

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809387.3

[43] 公开日 2002 年 7 月 10 日

[11] 公开号 CN 1358232A

[22] 申请日 2000.6.16 [21] 申请号 00809387.3

[30] 优先权

[32] 1999.6.24 [33] SE [31] 9902410-1

[86] 国际申请 PCT/EP00/05563 2000.6.16

[87] 国际公布 WO01/01129 英 2001.1.4

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.24

[71] 申请人 卡维迪技术有限公司

地址 瑞士乌普萨拉

[72] 发明人 C·凯兰德 S·格罗诺维茨

I·彼得松

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 钟守期

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 反转录酶分析试剂盒及其使用以及用于在生物样品中进行 RT 活性分析的方法

[57] 摘要

所描述的为一种在生物样品中进行 RT 活性分析的反转录酶(RT) 分析试剂盒该试剂盒含有含有结合有多聚核糖腺苷酸(prA) 和/或多聚脱氧腺苷酸(pdA) 模板的固相, 该包装物通过使一种基于聚苯乙烯的固相同一种含有 1-甲基咪唑的偶联溶液以及 prA 和/或 pdA 相接触并随后进行温育、以洗涤缓冲液进行洗涤、干燥和包装来获得, 还含有对 RT 类型进行适配的分隔包装的分析组分, 这些组分选自 pH \geq 7-8 缓冲液, 二价金属离子、螯合剂、多胺、RNA 酶抑制剂、还原试剂、盐、稳定化试剂和去污剂单独组分或其混合物, 以及冻干的脱氧核苷酸三磷酸、引物、保护试剂和浓缩的洗涤缓冲液单独组分或其混合物, 根据情况还含有冻干的参照酶和一种检测系统的组分, 该检测系统含有冻干的偶联有碱性磷酸酶的抗 BrdU 单克隆抗体、碱性磷酸酶缓冲液以及碱性磷, 以及文字的分析试剂盒使用指导组成的群体, 该群体根据情况含有冻干的参照酶, 该群体进一步根据情况还含有一种检测系统的组分, 该检测系统含有冻干的偶联有碱性磷酸酶的抗 BrdU 单克隆抗体、碱性

磷酸酶底物缓冲液以及碱性磷酸酶底物。进一步披露的还有一种方法和该试剂盒的应用, 该方法和应用用于在生物样品中进行 RT 活性的定性和定量分析, 根据情况该方法和应用之后根据该 RT 活性的分析结果进行了对与紊乱或疾病相关的 RT 活性水平的评估。

权 利 要 求 书

1. 反转录酶 (RT) 分析试剂盒, 该试剂盒含有一个或者几个包装, 这些包装固相结合的多聚核糖腺苷酸 (prA) 和/或多聚脱氧腺苷酸 (pdA) 模板, 该模板通过使一种基于聚苯乙烯的固相同一种含有 1-甲基咪唑的偶联溶液以及 prA 和/或 pdA 相接触并随后进行温育、以洗涤缓冲液进行洗涤、干燥和包装来获得, 该试剂盒还含有对 RT 类型进行适配的分隔包装的分析组分, 这些组分选自由 pH \approx 7-8 缓冲液, 二价金属离子、螯合剂、多胺、RNA 酶抑制剂、还原试剂、盐、稳定化试剂和去污剂单独组分或其混合物, 以及冻干的脱氧核苷酸三磷酸、引物、保护试剂和浓缩的洗涤缓冲液单独组分或其混合物, 根据情况还含有冻干的参照酶和一种检测系统的组分, 该检测系统含有冻干的偶联有碱性磷酸酶的抗 BrdU 单克隆抗体、碱性磷酸酶底物缓冲液以及碱性磷酸酶底物组成的组, 以及

该试剂盒的书面使用说明书。

2. 权利要求 1 的 RT 分析试剂盒, 其中该固相为一种微滴定板并且向各孔内加入了一份偶联溶液, 该溶液含有 100mM 1-甲基咪唑, pH \approx 5-7 以及 0.5-2mg/ml prA 和/或 pdA, 随后在 10-60°C 下温育 0.5-10 小时, 以洗涤缓冲液洗涤各孔以除去 1-甲基咪唑并且干燥并包装该平板, 该洗涤缓冲液含有 Bis-Tris 丙烷, pH \approx 5-7。

3. 权利要求 2 的 RT 分析试剂盒, 其中向各孔内加入了 100 μ l 偶联溶液, 该溶液含有 100mM 1-甲基咪唑, pH \approx 6.25 以及 1mg/ml prA 和/或 pdA, 随后在室温下温育 \approx 2 小时, 以 2 \times 300 μ l 洗涤缓冲液洗涤各孔并且在 37°C 下干燥该平板 \approx 25 分钟并在箔中包装该平板并且进行真空密封包装, 该洗涤缓冲液含有 10mM Bis-Tris 丙烷, pH \approx 6.25。

4. 权利要求 1-3 其中之一的 RT 分析试剂盒, 其中该分析组分选自该分析组分选自由 Tris 和 HEPES 缓冲液, pH \approx 7-8、二价金属离子 Mg²⁺ 和 Mn²⁺, 螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 和乙二醇双 (β -氨基乙醚) N, N, N', N'-四乙酸 (EGTA) 以及多胺, 精胺和亚精胺、RNA 酶抑制剂硫酸肝素和硫酸葡聚糖、还原试剂二硫苏糖醇 (DTT) 和二硫赤藓醇 (DTE), 谷胱甘肽、盐 NaCl 和 KCl、稳定化试剂新生小牛血清 (NCS) 和牛血清白蛋白 (BSA)、去污剂吐温-20 和 Triton X-100、脱氧核苷酸三磷酸 BrdUTP、引物寡聚 dT, 以及保护性试剂 ATP、GTP 和 CTP 组成的群体。

5. 权利要求 1-4 其中之一的 RT 分析试剂盒对于在生物样品中的定性和定量分析的应用。

6. 权利要求 5 的应用，其中该生物样品选自生物液体或细胞提取物。

5 7. 权利要求 6 的应用，其中该生物液体选自由血浆、血清、脊髓液、滑膜液和胸膜液组成的群体。

8. 权利要求 5-7 其中之一的应用，在该应用之后根据该 RT 活性的分析结果进行了对与紊乱或疾病相关的 RT 活性水平的评估。

10 9. 在生物样品中进行 RT 活性的定性和定量分析的方法，该方法包括的步骤有使用和遵循权利要求 1-4 其中之一的 RT 分析试剂盒的书面说明书来进行在生物样品中的 RT 活性检测。

10. 权利要求 9 的方法，其中该生物样品选自生物液体或细胞提取物。

15 11. 权利要求 10 的方法，其中该生物液体选自由血浆、血清、脊髓液、滑膜液和胸膜液组成的群体。

12. 权利要求 9-11 其中之一的的方法，在该方法之后根据该 RT 活性的分析结果进行了对与紊乱或疾病相关的 RT 活性水平的评估。

说明书

反转录酶分析试剂盒及其使用 以及用于在生物样品中 进行 RT 活性分析的方法

5

本发明涉及到一种反转录酶 (RT) 分析试剂盒, 该试剂盒用于在生物样品中进行 RT 活性分析。本发明还涉及到一种方法以及该 RT 试剂盒在生物样品中进行 RT 定性和定量分析中的应用, 可根据情况在该分析之后进行与紊乱或疾病相关的 RT 活性状况的评估, 该评估可根据该 RT 活性分析的结果进行。

10

发明背景

在包括人类免疫缺陷病毒 (HIV) 在内的所有反转录病毒中, 对于其进行的从病毒 RNA 合成 DNA, 反转录酶 (RT) 是一种关键性的酶 (Baltimore-70, Temin-70, Barre-Sinoussi et al-83)。这一过程涉及到三种酶活性: 第一条 DNA 链的合成, DNA/RNA 杂合体中的病毒 RNA 的降解以及第二条链的合成 (综述见 Goff)。

15

反转录病毒可以以外生和内生形式存在。其主要的区别在于内生的反转录病毒已经进入了胚系并且由此而存在于该生物体的所有的细胞中, 与之相比, 外生的反转录病毒只能进入具有该特定病毒的适当受体的细胞。人类中的内生反转录病毒 (ERVs) 被称为 HERVs。内生反转录病毒的整合前病毒形式具有同外生反转录病毒相同的基本结构。一些 HERVs 向胚系中的整合被认为在 3.5 到 4.5 千万年以前便已经发生。因此, 它们存在于所有的人类细胞中并且按照普通孟德尔定律进行遗传。这些反转录病毒序列占哺乳动物基因组的 1% 并因此也占人类基因组的 1%。

20

25

许多 HERVs 家族存在于人类基因组中。对于不同的家族, HERVs 的每单倍体基因组拷贝数从单拷贝到成千个拷贝不等。最高的核苷酸序列保守性在 pol 基因中被发现。这一特征被用于推断 HERV 家族间的亲缘关系。尽管许多 HERVs 及它们的 ORFs 是缺陷型的, 在多个组织类型的多数 HERV 家族中已经检测到 mRNA 转录本 (综述见 Wilkinson et al. 1994, Leib-Mösch and Seifarth 1996)。另外, 在普通的人类胎盘、卵母细胞、teratacarcinomas、乳腺肿瘤组织以及在一些自体免疫患

30

者的唾液腺中已经发现了具有聚合酶和蛋白酶的病毒粒子（综述见 Wilkinson et al. 1994, Urnovitz and Murphy 1996, Tönjes et al., 1997）。诸如缺氧和紫外照射这样的逆境（stress）条件可能也会诱导 HERVs 的表达，该表达同在感染性反转录病毒的观察一致（综述见 Duvic
5 1995）。

一些 HERVs 已被定位于基因组内的染色体断点（Di Cristofano et al. 1995, Meese et al. 1996）。位于不同的染色体位点的 HERV 序列间的重组可能导致基因组重排列，该重排列包括转位、反转、重复和删除。这样的重组事件引起了基因组的不稳定，该不稳定性是进化的
10 重要特征。另外，许多肿瘤的特征也在于特定的基因组重排，该重排被认为在肿瘤发生中起着关键作用。感染性反转录病毒的存在和肿瘤在宿主中的发展之间的关系提示 HERVs 与癌症有联系。在缺乏感染性病毒的情况下在原发性肿瘤样品也经常可以观察到毒粒颗粒和反转录病毒相关抗原（Weiss 1984, Faff e al. 1992）。另外，在患有癌症
15 的患者体内经显示具有针对反转录病毒蛋白的抗体（Weiss 1984）。进一步，HERV 序列被发现在特定的肿瘤衍生细胞系中高效表达（综述见 Löwer et al. 1996）。

内生前病毒还可以同外生变体进行重组（Martinelli et al. 1990）。新的重组体获得一种新的表型。这可能促成新感染性反转录病毒
20 的进化。由于其它部分的突变可能是有害的并与颗粒的形成不相容，主要受影响的为 env 基因。一些反转录株系被发现在一个物种中是共生的并且在另一个物种中是病原体。这些发现显示出异源移植的一个严重问题。被移植组织提供的共生 ERVs 在新的宿主中可能是病原性的。它们可能同反转录病毒融合所需的细胞表面受体相互作用，该受体存
25 在于新宿主的细胞表面。另外还可能同该组织受体的基因组中的内生反转录病毒发生重组并且创造出新的感染性反转录病毒，该病毒可能在种群中传播。内生和外生的反转录病毒均可促成遗传材料在种间的横向和垂直传播并且为新病原物质的进化提供机制。

感染性的反转录病毒和 ERVs 均已被发现表现出免疫调控功能（综述见 Krieg et al. 1992）。这些效应主要在小鼠中进行了研究，但是
30 有观察支持 HERVs 的类似机制的存在。如果 HERV 序列能够减量调节对一种免疫应答调节，这些序列可以导致自体免疫疾病。这些效应可被

HERV 蛋白直接调节或者通过影响参与该免疫应答的分子的表达而间接调节。HERV 蛋白可被暴露于细胞表面。对这些蛋白序列的自体耐受的丧失可导致针对暴露这些蛋白的细胞的自体免疫反应。反转录病毒感染之后产生的抗体可能同 HERV 编码的蛋白交联反应并导致自体耐受的丧失。这一现象已经在转基因小鼠中有所观察 (Zinkernagel et al. 1990)。另外, 在小鼠中观察到了对 ERV 所编码的 env 蛋白的耐受的丧失, 该小鼠自发产生了自体免疫的肾小球肾炎(综述见 Krieg et al. 1990 和 1992)。对人类的一些观察可能支持内生和外生反转录病毒蛋白之间的交联抗体的存在。已经在自体免疫患者的血中检测到针对反转录病毒蛋白的抗体 (综述见 Krieg et al. 1992, Urnovitz and Murphy 1996)。在特定的情况下发现该血清还同外生的反转录病毒反应。反转录病毒感染已经被同自体免疫疾病的发生相联系 (综述见 Krieg et al. 1990 和 1992)。进一步, 感染性反转录病毒蛋白同自体抗原表现出部分的相似性, 该自体抗原通常为自体抗体的目标 (综述见 Krieg et al. 1992)。它们可以引发针对这些目标的自体免疫应答, 该机制被称为分子拟态 (molecular mimicry)。但是, HERV 蛋白同已知的自体抗原的相似性尚未被检测出。

对 RT 活性的分析已经成为用于在细胞培养中进行反转录病毒的检测和定量的常规技术。它们同 p24 抗原分析一起被用作 HIV 分离物的证实性测试 (Jackson-88, Gupta-87)。在寻找针对 HIV 的有效抗病毒剂的尝试中 RT 也是一个主要目标。一种传统的 RT 活性分析通过使用一种可溶性酶分析而进行, 该分析具有一种人工的模板引物结构体并以氘化的三磷酸脱氧核糖核苷酸作为核苷酸底物 (Baltimore-71, Lee et al-87)。这一早期系统基于对掺入三氯乙酸沉淀的 RNA/DNA 杂合体中的放射性的检测。 β 放射性核苷酸的使用需要使用闪烁液以进行放射性的检测, 该检测由于淬灭问题经常导致很低的重复性。这一方法相对繁琐并且不容易适用于对大量样品的大规模检测。该方法还对样品中的干扰因素十分敏感。

在过去十年对 HIV 的深入研究中, RT 分析已经使用不同工艺进行改善。 I^{125} 标记的底物提供了更高的灵敏度并且消除的淬灭和闪烁液的使用 (Neumüller et al -90)。连接于固相的模板或引物的引入简化了底物同产物的分离, 避免了对 TCA 沉淀的需求并且产生了“一管 RT

分析” (Gronowitz et al -90, EP 0 447 442 B1)。

更近一段时间以来, 在 RT 分析中使用放射活性作为标记已经被修饰核苷酸碱基所淘汰, 该修饰核苷酸碱基含有抗原表位或对限定配基具有高亲和性的结构。这些表位或结构的在新生 RNA/DNA 杂合体中的存在被随后用于结合抗体, 该抗体与诸如 ELISA 酶这样的物质的抗体进行偶联。随后在一个二级酶分析中测定所结合的 ELISA 的量。

Porstmann et al 1991 利用 5-溴-脱氧尿嘧啶 (BrdU) 三磷酸作为 RT 分析中的核酸底物。所掺入的 BrdUMP 的量在二级步骤中进行测定, 该测定在一种免疫分析中进行, 该分析使用偶联有单克隆抗-BrdU 抗体的碱性磷酸酶。

Eberle and R. Seibl 1992 地高辛标记的 dUTP 在新生 DNA 中的掺入量以代替放射性标记的 dTTP。为能够将未掺入的核苷酸从新生 DNA 中分离, 生物素标记的 dUTP 也被加入至反应混合物中。在反转录之后, 新生的双链标记 DNA 被固定化于链亲和素包埋的 ELISA 孔中并且通过与偶联有过氧化物酶的抗地高辛抗体结合而进行光度测定。该程序已经成为一种试剂盒 RT 分析的基础, 该试剂盒可购自 Boehringer Mannheim。

Urabe et al 1994 已经开发出一种非放射性 RT 分析, 该分析基于生物素-dUTP 在一种固定化的 odT/prA 结构体中的掺入。掺入的核苷酸底物的量在加入偶联有碱性磷酸酶的链亲和素之后进行光度测量。本发明之前的最新工艺为 Ekstrand et al 1996 所开发。在该分析中与一个 96 孔板的孔相共价结合的多聚 (rA) 被用作在反转录步骤期间 BrdUMP 的掺入的模板。掺入 DNA 的 BrdUMP 的量随后根据与 Porstmann et al 1991 使用的类似的程序进行免疫测定。该方法可通过 Cavid Tech, Sweden 的 RT 测定试剂盒来实现。

NEN (New England Nuclear, USA) 商业应用的另一种 RT 活性检测的原理为使用序列特异性探针进行新生 cDNA 检测。该酶反应使用一种不均一多聚 RNA 分子以及一个 20 碱基寡聚核苷酸引物, 该引物与该 RNA 分子 5'末端的序列相互补。RT 反应期间产生一条完整的 DNA 链。在 RNA 模板水解之后以两个不同的寡聚核苷酸探针来合成该 cDNA, 这两种探针为捕获探针和检测探针。捕获探针被用于将 cDNA 结合于一个微孔板的孔内。检测探针同辣根过氧化物酶偶联, 该探针经洗脱除去

未利用的核苷酸底物和游离探针后提供一种颜色反应。

在最后一个类型的分析中的检测灵敏度可通过对 RT 反应产生的 cDNA 进行多聚酶链反应扩增来提高。该扩增 DNA 可在此之后以不同类型的标记探针进行检测 (Sliver 93, Heneine 1995, US5817457, US5849494)。

对于在生物样品中的 RT 活性的知识的应用, 使用给出定量结果的 RT 分析是较为理想的。这样的应用包括疾病或紊乱监测, 在该监测中不同时间进行的测量的 RT 分析结果被进行比较, 这样的应用还包括对疾病或紊乱的诊断, 在该诊断中 RT 活性水平同标准水平比较来显示是否该患者有患病危险或事实上已经患有被怀疑的疾病或紊乱。

在某些情况下需要在生物样品中使用一种尽可能敏感的分析, 即, 该分析能够测出尽可能低的 RT 活性, 以便使 RT 活性的存在和数量级可以同早期的紊乱和疾病相关联。

发明描述

本发明提供了一种 RT 分析, 该分析易于被应用于检测目的并且该分析对于 RT 活性非常敏感。

更精确地, 本发明直接指一种反转录酶 (RT) 分析试剂盒, 该分析试剂盒包括一种或多种包装物, 该包装物含有固相结合多聚核糖腺苷酸 (prA) 和/或多聚脱氧腺苷酸 (pdA) 模板, 通过使一种基于聚苯乙烯的固相同一种含有甲基咪唑 (methylimidazole) 的偶联溶液以及 prA 和/或 pdA 相接触并随后进行温育、以洗涤缓冲液进行洗涤、干燥和包装来获得该包装物。该试剂盒还含有适配 RT 类型的分隔包装的分析组分, 这些组分选自由 pH \approx 7-8 缓冲液, 二价金属离子、螯合剂、多胺、RNA 酶抑制剂、还原试剂、盐、稳定化试剂和去污剂的单独组分或其混合物, 以及冻干的脱氧核苷酸三磷酸、引物、保护试剂和浓缩的洗涤缓冲液单独组分或其混合物, 以及文字的分析试剂盒使用指导组成的群体中。根据情况该试剂盒可含有冻干的参照酶。根据情况该试剂盒可进一步含有一种检测系统组分, 该组分含有冻干的偶联有碱性磷酸酶抗 BrdU 单克隆抗体、碱性磷酸酶底物缓冲液以及碱性磷酸酶底物, 例如 pNPP 片剂。

在本发明的 RT 分析试剂盒的一个优选的实施方案中, 该固相为一微滴定板, 并且在该方案中向每个孔内加入了一份偶联溶液, 该溶液

含有 100mM 1-甲基咪唑, pH \approx 5-7 以及 0.5-2mg/ml prA 和/或 pdA, 随后在 10-60°C 下温育 0.5-10 小时并且以洗涤缓冲液洗涤每个孔以除去 1-甲基咪唑, 该洗涤缓冲液含有 bis-tris-丙烷, pH \approx 5-7。

5 在本发明的 RT 分析试剂盒的一个特别优选的实施方案中, 向每个孔内加入 100 μ l 偶联溶液, 该溶液含有 100mM 1-甲基咪唑, pH \approx 6.25 以及 1mg/ml prA 和/或 pdA, 随后在室温下温育 \approx 2 小时并且以 2 \times 300 μ l 洗涤缓冲液洗涤每个孔, 该洗涤缓冲液含有 10mM bis-tris-丙烷, pH \approx 6.25, 在 37°C 干燥该板 \approx 25 分钟并且在该板置于箔包裹中并对该包裹进行真空密封。

10 在本发明的 RT 分析试剂盒的一个进一步的实施方案中, 该分析组分选自 Tris 和 HEPES 缓冲液, pH \approx 7-8、二价金属离子 Mg²⁺和 Mn²⁺, 螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 和乙二醇双(β -氨基乙醚) N, N, N', N'-四乙酸 (EGTA) 以及多胺精胺和亚精胺、RNA 酶抑制剂硫酸肝素和硫酸葡聚糖、还原试剂二硫苏糖醇 (DTT) 和二硫赤藓醇 (DTE), 谷胱甘肽、
15 NaCl 和 KCl、稳定化试剂新生小牛血清 (NCS) 和牛血清白蛋白 (BSA)、去污剂吐温-20 和 Triton X-100、脱氧核苷酸三磷酸 BrdUTP、引物寡聚 dT 或寡聚 dN, 其中 N 为另一种 T 类似物, 如 U、以及保护试剂 ATP, GTP 和 CTP 组成的群体。

20 本发明还涉及本发明的试剂盒对于在生物样品中进行定性和定量分析的使用, 生物样品的例子如选自细胞抽提物和生物流体的生物样品, 生物流体例如血浆、血清、脊髓液、滑膜液和胸膜液 (pleural fluid)。

在一个优选的实施方案中, 根据本发明所进行的应用之后根据该 RT 活性分析的结果估测 RT 活性相关的紊乱或疾病状况。

25 另外, 本发明指一种在生物样品中进行 RT 活性的定量和定性分析的方法, 该方法包括使用并且遵循本发明的 RT 分析试剂盒的书面说明书以在生物样品中进行 RT 活性分析, 生物样品的例子如选自细胞抽提物和生物液体的生物样品, 生物液体例如血浆、血清、脊髓液、滑膜液和胸膜液。

30 在一个优选的实施方案中, 在本发明的方法之后根据该 RT 活性分析的结果估测 RT 活性相关的紊乱或疾病状况。

本发明在此通过参照图表和实施方案更详细的描述来阐明, 但是

这些实施方案不能被视为对附加的权利要求所定义的保护范围进行限制。

附图简述

5 图 1. 以两种方法测定培养基中 RT 活性, 培养基来自 PK 细胞系培养物。所获得的吸光值对加入反应混合物的培养基的量进行作图。

图 2. 在滑膜液样品中进行的 RT 活性直接测定, 该样品收集自患有风湿性关节炎的患者。用于作图的数值获自 1 μ l 的样品并且进行了过夜 RT 反应。

10 图 3. 以两种方法在来自乳腺癌的抽提物中进行 RT 活性的测定。所获得的吸光值对加入反应混合物的抽提物的量进行作图。

图 4. 在来自乳腺癌活检样品中的抽提物中进行的 RT 活性直接测定, 该样品收集自患有风湿性关节炎的患者。用于对蛋白浓度进行作图的数值获自 1 μ l 的样品并且进行了过夜 RT 反应。

15 图 5. 以两种方法检测了在 A) HTLV 1 转化细胞的培养物的培养基中的细胞以及在 B) 来自 BLV 感染的培养物中的 RT 活性。所获得的吸光值对加入反应混合物的样品的量进行作图。

图 6. 在来自 SIV 感染的恒河猴的血清中进行 RT 活性的直接检测。在一个 4 小时 RT 分析中获得的吸光值对血清取样天数作图。

20 本发明的实施方案的详细描述

本发明的 RT 试剂盒含有三种不同类型的组分, 即

1) 一个模板, 该模板由连接于一种固相的聚核糖腺苷酸 (prA) 或聚脱氧腺苷酸 (pdA) 组成。

25 2) 反应混合物, 该混合物使得酶可以依赖于引物的方式使用连接的模板多聚核苷酸聚合产生一种新的 DNA 链。

3) 一种检测系统组分, 该系统用于体外合成的 DNA 链的免疫检测。

1) 固相结合模板

30 已经开发出一种方法, 在该方法中 prA 或 pdA 可以连接于特定类型的微滴定板, 该连接的方式使该多聚核苷酸可用作引物依赖的 dNTP 掺入的模板, 该掺入通过病毒和细胞 RNA 和 DNA 依赖的 DNA 聚合酶进行。已经展示了在两种可购自 Nalge Nunc International 的微滴定板

CovaLink™ 和 NucleoLink™ 上进行的工作。本发明的分析试剂盒使用的偶联 prA 的微滴定板，该板来自 NucleoLink™ 型号。方法和缓冲液在表 1 中有所描述。由于该方法并不对应于制造商推荐或建议的方法，该结合的机制并非已知或在文献中有明确描述。一个可能的反应机制涉及到一些反应基团，这些基团在制造程序期间引入，但并非为已知和有目的用途而植于该特定表面。预期以来自其它商业来源的其它基于聚苯乙烯的微滴定板可获得类似的结果。已经发表了一种用于化学激活聚苯乙烯以获得一个与 CovaLink™ 平板性质相同的表面 (Zammatteo et al-96)。其它用于将多聚核苷酸连接于塑料表面的几种方法也已经发表 (Zammatteo et al-96, Gregorious et al-95, Niveleau et al-93, Rasmussen et al-91, Ghosh 和 Muss-87)。

2) 适配 RT 类型的反应混合物

用于通过 RNA 和 DNA 依赖的 DNA 聚合酶在可溶系统中使用纯化的酶而获得核苷酸掺入的一般条件是简单并且已知的。它们包括一种保持 pH 在 7.5 左右的缓冲液，一种二价金属离子， Mg^{2+} 或有时使用 Mn^{2+} ，一种盐以调节离子强度，对于某些酶还含有一种还原试剂和少量去污剂。同该简单缓冲液一起提供的酶应能够使用所添加的模板、引物和脱氧核苷酸三磷酸以合成一条 DNA 链。这一通用概念并不受存在于最佳或特别适配的反应条件的差异的影响，这些条件为不同类别或类型的反转录酶所需。另一个重要的方面是该反应混合物对加入的作为 RT 酶活性来源的生物液体或细胞抽提物的耐受能力。

使用诸如细胞培养物上清这样的粗样品以及纯化的酶进行的系统测试揭示了其它反应组分，这些组分被用于创建反应混合物，该混合物对反转录酶作了最优化处理或特别适配。

表 2 含有用于组建对个体 RT 类型适配的反应混合物的组分的简述。典型反应混合物的组成见表 3。

本发明的反转录酶分析方法如下文的描述进行。该分析中的第一步为向偶联有 prA 的微滴定板加入 100 μ l 的反应混合物，随后在 33 $^{\circ}$ C 下预温育 20-60 分钟。含有反转录酶的样品随后被加入 50 μ l 缓冲液，所产生的最终分析体积为 150 μ l，随后将该微滴定板在 33 $^{\circ}$ C 下温育。将每个样品加入同样的两个微滴定板中以进行两个分析时间，分析时间分别标准化为 3 小时和约 16-20 小时的过夜。在每个试剂盒均含有

的书面说明书或使用手册中提供了分步程序。该试剂盒含有建议或指导，该建议或指导针对如何对不同类型的反转录酶分析组分进行适配以用于下列应用之一或全部：1) RT 活性定量。2) 在细胞抽提物、细胞上清和/或生物液体中 RT 活性的检测，这些液体包括血浆、血清、脊髓液、滑膜液和胸膜液，但不限于这些。3) RT 活性阻断抗体的检测。4) RT 活性抑制物质的 IC₅₀ 值的检测。

我们通过使用这些反应混合物和固相结合模板而设计了权利要求中的分析，该分析不仅在 RT 活性的直接测量中比前述的其它基于固相结合的模板的分析更加敏感，而且可以检测先前未知的反转录酶活性。

3. 体外合成的 DNA 链的免疫检测

聚合酶在样品中使用在反应混合物中提供的溴-脱氧尿苷酸三磷酸 (BrdUTP) 而合成一条 DNA 链。

所掺入的 BrdUMP 通过偶联于碱性磷酸酶的 BrdU 结合单克隆抗体进行检测。被结合抗体的碱性磷酸酶活性随后通过加入一种含有底物的溶液而进行定量，该溶液含有对硝基苯基磷酸酯 (para-nitro phenyl phosphate), pNPP。当 pNPP 被碱性磷酸酶切断时该底物溶液变黄。在一个标准 ELISA 酶标仪中在 405nm 波长下测量吸光密度 (OD)。通过背景进行校正的 OD 值正比于样品中的 RT 活性。

检测步骤如下文进行。在每个试剂盒均含有的书面说明书或使用手册中提供了分步程序。缓冲溶液的组分在表 4 中提供。

在反转录酶分析之后，使用可购得的 ELISA 洗板机或通过含有洗涤缓冲液的桶中对该板进行一系列浸泡。该偶联抗体可根据情况在试剂盒中以冻干的形式提供。在双蒸水中以 1% 的 tritonX-100 重构后将 100μl 抗体溶液加入每个孔中并且随后在 33°C 下温育 90 分钟。为除去过量的抗体，该平板随后以相同的方式进行第二次洗涤。由缓冲液和 pNPP 药片制备底物溶液，该缓冲液和 pNPP 药片可根据情况由试剂盒提供。随后以适当的时间间隔测量 OD 值。

所结合的碱性磷酸酶的量与黄色产物的浓度的线性关系在高 OD 值时消失。通过在不同时间测量 OD，可以能够对于具有在反转录酶分析步骤期间形成的大量或少量产物的样品给出有用的数值，即，特定仪器的线性读取范围内的 OD 值。当在 30 分钟、2 小时和 16-20 小时，即，过夜后进行 OD 测量时，参照 RT 酶能够给出具有有用的 OD 值的滴定曲

线，该参照酶可根据情况由一些试剂盒含有，但并非所有试剂盒都含有。

由本发明的 RT 分析试剂盒而获得的改善的性能在表 5 中进行阐明。通过先前已知的来自 Cavid Tech AB 的 Lenti RT 试剂盒和本发明的分析试剂盒而获得 HIV-1 RT 滴定曲线。以 OD 值对 RT 酶浓度进行作图并且使用最小二乘方近似成直线。表 6 中的 k 值为所计算出来的直线的斜率，该值为该分析的敏感度的一个指标。可以看出本发明的试剂盒所具有的 k 值高出一个数量级。在特定的表述中这意味着从含有非常低的浓度的 HIV-1 反转录酶的样品中进行有效的测量和/或意味着对时间的节省。更短的反转录酶分析时间和/或更短的磷酸酶读标时间对于本发明的试剂盒的使用者来说意味着更短的周期时间 (turn-around time)。

本发明的试剂盒典型组分

- A. 连接有 prA 和/或 pdA 的两个 96 孔微滴定板。
- B. 一种样品稀释剂以及含有对 RT 类型进行适配的组分 I-IX 混合物的反应缓冲液，这些组分列于表 2。
- C. 混合的或者分开盛放于药瓶中的冻干的反应混合物 X-XII。
- D. 冻干的参照酶，它是重组、天然纯化或病毒颗粒的。
- E. 浓缩的洗涤缓冲液
- F. 冻干碱性磷酸酶偶联的抗 BrdU 单克隆抗体，名为“RT 产物六踪物”
- G. 碱性磷酸酶底物缓冲液和 pNPP 药片。
- H. 书面说明书或者手册

实施例

实施例 1

在细胞上清中的 PERV (猪内生反转录病毒) RT 的改良检测

猪细胞系 PK-15(猪肾)已知可以连续产生少量的 PERV。将来自 PK15 细胞培养物的上清进行连续稀释。在各稀释度下对 Cavid tech AB 的 C 型 RT 分析试剂盒和本发明的 Mn^{2+} RT 分析的能力进行测试。图 1 所示的数据由过夜 RT 分析产生。

同一种先前工艺相比，本发明的分析所表现出的敏感度高出约 25 倍。通过使用更多的样品来补偿检测灵敏度的差异是不可能的，这是因为在较高的上清浓度下 ($>2\mu\text{l}/\text{孔}$) C 型分析受困于背景水平的增加以及时间和/或样品量的线性偏差的增加。

- 5 本发明的分析试剂盒可用于针对伴随着异源移植的外生反转录病毒的转移和/或内生反转录病毒的激活的可能性的研究。

实施例 2

反转录酶在滑膜液中直接的检测

近来的 DNA 杂交实验已经暗示了风湿症紊乱与反转录病毒相关序列的存在之间的联系。来自风湿性关节炎患者的滑膜液的冷冻样品获
10 自位于 Karolinska sjukhuset, Stockholm, Sweden 的风湿病学部(系)。该样品中在冷冻之前已经通过低速离心除去了细胞和碎片。融化该样品，进行一系列的稀释并且检测 RT 活性。

所获得的活性被重新计算成为 OD_{405}/h 。图 2 为在本发明的滑膜液 RT
15 分析中使用 $1\mu\text{l}$ 样品并进行过夜酶反应后所发现的 RT 活性。通过 Caviditech AB 的 Lenti 或 C 型 RT 分析在被检测的样品中未检测到 RT 活性。

实施例 3

在来自人类乳腺癌的抽提物中的 RT 活性检测

MMTV (小鼠乳腺肿瘤病毒) 在人类中的内生或外生对应物涉及到
20 人类乳腺癌的发生。通过使用 MMTV RT 以最优化分析条件，在来自乳腺癌的抽提物中无需预先的浓缩或纯化便检测出了 RT 活性。来自人类乳腺癌的冷冻抽提物获自位于 Akademiska sjukhuset, Uppsala, Sweden 的肿瘤学部(系)。该肿瘤组织经匀浆并悬浮于标准缓冲液中 ($\text{pH} 7.4$)。
25 通过低速离心进行澄清后收集上清。融化该样品，进行一系列的稀释并且在本发明的 Mg^{2+} RT 分析和 Caviditech AB 的 Lenti 或 C 型 RT 分析中检测 RT 活性的存在。

图 3 所示为所获得的结果的代表性例子，该结果使用过夜 RT 反应
和 2 小时的 AP 反应而获得。本发明的 Mg^{2+} RT 分析和 Caviditech AB
30 的 Lenti RT 分析的检测灵敏度之间的差异约为 400 倍。在 Caviditech AB 的 C 型 RT 分析中未能检测出活性。

图 4 所示为通过在来自不同患者的肿瘤抽提物中进行的 Mg^{2+} RT 分

析所检测到的 RT 活性的变化。

本发明的分析试剂盒可用于针对在乳腺癌的发生中的外生反转录病毒和/或内生反转录病毒的作用的研究以及被用于诊断目的。

5 实施例 4

在来自细胞培养物的上清中进行的 HTLV (人类 T 细胞白血病病毒) 样病毒检测

一些 HTLV 感染的个体会继续发展成为肿瘤或脊髓病症。成体 T 细胞白血病相关疾病最初在日本和南亚的特定部分被描述。一种神经紊乱, 热带痉挛性下肢轻瘫, 最早在来自加勒比海的患者中被描述。能够检测对病毒的暴露和/或低水平病毒活性的连续存在的方法是需要

的。
一种高度相关的牛病毒, 牛白血病病毒 (BLV), 在一些牛体内为一种病原, 这些牛对于牛奶和牛畜牧业具有重要的经济价值。BLV 被用于对一种针对 BLV/HTLV 的 RT 活性进行最优化。

图 5A 所示为本发明的 RT 分析试剂盒和 Caviditech AB 的 Lenti RT 分析试剂盒的检测灵敏度之间的差异。来自 HTLV 转化细胞系 MT-2 的细胞培养上清被连续地稀释并且这两种 RT 分析被用于测定各样品中的 RT 的量。所使用的 RT 反应时间为过夜 (14 小时)。

图 5B 所示为来自 FLK-BLV 细胞的上清的一整套稀释液的对应数据。(该细胞被 BLV 慢性感染)。

总共获得的检测灵敏度对于 HTLV 酶为约 25 倍, 对于 BLV 酶为约 30 倍。灵敏度的增加对于从 MT-2 细胞的上清中获得显著的信号是很重要的。

25 实施例 5

来自 SIV 感染的恒河猴的粗血清中的 RT 活性直接检测

RT 活性在血清中的定量可被用于检测在急性 lenti 病毒感染期间的病毒复制。该血清活性随后被 RT 抑制抗体所消除。

在一次处理研究中, 4 只 cynomolgus macaque (Macaca fascicularis) 的一组作为未处理参照而被 SIVsm 的十倍猴类感染剂量进行感染。在感染后的显示时间点采样的血清被进行一系列的稀释并且使用本发明的 Lenti 分析进行 RT 活性分析。一个 4 小时的 RT 反

应含有 5 μ l 的血清样品，并且所获得的吸光值被重新计算为 OD₄₀₅/h 并且对感染后的天数进行作图，见图 6。

本发明的 Lenti 分析敏感得足以通过对在急性阶段感染取样的血清进行的分析而检测病毒复制。目前用于在人类血液供体中进行 HIV 5 阳检筛选的测试基于对抗 HIV-1 蛋白的抗体的检测，该测试不能检测处于感染的急性阶段的感染者。这些测试在某些国家通过以 ELISA 对病毒抗原进行的检测或通过 PCR 进行的对病毒基因组的检测来补充。这两类的测试均可能无法检测异常病毒株，这些异常病毒株由于 HIV 10 病毒中的巨大的遗传和免疫变化而造成。对于所有的反转录病毒的复制的检测 RT 具有不可或缺的功能，并且本分析对于急性感染提供了一种有吸引力的替代方法。

表 1

用于产生 prA 包埋的 NucleoLink™ 微滴定板的程序

偶联溶液	100mM 1mg/ml	- 甲基咪唑 pH 6.25 多聚核糖腺苷酸
洗涤缓冲液	10mM	Bis-Tris 丙烷 pH 6.25

- 15 向每个孔内加入 100 μ l 偶联溶液。
在室温下温育 2 小时。
以 2 \times 300 μ l 洗涤缓冲液洗涤各孔。
在 37 $^{\circ}$ C 下干燥 25 分钟。
将板放入箔包装中并进行真空密封。
20 在 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

表 2

用于组成对 RT 类型进行适配的反转录分析的组分

组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I 缓冲液	Tris, Hepes	10-100mM; pH7.0-8.0
II 二价金属离子	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	0-20mM
III 螯合剂	EDTA, EGTA	0-0.5mM
IV 多胺	精胺, 亚精胺	0-20mM
V RNA 酶抑制剂	硫酸肝素, 硫酸葡聚糖	0-100μg/ml
VI 还原试剂	DTT, DTE, 谷胱甘肽	0-5 mM
VII 盐	NaCl, KCl	0-100 mM
VIII 稳定化试剂	NCS, BSA	0-1mg/ml
IX 去污剂	吐温 -20 , TritonX-100	0-1.0%
X 脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	1-50μM
XI 引物	寡聚 dT	5-100ng/ml
XII 保护试剂	ATG, GTP, CTP	0-5mM

5

缩写:

EDTA 乙二胺四乙酸

EGTA 乙二醇双(β-氨基乙醚)N, N, N, ' N'-四乙酸

DTT 二硫苏糖醇

DTE 二硫赤藓醇

NCS 新生牛血清

BSA 牛血清白蛋白

10

表 3

本发明的优化 Lenti 反转录酶分析的组分

	组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I	缓冲液	Hepes-HCl	10mM; pH7.6
II	二价金属离子	MgCl ₂	4mM
III	螯合剂	EGTA	0.2mM
IV	多胺	精胺	2mM
V	RNA 酶抑制剂	硫酸葡聚糖	50μg/ml
VI	还原试剂		
VII	盐		
VIII	稳定化试剂	BSA	0.5mg/ml
IX	去污剂	TritonX-100	0.5%
X	脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	16μM
XI	引物	寡聚 dT	80ng/ml
XII	保护试剂	GTP	0.5mM
	防腐剂	NaN ₃	1.92mM

本发明的优化 BLV/HTLV 反转录酶分析的组分

组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I 缓冲液	Hepes-HCl	10mM; pH7.8
II 二价金属离子	MgCl ₂	8mM
III 螯合剂	EGTA	0.2mM
IV 多胺	亚精胺	1mM
V RNA 酶抑制剂	硫酸葡聚糖	2μg/ml
VI 还原试剂	谷胱甘肽	0.6mM
VII 盐		
VIII 稳定化试剂	BSA	0.5mg/ml
	NCS	0.5%
IX 去污剂	TritonX-100	0.5%
X 脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	16μM
XI 引物	寡聚 dT	80ng/ml
XII 保护试剂	GTP	0.5mM
	防腐剂	NaN ₃

本发明的优化 Mg^{2+} 反转录酶分析的组分

组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I 缓冲液	Hepes-HCl	10mM; pH7.6
II 二价金属离子	$MgCl_2$	25mM
III 螯合剂	EGTA	2.5mM
IV 多胺	精胺	0.15mM
	亚精胺	3mM
V RNA 酶抑制剂		
VI 还原试剂	谷胱甘肽	1mM
VII 盐		
VIII 稳定化试剂	BSA	0.5mg/ml
	NCS	0.25 %
IX 去污剂	TritonX-100	0.5 %
X 脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	16 μ M
XI 引物	寡聚 dT	80ng/ml
XII 保护试剂	ATP, GTP	0.5mM
	防腐剂	NaN_3

本发明的优化 Mn^{2+} 反转录酶分析的组分

组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I 缓冲液	Hepes-HCl	10mM; pH7.5
II 二价金属离子	$MnCl_2$	6mM
III 螯合剂	EDTA	0.3mM
IV 多胺	亚精胺	12mM
V RNA 酶抑制剂		
VI 还原试剂	谷胱甘肽	4mM
VII 盐		
VIII 稳定化试剂	BSA	0.2mg/ml
IX 去污剂	TritonX-100	0.5%
X 脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	16 μ M
XI 引物	寡聚 dT	80ng/ml
XII 保护试剂	GTP	0.5mM
防腐剂	NaN_3	1.92mM

本发明的优化滑膜液反转录酶分析的组分

	组分	底物	最终反应混合物中的有效浓度范围
I	缓冲液	Hepes-HCl	10mM; pH7.6
II	二价金属离子	MnCl ₂	1.2mM
III	螯合剂	EDTA	0.13mM
IV	多胺	亚精胺	8mM
V	RNA 酶抑制剂	硫酸葡聚糖	17μg/ml
VI	还原试剂	谷胱甘肽	0.3mM
VII	盐	KCl	20mM
VIII	稳定化试剂	BSA	0.3mg/ml
IX	去污剂	TritonX-100	0.5%
X	脱氧核苷三磷酸	BrdUTP	16μM
XI	引物	寡聚 dT	80ng/ml
XII	保护试剂	GTP	0.5mM
	防腐剂	NaN ₃	1.92mM

表 4

检测系统中的组分

洗涤缓冲液

5 3mM Tris-HCl, pH 8.6
 0.01% 吐温-20
 0.75% Triton X-100

用于抗 BrdUTP 单克隆抗体

10 25mM Bis-Tris 丙烷 pH 8.9
 250mg/ml 脱脂奶粉
 0.01% 吐温-20
 1% Triton X-100
 1.92mM NaN_3

15

碱性磷酸酶底物溶液

 200mM Tris-HCl, pH 9.8
 1mM MgCl_2
 0.5mg/ml pNPP
20 3.9mM NaN_3

表 5

从 Cavid Tech 的 Lenti RT 分析和本发明的改进分析中获得的 RT 酶浓度与 OD 值之间的关系

pg/ml	Cavid Tech的 Lenti RT分析	改进分析
	3小时RT/30分钟AP	3小时RT/30分钟AP
1240	1.274	nd
551	0.594	nd
245	0.332	9.999
109	0.175	1.837
48.4	0.108	0.989
21.5	0.070	0.525
9.6	0.052	0.264
4.25	0.046	0.174
1.89	0.054	0.121
0.839	0.041	0.101
0.373	0.042	0.091
0.166	0.040	0.081
0.074	nd	0.075
0.033	nd	0.075
0	0.042	0.078

5

pg/ml	过夜RT/ 2小时 AP	过夜RT/ 2小时 AP
1240	9.999	nd
551	9.999	nd
245	9.999	9.999
109	9.999	9.999
48.4	1.91	9.999
21.5	0.961	9.999
9.6	0.55	9.999
4.25	0.267	2.283
1.89	0.148	1.134
0.839	0.094	0.6
0.373	0.075	0.334
0.166	0.056	0.198
0.074	nd	0.144
0.033	nd	0.124
0	0.048	0.094

pg/ml	过夜RT/过夜AP	过夜RT/过夜AP
1240	9.999	nd
551	9.999	nd
245	9.999	9.999
109	9.999	9.999
48.4	9.999	9.999
21.5	9.999	9.999
9.6	9.999	9.999
4.25	2.217	9.999
1.89	1.155	9.999
0.839	0.595	9.999
0.373	0.403	2.289
0.166	0.191	1.171
0.074	nd	0.701
0.033	nd	0.577
0	0.115	0.251

nd=未进行

表 6

从 Cavid Tech 的 Lenti RT 分析和本发明的改进 Lenti RT 分析中获得的 k 值

来自 Cavid Tech 的 Lenti RT 分析		改进的分析	
	K 值		K 值
3 小时 RT/30 分钟 AP	0.0012	3 小时 RT/30 分钟 AP	0.0165
过夜 RT/2 hr AP	0.0432	过夜 RT/2 hr AP	0.5145
过夜 RT/过夜 AP	0.5453	过夜 RT/过夜 AP	5.2827

5

参考文献

- Baltimore D. (1970) RNA 肿瘤病毒的毒粒中的 RNA 依赖的 DNA 聚合酶。
RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour
5 viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Baltimore D, Smoler D (1971) RNA 肿瘤病毒的 DNA 聚合酶对引物的
要求和模板特异性。Primer requirement and template specificity
of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. *PNAS* 68, 1507-
10 11.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S,
Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux
C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983). 从可能患有获得免疫力
15 缺陷综合症 (AIDS) 的患者体内对一种嗜淋巴细胞反转录病毒的分离。
Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at
risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*
220(4599):868-71.
- 20 Bird RE, Chang-Yeh A. (1996) 用于在一种样品中使用酸性 pH 或提
高的温度来检测病毒的转录酶的方法和试剂盒。Methods and kits
for detecting viral transcriptase activity in a sample using
an acidic pH or an elevated temperature. *US5817457*.
- 25 Di Cristofano A, Strazullo M, Longo L, La Mantia G (1995) ZNF80
基因座的鉴定和基因组定位: 该锌指基因的表达由 ERV9 内生反转录
病毒家族的单生 (solitary) LTR 控制。Characterization and
genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this
zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous
30 retroviral family. *Nucleic Acids Res* 23(15):2823-30.
- Duvic M (1995) 人类免疫力缺陷病毒和皮肤: 争议选编。Human

immunodeficiency virus and the skin: selected controversies.
J Invest Dermatol 105(1 Suppl): 117S-121S.

5 Eberle J, and R. Seibl. (1992) 一种通过 ELISA 来测量反转录酶活性的新方法。A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA. *J. Virol. Methods* 40:347-356.

10 Ekstrand D.H.L., Awad R.J-K., Källander C.F.R. and Gronowitz J.S. (1996) 一种用于 RT 活性的检测和定量的敏感分析, 该分析基于同载体结合的模板和非放射性产物检测的使用, 本分析特别涉及到 HIV 分离 A sensitive assay for the detection and quantification of RT activity, based on the use of carrier bound template and non-radioactive product detection, with special reference to HIV isolation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 23, 95-105.
15

Faff O, Murray AB, Schmidt J, Leib-Mösch C, Erfle V, Hehlmann R, Thelen K, Löwer J, Kurth R (1992). 来自人类 T47D 细胞系的类似反转录病毒的粒子同小鼠乳腺肿瘤病毒相关, 并且来自人类内生来源。Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin. *J Gen Virol* 73: 1087-97.
20

Ghosh SS, Musso GF (1987) 寡核苷酸同固相支持物的共价结合。Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res* 15(13):5353-72.
25

Goff S.P. (1990) 反转录病毒的反转录酶: 合成, 结构与功能。Retrovirus reverse transcriptase: Synthesis, Structure and Function. Review. *J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.* 3:817-31.
30

Gregorius K, Mouritsen S, Elsner HI (1995) 水包埋

(hydroconting): 一种将生物大分子同固相偶联的新方法。
Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid
phases. *J Immunol Methods* 181(1):65-73.

5 Gronowitz JS., Neumüller M., Lennerstrand J., Bhikabhai R.,
Unge T., Weltman H & Källander CFR. (1991) 用于单管反转录
酶分析和组合纯化和活性分析的结合有载体的模板, 该模板特别同
HIV 相关. Carrier bound templates for single tube reverse
transcriptase assays and for combined purification and
10 activity analyses, with special reference to HIV.
Biotech. Appl. Biochem 13:127-142.

Gupta, P., Balachandran, Grovit, K., Webster, D., and Rinaldo.
C. (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25, 1122-1125.

15

Heneine W, Yamamoto S, Switzer WM, Spira TJ, Folks TM. (1995)
在来自人类免疫缺陷病毒类型 I 的感染者的血清中通过一种高灵敏
度分析进行的反转录酶活性检测。 Detection of reverse
transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons
20 infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect*
Dis 171:1210-1216.

Heneine W, Folks; Thomas M, Switzer W M, Yamamoto S. (1995) 用
于反转录酶的灵敏检测的方法。 Methods for sensitive detection
25 of reverse transcriptase. *US5849494*:

Jackson, B., Sannerud, K., Rhame, F., Tsang, R., and Balfour,
H.H. (1987) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 185-192.

30 Krieg AM, Steinberg AD (1990) 反转录病毒和自体免疫。 *Retroviruses*
and autoimmunity. *J Autoimmun.* 3(2):137-66.

- Krieg AM, Gourley MF, Perl A (1992) 内生反转录病毒: 自体免疫中的可能的病原物质。 *Endogenous retroviruses: potential etiologic agents in autoimmunity. FASEB J* 6(8):2537-44.
- 5 Källander CFR, Gronowitz JS, Neumüller TM, Karlström RA, Långström-Persson UM. (1988). 用于聚合酶活性测定的方法。 *Method for polymerase activity determination. Svensk patent no 8804344-3, EP 0 447 442 B1.*
- 10 Lee M., Sano K., Morales F.E., and D.T. Imagawa. (1987) 检测人类免疫缺陷病毒和对其进行定量的敏感的反转录酶分析。 *Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. J. Clin. Microbiol.* 25:1717-21.
- 15 Leib-Mösch C and Seifarth W (1996) 人类反转录元件 (retroelements) 的进化和生物学意义。 *Evolution and biological significance of human tetroelements. Virus genes* 11: 133-145.
- 20 Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) 我们所有人体内都具有的病毒: 人类内生反转录病毒序列的特征化和生物学意义。 *The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11):5177-84.
- 25 Martinelli SC, Goff SP (1990) 在 Moloney 鼠白血病病毒中的一个缺失突变通过同近缘相关的内生前病毒进行重组而迅速回复。 *Rapid reversion of a deletion mutation in Moloney murine leukemia virus by recombination with a closely related endogenous provirus. Virology* 174(1):135-44.
- 30 Meese E, Gottert E, Zang KD, Sauter M, Schommer S, Mueller-Lantsch N (1996) 人类内生反转录病毒元件 K10 (HERV K10): 通

过体细胞杂合体作图和荧光原位杂交而进行染色体定位。 Human endogenous retroviral element k10 (HERV-K10): chromosomal localization by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 72(1):40-2.

5

Neumüller M., Karlström A.R., Källander C.F.R., and J.S. Gronowitz. (1990) 通过使用酶法合成的 5-(¹²⁵I)碘-2'-脱氧尿苷三磷酸而进行的 DNA 多聚化酶的改进分析, 该分析通过抗 HIV 反转录酶抗体的直接定量和血清 DNA 聚合酶分析而阐明。 Improved assays for DNA-polymerizing enzymes by the use of enzymatically synthesized 5-(¹²⁵I)iodo-2' deoxyuridine triphosphate, illustrated by direct quantitation of anti-HIV reverse transcriptase antibody and by serum DNA polymerase analyses. *Biotech. Appl. Biochem.* 12:34-56.

10

15

Niveleau A, Sage D, Reynaud C, Bruno C, Legastelois S, Thomas V, Dante R (1993) 半抗原、蛋白质和核酸同修饰过的聚苯乙烯支持物的共价连接。 Covalent linking of haptens, proteins and nucleic acids to a modified polystyrene support. *Immunol Methods* 159(1-2):177-87.

20

Porstmann T., Meissner K., Glaser R., Döpel S-H., and G. Sydow. (1991) 对 HIV 相关的反转录酶特异的敏感的非放射性分析。 A sensitive non radioactive assay specific for HIV associated reverse transcriptase. *J. Virol. Meth.* 31:181-188.

25

Rasmussen SR, Larsen MR, Rasmussen SE (1991) DNA 在聚苯乙烯微孔上的共价固定化: 该分子反在 5' 末端进行结合。 Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Anal Biochem* 198(1):138-42.

30

Silver J, Maudru T, Fujita K and Repaske R. (1993) 一种用于反转录酶活性的能够检测单个毒粒的 RT-PCR 分析. An RT-PCR assay for the enzyme activity of reverse transcriptase capable of detecting single virions. *Nucleic Acids Res* 21:3593-3594.

5

Temin HM, Mizutani S. (1970) 在劳氏肉瘤病毒的毒粒中的 RNA 依赖的 DNA 聚合酶. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.

10 Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R. Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. (1997) 产自重组杆状病毒的人类内生反转录病毒类型 K 病毒样颗粒的鉴定. *Virology* 233(2):280-91.

15

Urabe T, Sano K, Nakano T, Odawara F, Lee MH, Otake T, *et al.* (1994) 通过非放射性同位素反转录酶类型分析对人类免疫缺陷病毒类型 1 (HIV-1) 和 HIV-2 进行区分. Differentiation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 isolates by nonradioisotopic reverse transcriptase-typing assay. *J Clin Microbiol*; 32:1870-75.

20

Urnovitz HB, and Murphy WH (1996) 人类内生反转录病毒: 天然性质、发生和在人类疾病中的临床上的牵涉. Human endogenous retroviruses: Nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* 9: 72-99.

25

Weiss R: 人类 RNA 肿瘤病毒研究. The search for human RNA tumor viruses. In R Weiss, N Teich, H Varmus, and J Coffin (eds) RNA 肿瘤病毒 (第二版, 第一集). RNA Tumor viruses (2nd ed vol 1) 1205-1281. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 1984.

30

- 5 Wilkinson DA Mager DL and Leong J-A (1994). 内生人类反转录病毒。 “反转录病毒科” Endogenous human retroviruses. In “The Retroviridae” (JA Levy, Ed), vol 3, pp 465-535. 3 vols Plenum Press, New York.
- 10 Zammattéo N, Girardeaux C, Delforge D, Pireaux JJ, Remacle J (1996) 聚苯乙烯微孔的胺化: 对用于杂交分析的 DNA 探针的共价植入的应用。 Amination of polystyrene microwells: application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays. Anal Biochem 236(1):85-94.
- 15 Zinkernagel RM, Cooper S, Chambers J, Lazzarini RA, Hengartner H, Arnherter H (1990) 针对一种转基因病毒抗原的病毒诱导的自体抗体反应。 Virus-induced autoantibody response to a transgenic viral antigen. Nature 345:68-71.

说明书附图

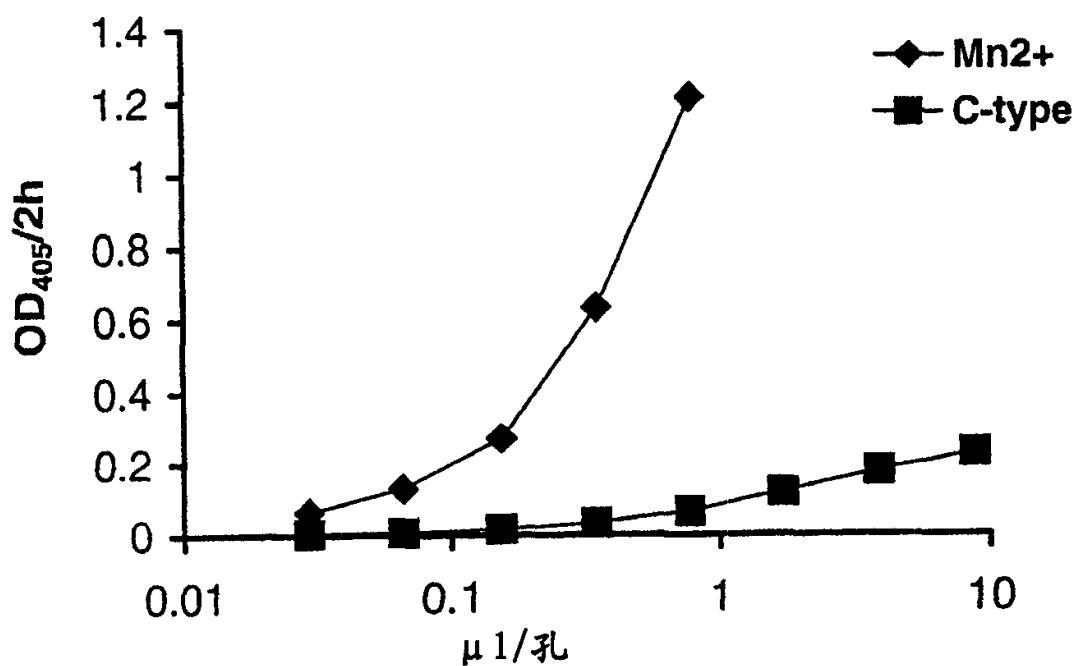


图 1

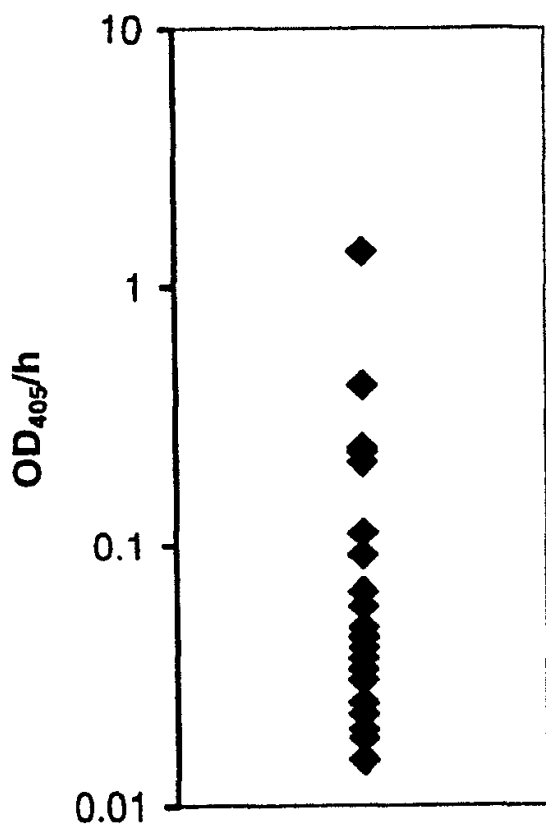


图 2

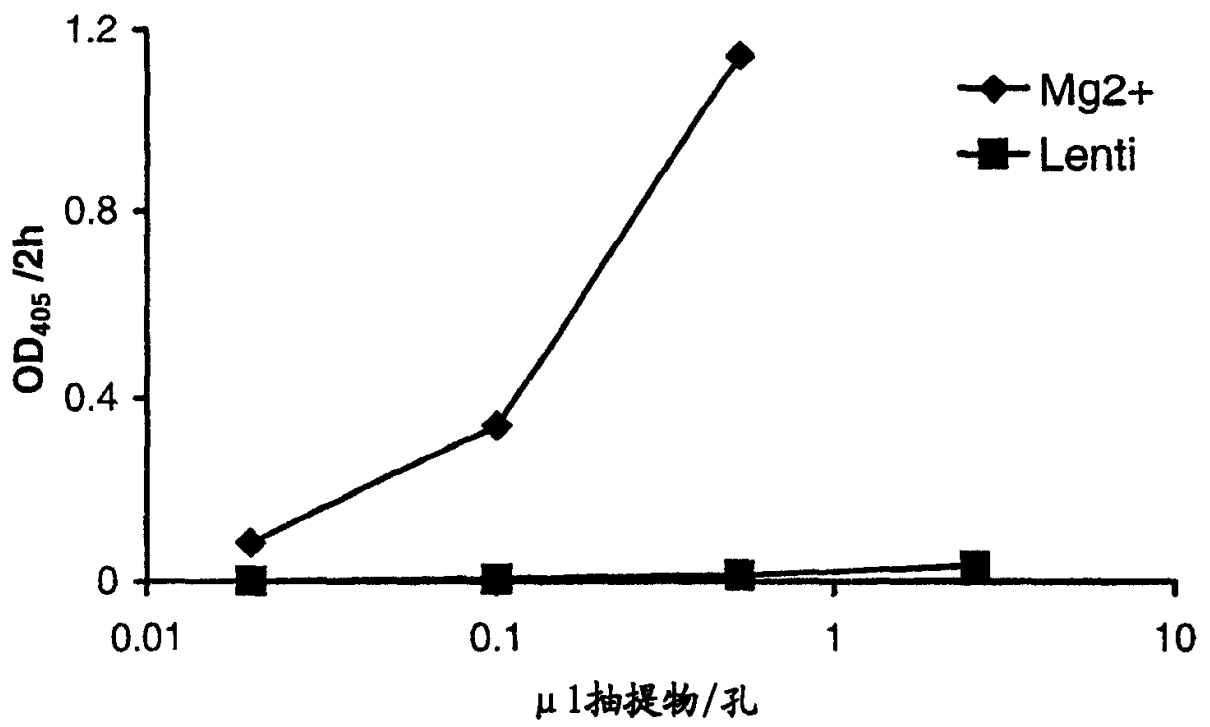


图 3

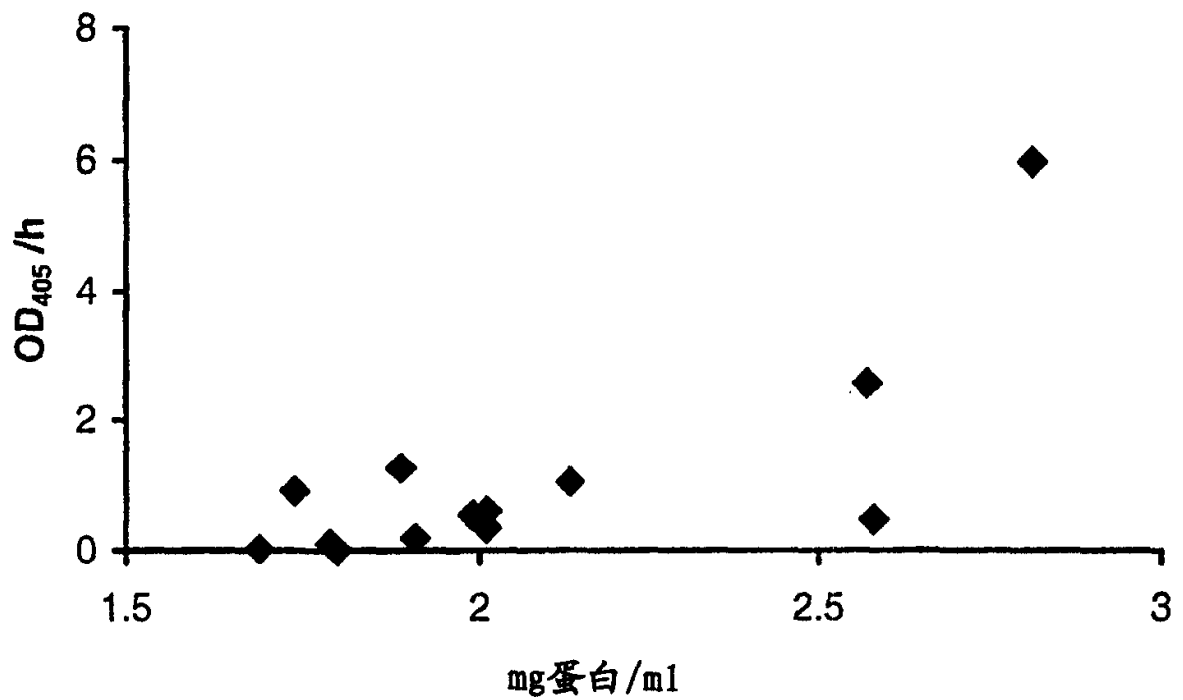


图 4

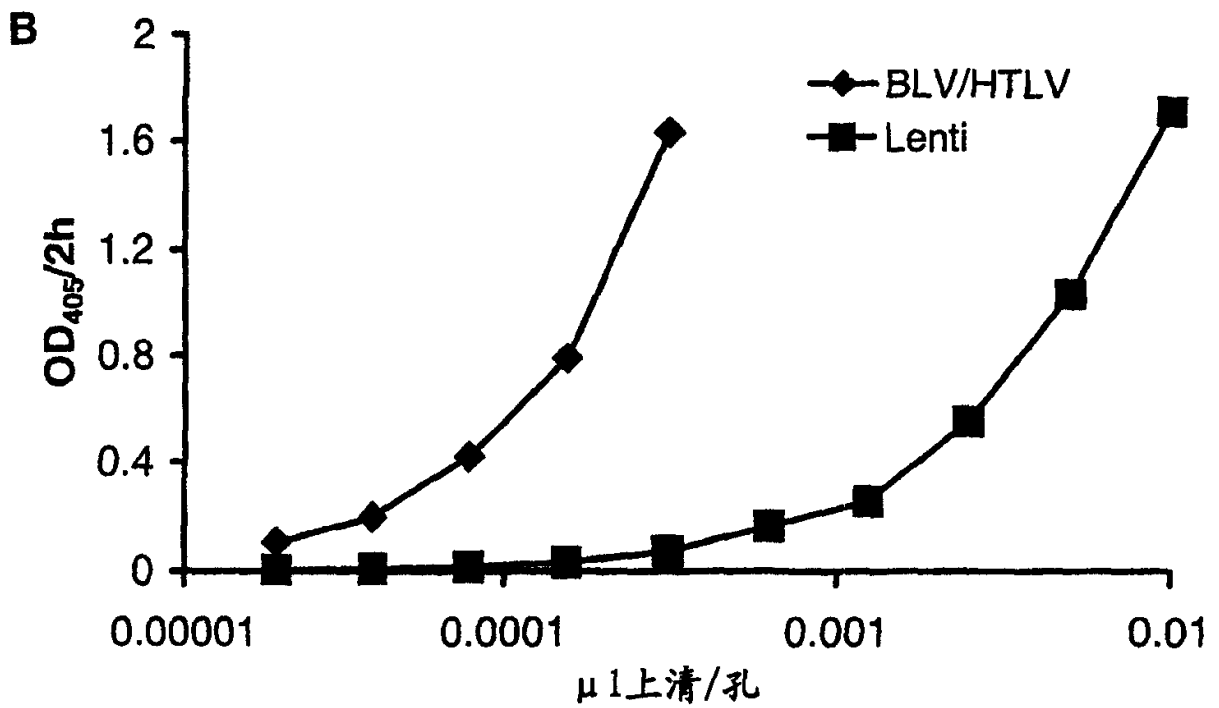
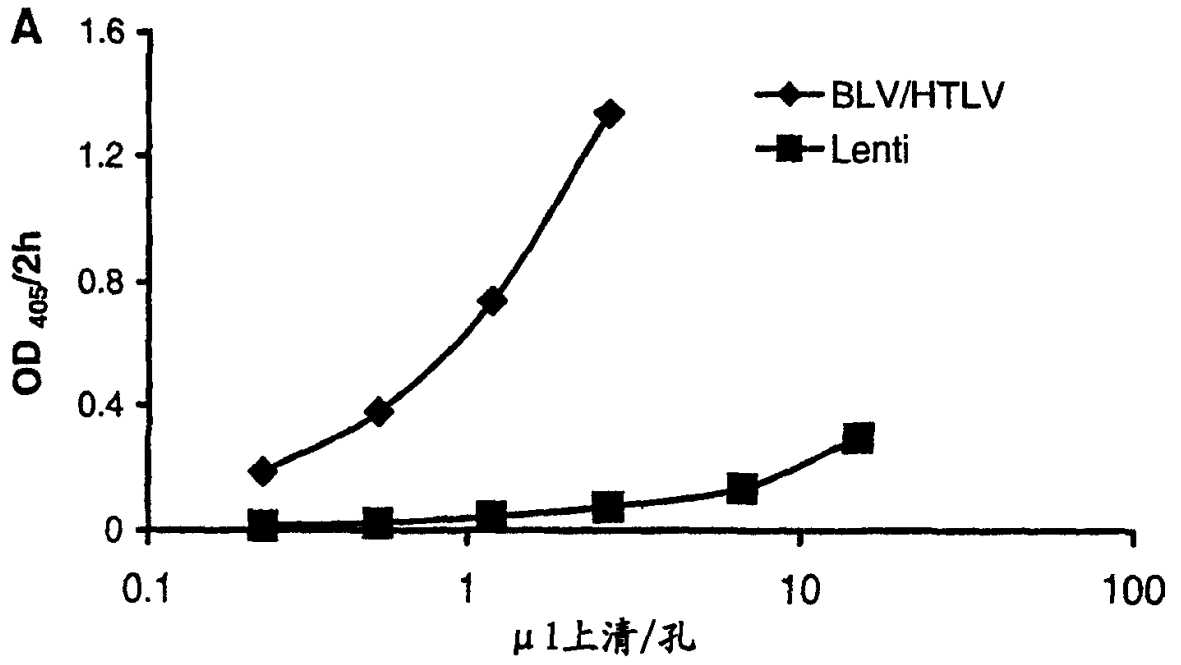


图 5

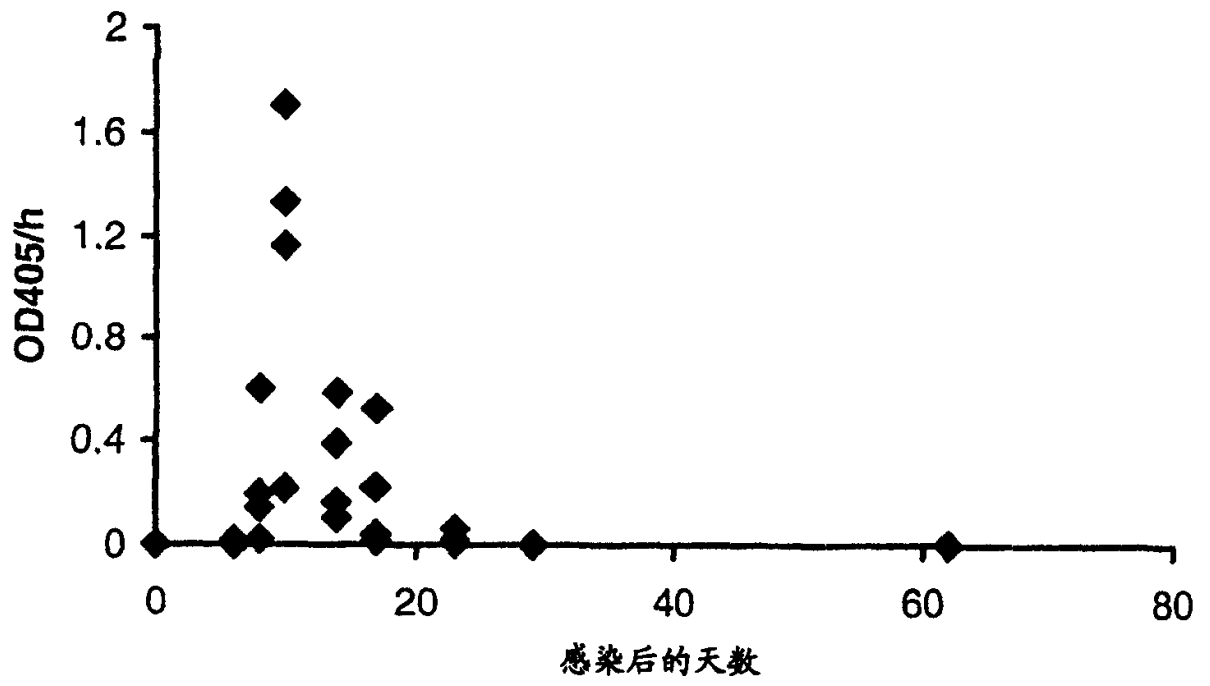


图 6

专利名称(译)	反转录酶分析试剂盒及其使用以及用于在生物样品中进行RT活性分析的方法		
公开(公告)号	CN1358232A	公开(公告)日	2002-07-10
申请号	CN00809387.3	申请日	2000-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	卡维迪技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	卡维迪技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卡维迪技术有限公司		
[标]发明人	C凯兰德 S格罗诺维茨 I彼得松		
发明人	C·凯兰德 S·格罗诺维茨 I·彼得松		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/42 C12Q1/48 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/48		
代理人(译)	罗宏		
优先权	9902410 1999-06-24 SE		
其他公开文献	CN1218047C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

所描述的为一种在生物样品中进行RT活性分析的反转录酶(RT)分析试剂盒该试剂盒含有含有结合有多聚核糖腺苷酸(prA)和/或多聚脱氧腺苷酸(pdA)模板的固相,该包装物通过使一种基于聚苯乙烯的固相同一种含有1-甲基咪唑的偶联溶液以及prA和/或pdA相接触并随后进行温育、以洗涤缓冲液进行洗涤、干燥和包装来获得,还含有对RT类型进行适配的分隔包装的分析组分,这些组分选自自由pH≈7-8缓冲液,二价金属离子、螯合剂、多胺、RNA酶抑制剂、还原试剂、盐、稳定化试剂和去污剂单独组分或其混合物,以及冻干的脱氧核苷酸三磷酸、引物、保护试剂和浓缩的洗涤缓冲液单独组分或其混合物,根据情况还含有冻干的参照酶和一种检测系统的组分,该检测系统含有冻干的偶联有碱性磷酸酶的抗BrdU单克隆抗体、碱性磷酸酶底物缓冲液以及碱性磷,以及文字的分析试剂盒使用指导组成的群体,该群体根据情况含有冻干的参照酶,该群体进一步根据情况还含有一种检测系统的组分,该检测系统含有冻干的偶联有碱性磷酸酶的抗BrdU单克隆抗体、碱性磷酸酶底物缓冲液以及碱性磷酸酶底物。进一步披露的还有一种方法和该试剂盒的应用,该方法和应用用于在生物样品中进行RT活性的定性和定量分析,根据情况该方法和应用之后根据该RT活性的分析结果进行了对与紊乱或疾病相关的RT活性水平的评估。

