

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480043814.8

[43] 公开日 2007年7月25日

[11] 公开号 CN 101006186A

[22] 申请日 2004.8.23
[21] 申请号 200480043814.8
[86] 国际申请 PCT/KR2004/002119 2004.8.23
[87] 国际公布 WO2006/022459 英 2006.3.2
[85] 进入国家阶段日期 2007.2.15
[71] 申请人 财团法人牧岩生命工学研究所
地址 韩国京畿道
[72] 发明人 朴海准 河永柱 金美贤

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司
代理人 钟 晶

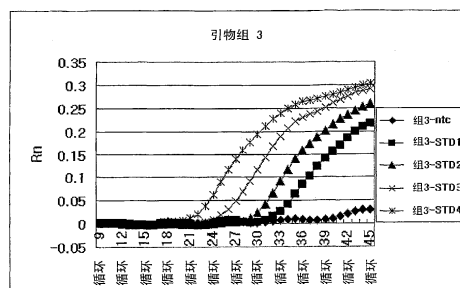
权利要求书 1 页 说明书 6 页 序列表 4 页
附图 10 页

[54] 发明名称

用于检测 SARS 冠状病毒的引物和探针，包括该引物和/或探针的试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

本发明涉及用于检测作为严重急性呼吸综合症 (SARS) 病原体的变异冠状病毒的引物和/或探针，包含所述引物和/或探针的试剂盒，以及使用所述试剂盒的诊断方法。



1. 在 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 中所列出的引物，其用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒。

2. 在 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 10 中所列出的探针，其用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒。

3. 一种用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的试剂盒，其特征在于，其包含权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸。

4. 根据权利要求 3 所述的用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的试剂盒，其特征在于，其还包含 DNA 聚合酶或反转录酶。

5. 一种用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的方法，其特征在于，其包括：

a) 将酶混合物与反应混合物进行混合，其中，所述酶混合物包含 DNA 聚合酶和/或反转录酶，所述反应混合物包含权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸；

b) 向在步骤 a)中所制备的混合物中加入样本 RNA；以及

c) 利用 RT-PCR 方法对在步骤 b)中所制备的包含样本 RNA 的反应溶液进行扩增。

用于检测 SARS 冠状病毒的引物和探针，包括该引物和/或探针的试剂盒及其检测方法

技术领域

本发明涉及用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒（Coronavirus）的寡核苷酸，包含引物和/或探针的试剂盒，和使用所涉及试剂盒检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的方法。

背景技术

2002 年 11 月中国广东省爆发了严重急性呼吸综合症（SARS），蔓延至世界，包括香港、新加坡、越南、加拿大、美国等。该综合症发展为发烧、咳嗽、呼吸困难、非典型性肺炎等。被认为，其病原体被报道是冠状病毒变体，并且主要通过诸如猫、狗等的动物传播(Marra, 等人, 2003, Science, 300:1399-1404; Guan, 等人, 2003, Science, 302:276-278)。

据报道，在 2~7 天的潜伏期后，80~90 % 的病人会好转，但 10~20 % 的病人会恶化发展成为死亡率约为 10% 的严重急性呼吸综合症。由于疫苗和治疗药物还处于开发之中，目前主要集中在早期诊断和检疫上。尽管最近在韩国没有人感染 SARS。但是，因为韩国在地理位置上与中国邻近并且人员和物资的交流持续增加，所以并不能完全排除传染的可能性。除禽流感外，仍认为在韩国其变体可能从动物身上出现。

检测病毒感染的方法中最通常的是通过 ELISA 对血液中的抗原或抗体进行诊断。但是，因为在出现感染症状后 7 天内很难用该方法对症状进行诊断，所以应该优先进行对该病毒基因的检测。实时 PCR 设备已经被用于检测高灵敏性病毒基因。因为冠状病毒是 RNA 病毒，所以可以使用 RT-PCR 方法对其基因进行检测。早期商业上可以获得的用于检测 SARS 基因的实时 RT-PCR 试剂盒是由 Roche 公司和 Artus 公司开发的。该试剂盒表现出高灵敏的检测性能，但它的问题是所使用的设备仅限于来自 Roche 的 LightCycler，并且价格昂贵。近来，Artus 公司开发了作为 ABI Prism 系列用于检测 SARS 冠状病

毒的试剂盒。但是，该试剂盒也存在问题，由于成本昂贵并要花费至少 3 小时来检测病毒，所以难以普遍使用。所以，为了达到解决这些问题的目的，需要开发用于检测 SARS 冠状病毒的新型试剂盒。

发明内容

所以，本发明的发明人尝试开发一种用于检测 SARS 冠状病毒 RNA 的实时 RT-PCR 试剂盒。发明人本人设计了引物和探针来开发一种试剂盒，其与常规试剂盒相比保持或改善了灵敏性和特异性。期望使用本发明自己设计的引物/探针的用于检测 SARS 冠状病毒 RNA 的试剂盒的开发将大大有助于在感染的早期阶段对其进行准确检测，该检测试剂盒在韩国内外的广泛应用也将大大有助于预防严重急性呼吸综合症。

为了完成上述目的，本发明人等提供了一种用于使用 RT-PCR 方法实时检测 SARS 冠状病毒 RNA 的引物/探针。本发明的引物优选是在 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 中所列出的，本发明的探针优选是在 SEQ ID NO: 10 中所列出的。本发明中，探针的特征是其 5'端被修饰为 FAM, TET, 或 VIC, 在 3'端被修饰为 TAMRA。

而且，本发明提供了一种用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的试剂盒，其包含所述引物和/或探针。

本发明中，该试剂盒的特征是，其还包含 DNA 聚合酶或反转录酶。

而且，本发明提供了一种用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒的方法，该方法包括以下步骤：将包含 DNA 聚合酶和/或反转录酶的酶组合物与包含所述引物和/或探针的反应组合物混合；向在前一步骤中制备的混合物中加入样本 RNA；使用 RT-PCR 方法对包含前一步骤中制备的样本 RNA 的溶液进行扩增。

本发明的试剂盒在检测 SARS 冠状病毒 RNA 方面具有优秀的灵敏性和特异性。

附图说明

在下面详细的说明书中，将借助附图对本发明优选实施方式的这些和其他特征、方面和优点进行更充分的描述。在附图中：

图 1 是表示实时 RT-PCR 原理的示意图；

图 2 表示了 SARS 冠状病毒的基因图和扩增子 RNA 在基因组中的位置；

图 3 是表示利用 7 M 尿素/6 % PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测的标准阳性 RNA 的电泳图；

图 4a 和 4b 是表示使用引物组 1 的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，图 4a 表示 PCR 曲线图，图 4b 表示标准曲线。“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。

图 5a 和 5b 是表示使用引物组 2 的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，图 5a 表示 PCR 曲线图，图 5b 表示标准曲线。“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。

图 6a 和 6b 是表示使用引物组 3 的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，图 6a 表示 PCR 曲线图，图 6b 表示标准曲线。“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。

图 7a 和 7b 是表示使用 BNI 引物作为阳性对照的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，图 7a 表示 PCR 曲线图，图 7b 表示标准曲线。“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。

图 8 是表示阳性样本的临床数据的图表。

图 9a 和 9b 是表示阳性样本的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，图 9a 表示 PCR 曲线图，图 9b 表示标准曲线。“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。

图 10 是表示临床结果的图表；

图 11 是表示使用引物组 4 作为阴性对照的实时 RT-PCR 的结果的图表；其中，“ntc”、STD1、STD2、STD3 和 STD4 具有与图 4、5、6 和 7 相同的模板浓度。也就是说，“ntc”代表无模板对照，STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表作为反应模板使用的扩增子 RNA 的 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 。

10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 。从图 11 中可以看出, 在引物组 4 中完全没有检测到该引物和探针的结合。

实施方明的最佳方式

下面, 将对本发明进行详细说明。

为了制造本发明的标准阳性 RNA 样本, 制备了德国 BNI (Bernhard-Nocht Institute) 推荐的扩增子 RNA (见图 2)。该扩增子 RNA 位于该病毒 RNA 基因组的 18120~18421 位核苷酸, 其长度相当于 302 个碱基对(bp)。该 RNA 在被克隆的载体中在体外被转录, 然后从尿素/PAGE 中被纯化 (见图 3)。使用 UV 分光光度计以及和通常商业上可以得到的实时 RT-PCR 试剂盒的标准 RNA, 进行定量地计算被纯化的 RNA 的浓度,

设计了三组引物/探针来检测 SARS 冠状病毒的标准样本 RNA。并且使用 BNI 推荐的引物/探针和实时 RT-PCR 来比较它们的灵敏性和特异性 (见图 4~7)。“ntc”代表无模板对照, STD1、STD2、STD3 和 STD4 分别代表 1×10^1 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 和 1×10^4 拷贝/ μl 的作为反应模板使用的扩增子 RNA。各种引物中设定阈值为 0.02 来分析标准曲线的斜率、截距和相关值。当该相关值达到 -1 时, 意味着其可靠性是非常好的。在引物组 1 (SEQ ID NO: 3、4 和 5) 和引物组 2 (SEQ ID NO: 5、6 和 7) 的情况下, 标准曲线的相关值分别为 -0.99760 和 -0.98930。假定两个引物组都表现出理想的相关值, 但相对于 ntc 的高背景, 在引物之间或者引物和探针之间形成了一些非特异性键 (见图 4 和 5)。在引物组 3 (SEQ ID NO: 8、9 和 10) 的情况下, 相关值为 -0.99586, 其表现出非常好的相关性, 并且形成了理想的 ntc 背景 (见图 6)。在 BNI 引物组 (SEQ ID NO: 11、12 和 13) 的情况下, 由于标准 RNA 如 STD1 和 ntc 最低的浓度而几乎不能被识别, 因此估计其很难检测低拷贝的病毒 RNA (见图 7)。而且, 在作为对照引物使用的引物组 4 中, 正义引物是 5'-CCTCTCTTGT TCTTGCTCGC-3' (SEQ ID NO: 14), 反义引物是 5'-ATAGTGAGCC GCCACACATG-3' (SEQ ID NO: 15), 其相当于 SARS-CoV 的序列第 15,271~15,290 位 (正向), 15,371~15,390 位 (反向), 所用的探针与引物组 1 和 2 中使用的探针相同。

最后, 估计引物组 1、2 和 3 可以用于 SARS 冠状病毒的检测, 并且显示, 在引物组 1、2 和 3 中, 引物组 3 与其他碱基序列的引物组相比, 表现出对检

测的非常好的可靠性和灵敏性。阳性临床样本得自中国疾病预防控制中心，用来验证使用引物组 3 是否可以以有效的方式检测来自真正的 SARS 冠状病毒病人的病毒 RNA（见图 8）。使用从病人粪便中分离和纯化的病毒 RNA 来进行实时 RT-PCR（见图 9）。当阈值被设为 699 时， R^2 值表现为 0.94096。基于标准曲线，通过进行二重检验来计算临床样本的 RNA 拷贝数（见图 10）。对于阳性/阴性检测，如果 RNA 以高于 4 拷贝/ml 的量出现，则 RNA 拷贝数表示为(+), 如果 RNA 的以低于 4 拷贝/ml 的量出现，则 RNA 拷贝数表示为(-)。在 15 个实验样品中，10 个实验样品被表示为(+/+), 4 个实验样品被表示为(+/-), 1 个实验样品被表示为(-/-)。考虑到 DaAn 公司开发的产品在中国的检测率为 66.7%，可以确定其表现出 99.3 %的非常好的检测率。

下面，以非限定性实施例对本发明进行具体说明。

实施例 1

用于表达 SARS 冠状病毒扩增子 RNA 的质粒的制备

通过寡核苷酸合成的方式制备单链 DNA，其相当于扩增子 RNA 的 302 个核苷酸。使用引物 T7AMPF (SEQ ID NO: 1)和 AMPR (SEQ ID NO: 2)对该 DNA 进行 PCR 扩增，然后使用来自 Qiagen 公司的 Qiaquick PCR 纯化试剂盒 (Cat. No. 28106)进行纯化。使用 Promega 公司的 pGEM-T easy 载体(批号: A1360)对纯化后的 PCR 产品进行克隆。通过 DNA 测序方式对最终克隆的插入片段进行鉴定。

实施例 2

SARS 冠状病毒扩增子 RNA 的体外转录和纯化

在体外转录反应中使用的是来自 Ambion 公司的 Megascript T7 试剂盒(批号: 1334) (见附件手册)。通过在 TBE 缓冲液中的电泳使转录物被固定在 7M 尿素/6%聚丙烯酰胺凝胶上，然后使用溴化乙啶 (ethidium bromide) 进行染色，并纯化。下面，进行纯化程序。按照每一条带 0.4ml RNA 凝胶提取缓冲液进行处理，并于 37 °C 下保持 2 小时。然后取出上清液，接着按照每一条带 0.1ml RNA 凝胶提取缓冲液进行处理，并于 37°C 下保持 30 分钟，使用酚进行萃取(1×体积)，然后用乙醇进行沉淀。然后，向存在于 50 μl 0.2 M KOAc 中的沉淀物中加入乙醇(3×体积)，使用乙醇进行沉淀，然后用 100μl 无核糖核酸酶/脱氧核糖核酸酶的水对该沉淀物进行处理。

所述凝胶提取缓冲液(100 ml)的组成如下：3.85g NH_4OAc +214mg $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ +200 μl 0.5 M EDTA+1ml 10%SDS。

实施例 3

对来自病人实验样品的病毒 RNA 的纯化

使用 QIAamp 病毒 RNA 小型试剂盒(QIAGEN, 52 904)从病人粪便中分离病毒 RNA。

实施例 4

实时 RT-PCR

最终产物的添加剂和实时 RT-PCR 的反应条件如下。

通过将 3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的 10X 酶混合物与 17 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的反应混合物混合来制备所需的适量的混合物，然后分成 20 μl 的量。向每等份的混合物中加入 10 μl 样本 RNA，使最终数量为 30 μl 。在 RT-PCR 反应中，将最终混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 30 分钟，并在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 10 分钟；通过重复 45 个下列循环进行扩增：95 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 秒，在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 分钟。此时，测量每个循环的荧光吸收。

反应混合物(17 μl)组成如下：25 μM dNTP 0.3 μl + 50 μM 组 3 的正向引物 (SEQ ID NO: 8) 0.3 μl + 50 μM 组 3 的反向引物(SEQ ID NO: 9) 0.3 μl + 25 μM 组 3 的探针(SEQ ID NO: 10)0.3 μl + 10X Taq Pol 缓冲液 3 μl + 无核糖核酸酶/脱氧核糖核酸酶的水 12.8 μl 。

酶混合物(10 μl)的组成如下：Taq DNA 聚合酶(5u/ μl) 0.5 μl +AMV-RT (10u/ μl) 0.5 μl +核糖核酸酶抑制剂(40u/ μl) 0.5 μl +酶储缓冲液 8.5 μl 。

图 4、5、7 和 11 中，在实时 RT-PCR 处理中，除了分别使用探针组 1、2、4 和 BNI 引物，并使用 SEQ ID NO: 5 作为探针以外，采用与使用引物组 3 相同的方式进行 PCR 扩增。结果分别如图 4 (引物组 1)、图 5 (引物组 2)、图 6 (引物组 3)、图 7 (BNI 引物) 和图 11 (引物组 4) 所示。

工业实用性

如上所述，设计用来通过使用实时 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒 RNA 引物的碱基序列，可以用于从病人的样本快速准确地检测病人是否感染了 SARS 冠状病毒。其可以直接用于开发利用 TaqMan 探针系统来检测 SARS 冠状病毒 RNA 的实时 RT-PCR 试剂盒。因此，预测其将在预防 SARS 疾病及其经呼吸道传染病的传染方面发挥重要作用。

-
- <110> 牧岩生命工学研究所(MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE)
- <120> 用于检测SARS冠状病毒的引物和探针, 包括该引物和/或探针的试剂盒及其检测方法
- <160> 15
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> T7AMPF
- <400> 1
 attaatacga ctactatag ggtaccgtag actcatctct a 41
- <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> AMPR
- <400> 2
 ggtataagat gtttaaactg g 21
- <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 组1的正向引物
- <400> 3
 cccgcgaaga agctattcg 19
- <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 组1的反向引物

<400>	4		
		agttgcatga cagccctcta ca	22
<210>	5		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	组1的探针		
<400>	5		
		acgttcgtgc gtggattggc tttg	24
<210>	6		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	组2的正向引物		
<400>	6		
		atcacccgcg aagaagctat t	21
<210>	7		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	组2的反向引物		
<400>	7		
		tctagttgca tgacagccct ctac	24
<210>	8		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	组3的正向引物		
<400>	8		
		ccaagtcaat ggttaccta atatggt	27
<210>	9		

<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	组3的反向引物	
<400>	9	17
	gccaatccac gcacgaa	
<210>	10	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	组3的探针	
<400>	10	26
	tcacccgcga agaagctatt cgtcac	
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BNI正向引物	
<400>	11	20
	ttatcacccg cgaagaagct	
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BNI反向引物	
<400>	12	22
	ctctagttgc atgacagccc tc	
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> BNI探针

<400> 13
tcgtgcgtgg attggctttg atgt 24

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物组4的正义引物

<400> 14
cctctctttgt tcttgctcgc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物组4的反义引物

<400> 15
atagtgagcc gccacacatg 20

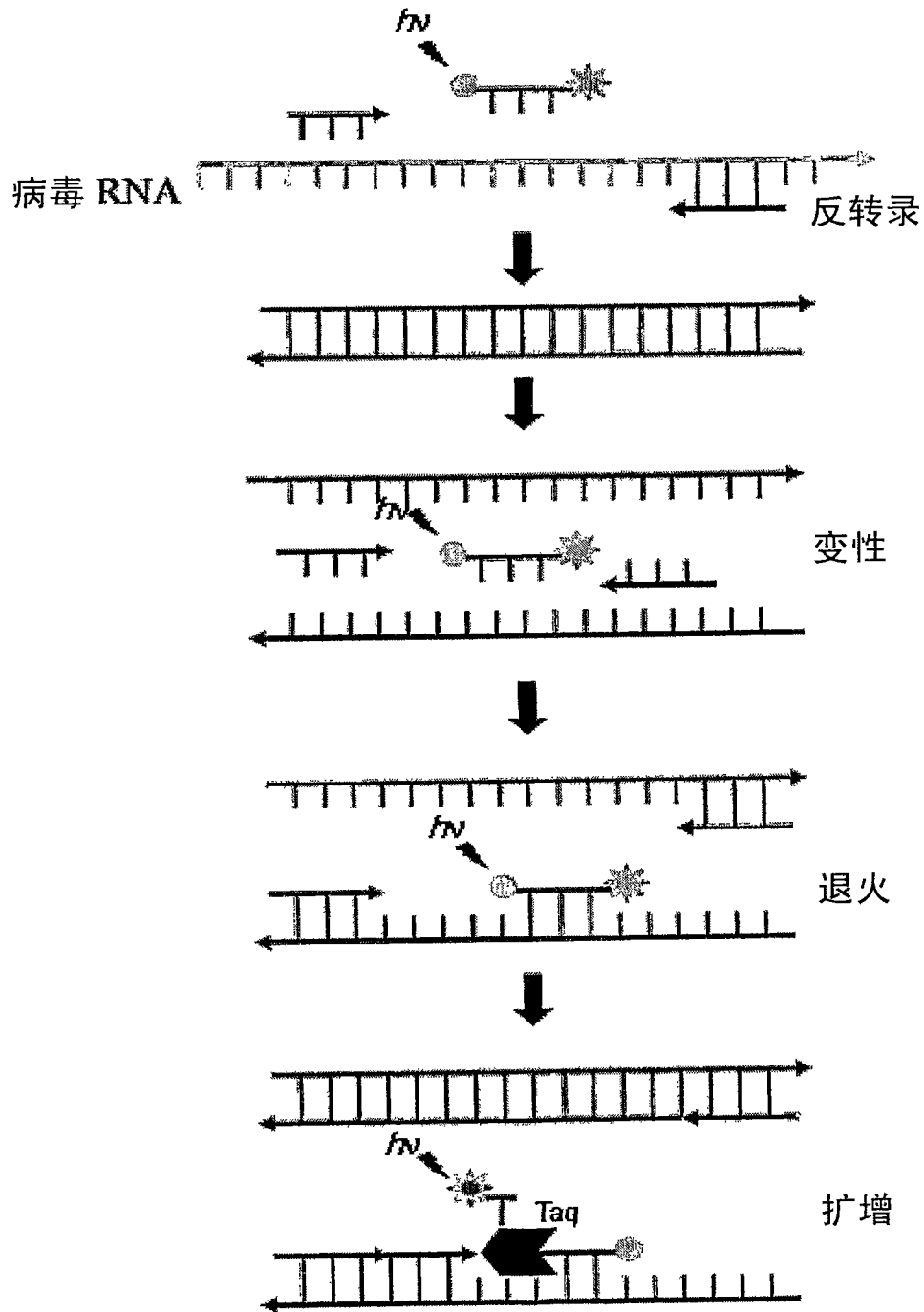


图 1

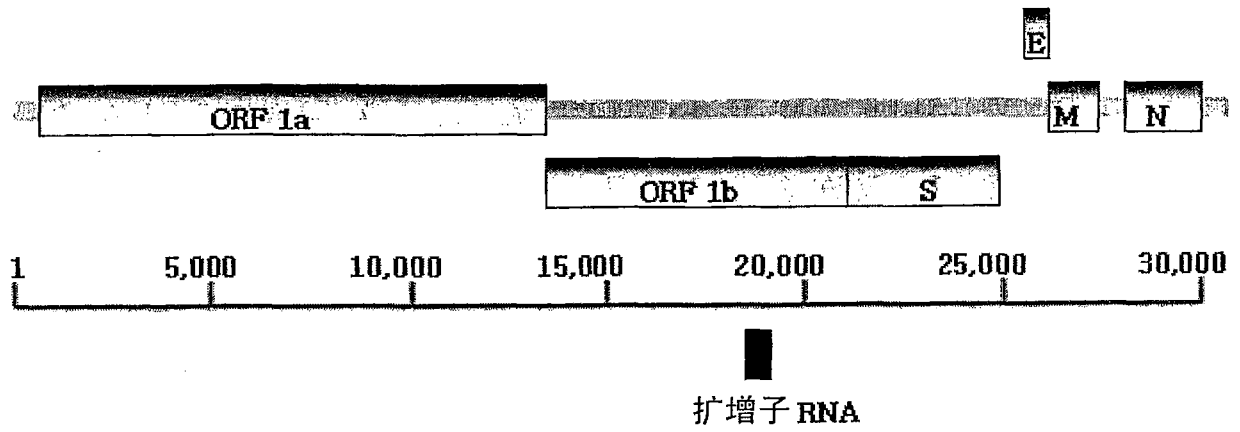


图 2

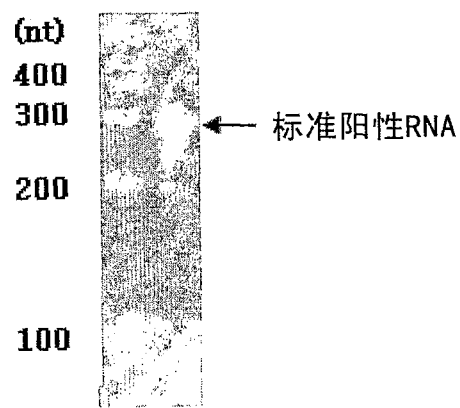


图 3

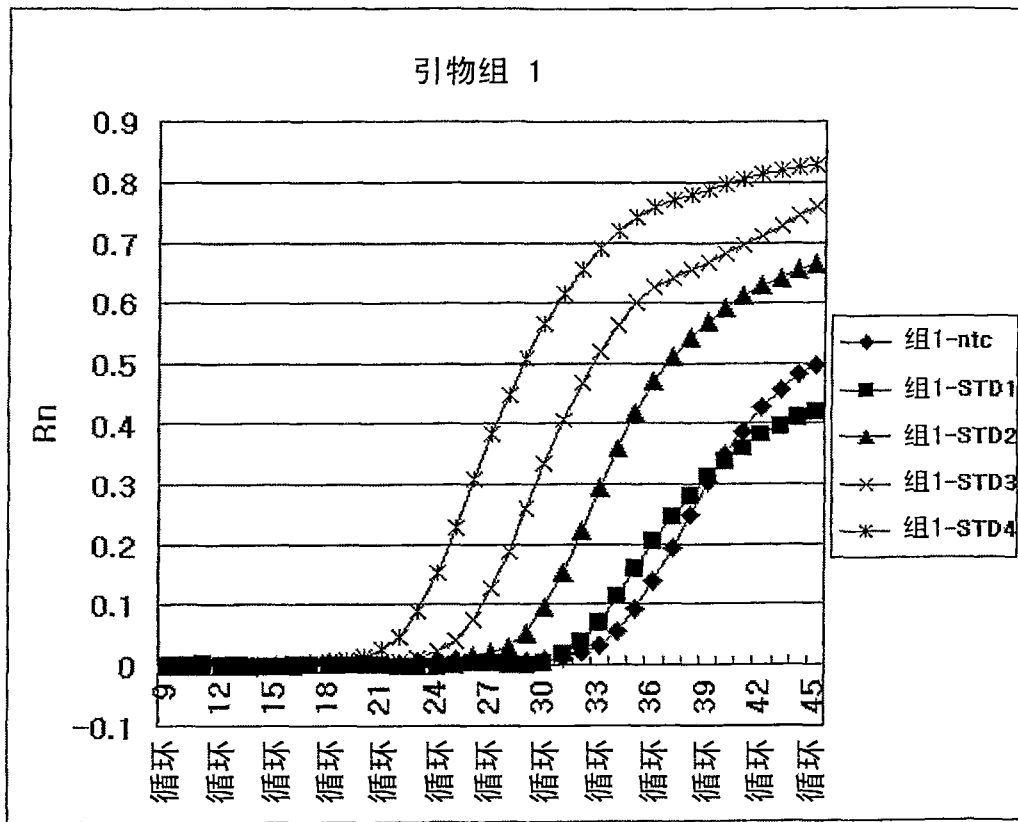


图 4a

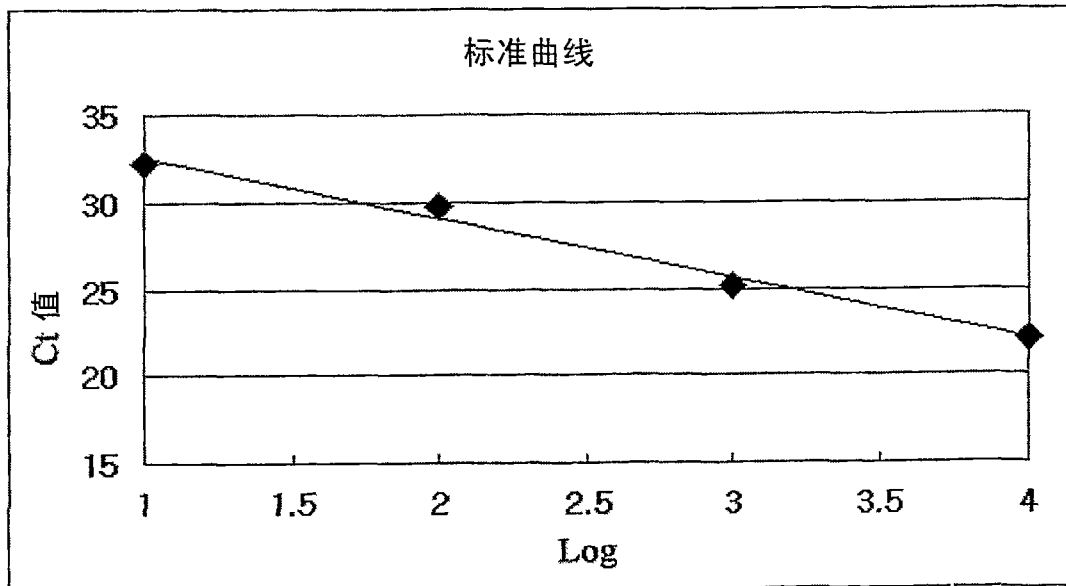


图 4b

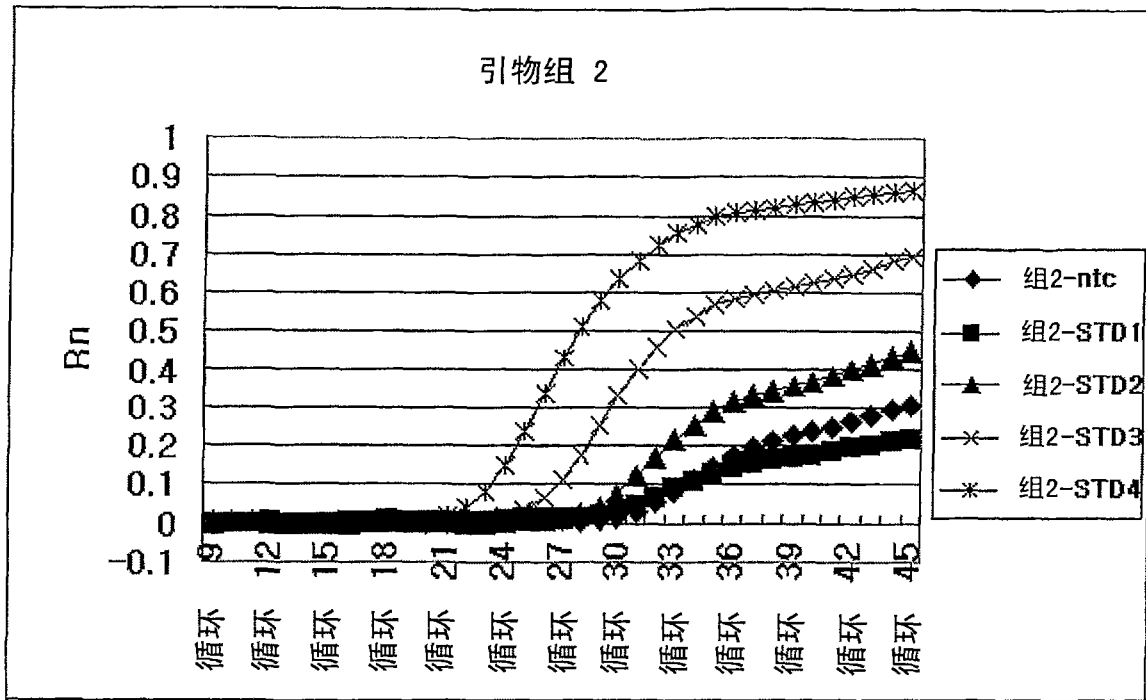


图 5a

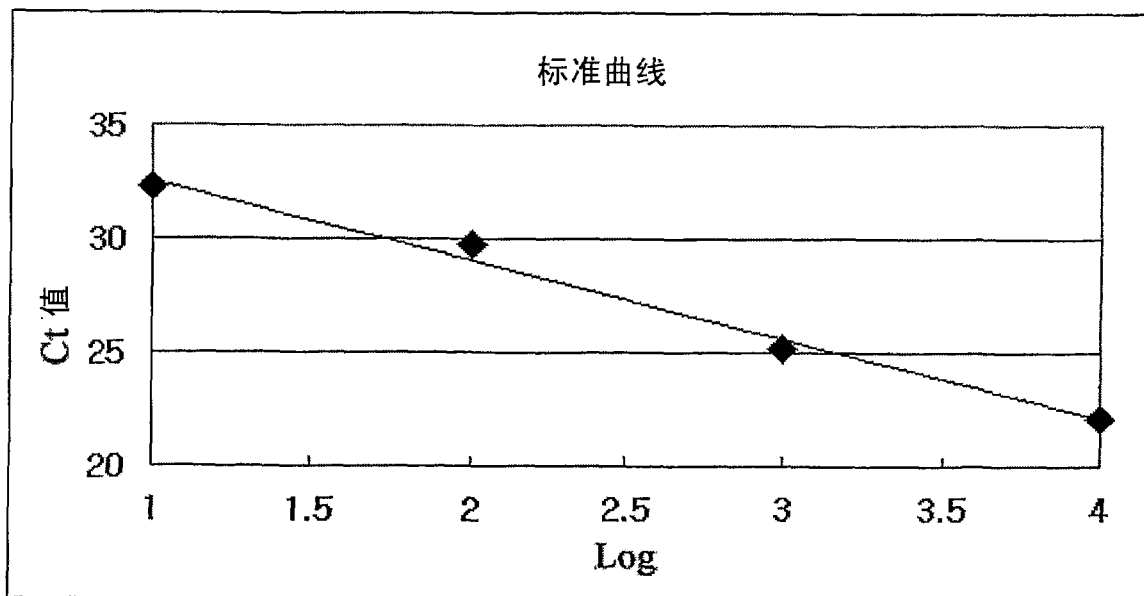


图 5b

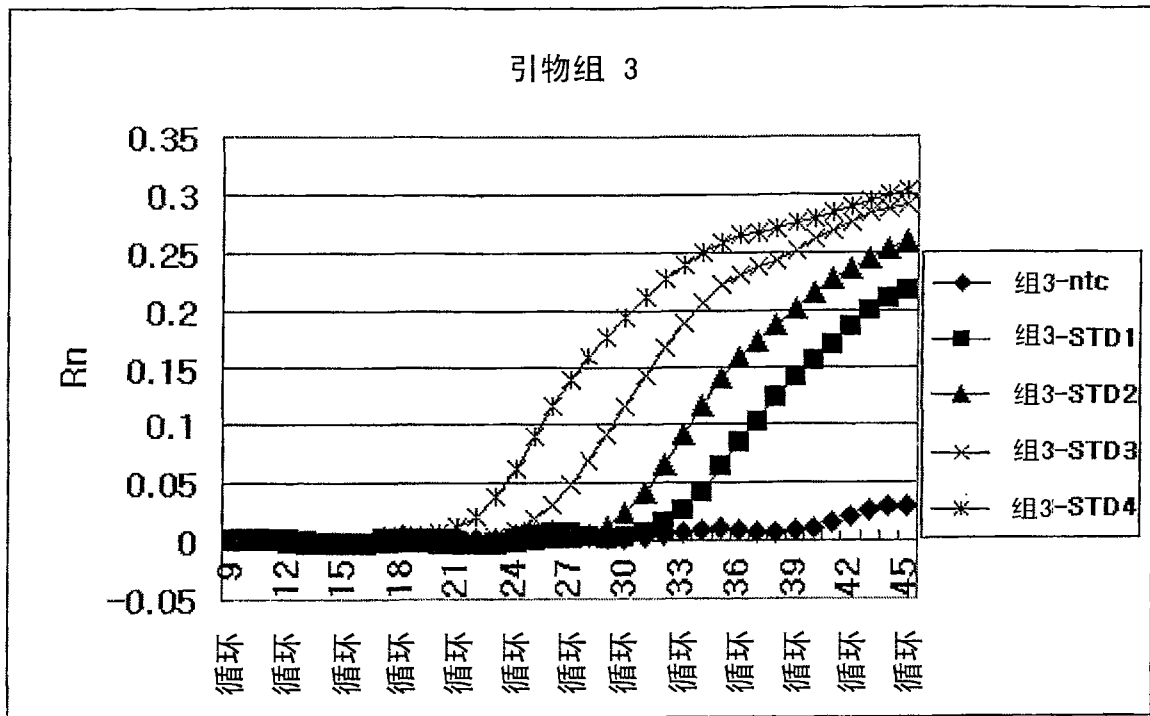


图 6a

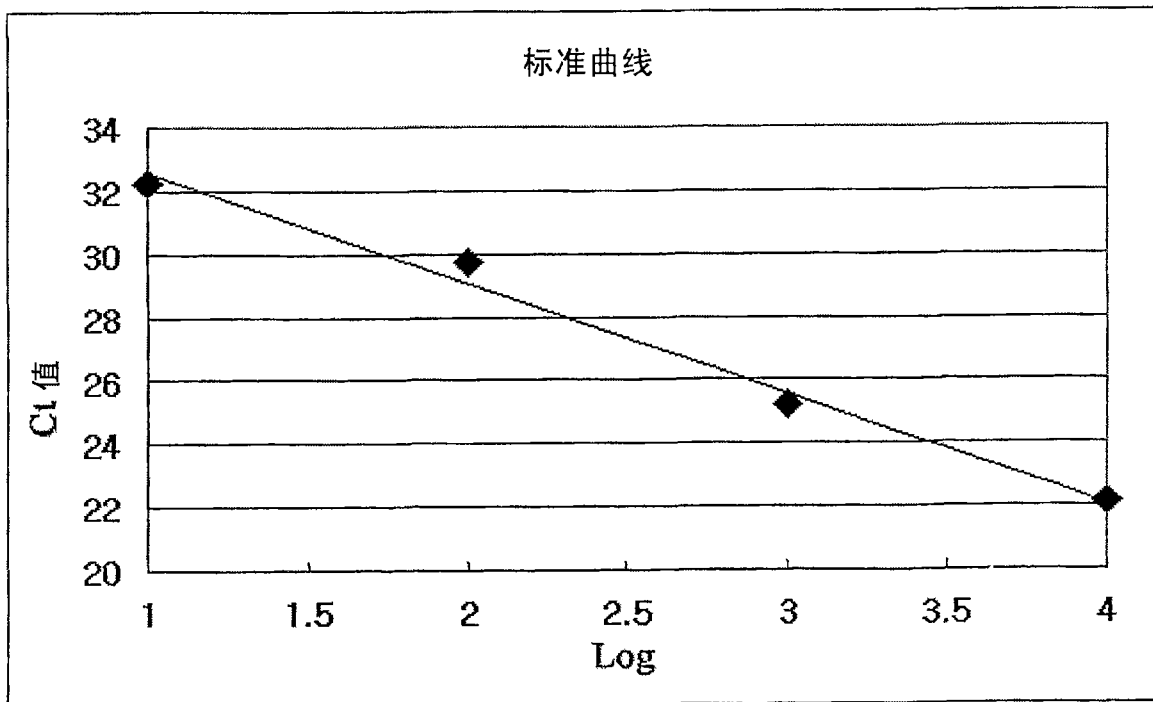


图 6b

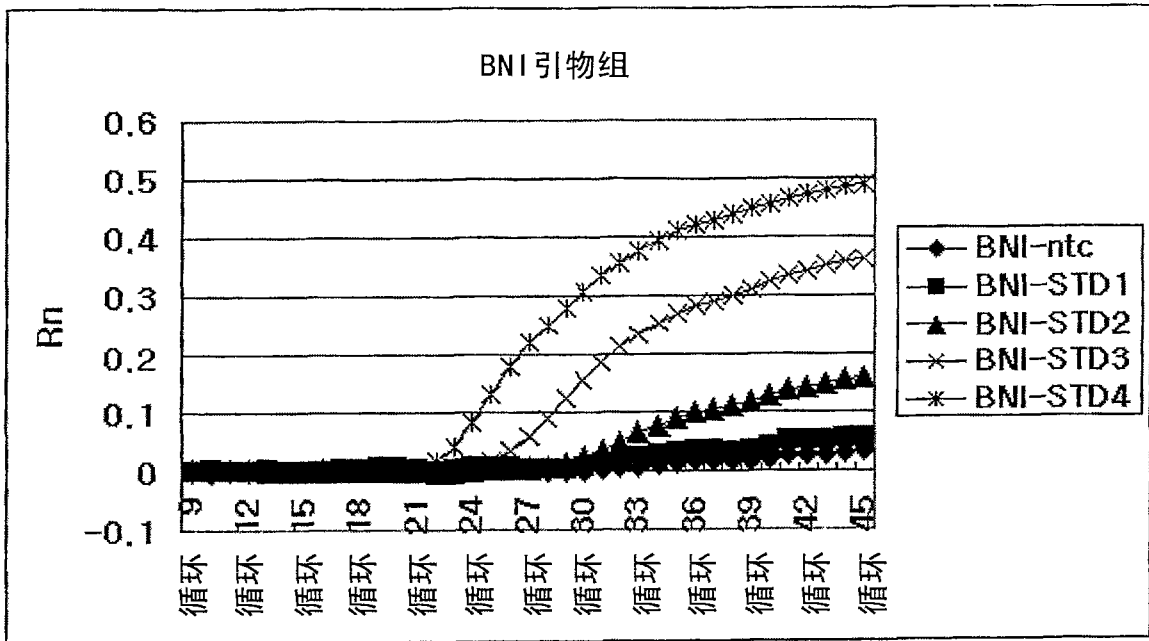


图 7a

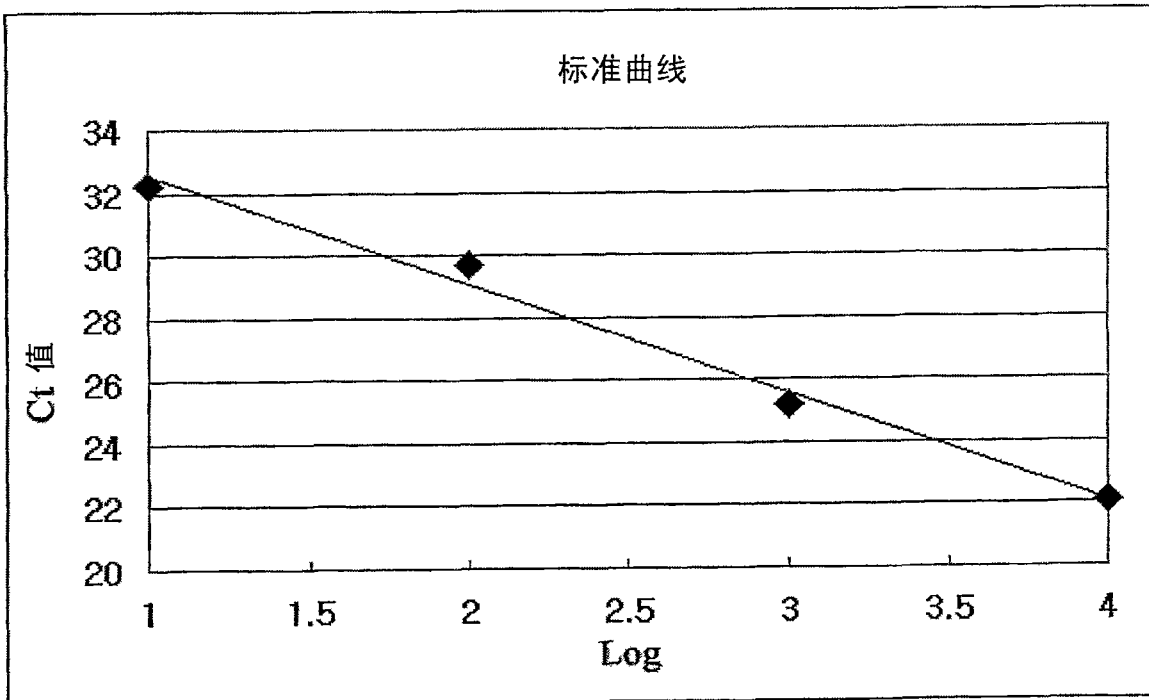


图 7b

地区	样品号	性别	年龄	病人类型	临床诊断	发病日期	入院日期	出院日期
北京	CYL067	男	18	住院病人	发烧	2003年6月4日	2003年6月7日	
北京	x013	男	21	住院病人	SARS病人	2003年4月10日		
北京	sf099	女	28	住院病人	SARS病人	2003年5月3日		
内蒙	5B	男	39	住院病人	SARS病人		2003年6月9日	
北京	1510415	男	43	住院病人	SARS病人	2003年5月11日		
北京	AZ053	女	30	住院病人	SARS病人	2003年4月27日		
北京	CW011	女	24	住院病人	SARS病人	2003年4月21日	2003年4月22日	2003年5月15日
北京	CW044	男	18	接触者	接触者			
北京	CW048	男	29	住院病人	SARS病人	2003年5月15日	2003年5月15日	2003年6月21日
北京	x021	男	21	住院病人	SARS病人	2003年4月11日		
北京	sf015	女	74	住院病人	SARS病人	2003年4月26日		
北京	sf016	男	23	住院病人	SARS病人	2003年5月2日		
北京	sf098	女	18	住院病人	SARS病人	2003年5月16日		
北京	CW043	男	45	接触者	接触者			
北京	XW014	男	32	住院病人	SARS病人	2003年4月17日	2003年4月18日	

图 8

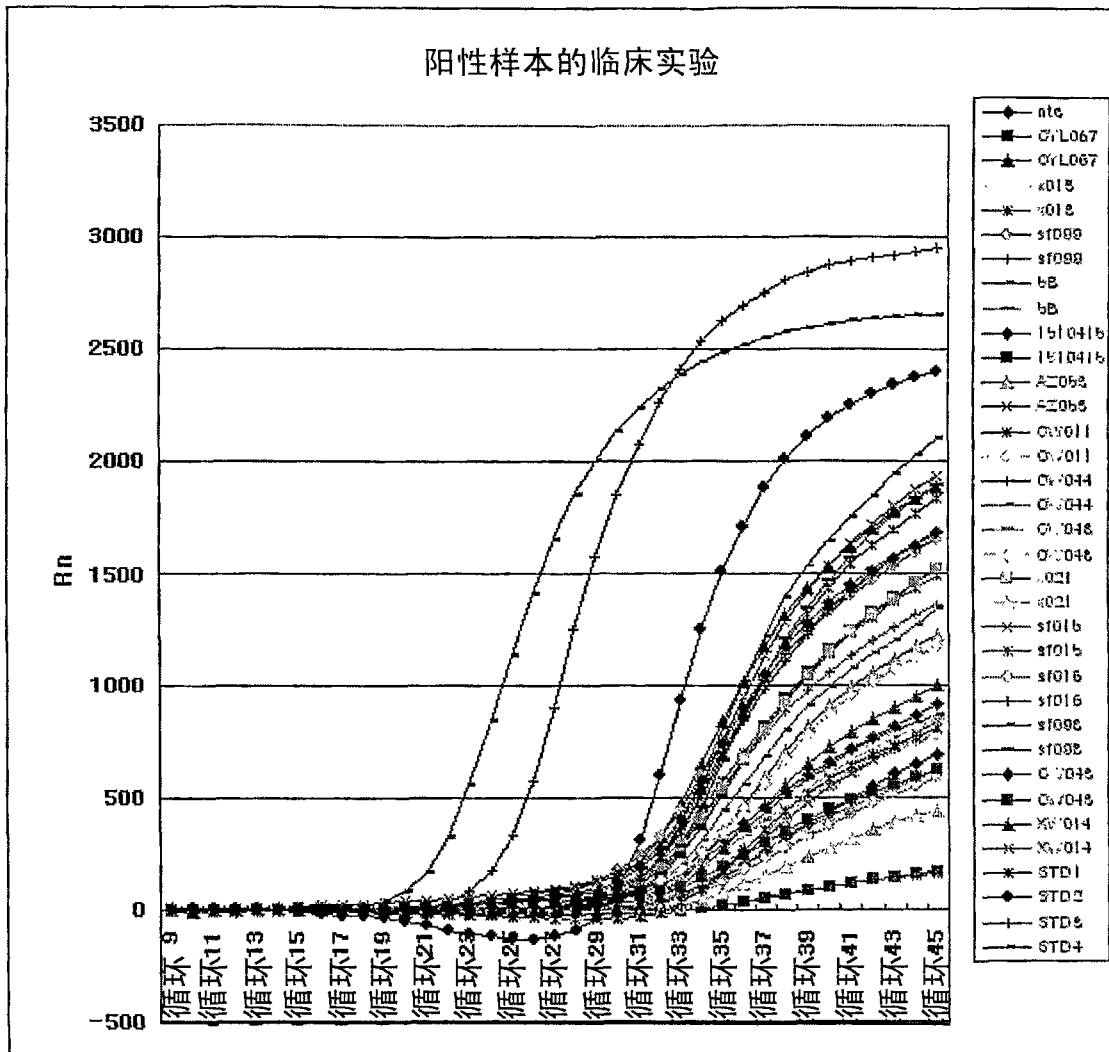


图 9a

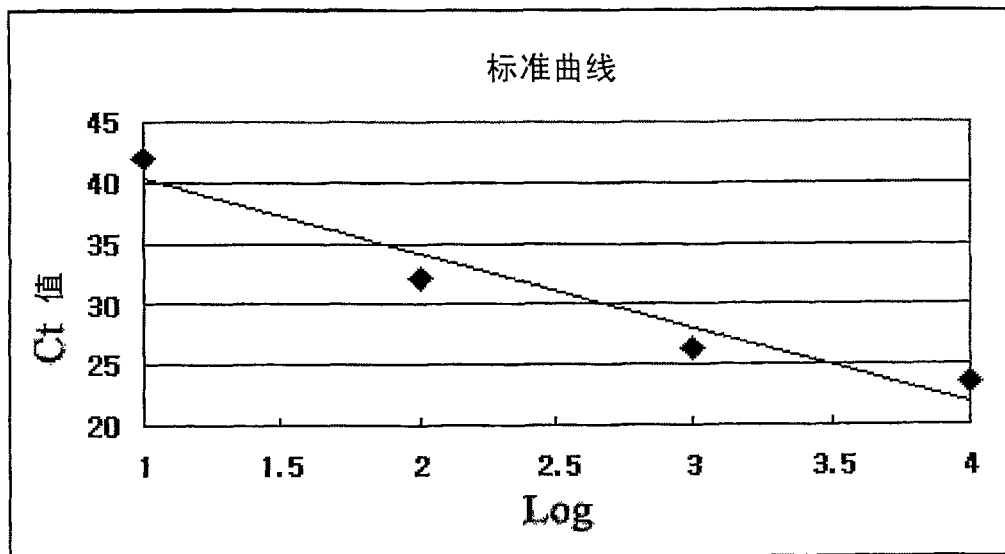


图 9b

样品	引物组3		DaAn (中国)	
	RNA No. / μ l		结果	结果
CYL067	46.96	96.52	(+)	(+/-)
x013	48.09	51.42	(+)	(-)
sf099	83.76	45.79	(+)	(+)
5B	8.34	6.35	(+)	(+/-)
1510415	9.02		(+/-)	(+)
AZ053	25	81.29	(+)	(+)
CW011	71.65	4.44	(+)	(+/-)
CW044	71.04	33.62	(+)	
CW048	4.04	22.13	(+)	(+)
x021	47.18		(+/-)	(-)
sf015			(-)	(-)
sf016		74.58	(+/-)	(-)
sf098	88.08	68.51	(+)	(+)
CW043	80.65		(+/-)	(+/-)
XW014	13.05	4.47	(+)	(+)
灵敏性			99.3%	66.7%

图 10

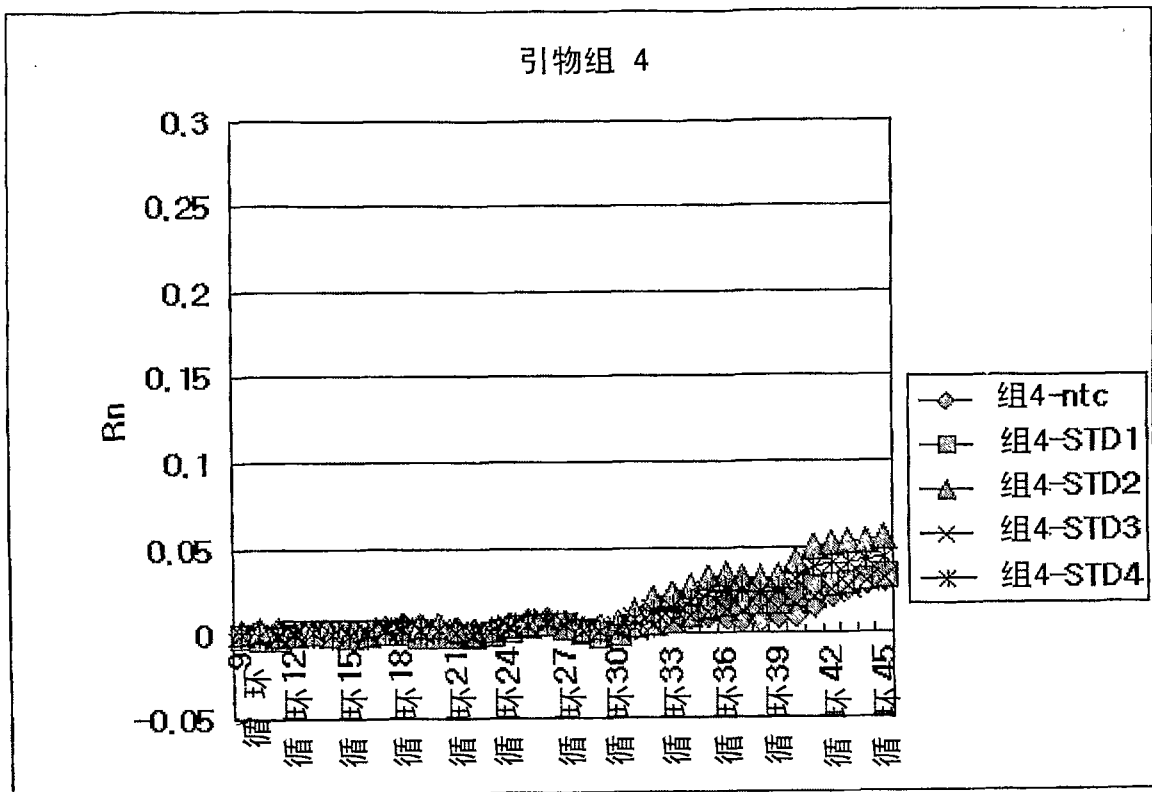


图 11