



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1661112 B

(45) 授权公告日 2010.07.28

(21) 申请号 200510001641.X

JP 2001095576 A, 2001.04.10, 全文.

(22) 申请日 2005.02.03

审查员 邱福恩

(30) 优先权数据

026996/2004 2004.02.03 JP

(73) 专利权人 东曹株式会社

地址 日本山口县

(72) 发明人 益田昇佳 保川清 堀江隆一

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003215814 A1, 2003.11.20, 全文.

WO 0123607 A2, 2001.04.05, 全文.

WO 0134842 A2, 2001.05.17, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

肠出血性大肠杆菌的志贺菌毒素家族基因的
检测试剂

(57) 摘要

本发明提供了优选用于肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 的 2 型志贺菌毒素家族基因 (stx) 的快速和特异性基因检测试剂的寡核苷酸的组合。更具体地, 本发明提供了用于检测 EHEC 的 stx2 RNA 的方法, 所述方法通过使用具有与 EHEC 的 stx2 基因特异的碱基序列同源或互补的并且位于基因型之间无变化的位点之间的序列引物以及结合 stx2 RNA 的特定位点的寡核苷酸而仅特异扩增 stx2 RNA。

1. 用于检测样品中存在的肠出血性大肠杆菌的 2 型志贺菌毒素家族基因 (stx2) 的检测试剂, 该试剂用于使用 RNA 扩增过程的检测方法, 所述检测方法包括步骤:

使用来自 stx2 的 RNA 的特定序列作为模板, 以及具有与所述特定序列同源的序列的第一引物, 和具有与所述特定序列互补的序列的第二引物, 用 RNA 依赖的 DNA 聚合酶产生 cDNA, 从而形成双链 RNA-DNA, 其中第一引物或者第二引物具有这样的序列, 其中 RNA 聚合酶的启动子序列已经被添加到该引物的 5' 末端;

通过核糖核酸酶 H 降解所述双链 RNA-DNA 的 RNA 部分, 从而产生单链 DNA ; 和

使用所述单链 DNA 作为模板用 DNA 依赖的 DNA 聚合酶产生具有所述启动子的双链 DNA, 其中所述启动子能够转录为由所述 RNA 特定序列组成的 RNA, 或转录为与所述 RNA 特定序列互补的序列 ; 其中,

双链 DNA 在 RNA 聚合酶存在下产生 RNA 转录产物, 所述 RNA 转录产物作为随后用 RNA 依赖的 DNA 聚合酶进行 cDNA 合成的模板 ;

该试剂包含第一引物和第二引物, 其中第一引物为由 SEQ. ID No. 1 所示序列组成的寡核苷酸 ; 第二引物为由 SEQ. ID No. 2 所示序列组成的寡核苷酸。

2. 根据权利要求 1 的检测试剂, 其中在荧光嵌入染料标记的寡核苷酸存在下进行所述 RNA 扩增过程, 并且通过测定反应液的荧光强度检测肠出血性大肠杆菌 ; 其中所述寡核苷酸的序列与 RNA 转录产物的序列的至少一部分互补, 并且在所述寡核苷酸与所述 RNA 转录产物存在互补结合的情况下, 反应液的荧光特征与没有复合体形成的情况相比发生改变。

3. 权利要求 2 的检测试剂, 其中嵌入荧光染料标记的寡核苷酸由 SEQ. ID No. 3 中所示序列的至少 10 个相邻碱基组成。

肠出血性大肠杆菌的志贺菌毒素家族基因的检测试剂

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及临床检查、公共健康检查、食物评价和食物中毒检查中检测肠出血性大肠杆菌的检测试剂。

[0003] 现有技术

[0004] 志贺菌毒素家族 (stx) 是肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 如病原性大肠杆菌 0157 产生的烈性毒素。与 EHEC 感染相关的主要症状包括水样稀便, 继之发生严重的腹部疼痛和血性便。此外, 一些受感染的人发生导致溶血性尿毒症 (HUS) 和脑病的并发症, 已经报导这在最坏情况下导致死亡。

[0005] 尽管 EHEC 的血清型非常不同, 有超过 60 种血清型, 但是按照检测频率最常见的血清型是 0157:H7。此外, 基于抗原性的不同, stx 还被广义上分为 1 型 (stx1) 或 2 型 (stx2)。

[0006] 尽管 0157 抗原试验和其他试验是检测和鉴定 EHEC 的公知方法, 但是扩增 EHEC 基因中和来自所述基因的 RNA 中存在的特定序列后检测所述序列的方法在灵敏性、速度和操作的容易性方法是优选的。在恒温扩增目标核酸的方法在试验系统的自动化方面是尤其优选的。

[0007] 发明公开

[0008] 已经报导了检测和鉴定 EHEC 的一种方法, 其中在相对低的温度 (41°C) 特异扩增来自 stx1 和 stx2 的 RNA (日本特开 2002-253257)。在该方法中, 使用了一种 RNA 扩增方法, 该方法包括步骤: 使用来自 stx1 或 stx2 的 RNA 的特定序列作为模板, 以及具有与所述特定序列互补的序列的第一引物, 和具有与所述特定序列同源的序列的第二引物, 用 RNA 依赖的 DNA 聚合酶产生 cDNA, 从而形成双链 RNA-DNA, 其中第一引物或第二引物具有这样的序列, 其中 RNA 聚合酶的启动子序列被加到引物之一的 5' 末端, 通过核糖核酸酶 H 降解双链 RNA-DNA 的 RNA, 从而产生单链 DNA, 并用 DNA 依赖的 DNA 聚合酶使用所述单链 DNA 作为模板产生具有这样启动子的双链 DNA, 所述启动子能够转录为由所述 RNA 序列组成的 RNA, 或转录为与所述 RNA 序列互补的序列, 其中所述双链 DNA 在 RNA 聚合酶存在下产生 RNA 转录产物, 所述 RNA 转录产物作为随后用 RNA 依赖的 DNA 聚合酶进行 cDNA 合成的模板。此外, 在荧光嵌入染料标记的寡核苷酸存在下实施 RNA 扩增方法, 其中所述寡核苷酸的序列与 RNA 转录产物的序列的至少一部分互补, 并且在所述寡核苷酸与所述 RNA 转录产物存在互补结合的情况下, 反应液的荧光特征与没有复合体形成的情况相比发生改变, 从而, 可以通过测量反应液的荧光强度进行检测。

[0009] 然而, 上面提到的方法在灵敏性和速度方面有问题。根据日本特开 2002-253257, 对于 stx2 RNA 的最初量为 10^2 份拷贝的情况, 检测时间为约 17 分钟, 这比使用 stx1 RNA 检测试剂的检测时间慢 (在约 14 分钟检测 stx1 RNA 的 10^2 份拷贝) (见实施例 1)。此外, 上面提到的方法的第二引物可能具有基因型中差异导致的碱基序列错配, 并且认为携带具有错配的基因型的 EHEC 导致更长的检测时间或者不能被检测到 (参考图 1)。

[0010] 因此, 本发明的目的是提供与基因型差异无关的具有更好的速度和特异性的 stx2 RNA 的检测试剂。

[0011] 作为对具有更好的速度和特异性的EHEC stx2 RNA的检测试剂开发的深入研究的结果,本发明的发明人开发了能够解决错配问题(见图1)和基于不同基因型中没有改变的位点设计寡核苷酸在约14分钟检测 10^2 份拷贝的stx2 RNA的最初量的试剂。

[0012] 本发明涉及用于检测样品中存在的肠出血性大肠杆菌的2型志贺菌毒素家族基因(stx2)的检测试剂,该试剂用于使用RNA扩增方法的检测法,该方法包括步骤:

[0013] 使用来自stx2的RNA的特定序列作为模板,以及具有与所述特定序列同源的序列的第一引物,和具有与所述特定序列互补的序列的第二引物,用RNA依赖的DNA聚合酶产生cDNA,从而形成双链RNA-DNA,其中第一引物或者第二引物具有这样的序列,其中RNA聚合酶的启动子序列已经被添加到该引物的5'末端;

[0014] 通过核糖核酸酶H降解所述双链RNA-DNA的RNA部分,从而产生单链DNA;和

[0015] 使用所述单链DNA作为模板用DNA依赖的DNA聚合酶产生具有这样启动子的双链DNA,所述启动子能够转录为由所述RNA特定序列组成的RNA,或转录为与所述RNA特定序列互补的序列;其中,

[0016] 双链DNA在RNA聚合酶存在下产生RNA转录产物,所述RNA转录产物作为随后用RNA依赖的DNA聚合酶进行cDNA合成的模板;

[0017] 其中试剂含有,作为第一引物,由SEQ. ID No. 1所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸,或者为这样的寡核苷酸,其中由SEQ. ID No. 1所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸中的一个或多个核苷酸被缺失、替换或者添加并且能够特异结合与该特定序列互补的序列,或者在高严格条件下与该由SEQ. ID No. 1所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸杂交并且能够特异结合与该特定序列互补的序列的寡核苷酸;和作为第二引物,由SEQ. ID No. 2所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸,或者为这样的寡核苷酸,其中由SEQ. ID No. 2所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸的一个或多个核苷酸被缺失、替换或者添加并且能够特异结合与该特定序列互补的序列,或者在高严格条件下与该由SEQ. ID No. 2所示序列的至少10个相邻碱基组成的寡核苷酸杂交并且能够特异结合与该特定序列互补的序列的寡核苷酸。

[0018] 高严格杂交条件指任何杂交条件并且,例如,为下面的实例中所指的条件,由在60mM Tris、17mM氯化镁、100-150mM氯化钾和1mM DTT存在下在41℃到44℃的温度下进行杂交组成。

[0019] 此外,对于旨在检测与来自stx2的RNA互补的RNA的情况,具有与上面提到的第一引物互补的序列并且其序列从5'末端到3'末端被颠倒的寡核苷酸应该被用作第一引物,具有与上面提到的第二引物互补的序列并且其序列从5'末端到3'末端被颠倒的寡核苷酸应该被用作第二引物。

[0020] 优选地,在切割用寡核苷酸的存在下进行前述RNA扩增方法,该切割用寡核苷酸在前述特定序列的5'末端切割前述目标RNA并且具有与所述特定序列的5'末端相邻并重叠的区域互补的序列。

[0021] 在一个优选的方面,前述第一引物是SEQ. ID No. 1中所示序列的寡核苷酸。

[0022] 在另一优选的方面,前述第二引物是SEQ. ID No. 2中所示序列的寡核苷酸。

[0023] 在更优选的方面,前述第一引物是SEQ. ID No. 1中所示序列的寡核苷酸,并且前述第二引物是SEQ. ID No. 2中所示序列的寡核苷酸。

[0024] 在另一优选的方面,在荧光嵌入染料标记的寡核苷酸存在下进行前述 RNA 扩增过程,并且通过测量反应液的荧光强度进行 EHEC 的检测。这里,所述寡核苷酸的序列与 RNA 转录产物的序列的至少一部分互补,并且在所述寡核苷酸与所述 RNA 转录产物的互补结合存在的情况下,反应液的荧光特征与没有复合体形成的情况相比发生改变。

[0025] 优选地,前述荧光嵌入染料标记的寡核苷酸由 SEQ. ID No. 3 中所示至少 10 个相邻碱基组成。

[0026] 使用本申请发明的检测试剂的检测方法用于检测肠出血性大肠杆菌的 stx2 RNA,而与基因型的差异无关,该检测方法比现有技术中的方法(日本特开 2002-253257)更快并且有更高的特异性。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 显示了实施例 1 和实施例 2 中所用检测 stx2 RNA 的每一寡核苷酸的结合位点以及 RNA 扩增区和三种 stx2 基因的外围碱基序列(见 Ito 等, Microbial Pathogenesis 8, 47-60(1990) 和 GenBank No. X07865)。碱基序列中用“-”指出的位点表示与 GeneBank No. X07865 的碱基序列相同的位点。本申请的发明中所用的所有寡核苷酸都基于基因型之间没有改变的位点设计。

[0029] 图 2(A) 显示了随着反应时间和 RNA 产物的增加(最初 stx1 RNA 量从 10^2 个拷贝/实施例 1 中进行的试验到 10^5 个拷贝/实施例 1 中进行的试验)荧光强度的比率图(stx1 的荧光强度图), (B) 显示了随着反应时间和 RNA 产物的增加(最初 stx2 RNA 量从 10^2 个拷贝/实施例 1 中进行的试验到 10^5 个拷贝/实施例 1 中进行的试验)荧光强度的比率图(stx2 的荧光强度图)。“Nega”指其中使用稀释剂代替 RNA 样品的样品。在约 14 分钟检测到 10^2 个 stx1 RNA 拷贝,而约 17 分钟检测到 10^2 个 stx2 RNA 拷贝,并且指出 stx2 RNA 的检测时间比 stx1 RNA 的检测时间长。

[0030] 图 3(C) 显示了在最初 RNA 量的对数值和从 10^2 份拷贝/在实施例 1 中进行的试验到 10^5 份拷贝/实施例 1 中进行的试验的最初 stx1 RNA 量的上升时间之间得到的校正曲线(stx1 的校正曲线),和 (D) 显示了在最初 RNA 量的对数值和从 10^2 份拷贝/在实施例 1 中进行的试验到 10^5 份拷贝/实施例 1 中进行的试验的最初 stx2 RNA 量的上升时间之间得到的校正曲线(stx2 的校正曲线)。

[0031] 图 4(A) 显示了随着反应时间和 RNA 的产生(最初 stx2 RNA 量为从 10^2 份拷贝/在实施例 2 中进行的试验到 10^5 份拷贝/在实施例 2 中进行的试验)荧光强度比率图(stx2 的荧光强度图),和 (B) 显示了最初 RNA 量的对数值和上升时间之间得到的校正曲线(stx2 的校正曲线)。“Nega”指其中用稀释剂代替 RNA 样品的样品。在约 14 分钟检测到 stx2 RNA 的 10^2 份拷贝,表明与现有技术的方法相比更短的检测时间(日本特开 2002-253257)。

[0032] 下面提供了本发明的详细说明。

[0033] 实施本发明的最佳模式

[0034] 下面提供了本发明的详细说明。

[0035] 在本发明中,尽管序列表中每个所列碱基序列的全长可分别用于第一和第二引物,但是由于约 10 个碱基已足够特异结合到特定核酸序列等,所以也可以使用由每一序列中至少 10 个相邻碱基组成的寡核苷酸的组合。

[0036] 本发明的扩增方法包括 NASBA 方法、3SR 方法和 TRC 方法(见例如,日本特开

2000-014400), 本发明的扩增方法通过反转录酶和 RNA 聚合酶的协同作用扩增 stx2 RNA 序列 (通过在反转录酶和 RNA 聚合酶协同作用的条件下使它们反应)。这里, 尽管对温度没有特定限制, 但是优选 35 到 50°C。

[0037] 在本申请的前述发明的一个方面, 目标 RNA 必须在特定序列的 5' 末端被切割。以这种方式切割该目标 RNA 的一个优选方法由通过加入具有与和该特定序列的 5' 末端相邻并重叠的区域互补的序列的寡核苷酸 (切割用寡核苷酸), 用核糖核酸酶 H 等切割目标 RNA 组成。这里, 重叠碱基的数目尤其优选为 5 或 6 个碱基。在所述切割用寡核苷酸中, 3' 末端羟基优选被化学修饰并且, 例如, 可以被胺化, 以抑制从 3' 末端的延伸反应。

[0038] 尽管在前述核酸扩增方法中得到的扩增产物可以用公知的核酸检测方法检测, 但是在该方法的一个优选方面, 优选在嵌入荧光染料标记的寡核苷酸存在下进行前述核酸扩增, 然后测定反应液的荧光特征的变化。在所述寡核苷酸中, 由于嵌入荧光染料通过衔接子结合该寡核苷酸中的磷原子, 与目标核酸形成双链的嵌合部分 (互补核酸) 而嵌入到双链部分, 导致荧光特征的改变, 从而导致不需要分离并分析的特征 (Ishiguro, T. 等 (1996) Nucleic Acid Res. 24(24) 4992-4997)。

[0039] 被所述寡核苷酸结合的序列可以是对 stx2 RNA 特异的任何序列, 虽然对其没有特定限制, 但是优选由 SEQ. ID No. 3 中所示序列中至少 10 个连续碱基组成的序列或其互补序列。此外, 所述寡核苷酸的 3' 末端的羟基优选被化学修饰以抑制通过使用该寡核苷酸作为引物可能发生的延伸反应, 其一个实例是日本特开 2000-316587 中描述的方法。

[0040] 结果, 可以在单个试管中, 在恒温下一步快速并具有高度特异性地扩增和检测 EHEC 的 stx2 RNA, 从而方便了自动化应用。

[0041] 实施例

[0042] 尽管下面通过实施例提供了对申请的发明的更详细说明, 但是本发明不被这些实施例所限制。

[0043] 实施例 1

[0044] 使用日本特开 2002-253257 中描述的寡核苷酸的组合检测了不同拷贝数的肠出血性大肠杆菌 (EHEC) stx1 RNA 和 stx2 RNA。

[0045] (1) 将含有 EHEC stx1 RNA 的碱基编号 228 到 1558 (RNA 的碱基编号根据 Calderwoods 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(13), 4364-4368 (1997), GeneBank No. M16625) 的标准 RNA 样品 (1337 个碱基) 通过 260nm 处紫外吸收定量, 然后用 RNA 稀释剂 (10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.25U/ μ L RNase 抑制剂) (TakaraBio)) 从 10^5 个拷贝/ 5μ L 稀释到 10^2 个拷贝/ 5μ L。仅仅稀释剂用于对照组 (阴性对照)。

[0046] (2) 将含有 EHEC stx2 RNA 的碱基编号 125 到 1479 (RNA 的碱基编号根据 GeneBank No. X07865) 的标准 RNA 样品 (1361 个碱基) 通过 260nm 处紫外吸收定量, 然后用 RNA 稀释剂 (10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.25U/ μ L RNase 抑制剂) (Takara Bio)) 从 10^5 个拷贝/ 5μ L 稀释到 10^2 个拷贝/ 5μ L。仅仅稀释剂用于对照组 (阴性对照)。

[0047] (3) 具有下面指出的组分的 20μ L 反应液置于 0.5mL PCR 管 (GeneAmp 薄壁反应管, Applied Biosystems), 然后向其中加入 5μ L 前述 RNA 样品。此外, 制备溶液制得了第一引物、第二引物、切割用寡核苷酸和用嵌入染料标记的寡核苷酸的组合如表 1 中所示的

组合。

[0048] 反应液的组分（浓度以 30 μ L 最终反应液体积中的浓度显示）

[0049] 60mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.6)

[0050] 17mM 氯化镁

[0051] 100mM 氯化钾（对于 stx1）或

[0052] 150mM 氯化钾（对于 stx2）

[0053] 6U RNase 抑制剂

[0054] 1mM DTT

[0055] 0.25mM 每一种 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP

[0056] 3.6mM ITP

[0057] 3.0mM 每一种 ATP、CTP、GTP 和 UTP

[0058] 0.16 μ M 切割用寡核苷酸

[0059] 1.0 μ M 第二引物

[0060] 1.0 μ M 第一引物

[0061] 25nM 嵌入染料标记的寡核苷酸

[0062] 13% DMSO

[0063] 用于调节体积的蒸馏水

[0064] (3) 在 44°C（对 stx1）或 41°C（对 stx2）孵育前述反应液 5 分钟后，加入具有下面指出的组分并在 44°C（对 stx1）或 41°C（对 stx2）预热 2 分钟的 5 μ L 酶溶液。

[0065] 酶溶液的组分（值以 30 μ L 最终反应液体积中的浓度显示）

[0066] 2.0% 山梨糖醇

[0067] 3.6 μ g 牛血清白蛋白

[0068] 142U T7 RNA 聚合酶 (Invitrogen)

[0069] 6.4U AMV 反转录酶 (LifeScience)

[0070] 用于调节体积的蒸馏水

[0071] (4) 随后，使用具有温度控制功能并且能够直接测量 PCR 管的荧光分光光度计，在激发波长 470nm 和荧光波长 520nm 下，随时间测量每个 PCR 管中的反应液（这些反应液在 44°C（对 stx1）或 41°C（对 stx2）被孵育）。

[0072] 通过将酶的加入时间设定为 0 分钟，stx1 和 stx2 样品的荧光强度比率（预定时间的荧光强度值 + 背景荧光强度值）的随时间的变化在图 2(A) 和 2(B) 中显示。此外，在图 3(C) 和 3(D) 中显示了 stx1 和 stx2 样品的对最初 RNA 量和“上升时间”（荧光比率增加到阴性对照样品的平均值加上 3 个标准误的和的 1.2 倍所需要的时间）之间的关系所得结果。此外，对于 tx1 和 tx2，最初的 RNA 量为 10^2 个拷贝 / 试验到 10^5 个拷贝 / 试验。

[0073] 根据图 2，在约 14 分钟检测到 stx1 RNA 的 10^2 个拷贝，在约 17 分钟检测到 stx2 RNA 的 10^2 个拷贝。根据这些结果，日本特开 2002-253257 中描述的使用寡核苷酸组合检测 stx2 RNA 表明了与用于检测 stx1 RNA 的那些寡核苷酸组合相比更慢的检测时间。

[0074] 表 1

组合	切割用寡核苷酸	第一引物	第二引物	用嵌入染料标记的寡核苷酸
用于 stx1RNA 检测	VT1-5S	VT1-5F	VT1-6R	Y0-VT1-S-G
用于 stx2RNA 检测	VT2-5S	VT2-5F	VR2-7R	Y0-VT2-S-G

[0075] 表 1 显示了用于实验体系的第一引物、第二引物、切割用寡核苷酸和用嵌入染料标记的寡核苷酸的组合。在图 1 中显示了检测 stx2 所用的每一种寡核苷酸组合相应于 EHEC 的 stx2 RNA 中寡核苷酸的位点。切割用寡核苷酸的碱基序列的 3' 末端羟基被胺化。从第一引物的碱基序列的 5' 末端开始的 1 位“A”到 22 位“A”的区域是 T7 启动子区,随后的从 23 位“G”到 28 位“A”的区域是增强子序列。用嵌入染料标记的寡核苷酸在 Y0-VT1-S-G (SEQ. ID No. 9) 的 5' 末端的 6 位“C”和 7 位“G”之间,和在 Y0-VT2-S-G (SEQ. ID No. 3) 的 5' 末端的 12 位“T”和 13 位“A”之间的磷原子处用嵌入染料标记,3' 末端的羟基用乙二醇基团修饰。

[0076] 切割用寡核苷酸:

[0077] VT1-5S (SEQ. ID No. 4)

[0078] VT2-5S (SEQ. ID No. 5)

[0079] 第一引物:

[0080] VT1-5F (SEQ. ID No. 6)

[0081] VT2-5F (SEQ. ID No. 7)

[0082] 第二引物:

[0083] VT1-6R (SEQ. ID No. 8)

[0084] VT2-7R (SEQ. ID No. 2)

[0085] 嵌入染料标记的寡核苷酸:

[0086] Y0-VT1-S-G (SEQ. ID No. 9)

[0087] Y0-VT2-S-G (SEQ. ID No. 3)

[0088] 实施例 2

[0089] 使用本申请发明的寡核苷酸的组合检测不同最初拷贝数的 EHEC 的 stx2 RNA。

[0090] (1) 类似于实施例 1,用 RNA 稀释剂 (10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.25U/ μ L RNase 抑制剂) (Takara Bio)) 将 EHEC 的 stx2 RNA 从 10^5 个拷贝/ 5μ L 稀释到 10^2 个拷贝/ 5μ L。仅仅稀释剂用于对照组 (阴性对照)。

[0091] (2) 将具有下面指出的组分的 20 μ L 反应液置于 PCR 管 (体积:0.5mL, GeneAmp 薄壁反应管, Applied Biosystems) 中,然后向其中加入 5 μ L 前述 RNA 样品。

[0092] 反应液的组分 (浓度以 30 μ L 的最终反应液体积中的浓度显示)

[0093] 60mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.6)

[0094] 18mM 氯化镁

[0095] 100mM 氯化钾

[0096] 6U RNase 抑制剂

- [0097] 1mM DTT
- [0098] 0.25mM 每一种 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP
- [0099] 3.6mM ITP
- [0100] 3.0mM 每一种 ATP、CTP、GTP 和 UTP
- [0101] 0.16 μ M 切割用寡核苷酸 (VT2-12S, SEQ. ID No. 10 ;其 3' 末端羟基被胺化)
- [0102] 1.0 μ M 第一引物 (VR2-12F, SEQ. ID No. 11)
- [0103] 1.0 μ M 第二引物 (VT2-7R, SEQ. ID No. 2)
- [0104] 25nM 嵌入染料标记的寡核苷酸 (Y0-VT2-S-G, SEQ. ID No. 3, 在 5' 末端的 12 位“T”和 13 位“A”之间的磷原子处用嵌入荧光染料标记, 并且其 3' 末端的羟基被乙二醇基团标记。)
- [0105] 13% DMSO
- [0106] 用于调节体积的蒸馏水
- [0107] (3) 将前述反应液在 43℃ 孵育 5 分钟后, 加入具有下面指出的组分并在 43℃ 预热 2 分钟的酶溶液。
- [0108] 酶溶液的组分 (值以 30 μ L 最终反应液体积中的浓度显示)
- [0109] 2.0% 山梨糖醇
- [0110] 3.6 μ g 牛血清白蛋白
- [0111] 142U T7 RNA 聚合酶 (Invitrogen)
- [0112] 6.4U AMV 反转录酶 (LifeScience)
- [0113] 用于调节体积的蒸馏水
- [0114] (4) 随后, 使用具有温度控制功能并且能够直接测量 PCR 管的荧光分光光度计, 在激发波长 470nm 和荧光波长 520nm 下, 于 43℃ 孵育时随时间测量每个 PCR 管中的反应液。
- [0115] 通过将酶的加入时间设定为 0 分钟, 样品的荧光强度比率 (预定时间的荧光强度值 + 背景荧光强度值) 的随时间的变化在图 4(A) 中显示。此外, 在图 4(B) 中显示了从最初 RNA 量和“上升时间” (荧光比率增加到阴性对照样品的平均值加上 3 个标准误的 1.2 倍所需要的时间) 之间的关系所得结果。此外, 最初的 RNA 量为 10^2 个拷贝 / 试验到 10^5 个拷贝 / 试验。
- [0116] 根据图 4, 在约 14 分钟检测到 10^2 个拷贝, 表明检测比现有技术的方法更快 (日本特开 2002-253257 和实施例 1)。此外, 由于本申请的发明中所用的所有寡核苷酸都基于基因型之间没有改变的位点设计 (见图 1), 所以认为本申请发明的检测方法在特异性方面也优于现有技术 (日本特开 2002-253257) 的方法。
- [0117] 工业可应用性
- [0118] 如上面已经解释的, 本申请的发明的检测方法可用于检测肠出血性大肠杆菌的 stx2 RNA, 而与基因型的差异无关, 比现有技术 (日本特开 2002-253257) 中的方法更快且具有更高特异性。
- [0119] 本申请的发明的寡核苷酸不限于序列中所列的碱基序列 (具有 20 到 23 个碱基), 而是可以由这些序列中至少 10 个相邻碱基组成的核苷酸。这是因为很明显约 10 个碱基的碱基序列在相对低温 (优选 43℃) 条件下足以保证对引物或探针的目标核酸的特异性。

[0120] 本领域技术人员将明白尽管将本发明与特定实施方案和实施例一起描述,但是本发明不一定被如此限制并且可以得到与这些实施方案、实施例和用途相偏离但不脱离本申请的发明范围的多种其他实施方案、实施例、用途、修改方案。

[0121] 序列表

[0122] <110> 东曹株式会社

[0123] <120> 肠出血性大肠杆菌的志贺菌毒

[0124] 素家族基因的检测试剂

[0125] <130>R003

[0126] <150>JP 2004-026996

[0127] <151>2004-02-03

[0128] <160>11

[0129] <210>1

[0130] <211>23

[0131] <212>DNA

[0132] <213> 人工序列

[0133] <220>

[0134] <223>VT2-12F-T7

[0135] <400>1

[0136] ataccactct gcaacgtgtc gca 23

[0137] <210>2

[0138] <211>20

[0139] <212>DNA

[0140] <213> 人工序列

[0141] <220>

[0142] <223>VT2-7R

[0143] <400>2

[0144] gtaaggcttc tgctgtgaca 20

[0145] <210>3

[0146] <211>20

[0147] <212>DNA

[0148] <213> 人工序列

[0149] <220>

[0150] <223>Y0-VT2-S-G

[0151] <400>3

[0152] ttaacgccag atatgatgaa 20

[0153] <210>4

[0154] <211>39

[0155] <212>DNA

[0156] <213> 人工序列

[0157]	<220>	
[0158]	<223>VT1-5S	
[0159]	<400>4	
[0160]	aaaaaacatt attgtcctg ttaacaaatc ctgtcacat	39
[0161]	<210>5	
[0162]	<211>39	
[0163]	<212>DNA	
[0164]	<213> 人工序列	
[0165]	<220>	
[0166]	<223>VT2-5S	
[0167]	<400>5	
[0168]	tagaaagtat ttgttgccgt attaacgaac ccggccaca	39
[0169]	<210>6	
[0170]	<211>53	
[0171]	<212>DNA	
[0172]	<213> 人工序列	
[0173]	<220>	
[0174]	<223>VT1-5F	
[0175]	<400>6	
[0176]	aattctaata cgactcacta tagggagatt tttatcgctt tgctgatttt tca	53
[0177]	<210>7	
[0178]	<211>53	
[0179]	<212>DNA	
[0180]	<213> 人工序列	
[0181]	<220>	
[0182]	<223>VT2-5F	
[0183]	<400>7	
[0184]	aattctaata cgactcacta tagggagatt ctaccgtttt tcagatttta cac	53
[0185]	<210>8	
[0186]	<211>20	
[0187]	<212>DNA	
[0188]	<213> 人工序列	
[0189]	<220>	
[0190]	<223>VT1-6R	
[0191]	<400>8	
[0192]	tggcgattta tctgcatccc	20
[0193]	<210>9	
[0194]	<211>20	
[0195]	<212>DNA	

[0196]	<213> 人工序列	
[0197]	<220>	
[0198]	<223>Y0-VT1-S-G	
[0199]	<400>9	
[0200]	tgtaacgtgg tatagctact	20
[0201]	<210>10	
[0202]	<211>24	
[0203]	<212>DNA	
[0204]	<213> 人工序列	
[0205]	<220>	
[0206]	<223>VT2-12S	
[0207]	<400>10	
[0208]	tggtataact gctgtccgtt gtca	24
[0209]	<210>11	
[0210]	<211>51	
[0211]	<212>DNA	
[0212]	<213> 人工序列	
[0213]	<220>	
[0214]	<223>VT2-12F	
[0215]	<400>11	
[0216]	aattctaata cgactcacta tagggagaat accactctgc aacgtgtcgc a	51

GenBank X07865	521	: CAAAATAATTTATATgTggCCgggTTCgTTAATACggCAA	: 560
slt-II	519	: -----A-----	: 558
slt-IIv	519	: -g-----T-A-T-----A---	: 558
ACACCggCCCAAgCAATTATgCCgTT			
VT2-5F (SEQ ID NO:7) TCTACCgTTTTTCAgATTTTACAC			
GenBank X07865	561	: CAAATACTTTCTACCgTTTTTCAgATTTTACACATATATC	: 600
slt-II	559	: -----	: 598
slt-IIv	559	: -----A-A-----g-----	: 598
gTTTATgAAAgAT VT2-5S (SEQ ID NO:5)			
GenBank X07865	601	: AgTgCCCggTgTgACAACggTTTCCATgACAACggACAgC	: 640
slt-II	599	: -----	: 638
slt-IIv	599	: -T-----TA-----	: 638
VT2-12S (SEQ ID NO:10) ACTgTTgCCTgTCg			
ATACCACTCTgCAACgTgTCgCA VT2-12F (SEQ ID NO:1,11)			
GenBank X07865	641	: AgTTATACCACTCTgCAACgTgTCgCAgCgCTggAACgTT	: 680
slt-II	639	: -----	: 678
slt-IIv	639	: -----	: 678
TCAATATggT			
GenBank X07865	681	: CCggAATgCAAATCAGTCgTCACTCACTggTTTCATCATA	: 720
slt-II	679	: -----	: 718
slt-IIv	679	: -----	: 718
AAgTAgTAT			
GenBank X07865	721	: TCTggCgTTAATggAgTTCAGtggtAATACAATgACCagA	: 760
slt-II	719	: -----	: 758
slt-IIv	719	: -----	: 758
AgACCgCAATT Y0-VT2-S-G (SEQ ID NO:3)			
GenBank X07865	761	: gATgCATCCAgAgCAGTTCTgCgTTTTgTCACTgTCACAg	: 800
slt-II	759	: -----	: 798
slt-IIv	759	: -----A-----	: 798
ACAgTgTC			
GenBank X07865	801	: CAgAAGCCTTACgCTTCAGgCAGATACAgAgAgAATTTcg	: 840
slt-II	799	: -----	: 838
slt-IIv	799	: -----g-----A-----T-----	: 838
gTCTTCggAATg VT2-7R (SEQ ID NO:2)			

图 1

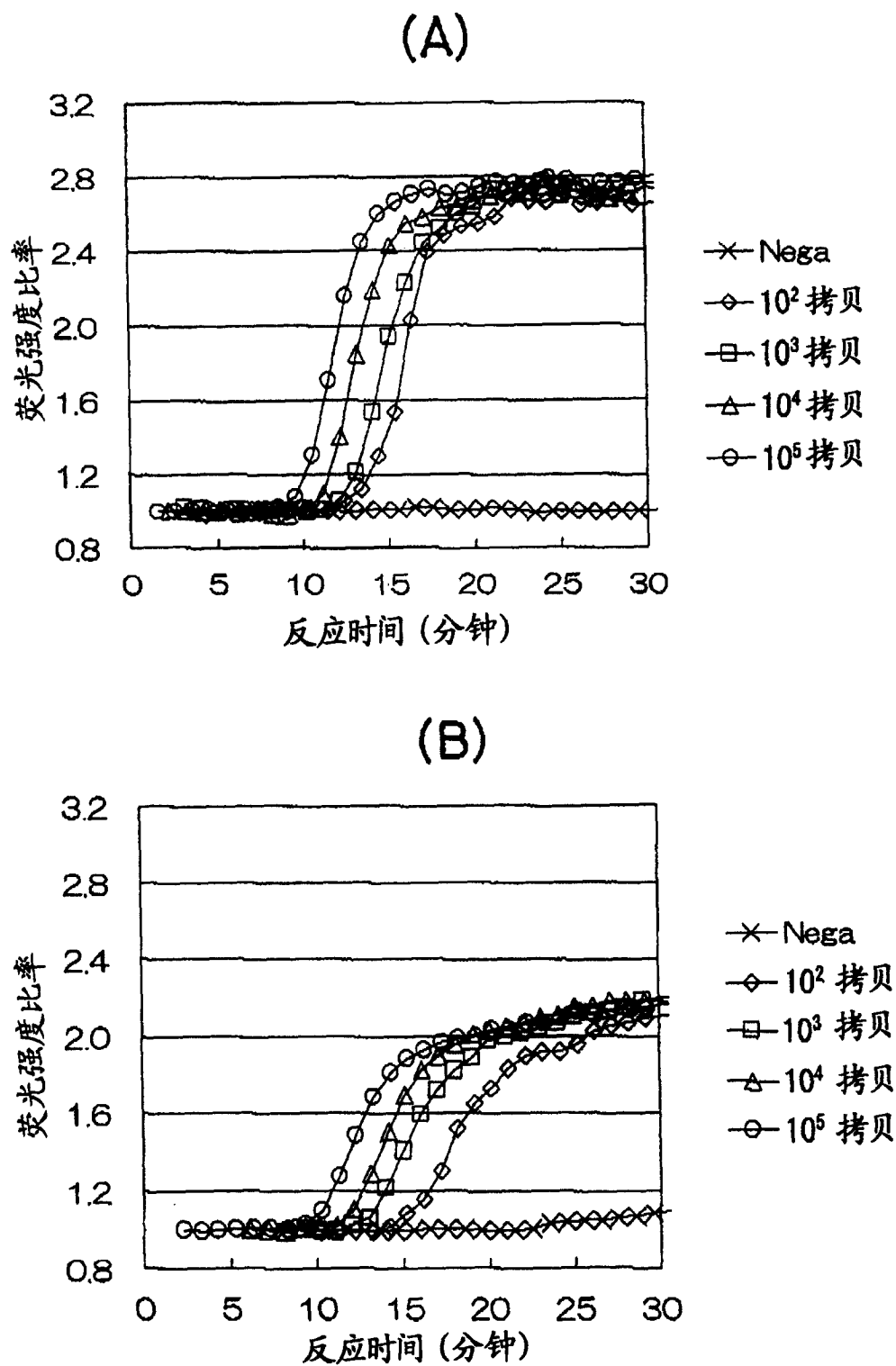


图 2

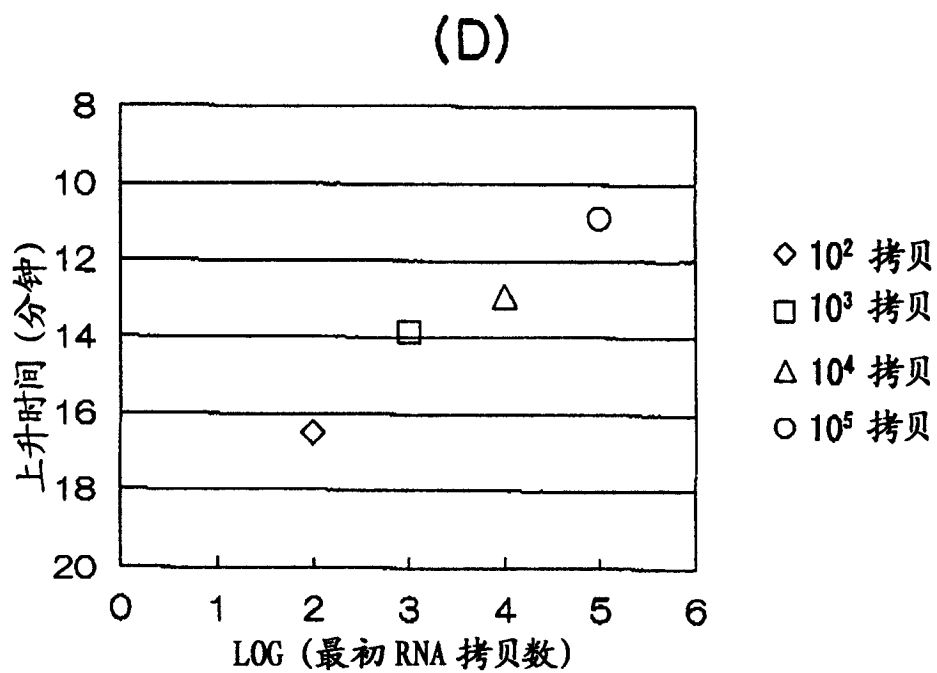
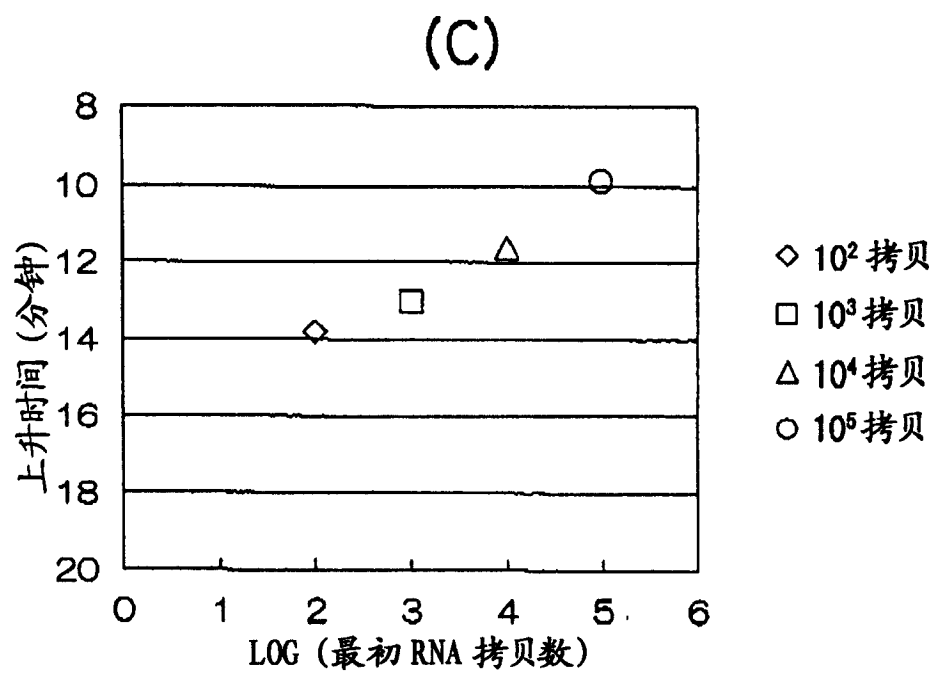


图 3

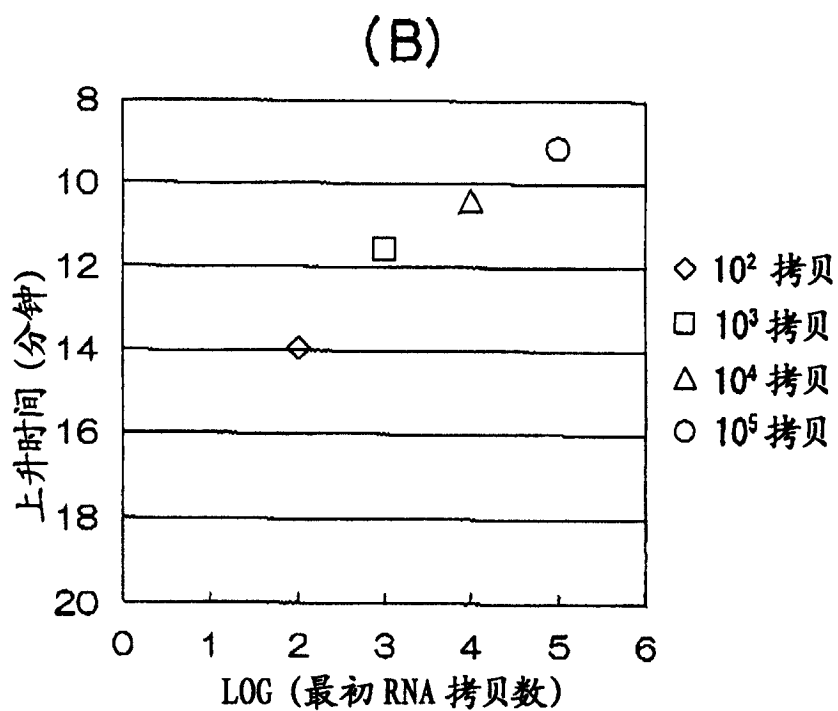
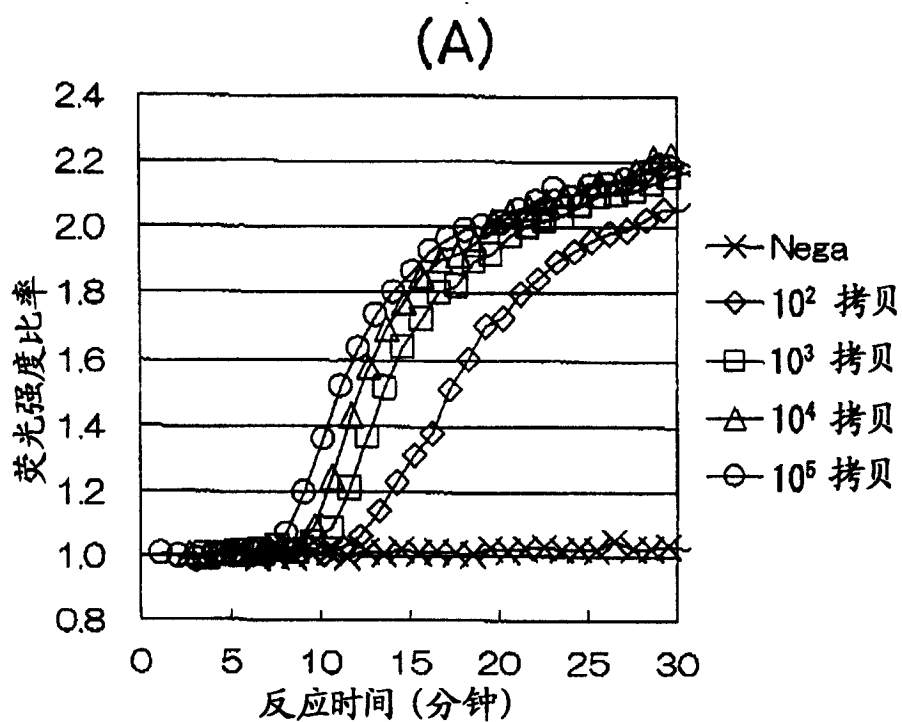


图 4