



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117568499 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 20

(21) 申请号 202410049887.7

(22) 申请日 2022.08.04

(66) 本国优先权数据

202210607484.0 2022.05.31 CN

(62) 分案原申请数据

202210934455.5 2022.08.04

(71) 申请人 深圳联合医学科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街
道留仙洞村留仙文化园第6栋2楼202
室

(72) 发明人 王艳平 郭永超 徐仲尧 蔡锦刚

(74) 专利代理机构 深圳舍穆专利代理事务所

(特殊普通合伙) 44398

专利代理师 伍颀

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

C12R 1/45 (2006.01)

C12R 1/44 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/085 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

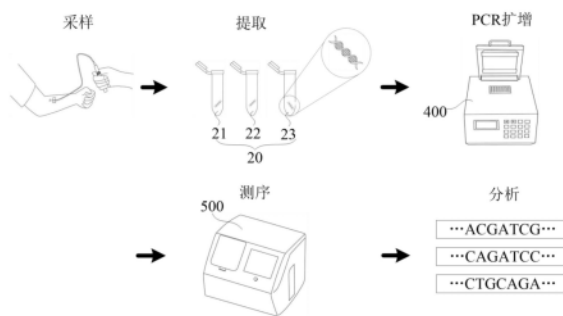
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

定量检测多种病原体基因的试剂盒

(57) 摘要

本公开描述了一种定量检测多种病原体基因的试剂盒,是通过多重PCR对多种病原体基因的靶标区域进行检测的试剂盒,试剂盒用于对DNA样本进行检测,试剂盒包括第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物、第三反向引物和人工质粒集合;其中:第二反向引物包括第二测序引物、第一条形码和第一测序接头,第一条形码配置为识别不同的样本;第二正向引物包括第二测序接头和第一测序引物;人工质粒集合包括多种具有预定拷贝数的并能够与第一正向引物和第一反向引物结合的人工质粒。根据本公开,能够能够提供一种定量检测多种病原体基因的试剂盒。



1. 一种定量检测多种病原体基因的试剂盒,是通过多重PCR对多种病原体基因的靶标区域进行检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒用于对DNA样本进行检测,所述试剂盒包括第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物、第三反向引物和人工质粒集合;其中:

所述第一正向引物包括第一测序引物和与所述靶标区域5'端相匹配的序列;所述第一反向引物包括第二测序引物和与所述靶标区域3'端相匹配的序列;所述第二反向引物包括所述第二测序引物、第一条形码和第一测序接头,所述第一条形码配置为识别不同的样本;所述第二正向引物包括第二测序接头和所述第一测序引物;所述第三反向引物包括所述第一测序接头;所述人工质粒集合包括多种具有预定拷贝数的并能够与所述第一正向引物和所述第一反向引物结合的人工质粒;所述第一正向引物、所述第一反向引物和所述第二反向引物用于第一轮PCR扩增,所述第二正向引物和所述第三反向引物用于第二轮PCR扩增。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述第一正向引物中的与所述靶标区域5'端相匹配的序列如SEQ ID NO.1~36所示,所述第一反向引物中的与所述靶标区域3'端相匹配的序列如SEQ ID NO.37~72所示。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述预定拷贝数为200~400拷贝。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述人工质粒集合的序列如SEQ ID NO.77~112所示。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述人工质粒的两端分别与所述第一正向引物和所述第一反向引物结合;所述人工质粒包括多个差异序列,距离与所述第一正向引物结合的序列的15bp内具有所述差异序列,距离与所述第一反向引物结合的序列的15bp内具有所述差异序列。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,

所述差异序列的长度为5bp。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述第二正向引物还包括第二条形码,所述第二正向引物的第二条形码配置为识别不同批次的样本。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述靶标区域选自多个不同病原体基因中的保守区域或选自一种病原体基因中的保守区域,所述靶标区域的数量为多个。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

所述第一正向引物、所述第一反向引物和所述第二反向引物的摩尔比为2:1:2、3:1:3或5:1:4。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,

目标文库的序列包括所述靶标区域的序列、所述人工质粒的序列和所述第一条形码的序列。

定量检测多种病原体基因的试剂盒

[0001] 本申请是申请日为2022年8月4日、申请号为:202210934455.5、发明名称为同时检测多种病原体基因的方法和试剂盒的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及基因检测领域,具体涉及一种定量检测多种病原体基因的试剂盒。

背景技术

[0003] 聚合酶链反应(即PCR)是一种广泛运用于分子诊断的技术,用于放大扩增特定的DNA片段,可看作是生物体外的特殊DNA复制。PCR的最大特点是将样品中微量的DNA大幅增加,达到可检测的水平。伴随着测序技术,尤其是下一代测序技术(即NGS技术)的发展,对PCR产物进行高灵敏度及高分辨率的检测成为了可能,因此多重PCR可同步扩增的片段数量上限演变为多重PCR自身体系的限制。不同于传统仅仅进行3-5重,至多15重的PCR反应体系,上千重甚至上万重的超多重PCR(high-multiplex PCR或ultrahigh-multiplex PCR)的实现辅以NGS测序,形成的靶向-NGS技术(即tNGS技术)已逐渐在传染病筛查、遗传病诊断、肿瘤基因检测等领域发挥作用。

[0004] 超多重PCR希望实现较好的扩增性能,需要综合考虑反应多方条件,具有极高的技术壁垒。主要难点在于,若想在一体系中实现上百、上千甚至上万个片段的特异性扩增,并非简单将引物混合扩增即可,不同引物的特异性、不同扩增片段本身的特异性及扩增条件均为需要综合考虑的内容。在这些因素中,引物二聚体和非特异扩增的形成,严重影响了超多重PCR扩增的性能。引物二聚体是由于引物间相互杂交形成的,在多重PCR反应体系中极高浓度下许多引物对的存在提高了引物二聚体形成,形成的引物二聚体会消耗大量引物和其他试剂进行扩增,从而对靶标DNA序列的扩增造成不良影响,抑制靶标DNA序列的扩增。

[0005] 尤其在对多种病原体基因进行检测时,在多重PCR引物池中包含了成百上千种病原微生物特异扩增的引物,但在实际待测样本中,通常只存在少量种类的微生物甚至没有,在这种情况下,成百上千种引物只有某几对引物实际会发生扩增,剩余的大量引物会由于没有目标DNA模板消耗,而形成大量的二聚体或者非特异扩增,进而导致扩增文库质量较差。此外,很多病原体是条件致病(即必须达到一定浓度才能致病),因此对病原体进行定量检测也具有重要临床意义。

发明内容

[0006] 本公开有鉴于上述现有技术状况而完成,其目的在于提供一种降低引物二聚体的、能够对病原体进行定量的同时检测多种病原体基因的方法和试剂盒。

[0007] 为此,本公开第一方面提供一种同时检测多种病原体基因的方法,是对各个病原体基因的靶标区域进行检测的方法,包括以下步骤:准备待测核酸样本;向所述待测核酸样本加入第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物和人工质粒集合并进行第一轮PCR扩增以得到第一轮PCR扩增产物;其中,所述第一正向引物包括第一测序引物和与所述靶标区域

5'端相匹配的序列;所述第一反向引物包括第二测序引物和与所述靶标区域3'端相匹配的序列;所述第二反向引物包括所述第二测序引物、第一条形码和第一测序接头;所述人工质粒集合包括多种具有预定拷贝数的并能够与所述第一正向引物和所述第一反向引物结合的人工质粒,所述人工质粒基于所述靶标区域的序列设计并异于所述靶标区域的序列;向所述第一轮PCR扩增产物加入第二正向引物和第三反向引物并进行第二轮PCR扩增以得到目标文库;其中,所述第二正向引物包括第二测序接头和所述第一测序引物;所述第三反向引物包括所述第一测序接头;对所述目标文库进行测序以获取测序数据,所述测序数据包括所述目标文库的序列,所述目标文库的序列包括所述第一条形码的序列;以及基于所述第一条形码的序列识别所述待测核酸样本,基于所述目标文库的序列和所述预定拷贝数判断所述病原体是否被检出以及得到所述病原体在所述待测核酸样本中的含量。

[0008] 在本公开所涉及的方法中,在第一轮PCR扩增中,人工质粒集合能够通过与所述第一正向引物和第一反向引物结合,对体系中的第一正向引物和第一反向引物进行消耗,由此,能够减少引物二聚体的形成;第一轮PCR扩增体系中的第二反向引物可以通过第一反向引物与人工质粒集合结合,由此,人工质粒集合也能够对第二反向引物进行消耗,减少引物二聚体的形成;此外,加入到待测核酸样本中的人工质粒集合的拷贝数是已知的,为预定拷贝数,由此,能够通过所加入的人工质粒的拷贝数和测序数据,得到靶标区域的含量,也即对靶标区域进行定量,进而对待测核酸样本中的病原体进行定量。

[0009] 在本公开所涉及的方法中,可选地,基于所述目标文库的序列得到所述靶标区域的Reads数(读段数)和所述人工质粒的Reads数,并基于所述预定拷贝数、所述靶标区域的Reads数和所述人工质粒的Reads数得到所述靶标区域的拷贝数,由此得到所述病原体的拷贝数。由此,能够通过所加入的人工质粒的拷贝数和测序所得到的人工质粒的Reads数及靶标区域的Reads数,得到靶标区域的拷贝数,也即对靶标区域进行定量,进而对病原体进行定量。

[0010] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述人工质粒基于所述靶标区域的序列,通过增加序列、减少部分序列或替换部分序列的方式设计得到。由此,能够涉及得到和靶标区域相应的人工质粒。

[0011] 在本公开所涉及的方法中,可选地,从每个病原体选取得到多个靶标区域,所述多个靶标区域之间互不重叠或仅部分重叠,对每个病原体的所述多个靶标区域进行检测,并基于所述多个靶标区域的检测结果判断所述病原体是否被检出。由此,能够提高检测结果的准确性。

[0012] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述人工质粒的两端分别与所述第一正向引物和所述第一反向引物结合;所述人工质粒包括多个差异序列,距离与所述第一正向引物结合的序列的15bp内具有所述差异序列,距离与所述第一反向引物结合的序列的15bp内具有所述差异序列。由此能够便于将人工质粒和靶标区域区分开来。

[0013] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述差异序列的长度为5bp。由此能够便于将人工质粒和靶标区域区分开来。

[0014] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述预定拷贝数为200~400拷贝。由此,能够加入合适含量的人工质粒,即不会过多地影响引物和靶标区域的结合,也能够达到消耗引物的效果。

[0015] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述第一测序引物和所述第二测序引物为illumina测序平台的测序引物,所述第一测序接头为illumina测序平台的P7接头,所述第二测序接头为illumina测序平台的P5接头,所述第一条形码为6~12bp的随机序列。由此,能够便于使用illumina测序平台对目标文库进行测序。

[0016] 在本公开所涉及的方法中,可选地,所述第一正向引物中的与所述靶标区域5'端相匹配的序列如SEQ ID NO.1~36所示,所述第一反向引物中的与所述靶标区域3'端相匹配的序列如SEQ ID NO.37~72所示,所述人工质粒集合的序列如SEQ ID NO.77~112所示。

[0017] 本公开第二方面提供一种同时检测多种病原体基因的试剂盒,是对各个病原体基因的靶标区域进行检测的试剂盒,包括第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物、第三反向引物和人工质粒集合;所述第一正向引物包括第一测序引物和与所述靶标区域5'端相匹配的序列;所述第一反向引物包括第二测序引物和与所述靶标区域3'端相匹配的序列;所述第二反向引物包括所述第二测序引物、第一条形码和第一测序接头,所述第一条形码配置为识别不同的样本;所述第二正向引物包括第二测序接头和所述第一测序引物;所述第三反向引物包括所述第一测序接头;所述人工质粒集合包括多种具有预定拷贝数的并能够与所述第一正向引物和所述第一反向引物结合的人工质粒,所述人工质粒基于所述靶标区域的序列设计并异于所述靶标区域的序列。

[0018] 在本公开所涉及的试剂盒中,人工质粒集合能够通过与所述第一正向引物和第一反向引物结合,对体系中的第一正向引物和第一反向引物进行消耗,由此,能够减少引物二聚体的形成;第二反向引物也可以通过第一反向引物与人工质粒集合结合,由此,人工质粒集合也能够对第二反向引物进行消耗,减少引物二聚体的形成;此外,人工质粒集合的拷贝数是已知的,为预定拷贝数,由此,能够通过所加入的人工质粒的拷贝数得到靶标区域的拷贝数,也即对靶标区域进行定量,进而对病原体进行定量。

[0019] 根据本公开,能够提供一种降低引物二聚体的、能够对病原体进行定量的同时检测多种病原体基因的方法和试剂盒。

附图说明

[0020] 图1示出本公开的示例所涉及的同时检测多种病原体基因的方法的场景示意图。

[0021] 图2示出本公开的示例所涉及的同时检测多种病原体基因的方法的流程图。

[0022] 图3示出本公开的示例所涉及的引物与靶标区域和人工质粒结合的场景示意图。

[0023] 图4示出本公开的示例所涉及的从一种病原体的基因序列中选取多个靶标区域的示意图。

[0024] 图5示出本公开的示例所涉及的从多种病原体的基因序列中选取多个靶标区域的示意图。

[0025] 图6示出本公开的示例所涉及的引物组对靶标区域进行PCR扩增的过程示意图。

[0026] 图7示出本公开的示例所涉及的两轮PCR扩增的场景示意图。

[0027] 图8示出本公开的示例所涉及的试剂盒的示意图。

具体实施方式

[0028] 以下,参考附图,详细地说明本公开的优选实施方式。在下面的说明中,对于相同

的部件赋予相同的符号,省略重复的说明。另外,附图只是示意性的图,部件相互之间的尺寸的比例或者部件的形状等可以与实际的不同。

[0029] 需要说明的是,本发明中的术语“包括”和“具有”以及它们的任何变形,例如所包括或所具有的一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可以包括或具有没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0030] 另外,在本发明的下面描述中涉及的小标题等并不是为了限制本发明的内容或范围,其仅仅是作为阅读的提示作用。这样的小标题既不能理解为用于分割文章的内容,也不应将小标题下的内容仅仅限制在小标题的范围内。

[0031] 本公开涉及一种同时检测多种病原体基因的方法和试剂盒。病原体是指能引起疾病或传播疾病的媒介的总称,包括病毒、细菌、真菌和寄生虫等。通过对检测样本中的病原体基因的存在情况,能够对疾病进行辅助诊断,帮助后续对症治疗。

[0032] 本公开中,通过对样本中的多种病原体同时进行检测,能够一次性判断某一样本中的多种病原体的感染情况。本公开中,可以通过多重PCR (multiplex PCR) 对多种病原体同时进行检测。多重PCR又称多重引物PCR或复合PCR,是在同一PCR反应体系里加上二对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应。

[0033] 本公开中,可以对各个病原体基因的靶标区域进行检测,靶标区域可以是选自病原体基因中的保守区域。换言之,靶标区域可以选自该病原体所特有的基因或基因片段,通过检测靶标区域,能够识别病原体。

[0034] 本公开涉及的同时检测多种病原体基因的方法,能够降低引物二聚体,且能够对病原体进行定量。本公开涉及的同时检测多种病原体基因的方法有时候可以简称为“检测方法”或“方法”。

[0035] 以下,结合附图对本公开涉及的同时检测多种病原体基因的方法和试剂盒进行说明。

[0036] 图1示出本公开的示例所涉及的同时检测多种病原体基因的方法的场景示意图。

[0037] 在本实施方式中,如图1所示,在本实施方式所涉及的目标基因的检测方法中,通常可以从待测对象例如人体中获取得到待测核酸样本20。其中,待测核酸样本20的数量可以为多个,例如包括待测核酸样本21、待测核酸样本22、待测核酸样本23等,各个待测核酸样本可以是来自不同的受检者。随后,例如可以使用PCR仪400对待测核酸样本进行PCR扩增。在一些示例中,可以通过多重PCR扩增将所需检测的多种病原体的基因片段进行捕获和富集。再经测序仪500进行测序,对测序数据进行分析,得到各个待测核酸样本中的序列信息,以得到待测核酸样本中的病原体的结果。

[0038] 图2示出本公开的示例所涉及的同时检测多种病原体基因的方法的流程图。

[0039] 在本实施方式中,如图2所示,同时检测多种病原体基因的方法可以包括以下步骤:准备待测核酸样本(步骤S10);向待测核酸样本加入第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物和人工质粒集合,进行第一轮PCR扩增以得到第一轮PCR扩增产物(步骤S20);向第一轮PCR扩增产物加入第二正向引物和第三反向引物,进行第二轮PCR扩增以得到目标文库(步骤S30);对目标文库进行测序以获取测序数据(步骤S40);基于测序数据得出待测样本中的病原体检测结果(步骤S50)。

[0040] 在一些示例中,在本实施方式中,同时检测多种病原体基因的方法可以是指同时检测粪肠球菌、屎肠球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌、溶血葡萄球菌、头葡萄球菌、路邓葡萄球菌、咽颊炎链球菌、缓症链球菌、无乳链球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的方法。

[0041] 如上所述,同时检测多种病原体基因的方法可以包括准备待测核酸样本(步骤S10)。

[0042] 在一些示例中,在步骤S10中,待测核酸样本可以从待测对象中获取。例如,可以通过采集包含待测对象的组织、体液等的样本来获取待测核酸样本。例如,在对呼吸道相关病原体进行检测时,通常可以通过采集血液或病灶组织等来获取样本,采集方法可以包括抽血、咽拭子、采集痰液、鼻拭子等。在一些示例中,对采集得到的样本进行核酸提取,即可得到待测核酸样本,待测核酸样本可以保存于试管并封闭。

[0043] 在一些示例中,可以利用核酸提取试剂盒来提取并得到待测核酸样本。其中,可以根据不同的样本类型,采用不同的核酸提取试剂盒进行提取,也可以使用DNA/RNA共提试剂盒进行提取。在一些示例中,对于包含难破壁细胞的样本,可以提前采取超声波破壁,再进行核酸的提取。

[0044] 在一些示例中,核酸提取完成后,可以用荧光定量试剂盒和荧光定量仪测定浓度,并尽量使各个核酸样本的核酸浓度均匀。在一些示例中,可以使用Qubit试剂盒作为荧光定量试剂盒,使用Qubit仪作为荧光定量仪。在一些示例中,提取得到的待测核酸样本可以在-20℃至-80℃的条件下进行保存。

[0045] 在一些示例中,所需检测的病原体的核酸类型可以为DNA,也可以为RNA。换言之,待测核酸样本可以包括DNA样本和RNA样本中的至少一种,并且若待测核酸样本包括RNA样本,则在获取待测核酸样本之后,还包括对待测核酸样本进行反转录的步骤。由此,能够对含RNA样本的待测核酸样本进行检测。例如,若待测核酸样本为新型冠状病毒基因、流感病毒基因等RNA样本时,需要将待测核酸样本进行反转录,反转录为DNA样本。

[0046] 在一些示例中,如上所述,同时检测多种病原体基因的方法可以包括向待测核酸样本加入第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物和人工质粒集合,进行第一轮PCR扩增以得到第一轮PCR扩增产物(步骤S20)。

[0047] 在一些示例中,在步骤S20中,第一正向引物可以包括第一测序引物和与靶标区域5'端相匹配的序列。在一些示例中,第一正向引物可以由第一测序引物和与靶标区域5'端相匹配的序列组成。具体地,第一正向引物从其5'端到3'端可以依次为第一测序引物和与靶标区域的5'端相匹配的序列。在这种情况下,第一正向引物能够作为正向引物结合到靶标区域的5'端,以便于对靶标区域进行捕获与扩增。

[0048] 在一些示例中,在本实施方式中,第一正向引物中的与靶标区域5'端相匹配的序列可以如SEQ ID NO.1~36所示。

[0049] 在一些示例中,第一反向引物可以包括第二测序引物和与靶标区域3'端相匹配的序列。在一些示例中,第一反向引物可以由第二测序引物和与靶标区域3'端相匹配的序列组成。具体地,第一反向引物从其5'端到3'端可以依次为第二测序引物和与靶标区域的3'端相匹配的序列。在这种情况下,第一反向引物能够作为反向引物结合到靶标区域的3'端,以便于对靶标区域进行捕获与扩增。

[0050] 在一些示例中,在本实施方式中,第一反向引物中的与靶标区域3'端相匹配的序

列可以如SEQ ID NO.37~72所示。

[0051] 在一些示例中,靶标区域可以是选自病原体基因中的保守区域。靶标区域可以选自多个不同病原体基因中的保守区域,也即靶标区域的数量可以为多个。靶标区域可以是选自一种病原体基因中的保守区域,且靶标区域的数量为多个。换言之,可以从一种病原体基因的保守区域中选取多个区域作为靶标区域,同时对一种病原体基因的多个靶标区域进行检测(后面详细描述)。在这种情况下,靶标区域选自该病原体所特有的基因或基因片段,通过检测靶标区域,能够识别病原体。

[0052] 在一些示例中,第二反向引物可以包括第二测序引物、第一条形码和第一测序接头。在一些示例中,第二反向引物可以由第二测序引物、第一条形码和第一测序接头组成。具体地,第二反向引物从其5'端到3'端可以依次为第一测序接头、第一条形码和第二测序引物。在这种情况下,在第一反向引物结合到靶标区域的3'端后,第二反向引物能够通过结合到第一反向引物的3'端,来结合到靶标区域上。

[0053] 在一些示例中,第二反向引物中的第一条形码可以配置为用于识别不同待测核酸样本。也就是说,对同一个待测核酸样本所使用的第一条形码的序列是相同的,对不同的待测核酸样本使用的是不同的第一条形码。在一些示例中,至少在同一实验批次中的待测核酸样本使用的是不同的第一条形码,在这种情况下,通过在第一轮PCR扩增过程中使不同的待测核酸样本添加不同的第一条形码,完成第一轮PCR扩增后,能够减少气溶胶污染等对不同待测核酸样本的检测结果的影响。

[0054] 在一些示例中,第一条形码可以为随机序列。例如,第一条形码可以由若干碱基组成,不同的碱基排序代表不同的第一条形码。在一些示例中,第一条形码可以为碱基数为6~12个的随机序列。例如第一条形码可以为碱基数为6、7、8、9、10、11或12个的随机序列。

[0055] 在一些示例中,通过第一正向引物、第一反向引物和第二反向引物对待测核酸样本进行第一轮PCR扩增,可以得到第一轮PCR扩增产物。在一些示例中,在第一轮PCR扩增过程中,第一反向引物的使用量可以比第一正向引物或第二反向引物的使用量少。这种情况下,由于PCR扩增的随机性反应过程中会产生只有由第一正向引物和第一反向引物扩增得到的中间产物,通过加大第一正向引物和第二反向引物的浓度,促使反应的进行,能够尽可能多地将中间产物转化为目的片段,从而得到更多的第一轮PCR扩增产物。

[0056] 在一些示例中,第一正向引物、第一反向引物和第二反向引物的摩尔比可以为2:1:2、3:1:3或5:1:4等。优选地,第一正向引物、第一反向引物和第二反向引物的摩尔比可以为3:1:3,由此能够有利于提高第一轮PCR扩增的效率。另外,在第一轮PCR扩增过程中,通过降低第一反向引物的使用量,也能够减少引物二聚体的形成。

[0057] 在一些示例中,人工质粒集合可以包括多种能够与第一正向引物和第一反向引物结合的人工质粒。其中,各种人工质粒可以基于不同病原体的靶标区域的序列而设计但又与靶标区域的序列具有差异。在这种情况下,在第一轮PCR扩增中,人工质粒集合通过与第一正向引物和第一反向引物结合,能够对体系中的第一正向引物和第一反向引物进行消耗,由此,能够减少引物二聚体的形成;第一轮PCR扩增体系中的第二反向引物能够通过第一反向引物与人工质粒集合结合,由此,人工质粒集合也能够对第二反向引物进行消耗,减少引物二聚体的形成。也就是说,通过加入人工质粒集合能够减少第一轮PCR扩增过程中的引物二聚体的形成。

[0058] 在一些示例中,各种人工质粒可以基于每种病原体的靶标区域的序列,通过增加序列、减少部分序列或替换部分序列的方式设计得到。换言之,人工质粒的序列可以由靶标区域的序列通过增加部分序列得到,或可以由靶标区域的序列通过减少部分序列得到,或可以由靶标区域的序列通过替换部分序列得到。最终,得到与各种病原体的靶标区域相对应的各种人工质粒,其中靶标区域和对应的人工质粒之间具有差异序列。优选地,各种人工质粒可以基于每种病原体的靶标区域的序列,通过替换部分序列的方式设计得到,由此能够便于进行数据分析。

[0059] 在一些示例中,每种人工质粒的两端可以分别与第一正向引物和第一反向引物结合,且人工质粒包括多个差异序列,在距离与第一正向引物结合的序列的15bp内具有一个差异序列,在距离与第一反向引物结合的序列的15bp内具有一个差异序列。在这种情况下,当从一种病原体基因中选取多个区域作为靶标区域,并同时对一种病原体基因的多个靶标区域进行检测(后面详细描述)时,若针对一种病原体,所选取的多个靶标区域之间具有重叠区域,此时,由于人工质粒的两端分别都有差异序列,也能够便于将人工质粒的序列和靶标区域的序列区分出来,减少假阳性的产生。

[0060] 在一些示例中,差异序列的长度可以为5bp。由此能够便于将人工质粒和靶标区域区分开来。

[0061] 在一些示例中,在本实施方式中,人工质粒集合的序列可以如SEQ ID NO.77~112所示。

[0062] 在一些示例中,加入到待测核酸样本中的人工质粒的拷贝数是已知的,可以为预定拷贝数。由此,能够便于对靶标区域进行定量(后续详细描述)。在一些示例中,预定拷贝数可以为200~400拷贝。由此,能够加入合适含量的人工质粒,即不会过多地影响引物和靶标区域的结合,也能够达到消耗引物的效果。

[0063] 图3示出本公开的示例所涉及的引物与靶标区域和人工质粒结合的场景示意图。可通过图3对人工质粒的减少引物二聚体的作用进行理解,如图3所示,当体系中存在靶标区域、引物和人工质粒集时,由于人工质粒和靶标区域均具有引物结合区域,因此,引物能够同时退火至人工质粒和靶标区域上,延伸后能够得到靶标区域产物和人工质粒产物。可以理解地,由于人工质粒和靶标区域之间具有差异序列,在测序后进行序列比对时,能够将靶标区域产物和人工质粒产物区分开来。

[0064] 在一些示例中,如上所述,同时检测多种病原体基因的方法可以包括向第一轮PCR扩增产物加入第二正向引物和第三反向引物,进行第二轮PCR扩增以得到目标文库(步骤S30)。

[0065] 在一些示例中,在步骤S30中,第二正向引物可以包括第二测序接头和第一测序引物。在一些示例中,第二正向引物可以由第二测序接头和第一测序引物。具体地,第二正向引物从其5'端到3'端可以依次为第二测序接头和第一测序引物。在一些示例中,第二正向引物还可以包括第二条形码。在一些示例中,第二正向引物可以由第二测序接头、第二条形码和第一测序引物组成。具体地,第二正向引物从其5'端到3'端可以依次为第二测序接头、第二条形码和第一测序引物。

[0066] 在一些示例中,第三反向引物可以包括第一测序接头。在一些示例中,第三反向引物可以为第一测序接头。由此,能够通过第二正向引物和第三反向引物对第一轮PCR扩增产

物进行第二轮PCR扩增,以得到目标文库。

[0067] 在一些示例中,第二正向引物的第二条形码可以配置为识别不同批次的样本。也就是说,对同一批次的中的待测核酸样本所使用的第二条形码的序列是相同的,对不同批次的中的待测核酸样本所使用的第二条形码的序列是不同的。由此,能够减少气溶胶污染等对不同批次的样本的检测结果的影响。

[0068] 在一些示例中,第二条形码可以为随机序列。例如第二条形码可以由若干碱基组成,不同的碱基排序代表不同的第二条形码。在一些示例中,第一条形码可以为碱基数为6~12的随机序列。例如第一条形码可以为碱基数为6、7、8、9、10、11或12的随机序列。

[0069] 在一些示例中,出于更方便进行测序数据分析的考虑,优选地,第二条形码与第一条形码可以不同。具体地,第二条形码的碱基数可以与第一条形码的碱基数不同,或者第二条形码的碱基序列可以与第一条形码的碱基序列不同。

[0070] 在一些示例中,在步骤S30中,第二轮PCR扩增时所使用的循环数可以根据检测灵敏度等的需求自行选择。优选地,在本实施方式中,PCR扩增时的循环数可以为10~30个循环。由此,能够有助于满足病原体检测的灵敏度需求。

[0071] 在一些示例中,在步骤S20和步骤S30中,在第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物中,第一测序引物和第二测序引物可以为illumina测序平台的测序引物,第一测序接头可以为illumina测序平台的P7接头,第二测序接头可以为illumina测序平台的P5接头,在这种情况下,可以通过illumina测序平台对目标文库进行测序。

[0072] 在一些示例中,在本实施方式中,第一测序引物的序列可以如SEQ ID NO.75所示,第二测序引物的序列可以如SEQ ID NO.76所示,第一测序接头的序列可以如SEQ ID NO.74所示,第二测序接头的序列可以如SEQ ID NO.73所示。

[0073] 当然,在另一些示例中,也可以使用其他测序平台的测序引物和测序结果并使用其他测序平台对目标文库进行测序。

[0074] 在一些示例中,可以从每种病原体的基因中选取多个靶标区域,在步骤S20,对每个病原体检测多个靶标区域进行第一轮PCR扩增,在步骤S30,对每个病原体检测多个靶标区域进行第二轮PCR扩增,最后根据多个靶标区域的检出结果来判断每个病原体的检出情况。例如,可以从每种病原体的基因中选取至少2个靶标区域。在一些示例中,优选地,从引物设计难度和成本考虑,可以从每种病原体的基因中选取2至5个靶标区域。例如,可以从每个目标基因的基因序列中选取2个、3个、4个或5个靶标区域。

[0075] 在一些示例中,若对于一种病原体的多个靶标区域,超过(大于)预设比例的靶标区域被检出,则判定该病原体被检出。在一些示例中,若对于一种病原体的多个靶标区域,不超过(小于或等于)预设比例的靶标区域被检出,则判定该病原体未被检出。可以理解地,若某个待测样本含有目标病原体的基因,则理论上在该样本中,该病原体的每个靶标区域均应被检出,因此若检测到该样本中只有小部分(未超过预设比例)的靶标区域被检出,则该样本可能是受到其他样本的污染。另外,若某个待测样本不含有目标病原体的基因,则理论上在该样本中,该病原体的每个靶标区域均应不被检出,因此若检测到该样本中有靶标区域被检出(但未超过预设比例),则该样本可能是受到其他样本的污染。由此,可以根据被检出的靶标区域的数量与设计引物组时所选取的靶标区域的数量比例和预设比例

关系,来进一步排除污染对检测结果的影响,提高检测结果的准确性。

[0076] 举例来说,若对于一种病原体基因,一共选取3个靶标区域进行检测。若根据测序数据判断得到某待测样本中该病原体基因中有2个靶标区域被检出,则被检出的靶标区域的数量与靶标区域的总数的比值为 $2/3$ 。然后,将该比值($2/3$)与预设比例进行大小比较,若该比值大于预设比例,则判定该待测核酸样本中含有该病原体基因,通常情况下,也可以称该待测核酸样本的检测结果为该病原体阳性;若该比值不大于预设比例,则判定该待测核酸样本中不含有该病原体基因,通常情况下,也可以称该待测核酸样本的检测结果为该病原体阴性。

[0077] 另外,在一些示例中,若对于多种病原体例如第一病原体、第二病原体和第三病原体,每种病原体分别选取3个靶标区域。根据测序数据判断得到第一病原体有2个靶标区域被检出,则被检出的靶标区域的数量与靶标区域的总数的比值为 $2/3$ 。同样地,根据测序数据判断得到第二病原体有3个靶标区域被检出,则被检出的靶标区域的数量与靶标区域的总数的比值为1。同样地,根据测序数据判断得到第三病原体有1个靶标区域被检出,则被检出的靶标区域的数量与靶标区域的总数的比值为 $1/3$ 。然后,将第一病原体的靶标区域的检出比值($2/3$)、第二病原体的靶标区域的检出比值(1)、第三病原体的靶标区域的检出比值($1/3$)分别与预设比例进行大小比较,若比值大于预设比例,则判定该待测核酸样本中含有相应的病原体;若比值不大于预设比例,则判定该待测核酸样本中不含相应的病原体。

[0078] 在一些示例中,进一步地,预设比例可以为50%至80%。例如,假如预设比例为50%;此时若某种病原体基因共选取2个靶标区域进行检测,则在判定待测核酸样本是否含有该病原体时,需确定2个靶标区域是否都被检出;若某种病原体基因共选取3个靶标区域进行检测,则在判定待测核酸样本是否含有该病原体时,需看是否有至少2个(2个或3个)靶标区域被检出;若某种病原体基因共选取5个靶标区域进行检测,则在判定待测核酸样本是否含有该病原体时,需确定是否有至少3个(3个、4个或5个)靶标区域被检出。也就是说,一半以上的靶标区域被检出,则判定该待测核酸样本含有该病原体(即检测结果为阳性)。

[0079] 在一些示例中,从每种病原体的基因中选取的多个靶标区域彼此之间可以不重叠。在另一些示例中,从每种病原体的基因中选取的多个靶标区域彼此之间也可以仅部分重叠。也就是说,从每种病原体的基因中选取多个靶标区域时,多个靶标区域之间不会完全重叠。由此,能够从每种病原体的基因中选取得到不同的多个靶标区域。

[0080] 图4示出本公开的示例所涉及的从一种病原体的基因序列中选取多个靶标区域的示意图。图5示出本公开的示例所涉及的从多种病原体的基因序列中选取多个靶标区域的示意图。图6示出本公开的示例所涉及的引物组对靶标区域进行PCR扩增的过程示意图。

[0081] 在一些示例中,如图4所示,可以从病原体基因10的序列中选取3个靶标区域即靶标区域100、靶标区域200和靶标区域300。这里,靶标区域100、靶标区域200和靶标区域300是从病原体基因10的保守序列区域中选取的。在一些示例中,靶标区域100、靶标区域200与靶标区域300可以彼此不重叠。在另一些示例中,靶标区域100、靶标区域200与靶标区域300可以仅部分重叠。由此能够更好地获得具有不同序列的靶标区域,从而能够更方便地基于靶标区域的测序数据来获得判断结果。

[0082] 在一些示例中,各种病原体均可以选取多个(2个以上)靶标区域,并对多个靶标区域进行检测。例如如图5所示,可以从病原体基因10A的序列中选取3个靶标区域(即靶标区

域100A、靶标区域200A和靶标区域300A),从病原体基因10B的序列中选取2个靶标区域(即靶标区域100B和靶标区域200B),可以从病原体基因10C的序列中选取3个靶标区域(即靶标区域100C、靶标区域200C和靶标区域300C)。病原体基因10A、病原体基因10B和病原体基因10C是不同的病原体。

[0083] 以下,再结合图6,以引物组对靶标区域100进行PCR扩增为例对步骤S20和步骤S30进行举例说明。如图6所示,针对靶标区域100设计的引物组可以包括引物11(第一正向引物)、引物12(第一反向引物)、引物13(第二反向引物)、引物14(第二正向引物)和引物15(第三反向引物)。其中,引物11从其5'端到3'端可以依次为第一测序引物和靶标区域100的正向互补序列。引物12从其5'端到3'端可以依次为第二测序引物和靶标区域100的反向互补序列。引物13从其5'端到3'端可以依次为测序接头P7、第一条条形码和第二测序引物。引物14从其5'端到3'端可以依次为测序接头P5、第二条条形码和第一测序引物。引物15可以为测序接头P7。其中,第一测序引物和第二测序引物为illumina测序平台的通用测序引物。

[0084] 在这种情况下,引物11能够作为靶标区域100的正向引物,引物12和引物13能够作为靶标区域100的反向引物,对靶标区域进行第一轮PCR扩增,得到扩增产物101。引物14能够作为扩增产物101的正向引物,引物15能够作为扩增产物101的反向引物,对扩增产物101进行第二轮PCR扩增,得到目标文库102。

[0085] 在本实施方式中,第一正向引物可以包括与靶标区域的上游特异性结合的序列(与5'端相匹配的序列,即正向互补序列),第一反向引物可以包括与靶标区域的下游特异性结合的序列(与3'端相匹配的序列,即反向互补序列)。因此,针对每个靶标区域,需单独设计与合成第一正向引物和第一反向引物。第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物的组成均可以为已知序列,因此,第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物对于各个靶标区域可以是通用的,无需单独进行设计与合成。也就是说,在一些示例中,第一正向引物和第一反向引物可以针对每个靶标区域单独进行设计;第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物可以是通用引物,无需针对每个靶标区域单独进行设计。

[0086] 在一些示例中,与靶标区域100同样,针对靶标区域200,也可以设计并得到与靶标区域200的上下游特异性结合的第一正向引物和第一反向引物;第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物为通用引物。同样地,针对靶标区域300,也可以设计得到与靶标区域300的上下游特异性结合的第一正向引物和第一反向引物;第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物为通用引物。

[0087] 对于多种病原体基因的情形,同样地,针对每种病原体的各个靶标区域设计并得到与各个靶标区域的上下游特异性结合的第一正向引物和第一反向引物。而针对每个目标基因的各个靶标区域的第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物均为通用引物。

[0088] 在一些示例中,在步骤S20之后,还可以包括对第一轮PCR扩增产物进行磁珠纯化的步骤。在这种情况下,通过磁珠法纯化能够将核酸提纯,并将所需长度的核酸片段保留,由此能够得到纯化后的第一轮PCR扩增产物。此外,在步骤S20后的纯化过程中,需对保存于试管的第一轮扩增产物进行开盖操作,此时容易产生气溶胶且气溶胶扩散至实验室环境中,从而产生气溶胶污染。在这种情况下,由于对待测核酸样本进行第一轮PCR扩增后,已通过第二反向引物带有的第一条条形码对不同的待测核酸样本进行标记,即使产生气溶胶,也能够减少气溶胶污染等对不同样本之间的检测结果的影响。

[0089] 在一些示例中,在步骤S30之后,还包括对第二轮PCR扩增的产物进行磁珠纯化的步骤,以得到目标文库。在这种情况下,通过磁珠法纯化能够将核酸提纯,使核酸与蛋白等其他成分分离,并将所需长度的核酸片段保留,由此能够得到纯化后的目标文库。同样地,在纯化过程中,通常需进行开盖操作,由于扩增后的核酸的含量较高,此时容易产生气溶胶且气溶胶扩散至实验室环境中,从而产生气溶胶污染。在这种情况下,由于在第一轮PCR扩增中就通过第二反向引物带有的第一条条形码对不同的待测核酸样本进行标记,且在第二轮PCR过程中通过第二正向引物带有的第二条条形码对不同批次的样本进行标记,由此也能够减少气溶胶污染等对不同批次间的不同样本的检测结果的影响。

[0090] 在一些示例中,在步骤S20后的磁珠纯化步骤、步骤S30和步骤S30后的磁珠纯化步骤的过程中,还可以包括向样本添加实验试剂、收集和/或转移纯化后样本等的操作。在上述的操作过程中,有可能会存在人为失误导致的弄混样本、样本溅出、试剂被污染等问题,这些都可能引起样本间的污染。在这种情况下,即使存在前述的污染问题,由于在第一轮PCR扩增后,每个待测核酸样本已分别被“贴上”不同的第一条条形码,因此,也能够减少前述的人为污染问题对检测结果的影响。

[0091] 在一些示例中,在步骤S20后,可以将每个待测核酸样本的第一轮扩增产物混合并得到混合扩增产物,再对混合扩增产物统一进行磁珠纯化。在这种情况下,由于第一轮PCR扩增结束后,每个待测核酸样本已被“贴上”不同的第一条条形码,即使将每个待测核酸样本的第一轮PCR扩增产物混合至一起,也能通过第一条条形码进行区分。此外,通过对混合扩增产物统一进行磁珠纯化及统一进行第二次PCR扩增,相较于对每个待测核酸样本的第一轮扩增产物进行磁珠纯化及第二次PCR扩增,能够减少试剂的使用和人力的成本。

[0092] 图7示出本公开的示例所涉及的两轮PCR扩增的场景示意图。

[0093] 在如图7所示的示例中,可以对多个样本(样本21、样本22和样本23)分别进行第一轮PCR扩增,分别得到第一轮PCR扩增产物31、第一轮PCR扩增产物32和第一轮PCR扩增产物33,随后将第一轮PCR扩增产物31、第一轮PCR扩增产物32和第一轮PCR扩增产物33混合得到混合扩增产物34,后续对混合扩增产物34进行磁珠纯化和第二轮PCR扩增,得到目标文库35。

[0094] 在一些示例中,如上所述,同时检测多种病原体基因的方法可以包括对目标文库进行测序以获取测序数据(步骤S40)。

[0095] 在一些示例中,在步骤S40中,测序数据可以包括目标文库的序列。在一些示例中,目标文库的序列可以包括靶标区域的序列、人工质粒的序列和第一条条形码的序列。在一些示例中,目标文库的序列还可以包括第二条条形码的序列。

[0096] 在一些示例中,如上所述,同时检测多种病原体基因的方法可以包括基于测序数据得出待测样本中的病原体检测结果(步骤S50)。

[0097] 在一些示例中,在步骤S50中,可以基于第一条条形码的序列识别不同的待测核酸样本。可以基于目标文库的序列判断各个靶标区域是否被检出,由此能够判断各种病原体是否被检出,最终实现对病原体的定性检测。

[0098] 具体地,可以基于测序得到的每条Reads的序列判断该条Reads是否为某个靶标区域的序列,也即判断各个靶标区域是否被检出。在一些示例中,可以基于第一条条形码的序列识别检出的Reads属于哪个样本,也可以基于第二条条形码的序列识别检出的Reads属于哪个

批次的样本,从而得到该Reads所属的批次和样本信息。由此,能够基于测序数据判断每个待测核酸样本中的各个靶标区域的检出情况。

[0099] 在一些示例中,进一步地,可以基于各种病原体基因的阳性质控品与阴性质控品获取各个靶标区域的检出阈值,并基于检出阈值判断待测样本中的各个靶标区域是否被检出。在一些示例中,进一步地,可以利用阳性质控品与阴性质控品获取得到接受者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve,ROC曲线),并通过ROC曲线建立每个靶标区域的检出阈值,然后根据检出阈值来判断待测核酸样本中每个靶标区域的检出情况。其中,阳性质控品例如可以是包括目标检测的病原体基因的样本,阴性质控品例如可以是不包括目标检测的病原体基因的样本。阳性质控品和阴性质控品可以自制或者从市售的试剂盒获得。

[0100] 在一些示例中,如上所述,若每种病原体选取了多个靶标区域进行检测,可以根据靶标区域的检出比例和预设比例的关系,来判断病原体的检出情况,由此能够进一步提高检测结果的准确性。

[0101] 在一些示例中,对测序数据进行分析后,可以基于靶标区域的Reads数(读段数)、人工质粒集的Reads数和一开始所加入到待测核酸样本中的人工质粒的预定拷贝数,得到靶标区域的拷贝数,由此得到病原体的拷贝数,最终实现对病原体的定量检测。

[0102] 具体而言,假设在某待测核酸样本中含有某种病原体,那么在第一轮PCR过程中,加入第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物和人工质粒集合到待测核酸样本中,进行PCR扩增时,假设第一正向引物和第一反向引物与该病原体的靶标区域的扩增效率,跟第一正向引物和第一反向引物与该病原体的靶标区域对应的人工质粒的扩增效率,两个扩增效率是相同的,而加入的该人工质粒的拷贝数是已知的(为预定拷贝数),由此就能够通过“靶标区域拷贝数/靶标区域Reads数=人工质粒拷贝数/人工质粒的Reads数”这一关系,计算得到靶标区域的拷贝数,并最终得到病原体的拷贝数,也即得到该待测核酸样本中的病原体的含量。由此,能够实现对该病原体的定量检测。

[0103] 在本公开的另一方面涉及一种同时检测多种病原体基因的试剂盒,是对各个病原体基因的靶标区域进行检测的试剂盒。

[0104] 图8示出本公开的示例所涉及的试剂盒1的示意图。以下,结合附图8详细地描述本公开所涉及的同时检测多种病原体基因的试剂盒(以下简称为“试剂盒”)。

[0105] 在本公开中,所需检测的病原体的种类可以根据实际需求进行选择。例如,病原体可以是包括但不限于新冠病毒、血流感染相关病原体、呼吸道感染相关病原体、中枢神经系统感染相关病原体。在一些示例中,根据病原体的种类的不同,试剂盒1可以用于不同的应用场景。例如,试剂盒1可以为新冠病毒的检测试剂盒、血流感染相关病原体的检测试剂盒、呼吸道感染相关病原体的检测试剂盒、中枢神经系统感染相关病原体的检测试剂盒等。

[0106] 在一些示例中,在本实施方式中,同时检测多种病原体基因的试剂盒1可以是指同时检测粪肠球菌、屎肠球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌、溶血葡萄球菌、头葡萄球菌、路邓葡萄球菌、咽颊炎链球菌、缓症链球菌、无乳链球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的试剂盒。

[0107] 在本实施方式中,试剂盒1可以包括上述的第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物、第三反向引物和人工质粒集合。具体而言,试剂盒1可以包括含有第

一正向引物的试剂瓶810、含有第一反向引物的试剂瓶820、含有第二反向引物的试剂瓶830、含有第二正向引物的试剂瓶840、含有第三反向引物的试剂瓶850、以及含有人工质粒集合的试剂瓶860(参见图8)。对于第一正向引物、第一反向引物、第二反向引物、第二正向引物、第三反向引物和人工质粒集合,均在上述的检测方法中进行了说明,在此不再赘述。

[0108] 在本实施方式所涉及的试剂盒中,人工质粒集合能够通过第一正向引物和第一反向引物结合,对体系中的第一正向引物和第一反向引物进行消耗,由此,能够减少引物二聚体的形成;第二反向引物也可以通过第一反向引物与人工质粒集合结合,由此,人工质粒集合也能够对第二反向引物进行消耗,减少引物二聚体的形成;此外,人工质粒集合的拷贝数是已知的,为预定拷贝数,由此,能够通过所加入的人工质粒的拷贝数得到靶标区域的拷贝数,也即对靶标区域进行定量,进而对病原体进行定量。由此,能够提供一种降低引物二聚体的、能够对病原体进行定量的同时检测多种病原体基因的试剂盒1。

[0109] 在一些示例中,试剂盒1还可以包括阳性质控品、阴性质控品、反转录试剂、核酸提取试剂、建库试剂(包括PCR缓冲液、DNA聚合酶、dNTPs等)、定量试剂、纯化试剂、测序试剂中的至少一种。这里,阳性质控品、阴性质控品、反转录试剂、核酸提取试剂、建库试剂(包括PCR缓冲液、DNA聚合酶、dNTPs等)、定量试剂、纯化试剂、测序试剂可以是自制或市售的。

[0110] 如上所述,阳性质控品可以是包括病原体基因的样本,阴性质控品可以是不包括病原体基因的样本。由此,能够提供针对病原体的各个靶标区域的真阳性和假阳性样本,用于建立ROC曲线以得到各个靶标区域的检出阈值,或用于进行阳性对照实验或阴性对照实验。

[0111] 在一些示例中,试剂盒1还可以包括说明书,说明书可以记载如何使用本公开的试剂盒对多种病原体进行检测,以及说明书还可以记载如何对检测结果进行判读。

[0112] 以下,结合实施例和对比例对本发明提供的同时检测多种病原体的方法和试剂盒进行详细的说明,但是不应把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0113] [实施例]

1、引物设计

在实施例中,针对表1中的12种血流感染病原体进行设计引物。通过NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)下载病原体的核酸序列,使用软件(Clone Manager)查找病原的保守序列区域。从每个病原体的保守序列区域选取3个区域作为靶标区域,并针对每个靶标区域设计特异性的正向互补序列(与靶标区域5'端互补的序列)和反向互补序列(与靶标区域3'端互补的序列)。具体序列信息如下表1所示。

[0114] 表1 病原体和引物序列信息

病原体名称	正向互补序列		反向互补序列	
	简称	序列	简称	序列
粪肠球菌	T1-F-1	SEQ ID NO.1	T1-R-1	SEQ ID NO.37
	T1-F-2	SEQ ID NO.2	T1-R-2	SEQ ID NO.38
	T1-F-3	SEQ ID NO.3	T1-R-3	SEQ ID NO.39
屎肠球菌	T2-F-1	SEQ ID NO.4	T2-R-1	SEQ ID NO.40
	T2-F-2	SEQ ID NO.5	T2-R-2	SEQ ID NO.41
	T2-F-3	SEQ ID NO.6	T2-R-3	SEQ ID NO.42
表皮葡萄球菌	T3-F-1	SEQ ID NO.7	T3-R-1	SEQ ID NO.43
	T3-F-2	SEQ ID NO.8	T3-R-2	SEQ ID NO.44
	T3-F-3	SEQ ID NO.9	T3-R-3	SEQ ID NO.45
人葡萄球菌	T4-F-1	SEQ ID NO.10	T4-R-1	SEQ ID NO.46
	T4-F-2	SEQ ID NO.11	T4-R-2	SEQ ID NO.47
	T4-F-3	SEQ ID NO.12	T4-R-3	SEQ ID NO.48
溶血葡萄球菌	T5-F-1	SEQ ID NO.13	T5-R-1	SEQ ID NO.49
	T5-F-2	SEQ ID NO.14	T5-R-2	SEQ ID NO.50
	T5-F-3	SEQ ID NO.15	T5-R-3	SEQ ID NO.51
头葡萄球菌	T6-F-1	SEQ ID NO.16	T6-R-1	SEQ ID NO.52
	T6-F-2	SEQ ID NO.17	T6-R-2	SEQ ID NO.53
	T6-F-3	SEQ ID NO.18	T6-R-3	SEQ ID NO.54
路邓葡萄球菌	T7-F-1	SEQ ID NO.19	T7-R-1	SEQ ID NO.55
	T7-F-2	SEQ ID NO.20	T7-R-2	SEQ ID NO.56
	T7-F-3	SEQ ID NO.21	T7-R-3	SEQ ID NO.57
咽颊炎链球菌	T8-F-1	SEQ ID NO.22	T8-R-1	SEQ ID NO.58
	T8-F-2	SEQ ID NO.23	T8-R-2	SEQ ID NO.59
	T8-F-3	SEQ ID NO.24	T8-R-3	SEQ ID NO.60
缓症链球菌	T9-F-1	SEQ ID NO.25	T9-R-1	SEQ ID NO.61
	T9-F-2	SEQ ID NO.26	T9-R-2	SEQ ID NO.62
	T9-F-3	SEQ ID NO.27	T9-R-3	SEQ ID NO.63
无乳链球菌	T10-F-1	SEQ ID NO.28	T10-R-1	SEQ ID NO.64
	T10-F-2	SEQ ID NO.29	T10-R-2	SEQ ID NO.65
	T10-F-3	SEQ ID NO.30	T10-R-3	SEQ ID NO.66
单增李斯特菌	T11-F-1	SEQ ID NO.31	T11-R-1	SEQ ID NO.67
	T11-F-2	SEQ ID NO.32	T11-R-2	SEQ ID NO.68
	T11-F-3	SEQ ID NO.33	T11-R-3	SEQ ID NO.69
蜡样芽孢杆菌	T12-F-1	SEQ ID NO.34	T12-R-1	SEQ ID NO.70
	T12-F-2	SEQ ID NO.35	T12-R-2	SEQ ID NO.71
	T12-F-3	SEQ ID NO.36	T12-R-3	SEQ ID NO.72

[0115] 在表1中,在实施例中,T1-F-1是指针对粪肠球菌的基因的第一个靶标区域的5'端所设计的特异性互补序列;T1-R-1是指针对粪肠球菌的基因的第一个靶标区域的3'端所设计的特异性互补序列;T1-F-2是指针对粪肠球菌的基因的第二个靶标区域的5'端所设计的特异性互补序列;T5-F-3是指针对溶血葡萄球菌的基因的第三个靶标区域的5'端所设计的特异性互补序列;其余简称的含义也是相似的原则,在此不再赘述。

[0116] 在实施例中,每个病原体的每个靶标区域的第一正向引物从其5'端到3'端分别为第一测序引物和表1中对应的正向互补序列,每个病原体的每个靶标区域的第一反向引物从其5'端到3'端分别为第二测序引物和表1中对应的反向互补序列。

[0117] 在实施例中,每个病原体的每个区域的第二反向引物、第二正向引物和第三反向引物为通用引物。第二反向引物从其5'端到3'端分别为测序接头P7(也即第一测序接头)、第一条形码和第二测序引物,第二正向引物从其5'端到3'端分别为测序接头P5(也即第二测序接头)、第二条形码和第一测序引物,第三反向引物为测序接头P7。

[0118] 在实施例中,第一条形码为碱基数为8的随机序列,针对同一个样本使用相同的第

一条形码。第二条形码为碱基数为8的随机序列。

[0119] 在实施例中,测序接头P5和测序接头P7为illumina测序平台的通用接头序列;第一测序引物和第二测序引物为illumina测序平台的通用测序引物,具体序列如下:

测序接头P5:AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC (SEQ ID:NO.73);

测序接头P7:CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (SEQ ID:NO74);

第一测序引物:ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT (SEQ ID:NO.75);

第二测序引物:GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA (SEQ ID:NO.76)。

[0120] 2、构建人工质粒集合

根据设计好的引物,分别合成两端与对应靶标区域的正向互补序列和反向互补序列完全匹配且与扩增的靶序列两端各有5bp碱基差异的人工质粒,具体信息见下表。然后将合成好的人工质粒,通过稀释及拷贝数定量,将每种人工质粒等体积混合,形成人工质粒集合,人工质粒集合中各种人工质粒的含量为200 copies/ μ l。具体序列信息如下表2所示。

[0121] 表2 人工质粒序列信息

病原体名称	人工质粒		人工质粒		人工质粒	
	简称	序列	简称	序列	简称	序列
粪肠球菌	T1-PC-1	SEQ ID NO.77	T1-PC-2	SEQ ID NO.78	T1-PC-3	SEQ ID NO.79
屎肠球菌	T2-PC-1	SEQ ID NO.80	T2-PC-2	SEQ ID NO.81	T2-PC-3	SEQ ID NO.82
表皮葡萄球菌	T3-PC-1	SEQ ID NO.83	T3-PC-2	SEQ ID NO.84	T3-PC-3	SEQ ID NO.85
人葡萄球菌	T4-PC-1	SEQ ID NO.86	T4-PC-2	SEQ ID NO.87	T4-PC-3	SEQ ID NO.88
溶血葡萄球菌	T5-PC-1	SEQ ID NO.89	T5-PC-2	SEQ ID NO.90	T5-PC-3	SEQ ID NO.91
头葡萄球菌	T6-PC-1	SEQ ID NO.92	T6-PC-2	SEQ ID NO.93	T6-PC-3	SEQ ID NO.94
路邓葡萄球菌	T7-PC-1	SEQ ID NO.95	T7-PC-2	SEQ ID NO.96	T7-PC-3	SEQ ID NO.97
咽颊炎链球菌	T8-PC-1	SEQ ID NO.98	T8-PC-2	SEQ ID NO.99	T8-PC-3	SEQ ID NO.100
缓症链球菌	T9-PC-1	SEQ ID NO.101	T9-PC-2	SEQ ID NO.102	T9-PC-3	SEQ ID NO.103
无乳链球菌	T10-PC-1	SEQ ID NO.104	T10-PC-2	SEQ ID NO.105	T10-PC-3	SEQ ID NO.106
单增李斯特菌	T11-PC-1	SEQ ID NO.107	T11-PC-2	SEQ ID NO.108	T11-PC-3	SEQ ID NO.109
蜡样芽孢杆菌	T12-PC-1	SEQ ID NO.110	T12-PC-2	SEQ ID NO.111	T12-PC-3	SEQ ID NO.112

[0122] 在表2中,在实施例中,T1-PC-1是指针对粪肠球菌的基因的第一个靶标区域所设计的人工质粒的序列;T1-PC-2是指针对粪肠球菌的基因的第二个靶标区域所设计的人工质粒的序列;T1-PC-3是指针对粪肠球菌的基因的第三个靶标区域所设计的人工质粒的序列;T2-PC-1是指针对屎肠球菌的基因的第一个靶标区域所设计的人工质粒的序列;其余简称的含义也是相似的原则,在此不再赘述。

[0123] 在表1和表2中,可以看到,针对粪肠球菌,其T1-F-1(第一个靶标区域的正向互补序列)的具体序列为tttgttgatggcggcagaag (SEQ ID NO.1),T1-R-1(第一个靶标区域的反向互补序列)的具体序列为cttcaccatttggccatgta (SEQ ID NO.37)。而针对粪肠球菌,其

T1-PC-1 (第一个靶标区域的人工质粒) 的具体序列, 为tttgttgatggcggcagaagTGAAGAGCAGTcatgGTCTGTTTTGTCTGCATATTCCGTTTTAAATGCAATCTATTATAAATATTATCAAGTACAGTTAGTCTTATTAGTAAAGACGGTCAATGGGTAAAAGGCCCTCTCTTATCTGAACGACCACAAAATAAAGAAGTTTTACATTTA ACTTGGGCACAAAACCTGAAGAAACAGGCGAATTTTCAGGAAAACGAATCAGTCCTTCGGAAATTTATGAAGAAGAAActagtTGTTTTCCCTGTTTTacatgggccaatggtgaag (SEQ ID NO.77)。可以看到, 该人工质粒的两端的序列 (T1-PC-1) 与相应的靶标区域的正向互补序列 (T1-F-1) 和反向互补序列 (T1-R-1) 是分别对应的, 在靠近人工质粒的两端处还分别具有5bp大小的差异序列。由此, 人工质粒的两端能够分别和第一正向引物及第一反向引物结合, 又能够通过差异序列将人工质粒和靶标区域进行区分。换言之, 在实施例1中, 人工质粒的序列, 除差异序列外, 其余与相应的靶标区域的序列相同。

[0124] 3、核酸样本提取

针对血液样本, 使用血液样本DNA试剂盒进行提取。提取完成后, 用Qubit测定浓度, -20℃保存。

[0125] 4、文库构建

4.1 第一轮PCR扩增

第一轮PCR反应体系主要分别对每个样本添加上述的第一测序引物、第二测序引物、第一条形码和测序接头P7。

[0126] 将样本的所有目标区域的PCR捕获分成2份进行, 以提取得到的DNA为模板, 每个样本配制2个单独的PCR反应体系。

[0127] 具体而言, 在室温下解冻PCR扩增缓冲液 (Amplicon PCR buffer), 解冻之后进行振荡并混匀离心。将扩增酶混合物 (AmpliconEnzyme Mix) 离心。对于表1中的十二种病原体基因, 将各个病原体基因的多个目标区域的第一正向引物根据目标区域分为两个第一正向引物混合池, 分别为第一正向引物混合池1和第一正向引物混合池2。对于表1中的十二种病原体基因, 将各个病原体基因的多个目标区域的第一反向引物根据目标区域分为两个第一反向引物混合池, 分别为第一反向引物混合池1和第一反向引物混合池2。在本实施例中, 第一正向引物混合池1和第一反向引物混合池1用于对每个病原体基因的3个目标区域中的部分目标区域进行PCR捕获与扩增; 第一正向引物混合池2和第一反向引物混合池2用于对每个病原体基因的3个目标区域中的剩余目标区域进行PCR捕获与扩增。另外, 准备第二反向引物和DNA模板。将上述所准备的试剂置于冰盒上备用。接着, 按照下表3和下表4所示的PCR反应体系分别配制得到每个样本的第一轮PCR反应体系1和第一轮PCR反应体系2。对于不同样本加入不同的第二反向引物, 同一样本的两个PCR反应体系中加入相同的第二反向引物。按样本数先配置预混反应液, 分装至0.2ml PCR管, 然后再加入第二反向引物和DNA模板。

[0128] 表3 第一轮PCR反应体系1

组份	PCR	体积 (μl)
Amplicon buffer		15.5
第一正向引物混合池1 (10 μM)		0.5
第一反向引物混合池1 (10 μM)		0.17
第二反向引物 (10 μM)		0.5
Amplicon Enzyme Mix (5U/ μl)		0.6
人工质粒集合 (各质粒200copies/ μl)		2
DNA模板		5
DEPC H ₂ O		0.73
总计		25

[0129] 表4 第一轮PCR反应体系2

组份	PCR	体积 (μl)
Amplicon buffer		15.5
第一正向引物混合池2 (10 μM)		0.5
第一反向引物混合池2 (10 μM)		0.17
第二反向引物 (10 μM)		0.5
Amplicon Enzyme Mix (5U/ μl)		0.6
人工质粒集合 (各质粒200copies/ μl)		2
DNA模板		5
DEPC H ₂ O		0.73
总计		25

[0130] 然后,将PCR管置于PCR仪中,按照下表5所示的第一轮PCR反应程序进行运行,得到第一轮PCR扩增产物。

[0131] 表5 第一轮PCR反应程序

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}\text{C}$	3min	1
95 $^{\circ}\text{C}$	30s	
60 $^{\circ}\text{C}$	1min	30
57 $^{\circ}\text{C}$	1min	
72 $^{\circ}\text{C}$	3min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	hold	/
热盖105 $^{\circ}\text{C}$	/	/

[0132] 4.2 第一轮PCR扩增产物纯化

在实施例中,在第一轮PCR扩增完成后,将以上第一轮PCR反应体系1和第一轮PCR反应体系2的反应液混合,获得50 μl 体积的混合溶液。接着,使用0.7X的XP磁珠对混合溶液纯化后,使用80%的乙醇进行漂洗,待磁珠晾干后,继续使用53 μl 洗脱液(TE)进行洗脱。重复以上步骤一次,使用20 μl TE进行洗脱,得到纯化后的第一轮PCR扩增产物。

[0133] 4.3 第二轮PCR扩增

第二轮PCR扩增主要添加测序接头P5和第二条形码,并将第一轮PCR扩增产物富集。

[0134] 具体按照下表6所示的反应体系配制得到第二轮PCR反应液。

[0135] 表6 第二轮PCR反应体系

组份	体积 (μ l)
2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12.5
第二正向引物 (10 μ M)	2.5
第三反向引物 (10 μ M)	2.5
第一轮PCR扩增产物	7.5
总计	25

[0136] 然后,将PCR管置于PCR仪中,按照下表7所示的反应程序运行,得到第二轮PCR扩增产物。

[0137] 表7 第二轮PCR反应程序

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	3min	1
98 $^{\circ}$ C	20s	
60 $^{\circ}$ C	15s	15
72 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	3min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	/
热盖105 $^{\circ}$ C	/	/

[0138] 4.4 第二轮PCR扩增产物纯化

从第二轮PCR扩增产物取20 μ l,使用0.7X的XP磁珠纯化一遍。接着,使用20 μ l TE进行洗脱,得到纯化后的第二轮PCR扩增产物。

[0139] 5、文库定量和上机测序

参考Qubit Fluorometer 4.0 说明书,对纯化后的第二轮PCR扩增产物(目标文库)进行准确定量。然后使用illumina测序平台的PE150进行上机测序,步骤严格按照供应商要求进行。

[0140] 6、测序数据分析

对测序所得的数据进行低质量序列和接头序列过滤。然后,利用比对软件BWA将其比对到参考病原数据库上,并判断病原体检出的Reads数(读段数)。再根据病原体对应的三个靶标区域是否有50%以上被检出,来判断该病原体是否被检出。

[0141] [对比比例]

对比比例在文库构建时,第一轮PCR扩增过程不添加人工质粒集合,其余步骤与实施例相同。也即,对比比例除了第一轮PCR扩增过程不添加人工质粒集合外,其余按照与实施例的方法进行引物设计、核酸样本提取、文库构建、文库定量和上机测序、测序数据分析。

[0142] 在本公开的实施例和对比比例中,如无特别指明,所使用的试剂与仪器均为市售。

[0143] [结果分析]

表8 实施例和对比比例实验效果分析

项目	实施例	对比比例
原始Reads数	345525	387873
接头比例	12.2%	68.9%
二聚体比例	4.2%	80.1%
非特异Reads数	2665 (0.9%)	73734 (30.6%)
有效Reads数	301228	21742

[0144] 实施例在建库时添加了人工质粒集合,对比比例在建库时未添加人工质粒集合,从表8可以看出,对比比例中的二聚体比例高达80.1%、非特异Reads数30.6%,而实施例中的二聚

体比例为4.2%，且非特异Reads数为0.9%。说明实施例中的多重PCR扩增文库的二聚体和非特异扩增明显降低。由此可见，人工质粒集合对于减少引物二聚体和非特异性扩增、提高文库质量具有显著的效果。

[0145] 此外，在实施例中，由于加入的人工质粒的拷贝数是已知的(400copies)，通过下机数据分析，分别统计人工质粒的Reads数和靶标区域的Reads数，假设引物和人工质粒的扩增效率与引物和靶标区域的扩增效率一致，由此就能够通过“靶标区域拷贝数/靶标区域Reads数=人工质粒拷贝数/人工质粒的Reads数”这一关系，计算得到靶标区域的拷贝数，以最终得到待测核酸样本中的病原体的含量。表9中列举了实施例的几种病原体的靶标区域的拷贝数的结果，具体信息见下表9。

[0146] 表9靶标区域定量检测结果

病原体名称	人工质粒Reads数	靶标区域Reads数	靶标区域拷贝数
粪肠球菌	267	15472	23179
溶血葡萄球菌	871	0	0
无乳链球菌	708	26	14
蜡样芽孢杆菌	1006	0	0

[0147] 从表9可以看出，粪肠球菌的质粒内参Reads数为267条，靶标区域Reads数为15472条，因此可以计算得出该待测核酸样本中含有23179copies的粪肠球菌的靶标区域；同理，可以得出无乳链球菌的靶标区域的拷贝数是14。因此，本实施例可以对待测核酸样本中的病原体进行定量检测。

[0148] 虽然以上结合附图和实施方式对本公开进行了具体说明，但是可以理解，上述说明不以任何形式限制本公开。本领域技术人员在不偏离本公开的实质精神和范围的情况下可以根据需要对本公开进行变形和变化，这些变形和变化均落入本公开的范围。

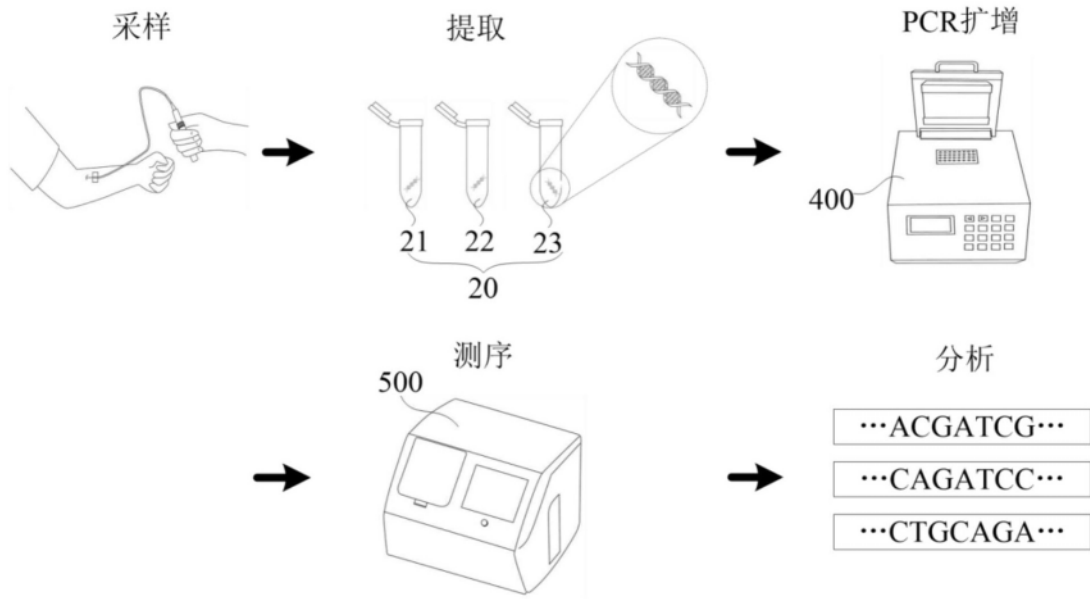


图1

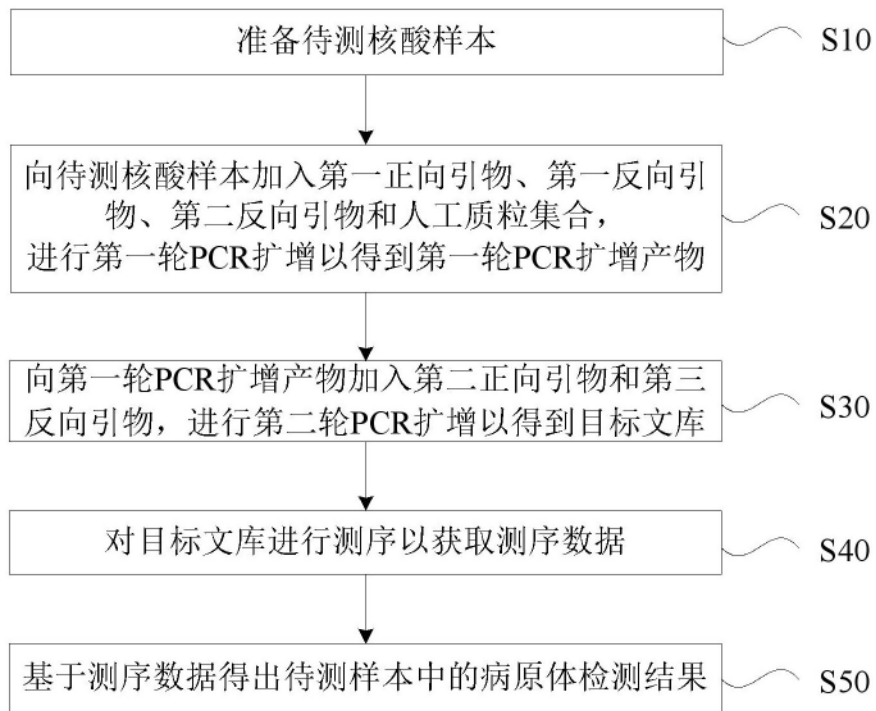


图2

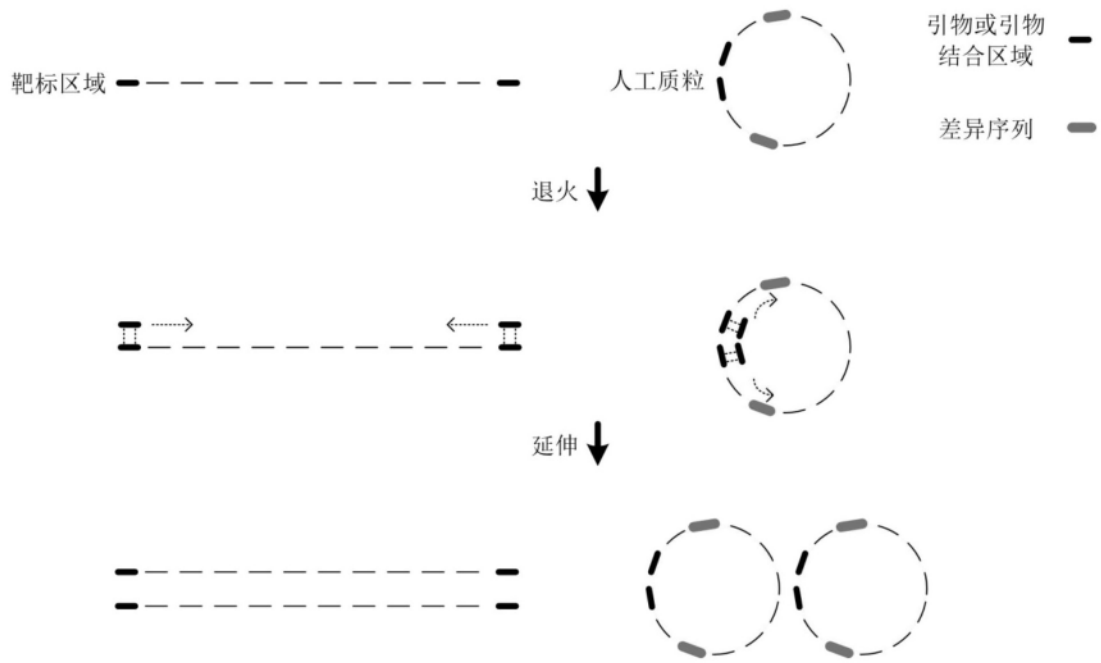


图3

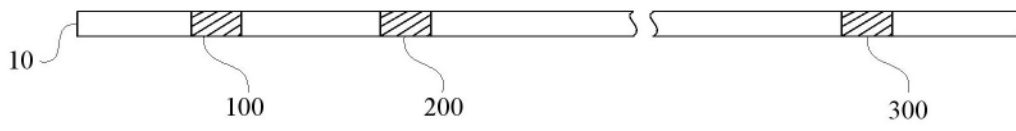


图4

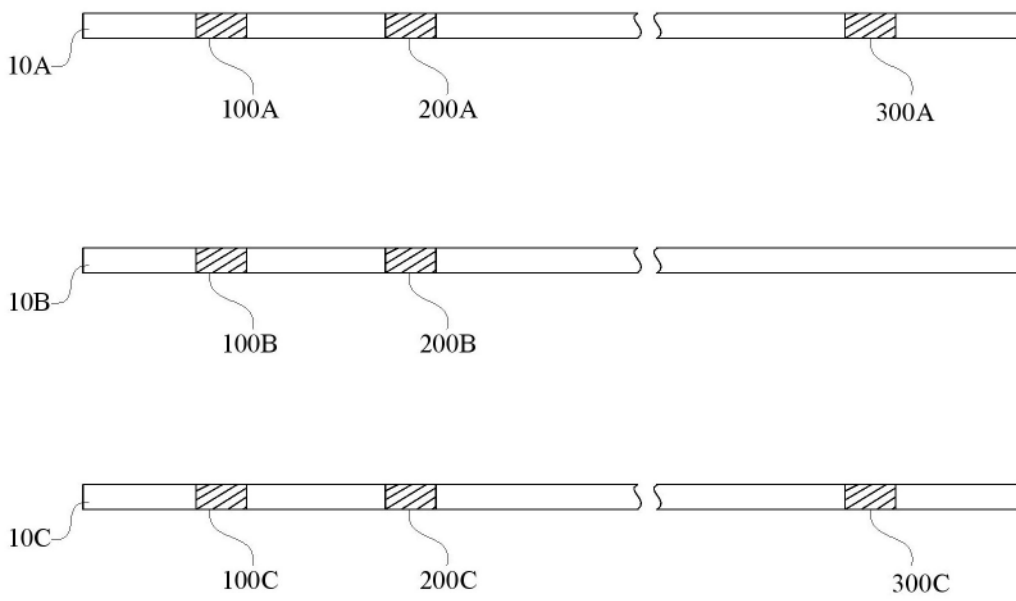


图5

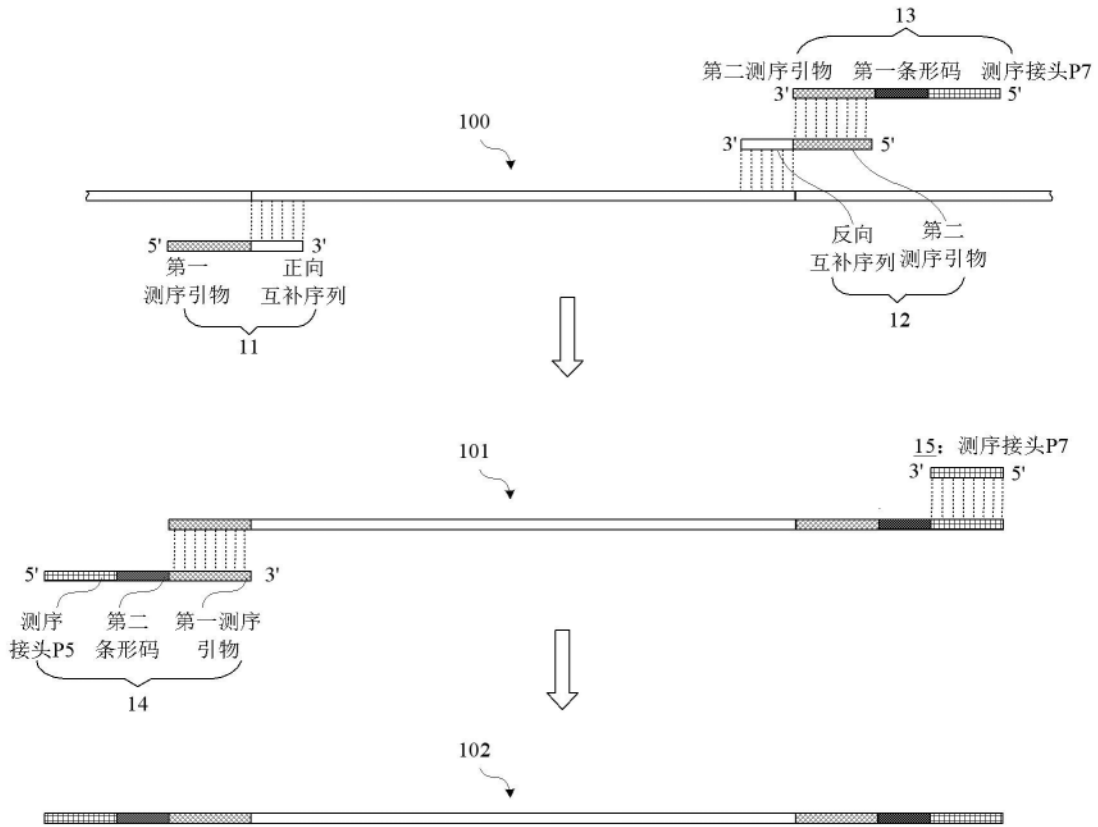


图6

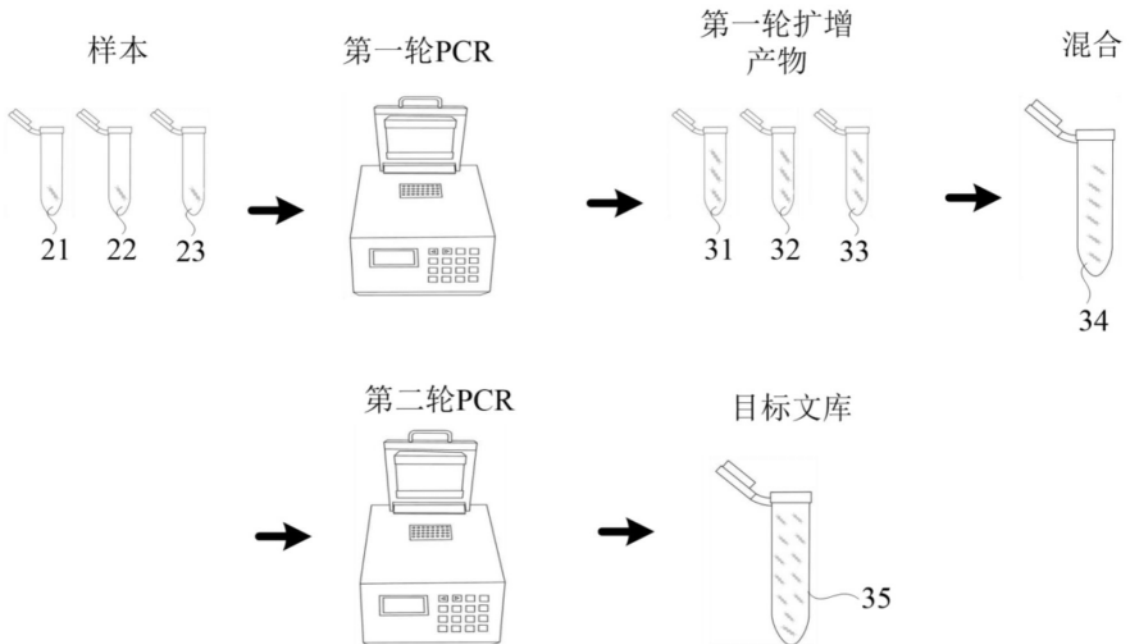


图7

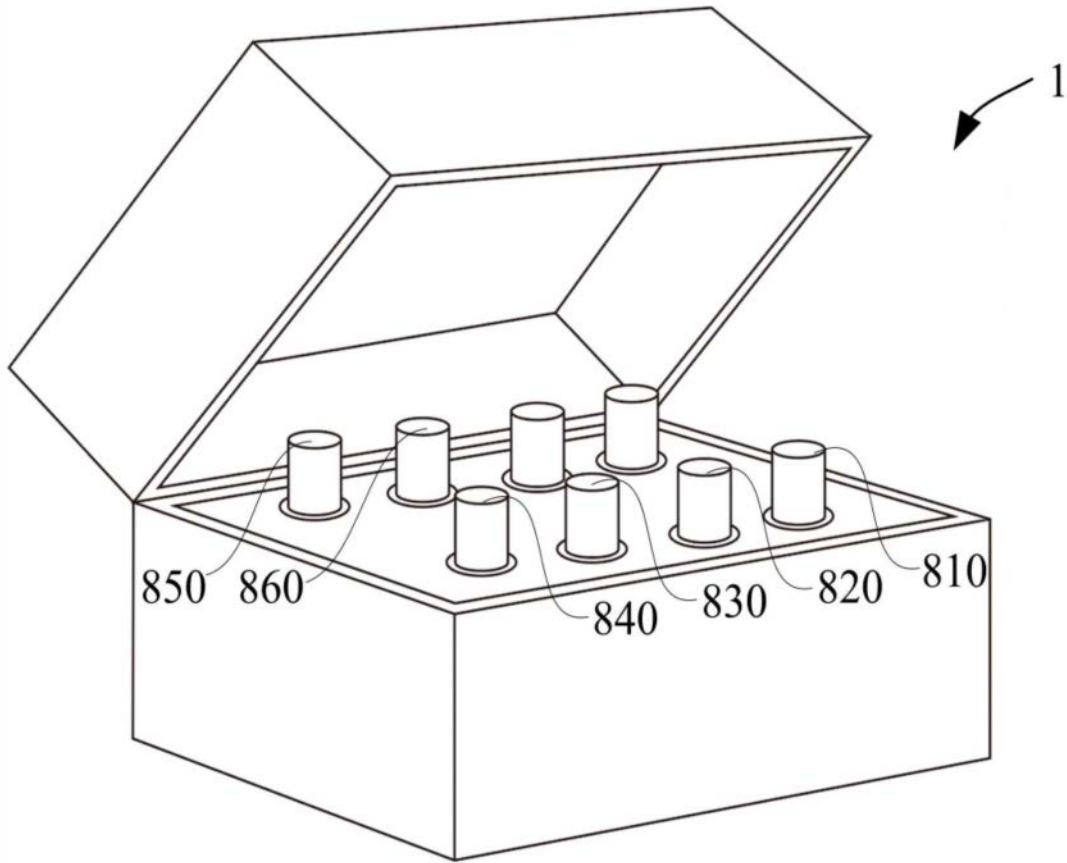


图8