

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 33/576



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 00104630.6

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1213150C

[22] 申请日 2000.2.2 [21] 申请号 00104630.6

[30] 优先权

[32] 1999. 2. 3 [33] US [31] 60/118498

[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 K·M·戈曼 D·R·帕特森

J·M·林南 K·宋

审查员 马秋娟

[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 10 页 说明书 13 页

[54] 发明名称 有效的多重检测丙型肝炎病毒
(HCV) 和人免疫缺损病毒(HIV)
的寡核苷酸引物及其使用方法

[57] 摘要

本发明公开了用于同时检测人生物样本中的丙型肝炎病毒和人免疫缺损病毒的方法和试剂盒。

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

1. 一种共检测生物样本中的丙型肝炎病毒(HCV)RNA 和人免疫缺损病毒(HIV)RNA 的方法, 该方法包括:

- 5 (A) 用来源于上述样本的 RNA 作为模板、并用至少一种引发从 HCV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物和至少一种引发从 HIV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物进行逆转录反应, 以产生逆转录产物, 该产物包括(a) HCV 特异性逆转录产物, (b) HIV 特异性逆转录产物, 或(c)包括 (a)和(b)的组合;

- (B) 用一对或多对对 HCV 的 5'非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多
10 对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对上述逆转录产物进行扩增, 以产生扩增产物, 该扩增产物包括(a) HCV 特异性扩增产物, (b) HIV 特异性扩增产物, 或(c) (a)和(b)的组合;

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

- (i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)<序
15 列号 1>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCCCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 2>;

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

- 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
20 选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>;

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

- 25 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_u)< 序列号 6>的正向引物, 和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物; 和

(C) 检测上述扩增产物;

- 其中对 HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA , 对
30 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV RNA , 对 HCV-特异性扩

增产物和 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA 和 HIV RNA。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的逆转录反应是使用随机寡核苷酸引物进行的。

5 3. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的逆转录反应是使用一种或多种具有与 HCV RNA 的序列相对应的序列的寡核苷酸引物和一种或多种具有与 HIV RNA 的序列相对应的序列的寡核苷酸引物进行的。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的扩增是通过一种选自下列的方法进行的: 聚合酶链反应、连接酶链反应、链置换扩增、核酸单碱基扩增和转录
10 介导的扩增。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的检测包括用凝胶电泳使所述的扩增产物显色。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的检测包括在固体支持体上捕捉上述扩增产物, 该支持体含有: (a)一种或多种 HCV 特异性寡核苷酸探针, (b)一种或多种 HIV 特异性寡核苷酸探针, 或(c) (a)和(b)的组合; 并用比色测定法对
15 上述捕捉产物进行定量检测。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述的 HCV 特异性探针是由 5' - CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12> 组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自:

20 (a) 5' -CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;
 (b) 5' -GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和
 (c) 5' -CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的样本是选自血液、血清、血浆、尿液、唾液和脑脊液。

25 9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的共检测是同时进行的。

10. 一种共扩增丙型肝炎病毒(HCV)DNA 和人免疫缺损病毒(HIV)DNA 的方法, 该方法包括:

 (A) 用一对或多对对 HCV 的 5'非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对可疑含有 HCV DNA、HIV DNA、或者同时含
30 HCV DNA 与 HIV DNA 的 DNA 样本进行聚合酶链反应, 以产生扩增产物, 该

扩增产物包括(a) HCV 特异性扩增产物, (b) HIV 特异性扩增产物, 或(c) (a)和(b)的组合;

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 1>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 2>;

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
10 选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>,和

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>; 且

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

15 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_u)< 序列号 6>的正向引物,
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 还进一步包括:

(B) 检测上述扩增产物,

20 其中对 HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV DNA, 对 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV DNA, 对 HCV-特异性扩增产物和 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV DNA 和 HIV DNA。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述的检测包括用凝胶电泳使所述的
25 扩增产物显色。

13. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述的检测包括在固体支持体上捕捉上述扩增产物, 该支持体含有: (a)一种或多种 HCV 特异性寡核苷酸探针, (b)一种或多种 HIV 特异性寡核苷酸探针, 或(c) (a)和(b)的组合; 并用比色测定法对上述捕捉产物进行定量检测。

30 14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述的 HCV 特异性探针是由 5'-

CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12> 组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自:

- (a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;
(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和
5 (c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的共扩增是同时进行的。

16. 一种共检测生物样本中的丙型肝炎病毒(HCV)RNA 和人免疫缺损病毒(HIV)RNA 的方法, 该方法包括:

(A) 用来源于上述样本的 RNA 和内部阳性对照(IPC)RNA 作为模板、用至少一种引发从 IPC RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物、至少一种引发从 HCV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物和至少一种引发从 HIV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物进行逆转录反应, 以产生逆转录产物, 该产物包括(a) IPC 特异性逆转录产物, (b) HCV 特异性逆转录产物, (c) HIV 特异性逆转录产物, 或(d) 任何上述逆转录产物的组合;

15 (B) 用一对或多对对 IPC 特异的寡核苷酸引物、一对或多对对 HCV 的 5'非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对上述逆转录产物进行扩增, 以产生扩增产物, 该扩增产物包括(a) IPC 特异性扩增产物, (b) IPC 特异性扩增产物和 HCV 特异性扩增产物, (c) IPC 特异性扩增产物和 HIV 特异性扩增产物, 或(d) 任何上述扩增产物的组合;

20 其中上述每一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物包括:

(1) 正向引物 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序列号 8>,和

(2) 反向引物 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序列号 9>;

25 其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 10>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 11>;

30 其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

5' -CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5' -GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

5 (2) 5' -TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5> ,

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

5' -GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR₂)< 序列号 6>的正向引物,
和对 HIV-2 特异、序列为 5' -GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物; 和

10 (C) 检测上述扩增产物;

其中对 IPC-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 IPC RNA , 对
HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA , 对 HIV-特异性
扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV RNA , 对 HCV-特异性扩增产物和
HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA 和 HIV RNA。

15 17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的逆转录反应是使用随机寡核苷酸引物进行的。

18. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的逆转录反应是使用一种或多种
具有与 IPC RNA 的序列相对应的序列的寡核苷酸引物、一种或多种具有与 HCV
RNA 的序列相对应的序列的寡核苷酸引物和一种或多种具有与 HIV RNA 的序
20 列相对应的序列的寡核苷酸引物进行的。

19. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的扩增是通过一种选自下列的方法
进行的: 聚合酶链反应、连接酶链反应、链置换扩增、转录介导的扩增。

20. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的检测包括用凝胶电泳使所述的
扩增产物显色。

25 21. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的检测包括在固体支持体上捕捉
上述扩增产物, 该支持体含有: (a)一种或多种 IPC 特异性寡核苷酸探针, (b)
一种或多种 HCV 特异性寡核苷酸探针, (c)一种或多种 HIV 特异性寡核苷酸探
针, 或(d)包括 (a)、(b)和(c)的任意组合; 并用比色测定法对上述捕捉产物进行
定量检测。

30 22. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述的 IPC 特异性探针是由 5' -

CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3'<序列号 17>组成, 所述的 HCV 特异性探针是由 5' -CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12>组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自:

- (a) 5' -CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;
- 5 (b) 5' -GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和
- (c) 5' -CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>。

23. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的样本是选自血液、血清、血浆、尿液、唾液和脑脊液。

24. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述的共检测是同时进行的。

- 10 25. 一种共扩增内部阳性对照(IPC) DNA、丙型肝炎病毒(HCV) DNA 和人免疫缺损病毒(HIV) DNA 的方法, 该方法包括:

(A) 用一对或多对对 IPC 特异的寡核苷酸引物、一对或多对对 HCV 的 5' 非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对含 IPC DNA 的 DNA 样本、可疑含有 HCV DNA、HIV DNA、或者任何全面所述
15 的组合的 DNA 样本进行聚合酶链反应, 以产生扩增产物, 该扩增产物包括(a) IPC 扩增产物, (b) IPC 扩增产物和 HCV 特异性扩增产物, (c) IPC 扩增产物和 HIV 特异性扩增产物, 或(d) 包括(a)、(b)和(c)的任意组合;

其中上述每一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物包括:

- (i) 正向引物 5' -CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序
20 列号 8>,和
- (ii) 反向引物 5' -CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序列号 9>;

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

- (i) 正向引物 5' -GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序
25 列号 10>,和
- (ii) 反向引物 5' -CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 11>;

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

- 5' -CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
30 选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>,
和

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>,

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

5 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR₉)< 序列号 6>的正向引物,
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

26. 如权利要求 10 所述的方法, 还包括

(B) 检测上述扩增产物,

10 其中对 IPC-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 IPC DNA, 对
HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV DNA, 对 HIV-特异性
扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV DNA, 对 HCV-特异性扩增产物和
HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV DNA 和 HIV DNA。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述的检测包括用凝胶电泳使所述的
15 扩增产物显色。

28. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述的检测包括在固体支持体上捕捉
上述扩增产物, 该支持体含有: (a)一种或多种 IPC 特异性寡核苷酸探针, (b)
一种或多种 HCV 特异性寡核苷酸探针, (c)一种或多种 HIV 特异性寡核苷酸探
针, 或(d) 全面所述的任意组合; 并用比色测定法对上述捕捉产物进行定量检
20 测。

29. 如权利要求 28 所述的方法, 其中所述的 IPC 特异性探针是由 5'-
CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3'<序列号 17>组成, 所述的
HCV 特异性探针是由 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-
27-PRB)< 序列号 12>组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自:

25 (a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;
(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和
(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述的共扩增是同时进行的。

31. 一种共检测生物样本中的 HCV RNA 和 HIV RNA 的试剂盒, 该试剂盒
30 包括:

(a) 一对对 HCV 的 5' 非编码区特异的寡核苷酸引物, 包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 10>, 和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 11>; 和

(b) 对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物, 它包括如下序列的正向引物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>, 和选自下列的、对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>, 以及一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物, 它包括: 序列为

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_U)< 序列号 6>的正向引物, 和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

32. 如权利要求 31 所述的试剂盒, 还包括一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物, 其中所述的对 IPC 特异的寡核苷酸引物对包括: 正向引物 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序列号 8>, 和反向引物 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序列号 9>。

33. 如权利要求 31 所述的试剂盒, 还包括一个或多个探针。

34. 如权利要求 32 所述的试剂盒, 还包括一个或多个探针。

35. 如权利要求 33 所述的试剂盒, 其中所述的探针选自由 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12>、5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTR_{pr3})< 序列号 13>、5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTR_{pr4})< 序列号 16> 和 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTR_{pr1})< 序列号 14>组成的组。

36. 如权利要求 34 所述的试剂盒, 其中所述的 IPC 特异性探针是由 5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3'< 序列号 17>组成, 所述的 HCV 特异性探针是由 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12>组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自以下组成的组:

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 14>。

37. 一种用于共扩增 DNA 样本中的 HCV DNA 和 HIV DNA 的试剂盒, 它
5 包括:

(a) 一对对 HCV 的 5' 非编码区特异的寡核苷酸引物, 包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 10>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序
10 列号 11>; 和

(b) 对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物, 它包括如下序列的正向引物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
选自下列的、对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和
15

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>, 以及
一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物, 它包括: 序列为

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR₂)< 序列号 6>的正向引物,
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
20 3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

38. 如权利要求 37 所述的试剂盒, 还包括一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物,
其中所述的对 IPC 特异的寡核苷酸引物对包括: 正向引物 5'-
CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序列号 8>,和反向引物 5'-
-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序列号 9>。

25 39. 如权利要求 37 所述的试剂盒, 还包括一个或多个探针。

40. 如权利要求 38 所述的试剂盒, 还包括一个或多个探针。

41. 如权利要求 39 所述的试剂盒, 其中所述的探针选自由 5'-
CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12>、5'-
-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>、5'-
30 GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16> 和 5'-

CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>组成的组。

42. 如权利要求 40 所述的方法, 其中所述的 IPC 特异性探针是由 5' - CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3'(IPCIP)<序列号 17>组成, 所述的 HCV 特异性探针是由 5' -CCTTTCGCGACCCCAACACTACTCGGCT-
5 3'(C252-27-PRB)< 序列号 12>组成, 所述的 HIV 特异性探针是选自以下组成的组:

- (a) 5' -CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13>;
- (b) 5' -GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>;和
- (c) 5' -CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>。

有效的多重检测丙型肝炎病毒(HCV)和人免疫缺陷病毒(HIV)的寡核苷酸引物及其使用方法

5

本发明涉及用于检测生物样本中的核酸序列、尤其是来源于感染性微生物的序列的改进方法。

全世界数百万人感染有人免疫缺陷病毒(HIV)，由此带来严重的公众健康问题。通过污染的血制品可导致 HIV 感染蔓延，这就意味需要一种能检测出患者
10 样本中少量 HIV RNA 的筛选方法。而且，对 HIV 感染的改进治疗的不断增加，意味着对患者的感染进行早期检测是极其重要的，以便开始实行适当的治疗措施。

丙型肝炎病毒(HCV)是一种非肠道传播病毒，全世界大多数输血后肝炎和大部分偶发性（或群体获得的）肝炎病例都源于此。已证实全世界 1%以上的人口
15 感染有 HCV。HCV 感染与急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化和随后的肝细胞癌有关。

在 Flaviviridae 家族中，目前将 HCV 分类成分离属、Hepacivirus。其基因组由含单个、大的开放读框(ORF)、约 9500 核苷酸的正链 RNA 分子组成，这种开放读框编码约 3000 氨基酸的聚蛋白前体。这种大的 ORF 以约 340 个核苷酸
20 的 5' 非编码(NC)区为开端，它是基因组的极其保守区域。ORF 的 5' 区编码（在 5'—3' 方向）衣壳蛋白、两个包膜蛋白（E1 和 E2）和少数未知功能的蛋白（P7）。ORF 的 3' 部分编码非结构蛋白，包括蛋白酶、蛋白酶/解旋酶双功能蛋白、RNA 聚合酶和常用肽。

全世界范围对 HCV 编码序列的分析发现个体病毒分离物之间存在相当大的
25 序列变化。而且，对单个病人的 HCV 序列的分析表明病毒循环成所谓的“准种”，它包含相关但不相同的序列。一般认为分离物间和单个病人中存在的变化是由于病毒编码的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的低保真性所致。HCV 的基因改变程度对感染的预防、诊断和控制具有重要意义。

HCV 感染的血清学诊断，典型的是通过商业上可得到的酶免疫测定法
30 （EIA）来检测，该方法可检测结合有重组 HCV 蛋白或肽的抗体。通过重组免

疫印迹测定法(RIBA)可以证实阳性EIA的结果,但是EIA或RIBA测定法都无法将现在的感染与过去区别开。由于循环病毒的滴度特别低,还没有成功地找到一种直接测定病毒蛋白的方法。而且,对于暴露感染后2-3个月,基于抗体的测定法通常无法检测出HCV感染。

- 5 因此,本技术领域需要一种改进的测定法,该方法能同时筛选患者样本中的HIV和HCV。

本发明提供了用多重测定法同时检测生物样本中存在的丙型肝炎病毒(HCV)RNA和人免疫缺损病毒(HIV)RNA的方法。

- 因此,一方面,本发明涉及共检测生物样本中的丙型肝炎病毒(HCV)RNA
10 和人免疫缺损病毒(HIV)RNA的方法。该方法包括:

(A) 用来源于上述样本的RNA作为模板、至少一种能引发从HCV RNA的DNA逆转录的逆转录引物和至少一种引发从HIV RNA的DNA逆转录的逆转录引物进行逆转录反应,以产生逆转录产物,该产物包括(a)HCV特异性逆转录产物,(b)HIV特异性逆转录产物,或(c)包括(a)和(b)的组合;

- 15 (B) 用一对或多对对HCV的5'非编码区具有特异性的寡核苷酸引物和一对或多对对HIV具有特性异的寡核苷酸引物对上述逆转录产物进行扩增,以产生扩增产物,该扩增产物包括(a)HCV特异性扩增产物,(b)HIV特异性扩增产物,或(c)包括(a)和(b)的组合;

其中上述每一对对HCV具有特异性的寡核苷酸引物包括:

- 20 (i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)<序列号 1>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)<序列号 2>;

- 其中每一对对HIV-1具有特异性的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引
25 物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)<序列号 3>,和选自下列的对HIV-1特异的反向引物:

(i) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3'(JBLTR6)<序列号 4>,和

- 30 (ii) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)<序列号 5>,

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括：序列为

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR)₆< 序列号 6>的正向引物，
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
3'(2LTR-R1)₇< 序列号 7>的反向引物；和

- 5 (C) 检测上述扩增产物，其中对 HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本
中存在 HCV RNA，对 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV
RNA，对 HCV-特异性扩增产物和 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中
存在 HCV RNA 和 HIV RNA。

第二方面，本发明涉及一种共扩增丙型肝炎病毒(HCV)DNA 和人免疫缺损
10 病毒(HIV)DNA 的方法，该方法包括：

(A) 用一对或多对对 HCV 的 5' 非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多
对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对可疑含有 HCV DNA、HIV DNA、或者同时含
HCV DNA 与 HIV DNA 的 DNA 样本进行聚合酶链反应，以产生扩增产物，该
扩增产物包括(a) HCV 特异性扩增产物，(b) HIV 特异性扩增产物，或(c)包括 (a)

15 和(b)的组合；

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括：

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序
列号 1>，和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序
20 列号 2>；

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物：

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>，和
选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物：

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>，
25 和

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>；且

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括：序列为

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR)₆< 序列号 6>的正向引物，
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
30 3'(2LTR-R1)₇<序列号 7>的反向引物。

第三方面, 本发明涉及一种共检测生物样本中的丙型肝炎病毒(HCV)RNA和人免疫缺损病毒(HIV)RNA的方法, 该方法包括:

(A) 用来源于上述样本的 RNA 和内部阳性对照(IPC)RNA 作为模板、用至少一种引发从 IPC RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物、至少一种引发从 HCV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物和至少一种引发从 HIV RNA 的 DNA 逆转录的逆转录引物进行逆转录反应, 以产生逆转录产物, 该产物包括(a) IPC 特异性逆转录产物, (b) HCV 特异性逆转录产物, (c) HIV 特异性逆转录产物, 或(d) 任何上述逆转录产物的组合;

(B) 用一对或多对对 IPC 特异的寡核苷酸引物、一对或多对对 HCV 的 5'非编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对上述逆转录产物进行扩增, 以产生扩增产物, 该扩增产物包括(a) IPC 特异性扩增产物, (b) IPC 特异性扩增产物和 HCV 特异性扩增产物, (c) IPC 特异性扩增产物和 HIV 特异性扩增产物, 或(d) 任何上述扩增产物的组合;

其中上述每一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序列号 8>, 和

(ii) 反向引物 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序列号 9>;

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 10>, 和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 11>;

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>, 和选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>;

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

5' -GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR₆)< 序列号 6>的正向引物, 和对 HIV-2 特异、序列为 5' -GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物; 和

(C) 检测上述扩增产物, 其中对 IPC-特异性扩增产物的检出表明上述样本中
5 存在 IPC RNA, 对 HCV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA, 对 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HIV RNA, 对 HCV-特异性扩增产物和 HIV-特异性扩增产物的检出表明上述样本中存在 HCV RNA 和 HIV RNA。

第四方面, 本发明涉及一种共扩增内部阳性对照(IPC) DNA、丙型肝炎病毒
10 (HCV) DNA 和人免疫缺损病毒(HIV) DNA 的方法, 该方法包括:

(A) 用一对或多对对 IPC 特异的寡核苷酸引物、一对或多对对 HCV 的 5'非
编码区特异的寡核苷酸引物和一对或多对对 HIV 特异的寡核苷酸引物对可疑含
有 IPC DNA、HCV DNA、HIV DNA、或者任何前面所述组合的 DNA 样本进
行聚合酶链反应, 以产生扩增产物, 该扩增产物包括(a) IPC 扩增产物, (b)HCV
15 特异性扩增产物, (c) HIV 特异性扩增产物, 或(d) 包括(a)、(b)和(c)的任意组合;

其中上述每一对对 IPC 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5' -CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3'(IPCF1)< 序
列号 8>,和

(ii) 反向引物 5' -CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3'(IPCR1)< 序
20 列号 9>;

其中上述每一对对 HCV 特异的寡核苷酸引物包括:

(i) 正向引物 5' -GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序
列号 10>,和

(ii) 反向引物 5' -CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序
25 列号 11>;

其中每一对对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物包括如下序列的正向引物:

5' -CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
选自下列的对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5' -GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>,
30 和

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>,

其中每一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物包括: 序列为

5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_L)< 序列号 6>的正向引物,
和对 HIV-2 特异、序列为 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-
5 3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

其它方面, 本发明使用随机寡核苷酸引物进行逆转录反应; 或者可以使用一种或多种 HCV 特异的和一种或多种 HIV 特异的逆转录引物, 如含与 HCV 或 HIV RNA 中的序列相对应的序列的寡核苷酸。

测定扩增物的方法包括, 但不限于: (a)电泳和(b)在固体支持体上捕捉扩增
10 产物, 该扩增产物上附有 IPC-、HCV-或 HIV-特异性探针, 接着用比色测定法对结合产物进行定量测定。有用的 IPC-特异性捕捉探针包括但不限于: 5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3'<序列号 17>, 有用的 HCV 特异性捕捉探针包括但不限于 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'< 序列号 12>, 有用的 HIV-1 特异性捕捉探针包括但不限于 5'-
15 CAACAGACGGGCACACACTACT-3'< 序列号 13>, 和有用的 HIV-2 特异性捕捉探针包括但不限于 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'< 序列号 14>。

另一方面, 本发明涉及一种共检测生物样本中的 HCV RNA 和 HIV RNA 的试剂盒, 该试剂盒包括:

20 (a) 一对对 HCV 的 5'非编码区特异的寡核苷酸引物, 包括:

(i) 正向引物 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 1>,和

(ii) 反向引物 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 2>; 和

25 (b) 对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物, 它包括如下序列的正向引物:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和
选自下列的、对 HIV-1 特异的反向引物:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

30 (2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>, 以及

(c) 一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物, 它包括: 序列为 5' - GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_e)< 序列号 6>的正向引物,和对 HIV-2 特异、序列为 5' -GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

5 还有一方面, 本发明涉及一种用于共扩增 DNA 样本中的 HCV DNA 和 HIV DNA 的试剂盒, 它包括:

(a) 一对对 HCV 的 5' 非编码区特异的寡核苷酸引物, 包括:

(i) 正向引物 5' -GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'(C131F25)< 序列号 1>,和

10 (ii) 反向引物 5' -CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'(C294R25)< 序列号 2>; 和

(b) 对 HIV-1 特异的寡核苷酸引物, 它包括如下序列的正向引物:

5' -CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'(JBLTR4)< 序列号 3>,和选自下列的、对 HIV-1 特异的反向引物:

15 (1) 5' -GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3'(JBLTR6)< 序列号 4>, 和

(2) 5' -TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'(JBLTR8)< 序列号 5>, 以及

(c) 一对对 HIV-2 特异的寡核苷酸引物, 它包括: 序列为 5' - GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'(2LTR_e)< 序列号 6>的正向引物,和对

20 HIV-2 特异、序列为 5' -GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'(2LTR-R1)< 序列号 7>的反向引物。

本发明发现可以用下列多重测定法同时检测含 HCV 和 HIV RNA 的生物样本中的少量丙型肝炎病毒(HCV) RNA 和人免疫缺损病毒(HIV) RNA, 即(i) 在来源于样本的 RNA 上进行逆转录反应, 和(ii) 用含与存在于 HCV 和 HIV RNA 中的某些序列互补的序列的特殊寡核苷酸对扩增逆转录产物。因此本发明提供了改进的单循环、多重逆转录/扩增测定法, 该方法可检测同一样本中低复制量的 HCV 和 HIV RNA。

根据序列保守性、分子内和分子间的相互作用以及预测的扩增子的二级结构和环境序列来选择寡核苷酸引物。而且, 该引物和测定方法应该允许 HCV 和 HIV 基因组的多区域、多病毒种类和内部阳性对照(IPC) RNA(或 DNA)的共同扩

30

增(和共同检测)。病毒基因组的多区域的共同扩增/检测增加了测定的敏感性, IPC 的共同扩增减少了因 PCR 抑制而致假阴性结果的可能性。

分子生物学、微生物学、重组 DNA 和蛋白质生物化学中的许多技术可用于实施本发明, 这些在下列文章中有解释: 《当代分子生物学技术》I、II 和 III 卷,1997(F.M.Ausubel ed.);Sambrook 等,1989,《分子克隆: 实验室手册》第二版, 5 冷泉港实验室出版, 冷泉港, 纽约;《DNA 克隆: 实验入门》I 和 II 卷, 1985(D.N. Glover ed.);《寡核苷酸合成》1984, (M.L. Gait ed.);《转录和翻译》, 1984(Hames 和 Higgins eds.);《分子克隆的实验指导》;丛书,《酶学方法》(Academic 出版社);和《蛋白质纯化: 原理和实验》第二版(Springer-Verlag,N.Y.)。

10 本文所用的“核酸”或“聚核苷酸”是指任意长度的含嘌呤和嘧啶的聚合物, 可以是多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸或混合多核糖—多脱氧核糖核苷酸。这包括单链和双链分子, 如 DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA 杂交体, 以及由碱基与氨基酸主链共轭形成的“蛋白质核酸(PNA)”。这些也包括含修饰碱基的核酸。

15 本文所用的核酸序列的“成分”是指与起始序列参加 Watson-Crick 碱基配对的反义序列。

本文所用的“引物”是指长度约为 5—50 核苷酸的分离寡核苷酸, 优选长约 6—25 核苷酸, 最好的优选是长约 6—18 核苷酸, 它与有意义的单链核酸序列形成双链体, 并通过逆转录酶或 DNA 聚合酶允许互补链聚合。

20 本文所用的“分离”的核酸是指从其初始环境去除的成分(例如, 如果是天然产生的, 则为天然环境; 或者如果是合成的, 则为反应混合物)。分离的核酸含有约小于 50% 的其原始相关成分, 优选小于约 75%, 最好的优选是约小于 90%。

“来源于”指定的序列的核苷酸序列是指与指定序列的区域相对应的序
25 列。这包括与该序列同源或互补的序列。

内部阳性对照(IPC)靶核苷酸是指克隆到成质粒载体中的合成的核苷酸序列, 该质粒随后被线性化, 尤其是通过限制酶的作用。IPC 尤其含有包围基因探针结合区域的多引物结合序列, 并作为一种对抗核苷酸扩增反应中的假阴性结果的基因控制。

30 优选的内部阳性对照靶 DNA 的序列为:

5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGAACGCACGGACGAGGACA
TCATAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGGTCTAACGCAGCAGTC
AGTGTATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTCAGTGTCTGCTCCAGG
ATCGTG-3'

5 <序列号 15>

可以用常规方法制备含有任何本文所公开的序列或其亚序列的核苷酸。例如，DNA 可以用下列方法化学合成，如 Matteucci 等，1981,《美国化学会杂志》(J.Am.Chem.Soc.)103:3185 中的亚磷酰胺固体支持体方法，Yoo 等，《生物化学杂志》764: 17078 中的方法，或者其它已知方法。也可用本技术领域已知的许多方法对核苷酸进行修饰。这些修饰的非限定例子包括甲基化作用、“帽结构”、用一种类似物取代一种或多种天然产生的核苷酸、以及内核苷酸修饰，如用未荷电的连锁（如磷酸甲基酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等）的修饰或荷电连锁（如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）的修饰。核苷酸可以含有一个或多个额外的共价交联部分，例如，蛋白质（如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等）、嵌入剂（如丫啶、补骨脂素等）、螯合剂（如金属、放射性金属、铁、氧化性金属等）以及烷化剂。“核酸”一词也包括 PNA。核酸可以通过甲基或乙基磷酸三酯的形成或者烷基氨基磷酸酯连锁而衍生。而且，本发明的核酸序列也可以用一种能直接或间接提供可检测信号的标记进行修饰。例如标记包括放射性同位素、荧光分子、生物素等等。

20 本文所用的扩增是指一种复制核酸的重复方法。适合的扩增方法包括但不限于：聚合酶链反应、连接酶链反应、链置换扩增、核酸单碱基扩增、以及转录介导的扩增。

本发明提供了用于检测生物样本中的 HCV 和 HIV 的方法。该方法是通过以下步骤完成的：

- 25 (i) 用包含在样本或来源于样本的 RNA 作为模板，进行逆转录反应；
(ii) 扩增逆转录产物，使用至少一对扩增引物，该引物含与 HCV 基因组内（优选 HCV 的 5' 编码区）的序列相对应的序列，和至少一对含与 HIV 基因组内的序列相对应的序列的扩增引物，以产生 HCV 特异性和 HIV 特异性扩增产物；和
30 (iii) 检测 HCV 特异性扩增产物和 HIV 特异性扩增产物。HCV 特异性扩

增产物和 HIV 特异性扩增产物的检出表明样本中分别存在 HCV 和 HIV RNA。

根据本发明，生物样本是通过任意常用方法从病人身上获得的。适合的生物样本包括但不限于血液、血清、血浆、尿液、人乳和脑脊液。血浆优选作为病毒 RNA 的来源。

- 5 以任意方法处理这种生物样本，这些方法可使逆转录试剂进入样本内含有的 RNA 特别是病毒 RNA 中。“来源于”生物样本的 RNA 是起初存在于样本中的任何 RNA，通过处理样本可完成进入。特别是，RNA 可以用本领域已知的任何方法从样本中提取，如使用异硫氰酸胍、或使用商业上可得到的试剂的方法，以及如来自 Gentra 系统公司(Minneapolis MN)的 PureScript[®] 方法。可以
10 使用任何提取方法，这些方法可从 RNA 酶、其它蛋白质和/或可能参与逆转录的任何其它成分分离出 RNA。

- 然后使用(a)随机引物，如从 Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ 得到的随机六聚体引物，和/或(b)来源于 HCV RNA 基因组序列的 5' 或 3' 非编码区的引物对样本进行逆转录。用常规方法实施逆转录，例如见于《当代分子生物学技术》I、
15 II 和 III 卷,1997(F.M.Ausubel ed.);美国专利 5,322,770;Young 等，《临床微生物杂志》31(4):882(1993);Myers 等，《生物化学》30(3):7661(1991);或者如未决专利申请系列号____，代理人案卷号为 2094/0E287 的案卷中所述。

- 逆转录反应后，将产物进行扩增。可以使用任何扩增方法，包括但不限于：聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应、链置换扩增、转录介导的扩增、或核酸单
20 碱基扩增。优选使用 PCR。特别是，含 PCR 的所有必需成分的反应混合物是直接加入逆转录反应混合物中的。然后采用对所用引物对有特异性的条件进行扩增。

- 本发明已发现某些 HCV 特异性和 HIV 特异性扩增引物对可以同时用以检测病人样本中低水平的 HCV 和 HIV RNA。可用于实施本发明的引物的非限定
25 实例包括下表 1 所列出的。

表 1			
ID	来源	序列	序列号
JBLTR4	HIV-1(s)	5' CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1(as)	5' -GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3'	4
JBLTR8	HIV-1(as)	5' -TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'	5
2LTRe	HIV-2(s)	5' -GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'	6
2LTR-R1	HIV-2(as)	5' -GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'	7
C131F25	HIV5'(s)	5' -GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'	10
C294R25	HIV5'(as)	5' -CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'	11

(s) = 有义链; (as) = 反义链

扩增后, 可以用本领域已知的任何方法检测扩增产物, 这些方法包括但不限于琼脂糖凝胶电泳或丙烯酰胺凝胶电泳; 非同位素比色测定如 SureCell[®] 系统, 它可以从 Ortho Clinical Diagnostic, Rochester, NY 获得 (参见下面实施例 1); Eci 测定; 化学发光和荧光。

病毒特异性扩增产物的检出表明样本中存在病毒 RNA。当使用凝胶电泳时, 病毒特异性扩增产物是根据其大小来确定的, 正如通过在含与反应中所用的扩增引物相对应的序列的各自病毒 RNA 中的定位所预测的。

本发明发现了其在诊断病人的 HIV 和 HCV 感染中的应用; 在检测抗病毒治疗方案的效能中的应用; 和在筛选用于 HCV 感染和 HIV 感染的样本的供血中的应用。

下面的实施例是举例说明本发明, 而不是进行限定。

15 实施例 1: 生物样本中的 HCV 和 HIV 的多重检测:

进行下面的实验是为了根据本发明的方法来检测 HCV 和 HIV 的多重测定的敏感性。

A. 方法:

1. 患者样本:

20 使用制造厂商的指导中的 Roche Amplicor 测定法对加样在 HIV 阳性患者血浆和 HCV 阳性患者血浆中的病毒进行定量测定。首先将含 HIV 和含 HCV 的

血浆样本分别稀释至含 1,000copies/ml 和 10,000copies/ml。然后按如下结合：将 50 l HCV 和 500 l HIV 血浆加入 450 l 阴性血浆中，以产生 25 个病毒基因组 RNA/PCR 反应复制。

5 将 10 l HCV 和 100 l HIV 血浆加入 890 l 阴性血浆中，以产生 5 个拷贝/PCR 反应。

2. 样本制备：

用 PureScript[®] RNA 分离试剂(Gentra Systems,Minneapolis MN)从血浆样本中制备 RNA。根据制造厂商的方案对体液的修饰包括使用 40g、而不是 20g 糖元作为载体以有助于病毒 RNA 的沉淀。另外，在大多数情况下，RNA 的异丙醇沉淀后，用乙醇洗涤 RNA 粒状沉淀，将粒状沉淀再悬浮在 RT 缓冲混合液中，而不是悬浮在厂商提供的 RNA 水合溶液中。

3. 逆转录：

通过在含 50mM Tris-HCl(pH8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mM DTT、0.4mM 每个 dNTP(Pharmacia Biotech)、4M 随机六聚体((Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)或特异性逆转录引物、和焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水中的 20 单位 RNA 酶蛋白质抑制剂(Promega,Madison,Wisconsin)的 50 l 溶液中加入 100 U 重组 Moloney 鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶 (RT)(Gibco BRL,Gaithersburg,Maryland)，来催化从 RNA 到 cDNA 的合成。在 42EC 培养 30 分钟后，在 100EC 进行 5 分钟 RT 反应以去除 RT 活性。使每一反应冷却 1 分钟

20 钟后，以 16000×g 微量离心 4 秒。

4. PCR 扩增：

在含 25mM Tris-HCl、3mM MgCl₂、0.725mM EDTA、54mM KCl、3.72mM NaCl、40M DTT、108g/mL 明胶(IV 型)、9.5%甘油、0.02%吐温 20、0.02% NP40、小牛胸腺 DNA(2g)、1.2mM 每个 dNTP、0.4 M 每个引物、10 个拷贝线性化内部阳性对照(IPC)质粒 DNA、和 16 U 标记 (Tag) 聚合酶的 100 l 溶液中、在 PE9600 热循环器(Perkin-Elmer)中进行 PCR。将 Tag、TP1-12 和 TP4-9 的单克隆抗体（其制备公开在美国专利 5,338,671 中），分别以 50:1 和 5:1 摩尔比例加入反应中，以提供 Tag 聚合酶的 55:1 摩尔比例的抗体。在 96EC 进行 3 分钟初始变性作用后，在 96EC 和 68EC 分别进行 5 秒和 40 秒的 40 个循环扩增。

30 循环结束时，在 103EC 进行 5 分钟后加热步骤，以使 Tag 聚合酶失活。

5. PCR 产物的检测:

通过 4% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 之后进行溴化乙锭染色。或者, 在扩增期间用 5'-生物素标记的引物 (有义链) 使 PCR 产物生物素化。通过对与乳汁颗粒共价结合的寡核苷酸探针进行杂交以捕捉产物, 它沉积在流通膜的表面 (SureCell[®] 测定: HCV-1 探针是 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr3)< 序列号 13> 和 5'-GAACAGATAAACACACACTGCT-3'(JBLTRpr4)< 序列号 16>; HIV-2 探针是 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)< 序列号 14>; 和 HCV 探针是 5'-CTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3'(C252-27-PRB)< 序列号 12> 组成)。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, 它催化染料前体向染料 (蓝色) 的氧化转化。通过将颜色强度与标准色比较, 对蓝色强度进行目视计分 (0-10)。所有目视颜色计分>3 则认为是阳性结果。

B. 结果:

凝胶电泳出现下列扩增产物: 188 nt(HCV)、160 nt (IPC), 和 150nt(HIV LTR-长产物)。在每个 PCR 检测 25 拷贝的检测 (500 病毒颗粒/ml 血浆) 时, HIV 和 HCV 的结合测定可以检测所有结合的 HIV 和 HCV 样本。另外, 在 5 拷贝/PCR 检测 (100 病毒颗粒/ml 血浆) 下, 检测了 50-90% 的结合阳性样本。结果如下表。

表 2		
# 每个 PCR 反应的病毒 RNA 拷贝数	n=8 HCV 探针阳性	n=8 HIV 探针阳性
0	0%	0%
5	88%	50%
25	100%	100%

上述的所有专利、申请、论文、出版物和实验方法均在此引作参考。

根据详细的说明书本领域技术人员可以对本发明进行许多变通。这些显而易见的变通应在附加的权利要求书的范围之内。

专利名称(译)	有效的多重检测丙型肝炎病毒(HCV)和人免疫缺损病毒(HIV)的寡核苷酸引物及其使用方法		
公开(公告)号	CN1213150C	公开(公告)日	2005-08-03
申请号	CN00104630.6	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	KM戈曼 DR帕特森 JM林南 K宋		
发明人	K·M·戈曼 D·R·帕特森 J·M·林南 K·宋		
IPC分类号	C12N15/09 C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/70 C12R1/92 G01N33/53 G01N33/569 G01N37/00 G01N33/576		
CPC分类号	C12Q1/707 C12Q1/703		
优先权	60/118498 1999-02-03 US		
其他公开文献	CN1268575A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于同时检测人生物样本中的丙型肝炎病毒和人免疫缺损病毒的方法和试剂盒。

表1			
ID	来源	序列	序列号
JBLTR4	HIV-1(s)	5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1(as)	5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3'	4
JBLTR8	HIV-1(as)	5'-TGTTGGGGGCCCACTGCTAGAGA-3'	5
2LRe	HIV-2(s)	5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3'	6
2LTR-R1	HIV-2(as)	5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3'	7
C131F25	HIV5'(s)	5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3'	10
C294R25	HIV5'(as)	5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'	11