

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12Q 1/68



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00105397.3

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1186455C

[22] 申请日 2000.2.2 [21] 申请号 00105397.3

[30] 优先权

[32] 1999. 2. 2 [33] US [31] 60/118417

[71] 专利权人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 D·R·帕特森 J·A·普斯卡斯

K·宋 J·M·林南

审查员 邢维玲

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴大建

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 4 页

[54] 发明名称 有效检测 HIV-1 和 HIV-2 的寡核苷酸逆转录引物及其应用方法

[57] 摘要

本发明公开了检测人的生物样品中人免疫缺陷病毒的方法和试剂盒。还描述了寡核苷酸逆转录引物在这种检测人免疫缺陷病毒的方法和试剂盒中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种逆转录生物样品中人免疫缺陷病毒 RNA 的方法，该方法包括：  
用一种寡核苷酸与来源于上述样品的 RNA 接触，其接触条件使所述  
5 的寡核苷酸引发 DNA 的合成，所述 DNA 与上述 RNA 的至少一部分互补；  
及

其中所述的寡核苷酸选自下列寡核苷酸组成的组：

- (a) SEQ ID NO: 1,
- (b) SEQ ID NO: 2,
- 10 (c) SEQ ID NO: 3,
- (d) SEQ ID NO: 4 和
- (e) 任意两种或更多上述序列。

2、权利要求 1 所述的方法，其中所述的样品选自由血液、血清、血浆、  
尿、唾液和脑脊液组成的组。

15 3、权利要求 1 所述的方法，它还包括回收所述的 cDNA 的步骤。

4、一种如权利要求 1 所述的方法，它还包含用随机六聚体寡核苷酸同  
时与来源于所述样品的 RNA 接触，其接触条件使所述的随机六聚体寡核苷  
酸引发 DNA 的合成，所述 DNA 与上述 RNA 的至少一部分互补。

5、一种检测生物样品中 HIV RNA 存在的方法，所述方法包括以下步  
20 骤：

(a) 进行逆转录反应，用来源于样品的 RNA 作为模板，并且用一  
种寡核苷酸作为逆转录引物来产生 HIV-特异性逆转录产物，此寡核苷酸与  
所述 RNA 中所包括的核苷酸序列互补，

其中所述的逆转录引物选自下组：

- 25 (i) SEQ ID NO: 1,
- (ii) SEQ ID NO: 2,
- (iii) SEQ ID NO: 3,
- (iv) SEQ ID NO: 4 和
- (v) 任意两种或更多上述序列；
- 30 (b) 扩增所述逆转录产物以产生扩增产物；以及

(c) 检测所述扩增产物;

其中检测到所述扩增的扩增产物表明样品中存在 HIV RNA。

6、权利要求 5 所述的方法，其中所述的样品选自由血液、血清、血浆、尿、唾液和脑脊液组成的组。

5 7、权利要求 5 所述的方法，其中所述的扩增是通过一种选自聚合酶链反应、连接酶链反应和链置换扩增的方法进行的。

8、权利要求 5 所述的方法，其中所述的检测是通过一种选自扩增产物凝胶电泳、扩增产物在固体载体上的捕获和扩增产物化学发光检测的方法进行的。

10 9、权利要求 5 所述的方法，其中在进行逆转录反应的步骤时也使用随机六聚体寡核苷酸作为逆转录引物。

10、一种选自由下列寡核苷酸组成的组的寡核苷酸:

(i) SEQ ID NO: 1,

(ii) SEQ ID NO: 2,

15 (iii) SEQ ID NO: 3 和

(iv) SEQ ID NO: 4。

11、一种 HIV 特异性的逆转录引物，其由如权利要求 10 所述的寡核苷酸组成。

12、一种检测生物样品中 HIV-1、HIV-2 或其组合的试剂盒，所述试  
20 剂盒包含一种逆转录引物，它选自由下列序列组成的组:

(i) SEQ ID NO: 1,

(ii) SEQ ID NO: 2,

(iii) SEQ ID NO: 3,

(iv) SEQ ID NO: 4 和

25 (v) 任意两种或更多上述的序列。

有效检测 HIV-1 和 HIV-2 的寡  
核苷酸逆转录引物及其应用方法

5

本发明涉及改进的检测生物样品核酸序列的方法,特别是检测来源于感染性微生物的序列的方法。

全世界数百万人感染有人免疫缺陷病毒(HIV)。因此,HIV感染成了严重的社会健康问题。HIV感染经过污染的血液制品传播,这就意味着迫切需要能够在患者的样品中检测出少量 HIV RNA 的筛选方法。而且,改进的 HIV 感染治疗方法有效性的提高意味着感染患者的早期检测非常重要,以便开始进行适宜的治疗。

因此,本领域中需要可用于诊断和筛选的高度敏感的 HIV 的检测方法。

本发明提供一种逆转录生物样品中人免疫缺陷病毒(HIV)RNA的方法,此方法包括:

(a)用一种寡核苷酸与来源于上述样品的 RNA 接触,条件是其中所述的寡核苷酸引发与上述 RNA 的至少一部分互补的 DNA 的合成;

其中所述的寡核苷酸选自下列寡核苷酸组成的组:

- (i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'<序列 1>、  
(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'<序列 2>、  
(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'<序列 3>、  
(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'<序列 4>、或者  
(v) 上述的任意组合。

另一方面,本发明提供一种检测生物样品中人免疫缺陷病毒(HIV)RNA存在的方法,此方法包括:

(a)进行逆转录反应,用来源于样品的 RNA 作为一种模板,并且用一种寡核苷酸产生 HIV-特异性逆转录产物,此寡核苷酸与 RNA 中所包括的核苷酸序列互补,它在此为一种引物,

其中的引物选自由下列组成的组:

- (i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'<序列 1>、

- (ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'<序列 2>、
- (iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'<序列 3>、
- (iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'<序列 4>、或者
- (v) 上述任意的组合；

- 5 (b) 扩增逆转录反应的产物以产生扩增产物；以及
- (c) 检测扩增产物；

其中扩增产物的检出显示样品中 HIV RNA 的存在。

扩增可以通过任何方法完成，优选聚合酶链反应 (PCR)。本发明 HIV-1 特异性逆转录引物的使用提供了一种用于检测样品 (优选血浆) 中 HIV-1 和/或 HIV-2 的敏感的方法。

再一方面，本发明提供了检测生物样品中 HIV-1、HIV-2、或其组合的试剂盒，其中试剂盒包括一种逆转录引物，该引物选自由下列组成的组：

- (a) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'<序列 1>、
- (b) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'<序列 2>、
- 15 (c) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'<序列 3>、
- (d) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'<序列 4>、或者
- (e) 上述任意的组合。

此试剂盒还可以包括用于逆转录、扩增和产物检测的试剂和说明。

附图 1 是用溴化乙锭染色的 4% 琼脂糖凝胶的显影说明，它显示应用 (a) 随机六聚体引物 (泳道 2-10)；或 (b) 随机六聚体引物和 LTR8RT 的混合物 (泳道 12-20) 作为一种逆转录引物而获得的 HIV-1 特异性扩增产物。泳道 1 含有标记物，泳道 22、24 和 26 为对照样品。

附图 2 是用溴化乙锭染色的 4% 琼脂糖凝胶的显影说明，它显示应用 (a) 随机六聚体引物和 POL3RT 的混合物 (泳道 2-10) 或 (b) LTR8RT 和 POL3RT 的混合物 (泳道 12-20) 作为一种逆转录引物而获得的 HIV-1 特异性扩增产物。泳道 1 含有标记物，泳道 22、24 和 26 为对照样品。

附图 3 是用溴乙锭染色的 4% 琼脂糖凝胶的显影说明，它显示应用 (a) 随机六聚体引物 (泳道 2-13) 或 (b) 随机六聚体引物与 POL3RT、LTR8RT、2LTRRT 和 2EnvRT 的混合物 (泳道 15-26) 而获得的 HIV-1 特异性扩增产物。泳道 1 含有标记物。

附图 4 是用溴乙锭染色的 4%琼脂糖凝胶的显影说明, 它显示应用 (a) 随机六聚体引物 (泳道 2-15); 或 (b) 随机六聚体引物与 POL3RT、LTR8RT、2LTRRT 和 2EnvRT 的混合物 (泳道 16-29) 而获得的 HIV-1-特异性扩增产物。泳道 1 和 30 含有标记物。

- 5 本发明人已经发现: 当具有与 HIV RNA 中某些序列存在互补的序列的寡核苷酸用作逆转录的引物时, 检测生物样品中人免疫缺陷病毒 (HIV) 更有效。优选, 引物的序列与 HIV RNA 的 3' 端附近的序列对应。

许多分子生物学、微生物学、重组 DNA 和蛋白质生物化学中的技术用于实施本发明, 例如下列中所述, 《现代分子生物学技术》, 第 I、II 和 III 卷, 1997  
10 (F.M., Ausubel 编); Sambrook 等, 1989, 《分子克隆: 实验室手册》, 第二版, 冷泉港实验室 出版, 冷泉港, 纽约; 《DNA 克隆: 一种实用手册》, 第 I、II 卷, 1985 (D.N., Glover 编); 《寡核苷酸合成》, 1984 (M.L., Gait 编); 《转录和翻译》, 1984 (Hames 和 Higgins 编); 《分子克隆的操作指南》; 丛书, 《酶学方法》(学术出版社, Inc.); 以及《蛋白质的纯化: 原理和操作》, 第二版  
15 (Springer-Verlag, 纽约)。

这里所用的“核酸”或“多核苷酸”是指任何长度的含嘌呤和嘧啶的聚合物, 可以是多核糖核苷酸, 可以是多脱氧核糖核苷酸, 或是混合的多核糖-多脱氧核糖核苷酸。它包括单链和双链分子, 例如 DNA-DNA, DNA-RNA 和 RNA-RNA 杂交体, 以及通过与氨基酸主链共轭碱基形成的“蛋白质核酸”(PNA)。  
20 它还包括含有修饰碱基的核酸。

这里所用的核酸序列的“互补体”是指参与与原始序列沃森-克里克碱基配对的反义序列。

这里所用的“引物”是长度约为 5 个至 50 个核苷酸的寡核苷酸, 优选长度为大约 6 个至 25 个核苷酸, 特别优选长度为大约 6 个至 18 个核苷酸, 它与相关的  
25 单链核酸序列形成一个双链体, 并且可以用例如逆转录酶或 DNA 聚合酶使互补链发生聚合反应。

这里所用的“分离的”核酸或多肽是指一种从它的原始环境(例如如果它是天然产生的, 是指它的天然环境, 或如果它是合成的, 是指它的反应混合物)中去除的成分。分离的核酸或多肽一般所含的与其原始成分相关的成分通常小于约  
30 50%左右, 优选小于约 75%左右, 特别优选小于约 90%左右。

“来源于”指定序列的核酸序列是指对应于指定序列区域的序列。它包含与此序列同源或互补的序列。

内部阳性对照 $\equiv$  (IPC) 靶核酸是指一种被克隆到质粒载体中的合成核酸序列，此质粒载体然后通常通过限制性内切核酸酶的作用线性化。一种 IPC 通常有多引物结合序列包围基因探针结合区，并且它在核酸扩增反应中充当假阴性结果的基因对照。

优选的内部阳性对照靶 DNA 的序列为：5'-  
CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGAACGCACGGACGAGGACATCA  
TAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGGTCTAACGCAGCAGTCAGTG  
10 TATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTCAGTGTCTGCTCCAGGATCGT  
G-3' <序列 5>。

在此所用适宜的逆转录条件为一种寡核苷酸引发 cDNA 的合成，它包括在一定温度下，将 RNA 和引物寡核苷酸与一种逆转录酶和核苷酸在一定温度下保温一定时间，以产生 cDNA 的合成。

15 可通过常用的方法制备核酸，此核酸包含此处或随后公开的序列。例如，可通过化学方法合成 DNA，例如应用 Matteucci 等人的“氨基亚磷酸酯载体方法”，1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, Yoo 等的方法，1989, J. Biol. Chem. 764:17078 或其它已熟知的方法。也可通过本领域已知的许多方法修饰此核酸。这种修饰的非限制性的实例包括甲基化，“加帽”，用一种类似物取代一个或多个天然核苷酸，和核苷酸间修饰，诸如不带电连结（例如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸盐、氨基甲酸酯等）或带电连结（例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）。核酸可包含一个或多个附加的共价连结部分，诸如蛋白（核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚左旋赖氨酸等）、嵌入剂（丫啶、补骨脂素等）、螯合剂（例如金属、放射性金属、铁、氧化金属等）和烷化剂。名词“核酸”也包含 PNA。此核酸可衍生自一  
25 种甲基或乙基磷酸三酯或一种烷基氨基磷酸盐连结的形成。而且，本发明的核酸序列也可用一种标记物进行修饰，此标记物可直接地或者间接地提供检测信号。典型的标记物包括放射性同位素、荧光分子、生物素等等。

在此所用的扩增是指一种重复的方法，通过此方法复制核酸。适宜的扩增方法包括聚合酶链反应、连接酶链反应和转录介导的扩增，但不局限于这些。

30 在此所用的人免疫缺陷病毒 (HIV) 指逆转录病毒属的物种，包括：HIV-1、

HIV-2 和 SIV, 以及它们的变种。本发明可检测的 HIV 分离群包括 HIV-1 和 HIV-2, 但并不局限于此。

本发明提供自生物样品逆转录 HIV RNA 的方法, 此方法用于检测生物样品中的 HIV。检测到 HIV 特异扩增产物表明此样品中存在 HIV RNA。

5 根据本发明, 通过任何常规方法获得患者的生物样品。适宜的生物样品包括但不限于血、血清、血浆、尿、乳汁、组织样品和脑脊液。优选血浆作为 HIV RNA 的来源。

10 可通过任意方法处理生物样品, 以便逆转录试剂接近 RNA, 特别是样品中包含的 HIV RNA。“来源于”生物样品的 RNA 为开始存在于样品中, 并且通过处理样品而获得接近途径的各种 RNA。优选应用本领域所熟知的任意方法提取 RNA, 诸如应用硫氰酸胍的方法, 或者应用市售的试剂或方法, 诸如 Genra Systems Inc. 的 PureScript 0 (Minneapolis MN)。可应用任意能够分离核糖核酸酶的 RNA、其它蛋白质、和/或其它任何可干扰逆转录的组分的提取方法。

15 然后将样品中提取的 RNA 与寡核苷酸引物接触, 在此寡核苷酸引发 DNA 合成, 所合成的 DNA 与所提取 RNA 的至少一部分互补。寡核苷酸引物的序列来源于 HIV 的序列。此引物对应于 HIV RNA 的区域可能为下游序列, 即 3' 端, 此区的检测是需要的。这些区可包括, 例如长末端重复序列 (LTR) 区, 此区编码病毒逆转录酶 (Pol)、Gag 蛋白、Tat 蛋白、包膜糖蛋白、Vif、Vpr 和 Vpu 蛋白, 以及 Rev 区, 它编码一种转录因子反应成分。优选此引物对应于 HIV 基因组近 3' 20 端的序列。此引物序列可用于特异性地鉴别 HIV 特异分离物(例如 HIV-1 和 HIV-2 的分离物)。通过引物与来源于此分离物的 RNA 杂交, 引物可鉴别一种特异的分离物, 在此条件下它不与其他分离物的 RNA 杂交, 即引物自身含有其分离物之间不同的序列。可替代的方法为, 可应用此引物的序列引发一个 HIV RNA 片段的合成, 此片段在不同分离物之间是不同的, 即分离物之间不同的序列可能为引物序 25 列的下游序列。

根据序列保守的理论考虑、分子内和分子间的相互作用、以及预测的扩增子和环境序列的二级结构来选择可用于实施本发明的逆转录引物。而且设计此引物和检测系统, 以进行 HIV 基因组、多病毒种和内部阳性对照 (IPC) RNA (或 DNA) 的联合扩增 (和联合检测)。

30 非限制性的本发明逆转录引物的实例显示于表 1 中。

表 1			
来源	标示	序列	序列号
HIV-1	POL3RT	5'-CTTGTATTACTACTG-3'	1
HIV-1	LTR8RT	5'-CCCTGTGGCGCC-3'	2
HIV-2	2LTR1RT	5'-GCGACTAGGAGAGA-3'	3
HIV-2	2Env2RT	5'-CCCAGACGGTCAGT-3'	4

应用一个或多个上述引物进行逆转录。也可加入随机引物，诸如随机六聚体逆转录引物 (N6, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。应用常规方法进行逆转录，诸如在《当代分子生物学技术》，第I、II和III卷，1997 (F.M., Ausubel 编) 中；在美国专利 5,322,770 中；Young 等在 J. Clin. Microbiol. 31(4):882(1993) 中；Myers 等在《生物化学》30(3):7661(1991) 中；或者序列号\_\_\_\_，代理号 2094/0E287 的待审专利申请中所述的方法。

在逆转录反应后，可通过常规方法分离并回收 cDNA 产物或其它产物。优选扩增 cDNA 产物或其它产物。可应用任意方法进行扩增，包括聚合酶链反应 (PCR)、连接酶链反应、链置换扩增、转录介导扩增和核酸单碱基扩增，但并不仅仅限制于这些。优选应用 PCR。通常将含有所有为实施 PCR 而必需的组分的反应混合物（包括 HIV-特异扩增引物）直接加入逆转录反应混合物。然后应用所用引物对指定的条件完成扩增。例如在序列号\_\_\_\_，代理号 2094/0E285 的美国专利申请和下面实施例中公开了适宜的扩增引物对。

15 扩增后，应用本领域已知的任意方法检测扩增产物，包括琼脂糖或丙烯酰胺凝胶电泳；在载体上获得扩增产物（例如参见下面的实施例 1），然后进行比色检测；ECi 检测；荧光、放射性同位素检测和化学发光检测，但并不仅仅限制于这些。可在市场上获得用于这些检测方法的试剂，例如 Molecular Probes、Eugene、Oregon 和 Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY。

20 检测到 HIV-特异扩增产物表明样品中存在 HIV RNA。当应用凝胶电泳时，通过其大小确定 HIV-特异扩增产物，正如根据与反应中所用扩增引物对应的序列在 HIV RNA 中的定位所预测的一样。

本发明提供检测生物样品中 HIV RNA 的试剂盒，它包含上面表 1 中所示的一个或多个逆转录引物。此试剂盒还包含用于逆转录的试剂，以及例如通过 PCR 检

测 HIV cDNA 的附加试剂。

下面的实施例是对本发明进行举例说明，并不是来限制本发明。

方法:

1、样品制备:

5 应用硫氰酸胍或 PureScript<sup>®</sup> RNA 分离试剂 (Gentra Systems, Minneapolis MN) 制备血浆样品的 RNA。对厂家用于体液的技术方案进行改进, 包括应用 40 g 糖原而不是用 20 g 作为载体以促进病毒 RNA 的沉淀。另外, 在大多数情况下, 进行 RNA 的异丙醇沉淀, 并用乙醇冲洗此 RNA 球后, 将此 RNA 球再悬浮于 RT 缓冲混合物中, 而不是将其悬浮于厂家所提供的 RNA 水合溶液中。

10 2、逆转录:

通过将 100 U 重组 Moloney 鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶 (RT) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) 加入到 50 L 溶液中, 该溶液含有 50 mM Tris-HCl (PH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、0.4 mM 的每种 dNTP (Pharmacia Biotech)、4 M 随机六聚体 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 和/或特异性逆转录引物, 以及 20 单位 RNA 酶抑制剂 (Promega, Madison, Wisconsin) 的焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水溶液, 来催化由 RNA 合成 cDNA。在 42EC 保温 30 分钟  
15 后, 在 100EC 进行 RT 反应 5 分钟, 以破坏 RT 的活性。将每个反应冷却 1 分钟, 然后以 16000 x g 微量离心 4 秒。

3、PCR 扩增:

20 于一种 PE9600 热循环器 (Perkin-Elmer) 中, 在含 25 mM Tris-HCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.725 mM EDTA、54 mM KCl、3.72 mM NaCl、40 M DTT、108 g/ml 明胶 (IV 型)、9.5% 甘油、0.02% Tween 20、0.02% NP40、小牛胸腺 DNA (2 g)、1.2 mM 的每种 dNTP、0.4 M 每种引物、10 份线性化内部阳性对照 (IPC) 质粒 DNA 和 16 U 的 Taq 聚合酶的 100 L 溶液中进行 PCR。将 Taq、TP1-12 和 TP4-9  
25 的单克隆抗体加入此反应, 它们与 Taq 聚合酶的摩尔比分别为 50:1 和 5:1, 这样使抗体与 Taq 聚合酶的摩尔比为 55:1, 这些抗体的制备方法公开在美国专利 5,338,671 中。在 96EC 进行初变性 3 分钟后, 40 轮的扩增在 96EC 进行 5 秒, 并在 68EC 进行 40 秒。循环结束时, 在 103EC 进行一种热后步骤 5 分钟, 以灭活 Taq 聚合酶。所用的扩增引物显示于下面表 2 中。

30

表 2

ID	来源	序列	序列号
JBLT R4	HIV-1(s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	6
JBLT R6	HIV-1(as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	7
JBLT R8	HIV-1(as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA-3'	8
2LTRe	HIV-2(s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA-3'	9
2LTR-R1	HIV-2(as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	10

#### 4、PCR 产物的检测:

可通过 (i) 凝胶电泳, 然后进行溴化乙锭染色; 也可通过 (ii) 在扩增过程中应用 5'-生物素标记的引物(有义链)来检测 PCR 的产物。在这种情况下, 通过杂交到寡核苷酸探针而捕获此扩增产物, 此寡核苷酸探针与胶乳颗粒共价连接, 这些胶乳颗粒沉积在一种流通膜 (SureCell<sup>®</sup> tests, Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY) 的表面。HIV-1 探针为: 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr)< 序列号 11> 和 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)< 序列号 12>; HIV-2 探针为: 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)< 序列号 13>。将探针/产物复合体与链霉亲和素 (SA)-辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物反应, 它可催化一种染料前体氧化转变为一种染料 (蓝色)。将颜色强度与颜色标准进行对比, 通过视觉对蓝色强度进行计分 (0-10)。所有视觉颜色得分>3 者被认为是阳性结果。

#### 实施例 1:

##### 应用 HIV-特异引物或随机引物的逆转录效率

应用本发明 HIV-特异引物或随机六聚体逆转录引物 (N6, Pharmacia Biotech) 进行下面的实验, 以比较来源于人血浆样品的 HIV RNA 的逆转

录效率。

稀释人血浆，使每 100 L 中含有 1000 份 HIV RNA，这样每个反应中大约含有 100 份 HIV RNA。用硫氰酸胍从血浆中提取 RNA。将此 RNA 球溶解在 26 L 焦碳酸二乙酯处理水中。

- 5 此逆转录反应物包含：13 L RNA、10 L 逆转录混合物（它含有 first-strand 缓冲剂、0.1 M DTT、20 U RNA 酶（Promega, Madison, WI）、0.4 mM 的每种 dNTP 和 200 单位 Moloney Murine Leukemia Virus(M-MLV)逆转录酶)。然后根据被检测的条件加入另外 2 L 下面的引物混合物（它们均为 50 M），这些引物混合物为：
- 10 (1) 2 L N6 随机引物；(2) 1 L N6 随机引物+1 L LTR8RT 引物；(3) 1 L N6 随机引物+1 L POL3RT 引物；(4) 1 L LTR8RT+1 L POL3RT。将此逆转录反应在 42EC 保温 30 分钟；加热至 100EC 保持 5 分钟；然后在冰上冷却 1 分钟。然后将 75 L PCR 主混合物加入含 cDNA 的反应混合物中，在下面的条件下进行 PCR：在 96EC 预热 3 分钟，在 96EC 进行 5 轮解链，然后在 62EC 进行退火和扩增 5 秒，然后在 96EC 进行 35 轮解链，并在 68EC 进行退火和扩增 40 秒。然后在 4%琼脂
- 15 糖凝胶中解析扩增产物，并用溴化乙锭显色。

- 结果：如附图 1 和 2 中所示，应用 HIV-特异逆转录引物，不论是单独使用，还是与随机六聚体引物一起使用，都可使检测到的 HIV-1-特异扩增产物显著地增多。将附图 1 的泳道 2—10（仅应用随机引物）与附图 1 泳道 12—20（LTR8RT+随机引物）、附图 2 的泳道 2—10（POL3RT+随机引物）
- 20 和附图 2 的泳道 12—20（LTR8RT+POL3RT）进行比较。还观察了应用 100 M 或 200 M 随机引物时的结果。

### 实施例 2:

#### 患者样品中 HIV RNA 的检测

- 进行下面的研究，应用随机六聚体逆转录引物和联合应用随机引物与 HIV-特异逆转录引物对患者样品中 HIV RNA 的检测进行比较。
- 25

从 CD4 T 细胞计数大于 500 的患者中采集 HIV 阳性血浆样品，这表明他们是无症状的，并且其病毒含量比较低。

- 按照上面实施例 1 中所述的方法，从血浆样品中提取 RNA。将 13 L 的这种 RNA 溶液稀释于 15 L 水中。将每个样品分为 12 L 的二等份，以进行逆转录。
- 30 按照上面实施例 1 所述的方法制备这 2 个逆转录反应混合物。每个混合物或者

包含 2 L 的 100 M 随机引物+1 L 水, 或者包含 2 L 的 100 M 随机引物+1 L 50 M 的 HIV 特异引物混合物, 此混合物含有等量下面的引物: (1) POL3RT; (2) LTR8RT; (3) 2LTRRT 和 (4) 2EnvRT。按照上面实施例 1 所述的方法进行逆转录和扩增反应。

- 5 通过在 4% 琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳, 并用溴乙锭染色而检测 HIV 特异扩增产物, 并且也可通过上述 SureCell<sup>®</sup> 比色法进行检测。

结果: 附图 3 和 4 显示的是通过凝胶电泳检测的扩增产物。表 3 是通过相对值表示用比色法检测的 HIV 特异扩增产物。IPC 表示内部阳性对照引物。

样品	仅用随机引物			N6+RT 引物		
	LTR	POL	IPC	LTR	POL	IPC
	3/4	3/4	1P	3/4	3/4	1P
1	0	0	8	0	0	8
2	8	7	8	8	7	7.5
3	5	6	8	7	7	7.5
4	5	5	8	5	5	8
5	7	5	8	7.5	7.5	8
6	无	无	无	无	无	无
7	6	7	8	5	7.5	8
8	8	8	8	8	8	8
9	2	2	8	3	0	8
10	5	7	8	7	8	8
11	6	7	8	6	6	8
12	8	8.5	8	7.5	9	7.5
13	8	7.5	8	8	7.5	8
14	0	0	8	0	0	9
15	0	0	8	0	0	8
16	2	0	8	7	8	9
17	7.5	7.5	8	7.5	7.5	8
18	6	7	8	6	7	8
19	7.5	7.5	7.5	7.5	8	8
20	2	1	8	5	5	8
21	6.5	6.5	8	7	7.5	7
22	1	1	8	3	5	8
23	3	1	8	2	2	8
24	7	9	8	7	9	7
25	无	无	无	无	无	无
26	9	9	7	9	9	6.5
27	3	4	7	5	7	8.5
28	2	2	8	2	2	8.5
阴性	0	0	7	0	0	7
阳性	5	5	7	5	5	7

样品 3 和 10 中，在随机六聚体引物中加入 HIV 特异逆转录引物比单独应用随机引物所引起的扩增反应的程度大。在应用 HIV 特异逆转录引物的样品中用比色法检测的产物的量也较多。

5 在逆转录反应中仅用随机引物时，既没有用凝胶电泳，也没有用比色法检测样品 16、20 和 22。但当一起应用随机引物和 HIV 特异逆转录引物时，这些样品为阳性。

这些结果表明本发明的方法和组合物在筛选患者和供血者的 HIV 时可减少假阴性结果的发生率。

10 前面提到的所有专利、申请、论文、出版物和试验方法在这里全部作为参考文献引用。

本领域的技术人员可根据上面本发明的说明书对本发明进行一些改变。这些显见的改变均是在所附权利要求书允许的全部预期范围内进行。

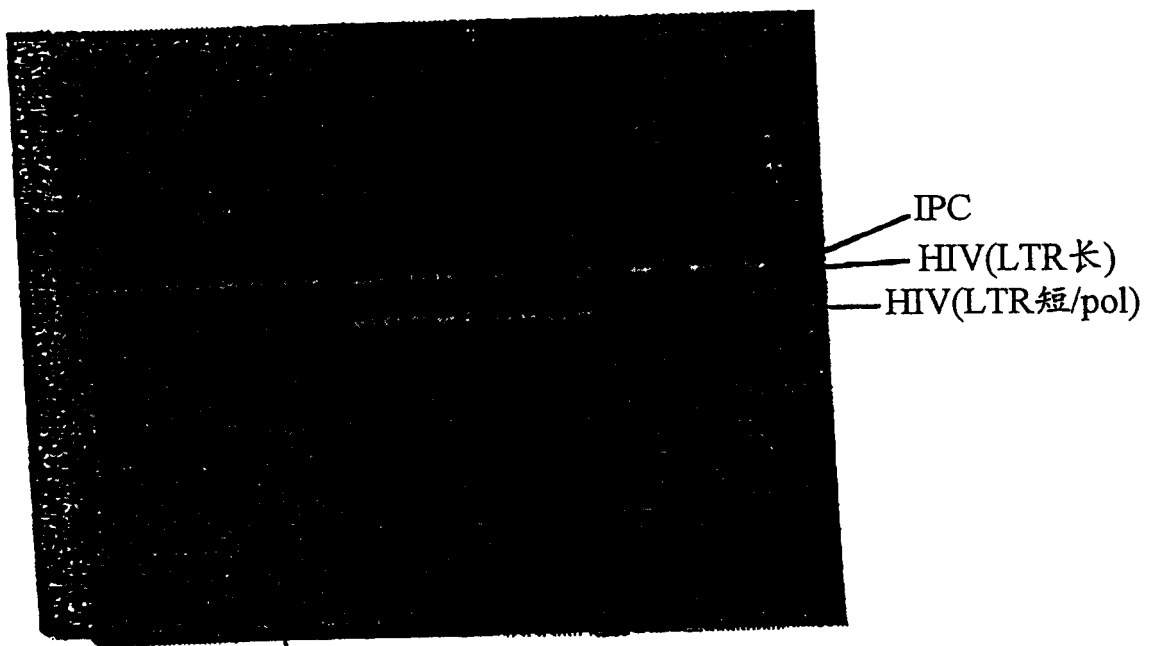


图 1

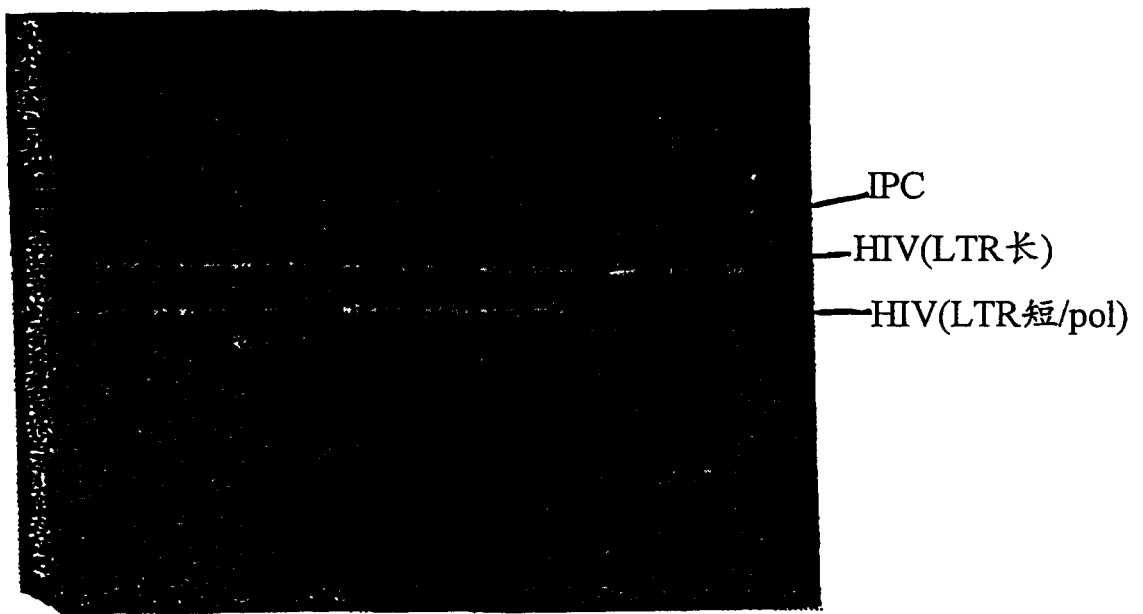


图 2



图 3

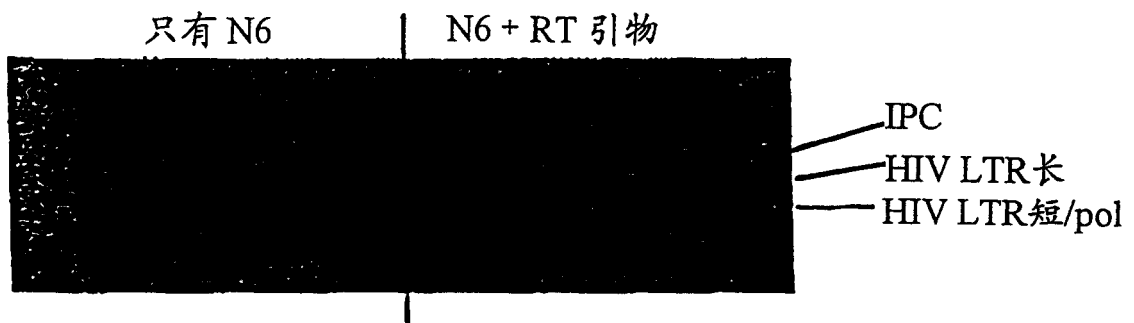


图 4

专利名称(译)	有效检测HIV - 1和HIV - 2的寡核苷酸逆转录引物及其应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1186455C</a>	公开(公告)日	2005-01-26
申请号	CN00105397.3	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
[标]发明人	DR帕特森 JA普斯卡斯 K宋 JM林南		
发明人	D·R·帕特森 J·A·普斯卡斯 K·宋 J·M·林南		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/569 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/703		
优先权	60/118417 1999-02-02 US		
其他公开文献	CN1271020A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了检测人的生物样品中人免疫缺陷病毒的方法和试剂盒。还描述了寡核苷酸逆转录引物在这种检测人免疫缺陷病毒的方法和试剂盒中的应用。

