



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I833069 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：110109507 (22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 17 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/6876 (2018.01) C12Q1/6888 (2018.01)
C12Q1/70 (2006.01)(71)申請人：國防醫學院(中華民國) NATIONAL DEFENSE MEDICAL CENTER (TW)
臺北市內湖區民權東路六段 161 號

(72)發明人：劉正哲 LIU, CHENG-CHE (TW)；洪伯達 HONG, PO-DA (TW)；黃怡慧 HUANG, YI-HUEI (TW)；余冠毅 YU, KUAN-YI (TW)；黃碩平 HUANG, SHOU-PING (TW)；唐守宏 TANG, SHOU-HUNG (TW)；程君弘 CHERNG, JUIN-HONG (TW)

(74)代理人：王清煌

(56)參考文獻：

TW 201520553A CN 110423844A

期刊 Yi-Huei Huang et al., Development of a Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Human Polyomavirus BK. Diagnostics (Basel). 2020 Jun 12; 10(6): 403. doi: 10.3390/diagnostics10060403.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：9 共 36 頁

(54)名稱

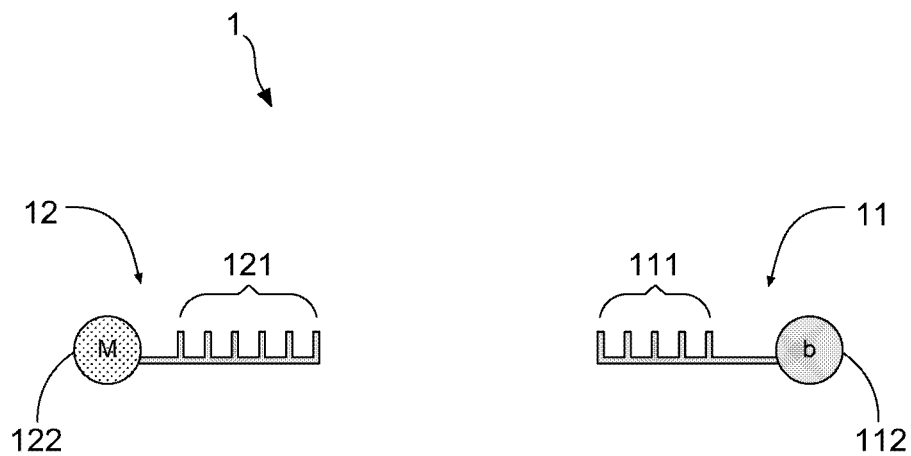
核酸探針組、核酸側流檢測套組以及該核酸側流檢測套組之用途

(57)摘要

本發明主要揭示一種核酸探針組。依據本發明之設計，所述核酸探針組包括一檢測探針與一捕捉探針，其中，該檢測探針包括取自於一 BK 病毒基因之中的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基的一標誌物(Marker)。另一方面，該捕捉探針同樣包括所述核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基的一結合物。進一步地，本發明之核酸探針組可和一檢測試片以及一四聚體蛋白(如 Streptavidin)一同組成一側流檢測套組。實驗證實，本發明之側流檢測套組可用於對一採集樣品進行 BK 病毒檢測，例如：環境水、汗水、飲用水、尿液、或血清。

The present invention discloses a nucleic acid probe set, comprising a detection probe and a capture probe. The detection probe comprises a nucleotide sequence that is extracted from a conserved region of a genome sequence belong of a BK virus, and further comprises a marker connected to a terminal base of the nucleotide sequence. On the other hand, the capture probe also comprises the same nucleotide sequence and a combiner connected to a terminal base of the nucleotide sequence, wherein the combiner is adopted for combining with a tetrameric protein such as Streptavidin. Therefore, a nucleic acid lateral flow immunoassay for detection of BK virus is developed, and comprises: the nucleic acid probe set, a test strip, and the Streptavidin. Experimental data have proved that, the nucleic acid lateral flow immunoassay can achieve the detection of BK virus from a sample that is collected from environmental water, waste water, drinking water, urine, or serum.

指定代表圖：



符號簡單說明：

- 1:核酸探針組
- 11:捕捉探針
- 111:第一引子
- 112:結合物
- 12:檢測探針
- 121:第二引子
- 122:標誌物

【圖1】



公告本

I833069

【發明摘要】

【中文發明名稱】核酸探針組、核酸側流檢測套組以及該核酸側流檢測套組之用途

【英文發明名稱】 Nucleic acid probe set, nucleic acid lateral flow immunoassay and use of the nucleic acid lateral flow immunoassay

【中文】

本發明主要揭示一種核酸探針組。依據本發明之設計，所述核酸探針組包括一檢測探針與一捕捉探針，其中，該檢測探針包括取自於一BK病毒基因之中的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基的一標誌物(Marker)。另一方面，該捕捉探針同樣包括所述核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基的一結合物。進一步地，本發明之核酸探針組可和一檢測試片以及一四聚體蛋白(如Streptavidin)一同組成一側流檢測套組。實驗證實，本發明之側流檢測套組可用於對一採集樣品進行BK病毒檢測，例如：環境水、汗水、飲用水、尿液、或血清。

【英文】

The present invention discloses a nucleic acid probe set, comprising a detection probe and a capture probe. The detection probe comprises a nucleotide sequence that is extracted from a conserved region of a genome sequence belong of a BK virus, and further comprises a marker connected to a terminal base of the nucleotide sequence. On the other hand, the capture probe also

comprises the same nucleotide sequence and a combiner connected to a terminal base of the nucleotide sequence, wherein the combiner is adopted for combining with a tetrameric protein such as Streptavidin. Therefore, a nucleic acid lateral flow immunoassay for detection of BK virus is developed, and comprises: the nucleic acid probe set, a test strip, and the Streptavidin. Experimental data have proved that, the nucleic acid lateral flow immunoassay can achieve the detection of BK virus from a sample that is collected from environmental water, waste water, drinking water, urine, or serum.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

1:核酸探針組

11:捕捉探針

111:第一引子

112:結合物

12:檢測探針

121:第二引子

122:標誌物

【發明說明書】

【中文發明名稱】核酸探針組、核酸側流檢測套組以及該核酸側流檢測套組之用途

【英文發明名稱】 Nucleic acid probe set, nucleic acid lateral flow immunoassay and use of the nucleic acid lateral flow immunoassay

【技術領域】

【0001】本發明係關於病毒檢測的技術領域，尤指一種核酸探針組、使用該核酸探針組的側流檢測套組、以及該側流檢測套組之用途。

【先前技術】

【0002】已知，在人類多瘤病毒(Polyomavirus)屬之中，BK病毒(BK Virus, BKV)、JC病毒(JC virus, JCV)與SV40病毒與人類基因序列之相似度高達70-75%。其中，BK病毒係雙股環狀之DNA病毒，且其基因全長包含5,000個鹼基對(5000 base pairs)。BK病毒廣泛存在於自然環境中，且常見於正常人體內，但是通常只有在免疫不全的病人身上才會引發嚴重的病症。近年來，研究和臨床醫學案例證實，對於腎臟移植患者而言，BK病毒會引起間質性腎炎以及輸尿管阻塞，甚至導致腎臟衰竭。然而，目前並無有效治療BK病毒感染的藥物，因此，若能腎臟移植手術前進行BK病毒篩檢，便可以降低BK病毒之感染風險，從而避免術後發生移植腎臟功能損壞之意外。並且，在腎臟移植手術後仍有必要持續對腎臟移植患者進行BK病毒量之定期篩檢追蹤。

【0003】BK病毒的基因編碼可分為三個區域：調控區(0.4 kb)、早期基因(2.4 kb)與晚期基因(2.3 kb)，其中，晚期編碼區的基因BK病毒的衣殼係由晚期基因的蛋白質VP1、VP2和VP3構成。因此，現有的BK病毒之臨床檢驗方法包括：(1)PCR檢測患者尿液或血清中的BK病毒之DNA量、(2)PCR檢測患者尿液中BK病毒的VP1 mRNA量、以及(3)病理鏡檢患者尿液中的Decoy cell。其中，PCR為聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)的英文縮寫，PCR檢測是利用BK病毒的引子(或稱目標檢測區段)為模板，在DNA聚合酶和核苷酸底物共同參與下，將該引子擴增至足夠數量，以利於凸顯檢測結果。熟悉病毒檢測的生技工程師應知道，PCR檢測具有以下缺點：耗時、檢測成本高、需使用(或購置)專業儀器、需專業人員操作。

【0004】尿液的病理檢查主要包括以下步驟：S1：收集尿液檢體；S2：離心尿液取得沉澱的細胞做成抹片；以及S3：對抹片進行固定、染色、封片後，利用光學顯微鏡仔細觀察細胞形態學的變化。可惜的是，對於BK病毒篩檢而言，尿液病理鏡檢具有偽陰性高之缺陷。

【0005】有鑑於此，文獻一揭露一種基於CRISPR的BK病毒檢測方法。於此，文獻一指的是Kaminski et.al, “A CRISPR-based assay for the detection of opportunistic infections post-transplantation and for the monitoring of transplant rejection”, Nature Biomedical Engineering, vol. 4, pp. 601 - 609(2020)。依據文獻一的揭示內容，已揭露之BK病毒檢測方法包括以下步驟：

(a)對尿液或血液檢體進行一DNA分離處理；

(b)對前述步驟(a)之產物進行重組酶聚合酶擴增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)處理；

第2頁，共17頁(發明說明書)

- (c) 利用 T7 啟動子完成前述步驟 (b) 之產物的一基因轉錄 (Transcription) 處理，從而獲得體外轉錄目標 RNA (In vitro transcribed target RNA)；
- (d) 引導一 CRISPR RNA (crRNA) 與前述步驟 (c) 之產物進行結合；以及
- (e) 將前述步驟 (d) 之產物滴於一側流裝置之上，接著利用一 CT 值讀取裝置對該側流裝置進行 CT 值讀取。

【0006】於此，必須加以說明的是，前述步驟 (a)-(e) 為文獻一所載 FIG. 4 的重點式摘要。並且，由文獻一的揭示內容可知，文獻一雖然提出了一種應用於篩檢 BK 病毒之側流裝置，然而使用該側流裝置時仍需要使用 BK 病毒進行酶聚合酶擴增處理以及基因轉錄處理。應可理解，酶聚合酶擴增處理和基因轉錄處理皆須由專業人士進行，使得該側流裝置被應用在 BK 病毒檢測時仍顯示出以下缺陷：耗時、檢測成本高、需使用(或購置)專業儀器、需專業人員操作。

【0007】由前述說明可知，現有的各種 BK 病毒之檢測方法及/或裝置皆明顯具有加以改善的空間。有鑑於此，本案之發明人係極力加以研究發明，而終於研發完成一種核酸探針組、使用該核酸探針組的側流檢測套組、以及該側流檢測套組之用途。

【發明內容】

【0008】本發明之主要目的在於提供一種核酸探針組。依據本發明之設計，所述核酸探針組包括一檢測探針與一捕捉探針，其中該檢測探針包括取自於一 BK 病毒基因之中的一保守區域 (conserved region) 的一段核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基

的一標誌物(Marker)。另一方面，該捕捉探針同樣包括所述核苷酸序列，且還包括連接該核苷酸序列之一端鹼基的一結合物，該結合物係用以結合一具有四聚體結構的蛋白質(Protein having quaternary structure)。進一步地，本發明之核酸探針組可和一檢測試片以及一四聚體蛋白(如Streptavidin)一同組成一側流檢測套組。實驗證實，本發明之側流檢測套組可用於對一採集樣品進行BK病毒檢測，例如：環境水、汗水、飲用水、尿液、或血清。

【0009】並且，本發明還提供包括前述核酸探針組與一檢測試片的一側流檢測套組。值得說明的是，在使用本發明之側流檢測套組對一採集樣品進行BK病毒篩檢時，不需要進行任何PCR處理及/或RPA處理，也不需要將BK病毒的DNA轉譯成RNA。換句話說，本發明之側流檢測套組具有以下優點：製造成本低、使用過程不需借助專業儀器、不需進行PCR處理及/或RPA處理、不需進行DNA轉譯處理、以及不限定由專業人員進行檢測操作。

【0010】為達成上述目的，本發明提出所述核酸探針組之一實施例，其包括：

一捕捉探針，包括具有至少19個鹼基的一第一引子以及連接該第一引子之一端鹼基(Terminal base)的一結合物，該結合物係用以結合一具有四聚體結構的蛋白質(Protein having quaternary structure)；以及

一檢測探針，包括具有至少19個鹼基的一第二引子以及連接該第二引子之一端鹼基的一標誌物；

其中，該第一引子與該第二引子皆包含取自於一BK病毒的一基因組序列的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列。

【0011】在一實施例中，所述結合物為用以結合一鏈霉親和素的一生物素，且該標誌物為選自於由奈米金、奈米銀、奈米碳、量子點、膠體金、膠體銀、和膠體量子點所組成群組之中的任一種螢光標誌材料。

【0012】在一實施例中，所述核苷酸序列為下列任一者：

5'-GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG-3'；或

5'-TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT-3'。

【0013】在可行的實施例中，該第一引子之所述端鹼基和該第二引子之所述端鹼基皆可為下列任一者：頭端鹼基或尾端鹼基。

【0014】在一實施例中，該捕捉探針更包括連接於該第一引子之所述端鹼基與該結合物之間的一間隔物，且該間隔物包含10個腺嘌呤(adenine)。

【0015】在一實施例中，該檢測探針更包括連接於該第二引子之所述端鹼基的一間隔物以及與該間隔物連接的一硫醇基(Thiol group)，使該標誌物連接所述硫醇基從而結合至該第二引子。

【0016】在一示範性實施例中，該標誌物為奈米金，且所述奈米金之粒徑係介於25nm與65nm之間。

【0017】並且，本發明同時揭示一種側流檢測套組，其係用於對一採集樣品進行BK病毒檢測，所述側流檢測套組包括：

一核酸探針組，其包括：

第5頁，共 17 頁(發明說明書)

一捕捉探針，包括一第一引子以及連接該第一引子之一端鹼基的一結合物，該結合物係用以結合一具有四聚體結構的蛋白質(Protein having quaternary structure)；以及

一檢測探針，包括一第二引子以及連接該第二引子之一端鹼基的一標誌物；其中，該第一引子與該第二引子皆包含取自於一BK病毒的一基因組序列的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列；

一檢測試片，包括具有一控制線與一測試線的一薄膜，其中，該控制線與該測試線係分別由一第一捕捉抗體和一第二捕捉抗體噴漬在該薄膜之上所形成；以及

一四聚體蛋白溶液；

其中，使用所述側流檢測套組對一採集樣品進行BK病毒分析檢測時，係需先將該採集樣品進行加熱，接著令該採集樣品依序地與該捕捉探針和該檢測探針進行反應以獲得一待測樣品，接著令該待測樣品與所述四聚體蛋白溶液進行反應以獲得一待測溶液，最終將該檢測試片置入該待測溶液之中，從而在該控制線與該測試線皆產生呈色反應的情況下，利用控制線與測試線比色法獲取一T/C值。

【0018】 在一實施例中，該採集樣品為下列任一者：環境水、汗水、飲用水、尿液、血清、或BK病毒的DNA。

【0019】 在一實施例中，該四聚體蛋白溶液包括一緩衝液以及分散或溶於該緩衝液之中的一四聚體蛋白。

【0020】在一實施例中，該四聚體蛋白為鏈霉親和素(Streptavidin, SA)，且該緩衝液為磷酸鹽溶液。

【0021】在可行的實施例中，所述檢測試片更包括：

一底材，用以供該薄膜設置於其上；以及

一吸收墊(absorption pad)，係設置於該底材之上，並連接於該薄膜之一端側。

【0022】在一實施例中，該薄膜係由選自於由硝化纖維(Nitrocellulos, NC)、聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)和尼龍(Nylon)所組成群組之中的一種材料所製成。

【0023】在一實施例中，所述結合物為生物素(biotin)。

【圖式簡單說明】

【0024】

圖1為本發明之一種核酸探針組的示意圖；

圖2為本發明之一檢測試片的一示範性實施例的立體圖；

圖3A至圖3E為使用側流檢測套組進行BK病毒檢測的示意性流程圖；

圖4為該檢測試片的立體圖；

圖5為9個檢測試片的實際影像圖；

圖6為由機器進行判讀之T/C訊號強度的統計長條圖；

圖7為4個檢測試片的實際影像圖；

圖8為T/C訊號強度的統計長條圖；以及

圖9為6個檢測試片的實際影像圖。

【實施方式】

【0025】為了能夠更清楚地描述本發明所提出之一種核酸探針組、使用該核酸探針組的側流檢測套組、以及該側流檢測套組之用途，以下將配合圖式，詳盡說明本發明之較佳實施例。

【0026】核酸探針組

【0027】圖1顯示本發明之一種核酸探針組(Nucleic acid labeling probes)的示意圖。如圖1所示，本發明之核酸探針組1包括：一捕捉探針11與一檢測探針12，其中，該捕捉探針11包括一第一引子111以及連接該第一引子111之一端鹼基(Terminal base)的一結合物112，該結合物係用以結合一具有四聚體結構的蛋白質(Protein having quaternary structure)。另一方面，該檢測探針12包括一第二引子121以及連接該第二引子121之一端鹼基的一標誌物122。特別地，該第一引子111與該第二引子121皆包含取自於一BK病毒的一基因組序列的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列(Nucleotide sequence)。並且，該第二引子121的熔解溫度(melting temperature, T_m)低於該第一引子111的熔解溫度。

【0028】更詳細地說明，所述結合物112為用以結合一鏈霉親和素13(Streptavidin, SA)的一生物素(biotin)，且該標誌物122為一種螢光標誌材料，例如：奈米金(gold nanoparticles)、奈米銀、奈米碳、量子點、膠體金(colloidal gold)、膠體銀、或膠體量子點。

【0029】 核酸探針組之製作

【0030】 在一示範性實施例中，係利用以下步驟(a)-(f)可完成自一BK病毒的一基因組序列(genome sequence)的一保守區域取得一段核苷酸序列以作為所述第一引子111及/或所述第二引子121：

- (a)自美國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的DNA序列數據庫之中收集BK病毒之232組基因組序列(即，完整核苷酸序列)、JC病毒之464組基因組序列以及SV40病毒之34組基因組序列；
- (b)利用核苷酸序列分析軟體對前述730組基因組序列一多重序列序列比對(Multiple sequence alignment)，從而獲得一共通序列(consensus sequence)；
- (c)依據該共通序列(consensus sequence)自232組BK病毒之基因組序列篩選出BK病毒之保守區域，共4段，分別為鹼基位置987~1100 (114 bp)、1102~1210 (109 bp)、1809~1876 (68 bp)、以及3306~3389 (84 bp)；
- (d)利用引子(primer)設計軟體依據篩選出的4段保守區域設計出4組(共8段)核苷酸序列(Nucleotide sequence)，整理於下表(1)之中；以及
- (e)依據4組(共8段)核苷酸序列合成複數個捕捉探針11以及複數個檢測探針12。

表(1)

第9頁，共 17 頁(發明說明書)

	Sequence
BK4 p0001	5'-TCACATAGACTCCGAAGAC-3' (SEQ ID NO:3)
BK4 p0002	5'-CCGACTTTAACGACGACCC-3' (SEQ ID NO:4)
BK5 p001	5'-CGCATTGAGGAGTTTGTATA-3' (SEQ ID NO:5)
BK5 p002	5'-CGACATTAACGACCACGAG-3' (SEQ ID NO:6)
BK7 p01	5'-TCTTTTTTTGATAACGGGGTC-3' (SEQ ID NO:7)
BK7 p02	5'-ATTAGTTTCTTGACGAGGAG-3' (SEQ ID NO:8)
BK12 P60011	5'-TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT-3' (SEQ ID NO:2)
BK12 P60012	5'-GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG-3' (SEQ ID NO:1)

【0031】依據本發明之設計，捕捉探針11所包括的第一引子111可為上表(1)所列之任一核苷酸序列片段，亦即，該第一引子111具有至少19個鹼基。並且，該捕捉探針11更包括連接於該第一引子111之端鹼基(Terminal base)與所述結合物112之間的一間隔物，且該間隔物包含10個腺嘌呤(adenine)，簡稱為A10。另一方面，檢測探針12所包括的第二引子121可為上表(1)所列之任一核苷酸序列片段，亦即，該第二引子121具有至少19個鹼基。並且，該檢測探針12更包括連接於該第二引子121之端鹼基的一間隔物以及與該間隔物連接的一硫醇基(Thiol group)，使該標誌物122連接所述硫醇基從而結合至該第二引子121。

【0032】接著，在完成探針專一性測試(Specificity test)之後，發現具有核苷酸序列片段P60011或P60012之捕捉探針11及/或檢測探針12顯示出較高的專一性。因此，本發明依據核苷酸序列片段P60011或P60012設計出兩組捕捉探針11和兩組檢測探針12，整理於下表(2)之中。

表(2)

	Sequence (5' → 3')
檢測探針	HS-A ₁₀ -TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT
檢測探針	TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT-A ₁₀ -SH
捕捉探針	Biotin-A ₁₀ -GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG
捕捉探針	GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG-A ₁₀ -Biotin

【0033】應可理解，表(2)所示A10指的是連接於第一引子111之頭端或尾端鹼基以及連接於該第二引子121之頭端或尾端鹼基的間隔物，其包含10個腺嘌呤(adenine)，故而簡稱A10。另一方面，HS指的是連接於該間隔物A10的硫醇基(Thiol group)，且Biotin(生物素)為所述結合物112。值得注意的是，表(2)內的檢測探針12並未標示出所述標誌物122。在一示範性實施例中，標誌物122可為粒徑介於25nm與65nm之間的奈米金(gold nanoparticles)。較佳地，奈米金(gold nanoparticles)的粒徑介於30nm與40nm之間。

【0034】包括核酸探針組之側流檢測套組(Lateral flow assay kit)

【0035】本發明同時提供一種側流檢測套組，其包括如前所述之核酸探針組1以及一檢測試片。圖2顯示該檢測試片的一示範性實施例的

立體圖。如圖2所示，在一示範性實施例之中，所述檢測試片2包括：一底材20、一薄膜21與一吸收墊(absorption pad)23。其中，該薄膜21的製造材料可為硝化纖維(Nitrocellulos, NC)、聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)或尼龍(Nylon)，且其具有一測試線21T與一控制線21C。依據本發明之設計，該測試線21T與該控制線21C係分別由一第一捕捉抗體和一第二捕捉抗體噴漬在該薄膜21之上所形成。在一可行實施例中，該第一捕捉抗體為抗-鏈霉親和素抗體(Anti-streptavidin antibody)，且該第二捕捉抗體為抗-BSA抗體(Anti-BSA antibody)。熟悉側流式檢測試片之設計與製作的工程師必然知道，製作測試線21T與控制線21C時，係先將對應的捕捉抗體分散或溶於例如為PBS的緩衝液之中以獲得一捕捉抗體溶液，接著再利用噴漬系統將該捕捉抗體溶液噴漬於該薄膜21上以形成一測試線21T或一控制線21C。

【0036】 使用側流檢測套組進行BK病毒檢測

【0037】 圖3A至圖3E顯示使用側流檢測套組進行BK病毒檢測的示意性流程圖。BK病毒檢測流程包括以下步驟：

第二引子121：

(1)如圖3A所示，以攝氏95度的溫度加熱一採集樣品(如BK病毒的DNA)2分鐘，使BK病毒之雙股環狀DNA分離為二個單股DNA；

- (2)如圖3B所示，將本發明之核酸探針組1的捕捉探針11加入該採集樣品之中，使該捕捉探針11所包含的該第一引子111結合至一個所述單股DNA；
- (3)如圖3C所示，繼續地將本發明之核酸探針組1的檢測探針12加入該採集樣品之中，使該檢測探針12所包含的該第二引子121結合至同一個所述單股DNA；
- (4)如圖3D所示，使一鏈霉親和素13溶於或分散於一磷酸鹽(PBS)溶液之中以獲得一鏈霉親和素溶液，且將該鏈霉親和素溶液加入該採集樣品之中，使該鏈霉親和素13與該捕捉探針11的該結合物112相結合，且獲得一待測溶液；以及
- (5)如圖3E所示，將該檢測試片2置入該待測溶液14之中，從而在該控制線21C與該測試線21T皆產生呈色反應的情況下，利用控制線與測試線比色法獲取一T/C值。

【0038】圖4顯示該檢測試片的立體圖。如圖4所示，吸收墊23提供待測溶液14移動的驅動力，讓待測溶液14能夠在NC薄膜21上以一定流速流向該測試線21T。當待測溶液14流至測試線21T時，第一捕捉抗體(即，Anti-streptavidin antibody)會捕捉生物素(biotin)，使得結合有捕捉探針11和檢測探針12的單股DNA(簡稱為雜交複合體，如圖3D所示)被固定在測試線21T之上。隨著越來越多的雜交複合體堆積在測試線21T的區域，該測試線21T轉變為一條紅色色帶。可以想像的到，測試線21T的呈色強弱係和待測溶液14所含有的BK病毒DNA的濃度成正相關。進一步地，待測溶液14沿著NC薄膜21持續移動至

控制線21C時，過多的檢測探針12則會被第二抗體(即，anti-BSA antibodies)捕捉沉積，使該測試線21T轉變為另一條紅色色帶。

【0039】側流檢測套組對於BK病毒之檢測靈敏度

【0040】圖5顯示9個檢測試片的實際影像圖。由圖5所示之檢測試片2的實際影像可知，當待測溶液14(如圖3E和圖4所示)所含有的BK病毒的DNA濃度達50 nM時，檢測試片2上的測試線21T與控制線21C的呈色反應為人眼可辨識。當然，在使用讀值裝置(如安裝讀值軟體的智慧型手機)的情況下，即使當待測溶液14所含有的BK病毒的DNA濃度低於50 nM，只要測試線21T與控制線21C皆有呈色反應，該讀值裝置皆可讀出。換句話說，本發明之側流檢測套組對於BK病毒之檢測靈敏度之人眼可判讀的臨界值為50 nM，但機器可判讀之臨界值則低於50 nM。圖6即顯示由機器進行判讀之T/C訊號強度的統計長條圖。利用機器進行T/C訊號強度的判讀之後，可以進一步地發現，檢測試片2對於BK病毒的DNA濃度之線性偵測範圍係介於5 nM與500 nM之間。

【0041】側流檢測套組對於BK病毒之檢測專一性

【0042】圖7顯示4個檢測試片的實際影像圖，且圖8顯示T/C訊號強度的統計長條圖。由圖7和圖8的實驗數據可知，當待測溶液14分別含有的BK病毒、JC病毒和SV40病毒時，檢測試片2上的測試線21T與控制線21C只會在待測溶液14含有BK病毒的情況下表現出的呈色反

應。因此，實驗數據證實，本發明之側流檢測套組對於BK病毒檢測係具有專一性。

【0043】側流檢測套組於BK病毒之質體DNA

【0044】進行BK病毒之質體DNA的檢測時，係先購入BK病毒之質體，並接著利用6個檢測試片進行BK病毒之質體DNA的檢測。圖9顯示6個檢測試片的實際影像圖。由圖9的實驗數據可知，檢測試片2的T/C訊號強度與質體DNA的量成正相關。更進一步地說明，檢測試片2對含有BK病毒之質體DNA的線性偵測範圍係介於 10^7 copies/mL與 10^{10} copies/mL之間。因此，實驗數據證實，本發明之側流檢測套組於BK病毒的檢測係符合臨床意義之篩檢需求(尿液含有病毒DNA量 $>10^7$ copies/mL)。

【0045】簡單地說，本發明揭示一種核酸探針組1以及包括該核酸探針組1與一檢測試片2的一種側流檢測套組，且相關實驗證實本發明之側流檢測套組可以檢測一採集樣品是否含有BK病毒，例如尿液、血清、或BK病毒DNA。值得說明的是，由於BK病毒會累積在自然水源以及家用廢水，故其亦為聯合國水病原研究計畫所列出的全球水資源特定排泄病原指標的其中之一。可以推知，本發明之側流檢測套組也可以用於檢測環境水、汗水、或飲用水中是否含有過量的BK病毒。

【0046】同時，由前述說明亦可得知，在使用本發明之側流檢測套組對一採集樣品進行BK病毒篩檢時，不需要進行任何PCR處理及/或

RPA處理，也不需要將BK病毒的DNA轉譯成RNA。換句話說，本發明之側流檢測套組具有以下優點：製造成本低、使用過程不需借助專業儀器、不需進行PCR處理及/或RPA處理、不需進行DNA轉譯處理、以及不限定由專業人員進行檢測操作。

【0047】必須加以強調的是，上述之詳細說明係針對本發明可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

【符號說明】

【0048】 <本發明>

1:核酸探針組

11:捕捉探針

111:第一引子

112:結合物

12:檢測探針

121:第二引子

122:標誌物

13:鏈霉親和素

14:待測溶液

2:檢測試片

20:底材

21:薄膜

21T:測試線

21C:控制線

23:吸收墊

【序列表】

<110> 國防醫學院

<120>核酸探針組、核酸側流檢測套組以及該核酸側流檢測套組之
用途

<160> 8

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 1

GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG

22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 2

TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT

23

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 3

TCACATAGACTCCGAAGAC

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 4

CCGACTTTAACGACGACCC

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 5

CGCATTGAGGAGTTTGTATA 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 6

CGACATTAACGACCACGAG 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 7

TCTTTTTTGATAACGGGGTC 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> PCR 引子

<400> 8

ATTAGTTTCTTGACGAGGAG

20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種核酸探針組，包括：

一捕捉探針，包括一第一引子以及連接該第一引子之一端鹼基 (Terminal base) 的一結合物，該結合物係高度親合一四聚體蛋白 (Protein having quaternary structure)；以及

一檢測探針，包括一第二引子以及連接該第二引子之一端鹼基的一標誌物；

其中，該第一引子與該第二引子皆包含取自於一BK病毒之一基因組序列的一保守區域 (conserved region) 的一段核苷酸序列；

其中，該核苷酸序列為下列任一者：

5'-GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG-3' (SEQ ID NO:1)；或

5'-TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT-3' (SEQ ID NO:2)。

【請求項2】如請求項1所述之核酸探針組，其中，該結合物為一生物素，且該標誌物為選自於由奈米金、奈米銀、奈米碳、量子點、膠體金、膠體銀、和膠體量子點所組成群組之中的任一種螢光標誌材料。

【請求項3】如請求項1所述之核酸探針組，其中，該第一引子之所述端鹼基和該第二引子之所述端鹼基皆可為下列任一者：頭端鹼基或尾端鹼基。

【請求項4】如請求項1所述之核酸探針組，其中，該捕捉探針更包括連接於該第一引子之所述端鹼基與該結合物之間的一間隔物，且該間隔物包含10個腺嘌呤(adenine)。

【請求項5】如請求項1所述之核酸探針組，其中，該檢測探針更包括連接於該第二引子之所述端鹼基的一間隔物以及與該間隔物連接的一硫醇基(Thiol group)，使該標誌物連接所述硫醇基(Thiol group)從而結合至該第二引子。

【請求項6】如請求項1所述之核酸探針組，其中，該標誌物為奈米金，且所述奈米金之粒徑係介於25nm與65nm之間。

【請求項7】一種側流檢測套組，包括：

一核酸探針組，其包括：

一捕捉探針，包括一第一引子以及連接該第一引子之一端鹼基的一結合物，該結合物係高度親合一四聚體蛋白(Protein having quaternary structure)；及

一檢測探針，包括一第二引子以及連接該第二引子之一端鹼基的一標誌物；其中，該第一引子與該第二引子皆包含取自於一BK病毒的一基因組序列的一保守區域(conserved region)的一段核苷酸序列，且該核苷酸序列為下列任一者：
5'-GAAAGGAAGGTAAGTTGTTAAG-3'(SEQ ID NO:1)；

或 5'-TATGTATGAATAGAGTCTTAGGT-3' (SEQ ID NO:2)；

一檢測試片，包括具有一測試線與一控制線的一薄膜，其中，該測試線與該控制線係分別由一第一捕捉抗體和一第二捕捉抗體噴漬在該薄膜之上所形成；以及

一溶液，包括一緩衝液以及分散或溶於該緩衝液之中的一四聚體蛋白；

其中，使用所述側流檢測套組對一採集樣品進行BK病毒分析檢測時，係需先將該採集樣品進行加熱，接著令該採集樣品依序地與該捕捉探針和該檢測探針進行反應以獲得一待測樣品，接著令該待測樣品與所述溶液進行反應以獲得一待測溶液，最終將該檢測試片置入該待測溶液之中，從而在該控制線與該測試線皆產生呈色反應的情況下，利用控制線與測試線比色法獲取一T/C值。

【請求項8】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該採集樣品為下列任一者：環境水、汗水、飲用水、尿液、血清、或BK病毒的DNA。

【請求項9】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該第一捕捉抗體為抗-鏈霉親和素抗體(Anti-streptavidin antibody)，且該第二捕捉抗體為抗-BSA抗體(Anti-BSA antibody)。

【請求項10】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該緩衝液為磷酸鹽溶液。

【請求項11】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該檢測試片更包括：

一底材，用以供該薄膜設置於其上；以及

一吸收墊(absorption pad)，係設置於該底材之上，並連接於該薄膜之一端側。

【請求項12】如請求項11所述之側流檢測套組，其中，該薄膜由選自於由硝化纖維(Nitrocellulos, NC)、聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)和尼龍(Nylon)所組成群組之中的一種材料所製成。

【請求項13】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該結合物為一生物素，且該標誌物為選自於由奈米金、奈米銀、奈米碳、量子點、膠體金、膠體銀、和膠體量子點所組成群組之中的任一種螢光標誌材料。

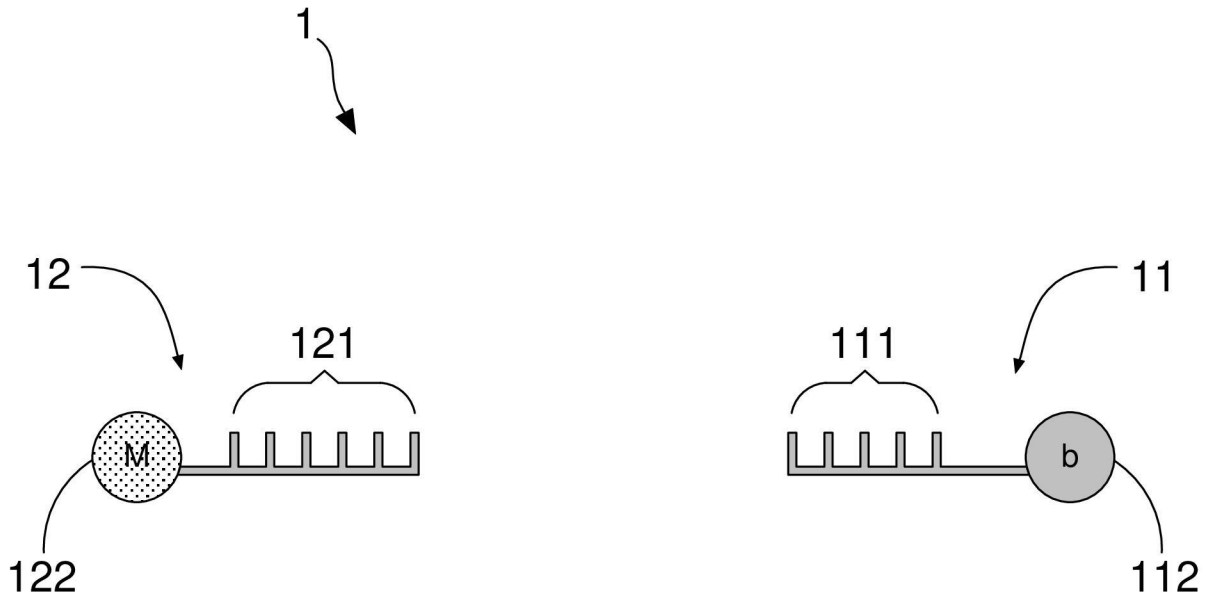
【請求項14】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該第一引子之所述端鹼基和該第二引子之所述端鹼基皆可為下列任一者：頭端鹼基或尾端鹼基。

【請求項15】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該捕捉探針更包括連接於該第一引子之所述端鹼基與該結合物之間的一間隔物，且該間隔物包含10個腺嘌呤(adenine)。

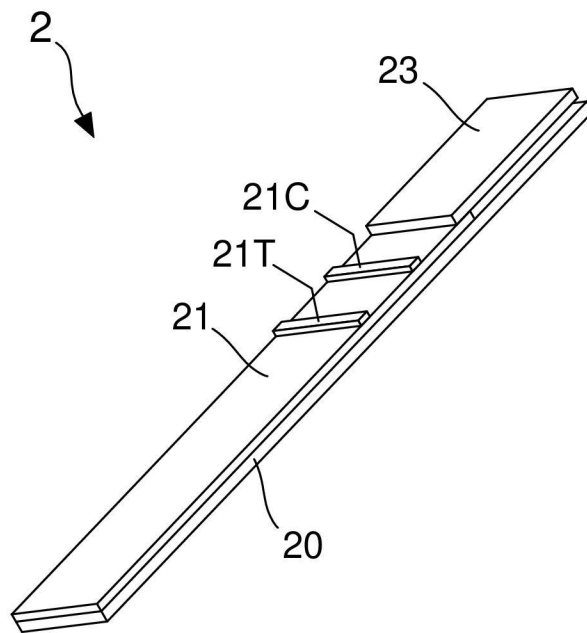
【請求項16】如請求項7所述之側流檢測套組，其中，該檢測探針更包括連接於該第二引子之所述端鹼基一間隔物以及與該間隔物連接的一硫醇基(Thiol group)，使該標誌物連接所述硫醇基(Thiol group)從而結合至該第二引子。

【請求項17】一種如請求項7至請求項16中任一項所述之側流檢測套組的用途，其係用於對一採集樣品進行BK病毒檢測，且該採集樣品為下列任一者：環境水、汗水、飲用水、尿液、或血清。

【發明圖式】



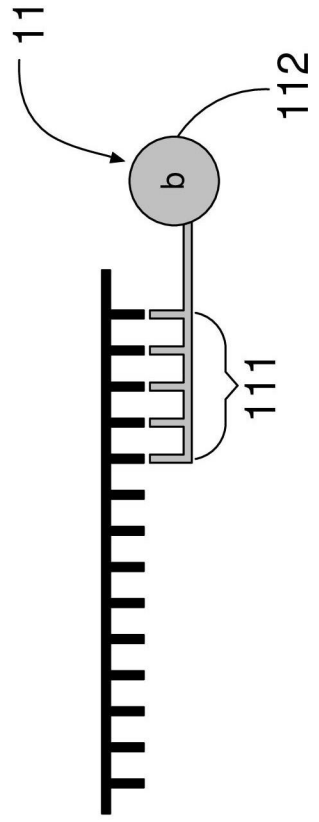
【圖1】



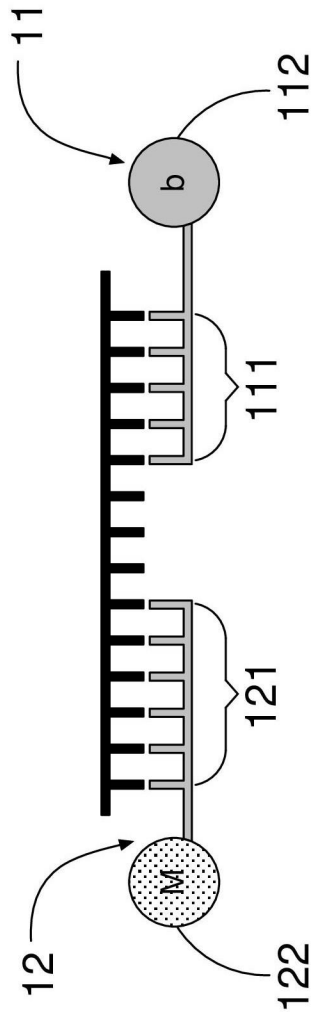
【圖2】



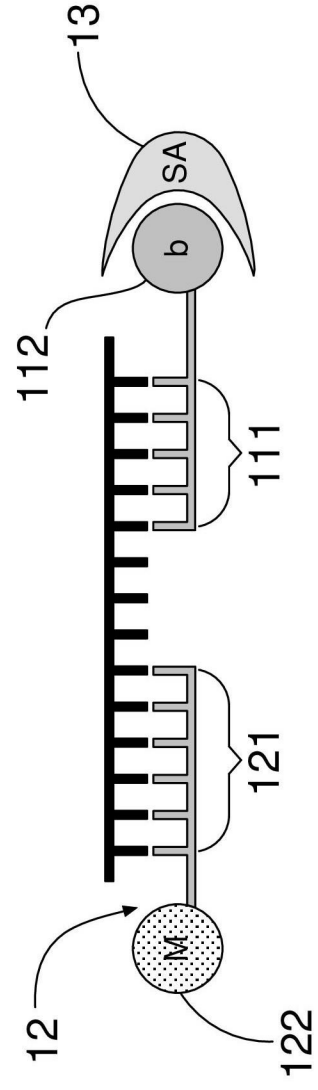
【圖3A】



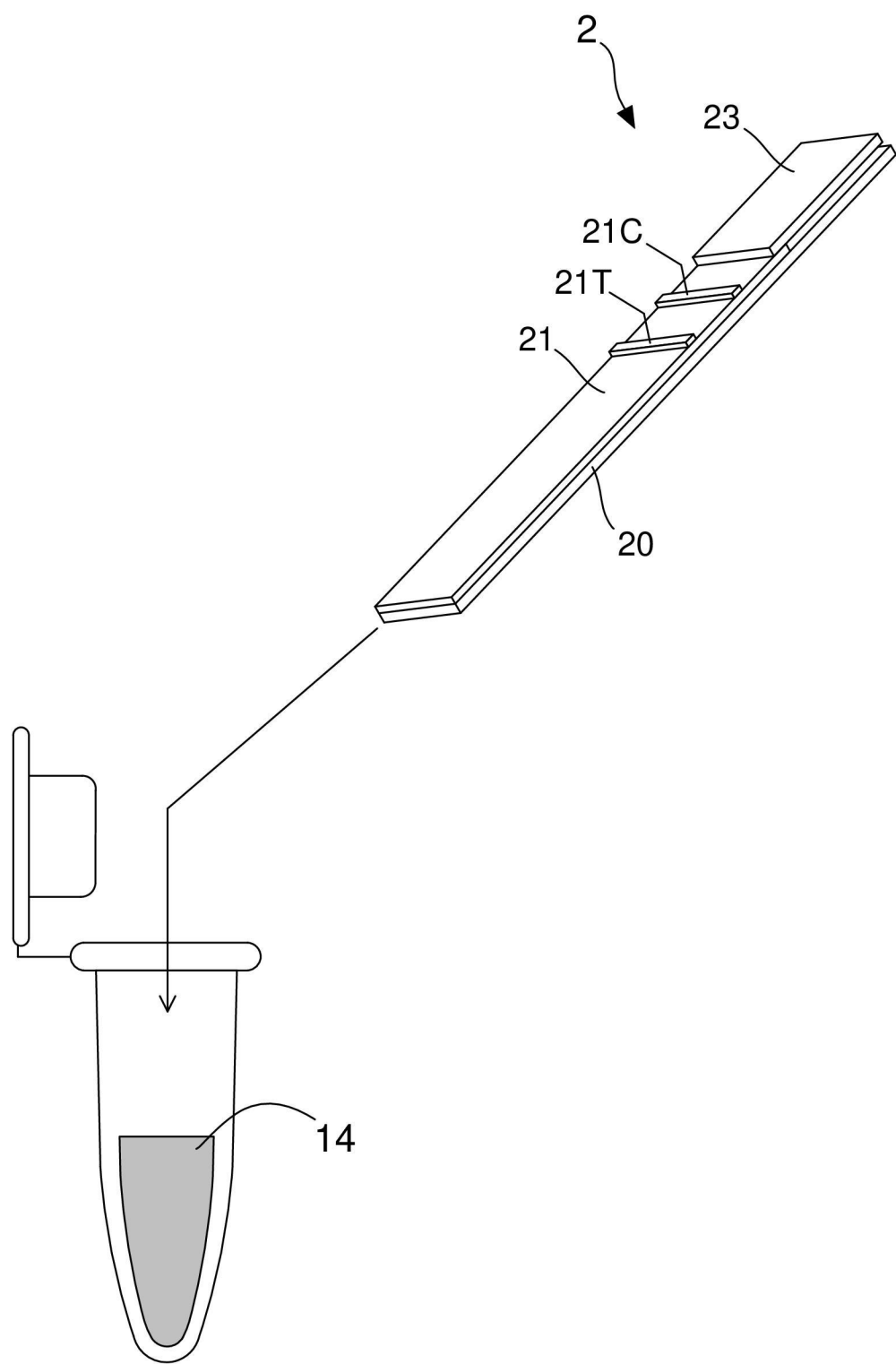
【圖3B】



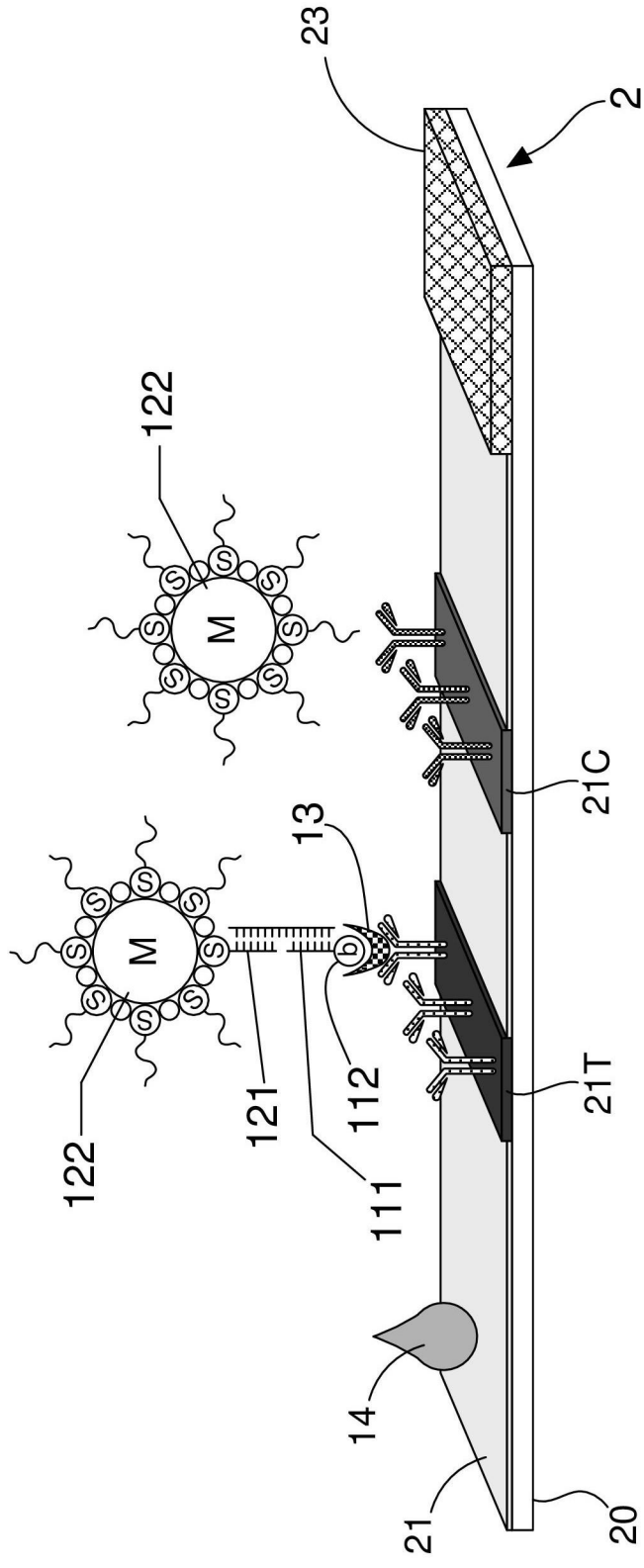
【圖3C】



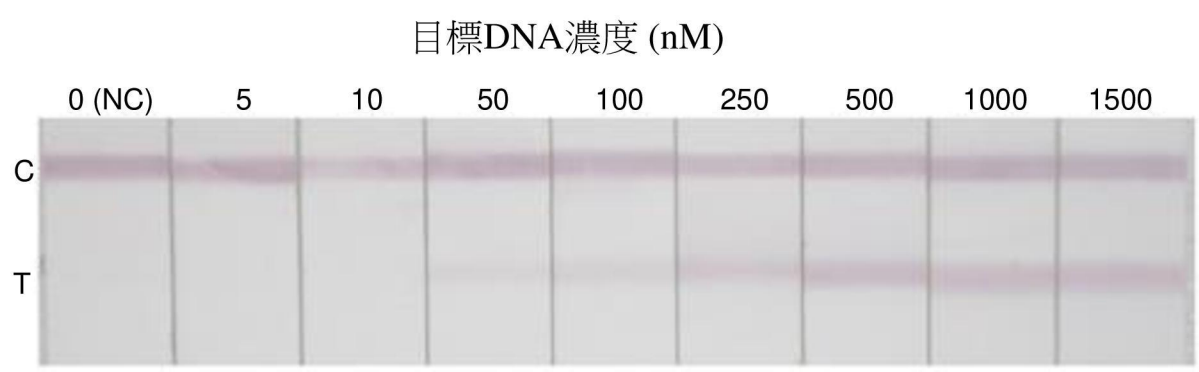
【圖3D】



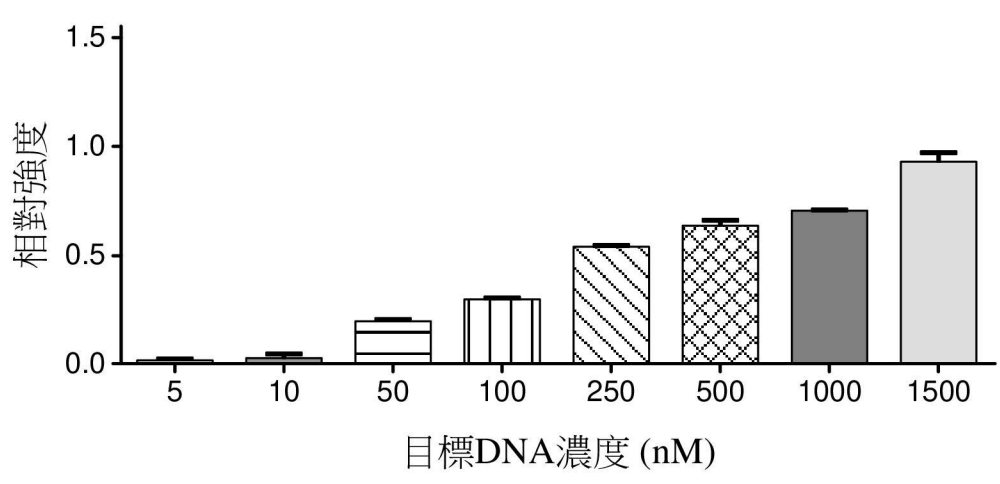
【圖3E】



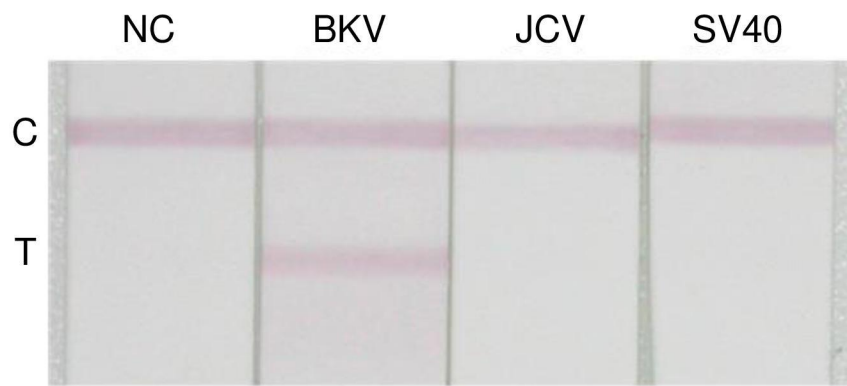
【圖4】



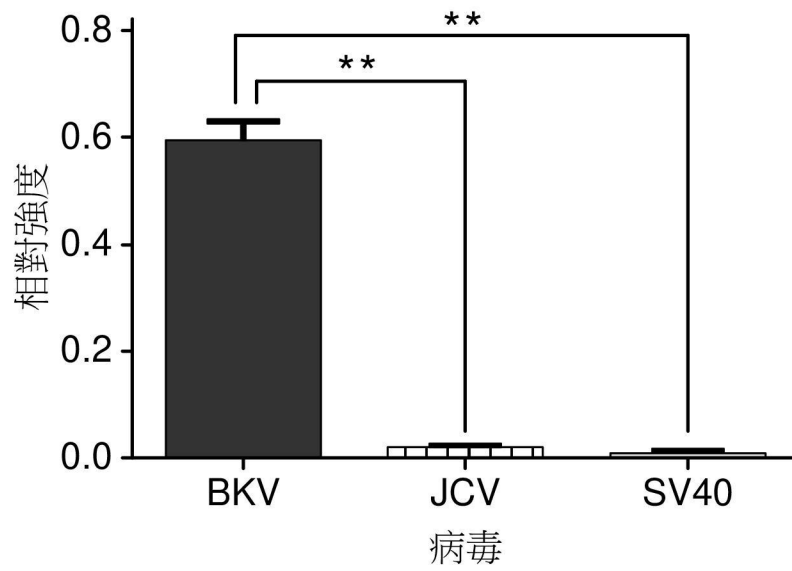
【圖5】



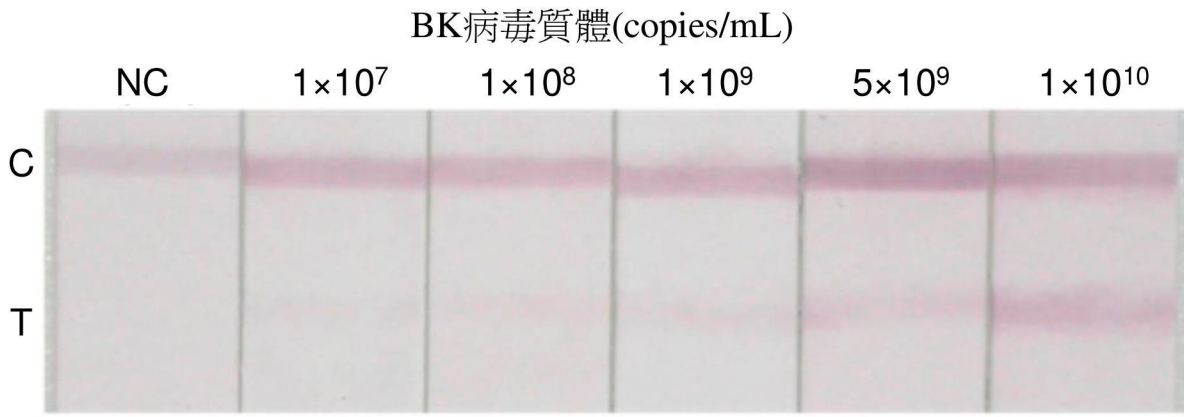
【圖6】



【圖7】



【圖8】



【圖9】