



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1665939 B

(45) 授权公告日 2015.08.12

(21) 申请号 03815771.3

(22) 申请日 2003.07.03

(30) 优先权数据

02077697.7 2002.07.04 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2005.01.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2003/000491 2003.07.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02003/080869 EN 2003.10.02

(73) 专利权人 普里马根控股公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

(72) 发明人 埃斯特·雷吉娜·德罗伊

马里纳斯·彼得鲁斯·德巴尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

Moye J等. Abstracts of the 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 1997, Washington DC. 1997, Abstract no. 621.

Moye J等. Abstracts of the 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 1997, Washington DC. 1997, Abstract no. 621.

Phillipe N. Nyambi等. Detection of human immunodeficiency virus type1(HIV-1) in heel prick blood on filter paper from children born to HIV-1-seropositive mothers. Journal of Clinical Microbiology 32 11. 1994, 32(11), 2858-2860.

审查员 张丽华

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

储存并定量加到固相载体上的核酸

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测至少一个样品中的目标核酸的方法,包含:将所述样品加到能至少部分吸收所述样品的固相载体上;干燥所述载体;至少将所述载体的有代表性的部分提供给一种核酸分离溶液,使得能从所述载体中提取出所述核酸的有代表性的量;以及测定所述核酸的有代表性的量。采用本发明的方法,可将例如体液样品的样品固定,由此使得能够通过正常的后勤方法将它们从取样地点(例如欠发达国家的当地医院或实验室)起运并运送到世界上其它地方的服务性测定实验室。为了检测低滴度的目标核酸,优选将至少 100 μ l,更优选将至少 250 μ l 样品加到固相载体上。在此也提供了用于检测、鉴定和/或定量样品中的目标核酸的试剂盒,其包含能至少部分吸收所述样品的固相载体;以及核酸分离溶液。

1. 一种用于定量至少一个全血样品中的目标核酸的方法,所述方法包含:
 - 将至少 100 μ l 所述样品加到能至少部分吸收所述样品的固相载体上;
 - 干燥所述载体;
 - 将所述载体的至少一部分提供给一种核酸分离溶液,使得能从所述载体中提取出核酸,其中所述的一部分包含所述样品的全部,并且其中所述核酸分离溶液包含离液核酸分离裂解缓冲液;以及
 - 测定所述核酸的量。
2. 权利要求 1 的方法,其中将至少 250 μ l 样品加于所述载体。
3. 权利要求 1 的方法,其中将至少两个样品提供给所述固相载体。
4. 权利要求 3 的方法,包含将已知量的参照核酸加到所述固相载体上。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述的一部分包含全部所述固相载体。
6. 权利要求 3 的方法,其中所述的一部分包含所述样品中的一个样品。
7. 权利要求 1,2,4,5 和 6 中任一项的方法,其中所述载体包含滤纸。
8. 权利要求 1,2,4,5 和 6 中任一项的方法,包含对突变体进行基因型分析。
9. 权利要求 1,2,4,5 和 6 中任一项的方法,其中所述样品包含取自手指或足跟穿刺的一小滴全血。
10. 权利要求 1,2,4,6 中任一项的方法,其中所述测定所述核酸的量包含扩增步骤。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述扩增步骤包含实时监视的扩增。
12. 权利要求 1,2,4,6 中任一项的方法,其中用终点阅读系统测定所述核酸的量。
13. 权利要求 1,2,4,6 中任一项的方法,其中确定不同核酸之间的比例。

储存并定量加到固相载体上的核酸

[0001] 本发明涉及医学领域。本发明特别涉及对样品中的目标核酸进行定量。

[0002] 病原体感染在全世界都是常见的。这些感染例如包括病毒、细菌、真菌及寄生虫感染。对感染的早期诊断对于进行有效的治疗通常是优选的,而有效的治疗可以预防出现严重的病理性症状。早期诊断有时是治疗可能性、延长生存时间和 / 或改善生活质量的首要条件。这些感染的实例包括丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、疟疾及 HIV, 例如 HIV-1。

[0003] HIV-1 在全世界迅速地流行性传播,随着病毒的传播,循环的 HIV-1 病毒亚型已经不再局限于地球上的某个地理位置。这样的发展要求应用能同样准确及精确地测定出 HIV 病毒的所有亚型的(核酸)诊断性测定。

[0004] 流行病的全球化以及在资源贫穷国家(南撒哈拉沙漠非洲和东南亚)的特别严重性已经驱使发达国家用药物使用权计划帮助欠发达国家对抗感染。然而,为了有效地帮助欠发达世界的 HIV-1 感染者,在例如监测治疗的有效性方面必须要有适宜的方法。这些适宜的方法特异地是病毒载量检测,它可测定体液例如感染者的血液、血浆、母乳、精液、淋巴液、痰液、liquor、唾液和 / 或尿液内的 HIV-1RNA 的量。同样的,适宜的核酸载量检测对于其它的感染相关性疾病也是必需的。

[0005] 适宜的核酸荷载检测的现状是技术标准过高,使得将这些检测应用于远离技术资源的地方例如在南撒哈拉沙漠非洲和 / 或东南亚是不容易的。这要求在基础建设方面的大量投资,而这在这些地区是不可能的。另一个可选择的解决方法是在发达地区(例如欧洲和北美)的实验室分析患者的样品。然而因为后勤问题,这种选择是不可能实现的。必须在低于 0°C 的温度下,通常在干冰盒中,将冰冻状态的个体的体液样品例如血液或血浆样品运送到实验室。这种运送临床材料的方法是非常昂贵的并需要在起运的地方可取得干冰。后者在欠发达世界的国家通常是不能实现的。因为花费及干冰的不可获得性,因此在实验室远距离测定样品(“服务性测定(service testing)”)对于这些国家以及这些国家的受感染者都不是一种选择。只有完善了诊断措施,对欠发达国家的药物使用权计划才能成功。

[0006] 本发明提供了一种定量至少一种样品中的目标核酸的方法,包括:

[0007] - 将上述样品加到能至少部分吸收上述样品的固相载体上;

[0008] - 干燥上述载体;

[0009] - 至少将上述载体的有代表性的部分提供给一种核酸分离溶液,使得从上述载体中提取出上述核酸的有代表性的量;以及

[0010] - 定量上述核酸的有代表性的量。

[0011] 用本发明的方法将例如体液样品的样品固定,这样就可以通过例如普通邮寄的正常后勤手段将样品从取得样品的地方(例如欠发达国家的当地医院或实验室)起运并运送到世界上其它地方的服务性测定实验室。上述方法使得通过平信邮寄将干燥的样品运送到远距离的实验室用于定量样品中的目标核酸成为可能。

[0012] 利用本领域已知的技术可以实现本发明的方法。例如,可以用吸管将设定量的液体样品加到固相载体上。上述固相载体不是关键,它可以包括任何本领域已知的固相载体,只要它能至少部分吸收上述样品。例如,上述固相载体可以由二氧化硅组成。不过,上述载

体优选地由滤纸组成。不仅滤纸的重量轻,它还能较好地吸收液体样品。这对于邮寄非常重要的。上述滤纸可以包括平常的未经处理的滤纸如来自 Schleicher 及 Schuell 的 903 纸,或经处理的能固定用于快速纯化的核酸的滤纸。本领域的两种实例是来自 Schleicher 及 Schuell 的 IsoCode 纸或来自 Whatman 的 FTA 处理的纸。为了安全的样品操作以及样品稳定性,这两种纸都是抗菌的、抗真菌的以及抗病毒的,它抑制细菌及真菌的生长并杀灭与基质相接触的病毒。用于储存并运送干燥的液体样品的适宜载体的另一个实例是 Lifestock(美国 5139742)设计的装置。该装置含有一个小刀以及直接连接于小刀的毛细管,它能收集、储存及运送在毛细管内的干燥血液,因此它相当于用滤纸的方法。

[0013] 可以用本领域已知的不同技术干燥上述载体。优选地空气干燥上述样品。这种方法是廉价及有效的。

[0014] 载体的有代表性的部分意思是能指示加到上述固相载体的样品的量的部分。例如,上述有代表性的部分可以包括整个上述样品。上述有代表性的部分也可以包括上述样品的一半的量。在这种情况下,另一半样品可以用于进行第二个试验。上述第二个试验可以是不同的试验,或可以是相似的试验。在后一种情况下,某个结果可以由重复试验得到,该结果更为准确。

[0015] 核酸的有代表性的量意思是能指示上述样品中所含有的核酸量的量。上述有代表性的量可以包括上述样品中所含有的上述核酸的全部的量。同样的,上述有代表性的量可以包括上述样品中所含有的上述核酸的一部分。

[0016] 本发明优选地提供了本发明的一种方法,其中将至少 100 μ l 样品加到上述载体。更优选的,将至少 250 μ l 样品加到上述载体。最优选的,将至少 500 μ l 样品加到上述载体。由于样品的大体积,所以仍可定量出低滴度的目标核酸。在本发明之前,因为观察到抑制作用,大量的体液样品例如血液或血浆样品不适合用于测定。例如,已经报导全血中存在的血红蛋白及碳酸酐酶干扰了聚合酶链反应(4)。因为血红素及其降解产物可自滤纸洗脱,因此 PCR 混合物变为深褐色(5)。为了提高 PCR 扩增,在 PCR 反应前用甲醇处理样品(6)。这包含了一个额外的步骤,就会带来污染的危险并降低测定结果的可靠性。另外,报导具有螯合性的金属离子在高温和低离子强度下可成为降解 DNA 的催化剂(7)。

[0017] 令人惊奇的是,用本发明的方法可以将大量的样品储存于干燥的固相载体并用于随后的分析。没有观察到上述的抑制作用并且不需要将甲醇处理作为预处理。现在用本发明的方法分析大的样品是可能的。

[0018] 利用本发明的方法,在储存和 / 或分离和 / 或检测过程中都没有出现显著量的核酸的丢失 / 降解。在实施例显示,如果使用本发明的方法,从储存于固相载体的干燥样品中测到的目标核酸的量与当上述样品直接用于分析时所测到的上述目标核酸的量相当。

[0019] 现在可以研究固相载体上的干燥样品中所含的病原体的核酸的量。例如血液样品的体液样品可以被收集于例如滤纸的固相载体上。上述滤纸可以被运送到例如在西欧的实验室。随后,可以测定目标核酸的量。也可以确定上述核酸的量是否随着时间而减少。

[0020] 在一个方面,本发明提供了一种本发明的方法,其中上述固相载体含有至少两个样品。优选的,上述样品取自同一个体。更优选的,上述样品取自上述个体的同种体液。例如上述样品可以包含两份血液。用本发明的方法可以独立地测定每一个上述血液样品。这样可以重复测定上述个体的血液中的目标核酸的量。这可以得到更准确的结果。此外,每

个样品可以被不同的个人 / 不同的研究所检测。独立的第二次检测可以发现个人所犯的
错误和 / 或因为设备不可靠而造成的错误。

[0021] 在另一个可选择的实施方案中,上述两个样品被用于不同的目的。例如,用一种样
品测定病毒核酸的量,而用另一个样品测定细菌核酸的量。可以用两个样品获得病毒核酸
与染色体 DNA 之间的比例(这对于 CMV 是重要的)、或者线粒体与细胞的 DNA/RNA 之间的
比例或测定所含的 mRNA 或核糖体 RNA 的比例。然而,仅用一种样品也可以进行大多数这样的
检测。

[0022] 在一个实施方案中,上述固相载体包括一系列至少两种取自不同时间点的样品。
例如,在治疗起始以及随后的规律间隔内,将样品加到上述固相载体上。这样上述固相载体
不仅用做于转运的目的,也用于在环境温度下稳定地储存且不降解目标核酸。在一定长的
时间后,可以将这些固相载体运送到合适的研究所。可以确定病原性核酸的量是否随着时
间而减少。

[0023] 同样的,可以定期地从患病个体中取得样品。随后可以定量每个样品中的病原
体的核酸的量。这样可以进一步地了解上述疾病的病程,例如病原体的核酸的量是否随着时
间而增加等等。

[0024] 分别地将每个样品运送到上述研究所是不必要的。可以在一段时间内收集大量样
品而只运送一次。这样可以节省时间和花费。此外,因为上述样品被一起运送,所以对运送
样品的分别的储存及分类是不必要的。减少了样品丢失的危险。

[0025] 为了更正确地用本发明的方法定量目标核酸的量,可以将已知量的参照核酸加到
上述固相载体上。可以定量上述参照核酸以及目标核酸。通过比较上述参照核酸的测定量
与上述参照核酸的加入量,可以测定出目标核酸定量的准确性。如果上述测定量与加入量
有轻微差异,那么对于上述目标核酸也可能存在着同样的差异。因此,可以校正所测定的上
述目标核酸的量以得到更准确的结果。

[0026] 此外,用参照核酸可以测定出含有一部分样品的有代表性的部分。如果将含有一
部分所述样品的有代表性的部分提供给上述核酸分离缓冲液,并且参照核酸的测定量显示
是加入量的 1/3,那么这表明目标核酸的测定量也近似是上述样品中含有的核酸的量的
1/3。因此,参照核酸表明如果将所述样品的一部分放置于上述核酸分离缓冲液中,用参照
核酸可以放大本发明的核酸的测定量的系数。参照核酸优选地以与上述目标核酸基本一
样的方式沿着上述固相载体扩散。在这种情况下,在本发明的方法中使用上述固相载体的哪
一部分都没有显著差异。准确地定量目标核酸的另一种方法是通过其与其它核酸的量的相
关性。通过这个方法,或在同一反应或在不同的反应、或在同一种样品或在任何一种其它的
样品中建立任何 DNA 与 DNA、任何 RNA 与 DNA 或反之亦然、以及任何 RNA 与 RNA 等靶分子之
间的比例是有可能的。本发明可以包括测定宿主核酸之间的比例的应用,例如线粒体 DNA
与核 DNA 的量的比例作为对特定的 HIV 的治疗反应的测定,或包括测定病原体核酸与宿主
核酸的比例的应用,例如 CMV DNA 对宿主的核 DNA 的量的比例。其它应用可以包括在基因
表达谱分析领域内每个细胞的 mRNA 的量。

[0027] 本发明也提供了本发明的一个方法,其中上述有代表性的部分基本上包括上述至
少一种样品的整个部分。本发明者表明用本发明的方法甚至对大样品进行对目标核酸的可
靠的定量是有可能的。如果使用整个大样品,可以定量甚至低浓度的核酸。

[0028] 通过切割例如滤纸的固相载体上的可见斑可以提供上述载体的有代表性的部分。这种切割可以用剪刀完成,也可以完全自动化完成,例如用来自 Wallack 的装置可以钻出相同的固相载体的表面。使这类手工钻孔便利化的另一种方法是将上述固相载体预先钻孔,之后加入样品并干燥。在到达实验室用于分析时,通过特殊设计的装置或现有装置例如来自 Eppendorf 的 Safe-lock 管完整地钻出该预钻孔的部分是便利的,也可以使用所述斑点的有代表性的部分。然而,优选地使用整个载体,因为它可以保证测定整个样品。根据本发明,例如滤纸的固相载体没有显著地影响目标核酸的定量。因此,优选的本发明的方法是上述有代表性的部分基本上包括整个上述固相载体。

[0029] 如果在本发明的一个方法中,上述固相载体含有至少两个样品,上述有代表性的部分优选地包含其中一种上述样品。上述有代表性的部分可以被用于定量目标核酸。如上面所解释的,含有上述第二个样品的有代表性的部分可以被用于重复测定。同样的,可以进行另一种测定。

[0030] 在一个方面提供了本发明的方法,其中上述核酸分离溶液包含离液 (chaotropic) 核酸分离裂解缓冲液。更优选地使用 Boom 等描述的核酸分离缓冲液。上述固相载体优选由滤纸构成,因为滤纸是廉价的,能较好地吸收液体样品并且是轻便的有助于运输。通常,在室温下洗脱上述核酸需要至少 30 分钟,或在更高的温度下甚至更短的时间,而直接应用于裂解缓冲液的体液中的核酸通常在 10 分钟内被释放出来。提高温度将有助于从固相载体中有效并快速地洗脱核酸。

[0031] 本发明的方法特别适合于定量体液中的目标核酸,例如血液、血浆、母乳、精液、淋巴液、血清、痰、liquor、唾液和 / 或尿液。这些体液样品容易得到。取得这些样品不会造成患者的许多不便,而如果例如进行活检将造成患者的许多不便。此外,取得体液样品不需要特殊的装置,而在欠发达国家以及边远地区往往缺乏这些装置。优选的本发明的方法是上述样品包括一滴从手指或足跟穿刺取得的全血。新生儿常进行这样的手指或足跟穿刺,因此取得上述材料不需要进一步地困扰个体。在另一个优选的实施方案中,上述样品是血浆样品。血浆样品可以更准确地测定游离病毒颗粒的量,而例如血液样品也包括整合于细胞内的病毒核酸。对游离病毒颗粒,基本上不含整合于细胞内的病毒核酸的测定,是例如病毒毒性、病毒传播能力等等特性的特殊指示。因此,如果要测定这些特性,血浆样品是特别优选的。为了保证至少收集到最少必需量的体液,可以将预先设定的表面印记于或以任何其它的方法应用于固相载体上。其目的是表面将完全被所需的体液所填充。既然等体积的全血将比相同量的体液例如血清或母乳形成更小的覆盖面积,因此在相同的固相载体上印记有一些针对于不同体液的表面,或者具有为特定的体液特殊设计的载体可能是必要的。这样就保证收集到最少准确量的体液。

[0032] 对于目标核酸的定量,扩增步骤 (例如 PCR 或 NASBA) 常常是必要的。之后可以用本领域已知的方法定量扩增的核酸。因此本发明的方法优选地包括扩增步骤。上述扩增优选地包括实时监视扩增。它使得所生成的核酸在扩增反应期间是直接可视的。例如可以用分子信号探针或其它类型的探针实现这一点。一旦这些探针退火于模板,就可以生成在扩增反应期间能被监视的荧光信号。荧光的强度是所生成的核酸的量的指示。用已知量的核酸可以生成校准曲线。然后将具有未知量核酸的样品的荧光信号与上述校准曲线进行比较。这样就可以测定出在上述样品中的上述核酸的量,因为荧光的强度与核酸的量是相

关的。

[0033] 在另一个实施方案中,利用终点阅读系统(end-point read-out system)进行上述核酸的定量。这些系统例如包括比色检测、酶检测和 / 或量尺检测。

[0034] 本发明也提供了一种含有样品的干燥的固相载体在定量上述样品中的目标核酸中的用途。如上所述,可以便利地储存并运送上述干燥的固相载体,之后可以进行可靠的核酸定量。上述固相载体优选地至少含有干燥形式的相当于 100 μ l 的血液或其衍生物。上述载体更优选地至少含有干燥形式的相当于 250 μ l 的,最优选地至少含有干燥形式的相当于 500 μ l 的血液,或其衍生物。通过本发明的这种用途,可以研究大体积样品,可以定量低浓度的核酸。血液的衍生物意思是血液的一种成分的至少一部分,例如血清和 / 或血浆。已经被人工处理的血液也在血液的衍生物的范畴内。固相载体被这样设计,它可以较好地包括能吸收体液的载体本身,连接有一部分纸或表面,在这些纸或表面上可以书写或印记信息,例如患者的信息、取样日期或多个取样日期、治疗方案、条形码、身份证号等。这些特异地用于这类信息的表面被准确地连接于带有样品的载体上,因此保证不会丢失信息。这类表面通常可以含有比试管所含的更多的信息。理论上,对这种方案的任何修改都是可能的。

[0035] 本发明也包括用于测定、鉴定和 / 或定量样品中的目标核酸的试剂盒,包括:

[0036] - 能至少部分吸收上述样品的固相载体;以及

[0037] - 核酸分离溶液。

[0038] 上述试剂盒优选地包括用于核酸扩增的元件。上述元件例如包括用于实时监视扩增的元件,以及用于终点检测 / 定量扩增的元件。本发明的试剂盒例如对于只有少数医院的资源贫穷国家是有用的。这些医院可以在边远地区的居民中发放上述固相载体,例如滤纸。一旦收集到样品,它们可以被储存并被运送回这些医院。如果上述医院被适当地装备,用上述核酸分离溶液可以研究上述样品。当然,发达国家的医院也可以用本发明的试剂盒收集并测定样品。用于检测、鉴定和 / 或定量的试剂盒可以包括有从患者中安全地提取到体液所必需的收集材料。理论上,对于如尿液、母乳或唾液的外在体液,必须采取不同于样品为如血液、血清或淋巴液的内在体液时的其它的安全预防措施。对于内在的体液,试剂盒可以包括能至少部分吸收上述样品的固相载体、以及核酸分离溶液、一副检查手套、一个清洗皮肤的酒精棉球、手指或足跟穿刺装置、绷带、信封例如写有目的地实验室的地址以及留有写识别号码或患者编号的空间,并被内侧封闭用于安全的邮寄运输、以及保持样品干燥并预防真菌或细菌生长的干燥器。其它可能的收集装置可以包括特别设计的一次性使用的装置,如美国专利 5139742 中所描述的装置:荷兰 Amersfoort 的 Livestock Control Holding B. V. 的一次性液体测定装置。这些内容物的任何组合,或用其它类型的用于储存和 / 或运送任何含核酸的体液的内容物 / 装置代替都是可能的。

[0039] 同时也提供了至少含有干燥形式的相当于 500 μ l 的血液或其衍生物的固相载体。优选地,上述固相载体含有至少两个样品。如果上述样品是同种类型,那么上述样品都可以被分开测定,造成一个重复测定。此外,通过独立地测定另一个样品可以控制第一个测定的结果。同样的,可将上述样品用于不同的目的。

[0040] 同时也提供了含有在不同的日期取得的一系列样品的本发明的固相载体。如前所述,这些固相载体适合于随访疾病随时间变化的病程,和 / 或测定特定的治疗是否有效。本

发明的固相载体优选地含有已知量的参照核酸。

[0041] 在下面的实施例中进一步地解释了发明。实施例只用于阐明本发明。它始终都不限制本发明的范围。替代性的实施方案也在本发明的范围内。

[0042] 实施例

[0043] 实施例 1

[0044] 将血液及血浆以 50 μ l 的小滴点到 S & S 903 纸 (Schleicher & Schull) 上并在空气中干燥。同时将 200 μ l 相同的血液及血浆样品直接加到如 Boom 等 (1990) 所描述的裂解缓冲液中。干燥后,将滤纸上的斑点在室温下保存直到 3 周,大概可以在室温下保存斑点数月。用剪刀剪下滤纸上的斑点并加到含有如 Boom 等 (1990) 所描述的裂解缓冲液的试管中。将 50 μ l 血液或血浆的滤纸斑加到三个不同的试管中:1) 含有 9ml 裂解缓冲液的 50ml 试管中;2) 含有 15ml 裂解缓冲液的 15ml 试管中或 3) 含有 1ml 裂解缓冲液的 1.5ml 的 Eppendorf 管中。

[0045] 室温下将试管在摇晃板上轻轻摇晃 3 个小时。在此孵育期间,血液或血浆斑从滤纸中溶解到裂解缓冲液内。随后用干净镊子将滤纸从试管中取出。在不同的试管之间,用热水-氯-热水-70%乙醇依次清洗镊子。

[0046] 将 $1 \cdot 10^6$ 拷贝的系统对照 RNA 分子加到含有裂解缓冲液及样品的试管中,使得可以识别出更晚阶段的假阴性反应。用与野生型 HIV-1 一样的引物扩增系统对照 RNA,并用反应中的可识别探针检测。因为长度的差异,在缺少(或存在非常少量)野生型 HIV-1RNA 时,只能扩增及检测系统对照 RNA。

[0047] 用 Boom 等 (1990) 所描述的方法或用购自 Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Germany) 或 Biomerieux (以前的 Organon Teknika, Boseind 15, 5281 RM Boxtel, The Netherlands) 的专用分离试剂盒进一步纯化现在存在于裂解缓冲液中的核酸,按厂商的说明书使用试剂盒。将分离到的核酸储存于 -80°C 直到进一步分析。通常将 5 μ l 核酸用作 De Baar 等描述的测定 HIV-1RNA 的量的 NASBA 扩增反应 (1,2) 的输入量。

[0048] 标准的 NASBA 核酸扩增反应是在 20 μ l 反应体积中进行并包括:40mM Tris-pH 8.5、70mM KCl、12mM MgCl_2 、5mM 二硫苏糖醇、1mM dNTP' s (每种)、2mM rNTP' s (每种)、0.2 μ M 引物 (每种)、(P1 :AAT TCTAAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA 和 P2 :CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA)、0.05 μ M 野生型 HIV-1 序列的分子信号 (MB045 : FAM-CGA CGT AGT AGTGTG TGC CCG TCT GTACGTCG-dabcy1)、0.05 μ M 系统对照 RNA 的分子信号 (MB054 :ROX-CCGACT CTC TAC ACA CCAGAC AAA AAA CGA GTCGG-dabcy1)、0.05 μ M 野生型 HIV-1 序列的分子信号、0.05 μ M 系统对照 RNA 的分子信号、375mM 山梨醇、0.105 μ g/ μ l 牛血清白蛋白、6.4 单位 AMV RT、32 单位 T7RNA 聚合酶、0.08 单位 RNase H 以及输入的核酸。在加入酶之前,将整个混合物(除了酶)加热到 65°C 以变性 RNA 的任何二级结构并容许引物退火。将混合物冷却到 41°C 后,加入酶。扩增在恒温荧光计 (CytoFluor2000 或 EasyQ Reader) 中 41°C 进行 60 分钟,每分钟测定分子信号探针的荧光信号。

[0049] 为了达到定量化,扩增了针对特异性引物的靶序列的稀释系列,并绘制出反应达到阳性时的时间点(达到阳性的时间, TTP) 对核酸输入量的曲线。这样就生成了校准曲线,可以用它读出未知输入量的反应的 TTP 值并推算出输入量。

[0050] 下面的表 1 中显示了实施例 1 中的测定结果。系统对照 RNA 的结果 说明不存在假阴性结果,且表 1 中所报导的所有阴性结果都是不存在 HIV-1 序列或其存在的浓度低于该测定的检测范围所产生的真阴性数据。

[0051]

患者#	200 μ l 直接加到裂解 缓冲液的血浆	200 μ l 直接加到裂解 缓冲液的血液	50 μ l 血浆斑	200 μ l 血浆斑	50 μ l 血液斑	200 μ l 血液斑
R02-05195	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	LQL
R02-05260	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
R02-05179	3.84	Pos.	Pos.	3.86	Pos.	3.86
R02-05183	LQL	Pos.	Pos.	3.74	Pos.	LQL
R02-05240	3.79	Pos.	Pos.	3.86	Pos.	3.77
R02-05244	3.79	Pos.	Pos.	3.59	Pos.	LQL
R02-05265	3.20	Pos.	Neg.	LQL	Pos.	LQL
R02-05175	5.18	Pos.	Pos.	4.79	Pos.	4.76

[0052] A. 如上文中所述用 TTP 检测定量测定出这些结果。给出的结果为对数值。Neg. 代表阴性结果, LQL 代表阳性结果但太低而不能准确定量。

[0053] B. 没有对 200 μ l 直接加到裂解缓冲液的血液、50 μ l 血浆斑以及 50 μ l 血液斑进行定量测定,只用阳性 (Pos.) 或阴性 (Neg.) 结果定性。

[0054] 表 1 中的数据清楚地说明用将样品直接加到裂解缓冲液中得到的结果与先将样品点到纸上、干燥然后加到裂解缓冲液中得到的结果之间有着很好的相关性。

[0055] 实施例 2

[0056] 将来自 1 个妇女的加入了 4 种浓度的 6 个不同分离株的病毒的母乳按 50 μ l 小滴分 4 次点到 S&S 903 纸 (Schleicher & Schull) 上,在空气中干燥并在室温下储存最少 1 周。干燥后,将滤纸上的斑点在室温下保持直到 3 周,大概可以在室温下保存斑点数月。同时将 200 μ l 相同的母乳样品 直接加到如 Boom 等 (1990) 所描述的裂解缓冲液中。用剪刀剪下滤纸上的斑点并加到含有 4ml 如 Boom 等 (1990) 所描述的裂解缓冲液的试管中。

[0057] 室温下将试管在摇晃板上轻轻摇晃 3 个小时。在此孵育期间,血液或血浆斑从滤纸中溶解到裂解缓冲液内。随后用干净镊子将滤纸从试管中取出。在不同的试管之间,用热水 - 氯 - 热水 - 70% 乙醇依次清洗镊子。

[0058] 将 1,000,000 拷贝的系统对照 RNA 分子加到含有裂解缓冲液及样品的试管中,使得可以识别出更晚阶段的假阴性反应。用与野生型 HIV-1 一样的引物扩增系统对照 RNA,并用反应中的可识别探针来检测。因为长度的差异,在不存在 (或存在非常少量的) 野生型 HIV-1RNA 时,只能扩增及检测系统对照 RNA。用 Boom 等 (1990) 所描述的方法或用购自 Qiagen (Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4, 40724 Hilden, Germany) 或 Biomerieux (以前的 Organon Teknika, Boseind 15, 5281 RM Boxtel, The Netherlands) 的专用分离试剂盒

进一步纯化现在存在于裂解缓冲液中的核酸,按厂商的说明书使用试剂盒。将分离到的核酸储存于 -80°C 直到进一步分析。通常将 $5\ \mu\text{l}$ 核酸用作 De Baar 等描述的测定 HIV-1RNA 的量的 NASBA 扩增反应的输入量。

[0059] 标准的 NASBA 核酸扩增反应是在 $20\ \mu\text{l}$ 反应体积中进行并包括: 40mM Tris-pH 8.5、 70mM KCl、 12mM MgCl_2 、 5mM 二硫苏糖醇、 1mM dNTP(每种)、 2mM rNTP(每种)、 $0.2\ \mu\text{M}$ 引物(每种)、(P1:AAT TCT AATACG ACT CAC TAT AGG GAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA 和 P2:CTC AATAAA GCT TGC CTT GA)、 $0.05\ \mu\text{M}$ 野生型 HIV-1 序列的分子信号(MB045:FAM-CGA CGT AGT AGTGTG TGC CCG TCT GTACGTCG-dabcy1)、 $0.05\ \mu\text{M}$ 系统对照 RNA 的分子信号(MB054:ROX-CCGACT CTC TAC ACA CCAGAC AAA AAA CGA GTCGG-dabcy1)、 375mM 山梨醇、 $0.105\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 牛血清白蛋白、 6.4 单位 AMV RT、 32 单位 T7RNA 聚合酶、 0.08 单位 RNase H 以及输入的核酸。在加入酶之前,将整个混合物(除了酶)加热到 65°C 以变性 RNA 的任何二级结构并容许引物退火。将混合物冷却到 41°C 后,加入酶。扩增在恒温荧光计(CytoFluor 2000 或 EasyQ Reader)中 41°C 进行 60 分钟,每分钟测定分子信号分子的荧光信号探针。

[0060] 为了达到定量化,扩增了一系列针对特异性引物的靶序列的稀释物,并绘制出反应成为阳性时的时间点(达到阳性的时间,TTP)对核酸输入量的曲线。这样就生成了校准曲线,可以用它读出用未知输入量的反应的 TTP 值并推算出输入量。

[0061] 比较了对点斑的及直接加到裂解缓冲液的同一样品的测定结果并在下面的图 1 中显示了分析。系统对照 RNA 的结果说明不存在假阴性结果以及图 1 中所报导的所有阴性结果都是缺乏 HIV-1 序列或其存在的浓度低于测定的检测范围所产生的真阴性数据。

[0062] 实施例 3

[0063] 将 88 个 HIV-1 感染个体的血浆以 $200\ \mu\text{l}$ 小滴点到 S&S 903 纸(Schleicher & Schull)上,并在空气中干燥并在室温下储存最少 24 小时。同时将 $200\ \mu\text{l}$ 相同的血浆样品直接加到如 Boom 等(1990)所描述的裂解缓冲液中。钻孔出滤纸上的斑点并加到含有 4ml 如 Boom 等(1990)所描述的裂解缓冲液的试管中。室温下将试管在摇晃板上轻轻摇晃 3 个小时。在此孵育期间,血液或血浆斑从滤纸中溶解到裂解缓冲液内。随后用干净镊子将滤纸从试管中取出。在不同的试管之间,用热水-氯-热水- 70% 乙醇依次清洗镊子。

[0064] 用 Boom 等(1990)所描述的方法或用购自 Qiagen(Qiagen GmbH, Max Volmer Strasse 4,40724 Hilden, Germany)或 Biomerieux(以前的 Organon Teknika, Boseind 15,5281 RM Boxtel, The Netherlands)的专用分离试剂盒进一步纯化现在存在于裂解缓冲液中的核酸,按厂商的说明书使用试剂盒。将分离到的核酸储存于 -80°C 直到进一步分析。通常将 $5\ \mu\text{l}$ 核酸用作 De Baar 等描述的测定 HIV-1RNA 的量的 NASBA 扩增反应 [2,3] 的输入量。

[0065] 标准的 NASBA 核酸扩增反应是在 $20\ \mu\text{l}$ 反应体积中进行并包括: 40mM Tris-pH 8.5、 70mM KCl、 12mM MgCl_2 、 5mM 二硫苏糖醇、 1mM dNTP(每种)、 2mM rNTP(每种)、 $0.2\ \mu\text{M}$ 引物(每种)、 $0.05\ \mu\text{M}$ 野生型 HIV-1 序列的分子信号、 $0.05\ \mu\text{M}$ 系统对照 RNA 的分子信号、 375mM 山梨醇、 $0.105\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 牛血清白蛋白、 6.4 单位 AMV RT、 32 单位 T7RNA 聚合酶、 0.08 单位 RNase H 以及输入的核酸。在加入酶之前,将整个混合物(除了酶)加热到 65°C 以变性 RNA 的任何二级结构并容许引物退火。将混合物冷却到 41°C 后,加入酶。扩增在恒温荧光计(CytoFluor 2000 或 EasyQReader)中 41°C 进行 90 分钟,每分钟测定分子信号分子的

荧光信号。

[0066] 为了达到量化,扩增了一系列针对特异性引物的靶序列的稀释物,并绘制出反应成为阳性时的时间点(达到阳性的时间,TTP)对核酸输入量的曲线。这样就生成了校准曲线,可以用它读出未知输入量的反应的 TTP 值并推算出输入量。

[0067] 比较了对点斑的及直接加到裂解缓冲液的同一样品的测定结果并在下面的图 2 中显示了分析。

[0068] 图 2 中的数据清楚地说明用将样品直接加到裂解缓冲液中得到的结果与先将样品点到纸上、干燥然后加到裂解缓冲液中得到的结果之间有着很好的相关性。当用 Pearson 相关性检测分析时,发现直接血浆的相关系数 (r) 为 0.919 以及干燥血浆为 0.959。

附图说明

[0069] 图 1. 从直接分析的或先点斑及干燥于滤纸的母乳中得到的定量的 HIV-1 数据的比较。检测的底限 (cut of) 为 \log_2 , 在图中用实线表示。轴上的数字代表在检测中所发现的 HIV-1RNA 的对数拷贝数。

[0070] 图 1 中的数据清楚地说明用将样品直接加到裂解缓冲液中得到的结果与先将样品点到纸上、干燥然后加到裂解缓冲液中得到的结果之间有着很好的相关性。

[0071] 图 2. 从直接分析的或先点斑及干燥于滤纸的血浆中得到的定量的 HIV-1 数据的比较。测定的检测下限为 \log_2 , 在图中用实线表示。轴上的数字代表在检测中所发现的 HIV-1RNA 的对数拷贝数。

[0072] 参考文献

[0073] 1. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*; 28(3):495-503.

[0074] 2. de Baar MP, van Dooren MW, de Rooij E, Bakker M, van Gemen B, Goudsmit J, de Ronde A. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr; 39(4):1378-84.

[0075] 3. de Baar MP, Timmermans EC, Bakker M, de Rooij E, van Gemen B, Goudsmit J. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG. *J Clin Microbiol*. 2001 May; 39(5):1895-902.

[0076] 4. Caggana M, Conroy J, Pass K. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Human mutation* 1998; 11:404-409.

[0077] 5. Romppanen E, Mononen I. PCR-oligonucleotide ligation assay from dried blood spots. *Clinical Chemistry* 1999; 45(11):2022-2025.

[0078] 6. Romppanen E. Oligonucleotide ligation assay: applications to molecular diagnosis of inherited disorders. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61:123-130.

[0079] 7. Tzeng CC, Lin SJ, Chen YJ, Kuo PL, Jong YJ, Tsai LP, Chen RM. An effective strategy of using molecular testing to screen mentally retarded individuals for

fragile X syndrome. Diagnostic Molecular Pathology 2001;10:34-40.

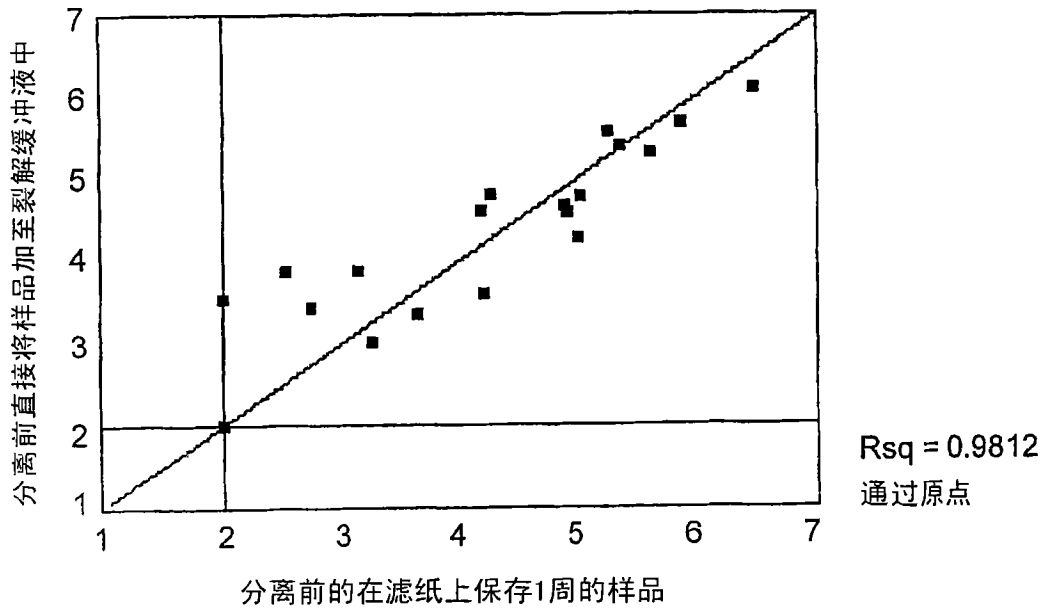


图 1

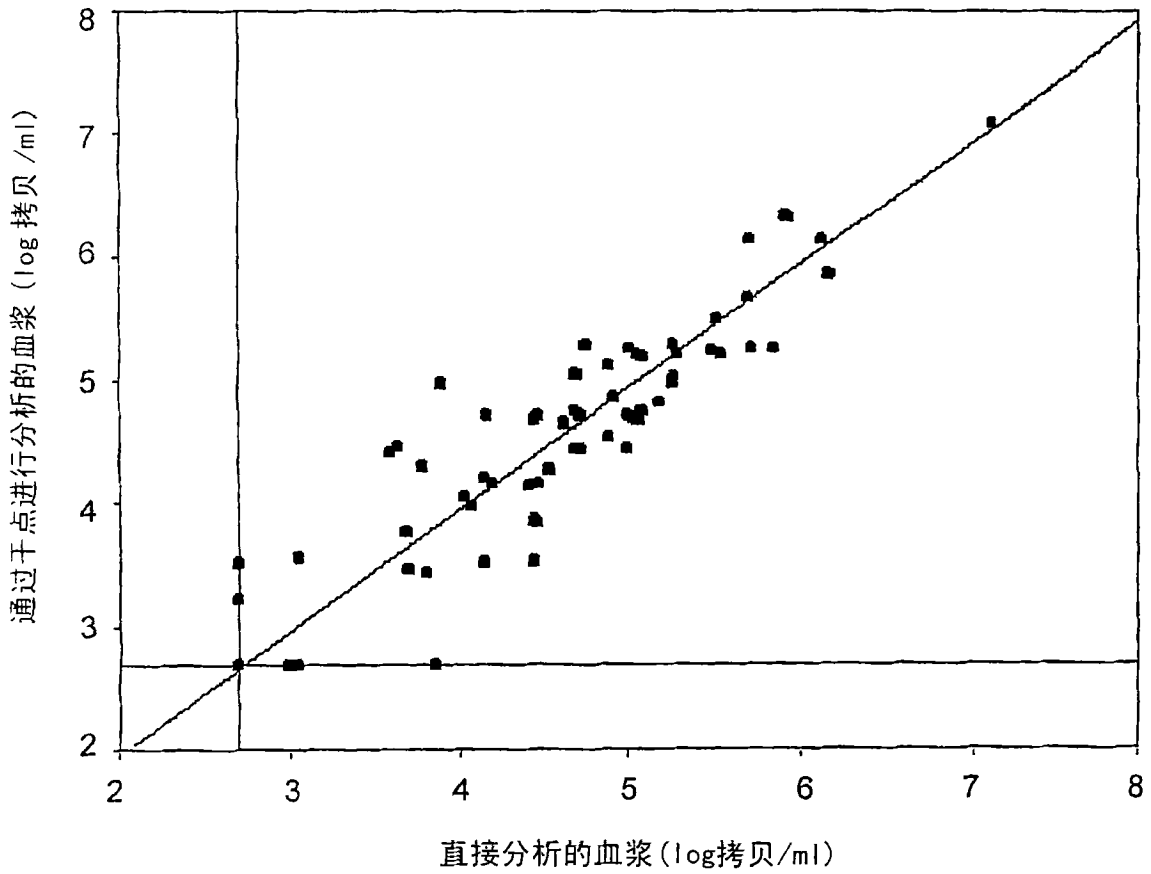


图 2

专利名称(译)	储存并定量加到固相载体上的核酸		
公开(公告)号	CN1665939B	公开(公告)日	2015-08-12
申请号	CN03815771.3	申请日	2003-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	普里马根控股公司		
申请(专利权)人(译)	普里马根控股公司		
当前申请(专利权)人(译)	普里马根控股公司		
[标]发明人	埃斯特雷吉娜德罗伊 马里纳斯彼得鲁斯德巴尔		
发明人	埃斯特·雷吉娜·德罗伊 马里纳斯·彼得鲁斯·德巴尔		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/70 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/703 C12Q1/6806 C12Q2545/114 C12Q2565/518		
代理人(译)	林晓红		
审查员(译)	张丽华		
优先权	2002077697 2002-07-04 EP		
其他公开文献	CN1665939A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测至少一个样品中的目标核酸的方法，包含：将所述样品加到能至少部分吸收所述样品的固相载体上；干燥所述载体；至少将所述载体的有代表性的部分提供给一种核酸分离溶液，使得能从所述载体中提取出所述核酸的有代表性的量；以及测定所述核酸的有代表性的量。采用本发明的方法，可将例如体液样品的样品固定，由此使得能够通过正常的后勤方法将它们从取样地点(例如欠发达国家的当地医院或实验室)起运并运送到世界上其它地方的服务性测定实验室。为了检测低滴度的目标核酸，优选将至少100μl，更优选将至少250μl样品加到固相载体上。在此也提供了用于检测、鉴定和/或定量样品中的目标核酸的试剂盒，其包含能至少部分吸收所述样品的固相载体；以及核酸分离溶液。

患者#	200μl 直接加到裂解 缓冲液的血浆	200μl 直接加到裂解 缓冲液的血液	50μl 血浆斑	200μl 血浆斑	50μl 血液斑	200ul 血液斑
R02-05195	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	LQL
R02-05260	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
R02-05179	3.84	Pos.	Pos.	3.86	Pos.	3.86
R02-05183	LQL	Pos.	Pos.	3.74	Pos.	LQL
R02-05240	3.79	Pos.	Pos.	3.86	Pos.	3.77
R02-05244	3.79	Pos.	Pos.	3.59	Pos.	LQL
R02-05265	3.20	Pos.	Neg.	LQL	Pos.	LQL
R02-05175	5.18	Pos.	Pos.	4.79	Pos.	4.76