



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101824409 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201010121335. 0

(22) 申请日 2004. 04. 26

(30) 优先权数据

60/465, 458 2003. 04. 25 US

(62) 分案原申请数据

200480014977. 3 2004. 04. 26

(73) 专利权人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·M·沃尔夫 C·A·马丁奈蒂斯

D·A·尤尔西斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

C12Q 1/70(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6060252 A, 2000. 05. 09, 全文.

WO 93/00447 A1, 1993. 01. 07, 全文.

D. WOLFE等. Detection of Herpes Simplex

Virus Type 1 by Strand Displacement

Amplification on the BD ProbeTec™

ET System. <the Clinical Virology Symposium>. 2003, 第 1-4 页.

ELHAM REKABDAR 等. Variability of the Glycoprotein G Gene in Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. 《CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY》. 1999, 第 6 卷 (第 6 期), 826 - 831.

McGeoch, D. J. 等. HSV-2 genomic HindIII 1 region of short unique component U(s) with genes US2 to US8. <GenBank: X04798. 1>. 1997, 全文.

STEPHANIE R. PEVENSTEIN 等. Quantitation of Latent Varicella-Zoster Virus and Herpes Simplex Virus Genomes in Human Trigeminal Ganglia. <JOURNAL OF VIROLOGY>. 1999, 第 73 卷 (第 12 期), 10514 - 10518.

方险峰等. 聚合酶链反应检测单纯疱疹病毒糖蛋白 G 基因片段. 《中华皮肤科杂志》. 1999, 第 32 卷 (第 6 期), 398.

李福民等. 单纯疱疹病毒 II 型 PCR 检测引物设计及其价值探讨. 《中国麻风皮肤病杂志》. 2002, 第 18 卷 (第 3 期), 241 - 242.

审查员 张颖

权利要求书2页 说明书25页

序列表21页 附图6页

(54) 发明名称

通过核酸扩增检测 1 型和 2 型单纯疱疹病毒

(57) 摘要

本发明涉及基于扩增一部分单纯疱疹病毒 (HSV) 的糖蛋白 G (US4) 基因检测样品中存在或不存在 HSV 和使用如本文所述的引物和检测引物检测扩增的核酸的方法。本发明的方法进一步鉴定了样品中的 HSV 类型, HSV-1 或者 HSV-2。本发明还包括试剂盒, 该试剂盒包括可以用于本文所述扩增方法的引物和检测引物。

AAAAAGACC CGACCCGCGT CTGTGGTGT TTTGGCATCA TGTCGCCGGG 50
CGCCATGCGT GCCGTGTGTC CCATTATCCC ATTCCPTTTFG GTTCTTGTGCG 100
GTGTATCGGG GGTCCACC ACCGTCTCCT CCACCACCCA ACCCCAACCTC 150
CAGACCACCG GTCGTCCCTC GCATGAAGCC CCCAACATGA CCCGACCCGG 200
CACCACCGAC TCTCCACC CGATCAGCCT TACCACGCC GACCACACAC 250
CCCCATGCC AAGTATCGGA CTGGAGGAGG AGGA---AGA GGAGGAGGGG 300
GCCCGGGGAG CCGAACATCT TGGGGGGGA GATGGGACCC GTGACAGAAG 350
ACCCAGTCC CCGGCCCCAG CCTCCCGT GGTCTAGGAC GTGACAGAAG 400
ACAAACCCAA CCGTCCCGTA GTCCATCCC CCGATCCCAA CAACTCCCCC 450
GCGCGCCCG AGACCACTCG CCCGAAGACA CCCCACACCA TTATCGGGCC 500
GCTGGCAACT CGCCCCAGA CCCGACTCAC CTCAAAGGGA CGACCCCTGG 550
TTCCGACGCC TCAACATACC CCGCTGTCT CGTTCCTCAC TGCCTCCCCC 600
GCCCTGGACA CCCTCTTCTG CTGACAGACC GTCATCCACA CCTTATCGTT 650
TTTGTGTATT GGTGCGATGG CGACACACCT GTGTGGCGGT TGCTCCAGAC 700
GCGGCGGAG CACACACCT AGCGTGCCTT ACCTGTGCTT GCCCTCCGAA 750
CGCGGGTAG

1. 引物组在制备用于扩增 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 靶序列的试剂中的用途, 其中所述的扩增是链置换扩增 (SDA) 反应, 其中所述引物组包括:

(a) 第一种扩增引物, 其中第一种扩增引物包括 SEQ ID NO :38 的 HSV-2 靶结合序列即 CTGTTCTGGTTCCTA,

(b) 第二种扩增引物, 其中第二种扩增引物包括 SEQ ID NO :43 的 HSV-2 靶结合序列即 CCGTGTGGATGGT,

(c) 第一种缓冲引物, 其中所述的第一种缓冲引物为 SEQ ID NO :46, 和

(d) 第二种缓冲引物, 其中所述的第二种缓冲引物为 SEQ ID NO :47。

2. 权利要求 1 的用途, 其中第一种扩增引物是 SEQ ID NO :38, 并且第二种扩增引物是 SEQ ID NO :43。

3. 权利要求 1 所述的用途, 其中所述的第一种扩增引物进一步包括选自由发夹、g- 四集体、限制酶识别序列和结合检测探针的序列组成的组的序列。

4. 权利要求 1 所述的用途, 其中所述的第一种扩增引物进一步包括可检测标记。

5. 权利要求 4 所述的用途, 其中所述的标记为荧光部分。

6. 权利要求 1 所述的用途, 其中所述的第一种扩增引物包括选自由限制酶识别位点和 RNA 聚合酶启动子组成的组的序列。

7. 权利要求 1 所述的用途, 所述试剂进一步包括扩增内部扩增对照 (IAC)。

8. 权利要求 7 所述的用途, 其中 IAC 选自 SEQ ID NOs :48-49 组成的组。

9. 权利要求 1 的用途, 其中所述试剂还包括连接引物, 所述连接引物包括 SEQ ID NO :45 的 HSV-2 靶结合序列即 TGCTCTAGATATCCTCTTTATCAT 的多核苷酸。

10. 权利要求 9 的用途, 其中所述多核苷酸还包括可检测标记。

11. 权利要求 1 的用途, 其中所述试剂还包括连接引物。

12. 权利要求 11 的用途, 其中所述连接引物选自 SEQ ID NO :44-45。

13. 用于通过链置换扩增 (SDA) 反应检测 HSV-2 靶序列的试剂盒, 包括第一种扩增引物、第二种扩增引物、第一种缓冲引物和第二种缓冲引物, 所述第一种扩增引物包括 SEQ ID NO :38 的 HSV-2 靶结合序列即 CTGTTCTGGTTCCTA, 所述第二种扩增引物包括 SEQ ID NO :43 的 HSV-2 靶结合序列即 CCGTGTGGATGGT, 所述的第一种缓冲引物为 SEQ ID NO :46, 并且所述的第二种缓冲引物为 SEQ ID NO :47。

14. 权利要求 13 所述的试剂盒, 进一步包括连接引物。

15. 权利要求 14 所述的试剂盒, 其中所述的连接引物选自由 SEQ ID NOs :44-45 组成的组。

16. 权利要求 13 所述的试剂盒, 进一步包括检测引物。

17. 权利要求 16 所述的试剂盒, 其中所述的检测引物选自由 SEQ ID NOs :30-35 组成的组。

18. 权利要求 13 所述的试剂盒, 进一步包括一种或多种选自由 SEQ ID NOs :48-49 组成的组的 IAC 靶序列和一种或多种选自由 SEQ ID NOs :50-51 组成的组的 IAC 连接引物。

19. 权利要求 13 所述的试剂盒, 还包含连接引物, 所述连接引物含有 HSV-2 靶结合序列的多核苷酸, 所述 HSV-2 靶结合序列是 SEQ ID NO :45 的 HSV-2 靶结合序列即 TGCTCTAGATATCCTCTTTATCAT。

20. 权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述多核苷酸还包含可检测标记。
21. 权利要求 13 的试剂盒,其中第一种扩增引物是 SEQ ID NO :38,并且第二种扩增引物是 SEQ ID NO :43。
22. 包含用于通过链置换扩增 (SDA) 反应检测样品中 HSV-2 靶序列的引物的组合物,包括:
- (a) 能够与 HSV-2 靶序列杂交的第一种扩增引物,其中所述的第一种扩增引物包含 SEQ ID NO :38 的 HSV-2 靶结合区域即 CTGTTCTGGTTCCTA ;
- (b) 能够与 HSV-2 靶序列的互补序列杂交的第二种扩增引物序列,其中所述的第二种扩增引物包含 SEQ ID NO :39-43 任一项中含有的 HSV-2 靶结合序列 ;
- (c) 在第一种扩增引物的上游能够与 HSV-2 靶序列杂交的第一种缓冲引物序列,其中所述的第一种缓冲引物为 SEQ ID NO :46 ;和
- (d) 在第二种扩增引物的上游能够与 HSV-2 靶序列的互补序列杂交的第二种缓冲引物序列,其中所述的第二种缓冲引物为 SEQ ID NO :47。
23. 权利要求 22 的组合物,还包括连接引物,所述连接引物为序列如 SEQ ID NO :45 所示的多核苷酸,其中的 HSV-2 靶结合序列为 TGCTCTAGATATCCTCTTTATCAT。
24. 权利要求 23 的组合物,其中多核苷酸还包括可检测标记。
25. 权利要求 22 的组合物,其中第一种扩增引物是 SEQ ID NO :38,其中 HSV-2 靶结合序列为 CTGTTCTGGTTCCTA。
26. 权利要求 25 所述的组合物,其中第二种扩增引物是 SEQ ID NO :43,其中 HSV-2 靶结合序列为 CCGTGTGGATGGT。
27. 权利要求 22 所述的组合物,进一步包括 :
- (g) 能够通过位于连接引物 3' 末端上的靶结合序列与靶序列杂交的连接引物序列,其中所述的连接引物包括 5' 通用尾且该连接引物选自由 SEQ ID NOs :44-45 组成的组 ;和
- (h) 能够通过检测引物的 3' 部分与连接引物 5' 尾的互补序列杂交的检测引物序列,其中所述的检测引物序列包括 5' 限制酶识别位点和可检测标记,所述的可检测标记选自由荧光部分、放射性同位素、化学发光剂、能够显现可见反应产物的酶底物和配体 - 可检测标记的配体结合配偶体组成的组。
28. 权利要求 27 所述的组合物,其中所述的检测引物序列包括选自由发夹和 g-四集体组成的组的结构部分。
29. 权利要求 27 所述的组合物,其中所述的可检测标记为荧光部分。
30. 权利要求 29 所述的组合物,其中所述的荧光部分包括供体和猝灭剂染料对,所述的供体和猝灭剂染料对选自由下列物质组成的组 :荧光素 (FAM) / 罗丹明 (ROX) ;FAM/P-(二甲基氨基苯基偶氮) 苯甲酸 (DABCYL) ;ROX/DABCYL ;异硫氰酸荧光素 (FITC) / 异硫氰酸四甲基罗丹明酯 (TRITC) ;FITC/Texas Red™;FITC/N- 羟基琥珀酰亚氨基 1- 苣丁酸酯 (PYB) ;FITC/ 伊红异硫氰酸酯 (EITC) ;N- 羟基琥珀酰亚氨基 1- 戊磺酸酯 (PYS) /FITC ; FITC/ 罗丹明 X ;和 FITC/ 四甲基罗丹明 (TAMRA)。
31. 权利要求 30 所述的组合物,其中所述的检测引物选自由 SEQ ID NOs :30-35 组成的组。

通过核酸扩增检测 1 型和 2 型单纯疱疹病毒

[0001] 本申请是基于申请号为 200480014977.3, 申请日为 2004 年 04 月 26 日, 发明名称同上的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及通过核酸扩增法鉴定单纯疱疹病毒 (HSV) 的诊断方法和核酸序列。

背景技术

[0003] 单纯疱疹是有包膜的双链 DNA 病毒, 它导致人原发性和复发性感染且与导致传染性单核细胞增多 (EB 病毒)、水痘和带状疱疹 (水痘 - 带状疱疹病毒) 的病毒有关。单纯疱疹病毒 (HSV) 感染的症状包括皮肤或粘膜上长出小水疱。在长出的水疱消退后, 病毒在对感染区提供神经纤维的神经细胞群 (神经节) 内保持静止 (潜伏) 状态。病毒定期再活化, 开始再生长并通过神经纤维传递回皮肤, 由此使与早期感染相同的皮肤区上长出水疱。有时病毒甚至可以在没有明显水疱出现时存在于皮肤或粘膜上。将单纯疱疹病毒 (HSV) 分类成两种类型: HSV-1 和 HSV-2。已经对人 HSV-1 和 HSV-2 的完整基因组进行了测序 (例如, 分别参见 NCBI 登记号 X14112 和 Z86099)。

[0004] 已经证实 HSV 造成或导致各种疾病, 包括失明和脑炎。除导致局部发作外, HSV-1 和 HSV-2 还与脑炎相关。这种脑炎的病理生理学在人中难以理解。动物模型提示该病毒通过外周神经进入中枢神经系统并使大脑产生炎症。HSV-1 是成年人脑炎的更为常见的原因。HSV-2 是新生儿脑炎的更为常见的原因, 它与母体生殖器感染有关。HSV-2 是社会中最常见的性传播疾病之一。与 HSV 相关的脑炎在所有类型的脑炎中具有最高致死率, 为 100 万分之 1-4 的年发病率。HSV 脑炎影响所有年龄的人且可以在全年的任意时间出现。在成年人中, 认为与 HSV 相关的脑炎因潜伏病毒再活化所致。症状可以包括发热、头痛、癫痫发作、意识水平改变和人格改变。这些症状与其它疾病的相似性使得临床诊断变得困难。如果不进行治疗, 那么单纯性疱疹脑炎 (HSE) 的死亡率可以高达 70%, 与之相比, 接受治疗的人中的死亡率低至 19%。据报导, 在接受治疗的患者中, 约 38% 最终可以恢复正常功能。因此, 能够在早期诊断 HSV 感染是极为重要的。

[0005] 通常对合适的临床样本使用细胞培养物进行 HSV 感染的诊断。然而, 在有宿主免疫反应和再活化发作存在下, 分离细胞培养物中的 HSV 的能力在旧损害中降低。血清学诊断, 特别是在脑脊髓液 (CSP) 中 HSV 的诊断不够灵敏或具有特异性且需要花费很多时间做出决定, 包括选择早期的脑炎治疗干预手段。难以使用细胞培养物在脑脊髓液中检测到 HSV, 其中仅 4% 的病例培养物呈阳性。血清学方法也因在开始感染后出现 2-3 周抗体反应延迟而不足以诊断 HSE。包括脑活检在内的诊断的“金标准”法是侵害性的且因具有长期发病的显著风险而存在争议。可选技术, 诸如计算机辅助断层摄影术和磁共振影像学不具有特异性且缺乏作为诊断工具的灵敏性。

[0006] 目前, 用于检测 HSV 的免疫学方法并不可靠且难以进行。分子检测方法比可能使用常规方式提供了增强的灵敏性和快速产生结果的可能性。存在必须快速、灵敏和特异性

诊断 HSV 疾病的情况。因此,存在研发有助于诊断 HSV 的快速和灵敏工具的临床需求。还存在对对 HSV 感染分型的工具的需求。快速鉴定病毒感染中所涉及的特异性病原体提供了可以用于在短期内确定合适疗法的信息。

发明内容

[0007] 本发明涉及用于测定哺乳动物中存在单纯疱疹病毒 (HSV),特别是 1 型 (HSV-1) 或 2 型 (HSV-2) 单纯疱疹病毒的方法和组合。该方法包括使用扩增和检测单纯疱疹病毒靶序列的引物。一个实施方案使用链置换扩增 (SDA) 的扩增技术。

[0008] 本发明的核酸引物可以独特地扩增 HSV-1 或 HSV-2 中的靶序列,由此能够对 HSV 进行灵敏性检测和类型鉴定。本发明还涉及基于链置换扩增 (SDA) 的用于检测 HSV 的方法,该方法包括使用通用荧光能量传递探针进行实时检测。本发明的探针和引物提供了对 HSV 核酸的直接、快速和灵敏性检测且由此为免疫学测定提供了有吸引力的选择。

[0009] 本发明的探针和引物可以在样品培养后用作证实培养的生物体的特性的工具。另一方面,可以在培养前使用它们或将它们用于代替培养物使用公知的扩增方法检测和鉴定 HSV 核酸。本发明的探针、引物和组合物以及使用所述探针、引物和组合物的测定方法为在 HSV-1 和 HSV-2 的核酸靶序列之间快速识别提供了工具,从而使专业人员能够鉴定、诊断和治疗 HSV 类型,而不需要借助于一般所依赖的耗时的免疫学和生物化学方法。

附图说明

[0010] 本发明的各种目的、优点和新特征易于在结合附图阅读时从下列详细描述中得到理解,其中;

[0011] 图 1 表示 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 的糖蛋白 G(US4) 基因的共有序列 (SEQ ID NO :1)。

[0012] 图 2 是表示 HSV-1 靶区 (SEQ ID NO :2) 基因组序列的一部分和用于对 HSV-1 DNA 的特异性检测的引物、缓冲物和连接物的位置的图。

[0013] 图 3 是表示结果的 "MOTA" 表达的示意图。

[0014] 图 4 是表示用于 BD ProbeTecTMET 系统的 "PAT" 算法的示意图。

[0015] 图 5 描绘了 SDA 法对各种 HSV-1 株稀释液的分析灵敏度。

[0016] 图 6 是 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 的糖蛋白 G(US4) 基因片段的共有序列 (SEQ ID NO :3)。

[0017] 图 7 是表示 HSV-2 靶区 (SEQ ID NO :4) 的基因组序列和用于对 HSV-2 DNA 的特异性检测的引物、缓冲物和连接物的位置的图。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明提供了分离和纯化的核酸、多核苷酸、扩增引物和核酸扩增反应中表现出单纯疱疹病毒 (HSV) 类型特异性的测定探针。本发明还提供了使用本发明的探针和引物检测和鉴定 HSV 核酸的方法。

[0020] 本发明的一个实施方案涉及检测靶核酸序列存在的扩增方法,其中使用含有靶结合序列的一种或多种扩增引物、产生扩增的靶序列和检测该靶序列。扩增方法的非限制性实例包括:聚合酶链反应 (PCR;参见 Saiki 等 1985 《科学》(Science) 230 :1350-1354,引

入本文作为参考);连接酶链反应(LCR;参见Wu等1989《基因组》(Genomics)4:560-569;Barringer等1990《基因》(Gene)89:117-122;Barany,1991《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)88:189-193,将所有这些文献引入本文作为参考);原位杂交;转录介导的扩增(TMA;参见Kwoh等1989《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)86:1173-1177,引入本文作为参考);自动维持序列扩增(3SR;参见Guatelli等1990《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)87:1874-1878,引入本文作为参考);滚环扩增(RCA);基于核酸序列的扩增(NASBA);Q β 复制酶系统(Lizardi等1988《生物技术》(BioTechnology)6:1197-1202,引入本文作为参考)和链置换扩增(SDA;参见Walker等1992《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)89:392-396;Walker等1992《核酸研究》(Nuc. Acids. Res.)20:1691-1696;和EP 0 497 272,将所有这些文献引入本文作为参考)),包括耐热SDA(tSDA)。

[0021] 本发明的另一个实施方案涉及通过使HSV靶序列以指数式扩增检测样品中存在的HSV核酸序列的等温链置换扩增(SDA)法。在另一个实施方案中,如美国专利US5,648,211中所述在约52℃下,使用如US5,919,630、US5,928,869、US5,958,700和US6,261,785所述为在扩增过程中检测靶物而选择的检测引物进行SDA,将所有这些文献的内容引入本文作为参考。作为用于SDA的典型,将试剂、引物、诸如限制酶和聚合酶这类酶和其它成分加入到反应微孔、容器或贮器中。SDA扩增来自样品的特异性DNA序列,其中一旦所有成分彼此混合,则反应持续至关键成分耗尽。与聚合酶链反应(PCR)相反,SDA是一种等温反应过程,使得一旦反应开始,则在反应过程中没有外部控制。

[0022] 本发明的SDA法需要至少两种HSV扩增引物和两种缓冲引物以启动扩增法。将所述的扩增引物设计成对HSV-1或HSV-2具有高度特异性。SDA法包括在混合物中同时进行的扩增反应且不需要用于循环变温的作为PCR扩增法中必不可少的单独的期或循环。本发明SDA的另一个优点在于指数式扩增。DNA聚合酶延伸、产生切口、置换和切口位点再生的步骤产生了取代的单链分子,这些分子在末端上带有循环且被扩增引物俘获的部分限制酶位点(例如BsoBI位点),由此使HSV靶序列以指数方式扩增。SDA法还提供了改善的工作流程,尤其用于高通量法。可以将SDA引入基于微阵列的应用,其中可以将小量体积(纳升)的样品和试剂用于扩增HSV靶DNA并通过在单一平台上进行多次SDA测定检测微嵌片阵列上的扩增产物。用于检测样品中的HSV的SDA法的主要优点在于最低的劳动需求量和高通量的可能性,因为等温扩增法在所述平台设计和维护方面提供了显著少的技术挑战。

[0023] 本文所用的术语“靶物”或“靶序列”指的是有待扩增和检测的HSV核酸序列、HSV-1或HSV-2。它们包括有待扩增的原始HSV核酸序列、有待扩增的原始HSV核酸序列的互补第二条链和通过扩增反应产生的原始HSV序列的拷贝链。这些拷贝用作可扩增靶物,因为它们含有扩增引物退火至的序列拷贝。扩增反应过程中产生的靶序列拷贝被称作扩增产物、扩增引物或扩增子。HSV-1和HSV-2靶序列位于HSV-1和HSV-2基因组序列的糖蛋白G(US4)基因内。HSV-1靶序列位于附图1的共有序列的555位-680位碱基之间。HSV-2靶序列位于附图6的共有序列的867位-990位碱基之间。糖蛋白G(US4)基因分别位于附图2和7的HSV-1基因组序列的136744-137460位之间和HSV-2基因组序列的137878-139977位之间。

[0024] 本文所用的“扩增引物”是退火至靶序列且可以通过扩增延伸的引物。结合靶序列的扩增引物区为靶结合序列。扩增技术包括,但不限于:链置换扩增(SDA),包括耐热 SDA(tSDA);聚合酶链反应(PCR);连接酶链反应(LCR);原位杂交;自动维持序列扩增(3SR);滚环扩增(RCA);基于核酸序列的扩增(NASBA);和转录介导的扩增(TMA)。

[0025] 在一个实施方案中,扩增引物可以用于链置换扩增(SDA)法。扩增引物包括3'末端上结合 HSV 靶序列的靶结合序列部分和5'末端上不结合或退火至靶序列的部分。不结合靶序列的 SDA 扩增引物的部分还如美国专利 US 5,455,166 和 US 5,270,184 中所述包括尾和靶结合序列上游的限制酶的识别位点,将所述文献引入本文作为参考。当该识别位点如 Walker 等(1992《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)89:392-396 和 1992《核酸研究》(Nucl. Acids Res.)20:1691-1696)中所述被半修饰时,这一识别位点对使 DNA 双链体的一条链产生切口的限制酶具有特异性。所述的尾是限制酶识别位点序列的上游且在扩增引物剩余部分在 SDA 过程中产生切口并被取代时起聚合酶再引发位点的作用。尾的再引发功能维持 SDA 反应并从单一靶分子合成多扩增子。尾的长度和序列一般并不关键且可以常规地选择和修饰。

[0026] 本发明的一个实施方案基于给扩增引物赋予靶特异性的靶结合序列,其中应理解本发明中举例说明的靶结合序列还可以在其它方式中用于检测 HSV。例如,本文公开的靶结合序列可选地在不进行预先扩增或在扩增后测定中用作直接检测 HSV 的杂交探针。这类杂交方法是本领域中众所周知的且一般使用与靶结合序列结合或连接的可检测标记以便有利于检测杂交。此外,表 1 和 2 中列出了含有通过大写和加下划线表示的靶结合序列的引物序列(分别为 SEQ ID NOs:5-25 和 36-47)。这些靶结合序列可以用作不需要其它特异性序列的扩增反应(诸如 PCR)中的引物或附加到用于 NASBA、原位杂交、TMA、3SR、需要与引物的靶结合序列连接的 RNA 聚合酶启动子的其它基于转录的扩增引物合适的特异性序列上;或这些靶结合序列可以用作任意其它引物延伸扩增反应中的引物。这些在引物中需要特异性非靶结合序列的扩增方法对进行扩增反应而言是必不可少的且一般用于给靶物附加特异性序列。例如,限制酶识别位点对 SDA 中发生指数式扩增而言是必不可少的(参见美国专利 US5,455,166 和 US5,270,184)。相反,用于自主序列复制(3SR)和基于核酸序列的扩增(NASBA)的扩增引物包括接近5'末端的 RNA 聚合酶启动子(如 Guatelli 等,1990,《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)87:1874-1878 中所述的 3SR 测定)。该启动子附加在靶结合序列上且通过指导模板的多 RNA 拷贝的转录用于驱动扩增反应。用于选择的扩增反应的这类特异性序列与靶结合序列的连接是常规的且对本领域技术人员而言众所周知。

[0027] 相反,诸如 PCR 这类在靶物末端上不需要特异性序列的扩增法一般使用仅由靶结合序列组成的扩增引物。为了在这些其它扩增方法中的检测目的,可以如本领域技术人员所理解的以检测方式标记引物。

[0028] 因为核酸不需要完全的互补性以便退火,所以本领域技术人员理解可以在某种程度上修饰本文公开的探针和引物序列,而不会丧失作为 HSV-1- 和 HSV-2- 特异性引物和探针的用途。术语“同源性”指的是互补性程度。可以存在部分同源性或完全同源性,其中完全同源性等同于同一性。至少部分抑制相同序列与靶核酸杂交的部分互补序列被称作“基本上同源的”。可以使用杂交试验(例如 DNA 印迹或 RNA 印迹、溶液杂交等)在低严格条件

下检验对完全互补序列与靶序列杂交的抑制。基本上同源的序列或探针竞争和抑制完全同源序列或探针在低严格条件下与靶序列结合（即，杂交）。尽管如此，低严格条件还是不允许非特异性结合；低严格条件要求两种序列彼此的结合为特异性（即，选择性）相互作用。

[0029] 正如本领域技术人员理解的，可以改变退火的严格性以便鉴定或检测相同或相关的多核苷酸序列。正如本领域技术人员进一步意识到的，可以根据本领域中公知的公式估计解链温度 T_m ，这取决于许多参数，诸如核苷酸编号中的引物或探针长度或退火缓冲液组分和条件（例如，参见 T. Maniatis 等《分子克隆：实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982 和 J. Sambrook 等《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989；《最新分子生物学方案》(Current Protocols in Molecular Biology), Eds. F. M. Ausubel 等 第 1 卷, “DNA 的制备与分析” (“Preparation and Analysis of DNA”), John Wiley and Sons, Inc., 1994-1995, 增刊 26, 29, 35 和 42；2. 10. 7-2. 10. 16 页；G. M. Wahl 和 S. L. Berger (1987；《酶学方法》(Methods Enzymol.) 152 :399-407)；和 A. R. Kimmel, 1987；《酶学方法》(Methods of Enzymol.) 152 :507-511)。作为一般性指导，序列同源性每减少 1%，则 T_m 降低大约 $1^\circ\text{C} - 1.5^\circ\text{C}$ 。温度范围可以在约 $50^\circ\text{C} - 62^\circ\text{C}$ 之间改变，但可以将扩增引物设计为在 52°C 下最佳。然而，低于 50°C 的温度可以导致引物缺乏特异性，而温度高于 62°C 则可能无法产生杂交。在设计扩增引物时，进一步考虑的是鸟嘌呤和胞嘧啶含量。一般来说，引物的 GC 含量可以约为 60-70%，还可以低于该范围且可以由本领域技术人员适当调整。靶结合序列的杂交区可以具有约 $42^\circ\text{C} - 48^\circ\text{C}$ 的 T_m 。可以通过改变退火条件以提高或降低严格性（即，调整退火温度或缓冲液的盐含量）获得退火互补和部分互补的核酸序列。对公开序列的这类次要的修饰和维持 HSV-1 和 HSV-2 特异性的退火条件的任何必要调整仅需要进行常规实验且属于本领域普通技能的范围。

[0030] 表 1 和 2 中分别将设计用于检测 HSV-1 和 HSV-2 靶序列的扩增引物标示为 SEQ ID NOs :7-18 和 38-43。设计这些扩增引物，使得靶结合序列退火至高度同源共有糖蛋白 G(US4) 基因区的片段（参见图 1-2 和 6-7）。给退火至 HSV 靶 DNA 序列或与之互补的扩增引物内的 HSV 靶结合序列区加下划线并以大写字母表示（参见表 1 和 2）。SDA 检测引物序列的剩余 5' 部分包括进行 SDA 反应所需的 BsoBI 限制酶识别位点 (RERS)（如以小写字母斜体字表示）以及一般非靶特异性 5' 尾端序列。

[0031] SEQ ID NOs :7-8 和 38 的 HSV-1 和 HSV-2 扩增引物分别为左手（“第一种”）S1 扩增引物且 SEQ ID NOs :9-18 和 39-43 分别为右手（“第二种”）S2 扩增引物。为了扩增目的，可以单独（即，一个 HSV-1 左扩增引物和一个 HSV-1 右扩增引物）或以组合方式（即，一个 HSV-1 SDA 左引物和两个 HSV-1 SDA 右引物）使用 HSV 特异性类型的扩增引物对，使得在反应中至少存在一个左手与右手引物对。可以将多个扩增引物用于扩增靶序列的几个区。可以适当调整引物的浓度，使得当将 HSV-1 第一种扩增引物以 500nM 的浓度用作唯一的 HSV-1 第一种扩增引物时，可以以结合方式使用两个 HSV-1 右扩增引物，它们各自具有的浓度为 250nM。

[0032] 术语“延伸产物”一般指的是通过使用酶，诸如聚合酶使引物或靶序列延伸产生的序列。在一个实施方案中，通过聚合酶，使用 HSV 靶序列作为模板使扩增引物杂交并使扩增

引物延伸产生扩增引物延伸产物。

[0033] “缓冲引物”或“外部引物”是退火至扩增引物上游的靶序列的引物,使得缓冲引物的延伸取代了下游扩增引物及其延伸产物。本文所用的术语“缓冲引物”指的是包括 HSV 靶结合序列的多核苷酸。表 1 和 2 中分别将有用的缓冲引物标示为 SEQ ID NOs :23-25 和 46-47。左或第一种 HSV-1 和 HSV-2 缓冲引物分别为 SEQ ID NOs :23 和 46,而右或第二种 HSV-1 和 HSV-2 缓冲引物分别为 SEQ ID NOs :24-25 和 47。缓冲引物来源于位于扩增引物侧翼的序列的保守区,所述的扩增引物位于充分接近该扩增引物靶结合位点的扩增引物上游位置,以便在缓冲引物延伸后取代扩增引物延伸产物。例如,SEQ ID NO :23 (HSV1GGLB 1.0) 的 HSV-1 第一种缓冲引物的 5' 末端位于 HSV-1 基因组序列的 137, 256 位碱基上 (图 2)。SEQ ID NO :25 (HSV1GGRB1.1) 的 HSV-1 第二种缓冲引物的 5' 末端位于 HSV-1 基因组序列的 137, 382 位碱基上 (图 2)。在 SDA 的初始循环过程中,缓冲引物与 HSV 靶序列杂交并通过聚合酶延伸取代下游扩增引物延伸产物,从而产生单链 DNA,它可以进行进一步的复制和 / 或指数式扩增循环。

[0034] 术语“测定探针”指的是用于有利于检测或鉴定核酸的任意核酸。例如,在本发明的一个实施方案中,测定探针用于检测或鉴定 HSV 核酸。如下所述的检测探针、检测引物、俘获探针和引物为测定探针的实例。

[0035] 特别地,标记 (labeled) 或标记 (tagged) 用于检测和鉴定特异性 HSV- 类型的“检测探针”。检测探针的可检测标记为可以直接或间接检测的部分,表明存在靶核酸序列。为了直接检测,可以用放射性同位素标记测定或检测探针并通过放射自显影术检测或用荧光部分标记且通过如本领域中公知的荧光检测。另一方面,可以通过用能够进行检测的其它试剂标记间接检测测定探针。间接可检测标记包括:例如化学发光剂;产生可见或显色反应产物的酶;和配体 - 可检测标记的配体结合配偶体,其中可以通过与标记的配体特异性结合配偶体结合来检测配体 (例如半抗原、抗体或抗原)。

[0036] 为了检测扩增产物,可以如本领域公知的方式标记包括本文公开的靶结合序列的扩增引物,或可以将包括公开的靶结合序列的标记的检测引物与如美国专利 US 5, 547, 861、US 5, 928, 869、US 5, 593, 867、US 5, 550, 025、US 5, 935, 791、US 5, 888, 739、US 5, 846, 726 中所述的扩增引物联合使用,以便对扩增进行实时均匀检测。这类检测引物可以包括直接或间接可检测序列,该序列开始不会与靶物杂交,而一旦与靶物杂交且得到延伸,则有利于检测引物的检测。例如,这类可检测序列可以为含有限制位点的序列或形成促使荧光团与猝灭剂部分彼此极接近的二级结构的序列,诸如,但不限于发夹和 g- 四集体序列或如本领域中公知的通过使其补体与标记的寡核苷酸 (有时被称作报道探针) 杂交而检测的直链序列。另一方面,可以实时或在扩增后通过使用嵌入染料或在扩增后通过使选自本文公开的任意靶结合序列的探针杂交来检测扩增产物,其中上述的任意靶结合序列属于选择的一组扩增引物。

[0037] 末端和内部标记法是本领域中公知的且可以用于连接检测引物中相应位点上的供体和受体染料。5' - 末端标记法的实例包括:a) 5' - 5' 偶联核苷酸的高碘酸盐氧化作用,随后与含有胺的标记反应;b) 乙二胺与 5' - 磷酸化多核苷酸缩合,随后与胺反应性标记反应;和 c) 在固相 DNA 合成中使用亚磷酸氨基己酯试剂引入脂族胺取代基,随后与胺反应性标记反应。还可以使用含特定的脂族胺的核苷酸亚磷酰胺试剂在特异性位置上将标记

与合成的 DNA 寡核苷酸连接在一起。用于使选择的标记与检测引物连接并进行连接反应的合适方法的选择是本领域中常规的。

[0038] 另一个实施方案使用与特异性靶序列杂交的检测引物,从而随检测的靶序列的不同导致多检测引物的必要性。然而,用于检测和鉴定具特异性 HSV- 类型的实施方案使用通用的检测系统,对其根据 Nadeau 等 (1999) 所述的实时 SDA 检测方法进行改变。通用的检测系统允许对众多测定使用同一对荧光检测引物,从而提供了诸如成本、时间和技术复杂性降低这样的几个优点。

[0039] “信号”或“连接”引物含有与 HSV 靶序列杂交的靶结合部分和一般的且不与 HSV 靶序列结合的尾部分。将连接引物与检测引物联合用于通用检测。检测引物与补体连接引物的尾部分(即,非靶结合序列)杂交。将信号或连接引物设计成与至少部分在第一种与第二种扩增引物之间的间插区内的靶序列区杂交,使得所述的信号或连接引物在扩增反应过程中被取代。具有 SEQ ID NOs :19-22 和 44-45 的 HSV-1 和 HSV-2 信号或连接引物分别如表 1 和 2 中所示。

[0040] 检测探针可以为“通用检测引物”或带有以可检测方式标记的 5' 尾端部分和与补体连接引物尾序列结合的 3' 末端部分的“检测引物”。一般来说,检测引物的 3' 末端不含与 HSV 或内部扩增对照 (IAC) 靶序列具有任何显著互补性的序列。检测引物还带有 5' 末端上的限制酶识别位点。

[0041] 简单地说,可以同时且在与用于扩增的 SDA 法相同的反应容器中使用这种通用检测系统。该通用检测系统包括靶物依赖性的延伸未标记的连接引物。连接引物包括 HSV-1 或 HSV-2 靶特异性 3' 序列和 5' 通用尾且分别以 SEQ ID NOs :19-22 和 SEQ ID NOs :44-45 及其补体为典型。连接引物与 S1 扩增引物下游的扩增 HSV 靶序列杂交。DNA 聚合酶从连接引物和 S1 扩增引物的 3' 末端延伸,其中扩增引物的延伸取代了连接引物延伸产物。S2 扩增引物退火至连接引物延伸产物。DNA 聚合酶使 S2 扩增引物的 3' 末端延伸,产生包括连接引物延伸产物及其补体的双链分子,且该 DNA 聚合酶带有可产生切口的限制酶识别位点。产生切口指的是使 DNA 双链体中的两条链中仅一条的磷酸二酯键断裂。相应的限制酶使所述的双链分子在限制酶识别位点上产生切口,生成包括短的产生切口尾的 5' 部分和包括带长切口的补体连接引物延伸产物的 3' 部分。使用相应的限制酶,诸如 BsoBI 酶使限制酶位点产生切口并使链从产生切口的位点延伸取代了连接引物补体的单链拷贝。DNA 聚合酶使产生切口尾的 3' 末端延伸,由此取代单链产生切口的补体连接引物延伸产物。可以通过 SDA 使 S1 扩增引物延伸产物和延伸的 HSV 靶序列进一步以指数方式扩增。然后由检测引物俘获取代的补体连接引物延伸产物,其中检测引物的 3' 末端退火至补体连接引物延伸产物的 5' 部分。检测引物包括可检测标记且检测靶序列。DNA 聚合酶从检测引物和补体连接引物延伸产物的 3' 末端延伸导致发夹开放(如果存在),产生包括检测引物延伸产物及其补体的双链检测分子。各链含有可切割的限制酶识别位点,它在被切割时使供体和猝灭剂染料分离,从而分离荧光团和猝灭剂部分并产生靶特异性荧光。由于分离而使猝灭剂不再能够抑制由荧光团发射的荧光。完全切割双链检测引物限制酶识别位点通过分离荧光团和猝灭剂而增加了荧光信号。

[0042] 在本发明的实施方案中,可以标记检测引物以便使用荧光供体部分(或荧光团)和猝灭剂部分进行荧光检测,其中各部分位于限制酶识别位点侧翼。表 1 和 2 表示了具有

SEQ ID NOs :30-35 的检测引物序列。在通用检测中,用于检测靶序列的检测引物一般与连接引物结合使用。用供体染料罗丹明 (ROX) 和猝灭剂染料 P-(二甲基氨基苯基偶氮) 苯甲酸 (DABCYL) 标记的具有 SEQ ID NOs :30-33 的检测引物用于在本发明的实施方案中的 HSV 靶序列检测。本领域技术人员易于选择其它用于 SDA 的供体和猝灭剂染料对,使得猝灭剂染料足以吸收由供体染料发射的荧光。例如,易于通过在不同波长处的吸收检测和区分供体和猝灭剂染料。随供体和猝灭剂染料的不同,猝灭剂染料可以在一种情况中起猝灭剂的作用,而在另一种情况中起供体染料的作用。

[0043] 在该实施方案中,SEQ ID NOs :30-35 的检测引物带有由位于该检测引物 5' 末端的限制酶识别位点分离的供体和猝灭剂对。此外,SEQ ID NO :30 的检测引物带有包括位于供体与猝灭剂部分之间的发夹结构序列的序列,在供体与猝灭剂部分中,限制酶识别位点位于其中。发夹结构使两种染料彼此极接近,使得猝灭剂染料抑制供体染料发射的荧光。然而,SEQ ID NOs :31-35 的检测引物带有两种染料之间的直链序列,它的长度足够短以便猝灭剂吸收由荧光团发射的任何荧光。

[0044] 本领域中公知的许多供体 / 猝灭剂染料对可用于本发明的实施方案。它们包括,但不限于:荧光素 (FAM ;Glen Research ;Sterling, VA) / 罗丹明 (ROXTM ;Molecular Probes ;Eugene,OR) ;ROX/P-(二甲基氨基苯基偶氮) 苯甲酸 (DABCYLTM ;Glen Research) ; FAM/DABCYL ; 异硫氰酸荧光素 (FITC) / 异硫氰酸四甲基罗丹明酯 (TRITC) ;FITC/Texas Red™ (Molecular Probes) ;FITC/N-羟基琥珀酰亚氨基 1-芘丁酸酯 (PYB) ;FITC/ 伊红异硫氰酸酯 (EITC) ;N-羟基琥珀酰亚氨基 1-戊磺酸酯 (PYS) /FITC ;FITC/ 罗丹明 X ;和 FITC/ 四甲基罗丹明 (TAMRA)。对具体供体 / 猝灭剂对的选择并不关键。

[0045] 然而,就能量传递猝灭机理而言,唯一必要的是供体荧光团的发射波长与猝灭剂的激发波长重叠,即,在两种染料之间必须有足够的光谱重叠以便进行有效的能量传递、电荷传递或荧光猝灭。ROX 具有的 $EM_{max} = 608nm$ 且 FAM 具有的 EM_{max} 为 520nm。本领域技术人员有能力选择合适的供体和猝灭剂染料对。P-(二甲基氨基苯基偶氮) 苯甲酸 (DABCYL) 是非荧光的猝灭剂染料,它可以有效地使来自相邻荧光团,例如 FAM 或 5-(2' -氨基) 氨基萘 (EDANS) 的荧光猝灭。某些供体 / 猝灭剂对以本说明书公开的为典型;不过,其它供体 / 猝灭剂对对于本领域技术人员而言显而易见且也可以用于本发明。在本发明检测引物中产生荧光猝灭的任意染料对适用于本发明的方法,而与猝灭发生的机理无关。其它猝灭剂的非限制性实例包括 Black Hole Quencher™ (Biosearch Technologies, Inc. ;Novato, CA) 和 IowaBlack™ (Integrated DNA Technologies, Inc. ;Corralville, IA)。

[0046] 在核酸扩增反应过程中测定荧光以监测特异性扩增产物的蓄积。荧光信号与产生的特异性扩增子的量成正比。在有 HSV 靶核酸序列存在下,荧光增加。在没有靶物存在下,荧光在整个反应中持续保持低水平。荧光增加或基本改变的荧光衰减分别表明存在或不存在 HSV 靶序列。

[0047] 一般在一段时间内测定样品的荧光以确定样品是否含有 HSV DNA。在一个实施方案中,可以经过 1 小时的时间监测通过 60 次的荧光。简单地说,约每分钟采集一次有关在样品容器内测定的荧光量、校正值 (如果必要) 和每栏的校准值的数据。可以使用根据图曲线下的面积表示结果的 "MOTA" (非加速度量 (Metric Other Than Acceleration)) 法分析数据。该图测定了通过次数 (X-轴) 与相对荧光单位 (Y-轴) (参见图 3)。MOTA 面积

越大,则产生的荧光越多且对扩增产物的检测越有效。

[0048] 另一个实施方案使用如图 4 中所示的阈值后通过次数 (PassesAfter Threshold) (PAT) 算法且特别研发用于 BD ProbeTec™ ET 系统。与 MOTA 类似,PAT 得分越高,表明 SDA 反应越有效。当使用 PAT 算法时,将荧光强度的背景校正的信号通过预定的阈值时的时间定为 T3 (“时间 - 阈值”)。该图还测定了通过次数与相对荧光单位的关系。相同的 T3 阈值用于每份样品。PAT 得分等于 60 减去 T3 值。阴性样品没有达到荧光的最低阈值且由此将 PAT 值定为 0。阳性样品具有的 PAT 值大于 0,优选在 1-60,更优选在 40-55,这取决于测定和靶物水平。较低的 T3 得分和相应较高的 PAT 的值与更有效的 SDA 相关。PAT 算法仅使用最能够再现的扩增曲线的区。作为结果,PAT 算法使孔或样品之间可辨别的差异减小到最低限度且比其它检测物之间的比较法更为精确。PAT 可以通过 BD ProbeTec™ ET 系统自动进行。BDProbeTec™ ET 打印输出提供了 PAT 得分和可报告的结果。

[0049] 在另一个实施方案中,可以将“内部扩增对照”(“ IAC”)引入本发明的方法以验证阴性结果并鉴定可能抑制的样本或有利于样品中生物体载荷,诸如,但不限于病毒、细菌和真菌的定量。就诊断应用而言,同时扩增和检测两种不同的 DNA 序列,即,HSV 靶序列和 IAC 靶序列能够利用 IAC。“ IAC 靶序列”或“ IAC 序列”与 HSV 靶序列相似,但 SEQ ID NOs : 26-27 和 SEQ ID NOs :48-49 的 IAC 靶序列与 HSV-1 和 HSV-2 靶序列相比错配了约 5-10 个碱基。这些修饰的碱基足以使 IAC 连接引物特异性退火。

[0050] “ IAC 连接引物”与信号或连接引物所起的作用类似,但 IAC 连接引物与“ IAC 靶序列”或“ IAC 序列”通过 IAC 靶结合序列杂交。IAC 连接引物还带有含有不与 IAC 靶序列杂交的一般序列的 5' 尾部分。而检测引物可以与 IAC 连接引物补体的尾部分杂交。用于 HSV-1 和 HSV-2SDA 测定的 IAC 连接引物可以分别选自 SEQ ID NOs :28-29 和 50-51 且可用于 IAC 靶序列的扩增。位于 IAC 连接引物 3' 末端的 IAC 靶结合序列与 HSV 靶序列非常不同,从而使 HSV-1 或 HSV-2 连接引物不杂交或不干扰 IAC 靶序列的扩增。在表 1 和 2 中,用加下划线的小写字母表示位于 IAC 连接引物 3' 末端上的 IAC 靶结合序列。IAC 连接引物可用于验证阴性结果和监测抑制反应的样本。就定量 SDA 而言,在 IAC 与天然靶序列之间竞争限速试剂也可能是有用的 (Nadeau 等,1999 《生物化学分析》(Anal. Biochem.) 276 : 177-187)。

[0051] 本发明的检测引物可以用于检测 HSV 靶序列或 IAC 靶序列。然而,在本发明的一个实施方案中,用于检测 HSV-1 或 HSV-2 靶序列的检测引物为 SEQ ID NOs :30-33 的那些序列。用于检测 IAC 靶序列的检测引物为选自 SEQ ID NOs :34-35 的那些序列,其中供体和猝灭剂染料对分别为荧光素 (FAM) 和 DABCYL 且在本文中被称作“ IAC 检测引物”。本领域技术人员有能力选择带有标记的合适的检测引物,使得对 IAC 靶序列的鉴定不同于对 HSV-1 或 HSV-2 靶序列的鉴定。因此,可以交换用于检测 HSV 靶序列和 IAC 靶序列的检测引物,从而使 SEQ ID NOs :30-33 的检测引物可以用于检测 IAC 靶序列且 SEQ ID NOs :34-35 的检测引物可以用于检测 HSV 靶序列。

[0052] 本发明的另一个实施方案涉及在高流通量过程中同时测定多个样品。样品包括,但不限于那些采集自脑脊髓液 (CSF)、生殖器损害、口腔损害、粘膜损害、眼部样本、皮肤样本、直肠拭子、阴道拭子、阴道分泌物、尿、外周血白细胞和组织 (诸如来自脑活检) 的样品。可以在平板、载玻片、孔、平皿、珠、颗粒、杯、束、小片和条带中检测样品。在一个实施方案

中,在 96 微孔平板中按照与用于 BD ProbeTec™ET CT/GC 扩增的 DNA 测定一致的形式实施方法。该方法在干燥的微孔中进行,其中干燥的组合物包括所有的引物和探针,这些引物和探针对进行用于同时测定多个样品的 HSV-1 或 HSV-2 的 SDA 检测而言必不可少。

[0053] 可以在溶液中或在固相上按照本发明方法实施检测存在的选择的靶序列的测定。一般在溶液中进行实时或终点均匀测定,其中检测核酸起引物的作用。还可以在溶液中进行使用本发明检测引物的杂交测定(例如,作为均匀实时测定),而且特别适合于用于靶物的实时或终点检测的固相测定。在固相测定中,可以使用本领域中公知的方法通过内部或末端标记将检测寡核苷酸固定在固相(例如珠、膜或反应容器)上。例如,可以将生物素标记的检测寡核苷酸固定在抗生物素蛋白修饰的固相上,其中它在合适的杂交条件下接触靶物时将产生荧光改变。按照这种方式俘获靶物有利于从样品中分离靶物并能够除去样品中可能干扰测定信号或其它方面的物质。

[0054] 将用于检测和鉴定 HSV-1 靶序列的引物和探针列在表 1 中。给特异性 HSV 靶结合序列加下划线并用大写字母表示,而用小写的斜体字表示限制酶内切核酸酶位点。就 IAC 连接引物而言,用加下划线的小写字母表示 IAC 靶结合序列。以 5' → 3' 方向列出所有引物。

[0055] 表 1

[0056]

用于扩增和检测单纯疱疹病毒 1 DNA 的引物序列

SEQ ID NO:

用于 HSV-1 靶序列的 PCR 扩增引物		
PCRL1.0	GCGGAATTCGACCCTTGGTTCC	5
PCRR1.0	GCGGGATCCCCAACCACCACAC	6
左 (第一) 扩增引物		
HSV1GGLP1.0	ACCGCATCGAATGACTGTctcgggCTGTTCTCGTTCCTC	7
HSV1GGLP1.1	ACCGCATCGAATGACTGTctcgggCTGTTCTCGTTCCT	8
右 (第二) 扩增引物		
HSV1GGRP1.0	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCACCAATACACAAAAA	9
HSV1GGRP1.1	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAACAATACACACAAA	10
HSV1GGRP2.0	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCACCAATACACAAAAAC	11
HSV1GGRP2.1	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAACAATACACACAAAAC	12
HSV1GGRP3.0	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCACCAATACACAAAAACG	13
HSV1GGRP3.1	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAACAATACACACAAAACG	14
HSV1GGRP4.0	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAATACACAAAAACGAT	15
HSV1GGRP4.1	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAATACACACAAAACGAT	16
HSV1GGRP4.2	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggCAATACACACAAAATGAT	17
HSV1GGRP5.2	CGATTCCGCTCCAGACTTctcgggAAGGTGTGGATGAC	18
连接引物		
HSV1GGAD1.0	ACGTTAGCCACCATAACGGATCCGTCATCCACACCTTATC	19
HSV1GGAD2.1	ACGTTAGCCACCATAACGGATGGACACCCTCTTCGTCGTC	20
HSV1GGAD3.0	ACGTTAGCCACCATACTTGAGGACACCCTCTTCGTCGTC	21
HSV1GGAD3.1	ACGTTAGCCACCATACTTGAGGACACCCTCTTCGTCG	22
左 (第一) 缓冲引物		
HSV1GGLB1.0	GACGCCTCAACATAC	23
右 (第二) 缓冲引物		
HSV1GGRB1.0	GTGTGTCGCCATCG	24
HSV1GGRB1.1	AGGTGTGTCGCCAT	25

[0057] 表 1

[0058]

用于扩增和检测单纯疱疹病毒 1 DNA 的引物序列

SEQ ID NO:

IAC 靶序列		
HSV1IAC8.1	CTGTTCTCGTTCCTCACTGCCTCCCCGCCCTGGACACCCTC TTGCTGCTGAGCACCGTCATCCACACCTT	26
HSV1IAC8.7	CTGTTCTCGTTCCTCACTGCCTCCCCGCCCTGGACACCCTC TGTTCACTAGCACCGTCATCCACACCTT	27
IAC 连接引物		
HSV1 IACAD8.1	ACTGATCCGCACTAACGACTggacaccctcttctgctgctg	28
HSV1 IACAD8.7	ACTGATCCGCACTAACGACTggacaccctctgcttcatct	29
检测引物		
TBD10.2 D/R	(DABCYL) -TAGCGcccgagCGCT- (ROX) - ACGTTAGCCACCATAACGGAT	30
TBD15 D/R	(DABCYL) -TGcccgagT- (ROX) -ACGTTAGCCACCATAACGGAT	31
TBD16 (D/R)	(DABCYL) -TcccgagT- (ROX) -ACGTTAGCCACCATAACGGAT	32
MPC.DR	(DABCYL) -TCcccgagT- (ROX) -ACGTTAGCCACCATAACTTGA	33
MPC2.FD	(FAM) -TCcccgagT- (DABCYL) -ACTGATCCGCACTAACGACT	34
AltD8 (F/D)	(FAM) -AcccgagT- (DABCYL) -AGCTATCCGCCATAAAGCCAT	35

[0059] 将用于检测和鉴定 HSV-2 靶序列的引物和探针列在表 2 中。

[0060] 表 2

[0061]

用于扩增和检测单纯疱疹病毒 2 DNA 的引物序列		SEQ ID NO:
用于 HSV-2 靶序列的 PCR 扩增引物		
HSV2PCRL	<u>GCGGAATTCATTCTTGGGCCGCT</u>	36
HSV2PCRR	<u>GCGGGATCCACGTAACGCACGCT</u>	37
左 (第一) 扩增引物		
HSV2GGLP1.0	<u>ACCGCATCGAATGACTGTctcgggCTGTTCTGGTTCCTA</u>	38
右 (第二) 扩增引物		
HSV2GGRP1.0	<u>CGATTCGGCTCCAGACTTctcgggCGACCAGACAAACGAA</u>	39
HSV2GGRP1.1	<u>CGATTCGGCTCCAGACTTctcgggACCAGACAAACGAAC</u>	40
HSV2GGRP1.2	<u>CGATTCGGCTCCAGACTTctcgggCGACCAGACAAACGAAC</u>	41
HSV2GGRP2.0	<u>CGATTCGGCTCCAGACTTctcgggAACGCCGCGTGT</u>	42
HSV2GGRP5.2	<u>CGATTCGGCTCCAGACTTctcgggCCGTGTGGATGGT</u>	43
连接引物		
HSV2GGAD1.0	<u>ACGTTAGCCACCATAACGGATCCACCATCCACACGGCGGC</u>	44
HSV2GGAD2.0	<u>ACGTTAGCCACCATACTTGATGCTCTAGATATCCTCTTTATC</u> <u>AT</u>	45

[0062] 表 2

[0063]

用于扩增和检测单纯疱疹病毒 2 DNA 的引物序列		SEQ ID NO:
左 (第一) 缓冲引物		
HSV2GGLB1.0	<u>CACACCCCAACACAT</u>	46
右 (第二) 缓冲引物		
HSV2GGRB1.0	<u>TTGTGCTGCCAAGG</u>	47
IAC 靶序列		
HSV2-IAC 5.2A1	<u>CTGTTCTGGTTCCTAACGGCTCCCTGCTCTAGATATCCTC</u> <u>T</u>	48
HSV2-IAC 5.2A2	<u>TTACTACCAGCACCACCATCCACACGG</u> <u>CTGTTCTGGTTCCTAACGGCTCCCTGCTCTAGATATCCTC</u> <u>T</u> <u>TAACTACCAGCACCACCATCCACACGG</u>	49
IAC 连接引物		
HSV2GG IAC ADA1.0	<u>ACTGATCCGCACTAACGACTtgctctagatatcctcttactac</u>	50
HSV2GG IAC ADA2.0	<u>ACTGATCCGCACTAACGACTtgctctagatatcctcttaactac</u>	51
检测引物		
TBD10.2 D/R	(DABCYL)-TAGCGcccagCGCT-(ROX)- ACGTTAGCCACCATAC GGAT	30
TBD15 D/R	(DABCYL)-TGcccagT-(ROX)-ACGTTAGCCACCATACGGAT	31
TBD16 (D/R)	(DABCYL)-TcccagT-(ROX)-ACGTTAGCCACCATACGGAT	32
MPC.DR	(DABCYL)-TCcccagT-(ROX)-ACGTTAGCCACCATACCTTGA	33
MPC2.FD	(FAM)-TCcccagT-(DABCYL)-ACTGATCCGCACTAACGACT	34
ALTD8 (F/D)	(FAM)-AcccgagT-(DABCYL)-AGCTATCCGCCATAAGCCAT	35

[0064] 基于通过分析各种菌株的 HSV 基因的糖蛋白 G(US4) 序列区产生的共有序列设计

本发明的核酸引物（参见附图 1 和 6；表 1 和 2）。还显示了用于 SDA 和通用检测方法的缓冲引物、连接引物和检测引物。设计的 HSV-1 引物特异性扩增在如表 4 中举例说明的所有菌株中识别的 HSV-1 靶序列。设计 HSV-2 引物以便特异性扩增在如表 7 中举例说明的所有菌株中识别的 HSV-2 靶序列。由于 HSV-1 与 HSV-2 靶序列之间的同源性约为 90%，谨慎设计所述引物以便在 HSV-1 与 HSV-2 之间进行特异性区分。本发明还关注基本上与靶结合序列同源的序列和含有这类表 1 和 2 中所列的基本上同源的靶结合序列的引物。

[0065] 在本发明的一个实施方案中，HSV-1 靶区首先选自具有 152,261 个碱基长度的人 HSV-1 菌株 17 的完整 HSV-1 基因组序列（NCBI 登记号 X14112）。糖蛋白“US4”基因位于 136,744-137,460 位碱基之间。HSV-1 左缓冲引物（HSV1LB1.0）（5' 末端）位于 137,256 位核酸上。HSV-1 右缓冲引物（HSV1RB1.1）（5' 末端）位于 137,382 位核酸上。用于所有 HSV-1SDA 系统的引物均位于这些缓冲引物坐标内。

[0066] 本发明的另一个实施方案涉及具有 154,746 个碱基长度的人 HSV-2 菌株 HG52HSV-1 的完整 HSV-2 基因组序列（NCBI 登记号 Z86099）。糖蛋白“US4”基因位于 137,878-139,977 位碱基之间。HSV-2 左缓冲引物（HSV2LB1.0）（5' 末端）位于 139,773 位上。HSV-2 右缓冲引物（HSV2RB1.0）（5' 末端）位于 139896 位上。用于所有 HSV-2 SDA 系统的引物均位于这些缓冲引物坐标内。

[0067] 设计 PCR 扩增引物用于将 HSV 靶 DNA 克隆入质粒载体。SEQ ID NOs :5-6 和 SEQ ID NOs :36-37 的 HSV-1 和 HSV-2PCR 扩增引物分别与 HSV 基因组的高度保守的靶序列区互补。PCR 扩增引物扩增包括 HSV 糖蛋白 G (US4) 基因的 DNA 片段的 HSV 靶序列区。将含有 HSV 靶区的单纯疱疹病毒 (HSV) 基因组的扩增片段定向克隆入含有便利限制酶位点的质粒载体。尽管可以如本领域技术人员所理解的将 HSV 片段克隆入任意质粒载体，但是在本发明的一个实施方案中，使用对选择的 HSV 靶区具有特异性的 PCR 扩增引物将扩增的 HSV-1 和 HSV-2 片段分别克隆入大肠杆菌质粒载体 pUC 19 (Genbank/EMBL 登记号 L09137) 和 pUC18 (Genbank/EMBL 登记号 L09136)。HSV 片段被称作 HSV 靶贮备物。可以使用 PicoGreen® 双链 DNA 定量测定 (Molecular Probes, Inc.) 对靶 HSV DNA 进行定量。在用于扩增反应时，表 1 和 2 中所列引物名称中存在的“L”或“R”分别表示“左”或“右”引物。

[0068] 在本发明的一个实施方案中，PCR 扩增引物 SEQ ID NOs :5-6 和 36-37 最初分别扩增 HSV-1 和 HSV-2 基因的糖蛋白 G 基因的 152 和 254 个碱基对片段。各自分别设计带有 EcoRI 限制酶位点的 SEQ ID NOs :5 和 36 的 HSV-1 和 HSV-2 左 PCR 引物。SEQ ID NOs :6 和 37 的 HSV-1 和 HSV-2 右 PCR 引物各自分别带有 BamHI 限制酶位点。然后将该片段定位克隆入 pUC 质粒载体。典型的质粒载体分别为带有限制酶位点 EcoRI 和 BamHI 的 HSV-1 和 HSV-2 的 pUC19 和 pUC18。在通过限制酶消化进行纯化和线性化后，使用 HSV 扩增引物和缓冲引物以指数方式扩增 HSV 靶片段。

[0069] 本发明的靶结合序列和引物可用于核酸扩增。在一个实施方案中，所述引物特别可用于链置换扩增 (SDA)。这是一种等温核酸扩增法，其中引物的延伸、半修饰的限制酶识别 / 切割位点的产生切口、单链延伸产物的取代、引物退火至延伸产物（或原始靶序列）和随后的引物延伸在反应混合物中同时发生。此外，SDA 使得靶序列复制在 15 分钟以内超过了 10¹⁰ 倍。而在 PCR 中，反应步骤在单独期或循环中出现作为反应中循环变温的结果。主要如本文和 Walker 等 (1992,《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) USA 89 :

392-396 和 1992,《核酸研究》(Nucl. Acids Res.) 20 :1691-1696) 所述的常规 SDA 法进行耐热链置换扩增 (tSDA), 其中取代了热稳定性聚合酶和热稳定性限制酶。可以将温度调节至适合于取代的酶的较高温度。

[0070] 检测 HSV 扩增产物或扩增的靶序列的可选方法可以通过用聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳检测特征大小来进行, 其中用溴化乙锭染色琼脂糖。还可以通过定量杂交或分子生物学领域普通技术人员公知的用于核酸检测的等同技术 (Sambrook 等《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning : A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, NY (1989)) 检测使用 HSV-1 或 HSV-2 扩增引物产生的扩增产物。

[0071] 表 1 和 2 中所列引物可用于检测和鉴定样品中的 HSV-1 和 HSV-2。本文所用的 S1 和 S2 扩增引物分别代表了第一种和第二种扩增引物, 而 B1 和 B2 缓冲引物分别代表了第一种和第二种缓冲引物。简单地说, 在 SDA 法中, S1 扩增引物与单链 HSV 靶序列杂交。恰在 S1 扩增引物的上游或 5', 第一种缓冲引物 B1 与单链 HSV 靶序列杂交。DNA 聚合酶使 B1 缓冲引物和 S1 扩增引物的 3' 末端延伸, 其中 B1 缓冲引物的延伸最终取代了 S1 SDA 延伸产物。S1 SDA 延伸产物被 S2 扩增引物和 S2 扩增引物上游退火的 B2 缓冲引物俘获。DNA 聚合酶使 S2 SDA 和 B2 缓冲引物的 3' 末端延伸, 其中 B2 缓冲引物的延伸取代了下游 S2 SDA 延伸产物。S1 扩增引物退火至取代的 S2 扩增引物延伸产物且 DNA 聚合酶使杂交的 S1 扩增引物的 3' 末端延伸, 产生带有 S2 扩增引物延伸产物及其补体链的双链分子。各链在任一端上带有可产生切口的限制酶识别位点。在添加相应的限制酶时, 使含有硫醇化胞嘧啶的修饰的 DNA 链产生切口, 形成短的带切口尾和切口位点的长延伸产物 3'。DNA 聚合酶使短的带切口尾从该短的带切口尾的 3' 末端以 5' → 3' 方向延伸, 从而取代单链长延伸产物。简单地说, S2 扩增引物延伸产物的带切口的尾及其补体的带切口的尾分别取代单链带切口的 S2 扩增引物延伸产物和单链带切口的补体 S2 扩增引物延伸产物。在一个实施方案中, BsoBI 酶用于使分别带有 SEQ ID NOs :52-53 和 54-55 序列的各链产生切口并切割或切断它们。将如下所示的切口位点引入扩增引物序列且需要半-硫代磷酸化识别序列 (dCsTP, 硫醇化胞嘧啶)。尽管具有切口位点, SEQ ID NO :53 甚至在有 dCsTP 存在下也易于进行双链切割且并非设计可产生切口的扩增引物中的优选序列。

[0072] 切口位点 :5' -CTCGGG-3' (SEQ ID NO :52) 和 5' -CCCGGG-3' (SEQ ID NO :53)

[0073] 切断位点 :5' -CTCGAG-3' (SEQ ID NO :54) 和 5' -CCCGAG-3' (SEQ ID NO :55)

[0074] 在本发明的另一个实施方案中, 检测探针可用于检测 HSV 靶序列。可以使用对 HSV 靶序列具有特异性的 S1 扩增引物和检测引物, 其中所述的检测引物带有 HSV 靶结合序列。DNA 聚合酶从 S1 引物和检测引物的 3' 末端延伸。S1 引物的延伸取代下游检测引物延伸产物进入溶液, 它在其中被俘获并与互补 S2 扩增引物杂交。DNA 聚合酶使 S2 扩增引物的 3' 末端延伸并打开检测引物的二级结构, 形成双链限制酶位点并使两种染料 (荧光团和猝灭剂对) 分离至使猝灭剂失去猝灭能力并产生荧光的距离。通过切割限制酶识别位点并进一步分离荧光团和猝灭剂产生附加荧光。

[0075] 可用于 SDA 法的酶为在半-硫代磷酸硫代化识别序列内产生单链切口的那些酶, 其中引入硫代磷酸化核苷酸不会防止产生切口和修复的进一步循环。具有这些特征的酶的非限制性实例包括 :HincII、BsoBI、AvaI、NciI 和 Fnu4HI。有用的 DNA 聚合酶为这类聚合酶, 它们在单链切口位点上启动 DNA 合成、将硫代磷酸化核苷酸引入延伸的核酸链并取代

没有 5' → 3' 外切核酸酶活性的链。切割指的是打断双链或单链 DNA 的磷酸二酯键。表现出这些特征的 DNA 聚合酶的非限制性实例包括外切核酸酶缺损克列诺片段和 Bst 聚合酶和 Bca 聚合酶的外切核酸酶缺损片段。尽管其它 DNA 聚合酶和限制酶适合于 SDA (Walker 等《美国国家科学院院报》(Proc. Natl. Acad. Sci USA), 第 89 卷, 392-396 页, 1992 年 1 月, Applied Biological Sciences), 但是因它们的热特性和彼此的相容性而选择 exo-Bst 聚合酶和 BsoBI。在本发明的一个实施方案中, 使用 BsoBI 限制性内切核酸酶识别位点并以斜体字标明 (参见, 表 1 和 2)。显而易见的是, 可以单独使用 HSV 靶结合序列以扩增不需要特异性序列或结构的反应 (例如, PCR) 中的 HSV 靶物, 且非 SDA 的扩增反应所要求的其它特异性序列 (例如, RNA 聚合酶启动子) 可以在系统中例如取代本文所述的含 RERS 的序列。

[0076] 然后在有单独或与缓冲引物组合形式的扩增引物、用于通用检测的信号 / 连接引物和通用检测引物存在下可以扩增靶贮备物。为了进行扩增反应, 选择包括一个“左”扩增引物的至少一对且选择一个“右”扩增引物来扩增 HSV 靶贮备序列的各链。在 SDA 反应中, 除左和右扩增引物外, 开始还使用一个左和右缓冲引物对。此外, 为了进行检测, 选择信号 / 连接引物和检测引物并用于检测和鉴定 HSV 靶序列。

[0077] 特异性扩增和检测 HSV-1 或 HSV-2DNA 的几种 HSV 系统包括在本发明中。例如, HSV-1 系统可以包括下列引物: HSV1GGLP1. 1、HSV1GGRP5. 2、HSV1GGAD2. 1、HSV1GGLB1. 0、HSV1GGRB1. 1 和 TBD16 (D/R); 或可以选择 HSV1GGLP1. 1、HSV1GGRP5. 2、HSV1GGAD3. 0 或 HSV1GGAD3. 1、HSV1GGLB1. 0、HSV1GGRB1. 1、MPC. DR、HSV1IAC AD8. 1 或 HSV1IACAD8. 7、MPC2. FD。在另一个实施方案中, 将使用引物的各种组合的 HSV-2 系统列在表 3 中。关注引物的其它组合, 不过, 本领域技术人员有能力将所述引物组合以检测样品中的 HSV-1 或 HSV-2。所述的引物可以选自表 1 和 2 中所列的那些且在按照统计学设计的实验中测试以便鉴定样品中的 HSV-1 或 HSV-2。另一方面, 对 HSV-1 或 HSV-2 具有特异性且基本上与表 1 和 2 中所列的那些同源的引物也可以用于检测 HSV-1 或 HSV-2 靶序列。

[0078]

HSV-2 SDA 系统	系统中使用的引物	
HSV2GG 1.0	HSV2GGRP1.0 HSV2GGLP1.0 HSV2GGRB1.0 HSV2GGLB1.0 HSV2GGAD1.0	右扩增引物 左扩增引物 右缓冲引物 左缓冲引物 连接引物
HSV2GG 1.1	HSV2GGRP1.1 HSV2GGLP1.0 HSV2GGRB1.0 HSV2GGLB1.0 HSV2GGAD1.0	右扩增引物 左扩增引物 右缓冲引物 左缓冲引物 连接引物
HSV2GG 1.2	HSV2GGRP1.2 HSV2GGLP1.0 HSV2GGRB1.0 HSV2GGLB1.0 HSV2GGAD1.0	右扩增引物 左扩增引物 右缓冲引物 左缓冲引物 连接引物
HSV2GG 2.0	HSV2GGRP2.0 HSV2GGLP1.0 HSV2GGRB1.0 HSV2GGLB1.0 HSV2GGAD2.0	右扩增引物 左扩增引物 右缓冲引物 左缓冲引物 连接引物
HSV2GG 5.2	HSV2GGRP5.2 HSV2GGLP1.0 HSV2GGRB1.0 HSV2GGLB1.0 HSV2GGAD2.0	右扩增引物 左扩增引物 右缓冲引物 左缓冲引物 连接引物

[0079] 为了商业上的便利性,可以以试剂盒的形式包装用于特异性检测和鉴定核酸的扩增引物。一般来说,这类试剂盒含有至少一个 HSV 扩增引物对。用于进行核酸扩增反应的试剂也可以包括在靶特异性扩增引物中,例如,缓冲剂、其它引物、核苷酸三磷酸、酶等。可以将试剂盒的成分共同包装在普通容器内,其中任选包括用于实施本发明方法的具体实施方案的技术说明书。试剂盒中还可以包括其它任选的成分,例如用适合于用作测定探针的标记标记的引物和 / 或用于检测所述标记的试剂或用具。

[0080] 在本发明的一个实施方案中,提供了包括第一种扩增引物或 S1SDA 扩增引物和第二种扩增引物或 S2 SDA 扩增引物的试剂盒。该试剂盒可以进一步包括:第一种 B1 缓冲引物和第二种 B2 缓冲引物;连接引物;检测引物;和任选用于同时检测内部扩增对照 (IAC)

靶序列,包括 IAC 连接引物和 IAC 靶序列的试剂。该试剂盒可以由对 HSV-1 或 HSV-2 具有特异性的引物组成或该试剂盒可以由定向于 HSV-1 和 HSV-2 的引物组成,其中本领域技术人员能够理解检测和鉴定 HSV-1 的扩增反应使用了 HSV-1 引物且检测和鉴定 HSV-2 的扩增反应使用了 HSV-2 引物。为了鉴定样品中是否含有 HSV-1 或 HSV-2 DNA,不应将用于 HSV-1 和 HSV-2 的引物混合。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明的试剂盒和引物可以用于检测和诊断临床样品是否含有 HSV-1 或 HSV-2 DNA。可以使用 SDA 扩增引物扩增和检测临床样品或可以将该临床样品用于进一步包括缓冲引物、连接引物和检测引物的 SDA 反应。在本发明的一个实施方案中,除用于 HSV-1 或 HSV-2 的阳性对照和阴性对照外,还可以将 IAC 连接引物用作反应的内部扩增对照。本领域技术人员能够从阅读本文的描述和从本领域中的一般方法和技术中理解如何制备和使用所述引物检测和鉴定样品中的 HSV-1 和 HSV-2。

[0082] 此外,在一个商业化实施方案中,可以将包括本发明引物和用于 SDA 的试剂的组合物制成干燥或液体形式。该组合物在干燥形式下更为稳定和易于操作。可以将干燥的组合物加入或预处理至固相中,诸如微量滴定板、微阵列或其它合适的贮器,其中仅需要加入样品和 SDA 缓冲液。这种方式有利于同时测定多个样品并用于高通量方法。在本发明的一个实施方案中,可以使用 BD ProbeTec™ ET 仪。

[0083] 可以理解由靶结合序列和任选选择的扩增反应所需的序列或选择的检测反应所需的序列组成的本发明核酸还可以包括用作间隔区、接头、用于标记或结合酶或其它应用的序列的某些其它序列。一般已知这类其它序列对在选择的反应中获得核酸的最佳功能是必不可少的。

[0084] 将本文引述的所有专利、专利申请、公开的 PCT 申请和文章、书籍、参考文献、参考手册和摘要的全部内容引入本文作为参考,以便更完整地描述本发明涉及的科学发展动态。

[0085] 因为可以在不脱离本发明范围和实质的情况下对上述主题做出各种改变,所以将上述描述中包含或在所附权利要求中定义的所有主题解释为对本发明的描述和说明。能够根据上述教导对本发明做出许多修改和改变。

具体实施方式

[0086] 本文的实施例旨在以典型实例说明实施本发明的不同方面且不得以任何方式来限定本发明的范围。这些实施例不包括对所用常规方法的详细描述,诸如构建载体或将 cDNA 插入这类载体的常规方法。这类方法对本领域技术人员而言是众所周知的且描述在大量出版物中,例如 J. Sambrook 和 D. W. Russell 《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning : a Laboratory Manual)第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, (2001)。

[0087] 实施例 1

[0088] HSV-1 糖蛋白 -G 链置换扩增靶区的克隆

[0089] 使用表 1 中鉴定的 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 的 PCR 扩增引物对来自 HSV-1 (菌株 ATCC :VR-539) 的 DNA 进行 PCR。

[0090] 设计这些引物以便扩增 HSV-1 的糖蛋白 G(US4) 基因内的 152 个碱基对片段。将 PCR 扩增的 DNA 插入 pUC 19 质粒载体 (Gibco BRL ;Grand Island, NY)。将该重组克隆命名

为 HSV1GG 质粒 #1。纯化质粒 #1 DNA 并通过用 BamHI 限制酶消化使其线性化。然后使用 QIAquick (Qiagen, Inc. ;Valencia, CA) 自旋柱纯化 DNA 并通过用荧光 Picogreen® 试剂分析进行定量。在含有 10ng/μl 人 DNA 的水中制备用于将要进行的实验的靶 HSV-1 DNA 稀释液。特异性 HSV-1 菌株稀释液和在每种稀释液中的 HSV-1 检测结果如图 5 中所示。“+”号表示样品中存在 HSV-1 ;“-”号表示样品中不存在 HSV-1 ;且问号表示样品中可疑的污染物。所有菌株在 1 : 10 的储备溶液稀释液下呈阳性,但不包括样品 0-2526。在 1 : 1,000 的储备溶液稀释液下,23 种菌株中的 20 种呈阳性。在 1 : 100,000 的储备溶液稀释液下,23 种菌株中的 15 种呈阳性。

[0091] 实施例 2

[0092] 克隆的 HSV-1 DNA 的扩增

[0093] 作为用于检测 HSV-1 DNA 的测定中的起始步骤,使用实施例 1 中所述的靶核酸法研发用于扩增 HSV-1 DNA 的 SDA 系统。使用克隆的质粒稀释液评价 DNA 扩增测定中的分析灵敏度。在每一靶水平下进行 8 次重复的 SDA 反应。这 8 次反应等同于每次反应中双链 DNA 的 100、50、25、12.5、6.25 和 0 个拷贝。如下进行扩增:在 52°C 下,使用 BD ProbeTec™ ET 仪 (BD Diagnostic Systems ;Sparks, MD) 与各 50nM 的 HSV1GGLB1.0 和 HSV1GGRB 1.0 缓冲引物、100nM 的 HSV1GGLP 1.0 左扩增引物、500nM HSV1GGRP1.0 右扩增引物、250nM HSV1GGAD1.0 连接引物、500nM TBD10.2D/R 检测引物。将这些引物的序列列在表 1 中。最终缓冲液条件如下:143mM N-二(羟乙基)甘氨酸;82mM KOH;25mM K_2PO_4 ;12.5% DMSO ;5mM 乙酸镁 ;500mM 2'-脱氧胞嘧啶-5-α-(1-硫代三磷酸)(dCsTP) ;各 100nM 的 dATP、dGTP 和 dTTP ;100ng/μl BSA ;约 12 个单位的 Bst 聚合酶 ;和约 30 个单位的 BsoBI 限制性内切核酸酶。

[0094] 监测 1 小时内通过 60 次的荧光。根据曲线下的面积或“MOTA”得分表示结果。易于通过常规实验测定阳性 MOTA 得分。就本发明的目的而言,将 MOTA 得分大于或等于 3500 视为“阳性”。测定产生 100%阳性结果时的 HSV 1GG 靶 DNA 的最低水平为 100 个拷贝 / 反应。在 50 个拷贝的靶 DNA / 反应下,8 次重复中有 7 次 (87.5%) 也呈阳性。

[0095] 实施例 3

[0096] 通过 SDA 检测 1 型单纯疱疹病毒粒子

[0097] 为了验证本发明引物和探针检测 HSV-1 的能力,对获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC ;Manassas, VA) 的 4 株 HSV-1、获自 QuestDiagnostic (Baltimore, MD) 的 10 株和来自俄亥俄州立大学 (OSU) 的 14 份未分型的 HSV 样品进行 SDA。

[0098] HSV 的未分型株的特征在于通过 PCR 扩增了 DNA 聚合酶基因的区。设计一组扩增 HSV-1 和 HSV-2 中相同区的扩增引物。两种类型的病毒可通过在 HSV-2 PCR 片段中存在 ApaI 限制性内切核酸酶识别位点,而 HSV-2 PCR 片段在由 HSV-1 株产生的 PCR 产物中不存在加以区分。当与 ApaI 限制酶一起保温时,将 HSV-2- 衍生的扩增产物切割成两个较短的片段,而获自 HSV-1 的那些扩增产物保持完整。使用琼脂糖凝胶电泳与合适的对照品分离限制酶切片段。

[0099] 用于评价 SDA 系统中存在或不存在 HSV 的病毒储备液的浓度是未知的。按 1 : 10 在磷酸盐缓冲盐水中稀释病毒储备液并通过 SDA 测试 10 μL 该混悬液。结果如表 4 中所示。使用 HSV-1 扩增引物检测所有 HSV-1 株,证实了所公开的引物和探针检测来自各种不同来源的 HSV-1 株的能力。在通过 ApaI 限制酶切消化分型的 HSV 中的预先未分型的 14 株中,

经测定 9 株为 HSV-1, 4 株为 HSV-2 且 1 株未通过 PCR 扩增 (参见表 4 和 5)。

[0100]

HSV 类型	样品编号	注解	APA1 凝胶 结果	HSV-1GG (MOTA)	HSV-1GG (PAT)
HSV-1	OSU0-2021	预先未分型的	HSV-1	16970	45.91
HSV-1	OSU0-450	预先未分型的	HSV-1	105400	50.07
HSV-1	OSU0-1010	预先未分型的	HSV-1	156280	52.43
HSV-1	OSU0-2526	预先未分型的	HSV-1	154715	51.96
HSV-1	OSU D-8-1973	预先未分型的	HSV-1	149720	54.73
HSV-1	OSU7-370	预先未分型的	HSV-1	152600	54.56
HSV-1	OSU0116-3	预先未分型的	HSV-1	175610	54.77
HSV-1	OSU 1136	预先未分型的	HSV-1	165410	53.36
HSV-1	OSU A.P.	预先未分型的	HSV-1	225340	54.62
HSV-1	ATCC 260VR	ATCC	HSV-1	148960	54.78
HSV-1	ATCCVR-733	ATCC	HSV-1	248080	54.73
HSV-1	ATCCVR-735	ATCC	HSV-1	153760	54.46
HSV-1	ATCCVR-539	ATCC	HSV-1	173860	54.47
HSV-1	临床 1	Quest Diagnostics	HSV-1	250570	54.33
HSV-1	临床 2	Quest Diagnostics	HSV-1	222590	54.52
HSV-1	临床 3	Quest Diagnostics	HSV-1	126780	51.51
HSV-1	临床 4	Quest Diagnostics	HSV-1	262540	54.63
HSV-1	临床 5	Quest Diagnostics	HSV-1	180530	54.44
HSV-1	临床 6	Quest Diagnostics	HSV-1	12750	35.12
HSV-1	临床 7	Quest Diagnostics	HSV-1	115500	50.31
HSV-1	临床 8	Quest Diagnostics	HSV-1	184130	54.29
HSV-1	临床 9	Quest Diagnostics	HSV-1	197860	52.98
HSV-1	临床 10	Quest Diagnostics	HSV-1	160660	50.99

[0101] 实施例 4

[0102] SDA 法的分析灵敏度

[0103] 为了使用本发明公开的引物和探针测定 HSV-1 测定法的检测极限, 对克隆的靶核酸的稀释液和病毒粒子的连续稀释液进行 SDA 反应。通过电子显微镜检查法 (Electron Microscopy Bioservices) 对病毒粒子储备液进行计数。在每一靶水平下重复测试 16 份样品。

[0104] 为了验证本测定法的灵敏度和特异性, 在 1 : 10、1 : 1,000 和 1 : 100,000 的生物体储备溶液稀释液下测试来自不同地域位置的 23 株 HSV-1。来自预先未分型株的和来自 Quest Diagnostics 的样品滴度是未知的。来自 ATCC 的两种 HSV-1 储备溶液的滴度近似如下: VR260, 1.5×10^4 TCID₅₀/μL; 和 VR-539, 2.0×10^5 TCID₅₀/μL。结果如图 5 中所示。所有菌株在 1 : 10 的储备混悬液稀释液下呈阳性, 但不包括菌株 #0-2526。在 23 株中, 20 株在 1 : 1000 储备溶液稀释液下测试呈阳性, 且 15 株在 1 : 100,000 稀释液下测试呈阳性。

[0105] 实施例 5

[0106] 用于 HSV-1 DNA 的 SDA 特异性

[0107] 用 HSV1GG SDA 系统测试 HSV-2 中的 16 株。每次反应各加入 10 微升 HSV-2 稀释

液混悬液。使用 HSV1GG 系统测试 17 种储备溶液之一呈阳性。结果如表 5 中所示。此外，使用本发明公开方法的引物和探针测试 23 种其它微生物。这些微生物包括临床样本中可能遇到的细菌、酵母和其它病毒。经测试，这些生物体中没有一种呈 HSV-1 的阳性。结果如表 6 中所示。

[0108]

样品编号	注解	APAI 凝胶解释	HSV-1GG (MOTA)	HSV-1GG (PAT)
0-2053	预先未分型的	HSV-2	680	0
0-1753	预先未分型的	无产物	90	0
0-8575	预先未分型的	HSV-2	390	0
C5 (S?)	预先未分型的	HSV-2	150	0
July-67	预先未分型的	HSV-2	740	0
ATCC VR-734	ATCC	HSV-2	30	0
ATCC VR-540	ATCC	HSV-2	100	0
临床 11	Quest Diagnostics	HSV-2	410	0
临床 12	Quest Diagnostics	HSV-2	20	0
临床 13	Quest Diagnostics	HSV-2	290	0
临床 14	Quest Diagnostics	HSV-2	320	0
临床 15	Quest Diagnostics	HSV-2	40	0
临床 16	Quest Diagnostics	HSV-2	210	0
临床 17	Quest Diagnostics	HSV-2	10	0
临床 18	Quest Diagnostics	HSV-2	40	0
临床 19	Quest Diagnostics	HSV-2*	145050	53.38
临床 20	Quest Diagnostics	HSV-2	220	0

[0109] * 临床 19 通过 Quest 被分型为 HSV-2 而通过 ApaI 分析被分型为 HSV-1。

[0110]

生物体	菌株#	HSV-1GG (MOTA)	HSV-1GG SDA (PAT)
腺病毒-5	ABI 74-070	180	0
白色假丝酵母	ATCC 44808	0	0
新型隐球酵母	ATCC 36556	60	0
巨细胞病毒(AD-169)	ABi 68-125	10	0
肠道病毒(艾可病毒群-11)	ABi 74-084	20	0
EB 病毒	SIGMA 104H0854	240	0
大肠埃希杆菌	ATCC 11775	0	0
核粒梭杆菌	ATCC 25586	0	0
B 链球菌群	ATCC 12386	130	0
流感嗜血杆菌	ATCC 33533	320	0
单核细胞增生利斯特氏菌	ATCC 7644	40	0
肺炎枝原体	ATCC 63-030	300	0
脑膜炎奈瑟氏球菌	ATCC 13077	10	0
痤疮丙酸杆菌	ATCC 6919	0	0
铜绿假单胞菌	ATCC 27853	170	0
呼吸道合胞病毒	ABi 74-093	180	0
金黄色葡萄球菌	ATCC 25923	0	0
表皮葡萄球菌	ATCC E155	0	0
温和链球菌	ATCC 6249	10	0
变异链球菌	ATCC 25175	20	0
肺炎链球菌	ATCC 6303	0	0
化脓链球菌	ATCC 19615	0	0
鼻病毒	临床 74	250	0

[0111] ATCC- 美国典型培养物保藏中心 ;ABi-Advanced Biotechnologies, Inc.

[0112] 实施例 6

[0113] HSV-2 糖蛋白 -G SDA 靶区的克隆

[0114] 使用引物 HSV2PCRR 和 HSV2PCRL 与 69°C 的退火温度对来自 HSV-2 株 ATCC VR-540 的 DNA 进行 PCR。这些引物扩增了 HSV-2 的糖蛋白 G(US4) 基因内的 254 个碱基对片段。将扩增的 DNA 插入 pUC18 质粒载体 (Invitrogen)。该重组克隆称作 pHSV2-NT#9-1。纯化质粒 DNA 并通过用 BamHI 限制酶消化使其线性化。使用 QIAGEN QIAquick 自旋柱纯化 DNA 并通过使用荧光 Picogreen® 试剂分析进行定量。在含有 7ng/μL 鲑精 DNA 的水中制备用于即将进行的实验的靶 DNA 稀释液。

[0115] 实施例 7

[0116] 克隆的 HSV-2 DNA 的扩增

[0117] 使用克隆的质粒稀释液评价 DNA 扩增测定法的分析灵敏度。使用 2.0 和 5.2 系统在各自的靶水平下进行 8 次重复的 SDA 反应。这 8 次反应等同于每次反应中双链 DNA 的 500、250、100、50、25、10 和 0 个拷贝。如下进行扩增：在 52°C 下，使用 BD ProbeTec™ ET 仪与各 50nM 的 HSV2GGLB1.0 和 HSV2GGRB 1.0、100nM 的 HSV2GGLP 1.0、500nM HSV2GGRP2.0 或 5.2、250nM HSV2GGAD1.0、500nM MPC.D/R。将这些引物的序列列在表 2 中。最终缓冲液条件如下：71mM N-二(羟乙基)甘氨酸；56.6mM KOH；23.9mM KPO₄；15.4% DMSO；5mM 乙酸镁；500mM 2'-脱氧胞嘧啶-5-α-(1-硫代三磷酸)(dCsTP)；各 100nM 的 dATP、dGTP 和 dTTP；100 μg/μL BSA；约 3.515 个单位的 Bst 聚合酶；和约 30 个单位的 BsoBI 限制性内切核酸酶。

[0118] 监测 1 小时内通过 60 次的荧光。根据曲线下的面积或“MOTA”得分表示结果并表示为 PAT 得分(阈值后通过次数)。就本发明的目的而言，将 MOTA 得分大于或等于 3500 和 PAT 得分大于 0 视为“阳性”。测定产生 100% 阳性结果时的 HSV2GG 靶 DNA 的最低水平对系统 2.0 和 5.2 而言为 50 个拷贝/反应。对系统 2.0 而言，在 25 个拷贝下，8 次重复中有 7 次呈阳性，而对系统 5.2 而言，在 25 个拷贝下，8 次重复中有 6 次呈阳性。

[0119] 实施例 8

[0120] 用 SDA 检测 HSV-2 病毒粒子

[0121] 为了验证本发明引物和探针检测 HSV-2 的能力，对获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的 2 株 HSV-2、获自 Quest Diagnostic(Baltimore, MD)的 9 株和来自俄亥俄州立大学(OSU)的通过 ApaI 分析被分型为 HSV-2 的 5 株进行 SDA。

[0122] 来自 OSU 的株的特征在于通过 PCR 扩增了 DNA 聚合酶基因的区。设计一组扩增 HSV-1 和 HSV-2 中相同区的 PCR 引物。两种类型的病毒可通过在 HSV-2 PCR 片段中存在 ApaI 限制性内切核酸酶识别位点，而 HSV-2 PCR 片段在由 HSV-1 株产生的 PCR 产物中不存在加以区分。当与 ApaI 限制酶一起保温时，将 HSV-2 衍生的 PCR 产物切割成两个较短的片段，而获自 HSV-1 的那些 PCR 产物保持完整。使用琼脂糖凝胶电泳与合适的对照品分离限制酶切片段。

[0123] 用于评价 SDA 系统的病毒储备液的浓度是未知的。按 1:10 在磷酸盐缓冲盐水中稀释病毒储备液并在 SDA 中测试 10 μL 该混悬液。结果如表 7 中所示。使用来自系统 1.0、2.0 和 5.2 的扩增引物检测所有 HSV-2 株，证实了所公开的引物和探针检测来自各种不同来源的 HSV-1 株的能力。

[0124]

菌株	来自储备溶液的稀释液	HSV2GG 1.0 MOTA	HSV2GG 1.0 PAT	HSV2GG 2.0 MOTA	HSV2GG 2.0 PAT	HSV2GG 5.2 MOTA	HSV2GG 5.2 PAT
OSU 0-2053	1:10	5460	34	103903	52.2	104334	52.6
OSU D-8575	1:10	59950	50	123676	52.6	129392	52.7
OSU C5	1:10	34230	47	96845	52.4	103945	52.6
OSU 7-2667	1:10	135900	53	88932	52.4	86426	52.6
ATCC VR-734	1.58E+9 TCID/ μ L	173220	54	108624	52.4	105501	52.6
ATCC VR-540	1.58E+4/T CID/ μ L	183190	55	131364	52.5	128644	52.6
Quest 临床 11	1:10	157930	52	83950	52.4	86787	52.5
Quest 临床 12	1:10	127670	51	129929	52.3	122640	52.4
Quest 临床 13	1:10	136710	51	103652	52.2	101533	52.4
Quest 临床 14	1:10	135660	53	106922	52.2	110146	52.5
Quest 临床 15	1:10	8440	38	110309	51.1	141752	52.2
Quest 临床 16	1:10	157960	53	125560	52.1	133232	52.4
Quest 临床 17	1:10	203550	53	85670	51.4	81501	52.2
Quest 临床 18	1:10	64690	48	153890	52.1	154132	52.4
Quest 临床 20	1:10	225400	54	142087	52.4	119663	52.5

[0125] OSU = 俄亥俄州立大学 ;ATCC = 美国典型培养物保藏中心 ;Quest = Quest Diagnostics

[0126] 实施例 9

[0127] 用于 HSV-2 DNA 的 SDA 的特异性

[0128] 用 HSV2GG SDA 系统 1.0、2.0 和 5.2 测试 25 株 HSV-1。每次反应各加入 10 微升 HSV-1 稀释液混悬液。使用 HSV-2 系统没有检测出 25 株中的任何一种。结果如表 8 中所示。此外,使用本发明公开方法的引物和探针测试了一组其它微生物。这些微生物包括临床样本中可能遇到的细菌、酵母和其它病毒。经测试,这些生物体中没有一种呈 HSV-2 的阳性。结果如表 9 中所示。

[0129]

HSV-1 株	来自储备溶液的稀释液	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG
		1.0 MOTA	1.0 PAT	2.0 MOTA	2.0 PAT	5.2 MOTA	5.2 PAT
0-2021	1:10	250	0	2059	0	433	0
0-450	1:10	150	0	500	0	632	0
0-1010	1:10	580	0	1063	0	1733	0
OSU0-2526	1:10	330	0	988	0	816	0
OSU0-1753	1:10	250	0	16	0	4	0
OSUD-8-1973	1:10	90	0	1	0	433	0
OSU7-370	1:10	110	0	612	0	102	0
OSU116-3	1:10	290	0	25	0	45	0
OSU1136	1:10	390	0	88	0	61	0
OSUA. P.	1:10	470	0	无数据	无数据	无数据	无数据
ATCC VR-260	2.8E+6 TCID/ μ L	610	0	656	0	858	0
ATCC VR-733	15.8 TCID/ μ L	1270	0	无数据	无数据	无数据	无数据
ATCC VR-735	15.8 TCID/ μ L	130	0	0	0	1008	0
ATCC VR-539	1000 vp/ μ L	480	0	926	0	1429	0
Quest 临床 1	1:10	990	0	1011	0	64	0
Quest 临床 2	1:10	190	0	0	0	68	0
Quest 临床 3	1:10	790	0	419	0	75	0
Quest 临床 4	1:10	310	0	无数据	无数据	无数据	无数据
Quest 临床 5	1:10	580	0	311	0	212	0
Quest 临床 6	1:10	370	0	0	0	0	0
Quest 临床 7	1:10	380	0	369	0	0	0
Quest 临床 8	1:10	520	0	1576	0	62	0
Quest 临床 9	1:10	770	0	2300	0	1138	0
Quest 临床 10	1:10	440	0	1956	0	1500	0
Quest 临床 19	1:10	640	0	587	0	480	0

[0130] OSU = 俄亥俄州立大学; ATCC = 美国典型培养物保藏中心; Quest = Quest

Diagnositics

[0131]

表 9
使用 HSV2GG 系统 HSV-2 对各种细菌、病毒和酵母的特异性

生物体	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG	HSV2 GG
	1.0 MOTA	1.0 PAT	2.0 MOTA	2.0 PAT	5.2 MOTA	5.2 PAT
腺病毒-5	50	0	0	0	581	0
白色假丝酵母	530	0	0	0	246	0
新型隐球酵母	120	0	1344	0	1436	0
巨细胞病毒 (AD-169)	140	0	3	0	1	0
肠道病毒(艾可病毒 -11)	680	0	491	0	15	0
BB 病毒	530	0	无数据	无数据	无数据	无数据
大肠杆菌	20	0	1974	0	69	0
核粒梭杆菌	0	0	801	0	1560	0
B 群链球菌	180	0	0	0	387	0
流感嗜血杆菌	340	0	618	0	1675	0
铜绿假单胞菌	500	0	183	0	1303	0
呼吸道合胞病毒	350	0	4	0	236	0
金黄色葡萄球菌	30	0	885	0	551	0
表皮葡萄球菌	10	0	84	0	831	0
温和链球菌	190	0	8	0	226	0
变异链球菌	510	0	294	0	1813	0
肺炎链球菌	60	0	404	0	2006	0
化脓链球菌	0	0	1063	0	3149	0
单核细胞增生利斯特氏菌	470	0	984	0	0	0
肺炎支原体	530	0	16	0	408	0
脑膜炎奈瑟氏球菌	300	0	1661	0	134	0
痤疮丙酸杆菌	40	0	1559	0	1022	0
鼻病毒	20	0	无数据	无数据	无数据	无数据
鼻病毒 74	0	0	无数据	无数据	无数据	无数据
鼻病毒 114	60	0	无数据	无数据	无数据	无数据
HIV-1	430	0	1335	0	2795	0

序列表

<110>Becton, Dickinson and Company
 <120> 通过核酸扩增检测 1 型和 2 型单纯疱疹病毒
 <130>2728-4001PC

<150>US 60/465, 458
 <151>2003-04-25
 <160>55
 <170>PatentIn 3.2 版

<210>1
 <211>756
 <212>DNA
 <213> 人疱疹病毒 -1

<220>
 <221>misc_ 特征
 <223> 糖蛋白 G(US4) 基因

<220>
 <221>misc_ 特征
 <222>(284).. (285)
 <223> 插入片段 XXX, 其中 X = 无碱基

<400>1
 aaaaagaccc cgacccecggt ctgtggtggt tttggcatca tgtcgccggg cgccatgcgt 60
 gccgttggtt ccattatccc attccttttg gttcttgtcg gtgtatcggg ggttcccacc 120
 aacgtctect ccaccacca accccaactc cagaccaccg gtcgtccctc gcatgaagcc 180
 cccaacatga cccagaccgg caccaccgac tctcccaccg ccatcagcct taccacgecc 240
 gaccacacac cccccatgcc aagtatcggg ctggaggagg aggaagagga ggagggggcc 300
 ggggacggcg aacatcttga ggggggagat gggaccctg acaccctacc ccagtccccg 360
 ggcccagcct tcccgttggc tgaggacgtc gagaaggaca aaccaaccg tcccgtagtc 420
 ccateccccg atcccaacaa ctcccccgcg cgccccgaga ccagtcgccc gaagacaccc 480
 cccaccatta tgggcecgct ggcaactcgc cccacgaccc gactcacctc aaagggacga 540
 cccttggttc cgacgcctca acataccccg ctgttctcgt tcctcaactgc ctcccccgcc 600
 ctggacaccc tcttcgtcgt cagcaccgtc atccacacct taticgtttt gtgtattggt 660
 gcgatggcga cacacctgtg tggcggttgg tccagacgcg ggcgacgcac acaccctagc 720
 gtgcgttacg tgtgcctgcc gtccgaacgc gggtag 756

<210>2

<211>717

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<400>2

atgtcgcagg ggcceatgcg tgccgttggt cccattatcc cattcctttt ggttcttgtc	60
ggtgtatcgg gggttcccac caacgtetec tccaccaccc aacccaact ccagaccacc	120
ggtcgtccct cgcatagaag cccaacatg acccagaccg gcaccaccga ctctcccacc	180
gccatcagcc ttaccacgce cgaccacaca cccccatgc caagtattgg actggaggag	240
gaggaagagg aggagggggc cggggacggc gaacatcttg aggggggaga tgggaccctg	300
gacaccctac cccagtccec gggcccagcc tccccgttgg ctgaggacgt cgagaaggac	360
aaaccaacc gtcccgtagt cccatcccc gatcccaaca actccccgc gcgcccag	420
accagtcgcc cgaagacacc ccccaccatt atcggggcgc tggcaactcg cccacgacc	480
cgactcacct caaaggagc acccttggtt ccgacgcctc aacatacccc gctgttctcg	540
ttcctcactg cctccccgc cctggacacc ctcttcgtcg tcagcaccgt catccacacc	600
ttatcgtttt tgtgtattgg tgcgatggcg acacacctgt gtggcggttg gtccagacgc	660
gggcgacgca cacaccctag cgtgcgttac gtgtgcctgc cgtccgaacg cgggtag	717

<210>3

<211>1071

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223> 糖蛋白 (US4) 基因片段

<400>3

ctcatggcct tgaccgagga cgcgtectec gattcgccta cgtccgctcc ggagaagacg	60
cccctccctg tgtcggccac cgccatggcg ccctcagtcg acccaagcgc ggaaccgacc	120
gccccgcaa cactactcc ccccgacgag atggccacac aagccgcaac ggtcgcctgt	180
acgccggagg aaacggcagt cgcctcccc ccccgactg catccgtgga gtcgtcgcca	240
cccccgccg cggcggcaac gcccggggcc gggcacacga acaccagcag cgctccgca	300
gcgaaaacgc cccccaccac accagcccc acgaccccc cgcccacgtc taccacgcg	360
acccccgcc ccacgactcc ggggccccaa acaaccctc ccggaccgc aacccgggt	420
ccggtgggcg cctcgcgcg gccacggcc gattcccccc tcaccgcctc gcccccgct	480
accgcgccgg ggccctcggc cgccaacgtt tcggtcgccg cgaccaccgc cacgccgga	540
accgggggca ccgcccgtac cccccaacg gaccacaaga cgcaccaca cggaccgcg	600
gacgtcccc ccgctcgcc agcccccca cccccgaac atcgcggcgg acccgaggag	660

tttgagggcg ccggggacgg cgaaccccc	gaggacgacg acagcgccac cggcctcgcc	720
ttccgaacte cgaacccccaa caaacccccc	cccgcgcgcc ccgggcccac ccgccccacg	780
ctcccgccag gaattcttgg gcegetegce	cccaacacgc ctcgcccccc cgcccaagct	840
cccgctaagg acatgcccctc gggecccaca	ccccaacaca tccccctggt ctggttccca	900
acggcctccc ctgctctaga tatectcttt	atcatcagca ccaccatcca cacggcggcg	960
ttcgtttgtc tggtegcctt ggcagcacia	ctttggcgcg gccgggcggg gcgcaggcga	1020
tacgcgcacc cgagcgtgcg ttacgtatgt	ctgccacccg agcgggatta g	1071

<210>4

<211>390

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<400>4

accaccccc gcgcgccccg ggcccacccg	ccccacgctc ccgccaggaa ttcttgggcc	60
gctcgcccc aacacgcctc gcccccccgc	ccaagctccc gctaaggaca tgccctcggg	120
ccccacacc caacacatcc ccctgtttctg	gttcctaacg gcctccccctg ctctagatat	180
cctctttate atcagcacca ccatccacac	ggcggcggtt gtttgtctgg tcgccttggc	240
agcacaactt tggcgcggcc gggcggggcg	caggcgatac gcgcacccga gcgtgcgtta	300
cgtatgtctg ccaccgagc gggattaggg	ggtgggggtg gggggcgaga aacgatgaag	360
gacgggaaag ggaacagcga ccaaatgtca		390

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>PCRL1.0

<400>5

gcggaattcg acccttggtt cc	22
--------------------------	----

<210>6

<211>22

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征	
<223>PCRR1.0	
<400>6	
gcgggatccc caaccaccac ac	22
<210>7	
<211>39	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGLP1.0-SDA 引物	
<400>7	
accgcatcga atgactgtctcgggctgttc tcgttcctc	39
<210>8	
<211>38	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGLP1.1-SDA 引物	
<400>8	
accgcatcga atgactgtct cgggctgttc tcgttcct	38
<210>9	
<211>40	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGRP1.0-SDA 引物	
<400>9	

cgattccgct ccagacttct cgggcaccaa tacacaaaa	40
<210>10	
<211>40	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGRP1. 0-SDA 引物	
<400>10	
cgattccgct ccagacttct cgggcaacaa tacacacaaa	40
<210>11	
<211>41	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGRP2. 0-SDA 引物	
<400>11	
cgattccgct ccagacttct cgggcaccaa tacacaaaa c	41
<210>12	
<211>41	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGRP2. 1-SDA 引物	
<400>12	
cgattccgct ccagacttct cgggcaacaa tacacacaaa c	41
<210>13	

- <211>42
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGRP3. 0-SDA 引物
- <400>13
 cgattccgct ccagacttct cgggcaccaa tacacaaaa cg 42
- <210>14
 <211>42
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGRP3. 1-SDA 引物
- <400>14
 cgattccgct ccagacttct cgggcaacaa tacacacaaa cg 42
- <210>15
 <211>41
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGRP4. 0-SDA 引物
- <400>15
 cgattccgct ccagacttct cgggcaatac acaaaaacga t 41
- <210>16
 <211>41
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1

- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGRP4.1-SDA 引物
- <400>16
 cgattccgct ccagacttct cgggcaatac acacaaacga t 41
- <210>17
 <211>41
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV 1GGRP4.2-SDA 引物
- <400>17
 cgattccgct ccagacttct cgggcaatac acacaaatga t 41
- <210>18
 <211>38
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGRP5.2-SDA 引物
- <400>18
 cgattccgct ccagacttct cgggaaggtg tggatgac 38
- <210>19
 <211>39
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -1
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV1GGAD1.0- 连接引物

<400>19
acgttagcca ccatacggat cegtcatecca cacettatc 39

<210>20

<211>39

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1GGAD2. 1- 连接引物

<400>20

acgttagcca ccatacggat ggacaccctc ttcgctgctc 39

<210>21

<211>39

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1GGAD3. 0- 连接引物

<400>21

acgttagcca ccatacttga ggacaccctc ttcgctgctc 39

<210>22

<211>37

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1GGAD3. 1- 连接引物

<400>22

acgttagcca ccatacttga ggacaccctc ttcgctgctc 37

<210>23

<211>15	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGLB1. 0- 缓冲引物	
<400>23	
gacgcctcaa catac	15
<210>24	
<211>14	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGRB1. 0- 缓冲引物	
<400>24	
gtgtgtcgcc atcg	14
<210>25	
<211>14	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV1GGLB1. 1- 缓冲引物	
<400>25	
aggtgtgtcg ccat	14
<210>26	
<211>71	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -1	

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1IAC8. 1-IAC 靶序列

<400>26

ctgtttctcgt tectcactgc ctcccccgcc ctggacaccc tcttgctgct gagcaccgtc 60
atccacacct t 71

<210>27

<211>71

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1IAC8. 7-IAC 靶序列

<400>27

ctgtttctcgt tectcactgc ctcccccgcc ctggacaccc tctgttcac tagcaccgtc 60
atccacacctt 71

<210>28

<211>39

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV1IACAD8. 1-IAC 连接引物

<400>28

actgatccgc actaacgact ggacaccctc ttgctgctg 39

<210>29

<211>39

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -1

<220>

- <221>misc_ 特征
<223>HSV1IACAD8. 7-IAC 连接引物
- <400>29
actgatccgc actaacgact ggacaccetc tgttcatct 39
- <210>30
<211>35
<212>DNA
<213> 人工
- <220>
<223> 合成检测引物
- <220>
<221>misc_ 特征
<223>TBD10. 2D/R- 检测引物
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(1).. (1)
<223>DABCYL
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(6).. (11)
<223>BsoBI 限制酶识别位点
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(15).. (15)
<223>ROX
- <400>30
tagcgcccga gcgctacgtt agccaccata cggat 35
- <210>31
<211>29
<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<223>TBD15D/R- 检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(1).. (1)

<223>DABCYL

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(3).. (8)

<223>BsoBI 限制酶识别位点

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(9).. (9)

<223>ROX

<400>31

tgcccagata cgtagccac catacggat 29

<210>32

<211>28

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<223>TBD16 (D/R)- 检测引物

<220>

- <221>misc_ 特征
<222>(1).. (1)
<223>DABCYL
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(3).. (7)
<223>BsoBI 限制酶识别位点
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(8).. (8)
<223>ROX
- <400>32
tcccaggtac gttagccacc atacggat 28
- <210>33
<211>29
<212>DNA
<213> 人工
- <220>
<223> 合成检测引物
<220>
<221>misc_ 特征
<223>MPC. DR- 检测引物
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(1).. (1)
<223>DABCYL
- <220>
<221>misc_ 特征
<222>(3).. (8)
<223>BsoBI 限制酶识别位点
- <220>

<221>misc_ 特征

<222>(9).. (9)

<223>ROX

<400>33

tccccgagta cgttagccac cataacttga 29

<210>34

<211>29

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<223>MPC2. FD- 检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(1).. (1)

<223>FAM

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(3).. (8)

<223>BsoBI 限制酶识别位点

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(9).. (9)

<223>DABCYL 染料

<400>34

tccccgagta ctgatccgca ctaacgact 29

<210>35

<211>28

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<223>Altd8 (F/D) - 检测引物

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(1).. (1)

<223>FAM

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(1).. (1)

<223>FAM

<220>

<221>misc_ 特征

<222>(3).. (7)

<223>BsoBI 限制酶识别位点

<400>35

acccgagtag ctatccgcca taagccat 28

<210>36

<211>23

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2PCRL-PCR 引物

<400>36

gcggaattca ttcttgggcc gct 23

- <210>37
 <211>23
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -2
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV2PCRR-PCR 引物
- <400>37
 gcgggatcca cgtaacgcac gct 23
- <210>38
 <211>39
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -2
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV2GGLP1.0-SDA 引物
- <400>38
 accgcatcga atgactgtct cgggctgttc tggttccta 39
- <210>39
 <211>40
 <212>DNA
 <213> 人单纯疱疹病毒 -2
- <220>
 <221>misc_ 特征
 <223>HSV2GGRP1.0-SDA 引物
- <400>39
 cgattccgct ccagacttct cgggcgacca gacaaacgaa 40
- <210>40
 <211>39
 <212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GGRP1.1-SDA 引物

<400>40

cgattccgct ccagacttct cgggaccaga caaacgaac 39

<210>41

<211>41

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GGRP1.2-SDA 引物

<400>41

cgattccgct ccagacttct cgggacgacca gacaaacgaa c 41

<210>42

<211>37

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GGRP2.0-SDA 引物

<400>42

cgattccgct ccagacttct cgggaacgcc gccgtgt 37

<210>43

<211>37

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GGRP5. 2-SDA 引物	
<400>43	
cgattccgct ccagacttct cgggcccgtgt ggatggt	37
<210>44	
<211>39	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2GGAD1. 0- 连接引物	
<400>44	
acgttagcca ccatacggat ccacatcca cacggcggc	39
<210>45	
<211>44	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2GGAD2. 0- 连接引物	
<400>45	
acgttagcca ccatacttga tgctctagat atcctcttta tcat	44
<210>46	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2GGLB1. 0- 缓冲引物	
<400>46	
cacaccccaa cacat	15

<210>47	
<211>14	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2GGRB1.0- 缓冲引物	
<400>47	
ttgtgctgcc aagg	14
<210>48	
<211>70	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2-IAC 5.2A1-IAC 靶序列	
<400>48	
ctgttctggt tectaacggc ctcccctgct ctagatatcc tctttactac cagcaccacc	60
atccacacgg	70
<210>49	
<211>70	
<212>DNA	
<213> 人单纯疱疹病毒 -2	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>HSV2-IAC 5.2A2-IAC 靶序列	
<400>49	
ctgttctggt tectaacggc ctcccctgct ctagatatcc tcttaactac cagcaccacc	60
atccacacgg	70

<210>50

<211>44

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GG IAC ADA1.0-IAC 连接引物

<400>50

actgatccgc actaacgact tgctctagat atcctcttta ctac

44

<210>51

<211>43

<212>DNA

<213> 人单纯疱疹病毒 -2

<220>

<221>misc_ 特征

<223>HSV2GG IAC ADA2.0-IAC 连接引物

<400>51

actgatccgc actaacgact tgctctagat atcctcttaa cta 43

<210>52

<211>6

<212>DNA

<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<220>

<221>misc_ 特征

<223>BsoBI 限制酶识别位点

<400>52

ctcggg

6

<210>53

<211>6

<212>DNA

<213> 嗜热脂肪芽孢杆菌

<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>BsoBI 限制酶识别位点	
<400>53	
cccggg	6
<210>54	
<211>6	
<212>DNA	
<213>嗜热脂肪芽孢杆菌	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>BsoBI 限制酶识别位点	
<400>54	
ctcgag	6
<210>55	
<211>6	
<212>DNA	
<213>嗜热脂肪芽孢杆菌	
<220>	
<221>misc_ 特征	
<223>BsoBI 限制酶识别位点	
<400>55	
cccgag	6

```

AAAAAGACCC CGACCCGCGT CTGTGGTGTT TTTGGCATCA TGTCGCCGGG 50
CGCCATGCGT GCCGTTGTTC CCATTATCCC ATTCCTTTTG GTTCTTGTCG 100
GTGTATCGGG GGTTCACACC AACGTCTCCT CCACCACCCA ACCCCAATC 150
CAGACCACCG GTCGTCCCTC GCATGAAGCC CCCAACATGA CCCAGACCGG 200
CACCACCGAC TCTCCACCG CCATCAGCCT TACCACGCC GACCACACAC 250
CCCCCATGCC AAGTATCGGA CTGGAGGAGG AGGA---AGA GGAGGAGGGG 300
GCCGGGGACG GCGAACATCT TGAGGGGGGA GATGGGACCC GTGACACCCT 350
ACCCAGTCC CCGGGCCAG CCTTCCCGTT GGCTGAGGAC GTCGAGAAGG 400
ACAAACCCAA CCGTCCCGTA GTCCCATCCC CCGATCCCAA CAACTCCCCC 450
GCGCGCCCCG AGACCAGTCG CCCGAAGACA CCCCCACCA TTATCGGGCC 500
GCTGGCAACT CGCCCCACGA CCCGACTCAC CTCAAAGGGA CGACCCTTGG 550
TTCCGACGCC TCAACATACC CCGCTGTTCT CGTTCCTCAC TGCCTCCCCC 600
GCCCTGGACA CCCTCTTCGT CGTCAGCACC GTCATCCACA CCTTATCGTT 650
TTTGTGTATT GGTGCGATGG CGACACACCT GTGTGGCGGT TGGTCCAGAC 700
GCGGGCGACG CACACACCCT AGCGTGCGTT ACGTGTGCCT GCCGTCCGAA 750
CGCGGGTAG 759

```

图 1

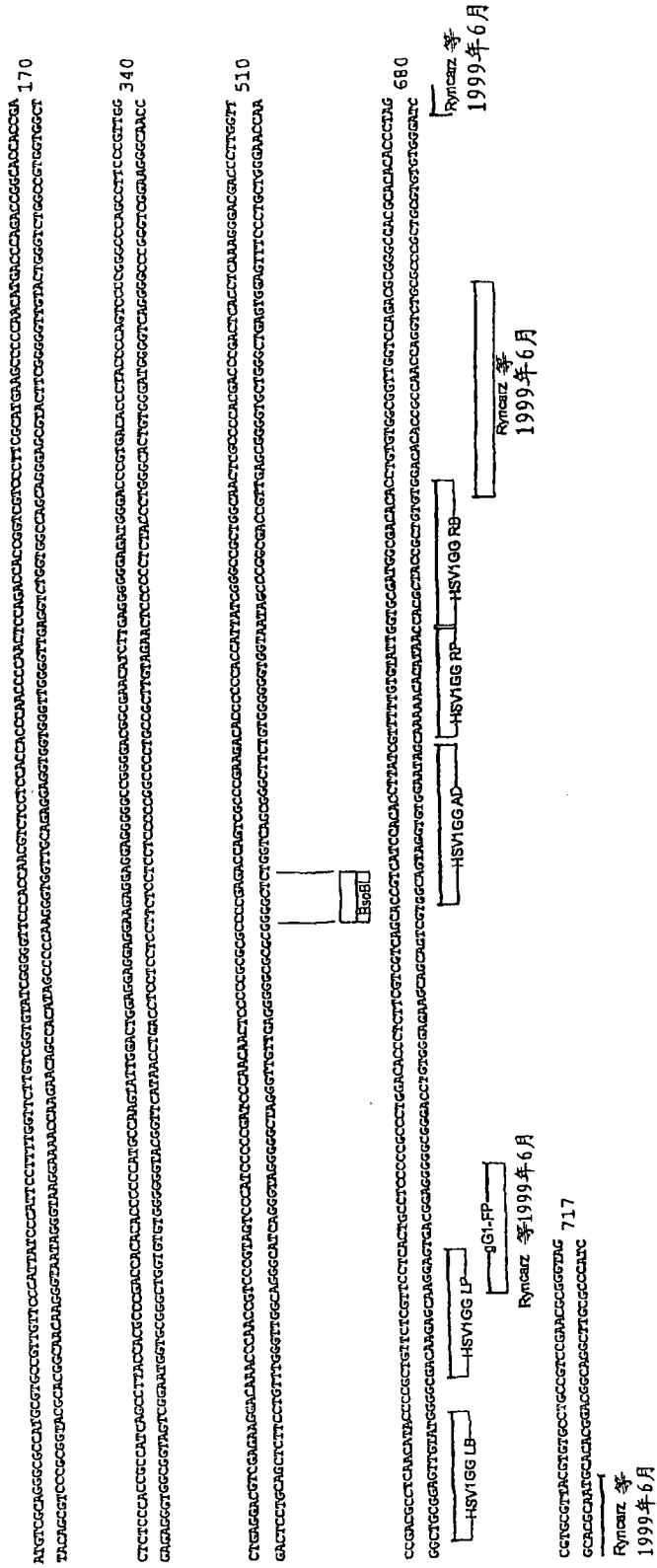


图 2

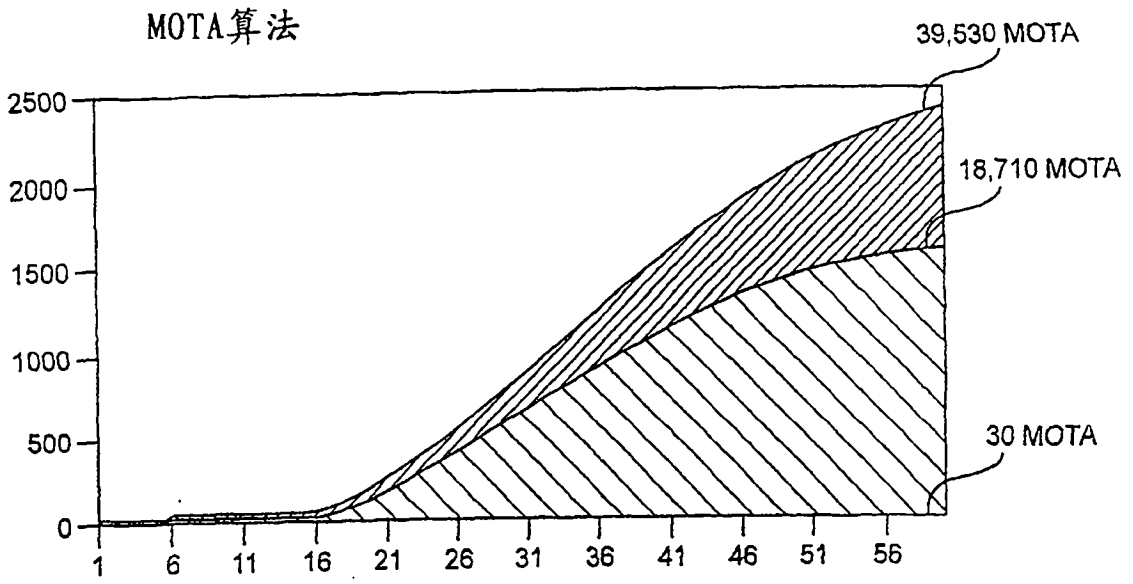


图 3

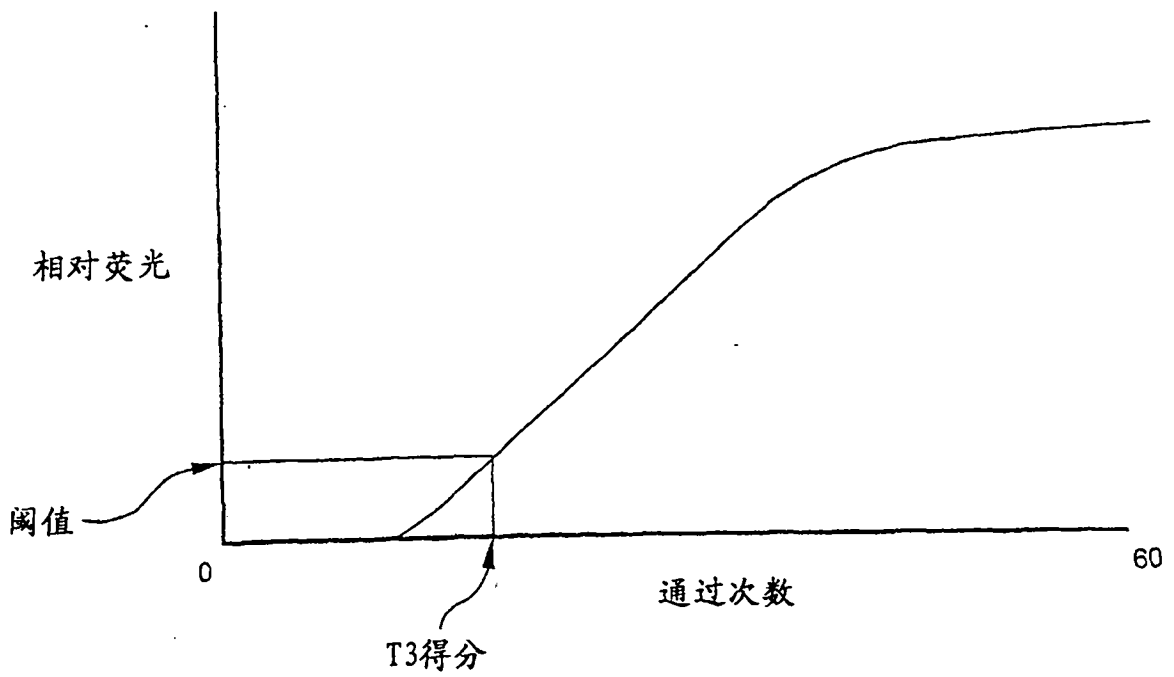


图 4

样品编号	储备溶液稀释液		
	1:10	1:1000	1:10000
OSU 0-2021			
OSU 0-450			
OSU 0-1010			
OSU 0-2526			
OSU 0-1753			
OSU D-8-1973			
OSU 7-370			
OSU 0116-3			
OSU 1136			
OSU A.P.			
ATCC VR-260			
ATCC VR-539			
DGX Clin1			
DGX Clin2			
DGX Clin3			
DGX Clin4			
DGX Clin5			
DGX Clin6			
DGX Clin7			
DGX Clin8			
DGX Clin9			
DGX Clin10			
DGX Clin19			
	阳性		
	阴性		
	可疑的实验室 污染物		

图 5

CTCATGGCCT	TGACCGAGGA	CGCGTCCTCC	GATTCGCCTA	CGTCCGCTCC	50
GGAGAAGACG	CCCCTCCCTG	TGTCGGCCAC	CGCCATGGCG	CCCTCAGTCG	100
ACCCAAGCGC	GGAACCGACC	GCCCCCGCAA	CCACTACTCC	CCCCGACGAG	150
ATGGCCACAC	AAGCCGCAAC	GGTCGCCGTT	ACGCCGGAGG	AAACGGCAGT	200
CGCCTCCCCG	CCCGCGACTG	CATCCGTGGA	GTCGTGCGCA	CCCCCGCCG	250
CGGCGGCAAC	GCCCGGGGCC	GGGCACACGA	ACACCAGCAG	CGCCTCCGCA	300
GCGAAAACGC	CCCCACCAC	ACCAGCCCC	ACGACCCCC	CGCCACGTC	350
TACCCACGCG	ACCCCCCGCC	CCACGACTCC	GGGGCCCCAA	ACAACCCCTC	400
CCGGACCCGC	AACCCCGGGT	CCGGTGGGCG	CCTCCGCCGC	GCCACGGCC	450
GATTCCCCC	TCACCGCCTC	GCCCCCGCT	ACCGCGCCGG	GGCCCTCGGC	500
CGCCAACGTT	TCGGTCGCCG	CGACCACCGC	CACGCCCGGA	ACCCGGGGCA	550
CCGCCCGTAC	CCCCCAACG	GACCCAAAGA	CGCACCACA	CGGACCCGCG	600
GACGCTCCCC	CCGGCTCGCC	AGCCCCCCA	CCCCCGAAC	ATCGCGGCGG	650
ACCCGAGGAG	TTTGAGGGCG	CCGGGGACGG	CGAACCCCC	GAGGACGACG	700
ACAGCGCCAC	CGGCCTCGCC	TTCCGAACTC	CGAACCCAA	CAAACCACCC	750
CCCGCGCGCC	CCGGGCCCAT	CCGCCCCACG	CTCCCGCCAG	GAATTCTTGG	800
GCCGCTCGCC	CCCAACACGC	CTCGCCCCC	CGCCCAAGCT	CCCGCTAAGG	850
ACATGCCCTC	GGGCCCCACA	CCCCAACACA	TCCCCCTGTT	CTGGTTCCTA	900
ACGGCCTCCC	CTGCTCTAGA	TATCCTCTTT	ATCATCAGCA	CCACCATCCA	950
CACGGCGGCG	TTCGTTTGTC	TGGTCGCCTT	GGCAGCACAA	CTTTGGCGCG	1000
GCCGGGCGGG	GCGCAGGCGA	TACGCGCACC	CGAGCGTGCG	TTACGTATGT	1050
CTGCCACCCG	AGCGGGATTA	G			1071

图 6

