



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116529362 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202180059316.6

(22) 申请日 2021.07.21

(30) 优先权数据

2020-128551 2020.07.29 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/027383 2021.07.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/024934 JA 2022.02.03

(71) 申请人 东洋纺株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 山越奈奈 冈山旦 寺内谦太

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 韩平

(51) Int.Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

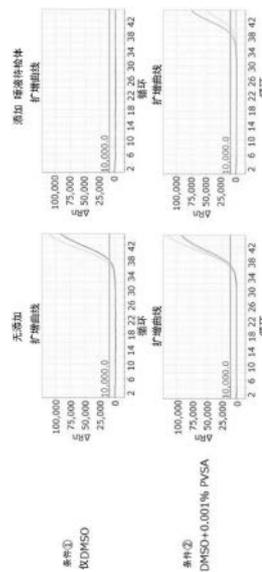
权利要求书3页 说明书15页
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

经改良的病毒的检测方法

(57) 摘要

本发明提供:能够在不进行从试样中分离RNA的情况下在反应液中加入仅进行了基于热处理的简便的预处理的样品、并通过一步式RT-PCR检测是否存在病毒RNA的方法、及试剂盒。特别是提供高灵敏度地检测试样中的冠状病毒的存在的手段。一实施方式中,本发明为检测RNA病毒的存在的方法,所述方法包括以下的(1)至(4)的工序:(1)制备包含未进行RNA的纯化的试样、阴离子性聚合物、及极性有机溶剂的混合液的工序;(2)对前述混合液进行加热的工序;(3)在加热后的前述混合液中添加包含(i)逆转录酶和DNA聚合酶或包含(ii)具有逆转录活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液的工序;(4)将反应容器密闭后,实施一步式RT-PCR反应的工序。



1. 一种检测方法,其特征在于,为试样中的RNA病毒的检测方法,所述方法包括以下的工序:

(1) 制备包含未进行RNA的纯化的试样、阴离子性聚合物、及极性有机溶剂的混合液的工序;

(2) 对所述混合液进行加热的工序;

(3) 在加热后的所述混合液中添加包含(i)逆转录酶和DNA聚合酶或包含(ii)具有逆转录活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液的工序;

(4) 将反应容器密闭后,实施一步式RT-PCR反应的工序。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,工序(1)中,混合液中的极性有机溶剂的含有率为20%以上。

3. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其中,工序(1)中,混合液中的阴离子性聚合物的含有率为0.00001%以上。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(1)中,混合液实质上不包含表面活性剂。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的检测方法,其中,从工序(1)中制备混合液后到实施工序(2)为止的时间为5分钟以内。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(2)中的加热条件为70℃下1秒以上。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的检测方法,其中,试样为选自由粪便、咽拭液、鼻拭液、痰液、肺吸出物、脑脊液、漱口液、唾液、泪液、培养细胞、培养上清液、和环境中的擦拭检查试样组成的组中的至少1种。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的检测方法,其中,试样为悬浮于水、生理盐水、缓冲液或者Sputazyme酶液的悬浮液、或它们的离心上清液或者浓缩物。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的检测方法,其特征在于,RNA病毒为具有包膜的RNA病毒。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,具有包膜的RNA病毒选自由黄病毒科病毒、披膜病毒科病毒、冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、弹状病毒科病毒、本雅病毒科病毒、副粘病毒科病毒、和丝状病毒科病毒组成的组。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的检测方法,其中,具有包膜的RNA病毒为冠状病毒科病毒。

12. 根据权利要求11所述的检测方法,其中,冠状病毒科病毒为SARS(严重急性呼吸综合征)冠状病毒、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒、SARS-nCoV-2冠状病毒。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的检测方法,其特征在于,RNA病毒为不具有包膜RNA病毒。

14. 根据权利要求13所述的病毒的检测方法,其特征在于,不具有包膜的RNA病毒选自由星状病毒科病毒、杯状病毒科病毒、小核糖核酸病毒科病毒、戊肝病毒科病毒、和呼肠孤病毒科病毒组成的组。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的检测方法,其特征在于,极性有机溶剂为选自由乙醇、甲醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、吡啶、三乙胺、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰三

胺、二甲基亚砷、丙酮、和乙腈组成的组中的至少1种。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的检测方法,其中,阴离子性聚合物是使具有选自由磺酸基、羧基、磷酸基、硫酸基、和膦酸基组成的组中的至少1种阴离子性官能团的单体聚合而得到的聚合物。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的病毒的检测方法,其中,阴离子性聚合物为选自由聚肌苷酸、聚胞苷酸、聚鸟苷酸、聚腺苷酸、聚脱氧肌苷酸、聚脱氧胞苷酸、聚脱氧鸟苷酸、聚脱氧腺苷酸、卡拉胶、肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、硫酸乙酰肝素、软骨素、硫酸皮肤素、聚乙烯基磺酸、聚乙烯基膦酸、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚丙烯酸/磺酸共聚物、聚丙烯酸/马来酸共聚物和它们的盐组成的组中的至少1种阴离子性聚合物。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的检测方法,其特征在于,DNA聚合酶为选自由Taq、Tth和它们的突变体组成的组中的任意者。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的检测方法,其特征在于,逆转录酶的来源为选自由莫洛尼氏鼠白血病毒(MMRV)、禽成髓细胞瘤病毒(AMV)和它们的突变体组成的组中的任意者。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(4)中的一步式RT-PCR反应液还包含选自由具有在氨基酸中的氨基上连接有3个甲基的结构季铵盐、牛血清白蛋白、甘油、二醇和明胶组成的组中的至少1种,所述季铵盐以下称为“甜菜碱样季铵盐”。

21. 根据权利要求20所述的病毒的检测方法,其中,甜菜碱样季铵盐为甜菜碱或L-肉碱。

22. 一种RNA病毒的检测用试剂盒,其特征在于,包含:阴离子性聚合物、极性有机溶剂、含有(i)逆转录酶和DNA聚合酶或含有(ii)具有逆转录酶活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液。

23. 根据权利要求22所述的检测用试剂盒,其还包含:选自由甜菜碱样季铵盐、牛血清白蛋白、甘油、二醇和明胶组成的组中的至少1种。

24. 根据权利要求22或23所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,还包含与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的引物对。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,还包含与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的杂交探针。

26. 根据权利要求22至25中任一项所述的病毒的检测试剂盒,其特征在于,RNA病毒具有包膜。

27. 根据权利要求26所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,具有包膜的RNA病毒选自由黄病毒科病毒、披膜病毒科病毒、冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、弹状病毒科病毒、本雅病毒科病毒、副粘病毒科病毒、和丝状病毒科病毒组成的组。

28. 根据权利要求26或27中任一项所述的病毒的检测用试剂盒,其中,具有包膜的RNA病毒为冠状病毒。

29. 根据权利要求27或28所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,冠状病毒科病毒为SARS(严重急性呼吸综合征)冠状病毒、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒、SARS-nCoV-2。

30. 根据权利要求22至25中任一项所述的病毒的检测试剂盒,其特征在于,RNA病毒不

具有包膜。

31. 根据权利要求30所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在於,不具有包膜的RNA病毒选自星状病毒科病毒、杯状病毒科病毒、小核糖核酸病毒科病毒、戊肝病毒科病毒、和呼肠孤病毒科病毒组成的组。

经改良的病毒的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基于核酸扩增的RNA病毒的检测法。更具体而言,涉及在不从试样中分离/纯化核酸的情况下制备包含试样、阴离子性聚合物和极性有机溶剂的混合液后进行热处理、并且加入实时逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)的反应液来检测RNA病毒。根据本发明,能够高灵敏度地检测例如以唾液、咽拭液、鼻拭液、痰液为主的生物体来源试样、粪便试样、血液试样、环境擦拭试样等中包含的RNA病毒。本发明能用于生命科学研究、临床诊断、食品卫生检查、环境检查等。

背景技术

[0002] 病毒大致分为具有脱氧核糖核酸作为基因组核酸的DNA病毒、及具有核糖核酸作为基因组核酸的RNA病毒。已知病毒因其世代时间短而突变率高,特别是RNA病毒容易发生突变。已知病毒的这种突变对宿主的感染性、被感染时的症状的种类、严重程度产生较大影响。因此,开发出对于突变病毒也能迅速/准确地检测的方法对于预防、遏制感染的传播是重要的。

[0003] 冠状病毒是引起包括感冒在内的呼吸道感染的致病病毒,据说在感冒的流行期约10~35%左右是由冠状病毒引起的。还已知会产生突变型病毒,已知会发生罕见的SARS(严重急性呼吸综合征)冠状病毒、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒、新型冠状病毒感染(COVID-19)冠状病毒(SARS-nCoV-2)等致死性的严重的呼吸系统疾病。因此,不言而喻,简便、迅速、高灵敏度地检测冠状病毒在临床诊断、食品卫生检查、环境检查等方面是重要的。

[0004] 冠状病毒的病原体检测中,开发出了电子显微镜法、基于ELISA的免疫学抗原检测法、或利用了核酸扩增技术的病毒基因检测法。这些检测法中,广泛使用了能够高灵敏度地检测冠状病毒的核酸扩增技术。已经开发出了几种利用核酸扩增法检测冠状病毒的技术(例如,非专利文献1、非专利文献2、专利文献1)。

[0005] 对于2019年确认发生的突变型冠状病毒SARS-nCoV-2,在病毒基因组RNA的解析完成后立即建立了使用核酸扩增技术的检测方法(例如,非专利文献3、非专利文献4)。在日本,国立感染研究所的“病原体检测手册2019-nCoV”中记载了用于检测SARS-nCoV-2的方法(非专利文献5)。这些方法中,试样中包含的冠状病毒的检测中伴随有试样中病毒RNA的提取和纯化工序。病毒RNA的提取和纯化工序、尤其纯化工序是繁杂、需要花费大量的作业时间的。近些年,在流感病毒的检测中,已知将咽拭液试样与包含水溶性有机溶剂和表面活性剂的预处理液混合而得到的病毒提取液作为试样的方法(专利文献2、专利文献3)。另外,K.Kang等人报道了:能够直接利用RT-PCR从猪血清样品中检测高致病性北美猪生殖器呼吸综合征病毒RNA(非专利文献6)。这些方法中,通过省略RNA的提取和纯化工序,从而将试样中包含的RT-PCR的反应抑制物质带入反应液中。RT-PCR的反应抑制物质根据试样的种类而有较大差异。例如,唾液试样中带入了大量的多糖类、作为消化酶的RNase等PCR反应抑制物质。此外,也已知病毒的灭活和RNA的提取条件根据病毒种类而有较大差异,但现有技术文献中,完全没有提及针对冠状病毒的效果(专利文献2、专利文献3)。目前,期望开发出:从包

含冠状病毒、特别是SARS-nCoV-2冠状病毒的咽喉/鼻拭液、唾液、痰液、粪便试样等生物试样、擦拭环境试样中,在无需RNA的纯化工序的情况下、通过一步式RT-PCR能够简便、迅速地检测的方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2012-24039号公报

[0009] 专利文献2:日本特开2017-023110号公报

[0010] 专利文献3:日本特开2016-182112号公报

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,Nov.2005,p.5452-5456

[0013] 非专利文献2:J Virol Methods.2004Sep 1;120(1):33-40.

[0014] 非专利文献3:Published Online January 29,2020,https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8

[0015] 非专利文献4:世界卫生组织(WHO)主页

[0016] 非专利文献5:国立感染研究所主页“病原体检测手册2019-nCoV”(https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200217.pdf)

[0017] 非专利文献6:J.Animal Science And Biotechnology,第5卷、2014年、第45页

发明内容

[0018] 发明要解决的问题

[0019] 本发明以上述现有技术的课题为背景而作出。即,能够在事先未进行纯化的情况下从例如唾液等包含大量消化酶、夹杂物质的试样中通过一步式RT-PCR简便、迅速、高灵敏度地检测病毒RNA、特别是具有包膜的病毒的RNA、尤其是冠状病毒的RNA。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 本发明人等鉴于上述情况而进行了深入研究,结果发现:通过未进行病毒RNA的纯化的试样中混合阴离子性聚合物和极性有机溶剂后进行热处理、然后供于一步式RT-PCR,由此能够检测试样中可能包含的RNA病毒(例如,冠状病毒、特别是SARS-nCoV-2),完成了本发明。

[0022] 代表性的本发明如下所述。

[0023] 项目1.一种检测方法,其特征在于,为试样中的RNA病毒的检测方法,所述方法包括以下的工序:

[0024] (1) 制备包含未进行RNA的纯化的试样、阴离子性聚合物、及极性有机溶剂的混合液的工序;

[0025] (2) 对所述混合液进行加热的工序;

[0026] (3) 在加热后的所述混合液中添加包含(i)逆转录酶和DNA聚合酶或包含(ii)具有逆转录活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液的工序;

[0027] (4) 将反应容器密闭后,实施一步式RT-PCR反应的工序。

[0028] 项目2.根据项目1所述的检测方法,其中,工序(1)中,混合液中的极性有机溶剂的含有率为20%以上。

[0029] 项目3.根据项目1或2所述的检测方法,其中,工序(1)中,混合液中的阴离子性聚合物的含有率为0.00001%以上。

[0030] 项目4.根据项目1至3中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(1)中,混合液实质上不包含表面活性剂。

[0031] 项目5.根据项目1至4中任一项所述的检测方法,其中,从工序(1)中制备混合液后到实施工序(2)为止的时间为5分钟以内。

[0032] 项目6.根据项目1至5中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(2)中的加热条件为70℃下1秒以上。

[0033] 项目7.根据项目1至6中任一项所述的检测方法,其中,试样为选自由粪便、咽拭液、鼻拭液、痰液、肺吸出物、脑脊液、漱口液、唾液、泪液、培养细胞、培养上清液、和环境中的擦拭检查试样组成的组中的至少1种。

[0034] 项目8.根据项目1至7中任一项所述的检测方法,其中,试样为悬浮于水、生理盐水、缓冲液或者Sputazyme酶液的悬浮液、或它们的离心上清液或者浓缩物。

[0035] 项目9.根据项目1至8中任一项所述的检测方法,其特征在于,RNA病毒为具有包膜的RNA病毒。

[0036] 项目10.根据项目9所述的检测方法,其特征在于,具有包膜的RNA病毒选自由黄病毒科病毒、披膜病毒科病毒、冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、弹状病毒科病毒、本雅病毒科病毒、副粘病毒科病毒、和丝状病毒科病毒组成的组。

[0037] 项目11.根据项目1至10中任一项所述的检测方法,其中,具有包膜的RNA病毒为冠状病毒科病毒。

[0038] 项目12.根据项目11所述的检测方法,其中,冠状病毒科病毒为SARS(严重急性呼吸综合征)冠状病毒、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒、SARS-nCoV-2冠状病毒。

[0039] 项目13.根据项目1至12中任一项所述的检测方法,其特征在于,RNA病毒为不具有包膜RNA病毒。

[0040] 项目14.根据项目13所述的病毒的检测方法,其特征在于,不具有包膜的RNA病毒选自由星状病毒科病毒、杯状病毒科病毒、小核糖核酸病毒科病毒、戊肝病毒科病毒、和呼肠孤病毒科病毒组成的组。

[0041] 项目15.根据项目1至14中任一项所述的检测方法,其特征在于,极性有机溶剂为选自由乙醇、甲醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、吡啶、三乙胺、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰三胺、二甲基亚砷、丙酮、和乙腈组成的组中的至少1种。

[0042] 项目16.根据项目1至15中任一项所述的检测方法,其中,阴离子性聚合物是使具有选自由磺酸基、羧基、磷酸基、硫酸基、和膦酸基组成的组中的至少1种阴离子性官能团的单体聚合而得到的聚合物。

[0043] 项目17.根据项目1至16中任一项所述的病毒的检测方法,其中,阴离子性聚合物为选自由聚肌苷酸、聚胞苷酸、聚鸟苷酸、聚腺苷酸、聚脱氧肌苷酸、聚脱氧胞苷酸、聚脱氧鸟苷酸、聚脱氧腺苷酸、卡拉胶、肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、硫酸乙酰肝素、软骨素、硫酸皮肤素、聚乙烯基磺酸、聚乙烯基膦酸、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚丙烯酸/磺酸共聚物、聚丙烯酸/马来酸共聚物和它们的盐组成的组中的至少1种阴离子性聚合物。

[0044] 项目18.根据项目1至17中任一项所述的检测方法,其特征在于,DNA聚合酶为选自

由Taq、Tth和它们的突变体组成的组中的任意者。

[0045] 项目19.根据项目1至18中任一项所述的检测方法,其特征在于,逆转录酶的来源为选自由莫洛尼氏鼠白血病毒(MMRV)、禽成髓细胞瘤病毒(AMV)和它们的突变体组成的组中的任意者。

[0046] 项目20.根据项目1至19中任一项所述的检测方法,其特征在于,工序(4)中的一步式RT-PCR反应液还包含选自由具有在氨基酸中的氨基上连接有3个甲基的结构季铵盐、牛血清白蛋白、甘油、二醇和明胶组成的组中的至少1种,所述季铵盐以下称为“甜菜碱样季铵盐”。

[0047] 项目21.根据项目20所述的病毒的检测方法,其中,甜菜碱样季铵盐为甜菜碱或L-肉碱。

[0048] 项目22.一种RNA病毒的检测用试剂盒,其特征在于,包含:阴离子性聚合物、极性有机溶剂、含有(i)逆转录酶和DNA聚合酶或含有(ii)具有逆转录酶活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液。

[0049] 项目23.根据项目22所述的检测用试剂盒,其还包含:选自由甜菜碱样季铵盐、牛血清白蛋白、甘油、二醇和明胶组成的组中的至少1种。

[0050] 项目24.根据项目22或23所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,还包含与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的引物对。

[0051] 项目25.根据项目22至24中任一项所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,还包含与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的杂交探针。

[0052] 项目26.根据项目22至25中任一项所述的病毒的检测试剂盒,其特征在于,RNA病毒具有包膜。

[0053] 项目27.根据项目26所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,具有包膜的RNA病毒选自由黄病毒科病毒、披膜病毒科病毒、冠状病毒科病毒、正粘病毒科病毒、弹状病毒科病毒、本雅病毒科病毒、副粘病毒科病毒、和丝状病毒科病毒组成的组。

[0054] 项目28.根据项目26或27中任一项所述的病毒的检测用试剂盒,其中,具有包膜的RNA病毒为冠状病毒。

[0055] 项目29.根据项目27或28所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,冠状病毒科病毒为SARS(严重急性呼吸综合征)冠状病毒、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒、SARS-nCoV-2。

[0056] 项目30.根据项目22至25中任一项所述的病毒的检测试剂盒,其特征在于,RNA病毒不具有包膜。

[0057] 项目31.根据项目30所述的病毒的检测用试剂盒,其特征在于,不具有包膜的RNA病毒选自由星状病毒科病毒、杯状病毒科病毒、小核糖核酸病毒科病毒、戊肝病毒科病毒、和呼肠孤病毒科病毒组成的组。

[0058] 发明的效果

[0059] 根据本发明,能够在不从试样中分离/纯化核酸的情况下仅通过将试样与含有阴离子性聚合物及极性有机溶剂的试剂混合后进行热处理并添加至一步式RT-PCR反应液中,从而显著降低由未经纯化工序的试样中可能包含的RNase等夹杂物质所带来的影响,能够检测试样中RNA病毒的有无。其结果,使检测业务进一步高效化,因此能够增加检测数,也有

助于感染预防。另外,由于省略病毒RNA的纯化工序而使业务变得简单,因此能够降低样品间的污染等。由此,也能够抑制假阳性发生风险,能够进一步提高检测业务的精度。另外,通过降低作业者操作具有感染性的样品的作业工序,也能够降低对作业者的感染风险。

[0060] 进而,本发明对于可能包含2019年产生的SARS-nCoV-2冠状病毒的试样也可以获得同样优异的效果。另外,根据本发明,也能够从包括血液、粪便(排泄便、直肠粪便)、呕吐物、尿液、痰液、淋巴液、血浆、射精液体、肺吸出物、脑脊液、咽喉擦拭液、鼻腔擦拭液、漱口液、唾液、泪液在内的生物体来源试样、环境擦拭试样、包含培养细胞或培养上清液的试样等包含大量夹杂物的试样中高灵敏度地检测冠状病毒。本发明也能用于生命科学研究、临床诊断、食品卫生检查、环境检查等。

附图说明

[0061] 图1是示出在RNase的存在下使用包含阴离子性聚合物的极性有机溶剂的病毒RNA的检测结果的图。

[0062] 图2是示出在RNase的存在下使用包含阴离子性聚合物的极性有机溶剂的灭活病毒的检测结果的图。

[0063] 图3是示出在唾液待检体的存在下使用包含阴离子性聚合物的极性有机溶剂的病毒RNA的检测结果的图。

具体实施方式

[0064] 以下,示出本发明的实施方式对本发明进行进一步详细说明,但本发明不受这些实施方式限定。需要说明的是,本说明书中使用的术语只要没有特别声明,则应当理解为该领域中通常使用的含义。

[0065] 另外,本说明书中记载的全部非专利文献和专利文献在本说明书中作为参考而援用。本说明书中的“~”是指“以上且以下”,例如在说明书中,若记载为“X~Y”,则表示“X以上且Y以下”。另外,本说明书中的“和/或”是指任意一者或两者。另外,本说明书中,单数形的表述只要没有特别声明,则应当理解也包括其复数形的概念。

[0066] 本发明的一方式为用于检测是否存在RNA病毒的方法,其为试样中的RNA病毒的检测方法,所述方法包括下述步骤:在不从试样中纯化病毒RNA的情况下制备包含试样、阴离子性聚合物和极性有机溶剂的混合液后进行热处理,添加包含逆转录酶和DNA聚合酶、或包含具有逆转录活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR试剂。

[0067] 优选的实施方式中,本发明的试样中的病毒检测方法的特征在于,至少包括以下的工序:

[0068] (1) 制备包含未进行RNA的纯化的试样、阴离子性聚合物、及极性有机溶剂的混合液的工序;

[0069] (2) 对前述混合液进行加热的工序;

[0070] (3) 在前述热处理后的混合液中添加包含(i)逆转录酶和DNA聚合酶或包含(ii)具有逆转录活性的DNA聚合酶的一步式RT-PCR反应液的工序;

[0071] (4) 将反应容器密闭后,实施一步式RT-PCR反应的工序。

[0072] 前述工序(1)至(4)优选在同一容器中进行。即,优选:在工序(1)至(4)期间,不将

混合液的全部或部分转移到其它容器中。可以将工序(1)和(2)的混合液的总量供于工序(3)(4),也可以将其一部分转移到其它容器中来实施工序(3)(4)。

[0073] 本发明中成为检测对象的RNA病毒可以是具有源自脂质双层膜的包膜的RNA病毒,也可以是不具有包膜的RNA病毒。特定的优选的实施方式中,本发明对于具有包膜的RNA病毒,能够从未纯化试样中以高灵敏度进行检测,效果优异。作为具有包膜的RNA病毒(也称为“包膜RNA病毒”),可列举出黄病毒科病毒(例如,丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒、寨卡病毒、猪瘟疫病毒);披膜病毒科病毒(例如,风疹病毒、基孔肯亚病毒);冠状病毒科病毒(例如,SARS冠状病毒、MERS冠状病毒、SARS-nCoV-2冠状病毒);正粘病毒科病毒(例如,流感病毒);弹状病毒科病毒(例如,狂犬病病毒);本雅病毒科病毒(例如,克里米亚-刚果出血热病毒、汉坦病毒);副粘病毒科病毒(例如,麻疹病毒、人RS病毒);线状病毒科病毒(例如,埃博拉)等,没有特别限定。从更进一步可靠地获得本发明的更高效果的观点出发,优选用于冠状病毒科病毒的检测,更优选用于SARS冠状病毒、MERS冠状病毒、SARS-nCoV-2冠状病毒的检测,尤其用于SARS-nCoV-2冠状病毒(也称为SARS-CoV-2)的检测。

[0074] 本发明也可以用于不具有包膜的RNA病毒(也称为“非包膜RNA病毒”)的检测,作为这种不具有包膜的RNA病毒,可列举出星状病毒科病毒(例如,星状病毒);杯状病毒科病毒(例如,札幌病毒、诺如病毒);小核糖核酸病毒科病毒(例如,甲型肝炎病毒、埃可病毒、肠病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒);戊肝病毒科病毒(例如,戊型肝炎病毒);呼肠孤病毒科病毒(例如,轮状病毒)等,没有限定,优选用于杯状病毒科病毒和呼肠孤病毒科病毒的检测,更优选用于诺如病毒、札幌病毒、轮状病毒的检测,进一步优选用于诺如病毒、轮状病毒的检测,尤其用于诺如病毒的检测。

[0075] 作为本发明中使用的试样,例如可列举出咽拭液、鼻拭液、痰液、粪便(排泄便、直肠粪便)、呕吐物、唾液等,没有特别限定,可以用于源自生物体的所有试样。特别是,对于从粪便、咽拭液、鼻拭液、痰液、肺吸出物、脑脊液、漱口液、唾液、泪液、培养细胞、培养上清液中检测是有用的。作为特征可列举出:这些试样中包含大量蛋白酶和核酸降解酶(RNase、DNase)等消化酶作为夹杂物,此外在粪便中包含大量源自大肠杆菌的蛋白质和核酸等PCR反应抑制物质。已知:RT-PCR反应中使用的酶、引物和核酸探针等反应液构成物受到试样中包含的夹杂物的影响而被消化或失活,检测灵敏度降低。另外,试样中包含的核酸降解酶由于会消化从病毒中露出的核酸,因此使灵敏度降低、或检测不到,有产生假阴性的判定结果的担心。本发明的特征在于,对于这些试样,在无需市售的RNA纯化试剂对RNA进行分离/纯化的情况下,在包含阴离子性聚合物和极性有机溶剂的混合液中事先进行热处理,由此使RNA从病毒结构中露出,用于RT-PCR反应。上述试样可以直接供于检测,或为了减少杂质对反应的影响、获得更稳定的检测结果,也可以是将上述试样悬浮于水、生理盐水或缓冲液中的试样。进而,粪便等夹杂物特别多的试样的情况下,也可以进行离心分离,使用其上清液。或者,也可以实施过滤器过滤。作为上述缓冲液,没有特别限定,可列举出HANKS缓冲液、Tris缓冲液、磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、HEPES缓冲液、Tricine(三(羟甲基)甲基甘氨酸)缓冲液等。另外,粘性强的生物试样(例如,包含粘性强的痰液的试样)的情况下,虽然没有特别限定,但是可以为用Sputazyme酶液处理后的试样。

[0076] 作为本发明中的其它方式的试样,是包含培养细胞或培养上清液的试样。病毒的分离中,利用细胞的分离培养是有效的。分离培养后的培养上清液和培养细胞中包含病毒,

因此可以成为本发明中的试样。作为用于分离培养的细胞的种类,可列举出MDCK细胞、hCK细胞、VeroE6/TMPRSS2细胞、CHO细胞、HEK-293细胞、BHK-21细胞、Sf9细胞和Sf21细胞等。对于包含已知在将细胞裂解或破碎时细胞破碎液中会含有大量核酸降解酶的U937细胞等的试样是有效的,没有特别限定,广泛包含基于此的方法。

[0077] 作为本发明中的另一方式的试样,为环境中的擦拭检查试样。为了阐明病毒、细菌的污染途径、把握设施环境等的污染状况,擦拭检查是有用的。本发明中,擦拭检查没有特别限定,是指例如用棉棒等擦拭相关区域、设备等,溶出至水、缓冲液中,用聚乙二醇(PEG)沉淀等进行浓缩的试样。作为具体的擦拭检查的要点,可示例出“擦拭待检体的诺如病毒检测法的改良”(http://idsc.nih.go.jp/iasr/32/382/dj3824.html)等,但没有特别限定,广泛包括基于此的方法。作为擦拭位置的例子,可列举出案板、厨刀、毛巾、餐具等烹饪设备类、冰箱的把手、洗手间、浴室的门把手、卫生间、厨房、洗手间、浴室等的水龙头、烹饪者的手、手指、浴室、洗手间、洗脸池、扶手、客厅等设施等。另外,尽管不是擦拭检查,但作为环境检测,还能用于污水试样的浓缩试样。

[0078] 本发明中,极性是指分子内存在的电子偏置,将分子内的正电荷与负电荷的重心不一致的分子称为极性分子。由极性分子构成的溶剂称为极性溶剂。极性溶剂中,通过使用由有机化合物构成的极性有机溶剂,能使核酸、蛋白质之类的生物分子的高级结构变得不稳定。通过利用该性质,从而使病毒的结构蛋白质的疏水键等变弱,发挥使衣壳结构变得不稳定之类的效果。如上所述,已知极性有机溶剂针对病毒的衣壳结构的不稳定化效果因病毒的种类而异。可认为这是由于病毒所具有的衣壳蛋白、包膜的性质的不同而疏水性键等的强度不同所致。

[0079] 作为前述极性有机溶剂,具体而言,可列举出乙醇、甲醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、三乙胺、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰三胺、二甲基亚砷、丙酮、乙腈、乙醇、甲醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、吡啶等,但不仅限于此。优选为甲醇、三乙胺、二甲基亚砷、丙酮。另外,也可以是包含这些极性有机溶剂中的2种以上的混合溶液。对于该极性有机溶剂作为衣壳蛋白的变性剂的下限浓度而言,也取决于极性有机溶剂、其它添加剂的种类,但只要是使衣壳蛋白变性的浓度就没有特别限定,另外,由于衣壳蛋白、包膜因病毒的种类而不同,因此每种病毒的极性有机溶剂的有效浓度不同,但通常极性有机溶剂相对于待检体量的有效浓度为10%以上且低于100%、更优选为30%以上且90%以下、进一步优选为50%以上且85%以下。例如,通过使前述工序(1)中的混合液中的极性有机溶剂的含有率为20%以上、优选为25%以上、更优选为30%以上,从而能够实现上述极性有机溶剂的有效浓度。前述工序(1)中的混合液中的极性有机溶剂的含有率的上限只要发挥本发明的效果就没有特别限定,例如90%以下、优选为80%以下、更优选为75%以下。需要说明的是,本发明中组合使用两种以上的极性有机溶剂的情况下,优选进行调整而使它们的总量在上述含有率范围内。

[0080] 已知前述极性有机溶剂通常也为PCR的抑制剂。因此,在所述极性有机溶剂中,选择蛋白质变性所需的浓度与允许引入PCR中的浓度之间的差异较小者,依次添加极性有机溶剂、试样、一步式RT-PCR反应液,从而在同一容器中简便地进行从衣壳蛋白的变性到一步式RT-PCR反应为止的检测操作,中途无需进行容器打开关闭。作为这样的极性有机溶剂的例子,特别优选列举出二甲基亚砷。例如,工序(1)中将二甲基亚砷1 μ L和试样1 μ L混合、工序(3)中加入一步式RT-PCR液48 μ L的情况下,反应液中所带入的二甲基亚砷的浓度为2%。即

使带入RT-PCR液中,2%的二甲基亚砷也是可接受的浓度。本发明中可以适宜使用的极性有机溶剂(二甲基亚砷)的量可以与上述同样容易地算出。

[0081] 前述极性有机溶剂可以组合1种以上的表面活性剂、还原剂、螯合剂、金属盐而使用,也可以实质上不包含这些表面活性剂等。特定的实施方式中,例如,工序(1)中的混合液可以实质上不包含表面活性剂。根据本发明,如此即使在实质上不包含表面活性剂的状态下进行预处理,也能够高灵敏度地检测试样中的RNA病毒。另外,表面活性剂根据其种类,有时也会抑制RT-PCR反应,因此期望实质上不包含表面活性剂。此处实质上不包含是指:不包含可从RNA病毒中提取核酸的浓度的表面活性剂,例如,工序(1)的混合液中的表面活性剂的浓度为0.001%以下、优选为0.0001%以下、更优选为0.00001%以下,其中,工序(1)的混合液优选完全不包含表面活性剂。

[0082] 阴离子性聚合物是通过以阴离子性单体为主的聚合而形成的聚合物。例如,本发明中使用的阴离子性聚合物是以具有选自磺酸基、羧基、磷酸基、硫酸基、和膦酸基组成的组中的至少1种阴离子性官能团的单体为主进行聚合而得到的聚合物,优选为以磺酸基作为单体进行聚合而得到的聚合物。以RNA、DNA为主的核酸分子也是阴离子性聚合物。试样中包含的核酸降解酶与作为阴离子性聚合物的核酸分子结合,进行消化。虽然不希望受理论约束,但在本发明中,通过在反应液体系中添加未被核酸降解酶消化的阴离子性聚合物,从而可期待发挥抑制目标核酸分子被消化的效果。

[0083] 作为前述阴离子性聚合物,只要发挥本发明的效果就没有特别限定,作为代表性例子,可列举出核酸聚合物(聚肌苷酸、聚胞苷酸、聚鸟苷酸、聚腺苷酸、聚脱氧肌苷酸、聚脱氧胞苷酸、聚脱氧鸟苷酸、聚脱氧腺苷酸)、多糖类(卡拉胶、肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、硫酸乙酰肝素、软骨素、硫酸皮肤素)、聚乙烯基磺酸、聚乙烯基膦酸、聚苯乙烯磺酸、聚丙烯酸、聚丙烯酸/磺酸共聚物、聚丙烯酸/马来酸共聚物等。

[0084] 前述阴离子性聚合物可以为盐的形态。例如可以为碱金属盐(钠盐、钾盐等)、碱土金属盐(钙盐、镁盐)等,可以为水合物盐。优选为碱金属盐,更优选为钠盐、钾盐,可以进一步优选为钠盐。

[0085] 前述阴离子性聚合物的平均分子量只要发挥本发明的效果就没有特别限定。需要说明的是,本说明书中平均分子量是指重均分子量。阴离子性聚合物的平均分子量取决于作为构成单元的单体的分子量和聚合度,可以为例如1000以上、优选为5000以上、进一步优选为10000以上、进而更优选50000以上。另外,阴离子性聚合物的平均分子量的上限值也只要发挥本发明的效果就没有特别限定,可以为例如为5000000以下、优选为1000000以下、更优选5000000以下。

[0086] 特定的实施方式中,前述工序(1)的混合液中的阴离子性聚合物的含有率优选为0.00001%(v/v%)以上,更优选为0.0001%以上,进一步优选为0.001%以上。前述工序(1)中的阴离子性聚合物的含有率的上限值只要发挥本发明的效果就没有特别限定,例如可以为0.5%以下、更优选为0.1%以下、进而更优选为0.01%以下。通过以这样的浓度含有阴离子性聚合物,从而能够有效地防止在未经纯化工序的试样中从病毒露出的RNA被消化,和/或能够有效地防止由该试样中包含的夹杂物质等PCR抑制物质所致的影响,结果能够显著抑制病毒RNA的检测灵敏度的降低。带入到工序(3)的一步式RT-PCR反应液中的阴离子性聚合物的含有率只要不抑制RT-PCR反应就没有特别限定,例如可以为0.05%以下,进而,具体

可以为0.01%以下,例如可以为0.00001~0.001%。

[0087] 一个实施方式中,本发明的RNA病毒的检测方法优选将前述工序(1)中制备混合液后到实施工序(2)为止的时间设为5分钟以内。如此通过将工序(1)结束后到工序(2)开始为止的时间设为短时间,从而能够实现更迅速的RNA病毒的检测。前述工序(1)中制备混合液后到实施工序(2)为止的时间没有特别限定,优选为5分钟以下,更优选为4分钟以下,更优选为3分钟以下,进一步优选为2分钟以下,可以为1分钟以下。前述工序(1)中制备混合液后到实施工序(2)为止的时间的下限值没有特别限定,例如为10秒以上、优选可以为30秒以上。本发明中,工序(1)中的预处理时间即使为如此短时间,也能够诱导包封在包膜、衣壳中的RNA的露出,能够通过一步式RT-PCR实现RNA的检测。

[0088] 一个实施方式中,本发明的RNA病毒检测方法中实施的工序(2)的加热条件可以为70℃以上。通过以优选为80℃以上、更优选为90℃以上、例如以95℃实施,从而能够更进一步有效地得到本发明的效果。工序(2)的加热条件的上限值没有特别限定,例如可以为100℃。另外,工序(2)的加热条件优选在上述加热温度下加热1秒以上。特定的优选的实施方式中,加热30秒以上为好,加热1分钟以上为好,加热3分钟以上为好。上限值只要发挥本发明的效果就没有特别限定,例如通过设为10分钟以下而能够实现迅速的RNA病毒的检测。例如,作为一个优选的方式,工序(2)中的加热条件可以设为70℃下1秒以上,作为其它优选的方式,可以设为80℃或90℃下1秒以上的加热条件。

[0089] 从待检体纯化病毒来源RNA的作业繁杂,成为作业时间延长的原因。此外,在进行装有含病毒待检体的反应容器的转移、离心分离作业等时,存在病毒和源自病毒的RNA发生飞散的风险。病毒的飞散对作业者的安全和健康造成威胁,同时意味着检测作业环境的污染。飞散的RNA病毒在作业场所发生气溶胶化,因此同时检测的其它样品的污染风险和作业者的感染风险成为问题。因此,在不从待检体纯化病毒来源RNA的情况下使用RT-PCR检测是否存在病毒的方法具有超过作业简化的意义。

[0090] 向前述混合液中添加的一步式RT-PCR溶液包含逆转录酶和DNA聚合酶。优选使用作为兼具逆转录酶活性的DNA聚合酶的Tth DNA聚合酶、Taq DNA聚合酶等。更优选使用两种酶、逆转录酶与DNA聚合酶中的至少两种酶。

[0091] 作为前述一步式RT-PCR反应液中包含的逆转录酶的来源,只要能将RNA转化为DNA就没有特别限定,可示例出MMLV(莫洛尼鼠白血病病毒,Moloney Murine Leukemia Virus)-RT、AMV-RT(禽成髓细胞瘤病毒,Avian Myeloblastosis Virus)、HIV-RT、RAV2-RT、EIAV-RT、生氢氧化碳嗜热菌(生氢氧化碳嗜热菌,Carboxydotherrmus hydrogenoformam) DNA聚合酶)、其突变体。作为特别优选的例子,可列举出MMLV-RT、AMV-RT、或它们的突变体。

[0092] 作为前述一步式RT-PCR反应液中包含的DNA聚合酶,可列举出Taq、Tth、Bst、KOD、Pfu、Pwo、Tbr、Tfi、Tfl、Tma、Tne、Vent、DEEPVENT、它们的突变体,没有特别限定。更优选使用Taq、Tth或它们的突变体。特别优选使用Tth或其突变体。进而,为了提高非特异反应抑制效果,通过与抗DNA聚合酶抗体的组合使用、或者通过化学修饰向DNA聚合酶中导入热不稳定嵌段基团而在逆转录反应期间抑制DNA聚合酶的酶活性,可以用于热启动PCR。

[0093] 本说明书中,DNA聚合酶的突变体是指:与作为其来源的野生型DNA聚合酶的氨基酸序列具有例如85%以上、优选为90%以上、更优选为95%以上、进一步优选为98%以上、尤其优选为99%以上的序列一致性、且与野生型DNA聚合酶同样地具有扩增DNA的活性和根

据需要将RNA转换为cDNA的活性的突变体。此处,作为计算氨基酸序列的一致性的方法,可以利用本领域中公知的任意手段来进行。例如,可以使用市售的或能够通过远程通信线路(因特网)而利用的解析工具来计算,作为一个例子,通过使用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的同源性算法BLAST(局部序列排比检索基本工具)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>中缺省(初始设定)的参数,能够计算出氨基酸序列的一致性。另外,本发明中可以使用突变体可以是:由在作为其来源的野生型DNA聚合酶的氨基酸序列中置换、缺失、插入和/或添加(以下也将这些统称为“突变”)了1个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的、与野生型DNA聚合酶同样地具有将RNA转换为cDNA的活性和扩增DNA的活性的多肽。此处1个或多个例如可以是1~80个、优选为1~40个、更优选为1~10个、进一步优选为1~5个,进而更优选为1~3个,没有特别限定。

[0094] 作为本发明中使用的一步式RT-PCR反应液,除了包含逆转录酶和DNA聚合酶之外还可以包含缓冲剂、作为适当的盐的镁盐或锰盐、脱氧核苷三磷酸、对应于检测对象的病毒RNA的检测对象区域的引物对,进而根据需要可以包含添加剂。

[0095] 作为本发明中使用的缓冲剂,没有特别限定,可列举出Tris、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、双-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Bis-Tricine)、羟乙基甘氨酸(Bicine)等。用硫酸、盐酸、乙酸、磷酸等将pH调节为6~9、更优选调节为pH7~8。另外,作为所添加的缓冲剂的浓度,以10~200mM、更优选以20~150mM来使用。此时,为了设为适于反应的离子条件,可加入盐溶液。作为盐溶液,可列举出氯化钾、乙酸钾、硫酸钾、硫酸铵、氯化铵、乙酸铵等。

[0096] 作为本发明中使用的dNTP,可加入dATP、dCTP、dGTP、dTTP各0.1~0.5mM,最常见的是加入0.2mM左右。通过代替dTTP和/或使用dUTP作为一部分,还可以预防交叉污染。作为镁盐,可示例出氯化镁、硫酸镁、乙酸镁,作为锰盐,可示例出氯化锰、硫酸锰、乙酸锰等,优选加入1~10mM左右。

[0097] 进而,作为一步式RT-PCR反应液中包含的添加剂,优选包含选自具有在氨基酸中的氨基上连接有3个甲基的结构季铵盐(以下称为“甜菜碱样季铵盐”)、牛血清白蛋白、甘油、二醇、和明胶组成的组中的至少1种。

[0098] 作为前述甜菜碱样季铵盐,可列举出甜菜碱(三甲基甘氨酸)、L-肉碱等,只要是具有在氨基酸中的氨基上连接有3个甲基的结构季铵盐就没有特别限定。甜菜碱样季铵盐所具有的结构是在分子内具有稳定的正、负两种电荷的化合物,显示出表面活性剂那样的性质,认为会引起病毒结构的不稳定化。进而,已知促进DNA聚合酶的核酸扩增。优选的上述甜菜碱样季铵盐浓度为0.1M~2M、更优选为0.2M~1.2M。

[0099] 作为前述一步式RT-PCR反应液中包含的牛血清白蛋白,优选至少为0.5mg/ml以上、更优选至少为1mg/ml以上。夹杂物较多的试样中,牛血清白蛋白的浓度优选为2mg/ml以上、进一步优选为3mg/ml以上,能够实现良好的检测。

[0100] 前述一步式RT-PCR反应液中包含的明胶源自牛、猪等动物的皮肤、骨骼、肌腱、或者鱼的鳞片、皮肤,认为有助于PCR酶的稳定化。作为使用浓度,优选使PCR扩增稳定化但不妨碍荧光检测的程度。优选为1~5%、进一步优选为1~2%。虽然对于明胶的来源没有特别限定,但是与源自牛、猪的明胶相比,源自鱼的明胶在凝胶强度低、反应液的操作性良好方面优选。

[0101] 进而,还可以与该技术领域已知促进RT-PCR的物质组合来使用。本发明中有用

的促进物质例如可列举出甘油、多元醇、蛋白酶抑制剂、单链结合蛋白(SSB)、T4基因32蛋白、tRNA、含硫或乙酸的化合物类、二甲基亚砷(DMSO)、甘油、乙二醇、丙二醇、三亚甲基二醇、甲酰胺、乙酰胺、甜菜碱、四氢嘧啶、海藻糖、葡聚糖、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP),四甲基氯化铵(TMCA)、四甲基氢氧化铵(TMAH)、四甲基乙酸铵(TMAA)、聚乙二醇、TritonX-100、TritonX-114、吐温20(Tween20),诺乃洗涤剂P40、Brij58等,但不限定于这些。进而为了减少反应抑制,还可以包含乙二醇-双(2-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)那样的螯合剂。

[0102] 本发明的方法中,前述工序(3)中一步式RT-PCR反应液优选进一步包含对应于靶区域的1个以上的引物对。作为本发明中使用的引物对,可列举出:作为对应于检测对象的RNA病毒的检测区域(靶区域)的引物对的、一个引物与另一个引物的DNA延伸产物彼此互补的2种一对引物。另外,作为另一方式,也可列举出包含2对以上的上述引物的所谓多重PCR。进而,在靶核酸包含亚型的情况下,还可以包含简并引物。在通过本发明检测作为包膜RNA病毒之一的冠状病毒(SARS-nCoV-2)时,作为引物对的例子,可列举出国立感染研究所发表的“病原体检测手册2019-nCoV”中记载的序列(序列号1、2、4、5)、美国疾病预防控制中心发表的“2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-pCR Panel Primers and Probes”(序列号7、8、10、11、13、14),也可以适宜地用于本发明中,但不限定于此。前述所述的引物序列中,由序列号1和2、序列号4和5、序列号7和8、序列号10和11、序列号13和14检测SARS-nCoV-2的核衣壳蛋白(N)区域。以SARS-nCoV-2为主的冠状病毒的检测中,可以将核衣壳蛋白(N)区域、包膜蛋白(E)区域、突刺蛋白(S)区域、依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)区域、开放阅读框(ORF)区域等的基因作为检测的对象,但没有特别限定。作为使用的引物的浓度,相对于RT-PCR反应液整体,优选正向引物的浓度为0.1 μ M以上且3 μ M以下,且上述反向引物的浓度为0.1 μ M以上且3 μ M以下。更优选正向引物的浓度为0.1 μ M以上且2 μ M以下,且上述反向引物的浓度为0.5 μ M以上且2 μ M以下。

[0103] 本发明中,作为另一方式,进而是包含至少1种经标记的杂交探针或双链DNA结合荧光化合物的检测方法。由此,可以通过荧光信号的监测来监视扩增产物的分析而并非通过通常的电泳,可减少解析劳力。进而,无需打开反应容器,能够减少污染的风险。也可以通过用不同的荧光色素标记对应于病毒的亚型的各杂交探针,来识别病毒的亚型。

[0104] 作为双链DNA结合荧光化合物,例如可列举出SYBR(注册商标)Green I,SYBR(注册商标)Gold、SYTO-9、SYTP-13、SYTO-82(Life Technologies),EvaGreen(注册商标; Biotium)、LCGreen(Idaho)、LightCycler(注册商标)480ResoLight(Roche Applied Science)等。

[0105] 作为本发明中使用的杂交探针,例如可列举出TaqMan水解探针(美国专利第5,210,015号公报、美国专利第5,538,848号公报、美国专利第5,487,972号公报、美国专利第5,804,375号公报)、分子信标(美国专利第5,118,801号公报)、FRET杂交探针(国际公开第97/46707号小册子,国际公开第97/46712号小册子,国际公开第97/46714号小册子)等。对于作为包膜RNA病毒之一的冠状病毒(SARS-nCoV-2)检测用的探针的碱基序列而言,可列举出美国疾病预防控制中心发表的“2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-pCR Panel Primers and Probes”(序列号9、12、15)和国立感染研究所发表的“病原体检测手册2019-nCoV”中记载的序列(序列号3、6),可以适宜地用于本发明中,但不限定于此。前

述所述的探针序列检测SARS-nCoV-2的N区域。进而,在靶核酸包含亚型的情况下,也可以包含简并序列。在以SARS-nCoV-2为主的冠状病毒的检测中,可以将N区域、E区域、S区域、RdRp区域、ORF区域等的基因作为检测的对象,不特别限定于此。作为荧光标记探针的浓度,优选0.01 μ M以上且1.0 μ M以下。更优选为0.013 μ M以上且0.75 μ M以下,进一步优选为0.02 μ M以上且0.5 μ M以下。

[0106] 本发明的另一方式为包膜RNA病毒的检测用试剂盒,其特征在于,其为试样中的病毒RNA的检测用试剂盒,包含:包含极性有机溶剂和阴离子性聚合物的预处理液、以及逆转录酶和DNA聚合酶(或者具有逆转录活性的DNA聚合酶)、一步式RT-PCR反应液。本发明的病毒的检测用试剂盒包含:至少包含极性有机溶剂、阴离子性聚合物的试剂;逆转录酶;DNA聚合酶;和一步式RT-PCR反应液。本发明的病毒的检测用试剂盒可以包含含有极性有机溶剂和阴离子性聚合物这两者的试剂,也可以将极性有机溶剂和阴离子性聚合物作为分别的试剂包含。从可更简便地进行检测作业的观点出发,优选以含有极性有机溶剂和阴离子性聚合物这两者的试剂的形式提供是理想的,本发明的适合的试剂盒中,可以以包含含有这两者的试剂的形式提供。一步式RT-PCR反应液中优选包含甜菜碱样季铵盐、牛血清白蛋白、甘油、二醇和明胶中的至少1种。优选包含:与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的引物对、进而与检测对象的RNA病毒的检测区域对应的杂交探针。本发明的试剂盒可以以如下方式提供:将上述那样的各种成分放入同一容器中或封入不同的容器并例如捆包成一个包装体,并包含关于该试剂盒的使用方法的信息。通过使用本发明的试剂盒,从而能够迅速、简便地检测试样中是否存在RNA病毒。

[0107] 实施例

[0108] 以下通过实施例对本发明进行具体地说明。当然,本发明不受下述实施例限定。

[0109] 试验例1.阴离子性聚合物对Rnase所致的RT-PCR抑制的效果

[0110] (1)反应液的制备

[0111] 将以下所示的组成的反应液作为基本组成,通过一步式RT-PCR,检测RNaseA存在下的反应液中的冠状病毒RNA。作为检测试剂,除预处理液以外,使用SARS-CoV-2Detection Kit-N1 set-(东洋纺)。需要说明的是,作为本试剂的随附品的检测用的引物·探针为美国疾病预防控制中心(CDC)发布“2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes”(Effective:24Jan 2020)中记载的N1套装,探针使用将FAM作为荧光标记、将BHQ1(Black hole quencher,黑洞猝灭剂)作为猝灭基团进行修饰的探针。

[0112] RT-PCR反应液(43 μ L)

[0113] 反应液:30 μ L

[0114] 酶液:5 μ L

[0115] 引物·探针液:5 μ L

[0116] 无RNase水:3 μ L

[0117] (2)模板RNA和RNase A的添加和预处理

[0118] 在100%二甲基亚砜3 μ L中添加无RNase水或1ng/ μ L RNase A(Nacalai Tesque)1 μ L,在其中以最终浓度0.001%的方式混合无RNase水或聚乙烯基磺酸钠(PVSA)1 μ L。然后,以成为最终浓度50个拷贝/反应~5个拷贝/反应的方式混合2 μ L AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19)RNAControl(Thermo Fisher Scientific),立即在热循环仪中对混合液7 μ

L进行95℃5分钟的热处理。

[0119] (3)反应液的添加

[0120] 在通过前工序进行热处理后的混合液7μL中添加(1)中制备的RT-PCR反应液43μL,在50μL反应体系中实施RT-PCR。

[0121] (4)RT-PCR反应条件

[0122] 使用StepOne plus(Thermo Fisher Scientific),按照以下的温度循环实施了实时PCR反应。

[0123] 42℃5分钟(逆转录条件)

[0124] 95℃10秒(热变性)

[0125] 95℃1秒-50℃3秒-55℃10秒50次循环(PCR-荧光读取)

[0126] (5)结果

[0127] 对于测定结果,利用StepOne plus(Thermo Fisher Scientific)随附的解析软件,将阈值设为10000计算出Ct值。将该结果示于下述的表1和图1。如该结果所示,若添加RNase A,则在不存在PVSA的条件下,在50~5个拷贝的所有情况下均未检测到。而在PVSA存在下,能够检测到50个拷贝~5个拷贝。

[0128] [表1]

Ct值		1	2	3	
PVSA		无	无	+0.001%	
RNase A		无	1ng	1ng	
[0129]	RNA (拷贝数)	50	34.4	N/A	37.6
		50	35.6	N/A	36.5
		10	36.5	N/A	38.5
		10	38.0	N/A	39.3
		5	38.9	N/A	39.4
		5	38.4	N/A	39.7

[0130] 试验例2.使用了灭活病毒的阴离子性聚合物的效果研究

[0131] 将以下所示的组成的反应液作为基本组成,通过一步式RT-PCR,检测了RNaseA存在下的反应液中的灭活冠状病毒。作为检测试剂,除预处理液以外,使用SARS-CoV-2Detection Kit-N1 set-(东洋纺)。需要说明的是,作为本试剂的随附品的检测用的引物·探针为美国疾病预防控制中心(CDC)发布“2019-Novel Coronavirus(2019-nCoV)Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes”(Effective:24Jan 2020)中记载的N1套装,探针使用将FAM作为荧光标记、将BHQ1(Black hole quencher)作为猝灭基团进行修饰的探针。

[0132] RT-PCR反应液(41μL)

[0133] 反应液:30μL

[0134] 酶液:5μL

[0135] 引物·探针液:5 μ L

[0136] 无RNase水:1 μ L

[0137] (2) 灭活病毒和RNase A的添加和预处理

[0138] 在100%二甲基亚砜3 μ L中添加无RNase水或100ng/ μ L RNase A(Nacalai Tesque) 1 μ L,在其中以最终浓度0.001%的方式混合无RNase水或聚乙烯基磺酸钠(PVSA) 1 μ L。然后,作为经灭活的冠状病毒待检体,以成为最终浓度20个拷贝/反应的方式混合4 μ L的AccuPlex SARS-CoV-2Reference Material Kit (Seracare) 随附的阳性对照,立即在热循环仪中对混合液9 μ L进行95 $^{\circ}$ C 5分钟的热处理。

[0139] (3) 反应液的添加

[0140] 在通过前工序进行热处理后的混合液9 μ L中添加(1)中制备的RT-PCR反应液41 μ L,在50 μ L反应体系中实施了RT-PCR。

[0141] (4) RT-PCR反应条件

[0142] 使用StepOne plus(Thermo Fisher Scientific),按照以下的温度循环实施了实时PCR反应。

[0143] 42 $^{\circ}$ C 5分钟(逆转录条件)

[0144] 95 $^{\circ}$ C 10秒(热变性)

[0145] 95 $^{\circ}$ C 1秒-50 $^{\circ}$ C 3秒-55 $^{\circ}$ C 10秒50次循环(PCR-荧光读取)

[0146] (5) 结果

[0147] 对于测定结果,利用StepOne plus(Thermo Fisher Scientific)随附的解析软件,将阈值设为10000计算出Ct值。将该结果示于下述的表2和图2。如该结果所示,添加RNase A时,在不存在PVSA的条件下,在所有的灭活病毒20个拷贝(n=4)情况下均未检测到。相反地,在PVSA存在下,全部能够检测到。

[0148] [表2]

Ct值		1	2	3	4
PVSA		无		+0.001%	
RNase A		0ng	100ng	0ng	100ng
[0149] SARS-CoV-2 (拷贝数)	20	36.1	N/A	36.3	38.8
	20	37.1	N/A	37.0	39.1
	20	36.7	N/A	35.6	37.7
	20	36.3	N/A	36.1	36.8

[0150] 试验例3. 使用了唾液待检体的研究

[0151] 将以下所示的组成的反应液作为基本组成,通过一步式RT-PCR,检测唾液待检体存在下的反应液中的灭活冠状病毒。作为检测试剂,除预处理液以外,使用SARS-CoV-2Detection Kit-N1 set-(东洋纺)。需要说明的是,作为本试剂的随附品的检测用的引物·探针为美国疾病预防控制中心(CDC)发布“2019-Novel Coronavirus(2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes”(Effective:24Jan 2020)中记载的N1套装,探针使用将FAM作为荧光标记、将BHQ1(Black hole quencher)作为猝灭基团进行修饰的探针。

[0152] RT-PCR反应液(41 μ L)

[0153] 反应液:30 μ L

[0154] 酶液:5 μ L

[0155] 引物·探针液:5 μ L

[0156] 无RNase水:1 μ L

[0157] (2)唾液待检体的添加和灭活病毒的预处理

[0158] 在100%二甲基亚砷3 μ L中添加无RNase水或唾液,在其中以最终浓度0.001%的方式混合无RNase水或聚乙烯基磺酸钠(PVSA) 1 μ L。然后,作为经灭活的冠状病毒待检体,以成为最终浓度20个拷贝/反应的方式混合4 μ L的AccuPlex SARS-CoV-2Reference Material Kit (Seracare)随附的阳性对照,立即在热循环仪中对混合液9 μ L进行95 $^{\circ}$ C 5分钟的热处理。

[0159] (3)反应液的添加

[0160] 在通过前工序进行热处理后的混合液9 μ L中添加(1)中制备的RT-PCR反应液41 μ L,在50 μ L反应体系中实施了RT-PCR。

[0161] (4)RT-PCR反应条件

[0162] 使用StepOne plus (Thermo Fisher Scientific),按照以下的温度循环实施了实时PCR反应。

[0163] 42 $^{\circ}$ C 5分钟(逆转录条件)

[0164] 95 $^{\circ}$ C 10秒(热变性)

[0165] 95 $^{\circ}$ C 1秒-50 $^{\circ}$ C 3秒-55 $^{\circ}$ C 10秒50次循环(PCR-荧光读取)

[0166] (5)结果

[0167] 对于测定结果,利用StepOne plus (Thermo Fisher Scientific)随附的解析软件,将阈值设为10000计算出Ct值。将该结果示于下述的表3和图3。如该结果所示,添加RNase A时,在不存在PVSA的条件下,在所有的灭活病毒20个拷贝(n=4)下均未检测到。相反,在PVSA的存在下,在n=4中的3个样品中确认检测到。

[0168] [表3]

Ct值		1	2	3	4
PVSA		无	+0.001%	无	+0.001%
唾液		无	无	有	有
SARS-CoV-2 (拷贝数)	20	37.8	37.0	N/A	38.8
	20	38.0	36.5	N/A	40.4
	20	36.8	36.6	N/A	N/A

[0170] 产业上的可利用性

[0171] 本发明可适宜用于分子生物学研究、进而以临床检测、食品卫生管理等为目的的检测中。

序列表

<110>	东洋纺株式会社 (TOYOBO. CO., LTD.)	
<120>	经改良的病毒的检测方法 (Improved methods for detecting viruses)	
<130>	200323W001	
<160>	15	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	1	
	cacattggca cccgcaatc	19
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	2	
	gaggaacgag aagaggcttg	20
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	探针	
<400>	3	
	acttcctcaa ggaacaacat tgcca	25
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	4	
	aaatthttggg gaccaggaac	20

<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	tggcagctgt gtaggtcaac	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	探针	
<400>	6	
	atgtcgcgca ttggcatgga	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	gacccccaaaa tcagcgaat	20
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	tctggttact gccagttgaa tctg	24
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	探针	
<400>	9	

accccgcatc acgtttggtg gacc	24
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
ttacaaacat tggccgcaaa	20
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
gcgacgacatt ccgaagaa	18
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 探针	
<400> 12	
acaatttgcc cccagcgctt cag	23
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引物	
<400> 13	
gggagccttg aatacaccaa aa	22
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引物	

<400> 14	
tgtagcacga ttgcagcatt g	21
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 探针	
<400> 15	
aycacattgg cacccgcaat cctg	24

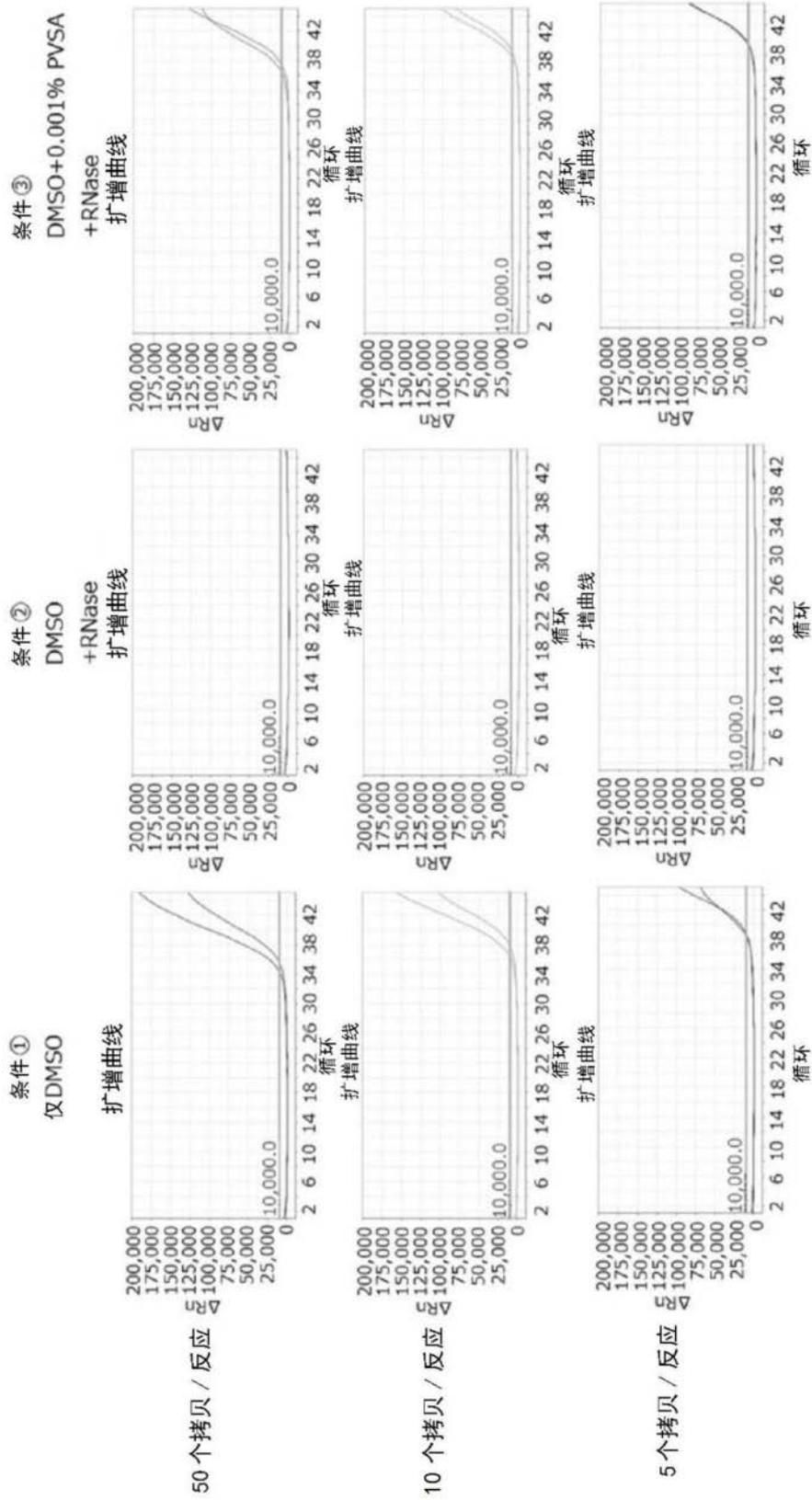


图1

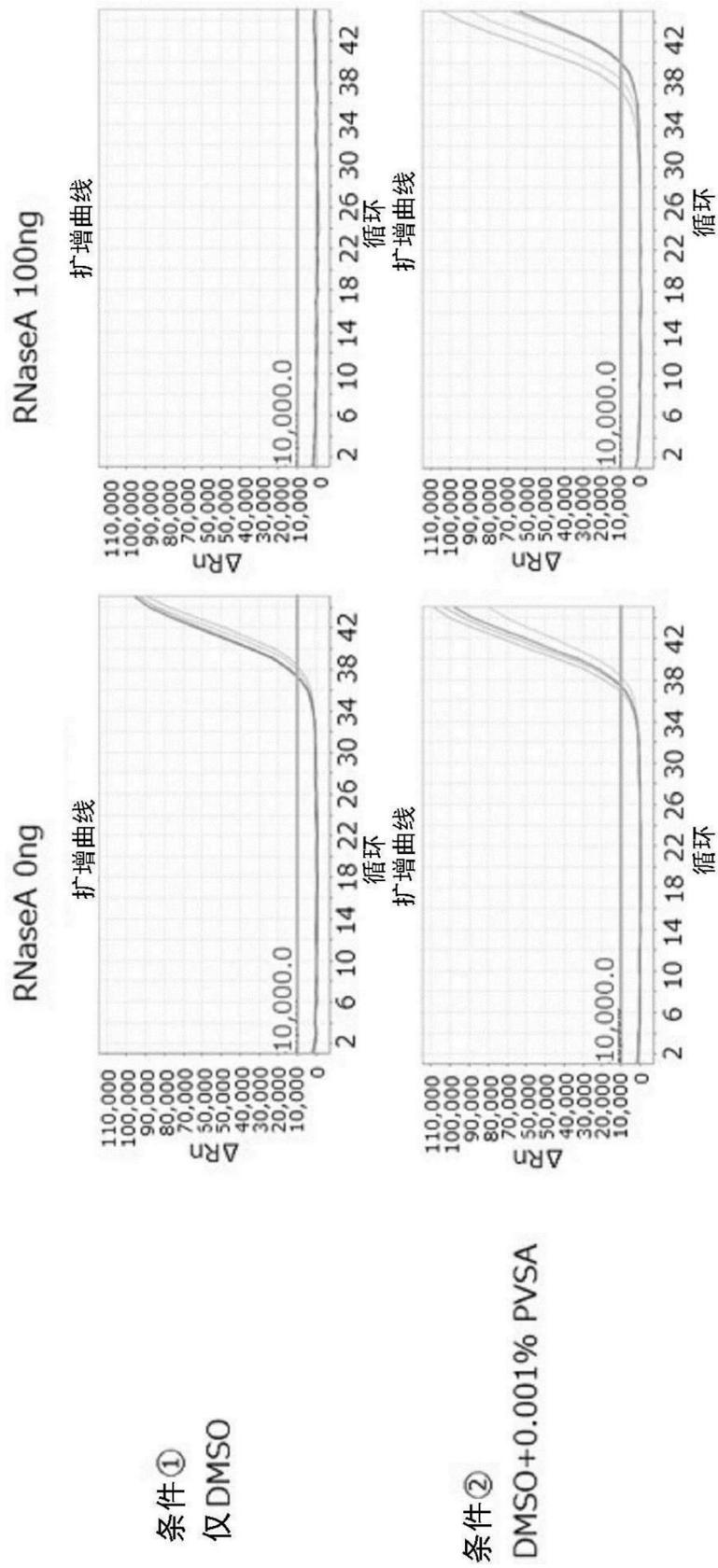


图2

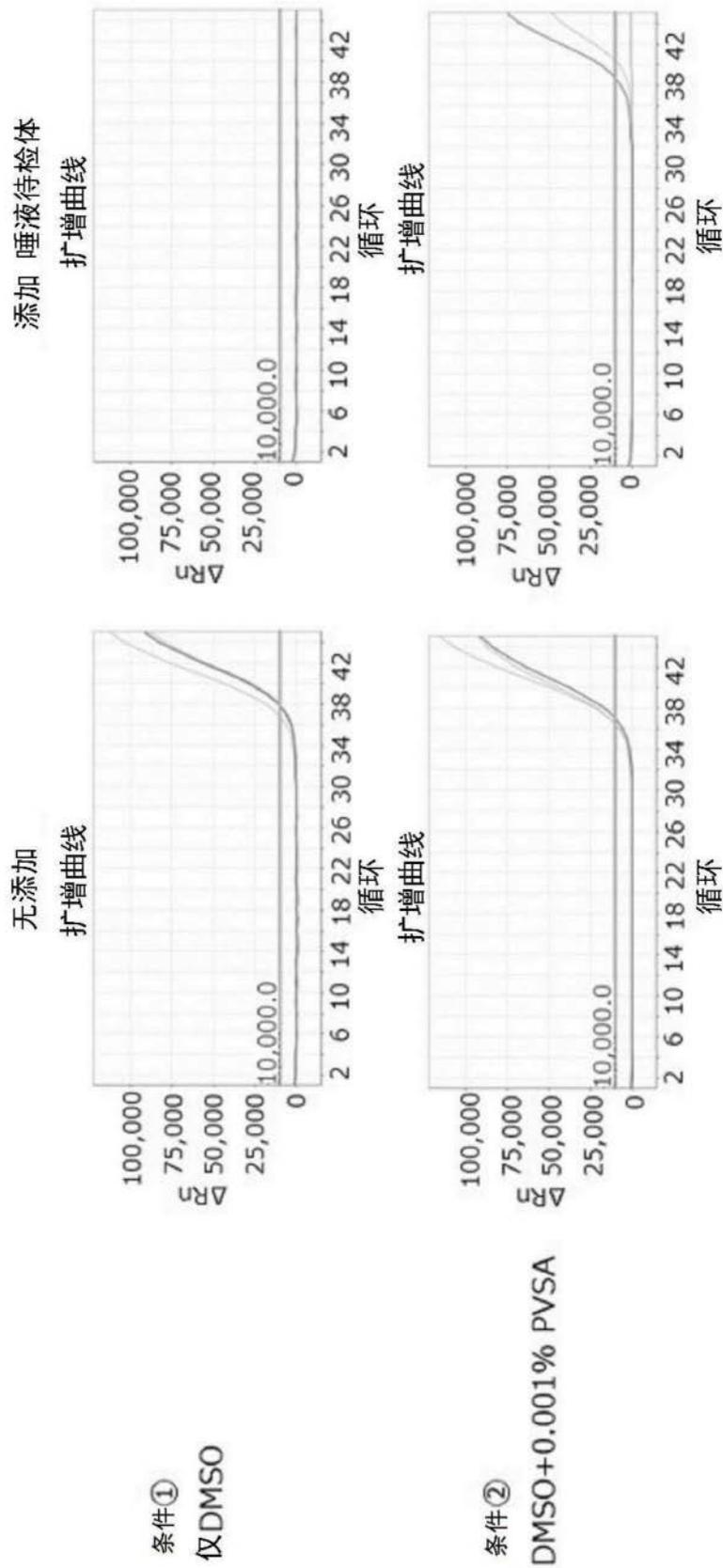


图3