(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117757985 A
(43)申请公布日 2024.03.26

(21)申请号 202311236251.5

(22)申请日 2023.09.22

(30)优先权数据
63/376,831 2022.09.23 US

(71)申请人 港大科桥有限公司
地址 中国香港薄扶林道
申请人 病毒与疫苗研究中心有限公司
医院管理局

(72)发明人 杜启泓 S·斯里达尔 袁国勇
叶植恩

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 涂滔

(51)Int.Cl.
C12Q 1/70(2006.01)
C12Q 1/6844(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

用于冠状病毒检测的组合物及其制备和使用方法

(57)摘要

提供了用于检测SARS-CoV-2的序列并且包括例如SEQ ID NO:4-8。这些序列可用于使用逆转录环介导的等温扩增(RT-LAMP)来扩增样品中的SARS-CoV-2nsp8基因,并且优选与Cas酶/sgRNA对和报告核酸组合使用。所公开的序列可以用于检测样品中的SARS-CoV-2核酸的方法。一般来说,SARS-CoV-2RNA的特定基因序列(本文为nsp8)使用RT-LAMP进行扩增。RT-LAMP产物由Cas12a-gRNA核糖核蛋白(RNP)复合物扫描。RNP与gRNA的特异性互补物结合,激活Cas12a的转切割活性。活性Cas12a系统切割短的ssDNA报告物,该报告物优选经标记,在两末端具有荧光团和淬灭剂。报告物的切割将淬灭剂与荧光团分开,并生成肉眼可检测到的荧光。

CN 117757985 A

1.用于检测样品中SARS-CoV-2nsp8基因的存在的核酸组合物,所述核酸组合物包含以下或由以下组成:核酸序列SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,或

与前述任一项具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

2.权利要求2的组合物,其进一步包含(a)Cas/sgRNA对,和(b)一种或多种荧光报告物、一种或多种淬灭剂或其组合,(c)磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液,(d)逆转录酶和具有链置换活性的DNA聚合酶,和/或(e)一种或多种去污剂。

3.权利要求1的组合物,其包含一种或多种盐。

4.权利要求3的组合物,其中所述盐是钾盐、钠盐、镁盐或铵盐。

5.权利要求4的组合物,其中所述盐选自KCl、NaCl、$MgCl_2$、$MgSO_4$、$(NH_4)_2SO_4$。

6.权利要求1的组合物,其包含选自dATP、dCTP、dGTP和dTTP的一种或多种核苷酸或核苷酸类似物。

7.权利要求2的组合物,其中所述sgRNA包含SEQ ID NO:1或与前述序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

8.权利要求7的组合物,其中所述报告物包含SEQ ID NO:3,或与前述序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

9.检测样品中SARS-CoV-2核酸的存在的方法,所述方法包括以下步骤:

(a)在足以扩增SARS-CoV-2的nsp8基因的条件下使所述样品与包含权利要求1的组合物的组合物接触,和

(b)检测SARS-CoV-2nsp8基因扩增产物,从而检测所述样品中SARS-CoV-2nsp8的存在,所述方法包括在步骤(b)之前将来自步骤(a)的所述样品与包含Cas酶/sgRNA对和报告核酸的组合物接触的任选步骤。

10.权利要求9的方法,其中所述引物包含SEQ ID NO:4-8。

11.权利要求9-10中任一项的方法,其中所述引物包含与SEQ ID NO:4-8中任一项具有至少90%的序列同一性的核酸序列。

12.权利要求11的方法,其中所述样品选自粘液、痰液(处理过的或未处理过的)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管冲洗液(BW)、体液、脑脊液(CSF)、尿液、组织(例如活检材料)、直肠拭子、鼻咽抽吸物、鼻咽拭子、咽拭子、粪便、血浆、血清或全血,其中所述方法包括从所述样品中提取核酸并将所述样品与所述RT-LAMP引物接触的步骤。

13.权利要求12的方法,其中所述样品获自鼻咽拭子、鼻咽抽吸物、痰/深喉唾液或咽拭子。

14.权利要求13的方法,其中所述RT-LAMP反应条件包括约60℃的反应温度和以下引物终浓度:

(i)SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:5,约0.1至约0.4μM;

(ii)SEQ ID NO:6,约0.8至约3.2μM;

(iii)SEQ ID NO:7,约0.8至约3.2μM;和

(iv)SEQ ID NO:8;约0.2至约1.6μM。

15.权利要求14的方法,其中,(i)SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:5的浓度为约0.2μM;(ii)

SEQ ID NO:7的浓度为约1.6μM;和/或(iii)SEQ ID NO:8的浓度为约0.4μM。

16.权利要求14的方法,其中所述RT-LAMP反应包含逆转录酶、DNA聚合酶、pH指示剂和六个引物以扩增所述SARS-CoV-2E基因,导致pH下降和从粉红色到黄色的颜色变化,表明所述样品中存在SARS-CoV-2。

17.用于检测样品中SARS-CoV-2nsp8基因的存在的试剂盒,其包含在一个或多个容器中的权利要求1-12中任一项的组合物。

18.权利要求17的试剂盒,其中所述组合物的一种或多种组分是冻干的。

19.权利要求18的试剂盒,其包含两个容器,其中一个容器包含冻干组分,并且第二容器包含再水化溶液,所述再水化溶液包含用于RT-LAMP的引物和ssDNA报告物。

20.权利要求18的试剂盒,其包含在容器底部的除引物外的RT-LAMP反应试剂和在所述容器的盖上的Cas酶反应试剂,其中(a)所述RT-LAMP反应试剂选自下组:dNTP、等温扩增缓冲液、MgSO4、RNase抑制剂、逆转录酶和DNA聚合酶以及合适的稳定剂,如D-(+)-海藻糖二水合物、甘露醇、蔗糖;和(b)Cas酶反应试剂包含用于Cas12a介导的反应的RNP复合物、MgSO4和Tris-HCl。

用于冠状病毒检测的组合物及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年9月23日提交的U.S.S.N.63/376,831的权益和优先权,其通过整体引用具体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 序列表以命名为“UHK_01210_ST26.xml”,创建于2023年8月30日,且大小为18,178字节的文本文件提交,根据37C.F.R.§1.834(c)(1)特此通过引用并入。

技术领域

[0005] 本发明总体上属于SARS-CoV-2检测领域。

背景技术

[0006] 由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的2019年冠状病毒病(COVID-19)大流行仍然是公共卫生问题(1-3)。伴随着全球确诊病例超过4.9亿,其已经是有记录以来最大规模的流行病之一(4,5)。及时诊断COVID-19是大流行控制的核心支柱,因为这不仅可以指导社区和医疗机构的感染控制,还可以为高危个体的早期治疗决策提供信息(6-9)。在全球范围内,COVID-19诊断主要依靠抗原检测(通常采用侧流形式)或核酸扩增检测(NAAT)如逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)(10)。SARS-CoV-2(引起2019年冠状病毒病(COVID-19)的病毒)的诊断的准确检测对于及时治疗和感染控制决策非常重要。抗原检测相对便宜,并且可以用作现场检测,但对早期COVID-19诊断缺乏敏感性(11,12)。相比之下,RT-PCR灵敏度很高,但需要在配备经过培训的工作人员和专业设备如热循环仪的实验室进行集中测试(13-15)。因此,RT-PCR无法在资源有限的环境中方便地大规模部署。

[0007] 仍然需要改进检测SARS-CoV-2的方法和试剂,从而避免复杂的仪器和训练有素的工作人员的需求、保持高度的敏感性和特异性,并降低与检测相关的成本。此类方法将使测试复杂程度降低且更便宜,从而大大提高测试的可能性。

[0008] 本发明的一个目的是提供用于检测和诊断SARS-CoV-2的组合物、方法和试剂盒。

[0009] 本发明的另一个目的是提供用于检测和诊断SARS-CoV-2的组合物、方法和试剂盒,相对于现有的检测方法,其显示出改进的灵敏度和特异性以及降低的与测试相关的成本。

发明内容

[0010] 提供了用于检测SARS-CoV-2的序列,并且可以例如包括以下或由以下组成:SEQ ID NO:4-8中任一项的序列,与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列,相对于其具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核酸取代、添加、缺失或其组合的核酸序列,或前述任一项的反向互补物。这些序列可用于使用逆转录环介导的等温扩增(RT-LAMP)来扩增样品中的SARS-CoV-2nsp8基因,并且优选与Cas酶/sgRNA对和报告核酸组合使用。报告核酸优选是在5’和3’末端用荧光团/淬灭剂对标记的ssDNA或

dsDNA,荧光团存在于一端(5’/3’)并且淬灭剂存在于另一端(5’/3’)。

[0011] 所公开的序列可以用于检测样品中的SARS-CoV-2核酸的方法,所述样品如粘液、痰(处理过的或未处理过的)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管冲洗液(BW)、体液、脑脊液(CSF)、尿液、组织(例如,活检材料)、直肠拭子、鼻咽抽吸物、鼻咽拭子、咽喉拭子、粪便、血浆、血清或全血,因此,也提供了检测此类样品中的SARS-CoV-2的方法。该样品可以是从可能已经暴露于或怀疑患有SARS-CoV-2的受试者中分离出来的样品。在一些实施方案中,在对样品进行检测方法之前,对样品进行处理以从样品中暴露或分离核酸。

[0012] 还公开了用于检测样品中SARS-CoV-2的存在的方法。该方法使用经设计以扩增样品中保守的SARS-CoV-2nsp8基因的5个引物。所公开的方法包括鉴定感染有SARS-CoV-2的受试者和/或诊断受试者为患有COVID 19。该方法是RT-LAMP测定,靶向SARS-CoV-2nsp8基因,并且优选利用Cas酶/sgRNA对和报告核酸。在优选的实施方案中,该方法是一步比色RT-LAMP。一般来说,SARS-CoV-2RNA的特定基因序列(本文为nsp8)使用RT-LAMP进行扩增。RT-LAMP产物由Cas12a-gRNA核糖核蛋白(RNP)复合物扫描。RNP与gRNA的特异性互补物结合,激活Cas12a的转切割活性。活性Cas12a系统切割短的(例如8nt)ssDNA报告物,该报告物优选经标记,在两末端具有荧光团和淬灭剂。报告物的切割将淬灭剂与荧光团分开,从而生成肉眼可检测到的荧光。该方法包括以下步骤:

[0013] (a)在足以扩增SARS-CoV-2的nsp8基因的条件下使样品与包含要求保护的组合物的组合物接触,所述要求保护的组合物包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的核酸序列,或与前述任一项具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列,和

[0014] (b)检测SARS-CoV-2nsp8基因扩增产物,从而检测样品中SARS-CoV-2nsp8的存在,该方法包括在步骤(b)之前将来自步骤(a)的样品与包含Cas酶/sgRNA对和报告核酸的组合物接触的任选步骤。

[0015] 本文公开了用于在单个管中进行RT-LAMP和CRISPR Cas12a介导的环境可视化的测定试剂盒。试剂盒包括本文公开的组合物,包括但不限于CRISPR Cas12a/sgRNA、报告核酸,例如标记的ssDNA、RT-LAMP引物。

[0016] 可以将测定试剂盒制备成包括至少一个或两个容器。容器可以包括液体试剂、冻干试剂及其组合。在其中一个容器包括干燥试剂的实施方案中,第二容器包括含有用于RT-LAMP的引物和ssDNA报告物的再水化缓冲溶液。

附图说明

[0017] 图1是本研究中使用的RT-LAMP-CRISPR测定的工作流程。

[0018] 图2A和2B是由内部开发的nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定生成的荧光读数的点图。通过RT-LAMP-CRISPR测定测试了319个样本,其中虚线阈值线用于nsp8和N测定(图2A),以及通过RT-LAMP-CRISPR测定测试呈阳性的146个样本(图2B)。****,P<0.0001。

[0019] 图3A和3B是由nsp8(图3A)和N(图3B)基因RT-LAMP-CRISPR测定生成的荧光读数与LightMix E-基因RT-PCR的Cp值的相关性的散点图。

[0020] 图4A和图4B是使用当前描述的引物和gRNA序列以及来自不同地理区域的SARS-CoV-2变体(野生型、Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron、Lambda和Mu)的nsp8基因序列的多

序列比对的示意图。野生型序列(NC_045512.2)和其他变体的序列分别从GenBank和GISAID获得。

具体实施方式

[0021] 等温NAAT方法,如环介导等温扩增(LAMP),通过在恒温下扩增靶核酸避免了热循环仪的需求(16)。LAMP产物检测可以使用CRISPR-Cas(成簇规则间隔短回文重复-CRISPR相关蛋白)化学进行(17)。CRISPR-Cas系统是细菌免疫的关键组成部分,选择性切割入侵者如噬菌体的核酸(18)。CRISPR效应蛋白如Cas12a在由向导RNA(gRNA)激活时选择性切割DNA(19)。该特征可用于LAMP最终产物的特异性检测。

[0022] 本文描述了用于诊断COVID-19的测定形式,该测定形式基于环介导等温扩增(LAMP)和成簇规则间隔短回文重复(CRISPR)-Cas化学的原理。这种测定形式的主要优点是不需要昂贵的设备来进行,并且可以目视地读取结果。已证明这种方法快速、易于进行且成本低廉。该测试在检测临床样品中SARS-CoV-2RNA的能力方面与RT-PCR测定相比较佳。没有观察到假阳性检测结果。新的测定形式非常适合在资源有限的环境中诊断SARS-CoV-2。

[0023] 多项研究证明了使用侧流条通过RT-LAMP和CRISPR-Cas12a的SARS-CoV-2检测(21-23),其涉及打开管以将RT-LAMP产物与CRISPR试剂组合,然后进行条读出。这会增加扩增子污染的机会。为了降低污染风险,所公开的测定采用单管形式。所公开方法的另一个优点在于其降低了每次反应的成本而不牺牲测定的灵敏度,因此与其他研究中使用的试剂相比,我们尝试减少RT-LAMP试剂的量(22,24,25)。本文公开的测定是快速、灵敏、特异、可负担且用户友好的。此外,其不需要热循环仪,使其即使在资源有限的环境中也能大规模部署。

[0024] I.定义

[0025] 公开了可以用于、可以结合用于、可以用于制备的材料、组合物和组分,或者是公开的方法和组合物的产物。这些材料和其他材料在本文中公开,并且应当理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,虽然可能没有明确公开这些化合物的每种不同的个体和集体组合和排列的具体参考,但每种都在本文中具体考虑和描述。因此,如果公开了一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F和组合分子A-D的实例,那么即使每个分子没有单独列举,每个分子也都个体和集体考虑。因此,在该实例中,组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每个都被具体考虑并且应该被认为从A、B和C;D、E和F;和示例组合A-D的公开中公开。同样,这些的任何子集或组合也被具体考虑和公开。因此,例如,A-E、B-F和C-E的亚组被具体考虑并且应该被认为从A、B和C;D、E和F;和示例组合A-D的公开中公开。此外,如上所考虑和公开的材料、组合物、组分等中的每一个也可以具体且独立地包括或排除在此类材料的任何组、亚组、列表、集合等中。这些概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在可以进行的多个附加步骤,则应当理解,这些附加步骤中的每一个都可以通过所公开方法的任何特定实施方案或实施方案的组合来进行,并且每个此类组合都被具体考虑并且应该视为已公开。

[0026] 如本文所用,术语“扩增”是指增加核酸分子,如基因或基因片段,例如SARS-CoV-2RNA的至少一部分的拷贝数。扩增反应的产物称为扩增产物。体外扩增的实例是环介导的等温扩增。

[0027] 如本文所用,关于多核苷酸(即,诸如寡核苷酸或靶核酸的核苷酸序列)的术语“互补物”、“互补的”或“互补性”是指Watson/Crick碱基配对规则。如本文所用,核酸序列的互补物是指当与核酸序列比对使得一个序列的5’末端与另一序列的3’末端配对时处于“反平行缔合”的寡核苷酸。例如,序列“5’-A-G-T-3’”与序列“3’-T-C-A-5’”互补。在天然存在的核酸中不常见的某些碱基可以包括在本文所述的核酸中。这些包括例如肌苷、7-脱氮鸟嘌呤、锁核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。互补性不必是完美的;稳定的双链体可以含有错配的碱基对、变性的或不匹配的碱基。核酸技术领域的技术人员可以根据经验考虑多个变量确定双链体稳定性,变量包括例如寡核苷酸的长度、寡核苷酸的碱基组成和序列、离子强度和错配碱基对的发生率。互补物序列还可以是与DNA序列或其互补物序列互补的RNA序列,并且还可以是cDNA。

[0028] 如本文所用,术语“足以进行的条件”与所公开的方法相关,是指允许期望活性的任何环境,例如允许两个核酸分子之间的特异性结合或杂交或允许核酸的逆转录和/或扩增的环境。此类环境可以包括但不限于特定的孵育条件(如时间和/或温度)或特定因子的存在和/或浓度,例如在溶液中(如缓冲液、盐、金属离子、去污剂、核苷酸、酶等)。

[0029] 如本文所用,术语“接触”与所公开的方法相关是指直接物理关联的布局;例如,呈固体和/或液体形式。例如,接触可以在体外与溶液中的一种或多种引物和/或探针与生物样品(如包含核酸的样品)发生。

[0030] 如本文所用,术语“引物”是指寡核苷酸,当置于诱导合成与靶核酸链互补的引物延伸产物的条件下时,即在适当的缓冲液(“缓冲液”包括pH、离子强度、辅因子等)中和在适当的温度下,在不同的三磷酸核苷酸和聚合酶存在下,其能够充当核酸序列合成的起始点。引物的一个或多个核苷酸可以例如通过添加甲基、生物素或地高辛部分、荧光标签或通过使用放射性核苷酸来修饰。引物序列不需要反映模板的确切序列。例如,非互补核苷酸片段可以附接至引物的5’末端,而引物序列的其余部分与该链基本上互补。如本文所用,术语引物包括可以合成的所有形式的引物,包括肽核酸引物、锁核酸引物、硫代磷酸酯修饰的引物、标记的引物等。如本文所用,术语“正向引物”是指与双链DNA(dsDNA)的反义链退火的引物。“反向引物”与dsDNA的正义链退火。

[0031] 引物的长度通常为至少10、15、18或30个核苷酸,或者长度最多为约100、110、125或200个核苷酸。在一些实施方案中,引物的长度优选在约15至约60个核苷酸之间,并且最优选地在约25至约40个核苷酸之间。在一些实施方案中,引物的长度为15至35个核苷酸。最佳杂交或聚合酶链式反应扩增没有标准长度。特定引物应用的最佳长度可以以H.Erlich,PCR Technology,PRINCIPLES AND APPLICATION FOR DNA AMPLIFICATION,(1989)中描述的方式容易地确定。

[0032] 如本文所用,术语“样品”是指从患者获得的体外样品以及临床样品。在优选的实施方案中,样品获自生物来源(即,“生物样品”),如从受试者收集的组织或体液。样品来源包括但不限于粘液、痰(处理的或未处理的)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管冲洗液(BW)、血液、体液、脑脊液(CSF)、尿液、血浆、血清、或组织(例如,活检材料)、鼻咽抽吸物、鼻咽拭子、咽喉拭子以及本文讨论的和本领域已知的其他来源。

[0033] 如本文所用,“灵敏度”是检测测定直接或间接检测样品中靶序列(例如,SARS-CoV-2病毒序列)的存在的能力的量度。

[0034] 如本文所用,“特异性”是检测测定区分真实存在的靶序列(例如,SARS-CoV-2病毒序列)与其他密切相关序列(例如,其他人类致病性冠状病毒和呼吸道病原体)的能力的量度。特异性是避免假阳性检测的能力。

[0035] 如本文所用,术语“靶核酸”或“靶序列”或“靶片段”是指待分析样品中待检测和/或定量的感兴趣核酸序列。靶核酸可以由基因组片段、具有或不具有基因间序列的完整基因、具有或不具有基因间序列的基因片段或部分、或设计的探针或引物所杂交的核酸序列构成。靶核酸可以包括野生型序列、突变、缺失、插入或重复、串联重复元件、感兴趣的基因、感兴趣的基因的区域或其任何上游或下游区域。靶核酸可以代表特定基因的替代序列或等位基因。靶核酸可以衍生自基因组DNA、cDNA或RNA。

[0036] II.组合物

[0037] 所公开的组合物包括设计用于识别模板链上的不同靶序列的引物。SARS-CoV-2基因组包括5’-非翻译区(5’-UTR)、编码用于复制的非结构蛋白(nsp)、包括刺突(蓝框)、包膜(橙色框)、膜(红色框)和核衣壳(青色框)蛋白的结构蛋白、辅助蛋白(紫色框)的开放阅读框1a/b(例如2019-nCoV(HKU-SZ-005b)基因组中的orf 3、6、7a、7b、8和9b)、和3’-非翻译区(3’-UTR)。Chan,et al.,Emerg Microbes and Infections 9(1):221-236|(2020)。

[0038] 设计的引物靶向SARS-CoV-2的nsp8基因。此类引物仅与这些序列结合,从而具有高特异性。在所涉及的引物中,其中两个是“内部引物”(FIP和BIP),经设计以合成新的DNA链。外部引物(F3和B3)与模板链退火并同样生成新的DNA。

[0039] RT-LAMP反应在包含合适缓冲液(如磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液)的混合物中进行。等温扩增缓冲液可从New England Biolabs Inc.(目录#B0537S)等供应商处购买。缓冲液还可以包含附加组分,如盐(如KCl或NaCl、镁盐(例如$MgCl_2$或$MgSO_4$)、铵盐(例如$(NH_4)_2SO_4$))、去污剂(例如TRITON-X100)或其他添加剂(如甜菜碱或二甲基亚砜)。缓冲液或反应混合物还包含核苷酸或核苷酸类似物。在一些形式中,包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP(称为dNTP)的等摩尔混合物,例如约5-15 mM dNTP(如约5-8 mM dNTP)。

[0040] 引物

[0041] 这些引物伴随着DNA聚合酶,可以帮助链置换并释放新形成的DNA链。用于SARS-CoV-2 nsp8基因检测的优选引物如下表1所示(以5’-3’方向)。

[0042] 表1:用于RT-LAMP反应的nsp8引物

[0043]

引物	序列(5’--3’)
SARS-CoV-2_nsp8_F3	TGGATAATGATGCACTCAACAACA (SEQ ID NO:4)

[0044]

SARS-CoV-2_nsp8_B3	TGTCCATACTAATTTCACTAAGTTGA (SEQ ID NO:5)
SARS-CoV-2_nsp8_FIP	ACCATTAGTTTGGCTGCTGTAAGAGATGGT TGTGTTCCCT (SEQ ID NO:6)
SARS-CoV-2_nsp8_BIP	ACGTGTGATGGTACAACATTTACTCTGC ATCTACAACCTGTTGGATT (SEQ ID NO:7)
SARS-CoV-2_nsp8_LB	TGCATCAGCATTGTGGGA (SEQ ID NO:8)

[0045] 因此,有用的引物包括SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和

SEQ ID NO:8,或与前述任一项具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

[0046] DNA聚合酶

[0047] 反应混合物中还包含具有链置换活性的DNA聚合酶。示例性DNA聚合酶包括Bst DNA聚合酶、Bst 2.0DNA聚合酶、Bst 2.0WarmStart™DNA聚合酶(New England Biolabs,Ipswich,MA)、Phi29 DNA聚合酶、Bsu DNA聚合酶、OmniAmp™DNA聚合酶(Lucigen,Middleton,MI)、Taq DNA聚合酶、Vent®和Deep Vent®DNA聚合酶(New England Biolabs)、9°N$_m$™DNA聚合酶(New England Biolabs)、DNA聚合酶I的Klenow片段、PhiPRD1 DNA聚合酶、噬菌体M2 DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶和T5 DNA聚合酶。

[0048] 可用的市售DNA聚合酶混合物,如WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix是Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶和WarmStart RTx在含有可见pH指示剂的特殊的低缓冲反应溶液中的优化制剂,用于快速且轻松地检测环-介导等温扩增(LAMP)和RT-LAMP反应。该系统经设计以根据LAMP反应中大量DNA聚合酶活性产生的质子和随后pH下降,使溶液颜色从粉红色变为黄色,提供快速、清晰的扩增视觉检测。可以使用P 2×Master Mix(New England Biolabs,Ipswich,USA)。

[0049] 因此,在一些形式中,所公开的用于检测SARS-CoV-2的核酸中的一种或多种处于包含用于扩增反应的附加试剂,如缓冲液、酶(如逆转录酶和DNA聚合酶)、dNTP或其他试剂的组合物中。在一些形式中,所公开的用于检测SARS-CoV-2的核酸中的一种或多种处于组合物中,该组合物包括反应所需的所有组分,除了样品(和水/缓冲液,如果试剂以干燥或冻干形式提供)。

[0050] Cas酶/sgRNA

[0051] CRISPR-Cas最初被鉴定为细菌免疫系统的一部分[115-117]。该系统天然由一个或多个CRISPR相关(Cas)蛋白和称为成簇规则间隔短回文重复(CRISPR)的基因组区域组成,该区域记忆先前的病原体攻击。出于工程化目的,CRISPR-Cas系统经改造使得只需要单个向导RNA分子并且通常只需要一个Cas蛋白即可结合并在某些情况下切割核酸靶标。值得注意的是,只有当靶标含有与向导RNA分子间隔区中定义的序列互补的序列时,该系统才会结合并激活其催化功能。

[0052] 基于CRISPR-Cas系统的RNA检测方法通常在溶液中工作,其作用机制可以概括为四个步骤:a)样品处理(即RNA提取)和靶标扩增;b)包含CRISPR相关蛋白(Cas)和向导RNA的核糖核蛋白(RNP)复合物形成,c)靶标识别,然后发生RNP复合物的构象变化,以及d)荧光淬灭报告分子的附带切割。因此,CRISPR-Cas系统依赖于两个主要组分:向导RNA(gRNA)和CRISPR相关(Cas)核酸酶,它们共同形成核糖核蛋白(RNP)复合物。gRNA是特异性RNA序列,其识别感兴趣的靶DNA区域并指导Cas核酸酶进行编辑。gRNA由两部分组成:crispr RNA(crRNA)(与靶DNA互补的17-20个核苷酸序列)和tracr RNA(反式激活crRNA),其用作Cas核酸酶的结合支架。crRNA和tracrRNA在自然界中作为两个独立的RNA分子存在。相比之下,sgRNA(单个向导RNA)是单个RNA分子,含有定制设计的与支架tracrRNA序列融合的短crRNA序列。sgRNA可以从DNA模板合成产生或在体外或体内制备。CRISPR相关蛋白是非特异性核酸内切酶。其由sgRNA引导至特定的DNA基因座,并在该基因座处产生双链断裂。

[0053] sgRNA设计通过扫描前间隔区相邻基序(PAM)序列(如SpCas9的5'-NGG-3')来实现

在基因组中寻找靶位点。一旦选择了靶基因和Cas核酸酶,就可以使用已知的方法来设计特异性向导RNA序列。用于CRISPR/Cas9sgRNA设计的工具是本领域已知的,并在Cui,et al.,Interdisciplinary Sciences:Computational Life Sciences,10:455-465(2018)中综述。用于制备sgRNA的方法是已知的,并且包括合成生成sgRNA或通过从DNA模板开始在体内或体外制备向导物。一种方法涉及在细胞中从转染的质粒表达向导RNA序列。在此方法中,sgRNA序列被克隆到质粒载体中,然后将其引入细胞中。细胞使用其正常的RNA聚合酶转录新引入的DNA中的遗传信息,以生成sgRNA。另一种制备sgRNA的方法称为体外转录(IVT),涉及从细胞外的相应DNA序列转录sgRNA。首先,设计DNA模板,其中含有向导序列和sgRNA序列上游的额外RNA聚合酶启动子位点。然后使用含有试剂和重组RNA聚合酶的试剂盒转录sgRNA。试剂盒是市售的,例如TranscriptAid T7 High Yield Transcription试剂盒(ThermoFisher Scientific)。

[0054] 具体而言,Cas12a的crRNA被编程以识别精确的双链(ds)DNA靶序列,该序列伴随着富含T的前间隔区相邻基序(PAM)。单个靶标识别会诱导Cas12a RuvC活性位点发生构象变化,水解远离PAM序列的5'-磷酸二酯键。然后释放远端切割产物,激活Cas12a,对环境中所有荧光(F)和淬灭剂(Q)标记的单链(ss)DNA进行无差别切割,生成荧光读出。不同长度的Cas 12a的ssDNA报告物和双链(ds)DNA报告物是本领域已知的。Smith,et al.,ACS Synth Biol.2021 10(7):1785-1791。

[0055] 表4显示了特异性靶向nsp8的RT-LAMP扩增子和ssDNA报告物的示例性gRNA。

[0056] 可以在所公开的方法中使用的其他Cas酶包括Cas3、Cas9、Cas10、Cas13、Cas14、mCas13(微型Cas13)等,所有这些都是本领域已知的,并且生成sgRNA以靶向感兴趣的基因的方法与特定Cas酶一起使用也是本领域已知的。合适的Cas酶的非限制性实例描述于Ali Z,et al.2020Virus Res.Vol.288:文章号198129;Mahas A,et al.2021,ACS Synth Biol.Vol.10(10):2541-2551页,Santiago-Frangos A,et al.2021Cell Rep Med.Vol.2(6):文章号100319,和Yoshimi K,et al.2022,iScience Vol.25(2):文章号103830中。

[0057] III.使用方法

[0058] 所公开的组合物可以用于通过环介导的等温扩增(LAMP)、优选地允许检测RNA的逆转录步骤(RT-LAMP)来检测样品中SARS-CoV-2的存在。所公开的方法包括鉴定感染SARS-CoV-2的受试者和/或诊断患有COVID 19的受试者。如果样品是从出现与COVID 19相关联的一种或多种症状(包括但不限于发烧、干咳、疲劳、食欲不振、嗅觉丧失、味觉丧失、身体疼痛、呼吸短促、肌肉无力、手脚刺痛或麻木、头晕、神志不清、谵妄、癫痫发作、中风、恶心、呕吐、腹泻以及腹痛或相关不适)的受试者中获得的,并且样品与包含以下的组合物接触:核酸序列SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,或与前述任一项具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列,则受试者被诊断为患有COVID 19。

[0059] 示例性样品包括例如粘液、痰(处理过的或未处理过的)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管冲洗液(BW)、体液、脑脊液(CSF)、尿液、组织(例如活检材料)、直肠拭子、鼻咽抽吸物、鼻咽拭子、咽拭子、粪便、血浆、血清或全血。优选的样品包括鼻咽拭子/抽吸物、痰/深喉唾液、咽拭子。

[0060] 如本文所例示,使用来自COVID-19患者和其他呼吸道病毒感染患者的临床样品进

行的评估表明,这种COVID-19-LAMP测定具有高度敏感性和特异性。所公开的方法可以以至少约90％的灵敏度,如90％、95％、98％等的灵敏度和至少90％、5％或甚至100％的特异性来检测样品中SARS-CoV-2的存在。结果可以通过肉眼明确地看到并由任何人解释,根据病毒载量,周转时间(包括样品提取)较短,为45-105分钟(图1)。

[0061] A.样品制备

[0062] 样品包括运输介质或病毒灭活收集管中的呼吸道样本,如鼻咽拭子/抽吸物、痰/深喉唾液、咽拭子。样本应保存在2℃-4℃下或在测试后四小时内提取。

[0063] 用于检测生物样品中的病毒的样品制备方法是本领域已知的并且在下面举例说明。例如,在一些实施方案中,试剂盒诸如QIAamp病毒RNA Mini试剂盒(QIAGEN,#52906,250个反应)用作RNA提取系统。例如,可以使用可商购试剂盒(如来自Qiagen(如QiaAmpO、DNEasy®或RNEasy®试剂盒)、Roche Applied Science(如MagNA Pure试剂盒和仪器)、Thermo Scientific(KingFisher mL)、bioMerieux(Nuclisens®NASBA Diagnostics)或Epicenter(Masterpure™试剂盒)的试剂盒和/或仪器)进行快速核酸制备。用于提取的样本体积和洗脱体积取决于样本类型和样本的可用量。

[0064] 在某些形式中,RNA不从样品中提取,即,对样品进行方法步骤,而没有从样品中提取RNA的初始步骤。在这些实施方案中,<5ml,例如约4ml、3ml、2ml或1ml的NPS样本/样品未经热预处理并且<5ml,例如约4ml、3ml、2ml或1ml样本/样品经过热预处理(98℃,5分钟)是所公开的RT-LAMP-CRISPR测定的优选条件。在某些形式中,不使用裂解缓冲液/蛋白酶K。

[0065] B.检测方法

[0066] 用于检测SARS-Co-V-2的测定的一般设置和总体操作公开于图1中。一般来说,SARS-CoV-2RNA的特定基因序列(本文为nsp8)使用RT-LAMP进行扩增。RT-LAMP产物由Cas12a-gRNA核糖核蛋白(RNP)复合物扫描。RNP与gRNA的特异性互补物结合,激活Cas12a的转切割活性。活性Cas12a系统切割短的(8nt)ssDNA报告物,该报告物优选经标记的,在两末端带有荧光团和淬灭剂。报告物的切割将淬灭剂与荧光团分开,从而生成荧光。

[0067] i.RT-LAMP

[0068] 所公开的方法使用逆转录偶联环介导的等温扩增(RT-LAMP)方法来检测感兴趣的病原体、优选病毒感染的存在,例如样品中SARS-Co-V-2RNA的存在。

[0069] 环介导的等温扩增(LAMP)是用于扩增DNA的单管技术,可以与逆转录步骤组合以允许RNA检测(RT-LAMP)。RT-LAMP需要引物、逆转录酶和具有链置换活性的DNA聚合酶来扩增RNA。与RT-PCR类似,常规RT-LAMP需要逆转录酶从RNA序列合成互补DNA(cDNA)。然后可以使用DNA聚合酶扩增该cDNA。

[0070] RT-LAMP是理想的,因为反应温度相对较低,并且不需要其他方法如PCR所必需的热循环设备。在常规LAMP中,四个专门设计的引物可以识别模板链上的不同靶序列。此类引物仅与这些序列结合,从而具有高特异性。在所涉及的四个引物中,其中两个是“内部引物”(FIP和BIP),经设计以合成新的DNA链。外部引物(F3和B3)与模板链退火并也生成新的DNA。这些引物伴随着DNA聚合酶,其可以帮助链置换并释放新形成的DNA链。

[0071] BIP引物(在常规方法中,伴随着逆转录酶)可以通过与RNA模板3’末端的靶序列结合并合成DNA拷贝链来启动该过程。B3引物还可以结合3’末端,并且与具有DNA聚合酶活性的多肽(例如,本文所述的突变聚合酶)一起可以同时创建新的cDNA链,同时置换先前形成

的拷贝链。不再需要含有模板链的双链DNA。

[0072] 此时,单链拷贝可以在3’末端成环,因为其与自身结合。FIP引物可以结合至该单链的5’末端,并伴随有具有DNA聚合酶活性的多肽,可以合成互补链。带有DNA聚合酶的F3引物可以结合到该末端,并可以生成新的双链DNA分子,同时置换先前形成的单链。

[0073] 这个新置换的单链可以作为LAMP循环扩增的起点。当末端折叠并自退火时,DNA可以具有类似哑铃的结构。当FIP或BIP引物再次在靶序列位置之一启动DNA合成时,该结构可以变成茎环。该循环可以使用适当的引物从链的前侧或后侧开始。一旦这个循环开始,链就可以在扩增过程的延伸阶段进行自引发DNA合成。该扩增可以在约60℃-65℃、优选约60℃的等温条件下在约一小时内进行。

[0074] ii.扩增产物的检测

[0075] 在前述方法(例如一步RT-PCR、RT-LAMP)中,在扩增反应(即RT-LAMP)之后,可以通过任何合适的方法检测扩增产物。

[0076] 例如,公开了通过在足以扩增核酸的条件下将样品和对核酸特异的多个引物与所公开的组合物组合来检测样品中核酸的存在并检测核酸扩增产物,从而检测样品中核酸的存在的方法。

[0077] 检测方法可以是定量的、半定量的或定性的。在一些情况下,可以通过在凝胶电泳上观察到的条带图案来确定特定的核酸(例如,病毒核酸)。

[0078] 扩增产物还可以使用比色测定来检测,如使用嵌入染料(例如,碘化丙啶、SYBR green、GelRed™或GelGreen™染料)。

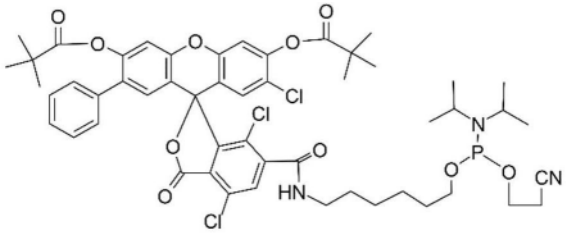
[0079] 扩增产物也可以用金属离子敏感的荧光分子(例如钙黄绿素,其是由锰离子淬灭并在与镁离子结合时荧光增强的荧光染料)来检测。

[0080] 在一些实施方案中,如果检测到一种或多种扩增产物(例如,通过任何合适的定量、半定量或定性方法),则样品被鉴定为含有病毒核酸(例如,样品对于病毒是“阳性”)。在一些实施方案中,如果检测到与对照(如无模板对照样品或已知阴性样品)相比荧光增加,则样品被鉴定为含有病毒核酸(例如,对于病毒是“阳性”)。

[0081] 在优选的实施方案中,使用如本文公开的和下面举例说明的Cas12a/sgRNA系统检测RT-LAMP扩增产物。在该实施方案中,荧光用于定量检测一种或多种扩增产物。一般来说,这依赖于使用含有荧光团部分和淬灭剂部分的检测探针,其定位方式使得可以通过来自核苷酸的荧光信号的增加将探针的杂交状态与探针的未杂交状态区分开。荧光团和淬灭剂分子以足够接近的方式掺入探针中,使得当探针与其识别序列杂交时淬灭剂淬灭荧光团分子的信号。可以用于标记用于所公开方法的ssDNA报告物的荧光团部分和淬灭剂部分是本领域已知的,并且本文中使用双标记有5’末端的荧光团(6-羧基荧光素、6-FAM)和3’末端的淬灭剂(Iowa Black® 荧光淬灭剂、IABk FQ(IDT integrated DNA Technologies))的ssDNA(8nt)报告物进行了例示。ssDNA报告物充当Cas12a的底物或反式切割活性。其他荧光团/淬灭剂对是本领域已知的。例如,荧光团是FAM(荧光素)、TET(四氯荧光素)、HEX(六氯荧光素)、JOE(5’-二氯二甲氧基荧光素)、6-JOE(6-羧基-4’,5’-二氯-2’,7’-二甲氧基荧光素);MAX、Cy3或TAMRA,并且淬灭剂是IBFQ、BLACK HOLE猝灭剂,例如附接至报告核酸(即ssDNA或dsDNA)的5’末端或3’末端。四甲基罗丹明(TMR)是制备蛋白质缀合物的重要荧光团。TMR的羧酸以TAMRA的名称作为用于寡核苷酸标记和自动化DNA测序应用的染料也取得了显著的

地位。5-(和-6)-羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯是TAMRA的胺反应性混合异构体形式。也可用5-TAMRA SE(Thermofisher目录号C-2211)和6-TAMRA SE(Thermofisher目录号C-6123)的单一异构体形式。示例性淬灭剂包括BHQ(Black Hole Quencher)1、BHQ2或BHQ3。

[0082] 在某些实施方案中,荧光团是ROX、德克萨斯红、Cy5或Cy5.5并且淬灭剂是IBRQ或BHQ2(WO 2013/033436)。在一些实施方案中,荧光团是FAM、TET或VIC并且淬灭剂是TAMRA。VIC亚磷酰胺的化学结构如下所示。

[0083] 

[0084] 在一些实施方案中,荧光团是FAM、NED、TET或VIC并且淬灭剂是MGB。在一些实施方案中,荧光团是ABY、FAM、JUN或VIC并且淬灭剂是QSY7。在一些实施方案中,荧光团是Yakima Yellow或SUN并且淬灭剂是Iowa Black FQ。在一些实施方案中,荧光团是TEX615或TYE并且淬灭剂是Black RQ-Sp或BHQ2。

[0085] 样品和RT-LAMP引物组在足以扩增病毒核酸的条件下接触,产生扩增产物。将样品以足以支持SARS-CoV-2的nsp8基因的扩增的浓度与RT-LAMP引物组接触。RT-LAMP反应在包含合适缓冲液(如磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液)的混合物中进行。缓冲液还可以包含附加组分,如盐(如KCl或NaCl、镁盐(例如$MgCl_2$或$MgSO_4$)、铵盐(例如$(NH_4)_2SO_4$))、去污剂(例如TRITON-X100)或其他添加剂(如甜菜碱或二甲基亚砜)。缓冲液或反应混合物还包含核苷酸或核苷酸类似物。在一些形式中,包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP(称为dNTP)的等摩尔混合物,例如约0.5-5mM dNTP(如约1-3mM dNTP)。

[0086] 该方法使用5个引物,其靶向SARS-CoV-2的高度保守的nsp8基因。

[0087] 在一些实施方案中,使用nsp8基因作为靶标的最佳RT-LAMP反应条件包括引物浓度:

[0088] 外部引物F3、B3:终浓度在约0.1μM至约0.4μM之间。

[0089] 内部引物FIP、BIP:终浓度在约0.8μM至约3.2μM之间,和

[0090] 环B(LB):终浓度在约0.2μM至约1.6μM之间。

[0091] 优选温度在约60℃至65℃之间,并且反应时间(30分钟、40分钟、60分钟,优选约40分钟)。如本文所例示,每个10μL RT-LAMP反应物可以含有0.4μL无核酸酶水、1μL 10X等温扩增缓冲液(NEB,USA)、0.6μL 100mM $MgSO_4$(NEB)、1.4μL 10mM dNTP溶液混合物、1μL 10X LAMP Primer Mix、0.4μL Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶(8000单位/mL)(NEB)、0.2μL WarmStart RTx逆转录酶(15,000单位/mL)(NEB)以及5μL TNA作为模板。

[0092] IV.试剂盒

[0093] 本文公开了用于在单管中进行RT-LAMP和CRISPR Cas12a介导的环境可视化的测定试剂盒。

[0094] 测定试剂盒可以制备为包括至少一个或两个容器,例如0.2mL PCR管和小瓶。在一个实施方案中,PCR管可以含有用于测定的干燥试剂,并且小瓶可以包含任选地含有引物和报告物的再水化缓冲溶液。再水化缓冲液的小瓶优选含有用于RT-LAMP的引物(例如,SEQ

ID NO:4-8)和用于Cas12a介导的检测的ssDNA报告物。

[0095] 在一个实施方案中,将除引物外的RT-LAMP反应试剂的混合物添加到PCR管的底部。该混合物可以包括dNTP、等温扩增缓冲液、$MgSO_4$、RNase抑制剂、逆转录酶和DNA聚合酶以及合适的稳定剂,如D-(+)-海藻糖二水合物、甘露醇、蔗糖等。用于在冻干过程中稳定生物分子的剂是本领域已知的。

[0096] 将Cas12a介导反应的RNP复合物、$MgSO_4$和Tris-HCl添加到管盖内。将管置于真空干燥器中2小时以干燥试剂。试剂干燥后,将管盖上并在4℃下保存直至使用。

[0097] 实施例

[0098] 方法

[0099] 用于评估的病毒、临床样本和能力验证样品

[0100] 为了进行分析灵敏度评估,使用从SARS-CoV-2Q Control 01中提取的总核酸(TNA)的两倍系列稀释液,其中靶标浓度为10,000dC/mL(Qnostics,UK)。在两次独立实验中对每个稀释度进行三次重复。

[0101] 为了进行分析特异性评估,使用从人冠状病毒(SARS-CoV-1、MERS-CoV、HCoV-OC43、HCoV-229E和HCoV-NL63)、甲型流感病毒(甲型[H1N1]pdm09和H3N2)、乙型流感病毒、丙型流感病毒、人腺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、人副流感病毒1-4型的培养分离株中提取的TNA。对于HCoV-HKU1,TNA是从患者样本中提取的[29,30,42-44]。

[0102] 为了进行诊断性能评估,本研究纳入了先前在2020年至2021年期间通过LightMix® SarbecoV E-基因试剂盒(TIB MolBiol,Germany)的实时RT-PCR测定测试的存档呼吸道样本。共选择319名疑似COVID-19住院患者(男:女=149:170;中位年龄:35岁;范围:9个月至103岁)的319份临床样本(149份鼻咽唾液和170份口咽后唾液)用于SARS-CoV-2RNA检测。通过纳米孔测序对SARS-CoV-2阳性样本进行谱系鉴定[45]。除临床样本外,还评估了来自CAP和QCMD的11份能力验证样品,其中具有不同浓度的SARS-CoV-2RNA或对SARS-CoV-2RNA呈阴性。

[0103] 这项研究得到了香港大学/医院管理局香港西联网机构审查委员会(HKU/HA HKW IRB)的批准(UW 20-224)。由于使用了存档样本,因此免去了书面知情同意书。

[0104] 逆转录环介导的等温扩增(RT-LAMP)

[0105] TNA提取是使用MagNA Pure 96提取系统(Roche,Switzerland)根据制造商的说明进行的,如我们在先前的研究中所述[8]。简而言之,将200μL的每个样品与MagNA Pure 96外部裂解缓冲液(Roche)混合。提取后,将TNA回收到50μL洗脱缓冲液中,然后在-80℃保存直至使用。

[0106] 在制备用于RT-LAMP测定的主混合物之前,先制备10X LAMP Primer Mix(表1和2)。

[0107] 表2:用于nsp8的10X LAMP Primer Mix

[0108]

试剂	体积(μL)
无核酸酶水	60
SARS-CoV-2_nsp8_FIP (100 μM)	16

[0109]

SARS-CoV-2_nsp8_BIP (100 μM)	16
SARS-CoV-2_nsp8_F3 (100 μM)	2
SARS-CoV-2_nsp8_B3 (100 μM)	2
SARS-CoV-2_nsp8_LB (100 μM)	4

[0110] 表3:用于N测定的10X LAMP Primer Mix

[0111]

试剂	体积(μL)
无核酸酶水	48
SARS-CoV-2_N_FIP (100 μM)	16
SARS-CoV-2_N_BIP (100 μM)	16
SARS-CoV-2_N_F3 (100 μM)	2
SARS-CoV-2_N_B3 (100 μM)	2
SARS-CoV-2_N_LF (100 μM)	8
SARS-CoV-2_N_LB (100 μM)	8

[0112] RT-LAMP试剂混合物(10μL)含有0.4μL无核酸酶水、1μL 10X等温扩增缓冲液(NEB,USA)、0.6μL 100mM $MgSO_4$(NEB)、1.4μL 10mM dNTP溶液混合物、1μL 10X LAMP Primer Mix、0.4μL Bst 2.0WarmStart DNA聚合酶(8000单位/mL)(NEB)、0.2μL WarmStart RTx逆转录酶(15,000单位/mL)(NEB)以及5μL TNA作为模板。对于nsp8测定,RT-LAMP反应在60℃下进行40分钟;对于N测定,RT-LAMP反应在62℃下进行30分钟。

[0113] 改进的反应条件与Pang等人公开的使用N基因和E基因作为靶标的RT-PCT方法的比较如下表4所示。

[0114] 表4:本方法和Pang等人之间的反应条件比较。

[0115]

	Pang 等人[22]	**本方法**
RT-LAMP 反应物体积	25 μL	10 μL
dNTP	1.4 mM	1.4 mM
F3 和 B3	0.2 μM 每个	0.2 μM 每个
FIP 和 BIP	1.6 μM 每个	1.6 μM 每个
LB	0.8 μM	0.4 μM
LF	0.8 μM	N/A
WarmStart RTx 逆转录酶	7.5 单位	3 单位
Bst 2.0 DNA 聚合酶	8 单位	3.2 单位
$MgSO_4$	6 mM	6 mM
10X 等温扩增缓冲液	2.5 μL	1 μL

[0116]

样品	1-10 μL	5 μL

[0117] 基于CRISPR Cas12a的荧光检测

[0118] Cas12a反式切割测定按照Pang等人[22]先前的描述进行,尽管对先前的RT-LAMP测定进行了更好的修改,这有利地减少了RT-LAMP试剂的量,同时维持了测定的灵敏度。简而言

之,试剂混合物(10μL)含有1.7μL无核酸酶水、2μL 10X NEBuffer r2.1、1μL 10μM向导RNA(gRNA)、0.8μL 10μM EnGen Lba Cas12a(Cpf1)(NEB)、0.5μL 100μM ssDNA报告物和4μL 100mM $MgSO_4$。设计并合成了特异性靶向nsp8和N基因的RT-LAMP扩增子的gRNA以及ssDNA报告物(表5)。

[0119] 表5:用于CRISPR的向导RNA和ssDNA报告物

[0120]

	序列(5'--3')
SARS-CoV-2_nsp8_gRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUUAUGCA UCAGCAUUGUGGGA (SEQ ID NO:1)
SARS-CoV-2_N_gRNA [9,10]	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCCCCCAGC GCUUCAGCGUUC (SEQ ID NO:2)
ssDNA 报告物*	6FAM- TTATTATT -IABkFQ (SEQ ID NO:3)

[0121] 用于SARS-CoV-2检测的单管RT-LAMP-CRISPR测定

[0122] 将10μL RT-LAMP试剂混合物添加到0.5mL PCR管(Sarstedt,Germany)的底部,并将10μL Cas12a试剂混合物添加到管盖内(图1)。将TNA(5μL)添加到管底部,并通过上下移液与RT-LAMP试剂混合。将管轻轻盖上,放入热循环仪(Eppendorf,Germany)中,不封闭盖子,将管底部保持在RT-LAMP反应的最佳温度30-40分钟。RT-LAMP反应完成后,用手腕轻弹管,并将Cas12a试剂混合物与RT-LAMP扩增子混合。然后将管在热循环仪中在37℃恒温下孵育10分钟。在紫外灯激发下显示绿色荧光的样品被视为阳性,并拍照。荧光强度也通过Qubit 4荧光计(Invitrogen,USA)测量。显示荧光强度高于截止值的样品被视为阳性。

[0123] 用于SARS-CoV-2检测的实时RT-PCR测定

[0124] 根据制造商的说明使用带有LightCycler Multiplex RNA Virus Master(Roche)的LightMix® SarbecoV E-基因试剂盒(TIB Molbiol,Germany)。每20μL反应混合物由5.4μL无核酸酶水、0.5μL试剂混合物、4μL Roche Master、0.1μL RT酶和10μL TNA作为模板组成。使用LightCycler 480II实时PCR系统(Roche)进行RT-PCR。热循环条件为55℃3分钟,95℃30秒,然后是95℃3秒和60℃12秒的45个循环。

[0125] 统计分析

[0126] 使用Kappa统计来确定内部开发的测定与参考方法之间的一致性。使用McNemar检验来比较内部开发的测定与参考方法的性能。使用Wilcoxon符号秩检验比较两种RT-LAMP-CRISPR测定的荧光读数。使用Spearman相关性来评估RT-LAMP-CRISPR测定的荧光读数与LightMix E-基因RT-PCR的Cp值之间的关系。$P<0.05$被认为是统计学显著的。使用GraphPad PRISM®9或IBM SPSS Statistics 26进行统计分析。

[0127] 结果

[0128] 以单管形式靶向SARS-CoV-2的nsp8基因的COVID-19RT-LAMP-CRISPR测定的设计

[0129] 使用New England Biolabs(NEB)LAMP引物设计工具(可在网站:lamp.neb.com/#!/获取)设计靶向作为RT-LAMP的靶标的nsp8基因区域的引物(表1(如上所示)和表6)。Broughton等人[21]设计的靶向N基因的其他引物用于比较性RT-LAMP-CRISPR测定(表1和6)。多序列比对表明,我们的nsp8引物和gRNA的靶位点在不同变体(祖先株、Alpha、Beta、Gamma、Delta、Lambda、Mu和Omicron[BA.1、BA.2、BA.3、BA.4和BA.5])之间高度保守

(图4A和4B)。

[0130] 在本研究中,单管形式的RT-LAMP-CRISPR测定是通过将样品核酸提取物与RT-LAMP试剂混合物在PCR管底部混合并在管盖内添加Cas12a试剂混合物来实现的(24)。RT-LAMP反应后,将Cas12a试剂混合物弹到管底部并与RT-LAMP扩增子混合,无需打开CRISPR管。荧光可以在紫外线激发下可视化或使用荧光计测量。

[0131] 以单管形式新型nsp8基因和比较性核衣壳(N)基因RT-LAMP-CRISPR测定用于SARS-CoV-2检测的分析灵敏度和特异性

[0132] 为了比较nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定的分析灵敏度,使用从SARS-CoV-2Q control 01(靶标SARS-CoV-2浓度为10000拷贝/mL的阳性对照)中提取的总核酸(TNA)的两倍系列稀释液评估检测限(LOD)。nsp8测定的LOD为750拷贝/mL,并且N测定为2000拷贝/mL(分别相当于15和40拷贝/反应物)(表7)。商用LightMix E-基因实时RT-PCR测定的LOD为31.3拷贝/mL(相当于1.3拷贝/反应物)(表7)。nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定均未显示与SARS-CoV-1和其他常见呼吸道病毒的交叉反应。

[0133] 表6:本研究中用于RT-LAMP反应的N引物[21,22]

[0134]

引物	序列(5'--3')
SARS-CoV-2 的 N 基因	
SARS-CoV-2_N_F3	AACACAAGCTTTCGGCAG (SEQ ID NO:9)
SARS-CoV-2_N_B3	GAAATTTGGATCTTTGTCATCC (SEQ ID NO:10)
SARS-CoV-2_N_FIP	TGCGGCCAATGTTTGTAATCAGCCAAGGA AATTTTGGGGAC (SEQ ID NO:11)
SARS-CoV-2_N_BIP	CGCATTGGCATGGAAGTCACTTTGATGGC ACCTGTGTAG (SEQ ID NO:12)
SARS-CoV-2_N_LF	TTCCTTGTCTGATTAGTTC (SEQ ID NO:13)
SARS-CoV-2_N_LB	ACCTTCGGGAACGTGGTT (SEQ ID NO:14)
人 RNase P 基因(21)	
NaseP-POP7_F3	TGATGAGCTGGAGCCA (SEQ ID NO:15)
RNaseP-POP7_B3	CACCCTCAATGCAGAGTC (SEQ ID NO:16)
RNaseP-POP7_FIP	GTGTGACCCTGAAGACTCGGTTTTAGCCACTGACTCGGATC (SEQ ID NO:17)
RNaseP-POP7_BIP	CCTCCGTGATATGGCTCTTCGTTTTTTTCTTACATGGCTCTGGTC (SEQ ID NO:18)
RNaseP-POP7_LF	ATGTGGATGGCTGAGTTGTT (SEQ ID NO:19)
RNaseP-POP7_LB	CATGCTGAGTACTGGACCTC (SEQ ID NO:20)

[0135] 表7:使用从Qnostics SARS-CoV-2Q Control 01中提取的TNA确定内部开发的nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定以及商用LightMix E基因RT-PCR测定的检测限的测试结果

[0136]

浓度(拷贝/mL)	运行内			运行间		
	测试 1	测试 2	测试 3	测试 1	测试 2	测试 3
nsp8 基因 RT-LAMP-CRISPR 测定						
1000	+	+	+	+	+	+
750	+	+	+	+	+	+
500	+	+	+	-	-	-
250	+	-	-	-	-	-
N 基因 RT-LAMP-CRISPR 测定						
4000	+	+	+	+	+	+
2000	+	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+	-
500	-	-	-	+	+	+
LightMix E 基因 RT-PCR 测定						
125	+	+	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+	+	+
31.3	+	+	+	+	+	+
15.6	+	-	-	+	+	-
125	+	+	+	+	+	+

[0137]

[0138] 使用样品提取物评估nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定对SARS-CoV-2检测的诊断性能

[0139] 为了评估nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定在临床样本中的诊断性能,总共选择了来自疑似COVID-19患者的319份呼吸道样本,这些样本先前已通过商用LightMix E-基因RT-PCR测定测试。在这些样本中,测试的46.4%(148/319)通过LightMix E-基因RT-PCR对SARS-CoV-2呈阳性(中位Cp:23.1;范围:14.2-36.6),而测试的45.8%(146/319)通过nsp8和N基因两者RT-LAMP-CRISPR测定对SARS-CoV-2呈阳性(表8)。内部nsp8/N基因RT-LAMP-CRISPR测定与商用E-基因RT-PCR测定之间的检测率没有显著差异(p=0.5)(表8)。为了监测临床样本中细胞物质的存在,使用靶向人RNase P基因的引物(表1)作为内部对照(21)。通过RNase P RT-LAMP-CRISPR测定检测到所有可用样品提取物的荧光,证明了测试样本的有效性(数据未显示)。以LightMix E-基因RT-PCR测定作为参考方法,nsp8和N基因两者RT-LAMP-CRISPR测定的诊断灵敏度和特异性分别为98.6%和100%。使用鼻咽样本的nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定(中位Cp,21.8[范围,14.2至33.5])两者的灵敏度均为100%,而使用唾液样本的两种检测(中位Cp,24.7[范围,14.6至36.6])为97.1%(表8)。测试的所有122份中高病毒载量(Cp<30)样本均对SARS-CoV-2呈阳性,而测试的92.3%(24/26)的低病毒载量(Cp≥30)样本对SARS-CoV-2呈阳性(表9)。

[0140] 表8:与LightMix E-基因RT-PCR测定相比,内部开发的nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定用于SARS-CoV-2检测的诊断性能

[0141]

分子测定	LightMix E-基因 RT-PCR		Kappa 值(95% CI)*	McNemar 检验
	阳性	阴性		
nsp8 RT-LAMP-CRISPR				
阳性	146	0	0.987	$P = 0.5$
阴性	2	171	(0.97–1)	
N RT-LAMP-CRISPR				
阳性	146	0	0.987	$P = 0.5$
阴性	2	171	(0.97–1)	

[0142]

[0143] 表9:内部nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定的测试性能

[0144]

内部 RT-LAMP-CRISPR 测定	灵敏度			
	Cp ≤ 25 (n = 89)	Cp >25 – <30 (n = 33)	Cp ≥ 30 (n = 26)	总体 (n = 148)
nsp8 测定	100%	100%	92.3%	98.6%
N 测定	100%	100%	92.3%	98.6%

[0145] 通过纳米孔测序鉴定了146份阳性样本中SARS-CoV-2的谱系。这些分离株属于关注的变体(Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron)和正在监测变体(Eta、Kappa、Mu和Theta)(表10和11)。本研究的nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定能够检测到最近出现的Omicron变体,如八个临床样本的绿色荧光所证明(中位Cp:24.3;范围15.8-32.5)。Omicron变体通过nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定检测,其中泳道1-8含有经纳米孔测序证实的含有omicron变体的临床样本,泳道9含有阴性对照,以及泳道10含有阳性对照(数据未显示)。对于nsp8和N RT-LAMP-CRISPR测定呈阴性但LightMix E-基因RT-PCR呈阳性的两个样本,无法鉴定SARS-CoV-2的谱系,这可能是由于这两个样本中的低病毒负载(由高Cp值(36.2和36.6)所揭示)。在美国病理学家学院(College of American Pathologists,CAP)的3个能力测试(PT)样品和分子诊断质量控制(QCMD)的8个PT样品中,nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定两者均提供了100%准确的结果。

[0146] 表10:临床样本中鉴定的SARS-CoV-2的变体

[0147]

VOC / VBM*	数量
Alpha	10
Beta	8
Gamma	1
Delta	40
Omicron	8

[0148]

Eta	3
Kappa	13
Mu	1
Theta	2
*关注的变体/正在监测的变体(来自 WHO)	

[0149] 表11:临床样本中鉴定的SARS-CoV-2的谱系

[0150]

Pango	数量
A	1
A.21	1
AY.3	1
B	1
B.1	5
B.1.1	3
B.1.1.529	8
B.1.1.63	6
B.1.1.7	10
B.1.177	2
B.1.210	1
B.1.351	7
B.1.351.3	1
B.1.36	5
B.1.36.27	19
B.1.459	3
B.1.466.2	5
B.1.470	3
B.1.480	1
B.1.525	3
B.1.562	1
B.1.617.1	13
B.1.617.2	39
B.1.621	1
B.43	1
B.6	2
P.1	1
P.3	2
无法输入	2

[0151] 为了在本研究中定性检测SARS-CoV-2RNA,在紫外激发下可视化绿色荧光,并通过荧光计测量每个反应物的荧光强度。通过计算LightMix E-基因RT-PCR测试呈阴性的样本

荧光读数的平均值+3标准差来确定荧光计测量的荧光截止值。nsp8和N基因RT-LAMP-CRISPR测定的截止值分别为126.3(图2A)和123.2(图2B)。在319份临床样本中,LightMix E-基因RT-PCR测试呈阳性的146份样本的荧光读数高于截止值,并且E-基因RT-PCR测试呈阴性的171份样本的荧光读数低于截止值。对于E-基因RT-PCR测试呈阳性但所公开的RT-LAMP-CRISPR测定呈阴性的两个样本,其荧光读数在96.9至107之间。在我们的RT-LAMP-CRISPR测定测试呈阳性的146份临床样本中,由nsp8测定生成的中位荧光读数(378.3;范围:215.6-592.6)显著高于来自N测定的中值荧光读数(342.0;范围:143.0-576.6)(P<0.0001)(图2A和2B)。在紫外线激发下,鼻咽和唾液样本的绿色荧光也可以用肉眼轻松观察到(数据未显示)。

[0152] 为了确定RT-LAMP-CRISPR测定的荧光读数与LightMix E-基因RT-PCR的Cp值之间是否存在任何相关性,绘制了散点图(图3A和图3B)。nsp8测定的荧光读数与E基因RT-PCR的Cp值之间存在弱相关性(r=-0.2;P=0.02),而N基因RT-LAMP-CRISPR测定的荧光读数与LightMix E-基因RT-PCR的Cp值之间没有相关性(r=0.04;P=0.61)。

[0153] 无需核酸提取的RT-LAMP-CRISPR测定的诊断性能

[0154] 由于病毒核酸提取是额外的步骤,需要时间并且需要专业技能,因此直接使用鼻咽拭子(NPS)和唾液样本而无需核酸提取来测试所公开的RT-LAMP-CRISPR测定。首先,确定反应所需的最佳样品处理和样品体积。数据显示,当NPS样本体积为5mL时,RT-LAMP-CRISPR测定呈阴性,而未经热预处理的1mL NPS样本和经过热预处理(98℃持续5分钟)的1mL唾液是所公开的RT-LAMP-CRISPR测定的最佳条件(数据未显示)。

[0155] 接下来,总共评估了28个样本,包括14个NPS样本和14个唾液样本。nsp8或N基因RT-LAMP-CRISPR测定的灵敏度对于NPS为27.3%(3/11),且对于唾液为54.5%(6/11)。通过RT-PCR测试呈阴性的所有样本也通过nsp8或N基因RT-LAMP-CRISPR测定测试呈阴性。通过nsp8或N基因RT-LAMP-CRISPR测定测试呈阳性的样本,对于NPS的实时RT-PCR Cp值为#22.3,且对于唾液样本的实时RT-PCR Cp值为#25.8。

[0156] 讨论

[0157] 本研究描述了用于诊断COVID-19的低成本单管RT-LAMP-CRISPR测定。所公开的单管形式通过将试剂沉积在小瓶的盖中而成为可能,因此在测定过程中不需要打开管,这显著降低了由于扩增子残留造成的污染风险。几项研究已描述具有类似灵敏度和特异性的类似方法,但我们的RTLAMP-CRISPR测定的试剂成本,包括酶、引物、脱氧核苷三磷酸(dNTP)、$MgSO_4$、Cas12a蛋白、gRNA和单链DNA(ssDNA)报告物,为每次反应少于2美元,这低于其他人报告的RT-LAMP-CRISPR测定的成本,因为我们的研究中使用了较少量的RT-LAMP试剂。与其他等温扩增形式如重组酶聚合酶扩增(RPA)测定(其没有商业试剂盒,并且需要添加其他来源的逆转录酶,从而增加了成本)不同,RT-LAMP试剂非常便宜。本文所述的测定优于先前描述的测定,至少因为其通过减少每次反应使用的RT-LAMP试剂体积来降低与测定相关的成本,其中RT-LAMP和CRISPR试剂每次反应的成本少于2美元[22,23,24]。与其他等温扩增形式(如重组酶聚合酶扩增(RPA)测定,其中没有商用RT-RPA试剂盒,并且需要添加来自其他来源的逆转录酶,从而增加了成本[25,26])不同,本文公开的测定的试剂成本相当便宜。

[0158] 靶向nsp8和N基因的引物用于两个独立RT-LAMP-CRISPR测定。由于带有分散在基因组中的突变的新变体的不断出现,因此始终建议设计靶向不同基因的引物。SARS-CoV-2N

基因是COVID-19NAAT测定的常见靶标,但N基因靶标失败已有报道[27,28]。图4A和图4B是使用当前描述的引物和gRNA序列以及来自不同地理区域的SARS-CoV-2变体(野生型、Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron、Lambda和Mu)的nsp8基因序列的多序列比对的示意图。野生型序列(NC_045512.2)和其他变体的序列分别从GenBank和GISAID获得。所公开的测定可以检测所有评估的关注的变体(包括Omicron变体)和正在研究的变体。本研究中表明,来自nsp8测定的中位荧光读数显著高于N基因测定,这表明nsp8测定允许更好的可视化效果,特别是对于肉眼观察时病毒载量较低的样品。

[0159] 所公开的RT-LAMP-CRISPR测定使用样品提取物进行评估,但是核酸提取需要时间并且需要专业技能来执行。因此,该测定是在直接临床标本上进行的,以测试我们的测定。在测定优化期间,使用5mL的直接样本(与我们用于测试的病毒核酸的体积相同)的反应未检测到荧光;这可能是由于使用较大样品体积时临床样本中抑制剂的存在。当使用较小体积(1或2mL)的直接样本时,可以检测到更强的信号。由于与热预处理相比的额外成本和不便,本评估中的测定没有使用裂解缓冲液/蛋白酶K,因此我们仅比较经过和未经热预处理的样品。热预处理改善了唾液样本的SARS-CoV-2检测,但没有改善NPS样本的检测。这一发现与另一项研究的发现一致,该研究表明,在使用经过长时间热预处理的唾液样品时,检测灵敏度显著提高(33)。最后,1mL未经热预处理的NPS和1mL在98℃下热预处理5min的唾液是RT-LAMP-CRISPR测定的最佳条件。研究进一步评估了14个NPS和14个唾液样本,其具有各种浓度的SARS-CoV-2或通过所公开的RT-LAMP-CRISPR测定使用优化条件对SARS-CoV-2呈阴性。尽管使用直接样本的测定比使用纯化样品提取物的测定的检测灵敏度较低,但有趣的是,我们使用经过热预处理的直接唾液样本的测定显示出比使用直接NPS样本的测定更高的检测灵敏度。尽管如此,与病毒核酸提取相比,使用直接标本有助于减少时间和成本,并且其在提取试剂短缺时特别有用。

[0160] 尽管实时RT-PCR因其高灵敏度和特异性而成为COVID-19诊断最常用的方法,但RT-LAMP-CRISPR测定相较于RT-PCR测定具有相当大的优势。所公开的RT-LAMP-CRISPR测定以与实时RT-PCR测定相当的灵敏度和特异性进行。这些测定不需要体积庞大且昂贵的实时PCR系统。事实上,它们可以在简单的加热块上进行[21,22]。实时RT-PCR的设备成本比RT-LAMP高>45倍。此外,RT-LAMP-CRISPR测定的运行时间少于一个小时,比RT-PCR测定更短[29-32]。荧光读出可以直观地解释结果,尽管这可以通过荧光计增强。使用荧光计相对于肉眼的优点在于,荧光计的测量是荧光的客观读出,这消除了使用肉眼的主观性。

[0161] RT-LAMP-CRISPR测定(荧光法)相较比色RT-LAMP测定具有多种优势。首先,比色测定比荧光测定给出假阳性结果的机会更高。比色测定依赖于pH的变化,因此具有较低pH的样本可能导致比色测定的假阳性结果。其次,病毒RNA提取的洗脱缓冲液可能显著影响比色读数,如假阴性结果;这可能是由于这些缓冲液中化学物质的pH影响,而我们用于提取的洗脱缓冲液对我们的RT-LAMP CRISPR测定没有不利影响。第三,比色解释对样品(包括阴性对照)具有时间敏感性,当RT-LAMP反应的孵育时间超过40分钟时,阴性对照可能转为阳性。第四,比色测定不涉及gRNA的使用,因此检测出非特异性产物的机会更高。为了克服这个问题,添加对病毒基因靶标具有特异性的Cas蛋白和gRNA可以增强荧光测定的特异性。第五,已经报道相较比色测定具有更高检测灵敏度的荧光测定。

[0162] RT-LAMP的假阳性结果可能是由于临床样本的伪扩增或pH效应[33-36]。为了克服这个

问题,添加对病毒基因靶标具有特异性的Cas蛋白和gRNA可以增强特异性。Cas12b先前已在多项研究中用于CRISPR反应,但其需要>100个核苷酸(nt)长的gRNA进行反应[37,38]。由于较长的gRNA存在gRNA与RT-LAMP引物之一之间部分重叠的风险,这可能会因零星的附带活性而导致假阳性结果[22,37]。此外,较长的合成RNA的成本也较高。在本研究中,Cas12a用于CRISPR,其需要大约40nt长的gRNA进行反应。因此,可以减少假阳性结果的机会。Cas12a相比用于诊断应用的其他Cas相关蛋白(如Cas3、Cas9、Cas12b或Cas13a)(44-48)具有明显的优势。Cas12b在多项研究中用于CRISPR反应,但其需要>100个核苷酸(nt)长的gRNA进行反应。由于较长的gRNA存在gRNA与RTLAMP引物之一之间部分重叠的风险,这可能会因零星的附带活性而导致假阳性结果。此外,较长的合成RNA的成本较高。用于CRISPR的Cas12a需要40nt长的gRNA进行反应。因此,可以减少假阳性结果的机会。此外,Cas12a蛋白是市售的。此外,与Cas13a不同,Cas12a不需要额外将DNA转录为RNA。

[0163] 总之,当前描述的用于检测SARS-CoV-2nsp8和N基因的RT-LAMP-CRISPR测定灵敏、特异、经济实惠、快速且易于进行。随着COVID-19大流行的持续,相信此类检测在资源有限的环境中对于提高COVID-19诊断能力具有相当大的价值。

[0164] 通过参考以下段落可以进一步理解本发明。

[0165] 1.检测样品中SARS-CoV-2nsp8基因的存在的核酸组合物,所述核酸组合物包含以下或由以下组成:核酸序列SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,或

[0166] 与前述任一项具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

[0167] 2.段落2的组合物,其进一步包含(a)Cas/sgRNA对,和(b)一种或多种荧光报告物、一种或多种淬灭剂或其组合。

[0168] 3.段落1-2中任一项的组合物,其包含合适的缓冲液(如磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液)。

[0169] 4.段落1-3中任一项的组合物,其包含一种或多种盐。

[0170] 5.段落4的组合物,其中所述盐是钾盐、钠盐、镁盐或铵盐。

[0171] 6.段落5的组合物,其中所述盐选自KCl、NaCl、$MgCl_2$、$MgSO_4$、$(NH_4)_2SO_4$。

[0172] 7.段落1-6中任一项的组合物,其包含一种或多种去污剂。

[0173] 8.段落1-7中任一项的组合物,其包含一种或多种核苷酸或核苷酸类似物。

[0174] 9.段落1-8中任一项的组合物,其进一步包含dATP、dCTP、dGTP和dTTP中的一种或多种。

[0175] 10.段落1-9中任一项的组合物,其进一步包含逆转录酶和具有链置换活性的DNA聚合酶。

[0176] 11.段落2-9中任一项的组合物,其中所述sgRNA包含SEQ ID NO:1或与前述序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

[0177] 12.段落11的组合物,其中所述报告物包含SEQ ID NO:3,或与前述序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的核酸序列。

[0178] 13.检测样品中SARS-CoV-2核酸的存在的方法,所述方法包括以下步骤:

[0179] (a)在足以扩增SARS-CoV-2的nsp8基因的条件下,将样品与一组对SARS-CoV-2的nsp8基因特异的逆转录环介导的等温扩增(RT-LAMP)引物接触,和(b)检测SARS-CoV-2nsp8基因扩增产物,从而检测样品中SARS-CoV-2nsp8的存在,所述方法在步骤(b)之前包括将来自步骤(a)的样品与包含Cas酶/sgRNA对和报告核酸的组合物接触的任选步骤。

[0180] 14.段落13的方法,其包括使所述样品与段落1-10中任一项的组合物接触。

[0181] 15.段落13的方法,其中所述引物包含SEQ ID NO:4-8。

[0182] 16.段落13-15中任一项的方法,其中所述引物包含与SEQ ID NO:4-8中任一项的核酸序列具有至少90%的序列同一性的核酸序列。

[0183] 17.段落13-14中任一项的方法,其中所述样品选自粘液、痰液(处理过的或未处理过的)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管冲洗液(BW)、体液、脑脊液(CSF)、尿液、组织(例如活检材料)、直肠拭子、鼻咽抽吸物、鼻咽拭子、咽拭子、粪便、血浆、血清或全血,其中所述方法包括从所述样品中提取核酸并将所述样品与所述RT-LAMP引物接触的步骤。

[0184] 18.段落17的方法,其中所述样品获自鼻咽拭子、鼻咽抽吸物、痰/深喉唾液或咽拭子。

[0185] 19.段落13-18中任一项的方法,其中所述RT-LAMP反应条件包括约60℃的反应温度和以下引物终浓度:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5,约0.1至约0.4μM,优选约0.2μM),(SEQ ID NO:6:约0.8至约3.2μM;SEQ ID NO:7:约0.8至约3.2μM,优选约1.6μM),和SEQ ID NO:8;约0.2至约1.6μM,优选约0.4μM。

[0186] 20.段落13-19中任一项的方法,其中所述RT-LAMP反应包含逆转录酶、DNA聚合酶、pH指示剂和六个引物以扩增所述SARS-CoV-2E基因,导致pH下降和从粉红色到黄色的颜色变化,表明所述样品中存在SARS-CoV-2。

[0187] 21.用于检测样品中SARS-CoV-2nsp8基因的存在的试剂盒,其包含在一个或多个容器中的段落1-12中任一项的组合物。

[0188] 22.段落21的试剂盒,其中所述组合物的一种或多种组分是冻干的。

[0189] 23.段落21或22的试剂盒,其包含两个容器,其中一个容器包含冻干组分,并且第二个容器包含再水化溶液,所述再水化溶液包含用于RT-LAMP的引物和ssDNA报告物。

[0190] 24.段落22或23的试剂盒,其包含容器底部除引物外的RT-LAMP反应试剂和所述容器的盖上的Cas酶反应试剂,其中(a)所述RT-LAMP反应试剂选自下组:dNTP、等温扩增缓冲液、MgSO4、RNase抑制剂、逆转录酶和DNA聚合酶以及合适的稳定剂,如D-(+)-海藻糖二水合物、甘露醇、蔗糖;和(b)Cas酶反应试剂包含用于Cas12a介导的反应的RNP复合物、MgSO4和Tris-HCl。

[0191] 参考文献:

[0192] 1.Chan,et al.2020.Lancet 395(10223):pages 514-523,doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

[0193] 2.Guan,et al.China Medical Treatment Expert Group for Covid-19.2020.New England Journal of Medicine Vol.382:pages 1708-1720,DOI:10.1056/NEJMoa2002032.

[0194] 3.Zhu,et al.2019.N Engl J Med Vol 382:pages 727-733,DOI:10.1056/NEJMoa2001017.4.WHO.2022.Website:who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-

2019.

[0195] 5.Petersen,et al.2020.Lancet Infectious Diseases Vol.20(9):pages e238-e244,DOI:

[0196] 10.1016/S1473-3099(20)30484-9

[0197] 6.Cheng,et al.2021.Lancet Reg Health West Pac Vol.17:article 100281,

[0198] DOI:10.1016/j.lanwpc.2021.100281

[0199] 7.Cheng,et al.2020Infect Control Hosp Epidemiol Vol.41(11):pages 1258-1265,doi:

[0200] 10.1017/ice.2020.282

[0201] 8.Hung,et al.2020.Lancet Infect Dis 20:1051-1060.

[0202] 9.Hung,et al.2020.Lancet Vol.395(10238):pages 1695-1704,DOI:10.1016/S0140-6736(20)31042-4

[0203] 10.U.S.Food&Drug Administration.2022.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas.

[0204] 11.Albert,et al.2021.Clin Microbiol Infect Vol.27(3):472.e7-472.e10.

[0205] 12.Young,et al.2020.J Clin Microbiol Vol.59(1):e02338-20,doi:10.1128/JCM.02338-20.13.Babady,et al.2021.J Mol Diagn Vol.23:pages 3-9,doi:10.1016/j.jmoldx.2020.10.018.14.Poljak,et al.2020J Clin Microbiol Vol.58:article e00599-20,doi:10.1128/JCM.00599-20.

[0206] 15.van Kasteren PB,et al.2020.J Clin Virol Vol.128:article 104412,doi:

[0207] 10.1016/j.jcv.2020.104412

[0208] 16.Notomi T,et al.2015.J Microbiol Vol.53:pages 1-5(2015).

[0209] 17.Li L,et al.2019.ACS Synth Biol Vol.8:pages 2228-2237,doi:

[0210] 10.1021/acssynbio.9b00209.

[0211] 18.Hille F,et al.2018.Cell 172:pages 1239-1259,doi:10.1016/j.cell.2017.11.032.

[0212] 19.Li SY,et al.2018.Cell Res Vol.28(4):pages 491-493,doi:10.1038/s41422-018-0022-x20.Chan WM et al.2020.J Med VirolVol.92(1):pages 2725-2734,doi:10.1002/jmv.26140.21.Broughton JP,et al.2020.Nat Biotechnol Vol.38:pages 870-874,doi:

[0213] 10.1002/jmv.26140

[0214] 22.Pang B,et al 2020.Anal Chem Vol.92:pages 16204-16212,doi:

[0215] 10.1021/acs.analchem.0c04047.

[0216] 23.Chen Y,et al.2020.Biosens Bioelectron Vol.169:article 112642,doi:

[0217] 10.1016/j.bios.2020.112642.

[0218] 24.Ooi KH,et al.2021.Nat Commun Vol.12:article 1739,doi:10.1038/s41467-021-21996-6.

[0219] 25.Feng W,et al.2021.Anal Chem Vol.93:pages 12808-12816,doi:10.1038/s41467-021-21996-6.

[0220] 26.de Puig H,et al.2021.Sci Adv Vol.7:article eabh2944,doi:10.1126/sciadv.abh2944.27.Miller S,et al.2021.Microbiol Spectr Vol.9:article e0149421,doi:

[0221] 10.1128/Spectrum.01494-21.

[0222] 28.Wollschläger P,et al.2021.Clin Microbiol Infect Vol.27:article 1353.e1-1353.e5,doi:

[0223] 10.1016/j.cmi.2021.05.025.

[0224] 29.Chan JF,et al.2020 J Clin Microbiol Vol.58:pages e00310-20,doi:10.1128/JCM.00310-20.

[0225] 30.Yip CC,et al.2020.Int J Mol Sci Vol.21:article 2574,doi:10.3390/ijms21072574.

[0226] 31.Brown JR,et al.2021.J Virol Methods Vol.295:article 114215,doi:

[0227] 10.1016/j.jviromet.2021.114215.

[0228] 32.van Kasteren PB,et al.2020.J Clin Virol Vol.128:article 104412,doi:

[0229] 10.1016/j.jcv.2020.104412.

[0230] 33.Dao Thi VL,et al.2020.Sci Transl Med Vol.12:article eabc7075,doi:

[0231] 10.1126/scitranslmed.abc7075.

[0232] 34.Lalli MA,et al.2021.Clin Chem Vol.67(2):pages 415-424,doi:

[0233] 10.1093/clinchem/hvaa267.

[0234] 35.Meagher RJ,et al.2018.Analyst Vol.143(8):pages 1924-1933,doi:10.1039/c7an01897e.36.Uribe-Alvarez C,et al.2021.PLoS One Vol.16(5):article e0250202,doi:

[0235] 10.1371/journal.pone.0250202..

[0236] 37.Joung J,et al.2020.N Engl J Med Vol.383:pages 1492-1494 doi:

[0237] 10.1056/NEJMc2026172.

[0238] 38.Nguyen LT,et al.2022.EBioMedicine Vol.77:article 103926,

[0239] DOI:10.1016/j.ebiom.2022.103926

[0240] 39.Yoshimi K,et al.2022.iScience Vol.25:article 103830,doi:10.1016/j.isci.2022.103830..40.Marsic T,et al.2021.Nano Lett Vol.21(8):pages 3596-3603,doi:

[0241] 10.1021/acs.nanolett.1c00612.

[0242] 41.Fozouni P,et al.2021.Cell Vol.184(2):pages 323-333.e9,doi:

[0243] 10.1016/j.cell.2020.12.001.

[0244] 42.Yip CC,et al.2020.J Clin Virol Vol.129:104476,doi:10.3390/ijms2116567443.Yip CC,et al.2020.Int J Mol Sci Vol.21(16):article 5674.

[0245] 44.Yip CCY,et al.2021.Expert Rev Mol Diagn Vol.21:pages 741-747,doi:

10.1080/14737159.2021.1933445.

[0246] 45.Chan WM,et al.2021.Lancet Reg Health West Pac Vol.10:article 100130,DOI:10.1016/j.lanwpc.2021.100130.

[0247] Yip,et.al.J Clin Microbiol 58:e02127-19(2020).

[0248] Ooi et al..Nat Commun 12:1739(2021).

[0249] Rezaei,et al.Biosensors(Basel)11:369(2021).

[0250] Chu et al.J Clin Virol 129:104519(2020).

[0251] Bruce e t al.,PLoS Biol 18:e3000896(2020)

[0252] Fomsgaard et al,Euro Surveill 25:2000398(2020)

[0253] Morais et al.Adv Virol 2022:7442907(2022).

[0254] Chow et al.Int J Mol Sci 21:5380(2020).

[0255] Huang et al.Microb Biotechnol 13:950-961(2020)

[0256] Wang et al.Biosens Bioelectron 172:112766(2021).

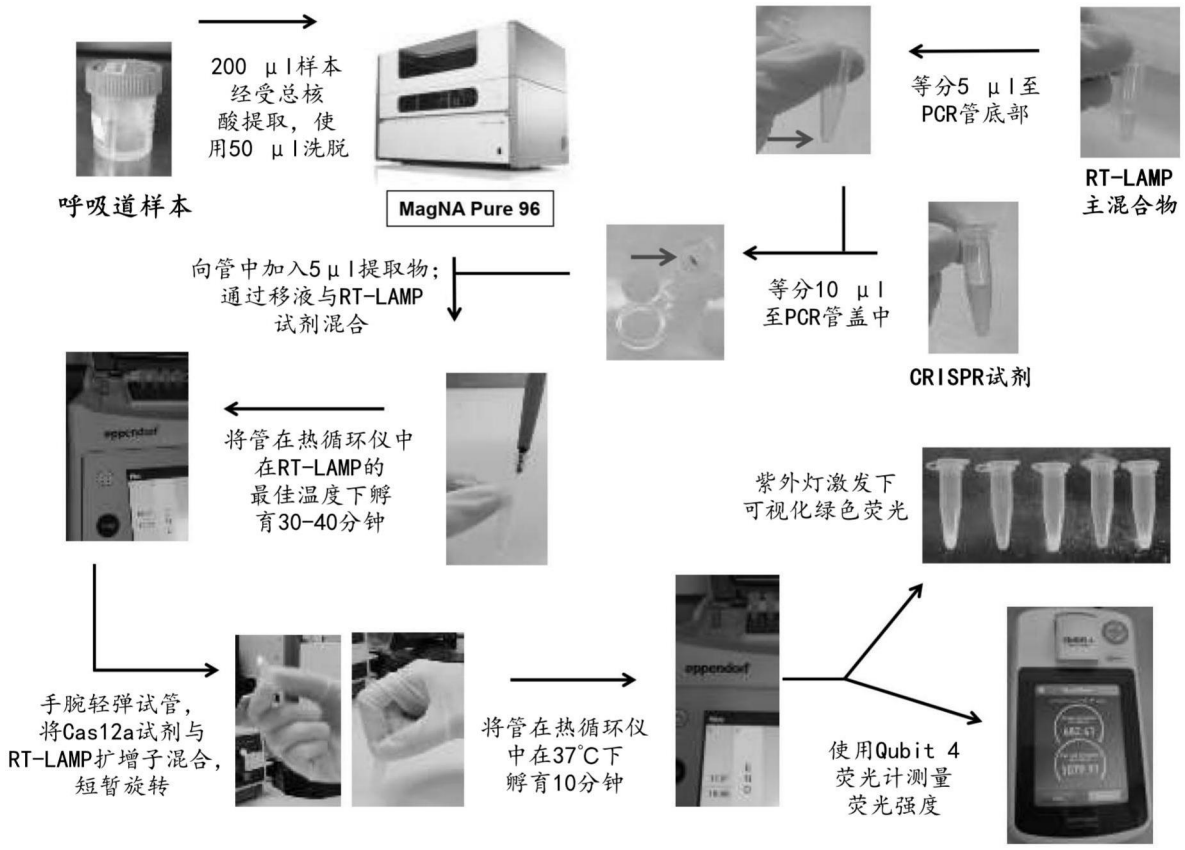

呼吸道样本
200 μl样本
经受总核
酸提取，使
用50 μl洗脱
MagNA Pure 96
等分5 μl至
PCR管底部
RT-LAMP
主混合物
等分10 μl
至PCR管盖中
CRISPR试剂
向管中加入5μl提取物；
通过移液与RT-LAMP
试剂混合
将管在热循环仪中
在RT-LAMP的
最佳温度下孵
育30-40分钟
紫外灯激发下
可视化绿色荧光
手腕轻弹试管，
将Cas12a试剂与
RT-LAMP扩增子混合，
短暂旋转
将管在热循环仪
中在37℃下
孵育10分钟
使用Qubit 4
荧光计测量
荧光强度

图1

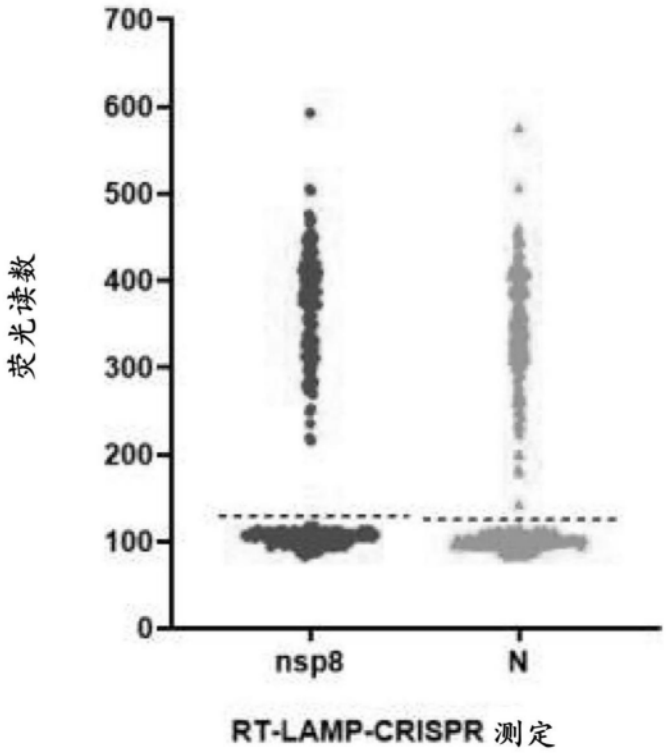

700
600
500
400
300
200
100
0
荧光读数
nsp8
N
RT-LAMP-CRISPR 测定

图2A

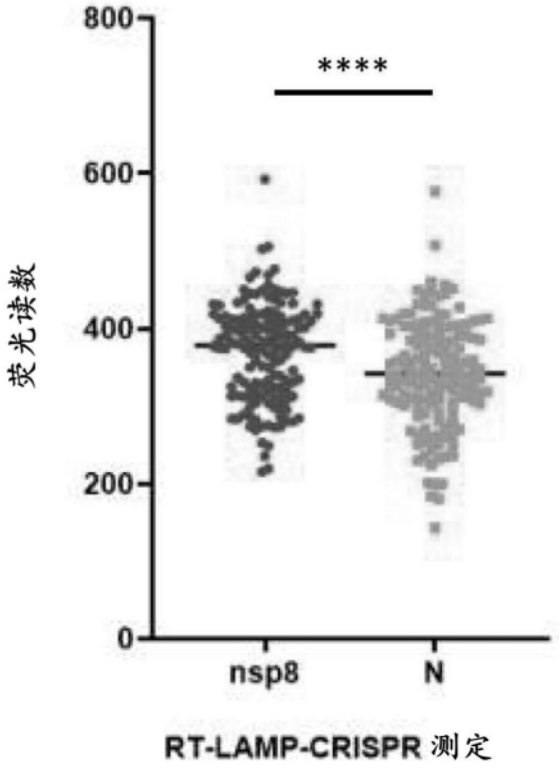

800
600
400
200
0
荧光读数
****
nsp8
N
RT-LAMP-CRISPR 测定

图2B

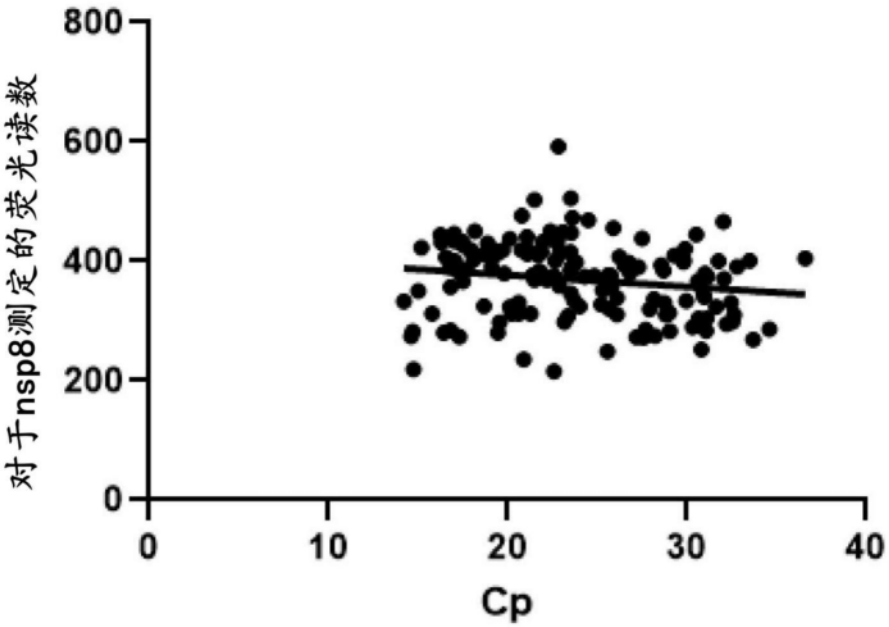

对于nsp8测定的荧光读数
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Cp

图3A

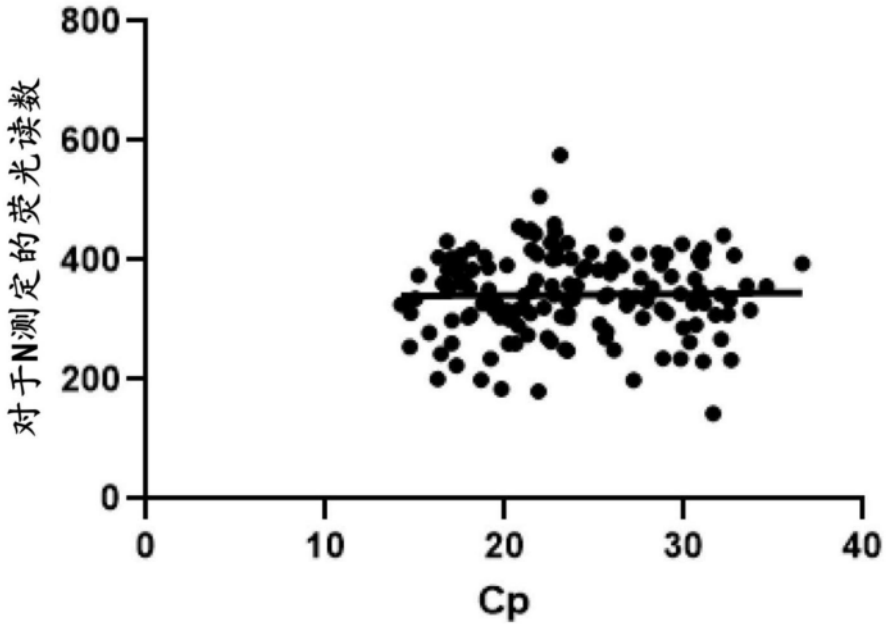

对于N测定的荧光读数
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Cp

图3B

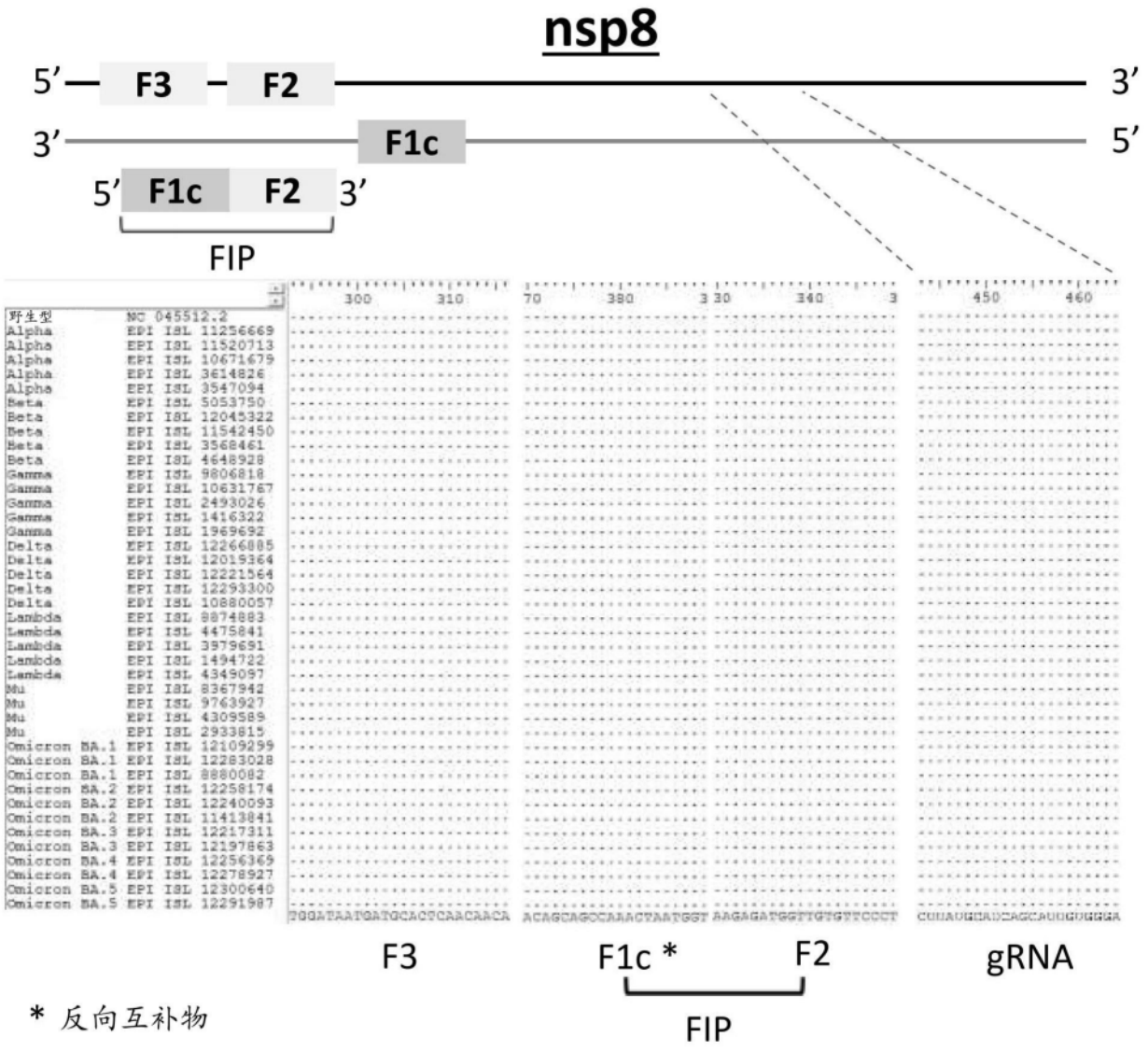

nsp8
5′
F3
F2
3′
3′
F1c
5′
5′
F1c
F2
3′
FIP
300
310
70
380
330
340
450
460
野生型 NC 045512.2
Alpha EPI ISL 11256669
Alpha EPI ISL 11520713
Alpha EPI ISL 10671679
Alpha EPI ISL 3614826
Alpha EPI ISL 3547094
Beta EPI ISL 5053750
Beta EPI ISL 12045322
Beta EPI ISL 11542450
Beta EPI ISL 3568461
Beta EPI ISL 4648928
Gamma EPI ISL 9806818
Gamma EPI ISL 10631767
Gamma EPI ISL 2493026
Gamma EPI ISL 1416322
Gamma EPI ISL 1969692
Delta EPI ISL 12266885
Delta EPI ISL 12019364
Delta EPI ISL 12221564
Delta EPI ISL 12293300
Delta EPI ISL 10880057
Lambda EPI ISL 9874883
Lambda EPI ISL 4475841
Lambda EPI ISL 3979691
Lambda EPI ISL 1494722
Lambda EPI ISL 4349097
Mu EPI ISL 8367942
Mu EPI ISL 9763927
Mu EPI ISL 4309589
Mu EPI ISL 2933815
Omicron BA.1 EPI ISL 12109299
Omicron BA.1 EPI ISL 12283028
Omicron BA.1 EPI ISL 8880082
Omicron BA.2 EPI ISL 12258174
Omicron BA.2 EPI ISL 12240093
Omicron BA.2 EPI ISL 11413841
Omicron BA.3 EPI ISL 12217311
Omicron BA.3 EPI ISL 12197863
Omicron BA.4 EPI ISL 12256369
Omicron BA.4 EPI ISL 12278927
Omicron BA.5 EPI ISL 12300640
Omicron BA.5 EPI ISL 12291987
TGGATAATGATGCACCCAACAACA ACAGCAGCCAAACTAATGGT AAGAGATGGTTGTGTTCCCT CUUAUGUAUCAGCAUUGUGGGA
F3
F1c *
F2
gRNA
FIP
* 反向互补物

图4A

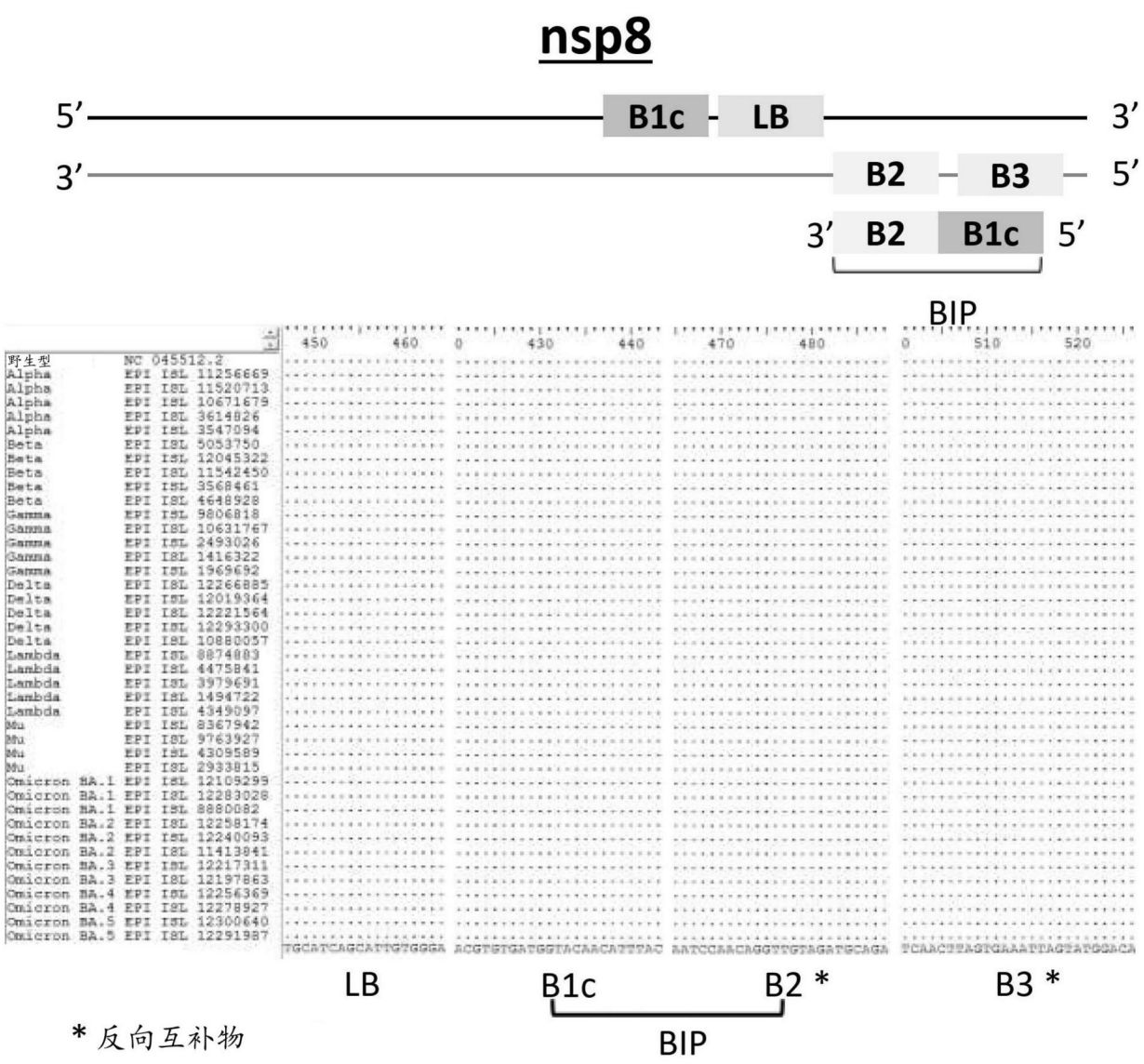

nsp8
5′
B1c
LB
3′
3′
B2
B3
5′
3′
B2
B1c
5′
BIP
野生型 NC 045512.2
Alpha EPI ISL 11256669
Alpha EPI ISL 11520713
Alpha EPI ISL 10671679
Alpha EPI ISL 3614826
Alpha EPI ISL 3547094
Beta EPI ISL 5053750
Beta EPI ISL 12045322
Beta EPI ISL 11542450
Beta EPI ISL 3568461
Beta EPI ISL 4648928
Gamma EPI ISL 9806818
Gamma EPI ISL 10631767
Gamma EPI ISL 2493026
Gamma EPI ISL 1416322
Gamma EPI ISL 1969692
Delta EPI ISL 12266885
Delta EPI ISL 12019364
Delta EPI ISL 12221564
Delta EPI ISL 12293300
Delta EPI ISL 10880057
Lambda EPI ISL 8074883
Lambda EPI ISL 4475841
Lambda EPI ISL 3979691
Lambda EPI ISL 1494722
Lambda EPI ISL 4349097
Mu EPI ISL 8367942
Mu EPI ISL 9763927
Mu EPI ISL 4309589
Mu EPI ISL 2933815
Omicron BA.1 EPI ISL 12109299
Omicron BA.1 EPI ISL 12283028
Omicron BA.1 EPI ISL 8880082
Omicron BA.2 EPI ISL 12258174
Omicron BA.2 EPI ISL 12240093
Omicron BA.2 EPI ISL 11413841
Omicron BA.3 EPI ISL 12217311
Omicron BA.3 EPI ISL 12197863
Omicron BA.4 EPI ISL 12256369
Omicron BA.4 EPI ISL 12278927
Omicron BA.5 EPI ISL 12300640
Omicron BA.5 EPI ISL 12291987
450 460 0 430 440 470 480 0 510 520
LB
B1c
B2 *
B3 *
BIP
* 反向互补物

图4B