

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01819293.9

[45] 授权公告日 2006年6月7日

[11] 授权公告号 CN 1258604C

[22] 申请日 2001.9.27 [21] 申请号 01819293.9

[30] 优先权

[32] 2000.10.5 [33] CN [31] 00106310.0

[86] 国际申请 PCT/CN2001/001458 2001.9.27

[87] 国际公布 WO2002/029118 英 2002.4.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.21

[71] 专利权人 香港基因晶片开发有限公司

地址 香港九龙

[72] 发明人 阿尔伯特·常海·于 苏家麟

高龙生 刘乐庭

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄健

权利要求书2页 说明书22页 附图5页

[54] 发明名称

一种用于检测非致病性或致病性 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒

[57] 摘要

目前用于检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的方法，如细胞培养、血凝抑制、荧光抗体和酶免疫分析测定及逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 可具有灵敏性低和特异性低的缺点。此外，这些方法相对来说使用困难，并且可能不适于每天的例行检测。本发明的用于检测 H5 病毒的试剂盒提供一种用户可容易掌握使用的替代方法，相对来说对 H5 病毒更灵敏和特异。此检测试剂盒利用两条用于扩增 H5 病毒的特异性设计的引物 A 和 B，和用于固定已扩增的病毒 RNA 的特异性捕获探针。另一引物 C 也被设计用于检测致病性 H5 病毒。用这种检测试剂盒如果需要，可在一天内完成对 H5 病毒检测。

1、一种用于检测生物样品中 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒，其包括：

- 一种分离试剂，用于从生物样品中分离 H5 病毒的 RNA 分子；
- 5 - 一种核酸扩增试剂，用于扩增目标分子，其中此目标分子包括：
 - 一段核酸序列，与 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列互补；和
 - 一段核酸序列，用于结合检测分子；

其中所述的核酸扩增试剂包括：

- a) 第一个已纯化并分离的 DNA 分子，该 DNA 分子由序列号 No. 1、
10 2 或 3 所示的任一 DNA 序列和编码 RNA 聚合酶启动子 DNA 序列的 DNA 序列构成；和
- b) 第二个已纯化并分离的 DNA 分子，该 DNA 分子由编码 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列的第一段 DNA 序列和编码用于结合检测分子的 DNA 序列的第二段 DNA 序列构成；
- 15 - 一种核酸检测试剂，用于检测上述目标分子，其中核酸检测试剂包括上述检测分子。

2、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒，其中此试剂盒还包括用于稳定生物样品中的核酸的裂解试剂。

3、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂
20 盒，其中所述目标分子是 RNA 分子。

4、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒，其中 RNA 聚合酶是噬菌体 T7 RNA 聚合酶，编码 RNA 聚合酶启动子 DNA 序列的 DNA 序列如序列号 No. 4 所示。

5、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂
25 盒，其中

- H5 病毒是非致病性的; 和
 - 第一段 DNA 序列编码任一如序列号 No. 5、6 或 7 所示的 DNA 序列。
- 6、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒, 其中
- 5 - H5 病毒是致病性的; 和
- 第一段 DNA 序列编码任一如序列号 No. 9、10 或 11 所示的 DNA 序列。
- 7、一种如权利要求 1 或 5 或 6 所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒, 其中第二段 DNA 序列编码如序列号 No. 8 所示的 DNA 序列。
- 8、一种如权利要求 1 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂
- 10 盒, 其中核酸检测试剂进一步包括已纯化并分离的检测 DNA 分子, 此分子包括:
- 检测 DNA 序列, 编码 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列, 用于结合目标分子; 和
 - 一种固定物质;
- 15 当目标分子与已纯化并分离的 DNA 分子结合时该目标分子被固定住。
- 9、一种如权利要求 8 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒, 其中检测 DNA 序列编码任一如序列号 No. 12、13 或 14 所示的 DNA 序列。
- 10、一种如权利要求 8 中所述的检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂
- 20 盒, 其中检测分子包括:
- 第一段 DNA 序列, 编码 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列, 用于结合目标分子; 和
 - 一种信号发生剂;
- 检测分子和已纯化并分离的 DNA 分子结合于目标分子的不同部位。

一种用于检测非致病性或致病性 A 型 流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒

5 技术领域

本发明涉及用于检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的设备。

背景技术

禽流感病毒（A 型流感病毒）侵染多种动物，包括人、猪、马、海洋
10 哺乳动物和鸟类。最近对 A 型流感病毒的种系发生学研究已经显示病毒基
因的种特异性世系，并已证明种间传播的流行依靠于动物物种。它们也显
示水生鸟类是其它物种中所有流感病毒的来源。

在人类中出现一种“新”的 A 型流感病毒是可能的。血清学和病毒学
的证据显示自 1889 年以来有六个病例关于带有 HA 亚型流感病毒，这种亚
15 型已经有一段时间没有在人类种群中出现了。三个人类 HA 亚型周期性地
出现—— H2 亚型在 1889 年，H3 在 1900 年，H1 在 1918 年，H2 又在 1957
年，H3 又在 1968 年，H1 又在 1977 年。1997 年报告第一个受 A 型禽流感
病毒 H5N1 亚型侵染的人类病例，它造成一个三岁男孩的死亡。这一首次
报告导致对动物体内 H5 病毒的例行筛查的需要，尤其是小鸡，以阻止病
20 毒的传播。

目前使用多种用于病毒鉴定的方法，包括细胞培养、血凝抑制、荧光
抗体和酶免疫测定及逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)。然而，这些方法都
存在同样的问题——它们相对来说灵敏性低和特异性低。此外，对于例行
检测这个目的来说检测时间可能太长，并且这些方法相对来说使用困难。

25 当前应用于检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的方法包括免疫学诊断分

析法和病毒培养。免疫学诊断分析法的例子包括血凝素抑制（HI）法和免疫分析法。然而，免疫学诊断分析法可具有灵敏性低的缺点。此外，由于免疫学诊断分析法的目标通常是特异性蛋白，所以目标潜在的遗传学本质可能不能直接获得。另外，最初抗体的衍生最终是依赖于在免疫寄主动物体内蛋白分析的抗原性，因此，有可能出现交叉反应。

虽然病毒培养是正确的成本低廉的检测方法，但它相对来说属劳力密集型，并且需要大量的培养空间。培养过程缓慢，不能满足每日检查的要求。另外，病毒培养不能直接提供检测结果，还得依赖其它可能非常昂贵的检测方法作进一步的验证。

10

发明目的

因此，本发明的目的之一是设计一种用户可容易掌握使用的用于检测H5病毒的诊断试剂盒，可改善灵敏性和特异性。

本发明的另一目的是设计一种用于检测A型流感病毒H5亚型病毒的试剂盒，可减少检测时间和用于检测的全部费用。

本发明还有一个目的是设计一种用于检测A型流感病毒H5亚型病毒的试剂盒，可直接检测H5病毒的致病性。

至少，本发明的一个目的是给公众提供有益的选择。

20 发明简述

相应地，本发明提供一种用于检测生物样品中非致病性或致病性A型流感病毒H5亚型病毒的试剂盒，其包括：

- 一种分离试剂，用于从生物样品中分离H5病毒的RNA分子；
- 一种核酸扩增试剂，用于扩增目标分子，其中此目标分子包括：
 - 一段核酸序列，可与H5病毒的至少一部分RNA序列互补；和
 - 一段核酸序列，用于结合检测分子；

25

- 一种核酸检测试剂，用于检测上述目标分子，其中核酸检测试剂包括上述检测分子。

本发明的另一方面是提供一种已纯化并分离的 DNA 分子或互补 DNA 分子，其包括：

- 5
- 第一段 DNA 序列，用于与 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列结合；和
 - 第二段 DNA 序列，编码 RNA 聚合酶启动子的 DNA 序列

这样，当第一段已纯化并分离的 DNA 分子与 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列结合时，已纯化并分离的 DNA 分子在酶和 DNA 核苷酸存在的情况下延伸以产生一段 DNA 序列，这段 DNA 序列包括：

- 10
- 一段 DNA 序列，可与 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列互补；和
 - 一段 DNA 序列，编码 RNA 聚合酶启动子的 DNA 序列。

本发明还有一方面是提供一种已纯化并分离的 DNA 分子或互补 DNA 分子，其包括：

- 15
- 第一段 DNA 序列，编码非致病性或致病性 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列；和
 - 第二段 DNA 序列，编码用于结合检测分子的一段 DNA 序列

这样，当已纯化并分离的 DNA 分子结合于一个包括可与非致病性或致病性 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列互补的 DNA 序列的 DNA 分子时，已纯化并分离的 DNA 分子在酶和 DNA 核苷酸存在的情况下延伸以产生一段 DNA 序列，这段 DNA 序列包括：

20

- 一段 DNA 序列，编码非致病性或致病性 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列；和
- 一段 DNA 序列，编码用于结合检测分子的 DNA 序列。

本发明还提供一种已纯化并分离的 DNA 分子或互补 DNA 分子，由编码任一如序列号 No. 5、6、7、9、10 或 11 所示的 DNA 序列的第一段 DNA 序列

25

构成。

本发明还有一方面是提供一种已纯化并分离的 DNA 分子或互补 DNA 分子，其包括：

- 第一段 DNA 序列，编码 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列，用于结合目标分子，其中，此目标分子包括一段可与 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列互补的核酸序列；和
- 一种固定物质；

这样，当目标分子与已纯化并分离的 DNA 分子结合时可被固定住。

本发明的另一方面是提供一种已纯化并分离的 DNA 分子或互补 DNA 分子，其包括：

- 第一段 DNA 序列，编码 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列，用于结合目标分子，其中，此目标分子包括一段可与 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的至少一部分 RNA 序列互补的核酸序列；和
- 一种信号发生剂；

这样，当目标分子与已纯化并分离的 DNA 分子结合时，信号就从目标分子中产生。

本发明还提供了在用于检测生物样品中 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的试剂盒的制造中第一个和第二个已纯化并分离的 DNA 分子的应用，其中：

- 用分离试剂从生物样品中分离 H5 病毒的 RNA 分子；
- 用包括第一个和第二个已纯化并分离的 DNA 分子的核酸扩增试剂扩增目标分子，其中此目标分子包括：
 - 一段核酸序列，可与 H5 病毒的至少一部分 RNA 序列互补；和
 - 一段核酸序列，用于结合检测分子；
- 用核酸检测试剂检测上述目标分子，其中核酸检测试剂包括上述检测分子。

附图简述

现将参考下列附图，描述本发明的优选实施方式。

图 1 显示用本发明的试剂盒检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒整体过程
5 的流程图。

图 2 显示用本发明的检测试剂盒检测 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的详细过程。

图 3 显示生物样品中病毒 RNA 分子的分离。

图 4 显示用两个 DNA 分子，引物 A 和 B，对 A 型流感病毒 H5 亚型病毒
10 RNA 分子的一部分的扩增。

图 5 显示扩增的 RNA 分子当结合于检测探针时的固定。

序列表显示本发明中序列号 No. 1-14 所示的核酸序列，它们被用于以
扩增和检测为目的的本检测试剂盒中的 DNA 分子。

15 优选实施方式详述

现参考附图描述本发明的优选实施方式。表 1 是部分列表，以便易于
参照图中标记数字。

生物样品如鸡血中的 A 型流感病毒 H5 亚型病毒的浓度可能非常低，
以致于不能在生物样品上直接检测 H5 病毒 RNA 的存在。为使病毒 RNA 分
20 子的数量达到足够用于检测的量，必须有一种适当的扩增技术。以核酸序
列为基础的扩增（NASBA）被认为是一种对 RNA 的扩增有特异性的灵活
的技术。这样，扩增的 RNA 分子就可以用适当的技术检测出来。NASBA 是一
种用于检测流感病毒 H5 亚型病毒的快速的、具有高敏感性和高特异性的
方法。结果可在仅一天内获得。另外，它可以直接区分致病性和非致病性
25 的 H5 病毒株。

流感病毒含有以一条单链的病毒核糖核酸（RNA）形式存在的遗传物

质。A型流感病毒H5亚型病毒RNA含有其复制必需的基因，其中一个重要的基因被称为血凝素。这个基因长大约1756核苷酸，核苷酸是从这个分子的5'端计数的。

图1显示用检测试剂盒检测H5病毒的整体过程。如图1所示，目标H5病毒核酸分子，其以一条单链RNA分子形式存在，被首先从生物样品中5 提取出来。适用的生物样品类型可包括血、血清/血浆、周边血单核细胞/周边血淋巴细胞(PBMC/PBL)、唾液、尿液、粪便、喉拭子、表皮损伤拭子、脑脊液、宫颈涂片、脓液样品、食物基质(food matrices)以及来源于身体各部位包括脑、脾和肝的组织。没有列出的其它样品也可能适用。本发10 明的检测试剂盒中核酸提取的过程是由一种分离试剂完成。

当目标H5病毒RNA分子从生物样品中提取出来后，样品中的RNA分子的数量可能不足以被检测。因此，H5病毒RNA分子的一部分可通过一种合适的扩增技术如NASBA被扩增成目标核酸分子。这样，此目标核酸分子就可用适合的方法检测出来。

15 在本发明的检测试剂盒的整体过程描述完之后，现在对每一个过程进行详细描述。

通过生物样品上施加适当的分离试剂可将H5病毒RNA分子从生物样品中分离出来。优选地，可在分离试剂前使用一种裂解试剂。此裂解试剂，如裂解缓冲液，负责溶解蛋白和脂类，并使生物样品中的蛋白失活，以致20 于这些物质可以更容易地从样品中除去。此外，裂解试剂也可以作为缓冲液来稳定以长期储存为目的的RNA分子。如图2所示，室温条件下RNA分子在裂解缓冲液中可保持稳定达48小时，可在-70℃无限期保存。这样做的好处是不需要必须在那些可能不适合操作这些过程的采样点进行分析。

适当的裂解缓冲液的例子可包括5M硫氰酸胍和Tris/HCl。裂解缓冲液不构成检测试剂盒的发明，而且适用于此目的的组合物在技术上已广为人知。因此，具体的裂解缓冲液组合物将不在这里讨论。含有不同组合物25

并可溶解蛋白和脂类、失活蛋白、稳定 RNA 分子的裂解试剂可在本发明的检测试剂盒中使用。

将生物样品上施加裂解试剂之后，下一步是通过用分离试剂将核酸分子从样品中分离出来。图 3 描述了检测试剂盒中分离的整体过程。将生物样品上施加裂解试剂后，核酸（10）和其它不需要的组分一起以溶液形式存在。然后可将吸附剂，如二氧化硅（12）加入溶液中以吸附核酸（10），形成核酸/二氧化硅混合物（14）。之后，溶液中的蛋白和脂类以及其它不需要的物质可以用适当的洗脱液洗去，如 5M 硫氰酸胍和 Tris/HCl 溶液、Tris/HCl 溶液、70%乙醇或丙醇或它们的组合物。用足够量的洗脱液洗脱混合物（14）之后，二氧化硅（12）中的核酸（10）可通过离心分离。

包含于样品中的核酸（12）被分离出来后，可使用扩增试剂加入核酸混合物中，这样可扩增 H5 病毒 RNA 分子用于检测，如 NASBA 技术。设计三个已纯化并分离的 DNA 分子用于扩增，命名为引物 A 到 C。

图 4 显示本发明中用 NASBA 扩增 H5 病毒 RNA 的示意图。如图中所示，扩增过程是从引物 A（22）退火到目标 H5 病毒 RNA（20），即一条单链 RNA 分子上开始的。引物 A（22）被设计为可与目标 RNA 分子结合，还包括一段 DNA 序列，该 DNA 序列编码 RNA 聚合酶启动子，优选噬菌体 T7 RNA 聚合酶。结合的确切位置依赖于被检查的病毒株。结合位点在某段时间后可能会改变。引物 A 的重要技术特征是它保持与 H5 病毒的一部分结合的能力。

相应地，引物 A（22）包括一段结合序列，该结合序列编码一段可与 H5 病毒 RNA（20）的至少一部分互补的 DNA 序列。对本发明来说，已发现适合用于结合 H5 病毒 RNA（20）的区域是 H5 病毒血凝素基因的 1107 到 1132 核苷酸之间的区域，其包含用于结合功能的最少数目的核苷酸。因此，引物 A 的结合序列优选包括可与 H5 病毒血凝素基因 1107 到 1132 核苷酸之间的区域互补的一段 DNA 序列，如图 6 中序列号 No.1 所示。应该注意到，

序列号 No. 1 是以正式格式按 5'-3'方向书写的。因此，病毒基因的结合方向是从“后”向“前”。

作为选择，H5 病毒血凝素基因的核苷酸 1060 到 1140（序列号 No. 2，图 7）或核苷酸 1040 到 1160（序列号 No. 3，图 8）也可在引物 A（22）中用于结合目的。

为了扩增的目的，这将会在说明书中更具体描述，引物 A（22）还包括一段编码 RNA 聚合酶如噬菌体 T7 RNA 聚合酶启动子的 DNA 序列。适用的启动子 DNA 序列如序列号 No. 4 所示（图 9）。启动子序列优选附加在结合序列的 5'端，这样当引物 A 与 H5 病毒 RNA 结合时，结合序列可以向 3'端延伸。如果使用其它 RNA 聚合酶，启动子序列也要相应改变。

引物 A 与 H5 病毒 RNA 结合后，引物 A 在其 3'端有合适的核苷酸存在的情况下并在合适的逆转录酶如禽成肌细胞过多症病毒逆转录酶（Avian Myoblastosis Virus-Reverse Transcriptase, AMV-RT）的作用下延伸。因此，得到包括下列序列的延伸引物 A（24）：

- 15 (a) 一段可与 H5 病毒 RNA 的一部分互补的 DNA 序列；和
- (b) 一段编码 RNA 聚合酶启动子的 DNA 序列。

由此得到的 DNA: RNA 杂合体（26）的 H5 RNA 部分可通过 Rnase H 的作用除去。需要考虑到引物 B（28）退火到延伸引物 A（24）上的位置是在引物 A（22）退火位点的上游。因此，为使引物 B（28）结合到延伸引物 A（24）上，引物 B（28）包括第一段结合 DNA 序列，编码 H5 病毒血凝素基因序列的一部分。优选地，引物 B（28）的这第一段 DNA 序列编码 H5 病毒血凝素基因核苷酸 914 到 940 的区域（序列号 No. 5，图 10）。作为选择，也可以使用 H5 病毒血凝素基因核苷酸 866 到 961 的区域（序列号 No. 6，图 11）或核苷酸 846 到 981 的区域（序列号 No. 7，图 12）。

为达到检测目的，引物 B（28）还包括第二段 DNA 序列，其可与检测

分子的核酸序列互补。如果将上述检测分子设计为包括一段编码H5病毒RNA序列一部分的DNA序列并由此可以和扩增的RNA分子结合的话，那么引物B就没有必要包括第二段DNA序列。这种情况下，引物B可只由第一段DNA序列构成。

5 作为选择，在引物B中可包括第二段DNA序列，其编码如序列号No.8所示的DNA序列（图13）。此第二段DNA序列优选附着于引物B结合序列的5'端。如果使用其它的检测核酸序列，序列号No.8也要相应改变。

在引物B(28)退火到延伸引物A(24)上之后，引物B(28)在AMV-RT的作用下向下延伸通过处于延伸引物A(24)末端的T7 RNA聚合酶启动子。
10 结果，产生了最初的H5病毒RNA目标序列的双链DNA拷贝(30)，其一端编码一个完整的T7 RNA聚合酶启动子，另一端是H5病毒RNA序列的一部分。于是，这个启动子被T7 RNA聚合酶识别，继而产生大量的目标RNA分子(32)，其包括一段与最初的H5病毒RNA序列的一部分互补的RNA序列。

15 引物B可被用于鉴定A型流感病毒H5亚型病毒的非致病株。为检测致病性H5病毒，使用引物C代替引物B。引物C也是一种已纯化并分离的DNA分子，包括下列DNA序列：

- 第一段DNA序列，编码致病性H5病毒的至少一部分RNA序列；和
- 第二段DNA序列，编码一段可与检测DNA序列互补的DNA序列。

20 正如引物B的情况，第二段DNA序列完全是可选的组分。

引物C的功能和作用与引物B相同，除了其目标是致病性H5病毒这一点以外。

优选地，引物C的第一段DNA序列编码H5病毒血凝素基因核苷酸1017到1042的区域（序列号No.9，图14）。作为选择，可使用H5病毒血凝素
25 基因核苷酸970到1063的区域（序列号No.10，图15）或核苷酸950到1083的区域（序列号No.11，图16）。

已发现，引物 C 不能有效地与引物 A (22) 在样品中新近分离的核酸来扩增目标 H5 病毒 RNA。因此，优选引物 C 从已用引物 A (22) 和引物 B (28) 鉴定为 H5 病毒阳性的样品中扩增 RNA。

5 扩增过程的产物是大量的目标 RNA 分子(32)，其中每一个包括下列 RNA 序列：

(a) 一段 RNA 序列，可与最初的 H5 病毒 RNA (致病性或非致病性) 的一部分互补；和

(b) 一段 RNA 序列，可与检测分子的核酸序列互补，如果引物 B 或 C 包括相应的第二段 DNA 序列。

10 这个详细实施方式的目标 RNA 分子(32)进一步包括一段可编码 T7 RNA 聚合酶启动子的 RNA 序列，这段序列在 T7 RNA 聚合酶作用下的扩增过程中自动包括在内。

目标 RNA 分子 (32) 的检测在图 5 中阐明。目标 RNA 分子 (32) 可通过与产生信号如检测探针 (40) 的检测分子结合而被检测出来。此信号可
15 从附着于检测探针 (40) 的信号发生剂 (41) 中产生。在图 5 所示的一个详细的优选实施方式中，信号发生剂 (41) 是联吡啶钌络合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 。作为选择，信号发生剂 (41) 可以是放射性物质 (如 ^{32}P)、化学发光物质 (如萤光素/萤光素酶)、荧光物质 (如荧光素)、酶 (如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶) 或其它电化学发光分子。

20 如果引物 B 或 C 包括相应的可与检测 DNA 序列互补的第二段 DNA 序列，那么目标 RNA 分子 (32) 包括一段可与上述检测分子核酸序列互补的 RNA 序列。这样设计的好处是可以应用市场上可买到的检测分子。

如果引物 B 或 C 只由编码 H5 病毒血凝素基因序列的一部分的第一段 DNA 序列构成，那么需要新的检测分子。在这种情况下，此检测分子可包
25 括：

- 一段编码一部分 H5 病毒 RNA 序列的核酸序列，与目标 RNA 分子(32)

中编码的序列互补；和

- 一种信号发生剂。

目标 RNA 分子 (32) 和其它不想要的组分一起包含在混合物中, 这些不想要的组分包括在最初样品中未扩增的核酸、引物 A、B 和 C、未反应的核苷酸、以及最重要的, 未结合的检测分子。因此, 目标 RNA 分子 (32) 5 被捕获分子, 如捕获探针 (42) 固定, 这样可将其它不想要的组分洗去。捕获探针 (42) 能结合于目标 RNA 分子 (32)。可通过包括一段编码 H5 病毒 RNA 部分序列的核酸序列来达到目的, 这段核酸序列与目标 RNA 分子 (32) 编码的那段序列互补。捕获探针 (42) 进一步附着于固定物质 (44) 10 上, 此固定物质可固定目标 RNA 分子 (32), 这样可洗去其它不想要的组分。图 5 所示的固定物质 (44) 是可被工作电极所吸引的磁性颗粒。也可以使用其它的固定物质, 如一块附有大量捕获探针 (42) 的聚合物。

检测探针的序列可以与扩增的 RNA 产物的任何区域互补, 这一 RNA 产物的末端是由引物 A 和 B 或引物 A 和 C 限定。然而, 检测探针序列不能和 15 捕获探针的序列重叠, 因为这样将影响扩增的 RNA 与捕获探针的相互作用, 反之亦然。

如图 5 所示, 目标 RNA 分子可与检测探针 (40) 一起被固定。因此, 并没有对在混合物中加入捕获探针 (42) 的时机进行限制。捕获探针 (42) 可在加入检测探针 (40) 之后或之前加入, 只要捕获探针是在洗涤步骤之前加入即可。 20

现已知引物 A、B 和 C 及捕获探针的核酸序列, 相应的互补 DNA 分子的合成对于本领域技术人来说是很清楚的。这些互补 DNA 分子也可用作合成引物 A、B 和 C 及捕获探针的模板。

25 现用下列非限定实施例阐明本发明。必须注意的是, 在下列实施例和过程中可采用多种变化和变更而并不会脱离本发明的范围。因此, 必须注

意，下列实施例只认为是说明性的，并没有任何限定意义。

实施例

本实施例的检测试剂盒中的详细组分如下所列：

- 5 **A. 裂解缓冲液**
- 50 x 0.9 ml 裂解缓冲液 (5M 硫氰酸胍, Triton X-100, Tris/HCl)
- B. 核酸分离组分**
- 5 x 22 ml 洗涤缓冲液 (5M 硫氰酸胍, Tris/HCl)
 - 5 x 0.8 ml 二氧化硅 (盐酸活化的二氧化硅颗粒)
 - 10 ▪ 5 x 1.5 ml 洗脱缓冲液 (Tris/HCl)
- C. 核酸扩增组分**
- 5 x 60 μ l 酶溶液 (稳定于牛血清白蛋白的禽成肌细胞过多症病毒-逆转录酶 (AMV-RT), RNase-H, T7 RNA 聚合酶)
 - 5 x 10 mg 试剂球 (含有核苷酸、二硫苏糖醇和 $MgCl_2$ 的冻干球)。
- 15 包在含有硅胶干燥剂的锡纸包里
- 1 x 0.6 ml 试剂球稀释液 (Tris-HCl, 45% DMSO)
 - 1 x 1.6 ml KCl 溶液
 - 1 x 70 μ l H5-引物混合物
- D. 核酸检测组分**
- 20 ▪ 1 x 0.9 ml 普通 ELC 检测探针 (钕标记 DNA 寡核苷酸保护剂: 5 g/L 2-氯乙酰胺)
 - 1 x 0.7 ml H5-捕获探针 (生物素标记寡核苷酸保护剂: 5 g/L 2-氯乙酰胺)
 - 2 x 1.7 ml 仪器参照溶液 (钕标记的顺磁珠)

25 以上列出的材料用于 50 次实验反应。

下面将列出在实验反应中用到的容易获得但未包括在检测试剂盒中的

材料。

材 料	推荐来源
70% (v/v) 乙醇 (用 96-100% (v/v) 乙醇制备, ACS 品质); 用无核酸酶的水稀释	Merck 1.00983
丙酮, 分析纯度	SIGMA A4206
二乙基焦碳酸盐, 用于制备无 RNase 的水	SIGMA D5758

试剂的制备

A. 裂解缓冲液

- 开始释放过程之前 37℃ 预热裂解缓冲液 30 分钟。
- 5 ▪ 孵育过程中每 10 分钟震荡混合含裂解缓冲液的试剂瓶使所有结晶彻底溶解。

- 冷却裂解缓冲液至室温。
- 避免裂解缓冲液过分受热或光照。

B. 核酸分离试剂

- 10 ▪ 使用前将所有试剂置于室温。
- 试剂的重新使用: 如果分析的样品少于 10 个, 余下的分离试剂可在 -20℃ 保存达两周。

1. 洗涤缓冲液

- 开始分离过程之前 37℃ 预热洗涤缓冲液 30 分钟。
- 15 ▪ 孵育过程中每 10 分钟震荡混合含洗涤缓冲液的试剂瓶使所有结晶彻底溶解。

- 冷却洗涤缓冲液至室温。
- 避免洗涤缓冲液过分受热或光照。

C. 核酸扩增试剂

- 20 ▪ 使用前将所有试剂置于室温。

▪ 试剂的重新使用：保存于-70℃的再生试剂球和未使用过的酶溶液可在两周内重新使用。其它未使用的扩增试剂保存于-20℃可重新使用。

1. 试剂球/KCl 溶液的制备

5 在冻干的试剂球中加入 80 μl 试剂球稀释液，立刻彻底涡旋。不能离心。

▪ 在稀释的试剂球中加入 30 μl KCl 溶液，涡旋。

2. 目标 RNA 特异性引物溶液的制备

▪ 将 110 μl 试剂球/KCl 溶液转移到一新试管中并加入 10 μl H5-引物混合物。涡旋混合均匀。不能离心。

10 3. 酶溶液

▪ 室温下溶解酶溶液，用手指轻弹试管使之逐渐混合。含有酶的任何溶液不能涡旋。使用前离心。

D. 核酸检测试剂

▪ 如未使用的试剂保存于 2-8℃，检测试剂可重新使用。

15 1. 捕获和检测探针

▪ 试剂盒中的普通检测探针和事先连接到顺磁珠上的 H5-捕获探针组合即可检测特异的 RNA 扩增子。

2. H5 RNA 杂交溶液

▪ 涡旋 H5-捕获珠直到形成不透明溶液。

20 对于 N 个 H5 RNA 特异性反应：

加 (N+2) x 10 μl H5 RNA 特异性捕获珠到一新的试管中

加 (N+2) x 10 μl 普通 ECL 探针。

▪ 使用前涡旋杂交溶液。

体外 RNA 扩增

25 A. 核酸的释放和分离

1. 开始核酸释放之前预热含有裂解缓冲液的试管 30 分钟并有规律地

涡旋。

2. 10,000 x g 离心含有裂解缓冲液的试管 30 秒。
3. 在含有裂解缓冲液的试管中加入 100 μ l 目标 RNA 并涡旋。

在裂解缓冲液中，样品可被保存在：

- 5 -70 $^{\circ}$ C 无限期
- 2-8 $^{\circ}$ C 达 14 天
- 25 $^{\circ}$ C 达 48 小时

4. 涡旋二氧化硅悬浮液，在每个样品 RNA/ 裂解缓冲液试管中各加入 50 μ l 。

- 10 5. RNA/裂解缓冲液/二氧化硅试管室温下孵育 10 分钟（每 2 分钟涡旋试管一次以避免二氧化硅沉于底部）。

6. 10,000 x g 离心 RNA/裂解缓冲液/二氧化硅试管 30 秒。
7. 小心除去上清（不要搅动沉淀），在每管中加入 1 ml 洗涤缓冲液。
8. 涡旋试管直到沉淀完全重悬。

- 15 9. 10,000 x g 离心试管 30 秒。

10. 重复步骤（7）到（9）

- 洗涤缓冲液一次
- 70%乙醇两次
- 丙酮一次。

- 20 11. 最后一步洗涤步骤之后，用 100 μ l 移液管小心除去所有残留的丙酮。

12. 打开试管，在一加热块上 56 $^{\circ}$ C 干燥二氧化硅沉淀 10 分钟。

13. 干燥后，在每个试管中加入 50 μ l 洗脱缓冲液。

14. 涡旋试管直到沉淀完全重悬。

- 25 15. 将重悬的二氧化硅于 56 $^{\circ}$ C 培养 10 分钟以洗脱核酸（5 分钟后涡旋试管）。

16. 10,000 x g 离心试管 2 分钟。

17. 每个核酸上清各取 5 μ l 转移到新管中，1 小时内开始扩增反应。

B. 核酸扩增

1. 对每一个 H5 RNA 反应，吸取 5 μ l 核酸提取液到一新试管中。

5 2. 加入 10 μ l H5 RNA 特异性扩增溶液。扩增溶液包括用于检测非致病性 H5 病毒的引物 A 和 B。

3. 加热块上 65 $^{\circ}$ C 孵育试管 5 分钟。

4. 加热块上 41 $^{\circ}$ C 冷却试管 5 分钟。

5. 加入 5 μ l 酶溶液，用手指轻弹试管使之混合均匀。

10 6. 立刻将试管放回 41 $^{\circ}$ C 10 分钟。

7. 短暂离心后将试管置于 41 $^{\circ}$ C 水浴 90 分钟。

8. 现在可进行扩增产物的检测。作为选择，也可将扩增产物置于-20 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。

9. 如果检测非致病性 H5 病毒的结果是阳性的，可使用包括引物 A
15 和 C 的用于检测致病性 H5 病毒的扩增溶液，通过重复步骤 2-8 来扩增产物。

C. 核酸检测

1. 涡旋杂交溶液直到溶液不透明。在每个杂交管中加入 20 μ l 目标 RNA 杂交物。

20 2. 对于扩增反应：

▪ 加入 5 μ l H5 RNA 扩增反应。

▪ 用胶带封住杂交管。

▪ 混合杂交管直到产生不透明的溶液。

3. 用胶带封住杂交管。这样可以避免蒸发和污染。

25 4. 将杂交管于 41 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

5. 在每个杂交管中加入 300 μ l 分析缓冲液。

现在样品已准备好，可以用一种适当的检测装备来检测 H5 病毒的存在。本实施例中的检测是在配有光电倍增管的系统中完成的。

H5 病毒检测结果列于下表中。这些结果通过用 Perkin Elmer ABI 310 遗传分析器进行 DNA 测序得以证实。

表 1. 利用检测试剂盒采用引物 A 和 B 检测非致病性 H5 病毒的结果

病例/样品号	H5 亚型检测	
	可检出的计数	结果分类
258/97	4229	阳性
977/97-2	6961	阳性
1000/97	33835	阳性
1258/97-2	2500	阳性
1258/97-3	2400	阳性
1258/97-4	10494	阳性
1258/97-5	3089	阳性
1258/97-9	4883	阳性
1258/97-10	方案最优化	
437/99-4	5165	阳性
437/99-6	22200	阳性
437/99-8	5142	阳性
437/99-10	511	阳性
阴性对照 1	1	阴性
阴性对照 2	1	阴性
阴性对照 3	35	阴性

表 2. 利用检测试剂盒采用引物 A 和 C 检测致病性 H5 病毒的结果

病例/样品号	H5 致病性检测	
	可检出的计数 ($\times 10^3$)	结果分类
258/97	11800	阳性
977/97-2	5300	阳性
1000/97	23100	阳性
1258/97-2	61800	阳性
1258/97-3	85100	阳性
1258/97-4	68400	阳性
1258/97-5	15800	阳性
1258/97-9	5400	阳性
1258/97-10	方案最优化	
437/99-4	48400	阳性
437/99-6	27100	阳性
437/99-8	21100	阳性
437/99-10	11600	阳性
阴性对照 1	1	阴性
阴性对照 2	3	阴性
阴性对照 3	2	阴性

如上述实施例所示，在包括农场的各种试验场地都可以方便地使用此检测试剂盒。此外，该检测试剂盒在使用上相对来说比现有的方法更容易，而且可以在更短的时间内得到检测结果——如果需要，在一天内可获得检测结果。由于它是基于 RNA 的检测系统，所以特异性和敏感性会提高——检测试剂盒是 H5 病毒特异的，而且样品中 H5 病毒的含量不再重要，因为病毒将被扩增成用于检测的目标分子。

显然，对本领域技术人员来说，以 RNA 分子形式存在的引物、检测探针、和捕获探针也是有用的。优选 DNA 分子是由于其稳定性的原因。

虽然本发明的优选实施方式已经在前面段落中描述过，但显然，对本领域技术人员来说本发明也可能有修正和可供选择的版本，这些修正和版本仍在本发明的范围之内，其如下面的权利要求所述。另外，本发明的实施方式不应受实施例或数字的限制。

5

索引号	描述
10	样品中的核酸
12	二氧化硅
14	核酸/二氧化硅混合物
20	H5 病毒 RNA
22	引物 A
24	延伸引物 A
26	延伸引物 A (DNA): H5 病毒 RNA 杂合体
28	引物 B
30	H5 病毒双链 DNA 拷贝
32	目标 RNA 分子
40	检测探针
41	信号发生剂
42	捕获探针
44	固定物质

表 1

序列表

- <110> 香港基因晶片开发有限公司
- <120> 一种用于检测非致病性或致病性A型流感病毒H5亚型病毒的试剂盒
- <130> P0304033F
- <150> CN 00106310.0
- <151> 2000-10-05
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <400> 1
- tcccctgctc attgctatgg tggta 25
- <210> 2
- <211> 81
- <212> DNA
- <400> 2
- gtatccactc ccctgctcat tgctatgggtg gtaccatac caaccatcta ccatgccctg 60
- ccatcctccc tctataaaac c 81
- <210> 3
- <211> 120
- <212> DNA
- <400> 3
- giggattcctt tgcctgcagc gtatccactc ccctgctcat tgctatgggtg gtaccatac 60
- caaccatcta ccatgccctg ccatcctccc tctataaaac tgctatagct ccaaatagtc 120
- <210> 4
- <211> 31
- <212> DNA
- <400> 4
- aattctaata cgactcacta tagggagaag g 31

<210> 5	
<211> 27	
<212> DNA	
<400> 5	
tgccattcca caacatacac cccctca	27
<210> 6	
<211> 96	
<212> DNA	
<400> 6	
actgcaacac caagtgtcaa actccaatgg gggcgataaa ctctagtatg ccattccaca	60
acatacaccc cctcaccatc ggggaatgcc ccaaat	96
<210> 7	
<211> 136	
<212> DNA	
<400> 7	
aagtgaattg gaatatggta actgcaacac caagtgtcaa actccaatgg gggcgataaa	60
ctctagtatg ccattccaca acatacaccc cctcaccatc ggggaatgcc ccaaatatgt	120
gaaatcaaac agatta	136
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<400> 8	
gatgcaaggt cgcatatgag	20
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<400> 9	
gagagaagaa gaaaaaagag aggac	25
<210> 10	
<211> 94	
<212> DNA	

<400> 10
 tcaaacagat tagttcttgc gactggactc agaaatacc c tcaaaggga gagaagaaga 60
 aaaaagagag gactatttgg agctatagca ggtt 94

<210> 11
 <211> 134
 <212> DNA

<400> 11
 aatgccccaa atatgtgaaa tcaaacagat tagttcttgc gactggactc agaaatacc 60
 ctcaaaggga gagaagaaga aaaaagagag gactatttgg agctatagca ggttttatag 120
 agggaggatg gcag 134

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA

<400> 12
 ctatttggag ctatagcagg tt 22

<210> 13
 <211> 91
 <212> DNA

<400> 13
 ggactcagaa ataccctca aaggagaga agaagaaaa agagaggact atttggagct 60
 atagcaggtt ttatagagg aggatggcag g 91

<210> 14
 <211> 131
 <212> DNA

<400> 14
 acagattagt tcttgcgact ggactcagaa ataccctca aaggagaga agaagaaaa 60
 agagaggact atttggagct atagcaggtt ttatagagg aggatggcag ggcatggtag 120
 atggttggta t 131

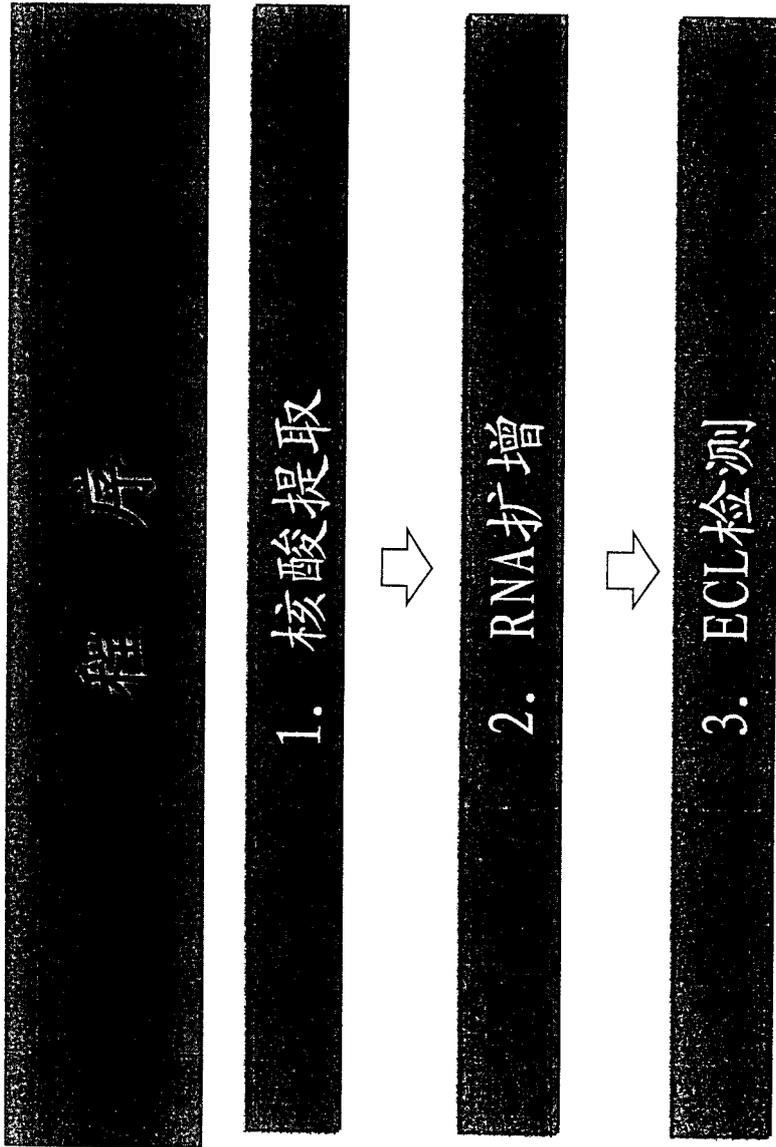


图1

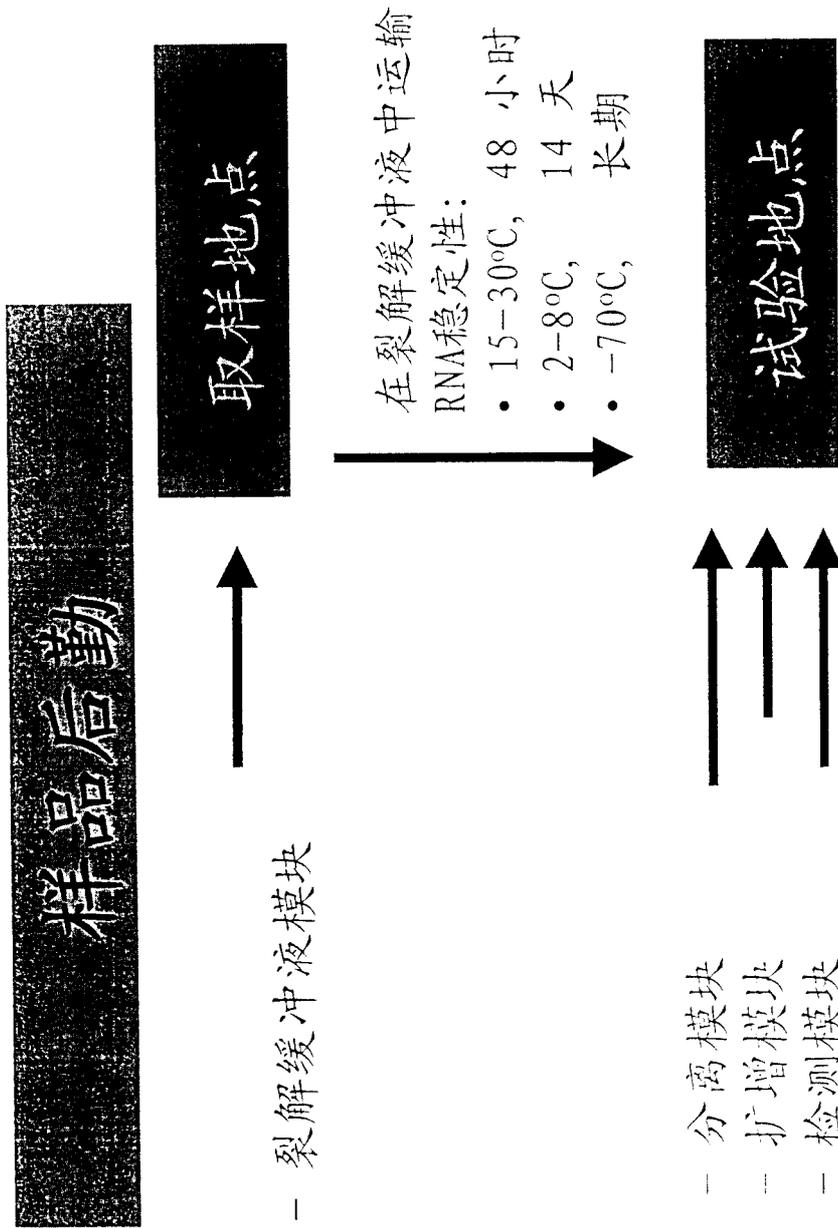


图2

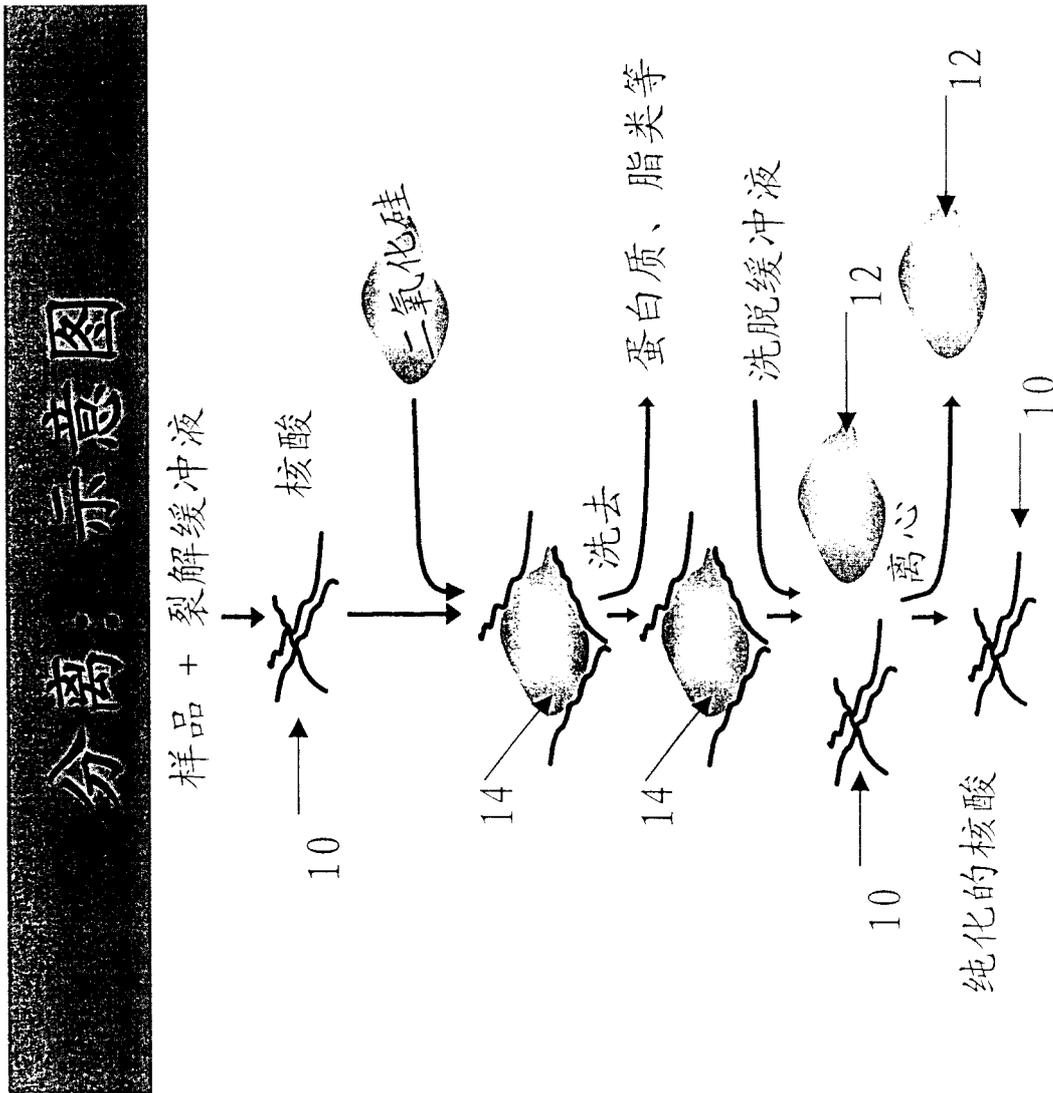


图3

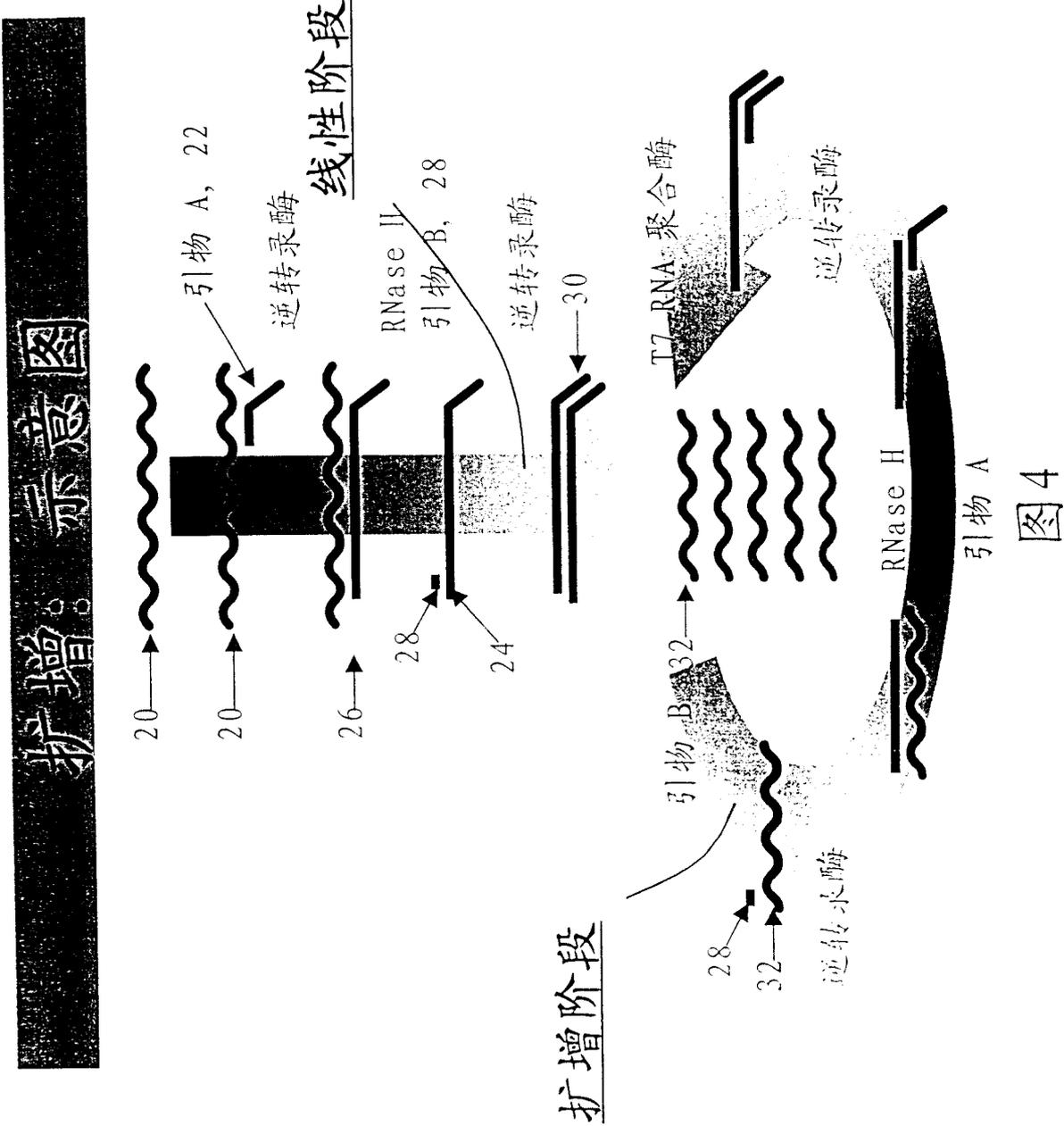


图 4

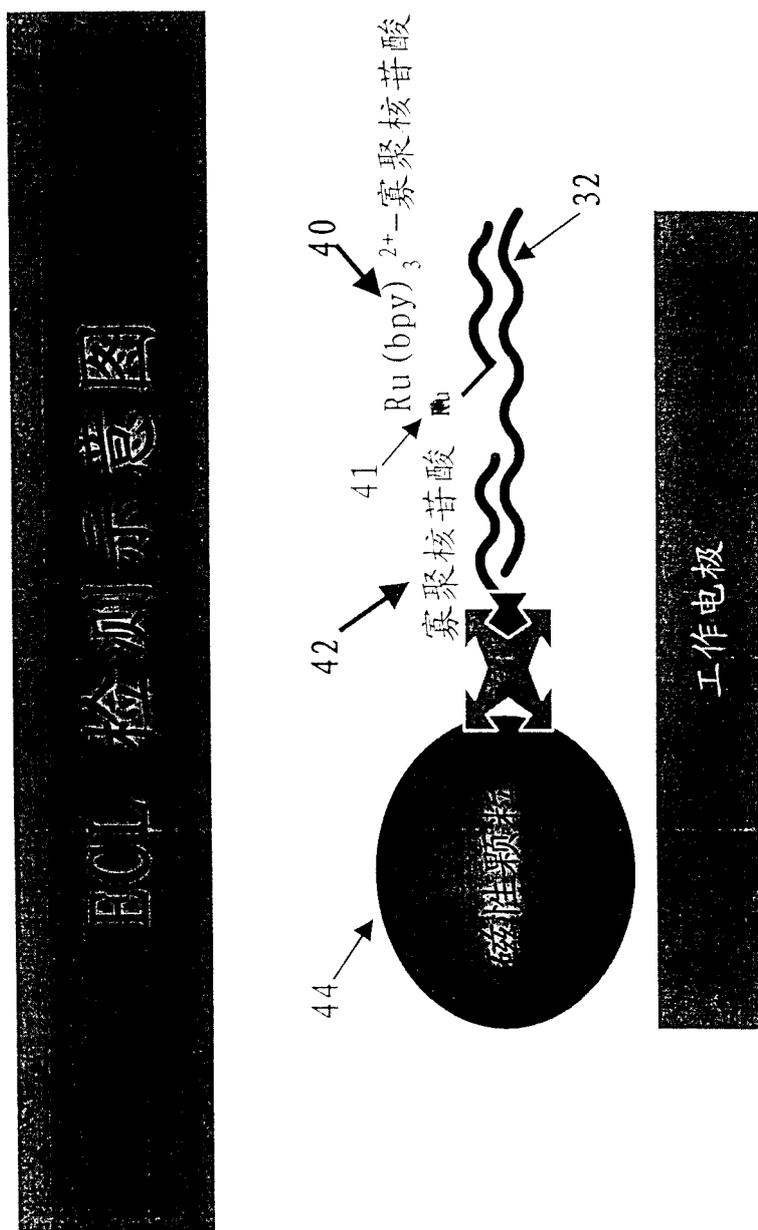


图5

专利名称(译)	一种用于检测非致病性或致病性A型流感病毒H5亚型病毒的试剂盒		
公开(公告)号	CN1258604C	公开(公告)日	2006-06-07
申请号	CN01819293.9	申请日	2001-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	香港基因晶片开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	香港基因晶片开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	海康生命科技有限公司		
[标]发明人	阿尔伯特常海于 苏家麟 高龙生 刘乐庭		
发明人	阿尔伯特·常海·于 苏家麟 高龙生 刘乐庭		
IPC分类号	C12Q1/70 C12Q1/68 C12R1/93 G01N33/53 C07H21/04 C12N15/09 C12Q C12R C12R1/92 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/701 Y02P20/582		
代理人(译)	黄健		
优先权	00106310.0 2000-10-05 CN		
其他公开文献	CN1476485A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

目前用于检测A型流感病毒H5亚型病毒的方法，如细胞培养、血凝抑制、荧光抗体和酶免疫分析测定及逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)可具有灵敏性低和特异性低的缺点。此外，这些方法相对来说使用困难，并且可能不适于每天的例行检测。本发明的用于检测H5病毒的试剂盒提供一种用户可容易掌握使用的替代方法，相对来说对H5病毒更灵敏和特异。此检测试剂盒利用两条用于扩增H5病毒的特异性设计的引物A和B，和用于固定已扩增的病毒RNA的特异性捕获探针。另一引物C也被设计用于检测致病性H5病毒。用这种检测试剂盒如果需要，可在一天内完成对H5病毒检测。

