



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114174540 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(21) 申请号 202080053438.X

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2020.07.24

代理人 权陆军 李唐

(30) 优先权数据

62/878643 2019.07.25 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/686 (2018.01)

2022.01.24

C12N 15/11 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/070896 2020.07.24

C12R 1/93 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/013972 EN 2021.01.28

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·T·汉密尔顿 M·海尔

D·利格特 J·孙 L·王 X·吴

权利要求书3页 说明书18页
序列表4页 附图23页

(54) 发明名称

用于检测爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)的组合物和方法

(57) 摘要

本文描述了用于快速检测生物学或非生物学样品中爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)的存在或不存在的方法。所述方法可包括执行扩增步骤、杂交步骤和检测步骤。此外,提供了经设计用于检测EBV的靶区域的靶向EBV的引物和探针以及试剂盒。还描述了用于扩增和检测EBV的试剂盒、反应混合物和寡核苷酸(例如,引物和探针)。还描述了检测EBV的不同区域并且能够在双靶标测定中采用以同时检测EBV的两个不同且不重叠的靶区域的引物和探针。



1. 一种用于检测样品中爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 的一种或多种靶核酸的方法, 所述方法包括:

(a) 提供样品;

(b) 执行扩增步骤, 所述扩增步骤包括使所述样品与一组或多组引物接触以在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候产生扩增产物;

(c) 执行杂交步骤, 所述杂交步骤包括使在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候的所述扩增产物与一个或多个探针接触; 以及

(d) 执行检测步骤, 所述检测步骤包括检测所述扩增产物的存在或不存在, 其中所述扩增产物的存在指示所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸, 并且其中所述扩增产物的不存在指示所述样品中不存在EBV的所述一种或多种靶核酸; 并且

其中所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括:

(i) 一组引物, 其包含含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物, 以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针; 和/或

(ii) 一组引物, 其包含含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物, 以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述样品是生物学样品。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述生物学样品是血浆或血液。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述方法用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸,

其中用于检测EBV的所述第一靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括: (i) 一组引物, 其包含含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物, 以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针; 并且

其中用于检测EBV的所述第二靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括: (ii) 一组引物, 其包含含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物, 以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。

6. 根据权利要求4和5中任一项所述的方法, 其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

7. 一种用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸的方法, 所述方法包括:

(a) 提供样品;

(b) 执行扩增步骤, 所述扩增步骤包括使所述样品与至少两组引物接触以在所述样品中存在EBV的一种或多种靶核酸的时候产生扩增产物;

(c) 执行杂交步骤, 所述杂交步骤包括使在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核

酸的时候的所述扩增产物与至少两个探针接触;以及

(d) 执行检测步骤,所述检测步骤包括检测所述扩增产物的存在或不存在,其中所述扩增产物的存在指示所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸,并且其中所述扩增产物的不存在指示所述样品中不存在EBV的所述一种或多种靶核酸;并且

其中所述至少两组引物中的一组引物和所述至少两个探针中的一个探针用于检测EBV的所述第一靶核酸并且包括:

(i) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且

其中所述一组或多组引物中的一组引物和所述至少两个探针中的一个探针用于检测EBV的所述第二靶核酸并且包括:

(ii) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。

9. 根据权利要求7和8中任一项所述的方法,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

10. 根据权利要求7至9中任一项所述的方法,其中所述样品是生物学样品。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述生物学样品是血浆或血液。

12. 一种用于检测可能存在于样品中的EBV的一种或多种靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包含扩增试剂,所述扩增试剂包含:

(a) DNA聚合酶;

(b) 核苷酸单体;

(c) 一组或多组引物;和

(d) 一个或多个探针,

其中所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括:

(i) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;和/或

(ii) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其中所述一个或多个探针用供体荧光部分和对应的受体部分标记。

14. 根据权利要求12和13中任一项所述的试剂盒,其中所述试剂盒用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸,

其中用于检测EBV的所述第一靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括:

(i) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且

其中用于检测EBV的所述第二靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括:

(ii) 一组引物,其包含含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。

16. 根据权利要求14和15中任一项所述的方法,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

17. 一种用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包含扩增试剂,所述扩增试剂包含:

(a) DNA聚合酶;

(b) 核苷酸单体;

(c) 用于检测EBV的第一靶核酸的第一组引物和一个探针;和

(d) 用于检测EBV的第二靶核酸的第二组引物和一个探针,

其中所述第一组引物和一个探针用于检测EBV的所述第一靶核酸并且包括:含有SEQ ID NO:1的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且

其中所述第二组引物和一个探针用于检测EBV的所述第二靶核酸并且包括:含有SEQ ID NO:4的核酸序列或其互补序列的第一引物和含有SEQ ID NO:6的核酸序列或其互补序列的第二引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中所述探针用供体荧光部分和对应的受体部分标记。

19. 根据权利要求17和18中任一项所述的试剂盒,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。

20. 根据权利要求19所述的试剂盒,其中EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

用于检测爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开涉及体外诊断领域。在该领域内,本发明涉及使用引物和探针对可能存在于样品中的靶核酸的扩增和检测,特别是对爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 的包括序列变异和/或个体突变的靶核酸的扩增、检测和/或定量。本发明进一步提供了含有用于EBV的扩增和检测的引物和探针的反应混合物和试剂盒。

背景技术

[0002] 爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 是一种DNA病毒,是疱疹病毒群的成员(它的另一个名称是人类疱疹病毒4或HHV-4)。EBV感染很常见,估计成人患病率为90%,并且通常无症状。EBV感染可在其初始裂解期引起单核细胞增多症,然后进入几个潜伏期中的一个或多个潜伏期。EBV与免疫功能低下患者的危及生命的疾病和几种形式的癌症(包括伯基特淋巴瘤(BL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、鼻NK/T细胞淋巴瘤(NKTL)、淋巴上皮瘤样癌(LELC)、鼻咽癌(NPC)和胃癌(GC))高度相关。免疫抑制的移植患者处于特别危险的境地,因为EBV潜伏感染的B细胞不受控制的生长会导致严重的并发症,从而引发移植后淋巴组织增生性疾患(PTLD)。移植涉及排斥风险和由于免疫抑制引起的疾病风险之间的平衡。EBV是几种常见的(90%)通常无症状的病毒感染之一,但它对免疫抑制患者构成威胁,因为该病毒无法被消灭。PTLD是B淋巴细胞的增殖,主要与阳性EBV相关联(尤其是如果早发的话)。事实上,EBV是第二主要的移植后监测标志物(仅次于巨细胞病毒(CMV)),并且EBV相关联的PTLD是在实体器官或造血干细胞移植后最常见的恶性肿瘤之一。多达5%的移植患者会发展PTLD,其在最坏的情况下可引发淋巴瘤。最高风险组包括移植后第一年的患者、EBV阳性供体器官的EBV阴性受者、干细胞移植患者和儿科患者。

[0003] 可能会在血流中从血浆中的病毒颗粒和DNA片段以及细胞内的游离DNA病毒基因组和mRNA中检测到EBV。EBV的基因组大小为约172kb或更大(取决于内部重复数量和缺失),并且可以线性或环形(游离基因(episomal,附加体))结构存在。据报告,EBV遗传多样性通常包括文献中列出的两种类型,但病毒的实际多样性特征更为复杂,并且可能取决于对基因组的哪个部分进行采样。EBNA2和EBNA3A、B和C基因序列将EBV毒株分为传统的“1型”和“2型”类别。一般来说,1型在大多数地区更为常见,然而1型和2型两者在非洲都非常普遍。在这些基因之外,1型/2型差异的相关性较低,并且对于选定的基因,可能存在不同的系统发育型式。已经根据东亚EBV毒株与来自欧洲和非洲的EBV毒株之间的差异描述了地理变异,但是可能需要对多于一个基因区域进行采样以全面表征EBV基因组多样性。在病毒的历史中重组似乎很常见,这表明可能会发生单细胞的再感染或合并感染。本领域仍然需要可靠、灵敏和可再现的用于检测EBV的手段。

[0004] EBV病毒载量测量正成为管理移植受者以及诊断和跟踪EBV关联疾病的常规测试。在接受EBV病毒监测的患者中,连续DNA测量可用于指示潜在治疗变化的需要并评估病毒对治疗的应答。鉴于世界上EBV感染的普遍流行以及EBV中发生的频繁重组,本领域需要一种快速、可靠、具有特异性且灵敏的方法来检测样品中EBV的存在和/或对其进行定量。

发明内容

[0005] 在分子诊断领域,核酸的扩增和检测具有相当重要的意义。此类方法可用于检测任何数量的微生物,例如病毒和细菌。最突出和广泛使用的扩增技术是聚合酶链式反应(PCR)。其他扩增技术包括连接酶链反应、聚合酶连接酶链反应、Gap-LCR、修复链反应、3SR、NASBA、链置换扩增(SDA)、转录介导扩增(TMA)和 $Q\beta$ -扩增。用于基于PCR的分析的自动化系统通常应用在同一反应容器中的PCR过程中实时检测产物扩增。这种方法的关键是使用带有报告基团或标记的修饰寡核苷酸。

[0006] 本发明涉及可靠、灵敏和可再现的EBV扩增和检测。尽管EBV是一种DNA病毒,具有用于测定设计的多个保存良好的靶标区域,但未遇到的取代(substitutions,置换)或缺失的可能性意味着双靶标法是谨慎和明智的。引物和探针的设计使用可用的公共序列信息来最大化提高对EBV的包容性并排除其他疱疹病毒。

[0007] 本发明包括新的寡核苷酸设计,设计为最大限度地提高EBV的包容性并防止与其他模板的交叉反应性。该EBV测定可用于cobas® 6800/8800。本发明的引物和探针可用作双靶标测定,其中对两个靶标均使用相同的染料,以防止病毒序列异质性。设计策略是从EBV基因组中选择保守序列区域,并针对每个靶标评估几种引物和探针组合。从中选择测定设计的五个区域是IR-1重复、LMP2A、EBNA-1(BKRF-1)、BMRF-2和还原酶/BORF-2。序列包括1型和2型EBV两者,以及来自世界各地(包括亚洲、非洲、北美洲、南美洲、欧洲和澳大利亚)的序列。在筛选和优化过程之后,确定了两个候选物来自EBNA-1的最终外显子之外以及来自BMRF-2的编码序列内。这些候选物可以在双靶标测定中单独使用或一起双重使用。如果用作双靶标测定,则采用两组引物和探针(每组检测EBNA-1或BMRF-2)。

[0008] 本公开中的某些实施例涉及用于例如通过单个试管或容器中的实时聚合酶链式反应(PCR)进行EBV的多重检测和定量来快速检测生物学样品或非生物学样品中EBV的存在或不存在的方法。实施例包括检测EBV的方法,这些方法包括执行至少一个循环步骤,该至少一个循环步骤可包括扩增步骤和杂交步骤。此外,实施例包括被设计用于在单个试管或容器中检测EBV的引物、探针和试剂盒。

[0009] 本发明的一个方面涉及一种用于检测样品中爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)的一种或多种靶核酸的方法,所述方法包括:(a)提供样品;(b)执行扩增步骤,所述扩增步骤包括使所述样品与一组或多组引物接触以在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候产生扩增产物;(c)执行杂交步骤,所述杂交步骤包括使在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候的所述扩增产物与一个或多个(一种或多种)探针接触;以及(d)执行检测步骤,所述检测步骤包括检测所述扩增产物的存在或不存在,其中所述扩增产物的存在指示所述样品中EBV的所述一种或多种靶核酸的存在,并且其中所述扩增产物的不存在指示所述样品中EBV的所述一种或多种靶核酸的不存在;并且其中所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括:(i)含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;和/或(ii)含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在相关实施例中,所述样品是生物学样品。在相关实施例中,所述生物学样品是血浆。在相关实施例中,所述生物学样品是血液。在另一个实施例中,所述方法用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸,其中用于检测EBV的所述第一靶核酸的所述一组或多组

引物和所述一个或多个探针包括：(i) 含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且其中用于检测EBV的所述第二靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(ii) 含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

[0010] 另一方面涉及一种用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸的方法,所述方法包括：(a) 提供样品；(b) 执行扩增步骤,所述扩增步骤包括使所述样品与两组引物接触以在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候产生扩增产物；(c) 执行杂交步骤,所述杂交步骤包括使在所述样品中存在EBV的所述一种或多种靶核酸的时候的所述扩增产物与两个探针接触;以及(d) 执行检测步骤,所述检测步骤包括检测所述扩增产物的存在或不存在,其中所述扩增产物的存在指示所述样品中EBV的所述一种或多种靶核酸的存在,并且其中所述扩增产物的不存在指示所述样品中EBV的所述一种或多种靶核酸的不存在;并且其中用于检测EBV的所述第一靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(i) 含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且其中用于检测EBV的所述第二靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(ii) 含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。在另一个实施例中,所述样品是生物学样品。在另一个实施例中,所述生物学样品是血浆。在另一个实施例中,所述生物学样品是血液。

[0011] 本发明的另一方面涉及一种用于检测样品中可能存在的EBV的一种或多种靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包括扩增试剂,所述扩增试剂包括：(a) DNA聚合酶；(b) 核苷酸单体；(c) 一组或多组引物;以及(d) 一个或多个探针,其中所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(i) 含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;和/或(ii) 含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在另一个实施例中,所述一个或多个探针用供体荧光部分和对应的受体部分标记。在另一个实施例中,所述试剂盒用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸,其中用于检测EBV的所述第一靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(i) 含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针;并且其中用于检测EBV的所述第二靶核酸的所述一组或多组引物和所述一个或多个探针包括：(ii) 含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物,以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。在另一个实施例中,EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

[0012] 本发明的另一方面涉及一种用于检测样品中的EBV的第一靶核酸和EBV的第二靶核酸的试剂盒,所述试剂盒包括扩增试剂,所述扩增试剂包括：(a) DNA聚合酶；(b) 核苷酸单

体；(c) 用于检测EBV的第一靶核酸的第一组引物和一个探针；以及(d) 用于检测EBV的第二靶核酸的第二组引物和一个探针，其中用于检测EBV的第一靶核酸的一个第一组引物和一个探针包括：(i) 含有SEQ ID NO:1和3的核酸序列或其互补序列的一组引物，以及含有SEQ ID NO:2的核酸序列或其互补序列的探针；并且其中用于检测EBV的第二靶核酸的所述第二组引物和一个探针包括：(ii) 含有SEQ ID NO:4和6的核酸序列或其互补序列的一组引物，以及含有SEQ ID NO:3的核酸序列或其互补序列的探针。在另一个实施例中，所述探针用供体荧光部分和对应的受体部分标记。在另一个实施例中，EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不同。在另一个实施例中，EBV的所述第一靶核酸和EBV的所述第二靶核酸不重叠。

[0013] 其他方面提供了包含选自SEQ ID NO:1-6的核苷酸序列或其互补序列或由其组成的寡核苷酸，该寡核苷酸具有100个或更少的核苷酸。在另一个实施例中，本公开提供了一种寡核苷酸，所述寡核苷酸包括与SEQ ID NO:1-6中的一个或其互补序列具有至少70%序列同一性（例如，至少75%、80%、85%、90%或95%等）的核酸，该寡核苷酸具有100个或更少的核苷酸。一般来讲，在这些实施例中，这些寡核苷酸可以是引物核酸、探针核酸等。在这些实施例的某些实施例中，寡核苷酸具有40个或更少的核苷酸（例如，35个或更少的核苷酸、30个或更少的核苷酸、25个或更少的核苷酸、20个或更少的核苷酸、15个或更少的核苷酸等）。在一些实施例中，寡核苷酸包括至少一个（一种）经修饰的核苷酸，例如，以改变相对于未经修饰的核苷酸的核酸杂交稳定性。任选地，寡核苷酸包括至少一个标记和任选地至少一个淬灭剂部分。在一些实施例中，寡核苷酸包括至少一种保守修饰的变异。特定核酸序列的“保守修饰的变异”或简称为“保守变异”是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸，或者在核酸不编码氨基酸序列的情况下，是指基本上相同的序列。本领域技术人员将认识到，在编码的序列中改变、添加或缺失单个核苷酸或小百分比的核苷酸（通常小于5%，更通常小于4%、2%或1%）的个别取代、缺失或添加是“保守修饰的变异”，其中这些改变导致缺失氨基酸、添加氨基酸或用化学上类似的氨基酸取代氨基酸。

[0014] 一方面，扩增可以使用具有5'至3'核酸酶活性的聚合酶。因此，供体荧光部分和受体部分，例如淬灭剂，沿着探针的长度可以彼此相距不超过5至20个核苷酸（例如，在7或10个核苷酸内）。另一方面，探针包括允许二级结构形成的核酸序列。这种二级结构的形成可使得第一和第二荧光部分之间的空间接近。根据该方法，探针上的第二荧光部分可以是淬灭剂。

[0015] 本公开还提供了检测来自个体的生物样品中EBV或EBV核酸的存在或不存在的方法。这些方法可用于检测血浆中EBV核酸的存在或不存在，例如用于血液筛查和诊断测试。此外，本领域技术人员可使用相同的测试来评估尿液和其他样品类型，以检测EBV核酸和/或对其进行定量。此类方法通常包括进行至少一个循环步骤，该循环步骤包括扩增步骤和染料结合步骤。通常，如果核酸分子存在于样品中，则扩增步骤包括使样品与多对寡核苷酸引物接触以产生一种或多种扩增产物，并且染料结合步骤包括使扩增产物与双链DNA结合染料接触。此类方法还包括检测存在或不存在双链DNA结合染料结合到扩增产物中，其中存在结合指示样品中存在EBV核酸，并且其中不存在结合指示样品中不存在EBV核酸。代表性双链DNA结合染料是溴化乙锭。其他核酸结合染料包括DAPI、Hoechst染料、PicoGreen®、RiboGreen®、OliGreen® 和花青染料，例如YO-YO®和SYBR®

Green。此外,此类方法还可包括确定扩增产物和双链DNA结合染料之间的解链温度,其中解链温度证实EBV核酸的存在或不存在。

[0016] 在进一步的实施例中,提供了用于检测EBV的一种或多种核酸和/或对其进行定量的试剂盒。该试剂盒可包括:对扩增基因靶标具有特异性的一组或多组引物;和对检测扩增产物具有特异性的一个或多个(一种或多种)可检测寡核苷酸探针。

[0017] 在一个方面,该试剂盒可包括已经用供体和对应的受体部分(例如,另一种荧光部分或黑暗淬灭剂)标记的探针,或者可包括用于标记探针的荧光部分。该试剂盒还可包括核苷三磷酸、核酸聚合酶、和核酸聚合酶功能所需的缓冲液。该试剂盒还可包括使用引物、探针和荧光部分来检测样品中EBV核酸的存在或不存在的包装插页和说明。

[0018] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。尽管可在本主题的实践或测试中使用与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料,但下文描述了合适的方法和材料。另外,材料、方法和实例仅是说明性的,而不旨在限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文合并于本文。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0019] 本发明的一个或多个实施例的细节在附图和以下描述中阐述。本发明的其他特征、目的和优点将从附图和具体实施方式以及从权利要求中显而易见。

附图说明

[0020] 图1显示了EBV基因组结构。图1A显示了线性EBV基因组(裂解形式)的示意图。图1B显示了环形EBV基因组(潜在形式)的示意图。EBV是一种双链DNA病毒,它为约172kb和更大。存在:(i)大部分独特区域,(ii)内部重复区域(IR1-IR4),(iii)末端重复(TR),(iv) Ori P.,这是潜伏感染EBV游离基因复制的起源,具有质粒维持和DNA复制活性,以及(v)潜伏EBV诱导的膜蛋白和核蛋白的外显子。图1突出显示了EBV靶标BMRF2和EBNA1,它们可用作双靶标测定。

[0021] 图2显示了EBV靶标和EBNA1的寡核苷酸组,包括由引物生成并由探针检测的96碱基对扩增子。

[0022] 图3显示了EBV靶标和BMRF2的寡核苷酸组,包括由引物生成并由探针检测的98碱基对扩增子。

[0023] 图4A-C显示了在8IU/ml(图4C)、80IU/ml(图4B)和8,000IU/ml(图4A)下对Qnostics EBV Analytic Panel(Qnostics目录号EBVAQP03-C)与EBV的WHO Standard(NIBSC代码09/260)的测定的性能的稀释系列的PCR生长曲线。还测试了其他EBV样品类型,诸如提取的EBV DNA和掺入EBV阴性血浆中的Raji细胞系DNA(数据未显示)。

[0024] 图5A-5L显示了对细胞培养物衍生材料(从1E4 IU/mL到20IU/mL)(图5H-5L)和针对对照模板(从1E9 IU/mL到1E3 IU/mL)(图5A-5G)的多重测定的性能的稀释系列的PCR生长曲线。通道2显示了双靶标EBV测定,并且通道5是内部对照反应。

[0025] 图6A和图6B显示了EBNA1(图6A)和BMRF2(图6B)在含有单个靶标(E1c,B2c)或两个靶标(dC)的质粒模板以及B95-8细胞系提取物(含有EBV DNA的拷贝)上的单独反应的PCR生长曲线。这些研究表明,双靶标EBNA1和BMRF2 EBV测定是有效的,并且可以特异性地识别EBNA1和BMRF2 EBV核酸。

[0026] 图7显示了对基因型1细胞培养物衍生材料和针对对照模板的双靶标测定的线性数据。

[0027] 图8显示了对含有基因2型EBV的细胞培养物衍生材料的双靶标测定的线性数据。

具体实施方式

[0028] 通过核酸扩增诊断EBV感染提供了一种用于快速、准确、可靠、具有特异性且灵敏地检测EBV感染和/或对其进行定量的方法。本文描述了用于检测和/或定量非生物学样品或生物学样品中的EBV核酸(包括DNA和/或RNA)的实时PCR测定。提供了用于检测和/或定量EBV的引物和探针,以及含有此类引物和探针的制品或试剂盒。与其他方法相比,实时PCR检测EBV的特异性和灵敏度提高,而且实时PCR具有改进的特征,包括样品容纳以及扩增产物的实时检测和定量,使该技术在临床实验室中用于EBV感染的常规诊断的实施变得可行。此外,该技术还可用于血液筛查和预后。该EBV检测测定也可与其他测定并行地多重使用以检测其他核酸,例如,其他细菌和/或病毒。

[0029] 本公开包括寡核苷酸引物和荧光标记的水解探针,它们与EBV基因组杂交以使用例如TaqMan®扩增和检测技术特异性鉴定EBV。

[0030] 所公开的方法可包括进行至少一个循环步骤,该循环步骤包括使用一对或多对引物从样品扩增核酸分子基因靶标的一个或多个部分。如本文所用的“EBV引物”是指与在EBV基因组中发现的核酸序列特异性退火并在适当条件下从其启动DNA合成从而产生相应扩增产物的寡核苷酸引物。在EBV基因组中发现的核酸序列的实例包括EBV基因组的病毒衣壳蛋白区域(诸如VP2区域)内的核酸。所论述的每个EBV引物与靶标退火,使得每个扩增产物的至少一部分含有对应于靶标的核酸序列。如果样品中存在一种或多种核酸,则产生一种或多种扩增产物,因此一种或多种扩增产物的存在指示样品中存在EBV。扩增产物应含有与EBV的一个或多个(一种或多种)可检测探针互补的核酸序列。如本文所用的“EBV探针”是指与在EBV基因组中发现的核酸序列特异性退火的寡核苷酸探针。每个循环步骤包括扩增步骤、杂交步骤和检测步骤,其中使样品与一个或多个(一种或多种)可检测EBV探针接触以检测样品中EBV的存在或不存在。

[0031] 如本文所用,术语“扩增”是指合成与模板核酸分子(例如,来自EBV基因组的核酸分子)的一条或两条链互补的核酸分子的过程。扩增核酸分子通常包括使模板核酸变性,在低于引物解链温度的温度下使引物与模板核酸退火,以及从引物酶促延伸以生成扩增产物。扩增通常需要存在脱氧核糖核苷三磷酸、DNA聚合酶(例如,Platinum® Taq)和适当的缓冲液和/或聚合酶最佳活性的辅助因子(例如,MgCl₂和/或KCl)。

[0032] 本文所用术语“引物”为本领域的熟练专家所知,且指能够引发通过模板依赖性DNA聚合酶的DNA合成的寡聚化合物,主要指寡核苷酸,但也指经修饰的寡核苷酸,即例如引物的3'末端提供游离的3'-OH基团,另外“核苷酸”可以通过模板依赖性DNA聚合酶建立3'至5'磷酸二酯键与其连接,由此使用脱氧核糖核苷三磷酸且由此释放焦磷酸盐。

[0033] 术语“杂交”是指一种或多种探针与扩增产物的退火。“杂交条件”通常包括低于探针解链温度但避免探针非特异性杂交的温度。

[0034] 术语“5'至3'核酸酶活性”是指核酸聚合酶的通常与核酸链合成相关的活性,由此从核酸链的5'端去除核苷酸。

[0035] 术语“热稳定的聚合酶”是指热稳定的聚合酶,即为催化与模板互补的引物延伸产物的形成并且当处于升高的温度经历实现双链模板核酸变性所需的时间时没有不可逆地变性的酶。一般来讲,合成在每个引物的3'端起始,并且沿着模板链在5'至3'方向上进行。已经从黄栖热菌(*Thermus flavus*)、红栖热菌(*T. ruber*)、嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)、水生栖热菌(*T. aquaticus*)、乳栖热菌(*T. lacteus*)、红色栖热菌(*T. rubens*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和炽热甲烷嗜热菌(*Methanothermus fervidus*)分离热稳定聚合酶。然而,非热稳定的聚合酶也可用于PCR测定中,条件是补充该酶(如果必要)。

[0036] 术语“其互补序列”是指与给定核酸长度相同并且完全互补的核酸。

[0037] 当关于核酸使用时,术语“延伸”或“延长”是指将另外的核苷酸(或其他类似分子)掺入核酸中。例如,核酸任选地通过核苷酸掺入生物催化剂(诸如通常在核酸的3'末端添加核苷酸的聚合酶)延伸。

[0038] 如本文所用,术语“相同”或百分比“同一性”指在两个或更多核酸序列的背景下,当对最大对应性比较和对准(例如,使用熟练人员可用的序列比较算法或通过目测来测量)时,两个或更多序列或子序列是相同的或具有特定百分比的相同核苷酸。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的示例性算法是BLAST程序,其在例如以下中有描述:Altschul等人(1990)“Basic local alignment search tool”*J.Mol.Biol.*215:403-410,Gish等人(1993)“Identification of protein coding regions by database similarity search”*Nature Genet.*3:266-272,Madden等人(1996)“Applications of network BLAST server”*Meth.Enzymol.*266:131-141,Altschul等人(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”*Nucleic Acids Res.*25:3389-3402以及Zhang等人(1997)“PowerBLAST:A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation”*Genome Res.*7:649-656,这些文献各自以引用方式并入本文。

[0039] 在寡核苷酸的上下文中,“经修饰的核苷酸”是指其中寡核苷酸序列的至少一个核苷酸被为寡核苷酸提供所需性质的不同核苷酸替换的改变。可在本文所述的寡核苷酸中被取代的示例性经修饰的核苷酸包括例如叔丁基苄基、C5-甲基-dC、C5-乙基-dC、C5-甲基-dU、C5-乙基-dU、2,6-二氨基嘌呤、C5-丙炔基-dC、C5-丙炔基-dU、C7-丙炔基-dA、C7-丙炔基-dG、C5-炔丙基氨基-dC、C5-炔丙基氨基-dU、C7-炔丙基氨基-dA、C7-炔丙基氨基-dG、7-脱氮-2-脱氧-黄苷、吡唑并嘧啶类似物、假-dU、硝基吡咯、硝基咪唑、2'-0-甲基核糖-U、2'-0-甲基核糖-C、N4-乙基-dC、N6-甲基-dA、5-丙炔基dU、5-丙炔基dC、7-脱氮-脱氧鸟苷(脱氮G(u-脱氮))等。可在寡核苷酸中被取代的许多其他经修饰的核苷酸在本文中提及或在本领域中另外已知。在某些实施例中,经修饰的核苷酸取代相对于相应的未经修饰的寡核苷酸的解链温度修饰寡核苷酸的解链温度(T_m)。为了进一步说明,在一些实施例中,某些经修饰的核苷酸取代可以减少非特异性核酸扩增(例如,最小化引物二聚体的形成等)、增加预期靶标扩增子的产率等。这些类型的核酸修饰的实例描述于例如美国专利号6,001,611,其通过引用并入本文。其他修饰的核苷酸取代可以改变寡核苷酸的稳定性,或提供其他所需的特征。

[0040] EBV靶标核酸的检测/定量

[0041] 本公开提供了通过扩增例如EBV核酸序列的一部分来检测EBV的方法。具体地,通过本公开的实施例提供了用于扩增和检测/或定量EBV核酸分子靶标的引物和探针。

[0042] 为了检测和/或定量EBV,提供了用于扩增和检测/定量EBV的引物和探针。除了本文列举的那些核酸之外的EBV核酸也可用于检测样品中的EBV。例如,本领域技术人员可使用常规方法来评价功能性变体的特异性和/或灵敏度。代表性功能变体可包括例如本文所公开的EBV核酸中的一个或多个缺失、插入和/或取代。

[0043] 更具体地,寡核苷酸的实施例各自包括具有选自SEQ ID NO:1-6、其基本上相同的变体的序列的核酸,其中该变体与SEQ ID NO:1-6中的一者或SEQ ID NO:1-6和变体的互补序列具有至少例如80%、90%或95%的序列同一性。

寡核苷酸名称	寡核苷酸类型	SEQ ID NO:	序列	修饰
BMFR2 #60				
EBVBMR F2F1181	正向引物	1	CATCTGTTGTGGTATATTTCTCK	K: 叔丁基苄基-dC
EBVBMR F2P1222	探针	2	<FAM_Thr>CTGGGCQAAGACCGTGCTGTTTATCTCAATCTT<Phos>	Q: BHQ-2
EBVBMR F2R1278	反向引物	3	CGTACCCCGCTAAAGTAJ	J: 叔丁基苄基-dA
EBNA1 #77				
EBVEBN A1F3127	正向引物	4	GCGTTGGAAAACATTAGCGAK	K: 叔丁基苄基-dC
EBVEBN A1P3150	探针	5	<FAM_Thr>TTACCTQGGTGAGCAATCAGACATGCGACGG<Phos>	Q: BHQ-2
EBVEBN A1R3222	反向引物	6	GTTGCTCCCATCTTAGGTGAJ	J: 叔丁基苄基-dA

[0044] 表1:EBV测试中的寡核苷酸

[0045] 在一个实施例中,使用上述EBV引物和探针组以便提供检测疑似含有EBV的生物学样品中的EBV(表1)。引物和探针组可包括对EBV核酸序列具有特异性的引物和探针或者由这些引物和探针组成,这些引物和探针含有SEQ ID NO:1-6的核酸序列或者由这些核酸序列组成。在另一个实施例中,EBV靶标的引物和探针含有SEQ ID NO:1-6的任何引物和探针的功能活性变体或者由该功能活性变体组成。

[0046] 可通过在所公开的方法中使用引物和/或探针来鉴定SEQ ID NO:1-6的任何引物和/或探针的功能活性变体。SEQ ID NO:1-6中任一者的引物和/或探针的功能活性变体涉及与SEQ ID NO:1-6的相应序列相比在所描述的方法或试剂盒中提供相似或更高特异性和灵敏度的引物和/或探针。

[0047] 变体可例如由于一个或多个核苷酸添加、缺失或取代(诸如SEQ ID NO:1-6的相应序列的5'端和/或3'端的一个或多个核苷酸添加、缺失或取代)而与SEQ ID NO:1-6的序列不同。如上所述,引物和/或探针可以是经化学修饰的,即引物和/或探针可包括经修饰的核苷酸或非核苷酸化合物。探针(或引物)则是经修饰的寡核苷酸。“经修饰的核苷酸”(或“核苷酸类似物”)与天然“核苷酸”的不同之处在于一些修饰,但仍由碱基或碱基样化合物、戊

呋喃糖基糖或戊呋喃糖基糖样化合物、磷酸部分或磷酸样部分或它们的组合组成。例如,可将“标记”附接到“核苷酸”的碱基部分,由此获得“经修饰的核苷酸”。“核苷酸”中的天然碱基也可被例如7-脱氮嘌呤替换,由此也获得“经修饰的核苷酸”。术语“经修饰的核苷酸”或“核苷酸类似物”在本申请中可互换使用。“经修饰的核苷” (或“核苷类似物”) 与天然核苷的不同之处在于以如上文针对“经修饰的核苷酸” (或“核苷酸类似物”) 概述的方式进行的一些修饰。

[0049] 可使用例如计算机程序诸如OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.) 来设计扩增编码EBV靶标的核酸分子 (例如, 编码EBV的替代部分的核酸) 的寡核苷酸, 包括经修饰的寡核苷酸和寡核苷酸类似物。当设计用作扩增引物的寡核苷酸时, 重要特征包括但不限于适当大小的扩增产物以便于检测 (例如, 通过电泳)、一对引物的成员的相似解链温度以及每个引物的长度 (即, 引物需要足够长以与序列特异性退火并启动合成, 但不能太长以至于在寡核苷酸合成期间保真度降低)。通常, 寡核苷酸引物的长度为8至50个核苷酸 (例如, 长度为8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48或50个核苷酸)。

[0050] 除了一组引物之外, 这些方法还可使用一个或多个探针以便检测EBV的存在或不存在。术语“探针”是指合成或生物产生的核酸 (DNA或RNA), 其通过设计或选择而包含特定核苷酸序列, 允许它们在定义的预定严格性下特异性 (即优先性地) 杂交到“靶标核酸”, 在本例中为EBV (靶标) 核酸。“探针”可被称为“检测探针”, 意指其检测靶核酸。

[0051] 在一些实施例中, 所述EBV探针可用至少一种荧光标记物进行标记。在一个实施例中, EBV探针可用供体荧光部分 (例如, 荧光染料) 和对应的受体部分 (例如, 淬灭剂) 标记。在一个实施例中, 探针包括荧光部分或由其组成, 并且核酸序列含有SEQ ID NO:2和/或5或由其组成。

[0052] 设计用作探针的寡核苷酸可以类似于引物设计的方式进行。实施例可使用单个探针或一对探针来检测扩增产物。根据实施例, 所用的探针可包括至少一个标记和/或至少一个淬灭剂部分。与引物一样, 探针通常具有相似的解链温度, 并且每个探针的长度必须足以发生序列特异性杂交, 但不能太长以至于在合成过程中保真度降低。寡核苷酸探针的长度通常为15至40 (例如, 16、18、20、21、22、23、24或25) 个核苷酸。

[0053] 构建体可包括载体, 每个载体包含EBV引物和探针核酸分子中 (例如, SEQ ID NO: 1、2、3、4和5) 的一者。构建体可用作例如对照模板核酸分子。适用的载体是市售的和/或通过本领域常规的重组核酸技术方法产生的。EBV核酸分子可例如通过化学合成、从EBV直接克隆或通过核酸扩增获得。

[0054] 除了EBV核酸分子 (例如, 包含SEQ ID NO:1-6中的一个或多个序列的核酸分子) 之外, 适用于所述方法的构建体通常还包括编码用于选择所需构建体和/或转化体的可选择标志物 (例如, 抗生素抗性基因) 的序列以及复制起点。载体系统的选择通常取决于若干因素, 包括但不限于宿主细胞的选择、复制效率、选择性、诱导性和回收的容易性。

[0055] 包含EBV核酸分子的构建体可在宿主细胞中繁殖。如本文所用, 术语宿主细胞意在包括原核生物和真核生物, 诸如酵母、植物和动物细胞。原核宿主可包括大肠杆菌 (*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。真核宿主包括酵母 (诸如酿酒酵母

(*S.cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S.pombe*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、哺乳动物细胞(诸如COS细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)、昆虫细胞和植物细胞(诸如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*))。可使用本领域普通技术人员公知的任何技术将构建体引入宿主细胞中。例如,磷酸钙沉淀、电穿孔、热激、脂质转染、显微注射和病毒介导的核酸转移是将核酸引入宿主细胞中的常用方法。另外,可将裸DNA直接递送到细胞(参见例加美国专利号5,580,859和5,589,466)。

[0056] 聚合酶链反应(PCR)

[0057] 美国专利号4,683,202、4,683,195、4,800,159和4,965,188公开了常规的PCR技术。PCR通常采用两个寡核苷酸引物,其与所选核酸模板(例如DNA或RNA)结合。在一些实施例中,有用的引物包括能够充当所述EBV核酸序列(例如,SEQ ID NO:1、3、4和6)内的核酸合成起始点的寡核苷酸。引物可通过常规方法从限制性消化物中纯化,或其可合成产生。引物优选地是单链的,以获得最大的扩增效率,但引物可以是双链的。首先将双链引物变性即处理以分离链。一种使双链核酸变性的方法是通过加热。

[0058] 如果模板核酸是双链的,则必须在其可用作PCR中的模板前分离两条链。链分离可通过任何合适的变性方法完成,包括物理、化学或酶促方式。分离核酸链的一种方法涉及加热核酸直至它多数变性(例如,大于50%、60%、70%、80%、90%或95%变性)。用于使模板核酸变性必需的加热条件将取决于例如缓冲液盐浓度以及变性核酸的长度和核苷酸组成,但通常范围在约90℃至约105℃,持续取决于反应特征(诸如温度和核酸长度)的一段时间。变性通常进行约30秒至4分钟(例如,1分钟至2分钟30秒、或1.5分钟)。

[0059] 如果双链模板核酸通过加热变性,则允许反应混合物冷却至促进每个引物退火至其靶标序列的温度。退火温度通常为约35℃至约65℃(例如,约40℃至约60℃;约45℃至约50℃)。退火时间可为约10秒至约1分钟(例如,约20秒至约50秒;约30秒至约40秒)。然后将反应混合物调整至聚合酶的活性得到促进或最佳化的温度,即足以使延伸从退火引物发生,以生成与模板核酸互补的产物的温度。温度应足以从退火至核酸模板的每个引物合成延伸产物,但不应如此高,以使延伸产物变性脱离其互补模板(例如用于延伸的温度通常范围为约40℃至约80℃(例如约50℃至约70℃;约60℃))。延伸时间可为约10秒至约5分钟(例如,约30秒至约4分钟;约1分钟至约3分钟;约1分钟30秒至约2分钟)。

[0060] 逆转录病毒或RNA病毒的基因组,或由DNA病毒(诸如EBV)产生的mRNA,由核糖核酸即RNA组成。在这种情况下,模板核酸RNA必须首先经由逆转录酶的作用转录成互补DNA(cDNA)。逆转录酶使用RNA模板和与RNA的3'端互补的短引物来指导第一链cDNA的合成,其然后可直接用作聚合酶链式反应的模板。

[0061] PCR测定可采用EBV核酸诸如RNA或DNA(cDNA)。模板核酸不需要纯化;其可以是复杂混合物的一小部分,诸如人类细胞中包含的EBV核酸。EBV核酸分子可通过常规技术从生物学样品中提取,所述常规技术诸如Diagnostic Molecular Microbiology:Principles and Applications(Persing等人(编),1993,American Society for Microbiology, Washington D.C.)中所描述的那些技术。核酸可以从许多来源获得,例如质粒,或天然来源,包括细菌、酵母、病毒、细胞器或高等生物,例如植物或动物。

[0062] 寡核苷酸引物(例如,SEQ ID NO:1、2、4和5)在诱导引物延伸的反应条件下与PCR试剂组合。例如,链延伸反应通常包括50mM KCl、10mM Tris-HCl(pH 8.3)、15mM MgCl₂、

0.001% (w/v) 明胶、0.5-1.0 μ g 变性模板DNA、每个寡核苷酸引物50pmol、2.5U Taq聚合酶和10% DMSO)。反应通常包含150至320 μ M dATP、dCTP、dTTP、dGTP中的每一种或者其一种或多种类似物。

[0063] 新合成的链形成可用于后续反应步骤的双链分子。链分离、退火和伸长步骤可根据需要重复多次,以产生所需数量的与靶标EBV核酸分子相对应的扩增产物。反应中的限制因素是反应中存在的引物、热稳定酶和三磷酸核苷的量。循环步骤(即变性、退火和延伸)优先重复至少一次。对于在检测中的使用,循环步骤的数目将取决于例如样品的性质。如果样品是核酸的复杂混合物,则将需要更多的循环步骤来扩增足以进行检测的靶序列。通常,重复循环步骤至少约20次,但可重复多达40、60次或甚至100次。

[0064] 荧光共振能量转移(FRET)

[0065] FRET技术(例如,参见美国专利号4,996,143、5,565,322、5,849,489和6,162,603)基于这样一个概念:当供体荧光部分和相应的受体荧光部分位于彼此相距一定距离内时,能量转移发生在两个荧光部分之间,这可以可视化或以其他方式检测和/或定量。当供体被合适波长的光辐射激发时,供体通常将能量转移到受体。受体通常以不同波长的光辐射形式重新发射转移的能量。在某些系统中,非荧光能量可以通过包括基本上非荧光供体部分的生物分子在供体和受体部分之间转移(参见,例如,美国专利第7,741,467号)。

[0066] 在一个实例中,寡核苷酸探针可以包含供体荧光部分或染料(例如,HEX或FAM)和相应的淬灭剂(例如,BlackHole QuencherTM(BHQ)(例如BHQ-2)),其可以是也可以不是荧光的,并以光以外的形式耗散传递的能量。当探针完整时,能量转移通常发生在供体与受体部分之间,使得来自供体荧光部分的荧光发射被受体部分淬灭。在聚合酶链式反应的延伸步骤期间,结合至扩增产物的探针由例如Taq聚合酶的5'至3'核酸酶活性切割,使得供体荧光部分的荧光发射不再淬灭。为此目的的示例性探针在例加美国专利号5,210,015、5,994,056和6,171,785中有所描述。常用的供体-受体对包括FAM-TAMRA对。常用的淬灭剂是DABCYL和TAMRA。常用的暗淬灭剂包括BlackHole QuenchersTM(BHQ)(例如BHQ2)(Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.)、Iowa BlackTM(Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa)和BlackBerryTM Quencher 650(BBQ-650)(Berry & Assoc., Dexter, Mich.)。

[0067] 在另一个实例中,两个寡核苷酸探针(各自包含荧光部分)可在由寡核苷酸探针与EBV靶核酸序列的互补性决定的特定位置与扩增产物杂交。当寡核苷酸探针与扩增产物核酸在适当位置杂交时,生成FRET信号。杂交温度可在约35 $^{\circ}$ C至约65 $^{\circ}$ C的范围内,持续约10秒至约1分钟。

[0068] 可使用例如光子计数落射荧光显微镜系统(包含适当的分色镜和用于监测特定范围的荧光发射的滤光器)、光子计数光电倍增器系统或荧光计来进行荧光分析。可以使用氩离子激光器、高强度汞(Hg)弧光灯、氙气灯、光纤光源或其他适当过滤以在所需范围内激发的高强度光源进行激发,以启动能量转移或允许直接检测荧光团。

[0069] 如本文关于供体和对应的受体部分所用,“对应的”是指具有与供体荧光部分的发射光谱重叠的吸收光谱的受体荧光部分或黑暗淬灭剂。受体荧光部分的发射光谱的最大波长应比供体荧光部分的激发光谱的最大波长大至少100nm。因此,在它们之间可产生有效的非辐射能量转移。

[0070] 通常选择荧光供体和相应的受体部分用于 (a) 高效Foerster能量转移; (b) 大的最终斯托克斯位移 (>100nm); (c) 将发射尽可能迁移到可见光谱的红色部分 (>600nm) 中; (d) 将发射迁移至比在供体激发波长激发产生的拉曼水荧光发射更高的波长。例如, 可选择以下供体荧光部分: 其在激光线 (例如, 氩-镉442nm或氩488nm) 附近具有其激发最大值, 具有高消光系数、高量子产率, 并且其荧光发射与对应的受体荧光部分的激发光谱良好重叠。可选择以下相应的受体荧光部分: 其具有高消光系数、高量子产率, 其发射与供体荧光部分的发射良好重叠, 并且在可见光谱的红色部分 (>600nm) 中发射。

[0071] 在FRET技术中可与各种受体荧光部分一起使用的代表性供体荧光部分包括荧光素、Lucifer Yellow、B-藻红蛋白、9-吡啶异硫氰酸酯、Lucifer Yellow VS、4-乙酰氨基-4'-异硫基-氰酰二苯乙烯基-2,2'-二磺酸、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫基氰酰苯基)-4-甲基香豆素、1-茈丁酸琥珀酰亚胺酯和4-乙酰氨基-4'-异硫基氰酰二苯乙烯基-2,2'-二磺酸衍生物。代表性受体荧光部分, 取决于所用的供体荧光部分, 包括LC Red 640、LC Red 705、Cy5、Cy5.5、丽丝胺罗丹明B磺酰氯、四甲基罗丹明异硫氰酸酯、罗丹明x异硫氰酸酯、异硫氰酸赤藓红、荧光素、二亚乙基三胺五乙酸盐或其他镧系离子的螯合物 (例如铈或铽)。供体和受体荧光部分可例如从Molecular Probes (Junction City, Oreg.) 或Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) 获得。

[0072] 供体和受体荧光部分可经由连接臂附接到合适的探针寡核苷酸。每个连接臂的长度很重要, 因为连接臂将影响供体与受体荧光部分之间的距离。连接臂的长度可为从核苷酸碱基到荧光部分的距离 (以埃(Å)表示)。一般来讲, 连接臂为约10Å至约25Å。连接臂可以是WO 84/03285中所述的种类。WO 84/03285还公开用于将连接臂附接到特定核苷酸碱基以及用于将荧光部分附接到连接臂的方法。

[0073] 受体荧光部分, 例如LC Red 640, 可以与包含氨基连接基的寡核苷酸 (例如, 可从ABI (Foster City, Calif.) 或Glen Research (Sterling, VA) 获得的C6-氨基亚磷酰胺) 组合以生产, 例如LC Red 640标记的寡核苷酸。经常使用的将供体荧光部分 (诸如荧光素) 偶联到寡核苷酸的连接基包括硫脲连接基 (FITC-衍生的, 例如来自Glen Research或ChemGene (Ashland, Mass.) 的荧光素-CPG')、酰胺连接基 (荧光素-NHS-酯衍生的, 诸如来自BioGenex (San Ramon, Calif.) 的CX-荧光素-CPG) 或需要在寡核苷酸合成后偶联荧光素-NHS-酯的3'-氨基-CPG。

[0074] EBV扩增产物 (扩增子) 的检测

[0075] 本公开提供了用于检测生物学样品或非生物学样品中EBV的存在或不存在的方法。所提供的方法避免了样品污染、假阴性和假阳性的问题。该方法包括执行至少一个循环步骤和FRET检测步骤, 该循环步骤包括使用一对或多对EBV引物从样品扩增EBV靶核酸分子的一部分。优选地在热循环仪中进行多个循环步骤。所述方法可使用检测EBV的存在的引物和探针来执行, 并且检测到EBV指示样品中存在EBV。

[0076] 如本文所述, 可使用利用FRET技术的标记的杂交探针来检测扩增产物。一种FRET形式利用TaqMan®技术来检测扩增产物的存在或不存在, 并且因此检测EBV的存在或不存在。TaqMan®技术使用一种单链杂交探针, 其标记有例如一种荧光部分或染料 (例如HEX或FAM) 和一种淬灭剂 (例如BHQ-2), 其可以是也可以不是荧光的。当用合适波长的光激

发第一荧光部分时,吸收的能量根据FRET原理转移到第二荧光部分或黑暗淬灭剂。第二部分通常是淬灭剂分子。在PCR反应的退火步骤中,标记的杂交探针与靶标DNA(即扩增产物)结合,并在随后的延伸阶段被例如Taq聚合酶的5'至3'核酸酶活性降解。因此,荧光部分和淬灭剂部分变得彼此空间上分离。因此,在不存在淬灭剂的情况下激发第一荧光部分后,可检测到来自第一荧光部分的荧光发射。举例来说,ABI PRISM®7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems)使用TaqMan®技术,并且适用于执行本文所述的用于检测样品中EBV的存在或不存在的方法。

[0077] 也可使用与FRET结合的分子信标来使用实时PCR方法检测扩增产物的存在。分子信标技术使用第一荧光部分和第二荧光部分标记的杂交探针。第二荧光部分一般是淬灭剂,并且荧光标记通常位于探针的每个端部。分子信标技术使用具有允许二级结构形成(例如发夹)的序列的探针寡核苷酸。作为在探针内形成二级结构的结果,当探针在溶液中时,两个荧光部分空间接近。在与靶核酸(即,扩增产物)杂交后,探针的二级结构被破坏并且荧光部分变得彼此分离,使得在用合适波长的光激发后,可检测到第一荧光部分的发射。

[0078] 另一种常见形式的FRET技术利用两种杂交探针。每种探针可用不同的荧光部分标记,并且通常被设计成在靶DNA分子(例如,扩增产物)中彼此非常接近地杂交。供体荧光部分(例如荧光素)由LightCycler®仪器的光源在470nm下激发。在FRET期间,荧光素将其能量转移到受体荧光部分,诸如LightCycler®-Red640(LC Red 640)或LightCycler®-Red705(LC Red 705)。然后,受体荧光部分发射较长波长的光,该光被LightCycler®仪器的光学检测体系检测到。只有当荧光部分直接局部接近,并且当供体荧光部分的发射光谱与受体荧光部分的吸收光谱重叠时,有效的FRET才发生。发射信号的强度可与原始靶DNA分子的数量(例如,EBV基因组的数量)相关。如果EBV靶核酸发生扩增并产生扩增产物,则杂交步骤产生基于探针对成员之间的FRET的可检测信号。

[0079] 通常,FRET的存在指示样品中存在EBV,并且FRET的不存在指示样品中不存在EBV。然而,标本采集不足、运输延迟、运输条件不当或使用某些采集拭子(藻酸钙或铝杆)都是会影响测试结果的成功和/或准确性的条件。

[0080] 可用于实施该方法的代表性生物学样品包括但不限于全血、呼吸道标本、尿液、粪便标本、血液标本、血浆、皮肤拭子、鼻拭子、伤口拭子、血培养物、皮肤、和软组织感染。生物样品的收集和储存方法是本领域技术人员已知的。可对生物学样品进行处理(例如,通过本领域已知的核酸提取方法和/或试剂盒)以释放EBV核酸,或者在一些情况下,可使生物学样品直接与PCR反应组分和适当的寡核苷酸接触。在一些例子中,生物学样品是全血。通常收集全血时,经常将其收集在含有抗凝剂(例如肝素、柠檬酸盐或EDTA)的容器中,这样可以将全血储存在合适的温度。然而,在这种情况下,全血中的核酸会发生大量降解。因此,将血液收集在将溶解、变性和稳定全血组分(包括核酸)的试剂中可能是有利的,例如核酸稳定溶液。在这种情况下,可以更好地保存和稳定核酸以用于后续的分离和分析,例如通过核酸测试,例如PCR。此类核酸稳定溶液是本领域众所周知的,包括但不限于,cobas PCR培养基,其包含4.2M胍盐(GuHCl)和50mM Tris,pH为7.5。

[0081] 样品可以通过任何设计用于在分析前充分保持和储存样品的方法或设备来收集。此类方法和设备在本技术领域是众所周知的。在样品是生物学样品例如全血的情况下,

该方法或装置可以包括血液收集容器。这种血液收集容器在本领域中是众所周知的,并且可以包括例如血液收集管。在许多情况下,使用这样的血液收集管可能是有利的,其中血液收集管在用于样品摄取的空间中处于压力之下,例如具有真空室的血液容器,例如真空血液收集管。这种具有真空室的血液收集管,例如真空血液收集管在本领域中是众所周知的。将血液收集在具有或不具有真空室的血液收集容器中可能是进一步有利的,该容器包含将溶解、变性和稳定全血组分(包括核酸)的溶液,例如核酸-稳定溶液,使得被抽取的全血立即接触血液收集容器中的核酸稳定溶液。

[0082] 解链曲线分析是可包括在循环曲线中的附加步骤。解链曲线分析基于DNA在称为解链温度(T_m)的特征温度下解链的事实,该解链温度被定义为一半DNA双链体分离成单链时的温度。DNA的解链温度主要取决于其核苷酸组成。因此,富含G和C核苷酸的DNA分子具有丰富的A和T核苷酸的DNA分子具有更高的 T_m 。通过检测信号丢失时的温度,可确定探针的解链温度。类似地,通过检测生成信号时的温度,可确定探针的退火温度。来自EBV扩增产物的EBV探针的解链温度可证实样品中存在或不存在EBV。

[0083] 在每个热循环仪运行中,也可循环对样品。阳性对照样品可使用例如对照引物和对照探针扩增靶核酸对照模板(除了所描述的靶基因扩增产物之外)。阳性对照样品也可扩增例如含有靶核酸分子的质粒构建体。此类质粒对照可在内部(例如,在样品内)扩增,或在与患者样品并排运行的单独样品中使用与用于检测预期靶标的相同的引物和探针进行扩增。此类对照是扩增、杂交和/或FRET反应的成功或失败的指标。每个热循环仪运行还可包括例如缺乏靶模板DNA的阴性对照。阴性对照可测量污染。这确保了系统和试剂不会产生假阳性信号。因此,对照反应可以容易地确定例如引物以序列特异性退火并启动延伸的能力,以及探针以序列特异性杂交并发生FRET的能力。

[0084] 在一个实施例中,所述方法包括避免污染的步骤。例如,美国专利号5,035,996、5,683,896和5,945,313中描述了一种利用尿嘧啶-DNA糖基化酶的酶促方法,以减少或消除一次热循环仪运行和下一次运行之间的污染。

[0085] 可使用与FRET技术结合的常规PCR方法来实践所述方法。在一个实施例中,使用LightCycler®仪器。以下专利申请描述了如LightCycler®技术中使用的实时PCR:WO 97/46707、WO 97/46714和WO 97/46712。

[0086] LightCycler®可使用PC工作站进行操作。当机器将毛细管按顺序定位在光学单元上时,获得来自样品的信号。软件可在每次测量后立即实时显示荧光信号。荧光采集时间为10-100毫秒(msec)。在每个循环步骤之后,可连续更新所有样品的荧光与循环数的定量显示。可存储所生成的数据以进行进一步分析。

[0087] LightCycler® 480II Real-Time PCR System也可使用PC工作站进行操作。该仪器具有热量变化循环仪,并且加热和冷却是使用Peltier元件实现的。来自样品的荧光信号是从96孔板使用发射宽光谱的光的高强度氙灯获得的。用于特定激发和发射的内置过滤器的灵活组合允许使用各种荧光染料和检测格式。该软件可显示荧光信号并计算CT值,并且生成的数据可被存储以供进一步分析。

[0088] 作为FRET的替代方案,可使用双链DNA结合染料诸如荧光DNA结合染料(例如SYBR® Green或SYBR® Gold(分子探针))来检测扩增产物。在与双链核酸相互作用时,

此类荧光DNA结合染料在用合适波长的光激发后发射荧光信号。还可使用双链DNA结合染料,诸如核酸嵌入染料。当使用双链DNA结合染料时,通常进行解链曲线分析以证实扩增产物的存在。

[0089] 本领域技术人员会理解,也可以采用其他核酸或信号放大方法。此类方法的实例包括但不限于分支DNA信号扩增、环介导等温扩增(LAMP)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、自持序列复制(3SR)、链置换扩增(SDA)或智能放大过程版本2(SMAP 2)。

[0090] 应当理解,本公开的实施例不受一种或多种市售仪器的配置的限制。

[0091] 制品/试剂盒

[0092] 本公开的实施例还提供了用于检测EBV的制品或试剂盒。制品可包括用于检测EBV基因靶标的引物和探针,以及合适的包装材料。用于检测EBV的代表性引物和探针能够与EBV靶核酸分子杂交。另外,试剂盒还可包括DNA固定、杂交和检测所需的适当包装的试剂和材料,诸如固体支持物、缓冲液、酶和DNA标准品。本文公开了设计引物和探针的方法,并且提供了扩增EBV靶核酸分子并与之杂交的引物和探针的代表性实例。

[0093] 制品还可包括用于标记探针的一个或多个荧光部分,或者,可替代地,与试剂盒一起提供的探针可被标记。例如,制品可包括用于标记EBV探针的供体和/或受体荧光部分。上文提供了合适的FRET供体荧光部分和相应的受体荧光部分的示例。

[0094] 制品还可包含包装说明书或包装标记,其上具有使用EBV引物和探针来检测样品中的EBV的说明。制品可另外包括用于实施本文公开的方法的试剂(例如,缓冲液、聚合酶、辅因子、或防止污染的试剂)。此类试剂可专用于本文所述的市售仪器中的一种。

[0095] 本公开的实施例还提供了用于检测样品中的EBV的一组引物和一个或多个可检测探针。

[0096] 本公开的实施例将在以下实例中进一步描述,这些实例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0097] 实例

[0098] 提供以下实例和附图以帮助理解本发明,本主题的真正范围在所附权利要求书中阐明。应当理解,在不脱离本发明的精神的情况下,可对所阐述的程序进行修改。

[0099] 该测试是全自动样品制备(核酸提取和纯化),然后是PCR扩增和检测。使用的系统是cobas® 6800/8800System,它由样品供应模块、转移模块、处理模块和分析模块组成。自动化数据管理由cobas® 6800/8800System执行。

[0100] 预混液包含对EBV和对照核酸具有特异性的检测探针。特异性EBV和对照检测探针各自用充当报告物的两种独特荧光染料中的一种荧光染料进行标记。每个探针还具有充当猝灭剂的第二染料。报告物染料在定义的波长下测量,从而允许检测和区分扩增的EBV靶标和对照物。完整探针的荧光信号被猝灭剂染料抑制。在PCR扩增步骤期间,探针与特异性单链DNA模板的杂交导致DNA聚合酶的5'到3'核酸酶活性的切割,从而导致报告物染料和猝灭剂染料分离,并生成荧光信号。随着每个PCR循环,生成越来越多数量的经切割的探针,并且报告物染料的累积信号也随之增加。因为这两种特异性报告物染料是在定义的波长下测量的,所以可同时检测和区分扩增的EBV靶标和对照物。

[0101] 用于EBV测试的引物和探针是通过基于比对在最保守的区域中沿基因组播种引物和探针来设计的。一组寡核苷酸(SEQ ID NO:1-3)设计用于检测EBV基因组的BMRF2区域。另

一组寡核苷酸 (SEQ ID NO:4-6) 设计用于检测EBV基因组的EBNA1区域。每组寡核苷酸 (或引物/探针) 都可在其自己的反应中以单重方式使用, 以扩增和检测特定的感兴趣靶标区域 (即BMRF2和EBNA1)。然而, 该组寡核苷酸也可在双靶标测定中组合, 由此在单个实时PCR反应中, BMRF2和EBNA1两者都在样品中被扩增并被检测到, 因为反应混合物包含两组寡核苷酸 (SEQ ID NO:1-3和SEQ ID NO:4-6)。对于对BMRF2区域的检测, 正向引物对应于核酸序列SEQ ID NO:1, 反向引物对应于核酸序列SEQ ID NO:3, 并且探针对应于核酸序列SEQ ID NO:2。对于对EBNA1区域的检测, 正向引物对应于核酸序列SEQ ID NO:4, 反向引物对应于核酸序列SEQ ID NO:6, 并且探针对应于核酸序列SEQ ID NO:5。这些寡核苷酸可用于检测EBV的BMRF2区域 (使用SEQ ID NO:1-3) 和检测EBV的EBNA1区域 (使用SEQ ID NO:4-6) 的单独测定中。可替代地, 寡核苷酸可用于双靶标测定中, 其中寡核苷酸 (SEQ ID NO:1-6) 同时检测相同样品内EBV的BMRF2区域和EBNA1区域。双靶标测定具有某些优势, 其在于在一个或多个靶标区域包含错配或某种错误的情况下, 或者如果其中一个反应出现错误, 则存在可能出现的另一个靶标和另一个反应。

[0102] 实例1: 用于通过实时PCR检测EBV的引物和探针的设计

[0103] EBV核酸测试的设计考虑了两个靶标。选择的两个靶标是BMRF2和EBNA1并在图1中显示。这些候选物可以在双靶标测定中单独使用或一起双重使用。如果用作双靶标测定, 则采用两组引物和探针 (每组检测EBNA1或BMRF2)。如上表1所示, 用于BMRF2靶标的引物所具有的核酸序列为SEQ ID NO:1和3, 并且用于BMRF2靶标的探针所具有的核酸序列为SEQ ID NO:2。此外, 如上表1所示, 用于EBNA1靶标的引物所具有的核酸序列为SEQ ID NO:4和6, 并且用于EBNA1靶标的探针所具有的核酸序列为SEQ ID NO:5。由靶向BMRF2的引物生成的扩增子是96碱基对长扩增子, 并且如图2所示 (以及引物和探针与扩增子重叠的位置)。由靶向EBNA1的引物生成的扩增子是98碱基对长扩增子, 并且如图3所示 (以及引物和探针与扩增子重叠的位置)。

[0104] 实例2: EBV引物和探针在实时PCR测定中检测EBV的BMRF2和EBNA-1

[0105] 使用用于检测BMRF2 (SEQ ID NO:1-3) 和EBNA1 (SEQ ID NO:4-6) 的引物/探针测试了EBV核酸测试。运行了EBV测定的完整过程。采用了四种类型的包含EBV的样品: (1) 掺入EBV阴性血浆中的EBV感染的Raji细胞提取物; (2) 提取的EBV DNA (来自Advanced Biotechnologies的B95-8细胞系中提取 (目录号17-926-500)); (3) Qnostics EBV Analytic Panel (EBV1604009C); 以及 (4) EBV的1stWHO International Standard。使用的试剂包括cobas®6800/8800通用PCR Master Mix, 具有与cobas®6800/8800一起使用的特性和条件, 以及使用TaqMan®扩增和检测技术。预混液中寡核苷酸的最终浓度对于引物为0.3μM, 并且对于探针为0.1μM。所采用的cobas®6800/8800PCR Profile如下表2所示:

[0106]

步骤	循环	靶标 (°C)	保持时间 (hh:mm:ss)	变温速度
Pre-PCR	1	50	00:02:00	4.4
		94	00:00:05	4.4
		55	00:02:00	2.2
		60	00:06:00	4.4
		65	00:04:00	4.4
1. 测量	5	95	00:00:05	4.4
		55	00:00:30	2.2
2. 测量	45	91	00:00:05	4.4
		58	00:00:25	2.2
后	1	40	00:02:00	2.2

[0107] 表2

[0108] 结果在下表3中显示。

[0109]

	CT	RFI	AFI
WHO, 8E5 IU/mL	19.21	16.27	48.78
WHO, 8E4 IU/mL	22.67	16.10	50.66
WHO, 8E3 IU/mL	25.94	15.97	53.94
WHO, 8E2 IU/mL (凝块)	NaN	1.08	0.01
WHO, 8E1 IU/mL	32.93	12.22	25.50
WHO, 8E0 IU/mL	36.07	11.24	36.64
Q_C, 8E3 IU/mL	25.12	16.13	45.87
Q_C, 8E2 IU/mL	28.94	15.66	41.89
Q_C, 8E1 IU/mL	32.43	15.04	43.79
Q_C, 8E0 IU/mL	35.63	10.47	31.30
Raji, 100c (400 c/mL)	30.36	14.64	45.77
Raji, 10c (40 c/mL)	34.37	12.49	36.25
Raji, 1c (4 c/mL)	36.15	9.70	26.49
Raji, 0.1c (0.4 c/mL)	NaN	1.01	0.02
Ad_B95-8, 5000c (2E4 c/mL)	26.5	16.08	45.72
Ad_B95-8, 500c (2E3 c/mL)	30.02	15.77	45.88
Ad_B95-8, 50c (2E2 c/mL)	33.37	13.55	37.41
Ad_B95-8, 5c (2E1 c/mL)	35.81	10.74	26.76
阴性_血浆	NaN	1.01	0.04
阴性_血浆	NaN	1.02	0.05

[0110] 表3

[0111] EBV储备物的1stWHO International Standard的浓度为 5×10^6 IU/ml,而Qnostics EBV Analytic Panel具有一系列不同浓度的样品。对WHO材料进行系列稀释,并对Qnostics组的等分部分进行额外稀释。在8,000IU/ml、800IU/ml、80IU/ml和8IU/ml下分析Qnostics

EBV Analytic Panel,而在800,000IU/ml、80,000IU/ml、8,000IU/ml、800IU/ml、80IU/ml和8IU/ml下分析EBV的1stWHO International Standard。Qnostics EBV Analytic Panel和EBV的1stWHO International Standard的结果在图4A-4C中显示。对细胞培养物衍生的病毒材料(精确诊断上清液)(如图5H-5L所示)和包含两个靶标区域的对照质粒材料(如图5A-5G所示)两者进行了双靶标测定的另一个完整过程测试。这两种材料均各自被稀释,并且估计的效价(titer,滴度)在这两种材料都可进行测试的1E4IU/mL和1E3IU/mL下重叠。所得生长曲线在图5A-5L中显示。这些数据 and 结果证明引物和探针(SEQ ID NO:1-6)在包括商业和国际标准品在内的各种样品类型中扩增EBV并检测其存在。

[0112] 使用单靶标EBV引物和探针测试了EBV双靶标和单靶标质粒。结果在图6A和图6B中显示,其证明了BMRF2和EBNA1两者的阳性对照模板均被针对BMRF2的相应EBV引物/探针(SEQ ID NO:1-3)和针对EBNA1的相应EBV引物/探针(SEQ ID NO:4-6)扩增和检测到,但每个单靶标对照质粒不会与另一个靶标发生交叉反应,而双靶标对照质粒和病毒基因组DNA提取物则被两个寡核苷酸组扩增。

[0113] 对EBV基因型1和EBV基因型2材料进行了双靶标测定的线性测试。对于基因型1,使用了细胞培养物衍生的病毒材料(精确诊断)和包含两个靶标区域的对照质粒材料两者,它们的估计的效价重叠。对于基因型2,测试了细胞培养物衍生的病毒材料(ATCC株P3)。结果在图7和图8中显示。这些数据和结果显示,该测定可检测并可用于对EBV基因型1和基因型2两者进行定量。

[0114] 虽然为了清楚和理解的目的已经相当详细地描述了上述发,但是本领域技术人员通过阅读本公开将清楚,在不脱离本发明的真实范围的情况下,可在形式和细节上进行各种改变。例如,可以各种组合使用上述所有技术和装置。本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和/或其他文档全文以引用方式并入以用于所有目的,其程度如同每项单独的出版物、专利、专利申请和/或其他文档被单独地指示通过引用并入以用于所有目的。

序列表

- <110> F. 霍夫曼-罗氏公司 (F. Hoffmann-La Roche AG)
 罗氏诊断有限公司 (Roche Diagnostics GmbH)
 罗氏分子系统公司 (Roche Molecular Systems, Inc.)
- <120> 用于检测爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 的组合物和方法
- <130> P35233-W0-HS
- <150> US 62/878643
 <151> 2019-07-25
- <160> 6
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- [0001]
- <220>
 <223> 正向引物
- <220>
 <221> 经修饰的_碱基
 <222> (24).. (24)
 <223> 叔丁基苄基-dC
- <400> 1
 catcigtigt ggtatatttc ctcc 24
- <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 探针

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(0).. (1)	
	<223>	FAM-Thr	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6).. (7)	
	<223>	BHQ-2	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(32).. (33)	
	<223>	磷酸根	
	<400>	2	
		ctgggcaaga ccgtgctgtt tatctcaatc tt	32
	<210>	3	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
[0002]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反向引物	
	<220>		
	<221>	经修饰的_碱基	
	<222>	(19).. (19)	
	<223>	叔丁基苄基-dA	
	<400>	3	
		cgctaccccg ctaaagtaa	19
	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	正向引物	

	<220>		
	<221>	经修饰的_碱基	
	<222>	(21).. (21)	
	<223>	叔丁基苄基-dC	
	<400>	4	
		gcgttggaaa acattagcga c	21
	<210>	5	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	探针	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
[0003]	<222>	(0).. (1)	
	<223>	FAM-Thr	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6).. (7)	
	<223>	BHQ-2	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(30).. (31)	
	<223>	磷酸根	
	<400>	5	
		ttacctggtg agcaatcaga catgcgacgg	30
	<210>	6	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>	
	<223>	反向引物
	<220>	
[0004]	<221>	经修饰的_碱基
	<222>	(22).. (22)
	<223>	叔丁基苄基-dA
	<400>	6
	gttgctccca ttcttaggtg aa	22

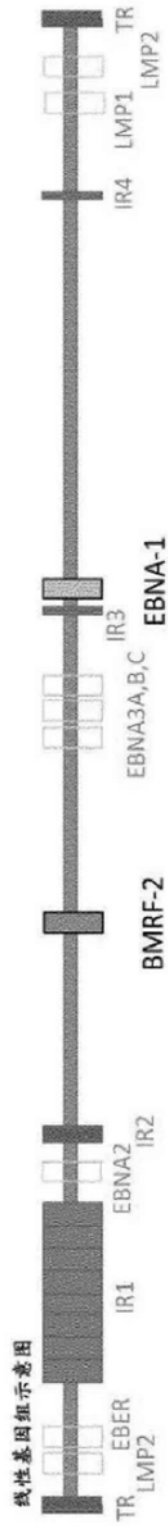


图1A

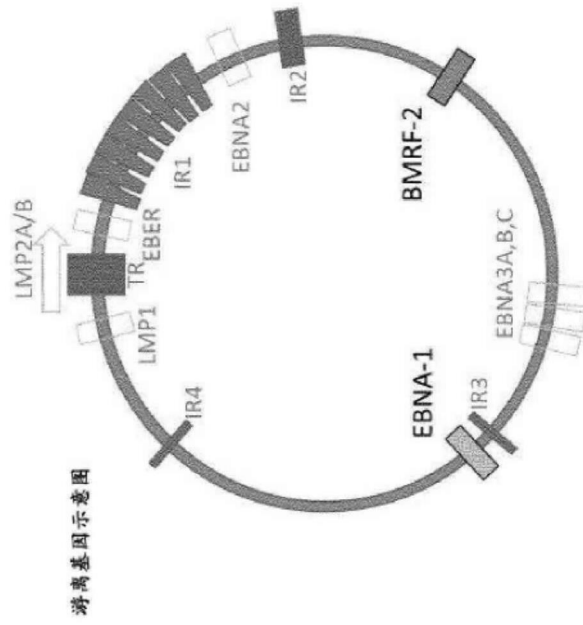


图1B

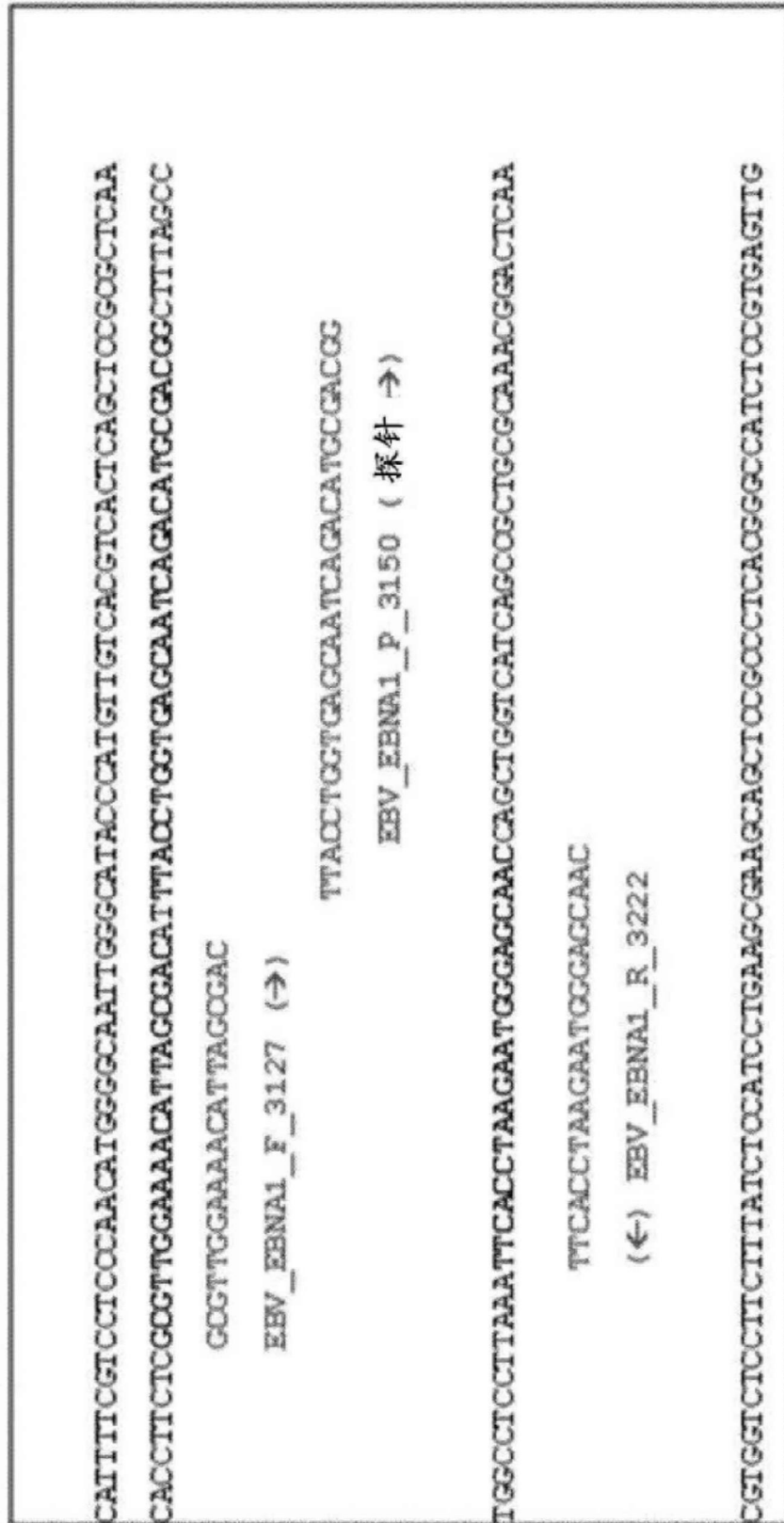


图2

```

TTCTTTGGACTCTAGATAOCTGCCOCTCTTCTCTGTGGGGGATGGCCCTCOGGGGCTGTACCTGGGCCATTCC
AGCATCAITGCATGIGICATGGCCACCCCTCTGCAOCCCTGACATCTGTTGTGGTATAATTCTOCTOCAIGAAACCCTTGGGA
CATCTGTTGTGGTATAATTTCTCTOC
EBV_EMRF2_F_1181 (→)

COCCITGGCCAAAGACCCTGCTGTTTATCTCAATCTTTGTCTATTAATTTAGCCGGGTAGCCOCCCTGAGCTCAGCTAIG
CTGGCCAAAGACCCTGCTGTTTATCTCAATCTTT
EBV_EMRF2_P_1222 (探针 →)

TTACTTTAGCCGGGTAGCC
(←) EBV_EMRF2_R_1278

CGCTACAGCCTTAGAGATTGTGGAOAGACCCCTGGTCCCACTCOGTGIGGINACAIGTCTGTTTGTCTTACT
TTTTGTGAATATCTGTTGGTGGACATTCATTAAATOCTAAGACCGGAGTCTGTCTCTTTGTGTTCTTTGGGGACTTG

```

图3

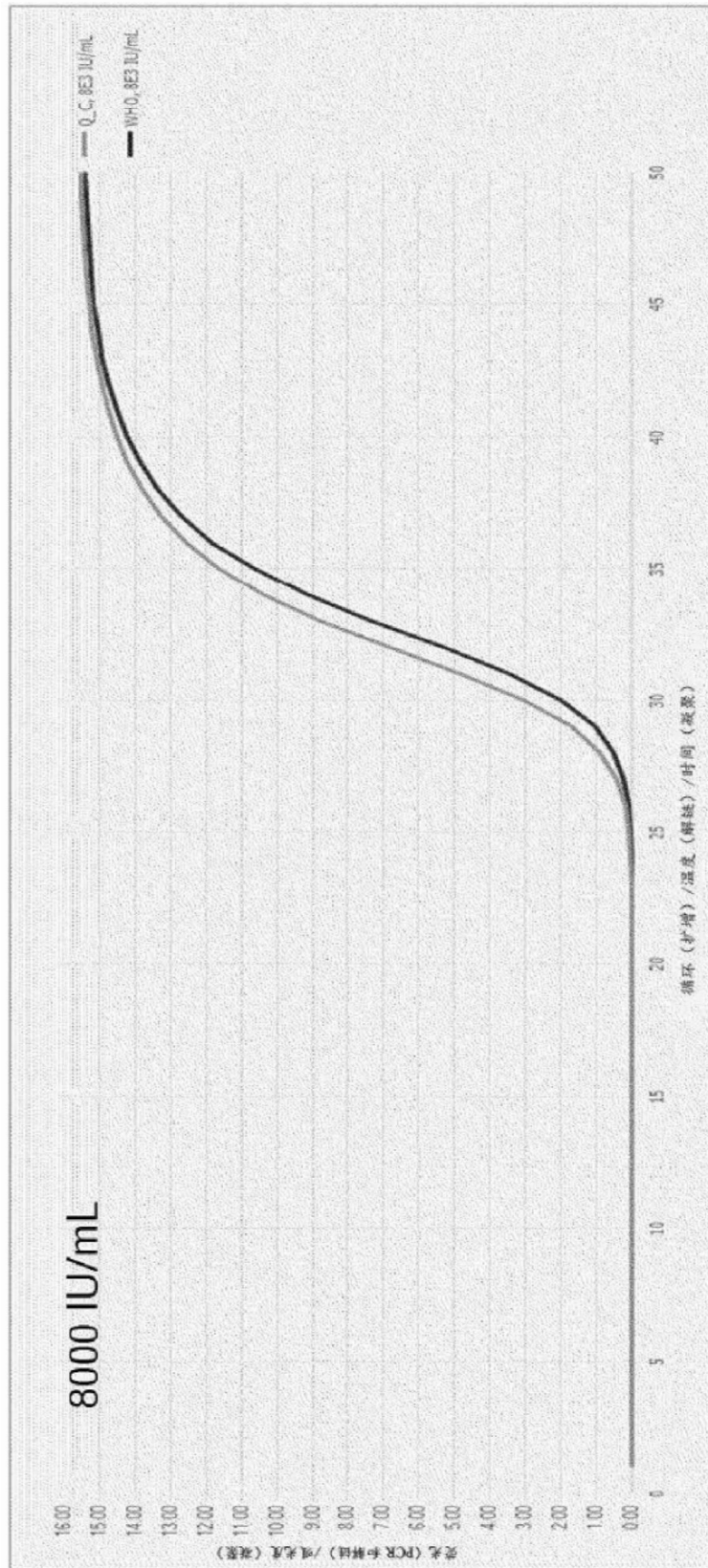


图4A

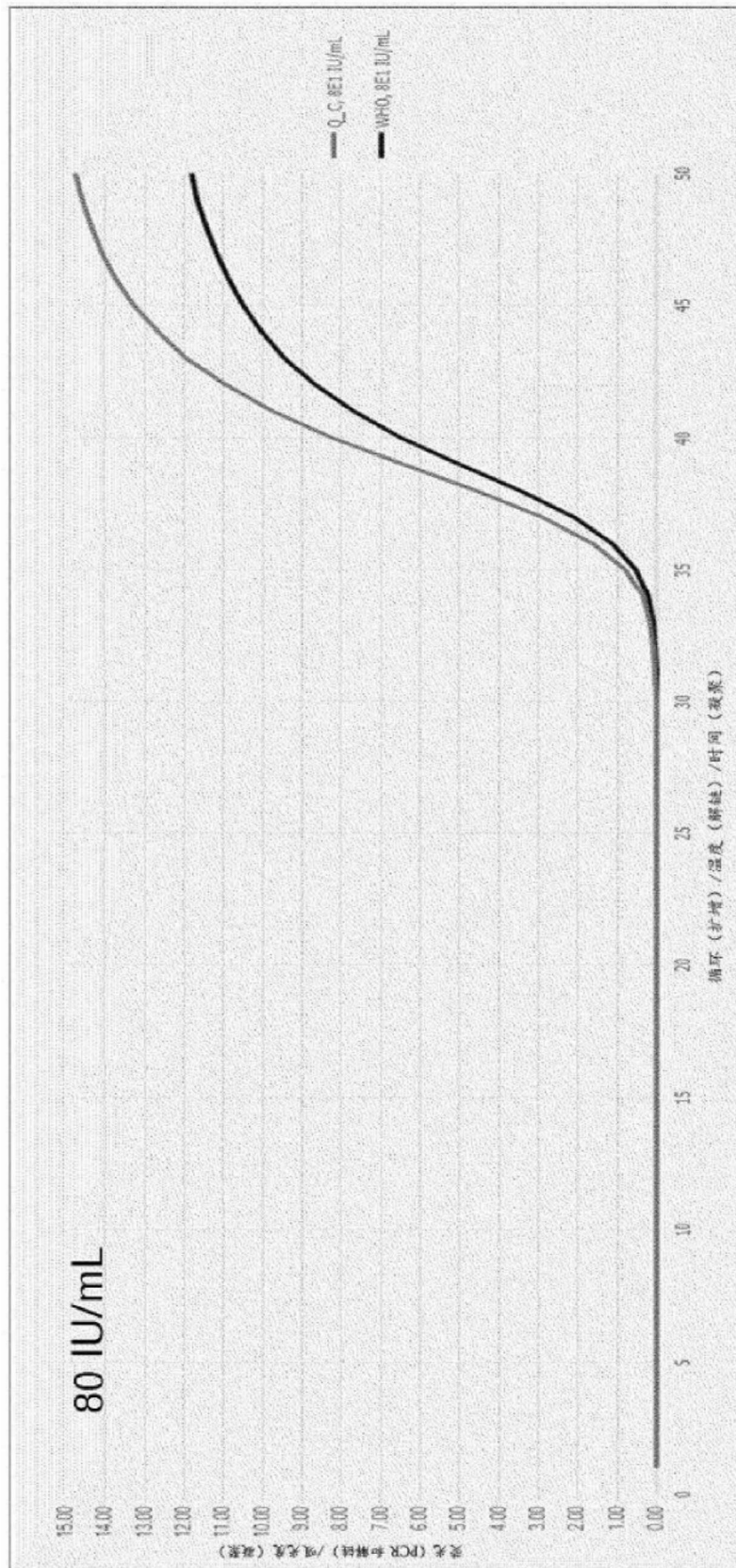


图4B

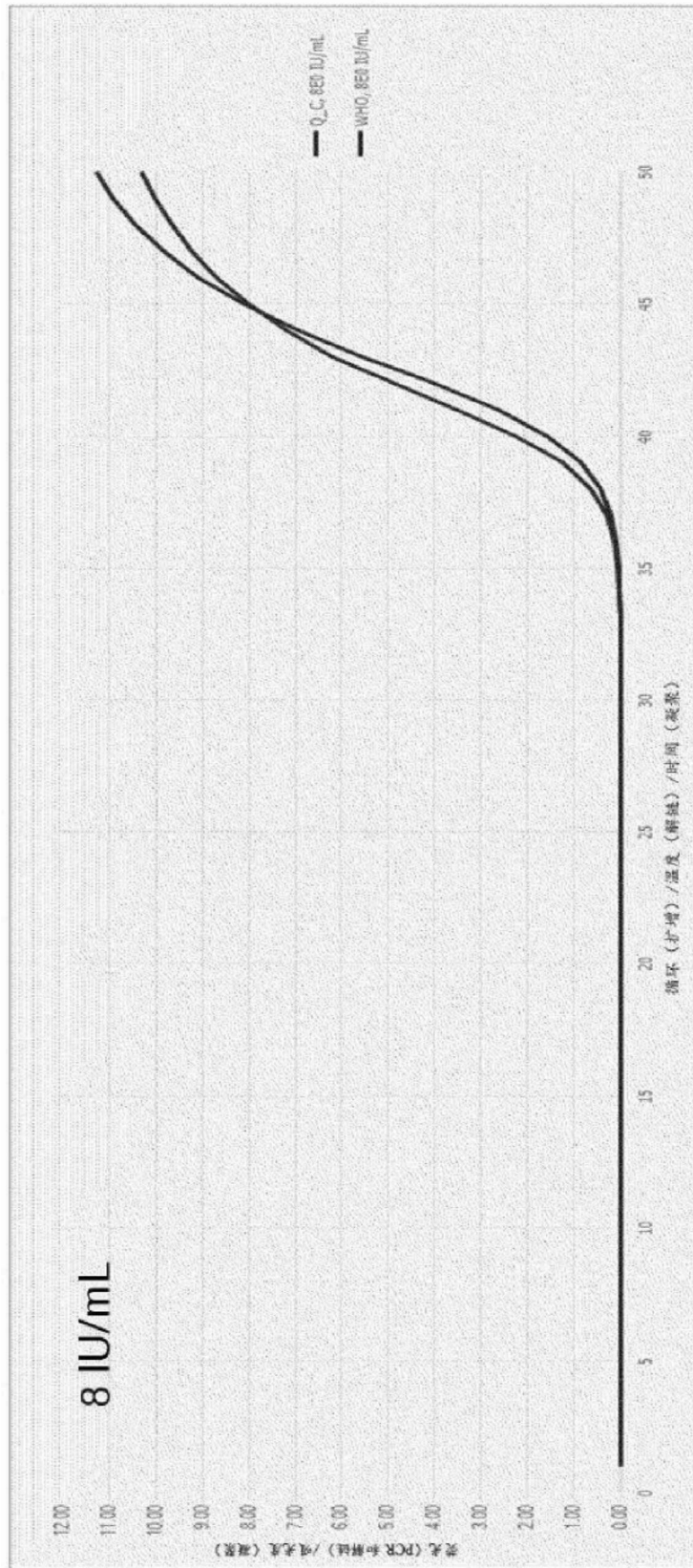


图4C

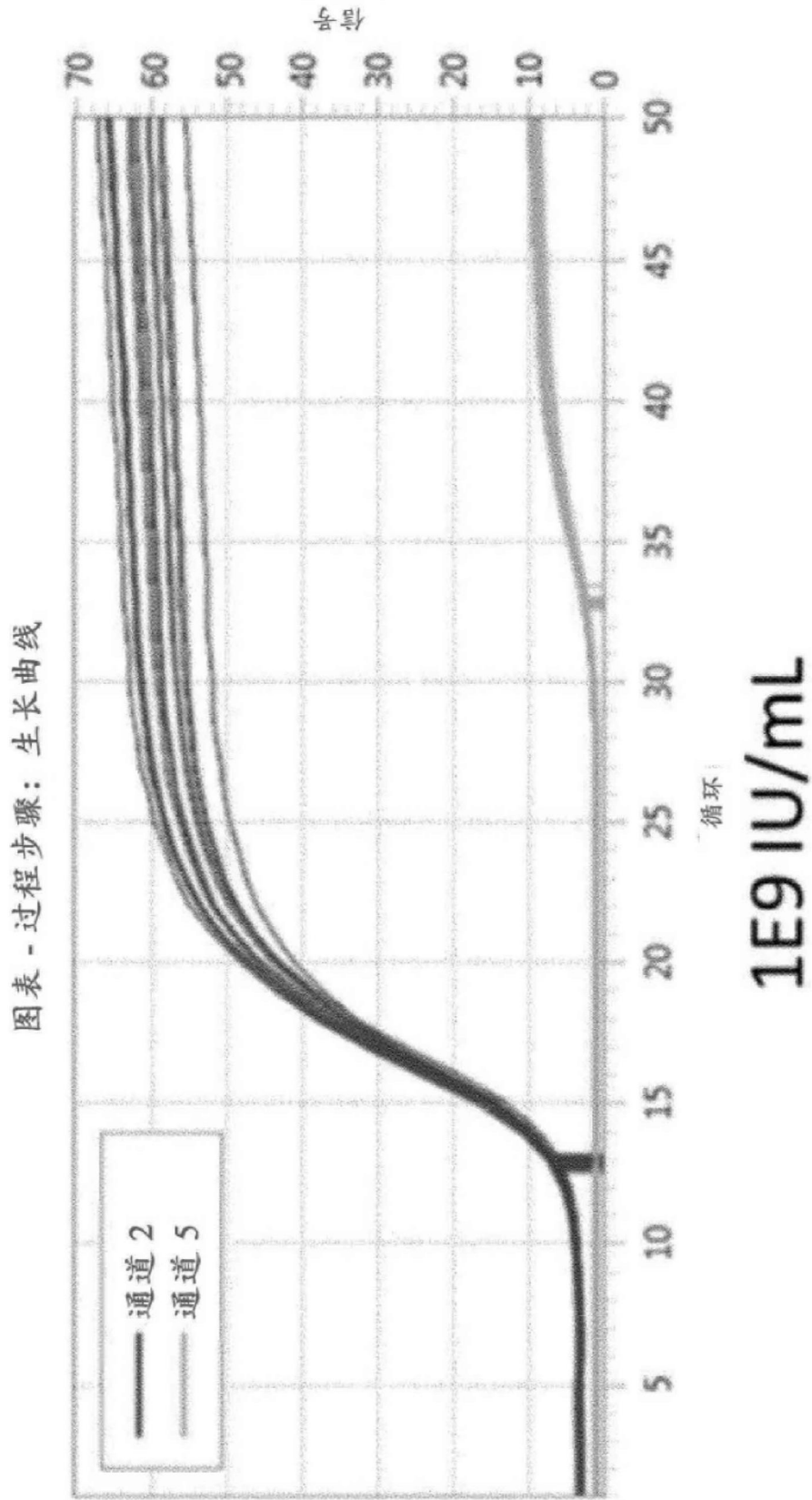


图5A

图表 - 过程步骤：生长曲线

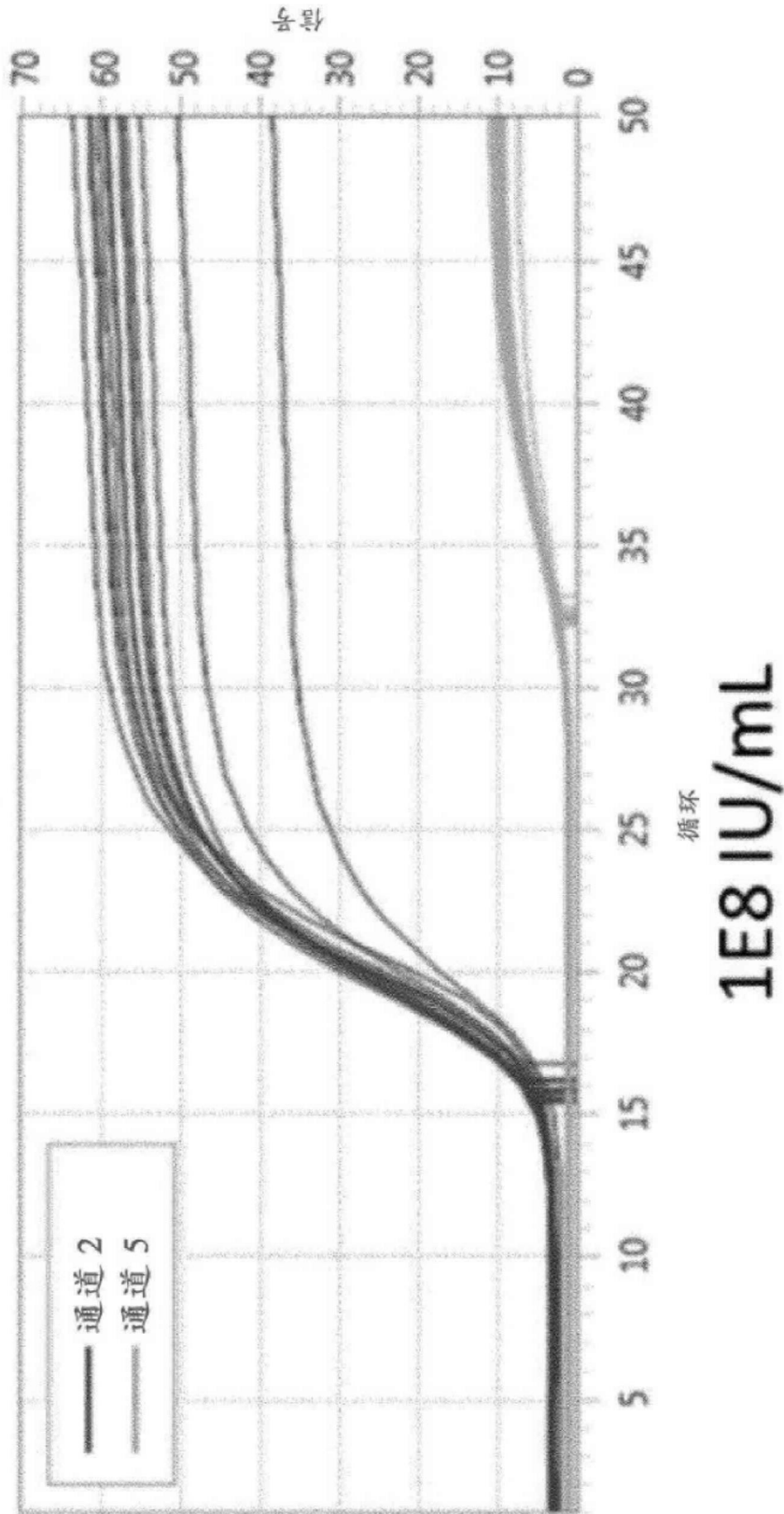


图5B

图表 - 过程步骤：生长曲线

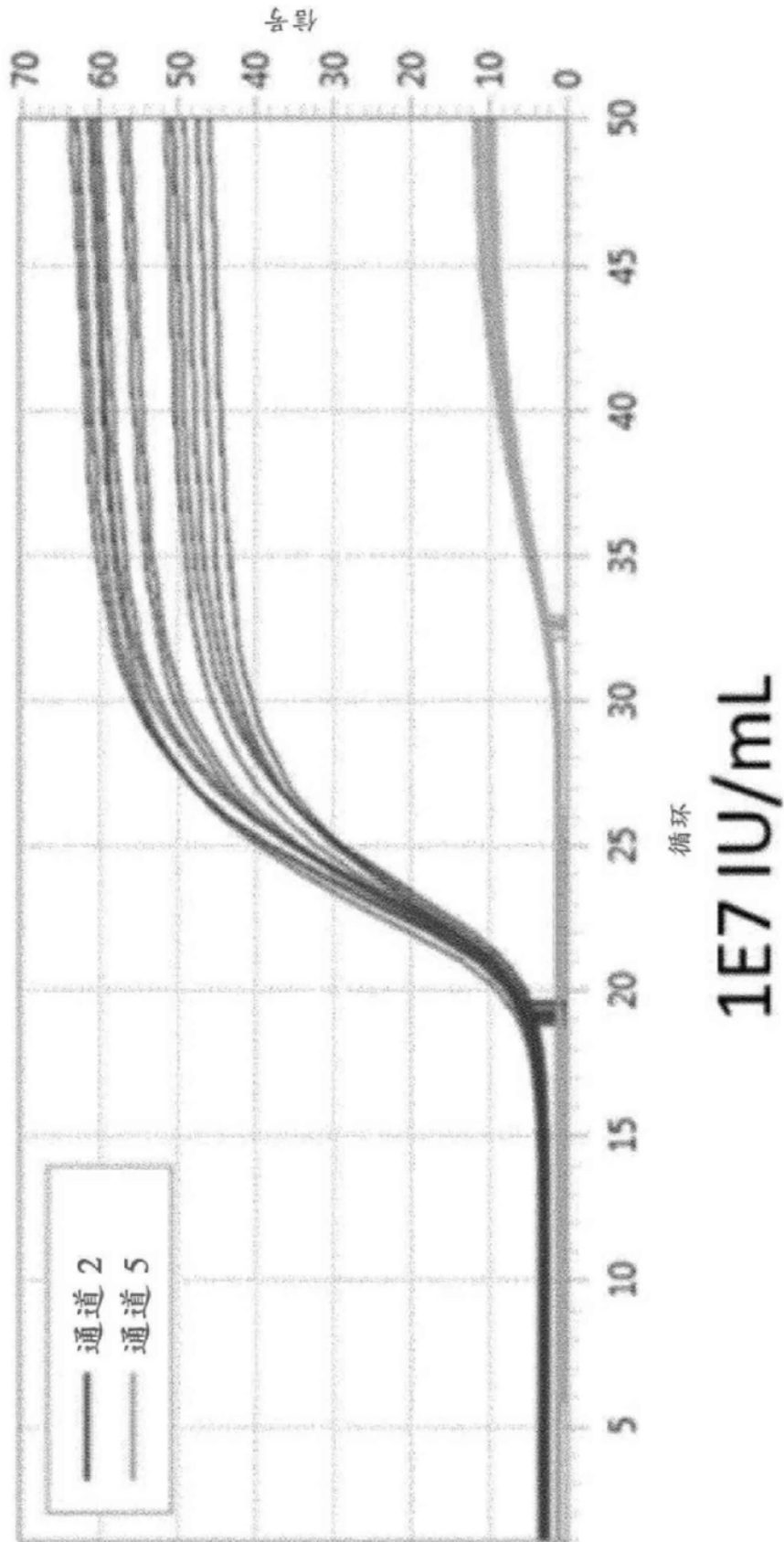
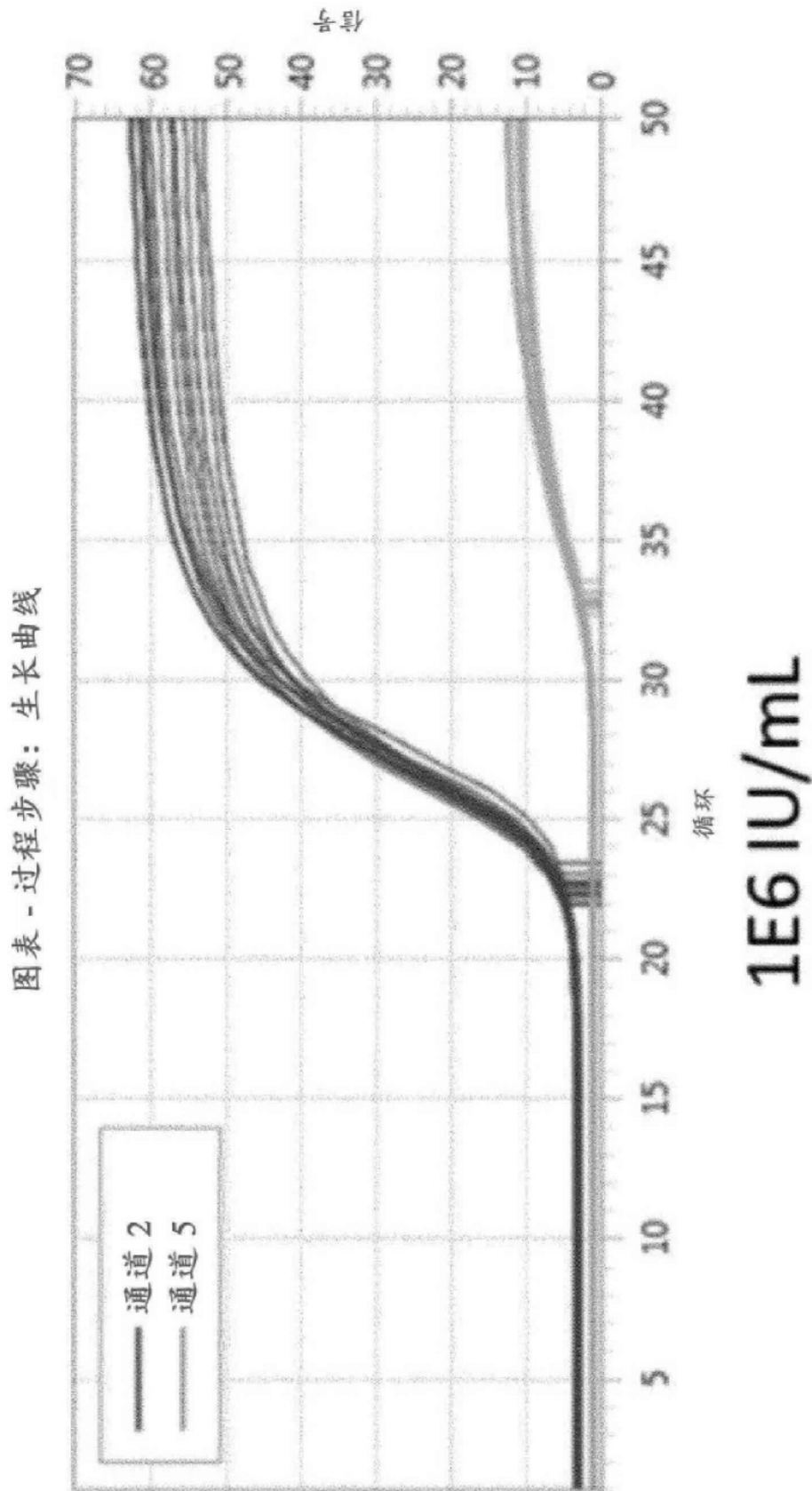


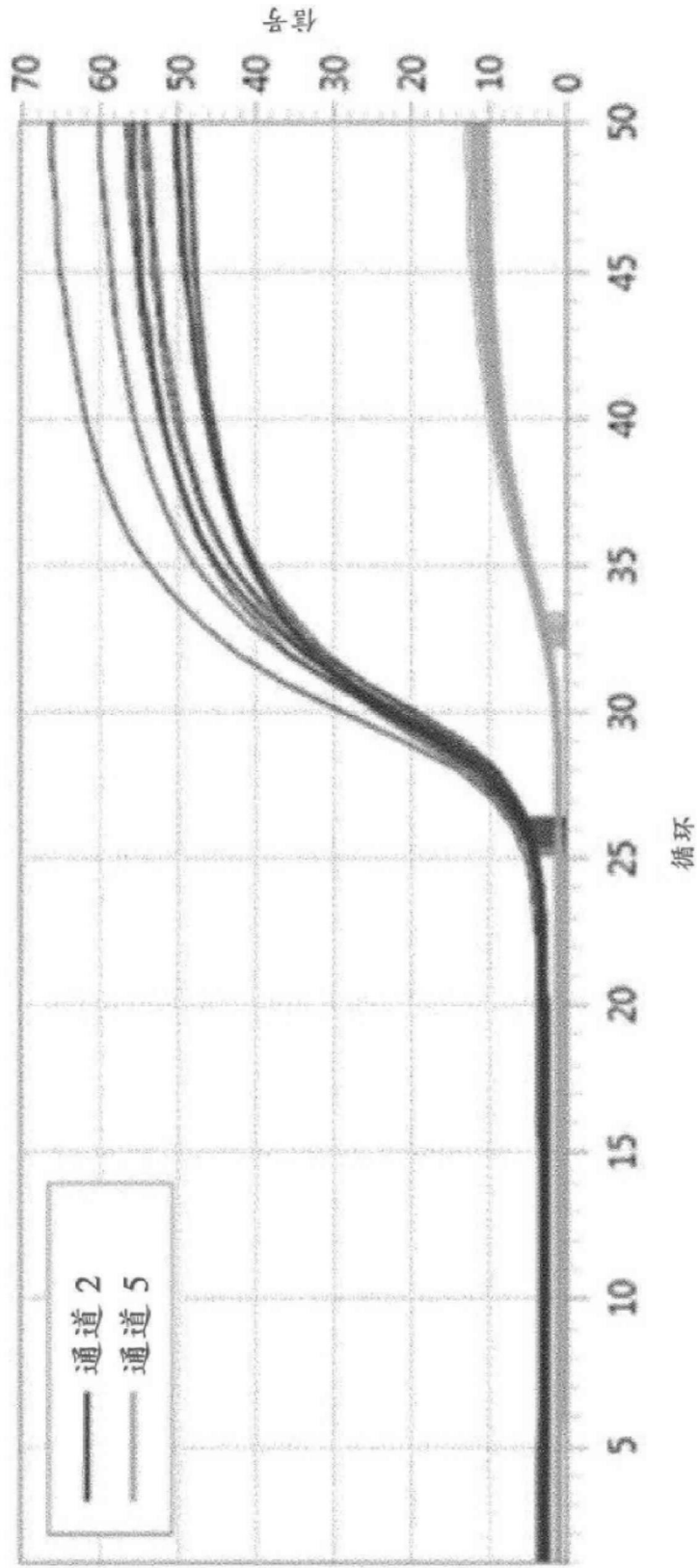
图5C



图表 - 过程步骤：生长曲线

图5D

图表 - 过程步骤：生长曲线



1E5 IU/mL

图表 - 过程步骤：生长曲线

图5E

图表 - 过程步骤：生长曲线

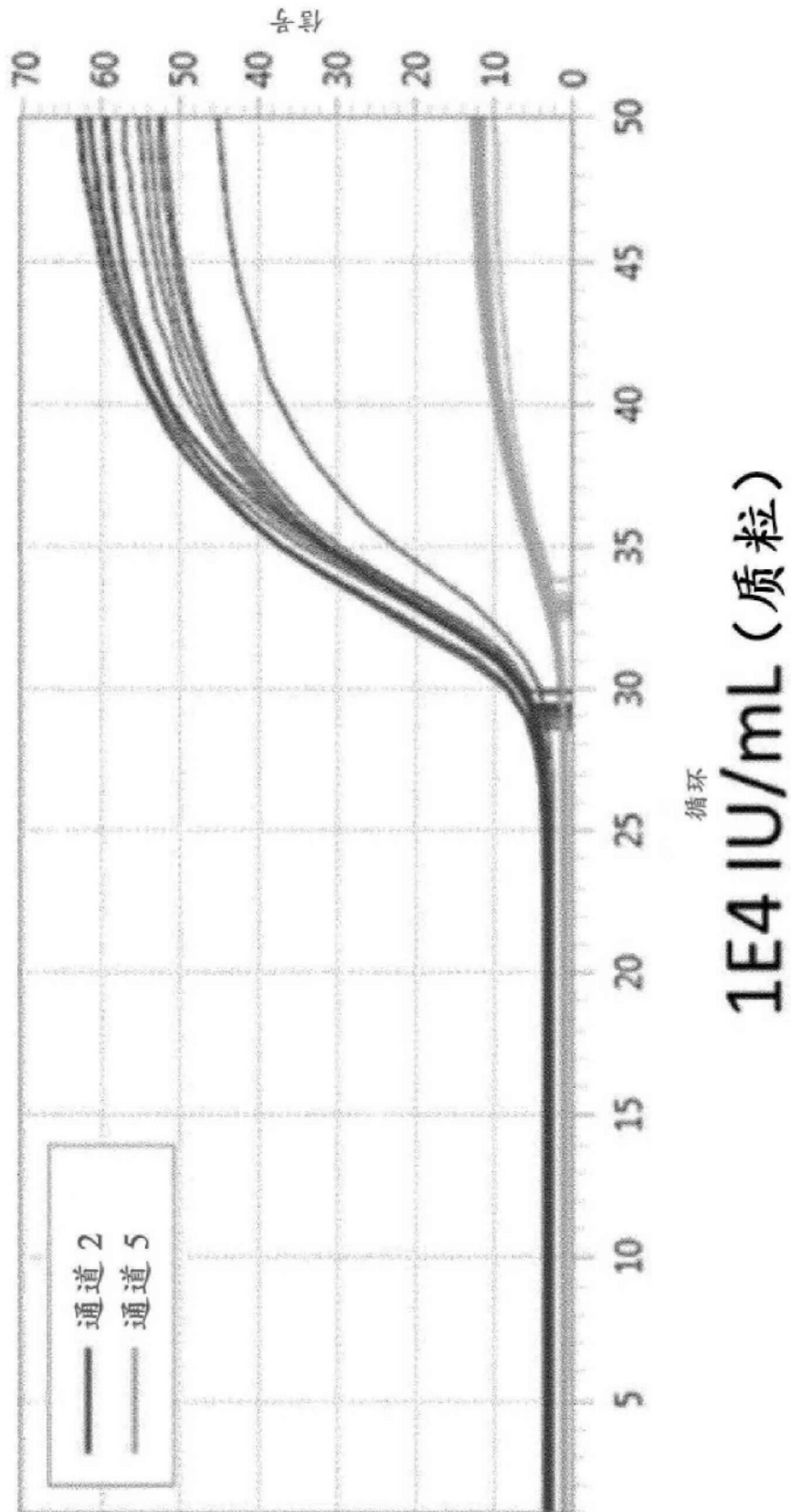


图5F

图表 - 过程步骤：生长曲线

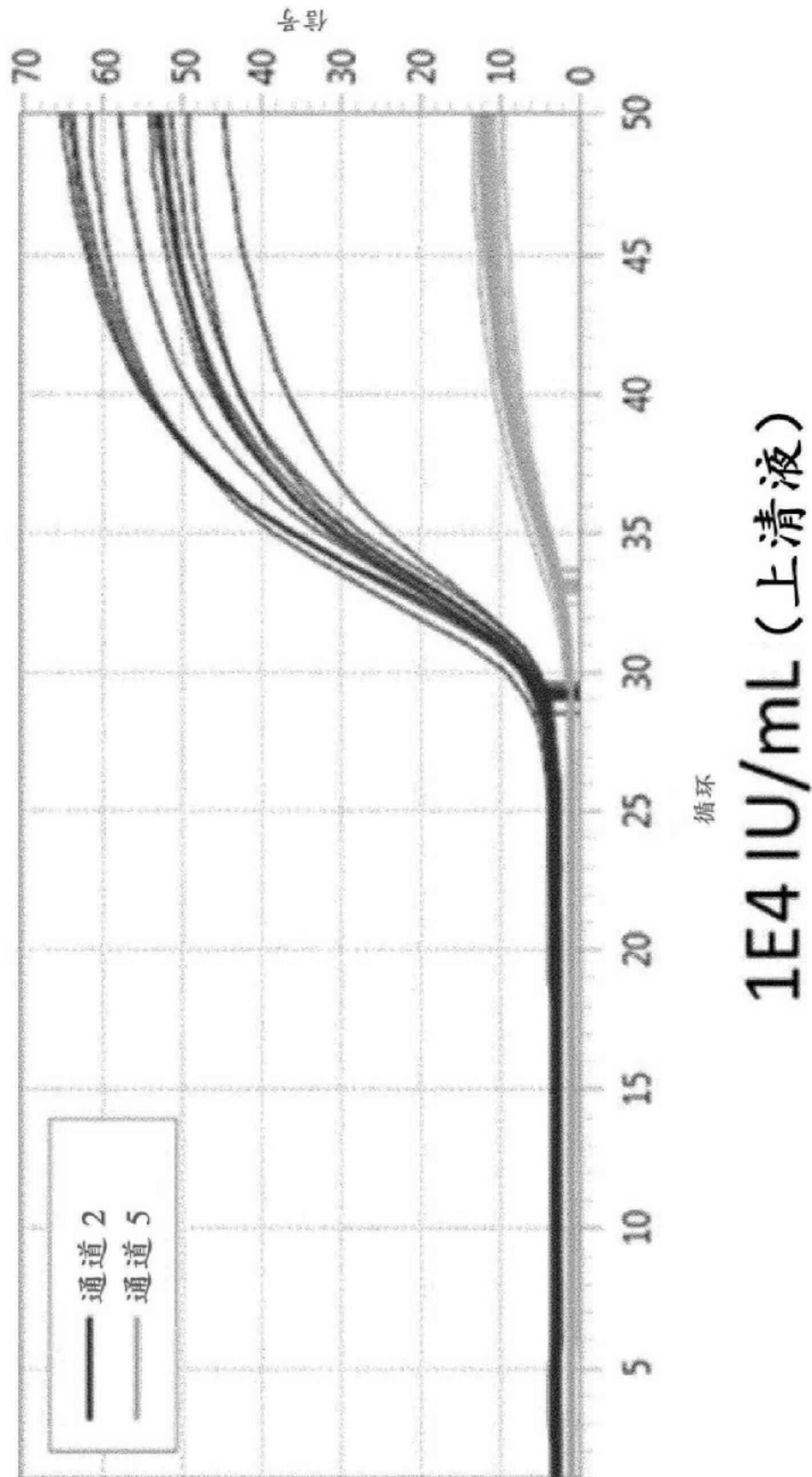


图5G

图表 - 过程步骤：生长曲线

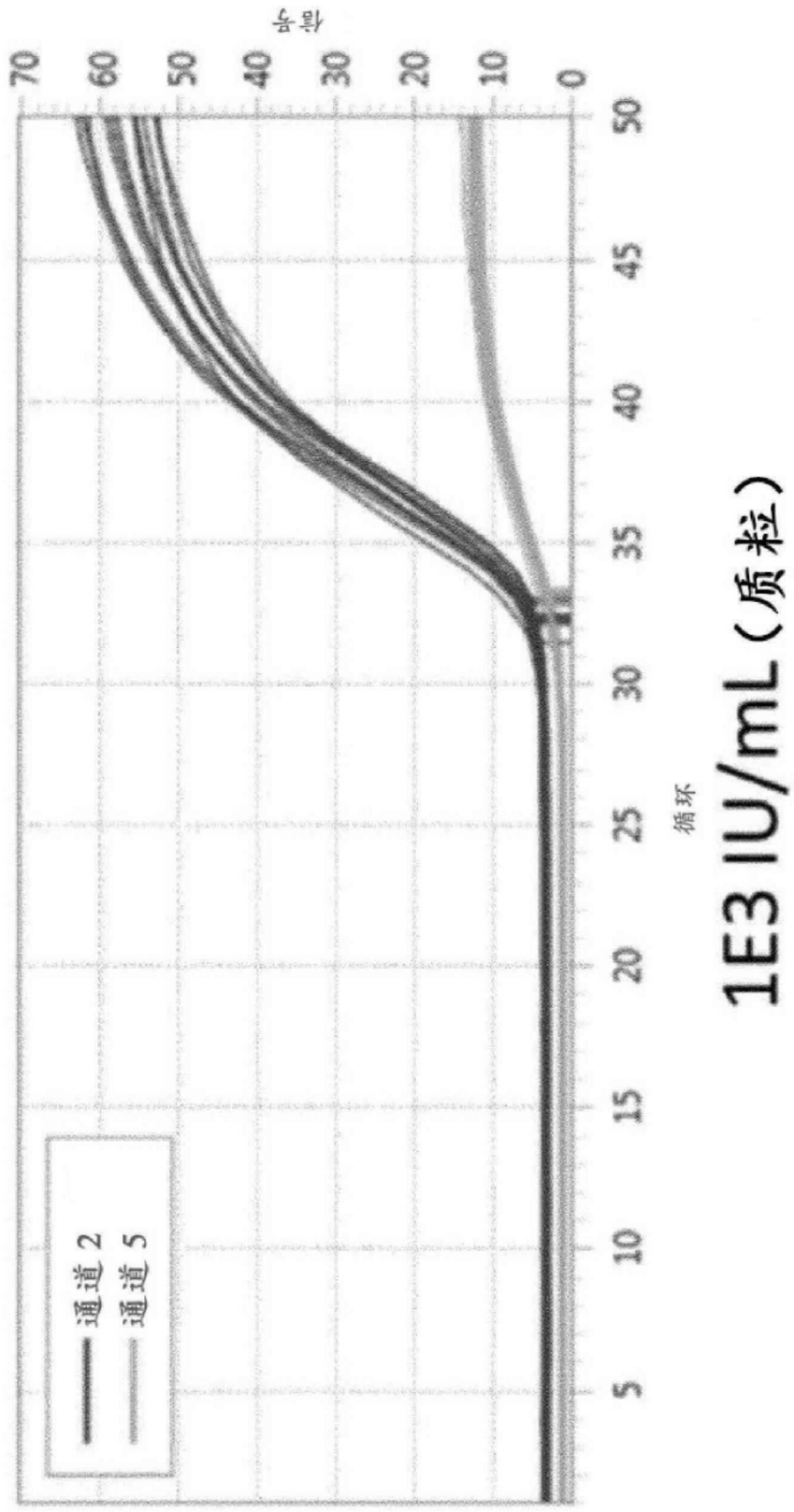


图5H

图表 - 过程步骤：生长曲线

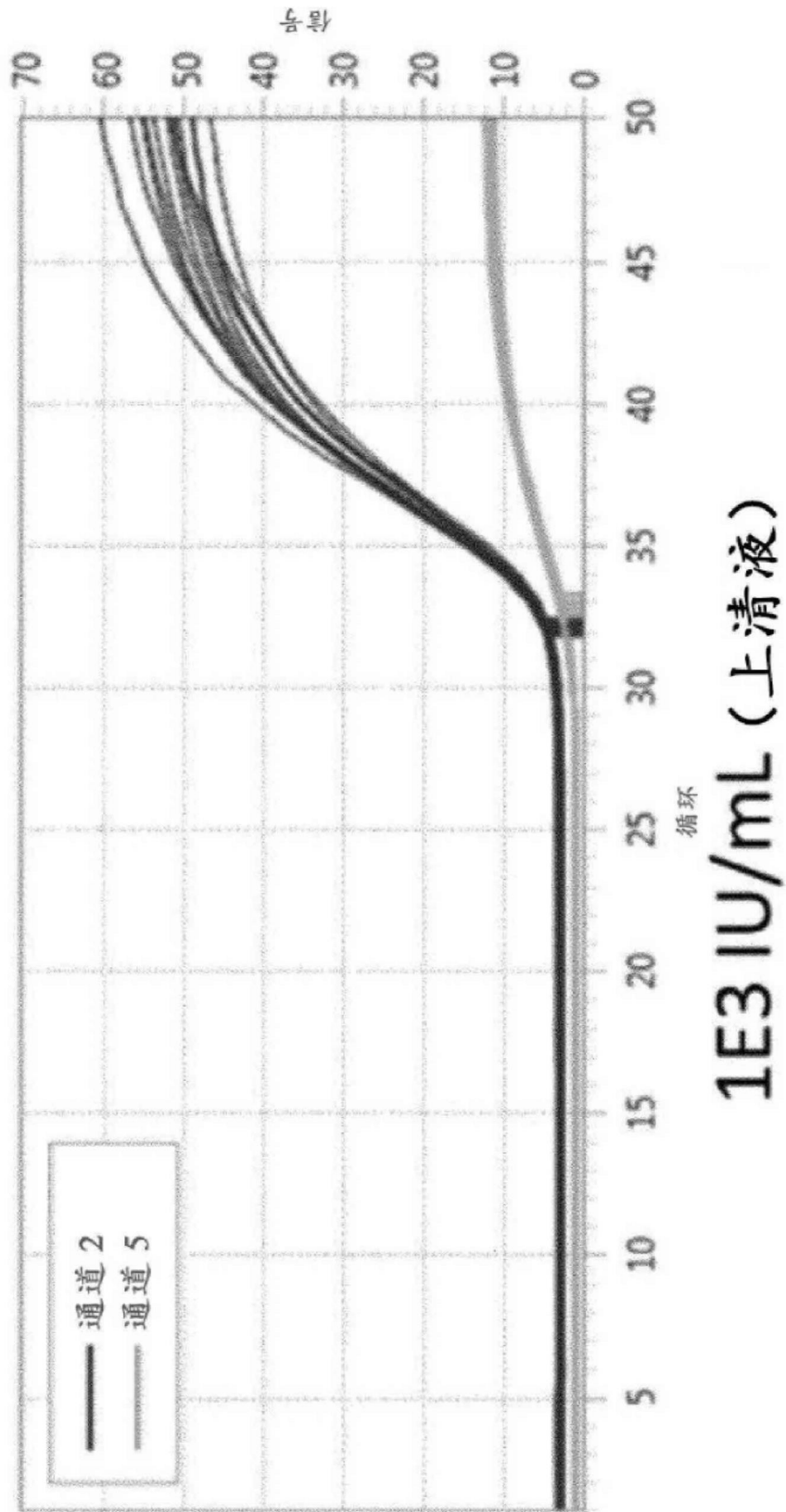


图5I

图表 - 过程步骤：生长曲线

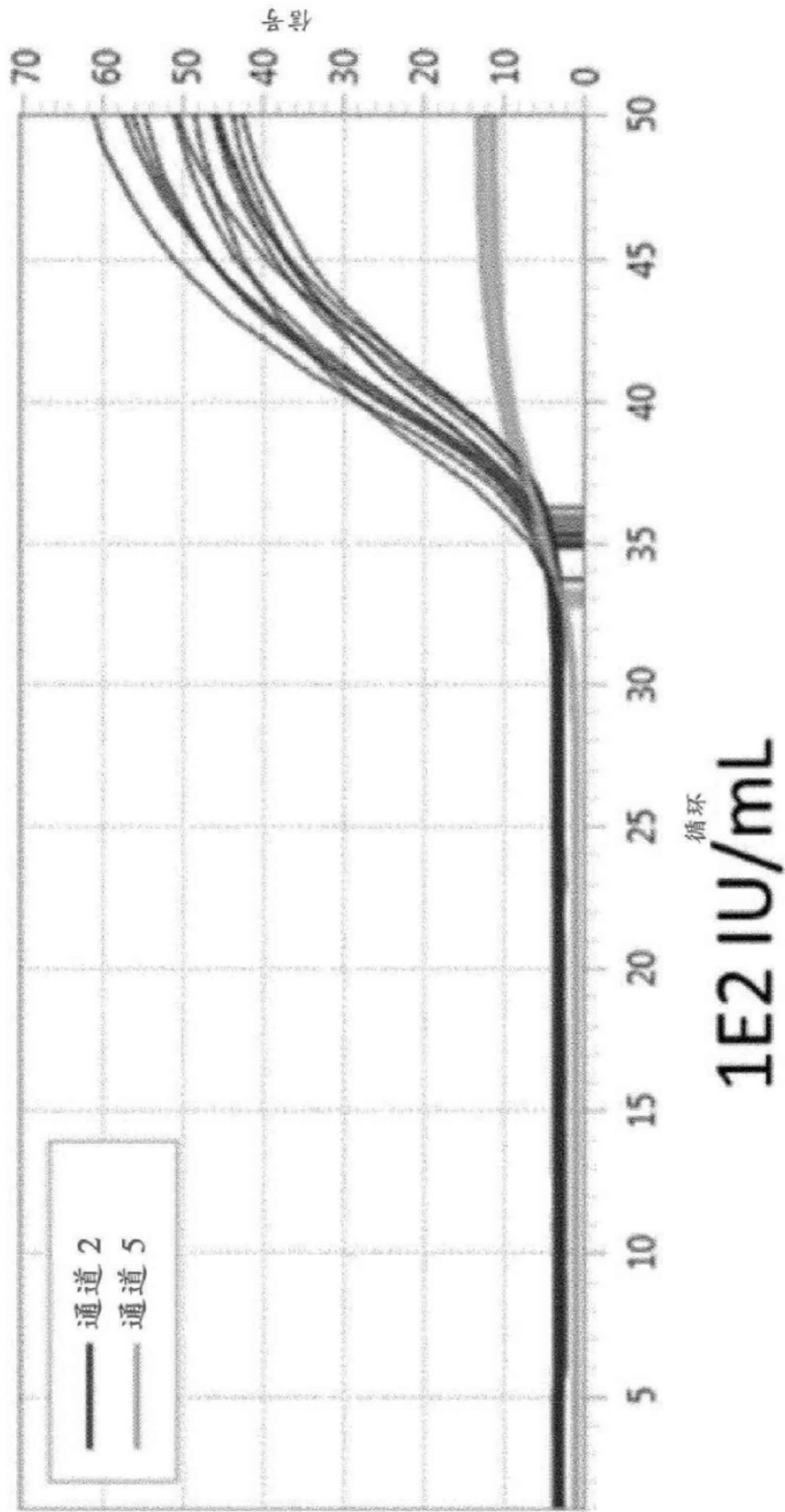


图5J

图表 - 过程步骤：生长曲线

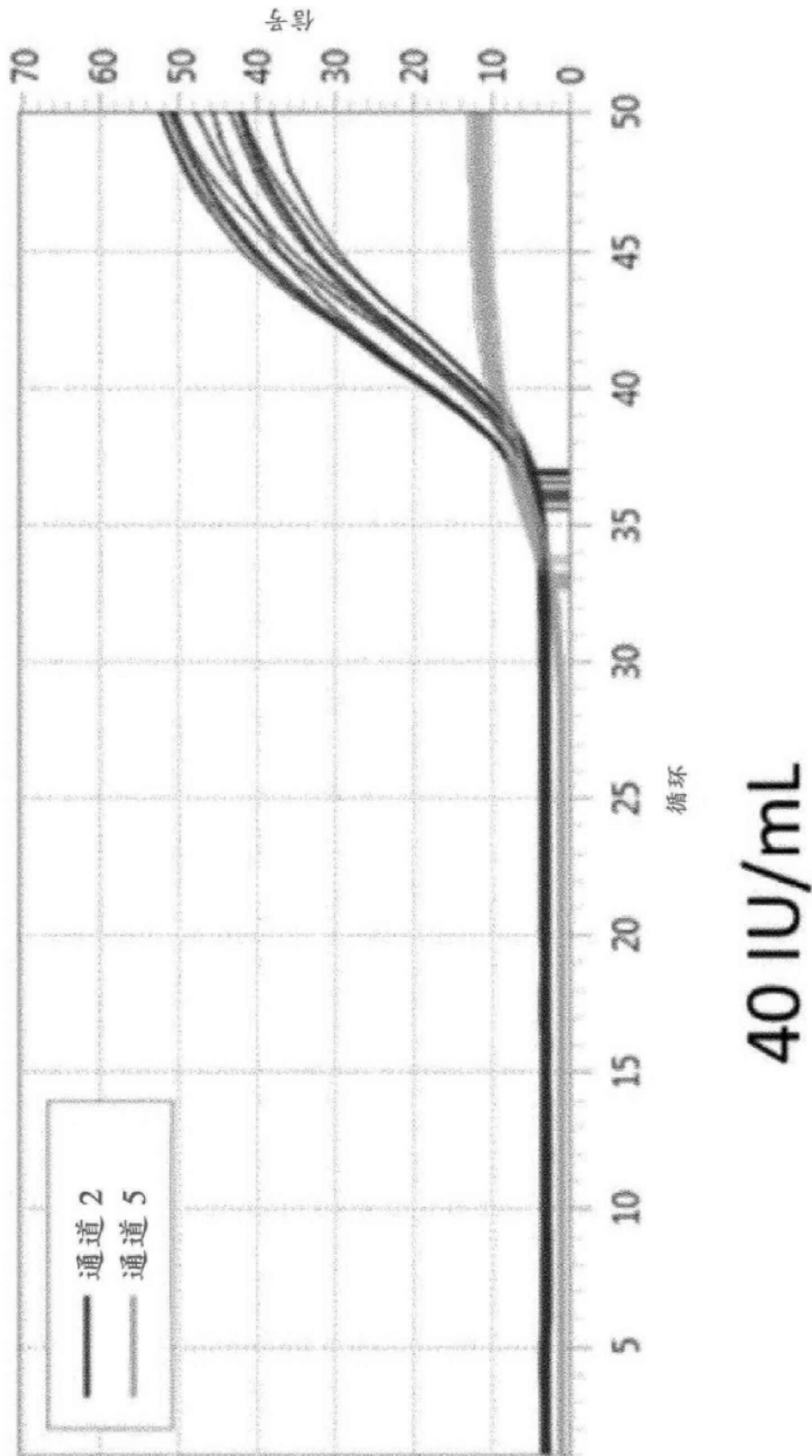


图5K

图表 - 过程步骤：生长曲线

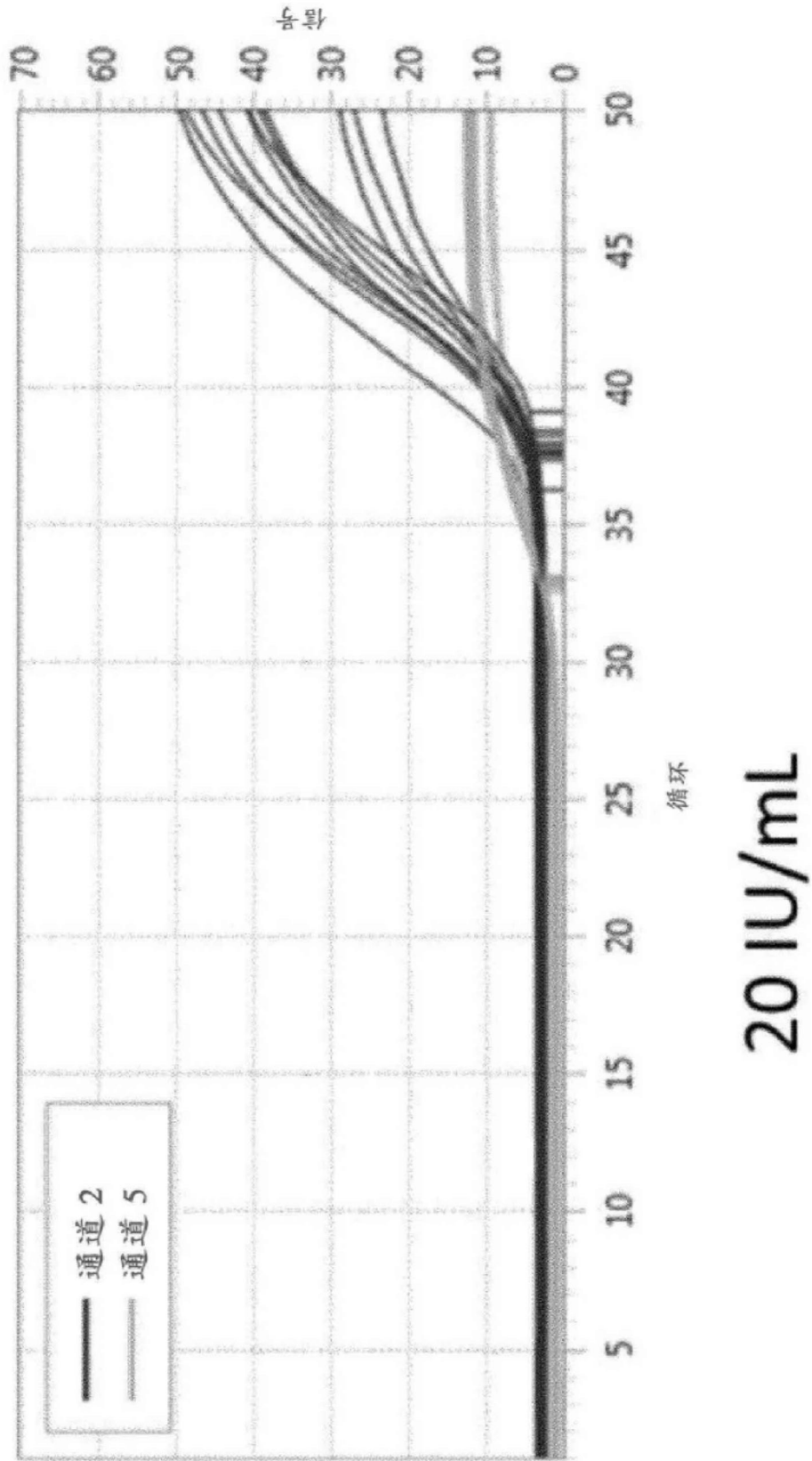


图5L

BMRF2

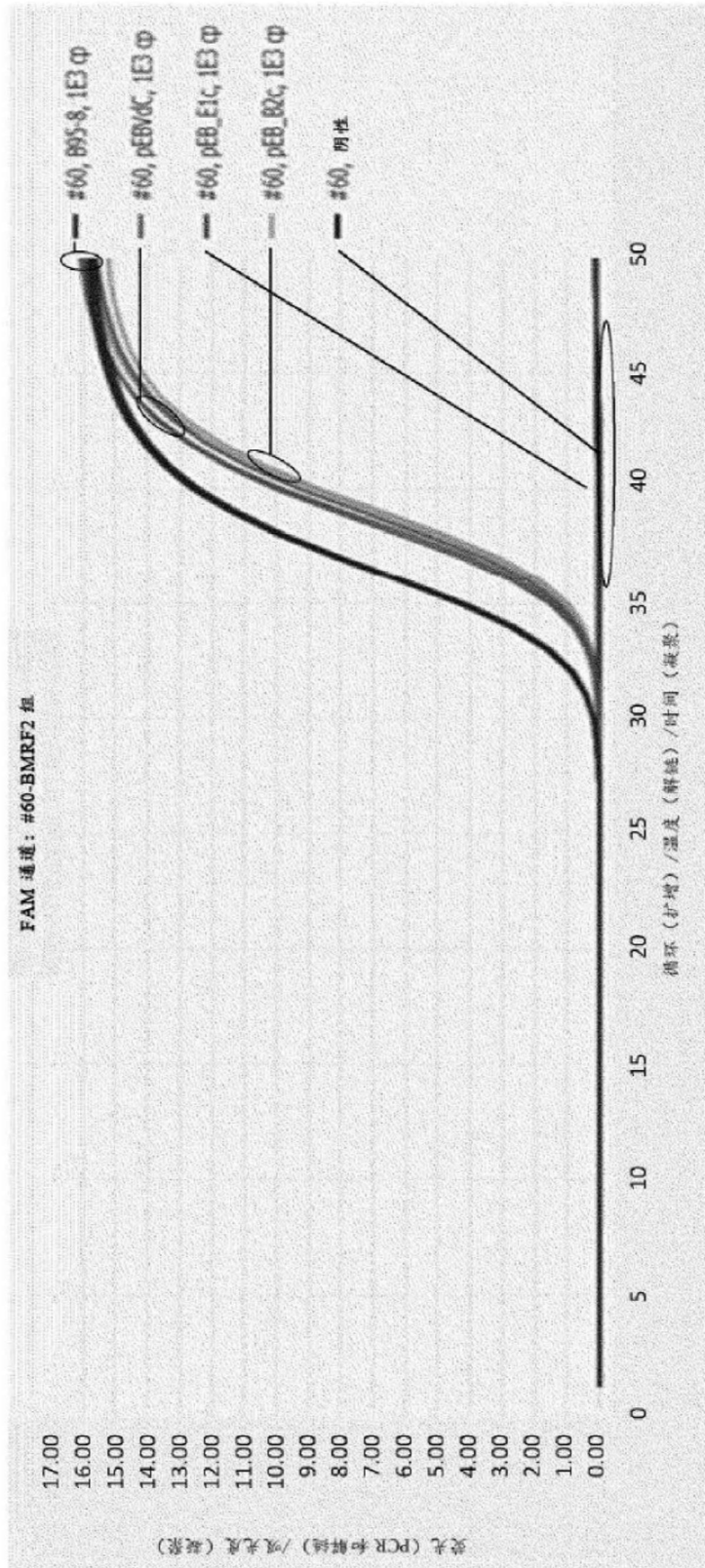


图6A

EBNA1

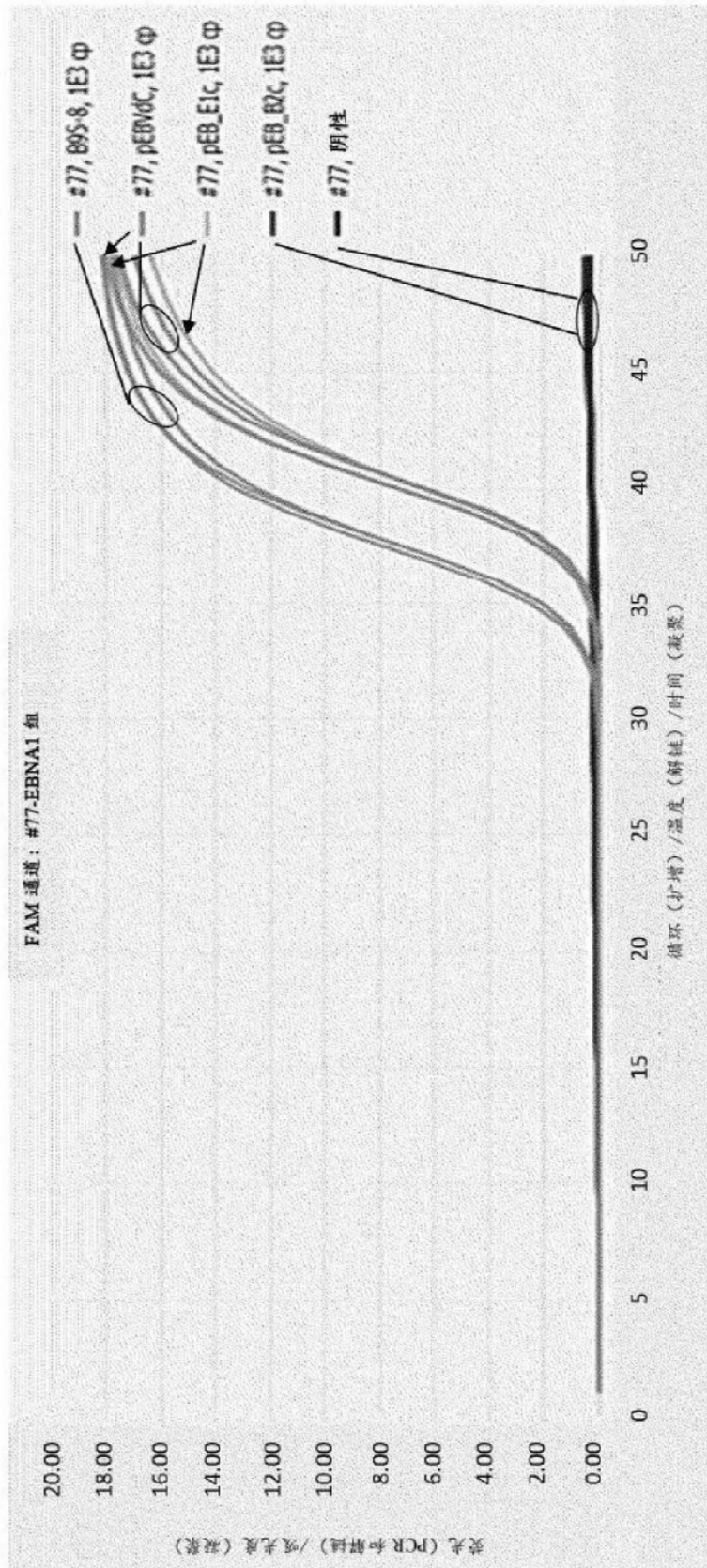


图6B

线性、GT1、细胞培养物衍生病毒材料和对照模板

将 log 10 效价分配给 SecStd 与 Ct [2]

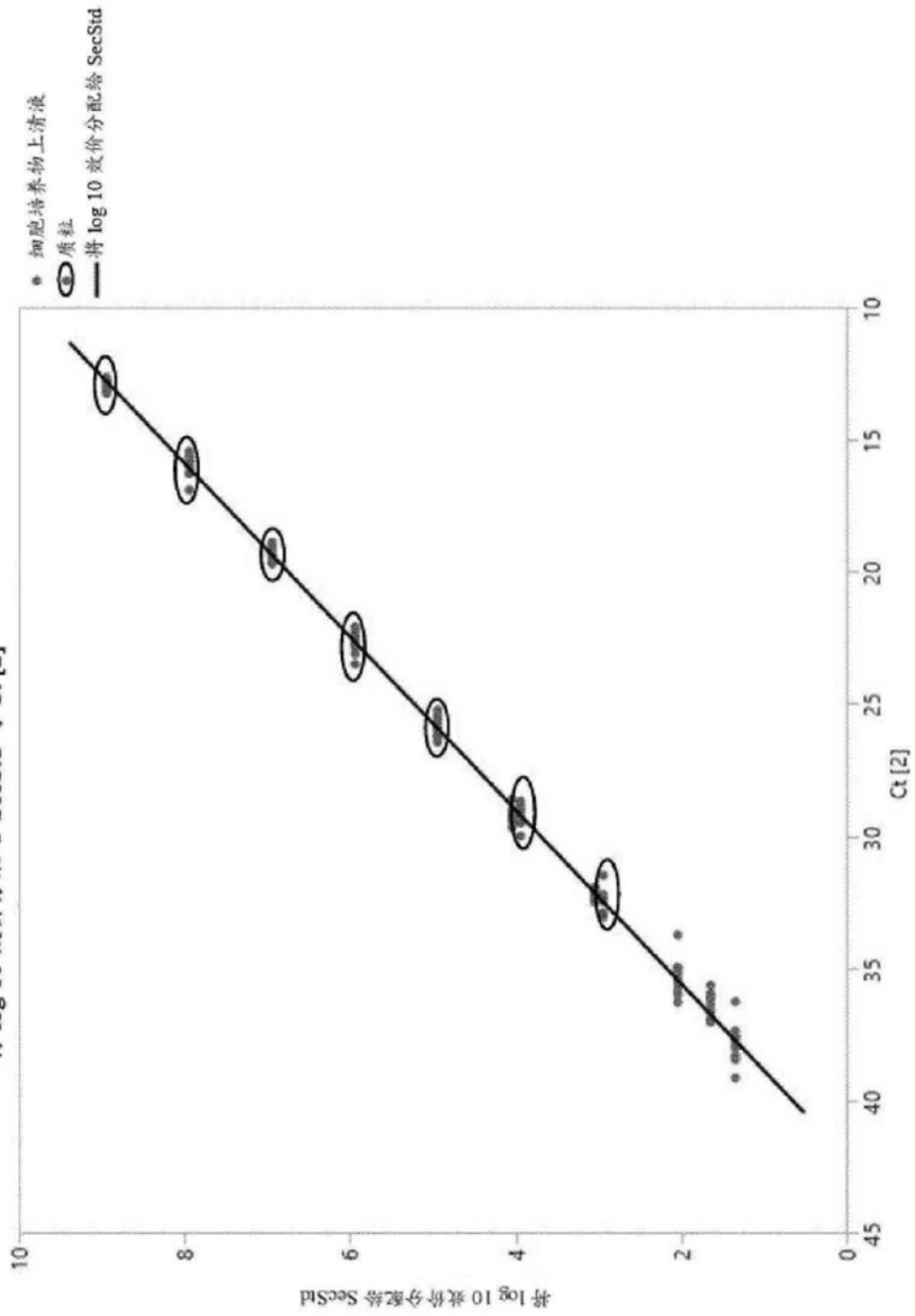


图7

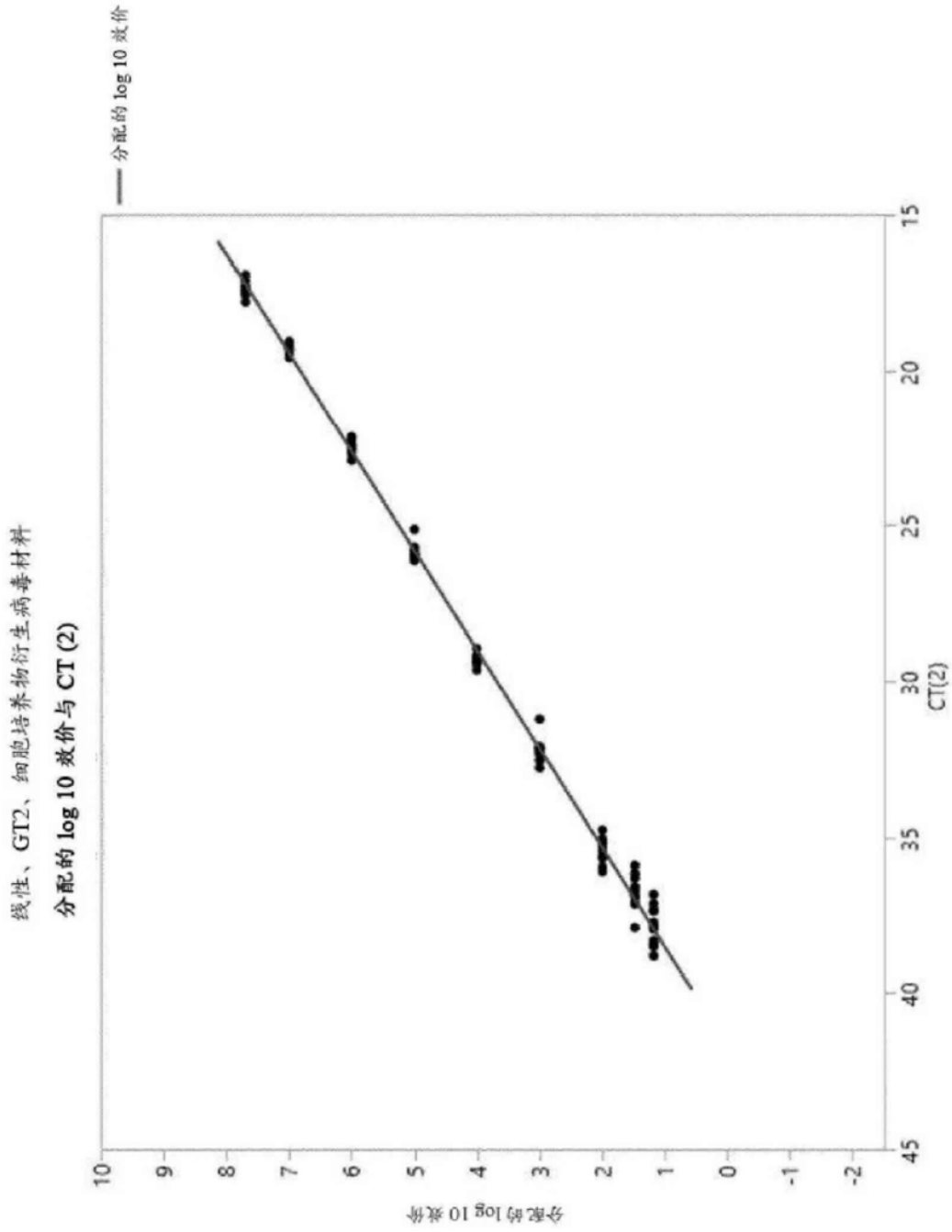


图8