(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107429297 A
(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201680018451.5
(22)申请日 2016.03.16
(30)优先权数据
62/133,881 2015.03.16 US
62/168,405 2015.05.29 US
62/168,688 2015.05.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/022628 2016.03.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/149357 EN 2016.09.22
(71)申请人 简·探针公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 B·L·伊顿 D·K·格特曼
T·帕夫洛夫斯基
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C12Q 1/04(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12R 1/225(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

权利要求书20页 说明书43页
序列表28页 附图5页

(54)发明名称

用于检测细菌核酸和诊断细菌性阴道病的方法和组合物

(57)摘要

公开的是用于诊断受试者中的细菌性阴道病的方法，其包括进行检测受试者样品中的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的任何一者或多者的测定法。还公开的是用于检测样品中的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属核酸的方法和组合物。



CN 107429297 A

1.一种用于确定样品中乳杆菌属物种(Lactobacillus sp.)、阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)和埃格特菌属物种(Eggerthella sp)的每一者的存在或缺失的多重方法,所述方法包括:

(1)使样品与下列扩增寡聚体接触,所述样品疑似含有乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的至少一者:

(a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列;

(b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列;和

(c)用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列;

(2)进行体外核酸扩增反应,其中任何乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶核酸用作产生对应于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板,如果样品中存在的话;和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失,从而确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的存在或缺失。

2.权利要求1的方法,其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

3.权利要求1的方法,其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列;

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列;

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

4.权利要求1或3的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

5.权利要求1或3的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成；

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成；

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成；

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成；

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成；和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

6.权利要求1、3和5中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

7.权利要求1至6中任一项的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。

8.权利要求1、3、5和7中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

9.权利要求2、4和6中任一项的方法，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

10.权利要求7或9的方法，其中所述启动子序列是T7启动子序列。

11.权利要求10的方法，其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列。

12.权利要求7的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列；

所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列;和/或

所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

13.权利要求9的方法,其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

14.权利要求1至13中任一项的方法,所述方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属、阴道加德纳菌和埃格特菌属靶核酸,如果存在的话。

15.权利要求14的方法,其中所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触,所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。

16.权利要求15的方法,其中所述样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触,

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体中的每一者包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列,并且

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列的每一者共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

17.权利要求16的方法,其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列,

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列,和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。

18.权利要求17的方法,其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列,

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列,和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

19.权利要求1至18中任一项的方法,其中检测步骤(3)包括

使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针接触,和

检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性、加德纳菌特异性和/或埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。

20.权利要求19的方法,其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列,

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列,和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。

21.权利要求20的方法,其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列,

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列,和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

22.权利要求20或21的方法,其中检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触,其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列。

23.权利要求22的方法,其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

24.权利要求19或20的方法,其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者包含标记物。

25.权利要求22的方法,其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。

26.权利要求24或25的方法,其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

27.权利要求24或25的方法,其中检测步骤(3)在扩增步骤(2)期间进行。

28.权利要求27的方法,其中每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

29.权利要求28的方法,其中每个检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

30.权利要求19或20的方法,其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者进一步包含非靶杂交序列。

31.权利要求30的方法,其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者是分子火炬或分子信标。

32.权利要求22的方法,其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

33.权利要求32的方法,其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

34.权利要求1至33中任一项的方法,其中在步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。

35.权利要求34的方法,其中所述扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。

36.权利要求34或35的方法,其中所述扩增反应是实时扩增反应。

37.一种用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者的存在或缺失的寡聚体组合,所述寡聚体组合包括:

(a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列;

(b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列;和

(c)用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列。

38.权利要求37的寡聚体组合,其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且其中所述寡聚体组合进一步包括用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体,

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

39.权利要求37的寡聚体组合,其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列;

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列;

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

40.权利要求37或39的寡聚体组合,其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且其中所述寡聚体组合进一步包括用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体,

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

41.权利要求37或39的寡聚体组合,其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成;

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成;

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成;

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成;

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成;和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

42.权利要求37、39和41中任一项的寡聚体组合,其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且其中所述寡聚体组合进一步包括用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体,

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸

序列组成的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

43.权利要求37至42中任一项的寡聚体组合，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。

44.权利要求37、39、41和43中任一项的寡聚体组合，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述寡聚体组合进一步包括用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

45.权利要求38、40和42中任一项的寡聚体组合，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

46.权利要求43或45的寡聚体组合，其中所述启动子序列是T7启动子序列。

47.权利要求46的寡聚体组合，其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列。

48.权利要求43的寡聚体组合，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列；

所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列；和/或

所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

49.权利要求45的寡聚体组合，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

50.权利要求37至49中任一项的寡聚体组合，其进一步包括至少一种包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列的捕获探针寡聚体。

51.权利要求50的寡聚体组合，其中所述寡聚体组合包括乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体，

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体中的每一者包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列的每一者共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

52.权利要求51的寡聚体组合，其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列，

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列，和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。

53.权利要求52的寡聚体组合，其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列，

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列，和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

54.权利要求37至53中任一项的寡聚体组合，其进一步包括与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针。

55.权利要求54的寡聚体组合，其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列，和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。

56.权利要求55的寡聚体组合，其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列，

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列，和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

57.权利要求55或56的寡聚体组合，其进一步包括与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列。

58.权利要求57的寡聚体组合，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

59.权利要求54或55的寡聚体组合，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者包含标记物。

60.权利要求57的寡聚体组合，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。

61.权利要求59或60的寡聚体组合，其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

62.权利要求59或60的寡聚体组合，其中每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

63.权利要求62的寡聚体组合，其中每个检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

64.权利要求54或55的寡聚体组合，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者进一步包含非靶杂交序列。

65.权利要求64的寡聚体组合，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者是分子火炬或分子信标。

66.权利要求57的寡聚体组合，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

67.权利要求66的寡聚体组合，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或

分子信标。

68.一种用于确定受试者中细菌性阴道病(BV)的存在或缺失的方法,所述方法包括:

(a)提供来自疑似患有BV的受试者的样品;

(b)进行检测样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的测定法;

(c)基于检测测定法,对乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的每一者指定阳性或阴性状态;和

(d)基于来自步骤(c)指定的乳杆菌属物种状态、阴道加德纳菌状态和埃格特菌属物种状态的组合,确定受试者中BV的存在或缺失,

其中

(i)阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阴性状态指示受试者中缺失BV,

(ii)阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阳性状态指示受试者中存在BV,

(iii)如果乳杆菌属物种的状态为阳性,那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中至少一者的阴性状态指示受试者中缺失BV,和

(iv)如果乳杆菌属物种的状态为阴性,那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中至少一者的阳性状态指示受试者中存在BV。

69.权利要求68的方法,其中所述检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的测定法是基于核酸的检测测定法。

70.权利要求69的方法,其中所述基于核酸的检测测定法靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的16S rRNA。

71.权利要求70的方法,其中所述基于核酸的检测测定法靶向

(i)对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的乳杆菌属物种16S rRNA区域;

(ii)对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域的阴道加德纳菌16S rRNA区域;和/或

(iii)对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域的埃格特菌属物种16S rRNA区域。

72.权利要求70至71中任一项的方法,其中所述基于核酸的检测测定法是基于扩增的测定法。

73.权利要求72的方法,其中所述基于扩增的测定法包括等温扩增反应。

74.权利要求73的方法,其中所述扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。

75.权利要求73或74的方法,其中所述扩增反应是实时扩增反应。

76.权利要求70的方法,其中所述基于核酸的检测测定法是基于扩增的测定法,其包括

(1)使样品与下列扩增寡聚体接触:

用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列;

用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚

体，其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列；和

用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)所述第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列；

(2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶核酸用作产生对应于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板，如果样品中存在的话；和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失。

77.权利要求76的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

78.权利要求76的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列；

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列；

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列；

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列；

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列；和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

79.权利要求76或78的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

80.权利要求76或78的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成；

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成；

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成；

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成；

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成；和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

81.权利要求76、78和80中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

82.权利要求76至81中任一项的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。

83.权利要求76、78、80和82中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

84.权利要求77、79和81中任一项的方法，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

85.权利要求82或84的方法，其中所述启动子序列是T7启动子序列。

86.权利要求85的方法，其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列。

87.权利要求82的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列；

所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列；和/或

所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

88.权利要求84的方法，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

89.权利要求76至88中任一项的方法，其进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属、阴道加德纳菌和埃格特菌属靶核酸，如果存在的话。

90.权利要求89的方法，其中所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。

91.权利要求90的方法，其中所述样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触，

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体中的每一者包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂

交的捕获探针靶杂交序列，并且

其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列的每一者共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

92.权利要求91的方法，其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列，

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列，和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。

93.权利要求92的方法，其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列，

所述阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列，和/或

所述埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

94.权利要求76至93中任一项的方法，其中检测步骤(3)包括

使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针接触，和

检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和/或埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。

95.权利要求94的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列，和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。

96.权利要求95的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列，

所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列，和/或

所述第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

97.权利要求95或96的方法，其中检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列。

98.权利要求97的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

99.权利要求94或95的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者包含标记物。

100.权利要求97的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。

101.权利要求99或100的方法，其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

102.权利要求99或100的方法，其中检测步骤(3)在扩增步骤(2)期间进行。

103.权利要求102的方法，其中每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

104.权利要求103的方法，其中每个检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

105.权利要求94或95的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者进一步包含非靶杂交序列。

106.权利要求105的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针、所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针和所述第一埃格特菌属特异性检测探针的每一者是分子火炬或分子信标。

107.权利要求97的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

108.权利要求107的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

109.权利要求76至108中任一项的方法，其中在步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。

110.权利要求109的方法，其中所述扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。

111.权利要求109或110的方法，其中所述扩增反应是实时扩增反应。

112.权利要求68至111中任一项的方法，其中所述方法包括检测不超过10个与BV相关的细菌属。

113.权利要求68至111中任一项的方法，其中所述方法包括检测不超过5个与BV相关的细菌属。

114.权利要求68至111中任一项的方法，其中所述方法不包括检测乳杆菌属、加德纳菌属和埃格特菌属之外的与BV相关的细菌属。

115.权利要求68至114中任一项的方法，其中如果指示受试者中存在BV，那么所述方法进一步包括向受试者施用用于BV的治疗方案。

116.权利要求68至114中任一项的方法，其中所述方法是监测受试者中的BV的方法，并且受试者在步骤(a)之前正在经历用于BV的治疗方案。

117.权利要求116的方法，其中如果指示受试者中存在BV，那么所述方法进一步包括(i)向受试者施用用于BV的治疗方案或(ii)向受试者施用不同的用于BV的治疗方案。

118.一种用于确定样品中乳杆菌属物种的存在或缺失的方法，所述方法包括：

(1)使样品与用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，所述样品疑似含有乳杆菌属物种，其中所述第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且其中所述第一和第二扩增寡聚体靶向乳杆菌属物种16S rRNA区域，其对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域；

(2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种靶核酸用作产生对应于乳杆菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板，如果样品中存在的话；和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中乳杆菌属物种的存在或缺失。

119.权利要求118的方法，其中(i)所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于

SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列，和(ii)所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列。

120.权利要求118或119的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

121.权利要求118或119的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列；和/或

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列。

122.权利要求118、119或121的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

123.权利要求118、119或121的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成；和/或

所述第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成。

124.权利要求118、119、121或123中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。

125.权利要求118至124中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

126.权利要求118、119、121、123和125中任一项的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且其中所述样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，

其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

127.权利要求120、122和124中任一项的方法，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

128.权利要求125或127的方法，其中所述启动子序列是T7启动子序列。

129.权利要求128的方法，其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸

序列。

130.权利要求125的方法，其中

所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

131.权利要求127的方法，其中所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

132.权利要求118至131中任一项的方法，其进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属靶核酸，如果存在的话。

133.权利要求132的方法，其中所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。

134.权利要求133的方法，其中样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体接触，所述乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体包含与乳杆菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且其中所述乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

135.权利要求134的方法，其中所述乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列。

136.权利要求135的方法，其中

所述乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

137.权利要求118至136中任一项的方法，其中检测步骤(3)包括

使一种或多种扩增产物与第一乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第一乳杆菌属特异性检测探针与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交，和

检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性检测探针的存在或缺失。

138.权利要求137的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列。

139.权利要求138的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列。

140.权利要求138或139的方法，其中检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列。

141.权利要求140的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

142.权利要求137或138的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。

143.权利要求140的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。

144.权利要求142或143的方法，其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

145.权利要求142或143的方法，其中检测步骤(3)在扩增步骤(2)期间进行。

146.权利要求145的方法，其中每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

147.权利要求146的方法，其中每个检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

148.权利要求137的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

149.权利要求137或138的方法，其中所述第一乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

150.权利要求140的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

151.权利要求140或150的方法，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

152.一种用于确定样品中阴道加德纳菌的存在或缺失的方法，所述方法包括：

(1)使样品与用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体接触，所述样品疑似含有阴道加德纳菌，其中所述第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且其中所述第一和第二扩增寡聚体靶向阴道加德纳菌16S rRNA区域，其对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域；

(2)进行体外核酸扩增反应，其中任何阴道加德纳菌靶核酸用作产生对应于阴道加德纳菌靶区域的一种或多种扩增产物的模板，如果样品中存在的话；和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中阴道加德纳菌的存在或缺失。

153.权利要求152的方法，其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列，和(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

154.权利要求152或153的方法，其中

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列；和/或

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

155.权利要求152至154中任一项的方法，其中

所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成；和/或

所述第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成。

155.权利要求152至155中任一项的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于所述第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列5'的启动子序列。

156.权利要求155的方法，其中所述启动子序列是T7启动子序列。

157.权利要求156的方法，其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列。

158.权利要求155的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列。

159.权利要求152至158中任一项的方法，其进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化阴道加德纳菌靶核酸，如果存在的话。

160.权利要求159的方法，其中所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。

161.权利要求160的方法，其中样品与阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体接触，所述阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体包含与阴道加德纳菌靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且其中所述阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

162.权利要求161的方法，其中阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列。

163.权利要求162的方法，其中所述阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

164.权利要求152至163中任一项的方法，其中检测步骤(3)包括

使一种或多种扩增产物与第一阴道加德纳菌特异性检测探针接触，所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交，和

检测任何靶杂交的阴道加德纳菌特异性检测探针的存在或缺失。

165.权利要求164的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列。

166.权利要求165的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

167.权利要求164或165的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含标记物。

168.权利要求167的方法，其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

169.权利要求167的方法，其中检测步骤(3)在扩增步骤(2)期间进行。

170.权利要求169的方法，其中所述检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

171.权利要求170的方法，其中所述检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

172.权利要求164或165的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

173.权利要求164或172的方法，其中所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

174.一种用于确定样品中埃格特菌属物种的存在或缺失的方法，所述方法包括：

(1)使样品与用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体接触，所述样品疑似含有埃格特菌属物种，其中所述第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二埃格特菌属特异性靶杂交序列，并且其中所述第一和第二扩增寡聚体靶向埃格特菌属物种16S rRNA区域，其对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域；

(2)进行体外核酸扩增反应，其中任何埃格特菌属物种靶核酸用作产生对应于埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板，如果样品中存在的话；和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中埃格特菌属物种的存在或缺失。

175.权利要求174的方法，其中(i)所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列，和(ii)所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序

列基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

176.权利要求174或175的方法,其中

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

177.权利要求174至176中任一项的方法,其中

所述第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成;和/或

所述第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

178.权利要求174至177中任一项的方法,其中所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。

179.权利要求178的方法,其中所述启动子序列是T7启动子序列。

180.权利要求179的方法,其中所述启动子序列具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列。

181.权利要求178的方法,其中所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

182.权利要求174至181中任一项的方法,其进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化埃格特菌属靶核酸,如果存在的话。

183.权利要求182的方法,其中所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触,所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。

184.权利要求183的方法,其中样品与埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触,所述埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体包含与埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列,其中所述埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。

185.权利要求184的方法,其中所述埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。

186.权利要求185的方法,其中所述埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

187.权利要求174至186中任一项的方法,其中检测步骤(3)包括

使一种或多种扩增产物与第一埃格特菌属特异性检测探针接触,所述第一埃格特菌属特异性检测探针与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交,和

检测任何靶杂交的埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。

188.权利要求187的方法,其中所述第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。

189.权利要求188的方法,其中所述第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

190.权利要求187或188的方法,其中所述第一埃格特菌属特异性检测探针包含标记物。

191.权利要求190的方法,其中所述标记物是化学发光标记物或荧光标记物。

192.权利要求190的方法，其中检测步骤(3)在扩增步骤(2)期间进行。

193.权利要求192的方法，其中所述检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。

194.权利要求193的方法，其中所述检测探针是分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

195.权利要求187的方法，其中所述第一埃格特菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。

196.权利要求187或195的方法，其中所述第一埃格特菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

197.权利要求118至196中任一项的方法，其中在步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。

198.权利要求197的方法，其中所述扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。

199.权利要求197或198的方法，其中所述扩增反应是实时扩增反应。

200.一种用于确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者的存在或缺失的多重方法，所述方法包括：

(1)使样品与下列扩增寡聚体接触，所述样品疑似含有乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的至少一者：

(a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)所述第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；和

(b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列；

(2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种和阴道加德纳菌靶核酸用作产生对应于乳杆菌属物种和阴道加德纳菌靶区域的一种或多种扩增产物的模板，如果样品中存在的话；和

(3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的存在或缺失。

201.权利要求200的方法，其中在所述样品中未检出乳杆菌属物种，在所述样品中检出阴道加德纳菌。

202.权利要求200的方法，其中在所述样品中以超过1.4e10拷贝/mL检出阴道加德纳菌。

203.一种用于确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者的存在或缺失的寡聚体组合，所述寡聚体组合包括：

(a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且

(ii)所述第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列;和

(b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体,其中(i)所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列,并且(ii)所述第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列。

204.一种用于确定受试者中细菌性阴道病(BV)的存在或缺失的方法,所述方法包括:

(a)提供来自疑似患有BV的受试者的样品;

(b)进行检测样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的测定法;

(c)基于检测测定法,对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的每一者指定阳性或阴性状态;和

(d)基于来自步骤(c)指定的乳杆菌属物种状态和阴道加德纳菌状态状态的组合,确定受试者中BV的存在或缺失,

其中

(i)阴道加德纳菌的阴性状态指示受试者中缺失BV,

(ii)如果阴道加德纳菌的状态为阳性,那么乳杆菌属物种的阳性状态指示受试者中缺失BV,而乳杆菌属物种的阴性状态指示受试者中存在BV。

205.一种组合物,其包含:

与乳杆菌属物种靶核酸特异性杂交的第一检测探针,和

与阴道加德纳菌靶核酸特异性杂交的第二检测探针,

其中所述第一和第二检测探针中的至少一者包含标记物,并且

其中所述组合物(i)不包含与来自任何真菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针,并且(ii)不包含与来自除乳杆菌属物种或阴道加德纳菌以外的任何细菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针。

206.一种试剂盒,其包含:

与乳杆菌属物种靶核酸特异性杂交的第一检测探针,和

与阴道加德纳菌靶核酸特异性杂交的第二检测探针,

其中所述第一和第二检测探针中的至少一者包含标记物,并且

其中所述试剂盒(i)不包含与来自任何真菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针,并且(ii)不包含与来自除乳杆菌属物种或阴道加德纳菌以外的任何细菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针。

207.权利要求205的组合物或权利要求206的试剂盒,其中所述第一检测探针与加氏乳杆菌(L.gasseri)靶核酸、卷曲乳杆菌(L.crispatus)靶核酸和詹氏乳杆菌(L.jensenii)靶核酸中的至少一者特异性杂交。

208.权利要求205的组合物或权利要求206的试剂盒,其中

所述第一检测探针靶向与SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域对应的乳杆菌属物种16S rRNA区域;和/或

所述第二检测探针靶向与SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的

区域对应的阴道加德纳菌16S rRNA区域。

209.权利要求205的组合物或权利要求206的试剂盒，其中

所述第一检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，和/或

所述第二检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列。

210.权利要求205的组合物或权利要求206的试剂盒，其中

所述第一检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列；和/或

所述第二检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

211.权利要求209或210的组合物或试剂盒，其中所述组合物或试剂盒进一步包含与乳杆菌属物种靶核酸特异性杂交的第三检测探针，其中所述第三检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列。

212.权利要求211的组合物或试剂盒，其中所述第三检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

用于检测细菌核酸和诊断细菌性阴道病的方法和组合物

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请包括已经以ASCII格式经由EFS-Web提交并且通过提述完整并入本文中的序列表。创建于2016年3月16日的所述ASCII拷贝被命名为“DIA-0002-PCT_ST25.txt”，大小为31KB。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请根据35U.S.C§119(e)要求2015年3月16日提交的临时申请号62/133,881、2015年5月29日提交的62/168,405和2015年5月29日提交的62/168,688的优先权；每篇专利通过提述并入本文。

[0005] 背景

[0006] 根据“国家健康与营养检查调查”，14至49岁的女性中有近三分之一患有细菌性阴道病(BV)。(参见Allsworth和Peipert,Obstetrics and Gynecology109:114-120,2007)。BV是阴道分泌物最常见的原因，也是许多女性寻求医疗护理的原因。它也与早产、低出生体重、盆腔炎性疾病、包括HIV在内的STD感染的增加、以及将HIV传给性伴侣的更高风险有关。参见Srinivasan和Fredricks,Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases,Vol.2008,Article ID 750479,22pages,2008)。患有细菌性阴道病的女性可能有包括恶臭阴道分泌物或刺激在内的症状，然而，多达一半的可诊断BV的女性没有明显症状(参见Srivinvasan和Fredricks，上文)。

[0007] 已知BV的病因不是单一的病原体。大多数研究者和CDC认为细菌性阴道病是阴道正常菌群破坏的结果。与常见感染不同，这种生态失调不是单独的细菌种类的结果。参见CDC Factsheet,2014(BV-Fact-Sheet-March-2014.pdf，来自CDC网站)。生态失调为体内环境如阴道内正常微生物群的破坏。参见Nibali等人，Journal of Oral Microbiology 6:22962,2014。

[0008] 在诊所使用Amsel标准并且在实验室使用Nugent评分系统诊断BV。后者依赖于借助革兰氏染色剂对细菌形态型进行计数。这样，Nugent评分是对生态失调的目测评估-相比于良好标准将不良细菌评分。参见Nugent等人，Journal of Clinical Microbiology 29:297-301,1991。Amsel标准评估样品中线索细胞的存在、pH、颜色和气味，这些是与BV相关的关键症状。参见Amsel等人，如Am.J.Med.74:14-22,1983。用显微镜检查样品的湿片，以检测线索细胞，线索细胞是被认为主要由阴道加德纳菌(G.vaginalis)组成的细菌覆盖的人上皮细胞。

[0009] 分子检测通常靶向与细菌性阴道病有强相关性的多种生物。靶向哪些生物在不同的检测中有所不同。在几乎所有的情况下都靶向高丰度厌氧菌，如阿托波菌属(Atopobium)、加德那菌属(Gardnerella)和巨球型菌属(Megasphaera)种类。

[0010] 在Cartwright等人的一项研究中，发现唯一通过FDA批准的BV检测(BD Affirm VPIII 2010)具有67.6％的敏感性和76.4％的特异性(Journal of Clinical Microbiology 51:3694-3699,2013)。为了诊断BV，将以Affirm产品检出阴道加德纳菌作为其唯一的指标。产品包装说明书表明，与革兰氏染色评分法相比，Affirm产品的敏感性为

95.1%,特异性为83.3%。

[0011] 上文Cartwright等人使用多重测定法检测阴道阿托波菌(Atopobium vaginae)、BVAB-2和巨球型菌属1(Megasphaera-1),用于诊断BV。他们在323名女性(93%的非洲裔美国人,7%的非西班牙裔白人)的群体中测量了该测定法相比于Nugent和Amsel结果组合的性能。他们报告,与Nugent和Amsel评分的组合相比,该检测的敏感性为96.9%,特异性为92.6%。他们没有报告该测定相对于单独的Nugent评分的结果。

[0012] 概述

[0013] 一方面,本发明提供了用于确定受试者中细菌性阴道病(BV)的存在或缺失的方法。在一些实施方案中,该方法通常包括以下步骤:(a)提供来自疑似患有BV的受试者的样品;(b)进行检测样品中的乳杆菌属物种(Lactobacillus sp.)、阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)和埃格特菌属物种(Eggerthella sp.)的测定法;(c)基于检测测定法,对乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的每一者指定阳性或阴性状态;和(d)基于来自步骤(c)指定的乳杆菌属物种状态、阴道加德纳菌状态和埃格特菌属物种状态的组合,确定受试者中BV的存在或缺失,其中(i)阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阴性状态指示受试者中缺失BV,(ii)阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阳性状态指示受试者中存在BV,(iii)如果乳杆菌属物种的状态为阳性,那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中至少一者的阴性状态指示受试者中缺失BV,(iv)如果乳杆菌属物种的状态为阴性,那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中至少一者的阳性状态指示受试者中存在BV。在其他实施方案中,该方法通常包括以下步骤:(a)提供来自疑似患有BV的受试者的样品;(b)进行检测样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的测定法;(c)基于检测测定法,对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的每一者指定阳性或阴性状态;和(d)基于来自步骤(c)指定的乳杆菌属物种状态和阴道加德纳菌状态的组合,确定受试者中BV的存在或缺失,其中i)阴道加德纳菌的阴性状态指示受试者中缺失BV,和ii)如果阴道加德纳菌状态为阳性,那么乳杆菌属物种的阳性状态指示受试者中缺失BV,而乳杆菌属物种的阴性状态指示受试者中存在BV。

[0014] 在如上所述的BV诊断方法的一些实施方案中,用于检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的测定法,或用于检测乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的测定法,是一种基于核酸的检测测定法。在一些实施方案中,乳杆菌属物种来自阴道微生物组。在一些实施方案中,埃格特菌属物种来自阴道微生物组。特别适合的基于核酸的检测测定法包括基于扩增的测定法,例如包括等温扩增反应(例如转录介导的扩增(TMA)反应)的测定法,其可以实时进行。在某些实施方案中,基于核酸的检测测定法靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的16S rRNA,或乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的16S rRNA。在特定变型中,基于核酸的检测测定法靶向(i)对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的乳杆菌属物种16S rRNA区域;(ii)对应于SEQ ID NO:3区域的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的阴道加德纳菌16S rRNA区域;和/或(iii)对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域的埃格特菌属物种16S rRNA区域。

[0015] 在如上所述的包括基于核酸的检测测定法的BV诊断方法的某些实施方案中,所述测定法是基于扩增的测定法,包括以下步骤:

[0016] (1)使样品与下述寡聚体接触:

[0017] 用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚

体，其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；

[0018] 用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列；和

[0019] 用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列；

[0020] (2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板；和

[0021] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失。

[0022] 在包括基于核酸的检测测定法的BV诊断方法的其他实施方案中，所述测定法是基于扩增的测定法，包括以下步骤：

[0023] (1)使样品与下述寡聚体接触：

[0024] 用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；和

[0025] 用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列；

[0026] (2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于乳杆菌属物种和阴道加德纳菌靶区域的一种或多种扩增产物的模板；和

[0027] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失。

[0028] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些变型中，第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列；第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列；第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列；第二阴道加德纳菌特

异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成;第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成;第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成;第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

[0029] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些变型中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,其中第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。在一些这样的实施方案中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列。在特定变型中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成。

[0030] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些实施方案中,所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体和第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体中的至少一者)是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。在一些这样的实施方案中,其中第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列,例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中,第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列;第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列;和/或第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中,其中使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0031] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的某些实施方案中,该方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属、阴道加德纳菌和埃格特菌属靶核酸,或纯化乳杆菌属和阴道加德纳菌靶核酸,如果存在的话。在一些这样的实施方案中,所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触,所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如,可以使样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触,其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异

性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且其中乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在针对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的检测的一些实施方案中，可以使样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体接触，其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属或阴道加德纳菌靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中，乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列，阴道加德菌菌特异性捕获探针靶杂交序列基本对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。在一些实施方案中，乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列，阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0032] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针接触，和(ii)检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和/或埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。在如上所述的用于检测乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针和与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针接触，和(ii)检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性和/或阴道加德纳菌特异性检测探针的存在或缺失。在一些实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。在具体的变型中，第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中，检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物和与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列；在一些这样的实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0033] 在如上所述的BV诊断方法的某些实施方案中，其包括基于扩增的检测测定法和第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针的使用(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针的使用)，所述探针各自包含标记物。在一些实施方案中，进一步包括使一种或多种扩增产物与第二乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0034] 在如上所述的BV诊断方法的一些实施方案中，其包括基于扩增的检测测定法和标记检测探针的使用，所述检测步骤(3)在扩增步骤(2)过程中进行。在一些这样的变型中，每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标和TaqMan检测探针。

[0035] 在如上所述的BV诊断方法的某些实施方案中，其包括基于扩增的检测测定法和检测探针的使用，第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针中的至少一者)进一步包含非靶杂交序列。在一些实施方案中，进一步包括使一种或多种扩增产物与第二乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在如上所述的一些这样的变型中，检测探针中的任何一种(例如，每种)是分子火炬或分子信标。

[0036] 在如上所述的包括基于扩增的检测测定法的BV诊断方法的一些实施方案中，步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。在特定变型中，等温扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。在某些实施方案中，等温扩增反应是实时扩增反应。

[0037] 在如上所述的BV诊断方法的一些实施方案中，所述方法包括检测不超过10个与BV相关的细菌属。例如，在某些变型中，所述方法包括检测不超过5个与BV相关的细菌属。在具体的变型中，所述方法不包括检测乳杆菌属、加德纳菌属和埃格特菌属之外的与BV相关的细菌属。在另一个具体的变型中，所述方法不包括检测乳杆菌属和加德纳菌属之外的与BV相关的细菌属。

[0038] 在如上所述的BV诊断方法的一些实施方案中，如果指示受试者中存在BV，那么所述方法进一步包括向受试者施用用于BV的治疗方案。

[0039] 在如上所述的BV诊断方法的一些实施方案中，所述方法是监测受试者中的BV的方法，并且受试者在步骤(a)之前正在经历用于BV的治疗方案。在一些这样的变型中，如果指示受试者中存在BV，那么所述方法进一步包括(i)向受试者施用用于BV的治疗方案或(ii)向受试者施用不同的用于BV的治疗方案。

[0040] 另一方面，本发明提供了多重检测方法。在一些实施方案中，多重检测方法用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者的存在或缺失。所述方法通常包括以下步骤：

[0041] (1)使样品与下列扩增寡聚体接触，所述样品疑似含有乳杆菌属物种、

[0042] 阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的至少一者：

[0043] (a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；

[0044] (b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德

纳菌特异性靶杂交序列;和

[0045] (c)用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列;

[0046] (2)进行体外核酸扩增反应,其中任何乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板;和

[0047] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失,从而确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的存在或缺失。

[0048] 在其他实施方案中,多重检测方法用于确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者的存在或缺失。所述方法通常包括以下步骤:

[0049] (1)使样品与下列扩增寡聚体接触,所述样品疑似含有乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的至少一者:

[0050] (a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体,其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列,并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列;和

[0051] (b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体,其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列,并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列;

[0052] (2)进行体外核酸扩增反应,其中任何乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于乳杆菌属物种和阴道加德纳菌靶区域的一种或多种扩增产物的模板;和

[0053] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失,从而确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的存在或缺失。

[0054] 在如上所述的多重方法的一些变型中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列;第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列;第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列;第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成;第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成;第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷

酸序列组成;第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

[0055] 在如上所述的多重方法的一些变型中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,其中第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。在一些这样的实施方案中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列。在特定变型中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成。

[0056] 在如上所述的多重方法的一些实施方案中,所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体和第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体中的至少一者)是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。在一些这样的实施方案中,其中第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列,例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中,第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列;第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列;和/或第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中,其中使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0057] 在如上所述的多重方法的某些实施方案中,该方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属、阴道加德纳菌和埃格特菌属靶核酸,或纯化乳杆菌属和阴道加德纳菌靶核酸,如果存在的话。在一些这样的实施方案中,所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触,所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如,可以使样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触,其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列,并且其中乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在针对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的检测的一些实施方案中,可以使样品与乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体接触,其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属或阴道加德纳菌靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列,并且其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中,乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本

上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列，阴道加德菌菌特异性捕获探针靶杂交序列基本对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。在一些实施方案中，乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列，阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0058] 在如上所述的多重方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针接触，和(ii)检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和/或埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。在如上所述的用于检测乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的多重方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物同与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针和与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针接触，和(ii)检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性和/或阴道加德纳菌特异性检测探针的存在或缺失。在一些实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。在具体的变型中，第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中，检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物和与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列；在一些这样的实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0059] 在如上所述的多重方法的某些实施方案中，其包括第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针的使用(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针的使用)，所述探针各自包含标记物。在一些实施方案中，进一步包括使一种或多种扩增产物与第二乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0060] 在如上所述的包括标记检测探针的使用的多重方法的一些实施方案中，所述检测步骤(3)在扩增步骤(2)过程中进行。在一些这样的变型中，每个检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标和TaqMan检测探针。

[0061] 在如上所述的包括检测探针的使用的多重方法的某些实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针中的至少一者)进一步包含非靶杂交序列。在一些实施方案中，进一步包括使一种或多种扩增产物

与第二乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在如上所述的一些这样的变型中，检测探针中的任何一种(例如，每种)是分子火炬或分子信标。

[0062] 在如上所述的多重方法的一些实施方案中，步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。在特定变型中，等温扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。在某些实施方案中，等温扩增反应是实时扩增反应。

[0063] 另一方面，本发明提供了寡聚体组合。在一些实施方案中，寡聚体组合用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者的存在或缺失。所述寡聚体组合通常包括以下寡聚体：

[0064] (a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；

[0065] (b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列；和

[0066] (c)用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的第一埃格特菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的第二埃格特菌属特异性靶杂交序列。

[0067] 在其他实施方案中，寡聚体组合用于确定样品中乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者的存在或缺失。所述寡聚体组合通常包括以下寡聚体：

[0068] (a)用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体，其中(i)第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第一乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且(ii)第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的第二乳杆菌属特异性靶杂交序列；和

[0069] (b)用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体，其中(i)第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且(ii)第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列。

[0070] 在如上所述的寡聚体组合的一些变型中，第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列；第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列；第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ

ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列;第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成;第二乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成;第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列组成;第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成;第一埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列组成;和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

[0071] 在如上所述的寡聚体组合的一些变型中,第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且所述寡聚体组合进一步包括用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体,其中第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。在一些这样的实施方案中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列。在特定变型中,第三乳杆菌属特异性靶杂交序列由SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列组成。

[0072] 在如上所述的寡聚体组合的一些实施方案中,所述第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体、所述第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体和所述第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体和第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体中的至少一者)是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列。在一些这样的实施方案中,其中第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列,并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者,其进一步包含位于第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列,例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中,第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列;第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列;和/或第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中,其中使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触,所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0073] 在如上所述的寡聚体组合的某些实施方案中,所述寡聚体组合进一步包括至少一种捕获探针寡聚体,所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如,寡聚体组合可以包括乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体、阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体,其中所述乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属、阴道加德纳菌或埃格特菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列,并且其中乳杆菌属特异性、阴道加德纳菌特异性和埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在针对寡聚体组合的一些实施方案中,所述寡聚体组合用于确定乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的每一者的存在或缺失,所述寡聚体组合可以包

括乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体，其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体各自包含分别与乳杆菌属或阴道加德纳菌靶核酸中的靶序列特异性杂交的捕获探针靶杂交序列，并且其中乳杆菌属特异性和阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列各自共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中，乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列，阴道加德菌特异性捕获探针靶杂交序列基本对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。在一些实施方案中，乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列，阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列，和/或埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0074] 在如上所述的寡聚体组合的一些实施方案中，寡聚体组合进一步包括与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针、与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针和与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交的第一埃格特菌属特异性检测探针。在如上所述的寡聚体组合的一些实施方案中，所述寡聚体组合用于确定乳杆菌属物种和阴道加德纳菌中的每一者的存在或缺失，所述寡聚体组合进一步包括与第一乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第一乳杆菌属特异性检测探针和与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交的第一阴道加德纳菌特异性检测探针。在一些实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。在具体的变型中，第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列，第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列，和/或第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中，所述寡聚体组合进一步包括与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列；在一些这样的实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0075] 在如上所述的寡聚体组合的某些实施方案中，其包括第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针)，所述探针各自包含标记物。在进一步包括第二乳杆菌属特异性检测探针的一些实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0076] 在如上所述的包括标记检测探针的寡聚体组合的一些实施方案中，每种检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标和TaqMan检测探针。

[0077] 在如上所述的包括检测探针的寡聚体组合的某些实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针、第一阴道加德纳菌特异性检测探针和第一埃格特菌属特异性检测探针中的至少一者(或第一乳杆菌属特异性检测探针和第一阴道加德纳菌特异性检测探针中的至少一者)进一步包含非靶杂交序列。在进一步包括第二乳杆菌属特异性检测探针的一些实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在如上所述的一些这

样的变型中，检测探针中的任何一种(例如，每种)是分子火炬或分子信标。

[0078] 在又另一方面，本发明提供了用于确定样品中乳杆菌属物种的存在或缺失的方法。所述方法通常包括以下步骤：

[0079] (1)使疑似含有乳杆菌属物种的样品与用于扩增乳杆菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，其中第一和第二乳杆菌属特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二乳杆菌属特异性靶杂交序列，并且其中第一和第二扩增寡聚体靶向乳杆菌属物种的16S rRNA区域，所述16S rRNA区域对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域；

[0080] (2)进行体外核酸扩增反应，其中任何乳杆菌属物种靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于乳杆菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板；和

[0081] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中乳杆菌属物种的存在或缺失。

[0082] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的一些变型中，第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列，和/或第二乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中，第一乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列或由其组成，和/或第二乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列或由其组成。

[0083] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的一些实施方案中，第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，其中第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体包含基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的第三乳杆菌属特异性靶杂交序列。在一些这样的实施方案中，第三乳杆菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列或由其组成。

[0084] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的一些实施方案中，第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体进一步包含位于第一乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。在一些这样的实施方案中，其中第一乳杆菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列，并且使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于第三乳杆菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列，例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中，第一乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中，其中使样品进一步与用于扩增乳杆菌属物种靶区域的第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体接触，所述第三乳杆菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0085] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的某些实施方案中，所述方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化乳杆菌属靶核酸，如果存在的话。在一些这样的实施方案中，所述纯化步骤包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如，可以使样品与包含

捕获探针靶杂交序列的乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针靶杂交序列与乳杆菌属靶核酸中的靶序列特异性杂交，其中乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中，乳杆菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列。在一些实施方案中，乳杆菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0086] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物与第一乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第一乳杆菌属特异性检测探针与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交，和(ii)检测任何靶杂交的乳杆菌属特异性检测探针的存在或缺失。在一些这样的实施方案中，第一乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列。在具体的变型中，第一乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列。在如上所述的一些实施方案中，检测步骤(3)进一步包括使一种或多种扩增产物和与乳杆菌属物种靶区域特异性杂交的第二乳杆菌属特异性检测探针接触，其中所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列；在一些这样的实施方案中，所述第二乳杆菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0087] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的某些实施方案中，其中所述方法包括第一乳杆菌属特异性检测探针的使用，所述第一乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。在一些实施方案中，进一步包括使一种或多种扩增产物与第二乳杆菌属特异性检测探针接触，所述第二乳杆菌属特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0088] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的一些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，检测步骤(3)在扩增步骤(2)过程中进行。在一些这样的变型中，检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标和TaqMan检测探针。

[0089] 在如上所述的检测乳杆菌属物种的方法的某些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，所述第一乳杆菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在所述方法的一些变型中，第一乳杆菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

[0090] 在又另一方面，本发明提供了用于确定样品中阴道加德纳菌的存在或缺失的方法。所述方法通常包括以下步骤：

[0091] (1)使疑似含有阴道加德纳菌的样品与用于扩增阴道加德纳菌靶核酸的靶区域的第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体接触，其中第一和第二阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列，并且其中第一和第二扩增寡聚体靶向阴道加德纳菌的16S rRNA区域，所述16S rRNA区域对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域；

[0092] (2)进行体外核酸扩增反应，其中任何阴道加德纳菌靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于阴道加德纳菌靶区域的一种或多种扩增产物的模板；和

[0093] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中阴道加德纳菌的存在或缺失。

[0094] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的一些变型中，第一阴道加德纳菌特异性

靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列，和/或第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中，第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列或由其组成，和/或第二阴道加德纳菌特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列或由其组成。

[0095] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的一些实施方案中，第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于第一阴道加德纳菌特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列，例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中，第一阴道加德纳菌特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:13的核苷酸序列。

[0096] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的某些实施方案中，所述方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化阴道加德纳菌靶核酸，如果存在的话。在一些实施方案中，所述纯化步骤进一步包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如，可以使样品与包含捕获探针靶杂交序列的阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针靶杂交序列与阴道加德纳菌靶核酸中的靶序列特异性杂交，其中阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中，阴道加德纳菌特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列。在一些实施方案中，阴道加德纳菌特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

[0097] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物与第一阴道加德纳菌特异性检测探针接触，所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针与阴道加德纳菌靶区域特异性杂交，和(ii)检测任何靶杂交的阴道加德纳菌特异性检测探针的存在或缺失。在一些这样的实施方案中，第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列。在具体的变型中，第一阴道加德纳菌特异性检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

[0098] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的某些实施方案中，第一阴道加德纳菌特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0099] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的一些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，检测步骤(3)在扩增步骤(2)过程中进行。在一些这样的变型中，检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

[0100] 在如上所述的检测阴道加德纳菌的方法的某些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，所述第一阴道加德纳菌特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在所述方法的一些变型中，第一阴道加德纳菌特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

[0101] 在又另一方面，本发明提供了用于确定样品中埃格特菌属物种的存在或缺失的方法。所述方法通常包括以下步骤：

[0102] (1)使疑似含有埃格特菌属物种的样品与用于扩增埃格特菌属物种靶核酸的靶区域的第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体接触，其中第一和第二埃格特菌属特异性扩增寡聚体分别包含第一和第二埃格特菌属特异性靶杂交序列，并且其中第一和第二扩增寡

聚体靶向埃格特菌属物种的16S rRNA区域，所述16S rRNA区域对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域；

[0103] (2)进行体外核酸扩增反应，其中任何埃格特菌属物种靶核酸(如果样品中存在的话)用作产生对应于埃格特菌属物种靶区域的一种或多种扩增产物的模板；和

[0104] (3)检测一种或多种扩增产物的存在或缺失，从而确定样品中埃格特菌属物种的存在或缺失。

[0105] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的一些变型中，第一埃格特菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列，和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中，第一埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列或由其组成，和/或第二埃格特菌属特异性靶杂交序列包含SEQ ID NO:16的核苷酸序列或由其组成。

[0106] 在如上所述的检测埃格特菌属的方法的一些实施方案中，第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于第一埃格特菌属特异性靶杂交序列5'的启动子序列。特别适合的启动子序列是T7启动子序列，例如像具有SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列的启动子序列。在具体的变型中，第一埃格特菌属特异性扩增寡聚体具有SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

[0107] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的某些实施方案中，所述方法进一步包括在步骤(2)之前自样品中的其他组分纯化埃格特菌属物种靶核酸，如果存在的话。在一些实施方案中，所述纯化步骤进一步包括使样品与至少一种捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针寡聚体包含共价附着至结合固定化探针的序列或模块的靶杂交序列。例如，可以使样品与包含捕获探针靶杂交序列的埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体接触，所述捕获探针靶杂交序列与埃格特菌属物种靶核酸中的靶序列特异性杂交，其中埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列共价附着至结合固定化探针的序列或模块。在具体的变型中，埃格特菌属特异性捕获探针靶杂交序列基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列。在一些实施方案中，埃格特菌属特异性捕获探针寡聚体具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0108] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的一些实施方案中，检测步骤(3)包括：(i)使一种或多种扩增产物与第一埃格特菌属特异性检测探针接触，所述第一埃格特菌属特异性检测探针与埃格特菌属物种靶区域特异性杂交，和(ii)检测任何靶杂交的埃格特菌属特异性检测探针的存在或缺失。在一些这样的实施方案中，第一埃格特菌属特异性检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:18的靶杂交序列。在具体的变型中，第一埃格特菌属特异性检测探针具有SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

[0109] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的某些实施方案中，第一埃格特菌属特异性检测探针包含标记物。特别适合的标记物包括化学发光标记物和荧光标记物。

[0110] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的一些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，检测步骤(3)在扩增步骤(2)过程中进行。在一些这样的变型中，检测探针包含荧光标记物和猝灭剂。特别适合的包含荧光标记物和猝灭剂的检测探针包括分子火炬、分子信标或TaqMan检测探针。

[0111] 在如上所述的检测埃格特菌属物种的方法的某些实施方案中，其中所述方法包括标记检测探针的使用，所述第一埃格特菌属特异性检测探针进一步包含非靶杂交序列。在

所述方法的一些变型中，第一埃格特菌属特异性检测探针是分子火炬或分子信标。

[0112] 在如上所述的检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌或埃格特菌属物种中的任何一者的方法的一些实施方案中，步骤(2)的扩增反应是等温扩增反应。在特定变型中，等温扩增反应是转录介导的扩增(TMA)反应。在某些实施方案中，等温扩增反应是实时扩增反应。

[0113] 在还有的其他方面，本发明提供了用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的任何一者的存在或缺失的寡聚体组合。在各种实施方案中，所述寡聚体组合包括如上所述的寡聚体，其用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的存在或缺失的方法。

[0114] 在另外其他方面，本发明提供了用于确定受试者中细菌性阴道病(BV)的存在或缺失的组合物或试剂盒。所述组合物或试剂盒通常包括：(a)与乳杆菌属物种靶核酸特异性杂交的第一检测探针，和(b)与阴道加德纳菌靶核酸特异性杂交的第二检测探针，其中第一和第二检测探针中的至少一者包含标记物，并且其中所述组合物或试剂盒(i)不包含与来自任何真菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针，和(ii)不包含与来自除乳杆菌属物种或阴道加德纳菌之外的任何细菌物种的靶核酸特异性杂交的检测探针。在一些实施方案中，第一检测探针与加氏乳杆菌(L.gasseri)靶核酸、卷曲乳杆菌(L.crispatus)靶核酸和詹氏乳杆菌(L.jensenii)靶核酸中的至少一者特异性杂交。在一些实施方案中，第一检测探针靶向乳杆菌属物种16S rRNA区域，所述乳杆菌属物种16S rRNA区域对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域，和/或第二检测探针靶向阴道加德菌16S rRNA区域，所述阴道加德菌16S rRNA区域对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域。在特定变型中，第一检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:9的靶杂交序列和/或第二检测探针包含基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列；在一些这样的实施方案中，第一检测探针具有SEQ ID NO:9的核苷酸序列和/或第二检测探针具有SEQ ID NO:14的核苷酸序列。在某些实施方案中，所述组合物或试剂盒进一步包含与乳杆菌属物种靶核酸特异性杂交的第三检测探针，例如，包含基本上对应于SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列的第三检测探针。在具体的变型中，第三检测探针具有SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0115] 参考下面对本发明的详细说明，本发明的这些和其他方面将是显而易见的。

[0116] 定义

[0117] 除非另外定义，本文中使用的全部技术术语和科学术语具有与所述方法和组合物相关的本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。如本文中使用的，以下术语和短语具有归属于它们的含义，除非另有说明。

[0118] 除非上下文另外清楚指出，术语“一个”、“一种”、“该”包括复数指代。

[0119] “样品”包括可能含有乳杆菌属物种、阴道加德纳菌或埃格特菌属物种或其组分(如核酸或核酸片段)的任何标本。样品包括“生物样品”，其包括源自可能含有乳杆菌属物种、阴道加德纳菌或埃格特菌属物种的活的或死亡的人的任何组织或材料或其组分(例如从其衍生的靶核酸)，包括例如阴道拭子样品、宫颈刷样品，呼吸组织或渗出物如支气管镜检查、支气管肺泡灌洗液(BAL)或肺活组织检查、痰，唾液、外周血、血浆、血清、淋巴结、胃肠组织、粪便、尿、精液或其他体液或物质。可以处理生物样品，以便以物理或机械方式破碎组织或细胞结构，从而将细胞内组分释放到可以进一步含有酶、缓冲剂、盐、洗涤剂等的溶液

中，所述酶、缓冲剂、盐、洗涤剂用于使用标准方法制备待分析的生物样品。同样，样品可以包括经过处理的样品，例如使样品经过或通过过滤装置、或者随后离心、或通过粘附到培养基、基质或支持物上获得的样品。

[0120] “核酸”是指包含两个或更多个共价键合的具有含氮杂环碱基或碱基类似物的核苷或核苷类似物的多聚体化合物，其中核苷通过磷酸二酯键或其他键连接在一起而形成多核苷酸。核酸包括RNA、DNA或嵌合DNA-RNA聚合物或寡核苷酸，及其类似物。核酸“骨架”可以通过多种键组成，包括糖-磷酸二酯键、肽-核酸键(在“肽核酸”或PNA中，参见PCT No.WO 95/32305)、硫代磷酸酯键、甲基膦酸酯键中的一种或多种，或其组合。核酸的糖模块可以是核糖或脱氧核糖，或具有诸如2’甲氧基取代和2’卤素取代(例如2’-F)的已知取代的类似化合物。含氮碱基可以是常规碱基(A,G,C,T,U)、其类似物(例如，肌苷、5-甲基异胞嘧啶、异鸟嘌呤；The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36，Adams等人编辑，第11版，1992，Abraham等人，2007，BioTechniques 43:617-24)，包括嘌呤或嘧啶碱基的衍生物(例如，N^4-甲基脱氧鸟苷、脱氮杂或氮杂嘌呤、脱氮杂或氮杂嘧啶、在5位或6位具有取代基的嘧啶碱基，在2位、6位和/或8位具有改变或替代的取代基的嘌呤碱基，如2-氨基-6-甲氨基嘌呤、O^6-甲基鸟嘌呤、4-硫代嘧啶、4-氨基-嘧啶、4-二甲基肼-嘧啶和O^4-烷基-嘧啶，以及吡唑并化合物，例如未取代的或3-取代的吡唑并[3,4-d]嘧啶；美国专利No.5,378,825、6,949,367和PCT No.WO 93/13121)。核酸可以包含“无碱基”残基，其中骨架的一个或多个残基不包括含氮碱基(美国专利No.5,585,481)。核酸可以仅包含在RNA和DNA中发现的常规糖、碱基和键，或者可以包括常规组分和取代(例如，通过2’甲氧基骨架连接的常规碱基，或包含常规碱基和一种或多种碱基类似物的混合物的核酸)。核酸可以包括“锁核酸”(LNA)，其中一个或多个核苷酸单体具有以RNA模拟糖构象锁定的双环呋喃糖单元，其增强了与单链RNA(ssRNA)、单链DNA(ssDNA)或双链DNA(dsDNA)中的互补序列的杂交亲和力(Vester等人，Biochemistry 43:13233-41，2004)。核酸可以包括修饰的碱基以改变核酸的功能或行为，例如添加3’-末端双脱氧核苷酸以阻止另外的核苷酸添加到核酸中。在体外制备核酸的合成方法是本领域熟知的，尽管可以使用常规技术从天然来源中纯化核酸。

[0121] 如本文中使用的术语“多核苷酸”表示核酸链。在本申请中，核酸被指定为5’-末端至3’末端。标准核酸，例如DNA和RNA，通常以“5’到3”的方向，即，通过向正在延伸的核酸的3’末端添加核苷酸而进行合成。

[0122] 如本文中使用的“核苷酸”是由磷酸基团、5-碳糖和含氮碱基组成的核酸的亚单元。RNA中存在的5碳糖是核糖。在DNA中，5碳糖是2’-脱氧核糖。该术语还包括这些亚单元的类似物，比如在核糖2’位的甲氧基(2’-O-Me)。

[0123] 如本文中使用的“基于核酸的检测测定法”是用于检测靶核酸内的靶序列并利用与靶序列特异性杂交的一个或多个寡核苷酸的测定法。

[0124] 在根据本发明的某些实施方案中，基于核酸的检测测定法是“基于扩增的测定法”，即利用扩增核酸靶序列的一个或多个步骤的测定法。用于检测测定法的各种扩增方法是本领域已知的，其中几种在本文中进一步概述。为了清楚起见，基于扩增的测定法可以包括不扩增靶序列的一个或多个步骤，例如像，在基于非扩增的测定方法(例如，杂交测定法或基于切割的测定法)中使用的步骤。

[0125] 在其他实施方案中，基于核酸的检测测定法是“基于非扩增的测定法”，即不依赖

扩增核酸靶序列的任何步骤的测定法。为了清楚起见，包括在不存在任何相应下游扩增寡聚体情况下的引物延伸反应(例如，通过逆转录酶延伸引物以产生RNA:DNA双链体，随后以RNA酶消化RNA，产生与RNA靶互补的单链cDNA，但不产生cDNA拷贝)的基于核酸的检测测定法视为基于非扩增的测定法。

[0126] 示例性的基于非扩增的测定法是“基于切割的测定法”，其为依赖于襟翼核酸内切酶进行线性双链体切割结构的特异性切割的测定法，所述线性双链体切割结构是通过重叠寡核苷酸与靶核酸的特异性杂交形成的。在这些测定法中，通过襟翼核酸内切酶以重叠依赖性方式切割含有非靶杂交襟翼区的探针寡核苷酸，从而释放随后被检测到的切割产物。基于切割的测定法的原理是本领域熟知的，示例性测定法描述于例如Lyamichev等人(Nat.Biotechnol.17:292-296,1999)、Ryan等人(Mol.Diagn.4:135-144,1999)、Allawi等人(J.Clin.Microbiol.44:3443-3447,2006)、Brow等人的美国专利No.5,846,717和6,706,471、以及Dahlberg等人的美国专利No.5,614,402。基于切割的测定法包括例如市售的Invader®测定法(Hologic,Inc.,Madison,WI).

[0127] 如本文中使用的“靶核酸”是包含待检测的靶序列的核酸。靶核酸可以是如本文中所述的DNA或RNA，并且可以是单链或双链的。靶核酸可以包括靶序列以外的其他序列。

[0128] 关于“分离”，是指从其自然环境获取含有靶核酸的样品，但该术语并不意味着任何程度的纯化。

[0129] 如本文中使用的术语“靶序列”是指待检测的靶核酸的特定核苷酸序列。“靶序列”包括在检测过程(例如，基于扩增的检测测定法，例如像，TMA或PCR，或基于非扩增的检测测定法，例如像，基于切割的测定法)中寡核苷酸(例如，探针寡核苷酸、引发寡核苷酸和/或启动子寡核苷酸)与其复合的复合序列。在靶核酸最初是单链的情况下，术语“靶序列”也将指与靶核酸中存在的“靶序列”互补的序列。在靶核酸最初是双链的情况下，术语“靶序列”是指有义(+)链和反义(-)链两者。在选择靶序列时，本领域技术人员将理解，应当选择“独特”序列，以便区分不相关或密切相关的靶核酸。

[0130] “靶杂交序列”在本文中用于指被配置为与靶核酸序列杂交的寡聚体部分。优选地，靶杂交序列被配置为与靶核酸序列特异性杂交。靶杂交序列可以(但不一定)与被配置为与其杂交的靶序列的部分100％互补。靶杂交序列还可以包括相对于靶序列的插入、缺失和/或取代的核苷酸残基。可能出现靶杂交序列与靶序列的互补性小于100％，例如，当靶核酸是物种内的多个菌株时，例如对于配置为与乳杆菌属的不同菌株杂交的寡聚体就是这种情况。应当理解，存在着将靶杂交序列配置为具有与靶核酸的互补性小于100％的其他原因。

[0131] 关于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种核酸的区域，本文中使用的术语“靶向一个序列”是指寡核苷酸藉此以允许如本文所述的检测的方式与靶序列杂交的过程。在一个实施方案中，寡核苷酸与靶向的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种核酸序列互补，且不包含错配。在另一个实施方案中，寡核苷酸与靶向的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种核酸序列互补，但包含1、2、3、4个或5个错配。优选地，与靶核酸序列杂交的寡核苷酸包含至少10个到至多50个核苷酸与靶序列互补。应当理解，至少10个到至多50个是包含的范围，使得10个、50个和它们之间的每个整数被包括在内。优选地，寡聚体与靶序列特异性杂交。

[0132] 术语“配置为”表示参考的寡核苷酸靶杂交序列的多核苷酸序列配置的实际排列。例如，配置为与靶序列特异性杂交的寡核苷酸具有在严格杂交条件下与参考序列特异性杂交的多核苷酸序列。

[0133] 如本文中使用的，术语“配置为特异性杂交”是指寡核苷酸的靶杂交区域被设计为具有能够靶向参考的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种靶区域的序列的多核苷酸序列。这样的寡核苷酸不限于仅靶向该序列，而且在靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种靶核酸的组合物、试剂盒或方法中是相当有用的。寡核苷酸被设计为用作检测来自样品的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种的测定法的组分，因此被设计为在测试样品中常见的其他核酸存在下靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种。正如本领域所理解的，“特异性杂交”并不意味着唯一杂交，因为可能发生一定程度的与非靶核酸的少量杂交。相反，“特异性杂交”是指寡核苷酸的功能被配置为在测定中主要与靶标杂交，从而可以确定样品中靶核酸的准确检测。术语“配置为”表示寡核苷酸靶杂交序列的多核苷酸序列配置的实际排列。

[0134] 关于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种靶向的核酸，如本文中使用的术语“片段”是指一段连续的核酸。在某些实施方案中，所述片段包括来自乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、或埃格特菌属物种的16S核糖体RNA的连续核苷酸，其中所述片段中16S连续核苷酸的数目小于全部16S核苷酸的数目。

[0135] 如本文中使用的术语“区域”是指核酸的一部分，其中所述部分小于整个核酸。例如，当参考的核酸是寡核苷酸启动子引物时，术语“区域”可以用于指代整个寡核苷酸的较小启动子部分。类似地，同样仅作为举例，当核酸是16S核糖体RNA时，术语“区域”可以用于指核酸的较小区域，其中该较小区域被本发明的一个或多个寡核苷酸靶向。作为另一个非限制性实例，当参考的核酸是扩增子时，术语区域可以用于指通过探针的靶杂交序列进行杂交加以鉴定的较小核苷酸序列。

[0136] 可互换的术语“寡聚体”、“寡聚物”和“寡核苷酸”是指通常具有小于1,000个核苷酸(nt)残基的核酸，包括在约5nt残基下限和约500至900nt残基上限范围内的聚合物。在一些实施方案中，寡核苷酸的尺寸范围具有约12至15nt的下限和约50至600nt的上限，并且其他实施方案在约15至20nt下限和约22至100nt上限的范围内。可以从天然存在的来源纯化寡核苷酸，或者可以使用各种公知的酶或化学方法中的任一种进行合成。术语寡核苷酸不表示试剂的任何特定功能；相反，它通常用于涵盖本文所述的所有这样的试剂。寡核苷酸可以发挥各种不同的功能。例如，如果它对于互补链是特异性的且能够与互补链杂交并且可以在核酸聚合酶的存在下进一步延伸，那么其可以用作引物；如果它含有被RNA聚合酶识别的序列并允许转录，那么其可以用作引物并提供启动子(例如T7引物)；并且如果它能够与靶核酸或其扩增子杂交，并且进一步提供可检测模块(例如吖啶酯化合物)，那么其可用于检测靶核酸。

[0137] 如本文中使用的，寡核苷酸“基本上对应于”指定参考核酸序列意指寡核苷酸与参考核酸序列足够相似，使得该寡核苷酸具有与参考核酸序列相似的杂交特性，这在于其在严格杂交条件下会与相同的靶标核酸序列杂交。本领域技术人员将理解，“基本上对应的寡核苷酸”可不同于参考序列，且仍然与相同的靶标核酸序列杂交。还应当理解，除非上下文另有明确规定，对应于第二核酸的第一核酸包括其RNA和DNA，并且包括其互补物。可以根据

序列中相同碱基的百分比或探针或引物与其靶序列之间的完全互补碱基的百分比来陈述核酸的这种变化。因此，在某些实施方案中，如果碱基同一性或互补性的这些百分比为100％至约80％，那么寡核苷酸“基本上对应于”参考核酸序列。在优选实施方案中，所述百分比为100％至约85％。在更优选的实施方案中，该百分比为100％至约90％；在其他优选实施方案中，该百分比为100％至约95％。类似地，核酸或扩增核酸的区域在本文中可被称为对应于参考核酸序列。本领域的技术人员将理解，在各种互补性百分比下可能需要对杂交条件进行各种修改，以允许与特定靶序列杂交，而不会产生不可接受程度的非特异性杂交。

[0138] “扩增寡聚体”是这样的寡聚体，该寡聚体的至少3’-端与靶核酸互补，其与靶核酸或其互补序列杂交，并参与核酸扩增反应。扩增寡聚体的实例是与靶核酸杂交并含有在扩增过程中由聚合酶延伸的3’OH末端的“引物”。扩增寡聚体的另一个实例是不被聚合酶延伸(例如，因为其具有3’封端)、但参与或促进扩增的寡聚体。例如，扩增寡核苷酸的5’区域可包含不与靶核酸互补的启动子序列(其可称为“启动子引物”或“启动子提供者”)。本领域技术人员将理解，用作引物的扩增寡聚体可被修饰成包含5’启动子序列，并因此起着启动子引物的作用。结合3’封端进一步修饰了启动子引物，该启动子引物现在能够与靶核酸杂交并提供用于引发转录的上游启动子序列，但是不提供使寡聚体延伸的引物。这种修饰的寡聚体在本文中称为“启动子提供者”寡聚体。扩增寡核苷酸的大小范围包括长度为约10至约70nt(不包括任何启动子序列或或聚腺苷酸尾)并且包含与靶核酸序列(或其互补链)的区域互补的至少约10个连续碱基、或甚至至少12个连续碱基的那些范围。所述连续碱基与扩增寡聚体所结合的靶序列至少80％、或至少90％、或完全互补。扩增寡聚体可任选地包含经修饰的核苷酸或类似物，或者参与扩增反应但不与靶核酸或模板序列互补或不包含在靶核酸或模板序列内的另外的核苷酸。应当理解，当提及寡核苷酸、扩增子或其他核酸的长度的范围时，该范围包括所有整数(例如，19-25个连续核苷酸的长度包括19、20、21、22、23、24和25个连续核苷酸)。

[0139] 如本文中使用的，“启动子”是被DNA依赖性RNA聚合酶(“转录酶”)识别为与核酸结合并在特定位点处开始RNA转录的信号的特异性核酸序列。

[0140] 如本文中使用的，“启动子提供者”或“提供者”是指包括第一区域和第二区域并且被修饰以便防止引发从其3’-端开始的DNA合成的寡核苷酸。启动子提供者寡核苷酸的“第一区域”包含与DNA模板杂交的碱基序列，其中所述杂交序列位于3’端，但不一定与启动子区相邻。启动子寡核苷酸的杂交部分的长度通常至少为10个核苷酸，并且可以延伸最多至50个或更多个核苷酸长度。“第二区域”包含RNA聚合酶的启动子序列。对启动子寡核苷酸进行工程改造，使得其不能被RNA依赖性DNA聚合酶或DNA依赖性DNA聚合酶(例如逆转录酶)延伸，优选地如上所述在其3’-端处包含阻断模块。如本文所提及的，“T7提供者”是阻断的启动子提供者寡核苷酸，其提供被T7RNA聚合酶识别的寡核苷酸序列。

[0141] “扩增”是指用于获得靶核酸序列或其互补序列或其片段的多个拷贝的任何已知程序。多个拷贝可称为扩增子或扩增产物。已知的扩增方法包括热循环和等温扩增方法。在一些实施方案中，优选等温扩增方法。复制酶介导的扩增、聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、链置换扩增(SDA)和转录介导或转录相关的扩增是核酸扩增方法的非限制性实例。复制酶介导的扩增使用自我复制RNA分子和复制酶如QB复制酶(例如美国专利No.4,786,600)。PCR扩增使用DNA聚合酶、引物对和热循环来合成dsDNA的或来自cDNA的两条互补

链的多个拷贝(例如美国专利No.4,683,195,4,683,202和4,800,159)。LCR扩增使用四个或更多个不同的寡核苷酸,通过使用多个循环的杂交、连接和变性来扩增靶标及其互补链(例如美国专利No.5,427,930和US专利No.5,516,663)。SDA使用含有限制性核酸内切酶的识别位点的引物和将包含靶序列的半修饰DNA双链体的一条链打开缺口的核酸内切酶,藉此以一系列引物延伸和链置换步骤的方式发生扩增(例如,美国专利No.5,422,252;美国专利No.5,547,861;和美国专利No.5,648,211)。优选的实施方案使用适合于扩增RNA靶核酸的扩增方法,比如转录介导的扩增(TMA)或NASBA,但是本领域普通技术人员显而易见的是本文中公开的寡聚体可以容易地用作其他扩增方法中的引物。

[0142] "转录相关扩增",本文中也称为"转录介导的扩增"(TMA),是指使用RNA聚合酶从核酸模板产生多个RNA转录物的核酸扩增。这些方法通常采用RNA聚合酶、DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸、核糖核苷三磷酸和包含启动子序列的模板互补寡核苷酸,并且任选地可以包括一种或多种其他寡核苷酸。TMA方法是如本文所述的用于扩增和检测HSV靶序列的扩增方法的实施方案。转录相关扩增的变型是本领域熟知的,如先前详细公开的那些文献(例如,美国专利No.4,868,105;5,124,246;5,130,238;5,399,491;5,437,990;5,554,516;和7,374,885;以及PCT公开号WO 88/01302、WO 88/10315和WO 95/03430)。本领域普通技术人员将理解,所公开的组合物可用于基于通过聚合酶延伸寡聚体序列的扩增方法。

[0143] 如本文中使用的,术语"实时TMA"是指通过实时检测手段监测的靶核酸的单引物转录介导的扩增("TMA")。

[0144] 与"扩增产物"可互换使用的术语"扩增子"是指在扩增程序期间产生的与靶序列中包含的序列互补或同源的核酸分子。这些术语可以用于指单链扩增产物、双链扩增产物或双链扩增产物的一条链。

[0145] 在本文中可互换使用的"探针"、"检测探针"、"检测寡核苷酸"和"检测探针寡聚体"是指这样的核酸寡聚体,在促进杂交以允许检测靶序列或经扩增核酸的条件下,该核酸寡聚体与核酸或经扩增核酸中的靶序列特异性杂交。检测可以是直接的(例如,探针直接与其靶序列杂交)或间接的(例如,探针经由中间分子结构连接至其靶上)。探针可以是DNA、RNA、其类似物或其组合,并且它们可以被标记或未标记。探针的"靶序列"通常是指在较大核酸序列内的通过标准碱基配对与探针寡聚体的至少一部分特异性杂交的较小核酸序列。探针可包含靶特异性序列和有助于探针的三维构象的其他序列(例如,美国专利No.5,118,801;5,312,728;6,849,412;6,835,542;6,534,274;和6,361,945;以及美国公开No.20060068417)。在优选的实施方案中,检测探针包含2'甲氧基骨架,其可导致获得更高的信号。

[0146] 术语"TaqMan®探针"是指含有通常在5'碱基上的荧光染料和通常在3'碱基上的非荧光淬灭染料(猝灭剂)的检测寡核苷酸。当被照射时,激发的荧光染料将能量转移到附近的淬灭染料分子而不是发荧光,从而产生非荧光底物。在扩增过程中,聚合酶的外切核酸酶活性切割TaqMan探针以将荧光团与猝灭剂分离,从而允许从荧光团发出未猝灭的信号作为扩增的指示物。

[0147] 如本文中使用的,"标记物"是指直接或间接与探针接合的被检测到或产生可检测信号的模块或化合物。可通过将标记物连接到探针的键或相互作用进行直接标记,所述键或相互作用包括共价键或非共价相互作用,例如氢键、疏水和离子相互作用,或形成螯合物

或配位络合物。可通过使用桥接模块或“接头”进行间接标记，所述桥接模块或“接头”诸如结合对成员、抗体或另外的寡聚体，其被直接标记或间接标记，并且可以放大可检测信号。标记物包括任何可检测模块，诸如放射性核素、配体(例如生物素、亲和素)、酶或酶底物、反应性基团或发色团(例如，赋予可检测颜色的染料、颗粒或小珠)、发光化合物(例如，生物发光标记物、磷光标记物或化学发光标记物)或荧光团。标记物在均相测定法中可以是可检测的，在均相测定法中，混合物中的结合标记探针表现出与未结合标记探针不同的可检测变化，例如不稳定性或有差别的降解性质。在没有从未结合形式的标记物或标记探针以物理方式去除结合形式的标记物或标记探针的情况下，可以检测“均相可检测标记物”(例如，美国专利No.5,283,174、5,656,207和5,658,737)。标记物包括化学发光化合物，例如吖啶酯(“AE”)化合物，其包括标准AE和衍生物(例如美国专利No.5,656,207、5,658,737和5,639,604)。将标记物连接到核酸上和检测标记物的合成和方法是熟知的(例如，Sambrook等人，Molecular Cloning,A Laboratory Manual，第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989)，第10章；美国专利No.5,658,737、5,656,207、5,547,842,5,283,174、和4,581,33)。可以在特定探针上存在多于一个的标记物和多于一种类型的标记物，或者可以使用探针的混合物进行检测，其中每个探针用产生可检测信号的化合物标记(例如，美国专利No.6,180,340和6,350,579)。

[0148] 如本文中使用的，称为“分子火炬”的结构被设计为包括通过接合区域(“靶结合结构域”)连接并且在预定的杂交测定条件下彼此杂交的不同的自身互补性区域(“闭合结构域”)。包含靶闭合结构域的全部或部分核苷酸序列也可用作靶结合结构域。因此，靶闭合序列可以包括靶结合序列、非靶结合序列及其组合。

[0149] 本文中可互换使用的“捕获探针”、“捕获寡核苷酸”、“靶捕获寡核苷酸”和“捕获探针寡聚体”是指这样的核酸寡聚体，所述核酸寡聚体通过标准碱基配对与靶核酸中的靶序列特异性杂交并且与固定化探针上的结合配偶体接合以将靶核酸捕获到支持物上。捕获寡聚体的一个实例包括包含靶杂交序列和固定的探针结合区域这两个结合区域的寡核苷酸。作为该实施例的变型，这两个区域可以存在于通过一个或多个接头接合在一起的两个不同的寡聚体上。捕获寡聚体的另一个实施方案，其靶杂交序列是包括随机或非随机聚GU、聚GT或聚U序列以便与靶核酸非特异性结合并将其连接到支持物上的固定化探针的序列(参见例如PCT公开No.WO 2008/016988)。固定化探针结合区域可以是被称为尾的核酸序列。尾包括具有约10个至40个核苷酸(例如，A_{10}至A_{40})或约14至33nt(例如，T_3A_{14}至T_3A_{30})的基本上均聚的尾，其与附着于支持颗粒或支持基质的互补固定序列结合。因此，在一些实施方案中，优选的核酸尾的非限制性实例可以包括$T_{0-4}A_{10-40}$序列。捕获寡聚体的另一个实例包含两个区域，即靶杂交序列和非核酸序列的结合对成员。

[0150] 如本文中使用的，“固定化寡核苷酸”、“固定化探针”或“固定化核酸”是指使捕获寡聚体直接或间接地与支持物接合的核酸结合配偶体。与支持物接合的固定化探针有助于将样品中的捕获探针结合的靶与未结合的材料分离。固定化探针的一个实施方案是与支持物接合的寡聚体，其有助于将样品中的结合靶序列与样品中未结合的材料分离。支持物可以包括已知的材料，例如可以由硝酸纤维素、尼龙、玻璃、聚丙烯酸酯、混合聚合物、聚苯乙烯、硅烷、聚丙烯、金属或其他组合物制成的游离在溶液中的基质和颗粒，其中一个实施方案是磁吸引的颗粒。支持物可以是单分散磁性球(例如，均匀大小±5%)，固定化探针直接

(通过共价键、螯合或离子相互作用)或间接(通过一个或多个接头)接合到其上,其中探针与支持物之间的键或相互作用在杂交条件下是稳定的。

[0151] 附图简述

[0152] 图1A展示了乳杆菌属16S核糖体RNA基因(卷曲乳杆菌菌株ATCC 33820的16S核糖体RNA基因,部分序列,以登录号NR_041800.1GI:343201103在GenBank中可见)的参考序列(SEQ ID NO:1)。图1B展示了詹氏乳杆菌16S核糖体RNA基因(部分序列,GenBank登录号NR_025087.1GI:219857499)的参考序列(SEQ ID NO:88)。

[0153] 图2展示了乳杆菌属16S核糖体RNA基因(加氏乳杆菌的部分16S核糖体RNA基因,典型菌株CIP 102991T菌株,以登录号HE573914.1GI:341599788在GenBank中可见)的参考序列(SEQ ID NO:2)。

[0154] 图3展示了阴道加德纳菌的16S核糖体RNA基因(阴道加德纳菌菌株594的16S核糖体RNA基因,完整序列,以登录号NR_044694.2GI:545589071在GenBank中可见)的参考序列(SEQ ID NO:3)。

[0155] 图4展示了埃格特菌属的16S核糖体RNA基因(未培养的埃格特菌属物种克隆123-f2 68的16S核糖体RNA基因,部分序列,以登录号AY738656.1GI:52222145在GenBank中可见)的参考序列(SEQ ID NO:4)。

[0156] 描述

[0157] 本发明总体上涉及确定样品中选择性细菌生物的存在或缺失的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供了用于诊断受试者的细菌性阴道病(BV)的方法和组合物。在其他非相互排斥的实施方案中,本发明提供了检测样品中的乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的任何一种或多种的方法,其中所述方法包括进行来自乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的一种或多种的16S rRNA靶核酸的基于扩增的检测。本发明进一步提供了包含用于检测样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的任何一种或多种的寡聚体组合的组合物(包括反应混合物)和试剂盒。寡聚体组合通常包括用于检测样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的一种或多种的至少两种扩增寡聚体,并且可以进一步包括如本文所述的用于进行乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的基于扩增的检测的一种或多种另外的寡聚体,例如像,捕获探针和/或检测探针。

[0158] BV诊断方法通常包括检测在疑似患有BV的受试者的样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的一种或多种的存在或缺失。具体而言,对乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者的样品的特异性检测、或者对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者的样品的特异性检测进行了分析。基于检测测定法的结果,对乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者,或者对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者指定阳性状态或阴性状态,并且基于所指定的乳杆菌属物种状态、阴道加德纳菌状态和埃格特菌属物种状态的组合,或者基于所指定的乳杆菌属物种状态和阴道加德纳菌状态的组合来确定受试者BV的存在或缺失。

[0159] 具体地说,在对乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种的每一者指定阳性状态或阴性状态的情况下,阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阴性状态指示受试者中缺失BV,阴道加德纳菌和埃格特菌属物种两者的阳性状态指示受试者中存在BV。此外,如

果乳杆菌属物种的状态为阳性，那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中的至少一者的阴性状态指示受试者中缺失BV，如果乳杆菌属物种的状态为阴性，那么阴道加德纳菌和埃格特菌属中的至少一者的阳性状态指示受试者中存在BV。下表1显示了基于乳杆菌属、阴道加德纳菌和埃格特菌属的组合状态的BV指示矩阵。

[0160] 表1：基于乳杆菌属、阴道加德纳菌、和埃格特菌属的细菌性阴道病指示矩阵

[0161]

乳杆菌属状态	阴道加德纳菌状态	埃格特菌属状态	BV
+	+	+	是
+	+	−	否
+	−	+	否
−	−	−	否
−	+	−	是
−	−	+	是
−	+	+	是
+	−	−	否

[0162] 或者，在对乳杆菌属物种和阴道加德纳菌的每一者指定阳性状态或阴性状态的情况下，阴道加德纳菌的阴性状态指示受试者中缺失BV。此外，如果阴道加德纳菌的状态为阳性，那么乳杆菌属物种的阳性状态指示受试者中缺失BV，而乳杆菌属物种的阴性状态指示受试者中存在BV。然而值得注意的是，样品中阴道加德纳菌的高拷贝数(例如≥1.4e10拷贝/mL)的存在是受试者中BV的阳性指标。下表2显示了基于乳杆菌属和阴道加德纳菌的组合状态的BV指示矩阵。

[0163] 表2：基于乳杆菌属和阴道加德纳菌的细菌性阴道病指示矩阵

[0164]

乳杆菌属状态	阴道加德纳菌状态	BV
+	+	否
+	−	否
−	+	是
−	−	否

[0165] 虽然可以使用任何适合的方法检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、和/或埃格特菌属物种，目前优选使用基于核酸的检测测定法来检测这些细菌。根据本发明的基于核酸的检测测定法，通常利用与乳杆菌属物种、阴道加德纳菌或埃格特菌属物种靶核酸特异性杂交的与疑似存在于样品中的其他核酸具有最小的交叉反应性的寡核苷酸。因此，用于乳杆菌属物种、阴道加德纳菌或埃格特菌属物种的选择物种的基于核酸的检测的寡核苷酸将与其他细菌属的物种具有最小的交叉反应性，所述其他细菌属的物种包括例如毛滴虫(Trichomonas sp)；阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis)；假丝酵母属(Candida sp.)；梭菌目(Clostridiales)细菌；梭菌样种类(Clostridium-like sp.)；阿托波菌属(Atopobium sp.)；阴道阿托波菌(Atopobium vaginae)；肠杆菌；微小消化链球菌(Peptostreptococcus micros)；克氏气球菌(Aerococcus christensenii)；羊膜纤毛菌(Leptotrichia amnionii)；蛋白胨菌属(Peptoniphilus sp.)；戴阿李斯特杆菌属(Dialister sp.)；人型

支原体(Mycoplasma hominis)；血斯尼斯菌(Sneathia sanguinegens)；四联厌氧球菌(Anaerococcus tetradius)；动弯杆菌属(Mobiluncus sp.)；人型动弯杆菌(Mobiluncus hominis)；巨球菌属(Megasphaera sp.)；普雷沃菌属(Prevotella sp.)；血纤毛菌(Leptotrichia sanguinegens)；和大芬戈尔德菌(Finegoldia magna)。在一个方面，根据本发明的基于核酸的检测测定法进一步包括用于检测这些生物中的一种或多种、或与BV相关的其他细菌属的组分。

[0166] 在具体实施方案中，基于核酸的检测测定法靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA或编码16S rRNA的基因。特适别合的16S rRNA或编码基因的靶区域是(i)对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的乳杆菌属物种16S rRNA区域；(ii)对应于的SEQ ID NO:2的从约第90位核苷酸至约第263位核苷酸的区域的乳杆菌属物种16S rRNA区域；(iii)对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域的阴道加德纳菌16S rRNA区域；和(iv)对应于SEQ ID NO:4从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域的埃格特菌属物种16S rRNA区域。在如上所述的靶向16S rRNA区域的基于核酸的检测测定法的具体变型中，(a)乳杆菌属特异性寡核苷酸包括这样的靶杂交区域，所述靶杂交区域包含：基本上对应于SEQ ID NO:6所示序列的序列，基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45所示序列的序列，基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45所示序列的序列，基本上对应于SEQ ID NO:9所示序列的序列，或基本对于SEQ ID NO:10的残基6-21所示序列的序列；(b)阴道加德纳菌特异性寡核苷酸包括这样的靶杂交区域，所述靶杂交区域包含：基本上对应于SEQ ID NO:12所示序列的序列，基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45所示序列的序列，或基本上对应于SEQ ID NO:14的残基1-19所示序列的序列；和/或(c)埃格特菌属特异性寡核苷酸包括靶杂交区域，所述靶杂交区域包含：基本上对应于SEQ ID NO:16所示序列的序列，基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51所示序列的序列，或基本上对应于SEQ ID NO:18所示序列的序列。在一些这样的实施方案中，(a)乳杆菌属特异性寡核苷酸包括这样的靶杂交区域，所述靶杂交区域包含或其组成为：SEQ ID NO:6所示的序列，SEQ ID NO:7的残基28-45所示的序列，SEQ ID NO:8的残基28-45所示的序列，或SEQ ID NO:9所示的序列；(b)阴道加德纳菌特异性寡核苷酸包括这样的靶杂交区域，所述靶杂交区域包含或其组成为：SEQ ID NO:12所示的序列，SEQ ID NO:13的残基28-45所示的序列，或SEQ ID NO:14的残基1-19所示的序列；和/或(c)埃格特菌属特异性寡核苷酸包括这样的靶杂交区域，所述靶杂交区域包含或其组成为：SEQ ID NO:16所示的序列，SEQ ID NO:17的残基28-51所示的序列，或SEQ ID NO:18所示的序列。在某些实施方案中，基于核酸的检测测定法使用至少两个或三个乳杆菌属特异性寡核苷酸，至少两个或三个阴道加德纳菌特异性寡核苷酸，和/或至少两个或三个埃格特菌属特异性寡核苷酸，其可以是选自上面指定的寡核苷酸。

[0167] 在包括使用核酸碱基检测测定法的方法的一些实施方案中，使用基于扩增的测定法来检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种。这样的变型通常包括使用体外核酸扩增反应扩增细菌靶核酸内的靶序列，并通过例如使扩增产物与提供信号的核酸检测探针特异性杂交来检测扩增产物，以指示样品中细菌靶的存在。如果样品中存在靶核酸的话，扩增步骤包括使样品与靶核酸中的靶序列(例如，16S rRNA中的靶序列)特异的两个或更多个扩增寡聚体接触，以产生扩增产物。例如，通过使用模板链使用至少一种核酸聚合

酶延伸扩增寡聚体(引物)的序列,扩增合成靶序列或其互补序列的额外拷贝。检测扩增产物的一个实施方案使用这样的杂交步骤,所述杂交步骤包括:使扩增产物与至少一个探针接触,所述至少一个探针对于选定扩增寡聚体所扩增的序列(例如,包含在靶序列中的侧翼为一对选定扩增寡聚体的序列)是特异性的。适合的扩增方法包括例如复制酶介导的扩增、聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、链置换扩增(SDA)和转录介导的或转录相关扩增(TMA)。这样的扩增方法是本领域熟知的(参见,例如,上文定义部分中的扩增方法的论述),并且根据本发明方法易于使用。

[0168] 例如,使用TMA扩增的一些扩增方法包括以下步骤。简言之,以单链核酸(例如,ssRNA或ssDNA)的形式提供含有待扩增序列的靶核酸。本领域技术人员将理解,可以使用双链核酸(例如,双链DNA)的常规融合来提供单链靶核酸。启动子引物与靶核酸上的靶序列特异性结合,并且逆转录酶(RT)使用靶链作为模板延伸启动子引物的3'端,以产生靶序列链的cDNA拷贝,从而生成RNA:DNA双链体。RNA酶消化RNA:DNA双链体的RNA链,第二引物与其靶序列特异性结合,所述靶序列位于启动子引物端下游的cDNA链上。RT通过使用第一cDNA模板延伸第二引物的3'端来合成新的DNA链,以产生含有功能启动子序列的dsDNA。然后,启动子序列特异的RNA聚合酶启动转录以产生RNA转录物,所述RNA转录物为反应中初始靶链的约100至1000个扩增拷贝("扩增子")。当第二引物与每个扩增子中的靶序列特异性结合时,扩增继续进行,并且RT从扩增子RNA模板产生DNA拷贝,从而产生RNA:DNA双链体。反应混合物中的RNA酶从RNA:DNA双链体消化扩增子RNA,并且启动子引物与新合成DNA中的互补序列特异性结合。RT延伸启动子引物的3'端以产生含有功能启动子的dsDNA,RNA聚合酶与所述功能启动子结合以转录与靶链互补的另外的扩增子。在反应过程中,重复产生更多扩增子拷贝的自催化循环,导致样品中存在的靶核酸扩增约十亿倍。可以通过使用与包含在扩增产物中的靶序列特异性结合的探针,在扩增期间或扩增反应结束时实时检测扩增产物。由结合探针产生的信号的检出指示样品中靶核酸的存在。

[0169] 在一些实施方案中,所述方法利用"反向"TMA反应。在这样的变型中,初始或"正向"扩增寡聚体是与靶区域的3'端附近的靶核酸杂交的引发寡核苷酸。逆转录酶(RT)通过使用靶核酸作为模板延伸引物的3'端来合成cDNA链。第二或"反向"扩增寡聚体是具有靶杂交序列的启动子引物或启动子提供者,所述靶杂交序列配置为与包含在合成的cDNA链中的靶序列杂交。当第二扩增寡聚体是启动子引物时,RT使用cDNA链作为模板延伸启动子引物的3'端,以产生靶序列链的第二cDNA拷贝,由此产生含有功能启动子序列的dsDNA。然后,基本上如上所述,利用RNA聚合酶从启动子序列启动转录而继续扩增。或者,当第二扩增寡聚体是启动子提供者时,通常利用与靶区域的5'端附近的靶序列杂交的终止寡核苷酸来终止在终止寡核苷酸3'端的引发寡聚体的延伸,由此提供限定的通过从引发寡聚体延伸合成的初始cDNA链的3'端。然后,启动子提供者的靶杂交序列与限定的初始cDNA链的3'端杂交,延伸cDNA链的3'端以添加与启动子提供者的启动子序列互补的序列,导致双链启动子序列形成。然后,使用识别双链启动子并启动从其转录的RNA聚合酶,将初始cDNA链用作模板来转录与初始cDNA链(不包括启动子部分)互补的多个RNA转录物。然后,这些RNA转录物中的每一个可用作模板,进行从第一引发扩增寡聚体的进一步扩增。

[0170] 在包括基于扩增的检测测定法的某些实施方案中,使用至少两种扩增寡聚体的组合来检测乳杆菌属物种16S rRNA或编码乳杆菌属物种16S rRNA的基因。寡聚体组合可以包

括第一和第二扩增寡聚体，用于扩增对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的乳杆菌属物种核酸靶区域、和/或对应于SEQ ID NO:2的从约第90位核苷酸至约第263位核苷酸的区域的乳杆菌属物种核酸靶区域。例如，在一些实施方案中，第一扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:6的核苷酸序列的靶杂交序列。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:7的残基28-45或SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:6的核苷酸序列的靶杂交序列。在一些实施方案中，在第一扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:7的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列的情况下，所述扩增检测测定法进一步利用第三扩增寡聚体，所述第三扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列；在一些这样的变型中，第三扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:8的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列。在如上所述的一些实施方案中，至少一个扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列(例如，T7启动子序列，例如像SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列)；在一些这样的实施方案中，第一扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，和/或如果存在的话，第三扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体由SEQ ID NO:7的核苷酸序列组成，第二扩增寡核苷酸由SEQ ID NO:6的核苷酸序列组成，和/或如果存在的话，第三扩增寡聚体由SEQ ID NO:8的核苷酸序列组成。

[0171] 在包括基于扩增的检测测定法的某些实施方案中，使用至少两种扩增寡聚体的组合来检测阴道加德纳菌16S rRNA或编码阴道加德纳菌16S rRNA的基因。寡聚体组合可以包括这样的第一和第二扩增寡聚体，其用于扩增对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域的阴道加德纳菌核酸靶区域。例如，在一些实施方案中，第一扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:12的核苷酸序列的靶杂交序列。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:13的残基28-45的核苷酸序列的靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:12的核苷酸序列的靶杂交序列。在如上所述的一些实施方案中，至少一个扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列(例如，T7启动子序列，例如像SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列)；在一些这样的实施方案中，第一扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体由SEQ ID NO:13的核苷酸序列组成和/或第二扩增寡聚体由SEQ ID NO:12的核苷酸序列组成。

[0172] 在包括基于扩增的检测测定法的某些实施方案中，使用至少两种扩增寡聚体的组合来检测埃格特菌属物种16S rRNA或编码埃格特菌属物种16S rRNA的基因。寡聚体组合可以包括这样的第一和第二扩增寡聚体，其用于扩增对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位的区域的埃格特菌属物种的核酸靶区域。例如，在一些实施方案中，第一扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括基本上对应于SEQ ID NO:16的核苷酸序列的靶杂交序列。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:17的残基28-51的核苷酸序列的

靶杂交序列，和/或第二扩增寡聚体包括包含或其组成为SEQ ID NO:16的核苷酸序列的靶杂交序列。在如上所述的一些实施方案中，至少一个扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者，其进一步包含位于相应靶杂交序列5'的启动子序列(例如，T7启动子序列，例如像SEQ ID NO:7的残基1-27的核苷酸序列)；在一些这样的实施方案中，第一扩增寡聚体是启动子引物或启动子提供者。在更具体的变型中，第一扩增寡聚体由SEQ ID NO:17的核苷酸序列组成和/或第二扩增寡聚体由SEQ ID NO:16的核苷酸序列组成。

[0173] 可以通过检测与扩增的靶序列特异性相关的信号的多种方法来完成扩增产物的检测。核酸可以与导致物理变化(如可检测的电变化)的表面相关联。扩增的核酸的检测可以通过如下进行：将扩增的核酸浓缩在基质中或基质上并检测与它们相关联的核酸或染料(例如，诸如溴化乙锭或核酸绿(cyber green)的嵌入剂)，或检测与溶液相中的核酸相关联的染料的增加。其他检测方法可以使用被配置为与扩增产物中的序列特异性杂交的核酸检测探针，并检测探针：产物复合物的存在，或借助于使用可以扩增与扩增产物相关联的可检测信号的探针复合物(例如，美国专利No.5,424,413;5,451,503;和5,849,481；各自通过提述并入本文)。与扩增产物特异性相关联的直接或间接标记的探针提供指示样品中存在靶核酸的可检测信号。例如，如果靶核酸是乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA，那么扩增产物将包含16S rRNA中的靶序列或与16S rRNA中的序列互补的靶序列，并且探针将直接或间接地与包含在扩增产物中的序列结合，以指示测试样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA的存在。

[0174] 与互补的扩增序列杂交的检测探针可以是DNA或RNA寡聚体，或者是含有DNA和RNA核苷酸的组合的寡聚体，或者是用修饰的骨架合成的寡聚体，例如包含一个或多个2'-甲氧基取代的核糖核苷酸的寡聚体。用于检测扩增序列的探针可以是未标记的且被间接地检测(例如，通过另一个结合配偶体与探针上的模块的结合)的，或者可用多种可检测标记物进行标记。在BV诊断方法的一些实施方案中，例如在使用转录介导扩增(TMA)的某些实施方案中，检测探针是线性的化学发光标记的探针，例如像，线性的吖啶酯(AE)标记的探针。

[0175] 检测步骤还可以提供关于扩增序列的附加信息，例如像，其核酸碱基序列的全部或部分。检测可以在扩增反应完成之后进行，或者可以与扩增靶区域同时进行，例如实时地进行。在一个实施方案中，检测步骤允许均相检测，例如杂交探针的检测，而不从混合物中除去未杂交探针(参见，例如，美国专利No.5,639,604和5,283,174，各自通过提述并入本文)。

[0176] 在当扩增步骤接近结束时或在结束时检测扩增产物的实施方案中，可以使用线性检测探针来提供指示探针与扩增产物的杂交的信号。这样的检测的一个实例使用与靶核酸杂交的发光标记探针。然后使发光标记物从非杂交探针水解。使用发光计通过化学发光进行检测。(参见，例如，国际专利申请公开号WO89/002476，将其通过提述并入本文)。在使用实时检测的其他实施方案中，检测探针可以是发夹探针，例如像，分子信标、分子火炬或杂交开关探针，所述杂交开关探针用报告模块加以标记，该报告模块在探针与扩增产物结合时被检测到。这样的探针可以包含靶杂交序列和非靶杂交序列。以前已经描述了各种形式的这种探针(参见，例如，美国专利No.5,118,801;5,312,728;5,925,517;6,150,097;6,849,412;6,835,542;6,534,274;和6,361,945;和美国专利申请公开号20060068417A1和20060194240A1；将其各自通过提述并入本文)。

[0177] 在包括基于扩增的检测测定法的某些实施方案中，所述检测测定法靶向乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA或编码乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA的基因，所述方法利用与乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的16S rRNA扩增产物特异性杂交的一种或多种检测探针。在特定变型中，乳杆菌属特异性检测探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的核酸靶区域；和/或对应于的SEQ ID NO:2的从约第90位核苷酸至约第263位核苷酸的区域的乳杆菌属物种核酸靶区域；阴道加德纳菌特异性检测探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域的核酸靶区域；和/或埃格特菌属特异性探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域的核酸靶区域。例如，在一些变型中，用于检测乳杆菌属物种扩增产物的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:9的序列的靶杂交序列或基本上对应于SEQ ID NO:10的序列的残基6-21的序列(例如，包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列的探针)。在一些变型中，用于检测阴道加德纳菌扩增产物的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:14的序列的残基1-19的序列的靶杂交序列(例如，包含SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列的探针)。在一些变型中，用于检测埃格特菌属物种扩增产物的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:18的序列的靶杂交序列(例如，包含SEQ ID NO:18的靶杂交序列的探针)。在某些实施方案中，用于检测乳杆菌属物种扩增产物的探针包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列或由其组成；用于检测阴道加德纳菌扩增产物的探针包含SEQ ID NO:14的序列或由其组成；和/或用于检测埃格特菌属物种扩增产物的探针包含SEQ ID NO:18的序列或由其组成。

[0178] 在包括使用核酸碱基检测测定法的方法的一些实施方案中，使用基于非扩增的测定法来检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种。在一些这样的实施方案中，基于非扩增的测定法是包括特异性检测探针与靶核酸杂交的杂交测定法。在本领域中，已充分开发了用于进行多核苷酸杂交测定法的方法。杂交测定法的程序和条件将根据应用而变化，并且根据已知的一般结合方法加以选择，所述接合方法包括在Maniatis等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版，Cold Spring Harbor,N.Y.,2002)，以及Berger和Kimmel,Methods in Enzymology,Vol.152,Guide to Molecular Cloning Techniques(Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.,1987)提及的那些方法。通常，在允许特异性核酸杂交的条件下将探针和样品混合，然后检测探针与其相应靶标的特异性杂交。核酸杂交适用于多种测定形式。一种适合的形式是夹心测定形式，其特别适用于在非变性条件下的杂交。夹心型测定的主要组分是固体支持物，固定化核酸探针已经吸附到其上或共价偶联到其上，所述固定化核酸探针是未标记的并且与DNA序列的一部分互补。靶核酸与固定化探针杂交，并且第二标记检测探针-与固定的未标记核酸探针所杂交的相同DNA链的第二不同区域互补-与[靶核酸]:[固定化探针]双链体杂交，以此检测靶核酸。另一个示例性格式利用与固定在适当电极表面(作为信号传感器)上的未标记检测探针杂交的靶核酸的电化学检测。参见，例如，Drummond等人，Nat.Biotechnol.21:1192,2003;Gooding,Electroanalysis 14:1149,2002;Wang,Anal.Chim.Acta 469:63,2002;Cagnin等人，Sensors 9:3122,2009;Katz和Willner,Electroanalysis 15:913,2003;Daniels和Pourmand,Electroanalysis 19:1239,2007。

[0179] 在包括杂交测定法的某些实施方案中，检测探针用于检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种16S rRNA或编码乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种16S rRNA的基因。在这样的实施方案中，用于检测乳杆菌属物种16S rRNA或编码乳杆菌属物种16S rRNA的基因的探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:1的从约第91位核苷酸至约第265位核苷酸的区域的核酸靶区域；和/或对应于SEQ ID NO:2的从约第90位核苷酸至约第263位核苷酸的区域的乳杆菌属物种核酸靶区域；用于检测阴道加德纳菌16S rRNA或编码阴道加德纳菌16S rRNA的基因的探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:3的从约第964位核苷酸至约第1036位核苷酸的区域的核酸靶区域；和/或用于检测埃格特菌属物种16S rRNA或编码埃格特菌属物种16S rRNA的基因的探针与下列区域特异性杂交：对应于SEQ ID NO:4的从约第165位核苷酸至约第259位核苷酸的区域的核酸靶区域。例如，在一些变型中，用于检测乳杆菌属物种16S rRNA或编码乳杆菌属物种16S rRNA的基因的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:9的序列的靶杂交序列或基本上对应于SEQ ID NO:10的序列的残基6-21的序列(例如，包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的残基6-21的靶杂交序列的探针)。在一些变型中，用于检测阴道加德纳菌16S rRNA或编码阴道加德纳菌16S rRNA的基因的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:14的序列的残基1-19的序列的靶杂交序列(例如，包含SEQ ID NO:14的残基1-19的靶杂交序列的探针)。在一些变型中，用于检测埃格特菌属物种16S rRNA或编码埃格特菌属物种16S rRNA的基因的探针包括基本上对应于SEQ ID NO:18的序列的序列的靶杂交序列(例如，包含SEQ ID NO:18的靶杂交序列的探针)。在某些实施方案中，用于检测乳杆菌属物种16S rRNA或编码乳杆菌属物种16S rRNA的基因的探针包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列或由其组成；用于检测阴道加德纳菌16S rRNA或编码阴道加德纳菌16S rRNA的基因的探针包含SEQ ID NO:14的序列或由其组成；和/或用于检测埃格特菌属物种16S rRNA或编码埃格特菌属物种16S rRNA的基因的探针包含SEQ ID NO:18的序列或由其组成。

[0180] 在一些实施方案中，用于检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的基于非扩增的测定法是基于裂解的测定法，其中含有非靶杂交襟翼区域的探针寡核苷酸以重叠依赖性方式被襟翼核酸内切酶切割，从而释放随后被检测到的切割产物。示例性的基于切割的测定法试剂描述于例如Lyamichev等人(Nat.Biotechnol.17:292-296,1999)、Ryan等人(Mol.Diagn.4:135-144,1999)和Allawi等人(J.Clin.Microbiol.44:3443-3447,2006)。襟翼核酸内切酶反应的适当条件是已知的或者可以使用本领域已知的方法容易地加以确定(参见，例如，Kaiser等人，J.Biol.Chem.274:2138-721394,1999)。可用于该方法的示例性襟翼核酸内切酶包括水生栖热菌(Thermus aquaticus)DNA聚合酶I、嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)DNA聚合酶I、哺乳动物FEN-1、闪烁古生球菌(Archaeoglobus fulgidus)FEN-1、詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)FEN-1、激烈火球菌(Pyrococcus furiosus)FEN-1、嗜热自养甲烷杆菌(Methanobacterium thermoautotrophicum)FEN-1、嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)FEN-1、CLEAVASE®(Hologic,Inc.,Madison,WI)、酿酒酵母RTH1、酿酒酵母RAD27、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)rad2、噬菌体T5 5'-3'核酸外切酶、掘越氏火球菌(Pyrococcus horikoshii)FEN-1、人核酸内切酶1、小牛胸腺5'-3'核酸外切酶，包括其在真细菌、真核生物和古细菌中的同源物，比如结构特异性酶的II类家族成员、以及其酶活性突

变体或变体。襟翼内切核酸酶的描述可以发现于例如Lyamichev等人,Science 260:778-783,1993;Eis等人,Nat.Biotechnol.19:673-676,2001;Shen等人,Trends in Bio.Sci.23:171-173,1998;Kaiser等人,J.Biol.Chem.274:21387-21394,1999;Ma等人,J.Biol.Chem.275:24693-24700,2000;Allawi等人,J.Mol.Biol.328:537-554,2003;Sharma等人,J.Biol.Chem.278:23487-23496,2003;和Feng等人,Nat.Struct.Mol.Biol.11:450-456,2004。

[0181] 在某些变型中,基于切割的测定法检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的RNA靶核酸,并且基于切割的测定法利用能够切割RNA:DNA线性双链体结构的襟翼内切核酸酶。在一些替代实施方案中,基于切割的测定法检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的DNA靶核酸,并且基于切割的测定法利用能够切割DNA:DNA线性双链体结构的襟翼内切核酸酶。能够切割RNA:DNA双链体的示例性襟翼内切核酸酶包括栖热菌属的聚合酶缺陷型5'核酸酶以及某些CLEAVASE®酶(Hologic,Inc.,Madison,WI),例如CLEAVASE®BN(Bst X NotI缺失的Taq聚合酶,参见美国专利No.5,614,402)、CLEAVASE®II(全长Taq聚合酶的"AG"突变体,参见美国专利No.5,614,402)、CLEAVASE®VII(全长嗜热栖热菌聚合酶的合成缺陷型突变体)、CLEAVASE®IX(Tth DNA聚合酶的聚合酶缺陷型突变体)和CLEAVASE®XII(由taq DNA聚合酶和Tth DNA聚合酶的片段构建的聚合酶缺陷型嵌合聚合酶)。能够切割DNA:DNA双链体的示例性襟翼核酸内切酶包括上述襟翼内切核酸酶,以及CLEAVASE®2.0(闪烁古生球菌FEN-1)、CLEAVASE®2.1(C端上具有6个组氨酸的闪烁古生球菌FEN-1)、CLEAVASE®3.0(混毒古生球菌FEN-1)和CLEAVASE®3.1(C端上具有6个组氨酸的混毒古生球菌FEN-1)。

[0182] 在一些实施方案中,基于切割的测定法检测乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的RNA靶核酸,并且所述测定法包括合成RNA靶区域的DNA互补序列的步骤,然后将cDNA链与重叠的第一和第二探针寡核苷酸杂交以形成被襟翼核酸内切酶切割的线性双链体切割结构。使用RNA依赖性DNA聚合酶(逆转录酶)从RNA模板合成cDNA的反应条件是本领域熟知的。

[0183] 在使用基于核酸的检测测定法的某些实施方案中,所述方法进一步包括自样品中的其他组分纯化乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种靶核酸。这样的纯化可以包括使包含在样品中的生物体与其他样品组分分离和/或将其浓缩的方法。在特定实施方案中,纯化靶核酸包括捕获靶核酸,以便特异性或非特异性地使靶核酸与其他样品组分分离。非特异性靶捕获方法可能涉及从基本上水性的混合物中选择性沉淀核酸,将核酸粘附至经过洗涤除去其他样品组分的支持物上,或从含有乳杆菌属物种、阴道加德纳菌、和/或埃格特菌属物种核酸和其他样品组分的混合物中物理分离核酸的其他手段。

[0184] 在一些实施方案中,通过乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种靶核酸(例如,16S rRNA靶核酸或编码16S rRNA的基因)与捕获探针寡聚体杂交而将所述靶核酸与其他样品组分分离。捕获探针寡聚体包含这样的靶杂交序列,其被配置为与靶核酸特异性或非特异性杂交以形成与其他样品组分分离的[靶核酸]:[捕获探针]复合物。包含适合于靶核酸的非特异性捕获的靶杂交序列的捕获探针描述在例如国际PCT公开WO 2008/016988中,将该专利通过提述并入本文。在包括被配置为与乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种16S rRNA靶核酸特异性杂交的靶杂交序列的一些具体的变型中,乳

杆菌属特异性捕获探针包含基本上对应于SEQ ID NO:5的残基1-12的核苷酸序列的靶杂交序列(例如,捕获探针包含SEQ ID NO:5的残基1-12的靶杂交序列);阴道加德纳菌特异性捕获探针包含基本上对应于SEQ ID NO:11的残基1-17的核苷酸序列的靶杂交序列(例如,捕获探针包含SEQ ID NO:11的残基1-17的靶杂交序列);和/或埃格特菌属特异性捕获探针包含基本上对应于SEQ ID NO:15的残基1-21的核苷酸序列的靶杂交序列(例如,捕获探针包含SEQ ID NO:15的残基1-21的靶杂交序列)。在优选的变型中,捕获探针将[靶核酸]:[捕获探针]复合物结合到固定化探针上以形成与样品分离的[靶核酸]:[捕获探针]:[固定化探针]复合物,并且任选地进行洗涤以除去非靶样品组分(参见,例如,美国专利号6,110,678;6,280,952;和6,534,273;各自通过提述并入本文)。在这样的变型中,捕获探针寡聚体进一步包含将捕获探针及其结合的靶序列附接到附着于固体支持物的固定化探针上的序列或模块,从而允许杂交的靶核酸与其他样品组分分离。

[0185] 在更具体的实施方案中,捕获探针寡聚体包括与靶核酸不互补但与固定化探针上的序列特异性杂交的尾部(例如,3'尾),从而用作允许靶核酸与其他样品组分分离的模块,如先前在例如美国专利No.6,110,678中所述,将该专利通过提述并入本文。任何序列可以用于尾区,其通常为约5至50nt长,并且优选的实施方案包括约10至40nt(例如,A_{10}至A_{40})、更优选约14至33nt(例如A_{14}至A_{30}或T_3A_{14}至T_3A_{30})的基本上均聚的尾,其与固体支持物例如基质或颗粒上的互补固定序列(例如,多聚T)结合。在包括被配置为与乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种16S rRNA靶核酸特异性杂交的靶杂交序列的一些这样的实施方案中,乳杆菌属特异性捕获探针包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列或由其组成;阴道加德纳菌特异性捕获探针包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列或由其组成;和/或埃格特菌属特异性捕获探针包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列或由其组成。

[0186] 靶捕获一般发生在溶液相混合物中,该溶液相混合物含有一种或多种捕获探针寡聚体,所述捕获探针寡聚体通常在高于[尾序列]:[固定化探针序列]双链体的T_m的温度的杂交条件下与靶核酸杂交。对于包含捕获探针尾的实施方案,通过调整杂交条件使得捕获探针尾与固定化探针杂交来捕获[靶核酸]:[捕获探针]复合物,然后将固体支持物上的整个复合物与其他样品组分分离。可以将附着有[固定化探针]:[捕获探针]:[靶核酸]的支持物洗涤一次或多次以进一步除去其他样品组分。优选的实施方案使用颗粒状固体支持物,例如顺磁珠,使得具有附着的[靶核酸]:[捕获探针]:[固定化探针]复合物的颗粒可以悬浮在洗涤溶液中并优选通过使用磁吸引从洗涤溶液中回收。在包括使用基于扩增的检测测定法的方法的实施方案中,为了限制处理步骤的数量,可以通过简单地将支持物上的复合物中的靶核酸与扩增寡聚体混合并继续进行扩增步骤来扩增靶核酸。

[0187] 在BV诊断方法的一些实施方案中,其中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的检出指示受试者中的BV,所述方法进一步包括治疗受试者中的BV。BV的治疗方案通常是本领域已知的,并且包括例如施用抗生素药物,如甲硝唑(例如,FLAGYL,METROGEL-VAGINAL)、克林霉素(例如,CLEOCIN,CLINDESSE)、和替硝唑(例如,TINDAMAX)。在某些变型中,受试者以前未曾被诊断为BV。在其他实施方案中,在进行本公开的诊断方法时,受试者先前已经诊断为BV,并且正在接受BV治疗。这样的变型对于监测受试者中的BV治疗特别有用。例如,如果该方法指示受试者中仍存在BV,那么受试者可以继续治疗。在一些实施方案中,将相同的治疗方案(即,在进行本诊断方法时受试者正在进行的相同治疗)重

新施用于受试者。或者，在接受治疗的受试者中，BV的持续存在可能指示需要改变正在进行的治疗，以及向受试者施用不同的治疗方案(例如，不同的药剂或增加的药物剂量和/或频率)。

[0188] 根据本发明，可以针对每个靶独立进行(例如，在单独的反应容器中，顺序地或并行地)，或作为多重反应系统一起进行乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的存在或缺失的检测。因此，在一些实施方案中，本文所述的方法(例如，BV诊断方法)利用多重反应，其中反应混合物包含用于并行测定多个(例如，至少两个、三个、四个或更多个)不同的靶序列的试剂。在这些情况下，反应混合物可以包含用于进行检测测定法的多个不同的靶特异性寡核苷酸。例如，在使用基于扩增的检测测定法的方法中，多重反应可以包含多组(例如，多对)扩增寡聚体(例如，多对PCR引物或多对TMA扩增寡聚体(例如，对于TMA，多对启动子引物和非启动子引物，或多对启动子提供者和非启动子引物))。在使用基于切割的检测测定法的其他实施方案中，多重反应可以包含具有不同襟翼的多个探针寡核苷酸、多个不同的重叠探针寡核苷酸、和用于检测不同襟翼(一旦它们被切割)的多个不同的FRET盒。

[0189] 可以类似地进行另外的微生物检测测定法，以确定涉及BV的多种微生物的存在和/或相对量。仅作为示例，这样的多种微生物可以包括一种或多种厌氧革兰氏阳性球菌；毛滴虫；阴道毛滴虫；假丝酵母属物种；埃格特菌属物种；梭菌目细菌；梭菌样种类；阿托波菌属物种；阴道阿托波菌；肠杆菌；微小消化链球菌；克氏气球菌；羊膜纤毛菌；蛋白胨菌属物种；戴阿李斯特杆菌属；人型支原体；血斯尼斯菌；四联厌氧球菌；动弯杆菌属物种；人型动弯杆菌；香港埃格特菌(Eggerthella hongkongensis)；普雷沃菌属物种；巨球菌属物种；血纤毛菌；和大芬戈尔德菌。测定法可以分开进行或多路进行。因此，BV的诊断可以包括鉴定多种生物以及任选地确定其在样品中的相对丰度。

[0190] 在某些实施方案中，BV诊断方法包括检测不超过10个与BV相关的细菌属。在其他实施方案中，所述方法包括检测不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个或不超过4个与BV相关的细菌属。在一些变型中，所述方法不包括检测乳杆菌属、加德纳菌属和埃格特菌属之外的与BV相关的细菌属。

[0191] 本主题发明还提供了用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和埃格特菌属物种中的任何一者或多者的存在或缺失的寡聚体。在各种实施方案中，所述寡聚体组合包括如本文中所述的寡聚体，其用于确定样品中乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的存在或缺失的方法。在一些变型中，寡聚体组合包括至少一个乳杆菌属特异性寡核苷酸(例如，至少两个或三个乳杆菌属特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)；至少一个阴道加德纳菌特异性寡核苷酸(例如，至少两个或三个阴道加德纳菌特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)；和至少一个埃格特菌属特异性寡核苷酸(例如，至少两个或三个埃格特菌属特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)。在一些变型中，寡聚体组合包括至少两个乳杆菌属特异性寡核苷酸(例如，至少三个乳杆菌属特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)；至少两个阴道加德纳菌特异性寡核苷酸(例如，至少三个阴道加德纳菌特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)；和/或至少两个埃格特菌属特异性寡核苷酸(例如，至少三个埃格特菌属特异性寡核苷酸，各自与不同的靶序列结合)。在一些实施方案中，所述寡聚体组合包括用于扩增乳杆菌属物种核酸靶区域的至少两个乳杆菌属特异性扩

增寡核苷酸;用于扩增阴道加德纳菌核酸靶区域的至少两个阴道加德纳菌特异性扩增寡核苷酸;和/或用于扩增埃格特菌属物种核酸靶区域的至少两个埃格特菌属特异性扩增寡核苷酸。寡聚体组合可以是包含所述寡聚体的反应混合物或试剂盒的形式。反应混合物或试剂盒可进一步包括许多任选的组分,例如像,捕获探针核酸或捕获探针核酸阵列。对于扩增反应混合物,所述反应混合物通常包括适于进行体外扩增的其他试剂,例如缓冲液、盐溶液、适当的三磷酸核苷酸(例如,dATP、dCTP、dGTP、dTTP、ATP、CTP、GTP和UTP)和/或酶(例如,逆转录酶和/或RNA聚合酶),并且通常将包括测试样品组分,其中埃格特菌属、普雷沃菌属和/或乳杆菌属靶核酸可能存在或可能不存在。包含用于扩增乳杆菌属物种、阴道加德纳菌和/或埃格特菌属物种的一个或多个靶核酸区域的寡聚体组合的试剂盒还可以包括适合于进行体外扩增的其他试剂,例如缓冲液、盐溶液、适当的三磷酸核苷酸(例如dATP、dCTP、dGTP、dTTP、ATP、CTP、GTP和UTP)和/或酶(例如,逆转录酶和/或RNA聚合酶)。对于寡聚体组合(例如,反应混合物或试剂盒),其包括检测探针连同靶向共同靶核酸的扩增寡聚体组合,扩增寡聚体和检测探针寡聚体的选择与共同靶区域相联系(即,所述组合将包括与扩增寡聚体组合可扩增的序列结合的探针)。

[0192] 通过以下非限制性实施例进一步说明本发明。

[0193] 实施例1:用于基于RT-TMA的测定法的试剂

[0194] 除非另有说明,在本文所述的基于RT-TMA的测定法中通常使用的试剂包括以下试剂。靶捕获试剂(TCR),通用试剂配方:250mM HEPES、1.88M LiCl、310mM LiOH、100mM EDTA,pH 6.4和250μg/ml顺磁性颗粒(0.7-1.05微米颗粒,$(dT)_{14}$寡聚体与其共价结合的Sera-Mag™ MG-CM)。洗涤溶液:10mM HEPES、150mM NaCl、6.5mM NaOH、1mM EDTA、0.3%(v/v)乙醇、0.02%(w/v)对羟基苯甲酸甲酯、0.01%(w/v)对羟基苯甲酸丙酯和0.1%(w/v)十二烷基硫酸钠,pH 7.5。扩增试剂,实时试剂配方:含有下列物质的溶液:11.61mM Tris碱、14.94mM Tris-HCl、28.5mM $MgCl_2$、23.30mM KCl、3.3%甘油、0.02%PRO CLIN 300、0.05mM醋酸锌二水合物,dATP、dCTP、dGTP和dTTP各0.76mM,ATP、CTP和GTP各6.50mM,7.50mM UTP,可以向其中加入引物。RT-TMA酶:57.46mM HEPES、49.58mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、0.98mM EDTA游离酸、0.039mM EDTA二钠二水合物、0.10v/v TRITON X-100、49.61mM KCl、0.20v/v甘油、0.03w/v海藻糖二水合物、MMLV逆转录酶(RT)和T7 RNA聚合酶。启动子试剂,实时试剂配方:试剂配方与扩增试剂相同。

[0195] 使用双相实时TMA格式,在OEM平台(Stratagene Mx3000)上进行扩增寡聚体和炬的寡核苷酸筛选实验。简言之,将样品与含有靶特异性捕获寡核苷酸(15pmol/rxn)和T7寡核苷酸(5pmol/rxn)的100μl TCR试剂在62℃温育30分钟,然后缓慢降温20分钟至室温。将与TCO和靶rRNA结合的磁珠洗涤并洗脱到含有15pmol/rxn NT7寡核苷酸的扩增试剂中。在加入酶试剂(25μL)和随后加入启动子试剂(25μL)期间,将样品在43℃下温育。所述启动子试剂含有15pmol/rxn T7寡核苷酸和15pmol/rxn Torch寡核苷酸。在Stratagene仪上实时测量荧光发射,每30秒一次,持续1小时,所述荧光发射反映了与靶扩增子rRNA的Torch结合并导致染料与猝灭剂分离。分析靶扩增的荧光曲线分布图。

[0196] 针对乳杆菌属物种靶系统筛选了几种T7寡核苷酸,以确定这些寡核苷酸在测定法中用于总乳杆菌属物种靶检测的最佳组合。选择两种T7寡核苷酸纳入测定法中。开发和测试了另外的火炬寡核苷酸,以便特异性地改进加氏乳杆菌的检测,并降低惰性乳杆菌(非靶

乳杆菌属物种)的交叉检测。几种火炬对加氏乳杆菌显示出良好的性能,其中之一显示最佳地降低了惰性乳杆菌的交叉检测。由于可能包括用于测定法的竞争性内部对照,利用相对于IC检测的针对阴道加德纳菌的T7/NT7寡核苷酸和针对阴道加德纳菌的火炬特异性寡核苷酸,筛选了针对阴道加德纳菌的两种不同的T7寡核苷酸。设计和筛选不同的靶特异性靶捕获寡核苷酸,将用于每个靶系统的测定法的性能与普通的BV靶捕获寡核苷酸进行比较。针对每个BV靶系统选择一种靶特异性TCO。针对乳杆菌属物种靶筛选另外的TCO,选择总体上在三个乳杆菌属物种靶的检测中提供最佳平衡的一种TCO。为优化细菌性阴道病多重测定法筛选的引物的列表列于表1中。

[0197] 遵循靶扩增和检测的优化,对每个BV靶选择寡核苷酸,并在Panther仪器平台上进行随后的实验。扩增和检测反应被配置为扩增和检测所有指定的BV靶以及核酸内部对照。简言之,将裂解的靶与靶捕获寡核苷酸、接合到固定化探针上的磁珠和T7引物合并。提供反应条件以使靶捕获寡核苷酸和T7引物与它们的预期靶杂交。进行一系列洗涤步骤以除去细胞组分、培养和运送培养基等。在洗涤步骤之后,将第一扩增试剂加入到洗涤和捕获的靶核酸中。第一扩增试剂只含有非T7引物。在酶加入之前没有引物退火步骤;在加入酶时开始进行扩增,然后在42℃下温育5分钟。在42℃温育反应5分钟后,将含有作为检测探针的T7引物和火炬的第二扩增试剂加入到第一扩增试剂中。通过用于检测每个不同检测探针上的Fam、Hex、Rox和Cy5.5染料标记的4个单独的荧光计,测量在该步骤中进行的实时检测。

[0198] 实施例2:用于BV靶核酸的扩增和检测的寡聚体组合的敏感性和特异性测试

[0199] 测试掺入Aptima标本运送培养基(STM)的裂解物(对于乳杆菌属物种靶和阴道加德纳菌)或埃格特菌属的体外转录物(IVT)的半对数滴定,评估BV靶标的分析灵敏度。在Panther仪器上以每个面板浓度(N=10个总浓度,对于每个靶)筛选15个重复。以多重试剂盒格式测试寡核苷酸;然而,对每个BV靶进行单独筛选。所述测定法使用TCO引物(15pmol/rxn)、T7引物(5或15pmol/rxn)、NT7引物(15p mol/rxn)和Torch引物(15pmol/rxn)。进行概率分析以确定每个BV靶的95%和50%检测水平。确定在95%概率(95%CL)时的检测限(LoD):卷曲乳杆菌,3.4e4(3.2e4-3.5e4)CFU/ml;詹氏乳杆菌,3.1e3(3.0e3-3.2e3)CFU/ml;加氏乳杆菌,3.2e3(3.1e3-3.2e3)CFU/ml;阴道加德纳菌,107(103-110)CFU/ml;埃格特菌属,1.1e8(1.0e8-1.2e8)拷贝/ml。

[0200] 针对每板具有4-5种生物的16个汇集的面板,对每个BV靶测试最佳引物组的交叉反应性。对于经优化用于检测阴道加德纳菌的引物组,没有观察到任何生物的显著交叉检测。经优化用于检测乳杆菌属物种靶的引物组与筛选的汇集面板之一有交叉反应。另外的实验确定,交叉反应性生物是嗜酸乳杆菌。嗜酸乳杆菌是一种肠道微生物,其被确定对所述测定法没有风险。经优化用于检测埃格特菌属靶的引物组与筛选的汇集面板之一有交叉反应。另外的实验确定,交叉反应性生物是淋病奈瑟球菌。淋病奈瑟球菌为高风险交叉检测,因此对埃格特菌属筛选了另外的引物。新的优化引物组成功消除了高达1e7CFU/ml的淋病奈瑟球菌检测。

[0201] 实施例3:用于检测BV靶核酸的RT-TMA测定法的临床敏感性

[0202] 使用阴道拭子患者标本(n=200,从四个不同的临床场所收集)评估细菌性阴道病测定法的临床性能,包括大约100个阳性样品和100个阴性样品(利用Cartwright标准)。在用于靶检测的每个荧光通道(Fam,Hex,Cy5.5)中,TTime用作截止值:乳杆菌属物种,25分

钟;阴道加德纳菌,12.5分钟;埃格特菌属,40分钟。分析了细菌性阴道病测定法的临床性能:敏感性:93.8%(86.2-97.3),特异性:88.6%(79.7-93.9)。

[0203] 利用98份ThinPrep/阴道拭子配对样品,还评估了临床可行性和细菌性阴道病测定法的性能,包括大致相等量的阳性样品和阴性样品(利用Cartwright标准)。阳性样品的总一致性=93.8%;阴性样品的总一致性=100%;中间样品的总一致性=87.5%。

[0204] 实施例4:用于检测BV靶核酸的RT-TMA测定法的临床敏感性

[0205] 对于该测试,与之前实施例1中描述的那些相比,进行了扩增和启动子试剂配方的调整。扩增试剂,实时试剂配方:含有下列物质的溶液:11.61mM Tris碱、14.94mM Tris-HCl、31.0mM $MgCl_2$、23.30mM KCl、3.3%甘油、0.02%PRO CLIN 300、0.05mM醋酸锌二水合物,dATP、dCTP、dGTP和dTTP各0.83mM,ATP、CTP和GTP各7.00mM,8.00mM UTP,可以向其中加入引物。RT-TMA酶:57.46mM HEPES、49.58mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、0.98mM EDTA游离酸、0.039mM EDTA二钠二水合物、0.10v/v TRITON X-100、49.61mM KCl、0.20v/v甘油、0.03w/v海藻糖二水合物、MMLV逆转录酶(RT)和T7RNA聚合酶。启动子试剂,实时试剂配方:试剂配方与扩增试剂相同。

[0206] 进行寡核苷酸浓度优化实验,以确定用于细菌性阴道病测定法的每种寡核苷酸的最佳浓度。逐步调整寡核苷酸浓度,对以能显示出性能差异的浓度掺入STM的靶IVT进行筛选。根据该测试确定调整寡核苷酸浓度,以优化所述测定法的性能。对于TCR试剂,将乳杆菌属物种、埃格特菌属和加德纳菌属的TCO从15pmol/rxn调整至10pmol/rxn。从TCR试剂中除去所有T7引物。对于扩增试剂,将埃格特菌属的NT7从15pmol/rxn调整至10pmol/rxn,将乳杆菌属和加德纳菌属的NT7从15pmol/rxn调整至5pmol/rxn。对于启动子试剂中的T7寡核苷酸,从配方中除去乳杆菌属物种T7寡核苷酸SEQ ID NO:7,将乳杆菌属T7寡核苷酸SEQ ID NO:8保留在配方中,并从15pmol/rxn调整至4pmol/rxn,将埃格特菌属T7从15pmol/rxn调整至10pmol/rxn,将加德纳菌属T7从15pmol/rxn调整至5pmol/rxn。对于启动子试剂中的火炬寡核苷酸,将用于加氏乳杆菌检测的乳杆菌属物种火炬(SEQ ID NO:10)从15pmol/rxn调整至10pmol/rxn,将用于卷曲乳杆菌和詹氏乳杆菌检测的乳杆菌属物种火炬从15pmol/rxn调整到20pmol/rxn,将加德纳菌属火炬和埃格特菌属火炬从15pmol/rxn调整至20pmol/rxn。

[0207] 使用阴道拭子患者标本(n=353,从三个不同的临床场所收集)评估细菌性阴道病测定法的临床性能,根据培养结果,包括78个阳性样品、41个中间样品、和234个阴性样品。用Amsel标准解析中间状态,产生4个阳性样品和37个阴性样品。如果样品的RFU信号在FAM中超过2000个RFU,在HEX中超过2000个RFU,和/或在ROX中超过1600个RFU,那么确定为阳性标准。FAM通道中的阳性结果对应于乳杆菌属物种的阳性结果,HEX中的阳性结果对应于埃格特菌属的阳性结果,ROX通道中的阳性结果全部对应于加德纳菌属的阳性结果。没有使用TTime截止值来确定阳性结果。在包括埃格特菌属靶和不包括埃格特菌属靶的情况下,针对敏感性和特异性分析了细菌性阴道病测定法的临床性能。在具有埃格特菌属的情况下的所述测定法的敏感性为96.3(89.7-99.2),在没有埃格特菌属的情况下为96.3(89.7-99.2)。在具有埃格特菌属的情况下的所述测定法的特异性为86.7(82.1-90.5),在没有埃格特菌属的情况下为87.5(82.9-91.2)。在从样品测试结果中排除埃格特菌属检测的情况下,获得更好的特异性(特异性提高是由于去除假阳性的缘故)。此外,只有当加德纳菌属也被确定为阳性结果时,才能发现阳性的埃格特菌属结果,并不是单独使用埃格特菌属状态确定BV

阳性样品。结果表明，通过从BV测定法组成中排除埃格特菌属，获得了特异性的提高，因此支持从所述测定法中去除埃格特菌属。

[0208] 表3：筛选的用于细菌性阴道病测定法的寡核苷酸

[0209]

SEQ ID NO:	序列(5' → 3')	类型
12	CTTACCTGGGCTTGACATGTGCCTG	NT7
19	GGATTCATTGGGCGTAAAGC	NT7
6	CGGATGGGTGAGTAAC	NT7
20	GCGTTATCCGGATTCAT	NT7
16	AGCGTTATCCGGATTC	NT7
13	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACCACCT GTGAACCTGC	T7

[0210]

17	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCGGAACCCGGCTCGAGGTTAAG	T7
21	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAGCCTTTACCTTACCA	T7
22	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATACGACAGCTTACGCCGC	T7
23	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATATCTGCGCATTTCACCGCTACAC	T7
8	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAGCCGTTACCTTACCA	T7
7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAGCCCTTACCTTACCA	T7
24	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGACCATGCACCACCTGT	T7
25	GGACUACCAGGGUAUCUAAUCCUGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
11	CAUGCUCCGCCGCUUGUTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
15	GUACCGUCGAUGUCUUCCCUGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
26	GUAGGAGUUUGGGCCGUGUTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
5	UCUGUUAGUUCCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
27	CUUUGAGUUUUAGCCUUGCGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
28	GCAUCGAAUUAAUCCGCAUGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
29	GUAGUUAGCCGGGGCUUCUUCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO

[0211]

30	UACGUAUUACCGCGGCUGTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
31	CGUGUCUCAGUCCCAAUGUGTTTAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
32	CAAUGUGGCCGAUCAGUCTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
33	CCAUUGUGGAAGAUUCCCUACTTTAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
34	CUCGCUCGACUUGCAUGUATTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
35	CUUGCAUGUAUUAGGCACGTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
36	CUUGUAUCUAUGUCCAUUCCTTTAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
37	UGGUGCAAGCACCAAAUUCTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
38	AAUUCAUCUAGGCAAGTTTAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
39	UCCUAACGUCAUUACCTTTAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
40	UCCAUUCCGAAGAATTTAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	TCO
41	UUGCUGCGUCAGGGUUUCCTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
42	GAAAGCGGUUUACAACCCGATTTAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
43	AAGGCCUUCAUCCCGCATTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
44	UCGCCGUUGGUGUUCUUCTTTAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO

[0212]

45	UGACGGCCCAGCAGACUTTTAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
46	UCCUGUUCGCUCCCCCAGCUTTTAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
47	TCCTAACGTCATTACCTTTAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA	TCO
48	GTACCGTCGATGTCTTCCCTGTTTAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
49	CAGCGCUCAUCGUUTTTAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	TCO
50	ACGGAAGAUGUAAUCUCTTTAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAA	TCO
51	GAUGUAAUCUCCCACTTTAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	TCO
52	CCAUUCCGAAGATTTAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAA	TCO
53	AGUUUCAUCUGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	TCO
54	CCGAAGAAUUUCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	TCO
55	UUCAAUAGGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA	TCO
56	CGUCAUUACCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA	TCO
57	CCAAAUUCAUCUTTTAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	TCO
58	AACGUCAUUACCTTTAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	TCO
59	UUUCCUAACGUCTTTAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	TCO
60	CCUGCAGAGAUGUGGUUUCGCAGG	火炬

[0213]

18	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
9	GUCUGGGAUACCACUUGGAAACAGAC	火炬
61	CUGGGAUACCACUUGGAAACACCCAG	火炬
62	UCUGGGAUACCACUUCCAGA	火炬
14	CCUGCAGAGAUGUGGUUUCGCAGG	火炬
63	CCUGCAGAGAUGUGGUUUCGCAGG	火炬
64	GGUUCUGCUAUCACUCUUGGAACC	火炬
65	ACGCAUGUCUAGAGUUGCGU	火炬
66	AGACGCAUGUCUAGAGCGUCU	火炬
67	GAUGCUAAUACCGGAUAACAACGCAUC	火炬
68	UACCGGAUAACAACACUAGACGCCGGUA	火炬
69	GUCUGGGAUACCAUUUGGAAACAGAC	火炬
70	GUCUGGGAUACCACUUGGAAACAGAC	火炬
71	GUCUGGGAUACCACUUGGAAACAGAC	火炬
72	GGUUCUGCUAUCACUCUUGGAACC	火炬
73	GGUUCUGCUAUCACUCUUGGAACC	火炬
74	CGCAUGUCUAGAGUUGCG	火炬
75	ACUCACGCAUGUCUAGAGU	火炬
10	CACUCACGCAUGUCUAGAGUG	火炬
76	GAGACGCAUGUCUAGAGUUGUCUC	火炬
77	GUUGCUCAAGCGGAACCUCGCAAC	火炬
78	UUGCUCAAGCGGAACCUCUAGCAA	火炬
79	GCUCAAGCGGAACCUCUGAGC	火炬
80	AGCGGAACCUCUAAUCUCGUCGCU	火炬
81	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
82	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
83	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
84	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
85	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
86	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬
87	CCGCUCAGGCGGUUGCUCAAGCGG	火炬

[0214] 从上述内容可以理解，虽然为了说明的目的在本文中描述了本发明的具体实施方案，但是可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此，除了所附权利要求书之外，本发明不受限制。出于所有目的，将本文中引用的所有出版物、专利和专利申请的全部内容通过提述并入本文。

序列表

<110> 简·探针公司(GEN-PROBE INCORPORATED)

B·L·伊顿(EATON, Barbara L.)

D·K·格特曼(GETMAN, Damon K.)

T·帕夫洛夫斯基(PAWLOWSKI, Traci)

<120> 用于检测细菌核酸和诊断细菌性阴道病的方法和组合物

<130> DIA.0002-PCT

<140> 待指派

<141> 2016-03-16

<150> US 62/168,688

<151> 2015-05-29

<150> US 62/168,405

<151> 2015-05-29

<150> US 62/133,881

<151> 2015-03-16

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1518

<212> DNA

<213> 卷曲乳杆菌(Lactobacillus crispatus)

<300>

<308> GenBank/NR_041800.1 GI:343201103

<309> 2011-08-10

<313> (1)..(1518)

<400> 1

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc gagcggaact aacagattta 60

cttcggtaat gacgttagga aagcgagcgg cggatgggtg agtaacacgt ggggaacctg 120

ccccatagtc tgggatacca cttggaaaca ggtgctaata ccggataaga aagcagatcg 180

catgatcagc ttttaaaagg cggcgtaagc tgtcgctatg ggatggcccc gcggtgcatt 240

agctagttgg taaggtaaag gcttaccaag gcgatgatgc atagccgagt tgagagactg 300

atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat 360

cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa ggttttcgga 420

tcgtaaagct ctgttgttgg tgaagaagga tagaggtagt aactggcctt tatttgacgg 480

taatcaacca gaaagtcacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc 540

aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggaagaata agtctgatgt 600

gaaagccctc ggcttaaccg aggaactgca tcggaaactg tttttcttga gtgcagaaga 660

ggagagtgga actccatgtg tagcggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg 720

cgaaggcggc tctctggtct gcaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag 780
gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg ggaggtttcc 840
gcctctcagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt 900
tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga 960
agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catctagtgc catttgtaga gatacaaagt 1020
tcccttcggg gacgctaaga caggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1080
ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttgttattag ttgccagcat taagttgggc 1140
actctaatga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1200
gcccccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatgggca gtacaacgag aagcgagcct 1260
gcgaaggcaa gcgaatctct gaaagctgtt ctcagttcgg actgcagtct gcaactcgac 1320
tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcacg ccgcggtgaa tacgttcccg 1380
ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtctgca atgcccaaag ccggtggcct 1440
aaccttcggg aaggagccgt ctaaggcagg gcagatgact ggggtgaagt cgtaacaagg 1500
tagccgtagg agaactgc 1518

<210> 2
<211> 1529
<212> DNA
<213> 加氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)
<300>
<308> GenBank/HE573914.1 GI:341599788
<309> 2011-07-25
<313> (1)..(1529)
<400> 2

ctgcggcgtg cctaatacat gcaagtcgag cgagcttgcc tagatgaatt tggtgcttgc 60
accagatgaa actagataca agcgagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc 120
ccaagagact gggataacac ctggaaacag atgctaatac cggataacaa cactagacgc 180
atgtctagag tttaaaagat ggttctgcta tcactcttgg atggacctgc ggtgcattag 240
ctagttggta aggtaacggc ttaccaaggc aatgatgcat agccgagttg agagactgat 300
cggccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaatct 360
tccacaatgg acgcaagtct gatggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc 420
gtaaagctct gttggtagtg aagaaagata gaggtagtaa ctggccttta tttgacggta 480
attacttaga aagtcacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa 540
gcgttgtccg gatttattgg gcgtaaagcg agtgcaggcg gttcaataag tctgatgtga 600
aagccttcgg ctcaaccgga gaattgcatc agaaactgtt gaacttgagt gcagaagagg 660
agagtggaac tccatgtgta gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg 720
aaggcggctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta gcgaacagga 780
ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgagtgct aagtgttggg aggtttccgc 840
ctctcagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacgac cgcaaggttg 900
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 960

caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tccagtgcaa acctaagaga ttaggtgttc 1020
ccttcgggga cgctgagaca ggtggtgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1080
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtcattagtt gccatcatta agttgggcac 1140
tctaatgaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcatcatgc 1200
cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacggt acaacgagaa gcgaacctgc 1260
gaaggcaagc ggatctctga aagccgttct cagttcggac tgtaggctgc aactcgccta 1320
cacgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc gcggtgaata cgttcccggg 1380
ccttgtacac accgcccgtc acaccatgag agtctgtaac acccaaagcc ggtgggataa 1440
cctttatagg agtcagccgt ctaaggtagg acagatgatt agggtgaagt cgtaacaagg 1500
tagccgtagg agaacctgcg gttggatca 1529

<210> 3
<211> 1475
<212> DNA
<213> 阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)
<220>
<221> 混杂特征
<222> (60)..(60)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (340)..(340)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (399)..(399)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (612)..(612)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (916)..(916)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (951)..(951)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>

<221> 混杂特征
<222> (1012)..(1012)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (1156)..(1156)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (1171)..(1171)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂特征
<222> (1277)..(1277)
<223> n 为 a, c, g, 或 t
<300>
<308> GenBank/NR_044694.2 GI:545589071
<309> 2013-09-24
<313> (1)..(1475)
<400> 3

tttcgtggag ggttcgattc tggctcagga tgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgcn 60
agtcgaacgg gatctgacca gcttgctggt tggtgagagt ggcgaacggg tgagtaatgc 120
gtgaccaacc tgccccatgc tccagaatag ctcttggaaa cgggtggtaa tgctggatgc 180
tccaacttga cgcatgtctt gttgggaaag tgtttagtgg catgggatgg ggtcgcgtcc 240
tatcagcttg taggcggggt aatggcccac ctaggcttcg acgggtagcc ggcctgagag 300
ggcggacggc cacattggga ctgagatacg gcccagactn ctacgggagg cagcagtggg 360
gaatattgcg caatggggga aaccctgacg cagcgacgnc gcgtgcggga tgaaggcctt 420
cgggttgtaa accgcttttg attgggagca agccttttgg gtgagtgtac ctttcgaata 480
agcgccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggcgcaag cgttatccgg 540
aattattggg cgtaaagagc ttgtaggcgg ttcgtcgcgt ctggtgtgaa agcccatcgc 600
ttaacggtgg gnttgcgccg ggtacgggcg ggctagagtg cagtagggga gactggaatt 660
ctcggtgtaa cggtggaatg tgtagatatc gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct 720
ctgggctgtt actgacgctg agaagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct 780
ggtagtccac gccgtaaacg gtggacgctg gatgtggggc ccattccacg ggttctgtgt 840
cggagctaac gcgttaagcg tcccgcctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag 900
aaattgacgg gggccngcac aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg naacgcgaag 960
aaccttacct gggcttgaca tgtgcctgac gactgcagag atgtggtttc cnttcggggc 1020
aggttcacag gtggtgcatg gtcgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 1080
cgcaacgagc gcaaccctcg ccctgtgttg ccagcgggtt atgccgggaa ctcacggggg 1140

accgccgggg ttaccncgga ggaaggtggg natgacgtca gatcatcatg ccccttacgt 1200
ccagggcttc acgcatgcta caatggccag tacaacgggt tgcttcatgg tgacatggtg 1260
ctaatccctt aaaactngtc tcagttcgga tcgtagtctg caactcgact acgtgaaggc 1320
ggagtcgcta gtaatcgcga atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtac 1380
acaccgcccg tcaagtcatg aaagtgggca gcacccgaag ccggtggcct aaccctttg 1440
ggatggagcc gtctaaggtg aggctcgtga ttggg 1475

<210> 4
<211> 1000
<212> DNA
<213> 未培养的埃格特菌属物种(Eggerthella sp.)克隆123-f2 68
<300>
<308> GenBank/AY738656.1 GI:52222145
<309> 2005-11-02
<313> (1)..(1000)
<400> 4
tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa cgccgcgtgc gggatgaagg 60
ccttcgggtt gtaaaccgct ttcagcaggg aagacatcga cggtacctgc agaagaagcc 120
ccggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg ggcgagcgtt atccggattc 180
attgggcgta aagcgcgcgc aggcggttgc tcaagcggaa cctctaatct cggggcttaa 240
cctcgagccg ggttccgaac tggacgactc gagtgcggta gaggcagatg gaattcccgg 300
tgtagcggtg gaatgcgcag atatcgggaa gaacaccaac ggcgaaggca gtctgctggg 360
ccgtcactga cgctgaggcg cgaaagctgg gggagcgaac aggattagat accctggtag 420
tcccagccgt aaacgatgag cgctgggtgt gggagattac atcttccgtg ccgaagctaa 480
cgcattaagc gctccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg 540
ggggcccgca caagcagcgg agcatgtggc ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 600
agggcttgac atgtaggtga agcggcggaa acgtcgtggc cgaaaggagc ctacacaggt 660
ggtgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc 720
aaccccctgcc ccgtgttacc agcatttagt tggggactcg cgggggactg ccggcgtcaa 780
gccggaggaa ggcggggatg acgtcaagtc atcatgcccc ttatgccctg ggccgcacac 840
gtgctacaat ggccggcaca gcgggctgca acctagcgat aggaagcgaa tcccgtaaag 900
ccggtcccag ttcggattgg aggctgaaac ccgcctccat gaagccggag ttgctagtaa 960
tcgcggatca gcacgccgcg gtgaatgcgt tcccgggcct 1000

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>

<221> 混杂特征
<222> (13)..(45)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 5
ucuguuaguu cctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45
<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 6
cggatgggtg agtaac 16
<210> 7
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 7
aatttaatac gactcactat agggagataa gcccttacct tacca 45
<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 8
aatttaatac gactcactat agggagataa gccgttacct tacca 45
<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 9
gucugggaua ccacuuggaa acagac 26
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 10
cacucacgca ugucuagagu g 21
<210> 11
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (18)..(50)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 11
caugcuccgc cgcuuguttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 50
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 12
cttacctggg cttgacatgt gcctg 25
<210> 13
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>

<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 13
aatttaatac gactcactat agggagacac cacctgtgaa cctgc 45
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 14
ccugcagaga ugugguuucg cagg 24
<210> 15
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (22)..(54)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 15
guaccgucga ugucuucccu gtttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54
<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 16
agcgttatcc ggattc 16
<210> 17
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>

<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 17
aatttaatac gactcactat agggagattc ggaacccggc tcgaggttaa g 51
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 18
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 19
ggattcattg ggcgtaaagc 20
<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 20
gcgttatccg gattcat 17
<210> 21
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 21
aatttaatac gactcactat agggagataa gcctttacct tacca 45

<210> 22
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 22
aatttaatac gactcactat agggagaata cgacagctta cgccgc 46
<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 23
aatttaatac gactcactat agggagatat ctgcgcattt caccgctaca c 51
<210> 24
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 启动子
<222> (1)..(27)
<400> 24
aatttaatac gactcactat agggagacga ccatgcacca cctgt 45
<210> 25
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体

<220>
<221> 混杂特征
<222> (25)..(57)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 25
ggacuaccag gguaucuaau ccugtttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57
<210> 26
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (20)..(52)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 26
guaggaguuu gggccgugut ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 52
<210> 27
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (21)..(53)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 27
cuuugaguuu uagccuugcg tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 53
<210> 28
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (22)..(54)

<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 28
gcaucgaauu aauccgcaug ctttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54
<210> 29
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (22)..(54)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 29
guaguuagcc ggggcuucuu ctttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54
<210> 30
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (19)..(51)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 30
uacguauuac cgcggcugtt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 51
<210> 31
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (21)..(53)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 31
cgugucucag ucccaaugug tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 53

<210> 32
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (19)..(51)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 32
caauguggcc gaucaguctt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 51
<210> 33
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (22)..(54)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 33
ccauugugga agauucccua ctttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54
<210> 34
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (20)..(52)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 34
cucgcucgac uugcauguat ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 52
<210> 35
<211> 52
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (20)..(52)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 35
cuugcaugua uuaggcacgt ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 52
<210> 36
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (21)..(53)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 36
cuuguaucua uguccauucc tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 53
<210> 37
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (20)..(52)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 37
uggugcaagc accaaauuct ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 52
<210> 38
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体

<220>
<221> 混杂特征
<222> (17)..(49)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 38
aauucaucua ggcaagttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 49
<210> 39
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (17)..(49)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 39
uccuaacguc auuaccttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 49
<210> 40
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (15)..(47)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 40
uccauuccga agaatttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 47
<210> 41
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (20)..(52)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 41

uugcugcguc aggguuucct ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 52

<210> 42

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (21)..(53)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 42

gaaagcgguu uacaacccga tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 53

<210> 43

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (18)..(50)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 43

aaggccuuca ucccgcattt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 50

<210> 44

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (19)..(51)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 44

ucgccguugg uguucuuctt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 51

<210> 45
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (18)..(50)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 45
ugacggccca gcagacuttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 50
<210> 46
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (21)..(53)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 46
uccuguucgc ucccccagcu tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 53
<210> 47
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (17)..(49)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 47
tcctaacgtc attaccttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 49
<210> 48
<211> 54
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (22)..(54)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 48
gtaccgtcga tgtcttccct gtttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54
<210> 49
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (15)..(47)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 49
cagcgcucau cguutttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 47
<210> 50
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (18)..(50)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 50
acggaagaug uaaucucttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 50
<210> 51
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体

<220>
<221> 混杂特征
<222> (16)..(48)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 51
gauguaaucu cccactttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 48
<210> 52
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (13)..(45)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 52
ccauuccgaa gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45
<210> 53
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (12)..(44)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 53
aguuucaucu gtttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 44
<210> 54
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (13)..(45)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 54

ccgaagaauu uctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45

<210> 55

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (11)..(43)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 55

uucaauaggc tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 43

<210> 56

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (11)..(43)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 56

cgucauuacc tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 43

<210> 57

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<220>

<221> 混杂特征

<222> (13)..(45)

<223> 固定化探针结合区：尾

<400> 57

ccaaauucau cutttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45

<210> 58
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (13)..(45)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 58
aacgucauua cctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45
<210> 59
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<220>
<221> 混杂特征
<222> (13)..(45)
<223> 固定化探针结合区：尾
<400> 59
uuuccuaacg uctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 45
<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 60
ccugcagaga ugugguuucg cagg 24
<210> 61
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 61

cugggauacc acuuggaaac acccag 26

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<400> 62

ucugggauac cacuuccaga 20

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<400> 63

ccugcagaga ugugguuucg cagg 24

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<400> 64

gguucugcua ucacucuugg aacc 24

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<400> 65

acgcaugucu agaguugcgu 20

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡聚体

<400> 66
agacgcaugu cuagagcguc u 21
<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 67
gaugcuaaua ccggauaaca acgcauc 27
<210> 68
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 68
uaccggauaa caacacuaga cgccggua 28
<210> 69
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 69
gucugggaua ccauuuggaa acagac 26
<210> 70
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 70
gucugggaua ccacuuggaa acagac 26
<210> 71
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成寡聚体
<400> 71
gucugggaua ccacuuggaa acagac 26
<210> 72
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 72
gguucugcua ucacucuugg aacc 24
<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 73
gguucugcua ucacucuugg aacc 24
<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 74
cgcaugucua gaguugcg 18
<210> 75
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 75
acucacgcau gucuagagu 19
<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 76
gagacgcaug ucuagaguug ucuc 24
<210> 77
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 77
guugcucaag cggaaccucg caac 24
<210> 78
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 78
uugcucaagc ggaaccucua gcaa 24
<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 79
gcucaagcgg aaccucugag c 21
<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 80
agcggaaccu cuaaucucgu cgcu 24
<210> 81
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 81
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 82
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 83
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 83
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 84
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 84
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 85
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 85
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 86
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 86
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 87
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡聚体
<400> 87
ccgcucaggc gguugcucaa gcgg 24
<210> 88
<211> 1496
<212> DNA
<213> 詹氏乳杆菌(Lactobacillus jensenii)
<300>
<308> GenBank/NR_025087.1 GI:219857499
<309> 2009-01-09
<313> (1)..(1496)
<400> 88
tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctatagaag ttcttcggaa tggaaataga 60
tacaagctag cggcggatgg gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcccttaa gtctgggata 120
ccatttggaa acagatgcta ataccggata aaagctactt tcgcatgaaa gaagtttaaa 180
aggcggcgta agctgtcgta aaggatggac ttgcgatgca ttagctagtt ggtaaggtaa 240
cggcttacca aggctgatga tgcatagccg agttgagaga ctgatcggcc acattgggac 300
tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa 360
agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtgaa gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt 420
tggtgaagaa ggatagaggt agtaactggc ctttatttga cggtaatcaa ccagaaagtc 480
acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt 540
attgggcgta aagcgagcgc aggcggattg ataagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa 600
ccgaagaact gcatcagaaa ctgtcaatct tgagtgcaga agaggagagt ggaactccat 660
gtgtagcggt ggaatgcgta gatatatgga agaacaccag tggcgaaggc ggctctctgg 720
tctgtaactg acgctgaggc tcgaaagcat gggtagcgaa caggattaga taccctggta 780
gtccatgccg taaacgatga gtgctaagtg ttgggaggtt tccgcctctc agtgctgcag 840
ctaacgcatt aagcactccg cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt 900
gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct 960

taccaggtct tgacatcctt tgaccaccta agagattagg ttttcccttc ggggacaaag 1020
agacaggtgg tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca 1080
acgagcgcaa cccttgttaa tagttgccag cattaagttg ggcactctat tgagactgcc 1140
ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcat catgcccctt atgacctggg 1200
ctacacacgt gctacaatgg gcagtacaac gagaagcgaa cctgtgaagg caagcggatc 1260
tcttaaagct gttctcagtt cggactgtag gctgcaactc gcctacacga agctggaatc 1320
gctagtaatc gcggatcagc acgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc 1380
ccgtcacacc atgagagttt gtaacaccca aagtcggtga ggtaaccttt ggagccagcc 1440
gcctaaggtg ggacagatga ttagggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta ggagaa 1496

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc gagcggaact aacagatttta
cttcggtaat gacgttagga aagcgagcgg cggatgggtg agtaacacgt ggggaacctg
ccccatagtc tgggatacca cttggaaaca ggtgctaata ccggataaga aagcagatcg
catgatcagc ttttaaaagg cggcgtaagc tgtcgctatg ggatggcccc gcggtgcatt
agctagttgg taaggtaaag gcttaccaag gcgatgatgc atagccgagt tgagagactg
atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat
cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa ggttttcgga
tcgtaaagct ctgttgttgg tgaagaagga tagaggtagt aactggcctt tatttgacgg
taatcaacca gaaagtcacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc
aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggaagaata agtctgatgt
gaaagccctc ggcttaaccg aggaactgca tcggaaactg ttttttcttga gtgcagaaga
ggagagtgga actccatgtg tagcggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg
cgaaggcggc tctctggtct gcaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag
gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg ggaggtttcc
gcctctcagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt
tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga
agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catctagtgc catttgtaga gatacaaagt
tcccttcggg gacgctaaga caggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg
ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttgttattag ttgccagcat taagttgggc
actctaatga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat
gccccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatgggca gtacaacgag aagcgagcct
gcgaaggcaa gcgaatctct gaaagctgtt ctcagttcgg actgcagtct gcaactcgac
tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcacg ccgcggtgaa tacgttcccg
ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtctgca atgcccaaag ccggtggcct
aaccttcggg aaggagccgt ctaaggcagg gcagatgact ggggtgaagt cgtaacaagg
tagccgtagg agaactgc

图1A

TGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTATAGAAGTTCTTCGGAATGGAAATAGATACAAGCT
AGCGGCGGATGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTCTGGGATACCATTTGGAAACAGAT
GCTAATACCGGATAAAAGCTACTTTCGCATGAAAGAAGTTTAAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGTAAAGG
ATGGACTTGCGATGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTGATGATGCATAGCCGAG
TTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAA
AGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGATTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAACTGC
ATCAGAAACTGTCAATCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGA
GGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGTTTTCCCTTCGGGGACAAAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTAATAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTATTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAG
TACAACGAGAAGCGAACCTGTGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGC
TGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGAGGTAACCT
TTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAA

图1B

ctgcggcgtg cctaatacat gcaagtcgag cgagcttgcc tagatgaatt tggtgcttgc
accagatgaa actagataca agcgagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc
ccaagagact gggataacac ctggaaacag atgctaatac cggataacaa cactagacgc
atgtctagag tttaaaagat ggttctgcta tcactcttgg atggacctgc ggtgcattag
ctagttggta aggtaacggc ttaccaaggc aatgatgcat agccgagttg agagactgat
cggccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaatct
tccacaatgg acgcaagtct gatggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc
gtaaagctct gttggtagtg aagaaagata gaggtagtaa ctggccttta tttgacggta
attacttaga aagtcacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa
gcgttgtccg gatttattgg gcgtaaagcg agtgcaggcg gttcaataag tctgatgtga
aagccttcgg ctcaaccgga gaattgcatc agaaactgtt gaacttgagt gcagaagagg
agagtggaac tccatgtgta gcggtggaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg
aaggcggctc tctggtctgc aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta gcgaacagga
ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgagtgct aagtgttggg aggtttccgc
ctcttcagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacgac cgcaaggttg
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag
caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tccagtgcaa acctaagaga ttaggtgttc
ccttcgggga cgctgagaca ggtggtgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaacccct gtcattagtt gccatcatta agttgggcac
tctaatgaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcatcatgc
cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacggt acaacgagaa gcgaacctgc
gaaggcaagc ggatctctga aagccgttct cagttcggac tgtaggctgc aactcgccta
cacgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc gcggtgaata cgttcccggg
ccttgtacac accgcccgtc acaccatgag agtctgtaac acccaaagcc ggtgggataa
cctttatagg agtcagccgt ctaaggtagg acagatgatt agggtgaagt cgtaacaagg
tagccgtagg agaacctgcg gttggatca

图2

tttcgtggag ggttcgattc tggctcagga tgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgcn
agtcgaacgg gatctgacca gcttgctggt tggtgagagt ggcgaacggg tgagtaatgc
gtgaccaacc tgccccatgc tccagaatag ctcttggaaa cgggtggtaa tgctggatgc
tccaacttga cgcatgtctt gttgggaaag tgtttagtgg catgggatgg ggtcgcgtcc
tatcagcttg taggcggggt aatggcccac ctaggcttcg acgggtagcc ggcctgagag
ggcggacggc cacattggga ctgagatacg gcccagactn ctacgggagg cagcagtggg
gaatattgcg caatggggga aaccctgacg cagcgacgnc gcgtgcggga tgaaggcctt
cgggttgtaa accgcttttg attgggagca agccttttgg gtgagtgtac ctttcgaata
agcgccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggcgcaag cgttatccgg
aattattggg cgtaaagagc ttgtaggcgg ttcgtcgcgt ctggtgtgaa agcccatcgc
ttaacggtgg gnttgcgccg ggtacgggcg ggctagagtg cagtagggga gactggaatt
ctcggtgtaa cggtggaatg tgtagatatc gggaagaaca ccaatggcga aggcaggtct
ctgggctgtt actgacgctg agaagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct
ggtagtccac gccgtaaacg gtggacgctg gatgtggggc ccattccacg ggtttctgtt
cggagctaac gcgttaagcg tccccgcctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag
aaattgacgg gggccngcac aagcggcgga gcatgcggat taattcgatg naacgcgaag
aaccttacct gggcttgaca tgtgcctgac gactgcagag atgtggtttc cnttcggggc
aggttcacag gtggtgcatg gtcgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc
cgcaacgagc gcaaccctcg ccctgtgttg ccagcgggtt atgcgggaaa ctcacgggga
accgccgggg ttaccncgga ggaaggtggg natgacgtca gatcatcatg cccccttacgt
ccagggcttc acgcatgcta caatggccag tacaacgggt tgcttcatgg tgacatggtg
ctaatccctt aaaactngtc tcagttcgga tcgtagtctg caactcgact acgtgaaggc
ggagtcgcta gtaatcgcga atcagcaacg tcgcggtgaa tgcgttcccg ggccttgtac
acaccgcccg tcaagtcatg aaagtgggca gcaccgaag ccggtggcct aaccctttg
ggatggagcc gtctaaggtg aggctcgtga ttggg

图3

tgggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa cgccgcgtgc gggatgaagg
ccttcgggtt gtaaaccgct ttcagcaggg aagacatcga cggtacctgc agaagaagcc
ccggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg ggcgagcgtt atccggattc
attgggcgta aagcgcgcgc aggcggttgc tcaagcggaa cctctaatct cggggcttaa
cctcgagccg ggttccgaac tggacgactc gagtgcggta gaggcagatg gaattcccgg
tgtagcggtg gaatgcgcag atatcgggaa gaacaccaac ggcgaaggca gtctgctggg
ccgtcactga cgctgaggcg cgaaagctgg gggagcgaac aggattagat accctggtag
tcccagccgt aaacgatgag cgctgggtgt gggagattac atcttccgtg ccgaagctaa
cgcattaagc gctccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg
gggcccgca caagcagcgg agcatgtggc ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc
agggcttgac atgtaggtga agcggcggaa acgtcgtggc cgaaaggagc ctacacaggt
ggtgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc
aaccccctgcc ccgtgttacc agcatttagt tggggactcg cggggactg ccggcgtcaa
gccggaggaa ggcggggatg acgtcaagtc atcatgcccc ttatgccctg ggccgcacac
gtgctacaat ggccggcaca gcgggctgca acctagcgat aggaagcgaa tcccgtaaag
ccggtcccag ttcggattgg aggctgaaac ccgcctccat gaagccggag ttgctagtaa
tcgcggatca gcacgccgcg gtgaatgcgt tcccgggcct

图4