

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02810268.1

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1279182C

[22] 申请日 2002.4.17 [21] 申请号 02810268.1

[30] 优先权

[32] 2001.4.17 [33] US [31] 60/284,334

[86] 国际申请 PCT/US2002/012035 2002.4.17

[87] 国际公布 WO2002/083927 英 2002.10.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.20

[71] 专利权人 纽约血液中心有限公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 琳达·安德勒斯

卡门·妮古拉·尼科尔斯

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 余刚

权利要求书 7 页 说明书 35 页 附图 15 页

[54] 发明名称

通用多变异体检测系统

[57] 摘要

本发明提供了一种采用单检测探针诊断检测如 HIV、丙型肝炎、乙型肝炎 (HBV)、细小病毒 B19 等病原体变异体的方法。



1. 用于检测样本中靶核酸分子存在的引物延伸链反应方法,所述方法包括:

(a) 下游引物与所述靶核酸分子在适于引物延伸链反应进行的条件下进行杂交;

(b) 以所述靶核酸分子为模板以延伸所述下游引物,从而生成下游引物延伸产物,其中所述下游引物与所述下游引物延伸产物相接合,形成下游引物扩增产物;

(c) 将所述下游引物扩增产物从其模板上变性;

(d) 上游引物与如下分子杂交:

(i) 与靶核酸分子互补的核酸分子, 如果存在;
或者

(ii) 下游引物扩增产物;

(e) 以互补靶核酸分子, 如果存在的话, 或者以所述下游引物扩增产物为模板延伸所述上游引物, 其中所述上游引物与所述上游引物延伸产物相接合, 形成上游引物扩增产物;

(f) 将所述上游引物扩增产物从其模板上变性;

(g) 所述下游引物与所述上游引物扩增产物进行杂交;

(h) 以所述上游引物扩增产物为模板延伸所述下游引物, 从而生成附加下游引物延伸产物, 其中所述下游引物与所述附加下游引物延伸产物相接合, 形成附加下游引物扩增产物;

(i) 将所述附加下游引物扩增产物从其模板上变性;

(j) 所述上游引物与所述下游引物扩增产物进行杂交;

(k) 以所述下游引物扩增产物为模板延伸所述上游引物, 从而生成附加上游引物延伸产物, 其中所述上游引物与所述附加上游引物延伸产物相接合, 形成附加上游引物扩增产物;

(l) 将所述附加上游引物扩增产物从其模板上变性;

(m) 以所述附加下游引物扩增产物和所述附加上游引物扩增产物分别作为所述上游引物和所述下游引物的模板, 重复步骤 (g) 到步骤 (l) 足够次数, 以产生可以检出的附加下游引物扩增产物或者附加上游引物扩增产物; 并且

(n) 检测所述附加下游引物扩增产物或者所述附加上游引物扩增产物的存在; 其中的改进为下游引物 3'末端的核苷酸与如下分子进行杂交:

(i) 所述上游引物延伸产物或者所述附加上游引物延伸产物的 5'末端核苷酸; 或者

(ii) 与所述上游延伸产物或者所述附加上游引物延伸产物 5'末端核苷酸距离一个核苷酸缺口的核苷酸, 其中所述缺口包括一段已知是高度保守的序列; 并且

其中所述上游引物的 3'末端核苷酸与如下分子进行杂交:

(i) 下游引物延伸产物或者附加下游引物延伸产物的 5'末端核苷酸; 或者

(ii) 与所述下游延伸产物或者所述附加下游引物延伸产物 5'末端核苷酸距离一个核苷酸缺口的核苷酸, 其中所述缺口包括一段已知高度保守的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述靶核酸分子已知具有变异序列。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述引物延伸链反应是聚合酶链式反应(PCR)。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶核酸分子是病毒的核酸分子。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述病毒是人类免疫缺陷病毒(HIV)。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述病毒是丙型肝炎病毒(HCV)或者乙型肝炎病毒(HBV)。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中所述缺口包括病毒基因组的一段高度保守序列。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缺口包括1-5个核苷酸。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述缺口包括2个核苷酸。
10. 根据权利要求3所述的方法,其中与所述步骤(d)(i)中所述靶核酸分子互补的所述核酸分子以所述靶核酸分子的cDNA形式单独提供。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中检测所述附加下游引物扩增产物或者附加上游引物扩增产物的方法包括:
 - (A) 提供一自变信号发生探针,其中所述探针包括:
 - (i) 与报告基团相接合的第一核酸序列,所述报告基团能够产生可检测信号;
 - (ii) 一第二核酸序列,具有如下特征:
 - (a) 与所述第一核酸序列互补,以及

(b)被接合至配合基团,当所述第一核酸序列和所述第二核酸序列互相杂交时,此基团能够改变所述报告基团的信号;以及

(iii)连接所述第一核酸序列和所述第二核酸序列的探针序列;其中所述探针序列包括下述序列之一:

(a)上游引物的片段的核酸序列;或者

(b)下游引物的片段的核酸序列;以及

(B)用所述探针接触所述扩增产物;

其中当所述探针的所述探针序列与所述附加下游引物扩增产物或者所述附加上游引物扩增产物进行杂交时,所述第一和所述第二核酸序列则发生变性,因此所述报告基团产生信号;以及

其中所述报告基团产生的信号指示所述靶分子的存在。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述探针序列包括如下成分之一:

(a)一段所述上游引物的核酸序列,以及不包括与所述下游引物互补的核酸序列片段;或者

(b)一段所述下游引物核酸序列,以及不包括与所述上游引物互补的核酸序列片段。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述探针序列包括如下成分之一:

(a)所述上游引物的核酸序列片段以及与所述下游引物互补的核酸序列片段;或者

(b)所述下游引物的核酸序列片段以及与所述上游引物互补的核酸序列片段。

14. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述探针产生的所述可检出信号与所述靶核酸分子的量成比例。
15. 根据权利要求 13 所述的方法，其中 60-99%所述探针序列包括如下成分之一：
 - (i) 所述上游引物的所述核酸序列片段；或者
 - (ii) 所述下游引物的所述核酸序列片段。
16. 根据权利要求 11 所述的方法，其中：

如果所述探针序列包括所述下游引物的所述核酸序列片段，所述下游引物与上游引物的摩尔比例应该在 1:5-1:20 范围内；或者

如果所述探针序列包括所述上游引物的所述核酸序列片段，所述上游引物与所述下游引物的摩尔比例应该在 1:5-1:20 范围内。
17. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述探针序列包括 10-30 个核苷酸残基。
18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述探针序列包括 18-24 个核苷酸残基。
19. 根据权利要求 11 所述的方法，其中可检出的信号为发光信号。
20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述发光信号为荧光信号。
21. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述光信号是化学发光信号。
22. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述报告基团连接在自变信号发生探针的 5'末端或者 3'末端。

23. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述配合基团连接在所述自变信号发生探针的 5'末端或者 3'末端。
24. 根据权利要求 11 所述的方法，其中报告基团为荧光基团。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述荧光基团为咕吨染料、花青染料、丹磺衍生物、EDANS、香豆素、荧光黄、BODIPY、Cy3、Cy5、Cy7、德克萨斯红、赤藓红、萘胺、俄勒冈绿，或者其组合。
26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述咕吨染料为荧光素或罗丹明。
27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中所述荧光素选自 5-羧基荧光素 (5-FAM)、6-羧基荧光素 (6-FAM)、2',4',1,4,-四氯荧光素 (TET)、2',4',5',7',1,4-六氯荧光素 (HEX)、曙红、钙离子绿以及 NED 构成的组。
28. 根据权利要求 26 所述的方法，其中罗丹明可以为四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)、四丙醇-6-羧基罗丹明 (ROX)、2',7'二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基罗丹明 (JOE) 或者四甲基罗丹明。
29. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述配合基团是淬灭剂。
30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述淬灭剂为 DABCYL、葱醌、硝基噻唑、硝基咪唑或者孔雀绿。
31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述 DABCYL 为 DABSYL、DABMI、或者甲基红。
32. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述配合基团是一个荧光基团。

-
33. 根据权利要求1所述的方法,其中所述扩增产物的检测和定量通过终端分析进行。
34. 根据权利要求1所述的方法,其中所述扩增产物的检测和定量通过实时分析进行。
35. 根据权利要求1所述的方法,其中所述扩增产物是利用一系列循环阈值测定得到的标准曲线检测的。
36. 根据权利要求13所述的方法,其中80-97%所述探针序列包括如下成分之一:
- (i) 所述上游引物的所述核酸序列片段; 或者
 - (ii) 所述下游引物的所述核酸序列片段。
37. 用于检测样品中靶核酸分子的试剂盒,其中所述靶核酸分子具有变异序列, 包括:
- (i) 用于权利要求1所述方法的一套引物;
 - (ii) 进行引物延伸链反应的试剂, 以及;
 - (iii) 可以检测所述引物扩增产物存在的自变信号发生探针,其中所述探针包括与检测可检出信号的报告基团相接合的第一核酸序列,与改变所述报告基团信号的配合基团相接合的第二核酸序列,以及连接所述第一和所述第二核酸序列的探针序列。

通用多变异体检测系统

相关申请的交叉参考文献

本申请要求于 2001 年 4 月 17 日提交的美国临时申请第 60/284,334 号的利益，并结合于此作为参考文献。

本发明背景技术

密切相关遗传变异体的检测是分析诊断技术领域的一项重要挑战。病原体诸如病毒和细菌通常变异频繁，从而形成上述遗传变异体。

例如，不同起源的人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV-1) 具有不同的核苷酸序列。用组和亚型区分不同类型的 HIV-1。其主要组 M 由十个现已确定的亚型组成，分别命名为亚型 A 到 H, J 和 K。除 M-组病毒外，其它已经确定的两组分别是 N 和 O (Simon 等, 1998, Nature Med, 4:1032-1037)。在组和亚型中，由于 HIV-1 复制系统的错误倾向特性，新的病毒株持续不断地产生。

类似地，丙型肝炎病毒 (HCV) 的 RNA 也不具有均一特性。即使是在单个被感染个体，也可能有大量异质的病毒基因组 (准种类) 共存。此外，根据不同部位分离得到的病毒变异体核苷酸序列分析确定了 HCV 的多种基因型。现在已经发现有 6 种主要的 HCV 基因型，用数字分类为 1 到 6。基因型可以根据亚型进一步进行划分。

由于同一种属病原体的这种遗传变异，能够提供可靠结果的诊断检测范围非常有限。现今所用的大多数检测样品中病原体的方法，主要是如下方法之一：根据检测病原体的抗原、病原体诱导的抗体，或病原体的固有酶类，如 HIV 的固有逆转录酶。这些方法的缺点除检测困难外，还经常不太灵敏。例如，血库现在常用的筛选 HIV-1 感染供血者的方法是检测病毒蛋白的抗体。但是对于早期急性期感染的个体，由于体内的可用于诊断的病毒抗体尚未出现，用这种检测方法就会出现遗漏。

基于核酸序列检测的筛选方法具有灵敏度高和方便的优点。但是，对于密切相关遗传变异体的检测，这些检测并不总是可靠的。

现今的基于核酸序列检测的方法之一是采用分子信标 (Tyagi 和 Kramer, 1996, *Nat. Biotechnol.*, 14(3):303-308) 实现。分子信标是一茎环状结构的单链寡核苷酸探针 (见图 1)。分子的环状部是一个与靶核酸分子互补的探针序列。茎部是由位于探针末端的互补的臂结构序列退火而形成的。将一个荧光基团连接到一个臂的末端；并且将一个淬灭基团连接到另一个臂的末端。茎部的臂结构互相杂交，从而保持上述两个基团的位置临近，使荧光基团的荧光通过能量转移而发生淬灭 (图 1a)。在信标的互补 DNA 靶序列存在时，环状结构与靶序列杂交，防止茎部的臂结构保持杂交状态。荧光基团和淬灭基团被分开，从而可以得到荧光 (图 1b)。

目前，分子信标应用于实时定量 PCR。设计 PCR 引物来扩增某一特定 DNA 片段，其长度通常小于 200 碱基对。信标代表性地设计为使其环状结构与被扩增 DNA 链之一的一短链区域 (20-25b.p.) 互补。这些被扩增 DNA 链的互补区域是被加入到引物的部分。

分子信标具有相当高的序列特异性。事实上，近年来这种技术原理的应用之一是等位基因鉴别或者“分子的基因型分析”。分子

信标对序列变异的灵敏性甚至可以区别在一给定靶序列内的单核苷酸多态性(Tyagi等, 1998, *Nat. Biotechnol.*, 16(1):49-53; Kostrikis等, 1998, *Science*, 279:5354:1228-9; Marras等, 1999, *Genet. Anal.*, 14(5-6) 151-6; Tapp等, 2000, *Biotechniques*, 28(4):732-8)。

迄今为止, 这种对序列变异的灵敏性在很大程度上限制了分子信标技术在病毒感染诊断方面的应用。分子信标不能有效地检测靶DNA或者RNA的变异序列。例如, 用于识别HIV A链PCR产物的信标可能不能够识别HIV B链的PCR产物(图2)。

这样, 目前的技术需要多个不同的信标才能够检测病毒所有不同的基因型。也就是说, 即使是HIV-1基因型的一些高度保守区域已知, 也有可能需要多个不同信标才能检测到此病毒的所有已知亚型。而且, 即使是采用多个不同的信标, 仍不能够检测到没有识别的其它HIV-1变异体。

由此, 目前的技术并不能够提供一个方便或者有效的诊断分析法, 可以检测病原体所有相关的基因变异体。

现代医学急需一种灵敏、方便的基于核酸的筛选分析法, 从而能够检测密切相关的基因变异体。例如, 人们急需能够直接从被污染的血液中检测病毒、细菌和其它病原体的分析法。这些分析法用来检测早期急性期病原体感染个体的血液或者血浆样品(UNITS), 即在感染个体体内出现可以检测到的病毒抗体之前。

由此, 本发明的目的之一就是克服现有技术的局限性, 提供一种用于检测特定靶核酸分子多种变异体的方便、有效的诊断分析法。

发明简述

这些以及其它目标,对本领域普通技术人员是容易理解的,可以通过本发明提供的一种用于诊断的方法实现,即采用诸如通用多变异体检测系统的单检测探针检测一定病原体变异体的方法,如 HIV、丙型肝炎、乙型肝炎(HBV)、细小病毒 B19 等。在一个实施例中,该单检测探针为分子信标。

附图说明

图 1: 分子信标的图示。在适宜的退火温度下,信标将会为如下情况之一:(A)没有互补靶序列时,形成一个茎环状,从而淬灭基团(□)淬灭报告基团(O)发光;或者(B)有互补靶序列存在时,与靶序列结合,从而报告基团发出光信号。

图 2: 采用分子信标的传统 PCR。PCR 引物的作用是扩增一段病毒 RNA。分子信标的环状结构与两个 PCR 引物内部的一段 PCR 产物杂交。信标能够与病毒 A 链的 PCR 产物杂交,但是由于靶序列的配对错误不能够检测病毒 B 链的 PCR 产物(以小写字母表示)。

图 3: 本发明原理之一的图示。(a.)下游和上游 PCR 引物(>30b.p.)分别以直接“鼻对鼻”的方式与靶 RNA(或者 DNA)及其互补 DNA 链杂交,由此生成的 PCR 产物不含任何干扰序列。与分子信标靶序列特异性的环状结构杂交的 DNA 是由引物之一与其它引物的互补链相接合而产生的。PCR 引物将会与含有错误配对的残基(以 X 表示)的靶模板链杂交。虚线表示杂交。(b.)由所有模板链扩增得到的 DNA 序列与引物之一及其它引物互补链的接合序列一致。由此,分子信标能够与所有模板链扩增得到的 PCR 产物杂交。

图 4: 本方法的实例。采用“鼻对鼻”引物和分子信标对不同亚型的 HIV 进行扩增, 其中分子信标能够识别引物之一与其它引物的互补链相接合而产生的序列。小写粗体字符所示为 HIV 变异体序列和引物或者信标环状结构之间的错误配对。

图 5: 引物位置变化图示。(A) 信标环状结构可以设计成与两个 PCR 引物均等扩增的序列杂交, 如 (I) 所示。或者, 可以设计信标与主要由上游或者下游引物生成扩增序列进行不均匀杂交, 如 (II) - (IV) 所示。(B) 在另一个变化, 上游和下游引物之间有核苷酸的缺口, 这个缺口与病毒基因的一个高度保守区域相应。

图 6: 4 个 HIV 变异体 V3 环状结构和侧翼区域的 DNA 序列排列显示传统和“鼻对鼻”PCR 的分子信标和引物的位置。(a) HIV/RT-1 的蛋白编码链与其它 3 个病毒变异体 HIV/RT-10、HIV/38-1 和 HIV/38-3 排列在一起。与 HIV/RT-1 序列以及分子信标的配对错误以小写粗体字母表示。点状虚线(.....)和短线虚线(--)分别表示传统 PCR 上游和下游引物的相对位置。双横线(=)和实线(—)分别表示“鼻对鼻”PCR 上游和下游引物的相对位置。分子信标的位置显示在序列上方。所有引物和信标探针序列均来自于 HIV/RT-1 序列。(b) 分子信标的分子结构。探针环状结构以大写字母表示, 互补的茎部核苷酸以小写字母表示。荧光基团 FAM 接合在 5' 末端, 淬灭基团 DABCYL 接合在 3' 末端。

图 7: 传统和“鼻对鼻”PCR 实时定量 PCR 方法的比较。采用 (a) 传统或者 (b) “鼻对鼻”PCR 方法对 4 个不同 HIV 变异体进行实时定量 PCR 的结果。PCR 反应含有 HIV/RT-1(•)、HIV/RT-10(o)、HIV/38-1(▼)、HIV/38-3(□) 10^6 拷贝, 而没有模板(+)或者 150ng 人 DNA (X)。

图 8: 传统 PCR 产物的琼脂凝胶分析。胶带所显示的是 HIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1 和 HIV/38-3 经传统 PCR 方法得

到的 PCR 产物。条带 1: 50bp 梯带; 条带 2: 没有模板的结果; 条带 3: HIV/RT-1; 条带 4: HIV/RT-10; 条带 5: HIV/38-1; 条带 6: HIV/38-3。

图 9: 采用“鼻对鼻” RT-PCR 方法扩增、产物采用分子信标检测进行 HCV RNA 定量的标准曲线举例。(a) “鼻对鼻” RT-PCR 检测 HCV RNA, 需要在每个 RT-PCR 反应中加入 0、10、25、50、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 或者 10^6 合成 HCV RNA 分子。采用 ABI 7700 序列检测仪在退火温度检测每一个 PCR 循环的荧光变化 (ΔR_n)。采用与仪器配套的软件计算阈值 (Ct)。(b) 每一个标准样品的 RNA 拷贝数与 Ct 值 (•) 相对应描画在一张图表内。未知检测样品的 Ct 值 (o) 与标准曲线相对应描画在一张图标内, X 轴外推即可得到 RNA 拷贝数。

图 10: 本发明扩增反应的步骤图示。

优选具体实施例详细描述

本发明提供一种采用单检测探针确定生物样品中靶核酸分子存在的方法。

本发明的方法包括采用引物延伸链反应对靶核酸分子进行扩增, 其中反应引物是一套“鼻对鼻”引物, 包括上游和下游引物, 如下所述 (参见图 3 和 4)。

靶核酸分子的全部或者部分序列已知, 这样可以设计引物延伸链反应所用的引物。靶核酸分子可以是单链或者双链结构。

靶核酸分子以高度同源序列的家族的形式存在。这些同一家族中的不同序列称为变异体。变异体的来源包括, 例如, 基因突变和多态性。

已知具有变异体的核酸分子包括,例如,病毒和细菌。病毒如 HIV、HCV、HBV 和人细小病毒 B19。细菌如大肠杆菌、肺炎双球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋球菌、结核分支杆菌和包氏螺旋体菌(莱姆病)。

用于检测靶核酸分子的生物样品可以是任何一种体液、细胞或者细胞碎片。生物样品包括,例如血液、血清、精液、黏液或者其他身体分泌液。

本发明可以用于任何类型的可以对靶核酸分子或其部分序列进行扩增的引物延伸链反应。扩增反应包括,例如,聚合酶链反应(PCR),包括定量 PCR;链置换扩增技术(SDA);转录介导扩增技术(TMA);以及依赖核酸序列扩增技术(NASBA)。NASBA 用于扩增 RNA。NASBA 在 EP-A-0 329 822 中有描述。

传统的聚合酶链反应(PCR)扩增过程在本技术领域是已知的。聚合酶链反应适宜的条件参数已于美国专利 4,683,195; 4,683,202; 和 4,965,188 中阐述。一些销售商家,如 Perkin Elmer (Norwalk, 美国康涅狄格州),出售 PCR 试剂并出版 PCR 实验手册。一套 PCR 扩增反应的混合物含有进行扩增反应所需的试剂。典型的混合物是包括聚合试剂,如耐热性 DNA 聚合酶;脱氧核苷 5'三磷酸(dNTP's);以及二价阳离子的适宜缓冲液。

不论是 DNA 还是 RNA 靶序列,均可以通过本发明所述方法进行扩增。采用 PCR 扩增靶 RNA 时,例如病毒的基因组核酸,第一步是靶序列 DNA 拷贝(cDNA)的合成。逆转录可以单独进行或者通过逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR)进行,后者更为优选。RT-PCR 扩增 RNA 在本技术领域已经众所周知,在如下文件中有阐述:美国专利 5,322,770 和 5,310,652; Myers 和 Gelfand, 1991, Biochemistry 30 (31):7661-7666; 美国专利 5,527,669; Young 等,

1993, J. Clin. Microbiol. 31 (4) :882-886; Young 等, 1995, J. Clin. Microbiol. 33 (3) :654-657.

PCR 反应混合物中还包括引物。引物是一种寡聚核苷酸, 在与模板核酸分子杂交后可以作为扩增反应中的合成起始点。模板核酸分子是初始靶核酸分子; 扩增产物就源自于这些分子。

本发明对所涉及引物长度的要求并不高。通常, 引物长度为 15-55 个核苷酸即可; 20-45 个核苷酸更好; 25-35 个核苷酸最佳。优选的方案是, 所构建引物略长 (>30 碱基), 从而使引物及其模板可以接受的错误配对的数目达到最大。引物对的长度不一定要一致。例如, 上游引物可以由 29 个核苷酸组成, 而下游引物则可以由 22 个核苷酸组成。

引物可以是天然的或者是合成的。对于 PCR, 优选引物是单链寡聚脱氧核苷酸。

杂交是指两个单链核酸由于互补碱基对的存在而形成双链结构的过程。杂交可以发生在完全互补的核酸链之间或者基本互补的核酸链之间, 后者是指二者之间含有较少错误配对的区域, 即变异体。所能允许的最大错误配对程度可以通过适当调节杂交条件进行控制。只有完全互补的核酸链能够杂交的条件称为“严格杂交条件”或者“序列特异性杂交条件”。基本互补序列的稳定双链结构可以通过略为宽松的杂交条件获得。

本发明的杂交条件, 即严格杂交条件, 之所以如此设定, 是为了引物能够容许引物和模板间的错误配对, 从而有可能与所有遗传变异体杂交。例如, 杂交条件可以设定在一定水平, 使得引物和模板进行杂交时容许引物与模板间错误配对的碱基对接近 20%。

核酸技术领域的熟练技术人员可以根据经验确定适宜的杂交条件，主要是考虑多种变量，如寡聚核苷酸的长度和碱基对含量、离子强度、错配碱基对的比例，以及寡聚核苷酸退火时所选取的温度，其中所参考举例如下：Sambrook 等，1989，*Molecular Cloning-A Laboratory Manual*，冷泉港实验室，冷泉港，纽约；Wetmur，1991，*Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26 (3/4):227-259；Ausubel 等（编委），1995，*Current Protocols in Molecular Biology*，(John Wiley & Sons, Inc., 纽约)，2.10 章节；和美国专利第 5,789,550 号。

关于本发明的引物延伸链反应循环的详细描述详见下文。这里所描述的特定反应是 PCR。但是其它类型的引物延伸链反应也可以用于本发明所述方法。

图 10 显示的是本发明的扩增反应的具体步骤。T 代表靶核酸分子，靶序列内的 X 代表可能变异的位点。

靶核酸分子可以是单链分子，或者是双链分子的一部分。图 10 所显示的实例中，靶核酸分子是双链结构，TC 代表与 T 互补的核酸分子。

如同传统 PCR，在扩增反应的每一个循环中，样品中任何双链核酸分子都会通过变性过程成为单链结构。杂交就发生在引物和靶核酸分子之间。图 10(a) 显示了下游引物 (RP) 和靶核酸序列 (T) 之间的杂交。

如图 10(b) 所示，下游引物以靶核酸分子为模板延伸，从而形成下游引物扩增产物 (reverse primer amplification products, RPA)。RPA 由下游引物 (RP) 接合下游引物延伸产物 (reverse primer extension product, RPE) 构成。基于本说明书的目的，下游引物延伸产物是添加到下游引物的核酸片段。

根据图 10 (b) 可以看出, 靶序列中含有的一些变异 (X) 并不出现在 RPA 中。显然, RPA 的由 RP 构成的部分没有变异出现。

如图 10 (c) 所示, 步骤 (b) 中形成的下游引物扩增产物由模板变性而成。

上游引物 (FP) 可以和如下分子进行杂交: (i) 与靶核酸分子 (TC) 互补的核酸分子, 如果其存在的话; 或者 (ii) 下游引物扩增产物 (RPA)。图 10 (d) 显示的是前一种情况。如果靶核酸分子是双链分子的一部分时, 与靶核酸分子互补的核酸分子就会存在。

以互补核酸分子 (TC) 或者下游引物扩增产物 (RPA) 为模板延伸上游引物。图 10 (e) 显示的是前一种情况。

如图 10 (e) 所示, 上游引物被延伸后形成上游引物扩增产物 (forward primer amplification products, FPA)。上游引物扩增产物 (FPA) 由上游引物 (FP) 接合上游引物延伸产物 (forward primer extension product, FPE) 构成。基于本说明书的目的, 上游引物延伸产物是添加到上游引物的核酸片段。

如图 10 (e) 所示, 与靶序列相比, 靶序列所含的一些变异 (X) 并不出现在 FPA 中。显然, FPA 的由 FP 构成的部分没有变异出现。

如图 10 (f) 所示, 步骤 (e) 中形成的上游引物扩增产物由模板变性而成。

如图 10 (g) 所示, 下游引物与 FPA 的 FPE 部分进行杂交。

如图 10 (h) 所示, 以 FPA 的 FP 部分为模板延伸下游引物, 从而形成附加下游引物扩增产物 (additional reverse primer amplification products, ARPA), ARPA 由下游引物 (RP) 接合附加

下游引物延伸产物 (additional reverse primer extension products, ARPE) 构成。

如图 10 (i) 所示, ARPA 产物由模板变性而成。

如图 10 (j) 所示, 上游引物与 RPA 的 RPE 部分进行杂交。

如图 10 (k) 所示, 以 RPA 的 RP 部分为模板延伸上游引物, 从而形成附加上游引物扩增产物 (additional forward primer amplification products, AFPA), AFPA 由上游引物接合附加上游引物延伸产物构成。

如图 10 (l) 所示, AFPA 产物由模板变性而成。

以附加下游引物扩增产物以及附加上游引物扩增产物作为下游和上游引物的模板, 重复步骤 (g) - (l) 足够多次, 从而生成可以检测到的附加下游引物扩增产物和/或者附加上游引物扩增产物。重复步骤最好是用自动循环仪器进行。足够数量的循环次数至少约 10 次, 至少约 20 次更好; 至少约 30 次优于前二者; 至少约 40 次为最佳选择。

本发明人发现了引物与扩增产物以某种特定的方式杂交时显示出优势, 本发明人将这种杂交方式称为“鼻对鼻”。

由图 10 (g) 可以看出, 上游引物扩增产物以及附加上游引物扩增产物的序列特征是, 下游引物的 3' 末端核苷酸与上游引物延伸产物或者附加上游引物延伸产物的 5' 末端核苷酸杂交。

类似的情况也可见于图 10 (j), 下游引物扩增产物以及附加下游引物扩增产物的序列特征是, 上游引物的 3' 末端核苷酸与下游引物延伸产物或者附加下游引物延伸产物的 5' 末端核苷酸杂交。

图 10 只阐述了一种变异体的引物延伸链反应。如上所述，一个病原体家族的所有变异体都可以采用本发明所述方法进行扩增。

附加扩增产物具有一致性，不管它来源于哪个变异体。因此，在图 10 的方案中，附加下游引物扩增产物具有下游引物直接与附加下游引物延伸产物接合的那部分序列。附加下游引物延伸产物与上游引物互补（上游引物互补链）。见图 10 (h)。

同样，附加上游引物扩增产物具有上游引物直接与附加上游引物延伸产物接合的那部分序列。附加上游引物延伸产物与下游引物互补（下游引物互补链）。见图 10 (k)。

因此，所有附加引物扩增产物具有下游引物和上游引物互补链的接合序列，或者下游引物互补链和上游引物的接合序列。既然下游和上游引物均具有相同的序列，那么所有的附加引物扩增产物也将具有相同的序列。换句话说，所有的可能变异体均被清除了。

在另一个具体实施中，上游引物扩增产物和附加上游引物扩增产物的序列特征是，与下游引物 3'末端核苷酸进行杂交的核苷酸，位于与上游引物延伸产物或者附加上游引物延伸产物的 5'末端相隔一个核苷酸缺口的部位。同样，由于下游引物扩增产物和附加下游引物扩增产物的序列特征，与上游引物 3'末端核苷酸进行杂交的核苷酸，位于与下游引物延伸产物或者附加下游引物延伸产物的 5'末端相隔一个核苷酸缺口的部位。

在这两种方案中，缺口包括一个高度保守序列。病毒和细菌基因组的高度保守区域是已知的。例如，在 HCV 已发表序列中，病毒基因组 5'末端非编码区的一段短核苷酸序列被认为是 HCV 各基因型中高度保守的区域（Okamoto 等，*J. Gen. Virol.*, 1991, 2697-2704; Smith 等，*J. Gen. Virol.*, 1995, 76:1749-1761; Simmonds 等，*J. Gen. Virol.*, 1993, 74:2391-2399）。

缺口包括的核苷酸最好少于5个。如果缺口包括2-5个核苷酸，1个或者2个核苷酸可能发生错误配对，但是仍旧能够与探针序列进行杂交。如果缺口包括一个核苷酸，此核苷酸也可能发生错误配对。当然，优选情况是没有错误配对发生。

一旦扩增反应完成，即可用此领域中常用的方法检测附加下游引物扩增产物或附加上游引物扩增产物是否存在。

优选的检测方法是以附加下游引物扩增产物或者附加上游引物扩增产物的核酸序列的检测为基础的。此方法中所用检测探针包括一段能够与附加下游引物扩增产物或者附加上游引物扩增产物杂交的核苷酸序列。由于这些扩增产物具有一致性，只需要一个检测探针便可以有效的检测所有扩增产物。

此外，由于扩增产物的一致性，检测时的杂交过程可以采用严格杂交条件。严格杂交条件降低源自偶然类似非靶序列的假阳性，因此结果更加可靠。

检测探针可以是DNA、RNA或者其结合体。经过修饰的核苷酸包括，例如，肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)、nitropyrole-based nucleotides 或者 2'-O-甲基核糖核苷酸。核酸或者经修饰的核酸分子的核苷可以以通常方式链接，即通过磷酸的链接。另外，核苷酸也可以通过经修饰的链接相连，如硫代磷酸。

在一个具体实施中，探针序列与扩增产物的接合处杂交。这样，探针序列就与AFPA的部分FP序列和部分AFPE序列都进行杂交；或者探针序列与ARPA的部分RP序列和部分ARPE序列进行杂交。

在此具体实施中，探针序列包括引物之一的一段核酸序列以及与其它引物互补的一段核酸序列。具体而言，探针序列包括下述二者之一：(i) 上游引物的一段核酸序列以及与下游引物互补的一段

核酸序列；或者 (ii) 下游引物的一段核酸序列以及与上游引物互补的一段核酸序列。探针序列可以包括引物以及与其它引物互补的全部或者部分序列。

探针序列所含引物核酸序列以及与其它引物互补的核酸序列的比例可以均等。此时，探针序列将与扩增产物进行“对称性杂交”（见图 5A (I)）。

对于提高灵敏度，优选方案是设计探针序列与扩增产物进行“非对称性杂交”。详细地说，探针序列可以由不同比例的引物核酸序列以及与其它引物互补的核酸序列组成（见图 5A (II-IV)）。例如，约 60% 到 99% 的探针序列包含引物之一的核酸序列。其余的探针序列（如约 1%-40%）包含与其它引物互补的核酸序列。更加优选的是，探针序列中与引物之一的序列相应的序列比例约为 80%-97%。

附加扩增产物的序列含有一段与其它引物互补链直接接合的引物序列，在此处，通过设计的探针序列可以精确地与所有或者一部分附加扩增产物杂交。

在附加扩增产物中插入缺口的部位，缺口最好是一个已知序列，从而通过设计的探针序列可以与缺口完全互补。但是，探针序列可以与缺口中含有一定数目错误配对残基的附加扩增产物进行杂交，如上所述。

探针序列除了跨接合部位处杂交，也可以只与一个引物的附加扩增产物的一段序列进行杂交。因此，在此实施例中，探针序列包括如下结构之一：上游引物的一段核酸序列，而并不含与下游引物互补的一段核酸序列；或者下游引物的一段核酸序列，而不含与上游引物互补的一段核酸序列。

在本发明的一个引物延伸发应实施例中，所使用的上游引物和下游引物浓度相同。在此实施例中，所述的浓度是均等的。

在一个优选实施例中，所采用的上游引物和下游引物的浓度为“不均等浓度”。尤其是对于提高敏感度，组成部分探针序列的引物的浓度低于其它引物浓度。如果探针序列与附加扩增产物进行不均匀杂交，或者只与引物互补的附加扩增产物的一序列杂交，则引物的“不均等浓度”即为优选。

例如，如果探针序列包含上游引物的一段核酸序列，那么上游引物与下游引物的摩尔比例 (FP:RP) 约为 1:5-1:20。同样，如果探针序列包含下游引物的一段核酸序列，那么下游引物与上游引物的摩尔比例 (RP:FP) 约为 1:5-1:20，更优选的比例约为 1:6-1:15，最佳的比例约为 1:10。

扩增反应在生物样品中进行足够多次后，向样品中加入检测探针。检测探针的探针序列可以与任何样品中存在的附加扩增产物杂交。如果探针包含上游引物的一段核酸序列（只包含此序列或者还包含与下游引物互补的一段核酸序列），探针序列将会与附加下游引物扩增产物进行杂交。同样，如果探针包含下游引物的一段核酸序列（只包含此序列或者还包含与上游引物互补的一段核酸序列），探针序列将会与附加上游引物扩增产物进行杂交。

在一个优选实施例中，检测探针是能够自我改变的信号生成探针。此探针含有第一核酸序列；与第一核酸序列互补的第二核酸序列；连接第一核酸序列和第二核酸序列的探针序列。第一核酸序列与一个能够产生可检测信号的报告基因相连接。第二核酸序列与一个配合基因相连接，当报告基因和配合基因距离足够近时，此配合基因能够改变报告基因产生的信号。例如，当第一和第二核酸序列互相杂交时，即“闭合构象”，报告基因被带至配合基因附近，因

此，信号得以改变。信号的改变包括降低，即淬灭；增强；或者其它改变，如信号的强度或者波长。信号淬灭包括降低或者消除信号。

报告和配合基团可以与检测探针的任何位点相连接，其中检测探针容许报告基团通过配合基团产生信号改变，从而用于检测附加扩增产物。在一个优选实施例中，报告基团和配合基团连接到自变信号发生探针的远端。

当没有附加扩增产物的情况下，检测探针处于闭合构象状态。报告和配合基团距离很近。信号由此而得以改变。

当探针序列和附加下游引物扩增产物或者附加上游引物扩增杂交后，检测探针的第一和第一核酸序列即发生变性，变为“开放构象”。

变性后，配合基团不再靠近报告基团并不再改变其信号。变化的信号和初始信号的差值可以检测到。当配合基团淬灭信号时，例如，初始信号增强；或者如果淬灭完全，即可产生信号。

第一和第二核酸序列（如探针的茎部）之间杂交的强度可以通过常规试验进行调节，从而达到适当机能。例如，强度是核酸长度的函数。第一和第二核酸序列的优选长度约为 3 到 15，更加优选的长度约为 4-7 个核苷酸。除长度外，降低 G-C 含量以及在核苷酸内插入打破稳定的错误配对均可以降低杂交强度。

对探针序列长度的要求并不严格。但是，其长度不能太短，否则不能与附加扩增产物有效地接合。此外，其长度不能太长，否则报告基团和配合基团不能正常分离，即使探针序列与产物杂交。优选的探针序列约包含 10-30 个核苷酸，更优选的约为 18-24 个核苷酸，最佳的约为 19-22 个核苷酸。探针在溶液中可以自由存在，或者固定于固体表面上。

能够产生可检测信号的任何浓度的检测探针均可用于本方法。例如，样品中检测探针的浓度可以与一个或者两个引物的浓度相同。

检测探针的优选浓度大于引物的浓度。由此，检测探针在和引物竞争时占有优势，其中引物的核酸序列是探针序列的一部分，而检测探针则是用于检测附加扩增产物的。当探针序列与扩增产物不均匀杂交时，或者如上所述，只与附加扩增产物的引物互补部分杂交时，增加检测探针浓度尤为优选。例如，检测探针的浓度可以约为引物浓度的 1.3-5 倍，优选约为 1.5-3 倍，最佳约为 2 倍，其中引物浓度是指核酸序列不属于探针序列的引物的浓度。

在一个优选实施例中，例如，探针序列由至少 65% 的上游引物序列组成；上游引物的浓度比下游引物的浓度约少 10 倍；检测探针的浓度约为下游引物浓度的 2 倍。

报告基团产生的初始信号可以作为样品中靶核酸分子存在的指示。探针产生可检测初始信号的水平与样本中靶核酸分子的量成比例。

检测探针的可检测信号可以是任何信号，例如光信号、染料信号或者放射活性信号。在一个优选实施例中，可检测信号是光信号。光信号可以是荧光信号或者化学发光信号。

在一个实施例中，本发明的报告基团和配合基团形成“FRET”对 (Selvin, P.R., “Fluorescence Resonance Energy Transfer”, *Methods in Enzymology* 246:300-335 (1995))。FRET 对依赖能量转移来产生信号。报告基团吸收第一波长的能量，并发出第二波长（波长更长一些）的能量。配合基团吸收部分或者大部分发射的能量，从而配合基团的光谱与发射光谱有重叠。如果配合基团是一个淬灭基团，淬灭基团就以热能方式释放能量。如果配合基团是一个荧光基团，配

合基团再次发出第三、波长更长的能量。FRET 对的作用应机理要求配合基团吸收光谱与报告基团的发射光谱有重叠。FRET 作用的效率与此重叠成线性比例。

在另一个实施例中，报告基团和配合基团为非 FRET 对。其特殊之处在于，配合基团的吸收光谱并不需要与报告基团的发射光谱重叠。也就是说，配合基团的吸收波长可以短于报告基团的最大激活和发射波长。非 FRET 对在美国专利 6,150,097 中有阐述，并列为本文的参考文献。非 FRET 对的可检测信号可以是吸收光谱的改变，此为光信号变化的另一个替代方案。

本发明方法中所用的检测探针报告基团优选为荧光基团。荧光基团可以是咕吨染料、花青染料、丹磺衍生物、EDANS、香豆素（如 3-苯基-7-异氰酸香豆素）、荧光黄、BODIPY、Cy3、Cy5、Cy7、德克萨斯红、赤藓红、萘胺、俄勒冈绿、ALEXA 氟染料、丫啶（如 9-异硫氰酸丫啶和丫啶橙）、N-（p-（2-苯并噁唑基）苯基）马来酰亚胺、苯并噁二唑、均二苯代乙烯和芘。

咕吨染料可以是荧光素或罗丹明。荧光素优选 5-羧基荧光素（5-FAM）、6-羧基荧光素（6-FAM）；2',4',1,4,-四氯荧光素（TET）；2',4',5',7',1,4-六氯荧光素（HEX）；曙红；钙离子绿；异硫荧光素（FITC）；或者 NED。罗丹明优选四甲基-6-羧基罗丹明（TAMRA）；四丙醇-6-羧基罗丹明（ROX）；2',7'二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基罗丹明（JOE）或者四甲基罗丹明（TMR）。这些化合物的多数都可在市面上购得，并具有多种适宜形式，如在氧杂蒽环上有多种替代基团，此环是寡核苷酸的接合部位或者具有接合寡核苷酸的功能。

荧光基团也可以是萘胺化合物，此化合物的阿尔法（alpha）位或者贝它（beta）位具有一个氨基。这类化合物包括 1-二甲基氨基萘胺-5-磺酸盐、1-苯胺基-8-萘磺酸盐和 2-甲苯胺-6-萘磺酸盐。

荧光基团还可以是接合荧光素,如 Lee 等(1997, *Nucleic Acids Research* 25:2816) 所描述的荧光 - 罗丹明二聚体,可以选择能够吸收和发射可见光谱或者可见光谱外的荧光基团,后者如紫外或红外范围的光谱。

本发明方法中,检测探针的配合基团优选淬灭基团。淬灭基团可以是 DABCYL、葱醌、硝基噻唑、硝基咪唑或者孔雀绿。DABCYL 类物质如 DABSYL、DABMI 或者甲基红也可采用。美国专利 6,080,868 中所阐述的不对称花青染料化合物可以用来作淬灭基团,并列为本文的参考文献。

此外,荧光基团也可以用作淬灭基团。例如,当探针处于开放构象时,当在检测范围内不发荧光的荧光基团靠近特定其它荧光基团时即可淬灭其荧光。

自变信号发生探针的实例之一是分子信标探针。如上所述,分子信标探针的环状结构与探针序列相应,被成为“臂”的核酸序列与第一和第二核酸序列相应。分子信标探针的阐述见如下文件:美国专利 5,925,517、PCT 申请 WO95/13399、PCT 申请 WO97/39008、Tygi 和 Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14:303,已列为本文的参考文献。

此外,分子信标探针可以以任何方式被修饰,从而可以检测扩增产物。被修饰探针包括,例如,美国专利 6,037,130 中所阐述的波长 - 偏移分子信标探针,已列为参考文献。特别地,这些经修饰的探针具有分子信标探针的基本结构,即环状结构、茎部双链、位于一端的淬灭基团以及位于淬灭基团另一端的报告基团(主要为荧光基团)。报告基团又称为“收获报告基团”。经修饰的探针越过“收获报告基团”,包含一个由数个核苷酸组成的延伸部分。此延伸部分中止于与“发射报告基团”相连接的一个核苷酸,“发射报告基团”通常为另一个荧光基团。当靶核酸序列存在时,淬灭基团与报

告基团分离。在开放构象状态下，“收获报告基团”从激发源吸收能量，但是将大部分能量转移至“发射报告基团”，在某种结构状态下是绝大部分能量。“发射报告基团”接受被转移的能量后，以其较长的特征波长方式发射能量。

在另一个实施例中，检测探针包含一对与附加扩增产物的临近区域相互补的寡聚脱氧核苷酸(Cardullo 等(1988), Proc. Nat'l. Acad. Sci. 85:8790-8794; Heller 等, EP 00 70685)。其中一个寡聚脱氧核苷酸在其 5'末端包含报告基团，另一个寡聚脱氧核苷酸在其 3'末端含有一个配合基团。当探针与靶序列杂交时，这两个基团的距离很近。当用适当频率的光照射样品时，荧光共振能量从一个基团转移到另一个基团，基团从而产生可检出的光谱反应变化，提示靶序列的存在。

在另一个实施例中，检测探针包含一对互补的寡聚脱氧核苷酸。其中一个核苷酸含有靶核酸分子的序列，另一个含有与靶核酸分子序列互补的序列 (Morrison 和 Stols , “ Sensitive Fluorescence-Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in Solution”, Biochemistry 32:309-3104 (1993); Morrison EP0 232 967 A2, 要求于 1986 年 1 月 10 日提交的美国申请第 817,841 号作为优先权申请,)。探针的每一个寡聚脱氧核苷酸包含一个 3'末端报告基团和一个 5'末端配合基团。当探针的两个寡聚核苷酸相互退火时，报告基团与对方的配合基团靠近。在这种构象状态下，如果报告基团受适宜波长的光照刺激，信号则被配合基团改变，优选方式为淬灭。但是，当任何一个探针分子与靶序列接合时，探针的互补寡聚脱氧核苷酸的变化效应立即消失。此构象状态可以产生信号。当处于与靶序列相接合的构象时，探针的寡聚脱氧核苷酸太长，不能被 FRET 自我淬灭。

此技术领域能够提供可靠的检测和测定的方法均可用来检测和测定探针生成的信号。

例如, ABI 7700 (由应用生物系统公司生产, 福斯特城, 加利福尼亚 (Applied Biosystems, Inc. in Foster city, CA)) 可用于测定信号发射, 主要是荧光发射。ABI 7700 采用纤维光学器件连接于 96 孔扩增反应试管排列板中的每一个孔。此仪器包括激发报告基团的激光, 并能够在扩增反应过程中连续测定每一个试管中信号的强度, 通常是荧光光谱强度。

附加扩增产物可以通过终点测定或者实时定量两种方法定量。在终点测定方法中, 信号测定要在扩增反应结束后进行, 例如, 在所有或者大部分扩增反应的循环结束后。在实时测定方法中, 信号测定在扩增反应过程中重复多次进行, 例如, 在扩增反应的每一次热循环后。当需要对靶核酸序列的初始量进行定量检测时, 例如, 样品中病毒或者细菌核酸的拷贝数, 优选实时测定方法。

检测样品中靶核酸分子在扩增之前的绝对数量可以通过标准曲线获得。例如, 可以从一系列平行引物延伸链反应的结果制作出标准曲线。这些平行引物延伸链反应采用的是一系列标准样品, 含有已知量的与靶核酸分子类似的核酸分子。大约需要 5-20 个含量已知但各自不同的标准样品系列。平行延伸反应采用与靶核酸分子的延伸反应同样的反应条件和反应试剂。

在每一个平行反应中, 信号强度相对于信号基线强度 (ΔR_n) 的增加可以在每一个扩增循环的退火温度进行测定。基线数值是附加扩增产物形成之前所检测到的信号强度。每一个反应都需要计算阈值 (C_t)。 C_t 是能够产生区别于基线的信号强度的最小扩增循环次数。每一个标准样品中核酸的初始量可以与 C_t 值相对应描画在一张图标内。此图即为标准曲线。

一般来说, 阈值必须足够高, 统计学上不同于基线数值, 但是要低于扩增反应相关饱和现象的信号强度。阈值通常定为高于平均

基线信号强度的 10 个标准差水平 (参阅, 例如, Heid 等, *Genome Research* 6:986-994 (1996))。

包括靶核酸分子在内的样品 Ct 值也需要计算。此 Ct 值可以与标准曲线相对应描画在一张图标内。利用标准曲线, 检测样品中靶核酸分子的量即可通过外推方法得到。图 9 阐述的是采用“鼻对鼻” PCR 引物和下述实施例中的反应条件进行的 PCR 靶序列定量方法 (此例中为 HCV RNA)。

与检测仪器一起提供的计算机软件, 如 ABI 7700, 能够记录扩增过程中的信号强度。根据所记录数值, 可以连续计算信号强度的增强。虽然 ABI 7700 软件主要适用于监测荧光, 并不需要根据荧光测定来确定 Ct 值。Ct 值可以根据多种不同类型信号的测定而确定。

本发明也涉及试剂盒以及包括本发明操作所需各成分的多孔单元。试剂盒包括一套用于扩增特定病原变异体的鼻对鼻引物, 以及探针, 如上述自变信号发射探针。某些情况下, 探针被固定于一适宜支持膜上。试剂盒的其它一些可选组成包括, 例如, 催化引物延伸产物合成的试剂, 核苷三磷酸底物, 用于扩增和/或杂交反应的适宜缓冲液, 使检测样本中模板分子的定量成为可能的核酸参照标准, 以及进行本方法的用法说明。

实施例

下文所述本发明的实施例仅用于说明目的, 而非对本发明加以限制。本领域普通技术人员在阅读前述内容和下文的实施例后, 实施例之后的权利要求范围内的本发明大量的实施方式, 对他们而言是显而易见的。

HCV 变异体的检测

对基于核酸的检测的三种不同方法进行比较, 所检测样品是 HCV 的八个病毒株, 为主要的 HCV 基因型和亚型的原型。所采用的四种检测方法为: (A) 本发明的鼻对鼻信标 RT-PCR, (B) 传统的信标 RT-PCR, 和 (C) COBAS AMPLICOR HCV 监控测试 2.0 版本 (COBAS HCM-2; Roche Diagnostic Systems Inc, Branchburg, 新泽西)。COBAS HCM-2 是基于 RT-PCR 的检测, 根据生产商所提供的用法说明进行操作。传统信标 RT-PCR 和“鼻对鼻”信标 RT-PCR 的操作方法如下:

设计 PCR 引物, 扩增 HCV 基因组 RNA 5' 末端的一段非编码区。基因组中此区域的核酸序列在 HCV 基因型和亚型之间相对而言是非常保守的。

设计传统信标 PCR 的的引物, 扩增与已发布 HCV-H 序列的 66-166 核苷酸 (Inchauspe 等, Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463) 相应的 101b.p. DNA 片段。两个传统 RT-PCR 引物之间的插入缺口长度为 61b.p.。引物如下:

上游引物: 5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCA-3' (SEQ ID NO: 1);

下游引物: 5'-GTACTCACCGGTTCCGCAGA-3' (SEQ ID NO: 2)。

本发明所述“鼻对鼻”RT-PCR 的两个引物中间没有插入缺口。被扩增的序列与已发布 HCV-H 序列的 83-133 核苷酸相对应, 长度为 51b.p.。引物如下:

上游引物: 5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGC-3'
(SEQ ID NO: 3)

下游引物: 5'-CCCGGGAGGGGGGGTTCCTGGAG-3' (SEQ ID
NO: 4)

对于传统和“鼻对鼻”PCR, 用于PCR产物检测的分子信标是5'-FAM-ccgggcTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTgcccg-DABCYL-3' (SEQ ID NO: 5)。核酸茎部以小写字母表示, 核酸环状结构(与已发布HCV-H序列的91-113核苷酸相对应)以大写字母表示。

采用传统的下游引物或者上述鼻对鼻下游引物, 从提取的血浆RNA逆转录生成互补DNA。每20 μ l反应含有2.5 μ M下游引物, 1单位Mo-MuLV逆转录酶(GIBCO BRL, Grand Island, 纽约), 1X逆转录酶缓冲液(GIBCO BRL), 5mM二硫苏糖醇(DTT), 0.06单位RNasin(Promega, Madison, 威斯康星), 以及0.5mM dNTPs, 即dATP、dTTP、dCTP和dGTP(Pharmacia, Piscataway, 新泽西)。反应在42 $^{\circ}$ C温浴中进行45分钟。然后在95 $^{\circ}$ C的温浴中进行2分钟, 使逆转录酶失活。

对于PCR扩增和检测, 逆转录产物需要在终容积为50 μ l反应混合物中进行温浴。此反应混合物含有上游引物(“鼻对鼻”PCR为0.1 μ M, 传统PCR为1 μ M), 1 μ M下游引物, 1.25单位AmpliAq Gold聚合酶(Applied Biosystems, 福斯特城, 加利福尼亚), 1X AmpliAq Gold缓冲液II(Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 以及10ng分子信标。PCR扩增在Applied Biosystems 7700序列检测仪中进行, 采用如下循环参数: 95 $^{\circ}$ C进行10分钟(酶激活), 随后进行44个循环[95 $^{\circ}$ C, 30秒(变性); 60 $^{\circ}$ C, 1分钟(退火); 72 $^{\circ}$ C(延伸)]。在退火温度测定分子信标的相对荧光。在每个RT-PCR检测中, 采用RNA标准曲线得到HCV模板分子的定量。标准曲线采用稀释于1 μ g/ml酵母tRNA中浓度为10, 25, 50,

10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 或者 10^6 分子的合成 HCV RNA 转录构建 (Ambion, 奥斯汀, 德克萨斯)。

表 1 显示的是三个不同的检测方法用于检测 HCV 8 个不同株的比较。所检测的病毒株是 HCV 主要基因型和亚型的原型。本发明所述鼻对鼻信标分析法 (A) 能够检测所有 8 个基因型/亚型, 而传统信标 PCR (B) 不能够检测基因型 4a 和 5a。

COBAS-HCM-2 检测的结果以国际单位 (I.U.) 表示。虽然提出了多种转换因子 (Saldanba 等, Vox Sang, 1999; 76(3):149-158; Cuijpers 等, 2001; 81(1):12-20)。I.U. 和 HCV RNA 拷贝数目的确切关系仍旧存有争议, 尤其是对于除了 1a 和 1b 的 HCV 基因型。由此, Roche 诊断系统并不能够提供一个确定的用于 COBAS-HCM-2 检测结果的转换因子。基于分析的目的, 假设 I.U. 和 RNA 拷贝数目是相等的。与 COBAS-HCM-2 检测相比, 鼻对鼻信标 RT-PCR 检测对基因型 1a、1b、2b 和 6a 的灵敏度与之相等或者略为敏感一些, 但是对基因型 4a 更加敏感 $1\log$ (10 倍), 对基因型 2a 和 5a 更加敏感 $0.5\log$ (3.2 倍), 对基因型 3a 更加敏感 $0.3\log$ (2 倍)。这两个检测相对灵敏度比较的统计学分析示于表 2 中。

表 1

检测样品 ¹				
HCV 基因型 /亚型	病毒株的 名称	A. 鼻对鼻信标 PCR (Log ₁₀ RNA 分子/ml)	B. 传统信标 PCR (Log ₁₀ RNA 分子/ml)	C. COBAS-HCM-2 (Log ₁₀ I.U./ml)
1a	H 株	5.1	5.0	4.9
1b	HC-J4/91	4.7	4.7	4.6
2a	HC-J6	5.1	4.2	4.6
2b	HC-J8	4.0	3.7	3.9
3a	S52	4.3	3.7	4.0
4a	ED43	6.3	<2.6	5.3
5a	SA13	5.2	<2.6	4.7
6a	HK6a	4.8	4.4	4.7

1. 检测样品来自分别感染每一个 HCV 病毒株原型的黑猩猩血浆。H 株 [Inchauspe 等, Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463], HC-J4/91 [Okamoto 等, Virology, 190:894-899, 1992; Genbank D10750], HC-J6 [Okamoto 等, J Gen Virol, 72:2697-2704, 1991; Genbank D00944], HC-J8 [Okamoto 等, Virology, 188:331-341, 1992; Genbank D10988], S52 [Bukh 等, Proc Natl Acad Sci (USA) 89:4942-4946, 1992; Genbank M84837], ED43 [Chamberlain 等, 78:1341-1347, 1997; Genbank Y11604], SA13 [Bukh 等, J Infect Dis, 178:1193-1197; Genbank AF064490], HK6a [Adams 等, Bichem Biophys Res Commun, 234:393-396, 1997; Genbank Y12083].

表 2

采用鼻对鼻信标 PCR 和 COBAS-HCM-2 检测 HCV 基因型

HCV 基因型	鼻对鼻信标 PCR (Log ₁₀ RNA 分子/ml)		COBAS-HCM-2 (Log ₁₀ I.U./ml)		倍数差异 ²
	x±s.d.	(n) ¹	x±s.d.	(n)	
1a	5.1±0.25	(7)	4.9±0.12	(2)	1.6x
1b	4.7±0.19	(7)	4.6±0.12	(5)	1.3x
2a	5.1±0.18	(6)	4.6±0.22	(6)	3.2x (p=0.0013)
2b	4.0±0.22	(7)	3.9±0.32	(6)	1.3x
3a	4.3±0.11	(7)	4.0±0.12	(6)	2.0x (p=0.0032)
4a	6.3±0.12	(7)	5.3±0.33	(6)	10x (p<0.0001)
5a	5.2±0.12	(6)	4.7±0.26	(6)	3.2x (p=0.0002)
6a	4.8±0.19	(7)	4.7±0.90	(2)	1.3x

1.结果用 (n) 次重复检测的均值±标准差方式显示。COBAS-HCM-2 检测的结果以国际单位 (I.U.) 表示。

2.两个检测方法的灵敏度倍数差异用鼻对鼻信标 PCR 所得数值与 Roche 监控检测所得的数值的比值表示。双尾 P 值采用 GraphPad InStat 软件计算。

筛选来自各种 HCV 基因型感染个体的血浆样品

本发明所述的“鼻对鼻”PCR 用于从 ICBS HCV Master 板中筛选一组病人血浆样品。此板不断扩大，由疾病控制中心 (Centers for Disease Control, CDC) 与国际血液安全协会 (International Consortium for Blood Safety, ICBS) 合作构建的。此板包括从各个地区采集而来的血浆样品。在 CDC 和 Visible Genetics Inc. (VGI) 的两个互相独立的实验室，对所有样品进行 HCV 抗体筛选，并进行基因型分析。

CDC 一共提供有 192 个样品，包括来自埃及、越南和印度尼西亚的血浆样品。其中，根据 CDC 和/或者 VGI 提供的 PCR-基因型数据，有 134 个样品呈现不同程度的 HCV RNA 阳性。5 个样品显示有相同或者不同的 PCR-基因型数据。53 个样品显示检测不到基因型（即，HCV RNA 阴性）。

采用机械提取程序从 70 μ l 新解冻的血浆中提取总 RNA，在此过程中，RNA 结合至 96 孔板的 PVDF 膜上，并洗脱（Lee 和 Prince, 2001, Transfusion; 41:483-487）。所获得的总 RNA 的体积为 50 μ l 的水溶液，不含核酸酶。取 10 微升此溶液（相当于 14 μ l 血浆），进行逆转录和采用如上所述的鼻对鼻引物（SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4）和分子信标（SEQ ID NO: 5）的 PCR 反应。

表 2 所示是 Master 板中 134 个不同程度 HCV 阳性样品的 RT-PCR 结果。“鼻对鼻”PCR 成功地从所有基因型中检测到绝大多数 HCV 病毒株。基因型测定中 HCV RNA 阴性的 53 个样品中，只有一个样品显示出 PCR 弱阳性信号（ $10^{3.1}$ RNA 分子/ml）。

采用上述的机械提取和“鼻对鼻”RT-PCR 相结合的方法，并不能检测到病毒数少于 700 个拷贝/ml（9.9 个拷贝/14 μ l 血浆）的样品。表 2 中的结果清楚地说明：本发明能够利用单独一套“鼻对鼻”引物和分子信标对各种 HCV 基因型进行检测。

表 2

基因型	检测到的总数/ 所检测总数	范围 (Log ₁₀ RNA 分子/ml 血浆)	(%)
1a	22/23	3.13-6.93	95.7
1b	19/20	3.18-7.13	95.0
1c	3/3	5.84-6.72	100
2a	3/3	3.85-6.85	100
2e	1/1	6.69	100
3a	3/3	4.36-6.8	100
3b	1/1	4.93	100
4a	43/43	3.78-7.0	100
4d	9/9	5.08-6.56	100
4l	1/1	6.25	100
6a	8/8	3.28-6.37	100
10a(3)	5/6	4.22-7.23	83.3
不明确者 ^{***}	12/13	4.11-6.85	92.3
总数	130/134		97.0

^{***}基因型分析提示混合感染或者未确定分类的基因型的样品。

鼻对鼻 PCR 和传统 PCR 用于 HIV-1 M 组 B 亚型变异性 检测的比较

图 6a 图示 4 个不同 HIV 变异体的相应于 V3 区和侧翼区序列的原病毒 DNA 序列排列，均属于 M 组 (Major, 主要组) B 亚型 (HIV/RT-1、HIV/RT10、HIV-38-1 和 HIV/38-3)。V3 区是 HIV 基因组中变异性最高的区域。分子信标设计为探针-环部结构与 HIV/RT-1 变异性 (图中 V3 序列的核苷酸 76-97) 完全一致。此探针序列与变异性 HIV/RT-10、HIV/38-1 和 HIV/38-3 分别有 1、3、4 个错误配对 (图 6a)。

“鼻对鼻” PCR 的 PCR 引物设计如下：上游引物 (5'-acaatacaagaaaaaggataactatgggac-3') (SEQ ID NO: 6) 与图 6a 中所示 HIV/RT-1 序列的核苷酸 65-94 相一致。上游引物为 NBF。下游引物 (5'-tttctcctgttgataaagtactctccccg-3') (SEQ ID NO: 7) 与相同序列的核苷酸 95-124 一致。下游引物为 NBR。

传统 PCR 的引物可以生成 177b.p. PCR 产物，其设计如下：上游引物 (5'-taatagtagctgaatgaatctg-3') (SEQ ID NO: 8) 与图 6a 中所示 HIV/RT-1 序列的核苷酸 14-37 相一致。下游引物 (5'-gttttaaagtgtattccatgc-3') (SEQ ID NO: 9) 与相同序列的核苷酸 168-190 相一致。

图 7 所示为传统信标 PCR 与鼻对鼻 PCR 检测图 6a 中所示 4 个 HIV 变异体的能力的比较。PCR 反应含有 10^6 个 HIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1 或者 HIV/38-3 模板分子，图 6b 所示的分子信标，以及如上所述的传统或者鼻对鼻引物。对照 PCR 反应不含模板或者含有 150ng 人基因组 DNA。扩增反应在 Perkin Elmer 7700 中进行，其循环参数为：95℃、10 分钟，随后为 95℃、30 秒（变性），50℃ 1 分钟（退火）以及 72℃、30 秒（延伸）的循环 40 个。在退火温度 50℃ 下测定分子信标的荧光。然后将荧光与 PCR 循环数相对应描画在一张图标内。PCR 扩增/检测的效率决定于“循环阈值”，即产生阳性荧光信号的最小 PCR 循环数。

如图 7a 所示，传统信标 PCR 技术能够检测 HIV/RT-1（与信标完全配对）和 HIV/RT-10（1 个错误配对），二者循环阈值相同（23 个循环），虽然后者的荧光峰值水平与完全配对模板相比低 2 倍（fold）。传统信标 PCR 技术不能够检测 HIV/38-1（3 个错误配对）或 HIV/38-3（4 个错误配对），虽然 PCR 产物源自于所有的 4 个变异体，如凝胶分析所示（图 8）。

相比之下,鼻对鼻 PCR 技术可以检测所有 4 个 HIV 变异体(0、1、3 或者 4 个错误配对),其信号阈值相近(图 7b)。重要的一点是,不含模板或者含有 150ng 人基因组 DNA 的试管均没有信号检出。

HIV-1 M 组不同亚型的检测

设计 PCR 引物以扩增 HIV-1 基因组 RNA 的一段 gag 基因,此段序列是 HIV-1 M 组各亚型间相对较保守的片断。尽管它相对保守,基因组中此区域的单个 HIV-1 亚型基因仍旧具有近 20%的核苷酸序列多态性(Roberton 等, 1999, Human Retroviruses and AIDS 1999, pp 492-505, 编委 Kuiken 等, Los Alamos 国家实验室, 新墨西哥)。

设计信标 PCR 的传统引物,以扩增与 HIV-1 HXB2 株 B 亚型已公布序列的核苷酸 1478-1571[Ratner 等, 1985, Nature, 313 (6000):277-284; Genbank K03455]相应的一段长度为 94b.p.的 RNA。两个传统 RT-PCR 引物之间的插入缺口长度为 53b.p.。引物序列如下:

上游引物: 5'-AACCAAGGGGAAGTGACATA-3'(SEQ ID NO: 10);

下游引物: 5'-ATTTCTCCTACTGGGATAGGT-3'(SEQ ID NO: 11)。

根据本发明方法,设计“鼻对鼻”RT-PCR 引物,以扩增与 HIV-1 HXB2 株已公布序列的核苷酸 1502-1558 相应的一段长度为 57b.p.的序列。两引物之间没有插入缺口。引物序列如下:

上游引物:

5'-GAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAG-3' (SEQ ID NO: 12);

下游引物: 5'-GGATAGGTGGATTATTTGTCATCCATC-3' (SEQ ID NO: 13).

对于传统和“鼻对鼻”PCR, 用于检测PCR产物的分子信标是5'-FAM-cgcctTACCCTTCAGGAACAAATAGagggcg-DABCYL-3' (SEQ ID NO: 14)。茎部核酸以小写字母表示, 探针环状核酸(与HIV-1 HXB2株序列的核苷酸1512-1530相应)以大写字母表示。

HIV-1亚型A、B、C、D、F和G的病毒株来源于NIAID, NIH下属AIDS分部的AIDS研究和参考试剂项目, 以不含细胞的培养上清液形式存在。从新解冻的140 μ l培养上清液中提取RNA。采用传统的下游引物或者上述鼻对鼻下游引物, 利用提取的RNA逆转录得到互补DNA。cDNA合成和PCR扩增的反应条件与上述HCV检测的条件相同。所有检测同时进行三份, 在每个RT-PCR检测中, 采用RNA标准曲线得到HIV模板分子的定量。标准曲线采用浓度为1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵或者10⁶的合成HIV RNA转录本分子构建, 均稀释于1 μ g/ml酵母tRNA中(Ambion, 奥斯汀, 德克萨斯)。

表3所示为传统RT-PCR和“鼻对鼻”RT-PCR用于检测HIV-1亚型的比较。本发明所述“鼻对鼻”检测(A)能够检测所有测试的6个HIV-1亚型, 而传统测定不能够检测亚型A、D和G。

表 3

检测样品		Log ₁₀ RNA 分子每毫升培养基上清液, 所用检测方法	
HIV-1 亚型	病毒株名称	传统信标 RT-PCR	“鼻对鼻”信标 RT-PCR
A	92UG029 ²	<3.9	9.7+/-0.05
B	92BR014 ²	9.3+/-0.3	9.3+/-0.1
C	92BR025 ²	9.4+/-0.2	9.2+/-0.3
D	94UG114 ²	<3.9	10.2+/-0.06
F	93BR020 ²	4.8+/-0.6	5.6+/-0.2
G	Jv1083 ³	<3.9	9.8+/-0.2
不含模板		<3.9	<3.9

1. 检测样本为病毒株, 来源于 NIAID/NIH 下属 AIDS 分部的 AIDS 研究和参考试剂项目, 以不含细胞的培养上清液形式存在。

2. 由 UNAIDS 网络以及 DAIDS 和 NIAID 提供的病毒株, 用于 HIV 分离和定性。

3. Abimiku 等, 1994, AIDS Res Hum Retroviruses, 10 (11) :1581-1583

本方法在同时检测 HIV-1 M 组和 HIV-1 O 组变体方面的应用

HIV-1 O 组 (Outlier, 局外组) 病毒株与 HIV-1 M 组 (Major, 主要组) 相比, 表示出明显的序列变异。虽然 O 组病毒主要见于部分非洲地区, 但是在采集自非洲以外地区血库的样品中, 它们的检出率在增加 (Jaffe 和 Schochetman, 1998, Infect Dis Clin North Am; 12 (1) :39-46; Couturier 等, 2000, AIDS; 14 (3) :289-296; Fed Regist, 1997, Sept 23; 62 (184) :49695)。本发明能够采用单独一套“鼻对鼻”引物和分子信标检测出 M 组和 O 组病毒株。

根据本发明方法, 设计“鼻对鼻” RT-PCR 引物, 以扩增一段长度为 64 b.p. 的 HIV-1 基因组 RNA *pol* 基因, 此序列与 HIV HXB2

株已公布序列的核苷酸 4750-4813 相应。两引物之间没有插入缺口。
引物序列如下：

上游引物：

5'-CAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTT-3' (SEQ ID NO: 15);

下游引物：5'-CTGTATCCCCCAATCCCCCCTTTTCTTTTA-3'
(SEQ ID NO: 16)。

用于检测 PCR 产物的分子信标是

5'-FAM-cgcacgGCAGTATTCATTCACCAATTTTcgtgcg-DABCYL-3'
(SEQ ID NO: 17)。茎部核酸以小写字母表示，探针环状核酸以大写字母表示。

然后检测新设计的引物和信标从 HIV-1 M 组 (亚型 A、B、C、F 和 G) 和 O 组中扩增和检测病毒株的能力。所用样品是不含细胞的培养上清液，来源于 NIAID/NIH 下属 AIDS 分部的 AIDS 研究和参考试剂项目。在提取 RNA 之前，在磷酸缓冲盐 (phosphate buffered saline, PBS) 中将所有细胞上清液稀释 1000 倍。从稀释的上清液中提取 RNA，方法与前述基本相同。所不同的是在分离后，所有 RNA 样本需要采用不含 RNA 酶的 DNA 酶 (Ambion, 奥斯汀, 德克萨斯) 处理，以保证污染原病毒 DNA 的完全清除。采用上述鼻对鼻下游引物 (SEQ ID NO: 16)，利用提取的 RNA 逆转录得到互补 DNA。cDNA 合成和 PCR 扩增的反应条件基本与上述相同。在每个 RT-PCR 检测中，采用 RNA 标准曲线得到 HIV-1 模板分子的定量。

表 4 所示为采用本发明的 *pol* 区“鼻对鼻”引物的 RT-PCR 结果，以及此方法与 COBAS AMPLICOR HIV-1 监控测定版本 1.0 (Roche Diagnostics; Branchburg 新泽西)。“鼻对鼻”RT-PCR 检测

能够检测所有 M 组和 O 组病毒株，其灵敏度等于 (M 组，亚型 B 和 C) 或者高于 (M 组，亚型 A、D 和 F) COBAS AMPLICOR HIV-1 监控测定 (1.0)。后者不能够检测 O 组病毒株，并且不能检测 M 组亚型 G。这些数据与近期的一篇报告一致，即不论 COBAS AMPLICOR HIV-1 监控测定 (1.0) 或其更高级的版本 (1.5) 都不能检测 O 组病毒株 (Yang 等, Transfusion, 2001;41:643-651)。相比之下，本发明能够利用一套“鼻对鼻”引物和分子信标对所有病毒株进行检测。

表 4

所检测样本		Log ₁₀ RNA 分子/ml 稀释的培养上清液，所用检测方法	
HIV-1 亚型	病毒株 ² 名称	“鼻对鼻”信标 RT-PCR	COBAS AMPLICOR HIV-1 监控测定版本 1.0
A	92UG029	5.1+/-0.17	3.5+/-0.10
B	92BR014	5.4+/-0.62	5.2+/-0.03
C	92BR025	5.6+/-0.04	5.5+/-0.04
D	94UG114	5.9+/-0.46	5.2+/-0.05
F	93BR020	5.7+/-0.80	3.7+/-0.09
G	Jv1083	7.3+/-0.08	阴性
O	L20571	5.4+/-0.66	阴性
O	Y14496	6.0+/-0.38	阴性
人 DNA (100ng) ³		<3.0	未检测到
人 DNA (100ng) ³		<3.0	未检测到

1. 在提取 RNA 之前，在 PBS 中 (“鼻对鼻” RT-PCR) 或者在正常人血浆中 (COBAS AMPLICOR HIV-1 监控测定版本 1.0) 将所有细胞上清液稀释 1000 倍。2. 病毒株见表 3 所述；L20571 株，Gurtler LG 等，1994, J Virol, 68:1581；Y14496 株，Loussert-Ajaka I 等，J Virol, 69:5640, 1995。3. 对 100ng 人 DNA 或者 RNA 也进行 “鼻对鼻” PCR 或者 RT-PCR，验证所观察到的信号是由于病毒扩增产生的，而不是污染人核酸扩增造成的。

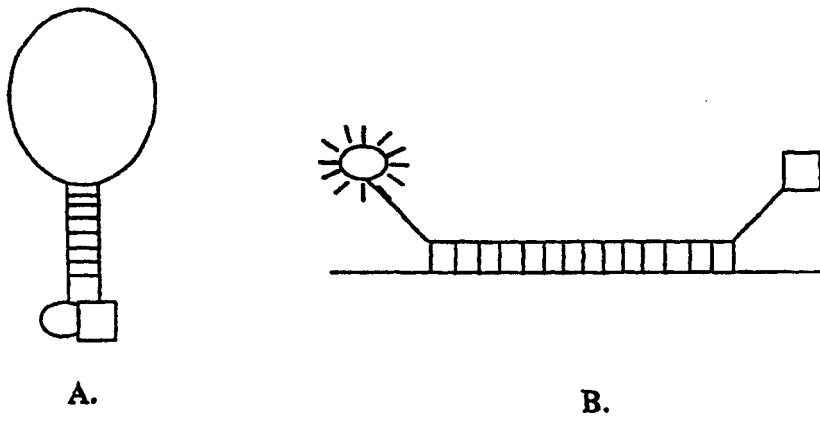


图1: 分子信标

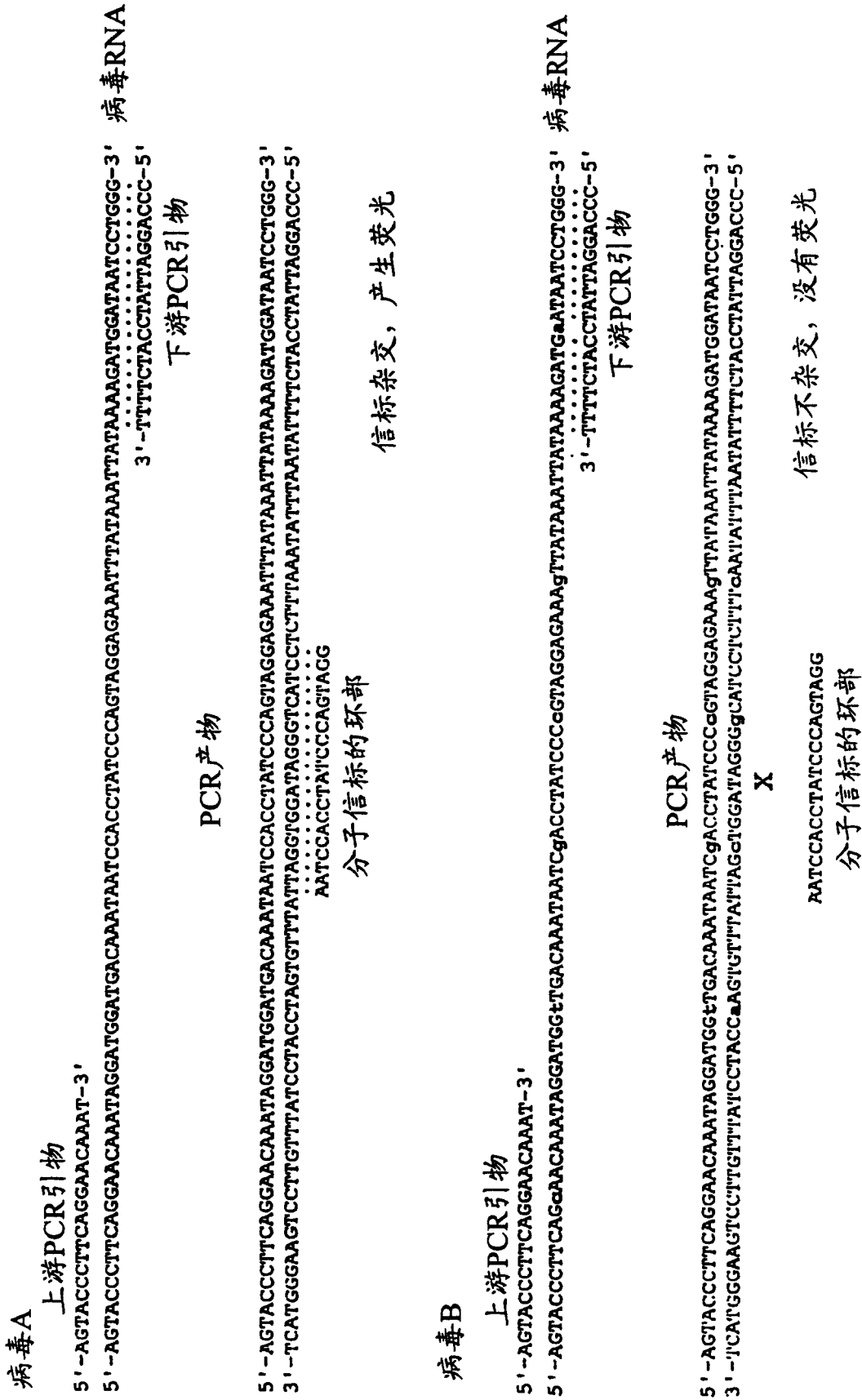
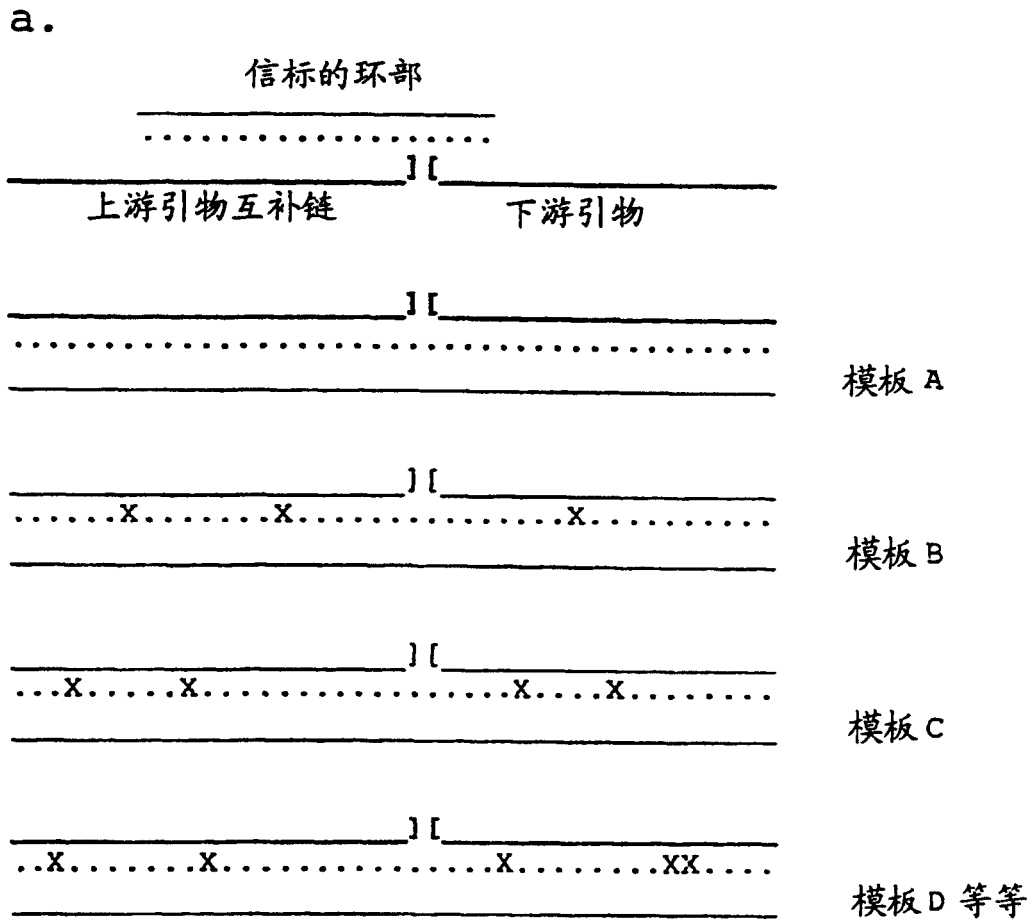


图2: 采用分子信标的传统PCR



b.

来源于所有模板的双链PCR产物:

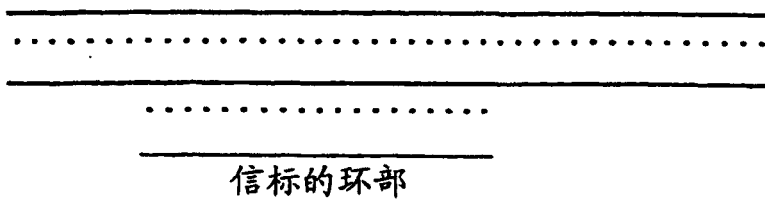
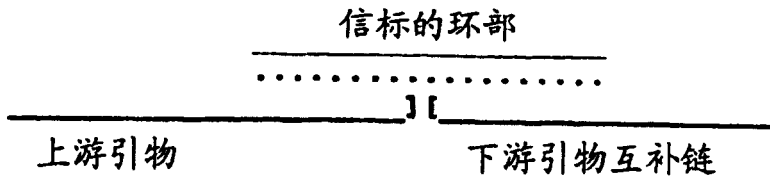
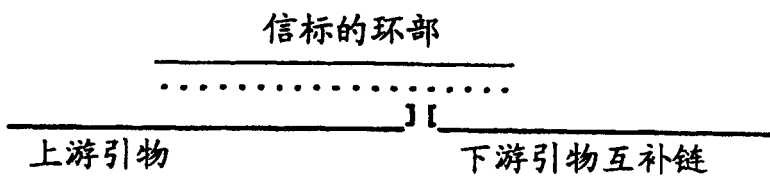


图3: 本发明原理之一图示

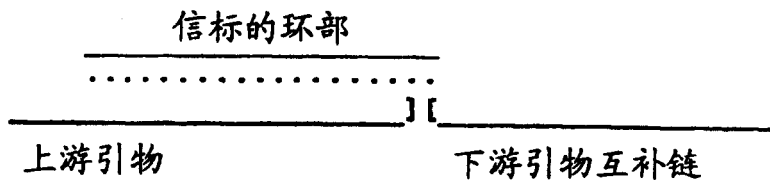
(I).



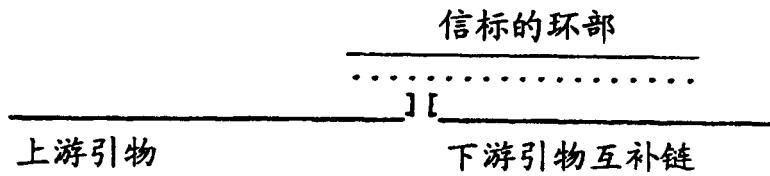
(II).



(III).



(IV).



B.

信标的环部

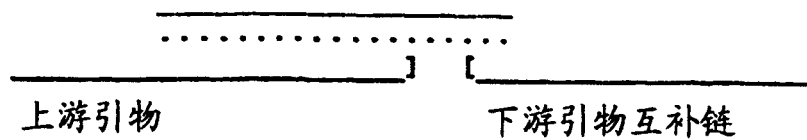


图5: 引物位置的变化图示

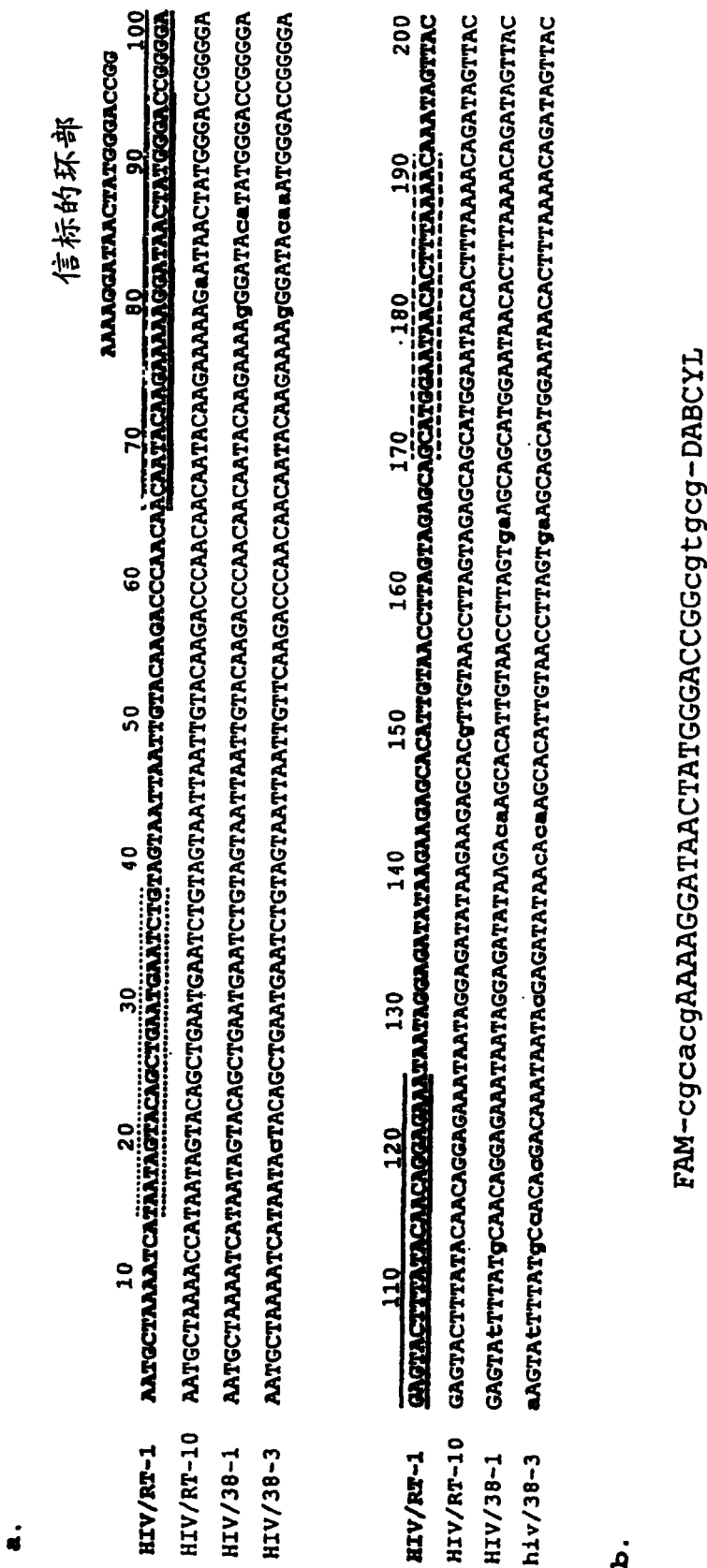


图6: HIV 4个变异体的V3环状结构和侧翼区的序列示意图，显示传统和“鼻对鼻”PCR的分子信标和引物的位置。(a) HIV/RT-1的蛋白编码链与其它3个病毒变异体HIV/RT-10、HIV/38-1和HIV/38-3排列在一起。与HIV/RT-1序列以及分子信标的配对错误以小写粗体字母表示。点状虚线(.....)和短划线虚线(---)分别表示传统PCR上游和下游引物的相对位置。双横线(==)和实线(—)分别表示“鼻对鼻”PCR上游和下游引物的相对位置。分子信标的位置显示在序列上方。所有引物和信标探针序列均来自于HIV/RT-1序列。(b) 分子信标的分子结构。探针环状结构以大写字母表示，互补的茎部核苷酸以小写字母表示。荧光基团FAM接合在5'末端，淬灭基团DABCYL接合在3'末端。

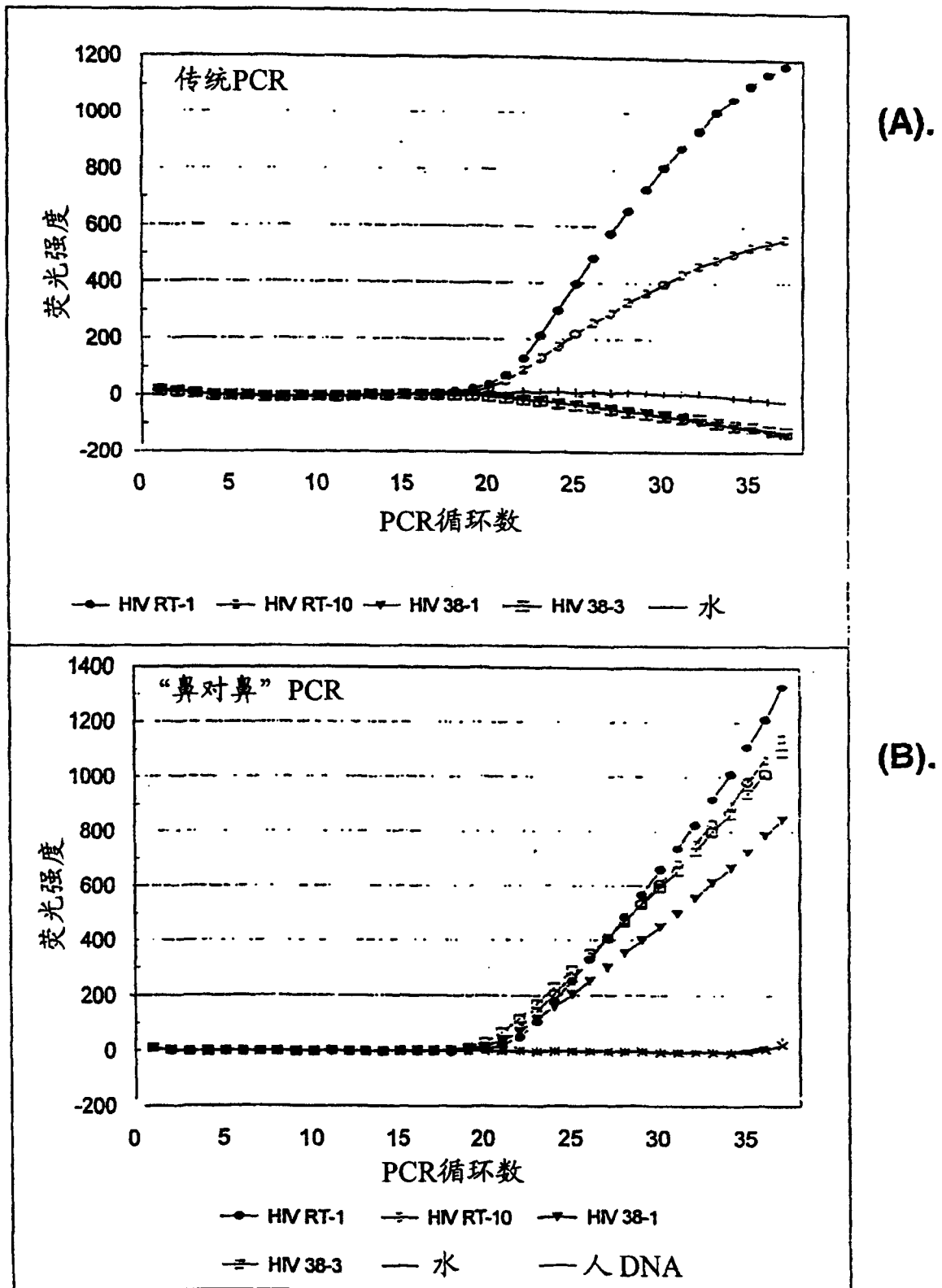


图7: 传统和“鼻对鼻”实时定量PCR检测图6中所述HIV的4个变异体比较。



图8：传统PCR产物的琼脂凝胶分析。
胶带所显示的是HIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1和HIV/38-3
经传统PCR方法得到的PCR产物。条带1：50bp梯带；
条带2：没有模板的结果；条带3：HIV/RT-1；
条带4：HIV/RT-10；条带5：HIV/38-1；条带6：HIV/38-3。

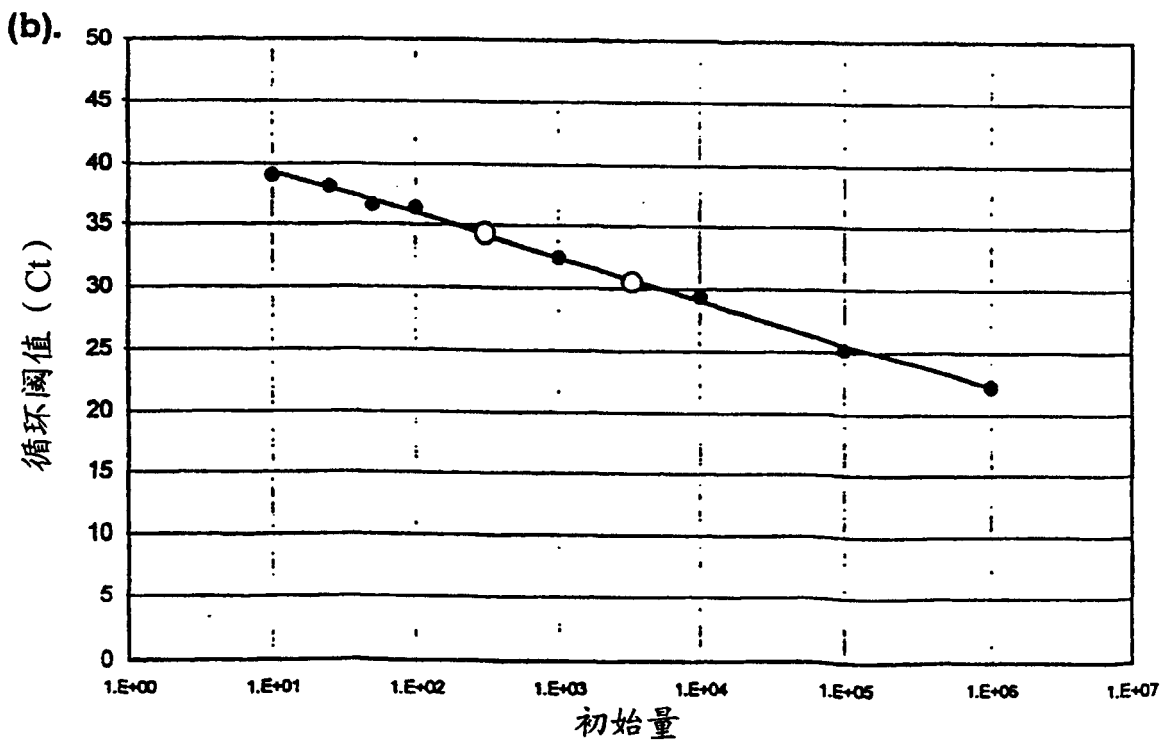
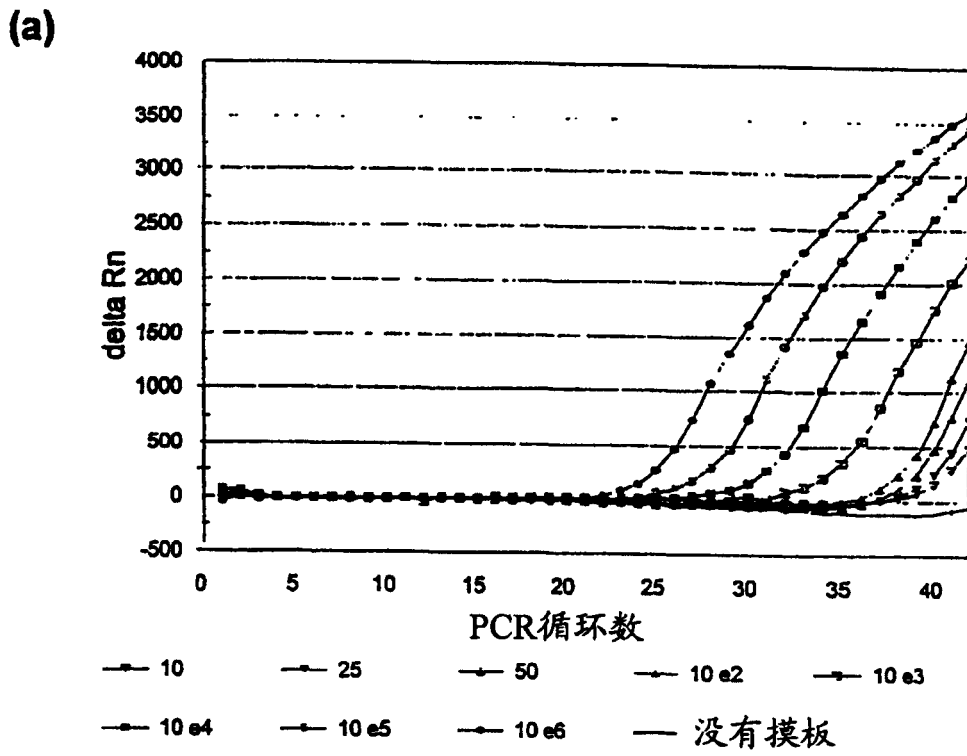


图9

PCR
第1轮

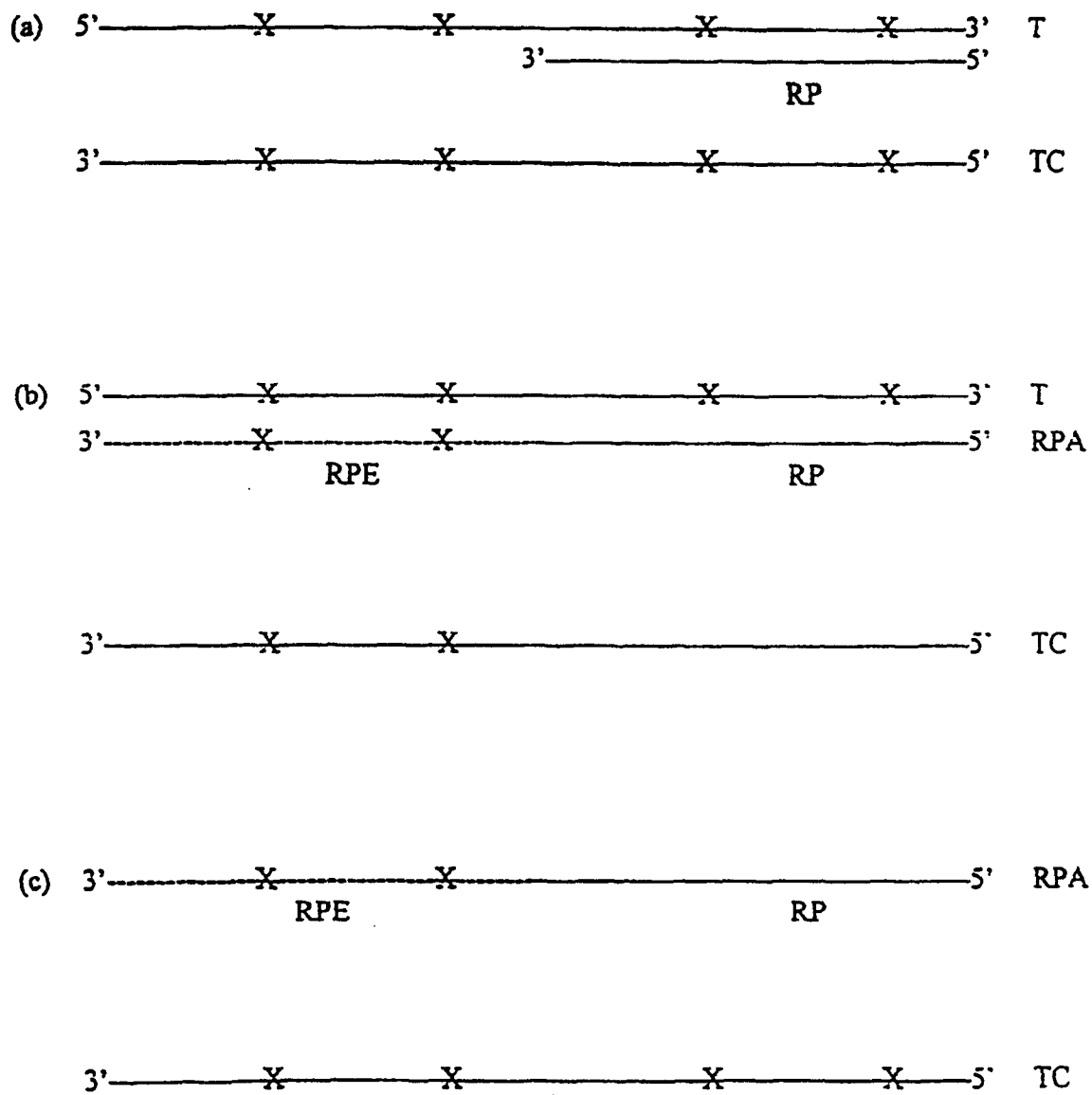
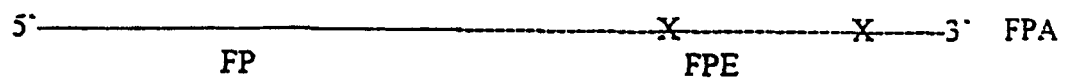
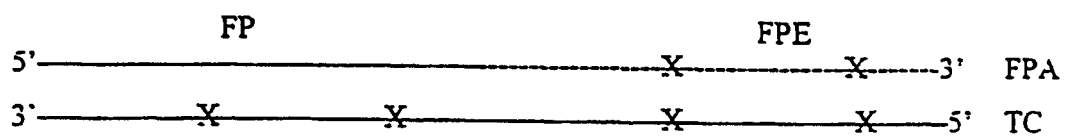
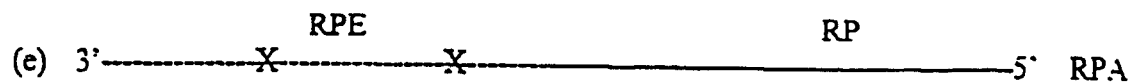
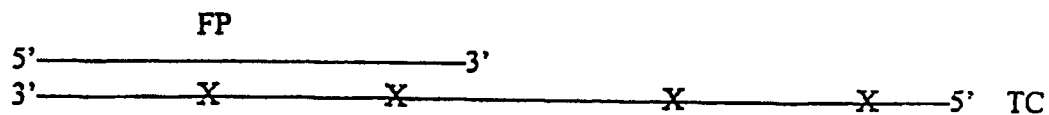
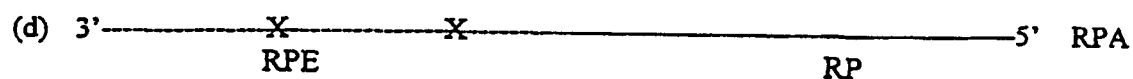
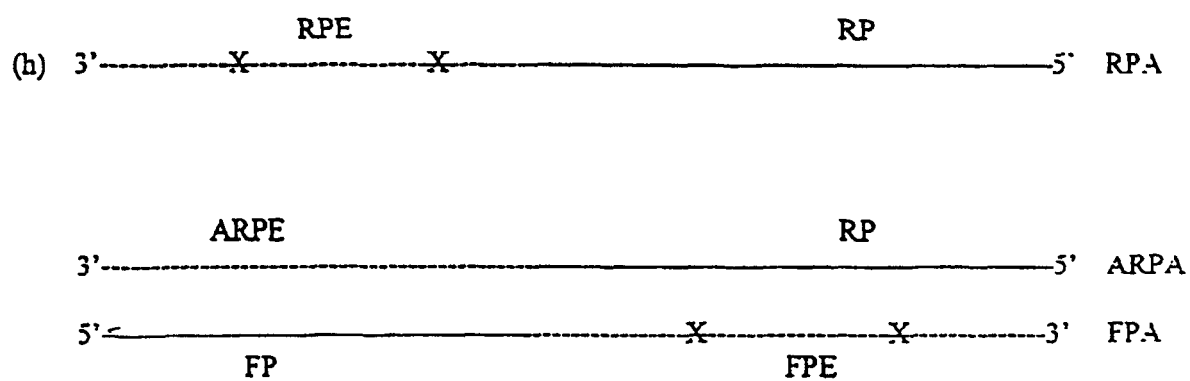
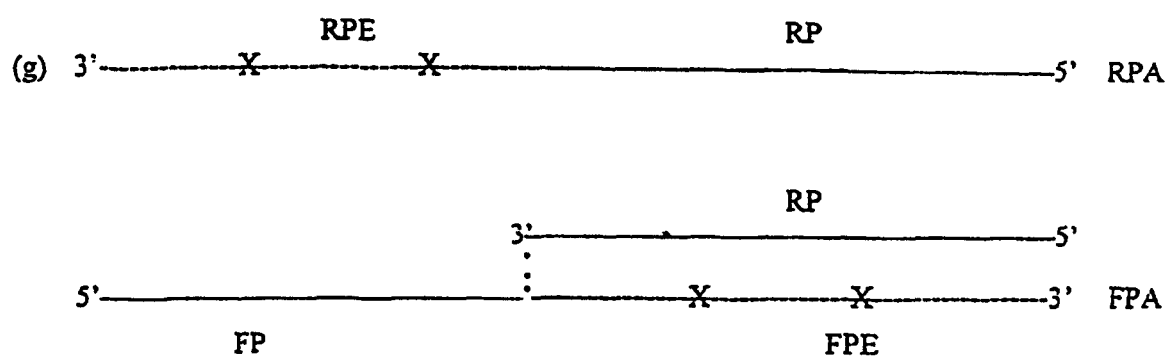
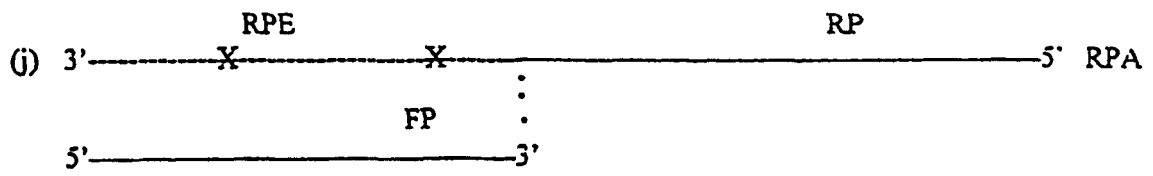


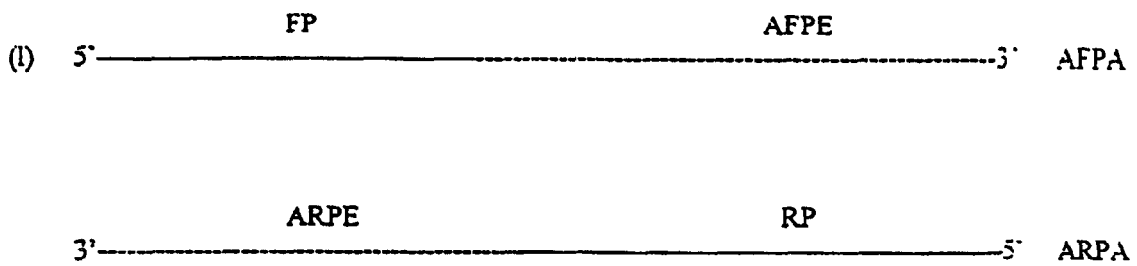
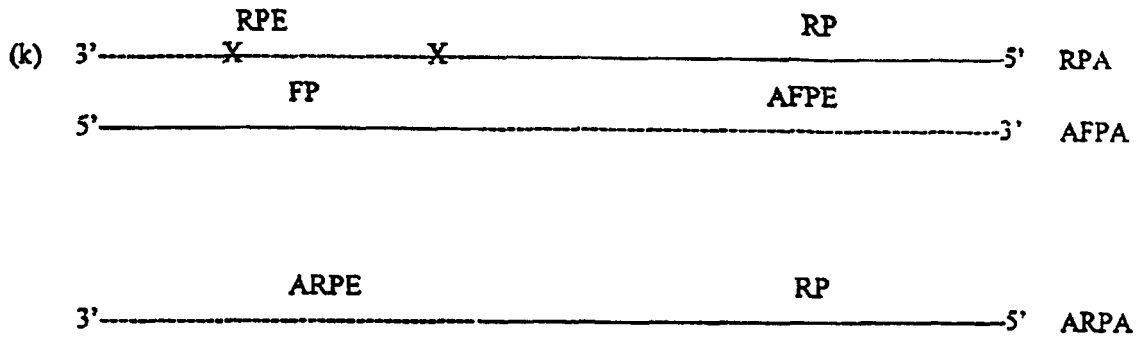
图10



PCR
第2轮







PCR
第3轮

(m) 重复步骤 (g) - (I)。RP和FP分别与AFPA和ARPA进行杂交。

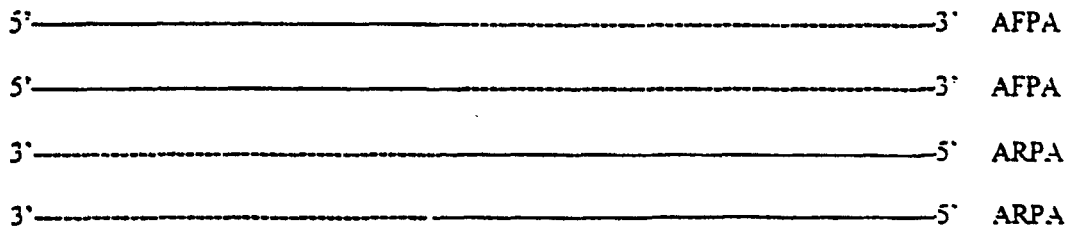


图10的标记说明

T = 靶核酸分子
TC = 靶核酸互补链
RP = 下游引物
RPE = 下游引物延伸产物
RPA = 下游引物扩增产物
FP = 上游引物
FPE = 上游引物延伸产物
FPA = 上游引物扩增产物
ARPE = 附加下游引物延伸产物
ARPA = 附加下游引物扩增产物
AFPE = 附加上游引物延伸产物
AFPA = 附加上游引物扩增产物

专利名称(译)	通用多变异体检测系统		
公开(公告)号	CN1279182C	公开(公告)日	2006-10-11
申请号	CN02810268.1	申请日	2002-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	紐約血液中心有限公司		
[标]发明人	琳达安德勒斯 卡门妮古拉尼科尔斯		
发明人	琳达·安德勒斯 卡门·妮古拉·尼科尔斯		
IPC分类号	C12Q1/68 C12P19/34 C07H21/02 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/6818 C12Q1/6858 C12Q1/70 G01N21/78 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/707 C12Q1/6818 C12Q1/6858 C12Q1/701 C12Q1/702 C12Q1/703 C12Q1/706 C12Q2537/101 C12Q2525/301 C12Q2561/113 C12Q2535/125		
代理人(译)	余刚		
优先权	60/284334 2001-04-17 US		
其他公开文献	CN1509338A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种采用单检测探针诊断检测如HIV、丙型肝炎、乙型肝炎(HBV)、细小病毒B19等病原体变异体的方法。

