



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117106932 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 24

(21) 申请号 202311183204.9

C12Q 1/6851 (2018.01)

(22) 申请日 2023.09.13

C12N 15/11 (2006.01)

(71) 申请人 圣湘生物科技股份有限公司

地址 410205 湖南省长沙市长沙高新技术产业开发区麓松路680号

申请人 湖南圣维尔医学检验所有限公司
中南大学湘雅三医院

(72) 发明人 明英姿 刘让蛟 程星 马洪昌
鲍文娟 杨悦 李俊辉 张宇
周杰 戴立忠

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

专利代理师 黄景辉 徐川

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

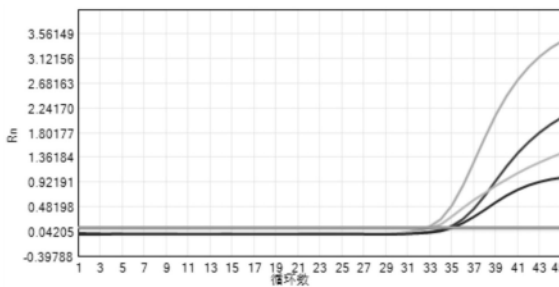
权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途

(57) 摘要

本发明属于分子生物学检测领域,具体地,涉及血吸虫的检测,更具体地,涉及SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途。本发明提供一种日本血吸虫SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途,使用本发明发现的新靶点制备的PCR检测试剂,相比现有的日本血吸虫的靶点,例如SJR2,其能够获得更高的灵敏度和特异性,特别地,在多重PCR的设计过程中,新靶点能够使得整个体系获得更好的灵敏度和更好的特异性。



1. 一种日本血吸虫SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在於,所述试剂为PCR试剂。
3. 一种检测血吸虫病的组合物,其特征在於,所述组合物包括用于检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其特征在於,检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针是如SEQ ID NO.4~6所示,或者SEQ ID NO.7~9所示,或者SEQ ID NO.10~12所示中的至少一对。
5. 根据权利要求3或4所述的组合物,其特征在於,所述组合物还包括用于检测曼氏血吸虫SM1-7序列的上下游引物和探针、用于检测埃及血吸虫Dra1序列的上下游引物和探针、用于检测日本血吸虫SJR2序列的上下游引物和探针,以及用于检测内标序列的上下游引物和探针中的至少一对。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在於,检测曼氏血吸虫SM1-7序列的上下游引物和探针如SEQ ID NO.13~15所示;检测埃及血吸虫Dra1序列的上下游引物和探针如SEQ ID NO.16~18所示;检测日本血吸虫SJR2序列的上下游引物和探针如SEQ ID NO.1~3所示;检测内标的上下游引物和探针如SEQ ID NO.19~21所示。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其特征在於,所述组合物包括用于检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针、用于检测曼氏血吸虫SM1-7序列的上下游引物和探针、用于检测埃及血吸虫Dra1序列的上下游引物和探针、用于检测日本血吸虫SJR2序列的上下游引物和探针,以及用于检测内标序列的上下游引物和探针。
8. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在於,所述组合物的各成分存在于同一个包装中。
9. 根据权利要求3~8中任一项所述的组合物在制备血吸虫病病原体检测试剂盒中的用途。
10. 一种检测血吸虫病病原体的试剂盒,所述试剂盒包括如权利要求3~8中任一项所述的组合物。

SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学检测领域,具体地,涉及血吸虫的检测,更具体地,涉及SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途。

背景技术

[0002] 血吸虫病(Schistosomiasis),俗称“大肚子病”,是由血吸虫引起的一种急、慢性病。感染人体的血吸虫分6种:日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、湄公河血吸虫、几内亚血吸虫和间插血吸虫,对人类造成主要伤害的血吸虫有3种:流行于亚洲的日本血吸虫、流行于拉美及中非的曼氏血吸虫以及流行于北非的埃及血吸虫。血吸虫病主要表现为入侵部位发生皮炎,伴有发热、腹痛腹泻、肝区压痛等症状。血吸虫病传染源难以完全消除、传播途径无法彻底切断,传播风险持续存在。

[0003] 诊断在血吸虫病防治工作中对控制及消除传染源发挥关键作用。常见的有粪便、尿液的标本检查,有时需要取肠道或膀胱组织的标本检查;有时也会采取血液化验来进行诊断。但这些测试不能表明感染的严重程度,存在局限性。

[0004] 核酸检测具有较高的敏感性和特异性。之前已建立的核酸诊断技术局限于现有靶点开发的引物探针,敏感性和特异性有待提高,例如Li, Juan, Zhao, Guang-Hui et. 报告了一种实时PCR测定结合高分辨率熔解(HRM)测定,以核18S rDNA的一部分为目标,以检测、识别和区分四种主要的血吸虫种类,但其检测来自血吸虫的基因组DNA,检测限定为Ct值<30时的最小基因组DNA量,为 10^{-5} ng,灵敏度有待提高,并且日本血吸虫和湄公河血吸虫熔解曲线的主峰值一样,均为83.65℃。二者差异点在于湄公河血吸虫熔解曲线主峰左侧有一个次峰,据此与日本血吸虫进行区分,不易于判读,可能会造成误判。

[0005] 因此,本领域需求一种产品能够更加快速有效的诊断血吸虫病,且灵敏度更高,特异性更好。

发明内容

[0006] 本文公开的主题是在湖南省科技创新计划资助的项目(项目编号:2022WZ1025)下做出的。

[0007] 有鉴于此,申请人以登录号为NC_002544.1的日本血吸虫基因序列作为检测靶点,发现了检测日本血吸虫的新靶点SjTR1微卫星序列(SiTR1区域),所述基因序列为:MW631938.1。

[0008] 第一方面,本发明提供一种日本血吸虫SjTR1微卫星序列用于制备检测血吸虫病的试剂的用途。

[0009] 进一步地,所述试剂为PCR试剂;更进一步地,所述试剂为多重PCR试剂。

[0010] 在一些具体的实施方案中,所述试剂为引物和/或探针。

[0011] 使用本发明发现的新靶点制备的PCR检测试剂,相比现有的日本血吸虫的靶点,例如SJR2,其能够获得更高的灵敏度和特异性,特别地,在多重PCR的设计过程中,新靶点能够

使得整个体系获得更好的灵敏度和更好的特异性。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种检测血吸虫病的组合物,包括

[0013] 用于检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针;

[0014] 用于检测曼氏血吸虫SM1-7序列的上下游引物和探针;以及

[0015] 用于检测埃及血吸虫Dra1序列的上下游引物和探针。

[0016] 进一步地,所述组合物还包括内标基因。在一些具体的实施方案中,内标是人管家基因。

[0017] 进一步地,上述本发明组合物的探针的荧光基团彼此互不相同且互不干扰。

[0018] 在本文中,“互不相同且互不干扰”是指组合物中每个探针所用的荧光基团是不一样的,并且不会影响彼此的检测,即可以利用不同的通道进行检测。例如可以使用ATTO 425、Quasar705、FAM、HEX、ROX和CY5,这些基团吸光值不接近,能选择不同的通道,因而不会互相干扰。

[0019] 在一些具体的实施方案中,SjTR1微卫星序列的探针的荧光报告基团为FAM;内标的探针的荧光报告基团为HEX(或VIC);SM1-7序列的探针的荧光报告基团为ROX;Dra1序列的探针的荧光报告基团为CY5。

[0020] 进一步地,所述组合物还包括:用于检测日本血吸虫SJR2序列的上下游引物和探针。

[0021] 增加上述引物和探针序列之后,本发明的组合物的灵敏度更高。

[0022] 在一些具体的实施方案中,检测日本血吸虫SJR2序列的探针可以与SjTR1微卫星序列的探针的荧光基团相同,也可以不同。

[0023] 在一些具体的实施方案中,检测日本血吸虫SJR2序列的上下游引物和探针如SEO ID NO.1~3所示。

[0024] 在一些具体的实施方案中,检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针是如SEO ID NO.4~6所示,或者SEO ID NO.7~9所示,或者SEO ID NO.10~12所示中的至少一对。

[0025] 在一些具体的实施方案中,检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针是如SEO ID NO.4~6所示,或者SEO ID NO.7~9所示,或者SEO ID NO.10~12所示中的至少两对。

[0026] 在一些具体的实施方案中,检测日本血吸虫SjTR1微卫星序列的上下游引物和探针是如SEO ID NO.4~6所示,SEO ID NO.7~9所示,以及SEO ID NO.10~12所示。

[0027] 在一些具体的实施方案中,检测SM1-7序列的上下游引物和探针如SEO ID NO.13~15所示。

[0028] 在一些具体的实施方案中,用于检测Dra1序列的上下游引物和探针如SEO ID NO.16~18所示。

[0029] 在一些具体的实施方案中,检测内标的上下游引物和探针如SEO ID NO.19~21所示。

[0030] 进一步地,在一些实施方案中,本发明的组合物可以同时包括上述引物和探针对中的一对或多对。在本发明中,“对”是指检测一个靶点的互相匹配的上游、下游引物和探针。

[0031] 本发明的组合物可以任意组合成检测对应5个靶点的任意组合形式。本领域技术人员可以根据需要进行组合,检测哪几个靶点,即把对应靶点的引物和探针对进行组合即可。这些组合形式均包括在本发明中。

[0032] 举例来说,可以包括上述7对引物和探针中的任意6对,可以包括上述7对引物和探针中的任意5对,可以包括上述7对引物和探针中的任意4对,可以包括上述7对引物和探针中的任意3对,可以包括上述7对引物和探针中的任意2对,也可以包括上述7对引物和探针中的任意1对。

[0033] 在一些具体的实施方案中,本发明组合物用于荧光PCR。

[0034] 进一步地,探针的3'末端还具有非荧光淬灭剂。

[0035] 进一步地,探针的3'末端还具有淬灭基团,例如BHQ1或BHQ2。

[0036] 在一个具体的实施方案中,探针的3'末端为BHQ1。

[0037] 在一个具体的实施方案中,本发明的组合物的各成分分别存在于单独包装中。

[0038] 在一个具体的实施方案中,本发明的组合物的各成分存在于同一个包装中。

[0039] 进一步地,本发明的组合物的各成分以混合的形式存在。

[0040] 第三方面,本发明提供了上述组合物在制备血吸虫病病原体检测试剂盒中的用途。

[0041] 进一步地,本发明提供了上述本发明的组合物在制备血吸虫病病原体联检并区分的试剂盒中的用途,其中,所述病原体为日本血吸虫、曼氏血吸虫,和埃及血吸虫。

[0042] 第四方面,本发明提供了一种检测血吸虫病病原体的试剂盒,所述试剂盒包括如上所述本发明的组合物。

[0043] 进一步地,所述试剂盒还包括阴性质控品和阳性质控品。

[0044] 在一个具体的实施方案中,阴性质控品是DEPC H₂O、生理盐水、内标基因中的至少一种。阳性质控品是日本血吸虫、曼氏血吸虫,和埃及血吸虫的片段DNA中的至少一种。

[0045] 进一步地,所述试剂盒还包括dNTP (U) s、PCR缓冲液以及Mg²⁺中的至少一种。

[0046] 更进一步地,所述试剂盒还包括:核酸释放试剂、核酸提取试剂,以及DNA聚合酶中的至少一种。

[0047] 更进一步地,所述试剂盒还包括核酸释放试剂、核酸提取试剂、dNTP、dUTP、尿嘧啶糖基化酶(UNG)、DNA聚合酶、PCR缓冲液以及Mg²⁺中的至少一种。

[0048] 进一步地,所述DNA聚合酶的浓度为3U/反应~15U/反应,例如DNA聚合酶可以是Taq酶。

[0049] 在一个具体的实施方案中,本发明试剂盒包括Taq酶、UNG酶、Mg²⁺、dNTP (U) s、引物、探针和PCR缓冲液。

[0050] 常见的PCR缓冲液由Tris-HCl、MgCl₂、KCl、Triton X-100等缓冲体系构成。一般单个PCR反应管中总体积为20μl~200μl。

[0051] 第五方面,提供了一种组合物用于制备检测血吸虫病病原体并区分的试剂的用途,所述检测包括以下步骤:

[0052] 1) 提取或释放待测样本的核酸;

[0053] 2) 使用如上所述本发明的组合物或上述本发明的试剂盒对步骤1)获得的核酸进行荧光定量PCR;

[0054] 3) 获得并分析结果。

[0055] 在本发明中,用于检测的样本可以是血液,组织液等,但不限于此。

[0056] 进一步地,所述荧光定量PCR的反应条件为:

[0057] UNG酶反应,温度为40~60℃,时间为30~150秒,1次循环;Taq酶活化,温度为94℃,时间为3~6min,1次循环;变性,温度为94℃,时间为5~20秒,退火,温度为55℃~60℃,时间为10~60秒,30~50次循环,采集荧光。

[0058] 在一个具体的实施方案中,提供了一种用于以非诊断目的的血吸虫病病原体联检并区分的方法,所述方法包括以下步骤:

[0059] 1) 提取或释放待测样本的核酸;

[0060] 2) 使用如上述本发明的组合物或上述本发明的试剂盒对步骤1) 获得的核酸进行荧光定量PCR;

[0061] 3) 获得并分析结果。

[0062] 进一步地,所述荧光定量PCR的反应条件为:

[0063] UNG酶反应,温度为40~60℃,时间为30~150秒,1次循环;Taq酶活化,温度为94℃,时间为3~6min,1次循环;变性,温度为94℃,时间为5~20秒,退火,温度为55~60℃,时间为10~60秒,30~50次循环,采集荧光。

[0064] 在本文中,术语“非诊断目的”指并非旨在获得个体是否感染上述病原体并罹患血吸虫病的信息。例如,该方法可以在检测培养物中(例如血液)需求检测是否有上述病原体。

附图说明

[0065] 图1为本发明组合物1检测结果图;

[0066] 图2为本发明组合物2检测结果图;

[0067] 图3为本发明组合物3检测结果图;

[0068] 图4为本发明组合物4检测结果图。

具体实施方式

[0069] 下文将结合具体实施方案和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方案和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0070] 实施例1、本发明所使用的引物及探针

[0071] 本发明所使用的引物及探针如下表1所示。

[0072] 表1

[0073]

名称	检测靶点	序列及标记方式(5'-3')
----	------	----------------

[0074]	SEQ ID NO: 1	日本血吸虫 SJR2	ATGCGATTCTCCCCATCCAAA
	SEQ ID NO: 2		GTCTCGCCTACGCCACAAGT
	SEQ ID NO: 3		AGGGCGTGAAACTATTGAATGCGT
	SEQ ID NO: 4	日本血吸虫 SJTR1	ACTCATCACCGCCAATCAAC
	SEQ ID NO: 5		TGCACAACCTTCTTCCCCATA
	SEQ ID NO: 6		ACACCCACAACATCTCGCCATCAT
	SEQ ID NO: 7	日本血吸虫 SJTR1	GGGGCACGAGGTGTATGAAA
	SEQ ID NO: 8		GCATGGTATAGTGACGCAGC
	SEQ ID NO: 9		ACACCCACAACATCTCGCCATCAT
	SEQ ID NO: 10	日本血吸虫 SJTR1	GCACGACATTGCCCCCTATTTTT
	SEQ ID NO: 11		TTCCCCATTTAAAGATGATGCGAG
	SEQ ID NO: 12		ACACCCACAACATCTCGCCATCAT
	SEQ ID NO: 13	曼氏血吸虫 SM1-7	ATATTAACGCCACGCTCT
	SEQ ID NO: 14		TATCTCCGAAACCACTGGACGGA
	SEQ ID NO: 15		ACCGTTCTATGAAAATCGTTG
	SEQ ID NO: 16	埃及血吸虫 Dra1	ATCTCACCTATCAGACGAAACA
	SEQ ID NO: 17		TCACAACGATACGACCAACC
	SEQ ID NO: 18		CCTGTTTCGCAATATCTCCGGAA
	SEQ ID NO: 19	管家基因 GAPDH	CAAGATCATCAGCAATGCCT
	SEQ ID NO: 20		AGTCCTTCCACGATACCAAA
	SEQ ID NO: 21		CACCACCAACTGCTTAGCACCCCT

[0075] 实施例2、检测血吸虫病原体的方法

[0076] 1、试剂准备：

[0077] 根据阴性对照、待测样本、阳性对照的数量，按比例（PCR反应液38 μ L/人份+酶混合液2 μ L/人份）取相应量的PCR反应液和酶混合液，充分混匀成PCR Mix，2000rpm离心10s后备用。

[0078] PCR反应体系：

[0079]	组份	每一个反应中的体
	PCR buffer*	34.6 μ L

[0080]	dNTPs (U)	0.8 μ L
	1mol/L MgCl ₂	0.6 μ L
	引物 (50pmol/ μ L)	1.6 μ L
	探针 (50pmol/ μ L)	0.4 μ L
	Taq 酶 (15U/ μ L)	1.7 μ L
	UNG 酶 (2U/ μ L)	0.3 μ L

[0081] 混合酶的配制:

[0082] 酶混合液由H-Taq酶和UNG酶组成。将H-Taq酶(15U/ μ L)和UNG酶(2U/ μ L)按照一定比例混合而成(每人份为1.7 μ L H-Taq酶与0.3 μ L UNG酶混合而成)。

[0083] 2、样本处理与加样

[0084] 取200 μ L待测样本到1.5mL离心管中,使用圣湘生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂(S10015)按其说明书操作进行核酸提取。

[0085] 吸取阴性对照、上述提取好的样本核酸、阳性对照各10 μ L分别加入对应的0.2mL PCR反应管中,每管加入40 μ L PCR Mix,盖上管盖。

[0086] 3、PCR扩增

[0087] 在SLAN-96P全自动医用PCR分析系统上,按照下表中的程序进行PCR扩增:

步骤		温度	时间	循环数	
[0088]	1	UNG 酶反应	50 $^{\circ}$ C	2 分钟	1
	2	Taq 酶活化	94 $^{\circ}$ C	5 分钟	1
	3	变性	94 $^{\circ}$ C	15 秒	45
	4	退火, 延伸及荧光检测	57 $^{\circ}$ C	30 秒	
	5	仪器冷却 (可选)	25 $^{\circ}$ C	10 秒	1

[0089] 4、检验结果的解释

[0090] 如果该样本FAM,HEX(VIC),ROX,CY5通道有明显S型扩增曲线,且Ct值 \leq 40,则判为阳性;如果该样本FAM,ROX,CY5通道无扩增曲线(No Ct)或Ct值 $>$ 40,且HEX(VIC)内标通道为阳性(Ct值 \leq 40),则判为阴性。具体如下:

扩增结果	FAM 通道		HEX (或 VIC) 通道		ROX 通道		CY5 通道	
	Ct 值 \leq 40	No Ct 或 Ct 值 $>$ 40	Ct 值 \leq 40	No Ct 或 Ct 值 $>$ 40	Ct 值 \leq 40	No Ct 或 Ct 值 $>$ 40	Ct 值 \leq 40	No Ct 或 Ct 值 $>$ 40
[0091] 结果判读	日本血吸虫阳性	日本血吸虫阴性	内标阳性	内标阴性	曼氏血吸虫阳性	曼氏血吸虫阴性	埃及血吸虫阳性	埃及血吸虫阴性

[0092] 实施例3、本发明组合物测试样本的检测结果

[0093] 将实施例1所示的引物和探针(组合物1:SEQ ID NO.4~6,SEQ ID NO.13~21),按

照实施例2的方法对样中的日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫同时检测,其结果如图1所示,从图1中可以看出,组合物1能够对样本中的各种血吸虫进行检测并区分。

[0094] 将实施例1所示的引物和探针(组合物2:SEQ ID NO.7~9,SEQ ID NO.13~21),按照实施例2的方法对样中的日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫同时检测,其结果如图2所示,从图2中可以看出,组合物2能够对样本中的各种血吸虫进行检测并区分。

[0095] 将实施例1所示的引物和探针(组合物3:SEQ ID NO.10~21),按照实施例2的方法对样中的日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫同时检测,其结果如图3所示,从图3中可以看出,组合物3能够对样本中的各种血吸虫进行检测并区分。

[0096] 将实施例1所示的引物和探针(组合物4:SEQ ID NO.1~6,SEQ ID NO.13~21),按照实施例2的方法对样中的日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫同时检测,其结果如图4所示,从图4中可以看出,组合物4能够对样本中的各种血吸虫进行检测并区分。

[0097] 实施例4、本发明组合物的灵敏度

[0098] 将日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫的人工合成质粒混合后使用阴性血清样本梯度稀释至 $1.00E+03$ copies/mL、 $4.00E+02$ copies/mL、 $2.00E+02$ copies/mL、 $1.00E+02$ copies/mL作为待测样本,以95%检出水平作为本试剂最低检测限,分析灵敏度测试结果表明,本发明组合物1对日本/曼氏/埃及血吸虫病原体的检测限均为: $4.00E+02$ copies/mL(见表2)。

[0099] 表2

样本浓度		检出率(检出个数/检测个数)
1.00E+03 copies /mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	20/20
	埃及血吸虫	20/20
4.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	19/20
	埃及血吸虫	19/20
2.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	18/20
	曼氏血吸虫	16/20
	埃及血吸虫	17/20
1.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	14/20
	曼氏血吸虫	12/20
	埃及血吸虫	12/20

[0101] 进一步地,本发明组合物2、3对日本/曼氏/埃及血吸虫病原体的检测限均为: $4.00E+02$ copies/mL(见表3、4)

[0102] 表3

样本浓度		检出率 (检出个数/检测个数)
[0103] 1.00E+03 copies /mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	20/20
	埃及血吸虫	20/20
4.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	19/20
	埃及血吸虫	19/20
2.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	17/20
[0104] 1.00E+02 copies /mL	曼氏血吸虫	14/20
	埃及血吸虫	15/20
	日本血吸虫	12/20
	曼氏血吸虫	13/20
	埃及血吸虫	12/20

[0105] 表4

样本浓度		检出率 (检出个数/检测个数)
[0106] 1.00E+03 copies /mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	20/20
	埃及血吸虫	20/20
4.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	19/20
	埃及血吸虫	19/20
2.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	17/20
	曼氏血吸虫	14/20
	埃及血吸虫	16/20
1.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	13/20
	曼氏血吸虫	11/20
	埃及血吸虫	11/20

[0107] 本发明组合剂4对曼氏/埃及血吸虫病原体的检测限均为:4.00E+02copies/mL,对日本血吸虫的检测线低至2.00E+02copies/mL(见表5)。

[0108] 表5

样本浓度		检出率 (检出个数/检测个数)	
[0109]	1.00E+03 copies/mL	日本血吸虫	20/20
		曼氏血吸虫	20/20
		埃及血吸虫	20/20
	4.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	20/20
		曼氏血吸虫	19/20
		埃及血吸虫	19/20
	2.00E+02 copies	日本血吸虫	19/20
[0110]	/mL	曼氏血吸虫	15/20
		埃及血吸虫	16/20
	1.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	15/20
		曼氏血吸虫	12/20
		埃及血吸虫	13/20

[0111] 实施例5、本发明组合物的特异性

[0112] 特异性实验表明,本发明中的方法对常见寄生虫病原体与传染性病毒(弓形虫(TOXO)、旋毛虫(Trichina)、人类微小病毒B19(HPV B19)、风疹病毒(RV)、巨细胞病毒(CMV)和单纯疱疹病毒(HSV1/2)等无交叉反应(样本信息见表6)。

[0113] 表6、不同近似病原体信息统计表

近似病原	来源	浓度	浓度确定方法
TOXO	湖南圣维尔医学检验中心	1.00E+06 copies/mL	数字 PCR 定值
Trichina		1.00E+06 copies/mL	
B19		1.00E+06 copies/mL	
RV		1.00E+06 copies/mL	
CMV		1.00E+06 copies/mL	
HSV1		1.00E+06 copies/mL	
HSV2		1.00E+06 copies/mL	

[0115] 特异性分析使用上述样本,用稀释至1.00E+06copies/mL的日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫混合质粒作为对照样本进行检测。

[0116] 用三批试剂(组合4)在SLAN-96P全自动医用PCR分析系统检测,通过检测阴阳性符合率,考查试剂盒的特异性。测试结果如下表7所示:

[0117] 表7、三批试剂检测交叉反应结果统计

[0118]	近似病原体	第一批 (Ct)				第二批 (Ct)				第三批 (Ct)			
		检测结果				检测结果				检测结果			
		FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5	FAM	HEX	ROX	CY5
	TOXO	-	24.26	-	-	-	24.6	-	-	-	24.88	-	-
[0119]	Trichina	-	24.34	-	-	-	24.2	-	-	-	24.77	-	-
	B19	-	24.55	-	-	-	24.5	-	-	-	24.47	-	-
	RV	-	24.59	-	-	-	24.8	-	-	-	24.67	-	-
	CMV	-	24.23	-	-	-	24.3	-	-	-	24.56	-	-
	HSV1	-	24.89	-	-	-	24.7	-	-	-	24.73	-	-
	HSV2	-	24.47	-	-	-	24.8	-	-	-	24.66	-	-

[0120] 结论:使用三批试剂检测,交叉样本血吸虫检测结果均为阴性,表明本试剂盒具有很好的特异性。同时,经验证上表中其他高浓度病原体也不会对日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫核酸检测产生影响。

[0121] 实施例6、本发明组合物的抗干扰性和稳定性

[0122] 为考察样本中可能存在的内源/外源性物质对检测结果的影响,将已定值的日本血吸虫样本核酸与埃及血吸虫和曼氏血吸虫的质粒混合后稀释至最低检测限,分成若干份,每份分别加入一定浓度的内源性干扰物质:血浆蛋白、白细胞、总胆红素、甘油三酯、总IgG、干扰素 α ;外源性干扰物质:吡喹酮,通过与对照样本的比较,考查试剂盒的抗干扰能力。采用本发明组合物1进行试验,试验结果如表8所示:

[0123] 表8、干扰试验验证检测结果

[0124]	干扰物质	FAM	HEX	ROX	CY5
	对照样本	36.00	34.08	34.43	37.05
	血浆蛋白	35.87	34.00	35.55	36.23
	总胆红素	37.17	33.77	34.35	35.52
	甘油三酯	35.24	34.28	36.48	36.79
	白细胞	37.37	34.21	35.81	35.18
	总IgG	36.55	34.98	35.10	38.10
	干扰素 α	36.21	34.98	34.93	37.45
	吡喹酮	35.36	35.84	34.49	39.37

[0125] 对比例1、本申请的新靶标和已知靶标对灵敏度的影响

[0126] 将日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫的人工合成质粒混合后使用阴性血清样本梯度稀释至 $1.00E+03$ copies/mL、 $4.00E+02$ copies/mL、 $2.00E+02$ copies/mL、 $1.00E+02$ copies/mL作为待测样本,以95%检出水平作为本试剂最低检测限,分析灵敏度测试结果表明,本发明组合物5(组合物5:SEQ ID NO.1~3,SEQ ID NO.13~21)对日本/曼氏/埃及血吸虫病原体的检测限均为: $1.00E+03$

[0127] copies/mL(见表9)。

[0128] 表9

样本浓度		检出率 (检出个数/检测个数)
1.00E+03 copies /mL	日本血吸虫	20/20
	曼氏血吸虫	20/20
	埃及血吸虫	20/20
4.00E+02 copies/mL	日本血吸虫	17/20
	曼氏血吸虫	15/20
	埃及血吸虫	15/20
2.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	16/20
	曼氏血吸虫	15/20
	埃及血吸虫	13/20
1.00E+02 copies /mL	日本血吸虫	14/20
	曼氏血吸虫	13/20
	埃及血吸虫	11/20

[0129]

[0130] 从表9和表2-4的对比可以看出,使用新靶点设计的引物和探针的组合物1,2和3的灵敏度均为4.00+02copies/mL,而使用已知靶点设计的引物和探针的组合物5的灵敏度却为1.00+03copies/mL。本申请新靶点设计的引物和探针的灵敏度高于已知靶点。

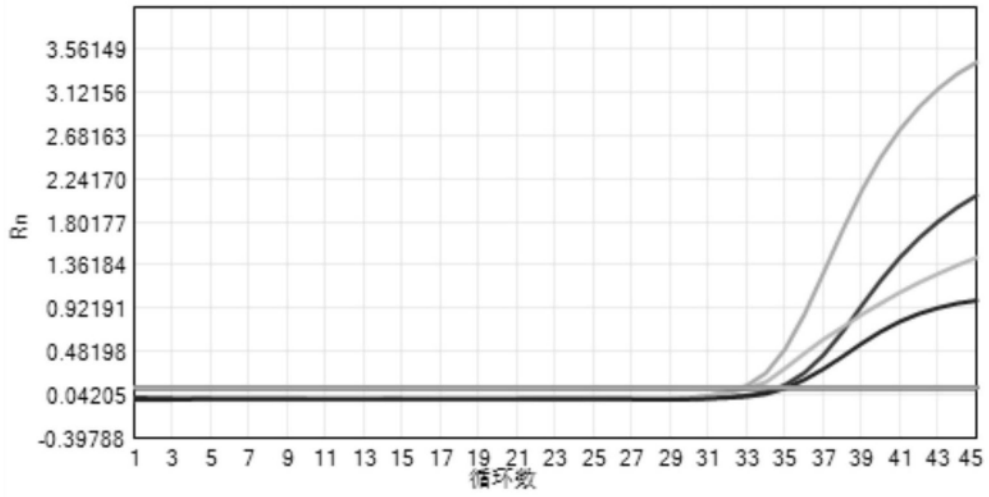


图1

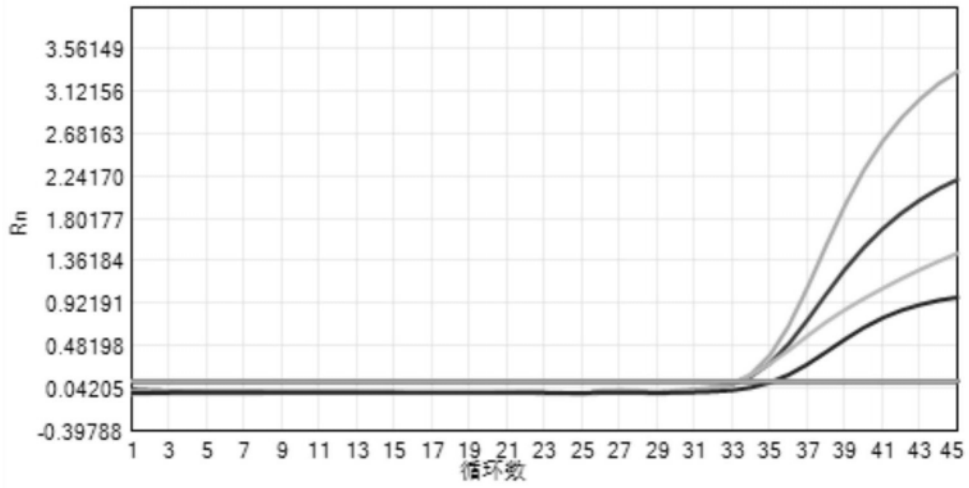


图2

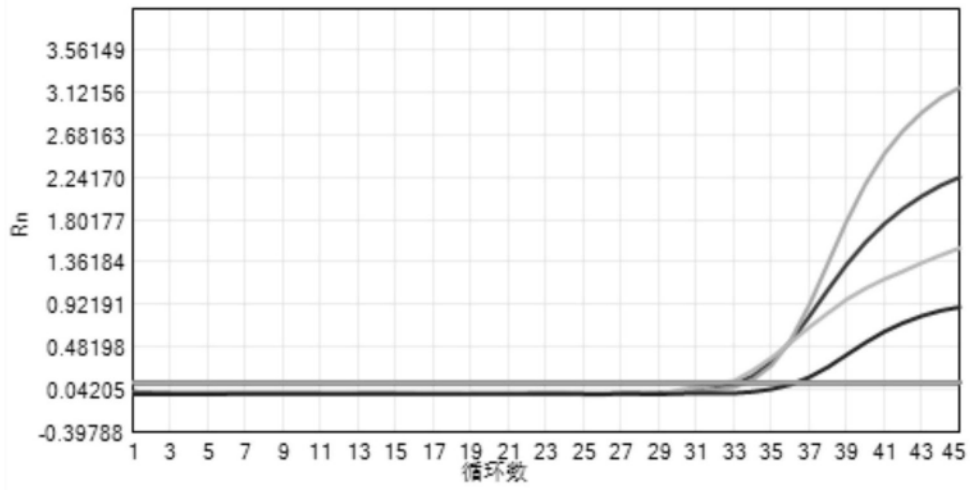


图3

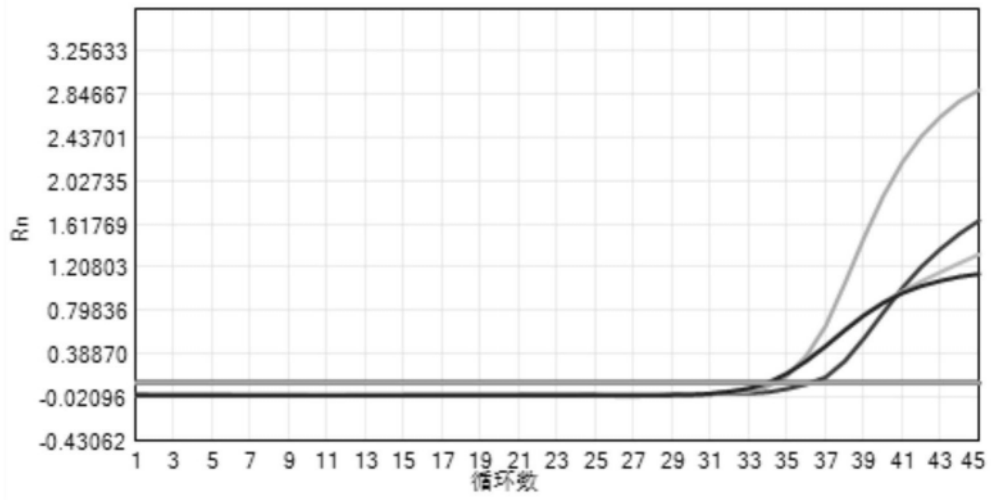


图4