



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111321251 B

(45)授权公告日 2020.08.14

(21)申请号 202010302240.2

C12R 1/93(2006.01)

(22)申请日 2020.04.16

C12R 1/35(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111321251 A

(43)申请公布日 2020.06.23

(73)专利权人 圣湘生物科技股份有限公司

地址 410205 湖南省长沙市高新技术产业
开发区麓松路680路

(72)发明人 陈晓亮 任小梅 向江艳 万旺

廖石榴 邓中平 戴立忠

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 胡亮 张颖玲

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/6851(2018.01)

C12Q 1/06(2006.01)

(56)对比文件

CN 105400907 A,2016.03.16

CN 110964854 A,2020.04.07

CN 109355437 A,2019.02.19

宏雅基因.公司开发含新冠病毒的多重呼吸
道病原体核酸检测产品.《宏雅基因》.2020,第1-
3页.

Tanu Singhal等.A Review of
Coronavirus Disease-2019 (COVID-19).《The
Indian Journal of Pediatrics》.2020,第281-
286页.

Chenyu Li等.High sensitivity
detection of SARS-CoV-2 using multiplex
PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic
method.《bioRxiv》.2020,第1-24页.

审查员 贺巧巧

权利要求书2页 说明书12页

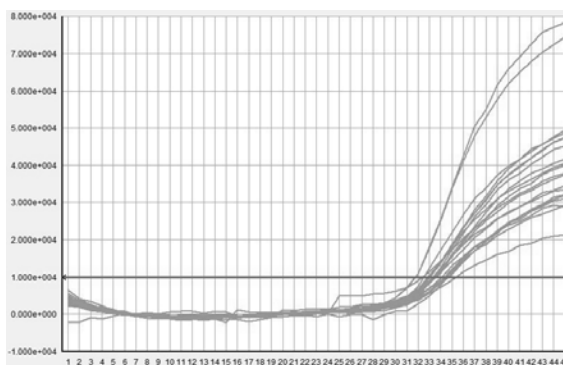
序列表5页 附图10页

(54)发明名称

检测引起呼吸道感染的病原体并分型的组
合物、试剂盒、方法及用途

(57)摘要

本发明涉及分子生物学检测领域,更具体
地,涉及新型冠状病毒2019-nCoV、甲型流感病
毒、乙型流感病毒、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病
毒和肺炎支原体的检测。本发明提供了一种用于
检测上述病原体的组合物;同时,还提供了含该
组合物的试剂盒,所述组合物的用途,以及用于
检测引起呼吸道感染的病原体并分型的方法。本
发明的组合物结合荧光探针法能够在两管同时
检测六种引起呼吸道感染的病原体并进行分型,
具有成本低、通量高、不受干扰物质影响,并且操
作简便,避免由于样本间交叉引起的假阳性和环
境污染的优势。



1. 一种能够检测引起呼吸道感染的病原体并分型的组合物,所述组合物包括:

第一核酸组合物:

如SEQ ID NO:1所示的甲型流感病毒上游引物、如SEQ ID NO:2所示的甲型流感病毒下游引物,和如SEQ ID NO:3所示的甲型流感病毒探针;

如SEQ ID NO:4所示的乙型流感病毒上游引物、如SEQ ID NO:5所示的乙型流感病毒下游引物,和如SEQ ID NO:6所示的乙型流感病毒探针;和

如SEQ ID NO:7所示的呼吸道合胞病毒上游引物、如SEQ ID NO:8所示的呼吸道合胞病毒下游引物,和如SEQ ID NO:9所示的呼吸道合胞病毒探针;以及

第二核酸组合物:

如SEQ ID NO:10所示的呼吸道腺病毒上游引物、如SEQ ID NO:11所示的呼吸道腺病毒下游引物,和如SEQ ID NO:12所示的呼吸道腺病毒探针;

如SEQ ID NO:13所示的新型冠状病毒2019-nCoV上游引物、如SEQ ID NO:14所示的新型冠状病毒2019-nCoV下游引物,和如SEQ ID NO:15所示的新型冠状病毒2019-nCoV探针;和

如SEQ ID NO:16所示的肺炎支原体上游引物、如SEQ ID NO:17所示的肺炎支原体下游引物,和如SEQ ID NO:18所示的肺炎支原体探针;

其中,所述各探针上带有荧光基团,并且,第一核酸组合物的荧光基团彼此互不相同且互不干扰,并且第二核酸组合物的荧光基团彼此互不相同且互不干扰。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物进一步包括用于监控的内标上游引物、内标下游引物和内标探针。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中,内标上游引物如SEQ ID NO:19所示、内标下游引物如SEQ ID NO:20所示,且内标探针如SEQ ID NO:21所示。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中,如SEQ ID NO:3所示的甲型流感病毒探针的荧光报告基团为FAM;如SEQ ID NO:6所示的乙型流感病毒探针的荧光报告基团为HEX;如SEQ ID NO:9所示的呼吸道合胞病毒探针的荧光报告基团为CY5;如SEQ ID NO:12所示的呼吸道腺病毒探针的荧光报告基团为FAM;如SEQ ID NO:15所示的新型冠状病毒2019-nCoV探针的荧光报告基团为HEX;如SEQ ID NO:18所示的肺炎支原体探针的荧光报告基团为CY5。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的组合物,其中,两个核酸组合物分别存在于单独包装中。

6. 权利要求1~5中任一项所述的组合物在制备检测引起呼吸道感染的病原体并分型的试剂盒中的用途。

7. 一种用于检测引起呼吸道感染的病原体并分型的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1~5中任一项所述的组合物。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括核酸释放试剂、dNTP、逆转录酶、DNA聚合酶、PCR缓冲液以及Mg²⁺中的至少一种。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,所述组合物中检测引物的用量为25~500nM;所述组合物中检测探针的用量为20~500nM;所述组合物中内标引物的用量为12.5~250nM;所述组合物中内标探针的用量为10~250nM。

10. 一种用于以非诊断目的检测引起呼吸道感染的病原体并分型的方法,所述方法包

括以下步骤：

- 1) 释放待测样本的核酸；
- 2) 使用如权利要求1~5中任一项所述的组合物对步骤1)获得的核酸进行荧光定量PCR；
- 3) 获得并分析结果。

检测引起呼吸道感染的病原体并分型的组合物、试剂盒、方法及用途

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学检测领域；具体地，属于引起呼吸道感染的病原体的检测领域；更具体地，本发明能够同时检测新型冠状病毒2019-nCoV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒和肺炎支原体，并对其分型。

背景技术

[0002] 呼吸系统感染性疾病大多数是临床上的常见病、多发病。该类疾病具有相似的临床症状和流行特征，通过临床症状和常规的实验室检测很难鉴别确定所感染的病原体种类。呼吸道病原体可以通过空气传播，引起急性呼吸道病的病原体具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急等特点，可引起广泛的急性上呼吸道和下呼吸道疾病，严重危害人类的健康。常见的呼吸道病原体包括：

[0003] 2019新型冠状病毒(2019-nCoV)，在2月11日国际病毒分类委员会随后将该病毒命名为SARS-CoV-2。冠状病毒是一个大型病毒家族，在此之前已知有6种可以感染到人类，如可引起感冒以及中东呼吸综合征(MERS)和严重急性呼吸综合征(SARS)等。新型冠状病毒2019-nCoV是以前从未在人体中发现的冠状病毒新毒株，该病毒在分类学上属于冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus)中的 β 类型冠状病毒，具有囊膜和刺突细胞学特征基因组为线性单股正链的RNA((+) ssRNA)病毒。新型冠状病毒2019-nCoV从2019年12月发现至今，短短的3个多月，几乎在全世界爆发，在全球累积造成超过100万人感染，累积造成超过5万人死亡，引起了国际社会高度重视。

[0004] 流行性感冒病毒(influenza virus)，简称流感病毒，是一种造成人类及动物患流行性感冒的RNA病毒，人流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型，是流行性感冒(流感)的病原体。禽流感(avian influenza; AI)是禽流行性感冒的简称，它是一种由甲型流感病毒的某种亚型(也称禽流感病毒)引起的传染性疾病。在分类学上，流感病毒属于正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)，流行性感冒病毒属(Influenza virus)，它会造成急性上呼吸道感染，并借由空气迅速的传播，在世界各地常会有周期性的大流行，如发生在1918~1919年造成全球有二千万以上的人死亡的“西班牙流感”(Spanish Influenza)、发生于1957年“亚洲流感”(Asian Influenza)、发生于1968年的“香港流感”(Hong Kong Influenza)和发生于1977年的“俄国流感”(Russian Influenza)，以及发生于2013年的H7N9禽流感。

[0005] 呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus, RSV)属副黏病毒科肺炎属的RNA病毒，临床研究表明，呼吸道合胞病毒是引起病毒性肺炎的最常见的病原，多见于三岁以下的婴幼儿，主要症状有高热、鼻炎、咽炎及喉炎，以后表现为细支气管炎及肺炎。少数患儿可并发中耳炎、胸膜炎及心肌炎等。成人和年长儿童感染后，主要表现为上呼吸道感染。

[0006] 腺病毒(Adenoviruses, HAdv)属于腺病毒科(Adenoviridae)，根据免疫学、生物学、生物化学特性不同，将其分为A~G 7个亚种，共有52个血清型，不同的血清型有不同的器官亲和性并引起相应的临床表现，对呼吸道、胃肠道、尿道和膀胱、眼、肝脏等均可感染。

[0007] 肺炎支原体(Mycoplasma Pneumonia, MP)是社区获得性肺炎的常见病原体,感染MP后可引起非典型性肺炎(Atypical pneumonias),病理改变以间质性肺炎为主,有时并发支气管肺炎。主要经飞沫传染,潜伏期2~3周,发病率以青少年最高。临床症状较轻,大多数患者只有头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状;少数会持续高热不退,剧烈咳嗽,病情进展快,短时间内出现呼吸衰竭,多器官功能性障碍等危重症变现。

[0008] 呼吸道感染性疾病具有相似的临床症状和流行特征,早诊断、早治疗、早隔离是防止的根本。然而,通过临床症状和常规的实验室检测很难鉴别确定所感染的病原体种类,而且病原体的培养条件较苛刻,造成培养阳性率低,甚至有些病原体在目前条件下尚不能培养,这给呼吸道感染患者及临床医生带来很大困扰。

[0009] 因此本领域上迫切需要一种简便、快速、客观的检测呼吸道病原体的方法,从而实现明确病原、及早诊断、合理指导临床用药。

发明内容

[0010] 有鉴于此,本发明提供了一种能够检测引起呼吸道感染的病原体并分型的组合物,所述组合物包括:

[0011] 第一核酸组合物:

[0012] 如SEQ ID NO:1所示的甲型流感病毒上游引物、如SEQ ID NO:2所示的甲型流感病毒下游引物,和如SEQ ID NO:3所示的甲型流感病毒探针;

[0013] 如SEQ ID NO:4所示的乙型流感病毒上游引物、如SEQ ID NO:5所示的乙型流感病毒下游引物,和如SEQ ID NO:6所示的乙型流感病毒探针;

[0014] 如SEQ ID NO:7所示的呼吸道合胞病毒上游引物、如SEQ ID NO:8所示的呼吸道合胞病毒下游引物,和如SEQ ID NO:9所示的呼吸道合胞病毒探针;和

[0015] 第二核酸组合物:

[0016] 如SEQ ID NO:10所示的呼吸道腺病毒上游引物、如SEQ ID NO:11所示的呼吸道腺病毒下游引物,和如SEQ ID NO:12所示的呼吸道腺病毒探针;

[0017] 如SEQ ID NO:13所示的新型冠状病毒2019-nCoV上游引物、如SEQ ID NO:14所示的新型冠状病毒2019-nCoV下游引物,和如SEQ ID NO:15所示的新型冠状病毒2019-nCoV探针;

[0018] 如SEQ ID NO:16所示的肺炎支原体上游引物、如SEQ ID NO:17所示的肺炎支原体下游引物,和如SEQ ID NO:18所示的肺炎支原体探针;

[0019] 其中,第一核酸组合物的荧光基团彼此互不相同且互不干扰,并且第二核酸组合物的荧光基团彼此互不相同且互不干扰。

[0020] 在本文中,“互不相同且互不干扰”是指核酸组合物中每个探针所用的荧光基团是不一样的,并且不会影响彼此的检测,即可以利用不同的通道进行检测。例如可以使用FAM、HEX、ROX和CY5,这些基团吸光值不接近,能选择不同的通道,因而不会互相干扰。

[0021] 进一步地,所述组合物包括:用于监控的内标上游引物、内标下游引物和内标探针。

[0022] 在一个具体的实施方案中,所述组合物还包括:如SEQ ID NO:19所示的内标上游引物、如SEQ ID NO:20所示的内标下游引物,和如SEQ ID NO:21所示的内标探针。

[0023] 在本发明中,荧光报告基团可以选自FAM、HEX、ROX、VIC、CY5、5-TAMRA、TET、CY3和JOE,但不限于此。

[0024] 在一个具体的实施方案中,如SEQ ID NO:3所示的甲型流感病毒探针的荧光报告基团为FAM;如SEQ ID NO:6所示的乙型流感病毒探针的荧光报告基团为HEX;如SEQ ID NO:9所示的呼吸道合胞病毒探针的荧光报告基团为CY5。

[0025] 在一个具体的实施方案中,如SEQ ID NO:12所示的呼吸道腺病毒探针的荧光报告基团为FAM;如SEQ ID NO:15所示的新型冠状病毒2019-nCoV探针的荧光报告基团为HEX;如SEQ ID NO:18所示的肺炎支原体探针的荧光报告基团为CY5。

[0026] 在一个具体的实施方案中,如SEQ ID NO:21所示的内标探针的荧光报告基团为ROX。

[0027] 内标检测人管家基因GAPDH基因序列的引物和探针。GAPDH基因序列序列(SEQ ID NO:22)为:

[0028] TCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACG
ACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGG

[0029] 进一步地,所述组合物中检测引物的用量为25~500nM;所述组合物中检测探针的用量为20~500nM;所述组合物中内标引物的用量为12.5~250nM;所述组合物中内标探针的用量为10~250nM。

[0030] 在本发明中,术语“检测引物”和“检测探针”是指用于扩增并检测病原体的引物和探针。

[0031] 在本发明中,术语“内标引物”和“内标探针”是指用于扩增并检测内标的引物和探针。

[0032] 在一个具体的实施方案中,本发明的组合物的两个核酸组合物分别存在于单独包装中。

[0033] 进一步地,本发明的组合物的每一核酸组合物的各成分以混合的形式存在。

[0034] 第二方面,本发明提供了上述本发明的组合物在制备检测引起呼吸道感染的病原体并分型的试剂盒中的用途。

[0035] 所述引起呼吸道感染的病原体包括:新型冠状病毒2019-nCoV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒和肺炎支原体。

[0036] 第三方面,本发明提供了一种检测引起呼吸道感染的病原体并分型的试剂盒,所述试剂盒包括上述本发明的组合物。

[0037] 进一步地,所述试剂盒还包括核酸释放试剂、dNTP、逆转录酶、DNA聚合酶、PCR缓冲液以及Mg²⁺中的至少一种。

[0038] 常见的PCR缓冲液由Tris-HCl、MgCl₂、KCl、Triton X-100等缓冲体系构成。一般单个PCR反应管中总体积为20-200μl。

[0039] 进一步地,所述组合物中检测引物的用量为25~500nM;所述组合物中检测探针的用量为20~500nM;所述组合物中内标引物的用量为12.5~250nM;所述组合物中内标探针的用量为10~250nM;所述dNTP的用量为0.2~0.3mM。

[0040] 进一步地,所述逆转录酶的浓度为5U/μL~15U/μL,例如逆转录酶可以是鼠白血病逆转录酶(MMLV)或者Tth酶;所述DNA聚合酶的浓度为5U/μL~15U/μL,例如DNA聚合酶可以是

Taq酶。

[0041] 在一个具体的实施方案中,本发明组合物的PCR体系为:

组份	每一个反应中的体积/浓度
5×PCR缓冲液*	10μl
dNTPs (100mM)	1.5μl
Tth酶 (5U/μl)	1.0μl
H-Taq酶 (5U/μl)	1.0μl
Mn (OAc) ₂ (150mM)	1.0μl
检测引物	0.5μM
检测探针	0.25μM
内标引物	0.25μM
内标探针	0.1μM
灭菌纯化水	补至45μl

[0042] 进一步地,试剂盒中含有阳性对照和阴性对照,且阴阳性对照与待测标本需同步处理。阳性对照中由含有2019年新型冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒和呼吸道合胞病毒特定核酸序列、人工合成的慢病毒颗粒与含有腺病毒和肺炎支原体特定核酸序列、人工合成的质粒混合而成,模拟实际临床标本;阴性对照由含有GAPDH管家基因目的片段(SEQ ID NO:22),人工合成的慢病毒颗粒组成,完全模拟正常人的咽拭子标本。

[0043] 第四方面,提供了一种用于检测引起呼吸道感染的病原体并分型的方法,所述方法包括以下步骤:

[0044] 1) 释放待测样本的核酸;

[0045] 2) 使用如上述本发明的组合物或上述本发明的试剂盒对步骤1)获得的核酸进行荧光定量PCR;

[0046] 3) 获得并分析结果。

[0047] 在本发明中,用于检测的样本可以是咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、血液等,但不限于此。

[0048] 进一步地,所述荧光定量PCR的反应条件为:

[0049] 预变性和酶激活,温度为95℃,时间1~10分钟,1次循环;逆转录,温度为60℃,时间25~35分钟,1次循环;cDNA预变性,温度为95℃,时间1~10分钟,1次循环;变性,温度为95℃,时间为10~20秒,退火,温度为60℃,时间为20~40秒,40~50次循环。

[0050] 在一个具体的实施方案中,提供了一种用于以非诊断目的检测引起呼吸道感染的病原体并分型的方法,所述方法包括以下步骤:

[0051] 1) 释放待测样本的核酸;

[0052] 2) 使用如上述本发明的组合物或上述本发明的试剂盒对步骤1)获得的核酸进行荧光定量PCR;

[0053] 3) 获得并分析结果。

[0054] 使用本发明的组合物,能够同时检测6种引起呼吸道感染的病原体并进行分型,分流一部分由于普通季节性感冒引起发热的患者,减少医疗资源的浪费,降低患者和社会的心理负担。

[0055] 同时,本发明可以快速确诊新型冠状病毒2019-nCoV,为新冠病毒的早诊断、早治疗、早隔离提供分子证据,为疾病的防控做充分的准备;对传染性和危害性大的新型冠状病毒2019-nCoV可以做到及时控制传染源,阻断病毒大流行和大爆发。

[0056] 本发明的组合物,结合荧光探针法,能够使用两个管在一次试验中同时,其成本低,通量高。使得单次试验一管能给出4个靶点的信息,并且操作简便,结果读取过程通过CT值即可以判定。检测全过程均在单管封闭条件下进行,避免了由于样本间交叉引起的假阳性和环境污染。

附图说明

[0057] 图1为本发明组合物检测新冠病毒400拷贝/mL检测图;

[0058] 图2为本发明组合物检测甲型流感病毒灵敏度6.5TCID₅₀/mL检测图;

[0059] 图3为本发明组合物检测乙型流感病毒灵敏度3.0TCID₅₀/mL检测图;

[0060] 图4为本发明组合物检测呼吸道合胞病毒500拷贝/mL检测图;

[0061] 图5为本发明组合物检测呼吸道腺病毒400拷贝/mL检测图;

[0062] 图6为本发明组合物检测肺炎支原体400拷贝/mL检测图;

[0063] 图7为本发明组合物特异性检测图;

[0064] 图8为干扰物质对新冠毒检测的影响(含对照曲线);

[0065] 图9为干扰物质对甲型流感病毒检测的影响(含对照曲线);

[0066] 图10为干扰物质对乙型流感病毒检测的影响(含对照曲线);

[0067] 图11为干扰物质对呼吸道合胞病毒检测的影响(含对照曲线);

[0068] 图12为干扰物质对腺病毒检测的影响(含对照曲线);

[0069] 图13为干扰物质对肺炎支原体检测的影响(含对照曲线);

[0070] 图14为检测结果图,A为本发明组合物的结果,B为如果以鼻病毒代替本发明中的肺炎支原体时的结果;

[0071] 图15为检测结果图,A为本发明组合物的结果,B为如果以偏肺病毒代替本发明中的肺炎支原体时的结果;

[0072] 图16为本发明组合物检测6个甲型流感病毒检测图;

[0073] 图17为本发明对比例组合物检测6个甲型流感病毒检测图;

[0074] 图18为本发明组合物检测3个梯度(2000拷贝/mL、500拷贝/mL、200拷贝/mL)的新型冠状病毒2019-nCoV检测图;

[0075] 图19为本发明对比例组合物检测3个梯度(2000拷贝/mL、500拷贝/mL、200拷贝/mL)的新型冠状病毒2019-nCoV检测图。

具体实施方式

[0076] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明本发明,而非限制本发明。

[0077] 实施例1、本发明所使用的引物及探针

[0078] 本发明所使用的引物及探针如下表1所示:

表 1

[0079]

名称	碱基序列 5'-3'
甲型流感病毒上游引物 SEQ ID NO:1	CAGAAGATTTGTCCTTCCAG
甲型流感病毒下游引物 SEQ ID NO:2	GTCATACTCCTCTGCATTGTCTC
甲型流感病毒探针 SEQ ID NO:3	TCTTCGAGCTCTCGGACGAAAA GGCAA
乙型流感病毒上游引物 SEQ ID NO:4	GCCATCGGATCCTCAATTC
乙型流感病毒下游引物 SEQ ID NO:5	TTCTTCCGTGACCAGTCTAATT
乙型流感病毒探针 SEQ ID NO:6	AAGGACATCCAAAGCCAATTCG AGCAG
呼吸道合胞病毒上游引物 SEQ ID NO:7	CACCCTGACAAAATCAACAATAT A

[0080]

呼吸道合胞病毒下游引物 SEQ ID NO:8	CATAGGCACCCATATTGTTAGT AAAC
呼吸道合胞病毒探针 SEQ ID NO:9	AGACAAGATGGGGCAAATATGG AAAC
呼吸道腺病毒上游引物 SEQ ID NO:10	GCAGTGGTCTTACATGCACATC
呼吸道腺病毒下游引物 SEQ ID NO:11	TATCCTCACGGTCCACAGGG
呼吸道腺病毒探针 SEQ ID NO:12	CCAGGACGCCTCGGAGTACCTG AGC
新型冠状病毒 2019-nCoV 上游引物 SEQ ID NO:13	AGCAATCTTTAATCAGTGTGTAA CAT
新型冠状病毒 2019-nCoV 下游引物 SEQ ID NO:14	AAATCACATGGGGATAGCACTAC T

[0081]

新型冠状病毒 2019-nCoV 探针 SEQ ID NO:15	AAAGAGCCACCACATTTTCACC GAGG
肺炎支原体上游引物 SEQ ID NO:16	CTTTGGTTCGCATGAATCAA
肺炎支原体下游引物 SEQ ID NO:17	TTCCCTACTGCTGCCTCC
肺炎支原体探针 SEQ ID NO:18	TCGTTATTTGATGAGGGTGCGCC ATATC
内标上游引物 SEQ ID NO:19	CTCCTCTGACTTCAACAGCGA
内标下游引物 SEQ ID NO:20	CCACCACCCTGTTGCTGT
内标探针 SEQ ID NO:21	TTGACGCTGGGGCTGGCATT

[0082] 其中,甲型流感病毒探针和呼吸道腺病毒探针的荧光报告基团为FAM;新型冠状病毒病

毒2019-nCoV探针和乙型流感病毒探针的荧光报告基团为HEX;呼吸道合胞病毒和肺炎支原体探针的荧光报告基团为CY5,内标的荧光报告基团为ROX,探针的3'末端还具有BHQ1或BHQ2猝灭基团。

[0083] 实施例2、检测引起呼吸道感染的病原体并分型的方法

[0084] 本发明检测样本为咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、血液。磁珠法提取病毒核酸,在样本处理室进行如下操作:

[0085] 2.1 取适量1.5 mL灭菌离心管,分别标记阴性对照、阳性对照及待测样本,每管加入300 μ L RNA提取溶液1;

[0086] 2.2 每管加入200 μ L待测样本或阴性对照、阳性对照;盖上管盖,震荡混匀10秒钟,瞬时离心;

[0087] 2.3 每管加入100 μ L RNA提取溶液2-mix(充分混匀后吸取),震荡混匀10秒钟后,室温静置10分钟;

[0088] 2.4 瞬时离心后将离心管置于分离器上,3分钟后缓慢将溶液吸出(注意不要碰到吸附于管壁的棕色物);

[0089] 2.5 每管加入600 μ L RNA提取溶液3和200 μ L RNA提取溶液4,震荡混匀5秒钟,瞬时离心后将离心管再次置于分离器上;

[0090] 2.6 约3分钟后,上清液分为两层,将吸头插入离心管底部,从底部开始缓慢将液体完全吸出丢弃,静置1分钟后将管底残余液体完全吸出丢弃;

[0091] 2.7 每管加入50 μ L TE buffer(pH8.0)进行洗脱,然后将洗脱后的全部棕色混合液作为待测样本转移至0.2mL PCR反应管中,盖上管盖,转移到扩增检测区。

[0092] 实时荧光PCR反应体系按照如下进行配置:

组份	每一个反应中的体积/浓度
5 \times PCR缓冲液	10 μ l
dNTPs(100mM)	1.5 μ l
Tth酶(5U/ μ l)	1.0 μ l
H-Taq酶(5U/ μ l)	1.0 μ l
Mn(OAc) ₂ (150mM)	1.0 μ l
检测引物	0.5 μ M
检测探针	0.25 μ M
内标引物	0.25 μ M
内标探针	0.1 μ M
灭菌纯化水	补至45 μ l

[0093] PCR扩增程序如下进行设置:

[0094]

步骤	温度	时间	循环数
1 预变性和酶激活	95℃	1 分钟	1
2 逆转录	60℃	30 分钟	1
3 cDNA 预变性	95℃	1 分钟	1
4 变性 退火, 延伸及荧光采集	95℃	15 秒	45
	60℃	30 秒	
5 仪器冷却	25℃	10 秒	1

[0095] 结果分析:

[0096] 1) 目的检测信号为FAM, HEX (或VIC) 及CY5, 内参检测信号为ROX;

[0097] 2) Baseline的设置: Baseline一般设置为3-15个循环, 具体可根据实际情况进行调整。其调整原则为: 选择指数扩增前荧光信号较稳定的区域, 起点(Start) 避开荧光采集起始阶段的信号波动, 终点(End) 比最早出现指数扩增的样本Ct减少1-2个循环。Threshold的设置: 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点;

[0098] 3) 先分析内标在ROX通道是否检测扩增曲线, 且 $Ct \leq 39$, 若有, 表示本次检测有效, 继续进行后续分析:[0099] A) 若FAM通道检测到典型的S型扩增曲线, 且 $Ct < 39$, 表示甲型流感病毒和呼吸道腺病毒检测结果为阳性;[0100] B) 若HEX通道检测到典型的S型扩增曲线, 且 $Ct < 39$, 表示新型冠状病毒2019-nCoV和乙型流感病毒检测结果为阳性;[0101] C) 若CY5通道检测到典型的S型扩增曲线, 且 $Ct < 39$, 表示呼吸道合胞病毒和肺炎支原体检测结果为阳性;[0102] 4) 若内标在ROX通道没有检测到Ct或 $Ct > 39$, 表示本次检测样本浓度太低或者有干扰物质抑制反应, 需重新准备实验。

[0103] 实施例3、本发明组合物测试临床样本的检测结果

[0104] 使用本发明表1的组合物, 按照实施例2所述的方法, 对411份标本进行检测, 其中, 2019年新型冠状病毒细胞培养液1份、甲型流感病毒阳性25例、乙型流感病毒阳性68例、呼吸道腺病毒阳性77例、呼吸道合胞病毒阳性18例和肺炎支原体阳性27例, 整体结果与疾病预防控制中心鉴定结果一致。另外也将本发明的组合物与对照方法(以市售试剂盒做为对照试剂盒的方法)进行了对比, 在对照方法具有假阴性或假阳性的同时, 本发明组合物的检测效果更为准确, 结果如下表2-7所示。

[0105] 表2甲型流感病毒(Flu A) 阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
待考 评试 剂盒	阳性	25	0	25
	阴性	0	385	385
总数		25	385	410

[0107] 表3乙型流感病毒(Flu B)阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
待考 评试 剂盒	阳性	67	1	68
	阴性	1	341	342
总数		68	342	410

[0109] 表4呼吸道合胞病毒(RSV)阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
待考 评试 剂盒	阳性	18	2	20
	阴性	0	390	390
总数		18	392	410

[0111] 表5腺病毒(ADV)阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
待考 评试 剂盒	阳性	76	11	87
	阴性	1	322	323
总数		77	333	410

[0113] 表6肺炎支原体(MP)阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
[0114] 待考 评试 剂盒	阳性	27	2	29
	阴性	0	381	381
总数		27	383	410

[0115] 表7整体样本阴阳性统计表

实验		对照方法		合计
		阳性	阴性	
[0116] 待考 评试 剂盒	阳性	214	8	222
	阴性	3	185	188
总数		217	193	410

[0117] 实施例4、本发明组合物的灵敏度

[0118] 用不同浓度的样本进行实验,检测本发明组合物的灵敏度

[0119] 使用本发明表1的组合物,按照实施例2所述的方法,对各个靶标灵敏度阳性样本进行检测梯度稀释,以稀释到检测限的样本作为待测样本检测,每个通道检测20次。本发明中的组合物对2019年新型冠状病毒检出的检测灵敏度为400拷贝/mL;对甲型流感病毒检出的检测灵敏度为6.5TCID₅₀/mL;对乙型流感病毒检出的检测灵敏度为3.0TCID₅₀/mL;对呼吸道合胞病毒检出的检测灵敏度为500拷贝/mL;对腺病毒检出的检测灵敏度为400拷贝/mL;对肺炎支原体检出的检测灵敏度为400拷贝/mL,实验结果如图1-6所示。

[0120] 实施例5、本发明组合物的特异性

[0121] 将本发明的组合物用于检测其余的常见呼吸道病原体,实验发现本发明组合物对常见呼吸道病原体(麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、I型人副流感病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒A型、人偏肺病毒、百日咳杆菌、肺炎衣原体、流感嗜血杆菌、唾液链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌等)无交叉反应,实验结果如图7所示。

[0122] 实施例6、干扰物质对本发明组合物的影响

[0123] 样本中分别加入一定比例的治疗药物,如常见抗感冒药物、糖皮质激素、抗生素等对本试剂盒的检测无影响。分别检测了含有盐酸羟甲唑啉(100μg/mL)、地塞米松(50μg/mL)、盐酸头孢甲肟(50μg/mL)、薄荷醇(50μg/mL)、扎那米韦(100μg/mL)、利巴韦林(100μg/mL)、阿奇霉素(100μg/mL)的样本,结果表明,这些干扰对检测结果无影响,不影响本发明组合物的准确性,实验结果如图8-13所示。

[0124] 实施例7、多种病原体联检,引物探针之间的相互干扰

[0125] 由于碱基互补配对原则,引物和(或)探针之间会形成二聚体,但这种概率很少,在设计之初就可以排除掉。但多种病原体联合检测时,引物和探针众多,引物和引物、探针和探针或者引物和探针之间容易发生二聚体,要保证设计的保守性(保守性对检测的准确性至关重要),又要考虑不同引物探针之间的相互干扰,需要精心对引物探针进行设计。

[0126] 本发明中,发明人以鼻病毒或者偏肺病毒代替本发明中的肺炎支原体,但经过试验,发现鼻病毒和偏肺病毒的加入会严重影响到本发明所述组合物和方法的检测灵敏度(实验结果如图14、图15所示),从图中可以看出使用鼻病毒或偏肺病毒代替之后,Ct值明显后移,影响本发明组合物和方法的灵敏度。

[0127] 本发明中,发明人以本发案中优选的检测甲型流感病毒的引物探针和其它本发明人设计的检测甲型流感病毒的引物探针对比(引物序列为SEQ ID NO:23 GCGGATGCCTTTTGTGATT;SEQ ID NO:24 TTGCTTCAAATGAGAATGTGG;探针序列SEQ ID NO:25 CCACTCCTGGTCCTTATGGCCAGT),同时检测6个甲型流感病毒样本,其实验结果如图16和图17表示,结果表明其它非本发明中优选的引物探针严重影响了整个体系的检测结果。

[0128] 本发明中,发明人以本发案中优选的检测新型冠状病毒2019-nCoV的引物探针和其它本发明人设计的检测新型冠状病毒2019-nCoV的引物探针对比(引物序列为SEQ ID NO:26 CACTGATGACAATGCGTTAGCTTAC;SEQ ID NO:27 CCAGTTCTGTATAGATAGTACCAGTTCCA;探针序列SEQ ID NO:28 CGGATAACAGTGCAAGTACAAACCTACCT),将新型冠状病毒2019-nCoV的标准品浓度稀释为3个梯度(2000拷贝/mL、500拷贝/mL、200拷贝/mL)实验结果如图18和图19表示,结果表明其它非本发明中优选的引物探针严重影响了整个体系的检测结果。

[0129] 因此,本发明的组合物具有唯一性。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 圣湘生物科技股份有限公司
- [0003] <120> 检测引起呼吸道感染的病原体并分型的组合物、试剂盒、方法及用途
- [0004] <160> 28
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] cagaagattt gtccttccag 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 23
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <400> 2
- [0017] gtcataactcc tctgcattgt ctc 23
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 27
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] tcttcgagct ctcggacgaa aaggcaa 27
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 19
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列
- [0028] <400> 4
- [0029] gccatcggat cctcaattc 19
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 22
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <400> 5
- [0035] ttcttccgtg accagtctaa tt 22
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 27
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列
[0040] <400> 6
[0041] aaggacatcc aaagccaatt cgagcag 27
[0042] <210> 7
[0043] <211> 24
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工序列
[0046] <400> 7
[0047] caccctgaca aaatcaacaa tata 24
[0048] <210> 8
[0049] <211> 22
[0050] <212> DNA
[0051] <213> 人工序列
[0052] <400> 8
[0053] cataggcacc catattgtta gt 22
[0054] <210> 9
[0055] <211> 26
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列
[0058] <400> 9
[0059] agacaagatg gggcaaatat ggaaac 26
[0060] <210> 10
[0061] <211> 22
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列
[0064] <400> 10
[0065] gcagtgtct tacatgcaca tc 22
[0066] <210> 11
[0067] <211> 20
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工序列
[0070] <400> 11
[0071] tatectcag gtccacaggg 20
[0072] <210> 12
[0073] <211> 25
[0074] <212> DNA
[0075] <213> 人工序列
[0076] <400> 12
[0077] ccaggacgcc tcggagtacc tgagc 25

- [0078] <210> 13
[0079] <211> 26
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列
[0082] <400> 13
[0083] agcaatcttt aatcagtggtg taacat 26
[0084] <210> 14
[0085] <211> 24
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列
[0088] <400> 14
[0089] aaatcacatg gggatagcac tact 24
[0090] <210> 15
[0091] <211> 26
[0092] <212> DNA
[0093] <213> 人工序列
[0094] <400> 15
[0095] aaagagccac cacatcttca ccgagg 26
[0096] <210> 16
[0097] <211> 20
[0098] <212> DNA
[0099] <213> 人工序列
[0100] <400> 16
[0101] ctttggttcg catgaatcaa 20
[0102] <210> 17
[0103] <211> 18
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列
[0106] <400> 17
[0107] ttccctactg ctgcctcc 18
[0108] <210> 18
[0109] <211> 28
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 人工序列
[0112] <400> 18
[0113] tcgttatctg atgagggtgc gccatctc 28
[0114] <210> 19
[0115] <211> 21
[0116] <212> DNA

- [0117] <213> 人工序列
[0118] <400> 19
[0119] ctctctgac ttcaacagcg a 21
[0120] <210> 20
[0121] <211> 18
[0122] <212> DNA
[0123] <213> 人工序列
[0124] <400> 20
[0125] ccaccaccct gttgctgt 18
[0126] <210> 21
[0127] <211> 20
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 人工序列
[0130] <400> 21
[0131] ttgacgctgg ggctggcatt 20
[0132] <210> 22
[0133] <211> 132
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 智人
[0136] <400> 22
[0137] tctctctga cttcaacagc gacacccact cctccacctt tgacgctggg gctggcattg 60
[0138] ccctcaacga ccactttgtc aagctcattt cctggtatga caacgaattt ggctacagca 120
[0139] acagggtggt gg 132
[0140] <210> 23
[0141] <211> 20
[0142] <212> DNA
[0143] <213> 人工序列
[0144] <400> 23
[0145] gcggatgcct tttgttgatt 20
[0146] <210> 24
[0147] <211> 21
[0148] <212> DNA
[0149] <213> 人工序列
[0150] <400> 24
[0151] ttgcttcaaa tgagaatgtg g 21
[0152] <210> 25
[0153] <211> 25
[0154] <212> DNA
[0155] <213> 人工序列

- [0156] <400> 25
[0157] ccactcctgg tccttatggc ccagt 25
[0158] <210> 26
[0159] <211> 25
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列
[0162] <400> 26
[0163] cactgatgac aatgcgttag cttac 25
[0164] <210> 27
[0165] <211> 29
[0166] <212> DNA
[0167] <213> 人工序列
[0168] <400> 27
[0169] ccagttctgt atagatagta ccagttcca 29
[0170] <210> 28
[0171] <211> 29
[0172] <212> DNA
[0173] <213> 人工序列
[0174] <400> 28
[0175] cggataacag tgcaagtaca aacctacct 29

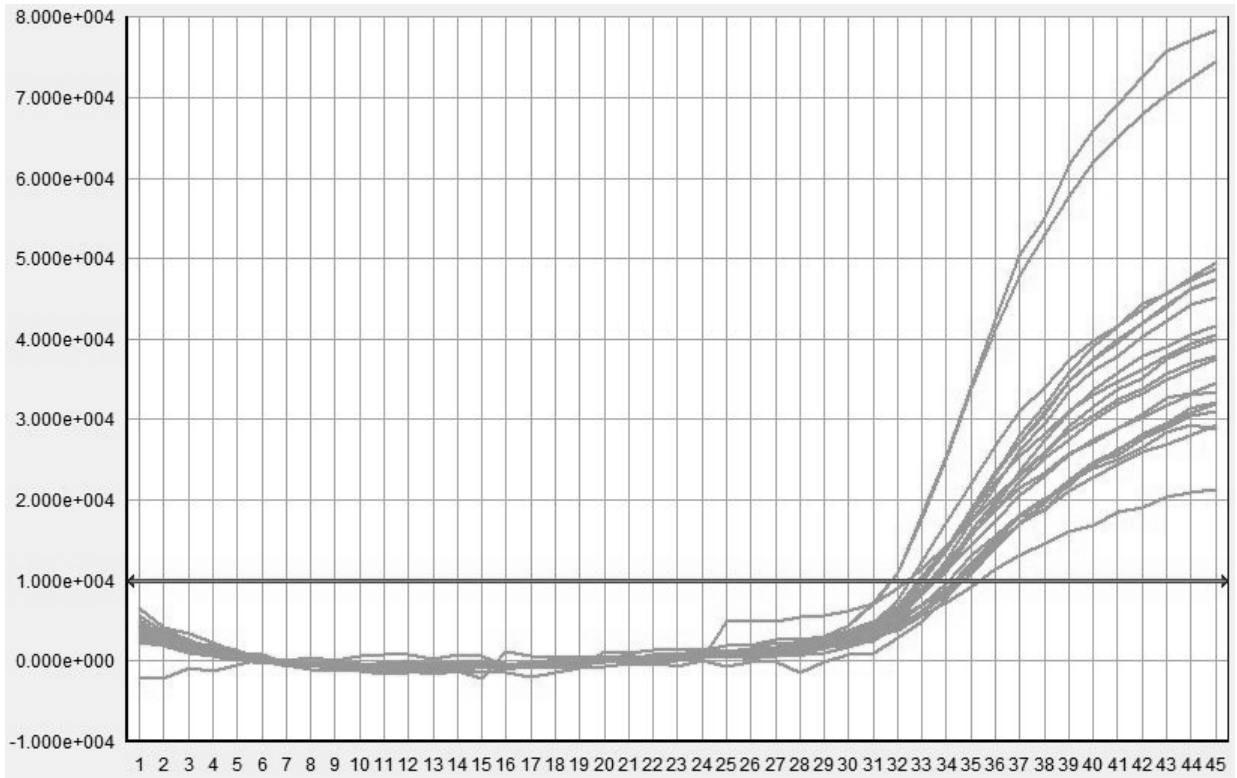


图1

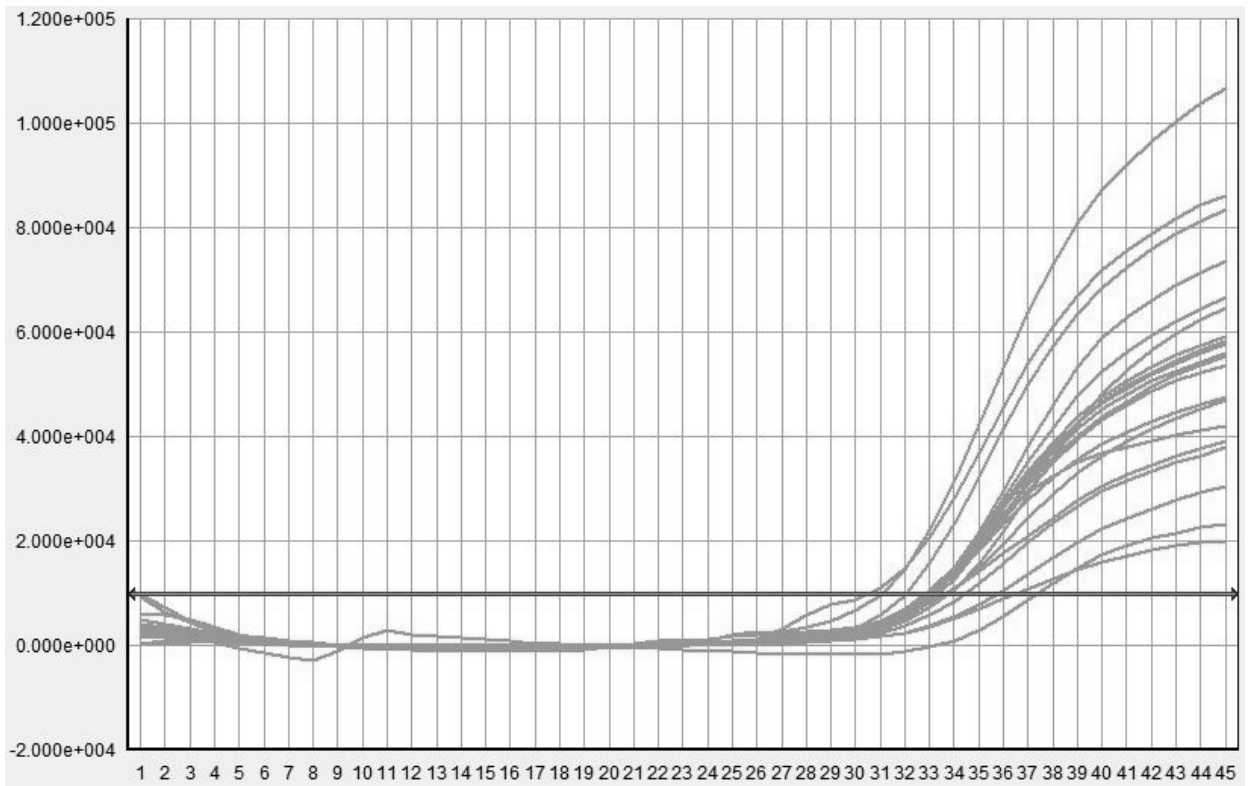


图2

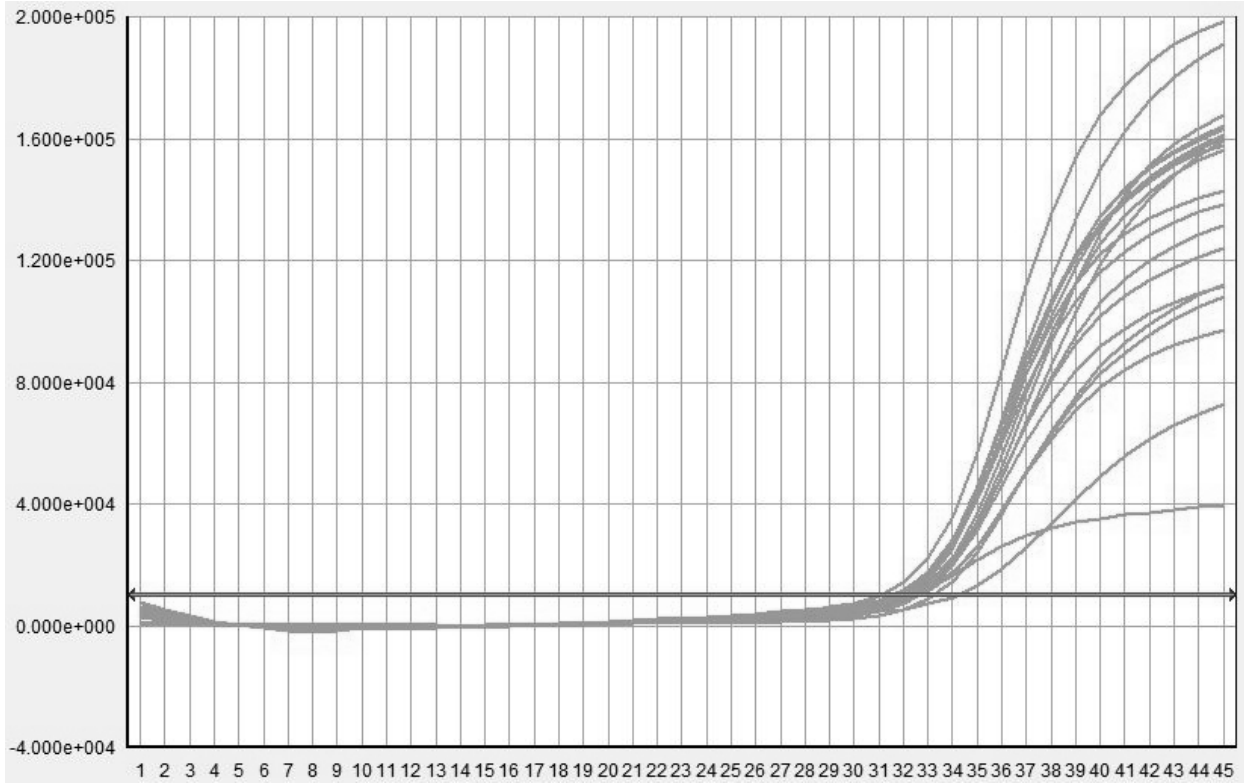


图3

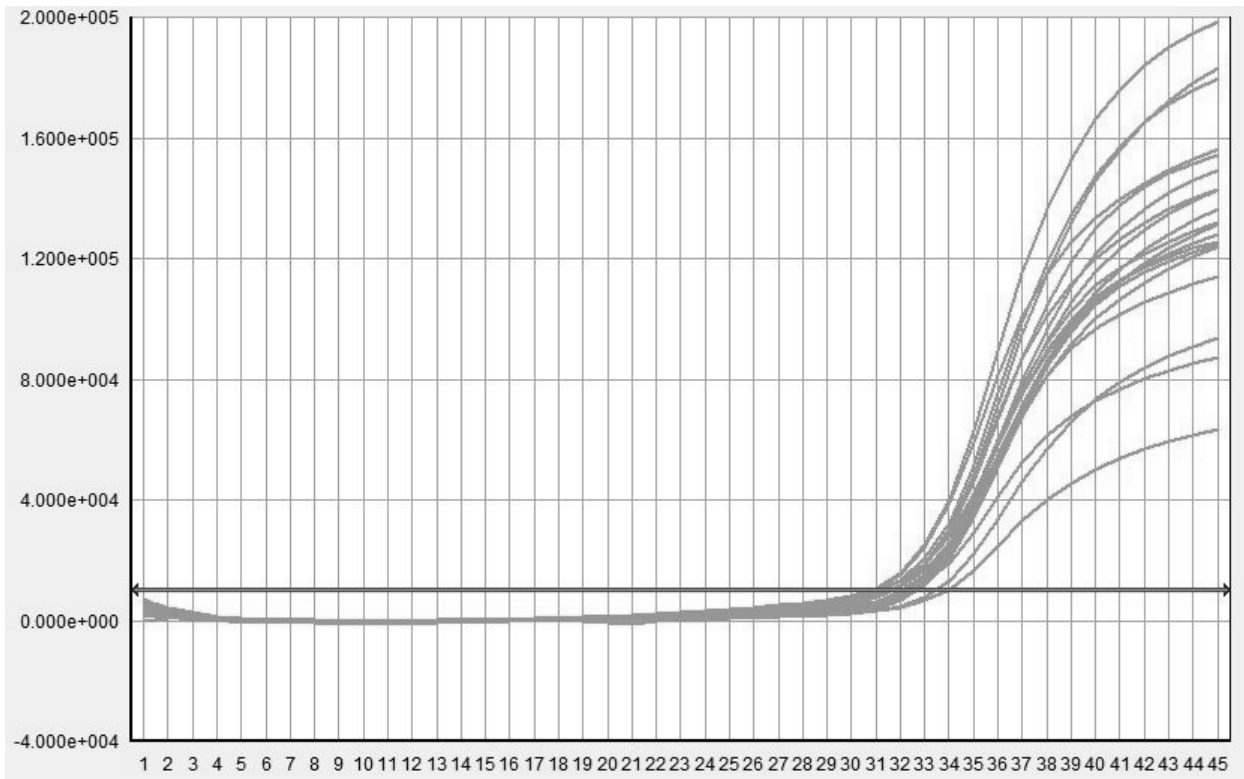


图4

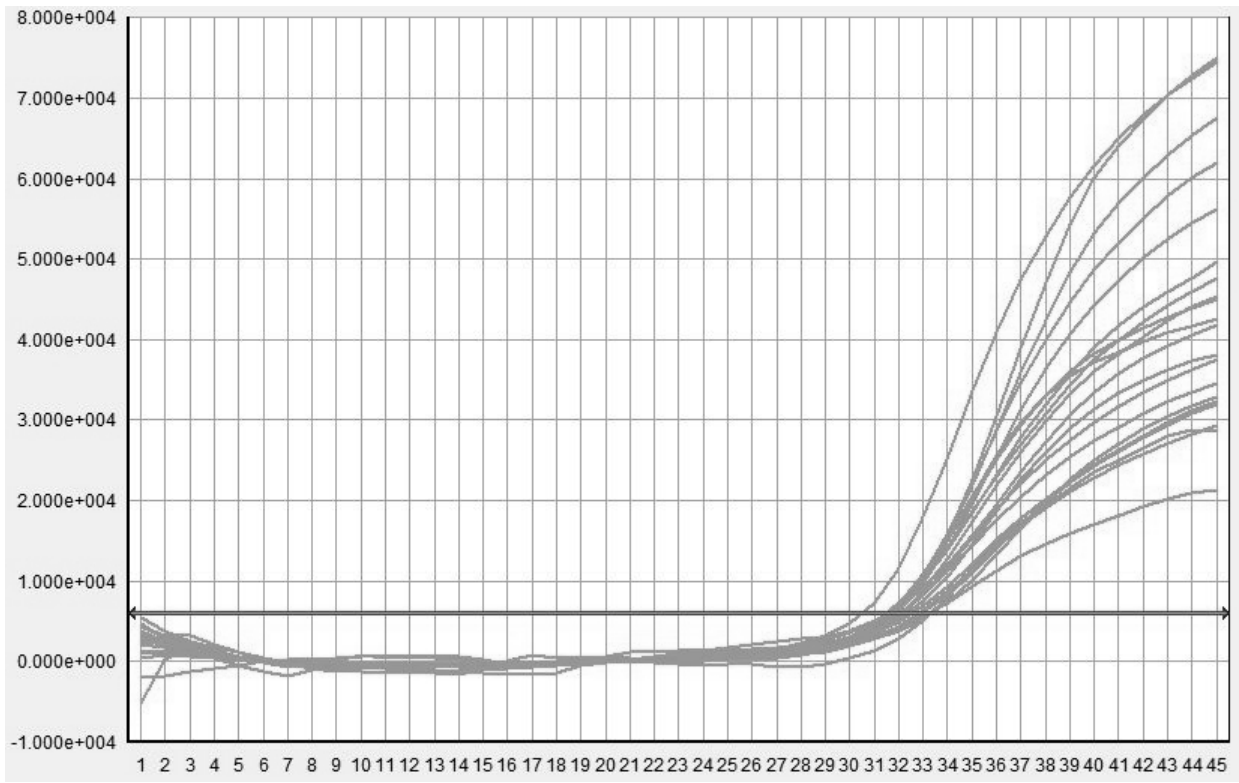


图5

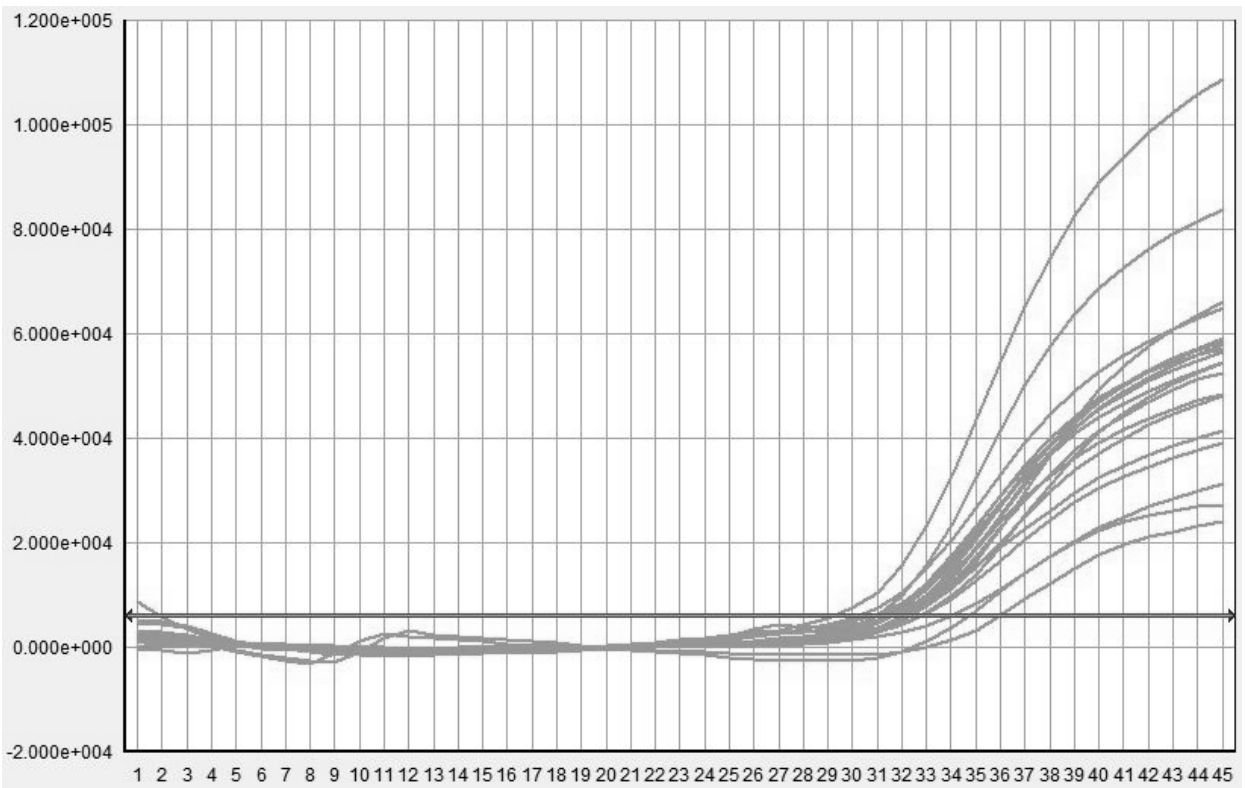


图6

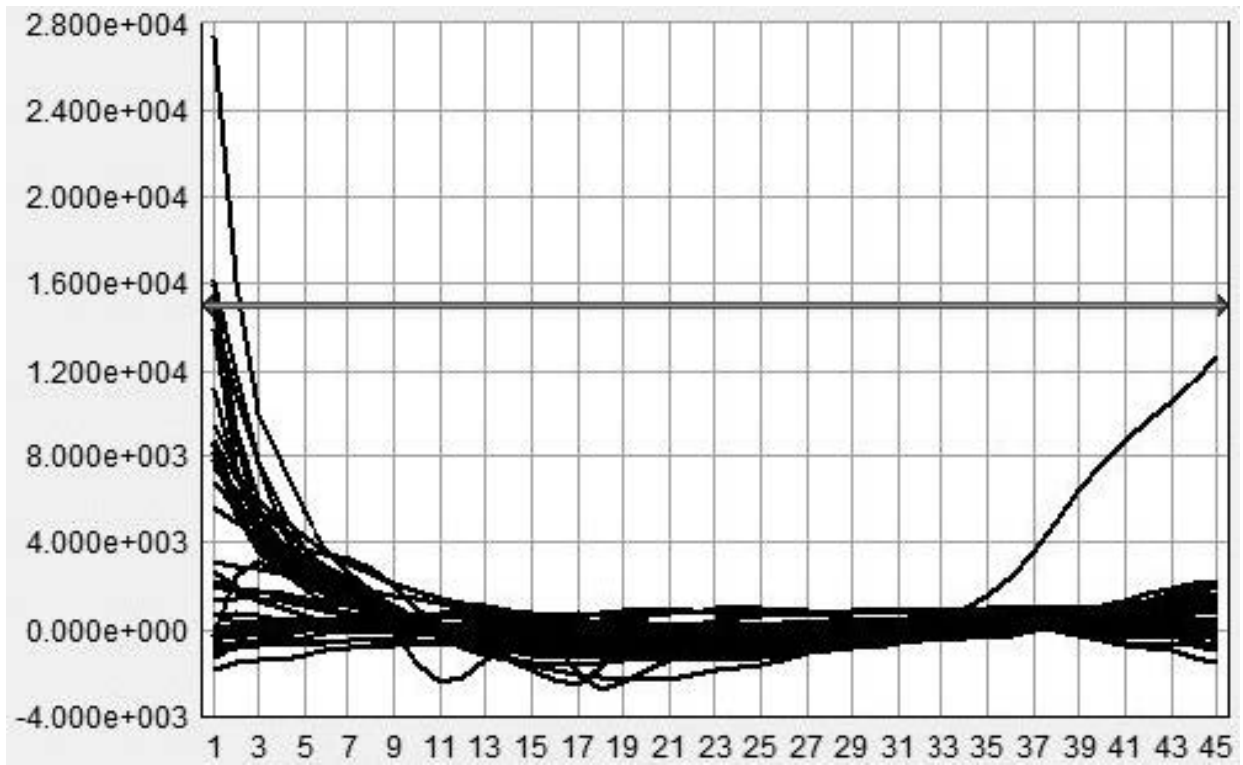


图7

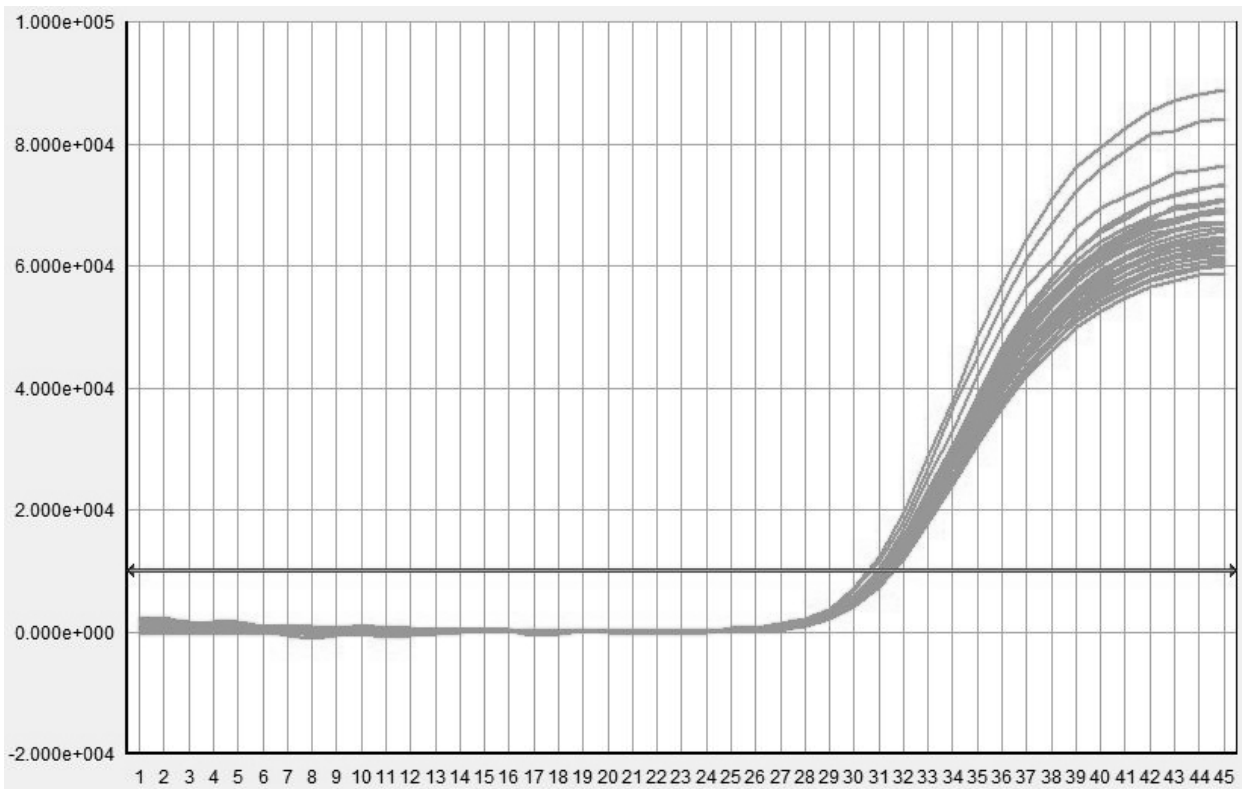


图8

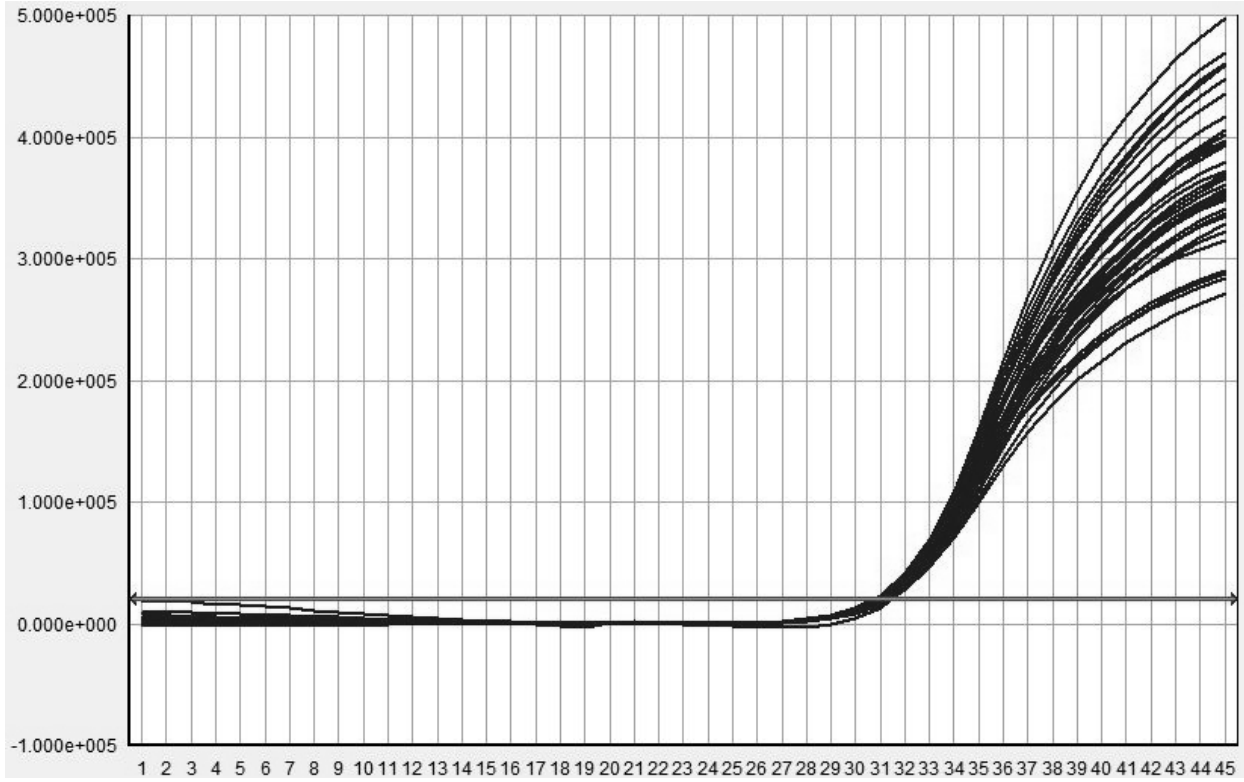


图9

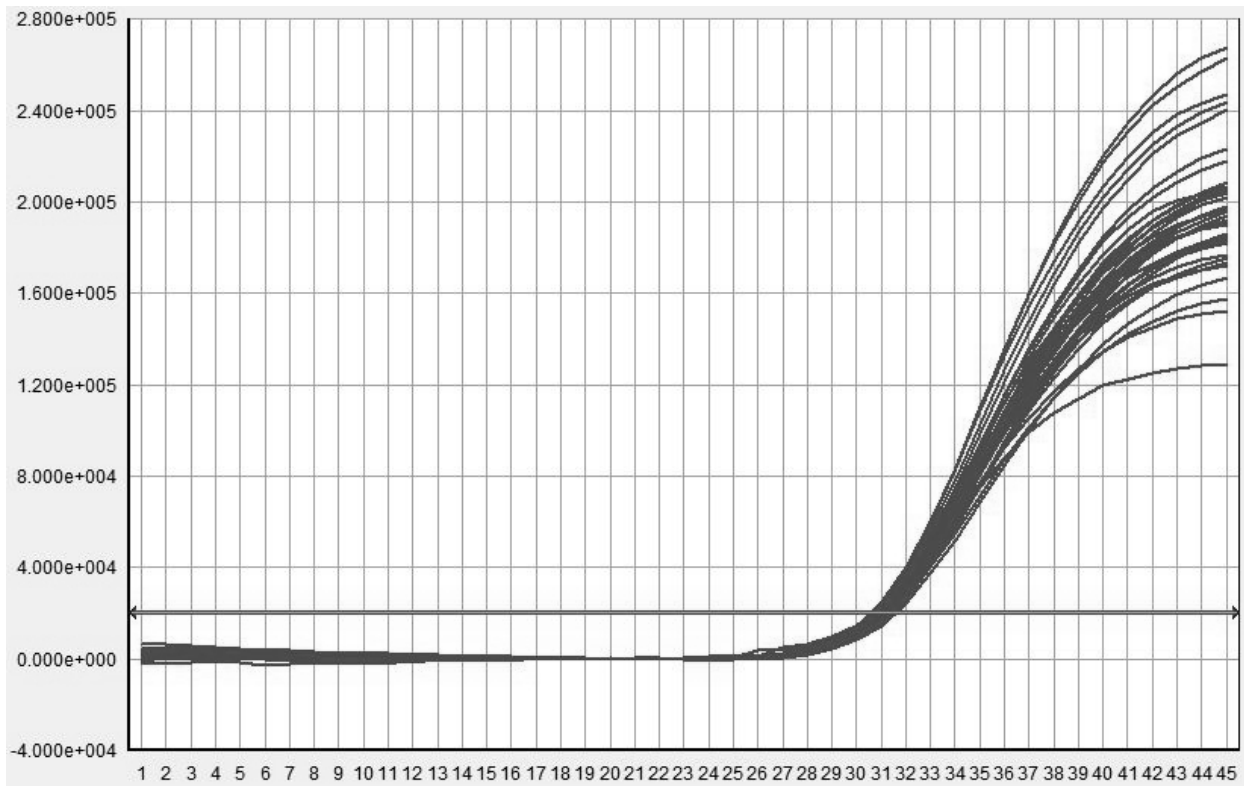


图10

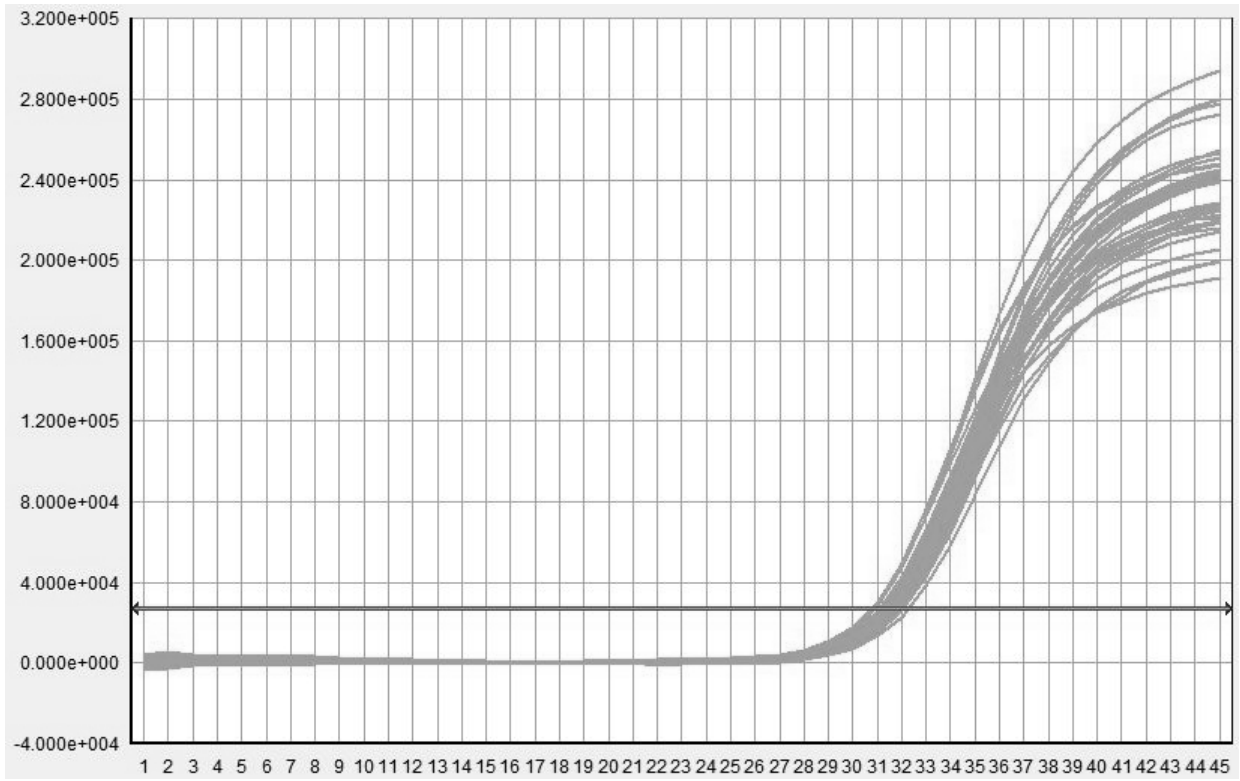


图11

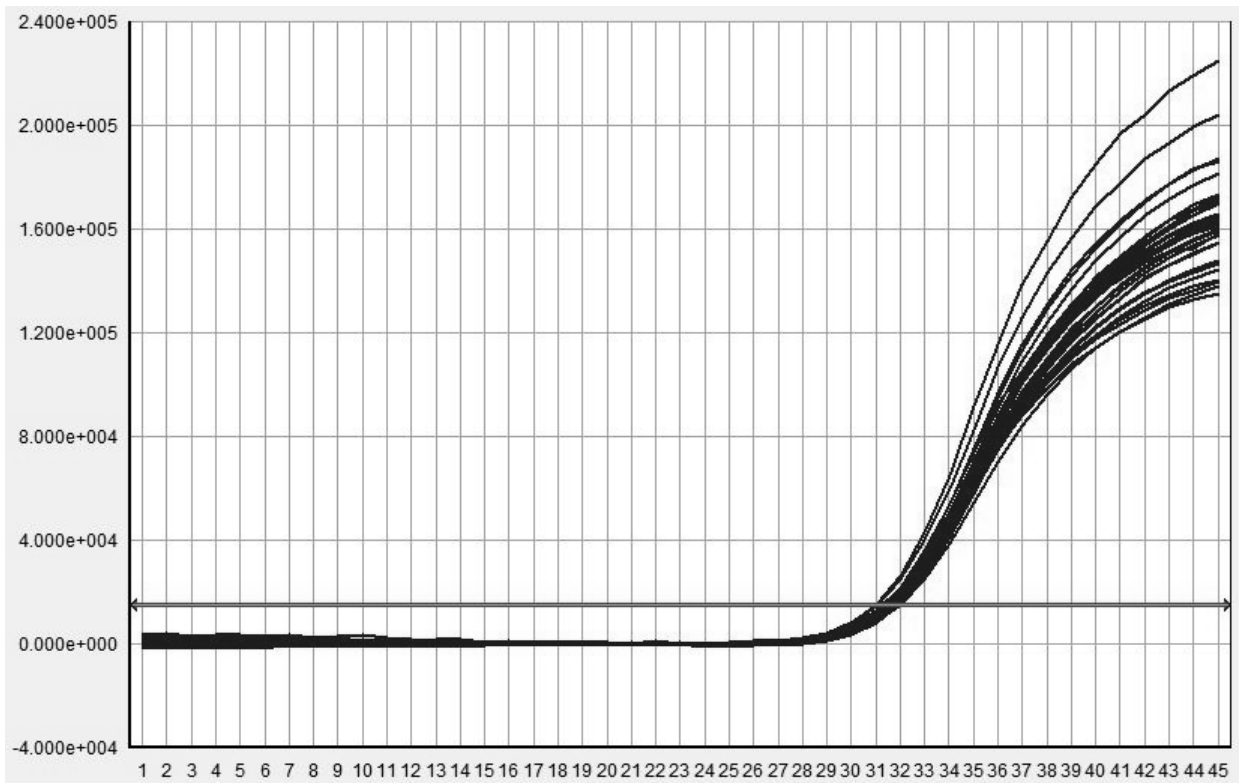


图12

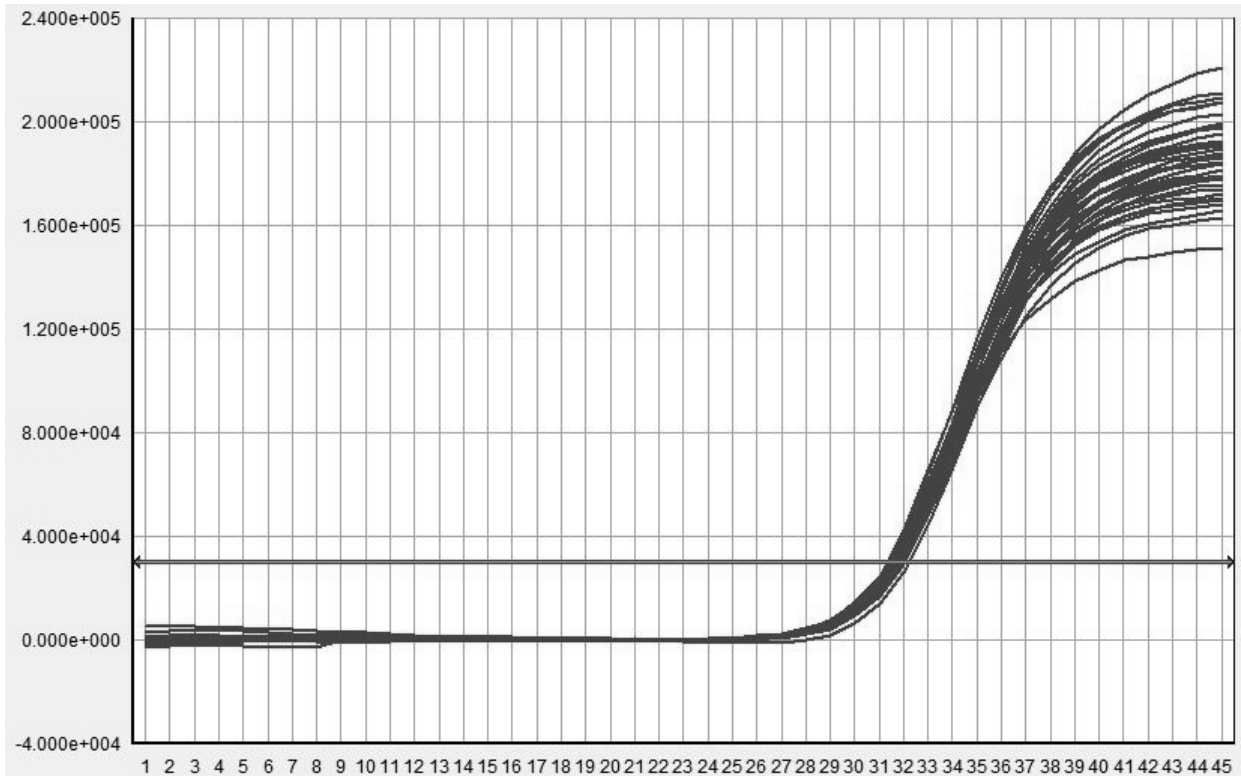


图13

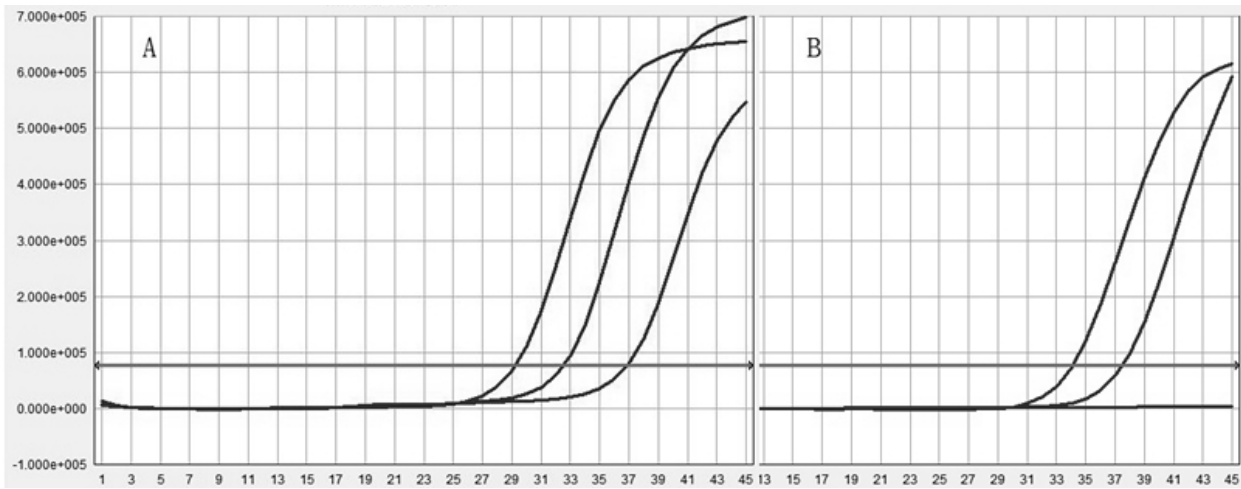


图14

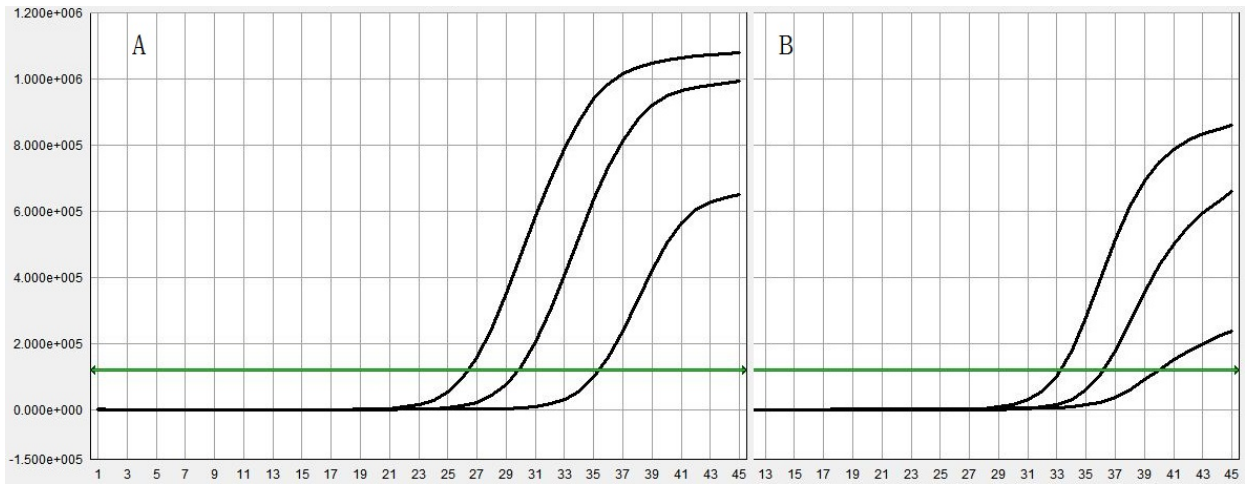


图15

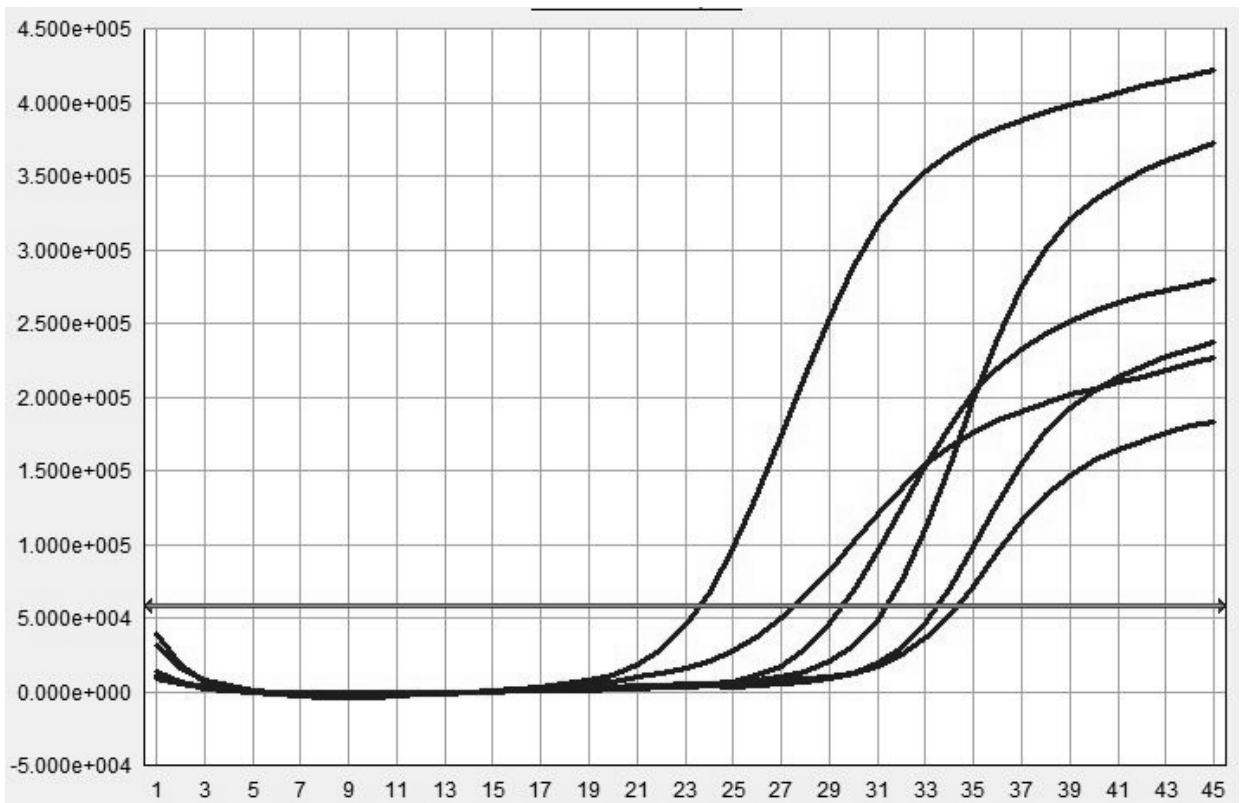


图16

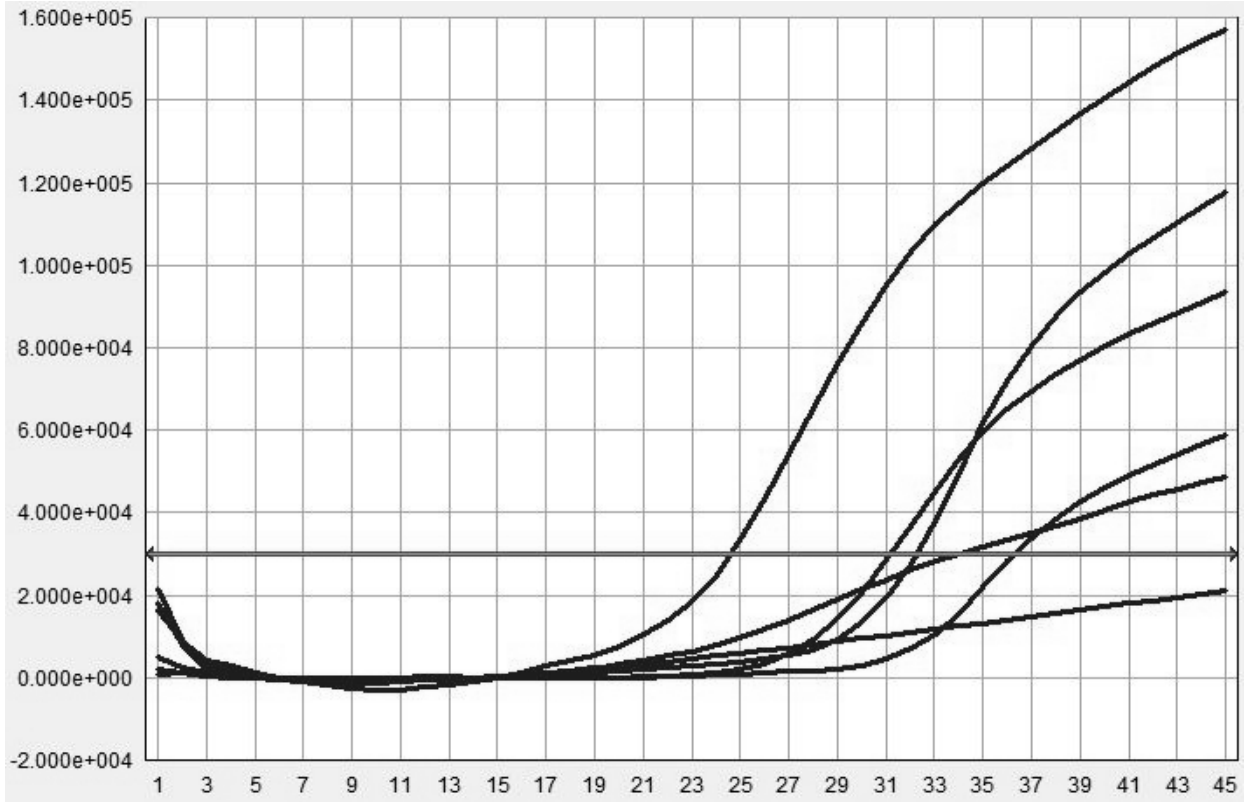


图17

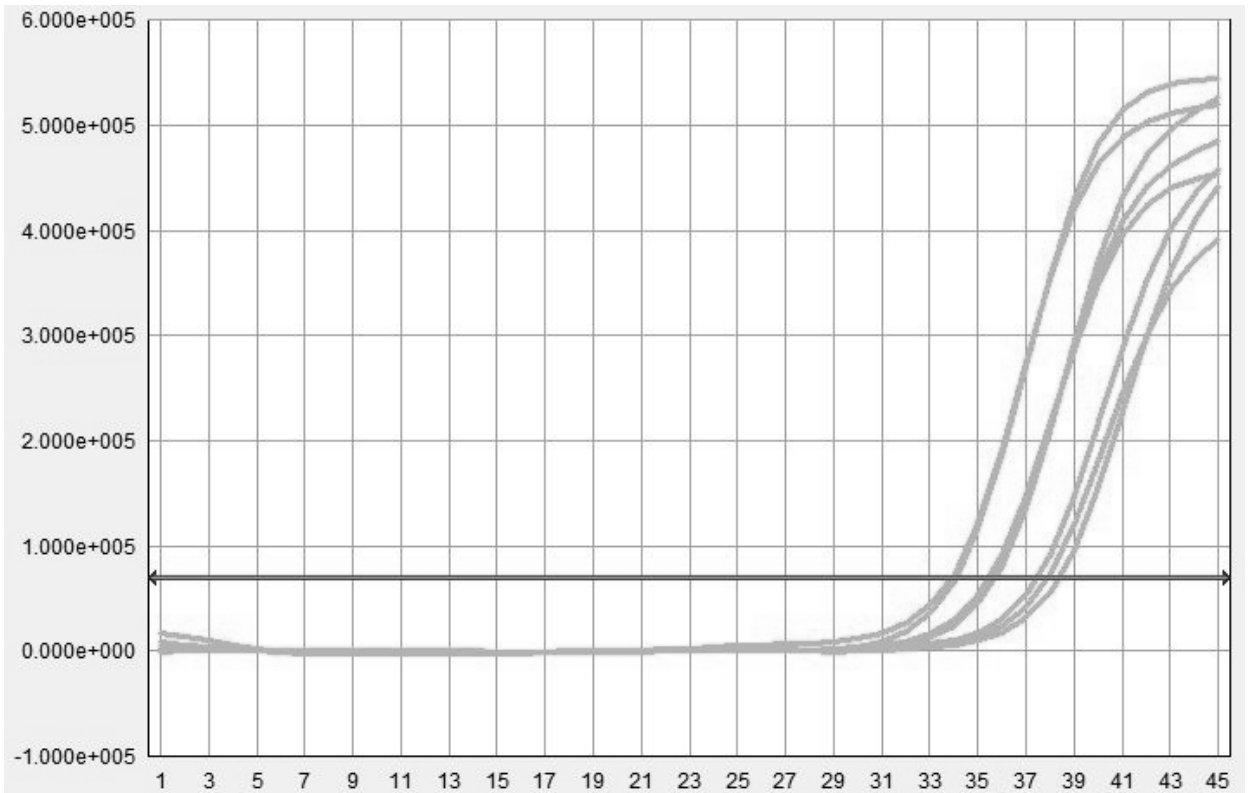


图18

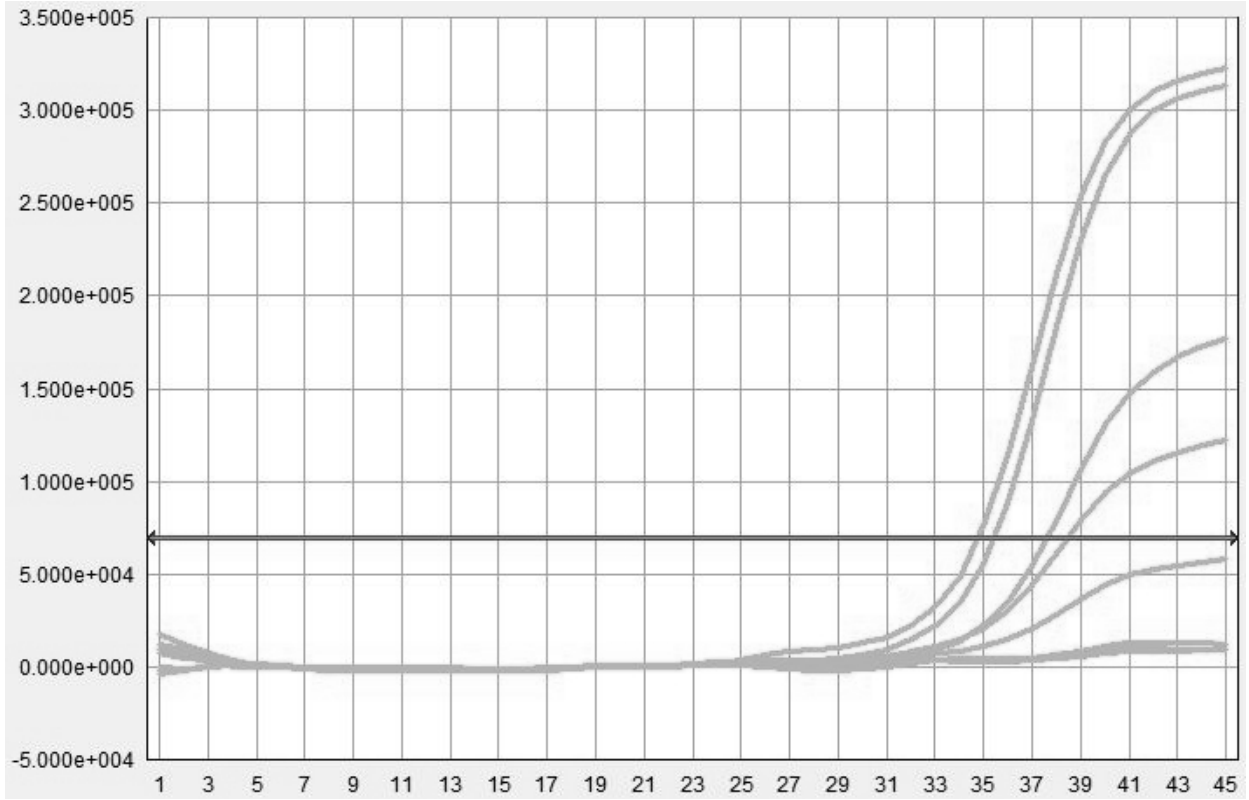


图19