



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102037138 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200980117982. X

(22) 申请日 2009. 05. 19

(30) 优先权数据

61/128238 2008. 05. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/044421 2009. 05. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02009/143089 EN 2009. 11. 26

(71) 申请人 纳慕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 R·C·埃伯索尔 J·A·里文巴克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 李炳爱

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

用于收集及处理 DNA 和 RNA 检测样品的方法、
试剂盒和系统

(57) 摘要

本发明涉及用于收集和处理样品以释放和处
理用于基因序列检测的 DNA 和 RNA 的方法、试剂盒
和系统。本文所述方法从组织和细胞材料中迅速
简便地释放并回收 DNA 和 RNA。

1. 用于收集、处理及分析来自样品的靶核酸的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供包含核酸的样品;
 - (b) 将所述样品转移到柔性壁容器中;
 - (c) 将萃取液加入到所述容器中;
 - (d) 用所述萃取液和一种或多种处理试剂在所述容器中处理所述样品以从所述样品中释放核酸以溶解所述核酸并产生回收液;以及
 - (e) 将一部分来自步骤(d)的回收液或产物转移到合适的检测系统以用于所述靶核酸的检测。
2. 权利要求1的方法,其中所述样品包含固体材料,并且所述处理步骤(d)包括用所述萃取液和一种或多种处理试剂在所述容器中混合并浸软所述样品以帮助释放所述核酸。
3. 权利要求1的方法,其中所述一种或多种处理试剂包含裂解剂,所述裂解剂包含去污剂、酶、或者它们的组合;pH在7至7.8范围内的缓冲液;氯化镁;和氯化钾。
4. 权利要求2的方法,其中所述样品是虾组织,所述核酸是虾病原体的诊断剂,并且其中所述病原体选自白斑综合征病毒、传染性皮下及造血组织坏死病毒、桃拉综合征病毒、以及哈氏弧菌。
5. 试剂盒,所述试剂盒提供材料和容器以制备样品并检测或鉴定诊断性靶DNA或RNA,所述试剂盒包括
 - (a) 柔性壁容器,样品在该柔性壁容器中进行处理,
 - (b) 萃取液,
 - (c) 一种或多种处理试剂,以及
 - (d) 移液管,所述移液管用于收集并测量用所述萃取液和一种或多种处理试剂在所述容器中处理所述样品而产生的回收液,并且用于将所述回收液转移到合适的检测系统中。
6. 权利要求5的试剂盒,其中所述容器具有连接到所述容器顶部的闭合件,并且其中所述容器由聚丙烯或聚乙烯制成,具有介于1和8密耳之间(0.025至0.20mm)的厚度,并且具有介于0.5和1,000mL之间的尺寸。
7. 权利要求5的试剂盒,所述试剂盒还包括过滤介质或过滤颗粒。
8. 用于样品制备和靶核酸检测或鉴定的诊断系统,所述诊断系统包括:
 - (a) 柔性壁容器,样品在该柔性壁容器中进行处理;
 - (b) 萃取液;
 - (c) 一种或多种处理试剂;
 - (d) 移液管,所述移液管用于收集并测量用所述萃取液和一种或多种处理试剂在所述容器中处理所述样品而产生的回收液,并且用于将所述回收液转移到合适的检测系统中;以及
 - (e) 检测系统,所述检测系统包括检测介质、基于选自下组的技术的设备:PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术、和处理器。
9. 权利要求8的系统,其中所述处理器包括热循环仪或烘箱式加热器。
10. 权利要求8的系统,所述系统还包括检测方法,其中所述检测方法是标准的非变性凝胶电泳、变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳、毛细管电泳、或荧光检测。
11. 权利要求8的系统,其中所述检测系统基于PCR,并且所述检测介质包含至少一个

与靶核酸互补的引物组,所述靶核酸是 DNA ;耐热聚合酶 ;核苷酸 ;缓冲液和一种或多种检测探针。

12. 权利要求 8 的系统,其中所述检测系统基于 RT-PCR,并且所述检测介质包含至少一个与靶核酸互补的引物,所述靶核酸是 RNA ;热活化的耐热聚合酶 ;逆转录酶 ;核苷酸 ;缓冲液 ;和 RNA 酶抑制剂。

用于收集及处理 DNA 和 RNA 检测样品的方法、试剂盒和系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请根据美国法典第 35 条 119 款要求提交于 2008 年 5 月 19 日的美国临时申请 61/128238 的优先权。

发明领域

[0003] 本发明涉及收集及处理生物学样品（例如植物和动物组织等）用于分析或鉴定（检测）特定基因组材料（DNA 和 RNA）目的的方法；并且还涉及用于实施该方法以及检测此类材料的试剂盒和系统。

[0004] 发明背景

[0005] 来自昆虫的微生物、细菌和病毒病原体是威胁人类和动物健康并极大增加食品生产成本和财政风险的有害物剂。这些威胁在农场和水产业以及其中“牲畜”在高强度生产设施中生长的环境下是尤其真实的。目前很好地建立了通过基因组材料经由 PCR、RT-PCR（其中 PCR 指聚合酶链反应而 RT-PCR 指反转录 PCR）和基因测序检测并鉴定这些物剂的方法并且提供了检测和控制这些物剂的可用方法。然而，应用这些方法直接检测水产业、农业、环境和临床样品中包含的核酸已经常常证明是无效的，并且多半是不可能的。

[0006] 已知这种检测无效的多个原因。这些原因包括实际上靶核酸很多情况下包含在或定位于微生物内部并且位于宿主的组织内部。这种定位可致使微生物的基因组材料（“靶核酸”）不可用于直接检测。因此，需要一种释放并溶解靶核酸的方法来用于检测。在已知的方法中，靶核酸与抑制剂和细胞及组织中包含的大量宿主 DNA 和 RNA 结合，使得靶核酸的检测复杂化。

[0007] 动物、海洋和环境样品被样品中的固体沉淀物、胶体、乳液、可溶解的和不可溶解的盐、生物大分子、生物可降解碎片、惰性材料和污染的工业化学品和天然化学制品进一步复杂化。这些样品的异质性和复杂性可抑制直接的核酸检测方法或使其无效。当颜色是分析或检测方法的一部分时，样品着色也会干扰测试结果。

[0008] 在多种情况下微生物和病原体的直接检测被进一步复杂化，因为样品仅包含靶基因组材料的一些拷贝。此外，在一些样品中靶基因组材料很多情况下与样品中存在的大量来自宿主和非靶生物的基因组材料一起存在。因为靶标的低拷贝数和高浓度的背景基因组材料和抑制剂，直接检测方法如 PCR、RT-PCR 和免疫测定方法的灵敏度和特异性受到化学干扰并且无法有效进行检测。

[0009] 为了避免这些问题，需要一些形式的样品处理以从干扰材料中浓缩、纯化并释放出靶基因组材料。已开发了多种样品制备方法以避免由于基因组定位、抑制剂和无效的基因组检测引起的灵敏度丧失和不良特异性产生的不精确及假性结果。

[0010] 一般来讲，这些处理方法涉及：i) 破坏组织并溶解细胞以释放靶基因组材料，ii) 将基因组材料吸附在固体支持体如膜或吸附剂材料上，iii) 洗涤吸附的基因组材料使其不含污染物，以及 iv) 从固体支持体上释放基因组材料用于检测。

[0011] 虽然上述方法已经证明对检测和鉴定基因组材料是有用的，但它们仍需要在分析

前进行多步骤处理以纯化并分离基因组材料。此类方法不但需要使用支持设备和材料（例如离心、膜过滤和 / 或化学沉淀），它们还可能需要毒性化学制品和溶剂以稳定基因组材料并有助于从固体支持体中释放基因组材料。这些方法不但增加了分析的复杂性、成本和时间，而且还可能需要在实验室中使用真空或电气设备。

[0012] 因此，仍需要一种检测有害物剂如包括细菌和病毒病原体在内的微生物的方法，该方法能够在现场使用，不需要实验室真空或电气设备，使用迅速且简便，不需要无毒的化学制品，成本低廉并且能够基于诊断基因序列用于病原体的迅速检测和鉴定。“现场”是指例如生长或生产或加工食物产品的场所，包括但不限于农场（水产业和农业）、食品加工和包装场所等。

[0013] 为了监控和控制有害微生物及控制它们引起的病害，还需要简单的样品处理技术，该技术能够在现场使用以从样品中收集、处理和回收基因组材料，其中发现的微生物对其靶核酸进行分析。

[0014] 本发明满足了这些需要。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明通过提供一种柔性壁容器和用于收集并处理样品中核酸的方法以及适用于该方法的诊断系统来解决上述问题，所述诊断系统包括一个试剂盒，其中该方法能以低成本操作、使用简便并且能够在现场使用。所述方法包括收集并处理基因组材料，它们是来自样品的核酸），不需要对样品基因组材料进行纯化。所述方法能够与试剂盒一起使用以提供对动物和植物流体或组织中包含的细菌和病毒病原体的低成本的、迅速的原位（在现场）检测。

[0017] 本发明的一个目标是提供有效的、简便的、迅速的和廉价的容器和方法以收集并回收样品中的核酸用于靶核酸或特定基因序列的分析或鉴定。该方法能够在现场使用。本发明的另一个目的是提供释放并溶解核酸以及使得它们不含干扰溶质和抑制剂（其能抑制或减少检测结果）的方法。本发明的另一个目的是提供廉价的试剂盒和诊断系统以达到前述目标。

[0018] 本发明提供用于收集、处理并分析样品中的靶核酸的方法、试剂盒和系统。该方法包括 (a) 提供包含核酸的样品；(b) 将所述样品转移到柔性壁容器中；(c) 将萃取液加到容器中；(d) 用萃取液和一种或多种处理试剂在容器中处理所述样品以从样品中释放核酸以溶解核酸并产生回收液；以及 (e) 将一部分来自步骤 (d) 的回收液或产物转移到合适的检测系统以用于靶核酸的检测。

[0019] 步骤 (d) 中的“处理”在本文是指包括将样品与萃取液和一种或多种处理试剂混合并且任选地处理混合物，例如用萃取液和一种或多种处理试剂浸软样品。

[0020] 任选地，可在转移样品至容器之前将一种或多种处理试剂加到容器中。一种或多种处理试剂可有助于释放并溶解核酸和 / 或移除或灭活抑制物质（“抑制剂”），所述抑制物质干扰靶核酸中的基因序列的后续检测。也可加热或冷冻柔性壁容器以灭活抑制剂和 / 或保存或稳定核酸。

[0021] 任选地，柔性壁容器可包含过滤介质以利于在步骤 (d) 之后和步骤 (e) 之前，在已经释放并溶解核酸后除去微粒。

[0022] 适用的检测系统使用 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术。

[0023] 还提供一试剂盒,该试剂盒提供材料和容器以制备样品并经由 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术检测或鉴定诊断性靶 DNA 或 RNA。该试剂盒包括 (a) 在其内处理样品的柔性壁容器, (b) 萃取液, (c) 一种或多种处理试剂和 (d) 移液管,该移液管用于收集并测量用萃取液和一种或多种处理试剂在容器中处理样品而产生的回收液,并且用于将回收液转移到合适的检测系统中。该试剂盒还可包括压碎装置用于辅助压碎固体样品,以及过滤装置。

[0024] 该试剂盒还可包括检测介质,它包含一种或多种检测试剂用于 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交产物的检测和鉴定。

[0025] 该试剂盒通常还包括描述使用试剂盒组件进行样品制备和诊断性靶 DNA 或 RNA 核酸检测的方法的说明书。

[0026] 还提供了诊断系统,它用于样品制备和样品中包含的靶核酸的检测或鉴定。该系统包括如上文所述的试剂盒以及检测系统。该检测系统取决于靶核酸是 DNA 或 RNA、或 cDNA 产物。该检测系统或试剂盒包括检测介质。该检测系统包括用于检测 DNA 或 RNA、或 cDNA 产物的处理器。检测可使用 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术完成。完成检测的处理器包括热循环仪或烘箱式加热器。

[0027] 该检测系统还包括检测方法。检测方法可选自标准非变性凝胶电泳(例如丙烯酰胺或琼脂糖)、变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳、毛细管电泳、或荧光检测。

[0028] 术语和缩写

[0029] 以下缩写和定义用于阐明权利要求书和说明书。

[0030]	dNTP	核苷酸
[0031]	DNA	脱氧核糖核酸
[0032]	PCR	聚合酶链反应
[0033]	RNA	核糖核酸
[0034]	DNase	脱氧核糖核酸酶
[0035]	RNA 酶	核糖核酸酶
[0036]	RT	反转录
[0037]	RT-PCR	反转录聚合酶链反应

[0038] 定义

[0039] 如本文所用,术语微生物指具有适于分析或检测的 DNA 或 RNA 的任何细菌、病毒、真核或原核生物细胞。微生物可为活的、死的、或已被损坏了的,即细胞壁或细胞膜上有损伤的。具体地讲,关于虾养殖业,尤其值得注意的微生物是病原体,包括白斑综合征病毒(“WSSV”);传染性皮下及造血组织坏死病毒(“IHHNV”);桃拉(taura)综合征病毒(“TSV”);以及哈氏弧菌(革兰氏阴性菌)。作为特定病原体的诊断剂的诊断性靶 DNA 或 RNA 和/或它们的片段是已知的。参见例如 WO 2008/024294(WSSV);WO2008/024293(IHHNV);WO 2008/024292(TSV);和 WO 2008/048673(哈氏弧菌)。虾和其他牲畜的其他病原体可使用本文所公开的方法、试剂盒和诊断系统进行简便的检测,本领域的技术人员将认识到这一点。

[0040] 如本文所用,术语“DNA”指包含脱氧核糖的核酸分子,它与具有核糖的“RNA”相反。如本文所用,“DNA”和“RNA”指 DNA 和 RNA 的所有种类,它们分别包括信使 RNA(mRNA)、核糖体 RNA(rRNA)、转运 RNA(tRNA)以及具有调节功能的小 RNA 种类。“小 RNA 种类”具有

特定的意义并且指细菌中具有持家或调节功能的未翻译 RNA。“小 RNA 种类”不是 rRNA 或 tRNA。

[0041] 如本文所用,术语“抑制剂”指化学制剂或其他制剂,它们具有干扰 PCR 或 RT-PCR 作用的能力

[0042] 如本文所用,术语“RNA 酶抑制剂”指化学制剂或其他制剂,它们具有干扰 RNA 酶如大多数细菌细胞产生的内源 RNA 酶作用的能力。需要澄清的是,RNA 酶是核糖核酸酶,它是催化 RNA 中的核苷酸裂解的酶。

[0043] 术语“靶核酸”指在本发明的方法、试剂盒和诊断系统中使用 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术检测的 DNA 或 RNA 核酸或 DNA 或 RNA 片段。靶核酸可为基因序列。

[0044] 如本文所用,术语“诊断性靶 DNA 或 RNA”分别指是特定微生物、病原体或病害的诊断剂的 DNA 或 RNA 分子或片段。一般来讲,靶核酸是诊断性靶 DNA 或 RNA。

[0045] 如本文所用,术语“诊断性靶 DNA 产物”指从诊断性靶 RNA 转录得到或用诊断性靶 RNA 作模板转录得到的 DNA 拷贝合成的 DNA 分子或片段。

[0046] 如本文所用,术语“反转录后的聚合酶链反应”或“RT-PCR”指用是 RNA 序列的一个拷贝的序列合成并扩增 DNA 分子的技术。RT-PCR 用于检测 RNA 种类如在基因表达的定量分析中进行检测,以及用于制备 RNA 的 DNA 拷贝用于克隆、cDNA 文库构建、探针合成、以及原位杂交中的信号扩增。该技术由两部分组成:通过反转录 (RT) 从 RNA 合成 cDNA,以及通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增特定的 cDNA。逆转录酶是依赖 RNA 的 DNA 聚合酶,它使用模板 RNA 或 RNA:DNA 杂交体中的 RNA 分子催化核苷酸的聚合。

[0047] 如本文所用,术语“引物”指合成的或天然存在的寡核苷酸。当被置于其中通过聚合酶催化互补链合成的条件下时,它能够作为沿模板链进行核酸合成或复制的起始点。在反转录情况下,引物由核酸构成并且最适用于 RNA 模板。在 PCR 情况下,引物由核酸构成并且最适用于 DNA 模板。

[0048] 如本文所用,术语“扩增产物”指在引物引导的扩增反应期间产生的核酸片段。引物引导的扩增的典型方法包括聚合酶链反应 (PCR)、RT-PCR、连接酶链反应 (LCR) 或链置换扩增反应 (SDA)。

[0049] 如本文所用,术语“溶解”指破坏或改变细胞壁以利于接近或释放细胞 RNA 或 DNA。溶解概念基本上不需要完全破坏或破损细胞壁。

[0050] 如本文所用,术语“溶解剂”指适于溶解或打开细胞壁的任何剂或条件、或者剂或条件的组合。溶解剂可包含酶(如溶菌酶、或噬菌体溶胞酶)或化学制品(如氯仿)、去污剂、溶解缓冲液、加热或可涉及物理剪切装置如使用超声波降解、砂磨机、弗氏压碎器等。溶解剂是为本领域人们所熟知的。

[0051] 如本文所用,术语“热循环”指在 RT-PCR 或 PCR 检测分析期间改变温度的整个模式。该方法是本领域常见并熟知的。参见例如 Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; 和授予 Mullis 等人的美国专利公开 4,683,202 以及授予 Mullis 等人的美国专利公开 4,683,195。一般来讲,PCR 热循环包括初始的高温变性步骤,随后是设计使得模板变性、引物退火、以及聚合酶引起的退火引物延伸的一系列重复温

度循环。

[0052] 如本文所用,术语“直接检测”指在不分离或纯化诊断性靶 DNA 或 RNA 的情况下检测和 / 或鉴定存在的诊断性靶 DNA 或 RNA 的检测分析法。

[0053] 发明详述

[0054] 本发明提供检测有害物剂如包括细菌和病毒病原体的微生物的方法,以及适用于该方法的试剂盒和系统。具体地讲,本发明可应用于检测病原体,所述病原体是或可能是病害引发剂。所述方法包括收集、处理并检测靶核酸 (DNA 或 RNA) 或者在存在有害物剂的代表性样品中,不需要纯化该样品。该方法和试剂盒及系统提供廉价的、迅速的原位 (在现场) 检测动物和植物组织中包含的病毒和细菌病原体。

[0055] 本发明提供用于收集、分析或鉴定样品中的靶核酸的方法、试剂盒和系统。该基因序列用于检测并鉴定样品中存在的有害物剂。该方法包括 (a) 提供包含核酸的样品 ;(b) 将所述样品转移到柔性壁容器中 ;(c) 将萃取液加到容器中 ;(d) 用萃取液和一种或多种处理试剂在容器中处理所述样品以从样品中释放核酸以溶解核酸并产生回收液 ;以及 (e) 将一部分来自步骤 (d) 的回收液或产物转移到合适的检测系统以用于靶核酸的检测。因此,本发明的方法提供直接检测。不需要纯化靶核酸。

[0056] 步骤 (d) 中的“处理”本文指包括将样品与萃取液和一种或多种处理试剂混合。可通过振荡容器作为混合的一部分来辅助核酸的回收。处理可包括附加的处理步骤,例如用萃取液和一种或多种处理试剂浸软样品。“浸软”是指压碎或破碎样品中的固体以帮助从样品中释放核酸。当样品是固体如生物组织时浸软可起到作用。可通过例如施加外力到容器壁上完成浸软。在浸软期间,可使容器壁互相接触,引起样品在容器壁之间被压碎或浸软。可改变或破坏组织和细胞膜以便能够将其中包含的靶核酸溶解在萃取液中供利用。因此,该任选步骤有助于溶解和回收核酸。如果样品是均质流体,例如血液或血淋巴,可不进行压碎。

[0057] 处理试剂可包括酶或其他试剂。处理试剂可用于处理或降解抑制剂。此外,可在步骤 (e) 之前灭活处理试剂以便它们不对靶核酸的后续检测产生负面影响。

[0058] 在步骤 (e) 中,将步骤 (d) 中的一部分回收液转移到合适的检测系统中用于靶核酸的检测和 / 或鉴定。适用的检测系统基于 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术。

[0059] 任选地,可通过孵育和 / 或加热容器中的样品及萃取液进一步促进核酸的回收。期望的孵育和 / 或加热时间取决于样品中包含的抑制剂的特性和类型。例如孵育和 / 或加热程度取决于灭活或降解抑制剂所需的时间和温度。加热也可用于灭活处理试剂如用于灭活或降解抑制剂的酶。

[0060] 用于检测靶核酸的优选检测系统使用 PCR 或 RT-PCR 扩增靶核酸,使用 WSSV、IHHNV、TSV 和哈氏弧菌的诊断引物序列,该检测系统详述于 WO 2008/024294 (WSSV) ;WO 2008/024293 (IHHNV) ;WO 2008/024292 (TSV) ;和 WO 2008/048673 (哈氏弧菌) 中。

[0061] 本发明的试剂盒包括制备样品及检测或鉴定诊断性靶 DNA 或 RNA 的材料和容器,例如经由 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术检测或鉴定靶 DNA 或 RNA。试剂盒包括 (a) 在其内处理样品的柔性壁容器, (b) 萃取液, (c) 处理试剂, (d) 移液管,该移液管用于收集并测量用萃取液在容器中混合样品制备的回收液,并且用于将容器内容物转移

到检测系统中。

[0062] 下文描述了样品、柔性壁容器、萃取液和检测系统。移液管可为能够将流体从一个容器转移到另一个容器的任何装置。可用的移液管的一个实例是精确定量移液管,例如那些可从 Poly-Pipets, Inc. (Englewood Cliffs, NJ) 商购获得的移液管。

[0063] 试剂盒还可包括用于辅助压碎固体样品的压碎装置、过滤装置和 / 或过滤介质以及一种或多种处理试剂以帮助释放和溶解核酸并移除或灭活抑制物质。

[0064] 试剂盒通常还包括描述使用试剂盒组件进行样品制备的说明书。

[0065] 用于检测靶核酸的试剂盒可包括以干燥形式或液体形式存在的检测介质,所述介质用于杂交靶和探针核酸以及通过洗涤移除非期望的和未杂交形式的核酸。试剂盒可包括固体支持体(例如量油计、小珠等),来源于分离的诊断引物序列的未标记核酸探针被固定在它上面(或与其结合)。试剂盒还可包括与相同 DNA 链的第二及不同区域互补的标记探针,未标记的核酸探针与该 DNA 链杂交。标记探针也可来源于本文所公开的分离诊断引物序列。

[0066] 试剂盒还可包括与检测系统一起使用的检测介质。检测介质可包含酶、三磷酸脱氧核苷酸、荧光剂、至少一对内部样品对照引物、至少一个内部模板对照物和至少一对内部模板对照引物、以及包含与靶核酸至少一个区域的一部分互补的序列的探针,该探针能够用试剂盒中包含的诊断引物序列扩增。检测介质可为多种形式,例如液体、干燥物、或片剂形式,并且可存在于任何合适的容器或多个容器中,例如小瓶、管等。

[0067] 还提供了诊断系统,它用于样品制备和样品中包含的靶核酸的检测或鉴定。所述系统包括如上文所述的试剂盒、包含一种或多种用于检测诊断性靶核酸的检测试剂的检测介质、以及用于检测 DNA 或 RNA、或 cDNA 产物的处理器。完成检测的处理器包括热循环仪或烘箱式加热器。

[0068] 在扩增后,例如使用 PCR 或 RT-PCR,可将扩增的核苷酸序列连接到合适载体上,随后用所述载体转化合适的宿主生物。因此确保较容易利用的扩增序列的供应。作为另外一种选择,如下文所述,在扩增后可化学合成扩增序列或其一部分用作核苷酸探针,将该探针用于杂交测定。在任一种情况下 DNA 序列的可变区可使用以下方法确定:例如双脱氧方法(Sanger, F. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 74 :5463-5467 (1977))。获取的序列用于指导生物探针的选择并选择最合适的序列。

[0069] 样品

[0070] 一般来讲,样品来自食品生产(即,食品或与食品接触的液体)、水产业、农业、食品生产的工业过程、以及环境。该列表是示例性的而非详尽的。尤其值得关注的应用是从与养殖的牲畜或水产品的生长相关联的样品中回收靶核酸。这些包括食品和饲料生产及加工、处理和食品制备。尤其关注的是由于病原体的发展及由此引起污染的样品,所述样品与海洋水产养殖业和食品供应相关联。一般来讲,样品包含水、饲料、种鱼、动物组织、体液和 / 或生产的食品。

[0071] 可通过擦洗表面收集组织或体液、萃取固体或半固体样品提供样品。其他方法是本领域技术人员已知的。在一个优选的实施方案中,样品是虾组织,更具体地讲一个或多个虾腹肢。在本发明中,可使用虾腹肢检测虾中的常见病原体。更具体地讲,白斑综合征病毒(WSSV)能在虾场或其他养虾设施或场所中使用本发明的方法、试剂盒和诊断系统对虾进行

检测。

[0072] 柔性壁容器

[0073] 使用柔性收集容器收集、处理并回收靶核酸进行检测或鉴定。密封该容器的壁以形成小袋，其一端开口 – 顶部 – 并且提供液体密封的容器。

[0074] 该容器主要的和基本的特征是其壁是柔性的，这种柔性提供以下功能。

[0075] (i) 可将外力施加到容器壁上以便能在壁间压碎固体样品（例如生物组织）。因此，通过减小样品材料的粒度、浸软组织结构并破坏生物样品材料的细胞壁，将能够进行并改善靶核酸的回收。

[0076] (ii) 容器的柔性提供了收集样品的多种方法。例如能将柔性容器里外翻转使得外壁变成内壁。一旦里外翻转了容器壁，操作人员可把手伸入翻转后的容器中收集样品材料，然后将容器壁翻转回最初的一边并从而将样品放入容器中。因此操作人员避免了自己的手对样品造成污染。这种特殊的技术可在对海产品和农产品进行采样时有利地使用。例如可轻易地从虾上移除虾腹肢并将其置于容器中，不需要使用其他收集辅助工具如解剖刀或镊子。

[0077] (iii) 容器的柔性还提供在萃取液中搅动并悬浮样品材料的手段。通过简单地对壁施加并释放外部压力，可搅动并悬浮萃取液中的样品材料。

[0078] 为了提高本发明的方法和试剂盒及系统的效用，柔性容器优选具有连接到容器顶部的闭合件，以便在本方法中能在开口和封闭情况下翻转该容器。该闭合件能进行密封并使得样品和回收液通过方法步骤，所述步骤可包括收集材料、混合样品与萃取液、和将处理试剂加到样品中以及防止容器内容物的溢出和污染。可使用多种闭合机构，优选细条纹和槽型以及拉链袋。

[0079] 可使用多种合成聚合物和天然衍生聚合物（例如玻璃纸）制备容器壁。一般来讲，优选聚丙烯和聚乙烯。为了保持柔韧性并提供合适的强度，壁的厚度一般介于 1 和 8 密耳之间（0.025 至 0.20mm），优选壁的厚度为 2 至 6 密耳（0.51 至 0.15mm）。虽然不意欲进行限制，但容器的尺寸一般大到足以包含 0.5 至 1,000mL 的体积，优选 1 至 15mL 的体积。

[0080] 萃取液

[0081] 加入萃取液以溶解存在于容器中或者加到容器中的任何处理试剂并且溶解样品中包含的靶核酸。萃取液可溶解并化学处理样品以促进核酸回收。萃取液可包含一种或多种处理试剂以灭活或降解样品组分，所述样品组分抑制核酸的检测（“抑制剂”）。

[0082] 萃取液是流体。萃取液可为水。萃取液可包含水和一种或多种处理试剂。将萃取液加入柔性容器以溶解并从样品中回收靶核酸。因为可将这种流体转移到检测介质上，它的化学组成必须与检测系统相容并且不干扰检测系统（基于 PCR、RT-PCR、等温扩增、探针杂交、或基因测序），包括不干扰在系统中的反应。样品与萃取液的混合产物本文称为“回收液”。因此，回收液包含已从样品中释放并溶解的核酸。

[0083] 在一个优选的实施方案中，回收液作为检测介质的唯一稀释剂使用，所述检测介质包含一种或多种检测试剂如干燥的或冻干的检测试剂组合物。用这种方法，通过将单独的检测液加到干燥检测试剂中，将能够进行简便的、无需后续步骤的检测。

[0084] 还需要萃取液的体积足以有效地从样品中萃取靶核酸，同时足以稀释样品中的抑制剂以便抑制剂不干扰检测。一般来讲萃取液的体积应在检测反应体积的 25 至 500 倍的

范围内。更优选地,萃取液的体积应在检测反应体积的 50 至 200 倍的范围内。

[0085] 处理试剂

[0086] 试剂盒还可包括一种或多种处理试剂以利于溶解核酸用于通过 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序、或探针杂交对它们进行检测和鉴定。加入一种或多种处理试剂行使两种不同的功能。第一,加入处理试剂以从样品中释放并溶解靶核酸。处理试剂的第二种功能是支持靶核酸的扩增。

[0087] 通常加入一种以上的处理试剂。例如第一处理试剂可为包含溶解剂的组合物,它可用于破坏细胞壁以接触靶核酸。溶解剂可为或可包含去污剂、酶、或它们的组合。去污剂可为促进溶解靶核酸的表面活性剂。酶也可通过引起蛋白沉淀或换句话说讲移除或灭活抑制剂来与萃取液协同作用。可将多种酶和其他溶解试剂固定在支持体上以协助过滤颗粒。因此,可处理样品并且在将样品转移到检测系统之前移除处理试剂。附加溶解剂在例如 US 2005/0266468A1 中进行了描述,其教导以引用方式并入本文。

[0088] 第二处理试剂可为包含 pH 在 7 至 7.8 范围内的缓冲液、氯化镁、和氯化钾的组合物。这种组合物有助于扩增靶核酸。

[0089] 处理试剂还可包含抑制 RNA 酶和 DNase 的稳定剂。

[0090] 虽然不意欲进行限制,但回收液的可用组合物为 50mM Tris-HCl 缓冲液,3.0mM MgCl₂,28mM KCl,0.1% Triton X-100 表面活性剂 (Triton X-100 是得自 Dow Chemical Co., Midland MI 的表面活性剂)。

[0091] 可在加入样品和萃取液之前,将一种或多种处理试剂加到柔性壁容器中。除此之外或作为另外一种选择,可将处理试剂加到萃取液中。

[0092] 过滤

[0093] 本发明的方法任选地包括在将回收液加到检测系统之前,过滤回收液以移除不需要的颗粒的步骤。回收液中不需要的颗粒可包括抑制剂和过多的靶核酸。因此过滤可有助于移除抑制剂并改善测试的再现性。

[0094] 通过在试剂盒中加上过滤介质可容易地进行过滤,例如在柔性容器中加上过滤介质。所述方法可包括使得回收液通过柔性容器中的过滤器。作为另外一种选择,试剂盒可包括移液管,其中移液管在其管内具有过滤介质。过滤通过转移回收液使其通过移液管中的过滤介质进行,并且将过滤后的液体转移到检测系统。在将回收液分配到检测系统中前应移除过滤器。

[0095] 试剂盒也可包括过滤介质和 / 或可为吸附剂或非吸附剂的颗粒。也可将过滤介质和颗粒加到容器中或在方法中使用以移除抑制剂和 / 或辅助过滤过程。

[0096] 过滤介质包括加工的或非加工的天然纤维以及非织造的合成纤维。这些材料可为经处理的或未经处理的,它们有助于样品相容性和润湿。例如可使用纤维如棉花和尼龙。

[0097] 过滤颗粒包括吸附的和非吸附的颗粒,它们可用于吸附并从回收液中移除不需要的材料或用于辅助过滤。吸附的和非吸附的颗粒也可与过滤介质联合使用。吸附剂应具有大于 1.0 克每毫升的密度。具体的吸附剂包括 J. T. Baker 硅藻土 (cat. #1939-01)、CELITE4/4、KENITE4/4200、CELATOM4/4 FW6、CUNO4/4 M-901、CUNO4/4m802、PERFLO4/4200、PERFLO4/463、PERFLO4/430、ALITE4/4150、ALITE4/4180、或它们的混合物、J. T. Baker 硅藻土 (cat. # 1939-01)、CELITE4/4、KENITE4/4200、CELATOM4/4FW6、CUNO4/4M-901、

CUN04/4m802、PERFL04/4200、PERFL04/463、和 PERFL04/430 吸附剂。

[0098] 虽然使用的过滤介质或颗粒的量取决于样品的大小,但每 mL 回收液应有 10 至 170mg 的吸附剂,优选每 mL 回收液有 10-60mg 的吸附剂。

[0099] 检测系统

[0100] 检测系统包括检测设备和与设备一起使用的检测介质。设备和检测介质可基于 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术。当检测系统使用 PCR 时,检测系统包括具有引物混合物的检测介质,所述引物混合物包含至少一个与靶核酸互补的引物组;耐热聚合酶;核苷酸(dNTP);缓冲液和一种或多种检测探针。当检测系统使用 RT-PCR 时,检测系统包括具有引物混合物的检测介质,所述引物混合物包含至少一个与靶 RNA 互补的引物;热活化的耐热聚合酶;逆转录酶;核苷酸(dNTP);缓冲液;和 RNA 酶抑制剂。当检测系统使用等温扩增时,所述检测系统包括具有 DNA 聚合酶和一套四个专门设计的引物的检测介质,所述引物识别靶核酸总计六个不同的序列。当检测系统使用基因测序时,所述检测系统包括具有一个或多个标记终止子、缓冲液和合适的酶的检测介质。当检测系统使用探针杂交时,所述检测系统包括具有寡核苷酸(合成的或天然存在的)的检测介质,所述寡核苷酸与靶核酸显著互补并且杂交到其上。当检测系统使用等温扩增时,所述检测系统包括具有 DNA 聚合酶和一套四个专门设计的引物的检测介质,所述引物识别靶核酸总计六个不同的序列。

[0101] 本发明的诊断系统不受检测方法的限制并且可通过检测 PCR、RT-PCR、等温扩增、基因测序或探针杂交技术的产物的任何方法使用。优选 PCR 和 RT-PCR。

[0102] 一般来讲,PCR 热循环包括初始的高温变性步骤,随后是设计使得模板变性、引物退火、以及聚合酶引起的退火引物延伸的一系列重复温度循环。一般来讲,最初在约 95°C 加热样品约 2 至 10 分钟以变性双链 DNA 样品。然后在每个循环开始时,取决于样品和所用仪器的类型,变性样品约 10 至 60 秒。在变性后,允许引物在较低温度下对靶 DNA 进行退火,从约 40°C 至约 60°C 退火约 20 至 60 秒。聚合酶催化的引物延伸常常在约 60°C 至约 72°C 的温度范围内进行。延伸所用的时间将取决于扩增子的大小和用于扩增的酶的类型并且通过常规实验容易地测定。此外,退火步骤可与延伸步骤组合使用,产生两步骤循环。在 PCR 检测分析法中热循环也可包括附加的温度变化。在任何检测分析法中使用的循环数可由本领域的技术人员用常规实验容易地测定。在完成热循环后任选地可增加最终的延伸步骤以确保所有扩增产物的合成。

[0103] 在扩增后,可将扩增的核苷酸序列连接到合适载体上,随后用所述载体转化合适的宿主生物。因此确保较容易利用的扩增序列的供应。作为另外一种选择,如下文所述在扩增后可化学合成扩增序列或其一部分用作核苷酸探针,将该探针用于杂交测定。在任一种情况下 DNA 序列的可变区可使用以下方法确定:例如双脱氧方法(Sanger, F. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. 74 :5463-5467 (1977))。获取的序列用于指导生物探针的选择并选择最合适的序列。

[0104] 在 RT-PCR 中,反转录通常在组合物中进行,所述组合物包含杂交到靶 RNA 以引导拷贝 DNA 合成的引物、四种三磷酸脱氧核苷酸的混合物(即 dATP、dCTP、dTTP、和 dGTP)、MgCl₂、逆转录酶和逆转录酶缓冲液。此外,所述组合物可任选地包含 RNA 酶抑制剂,如异硫氰酸胍、焦碳酸二乙酯、SuperaseIn™ (Ambion, Inc., Austin, TX)、RNA 酶 Block (Stratagene

Corp., La Jolla, CA)、人胎盘核糖核酸酶抑制剂、猪肝 RNA 酶抑制剂 (Takara Mirus Bio Company, Madison, WI)、Anti-RNA 酶 (Novagen, Inc., Madison, WI)、Ribonuclease Inhibitor III (PanVera Corp., Madison, WI)、RNAlater™ (Ambion, Inc.)、或 RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Inc., Valencia, CA)。合适的逆转录酶是为本领域人们所熟知的,包括但不限于 HIV 逆转录酶 (Ambion, Inc.)、Transcriptor 逆转录酶 (Roche Applied Science Corp., Indianapolis, IN)、Thermoscript 逆转录酶 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。

[0105] 无论反转录和扩增是分两步完成还是一步完成,首先进行的是反转录步骤,它通常由在介于约 37°C 和约 70°C 之间的单温度孵育组成。不同的温度适用于不同的逆转录酶和不同的引物,这一点是本领域技术人员已知的。

[0106] 在本文公开的方法中可使用本领域熟知的多种检测方法。这些检测方法包括但不限于标准非变性凝胶电泳 (例如丙烯酰胺或琼脂糖)、变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳、毛细管电泳、以及荧光检测。

[0107] 荧光检测方法对扩增产物提供迅速灵敏的检测。荧光检测还提供了实时检测的能力,其中在热循环过程期间监控扩增产物的形成。此外,初始靶的量可使用荧光检测进行定量。荧光检测可通过在热循环过程之前或之后将核酸结合荧光剂加入反应混合物中完成。核酸结合荧光剂优选地是一种插入染料,它能够以非共价形式插入核酸双螺旋结构的堆叠碱基对之间。然而非插入核酸结合荧光剂也是适用的。

[0108] 本发明方法中可用的核酸结合荧光剂的非限制性实例为溴化乙锭和 SYBR Green I (得自 Molecular Probes ;Eugene, OR)。在热循环之前将核酸结合荧光剂加到反应混合物中允许实时监控扩增产物的形成,这在 Higuchi (美国专利 5,994,056) 中进行了描述。能够进行实时荧光测量的热循环仪可从公司如 Applied Biosystems (Foster City, CA)、MJ Research (Waltham, MA)、和 Stratagene (La Jolla, CA) 商购获得。在扩增后,可使用本领域已知的方法测定产物的熔融温度,由此评估形成的扩增产物,所述方法例如使用荧光测量生成熔融曲线。

[0109] 也可使用本领域已知的其他方法完成扩增产物的荧光检测,例如使用荧光标记探针。所述探针包含至少一部分扩增产物的互补序列。此类探针的非限制性实例包括 TaqMan 探针 (Applied Biosystems) 和分子信标 (Goel 等人, J. Appl. Microbiol. 99(3) : 435-442 (2005))。例如,用于与 TSV 引物一起使用以构建荧光标记探针的基因序列可通过分析 TSV 基因并测试扩增子进行选择,分析使用可商购获得的分析软件如 Primer Express® v2.0 (Applied BioSystems Inc., Foster City California),这在 WO 2008/024292 A1 的实施例 9 和 10 中进行了详述。用于与本文公开的 WSSV 引物一起使用以构建荧光标记探针的基因序列可通过分析 WSSV 基因并测试扩增子进行选择,这在 WO2008/024294A2 的实施例 11 和 12 中进行了详述。选择的探针序列位于特定测试扩增子的近端。可使用本领域已知的方法荧光标记探针,例如那些下述的标记杂交探针的方法。就实时荧光检测而言,可对探针进行双标记。例如可使用荧光基团如 6FAM™ (Applied BioSystems) 标记探针的 5' 末端,使用淬灭剂染料如 6-羧基四甲基罗丹明 (TAMRA) 标记探针的 3' 末端。就小沟结合探针 (minor groove binding probe) 而言,可用淬灭剂染料和小沟结合复合物标记 3' 末端。荧光标记探针可获取自商业来源如 Applied BioSystems。

[0110] 在一个实施方案中,本发明提供用于定量样品中的靶核酸的方法。在这个实施方

案中,从推测含有靶核酸的样品中提供 DNA 或 RNA 并生成互补 DNA。用本文公开的至少一对寡核苷酸引物通过介于至少一个变性温度和一个延伸温度之间的热循环,在存在核酸结合荧光剂或荧光标记探针的情况下扩增所述 DNA。在热循环期间测量通过核酸结合荧光剂或荧光标记探针生成的荧光量。根据荧光测量,测定出一个循环数阈值,在该阈值上核酸结合荧光剂或荧光标记探针生成的荧光量达到在基线值之上的固定阈值。循环数阈值本文称为 CT 数或值。CT 数可手动测定或通过仪器自动测定。为了测定 CT 值,在初始扩增循环期间测定每个样品的基线荧光。然后使用数学算法确定什么样的统计意义上的显著性荧光改变将需要成为高于背景的荧光信号。将荧光超过其阈值时的循环数称为 CT 数。通常在热循环开始时样品中存在的 DNA 越多,达到阈值将进行的循环数越少。

[0111] 因此 CT 数与样品中的初始靶核酸的量逆相关。在测定了样品的 CT 数后,样品中最初存在的靶核酸的量可通过比较测定的样品中靶核酸循环数阈值与循环数阈值对使用已知浓度标准溶液测定的模板浓度的对数的标准曲线进行计算,这是本领域熟知的方法。

[0112] 下文描述了 WSSV 和 TSV 的靶核酸序列。本领域的技术人员将认识到使用本发明的方法、试剂盒和诊断系统能检测或鉴定其他靶核酸序列。

[0113] 序列描述

[0114] 从下文的发明详述及附带的序列描述中可较充分地理解本发明的多个实施方案,它们形成本专利申请的一部分。

[0115] 以下序列符合 37C.F.R. 1.821-1.825 (“对含有核酸序列和 / 或氨基酸序列公开的专利申请的要求-序列规则”) 并且与 World Intellectual Property Organization(WIPO) Standard ST.25(1998) 以及 EP0 和 PCT(Rules 5.2 和 49.5(a-bis),以及 Administrative Instructions 的 Section 208 和 Annex C) 的序列表要求一致。核苷酸的符号和格式以及氨基酸序列数据符合如 37C.F.R. § 1.822 所示的规则。

[0116] SEQ ID NO:1-8 是用于检测 WSSV 的 WSSV 诊断引物的核苷酸序列。

[0117] SEQ ID NO:9-12 是如实施例的一般方法部分所述的合成 WSSV 模板的核苷酸序列。这些序列也是使用本文所公开的 WSSV 诊断引物对获取的扩增产物的核苷酸序列。

[0118] SEQ ID NO:13-18 是用于检测 TSV 的桃拉综合征病毒 (TSV) 诊断引物的核苷酸序列。

[0119] SEQ ID NO:19-21 是如实施例的一般方法部分所述的合成 TSV 模板的核苷酸序列。这些序列也是使用本文所公开的 TSV 诊断引物对获取的扩增产物的核苷酸序列。

[0120] 针对 WSSV、IHHNV、TSV 和哈氏弧菌描述了序列、扩增产物、和诊断引物,它们被更充分地描述于 WO 2008/024294(WSSV);WO 2008/024293(IHHNV);WO 2008/024292(TSV);和 WO2008/048673(哈氏弧菌)中。

[0121] 一般来讲两个引物与样品 DNA、四种三磷酸脱氧核苷酸(即 dATP、dCTP、dTTP、和 dGTP)的混合物、耐热 DNA 聚合酶如 TaqDNA 聚合酶在缓冲液中混合。然后使用热循环仪使这种混合物进行热循环以扩增期望的靶区域。热循环仪可从许多来源商购获得(例如 Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA;Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY;MJ Research, Inc., Waltham, MA;Stratagene Corp., La Jolla, CA)。

[0122] 病毒基因组

[0123] 白斑综合征病毒 (WSSV),也称为白斑杆状病毒 (WSBV),是一种主要的虾病原体,

它具有高致死率和广泛的宿主范围。已经对 WSSV 的全部基因组进行了测序 (van Hulten 等人, Virology 286:7-22 (2001); 以及 Yang 等人, J. Virol. 75:11811-11820 (2001))。该基因组由双链环状 DNA 组成, 所述 DNA 包含 305, 107 个碱基对 (bp) 和 181 个开放阅读框 (ORF) (GenBank AF332093)。在泰国存在至少 12 个 WSSV 的变体, 它们的区别在于 ORF 94 中的多个重复序列长度不同 (Wongteerasupaya 等人, Dis. Aquat. Org. 54:253-257 (2003))。

[0124] 桃拉综合征病毒 (TSV) 是主要的虾病原体, 它具有高致死率和广泛的宿主范围。已经对 TSV 的全部基因组进行了测序 (GenBank AF277675)。该基因组由单链 RNA 组成, 所述 RNA 包含 10, 205 个碱基和 2 个开放阅读框 (ORF)。

[0125] WSSV 诊断引物序列

[0126] 本文所公开的是用于 WSSV 高灵敏度检测的多种测定方法的诊断引物序列。这些引物导向 WSSV 基因组的区域, 它们是 WSSV 检测的诊断剂。

[0127] 引物序列使用一系列“硅片”(即, 基于电脑的)序列分析工具根据经验进行鉴定。在这一过程中, 形成包含所有已知 WSSV 序列的数据库。使用 Vector NTI[®] 软件 (InforMax, Inc., Bethesda, MD) 基于与其他 WSSV 序列的同源性、特定的扩增子长度、盐浓度、T_m (熔融温度)、C+G 含量和免于形成发夹结构及二级结构的参数, 首先比对然后分析这些序列的引物位置。然后参照 GenBank 序列筛选预期的引物。选择那些确定与其他非靶基因序列的同源性小于 5 个碱基的引物进行 PCR 扩增效率和最少引物二聚体形成的实验研究。选择显示高扩增效率和最少引物二聚体形成的引物测试分离自感染多种虾病原体的虾的一组 DNA 以及来自证实无病害的虾的 DNA。选择如下那些引物作为可用的引物: 所述引物扩增所有 WSSV 菌株并显示对来自感染非 WSSV 病原体的虾的 DNA 和分离自证实无病害的不同种类虾的 DNA 无响应。

[0128] 用于检测 WSSV 和它们在 WSSV 基因组中的位置的引物序列在表 1 中给出。这些引物通过标准亚磷酸胺化学法合成或可购自公司如 Sigma Genosys, LP。

[0129] 表 1: WSSV 诊断引物序列

[0130]

引物, 方向	SEQ ID NO:	ORF	WSSV 基因组位置 (GenBank AF332093)
WSSV77F, 正向	1	77	61335-61358
WSSV77R, 反向	2	77	61420-61443
WSSV54F, 正向	3	54	31287-31309
WSSV54R, 反向	4	54	31391-31414
WSSV56F, 正向	5	56	33145-33168
WSSV56R, 反向	6	56	33269-33292
WSSV130F, 正向	7	130	146110-146132
WSSV130R, 反向	8	130	146212-146234

[0131] 表 1 中列出的每个 WSSV 引物组的扩增子序列如表 2 所示。为了用作阳性对照, 使

用标准方法合成 WSSV 模板。合成模板的浓度和拷贝数通过在 260nm (OD₂₆₀) 进行分光光度测量来测定。用纯化水将模板稀释成特定的拷贝数并用作定量检测分析法的阳性对照和标准品。表 2 显示基因组位置、序列鉴定、和靶模板的长度。用于 WSSV 检测的引物序列如 SEQ ID NO:1-8 所示。

[0132] 表 2:模板序列

[0133]

模板	长度 (bp)	SEQ ID NO:	WSSV 基因组位置 (GenBank AF332093)
WSSV 77T	109	9	61335-61443
WSSV 54T	128	10	31287-31414
WSSV 56T	148	11	33145-331292
WSSV 130T	125	12	146110-146234

[0134] TSV 诊断引物序列

[0135] 表 3 列出的是用于 TSV 高灵敏度检测的多种测定方法的诊断引物序列。这些引物导向 TSV 基因组的区域,它们是 TSV 检测的诊断剂。

[0136] TSV 的引物序列使用一系列“硅片”(即基于电脑的)序列分析工具根据经验进行鉴定。在这一过程中,形成包含所有已知 TSV 序列的数据库。使用 Vector **NTI**[®]软件 (InforMax, Inc., Bethesda, MD) 基于与其他 TSV 序列的同源性、特定的扩增子长度、盐浓度、T_m(熔融温度)、C+G 含量和免于形成发夹结构及二级结构的参数,首先比对然后分析这些序列的引物位置。然后参照 GenBank 序列筛选预期的引物。选择那些确定与其他非靶基因序列的同源性小于 5 个碱基的引物进行 PCR 扩增效率和最少引物二聚体形成的实验研究。选择显示高扩增效率和最少引物二聚体形成的引物测试分离自感染多种虾病原体的虾的一组 DNA 以及来自证实无病害的虾的 DNA。选择如下那些引物作为可用的引物:所述引物扩增所有 TSV 菌株并显示对来自感染非 TSV 病原体的虾的 DNA 和分离自证实无病害的不同种类虾的 DNA 无响应。

[0137] 发现用于检测 TSV 和它们在 TSV 基因组中的位置的引物序列在表 3 中给出。这些引物可通过标准亚磷酰胺化学法合成或可购自公司如 Sigma Genosys, LP。

[0138] 表 3:TSV 诊断引物序列

[0139]

引物, 方向	SEQ ID NO:	ORF	WSSV 基因组位置 (GenBank AF332093)
TSV2F, 正向	13	1	475-498
TSV2R, 反向	14	1	568-592
TSV3F, 正向	15	1	4953-4976
TSV3R, 反向	16	1	5053-5075
TSV5F, 正向	17	2	7377-7401
TSV5R, 反向	18	2	7470-7494

[0140] 表 3 中列出的每个 TSV 引物组的扩增子序列如表 4 所示。为了用作阳性对照, 使用标准方法合成 TSV 模板。合成模板的浓度和拷贝数通过在 260nm (OD₂₆₀) 进行分光光度测量来测定。用纯化水将模板稀释成特定的拷贝数并用作定量检测分析法的阳性对照和标准品。表 4 显示基因组位置、序列鉴定、和靶模板的长度。用于 WSSV 检测的引物序列如 SEQ ID NO:13-18 所示。

[0141] 表 4:模板序列

[0142]

模板	长度 (bp)	SEQ ID NO:	WSSV 基因组位置 (GenBank AF332093)
TSV 2T	118	19	475-592
TSV 3T	123	20	4953-5075
TSV 5T	118	21	7377-7494

实施例

[0143] 以下实施例有助于说明用于检测 DNA 靶核酸和 RNA 靶核酸的样品处理方法的总体效用。应当理解这些实施例仅作为例证给出。从上文的讨论和这些实施例中, 本领域的技术人员能够确定本发明的特性, 并且在不脱离其实质和范围的情况下, 能对本发明进行各种变化和修改以适应不同的用途和条件。

[0144] 缩写的含义如下: “sec”指秒钟, “min”指分钟, “hr”指小时, “d”指天, “μL”指微升, “mL”指毫升, “L”指升, “μM”指微摩尔每升, “mM”指毫摩尔每升, “nM”指纳摩尔每升, “M”指摩尔每升, “mmol”指毫摩尔, “μmol”指微摩尔, “ng”指纳克, “fg”指飞克, “μg”指微克, “mg”指毫克, “g”指克, “nm”指纳米, “mU”指毫单位, “in.”指英寸, “U”指单位, “rxn”指反应, “OD”指光密度, “OD₂₆₀”指在 260nm 波长测量的光密度, “OD₂₈₀”指在 280nm 波长测量的光密度, “OD_{280/260}”指 OD₂₈₀ 值对 OD₂₆₀ 值的比率, “rpm”指每分钟转数, “CT”指反应中积聚的荧光超过检测阈值时的循环数, “SPF”指无特定病原体。

[0145] 一般方法

[0146] 实施例中使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域熟知的并且描述于

Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 ;T. J. Silhavy, M. L. Bennan, 和 L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1984 ;以及 Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, N. Y., 1987。使用得自 InforMax, Inc. (Bethesda, MD) 的 Vector **NTI**[®]软件包

[0147] 完成基因组序列分析和引物设计。

[0148] 本文使用的酶和试剂购自以下供应商：

[0149] Applied Biosystems, Inc. :AmpliTaq(目录号 N808-0160) ；

[0150] New England Biolabs, Inc. , Beverly, MA :脱氧核苷酸溶液混合物 (目录号 N0447S) ；

[0151] Sigma Genosys, LP :寡核苷酸；

[0152] Invitrogen Corp. , Carlsbad, CA :4% 琼脂糖 E- 凝胶 (目录号 G6018-02) ；

[0153] Qiagen, Inc. :蛋白酶 K(目录号 19131) ；和 RNA 酶 A, 不含 DNase(目录号 19101)。

[0154] 试剂盒元件和试剂购自以下供应商：**SYBR**[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc. ; 目录号 4309155) ；和 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Inc. ; 目录号 51304)。

[0155] 虾样品

[0156] 所有虾 DNA 样品获取自 Donald V. Lightner, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA。这些样品包括来自证实无病害的虾 (SPF) 和包含斑节对虾杆状病毒 (MBV)、桃拉综合征病毒 (TSV)、白斑综合征病毒 (WSSV)、对虾黄头病毒 (YHV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 和染性肌肉坏死病毒 (IMNV) 的感染后的虾。

[0157] 模板和引物

[0158] 为了说明如何从虾组织中回收并检测 DNA 病毒靶核酸, 开发并合成白斑综合征病毒 (WSSV) DNA 基因组的 DNA 寡核苷酸基因组区域的引物 (GenBank 登录号 AF332093 ;Yang, F. 等人, J. Virology 75(23), 11811-11820 (2001)) 并使用标准亚磷酰胺化学法合成或购买 (Sigma Genosys, LP)。

[0159] 为了说明如何从虾中回收并检测 RNA 病毒靶核酸, 开发并合成桃拉综合征病毒 (TSV) 基因组的寡核苷酸序列 (GenBank 登录号 AF277675) 的引物 ;Mari, J. , Poulos, B. T. , Lightner, D. V. and Bonami, J. R. , J. Gen. Virol. 83(Pt 4) :915-926 (2002)。这些引物分别从碱基 475 至 592 和 4953 至 5076 以及 7377 至 7495 合成。使用标准亚磷酰胺化学法合成或购买 (Sigma Genosys, LP) 合成 TSV 靶。在单反应中使用合成 TSV 靶作为阳性对照和实时 RT-PCR 检测分析法中的定量标准品。

[0160] 实施例 1

[0161] 该实施例显示本发明方法和处理虾样品的容器的应用, 以及在不同的虾组织中检测 WSSV 靶核酸。因为 WSSV 感染组织 / 器官的中胚层和外胚层起源, 对虾的多种虾组织获取自 Dr. Lightner。从感染 WSSV 的虾和证实未感染 WSSV 的 SPF 虾中收集组织。样品包括 (a) 血淋巴, (b) 腹肢, (c) 鳃, 和 (d) 尾部肌肉。用基准样品萃取方法 (QIAamp DNA Mini

Kit(Qiagen, Inc. ;目录号 51304) 处理相同样品的萃取对照部分。

[0162] 样品间的每个样品处理的虾组织量不同。就虾组织而言,处理的样品重量介于 50 至 200mg/ 样品的范围内。就血淋巴而言,处理 5 至 50 μ L/ 样品。

[0163] 通过将各个固体组织和血淋巴加到用作柔性容器的 3 in. $\times$ 3 in. (76 $\times$ 76mm) 4mil (0.10mm) 聚丙烯拉链袋 (Associated Bag, Inc., Milwaukee, WI) 中进行样品处理。就血淋巴而言,将血淋巴直接加到袋中。

[0164] 不对血淋巴样品进行压碎。就腹肢、鳃、和尾部肌肉样品而言,通过施力到袋表面或用塑料容器 (1in. $\times$ 1in., 25mm $\times$ 25mm, 直径) 的平末端撞击袋来压碎袋中的组织。在约 10 秒的时间内重复压碎动作约 5 次。

[0165] 然后在室温下将五毫升萃取液 (50mM Tris-HCl, 3.0mM $MgCl_2$, 28mM KCl, 0.1% Triton X-100 表面活性剂) 加到每个样品中并闭合袋上的拉链。

[0166] 然后混合组织样品并将其悬浮在萃取液中,通过振荡或重复挤压袋来提供回收液。静置袋约五分钟。在此期间观察到颗粒沉降。

[0167] 为了进行检测,将袋打开并将 50 μ L 回收液转移到冻干的 PCR 试剂制剂中 (25mM dNTP, .005 μ L SYBR Green I (R), 0.24 μ g BSA, 1.8 单位 AmplitagTM, 赋形剂和 18pmole/rxn 正向和反向 WSSV 引物 (3 和 4)。使用以下热循环程序进行 PCR: 变性 95 $^{\circ}C$ (5 分钟), 35 个循环的 95 $^{\circ}C$ (30 秒), 58 $^{\circ}C$ (30 秒), 72 $^{\circ}C$ (60 秒), 1 个循环的 72 $^{\circ}C$ (60 秒), 4 $^{\circ}C$ (保温)。然后通过电泳分析测试结果,电泳使用 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA: 4% 琼脂糖 E- 凝胶 (目录号 G6018-02)。

[0168] 比较用该方法处理的组织和通过基准样品萃取方法 ((QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, Inc. ;目录号 51304) 处理的相同组织的检测结果,结果类似。在包含病毒的每个样品中检测 WSSV。用鳃组织检测出一些 PCR 抑制。因此使用本发明的方法有利于检测白斑综合征病毒 (WSSV), 它比常规方法所需时间更短并且更方便。

[0169] 实施例 2

[0170] 该实施例显示本发明的方法和容器可有效地用于处理和回收待检测的靶 RNA。

[0171] 用 SPF 对照虾和感染 TSV 病毒的虾进行与实施例 1 相似的实验。因为 TSV 感染组织 / 器官的中胚层和外胚层起源,使用对虾的多种虾组织。TSV 样品获取自 Dr. Lightner。从感染 TSV 的虾和证实未感染 WSSV 的 SPF 虾中收集组织。

[0172] 样品包括 (a) 血淋巴, (b) 腹肢, (c) 鳃, 和 (d) 尾部肌肉。用基准样品萃取方法 (QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, Inc. ;目录号 51304) 处理相同样品的萃取对照部分。

[0173] 样品间的每个样品处理的虾组织量可不同。虾组织的样品重量介于 50 至 200mg/ 样品的范围内。就血淋巴样品而言,处理 5 至 50 μ L/ 样品。

[0174] 通过将各个固体组织和血淋巴加到 3in. $\times$ 3in. (76mm $\times$ 76mm) 4mil (0.10mm) 聚丙烯拉链袋 (Associated Bag, Inc., Milwaukee, WI) 中进行样品处理。就血淋巴而言,将血淋巴直接加到袋中。不进行压碎。就腹肢、鳃、和尾部肌肉而言,通过施力到袋表面或用塑料容器 (1in., 25mm 的直径) 的平末端撞击袋来压碎袋中的组织。在约 10 秒的时间内重复压碎动作约 5 次。然后在室温下将五毫升萃取液 (50mM Tris-HCl, 3.0mM $MgCl_2$, 28mM KCl, 0.1% Triton X-100) 加到每个样品中并闭合拉链。可混合组织样品并通过振荡或重复挤压袋将其悬浮在回收液中。静置袋约五分钟。在此期间颗粒趋于沉降。

[0175] 为了进行检测,将袋打开并将 50 μ L 回收液转移到冻干的 RT-PCR 试剂制剂中。该制剂通过加入 25 μ L SYBR[®] Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Inc.; 目录号 4309155), 31.3nM 各个合适的 TSV 正向引物 13 和 62.5nM 的反向引物 14, 12.5U Multiscribe 逆转录酶, 20U Multiscribe RNA 酶抑制剂来进行制备。

[0176] 使用以下热循环程序进行 RT-PCR: 初始步骤是 48°C 30 分钟, 随后是初始变性步骤 95°C 10 分钟, 然后是温度程序为 95°C 15 秒, 60°C 1 分钟的 35 个循环。95°C 变性 (5 分钟), 35 个循环的 95°C (30 秒), 58°C (30 秒), 72°C (60 秒), 1 个循环的 72°C (60 秒), 4°C (保温), 然后是热循环, 其初始步骤为 48°C 30 分钟, 随后是初始变性步骤 95°C 10 分钟, 然后是温度程序为 95°C 15 秒, 60°C 1 分钟的 40 个循环。最终循环是 72°C (60 秒), 4°C (保温)。

[0177] 可通过电泳分析测试结果, 电泳使用 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA :4% 琼脂糖 E- 凝胶 (目录号 G6018-02)。

[0178] 在包含 TSV 病毒的各个样品中, 显示 TSV 的样品结果的比较可指示用本发明方法处理的组织和通过基准样品萃取方法 RNeasy 纤维组织 Mini Kit(Qiagen, Inc. 目录号 74704) 处理的相同组织显示类似的结果。用鳃组织检测出一些 PCR 抑制。因此使用本发明的方法有利于检测桃拉综合征病毒 (TSV), 它比常规方法所需时间更短并且更方便。