固体支持物。只要目的细菌可固定于固体支持物上并且不会不利影响后续步骤中的生长，则固体支持物的性质对于本发明的效果来说不是关键的。固体支持物的非限制性实例包括任何珠子（例如聚苯乙烯珠及其衍生物和顺磁性珠）、亲和柱、微量滴定板等。如果需要，可使用生物素和链霉亲和素以有利于固定。

[0126] 类似地，固定化学反应可由本领域人员常规完成。只要固定对本发明的方法没有不利影响（尤其是对于检测目的细菌的特异性和灵敏度来说），则可采用任何固定方式。

[0127] 步骤 (b) 对于阻止、抑制或限制任何经捕获细菌的生长是重要的，所述细菌对特定抗菌剂是敏感的但在步骤 (a) 中被捕获。该步骤有效地确保可容易地检测出抗性目的细菌并与那些被捕获但对特定抗菌剂敏感的细菌进行区分。可使用任何合适的孵育介质。在一些具体实施方案中，使用液体介质。允许细菌生长的合适介质是本领域熟知并且是市售的。如上所述，孵育介质含有控制步骤 (a) 中所捕获的任何敏感细菌之生长的特定抗菌剂。这确保本发明方法的背景保持很低，并有助于提高检测对特定抗菌剂具有抗性之目的细菌的灵敏度和特异性。当然，由于目的细菌对所述试剂具有抗性，它们会继续生长，从而在裂解或细胞通透性提高（步骤 (c) 和 (d) 中）后允许对其进行灵敏的、特异性的检测。

[0128] 步骤 (c) 使得目的细菌的细胞内成分被释放，从而允许在步骤 (d) 中检测目的细菌。可使用任何能够导致细胞裂解的试剂。在本发明的一些具体实施方案中，能够导致细胞裂解的试剂选择性地针对目的细菌。然而，这并不必需，原因是步骤 (a) 导致特异性捕获并且步骤 (b) 阻止敏感细菌的生长。在某些实施方案中，所述试剂对金黄色葡萄球菌具有选择性。在一些更具体的实施方案中，所述能够导致细胞裂解的试剂是溶葡萄球菌素。溶葡萄球菌素可以是市售的溶葡萄球菌素，或者可以是本发明的溶葡萄球菌素，其讨论经必要修正应用于此。

[0129] 在另一些实施方案中,所述能够导致细胞裂解的试剂是噬菌体。噬菌体可对目的细菌具有选择性。在一些替代实施方案中,所述试剂可以是细菌素 (bacteriocin),例如视情况可以是大肠菌素 (colicin) 或微生物素 (microcin)。然而,在本发明的所有实施方案中裂解可以不是必需的。特别地,在某些实施方案中,根据本发明的方法提高细菌细胞壁和/或膜的通透性可足以能够检测细胞内物质(例如 NAD 依赖性连接酶活性)。用于实现该通透性增加的合适试剂和技术是本领域已知的。

[0130] 步骤(d)包括确定来自目的细菌的细胞内物质的存在(由细菌细胞裂解或细胞通透性增加导致)。该步骤可包括本领域已知的任何合适测定,或者基本由其组成或由其组成。实例包括生物发光测定,例如在国际公开号 W094/17202 和 W096/02665 中描述的基于腺苷酸激酶(AK)的测定。然而,作为替代,所述测定可包括基于细胞内酶标记物(例如磷酸酶或过氧化物酶)的比色测定或荧光测定。但是,在一些优选的实施方案中,步骤(d)包括本发明的检测方法,其包括使用 NAD 依赖性连接酶作为存在目的细菌的指示物。因此,可将合适的核酸分子底物加至细胞内物质。如果样品中存在抗性目的细菌,则存在 NAD 依赖性连接酶活性,所述底物会被连接产生经连接的核酸分子。特异性检测这种经连接的核酸分子指示起始样品中存在抗性目的细菌。因此,本文所述的本发明方法的所有实施方案可用于本发明的这一方面。因而,步骤(d)可包括如下步骤:

[0131] (a) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

[0132] (b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品;

[0133] (c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的存在。

[0134] 在一些实施方案中,在步骤(a)结束/步骤(b)开始时进行细胞内物质测量以及特别地 NAD 依赖性连接酶活性的实施方案。这一测量提供了背景信号,可将测试信号与之进行比较从而获得有关结果显著性的结论。其指示孵育步骤(设计用以选择性允许对特定抗菌剂具有抗性之细菌的生长)前样品中细胞内物质(特别是 NAD 依赖性连接酶活性)的基础水平。与步骤(a)结束/步骤(b)开始时进行的测量相比,步骤(d)中进行的测量(例如 NAD 依赖性连接酶活性)显著或明显的增长可靠地指示对特定抗菌剂具有抗性之目的细菌的存在。如果与背景信号相比,孵育(步骤(b))以及增加通透性或导致细胞裂解的处理(步骤(c))之后没有增长(或实际是下降的),则指示不存在对特定抗菌剂具有抗性的细菌。

[0135] 在本发明的某些实施方案中,所述方法在步骤(a)之后还包括清洗步骤或者基本由其组成或由其组成,以除去与捕获试剂非特异性关联的任何细胞或其它物质。这样的步骤在处理特异性捕获步骤时对于本领域人员来说是常规的。

[0136] 在一些优选的实施方案中,其中步骤(d)包括本发明的检测方法,其包括使用 NAD 依赖性连接酶作为目的细菌存在的指示,所述方法的步骤不必限制于指定的顺序。特别地,使用特异性捕获试剂捕获目的细菌的步骤(a)可在起始步骤(b)(即,在含有特定抗菌剂的孵育介质中孵育目的细菌)后进行。因此,本发明提供了用于确定样品中对特定抗菌剂具有抗性之目的细菌存在的方法,其包括(以下步骤,特别是以指定顺序)或者基本由其组成或由其组成:

[0137] (a) 在含有特定抗菌剂的孵育介质中孵育目的细菌,

[0138] (b) 使用特异性捕获试剂捕获经孵育的目的细菌，

[0139] (c) 将捕获的目的细菌暴露于能够导致细菌裂解或增加细菌细胞壁通透性至一定程度（使得可测定来自细菌之 NAD 依赖性连接酶的存在）的试剂，以及

[0140] (d) 测定样品中（抗性）目的细菌的存在，其通过以下来实现：

[0141] (i) 将样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触；

[0142] (ii) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触的样品；以及

[0143] (iii) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在，以指示表达 NAD 依赖性连接酶之微生物的存在。

[0144] 当然，对本文所提供方法的各步骤的所有描述均适用于这些特定方面。在捕获后进行培养的顺序一般是优选的，这是因为在一些具体实施方案中这只需要单一培养步骤。当在捕获之前进行培养时，实践中发现在捕获之后需要额外的培养步骤以确保测试具有足够的灵敏度。

[0145] 本发明的方法可包括额外的中间步骤，从而能够测定多于一种靶细菌的存在。通常，这些步骤可包括使用一种或多种合适的捕获试剂捕获多种不同的目的细菌。类似地，本发明的方法可包括多个这样的步骤，从而可测定其它靶细菌的存在。

[0146] 本发明还提供了实施本发明这些方法的测试试剂盒。在某些实施方案中，所述测试试剂盒可以是一次性测试试剂盒。所述测试试剂盒的每种组分可提供在单独的隔室或载体中，或者可组合一种或多种组分——只要这些组分可稳定地储存在一起即可。所述测试试剂盒包含特异性捕获试剂用以捕获对特定抗菌剂具有抗性的目的细菌。合适的捕获试剂已在上文讨论，并经必要修正应用于此。在某些实施方案中，所述试剂盒中提供用于特异性捕获试剂的固体支持物。在另一些实施方案中，所述特异性捕获试剂预先装载在固体支持物上来提供。合适的固体支持物和固定方式在本文中已描述，该描述已针对本发明的这些方面作必要修正。

[0147] 所述试剂盒还可包含目的细菌的孵育介质。在一些具体实施方案中，所述介质包含目的细菌对其具有抗性的特定抗菌剂。或者，所述试剂可单独提供并仅在所述方法进行加入介质。合适的介质和特定抗菌剂已于本文中描述（有关相应的方法），该讨论经必要修正应用于此。所述介质可以任何合适的形式来提供，例如以冻干形式。

[0148] 根据本发明的方法，所述试剂盒还可包含能够导致目的细菌细胞裂解或提高细菌细胞壁和 / 或细胞膜通透性的合适试剂，以充分使得能够检测细胞内物质（特别是 NAD 依赖性连接酶活性）。合适的试剂已在上文讨论，该讨论经必要修正应用于此。在一些具体实施方案中，所述试剂是溶葡萄球菌素，例如本发明提供的（功能性）溶葡萄球菌素，特别是基本不含核酸酶和 / 或连接酶污染物的溶葡萄球菌素制剂（如本文所述，通过将这些组分失活而产生）。

[0149] 所述试剂盒还可包含测定来自目的细菌的裂解细胞或来自经处理通透性增加之细胞的细胞内物质之存在的手段 / 工具。取决于所采用的特定检测技术，可包含任何合适的组分。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包含允许检测样品中 NAD 依赖性连接酶活性的组分。因此，本文所述的本发明试剂盒可与现有的试剂盒组合，以提供用于测定样品中对特定抗菌剂具有抗性的目的细菌之存在的 NAD 依赖性连接酶关联检测试剂盒。在某些实施方案中，所述试剂盒包含至少一种作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子。

合适的底物核酸分子可包含两种或更多种可连接的核酸分子,其已在本文中讨论并经必要修正应用于此。因此,在某些实施方案中,所述底物核酸分子可被固定在固体支持物上或与固体支持物一起提供以允许固定。

[0150] 在某些实施方案中,所述试剂盒还可包含对于核酸扩增来说必需的试剂。采用核酸扩增技术允许灵敏地检测新的经连接核酸分子的存在。合适的技术和必需的试剂对于本领域技术人员来说是很明显的。因此,所述试剂盒可特别地包含用于特异性检测经连接核酸分子的合适引物,如本文中详细讨论地。所述试剂盒还可包含用于实时检测扩增产物的合适试剂。

[0151] 所述试剂盒可包含反应在其中发生的合适载体。有利地,这样的载体可包括多孔板,例如 48 或 96 孔板。这样的载体允许所述检测方法以相对较少的体积进行,从而有利于按比例放大并使所需样品体积最小化。

[0152] 所述试剂盒通常包含合适的说明书。这些说明书允许用本发明的试剂盒可靠地实施本发明的方法。

[0153] 在一个特定方面,本发明的方法用于检测血小板样品中的细菌污染。

[0154] 因此,提供了检测 NAD 依赖性连接酶作为血小板样品(含血小板之样品)中存在细菌污染的指示的方法,其包括:

[0155] (a) 将血小板样品与作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子接触;

[0156] (b) 在适合 NAD 依赖性连接酶活性的条件下孵育如上接触样品;以及

[0157] (c) 特异性测定由 NAD 依赖性连接酶针对底物核酸分子之作用产生的经连接核酸分子的存在,以指示血小板样品(含血小板之样品)中细菌污染的存在。

[0158] 在一些具体实施方案中,用于检测血小板中细菌污染的方法包括另外的子步骤或者基本由其组成或由其组成。这些子步骤可包括例如:

[0159] (i) 在使细菌细胞保持完整的条件下裂解血小板。这主要是在检测 NAD 依赖性连接酶活性之存在前进行细菌细胞的选择性浓缩。因此,哺乳动物细胞提供的任何 ATP 依赖性连接酶活性可在测试前被除去

[0160] (ii) 细菌的浓缩(例如通过离心产生含有细菌细胞的沉淀来实现)

[0161] (iii) 裂解细菌或进行处理以提高细菌的通透性从而释放 NAD 依赖性连接酶。

[0162] 对本发明方法各实施方案的描述针对该具体应用已作必要的修正,为简要起见不再赘述。

[0163] 本发明还提供了能够并适于实施本发明多种方法的试剂盒。

[0164] 为此,在另一方面,本发明提供了实施本发明一种方法的试剂盒,其包含以下组分或者基本由其组成或由其组成:

[0165] (a) 至少一种作为样品中 NAD 依赖性连接酶活性之底物的核酸分子,

[0166] (b) 固定所述底物核酸分子的手段/工具,和/或

[0167] 特异性捕获 NAD 依赖性连接酶的试剂,和/或

[0168] 用于选择性裂解样品中含 NAD 依赖性连接酶活性的细菌细胞或其它微生物或者增加细菌细胞或其它微生物通透性以允许检测 NAD 依赖性连接酶活性的手段/工具,和/或

[0169] 用于选择性裂解样品中不含 NAD 依赖性连接酶活性的任何细胞(例如哺乳动物细

胞等,特别是在血小板样品中的血小板)的手段/工具,和/或

[0170] 用于抑制样品中 ATP 依赖性连接酶活性的手段/工具,和/或

[0171] 用于选择性除去未连接的底物分子(以防止未连接的底物影响经连接核酸分子检测的灵敏度和/或特异性)的手段/工具。

[0172] 有关本发明方法(和其它试剂盒)的实施方案已作必要的修正,为简要起见不再赘述。因此,本发明的试剂盒中可包含实施本发明方法所需的必要组分和试剂。特别地,所述底物核酸分子包括可被 NAD 依赖性连接酶连接的 dsDNA 组分。特定实例可选自分别包含 SEQ ID NO:1~4 和/或 7 和 8 所示核苷酸序列的核酸底物(如本文详述中所示)。在本发明的一个方面,分别包含 SEQ ID NO:1~4 所示核苷酸序列的 4 种核酸分子可形成具有可连接的互补性 5 个核苷酸重叠的底物分子。在另一方面,包含 SEQ ID NO:7 和 8 所示核苷酸序列的核酸分子可杂交形成带有缺口之双链部分的底物分子。

[0173] 本发明的试剂盒还可包含合适的滤器以分离待检测的细菌细胞或其它微生物与其它(产生连接酶的)细胞。这样的滤器和过滤系统以及方法是本领域熟知的并且有售(例如来自 New Horizons Diagnostics Inc.)。本发明的试剂盒还可包含合适的滤器或者过滤机制或系统从而能够在确定 NAD 依赖性连接酶活性是否存在之前分离靶细胞或生物。

[0174] 此外,特定细菌细胞或其它微生物还可通过使用可结合所述细胞或微生物的特异性试剂来选择和/或分离。合适的试剂包括基于蛋白质和核酸的试剂。实例包括抗体、凝集素、受体、DNA、RNA 等。因此,本发明的试剂盒可另外包含用于分离目的细菌的合适试剂,或者基本由其组成或由其组成。抗体及其保留特异性结合亲和力的所有衍生物(例如 Fab 片段、单结构域抗体和可变区片段)可涵盖在术语“抗体”的定义中。

[0175] 如本文所讨论地,所述底物核酸分子可固定在固体支持物上。将底物核酸分子固定在固体支持物上允许有效捕获样品中的 NAD 依赖性连接酶。经固定的底物核酸分子与 NAD 依赖性连接酶的相互作用导致产生新的经连接核酸分子。因此,本发明的试剂盒还可包含固体支持物。所述底物可预装载或者不预装载在固体支持物上提供。如果不预先固定在固体支持物上,则试剂盒中可提供允许固定的合适试剂,任选地与合适的说明书一起提供。允许固定的试剂是本领域技术人员熟知的。可使用任意固定方式,只要其对本发明方法的施行(尤其是有关检测一种或多种靶细菌细胞或微生物中 NAD 依赖性连接酶的灵敏度和特异性方面)没有不利影响即可。

[0176] 本发明的试剂盒中可包含任何合适的固体支持物。只要底物核酸分子可以固定于其上而不会不利影响 NAD 依赖性连接酶活性(包括所述酶与核酸分子相互作用的能力),则固体支持物的性质对于本发明的效果来说不是关键的。固体支持物的非限制性实例包括任何珠子(例如聚苯乙烯珠和顺磁性珠及其衍生物)、亲和柱、微量滴定板等。当底物核酸分子事实上是连接在一起的两种(或更多种)核酸分子时,可将底物核酸分子中任一种或两种固定在固体支持物上。在一些具体实施方案中,彼此分开的底物核酸分子可固定在同一支持物上。这使得所述分子彼此靠近,以确保检测时如果样品中存在 NAD 依赖性连接酶,连接反应能够有效发生。例如,所述试剂盒中可包含生物素和/或链霉亲和素试剂以有利于固定。

[0177] 在另一些实施方案中,本发明的试剂盒还包含对于核酸扩增来说必需的试剂,或者基本由其组成或由其组成。优选地,所述试剂用于实施本文所述的任一种扩增。用于实施

核酸扩增的试剂是市售的并且是本领域中良好表征的。合适试剂的实例包括设计用来扩增新的经连接核酸分子的合适引物。有关本发明方法中引物设计的讨论在本文中已作必要的修正。因此,本发明的合适引物可包含在合适的试剂盒中用以检测经连接的核酸分子(例如,如 SEQ ID NO:5 和 6 或者 9 和 10 分别所示的)。还可包含聚合酶(例如 Taq 聚合酶,其已有若干种变体(包括热启动变体))和缓冲液(例如 KCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)。

[0178] 在一些相关的实施方案中,所述试剂盒还包含以实时或终点方式检测核酸扩增产物的试剂,或者基本由其组成或由其组成。所述试剂盒可包含用于施行实时或终点扩增和检测的试剂,其利用本文公开的任何基于荧光的系统。可用于这些方法的合适试剂是本领域熟知并有市售。

[0179] 合适试剂的实例包括序列特异性探针。这些探针可结合在用来扩增新核酸分子的引物之间,从而可结合经扩增的核酸分子,以提供对扩增中所形成产物水平的直接指示物。此类探针的设计对于本领域技术人员来说是常规的。或者,合适的引物可设计在例如 Amplifluor 和 Scorpion 系统中,其允许进行扩增产物的实时或终点检测。因此,本发明的试剂盒可包含例如发夹引物(Amplifluor)、发夹探针(Molecular beacons)、水解探针(Taqman)、FRET 探针对(Lightcycler)、并入发夹探针的引物(Scorpion)、荧光染料(SYBR Green 等)、并入脱氧核酶之互补序列和可切割荧光脱氧核酶底物(DzYNA)的引物或者寡核苷酸封闭物。合适的水解探针如 SEQ ID NO:11 所示。

[0180] 任何合适的荧光基团均包括在本发明范围内,其用于标记或作为相关引物或探针的一部分。可包含在本发明试剂盒中的荧光基团包括例如 FAM、HEXTM、NEDTM、ROXTM、Texas RedTM 等。类似地,本发明的试剂盒不限于单种猝灭剂。猝灭剂(例如 Dabcyl 和 TAMRA)是周知的猝灭分子,其可用于本发明的方法中并包含在本发明的试剂盒中。

[0181] 除上述以外,本发明的试剂盒还可包含对于 PCR 产物的产生和检测必需的另一些组分,例如微阵列(其可用于检测扩增产物,或可用于扩增(在芯片上扩增)和检测扩增产物)。其它组分还可包含 Applied Biosystems 所述的“微流体板(micro fluid card)”、反向杂交带(例如 LIPA technology(Innogenetics,Zwijnaarde,Belgium)或 Ulysis and ULS technology(Kreatech Biotechnologies,阿姆斯特丹,荷兰)所述的那些)。这些组分是本领域已知的,并通过举例和非限制的方式列出本发明试剂盒中所包含的。

[0182] 用本发明试剂盒来检测的样品可以是任何上文所述的合适样品。

[0183] 另外,本发明的试剂盒中可包含裂解试剂,其裂解并非靶标细菌细胞或微生物但另外向测定系统提供连接酶活性的其它细胞。合适的试剂(其优选地不裂解待检测的细菌或其它微生物)包括例如但不限于醇类、盐类等,以及还可能地试剂例如蛋白酶 K 和氯仿(这取决于所检测的细菌或其它微生物)。在检测血小板中细菌污染的具体应用中,可使用适当浓度的碳酸钠和两性去污剂,用来选择性裂解血小板并使所有细菌细胞保持完整。因此,所述试剂盒可包含这些组分。

[0184] 本发明的试剂盒还可包含用于除去或消耗样品中 ATP 的酶或者基本由其组成或由其组成,从而防止样品中任何 ATP 依赖性连接酶活性影响细菌检测。在一个具体实施方案中,所述酶包括萤光素酶、磷酸酶和焦磷酸酶中的任何一种或多种,因为所有这些酶可用于消耗样品中源自非靶细胞或生物的可产生假阳性结果的 ATP 信号。这些酶的合适试剂(例如合适的(储存)缓冲液)可包含在试剂盒中。

[0185] 本发明的试剂盒还可包含用于裂解待检测细菌或其它微生物的细胞从而释放 NAD 依赖性连接酶的试剂,或者基本由其组成或由其组成。合适的试剂包括例如但不限于苯酚、氯仿、蛋白酶 K 和溶葡萄球菌素,特别是本发明的溶葡萄球菌素。类似地,可包含用于增加细胞通透性从而允许检测 NAD 依赖性连接酶活性的试剂,如本文所述。

[0186] 本发明的试剂盒还可包含一种或多种核酸酶或者基本由其组成或由其组成,用以降解样品中待检测的提供 NAD 依赖性连接酶活性的细菌或其它微生物相关的核酸分子。这例如可对于防止非特异性连接事件有利。然而,这可以不是绝对需要的,因为可设计底物核酸分子使其与(存活力)待检测细菌或其它微生物中的核酸分子不具有同源性。因此,可在存在内源性“污染”核酸时实现新的经连接核酸分子的特异性检测。这在上文已有详述,该讨论和实施方案已针对本发明的试剂盒作必要的修正。

[0187] 如上文所述,所述试剂盒可包含用于选择性除去未连接底物分子的手段/工具。这有助于防止未连接的底物影响经连接核酸分子检测的灵敏度和/或特异性。在一些具体实施方案中,选择性除去未连接底物分子的手段/工具包括一种或多种选择性核酸酶。特别地,可使用一种或多种核酸外切酶除去未连接的底物分子。在一些具体实施方案中,使用 3'-5' 核酸外切酶(例如 ExoIII、ExoI 和/或 ExoT)来消化未连接的底物分子。可有利地将 dsDNA 特异性 3'-5' 核酸外切酶(例如 ExoIII)和一种或多种 ssDNA 特异性 3'-5' 核酸外切酶(例如 ExoI 和/或 ExoT)的组合包含在所述试剂盒中,特别是当经连接核酸分子由至少三种底物核酸分子形成时,它们被样品中的 NAD 依赖性连接酶活性连接,一起形成包含缺口的双链区域。

[0188] 在一些具体实施方案中,所述试剂盒提供合适的缓冲液,其允许所有组分提供在同一隔室或储存容器中。因此,完整试剂盒有必要提供为完整(同质)反应混合物。因此,本发明的方法可以单个反应步骤完成,这样减少了样品交叉污染的可能性,并且还快速获得结果。尤其优选以实时或终点方式提供结果的反应混合物。优选地,这样的反应混合物是含水组合物,但可提供为用于重溶(例如使用无菌或蒸馏水)的干粉。

[0189] 优选地,所包含的试剂允许使用等温扩增技术(例如 TMA)。所述试剂可允许等温扩增技术(例如 TMA)以实时或终点方式实现。

[0190] 本发明的所有试剂盒可与适当的说明书一起提供,以用于本发明的任一种方法。例如,说明书可作为插入物提供(例如作为试剂盒包装内的小册子)和/或可印制在试剂盒的包装上。

[0191] 因此,根据另一方面,本发明提供了用于将所述反应混合物施用于表面上的喷雾装置,所述反应混合物含有实现本发明方法的所有必要组分。可使用任何合适的喷雾装置,例如可以是泵喷雾器或气雾装置。这样的装置可应用于多种情形中,其中需要对表面上的微生物进行检测或者对任意来源的污染微生物进行检测。例如,当制备食物时,有利地是确保在食物制备后清理表面之后,没有可能有害的细菌细胞或微生物仍留在所述表面上。这确保了所述表面之后是“干净的”,并可用于另外的食物制备。喷雾装置也可用于检测卫生监测设备表面上的细菌污染,其通过检测 NAD 依赖性连接酶活性来实现。因此,作为(存活)细菌之标志物的这种酶的存在指示表面上存在某种形式的污染。使用等温 DNA 扩增方法对于检测表面上的 NAD 依赖性连接酶活性是优选的。合适的实例(例如 TMA)参考上文。

[0192] 本发明进一步通过发明详述以及附图和实施例进行定义和帮助理解,其中:

[0193] 发明详述

附图说明

[0194] 图 1 是本发明的连接酶介导测定的示意图,其检测细菌的酶——NAD 依赖性连接酶。NAD 依赖性连接酶仅在真细菌 (2) 中发现,在哺乳动物中尚无报道。因此,这种技术对于用在临床样品中快速和灵敏地检测细菌来说是理想的,其中来自宿主的背景会成为问题。本发明方法的另一优势在于系统中有另外的扩增步骤,这是因为 NAD 依赖性连接酶在 NAT 扩增之前产生许多 DNA 引物分子。因此,这种测定是一种灵敏的方法,目前该检测限制于培养样品中范围在 100 ~ 1000 个细胞的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

[0195] 图 2 显示多种反应条件下 (含有或不含额外的 NAD⁺ 以及进行或不进行庆大霉素处理) 相对扩增对比时间的图。

[0196] 图 3 是显示用本发明的方法检测金黄色葡萄球菌之方案的流程图。

[0197] 图 4. 金黄色葡萄球菌细胞的稀释。使用本发明的方法 (称为“LiMA-2”) 和实时 PCR (Taq-Man) 进行检测。从左至右的曲线代表: 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10、0 个细胞和 PCR 空白。

[0198] 图 5. 金黄色葡萄球菌细胞对抗生素的灵敏度。向介质中加入 10^4 个细胞,显示 PCR 描记图,从左至右为: T = 5 小时培养物 (无苯唑西林)、T = 0 小时和 T = 5 小时培养物 (加入苯唑西林)。

[0199] 实施例 1. 血小板污染的检测[0200] 原理.

[0201] 血小板中的细菌污染可通过选择性裂解血小板之后将细菌细胞裂解并检测细菌连接酶来检测。所有污染的哺乳动物连接酶不会被本测定有效检测,这是因为哺乳动物连接酶使用 ATP 作为辅因子,而细菌连接酶使用 NAD⁺。该情形中的连接酶缓冲液补充有细菌特异性 NAD⁺ 辅因子。所述细菌连接酶通过两种具有互补 5' 碱基突出端之合成 DNA 的连接来检测。一经连接,连接分子通过跨越连接位点的 PCR 来检测。

[0202] 方法

[0203] 1. 将已知数量的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 (通过预先培养和计数来评估) 加至 0.5ml 血小板 (通过血液采集术来收集)。

[0204] 2. 用 50mM 碳酸钠和 1% (w/v) 两性洗去污剂制备经添加的样品,终体积为 1ml。

[0205] 3. 孵育 5 分钟使得血小板裂解后,加入 100 μ l 4M Tris (pH 7.5)。

[0206] 4. 以 6000 $\times$ g 离心 5 分钟来沉淀细菌,除去上清。

[0207] 5. 加入 20 μ l BPer (Pierce), 孵育 5 分钟使细菌细胞裂解。

[0208] 6. 然后,将 2 μ l 细菌裂解物加入连接酶反应,其含有 2 μ l 10 $\times$ 大肠杆菌连接酶缓冲液 (NEB)、2 μ l (20ng) 每种 DNA 底物 S1/AS1 和 S2/AS2,总体积为 20 μ l。所述 DNA 底物由 4 种具有可连接的互补性 5 个碱基重叠的合成寡核苷酸形成:

[0209] S1 5' GCCGATATCGGACAACGGCCGAAGTGGGAAGGCGCACGGAGAGA 3' (SEQ ID NO:1)

[0210] AS1 3' TATAGCCTGTTGCCGGCTTGACCCCTCCGCGTGCCTCTCTGGTGC 5', 5' 端被磷酸化 (SEQ ID NO:2)

[0211] S2 5' CCACGAAGTACTAGCTGGCCGTTTGTACCGACGCCTA 3', 5' 端被磷酸化 (SEQ ID

NO :3)

[0212] AS2 3' TTCATGATCGACCGCAAACAGTGGCTGCGGAT 5' (SEQ ID NO :4)

[0213] 所述底物通过在 93℃ 混合等摩尔浓度的 S1 和 AS1 然后使其冷却到室温而形成。类似地, S2 和 AS2 以同样方式形成。

[0214] 7. 在室温 30 分钟后, 对 2 μ l 连接产物进行 PCR。

[0215] 8. 实时 PCR (Eurogentec) 含有 SYBR Green 以及正向引物: 5' GGACAACGGCCGAAGTGGGAAGG 3' (SEQ ID NO :5) 和反向引物: 3' CGACCGCAAACAGTGGCTGCGGAT 5' (SEQ ID NO :6), 在 94℃ 变性 10 秒, 65℃ 退火 15 秒, 72℃ 延伸 15 秒。

[0216] 结果

[0217] E. coli 数 PCR 呈阳性的循环数

[0218] 10⁶ 14. 5

[0219] 10⁵ 18. 44

[0220] 10⁴ 20. 82

[0221] 10³ 23. 88

[0222] 10² 25. 55

[0223] 10¹ 27. 95

[0224] S. aureus 数 PCR 呈阳性的循环数

[0225] 10⁶ 14. 2

[0226] 10⁵ 17. 55

[0227] 10⁴ 20. 16

[0228] 10³ 22. 65

[0229] 10² 25. 74

[0230] 10¹ 28. 55

[0231] P. aeruginosa 数 PCR 呈阳性的循环数

[0232] 10⁶ 15. 42

[0233] 10⁵ 18. 65

[0234] 10⁴ 21. 18

[0235] 10³ 23. 68

[0236] 10² 26. 93

[0237] 10¹ 29. 83

[0238] 无细菌对照 30. 58

[0239] 无血小板对照 30. 48

[0240] PCR 对照 34. 26

[0241] 讨论

[0242] 添加用 10 倍稀释的细菌, 获得对应的 PCR 信号效价。从 PCR 结果, 可以看出可检测到添加至 0. 5ml 血小板中的少至 10 个细菌。用硫酸铵代替碳酸钠进行血小板裂解获得类似的结果。

[0243] 实施例 2. 药物易感性测试

[0244] 原理

[0245] 产生的 PCR 信号与经连接的 DNA 底物分子数有关,而 DNA 底物分子数又与存在的连接酶分子数有关。相应地,存在的连接酶分子数取决于细菌的存活力。培养给定的细菌,如果细菌是健康的、生长的并且数量增加,则会出现逐渐增多的连接酶,其将产生更多的连接和更多的 PCR 信号。如果细菌不健康并且非存活的或将要死亡,则培养物中连接酶将不会增加,连接酶分子的数量甚至会减少,这会反映在连接的数量和产生的 PCR 信号中。在这个实施例中,我们测试了生物对抗生素的易感性。通过在存在和不存在抗生素下进行培养,我们可以比较在不同时间点细菌连接酶产生的信号。另外,该实验中可加入或不加入 NAD⁺ 辅因子来进行。在存在加入的辅因子时,连接酶可以循环进行多个连接步骤。在不存在加入的辅因子时,连接酶必须依赖于内源性细菌 NAD⁺ 来连接。因此,这两种条件是细菌细胞健康状况的两种不同测量。

[0246] 方法

[0247] 1. 在 10ml 含有 50 μ g/ml 庆大霉素的介质 (LB 培养液) 中接种 10^4 个大肠杆菌细菌 /ml, 孵育 3 小时。在 30 分钟时间点取去 1ml 培养物, 置于冰上, 直至完成本时间段。

[0248] 2. 然后, 以 $6000\times g$ 离心 5 分钟来沉淀细菌, 除去上清。

[0249] 3. 从这一阶段开始的步骤与实施例 1 中步骤 3 至 8 相同, 除了连接酶反应使用或不使用加入的 NAD⁺ 进行以外。

[0250] 结果

[0251]

	PCR呈阳性的循环数			
	添加 NAD ⁺		未添加 NAD ⁺	
	+庆大霉素	-庆大霉素	+庆大霉素	-庆大霉素
时间 (分钟)				
0	26.2	24.5	29.5	29.85
30	25.1	25	29.4	29.95
60	25.7	23.6	31.6	31.64
90	26.2	22.7	30.1	28.52
120	27.2	21	30.3	25.53
150	26.8	20.1	29.4	24.35
180	26.3	18.2	30.1	22.71
无细菌对照	29.3		30.6	

[0252] 结果可以图表形式展示, 其中每个时间点和每种条件下的扩增因数与 0 时间点比较作图 (参见图 2)。

[0253] 讨论

[0254] 该测定很好地用作抗生素易感性测试。当存在庆大霉素时, 来自细菌连接酶的信号不随孵育而增加。然而, 当不存在庆大霉素时, 在每个时间点有逐渐增多的连接和相关 PCR 信号。这反映了大肠杆菌的生长和生存力。在这个实施例中, 仅有 10^4 个大肠杆菌用于

最初接种,这表明本方法具有高灵敏度。在连接缓冲液中包含 NAD⁺ 使得连接酶循环用于多个 DNA 底物分子,从而增加了检测灵敏度。但是,当不存在外源 NAD⁺ 时,细菌的酶必须利用细菌的 NAD⁺,尽管信号被延迟,在 0 时刻和之后时间点之间的信号仍有较大差异。这反映出非存活细菌可利用的 NAD⁺ 水平降低的事实。

[0255] 实施例 3. 核酸捕获后细菌连接酶的检测

[0256] 本实施例表明可使用固定的核酸底物从溶液中捕获细菌连接酶。本实施例与实施例 1 基本类似,只是通过在 3' 端合成生物素化的 AS1 将核酸底物固定在链霉亲和素珠上。

[0257] 方法

[0258] 1. 最初,本方法与实施例 1 中步骤 1-5 相同,其中使用 0.5ml 血小板(通过血液采集术来收集)并添加已知数量的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌(通过预先培养和计数来评估)。

[0259] 2. 用 20 μ l BPer 裂解细菌细胞后,用不含 NAD⁺ 的 1 $\times$ 连接酶缓冲液将溶液制备成 100 μ l。

[0260] 3. 如前所述形成核酸双链体 S1/AS1,除了 AS1 在 3' 端被生物素化以及双链体结合在链霉亲和素珠(Sigma)上(其浓度为每 20 μ l 珠子上有 20ng 双链体)以外。将 20 μ l 固定有 S1/AS1 的珠子加入上述步骤 2 的裂解物中,孵育 10 分钟。

[0261] 4. 附着有连接酶的珠子用磁体收集,置于 20 μ l 含有 1 $\times$ 连接酶缓冲液和 NAD⁺ 以及 20ng 核酸双链体 S2/AS2 的连接反应体系中。

[0262] 5. 在连接 30 分钟后,反应体系在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,使用 2 μ l 进行实施例 1 步骤 8 中所述的 PCR。

[0263] 结果

[0264] E. coli 数 PCR 呈阳性的循环数

[0265] 10⁶ 12.3

[0266] 10⁵ 15.36

[0267] 10⁴ 17.22

[0268] 10³ 20.15

[0269] 10² 22.89

[0270] 10¹ 25.67

[0271] S. aureus 数 PCR 呈阳性的循环数

[0272] 10⁶ 12.4

[0273] 10⁵ 14.57

[0274] 10⁴ 18.16

[0275] 10³ 21.35

[0276] 10² 23.99

[0277] 10¹ 26.15

[0278] P. aeruginosa 数 PCR 呈阳性的循环数

[0279] 10⁶ 12.92

[0280] 10⁵ 15.23

[0281] 10⁴ 18.64

[0282]	10^3	21.21
[0283]	10^2	23.94
[0284]	10^1	26.76
[0285]	无细菌对照	30.52
[0286]	无血小板对照	30.39
[0287]	PCR 对照	34.10

[0288] 讨论

[0289] 本实施例显示可以在随后的连接之前将细菌释放出的连接酶捕获在经固定的核酸底物上。这一方法使连接酶浓缩,并允许分析更大比例的所释放连接酶。这导致更灵敏的检测,其表现在对给定数量生物的 PCR 分析中在较早的循环数时出现阳性结果。

[0290] 实施例 4. 金黄色葡萄球菌的 NAD 依赖性连接酶检测:

[0291] 介质清洗步骤:

[0292] 取 1ml 新鲜的金黄色葡萄球菌培养物 (10^6 个细胞 / μ l), 以 8000rpm 离心 5 分钟, 用 1ml 去离子水重悬沉淀。以 10 倍系列稀释至 10^2 个细胞 / μ l。

[0293] 裂解 / 连接混合物

[0294] 加入 2 μ l “10 $\times$ 连接酶缓冲液”(4mM MgCl₂, 1mM DTT, 50 μ g/ml BSA, 26 μ M NAD⁺, 30mM Tris pH 8)

[0295] DNA 底物 ** (“锚定物和模板”) 1 μ l (退火至 100ng / μ l 终浓度)

[0296] 经热处理的溶葡萄球菌素 2 μ l*

[0297] 1% Triton X-100 2 μ l

[0298] 非特异性 DNA 100 μ M 0.2 μ l (单链寡聚物)

[0299] 去离子水 12.8 μ l

[0300] 加入 1 μ l 相应的金黄色葡萄球菌培养稀释物。

[0301] 在室温孵育 30 分钟。

[0302] *取溶葡萄球菌素储液 (10mg/ml), 用不添加 NAD⁺ 的 1 $\times$ 最终连接酶缓冲液稀释 10 倍, 在 55 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 然后再稀释 10 倍。应当注意, 经热处理的溶葡萄球菌素消除了溶液中的污染核酸酶和连接酶, 从而降低了背景以及随后的 NAD 依赖性连接酶测定中的信号损失问题。

[0303] ** 两种组分, 当它们进行杂交时产生带有缺口的双链部分。

[0304] 锚定物:

[0305] 5' -CCCCGGATCCCTTAGAATTCCTCAGAGGCACTGGAGCTGGAGACGTA-3' ((SEQ ID NO:7)

[0306] 模板:

[0307] 5' P-GTGCCTCTGAGCCAGGGGAGCAGTTCGGCGTAGTGATGACGAGTCTACGAGTCTACGAGTTCTACGTCTCCAGCTCCA-3' (SEQ ID NO:8)

[0308] 处理未连接的底物

[0309] 在上述连接步骤之后, 向每管中加入 2 μ l 下列核酸酶混合物:

[0310] 10 倍稀释的 ExoIII 2 μ l

[0311] ExoI 2 μ l

[0312] ExoT 2 μ l

[0313] 100 倍稀释的“10× 连接酶缓冲液”(不含 NAD⁺) 14 μ l

[0314] 在 37℃ 孵育 30 分钟

[0315] 加热至 95℃ 5 分钟(以失活核酸外切酶)

[0316] PCR 步骤

[0317] 向 PCR 预混合物加入 2 μ l, 循环为:

[0318] 90℃ 10 分钟 1 次, 然后进行:

[0319] 90℃ 5 秒 40 次

[0320] 60℃ 10 秒 40 次

[0321] 使用:

[0322] 引物 1 5' -GAGTCTACGAGTCTACGAGTTCT-3' (SED ID NO :9)

[0323] 引物 2 5' -TCATCACTACGCCGAAGTGC-3' (SEQ ID NO 10)

[0324] Taqman 探针 5' FAM-CTCAGAGGCACTGGAGCTGGAGAC-3' TAM(SEQ ID NO :11)。双标记的 HPL(5' 荧光素和 3' TAMRA 猝灭基团)

[0325] 结果

[0326] 图 3 显示使用 LiMA-2 技术检测金黄色葡萄球菌的测定方案。图 4 显示使用 Taq-Man 方法由“实时”PCR 测定获得的金黄色葡萄球菌系列稀释物的典型数据。该实验中的检测限估计在 10 ~ 100 个细胞之间。图 5 显示向介质中加入抗生素的效果, NAD 依赖性连接酶成分在抗生素出现 4 小时后下降了 $> 2 \times 10^3$ 倍。

[0327] 结论

[0328] 我们已显示, NAD 依赖性连接酶是一种有用的存活细菌细胞标志物, 并可以用基于核酸模板的技术非常灵敏地检测出。针对金黄色葡萄球菌的非常低的检测限表明 LiMA-2 技术是目前用于细菌检测的最灵敏方法之一。

[0329] 参考文献

[0330] Barringer KJ, Orgel L, Wahl G, Gingeras TR Blunt-end and single-strand ligations by Escherichia coli ligase influence on an in vitro amplification scheme Gene 1990 Apr 30, 89(1) 117-22.

[0331] Compton J Nucleic acid sequence-based amplification.

[0332] Nature. 1991 Mar 7 ; 350(613). 91-2

[0333] Fahy E, Kwok DY, Gingeras TR Self-sustained sequence replication (3SR). an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR.

[0334] PCR Methods Appl 1991 Aug ; 1(1) 25-33 Review.

[0335] The LiMA Technology Measurement of ATP on a Nucleic Acid Testing Platform Banin S, Wilson SM and Stanley CJ (2007). Clinical Chemistry 53, 2034-2036

[0336] Recent developments in ligase-mediated amplification and detection. Cao W (2004) Trends in Biotechnology 22(1), 38-44

[0337] 本发明不限于本文所述的具体实施方案的范围。事实上, 从上文的说明和附图, 对本发明进行除本文所述的多种修正对于本领域技术人员来说是明显的。这样的修正旨在落入所附权利要求的范围内。此外, 认为本文所述的所有实施方案是广泛适用的, 并且可酌情

与任意或所有其它相容的实施方案结合。

[0338] 本文引用了多个出版物,其公开内容通过援引并入本文。

序列表

<110> 伊赛奥技术有限公司

<120> 改进的微生物检测

<130>P93842W000

<150>0713255.8

<151>2007-07-09

<150>0713972.8

<151>2007-07-18

<150>0719785.8

<151>2007-10-10

<150>0802857.3

<151>2007-02-15

<150>0807054.2

<151>2007-04-17

<160>11

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>44

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>1

gccgatatcg gacaacggcc gaactgggaa ggcgcacgga gaga

44

<210>2

<211>45

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>2

cgtggtctct cegtgcgct tcccagttcg gccgttgtcc gatat

45

<210>3

<211>38

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>3

ccacgaagta ctagctggcc gtttgtcacc gacgccta

38

<210>4

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>4

taggcgtcgg tgacaaacgg ccagctagta ctt

33

<210>5

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>5

ggacaacggc cgaactggga agg

23

<210>6

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>6

taggcgtcgggtgacaaacgg ccagc

25

<210>7

<211>49

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>7

ccccggatcc cttagaattc ccctcagagg cactggagct ggagacgta

49

<210>8

<211>78

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚物

<400>8

gtgcctctga gccaggggag cagttcggcg tagtgatgac gagtctacga gtctacgagt
tctacgtctc cagctcca

60

78

<210>9

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>9

gagtctacga gtctacgagttct

23

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>10

tcatcactac gccgaactgc

20

<210>11

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400>11

ctcagaggca ctggagctgg agac

24

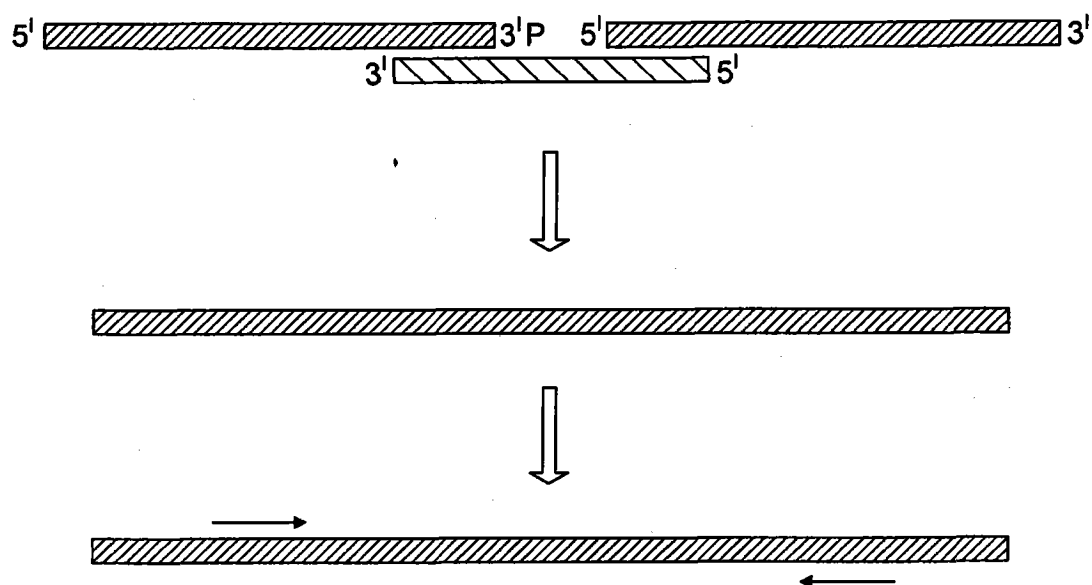


图 1

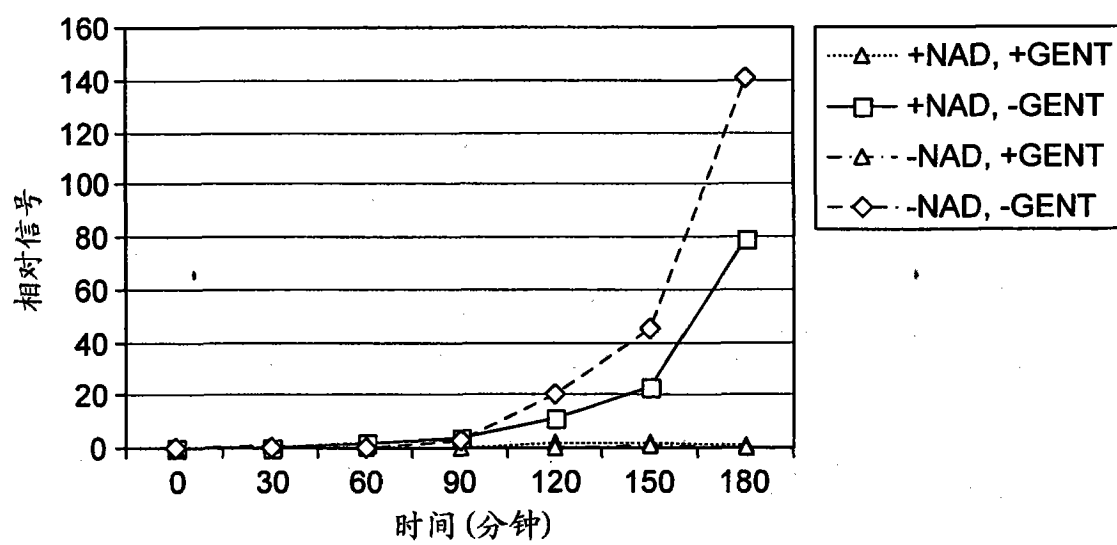


图 2

步骤1: 选择性裂解金黄色葡萄球菌细胞
并连接DNA底物: 30分钟(室温)



步骤2: 去除未被连接的DNA底物
(使用选择性特异性核酸酶): 30分钟, 37℃



步骤3: 使核酸酶失活: 5分钟, 95℃



步骤4: 加至PCR混合物并进行扩增(Taq-Man): 60分钟

图 3

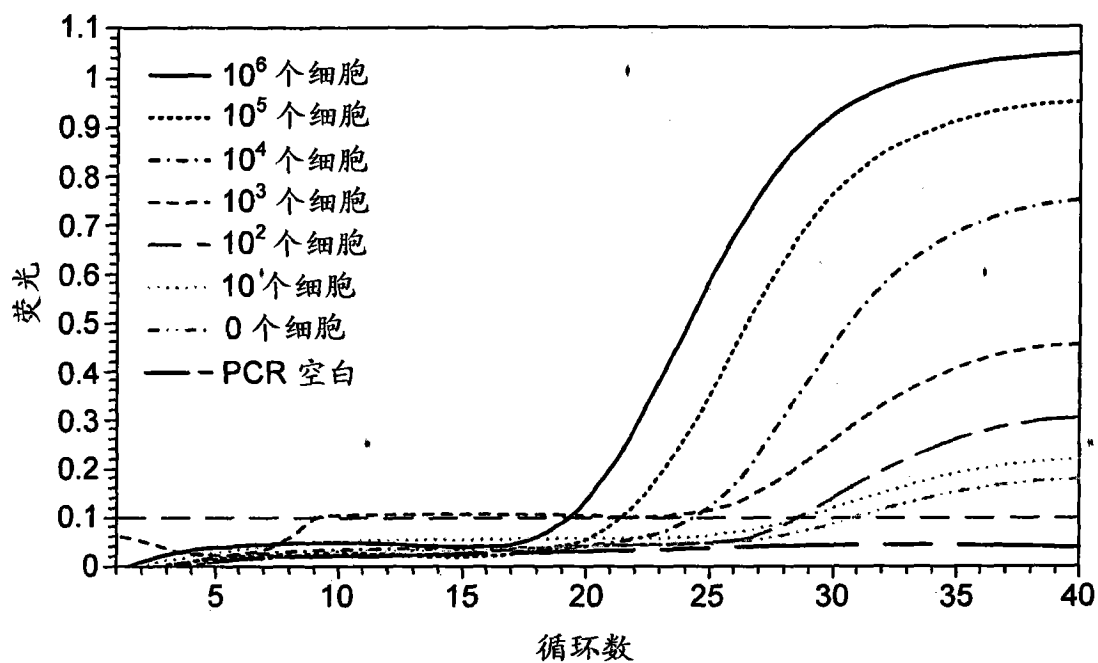


图 4

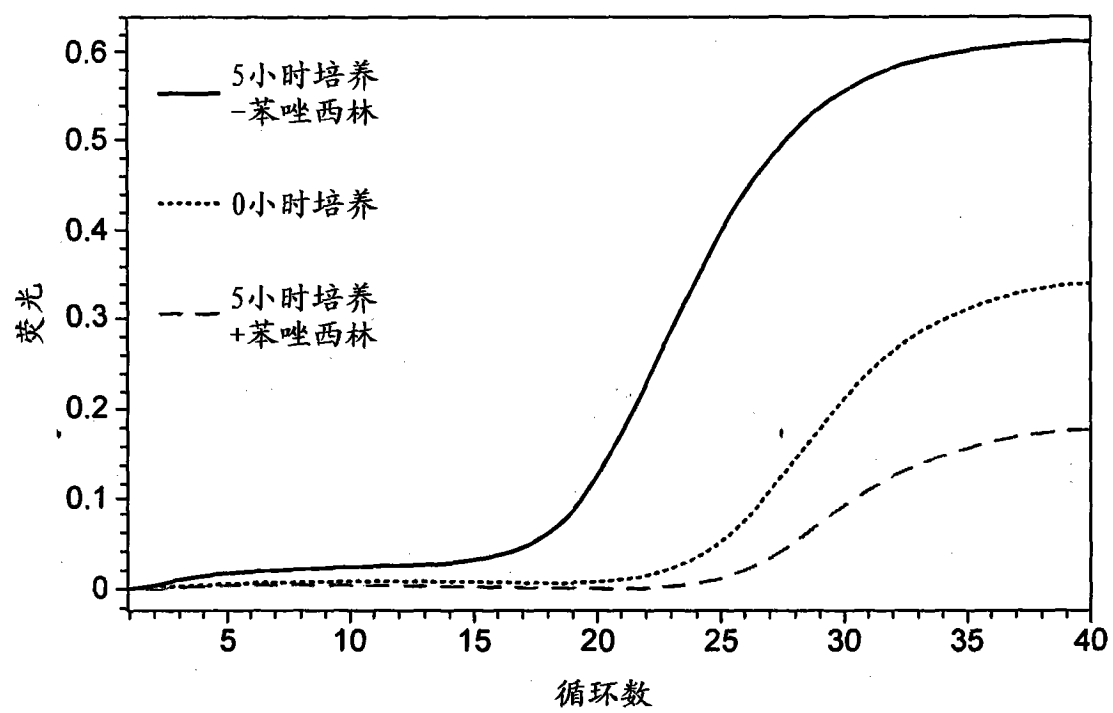


图 5