



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105722977 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201480062637.1

(22)申请日 2014.10.30

(30)优先权数据

61/897,626 2013.10.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/063181 2014.10.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/066341 EN 2015.05.07

(71)申请人 绿色生活生物技术有限责任公司

地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 小罗伯特·M·劳埃德

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.

G12N 7/00(2006.01)

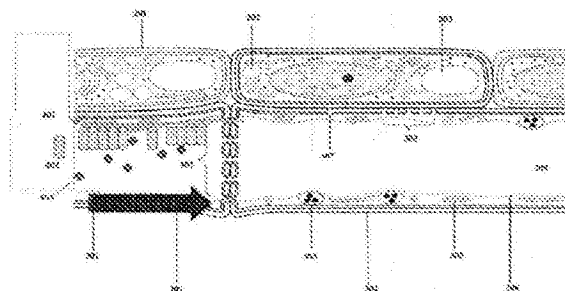
权利要求书3页 说明书20页 附图5页

(54)发明名称

用于柑橘绿化枯萎病的发病定量系统和治疗方法

(57)摘要

本发明涉及用于检测受试者的发病的新型发病模型、方法或试剂盒。具体地,本发明提供一种源自双病原体靶标的量相对于宿主定量测量值的比率的病原体指数。所述病原体指数用于包括柑橘绿化病(HLB)的任何疾病的诊断、预后和/或治疗策略。还提供了用于筛选治疗或预防柑橘绿化病所用的药物的研究工具和方法,以及用于柑橘绿化病的治疗或预防方法。



1. 一种用于检测生物样品中的发病的方法,其包括:
 - a) 定量所述样品中对第一生物体具有特异性的核酸的量,所述第一生物体为与第二生物体相关联的病原体,其中所述第一生物体和所述第二生物体接连地感染宿主生物体以确定病原体定量测量值,
 - b) 定量所述样品中对响应于病原体的所述宿主生物体具有特异性的核酸的量以确定与疾病的所述病原体相关联的靶标的多重定量;以及
 - c) 计算双病原体靶标的量相对于宿主定量测量值的比率,其中所述比率提供了用于检测发病的病原体指数。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述病原体指数指示所述发病的预后或者可用于药物治疗效力和药物筛选。
3. 如权利要求1所述方法,其中通过使来自所述样品的所述核酸与核酸扩增反应中的第一组寡核苷酸引物接触来进行所述样品中的对所述第一生物体具有特异性的所述核酸的定量,所述第一组寡核苷酸与所述第一生物体的核酸至少部分互补,并且其中通过使来自所述样品的所述核酸与核酸扩增反应中的第二组寡核苷酸引物接触来进行所述样品中的对所述第二生物体具有特异性的所述核酸的定量,所述第二组寡核苷酸与所述第二生物体的核酸至少部分互补,并且其中通过使来自所述样品的所述核酸与核酸扩增反应中的第三组寡核苷酸引物接触来进行所述样品中的对所述第三宿主生物体具有特异性的所述核酸的定量,所述第三组寡核苷酸与所述第三生物体的核酸至少部分互补,并且还包括检测来自所述核酸扩增反应的扩增子,还包括检测来自所述核酸扩增反应的扩增子,其中所述扩增反应可发生在同一容器中,以及基于扩增子的相对数目来计算病原体比率的量相对于宿主负载量的比率以导出致病指数或四分位数。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述病原生物体是病毒或细菌。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述宿主生物体是细菌、植物或动物。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述发病是柑橘绿化枯萎病或黄龙病(HLB)。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述宿主生物体是候选韧皮部亚洲种(LAS)。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述病原生物体选自由以下组成的组:噬菌体、病毒和任何与LAS在致病上联系的诱导物或因子基因。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述第二生物体是细菌噬菌体。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述细菌噬菌体选自由SC1、SC2和SC3溶菌噬菌体组成的组的溶菌噬菌体。
11. 如权利要求1所述的方法,其中所述核酸是RNA或DNA。
12. 如权利要求3所述的方法,其中所述核酸扩增反应是实时PCR、重组酶聚合酶扩增(RPA)、螺旋酶依赖性扩增(HAD)、环介导的等温扩增(LAMP)和切口酶扩增反应(NEAR)。
13. 如权利要求1所述的方法,其还包括与提供作为治疗策略的临床效用或药物筛选的病原体指数或四分位数相关的报告算法或指数。
14. 如权利要求13所述的方法,其还包括下述步骤:定量所述样品中对所述病原生物体的诱导物具有特异性的核酸的量以确定诱导物负载量;并且其中所述病原体指数和所述诱导物负载量与用于确定预后和提供作为治疗策略的临床效用或药物筛选的所述报告指数

相关。

15. 如权利要求14所述的方法,其中对所述病原生物体、所述宿主生物体或所述诱导物具有特异性的多种独特核酸被定量,并且在所述报告指数中是相关的。

16. 一种用于检测样品中的发病的试剂盒,其包括:

a) 同与第二生物体在致病上相关联的第一病原生物体的核酸至少部分互补的至少第一组寡核苷酸,其中这两种病原体接连地感染宿主生物体以确定病原体定量测量值,

b) 与所述宿主生物体中的响应于疾病病原体的核酸至少部分互补的至少第二组寡核苷酸,

c) 用于使用所述第一组和第二组寡核苷酸的核酸扩增反应的试剂;

d) 用于指导所述核酸扩增反应和检测其一种或多种扩增子的说明书;以及

e) 用于计算所述扩增子的比率或双病原体靶标的量相对于宿主定量测量值的比率的说明书,其中所述比率提供针对所述发病的检测、预后、药物筛选和治疗策略或效力的病原体指数。

17. 如权利要求16所述的试剂盒,其中所述发病是柑橘绿化枯萎病或HLB。

18. 一种用于筛选抑制或预防柑橘绿化枯萎病(HLB)所用的候选治疗剂的方法,其包括提供带有具有阻遏的噬菌体裂解周期的细菌噬菌体的候选韧皮部杆菌的培养物;将所述培养物与候选治疗剂候选物合并;以及检测所述候选韧皮部杆菌培养物的生长抑制,从而表明所述候选治疗剂抑制或预防柑橘绿化枯萎病(HLB)。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述细菌噬菌体是选自由SC1、SC2和SC3溶菌噬菌体组成的组的溶菌噬菌体。

20. 如权利要求18所述的方法,其中所述噬菌体裂解周期被阻遏或遗传缺失。

21. 一种用于治疗细菌、植物或动物个体中的细菌噬菌体感染的方法,其包括向有需要的所述个体施用组合物,所述组合物包含有效量的选自由以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。

22. 一种用于治疗植物中的病毒感染的方法,其包括向有需要的所述植物施用组合物,所述组合物包含有效量的选自由以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。

23. 一种用于治疗柑橘绿化枯萎病的方法,其包括向有需要的柑橘树施用组合物,所述组合物包含有效量的选自由以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述组合物还包含有效量的羟基脲或另一种核苷酸库减少剂。

25. 如权利要求23所述的方法,其中所述组合物还包含表面活性剂或穿透剂以增强所述组合物向受试者的靶向位置的递送。

26. 一种用于预防柑橘绿化枯萎病的方法,其包括向有需要的柑橘树施用组合物,所述组合物包含有效量的选自由以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述组合物还包含有效量的羟基脲或另一种核苷酸库减少剂。

28. 如权利要求25所述的方法,其中所述组合物还包含表面活性剂或穿透剂以增强所述组合物向所述受试者的靶向位置的递送。

用于柑橘绿化枯萎病的发病定量系统和治疗方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月30号提交的题为“Pathogenesis Quantification Systems and Treatment Methods for Citrus Greening Blight”的美国临时申请序列No.61/897,626的优先权,所述申请的全部内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明尤其涉及对宿主植物和哺乳动物致病的噬菌体和细菌的检测和控制。

[0004] 本发明在柑橘绿化枯萎病(citrus greening blight)(也称为黄龙病)(HLB)的背景下进行例示,并且更通常涉及基于根据双病原体:多重宿主定量比率或发病四分位数测定致病指数的测试和治疗方法及组合物,所述致病指数被专门设计用于四分位数的诊断和治疗,其次用于药物开发,并且作为用于鉴定药物候选物的研究工具。

[0005] 发明背景

[0006] 柑橘绿化枯萎病(也称为黄龙病(HLB))是遍及世界的柑橘植物的致死疾病,其导致被感染的树的显著果实损失和死亡。HLB感染影响树的叶片、桠枝和果实,最终导致整个树的衰退。HLB的症状包括具疤痕、具斑驳并具黄化脉纹的叶片,歪斜且小的绿色咸苦味果实,桠枝梢枯,以及整个树发育迟缓并衰退。HLB的诊断由于下述事实而变得复杂:HLB的一些症状与其它的小病(包括营养缺乏)的症状类似。HLB控制常常需要破坏被感染的树,所述被感染的树可能甚至在被感染后数年也不显示HLB的症状。

[0007] 聚合酶链式反应诊断试验已鉴定出与HLB的症状相关联的主要病原体为细菌候选韧皮部杆菌属某些种(*Candidatus Liberibacter* spp),包括候选韧皮部杆菌亚洲种(*Ca.L.asiaticus*)(LAS)、候选韧皮部杆菌非洲种(*Ca.L.africanus*)和候选韧皮部杆菌美洲种(*Ca.L.americanus*)物种。据信细菌损害营养素在柑橘树的韧皮部和叶茎中的传递,其中怀疑植物病状是由营养缺乏所引起。假定的致病细菌的抗生素控制是被动的解决方案,但对果园管理来说是昂贵的手段,其绝不可能是合理的解决方案。柑橘中的候选韧皮部杆菌的低复制水平需要高灵敏度方法来检测它们的存在。已用来检测候选韧皮部杆菌亚洲种细菌的基于PCR的方法包括定性PCR测定(Saponari等,2013,*J.Virol.Methods*.193(2):478-86)和组织印迹诊断(Nageswara-Rao M.等,2013,*Mol.Cell Probes*.27(5-6):176-83),所述文献中的每个以引用的方式并入本文。

[0008] 细菌噬菌体或噬菌体是感染细菌的病毒。大多数是DNA病毒。每种噬菌体仅攻击特定物种或者在许多情况下仅攻击物种中的某些菌株。在结构上,细菌噬菌体或噬菌体由多边形的头部和短直的尾部构成,所述头部由薄蛋白膜包裹的DNA组成,所述尾部由蛋白质组成。然而,也已报道球形噬菌体和丝状噬菌体。细菌噬菌体的生活周期包括两个周期:营养周期和溶源性周期。在营养周期中,噬菌体被称为烈性噬菌体,并且所述周期包括附着(吸附)、穿入、隐蔽期、复制、组装和释放的步骤。在溶源性周期中,噬菌体被称为温和噬菌体,并且所述周期包括附着(吸附)、穿入、隐蔽期的步骤,并且随后与营养周期中的烈性噬菌体不同,温和噬菌体在隐蔽期之后不复制,相反,其整合到细菌染色体中并且潜伏一段时间。

整合的噬菌体被称为原噬菌体,并且携带原噬菌体的细菌被称为溶源体。溶源体不被溶解,而是与作为染色体的一部分的原噬菌体一起生长和增殖。溶源体可获得新的特性,并且原噬菌体可恢复成烈性噬菌体并且被感染的细菌可以被溶解。细菌噬菌体的实际应用包括但不限于细菌噬菌体分型、将细菌分类为噬菌体群、噬菌体溶源性转换、噬菌体疗法以及作为克隆载体。

[0009] 细菌噬菌体诸如与葡萄球菌(*Staphylococci*)和肠共生的细菌粪肠球菌(*E.faecalis*)相关联的那些被认为是宿主细菌的生活周期中的重要因素,其可影响宿主的致病性(Deghorain和Melderer,2012,*Viruses*4:3316-35;Duerkop等,PNAS 109(43):17621-626)。对源自有HLB症状的柑橘的候选韧皮部杆菌亚洲种基因组的分析已显示两个环状噬菌体基因组SC1和SC2的存在(Zhang等,2011,*Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(4):458-68)。对与柑橘绿化病相关联的未培养的一类细菌生物体(BLO)的三个DNA片段(In-2.6、In-1.0和In-0.6)进行了克隆,并且核苷酸序列测定表明与柑橘绿化病相关联的未培养的BLO的基因组含有nusG-rplKAJL-rpoBC基因簇和细菌噬菌体型DNA聚合酶的基因(Villechanoux等,1993,*Curr Microbiol.*26(3):161-6),所述参考文献的全部内容以引用的方式并入本文。对山木瓜韧皮部杆菌BT-1(*Liberibacter crescens* BT-1)的全基因组进行了测序,并且所述全基因组含有硫胺素和必需氨基酸生物合成方面的较多基因,以及含有两个原噬菌体区域(Leonard等,2012,*Standards in Genomic Sciences* 7:271-83),所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0010] 鉴于前述,在本领域中仍然存在对HLB诊断方法和根除方法及用于所述疾病的组合物,以及用于病原体-致病的-宿主介导的疾病系统的更通常的诊断和治疗方法及组合物的需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本文所述的各种实施方案提供了一种用于诊断、预后、药物筛选的新型发病模型,和可用于检测生物样品的发病的治疗方法和相关算法。在某些实施方案中,本发明提供了一种用于检测生物样品的发病的方法,所述方法包括:a)定量样品中对第一生物体具有特异性的核酸的量,所述第一生物体为与第二生物体相关联的病原体,其中这两种生物体接连地感染宿主生物体以确定病原体定量测量值,b)定量样品中对响应于病原体的宿主生物体具有特异性的核酸的量以确定与疾病的发病相关联的靶标的多重定量;以及c)计算双病原体靶标的量相对于宿主定量测量值(measures)的比率,其中所述比率提供了用于检测发病的病原体指数。在某些实施方案中,较高的病原体指数指示较差的预后并且可用于药物治疗效力和药物筛选。

[0013] 在某些实施方案中,通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第一组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第一生物体具有特异性的核酸的定量,第一组寡核苷酸与第一生物体的核酸至少部分互补,并且其中通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第二组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第二生物体具有特异性的核酸的定量,第二组寡核苷酸与第二生物体的核酸至少部分互补,并且还包括检测来自核酸扩增反应的扩增子,并且其中通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第三组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第三宿主生物体具有特异性的核酸的定量,第三组寡核苷酸与第三生物体的核酸至少部分互补,并且还包括检测来自核酸扩增反应的扩增子,其中扩增反应发生在同一容器中,

并且基于扩增子的相对数目来计算病原体比率的量相对于宿主负载量的比率以导出病原体指数或四分位数。如本文所用,病原生物体是病毒和细菌,并且宿主生物体是植物或动物。当宿主生物体是细菌时,宿主还可驻留在另一宿主诸如植物或动物(例如人)内或与所述另一宿主相关联。在某些实施方案中,发病是柑橘绿化枯萎病或黄龙病(HLB),病原体或第一生物体可以是细菌噬菌体或病毒,并且第二生物体是候选韧皮部杆菌亚洲种(LAS)细菌并且宿主是大量的结果类和非结果类植物。病原体指数还可源自与双病原体-宿主关系在致病上紧密联系的任何诱导物或因子基因的另外相关性。

[0014] 在某些实施方案中,本发明的方法还包括与提供作为治疗策略的临床效用的病原体指数或四分位数相关的报告算法。在一些实施方案中,本发明的方法还包括下述步骤:定量样品中对病原生物体的诱导物具有特异性的核酸的量以确定诱导物负载量;并且其中病原体指数和诱导物负载量与用于确定预后和提供作为治疗策略的临床效用的报告指数相关。本发明的方法还提供的是,定量对病原生物体、宿主生物体或诱导物具有特异性的多种独特核酸,并且所述多种独特核酸在报告指数中是相关的。

[0015] 本发明中定量的核酸包括但不限于RNA或DNA。在某些实施方案中,定量噬菌体RNA和细菌DNA,并且计算噬菌体RNA与细菌DNA的比率以导出病原体指数。可通过现在已知或以后发展的任何常规核酸检测反应来扩增核酸以用于相对定量测定,所述核酸检测反应包括但不限于标准聚合酶链式反应(SPCR)、实时PCR、重组酶聚合酶扩增(RPA)、螺旋酶依赖性扩增(HAD)、环介导的等温扩增(LAMP)和切口酶扩增反应(NEAR)。

[0016] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于检测样品的发病(诸如柑橘绿化枯萎病(HLB))的试剂盒,所述试剂盒包括:a)同于样品中的与第二生物体在致病上相关联的第一病原生物体的核酸至少部分互补的至少第一组寡核苷酸,其中这两种病原体接连地感染宿主生物体以确定病原体定量测量值;b)同于宿主生物体中的响应于疾病病原体的核酸至少部分互补的至少第二组寡核苷酸;c)用于使用第一组寡核苷酸和第二组寡核苷酸的核酸扩增反应的试剂;d)用于指导核酸扩增反应和检测其一种或多种扩增子的说明书;以及e)用于计算扩增子的比率和/或双病原体靶标的量相对于宿主定量测量值的比率的说明书,其中所述比率提供了用于发病(pathogenesis)(诸如柑橘绿化枯萎病(HLB))的检测、预后、药物筛选和治疗策略或效力的病原体指数。

[0017] 本发明还提供一种用于筛选用于抑制或预防柑橘绿化枯萎病的候选治疗剂的方法。本发明的方法包括以下步骤:提供带有具有阻遏的噬菌体裂解周期的细菌噬菌体的候选韧皮部杆菌的培养物;将培养物与候选治疗剂候选物合并;以及检测候选韧皮部杆菌培养物的生长抑制,从而表明候选治疗剂抑制或预防柑橘绿化枯萎病。在某些实施方案中,细菌噬菌体是溶菌噬菌体,包括但不限于SC1、SC2和SC3溶菌噬菌体,并且其中噬菌体裂解周期被阻遏或遗传缺失。

[0018] 本发明还提供了一种用于治疗和/或预防细菌、植物或动物个体的细菌噬菌体或病毒感染的方法,所述方法包括向有需要的个体施用组合物,所述组合物包含有效量的选自由以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。在某些实施方案中,细菌噬菌体感染是在柑橘树中的导致柑橘绿化枯萎病(诸如HLB或LAS)的候选韧皮部杆菌中。在某些实施方案中,使用抗病毒剂来治疗和/或预防HLB或LAS。本发明涵盖现在已知或以后发展的不同种类的抗病毒剂,包括但不限

于天然抗病毒化合物,诸如具有最大抗病毒活性的干扰素- α (IFN- α)和具有中等活性的干扰素- β (IFN- β),和合成抗病毒剂,所述合成抗病毒剂基于病毒复制周期中的作用点分为以下组:1)核苷类似物,诸如阿昔洛韦(acyclovir)(ACV)和其前药伐昔洛韦(valacyclovir)、利巴韦林(ribavirin)、齐多夫定(zidovudin)和叠氮胸苷(azidothymidine)(AZT),其阻断病毒的核苷酸合成;2)核苷酸类似物,例如西多福韦(cidofovir)(CDV)、更昔洛韦(ganciclovir)(GCV)(或缙更昔洛韦(valganciclovir)),其由于具有连接的磷酸基团而不同于核苷类似物。核苷酸类似物可在细胞中持续较长时间段;3)非核苷类逆转录酶抑制剂,例如奈韦拉平(nevirapine),其结合逆转录酶;4)蛋白酶抑制剂,例如沙奎那韦(saquinavir),其抑制病毒蛋白酶;以及5)其它类型,诸如金刚烷胺和金刚乙胺,其通过抑制病毒脱壳来抑制流感病毒,和/或焦磷酸类似物磷酰甲酸(phosphonoformic)(PFA,磷甲酸),其抑制HIV中的逆转录酶和疱疹病毒中的病毒聚合酶(参见,例如Bennett和Gotte, 2013, *Viruses* 5:54-86, the review aims to discuss strengths, limitations, and opportunities of the phage surrogate with emphasis placed on its utility in the discovery and development of antiherpetic drugs),所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0019] 在某些实施方案中,抗病毒剂是ATP类似物,诸如2'-脱氧-2'-叠氮基腺苷5'-三磷酸(AzTP)和/或2'-脱氧-2'-氟腺苷5'-三磷酸(triphosphate)(AfTP),其通过大肠杆菌(*E. coli*)RNA聚合酶抑制RNA合成(Ishihama等,1980, *J. Biochem.* 87:825-30),所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。在其它实施方案中,抗病毒剂是叠氮胸苷(AZT),即胸苷类似物3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(又叫作BW A509U),其具有对抗肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)家族中的许多成员的强有力的细菌活性,并且AZT-三磷酸是复制型DNA合成的最有力的抑制剂并且/或者是体外DNA聚合反应中的特异性DNA链终止子,这可解释此化合物对抗易感微生物的致死特性(Elwell等,1987, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(2):274-80),所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0020] 在某些实施方案中,治疗方法还可包括核苷酸库减少剂(nucleotide pool reducer),诸如有效量的羟基脲。在一些实施方案中,治疗组合物还包括用于增强组合物向被感染的植物的靶向位置(诸如叶片)的递送的表面活性剂或穿透剂。

[0021] 附图简述

[0022] 图1示出新型发病模型。

[0023] 图2示出被子植物筛管分子和伴胞中的正常的孔。

[0024] 图3示出被子植物筛管分子和伴胞中的有鞭毛的HLB。

[0025] 图4示出阻断的孔,其中在溶菌噬菌体爆发(LPB)过程中噬菌体颗粒、细菌细胞壁、淀粉、残余肽聚糖和细胞内含物同时释放。

[0026] 图5示出“绿化效应”,其中下游韧皮部干枯,呈“河床”软木质外观。蒸腾作用停止,因为树的此区域不依赖于其它系统性营养路径。

[0027] 发明详述

[0028] 应当理解,本发明的应用并不限于以下描述中阐述的组件的细节与布置。还应当理解,本发明不限于当然可以改变的特定寡核苷酸探针、方法、组合物、反应混合物、试剂盒、系统、计算机、或计算机可读介质。还将理解,本文所使用的术语仅是用于描述特定实施

方案的目的,并且不意图具限制性。此外,除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文所引用的每个参考文献以引用的方式整体并入本文。在描述和要求本发明的过程中,将根据以下所阐述的定义来使用以下的术语和语法变体。

[0029] 定义:

[0030] “扩增反应”是指引物启动的一种或多种靶标核酸序列或其补体的复制。

[0031] “扩增子”是指通过例如在转录、克隆和/或以下技术中发生的复制或转录另一个分子形成的分子:诸如聚合酶链式反应(“PCR”)(例如,链置换PCR扩增(SDA)、双重PCR扩增、实时PCR、重组酶聚合酶扩增(RPA)、螺旋酶依赖性扩增(HAD)、环介导的等温扩增(LAMP)和切口酶扩增反应(NEAR))或其它核酸扩增技术。通常,扩增子是所选择的核酸(例如,模板或靶标核酸)的拷贝或者互补于所述核酸。

[0032] “扩增信号”是指可在扩增反应不存在下或与扩增反应结合所产生的增加的可检测信号。示例性信号扩增技术描述于以下文献中:例如Cao等(1995)“Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma”,AIDS Res Hum Retroviruses 11(3):353-361和授予Segev的美国专利No.5,437,977、授予Delair等的美国专利No.6,033,853以及授予Horn的美国专利No.6,180,777,所述文献各自以引用方式并入。

[0033] 术语“连接的”或“缀合的”是指其中材料或化合物彼此连接或以其它方式接合的相互作用和/或状态。所述相互作用和/或状态通常通过例如共价键合、离子键合、化学吸附、物理吸附和其组合来产生。在某些实施方案中,例如,寡核苷酸探针连接到固体载体。在这些实施方案中的一些中,寡核苷酸探针与生物素(即生物素酰化的)缀合并且固体载体与抗生物素蛋白缀合,使得探针通过例如生物素和抗生物素蛋白的结合作用连接到固体载体。

[0034] 当它们通过共价作用和/或非共价作用彼此缔合时,分子种类“结合”。例如,两个互补的单链核酸可彼此杂交以形成具有至少一个双链区域的核酸。为了进一步说明,抗体和对应的抗原也可彼此非共价地缔合。

[0035] 术语“裂解”是指将材料或化合物从另一材料或化合物的连接点上释放的过程。在某些实施方案中,例如,寡核苷酸从例如固体载体上裂解以允许通过溶液相方法分析寡核苷酸。参见,例如Wells等(1998)“Cleavage and Analysis of Material from Single Resin Beads”,J.Org.Chem.63:6430,其以引用的方式并入。

[0036] 当关于字符串的字符使用时,“字符”是指串的亚单位。在一个实施方案中,字符串的字符编码编码的生物分子的一个亚单位。因此,例如,在编码的生物分子是多核苷酸或寡核苷酸的情况下,串的字符编码单核苷酸。

[0037] “字符串”是能够存储序列信息(例如,生物分子的亚单位结构诸如核酸的核苷酸序列等)的任何实体。在一个实施方案中,字符串可以是字符(字母、数字或其它符号)的简单序列,或者其可以是为有形或无形(例如,电、磁等)形式的此类信息的数字或编码表示。字符串不一定是“线性的”,但是还可以许多其它形式例如链表或其它非线性阵列(例如,用作产生字符的线性阵列的代码)等的形式存在。字符串通常是直接或间接地编码寡核苷酸或多核苷酸串的那些,包括任何加密的串、或图像、或可毫无疑问地转换成表示多核苷酸等

的单体或多聚体(无论是由天然单体还是人工单体形成)的序列的字符串的对象布置。

[0038] 术语“其补体”是指与给定核酸长度相同和恰好互补于给定核实的核酸。

[0039] “组合物”是指两种或更多种不同的组分的组合。在某些实施方案中,例如,组合物包含固体载体,并包含例如共价地或非共价地连接到载体的表面的一个或多个寡核苷酸探针。在其它实施方案中,组合物包含于溶液中的一个或多个寡核苷酸探针。

[0040] 在核酸序列背景下的术语“缺失”是指这样的改变:其中至少一个核苷酸被从核酸序列中,例如从核酸序列中的5'-端、3'-端和/或内部位置移除。

[0041] 术语“衍生物”是指在结构上与另一种物质相关的化学物质,或者可例如通过化学或酶修饰由另一种物质(即其所源自的物质)制成的化学物质。为了说明,寡核苷酸探针任选地与生物素或生物素衍生物缀合。为了进一步说明,一个核酸可基于另一个核酸的序列的知识、另一个核酸的扩增等通过诸如化学合成的方法“源自”另一个核酸。

[0042] 在核酸检测试剂的背景下术语“选择性地结合”或“选择性的结合”是指与核酸检测试剂在相同杂交条件下与非靶标核酸结合相比,核酸检测试剂与一个或多个靶标核酸或其基本相同的变体或其补体结合的程度更大。术语“可检测地结合”是指使用一种或多种检测方法在背景信号(例如噪音)之上可检测的至少两种分子种类(例如,探针核酸与靶标核酸,序列特异性抗体与靶标核酸等)之间的结合。术语“选择性地检测”是指检测一个或多个靶标核酸或其基本相同的变体或其补体比检测来自生物体的非靶标核酸的程度更大的能力。

[0043] 当另外的核苷酸(或其它类似分子)掺入核酸中时,则所述核酸被“延伸”或“延长”。例如,核酸任选地通过掺入核苷酸的生物催化剂诸如通常将核苷酸添加在核酸的3'终端的聚合酶来延伸。

[0044] “延伸的引物核酸”是指一个或多个另外的核苷酸已添加或以另外方式掺入(例如,共价地结合到其上)到其上的引物核酸。

[0045] 当核酸通常在溶液中与另一个缔合时,则所述核酸进行“杂交”或“结合”。核酸由于多种充分表征的物理化学力诸如氢键、溶剂排斥、碱基堆积等而进行杂交。核酸杂交的详尽指南见于Tijssen(1993)Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes第I部分第2章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,”(Elsevier,New York)中以及Ausubel(编著)Current Protocols in Molecular Biology,第I、II和III卷,1997中,所述文献以引用的方式并入。Hames和Higgins(1995)Gene Probes 1 IRL Press at Oxford University Press,Oxford,England,(Hames和Higgins 1)以及Hames和Higgins(1995)Gene Probes 2 IRL Press at Oxford University Press,Oxford,England(Hames和Higgins 2)提供了关于DNA和RNA(包括寡核苷酸)的合成、标记、检测和定量的细节。Hames和Higgins 1和2均以引用的方式并入。

[0046] 在核酸杂交测定或实验(诸如核酸扩增反应、DNA和RNA杂交等)的背景下的“严格杂交洗涤条件”是依赖序列的,并且在不同环境参数下是不同的。核酸杂交的详尽指南见于Tijssen(1993),同上中以及Hames和Higgins,1和2中。就本发明的目的来说,通常,对于在限定离子强度和pH下的特异性序列,“高度严格的”杂交和洗涤条件被选择为低于热熔点(T_m)约5°C。 T_m 是50%测试序列杂交于完全匹配探针所处的温度(在限定离子强度和pH下)。

非常严格的条件被选择为等于特定探针 T_m 的。

[0047] 在DNA或RNA印迹中的过滤器上互补核酸杂交的严格杂交条件的实例是50%福尔马林与1mg肝素于42°C下,其中杂交过夜进行。严格洗涤条件的实例是于65°C下0.2xSSC洗涤15分钟(对于SSC缓冲液描述,参见Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), 所述文献以引用的方式并入)。通常,低严格洗涤先于高严格洗涤—去除背景探针信号。一个低严格实例是于40°C下2xSSC洗涤15分钟。一般来讲,在特定杂交测定中,为对不相关的探针所观察的信噪比的5x(或更高)的信噪比表明检测到特异性杂交。

[0048] 可使用比较杂交来鉴定用于本发明的扩增的核酸或用于互补核酸组的优选引物。具体地,在本发明的背景下检测到的严格杂交表明与例如所需细菌、噬菌体、病毒等的核酸具有较高的结构类似性。例如,需要鉴定在严格条件下与本文的试样核酸杂交的测试核酸。严格杂交的一个量度是,在严格条件下与一个所需核酸(例如,与HLB或其它柑橘绿化枯萎病相关联的细菌和/或噬菌体的核酸及其补体)可检测地杂交的能力。对于任何测试核酸,可容易地以经验为主地确定严格杂交和洗涤条件。

[0049] 例如,在确定高度严格的杂交和洗涤条件的过程中,杂交和洗涤条件的严格性逐渐增加(例如,通过在杂交或洗涤中增加温度、降低盐浓度、增加去垢剂浓度和/或增加有机溶剂(诸如福尔马林)浓度)直到符合一组所选择的标准。例如,杂交和洗涤条件的严格性逐渐增加直到由一个或多个所需核酸序列或其互补多核苷酸序列组成或包括所述序列的探针结合完全匹配的互补靶标(例如,包含与HLB或其它柑橘绿化枯萎病相关联的细菌和/或噬菌体的一种或多种核酸序列和其互补多核苷酸序列的核酸),所产生的信噪比是对探针与非靶标核酸的杂交所观察到的信噪比的至少5x高。在所述情况下,非靶标核酸是来自除所需细菌、噬菌体、病毒等之外的生物体的那些。所述非靶标核酸序列可以通过本领域技术人员在例如GenBank中鉴定。如果测试核酸被说成与探针核酸特异性地杂交,那么所述测试核酸与探针的杂交程度至少相当于与完全匹配的互补靶标的杂交程度的二分之一,即所产生的信噪比是探针与靶标杂交的至少二分之一高,杂交所处的条件是其中完全匹配的探针结合完全匹配的互补靶标,所产生的信噪比是对与非靶标核酸的杂交所观察到的信噪比的至少约5x-10x高。

[0050] 超高严格杂交和洗涤条件是下述那些:其中杂交和洗涤条件的严格性进行增加直到探针与完全匹配的互补靶标核酸的结合的信噪比是与非靶标核酸杂交所观察到的信噪比的至少10x高。如果靶标核酸在所述条件下与探针杂交,且所产生的信噪比是完全匹配的互补靶标核酸所产生的信噪比的至少二分之一,那么就说所述靶标核酸在超高严格条件下与探针结合。

[0051] 类似地,可通过逐渐增加相关杂交测定的杂交和/或洗涤条件的严格性来确定甚至更高水平的严格性。例如,可鉴定出以下那些严格性:其中杂交和洗涤条件的严格性进行增加直到探针与完全匹配的互补靶标核酸的结合的信噪比是与非靶标核酸杂交所观察到的信噪比的至少10x、20x、50x、100x或500x高或更高。如果靶标核酸在所述条件下与探针杂交,且所产生的信噪比是完全匹配的互补靶标核酸所产生的信噪比的至少二分之一,那么就说所述靶标核酸在超超高严格条件下与探针结合。

[0052] 当与核酸序列与非靶标核酸序列杂交相比,核酸序列与指定核酸靶标序列杂交的

可检测程度更高时,则发生“选择性地杂交”或“选择性的杂交”。选择性杂交序列彼此具有至少50%、或60%、或70%、或80%、或90%序列一致性或更高例如通常95-100%序列一致性(即互补性)。

[0053] 核酸的“序列”是指核酸中的核苷酸的顺序和一致性。序列通常沿5'至3'方向读取。在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“一致性”或百分比“一致性”是指在进行比较和比对以获得最大对应性时,例如,如使用本领域技术人员可利用的序列比较算法或通过目视检查所测量,两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸。适用于测定百分比序列一致性和序列相似性的示例性算法是BLAST程序,其描述于例如Altschul等(1990)“Basic local alignment search tool”*J.Mol.Biol.*215:403-410,Gish等(1993)“Identification of protein coding regions by database similarity search”*Nature Genet.*3:266-272,Madden等(1996)“Applications of network BLAST server”*Meth.Enzymol.*266:131-141,Altschul等(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”*Nucleic Acids Res.*25:3389-3402,以及Zhang等(1997)“PowerBLAST:A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation”*Genome Res.*7:649-656中,所述文献各自以引用的方式并入。许多其它最佳比对算法在本领域也是已知的并且任选地用来测定百分比序列一致性。

[0054] 短语“在溶液中”是指这样的测定或反应条件:其中测定或反应的组分不连接到固体载体并且存在于液体媒介中。示例性液体媒介包括水性和有机流体。例如,本发明的某些测定包括将寡核苷酸探针与候选韧皮部杆菌亚洲种(LAS或HLB)细菌核酸和LAS核酸一起于溶液中温育以使得杂交发生。

[0055] 在核酸序列背景下的术语“插入”是指这样的改变:其中至少一个核苷酸被添加到核酸序列,例如添加在核酸序列的5'-端处、3'-端处和/或内部位置处。

[0056] “标记”是指连接(共价地或非共价地)到或能够连接到分子的部分,所述部分提供或能够提供关于分子(例如,关于分子的描述性、鉴定等信息)或标记分子与其相互作用(例如,杂交等)的另一分子。示例性标记包括荧光标记(包括例如猝灭剂或吸收剂)、弱荧光标记、非荧光标记、比色标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记、质量修饰基团、抗体、抗原、生物素、半抗原、酶(包括例如过氧化物酶、磷酸酶等)等等。

[0057] “接头”是指将化合物或取代基共价地或非共价地连接到另一部分例如核酸、寡核苷酸探针、引物核酸、扩增子、固体载体等的化学部分。例如,接头任选地用于将寡核苷酸探针连接到固体载体(例如以线性或其它逻辑探针阵列形式)。为了进一步说明,接头任选地将标记(例如,荧光染料、放射性同位素等)连接到寡核苷酸探针、引物核酸等。接头通常是至少双官能的化学部分并且在某些实施方案中,它们包含可裂解连接点,所述可裂解连接点可通过例如热、酶、化学试剂、电磁辐射等裂解以将材料或化合物从例如固体载体中释放。谨慎选择接头使得裂解在与化合物和测定方法的稳定性相容的适当条件下进行。一般来讲,接头除了例如将化学种类联接在一起或保持所述种类之间一定程度的最小距离或其它空间关系外,不具有特异性生物活性。然而,接头的成分可被选择以影响连接的化学种类的一些特性诸如三维构象、净电荷、疏水性等。示例性接头包括例如寡肽、寡核苷酸、寡聚酰胺、寡乙烯丙三醇(oligoethyleneglycerols)、寡丙烯酰胺、烷基链等。接头分子的另外描

述提供于例如Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science(1996), Lyttle等(1996) *Nucleic Acids Res.* 24(14):2793, Shchepino等(2001) *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* 20:369, Doronina等(2001) *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* 20:1007, Trawick等(2001) *Bioconjugate Chem.* 12:900, Olejnik等(1998) *Methods in Enzymology* 291:135, 以及Pljevaljcic等(2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125(12):3486中, 所有的所述文献以引用的方式并入。

[0058] “混合物”是指两种或更多种不同的组分的组合。“反应混合物”是指包含可参与和/或有利于给定反应的分子的混合物。“扩增反应混合物”是指含有进行扩增反应所必要的试剂的溶液, 并且通常含有引物、热稳定的DNA聚合酶、dNTP和于合适的缓冲剂中的二价金属阳离子。反应混合物如果含有进行反应所必要的所有试剂, 则称之为完整的, 如果仅含有所必要的试剂的亚组, 则称之为不完整的。本领域技术人员应理解的是, 出于方便、储存稳定性或允许依赖应用的组分浓度调整的原因, 反应组分常规地储存为单独的溶液, 每个均含有总组分的亚组, 并且在反应之前将反应组分合并以产生完整的反应混合物。此外, 本领域技术人员应理解的是, 反应组分被单独地包装以用于商业化并且可用的商业试剂盒可含有反应组分的任何亚组, 其中包括本发明的修饰的引物。

[0059] “修饰的引物核酸”是指包含向引物核酸提供所需特性的核苷酸的部分或序列的引物核酸。在某些实施方案中, 例如, 修饰的引物核酸包含例如减小非特异性核酸扩增(例如, 使引物二聚体形成最小化等等)、增加预期的靶标扩增子的产率和/或类似的“核酸扩增特异性改变的修饰”。核酸扩增特异性改变的修饰的实例描述于例如美国专利No. 6,001,611中, 所述专利以引用的方式并入。其它示例性引物核酸修饰包括“限制性位点接头修饰”, 其中包含所选择的限制性位点的核苷酸序列连接在例如引物核酸的5'-端处。限制性位点接头通常连接到引物核酸以有利于随后的扩增子克隆等等。

[0060] “部分”或“基团”是指某物诸如分子所分裂成的部分中的一个(例如, 官能团、取代基等等)。例如, 寡核苷酸探针任选地包含猝灭剂部分、标记部分等等。

[0061] 术语“候选韧皮部杆菌亚洲种”、“候选韧皮部杆菌”或“韧皮部杆菌”是指根瘤菌科家族中的革兰氏天然细菌的属。韧皮部杆菌的检测可基于其16S rRNA基因的PCR扩增, 所述PCR扩增使用本领域已知或出于此目的而设计的特异性引物。属成员是主要通过木虱传播的植物病原体。已用于检测候选韧皮部杆菌亚洲种细菌的基于PCR的方法包括多重实时定量PCR测定(Saponari等)和组织印迹诊断(Nageswara-Rao M.等), 以上所述文献各自以全文形式引用并且在此以引用的方式并入。

[0062] 术语“噬菌体”或“细菌噬菌体”或“细菌病毒”是指在细菌内感染并复制的病毒组中的任一种。细菌噬菌体由包封DNA或RNA基因组的蛋白质组成。它们的基因组可编码至少四个基因, 多至数百个基因。在其基因组注入细胞质中以后, 噬菌体在细菌内复制。噬菌体广泛分布在细菌宿主居住的位置中。噬菌体被视为对抗许多细菌的可能疗法。“病毒”是仅在其它生物体的活细胞内部复制的小的感染剂。病毒可感染从动物和植物到细菌和古生菌的生命形式的所有类型。

[0063] 在感染过程中, 噬菌体连接到细菌并且将其遗传物质插入细胞中。在此举之后, 噬菌体进行两个生活周期中的一个, 裂解周期(烈性或病毒性复制)或溶源性周期(温和的)。溶菌噬菌体接收细胞的机制以形成噬菌体组分。然后它们破坏或裂解细胞, 从而释放新的

噬菌体颗粒。溶源性噬菌体将其核酸掺入宿主细胞的染色体中并且在不破坏细胞的情况下与所述染色体作为一个单元进行复制。在某些条件下,可诱导溶源性噬菌体进行裂解周期。溶菌噬菌体周期与溶源性噬菌体周期之间的关键区别在于,在溶菌噬菌体中,病毒DNA在细菌细胞内以单独的分子存在,并且与宿主细菌DNA分别地进行复制。溶源性噬菌体周期中的病毒DNA的位置是在宿主DNA内,因此在两种情况中,病毒/噬菌体均利用宿主DNA机制进行复制,但是在溶菌噬菌体周期中,噬菌体相对于宿主DNA是自由浮动的单独的分子。

[0064] 术语“候选韧皮部杆菌亚洲种核酸”或“细菌或噬菌体或病毒核酸”是指源自或分离自候选韧皮部杆菌或候选韧皮部杆菌亚洲种或靶标细菌、噬菌体或病毒等的核酸(和/或其扩增子)。

[0065] 术语“核酸”是指核苷酸(例如,核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、双脱氧核苷酸等)和包含以直链或支链方式共价地连接在一起的所述核苷酸的聚合物。示例性核酸包括脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)、DNA-RNA杂合体、寡核苷酸、多核苷酸、基因、cDNA、适配子、反义核酸、干扰RNA(RNAi)、分子信标、核酸探针、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNATM)、PNA-DNA缀合物、PNA-RNA缀合物、LNATM-DNA缀合物、LNATM-RNA缀合物等。

[0066] 核酸通常是单链或双链的并且通常含有磷酸二酯键,但是在一些情况下,如本文所概述的,包括的核酸类似物可具有交替的骨架,所述骨架包括例如但不限于,磷酰胺(Beaucage等(1993)*Tetrahedron* 49(10):1925以及其中参考文献;Letsinger(1970)*J. Org. Chem.* 35:3800;Sprinzl等(1977)*Eur. J. Biochem.* 81:579;Letsinger等(1986)*Nucl. Acids Res.* 14:3487;Sawai等(1984)*Chem. Lett.* 805;Letsinger等(1988)*J. Am. Chem. Soc.* 110:4470;和Pauwels等(1986)*Chemica Scripta* 26:1419,所述文献各自以引用的方式并入),硫代磷酸酯(Mag等(1991)*Nucleic Acids Res.* 19:1437;和美国专利No. 5,644,048,所述文献均以引用的方式并入),二硫代磷酸酯(Briu等(1989)*J. Am. Chem. Soc.* 111:2321,其以引用的方式并入),0-甲基磷酸氨基连接键(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992), 其以引用的方式并入),和肽核酸骨架和连接键(参见Egholm(1992)*J. Am. Chem. Soc.* 114:1895;Meier等(1992)*Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008;Nielsen(1993)*Nature* 365:566;和Carlsson等(1996)*Nature* 380:207,所述文献各自以引用的方式并入)。其它类似核酸包括具有正电荷骨架(Denpcy等(1995)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097,其以引用的方式并入);非离子骨架(美国专利No. 5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141和4,469,863;Angew(1991)*Chem. Intl. Ed. English* 30:423;Letsinger等(1988)*J. Am. Chem. Soc.* 110:4470;Letsinger等(1994)*Nucleoside&Nucleotide* 13:1597,第2和3章,ASC Symposium Series 580,“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Y.S. Sanghvi和P. Dan Cook编辑;Mesmaeker等(1994)*Bioorganic&Medicinal Chem: Lett.* 4:395;Jeffs等(1994)*J. Biomolecular NMR* 34:17;和Tetrahedron Lett. 37:743(1996),所述文献各自以引用的方式并入)和非核糖骨架的核酸,包括在美国专利No. 5,235,033和5,034,506,和第6和7章,ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Y.S. Sanghvi和P. Dan Cook编(所述文献各自以引用的方式并入)中描述的那些。含有一个或多个碳环糖的核酸也包括于核酸的一个定义内(参见Jenkins等(1995)*Chem. Soc. Rev.* 第169-176页,其以引用的方式并入)。若干核酸类

似物还描述于例如Rawls, C&E News 1997年6月2号第35页中,所述文献以引用的方式并入。可完成磷酸核糖骨架的所述修饰,以有利于另外部分诸如标记的添加,或有利于改变所述分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

[0067] 除了通常发现于核酸中的这些天然存在的杂环碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)之外,核酸类似物还包括具有非天然存在的杂环或修饰的碱基(其中许多描述于或以其它方式提及于本文中)的那些。具体地,许多非天然存在的碱基还描述于例如Seela等(1991)Helv.Chim.Acta 74:1790, Grein等(1994)Bioorg.Med.Chem.Lett.4:971-976,和Seela等(1999)Helv.Chim.Acta82:1640中,所述文献各自以引用的方式并入。为了进一步说明,任选地包括在核苷酸中使用的充当熔解温度(T₀)调节剂的某些碱基。例如,所述碱基中的一些包括7-脱氮嘌呤类(例如,7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑[3,4-d]嘧啶、丙炔基-dN(例如,丙炔基-dU、丙炔基-dC等)等等。参见,例如1999年11月23号发布的授予Seela的题为“SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES”的美国专利No.5,990,303,所述专利以引用的方式并入。其它代表性杂环碱基包括例如次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤;2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的8-氮衍生物;腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的7-脱氮-8-氮衍生物;6-氮胞嘧啶;5-氟胞嘧啶;5-氯胞嘧啶;5-碘胞嘧啶;5-溴胞嘧啶;5-甲基胞嘧啶;5-丙炔基胞嘧啶;5-溴乙烯基尿嘧啶;5-氟尿嘧啶;5-氯尿嘧啶;5-碘尿嘧啶;5-溴尿嘧啶;5-三氟甲基尿嘧啶;5-甲氧基甲基尿嘧啶;5-乙炔基尿嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶等等。

[0068] 修饰的碱基和核苷酸的实例还描述于例如1996年1月16号发布的授予Froehler等的题为“OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL PYRIMIDINES”的美国专利No.5,484,908,1997年7月8号发布的题为“ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION WITH OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES”的美国专利No.5,645,985,1998年11月3号发布的授予Froehler等的题为“METHODS OF USING OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES”的美国专利No.5,830,653,2003年10月28日发布的授予Kochkine等的题为“SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES”的美国专利No.6,639,059,2001年10月16号发布的授予Skouv的题为“ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES”的美国专利No.6,303,315,和2003年5月15日公布的授予Kochkine等人的题为“SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES”的美国专利申请公布号2003/0092905中,所述专利各自以引用的方式并入。

[0069] 术语“核酸检测试剂”是指这样的试剂:其可检测地结合(例如,核酸杂交中、抗体-抗原识别等中的氢键或其它结合作用类型)与柑橘绿化病或HLB相关联的所需细菌、噬菌体、病毒等的核酸、其基本相同的变体的试剂,其中变体与所述核酸或变体中的一个具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%的序列一致性。“核苷酸”是指核苷的酯,例如,核苷的磷酸酯。例如,核苷酸可包含共价地连接到核苷糖部分的5'位置的1、2、3或更多个磷酸基。

[0070] “掺入核苷酸的生物催化剂”是指催化剂,其催化核苷酸掺入到核酸中。掺入核苷酸的生物催化剂通常是酶。“酶”是用于降低涉及其它化合物或“底物”的化学反应的活化能的基于蛋白质和/或核酸的催化剂。“掺入核苷酸的酶”是指例如在核酸扩增等过程中催化

核苷酸掺入到核酸中的酶。示例性的掺入核苷酸的酶包括例如聚合酶、末端转移酶、逆转录酶、端粒酶、多核苷酸磷酸化酶等等。

[0071] “寡核苷酸”是指包括至少两个核酸单体单元(例如核苷酸),通常三个以上的单体单元,并且更通常大于十个单体单元的核酸。寡核苷酸的精确尺寸通常取决于各种因素,包括寡核苷酸的最终功能或用途。寡核苷酸任选地通过任何合适的方法来制备,所述方法包括但不限于分离现有的或天然的序列、DNA复制或扩增、逆转录、克隆和限制酶切消化适当的序列、或通过诸如下述方法直接化学合成:Narang等(1979)*Meth. Enzymol.* 68:90-99的磷酸三酯法;Brown等(1979)*Meth. Enzymol.* 68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage等(1981)*Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862的二乙基亚磷酰胺法;Matteucci等(1981)*J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191的三酯法;自动合成法;或美国专利No. 4,458,066的固体载体法,或本领域已知的其它方法。所有这些参考文献均以引用的方式并入。

[0072] 如果寡核苷酸与靶标序列之间存在的失配数目小于寡核苷酸与可能存在于样品中的非靶标序列之间存在的失配数目,那么寡核苷酸探针对靶标序列具有“特异性”。可选择杂交条件使得只有存在的失配数目不大于寡核苷酸与靶标序列之间存在的失配数目才在所述杂交条件下形成稳定的双链体。在所述条件下,靶标特异性寡核苷酸可只与靶标序列形成稳定的双链体。因此,在合适的严格扩增条件下使用靶标特异性引物能够特异性扩增含有靶标引物结合位点的那些序列。类似地,在合适的严格杂交条件下使用靶标特异性探针能够检测特异性靶标序列。

[0073] 术语“寡核苷酸探针”、“探针核酸”或“探针”是指在合适条件下能够选择性地与靶标核酸杂交的标记或未标记的寡核苷酸。通常,探针足以互补于核酸样品中含有的特异性靶标序列(例如,候补韧皮部杆菌核酸或变体)以在所选择的杂交条件诸如但不限于严格杂交条件下与靶标序列形成稳定的杂交双链体。在足够严格的杂交条件下使用探针进行的杂交测定允许选择性地检测特异性靶标序列。术语“杂交区域”是指完全或大体上互补于并因此杂交于靶标序列的核酸的那个区域。对于在用于鉴别序列中的单核苷酸差异的杂交测定中的使用,杂交区域通常是约8至约100个核苷酸的长度。虽然杂交区域通常是指整个寡核苷酸,但是探针可包括例如作为接头结合位点的另外的核苷酸序列,以提供用于将探针序列连接到固体载体或类似物的位点。在某些实施方案中,本发明的寡核苷酸探针包含一个或多个标记(例如,报告染料、猝灭剂部分等),诸如FRET探针、分子信标等,所述分子信标还可用于检测探针与样品中靶标核酸之间的杂交。在一些实施方案中,寡核苷酸探针的杂交区域完全互补于靶标序列。然而,一般来讲,没有必要完全互补;稳定的双链体可含有失配碱基或不匹配碱基。严格条件的修改可能是必要的,以便允许稳定的杂交双链体具有一个或多个碱基对失配或不匹配碱基。以引用的方式并入的Sambrook等,*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)提供了用于合适修改的指南。靶标/探针双链体的稳定性取决于许多变量,包括寡核苷酸的长度、碱基组合物和寡核苷酸的序列、温度和离子条件。本领域的技术人员应当认识到,一般来讲,给定探针的完全补体可类似地用作探针。本领域的技术人员还应当认识到,在某些实施方案中,探针核酸还可用作引物核酸。

[0074] “引物核酸”或“引物”是可与目标核酸(例如,候选韧皮部杆菌核酸、其基本相同的变体(其中变体与所述核酸或变体中的一个具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、

99%的序列一致性))杂交并且在适当反应条件下允许使用例如掺入核苷酸的生物催化剂(诸如聚合酶)进行链延伸或伸长的核酸。引物核酸通常是天然或合成的寡核苷酸(例如,单链的寡脱氧核糖核苷酸等)。虽然其它引物核酸长度是任选利用的,但是其通常包含在约8至约100个核苷酸长度的杂交区域。短的引物核酸通常利用较低的温度以与目标核酸形成足够稳定的杂交复合体。同于目标核酸的子序列至少部分互补的引物核酸通常足以与模板杂交以用于发生延伸。

[0075] 如果需要,可通过掺入可通过例如光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它技术检测的标记来标记引物核酸。为了说明,可用的标记包括放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶(如ELISA中通常使用的)、生物素或半抗原和可获得抗血清或单克隆抗体的蛋白质。许多这些和其它标记进一步描述于本文中并且/或者在本领域中是以其它方式已知的。本领域的技术人员应当认识到,在某些实施方案中,引物核酸还可用作探针核酸。

[0076] “子序列”或“片段”是指整个核酸序列的任何部分。在核酸或多肽的背景下,“基本相同的变体”是指在进行比较和比对以获得最大对应性时,如使用例如序列比较算法或通过目视检查所测量,彼此具有至少85%,通常至少90%,更通常至少95%核苷酸或序列一致性的两个或更多个序列。基本同一性通常在至少约15个核苷酸或氨基酸长度的序列区域内,更通常在至少约20个核苷酸或氨基酸长度的区域内存在,并且甚至更通常地序列在至少约25个核苷酸或氨基酸长度的区域内基本上相同。在一些实施方案中,例如,序列在整个被比较的核酸或多肽长度内基本上相同。在核酸序列的背景下,术语“取代”是指这样的改变:其中核酸序列的至少一个核苷酸被不同的核苷酸代替。术语“靶标序列”、“靶标区域”和“靶标核酸”是指待扩增、检测或以其它方式分析的核酸区域。

[0077] “终止子核苷酸”是指这样的核苷酸:其在例如通过至少一种掺入核苷酸的生物催化剂掺入到核酸中后,阻止核酸的进一步延伸。

[0078] “热稳定的酶”是指这样的酶:其对热稳定,具有耐热性,并且在经受持续所选择的时间段的高温时保持足够的催化活性。例如,当经受持续实现双链核酸的变性所必要的时间的高温时,热稳定的聚合酶保持足够的活性以实现随后的引物延伸反应。核酸变性所必要的加热条件在本领域中是已知的并且例证在美国专利No.4,683,202和4,683,195中,所述专利均以引用的方式并入。如本文所用,热稳定的聚合酶通常适合用于温度循环反应诸如聚合酶链式反应(“PCR”)中。对于热稳定的聚合酶,酶活性是指以适当的方式催化核苷酸组合,以形成互补于模板核酸(例如,候选韧皮部(LAS)基因组的所选择的子序列)的引物延伸产物。

[0079] “猝灭剂部分”或“猝灭剂”是指减少和/或能够减少来自以其它方式具有发射辐射的来源的所述辐射(例如荧光或发光辐射)的可检测发射。猝灭剂通常将由来源发射的可检测辐射减少至少50%,通常至少80%,并且更通常至少90%。示例性猝灭剂提供在例如2002年10月15号发布的授予Horn等的题为“OLIGONUCLEOTIDE PROBES BEARING QUENCHABLE FLUORESCENT LABELS, AND METHODS OF USE THEREOF”的美国专利No.6,465,175中,所述专利以引用的方式并入。

[0080] 术语“样品”是指含有或推测含有一种或多种宿主和/或病原体核酸的任何物质,包括但不限于从一个或多个受试者或个体中分离的组织或体液、体外细胞培养成分以及临床样品。示例性样品包括细菌、病毒、植物、动物或哺乳动物样品,所述动物或哺乳动物样品

包括血液、血浆、血清、尿、滑液、精液、精液浆、前列腺液、阴道液、宫颈液、子宫液、宫颈刮擦物、羊水、肛门刮擦物、黏液、痰、组织等等。

[0081] 短语“源自受试者的样品”是指从受试者获得的样品,无论所述样品是否在分析之前进行一个或多个处理步骤(例如,细胞裂解、碎片移除、稳定化等)。为了说明,样品可通过本领域已知的刮擦、静脉穿刺、擦洗、活组织检查或其它技术而源自受试者。

[0082] “测序反应”是指包括例如使用终止子核苷酸并且被设计以解释给定核酸中的核苷酸序列的反应。“组”是指至少两个事物的收集物。例如,组可包括2、3、4、5、10、20、50、100、1,000个或其它数目的分子或序列类型。例如,本发明的某些方面包括具有扩增子组的反应混合物。“亚组”是指组的任何部分。

[0083] “固体载体”是指可用化学部分诸如寡核苷酸探针或类似物衍生化或以其它方式连接到所述化学部分的固体材料。示范性固体载体包括板、珠子、微珠、管、纤维、晶须、蜂巢、杂交芯片(包括微阵列基底诸如GeneChip™探针阵列(Affymetrix公司,Santa Clara, Calif., USA)中使用的那些,等等)、膜、单晶、陶瓷层、自组装单层等等。

[0084] “受试者”是指生物体。通常,生物体可以是细菌生物体、病毒生物体、植物生物体、动物生物体或哺乳动物生物体(包括人生物体)。在某些实施方案中,例如,受试者是疑似患有LAS或柑橘绿化感染或疾病诸如HLB的植物或树。

[0085] 本发明提供了一种阐明HLB的古噬菌体感染的新型发病模型。更具体地,本发明提供的是,在应激下和/或在植物或细菌源的诱导物或调节因子存在下,噬菌体基因连接/吸附到细菌靶向的基因使得在准备“爆发”的时候肽聚糖破坏,并且使得噬菌体蛋白产生和噬菌体组装(“爆发标记物”),然后在裂解阶段中进行噬菌体释放,其中在溶菌噬菌体爆发(LPBB)过程中细菌组分诸如噬菌体颗粒、细菌细胞壁、淀粉、残余肽聚糖和细胞内含物同时释放,从而产生“绿化效应”,其中下游韧皮部和/或叶片被阻塞并干枯,呈“河床”软木质外观,并且蒸腾作用停止,因为树的此区域不依赖于其它系统性营养路径(参见图1、3、4和5)。

[0086] 图1示出新型发病模型。所述模型阐明的是,在应激(103)下,例如在植物或细菌源(104)的诱导物或调节因子存在下,噬菌体基因(101)连接/吸附到细菌靶向的基因(102)使得噬菌体蛋白产生并发生噬菌体组装(“爆发标记物”)(106),并且使得在准备“爆发”的时候肽聚糖破坏(105),然后在“裂解阶段”(107)中进行噬菌体释放,其中细菌组分被释放。在某些实施方案中,释放的细菌淀粉葡萄糖分子(108)以类似于人心脏病的方式阻塞茎和叶片(109)的韧皮部,因此,中断正常的蒸腾作用。

[0087] 图2示出被子植物筛管分子和伴胞中的正常的孔。图中示出伴胞(200)的细胞壁(201)、质体(202)和液泡(203),和筛分子(300)的线粒体(301)、退化性SER(302)、质体(303)、细胞壁(304)、P-蛋白(305)、退化的液泡膜(306)、以及大胞间连丝(plasmodesmate)(307)、筛域(308)和内腔(309)。图还示出沿箭头方向穿过这些正常孔的正常蒸腾流动。

[0088] 图3示出被子植物筛管分子和伴胞中的有鞭毛的HLB,其中当细菌在应激(诱导物)(403)下时生物被膜(401)形成,从而产生HLB(402),形成筛板(404),由此导致正常蒸腾作用的中断,如图4和5所示。

[0089] 图4示出筛板的堵塞的孔,其中在溶菌噬菌体爆发(LPBB)过程中噬菌体颗粒、细菌细胞壁、淀粉、残余肽聚糖和/或细胞内含物同时释放。

[0090] 图5示出“绿化效应”,其中下游韧皮部(500)干枯,呈“河床”软木质外观。蒸腾作用

停止,因为树的此区域不依赖于其它系统性营养路径。

[0091] 本发明的某些实施方案提供在HLB中产生的噬菌体。SC1_gp110基因的穴蛋白功能活性证实了注释。在某些实施方案中,本发明提供的表达分析揭示,与柑橘相比,长春花中的噬菌体晚期基因(尤其是穴蛋白)表达水平更高,这表明噬菌体对长春花具有响应特异性。在其它实施方案中,无论温度如何,脱离后12至24小时柑橘中的穴蛋白mRNA水平的显著增加指示柑橘中的潜在的裂解触发信号。在另一其它实施方案中,穴蛋白启动区通过柑橘中的潜在诱导物发展到可用于监测溶菌活化的报告基因构建体中,并且已证明热疗法(Las的热硬化)在被感染的柑橘中的作用方式似乎与噬菌体诱导没有联系。

[0092] 本发明还提供了基于分子生物技术和试剂对受试者中的一种或多种病原体的选择性检测。具体地,基于新检测策略,利用使用至少来自两种不同生物体的在致病上紧密联系的至少两个(2)或三个(3)靶标的定量负载试验导出在诊断、预后和/或治疗涉及病毒或噬菌体与植物和/或动物或哺乳动物(包括人)中的宿主(例如细菌或植物)的比率的任何疾病中使用的致病比率或负载量或指数。更具体地,基于本文所述方法和试剂,候选韧皮部杆菌亚洲种(LAS)或柑橘绿化感染可通过利用噬菌体DNA或RNA定量作为与其宿主即LAS细菌基因组一起致病的致病比率来诊断,以用于报告发病和具有临床效用的治疗策略。除了检测方法和反应混合物之外,本发明还提供了用于检测所述致病因子的试剂盒和系统,以及包含用于药物筛选的噬菌体裂解循环阻遏物的系统或体外细胞培养模型用于治疗 and 预防HLB和柑橘绿化的用途。此外,本发明提供了在核苷酸库减少剂诸如羟基脲存在或不存在下,使用任何抗病毒剂治疗和预防HLB和柑橘绿化的方法和组合物,所述抗病毒剂包括但不限于核苷、核苷酸、核糖核苷或其类似物。此外,本发明提供的治疗或预防组合物还可包含表面活性剂或穿透剂以有利于药物递送至受试者的靶标位置而实现较好的靶向治疗。

[0093] 用于诊断和预后发病和/或柑橘绿化枯萎病诸如HLB或LAS的病原体负载量或病原体指数

[0094] 本发明提供了用于生物样品的诊断、预后和治疗方法的新型发病模型。

[0095] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于检测生物样品的发病的方法,所述方法包括:a)定量样品中对第一生物体具有特异性的核酸的量,所述第一生物体为与第二生物体相关联的病原体,其中这两种生物体接连地感染宿主生物体以确定病原体定量测量值,b)定量样品中对响应于病原体的宿主生物体具有特异性的核酸的量以确定与疾病的发病相关联的靶标的多重定量;以及c)计算双病原体靶标的量相对于宿主定量(quantitative)测量值的比率,其中所述比率提供了用于检测发病的致病指数。在某些实施方案中,较高的致病指数指示较差的预后并且可用于药物治疗效力和药物筛选。

[0096] 在某些实施方案中,通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第一组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第一生物体具有特异性的核酸的定量,第一组寡核苷酸与第一生物体的核酸至少部分互补,并且其中通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第二组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第二生物体具有特异性的核酸的定量,第二组寡核苷酸与第二生物体的核酸至少部分互补,并且还包括检测来自核酸扩增反应的扩增子,并且其中通过使来自样品的核酸与核酸扩增反应中的第三组寡核苷酸引物接触来进行样品中的对第三宿主生物体具有特异性的核酸的定量,第三组寡核苷酸与第三生物体的核酸至少部分互补,并且还包括检测来自核酸扩增反应的扩增子,其中扩增反应可发生在同一容器

中,并且基于扩增子的相对数目来计算病原体比率的量相对于宿主负载量的比率以导出致病指数或四分位数。如本文所用,病原生物体是病毒或细菌,并且宿主生物体是细菌、植物或动物。当宿主生物体是细菌时,宿主还可驻留在另一宿主诸如植物或动物(例如人)内或与所述另一宿主相关联。在某些实施方案中,发病是柑橘绿化枯萎病或黄龙病(HLB),病原体或第一生物体可以是细菌噬菌体或病毒,并且第二生物体是候选韧皮部杆菌亚洲种(LAS)细菌并且宿主是大量的结果类和非结果类植物。致病指数还可源自与双病原体-宿主关系在致病上紧密联系的任何诱导物或因子基因的另外相关性。在某些实施方案中,第二生物体是溶菌细菌噬菌体,包括但不限于SC1、SC2和SC3溶菌噬菌体。

[0097] 本发明的方法中定量的核酸包括但不限于RNA或DNA。在某些实施方案中,定量噬菌体RNA和细菌DNA,并且计算噬菌体RNA与细菌DNA的比率以导出病原体指数或四分位数。可通过用于定量的任何常规核酸扩增反应(例如qPCR)来扩增核酸,所述核酸扩增反应包括但不限于标准聚合酶链式反应(PCR)、实时PCR(例如,Roche,HIV-1Cobas Taqman系统;Abbot HIV-1M2000系统)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、螺旋酶依赖性扩增(HAD)、环介导的等温扩增(LAMP)和切口酶扩增反应(NEAR)。参描述qPCR和/或实时PCR的细节可见于美国专利No.5,972,716;6,800,452;6,746,864;7,427,380;7,238,321;和8,058,054,以及Tatineni等(2008,Phytopathology 98(5):592-99)中,所述文献各自的全部内容以引用的方式并入本文。此外,RPA扩增的详细描述提供于例如美国专利No.7,485,428;7,666,598;7,763,427;和7,759,061中,所述专利各自的全部内容以引用的方式并入本文;HAD扩增的详细描述提供于例如美国专利No.7,829,284;7,282,328;和7,662,594中,所述专利各自的全部内容以引用的方式并入本文;并且LAMP扩增的详细描述提供于例如美国专利No.7,851,186;7,745,135;和6,974,670中,所述专利各自的全部内容以引用的方式并入本文。

[0098] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于检测样品的柑橘绿化枯萎病的试剂盒,所述试剂盒包括:a)同样品中的与柑橘绿化枯萎病在致病上相关联的第一病原生物体的核酸至少部分互补的第一组寡核苷酸;b)同为同样品中的病原体生物体的宿主的第二生物体的核酸至少部分互补的第二组寡核苷酸;c)用于使用第一组寡核苷酸和第二组寡核苷酸的核酸扩增反应的试剂;d)用于指导核酸扩增反应和检测其一种或多种扩增子的说明书;以及e)用于计算扩增子的比率的说明书,其中所述比率提供了用于检测、预后和治疗柑橘绿化枯萎病的致病指数。

[0099] 通常,至少一种核酸检测试剂包含至少一个标记和/或至少一个猝灭剂部分。为了说明,标记任选地包括荧光染料、弱荧光标记、非荧光标记、比色标记、化学发光标记、生物发光标记、抗体、抗原、生物素、半抗原、质量修饰基团、放射性标记、酶等等。

[0100] 本发明的核酸检测试剂以多种形式提供。在一些实施方案中,例如,至少一种核酸检测试剂是在溶液中。在其它实施方案中,固体载体包含至少一种核酸检测试剂。在这些实施方案中,核酸检测试剂非共价地或共价地连接到固体载体。在这些实施方案中利用的示例性固体载体任选地选自例如,板、微孔板、珠子、微珠(例如,磁性微珠等)、管(例如微管等)、纤维、晶须、蜂巢、杂交芯片、膜、单晶、陶瓷层、自组装单层等等。

[0101] 为了进一步说明,核酸检测试剂任选地与生物素或生物素衍生物缀合,并且固体载体任选地与抗生物素蛋白或抗生物素蛋白衍生物或抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白链菌素衍生物缀合。在一些实施方案中,接头将核酸检测试剂连接到固体载体。接头通常

选自例如寡肽、寡核苷酸、寡聚酰胺、寡乙烯丙三醇、寡丙烯酰胺、烷基链等等。任选地,可裂解连接点将核酸检测试剂连接到固体载体。可裂解连接点通常可通过例如热、酶、化学试剂、电磁辐射等裂解。

[0102] 试剂盒还包括以下中的一个或多个:用于使核酸检测试剂与来自样品的核酸或其扩增子接触和检测核酸检测试剂与靶标核酸之间的结合的一套说明书,如果存在的话,或用于包装核酸检测试剂的至少一个容器和一套说明书。包括在本发明的试剂盒中的示例性固体载体任选地选自例如,板、微孔板、珠子、微珠、管(例如微管等)、纤维、晶须、蜂巢、杂交芯片、膜、单晶、陶瓷层、自组装单层等。

[0103] 诊断、预后和治疗报告:

[0104] 本发明还提供了一份包含与提供作为治疗策略的临床效用的致病指数相关的报告算法的报告。TRUGENE[®]HIV-1基因分型试剂盒(Visible Genetics, Siemens)是具有作为治疗策略的临床效用的报告算法的示例。具体地,TRUGENE HIV-1基因分型测试是基于数据分析步骤中最后的若干过程,其中通过软件系统来分析基因序列以提供可用于患者的HIV的治疗处理的TRUGENE HIV-1抗性报告,还参见美国专利No.6,830,887;6,653,107;6,265,152;6,007,983;5,795,722;5,834,189;和5,545,527,所述专利各自的全部内容以引用的方式并入本文。

[0105] 在一些实施方案中,本发明的方法还包括下述步骤:定量样品中对宿主细菌、噬菌体病原体 and 病原生物体的诱导物具有特异性的核酸的量以确定宿主负载量、病原体负载量和诱导物负载量;并且其中致病指数、宿主或病原体负载量和/或诱导物负载量与用于确定预后和提供作为治疗策略的临床效用的报告指数相关。本发明的方法还提供的是,定量对病原生物体、宿主生物体或诱导物具有特异性的多种独特核酸,并且所述多种独特核酸在报告指数中是相关的。

[0106] 用于筛选治疗剂或研究的柑橘绿化枯萎病的培养

[0107] 本发明还提供一种用于筛选用于抑制或预防柑橘绿化枯萎病的候选治疗剂的方法。与黄龙病相关联的‘候选韧皮部杆菌亚洲种’、‘候选韧皮部杆菌非洲种’和‘候选韧皮部杆菌美洲种’的培养报告于Sechler等(2009, *Phytopathology* 99(5):480-86)中,所述文献的全部内容以引用的方式并入。本发明的方法包括以下步骤:提供带有具有阻遏的噬菌体裂解周期的细菌噬菌体的候选韧皮部杆菌的培养物;将培养物与候选治疗剂候选物合并;以及检测候选韧皮部杆菌培养物的生长抑制,从而表明候选治疗剂抑制或预防柑橘绿化枯萎病。在某些实施方案中,细菌噬菌体是溶菌噬菌体,包括但不限于SC1、SC2和SC3溶菌噬菌体,并且其中噬菌体裂解周期被阻遏或遗传缺失。在一些实施方案中,柑橘绿化枯萎病细菌诸如HLB细菌候选韧皮部杆菌在含有针对细菌噬菌体的噬菌体裂解周期的阻遏物培养基中培养。本发明涵盖适合用于生长任何细菌培养物的细菌培养基和系统。本发明还涵盖本领域现已知或以后发展的任何噬菌体裂解周期阻遏物或抑制剂,包括但不限于SC1阻遏物SC1_gp110(穴蛋白)、SC1_gp025、SC1_gp-95、SC2_gp100、C1或噬菌体λ阻遏物(例如噬菌体434, P22),参见由柑橘研究和发展基金会(Citrus Research and Development Foundation)于2013年8月7号提交的最终报告Exploiting the Las and Lam phage for potential control of HLB, Citrus Advanced Technology Program, 全部报告以引用的方式并入本文。

[0108] 细菌噬菌体或病毒感染的预防和治疗

[0109] 本发明还提供了一种用于治疗 and/或预防细菌、植物或动物个体的细菌噬菌体或病毒感染的方法,所述方法包括向有需要的个体施用组合物,所述组合物包含有效量的选自以下组成的组的药剂:核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷和选择性地抑制病毒复制的核糖核苷类似物。核苷可通过细胞中的特异性激酶在糖的伯醇基(-CH₂-OH)上进行磷酸化,从而产生核苷酸,所述核苷酸是DNA和RNA的分子的构造单元。核苷可通过从头合成路径产生,特别是在肝脏中,但是它们通过饮食中的核酸的摄食和消化而被大量供应,由此,核苷酸酶将核苷酸(诸如胸苷一磷酸)分解成核苷(诸如胸苷)和磷酸。进而核苷随后在消化系统的内腔中通过核苷酶分解成核碱基和核糖或脱氧核糖。此外,核苷酸可在细胞内部分解成含氮碱基和核糖-1-磷酸或脱氧核糖-1-磷酸。

[0110] 还使用若干核苷类似物作为抗病毒剂或抗癌剂。核苷类似物是类似DNA合成中的核苷起作用的分子。它们包括用于阻止被感染的细胞中的病毒复制的一系列抗病毒产品。最常使用的是阿昔洛韦(ACV)。本领域已知核苷、非核苷、核苷酸、非核苷酸、核糖核苷、核糖核苷类似物和核苷酸库减少剂用于治疗病毒感染,诸如像治疗人类免疫缺陷病毒的用途。病毒聚合酶将这些化合物与非规范碱基结合。这些化合物在细胞中通过转化为核苷酸而被活化。它们以核苷的形式来施用,因为带电荷的核苷酸不能容易地跨过细胞膜。

[0111] 示例性核苷类似物药物包括但不限于脱氧腺苷类似物(例如,去羟肌苷(DIDANOSINE)(ddI)(HIV)和阿糖腺苷(VIDARABINE)(化学疗法));脱氧胞苷类似物(例如,阿糖胞苷(VIDARABINE)(化学疗法)、恩曲他滨(EMTRICITABINE)(FTC)(HIV)、拉米夫定(LAMIVUDINE)(3TC)(HIV,乙型肝炎)和扎西他滨(ZALCITABINE)(ddC)(HIV));脱氧鸟苷类似物(例如,阿巴卡韦(ABACAVIR)(HIV)和恩替卡韦(Entecavir)(乙型肝炎));(脱氧-)胸苷类似物(例如,司他夫定(STAVUDINE)(d4T)、替比夫定(TELBIVUDINE)(乙型肝炎)、齐多夫定(叠氮胸苷或AZT)(HIV));和脱氧尿苷类似物(例如,碘苷和曲氟尿苷)。

[0112] 本发明涵盖本领域现已知或以后发展的能够治疗病毒感染的任何核苷或核苷类似物。示例性核苷抗逆转录病毒剂包括但不限于ZIDOVUDINE[®](ZDV,AZT)、EPIVIR[®](3TC,拉米夫定)、EMTRIVA[®](FTC,拉米夫定)、VIREAD[®](替诺福韦富马酸酯(tenofovir disoproxil fumarate),TDF)、ZIAGEN[®](硫酸阿巴卡韦,ABC)、CARBOVIR[®](CBV)、Racivir[RCV,(±)-β-2',3'-双脱氧-5-氟代-3'-硫代胞苷]、DEXELVUCITABINE[®](β-D-2',3'-双脱氧-2',3'-双脱氧-5-氟胞苷,逆转录(reverset),RVT,D-D4FC,DFC)、AMDOXOVIR[®][AMDX,(-)-β-D-2,6-二氨基嘌呤二氧戊环,DAPD]、9-(β-D-1,3-二氧戊环-4-基)鸟嘌呤(DXG)、AVX754[SPD-754,(-)dOTC,(-)-2'-脱氧-3'-氧杂基-4'-硫代胞苷]。非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)代表了可用于本发明中的另一类药物,并且可选自诸如用于治疗HIV感染的NNRTI,诸如依法韦仑(efavirenz)(SUSTIVA[®])、利匹韦林(rilpivirine)(EDURANT[®])、依曲韦林(etravirine)(INTELENCE[®])、地拉韦啉(delavirdine)(RESCRIPTOR[®])、奈韦拉平(nivirapine)(VIRAMUNE[®])和来司伟林(lersivirine)。还参见美国专利No.8,415,321;8,168,583;7,635,690;7,402,588;7,115,584;6,949,521;和5,990,093,所述专利各自的全部内容以引用的方式并入本文。

[0113] 可单独地使用或与药学上可接受的载体组合使用来产生单剂型的核苷或其类似物的量将根据所治疗的宿主和具体施用方式变化。本领域技术人员应当理解,包含于各剂型的个体剂量中的核苷或其类似物的单位含量本身不需要构成有效量,因为必要的有效量可通过施用一些个体剂量达到。剂量的选择取决于所使用的剂型、被治疗的病状以及根据本领域技术人员的测定所要达到的具体目标。

[0114] 根据多种因素选择使用本发明的核苷或其类似物用于治疗或预防细菌、植物或动物个体的细菌噬菌体或病毒感染的剂量方案,所述因素包括受试者的类型、年龄、体重、性别、饮食和身体状况、施用途径、药理考虑诸如所采用的具体化合物的活性、疗效、药物动力学以及毒理学特性,是否利用核苷递送系统以及核苷是作为前药还是药物组合的一部分来施用。因此,实际采用的剂量方案可以因受试者不同而广泛变化。

[0115] 包含本发明中使用的核苷或其类似物的任何抗病毒剂可通过化学方式合成并且/或者通过本领域技术人员已知的任何合适的神话和/或技术来产生,并且可通过已知方法配制,以使用若干合适的路径向受试者施用,所述路径包括但不限于全身性施用或局部施用,这取决于被治疗或施用到的受试者。单独的抗病毒剂也可与一种或多种其它抗病毒剂组合和/或其它生物学活性或生物学惰性药剂一起施用。所述生物学活性或惰性药剂可与抗病毒剂流体或机械连通或通过离子、共价、范德华力、疏水力、亲水力或其它物理力连接到抗病毒剂。

[0116] 可通过任何常规方式使用一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂配制本发明的抗病毒剂诸如核苷或其类似物。本发明的抗病毒剂可采取带电形式、中性形式和/或其它药学上可接受的盐形式。药学上可接受的载体的实例包括但不限于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(A.R.Gennaro编著),第20版,Williams&Wilkins PA,USA(2000)中所述的那些。

[0117] 核苷或其类似物还可采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、控释或缓释制剂等等的形式。所述制剂将含有有效量的核苷或其类似物(优选呈纯化形式)以及适合量的载体以便提供用于向患者适当施用的形式。制剂应该符合施用方式的要求。

[0118] 抗病毒剂(例如核苷或其类似物)的有效量通常涉及从受试者实现抗病毒剂的预防或治疗目的、施用速率和消耗或代谢速率所需的量。有效剂量的常见范围以及给药频率可根据以上所论述的因素进行变化。

[0119] 在一些实施方案中,治疗和/或预防方法还可包含核苷酸库减少剂。在一方面,核苷酸库减少剂是羟基脲或羟基尿素。虽然不希望受理论束缚,但已显示羟基脲抑制脱氧核糖核苷酸的从头合成,消耗脱氧核糖核苷三磷酸库并且使宿主细胞和前体分子的病毒复制饥饿,诸如Hendricks和Matthews,1998中所述,并且所述文献以引用的方式并入本文。

[0120] 在另一方面,用于治疗柑橘绿化枯萎病的方法包括施用包含用于增强组合物的递送的表面活性剂或穿透剂的组合物。术语表面活性剂或穿透剂意指改进和/或加速组合物的递送的一种或多种化合物。在某些实施方案中,本发明的组合物包含由NanoCanopy制造的商品名为Atomic Grow的穿透剂。本发明涵盖本领域现已知或以后发展的用于相同用途的任何其它表面活性剂或穿透剂。用于向植物递送的各种施用策略是本领域所熟知的。

[0121] 本文提及的每个出版物在此以引用的方式整体并入以达到所有目的。

[0122] 已参考优选实施方案描述了本发明。根据前面的详细描述,本发明的变化和修改

对于本领域的技术人员将是明显的。

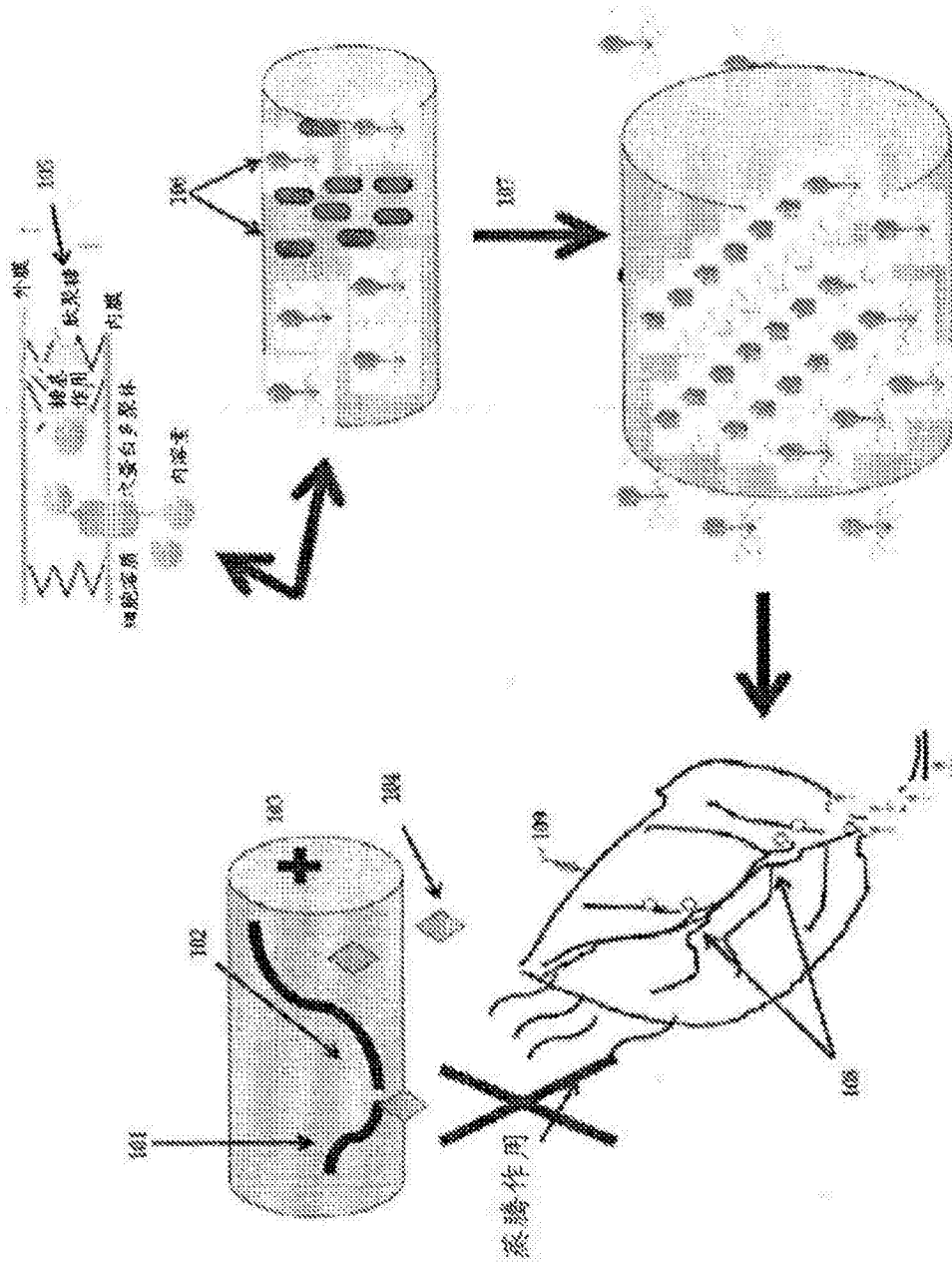


图1

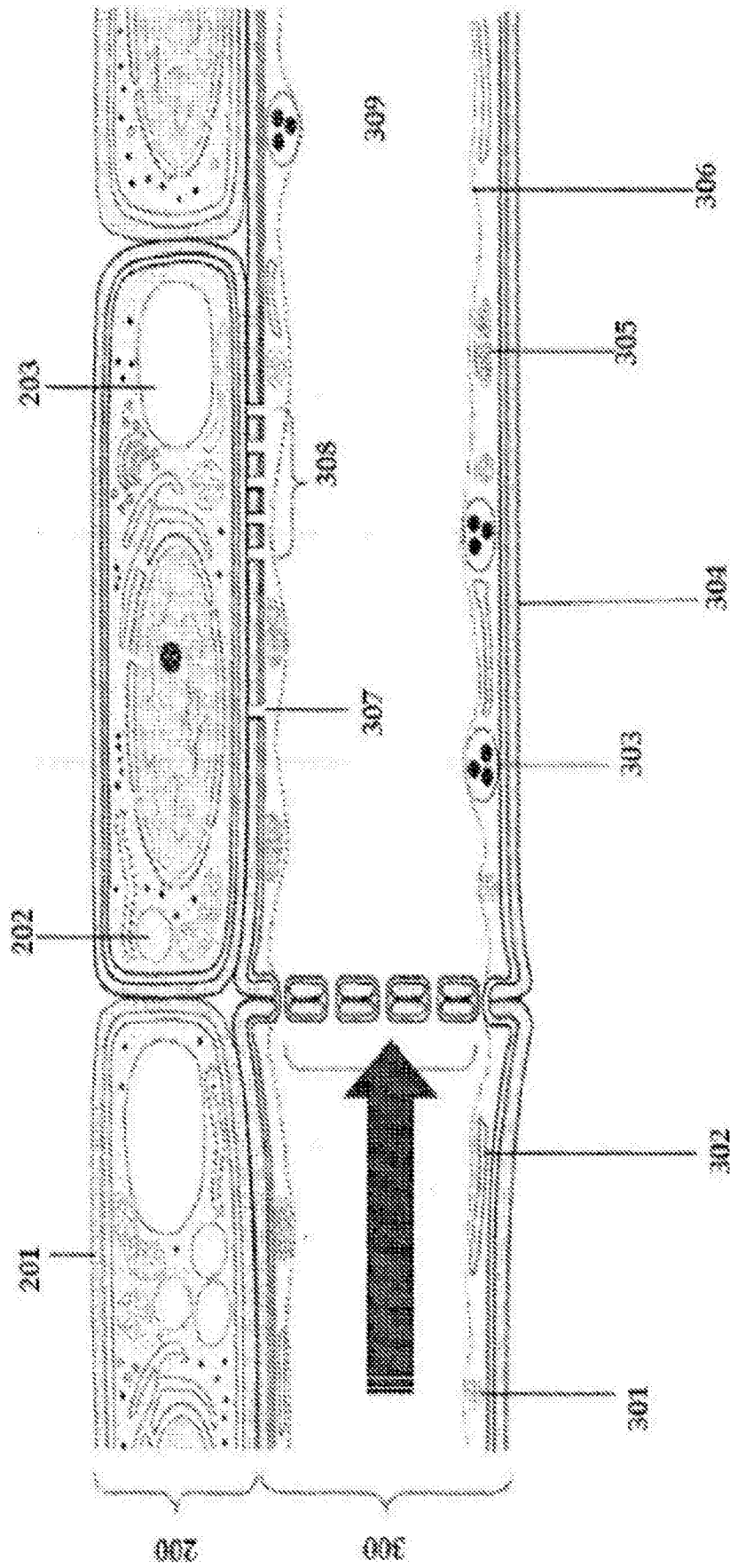


图2

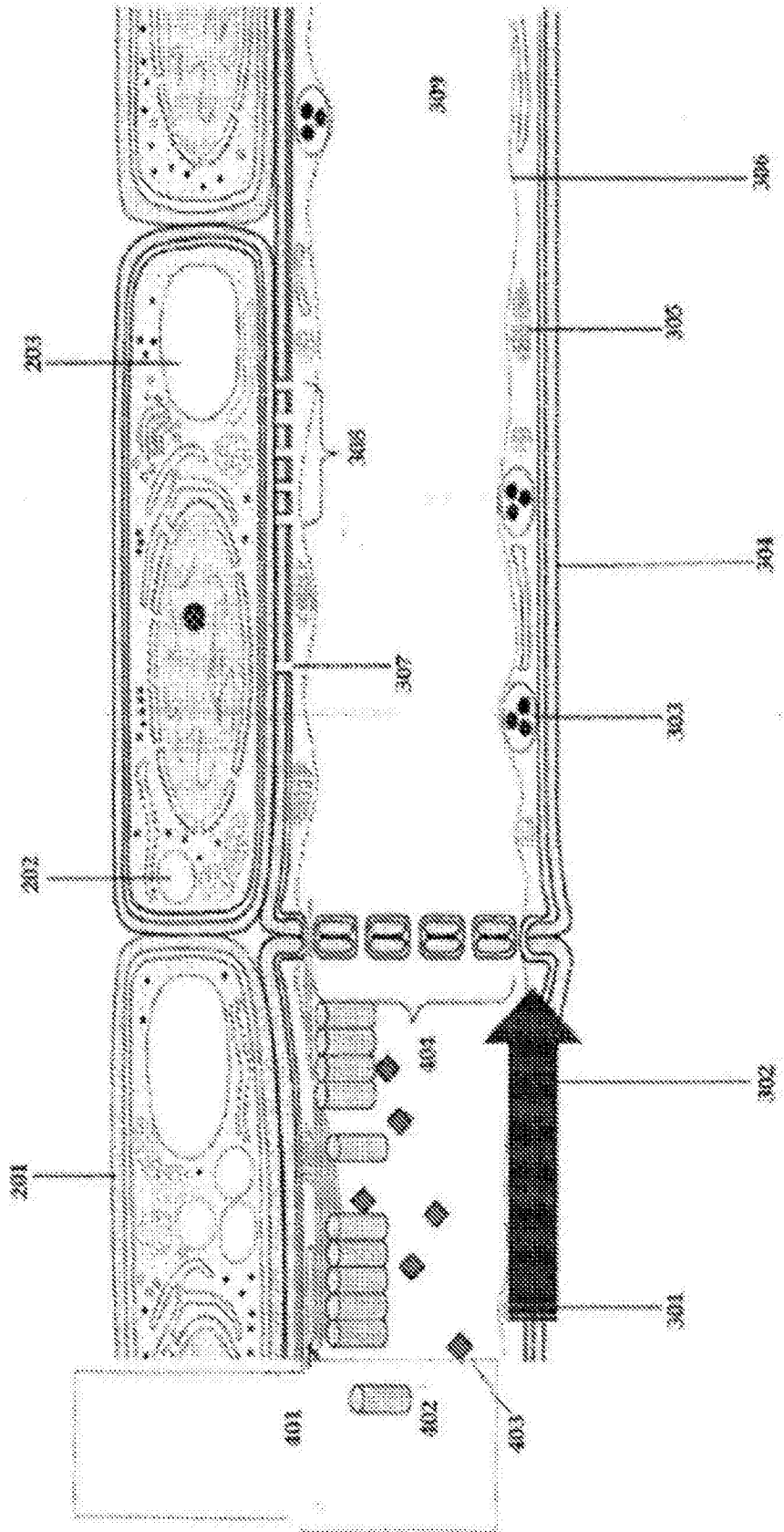


图3

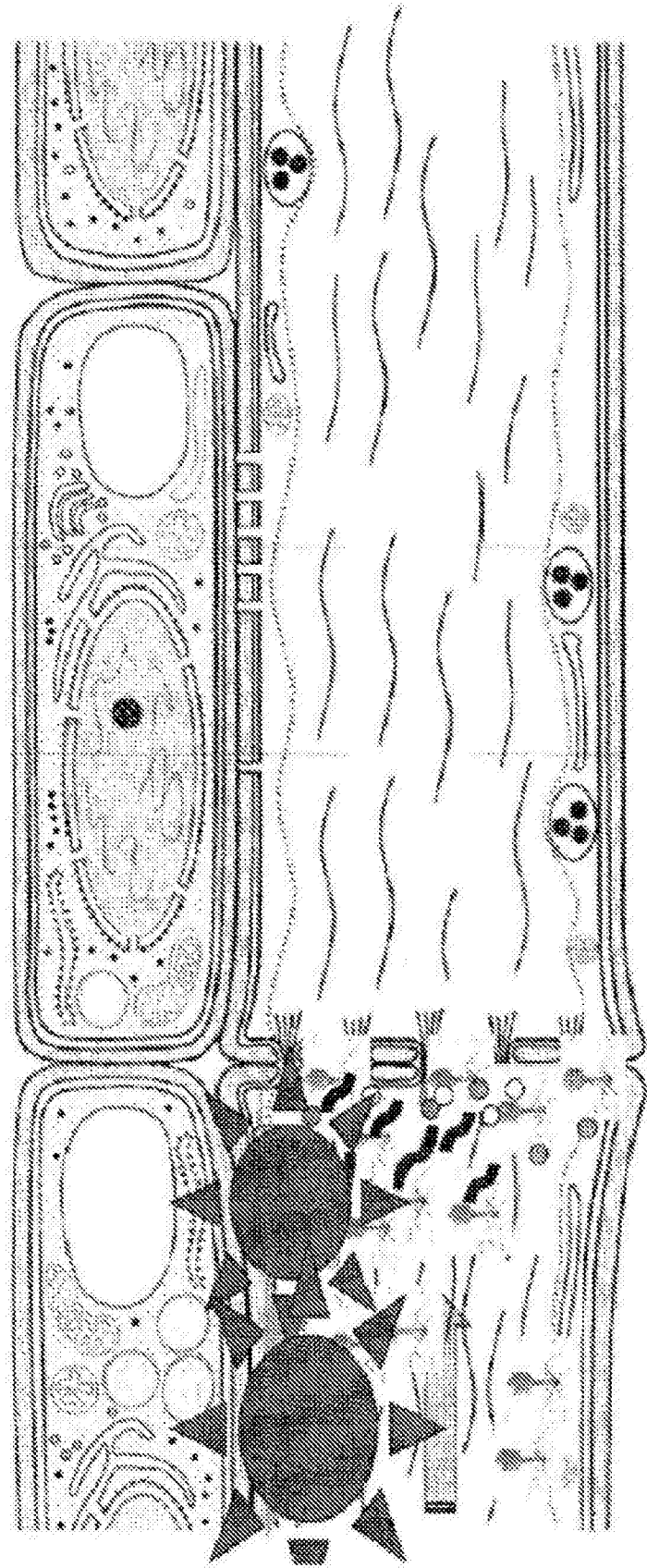


图4

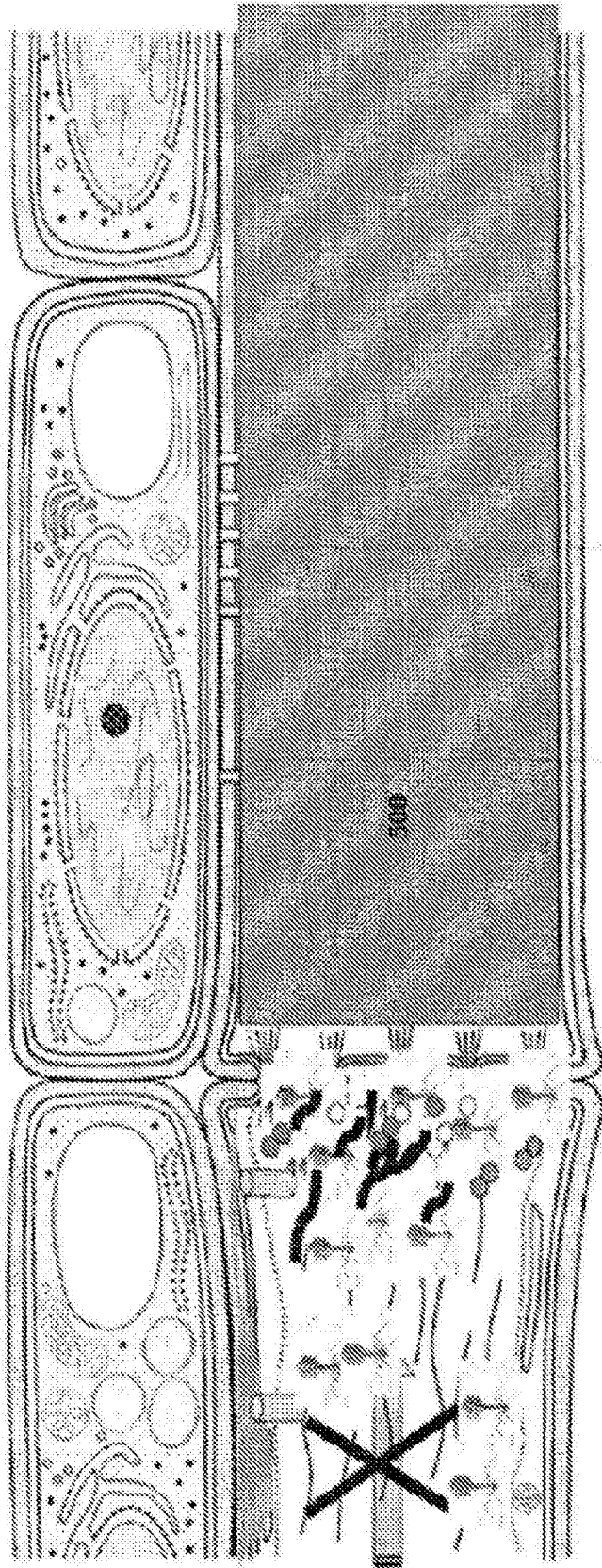


图5