



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202030333 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 16 日

(21) 申請案號：108146097

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 17 日

(51) Int. Cl. :

*C12Q1/6876 (2018.01)**C12Q1/6888 (2018.01)**C12Q1/6893 (2018.01)**C07H21/04 (2006.01)**C12R1/90 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/12/20 美國

62/782,945

(71) 申請人：美商簡 探針公司 (美國) GEN-PROBE INCORPORATED (US)

美國

美商格里佛診斷方法股份有限公司 (美國) GRIFOLS DIAGNOSTIC SOLUTIONS  
INC. (US)

美國

(72) 發明人：塞爾夫 迪納 SELF, DEANNA (US) ; 林儂 傑佛瑞 M LINNEN, JEFFERY M.

(US) ; 布雷斯 凡妮莎 BRES, VANNESSA (US)

(74) 代理人：張耀暉；王奕軒

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：0 共 234 頁

(54) 名稱

用於檢測瘧原蟲物種核酸之組成物及方法

(57) 摘要

本發明揭露一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的核酸寡聚物，其包含擴增寡聚物、檢測探針和捕獲探針。本發明還揭露一種使用所揭露的寡聚物進行特異性核酸擴增和檢測的方法，其包括即時擴增和檢測標靶核酸；以及對應的反應混合物和套組。

Disclosed are nucleic acid oligomers, including amplification oligomers, detection probes, and capture probes, for detection of Plasmodium species nucleic acid in a sample. Also disclosed are methods of specific nucleic acid amplification and detection, including amplification and detection of target nucleic acid in real time, using the disclosed oligomers, as well as corresponding reaction mixtures and kits.



202030333

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】用於檢測瘧原蟲物種核酸之組成物及方法

【英文發明名稱】COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING PLASMODIUM SPECIES NUCLEIC ACID

【中文】

本發明揭露一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的核酸寡聚物，其包含擴增寡聚物、檢測探針和捕獲探針。本發明還揭露一種使用所揭露的寡聚物進行特異性核酸擴增和檢測的方法，其包括即時擴增和檢測標靶核酸；以及對應的反應混合物和套組。

【英文】

Disclosed are nucleic acid oligomers, including amplification oligomers, detection probes, and capture probes, for detection of Plasmodium species nucleic acid in a sample. Also disclosed are methods of specific nucleic acid amplification and detection, including amplification and detection of target nucleic acid in real time, using the disclosed oligomers, as well as corresponding reaction mixtures and kits.

【指定代表圖】 無。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】用於檢測瘧原蟲物種核酸之組成物及方法

【英文發明名稱】COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING PLASMODIUM SPECIES NUCLEIC ACID

【技術領域】

[相關申請案]

【0001】本申請案要求於2018年12月20日提交的美國臨時申請案第62/782,945號的權益，其全部內容藉由引用合併於本文中。

【先前技術】

【0002】瘧疾是由瘧原蟲的紅血球內寄生蟲所引起的嚴重疾病。前述寄生蟲是經由被瘧蚊屬蚊子叮咬受感染的女性所感染的。有五種導致人類瘧疾的寄生蟲：惡性瘧原蟲(*P. falciparum*)、諾氏瘧原蟲(*P. knowlesi*)、三日瘧原蟲(*P. malariae*)、卵形瘧原蟲(*P. ovale*)和間日瘧原蟲(*P. vivax*)。根據世界衛生組織(WHO)的數據，2016年全世界有2.16億瘧疾病例，其中有44.5萬例是致命的。

【0003】美國食品和藥物管理局(U.S. FDA)已實施嚴格的血液篩查指南，以接受或延緩前往瘧疾流行地區的捐贈者。該旅者在到流行地區旅行之後要延緩一年，或若該捐贈者是流行地區的前居民，則要延緩三年。被診斷出患有瘧疾的人在完成治療且無症狀之後要被延緩三年。在美國，沒有可供用於篩檢針對瘧原蟲的血液捐贈者的批准試驗。這需要經由醫療問卷仔細篩選潛在的捐血者。

【0004】在流行國家，WHO建議藉由厚血膜或使用高度靈敏的酵素免疫分析法進行試驗。在非流行國家，WHO建議捐血者從最近一次潛在的暴露結合使用高度靈敏的酵素免疫分析法進行的瘧疾抗體試驗延緩六個月。如果沒有證據顯示存在瘧疾抗體，則可以恢復為捐血者。惟存在的風險是，這些方法無法有效地檢測可能發生傳播的低水平的寄生蟲血症(parasitemia)。

【0005】在美國已經記錄了輸血傳播的瘧疾(TTM)。在1911年至2015年之間報導有46例TTM病例，而最新的病例被報導於2018年。因此，需要一種特異性且靈敏性的核酸試驗(NAT)來檢測樣品中的瘧原蟲物種，以減少TTM和延緩捐血者的數量。

#### 【發明內容】

【0006】在一個態樣中，本發明提供一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的方法。該方法一般包括(1)使樣品與用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種寡聚物接觸，該樣品疑似含有瘧原蟲物種核酸；(2)進行體外核酸擴增反應，其中將前述樣品中存在的任何瘧原蟲標靶核酸用作為產生擴增產物的模板；以及(3)檢測該擴增產物的存在或不存在，從而指示前述樣品中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。在一些實施例中，該至少兩種擴增寡聚物包括：(a)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，(i)前述標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包含SEQ ID NO：163的序列；或(ii)前述標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包含SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168的序列；及(b)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列的長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169中，且包含SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列。在其他實施例中，該至少兩種擴增寡聚物包括：(a')包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：185的序列中，且包括SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及(b')包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：188的序列中，且包括SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。

【0007】在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(i)

和(b)中的擴增寡聚物，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：54和SEQ ID NO：55所組成之群組。在其他實施例中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：164的序列中，且包括SEQ ID NO：165的序列；在一些此類變異型中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：35。

【0008】 在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(ii)和(b)中的擴增寡聚物，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列；在一些此類變異型中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：28至SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：49至SEQ ID NO：51。在其他實施例中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：168的序列；在一些此類變異型中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：44和SEQ ID NO：53。

【0009】 在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：80至SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：85至SEQ ID NO：100。在其他實施例中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170的序列中，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列。在一些變異型中，其中(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170的序列中，且包括SEQ ID NO：171的序列，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：81、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85、SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：90、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：96至SEQ ID NO：98。在一些變異型中，其中(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170的序列中，且

包括SEQ ID NO：172的序列，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：80、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85和SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：100。

【0010】 在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，(a')中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46、SEQ ID NO：183和SEQ ID NO：184。在其他實施例中，(a')中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：186的序列中；在一些此類變異型中，(a')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184。在某些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，(b')中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84和SEQ ID NO：182。在更特定的變異型中，(a')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184，且(b')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：182。

【0011】 在上述方法的一些實施例中，(b)或(b')中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其分別進一步包括位於5'到(b)或(b')中的該標靶-雜交序列的啟動子序列。特定適合的啟動子序列係T7啟動子序列，諸如，如SEQ ID NO：179。在特定的變異型中，其中(b)中的該擴增寡聚物包括啟動子序列，(b)中的該擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO：57至SEQ ID NO：59和SEQ ID NO：62至SEQ ID NO：77的序列。在特定的變異型中，其中(b')中的擴增寡聚物包括啟動子序列，(b')中的該擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO：60、SEQ ID NO：61和SEQ ID NO：181的序列。

【0012】 (a)和(b)中特定適合的成對擴增寡聚物標靶-雜交序列各自為(A) SEQ ID NO：30和SEQ ID NO：82；(B) SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：82；(C) SEQ ID NO：49和SEQ ID NO：82；(D) SEQ ID NO：21和SEQ ID NO：89；(E) SEQ ID NO：30和SEQ ID NO：89；(F) SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：89；(G) SEQ ID NO：49和SEQ ID NO：89；(H) SEQ ID NO：21和SEQ ID NO：92；(I) SEQ ID

NO : 30和SEQ ID NO : 92 ; (J) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 94 ; (K) SEQ ID NO : 34和SEQ ID NO : 94 ; (L) SEQ ID NO : 53和SEQ ID NO : 94 ; (M) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 95 ; (N) SEQ ID NO : 34和SEQ ID NO : 95 ; 及(O) SEQ ID NO : 53和SEQ ID NO : 95 。 在一些此類實施例中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列(例如，T7啟動子序列，諸如，如SEQ ID NO : 179)。

**【0013】** 在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。在一些此類變異型中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。(a)(ii)中的特定適合的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物包括其包含SEQ ID NO : 167的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 34的標靶-雜交序列)的第一擴增寡聚物、及其包含SEQ ID NO : 168的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 53的標靶-雜交序列)的第二擴增寡聚物。

**【0014】** 在上述方法的其他實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物和如(a)(ii)中的擴增寡聚物。在一些此類實施例中，如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO : 164的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO : 165的序列(如SEQ ID NO : 21的標靶-雜交序列)，且如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括其包含SEQ ID NO : 167的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 34的標靶-雜交序列)。

**【0015】** 在上述方法的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。在一些此類實施例中，(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物各自包括SEQ ID NO : 170的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO : 171或SEQ ID NO : 172的序列(如第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO : 94的標



靶-雜交序列，且第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：95的標靶-雜交序列)。在一些變異型中，(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物各自為啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列。特定適合的啟動子序列係T7啟動子序列，諸如，如SEQ ID NO：179。在特定的變異型中，其中(b)中的該第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物各自包括啟動子序列，(b)中的該第一擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO：71的序列，且(b)中的該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：72的序列。

**【0016】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的某些實施例中，該方法進一步包括在步驟(1)之前，純化來自前述樣品中的其他成分的標靶核酸。在一些此類變異型中，該純化步驟包括使該樣品與至少一種捕獲探針寡聚物接觸，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中該標靶-雜交序列經配置以特異性地雜交到該瘧原蟲物種標靶核酸。特定適合的捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列包括其長度為至多約30個鄰接核苷酸的序列，且包括選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20的序列，前述序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。在更特定的變異型中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物的SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20。在一些實施例中，該純化步驟包括使該樣品與至少兩種捕獲探針寡聚物(例如，如上述的至少兩種捕獲探針寡聚物)接觸；在一些此類變異型中，該至少兩種捕獲探針寡聚物包括包含SEQ ID NO：19之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物及包含SEQ ID NO：20之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

**【0017】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的一些實施例中，檢測步驟(3)包括使該體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸，

該至少一種檢測探針寡聚物包括經配置為在判定擴增產物的存在或不存在的條件下來特異性地雜交到擴增產物的標靶-雜交序列，從而指示樣品中瘧原蟲物種的存在或不存在。在一些此類實施例中，其中至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列。適合的檢測探針寡聚物標靶-雜交序列包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列；在一些包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159；在其他包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177及SEQ ID

NO：178的序列；在一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。

【0018】在如上述方法的其他實施例中，其中檢測步驟(3)包括使體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸且其中至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為至少約13個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191的序列。在一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID NO：143的序列。

【0019】在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的特定變異型中，其中檢測步驟(3)包括使體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸且其中至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：(A) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：151或其互補序列，或SEQ ID NO：151或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(B) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：157或其互補序列，或SEQ ID NO：157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(C) SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：155或其互補序列，或SEQ ID NO：155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(D) SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：150或其互補序列，或SEQ ID NO：150或其互補序列之

DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(E) SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：155或其互補序列，或SEQ ID NO：155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(F) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(G) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(H) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(I) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(J) SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：158或其互補序列，或SEQ ID NO：158或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(K) SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：150或其互補序列，或SEQ ID NO：150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(L) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(M) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(N) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(O) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(P) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(Q) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(R) SEQ ID

NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(S) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(T) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(U) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(V) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(W) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(X) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(Y) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(Z) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(AA) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(AB) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(AC) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(AD) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或(AE) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157

或其互補序列，或SEQ ID NO：157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

**【0020】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的特定變異型中，其中檢測步驟(3)包括使體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸且其中至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，(a')中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b')中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：(A) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(B) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：127或其互補序列，或SEQ ID NO：127或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(C) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：128或其互補序列，或SEQ ID NO：128或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(D) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：143或其互補序列，或SEQ ID NO：143或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(E) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：129或其互補序列，或SEQ ID NO：129或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或(F) SEQ ID NO：184、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

**【0021】** 在如上述利用至少一種檢測探針寡聚物之方法的一些實施例中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成員上的2'甲氧基修飾體。

**【0022】** 在如上述利用至少一種檢測探針寡聚物之方法的一些實施例中，該檢測探針寡聚物進一步包括可檢測的標記物，舉例而言，例如螢光標記物或化學發光標記物。特定適合的化學發光標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其

聯結在該檢測探針寡聚物之兩個核鹼基之間。在包括可檢測標記的探針寡聚物的一些實施例中，該可檢測的標記物是螢光標記物且該檢測探針寡聚物進一步包括非螢光淬滅劑。

**【0023】** 在如上述方法的一些實施例中，檢測步驟(3)發生在擴增步驟(2)期間。在一些此類實施例中，該方法利用檢測探針寡聚物，包括螢光標記物及淬滅劑(例如，分子炬、分子信標或TaqMan檢測探針)。

**【0024】** 在如上述利用至少一種檢測探針寡聚物的一些實施例中，該檢測探針進一步包括非標靶-雜交序列。在特定的變異型中，檢測探針寡聚物包括非標靶-雜交序列是髮夾式檢測探針，諸如，如分子信標或分子炬。

**【0025】** 在某些實施例中，如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法利用至少兩種檢測探針寡聚物。在一些此類實施例中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物及第二檢測探針寡聚物，其中(A)該第一檢測探針寡聚物包括標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列，且(B)該第二檢測探針寡聚物包括標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。在更特定的變異型中，該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列，且該第二檢測探針寡聚物包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152的標靶-雜交序列。

**【0026】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的某些變異型

中，在步驟(2)中的該體外核酸擴增反應是等溫擴增反應(例如，轉錄介導的擴增(TMA)反應)。

**【0027】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的某些變異型中，該擴增反應是即時擴增反應。

**【0028】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法的一些實施例中，該樣品是臨床樣品。在一些實施例中，該樣品是血液樣品，舉例而言，例如紅血球樣品(例如，裂解的血細胞樣品或裂解的紅血球樣品)。

**【0029】** 在另一個態樣中，本發明提供一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種之至少兩種寡聚物的組合物。該寡聚物組合物一般包括用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種寡聚物。在一些實施例中，該至少兩種擴增寡聚物包括：**(a)**包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，**(i)**該標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包含SEQ ID NO：163的序列；或**(ii)**該標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包含SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168的序列；及**(b)**包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列的長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169中，且包含SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列。在其他實施例中，該至少兩種擴增寡聚物包括：**(a')**包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：185的序列中，且包含SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及**(b')**包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：188的序列中，且包含SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。

**【0030】** 在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括**(a)(i)**和**(b)**中的擴增寡聚物，**(a)(i)**中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID



NO : 21、SEQ ID NO : 23至SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 35、SEQ ID NO : 54和SEQ ID NO : 55。在其他實施例中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO : 164的序列中，且包括SEQ ID NO : 165的序列；在一些此類變異型中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 23至SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 33和SEQ ID NO : 35。

**【0031】** 在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(ii)和(b)中的擴增寡聚物，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO : 167的序列；在一些此類變異型中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 28至SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 40、SEQ ID NO : 41和SEQ ID NO : 49至SEQ ID NO : 51。在其他實施例中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO : 168的序列；在一些此類變異型中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 38、SEQ ID NO : 39、SEQ ID NO : 43、SEQ ID NO : 44和SEQ ID NO : 53。

**【0032】** 在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 80至SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 85至SEQ ID NO : 100。在其他實施例中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO : 170的序列中，且包括SEQ ID NO : 171或SEQ ID NO : 172的序列。在一些變異型中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO : 170的序列中，且包括SEQ ID NO : 171的序列，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 81、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87至SEQ ID NO : 90、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 96至SEQ ID NO : 98。在一些變異型中，其中(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO : 170的序列中，且包括SEQ ID NO : 172的序列，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ

ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85和SEQ ID NO : 87至SEQ ID NO : 100。

【0033】在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，(a')中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 37、SEQ ID NO : 46、SEQ ID NO : 183和SEQ ID NO : 184。在其他實施例中，(a')中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO : 186的序列中；在一些此類變異型中，(a')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO : 183或SEQ ID NO : 184。在某些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物，(b')中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 84和SEQ ID NO : 182。在更特定的變異型中，(a')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO : 183或SEQ ID NO : 184，且(b')中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO : 182。

【0034】在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，(b)或(b')中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其各自進一步包括位於5'到(b)或(b')中的該標靶-雜交序列的啟動子序列。特定適合的啟動子序列係T7啟動子序列，諸如，例如SEQ ID NO : 179。在特定的變異型中，其中(b)中的該擴增寡聚物包括啟動子序列，(b)中的該擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO : 57至SEQ ID NO : 59和SEQ ID NO : 62至SEQ ID NO : 77的序列。在特定的變異型中，其中(b')中的該擴增寡聚物包括啟動子序列，(b')中的該擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO : 60、SEQ ID NO : 61和SEQ ID NO : 181的序列。

【0035】(a)和(b)中特定適合的成對擴增寡聚物標靶-雜交序列各自為(A) SEQ ID NO : 30和SEQ ID NO : 82；(B) SEQ ID NO : 33和SEQ ID NO : 82；(C) SEQ ID NO : 49和SEQ ID NO : 82；(D) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 89；(E) SEQ ID NO : 30和SEQ ID NO : 89；(F) SEQ ID NO : 33和SEQ ID NO : 89；(G) SEQ ID NO : 49和SEQ ID NO : 89；(H) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 92；(I) SEQ ID

NO : 30和SEQ ID NO : 92 ; (J) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 94 ; (K) SEQ ID NO : 34和SEQ ID NO : 94 ; (L) SEQ ID NO : 53和SEQ ID NO : 94 ; (M) SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 95 ; (N) SEQ ID NO : 34和SEQ ID NO : 95 ; 及(O) SEQ ID NO : 53和SEQ ID NO : 95 。 在一些此類實施例中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列(例如，T7啟動子序列，諸如，如SEQ ID NO : 179)。

**【0036】** 在如上述寡聚物組合物之一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。在一些此類變異型中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。(a)(ii)中的特定適合的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物包括其包含SEQ ID NO : 167的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 34的標靶-雜交序列)的第一擴增寡聚物、及其包含SEQ ID NO : 168的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 53的標靶-雜交序列)的第二擴增寡聚物。

**【0037】** 在如上述寡聚物組合物的其他實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物和如(a)(ii)中的擴增寡聚物。在一些此類實施例中，如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO : 164的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO : 165的序列(如SEQ ID NO : 21的標靶-雜交序列)，且如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括其包含SEQ ID NO : 167的序列的標靶-雜交序列(如SEQ ID NO : 34的標靶-雜交序列)。

**【0038】** 在如上述寡聚物組合物的一些實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該至少兩種擴增寡聚物包括如(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。在一些此類實施例中，(b)中的第一擴增寡聚物和第

二擴增寡聚物各自包括SEQ ID NO：170的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列(如第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：94的標靶-雜交序列，且第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：95的標靶-雜交序列)。在一些變異型中，(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物各自為啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列。特定適合的啟動子序列係T7啟動子序列，諸如，如SEQ ID NO：179。在特定的變異型中，其中(b)中的該第一擴增寡聚物和該第二擴增寡聚物各自包括啟動子序列，(b)中的該第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：71的序列，且(b)中的該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：72的序列。

**【0039】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之寡聚物組合物的某些實施例中，該寡聚物組合物進一步包括至少一種捕獲探針寡聚物，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中，該標靶-雜交序列經配置以特異性地雜交到該瘧原蟲物種標靶核酸。特定適合的捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列包括其長度為至多約30個鄰接核苷酸的序列，且包括選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20的序列，該序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。在更特定的變異型中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物的SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20。在一些實施例中，該寡聚物組合物包括至少兩種捕獲探針寡聚物(例如，如上述的至少兩種捕獲探針寡聚物)；在一些此類變異型中，該至少兩種捕獲探針寡聚物包括包含SEQ ID NO：19之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物及包含SEQ ID NO：20之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

**【0040】** 在如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之寡聚物組合物的一些

實施例中，該寡聚物組合物進一步包括至少一種檢測探針寡聚物，該檢測探針寡聚物包括經配置為與可被至少兩種擴增寡聚物擴增的瘧原蟲物種擴增特異性雜交的標靶-雜交序列。在一些此類實施例中，其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列。適合的檢測探針寡聚物標靶-雜交序列包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列；在包含SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的序列的一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159；在包含SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的其他此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：

177和SEQ ID NO：178的序列；在一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。

【0041】在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物及其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物的寡聚物組合物的其他實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為至少約13個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191的序列。在一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID NO：143。

【0042】在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物及其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a)和(b)中的擴增寡聚物的寡聚物組合物的特定變異型中，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：(A) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：151或其互補序列，或SEQ ID NO：151或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(B) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：157或其互補序列，或SEQ ID NO：157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(C) SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：155或其互補序列，或SEQ ID NO：155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(D) SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：150或其互補序列，或SEQ ID NO：150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(E) SEQ ID NO：49、SEQ ID

NO：82和SEQ ID NO：155或其互補序列，或SEQ ID NO：155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(F) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(G) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(H) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(I) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(J) SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：158或其互補序列，或SEQ ID NO：158或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(K) SEQ ID NO：49、SEQ ID NO：89和SEQ ID NO：150或其互補序列，或SEQ ID NO：150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(L) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(M) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(N) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(O) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：92和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(P) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：148或其互補序列，或SEQ ID NO：148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(Q) SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：152或其互補序列，或SEQ ID NO：152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(R) SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：148或其互補序列，或

SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (S) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (T) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (U) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (V) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (W) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (X) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (Y) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (Z) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (AA) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (AB) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (AC) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; (AD) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物 ; 或(AE) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或



DNA/RNA嵌合物。

**【0043】** 在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物及其中該至少兩種擴增寡聚物包括(a')和(b')中的擴增寡聚物的寡聚物組合物的特定變異型中，(a')中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b')中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：(A) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(B) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：127或其互補序列，或SEQ ID NO：127或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(C) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：128或其互補序列，或SEQ ID NO：128或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(D) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：143或其互補序列，或SEQ ID NO：143或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；(E) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：129或其互補序列，或SEQ ID NO：129或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或(F) SEQ ID NO：184、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

**【0044】** 在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物的寡聚物組合物的一些實施例中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成員上的2'甲氧基修飾體。

**【0045】** 在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物的寡聚物組合物的一些實施例中，該檢測探針寡聚物進一步包括可檢測的標記物，舉例而言，例如螢光標記物或化學發光標記物。特定適合的化學發光標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其聯結在該檢測探針寡聚物的兩個核鹼基之間。在包括可檢測標記的探針寡聚物的一些實施例中，該可檢測的標記物是螢光標記物且該檢測

探針寡聚物進一步包括非螢光淬滅劑；特定適合的檢測探針寡聚物包括螢光標記物及淬滅劑，包含分子炬、分子信標和TaqMan檢測探針。

**【0046】** 在如上述進一步包含至少一種檢測探針寡聚物的寡聚物組合物的某些實施例中，該檢測探針進一步包括非標靶-雜交序列。在特定的變異型中，檢測探針寡聚物包括非標靶-雜交序列是髮夾式檢測探針，諸如，例如分子信標或分子炬。

**【0047】** 在某些實施例中，如上述用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的寡聚物組合物包括至少兩種檢測探針寡聚物。在一些此類實施例中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物及第二檢測探針寡聚物，其中(A)該第一檢測探針寡聚物包括標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列，且(B)該第二檢測探針寡聚物包括標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。在更特定的變異型中，該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列，且該第二檢測探針寡聚物包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152的標靶-雜交序列。

**【0048】** 在另一個態樣中，本發明提供一種如上述用於特異性擴增樣品中瘧原蟲物種核酸的至少兩種寡聚物的組合物的用途。

**【0049】** 在另一個態樣中，本發明提供一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢測探針寡聚物。在一些實施例中，該檢測探針寡聚物包括標靶-

雜交序列，其長度為約13至約40個鄰接核苷酸，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，該寡聚物組合物包含第一瘧原蟲物種擴增寡聚物和第二瘧原蟲物種擴增寡聚物，其中，(a)該第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，(i)該標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包含SEQ ID NO：163的序列，或(ii)該標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包含SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168的序列；及(b)該第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列的長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169中，且包含SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列。在一些此類實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列。適合的檢測探針寡聚物標靶-雜交序列包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列；在包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159；在包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物

的其他此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。在某些實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列；在一些此類變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161。

**【0050】** 在用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢測探針寡聚物的其他實施例中，該檢測探針寡聚物包括標靶-雜交序列，其長度為至少13個核苷酸，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，該寡聚物組合物包含第一瘧原蟲特異性擴增寡聚物和第二瘧原蟲特異性擴增寡聚物，其中，(a)該第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：185的序列中，且包含SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及(b)該第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：188中，且包含SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。在一些此類實施例中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191的序列。在更特定的變異型中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID

NO：143。

【0051】 在如上述檢測探針寡聚物的一些實施例中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成員上的2'甲氧基修飾體。

【0052】 在如上述檢測探針寡聚物的一些實施例中，該檢測探針寡聚物進一步包括可檢測的標記物，舉例而言，例如螢光標記物或化學發光標記物。特定適合的化學發光標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其聯結在該檢測探針寡聚物的兩個核鹼基之間。在包括可檢測標記的一些實施例中，該可檢測的標記物是螢光標記物且該檢測探針寡聚物進一步包括非螢光淬滅劑；特定適合的檢測探針寡聚物包括螢光標記物及淬滅劑，包含分子炬、分子信標及TaqMan檢測探針。

【0053】 在如上述檢測探針寡聚物的一些實施例中，該檢測探針進一步包括非標靶-雜交序列。在特定的變異型中，檢測探針寡聚物包括非標靶-雜交序列是髮夾式檢測探針，諸如，如分子信標或分子炬。

【0054】 在另一個態樣中，本發明提供一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之至少兩種寡聚物的組合物，該寡聚物組合物包括如上述至少兩種檢測探針寡聚物。在一些實施例中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括(A)包括標靶-雜交序列的第一檢測探針寡聚物，該標靶-雜交序列(i)係包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列，及(B)包括標靶-雜交序列的第二檢測探針寡聚物，該標靶-雜交序列(i)係包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。在更特定的變異型中，該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同

物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列，且該第二檢測探針寡聚物包括選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152的標靶-雜交序列。

【0055】在另一個態樣中，本發明提供一種如上述用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的檢測探針寡聚物或寡聚物組合物的用途。

【0056】在另一個態樣中，本發明提供一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之捕獲探針寡聚物。在一些實施例中，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中該標靶-雜交序列的長度為至多約30個鄰接核苷酸，且包括選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20的序列，該序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。在更特定的變異型中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物的SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20。

【0057】在另一個態樣中，本發明提供一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之至少兩種寡聚物的組合物，該寡聚物組合物包括如上述至少兩種捕獲探針寡聚物。在一些實施例中，該至少兩種捕獲探針寡聚物包括包含SEQ ID NO：19，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物、及包含SEQ ID NO：20，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

【0058】在另一個態樣中，本發明提供一種如上述用於特異性從樣品中捕獲瘧原蟲物種核酸之捕獲探針寡聚物或寡聚物組合物的用途。

【0059】在另一個態樣中，本發明提供一種包括如上述至少兩種寡聚物的組合物的套組。

【0060】在另一個態樣中，本發明提供一種包括如上述至少兩種寡聚物的組

合物的反應混合物。

【0061】 參考以下本發明詳細的描述和圖式，本發明的彼等態樣和其他態樣將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

無。

【實施方式】

[定義]

【0062】 除非另有說明，本文使用的所有技術和科學術語具有本發明所屬技術領域中具有通常知識者通常理解的含義。如本文所用，除非另有說明，否則以下術語和短語具有賦予它們的含義。

【0063】 除非上下文另明確指出，否則術語「一(a； an)」和「(the)」包括複數指示物。

【0064】 「樣品」包括可能含有或懷疑含有瘧原蟲物種或其組分，例如核酸或瘧原蟲核酸之片段的任何試樣。樣品可以是經分離的樣品。樣品包括「生物樣品」，其包括衍生自活體或死體的任何組織或材料，其可能含有瘧原蟲寄生蟲或其組分(例如，衍生於其中的標靶核酸)，包括(例如)血液、周邊血液和紅血球。也可以考慮使用可能包含瘧原蟲寄生蟲或其組分(例如，衍生於其中的標靶核酸)的其他樣品類型，諸如血漿、血清、淋巴結、胃腸道組織、糞便、尿液、精液或其他體液或物質。生物樣品可經處理以物理地或機械地破壞組織或細胞結構，從而將細胞內組分釋放到溶液中，該溶液可進一步含有酵素、緩衝液、鹽類、清潔劑等，該溶液用於使用標準方法製備用於分析的生物樣品。舉例而言，可以用細胞裂解試劑處理樣品，諸如，如美國專利第10,093,989號或PCT公開案第2017/189746號中所述的裂解試劑，各自經引用併入本文中。而且，樣品可包括經處理後樣品，例如樣品經從過濾裝置上方或經從通過過濾裝，或離心

後，或經黏附到培養基、基質或載體而獲得的那些樣品。

【0065】 「核酸」是指包含兩個或更多個具有含氮雜環鹼基的共價鍵合的核苷或核苷類似物或鹼基類似物的多聚體化合物，其中核苷藉由磷酸二酯鍵或其他鍵聯結在一起以形成多核苷酸。核酸包括RNA、DNA或嵌合DNA-RNA聚合物或寡核苷酸及其類似物。核酸「骨架」可以由多個鍵組成，包括一個或多個糖-磷酸二酯鍵、肽-核酸鍵(「肽核酸」或PNA，請參見PCT第WO95/32305號)，硫代磷酸酯鍵、磷酸甲酯鍵或其組合。核酸的糖部分可以是核糖或去氧核糖，或具有已知取代例如2'甲氧基取代和2'鹵化物取代(例如2'-F)的類似化合物。含氮鹼基可以是習知的鹼基(A、G、C、T、U)，其類似物(例如肌苷、5-甲基異胞嘧啶、異鳥嘌呤；*The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams *et al.*, ed., 11th ed., 1992, *BioTechniques* (2007) 43:617-24)，其包括嘌呤或嘧啶鹼基的衍生物(例如，N4-甲基去氧鳥苷、去氮-或氮雜-嘌呤、去氮-或氮雜-嘧啶、在5或6位置處具有取代基之嘧啶鹼基、在2、6及/或8位置處具有經改變或置換的取代基之嘌呤鹼基，例如2-胺基-6-甲胺基嘌呤、O6-甲基鳥嘌呤、4-硫基-嘧啶、4-胺基-嘧啶、4-二甲基胍-嘧啶及O4-烷基-嘧啶、及吡唑并-化合物，例如未經取代或3-經取代的吡唑并[3,4-d]嘧啶；美國專利第5,378,825號、第6,949,367號及PCT第WO93/13121號)。核酸可包括「無鹼基」殘基，其中骨架不包括針對一或多個殘基之含氮鹼基(美國專利第5,585,481號)。核酸可僅包含習知如在RNA或DNA中存在的糖類、鹼基及鍵，或可包括習知組分及取代基(例如，經2'甲氧基骨架鍵聯之習知鹼基，或含有習知鹼基及一或多個鹼基類似物之混合物的核酸)。核酸可包括「鎖核酸」(LNA)，其中一或多個核苷酸單體具有雙環呋喃糖單元，其鎖定於RNA模擬糖構形中，其會增強對單鏈RNA(ssRNA)、單鏈DNA(ssDNA)或雙鏈DNA(dsDNA)中互補序列的雜交親和性(*Biochemistry* (2004) 43:13233-41)。核酸可包括經修飾的鹼基以改變核酸的功能或行為，例如，添加3'-末端雙去氧核苷



酸以阻止其他核苷酸被加至核酸。體外製備核酸的合成方法是本領域眾所周知的。

【0066】如本文所用術語「多核苷酸」表示核酸鏈。在整篇本發明中，核酸由5'末端至3'末端命名。標準核酸，例如DNA和RNA，通常是經「5'至3'」合成的，亦即，藉由向生長的核酸的3'末端添加核苷酸來合成。

【0067】如本文所用「核苷酸」是由磷酸基、5-碳糖和含氮鹼基組成的核酸的次單位。RNA中發現的5碳糖是核糖。在DNA中，5-碳糖是2'-去氧核糖。該術語亦包括此次單位的類似物，例如在核糖2'位置處的甲氧基(2'-O-Me)。

【0068】如本文所用「基於核酸的檢測測定法」是用於檢測標靶核酸內的標靶序列並利用與標靶序列特異性雜交的一或多個寡核苷酸的測定法。

【0069】在某些實施例中，基於核酸的檢測測定法是「基於擴增的測定法」，亦即，利用一個或多個步驟來擴增核酸標靶序列的測定法。用於檢測測定法的各種擴增方法是本領域眾所周知的，本文中進一步總結其中的幾種。為了清楚起見，基於擴增的測定法可包括非擴增標靶序列的一個或多個步驟，例如，在基於非擴增的測定方法(例如，雜交測定法或基於切割的測定法)中使用的步驟

【0070】在其他的實施例中，基於核酸的檢測測定法是「基於非擴增的測定法」，亦即，不依賴於任何步驟來擴增核酸標靶序列的測定法。為了清楚起見，基於核酸的檢測測定法包括在沒有任何相應的下游擴增寡聚物的情況下引子延伸的反應(例如，引子藉由反轉錄酶延伸以生成RNA：DNA雙股螺旋隨後經RNA的RNase酶分解，產生與RNA標靶互補的單股cDNA，而沒有生成cDNA的複本)被認為是基於非擴增的測定法。

【0071】示例性的基於非擴增的測定法是「基於切割的測定法」，其是依賴於特異性切割的測定法，藉由flap核酸內切酶，經由重疊的寡核苷酸與標靶核酸特異性雜交形成的線性雙股螺旋切割結構的特異性切割。在這些測定法中，含

有非標靶雜交flap區域的探針寡核苷酸被flap核酸內切酶以重疊依賴性方式切割，以釋放切割產物，然後檢測該切割產物。基於切割的測定法的原理是本領域中眾所周知的，並且示例性測定法描述於例如*Nat. Biotechnol.* (1999) 17:292-296, *Mol. Diagn.* (1999) 4: 135-144, *J. Clin. Microbiol.* (2006) 44:3443-3447，和美國專利第5,846,717號、第6,706,471號和第5,614,402號。基於切割的測定法包括(例如)市售可得的Invader<sup>®</sup> assays (Hologic, Inc., Madison, WI)。

【0072】如本文所用「標靶核酸」是包含待檢測的標靶序列的核酸。標靶核酸可以是本文所述的DNA或RNA，並且可以是單股或雙股的。標靶核酸除標靶序列外還可以包括其他序列。

【0073】「分離的」是指含有標靶核酸的樣品係取自其天然環境，但是該術語並不意味任何純化程度。

【0074】如本文所用術語「標靶序列」是指待檢測的標靶核酸的特定核苷酸序列。「標靶序列」包括寡核苷酸(例如，探針寡核苷酸、引子寡核苷酸及/或啟動子寡核苷酸)在檢測過程期間(例如，基於擴增的檢測測定，例如，如TMA或PCR，或基於非擴增的檢測測定，例如，如基於切割的測定法)與之複合的複合序列。在標靶核酸最初是單股的情況下，術語「標靶序列」也將指與標靶核酸中存在的「標靶序列」互補的序列。在標靶核酸最初是雙股的情況下，術語「標靶序列」是指有義(+)股和反義(-)股。在選擇標靶序列時，本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解，應選擇「獨特」序列以區分無關或密切相關的標靶核酸。

【0075】本文使用「標靶-雜交序列」係指寡聚物經配置為與標靶核酸序列雜交的部分。較佳地，該標靶-雜交序列經配置為與標靶核酸序列特異性雜交。標靶-雜交序列可以與它們被配置成雜交的標靶序列的部分100%互補，但不是必須的。標靶-雜交序列也可包括相對於標靶序列的插入、缺失及/或取代的核苷酸

殘基。標靶-雜交序列與標靶序列的互補性可能會小於100%，例如，當標靶核酸是物種內的多種菌株時，例如經配置為可與瘧原蟲的各種菌株雜交的寡聚物的情況。應當理解，存在其他原因使標靶-雜交序列配置為與標靶核酸具有小於100%的互補性。

**【0076】** 如本文所用術語「靶向序列」是關於瘧原蟲屬核酸的區域，是指寡核苷酸以允許如本文所述進行檢測的方式與標靶序列雜交的過程。在一個實施例中，寡核苷酸與靶向瘧原蟲物種核酸序列互補但不包含錯誤配對。在另一個實施例中，寡核苷酸是互補的，但含有與靶向瘧原蟲物種核酸序列的1個、2個、3個、4個或5個錯誤配對。較佳地，與標靶核酸序列雜交的寡核苷酸包括與標靶序列互補的至少10個至多達50個核苷酸。應當理解，至少10個和多達50個是包括在內的範圍，使得包括10個、50個及其之間的每個整數。較佳地，該寡聚物特異性雜交到該標靶序列。

**【0077】** 術語「經配置為」表示所參考的寡核苷酸標靶-雜交序列的多核苷酸序列的配置的實際排列。舉例而言，經配置為與標靶序列特異性雜交的寡核苷酸具有在嚴格雜交條件下與參考的序列特異性雜交的多核苷酸序列。

**【0078】** 如本文所用術語「經配置為特異性雜交」是指寡核苷酸的標靶-雜交區域被設計為具有多核苷酸序列，其可靶向參考的瘧原蟲物種標靶區域的序列。這樣的寡核苷酸不限於僅靶向該序列，而是相當有效地用作靶向瘧原蟲物種標靶核酸的組合物、套組或方法。寡核苷酸被設計為用作檢測來自樣品中瘧原蟲物種的測定法中的組分，故因此被設計為用於在檢測樣品中常見的其他核酸存在下靶向瘧原蟲物種。如本領域中所理解的，「特異性雜交到(與...特異性雜交)」並不意味著僅雜交到(僅與...特異性雜交)，因為可能會發生與非標靶核酸的一些小程度的雜交。相反，「特異性雜交到(與...特異性雜交)」是指寡核苷酸經配置為在測定法中起作用以主要雜交靶標，使得可以判定樣品中標靶核酸

的準確檢測。術語「經配置為」表示寡核苷酸標靶-雜交序列的多核苷酸序列配置的實際排列。

**【0079】** 如本文所用術語「片段」是關於瘧原蟲物種靶向核酸，是指一部分鄰接核酸。

**【0080】** 如本文所用術語「區域」是指核酸的一部分，其中該部分小於整個核酸。例如，當參考的核酸是寡核苷酸啟動子引子時，可以使用術語「區域」指整個寡核苷酸的較小啟動子部分。作為非限制性實例，當參考的核酸是擴增子時，術語「區域」可用於指藉由探針的標靶-雜交序列識別為雜交的較小核苷酸序列。

**【0081】** 可互換的術語「寡聚物」、「寡核苷酸(oligo)」和「寡核苷酸」是指通常具有少於1,000個核苷酸(nt)殘基的核酸，包括具有約5nt殘基的下限和大約500至900 nt殘基的上限。在一些實施例中，寡核苷酸在具有約12至15nt的下限和約50至600nt的上限的大小範圍內，並且其他實施例係在具有約15至20nt的下限和約22至100nt的上限的範圍內。寡核苷酸可以從天然來源中被純化或可以使用多種眾所周知的酵素或化學方法中的任何一種來合成。術語「寡核苷酸」不表示對試劑有任何特定功能；相反，它通常用於涵蓋本文所述的所有此類試劑。寡核苷酸可以發揮各種不同的功能。例如，如果寡核苷酸對互補股具有特異性並且能夠與之互補，且可以在存在核酸聚合酶的情況下進一步延伸，則它可以起到引子的作用；如果寡核苷酸含有被RNA聚合酶識別的序列並允許轉錄，則它可以起到引子的作用並提供啟動子(例如T7引子)；及如果寡核苷酸能夠與標靶核酸或其擴增子雜交，則它可以起到檢測標靶核酸的作用，並進一步提供可檢測的部分(例如，吡啶酯化合物)。

**【0082】** 如本文所用，寡核苷酸可「實質上對應於」特定的參考核酸序列，這意味著該寡核苷酸與參考核酸序列足夠相似，使得該寡核苷酸具有與參考核

酸序列相似的雜交特性，因為它將在嚴格的雜交條件下與相同的標靶核酸序列雜交。本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解，「實質上對應寡核苷酸」可以與參考序列不同，並且仍然可與相同的標靶核酸序列雜交。還應理解，除非上下文另外明確指出，否則對應於第二核酸的第一核酸包括其RNA和DNA並包括其互補序列。可以根據序列中相同鹼基的百分比或探針或引子與其標靶序列之間的完全互補鹼基的百分比來說明與核酸的這種差異。因此，在某些實施例中，如果鹼基同一性或互補性的這些百分比為100%至約80%，則寡核苷酸「實質上對應於」參考核酸序列。在較佳的實施例中，該百分比為100%至約85%。在更佳的實施例中，該百分比為100%至約90%；在其他較佳的實施例中，該百分比為100%至約95%。類似地，核酸或經擴增的核酸的區域在本文中可被稱為對應於參考核酸序列。本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解對雜交條件的各種修飾，這些修飾可能需要以不同百分比的互補性以允許與特定標靶序列雜交，而不會引起不可接受程度的非特異性雜交。

**【0083】** 瘧原蟲物種標靶核酸的示例性序列係顯示於下表19。具體地，SEQ ID NO：180和SEQ ID NO：192至SEQ ID NO：195分別是對應於惡性瘧原蟲(*P. fal*)、間日瘧原蟲、諾氏瘧原蟲、卵形瘧原蟲和三日瘧原蟲的核糖體RNA序列的參考序列。本文中將瘧原蟲物種的標靶區域描述為「對應於」SEQ ID NO：180的界定區域的情況下，應當理解，這種參考包括SEQ ID NO：192至SEQ ID NO：195中的任何一個或多個的同源區域。還應理解，這種關於「對應於」SEQ ID NO：180的界定區域的區域包括SEQ ID NO：180和SEQ ID NO：192至SEQ ID NO：195中的任何一個或多個的天然存在的變異型的同源區域，其可能存在於樣品中。

**【0084】** 「擴增寡聚物」是至少3'末端與標靶核酸互補且與標靶核酸或其互補序列雜交並參與核酸擴增反應的寡聚物。擴增寡聚物的實例是與標靶核酸雜

交並包含在擴增過程中被聚合酶延伸的3'OH末端的「引子」。擴增寡聚物的另一個實例是不被聚合酶延伸的寡聚物(例如，因為它具有3'封閉端)，但是參與或促進擴增。舉例而言，擴增寡核苷酸的5'區域可以包括與標靶核酸不互補的啟動子序列(其可被稱為「啟動子引子」或「啟動子提供者」)。本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解，可以修飾充當引子的擴增寡聚物以包括5'啟動子序列，並因此充當啟動子引子。併入3'封閉端進一步修飾啟動子引子，該引子現在能夠與標靶核酸雜交並提供用於啟動轉錄但不提供用於寡核苷酸延伸的引子的上游啟動子序列。此類經修飾的寡核苷酸在本文被稱為「啟動子提供者」寡聚物。擴增寡核苷酸的大小範圍包括約10至約70 nt長(不包括任何啟動子序列或poly-A尾)且包含至少約10個鄰接鹼基，或甚至至少12個與標靶核酸序列(或其互補股)的區域互補的鄰接鹼基之彼等者。該鄰接鹼基與擴增寡聚物結合的標靶序列至少80%互補或至少90%互補或完全互補。擴增寡聚物可視需要地包括經修飾的核苷酸或類似物，或參與擴增反應但與標靶核酸或模板序列不互補或不包含在標靶核酸或模板序列中的其他核苷酸。應當理解，當提及寡核苷酸、擴增子或其他核酸的長度範圍時，該範圍包括所有整數(例如，長度為19至25個鄰接核苷酸，包括19個、20個、21個、22個、23個、24個和25個)。

**【0085】** 如本文所用「啟動子」是特定的核酸序列，其被DNA依賴性RNA聚合酶(「轉錄酶」)識別為結合至核酸並在特定位點處開始RNA轉錄的訊號。

**【0086】** 如本文所用「啟動子提供者」或「提供者」是指包含第一區域和第二區域並且經修飾以防止從其3'末端開始DNA合成的寡核苷酸。啟動子提供者寡核苷酸的「第一區域」包括與DNA模板雜交的鹼基序列，其中雜交序列位於啟動子區域的3'但不一定與啟動子區域相鄰。啟動子寡核苷酸的雜交部分的長度通常為至少10個核苷酸，並且可延伸長達50個或更多個核苷酸。「第二區域」包含用於RNA聚合酶的啟動子序列。對啟動子寡核苷酸進行工程改造，使其不

能被RNA-依賴性或DNA-依賴性DNA聚合酶(例如反轉錄酶)延伸，如上所述，較佳在其3'末端包含一個封閉部分。如本文所述「T7提供者」是封閉的啟動子提供者寡核苷酸，其提供可被T7 RNA聚合酶識別的寡核苷酸序列。

**【0087】** 「擴增」是指用於獲得標靶核酸序列或其互補序列或其片段的多個複本的任何已知程序。多個複本可以被稱為擴增子或擴增產物。已知的擴增方法包括熱循環和等溫擴增方法。在一些實施例中，等溫擴增方法是較佳的。複製酶介導的擴增、聚合酶鏈鎖反應(PCR)、連接酶鏈鎖反應(LCR)、股替代擴增(SDA)和轉錄介導的擴增或轉錄相關的擴增都是核酸擴增方法中的非限制性實例。複製酶介導的擴增使用自我複製的RNA分子和複製酶，例如QB-複製酶(例如，美國專利案第4,786,600號)。PCR擴增使用DNA聚合酶、引子對和熱循環來合成dsDNA的兩條互補股的多個複本或從cDNA合成(例如，美國專利案第4,683,195號、第4,683,202號和第4,800,159號)。LCR擴增藉由使用雜交、連接和變性的多個循環來使用四個或更多個不同的寡核苷酸來擴增標靶及其互補股(例如，美國專利案第5,427,930號和美國專利案第5,516,663號)。SDA使用的引子包含限制性核酸內切酶的識別位點和可切割包括標靶序列的半修飾DNA雙股螺旋的一股的核酸內切酶，從而在一系列引子延伸和股替代步驟中發生擴增(例如，美國專利案第5,422,252號；美國專利案第5,547,861號；和美國專利案第5,648,211號)。較佳的實施例使用適合於RNA標靶核酸擴增的擴增方法，例如轉錄介導的擴增(TMA)或NASBA，但對本案所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見的是，本文揭露的寡聚物可以容易地用作其他擴增方法中的引子。

**【0088】** 「轉錄相關的擴增」在本文中也稱為「轉錄介導的擴增」(TMA)，是指使用RNA聚合酶從核酸模板產生多個RNA轉錄物的核酸擴增。這些方法一般採用RNA聚合酶、DNA聚合酶、去氧核糖核苷三磷酸、核糖核苷三磷酸和模板互補寡核苷酸，其包括啟動子序列，並且可視需要地包括一個或多個其他寡

核苷酸。TMA方法是如本文所述用於擴增和檢測瘧原蟲標靶序列的擴增方法的實施例。轉錄相關的擴增的變異型是本領域中眾所周知的，如先前詳細揭露的(例如，美國專利案第4,868,105號；第5,124,246號；第5,130,238號；第5,437,990號；第5,554,516號；和第7,374,885號；以及PCT公開號WO88/01302，WO88/10315和WO95/03430)。本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解，所揭露的組合物可用於基於藉由聚合酶延伸寡聚物序列的擴增方法中。

【0089】如本文所用術語「即時TMA」是指藉由即時檢測手段監測的標靶核酸的轉錄介導的擴增(「TMA」)。

【0090】與「擴增產物」可互換使用的術語「擴增子」是指在擴增程序期間產生的核酸分子，其與標靶序列中包含的序列互補或同源。這些術語可用於指單股擴增產物、雙股擴增產物或雙股擴增產物的股之一個。

【0091】「探針」、「檢測探針」、「檢測寡核苷酸」和「檢測探針寡聚物」在本文中可互換使用，是指核酸寡聚物，其在促進雜交的條件下與核酸或擴增的核酸中的標靶序列特異性雜交，以允許檢測標靶序列或擴增的核酸。該檢測可以是直接的(例如，直接與其標靶序列雜交的探針)或間接的(例如，透過中間分子結構與其標靶聯結的探針)。探針可以是DNA、RNA、其類似物或其組合，並且它們可以被標記或未被標記。探針的「標靶序列」一般是指較大核酸序列中的較小核酸序列，其藉由標準鹼基配對與探針寡聚物的至少一部分特異性雜交。該探針可包括標靶特異性序列和有助於探針的三維構象的其他序列(例如，美國專利案第5,118,801號；第5,312,728號；第6,849,412號；第6,835,542號；第6,534,274號；和第6,361,945號；以及美國專利案第20060068417號)。在一較佳的實施例中，該檢測探針包括2'甲氧基骨架，其可導致獲得更高的訊號。

【0092】術語「TaqMan®探針」是指檢測寡核苷酸，其包含通常在5'鹼基上的螢光染料和通常在3'鹼基上的非螢光淬滅染料(淬滅劑)。照射後，激發的螢光



染料將能量轉移到附近的淬滅染料分子上，而不發出螢光，從而產生非螢光基質。在擴增期間，聚合酶的核酸外切酶活性切割TaqMan探針，使螢光團與淬滅劑分離，從而允許從螢光團發出未淬滅的訊號，作為擴增的指標。

**【0093】** 如本文所用「標記物」是指直接或間接連接至被檢測或導致可檢測的訊號的探針的部分或化合物。直接標記可以通過將標記物連接到探針的鍵或相互作用來發生，包括共價鍵或非共價相互作用，例如氫鍵、疏水性和離子相互作用，或螯合物或配位複合物的形成。間接標記可以通過使用橋接部分或「連接子」，例如直接或間接標記的結合成對分子、抗體或其他寡聚物來進行，並且可以放大可檢測的訊號。標記物包括任何可檢測的部分，例如放射性核種、配位體(例如，生物素、抗生物素蛋白)、酵素或酵素基質、反應性基團或發色團(例如，賦予可檢測顏色的染料、顆粒或珠粒)、發光化合物(例如，生物發光、磷光或化學發光標記)或螢光團。可在均質測定法中檢測到標記物，其中混合物中結合的標記探針呈現出與未結合的標記探針不同的可檢測變化，例如不穩定或差異降解性質。可以檢測到「均質可檢測的標記物」，而無需物理去除未結合形式的標記物或標記探針的結合(例如，美國專利案第5,283,174號、第5,656,207號和第5,658,737號)。該標記物包括化學發光化合物，例如包括標準AE和衍生物的吡啶酯(「AE」)化合物(例如，美國專利案第5,656,207號、第5,658,737號和第5,639,604號)。將標記物附著於核酸並檢測標記物的合成和方法是眾所周知的(例如，Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10；美國專利案第5,658,737號，第5,656,207號，第5,547,842號，第5,283,174號，和第4,581,333號)。一個特定的探針上可能存在不止一種標記物和一種以上類型的標記物，或者檢測可以使用多種探針混合物，其中每種探針都用產生可檢測的訊號的化合物標記(例如，美國專利第6,180,340號和第6,350,579號)。

【0094】如本文中所使用的被稱為「分子炬」的結構被設計為包括藉由連接區域(「標靶結合域」)連接的自互補的不同區域(「封閉結構域」)，並且在預定雜交測定條件下彼此雜交。包含封閉結構域的全部或部分核苷酸序列也可充當標靶結合結構域。因此，封閉結構域可包括標靶結合序列、非標靶結合序列及其組合。

【0095】如本文所使用的被稱為「分子信標」的結構被設計為包括標靶結合序列，該標靶結合序列在其5'和3'末端均側接有彼此互補的序列，並且該序列在預定雜交測定條件下彼此雜交。側翼互補區域可被稱為「開關序列」。

【0096】「捕獲探針」、「捕獲寡核苷酸」、「標靶捕獲寡核苷酸」和「捕獲探針寡聚物」在本文中可互換使用，是指核酸寡聚物，其藉由標準鹼基配對與標靶核酸中的標靶序列特異性雜交，並與固定化探針上的結合配體結合，以將標靶核酸捕獲到載體上。捕獲寡聚物的一個實例包括包含兩個結合區域的寡核苷酸、標靶雜交序列和固定化探針結合區域。此實例的變異型，兩個區域可以存在於藉由一個或多個連接子連接在一起的兩個不同的寡聚物上。在捕獲寡聚物的另一個實施例中，標靶雜交序列是包括隨機或非隨機的poly-GU、poly-GT或poly U序列，以與標靶核酸非特異性結合，並將其鏈接到載體上的固定化探針(參見，例如，PCT第WO 2008/016988號)。固定化探針結合區域可以是核酸序列，稱為尾。該尾包括約10至40個核苷酸(例如，A<sub>10</sub>至A<sub>40</sub>)或約17至33nt(例如，T<sub>3A14</sub>至T<sub>3A30</sub>)的實質上均聚的尾，其與附著在載體顆粒或載體基質上的互補固定化序列結合。因此，在一些實施例中，較佳的核酸尾的非限制性實例可包括T<sub>0-4</sub>A<sub>10-40</sub>序列。捕獲寡聚物的另一個實例包括兩個區域，標靶雜交序列和不是核酸序列的結合成對分子。

【0097】如本文所用「固定化寡核苷酸」、「固定化探針」或「固定化核酸」是指將捕獲寡聚物直接或間接連接至載體的核酸結合配體。與載體連接的固定

化探針有助於將捕獲探針結合的標靶與樣品中未結合的材料分離。固定化探針的一個實施例是連接至載體的寡聚物，其有助於將結合的標靶序列與樣品中未結合的物質分離。載體可包括已知的材料，例如不溶於溶液的基質和顆粒，其可由硝酸纖維素、尼龍、玻璃、聚丙烯酸酯、混合聚合物、聚苯乙烯、矽烷、聚丙烯、金屬或其他組合物製成，其中一個實施例是可磁吸引的顆粒。載體可以是單分散磁球(例如，均勻大小+5%)，固定化探針直接(透過共價鍵、螯合或離子相互作用)或間接(透過一個或多個連接子)與之連接，其中在雜交條件期間，探針與載體之間的聯結或相互作用是穩定的。

[描述]

**【0098】** 本發明一般關於用於判定在樣品(諸如血液樣品)中是否存在原生動物寄生蟲瘧原蟲物種的方法和組合物。適當地，本文描述的方法和組合物能夠檢測惡性瘧原蟲、諾氏瘧原蟲、三日瘧原蟲、卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲的存在或不存在。在一些實施例中，本發明提供用於檢測樣品中瘧原蟲物種的方法，其中該方法包括對來自瘧原蟲物種的標靶核酸進行基於擴增的檢測。本發明進一步提供組成物(包含反應混合物)和套組，包括用於檢測樣品中瘧原蟲物種的寡聚物的組合物，該瘧原蟲物種包含惡性瘧原蟲及/或諾氏瘧原蟲及/或三日瘧原蟲及/或卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲。該寡聚物組合物一般包括用於檢測樣品中瘧原蟲物種的至少兩種擴增寡聚物，該瘧原蟲物種包含惡性瘧原蟲及/或諾氏瘧原蟲及/或三日瘧原蟲及/或卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲，並且可進一步包括如本文所述的一種或多種其他寡聚物，用於對瘧原蟲物種進行基於擴增的檢測，該瘧原蟲物種包含惡性瘧原蟲及/或諾氏瘧原蟲及/或三日瘧原蟲及/或卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲，該其他寡聚物例如，如捕獲探針及/或檢測探針。

**【0099】** 用於檢測來自受試者的樣品中是否存在瘧原蟲物種的方法一般包括進行基於核酸的檢測測定法，以用於特異性檢測瘧原蟲物種核酸的樣品。基

於核酸的檢測測定法一般利用與瘧原蟲物種的標靶核酸特異性雜交的寡核苷酸與懷疑存在於樣品中的其他核酸的最小交叉反應性。在一些變異型中，用於基於核酸的瘧原蟲物種檢測的寡核苷酸或寡核苷酸組合物對焦蟲(*Babesia* sp) (例如，小鼠焦蟲(*B. microti*)核酸)具有最小交叉反應性。

**【0100】** 在本發明的某些態樣中，提供至少兩種寡聚物的組合物，用於判定樣品中是否存在瘧原蟲物種。典型地，寡聚物組合物包括至少第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，用於擴增對應於SEQ ID NO：180的區域的瘧原蟲物種標靶序列。在此類實施例中，至少一種擴增寡聚物包含有義方向的標靶雜交序列(「有義THS」)，且至少一種擴增寡聚物包括反義方向的標靶雜交序列(「反義THS」)，其中擴增寡聚物的有義THS和反義THS分別被配置為與對應於包括在SEQ ID NO：180中的序列的瘧原蟲物種標靶序列特異性雜交，且其中選擇標靶雜交序列，以使反義THS靶向的瘧原蟲序列位於有義THS靶向的瘧原蟲序列的下游(亦即，放置至少兩種擴增寡聚物，以使其位於待擴增標靶區域的側面)。

**【0101】** 在一些實施例中，對應於SEQ ID NO：180的區域的瘧原蟲物種標靶區域，從約核苷酸位置844或約核苷酸位置910到約核苷酸位置1038，約核苷酸位置1051，約核苷酸位置1060，或約核苷酸位置1077。在其他實施例中，對應於SEQ ID NO：180的區域的瘧原蟲物種標靶區域，從約核苷酸位置1153，約核苷酸位置1169，或約核苷酸位置1182到約核苷酸位置1327，約核苷酸位置1354，或約核苷酸位置1382。

**【0102】** 在一些實施例中，組成物包括擴增寡聚物，其包含實質上對應於或相同於SEQ ID NO：21至SEQ ID NO：56、SEQ ID NO：80至SEQ ID NO：102和SEQ ID NO：182至SEQ ID NO：184中任一個所示的序列的瘧原蟲特異性標靶雜交序列的擴增寡聚物。在此類變異型中，寡聚物組合物包括至少一種擴增寡聚物，其包含與上述寡聚物的標靶雜交序列相反極性(有義與反義，反之亦然)

的瘧原蟲特異性標靶雜交序列，使得至少兩種擴增寡聚物位於待擴增的標靶區域的側面。

【0103】 在一些實施例中，組成物包括(1)至少一種擴增寡聚物，其包含實質上對應於下表1中描述的至少一個有義寡聚物序列的瘧原蟲特異性標靶雜交區域；及(2)至少一種擴增寡聚物，其包含實質上對應於表1中所示的至少一個反義寡聚物序列的瘧原蟲特異性標靶雜交區域。在特定變異型中，擴增寡聚物組合物的有義及/或反義標靶雜交序列包含或由以下組成：從表1中選擇的有義及/或反義序列。

[表1] 用於擴增瘧原蟲物種標靶區域之示例性有義及反義擴增寡聚物標靶雜交序列

SEQ ID NO	序列 (5' → 3')	有義/反義 <sup>1</sup>
21	AATACTACAGCATGG	有義
22	GGAAGGCAGCAGGCGCGTA	有義
23	AATACTACAGCATGGA	有義
24	AATACTACAGCATGGAA	有義
25	ATACTACAGCATGGAATA	有義
26	ATTCAGATGTCAGAGGTGA	有義
27	GTATTCAGATGTCAGAGGTGA	有義
28	GTTACGATTAATAGGAGT	有義
29	GTTACGATTAATAGGAGTA	有義
30	GTTACGATTAATAGGAGTAG	有義
31	GTTACGATTAATAGGAGTAGC	有義

SEQ ID NO	序列 (5' → 3')	有義/反義 <sup>1</sup>
32	AATACTACAGCATGGAAT	有義
33	AATACTACAGCATGGAATA	有義
34	TACGATTAATAGGAGT	有義
35	TACTACAGCATGGAATA	有義
36	TATTCAGATGTCAGAGGTGA	有義
37	TCAGTNCCTTATGAGAAATC	有義
38	TGGCTTAGTTACGATT	有義
39	TGGCTTAGTTACGATTAATAG	有義
40	TTAATAGGAGTAGCTTGGGG	有義
41	TTACGATTAATAGGAGT	有義
42	TTCAGATGTCAGAGGTGA	有義
43	TTGGCTTAGTTACGAT	有義
44	TTGGCTTAGTTACGATTA	有義
45	TTGGGGACATTCGTATTCAGA	有義
46	TTTAGATTGCTTCCTTCAGT	有義
47	TTTGAATACTANAGCA	有義
48	ACATTCGTATTCAGATGTCAG	有義
49	CTTAGTTACGATTAATAGGA	有義
50	CGATTAATAGGAGTAGCTTGG	有義

SEQ ID NO	序列 (5' → 3')	有義/反義 <sup>1</sup>
51	CTTAGTTACGATTAATAGGAGTAG	有義
52	CTTGAATACTNCAGCA	有義
53	GGCTTAGTTACGATTA	有義
54	AATACTANAGCATGG	有義
55	AATACTANAGCATGGAATA	有義
56	AATTCTAAAGAAGAGAG	有義
80	TTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTG	反義
81	CTTGATTAATGGAAGTATTTTAGA	反義
82	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	反義
83	CCTACTCTTGTCTTAAACTA	反義
84	AAACGGCCATGCATCACCATCCAAGA	反義
85	CTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	反義
86	CGACGGTATCTGATCGTCTTCACTCCC	反義
87	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAG	反義
88	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGTA	反義
89	CACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	反義
90	CACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGG	反義
91	CTTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATT	反義
92	CTTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	反義

SEQ ID NO	序列 (5' → 3')	有義/反義 <sup>1</sup>
93	ATCGTCTTCACTCCCTTAACTTTCGTTC	反義
94	CTCCCTTAACTTTCGTTCCTTGATTAATG	反義
95	TCACTCCCTTAACTTTCGTTCCTTGAT	反義
96	CCCTTAACTTTCGTTCCTTGATTAATG	反義
97	CTTAACTTTCGTTCCTTGATTAATG	反義
98	TAACTTTCGTTCCTTGATTAATG	反義
99	ACTCCCTTAACTTTCGTTCCTTGAT	反義
100	TCCCTTAACTTTCGTTCCTTGAT	反義
101	AGGCAAATGCTTTCGCAGTTGTTNGTCT	反義
102	AGGCAAATGCTTTCGCAGTTGTTTGTCT	反義
182	TCAAGAAAGAGCTATNAATCTGTCAATCC	反義
183	GAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTG	有義
184	CAAAGTCTTTGGGTTCTGG	有義

<sup>1</sup>這些序列的有義/反義指定僅用於示例性目的。此指定不一定將順序限制為所附的指定。

**【0104】** 在一些實施例中，寡聚物組合物包括(a)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，(i)該標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包含SEQ ID NO：163的序列；或(ii)該標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包含SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168的序列；及(b)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該



標靶-雜交序列的長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169中，且包含SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列。在一些此類實施例中，該寡聚物組合物包括(a)(i)中的擴增寡聚物，其中該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：54和SEQ ID NO：55，或其中該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：164的序列中，且包括SEQ ID NO：165的序列(例如，標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：35)。在又一其他實施例中，該寡聚物組合物包括(a)(ii)中的擴增寡聚物，其中該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列(例如，標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：28至SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：49至SEQ ID NO：51)，或其中該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：168的序列(例如，標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：44和SEQ ID NO：53)。在如上述寡聚物組合物的某些實施例中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：80至SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：85至SEQ ID NO：100。在其他實施例中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170的序列中，且包括SEQ ID NO：171的序列(例如，標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：81、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85、SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：90、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：96至SEQ ID NO：98)，或包括在SEQ ID NO：170的序列中，且包括SEQ ID NO：172的序列(例如，標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：80、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85和SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：100)。

**【0105】** 在一些實施例中，寡聚物組合物包括(a')包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：185的序列中，且包括SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及(b')包含標靶-雜交序列的擴

增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：188的序列中，且包括SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。在一些實施例中，(a')的擴增寡聚物包括標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列選自SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46、SEQ ID NO：183和SEQ ID NO：184，或標靶-雜交序列包括在SEQ ID NO：186的序列中(例如，SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：84的標靶-雜交序列)。在某些實施例中，(b')中的擴增寡聚物包括選自SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84和SEQ ID NO：182的標靶-雜交序列。

【0106】 在某些實施例中，本文所述的擴增寡聚物是啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到標靶-雜交序列的啟動子序列，且其與瘧原蟲物種標靶核酸不互補。舉例而言，在如本文所述寡聚物組合物的一些實施例中，(b)或(b')中的擴增寡聚物係進一步包含5'啟動子序列的啟動子引子。在特定實施例中，該啟動子序列係T7 RNA聚合酶啟動子序列，例如，諸如具有SEQ ID NO：179所示序列的T7啟動子序列。在特定的變異型中，擴增寡聚物係具有選自SEQ ID NO：57至SEQ ID NO：77和SEQ ID NO：181所示序列的啟動子引子。

【0107】 表2顯示用於檢測瘧原蟲物種標靶核酸的擴增寡聚物標靶雜交序列(「Amp 1」和「Amp 2」)的特定合適的組合物。

[表2] 擴增寡聚物標靶雜交序列的示例性組合物

Amp 1 (SEQ ID NO)	Amp 2 (SEQ ID NO)
30	5
33	8
49	11
21	14

Amp 1 (SEQ ID NO)	Amp 2 (SEQ ID NO)
30	17
33	20
49	23
21	26
30	29
21	32
34	35
53	38
21	41
34	44
53	46
183	182
184	182

**【0108】** 在一些實施例中，如上述寡聚物組合物包括至少兩種有義擴增寡聚物及/或至少兩種反義擴增寡聚物側翼於瘧原蟲物種標靶區域。舉例而言，寡聚物組合物可包括(a)至少兩種擴增寡聚物(例如，兩種或三種擴增寡聚物)，各自包含長度為約14至約25個鄰接核苷酸的標靶-雜交序列，包含在SEQ ID NO：166的序列中，並且包括SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：16及/或(b)至少兩種擴增寡聚物(例如，兩種或三種擴增寡聚物)，各自包含長度為約15至約33個鄰接核苷酸

的標靶-雜交序列，包含在SEQ ID NO：169的序列中，並且包括SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列；在一些此類變異型中，寡聚物組合物包括(a)第一擴增寡聚物，其包含標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列(例如，SEQ ID NO：34的標靶-雜交序列)及第二擴增寡聚體，其包含標靶-雜交序列，該靶雜-交序列包括SEQ ID NO：168的序列(例如，SEQ ID NO：53的標靶-雜交序列)。在包含至少兩種有義擴增寡聚物及/或至少兩種反義擴增寡聚物的其他實施例中，寡聚物組合物包含(a)(i)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包括SEQ ID NO：163的序列；以及(ii)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚體，該標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包括SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168；及/或(b)至少兩種擴增寡聚物(例如，兩種或三種擴增寡聚物)，各自包含標靶-雜交序列，其長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169的序列中，且包括SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列；在一些此類變異型中，寡聚物組合物包括(a)(i)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：164的序列中，且包括SEQ ID NO：165的序列(例如，SEQ ID NO：21的標靶-雜交序列)；及(a)(ii)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列(例如，SEQ ID NO：34的標靶-雜交序列)。在包含(b)中至少兩種擴增寡聚物的上述寡聚物組合物的一些實施例中，寡聚物組合物包括(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，各自包括標靶-雜交序列，其包含在SEQ ID NO：170中，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列(例如，包含SEQ ID NO：94的標靶-雜交序列的第一擴增寡聚物和包含SEQ ID NO：95的標靶-雜交序列的第二擴增寡聚物)。

**【0109】** 在一些實施例中，如本文所述的寡聚物組合物進一步包括至少一種

捕獲探針寡聚物，其包含經配置為與瘧原蟲物種標靶核酸特異性雜交的標靶-雜交序列。在一些此類實施例中，該捕獲探針寡聚物包含標靶-雜交序列，該序列實質上對應於包含在SEQ ID NO：180的互補序列中的序列。在一些實施例中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列共價地附接於結合至固定化探針的序列或部分。適合的捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列包括長度至多約30個鄰接核苷酸的序列，且包括實質上對應於選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20的序列的序列(例如，標靶-雜交序列，其包含或由選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成的序列，包括其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物)。在一些實施例中，捕獲探針寡聚物包含或由選自SEQ ID NO：1至SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：10所組成的序列。在一些實施例中，寡聚物組合物包括至少兩種捕獲探針寡聚物(例如，如上述的至少兩種捕獲探針寡聚物)。包含SEQ ID NO：19的標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物(例如，包含SEQ ID NO：9的序列的捕獲探針寡聚物)和包含SEQ ID NO：20的標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物(例如，包含SEQ ID NO：10的序列的捕獲探針寡聚物)特定適合一起用於如本文所述的寡聚物組合物中。

**【0110】** 在某些變異型中，本文所述的寡聚物組合物進一步包括至少一種檢測探針寡聚物，其經配置為與瘧原蟲物種標靶序列(其係可擴增的)特異性雜交，使用靶向瘧原蟲物種標靶區域的至少兩種擴增寡聚物。在一些實施例中，在瘧原蟲物種標靶區域對應於SEQ ID NO：180(從約核苷酸位置844或約核苷酸位置910到約核苷酸位置1038，約核苷酸位置1051，約核苷酸位置1060或約核苷酸位置1077)的區域中，該寡聚物組合物包括特異性地雜交到標靶區域的檢測探針寡聚物，該標靶區域對應於SEQ ID NO：180(從約核苷酸位置951到約核苷酸位置998)或其完整互補序列的區域。舉例而言，檢測探針寡聚物可包括標靶-雜交序

列，該標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列的序列中，且(ii)包括選自SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列，包括其互補序列。在更具體的變異型中，檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列的序列中，並且(ii)包括SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列，包括其互補序列。在其他變異型中，檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列的序列中，並且(ii)包括選自SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178的序列，包括其互補序列。特定適合的檢測探針寡聚物標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161，包括其互補序列。適合的檢測探針進一步包括如上述任何一種的DNA等同物和DNA/RNA嵌合物。

**【0111】** 在一些實施例中，在瘧原蟲物種標靶區域對應於SEQ ID NO:180(其從約核苷酸位置1153，約核苷酸位置1169，或約核苷酸位置1182到約核苷酸位置1327，約核苷酸位置1354，或約核苷酸位置1382)的區域，該寡聚物組合物包括特異性地雜交到標靶區域的檢測探針寡聚物，該標靶區域對應於SEQ ID NO：180(從約核苷酸位置1210到約核苷酸位置1233)或其完整互補序列的區域。舉例而言，檢測探針寡聚物可包括標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列的長度為至少約13個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列的序列中，且(ii)包括選自SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191的序列，包括其互補序列。特定適合的檢測探針寡聚物標靶-雜交序列包含SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID NO：143，包括其互補序列。適合的檢測探針寡聚物進一步包括上述任何一種的DNA等同物和DNA/RNA嵌合物。

**【0112】** 表3顯示用於檢測瘧原蟲物種標靶核酸的檢測探針標靶雜交序列與

第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物標靶雜交序列(「Amp 1」和「Amp 2」)的示例性組合物。

[表3] 擴增寡聚物和檢測探針標靶-雜交序列的示例性組合物

擴增寡聚物 THSs		檢測探針 THS (SEQ ID NO)
Amp 1 (SEQ ID NO)	Amp 2 (SEQ ID NO)	
30	82	151
30	82	157
33	82	155
49	82	150
49	82	155
21	89	148
21	89	152
30	89	148
30	89	152
33	89	158
49	89	150
21	92	148
21	92	152
30	92	148
30	92	152

擴增 寡聚物 THSs		檢測探針 THS (SEQ ID NO)
Amp 1 (SEQ ID NO)	Amp 2 (SEQ ID NO)	
21	94	148
21	94	152
34	94	148
34	94	152
34	94	157
53	94	148
53	94	152
53	94	157
21	95	148
21	95	152
34	95	148
34	95	152
34	95	157
53	95	148
53	95	152
53	95	157
183	182	126



擴增 寡聚物 THSs		檢測探針 THS (SEQ ID NO)
Amp 1 (SEQ ID NO)	Amp 2 (SEQ ID NO)	
183	182	127
183	182	128
183	182	143
183	182	129
184	182	126

**【0113】** 在一些變異型中，寡聚物組合物包括至少兩種檢測探針寡聚物(例如，如本文所述的至少兩種特異性檢測探針)。舉例而言，在瘧原蟲物種標靶區域對應於SEQ ID NO：180(從約核苷酸位置844或約核苷酸位置910到約核苷酸位置1038，約核苷酸位置1051，約核苷酸位置1060，或約核苷酸位置1077)的區域，該寡聚物組合物可包括(A)包含標靶-雜交序列的第一檢測探針寡聚物，該標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列的序列中，並且(ii)包含SEQ ID NO：175或其互補序列的序列；及(B)包含標靶-雜交序列的第二檢測探針寡聚物，該標靶-雜交序列係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列的序列中，並且(ii)包含SEQ ID NO：176或其互補序列的序列(包括上述DNA等同物或DNA/RNA嵌合物)。第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物的特定適合的組合物包括：包含SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第一檢測探針寡聚物、及包含選自包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152之標靶-雜交序列的第二檢測探針寡聚物。

**【0114】** 檢測探針寡聚物可在核酸骨架中的一個或多個鍵結處包含2'-甲氧

基骨架。在一些實施例中，在擴增子檢測反應混合物中提供至少一種檢測探針寡聚物。

**【0115】** 典型地，根據本發明的檢測探針寡聚物進一步包括標記物。特定適合的標記物包括發射可檢測的光訊號的化合物，例如可以在均質混合物中檢測到的螢光團或發光(例如化學發光)化合物。一特定探針上可能存在不止一種標記物和一種以上類型的標記物，或者檢測可以依賴於使用多種探針的混合物，其中每種探針都用產生可檢測的訊號的化合物標記(參見，例如，美國專利案第6,180,340號和第6,350,579號，其各自藉由引用併入本文)。標記物可以藉由包括共價鍵、螯合和離子相互作用的多種方式附著於探針，但是較佳為，該標記物是共價附著的。舉例而言，在一些實施例中，檢測探針具有附著的化學發光標記物，例如吡啶酯(AE)化合物(參見，例如，美國專利案第5,185,439號；第5,639,604號；第5,585,481號；和第5,656,744號；其各自藉由引用併入本文)，其典型的變異型是藉由非核苷酸連接子附接至探針(參見，例如，美國專利案第5,585,481號；第5,656,744號；和第5,639,604號，特定是在第10欄第6行至第11欄第3行，以及實例8；其各自藉由引用併入本文)。在其他實施例中，檢測探針既包含螢光標記物又包含淬滅劑，這組合在螢光共振能量轉移(FRET)測定法中特定有用。此檢測探針的具體變異型包括例如TaqMan檢測探針(Roche Molecular Diagnostics)和「分子信標」(參見，例如，Tyagi *et al.*, *Nature Biotechnol.* 16 : 49-53, 1998；美國專利案第5,118,801號和第5,312,728號；其各自藉由引用併入本文)。

**【0116】** 根據本發明的檢測探針寡聚物可進一步包括非標靶-雜交序列。此類檢測探針的具體實施例包括例如形成藉由分子內雜交保持的構象的探針，諸如通常稱為髮夾的構象。特定適合的髮夾式探針包括「分子炬」(參見，例如，美國專利案第6,849,412號；第6,835,542號；第6,534,274號；和第6,361,945號，其各自藉由引用併入本文)和「分子信標」(參見，例如，如前述Tyagi *et al.*；如

前述美國專利案第5,118,801號和第5,312,728號)。使用此類髮夾式探針的方法是本領域中眾所周知的。

**【0117】** 在又一其他實施例中，檢測探針是實質上不形成分子內鍵合所保持的構象的線性寡聚物。在特定的變異型中，線性檢測探針寡聚物包括化學發光化合物作為標記物，較佳為吡啶酯(AE)化合物。

**【0118】** 本發明亦提供本文所述的檢測探針寡聚物、捕獲探針寡聚物及其組合物。

**【0119】** 在其他態樣中，本發明提供檢測來自受試者的樣品中是否存在瘧原蟲物種的方法。此方法一般包括進行基於核酸的檢測測定，以用於特異性檢測瘧原蟲物種核酸的樣品。用於特異性檢測瘧原蟲物種的基於核酸的檢測測定法可使用本文所述的任何一種或多種瘧原蟲物種-特異性寡聚物(例如，本文所述的寡聚物組合物，包含至少兩種擴增寡聚物；或本文所述的檢測探針或檢測探針的組合物)。來自根據本發明的基於核酸的檢測測定法的正訊號指示樣品中存在惡性瘧原蟲、諾氏瘧原蟲、三日瘧原蟲、卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲中的一種或多種。

**【0120】** 在包括使用基於核酸的檢測測定法的方法的一些實施例中，基於擴增的測定法被用於檢測瘧原蟲物種。此基於擴增的測定法一般包括進行瘧原蟲物種標靶區域的核酸擴增以及檢測經擴增的產物(例如，藉由使擴增產物與提供訊號以指示樣品中存在瘧原蟲物種的訊號的核酸檢測探針特異性雜交)。如果樣品中存在瘧原蟲物種核酸，則擴增步驟包括使樣品與一種或多種對瘧原蟲物種標靶核酸中的標靶序列具有特異性的擴增寡聚物接觸，以產生擴增產物。在特定實施例中，在擴增步驟中使用本文所述的至少兩種擴增寡聚物的組合物。擴增藉由使用至少一種核酸聚合酶和擴增寡聚物從模板股產生複本來合成標靶序列或其互補序列的其他複本(例如，藉由使用模板股從引子延伸序列)。適合的擴

增方法包括，例如，複製酶介導的擴增、聚合酶鏈鎖反應(PCR)、連接酶鏈鎖反應(LCR)、股替代擴增(SDA)和轉錄介導的擴增或轉錄相關的擴增(TMA)。此擴增方法是本領域中眾所周知的(參見，例如，上文所述“定義”部分中的擴增方法的討論)，並且根據本發明揭露的方法能容易使用。

**【0121】** 擴增產物的檢測可以藉由多種方法來檢測與擴增的標靶序列特異性相關的訊號。核酸可能與導致物理變化的表面相關，例如可檢測的電變化。可以藉由以下方法檢測擴增的核酸：將其濃縮在基質中或基質上，然後檢測與其相關的核酸或染料(例如，嵌入劑，如溴化乙錠或螢光綠(cyber green))，或檢測溶液相中與核酸相關的染料的增加。檢測的其他方法可使用雜交步驟，該雜交步驟包括使擴增產物與至少一種檢測探針接觸，該檢測探針經配置為與擴增產物中的序列特異性雜交並檢測探針：產物複合物的存在，或藉由使用可以擴增與擴增產物相關的可檢測的訊號的探針(例如，美國專利案第5,424,413號；第5,451,503號和第5,849,481號)。與擴增產物特異性相關的直接或間接標記的探針可提供可檢測的訊號，指示樣品中標靶核酸的存在。在一些實施例中，利用基於擴增的測定法檢測瘧原蟲物種的方法利用本文所述的一種或多種檢測探針寡聚物來檢測擴增產物。

**【0122】** 與互補的擴增序列雜交的檢測探針可以是DNA或RNA寡聚物，或包含DNA和RNA核苷酸的組合物的寡聚物，或用經修飾的骨架合成的寡聚物，例如，包含一個或多個2'-甲氧基取代的核糖核苷酸的寡聚物。用於檢測擴增序列的探針可以是未標記的和間接檢測的(例如，藉由另一種結合配體與探針上的部分的結合)，或者可以用多種可檢測的標記物標記。在用於檢測瘧原蟲物種的方法的一些實施例中，例如在使用轉錄介導的擴增(TMA)的某些實施例中，檢測探針是線性化學發光標記的探針，例如線性吡啶酯(AE)標記的探針。檢測步驟亦可提供有關擴增序列的附加資訊，例如其核酸鹼基序列的全部或部分。該檢

測可以在擴增反應完成之後進行，或者可以與擴增標靶區域同時進行，例如即時進行。在一個實施例中，檢測步驟允許均質檢測，例如檢測雜交的探針，而不從混合物中除去未雜交的探針(參見，例如，美國專利案第5,639,604號和第5,283,174號)。

**【0123】** 在檢測擴增步驟鄰近或結束時的擴增產物的實施例中，可以使用線性檢測探針來提供訊號，以指示探針與擴增產物的雜交。此檢測的一個實例是使用與標靶核酸雜交的發光標記的探針。然後使發光標記物從未雜交的探針水解。使用光度計藉由化學發光進行檢測(參見，例如，國際專利申請公開案WO 89/002476)。在使用即時檢測的其他實施例中，檢測探針可以是髮夾式探針，例如分子信標、分子炬或雜交開關探針，其標記有報導部分，當探針結合到擴增產物時會被檢測到。此探針可包含標靶-雜交序列和非標靶-雜交序列。前文已經描述了各種形式的此類探針(參見，例如，美國專利案第5,118,801號；第5,312,728號；第5,925,517號；第6,150,097號；第6,849,412號；第6,835,542號；第6,534,274號；和第6,361,945號；以及美國專利申請公開案第20060068417A1號和第20060194240A1號)。

**【0124】** 使用TMA擴增的一些擴增方法包括以下步驟。簡言之，包含待擴增的序列的標靶核酸以單股核酸(例如，ssRNA或ssDNA)的形式提供。本案所屬技術領域中具有通常知識者將理解，雙股核酸(例如，dsDNA)的常規解離可用於提供單股標靶核酸。啟動子引子在其標靶序列上與標靶核酸特異性結合，且反轉錄酶(RT)使用標靶股作為模板延伸啟動子引子的3'端，以產生標靶序列股的cDNA複本，從而產生RNA：DNA雙股。RNase水解RNA：DNA雙股中的RNA股，且第二個引子特異性結合到其標靶序列，該標靶序列位於啟動子引子末端下游的cDNA股上。RT藉由使用第一個cDNA模板延伸第二個引子的3'端來合成新的DNA股，以產生包含官能性啟動子序列的dsDNA。然後，對啟動子序列具

有特異性的RNA聚合酶開始轉錄，以產生RNA轉錄本，該轉錄本為反應中初始標靶股的約100至1000個擴增複本(「擴增子」)。當第二個引子與每個擴增子中的標靶序列特異性結合且RT從擴增子RNA模板建立DNA複本以產生RNA:DNA雙股時，擴增會繼續進行。反應混合物中的RNase從RNA:DNA雙股水解擴增子RNA，且啟動子引子與新合成的DNA中的互補序列特異性結合。RT延伸啟動子引子的3'端，以產生dsDNA，該dsDNA包含官能性啟動子，RNA聚合酶與之結合，以轉錄與標靶股互補的其他擴增子。在反應過程期間重複進行更多擴增子複本的自催化循環，這會導致樣品中存在的標靶核酸擴增約十億倍。擴增產物可以在擴增期間即時被檢測到，也可以在擴增反應結束時藉由使用與擴增產物中包含的標靶序列特異性結合的探針進行檢測。從結合的探針產生的訊號的檢測指示樣品中存在有標靶核酸。

**【0125】** 在一些實施例中，該方法利用「反向」TMA反應。在此類變異型中，初始或「正向」擴增寡聚物是在標靶區域的3'-末端附近與標靶核酸雜交的引子寡核苷酸。反轉錄酶(RT)藉由使用標靶核酸作為模板延伸引子的3'端來合成cDNA股。第二或「反向」擴增寡聚物是具有經配置為與合成cDNA股內包含的標靶-序列雜交的標靶-雜交序列的啟動子引子或啟動子提供者。當第二個擴增寡聚物是啟動子引子時，RT使用cDNA股作為模板延伸啟動子引子的3'端，以產生標靶序列股的第二個cDNA複本，從而產生包含官能性啟動子序列的dsDNA。然後基本上如上所述進行擴增，以利用RNA聚合酶從啟動子序列開始轉錄。可選地，在第二擴增寡聚物是啟動子提供者的情況下，與標靶序列雜交的終止寡核苷酸通常用於在終止寡核苷酸的3'-末端終止引子寡聚物的延伸，該終止寡核苷酸與在標靶區域的5'-末端附近的標靶序列雜交，從而為藉由引子寡聚物的延伸而合成的初始cDNA股提供經定義的3'-末端。然後，啟動子提供者的標靶-雜交序列與起始cDNA股的經定義的3'-末端雜交，並且該cDNA股的3'-末端被延伸以

添加與啟動子提供者的啟動子序列互補的序列，導致形成雙股啟動子序列。然後，使用識別該雙股啟動子並從其中開始轉錄的RNA聚合酶，將初始cDNA股用作模板來轉錄與該初始cDNA股互補的多個RNA轉錄物，不包括啟動子部分。然後，這些RNA轉錄物中的每一個均可以用作模板，以從第一個引子擴增寡聚物進一步擴增。

【0126】 在包括使用基於核酸的檢測測定法的方法的一些實施例中，基於非擴增的測定法被用於檢測瘧原蟲物種。在一些此類實施例中，該基於非擴增的測定法是雜交測定法，其包括特異性檢測探針與標靶核酸的雜交。進行多核苷酸雜交測定法的方法在本領域中已經有良好的發展。雜交測定法的程序和條件將根據應用而變化，並根據已知的一般結合方法進行選擇，包括以下提及者：例如，Maniatis et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 2002), 和Berger and Kimmel, *Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987)。通常，探針和樣品能在允許特異性核酸雜交的條件下混合，然後檢測探針與其相應標靶的特異性雜交。核酸雜交可適應多種測定形式。一種合適的形式是三明治測定形式，其特別適用於在非變性條件下的雜交。三明治型測定法的主要成分是固體載體，其已經吸附或與固定化核酸探針共價偶聯，該探針係未標記且與DNA序列的一部分互補。標靶核酸係與該固定化探針雜交，且第二個標記的檢測探針(其與固定化未標記核酸探針雜交的共同DNA股的第二個不同區域互補)與[標靶核酸]：[固定化探針]雙股雜交，以檢測標靶核酸。另一示例性形式利用與固定在合適的電極表面上的未標記檢測探針雜交的標靶核酸的電化學檢測作為訊號轉換器。參見，例如，Drummond *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21: 1192, 2003; Gooding, *Electroanalysis* 14: 1149, 2002; Wang, *Anal. Chim. Acta* 469:63, 2002; Cagnin *et al.*, *Sensors* 9:3122, 2009; Katz and Willner, *Electroanalysis* 15:913, 2003;

Daniels and Pourmand, *Electroanalysis* 19: 1239, 2007。

【0127】 在包括雜交測定法的用於檢測瘧原蟲物種的方法的某些實施例中，該雜交測定法利用如本文所述的一種或多種檢測探針寡聚物。

【0128】 在一些實施例中，用於檢測瘧原蟲物種的基於非擴增的測定法係基於切割的測定法，其中含有非標靶雜交flap區域的探針寡核苷酸被flap核酸內切酶以重疊依賴性方式切割，以釋放切割產物，然後檢測該切割產物。示例性的基於切割的測定試劑描述於(例如)Lyamichev *et al.* (*Nat. Biotechnol.* 17:292-296, 1999), Ryan *et al.* (*Mol. Diagn.* 4: 135-144, 1999)，和Allawi *et al.* (*J. Clin. Microbiol.* 44:3443-3447, 2006)。

【0129】 用於flap核酸內切酶反應的合適條件是已知的，或者可以使用本領域中已知的方法而容易地判定(參見，例如，Kaiser *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:2138-721394, 1999)。可以在該方法中使用的示例性flap核酸內切酶包括水生棲熱菌DNA聚合酶 I (*Thermus aquaticus* DNA polymerase I)、嗜熱棲熱菌DNA聚合酶 I (*Thermus thermophilus* DNA polymerase I)、哺乳動物FEN-1、古生粉球菌FEN-1(*Archaeoglobus fulgidus* FEN-1)、詹氏甲烷球菌FEN-1 (*Methanococcus jannaschii* FEN-1)、激烈熱球菌FEN-1(*Pyrococcus furiosus* FEN-1)、嗜熱甲烷化桿菌FEN-1(*Methanobacterium thermoautotrophicum* FEN-1)、嗜熱棲熱菌FEN-1(*Thermus thermophilus* FEN-1)、CLEAVASE<sup>®</sup>( Hologic, Inc., Madison, WI)、釀酒酵母RTH1(*S. cerevisiae* RTH1)、釀酒酵母RAD27、粟酒裂殖酵母rad2 (*Schizosaccharomyces pombe* rad2)、噬菌體T5 5'-3'核酸外切酶、嗜熱火球菌FEN-1(*Pyrococcus horikoshii* FEN-1)、人類核酸內切酶1、小牛胸腺5'-3'核酸外切酶，包括其在真細菌、真核生物和古細菌中的同源物，例如II類結構特異性酵素家族的成員，以及其經酵素活性突變體或其變體。flap核酸內切酶的描述可以在以下文獻找到，例如Lyamichev *et al.*, *Science* 260:778-783, 1993; Eis *et al.*, *Nat.*



*Biotechnol.* 19:673-676, 2001; Shen *et al.*, *Trends in Bio. Sci.* 23: 171 -173, 1998; Kaiser *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:21387-21394, 1999; Ma *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:24693-24700, 2000; Allawi *et al.*, *J. Mol. Biol.* 328:537-554, 2003; Sharma *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:23487-23496, 2003; and Feng *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 :450-456, 2004。

【0130】 在某些變異型中，基於切割的測定法檢測瘧原蟲物種的RNA標靶核酸，並且該基於切割的測定法利用能夠切割並具有RNA：DNA線性雙股結構的flap核酸內切酶。在一些替代實施例中，基於切割的測定法檢測瘧原蟲物種的DNA標靶核酸，並且該基於切割的測定法利用能夠切割並具有DNA：DNA線性雙股結構的flap核酸內切酶。能夠切割RNA：DNA雙股的示例性flap核酸內切酶包括嗜熱細菌屬的聚合酶缺陷型5'核酸酶以及某些CLEAVASE<sup>®</sup>酵素(Hologic, Inc., Madison, WI)，例如，諸如CLEAVASE<sup>®</sup>BN (Taq聚合酶的BstX-NotI刪除，參見美國專利案第5,614,402號)、CLEAVASE<sup>®</sup>II (全長Taq聚合酶的“AG”突變，參見美國專利案第5,614,402號)、CLEAVASE<sup>®</sup>VII (全長嗜熱棲熱菌聚合酶的合成缺陷型突變)、CLEAVASE<sup>®</sup>IX (Tth DNA聚合酶的聚合酶缺陷型突變)和CLEAVASE<sup>®</sup>XII (由taq DNA聚合酶和Tth DNA聚合酶的片段構建的聚合酶缺陷型嵌合聚合酶)。能夠切割DNA：DNA雙股的示例性flap核酸內切酶包括上述的flap核酸內切酶，以及CLEAVASE<sup>®</sup>2.0 (古生粉球菌FEN-1)、CLEAVASE<sup>®</sup>2.1 (古生粉球菌FEN-1在C-末端具有6個組胺酸)、CLEAVASE<sup>®</sup>3.0 (Archaeoglobus veneficus)和CLEAVASE<sup>®</sup>3.1 (Archaeoglobus veneficus FEN-1在C-末端具有6個組胺酸)。

【0131】 在一些實施例中，基於切割的測定法檢測瘧原蟲物種的RNA標靶核酸，並且該測定法包括用於合成RNA標靶區域的DNA互補序列的步驟，然後將該cDNA股與重疊的第一探針寡核苷酸和第二探針寡核苷酸雜交，形成線性雙股

切割結構，以藉由flap核酸內切酶進行切割。使用RNA依賴性DNA聚合酶(反轉錄酶)從RNA模板合成cDNA的反應條件是本領域眾所周知的。

**【0132】** 在利用基於核酸的檢測測定法的某些實施例中，該方法進一步包括從樣品中其他組分純化瘧原蟲物種的標靶核酸。此純化可包括從其他樣品組分中分離及/或濃縮樣品中包含的有機體的方法。在特定實施例中，純化標靶核酸包括捕獲標靶核酸，以將標靶核酸與其他樣品組分特異性或非特異性分離。非特異性標靶捕獲方法可能包括從實質上含水的混合物中選擇性沉澱核酸，為該核酸與洗滌後去除其他樣品組分的載體的黏附，或從含有瘧原蟲物種核酸和其他樣品組分的混合物中物理分離該核酸的其他手段。在一些實施例中，純化包括裂解細胞樣品，例如，諸如血液細胞(例如紅血球細胞)並從裂解的細胞樣品中純化任何瘧原蟲物種標靶核酸。根據本發明使用的示例性裂解試劑和方法描述於美國專利案第10,093,989號和PCT公開案WO 2017/189746，其各自藉由引用併入本文。

**【0133】** 在一些實施例中，瘧原蟲物種的標靶核酸係藉由使標靶核酸與捕獲探針寡聚物雜交而將其與其他樣品組分分離。該捕獲探針寡聚物包含標靶-雜交序列，其經配置為與標靶核酸特異性或非特異性雜交，以形成與其他樣品組分分離的[標靶核酸]：[捕獲探針]複合物。包括適合於非特異性捕獲標靶核酸的標靶-雜交序列的捕獲探針描述於例如PCT公開案WO 2008/016988。在包括經配置為與瘧原蟲物種標靶核酸特異性雜交的標靶-雜交序列的一些特定變異型中，瘧原蟲物種特異性的捕獲探針包括標靶-雜交序列，其長度為至多約30個鄰接核苷酸，且包括實質上對應於選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20之序列的序列(例如，其包括或由選自SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20(包括其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物)的序列的標靶-雜交序列)。在較佳

的變異型中，該捕獲探針將[標靶核酸]：[捕獲探針]複合物結合到固定化探針，以形成與樣品分離的[標靶核酸]：[捕獲探針]：[固定化探針]複合物。視需要地，經洗滌以除去非標靶樣品組分(參見，例如，美國專利案第6,110,678號；第6,280,952號；和第6,534,273號)。在此變異型中，該捕獲探針寡聚物進一步包括將捕獲探針及其結合的標靶序列結合至附接在固體載體上的固定化探針的序列或部分，從而使雜交的標靶核酸能與其他樣品組分分離。

**【0134】** 在更具體的實施例中，該捕獲探針寡聚物包括與標靶核酸不互補但與固定化探針上的序列特異性雜交的尾部(例如3'尾)，從而用作允許標靶核酸與其他樣品組分分離，例如前文在例如美國專利案第6,110,678號中描述的。可在尾區域中使用任何序列，該尾區域一般長約5至50nt，且較佳的實施例包括實質上均聚的尾，約10至40nt(例如，A10至A40)，更佳約14至33nt(例如，A14至A30或T3A14至T3A30)，其與附接於固體載體(例如，基質或顆粒)上的互補固定化序列(例如，poly-T)結合。在包括經配置為與瘧原蟲物種標靶核酸特異性雜交的標靶-雜交序列的一些此實施例中，瘧原蟲物種特異性的捕獲探針包括或由選自SEQ ID NO：1至SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：7、SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：10的核苷酸序列。

**【0135】** 標靶捕獲典型發生在包含一種或多種捕獲探針寡聚物的溶液相混合物中，該寡聚物通常在高於[尾序列]：[固定化探針序列]雙股的 $T_m$ 溫度的雜交條件下與標靶核酸雜交。對於包括捕獲探針尾的實施例，藉由調節雜交條件來捕獲[標靶核酸]：[捕獲探針]複合物，使得捕獲探針尾與固定化探針雜交，然後將固體載體上的整個複合物與其他樣品組分分離。可以將附接有[固定化探針]：[捕獲探針]：[標靶核酸]的載體清洗一次或多次，以進一步去除其他樣品組分。較佳的實施例使用顆粒狀固體載體，例如順磁珠，以使具有附接有[標靶核酸]：[捕獲探針]：[固定化探針]複合物的顆粒可以懸浮在洗滌溶液中，並且較佳地藉

由使用磁吸力而從洗滌溶液中回收。在包括使用基於擴增的檢測測定法的方法的實施例中，為了限制操作步驟的數量，可以藉由簡單地將載體上的複合物中的標靶核酸與擴增寡聚物混合並繼續進行擴增步驟來擴增標靶核酸。

**【0136】** 根據本發明，檢測瘧原蟲物種的存在或不存在可以單獨地進行(例如，在單獨的反應容器中)，或者與另一種測定法作為多工反應系統而一起進行。因此，在一些實施例中，本文描述的方法利用多工反應，其中反應混合物包含用於平行測定多個(例如，至少兩個，三個，四個或更多個)不同標靶序列的試劑。在這些情況下，反應混合物可能包含多種不同的標靶特異性寡核苷酸，用於執行檢測測定法。舉例而言，在利用基於擴增的檢測測定法的方法中，多工反應可包含多組(例如多對)擴增寡聚物(例如，多對PCR引子或多對TMA擴增寡聚物(例如，TMA、多對啟動子引子和非啟動子引子，或多對啟動子提供者和非啟動子引子)。在利用基於切割的檢測測定法的其他實施例中，多工反應可包含具有不同flap的多個探針寡核苷酸、多個不同的重疊探針寡核苷酸及多個不同的FRET盒，一旦它們被切割，將會被用於檢測不同的flap。

**【0137】** 本文所述的寡聚物組合物可以是反應混合物或包含該寡聚物的套組的形式。反應混合物或套組可進一步包括許多視需要的組分，例如，諸如捕獲探針核酸或捕獲探針核酸的陣列。對於擴增反應混合物，該反應混合物典型將包含適合於進行體外擴增的其他試劑，例如，諸如緩衝液、鹽溶液、適當的核苷酸三磷酸(例如，dATP、dCTP、dGTP、dTTP、ATP、CTP、GTP和UTP)及/或酵素(例如，反轉錄酶及/或RNA聚合酶)，且典型將包括測試樣品組分，其中可能存在或可能不存在瘧原蟲物種標靶核酸。包含用於擴增瘧原蟲物種的寡聚物組合物的套組亦可包括適合於進行體外擴增的其他試劑，例如，緩衝液、鹽溶液、合適的核苷酸三磷酸(例如，dATP、dCTP、dGTP、dTTP、ATP、CTP、GTP和UTP)及/或酵素(例如，反轉錄酶及/或RNA聚合酶)。對於包括檢測探針與

靶向共同標靶核酸的擴增寡聚物組合物的寡聚物組合物(例如，反應混合物或套組)，擴增寡聚物和檢測探針寡聚物的選擇係藉由共同標靶區域連接(亦即，組合物將包括與可被擴增寡聚物組合物擴增的序列結合的探針)。

【0138】 藉由以下非限制性實例進一步說明用於檢測瘧原蟲核酸的組成物、方法、反應混合物、系統、套組等。

[實例]

【0139】 「寄生蟲轉運溶液」一般是指配製用於保存樣品的溶液，在某些情況下，配製為至少部分裂解樣品中的一種或多種細胞類型的溶液。一種示例性的寄生蟲轉運溶液包括15 mM磷酸二氫鈉、15 mM磷酸氫二鈉、1 mM EDTA、1 mM EGTA和110 mM十二烷基硫酸鈣(LLS)，pH值為6.7。另一個示例性的寄生蟲轉運溶液包括100 mM TRIS、30 mM氯化鎂和6%(v/v) LLS的水溶液，pH值為7.5。另一個示例性的寄生蟲轉運溶液包含14 mM碳酸氫鈉、250 mM氯化銨、5%(v/v) LLS和0.1 mM EDTA的水溶液，pH值為7.4。寄生蟲轉運溶液的其他調配物也可同樣起作用。

【0140】 「標靶捕獲試劑」一般是指包含許多有助於從溶液中捕獲核酸的組分的溶液。一種示例性標靶捕獲試劑包括250 mM HEPES、310 mM氫氧化鈣、1.88 M氯化鈣、100 mM EDTA，pH值為6.4；及用dT<sub>14</sub>寡聚物共價結合的250 µg/ml磁性顆粒(1微米SERA-MAG™ MG-CM顆粒，GE Healthcare Lifesciences)。另一個示例性標靶捕獲試劑包括790 mM HEPES、453 mM氫氧化鈣、10% w/v LLS、230 mM琥珀酸、0.03% w/v Foam Ban MS-575和用dT<sub>14</sub>寡聚物共價結合的0.0125% w/v磁性顆粒(1微米SERA-MAG™ MG-CM顆粒，GE Healthcare Lifesciences)。標靶捕獲探針試劑的其他調配物也可同樣起作用。

【0141】 「洗滌溶液」一般是指包含10 mM HEPES、150 mM氯化鈉、6.5 mM氫氧化鈉、1 mM EDTA、0.3%(v/v)乙醇、0.02%(w/v)對羥苯甲酸甲酯、0.01%(w/v)

對羥苯甲酸丙酯和0.1%(w/v)十二烷基聚氧乙醚硫酸鈉的溶液，pH值為7.5。

【0142】「探針試劑」一般是指包含一種或多種經標記的檢測探針的溶液。一個示例性的探針試劑是由約75至約100 mM琥珀酸鋰、2%(w/v) LLS、15 mM巰基乙磺酸鹽、1.2 M氯化鋰、20 mM EDTA和3%(v/v)乙醇組成的溶液，pH值為4.7。另一個示例性探針試劑是由約75至約100 mM琥珀酸、3.5%(w/v) LLS、75 mM氫氧化鋰、15 mM Aldrithiol-2、1.0 M氯化鋰、1 mM EDTA和3.0%(v/v)乙醇組成的溶液，pH值為4.1-4.3。其他調配物也可以同樣發揮作用。

【0143】「擴增試劑」一般是指反應組分的濃縮混合物，用以促進擴增反應。擴增試劑將包括多種不同濃度的不同試劑，其取決於諸如擴增類型(PCR、TMA等)、標靶核酸(GC含量)等因素。一個示例性擴增試劑包括47.6 mM Na-HEPES、12.5 mM N-乙醯基-L-半胱胺酸、2.5% TRITON™X-100、54.8 mM KCl、23 mM MgCl<sub>2</sub>、3 mM NaOH、0.35 mM的每種dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、7.06 mM rATP、1.35 mM rCTP、1.35 mM UTP、8.85 mM rGTP、0.26 mM Na<sub>2</sub>EDTA、5% v/v甘油、2.9%海藻糖、0.225%乙醇、0.075%對羥苯甲酸甲酯、0.015%對羥苯甲酸丙酯和0.002%酚紅，pH值為7.5至7.6。另一個示例性擴增試劑包含19.1 mM Trizma鹼、7.5 mM Trizma鹽酸鹽、23.3 mM KCl、21.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM的每種dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、6.5 mM rATP、4.0 mM rCTP、4.0 mM UTP、6.5 mM rGTP、3.33% v/v甘油、0.05 mM醋酸鋅、6 ppm Pro Clin 300防腐劑，pH值為8.25-8.45。擴增試劑的其他調配物也可同樣起作用。可將引子添加至擴增試劑或添加至與擴增試劑分開的擴增反應。擴增試劑中的酵素可包括莫洛尼鼠白血病病毒反轉錄酶(MMLV-RT)和噬菌體T7 RNA聚合酶中的一種或多種，在功能上將單位定義為：在37°C 10分鐘內使用200至400微莫耳 oligo dT-primed poly(A)作為模板將1 U MMLV-RT摻入1 nmol dTTP，及在37°C 1小時內使用含有T7啟動子的DNA模板用T7 RNA聚合酶將1 nmol ATP摻入RNA。

【0144】「雜交試劑」一般是指由以下範圍之濃度的試劑組成的溶液：75-100 mM琥珀酸、2%-3.5%(w/v) LLS、75-100 mM氫氧化鋰、14-16 mM aldrithiol-2、1.0-1.2 M氯化鋰、20-1000 mM EDTA和2.0-4.0%(v/v)乙醇，pH值為4-5。雜交試劑的其他調配物也可同樣起作用。

【0145】「選擇試劑」一般是指包含600 mM硼酸、182.5 mM氫氧化鈉、1% (v/v)辛醇(TRITON<sup>®</sup> X-100)的溶液，pH值為8.5。

【0146】「檢測試劑」包括「檢測試劑I」，其一般是指含有1 mM硝酸和32 mM過氧化氫的溶液；以及「檢測試劑II」，其一般是指1.5 M氫氧化鈉的溶液

[實例1]

【0147】使用惡性瘧原蟲體外轉錄物(IVT)，在人工Procleix增強半自動系統(eSAS)上使用轉錄介導的擴增(TMA)進行引子篩選。測定架由十排十管單元(TTU)組成。將75微升(75  $\mu$ L)的擴增試劑和5皮莫耳的每個T7啟動子提供者寡核苷酸和非T7引子寡核苷酸添加到該架上的合適試管中，以使擴增寡聚物的每種組合進行試驗：用惡性瘧原蟲IVT的三個重複試驗，每個反應30至10 copies，以及小鼠焦蟲IVT的兩個重複，每個反應1,000,000 copies(如果適用)。由於小鼠焦蟲(B.mic)和瘧原蟲之間的保守區域，將小鼠焦蟲作為交叉反應性樣本包括在最初的篩檢。有必要判定針對瘧原蟲為特異性的擴增和檢測系統。為了達到每個反應的標靶複製數，將10  $\mu$ L惡性瘧原蟲IVT以3 c/ $\mu$ L或1 c/ $\mu$ L在緩衝液中稀釋後加到合適的試管中，然後將10  $\mu$ L小鼠焦蟲IVT以100,000 c/ $\mu$ L在緩衝液中稀釋後加到合適的試管中。測試引子的各種組合。此設置允許每個架測試10個引子組合。一旦添加引子組合物和IVT，就向每個試管中加入200  $\mu$ L油，然後用密封卡覆蓋樣品架，並渦旋至少20秒鐘。

【0148】然後將該架在 $60\pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中培養 $10\pm 1$ 分鐘，然後在 $41.5\pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中培養9至20分鐘。當該架保持在水浴中時，移開密封卡，並將25 $\mu$ L市售可得

的Procleix Ultrio Plus酵素試劑(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)添加到每個反應試管中，然後再次用密封卡覆蓋。輕輕搖動該架以使其混合，然後再次用密封卡覆蓋，並在 $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中再培養 $60\pm 5$ 分鐘。

【0149】 培養完成後，將該架轉移至雜交保護測定法(HPA)區域，在該區域移除密封卡。將由吡啶酯(AE)標記的探針組成的 $100\mu\text{L}$ 探針試劑以每反應至少 $2.5\text{e}6$ 相對光單位(RLU)的總期望濃度添加到雜交試劑中。然後將探針試劑添加到合適的反應試管中。將試管用密封卡覆蓋，並將樣品架渦旋至少20秒，然後將該架在 $61\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的水浴中培養 $15\pm 1$ 分鐘。

【0150】 從水浴中移出該架，移開密封卡，並將 $250\mu\text{L}$ 市售可得的Procleix Ultrio Plus選擇試劑(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)添加到每個試管中。將試管用密封卡覆蓋並渦旋至少20秒，然後返回到 $61\pm 2^{\circ}\text{C}$ 水浴中並培養 $10\pm 1$ 分鐘。培養之後，使該架在 $23\pm 4^{\circ}\text{C}$ 水浴中冷卻至少10分鐘。

【0151】 為了檢測，將TTU從該架上卸下，並裝載到自動化Leader儀器上，然後使用市售可得的Procleix Auto Detect 1和2試劑(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)進行隨後的light off，並將結果輸出以用於相對光單位(RLU)的訊號分析。

【0152】 在此實例中篩選的AE-標記的探針顯示在下表4中。在四個實驗組(組1、組2a和組2b和組3)中用擴增寡聚物對來篩選探針。

[表4]

探針 #	SEQ ID NO :	2MeAE 連接子位點
1	159	7,8
3	159	9,10
4	151	6,7
5	151	7,8
6	151	8,9



探針 #	SEQ ID NO :	2MeAE 連接子位點
7	150	8,9
8	155	7,8
12	160	13,14
14	147	11,12
15	157	10,11
16	156	10,11
20	158	6,7
21	158	7,8
22	158	10,11

【0153】 組1：探針1、探針3、探針4-6、探針12和探針14-16各自用SEQ ID NO：59 (T7啟動子提供者寡聚物)和SEQ ID NO：30 (非T7寡聚物)進行測試。下表5中顯示此探針篩選的結果。候選者在每個反應中以1e6 copies顯示與小鼠焦蟲 IVT無交叉反應性。另外，具有相同核苷酸序列但具有不同2MeAE連接子位點的探針(參見，例如，探針1和探針3；亦參見探針4、探針5和探針6)，不論它們的標記不同，都表現良好。

[表5]

	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	B.mic 1e6 c/rxn	B.mic 1e6 c/rxn	B.mic 1e6c/c/rxn
探針 1	1,222,972	1,157,299	1,201,553	927,342	1,093,944	98,711	919	985	871
探針 3	1,179,477	1,192,980	1,155,140	1,130,568	854,803	1,206,816	1,515	1,640	1,708
探針 5	816,162	815,694	774,947	708,438	745,288	519,080	1,562	1,253	1,322
探針 4	965,152	1,019,364	1,043,712	767,525	957,437	905,300	1,203	1,565	1,276
探針 6	1,179,590	1,182,350	1,136,391	1,034,114	1,098,623	856,584	2,211	3,484	2,473
探針 12	1,801,146	1,739,366	1,606,426	698,553	1,610,398	1,515,342	1,540	1,278	2,523
探針 14	1,017,636	997,356	1,015,960	951,505	830,243	909,076	870	865	1,470
探針 15	1,116,536	1,203,192	1,038,531	1,093,438	958,900	891,744	1,174	1,019	1,803
探針 16	182,425	195,626	73,184	141,723	47,725	52,841	4,155	2,440	2,629
NEG	探針 1		探針 3			探針 4			

1,108	1,046	1,310	1,935	1,749	1,784	1,319	1,489	1,388
探針 4			探針 6			探針 12		
2,614	1,194	2,321	2,673	2,935	4,364	1,473	1,474	2,528
探針 14			探針 15			探針 16		
1,311	1,597	978	1,359	1,171	1,475	3,940	1,430	1,869

【0154】 組2a和組2b:在組2a中,測試以下引子/探針組合:探針8和探針20-22各自與SEQ ID NO: 59和SEQ ID NO: 33 (T7/NT7)配對,探針7和探針20-22各自與SEQ ID NO: 59和SEQ ID NO: 52 (T7/NT7)配對,以及探針7和探針8各自與SEQ ID NO: 59和SEQ ID NO: 49 (T7/NT7)配對。在組2b中,測試以下引子/探針組合:探針20-22各自與SEQ ID NO: 66和SEQ ID NO: 33 (T7/NT7)配對,探針7和探針20-22各自與SEQ ID NO: 66和SEQ ID NO: 52 (T7/NT7)配對,以及探針7與SEQ ID NO: 66和SEQ ID NO: 49 (T7/NT7)配對。

【0155】 此探針篩選的結果顯示在下表6和表7中。具有SEQ ID NO: 52的非T7寡聚物的系統不能擴增瘧原蟲。儘管與探針20-22中任一個配對的具有SEQ ID NO: 59/SEQ ID NO: 33的T7/NT7寡聚物對的系統沒有檢測到瘧原蟲,但當與SEQ ID NO: 66/SEQ ID NO: 33的T7/NT7寡聚物對一起使用時,這些探針可以檢測到瘧原蟲。

[表6]

	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	B. mic 1e6 c/rxn	B. mic 1e6 c/rxn	NEG	NEG
T7/NT7+探針 7	1,414,377	1,429,342	1,423,366	1,293,402	1,271,942	1,347,111	1,967	1,113	1,651	1,603
59/49+探針 7	15,998	92,089	4,310	676	1,465	3,151	1,473	3,105	793	1,315
59/49+探針 8	1,556,915	1,585,955	1,594,418	1,523,106	1,419,616	1,564,211	7,048	2,935	3,710	5,601
59/33+探針 8	1,026,164	1,188,939	1,511,173	1,022,388	1,030,495	421,293	2,804	2,963	4,303	6,879
59/33+探針 20	438,708	543,560	635,481	385,704	410,210	728,374	1,263	1,475	1,151	1,295
59/52+探針 20	1,058	1,196	875	9,308	69,190	686	926	930	1,169	1,771
59/33+探針 21	1,131,775	1,206,597	957,441	1,558	260,318	653,321	1,217	3,177	1,160	2,281
59/52+探針 21	2,260	8,505	1,529	901	1,109	2,917	1,314	1,386	1,911	1,978
59/33+探針 22	475,040	486,044	474,661	342,995	713	427,613	1,257	729	585	1,143
59/52+探針 22	53,691	57,052	1,205	1,225	2,526	2,948	4,203	677	5,728	1,344

[表6]

T7/NT7+探針	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	B. mic 1e6 c/rxn	B. mic 1e6 c/rxn	NEG	NEG
66/49 + 探針 7	1,697,508	1,654,623	1,702,775	1,632,642	1,670,622	1,710,421	4,352	6,899	1,718	780
66/52 + 探針 7	698,772	9,692	1,394,770	1,732	926	198,284	3,588	4,249	1,173	890
66/33 + 探針 20	2,085,094	1,917,183	1,977,048	2,166,352	1,898,001	1,529,882	1,294	1,645	2,378	1,368
66/52 + 探針 20	5,387	6,054	1,395,984	78,381	13,600	1,825	2,979	5,688	5,636	2,165
66/33 + 探針 21	2,787,188	2,641,943	2,691,394	2,189,645	1,834,205	2,528,971	5,627	3,547	3,817	4,417
66/52 + 探針 21	103,016	1,944,005	8,745	2,694,902	1,167,241	5,856	3,229	4,437	6,515	2,704
66/33 + 探針 22	1,976,930	2,048,269	2,206,921	2,248,244	1,576,131	1,897,000	1,619	5,010	2,252	2,978
66/52 + 探針 22	314,430	1,222,503	36,814	1,596	60,021	110,944	1,831	2,930	2,213	1,337

【0156】 組3：測試SEQ ID NO：33的非T7引子的重新設計。探針7和探針8各自與SEQ ID NO：66/SEQ ID NO：25和SEQ ID NO：66/SEQ ID NO：35 (T7/NT7)各自配對。另外，探針20與SEQ ID NO：66/SEQ ID NO：33 (T7/NT7)配對。

【0157】 此探針篩選的結果顯示在下表8中。SEQ ID NO：66/SEQ ID NO：33的T7/NT7寡聚物對用探針20配對的表現良好。重新設計SEQ ID NO：33的非T7寡聚物(SEQ ID NO：25和SEQ ID NO：35)指示用探針7和探針8為偽陽性。

[表8]

T7/NT7+探針	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 30 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	P. fal 10 c/rxn	NEG	NEG	NEG	NEG
66/33+探針 20	2,259,738	2,251,254	2,259,806	2,193,185	2,229,852	2,305,634	10,987	2,278	2,517	833
66/25+探針 7	1,639,345	1,634,590	1,094,963	1,577,109	1,447,969	1,443,799	659,001	907,064	955,394	106,595
69/25+探針 7	1,604,438	1,518,505	1,606,930	1,473,808	1,431,398	1,542,777	873,665	963,803	849,156	705,831
66/35+探針 7	1,590,743	1,608,076	1,615,693	1,595,727	1,351,299	1,582,092	759,553	622,876	495,724	743,057
69/35+探針 7	1,669,062	1,684,886	1,610,911	1,604,953	1,279,697	1,584,979	816,245	874,237	467,269	1,302,044
66/25+探針 8	1,690,077	1,673,850	1,597,686	1,601,896	1,359,389	1,572,372	1,172,325	693,937	286,919	536,015
69/25+探針 8	1,607,570	1,637,678	1,622,369	1,613,782	1,538,278	1,613,946	93,383	1,029,827	1,213,750	1,192,320
66/35+探針 8	1,622,258	1,609,624	1,572,273	1,600,610	1,570,232	1,611,927	1,235,255	947,640	841,628	1,143,229
69/35+探針 8	1,623,329	1,679,140	1,634,462	1,628,953	1,509,017	1,583,660	604,251	705,198	1,259,683	966,102

## [實例2]

【0158】 此實例描述在全自動化Procleix Panther系統(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)上使用TMA篩選候選者擴增系統的材料和方法。

【0159】 試樣包括在緩衝液中稀釋的惡性瘧原蟲、諾氏瘧原蟲、三日瘧原蟲、卵形瘧原蟲及/或間日瘧原蟲IVT。試樣可能還包括小鼠焦蟲IVT作為交叉反

應性試樣。有必要判定針對瘧原蟲為特異性的擴增和檢測系統。包括包含有500 c/mL惡性瘧原蟲IVT板的測定校準品以判定運行的分析物cutoff。分析軟體使用分析物cutoff來判定樣品是反應性還是非反應性。訊號對cutoff比率 $\geq 1$ 的樣品被認為是反應性的，而 $< 1$ 的樣品則被認為是非反應性的。所使用的測定試劑包括以下：標靶捕獲試劑(TCR)，其包含至少一種標靶捕獲寡聚物(TCO)；擴增試劑，其包含至少一種T7啟動子提供者和至少一種非T7引子；探針試劑，其由至少一種AE標記的探針組成；Ultrio Plus酵素試劑；以及選擇試劑。

[實例3] 瘧原蟲標靶捕獲探針篩選

【0160】 用含有1 mL全血的3 mL寄生蟲轉運介質(PTM；100 mM TRIS，30 mM氯化鎂和6%(v/v) LLS，pH 7.5)製備的含有惡性瘧原蟲IVT的樣品以500 c/mL篩選候選者標靶捕獲探針(TCO)。實質上如實例2所述，在全自動化Procleix Panther系統上進行TMA反應。使用SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:69(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:1的非T7寡聚物(各5 pmol/rxn)和SEQ ID NO:148和SEQ ID NO:152(各1.9e6 RLU/rxn)的檢測探針在反應中測試SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

【0161】 結果顯示在下表9和表10中。用TCO SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的測定性能是最佳的。SEQ ID NO:3在此測定中不是最佳的。

[表9]

TCO	平均總 RLU*
SEQ ID NO:3	663,034
SEQ ID NO:1	873,914
SEQ ID NO:9	1,474,284
SEQ ID NO:2	985,039
SEQ ID NO:10	1,455,387
SEQ ID NO:7	793,219
SEQ ID NO:5	951,504

TCO	平均總 RLU*
SEQ ID NO : 4	952,023

\* N = 10 除SEQ ID NO : 3以外的所有TCO (N = 20)

[表10]

TCO	%CV 總 RLU*
SEQ ID NO : 3	19.2
SEQ ID NO : 1	19.7
SEQ ID NO : 9	2.6
SEQ ID NO : 2	11.2
SEQ ID NO : 10	3.6
SEQ ID NO : 7	28.1
SEQ ID NO : 5	14.4
SEQ ID NO : 4	14.4

\* N = 10 除SEQ ID NO : 3以外的所有TCO (N = 20)

實例4：分析靈敏度-RNA的LoD copies/mL

**【0162】** 使用惡性瘧原蟲、諾氏瘧原蟲、三日瘧原蟲、卵形瘧原蟲及間日瘧原蟲的體外合成轉錄物藉由概率分析來評估候選者擴增系統的檢測極限(LoD)。實質上如實例2所述，在全自動化Procleix Panther系統上進行TMA反應。將每種物種的IVT在緩衝液中依次稀釋至100、30、10、3、1和0 copies/mL，並針對每種物種的每個水平進行32次重複測試。使用TMA在全自動化Procleix Panther系統(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)上測試試樣。包括包含有500 c/mL惡性瘧原蟲IVT板的測定校準品以判定運行的分析物cutoff。分析軟體使用分析物cutoff來判定樣品是反應性還是非反應性。訊號對cutoff比率 $\geq 1$ 的樣品被認為是反應性的，而 $< 1$ 的樣品則被認為是非反應性的。對於此測定，使用以下寡聚物：SEQ ID NO : 66和SEQ ID NO : 69(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物、SEQ ID NO : 21和SEQ ID NO : 30(各5 pmol/rxn)的非T7寡聚物、SEQ ID NO : 148和SEQ ID NO : 152(各1.9e6 RLU/rxn)的檢測探針以及SEQ ID NO : 9和SEQ ID NO : 10的TCO。

【0163】 結果顯示在下表11中。對於測試的五個物種觀察到相似的LoD值。95%LoD範圍從9.4到14.8 copies/mL。

[表11]

體外轉錄物 (N=32)	50% LoD in Copies/mL (基準界線)	95% LoD Copies/mL (基準界線)
<i>P. falciparum</i>	2.1 (1.3 – 2.9)	9.4 (6.5 – 17.3)
<i>P. knowlesi</i>	3.3 (2.2 – 4.5)	14.8 (10.2 – 27.3)
<i>P. malariae</i>	3.3 (2.2 – 4.4)	13.1 (9.1 – 24.4)
<i>P. ovale</i>	2.5 (1.5 – 3.5)	13.6 (9.0 – 27.8)
<i>P. vivax</i>	4.5 (3.4 – 5.7)	11.6 (8.9 – 17.7)

實例5：分析靈敏度-RNA的LoD parasites/mL

【0164】 使用經培養寄生蟲感染的細胞藉由概率分析來評估候選者擴增系統的檢測極限(LoD)。具體而言，使用裂解的陰性全血試樣和稀釋的經培養惡性瘧原蟲感染的紅血球來測試條件。接受培養的樣品具有已知的寄生蟲百分率，並藉由螢光激發細胞分選儀(FACS)判定RBC計數以估計濃度(每毫升寄生蟲值)。根據估計的每毫升寄生蟲值，將樣品在正常陰性人類全血中稀釋至估計的6、4、2、1和0.5 parasites/mL。將稀釋的經瘧原蟲感染的全血以2.7 mL寄生蟲轉運介質(PTM；100 mM TRIS，30 mM氯化鎂和6%(v/v) LLS，pH 7.5)中的0.9 mL全血比率裂解。使用TMA在全自動化Procleix Panther系統(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)上測試試樣。包括包含有500 c/mL惡性瘧原蟲IVT板的測定校準品以判定運行的分析物cutoff。分析軟體使用分析物cutoff來判定樣品是反應性還是非反應性。訊號對cutoff比率>1的樣品被認為是反應性的，而<1的樣品則被認為是非反應性的。所使用的測定試劑包括以下：標靶捕獲試劑(TCR)，其包含SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：10的TCO；擴增試劑，其包含SEQ ID NO：66和SEQ ID NO：69(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物；SEQ ID NO：21和SEQ ID NO：30(各5 pmol/rxn)的非T7寡聚物；探針試劑，其包含SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152(各1.9e6

RLU/rxn)的AE-標記的檢測探針；Ultrio Plus酵素試劑；以及選擇試劑。

【0165】結果顯示在下表12中。95% LoD為2.14 parasites/mL。評估內部對照緩衝液、PTM和陰性裂解液各進行480次重複，無偽陽性(0 / 1,440)。

[表12]

	50% LoD in Parasites/mL (基準界線)	95% LoD in Parasites/mL (基準界線)
<i>P. falciparum</i>	0.35 (0.14-0.56)	2.14 (1.38-5.17)

實例6：與焦蟲的干擾和交叉反應

【0166】使用體外合成的轉錄物評估與小鼠焦蟲(同源原生動物)的干擾和交叉反應性。實質上如實例2所述，在全自動化Procleix Panther系統上的TMA反應中進行測試。其中惡性瘧原蟲IVT稀釋在100-1 c/mL之間，並且添加和不添加1e6 c/mL的小鼠焦蟲IVT。使用以下寡聚物：SEQ ID NO：71和SEQ ID NO：72(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物、SEQ ID NO：34和SEQ ID NO：53(各5 pmol/rxn)的非T7寡聚物、SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：157(各1.9e6 RLU/rxn)的AE標記的檢測探針以及SEQ ID NO：9和SEQ ID NO：10的TCO。

【0167】結果顯示在下表13和表14中。在存在或不存在小鼠焦蟲IVT的情況下，惡性瘧原蟲IVT的反應性和分析物RLU相當。

[表13]

		<i>P. falciparum</i> (copies)					
		100	30	10	3	1	0
%反應性 (N=24)	對照組	100	100	100	58	17	0
	存在小鼠焦蟲	100	100	96	58	17	0

[表14]

		<i>P. falciparum</i> (copies)					
		100	30	10	3	1	0
平均 RLU (N=24)	對照組	2,043,991	2,031,427	1,993,527	1,992,755	2,001,796	2,518
	存在小鼠焦蟲	2,055,344	2,029,613	1,925,711	1,777,978	1,815,085	855

## 實例7：冗餘探針的評估

【0168】 使用體外合成的轉錄物評估冗餘探針組合。實質上如實例2所述，在全自動化Procleix Panther系統上進行的TMA反應中進行測試。使用以下寡聚物：(i)SEQ ID NO：71和SEQ ID NO：72(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物，(ii)SEQ ID NO：34和SEQ ID NO：53(各5 pmol/rxn)的非T7寡聚物，(iii)SEQ ID NO：148(4,5 2MeAE連接子)和SEQ ID NO：157(各1.27e6 RLU/rxn)具有SEQ ID NO：148(5,6 2MeAE連接子)或SEQ ID NO：148(6,7 2MeAE連接子)的AE標記的檢測探針，以及(iv)SEQ ID的TCO NO：9和SEQ ID NO：10的TCO。

【0169】 結果顯示在下表15中。「C1」是指含有SEQ ID NO：148(4,5 2MeAE連接子)的探針組合；「C2」是指含有SEQ ID NO：148(6,7 2MeAE連接子)的探針組合。使用冗餘的探針組合，在30和10 c/mL下觀察所有瘧原蟲物種的可比反應性。與實例1的結果一致，具有相同核苷酸序列(SEQ ID NO：148)但具有不同2MeAE連接子位點的探針表現良好，而與它們的不同標記無關。

[表15]

		<i>P. falciparum</i> (copies)		<i>P. knowlesi</i> (copies)		<i>P. malariae</i> (copies)		<i>P. ovale</i> (copies)		<i>P. vivax</i> (copies)	
		30	10	30	10	30	10	30	10	30	10
%反應性 (N=8)	C1	100	88	100	100	100	100	100	75	100	100
	C2	100	75	100	88	100	100	100	88	100	100

## 實例8：分析靈敏度-RNA的LoD parasites/mL

【0170】 使用培養的惡性瘧原蟲感染的紅血球藉由概率分析來評估候選者擴增系統的檢測極限(LoD)。實質上如實例5所述，在全自動化Procleix Panther系統上進行的TMA反應中進行測試。使用以下寡聚物：(i)SEQ ID NO：71和SEQ ID NO：72(各5 pmol/rxn)的T7寡聚物，(ii)SEQ ID NO：34和SEQ ID NO：53(各5 pmol/rxn)的非T7寡聚物，(iii)SEQ ID NO：148(4,5 2MeAE連接子)、SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：148(5,6 2MeAE連接子) (各自為1.27e6 RLU/rxn，2.03e6



RLU/rxn)的AE標記的檢測探針，以及(iv)SEQ ID的TCO NO：9和SEQ ID NO：10的TCO。

【0171】 結果顯示在下表16中。95% LoD為2.31 parasites/mL。測試的陰性試樣中沒有偽陽性。這些結果與實例5中評估的系統相當，其中95% LoD為2.14 parasites/mL。

[表16]

	50% LoD in Parasites/mL (基準界線)	95% LoD in Parasites/mL (基準界線)
<i>P. falciparum</i>	0.70 (0.33-0.97)	2.31 (1.61-5.82)

#### 實例9

【0172】 使用用於手動雙相即時TMA測定法的程序進行引子篩選。在標靶捕獲步驟中，將包括至少1個標靶捕獲寡核苷酸(TCO)和1個T7啟動子提供者的400  $\mu$ L標靶捕獲試劑(TCR)加入2mL深孔96孔板(Thermo Scientific Cat. No. 95040450)中，接著進行500  $\mu$ L的試樣。試樣由在緩衝液中稀釋用於瘧原蟲檢測的瘧原蟲物種體外轉錄物(IVT)和在緩衝液中稀釋用於焦蟲的焦蟲物種IVT組成。由於焦蟲和瘧原蟲之間的保守區域，試樣也可能包括小鼠焦蟲IVT或惡性瘧原蟲IVT作為交叉反應性試樣，用於相對的檢測系統。需要判定擴增和檢測系統是特異性於分析物系統的。將該板用密封卡覆蓋，並裝載到Torrey Pines板培養箱上，並蓋上蓋子。Torrey Pines培養箱的培養步驟分別包括在80°C下7分鐘，接著62°C下17分鐘和25°C下15至25分鐘。

【0173】 在標靶捕獲培養步驟之後，在該板上裝有深孔管尖梳(Thermo Scientific Cat. No. 97002534)，並置於裝有深孔磁珠的Kingfisher 96儀器(Thermo Scientific Type 710 REF 5400500)上。該Kingfisher儀器另外裝有洗滌板，該洗滌板由2mL 96孔板組成(Nunc深孔板 Cat. No. 278752)，該板用500  $\mu$ L市售可得的Procleix洗滌緩衝液試劑(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)製備，且第二個洗滌板

由200 $\mu$ L 96孔板(Thermo Scientific Cat. No. 97002540)組成，其中含有200  $\mu$ L洗滌緩衝液。對於深孔洗滌步驟，將含有雜交TCR樣品混合物的板混合5分鐘，然後收集20個計數的磁珠，並在含有500  $\mu$ L洗滌緩衝液的板上洗提20秒。將500  $\mu$ L洗滌板混合1分鐘，然後收集10個計數的磁珠，並在含有200  $\mu$ L洗滌緩衝液的洗滌板上洗提20秒。

**【0174】** 將含有雜交磁珠和洗滌緩衝液的混合物的第二洗滌板從Kingfisher儀器中取出，裝入小的PCR尖端梳(Thermo Scientific 97002514)，並轉移到裝有PCR磁珠的第二個Kingfisher 96儀器(Thermo Scientific Type 710 REF 5400500)。該Kingfisher儀器另外裝有96孔PCR板(Axygen Cat. No. PCR-96-HS-C)，其中含有30  $\mu$ L擴增試劑(不含酚紅)，其中含有至少一種非T7引子(擴增板)。為了將雜交的磁珠轉移到擴增板上，將洗滌板混合5分鐘，然後收集30個計數的磁珠並在擴增板上洗提30秒。將洗滌板再次混合1分鐘，然後收集30個計數的磁珠，並在擴增板上洗提30秒以完成轉移。

**【0175】** 擴增板用密封卡覆蓋，並加載到Stratagene儀器(Mx3005P Multiplex Quantitative PCR System)上，在43 $^{\circ}$ C下培養5分鐘。將該板轉移到設定為42 $^{\circ}$ C的加熱塊上，然後不覆蓋以添加10  $\mu$ L市售可得的Ultrio Plus酵素試劑(Grifols Diagnostic Solutions Inc.)，並用密封卡再次覆蓋。將該板在加熱塊上以1400 RMP混合1分鐘，然後重新裝在Stratagene儀器上，在43 $^{\circ}$ C培養5分鐘。再次將該板轉移到加熱塊上，並蓋上蓋子，加入15  $\mu$ L的啟動子試劑(不含酚紅的擴增試劑)，其中含有至少一種T7啟動子提供者和至少一種螢光標記的分子炬或信標(5'-六氯-螢光素(HEX)用於瘧原蟲，或5'-氟樹脂(FAM)用於膠蟲)的混合物，並用透明的黏合劑板蓋密封。將該板在加熱塊上以1400 RMP混合1分鐘，然後重新加載到Stratagene上進行讀取程序。該讀取程序包括在43 $^{\circ}$ C下培養，每30秒讀取一次，週期為120或150。

【0176】 使用內部軟體工具分析從Stratagene儀器導出的原始數據。使用1,000個相對螢光單位(RFU)的閾值分析螢光曲線。試樣達到或超過閾值的時間(TTime)由軟體判定。帶有TTime的試樣被認為對HEX通道的瘧原蟲有反應性，而FAM通道的則對膠蟲有反應性。較低的TTimes指示測試系統的性能更好。沒有TTime或低於閾值的試樣被認為是無反應性的。

【0177】 在此實例中，在三個組(組1、組2和組3)中測試分子炬或信標探針與擴增寡聚物對的組合。經測試的寡聚物組合顯示於下表17中。

[表17] 擴增寡聚物和炬探針的組合

T7 引子	非 T7 引子	探針 (炬/信標)	組
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 104 (炬)	組 1
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 105 (炬)	
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 106 (炬)	
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 121 (炬)	
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 107 (信標)	
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 183	SEQ ID NO : 108 (信標)	
SEQ ID NO : 181	SEQ ID NO : 184	SEQ ID NO : 104 (炬)	組 2
SEQ ID NO : 59	SEQ ID NO : 51	SEQ ID NO : 123 (炬)	組 3
SEQ ID NO : 59	SEQ ID NO : 31	SEQ ID NO : 123 (炬)	
SEQ ID NO : 59	SEQ ID NO : 50	SEQ ID NO : 123 (炬)	

【0178】 組1結果。SEQ ID NO : 104至SEQ ID NO : 107和SEQ ID NO : 121的探針成功地檢測到瘧原蟲，其螢光曲線在10 c/mL下產生的平均TTime小於或等於30.69分鐘。SEQ ID NO : 108的探針未產生帶有TTimes的螢光曲線，表明它無法檢測到瘧原蟲。

【0179】 組2結果。SEQ ID NO : 181和SEQ ID NO : 184的擴增寡聚物與SEQ ID NO : 104的炬探針組合成功地檢測到瘧原蟲，藉由螢光曲線證明，在10 c/mL下產生的TTime小於或等於20.89分鐘，並且與膠蟲IVT沒有交叉反應性，藉由沒有TTime的螢光曲線證明。

【0180】 組3結果。分別由SEQ ID NO：51、SEQ ID NO：31和SEQ ID NO：50的非T7擴增寡聚物與SEQ ID NO：59的T7擴增寡聚物和SEQ ID NO：123的炬探針組合而成，成功地檢測出瘧原蟲，如藉由產生的TTime的螢光曲線小於或等於22.82分鐘證明。

#### 實例10

【0181】 使用即時TMA在安裝有即時螢光計(Hologic Inc.)的全自動化Panther系統上測試候選者擴增系統。試樣由在緩衝液中稀釋用於瘧原蟲檢測的瘧原蟲物種IVT和在緩衝液中稀釋用於膠蟲檢測的膠蟲物種IVT組成。試樣還可包括小鼠膠蟲IVT或惡性瘧原蟲IVT作為交叉反應性試樣。需要判定擴增和檢測系統是特異性於分析物系統的。使用的測定試劑包括以下：TCR，其包含至少一種TCO和一種T7啟動子提供者；擴增試劑，其包含至少一種非T7引子；由至少一種T7啟動子提供者和至少一種螢光標記的分子炬或信標(5'-六氯-螢光素(HEX)用於瘧原蟲，或5'-氟樹脂(FAM)用於膠蟲)組成的啟動子試劑(不含酚紅的擴增試劑)；以及Ultrio Plus酵素試劑。

【0182】 為了分析從Panther系統導出的原始數據，使用Panther RT-Dev Tool(Hologic Inc.)。使用1,000個相對螢光單位(RFU)的閾值分析螢光曲線。試樣達到或超過閾值的時間(TTime)由軟體判定。帶有TTime的試樣被認為對HEX通道的瘧原蟲有反應性，而FAM通道則對膠蟲有反應性。較低的TTimes指示測試系統的性能更好。沒有TTime或低於閾值的試樣被認為是無反應性的。

【0183】 在此實例中測試的寡聚物是SEQ ID NO：59的T7寡聚物、SEQ ID NO：30的非T7寡聚物和SEQ ID NO：123的炬探針。結果證明，在30 c/mL的瘧原蟲IVT測試的8個重複樣品中有8個被檢測到，且在10 c/mL下測試的8個重複樣品中有3個被檢測到。對於10 c/mL的檢測到的重複，螢光曲線產生的TTime小於或等於33.18分鐘。

## 實例11：臨床試樣中瘧原蟲的檢測

【0184】 使用即時TMA在安裝有即時螢光計(Hologic Inc.)的全自動化Panther系統上測試候選者擴增系統。試樣由在緩衝液中稀釋至300 c/mL的小鼠焦蟲和惡性瘧原蟲IVT的陽性對照和由陰性緩衝液組成的陰性對照所組成。臨床試樣由惡性瘧原蟲和卵形瘧原蟲全血和血漿試樣組成。藉由將100  $\mu$ L手動添加到3 mL裂解緩衝液(14 mM碳酸氫鈉，250 mM氯化銨，5%(v/v) LLS和0.1 mM EDTA，pH值為7.4)中來製備全血試樣。試樣在Panther系統上進行測試。使用的測定試劑包括：TCR，其包含至少一種TCO和一種T7啟動子提供者；擴增試劑，其包含至少一種非T7引子；由至少一種T7啟動子提供者和至少一種螢光標記的分子炬或信標(5'-六氯-螢光素(HEX)用於瘧原蟲，或5'-氟樹脂(FAM)用於膠蟲)組成的啟動子試劑(不含酚紅的擴增試劑)；以及酵素試劑。

【0185】 為了分析從Panther系統導出的原始數據，使用Panther RT-Dev Tool(Hologic Inc.)。使用1,000個相對螢光單位(RFU)的閾值分析螢光曲線。試樣達到或超過閾值的時間(TTime)由軟體判定。帶有TTime的試樣被認為對HEX通道的瘧原蟲有反應性，而FAM通道則對膠蟲有反應性。較低的TTimes指示測試系統的性能更好。沒有TTime或低於閾值的試樣被認為是非反應性的。

【0186】 在此實例中測試的寡聚物是SEQ ID NO：59的T7寡聚物、SEQ ID NO：30的非T7寡聚物和SEQ ID NO：123的炬探針。結果顯示在下表18中。測試的寡聚物的即時TMA結果與PCR結果顯示100%一致。根據使用體外惡性瘧原蟲感染的紅血球生成的校準曲線，測試樣品全血中每毫升寄生蟲含量為7.14E6至2.14E8。用膠蟲則沒有觀察到交叉反應。

[表18] 瘧原蟲陽性臨床試樣的檢測

樣品	生物體	全血		血漿	全血	血漿	相對數量的寄生蟲(WB/血漿)
		PCR 結果 (Wadsworth)	即時 TMA #反應性/	即時 TMA #反應性/	Est. # par/mL	Est. # par/mL	

			#經測試	#經測試			
1	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	2.14E+08	3.18E+02	672,841
2	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	1.49E+08	2.63E+02	566,724
3	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	1.11E+08	2.55E+03	43,685
4	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	7.28E+07	4.60E+02	158,340
5	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	5.49E+07	1.08E+02	508,948
6	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	3.07E+07	1.96E+01	1,568,437
7	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	2.27E+07	2.22E+01	1,026,604
8	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	1.09E+07	2.38E+01	457,997
9	<i>P. ova</i>	陽性	4/4	4/4	1.05E+07	3.21E+04	329
10	<i>P. fal</i>	陽性	4/4	4/4	7.14E+06	1.74E+01	411,025

### 實例12

**【0187】** 使用即時TMA在安裝有即時螢光計(Hologic Inc.)的全自動化Panther系統上測試候選者擴增系統。試樣由5株經瘧原蟲感染的紅血球組成：US 05 F Benin I，US 05 F Santa Lucia，US 08 F Nigeria XII，US05 F FC27/A3和US 05 F PH1。為經感染的紅血球提供估計的寄生蟲/mL值。將每株在正常陰性人類全血中連續稀釋至10 parasites/mL的估計值。將稀釋的經瘧原蟲感染的全血以1 mL全血的比率在3 mL裂解緩衝液(14 mM碳酸氫鈉，250 mM氯化銨，5%(v/v) LLS和0.1 mM EDTA，pH值為7.4)中進行手動裂解。試樣在Panther系統上進行測試。使用的測定試劑包括以下：TCR，其包含至少一種TCO和一種T7啟動子提供者；擴增試劑，其包含至少一種非T7引子；由至少一種T7啟動子提供者和至少一種螢光標記的分子炬或信標(5'-六氯-螢光素(HEX)用於瘧原蟲，或5'-氟樹脂(FAM)用於膠蟲)組成的啟動子試劑(不含酚紅的擴增試劑)；以及酵素試劑)；以及酵素試劑。

**【0188】** 為了分析從Panther系統導出的原始數據，使用Panther RT-Dev Tool(Hologic Inc.)。使用1,000個相對螢光單位(RFU)的閾值分析螢光曲線。試樣達到或超過閾值的時間(TTime)由軟體判定。帶有TTime的試樣被認為對HEX通道的瘧原蟲有反應性，而FAM通道則對膠蟲有反應性。較低的TTimes指示測試

系統的性能更好。沒有TTime或低於閾值的試樣被認為是非反應性的。

【0189】 在此實例中測試的寡聚物是SEQ ID NO：59的T7寡聚物、SEQ ID NO：30的非T7寡聚物和SEQ ID NO：123的炬探針。結果證明，在10 parasites/mL 測試的6個重複測試中，有6個檢測到所有5株瘧原蟲感染的紅血球，其螢光曲線產生的TTime為14.29至17.17分鐘。

[表19] 示例性序列

SEQ ID NO：	序列 (5' to 3')	註釋
1	GGAUUGGGUAAUUUGCGCGCCCTTTAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
2	CAAGAAAGAGCUAUCAAUCUGUCAAUCCCTTT AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
3	CCCGUGUUGAGUCAAAUUAAGCCGCATTTAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
4	GGGUAAUUUGCGCGCCUGCUGCTTTAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
5	UUUCUCAGGCUCCUCUCCGGAAUCGTTTAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
6	ACAUCUGAAUACGAAUGUCCCAATTTAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
7	CUAGUCGGCAUAGUUUAUGGUUATTTAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
8	AAAAACGGCCAUGCAUCACCAUCCTTTAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
9	UAGGCCAAUACCCUACCGUCCTTTAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
10	AAAGACUUUGAUUUCUCUCAAGGTTTAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	標靶捕獲寡聚物
11	GGAUUGGGUAAUUGCGCGCCC	SEQ ID NO : 1 的 THS
12	CAAGAAAGAGCUAUCAAUCUGUCAAUCC	SEQ ID NO : 2 的 THS
13	CCCGUGUUGAGUCAAAUUAAGCCGCA	SEQ ID NO : 3 的 THS
14	GGGUAAUUGCGCGCCUGCUGC	SEQ ID NO : 4 的 THS
15	UUUCUCAGGCUCCUCUCCGGAAUCG	SEQ ID NO : 5 的 THS
16	ACAUCUGAAUACGAAUGUCCCAA	SEQ ID NO : 6 的 THS
17	CUAGUCGGCAUAGUUUAUGGUUA	SEQ ID NO : 7 的 THS
18	AAAAACGGCCAUGCAUCACCAUCC	SEQ ID NO : 8 的 THS
19	UAGGCCAAUACCCUACCGUCC	SEQ ID NO : 9 的 THS
20	AAAGACUUUGAUUUCUCUCAAGG	SEQ ID NO : 10 的 THS
21	AATACTACAGCATGG	非 T7 擴增寡聚物
22	GGAAGGCAGCAGGCGCGTA	非 T7 擴增寡聚物



SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
23	AATACTACAGCATGGA	非 T7 擴增寡聚物
24	AATACTACAGCATGGAA	非 T7 擴增寡聚物
25	ATACTACAGCATGGAATA	非 T7 擴增寡聚物
26	ATTCAGATGTCAGAGGTGA	非 T7 擴增寡聚物
27	GTATTCAGATGTCAGAGGTGA	非 T7 擴增寡聚物
28	GTTACGATTAATAGGAGT	非 T7 擴增寡聚物
29	GTTACGATTAATAGGAGTA	非 T7 擴增寡聚物
30	GTTACGATTAATAGGAGTAG	非 T7 擴增寡聚物
31	GTTACGATTAATAGGAGTAGC	非 T7 擴增寡聚物
32	AATACTACAGCATGGAAT	非 T7 擴增寡聚物
33	AATACTACAGCATGGAATA	非 T7 擴增寡聚物
34	TACGATTAATAGGAGT	非 T7 擴增寡聚物
35	TACTACAGCATGGAATA	非 T7 擴增寡聚物
36	TATTCAGATGTCAGAGGTGA	非 T7 擴增寡聚物
37	TCAGTNCCTTATGAGAAATC	非 T7 擴增寡聚物
38	TGGCTTAGTTACGATT	非 T7 擴增寡聚物
39	TGGCTTAGTTACGATTAATAG	非 T7 擴增寡聚物

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
40	TTAATAGGAGTAGCTTGGGG	非 T7 擴增寡聚物
41	TTACGATTAATAGGAGT	非 T7 擴增寡聚物
42	TTCAGATGTCAGAGGTGA	非 T7 擴增寡聚物
43	TTGGCTTAGTTACGAT	非 T7 擴增寡聚物
44	TTGGCTTAGTTACGATTA	非 T7 擴增寡聚物
45	TTGGGGACATTCGTATTCAGA	非 T7 擴增寡聚物
46	TTTAGATTGCTTCCTTCAGT	非 T7 擴增寡聚物
47	TTTGAATACTANAGCA	非 T7 擴增寡聚物
48	ACATTCGTATTCAGATGTCAG	非 T7 擴增寡聚物
49	CTTAGTTACGATTAATAGGA	非 T7 擴增寡聚物
50	CGATTAATAGGAGTAGCTTGG	非 T7 擴增寡聚物
51	CTTAGTTACGATTAATAGGAGTAG	非 T7 擴增寡聚物
52	CTTGAATACTNCAGCA	非 T7 擴增寡聚物
53	GGCTTAGTTACGATTA	非 T7 擴增寡聚物
54	AATACTANAGCATGG	非 T7 擴增寡聚物
55	AATACTANAGCATGGAATA	非 T7 擴增寡聚物
56	AATTCTAAAGAAGAGAG	非 T7 擴增寡聚物

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
57	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCAC TCCCTTAACTTTCGTTCTTG	T7 擴增寡聚物
58	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGA TTAATGGAAGTATTTTAGA	T7 擴增寡聚物
59	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAA CTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	T7 擴增寡聚物
60	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTAC TCTTGTCTTAAACTA	T7 擴增寡聚物
61	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAACG GCCATGCATCACCATCCAAGA	T7 擴增寡聚物
62	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCC TTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	T7 擴增寡聚物
63	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGACG GTATCTGATCGTCTTCACTCCC	T7 擴增寡聚物
64	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAA CTTTCGTTCTTGATTAATGGAAG	T7 擴增寡聚物
65	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAA CTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGTA	T7 擴增寡聚物
66	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACTC	T7 擴增寡聚物

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
	CCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	
67	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACTC CCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGG	T7 擴增寡聚物
68	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCA CTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATT	T7 擴增寡聚物
69	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCA CTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	T7 擴增寡聚物
70	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATCGT CTTCACTCCCTTAACTTTCGTTTC	T7 擴增寡聚物
71	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCC TTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	T7 擴增寡聚物
72	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATCACT CCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	T7 擴增寡聚物
73	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCTT AACTTTCGTTCTTGATTAATG	T7 擴增寡聚物
74	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAA CTTTCGTTCTTGATTAATG	T7 擴增寡聚物
75	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATAACT TTCGTTCTTGATTAATG	T7 擴增寡聚物

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
76	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAACTCC CTTAACTTTCGTTCTTGAT	T7 擴增寡聚物
77	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCCT TAACTTTCGTTCTTGAT	T7 擴增寡聚物
78	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCA AATGCTTTCGCAGTTGTTNGTCT	T7 擴增寡聚物
79	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCA AATGCTTTCGCAGTTGTTTGTCT	T7 擴增寡聚物
80	TTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTG	SEQ ID NO : 57 的 THS
81	CTTGATTAATGGAAGTATTTTAGA	SEQ ID NO : 58 的 THS
82	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	SEQ ID NO : 59 的 THS
83	CCTACTCTTGTCTTAAACTA	SEQ ID NO : 60 的 THS
84	AAACGGCCATGCATCACCATCCAAGA	SEQ ID NO : 61 的 THS
85	CTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGT	SEQ ID NO : 62 的 THS
86	CGACGGTATCTGATCGTCTTCACTCCC	SEQ ID NO : 63 的 THS
87	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAG	SEQ ID NO : 64 的 THS
88	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGGAAGTA	SEQ ID NO : 65 的 THS
89	CACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	SEQ ID NO : 66 的 THS

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
90	CACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATGG	SEQ ID NO : 67 的 THS
91	CTTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATT	SEQ ID NO : 68 的 THS
92	CTTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	SEQ ID NO : 69 的 THS
93	ATCGTCTTCACTCCCTTAACTTTCGTTTC	SEQ ID NO : 70 的 THS
94	CTCCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	SEQ ID NO : 71 的 THS
95	TCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	SEQ ID NO : 72 的 THS
96	CCCTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	SEQ ID NO : 73 的 THS
97	CTTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	SEQ ID NO : 74 的 THS
98	TAACTTTCGTTCTTGATTAATG	SEQ ID NO : 75 的 THS
99	ACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	SEQ ID NO : 76 的 THS
100	TCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT	SEQ ID NO : 77 的 THS
101	AGGCAAATGCTTTCGCAGTTGTTNGTCT	SEQ ID NO : 78 的 THS
102	AGGCAAATGCTTTCGCAGTTGTTTGTCT	SEQ ID NO : 79 的 THS
103	CGCGCAAGCGAGAAAGCGCG	炬檢測探針
104	GCUCGCAUUCGCGCAAGCGAGC	炬檢測探針
105	GCUUGCGAGUAUUCGCGCAAGC	炬檢測探針
106	GGCAAGCGAGAAAGUCUUGCC	炬檢測探針

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
107	CCGAGGUAUUCGCGCAACUCGG	信標檢測探針
108	GGCUCACUUUCUCGCUUGGAGCC	信標檢測探針
109	CUCUGGAGACNAGCACCAGAG	炬檢測探針
110	GUCUCAUUUUCUGGAGAC	炬檢測探針
111	GCCUAAAAUACUCCUAGGC	炬檢測探針
112	CAUGGAAAUACUCCAUG	炬檢測探針
113	CCGAGAUUUUCUGGAGACCUCGG	信標檢測探針
114	CCGAGGCCUAAAAUACUCCCUCGG	信標檢測探針
115	GGGAAUUUAAAACCUUCCC	炬檢測探針
116	GGAAGGAAUUUAAAACCUUCC	炬檢測探針
117	GUGGGAAUUUAAAACCCCCAC	炬檢測探針
118	UCCAGAAAUUCUUAGAUUUUCUGGA	炬檢測探針
119	ACUCCGAACGAAAGUUAAGGGAGU	炬檢測探針
120	AGGGAGUGAAGACGAUCAUCCCU	炬檢測探針
121	UCGCGCAAGCGAGAAAGGCGCGA	炬檢測探針
122	CCGAAGUGNCUAAAAUACUUCGG	炬檢測探針
123	CACCUCAGAUGUCAGAGGUG	炬檢測探針

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
124	CUACCUCUAAAGAAGAGAGGUAG	炬檢測探針
125	CGCGCAAGCGAGAAAG	SEQ ID NO : 103 的 THS
126	AUUCGCGCAAGCGAGC	SEQ ID NO : 104 的 THS
127	GAGUAUUCGCGCAAGC	SEQ ID NO : 105 的 THS
128	GGCAAGCGAGAAAGU	SEQ ID NO : 106 的 THS
129	GUAUUCGCGCAA	SEQ ID NO : 107 的 THS
130	ACUUUCUCGCUUG	SEQ ID NO : 108 的 THS
131	CUCUGGAGACNAGCA	SEQ ID NO : 109 的 THS
132	AUUUUCUGGAGAC	SEQ ID NO : 110 的 THS
133	GCCUAAAAUACUUC	SEQ ID NO : 111 的 THS
134	AAAUACUCCAUG	SEQ ID NO : 112 的 THS
135	AUUUUCUGGAGAC	SEQ ID NO : 113 的 THS
136	CCUAAAAUACUUC	SEQ ID NO : 114 的 THS
137	GGGAAUUUAAAACC	SEQ ID NO : 115 的 THS
138	GGAAUUUAAAACCUUC	SEQ ID NO : 116 的 THS
139	GUGGGAAUUUAAAACC	SEQ ID NO : 117 的 THS
140	GAAAUUCUUAGAUUUUCUGGA	SEQ ID NO : 118 的 THS



SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
141	GAACGAAAGUUAAGGGAGU	SEQ ID NO : 119 的 THS
142	AGGGAGUGAAGACGAUCA	SEQ ID NO : 120 的 THS
143	UCGCGCAAGCGAGAAAG	SEQ ID NO : 121 的 THS
144	UGNCUAAAAUACUUCGG	SEQ ID NO : 122 的 THS
145	CAGAUGUCAGAGGUG	SEQ ID NO : 123 的 THS
146	UCUAAAGAAGAGAGGUAG	SEQ ID NO : 124 的 THS
147	UCUUAGAUUUUCUGGAGAC	檢測探針
148	UUCAGAUGUCAGAGG	檢測探針
149	UUCAGAUGUCAGAGGT	檢測探針
150	UAUUCAGAUGUCAGAGGT	檢測探針
151	UAUUCAGAUGUCAGAGGUG	檢測探針
152	UCAGAUGUCAGAGGT	檢測探針
153	UUCAGAUGUCAGAGGT	檢測探針
154	AUUCAGAUGUCAGAGGT	檢測探針
155	AUUCAGAUGUCAGAGGUG	檢測探針
156	CUUAGAUUUUCUGGAGA	檢測探針
157	CUUAGAUUUUCUGGAGAC	檢測探針

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
158	CUUAGUUACGAUUAUAGGA	檢測探針
159	GUAUUCAGAUGUCAGAGGUGA	檢測探針
160	AUUCUUAGAUUUUCUGGAGAC	檢測探針
161	CUAAGAUUUUCUGGAGAC	檢測探針
162	TTTGAATACTANAGCATGGAATA	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 21, 23-25, 32, 33, 35, 54, & 55 包括在此)
163	TACTANAGCA	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 21, 23-25, 32, 33, 35, 54, & 55 共享此)
164	TTTGAATACTACAGCATGGAATA	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 21, 23-25, 32, 33, & 35 包括在此)
165	TACTACAGCA	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 21, 23-25, 32, 33, & 35 共享此)
166	TTGGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTAGCTTG GGG	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 28-31, 34, 38-41, 43, 44, 49-51, & 53 包括在此)

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
167	TTAATAGGAGT	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 28-31, 34, 40, 41, & 49-51 共享此)
168	GGCTTAGTTACGAT	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 38, 39, 43, 44, & 53 共享此)
169	CGACGGTATCTGATCGTCTTCACTCCCTTAACT TTCGTTCTTGATTAATGGAAGTATTTTAGA	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 80-82, & 85-100 包括在此)
170	ATCGTCTTCACTCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT TAATGGAAGTATTTTAGA	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 80-82, 85, & 87-100 包括在此)
171	CTTGATTAATG	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 81, 82, 85, 87-90, 94, & 96-98 共享此)
172	TAACTTTCGTTC	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 80, 82, 85, & 87-100 共享此)
173	CTTCACTCCC	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 86 & 91-93 共享此)

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
174	UCAGAUGUCAGAGG	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 148-155 & 159 共享此)
175	CUAAGAUUUUCUGGAGA	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 147, 156, 157, 160, & 161 共享此)
176	CAGAUGUCAGAGG	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 145, 148-155, & 159 共享此)
177	YUCUGGAGAC	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 131, 132, 135, 147, 156, 157, 160, & 161 共享此)
178	AUUUUCUGGA	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 132, 135, 140, 147, 156, 157, 160, & 161 共享此)
179	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA	用於等溫的示例性 T7 啟動 子序列
180	aacctggtgatctgccagtagcatatgcttgtctcaaagattaagccatgc aagtgaaagtatatatatatatttatatgtagaaactgcgaacggctcattaaac agttatagtctacttgacatatttattataaggataactacggaaaagctgtagct aatacttgctttattatcctttgattttatctttggataagtatttggtaggccttata	惡性瘧原蟲 3D7 18S 核糖體 RNA (PF3D7_0725600), rRNA NCBI 參考序列 :

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
	agaaaaagtattaacttaaggaattataacaaagaagtaacacgtaataaa tttattttatttagtgtgatcaatcgagtttctgacctatcagctttgatgtagg gtattggcctaacatggctatgacgggtaacggggaattagagttcgattcc ggagaggagcctgagaaatagctaccacatctaaggaaggcagcaggc gcgtaaattaccaattctaaagaagagaggtagtacaagaataacaatg caaggccaattttggtttgtaattggaatggtgggaattaaaaccttccag agtaacaattggagggaagtctggtgccagcagccgcggaattccagct ccaatagcgtatattaaaattggtgcagtaaaacgctcgtagttgaattcaa gaatcgatattttattgtaactattctaggggaactatttagcttctgcttaatac gcttctctattattatgttcttaataacaaagattcttttaaaatccccacttt gcttttgcttttggggattttgtactttgagtaaattagagtgtcaaagcaaac agttaaagcattactgtgttgaatactatagcatggaataacaaaattgaaca agctaaaatttttgttctttttctattttggcttagttacgattaataggagtagc ttggggacattcgtattcagatgtcagaggtgaaattcttagattttctggagac gaacaactgcgaaagcattgtctaaaatactccattaatcaagaacgaaag ttaaggagtgagacgatcagataccgtcgaatcttaaccataaactatgc cgactaggtgttgatgaaagtgttaaaaataaaagtcatttctgaggtgact ttagattgcttcttcagttacattatgagaaatcaaagtctttgggttctggggc gatttctgcgcaagcgagaaagttaaaagaattgacggaagggcaccac caggcgtggagcttgcggcttaattgactcaacacggggaactcactagt ttaagacaagagtaggattgacagattaatagctctttcttgatttcttgatggt	XR_002273081.2

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
	gatgcatggccgTTTTAGTTCGTGAATATGATTTGTCTGGTTAATCCGATAACG AACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACACTATATTCTTATTGAAAT TGAACATAGGTAACATAACATTTATTCAGTAATCAAATTAGGATATTTTATTA TAAATATCCTTTCCCTGTTCTACTAATAATTTGTTTTACTCTATTTCTCTCTTTAAGAA TGTACTTGCTTGATTGAAAAGCTCTTAGAGGAACATTGTGTGCTAACACAAG GAAGTTAAGGCAACAACAGGTCTGTGATGTCCTTAGATGAAC TAGGCTGCA CGCGTGCTACTGATATATAACGAGTTTTAAAAATAGCTTATATTGTATCT TTGCTTATATTTGCATACTTTCTCCGCCGAAAGGCGTAGGTAATCTTATCAAT ATATATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATAATCTTGAACGAGGAATGC CTAGTAAGCATGATTCAACAGATTGTGCTGACTACGTCCTGCCCTTGTACAC ACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAAAGATATGATGAATTGTTGGACAAGAA AAATTGAATTATATTCTTTTTTTCTGGAAAACCGTAAATCCTATCTTTAAAGGA AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT	
181	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAG AAAGAGCTATNAATCTGTCAATCC	T7 擴增寡聚物
182	TCAAGAAAGAGCTATNAATCTGTCAATCC	SEQ ID NO : 181 的 THS
183	GAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTG	非 T7 擴增寡聚物
184	CAAAGTCTTTGGGTTCTGG	非 T7 擴增寡聚物
185	TTTAGATTGCTTCCTTCAGTNCCTTATGAGAAA TCAAAGTCTTTGGGTTCTGG	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 37, 46, 183, & 184)

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
		包括在此)
186	GAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGG	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 183 & 184 包括在此)
187	CAAAGTCTTTGGGTTCTG	擴增寡聚物核心序列 (SEQ ID NOs : 183 & 184 共享此)
188	AAACGGCCATGCATCACCATCCAAGAAATCAA GAAAGAGCTATNAATCTGTCAATCCTACTCTT GTCTTAAACTA	擴增寡聚物雜交區域 (SEQ ID NOs : 83, 84, & 182 包括在此)
189	GAGUAUUCGSGCAAGCGAGAAAGU	檢測探針雜交區域 (SEQ ID NOs : 125-130 & 143 包括在此)
190	AUUCGCGCAA	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 126, 127, & 129 共享此)
191	CAAGCGAGC	檢測探針核心序列 (SEQ ID NOs : 125, 126, 128, 130, & 143 共享此)
192	[GenBank Accession JQ627153.1]	間日瘧原蟲分離 SV1 18S 核糖體 RNA 基因, 部分序列

SEQ ID NO :	序列 (5' to 3')	註釋
193	[GenBank Accession L07560.1]	諾氏瘧原蟲小次單位核糖體 RNA 序列
194	[GenBank Accession AB182491.1]	卵形瘧原蟲基因，用於小次 單位核糖體 RNA, 互補序列, 變異型 1
195	[GenBank Accession AF487999.1]	瘧原蟲 cf. 瘧疾型 1 小次單 位核糖體 RNA 基因, 互補序 列
196	GUAUUCAGAUGUCAGAGGUGAAAUUCUUAG AUUYUCUGGAGACNAGCA	檢測探針雜交區域 (SEQ ID NOs : 131, 132, 135, 140, 145, 147-157 & 159-161 包括在 此)
197	GUAUUCAGAUGUCAGAGGUGAAAUUCUUAG AUUUUCUGGAGAC	檢測探針雜交區域 (SEQ ID NOs : 132, 135, 140, 145, 147-157 & 159-161 包括在 此)

## [實施例]

**【0190】** 實施例1：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法，該方法包括以下步驟：



(1) 使樣品與用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種寡聚物接觸，該樣品疑似含有瘧原蟲物種核酸，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，

(i) 該標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 20 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：162 的序列中，且包含 SEQ ID NO：163 的序列；或

(ii) 該標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 25 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：166 的序列中，且包含 SEQ ID NO：167 或 SEQ ID NO：168 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列的長度為約 15 至約 33 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：169 中，且包含 SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172 或 SEQ ID NO：173 的序列；

(2) 進行體外核酸擴增反應，其中將該樣品中存在的任何瘧原蟲標靶核酸用作為產生擴增產物的模板；以及

(3) 檢測該擴增產物的存在或不存在，從而指示該樣品中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。

**【0191】** 實施例2：如實施例1之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(i) 中的擴增寡聚物。

**【0192】** 實施例3：如實施例2之方法，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：54和SEQ ID NO：55所組成之群組。

**【0193】** 實施例4：如實施例2之方法，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：164的序列中，且包括SEQ ID NO：165的序列。

**【0194】** 實施例5：如實施例4之方法，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係

選自由SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：35所組成之群組。

【0195】 實施例6：如實施例1之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(ii)中的擴增寡聚物。

【0196】 實施例7：如實施例6之方法，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列。

【0197】 實施例8：如實施例7之方法，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：28至SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：49至SEQ ID NO：51所組成之群組。

【0198】 實施例9：如實施例6之方法，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：168的序列。

【0199】 實施例10：如實施例9之方法，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：44和SEQ ID NO：53所組成之群組。

【0200】 實施例11：如實施例1至10中任一項之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：80至SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：85至SEQ ID NO：100所組成之群組。

【0201】 實施例12：如實施例1至10中任一項之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170中，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列。

【0202】 實施例13：如實施例12之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：171的序列。

【0203】 實施例14：如實施例13之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：81、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85、SEQ ID NO：87至

SEQ ID NO : 90、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 96至SEQ ID NO : 98所組成之群組。

【0204】 實施例15：如實施例12之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO : 172的序列。

【0205】 實施例16：如實施例15之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85和SEQ ID NO : 87至SEQ ID NO : 100所組成之群組。

【0206】 實施例17：如前述實施例中任一項之方法，其中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列。

【0207】 實施例18：如實施例17之方法，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

【0208】 實施例19：如實施例18之方法，其中，該T7啟動子序列係SEQ ID NO : 179。

【0209】 實施例20：如實施例19之方法，其中，(b)中的該擴增寡聚物包括選自由SEQ ID NO : 57至SEQ ID NO : 59和SEQ ID NO : 62至SEQ ID NO : 77所組成之群組的序列。

【0210】 實施例21：如實施例1之方法，其中，(a)和(b)中的該標靶-雜交序列各自為：

(A) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 82 ;

(B) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 82 ;

(C) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 82 ;

(D) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 89 ;

(E) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 89 ;

- (F) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (G) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (H) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (I) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (J) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (K) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (L) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (M) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 95 ;
- (N) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 95 ; 或
- (O) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 95 。

**【0211】** 實施例22：如實施例21之方法，其中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜交序列的啟動子序列。

**【0212】** 實施例23：如實施例22之方法，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

**【0213】** 實施例24：如實施例23之方法，其中，該T7啟動子序列係SEQ ID NO : 179 。

**【0214】** 實施例25：如實施例1之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。

**【0215】** 實施例26：如實施例25之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。

**【0216】** 實施例27：如實施例26之方法，其中，

如(a)(ii)中的該第一擴增寡聚物包括包含SEQ ID NO : 167的序列的標靶-雜交序列，且

如(a)(ii)中的該第二擴增寡聚物包括包含SEQ ID NO：168的序列的標靶-雜交序列。

【0217】 實施例28：如實施例27之方法，其中，該第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：34的該標靶-雜交序列，且該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：53的該標靶-雜交序列。

【0218】 實施例29：如實施例25之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物及如(a)(ii)中的擴增寡聚物。

【0219】 實施例30：如實施例29之方法，其中，

如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括 SEQ ID NO：164 的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括 SEQ ID NO：165 的序列，且

如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括 SEQ ID NO：167 的序列。

【0220】 實施例31：如實施例30之方法，其中，如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO：21的標靶-雜交序列；且如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO：34的標靶-雜交序列。

【0221】 實施例32：如實施例1和25至31之方法，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。

【0222】 實施例33：如實施例32之方法，其中，(b)中的該第一擴增寡聚物和該第二擴增寡聚物各自包括SEQ ID NO：170的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列。

【0223】 實施例34：如實施例33之方法，其中，如(b)中的該第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：94的標靶-雜交序列，且如(b)中的該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：95的標靶-雜交序列。

【0224】 實施例35：如實施例32至34中任一項之方法，其中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的標靶-雜

交序列的啟動子序列。

【0225】 實施例36：如實施例35之方法，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

【0226】 實施例37：如實施例36之方法，其中，該T7啟動子序列係SEQ ID NO：179。

【0227】 實施例38：如前述實施例中任一項之方法，其進一步包括在步驟(1)之前，純化來自樣品中的其他成分的標靶核酸。

【0228】 實施例39：如實施例38之方法，其中，該純化步驟包括使樣品與至少一種捕獲探針寡聚物接觸，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中，該標靶-雜交序列的長度為至多約30個鄰接核苷酸，且包括選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，前述序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

【0229】 實施例40：如實施例39之方法，其中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，前述序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

【0230】 實施例41：如實施例39之方法，其中，該純化步驟包括使樣品與至少兩種捕獲探針寡聚物接觸，

【0231】 實施例42：如實施例41之方法，其中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括：

包含SEQ ID NO：19之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物；及

包含SEQ ID NO：20之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

【0232】 實施例43：如前述實施例中任一項之方法，其中，檢測步驟(3)包

括使體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸，該至少一種檢測探針寡聚物包括經配置為在判定擴增產物的存在或不存在的條件下來特異性地雜交到擴增產物的標靶-雜交序列，從而指示樣品中瘧原蟲物種的存在或不存在。

【0233】 實施例44：如實施例43之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178所組成之群組的序列。

【0234】 實施例45：如實施例44之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0235】 實施例46：如實施例44之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列。

【0236】 實施例47：如實施例46之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物。

【0237】 實施例48：如實施例47之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159所組成之群組。

【0238】 實施例49：如實施例46之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜

交序列(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物。

【0239】 實施例50：如實施例49之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0240】 實施例51：如實施例44之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178所組成之群組的序列。

【0241】 實施例52：如實施例51之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0242】 實施例53：如實施例43至52中任一項之方法，其中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成員上的2'甲氧基修飾體。

【0243】 實施例54：如實施例43至53中任一項之方法，其中，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：

(A) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：151或其互補序列，或SEQ ID NO：151或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(B) SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：157或其互補序列，或SEQ ID NO：157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；



(C) SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 155或其互補序列，或SEQ ID NO : 155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(D) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 150或其互補序列，或SEQ ID NO : 150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(E) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 155或其互補序列，或SEQ ID NO : 155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(F) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(G) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(H) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(I) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(J) SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 158或其互補序列，或SEQ ID NO : 158或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(K) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 150或其互補序列，或SEQ ID NO : 150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(L) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(M) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(N) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(O) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(P) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Q) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(R) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(S) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(T) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(U) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(V) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(W) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(X) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Y) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Z) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AA) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AB) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AC) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AD) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或

(AE) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

【0244】 實施例55：如實施例43至54中任一項之方法，其中，該檢測探針寡聚物包括可檢測的標記物。

【0245】 實施例56：如實施例55之方法，其中，該可檢測的標記物是化學發光標記物或螢光標記物。

【0246】 實施例57：如實施例56之方法，其中，該可檢測的標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其聯結在該檢測探針寡聚物之兩個核鹼基之間。

【0247】 實施例58：如前述實施例中任一項之方法，其中，該檢測步驟(3)發生在該擴增步驟(2)期間。

【0248】 實施例59：如實施例56或58之方法，其中，該可檢測的探針包括螢光標記物和淬滅劑。

【0249】 實施例60：如實施例59之方法，其中，該可檢測的探針係選自由分子炬、分子信標和TaqMan檢測探針組成之群組。

【0250】 實施例61：如實施例43至60中任一項之方法，其中，該可檢測的探針進一步包括非標靶-雜交序列。

【0251】 實施例62：如實施例61之方法，其中，該可檢測的探針是分子炬或分子信標。

【0252】 實施例63：如實施例43之方法，其中，該至少一種檢測探針寡聚物包括至少兩種檢測探針寡聚物。

【0253】 實施例64：如實施例44之方法，其中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物，其中，

(A)該第一檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列；且

(B)該第二檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。

【0254】 實施例65：如實施例64之方法，其中，

該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列；且

該第二檢測探針寡聚物包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152所組成之群組的標靶-雜交序列。

【0255】 實施例66：如前述實施例中任一項之方法，其中，步驟(2)中的該擴增反應是等溫擴增反應。

【0256】 實施例67：如實施例66之方法，其中，該擴增反應是轉錄介導的擴增(TMA)反應。

【0257】 實施例68：如前述實施例中任一項之方法，其中，該擴增反應是即時擴增反應。

【0258】 實施例69：如前述實施例中任一項之方法，其中，該樣品是臨床樣品。

【0259】 實施例70：如前述實施例中任一項之方法，其中，該樣品是血液樣品。

【0260】 實施例71：如實施例70之方法，其中，該樣品是裂解的血細胞樣品，或視需要地其中，該樣品是裂解的紅血球樣品。

【0261】 實施例72：如實施例70之方法，其中，該樣品是紅血球樣品。

【0262】 實施例73：一種用於判定樣品中是否存在瘧原蟲物種的至少兩種寡聚物之組合物，該寡聚物組合物包括用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種寡聚物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，

(i)該標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 20 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：162 的序列中，且包含 SEQ ID NO：163 的序列；或

(ii)該標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 25 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：166 的序列中，且包含 SEQ ID NO：167 或 SEQ ID NO：168 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列的長度為約 15 至約 33 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：169 中，且包含 SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172 或 SEQ ID NO：173 的序列。

【0263】 實施例74：如實施例73之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(i)中的擴增寡聚物。

【0264】 實施例75：如實施例74之寡聚物組合物，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID

NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：54和SEQ ID NO：55所組成之群組。

【0265】 實施例76：如實施例74之寡聚物組合物，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：164的序列中，且包括SEQ ID NO：165的序列。

【0266】 實施例77：如實施例76之寡聚物組合物，其中，(a)(i)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33和SEQ ID NO：35所組成之群組。

【0267】 實施例78：如實施例73之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(a)(ii)中的擴增寡聚物。

【0268】 實施例79：如實施例78之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：167的序列。

【0269】 實施例80：如實施例79之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：28至SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：49至SEQ ID NO：51所組成之群組。

【0270】 實施例81：如實施例78之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：168的序列。

【0271】 實施例82：如實施例81之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：44和SEQ ID NO：53所組成之群組。

【0272】 實施例83：如實施例73至82中任一項之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：80至SEQ ID NO：82和SEQ ID NO：85至SEQ ID NO：100所組成之群組。

【0273】 實施例84：如前述實施例中任一項之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：170中，且包括SEQ ID NO：171或SEQ

ID NO：172的序列。

【0274】 實施例85：如實施例84之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：171的序列。

【0275】 實施例86：如實施例85之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自(i)由 SEQ ID NO：81、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85、SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：90、SEQ ID NO：94和SEQ ID NO：96至SEQ ID NO：98所組成之群組。

【0276】 實施例87：如實施例84之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列包括SEQ ID NO：172的序列。

【0277】 實施例88：如實施例87之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：80、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85和SEQ ID NO：87至SEQ ID NO：100所組成之群組。

【0278】 實施例89：如前述實施例中任一項之寡聚物組合物，其中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的該標靶-雜交序列的啟動子序列。

【0279】 實施例90：如實施例89中任一項之寡聚物組合物，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

【0280】 實施例91：如實施例90之寡聚物組合物，其中，該T7啟動子序列是SEQ ID NO：179。

【0281】 實施例92：如實施例91之寡聚物組合物，其中，(b)中的該擴增寡聚物包括選自由SEQ ID NO：57至SEQ ID NO：59和SEQ ID NO：62至SEQ ID NO：77所組成之群組的序列。

【0282】 實施例93：如實施例73之寡聚物組合物，其中，(a)和(b)中的該標靶-雜交序列各自為：

- (A) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (B) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (C) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (D) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (E) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (F) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (G) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (H) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (I) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (J) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (K) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (L) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (M) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 95 ;
- (N) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 95 ; 或
- (O) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 95 。

【0283】 實施例94：如實施例93之寡聚物組合物，其中，(b)中的該擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的該標靶-雜交序列的啟動子序列。

【0284】 實施例95：如實施例94之寡聚物組合物，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

【0285】 實施例96：如實施例95之寡聚物組合物，其中，該T7啟動子序列是SEQ ID NO : 179 。

【0286】 實施例97：如實施例73之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。



【0287】 實施例98：如實施例97之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。

【0288】 實施例99：如實施例98之寡聚物組合物，其中，  
如(a)(ii)中的該第一擴增寡聚物包括包含SEQ ID NO：167的序列的標靶-雜交序列；且

如(a)(ii)中的該第二擴增寡聚物包括包含SEQ ID NO：168的序列的標靶-雜交序列。

【0289】 實施例100：如實施例99之寡聚物組合物，其中，該第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：34之該標靶-雜交序列，且該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：53之該標靶-雜交序列。

【0290】 實施例101：如實施例97之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物和如(a)(ii)中的擴增寡聚物。

【0291】 實施例102：如實施例101之寡聚物組合物，其中，  
如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括 SEQ ID NO：164 的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括 SEQ ID NO：165 的序列；且

如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括 SEQ ID NO：167 的序列。

【0292】 實施例103：如實施例102之寡聚物組合物，其中，如(a)(i)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO：21的標靶-雜交序列，且如(a)(ii)中的該擴增寡聚物包括SEQ ID NO：34的標靶-雜交序列。

【0293】 實施例104：如實施例73和97至103中任一項之寡聚物組合物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物。

【0294】 實施例105：如實施例104之寡聚物組合物，其中，(b)中的該第一擴增寡聚物和該第二擴增寡聚物各自包括SEQ ID NO：170中所包含的標靶-雜交序列，且包括SEQ ID NO：171或SEQ ID NO：172的序列。

【0295】 實施例106：如實施例105之寡聚物組合物，其中，如(b)中的該第一擴增寡聚物包括SEQ ID NO：94的標靶-雜交序列，且如(b)中的該第二擴增寡聚物包括SEQ ID NO：95的標靶-雜交序列。

【0296】 實施例107：如實施例93之寡聚物組合物，其中，(b)中的該擴增寡聚物各自係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於5'到(b)中的該標靶-雜交序列的啟動子序列。

【0297】 實施例108：如實施例107之寡聚物組合物，其中，該啟動子序列係T7啟動子序列。

【0298】 實施例109：如實施例108之寡聚物組合物，其中，該T7啟動子序列是SEQ ID NO：179。

【0299】 實施例110：如前述實施例中任一項之寡聚物組合物，其進一步包括至少一種捕獲探針寡聚物，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中，該標靶-雜交序列的長度為至多約30個鄰接核苷酸，且包括選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，前述序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

【0300】 實施例111：如實施例110之寡聚物組合物，其中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，前述序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

【0301】 實施例112：如實施例110之寡聚物組合物，其中，該寡聚物組合物包括至少兩種捕獲探針寡聚物。

【0302】 實施例113：如實施例112之寡聚物組合物，其中，該至少兩種捕獲探針寡聚物包括：

包含SEQ ID NO：19，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物；以及

包含SEQ ID NO：20，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

**【0303】** 實施例114：如前述實施例中任一項之寡聚物組合物，其進一步包括至少一種檢測探針寡聚物，該檢測探針寡聚物包括經配置為與可被該至少兩種擴增寡聚物擴增的瘧原蟲物種標靶區域特異性雜交的標靶-雜交序列。

**【0304】** 實施例115：如實施例114之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：175、SEQ ID NO：176、SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178所組成之群組的序列。

**【0305】** 實施例116：如實施例115之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147至SEQ ID NO：157和SEQ ID NO：159至SEQ ID NO：161所組成之群組。

**【0306】** 實施例117：如實施例115之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列。

**【0307】** 實施例118：如實施例117之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的序列。

【0308】 實施例119：如實施例118之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159所組成之群組。

【0309】 實施例120：如實施例117之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物的序列。

【0310】 實施例121：如實施例120之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0311】 實施例122：如實施例115之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178所組成之群組的序列。

【0312】 實施例123：如實施例122之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0313】 實施例124：如實施例114至123中任一項之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成員上的2'甲氧基修飾體。

【0314】 實施例125：如實施例114至124中任一項之寡聚物組合物，其中，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：

(A) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 151或其互補序列，或SEQ ID NO : 151或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(B) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(C) SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 155或其互補序列，或SEQ ID NO : 155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(D) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 150或其互補序列，或SEQ ID NO : 150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(E) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 82和SEQ ID NO : 155或其互補序列，或SEQ ID NO : 155或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(F) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(G) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(H) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(I) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(J) SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 158或其互補序列，或SEQ ID NO : 158或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(K) SEQ ID NO : 49、SEQ ID NO : 89和SEQ ID NO : 150或其互補序列，或SEQ ID NO : 150或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(L) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(M) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(N) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(O) SEQ ID NO : 30、SEQ ID NO : 92和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(P) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Q) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(R) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(S) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(T) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(U) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(V) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(W) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 94和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(X) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Y) SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(Z) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AA) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AB) SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AC) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 148或其互補序列，或SEQ ID NO : 148或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(AD) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 152或其互補序列，或SEQ ID NO : 152或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或

(AE) SEQ ID NO : 53、SEQ ID NO : 95和SEQ ID NO : 157或其互補序列，或SEQ ID NO : 157或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

【0315】 實施例126：如實施例114至125中任一項之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物包括可檢測的標記物。

【0316】 實施例127：如實施例126之寡聚物組合物，其中，該可檢測的標記物是化學發光標記物或螢光標記物。

【0317】 實施例128：如實施例127之寡聚物組合物，其中，該可檢測的標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其聯結在該檢測探針寡聚物之兩個核鹼基之間。

【0318】 實施例129：如實施例127之寡聚物組合物，其中，該可檢測的探針包括螢光標記物和淬滅劑。

【0319】 實施例130：如實施例129之寡聚物組合物，其中，該可檢測的探針

係選自由分子炬、分子信標和TaqMan檢測探針組成之群組。

【0320】 實施例131：如實施例114至130中任一項之寡聚物組合物，其中，該可檢測的探針進一步包括非標靶-雜交序列。

【0321】 實施例132：如實施例131之寡聚物組合物，其中，該可檢測的探針是分子炬或分子信標。

【0322】 實施例133：如實施例114之寡聚物組合物，其中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物。

【0323】 實施例134：如實施例115之寡聚物組合物，其中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物，其中，

(A)該第一檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列；且

(B)該第二檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。

【0324】 實施例135：如實施例134之寡聚物組合物，其中，

該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列；且

該第二檢測探針寡聚物包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152所組成之群組的標靶-雜交序列。

【0325】 實施例136：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢



測探針寡聚物，該檢測探針寡聚物包括長度為約13至約40個鄰接核苷酸的標靶-雜交序列，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，該寡聚物組合物包含第一瘧原蟲特異性擴增寡聚物和第二瘧原蟲特異性擴增寡聚物，其中，

(a)該第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，(i)該標靶-雜交序列的長度為約14至約20個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：162的序列中，且包含SEQ ID NO：163的序列，或(ii)該標靶-雜交序列的長度為約14至約25個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：166的序列中，且包含SEQ ID NO：167或SEQ ID NO：168的序列；及

(b)該第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，前述標靶-雜交序列的長度為約15至約33個鄰接核苷酸，包含在SEQ ID NO：169中，且包含SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172或SEQ ID NO：173的序列。

【0326】 實施例137：如實施例136之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：196或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177及SEQ ID NO：178的序列。

【0327】 實施例138：如實施例137之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0328】 實施例139：如實施例137之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係(i)包括在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自包含其互補序列、其DNA等同

物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：174或SEQ ID NO：175的序列。

【0329】 實施例140：如實施例139之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括SEQ ID NO：174或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物。

【0330】 實施例141：如實施例140之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148至SEQ ID NO：155和SEQ ID NO：159所組成之群組。

【0331】 實施例142：如實施例139之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物。

【0332】 實施例143：如實施例142之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0333】 實施例144：如實施例137之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：177和SEQ ID NO：178所組成之群組的序列。

【0334】 實施例145：如實施例144之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160和SEQ ID NO：161所組成之群組。

【0335】 實施例146：如實施例136至145中任一項之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物包括在檢測探針寡聚物核苷酸序列的至少一個核苷酸殘基成

員上的2'甲氧基修飾體。

【0336】 實施例147：如實施例136至146中任一項之檢測探針寡聚物，其中，該檢測探針寡聚物包括標記物。

【0337】 實施例148：如實施例147之檢測探針寡聚物，其中，該標記物是化學發光標記物或螢光標記物。

【0338】 實施例149：如實施例148之檢測探針寡聚物，其中，該標記物是化學發光吡啶酯(AE)化合物，其聯結在該檢測探針寡聚物之兩個核鹼基之間。

【0339】 實施例150：如實施例148之檢測探針寡聚物，其中，該可檢測的探針包括螢光標記物和淬滅劑。

【0340】 實施例152：如實施例150之檢測探針寡聚物，其中，該可檢測的探針係選自由分子炬、分子信標和TaqMan檢測探針組成之群組。

【0341】 實施例153：如實施例136至152中任一項之檢測探針寡聚物，其中，該可檢測的探針進一步包括非標靶-雜交序列。

【0342】 實施例154：如實施例153之檢測探針寡聚物，其中，該可檢測的探針是分子炬或分子信標。

【0343】 實施例155：一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之至少兩種寡聚物的組合物，該寡聚物組合物包括至少兩種實施例136之檢測探針寡聚物。

【0344】 實施例156：如實施例155之寡聚物組合物，其中，該至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物，其中，

(A)該第一檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：175或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列；且

(B)該第二檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在SEQ ID

NO：197或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括SEQ ID NO：176或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列。

**【0345】** 實施例157：如實施例156之寡聚物組合物，其中，

該第一檢測探針寡聚物包括SEQ ID NO：157或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列；且

該第二檢測探針寡聚物包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：148和SEQ ID NO：152所組成之群組的標靶-雜交序列。

**【0346】** 實施例158：一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之捕獲探針寡聚物，該捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，該標靶-雜交序列的長度為至多約30個鄰接核苷酸，且包括選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，該序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

**【0347】** 實施例159：如實施例158之捕獲探針寡聚物，其中，該捕獲探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：11至SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所組成之群組的序列，該序列包含其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物。

**【0348】** 實施例160：一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之至少兩種寡聚物的組合物，其中，該寡聚物組合物包括至少兩種實施例158之捕獲探針寡聚物。

**【0349】** 實施例161：如實施例160之寡聚物組合物，其中，該至少兩種捕獲探針寡聚物包括

包含SEQ ID NO：19或其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第一捕獲探針寡聚物；以及

包含SEQ ID NO：20或其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之標靶-雜交序列的第二捕獲探針寡聚物。

【0350】 實施例162：一種套組，其包括如實施例73至135、155至157、160和161中任一項之至少兩種寡聚物的組合物。

【0351】 實施例163：一種反應混合物，其包括如實施例73至135、155至157、160和161中任一項之至少兩種寡聚物的組合物。

【0352】 實施例164：一種用於特異性擴增樣品中瘧原蟲物種核酸的如實施例73至135中任一項之至少兩種寡聚物的組合物的用途。

【0353】 實施例165：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的如實施例136至157中任一項之檢測探針寡聚物或寡聚物組合物的用途。

【0354】 實施例166：一種用於特異性從樣品中捕獲瘧原蟲物種核酸之如實施例158至161中任一項之捕獲探針寡聚物或寡聚物組合物的用途。

【0355】 實施例167：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法，該方法包括以下步驟：

(1) 使樣品與用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種寡聚物接觸，該樣品疑似含有瘧原蟲物種核酸，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：185的序列中，且包括SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，該標靶-雜交序列包含在SEQ ID NO：188的序列中，且包括SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列；

(2) 進行體外核酸擴增反應，其中將該樣品中存在的任何瘧原蟲標靶核酸用作為產生擴增產物的模板；以及

(3) 檢測該擴增產物的存在或不存在，從而指示該樣品中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。

【0356】 實施例168：如實施例167之方法，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46、SEQ ID NO：183和SEQ ID NO：184所組成之群組。

【0357】 實施例169：如實施例168之方法，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：186的序列中。

【0358】 實施例170：如實施例169之方法，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184。

【0359】 實施例171：如實施例167至170中任一項之方法，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84和SEQ ID NO：182。

【0360】 實施例172：如實施例167之方法，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184，且(b)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：182。

【0361】 實施例173：如實施例167至172中任一項之方法，其中，檢測步驟(3)包括使體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸，該至少一種檢測探針寡聚物包括經配置為在判定擴增產物的存在或不存在的條件下來特異性地雜交到擴增產物的標靶-雜交序列，從而指示該樣品中瘧原蟲物種的存在或不存在。

【0362】 實施例174：如實施例173之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包

含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191所組成之群組的序列。

**【0363】** 實施例175：如實施例174之方法，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID NO：143所組成之群組。

**【0364】** 實施例176：如實施例173之方法，其中，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：

(A) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(B) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：127或其互補序列，或SEQ ID NO：127或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(C) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：128或其互補序列，或SEQ ID NO：128或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(D) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：143或其互補序列，或SEQ ID NO：143或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(E) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：129或其互補序列，或SEQ ID NO：129或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或

(F) SEQ ID NO：184、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

**【0365】** 實施例177：一種用於判定樣品中是否存在瘧原蟲物種的至少兩種寡聚物之組合物，該寡聚物組合物包括用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種擴增寡聚物，其中，該至少兩種擴增寡聚物包括：

(a)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，其包含在SEQ ID NO：185的序列中，

且包括SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及

(b)包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，其包含在SEQ ID NO：188的序列中，且包括SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。

**【0366】** 實施例178：如實施例177之寡聚物組合物，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46、SEQ ID NO：183和SEQ ID NO：184所組成之群組。

**【0367】** 實施例179：如實施例178之寡聚物組合物，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係包含在SEQ ID NO：186的序列中。

**【0368】** 實施例180：如實施例179之寡聚物組合物，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184。

**【0369】** 實施例181：如實施例177至180中任一項之寡聚物組合物，其中，(b)中的該標靶-雜交序列係選自由SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84和SEQ ID NO：182所組成之群組。

**【0370】** 實施例182：如實施例177之寡聚物組合物，其中，(a)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：183或SEQ ID NO：184，且(b)中的該標靶-雜交序列係SEQ ID NO：182。

**【0371】** 實施例183：如實施例177至182中任一項之寡聚物組合物，其進一步包括至少一種檢測探針寡聚物，該檢測探針寡聚物包括經配置為與可被該至少兩種擴增寡聚物擴增的瘧原蟲物種標靶區域特異性雜交的標靶-雜交序列。

**【0372】** 實施例184：如實施例183之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列的長度為約13至約40個核苷酸，且係(i)包含在SEQ ID NO：189或其互補序列，或其DNA等同物或其DNA/RNA嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA等同物之SEQ ID NO：190和SEQ ID NO：191所組成之群組的序列。



【0373】 實施例185：如實施例184之寡聚物組合物，其中，該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其DNA等同物及其DNA/RNA嵌合物之SEQ ID NO：125至SEQ ID NO：130和SEQ ID NO：143所組成之群組。

【0374】 實施例186：如實施例183之寡聚物組合物，其中，(a)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、(b)中的該擴增寡聚物標靶-雜交序列、和該檢測探針寡聚物標靶-雜交序列各自為：

(A) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(B) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：127或其互補序列，或SEQ ID NO：127或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(C) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：128或其互補序列，或SEQ ID NO：128或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(D) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：143或其互補序列，或SEQ ID NO：143或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；

(E) SEQ ID NO：183、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：129或其互補序列，或SEQ ID NO：129或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物；或

(F) SEQ ID NO：184、SEQ ID NO：182和SEQ ID NO：126或其互補序列，或SEQ ID NO：126或其互補序列之DNA等同物或DNA/RNA嵌合物。

【0375】 實施例187：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢測探針寡聚物，該檢測探針寡聚物包括長度為至少約13個核苷酸的標靶-雜交序列，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，該寡聚物組合物包含第一瘧原蟲特異性擴增寡聚物和第二瘧原蟲特異性擴增寡聚物，其中，

(a)該第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，其包含在SEQ ID NO：185的序

列中，且包括SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46或SEQ ID NO：187的序列；及

(b)該第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，其包含在SEQ ID NO：188中，且包括SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84或SEQ ID NO：182的序列。

【0376】 實施例188：一種套組，其包括如實施例177至186中任一項之至少兩種寡聚物的組合物。

【0377】 實施例189：一種反應混合物，其包括如實施例177至186中任一項之至少兩種寡聚物的組合物。

【0378】 實施例190：一種用於特異性擴增樣品中瘧原蟲物種核酸的如實施例177至186中任一項之至少兩種寡聚物的組合物的用途。

【0379】 實施例191：一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸的如實施例177至187中任一項之檢測探針寡聚物或寡聚物組合物的用途。

【0380】 從前述內容可以理解，儘管本文出於說明的目的已經描述本發明的特定實施例，但是在不背離本發明之精神和範圍可以進行各種修改。因此，本發明不受隨附申請專利範圍的限制。本文引用的所有出版物、專利和專利申請案出於所有目的均藉由引用整體併入本文。

#### 【符號說明】

無。

## 【序列表】

<110> 美商簡 探針公司 (GEN-PROBE INCORPORATED)

<110> 美商格里佛診斷方法股份有限公司 (GRIFOLS DIAGNOSTIC SOLUTIONS INC.)

<120> 用於檢測瘧原蟲物種核酸之組成物及方法

<130> 108P002008TW

<140> 108146097

<141> 2019-12-17

<150> US 62/782,945

<151> 2018-12-20

<160> 197

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(55)

<400> 1

ggauugggua auuugcgcgc cctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

55

<210> 2

<211> 61

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (29)..(61)

<400> 2  
caagaaagag cuaucaaucu gucaaucctt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

a 61

<210> 3  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (27)..(59)

<400> 3  
cccguguuga gucaauuaa gccgcattta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 59

<210> 4  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(55)

<400> 4

ggguaauuug cgcgccugcu gctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

55

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (27)..(59)

<400> 5

uuucucaggc ucccucuccg gaucgttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

59

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (25)..(57)

<400> 6

acaucugaau acgaaugucc ccaatttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

57

<210> 7

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (24)..(56)

<400> 7

cuagucggca uaguuaugg uuatttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

56

<210> 8

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (25)..(57)

<400> 8

aaaaacggcc augcaucacc aucctttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

57

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (22)..(54)

<400> 9

uaggccaaua ccuaccguc ctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

54

<210> 10

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 10

aaagacuuug auuucucuca aggtttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

56

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 11

ggauugggua auuugcgcg c c

22

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 12

caagaaagag cuaucaaucu gucaaucc

28

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 13

cccguguuga gucaauuaa gccgca

26

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>



<223> 合成的寡核苷酸

<400> 14

ggguaauuug cgcgccugcu gc

22

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 15

uuucucaggc ucccucuccg gaaucg

26

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 16

acaucugaau acgaaugucc ccaa

24

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 17 cuagucggca uaguuuaugg uua	23
<210> 18 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 18 aaaaacggcc augcaucacc aucc	24
<210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 19 uaggccaaua cccuaccguc c	21
<210> 20 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的寡核苷酸	
<400> 20 aaagacuuug auuucucuca agg	23

<210> 21  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸  
  
 <400> 21  
 aatactacag catgg 15  
  
 <210> 22  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸  
  
 <400> 22  
 ggaaggcagc aggcgcgta 19  
  
 <210> 23  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸  
  
 <400> 23  
 aatactacag catgga 16

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 24

aatactacag catggaa

17

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 25

atactacagc atggaata

18

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 26

attcagatgt cagaggtga

19

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 27

gtattcagat gtcagaggtg a

21

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 28

gttacgatta ataggagt

18

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 29

gttacgatta ataggagta

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 30

gttacgatta ataggagtag

20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 31

gttacgatta ataggagtag c

21

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 32

aatactacag catggaat

18

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 33

aatactacag catggaata

19

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 34

tacgattaat aggagt

16

<210> 35

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 35

tactacagca tggaata

17

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 36  
tattcagatg tcagaggtga 20

<210> 37  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 37  
tcagtnccctt atgagaaatc 20

<210> 38  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 38  
tggcttagtt acgatt 16

<210> 39  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列



<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 39

tggcttagtt acgattaata g

21

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 40

ttaataggag tagcttgggg

20

<210> 41

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 41

ttacgattaa taggagt

17

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 42

ttcagatgtc agaggtga

18

<210> 43

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 43

ttggcttagt tacgat

16

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 44

ttggcttagt tacgatta

18

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 45  
ttggggacat tcgtattcag a 21

<210> 46  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 46  
ttagattgc ttccttcagt 20

<210> 47  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 47  
tttgaatact anagca 16

<210> 48  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 48

acattcgtat tcagatgtca g

21

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 49

cttagttacg attaatagga

20

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 50

cgattaatag gagtagcttg g

21

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 51

cttagttacg attaatagga gtag

24

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 52

cttgaatact ncagca

16

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 53

ggcttagtta cgatta

16

<210> 54

<211> 15

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 54  
aatactanag catgg 15

<210> 55  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 55  
aatactanag catggaata 19

<210> 56  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 56

aattctaaag aagagag

17

<210> 57

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 57

aatttaatac gactcactat agggagattc actcccttaa ctttcgttct tg

52

<210> 58

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 58  
 aatttaatac gactcactat agggagactt gattaatgga agtattttag a 51

<210> 59  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 59  
 aatttaatac gactcactat agggagactt aactttcggtt cttgattaat ggaagt 56

<210> 60  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 60  
 aatttaatac gactcactat agggagacct actcttgtct taaacta 47



<210> 61  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 61  
 aatttaatac gactcactat agggagaaaa cggccatgca tcaccatcca aga 53

<210> 62  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 62  
 aatttaatac gactcactat agggagactc ccttaacttt cgttcttgat taatggaagt 60

<210> 63  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 63

aatttaatac gactcactat agggagacga cggatatctga tcgtcttcac tccc

54

<210> 64

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 64

aatttaatac gactcactat agggagactt aactttcggtt cttgattaat ggaag

55

<210> 65

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 65

aatttaatac gactcactat agggagactt aactttcggtt cttgattaat ggaagta

57

<210> 66

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 66

aatttaatac gactcactat agggagacac tcccttaact ttcgttcttg attaatg

57

<210> 67

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 67  
aatttaatac gactcactat agggagacac tcccttaact ttcgttcttg attaatgg 58

<210> 68  
<211> 56  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> 啟動子  
<222> (1)..(27)

<400> 68  
aatttaatac gactcactat agggagactt cactccctta actttcgttc ttgatt 56

<210> 69  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> 啟動子  
<222> (1)..(27)

<400> 69  
aatttaatac gactcactat agggagactt cactccctta actttcgttc ttgat 55

<210> 70  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 70  
 aatttaatac gactcactat agggagaatc gtcttcactc ccttaacttt cgttc 55

<210> 71  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<400> 71  
 aatttaatac gactcactat agggagactc ccttaacttt cgttcttgat taatg 55

<210> 72  
 <211> 53  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 72

aatttaatac gactcactat agggagatca ctcccttaac ttctgttctt gat 53

<210> 73

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 73

aatttaatac gactcactat agggagaccc ttaactttcg ttcttgatta atg 53

<210> 74

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 74

aatttaatac gactcactat agggagactt aactttcggtt cttgattaat g

51

<210> 75

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 75

aatttaatac gactcactat agggagataa ctttcggttct tgattaatg

49

<210> 76

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 76

aatttaatac gactcactat agggagaact cccttaactt tcgttcttga t

51

<210> 77

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 77

aatttaatac gactcactat agggagatcc ctttaactttc gttcttgat

49

<210> 78

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<220>

<221> misc\_feature



<222> (51)..(51)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 78

aatttaatac gactcactat agggagaagg caaatgcttt cgcagttgtt ngctct 55

<210> 79

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> 啟動子

<222> (1)..(27)

<400> 79

aatttaatac gactcactat agggagaagg caaatgcttt cgcagttgtt tgtct 55

<210> 80

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 80

ttcactccct taactttcgt tcttg 25

<210> 81

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 81

cttgattaat ggaagtattt taga

24

<210> 82

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 82

cttaactttc gttcttgatt aatggaagt

29

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 83

cctactcttg tcttaaacta

20

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 84

aaacggccat gcatcaccat ccaaga

26

<210> 85

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 85

ctcccttaac tttcgttctt gattaatgga agt

33

<210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 86

cgacggtatc tgatcgtctt cactccc

27

<210> 87

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 87

cttaactttc gttcttgatt aatggaag

28

<210> 88

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 88

cttaactttc gttcttgatt aatggaagta

30

<210> 89

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 89

cactccctta actttcgttc ttgattaatg

30

<210> 90

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 90  
cactccctta actttcgttc ttgattaatg g 31

<210> 91  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 91  
cttcaactccc ttaactttcg ttcttgatt 29

<210> 92  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 92  
cttcaactccc ttaactttcg ttcttgat 28

<210> 93  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 93  
atcgtcttca ctcccctaac tttcgttc 28

<210> 94

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 94

ctcccttaac ttctgttctt gattaatg

28

<210> 95

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 95

tcactccctt aactttcggtt cttgat

26

<210> 96

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 96

cccttaactt tcgttcttga ttaatg

26

<210> 97

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 97

cttaactttc gttcttgatt aatg

24

<210> 98

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 98

taactttcgt tcttgattaa tg

22

<210> 99

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 99

actcccttaa ctttcgttct tgat

24

<210> 100

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 100

tcccttaact ttcgttcttg at

22

<210> 101

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (24)..(24)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 101

aggcaaatgc tttcgcagtt gttngtct

28

<210> 102

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 102

aggcaaatgc tttcgcagtt gtttgtct

28



<210> 103  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 103  
 cgcgcaagcg agaaagcgcg 20

<210> 104  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 104  
 gcucgcauuc gcgcaagcga gc 22

<210> 105  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 105  
 gcuugcgagu auucgcgcaa gc 22

<210> 106  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 106  
 ggcaagcgag aaagucuugc c

21

<210> 107  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 107  
 ccgagguauu cgcgcaacuc gg

22

<210> 108  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 108  
 ggucacuuu cucgcuugga gcc

23

<210> 109  
 <211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 109

cucuggagac naggaccaga g

21

<210> 110

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 110

gucucauuuu cuggagac

18

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 111

gccuaaaaua cuuccuaggc

20

<210> 112  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 112  
 cauggaaaua cuuccaug

18

<210> 113  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 113  
 ccgagauuuu cuggagaccu cgg

23

<210> 114  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 114  
 ccgaggccua aaauacuucc cucgg

25

<210> 115  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 115  
 gggaauuuuaa aaccuuccc 19

<210> 116  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 116  
 ggaaggaauu uaaaaccuuc c 21

<210> 117  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 117  
 gugggaauuu aaaacccccca c 21

<210> 118  
 <211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 118

uccagaaauu cuuagauuuu cugga

25

<210> 119

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 119

acuccgaacg aaaguuaagg gagu

24

<210> 120

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 120

agggagugaa gacgaucauc ccu

23

<210> 121

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 121

ucgcgcaagc gagaaaggcg cga

23

<210> 122

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 122

ccgaagugnc uaaaauacuu cgg

23

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 123

caccucagau gucagaggug

20

<210> 124  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 124  
 cuaccucuaa agaagagagg uag

23

<210> 125  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 125  
 cgcgcaagcg agaaag

16

<210> 126  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 126  
 auucgcgcaa gcgagc

16

<210> 127  
 <211> 16



<212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 127  
 gaguauucgc gcaagc

16

<210> 128  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 128  
 ggcaagcgag aaagu

15

<210> 129  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 129  
 guauucgcgc aa

12

<210> 130  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 130

acuuucucgc uug

13

<210> 131

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 131

cucuggagac nagca

15

<210> 132

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 132

auuuucugga gac

13

<210> 133  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 133  
 gccuaaaaua cuucc

15

<210> 134  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 134  
 aaauacuucc aug

13

<210> 135  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 135  
 auuuucugga gac

13

<210> 136  
 <211> 13

<212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 136  
 ccuaaaauac uuc

13

<210> 137  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 137  
 gggaauuuuaa aacc

14

<210> 138  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 138  
 ggaauuuuaaa accuucc

17

<210> 139  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 139

gugggaauuu aaaacc

16

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 140

gaaauucuua gauuuucugg a

21

<210> 141

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 141

gaacgaaagu uaagggagu

19

<210> 142

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 142

agggagugaa gacgauca

18

<210> 143

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 143

ucgcgcaagc gagaaag

17

<210> 144

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 144

ugncuaaaau acuucgg

17

<210> 145

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 145

cagaugucag aggug

15

<210> 146

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 146

ucuaaagaag agagguag

18

<210> 147

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 147

ucuuagauuu ucuggagac

19

<210> 148

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 148

uucagauguc agagg

15

<210> 149

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 149

uucagauguc agaggt

16

<210> 150

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 150

uauucagaug ucagaggt

18

<210> 151

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>



<223> 合成的寡核苷酸

<400> 151

uauucagaug ucagaggug

19

<210> 152

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 152

ucagauguca gaggt

15

<210> 153

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 153

uucagauguc agaggt

16

<210> 154

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 154  
 auucagaugu cagaggt 17

<210> 155  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 155  
 auucagaugu cagaggug 18

<210> 156  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 156  
 cuuagauuuu cuggaga 17

<210> 157  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 157  
 cuuagauuuu cuggagac 18

<210> 158  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 158  
 cuuaguuacg auuaauagga

20

<210> 159  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 159  
 guauucagau gucagaggug a

21

<210> 160  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 160  
 auucuuagau uuucuggaga c

21

<210> 161  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 161  
 cuaagauuuu cuggagac

18

<210> 162  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 162  
 tttgaatact anagcatgga ata

23

<210> 163  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 163

tactanagca

10

<210> 164

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 164

tttgaatact acagcatgga ata

23

<210> 165

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 165

tactacagca

10

<210> 166

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 166

ttggcttagt tacgattaat aggagtagct tgggg

35

<210> 167

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 167

ttaataggag t

11

<210> 168

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 168

ggcttagtta cgat

14

<210> 169

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 169

cgacggtatc tgatcgtctt cactccctta actttcgttc ttgattaatg gaagtathtt 60

aga 63

<210> 170

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 170

atcgtcttca ctcccttaac ttctgttctt gattaatgga agtatttttag a 51

<210> 171

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 171

cttgattaat g 11

<210> 172

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 172

taactttcgt tc

12

<210> 173

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 173

cttcactccc

10

<210> 174

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 174

ucagauguca gagg

14

<210> 175

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸



<400> 175  
cuaagauuuu cuggaga 17

<210> 176  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 176  
cagaugucag agg 13

<210> 177  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> y 表示 t/u 或 c

<400> 177  
yucuggagac 10

<210> 178  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的寡核苷酸

&lt;400&gt; 178

auuuucugga

10

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的寡核苷酸

&lt;400&gt; 179

aatttaatac gactcactat agggaga

27

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 2087

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Plasmodium falciparum

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; XR\_002273081.2

&lt;309&gt; 2018-03-28

&lt;313&gt; (1)..(2087)

&lt;400&gt; 180

aacctggttg atcttgccag tagtcatatg ctgtctcaa agattaagcc atgcaagtga 60

aagtatatat atatattata ttagaaact gcgaacggct cattaaaaca gttatagtct 120

acttgacatt ttattataa ggataactac ggaaaagctg tagctaatac ttgctttatt 180

atcctttgat tttatcttt ggataagtat ttgttaggcc ttataagaaa aaagttatta 240

第 64 頁，共 79 頁(序列表)

108P002008TW

acttaaggaa ttataacaaa gaagtaacac gtaataaatt tattttattt agtgtgtatc 300  
 aatcgagttt ctgacctatc agcttttgat gttagggtat tggcctaaca tggctatgac 360  
 gggtaacggg gaattagagt tcgattccgg agagggagcc tgagaaatag ctaccacatc 420  
 taaggaaggc agcaggcgcg taaattaccc aattctaaag aagagaggta gtgacaagaa 480  
 ataacaatgc aaggccaatt tttggttttg taattggaat ggtgggaatt taaaaccttc 540  
 ccagagtaac aattggaggg caagtctggt gccagcagcc gcggtaatc cagctccaat 600  
 agcgtatatt aaaattggtg cagttaaac gctcgtagtt gaatttcaa gaatcgatat 660  
 tttattgtaa ctattctagg ggaactatct tagctttcgc ttaatacgc ttcctctatt 720  
 attatgttct ttaaataaca aagattcttt ttaaaatccc cacttttgct tttgcttttt 780  
 ggggattttg ttactttgag taaattagag tgttcaaagc aaacagttaa agcatttact 840  
 gtgtttgaat actatagcat ggaataacaa aattgaacaa gctaaaattt tttgttcttt 900  
 tttcttattt tggcttagtt acgattaata ggagtagctt ggggacattc gtattcagat 960  
 gtcagaggtg aaattcttag attttctgga gacgaacaac tgcgaaagca tttgtctaaa 1020  
 atacttccat taatcaagaa cgaaagttaa gggagtgaag acgatcagat accgtcgtaa 1080  
 tcttaacat aaactatgcc gactaggtgt tggatgaaag tgttaaaaat aaaagtcac 1140  
 tttcgaggtg acttttagat tgcttccttc agtaccttat gagaaatcaa agtctttggg 1200  
 ttctggggcg agtattcgcg caagegagaa agttaaaga attgacggaa gggcaccacc 1260  
 aggcgtggag cttgcggctt aatttgactc aacacgggga aactcactag ttttaagaaa 1320  
 gagtaggatt gacagattaa tagctctttc ttgatttctt ggatggtgat gcatggccgt 1380

ttttagttcg tgaatatgat ttgtctgggtt aattccgata acgaacgaga tcttaacctg 1440  
 ctaattagcg gcgagtacac tatattctta ttgaaattg aacataggta actatacatt 1500  
 tattcagtaa tcaaattagg atatTTTTat taaaatatcc tttccctgt tctactaata 1560  
 atttgTTTT tactctatTT ctctcttctt ttaagaatgt acttgcttga ttgaaaagct 1620  
 tcttagagga acattgtgtg tctaacacaa ggaagttaa ggcaacaaca ggtctgtgat 1680  
 gtccttagat gaactaggct gcacgcgtgc tacactgata tatataacga gTTTTaaaa 1740  
 atatgcttat atttgTatct ttgcttatat ttTgcatact tttcctccgc cgaaaggcgt 1800  
 aggtaatctt tatcaatata tatcgtgatg gggatagatt attgcaatta ttaatcttga 1860  
 acgaggaatg cctagtaagc atgattcadc agattgtgct gactacgtcc ctgccctttg 1920  
 tacacaccgc ccgtcgctcc taccgattga aagatatgat gaattgtttg gacaagaaaa 1980  
 attgaattat attctTTTT tttctggaaa aaccgtaaat cctatctttt aaaggaagga 2040  
 gaagtcgtaa caaggtttcc gtaggtgaac ctgCGgaagg atcatta 2087

<210> 181  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> 啟動子  
 <222> (1)..(27)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (43)..(43)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 181

aatttaatac gactcactat agggagatca agaaagagct atnaatctgt caatcc

56

<210> 182

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 182

tcaagaaaga gctatnaatc tgtcaatcc

29

<210> 183

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 183

gaaatcaaag tctttgggtt ctg

23

<210> 184  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 184  
 caaagtcttt gggttctgg

19

<210> 185  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 185  
 tttagattgc ttccttcagt nccttatgag aaatcaaagt ctttgggttc tgg

53

<210> 186  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 186

gaaatcaaag tctttgggtt ctgg

24

<210> 187

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 187

caaagtcttt gggttctg

18

<210> 188

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (44)..(44)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 188

aaacggccat gcatcacat ccaagaaatc aagaaagagc tatnaatctg tcaatcctac

60

tcttgtctta aacta

75

<210> 189  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> s 表示 g 或 c

<400> 189  
 gaguauucgs gcaagcgaga aagu

24

<210> 190  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 190  
 auucgcgcaa

10

<210> 191

<400> 191  
 000

<210> 192  
 <211> 1557  
 <212> DNA



<213> Plasmodium vivax

<300>

<308> JQ627153.1

<309> 2012-08-14

<313> (1)..(1557)

<400> 192

caaagattac gccatgcaag tgaaggtata tgcatatfff atatgtagaa actgcgaacg	60
gctcattaaa acagttataa tctacttgac atfffftcta taaggataac tacggaaaag	120
ctgtagctaa tacttgctff agcactcttg atfcattfct tgagtgtgta cttgttaagc	180
ctfftaagaa aaaagttatt aacttaagga attataacaa agaagcgcaca cgtaatggat	240
ccgtccatff ttagtgtgta tcaatcgagt ffctgaccta tcagctfftg atgttagggf	300
attggcctaa catggctatg acgggtaacg gggaattaga gttcgattcc ggagagggag	360
cctgagaaat agctaccaca tctaaggaag gcagcaggcg cgtaaattac ccaattctaa	420
agaagagagg tagtgacaag aaataacaat acaaggccaa tctggctffg taattggaat	480
gatgggaatt taaaaccttc ccaaaactca attggagggc aagtctggf g ccagcagccg	540
cgtaattcc agctccaata gcgtatatta aaattgffg agffaaaacg cfcgtagffg	600
aattfcaaag aatcgatatt ftaagcaacg cffctagcft aatccacata actgatactf	660
cgtatcgact ffgtgcgcat fffgctatta fgtgffctff taattaaaat gattctffff	720
aaggactff c fffgctfcgg cffggaatcc cffgffactf fgagftaaatt agagffgffca	780
aagcaaacag atatagcatt gcgcgfffga atactacagc atggaataac aaaattgaac	840
aagfcagaat fffgffctff fffctfafff fggcfftagff acgafftaata ggagffagcft	900

gggggcattt gtattcagat gtcagagggtg aaattcttag attttctgga gacaaacaac 960  
 tgcgaaagca ttigcctaaa atacttccat taatcaagaa cgaaagttaa gggagtgaag 1020  
 acgatcagat accgtcgtaa tcttaacat aaactatgcc gactaggctt tggatgaaag 1080  
 attttaaaat aagaattttc tcttcggagt ttattcttag attgcttctt tcagtgcctt 1140  
 atgagaaatc aaagtctttg ggttctgggg cgagtattcg cgcaagcgag aaagttaaaa 1200  
 gaattgacgg aagggcacca ccaggcgtgg agcttgccgc ttaatttgac tcaacacggg 1260  
 aaaactcact agtttaagac aagagtagga ttgacagatt aatagctctt tcttgatttc 1320  
 ttggatggtg atgcatggcc gtttttagtt cgtgaatatg atttgtctgg ttaattccga 1380  
 taacgaacga gatcttaacc tgctaattag cggcaaatac gatataattct tacgtgggac 1440  
 tgaattcggg tgatttgctt actttgaaga aaatattggg atacgtaaca gtttcccttt 1500  
 cccttttcta cttagttcgc ttttcatact gtttcttttt cgcgtaagaa tgtattt 1557

<210> 193  
 <211> 2096  
 <212> DNA  
 <213> 諾氏瘧原蟲

<300>  
 <308> L07560.1  
 <309> 2008-10-02  
 <313> (1)..(2096)

<400> 193  
 aacctgggtg atcttgccag tagtcatatg ctgtctcaa agattaagcc atgcaagtga 60  
 aagtatatgc atattttata tgtagaact gcgaacggct cattaaaaca gttataatct 120

acttgacatt ttctatataa ggataactac ggaaaagctg tagctaatac ttgcttttagc	180
actcttgatt tctttcttga gtgtgtactt gttaagcctt ataagaaaag agttattaac	240
ttaaggaatt ataacaaaga agtaacacgt aatggattct tccatTTTTA gtgtgtatca	300
atcgagtTTC tgacctatca gcttttgatg ttagggTatt ggcctaacaT ggctatgacg	360
ggtaacgggg aattagagtt cgattccgga gagggagcct gagaaatagc taccacatct	420
aaggaaggca gcaggcgcgt aaattacca attctaaaga agagaggtag tgacaagaaa	480
taacaataca aggccaatct ggctttgtaa ttggaatgat gggaatttaa aaccttccca	540
aaattcaatt ggagggcaag tctggTgcca gcagccgcgg taattccagc tccaatagcg	600
tatattaaaa ttgtTgcagt taaaacgctc gtagttgaat ttcaaagaat cgatatttta	660
agcaacgctt ctagctataa atccacataa ctgatgcctc cgcgtatcga cttTgtgcgc	720
atTTtagcta ttatgtgttc tTTtaattaa aatgattctt tTTaagattc atctattaaa	780
aattcgcttc ggcataattt tTTtgatgat ctTgttactt tgagtaaatt agagtgttca	840
aagcaaacag atatagcatt tgtgcgtTtg aatactacag catggaataa caaattgaa	900
caagtcagaa tTTTTTgtt cTTTTTctt atTTTggctt agttacgatt aataggagta	960
gctTgggggc attTgtattc agatgtcaga ggtgaaattc ttagattTtc tggagacaaa	1020
caactgcgaa agcattTgcc taaaatactt ccattaatca agaacgaaag ttaagggagt	1080
gaagacgatc agataccgTc gtaatcttaa ccataaacta tgccgactag gctTtgatg	1140
aaagatttta aaataagagt tTTtctTtTc tctccggaga ttagaactct tagattgctt	1200
cctTcagTgc cttatgagaa atcaaagtct ttgggtTctg gggcgagtat tcgcgcaagc	1260

gagaaagtta aaagaattga cggaagggca ccaccaggcg tggagcttgc ggcttaattt 1320  
 gactcaacac gggaaaactc actagtttaa gacaagagta ggattgacag attaatagct 1380  
 ctttcttgat ttcttggatg gtgatgcatg gccgttttta gttcgtgaat atgatttgtc 1440  
 tggttaattc cgataacgaa cgagatctta acctgctaata tagcggcaaa tacgatatat 1500  
 tcttatgtag aattgaatat agtggatttg ttagattttg aagaaaatat tggattacg 1560  
 ttaaagtga ttcccttccc ttttctactt aatttacatt tccatctatt tcttttttgc 1620  
 gtatgaatgt atttgcttga ttgtaaagct tcttagagga acgatgtgtg tctaacacaa 1680  
 ggaagttaa ggcaacaaca ggtctgtgat gtccttagat gaactaggct gcacgcgtgc 1740  
 tacactgata tgtataacga gttactaaaa ttacgatttt agctgcttgc agtttatattt 1800  
 cgtacttttc ctccactgaa aagtgtaggt aatctttatc aatacatatc gtgatgggga 1860  
 tagattattg caattattaa tcttgaacga ggaatgccta gtaagcatga ttcacagat 1920  
 tgtgctgact acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt cgctcctacc gattgaaaga 1980  
 tatgatgaat tgtttggaca agaaaaaatt ggattatatac tttttttttg gaaaaaccgt 2040  
 aaatcctatc ttttaaagga aggagaagtc gtaacaaggt ttccgtaggt gaattc 2096

<210> 194  
 <211> 2091  
 <212> DNA  
 <213> 卵形瘧原蟲

<300>  
 <308> AB182491.1  
 <309> 2007-07-24  
 <313> (1)..(2091)

&lt;400&gt; 194

aacctggttg atcttgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcaagtga 60  
aagtatatgc atatittata tgtagaaact gcgaacggct cattaaaaca gttataatct 120  
acttgacatt tctacttaca aggataacta cggaaaagct gtagctaata cttgctttaa 180  
tacgtttgat tcatttttgt ctcttacgta tgtacttggt aagcctttaa gagaaaagtt 240  
tacaacttaa ggaattataa caaagaagta acacataata agtttacctt atttagtgtg 300  
tatcaatcga gtttctgacc tctcagcttt tgatgtagg gtattggcct aacatggcta 360  
tgacgggtaa cggggaatta gagttcgatt ccggagaggg agcctgagaa atagctacca 420  
catctaagga aggcagcagg cgcgtaaatt acccaattct aaagaagaga ggtagtgaca 480  
agaaataaca atacaaggcc atttcatggt tttgtaattg gaatgatggg aatttaaac 540  
cttcccaaaa ttcaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc 600  
aatagcgtat attaaaattg ttgcagttaa aacgctcgta gttgaatttc aaagaatcaa 660  
tattttaagt aatgcttttg gtataagatg cttaggcaat acaacgtatc tgctctttgc 720  
attccttacc caaatgtgt tcttattata aaaaggattc tttttaaat ctcccttact 780  
ttttgtactg gagatitttg tactttgagt aaattagagt gttcaaagca aacagttaa 840  
gcattttact gcgtttgaat actacagcat ggaataacaa aattgaacaa gtcaaaactc 900  
tgttcttttt tcttattttg gcttagttac gattaatagg agtagcttgg gggcatttgg 960  
attcagatgt cagaggtgaa attccttagat tttctggaga caaacaactg cgaaagcatt 1020  
tgccataaat acttccatta atcaagaacg aaagttaagg gagtgaagac gatcagatac 1080

第 75 頁，共 79 頁(序列表)

108P002008TW

cgfcgtaatc ttaaccataa actatgccga ctaggttttg gatgaaagat ttttaaataa 1140  
 gaaaattcct ttgggaaatt tcttagattg ctcccttcag taccttatga gaaatcaaag 1200  
 tctttgggtt ctggggcgag tattcgcgca agcgagaaag ttaaaagaat tgacggaagg 1260  
 gcaccaccag gcgtggagct tgcggcttaa ttgactcaa cacggggaaa ctactagtt 1320  
 taagacaaga gtaggattga cagattaata gctctttctt gatttcttgg atggtgatgc 1380  
 atggccgttt ttagttcgtg aatatgattt gtctgggtta ttccgataac gaacgagatc 1440  
 ttaacctgct aattagcggc gaatacgtta tttcctact tgaaattgaa tatagctgaa 1500  
 ttgcttatt ttgaagaata tattaggata cattatagtg tccttttccc ttttctactt 1560  
 aattcgctat tcatgctgtt tcttttttgt gtaggaatgt attcgtttga ttgtaaagct 1620  
 tcttagagga acgatgtgtg tctaacacaa ggaagttaa ggcaacaaca ggtctgtgat 1680  
 gtccttagat gaactaggct gcacgcgtgc tacactgata tgtataacga gttactaaaa 1740  
 atatactttt gtttgagtat ttatactctc tcaaatagta tacttttccct ccgccgaaag 1800  
 gtgtaggtaa tctttatcag tacatatcgt gatggggata gattattgca attattaatc 1860  
 ttgaacgagg aatgcctagt aagcatgatt catcagattg tgctgactac gtcctgccc 1920  
 ttgtacaca ccgcccgtcg ctccctaccga ttgaaagata tgatgaattg ttggacaag 1980  
 aaaaggaaa attatatttt cttttttctg gaaaaccgt aatcctatc ttttaaagga 2040  
 aggagaagtc gtaacaaggt ttccgtaggt gaacctgcgg aaggatcatt a 2091

<210> 195  
 <211> 2152  
 <212> DNA

<213> 三日癩原蟲

<300>

<308> AF487999.1

<309> 2002-05-06

<313> (1)..(2152)

<400> 195

```

aacctggttg atcttgccag tagtcatatg ctgtctcaa agattaagcc atgcaagtga      60
aagtatatgc atatittata ttagaaact gcgaacggct cattaaca gttatagtct      120
acttgacatt tttttataa ggataactac ggaaaagctg tagctaatac ttgctttaat      180
actcttaatt ctttatgttt ttgagtatg ttttgttaa gccttataag agaaaagtat      240
attaacttaa ggaatataac aaagaagtaa cacataataa atttcgattt atttagtgtg      300
tatcaatcga gttctgacc taccagcttt tgatgtagg gtattggcct aacatggcta      360
tgacgggtaa cggggaatta gagttcgatt ccggagagg agcctgagaa atagctacca      420
catctaagga aggcagcagg cgcgtaaatt acccaattct aaagaagaga ggtagtgaca      480
agaataaca atgcaaggcc aaatittggt ttgcaattg gaatgatggg aatttaaac      540
cttcccagaa ggcaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc      600
aatagcgtat attaaaattg ttgcagttaa aacgctcgta gttgaatttc aaggaatcaa      660
tattttaagt aatgctttgt atatittataa caaagttgta cattaagaat aaacgccaag      720
cgttatattt tttctgttac attttgtttt attaataat atatgcgttc ttattataaa      780
aatgattcct tttaaaattc ttttgtataa tttttatgc atgggaattt tgttactttg      840
agtaaattag agtgttcaaa gcaaacagtt aaaacagttt ctgtgtttga atactacagc      900

```

atggaataac	aaaattgaac	aagtcagaat	tttgttcttt	tttcttattt	tggttagtt	960
acgattaata	ggagtagctt	gggggcattt	gtattcagat	gtcagaggtg	aaattcttag	1020
atfttctgga	gacaagcaac	tgcgaaagca	tttgcctaaa	atacttccat	taatcaagaa	1080
cgaaagttaa	gggagtgaag	acgatcagat	accgtcgtaa	tcttaacct	aaactatgcc	1140
gactaggtgt	tggatgatag	agtaaaaaat	aaaagagaca	ttcatatgag	tgtttctttt	1200
agatagcttc	cttcagtacc	ttatgagaaa	tcaaagtctt	tgggttctgg	ggcgagtatt	1260
cgcgcaagcg	agaaagttaa	aagaattgac	ggaagggcac	caccaggcgt	ggagcttgcg	1320
gcttaatttg	actcaacacg	gggaaactca	ctagtttaag	acaagagtag	gattgacaga	1380
ttaatagctc	tttcttgatt	tcttggatgg	tgatgcatgg	ccgtttttag	ttcgtgaata	1440
tgatttgtct	ggttaattcc	gataacgaac	gagatcttaa	cctgctaatt	agcggtaaat	1500
acactatatt	cttaagtga	attagaatat	agataaattg	tgctaatttt	gattaaaata	1560
ttagaatggt	ttttttaata	aaaacgttct	tttccctttt	tttcttaatt	atgcatattt	1620
attctttttc	ttttttcgca	taagaatgta	tttgcttaat	tgtaaagctt	cttagaggaa	1680
cgatgtgtgt	ctaacacaag	gaagttaag	gcaacaacag	gtctgtgatg	tccttagatg	1740
aactaggctg	cacgcgtgct	acactgatat	gtataacgag	tatttaaaaa	tatatatctt	1800
gttatgttat	atgtatttct	atatgtatgc	atgcaaagaa	tatatagttt	tcctccactg	1860
aaaagtgtag	gtaatctttt	tcaatacata	tcgtgatggg	gatagattat	tgcaattatt	1920
aatcttgaac	gaggaatgcc	tagtaagcat	gattcatcag	attgtgctga	ctacgtccct	1980
gccctttgta	cacaccgccc	gtcgtccta	ccgattgaaa	gatatgatga	attgtttgga	2040



caaggaaaaa gggttttttt cttttttctg gaaaaatcgt aaatcctatc ttttaaagga 2100

aggagaaagt cgtaacaagg tttccgtcgg tgaacctgcg gaaggatcat ta 2152

<210> 196

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (34)..(34)

<223> y 表示 t/u 或 c

<220>

<221> misc\_feature

<222> (44)..(44)

<223> n 表示 a 或 g 或 c 或 t/u, 未知, 或其他

<400> 196

guauucagau gucagaggug aaauucuuag auuyucugga gacnagca 48

<210> 197

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 197

guauucagau gucagaggug aaauucuuag auuuucugga gac 43

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法，前述方法包括以下步驟：

(1) 使樣品與用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種擴增寡聚物接觸，前述樣品疑似含有瘧原蟲物種核酸，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，

(i) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 20 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：162 的序列中，且包含 SEQ ID NO：163 的序列；或

(ii) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 25 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：166 的序列中，且包含 SEQ ID NO：167 或 SEQ ID NO：168 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列的長度為約 15 至約 33 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：169 中，且包含 SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172 或 SEQ ID NO：173 的序列；

(2) 進行體外核酸擴增反應，其中將前述樣品中存在的任何瘧原蟲物種標靶核酸用作為產生擴增產物的模板；以及

(3) 檢測前述擴增產物的存在或不存在，從而指示前述樣品中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。

【請求項2】如請求項 1 所記載之方法，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括 (a)(i) 中的擴增寡聚物。

【請求項3】如請求項 2 所記載之方法，其中，(a)(i) 中的前述標靶-雜交序列係

選自由 SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 23 至 SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 35、SEQ ID NO : 54 和 SEQ ID NO : 55 所組成之群組，或

其中，(a)(i)中的前述標靶-雜交序列係包含在 SEQ ID NO : 164 的序列中，包括 SEQ ID NO : 165 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO : 21、SEQ ID NO : 23 至 SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 32、SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 35 所組成之群組。

**【請求項4】** 如請求項 1 所記載之方法，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括 (a)(ii)中的擴增寡聚物。

**【請求項5】** 如請求項 4 所記載之方法，其中，(a)(ii)中的前述標靶-雜交序列包括 SEQ ID NO : 167 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO : 28 至 SEQ ID NO : 31、SEQ ID NO : 34、SEQ ID NO : 40、SEQ ID NO : 41 和 SEQ ID NO : 49 至 SEQ ID NO : 51 所組成之群組。

**【請求項6】** 如請求項 4 所記載之方法，其中，(a)(ii)中的前述標靶-雜交序列包括 SEQ ID NO : 168 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO : 38、SEQ ID NO : 39、SEQ ID NO : 43、SEQ ID NO : 44 和 SEQ ID NO : 53 所組成之群組。

**【請求項7】** 如請求項 1 至 6 中任一項所記載之方法，其中，(b)中的前述標靶-雜交序列係選自由 SEQ ID NO : 80 至 SEQ ID NO : 82 和 SEQ ID NO : 85 至 SEQ ID NO : 100 所組成之群組，或

其中，(b)中的前述標靶-雜交序列係包含在 SEQ ID NO : 170 的序列中，包括 SEQ ID NO : 171 或 SEQ ID NO : 172 的序列，且視需要地選自(i)由 SEQ ID NO : 81、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87 至 SEQ ID NO : 90、SEQ ID NO : 94 和 SEQ

ID NO:96 至 SEQ ID NO:98 所組成之群組，或(ii) 由 SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85 和 SEQ ID NO : 87 至 SEQ ID NO : 100 所組成之群組。

【請求項8】如前述請求項中任一項所記載之方法，其中，(b)中的前述擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於 5'到(b)中的前述標靶-雜交序列的啟動子序列，視需要地其中，前述啟動子序列係 T7 啟動子序列，視需要地其中，(b)中的前述擴增寡聚物包括選自由 SEQ ID NO : 57 至 SEQ ID NO : 59 和 SEQ ID NO : 62 至 SEQ ID NO : 77 所組成之群組的序列。

【請求項9】如請求項 1 所記載之方法，其中，(a)和(b)中的前述標靶-雜交序列各自為：

- (A) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (B) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (C) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (D) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (E) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (F) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (G) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (H) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (I) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (J) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (K) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (L) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (M) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 95 ;

(N) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 95 ; 或

(O) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 95 。

**【請求項10】** 如請求項 1 所記載之方法，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，視需要地其中，

如(a)(ii)中的前述第一擴增寡聚物包括包含 SEQ ID NO : 167 的序列的標靶-雜交序列，視需要地其中，前述第一擴增寡聚物的前述標靶-雜交序列係 SEQ ID NO : 34 ; 且

如(a)(ii)中的前述第二擴增寡聚物包括包含 SEQ ID NO : 168 的序列的標靶-雜交序列，視需要地其中，前述第二擴增寡聚物的前述標靶-雜交序列係 SEQ ID NO : 53 。

**【請求項11】** 如請求項 1 所記載之方法，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物及如(a)(ii)中的擴增寡聚物，視需要地其中，

如(a)(i)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 164 的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括 SEQ ID NO : 165 的序列，視需要地其中，如(a)(i)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 21 的標靶-雜交序列；且

如(a)(ii)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 167 的序列，視需要地其中，如(a)(ii)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 34 的標靶-雜交序列。

**【請求項12】** 如請求項 1、10 和 11 中任一項所記載之方法，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，視需要地其中，(b)中的前述第一擴增寡聚物和前述第二擴增寡聚物各自包括 SEQ ID NO : 170 的序列中所包含的標靶-雜交序列，

且包括 SEQ ID NO : 171 或 SEQ ID NO : 172 的序列，

視需要地其中，如(b)中的前述第一擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 94 的標靶-雜交序列，且如(b)中的前述第二擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 95 的標靶-雜交序列。

**【請求項13】** 如前述請求項中任一項所記載之方法，其進一步包括在步驟(1)之前，純化來自前述樣品中的其他成分的標靶核酸，視需要地其中，前述純化步驟包括使前述樣品與至少一種捕獲探針寡聚物接觸，前述捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中，前述標靶-雜交序列的長度為至多約 30 個鄰接核苷酸，且包括選自由包含其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 11 至 SEQ ID NO : 15、SEQ ID NO : 17、SEQ ID NO : 19 和 SEQ ID NO : 20 所組成之群組的序列。

**【請求項14】** 如前述請求項中任一項所記載之方法，其中，步驟(3)中的前述檢測包括使前述體外核酸擴增反應與至少一種檢測探針寡聚物接觸，前述檢測探針寡聚物包括經配置為在判定前述擴增產物的存在或不存在的條件下與前述擴增產物特異性雜交的標靶-雜交序列，從而指示前述樣品中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。

**【請求項15】** 如請求項 14 所記載之方法，其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列的長度為約 13 至約 40 個核苷酸，且係(i)包含在 SEQ ID NO:196 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 等同物之 SEQ ID NO : 175、SEQ ID NO : 176、SEQ ID NO : 177 和 SEQ ID NO : 178 所組成之群組的序列，

視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO：131、SEQ ID NO：132、SEQ ID NO：135、SEQ ID NO：140、SEQ ID NO：145、SEQ ID NO：147 至 SEQ ID NO：157 和 SEQ ID NO：159 至 SEQ ID NO：161 所組成之群組。

**【請求項16】** 如請求項 15 所記載之方法，其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係(i)包括在 SEQ ID NO：197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO：174 或 SEQ ID NO：175 的序列，視需要地其中，

(a) 前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列(ii)包括 SEQ ID NO：174 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO：148 至 SEQ ID NO：155 和 SEQ ID NO：159 所組成之群組，或

(b) 前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列(ii)包括 SEQ ID NO：175 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO：147、SEQ ID NO：156、SEQ ID NO：157、SEQ ID NO：160 和 SEQ ID NO：161 所組成之群組。

**【請求項17】** 如請求項 15 所記載之方法，其中，前述檢測探針寡聚物的前述

標靶-雜交序列(ii)包括選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 177 和 SEQ ID NO : 178 所組成之群組的序列，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 131、SEQ ID NO : 132、SEQ ID NO : 135、SEQ ID NO : 140、SEQ ID NO : 147、SEQ ID NO : 156、SEQ ID NO : 157、SEQ ID NO : 160 和 SEQ ID NO : 161 所組成之群組。

**【請求項18】** 如請求項 15 所記載之方法，其中，前述至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物，其中，

(A) 前述第一檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在 SEQ ID NO : 197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括 SEQ ID NO : 175 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列，視需要地其中，前述第一檢測探針寡聚物包括 SEQ ID NO : 157 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之標靶-雜交序列；且

(B) 前述第二檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在 SEQ ID NO : 197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括 SEQ ID NO : 176 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列，視需要地其中，前述第二檢測探針寡聚物包括選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 148 和 SEQ ID NO : 152 所組成之群組的標靶-



雜交序列。

**【請求項19】** 如前述請求項中任一項所記載之方法，其中，步驟(2)中的前述擴增反應是等溫擴增反應，視需要地其中，前述擴增反應是轉錄介導的擴增(TMA)反應，且視需要地其中，前述擴增反應是即時擴增反應。

**【請求項20】** 一種用於判定樣品中是否存在瘧原蟲物種的至少兩種寡聚物之寡聚物組合物，前述寡聚物組合物包括用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種擴增寡聚物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，

(i) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 20 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：162 的序列中，且包含 SEQ ID NO：163 的序列；或

(ii) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 25 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：166 的序列中，且包含 SEQ ID NO：167 或 SEQ ID NO：168 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列的長度為約 15 至約 33 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：169 中，且包含 SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172 或 SEQ ID NO：173 的序列。

**【請求項21】** 如請求項 20 所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括(a)(i)中的擴增寡聚物。

**【請求項22】** 如請求項 21 所記載之寡聚物組合物，其中，(a)(i)中的前述標靶-雜交序列係選自由 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23 至 SEQ ID NO:

25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：54 和 SEQ ID NO：55 所組成之群組，或

其中，(a)(i)中的前述標靶-雜交序列係包含在 SEQ ID NO：164 的序列中，包括 SEQ ID NO：165 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：23 至 SEQ ID NO：25、SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33 和 SEQ ID NO：35 所組成之群組。

**【請求項23】** 如請求項 20 所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括(a)(ii)中的擴增寡聚物。

**【請求項24】** 如請求項 23 所記載之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的前述標靶-雜交序列包括 SEQ ID NO：167 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO：28 至 SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41 和 SEQ ID NO：49 至 SEQ ID NO：51 所組成之群組。

**【請求項25】** 如請求項 23 所記載之寡聚物組合物，其中，(a)(ii)中的前述標靶-雜交序列包括 SEQ ID NO：168 的序列，且視需要地選自由 SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：43、SEQ ID NO：44 和 SEQ ID NO：53 所組成之群組。

**【請求項26】** 如請求項 20 至 25 中任一項所記載之寡聚物組合物，其中，(b)中的前述標靶-雜交序列係選自由 SEQ ID NO：80 至 SEQ ID NO：82 和 SEQ ID NO：85 至 SEQ ID NO：100 所組成之群組，或

其中，(b)中的前述標靶-雜交序列係包含在 SEQ ID NO：170 的序列中，包括 SEQ ID NO：171 或 SEQ ID NO：172 的序列，且視需要地選自(i)由 SEQ ID NO：81、SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：85、SEQ ID NO：87 至 SEQ ID NO：90、SEQ ID NO：94

和 SEQ ID NO : 96 至 SEQ ID NO : 98 所組成之群組，或(ii) 由 SEQ ID NO : 80、SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 85 和 SEQ ID NO : 87 至 SEQ ID NO : 100 所組成之群組。

**【請求項27】** 如前述請求項中任一項所記載之寡聚物組合物，其中，(b)中的前述擴增寡聚物係啟動子引子或啟動子提供者，其進一步包括位於 5'到(b)中的前述標靶-雜交序列的啟動子序列，視需要地其中，前述啟動子序列係 T7 啟動子序列，視需要地其中，(b)中的前述擴增寡聚物包括選自由 SEQ ID NO:57 至 SEQ ID NO:59 和 SEQ ID NO : 62 至 SEQ ID NO : 77 所組成之群組的序列。

**【請求項28】** 如請求項 20 所記載之寡聚物組合物，其中，(a)和(b)中的前述標靶-雜交序列各自為：

- (A) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (B) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (C) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 82 ;
- (D) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (E) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (F) SEQ ID NO : 33 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (G) SEQ ID NO : 49 和 SEQ ID NO : 89 ;
- (H) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (I) SEQ ID NO : 30 和 SEQ ID NO : 92 ;
- (J) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (K) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (L) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 94 ;
- (M) SEQ ID NO : 21 和 SEQ ID NO : 95 ;

(N) SEQ ID NO : 34 和 SEQ ID NO : 95 ; 或

(O) SEQ ID NO : 53 和 SEQ ID NO : 95 。

**【請求項29】** 如請求項 20 所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(ii)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，視需要地其中，

如(a)(ii)中的前述第一擴增寡聚物包括包含 SEQ ID NO : 167 的序列的標靶-雜交序列，視需要地其中，前述第一擴增寡聚物的前述標靶-雜交序列係 SEQ ID NO : 34 ; 且

如(a)(ii)中的前述第二擴增寡聚物包括包含 SEQ ID NO : 168 的序列的標靶-雜交序列，視需要地其中，前述第二擴增寡聚物的前述標靶-雜交序列係 SEQ ID NO : 53 。

**【請求項30】** 如請求項 20 所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括如(a)(i)中的擴增寡聚物及如(a)(ii)中的擴增寡聚物，視需要地其中，

如(a)(i)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 164 的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括 SEQ ID NO : 165 的序列，視需要地其中，如(a)(i)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 21 的標靶-雜交序列；且

如(a)(ii)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 167 的序列，視需要地其中，如(a)(ii)中的前述擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 34 的標靶-雜交序列。

**【請求項31】** 如請求項 20、29 和 30 中任一項所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括(b)中的第一擴增寡聚物和第二擴增寡聚物，視需要地其中，(b)中的前述第一擴增寡聚物和前述第

二擴增寡聚物各自包括 SEQ ID NO : 170 的序列中所包含的標靶-雜交序列，且包括 SEQ ID NO : 171 或 SEQ ID NO : 172 的序列，

視需要地其中，如(b)中的前述第一擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 94 的標靶-雜交序列，且如(b)中的前述第二擴增寡聚物包括 SEQ ID NO : 95 的標靶-雜交序列。

**【請求項32】** 如前述請求項中任一項所記載之寡聚物組合物，其進一步包括至少一種捕獲探針寡聚物，前述捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，其中，前述標靶-雜交序列的長度為至多約 30 個鄰接核苷酸，且包括選自由 SEQ ID NO : 11 至 SEQ ID NO : 15、SEQ ID NO : 17、SEQ ID NO : 19 和 SEQ ID NO : 20 所組成之群組的序列，前述序列包含其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物。

**【請求項33】** 如前述請求項中任一項所記載之寡聚物組合物，其進一步包括至少一種檢測探針寡聚物，前述檢測探針寡聚物包括經配置為與可被至少兩種擴增寡聚物擴增的瘧原蟲物種標靶區域擴增子特異性雜交的標靶-雜交序列。

**【請求項34】** 如請求項 33 所記載之寡聚物組合物，其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列的長度為約 13 至約 40 個核苷酸，且係(i) 包含在 SEQ ID NO : 196 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 等同物之 SEQ ID NO : 175、SEQ ID NO : 176、SEQ ID NO : 177 和 SEQ ID NO : 178 所組成之群組的序列，

視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列

係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 131、SEQ ID NO : 132、SEQ ID NO : 135、SEQ ID NO : 140、SEQ ID NO : 145、SEQ ID NO : 147 至 SEQ ID NO : 157 和 SEQ ID NO : 159 至 SEQ ID NO : 161 所組成之群組。

**【請求項35】** 如請求項 34 所記載之寡聚物組合物，其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係(i)包括在 SEQ ID NO : 197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 174 或 SEQ ID NO : 175 的序列，視需要地其中，

(a) 前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列(ii)包括 SEQ ID NO : 174 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物的序列，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 148 至 SEQ ID NO : 155 和 SEQ ID NO : 159 所組成之群組，或

(b) 前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列(ii)包括 SEQ ID NO : 175 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物的序列，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 147、SEQ ID NO : 156、SEQ ID NO : 157、SEQ ID NO : 160 和 SEQ ID NO : 161 所組成之群組。

**【請求項36】** 如請求項 34 所記載之寡聚物組合物，其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列(ii)包括選自由包含其互補序列、其 DNA

等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO:177 和 SEQ ID NO : 178 所組成之群組的序列，視需要地其中，前述檢測探針寡聚物的前述標靶-雜交序列係選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 131、SEQ ID NO : 132、SEQ ID NO : 135、SEQ ID NO : 140、SEQ ID NO : 147、SEQ ID NO : 156、SEQ ID NO : 157、SEQ ID NO : 160 和 SEQ ID NO : 161 所組成之群組。

**【請求項37】** 如請求項 34 所記載之寡聚物組合物，其中，前述至少兩種檢測探針寡聚物包括第一檢測探針寡聚物和第二檢測探針寡聚物，其中，

(A) 前述第一檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在 SEQ ID NO : 197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括 SEQ ID NO : 175 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列，視需要地其中，前述第一檢測探針寡聚物包括 SEQ ID NO : 157 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之標靶-雜交序列；且

(B) 前述第二檢測探針寡聚物包括一標靶-雜交序列，其係(i)包含在 SEQ ID NO : 197 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列中，且(ii)包括 SEQ ID NO : 176 或其互補序列，或其 DNA 等同物或其 DNA/RNA 嵌合物之序列，視需要地其中，前述第二檢測探針寡聚物包括選自由包含其互補序列、其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物之 SEQ ID NO : 148 和 SEQ ID NO : 152 所組成之群組的標靶-

雜交序列。

**【請求項38】** 一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢測探針寡聚物，前述檢測探針寡聚物包括長度為約 13 至約 40 個鄰接核苷酸的標靶-雜交序列，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，前述寡聚物組合物包含第一瘧原蟲特異性的擴增寡聚物和第二瘧原蟲特異性的擴增寡聚物，其中，

(a) 前述第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，(i) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 20 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：162 的序列中，且包含 SEQ ID NO：163 的序列，或(ii) 前述標靶-雜交序列的長度為約 14 至約 25 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：166 的序列中，且包含 SEQ ID NO：167 或 SEQ ID NO：168 的序列；及

(b) 前述第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，前述標靶-雜交序列的長度為約 15 至約 33 個鄰接核苷酸，包含在 SEQ ID NO：169 中，且包含 SEQ ID NO：171、SEQ ID NO：172 或 SEQ ID NO：173 的序列。

**【請求項39】** 一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之至少兩種寡聚物的寡聚物組合物，前述寡聚物組合物包括至少兩種如請求項 38 所記載之檢測探針寡聚物。

**【請求項40】** 一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之捕獲探針寡聚物，前述捕獲探針寡聚物包括與結合到固定化探針的序列或部分共價附接的標靶-雜交序列，前述標靶-雜交序列的長度為至多約 30 個鄰接核苷酸，且包括選自由 SEQ ID NO：11 至 SEQ ID NO：



15、SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：19 和 SEQ ID NO：20 所組成之群組的序列，前述序列包含其 DNA 等同物及其 DNA/RNA 嵌合物。

**【請求項41】** 一種用於特異性從樣品中分離瘧原蟲物種核酸之至少兩種寡聚物的寡聚物組合物，前述寡聚物組合物包括至少兩種如請求項 40 所記載之捕獲探針寡聚物。

**【請求項42】** 一種套組，其包括如請求項 20 至 37、39 和 41 中任一項所記載之至少兩種寡聚物的寡聚物組合物。

**【請求項43】** 一種反應混合物，其包括如請求項 20 至 37、39 和 41 中任一項所記載之至少兩種寡聚物的寡聚物組合物。

**【請求項44】** 一種用於檢測樣品中瘧原蟲物種核酸之方法，前述方法包括以下步驟：

(1) 使樣品與用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種擴增寡聚物接觸，前述樣品疑似含有瘧原蟲物種核酸，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：185 的序列中，且包括 SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46 或 SEQ ID NO：187 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：188 的序列中，且包括 SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84 或 SEQ ID NO：182 的序列；

(2) 進行體外核酸擴增反應，其中將前述樣品中存在的任何瘧原蟲物種標靶核酸用作為產生擴增產物的模板；以及

(3) 檢測前述擴增產物的存在或不存在，從而指示前述樣品

中瘧原蟲物種標靶核酸的存在或不存在。

**【請求項45】** 一種用於判定樣品中是否存在瘧原蟲物種的至少兩種寡聚物之寡聚物組合物，前述寡聚物組合物包括用於擴增瘧原蟲物種標靶核酸的標靶區域的至少兩種擴增寡聚物，其中，前述至少兩種擴增寡聚物包括：

(a) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：185 的序列中，且包括 SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46 或 SEQ ID NO：187 的序列；及

(b) 包含標靶-雜交序列的擴增寡聚物，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：188 的序列中，且包括 SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84 或 SEQ ID NO：182 的序列。

**【請求項46】** 一種用於特異性檢測樣品中瘧原蟲物種標靶核酸之檢測探針寡聚物，前述檢測探針寡聚物包括長度為至少約 13 個核苷酸的標靶-雜交序列，且經配置為與可被寡聚物組合物擴增的瘧原蟲物種標靶區域內包含的標靶序列特異性雜交，前述寡聚物組合物包含第一瘧原蟲特異性的擴增寡聚物和第二瘧原蟲特異性的擴增寡聚物，其中，

(a) 前述第一擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：185 的序列中，且包括 SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46 或 SEQ ID NO：187 的序列；及

(b) 前述第二擴增寡聚物包括一標靶-雜交序列，前述標靶-雜交序列包含在 SEQ ID NO：188 中，且包括 SEQ ID NO：83、SEQ ID NO：84 或 SEQ ID NO：182 的序列。

**【請求項47】** 一種套組，其包括如請求項 45 所記載之至少兩種寡聚物的寡聚

物組合物。

**【請求項48】** 一種反應混合物，其包括如請求項 45 所記載之至少兩種寡聚物的寡聚物組合物。