



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103403191 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201180068515. X

(22) 申请日 2011. 12. 21

(30) 优先权数据

61/427404 2010. 12. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/066392 2011. 12. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/092054 EN 2012. 07. 05

(83) 生物保藏信息

PTA-11553 2010. 12. 21

(73) 专利权人 伊莱利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 D. W. 维斯 J. R. 哈里斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 李炳爱

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0139801 A2, 2001. 06. 07,

WO 2004073737 A1, 2004. 09. 02,

CN 101696453 A, 2010. 04. 21,

Robert W. Fulton et al.. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. 《JAVMA》. 2006, 第 228 卷(第 4 期), 578-584.

李天松. 1BVDV 荧光 RT-PCR 检测方法的建立

和初步应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2006, (第 3 期), 第 16 页 1. 2. 3 节.

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书30页
序列表6页

(54) 发明名称

鉴定和区分多价船运热疫苗的病毒成分的组合物与方法

(57) 摘要

本文公开了用于鉴定生物样品、特别是兽医来源的样品中病毒特有的多核苷酸序列的方法和组合物。还公开了可用于检测一种或多种病毒来源的哺乳动物病原体的一种或多种特定的种、毒株、类型或亚型的存在情况的寡核苷酸引物对和标记的寡核苷酸检测探针,以及包含病毒特异性引物和标记的检测探针的系统、诊断试剂盒和制造品,包括可用于鉴定多价疫苗的病毒成分和定量测定包括家畜疫苗的特定减毒活病毒的效价的系统、诊断试剂盒和制造品。在某些实施方案中,实时定量 PCR 方法已被用来鉴定和区分多价牛科动物船运热疫苗中牛病毒性腹泻病毒的 3 种已知遗传亚型(BVDV-1a、BVDV-1b 和 BVDV-2)。

1. 一种适用于检测多个减毒活病毒颗粒内如若存在的BVDV-1b病毒特异性核酸的组合物,所述组合物包含:

- (a) 第一病毒特异性寡核苷酸扩增引物,其由SEQ ID NO:1的核苷酸序列组成;
- (b) 第二病毒特异性寡核苷酸扩增引物,其由SEQ ID NO:2组成的核苷酸序列组成;和
- (c) 至少第一标记的病毒特异性检测探针,其由标记的核苷酸序列组成,所述核苷酸序列由SEQ ID NO:3组成;其中所述组合物适用于使用定量实时聚合酶链式反应(qPCR)检测病毒特异性核酸。

2. 一种用于检测样品中多核苷酸群中BVDV-1b病毒特异性多核苷酸的存在情况的方法,所述方法包括:

在(i)含有其中多个减毒活病毒颗粒能够复制的培养的牛细胞的测定板和(ii)相应的没有细胞的参比板中稀释疑似含有所述减毒活病毒颗粒的样品;

使来自样品的核酸与权利要求1的组合物接触;并且

如果BVDV-1b-特异性核酸分子存在于样品中则进行定量实时聚合酶链式反应(qPCR)以产生病毒特异性扩增产物;

其中所述多个减毒活病毒颗粒包含在哺乳动物疫苗中。

3. 权利要求2的方法,其中所述哺乳动物疫苗是牛BRDC或船运热疫苗。

4. 权利要求2的方法,其中所述多个减毒活病毒颗粒包含选自牛疱疹病毒1 (BHV-1)、牛副流感3型病毒(PI3)、牛呼吸道合胞病毒(BRSV)和牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的一种或多种病毒。

5. 权利要求2-4中任一项的方法,其中所述多个减毒活病毒颗粒包含牛病毒性腹泻病毒1a型(BVDV-1a)、牛病毒性腹泻病毒1b型(BVDV-1b)和牛病毒性腹泻病毒2型(BVDV-2)中的一种或多种。

6. 权利要求2-4中任一项的方法,其中标记的检测探针还包含非荧光猝灭剂或小沟结合剂。

7. 权利要求2-4中任一项的方法,其中检测探针用6-羧基-荧光素进行荧光标记。

8. 权利要求1的组合物在检测获自哺乳动物疫苗的多核苷酸群中减毒的BVDV-1b-特异性多核苷酸中的用途。

9. 权利要求8的用途,其中所述用途用于自包含在多价牛船运热疫苗内的多个减毒活病毒颗粒中检测BVDV-1b特异性多核苷酸。

10. 权利要求1的组合物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测多个减毒活病毒颗粒内如若存在的BVDV-1b病毒特异性核酸。

鉴定和区分多价船运热疫苗的病毒成分的组合物与方法

[0001] 发明背景

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请涉及共同待审的美国临时专利申请号61/427,361,名为“Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1b Vaccine Compositions and Methods (牛病毒性腹泻病毒1b型疫苗组合物和方法)”(与本文于2010年12月27日同时提交,通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。

[0004] 有关联邦政府资助的研究或开发的声明

[0005] 无可适用声明。

[0006] 联合研究协议各方的名称

[0007] 无可适用方。

发明领域

[0008] 本发明总的来说涉及分子生物学领域,更具体地说涉及兽医临床实验室诊断方法。特别提供用于鉴定、扩增、定量和/或检测来源于特定病毒种、类型和/或亚型(包括作为牛呼吸道疾病综合征(BRDC)的起病因子或促进因子所涉及的那些种类)的核酸区段的系统、方法、组合物和诊断试剂盒。具体地说,公开了用于鉴定和区分牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的3种已知亚基因型的方法和组合物。

[0009] 相关领域的描述

[0010] “船运热”

[0011] “船运热”是针对牛和绵羊中的急性高度传染性败血症综合征而提出的术语,其临床特征在于发热、急性气道炎症、流鼻涕、厌食、抑郁、纤维蛋白性肺炎和感染组织坏死。最通常在运输后在饲养场中遭受的船运热是幼牛死亡的主要原因,并且是造成估计该产业每年超过5亿美元损失的原因。仅1991年,估计船运热耗费美国牛产业将近6.24亿美元,这主要由治疗成本、生产损失和死亡所致。

[0012] 一般认为船运热的发病机制包括使动物易患初期病毒性呼吸道感染的不良外界影响,初期病毒性呼吸道感染进而产生有利于一种或多种继发细菌感染激增的条件。

[0013] 牛呼吸道疾病(BRD)综合征(BRDC)

[0014] BRDC(常统称为“船运热”)是通常累及市场渠道中和目的地牧场或饲养场中的架子牛/待肥育犊牛的多因子疾病综合征。以伴发性相继或同时感染病毒和细菌病原体两者为特征,BRDC是肉牛和乳牛产业经济损失的主要原因。

[0015] 该疾病感染所有年龄段的牛(包括哺乳犊牛),其特征不在于呼吸急促、咳嗽、抑郁、食欲不振、流眼泪和流鼻涕及高热。在急性暴发时,可能在症状开始24小时内发生死亡。出现抑郁的犊牛可能出现耳下垂、头耷拉、弓背和/或自己常常与其它牛疏离。由于犊牛的健康逐渐恶化,它们停止进食,呼吸频率显示增加,并出现显著发热(通常为104°-108°F的范围)。

[0016] 至少4种病毒病原体参与BRDC。它们包括牛疱疹病毒1(BHV-1)(感染性牛鼻气管

炎[IBR]的病因)、牛副流感病毒3型病毒(PI₃)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的一种或多种遗传变体和牛呼吸道合胞病毒(BRSV)。

[0017] 在病毒感染后,受感染的动物随后出现一种或多种后续的细菌感染(例如溶血曼海姆菌(*Mannheimia haemolytica*) [旧称溶血巴斯德氏菌(*Pasteurella haemolytica*)、多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、睡眠嗜组织菌(*Histophilus somni*) (旧称嗜眠嗜血菌(*Haemophilus somnus*))、化脓放线菌(*Actinomyces pyogenes*)和各种支原体(*Mycoplasma* spp.)),其常常表现出急性肺炎。

[0018] 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)

[0019] BVDV目前被公认为BRDC中的重要病因。以粪-口方式在牧群中传播,该病毒引起急性感染(包括腹泻、发热和出血症状),并且能够穿过孕牛的胎盘,这常常导致持续感染(PI)犊牛的出生,所述犊牛对该病毒是免疫耐受的,并且其余生是持久病毒血症的。PI牛科动物目前代表了主要的病毒库;这些动物极易受致肺炎或肠病的微生物感染,并提供在牛中暴发致死性粘膜病(MD)所必需的病毒库(参见例如Liess等,1974;Barber等,1985;Olafson等,1946;Ramsey等,1953;Malmquist,1968;以及Ross等,1986,所述各文献通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。

[0020] 牛病毒性腹泻病毒是可进行表型(参见例如Baker,1995)(引起细胞病变的或不引起细胞病变的)和基因型(参见例如Ridpath等,1994;Vilcek等,2001;以及Flores等,2002)两种分类的不同病毒组群。出于多种原因,在家畜中建立针对BVDV的保护性免疫一直是个问题。与某些其它病毒介导的疾病一样,针对BVDV的血清抗体水平不一定与防止疾病有关。在哺乳犊牛中建立保护性免疫提出额外障碍,因为BVDV的母体抗体可消耗注射的免疫原,并有效地中和疫苗。

[0021] Fulton等人(2006)的一项研究评价了进入美国饲养场的21,743头犊牛,并测出88头犊牛患有BVDV持续感染(PI)。88头PI犊牛中,77.9%感染了BVDV-1b;仅11.6%感染了BVDV-1a,而仅10.5%感染了BVDV-2a。

[0022] 发明概述

[0023] 本发明通过有利地提供用于检测样品(特别是生物或兽医来源的样品)中或获自样品的多核苷酸群中病毒特有的核苷酸序列的系统和方法,而克服了现有技术固有的这些和其它限制。在另一个实施方案中,本发明还通过有利地提供用于特异性检测和区分获自两个或更多个遗传上相关的多核苷酸群的核酸(包括例如获自两个或更多个遗传上相关的病毒种、毒株、类型或亚型的核酸)的组合物和方法,来克服了本领域的不足。本发明首次可提供特异性寡核苷酸扩增引物和标记的寡核苷酸检测探针(以及包含所述引物和探针的诊断测定试剂盒),用于区分已知的BVDV遗传亚型(例如1a型、1b型和2型)特有的多核苷酸,以及用于鉴定和定量存在于多价病毒颗粒群中的各个病毒成分。

[0024] 本发明还可有利地提供扩增引物对和标记的寡核苷酸检测探针,以及在不同的实施方案中使用这类组合物用于制备高灵敏度的病毒特异性检测系统的方法,所述系统可被用来更准确地测定各种改性活病毒(modified live virus,MLV)在多价疫苗制剂(包括例如申请人的共同待审美国临时专利申请61/427,361(2010年12月27日提交,通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)所述的六价船运热疫苗)中的效价。

[0025] 还公开了制造品,包括包含这类病毒特异性引物和探针的诊断试剂盒。采用使用

本发明组合物的定量(特别是实时定量)聚合酶链式反应(qPCR)测定法(特别当与一种或多种可检测标记联用时,包括例如荧光和显色检测方法,例如基于荧光共振能量转移(FRET)的检测系统)所提供的快速分析和提高的灵敏度,只说明了本发明可提供给兽医临床实验室环境的许多优势中的两个。

[0026] 在第一个实施方案中,本发明提供这样的组合物,其包含至少第一病毒特异性寡核苷酸扩增引物;至少第二病毒特异性寡核苷酸扩增引物;和适于进行多核苷酸群的基于PCR的扩增/检测测定法的至少第一标记的病毒特异性检测探针。

[0027] 如本文注意到的一样,这类病毒特异性检测探针优选包括至少一种可检测标记,包括而不限于一种或多种显色、荧光、自旋标记或放射性部分或其任何组合。

[0028] 在一个相关的实施方案中,本发明提供用于检测含水样品中的一种或多种病毒特有的核酸序列的组合物。优选样品是已知含有或疑似含有一种或多种病毒特有的核酸的生物来源的样品(包括而不限于细胞、组织、血液、血浆、血清及其任何组合)或诊断、实验室或药物组合物或制剂。优选这类组合物是哺乳动物疫苗制剂或能够在哺乳动物家畜的一种或多种物种中引起免疫应答的免疫原性组合物。

[0029] 优选这类组合物包括一种或多种正向扩增引物和一种或多种反向扩增引物,所述引物与一种或多种牛致病性病毒种、毒株、类型和/或亚型所特有的核酸序列特异性杂交,并促进所述核酸序列的聚合酶依赖性扩增。

[0030] 本发明的更多方面包括本文更详细描述的诊断和/或分子测定试剂盒,所述试剂盒包含一种或多种上述组合物,其优选在通过PCR产生多个扩增的核酸区段的适当条件下,适于进行聚合酶链式反应以扩增来自包含兽用改性活病毒疫苗的样品的病毒特有核酸序列,所述扩增的核酸区段是可使用一种或多种适当标记的寡核苷酸检测探针(包括而不限于本文描述和列举的那些探针序列)检测和/或定量的。

[0031] 本发明还提供一种或多种这类组合物在制备用于扩增和/或检测获自生物样品的多核苷酸群中的一种或多种病毒特有的多核苷酸的制品中的用途。在说明性实施方案中,这类用途包括一种或多种BVDV颗粒、优选与MLV一起包含在内的一种或多种这类病毒颗粒的扩增、检测和/或定量。在示例性实施方案中,表明了这类组合物在扩增、检测和定量测定来自多价牛船运热疫苗内所包含的多个减毒活病毒颗粒的BVDV 1b型、1b型和2型特有的多核苷酸中的用途。通过利用对病毒的不同种、毒株、类型或亚型有特异性的探针/引物组合,可将本发明的方法进一步用于疫苗效价的表征、特别用于多价动物疫苗,例如对疾病例如BRDC和具有已知病毒源的病因的有关船运热是预防性的疫苗。

[0032] 在总体和一般含义上,本发明的方法允许快速、准确和容易地检测来自多核苷酸群的病毒特有的多核苷酸,特别是来自在预防、治疗、管理和/或改善多因子疾病(特别是多病因来源的疾病)(例如BRDC和相关船运热)的一种或多种症状中有效的多价疫苗制剂中的病毒特有的多核苷酸。这类方法一般包括进行至少一个循环步骤,其中循环步骤包括至少第一扩增步骤和至少第一杂交步骤,且其中至少第一扩增步骤包括使样品与本文公开的探针/引物组合物接触以产生病毒特有的扩增产物,如果病毒特有的核酸分子存在于样品中的话,其中至少第一杂交步骤包括使样品与组合物接触;和在有效地特异性检测所得杂交产物的条件下,使如此产生的扩增产物与至少第一标记的寡核苷酸检测探针接触。在说明性实施方案中,病毒特异性扩增引物对包括:长度小于约50个核苷酸的第一寡核苷酸扩

增引物,其包含选自以下的一个或多个核酸序列、基本由或备选由选自以下的一个或多个核酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:16;和长度小于约50个核苷酸的第二寡核苷酸扩增引物,其包含选自以下的一个或多个核酸序列、基本由或备选由选自以下的一个或多个核酸序列组成:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:17。

[0033] 在某些实施方案中,组合物还可包含至少第一标记的病毒特异性检测探针。这类检测探针优选为长度小于约50个核苷酸,并包含选自以下的一个或多个核酸序列、基本由或备选由选自以下的一个或多个核酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:18。

[0034] 在优选的实施方案中,第一循环步骤优选包括使多核苷酸群与病毒特异性扩增引物对接触,以便当病毒特有的核酸分子存在于多核苷酸群中时产生扩增产物,并且其中至少第一杂交步骤包括在有效检测如此产生的扩增产物的条件下使多核苷酸群与至少第一标记的病毒特异性检测探针接触。在某些实施方案中,检测步骤可以实时进行,还可任选包括测定病毒特异性检测探针和病毒扩增产物之间的解链温度的额外步骤。

[0035] 测定疫苗效价的方法和组合物

[0036] 本发明提供鉴定病毒特有的多核苷酸序列、特别是MLV样品中BVDV特有的多核苷酸序列(例如存在于动物疫苗的那些)的方法。本发明还提供用于特异性检测样品、特别是哺乳动物疫苗或获自牛科动物的兽医或生物样品以及得自疫苗候选物中的病毒特有的多核苷酸序列的方法和组合物。所公开的方法优选利用寡核苷酸引物对和标记的寡核苷酸探针组合物和试剂盒,特别是包含本文公开的一个或多个序列的那些,用于检测PCR扩增产物,通过杂交引物标记所得到的扩增产物,并采用基于PCR、qPCR、RT-qPCR和PCR/FRET的测定法的一种或多种,特别是与随后的解链曲线(例如 C_T)分析组合,定量测定这类扩增产物。

[0037] 在一个实施方案中,本发明提供用于检测一种或多种病毒特有的多核苷酸或者编码病毒来源的蛋白质、肽或多肽的全部或部分的核酸区段的存在或不存在的方法。在某些方面,一种或多种生物样品可获自个体(例如疫苗制剂,或获自家畜的生物样品),并针对这类序列的存在情况进行筛选。在具体的实施方案中,可针对一种或多种特定的病毒序列(包括例如多因子动物疫苗的MLV病毒成分的一种或多种的特有序列)的存在情况,对疫苗制剂或生物样品进行筛选。

[0038] PCR的方法为分子生物学领域普通技术人员所熟知(参见例如美国专利号4,683,195和4,683,202,所述每个专利通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。在适量的4种脱氧核糖核苷三磷酸(dATP、dGTP、dCTP和dTTP)存在下,在由合适的盐、金属阳离子和pH缓冲系统组成的反应介质中,通过聚合剂催化PCR中引物的模板依赖性延伸。合适的聚合剂是已知催化模板依赖性DNA合成的酶。例如,如果模板为RNA,则将RNA转化成互补DNA(cDNA)序列的合适聚合剂是反转录酶(RT),例如鸟类成髓细胞血症病毒RT。正如美国专利号5,614,388(通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)注意到的一样,如果扩增的靶标为DNA,则合适的聚合酶包括而限于大肠杆菌(*E. coli*) DNA聚合酶I或其Klenow片段、T₄ DNA聚合酶和Taq聚合酶(自微生物水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)分离的耐热DNA聚合酶)。称为“Taq聚合酶”的后一种酶广泛用于核酸的扩增和测序,且使用这类聚合酶

的反应条件为本领域普通技术人员所熟知(参见例如Sambrook和Russell, 2001)。在PCR方法的一个优选实施方案中, 该反应由热稳定的DNA聚合酶例如Taq DNA聚合酶催化, 并在高温下进行。优选的温度是酶在其中是热稳定的且核酸在其中处于单链和双链平衡, 使得足够的引物可与模板链退火以允许合理的聚合速率的温度。通过将反应加热至足够高的温度持续引起双链体变性、但不引起聚合酶不可逆变性的足够时间, 来实现链分离。

[0039] 在具体应用中, 本发明的方法有利地利用至少基于第一PCR的扩增步骤, 优选至少基于第一定量PCR的扩增步骤, 其通常包括进行至少一个循环步骤(其包括至少第一“扩增”步骤和至少第一“杂交”步骤)。如果病毒靶多核苷酸原来存在于样品中, 则该扩增步骤包括使样品与病毒特异性寡核苷酸引物对接触以产生扩增产物。(相反地, 如果原来无病毒靶多核苷酸存在于样品中, 则在PCR方法期间不引起特异性产物扩增)。

[0040] 杂交步骤通常包括使产生于扩增步骤的样品与一种或多种标记的寡核苷酸探针接触, 所述探针与如此产生的扩增产物特异性杂交(即与之结合)。在FRET分析的情况下, 检测探针可包含病毒特异性寡核苷酸探针的FRET相容检测对(包括例如在彼此不超过约4或5个核苷酸内与扩增产物杂交的那些FRET相容对)的第一和第二成员。在FRET分析的情况, 检测探针对的第一探针通常用供体荧光部分标记, 检测探针对的第二探针通常用相应的接纳体荧光部分标记。上文中更详细地描述了这些检测探针和检测探针可与之有效连接而用于杂交步骤的部分的类型。

[0041] 所述方法还包括至少通过使用合适的标记(且通常是与探针有效连接的标记)检测扩增产物: 探针杂交体存在与否的步骤, 其中存在来自标记探针的信号通常表明样品中存在靶多核苷酸。相反地, 在所产生的扩增产物不存在时, 在探针杂交步骤后基本无法获得可检测的信号, 因而表明最初存在于分析样品的核酸序列群中不存在靶多核苷酸。

[0042] 在某些实施方案中, 可以实时进行扩增和检测步骤, 任选所述方法还可包括其它定量或分析步骤(包括例如测定检测探针与相应扩增产物之间的解链温度以定量测定或进一步表征分析样品中的病毒来源的靶序列(如果存在的话))。

[0043] 测定探针与其相应靶标之间的解链温度的方法一般包括下列步骤: 使PCR扩增产物和相应的检测探针冷却至约40°C以促进探针与靶定PCR扩增产物的互补序列退火。一旦标记的探针在有效使探针与靶定的PCR产物(如果存在的话)退火的条件下与反应混合物接触, 便可采用分子生物学领域普通技术人员已知的常规技术检测(并随后定量)可检测标记(例如荧光团等)。

[0044] 核酸的检测为本领域普通技术人员所熟知, 并且可通过应用许多方法实现。这些方法一般以标记或标志物的检测为基础, 例如本领域已知的任何放射性、荧光、生物或酶标签或标记(参见例如美国专利号3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241, 所述各专利通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。可用于本发明实践中的可检测标记的其它实例包括顺磁离子例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镧(III)、铈(III)和铕(III), 其中钆是特别优选的。还可使用荧光部分, 包括而限于罗丹明、荧光素和肾造影剂, 其中在与显色底物接触时产生有色产物的酶是特别优选的。还可使用分子生物学领域普通技术人员已知的第二结合配体(包括而限于第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合方案)。

[0045] 如上所述,任何标记均可用作寡核苷酸探针的标记,只要它满足上述要求,并且与核酸特异性标记相互作用。实例包括但不限于LightCycler® RED 640、LightCycler® RED 705、TAMRA和Alexa 633。标记可在任何位置上与寡核苷酸连接,只要所述连接不影响寡核苷酸的杂交。在具体应用中,标记通常在寡核苷酸探针分子的5'或3'末端有效连接(即结合、连接、相连等)。

[0046] 除本文特别列出的寡核苷酸以外,可以设计并合成其它核酸(例如应用计算机程序例如OLIGO [Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, USA])作为扩增引物或检测探针用于本文所述病毒效价测定法。通常,寡核苷酸引物和探针的长度为约7或8个至约60或80个左右核苷酸(例如核苷酸长度为7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49个等)。本文所用“病毒特异性引物”是指这样的寡核苷酸引物,其与存在于具体选定的病毒基因组内的核酸序列特异性退火,并且在合适的条件下促进引发由其进行扩增产物的聚合酶合成。同样地,“病毒特异性探针”是指这样的寡核苷酸探针,其与在合适的条件下使用杂交的引物对通过合适聚合酶扩增的核酸序列特异性退火,并且是采用常规寡核苷酸检测测定法等,依次、同时、序贯和/或随后可检测的(且优选是可计量的)。

[0047] 寡核苷酸组合物

[0048] 在一个实施方案中,本发明提供可用于与相应的同源病毒多核苷酸序列、特别是动物疫苗中存在的改性活病毒颗粒的序列杂交并扩增所述序列的对病毒特有的多核苷酸有特异性的寡核苷酸探针和引物序列及由其产生的扩增产物。在说明性实施方案中,公开了可用于检测和扩增BVDV的特定遗传毒株、类型和亚型特有的核酸序列的示例性寡核苷酸引物序列。

[0049] 针对选择性扩增和检测病毒特有的核酸区段和特别是BVDV特有的多核苷酸(和由其获得的扩增产物),设计本发明的寡核苷酸引物和探针。所公开的引物序列适用于杂交方法和DNA扩增方法,例如基于PCR™的扩增方法(包括例如实时pPCR、RT-PCR、基于RT-PCR/FRET的遗传分析)。同样地,所公开的寡核苷酸检测探针适于用合适的标记方法标记,以使用本文公开的一个或多个病毒特异性扩增引物对来检测和定量测定产生于核酸扩增的产物。

[0050] 当用合适的标志物标记时,寡核苷酸检测探针特别适于基于荧光的检测,包括例如基于PCR、实时PCR、定量PCR (qPCR)、FRET的分析等。例如,FRET标记的检测方法特别可用于基于微体积荧光测定法(microvolume fluorimetry)的荧光测定检测。特别考虑了所公开的扩增和检测寡核苷酸对的一个或多个在基于RT-PCR™/微体积荧光测定FRET的方法(RT-PCR™/FRET)联用、特别是由Idaho Technology, Inc.开发、现由Roche Molecular Systems制造和销售的“LightCycler®”仪器促进的分析中的应用。

[0051] 对于大多数实施方案,本发明人考虑了本发明的选定探针和引物组合物可优选为长度小于约50-60个左右的核苷酸,更优选可为长度小于约40-45个左右的核苷酸,而本发明的其它探针和引物可为长度大约30-35个左右的核苷酸。在一些实施方案中,所选寡核苷酸引物序列(例如“正向”和“反向”引物)的长度和/或所选检测探针序列(例如“锚(anchor)”和“传感器”探针)的长度可能可为大约20-30个左右核苷酸长度,但在一些情况中,具体探针和引物序列的大小可大于该长度,约为60-70个核苷酸的长度。或者,在一些实

施方案中,可能需要采用较短的探针和/或引物序列,因此在一些实施方案中,选用于本发明实践的寡核苷酸长度可约为15-20个左右或甚至略微更短的核苷酸。

[0052] 在本申请的情况下,要了解,考虑了本文所述各种范围内的所有中间寡核苷酸长度明确落入本发明的范围内。为此目的,“长度小于约XX个核苷酸”的寡核苷酸包括所有包括在该范围内的整数。例如,“长度小于约60个核苷酸”的寡核苷酸包括长度为59、58、57个等直到4、3、2或1个核苷酸的寡核苷酸,且每一个都明确落入本公开内容的范围内。

[0053] 可采用标准方法,包括亚磷酰胺化学法(参见例如Beaucage和Iyer,1992;以及美国专利号4,980,460、4,725,677、4,415,732、4,458,066和4,973,679等),通过多种本领域普通技术人员已知的常规方法合成本发明的寡核苷酸(参见例如Ozaki等,1992;Agrawal等,1990等)。还可采用例如导致非天然骨架基团(例如硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)的备选化学法,条件是所得寡核苷酸的杂交效率不会受到不利影响。优选寡核苷酸的长度为约10-约120个核苷酸的范围;更优选长度为约15-约100个核苷酸的范围,还更优选长度为约20-约80个核苷酸的范围,但是寡核苷酸的确切序列和长度尤其可取决于其与之杂交的靶核酸序列的性质,因为结合位置和长度可变化,以实现具体实施方案的合适的退火和解链性质。进行这类设计选择的指导可参见许多描述应用于以下实施例的“Taqman® 类型”测定法的上述参考文献,并且还详细描述于Holland等(1991)。上述参考文献的每一份均通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中。

[0054] 病毒特异性扩增引物

[0055] 在本发明的实践中,用于扩增病毒特有的多核苷酸序列、尤其是BVDV编码多核苷酸序列的正向和反向扩增引物,优选可包含至少约6-至少约25个(包括其间的每个整数)或更多个连续核酸、基本由或备选由至少约6-至少约25个(包括其间的每个整数)或更多个连续核酸组成,所述连续核酸来自于:公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列中的任一个;或与公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个有至少约90%同一性的寡核苷酸序列;或甚至与公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个有至少约95%同一性的寡核苷酸序列。

[0056] 在其它实施方案中,本发明优选的寡核苷酸正向和反向扩增引物序列可包含公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个、基本由或备选由公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公

开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个组成;而在其它实施方案中,可能需要使用基本由公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个组成的引物序列;而在另外其它的实施方案中,可能需要使用由公开于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16的“正向”寡核苷酸引物序列或者公开于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的“反向”寡核苷酸引物序列的任一个组成的引物序列。

[0057] 在更多其它的实施方案中,优选用于本发明方法实践中的正向和反向扩增引物组合可包含表示公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列的核酸序列、基本由或备选由表示公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列的核酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0058] 同样地,优选用于本发明扩增方法的实践的引物组合可包含与公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列有约90%同一性的核酸序列、基本由或备选由与公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列有约90%同一性的核酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0059] 此外,优选用于本发明扩增方法的实践的扩增引物组合可包含与公开于以下任一个的寡核苷酸序列的任一个有至少约95%同一性的核酸序列、基本由或备选由与公开于以下任一个的寡核苷酸序列的任一个有至少约95%同一性的核酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0060] 在其它实施方案中,优选用于本发明实践的引物组合可包含作为选自以下任一个公开的任一寡核苷酸序列的至少约6-至少约25个(也包括其间的每个整数)或更多个连续核酸的核酸序列、基本由或备选由作为选自以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列的至少约6-至少约25个(也包括其间的每个整数)或更多个连续核酸的核酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;或者可基本由与以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列有至少约90%同一性的寡核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;或者甚至可基本由与以下任一个

所公开的任一寡核苷酸序列有至少约95%同一性的寡核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0061] 在某些实施方案中,本发明的说明性扩增引物为长度至少约50个核苷酸,并含有包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列、基本由或由包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0062] 在其它实施方案中,本发明的说明性扩增引物为长度至少约40个核苷酸,并含有包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列、基本由或由包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0063] 在其它的实施方案中,本发明的说明性扩增引物为长度至少约30个核苷酸,并含有包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列、基本由或由包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0064] 在本发明另外的其它方面,本发明的说明性扩增引物为长度至少约25个核苷酸,并含有包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列、基本由或由包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;而在其它方面,本发明的说明性扩增引物为长度至少约20个左右核苷酸,并含有包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列、基本由或由包含公开于以下任一个的核苷酸序列的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0065] 在具体的说明性实例中,本发明的寡核苷酸引物组合物长度小于约50个核苷酸,并包含以下任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;而在其它说明性实例中,本发明的寡核苷酸引物组合物长度小于约40个核苷酸,并包含以下任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;而在另外其它的实例中,本发明的寡核苷酸引物组合物长度小于约30个核苷酸,并包含以下任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ

ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0066] 在本发明的一些方面,在本文公开的方法的实践中可能需要使用长度小于约45个左右的核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的寡核苷酸引物组合物:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17,或者长度小于约35个左右的核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的组合物:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17;而在另外其它的实例中,可能需要使用长度小于约25个左右的核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的寡核苷酸引物组合物:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0067] 病毒特异性检测探针

[0068] 在本发明的实践中,采用本文所述RT-qPCR[™]分析用于检测病毒特有的多核苷酸序列(且特别是BVDV特有的多核苷酸序列)的寡核苷酸探针,可优选包含来自以下的至少约6-至少约25个(包括其间的每个整数)或更多个连续核酸:公开于SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18的任一个寡核苷酸探针序列;或与公开于SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18的任一个寡核苷酸检测探针序列有至少约90%同一性的寡核苷酸序列;或甚至与公开于SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18的任一个寡核苷酸探针序列有至少约95%同一性的寡核苷酸序列。

[0069] 在其它实施方案中,本发明优选的寡核苷酸检测探针可包含公开于以下的任一个寡核苷酸探针序列、基本由或备选由公开于以下的任一个寡核苷酸探针序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而在其它实施方案中,可能需要使用基本由公开于以下的任一个寡核苷酸组成的检测探针核酸区段:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而在另外其它的实施方案中,可能需要使用由公开于以下的任一个寡核苷酸序列组成的探针序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0070] 在更多其它的实施方案中,特别是其中采用FRET分析以检测如此产生的扩增产物的实施方案中,本发明的检测探针可优选包含探针对,其中的第一个是“锚”探针,其中的第二个是“传感器”探针。

[0071] 用于本发明方法实践的优选的探针组合物可包含检测探针对、基本由或备选由检测探针对组成,其中的第一和第二成员可由表示公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列的核酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0072] 同样地,用于基于FRET的检测方法的实践的优选探针组合物可包含检测探针对、

基本由或备选由检测探针对组成,所述检测探针对的第一成员可由与公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列有约80%、至少约81%同一性、至少约82%同一性、至少约83%、至少约84%或至少约85%同一性的核酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而所述检测探针对的第二成员可优选包含与公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列有约90%、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%、至少约94%或至少约95%同一性的核酸序列、基本由或备选由与公开于以下任一个的约6-约25个(包括其间的每个整数)或更多个核苷酸的连续核酸序列有约90%、至少约91%同一性、至少约92%同一性、至少约93%、至少约94%或至少约95%同一性的核酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0073] 此外,当需要扩增产物基于FRET的分析时,用于本发明方法的实践的优选寡核苷酸探针可包含FRET检测探针对、基本由或备选由FRET检测探针对组成,其中的第一和第二成员可包含与以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列有至少约95%、至少约96%同一性、至少约97%同一性或至少约98%或99%同一性的核酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。在其它实施方案中,用于本发明实践的优选的探针组合可包含FRET锚/传感器探针对、基本由或备选由FRET锚/传感器探针对组成,其中的第一和第二成员可基本由作为选自以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列的至少约6-至少约25个(包括其间的各个整数)或更多个连续核酸的核酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;或者可基本由与以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列有至少约90%同一性的寡核苷酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;或者甚至可基本由与以下任一个所公开的任一寡核苷酸序列有至少约95%、至少约96%同一性、至少约97%同一性或至少约98%或99%同一性的寡核苷酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0074] 在某些实施方案中,本发明的说明性病毒扩增产物-特异性寡核苷酸检测探针组合优选为长度至少约50个左右的核苷酸,其包含选自以下的核苷酸序列、基本由或由选自以下的核苷酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0075] 在其它实施方案中,本发明的说明性检测探针组合优选为包含选自以下的核苷酸序列、基本由或由选自以下的核苷酸序列组成的长度至少约40个左右核苷酸的寡核苷酸:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0076] 在其它实施方案中,检测探针组合可为包含选自以下的核苷酸序列、基本由或由选自以下的核苷酸序列组成的长度至少约30个左右核苷酸的寡核苷酸:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而在另外其它的实施方案中,合适的检测寡核苷酸可为包含选自以下的核苷酸序列、基本由或由选自以下的核苷酸序列组成的长度至少约20个左右的核苷酸:SEQ ID NO:3、SEQ ID

NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0077] 在具体的说明性实例中,本发明的寡核苷酸检测探针组合物为长度小于约50个左右的核苷酸,并包含以下任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而在其它说明性实例中,寡核苷酸检测探针组合物为长度小于约40个的核苷酸,并包含以下任一个的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0078] 在其它应用中,合适的寡核苷酸检测探针可为长度小于约30个的核苷酸,且可包含选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0079] 在本发明的一些方面,在本文公开的方法的实践中可能需要使用长度小于约45个左右的核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的寡核苷酸探针组合物:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;或者,长度为小于约35个左右核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的寡核苷酸探针:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18;而在另外其它的实例中,可能需要使用长度为小于约25个左右核苷酸且基本由以下任一个的核苷酸序列组成的寡核苷酸检测探针组合物:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18。

[0080] 在说明性实施方案中,本发明提供这样的病毒特异性扩增引物和检测探针,其包含优选与公开于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:18的任一个或多个寡核苷酸序列有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%或更大同一性的核酸序列、基本由或由优选与公开于SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:18的任一个或多个寡核苷酸序列有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%或更大同一性的核酸序列组成。

[0081] 在某些实施方案中,本发明提供根据其病毒特异性扩增产物的一个或多个部分的特异性结合而设计的引物和探针组。这些探针和引物特别可用于快速检测和鉴定生物样品中的病毒特有的多核苷酸序列的方法。在具体的实施方案中,这些方法包括实时定量,包括但不限于基于定量PCT (qPCR)、逆转录酶-PCR (RT-PCR)和/或RT-PCR/荧光共振能量转移(FRET) (RT-PCR/FRET)的扩增、检测和/或定量方法。

[0082] 说明性实施方案的描述

[0083] 下面描述了本发明的说明性实施方案。为了清楚起见,本说明书中并未描述实际实施的全部特征。当然应当了解,在任何这类实际实施方案的开发中,必须做出许多实施特定的决定以实现开发者的特定目标,例如遵循系统相关约束和商业相关约束,这在一种实施与另一种实施间可改变。此外,应了解,这类开发努力可能是复杂的和费时的,但会是得益于本公开内容的本领域普通技术人员的日常工作。

[0084] 瘟病毒属

[0085] 瘟病毒属在世界范围内引起经济上重大的动物疾病。黄病毒科(Flaviviridae)的瘟病毒属(Pestivirus)包含3种单链正义RNA病毒:牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、经典型猪瘟病毒(CSFV)、边界病病毒(BDV)。最近,鉴定出第4种的瘟病毒属的不同类别,其在遗传上与

BVDV相关,在文献上被称为牛病毒性腹泻病毒2型(BVDV-2)(参见例如Thiel等,1996;以及Becher等,1995;所述各文献通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。因此,现代教科书目前将BVDV的原始种称为“BVDV-1”以区分两个种。

[0086] 瘟病毒属的模式种是BVDV 1型(BDVD-1),其基因组长度约为12.5-kb,含有一个大的可读框(ORF)(Collett等,1988,通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。ORF编码约450 kDa的大多蛋白,其通过宿主或病毒蛋白酶进行共翻译和翻译后加工。标准BVDV多蛋白的N末端产生非结构蛋白p20 (Npro)、衣壳蛋白p14 (C);包膜糖蛋白gp48 (E0)、gp25 (E1)、gp53 (E2);非结构蛋白p125 (NS23)、p10 (NS4A)、p32 (NS4B)、p58 (NS5A)和p75 (NS5B)(参见例如Tautz等,1997;Xu等,1997;Elbers等,1996;以及Wiskerchen等,1991,所述各文献通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。BVDV-1以引起细胞病变(命名为“cp”)或非引起细胞病变(“ncp”)的两种生物型存在,其通常因在引起细胞病变的变体中单一80-kDa多肽(非结构蛋白p80,NS3)的产生而不同(参见例如Gillespie等,1960,通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。

[0087] 根据对多个BVDV分离株的系统发育分析,表明了BVDV-1包含至少13种不同的亚基因型(命名为BVDV-1a至BVDV-1l),而已鉴定出BVDV-2的两个亚基因型(BVDV-2a和BVDV-2b)(参见例如Pellerin等,1994;Ridpath等,1994和Xue等,2010;所述各文献通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)。

[0088] 在过去30年,已推广到牛产业市场的几乎150种BVDV疫苗,即改性活病毒(MLV)和灭活减毒病毒或病毒颗粒两种,取得不同程度的成功;尽管商用疫苗制剂的广泛可得性和使用,但在每年基础上仍有BVDV暴发的报告。疾病管理的现有方法包括每年重复为牛接种疫苗,一般要采取额外步骤以试图确保没有作为PI携带者的犊牛出生。已开发出用于BVDV检测和/或BVDV感染动物检测的几种不同的试验方法,包括反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、酶联免疫测定法(ELISA)、标准病毒分离技术和各种免疫组织化学测定法。

[0089] 病毒效价测定法

[0090] 发给指定疫苗许可证的一个主要障碍常常是合适的效价试验的开发。历史上一直按照疫苗中牛病毒性腹泻病毒滴定的补充测定方法(Supplemental Assay Method for the Titration of Bovine Viral Diarrhea Virus in Vaccine)(SAM 101)进行BVDV效价试验。例如SAM101等方法在接种易感细胞系前,利用单特异性中和性抗血清以中和BHV、PI₃和BRSV组分。针对致细胞病变效应(CPE)对培养物进行观察,然后采用直接荧光抗体(FA)和/或间接FA (IFA)染色以确定特定孔(稀释液)对BVDV 1型或2型是阳性还是阴性。然后根据测定为对CPE/FA阳性的孔,计算效价。

[0091] 然而,常规方法(例如所述方法)并不令人满意地适于区分BVDV的亚基因型,主要是因为BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2的现有抗体缺乏准确区分这些基因型和亚基因型中的各个效价所需要的特异性。

[0092] 这个问题可以通过利用存在于瘟病毒属基因组的5'非翻译区的差异来克服。这些差异已被用来将瘟病毒属分隔成基因型和亚基因型(Paton,1995和Hofmann等,1994)。Ridpath和Bolin (1998)报告了用于区分BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2的聚合酶链式反应(PCR)方法。反转录定量PCR (RT-qPCR)测定法在人类生物制剂中变得越来越普遍,被用来测定麻疹病毒(Schalk等,2004);基于腺病毒的疫苗(Wang等,2005)、轮状病毒疫苗

(Ranheim等,2006)和三价流行性腮腺炎-麻疹-风疹(MMR)疫苗(Schalk等,2005)的效价。上述参考文献的每一份均通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中。

[0093] 在名为“牛病毒性腹泻病毒1b型疫苗组合物和方法”(与本文同时提交,并通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中)的共同待审美国临时专利申请号61/427,361中,本发明人报告了可用于得到多价疫苗中每个个别病毒成分的直接病毒定量(即“效价”)的基于遗传修饰的测定方案的开发。本发明用RT-qPCR测定法替换常规FA/IFA测定法(例如描述于现有SAM 101测定法中的那些)以确定各试验孔(即稀释液)中特定的病毒种、类型或亚型存在与否。

[0094] 还可通过各孔的RT-qPCR/qPCR分析替换CPE的目测法,更客观地进行本文所述多价疫苗(例如六价MLV疫苗)各成分的效价试验。例如,病毒滴定测定法中CPE的观察可相当主观,常常被视为试验设备间MLV疫苗效价差异的来源。然而,通过提高该测定法的客观性,还应提高实验室间的再现性。

[0095] 可采用副流感病毒3病毒疫苗滴定的改进补充测定方法(MVSAM102.01),进行PI₃的效价试验。可采用疫苗中牛呼吸道合胞病毒滴定的改进补充测定方法(MVSAM0129.01),进行BRSV的效价试验。通过各孔的实时qPCR分析替换CPE的目测法,来改进这些测定法。采用疫苗中感染性牛鼻气管炎病毒滴定的改进补充测定方法(MVSAM0105.01),来进行BHV组分的滴定。在该测定法中,可使用96孔形式替代标准6孔形式,以使用于多价疫苗分析的测定法标准化。重要的是,该方案包括用各孔的qPCR分析替换目测法,并统计BHV噬斑以提供更准确和稳固的测定。

[0096] 核酸扩增

[0097] 可按照标准方法(Sambrook等,1989),由病毒或细胞分离用作扩增模板的核酸。核酸可以是基因组DNA或分级分离的细胞RNA或完整细胞RNA。如果使用RNA,则可能需要将RNA转化为互补DNA。在一个实施方案中,RNA为完整细胞RNA,并直接用作扩增的模板。

[0098] 在允许选择性杂交的条件下,使与对应于病毒特有的多核苷酸的核酸(或与保守侧翼区)选择性杂交的引物对与分离核酸接触。如本文定义的术语“引物”意指包括在模板依赖性方法中能够引发新生核酸合成的任何核酸。引物通常是长度为8或10个至40个左右碱基对(bp)的寡核苷酸,但在某些实施方案中,可以使用更长或更短的序列。可提供双链或单链形式的引物,但是单链形式是优选的。

[0099] 一旦杂交,便使核酸:引物复合物与促进模板依赖性核酸合成的一种或多种酶接触。进行多轮扩增(亦称为“循环”),直到产生足量的扩增产物。

[0100] 接下来,检测扩增产物。在某些应用中,可通过目视方法进行检测。或者,检测可包括通过化学发光、掺入放射性标记或荧光标记的放射性闪烁法或甚至通过使用电或热脉冲信号的系统,间接鉴定产物。

[0101] 可获得多种模板依赖性方法以扩增存在于给定模板样品中的标志物序列。最著名的扩增方法之一是聚合酶链式反应(PCR),其详细描述于美国专利号4,683,195、美国专利号4,683,202和美国专利号4,800,159(所述各专利通过引用以其整体结合到本文中)。

[0102] 简单地说,在PCRTM中,制备与标志物序列的相对互补链的区域互补的两个引物序列。将过量的脱氧核苷三磷酸与DNA聚合酶(例如Taq聚合酶)一起加入反应混合物中。如果标志物序列存在于样品中,则引物将与标志物结合,而聚合酶将通过添加核苷酸,使引物沿

标志物序列延伸。通过升高和降低反应混合物的温度,延伸的引物将从标志物上解离以形成反应产物,过量的引物将与标志物和与反应产物结合,并重复该过程。

[0103] 可进行反转录酶PCRTM扩增方法,以量化扩增mRNA的量。将RNA反转录成cDNA的方法是众所周知的,并描述于Sambrook等(1989)。反转录的备选方法利用热稳定的依赖于RNA的DNA聚合酶。

[0104] 基于在具有所得“二寡核苷酸”的序列从而扩增二寡核苷酸的核酸存在下连接两个(或更多个)寡核苷酸的方法,也可用于本发明的扩增步骤。

[0105] 在任何扩增后,可能需要将扩增产物与模板和过量引物分离,以便测定是否发生了特异性扩增。在一个实施方案中,扩增产物采用标准方法通过琼脂糖、琼脂糖-丙烯酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(参见例如Sambrook等(1989)),所述文献通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中。

[0106] 或者,可以采用层析技术以实现扩增产物和/或杂交的扩增产物:标记的探针双链体的分离。有许多可与本发明扩增产物的分析法联用的层析法,包括而不限于吸附、分配、离子交换层析法、分子筛和采用它们的许多特化技术,包括柱层析法、纸层析法、薄层层析法和气相层析法。

[0107] 扩增产物必须显现以证实标志物序列的扩增。一种典型的显现方法包括使具有溴化乙锭的凝胶染色,并在UV光下显现。或者,如果扩增产物用放射性标记的核苷酸或荧光标记的核苷酸完整标记,则可在分离后,将扩增产物暴露于X射线胶片或在合适的激发光谱下显现。

[0108] 在某些实施方案中,显现可间接实现。在扩增产物分离后,使标记的核酸探针与扩增的标志物序列接触。探针优选与发色团缀合,但可以是放射性标记的。在另一个实施方案中,探针与结合配偶体(例如抗体或生物素)缀合,而结合对的另一成员携带了可检测部分。

[0109] 在一个实施方案中,通过DNA杂交分析(“印迹法”),用适当标记的寡核苷酸检测探针进行检测。涉及DNA印迹法的技术为本领域技术人员所熟知,可参见有关分子方案的许多标准书籍。参见Sambrook等(1989)。简单地说,通过凝胶电泳分离扩增产物。然后使凝胶与膜(例如硝化纤维)接触,允许核酸转印和非共价结合。随后,使膜与能够与靶扩增产物杂交的发色团缀合的探针一起温育。通过将膜暴露于X射线胶片或离子发射检测装置来进行检测。

[0110] 上述方法的一个实例描述于美国专利号5,279,721(通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中),该专利公开了用于自动电泳和核酸转印的仪器和方法。该仪器允许在没有凝胶外部操作的情况下进行电泳和印迹法,理想地适于实施本发明的方法。

[0111] 多核苷酸扩增试剂盒

[0112] 本发明还提供用于扩增病毒来源的核酸,具体地讲是BVDV的一个或多个特定毒株、类型或亚型(包括而限于BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2)特有的核酸的试剂盒。这类试剂盒通常包含两个或更多个对扩增多核苷酸群的一种或多种病毒核酸所必需的组分。例如,试剂盒内的一个容器可包含第一引物,而试剂盒内的第二容器可包含第二引物。试剂盒内的第三容器可包含一种或多种杂交和/或检测探针,和/或用于标记一种或多种这类检测探针的一种或多种试剂。另外,本发明的试剂盒还可包含使用说明书,例如关于使用在如本文所述的扩增和/或检测反应中的引物以及一种或多种荧光分子或可能需要的其它试剂(包

括例如但不限于缓冲剂、酶、聚合酶、RNA酶等)的说明书。

[0113] 用于病毒特有的核苷酸的检测和定量的试剂盒

[0114] 诊断试剂盒代表本发明的另一个方面。这类试剂盒还可在试剂盒内包含用于探针、引物、荧光标记或反应缓冲剂、聚合酶等的一个或多个不同的容器工具。试剂盒还可另外包含在一种或多种基于聚合酶链式反应的方法中使用试剂盒内所含有的组合物的说明书,所述方法包括而限于PCR、qPCR、RT-PCR、RT-PCR/FRET等。还可提供使用试剂盒所装试剂的说明书,以在疑似含有这类一种或多种病毒特有的多核苷酸的样品中,检测一种或多种毒株、类型或亚型或病毒例如BVDV (包括而限于BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2)或一种或多种其它哺乳动物病毒病原体,例如而限于BHV-1、PI3、BRSV等。在某些实施方案中,本发明的诊断测定试剂盒还可优选包含在本文所述PCR、qPCR、RT-PCR、RT-PCR/FRET测定法(包括例如实时qPCR)中使用这类试剂盒内所含项目的说明书。

[0115] 前述试剂盒的任一种还可任选包括一种或多种“阳性”或“阴性”对照试剂(control agent)(不论是标记的还是未标记的),用于制备检测测定法的标准曲线。试剂盒的成分可以常规方法包装,包括例如在含水介质中,或作为干燥、冷冻干燥或冻干成分。试剂盒的容器工具一般可包括至少一个小瓶、试管、长颈瓶、瓶子、注射器或其它容器,可将该测定法的成分装于其中,优选适当分装成一份或多份等分成分。如果提供额外成分,则试剂盒一般还可包括可将该成分装入其中的第二、第三或其它额外的容器。试剂盒还可包括其它诊断试剂用于鉴定、定量、物种化(speciating)或表征样品(例如多价疫苗制剂)内所含的MLV。本发明的试剂盒通常还可包括用于在封闭密封中装入一种或多种探针、引物和/或试验试剂以用于商业销售的工具。这类容器可包括例如一个或多个注模或吹模塑料容器,所需试剂容器(例如小瓶、试管、注射器等)被保持在其中。

[0116] 示例性定义

[0117] 按照本发明,多核苷酸、核酸区段、核酸序列等,包括但不限于获自天然来源、化学合成、修饰或另外通过人手完全或部分制备或合成的DNA(包括例如而限于基因组或基因组外DNA)、基因、肽核酸(PNA)、RNA(包括例如但不限于rRNA、mRNA和tRNA)、核苷和合适的核酸区段。

[0118] 除非另有说明,否则本文所用的所有科技术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。虽然类似或等同于本文所述方法和组合物的任何方法和组合物都可用来实践或检验本发明,但是本文描述了优选的方法和组合物。对于本发明的目的,下面定义了下列术语:

[0119] 本文所用术语“约”和“大约”可互换使用,一般应理解是指给定数值左右的数值范围,以及是指所引述数值范围内的所有数值(例如“约5-15”意指“约5-约15”,除非另有说明)。此外,本文所有数值范围应理解为包括该范围内的全部整数的每一个。

[0120] 本文所用术语“PCR试剂”是指除靶核酸序列以外进行聚合酶链式反应测定法所需要的化学制品。这些化学制品一般包括5种成分类别:(a)水性缓冲液;(b)水溶性镁盐;(c)脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP);(d)正向和反向寡核苷酸引物对;和(e)热稳定DNA聚合酶(即可耐受约80和约100°C间的温度达至少约10分钟而又不失去其约一半以上的酶促活性的DNA聚合酶)。4种常用的dNTP为胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)和脱氧鸟苷三磷酸(dGTP),但是它们在PCR反应中可被一种或多种含有碱基类似

物的dNTP补充或置换,所述碱基类似物以类似于常规碱基之一的方式按Watson-Crick方式碱基配对(例如脱氧尿苷三磷酸[dUTP]等)。

[0121] 本文所用术语“寡核苷酸”包括能够通过单体-单体间相互作用的有序方式(例如通过Watson-Crick碱基配对等)与靶核酸特异性结合的天然或修饰的单体或键的线性寡聚体,包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸等。单体通常是通过磷酸二酯(或等同物)键连接的,以形成大小范围为几个单体单位到几十个单体单位的寡核苷酸。在整个本公开内容中,每当寡核苷酸用一连串字母(例如“TTACGCAG”)表示时,应理解为该核苷酸以5'→3'顺序呈现,自左向右读取。在这种表示中,“A”要理解为意指腺苷(或在DNA的情况下为脱氧腺苷),而“C”、“G”、“T”和“U”分别表示胞苷/脱氧胞苷、鸟苷/脱氧鸟苷、脱氧胸苷和尿苷。磷酸二酯键的类似物包括而不限于硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)、氨基磷酸酯等。

[0122] 本文所用术语“基本相当于”、“基本上同源”或“基本同一性”表示核酸或氨基酸序列的性质,其中与选定的参比核酸或氨基酸序列相比,选定核酸或氨基酸序列具有至少约70或约75%序列同一性。更通常,选定序列与参比序列可具有至少约76、77、78、79、80、81、82、83、84或甚至85%序列同一性,更优选至少约86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%序列同一性。还更优选高度同源的序列常常在所选序列和与之相比较的参比序列间共有大于至少约96、97、98或99%序列同一性。

[0123] 序列同一性的百分比可以在待比较的全长序列内计算,或者还可通过不包括总共小于选定参比序列的约25%左右的少量缺失或添加来计算。参比序列可以是较大序列的子集,例如基因的一部分或侧翼序列,或染色体的重复部分。然而,在两个或更多个寡核苷酸或多核苷酸序列的序列同源性的情况下,参比序列通常可包含至少约10-15个核苷酸、更通常至少约16-25个核苷酸、甚至更通常至少约26-35个核苷酸、至少约40个核苷酸、至少约45个核苷酸、至少约50个核苷酸或至少约60、70、80、90个或甚至至少约100个左右的核苷酸。

[0124] 优选当需要高度同源片段时,两个序列(通常称为“靶”和“探针”序列)间的百分比同一性可为至少约80%同一性、优选至少约85%同一性、更优选至少约90%同一性、至少约92%同一性、至少约93%同一性、至少约94%同一性或甚至至少约95%、96%、97%、98%或99%或更高。应用一种或多种标准序列比较算法,例如Pearson和Lipman (1988)描述的FASTA程序分析,本领域技术人员可容易地测定两个或更多个寡核苷酸或多核苷酸序列间的同源性百分比或同一性百分比。

[0125] 本文所用术语“天然存在的”当应用于某一对象时,是指可在自然中找到对象这一事实。例如,可从天然来源分离,并且未经过人手有意修饰的多肽或多核苷酸序列是“天然存在的”序列。

[0126] 术语“基本上互补”当用于定义氨基酸或核酸序列时,意指特定的主题序列例如寡核苷酸序列与所选序列的全部或部分基本上互补,因此可与编码所选序列的mRNA的一部分特异性结合。因此,通常该序列可与mRNA “靶”序列高度互补,并且在整个序列的互补部分将具有不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基错配。

[0127] 基本上互补的寡核苷酸序列与寡核苷酸与之特异性结合的相应的靶核酸序列可有大于约80%互补性、大于约85%互补性、大于约90%互补性或甚至大于约95%互补性(或“%精确匹配”),且可更优选与寡核苷酸与之特异性结合的相应的核酸序列有大于约96%或更高互补性。

[0128] 在某些方面,如上所述,可能需要具有甚至更高的基本互补的寡核苷酸序列用于本发明的实践中,在这类情况中,寡核苷酸序列与所设计的寡核苷酸探针或引物与之特异性结合的靶核酸序列的全部或部分将有大于约96%、97%、98%、99%或甚至100%互补性。

[0129] 例如,可采用可获自University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCGC)的GAP计算机程序6.0版,通过比较序列信息,来测定所公开的序列任一个的百分比相似性或百分比互补性。GAP程序利用Needleman和Wunsch的比对方法。简单地说,GAP程序把相似性定义为相似的比对符号(即核苷酸或氨基酸)数除以两个序列中较短序列的符号总数。GAP程序优选的默认参数包括:(1)核苷酸的一元比较矩阵(含有同一性的值为1,非同性的值为0),和Gribskov等人的加权比较矩阵,(2)对于每个空位,罚分为3.0,且每个空位每个符号的额外罚分为0.10;和(3)末端空位无罚分。

[0130] 在许多情况下,可能需要精确匹配的序列,即与寡核苷酸与之特异性结合的序列完全互补,因此沿互补段具有零错配。因此,高度互补的引物或探针序列通常可与多个多核苷酸的靶序列区极特异性地结合,因此可在指导靶序列通过PCR、qPCR、RT-qPCR或RT-qPCR/FRET等的扩增时十分有效。

[0131] “扩增反应混合物”是指包含扩增一种或多种选定靶核酸序列所必需的一种或多种不同试剂的水性溶液。这类混合物包括而不限于一种或多种酶、一种或多种水性缓冲液、一种或多种盐、一种或多种靶核酸和多个常用的核苷三磷酸。根据上下文,混合物可为完全或不完整的扩增反应混合物。

[0132] “扩增反应”是指任何用于扩增靶核酸序列以产生这类序列群的体外方法。常规扩增方法包括但不限于PCR、DNA连接酶、Q β 复制酶、基于RNA转录的扩增系统等。

[0133] 本文所用术语“扩增试剂”是指用于进行选定扩增反应的各种缓冲剂、酶、引物、核苷三磷酸(常用和非常用两者)和探针。

[0134] 本文所用“使……扩增”或“扩增”通常是指本文使用靶核酸的指数增长来描述核酸的选定靶序列数目的线性和指数增长两者。

[0135] “基本上结合”是指寡核苷酸间的互补杂交,并包括可通过降低杂交介质的严格性以实现PCR聚合酶所需启动而容纳的少量错配。

[0136] 本文所用“生物素化”是指在检测测定法中为了与链霉抗生物素反应而与寡核苷酸的5'端共价连接的生物素部分。

[0137] 在核酸的情况下,术语“结合”、“与……结合”和“结合的”是指两个或更多个核酸序列通过互补Watson-Crick碱基配对的杂交。

[0138] 本文所用“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,除非另有限制,否则可包括可以与天然存在的核苷酸类似的方式起作用的天然核苷酸的已知类似物。

[0139] “核苷酸聚合酶”是能够催化自核苷三磷酸前体群合成DNA或RNA的酶。在本发明的扩增反应中,聚合酶是模板依赖性的,并且通常从正在形成的聚合物的2'端延伸。在优选的应用中,所采用的聚合酶是热稳定聚合酶。

[0140] 本文所用“引物”或“寡核苷酸引物”是指能够在合适的缓冲液中和在合适的温度下,于其中启动与核酸链互补的引物延伸产物进行合成的条件下(即在4种不同的核苷三磷酸(nucleotide triphosphate)和用于聚合的作用剂例如DNA聚合酶或逆转录酶存在下)用

作DNA合成起始点的不论是天然的还是合成的寡核苷酸。在本发明的情况下,引物优选为寡脱氧核糖核苷酸,优选单链以在扩增中效率最大。如本领域普通技术人员所知,这类引物不必反映靶模板的确切序列,但是必须与所述序列充分互补,以允许在合适的反应条件下与模板杂交(即结合)。

[0141] 本文所用的“改性活疫苗”是这样的疫苗,其包含通常通过在组织培养细胞中传代而经改变以减弱其引发疾病的能力,但是当随后给予动物时仍保持其防止疾病或感染的能力的病毒。

[0142] 术语“病原体”在本文定义为任何种类的感染因子,包括例如病毒、朊病毒、原生动物、寄生物、以及微生物例如细菌、酵母、霉菌、真菌等。

[0143] 本文所用术语“个体”(亦可互换称为“宿主”、“受试者”、“接受者”、“患者”等)是指可接受本文公开的一种或多种药物组合物或疫苗制剂的任何动物。优选受试者是脊椎动物,其旨在表示任何动物物种(优选哺乳动物物种)。在某些实施方案中,个体优选为任何哺乳动物宿主,包括但不限于非人灵长类动物、牛、犬、公山羊、豚鼠(cavines)、乌鸦、epines、马、猫、山羊、兔子(lapines)、野兔、狼、绵羊、猪、racines、狐狸等,包括家畜、动物学标本、引进种以及陪伴动物、宠物和在兽医从业者护理下的任何动物。

[0144] 本文所用术语“疫苗”是指含有本发明的免疫原性组合物、呈能够给予脊椎动物、优选给予例如哺乳动物等动物的形式的组合物或制剂。通常本发明的疫苗可包括本文公开的配制用于给予有需要的动物的一种或多种免疫原性组合物(包括一种或多种改性活病毒颗粒或其多个颗粒)。这类组合物可以是任何合适的制剂,包括而但不限于在水性溶媒中制备的制剂,以及呈冻结、冷冻干燥、冻干或脱水形式,随后在给予前在常规药学上可接受的溶媒(例如无菌盐水或类似的缓冲水溶液)中再水合或混悬的制剂。在这类形式中,本发明的疫苗组合物可制成合适的单剂量或多剂量等分制剂,所述等分制剂可容易地应用于一种或多种本文公开的方法或接种方案,以预防、管理或另外治疗易感动物的病毒和/或微生物感染的一种或多种病况或一种或多种症状。

[0145] 本文所用术语“例如”仅用于举例说明,而无任何预定限制;因此,不应解释为仅仅是指说明书中明确列举的那些项目。

[0146] 本文所用“靶序列”或“靶核苷酸序列”包括所述引物序列之一与之在以下条件下杂交的任何核苷酸序列,所述条件允许具有聚合酶活性的酶使引物序列延长,并因此复制互补链。

[0147] 核酸分子(通常由DNA组成)能够在宿主细胞中复制和/或另一核酸区段可与之有效连接从而引起所连接的区段复制。质粒、黏粒或病毒为示例性载体。

[0148] “引物”或“引物序列”可包括与互补模板核酸链(“靶序列”)选择性杂交并起加入核苷酸的起始点的作用从而复制模板链的任何核酸序列或区段。本发明的引物序列可被标记或包含允许检测和/或分析扩增产物的其它修饰。除用作聚合酶介导的靶DNA序列复制的引发剂以外,引物序列还可用于模板RNA反转录成相应的DNA。

[0149] 本文所用“荧光共振能量转移对”或“FRET对”是指包含供体荧光团和接纳体荧光团的荧光团对,其中供体荧光团能够将共振能转移至接纳体荧光团。在优选的荧光共振能量转移对中,供体荧光团的吸收光谱基本上不与接纳体荧光团的吸收光谱重叠。本文所用“供体寡核苷酸探针”是指用FRET对的供体荧光团标记的寡核苷酸。本文所用“接纳体寡核

核苷酸探针”是指用FRET对的接纳体荧光团标记的寡核苷酸。本文所用“FRET寡核苷酸对”通常可包含“锚”或“供体”寡核苷酸探针和“接纳体”或“传感器”寡核苷酸探针,当供体寡核苷酸探针和接纳体寡核苷酸探针两者与其互补靶核酸序列杂交时,这类配对构成FRET关系。用作FRET对的可接受的荧光团对为本领域技术人员所熟知的,包括但不限于荧光素/罗丹明、藻红蛋白/Cy7、荧光素/Cy5、荧光素/Cy5.5、荧光素/LC Red 640和荧光素/LC Red 705。

[0150] 按照长期专利法惯例,不定冠词当用于包括权利要求书在内的本申请中时,表示“一个或多个”。

实施例

[0151] 本文包括下列实施例以说明本发明的说明性实施方案。本领域普通技术人员应了解,公开于下文的实施例中的技术代表了已发现在本发明实践中运行良好的技术,因此可视为构成其实践的优选模式。然而根据本公开内容,本领域普通技术人员应认识到,可对已公开的具体实施方案进行许多改变,并且仍获得相同或相似的结果而又不偏离本发明的精神和范围。

[0152] 用于多因子疫苗成分的效价测定方案

[0153] 本实施例表明使用定量(实时)聚合酶链式反应(qPCR)测定法成功地测定出多价改性活病毒(MLV)疫苗的各个病毒成分的效价。

[0154] 在本发明人的共同待审美国临时专利申请号61/427,361中,本发明人开发了有效针对BRDC和船运热的6联(six-way)(即六价)改性活病毒(MLV)疫苗。本实施例描述了可用于定量测定这类疫苗的各个病毒成分的测定法。本发明人表明该测定法相对于现有方法在测定多价(即多价或多成分)疫苗中在遗传上有关的毒株的各自效价方面是特别有利的。使用六价MLV BRDC疫苗作为模型,本发明人证实了该测定法在区分和定量测定各个疫苗成分的效价中是有效的,甚至在疫苗含有单个病毒类型的3种亚基因型时。这类测定法为用于在多价疫苗制剂中准确定量测定BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2的存在情况提供了新的更可靠的方法。

[0155] 材料与方法

[0156] 细胞培养

[0157] 所有培养物采用Freshney (1987)描述的常规技术和必需品制备。在全部培养测定法中使用TVL-牛肾细胞系,该细胞系在培养中显示典型的上皮样形态。

[0158] BVDV-1b Master Seed培养物(在申请人共同待审的美国临时专利申请号61/427,361)中命名为“TVL BVDV1b MS 04/27/2007 DW3-095”)已保藏于这样的条件下,所述条件确保在该专利申请的待审期间由专利与商标委员根据37 C.F.R. § 1.14和35 U.S.C. § 122条款确定有资格的人员可获得培养物。保藏材料可在其中提交了本主题申请的对应申请或其子申请的国家中按照外国专利法根据需要获得。然而,应当了解保藏材料的可用性不构成许可实施本主题发明而减损由政府行为授予的专利权。主题培养物保藏材料将按照微生物保藏材料布达佩斯条约的规定保存,并可使之成为可公开获取的,即可以保持其活力及不受污染达在最近要求完成保藏材料样品后的至少5年时期且在任何情况下达保藏日期后至少30(三十)年的时期或达公开了保藏材料的可能授权的任何专利的可行使期限所必需的所有照管下保存。若由于保藏材料的情况所致保藏处不能在请求时提供样品的话,

保藏人确认更换保藏材料的责任。所有关于公众对本主题培养物保藏材料的可用性的限制将在公开了该保藏材料的专利授权时不可撤消地移除。根据布达佩斯条约的条款,TVL BVDV1b MS 04/27/2007 DW3-095病毒的保藏材料于2010年12月21日进入位于10801 University Blvd.,Manassas,VA,20110-2209,USA的美国典型培养物实验室专利保藏中心的永久保藏,然后由保藏中心指定保藏号为ATCC PTA-11553。

[0159] 引物/探针组的特异性

[0160] 从来自每一种下列美国农业部(United States Department of Agriculture, USDA)批准的病毒种子的病毒液体中提取RNA:BVDV-1a (Singer毒株)、BVDV-1b (TGAC毒株)、BVDV-2 (125)、PI3 (Reisinger SF-4)和BRSV (N375) (未对BHV-1 [Cooper毒株] 进行提取过程,因为它是DNA病毒)。提取采用RNAqueous[®]-4PCR (Ambion;Austin,TX,USA)进行。

[0161] RNA病毒样品的每一种在使用TaqMan[®]一步RT-PCR化学法的6个引物/探针组每一个的各个RT-qPCR反应中用作模板(样品)。DNA病毒(BHV-1)亦在具有上述6个引物/探针组每一个的各qPCR反应中用作模板(样品)。针对六价疫苗所有6个病毒组分的BRSV引物/探针组的分析表明,引物/探针组的每一种与其它病毒组分的任一种都没有交叉反应性。

[0162] qPCR测定法

[0163] 采用Applied Biosystems 7500实时PCR系统进行qPCR测定法。

[0164] 寡核苷酸引物和标记的分子探针

[0165] 下列定制的TaqMan[®]探针和病毒特异性正向和反向引物对由Applied Biosystems (Foster City,CA,USA)制备。

[0166] BVDV-1b (第一):

[0167] 正向引物:5'-CACCTATCAGGCTGTATTCATAGC-3' (SEQ ID NO:1);

[0168] 反向引物:5'-TGCCACAGCACATCTTAACC-3' (SEQ ID NO:2);和

[0169] BVDV-1b检测探针:5'-TCACCTGGACGACCC-3' (SEQ ID NO:3)。

[0170] BVDV-1b (第二):

[0171] 第二正向引物:5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO:19);

[0172] 第二反向引物:5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO:20);和

[0173] 第二BVDV-1b检测探针:5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO:21)。

[0174] 虽然BVDV-1b (第一)提供了可接受的结果,但是BVDV-1b (第二)显示出更好的结果。

[0175] BRSV:

[0176] 正向引物:5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3' (SEQ ID NO:4);

[0177] 反向引物:5'-ACACTGTAATTGATGACCCATTCT-3' (SEQ ID NO:5);和

[0178] BRSV检测探针:5'-AAGACTTGTATGATGCTGCCAA-3' (SEQ ID NO:6)。

[0179] BVDV-1a:

[0180] 正向引物:5'-GGTCGCCCAGGTAAAAGCA-3' (SEQ ID NO:7);

[0181] 反向引物:5'-GCCTCTGCAGCACCTATCA-3' (SEQ ID NO:8);和

[0182] BVDV-1a检测探针:5'-AACCGACTGTTACGAATAC-3' (SEQ ID NO:9)。

[0183] BVDV-2:

- [0184] 正向引物:5'-GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGAC-3' (SEQ ID NO:10);
- [0185] 反向引物:5'-GACGAGTCCCCTGTACTCAGG-3' (SEQ ID NO:11);和
- [0186] BVDV-2检测探针:5'-CAGTGAGTCCATTGGATGG-3' (SEQ ID NO:12)。
- [0187] PI₃:
- [0188] 正向引物:5'-GGAGACCAAGACCAAGGAGATG-3' (SEQ ID NO:13);
- [0189] 反向引物:5'-CGTCTGCCCATGCATAAGG-3' (SEQ ID NO:14);和
- [0190] PI₃检测探针:5'-ACCTCGGTCATCCATAG-3' (SEQ ID NO:15)。
- [0191] BHV-1:
- [0192] 正向引物:5'-CCATGTTAGCGCTCTGGAACC-3' (SEQ ID NO:16);
- [0193] 反向引物:5'-CGTCTTTACGGTCGACGACTCC-3' (SEQ ID NO:17);和
- [0194] BHV-1检测探针:5'-ACGGACGTGCGCGAA-3' (SEQ ID NO:18)。
- [0195] 单价疫苗的效价测定

[0196] 下列测定法每一个的方案利用Applied Biosystems 7500比较阈值循环(Comparative Threshold Cycle, C_t)方法以确定与相应的参比孔相比,滴定板的各孔是否含有大量的病毒。大部分病毒样品包含可通过PCR测定法检测的一些无活力的病毒颗粒,因此可能得到假阳性结果。这个问题通过使用没有细胞的参比板来解决。将样品在参比板中稀释,完全像在测定板中一样,只是没有细胞以排除病毒复制的可能性。使用参比板以产生作为各项测定中每孔的基线或背景C_t值。如果测定板上的孔具有比相应的背景孔大的C_t值,则已发生了病毒复制,该孔被视为阳性。如果测不出孔的C_t值,或C_t值等于背景C_t值,则该孔被视为阴性。

[0197] 多价疫苗的效价测定

[0198] 如本文所述制备了试验系列的IBR/BVDV-1a、-1b、-2/PI₃/RSV六价疫苗改性活病毒。简单地说,使BHV-1 (Cooper毒株)、BVDV-1a (Singer毒株)、BVDV-1b (TGAC毒株)、BVDV-2 (125)、PI₃ (Reisinger SF-4)和BRSV (N375)在TVL-BK细胞系中繁殖(第20传代)。在第10传代收获各部分,混合在一起成为6联制品。可按本文所述,加入合适的中和抗血清,来进行6联疫苗各组分的效价试验。根据CPE/FA/IFA结果确定各病毒组分的TCID₅₀,并与根据RT-qPCR/qPCR的结果进行比较。

[0199] BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2效价试验

[0200] 可按照疫苗中牛病毒性腹泻病毒滴定的补充测定方法(SAM 101),对单价BVDV-1a、BVDV-1b和BVDV-2样品进行滴定。简单地说,该测定以一式两份进行,其中一板用于基本所述CPE和/或FA/IFA的效价计算。另一板用来测定基于RT-qPCR的效价。对于每种病毒,包括如上所述没有细胞的参比板。

[0201] PI₃效价试验

[0202] PI₃的效价试验以一式两份进行,其中一板用于基于CPE的效价计算。另一板用来根据通过RT-qPCR测定的PI₃的比较C_t值来测定效价。如上所述,包括没有细胞的参比板。

[0203] BRSV效价试验

[0204] BRSV的效价试验以一式两份进行,其中一板用于基于如上所述的CPE的效价计算,其余板用来根据通过RT-qPCR测定的BRSV的比较C_t值来测定效价。如上所述,没有细胞的参比板也包括在该测定法中。

[0205] BHV效价试验

[0206] 通过用各孔的qPCR分析替换常规的目测法,并统计噬斑,在96孔板中进行BHV的效价试验。该测定以一式两份进行,其中一个板用于基于各孔(稀释液)中CPE存在与否的效价计算,而其余板用来根据通过QPCR测定的BHV的比较C_T值来计算效价。如上所述,包括没有细胞的参比板。

[0207] 试验结果

[0208] 下面提供来自上述试验的结果。

[0209] 表1:来自研究中的6种病毒每种的已知病毒样品针对RT-PCR BVD 1a探针-引物组(1A pp)运行。BVD 1a探针-引物组与研究中的其它病毒的每一种没有交叉反应性。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0210]

孔	样品名称	靶	报告分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值
A7	BHV nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A8	1A nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	19.09957	19.09957
A9	PI3 nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A10	1B nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A11	BVD2 nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A12	BRSV nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
D3	1A + 对照	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	20.24967	20.24967
D4	1A - 对照	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定

[0211] 表2:具有已知TCID₅₀的BVD 1a (1A)的对数稀释度与得自与RT-PCR BVD 1a探针-引物组的反应的其相应C_T分值和针对各稀释度推导的TCID₅₀值。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0212]

孔	样品名称	靶	报告分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值	TCID ₅₀
A8	1A nd 和 1A pp	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	19.09957	19.09957	7.79
E8	1A 10 ⁻¹	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	25.53863	25.53863	6.79
E9	1A 10 ⁻²	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	29.94803	29.94803	5.79
E10	1A 10 ⁻³	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	35.1481	35.1481	3.79
E11	1A 10 ⁻⁴	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	1.79
E12	1A 10 ⁻⁵	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	0.79

[0213] 表3:研究中的6种病毒每种的已知病毒样品针对RT-PCR BRSV探针-引物组(pp)运行。BRSV探针-引物组与研究中的其它病毒的每一种没有交叉反应性。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0214]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值
C6	BHV nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
C7	1A nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
C8	PI3 nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
C9	1B nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
C10	BVD2 nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
C11	BRSV nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	19.72052	19.72052
C12	BRSV + 对照	BRSV	FAM	NFQ-MGB	21.971	21.971
D1	BRSV - 对照	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定

[0215] 表4:具有已知TCID₅₀的BRSV的对数稀释度与得自与RT-PCR BRSV探针-引物组的反应的其相应C_T分值和针对各稀释度推导的TCID₅₀值。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0216]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值	TCID ₅₀
C11	BRSV nd 和 BRSV pp	BRSV	FAM	NFQ-MGB	19.72052	19.72052	5.79
H8	BRSV 10 ⁻¹	BRSV	FAM	NFQ-MGB	26.95523	26.95523	4.79
H9	BRSV 10 ⁻²	BRSV	FAM	NFQ-MGB	29.32718	29.32718	3.79
H10	BRSV 10 ⁻³	BRSV	FAM	NFQ-MGB	36.95991	36.95991	1.79
H11	BRSV 10 ⁻⁶	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	NA
H12	BRSV 10 ⁻⁸	BRSV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	NA

[0217] 表5:研究中的6种病毒每种已知病毒样品针对RT-PCR BVD 1b探针-引物组(1B pp)运行。BVD 1b探针-引物组与研究中的其它病毒的每一种没有交叉反应性。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组,+= 阳性对照)

[0218]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值
H1	BHV +和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
H2	1A +和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
H3	PI3 +和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
H7	1B nd 和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	18.81768
H5	BVD2 +和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
H6	BRSV +和 1B pp	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
H4	1B + 对照	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	20.74105	20.74105
C12	1B - 对照	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定

[0219] 表6:具有已知TCID₅₀的BVD 1b (1B)的对数稀释度与得自与RT-PCR BVD 1b探针-引物组的反应其相应的C_T分值和针对各稀释度推导的TCID₅₀值。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0220]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值	TCID ₅₀
H7	IB nd 和 IB pp	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	18.81769	18.81769	7.79
H8	IB 10 ⁻¹	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	27.91738	27.91738	6.79
H9	IB 10 ⁻²	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	33.86901	33.86901	5.79
H10	IB 10 ⁻³	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	3.79
H11	IB 10 ⁻⁴	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	1.79
H12	IB 10 ⁻⁵	BVD Ib	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	0.79

[0221] 表7:研究中的6种病毒每种的已知病毒样品针对RT-PCR PI3探针-引物组运行。PI3探针-引物组与研究中的其它病毒的每一种没有交叉反应性。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0222]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值
B1	BHV nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
B2	IA nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
B3	PI3 nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	11.23717	11.23717
B4	IB nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
B5	BVD2 nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
B6	BRSV nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
D5	PI3 + 对照	PI3	FAM	NFQ-MGB	19.16233	19.16233
D6	PI3 - 对照	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定

[0223] 表8:具有已知TCID₅₀的PI3的对数稀释度与得自与RT-PCR PI3探针-引物组的反应的其相应C_T分值和针对各稀释度推导的TCID₅₀值。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0224]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值	TCID ₅₀
B3	PI3 nd 和 PI3 pp	PI3	FAM	NFQ-MGB	11.23717	11.23717	9.44
F1	PI3 10 ⁻¹	PI3	FAM	NFQ-MGB	21.23889	21.23889	8.44
F2	PI3 10 ⁻²	PI3	FAM	NFQ-MGB	26.39993	26.39993	7.44
F3	PI3 10 ⁻³	PI3	FAM	NFQ-MGB	30.55147	30.55147	5.44
F4	PI3 10 ⁻⁴	PI3	FAM	NFQ-MGB	34.95575	34.95575	4.44
F5	PI3 10 ⁻⁵	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	2.44
F6	PI3 10 ⁻⁶	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	1.44
F7	PI3 10 ⁻⁷	PI3	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	NA

[0225] 表9:研究中的6种病毒每种的已知病毒样品针对RT-PCR BHV探针-引物组运行。BHV探针-引物组与研究中的其它病毒的每一种没有交叉反应性。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0226]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值
A1	BHV nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	14.87263107	14.87263
A2	1A nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A3	PI3 nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A4	1B nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A5	BVD2 nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
A6	BRSV nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定
D1	BHV + 对照	BHV	FAM	NFQ-MGB	11.92034817	11.92035
D2	BHV - 对照	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定

[0227] 表10:具有已知TCID₅₀的BHV的对数稀释度与得自与RT-PCR BHV探针-引物组的反应的其相应C_T分值和针对各稀释度推导的TCID₅₀值。(nd= 未稀释,pp=探针-引物组)

[0228]

孔	样品名称	靶	报道分子	猝灭剂	C _T	C _T 平均值	TCID ₅₀
A1	BHV nd 和 BHV pp	BHV	FAM	NFQ-MGB	14.87263107	14.87263	8.32
E1	BHV 10 ⁷	BHV	FAM	NFQ-MGB	20.99085045	20.99085	7.32
E2	BHV 10 ⁶	BHV	FAM	NFQ-MGB	25.22445679	25.22446	6.32
E3	BHV 10 ⁵	BHV	FAM	NFQ-MGB	29.45383453	29.45383	4.32
E4	BHV 10 ⁴	BHV	FAM	NFQ-MGB	36.95075989	36.95076	3.32
E5	BHV 10 ³	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	1.32
E6	BHV 10 ²	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	NA
E7	BHV 10 ¹⁰	BHV	FAM	NFQ-MGB	未测定	未测定	NA

[0229] 参考文献

[0230] 下列参考文献,在其提供补充本文所给出的详细内容的示例性程序上或其它详细内容的范围内,通过对其的明确引用以其整体特别结合到本文中。

[0231] Caruthers等人的美国专利号4,415,732。

[0232] Caruthers等人的美国专利号4,458,066。

[0233] Mullis等人的美国专利号4,683,195。

[0234] Mullis等人的美国专利号4,683,202。

[0235] Koster等人的美国专利号4,725,677。

[0236] Caruthers等人的美国专利号4,973,679。

[0237] Molko等人的美国专利号4,980,460。

[0238] Picone等人的美国专利号5,614,388。

[0239] Agrawal等, Nucl. Acids Res., 18:5419-5423,1990。

[0240] Baker, J.C., "The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection (牛病毒性腹泻感染的临床表现)," Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., 11:425-445, 1995。

[0241] Baker, J.C., Werdin, R.E., Ames, T.R., Markham, R.J.和Larson, V.L., "Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves (对牛呼吸道合胞病毒在乳牛肺炎中的病因学作用的研究)"

究),” J. Am. Vet. Med. Assoc.,189(1):66-70, 1986。

[0242] Barber, D.M., Nettleton, P.F.和Herring, J.A., “Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine diarrhoea virus (与牛腹泻病毒传入与传播有关的乳畜群中的疾病),” Vet. Rec.,117(18):459-464, 1985。

[0243] Beaucage和Iyer,Tetrahedron,48:2223-2311,1992。

[0244] Becher, P., Konig, M., Paton, D.J.和Thiel, H.J., “Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus (边界病病毒分离株的进一步表征:瘟病毒属内存在3个以上种的证据),” Virology,209(1):200-206, 1995。

[0245] Collett, M.S., R. Larson, S.K. Belzer和E. Retzel, “Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus (由牛病毒性腹泻病毒编码的蛋白质:瘟病毒属的基因组结构),” Virology, 165(1):200-208, 1988。

[0246] Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, D. Stoll, T. Rumenapf和H.J. Thiel, “Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7 (瘟病毒属E2-NS2区的加工:蛋白质p7和E2p7的鉴定),” J. Virol., 70(6): 4131-4135, 1996。

[0247] Fergen, B.J., “Estimating an Intervention Effect on Outcome Severity (评价对结果严重程度的干预作用),” USDA Center for Veterinary Biologics, Ames, IA, USA; 个人通信, 2004。

[0248] Finney, D.J., “Statistical method in biological assay (生物学测定中的统计方法),” 第3版, Charles Griffin and Company Ltd., London, 1978。

[0249] Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R.等, “Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence of subgenotype within BVDV-2 (巴西牛病毒性腹泻病毒2型(BVDV-2)分离株的系统发育分析:BVDV-2内亚基因型的证据),” Virus Res.,87:51-60, 2002。

[0250] Freshney, R.I., “Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (动物细胞培养基础技术手册),” 第2版, Dept of Medical Oncology, University of Glasgow, Alan R. Liss, Inc., Publisher, New York, NY, USA, 1987。

[0251] Fulton, R.W., Hessmand, B, Johnson, B.J.等, “Evaluation of diagnostic test used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot (对用于检测进入饲养场的受持续感染牛中的牛病毒性腹泻病毒和亚型1a、1b和2a的发生率的诊断试验的评价),” J. Am. Vet. Med. Assoc., 228(4):578-584, 2006。

[0252] Gillespie, J.H., J.A. Baker和K. McEntee, “A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus (病毒腹泻病毒的致细胞病变毒株),” Cornell Vet.,50:73-79, 1960。

[0253] Hofmann, M.A., Brechtbuhl, K.和Stauber, N., “Rapid characterization

of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' non-coding region (通过对自5'非编码区的PCR扩增cDNA直接测序对新的瘟病毒属毒株的快速表征),” Arch. Virol.,139:217-229, 1994。

[0254] Holland等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280, 1991。

[0255] Liess, B., H.R. Frey, H. Kittsteiner, F. Baumann和W. Neumann, “Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a ‘slow virus infection (牛粘膜病,一种用‘缓慢病毒感染’标准在免疫生物学上可解释的BVD-MD病毒感染晚期),” Dtsch. Tieraerzti. Wschr., 81(2):481-487, 1974。

[0256] Malmquist, W.A., “Bovine viral diarrhea mucosal disease: etiology, pathogenesis, and applied immunity (牛病毒性腹泻粘膜疾病:病因、发病机制和适用免疫力),” J. Am. Vet. Med. Assoc., 152:763-768, 1968。

[0257] McNulty M.S., Allan G.M., “Application of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis (兽医病毒诊断中免疫荧光的应用),”载于: Recent advances in virus diagnosis, McNulty MS, McFerran JB (主编), 第15-26页. Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands, 1984。

[0258] Olafson, P., A.D., MacCallum和F.H. Fox, “An apparently new transmissible disease of cattle (一种显然是新的可传染性牛疾病),” Cornell Vet.,36:205-213, 1946。

[0259] Ozaki等, Nucl. Acids Res., 20:5205-5214,1992。

[0260] Paton, D.J., “Pestivirus diversity (瘟病毒属多样性),” J. Comp. Pathol.,112(3):215-236, 1995。

[0261] Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte和P. Tussen, “Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities (与强暴发和高死亡率有关的新的一类牛病毒性腹泻病毒毒株的鉴定),” Virology,203(2):260-268, 1994。

[0262] Ramsey, F.K.和W.H. Chivers, “Mucosal disease of cattle (牛粘膜病),” North Am. Vet., 34:629-633, 1953。

[0263] Ranheim, T, Mathis, P.K., Joelsson, D.B.等, “Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (Rota Teq®) (五价轮状病毒疫苗(Rota Teq®)定量RT-PCR效价测定法的开发与应用),” J. Virol. Meth.,131:193-201, 2006。

[0264] Ridpath, J.F.和Bolin, S.R., “Differentiation of types 1a, 1b, and 2 bovine virus diarrhea virus by PCR (通过PCR鉴别1a型、1b型和2型牛病毒腹泻病毒),” Molec. Cell. Probes,12:101-106, 1998。

[0265] Ridpath, J.F., S.R. Bolin和E.J. Dubovi, “Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes (将牛病毒性腹泻病毒分成基因型),” Virology,205(1):66-74, 1994。

[0266] Ridpath, J.F., Bolin, S.R.和Dubovi, E.J., “Segregation of bovine

viral diarrhea virus into genotype (将牛病毒性腹泻病毒分成基因型),” *Virology*, 205:66-74, 1994。

[0267] Ross, C.E., Dubovi, E.J.和Donis, R.O., “Herd problems of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea (由牛病毒性腹泻所致流产和畸形犊牛的牧群问题),” *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188(6):618-619, 1986。

[0268] Sambrook等, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989。

[0269] Sambrook和Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001。

[0270] Schalk, J.A.C., de Vries, C.G.J.C.A.和Jongen, P.M.J.M., “Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay (用定量PCR感染性测定法对麻疹、流行性腮腺炎和风疹三价疫苗的效价评价),” *Biologicals*, 33(2):71-79, 2005。

[0271] Schalk, J.A.C., Elzen, C.V.D., Ovelgonne, H等, “Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR (采用定量实时PCR对活病毒疫苗中的感染性麻疹病毒数的评价),” *J. Virol. Meth.*, 117:179-187, 2004。

[0272] Scheifers, J., Munoz-Zanzi, C., Collins, J.E., Goyal, S.M.和Ames, T.R., “Serological evaluation of precolostral serum samples to detect Bovine viral diarrhea virus infections in large commercial dairy herds (检测大规模商业乳畜群中的牛病毒性腹泻病毒感染的初乳前血清样品的血清学评价),” *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20:625-628, 2008。

[0273] Tanner, J.E.和A. P. Morgan, “Design and analysis of veterinary vaccine efficacy trials (兽用疫苗功效试验的设计和分析),” *Vet. Microbiol.*, 37 (3-4):221-230, 1993。

[0274] Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G.和Thiel, H.J., “Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites (瘟病毒属的丝氨酸蛋白酶:切割位点的确定),” *J. Virol.*, 71(7):5415-5422, 1997。

[0275] Thiel等, “The pestiviruses (瘟病毒属),” 载于*Virology*, Fields等, (主编) (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA), 第1059-1073页, 1996。

[0276] Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B等, “Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups (牛病毒性腹泻病毒基因型1可分成至少11个遗传类群).” *Arch. Virol.*, 146:99-115, 2001。

[0277] Wang, F., Puddy, A.C., Mathis, B.C.等, “Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency (采用QPCR指定基因疗法的基于腺病毒的疫苗和载体的感染效价:朝向用于简易定量测定病毒和载体效价的通用方法),” *Vaccine*, 23:4500-4508, 2005。

[0278] Wiskerchen, M.和M.S. Collett, “Pestivirus gene expression: protein

p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing (瘟病毒属基因表达:牛病毒性腹泻病毒的蛋白质p80是参与多蛋白加工的蛋白酶),” *Virology*, 184(1):341-350, 1991。

[0279] Wren, G., “New Thinking on BRSV: Research into BRSV and vaccines reveals new information about how the virus behaves and how it may interact with killed vaccines (有关BRSV的新见解:BRSV和疫苗的研究提示有关病毒如何表现和其如何可与已杀灭的疫苗相互作用的新信息),” *Bovine Veterinarian*, (二月) 第16-19页, 2001。

[0280] Xu, J., E. Mendez, P.R. Caron, C. Lin, M.A. Murcko, M.S. Collett和C.M. Rice, “Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication (牛病毒性腹泻病毒NS3丝氨酸蛋白酶:瘟病毒属复制必需的酶的多蛋白切割位点、辅因子要求和分子模型),” *J. Virol.*, 71(7):5312-5322, 1997。

[0281] Xue, W., D. Mattick, L. Smith, J. Umbaugh和E. Trigo, “Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1 b strains (用改性的活的牛病毒性腹泻病毒(BVDV) 1a型疫苗接种完全保护犊牛免于受BVDV 1型b毒株攻击),” *Vaccine*, 29(1):70-76, 2010年12月10日, [2010年10月27日出版前的电子版]。

[0282] 可根据本公开内容在没有过度实验的情况下制备和实施本文公开和要求保护的所有组合物和方法。虽然根据示例性实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对本领域普通技术人员显而易见的是可将各种变化应用于本文所述组合物、方法和方法的步骤顺序中而不偏离本发明的构思、精神和范围。更具体地说,既是化学上相关又是生理学上相关的某些作用剂可替换本文描述的作用剂同时可实现相同或相似的结果将是显然的。对本领域普通技术人员显然的所有这类相似的替换和修改被认为落入随附权利要求书限定的本发明的精神、范围和构思内。因此,试图获得专利的专有权如随附权利要求书中的描述。

	<110> 伊莱利利公司 Weise, Dale W Harris, James R	
	<120> 鉴定和区分多价船运热疫苗的病毒成分的组合物与方法	
	<130> X19558	
	<150> 61/427404	
	<151> 2010-12-27	
	<160> 21	
	<170> PatentIn版本3.5	
	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
[0001]	<400> 1 cacccatca ggctgtattc atagc	25
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
	<400> 2 tgeccacagc acatcctaac c	21
	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	

	<400> 3 tcacctggac gaccc	15
	<210> 4 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体-引物	
	<400> 4 gcaatgctgc aggactaggt ataatt	25
	<210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体-引物	
[0002]	<400> 5 acactgtaat tgatgacccc attct	25
	<210> 6 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体-引物	
	<400> 6 aagacttgta tgatgctgcc aa	22
	<210> 7 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体-引物	
	<400> 7 ggtcgcccag gtaaaagca	19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体-引物

<400> 8
gcctctgcag caccetatea 20

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体-引物

<400> 9
aaccgactgt tacgaatac 19

[0003]

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体-引物

<400> 10
gctagccatg cccttagtag gac 23

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体-引物

<400> 11
gacgagtecc ctgtactcag g 21

	<210>	12	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	12	
		cagtgagtcc attggatgg	19
	<210>	13	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	13	
		ggagaccaag accaaggaga tg	22
[0004]	<210>	14	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	14	
		cgtctgcca tgcataagg	19
	<210>	15	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	15	
		acctcggtea tccatag	17
	<210>	16	
	<211>	21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
	<400> 16	
	ccatgttagc gctctggaac c	21
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
	<400> 17	
	cgtctttaag gtcgacgact cc	22
	<210> 18	
	<211> 15	
	<212> DNA	
[0005]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
	<400> 18	
	acggacgtgc gegaa	15
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体-引物	
	<400> 19	
	gtcgtccagg tgaaaacggt	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	20	
	gtcgtccagg tgaaaacggt		20
[0006]	<210>	21	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体-引物	
	<400>	21	
	gtcgtccagg tgaaaacggt		20