



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107636172 B

(45) 授权公告日 2021.11.16

(21) 申请号 201680021613.0
 (22) 申请日 2016.04.15
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107636172 A
 (43) 申请公布日 2018.01.26
 (30) 优先权数据
 15305562.9 2015.04.15 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.10.13
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2016/058355 2016.04.15
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/166287 EN 2016.10.20
 (73) 专利权人 巴斯德研究所
 地址 法国巴黎
 专利权人 公共救济事业局-巴黎医院
 狄德罗-巴黎第七大学
 (72) 发明人 A·阿拉尼奥 S·布列塔尼
 F·德罗梅 A·斯图尼-勒克莱尔
 (续)
 (74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
 有限公司 11038
 代理人 张小勇
 (51) Int.Cl.
 G12Q 1/6895 (2018.01) (续)

(56) 对比文件
 WO 2010039819 A2,2010.04.08
 WO 2014071946 A1,2014.05.15
 A. Alanio等.“Real-time PCR assay-
 based strategy for differentiation
 between active Pneumocystis jirovecii
 pneumonia and colonization in
 immunocompromised patients”.《Clin
 Microbiol Infect》.2010,第17卷(第10期),摘
 要,第1532页左栏第3-4段、右栏第2、4段,1533页
 左栏第1段.
 Jeong Hwan Shin等.“Detection,
 Identification, and Distribution of Fungi
 in Bronchoalveolar Lavage Specimens by
 Use of Multilocus PCR Coupled with
 Electrospray Ionization/Mass
 Spectrometry”.《Journal of Clinical
 Microbiology》.2012,第51卷(第1期),表2.
 Karine Kaiser等.“Real time
 quantitative PCR and RT-PCR for analysis
 of Pneumocystis carinii hominis”.《Journal
 of Microbiological Methods》.2001,第45卷摘
 要,第114页左栏倒数第1段-右栏第3段,第116页
 右栏第2段. (续)
 审查员 宋如生

权利要求书4页 说明书53页
 序列表15页 附图8页

(54) 发明名称
 用于诊断、预测或监测肺孢子菌肺炎的工具
 (57) 摘要
 本申请涉及用于诊断、预测或监测肺孢子菌
 肺炎(Pneumocystis pneumonia,PCP)的工具。本
 申请的工具也适用于在人患者中确定或预测针
 对PCP的药物或治疗的功效。本申请的工具涉及
 检测和/或定量、更具体地是定量两种不同耶氏
 肺孢子菌(P. jirovecii)线粒体基因的RNA转录
 物。所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一

种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,
 或耶氏肺孢子菌线粒体小亚单位(mtSSU)基因。
 所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种
 是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏
 肺孢子菌基因,例如是线粒体耶氏肺孢子菌大亚
 单位(mtLSU)基因。

CN 107636172 B

[接上页]

(72) 发明人 B·霍梅尔 M·本阿扎

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

(56) 对比文件

Jannik Helweg-Larsen等.“Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia- a case-

control study”.《BMC Infectious Diseases》.2002,第2卷第1-6页.

Ernesto X. Monroy-Vaca等.“Genetic diversity of Pneumocystis jirovecii in colonized Cuban infants and toddlers”.《Infection, Genetics and Evolution》.2014,第22卷第60-66页.

1. 逆转录酶和寡核苷酸在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断或预测其为耶氏肺孢子菌 (*Pneumocystis jirovecii*) 携带者的人患者是否患有或者发展肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) 的体外方法,

其中所述寡核苷酸包含引物和/或探针,其中所述引物包含第一引物对和第二引物对,其中所述探针包含第一探针和第二探针,

其中所述第一引物对和/或所述第一探针与第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录物特异性杂交,

其中所述第二引物对和/或所述第二探针与第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录物特异性杂交,

其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是第一线粒体耶氏肺孢子菌基因,

其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是第二线粒体耶氏肺孢子菌基因,

其中所述方法包括

i. 在先前从所述人患者的呼吸道获得的生物流体样品的RNA物质中,定量两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物,以获得第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,其中所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA小亚单位的耶氏肺孢子菌小亚单位 (mtSSU) 基因,并且其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA大亚单位的耶氏肺孢子菌大亚单位 (mtLSU) 基因,

ii. 计算i的所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与i的所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比,

iii. 将ii的比的值与阈值进行比较,

其中,当ii的比的值等于或低于所述阈值时,所述人患者被诊断或预测为患有或发展PCP的风险高,

其中,当ii的比的值高于所述阈值时,所述人患者被诊断或预测为患有或发展PCP的风险低,

其中所述阈值通过比较所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比的值或值的分布而被预先确定,所述比取自耶氏肺孢子菌携带者的参考人队列,所述队列已根据患有或发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的状态或者根据没有患有或没有发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的状态而预先建立,以将所述人患者分类为其具有最高概率属于的那些参考队列的患者,和

其中通过逆转录和PCR扩增进行所述步骤i的定量。

2. 逆转录酶和寡核苷酸在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于在其为耶氏肺孢子菌携带者并且被诊断患有或发展肺孢子菌肺炎 (PCP) 的人患者中测定或预测针对PCP的药物或治疗的功效的体外方法,

其中所述寡核苷酸包含引物和/或探针,其中所述引物包含第一引物对和第二引物对,其中所述探针包含第一探针和第二探针,

其中所述第一引物对和/或所述第一探针与第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录

物的cDNA逆转录物特异性杂交，

其中所述第二引物对和/或所述第二探针与第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录物特异性杂交，

其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是第一线粒体耶氏肺孢子菌基因，

其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是第二线粒体耶氏肺孢子菌基因，

其中所述方法包括

-在先前在第一时间点和第二时间点从所述人患者的呼吸道获得的生物流体样品的RNA物质中，定量RNA转录物，其中所述第二时间点晚于所述第一时间点，其中所述第一和第二时间点中的至少一个包括在所述人患者正在接受所述药物或治疗期间的时段中，其中所述RNA转录物是两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物，其中所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因，其中所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因，或是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA小亚单位的耶氏肺孢子菌小亚单位(mtSSU)基因，其中所述两种不同线粒体基因的第二种是其序列被转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA大亚单位的耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因，以分别获得在所述第一个时间点和所述第二时间点上所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值，以及在所述第一时间点和所述第二时间点上所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值，并且其中通过逆转录和PCR扩增进行所述RNA转录物的定量，

-计算所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比，以获得所述比在所述第一时间点的值以及其在第二时间点的值，和

-将所述比在所述第二时间点的值与其在所述第一时间点的值进行比较，其中与所述第一时间点相比，所述比在所述第二时间点的值的增加表示所述治疗或药物有效或者将有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。

3. 根据权利要求1或2所述的用途，其包括提取和/或纯化所述生物流体样品的RNA物质，以及在所述提取和/或纯化之前加入RNA提取内部对照。

4. 根据权利要求1或2所述的用途，其中通过二氧化硅膜过滤所述生物流体样品来纯化所述生物流体样品的RNA物质。

5. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述生物流体样品是支气管肺泡灌洗液、诱导的痰液、痰、鼻咽抽吸物、口腔洗涤物或鼻拭子样品。

6. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述人患者为HIV阴性。

7. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述PCR是实时PCR。

8. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因，并且其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因。

9. 根据权利要求8所述的用途，其中所述阈值在1.27-1.66范围内。

10. 根据权利要求9所述的用途，其中所述阈值为1.50。

11. 根据权利要求8所述的用途，其中使用以下等式计算所述比

$$R = E(\text{CYTb})^{-Cq(\text{CYTb})} / E(\text{mtrDNA})^{-Cq(\text{mtrDNA})}$$

其中

R是所述比，

CYTb是所述其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因的RNA转录物的cDNA逆转录物，
mtDNA是所述其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因的RNA转录物的cDNA逆转录物，

E是所示cDNA的指数阶段中一个扩增循环的PCR效率的值，和

C_q是所示cDNA的PCR定量循环的值。

12. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位 (mtSSU) 基因，并且其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位 (mtLSU) 基因。

13. 根据权利要求12所述的用途，其中所述阈值在2.7-3.3范围内。

14. 根据权利要求13所述的用途，其中所述阈值为3.2。

15. 根据权利要求12所述的用途，其中使用以下等式计算比：

$$R = E^{(mtSSU)^{-C_q(mtSSU)}} / E^{(mtLSU)^{-C_q(mtLSU)}}$$

其中

R是所述比，

mtSSU是所述线粒体耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物，

mtLSU是所述线粒体耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物，

E是所示cDNA的指数阶段中一个扩增循环的PCR效率的值，和

C_q是所示cDNA的PCR定量循环的值。

16. 根据权利要求1或2所述的用途，其中各个RNA转录物的定量包括：

- 使用第一引物对cDNA逆转录所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物中包含的第一RNA靶，以获得第一cDNA逆转录物，并且使用相同的第一引物对PCR扩增所述第一cDNA逆转录物，以获得第一扩增子，和

- 使用第二引物对cDNA逆转录所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物中包含的第二RNA靶，以获得第二cDNA逆转录物，并且使用相同的第二引物对PCR扩增所述第二cDNA逆转录物，以获得第二扩增子，

其中所述方法还包括所述第一扩增子的定量和所述第二扩增子的定量，

其中所述第一扩增子的定量的值是所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值，并且所述第二扩增子的定量的值是所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值。

17. 根据权利要求16所述的用途，其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因。

18. 根据权利要求17所述的用途，其中所述第一RNA靶由100-120个核苷酸组成，并且包含或为

- SEQ ID NO:29的序列，或

- 具有与SEQ ID NO:29相同的长度且与SEQ ID NO:29至少95%相同的RNA序列。

19. 根据权利要求16所述的用途，其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位 (mtSSU) 基因。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第一RNA靶由60-110个核苷酸组成并且包含或为

-SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24的序列,或

-具有分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24相同的长度并且分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24至少95%相同的RNA序列。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中所述第二RNA靶由115-125个核苷酸组成并且包含或为

-SEQ ID NO:9的序列,或

-具有与SEQ ID NO:9相同的长度并且与SEQ ID NO:9至少95%相同的RNA序列。

22. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,并且其中使用第一探针定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物,所述第一探针与SEQ ID NO:30或其互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:1的互补序列、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:2的互补序列中的任一序列杂交。

23. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位(mtSSU)基因,并且其中使用第一探针定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物,所述第一探针与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:15的互补序列杂交,或者与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:20的互补序列杂交,或者与SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:25的互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:3的互补序列、SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:1的互补序列中的任一序列杂交。

24. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因,并且其中使用第二探针定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物,所述第二探针与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:10的互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:3的互补序列、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:2的互补序列中的任一序列杂交。

25. 一种试剂盒,其适用于诊断或预测其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者是否患有或发展肺孢子菌肺炎(PCP)或适用于在其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,其中所述试剂盒包含聚合酶以及如权利要求2所定义的逆转录酶和寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含如权利要求2所定义的所述第一引物对、所述第一探针、所述第二引物对和所述第二探针,并且其中所述逆转录酶和所述聚合酶包含在相同的管中,并且其中所述第一引物对和所述第一探针针对其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA小亚单位的耶氏肺孢子菌小亚单位(mtSSU)基因,其中所述第二引物对和所述第二探针针对其序列被转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA大亚单位的耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因。

26. 一种计算机装置,包括处理单元,处理单元的存储器中存储

计算机程序产品,其存储于处理单元的存储器中或支持与所述处理单元的读取器协作的可移动存储器上,其包括用于执行权利要求1-24中任一项所述的方法的指令,和

所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的相应值的测量值。

用于诊断、预测或监测肺孢子菌肺炎的工具

发明领域

[0001] 本申请涉及用于诊断、预测或监测肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) 的工具 (means)。本申请的工具涉及检测和/或定量、更具体地是定量两种不同耶氏肺孢子菌 (*P. jirovecii*) 线粒体基因的RNA转录物。

[0002] 本申请的工具也适用于在人患者中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效或者适用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0003] 发明背景

[0004] 肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis Pneumonia*, PCP) 是由于子囊菌 (ascomycetous) 真菌耶氏肺孢子菌 (*Pneumocystis jirovecii*) 的机会性感染。该病原体特异性针对人而相关物种针对其他陆生哺乳动物存在, 并且越来越多的证据表明耶氏肺孢子菌可以被认为是人呼吸道的共生菌。它在肺泡细胞 (I型肺细胞) 表面生长和繁殖, 通常可以发现两种主要形式: (i) 通过二分裂进行无性繁殖的营养形式和 (ii) 含有八个其为有性复制模式结果的子囊孢子的子囊 (孢囊)。已经在大鼠中研究了卡氏肺孢子菌 (*Pneumocystis carinii*) 的完整生命周期。动物实验表明, 肺孢子菌可以从宿主到宿主进行传播, 其中免疫活性个体作为最重要的库, 而子囊作为潜在的传播病原体。流行病学和实验数据表明, 耶氏肺孢子菌也是可在人中传播的生物。

[0005] 具有低CD4计数的感染HIV的个体具有发展PCP的风险。尽管用复方新诺明 (二氢叶酸还原酶抑制剂 (甲氧苄啶) 和磺酰胺抗生素 (磺胺甲噁唑) 的复合片) 和高度活性的逆转录病毒治疗高度有效预防, 但PCP仍然是AIDS患者最常见的感染之一。PCP也发生在非HIV免疫受损患者, 包括患有血液系统或实体恶性肿瘤的患者、移植受者以及接受用于自身免疫性或炎性疾病的免疫抑制治疗的患者。

[0006] 在非HIV免疫受损患者中, PCP通常比在HIV患者中更为急性和严重。因为非HIV患者的平均真菌感染率低于HIV患者, PCP的诊断也更加困难。

[0007] 总体来说, 与HIV感染患者的死亡率为10%至20%相比, PCP在非HIV免疫受损患者中的死亡率为35%至55%。

[0008] PCP的诊断通常依赖于使用包括常规染色 (Calcofluor White, 甲苯胺蓝O, Gomori methamine, 吉姆萨染色) 和抗耶氏肺孢子菌的免疫荧光测定 (IFA) (直接或间接IFA) 的各种染色方法在呼吸标本中显微镜证实耶氏肺孢子菌。长期以来已知免疫荧光比常规染色更灵敏。或者, 在20世纪90年代, 已经开发了两种方法: β -D-葡聚糖 (BDG) 检测和PCR。

[0009] 由于非HIV免疫受损患者中耶氏肺孢子菌的负荷较低, 显微镜方法的灵敏度缺乏已经证明在20世纪90年代早期开发基于PCR的诊断方法是合理的, 其检测临床样品中的DNA而不是微生物本身。最初, DNA检测还旨在提高耶氏肺孢子菌检测的灵敏度, 以避免怀疑患有PCP的患者的支气管肺泡灌洗液 (BAL) 等侵入性手术而目的是使用诱导的痰 (IS) 和/或上呼吸道标本 (URS, 鼻咽抽吸物, 口腔清洗物或鼻拭子) 作为诊断标本。在当时, 这些方法比显微镜检测 (常规染色和/或免疫荧光) 更为灵敏和可重复, 被认为是呼吸道样品如支气管肺

泡灌洗液 (BALF) 或诱导的痰中的金标准试验。

[0010] 最初用于DNA检测的单一 (sPCR) 和巢式终点 (nPCR) 形式逐渐被定量实时PCR (qPCR) 形式所代替, 其中在扩增期间检测和定量PCR产物而无需打开反应管。这种形式的主要优点是防止由于以前扩增产品的环境污染而导致的假阳性, 并提供快速的定量结果。在荟萃分析 (meta-analyses) 中进行了PCR形式的亚组分析, 与全局分析相比, 在qPCR测定中显示出更高的灵敏度和特异性。此外, 诊断PCR的建议早已存在, 突出了使用实时PCR形式的必要性。

[0011] 不同PCR测定报告的性能差异可以通过用于扩增和引物设计的不同DNA靶来解释。实际上, 大多数作者已经开发了自己的引物, 尽管通常设计用于扩增多拷贝基因, 与单拷贝基因相比, 其提高了灵敏度。耶氏肺孢子菌大亚单位 (Large Sub-Unit) 核糖体RNA (rRNA) 基因 (mtLSU) 是最常用的。在各种报道中还将多拷贝主要表面抗原 (MSG) 基因作为目标。还使用多个单拷贝核基因, 如18S核糖体DNA (rDNA), 5S rDNA, 内转录间隔区 (ITS), DHPS, KEX, HSP70, β 微管蛋白 (Beta-TUBulin) (BTUB) 和CDC2。实际上, 核糖体RNA基因簇在肺孢子菌中是独特的。

[0012] 使用外部质量对照的定量结果可以轻松实现分析性能的比较。使用MSG (多拷贝) 和DHPS (单拷贝) 靶基因的三个PCR测定的比较表明结果的可转移性。

[0013] 然而, PCR揭示了在没有PCP的临床体征或症状的情况下从免疫受损个体的肺标本中检测肺孢子菌DNA的可能性。这种现象被称为耶氏肺孢子菌定殖或携带。由于这个原因, 尽管PCR检测的灵敏度高于显微镜, PCR在非侵入性标本中具有成本效益, 但PCR没有完全被接受为PCP的诊断标准。

[0014] 在具有PCP风险的患者呼吸道样品中鉴别活性肺孢子菌肺炎与耶氏肺孢子菌携带的一种简单方法是确定定量阈值。由于PCR比显微镜灵敏得多, 因此定义用于评估诊断的阈值是至关重要的, 如果不能进行可靠的定量, 则不能执行。

[0015] 实时定量PCR是指能够使用基于参考DNA (质粒) 的校准曲线来定量提取物中的DNA量的实时PCR, 以拷贝/体积单位表示。然而, 定量结果可以用其他单位来表示。或者, 一些作者使用粗qPCR结果 (作为定量循环, C_q , C_t 或 C_p), 或者其他一些作者根据计数 (例如营养形式当量) 将其转化为多种微生物的数量。目前没有协商一致的国际标准的qPCR测定和阈值。大量的国际研究或至少前瞻性研究是非常需要的, 以允许技术验证这个工具。此后, 使用qPCR用于临床解释qPCR结果将是可能的并且得到验证的。

[0016] 对于具有阳性IFA的样品, qPCR和显微镜定量 (如孢囊数 (通常表示为+, ++或+++)) 所评估的) 给出相似的结果。当qPCR结果与IFA一致时, 对结果的解释几乎没有问题。然而, 在IFA的灵敏度极限周围存在重叠, 一些样品IFA阴性而PCR阳性, 而其他样品是IFA阳性但具有较低的耶氏肺孢子菌DNA含量。对于具有最低真菌负荷的IFA阳性样品, 对应的最低qPCR结果的一致几乎是不可能的, 因为IFA依赖于检查者和样品的质量。另一方面, 对qPCR阴性结果的解释几乎没有疑问。PCR测定的阴性预测值已经达成一致。要检查的唯一要点是内部对照的正确扩增, 以避免假阴性结果。IFA阴性而qPCR阳性的结果出现矛盾。一些作者提出了灰色地带。例如, 提出了120和1900营养形式当量/mL的两个截断值, 以区分活性肺炎与携带, 其间具有灰色地带。

[0017] 需要一种诊断、预测或监测PCP的新工具, 特别是用于区分PCP与耶氏肺孢子菌携

带的工具。因此,我们开发了一种用于检测肺孢子菌RNA的新PCR方法。

[0018] 我们的测试是基于患者BAL液中耶氏肺孢子菌的两种基因的RNA转录物的检测和定量。

[0019] 发明概述

[0020] 本申请提供了对诊断、预测或监测肺孢子菌肺炎 (PCP) 特别有用的工具。

[0021] 本申请的工具有助于特别地能够区分PCP患者与没有患有或没有发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者,包括当患者是HIV阴性时。HIV阴性人患者的PCP状况尤其难以确定,因为这些患者的耶氏肺孢子菌负荷低于HIV阳性人患者。因此,本申请的工具有助于避免所述耶氏肺孢子菌携带者接收不必要的PCP治疗。

[0022] 本申请的工具有助于涉及两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的检测和/或定量、更具体地是定量。本申请的工具有助于更具体地确定所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的一种(以下称为第一耶氏肺孢子菌线粒体基因)的RNA转录物与所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的另一种(以下称为第二耶氏肺孢子菌线粒体基因)的RNA转录物的比。

[0023] 两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一种独立地选自:

[0024] 其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因 (SEQ ID NO:3), 和

[0025] 将其各自的序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位 (mtLSU) 基因 (SEQ ID NO:1) 和线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位 (mtSSU) 基因 (SEQ ID NO:2)。

[0026] 所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如mtLSU基因或mtSSU基因。

[0027] 更具体地,所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是mtLSU基因。

[0028] 例如,所述比的第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是mtSSU基因。

[0029] 例如,所述比的第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因或mtLSU基因(但仍然不同于所述比的第一耶氏肺孢子菌线粒体基因),更具体地是mtLSU基因。

[0030] 例如,第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是编码Cytb蛋白的序列,第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,例如mtLSU基因或mtSSU基因[比Cytb/(mtLSU或mtSSU),更具体地是比Cytb/mLSU]。例如,第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因,第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因[比mtSSU/mLSU]。

[0031] 本申请的工具有助于特别适合:

[0032] 用于诊断或预测肺孢子菌肺炎 (PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或发展PCP,或

[0033] 用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或

[0034] 用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0035] 本申请的工具有助于包括方法、产品(例如引物和/或探针)、这些产品中至少两种的关联或组合,以及包含所述产品中的至少一种的试剂盒和组合物。

[0036] 本申请的工具还包括所述产品中的至少一种连接到其上的固体支持物,例如微阵列,纳米阵列,芯片,以及适用于定量耶氏肺孢子菌转录组的核酸文库,计算机程序产品,用于在人患者中治疗和/或预防和/或缓解PCP的计算机装置和试剂盒。

[0037] 附图简要说明

[0038] 图1.用DNA (Cq mtLSU DNA PCR) 或RNA扩增 (Cq mtLSU RNA PCR) 在患者的BALF中获得的mtLSU定量阈值的比较。Cq平均损失为3.58 (95%CI:2.68-4.47),大致对应于高出约10倍的RNA表达。

[0039] 图2A和2B:针对诊断 (A, n=41) 或诊断和后续 (B, n=46) 样品的mtLSU RNA qPCR (qPCR) 和CYTB/mtLSU比 (PCP Xpress) 测试的ROC曲线。Sens, 灵敏度; Spec, 特异性; LR, 似然比。

[0040] 图3A. 对不同类别样品中每个mtLSU阳性样品的mtLSU RNA定量循环 (Cq) 的图。允许较高似然比的阈值范围被描绘为虚线]30.49至31.78[。空心点来自分类在一个类别中的患者,但其比倾向于另一组患者。

[0041] 图3B. 其中CYTB和mtLSU RNA二者扩增的样品中每类患者的CYTB/mtLSU比的值的图。PCP样品主要具有CYTB/mtLSU<1.27, 而无PCP样品 (携带者) 或治疗至少15天的患者 (PCP Rx) 主要具有CYTB/mtLSU比>1.66。十六份样品没有扩增CYTB, 因此比不计算。那些样品来自没有患有PCP的患者。允许较高似然比的阈值范围被描绘为虚线]1.27至1.66[。空心点来自分类在一个类别中的患者,但其比倾向于另一组患者。

[0042] 图4: BTUB, HSP70和CYTB对mtLSU比的ROC曲线分析。以CYTB/mtLSU比获得较高的似然比。

[0043] 图5: 通过PCR定量BAL液样品中的mtLSU和mtSSU。

[0044] 图6: 用mtSSU和mtLSU (在BAL流体样品中) 的PCR (循环) 定量获得和用mtSSU/mtLSU比获得的ROC曲线的分析。mtSSU/mtLSU比的最大似然比 (LR) 为10 (最佳比为2.7) [而单独的mtLSU和mtSSU定量各自最大LR为6]。然而, 3.1-3.3的比将允许达到100%的灵敏度, 并且对于准确的PCP检测可能是优选的。

[0045] 图7: PCP患者和耶氏肺孢子菌携带者 (但无PCP) 患者的BAL液样品中mtSSU/mtLSU比的分布。2.7的比以短划线显示。

[0046] 图8A和8B: PCP患者和耶氏肺孢子菌携带者 (但无PCP) 患者的BAL液样品中的mtSSU (左侧图8A) 和mtLSU (右侧图8B) 定量循环的分布。

[0047] 发明详述

[0048] 本申请涉及如权利要求书所定义和如在此描述的主题。

[0049] 在本申请中, 除非另有说明或者除非上下文另有规定, 否则所有术语在相关领域中具有其普通含义。

[0050] 本申请提供了涉及两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的检测和/或定量、更具体地是定量的工具。

[0051] 本申请的一个方面是本申请的工具是基于RNA转录物的分析, 而不是基于DNA的分析。本申请的另一方面是本申请的RNA转录物是 (耶氏肺孢子菌) 线粒体基因的RNA转录物。

[0052] 本申请的工具涉及更具体地确定所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的一种 (以下称为第一耶氏肺孢子菌线粒体基因) 的RNA转录物与所述两种不同耶氏肺孢子菌线

粒体基因中另一种(以下称为第二耶氏肺孢子菌线粒体基因)的RNA转录物的比。

[0053] 两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一种独立地选自:

[0054] 其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因(SEQ ID NO:3),和

[0055] 将其各自的序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因(SEQ ID NO:1)和线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位(mtSSU)基因(SEQ ID NO:2)。

[0056] 所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如mtLSU基因或mtSSU基因。

[0057] 根据本申请的一个方面,所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因中的至少一种是mtLSU基因。

[0058] 根据本申请的一个方面,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因(SEQ ID NO:3)。

[0059] 所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如mtLSU基因(SEQ ID NO:1)或mtSSU基因(SEQ ID NO:2),更具体地是mtLSU基因。

[0060] 根据本申请的一个方面,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因。

[0061] 所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因或其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,更具体地是mtLSU基因。

[0062] 根据本申请的一个方面,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtLSU基因。

[0063] 所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtSSU基因或其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,更具体地是mtSSU基因。

[0064] 本申请的工具有非常适合:

[0065] 用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或发展PCP,或

[0066] 用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或

[0067] 用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0068] 有利地,本发明的工具有足够可靠以确定HIV阴性的人患者、更具体地是HIV阴性和免疫受损的人患者的PCP状态。HIV阴性人患者的PCP状况尤其难以确定,因为这些患者的耶氏肺孢子菌负荷低于HIV阳性人患者。

[0069] 所述两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量可以通过本领域技术人员可发现合适的任何工具来实现。然而,本申请提供了逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)工具,所述RT-PCR工具可以实时实施。

[0070] 本申请涉及用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP)的体外方法,更具体地涉及用于诊断或预测人患者(更具体地其是耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或者发展PCP的体外方法,其中所述方法包括

[0071] i. 在先前从所述人患者的呼吸道获得的生物流体样品的RNA物质中,检测和/或定量两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因(中每一种)的RNA转录物(的数量或浓度),更具体地定量两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因(中每一种)的RNA转录物(的数量或浓度),以获得第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,

[0072] ii. 计算i的所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与i的所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比,和

[0073] iii. 将ii的比的值与阈(数)值进行比较,

[0074] 其中所述人患者被诊断或预测具有患有或发展PCP的高风险或者具有患有或发展PCP的低风险,取决于ii的比的值是否等于或低于所述阈值,或者比的值是否高于所述阈值。

[0075] 当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白(SEQ ID NO:3)的耶氏肺孢子菌基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU或mtSSU基因、更具体地是mtLSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因时,所述步骤iii可以是将步骤ii的比与阈(数)值比较的步骤,其中,当ii的比的值等于或低于(更具体地低于)所述阈值时,所述人患者被诊断或预测为患有或发展PCP的风险高,

[0076] 其中,当ii的比的值高于所述阈值时,所述人患者被诊断或预测为患有或发展PCP的风险低。

[0077] 当然,反转所述比中的第一和第二线粒体基因导致相应地反转阈值和由比与阈值的比较产生的结论。

[0078] 因此,当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtLSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是mtSSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述步骤iii可以是将步骤ii的比与阈(数)值比较的步骤,其中,当ii的比的值高于或等于(更具体地高于)所述阈值时,所述人患者被诊断或预测具有患有或发展PCP的高风险,

[0079] 其中,当ii的比的值低于所述阈值时,所述人患者被诊断或预测为具有或发展PCP的低风险。

[0080] 所述阈值可以例如通过比较所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与所述第一细菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比的值或值的分布而被预先确定,所述比取自耶氏肺孢子菌携带者的参考人队列,所述队列已根据患有或发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的状态或者根据没有患有或没有发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的状态而预先建立,以将所述人患者分类为其具有最高概率属于的那些参考队列的患者。

[0081] 患有或发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的参考人队列以及没有患有或没有发展PCP的耶氏肺孢子菌携带者的参考人队列可以各自包括超过100个人。通过本技术人员可发现合适的任何工具将耶氏肺孢子菌的人携带者分类为所述两个参考队列中的任一个。例如,所述工具可以包括由两名独立专家(例如肺炎专家和传染病专家)分析人个体的临床、放射学和生物特征(包括不存在或存在耶氏肺孢子菌的显微镜检测)(参考下文的实施例和

表1),并且对于每个所述人个体,同时得出存在PCP(已证明、待证实或有可能的PCP,更具体地已证明的PCP)或不存在PCP的结论。

[0082] 本申请还涉及用于在其为耶氏肺孢子菌携带者并且被诊断患有或发展PCP的人患者中测定或预测针对PCP的药物或治疗的功效的体外方法,其中所述方法包括

[0083] -在先前在第一时间点和第二时间点从所述人患者的呼吸道获得的生物流体样品的RNA物质中,定量RNA转录物(的数量或浓度),其中所述第二时间点晚于所述第一时间点,其中所述第一和第二时间点中的至少一个包括在所述人患者正在接受所述药物或治疗的时间段中,其中所述RNA转录物是两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因(相应)的RNA转录物,以分别获得在所述第一个时间点和所述第二时间点上所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,以及在所述第一时间点和所述第二时间点上所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,

[0084] -计算所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比,以获得所述比在所述第一时间点的值以及其在第二时间点的值,和

[0085] -将所述比在所述第二时间点的值与其在所述第一时间点的值进行比较,其中与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的增加或降低表示所述治疗或药物有效或者将有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。

[0086] 当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,以及所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因或mtSSU基因,更具体地mtLSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因时,正是与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的增加表示所述治疗或药物有效或者将有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的增加的缺乏,更具体地是降低可以表示或表示所述治疗或药物没有有效或者不会有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。

[0087] 当然,反转所述比中的第一和第二线粒体基因导致相应地反转阈值和由比与阈值的比较产生的结论。

[0088] 因此,当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtLSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是mtSSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,正是与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的降低表示所述治疗或药物有效或者将有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的降低的缺乏,更具体地是增加可以表示或表示所述治疗或药物没有有效或者不会有效治疗或缓解所述人患者中的PCP。

[0089] 本申请还涉及用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗的体外方法,其中所述方法包括

[0090] -在先前在第一时间点和第二时间点从所述人患者的呼吸道获得的生物流体样品

的RNA物质中,定量RNA转录物(的数量或浓度),其中所述第二时间点晚于所述第一时间点,其中所述第一和第二时间点中的至少一个包括在所述人患者正在接受所述药物或治疗的时间段中,其中所述RNA转录物是两种不同耶氏肺孢子菌线粒体基因(相应)的RNA转录物,以分别获得在所述第一个时间点和所述第二时间点上所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,以及在所述第一时间点和所述第二时间点上所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值,

[0091] -计算所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的比,以获得所述比在所述第一时间点的值以及其在第二时间点的值,和

[0092] -将所述比在所述第二时间点的值与其在所述第一时间点的值进行比较,其中与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的增加或降低表示在所述人患者中PCP消退或已经得到治疗。

[0093] 当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因(SEQ ID NO:3),以及所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因或者mtSSU基因,更具体地是mtLSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是mtLSU基因时,正是与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的增加表示在所述人患者中PCP消退或已经得到治疗。与所述第一时间点相比,比在所述第二时间点的值的增加的缺乏,特别是降低可以表示或表示PCP在所述人患者中没有消退或没有得到治疗。

[0094] 当然,反转所述比中的第一和第二线粒体基因导致相应地反转阈值和由比与阈值的比较产生的结论。

[0095] 因此,当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtLSU基因,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或是mtSSU基因时,或者当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因,并且所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,正是与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的降低表示在所述人患者中PCP退化或已经得到治疗。与所述第一时间点相比,所述比在所述第二时间点的值的降低的缺乏,更具体地是增加可以是表示或表示在所述人患者中PCP没有消退或没有得到治疗。

[0096] 当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种可以是例如其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如mtLSU基因(SEQ ID NO:1)或mtSSU基因(SEQ ID NO:2),更具体地是mtLSU基因。

[0097] 当所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第一种是mtSSU基因时,所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的第二种可以例如是mtLSU基因。

[0098] 根据本申请的一个方面,所述第二耶氏肺孢子菌核糖体RNA是线粒体耶氏肺孢子菌大亚单位(mtLSU)基因。

[0099] 根据本申请的一个方面,所述第一耶氏肺孢子菌核糖体RNA是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,或者是线粒体耶氏肺孢子菌小亚单位(mtSSU)基因。

[0100] 有利地,在相同的生物流体样品的RNA物质中定量所述两种不同耶氏肺孢子菌线

粒体基因的各个RNA转录物。

[0101] 所述生物流体样品的RNA物质可以从样品中提取和/或纯化。RNA提取工具和RNA纯化工具是本领域普通技术人员已知的。例如, RNA提取工具包括细胞裂解剂和/或缓冲剂。例如, RNA纯化工具包括二氧化硅膜。

[0102] 有利地, 通过所述生物流体样品的二氧化硅膜过滤来纯化所述生物流体样品的RNA物质。

[0103] 本申请的工具还可以包括核酸提取和/或纯化的对照, 更具体地是核酸提取和/或纯化的内部对照。更具体地, 本申请的工具还可以包括RNA提取和/或纯化的对照, 更具体地是RNA提取和/或纯化的内部对照。

[0104] 更具体地, 本申请的工具可以进一步包括用作RNA提取和/或纯化的内部对照的RNA, 更具体地是人工或外源性RNA, 更具体地是用作内部提取对照RNA (IECR) 的RNA (参见下文的实施例2), 或者可以进一步含有包含这种RNA的细胞 (例如通过基因工程改造)。

[0105] 所述RNA或IECR可以例如是RNA序列 (例如, 30-500个核苷酸的RNA序列), 其不是人或真菌核酸序列, 更优选其与任意人或真菌核酸序列具有小于60% (例如小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于1%) 的同一性。

[0106] IECR的实例是可以商业上获得的。IECR的实例包括:

[0107] -RNA提取对照, 其由BIOLINE (BIOLINE USA Inc.; 305 Constitution Dr.; TAUNTON; MA 027080; U.S.A.) 以目录号BIO-38040或BIO-35040销售,

[0108] - **AMBION®** ERCC RNA Spike-In对照, 其由LIFE TECHNOLOGIES S.A.S. (route de l'orme des merisiers; Immeuble Discovery-Zone Technologique; 91190 SAINT AUBIN, FRANCE) 以目录号4456740销售, 和

[0109] -RNA内部对照, 其由**QIAGEN®** (**QIAGEN®** France S.A.S.; 3, avenue du Canada; LP 809; 91974 COURTABOEUF CEDEX; FRANCE) 以目录号211492销售。

[0110] 作为IECR的替代方案, RNA提取和/或纯化的内部对照可以通过在所述提取和/或纯化步骤之后检测到人基因仍然存在来进行。合适的人基因的实例是本领域已知的, 并且包括组成型基因, 例如人白蛋白 (ALB) 基因或人TATA框结合蛋白 (TBP)。因此, 本申请的工具还可以至少包含探针, 更具体地至少一种 (实时) 探针和至少一种引物对, 其特异性检测人基因, 例如人白蛋白 (ALB) 基因或人TATA框结合蛋白 (TBP); 参见下文的实施例2。

[0111] 所述生物流体样品例如可以是下呼吸道液体样品, 例如支气管肺泡灌洗液或诱导的痰样品, 或上呼吸道液样品, 例如痰, 鼻咽抽吸物, 口腔洗涤物或鼻拭子样品。

[0112] 所述人患者可以为HIV阳性或HIV阴性, 更具体地为HIV阴性。更具体地, 所述人患者是HIV阴性且免疫受损。有利地, 本申请的工具对于HIV阴性人患者是可靠的, 而HIV阴性人患者的耶氏肺孢子菌负荷低于HIV阳性人患者。

[0113] 有利地, 所述人患者是正在接受、已经接受或即将接受免疫抑制治疗, 更具体地是免疫抑制剂或药物, 更具体地是化学疗法, 抗排斥药物或类固醇的人患者, 更具体地是HIV阴性人患者。例如, 所述人患者是正在接受、已经接受或即将接受器官和/或组织的移植物 (例如, 骨髓, 心脏, 肾脏, 肝器官和/或其组织) 的人患者, 更具体地是HIV阴性人患者。所述免疫抑制治疗, 免疫抑制剂或药物, 抗排斥药物可以例如旨在用于预防和/或缓和所述移植的器官和组织的排斥反应和/或移植物抗宿主病。例如, 所述人患者是患有自身免疫疾病

和/或炎性疾病的人患者,更具体地是HIV阴性患者。

[0114] 有利地,所述人患者是患有血液系统恶性肿瘤和/或实体恶性肿瘤的人患者,更具体地是HIV阴性人患者。

[0115] 有利地,所述人患者是其为早产婴儿(更具体地是出生于孕周不足37周的早产婴儿),新生儿(newborn或neonate)(更具体地是1日龄至小于4周龄)或婴儿(更具体地是4周龄至小于1岁)的人患者,更具体地是HIV阴性人患者。更具体地,所述人患者是其为早产婴儿(更具体地是出生于孕周不足37周的早产婴儿),新生儿(更具体地是1日龄至小于4周龄)的人患者,更具体地的是HIV阴性人患者。

[0116] 有利地,通过(cDNA)逆转录和PCR扩增定量(所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一种的)所述RNA转录物。

[0117] 更具体地,所述(cDNA)逆转录和PCR扩增可以(作为一步RT-PCR反应,即)在同一管(对所述两种耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一种)进行。

[0118] 因此,可以在同一管中进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的(cDNA)逆转录和PCR扩增,并且可以在同一管中进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物进行逆转录和PCR扩增。

[0119] 可以在与其中进行第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的(cDNA)逆转录和PCR扩增相同或不同的管中进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的(cDNA)逆转录和PCR扩增。

[0120] 所述PCR有利地是实时PCR。

[0121] 有利地,所述PCR是定量PCR,更具体地是定量实时PCR,更具体地是定量实时RT-PCR,更具体地是一步定量实时RT-PCR。

[0122] 所述阈值可以例如在1.00-2.00范围内,更具体地在1.00-1.80范围内,更具体地在1.20-1.70范围内,更具体地在1.27-1.66范围内,更具体地为1.50。

[0123] 例如,使用以下等式计算所述比:

$$[0124] \quad R = E^{(CYTb)}^{-Cq(CYTb)} / E^{(mtrDNA)}^{-Cq(mtrDNA)}$$

[0125] 其中

[0126] R是所述比,

[0127] CYTB是所述其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因的RNA转录物的cDNA逆转录物,

[0128] mtrDNA是所述其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因的RNA转录物的cDNA逆转录物,

[0129] E是所示cDNA的指数阶段中一个扩增循环的PCR效率的值,和

[0130] Cq是所示cDNA的PCR定量循环的值。

[0131] 有利地,所述比是与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因相比,所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量的值的倍数变化。

[0132] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,并且当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因,如mtLSU基因或mtSSU基因,更具体地是mtLSU基因时,这些特征可能特别适用。

[0133] 当然,当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因,所述第二条线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白质的耶氏肺孢子菌基因时,所述阈值可以例如是在1/2.00-1/1.00范围,更具体地是在1/1.80-1/1.00范围内,更具体地是在1/1.70-1/1.20范围内,更具体地在1/1.66-1/1.27范围内,更具体地是为1/1.50。

[0134] 所述阈值可以例如在2.7-3.3范围内,更具体地在3.1-3.3范围内,例如3.2。

[0135] 例如,使用以下等式计算比:

$$[0136] \quad R = E(\text{mtSSU})^{-Cq(\text{mtSSU})} / E(\text{mtLSU})^{-Cq(\text{mtLSU})}$$

[0137] 其中

[0138] R是所述比,

[0139] mtSSU是所述线粒体耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物,

[0140] mtLSU是所述线粒体耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物,

[0141] E是所示cDNA的指数阶段中一个扩增循环的PCR效率的值,和

[0142] Cq是所示cDNA的PCR定量循环的值。

[0143] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因并且其中所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,这些特征可能特别适用。

[0144] 当然,当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因,所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述阈值可以例如是在1/3.3-1/2.7范围内,更具体地是在1/3.3-1/3.1范围,例如是1/3.2。

[0145] 在本申请的方法中,各个RNA转录物的定量可以通过本领域普通技术人员可发现合适的任何工具来实现。

[0146] 这样的工具包括基于杂交或基于序列的工具,以及能够定量转录组的任何工具,例如RNA-Seq方法(参见Wang et al., 2009)。本申请提供了适用于实施RNA-Seq方法的DNA文库以及计算机工具(参见下文)。

[0147] 在本申请的方法中,各个RNA转录物的定量可以包括:

[0148] - (使用逆转录酶)进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录以获得第一cDNA逆转录物,以及(使用聚合酶和)使用第一引物对PCR扩增来自所述第一cDNA逆转录物的第一cDNA靶,以获得第一扩增子(第一cDNA或DNA核酸),和

[0149] - (使用逆转录酶)进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录以获得第二cDNA逆转录物,以及(使用聚合酶和)使用第二引物对PCR扩增来自所述第二cDNA逆转录物的第二cDNA靶,以获得第二扩增子(第二cDNA或DNA核酸),

[0150] 其中所述方法还包括定量所述第一扩增子(的数量或浓度)和所述第二扩增子(的数量或浓度),

[0151] 其中所述第一扩增子的定量(例如,其数量或浓度)的值是所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量(例如,其数量或浓度)的值,以及所述第二扩增子的定量(例如,其数量或浓度)的值是所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量(例如,其数量或浓度)的值。

[0152] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述第一cDNA靶有利地由100-120个核苷酸(更具体地是100-110个核苷酸,更具体地是102-108个核苷酸,更具体地是104-106个核苷酸,更具体地是105个核苷酸)组成,并且包

含或者是

[0153] -SEQ ID NO:30的序列,或

[0154] -具有与SEQ ID NO:30相同的长度并且与SEQ ID NO:30至少95% (更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0155] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述第一cDNA靶有利地由60-110个核苷酸组成,并且包含或是

[0156] -SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25的序列,或

[0157] -具有分别与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25相同的长度并且分别与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25至少95%相同的cDNA序列。

[0158] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,所述第二cDNA靶有利地由115-125个核苷酸组成,并且包含或是

[0159] -SEQ ID NO:10的序列

[0160] -具有与SEQ ID NO:10相同的长度且与SEQ ID NO:10至少95%相同的cDNA序列。

[0161] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是耶氏肺孢子菌基因是mtSSU基因时,所述第二cDNA靶有利地由60-110个核苷酸组成,并且包含或是

[0162] -SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25的序列,或

[0163] -具有分别与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25相同的长度并且分别与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:25至少95%相同的cDNA序列。

[0164] 在本申请的方法中,各个RNA转录物的定量包括:

[0165] - (使用逆转录酶和) 使用第一引物对进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物中包含的第一RNA靶的cDNA逆转录,以获得第一cDNA逆转录物,并(使用聚合酶和) 使用相同的第一引物对PCR扩增所述第一cDNA逆转录物以获得第一扩增子,和

[0166] - (使用逆转录酶和) 使用第二引物对进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物中包含的第二RNA靶的cDNA逆转录,以获得第二cDNA逆转录物,并(使用聚合酶和) 使用相同的第二引物对PCR扩增所述第二cDNA逆转录物以获得第二扩增子,

[0167] 其中所述方法还包括定量所述第一扩增子(的数量或浓度)和所述第二扩增子(的数量或浓度)

[0168] 其中所述第一扩增子的定量(例如,其数量或浓度)的值是所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量(例如,其数量或浓度)的值,以及所述第二扩增子的定量(例如,其数量或浓度)的值是所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量(例如,其数量或浓度)的值。

[0169] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述第一RNA靶可以有利地由100-120个核苷酸(更具体地是100-110个核苷酸,更具体地是102-108个核苷酸,更具体地是104-106个核苷酸,更具体地是105个核苷酸)组成,并且包含或者是

[0170] -SEQ ID NO:29的序列,或

[0171] -具有与SEQ ID NO:29相同的长度并且与SEQ ID NO:29至少95% (更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的RNA序列。

[0172] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述第一RNA靶有利地由

60-110个核苷酸组成,并且包含或是

[0173] -SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24的序列,或

[0174] -具有分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24相同的长度并且分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24至少95%相同的RNA序列。

[0175] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,所述第二RNA靶有利地由115-125个核苷酸组成,并且包含或是

[0176] -SEQ ID NO:9的序列,或

[0177] -具有与SEQ ID NO:9相同的长度并且与SEQ ID NO:9至少95%相同的RNA序列。

[0178] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述第二RNA靶有利地由60-110个核苷酸组成,并且包含或是

[0179] -SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24的序列,或

[0180] -具有分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24相同的长度并且分别与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24至少95%相同的RNA序列。

[0181] 在本申请中,根据本领域普通技术人员的理解,短语“逆转录酶(reverse polymerase)”是指RNA依赖性DNA聚合酶,短语“聚合酶”是指“DNA依赖性DNA聚合酶”。

[0182] 术语“核苷酸”包括天然存在的核苷酸,以及非天然存在的核苷酸,例如锁定核酸(LNATM)核苷酸。根据其在本领域的普通含义即核糖或脱氧核糖环通过连接2'-O原子和4'-C原子的亚甲基桥“锁定”的核苷酸来理解LNATM核苷酸。术语“核苷酸”包括更具体地是天然存在的核苷酸(DNA分子的核苷酸A,G,T和C;RNA分子的核苷酸A,G,U和C)。

[0183] 换句话说,当所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述第一或第二引物对是与其分别与所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物及其cDNA逆转录物)退火的引物对,以产生(cDNA或DNA)扩增子(或以产生cDNA逆转录物及其(cDNA或DNA)扩增子),其长度为100-120个核苷酸(更具体地是100-110个核苷酸长,更具体地是102-108个核苷酸长,更具体地是104-106个核苷酸长,更具体地是105个核苷酸长),并且其包含或是

[0184] -SEQ ID NO:30的序列,或

[0185] -具有与SEQ ID NO:30相同的长度并且与SEQ ID NO:30至少95%(更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。

[0186] 所述第一或第二引物对的每个引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个核苷酸(更具体地是18-28个核苷酸,更具体地是19-27个核苷酸,更具体地是20-26个核苷酸,更具体地是20个核苷酸)组成。

[0187] 例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的引物对。或者,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:32的引物对。

[0188] 所述第一或第二cDNA或RNA靶可以是耶氏肺孢子菌mtLSU靶。

[0189] 例如,当所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,所述第一或第二(mtLSU)cDNA靶可以由115-125个核苷酸(更具体地是117-124个核苷酸,更具体地是119-123个核苷酸更具体地是121个核苷酸)组成,并且包含或者是

[0190] -SEQ ID NO:10的序列

[0191] -具有与SEQ ID NO:10相同的长度并且与SEQ ID NO:10至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0192] 例如,所述第一或第二(mtLSU) RNA靶可以由115-125个核苷酸(更具体地是117-124个核苷酸,更具体地是119-123个核苷酸,更具体地是121个核苷酸)组成,并且包含或是

[0193] -SEQ ID NO:9的序列,或

[0194] -具有与SEQ ID NO:9相同的长度并且与SEQ ID NO:9至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的RNA序列。

[0195] 换句话说,所述第一或第二引物对可以例如是(mtLSU) 引物对,其与耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物以及与其cDNA逆转录物)退火,以产生(cDNA或DNA) 扩增子(或产生cDNA逆转录物以及其(cDNA或DNA) 扩增子),其为115-125核苷酸(更具体地是117-124个核苷酸,更具体地是119-123个核苷酸,更具体地是121个核苷酸),并且其包含或是

[0196] -SEQ ID NO:10的序列

[0197] -具有与SEQ ID NO:10相同的长度并且与SEQ ID NO:10至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0198] 第一或第二引物对的每个(mtLSU) 引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个核苷酸(更具体地是18-28个核苷酸,更具体地是19-27个核苷酸,更具体地是20-26个核苷酸,更具体地是26个核苷酸)组成。

[0199] 例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的(mtLSU) 引物对。

[0200] 或者,所述第一或第二cDNA或RNA靶可以例如为耶氏肺孢子菌mtSSU靶。

[0201] 例如,所述第一或第二(mtSSU) cDNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是82个核苷酸)组成,并且包含或是

[0202] -SEQ ID NO:15的序列

[0203] -具有与SEQ ID NO:15相同的长度并且与SEQ ID NO:15至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0204] 例如,所述第一或第二(mtSSU) RNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是82个核苷酸)组成,并且包含或是

[0205] -SEQ ID NO:14的序列,或

[0206] -具有与SEQ ID NO:14相同的长度并且与SEQ ID NO:14至少95% (更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的RNA序列。

[0207] 换句话说,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU) 引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物以及其cDNA逆转录物)退火,以产生(cDNA或DNA) 扩增子(或产生cDNA逆转录物及其(cDNA或DNA) 扩增子),其为60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是82个核苷酸),并且包含或者是

[0208] -SEQ ID NO:15的序列

[0209] -具有与SEQ ID NO:15相同的长度并且与SEQ ID NO:15至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0210] 所述第一或第二引物对的每个(mtSSU) 引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个

核苷酸(更具体地是18-28个核苷酸,更具体地是19-27个核苷酸,更具体地是20-26个核苷酸,更多特别是20-23个核苷酸)组成。

[0211] 例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的(mtSSU)引物对。

[0212] 例如,所述第一或第二(mtSSU)cDNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是92个核苷酸)组成,并且包含或是

[0213] -SEQ ID NO:20的序列,或

[0214] -具有与SEQ ID NO:20相同的长度并且与SEQ ID NO:20至少95%(更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。

[0215] 例如,所述第一或第二(mtSSU)RNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是92个核苷酸)组成,并且包含或是

[0216] -SEQ ID NO:19的序列,或

[0217] -具有与SEQ ID NO:19相同的长度并且与SEQ ID NO:19至少95%(更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的RNA序列。

[0218] 换句话说,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物及其cDNA逆转录物)退火,以产生(cDNA或DNA)扩增子(或产生cDNA逆转录物及其(cDNA或DNA)扩增子),其为60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是92个核苷酸),并且包含或者是

[0219] -SEQ ID NO:20的序列,或

[0220] -具有与SEQ ID NO:20相同的长度并且与SEQ ID NO:20至少95%(更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。

[0221] 所述第一或第二引物对的每个(mtSSU)引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个核苷酸(更具体地是18-28个核苷酸,更具体地是19-27个核苷酸,更具体地是20-26个核苷酸,更多特别是20-23个核苷酸)组成。

[0222] 例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的(mtSSU)引物对。

[0223] 例如,所述第一或第二(mtSSU)cDNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是76个核苷酸)组成,并且包含或是

[0224] -SEQ ID NO:25的序列,或

[0225] -具有与SEQ ID NO:25相同的长度并且与SEQ ID NO:25至少95%(更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。

[0226] 例如,所述第一或第二(mtSSU)RNA靶可以由60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是76个核苷酸)组成,并且包含或是

[0227] -SEQ ID NO:24的序列,或

[0228] -具有与SEQ ID NO:24相同的长度并且与SEQ ID NO:24至少95%(更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的RNA序列。

[0229] 换句话说,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物及其cDNA逆转录物)退火,以产生(cDNA或DNA)扩增子(或产生cDNA逆转录物及其(cDNA或DNA)扩增子),其为60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸)

酸,更具体地是76个核苷酸),并且包含或者是

[0230] -SEQ ID NO:25的序列,或

[0231] -具有与SEQ ID NO:25相同的长度并且与SEQ ID NO:25至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。

[0232] 所述第一或第二引物对的每个(mtSSU) 引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个核苷酸(更具体地是18-28个核苷酸,更具体地是19-27个核苷酸,更具体地是20-26个核苷酸,更多特别是20-23个核苷酸) 组成。

[0233] 例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的(mtSSU) 引物对。

[0234] 有利地,所述第一引物对的T_m与所述第二引物对的T_m的差异不大于5°C (更具体地不大于4°C,更具体地不大于3°C,更具体地不大于2°C,更具体地不大于1°C)。所述第一引物对的T_m可以与所述第二引物对的T_m相同。

[0235] 替代地或互补地,所述第一引物对的T_m和所述第二引物对的T_m均可以为53°C或以上。更具体地,所述第一引物对和所述第二引物对可以都具有在53-65°C范围内的T_m(更具体地在56-64°C范围内,更具体地在57-63°C范围内,更具体地在58-63°C范围内,更具体地在59-62°C范围内,更具体地在59-61°C范围内)。例如,所述第一引物对和所述第二引物对都可以具有60°C的T_m。

[0236] 例如,所述第一引物对的T_m和所述第二引物对的T_m都在58-63°C范围内,彼此之间的差异不大于5°C。

[0237] 可以实现本领域技术人员认为适合的任何PCR或RT-PCR条件。

[0238] 例如,PCR扩增(对于所述第一和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一个) 包括:

[0239] -在95°C聚合酶活化2-10分钟,和

[0240] -45-50个循环:95°C15-30秒和60°C30-60秒。

[0241] 例如,PCR扩增(对于所述第一和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一个) 包括:

[0242] -在95°C聚合酶活化2分钟,和

[0243] -45个循环:95°C15秒和60°C30秒。

[0244] 例如,RT-PCR扩增包括(对于所述第一和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一个):

[0245] -在42-61°C逆转录,优选50°C下逆转录2-15分钟,

[0246] -在95°C聚合酶活化2分钟,和

[0247] -45个循环:95°C15秒和60°C30秒。

[0248] 例如,RT-PCR扩增包括(对于所述第一和第二耶氏肺孢子菌线粒体基因中的每一个):

[0249] -在50°C下逆转录2分钟,

[0250] -在95°C聚合酶活化2分钟,和

[0251] -45个循环:95°C15秒和60°C30秒。

[0252] 所述第一和/或(更具体地和) 所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量可以使用探针,更具体地,

[0253] 使用至少一种第一探针,其与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(CYTB) 的cDNA逆转录物杂交,和/或(更具体地,和) 至少一种第二探针,其与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体

基因(mtLSU或mtSSU,更具体地是mtLSU)的cDNA逆转录物杂交,或更具体地

[0254] 使用至少一种第一探针,其与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(mtSSU)的cDNA逆转录物杂交,和/或(更具体地,和)至少一种第二探针,其与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因(mtLSU)的cDNA逆转录物杂交。

[0255] 所述第一和第二探针中的每一种可以独立地由17-37个核苷酸组成。

[0256] 更具体地,可以使用与所述第一cDNA靶(或所述第一扩增子)杂交而不与所述第二cDNA靶(或者与所述第二扩增子)杂交的至少一种第一探针,来进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量。

[0257] 更具体地,可以使用与所述第一cDNA靶(或所述第一扩增子)特异性杂交的至少一种第一探针来进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量。

[0258] 更具体地,可以使用与所述第二cDNA靶(或所述第二扩增子)杂交而不与所述第一cDNA靶(或者与所述第一扩增子)杂交的至少一种第二探针,来进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量。

[0259] 更具体地,可以使用与所述第二cDNA靶(或所述第二扩增子)特异性杂交的至少一种第二探针来进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量。

[0260] 例如,可以使用与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的(至少一种)第一探针来进行所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量。

[0261] 例如,当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述第一探针可以与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列、更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:1(耶氏肺孢子菌mtLSU基因)和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2(耶氏肺孢子菌mtSSU基因)和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地是不与SEQ ID NO:1、与SEQ ID NO:1互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交。所述第一探针也可以不与人DNA或RNA杂交。有利地,所述第一探针与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列特异性杂交。

[0262] 所述第一探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针的杂交部分,即是DNA或RNA部分或充当DNA或RNA部分,其赋予第一探针与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0263] 所述杂交部分可以例如是19-30个核苷酸(更具体地是20-24个核苷酸,更具体地是22个核苷酸)的DNA或RNA序列,其与SEQ ID NO:3的序列或与SEQ ID NO:3互补的序列、更具体地与SEQ ID NO:30的序列或与SEQ ID NO:30互补的序列杂交,而不与SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,或者不与SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:1、与SEQ ID NO:1互补的序列、SEQ ID NO:2、与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交。所述第一探针的所述杂交部分也可以不与人DNA或RNA杂交。所述第一探针的所述杂交部分可以与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列特异性杂交。例如,所述第一探针的杂交部分是SEQ ID NO:33的(22个核苷酸长)序列或其互补序列或其LNA对应物,例如SEQ ID NO:58的(22个核苷酸长)序列或其互补序列(SEQ ID NO:59;参见下文的实施例3)。

[0264] 所述第一探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0265] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第一探针的序列可以包含其他DNA或RNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA或RNA序列。该其他DNA或RNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA或RNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第一探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第一探针的总长度有利地为28-32个核苷酸,或27-31个核苷酸,或26-30个核苷酸,或25-29个核苷酸。

[0266] 所述第一探针可以包含(例如,共价连接至)至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四氯荧光素)和/或至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如,**TAMRA**®),Black Hole **Quencher**®-0,Black Hole **Quencher**®-1,Black Hole **Quencher**®-2,Black Hole **Quencher**®-3或Minor Groove **Binder**®淬灭剂)。

[0267] 所述第一探针可以例如是锁核酸(LNA)探针。

[0268] 所述第一探针可以例如是DNA或RNA探针。例如,所述第一探针可以是**TAQMAN**®探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如**TAMRA**®或**BHQ**®-1)。**TAQMAN**®探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0269] 或者,所述第一探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第一探针发夹构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0270] 或者,所述第一探针可以是**SCORPION**®探针(即探针,在其在一个末端连接至荧光团,在另一个末端通过PCR阻断剂连接至引物)。

[0271] 也可以使用至少两种第一探针(即两种不同的第一探针)进行定量,每种第一探针包含至少一种荧光团(例如,**LIGHTCYCLER**®杂交探针)。

[0272] 探针的T_m可比引物对的T_m高4-10°C。

[0273] 例如,当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述第一个探针可以与以下序列杂交

[0274] -具有SEQ ID NO:2的耶氏肺孢子菌mtSSU基因或与SEQ ID NO:2的互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:15的序列(一种耶氏肺孢子菌mtLSU靶)杂交或与SEQ ID NO:15的互补序列杂交,和/或

[0275] -与SEQ ID NO:20(另一个耶氏肺孢子菌mtLSU靶)的序列杂交或与SEQ ID NO:20的互补序列杂交,和/或

[0276] -与SEQ ID NO:25(又一个耶氏肺孢子菌mtLSU靶)的序列杂交或与SEQ ID NO:25的互补序列杂交。

[0277] 更具体地,所述第一探针可以与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列杂交,而不与SEQ ID NO:3(耶氏肺孢子菌CYTB基因)和与SEQ ID NO:3互补的序列中任一个序列杂交,或不与SEQ ID

NO:1(耶氏肺孢子菌mtLSU基因)和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中任一个序列杂交。

[0278] 所述第一探针也可不与人的DNA或RNA杂交。

[0279] 有利地,所述第一探针与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列特异性杂交。

[0280] 所述第一探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针的杂交部分,即其是或充当DNA部分,其赋予第一探针与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0281] 所述杂交部分例如可以是23-29个核苷酸(更具体地是25-27个核苷酸)的DNA序列,其与SEQ ID NO:2的序列或与SEQ ID NO:2互补的序列杂交,更具体地是与SEQ ID NO:15、20、25的序列和与SEQ ID NO:10、20、25互补的序列中的至少一个序列杂交,而不与SEQ ID NO:3和与SEQ ID NO:3互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中任一个序列杂交。

[0282] 所述第一探针的所述杂交部分也可不与人DNA或RNA杂交。所述第一探针的所述杂交部分可以与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列特异性杂交。例如,所述第一探针的杂交部分是SEQ ID NO:18、23或28的(25或27个核苷酸长)序列或其互补序列。

[0283] 所述第一探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0284] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第一探针的序列可以包含其他DNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA序列。该其他DNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第一探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第一探针的总长度有利地为31-37个核苷酸,或30-36个核苷酸,或29-36个核苷酸,或28-34个核苷酸。

[0285] 所述第一探针可以包含至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四羧基荧光素)和/或至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如**TAMRA®**),Black Hole **Quencher®**-0,Black Hole **Quencher®**-1,Black Hole **Quencher®**-2,Black Hole **Quencher®**-3或Minor Groove **Binder®**淬灭剂)。

[0286] 所述第一探针可以是**TAQMAN®**探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如,**TAMRA®**或**BHQ®**-1)。**TAQMAN®**探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0287] 或者,所述第一探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第二探针的构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0288] 探针的 T_m 可比引物对的 T_m 高4-10°C。

[0289] 当所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,所述第一探针可以与SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1互补的序列的耶氏肺孢子菌mtLSU基因杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列(一种耶氏肺孢子菌mtLSU靶)或与SEQ ID NO:10的互补序列杂交。

[0290] 更具体地,所述第一探针可以与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或其互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:3(耶氏肺孢子菌CYTB基因)和与SEQ ID NO:3互补的序列中任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2(耶氏肺孢子菌mtSSU基因)和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中任一序列杂交。

[0291] 所述第一探针也可不与人的DNA或RNA杂交。

[0292] 有利地,所述第一探针与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或其互补序列特异性杂交。

[0293] 所述第一探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针的杂交部分,即其是或充当DNA或RNA部分,其赋予第一探针与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0294] 所述杂交部分可以例如是17-21个核苷酸(更具体地是19个核苷酸)的DNA或RNA序列,其与SEQ ID NO:1的序列或与SEQ ID NO:1互补的序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10互补的序列杂交,而不与SEQ ID NO:3和与SEQ ID NO:3互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中任一序列杂交。

[0295] 所述第一探针的所述杂交部分也可不与人DNA或RNA杂交。所述第一探针的所述杂交部分可与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或其互补序列特异性杂交。例如,所述第一探针的杂交部分是SEQ ID NO:13的(19个核苷酸长)序列或其互补序列。

[0296] 所述第一探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0297] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第一探针的序列可以包含其他DNA或RNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA或RNA序列。该其他DNA或RNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA或RNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第一探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第一探针的总长度有利地为25-29个核苷酸,或24-28个核苷酸,或23-27个核苷酸,或22-36个核苷酸。

[0298] 所述第一探针可以包含(例如,共价连接至)至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四羧基荧光素)和/或至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如,**TAMRA**®),Black Hole**Quencher**®-0,Black Hole**Quencher**®-1,Black Hole**Quencher**®-2,Black Hole**Quencher**®-3或Minor Groove**Binder**®淬灭剂)。

[0299] 所述第一探针可以例如是锁核酸(LNA)探针。

[0300] 所述第一探针可以例如是DNA或RNA探针。

[0301] 例如,所述第一探针可以是**TAQMAN®**探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如**TAMRA®**或**BHQ®-1**)。**TAQMAN®**探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0302] 或者,所述第一探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第一探针发夹构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0303] 或者,所述第一探针可以是**SCORPION®**探针(即探针,其在其中一个末端连接至荧光团,在另一个末端通过PCR阻断剂连接至引物)。

[0304] 也可以使用至少两种第一探针(即两种不同的第一探针)进行定量,每种第一探针包含至少一种荧光团(例如,**LIGHTCYCLER®**杂交探针)。

[0305] 探针的 T_m 可比引物对的 T_m 高4-10°C。

[0306] 例如可以使用(至少一种)第二探针进行所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的定量,其与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交。

[0307] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因时,所述第二个探针可以与具有SEQ ID NO:1的耶氏肺孢子菌mtLSU基因或与SEQ ID NO:1的互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列(一种耶氏肺孢子菌mtLSU靶)杂交或与SEQ ID NO:10的互补序列杂交。

[0308] 更具体地,所述第二探针可以与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或其互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:3(耶氏肺孢子菌CYTB基因)和与SEQ ID NO:3互补的序列中任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2(耶氏肺孢子菌mtSSU基因)和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中任一序列杂交。

[0309] 所述第二探针也可不与人DNA或RNA杂交。

[0310] 有利地,所述第二探针与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或其互补序列特异性杂交。

[0311] 所述第二探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针的杂交部分,即是或充当DNA或RNA部分,其赋予第二探针与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0312] 所述杂交部分可以例如是17-21个核苷酸(更具体地是19个核苷酸)的DNA或RNA序列,其与SEQ ID NO:1的序列或与SEQ ID NO:1互补的序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10互补的序列杂交,而不与SEQ ID NO:3和与SEQ ID NO:3互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中任一序列杂交。

[0313] 所述第二探针的所述杂交部分也可以不与人DNA或RNA杂交。所述第二探针的所述杂交部分可以与SEQ ID NO:1的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:10

的序列或其互补序列特异性杂交。例如,所述第二探针的杂交部分是SEQ ID NO:13的(19个核苷酸长)序列或其互补序列。

[0314] 所述第二探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0315] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第二探针的序列可以包含其他DNA或RNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA或RNA序列。该其他DNA或RNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA或RNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第二探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第二探针的总长度有利地为25-29个核苷酸,或24-28个核苷酸,或23-27个核苷酸,或22-36个核苷酸。

[0316] 所述第二探针可以包含(例如,共价连接至)至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四氯荧光素)和/或至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如,**TAMRA**®),Black Hole **Quencher**®-0,Black Hole **Quencher**®-1,Black Hole **Quencher**®-2,Black Hole **Quencher**®-3或Minor Groove **Binder**®淬灭剂)。

[0317] 所述第二探针可以例如是锁核酸(LNA)探针。

[0318] 所述第二探针可以例如是DNA或RNA探针。

[0319] 例如,所述第二探针可以是**TAQMAN**®探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如**TAMRA**®或**BHQ**®-1)。

TAQMAN®探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0320] 或者,所述第二探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第二探针发夹构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0321] 或者,所述第二探针可以是**SCORPION**®探针(即探针,在其一个末端连接至荧光团,在另一个末端通过PCR阻断剂连接至引物)。

[0322] 也可以使用至少两种第二探针(即两种不同的第二探针)进行定量,每种第二探针包含至少一种荧光团(例如,**LIGHTCYCLER**®杂交探针)。

[0323] 探针的 T_m 可比引物对的 T_m 高4-10°C。

[0324] 例如,当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因时,所述第二探针可以与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列杂交,而不与SEQ ID NO:1(耶氏肺孢子菌mtLSU基因)和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:2(耶氏肺孢子菌mtSSU基因)和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地是不与SEQ ID NO:1、与SEQ ID NO:1互补的序列、SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交。所述第二探针也可以不与人DNA或RNA杂交。有利地,所述第二探针与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列特异性杂交。

[0325] 所述第二探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针

的杂交部分,即是DNA或RNA部分或充当DNA或RNA部分,其赋予第二探针与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0326] 所述杂交部分可以例如是19-30个核苷酸(更具体地是20-24个核苷酸,更具体地是22个核苷酸)的DNA或RNA序列,其与SEQ ID NO:3的序列或与SEQ ID NO:3互补的序列、更具体地与SEQ ID NO:30的序列或与SEQ ID NO:30互补的序列杂交,而不与SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,或者不与SEQ ID NO:2和与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:1、与SEQ ID NO:1互补的序列、SEQ ID NO:2、与SEQ ID NO:2互补的序列中的任一序列杂交。所述第二探针的所述杂交部分也可不与人DNA或RNA杂交。所述第二探针的所述杂交部分可以与SEQ ID NO:3的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:30的序列或其互补序列特异性杂交。例如,所述第二探针的杂交部分是SEQ ID NO:33的(22个核苷酸长)序列或其互补序列或其LNA对应物,例如SEQ ID NO:58的(22个核苷酸长)序列或其互补序列(SEQ ID NO:59;参见下文的实施例3)。

[0327] 所述第二探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0328] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第二探针的序列可以包含其他DNA或RNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA或RNA序列。该其他DNA或RNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA或RNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第二探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第二探针的总长度有利地为28-32个核苷酸,或27-31个核苷酸,或26-30个核苷酸,或25-29个核苷酸。

[0329] 所述第二探针可以包含(例如,共价连接至)至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四羧基荧光素)和/或至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如,**TAMRA**®),Black Hole **Quencher**®-0,Black Hole **Quencher**®-1,Black Hole **Quencher**®-2,Black Hole **Quencher**®-3或Minor Groove **Binder**®淬灭剂)。

[0330] 所述第二探针可以例如是锁核酸(LNA)探针。

[0331] 所述第二探针可以例如是DNA或RNA探针。例如,所述第二探针可以是**TAQMAN**®探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如**TAMRA**®或**BHQ**®-1)。**TAQMAN**®探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0332] 或者,所述第二探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第二探针发夹构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0333] 或者,所述第二探针可以是**SCORPION**®探针(即探针,在其一个末端连接至荧光团,在另一个末端通过PCR阻断剂连接至引物)。

[0334] 也可以使用至少两种第二探针(即两种不同的第二探针)进行定量,每种第二探针包含至少一种荧光团(例如,**LIGHTCYCLER**®杂交探针)。

[0335] 探针的 T_m 可比引物对的 T_m 高4-10℃。

[0336] 当所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU基因时,所述第二个探针可以与以下序列杂交

[0337] -具有SEQ ID NO:2的耶氏肺孢子菌mtSSU基因或与SEQ ID NO:2的互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:15的序列(一种耶氏肺孢子菌mtSSU靶)杂交或与SEQ ID NO:15的互补序列杂交,和/或

[0338] -与SEQ ID NO:20(另一个耶氏肺孢子菌mtSSU靶)的序列杂交或与SEQ ID NO:20的互补序列杂交,和/或

[0339] -与SEQ ID NO:25(又一个耶氏肺孢子菌mtSSU靶)的序列杂交或与SEQ ID NO:25的互补序列杂交。

[0340] 更具体地,所述第二探针可以与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列杂交,而不与SEQ ID NO:3(耶氏肺孢子菌CYTB基因)和与SEQ ID NO:3互补的序列中任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中任一序列杂交。

[0341] 所述第二探针也可不与人DNA或RNA杂交。

[0342] 有利地,所述第二探针与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列特异性杂交。

[0343] 所述第二探针的序列可以例如由杂交部分组成或包含杂交部分,其是或充当探针的杂交部分,即其是或充当DNA部分,其赋予第二探针与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的cDNA逆转录物杂交的能力。

[0344] 所述杂交部分例如可以是23-29个核苷酸(更具体地是25-27个核苷酸)的DNA序列,其与SEQ ID NO:2的序列或与SEQ ID NO:2互补的序列杂交,更具体地是与SEQ ID NO:15、20、25的序列和与SEQ ID NO:10、20、25互补的序列中的至少一个序列杂交,而不与SEQ ID NO:3和与SEQ ID NO:3互补的序列中的任一序列杂交,或不与SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中的任一序列杂交,更具体地不与SEQ ID NO:3、与SEQ ID NO:3互补的序列、SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1互补的序列中任一序列杂交。

[0345] 所述第二探针的所述杂交部分也可不与人DNA或RNA杂交。所述第二探针的所述杂交部分可以与SEQ ID NO:2的序列或其互补序列特异性杂交,更具体地与SEQ ID NO:15、20、25的序列及其互补序列中的至少一个序列特异性杂交。例如,所述第二探针的杂交部分是SEQ ID NO:18、23或28的(25或27个核苷酸长)序列或其互补序列。

[0346] 所述第二探针的序列可以由所述杂交部分组成。

[0347] 或者,除了所述杂交部分之外,所述第二探针的序列可以包含其他DNA序列,例如与所述杂交部分的5'和/或3'末端连接的其他DNA序列。该其他DNA序列不应(显著)降低所述杂交部分的杂交特异性。所述其他DNA序列可以例如是信标臂,更具体地是5'信标臂和3'信标臂,其在未杂交时赋予所述第二探针发夹构型(例如,3'信标臂与5'信标臂互补)。所述第二探针的总长度有利地为31-37个核苷酸,或30-36个核苷酸,或29-36个核苷酸,或28-34个核苷酸。

[0348] 所述第二探针可以包含至少一种荧光团(例如6-羧基荧光素或四氯荧光素)和/或

至少一种淬灭剂(例如,羧基四甲基罗丹明荧光染料(例如,**TAMRA**®),**Black Hole Quencher**®-0,**Black Hole Quencher**®-1,**Black Hole Quencher**®-2,**Black Hole Quencher**®-3或**Minor Groove Binder**®淬灭剂)。

[0349] 所述第二探针可以是**TAQMAN**®探针,即其中荧光团与其5'末端共价连接并且淬灭剂与其3'末端共价连接的探针,(例如**TAMRA**®或**BHQ**®-1)。**TAQMAN**®探针被PCR聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性降解,从而从其中(并且从淬灭剂附近)释放荧光团。

[0350] 或者,所述第二探针可以是信标探针,即除了所述杂交部分之外,其包括连接至5'末端的信标臂和连接至3'末端的信标臂(其当未杂交时赋予所述第二探针的构型),并且其携带共价连接至所述两个信标臂中的一个的荧光团,以及连接至所述两个信标臂中的另一个的淬灭剂的探针。

[0351] 探针的 T_m 可比引物对的 T_m 高4-10°C。

[0352] 有利地,所述至少一种第一探针在实时PCR中实施。更具体地,所述至少一种第一探针在实时PCR扩增中有利地与所述第一引物对在相同的管中实施。

[0353] 有利地,所述至少一种第二探针在实时PCR中实施。更具体地,所述至少一种第二探针在实时PCR扩增中有利地与所述第二引物对在相同的管中实施。

[0354] 有利地,所述至少一种第一探针和一种第二探针在实时PCR中实施。更具体地,所述至少一种第一探针和所述至少一种第二探针在实时PCR扩增中与所述第一引物对和第二引物对在相同的管中实施。

[0355] 本申请还涉及通过本申请的方法实施或可获得的每个单独的产品。

[0356] 更具体地,本申请还涉及各自作为产品的所述第一引物对、所述第二引物对、所述第一探针和所述第二探针中的每一个。

[0357] 更具体地,本申请还涉及各自作为产品的所述第一cDNA靶,所述第二cDNA靶,所述第一RNA靶,所述第二RNA靶,所述第一扩增子和所述第二扩增子中的每一个。

[0358] 本申请还涉及此类产品的关联或组合。

[0359] 更具体地,本申请涉及四个(不同)元素的以下列表中的至少两个或至少三个不同元素的关联或组合:所述第一引物对,所述第二引物对,所述第一探针和所述第二探针;或其中四个的关联或组合。

[0360] 更具体地,本申请涉及所述第一探针和所述第二探针的关联或组合。

[0361] 更具体地,本申请涉及所述第一引物对和所述第二引物对的关联或组合。

[0362] 更具体地,本申请涉及所述第一引物对和所述第一探针的关联或组合。

[0363] 更具体地,本申请涉及所述第二探针和所述第二引物对的关联或组合。

[0364] 例如,它们可以在试剂盒中相关联或组合,更具体地在用于同时、分开或顺序使用的试剂盒中,或组合物中,更具体地是液体组合物如扩增组合物中。所述关联、组合、试剂盒或组合物还可包含至少一种逆转录酶(即至少一种RNA依赖性DNA聚合酶)或至少一种逆转录酶和至少一种DNA依赖性DNA聚合酶。

[0365] 有利地,所述试剂盒包含至少所述第一引物对和/或至少所述第一探针,更具体地至少包含所述引物对和至少所述第一探针。

[0366] 所述试剂盒还可包含用于RNA提取和/或纯化的内部对照,例如IECR或至少一种(实时)探针,更具体地是至少一种(实时)探针和至少一种引物对,其特异性检测人基因(参见上文以及下文的实施例2)。

[0367] 更具体地,本申请涉及六个(不同)元素的以下列表中的至少两个或至少三个或至少四个或至少五个不同元素的关联或组合:所述第一cDNA靶,所述第二cDNA靶,所述第一RNA靶,所述第二RNA靶,所述第一扩增子和所述第二扩增子;或者其中六个的关联或组合。更具体地,本申请涉及所述第一扩增子和所述第二扩增子的关联或组合。所述六个元素中的每一个可以包含在组合物中,更具体地在液体组合物如扩增组合物中。所述关联、组合或组合物还可包含至少一种逆转录酶(即至少一种RNA依赖性DNA聚合酶)或至少一种逆转录酶和至少一种聚合酶(更具体地是至少一种DNA依赖性DNA聚合酶)。

[0368] 所述逆转录酶(或所述逆转录酶和DNA依赖性DNA聚合酶)可以是本领域技术人员可能认为合适的任何逆转录酶(或任何逆转录酶和DNA依赖性DNA聚合酶)。

[0369] 逆转录酶的实例包括由INVITROGEN™(INVITROGEN™,LIFE TECHNOLOGIES™; 5791Van Allen way;Carlsbad;CA 92008;U.S.A)销售的**SUPERSCRIPT®III**逆转录酶(RT)。

[0370] 聚合酶(即DNA依赖性DNA聚合酶)的实例包括水生栖热菌属(*Thermus aquaticus*)聚合酶。

[0371] 所述产品、关联、组合、试剂盒、组合物适用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或发展PCP,或用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0372] 因此,本申请还涉及所述产品、关联、组合、试剂盒、组合物的(体外)用途,用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或发展PCP,或用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0373] 更具体地,本申请涉及逆转录酶(即RNA依赖性DNA聚合酶)和寡核苷酸的体外用途:

[0374] -用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)是否患有或发展PCP,或

[0375] -用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或

[0376] -用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗,

[0377] 其中所述寡核苷酸包含引物和/或探针,其中所述引物包含第一引物对和第二引物对,其中所述探针包含第一探针和第二探针,

[0378] 其中所述第一引物对和/或所述第一探针与所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的

RNA转录物的cDNA逆转录物特异性杂交(参见上文),

[0379] 其中所述第二引物对和/或所述第二探针与所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录物特异性杂交(参见上文)。

[0380] 例如,所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列编码Cytb蛋白的耶氏肺孢子菌基因,所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是其序列转录成耶氏肺孢子菌核糖体RNA的耶氏肺孢子菌基因(mtLSU基因或mtSSU基因,更具体地是mtLSU基因)。

[0381] 例如,所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtSSU耶氏肺孢子菌基因,而所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因是耶氏肺孢子菌mtLSU基因。

[0382] 所述用途可进一步包括使用聚合酶(即DNA依赖性DNA聚合酶)。

[0383] 所述用途可进一步包括使用RNA提取和/或纯化内部对照,例如IECR或至少一种(实时)探针,更具体地至少一种(实时)探针和至少一种引物对,其特异性检测人基因(参见上文以及下文的实施例2)。

[0384] 本申请还涉及试剂盒,其包含所述逆转录酶和所述寡核苷酸。所述试剂盒还可以包含聚合酶(即DNA依赖性DNA聚合酶)。所述试剂盒可以被看作适用于以下用途的试剂盒:在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),或用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。所述试剂盒还可包含用于在这些用途或应用中实施所述逆转录酶和所述寡核苷酸(和任选所述聚合酶)的书面说明书。

[0385] 所述试剂盒可以是用于所述逆转录酶和所述寡核苷酸(或所述逆转录酶、所述寡核苷酸和所述聚合酶)的同时、分开或顺序使用、更具体地是用于同时使用的试剂盒。所述试剂盒可以包含容器(例如管),其中包含所述逆转录酶和所述寡核苷酸(或所述逆转录酶、所述寡核苷酸和所述聚合酶)。有利地,所述逆转录酶和所述聚合酶包含在相同的容器中(例如,在相同的管中)。所述第一引物对可以容纳在与其中容纳所述第二引物对的容器(例如管)不同的容器(例如管)中。所述第一探针可以容纳在与其中容纳所述第二探针的容器(例如管)不同的容器(例如管)中。所述第一引物对和所述第一探针可以在相同的容器(例如管)中。所述第二引物对和所述第二探针可以在相同的容器(例如管)中。

[0386] 所述试剂盒可进一步包括用于RNA提取和/或纯化的工具。例如,所述试剂盒可以进一步包含细胞裂解剂和/或缓冲剂,和/或RNA纯化工具,例如二氧化硅膜。

[0387] 所述试剂盒还可包含用于RNA提取和/或纯化的内部对照,例如IECR或至少一种(实时)探针,更具体地是至少一种(实时)探针和至少一种引物对,其具体检测人基因(参见上文以及下文的实施例2)。

[0388] 在本申请方法的上下文中描述的每个特征或特征的组合适用于每个产品、组合、关联、试剂盒或组合物以及其用途,加上必要的修改。

[0389] 例如,所述第一和第二引物对的每个引物的核苷酸序列可以独立地由15-30个核苷酸(例如,18-28或19-27或20-26个核苷酸)组成(参见上文)。

[0390] 例如,所述第一和第二探针中的每一个的核苷酸序列独立地由17-37个核苷酸(例如,20-24或28-32或17-21或25-29或23-29或31-37个核苷酸)组成(参见上文)。

[0391] 例如,所述第一或第二引物对是引物对,其与所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的cDNA逆转录(或与所述第一或第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物以及其cDNA逆转录物)退火,以产生cDNA扩增子,其为100-120个核苷酸长(更具体地是100-110个核苷酸长,更具体地是102-108个核苷酸长,更具体地是104-106个核苷酸长,更具体地是105个核苷酸长),并且其包含或是

[0392] -SEQ ID NO:30的序列,或

[0393] -具有与SEQ ID NO:30相同的长度并且与SEQ ID NO:30至少95%(更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的引物对。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:32的引物对。

[0394] 例如,所述第一或第二引物对可以例如是(mtLSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物以及与其cDNA逆转录物)退火,以产生115-125个核苷酸(更具体地是117-124个核苷酸,更具体地是119-123个核苷酸,更具体地是121个核苷酸)的cDNA扩增子,并且包含或是

[0395] -SEQ ID NO:10的序列

[0396] -具有与SEQ ID NO:10相同的长度并且与SEQ ID NO:10至少95%(更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的(mtLSU)引物对。

[0397] 例如,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物以及其cDNA逆转录物)退火,以产生60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是82个核苷酸)的cDNA扩增子,并且包含或者是

[0398] -SEQ ID NO:15的序列

[0399] -具有与SEQ ID NO:15相同的长度并且与SEQ ID NO:15至少95%(更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的(mtSSU)引物对。

[0400] 例如,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物以及其cDNA逆转录物)退火,以产生具有60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是92个核苷酸)的cDNA扩增子,并且包含或者是

[0401] -SEQ ID NO:20的序列,或

[0402] -具有与SEQ ID NO:20相同的长度并且与SEQ ID NO:20至少95%(更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%)相同的cDNA序列。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的(mtSSU)引物对。

[0403] 例如,所述第一或第二引物对可以替代地是(mtSSU)引物对,其与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的cDNA逆转录物(或与耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物以及其cDNA逆转录物)退火,以产生具有60-110个核苷酸(更具体地是76-92个核苷酸,更具体地是76、82或92个核苷酸,更具体地是76个核苷酸)的cDNA扩增子,并且包含或者是

[0404] -SEQ ID NO:25的序列,或

[0405] -具有与SEQ ID NO:25相同的长度并且与SEQ ID NO:25至少95% (更具体地是至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同的cDNA序列。例如,所述第一或第二引物对是SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的(mtSSU) 引物对。

[0406] 根据本领域普通技术人员的理解,与(靶) cDNA或RNA或DNA退火的引物对可以看作是一对正向和反向引物。正向引物包含在所述(靶) cDNA或RNA或DNA中的第一序列退火,反向引物与所述(靶) cDNA或RNA或DNA互补的序列中包含的第二序列退火。所述第一(靶) 序列的5'末端和所述第二(靶) 序列的5'末端可以看作是由所述引物对产生扩增子的起始和终止位置。

[0407] 更具体地,并且仍然根据本领域技术人员的理解,与(靶) cDNA或RNA或DNA退火的引物对可以被视为引物对,其中:

[0408] -该对的第一引物与包含在所述(靶) cDNA或RNA或DNA中并且其长度与所述第一引物长度相同的第一序列至少95% (更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同,

[0409] -相同对的第二引物与包含在所述(靶) cDNA或RNA或DNA的互补序列中并且其长度与所述第二引物长度相同的第二序列至少95% (更具体地至少96%,至少97%,至少98%或至少99%) 相同。

[0410] 根据本领域技术人员的理解,所述第一(靶) 序列的5'末端和所述第二(靶) 序列的5'末端可以看作是由所述引物对产生扩增子的起始和终止位置。

[0411] 本申请还涉及固体支持物,例如核酸微阵列,纳米阵列,芯片或泳道,所述第一引物对和/或所述第一探针附着或结合在其上。所述固体支持物还可以包含附着或结合于其上的所述第二引物对和/或所述第二探针。所述固体支持物可以例如是塑料,玻璃或硅微阵列,纳米阵列,芯片或泳道。

[0412] 本申请还涉及耶氏肺孢子菌转录组的(体外) 用途,其用于诊断或预测肺孢子菌肺炎(PCP),更具体地用于诊断或预测人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者) 是否患有或发展PCP,或用于在人患者(更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者) 中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效,或用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。所述用途包括检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物(的数量或浓度) 和所述第二个耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物(的数量或浓度)。例如,所述用途包括检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(CYTB基因) 的RNA转录物(的数量或浓度) 和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因(mtLSU或mtSSU,更具体地是mtLSU) 的RNA转录物(的数量或浓度)。例如,所述用途包括检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(mtSSU) 的RNA转录物(的数量或浓度) 和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因(mtLSU) 的RNA转录物(的数量或浓度)。

[0413] 本申请还涉及一种核酸文库,其是或包含耶氏肺孢子菌的转录组,更具体地是耶氏肺孢子菌的RNA转录物。该转录组或转录物可以是如上讨论的患者生物样品的转录物。这样的文库可用于检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物(的数量或浓度) 和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA的转录物(的数量或浓度)。例如,这样的文库可用于检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体

基因 (CYTB基因) 的RNA转录物 (的数量或浓度) 和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因 (mtLSU 或mtSSU) 的RNA转录物 (的数量或浓度)。例如, 这样的文库可用于检测和/或定量、更具体地定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因 (mtSSU) 的RNA转录物 (的数量或浓度) 和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因 (mtLSU) 的RNA转录物 (的数量或浓度)。

[0414] 本申请的文库特别适用于高通量测序, 例如用于实施Wang et al. 2009描述的RNA-Seq方法。

[0415] 所述文库可以根据本申请使用, 例如用于诊断或预测肺孢子菌肺炎 (PCP), 更具体地用于诊断或预测人患者 (更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者) 是否患有或发展PCP, 或用于在人患者 (更具体地是其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者) 中确定或预测针对PCP的药物或治疗的功效, 或用于确定PCP在已经被诊断为患有PCP并且正在接受或者已经接受针对PCP的药物或治疗的人患者中是否消退或者已经得到治疗。

[0416] 所述核酸文库可以例如是DNA文库, 其包含40-400bp的DNA片段或由其组成, 其中每个所述DNA片段包含40-400个核苷酸的耶氏肺孢子菌RNA片段的cDNA逆转录物, 其中所述40-400个核苷酸的耶氏肺孢子菌RNA片段是来自耶氏肺孢子菌线粒体基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段。

[0417] 有利地, 所述耶氏肺孢子菌线粒体基因是mtLSU基因, mtSSU或CYTB基因。

[0418] 有利地, 所述DNA文库包含或由以下组成:

[0419] -至少一个40-400bp的第一DNA片段, 其包含来自耶氏肺孢子菌, CYTB基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段的cDNA逆转录和

[0420] -至少一个40-400bp的第二DNA片段, 其包含来自耶氏肺孢子菌mtLSU或mtSSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段的cDNA逆转录物,

[0421] 其中所述来自耶氏肺孢子菌CYTB基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段不同于所述来自耶氏肺孢子菌mtLSU或mtSSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段。

[0422] 有利地:

[0423] -所述来自耶氏肺孢子菌CYTB基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段是特异性针对耶氏肺孢子菌CYTB基因的RNA转录物的,

[0424] -所述来自耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段是特异性针对耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的,

[0425] -所述来自耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段是特异性针对耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的。

[0426] 有利地, 所述DNA文库包含或由以下组成:

[0427] -至少一个40-400bp的第一DNA片段, 其包含来自耶氏肺孢子菌, mtSSU的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段的cDNA逆转录物, 和

[0428] -至少一个40-400bp的第二DNA片段, 其包含来自耶氏肺孢子菌mtLSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸片段的cDNA逆转录物,

[0429] 其中所述来自耶氏肺孢子菌mtSSU基因的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段不同于所述来自耶氏肺孢子菌mtLSU的RNA转录物的40-400个核苷酸的片段。

[0430] 在所述DNA文库中, 每个所述DNA片段可任选进一步包含:

[0431] -30-150bp的第一DNA, 其不是耶氏肺孢子菌cDNA或DNA的片段, 并且 (共价地) 连接

到所述cDNA逆转录物的5'末端(例如,30-150bp的DNA,其为第一测序衔接子),和

[0432] -30-150bp的第二DNA,其不是耶氏肺孢子菌cDNA或DNA的片段,并且(共价地)连接到所述cDNA逆转录物的3'末端(例如,30-150bp的DNA,其中是与第一测序衔接子不同的第二测序衔接子)。

[0433] 本申请还涉及一种计算机程序产品,其存储于处理单元的存储器中或支持与所述处理单元的读取器协作的可移动存储器上,其包括用于执行本申请方法的(代码)指令(当由处理器或微处理器读取或执行时)。

[0434] 更具体地,本申请的计算机程序产品可以包括(代码)指令,(当由处理器或微处理器读取或执行时)比对耶氏肺孢子菌的线粒体DNA序列的RNA或cDNA序列读取以检测和/或定量所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(例如,cytb或mtSSU)的RNA转录物(的数量或浓度)和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因(例如,mtLSU或mtSSU)的RNA转录物(的数量或浓度)。

[0435] 本申请还涉及一种计算机装置,包括处理单元,处理单元的存储器中存储本申请的计算机程序产品,以及所述第一耶氏肺孢子菌线粒体基因(例如cytb或mtSSU)和所述第二耶氏肺孢子菌线粒体基因(例如,mtLSU或mtSSU)的RNA转录物的定量的相应值的测量值。

[0436] 本申请还涉及用于治疗 and/or 预防和/或缓解人患者(更具体地其为耶氏肺孢子菌携带者的人患者)中的PCP的试剂盒,其中包含一种或多种成分用于在所述治疗和/或预防和/或缓解中同时、分开或顺序使用。所述一种或多种活性成分可以例如是

[0437] -至少一种二氢叶酸还原酶抑制剂和至少一种磺酰胺类抗生素(的组合或关联),例如,甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑(的组合或关联)(例如,复方新诺明组合药物),或

[0438] -雾化的戊烷脒,或

[0439] -伯氨喹和克林霉素,或

[0440] -atovaquone,或

[0441] -乙胺嘧啶,或

[0442] -棘球白素(包括卡泊芬净),或

[0443] -皮质类固醇(包括泼尼松),或

[0444] -抗炎活性成分,或

[0445] -氨苯砞,或

[0446] -氨苯砞和乙胺嘧啶和甲酰四氢叶酸。

[0447] 更具体地,所述人患者是其已用本申请方法诊断或预测具有患有或发展PCP的高风险的人患者。

[0448] 本申请还涉及用于在有需要的人患者中治疗和/或预防和/或缓解PCP的方法,其中所述人患者是耶氏肺孢子菌携带者。所述方法包括:

[0449] 用本申请方法诊断或预测所述人患者是否具有患有或发展PCP的高风险,

[0450] 提供用于治疗 and/or 预防和/或缓解PCP的药物或药物组合,以及

[0451] 将所述药物或药物组合施用于所述人患者。

[0452] 所述药物或药物组合可包含

[0453] -至少一种二氢叶酸还原酶抑制剂和至少一种磺酰胺类抗生素(的组合或关联),例如,甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑(的组合或关联)(例如,复方新诺明组合药物),或

[0454] -雾化的戊烷脒,或

- [0455] -伯氨喹和克林霉素,或
- [0456] -atovaquone,或
- [0457] -乙胺嘧啶,或
- [0458] -棘球白素(包括卡泊芬净),或
- [0459] -皮质类固醇(包括泼尼松),或
- [0460] -抗炎活性成分,或
- [0461] -氨苯砒,或
- [0462] -氨苯砒和乙胺嘧啶和甲酰四氢叶酸。
- [0463] 与“包含”或“含有”同义的术语“包括”是开放式的术语,不排除额外的未引用的元素、成分或方法步骤,而术语“由……组成”是一个封闭式术语,不包括未明确叙述的任何额外的元素、步骤或成分。
- [0464] 术语“基本上由...组成”是部分开放式的术语,其不排除额外的未引用的元素、步骤或成分,只要这些额外的元素、步骤或成分不实质上影响本发明的基本和新颖性质。
- [0465] 因此,术语“包含”包括术语“由……组成”以及术语“基本上由……组成”。因此,在本申请中,术语“包含”意在更具体地涵盖术语“由...组成”和术语“基本上由……组成”。
- [0466] 为了帮助本申请的读者,本申请说明书已经在各个段落或章节中分开。这些分开的内容不应被视为将段落或章节的实质与另一段落或章节的实质断开联系。相反,本申请包括可以预期的各个章节、段落和句子的所有组合。
- [0467] 本文引用的所有参考文献的每个相关公开内容通过引用具体并入本文。通过说明而非限制的方式提供以下实施例。

实施例

- [0468] 实施例1:
- [0469] 材料与amp;方法
- [0470] 样品
- [0471] 在2013年1月1日至2013年8月31日期间共前瞻性地收集了200份连续的支气管肺泡灌洗(BAL)液(BALF)。纤维光导支气管镜检查是在患者不反对使用BALF测试新的诊断程序后进行的。在肺高分辨率计算机断层扫描中,BAL的部位由病变的形貌引导,并且按照Alanio et al.2011的标准化操作方案,用四个50mL等分的无菌盐水溶液进行BAL。BALF在收集后的一小时内送到实验室。到达后,将BALF以2,800g离心10分钟,将沉淀物用4mL磷酸盐缓冲盐水重新悬浮,并分成4个1mL的级分。然后将这四个管以8,000g离心5分钟,将两个管的沉淀物冷冻并储存在-80℃。将另外两个沉淀物用于Alanio et al.2011所述的经典染色、免疫荧光程序和DNA提取。
- [0472] 记录每份BALF以及在BALF之前进行的任何非侵入性诊断标本(主要是痰和诱导的痰)的经典染色、免疫荧光和DNA PCR的Cq值(Alanio et al.2011)。
- [0473] 重复7个样品并被认为是新的感染发作,除了如果之前基于免疫荧光的PCP诊断为阳性。
- [0474] 患者
- [0475] 在巴黎北部的三家医院(Hospital Saint Louis,lavenue Claude Vellefaux

75010Paris France;Hospital Lariboisière,2rue Ambroise Paré75010Paris France;和Hospital Robert Debré,48Boulevard Serrurier 75019Paris France) 护理了192名相应的患者。性别比为1.5,中位年龄为50岁,其范围为2至82岁。在有耶氏肺孢子的证据(免疫荧光、DNA或RNA检测)的患者中,包括临床、放射学和生物学特征在内的整个医疗档案由两名专家医师(一名肺科医师和一名传染病专家)进行回顾性分析。对于具体分析,在BAL时记录了复方新诺明(cotrimoxazole)治疗的引入日期和持续时间。电子医疗档案记录了最后一次后续就诊的结果。基础疾病分为四类(HIV阳性、血液系统恶性肿瘤、实体器官移植、其他)。

[0476] PCP分类概率

[0477] 肺孢子菌肺炎(PCP)诊断作为急性肺炎发作的病因被分类为已证实、待证实、有可能和无PCP。用于已证实、待证实、有可能的分类标准总结在下表1中。其他临床情况分类为无PCP。

[0478]

表 1: 在急性肺炎发作情况下用于分类患者肺炎球菌肺炎 (PCP) 概率的标准

PCP	相容性背景(ID)	相容性临床和放射学表现	治疗结果良好	没有预防	没有替代诊断	阳性 IF (BAL 或 IS)*
已证明	X	X	X		X	X
待证实	X	X	X	X	X	
有可能	X	X	X	X		

*基于 BALF 和痰标本。

[0479] RNA提取

[0480] 实验当天, 将一个管的沉淀物解冻, 并使用来自 **QIAGEN®** France S.A.S. 的

RNeasy® plus 迷你试剂盒 (目录号 74136) (3 avenue du Canada; LP 809; 91974COURTABOEUF CEDEX; FRANCE) 提取RNA。简言之: 将350 μ L裂解缓冲液RLT+1% β -巯基乙醇加入沉淀物并涡旋。加入350 μ L的70%乙醇, 并轻轻混合。最终体积沉积在柱中, 并按照制造商的建议进行附加步骤。我们最终得到提取的50 μ L RNA。

[0481] 基因序列

[0482] 用于设计引物和用于定量线粒体大亚单位的RNA转录物 (mtLSU, 也称为RNL) 的探针的参考序列在 **GENBANK®** 中以登录号 JX499143.1 REGION: 12373..15076 (SEQ ID NO: 1) 参考, 其为: AAAGGGTTATTAAGGATACTAGCTAATATATTTAAGGAGGTGTCGAATCCAAAATCATT ATTCTAAAGATGTAATAATGTAAATCCGAGAGGGAAAACCTCAACTACTAATTACGAAGTGAAATGAAACATCTTAGTA ACTTTAGGAAAAGAAATCAACCGAGATTTTATGAGTAGTGGTGAGCGAAAGTAAATTAGCCAAGTATTTATATAATA GATTAAATATAATTAATTACAAAAATTAATTGTAGTCTTCAATGAAAGATCAATCTCCTCTTTAAAAGTTGGAAT GCTTTAGCCAAGGATGGTGAAAGCCCAGAGTCCCAGGAATATAAATACAAAATAAGTAGAACGAGAGATAACTTGTT TGAATACAGATAATATTTATGTAGTAATGTATGGAACAATTCAACTTTATACTAATTACACATAAGATTATTAGGGG AACTATCCTCTAAGGCTAAATATAATATATTAAGCGATAGTGAAGAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGAATATAA GTGAAACAGATCTTGAATTAATAACCTTATAAGCAGTCGGAGGTCCAAAGACTGACGACGTACCTTTTGCATAATGG GTCAGCAAGTTAATATGCAATGCAAGTCGCAAGACCTAATGAAGATGATTCTGAACAGGGATATAAAGTATTGTGTA TTAGACCCGAAATCTAGTGATCTTACTATGATCAGACAACTTCAGGTGCAACTGGTGTACGTGCAAGTACTCAGA AGAATTGTGGTAAGTAGTGAAATACAAATCGGACTAGGATATAGCTGGTTTTCTGCGAAAATTGTTTTGGCAAATTG TTTATTCCTCTAAAAATAGTAGGTATAGCACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAAAATATTTATCTCAGATATTTAA TCTCAAAATAACTATTTCTTAAAAATAAATAATCAGACTATGTGCGATAAGGTAGATAGTCGAAAGGGAAACAGCCCA GAACAGTAATTAAGCTCCCAATTAATATTAAGTGAAATAAAAGTTGTTGGATATCTAAAACAGTTAAGAAGTGGG CTTGGAACAGCCATCTTTTAAAGAACACGTAAAAGTGAATGATCTATGATCTCCAGCGCTGAAAATATCCGGATC TAAATATTATGCTGAAAGACTGTTTATTTTTCTTTAATTAAGTGAATTTAATTAATAAAGGTAGCAGAAC ATTTAGTAAATGTGTGAAGAATAGTATTTTATTATTCGGACATAACTAAAGAGAGAATGCTGACATGAGTAACGTTA AAATAGGTGAAAATCCTATTCGCCGAAAATGGAAGGTTTTTATAGTTCGGCTTAACACTATAAATCAGATCGGTCT CTAACAGTAATTCGAATGAATAATGGATGAGAAAACATATATAAAAATCGTAAGATTCAGGAAAAATTATATGTAATA ACCGTACTAAAACCGACACAGGTCCATGAATATTAATGTATACAGGCGAATGAGAGAATTATTGCGAAGGAACTCGG CAAATGAATTTTCGTAATTTTCGAGATAAGAAAATACCAATGGTGTCAATAATGAGGTTGTACAACGTCTTACTTAAAAC ACAGTACTTTGCAAAGATTAATAAATCATTGTATAAAGTATGAAATCTGCCAATGCTAAATGATAAATCTATGGCT TCAATGGCTGTGGGTATAATGTTTAGTGAATGGCGGCCCTTAACTATAAGGGTCCTAAGGTAGCGAATTTCTTTGGCC GTTAAATGCGGTCCCGCACGAATGATTTAATGATACAACAACTGTCTCCGCAATAAACTCAGTGAAATTGGATTAGC CGTGAAGATACGGTTTGTATATAGATAGACGGGAAGACCCTATGCAGCTTAACGTGTGTTCTTTATTGTTTTTTTAA ATTCTCTTCTGTAGTGCTAAAAGGTAGTCGATGAGATGTCAGTGAAAAACCTTTGTGGAATTTAAAATAACTAACT TACTTAATTAAGAACAGTGAAGATTAGACAGTTTCTGTGGGGCGCAGATCTCAAAAATTGTATCTGAGATGCCAAA GGCATGGTGAAATTGGATGGTAACCAATGAATGTACATTTGTATATCTAGTGGTCTTAACTACTAGATGATGTTTT ATTTAATAAAGTGAATGGCATAACTCATGCTTAACAGTAAGACTAACAAGTCAAACGTGACATGTAAGTGGGGCATA ATGACCCTCGTTTACATTATGGATTGGAACGAGAGTAACGAATAAAAGCTACGCTAGGGATAACAGGGTTATTTCTG TGAGAGATCGTATTGACCACGAAGTTTGCCACCTCGATGTCGACTCAACCTATCCTCCAGGAGTAGAATATTGGAA

GGGTTCGGCTGTTCCGCCGATTA AAAAGGTTACGTGAGTTGGGTTAAAAACGTTGTGAAACAGTTTGGTTCCTATCTTC
TATATATTTTAAAAGTTAATGGAGAATTTACTCTTTGTACGCAAGGATCAGATGTATTTTAACTCTGGTTTGTCTG
TTGTTTGTGCATCGCAGATACGCTATGTTGATACGGAATAAATATTGAAAGCATATTAATATGAAGTCTACTCC
ATAAACTTTCTTGC GTTAGACTACGACGTAGATAGGCTTTATCTGTAAGAATAGTAATGTTTTAAGGTATAAAGT
ACTAATTTTTTTTTGACTGAATTAT

[0483] (SEQ ID NO:1)。

[0484] 用于设计引物和用于定量线粒体小亚单位的RNA转录物(mtSSU,也称为RNS)的探
针的参考序列在**GENBANK®**中以登录号JX499143.1,REGION:31755..33192(SEQ ID
NO:2)参考,其为:TAAGATAATCACAAAAGAAAGAGTTTAAATGTTAGCTCCGAATCAACGCTATCTAGAGGCA
TTACACATGCAAATCGTACGTTTAAAGTGGTGAACAGGTGAGTAAAGATAGAAATCTACCTATTCATAAGGTTAGAT
ACCTTTTAAAAGAACAATTGTTTGTGAATAGATGAGTCTAAGTGGGGGAGGTAGTTGTGAGGTGAAGATCCTCCCAA
GCCTAAGAACCCTAGTTATATTTGAAAGAATGAATAACCACATTGGCTCTGAAACAACAGCCAAGATTTTCATCCAA
GAAAGTCCAGCAGTGGGAATATTGGTCAATGATCGAAAAGATTGAACCAGCTATCTAGAAGAATTTGTATTCTGTTA
TTAGAGAGGATTATGACGTTATCTAATTAAGTCTCGACCAATTCTCGTGCCAGCAGTCGCGGTAAGACGAGTGAGG
CTAGCGTTATTCATAATTATTAGGTCTAAAGGGTACGTAGATGGTAACTTATCTGTTATTTATGTGTGAAGGAATT
AGTATTCTAATTCGTTTTATTAGTATTCTAATTTTTTTTAAATAGAACATAAAAAGAATTGGATAAATTGATTAACTAGA
GTCGAATAGAAGAATAAAGAATTTTAAAGAGTAGAGATGAAATTCAACGATACTTAAAGGACTGCCAATGGCGAAAGC
ATTATTCTAGGTAACGACTGACATTGAGGTACGTAGGCATAAGTAGCGAAAAGGATTAGATACCCTTGTAGTTTATG
CTGTAAACGATGAATGCTAGAGGTCAGAAATTTATTTATTTTTGGTCTTTAAGTGAAGATTTTAAAGCATTCCACCTGA
GAAGTACTGTGCAAGACTGAAACTCAAAACATTAGACGGTCACAGAGATCAGCAGTGAAGCATGTTGTTAATTTCG
ATAACCCACGATAAATCTTACCACCTTCTTGCATATTTTCCCTATTCGGAATTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCTTTAG
TTCGTGTTGTGAAATGTTAGGTTTATTCCGATAACGAACGTAAACCTTGTCCCTAATTATTTTAAAGGAAATGTCTAT
CGATATTATAGATGAATGAGGATGAAGACAAGTCCCTCATGACCCTTATGAAGTGGGCTACAGACGTGCTGCAAAATT
TTCTACAATGGGATGCAATGATGGAAGTCGGAGCTAATCCCCTAAAAGATTGTTTAGTCCGGATAAGTGCCTGGAAC
TCGGCTCTTTGAAGTTGGAATTGCTAGTAATCGTCTATCATCATGAGACGGTGAATCTTTTATCTGTGATGTACTAA
CTACTCGTCAAGCGCGGAAATTTTTTAAAGAAATCAAGTCTTACGTCCATTTCTTGGAGATCTGTGCTAAGTCGAA
ATAAGGTAGCTGTAGGGGAACCCTGTAGCTGAATAATTTGTGTTGTTTAAATCCCCCATCCTTGTG

[0485] (SEQ ID NO:2)。

[0486] 用于设计引物和用于定量细胞色素(CYTochrome)B(CYTB)的RNA转录物的探针的
参考序列在**GENBANK®**中以登录号AF074871.1(SEQ ID NO:3)参考,其为:

[0487] TATTTATGGAATTATGGTTCATTATCAGGACTGTGTTTAAATTATACAGATTATTACGGGTGTGACTTTA
GCTATGCATTATATACTTCGATTGATTTAGCTTTCTTGAGTGTGAACATATTATGTGAGATGTAAATTATGGTTG
GTTGATTCGTTATATTCATAGTAATACGGCTCTTTTTTCTTTCTGTTTGTATATTCATATTGCTTGAGGTATCT
ATTATGGATCTTATCGAACTCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATTGGTGTAGTTATCTTCTTAATTATGATTGTTACT
GCTTTCTTGGGATATGTTCTGCCTTTTGGTCAAATGTCATTGTGGGGAGCGACTGTTACTACTAATTTGATGTCTGC
TATACCTTGGATTGGTAATGATATTGTGAATTTTATTTGGGGTGGGTTCTCTGTTAATCATGCTACTCTGAATTGAT
TCTTCTCTTTACATTATTTATTGCCTTTTGTTTTATTGGCTTTAGTTGTTGCTCATTAAATCTCTTTACATGTTTCA
GGAAGTAGTAATCCTCTGGGTGTTACTGGTAATTCAGATCGTCTGCCTTTCCATCCCTATTTCTCATTTAAAGATTT
AGTTACTGTTTTTTTTATTTTTATTAGCTTTATCTTCTTTGTGTTTTATGCTCCTAATGTCTTGGGACATAGTGATA

ATTATATTATGGCTAATCCTATGGCTACTCCTCCAAGTATTGTTCCCTGAATGGTATCTTTTACCTTTCTATGCAATC
 TTGTGATCTATTTTCGAATAAATTATTTGGAGTTGTGGCTATGTTAGCTGCTATTCTTATTCTTTTTGTTTTACCTCT
 TGTGGATTTATCTTGAATTTGAGGTTCTGCTTTTAGACCTCTTAGTAAATTCTTTTTTTGGATCTTTGTCACTAATT
 TCTTCTTGTTAATGTTTGTGGGTTTACAACATGTTGAAGAACCTTTTGTGACGCTTGGACAATATGCTACATTCTTC
 TATTTCTTCTATTTCTTAGTTGTTATTCTCTGGTGGGTATTATT

[0488] (SEQ ID NO:3)。

[0489] 用于设计引物和用于定量β微管蛋白 (Beta TUBuline) (BTUB) 的RNA转录物的探针的参考序列在**GENBANK®**中以登录号AF170964.1 (SEQ ID NO:4) 参考,其为:

1 ggcgcctctt tttggagcac cattagcggg gaacacgggc ttgatagcac tggcctgtaa
 [0490] 61 gcaatattgt aatactgcag tgtgtttgca gaggtgatta gaaatgccta taaggcagca
 121 aaaaggcatt gaaaagactc caaagaagta taaagatgct ctgcaaacaa tctaaaaaca
 181 tgcagtaata ctgcatgttt gcagtacttt ttttccaaaa cttatatttt tcagctatca
 241 tggaacctct gatctccaac tcgaacggat gaatgtttat ttcaacgagg tttctacgga
 301 aaaatgttta tagaatgtca gacatttatt ttaataggca tctgggtgga aatacgtgcc
 361 tcgtgcagta ctggttgatt tagagcccgg tacaatggat gcagtacggt ctgggccatt
 421 tgggaacctg tttcgaccag ataattttat ttttggtaa tcaggtgcag gaaataactg
 481 ggcaaaaagg cattatacag agggagcggg attggtagat actgtgttag atgtagttag
 541 tcgggaagcc gaagcatgtg attgcttgca aggattccag attacacatt cattaggtgg
 601 tggaacgggt gcaggcatgg gaactttgct aatttcgaaa attcgagagg aatatccgga
 661 tcggatgatg gcaacgtttt cagtggttcc ctcacaaaa gtttccgata cagttgtaga
 721 gccatataat gcaacattat cagtgcattg gtgtttttta gccattttta gaatgtatat
 [0491] 781 taatgaggag gggtagcaat tagttgaaaa ttccgatgaa acattctgta tcgacaatga
 841 agcattatat gatatttgta tgcgtacatt aaaattgccg gatccaggat atgggtgatt
 901 gaatcatctt gtctcggcag taatgagtgg tattacaact tgtcttcgat ttctggaca
 961 actcaactcg gatttgcgta aattggccgt taatatggtg ccgtttctc gtttgcaact
 1021 tttcatgggt gggtttgctc cattaacaag cagtaagatg ctttaaactg attctgaaat
 1081 ggctgattgt tattctgtct agagggatca cattcatttc ggtcattgac agttcctgaa
 1141 ttgactcagc aaatgtttga tgcaagaat atgatggcag catcggatcc gagacatggt
 1201 cgctatttaa ctggtgcagc gattttccgc ggtactgttt ccatgaagga ggttgaagat
 1261 caaatgcata atgttcagca gaagaactct tcatattttg ttgaatggat tccaaacaat
 1321 gtgcaaaccg cgctatgttc tattccacca cgtggtctca aatgtcacc aacgtttatt
 1381 ggcaattcaa catctattca ggaactattt aaacgtgtag gcgaccaatt tgctgca

[0492] (SEQ ID NO:4)。

[0493] 用于设计引物和用于定量HSP70的RNA转录物的探针的参考序列在**GENBANK®**中以登录号DQ987621.1 (SEQ ID NO:5) 参考,其为:

```
1 gacggaaatt cggggatcca gaagtgcaat cagatatgaa acattggcct tttaaagtta
61 tagacaaaagg tcagaagcct tatattcagg ttgaatataa aggggatatt aaaacattta
121 cgccggagga gatttcatca atggtcctta caaaaatgaa ggaggtggca gaagcgtatc
181 ttgggactaa agtttccaat gccgttatca cgggccagc atatttcaat gattcacagc
241 gacaggctac gaaagacgca ggattgattg caggattgaa tgttttacgt attatcaatg
301 aacctacagc agcagccatt gcatatggtc tagataagaa gacatcaaat gaaaagaatg
361 tgottatddd tgatcttggg ggaggaactt ttgacgtatc gttattaact atcgaagagg
421 gaatdddttga agtcaaagca accgcaggcg ataccattt gggaggagaa gatdddttgaca
[0494] 481 atcgtcttgt aaaccacttc attgctgaac gcaaacacaa gaaagatctt tcagggaatg
541 cacgatctct tcgtcggctt cgaacagcat gtgagcgtgc taaacggact ctttcatcat
601 caacacagac gagtatagaa attgattcct tatttgaagg aattgattta tatacttcta
661 ttactcgtgc tcgatttgaa gaactttgtc aaggctcttt taggggaaca atggaaccag
721 ttgagaaagt tcttcgtgat tctaaaattg ataaatcaag tgttcatgaa attgtattgg
781 ttggtgggtc tacgcgtatt ccgcgtattc agaaattggt ttgtgatttt tttaatggaa
841 aagagccaaa tagaacgatc aatccagatg aggctgttgc ctatggtgcg gcagttcaag
901 ttgctattct ttcaggagac acatcggaac aaactcaaga catactcttg cttgatgtgg
961 cgctctctc aatgggt
```

[0495] (SEQ ID NO:5)。

[0496] 用于设计引物和用于定量COX1的RNA转录物的探针的参考序列在**GENBANK®**中以登录号JX499143.1,REGION:16256..17836 (SEQ ID NO:6) 参考,其为:

```

16256 atgac
16261 atgatgggtg ttttcaacaa atgctaagga taccggagtc ttgtacttga tctttgcact
16321 tttttctgga atggtgggta cagcatattc agtattattg agaatggaat taacttcccc
16381 aggtgttcag tatttacagg gtgataatca attgtataat gtaattttaa cgagtcatgc
16441 gttgttaatg atattcttta tggttatgcc cggaaatggta ggaggttttg gtaattgggt
16501 ggttccagta atgattggag caccagatat ggcctttcca agattaaata atatctcctt
16561 ctggttgta cgccttctc tgattctggt aattgcttct tctcttctag aagggtggaag
16621 tggtagcagg tggacttttt atccaccttt gtccagttta caaagtcatt cctcagggtgc
16681 tgtagatttg tctatcttta gtctacattt agcaggattt agttctatgt tgggagctat
16741 taattttatt actactgttc ttaatacttg agctcccggg atgactatgc ataaaattcc
16801 attgtttgta tgggtctatct ttgttactgc tatactgttg ttattgtcct tgccagctct
16861 agcaggagggt attactatgc tcttgacgga ttgaaatttt aatacttctt tctatgatgt
16921 cgcaggagga ggggatccta tcctttatca acatctcttc tggttcttcg gacatccaga
[0497] 16981 agtttatatt ctgattatc caggatttgg tatcattagt catattattt ccactttctc
17041 tggaaaacca gtattcgggt atttaggtat ggtttatgct atgttgtcaa ttggtgtctt
17101 aggatttatt gtctggagtc atcatatgta ttcagtgggt ttagatgttg atacatgagc
17161 ttattttact gctgctacta tgattattgg tgtacctact ggtattaaaa tcttctcttg
17221 gattgctact atgtatgggt gtgtgattcg atttaataca cctatgctct ttgctatcgg
17281 attccttttc ctttttactg tgggaggatt aacgggtatt gtcttgtcta atgcttctt
17341 agatgtggct ttacatgata ctattatgt ttagctcat tccattatg ttttatccat
17401 gggtagcagtc tttgctctct tagcagcttg gtatttctgg tctccaaaaa ttttaggatt
17461 gttctttgat gaaaaattag ggcatttgca tttctggact ctttttattg gagtgaattt
17521 aacttttatg cctatgcatt tcttgggatt acagggtatg cccagatgaa ttctgatta
17581 tctgatgct tttgctcagt ggaatcatat ctcaagttta ggtagtttga tttctgttgt
17641 tgctactggt gtttttattt attctatttt tgatcaattg atctctaaat gattggtacc
17701 gatgaatcct tggattctc ctgatttctt tgtagtcat acgaatttag aggattccaa
17761 agcttgttcc ttagaatggg cattgatctc accaccagct tccatgctt atactagttt
17821 acctaaacaa gcttaa

```

[0498] (SEQ ID NO:6)。

[0499] 用于设计引物和用于定量NAD1的RNA转录物的探针的参考序列在 **GENBANK®**中以登录号JX499143.1,REGION:29671..30672 (SEQ ID NO:7)参考,其为:

```

29671 atgttaaatt gtattcaagt gggattggtt
29701 ttattacctg ttttgtttaag ttagcttttt gtgacattag ctgaacgtaa agttatggga
[0500] 29761 tcgattcaac gacgtgtggg tcctaattgt gtgggttatt atggtttggt acaacctgta
29821 gctgatgctt taaaattatt attaaaagaa actattatc ctatccattc gaataaagtg
29881 ttgttcttct taggaccttc tattgcatta gtctttgctt taatgggttg gggattattt

```

29941 ccatggaatt caggtataac actttgggat tttgatttag gtattttatt tagtttagct
 30001 atttcttctt taggtgtgta tggattttta attgggggtt gggcttctaa ttccaaatat
 30061 gctttattag gttccttggt aagtactgct caattaatta gttatgaatt agttttaact
 30121 tcgattgttt ttggtgtgtt tcttttatct ggttctttta attttactca cattattgaa
 30181 gaacaaaaag ctatttggtt tgttttgcc tttatttctc tgtttatttt gttctttatt
 30241 ggtgcttttag cagaaacgaa ttgagctcct tttgatttgc cagaagctga atccgaatta
 [0501] 30301 gttgctgggt ttatgactga gtattctgct gcgatctttg ttttcttctt cctagctgaa
 30361 tatgctaata ttattcttat ctctactcta gctgctattt tcttcttagg aggttattta
 30421 ttacctttcg agttgcattt ctgctaat ggttttagatg ttctcgttca gggattactt
 30481 tctgggttga ttttaggtt gaaagtgtc gggattattt tctctttgt ttgggttga
 30541 tctagcttcc ctagaatttg atatgatcaa ttgtagtctc tatgttggtc tgttctgtta
 30601 cctttgcttt ttgcttggat tttctgtt tttagctatc tttttcttt taattctttt
 30661 attcatttct ag

[0502] (SEQ ID NO:7)。

[0503] 用于设计引物和用于定量ATP9的RNA转录物的探针的参考序列在 **GENBANK®**中以登录号为JX499143.1,REGION:20225..20449 (SEQ ID NO:8) 参考,其为:

20225 atgtta caagcagcta aagttattgg ttcagggtta gctacaattg gattagcagg
 20281 ggctgggtatc ggtatcgggt tagttttcgg taatttatta gtagegacaa gtcgaaatcc
 [0504] 20341 ttcattgaaa ggacaactct tctcttatgc tatcttggga tttgctctag cagaagctac
 20401 tggctttttc tgtttgatga tggctttcct tctgctatat gcagcttaa

[0505] (SEQ ID NO:8)。

[0506] qRT-PCR扩增

[0507] 对于每个样品,测试了mtLSU,CYTB,BTUB,HSP70,COX1,NAD1和ATP9基因的表达(RNA转录物的定量)。所有PCR反应在 **LIGHTCYCLER®**480 仪器(ROCHE DIAGNOSTICS;2,Avenue du Vercors;BP 59;38242MEYLAN CEDEX;FRANCE)上进行,PCR反应的最终体积为10 μ L,含有0.2 μ L用于一步法的qRT-PCR EXPRESS **SuperScript®**III混合物(INVITROGEN™by LIFE TECHNOLOGIES™;5791Van Allen way;Carlsbad;CA 92008;U.S.A.),1X EXPRESS **SuperScript®** III SuperMix通用缓冲液(INVITROGEN™by LIFE TECHNOLOGIES™;5791Van Allen way;Carlsbad;CA 92008;U.S.A.),0.3 μ M的每个引物,0.1 μ M的探针和2 μ L的RNA的1:2稀释液。该反应由50 $^{\circ}$ C 15分钟的逆转录步骤,随后在95 $^{\circ}$ C 2分钟进行DNA聚合酶活化以及95 $^{\circ}$ C 15秒和60 $^{\circ}$ C 30秒的45个循环组成。

[0508] mtLSU (RNA) 靶是:

[0509] CACUGAAUAUCUCGAGGGAGUAUGAAAAUAUUUAUCUCAGAUUUUAAUCUCAAAAUAACUAUUUCUUA
 AAAUAAAUAUCAGACUAUGUGCGAUAAGGUAGAUAGUCGAAAGGGAAACAG

[0510] SEQ ID NO:9。

[0511] mtLSU靶的cDNA逆转录物是(来自SEQ ID NO:1的片段861-981):

[0512] CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAAAATATTTATCTCAGATATTTAATCTCAAATAACTATTTCTTA
 AAATAAATAATCAGACTATGTGCGATAAGGTAGATAGTCGAAAGGGAAACAG

[0513] SEQ ID NO:10。

- [0514] 用于检测mtLSU RNA的靶向区域的引物和探针是：
- [0515] PjF1:5' -CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA-3' (SEQ ID NO:11)
- [0516] PjR1:5' -CTGTTTCCCTTTTCGACTATCTACCTT-3' (SEQ ID NO:12) 和
- [0517] PjSL探针：**TAQMAN®**形式的5' -TCGCACATAGTCTGATTAT-3' (SEQ ID NO:13) (5' 中FAMTM和3' 中**MGB®**)。
- [0518] FAMTM=6-羧基荧光素染料
- [0519] **MGB®**=Minor Groove **Binder®**淬灭剂
- [0520] mtSSU (RNA) 靶可以是：
- [0521] GCAAUGAUGGAAGUCGGAGCUAAUCCCCUAAAAGAUUGUUUAGUCCGGAUAAGUGCCUGGAACUCGGCU
CUUUGAAGUUGA
- [0522] SEQ ID NO:14。
- [0523] mtSSU靶的cDNA逆转录物可以是 (来自SEQ ID NO:2的片段1154-1235)：
- [0524] GCAATGATGGAAGTCGGAGCTAATCCCCTAAAAGATTGTTTAGTCCGGATAAGTGCCTGGAAGTCCGGCT
CTTTGAAGTTGGA
- [0525] SEQ ID NO:15。
- [0526] 用于检测该mtSSU RNA的靶区域的引物和探针可以是：
- [0527] Pj1154F:5' -GCAATGATGGAAGTCGGAGC-3' (SEQ ID NO:16) ,
- [0528] Pj1235R:5' -TCCAACCTCAAAGAGCCGAGT-3' (SEQ ID NO:17) ,和
- [0529] Pj1190P探针：**TAQMAN®**形式的5' -TGTTTAGTCCGGATAAGTGCCTGGA-3' (SEQ
ID NO:18) (5' 中FAMTM和3' 中BHQ-1®)。
- [0530] BHQ-1®=Black Hole **Quencher®**-1。
- [0531] 另一mtSSU (RNA) 靶可以是：
- [0532] GGAUGCAAUGAUGGAAGUCGGAGCUAAUCCCCUAAAAGAUUGUUUAGUCCGGAUAAGUGCCUGGAACUC
GGCUCUUUGAAGUUGGAAUUGCU
- [0533] SEQ ID NO:19。
- [0534] 该mtSSU靶的cDNA逆转录物可以是 (来自SEQ ID NO:2的片段1150-1241)：
- [0535] GGATGCAATGATGGAAGTCGGAGCTAATCCCCTAAAAGATTGTTTAGTCCGGATAAGTGCCTGGAAGTCC
GGCTCTTTGAAGTTGGAATTGCT
- [0536] SEQ ID NO:20。
- [0537] 用于检测该mtSSU RNA的靶区域的引物和探针可以是：
- [0538] Pj1150F:5' -GGATGCAATGATGGAAGTCGGA-3' (SEQ ID NO:21) ,
- [0539] Pj1241R:5' -AGCAATCCAACCTCAAAGAGCC-3' (SEQ ID NO:22) ,和
- [0540] Pj1190P探针：**TAQMAN®**形式的5' -TGTTTAGTCCGGATAAGTGCCTGGAAC-3' (SEQ
ID NO:23) (5' 中FAMTM和3' 中BHQ-1®)。
- [0541] 又一mtSSU (RNA) 靶可以是：
- [0542] UCAUGACCCUUAUGAAGUGGGCUACAGACGUGCUGCAAAUUUUCUACAAUGGAUGCAAUGAUGGAAG
UCGGAGC

[0543] SEQ ID NO:24。

[0544] 该mtSSU靶的cDNA逆转录物可以是(来自SEQ ID NO:2的片段1098-1173)：

[0545] TCATGACCCTTATGAAGTGGGCTACAGACGTGCTGCAAAATTTTCTACAATGGGATGCAATGATGGAAGTCGGAGC

[0546] SEQ ID NO:25。

[0547] 用于检测该mtSSU RNA的靶区域的引物和探针可以是：

[0548] Pj1098F:5'-TCATGACCCTTATGAAGTGGGC-3'(SEQ ID NO:26)，

[0549] Pj1173R:5'-GCTCCGACTTCCATCATTGC-3'(SEQ ID NO:27)，和

[0550] Pj1125P探针：**TAQMAN®**形式的5'-ACGTGCTGCAAAATTTTCTACAATGGG-3'(SEQ ID NO:28)(5'中FAMTM和3'中BHQ-1®)。

[0551] CYTB(RNA)靶是：

[0552] CUCCCAGAAUUCUCGUUUGGUCUAUUGGUGUAGUUAUCUUCUUAUUUAUGAUUGUUACUGCUUUCUUGGGAUAUGUUCUGCCUUUUGUCAAAUGUCAUUGUGGG

[0553] SEQ ID NO:29。

[0554] CYTB靶的cDNA逆转录物是(来自SEQ ID NO:3的片段242-346)：

[0555] CTCCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATTGGTGTAGTTATCTTCTTAATTATGATTGTTACTGCTTTCTTGGATATGTTCTGCCTTTTGGTCAAATGTCATTGTGGG

[0556] SEQ ID NO:30。

[0557] 用于检测CYTB RNA的靶向区域的引物和探针是：

[0558] CYTB_Pj242F:5'-CTCCCAGAATTCTCGTTTGG-3'(SEQ ID NO:31)

[0559] CYTB_Pj346R:5'-CCCACAATGACATTTGACCA-3'(SEQ ID NO:32)和

[0560] CYTB_Pj301P探针：**TAQMAN®**形式的5'-CTTTCTTGGGATATGTTCTGCC-3'(SEQ ID NO:33)(5'中FAMTM和3'中TAMRATM)。

[0561] TAMRATM=羧基四甲基罗丹明荧光染料。

[0562] 用于检测BTUB RNA的引物和探针是：

[0563] BTUB_Pj766F:5'-CCATTAACAAGCAAGGGATCAC-3'(SEQ ID NO:34)

[0564] BTUB_Pj861R:5'-CGATGCTGCCATCATATTCTT-3'(SEQ ID NO:35)和

[0565] BTUB_Pj795P探针：**TAQMAN®**形式的5'-TCGGTCATTGACAGTTCCTGAA-3'(SEQ ID NO:36)(5'中FAMTM和3'中TAMRATM)。

[0566] 用于检测HSP70RNA的引物和探针是：

[0567] HSP70_Pj126F:5'-GGAGATTTCAATGGTCCTT-3'(SEQ ID NO:37)

[0568] HSP70_Pj202R(5'-CGGCATTGGAACTTTAGTCC-3'(SEQ ID NO:38)和

[0569] HSP70_Pj157P探针：**TAQMAN®**形式的5'-AAGGAGGTGGCAGAAGCGTA-3'(SEQ ID NO:39)(5'中FAMTM和3'中TAMRATM)。

[0570] 在每个待运行的PCR中使用具有定义定量的样品的等分试样作为内部对照运行并测量可重复性。对于mtLSU,CYTB,BTUB和HSP70,Cq值±SD分别为24.1±0.3、23.6±0.3、32.5±0.3、29.0±0.2。

[0571] 用于检测COX1RNA的引物和探针是：

[0572] COX1_Pj228F:5' -AGGTTTTGGTAATTGGTTGGTTCC-3' (SEQ ID NO:40)

[0573] COX1_Pj324R:5' -AGAAGGCGGTAACAACCAGAA-3' (SEQ ID NO:41) 和

[0574] COX1_Pj261P探针：**TAQMAN®**形式的5' -TGGAGCACCAGATATGGCCTTCCAAGA-3' ;SEQ ID NO:42) (5' 中FAM™和3' 中BHQ-1™)。

[0575] BHQ-1™=Black Hole **Quencher®**-1。

[0576] 用于检测NAD1RNA的引物和探针是：

[0577] NAD1_Pj579F:5' -AGCAGAAACGAATTGAGCTCCT-3' (SEQ ID NO:43)

[0578] NAD1_Pj664R:5' -TCGCAGCAGAATACTCAGTCAT-3' (SEQ ID NO:44) 和

[0579] NAD1_Pj608P探针：**TAQMAN®**形式的5' -TGCCAGAAGCTGAATCCGAATTAGTTGC-3' (SEQ ID NO:45) (5' 中FAM™和3' 中BHQ-1™)。

[0580] 用于检测ATP9RNA的引物和探针是：

[0581] ATP9_Pj25F:5' -GGTTCAGGGTTAGCTACAATTGGA-3' (SEQ ID NO:46)

[0582] ATP9_Pj118R:5' -AAGGATTTGACTTGTCGCTACT-3' (SEQ ID NO:47) 和

[0583] ATP9_Pj52P探针：**TAQMAN®**形式的5' -GCAGGGGCTGGTATCGGTATCGGTTAG-3' (SEQ ID NO:48) (5' 中FAM™和3' 中BHQ-1™)。

[0584] 基因表达测定

[0585] 为了测定不同样品的基因表达水平,将所有定量数据(C_q)与BTUB表达相比进行标准化。实验校准曲线允许确定测定每个PCR的基因表达所需的PCR效率(e)。最后,将CYTB的表达与mtLSU基因的表达进行比较而不考虑BTUB表达,Pfaffl 2001的式修饰如下:

[0586] $CYT B / mtLSU 比 = E(CYT B)^{-C_q(CYT B)} / E(mtLSU)^{-C_q(mtLSU)}$

[0587] 如Pfaffl 2001中所述,根据式 $E = 10^{[-1/slope]}$ 计算指数阶段一个循环的实时PCR效率(E)。CYTB、mtLSU、BTUB和HSP70的实时PCR效率值报告在表8中。

[0588] 数据分析

[0589] 仅与每位患者一个样品进行与临床资料的相关。使用**PRISM®** v5.0 (GraphPAD Software Inc.;7825Fay Avenue;Suite 230;LA JOLLA;CA 92037,U.S.A.)进行统计学分析。

[0590] 结果

[0591] 检测BALF中的RNA

[0592] 从所有200个样品中,将mtLSU RNA PCR与作为常规测试进行的mtLSU DNA PCR进行比较。对于RNA和DNA PCR,200个样品中的34个(17%)二者均为阳性,148个(74%)二者均为阴性;参考下表2。

[0593] 表2:关于DNA和RNA mtLSU PCR的样品数的分布

[0594] 样品数	阳性 RNA mtLSU PCR	阴性 RNA mtLSU PCR	总计

	阳性 DNA <i>mtLSU</i> PCR	34	5	39
[0595]	阴性 DNA <i>mtLSU</i> PCR	13	148	161
	总计	47	153	200

[0596] 在5个(2.5%)样品中,检测到*mtLSU* DNA,但没有检测到RNA,而在13个样品中检测到*mtLSU* RNA,但没有检测到DNA(参见上述表2)。在BALF中,RNA检测(n=47)比DNA检测(n=39)更灵敏。

[0597] 此外,RNA检测的真菌载量比DNA检测显著更高(图1,配对t检验: $p < 0.0001$)。RNA检测给出比DNA高出10倍的检测,其平均 ΔC_q (DNA-RNA)为3.577(95%置信区间:2.681-4.473)。

[0598] 在47份*mtLSU* rRNA阳性样品中,分别在31个(66%)、32个(68%)和32个(68%)中检测到CYTB、BTUB和HSP70mRNA。

[0599] PCP分类的临床概率

[0600] 从192名患者中前瞻性收集的200份BALF中,由于缺乏临床资料,排除了携带阳性DNA PCR的2份样品(2名患者)。

[0601] 最后,共研究了用RNA或DNA检测的49名患者(50份样品)进行分类。18名患者被认为是PCP(14名患者为已证实的PCP,1名患者为待证实的PCP,3名患者为有可能PCP),31名患者被认为是无PCP。

[0602] 在有和无PCP患者中,观察到不同组别疾病组的重新分配没有差异(χ^2 , $p = 0.063$,参见下表3)。

[0603] 表3:根据不同疾病组PCP和无PCP患者的分布

背景	PCP	无 PCP	p
血液系统恶性肿瘤	7	13	
HIV 阳性	8	4	
[0604] SOT	1	2	0.063
无	2	5	
无 ID	0	7	
总计	18	31	

[0605] 在PCP患者中,14份样品(14名患者)为诊断样品,5份样品(4名患者)未作为诊断样品进行检查,但在PCP诊断和超过15天的复方新诺明治疗后寻找持续性或近期获得性肺炎的其他病因(分开分析其他标本,称为后续样品)。患有PCP的患者由血液系统恶性肿瘤(7/14,50%)、HIV患者(8/14,57%)、实体器官移植(SOT)(1/14,7%)和其他背景(2/14,14%)。8/14(57%)的患者的免疫荧光为阳性,6/14(43%)患者为阴性。基于免疫荧光结果,灵敏度和特异性分别为0.57(95%CI,0.289-0.823)和1.00(95%CI,0.888-1.000)。ROC曲线分析的定量结果(*mtLSU* RNA PCR)允许确定最佳定量循环(C_q)阈值为30.49至31.78(图2A和3B)。基于定量结果,诊断样品的最佳灵敏度和特异性分别为0.812(95%CI,0.543-0.959)和0.960(95%CI,0.796-0.999)($n = 41$,图2A和表7),诊断和后续样品的最佳灵敏度和特异性分别为0.650(94%CI,0.408-0.846)和0.961(95%CI,0.804-0.999)($n = 46$,图2B和表7)。

[0606] 不同类别患者的可变CYTB/mtLSU比

[0607] 在具有阳性mtLSU RNA和阴性CYTB RNA PCR的16份样品中以及具有阴性mtLSU和CYTB RNA PCR的152份样品中无PCP的患者被记录(参见下表6)。

[0608] 表6:在不同类别的样品中重新分配CYTB和mtLSU的表达

样品类别	临床分类		
	PCP	PCP w Rx 15 天	无 PCP
[0609] <i>CYTB/mtLSU</i> >1.66	1	5	9
<i>CYTB/mtLSU</i> <1.27	13	0	2
无 <i>CYTB</i>	0	0	16
无 <i>CYTB</i> /无 <i>mtLSU</i>	0	0	152

[0610] 进行CYTB/mtLSU比率的ROC曲线分析,显示1.27至1.66的阈值允许较高的似然比(LR:12.96)(参见下表4,参见图2A和3B)。

[0611] 表4:基于诊断样品的PCP Xpress测试的ROC曲线数据(n=41)

截断值	<i>CYTB/mtLSU</i> 灵敏度%	95% CI	特异性%	95% CI	似然比
-156.9	100.0	87.23 至 100.0	7.143	0.1807 至 33.87	1.08
-3.985	100.0	87.23 至 100.0	14.29	1.779 至 42.81	1.17
-2.864	96.30	81.03 至 99.91	14.29	1.779 至 42.81	1.12
-2.386	96.30	81.03 至 99.91	21.43	4.658 至 50.80	1.23
-2.191	96.30	81.03 至 99.91	28.57	8.389 至 58.10	1.35
-1.992	96.30	81.03 至 99.91	35.71	12.76 至 64.86	1.50
-1.926	96.30	81.03 至 99.91	42.86	17.66 至 71.14	1.69
-1.903	96.30	81.03 至 99.91	50.00	23.04 至 76.96	1.93
-1.763	92.59	75.71 至 99.09	50.00	23.04 至 76.96	1.85
-1.546	92.59	75.71 至 99.09	57.14	28.86 至 82.34	2.16
[0612] -1.398	92.59	75.71 至 99.09	64.29	35.14 至 87.24	2.59
-1.279	92.59	75.71 至 99.09	71.43	41.90 至 91.61	3.24
-1.222	92.59	75.71 至 99.09	78.57	49.20 至 95.34	4.32
0.02900	92.59	75.71 至 99.09	85.71	57.19 至 98.22	6.48
1.472	92.59	75.71 至 99.09	92.86	66.13 至 99.82	12.96
1.909	88.89	70.84 至 97.65	92.86	66.13 至 99.82	12.44
2.544	85.19	66.27 至 95.81	92.86	66.13 至 99.82	11.93
3.959	81.48	61.92 至 93.70	92.86	66.13 至 99.82	11.41
5.402	77.78	57.74 至 91.38	92.86	66.13 至 99.82	10.89
6.060	74.07	53.71 至 88.89	92.86	66.13 至 99.82	10.37
8.202	70.37	49.82 至 86.25	92.86	66.13 至 99.82	9.85
10.11	66.67	46.04 至 83.48	92.86	66.13 至 99.82	9.33
10.96	62.96	42.37 至 80.60	92.86	66.13 至 99.82	8.81
14.93	59.26	38.80 至 77.61	92.86	66.13 至 99.82	8.30
59.02	59.26	38.80 至 77.61	100.0	76.84 至 100.0	

[0613] 在添加5份后续样品之后,相同范围的比允许更高的似然比(LR:13.13)(参见下表5,参见图2B和3B)。

[0614] 表5:基于诊断 (n=41) 和后续 (n=5) 样品的PCP Xpress测试的ROC曲线数据

	截断值 CYTB/mtLSU 比	灵敏度%	95% CI	特异性%	95% CI	似然比
[0615]	0.1085	100.0	89.11 至 100.0	7.143	0.1807 至 33.87	1.08
	0.2585	100.0	89.11 至 100.0	14.29	1.779 至 42.81	1.17
	0.3570	100.0	89.11 至 100.0	21.43	4.658 至 50.80	1.27
	0.4190	96.88	83.78 至 99.92	21.43	4.658 至 50.80	1.23
	0.4585	96.88	83.78 至 99.92	28.57	8.389 至 58.10	1.36
	0.5025	96.88	83.78 至 99.92	35.71	12.76 至 64.86	1.51
	0.5195	96.88	83.78 至 99.92	42.86	17.66 至 71.14	1.70
	0.5260	96.88	83.78 至 99.92	50.00	23.04 至 76.96	1.94
	0.5705	96.88	83.78 至 99.92	57.14	28.86 至 82.34	2.26
	0.6490	96.88	83.78 至 99.92	64.29	35.14 至 87.24	2.71
	0.7170	96.88	83.78 至 99.92	71.43	41.90 至 91.61	3.39
	0.7835	93.75	79.19 至 99.23	71.43	41.90 至 91.61	3.28
	0.8185	93.75	79.19 至 99.23	78.57	49.20 至 95.34	4.38
	1.050	93.75	79.19 至 99.23	85.71	57.19 至 98.22	6.56
	1.473	93.75	79.19 至 99.23	92.86	66.13 至 99.82	13.13
	1.745	90.63	74.98 至 98.02	92.86	66.13 至 99.82	12.69
[0616]	1.989	87.50	71.00 至 96.49	92.86	66.13 至 99.82	12.25
	2.545	84.38	67.21 至 94.72	92.86	66.13 至 99.82	11.81
	3.025	81.25	63.56 至 92.79	92.86	66.13 至 99.82	11.38
	3.412	78.13	60.03 至 90.72	92.86	66.13 至 99.82	10.94
	4.347	75.00	56.59 至 88.54	92.86	66.13 至 99.82	10.50
	5.402	71.88	53.25 至 86.25	92.86	66.13 至 99.82	10.06
	6.060	68.75	49.99 至 83.88	92.86	66.13 至 99.82	9.63
	7.766	65.63	46.81 至 81.43	92.86	66.13 至 99.82	9.19
	9.669	62.50	43.69 至 78.90	92.86	66.13 至 99.82	8.75
	10.11	59.38	40.64 至 76.30	92.86	66.13 至 99.82	8.31
	10.79	56.25	37.66 至 73.64	92.86	66.13 至 99.82	7.88
	11.64	53.13	34.74 至 70.91	92.86	66.13 至 99.82	7.44
	14.93	50.00	31.89 至 68.11	92.86	66.13 至 99.82	7.00
	59.02	50.00	31.89 至 68.11	100.0	76.84 至 100.0	

[0617] 没有治疗,所有IF阳性样品具有<1.27的比。在具有IF阳性样品的患者中,复方新诺明15天后,可以扩增CYTB和mtLSU,比>1.66。在IF阴性样品中,对应于患有PCP但具有阴性IF的患者或被定殖的患者,观察到比<1.27和>1.66。

[0618] 临床分类后,PCP患者的样品多数具有<1.27的比 (13/14,92.9%),而复方新诺明治疗>15天 (5/5,100%) 患者和无PCP的患者多数具有>1.66的比 (9/11,81.9%) (参见上表6,参见图3B)。

[0619] PCP Xpress测试的性能

[0620] 然后根据不同类型的样品计算我们测试的诊断性能。考虑到比可确定的样品(阳性CYTB和mtLSU RNA PCR,n=25),在CYTB/mtLSU比的阈值为1.5(阈值为]1.27至1.66[]),灵敏度、特异性、阳性预测值 (PPV) 和阴性预测值 (NPV) 和似然比 (LR) 分别为0.867、0.900、0.929、0.818、8.667 (参见下表7)。

[0621]

表 7: 诊断以及诊断和后续样品中的 PCP Xpress 和 RNA mtLSU 的 qPCR 试验的灵敏度、特异性、阳性预测和阴性预测值、似然比

样品	诊断和 CYTB 和 mtLSU 阳性 (n=25)			诊断和后续 CYTB 和 mtLSU 阳性 (n=30)			诊断和 mtLSU 阳性 (n=41)			诊断和后续和 mtLSU 阳性 (n=46)		
	PCP Xpress	RNA qPCR	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR	RNA qPCR
灵敏度[95% CI]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.6842 [0.4345 至 0.8742]	0.8125 [0.5435 至 0.9595]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.8125 [0.5435 至 0.9595]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.8667 [0.5954 至 0.9834]	0.6500 [0.4078 至 0.8461]	0.6500 [0.4078 至 0.8461]
特异性[95% CI]	0.9000 [0.5550 至 0.9975]	0.9000 [0.5550 至 0.9975]	0.9000 [0.5550 至 0.9975]	0.9333 [0.6805 至 0.9983]	0.9091 [0.5872 至 0.9977]	0.9600 [0.7965 至 0.9990]	0.9615 [0.8036 至 0.9990]	0.9600 [0.7965 至 0.9990]	0.9677 [0.8330 至 0.9992]	0.9677 [0.8330 至 0.9992]	0.9615 [0.8036 至 0.9990]	0.9615 [0.8036 至 0.9990]
阳性预测值 [95% CI]	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982	0.6613 至 0.9982
阴性预测值 [95% CI]	0.8182 至 0.9772	0.8182 至 0.9772	0.8182 至 0.9772	0.8750 至 0.9845	0.6250 至 0.8480	0.8889 至 0.9708	0.9259 至 0.9757	0.8889 至 0.9708	0.9375 至 0.9791	0.9375 至 0.9791	0.7813 至 0.9600	0.7813 至 0.9600
似然比	8.667	8.667	8.667	13.00	7.526	20.31	22.53	20.31	26.87	26.87	16.90	16.90

[0622]

表 7 (续和结束):

样品	所有诊断样品 (n=193)				全部 (n=198)			
所用测试	PCP Xpress	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR	PCP Xpress	RNA qPCR
灵敏度	0.8667	0.8125	0.8667	0.8125	0.8667	0.6500	0.8667	0.6500
[95% CI]	[0.5954 至 0.9834]	[0.5435 至 0.9595]	[0.5954 至 0.9834]	[0.5435 至 0.9595]	[0.5954 至 0.9834]	[0.4078 至 0.8461]	[0.5954 至 0.9834]	[0.4078 至 0.8461]
特异性	0.9944	0.9944	0.9944	0.9944	0.9945	0.9944	0.9945	0.9944
[95% CI]	[0.9691 至 0.9999]	[0.9689 至 0.9999]	[0.9691 至 0.9999]	[0.9689 至 0.9999]	[0.9699 至 0.9999]	[0.9691 至 0.9999]	[0.9699 至 0.9999]	[0.9691 至 0.9999]
阳性预测值	0.9286	0.9286	0.9286	0.9286	0.9286	0.9286	0.9286	0.9286
[95% CI]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]	[0.6613 至 0.9982]
阴性预测值	0.9888	0.9832	0.9888	0.9832	0.9891	0.9620	0.9891	0.9620
[95% CI]	[0.9602 至 0.9986]	[0.9518 至 0.9965]	[0.9602 至 0.9986]	[0.9518 至 0.9965]	[0.9613 至 0.9987]	[0.9232 至 0.9846]	[0.9613 至 0.9987]	[0.9232 至 0.9846]
似然比	154.3	143.8	154.3	143.8	158.6	115.7	158.6	115.7

PCP Xpress: *CYTB/mtLSU* 阈值为 |1.27 至 1.66|
qPCR RNA *mtLSU*: *Cq* 阈值为 |30.49 至 31.78|

[0623] 如果添加16份具有阴性CYTB表达的样品,在CYTB/mtLSU比的阈值为1.5 (|1.27至1.66|的阈值),灵敏度、特异性、PPV和NPV和LR分别为0.867、0.961、0.929、0.926、22.53 (参见上表7)。如果考虑所有诊断样品,CYTB/mtLSU比的阈值为1.5 (阈值在1.27至1.66之间),灵敏度、特异性、PPV和NPV和LR分别为0.867、0.994、0.929、0.989、154.3 (参见上表7)。如果包括后续样品,在每个类别的样品中,似然比高于单独的诊断样品 (参见上表7)。总体而言,

PCP Xpress比mtLSU RNA定量的似然比更高(LR=158.6)(参见上表7)。

[0624] 与mtLSU相比,测试其他基因(HSP70,BTUB,COX1,NAD1,ATP9)的基因表达

[0625] 测试HSP70基因,因为它的mRNA是肺孢子菌大鼠模型中暴发感染期间在卡氏肺孢子菌(*Pneumocystis carinii*)转录组分析中发现的最丰富的转录物之一。将BTUB基因用作参考基因,并与相比于mtLSU进行测试。还研究了其他线粒体基因:COX1,NAD1和ATP9。

[0626] 在所有样品中测试了与CYTB和mtLSU平行的BTUB和HSP70基因表达。在9份阳性样品中检测到COX1,NAD1和ATP9(4份从PCP患者中回收;5份从无PCP的患者中回收)。ATP9没有得到充分表达足以用作诊断标记。

[0627] 对于每个基因,如上所述计算与mtLSU相比的比。

[0628] 我们研究中的HSP70和BTUB的比分别给出5.83和9.69的最大似然比。这些值低于CYTB(参见图4)。没有其他的比(CYTB vs.BTUB,mtLSU vs.BTUB,HSP70vs.BTUB,HSP70vs.CYTB)能够准确区分PCP和无PCP样品。此外,不能看到PCP和无PCP样品中COX1和NAD1的比的差异(参见下表8)。

[0629]

表 8: 9 份样品 (来自 PCP 的 4 份和来自无 PCP 患者的 5 份) 获得的 BTUB、HSP70、NADI、COXI 和 CYTB 基因的基因表达和与 mtLSU 的比

PCR 功效	临床分类	BTUB		HSP70		HSP70/ NADI		NADI/ COXI		COXI/ CYTB		CYTB/ mtLSU	
		Cq	mtLSU 比	Cq	mtLSU 比	Cq	mtLSU 比	Cq	mtLSU 比	Cq	mtLSU 比	Cq	mtLSU 比
样品 17	PCP	23.145	0.01	21.69	0.03	17.555	0.26	17.56	0.26	16.885	0.52	16.545	
样品 21	PCP	30.03	0.02	28.825	0.07	26.73	0.13	26.73	0.13	25.17	0.53	25.16	
样品 30	PCP	28.82	0.01	23.155	0.57	24.68	0.10	24.68	0.10	23.505	0.30	22.585	
样品 51	PCP	32.59	0.02	29.565	0.28	30.33	0.07	30.33	0.07	28.225	0.43	28.01	
样品 6	无 PCP	38.73	0.09	38.28	0.23	36.54	0.24	36.54	0.24	32.81	4.98	36.525	
样品 9	无 PCP	no	na	37.51	0.08	34.66	0.17	34.66	0.17	32.035	1.66	34.045	
样品 16	无 PCP	37.44	0.02	34.925	0.21	33.81	0.16	33.81	0.16	32.185	0.75	32.98	
样品 27	无 PCP	34.57	0.01	32.755	0.09	31.625	0.07	31.63	0.07	29.725	0.41	29.51	
样品 57	无 PCP	35.74	0.50	no	na	36.4	0.20	36.4	0.20	31.13	11.82	36.1	

*未对 NADI 和 COXI 基因计算 PCR 功效, 因此固定为 2。

no = 未检出

na = 不适用

[0630] 实施例2: 添加内部对照作为RNA提取和/或纯化的对照

[0631] 在提取和/或纯化步骤之前, 可将人工RNA或外源RNA加入到样品中。这种人工RNA

或外源RNA称为内部提取对照RNA (IECR)。

[0632] IECR可以是含有经校准的RNA的人工细胞。RNA提取后并且以与测试靶基因 (CYTB和mtLSU) 平行的方式,将在加入专用混合物中并且特定引物在特定孔中后测试对照IECR的存在和数量。来自内部对照RNA的信号证实了提取步骤的成功,并且还用于确定RNA样品中抑制剂的存在。

[0633] IECR包含与任何公开序列没有显著的同源性的序列,不应干扰样品RNA (人和真菌) 的检测。也可以进行阴性对照反应。

[0634] IECR的实例包括:

[0635] -RNA提取对照,其由BIOLINE (BIOLINE USA Inc.;305 Constitution Dr.; TAUNTON;MA 027080;U.S.A.)以目录号BIO-38040或BIO-35040销售,

[0636] - **AMBION®** ERCC RNA Spike-In对照,其由LIFE TECHNOLOGIES S.A.S. (route de l'orme des merisiers;Immeuble Discovery-Zone Technologique; 91190SAINT AUBIN,FRANCE)以目录号4456740销售,和

[0637] -RNA内部对照,其由**QIAGEN®** (**QIAGEN®**France S.A.S.;3,avenue du Canada;LP 809;91974COURTABOEUF CEDEX;FRANCE)以目录号211492销售。

[0638] 或者在提取和/或纯化步骤之前引入人工或外源RNA,可以通过检测在所述提取和/或纯化步骤之后仍然存在人基因来进行对照。合适的人基因的实例是本领域已知的,并且包括组成型基因,例如人白蛋白 (ALB) 基因或人TATA框结合蛋白 (TBP)。

[0639] 可以使用特异性检测所述人基因的探针、特别是引物对和 (实时) 探针来检测所述人基因。

[0640] 人白蛋白 (ALB) 基因的引物对和 (实时) 探针的实例包括

[0641] ALB_Hs_10F TCGTTACACCAAGAAAGTACCCC (SEQ ID NO:49);

[0642] ALB_Hs_89R TGCTGCCCACTTTTCCTAGG (SEQ ID NO:50);

[0643] ALB_Hs_34P AGTGTCAACTCCAACCTCTGTAGAGGT (SEQ ID NO:51)。

[0644] 人TATA框结合蛋白 (TBP) 的引物对和 (实时) 探针的实例包括

[0645] TBP_Hs_107F TGGCGTGTGAAGATAACCCA (SEQ ID NO:52);

[0646] TBP_Hs_204R CGCTGGAACCTCGTCTCACTA (SEQ ID NO:53);和

[0647] TBP_Hs_142P TGCTGAGAAGAGTGTGCTGGAGATGC (SEQ ID NO:54);

[0648] 或

[0649] TBP_Hs_73F ATCTTTGCAGTGACCCAGCA (SEQ ID NO:55);

[0650] TBP_Hs_169R GAGCATCTCCAGCACACTCT (SEQ ID NO:56);和

[0651] TBP_Hs_93R GCATCACTGTTTCTTGCGTGTGAAG (SEQ ID NO:57)。

[0652] 实施例3:替代CYTB探针和引物

[0653] 上文的实施例1中使用的CYTB (cDNA) 探针是**TAQMAN®**形式的SEQ ID NO:33的探针,其使用5' 中FAM[™]荧光团和3' 中TAMRA[™]淬灭剂。

[0654] 成功使用Black-Hole **Quencher®-1 (BHQ®1)**替代**TAMRA®**淬灭剂。使用该替代淬灭剂,单一 (simplex) RT-PCR的效率为1.94。

[0655] mtLSU的单一RT-PCR效率为1.92 (如实施例1所述的SEQ ID NO:11-13的引物和探

针)。

[0656] mtSSU的单一RT-PCR效率为1.95(如实施例1所述的SEQ ID NO:26-28的引物和探针)。

[0657] 如实施例1所述进行每个单一RT-PCR,即在**LIGHTCYCLER®** 480仪器(ROCHE DIAGNOSTICS;2,Avenue du Vercors;BP 59;38242MEYLAN CEDEX;FRANCE)上进行,RT-PCR的终体积为10 μ L,含有0.2 μ L用于一步法的qRT-PCR EXPRESS **SuperScript®** III混合物(INVITROGEN™by LIFE TECHNOLOGIES™;5791Van Allen way;Carlsbad;CA 92008;U.S.A.),1X EXPRESS **SuperScript®** III SuperMix通用缓冲液(INVITROGEN™by LIFE TECHNOLOGIES™;5791Van Allen way;Carlsbad;CA 92008;U.S.A.),0.3 μ M的每个引物,0.1 μ M的探针和2 μ L的RNA的1:2稀释液。该反应由50 $^{\circ}$ C 15分钟的逆转录步骤,随后在95 $^{\circ}$ C 2分钟进行DNA聚合酶活化以及95 $^{\circ}$ C 15秒和60 $^{\circ}$ C 30秒的45个循环组成。

[0658] SEQ ID NO:33(CYTB cDNA探针)的核苷酸序列可以被修饰以通过其锁定核酸(LNA™)形式(EXIQON™Inc.14F Gill Street Woburn MA 01801U.S.A.)代替至少一个核苷酸。

[0659] 例如,SEQ ID NO:33的序列的T、A和G核苷酸中的至少一个可以分别被LNA™-T、LNA™-A或LNA™-G代替。

[0660] 例如,SEQ ID NO:33的序列的1至5个核苷酸可以(每一个)由其(各自)LNA™形式代替。

[0661] 例如,SEQ ID NO:33的序列的T、A和G核苷酸中的一个到五个可以(每一个)分别被其(各自)LNA™对应物,即LNA™-T、LNA™-A或LNA™-G。

[0662] 例如,可以将SEQ ID NO:33(CTT-TCT-TGG-GAT-ATG-TTC-TGC-C)的核苷酸序列修饰为CT8-TCT-8GG-G5T-ATG-8TC-T7C-C,其中8=LNA™-T,5=LNA™-A和7=LNA™-G(SEQ ID NO:58)[与SEQ ID NO:58互补的序列为G-G6A-GA5-CAT-A8C-CC5-AGA-5AG(SEQ ID NO:59),其中8=LNA™-T,5=LNA™-A,7=LNA™-G和6=LNA™-C]。

[0663] 这样的LNA修饰旨在增加核苷酸序列的特异性(即,在SEQ ID NO:33或其互补序列的情况下,以增加CYTB cDNA探针的特异性)。

[0664] 上述实施例1中使用的CYTB正向引物是序列SEQ ID NO:31的引物。或者,将SEQ ID NO:31的核苷酸序列(CYTB_Pj242F:5'-CTC-CCA-GAA-TTC-TCG-TTT-GG-3')可以根据IUPAC核苷酸代码修饰为CTC-CCA-GAA-TTC-TMG-TTT-GG,其中M=C或A(SEQ ID NO:60)。

[0665] 这种简并引物旨在允许检测和定量来自患者的样品中CYTB mRNA,该患者在该基因组中具有与CYTB基因相对应的核苷酸序列SEQ ID NO:3的255位的C或A。

[0666] 实施例4:替代比(mtSSU/mtLSU比)

[0667] 分析18名患者的支气管肺泡灌洗液(BAL)液体样品,用于检测和定量mtSSU和mtLSU的RNA转录物[十二名无PCP的患者为肺孢子菌肺炎(P.pneumonia)携带者;6名PCP患者未接受抗PCP治疗或接受抗PCP治疗至多15天]。

[0668] 所有样品对于两种RNA转录物(mtSSU和mtLSU)均为阳性。

[0669] 如上述实施例1所述进行mtLSU RT-PCR(使用SEQ ID NO:11-12的mtLSU引物和SEQ ID NO:13的探针)。

[0670] 如上述实施例1所述进行mtSSU RT-PCR (使用SEQ ID NO:26-27的mtSSU引物和SEQ ID NO:28的探针)。

[0671] mtSSU和mtLSU的定量:

[0672] mtSSU基因比mtLSU显著更好的循环结果,中位数为27.90 [CI95%24.39-28.55] 相比于30.00 [CI95%26.51-31.36], 分别 ($p < 0.001$)。请参见图5。

[0673] mtSSU/mtLSU比:

[0674] mtSSU/mtLSU RNA比允许区分PCP和携带(最佳比为2.7)。

[0675] 3.1至3.3的比将导致100%的灵敏度,但具有较低的特异性(在3.1为75%,在3.3为66.6%)。然而,如果目的是允许PCP诊断以及鉴定携带的患者,则3.1到3.3的比将是最佳的,以避免需要治疗PCP的PCP患者的错误鉴定。

[0676] 单独使用mtLSU或mtSSU定量(循环)获得的ROC曲线的比较给出两者的最大似然比两者都为6。mtSSU/mtLSU比得到最好的结果(比为2.7时的似然比为10)。请参见图6。

[0677] 图7显示了PCP患者和携带者患者中mtSSU/mtLSU RNA比的值的分布。

[0678] 图8显示了PCP患者和携带者患者中mtSSU et mtLSU基因的RNA转录物的定量的值(循环)的分布。

[0679] 参考文献

[0680] Alanio et al.2011.Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients.Clin Microbiol Infect 2011;17:1531-7.

[0681] Pfaffl 2001.A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.Nucleic Acids Res 2001;29:e45.

[0682] Wang et al.2009.RNA-Seq:a revolutionary tool for transcriptomics.Nat .Rev.Genet.2009January;10 (1) :57-63.

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 巴斯德研究所	
[0003]	狄德罗-巴黎第七大学	
[0004]	公共救济事业局-巴黎医院	
[0005]	<120> 用于诊断、预测或监测肺孢子菌肺炎的工具	
[0006]	<130> B11232A - FP	
[0007]	<150> EP15305562	
[0008]	<151> 2015-04-15	
[0009]	<160> 60	
[0010]	<170> PatentIn version 3.5	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 2704	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 耶氏肺孢子菌(<i>Pneumocystis jirovecii</i>)	
[0015]	<400> 1	
[0016]	aaaggggta ttaaggataa ctagctaata tatttaagga ggtgtcgaat ccaaaatcat	60
[0017]	tattctaaag atgtaataat gtaaatccga gagggaaacc tcaatactaa ttacgaagtg	120
[0018]	aatgaaaca tcttagtaac tttagaaaa gaaatcaacc gagattttat gagtagtggt	180
[0019]	gagcгааagt aaattagcca agtatttata taatagatta aatataatta attacaaaa	240
[0020]	ttaattgtag tcttcgaatg aaagatcaat ctctctttt aaaagttgga atgcttttagc	300
[0021]	caaggatggt gaaagcccag agtcccagga atataaatac aaaataagta gaacgagaga	360
[0022]	taacttgttt gaatacagat aatatttatg tagtaatgta tggaacaatt caactttata	420
[0023]	ctaattacac ataagattat taggggaact atcctctaag gctaaatata atatattaag	480
[0024]	cgatagtga gagtaccgtg agggaaagt gaaaagaata taagtgaac agatcttga	540
[0025]	ttaataacct tataagcagt cggaggcca aagactgacg acgtacctt tgcataatgg	600
[0026]	gtcagcaagt taatatgcaa tgcaagtcg aagacctaag gaagatgatt ctgaacaggg	660
[0027]	atataaagta ttgtgtatta gaccgaaat ctagtgatct tactatgatc agacaacttc	720
[0028]	aggtcgaact ggtgtacgtc gcaagtact cagaagaatt gtgtaagta gtgaaataca	780
[0029]	aatcgacta ggatatact ggtttctgc gaaaattgtt ttggcaaatt gtttattcct	840
[0030]	ctaaaaata gtaggtatag cactgaatat ctcgaggag tatgaaaata tttatctcag	900
[0031]	atatttaatc tcaaaataac tatttcttaa aataaataat cagactatgt gcgataaggt	960
[0032]	agatagtcga aagggaaca gcccagaaca gtaattaaag ctcccaatt aatattaagt	1020
[0033]	gaaataaaag ttgttgata tctaaaacag ttaagaagtg ggcttgaaa cagccatctt	1080
[0034]	ttaaagaaca cgtaaaagt caatgatcta tgatctccag cgctgaaaat atccggatct	1140
[0035]	aatatttatg ctgaaagact gtttattttt cttttaatta actgtaattt aattaaaaa	1200
[0036]	aataaggtag cagaacattt agtaaagtg tgaagaatag tattttatta ttcggacata	1260
[0037]	actaaagaga gaatgctgac atgagtaacg ttaaaatagg tgaaaatcct attcgccgaa	1320
[0038]	aatggaaggt ttttatagtt ccgcttaact actataaatc agatcggctc ctaacagtaa	1380
[0039]	ttcgaatgaa taatggatga gaaacatata taaaatcgt aagattcagg aaaaattata	1440
[0040]	tgtaataacc gtactaaaac cgacacaggt ccatgaatat taatgtatac aggcgaatga	1500
[0041]	gagaattatt gcgaaggaac tcggcaaatg aatttcgtaa tttcgagata agaaatacca	1560

[0042]	atgggtgcaa taatgagggt gtacaactgt ttacttaaaa cacagtactt tgcaaagatt	1620
[0043]	aaaaatcatt gtataaagta tgaaatctgc ccaatgctaa atgataaaat ctatggcttc	1680
[0044]	aatggctgtg ggtataatgt ttagtgaatg gcggccttaa ctataagggt cctaaggtag	1740
[0045]	cgaatttccct tggccgtaa atgcggtccc gcacgaatga tttaatgata caacaactgt	1800
[0046]	ctccgcaata aactcagtga aattggatta gccgtgaaga tacggtttgt atatagatag	1860
[0047]	acgggaagac cctatgcagc ttaactgttg ttctttattg tttttttaa ttctcttctg	1920
[0048]	tagtgcataa aggtagtcga tgagatgca gtgaaaaacc tttgtggaaa tttaaaataa	1980
[0049]	ctaacttact taattaagaa cagtgaagat tagacagttt ctgtggggcg cagatctcaa	2040
[0050]	aaattgtatc tgagatgcc aaaggcatgg tgaaattgga tggtaaccaa tgaatgtaca	2100
[0051]	tttgatatc tagtggctt taattactag atgatgtttt atttaataa gtgtaatggc	2160
[0052]	ataactcatg cttaacagta agactaaca gtcaaactga catgtaagt gggcataatg	2220
[0053]	accctcgtt acattatgga ttggaacgag agtaacgaat aaaagctac ctagggataa	2280
[0054]	cagggttatt tcgtgtgaga gatcgtattg accacgaagt ttgccacct gatgtcgact	2340
[0055]	caacctatcc tccaggagta gaatattgga agggttcggc tgttcggca ttaaaaggt	2400
[0056]	acgtgagttg ggttaaaaac gttgtgaac agtttggtc ctatcttcta tatattttaa	2460
[0057]	aagttaatgg agaatttact cttgtacgc aaggatcaga tgtattttaa cctctggtt	2520
[0058]	gtctgttgtt tgtcgcacg cagatacgt atgttgatac ggaataaata ttgaaagcat	2580
[0059]	attaatatg aagtctact ccataaactt tcttgcttg tagactacga cgtagatagg	2640
[0060]	ctttatctgt aagaatagta atgttttaag gtataaagta ctaattttt tttgactgaa	2700
[0061]	ttat	2704
[0062]	<210> 2	
[0063]	<211> 1438	
[0064]	<212> DNA	
[0065]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0066]	<400> 2	
[0067]	taagataatt cacaaaagaa agagttaat gttagctccg aatcaacgct atctagaggc	60
[0068]	attacacatg caaatcgtac gtttaaagtg gtgaacaggt gagtaaagat agaaatctac	120
[0069]	ctattcataa ggtagatac cttttaaaag aacaattgtt tgtgaataga tgagtctaag	180
[0070]	tgggggaggt agttgtgagg tgaagatcct cccaagceta agaaccctag ttatatttga	240
[0071]	aagaatgaat aaccacattg gctctgaaac aacagccaag attttcatcc aagaaagtcc	300
[0072]	agcagtgggg aatattggtc aatgatcga agattgaacc agctatctag aagaatttgt	360
[0073]	attctgttat tagagaggat tatgacgta tctaattaaa gtctcgacca attctcgtgc	420
[0074]	cagcagtcgc ggtaagacga gtgaggctag cgttattcat aattattagg tctaaagggt	480
[0075]	acgtagatgg ttaacttacc tgttatttat gtgtgaagga attagtattc taattcgtt	540
[0076]	tattagtatt ctaattttt taatagaaca taaaagaatt ggataaattg attaactaga	600
[0077]	gtcgaataga agaataaaga attttaagag tagagatgaa attcaacgat acttaagga	660
[0078]	ctgccaatgg cgaaagcatt attctaggtg acgactgaca ttgaggtagc taggcataag	720
[0079]	tagcgaagag gattagatac cctttagatt tatgctgtaa acgatgaatg ctagaggtca	780
[0080]	gaatttattt atttttggtc ttttaagtga gattttaagc attccacctg agaagtactg	840
[0081]	tcgcaagact gaaactcaa acattagacg gtcacagaga tcagcagtga agcatgttgt	900
[0082]	ttaattcgat aaccacgat aaatcttacc acttcttca tattttccta ttcggaatt	960
[0083]	acaggtgttg catggtgtgc tttagttcgt gttgtgaaat gttaggttta ttccgataac	1020

[0084]	gaacgtaaac cttgtcctta attatnttaa ggaaatgtct atcgatatta tagatgaatg	1080
[0085]	aggatgaaga caagtcctca tgacccttat gaagtgggct acagacgtgc tgcaaaattt	1140
[0086]	tctacaatgg gatgcaatga tggaagtcgg agctaattccc ctaaaagatt gtttagtccg	1200
[0087]	gataagtgcc tggaactcgg ctctttgaag ttggaattgc tagtaatcgt ctatcatcat	1260
[0088]	gagacggatga atcttttatc tgtgatgtac taactactcg tcaagcgcgg aaatntntta	1320
[0089]	agaaattcaa gttcttacgt ccatttcttg gagatctgtg ctaagtcgaa ataaggtagc	1380
[0090]	tgtaggggaa ccctgtagct gaataatttg tgttntntaa atcccccca tccttgtg	1438
[0091]	<210> 3	
[0092]	<211> 1038	
[0093]	<212> DNA	
[0094]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0095]	<400> 3	
[0096]	tatttatgga attatggttc attatcagga ctgtgntntaa ttatacagat tattacgggt	60
[0097]	gtgactnttag ctatgcatta tataccttcg attgatttag ctttcttgag tnttgaacat	120
[0098]	attatgtgag atgtaaatta tggntgnttg attcgtntata ttcatagtaa tacggcttct	180
[0099]	ntnttctntc tnttntntta tattcatatt gcttgagnta tctattatgg atcttatcga	240
[0100]	actcccagaa ttctcgtntg gtctattggt gtagntatct tcttaattat gattgntact	300
[0101]	gctntcttg gatatntct gcctntnttg caaatgtcat tntggggagc gactgntatt	360
[0102]	actaatttga tntctgctat acctgntgatt ggtaatgata tnttgaattt tatttggntg	420
[0103]	ggnttctctg ttaatcatgc tactctgaat gattcttct ctttacatta tntattgct	480
[0104]	nttntnttat tggctntagt tnttntcat ttaatctct tacatnttca tntgaagntg	540
[0105]	aatcctctgg gtnttactgg taattcagat cgtctgcct tccatcccta tntctcatt	600
[0106]	aaagatttag ttactgntt tntatntnta ttagctntat ctttctntg gntntatgct	660
[0107]	cctaattgct tgggacatag tgataattat attatgnta atcctatggc tactcctcca	720
[0108]	agtattntc ctgaatgnta tctnttacct ttctatgcaa tctntgtatc tnttntgaat	780
[0109]	aaattatntg gagtntgntc tatnttagct gctattctta tntntntntg tntacctct	840
[0110]	gtgntnttat cttgaattg agnttctgct tnttagacct ttagntaatt cttntntntg	900
[0111]	atctntgnta ctaattctt cttntntatg tnttntgntt cacaacatg tntaagaacct	960
[0112]	nttntgacgc tntgacaata tntctacatc ttctattct tctattctt agntntnt	1020
[0113]	cctctgntg gntatt	1038
[0114]	<210> 4	
[0115]	<211> 1437	
[0116]	<212> DNA	
[0117]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0118]	<400> 4	
[0119]	ggcgcctct tntgntcac cattagcgt gaacacgntc tntatagcac tntcctgnta	60
[0120]	gcaatattg aatactgntc tntntntnta gngntgnta gaaatgnta taagcagnta	120
[0121]	aaaagcatt gaaaagact caaagaagnta taaagntgct ctgcaaaaca tntaaaaaca	180
[0122]	tgcagnta ctgcatntt gcntactnt tnttcaaaa cttatntnt tcagntatca	240
[0123]	tntaacctct gatctcaac tntaacgnt gaatntnt tntaacgnt tntctacgnta	300
[0124]	aaaatntnta tagaantgnta gacntntt tntaatagnta tctntgntgnta aatacgtntc	360
[0125]	tntgntcagnta cntgntgnt tagagcctg tacaantgnt gcntacnt cntgntcatt	420

[0126]	tggaacctg tttcgaccag ataattttat ttttggtaa tcaggtgcag gaaataactg	480
[0127]	ggcaaaaggg cattatacag agggagcggg attggttagat actgtgttag atgtagtctg	540
[0128]	tcgggaagcc gaagcatgtg attgcttga aggattccag attacacatt cattaggtgg	600
[0129]	tggaacgggt gcaggcatgg gaactttgct aatttcgaaa attcgagagg aatatccgga	660
[0130]	tcggatgatg gcaacgtttt cagtggttcc ctcacaaaa gtttccgata cagttgtaga	720
[0131]	gccatataat gcaacattat cagtgcattg gtgtttttta gccattttta gaatgtatat	780
[0132]	taatgaggag gggtagcaat tagttgaaaa ttccgatgaa acattctgta tcgacaatga	840
[0133]	agcattatat gatatttga tgcgtacatt aaaattgccg gatccaggat atgggtgatt	900
[0134]	gaatcatctt gtctcggcag taatgagtgg tattacaact tgtcttcgat ttcctggaca	960
[0135]	actcaactcg gatttgcgta aattggccgt taatatgggtg ccgtttcctc gtttgcactt	1020
[0136]	tttcatgggt gggtttgctc cattaacaag cagtaagatg ctttaaactg attctgaaat	1080
[0137]	ggctgattgt tattctgtct agagggatca cattcattc ggtcattgac agttcctgaa	1140
[0138]	ttgactcagc aatggttga tgcaagaat atgatggcag catcggatcc gagacatggt	1200
[0139]	cgctatttaa ctggtgcagc gattttccgc ggtactgttt ccatgaagga ggttgaagat	1260
[0140]	caaatgcata atgttcagca gaagaactct tcatattttg ttgaatggat tccaacaat	1320
[0141]	gtgcaaaccg cgctatgttc tattccacca cgtgggtctca aatgtcacc aacgtttatt	1380
[0142]	ggcaattcaa catctattca ggaactattt aaacgtgtag gcgaccaatt tgctgca	1437
[0143]	<210> 5	
[0144]	<211> 977	
[0145]	<212> DNA	
[0146]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0147]	<400> 5	
[0148]	gacggaaatt cgggatcca gaagtcaat cagatatgaa acattggcct tttaaagtta	60
[0149]	tagacaaagg tcagaagcct tatattcagg ttgaatataa aggggatatt aaaacattta	120
[0150]	cgccggagga gatttcatca atggtcctta caaaaatgaa ggaggtggca gaagcgtatc	180
[0151]	ttgggactaa agtttccaat gccgttatca cgggtccagc atatttcaat gattcacagc	240
[0152]	gacaggctac gaaagacgca ggattgattg caggattgaa tgttttacgt attatcaatg	300
[0153]	aacctacagc agcagccatt gcatatggtc tagataagaa gacatcaaat gaaaagaatg	360
[0154]	tgtttatttt tgatcttga ggaggaactt ttgacgtatc gttattaact atcgaagagg	420
[0155]	gaatttttga agtcaaagca accgcaggcg ataccattt gggaggagaa gattttgaca	480
[0156]	atcgtcttgt aaaccacttc attgctgaac gcaaacacaa gaaagatctt tcagggaatg	540
[0157]	cacgatctct tcgtcggctt cgaacagcat gtgagcgtgc taaacggact ctttcatcat	600
[0158]	caacacagac gagtatagaa attgattcct tatttgaagg aattgattta tatacttcta	660
[0159]	ttactcgtgc tcgatttga gaactttgct aaggtctttt taggggaaca atggaaccag	720
[0160]	ttgagaaagt tcttcgtgat tctaaaattg ataatcaag tgttcatgaa attgtattgg	780
[0161]	ttggtgggtc tacgcgtatt ccgcgtatc agaaattggt ttgtgatttt tttaatggaa	840
[0162]	aagagccaaa tagaacgatc aatccagatg aggctgttgc ctatgggtgc gcagttcaag	900
[0163]	ttgetattct ttcaggagac acatcggaac aaactcaaga catactcttg cttgatgtgg	960
[0164]	cgctctctc aatgggt	977
[0165]	<210> 6	
[0166]	<211> 1581	
[0167]	<212> DNA	

[0168]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0169]	<400> 6	
[0170]	atgacatgat ggttgttttc aacaaatgct aaggatatcg gagtcttgta cttgatcttt	60
[0171]	gcactttttt ctggaatggt gggtagcagca tattcagtat tattgagaat ggaattaact	120
[0172]	tccccagggtg ttcagtattt acagggtgat aatcaattgt ataatgtaat tttaacgagt	180
[0173]	catgcgttgt taatgatatt ctttatgggt atgccccgaa tggtaggagg ttttgtaat	240
[0174]	tggttggttc cagtaatgat tggagcacca gatatggcct ttccaagatt aaataatata	300
[0175]	tcctctgggt tgttaccgcc ttctctgatt ctgttaattg cttcttctct tctagaaggt	360
[0176]	ggaagtggta caggttgac ttttatcca ctttgtcca gtttacaag tcattcctca	420
[0177]	ggtgctgtcg atttgtctat ctttagtcta catttagcag gtattagttc tatgttggga	480
[0178]	gctattaatt ttactactac tgttcttaat acttgagtc ccggtatgac tatgcataaa	540
[0179]	attccattgt ttgtatggtc tatctttgtt actgctatac tgttgttatt gtccttgcca	600
[0180]	gtcttagcag gaggtattac tatgctcttg acggattgaa attttaatac ttccttctat	660
[0181]	gatgtcgcag gaggagggga tcctatcctt tatcaacatc tcttctgggt cttcgacat	720
[0182]	ccagaagttt atattctgat tattccagga tttggatca ttagtcatat tatttccact	780
[0183]	ttctctggaa aaccagtatt cggttattta ggtatggtt atgctatgt gtcaattggt	840
[0184]	gtcttaggat ttattgtctg gagtcatcat atgtattcag tgggtttaga tgttgataca	900
[0185]	tgagcttatt ttactgctgc tactatgatt attgggtgac ctactggat taaaatcttc	960
[0186]	tcttgattg ctactatgta tgggtggtg attcgattta atacacctat gctctttgct	1020
[0187]	atcgattcc ttttctttt tactgtggga ggattaacgg gtattgtctt gtctaagct	1080
[0188]	tcttagatg tggctttaca tgatacttat tatgtttag ctcatttcca ttatgtttta	1140
[0189]	tccatgggtg cagtcttgc tctcttagca gcttggatt tctggtctcc aaaaatttta	1200
[0190]	ggattgttct ttgatgaaaa attagggcat ttgcatttct ggactctttt tattggagt	1260
[0191]	aatttaactt ttatgcctat gcatttctg ggattacagg gtatgccag atgaattcct	1320
[0192]	gattatcctg atgcttttgc tcagtggaat catatctcaa gtttaggtag tttgatttct	1380
[0193]	gttgttgcata ctgttgtttt tatttattct atttttgatc aattgatctc taaatgattg	1440
[0194]	gtaccgatga atccttggta ttctctgat ttctttgta gtcatacga ttttagaggat	1500
[0195]	tccaaagctt gttccttaga atgggcattg atttcaccac cagctttcca tgcttatact	1560
[0196]	agtttaccta aacaagctta a	1581
[0197]	<210> 7	
[0198]	<211> 1002	
[0199]	<212> DNA	
[0200]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0201]	<400> 7	
[0202]	atgttaaatt gtattcaagt gggatttgtt ttattacctg ttttgtaag tgtagctttt	60
[0203]	gtgacattag ctgaacgtaa agttatggga tcgattcaac gacgtgtggg tcctaattgt	120
[0204]	gtgggttatt atggtttgtt acaacctgta gctgatgctt taaaattatt attaaaagaa	180
[0205]	actattatc ctatccattc gaataaagtg ttgttcttct taggacctc tattgcatta	240
[0206]	gtctttgctt taatgggtg gggattattt ccatggaatt caggtataac actttgggat	300
[0207]	tttgatttag gtattttatt tagtttagct atttcttct taggtgtgta tggattttta	360
[0208]	attgggggtt gggcttctaa ttccaaatat gctttattag gttccttgtg aagtactgct	420
[0209]	caattaatta gttatgaatt agttttaact tcgattgtt ttgttgttgt tcttttatct	480

[0210]	ggttctttta attttactca cattattgaa gaacaaaaag ctatttggtt tgttttgcct	540
[0211]	ttatttcctc tgtttatttt gttctttatt ggtgcttttag cagaaacgaa ttgagctcct	600
[0212]	tttgatttgc cagaagctga atccgaatta gttgctgggt ttatgactga gtattctget	660
[0213]	gcgatctttg ttttcttctt cctagctgaa tatgctaata ttattcttat ctctacteta	720
[0214]	gctgctattht tcttcttagg aggttattta ttaccttcg agttgcattt cttgccta	780
[0215]	ggtttagatg ttctcgttca gggattactt tctggtttga ttttaggtt gaaagttgct	840
[0216]	gggattattht tcctctttgt ttgggttga tctagcttcc ctagaattg atatgatcaa	900
[0217]	ttgttagttc tatgttggac tgttctgta ctttgcctt ttgcttggat ttttctggtt	960
[0218]	ttagctattc tttttcttt taattcttt attcattct ag	1002
[0219]	<210> 8	
[0220]	<211> 225	
[0221]	<212> DNA	
[0222]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0223]	<400> 8	
[0224]	atgttacaag cagctaaagt tattggttca gggtttagcta caattggatt agcaggggct	60
[0225]	ggtatcggtg tcggttagt tttcggtaat ttatttagtag cgacaagtgc aaatccttca	120
[0226]	ttgaaaggac aactcttctc ttatgctatc ttgggattg ctctagcaga agctactggt	180
[0227]	ctttctggtt tgatgatggc tttcctctg ctatatgcag cttaa	225
[0228]	<210> 9	
[0229]	<211> 121	
[0230]	<212> RNA	
[0231]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0232]	<400> 9	
[0233]	cacugaaauu cucgaggag uaugaaaaua uuuauucucag auuuuuuauc ucaaaaauac	60
[0234]	uauuuuuuua aauaaaauau cagacuaugu gcgauaaggu agauagucga aagggaaaca	120
[0235]	g	121
[0236]	<210> 10	
[0237]	<211> 121	
[0238]	<212> DNA	
[0239]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0240]	<400> 10	
[0241]	cactgaatat ctcgaggag tatgaaaata tttatctcag atatttaac tcaaaataac	60
[0242]	tatttcttaa aataaataat cagactatgt gcgataaggt agatagtcga aagggaaaca	120
[0243]	g	121
[0244]	<210> 11	
[0245]	<211> 26	
[0246]	<212> DNA	
[0247]	<213> 耶氏肺孢子菌	
[0248]	<400> 11	
[0249]	cactgaatat ctcgaggag tatgaa	26
[0250]	<210> 12	
[0251]	<211> 26	

- [0252] <212> DNA
[0253] <213> 耶氏肺孢子菌
[0254] <400> 12
[0255] ctgtttccct ttcgactatc tacctt 26
[0256] <210> 13
[0257] <211> 19
[0258] <212> DNA
[0259] <213> 耶氏肺孢子菌
[0260] <400> 13
[0261] tcgcacatag tctgattat 19
[0262] <210> 14
[0263] <211> 82
[0264] <212> RNA
[0265] <213> 耶氏肺孢子菌
[0266] <400> 14
[0267] gcaaugaugg aagucggagc uaucccccua aaagauuguu uaguccggau aagugccugg 60
[0268] aacucggcuc uuugaaguug ga 82
[0269] <210> 15
[0270] <211> 82
[0271] <212> DNA
[0272] <213> 耶氏肺孢子菌
[0273] <400> 15
[0274] gcaatgatgg aagtcggagc taatccccta aaagattgtt tagtccggat aagtgcctgg 60
[0275] aactcggctc tttgaagttg ga 82
[0276] <210> 16
[0277] <211> 20
[0278] <212> DNA
[0279] <213> 耶氏肺孢子菌
[0280] <400> 16
[0281] gcaatgatgg aagtcggagc 20
[0282] <210> 17
[0283] <211> 21
[0284] <212> DNA
[0285] <213> 耶氏肺孢子菌
[0286] <400> 17
[0287] tccaacttca aagagccgag t 21
[0288] <210> 18
[0289] <211> 25
[0290] <212> DNA
[0291] <213> 耶氏肺孢子菌
[0292] <400> 18
[0293] tgtttagtcc ggataagtgc ctgga 25

- [0294] <210> 19
[0295] <211> 92
[0296] <212> RNA
[0297] <213> 耶氏肺孢子菌
[0298] <400> 19
[0299] ggau gcaaug auggaagucg gagcuaaucc ccuaaaagau uguuuagucc ggauaagucg 60
[0300] cuggaacucg gcucuuugaa guuggaaug cu 92
[0301] <210> 20
[0302] <211> 92
[0303] <212> DNA
[0304] <213> 耶氏肺孢子菌
[0305] <400> 20
[0306] ggatgcaatg atggaagtcg gagctaatacc cctaaaagat tgtttagtcc ggataagtgc 60
[0307] ctggaactcg gctctttgaa gttggaattg ct 92
[0308] <210> 21
[0309] <211> 22
[0310] <212> DNA
[0311] <213> 耶氏肺孢子菌
[0312] <400> 21
[0313] ggatgcaatg atggaagtcg ga 22
[0314] <210> 22
[0315] <211> 23
[0316] <212> DNA
[0317] <213> 耶氏肺孢子菌
[0318] <400> 22
[0319] agcaattcca acttcaaaga gcc 23
[0320] <210> 23
[0321] <211> 27
[0322] <212> DNA
[0323] <213> 耶氏肺孢子菌
[0324] <400> 23
[0325] tgtttagtcc ggataagtgc ctggaac 27
[0326] <210> 24
[0327] <211> 76
[0328] <212> RNA
[0329] <213> 耶氏肺孢子菌
[0330] <400> 24
[0331] ucaugaccu uaugaagugg gcuacagacg ugcugcaaaa uuuuuacaa uggaugcaa 60
[0332] ugauggaagu cggagc 76
[0333] <210> 25
[0334] <211> 76
[0335] <212> DNA

- [0336] <213> 耶氏肺孢子菌
[0337] <400> 25
[0338] tcatgaccct tatgaagtgg gctacagacg tgctgcaaaa ttttctacaa tgggatgcaa 60
[0339] tgatggaagt cggagc 76
[0340] <210> 26
[0341] <211> 22
[0342] <212> DNA
[0343] <213> 耶氏肺孢子菌
[0344] <400> 26
[0345] tcatgaccct tatgaagtgg gc 22
[0346] <210> 27
[0347] <211> 20
[0348] <212> DNA
[0349] <213> 耶氏肺孢子菌
[0350] <400> 27
[0351] gctccgactt ccatcattgc 20
[0352] <210> 28
[0353] <211> 27
[0354] <212> DNA
[0355] <213> 耶氏肺孢子菌
[0356] <400> 28
[0357] acgtgctgca aaattttcta caatggg 27
[0358] <210> 29
[0359] <211> 105
[0360] <212> RNA
[0361] <213> 耶氏肺孢子菌
[0362] <400> 29
[0363] cuccagaau ucucguuugg ucuauuggug uaguuaucuu cuuaauaug auuguuacug 60
[0364] cuuuuuggg auauguucug ccuuuugguc aaaugucauu guggg 105
[0365] <210> 30
[0366] <211> 105
[0367] <212> DNA
[0368] <213> 耶氏肺孢子菌
[0369] <400> 30
[0370] ctcccagaat tctcgtttgg tctattggtg tagttatctt ctttaattatg attgttactg 60
[0371] ctttcttggg atatgttctg ctttttggtc aaatgtcatt gtggg 105
[0372] <210> 31
[0373] <211> 20
[0374] <212> DNA
[0375] <213> 耶氏肺孢子菌
[0376] <400> 31
[0377] ctcccagaat tctcgtttgg 20

- [0378] <210> 32
[0379] <211> 20
[0380] <212> DNA
[0381] <213> 耶氏肺孢子菌
[0382] <400> 32
[0383] cccacaatga catttgacca 20
[0384] <210> 33
[0385] <211> 22
[0386] <212> DNA
[0387] <213> 耶氏肺孢子菌
[0388] <400> 33
[0389] ctttcttggg atatgtctg cc 22
[0390] <210> 34
[0391] <211> 22
[0392] <212> DNA
[0393] <213> 耶氏肺孢子菌
[0394] <400> 34
[0395] ccattaacaa gcaaggatc ac 22
[0396] <210> 35
[0397] <211> 21
[0398] <212> DNA
[0399] <213> 耶氏肺孢子菌
[0400] <400> 35
[0401] cgatgctgcc atcatattct t 21
[0402] <210> 36
[0403] <211> 22
[0404] <212> DNA
[0405] <213> 耶氏肺孢子菌
[0406] <400> 36
[0407] tcggtcattg acagttcctg aa 22
[0408] <210> 37
[0409] <211> 22
[0410] <212> DNA
[0411] <213> 耶氏肺孢子菌
[0412] <400> 37
[0413] ggagatttca tcaatgggcc tt 22
[0414] <210> 38
[0415] <211> 21
[0416] <212> DNA
[0417] <213> 耶氏肺孢子菌
[0418] <400> 38
[0419] cggcattgga aactttagtc c 21

- [0420] <210> 39
[0421] <211> 20
[0422] <212> DNA
[0423] <213> 耶氏肺孢子菌
[0424] <400> 39
[0425] aaggaggtgg cagaagcgta 20
[0426] <210> 40
[0427] <211> 24
[0428] <212> DNA
[0429] <213> 耶氏肺孢子菌
[0430] <400> 40
[0431] aggttttgg aattggttg ttcc 24
[0432] <210> 41
[0433] <211> 21
[0434] <212> DNA
[0435] <213> 耶氏肺孢子菌
[0436] <400> 41
[0437] agaagcggt aacaaccaga a 21
[0438] <210> 42
[0439] <211> 28
[0440] <212> DNA
[0441] <213> 耶氏肺孢子菌
[0442] <400> 42
[0443] tggagcacca gatatggcct ttccaaga 28
[0444] <210> 43
[0445] <211> 22
[0446] <212> DNA
[0447] <213> 耶氏肺孢子菌
[0448] <400> 43
[0449] agcagaaacg aattgagctc ct 22
[0450] <210> 44
[0451] <211> 22
[0452] <212> DNA
[0453] <213> 耶氏肺孢子菌
[0454] <400> 44
[0455] tcgcagcaga atactcagtc at 22
[0456] <210> 45
[0457] <211> 28
[0458] <212> DNA
[0459] <213> 耶氏肺孢子菌
[0460] <400> 45
[0461] tgccagaagc tgaatccgaa ttagttgc 28

- [0462] <210> 46
[0463] <211> 24
[0464] <212> DNA
[0465] <213> 耶氏肺孢子菌
[0466] <400> 46
[0467] ggttcagggt tagctacaat tgga 24
[0468] <210> 47
[0469] <211> 23
[0470] <212> DNA
[0471] <213> 耶氏肺孢子菌
[0472] <400> 47
[0473] aaggatttcg acttgtcgt act 23
[0474] <210> 48
[0475] <211> 28
[0476] <212> DNA
[0477] <213> 耶氏肺孢子菌
[0478] <400> 48
[0479] gcaggggctg gtatcggat cggttag 28
[0480] <210> 49
[0481] <211> 23
[0482] <212> DNA
[0483] <213> 智人(Homo sapiens)
[0484] <400> 49
[0485] tcgttacacc aagaaagtac ccc 23
[0486] <210> 50
[0487] <211> 20
[0488] <212> DNA
[0489] <213> 智人
[0490] <400> 50
[0491] tgctgccac ttttctagg 20
[0492] <210> 51
[0493] <211> 27
[0494] <212> DNA
[0495] <213> 智人
[0496] <400> 51
[0497] agtgtaact ccaactcttg tagaggt 27
[0498] <210> 52
[0499] <211> 20
[0500] <212> DNA
[0501] <213> 智人
[0502] <400> 52
[0503] tggcgtgtga agataacca 20

[0504] <210> 53
[0505] <211> 20
[0506] <212> DNA
[0507] <213> 智人
[0508] <400> 53
[0509] cgctggaact cgtctcacta 20
[0510] <210> 54
[0511] <211> 26
[0512] <212> DNA
[0513] <213> 智人
[0514] <400> 54
[0515] tgctgagaag agtgtgctgg agatgc 26
[0516] <210> 55
[0517] <211> 20
[0518] <212> DNA
[0519] <213> 智人
[0520] <400> 55
[0521] atctttgcag tgaccagca 20
[0522] <210> 56
[0523] <211> 20
[0524] <212> DNA
[0525] <213> 智人
[0526] <400> 56
[0527] gagcatctcc agcacactct 20
[0528] <210> 57
[0529] <211> 20
[0530] <212> DNA
[0531] <213> 智人
[0532] <400> 57
[0533] gagcatctcc agcacactct 20
[0534] <210> 58
[0535] <211> 22
[0536] <212> DNA
[0537] <213> 耶氏肺孢子菌
[0538] <220>
[0539] <221> misc_feature
[0540] <222> (3) .. (3)
[0541] <223> LNA-T
[0542] <220>
[0543] <221> misc_feature
[0544] <222> (7) .. (7)
[0545] <223> LNA-T

[0546] <220>
[0547] <221> misc_feature
[0548] <222> (11) .. (11)
[0549] <223> LNA-A
[0550] <220>
[0551] <221> misc_feature
[0552] <222> (16) .. (16)
[0553] <223> LNA-T
[0554] <220>
[0555] <221> misc_feature
[0556] <222> (20) .. (20)
[0557] <223> LNA-G
[0558] <400> 58
[0559] ctttcttggg atatgttctg cc 22
[0560] <210> 59
[0561] <211> 22
[0562] <212> DNA
[0563] <213> 耶氏肺孢子菌
[0564] <220>
[0565] <221> misc_feature
[0566] <222> (3) .. (3)
[0567] <223> LNA-C
[0568] <220>
[0569] <221> misc_feature
[0570] <222> (7) .. (7)
[0571] <223> LNA-A
[0572] <220>
[0573] <221> misc_feature
[0574] <222> (12) .. (12)
[0575] <223> LNA-T
[0576] <220>
[0577] <221> misc_feature
[0578] <222> (16) .. (16)
[0579] <223> LNA-A
[0580] <220>
[0581] <221> misc_feature
[0582] <222> (20) .. (20)
[0583] <223> LNA-A
[0584] <400> 59
[0585] ggcagaacat atccaagaa ag 22
[0586] <210> 60
[0587] <211> 20

-
- [0588] <212> DNA
[0589] <213> 人工序列
[0590] <220>
[0591] <223> 耶氏肺孢子菌简并引物
[0592] <400> 60
[0593] ctcccagaat tctmgtttg 20

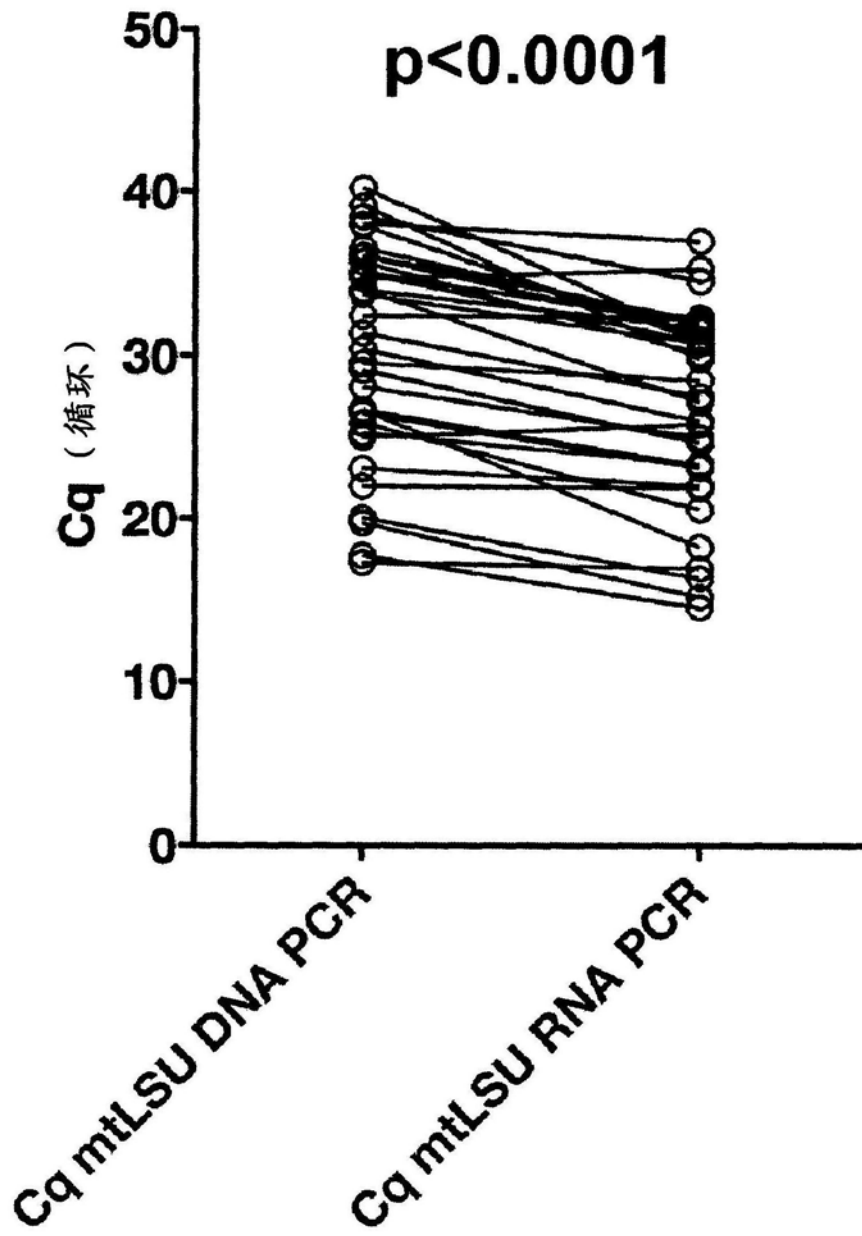


图1

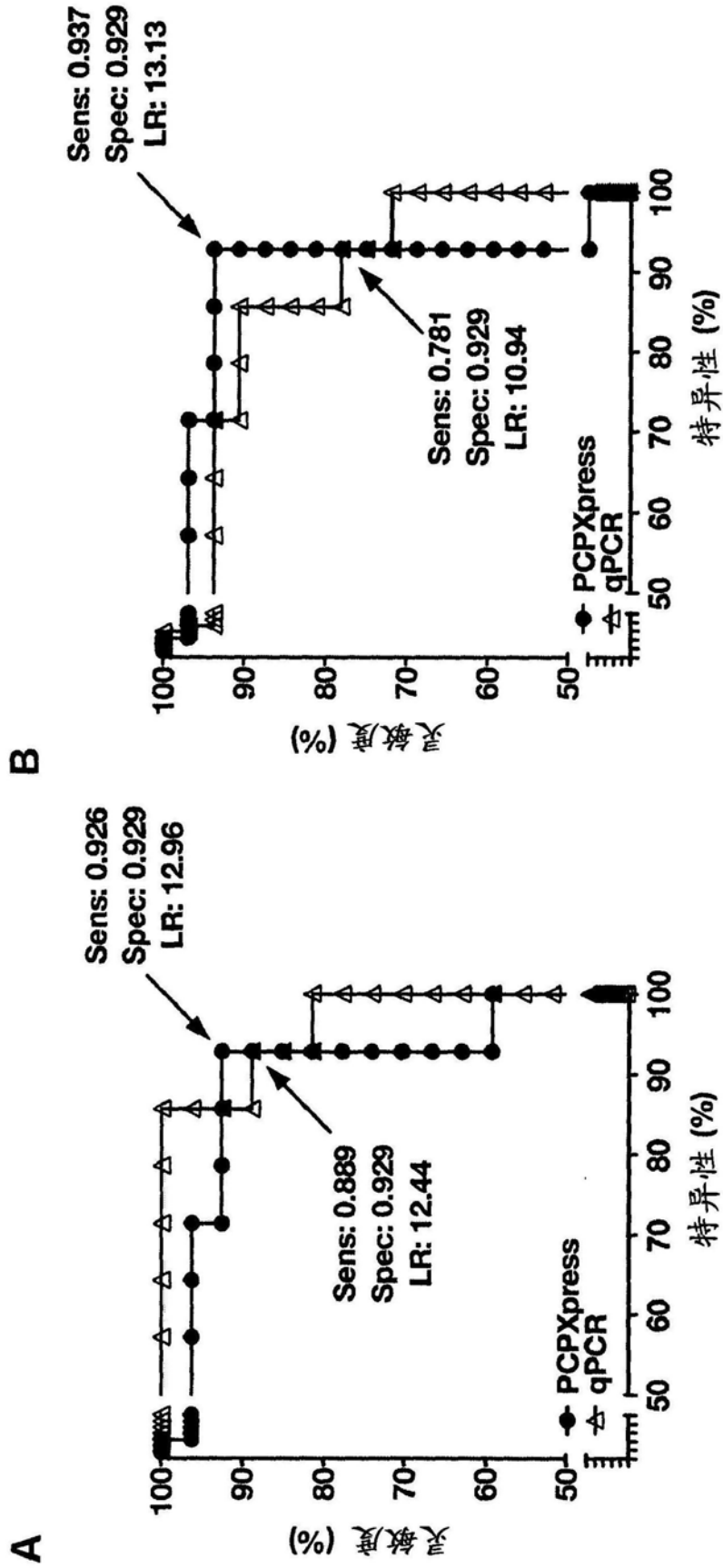


图2A和2B

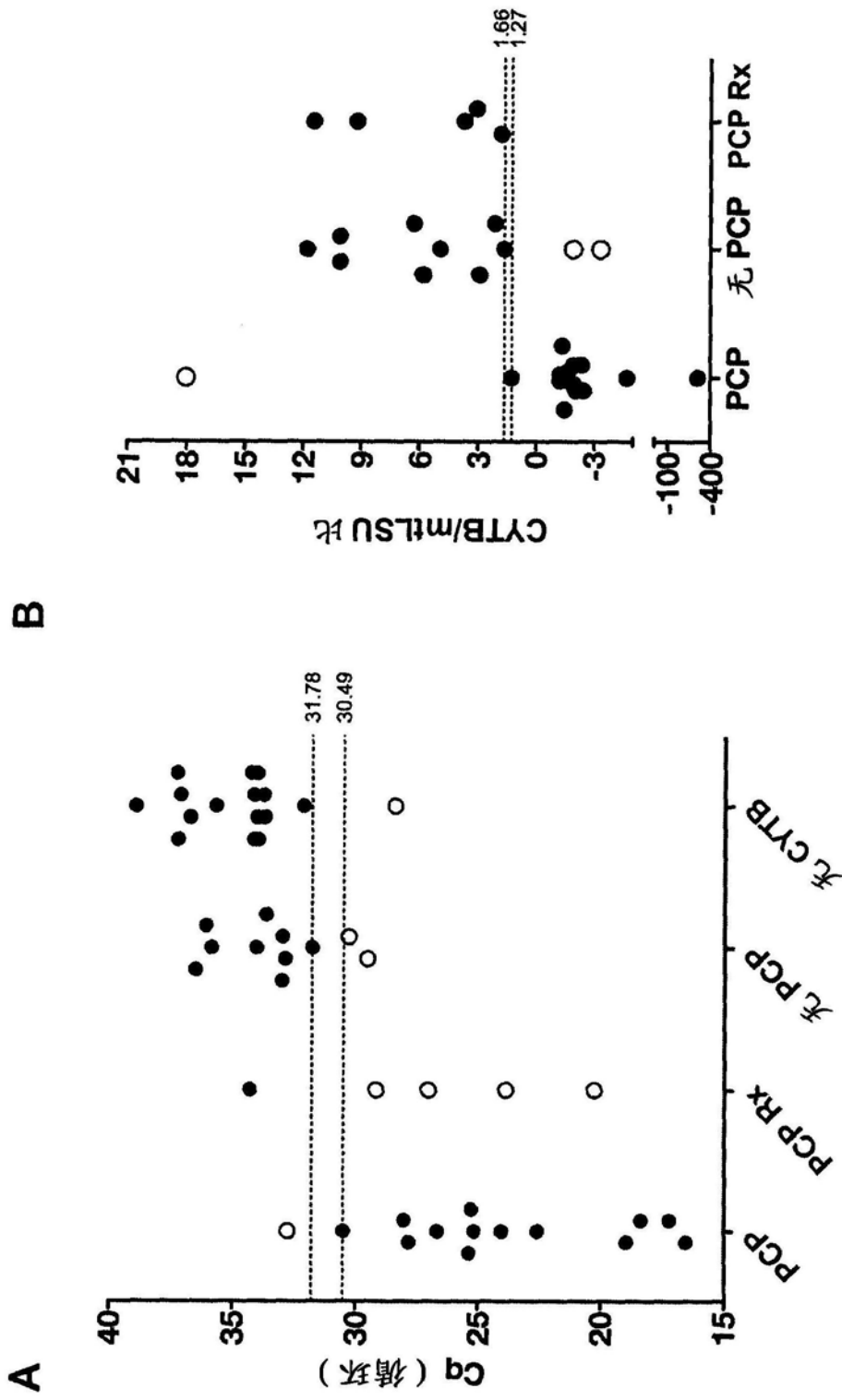


图3A和3B

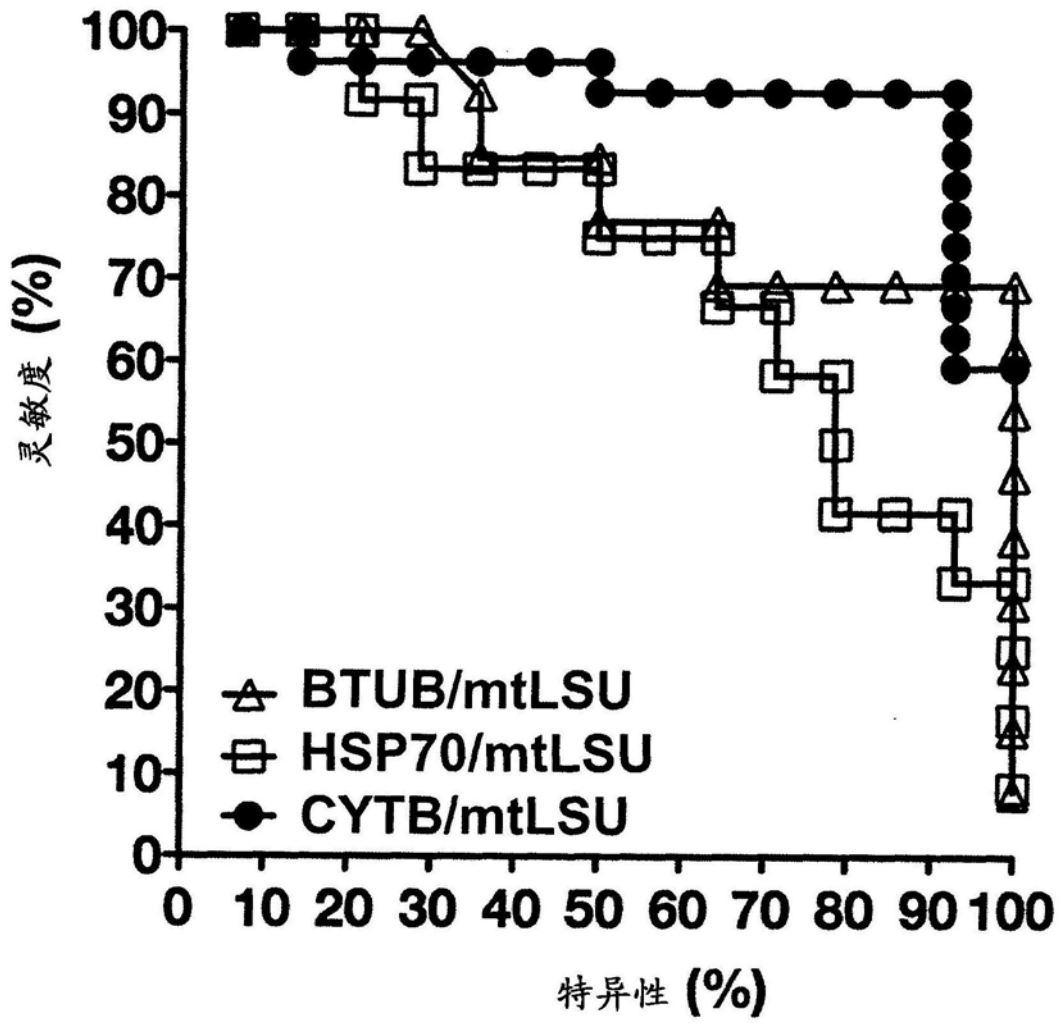


图4

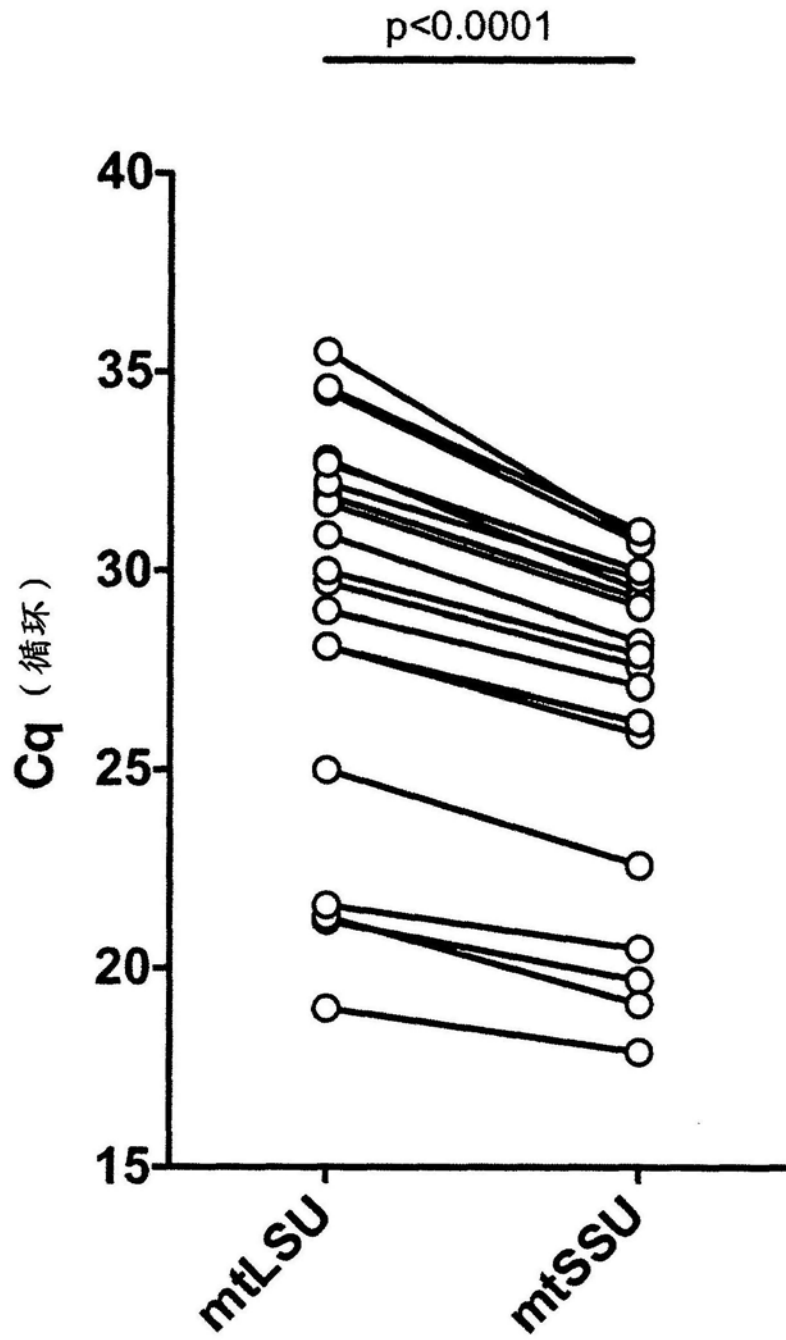


图5

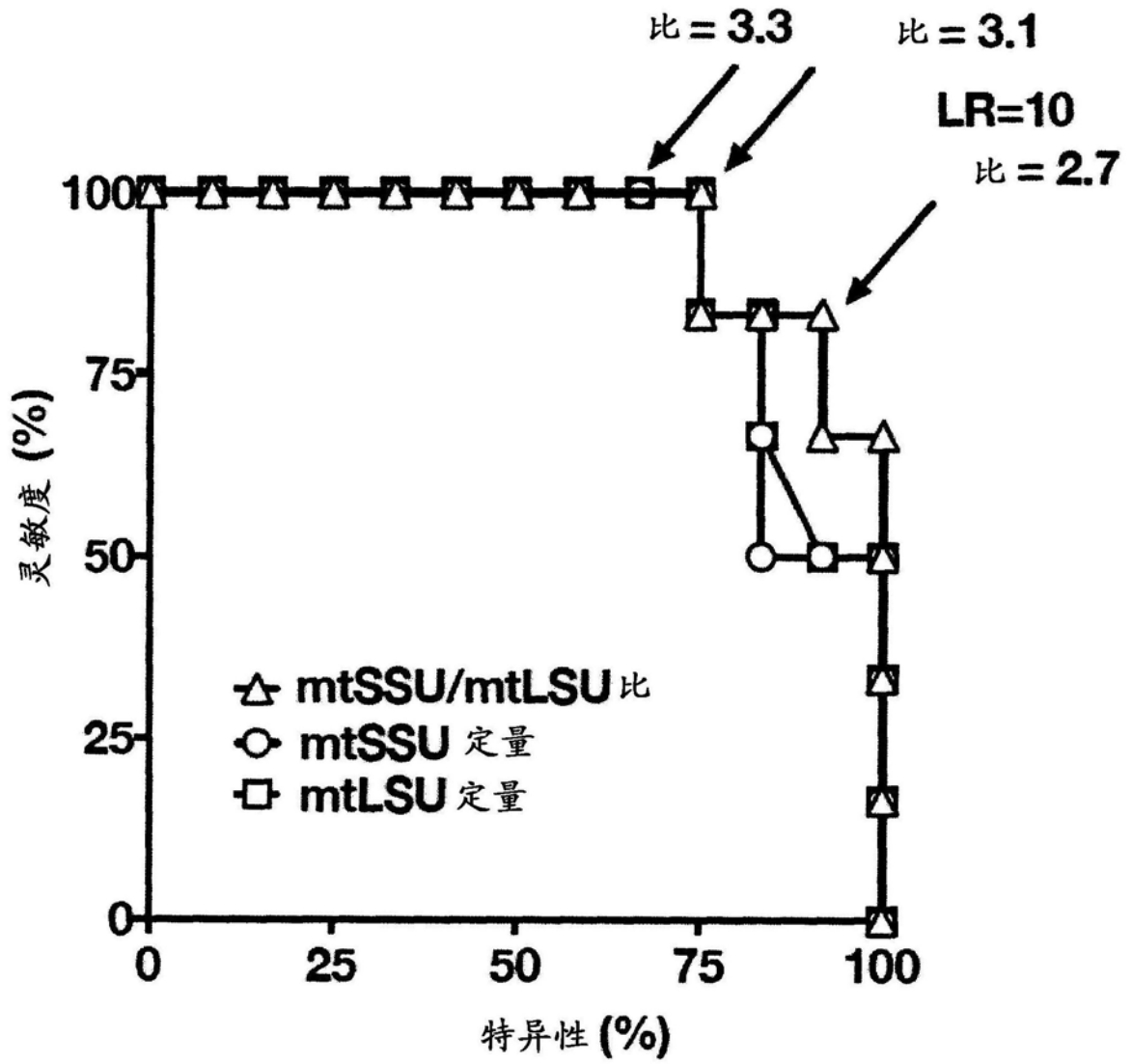


图6

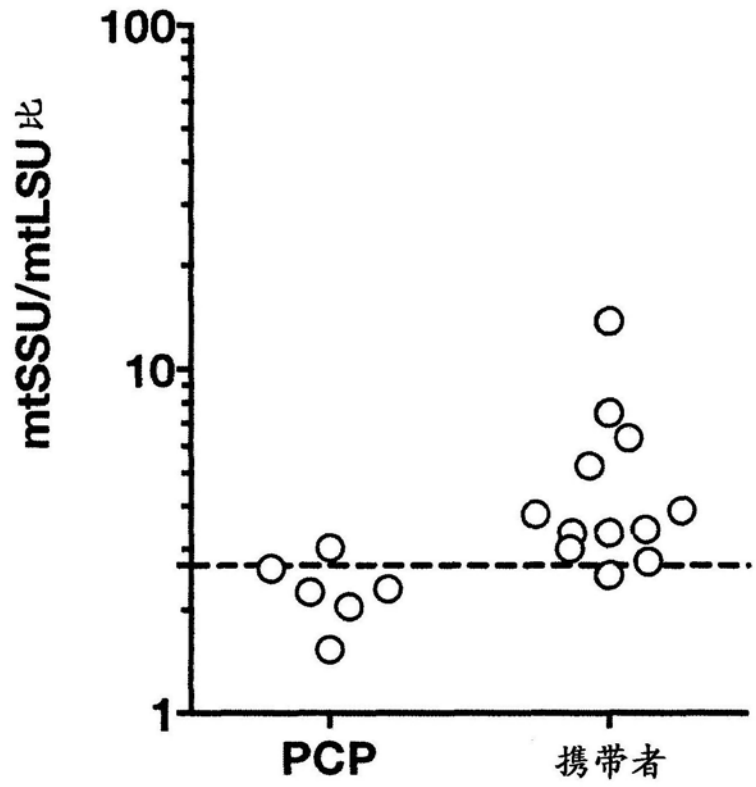


图7

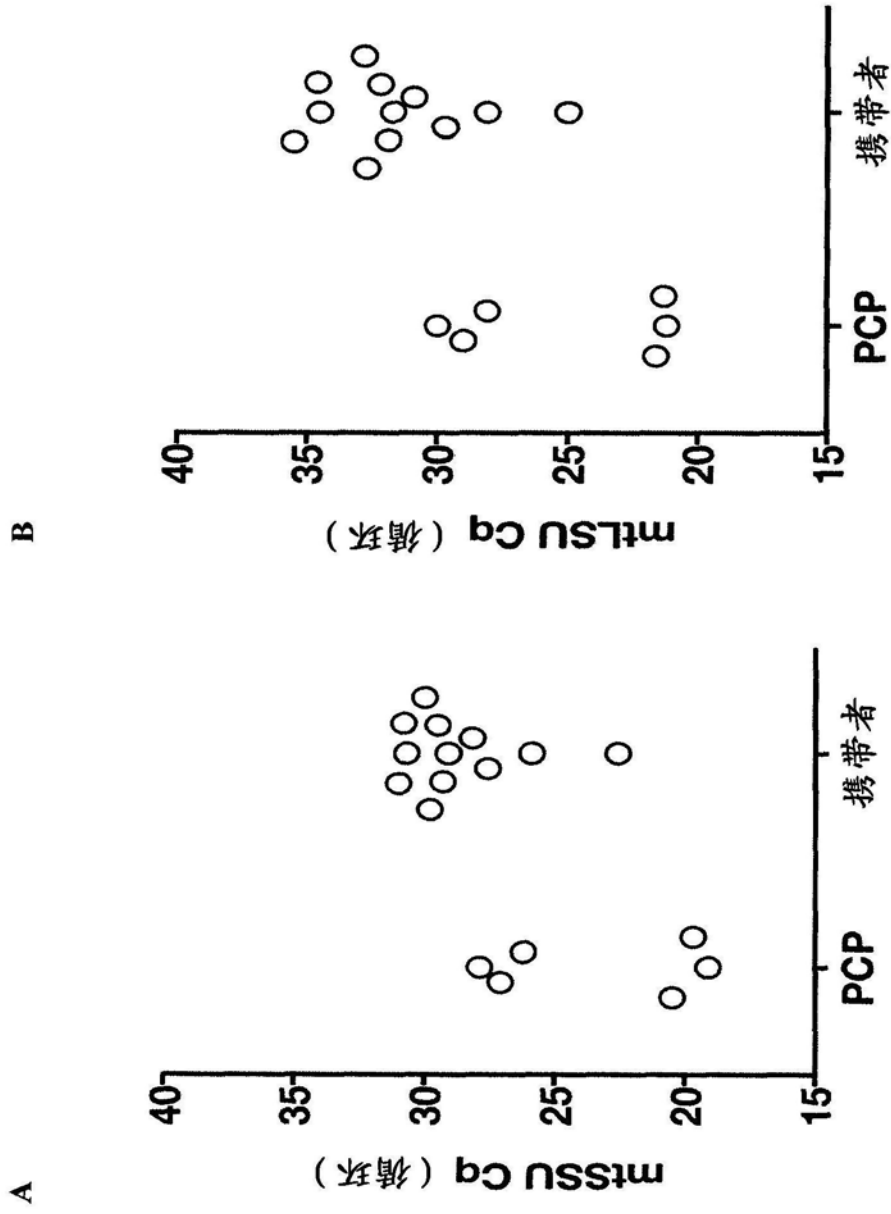


图8A和8B