



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106164292 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 22

(21) 申请号 201580009181.7
 (22) 申请日 2015.02.20
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106164292 A
 (43) 申请公布日 2016.11.23
 (30) 优先权数据
 14290046.3 2014.02.21 EP
 14290047.1 2014.02.21 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.08.18
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2015/000393 2015.02.20
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02015/124315 EN 2015.08.27
 (73) 专利权人 默克专利股份公司
 地址 德国达姆施塔特
 专利权人 私募蛋白质体营运公司
 (72) 发明人 A. 鲍姆斯蒂姆勒
 F. 马克-克勒谢尔 D. 莱曼
 U. 奥克斯纳 N. 詹吉克
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 专利代理师 梁谋 彭昶

(51) Int.Cl.
 C12Q 1/689 (2018.01)
 C12Q 1/14 (2006.01)
 G01N 21/64 (2006.01)
 C12R 1/445 (2006.01)

(56) 对比文件

Urs A. Ochsner et al..Detection of Clostridium difficile toxins A, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers.《Diagnostic Microbiology and Infectious Disease》.2013,摘要,2.2-2.7部分,表1、3,图1,第284页右栏.

Urs A. Ochsner et al..Detection of Clostridium difficile toxins A, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers.《Diagnostic Microbiology and Infectious Disease》.2013,摘要,2.2-2.7部分,表1、3,图1,第284页右栏.

Larry Gold et al..Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery.《PLOS ONE》.2010,摘要,第9-15页. (续)

审查员 沈晶晶

权利要求书1页 说明书18页 附图2页

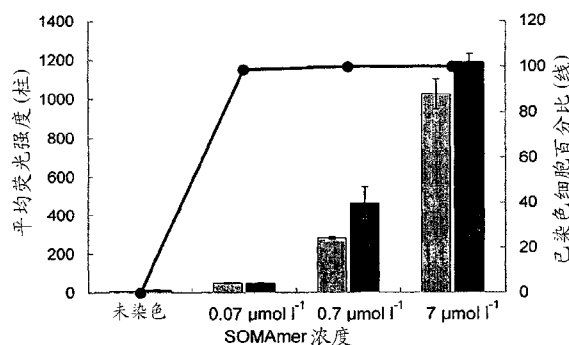
(54) 发明名称

使用SOMAmer通过基于荧光的检测方法检测样品中微生物的方法

(57) 摘要

本发明涉及检测样品中微生物特别是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的方法,包括步骤:a)将所述样品与包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体(SOMAmer)温育;b)任选地洗涤所述样品;c)通过基于荧光的检测方法分析所述样品.本发明还涉及包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体,其中所述SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列,其用于检测样

品中的金黄色葡萄球菌细胞,并且涉及包括至少一种此类包含荧光标记的SOMAmer的微阵列或生物传感器以及试剂盒。



CN 106164292 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Stephan Kraemer et al..From SOMAmer-Based Biomarker Discovery to Diagnostic and Clinical Applications: A SOMAmer-Based, Streamlined Multiplex Proteomic Assay.《PLOS ONE》.2011,第1-3页,图1.

Stephan Kraemer et al..From SOMAmer-Based Biomarker Discovery to Diagnostic and Clinical Applications: A SOMAmer-Based, Streamlined Multiplex Proteomic Assay.《PLOS ONE》.2011,第1-3页,图1.

1. 检测样品中金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的方法, 包括步骤:
 - a) 将所述样品与包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体 (SOMAmer) 温育;
 - b) 任选地洗涤所述样品;
 - c) 通过基于荧光的检测方法分析所述样品,其特征在于, 所述SOMAmer的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示, 并且所述修饰是经C-5修饰的嘧啶:5-色氨酸基-dU (TrpdU);
其中所述方法不用于疾病诊断。
2. 根据权利要求1的方法, 其特征在于, 所述基于荧光的检测方法是选自以下的方法: 流式细胞术、固相式细胞术、基于荧光的分析方法和荧光成像系统。
3. 根据权利要求1或2的方法, 其特征在于, 所述样品为食物或饲料样品、饮料样品、药物样品、个人护理或化妆品样品和/或水样。
4. 根据权利要求1至3中一项或多项的方法, 其特征在于, 所述SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列。
5. 根据权利要求1至4中一项或多项的方法, 其特征在于, 所述荧光标记选自荧光素染料、若丹明染料、花青染料、甲藻叶绿素 (PerCP)、R-藻红蛋白、香豆素染料和量子点。
6. 包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体 (SOMAmer) 在制备用于通过以下方法检测样品中金黄色葡萄球菌的试剂中的用途, 其中所述方法包括步骤:
 - a) 将所述样品与所述SOMAmer温育;
 - b) 任选地洗涤所述样品;
 - c) 通过基于荧光的检测方法分析所述样品,其特征在于, 所述SOMAmer的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示, 并且所述修饰是经C-5修饰的嘧啶TrpdU。
7. 根据权利要求6的用途, 其特征在于, 所述基于荧光的检测方法是选自以下的方法: 流式细胞术、固相式细胞术、基于荧光的分析方法和荧光成像系统。
8. 根据权利要求6或7的用途, 其特征在于, 所述样品为临床样品、食物或饲料样品、饮料样品、药物样品、个人护理或化妆品样品和/或水样。
9. 根据权利要求6-8中任一项的用途, 其特征在于, 所述SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列。
10. 根据权利要求6-9中任一项的用途, 其特征在于, 所述荧光标记选自荧光素染料、若丹明染料、花青染料、甲藻叶绿素 (PerCP)、R-藻红蛋白、香豆素染料和量子点。

使用SOMAmer通过基于荧光的检测方法检测样品中微生物的方法

[0001] 本发明涉及检测样品中微生物特别是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的方法,其包括步骤:a) 将所述样品与包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体 (SOMAmer) 温育;b) 任选地洗涤所述样品;c) 通过基于荧光的检测方法分析所述样品。

[0002] 本发明还涉及包含荧光标记的SOMAmer,其中所述SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列,其用于检测样品中的金黄色葡萄球菌细胞,并且涉及包括至少一种此类包含荧光标记的SOMAmer的微阵列或生物传感器以及试剂盒。

[0003] 对于食物、水、非无菌产品或环境的微生物污染的监测通常基于传统的微生物学方法,如培养方法。对于检测特定的微生物,可以使用选择性或鉴别性培养基,其分别允许仅选定的微生物生长或将一种微生物类型与生长在相同培养基上的另一种微生物区分开来。这些方法需要若干天以得到结果,因为其依赖于微生物生长以产生可见菌落的能力。即使其耗时,但其一直是标准的检测方法。

[0004] 在过去的二十多年里,在快速微生物学领域兴起了许多技术和检测系统,如基于核酸扩增的技术 (NAAT) 和免疫测定法。相比传统的基于培养的方法,这些替代技术减少了检测时间。

[0005] 已知NAAT可以在数小时内得出污染结果。然而,此技术有若干缺点,如方案的复杂性(需要很高专业技术)或假阳性问题,并且依然受限于样品的制备方法。

[0006] 免疫测定法依赖于使用特定的单克隆或多克隆抗体以捕获和/或检测靶微生物。免疫测定法的效率和成功依赖于测试中所使用的抗体的质量。由于其生产方式(在动物体内或通过细胞培养),使用抗体的一个缺点是各批次间的再现性问题。

[0007] 为了克服抗体的某些缺点并提高测定质量,已经开发了新的亲和力结合剂,如适体。

[0008] 适体是合成的、短的DNA或RNA链,其可以折叠成多种结构并可以(如抗体般)特异性结合至其靶标。

[0009] DNA适体已经被用于检测微生物(包括金黄色葡萄球菌)。此外,也已经报道了经荧光标记的DNA适体用于使用基于荧光的方法检测全细菌细胞:

[0010] US 2012/0071639 A1公开了用于结合多种食源性和水源性病原体及生物毒素的特定DNA序列。

[0011] WO 2013/064818 A1公开了用于检测样品中病原细菌的经荧光标记的适体。

[0012] Cao 等人(2009, *Nucleic Acids Res* 37, 4621-4628)公开了通过全细菌SELEX程序获得的对金黄色葡萄球菌特异的一组ssDNA适体。这些适体中的五种的组合在识别不同的金黄色葡萄球菌菌株中取得了良好的效果。

[0013] Dwivedi 等人(2013, *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3677-3686)描述了对塞洛瓦鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica serova Typhimurium*) 特异的DNA适体及其在通过流式细胞术检测沙门氏菌上的用途。

[0014] Gold 等人(2010, *PLoS One* 5, e15004)和Vaught 等人(2010, *J Am Chem Soc*

132, 4141-4151) 描述了被称为SOMAmer (经修饰的慢解离率的适体) 的新的基于适体的试剂的开发。SOMAmer由单链DNA (ssDNA) 制成, 含有在其5' 位置用氨基酸侧链模拟物修饰过的嘧啶残基并且具有相当长的 (> 30 min) 解离速率。这些特征导致了SOMAmer相比标准的RNA或DNA适体更好的亲和力和更好的动力学特性。

[0015] US 7947447 B2公开了用于生产SOMAmer的经过改进的SELEX方法, 所述SOMAmer能够以较使用以前的SELEX方法获得的更慢的解离速率常数结合至靶分子。

[0016] Ochsner 等人 (2013, Diagn Microbiol Infect Dis.76, 278-285) 描述了对艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*) 毒素 (即, 微生物蛋白质) 特异的SOMAmer的特征。

[0017] 在现有技术中尚未描述SOMAmer在检测全细菌细胞上的用途。

[0018] 本发明的目的是为检测复杂样品中的微生物提供合适的试剂。

[0019] 令人惊奇的是, 据发现, 高度特异的经荧光标记的SOMAmer是用于通过基于荧光的方法检测复杂样品中微生物的非常有效的工具。

[0020] 因此, 本发明涉及检测样品中微生物的方法, 包括步骤: a) 将所述样品与包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体 (SOMAmer) 温育; b) 任选地洗涤所述样品; c) 通过基于荧光的检测方法分析所述样品。

[0021] SOMAmer (经修饰的慢解离率的适体) 由单链DNA (ssDNA) 制成, 含有在其5' 位置用氨基酸侧链模拟物修饰过的嘧啶残基并且具有相当长的 (> 30 min) 解离速率。这些特征导致了SOMAmer相比标准的RNA或DNA适体更好的亲和力和更好的动力学特性 (Gold 等人, 2010, PLoS One 5, e15004; Vaught 等人, 2010, J Am Chem Soc 132, 4141-4151)。

[0022] 如本文所用, “慢解离率” 指代适体/靶标复合物开始解离所花费的时间。这可以表示为半衰期或50%的适体/靶标复合物已经解离的 (时间) 点。SOMAmer的解离率或解离速率, 表示为半衰期 ($t_{1/2}$) 值, 可以大于30 min、大于60 min、大于90 min或大于120 min。解离时间可以通过本领域熟知的监测复合物的结合与解离的动态系统 (例如, 表面等离子体共振) 来测量。

[0023] 可以使用天然或经纯化的重组蛋白用多个经修饰的DNA文库通过SELEX方法对微生物的细胞表面结合蛋白质生成SOMAmer试剂。用于生成此类SOMAmer的合适的SELEX方法公开于US 7947447 B2中, 其以引用方式并入本专利申请的公开内容中。

[0024] 实施本发明所需的常规的化学、微生物学和分子生物学方法是本领域技术人员已知的, 并且也可见于标准文献中。

[0025] 根据本发明, 术语微生物涉及细菌、酵母或真菌。在优选的实施方案中, 微生物为细菌, 优选病原细菌。

[0026] 其可以, 例如, 选自沙门氏菌属 (如鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、李斯特氏菌属 (*Listeria spp*)、单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、弯曲菌 (*Campylobacter*)、志贺氏杆菌 (*Shigella*)、链球菌 (*Streptococcus*)、分枝杆菌 (*Mycobacterium*)、伯克氏菌 (*Burkholderia*)、军团菌 (*Legionella*)、耶尔森氏菌 (*Yersinia*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)、棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 和弧菌 (*Vibrio*)。

[0027] 在本发明的优选实施方案中, 微生物为金黄色葡萄球菌。

[0028] 金黄色葡萄球菌的表面结合蛋白质(可以针对其制备例如SOMAmer)的实例包括: SpA、ClfA、ClfB、FnbA、FnbB、SasD、IsdA、IsdB、IsdC和IsdH。通过转肽酶介导的LPXTG转肽酶基序的苏氨酸与甘氨酸之间的裂解,所有这些蛋白质均连接到细胞壁上,并且变成酰胺连接至肽聚糖的五甘氨酸交联桥 (Marraffini 等人, 2006, *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 192-221)。金黄色葡萄球菌蛋白质A (SpA) 存在于细菌表面并且分泌到细胞外环境中。ClfA和ClfB是结构上相关的纤维蛋白原结合蛋白 (McDevitt 等人, 1997, *Eur J Biochem* 247: 416-424; Ni Eidhin 等人, 1998, *Mol Microbiol* 30: 245-257)。ClfB是负责粘附至脱落的前鼻孔上皮细胞的关键因素之一,并且通常产生于早期指数生长期 (Ni Eidhin 等人, 1998, 参见上文)。FnbA和FnbB附着到细胞外基质的组分(既有纤粘蛋白又有弹性蛋白),并且对于感染期间宿主组织的定殖很重要 (Roche 等人, 2004, *J Biol Chem* 279: 38433-38440)。SasD是假定的具有未知生理作用的粘附蛋白 (Roche 等人, 2003, *Microbiology* 149: 643-654; Ythier 等人, 2012, *Mol Cell Proteomics* 11: 1123-1139)。这些蛋白质中的四种属于铁响应表面决定因子 (Isd) 系统,该系统在金黄色葡萄球菌中于限铁条件下被诱导并且对于捕获来自血红蛋白 (IsdB、IsdH) 及其跨细胞壁转运子 (IsdA、IsdC) 的血红素很重要 (Grigg 等人, 2010, *J Inorg Biochem* 104: 341-348; Mazmanian 等人, 2003, *Science* 299: 906-909)。

[0029] 通常,待分析的样品是复杂样品,如临床样品、食物或饲料样品、饮料样品、药物样品(包括注射用水)、个人护理和/或化妆品样品。样品可以是原料、成品,或者可以取自生产或储存环境。优选地,样品为临床样品、食物样品、药物样品和/或个人护理产品。

[0030] “复杂样品”意指包含不止一种组分的样品。例如,当其为食物或饲料时 - 其可以是肉类或肉制品(例如,生或熟肉制品)、乳制品或用于乳制品生产的组合物(如奶酪或酸奶)、基于植物的食物产品、即食食物或食物成分、沙拉产品、婴儿配方奶粉。在一个实施方案中,样品可以是个人护理或化妆产品如眼部护理产品,如隐形眼镜护理液。如果样品为饮料,则其可以是例如啤酒或取自啤酒酿制期间的样品、饮用水。药物样品涵盖了人用以及动物用(即兽医应用)药品。临床样品可以例如是体液(特别是血液、血浆或血清)或组织样品。

[0031] 示例性样品包括但不限于:食物(例如牛奶、羊奶、山羊奶、马奶、驴奶、骆驼奶、牦牛奶、水牛奶和驯鹿奶、奶制品、牛肉、山羊肉、羔羊肉、羊肉、猪肉、蛙腿肉、小牛肉、啮齿类动物肉、马肉、袋鼠肉、禽类肉(包括鸡肉、火鸡肉、鸭肉、鹅肉、野鸽肉或鸽子肉、鸵鸟肉、鹌鹑肉)、海鲜(包括有鳍鱼如鲑鱼和罗非鱼,以及贝类如软体动物和甲壳类以及蜗牛)、肉制品、植物制品、种子、来自草本植物的谷类(包括玉蜀黍、小麦、水稻、大麦、高粱和小米)、来自非草本植物的谷类(包括菜豆、花生、豌豆和小扁豆)、坚果(包括杏仁、核桃和松子)、含油种子(包括葵花、油菜和芝麻)、蔬菜如食根类蔬菜(包括马铃薯、木薯和芜菁)、食叶类蔬菜(包括苋菜、菠菜和甘蓝)、海生蔬菜(包括掌状红皮藻、昆布和翅菜)、食茎类蔬菜(包括竹笋、仙人掌和芦笋)、食花类蔬菜(包括洋蓍、花椰菜和黄花菜)以及食果实类蔬菜(包括南瓜、秋葵和茄子)、水果、香草和香料)、全血、尿液、痰液、唾液、羊水、血浆、血清、肺灌洗液和组织(包括但不限于肝、脾、肾、肺、肠、脑、心脏、肌肉、胰腺等)。技术人员将认识到,得自任何以上示例性样品或所述示例性样品的混合物或包括一种或多种所述示例性样品的组合物的细胞裂解物、提取物或(均质化)材料也是在本发明的范围之内的样品。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列。

[0033] 如本文所用的术语“核苷酸序列”指代寡核苷酸序列或多核苷酸序列及其变体、同系物、片段和衍生物(如其部分)。核苷酸序列可以源于合成或重组,其可以是单链的,代表有义或反义链。

[0034] 与本发明有关的术语“核苷酸序列”包括合成的DNA和RNA。优选地,可以使用本领域熟知的化学方法整体地或部分地合成根据本发明的SOMAmer的核苷酸序列。

[0035] 如本文所用的术语“特异的”意指,相比其它微生物,SOMAmer选择性地与金黄色葡萄球菌反应。

[0036] 根据本发明的SOMAmer可以类似抗体的方式使用。与抗体类似,SOMAmer提供靶标结合特异性。

[0037] 在本发明的一个方面,SOMAmer包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16或其片段或与其具有至少80%同一性的序列,或在严格条件下与其杂交的序列。

[0038] 优选地,SOMAmer包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12或其片段或与其具有至少80%同一性的序列,或在严格条件下与其杂交的序列。

[0039] 更优选地,SOMAmer包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12。

[0040] 在本发明的非常优选的实施方案中,SOMAmer包含根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0041] 如本文所用的术语“片段”意指本文教导的适体序列的一部分,相比完整序列,其对目的靶标具有相同或更好的亲和力、特异性或功能活性。片段可以由约35个核苷酸(例如33-37个核苷酸)构成。优选地,片段具有与原始全长适体在该片段所代表的区域上相似的二级结构。

[0042] 本发明也涵盖了与本发明的核酸序列具有至少80%的序列同一性的序列的通途。在本上下文中,所采取的相似序列包括可能与目标序列(subject sequence)具有至少80%、优选至少90%、更优选至少95或98%的同一性的核苷酸序列。通常,相似序列将包含与目标SOMAmer相同或相似的二级结构。

[0043] 在一个实施方案中,所采取的相似序列包括相比目标序列具有一个或若干个添加、缺失和/或置换的核苷酸序列。

[0044] 序列同一性比较可以通过肉眼,或更常用地,借助容易得到的序列比较程序进行。这些市售的计算机程序可以计算两个或更多个序列之间的%同一性。

[0045] 本发明也涵盖了与本发明的核酸序列互补的序列或能够杂交至本发明的序列或与其互补的序列的序列。

[0046] 如本文所用的术语“杂交”应当包括“核酸链与互补链通过碱基配对连接的方法”。杂交在严格条件下(例如,50°C 和 0.2xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl、0.015 M 柠檬酸钠 pH 7.0})进行。

[0047] 根据本发明,SOMAmer包含荧光标记。

[0048] 所述标记可连接到SOMAmer的5' 或3' 端。在优选的实施方案中,所述标记连接到

SOMAmer的5'端。技术人员很清楚用于将荧光标记连接到核酸链的技术。这些方法中的任何一种均可用于本发明以将荧光标记连接到SOMAmer,例如,如Schubert 等人, 1990, *Nucleic Acids Research* 18, 3427所述。

[0049] 理论上,可以在寡核苷酸合成期间或之后连接荧光标记。

[0050] 荧光标记可以直接或间接连接到SOMAmer。对于间接连接而言,可以使用本领域技术人员已知的任何机制,如使用生物素和链霉亲和素或地高辛(DIG)和抗地高辛。

[0051] 合适的荧光标记由本领域技术人员根据不同的参数选择,如标记的大小和/或光学特性(如颜色、荧光激发波长、荧光发射波长和强度)。大量各种各样的荧光标记在市场上有售。合适的荧光标记的实例有:荧光素染料(如荧光素、6-FAM(6-羧基荧光素)、JOE、TET、HEX)、若丹明染料(如5'-四甲基若丹明、ROX、TRITC、X-若丹明、丽丝胺若丹明B)、花青染料(如Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、IRD700、IRD800、别藻蓝蛋白(APC))、甲藻叶绿素(PerCP)、R-藻红蛋白(R-PE)、香豆素染料(如羟基香豆素、氨基香豆素、甲氧基香豆素)和量子点。另外的实例有:Alexa Fluor® 350、Alexa Fluor® 405、Alexa Fluor® 430、Alexa Fluor® 488、Alexa Fluor® 500、Alexa Fluor® 514、Alexa Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Alexa Fluor® 568、Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 610、Alexa Fluor® 633、Alexa Fluor® 647、Alexa Fluor® 660、Alexa Fluor® 680、Alexa Fluor® 700、Alexa Fluor® 750、Alexa Fluor® 790、DyLight 350、DyLight 408、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 594、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、DyLight 759、DyLight 800、eFluor® 660、Cascade Blue、Pacific Blue、Pacific Orange、Lucifer Yellow、NBD、Red 613、TruRed、FluorX、BODIPY-FL、Texas Red。优选地,使用荧光素。

[0052] 根据本发明的方法涉及步骤 a) 将样品与包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体(SOMAmer)温育。这意味着将包含荧光标记的SOMAmer与样品混合并温育一段时间。

[0053] 通常,在使用SOMAmer通过基于荧光的检测方法进一步分析之前,将样品直接接种到缓冲液或生长培养液中(任选温育)。如果样品是固体样品,则可能有必要在加入缓冲液或生长培养液之后或期间进行均化(stomaching)。在另外的可选的实施方案中,用液体冲洗固体样品,并随后收集所述液体用于另外任选的在生长培养液中温育并用SOMAmer进一步分析。

[0054] 可选地,将SOMAmer与合适的缓冲液或与生长培养液混合,随后与样品混合。如果样品是固体样品,则可能有必要在加入包含SOMAmer的缓冲液/生长培养液之后或期间进行均质化。

[0055] 合适的缓冲液可以由本领域技术人员选择。其通常具有大于5而小于9的pH值,优选大于6而小于8,更优选在6.5到7.5之间。可用于本发明的方法中的缓冲液优选自磷酸缓冲液、磷酸盐缓冲生理盐水缓冲液(PBS)、2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇(TRIS)缓冲液、TRIS缓冲生理盐水缓冲液(TBS)和TRIS/EDTA(TE)。在本发明的一个实施方案中,所述缓冲液还包含MgCl₂。MgCl₂ - 如果存在 - 通常以0.005至3 M之间、优选0.01至1 M之间、更优选0.01至0.5 M之间,例如25 mM,的浓度存在。

[0056] 通常,大约0.07 μmol/L的SOMAmer将足以检测样品中10⁷个靶微生物的细胞。在优选的实施方案中,使用0.01至10 μmol/L缓冲液的SOMAmer浓度。

[0057] 温育通常在16°C至30°C的温度、优选18°C至28°C的温度、更优选室温下进行。

[0058] 通常,温育时间周期在1至60分钟、优选5至30分钟。

[0059] 根据本发明所用的SOMAmer的浓度可以由本领域技术人员确定。

[0060] 任选地,根据本发明的方法可涉及洗涤样品的步骤。在此步骤期间,可以在检测结合态SOMAmer的存在之前,洗脱任何未结合的SOMAmer。通常,洗涤意指将样品离心并将团块重悬浮于缓冲液中。所述洗涤步骤可以进行一次或重复若干次,例如两次、3次或4次。

[0061] 在根据本发明的步骤c)中,通过基于荧光的检测方法分析样品。基于荧光的检测方法优选自:流式细胞术、固相式细胞术、基于荧光的分析方法和荧光成像系统(如荧光显微术)。

[0062] 流式细胞术是一种分析方法,其允许测量由发光的单个细胞所散射的光和所产生的荧光发射。通常,将待分析的细胞或颗粒悬浮于液体中并单独通过激光束。通过检测器收集每个颗粒的散射光(与颗粒大小和复杂性有关)和荧光发射(由于对靶颗粒/细胞的荧光标记)并发送至计算机。由于每个颗粒或细胞是分别调查的,所以结果代表了累积的个体细胞特征(Álvarez-Barrientos 等人2000, *Clin Microbiol Rev*, 13(2): 167-195)。

[0063] 将可含有靶分析物的样品与用合适的荧光分子标记的对该靶分析物特异的试剂(例如,根据本发明的SOMAmer)混合。在施加恰当的结合条件及任选的洗涤步骤之后,然后通过流式细胞仪处理经标记的样品:细胞单独地通过激光束并分析所得散射光和荧光信号以收集与该靶分析物(例如细胞)有关的信息。

[0064] 荧光成像系统提供了被观察对象(例如单个细胞、微菌落)的图像,所述图像是使用由荧光现象发射的光所形成的(Barrett 和 Myers 2003, *Foundations of Image Science*. In Wiley Series in pure and Applied Optics ed. Saleh B.E.A. USA, New Jersey, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc)。荧光显微术是荧光成像系统的一个实例,其中被成像的特征很小并通过光学放大获得。

[0065] 将可能含有靶分析物的样品与用合适的荧光分子标记的对该靶分析物特异的试剂(例如SOMAmer)混合。在施加恰当的结合条件及任选的洗涤步骤之后,将经标记的样品置于显微镜的物镜下。设置显微镜的参数以匹配荧光标记的特性。

[0066] 固相式细胞术是用于检测固体表面上单个颗粒/细胞的方法。通常,固相式细胞术是在膜上实现的。基于图像的定量系统将结合任何选定标记在膜上的定位提供其数量、大小和形状。

[0067] 将可能含有靶分析物的样品通过具有适当孔径(即对于细菌而言,0.4 μm)的黑膜过滤器(例如聚酯或聚碳酸酯)过滤。然后,将保留下来的细胞用经合适的荧光分子标记的对该靶分析物特异的试剂(例如SOMAmer)标记。随后用激光扫描所述过滤器,所述激光允许膜上的荧光事件(例如经标记的微生物)被一系列检测单元所检测到。这使得能够对膜上的靶分析物进行检测和计数(Reynolds 和 Fricker 1999, *J Appl Microbiol* 86, 785-795; Vanhee 等人2009, *Nat Protoc* 4, 224-231)。

[0068] 基于荧光的分析方法是测量荧光信号总量的方法,其用于检测和/或测量已经合适的荧光标签标记的靶分析物的量(Skoog 等人2007, *Principles of Instrumental Analysis*, 第六版, USA, California, Belmont: Brooks/Cole)。此类方法可以在各种载体(例如微板、管、微管、微流体装置)上实施。

[0069] 将可能含有靶分析物的样品与用合适的荧光分子标记的对该靶分析物特异的试

剂(例如SOMAmer)混合。在施加恰当的结合条件及任选的洗涤步骤之后,将装有经标记的样品的容器(例如微孔板、小管)暴露于特定波长以恰当地激发荧光染料。通过恰当的光传感器收集(作为靶分析物与荧光试剂结合的结果而发生的)荧光发射。通过传感器对此荧光量进行定量并就与参考数据的相关性进行了处理以提供对分析物的量度。

[0070] 任何荧光分子均可以用于任何基于荧光的检测方法。对于给定的检测方法而言,关键的要求在于适合于所选荧光分子的激发源以及荧光检测器的可用性。

[0071] 用于荧光检测(合适的荧光标记)的波长组合的实例:

[0072] - 激发:488 nm (蓝色激光) + 发射:530 nm (荧光素、Alexa Fluor® 488)、585 nm (R-藻红蛋白 - R-PE) 以及 >670 nm (甲藻叶绿素 - PerCP)

[0073] - 激发:532 - 561 nm (绿色和黄/绿色激光) + 发射:560 (Alexa Fluor® 532)、585 (R-PE - R-藻红蛋白)

[0074] - 激发:635 nm (红色激光) + 发射:660 nm (别藻蓝蛋白 - APC / 花青 5 - Cy5 / eFluor® 660 / Alexa Fluor® 647)。

[0075] 根据本发明的方法相比使用抗体提供了若干优点:

[0076] - 在溶液中优越的热稳定性

[0077] - 更低的分子量

[0078] - 更高的多路复用能力

[0079] - 对热、干燥和溶剂的化学稳定性

[0080] - 可逆复性

[0081] - 易于试剂生产

[0082] - 一致的批次间表现

[0083] - 更低的成本。

[0084] 本发明还涉及包含荧光标记的经修饰的慢解离率的适体(SOMAmer),其中所述SOMAmer包含对金黄色葡萄球菌特异的核苷酸序列。

[0085] 如上所述定义了SOMAmer、荧光标记及其优选的实施方案。

[0086] 因此,在另一个方面,本发明涉及包含荧光标记的SOMAmer,其特征在于,所述SOMAmer包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16或其片段或与其具有至少80%同一性的序列,或在严格条件下与其杂交的序列。

[0087] 在另一个方面,本发明涉及包含荧光标记的SOMAmer,其特征在于,所述SOMAmer包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12或其片段或与其具有至少80%同一性的序列,或在严格条件下与其杂交的序列。

[0088] 在另外的方面,本发明涉及包含荧光标记的SOMAmer,其特征在于,所述SOMAmer包含根据SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0089] 在另外的方面,本发明涉及如上文所定义的包含荧光标记的SOMAmer在检测样品中金黄色葡萄球菌细胞上的用途。

[0090] 根据本发明的SOMAmer可以被固定在(例如结合或粘附于)基底或载体(例如微载体)上。

[0091] 本发明也涉及包含至少一种如上所述包含荧光标记的SOMAmer的微阵列或生物传感器。

[0092] 生物传感器是用于检测靶分析物的分析装置,其将生物应答转化成电信号。生物传感器的应用使用生物识别元件(如酶、抗体和核酸)以检测靶分子。通常的生物传感器含有三个组件:可以识别或结合分析物的生物传感元件、将检测事件转化成可测量信号的转导元件以及将信号转化成数字格式的显示器。传感元件主要限定生物传感器的选择性和灵敏度。检测分析物通常是基于用电子读数或光学读数传感分析物。根据本发明的包含荧光标记的SOMAmer可以用作生物传感器应用中的生物元件。

[0093] 在另外的实施方案中,本发明涉及包括至少一种如上文定义的包含荧光标记的SOMAmer的试剂盒。

[0094] 根据本发明的试剂盒可以是快速检测试剂盒。所述试剂盒可以例如包括i)至少一种(如2、3或4种)根据本发明的包含荧光标记的SOMAmer以及ii)如何使用所述SOMAmer的说明书。

附图说明

[0095] 图1:在用不同浓度的经荧光标记的4520-8 (SEQ ID NO:3)和4531-56 (SEQ ID NO:1) SpA SOMAmer染色 10^7 个细胞(15分钟的结合反应)后,通过流式细胞术检测金黄色葡萄球菌。

[0096] (a) 于不同SOMAmer浓度($n=3$)下获得的平均荧光强度(柱)和经染色细胞的百分比(线)的图示。灰色柱:使用4520-8 (SEQ ID NO:3)时的平均荧光强度,黑色柱:使用4531-56 (SEQ ID NO:1)时的平均荧光强度。黑线:使用4520-8 (SEQ ID NO:3)或4531-56 (SEQ ID NO:1)时的经染色细胞的百分比(同一数据)。

[0097] (b) 使用4531-56 (SEQ ID NO:1) SpA SOMAmer时获得的流式细胞术结果的实例。黑色区域:未染色的细胞群体;用 $0.07 \mu\text{mol l}^{-1}$ (浅灰色)、 $0.7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (深灰色)和 $7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (黑色实线)染色的细胞群体。设置M1和M2区间以将对未染色细胞的荧光信号(自体荧光)包括在M1中。因此,位于M2区间中的细胞群体被视为已染色的。

[0098] 图2:在用 $7 \mu\text{mol l}^{-1}$ 的经荧光标记的4531-56 (SEQ ID NO:1) SpA SOMAmer染色 10^7 个细胞后,通过流式细胞术检测金黄色葡萄球菌。比较不同的染色时间($n=3$)。平均荧光强度以柱表示而经染色细胞的百分比以线图表示。

[0099] 图3:在用 $0.7 \mu\text{M}$ 的经荧光标记的4531-56 (SEQ ID NO:1) SpA SOMAmer染色 10^7 个细胞后,通过流式细胞术检测金黄色葡萄球菌。比较不同的染色时间($n=3$)。相比经过5分钟的染色温育所获得的强度,使用30分钟的染色温育,平均荧光强度提高了1.4倍。

[0100] 实施例:

[0101] 实施例1:纯化金黄色葡萄球菌靶标

[0102] 用表1中所示的引物从金黄色葡萄球菌NRS384 (USA300)的基因组DNA中PCR扩增编码所需靶标或靶域的基因的相关部分,并将其克隆到pCR-Script SK+ (Stratgene)中。将*clfA*基因以*Bam*HI-*Sac*I盒的形式转移到表达载体pET-51b (EMD-Novagen)中,所述载体内含氨基末端Strep标签和羧基末端His₁₀标签。对质粒测序以验证基因的身份以及所克隆的DNA片段与载体编码的His标签和Strep标签的序列的正确基因融合。

[0103] 表1: 扩增和克隆编码金黄色葡萄球菌细胞表面蛋白的基因

[0104]	靶标	PCR引物 (正向和反向, 限制性位点以下划线标出)			重组蛋白	
		名称	RE位点	5'序列	aa 范围	大小 (kDa)
	CfIA	cfIA-3	<i>Bam</i> HI	<u>CGGATCCAGTAGCTGCAGATGCACC</u>	221-550	45
		cfIA-4	<i>Sac</i> I	<u>CGAGCTCGCTCATCAGGTTGTTTCAGG</u>		

[0105] 在大肠杆菌BL21 (DE3) 或BL21 (DE3)/pLysE (EMD/Novagen) 中过表达重组蛋白。相对于生长温度 (25- 37°C) 和诱导时间 (4-15 h) 优化了可溶性蛋白的最佳表达条件。将来自 0.1-0.8 L 培养物的细胞用 10 mL BugBuster/核酸酶试剂 (EMD Millipore) 裂解。依序通过 Ni-NTA 琼脂糖和 Strep·Tactin® Superflow™ 琼脂糖 (EMD Millipore) 的亲和力层析, 将重组的、经 His₁₀/Strep 标签的蛋白质从可溶性级分中纯化出来。天然的葡萄球菌蛋白质 A 购自 VWR 并且用 NHS-PEG4-生物素 (Pierce Biotechnology) 进行了生物素酰化。使用 Quick Start Bradford 蛋白质测定试剂盒 (BioRad) 测定了蛋白质浓度。

[0106] 实施例2: 选择 SOMAmer

[0107] 将分别使用 5-苄基氨羰基-dU (BndU)、5-萘基甲基氨羰基-dU (NapdU) 和 5-色氨酸羰基-dU (TrpdU) 的文库用于使用金黄色葡萄球菌蛋白质的 SELEX。每次选择均从 1 nmol (10¹⁴-10¹⁵) 含有 40 个连续随机化位置的序列 (其侧接 PCR 扩增所需的固定序列) 开始。SELEX 基本上如 (Gold 等人 2010, *PLoS One* 5: e15004; Ochsner 等人 2013, *Diagn Microbiol Infect Dis.*; Vaught 等人 2010, *J Am Chem Soc* 132: 4141-4151) 所述进行。在整个 SELEX 及随后的结合测定中使用缓冲液 SB18T, 其由 40 mM HEPES pH 7.5、0.1 M NaCl、5 mM KCl、5 mM MgCl₂ 和 0.05% Tween-20 组成。进行了八轮选择, 并且从第 2 轮开始, 用 10 mM 硫酸葡聚糖进行动力学挑战以利于慢解离率。用顺磁性 Talon Dynabeads® Talon® (Invitrogen) (其结合重组蛋白上的 His₁₀ 标签) 或用 MyOne 链亲和素 C1 微珠 (Life Technologies) (针对经生物素酰化的 SpA) 实现 SOMAmer-靶标复合物的分配。将选定的序列从与微珠结合的靶标上用 80 μl 40 mM NaOH 洗脱, 用 20 μl 160 mM HCl 中和并用 KOD EX DNA 聚合酶 (Invitrogen-Life Technologies) 进行 PCR 扩增。用 KOD EX DNA 聚合酶通过从 PCR 产物的反义链引物延伸制备了用于下一轮的经修饰的 DNA 并纯化, 如 (Gold 等人, 2010) 中所述。

[0108] 对从第 3 到 8 轮中选定的 DNA 的 DNA 再结合动力学分析 (C₀t) 被用于评估后几轮期间的序列趋同性, 指示出一些序列或序列家族的增加的丰度。克隆在溶液结合放射性测试 (见下) 中表现出良好亲和力 (K_d ≤ 10 nM) 的 SOMAmer 池并确定 48 个克隆/池的序列。根据序列模式和多样性选择单个的 SOMAmer 并采用酶法制备以用于进一步表征。

[0109] 通过标准亚磷酸胺化学法以 1 μmol 的规模制备 48-50 聚体形式的合成 SOMAmer 并经过 HPLC 纯化。其含有 5' 生物素-dA 或 5' 荧光素-生物素-dA 以及在 3' 端倒置的 dT 核苷酸 (3' idT) 以增加针对 3' 至 5' 核酸外切酶的稳定性。

[0110] 实施例3: SOMAmer 平衡和全细胞放射性标记结合测定

[0111] 在结合测定前, 通过在 95°C 加热 5 min 使 SOMAmer 适当地折叠, 接着经过 10-15 min 时间段冷却至室温。

[0112] 在经放射性标记的 SOMAmer (10-20 pM) 与连续稀释的蛋白质 (0.001-100 nM) 的

平衡溶液结合测定中确定亲和力 (K_d) 并将Zorbax PSM-300A (Agilent Technologies) 树脂用于分配至过滤平板上, 如(Gold 等人2010)中所述。

[0113] 在克隆前, 也使用表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、溶血性链球菌 (*S. hemolyticus*)、化脓性链球菌 (*S. pyogenes*)、粪肠球菌 (*E. faecalis*)、大肠杆菌和铜绿假单胞菌作为对照, 在2 h的平衡结合测定中测试了SOMAmer池对金黄色葡萄球菌的特异性结合。细胞密度在 $10^5 - 10^8$ CFU/mL的范围内, 并且向结合缓冲液中加入了 0.1 mM 硫酸葡聚糖和0.35 M NaCl以减少非特异性背景。另外, 针对与八种不同金黄色葡萄球菌的结合对单个的核酸适体进行筛选, 所述金黄色葡萄球菌属于不同的谱系, 包括: NRS382、NRS383、NRS384、NRS123、NRS385、NRS386、NRS103 (NARSA和ATCC 29213 (ATCC))。

[0114] 结果:

[0115] 池亲和力测定确认, 针对用经BndU、NapdU或TrpdU修饰的ssDNA获得的总共22个池, 成功选择了SOMAmer, 而池亲和力在0.13-8.90 nM的范围内。观察到了对金黄色葡萄球菌的特异性结合, 但未观察到对表皮葡萄球菌、溶血性链球菌、化脓性链球菌、粪肠球菌、大肠杆菌或铜绿假单胞菌的结合。

[0116] 针对来自每个池的各48个克隆所确定的序列的比对示出了共享相同序列模式的多拷贝克隆和家族。在亲和力测定中筛选了代表性的克隆, 而最佳SOMAmer的 K_d 在0.03-2.17 nM的范围内(表2)。

[0117] 表2: 用于金黄色葡萄球菌表面蛋白的SOMAmer试剂, 显示了针对在SELEX中获得的原始全长序列的亲和力 (K_d)

	SOMAmer 表征			
	靶标	Seq no	经修饰的	K_d (nM)
[0118]	SPA	4520-8 (SEQ ID NO:3)	NapdU	0.22
	SPA	4531-56 (SEQ ID NO:1)	TrpdU	0.03
	C1fA	4503-73 (SEQ ID NO:12)	BndU	0.79

[0119] SOMAmer对经纯化的金黄色葡萄球菌蛋白质的结合亲和力与所观察到的对全细菌的结合有良好的相关性。一个SpA-NapdU克隆(4520-8; SEQ ID NO:3)和一个tSpA-TrpdU克隆(4531-56; SEQ ID NO:1)能够结合所有经测试的金黄色葡萄球菌的全细胞, 其在放射性标记过滤结合测定中的检测极限为 $\sim 10^4$ 个细胞/孔 ($10^5 - 10^6$ 个细胞/mL)。未观察到对表皮葡萄球菌或乙型链球菌的结合, 指示出这些SOMAmer良好的特异性。对于C1fA SOMAmer而言, 观察到了类似的结合特性。

[0120] SOMAmer的序列列于表3中。

[0121] 表3: SOMAmer的序列:

[0122]

靶标	Seq no	SEQ ID	序列
SpA	4531-56	SEQ ID NO:1	GCTCGAGTTAATTCGGGATCGGGCTCCGGCTTTT CGAAT
SpA	4520-3	SEQ ID NO:2	CCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CATAA
SpA	4520-8	SEQ ID NO:3	TCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAGAA
SpA	4520-20	SEQ ID NO:4	GCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAAAA
SpA	4520-23	SEQ ID NO:5	GTGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAGAA
SpA	4520-27	SEQ ID NO:6	GCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCTGT CAGGA
SpA	4520-30	SEQ ID NO:7	GTGATCGAGCGGCTTCGGGTACCTATTATTGGTTT AGCCCAGTCAGAA
SpA	4520-42	SEQ ID NO:8	TCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CTGAA
SpA	4520-44	SEQ ID NO:9	ACGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCA- GTCAGAA
C1fA	4503-66	SEQ ID NO:10	ATCTGGTTCAAAGTGACGATTGGGCATCTGGTTTT TAAGT
C1fA	4503-68	SEQ ID NO:11	ATCTGGTTCTAAGTTACTTGGCGTAATCTGGTTTT AAGA
C1fA	4503-73	SEQ ID NO:12	ATCTGGTTCAAAGTGGCGATTGGGCATCTGGTTTT TAAGT

[0123] 表3中所提供的序列的“T”核苷酸是经C-5修饰的嘧啶。更具体地讲,靶向SpA蛋白的SOMAmer的“T”核苷酸是NapdUTP(或NapdU)核苷酸,而靶向C1fA蛋白的SOMAmer的“T”核苷酸是BndUTP(或BndU)核苷酸。

[0124] 另外,结合SpA蛋白的适体序列基序(4520)由以下序列表示:

[0125] $GGCWWCGGGWACCWAWWAWNGGWWAGCC(N)_nGWC$ (SEQ ID NO: 15),其中所述序列中的“W”表示可能由经C-5修饰的嘧啶所占据的位置,而其中所述序列中的“N”表示可能由任何未修饰或经修饰的核苷酸所占据的位置,并且n为0到2(或0、1或2)。优选地,所述经C-5修饰的嘧啶为NapdU或BndU。更优选地,所述经C-5修饰的嘧啶为NapdU。

[0126] 结合C1fA蛋白的适体序列基序(4503)由以下序列表示:

[0127] $AWCWGGWC(N)_nAWCWGGWWWWAAG$ (SEQ ID NO: 16),其中所述序列中的“W”表示可能由经C-5修饰的嘧啶所占据的位置,而其中所述序列中的“N”表示可能由任何未修饰或经修饰的核苷酸所占据的位置。另外,n可以从1到30(或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)或从2到20(或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)或从5到18(或5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18)或从10到16(或10、11、12、13、14、15或16)的数。优选地,n为16。优选地,所述经C-5修饰的嘧啶为NapdU或BndU。更优选地,所述经C-5修饰的嘧啶为BndU。

[0128] 实施例4:通过流式细胞术检测金黄色葡萄球菌细胞

[0129] 如上所述以含有5' ABf1T(生物素和荧光素)的48聚体的形式合成了针对蛋白质A(SpA)的SOMAmer,用于流式细胞术实验。确认了以下的活性:4520-8 (SEQ ID NO:3) ($K_d =$

0.17 nM) 和 4531-56 (SEQ ID NO:1) ($K_d=0.09$ nM)。

[0130] 在胰酶大豆肉汤(Trypcase Soy Broth, TSB; bioMérieux, Craponne, France) 中用冷冻保存的金黄色葡萄球菌DSM 1104(或ATCC 25923) 培养物接种并在32.5°C摇动温育过夜。然后将过夜培养物在新鲜TSB中于32.5°C摇动继代培养直至工作培养物的OD600达到0.8(大约 10^8 细菌 ml^{-1}) 并分成大约 10^7 个细胞/管的等分试样。通过在10 000g离心2 min收获细菌。将团块重悬浮于含有SOMAmer(浓度范围 $0.07 - 7 \mu\text{mol l}^{-1}$)的100 μl PBS / 25 mmol l^{-1} MgCl_2 中。在室温下温育5、15或30 min之后,将细菌在10 000g离心2 min并将团块用PBS / 25 mmol l^{-1} MgCl_2 重悬浮。将此洗涤步骤重复两次。依照相同的程序(不加入SOMAmer)制备了未染色细菌作为对照。然后通过流式细胞术分析了未染色和已染色的细菌。所有实验均用配备了在488 nm发射的风冷15 mW氩离子激光的FACSCalibur™ 流式细胞仪(Becton Dickinson Biosciences; Le Pont de Claix, France)进行。在FL1通道(530 ± 30 nm)中以对数信号的形式收集绿色荧光。在这些测定中确定了作为SOMAmer结合结果产生的平均荧光强度和荧光细胞(在限定的门中, $n= 10\ 000$) 百分比。使用BD CellQuest™ 软件(Becton Dickinson Biosciences)分析来自FACSCalibur™ 的数据。

[0131] 结果:

[0132] 经荧光标记的SpA SOMAmer 4520-8 (SEQ ID NO:3) 和 4531-56 (SEQ ID NO:1) 被用于评估其通过流式细胞术检测金黄色葡萄球菌的效率。两种SOMAmer在对全金黄色葡萄球菌细胞染色上均表现良好。

[0133] 虽然100%的所述细胞在 $0.07 \mu\text{mol l}^{-1}$ 的低SpA SOMAmer浓度下均已经被染色,但是在 $0.7 \mu\text{mol l}^{-1}$ 和 $7 \mu\text{mol l}^{-1}$ 的更高的试剂浓度下,平均荧光强度大幅增加(图1a)。此数据与当高度丰富的细胞表面组分被经荧光标记的SOMAmer饱和时所预期的增加是一致的。确保通过流式细胞术精确区分阴性群体(未染色细胞)和阳性群体(已染色细胞)的SpA SOMAmer的最低浓度可以设为 $0.07 \mu\text{mol l}^{-1}$ (图1b)。

[0134] 为了确定最佳结合时间,进行了时程测定。在存在 $7 \mu\text{mol l}^{-1}$ SpA SOMAmer的情况下,经过仅5-min的结合反应之后,100%的细胞均已经被染色(图2)。通过将结合时间增加至15和30分钟,荧光强度分别提高了约2倍和3倍,导致更好地区分阴性群体和阳性群体。当用更低的SpA SOMAmer浓度($0.7 \mu\text{mol l}^{-1}$) 标记细胞时,荧光强度的这种增加不太明显,可能是由于限制了SOMAmer浓度(图3)。

[0135] 所开发的SpA SOMAmer经证实对金黄色葡萄球菌具有高染色效率。在实验条件中,通过流式细胞术对金黄色葡萄球菌的最佳检测是在使用低试剂浓度($0.7 \mu\text{mol l}^{-1}$)和短结合时间(15 min)的简单的一步程序中实现的。已经报道了用于使用单个或组合适体的基于流式细胞术的金黄色葡萄球菌检测的DNA适体(Cao 等人2009)或用于使用由全细胞SELEX生成的适体检测鼠伤寒沙门氏菌的DNA适体(Dwivedi 等人2013)。然而,在这些研究中获得的经适体标记的细胞的百分比未接近100%并且荧光强度相比用本发明的SOMAmer所获得的荧光强度更弱。

[0136] 实施例5:比较根据本发明的SOMAmer与标准适体

[0137] 由于根据本发明的SOMAmer独特的慢解离率特征,相比标准RNA或DNA适体,这些试剂应当具有更好的亲和力和更好的动力学特性。为了证明这一论断,将根据本发明的SpA SOMAmer与对金黄色葡萄球菌特异的DNA适体(未知靶抗原)进行了比较。

[0138] 所述DNA适体由Integrated DNA Technologies制备。

[0139] 本发明的适体和标准适体的方案均与实施例4中所述的相同(标准适体的不同之处:在测定前不加热适体;PBS用作结合缓冲液)。

[0140] 由金黄色葡萄球菌DSM 1104所获得的流式细胞术结果:

[0141]		结合剂浓度	结合时间	已染色细胞的百分比	平均荧光强度
	SOMAmer (4531-56; (SEQ ID NO:1))	0.7 $\mu\text{mol l}^{-1}$	5 min	100%	331
	标准适体	159 $\mu\text{mol l}^{-1}$	60 min	90 %	265

[0142] 在60-min的结合时间之后,由159 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 的标准适体所获得的已染色细胞的百分比没有达到100%。而使用0.7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 的本发明的SOMAmer,在仅5分钟后就使100%的细胞染色。此结果证明,根据本发明的SOMAmer即使在其浓度比标准DNA适体低200倍的情况下,其结合效率依然更好。

[0143] 此实验证明了根据本发明的SOMAmer的慢解离率特征在金黄色葡萄球菌的流式细胞术检测上的益处:可以用更低的试剂浓度在非常短的时限内实现更高的结合/检测效率。

[0144] 序列表

[0145] <110> Merck Patent GmbH, SOMALogic Inc

[0146] <120> 通过基于荧光的检测方法检测样品中微生物的方法

[0147] <130> I 14/041

[0148] <160> 16

[0149] <170> PatentIn 版本 3.5

[0150] <210> 1

[0151] <211> 39

[0152] <212> DNA

[0153] <213> 人工序列

[0154] <220>

[0155] <223> SOMAmer: 靶标 SpA

[0156] <220>

[0157] <221> t

[0158] <222> (1) .. (1)

[0159] <223> 经C-5修饰的嘧啶

[0160] <400> 1

[0161] gctcgagtta attcgggatc gggctccggc ttttcgaat

39

[0162] <210> 2

[0163] <211> 40

[0164] <212> DNA

[0165] <213> 人工序列

[0166] <220>

[0167] <223> SOMAmer: 靶标 SpA

[0168] <220>

[0169] <221> t

[0170]	<222>	(1) .. (1)	
[0171]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0172]	<400>	2	
[0173]		ccggcttcgg gtacctatta tcggttttagc ccagtcataa	40
[0174]	<210>	3	
[0175]	<211>	40	
[0176]	<212>	DNA	
[0177]	<213>	人工序列	
[0178]	<220>		
[0179]	<223>	SOMAmer: 靶标 SpA	
[0180]	<220>		
[0181]	<221>	t	
[0182]	<222>	(1) .. (1)	
[0183]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0184]	<400>	3	
[0185]		tcggcttcgg gtacctatta tcggttttagc ccagtcagaa	40
[0186]	<210>	4	
[0187]	<211>	40	
[0188]	<212>	DNA	
[0189]	<213>	人工序列	
[0190]	<220>		
[0191]	<223>	SOMAmer: 靶标 SpA	
[0192]	<220>		
[0193]	<221>	t	
[0194]	<222>	(1) .. (1)	
[0195]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0196]	<400>	4	
[0197]		gcggcttcgg gtacctatta tcggttttagc ccagtcaaaa	40
[0198]	<210>	5	
[0199]	<211>	40	
[0200]	<212>	DNA	
[0201]	<213>	人工序列	
[0202]	<220>		
[0203]	<223>	SOMAmer: 靶标 SpA	
[0204]	<220>		
[0205]	<221>	t	
[0206]	<222>	(1) .. (1)	
[0207]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0208]	<400>	5	

[0209]	gtggcttcgg gtacctatta tcggttttagc ccagtcagaa	40
[0210]	<210> 6	
[0211]	<211> 40	
[0212]	<212> DNA	
[0213]	<213> 人工序列	
[0214]	<220>	
[0215]	<223> SOMAmer: 靶标 SpA	
[0216]	<220>	
[0217]	<221> t	
[0218]	<222> (1) .. (1)	
[0219]	<223> 经C-5修饰的嘧啶	
[0220]	<400> 6	
[0221]	gcggttcgg gtacctatta tcggttttagc cctgtcagaa	40
[0222]	<210> 7	
[0223]	<211> 48	
[0224]	<212> DNA	
[0225]	<213> 人工序列	
[0226]	<220>	
[0227]	<223> SOMAmer: 靶标: SpA	
[0228]	<220>	
[0229]	<221> t	
[0230]	<222> (1) .. (1)	
[0231]	<223> 经C-5修饰的嘧啶	
[0232]	<400> 7	
[0233]	gtgatcgagc ggcttcgggt acctattatt ggtttagccc agtcagaa	48
[0234]	<210> 8	
[0235]	<211> 40	
[0236]	<212> DNA	
[0237]	<213> 人工序列	
[0238]	<220>	
[0239]	<223> SOMAmer: 靶标 SpA	
[0240]	<220>	
[0241]	<221> t	
[0242]	<222> (1) .. (1)	
[0243]	<223> 经C-5修饰的嘧啶	
[0244]	<400> 8	
[0245]	tcggcttcgg gtacctatta tcggttttagc ccagtcagaa	40
[0246]	<210> 9	
[0247]	<211> 39	

[0248]	<212>	DNA	
[0249]	<213>	人工序列	
[0250]	<220>		
[0251]	<223>	SOMAmer: 靶标 SpA	
[0252]	<220>		
[0253]	<221>	t	
[0254]	<222>	(1) .. (1)	
[0255]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0256]	<400>	9	
[0257]		acggcttcgg gtacctatta tcggttttagc cagtcagaa	39
[0258]	<210>	10	
[0259]	<211>	40	
[0260]	<212>	DNA	
[0261]	<213>	人工序列	
[0262]	<220>		
[0263]	<223>	SOMAmer: 靶标 ClfA	
[0264]	<220>		
[0265]	<221>	t	
[0266]	<222>	(1) .. (1)	
[0267]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0268]	<400>	10	
[0269]		atctggttca aagtgacgat tgggcatctg gtttttaagt	40
[0270]	<210>	11	
[0271]	<211>	40	
[0272]	<212>	DNA	
[0273]	<213>	人工序列	
[0274]	<220>		
[0275]	<223>	SOMAmer: 靶标 ClfA	
[0276]	<220>		
[0277]	<221>	t	
[0278]	<222>	(1) .. (1)	
[0279]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0280]	<400>	11	
[0281]		atctggttct aagttacttg gcgtaatctg gtttttaaga	40
[0282]	<210>	12	
[0283]	<211>	40	
[0284]	<212>	DNA	
[0285]	<213>	人工序列	
[0286]	<220>		

[0287]	<223>	SOMAmer: 靶标 ClfA	
[0288]	<220>		
[0289]	<221>	t	
[0290]	<222>	(1) .. (1)	
[0291]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0292]	<400>	12	
[0293]		atctggttca aagtggcgat tgggcatctg gtttttaagt	40
[0294]	<210>	13	
[0295]	<211>	25	
[0296]	<212>	DNA	
[0297]	<213>	人工序列	
[0298]	<220>		
[0299]	<223>	引物序列 clfA-3	
[0300]	<400>	13	
[0301]		cggatccagt agctgcagat gcacc	25
[0302]	<210>	14	
[0303]	<211>	26	
[0304]	<212>	DNA	
[0305]	<213>	人工序列	
[0306]	<220>		
[0307]	<223>	引物序列 clfA-4	
[0308]	<400>	14	
[0309]		cgagctcgct catcaggttg ttcagg	26
[0310]	<210>	15	
[0311]	<211>	34	
[0312]	<212>	DNA	
[0313]	<213>	人工序列	
[0314]	<220>		
[0315]	<223>	结合SpA的SOMAmer	
[0316]	<220>		
[0317]	<221>	n	
[0318]	<222>	(1) .. (1)	
[0319]	<223>	没有核苷酸或任何未修饰或经修饰的核苷酸	
[0320]	<220>		
[0321]	<221>	W	
[0322]	<222>	(1) .. (1)	
[0323]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0324]	<220>		
[0325]	<221>	misc_feature	

[0326]	<222>	(20) .. (20)	
[0327]	<223>	n为a、c、g或t	
[0328]	<220>		
[0329]	<221>	misc_feature	
[0330]	<222>	(30) .. (31)	
[0331]	<223>	n为a、c、g或t	
[0332]	<400>	15	
[0333]		ggcwwcgggw accwawwawn ggwwwagccn ngwc	34
[0334]	<210>	16	
[0335]	<211>	23	
[0336]	<212>	DNA	
[0337]	<213>	人工序列	
[0338]	<220>		
[0339]	<223>	结合ClfA的SOMAmer	
[0340]	<220>		
[0341]	<221>	W	
[0342]	<222>	(1) .. (1)	
[0343]	<223>	经C-5修饰的嘧啶	
[0344]	<220>		
[0345]	<221>	n	
[0346]	<222>	(1) .. (1)	
[0347]	<223>	1到30个未修饰或经修饰的核苷酸	
[0348]	<220>		
[0349]	<221>	misc_feature	
[0350]	<222>	(9) .. (9)	
[0351]	<223>	n为a、c、g或t	
[0352]	<400>	16	
[0353]		awcggwcna wcggwwwww aag	23

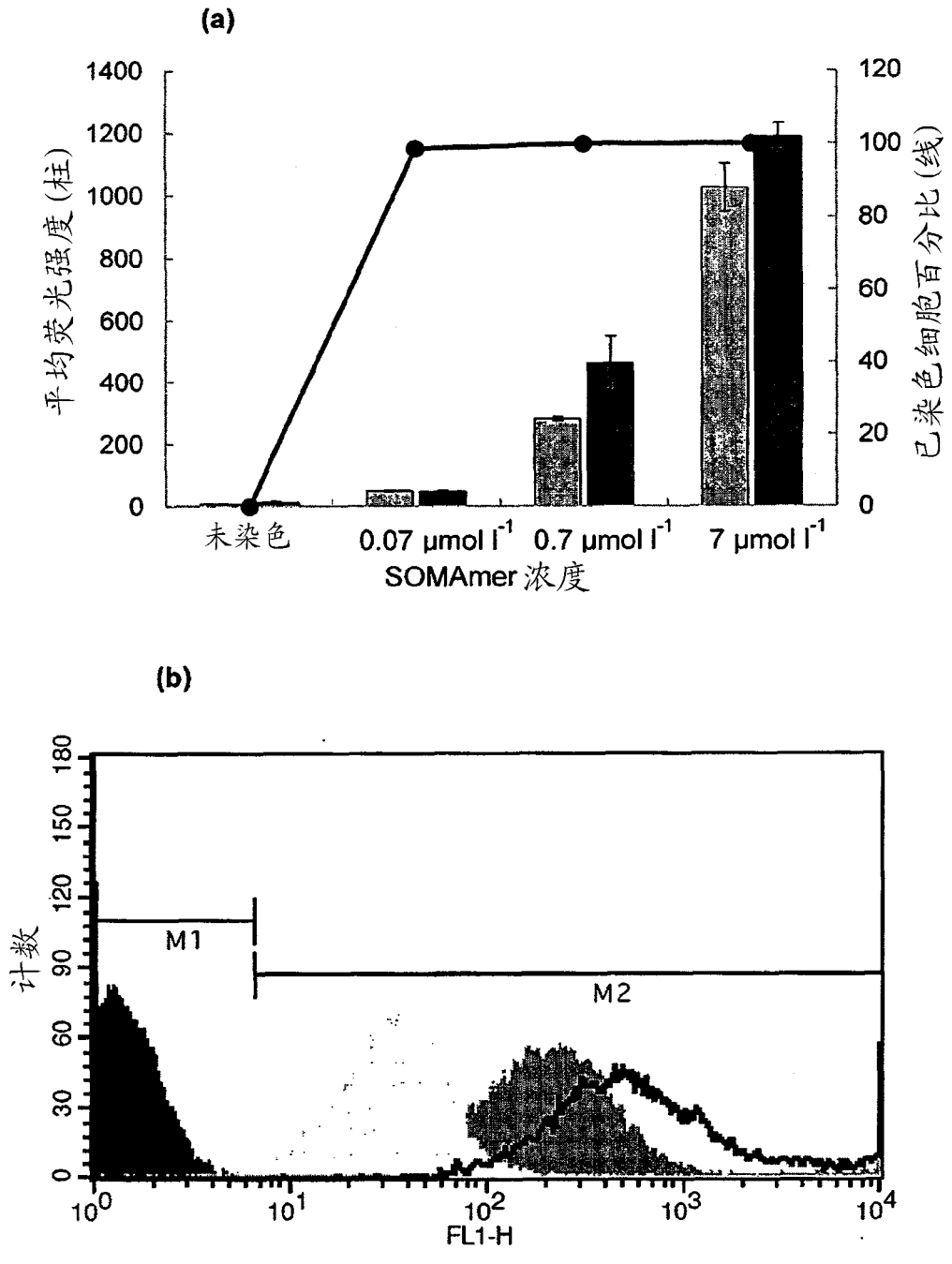


图 1

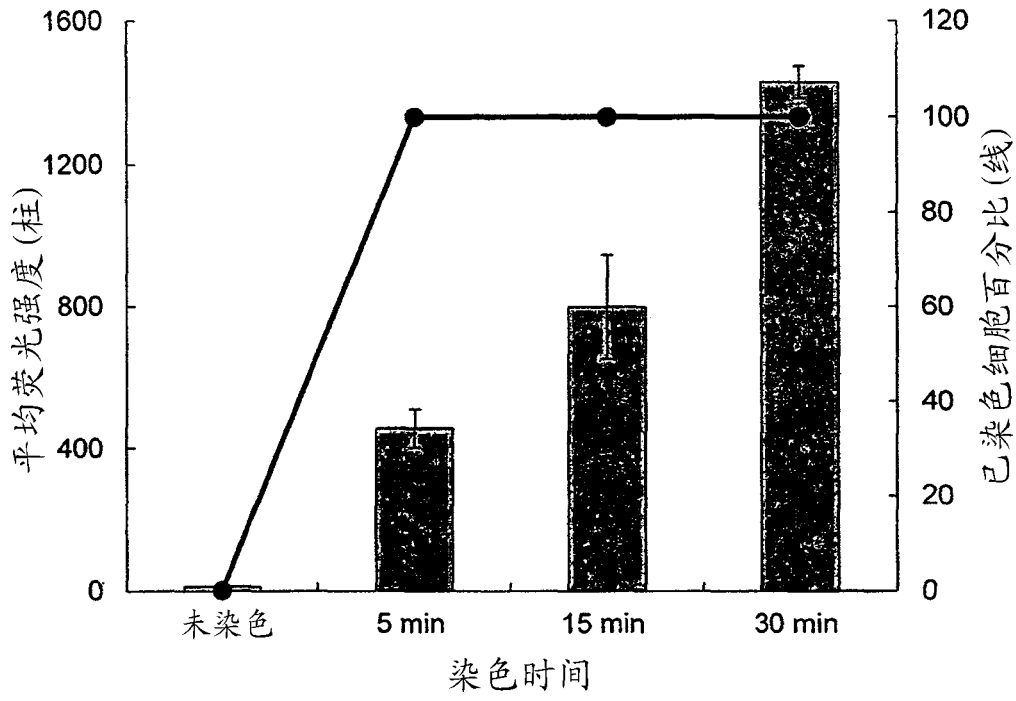


图 2

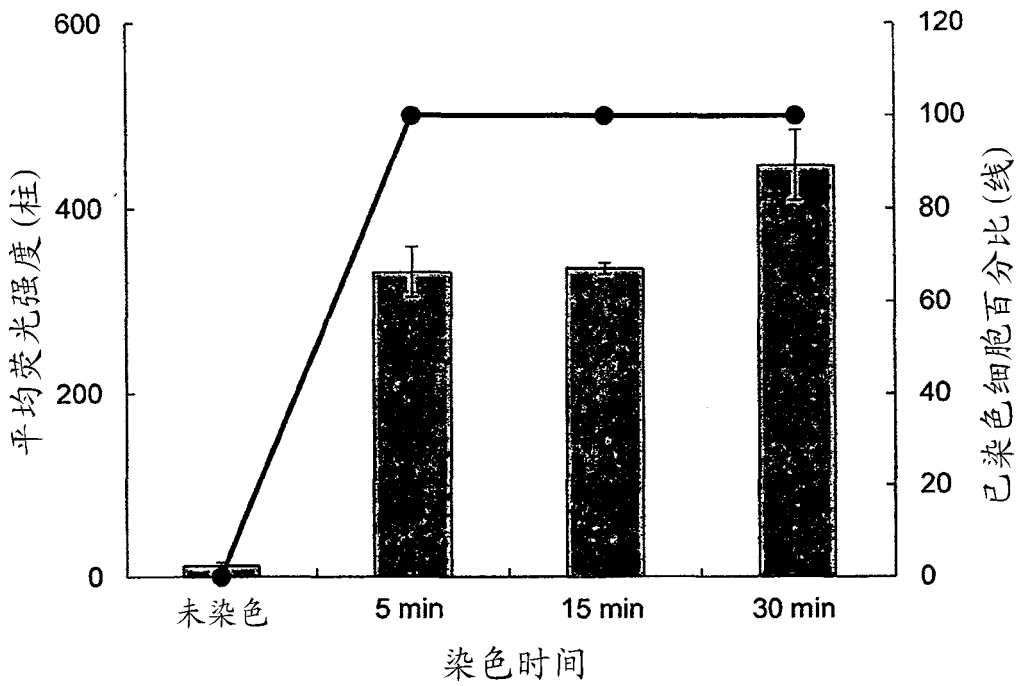


图 3