



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102869773 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 09

(21) 申请号 201180020389. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 03. 15

C12N 15/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

61/314, 318 2010. 03. 16 US

C12Q 1/04 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/028494 2011. 03. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02011/115975 EN 2011. 09. 22

(71) 申请人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·海利高斯 L·M·科勒

S·拉马丹 J·寇迪 T·J·赫雷尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

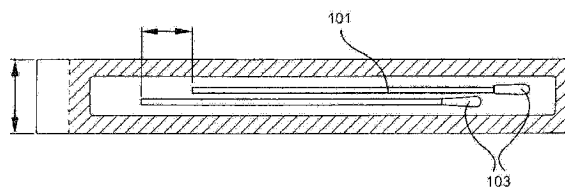
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

无色肽酶用于室温下裂解的用途

(57) 摘要

用于检测生物样品中革兰氏阳性细菌的存在或不存在的方法。所述生物样品可以获自任何哺乳动物并且至少含有细胞成分。将所述样品与酶裂解剂(如无色肽酶)混合,并且在室温下裂解。然后将氧化铁加入到含无色肽酶的样品中。将磁场施加于所述样品,并且从细胞成分中提取出核酸。如果存在,使用如聚合酶链反应(PCR)的技术扩增靶核酸,然后用于检测革兰氏阳性细菌的存在或不存在。金黄色葡萄球菌和无乳链球菌是通过本发明的方法检测的靶细菌的实例。



1. 用于从样品中可能存在的靶细菌中提取核酸的方法,包括:
 - a) 在室温下裂解包含细胞成分的生物样品,其中将所述生物样品与无色肽酶混合;
 - b) 将氧化铁颗粒与所述生物样品混合,其中来自所述裂解样品的核酸与氧化铁结合;和
 - c) 通过磁从所述生物样品中分离出与氧化铁颗粒结合的核酸。
2. 权利要求 1 的方法,其中使用磁场从所述生物样品中提取出所述核酸。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述氧化铁颗粒是未覆盖的。
4. 权利要求 1 的方法,其中将所述生物样品与缓冲液混合。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述缓冲液形成用于所述生物样品的等渗环境。
6. 权利要求 4 的方法,其中所述缓冲液维持所述细胞成分的存活力。
7. 权利要求 4 的方法,其中所述缓冲液形成具有受控 pH 的低盐环境。
8. 权利要求 5 的方法,其中所述缓冲液选自:10% 磷酸盐缓冲盐溶液;Amies 介质;Stuarts 介质和 Tris EDTA。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述靶细菌是革兰氏阳性细菌。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述靶革兰氏阳性细菌选自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和无乳链球菌(*Streptococcusagalactiae*)。
11. 权利要求 1 的方法,其中从基本上由尿液、精液、痰液、血液、唾液、粘液和粪便组成的组收集所述生物样品。
12. 权利要求 1 的方法,其中从环境中收集所述生物样品。
13. 权利要求 12 的方法,其中从水或土壤中收集所述生物样品。
14. 权利要求 12 的方法,其中从在环境中发现的任一个物体表面收集所述样品。
15. 用于从生物样品中可能存在的靶革兰氏阳性微生物中提取核酸的方法,包括:
 - a) 在室温下裂解包含细胞成分的生物样品,其中将所述生物样品与无色肽酶和 10% 磷酸盐缓冲盐溶液混合;
 - b) 将氧化铁颗粒与所述生物样品混合,其中所述裂解的生物样品中可能存在的核酸与氧化铁颗粒结合;和
 - c) 通过磁从生物样品中分离出与所述氧化铁颗粒结合的核酸。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述靶革兰氏阳性微生物是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)。
17. 权利要求 15 的方法,其中室温在约 18°C 至约 22°C 的范围内。
18. 用于检测生物样品中可能存在的靶微生物的存在或不存在的方法,包括:
 - a) 将所述生物样品与无色肽酶混合,其中所述生物样品至少包含细胞成分;
 - b) 在约 18°C 至约 22°C 的温度下,将至少一部分的所述生物样品的所述细胞成分裂解;
 - c) 将氧化铁颗粒与所述生物样品混合;
 - d) 如果存在,来自所述裂解细胞成分的核酸与至少一些所述氧化铁颗粒结合;
 - e) 使用磁场从所述生物样品中分离出核酸,如果存在,包括来自所述靶微生物的所述细胞成分的核酸;
 - f) 如果存在,扩增从所述靶微生物的所述细胞成分分离的核酸;
 - g) 进行试验,用于检测所述靶微生物的核酸的存在或不存在;和

h) 基于试验中检测的所述靶微生物的核酸的存在或不存在来确定靶微生物的存在或不存在。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述靶微生物是革兰氏阳性细菌。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述革兰氏阳性细菌选自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和无乳链球菌(*Streptococcusagalactiae*)。

21. 权利要求 18 的方法,其中将所述生物样品与选自 10% 磷酸盐缓冲盐溶液、Amies 介质、Stuarts 介质和 Tris EDTA 的缓冲液混合。

22. 权利要求 18 的方法,其中至少对于步骤 b)至 e)将所述生物样品维持在约 18℃至约 22℃的温度下。

无色肽酶用于室温下裂解的用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求享有 2010 年 3 月 16 日提交的美国临时专利申请 No. 61/314, 318 的申请日权益, 在此将其公开内容引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 某些革兰氏阳性细菌物种是已知的致病菌。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 是已知在哺乳动物中特别毒的感染的根本原因的两种类型的细菌。这些致病菌的检测对于成功的诊断和治疗是至关重要的。

[0005] 存在许多用于检测致病细菌的方法, 其中几种依赖于细菌细胞壁的裂解。裂解后, 随后从细胞成分中提取出核酸, 并且在下游过程 (如 PCR) 中扩增。然后将核酸的存在或不存在用作感染的指示。

[0006] 革兰氏阳性细菌的裂解特别困难, 部分是因为它们细胞壁的结构。革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌在它们的细胞壁内都含有肽聚糖层。该层由通过肽桥交联的聚糖链组成。然而, 在革兰氏阳性细菌中, 肽聚糖层内交联的数量、厚度和程度更强。Mahalanabis 等, Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip (在一次性微流体芯片中来自全血的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的细胞裂解和 DNA 提取), Lab Chip, 9, 2811-17 (2009)。这种更强的肽聚糖层使得革兰氏阳性细菌是对酶裂解的挑战。

[0007] 细菌分解酶无色肽酶是革兰氏阳性细菌的有效裂解剂。然而, 它并不是没有缺陷。尽管无色肽酶确实可以有效地裂解革兰氏阳性细菌的细胞壁, 但如果在一时间段后没有停止其活性, 则它将继续裂解进一步的下游分析 (如 PCR) 所需的其他关键的细胞组分。

[0008] 显著提高样品温度是停止无色肽酶的裂解活性的一种方法。这种温度的提高, 或者称为热峰, 可以停止该酶的任何裂解活性。然而, 形成产生这种类型的热系统是昂贵的并且给诊断平台增加了显著的复杂性。本发明通过消除热峰和使用提取方法来停止无色肽酶的裂解活性而克服了这些挑战。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明提供了一种使用无色肽酶作为裂解剂从生物样品中提取核酸的方法。在一个实施方案中, 从生物样品开始提取。尽管生物样品含有细胞成分, 但它还可能具有其他组分。然后将生物样品与无色肽酶混合, 并且在室温下裂解。如在此所用的, 将裂解定义为细胞壁和细胞膜通过外部的、机械或非机械方式的破裂。在此所述的方法可以实现裂解, 而不使用机械方式。在另一个实施方案中, 在 18 至 22°C 的特定温度下裂解样品。

[0011] 在进一步的实施方案中, 将样品与无色肽酶和 10% 磷酸盐缓冲盐水 (“PBS”) 溶液混合。PBS 溶液可以给生物样品提供等渗环境, 有助于维持样品内细胞成分的存活力, 并且可以进一步提供具有受控 pH 水平的低盐环境。

[0012] 除了 PBS 溶液, 本发明的其他实施方案还可利用 Amies 培养基、Stuarts 培养基和 Tris EDTA 作为缓冲剂。

[0013] 裂解后, 将样品加入到氧化铁中, 并且使用磁场从样品中提取出核酸。提取后, 然

后将核酸进行扩增,并且检测样品中革兰氏阳性细菌的存在或不存在。通过本发明检测的革兰氏阳性细菌是金黄色葡萄球菌和无乳链球菌。此外,本发明的方法可以用于靶向耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 说明了本发明的一个实施方案,其利用了取样棉签,该棉签具有可以折断并且留在采样管内的尖端;

[0016] 图 1A 说明了本发明的另一个实施方案,其利用了取样棉签,该棉签具有可以折断并且留在采样管内的尖端。

[0017] 图 2 是本发明的一个实施方案的透视图,其利用了圆柱形采样管,其具有能够容纳生物样品的锥形底;

[0018] 图 2A 是本发明的另一个实施方案的侧视图,其利用了能够容纳生物样品的圆柱形采样管;

[0019] 图 2B 是能够容纳生物样品的圆柱形采样管的俯视图;

[0020] 图 2C 是图 2 沿着 A 的横截面,其利用了具有能够容纳生物样品的锥形底的圆柱形采样管;

[0021] 图 2D 是本发明的另一个实施方案的侧视图,其利用了能够容纳生物样品的圆柱形采样管;

[0022] 图 3 是本发明的第三个实施方案的透视图,其利用了用于密封采样管的可刺穿盖;

[0023] 图 3A 是本发明的一个实施方案的平面图,其利用了用于密封采样管的可刺穿盖;

[0024] 图 3B 说明了本发明的一个实施方案的侧视图,其利用了用于密封采样管的可刺穿盖;

[0025] 图 3C 说明了图 3 沿着 B 的横截面,其利用了用于密封采样管的含有两层密封膜的可刺穿盖。

[0026] 详述

[0027] 在此描述了使用具有裂解特性的酶裂解细胞的方法。可以通过所讨论的方法裂解任何类型的细胞。在优选的实施方案中,裂解革兰氏阳性细菌。然而,使用本发明的方法,革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌都可以被裂解。该方法包括从裂解的细菌中提取核酸。然后将提取的核酸用于本领域技术人员已知的目的(即,从其提取核酸的靶物的诊断和检测)。由于核酸用于诊断和检测目的的用途是公知的,因此在此不详细描述用于分离和检测靶核酸的试验等。在优选的实施方案中,靶核酸是 DNA。

[0028] 使用在此所述的方法可以裂解任何细菌细胞。因此,本发明可用于诊断和检测多种细菌物种。本发明中有用的细菌物种的实例包括,但不限于,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和无乳链球菌(GBS)。通过在此所述的方法可以检测的其他细菌物种是砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)和淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)。

[0029] 使用任何常规方法来收集根据在此所述的方法测试靶细菌的存在或不存在的样品,并且决不限于该样品的来源。可以通过在此所述的方法来分析任何潜在的细菌源。

[0030] 可以通过常规方式,如棉签、抽血、尿样等,来进行样品采集。在一个实施方案中,样品可以获自阴道-直肠擦拭物。在一个优选实施方案中,细菌样品可以获自鼻擦拭物。可

以使用上述任一种常规收集方法,从尿液、精液、痰液、血液、唾液、粘液、粪便或源自人和动物的任何其他组织或流体来收集样品。

[0031] 在本发明的另一个实施方案中,可以从环境中收集样品,包括但不限于水和土壤样品。使用上述常规方法,如擦拭,来收集这些样品。除了水和土壤,可以通过本领域已知的那些方法来擦拭任何表面或物体并且通过在此所述的方法来分析。本发明人充分考虑了使用本发明的实施方案来检测整个环境中不同位置的细菌的存在。这包括但不限于如柜台、门把手、汽车操作杆这类物体的表面,浴室表面和本领域技术人员可能认为含有细菌的环境内的任何其他物理位置。

[0032] 在所述的方法中,使用无色肽酶来裂解细菌,以从该生物体中释放出核酸所述生物体提取自用于检测的样品。所述核酸是样品中靶细菌存在的信号指示。因为已知无色肽酶对提高的盐度是敏感的,因此优选采用在以下详述的某些步骤,以获得和制备用于使用无色肽酶裂解的样品。

[0033] 在一个实施方案中,通过收集和转移装置来收集样本。图 2 说明了转移装置的一个实例。该转移装置是其中使用湿棉签收集含有靶生物体的样品(如, MRSA、GBS 等)的系统。

[0034] 本发明的一个实施方案使用了图 1 和 1A 中所示的棉签。湿棉签收集装置的目的是促进现场样品收集并延长收集的生物体的存活力。棉签自身具有构造成获得擦拭样品的顶端 103。可以通过本领域普通技术人员公知的方式来设计顶端 103。棉签还可以含有孔 101,使得擦拭样品部位后,例如,鼻通道的棉签,收集部分可以在收集部位断裂到转移管 201 中。

[0035] 图 2、2A、2B、2C 和 2D 中说明了转移管 201。管 201 的形状通常是圆柱状的,并且含有开口 202 和样品空间 211。管 201 含有顶部 203,其可具有置于其上的螺纹,和底部 207。在一个实施方案中,底部 207 可以是锥形的 209。

[0036] 其中容纳棉签的转移管 201 可适于接收可刺穿盖 301,如图 3、3A、3B 和 3C 中所示。收集后,使棉签断裂至管 201 中,并且通过可刺穿盖密封管 201。

[0037] 在一个优选的实施方案中,可刺穿盖 301 配有升高的以轴向放置的突出 303,以有助于用手抓住盖 301。盖 301 也可以是带螺纹的(305),以牢固地将盖 301 连接于管 201 的螺纹 205 上。在优选的实施方案中,盖 301 可以含有上层膜 307 和下层膜 309,用于减少烟雾化和污染。在此引入作为参考的是共同转让的美国专利系列号 11/785,144 和 11,979,713,其描述了可刺穿盖的共同转让结构和设计及其使用方法,在此没有进行详细描述。

[0038] 优选地,选择该管内所含的转移介质以保持潜在在未来培养物的存活力。在一个优选的实施方案中,转移介质是 10% 磷酸盐缓冲盐水(“PBS”)溶液。如在此所讨论的,该溶液有助于维持细胞成分的存活力,并且还提供了低盐环境,并具有对于无色肽酶裂解有利的受控 pH。因为从转移介质中提取用于裂解和检测的样品,因此重要的是与该样品一起提取出来的转移介质不会阻碍或者不利地影响裂解。

[0039] 特别地,其特性与人体流体的特性相似的转移介质在保存细胞完整性和生物体存活力中是有用的。在这点上,优选使用 10%PBS 溶液,并且在此讨论的转移装置不依赖于使用任何特定的转移介质。因此,认为任何常规转移介质都适于与本发明一起使用,只要其满足如之前所述的保持细胞存活力的标准。这样的转移介质是本领域技术人员公知的,因

此在此没有进行详细描述。其他转移介质可以包括,但不限于 Stuarts 介质、Amies 介质和 Tris EDTA (“TE”)。优选稀释这些介质,以形成具有上述盐度和 pH 环境的环境。如在此所讨论的,形成等渗环境的介质可以提供最佳的裂解环境。

[0040] 如上所述,高盐含量可以抑制无色肽酶的裂解活性。某些低盐介质,如上述的那些,保持了无色肽酶的活性。在一个优选的实施方案中,转移介质是上述的 10%PBS 溶液的溶液。使用 100%PBS 溶液来制备该稀释溶液,100%PBS 溶液是通过将 0.023mM 磷酸二氢钾、0.629mM 磷酸氢二钾、14.5mM 氯化钠和水混合而制得的。在另一个实施方案中,使用了 10%至 50%的 Stuarts 介质。表 1 说明了 Stuarts 介质中的组分。

[0041] 表 1-100%Stuarts 介质

[0042]

试剂	量
氯化钙	0.10g
氯化钠	1mL
甘油磷酸钠	10g

[0043] 在另一个优选的实施方案中,可以使用 10%至 50%的 Amies 介质。表 2 描述了 100%Amies 介质的组成。

[0044] 表 2-100%Amies 介质

[0045]

试剂	量
氯化钙	0.1g/L
磷酸二钠	1.15g/L
氯化镁	0.2g/L
磷酸二氢钾	0.2g/L
氯化钾	0.2g/L
氯化钠	0.2g/L
硫代乙醇酸钠	1.0g/L

[0046] 部分地,PBS、Amies 介质、Stuarts 介质和 TE 是结合酶裂解有用的缓冲剂,并且特别是无色肽酶裂解,因为它们提供了与人体流体中发现的相似的等渗环境。

[0047] 在另一个优选的实施方案中,将含有样品和上述介质的收集管进行构造,使得可以将其直接置于测试样品中靶核酸存在或任何进一步分析的装置中。这强调了转移介质和裂解环境之间需要协同。收集管内的样品中的生物体裂解后,将该管直接置于用于自动化提取和分析靶核酸存在或不存在的工具中。一种这样的工具是 Viper™XTR 平台,其从

(Becton Dickinson Sparks, MD) 可购得。

[0048] 在此所述的一个实施方案提供了细菌样品的酶裂解,从样品提取 DNA 以及提取的细菌 DNA 随后在诊断程序中的使用。以及如上所述的,优选无色肽酶(“ACH”),也称为赖氨酸内肽酶,用作细菌分解酶来裂解细菌金黄色葡萄球菌和无乳链球菌。无色肽酶具有细菌分解以及蛋白分解特性。尽管将无色肽酶用作一般的细菌分解剂,但其对于裂解能够抵抗其他细菌分解酶(例如,溶菌酶)革兰氏阳性细菌特别有用。认为这种抵抗力与革兰氏阳性细菌的细胞壁中存在的化学物质有关,但该化学物质不存在于革兰氏阴性细菌中。也就是说,在此所述的方法不限于使用无色肽酶来裂解,并且可以使用任何酶裂解剂(例如,溶菌酶)来进行。

[0049] 已知当在 37°C 至 50°C 范围的温度下与细菌样品一起培养时,无色肽酶是有效的裂解酶。然而,溶菌酶,如无色肽酶,必须在裂解后灭活,因为它们持续的蛋白水解活性不利地影响提取的核酸随后的诊断和检测。获得裂解活性停止的方法包括对样品进行热峰以停止无色肽酶的蛋白水解作用。对于本发明来说,将“热峰”定义为样品温度提高至约 95°C。一种提供热峰的常规方法是将放置样品的模块加热至 95°C,持续五分钟。

[0050] 一旦样品被裂解,可以从样品成分的剩余部分中提取出核酸。在在此所述的方法中,认为本领域中已知的任何核酸提取机制都是有用的。这样的机制是公知的,因此在此没有进行详细描述。在一个优选的实施方案中,在 Viper™XTR 上进行提取。Viper™XTR 结合非选择性核酸提取,该提取使用 FOX 颗粒从含有 KOH 和其他组分的提取溶液进行提取。

[0051] 裂解、提取溶液和物理条件之间的相互影响是复杂的并且是互相依赖的。在这些环境中,难以精确画出裂解结束和提取开始之间的线。此外,裂解溶液对提取机制的影响也没有得到充分了解。也就是说,在此公开的是特别有利的裂解和提取条件的组合,其允许使用无色肽酶的室温裂解。这种组合获得了无色肽酶用于裂解的全部益处并且避免了无色肽酶对提取的核酸的不利影响。尽管申请人不希望受缚于特定的理论,但是申请人认为使用无色肽酶的室温裂解,接着使用 KOH 和与其一起使用的其他提取溶液成分中的氧化铁颗粒的非选择性核酸提取,提供了特别有利的裂解和提取实验方案。该优选实施方案没有排除其他提取方案与在此所述的室温无色肽酶裂解一起使用,只要避免无色肽酶对提取的核酸的不利影响。对于备选提取实验方案选择的研究在本领域技术人员的能力范围之内。

[0052] 在在此所述方法的一个方面中,在室温下进行用无色肽酶的孵育,接着进行用氧化铁(Fe_2O_3) (“FOX”)颗粒的核酸提取。在孵育和提取的过程中,样品温度和环境温度都是室温。如在此所用的,将“室温”定义为约 16°C 至约 22°C 范围的温度。或者,可以在高于室温的温度下进行无色肽酶裂解。然而,在这些较高温度下的裂解不太优选。

[0053] 提高样品中无色肽酶的浓度使得裂解可以在较低温度下发生。然而,较高的无色肽酶浓度可能使分析更困难并且可能需要更长的孵育时间。根据在此所述的方法,在室温下孵育和提取,不需要热峰,使得可以使用较高浓度的无色肽酶,而没有之前遇到的伴随的困难。结果是较短的孵育时间和潜在较高的可用核酸产率。

[0054] 样品中的细胞裂解后,从剩余的裂解样品中提取核酸。通过将氧化铁(Fe_2O_3) (“FOX”)引入细菌样品中来进行提取。FOX 颗粒与裂解样品的带负电荷的 DNA 结合。然后将磁场施加至该样品,以吸附结合的 DNA,并且通过常规方法除去洗脱液。该提取程序在从裂解细菌提取 DNA 中是成功的。将 FOX 颗粒用于在 BD Viper™ 系统中的核酸提取。

[0055] 一旦提取出 DNA, 可以进行进一步的分析, 用于诊断和检测的目的。下游分析的实例包括, 但不限于, 聚合酶链反应、凝胶电泳等。用于生物测试从样品提取的生物样品中靶核酸存在或不存在的平台包括 BD Viper™ 系统。

[0056] 用于实施例的实验方案

[0057] 在以下实施例中, 研究了裂解以及随后从细菌中提取 DNA 所需的条件。在以下实施例中存在的两种细菌生物体是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(“MRSA”)金黄色 *Ros* enbach 亚种 ATCC#43300 和无乳链球菌(“GBS”) ATCC#12973, ATCC 命名为模式菌株 V8。溶菌酶, 即无色肽酶(“ACH”)(获自 Wako Chemicals USA)被用作以下所有实施例中的裂解剂。

[0058] 为了证明 ACH 对 MRSA 和 GBS (总称为“细菌样品”) 的裂解作用, 将该细菌样品与不同浓度的无色肽酶混合, 并且在室温下孵育不同的时间。

[0059] 对于以下每个实施例, 将 7.5×10^4 CFU/ml 生物体与每个实施例中所述的其他组分混合。检查了该组分和条件对裂解和核酸提取的影响。

[0060] 在 BD Viper™ 系统上利用氧化铁(FOX)技术来进行了核酸提取。BD Viper™ 系统是可购得的, 因此在此没有详细描述其操作。首先, 将裂解的细菌样品置于 BD Viper™ 系统中。将细菌样品与 FOX 混合, FOX 颗粒与裂解的细菌核酸的核苷酸片段, 包括细菌 DNA 结合。接着, 使样品接受磁场, 以从样品的其他部分中分离出结合的核酸。用磁场分离后, 除去该样品的其他成分。然后在用于 PCR 的准备中, 从 FOX 颗粒中洗脱出核酸组分。在孵育过程中没有使用热峰来停止 ACH 的裂解作用。

[0061] 通过循环阈值(“Ct”)测量了裂解程序和随后的 DNA 提取的结果。如在此所用的, 将循环阈值定义为荧光通过固定阈值时的部分循环数。循环阈值是用于确定样品中临床上有意义量的核酸的正向指示的公知技术, 因此在此没有进行详细描述。

[0062] 对于 MRSA, 循环由将提取的 DNA 样品的温度提高至 95°C 持续 15 秒, 接着 59°C 暴露 60 秒组成。对于 GBS, 循环由将提取的 DNA 样品的温度提高至 95°C 持续 15 秒, 接着 56°C 暴露 60 秒组成。对于 MRSA 和 GBS, 分别运行四十五个循环。对应于超过循环阈值的荧光读数的循环数就是 C t。

[0063] 低于 30 的 Ct 值表示样品中丰富量的靶核酸。对于在此所述的实施例来说, 30-35 之间的 Ct 值表示中等至低的阳性反应, 并且被认为是良好的结果。35 至 45 之间的 Ct 值表示弱的反应, 并且表明仅有少量 DNA 从样品中提取出来。高于 45 的 Ct 值表示其中未能检测到 DNA 的样品。

[0064] 实施例 1- 室温裂解

[0065] 将 MRSA 和 GBS 在培养物中生长, 然后在单个试管中稀释, 每个含有一 mL 1X TE (10mM Tris/1mM EDTA) 溶液, 以获得溶液中约 7500CFU/ml 的细菌浓度。随后, 将样品强化(spike), 以获得靶生物体。

[0066] 将 ACH 溶解于 1X TE 中, 并且与稀释的细菌样品混合。每个样品中 ACH 的浓度范围为 1.01U/μl 至 5.05U/μl。将所得到的细菌和无色肽酶悬浮液在 22°C 或 37°C 下孵育 10 分钟至 30 分钟的范围。每一 mL 细菌样品中的 ACH 终浓度范围为约 1000U 至约 5000U。

[0067] 孵育后, 根据在此所述的实验方案, 使用 BD Viper™ 系统提取包括基因组 DNA 的核酸。提取后, 进行 PCR 来扩增提取的 DNA。

[0068] 提取后立即在 ABI 7500 序列检测系统(Applied Biosystems)上进行 PCR。对于

每个样品,设定 50 μ L PCR 反应,含有以下成分:200uM dNTPs (三磷酸脱氧核糖核苷酸);2U FastStart Taq 聚合酶;0.9 μ M 右和左引物(Routing 04738403001);0.25 μ M 靶特异性分子信标;和 60nM ROX (参照染料),所有都是可购得的 PCR 缓冲液(Roche)。

[0069] 在含有 MRSA 和 GBS 样品的 PCR 过程中所用的热特征为:50°C,2 分钟;95°C,10 分钟;以及 95°C 15 秒和 59°C 1 分钟的 45 个循环。

[0070] 扩增后,测试的所有样品都具有低于 35.0 的 Ct 值。这些 Ct 值表示可以用 FOX 技术提取 MRSA 和 GBS DNA,接着用 ACH 室温裂解,而不必进行热峰来停止裂解。

[0071] 实施例 2- 使用较宽范围的 ACH 浓度的室温裂解

[0072] 根据在此所述的实验方案制备了细菌样品,并且使用 1X TE 溶液稀释,以获得约 7500CFU/mL 的浓度。

[0073] 将含有稀释细菌的样品与溶解于 1X TE 中的无色肽酶溶液混合,ACH 的浓度范围为 3.03U/ μ L 至 7.07U/ μ L,使得终浓度为 3000U 至 7000U。将含有细菌和无色肽酶的样品在室温下孵育 20 分钟,使得可以裂解。

[0074] 孵育后,根据在此所述的实验方案,使用 BD Viper™ 系统提取包括基因组 DNA 的核酸。提取后,进行 PCR 来扩增提取的 DNA。

[0075] 在 ABI 7500 序列检测系统(Applied Biosystems)上进行 PCR。对于每个样品设定 50 μ L PCR 反应(200 μ M dNTPs,2U FastStart Taq 聚合酶,0.9 μ M 右和左引物,0.25 μ M 靶特异性分子信标,60nM ROX,所有都是可购得的 PCR 缓冲液(Roche))。用于 MRSA 的以下热特征为:50°C,2 分钟;95°C,10 分钟;以及 95°C 15 秒和 59°C 1 分钟的 45 个循环。用于 GBS 的以下热特征为:50°C,2 分钟;95°C,10 分钟;95°C 15 秒和 56°C 1 分钟的 45 个循环。

[0076] 从使用 4000 至 6000U ACH 裂解的样品获得了最佳结果。所有这些样品都产生了低于 35.0 的 Ct 值,表示当与 FOX 提取技术结合时,利用宽范围 ACH 浓度的室温裂解是可行的。

[0077] 实施例 3- 使用两个 ACH 浓度水平的室温裂解和生物体水平的滴定

[0078] 通过生长培养物制备了 MRSA 和 GBS 样品,然后将样品稀释至五个不同的测试水平。将样品在 1X TE 中稀释至以下的水平:75000、35000、7500、5000 和 1000CFU/mL。将无色肽酶溶解于 1X TE 中。将稀释的细菌样品与 3.03 或 5.05U/ μ L 浓度的溶解无色肽酶溶液混合,使得最终的 ACH 浓度为 3000U 或 5000U。将细菌样品和无色肽酶在 22°C 下孵育 20 分钟。

[0079] 孵育后,根据在此所述的实验方案,使用 BD Viper™ 系统提取包括基因组 DNA 的核酸。提取后,进行 PCR 来扩增提取的 DNA。

[0080] 在 ABI 7500 序列检测系统(Applied Biosystems)上进行 PCR。对于每个样品设定 50 μ L PCR 反应(200 μ M dNTPs,2U FastStart Taq 聚合酶,0.9 μ M 右和左引物,0.25 μ M 靶特异性分子信标,60nM ROX,所有都是可购得的 PCR 缓冲液(Roche))。

[0081] 用于 MRSA 的以下热特征为:50°C,2 分钟;95°C,10 分钟;95°C 15 秒和 59°C 1 分钟的 45 个循环。用于 GBS 的以下热特征为:50°C,2 分钟;95°C,10 分钟;以及 95°C 15 秒和 56°C 1 分钟的 45 个循环。

[0082] 检测了所有靶水平的所有样品,Ct 值范围为 27.5 至 36.2。结果没有显示出测试的任一个浓度的 ACH 之间的实质性差异。Ct 值表示当与 FOX 提取技术结合时,利用多个 ACH

浓度的室温裂解是可行的,并且产生了足以进行本领域技术人员已知的分析(例如,PCR)量的 DNA。

[0083] 实施例 4- 环境温度提取数据

[0084] 根据实施例 2 中所述的方法,在 TE 缓冲液中进行了 GBS 和 MRSA 的测试。使用无色肽酶在 37℃ 下将该实验中的生物体裂解 30 分钟。一个实验对象亚组经受了 95℃ 热杀灭 5 分钟,接着用 FeO 提取。另一个亚组经受了没有使用热杀灭的 FeO 提取,而最后一个亚组的生物体直接进行 PCR 反应,没有任何提取(同样使用和没有使用热杀灭)。作为对照,另一组样品没有裂解并且没有接受热杀灭,但接受了提取和分析。以下的表 3 和表 4 分别表示 GBS 和 MRSA 的结果。如表 3 和 4 所示的,每个亚组经受了两个重复。这通过命名“重复 1”和“重复 2”来表示。接着,对于每个重复,进行了两次 PCR。循环极限(“Ct”)显示于表 3 和 4 中。对于所有样品,较低的 Ct 表示从原始样品中收集了较高的 DNA。对于没有经受提取的样品,在裂解后,对每种样品直接进行了 PCR。

[0085] 表 3:

[0086] GBS- 提取的样品

[0087]

	37℃ 裂解, 30'				未裂解			
	95℃ 热杀灭		未热杀灭		未热杀灭		gDNA	PC
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2		
cfu/rxn	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	1000
Ct	28.85	30.76	29.11	30.98	39.81	39.69	37.30	31.54
	29.36	29.40	30.98	30.78	43.77	38.96	35.62	31.92
平均	29.10	30.08	30.04	30.88	41.79	39.32	36.46	31.73
Sdev	0.36	0.96	1.32	0.15	2.80	0.52	1.19	0.27

[0088] 直接 PCR (3ul)

[0089]

	37℃ 裂解, 30'							
	95℃ 热杀灭		未热杀灭				gDNA	
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2				
cfu/rxn	225	225	225	225			225	
Ct	31.06	30.65	40.72	43.43			33.81	
	30.63	30.67	44.72	U			33.50	
平均	30.85	30.66	42.72	43.43			33.65	
Sdev	0.31	0.02	2.83	U			0.22	

[0090] 表 -4 :

[0091] MRSA- 提取的样品

[0092]

	37℃裂解, 30'				未裂解			
	95℃热杀灭		未热杀灭		未热杀灭		gDNA	PC
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2		
cfu/rxn	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	1000
Ct	30.05	28.73	30.35	31.25	35.40	34.97	35.56	32.41
	29.94	28.34	30.78	32.63	34.70	34.74	35.89	31.57
平均	30.00	28.54	30.57	31.94	35.05	34.85	35.72	31.99
Sdev	0.08	0.28	0.30	0.97	0.50	0.16	0.23	0.59

[0093] 针对 PCR (3 μl)

	37℃裂解, 30'							
	95℃热杀灭		未热杀灭				gDNA	
	重复 1	重复 2	重复 1	重复 2				
cfu/rxn	225	225	225	225			225	
Ct	30.02	27.58	36.41	38.06			33.48	
	30.52	30.23	U	33.36			34.32	
平均	30.27	28.90	36.41	35.71			33.90	
Sdev	0.36	1.87	U	3.32			0.59	

[0094] 如表 3 和 4 所示, 在 37℃ 下裂解 30 分钟并且提取而没有使用热杀灭的生物体具有与经受了热杀灭的那些生物体相似的结果。认为任何低于 35 的平均 Ct 值是阳性收集。如通过表 3 和表 4 所示, 没有裂解并且没有接受热杀灭的生物体, 对于 GBS 具有高于 39 的 Ct 值, 对于 MRSA 具有高于 34.5 的 Ct 值。使用没有裂解并且没有接受热杀灭的生物体显示出实验组在从样品生物体提取 DNA 中实际上是有效的。

[0095] 在 GBS 和 MRSA 的两种情况中, 对于没有暴露于热杀灭的裂解生物体的平均 Ct 值基本上等于那些暴露于热杀灭的裂解生物体。这些结果表明可以使用无色肽酶从细菌中成功地提取临床上有用量的 DNA, 并且使用 FeO 进行提取而没有使用热杀灭。

[0096] 尽管在此已经参照特定的实施方案描述了本发明, 但应当理解这些实施方案仅仅是本发明的原理和应用的说明。因此, 应当理解可以对说明性的实施方案进行各种改变, 并且可以设计其他安排, 而不脱离所附权利要求限定的本发明的精神和范围。

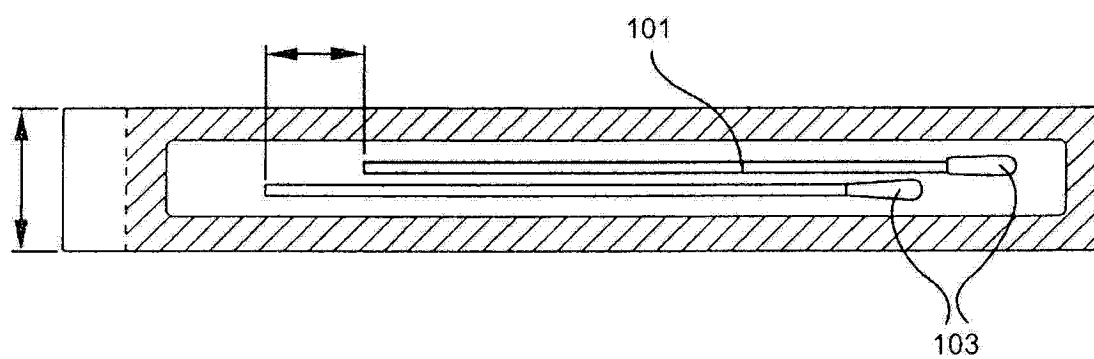


图 1

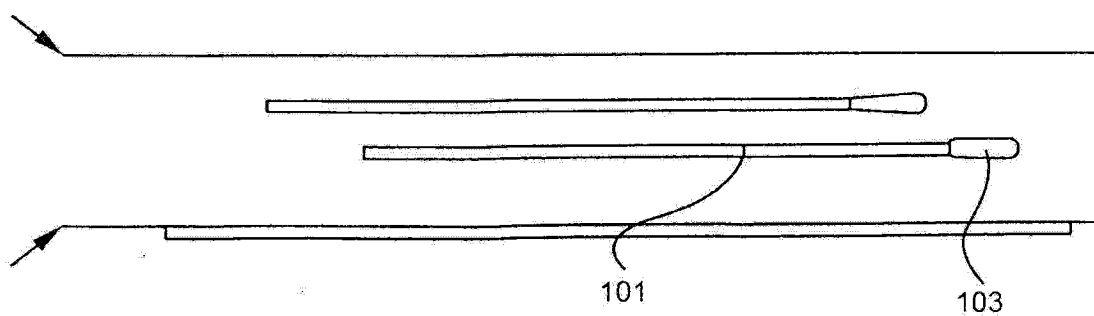


图 1A

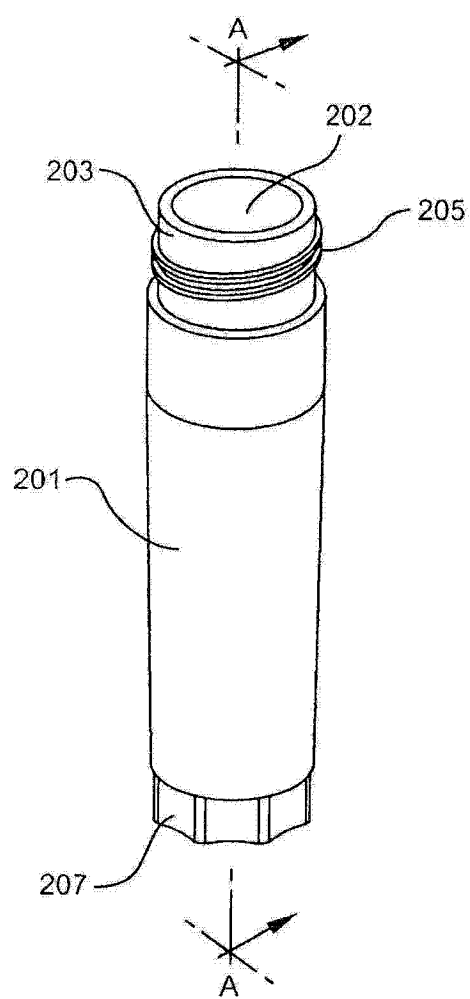


图 2

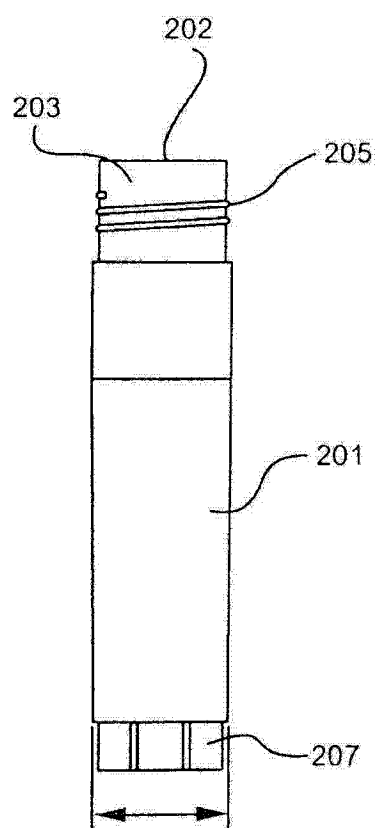


图 2A

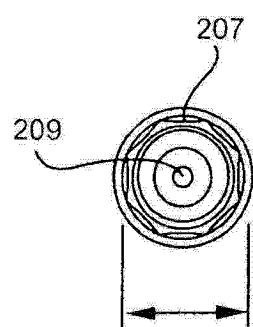


图 2B

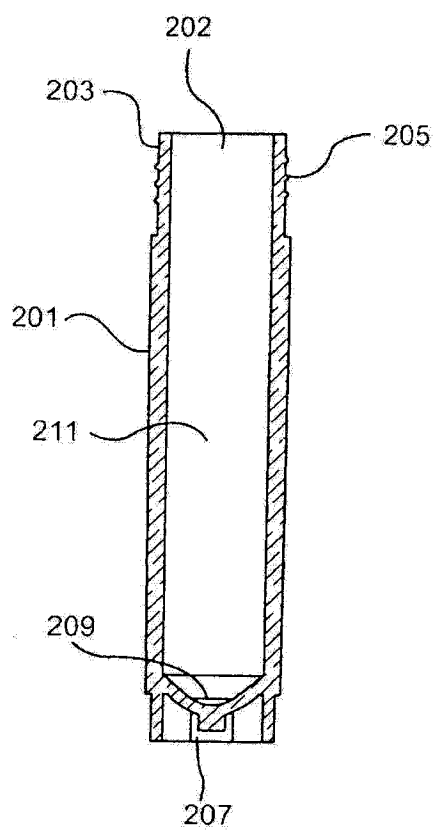


图 2C

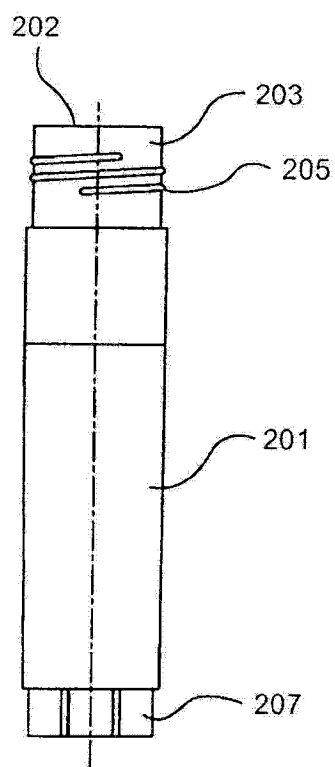


图 2D

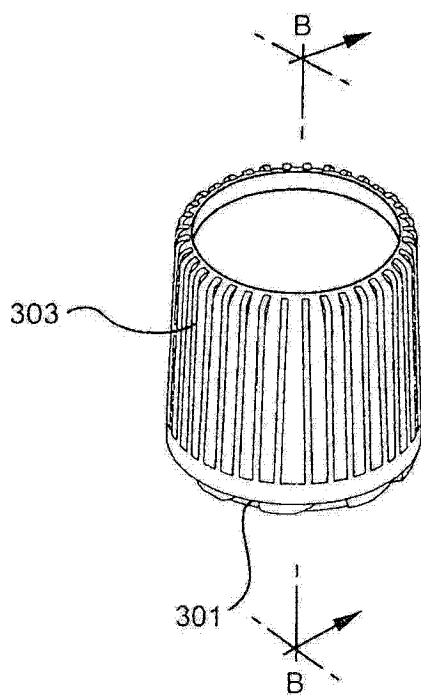


图 3

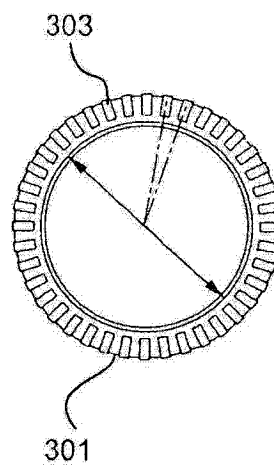


图 3A

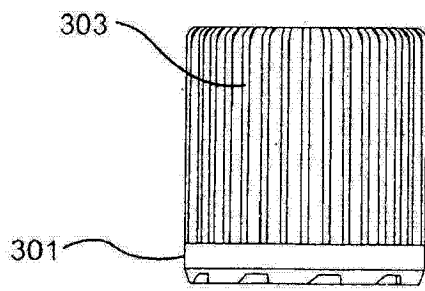


图 3B

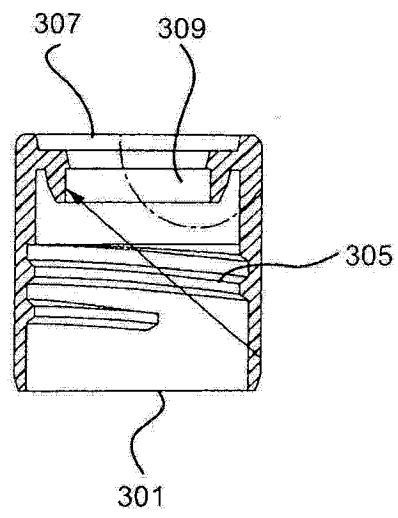


图 3C