(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3744548号
(P3744548)
(45)発行日　平成18年2月15日(2006.2.15)　(24)登録日　平成17年12月2日(2005.12.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 4　(全 23 頁)

(21)出願番号	特願平11-504519
(86)(22)出願日	平成10年6月4日(1998.6.4)
(65)公表番号	特表2000-512160(P2000-512160A)
(43)公表日	平成12年9月19日(2000.9.19)
(86)国際出願番号	PCT/US1998/011652
(87)国際公開番号	WO1998/058086
(87)国際公開日	平成10年12月23日(1998.12.23)
審査請求日	平成12年3月3日(2000.3.3)
(31)優先権主張番号	08/876,546
(32)優先日	平成9年6月16日(1997.6.16)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
アボツト・ラボラトリーズ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４―３５００、アボツト・パーク、アボツト・パーク・ロード・１００、チヤド・０３７７／エイ・ピー・６・デイ―２
(74)代理人
弁理士　川口　義雄
(74)代理人
弁理士　伏見　直哉
(74)代理人
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２を検出するための核酸プライマーおよびプローブ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＨＩＶ－１を検出するためのプライマー／プローブセット１（配列番号２、３および４）。

【請求項２】

試験試料中のＨＩＶの検出方法であって、該方法は

（ａ）核酸増幅試薬と、プライマー／プローブセット１と、ＨＩＶターゲット配列を含む試験試料とを含む反応混合液を調製する段階と、

（ｂ）該混合液を増幅条件下におき、ターゲット配列に相補的である核酸配列を少なくとも１コピー生産する段階と、

（ｃ）プローブをターゲット配列に相補的である核酸にハイブリダイズさせる段階と、

（ｄ）試験試料中にＨＩＶが存在することを示すものとしてハイブリッドを検出する段階と、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項３】

前記反応混合液が、プライマー／プローブセット５（配列番号１６、１７および１８）と、プライマー／プローブセット６（配列番号１９、２０および２１または２２）と、プライマー／プローブセット７（配列番号２３、２０および２１）と、プライマー／プローブセット８（配列番号１６、２４および１８）とからなる群より選択されるプライマー／プローブセットを更に含むことを特徴とする、請求項２に記載の方法。

【請求項４】
ａ）プライマー／プローブセット１と、
ｂ）核酸増幅試薬と、
を含む、ＨＩＶ－１を検出するためのキット。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明はＨＩＶに関する。特には、本発明はＨＩＶ１およびＨＩＶ２を検出するためのオリゴヌクレオチドおよび方法に関する。
発明の背景
ＨＩＶに分類されるウィルスは自らの遺伝情報としてのＲＮＡを有しており、ＨＩＶの感染性は、宿主のＤＮＡにその遺伝情報を挿入するというウィルスの能力に依るものである。遺伝情報を挿入し、その結果、宿主をうまく感染させるためには、ＨＩＶウィルスはその遺伝物質（ＲＮＡ）をＤＮＡに変換して、ＨＩＶの遺伝情報が宿主の遺伝情報と適合するようにしなければならない。ＡＩＤＳの流行を考えれば、明らかにＨＩＶは自らのＲＮＡをＤＮＡに変換することに成功している。しかしながら、ウィルスがうまくＲＮＡをＤＮＡに変換しうる一方で、その変換が正確に行われることは滅多にない。言い換えれば、ウィルスのＲＮＡのＤＮＡ複製物は常に正確であるとは限らず、ＤＮＡ複製物はウィルスのＲＮＡとは数塩基対異なっている場合がある。したがって、宿主が最初に単一のウィルス粒子に感染したとしても、何回かの複製の後には、遺伝的に多様なウィルス集団に感染することになる。
ＨＩＶは統一的に分類されていないものの、ＨＩＶ１とＨＩＶ２が異なるウィルスであることは一般に認められている。これら各ウィルスの分類としてはいくつかのグループまたはサブタイプがある。たとえば、ＨＩＶ１の分類としては、サブタイプＡ～Ｅにさらに分類される「グループＭ」と、「グループＯ」とがある。一方、ＨＩＶ２はサブタイプＡ～Ｅを含む。ＨＩＶ１およびＨＩＶ２のサブタイプは、本文中に記載するように、さらに多くのカテゴリーに細分化される。しかしながら、これらすべての分類はウィルス間の遺伝的差異に基づいており、分類学的理論によれば、これらのウィルスの多くは単一のウィルスの子孫である。したがって、多数のＨＩＶのタイプおよびサブタイプは、ＨＩＶの高い突然変異性およびＨＩＶゲノムの遺伝的多様性を実証するものである。
ウィルスの遺伝的多様性は、上述のようにウィルスが自らのＲＮＡをＤＮＡに変換するときの非効率さに起因するものと考えることができる。ウィルスの遺伝的多様性に関する他の理論は、上述のように宿主が複数の異なるＨＩＶ集団に感染することがあり（上述のように単一のウィルスによる感染から発することもある）、ウィルスの遺伝情報の複製とパッケージングの過程で、あるウィルスゲノムの一部分が別のウィルスゲノムの部分と組み換えられるというものである。したがって、組み換えられたゲノムのパッケージングによって、遺伝的に区別されるウィルスが生み出されることになる。ウィルスが突然変異するときの様式に関わらず、ＨＩＶとして知られるウィルスは非常に突然変異性の高いゲノムを有し、したがって常に変化し続けていることが分かる。このため、ウィルスの検出をその遺伝的情報に基づいて行おうとしている研究者は、常に動いているターゲットに直面することになる。
ＨＩＶゲノムのある領域が保存されていることが知られている。しかしながら、特にこれらの領域における突然変異が、該領域によってコードされるタンパク質の構造に影響を及ぼさなければ、これらの領域が突然変異を免れているとは言えない。したがって、ＨＩＶの遺伝情報に基づいてＨＩＶを検出するための試薬および方法の開発が引き続き課題となっている。
発明の要約
本発明は、ＨＩＶウィルスの遺伝情報に基づいて、ＨＩＶ（ＨＩＶ１およびＨＩＶ２の様々なサブタイプ）を検出するのに有用な試薬を提供する。特には、それらの試薬はプライマーとプローブのセットの形態のものであり、該試薬は核酸増幅法に従って使用することができ、様々なサブタイプのＨＩＶ１およびＨＩＶ２を特異的かつ高感度で検出する。好

適には、ここで提供されるプライマー／プローブセットは、２つのプライマー配列と１つのプローブ配列とを含み、逆転写酵素（ＲＴ）ＰＣＲフォーマットに従って使用される。ＨＩＶ１の検出に使用することのできる本発明のプライマー／プローブセットは、ここで、プライマー／プローブセット１（配列番号２、３および４）、プライマー／プローブセット２（配列番号５、６および７）、プライマー／プローブセット３（配列番号８、９、１０お１２、１３よび１１）、およびプライマー／プローブセット４（配列番号および１４）として定義する。ＨＩＶ２の検出に使用することのできるプライマー／プローブセットは、ここで、プライマー／プローブセット５（配列番号１６、１７および１８）、プライマー／プローブセット６（配列番号１９、２０および２１または２２）、プライマー／プローブセット７（配列番号２３、２０および２１）、およびプライマー／プローブセット８（配列番号１６、２４および１８）として定義する。

ＨＩＶの検出方法は、一般に以下の段階を含んで構成される。（ａ）核酸増幅試薬と、少なくとも１つの上記プライマー／プローブセットと、ＨＩＶターゲット配列を含む試料とを含む反応混合液を調製する。（ｂ）反応混合液を増幅条件下におき、ターゲット配列に相補的である核酸配列を少なくとも１コピー生産する。（ｃ）プローブをターゲット配列に相補的である核酸配列とハイブリダイズさせ、プローブとターゲット配列に相補する核酸配列とを含むハイブリッドを形成する。（ｄ）試料中にＨＩＶが存在することを示すハイブリッドを検出する。

好適な逆転写酵素ＰＣＲフォーマットは上記と同じ段階を含むが、増幅試薬が逆転写酵素活性を有する酵素を含む。さらに、本発明において提供されるいずれの方法によっても、ターゲット配列のコピー数を増やすために段階（ｂ）を複数回繰り返すことができる。段階（ｂ）は反応混合液の熱サイクル処理によって繰り返すことができることは、当業者によって理解されよう。

発明の詳細な説明

本発明において提供されるプライマー／プローブセットは、２つのプライマーと少なくとも１つのプローブとを含んで構成される。これらのプライマー／プローブセットは核酸増幅技術に従って使用することができる。したがって、いずれのプライマー／プローブセットのプライマーも、ターゲット配列を増幅するために使用することができる。ほとんどの場合、プローブはプライマーの１つによって生産されたターゲット配列の複製物とハイブリダイズし、増幅反応中に生産されるターゲット配列のあらゆる複製物の検出を容易にする。すべてのプライマー／プローブセットは、核酸増幅技術に従って使用され、ＨＩＶ１グループＭおよびグループＯ、並びに様々なサブタイプのＨＩＶ２を特異的かつ高感度で検出することができる。ＨＩＶ１のサブタイプを検出するためのプライマー／プローブセットを下記の表１に、ＨＩＶ２のサブタイプを検出するためのプライマー／プローブセットを下記の表２に示した。

表１

プライマー/プローブセット	配列（５’－３’）	配列番号
1	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	2
	CCTGCACTGTACCCCCCAATCC	3
	ACAGCAGTACAAATGGCA	4
2	GGAGCAGAAACTTTCTATGTAGATGG	5
	CATATTGTGAGTCTGTTACTATGTTTACT	6
	TAGGAAAAGCAGGATATG	7
3	GGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGT	8
	GGCCATTGTTTAACTTTTGGGCCATCCA	9
	ATTAGTCCTATTGAAACTGT	10
	ATAAGCCCCATAGCC	11
4	CCTAGTATAAACAATGAGACACCAGG	12
	GATCCTACATACAAGTCATCCATGTA	13
	GGATGGAAAGGATCACCA	14

表２

プライマー/プローブセット	配列（５’－３’）	配列番号
5	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTTAAAAG	16
	TTCCACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTG	17
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18
6	CCTCAATTCTCTCTTTGGAAAAGACC	19
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
	ATAGTAGCAGGAATAGA	22
7	CAATAGTAGCAGGAATAGAGTTAGG	23
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
8	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTTAAAAG	16
	CACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTGTAATAGAC	24
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18

前に触れたように、プライマー／プローブセットに含まれるプライマーは、配列番号２、３、５、６、８、９、１２および１３の場合にはＨＩＶ１ターゲット配列の複製物の合成を、配列番号１６、１７、１９、２０、２３および２４の場合にはＨＩＶ２ターゲット配列の複製物の合成を開始させるために使用することができる。残りの配列番号（配列番号

４、７、１０、１１、１４、１８、２１および２２）は、同一のプライマー／プローブセット内のプライマー配列のいずれか一方または両方の増幅産物とハイブリダイズする。たとえば、プライマー／プローブセット６は、配列番号１９および２０がＨＩＶ２ターゲット配列の合成を開始させ、配列番号２１および２２が配列番号１９および２０によって生産された増幅産物とハイブリダイズする限りにおいて、ＨＩＶ２に特異的である。したがって、プローブ配列は、ＨＩＶ１またはＨＩＶ２の様々なサブタイプに対しても特異的である。

プライマー配列は一般に、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）から成る。一方、プローブ配列は、ＤＮＡ、ＲＮＡまたは核酸アナログなどから成ってもよく、該核酸アナログは、たとえば、国際特許出願ＷＯ９２／２０７０２に開示されている、ペプチド核酸（ＰＮＡ）を含むがそれに限定されることはない無荷電の核酸アナログ、あるいは、ここで引用によって援用する米国特許第５，１８５，４４４号、第５，０３４，５０６号および第５，１４２，０４７号に記載されている、モルホリンアナログ（ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏ　ａｎａｌｏｇ）などである。そのような配列は、現在利用可能な様々な技術を用いて常套的に合成することができる。たとえば、ＤＮＡ配列は、従来のヌクレオチドホスホルアミダイト化学、および、アプライド・バイオシステムズ社（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｉｎｃ，　Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，　ＣＡ）、デュポン（Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，　ＤＥ）、またはミリゲン（Ｂｅｄｆｏｒｄ，　ＭＡ）より入手可能な装置を用いて合成することができる。同様に、配列は所望により、ここで引用によって援用する米国特許出願第５，４６４，７４６号、第５，４２４，４１４号、および第４，９４８，８８２号などに記載されているような、当該技術分野における周知の方法を用いて標識することもできる。

ここで用いる「ラベル」という用語は、検出可能な性質または特性を有する分子または部分を意味する。ラベルは、たとえば放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質、酵素、コロイド粒子、蛍光性微粒子などによる直接的に検出可能なものであってもよいし、あるいは、たとえば特異的に結合する要素などによって間接的に検出可能なものであってもよい。直接的に検出可能なラベルは、ラベルの検出を可能にする追加の成分、たとえば基質、引き金（トリガー）試薬、光線などを必要とすることもあることが理解されよう。間接的に検出可能なラベルを使用する場合、それらのラベルは典型的にはコンジュゲート（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）と組み合わせて使用される。コンジュゲートは、典型的には直接検出可能なラベルに、連結またはカップリングされた特異的結合要素である。コンジュゲートを合成するためのカップリング化学は当該技術分野において周知であり、たとえば、特異的結合要素の特異的結合特性またはラベルの検出可能特性を損なわないあらゆる化学的手段および／または物理的手段が含まれる。ここで用いる「特異的結合要素」とは、結合対、すなわち一方の分子がたとえば化学的または物理的手段を介して特異的に他方の分子に結合するような異なる分子の対の１要素を意味する。抗原抗体特異的結合対に加えて、他の特異的結合対としては、アビジンとビオチン、ハプテンとハプテンに特異的な抗体、相補的核酸配列、酵素補因子または基質と酵素などが含まれるが、これらに限定されることはない。

ここで用いる「試料」という用語は、ＨＩＶターゲット配列を含む疑いのあるあらゆるものを意味する。試験試料は、たとえば血液、眼球レンズ液、大脳脊椎液、乳汁、腹水、滑液、腹膜液、羊水、組織、発酵培養液、細胞培養物などのあらゆる生物学的起源に由来するものであるか、由来するものであることができる。試験試料は（ｉ）起源から得たものを直接、あるいは（ｉｉ）試料の性質改変するための前処理を行った形で使用することができる。したがって、試験試料は使用に先だって、たとえば、血液から血漿を調製する、細胞またはウィルス粒子を分離する、固体物質から液体を調製する、粘性の液を希釈する、液体を濾過する、液体を蒸留する、液体を濃縮する、干渉成分を不活性化する、試薬を添加する、核酸を精製するなどの方法で前処理することができる。

ここで用いる「ターゲット配列」という用語は、本発明で提供されるプライマー／プローブセットを用いて検出、増幅、あるいは検出および増幅される核酸配列を意味する。さら

に、ターゲット配列という用語は時として一本鎖のことを指すが、当業者であればターゲット配列が実際には二本鎖であってもよいことを理解するであろう。したがって、ターゲットが二本鎖である場合には、本発明のプライマー配列により、ターゲット配列の両方の鎖が増幅される。

先に述べたように、どの特定のプライマー／プローブセット（それら自身または付加的なオリゴヌクレオチドを有する）のプライマー配列も、当該技術分野において周知の核酸増幅法に従って増幅用プライマーとして使用することができる。そのような反応としては、米国特許第４，６８３，１９５号および第４，６８３，２０２号に記載されているポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ＥＰ－Ａ－３２０　３０８に記載されているリガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、および、米国特許第５，４２７，９３０号に記載されているギャップＬＣＲ（ＧＬＣＲ）などが含まれるが、これらに限定されることはない。上記文献はすべてここで引用によって援用する。上に例示したすべての増幅反応は包括して、ＤＮＡターゲット配列の複製物を複数生産する。

本発明に従えば、ターゲット配列は実際にＤＮＡであってもよいが、ＨＩＶゲノムがＲＮＡからなることを考慮すると、プライマー／プローブセットは、ここで引用によって援用する米国特許第５，３２２，７７０号および第５，３１０，６５２号に記載されている「ＲＴ　ＰＣＲ」フォーマットに従って使用してもよい。簡単に説明すると、ＲＴ　ＰＣＲはＲＮＡターゲット配列をＤＮＡ鎖に転写する方法を提供する。ＲＮＡターゲットから転写されて複製されたＤＮＡ鎖は、一般に「ｃＤＮＡ」と呼ばれ、上述のあらゆる方法による増幅のための鋳型として使用することができる。ｃＤＮＡの生産方法は、ＰＣＲなどの上述の他の増幅方法に関連するハイブリダイゼーションおよび伸長方法の多くと共通するものであるが、使用する酵素が逆転写酵素活性を有していなければならない。逆転写酵素活性を有する酵素はＲＴ　ＰＣＲ法とともに周知であり、これ以上の説明は必要ないであろう。さらに、ｃＤＮＡを合成するための別法も周知であり、これには、ここで引用によって援用する１９９５年２月２２日付で出願された、公知の米国特許出願番号０８／３５６，２８７が含まれる。

好適な実施態様によれば、プライマー／プローブセットは、ここで引用によって援用する１９９５年８月１４日付で出願された米国特許出願番号０８／５１４，７０４に記載されている「オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションＰＣＲ」（本文中では「ＯＨ　ＰＣＲ」と呼ぶ場合もある）増幅反応において使用する。簡単に説明すると、好適な方法において使用される試薬は、（プライマー／プローブセット１～８として示される）少なくとも１つのプライマー／プローブセット、ならびに増幅反応を行うための他の試薬を含む。「増幅反応を行うための他の試薬」または「核酸増幅試薬」は、周知の試薬を含み、ポリメラーゼ活性、酵素補因子（たとえばマグネシウム）、塩、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ）、およびデオキシヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰｓ）（たとえばデオキシアデニン三リン酸、デオキシグアニン三リン酸、デオキシシトシン三リン酸、およびデオキシチミン三リン酸）などを含んでいてもよいが、これらに限定されることはない。

好適な方法は一般に以下の段階（ａ）～（ｄ）を含む。（ａ）核酸増幅試薬と、少なくとも１つの本発明のプライマー／プローブセットと、ターゲット配列を含む疑いのある試料とを含む反応混合液を調製する。（ｂ）混合液を増幅条件下におき、ターゲット配列に相補的な核酸配列を少なくとも１コピー生成させる。（ｃ）プローブをターゲット配列に相補的な核酸配列とハイブリダイズさせ、プローブとターゲット配列に相補的な核酸配列とによるハイブリッドを形成させる。（ｄ）サンプル中にターゲット配列（ＨＩＶ）が存在することを示すものとしてのハイブリッドを検出する。上記方法において、段階（ｃ）に先だって、当該技術分野において周知のように、反応混合液の熱サイクルを１０～１００回、より典型的には２０～６０回行うことにより、段階（ｂ）を数回繰り返すことができることが理解されよう。

増幅条件は、一般に、１またはそれ以上の核酸配列のアニーリングおよび伸長を促進する条件として規定される。そのようなアニーリングは、かなり予測できるやり方で、温度、

配列の長さ、相補性、および配列のＧ：Ｃ含量を含むいくつかのパラメータ次第で変わることは、当該技術分野において周知である。たとえば、相補的核酸配列の置かれる環境中の温度を低くすることにより、アニーリングが促進される。任意の配列の組に対して、融解温度あるいはＴｍをいくつかの既知の方法によって見積もることができる。典型的には、診断用途においては、融解温度近く（すなわち１０℃以内）のハイブリダイゼーション温度を使用する。イオン強度または「塩」濃度もまた融解温度に影響を与える。これは、小さなカチオンがリン酸ジエステルのバックボーン上の負荷電を打ち消して二重らせんの形成を安定化させる傾向にあるためである。典型的な塩濃度はカチオンの性質と原子価に依存するが、当業者によって容易に理解されよう。同様に、Ｇ：Ｃ含量が高い場合と、配列の長さが長い場合にも二重らせんが安定化されることが知られている。これは、Ａ：Ｔ対が２つの水素結合しか持たないのに対し、Ｇ：Ｃ対は３つの水素結合を含んでいるためであり、また配列が長くなると配列同士を繋ぎ止めている水素結合の数も増加するためである。したがって、高いＧ：Ｃ含量および長い配列長は、融解温度を上昇させることによって、ハイブリダイゼーション条件に影響を与える。

任意の診断用途に対する配列が選択されると、Ｇ：Ｃ含量および配列長を知ることができ、ハイブリダイゼーション条件に包含されるものを正確に決定するためにこれらを考慮に入れることができる。イオン強度は典型的には酵素活性に対して最適化されるので、変化させることのできるパラメータは温度だけになる。一般に、ハイブリダイゼーション温度は、プライマーまたはプローブのＴｍ付近またはＴｍに選ばれる。したがって、ある特定のプライマー／プローブセットに対する適切なハイブリダイゼーション条件を得ることは、当業者の通常の知識の範囲にある。

ＯＨ　ＰＣＲ法によれば、プライマー、プローブ、および反応条件は、プローブ配列がプライマー配列よりも低い融解温度を有し、反応混合液を増幅条件においた場合に、プローブのＴｍよりも高い温度でターゲット配列の複製物またはその相補物（アンプリコンと呼ばれる場合もある）が生産されるように選択することが好ましい。そのような複製物が合成された後、それらを変性させて混合液を冷却し、プローブと、ターゲットの複製物またはその相補物との間でハイブリッドを形成させる。温度を変性温度からプローブが一本鎖複製物と結合する温度まで低下させる速度は、好適には、たとえば約８分～約１５分とかなり速く、好適には２分未満である。このように急速に冷却することは、アンプリコンの相補鎖間でのハイブリッド形成ではなく、たとえばターゲット配列の複製物とプローブの間でのハイブリッド形成にとって有利である。

プライマー配列産物を検出するためにラベルを使用する場合には、捕捉ラベルまたは検出ラベルのいずれかでプライマー配列を標識する。プローブ配列は、プライマー配列によって生産された配列とハイブリダイズさせるために使用され、典型的にはプライマー配列を含まない配列とハイブリダイズする。プライマー配列の場合と同様に、プローブ配列もまた捕捉ラベルまたは原子価を有する検出ラベルのいずれかでラベルされる。プローブのラベルは、プライマーが捕捉ラベルでラベルされている場合には検出ラベルであり、逆にプライマーが検出ラベルでラベルされている場合には捕捉ラベルである。検出ラベルは前に定義した「ラベル」と同一の定義のものであり、「捕捉ラベル」は典型的には、伸長産物および他の増幅反応物に由来する副産物と結合したプローブを分離するために用いられる。（前に定義した）特異的結合要素がこの目的のために特に適している。また、本方法に従って使用されるプローブは、ハイブリダイゼーション条件下で伸長しないように、３’末端においてブロックされていることが好ましい。プローブの伸長を防止する方法は周知であり、当業者による選択事項である。典型的には、プローブの３’末端にリン酸基を添加するだけで、プローブの伸長を阻止する目的に対しては十分である。

複製配列／プローブハイブリッドが形成されると、複製配列およびプローブ配列上の異なるラベル（すなわち捕捉ラベルと検出ラベル）を用いて、そのようなハイブリッドを分離、検出することができる。好ましくは、検出は市販のＡｂｂｏｔｔ　ＬＣｘ（登録商標）機器（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；　Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，　ＩＬ）によって用いられるプロトコールに従って行う。

前に検討したように、ターゲット配列はＤＮＡであってもよいし、ターゲット配列はＨＩＶゲノム中に埋め込まれていてもよく、したがってターゲット配列はＲＮＡの形であってもよい。ターゲット配列がＨＩＶゲノムの一部である場合には、いわゆる核酸増幅試薬の一部として逆転写酵素活性を有する酵素を含め、続く増幅反応のためにｃＤＮＡを生産することが好ましい。本実施態様によれば、プライマー配列はｃＤＮＡ合成のためのプライマーとしての役割も果たす。本発明では、ｃＤＮＡの生産、次に増幅、そして増幅されたｃＤＮＡ配列の検出というように段階を区別したが、これらのプロセスを１つの増幅反応混合液中で同時に行ってもよいことが理解されよう。

他の実施態様によれば、２つのプライマー／プローブセットの組み合わせ（一方はＨＩＶ１特異的プライマー／プローブセットから選ばれ、他方はＨＩＶ２特異的プライマー／プローブセットから選ばれる）を用いた１つの反応において、ＨＩＶ１およびＨＩＶ２を同時に検出することができる。たとえば、試験試料を、逆転写酵素活性を有する酵素を含んでいても含んでいなくてもよい増幅試薬とともにプライマー／プローブセット１および８に接触させて、増幅を行い、試験試料中のＨＩＶ１およびＨＩＶ２の存在を検出することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドは、ＨＩＶ１またはＨＩＶ２を検出するための有用なキットの一部として提供されることもできる。このキットは、本発明による１またはそれ以上のプライマー／プローブセットを収容する１またはそれ以上の適切な容器と、ポリメラーゼ活性を有する酵素と、デオキシヌクレオチド三リン酸と、任意に逆転写酵素活性を有する酵素とを含んで構成される。典型的には、少なくとも１つの配列がラベルを持つが、ラベルなしでも検出は可能である。

以下の実施例は、本発明をさらに説明するためのものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

以下の実施例では、本発明において提供されるプライマー／プローブセットを用いてＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２の様々なサブタイプが検出されることを実証する。プライマー／プローブセットを構成するＤＮＡプライマーおよびプローブは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、および、配列番号２４として同定される。配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、および、配列番号１４はＨＩＶ－１に対して特異的である。ＨＩＶ－１（サブタイプＢ、ＭＮ株）からの代表的なターゲット配列をここで配列番号１として定義する。配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、および、配列番号２４はＨＩＶ－２に対して特異的である。ＨＩＶ－２（サブタイプＡ、ＮＩＨ－Ｚ株）からの代表的なターゲット配列をここで配列番号１５として定義する。すべてのプライマーおよびプローブは、３１個のＨＩＶ－１グループＭ（サブタイプＡ、ＢおよびＤ）およびグループＯの単離体に由来するコンセンサス配列であり、またＨＩＶ－２配列についてはサブタイプＡおよびＢの両方の単離体に由来するコンセンサス配列である。

以下の実施例においては、配列番号２、配列番号３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１２、および、配列番号１３をＨＩＶ－１ターゲット配列に特異的なコンセンサス増幅プライマーとして使用する。配列番号４、配列番号７、配列番号１０、配列番号１１、および配列番号１４をＨＩＶ－１増幅産物に対するコンセンサス内部ハイブリダイゼーションプローブとして使用する。配列番号１６、配列番号１７、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２３、および配列番号２４を、ＨＩＶ－２ターゲット配列に対して特異的なコンセンサス増幅プライマーとして、また、配列番号１８、配列番号２１および配列番号２２を、ＨＩＶ－２増幅産物に対するコンセンサス内部ハイブリダイゼーションプローブとして使用する。

実施例１

ＨＩＶプライマーおよびプローブの調製

Ａ．ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２のコンセンサスプライマー

コンセンサスプライマーは、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションＰＣＲによって、すべての既知のＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２を検出するように設計した。ＨＩＶ－１に対しては配列番号２、配列番号３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１２、および配列番号１３のプライマーを作製し、ＨＩＶ－２に対しては、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２３、および配列番号２４を作製した。プライマー配列は標準的なオリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成し、ここで引用によって援用する米国特許第５，４２４，４１４号に記載されている標準的なシアノエチルホスホルアミダイト結合化学を用いて、該プライマー配列の５’末端をアダマンタンによってハプテン化した。

Ｂ．ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２のコンセンサスプローブ

コンセンサスプローブは、増幅されたＨＩＶターゲット配列とオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによってハイブリダイズするように設計した。ＨＩＶ－１に対しては配列番号４、配列番号７、配列番号１０、配列番号１１、および配列番号１４のプローブを作製し、ＨＩＶ－２に対しては、配列番号１８、配列番号２１、および配列番号２２を作製した。プローブ配列は標準的なオリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成し、（ここで引用によって含める）米国特許第５，４６４，７４６号に記載されている標準的なシアノエチルホスホルアミダイト結合化学を用いて、該プローブ配列の５’末端を２つのカルバゾールによってハプテン化し、３’末端をリン酸によってブロックした。

実施例２

ＨＩＶ－１検出の感度

ＨＩＶ－１のサブタイプＢは、欧州および米国において最も一般的なＨＩＶ－１株であると報告されているので、この株を種々のＨＩＶ－１のコンセンサスプライマー／プローブセットの感度を調べるために使用した。ＲＮＡは、勾配精製したＨＩＶ－１のサブタイプＢビリオンから、製造業者（キアゲン，　Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，　Ｇｅｒｍａｎｙ）の説明に従って、キアゲンＲＮＡ抽出法およびカラム技法を用いて単離した。ＲＮＡを１ミリリットル当たりのウィルスＲＮＡのコピー数として定量し、検出に適した濃度まで、１ｎｇ／μｌのリボゾームＲＮＡ中に希釈した。

以下に示す４つの異なるＨＩＶ－１コンセンサスプライマー／プローブセットについて評価を行った。セット＃１：配列番号２および３をプライマーとして用い、配列番号４をプローブとして用いたもの。セット＃２：配列番号５および６をプライマーとして用い、配列番号７をプローブとして用いたもの。セット＃３：配列番号８および９をプライマーとして用い、配列番号１０および１１をプローブとして用いたもの。セット＃４：配列番号１２および１３をプライマーとして用い、配列番号１４をプローブとして用いたもの。すべての配列は実施例１に記載したようにして調製した。

上記４種のＨＩＶ－１コンセンサスプライマー／プローブセットに対して別々の準備された反応系を用いて、精製ＨＩＶ－１　ＲＮＡの希釈液の逆転写、ＰＣＲ増幅および検出を行った。ＲＴ－ＰＣＲは、５０ｍＭビシン、ｐＨ　８．２５、１１５ｍＭ酢酸カリウム、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、８％グリセロール、１０μｇ／μｌウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、および０．０２％アジ化ナトリウムを用いて行った。組換えサーマス・サーモフィラス（Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ポリメラーゼを１反応あたり５ユニットの濃度で用い、ｄＮＴＰ（ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰおよびｄＣＴＰ）をそれぞれの最終濃度が０．１５ｍＭとなるように共存させた。プライマーはそれぞれ５００ｎＭの濃度で使用し、プローブはそれぞれ１０ｎＭの濃度で使用した。２５～５０μｌ容積の試料を含む全容積０．２ｍｌの反応溶液に対して、最終濃度が２．５ｍＭとなるように$MnCl_2$を使用した。反応溶液中に１００ｎｇのリボゾームＲＮＡのみを含むものを陰性対照とした。

反応混合液の逆転写および増幅は、パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）４８

０型サーマルサイクラー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　４８０　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ）中で行った。まず最初に反応混合液を６２℃で３０分間インキュベートしてＲＮＡの逆転写を行った後、９４℃に３０秒間保持した。その後、増幅の初期段階における反応の厳密さを確保するためにタッチダウンまたはステップダウンプロトコールを介して、ＰＣＲ増幅を開始した。このプロトコールでは、以下の８サイクルを記載の順序で用いた。７０℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６９℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６８℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６７℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６６℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６５℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６４℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。６３℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクル。その後、６２℃、８０秒間→９４℃、３０秒間を１サイクルとして、このサイクルを３５サイクル繰り返し、さらなる増幅を行った。熱サイクルの終了後、混合液を９７℃で１５分間保持し、２分以内に温度を４℃まで低下させることにより、プローブオリゴハイブリダイゼーションを行った。反応産物の検出を行うまで、試料は４℃に保持した。

反応産物はＡｂｂｏｔｔ　ＬＣｘ（登録商標）システム（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，　ＩＬより入手可）上で検出した。抗カルバゾール抗体で被覆された微粒子の懸濁液と、抗アダマンタン抗体／アルカリホスファターゼコンジュゲート（これらはすべてＡｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，　ＩＬより市販されている）とを、ＬＣｘ（登録商標）との結合に使用し、反応産物を捕捉、検出した。使用した酵素基質はメチルウンベリフェリルホスフェート（ＭＵＰ）であり、ＭＵＰからＭＵ（メチルウンベリフェロン）への変換速度を、数／秒／秒（ｃ／ｓ／ｓ）として表した。

本実験から得られたデータを表３に示す。これらのデータは、ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット１、２および３を用いた場合には１０分子／検定（モル／検定）の濃度までＨＩＶ－１のサブタイプＢの検出が可能であるが、プライマー／プローブセット４を用いた場合には１００分子／検定までしか検出できないことを示している。

表３

[HIV-1] (モル／検定)	セット#２ LCx(登録商標) 速度	セット#２ LCx(登録商標) 速度	セット#３ LCx(登録商標) 速度	セット#４ LCx(登録商標) 速度
10,000	2485.4	1389.6	1179.6	1459.3
1000	2323.8	1370.4	1061.1	892.6
100	1452.7	1358.2	605.2	211.9
10	490.0	853.3	440.6	73.8
0	33.0	18.7	48.1	59.7

実施例３

ＨＩＶ－２検出の感度

種々のＨＩＶ－２コンセンサスプライマー／プローブセットの感度を調べるために、ＨＩＶ－２のサブタイプＡを使用した。ＲＮＡは、勾配精製したＨＩＶ－２のサブタイプＡビリオン（ＨＩＶ－2_{NIHZ}，Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．，　Ｃｏｌｕｍｂｉａ，　ＭＤ）から、製造業者（キアゲン，　Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，　Ｇｅｒｍａｎｙ）の説明に従って、キアゲンＲＮＡ抽出法およびカラム技法を用いて単離した。ＲＮＡは、最初に電子顕微鏡で定量しておいたビリオンから精製した。得られた精製ＲＮＡは、１ｎｇ／μｌのリボゾームＲＮＡ中に検出に適切な濃度まで希釈した。

以下に示す３つの異なるＨＩＶ－２コンセンサスプライマー／プローブセットについて評

価を行った。セット＃５：配列番号１６および１７をプライマーとして用い、配列番号１８をプローブとして用いたもの。セット＃６：配列番号１９および２０をプライマーとして用い、配列番号２２をプローブとして用いたもの（配列番号２１をプローブとして単独で、あるいは配列番号２２と組み合わせて使用することもできる）。セット＃７：配列番号２０および２３をプライマーとして用い、配列番号２１をプローブとして用いたもの。すべての配列は実施例１に記載したようにして調製した。

実施例２の記載と同様にして、別個の反応系として３種のＨＩＶ－２コンセンサスプライマー／プローブセットを用いた反応混合液を調製し、逆転写および増幅を行った後、検出を行った。

表４に示した結果は、ＨＩＶ－２プライマー／プローブセット５および６を用いた場合には１分子／検定（モル／検定）の濃度までＨＩＶ－２の検出が可能であるが、プライマー／プローブセット７を用いた場合には１００分子／検定までしか検出できないことを示している。

表 4

[ＨＩＶ-2] (モル／検定)	セット＃５ LCx(登録商標) 速度	セット＃６ LCx(登録商標) 速度	セット＃７ LCx(登録商標) 速度
10,000	2254.3	1427.3	501.1
1000	2310.5	1309.6	541.2
100	2290.6	1084.9	343.6
10	1967.5	750.3	75.1
1	1116.9	371.4	49.0
0	28.4	78.6	48.1

実施例４

ＨＩＶ－１サブタイプの検出

ＨＩＶの遺伝的多様性は検出に対して最も問題となる事項である。検定では、最も広範に多様化したサブタイプ「Ｏ」を含むすべてのサブタイプを正確に検出することが必要とされる。血清試料は、ＨＩＶ－１のサブタイプＡ～ＦのＤｉｇｅｎｅ（Ｓｌｉｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ ＭＤ）および、ＨＩＶ－１のサブタイプＯの２つの単離体より得た。各単離体からキアゲンカラムを用いてウィルスＲＮＡを抽出、精製した。方法は製造業者（キアゲン, Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ, Ｇｅｒｍａｎｙ）の説明に従った。ＲＮＡを１ミリリットル当たりのウィルスＲＮＡのコピー数として定量し、検出のために１ｎｇ／μｌのリボゾームＲＮＡによって１０倍連続希釈を行った。表５は、各サブタイプに対する各希釈試料において使用したＲＮＡ（分子／検定）の量を示している。

表 5

	ＲＮＡ（分子／検定）				
	試料の希釈率				
ＨＩＶ－１サブタイプ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
A	1737	173	17.3	1.73	0.17
B	890	89	8.9	0.89	0.09
C	247	24.7	2.47	0.25	0.03
D	20,700	2070	207	20.7	2.07
E	7170	717	71.7	7.17	0.72
F	24,000	2400	240	24	2.4
HAM O	66,460	6646	664.6	66.46	6.65
ＬＡ O	149,000	14,900	1490	149	14.9

別個の反応系において４つの異なるコンセンサスプライマー／プローブセットを用いて、実施例２に記載のように、種々のＨＩＶ－１サブタイプからのＲＮＡ試料の逆転写、増幅および検出を行った。サブタイプＯはＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃１のみを用いて試験した。以下の表６～９に試験の結果を示す。

表 6

	ＨＩＶ－１セット＃１によるＬＣｘ（登録商標）速度（c/s/s）				
	試料の希釈率				
ＨＩＶ－１サブタイプ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
A	1995	1530	559	45	37
B	2103	1979	750	31	27
C	740	135	133	26	24
D	1988	2042	1907	1226	528
E	2040	1954	1584	661	71
F	2027	1967	1871	1116	461
HAM O	1315	1389	1507	1224	138
ＬＡ O	1206	1413	1509	1403	650

ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃１により、広範に多様化したサブタイプＯを含む上記表６中の試験したすべてのＨＩＶ－１サブタイプが、１００～１分子／検定の感度範囲で検出された。

表７

	ＨＩＶ－１セット＃２によるＬＣｘ（登録商標）速度（ｃ／ｓ／ｓ）				
	試料の希釈率				
ＨＩＶ－１サブタイプ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Ａ	1218	1207	790	165	34
Ｂ	1597	1873	1544	380	20
Ｃ	569	30	*	*	*
Ｄ	1864	1866	1796	1246	636
Ｅ	931	949	856	406	61
Ｆ	1872	1838	1882	1807	1063

ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃２により、上記表７中の試験したすべてのＨＩＶ－１サブタイプが、ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃１と同様の感度で検出された。

表８

	ＨＩＶ－１セット＃３				
	試料の希釈率				
ＨＩＶ－１サブタイプ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Ａ	＋	＋	－	－	－
Ｂ	＋	－	－	－	－
Ｃ	－	－	－	－	
Ｄ	ＮＤ	＋	＋／－	－	－
Ｅ	＋	＋	－	－	－
Ｆ	ＮＤ	＋	＋	＋	－

（ＮＤ＝測定せず）

ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃３により、上記表８中の試験した６つのＨＩＶ－１サブタイプのうち５つのサブタイプが検出され、検出の感度は約２００モル／検定であった。

表９

	ＨＩＶ－１セット＃４				
	試料の希釈率				
ＨＩＶ－１サブタイプ	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Ａ	－	－	－	－	－
Ｂ	＋	－	－	－	－
Ｃ	－	－	－	－	ＮＤ
Ｄ	＋	＋	＋	－	－
Ｅ	＋	＋	＋／－	－	－
Ｆ	＋	－	－	－	－

（ＮＤ＝測定せず）

ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃４により、上記表９中の試験した６つのＨＩＶ－１サブタイプのうち４つのサブタイプが検出され、検出の感度は２０００～２００モル／検定であった。

実施例５

ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２プライマー／プローブセットの特異性

ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃１および＃２の、ＨＩＶ－１のサブタイプＢ（ＭＮ株および３Ｂ株）から抽出、精製したＲＮＡに対する特異性、および実施例４と同様のＨＩＶ－２血清試料に対する特異性を調べた。２つの異なるＨＩＶ－１コンセンサスプライマー／プローブセットを使用して、別個の反応系において、実施例２に記載したようなＲＮＡ試料の１：１０希釈液に対する逆転写、増幅および検出を行った。表１０に示されるように、どちらのＨＩＶ－１プライマー／プローブセットも、両方のＨＩＶ－１　ＲＮＡを検出したが、ＨＩＶ－２血清からＲＮＡは検出しなかった。このことは、ＨＩＶ－１プライマー／プローブセットがＨＩＶ－１の検出に特異的であり、ＨＩＶ－２とは交差反応せず、ＨＩＶ－２を検出しないことを示す。

表１０

ＲＮＡ試料	ＨＩＶ－１セット＃１ ＬＣｘ（登録商標） 速度	ＨＩＶ－１セット＃２ ＬＣｘ（登録商標） 速度
ＨＩＶ－1_{MN}	2317	1321
ＨＩＶ－1_{3B}	2366	1395
ＨＩＶ－２	109	19

次にＨＩＶ－２プライマー／プローブセット＃５の、実施例２のような勾配精製ＨＩＶ－１から単離したＲＮＡに対する特異性を調べた。精製ＨＩＶ－１　ＲＮＡの希釈液に対し、ＨＩＶ－２コンセンサスプライマー／プローブセット＃５を用いて実施例２のように、

逆転写、ＰＣＲ増幅、および検出を行った。対照として、別の反応系においてＨＩＶ－１コンセンサスプライマー／プローブセット＃１を使用した。表１１の結果は、ＨＩＶ－２プライマー／プローブセット＃５はＨＩＶ－１のＲＮＡと交差反応せず、ＨＩＶ－１　ＲＮＡを検出しないことを示している。

表１１

[ＨＩＶ－１] (モル／検定)	セット＃１ ＬＣｘ（登録商標） 速度	セット＃５ ＬＣｘ（登録商標） 速度
1,000,000	1792	16
100,000	1819	15
10,000	1812	16
1000	1823	15
100	1714	15
10	517	15
0	27	16

実施例６

ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２プライマー／プローブによるＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２の検出

２つの別個の反応ではなく、１つの反応においてＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２の両方を検出することを可能にするために、ＨＩＶ－１に対するプライマー／プローブセットとＨＩＶ－２に対するプライマー／プローブセットとを同じ反応において使用することが当然考えられる。これが実現可能であるかどうかは、ＨＩＶ－１に対するプライマー／プローブセットとＨＩＶ－２に対するプライマー／プローブセットとを混合し、これを用いてＨＩＶ－１またはＨＩＶ－２のいずれかの精製ＲＮＡを検出することによって試験した。

ＨＩＶ－１　ＲＮＡおよびＨＩＶ－２　ＲＮＡは、それぞれ実施例２および３のようにして精製、定量した。ＨＩＶ－１プライマー／プローブセット＃１と、実施例１に記載のようにして調製した、プライマーとしての配列番号１６および２４およびプローブとしての配列番号１８から成るＨＩＶ－２プライマー／プローブセット＃８とを、一緒に、あるいは別個に使用して、実施例２に記載したようにして、精製ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２ＲＮＡの希釈液に対する逆転写、増幅、および検出を行った。結果を表１２に示す。

表１２

[HIV−1] (モル/検定)	ＨＩＶ－１ LCx (登録商標) 速度	HIV−1/2 LCx (登録商標) 速度	[HIV−2] (モル/検定)	ＨＩＶ－１ LCx (登録商標) 速度	HIV−1/2 LCx (登録商標) 速度
10,000	2114.5	1858.3	10,000	2094.1	2261.6
1000	1708.0	1550.2	1000	2209.2	1966.8
100	680.8	539.6	100	2216.2	1066.6
10	112.6	151.0	10	1879.8	254.9
1	ＮＤ	ＮＤ	1	805	66.8
0	50.4	74.5	0	31	90.4

（ＮＤ＝測定せず）

ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２にプライマー／プローブセットを同一の反応混合物において使用した場合、ＨＩＶ－２の検出にはｌｏｇ１～１．５の低下が見られたが、感度に関しては１反応あたり約１０分子と許容範囲に保たれていた。重要なのは、ＨＩＶ－１の反応混合物中に、ＨＩＶ－１プライマー／プローブセットとＨＩＶ－２プライマー／プローブセットを共存させても、ＨＩＶ－２の検出に変化は無く、感度も１反応あたり約１０分子に維持されていたことである。

本発明を詳細に、また特別な実施態様を参照しながら説明してきたが、本発明の精神と範囲を逸脱しない限りにおいて、そのような実施態様に対して様々な変更および改変ができることは当業者にとって明らかであろう。

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：２３４８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムＲＮＡ　（ＨＩＶ－１）

配列

```
ACAGTATTAG TAGGACCTAC ACCTGTCAAC ATAATTGGAA GAAATCTGTT    50
GACTCAGCTT GGGTGCACTT TAAATTTTCC CATTAGTCCT ATTGAAACTG   100
TACCAGTAAA ATTAAAGCCA GGAATGGATG GCCCAAAAGT TAAACAATGG   150
CCATTGACAG AAGAAAAAAT AAAAGCATTA ATAGAAATTT GTACAGAAAT   200
GGAAAAGGAA GGGAAAATTT CAAAAATTGG GCCTGAAAAT CCATACAATA   250
CTCCAGTATT TGCCATAAAG AAAAAAGACA GTACTAAATG GAGAAAATTA   300
GTAGATTTCA GAGAACTTAA TAAGAAAACT CAAGACTTCT GGGAAGTTCA   350
ATTAGGAATA CCACATCCTG CAGGGTTAAA AAAGAAAAAA TCAGTAACAG   400
TACTGGATGT GGGTGATGCA TATTTTTCAG TTCCCTTAGA TAAAGACTTC   450
AGGAAGTATA CTGCATTTAC CATACCTAGT ATAAACAATG AAACACCAGG   500
GATTAGATAT CAGTACAATG TGCTTCCACA GGGATGGAAA GGATCACCAG   550
CAATATTCCA AAGTAGCATG ACAAAAATCT TAGAGCCTTT TAGAAAACAA   600
AATCCAGACA TAGTTATCTA TCAATACATG GATGATTTGT ATGTAGGATC   650
TGACTTAGAA ATAGGGCAGC ATAGAGCAAA AATAGAGGAA CTGAGACGAC   700
ATCTGTTGAG GTGGGGATTT ACCACACCAG ACAAAAAACA TCAGAAAGAA   750
CCTCCATTCC TTTGGATGGG TTATGAACTC CATCCTGATA AATGGACAGT   800
ACAGCCTATA GTGCTACCAG AAAAAGACAG CTGGACTGTC AATGACATAC   850
AGAAGTTAGT GGGAAAATTG AATTGGGCAA GTCAGATTTA CGCAGGGATT   900
AAAGTAAAGC AATTATGTAA ACTCCTTAGA GGAACCAAAG CACTAACAGA   950
AGTAATACCA CTAACAGAAG AAGCAGAGCT AGAACTGGCA GAAAACAGGG  1000
AAATTCTAAA AGAACCAGTA CATGGAGTGT ATTATGACCC ATCAAAAGAC  1050
TTAATAGCAG AAGTACAGAA GCAGGGGCAA GGCCAATGGA CATATCAAAT  1100
TTATCAAGAG CCATTTAAAA ATCTGAAAAC AGGCAAATAT GCAAGAATGA  1150
GGGGTGCCCA CACTAATGAT GTAAAACAAT TAACAGAGGC AGTGCAAAAA  1200
ATAGCCACAG AAAGCATAGT AATATGGGGA AAGACTCCTA AATTTAGACT  1250
ACCCATACAA AAAGAAACAT GGGAAACATG GTGGACAGAG TATACGTAAG  1300
CCACCTGGAT TCCTGAGTGG GAGGTTGTCA ATACCCCTCC CTTAGTGAAA  1350
TTATGGTACC AGTTAGAGAA AGAACCCATA GTAGGTGCAG AAACTTTCTA  1400
TGTAGATGGG GCAGCTAACA GGGAGACTAA AAAAGGAAAA GCAGGATATG  1450
TTACTAACAG AGGAAGACAA AAGGTTGTCT CCCTAACTGA CACAACAAAT  1500
CAGAAGACTG AGTTACAAGC AATTCATCTA GCTTTGCAAG ATTCAGGGTT  1550
AGAAGTAAAC ATAGTAACAG ACTCACAATA TGCATTAGGA ATCATTCAAG  1600
CACAACCAGA TAAAAGTGAA TCAGAGTTAG TCAGTCAAAT AATAGAGCAG  1650
TTAATAAAAA AGGAAAAGGT CTATCTGGCA TGGGTACCAG CACACAAAGG  1700
AATTGGAGGA AATGAACAAG TAGATAAATT AGTCAGTGCT GGAATCAGGA  1750
AAGTACTATT TTTAGATGGA ATAGATAAGG CCCAAGAAGA CCATGAGAAA  1800
TATCACAGTA ATTGGAGAGC AATGGCTAGT GACTTTAACC TACCACCTAT  1850
AGTAGCAAAA GAAATAGTAG CCAGCTGTGA TAAATGTCAG CTAAAAGGAG  1900
AAGCCATGCA TGGACAAGTA GACTGTAGTC CAGGAATATG GCAACTAGAT  1950
TGTACACATT TAGAAGGAAA AGTTATCCTG GTAGCAGTTC ATGTAGCCAG  2000
TGGATACATA GAAGCAGAAG TTATTCCAGC AGAGACAGGG CAGGAGACAG  2050
CATACTTTCT CTTAAAATTA GCAGGAAGAT GGCCAGTAAA AACAATACAT  2100
ACAGACAATG GCCCCAATTT CACCAGTACT ACGGTTAAGG CCGCCTGTTG  2150
GTGGACGGGA ATCAAGCAGG AATTTGGCAT TCCCTACAAT CCCCAAAGTC  2200
AAGGAGTAAT AGAATCTATG AATAAAGAAT TAAAGAAAAT TATAGGACAG  2250
GTAAGAGATC AGGCTGAACA TCTTAAGAGA GCAGTACAAA TGGCAGTATT  2300
CATCCACAAT TTTAAAAGAA AAGGGGGGAT TGGGGGGTAC AGTGCAGG    2348
```

配列番号：２
配列の長さ：２９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列

```
ATTCCCTACA ATCCCCAAAG TCAAGGAGT
```

29

配列番号：３
配列の長さ：２２
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ

配列
CCTGCACTGT ACCCCCCAAT CC 22

配列番号：４
配列の長さ：１８
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
ACAGCAGTAC AAATGGCA 18

配列番号：５
配列の長さ：２６
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
GGAGCAGAAA CTTTCTATGT AGATGG 26

配列番号：６
配列の長さ：２９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
CATATTGTGA GTCTGTTACT ATGTTTACT 29

配列番号：７
配列の長さ：１８
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
TAGGAAAAGC AGGATATG 18

配列番号：８
配列の長さ：２９
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
GGTACAGTAT TAGTAGGACC TACACCTGT 29

配列番号：９
配列の長さ：２８
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
GGCCATTGTT TAACTTTTGG GCCATCCA 28

配列番号：１０
配列の長さ：２０
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
ATTAGTCCTA TTGAAACTGT

20

配列番号：１１
配列の長さ：１５
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
ATAAGCCCCA TAGCC

15

配列番号：１２
配列の長さ：２６
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
CCTAGTATAA ACAATGAGAC ACCAGG

26

配列番号：１３
配列の長さ：２６
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
GATCCTACAT ACAAGTCATC CATGTA

26

配列番号：１４
配列の長さ：１８
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
GGATGGAAAG GATCACCA

18

配列番号：１５
配列の長さ：２６８９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ゲノムＲＮＡ　（ＨＩＶ－２）

```
TTGCTGCACC TCAATTCTCT CTTTGGAAAA GACCAGTAGT CACAGCACAC          50
ATTGAGGGTC AGCCAGTAGA AGTTTTGTTA GACACAAGGG CTAACGACTC         100
AATAGTAGCA GGAATAGAGT TAGGGAGCAA TTATAGTCCA AAAATAGTAG         150
GAGGAATAGG GGGATTCATA AATACCAAGG AATATAAAAA TGTAGAAATA         200
GAAGTCCTAG GTAAAAGGGT AAAAGCCACC ATAATGACAG GTGATACCCC         250
GATCAACATT TTTGGCAGAA ATGTTCTGAC AGCTTTAGGC ATGTCATTAA         300
ACCTGCCAGT TGCCAAGATA GAACCAATAA AAATAATGCT AAAGCCAGGG         350
AAAGATGGAC CAAGACTAAA ACAATGGCCT TTAACAAAAG AAAAAATAGA         400
AGCACTAAAA GAAATCTGTG AAAAAATGGA AAAAGAAGGC CAGCTAGAAG         450
AAGCACCTCC AACTAATCCT TATAATACCC CCACATTTGC AATCAAGAAA         500
AAGGACAAAA ACAAATGGAG AATGCTAATA GACTTTAGGG AGCTAAACAA         550
GGTAACTCAG GATTTCACAG AAATTCAGTT AGGAATTCCA CACCCAGCAG         600
GATTGGCCAA AAAGAGGAGA ATTACTGTAC TAGATGTAGG GGATGCTTAC         650
TTTTCCATAC CACTACATGA GGACTTTAGA CAGTATACTG CATTCACTCT         700
ACCATCAGTA AACAATGCAG AACCAGGAAA AAGATATATA TACAAAGTCC         750
TACCACAGGG GTGGAAGGGG TCACCAGCAA TTTTTCAATA CACAATGAGG         800
CAGATCTTAG AACCATTCAG AAAAGCAAAC GAGGATGTCA TTATCATTCA         850
GTACATGGAT GATATCTTAA TAGCCAGCGA CAGGACAGAC TTAGAACATG         900
ACAAAGTGGT CCTGCAGCTA AAAGAACTTC TAAATGGACT AGGATTTTCC         950
ACCCCAGATG AGAAATTCCA GAAAGACCCT CCATATCGCT GGATGGGCTA        1000
TGAATTATGG CCAACTAAAT GGAAGTTGCA AAAAATACAG CTGCCCCAAA        1050
AAGAAGTATG GACAGTCAAT GACATCCAAA AGCTAGTGGG TGTCCTAAAT        1100
TGGGCAGCAC AAATCTACCC AGGGATAAAG ACCAAACACC TATGTAGGCT        1150
AATTAGAGGA AAAATGACAC TCACAGAAGA GGTACAGTGG ACAGAATTAG        1200
CAGAAGCAGA GCTAGAGGAA AACAGAATTA TCTTAAGCCA GAAACAAGAA        1250
GGACACTATT ACCAGGAAGA AAAAAAGTTA GAAGCAACAG TCCAGAAAGA        1300
TCAAGACAAT CAGTGGACAT ATAAGGTACA CCAGGGGGAG AAAATTCTCA        1350
AAGGTGGGAA AATATGCAAA GATAAAAAAT ACCCATACCA ACGGGTCAGA        1400
TTGTTAGCAC AGGTAGTTCA AAAAATAGGA AAAGAAGCAC TAGTCATTTG        1450
GGGACGGATA CCAAAATTTC ACCTACCAGT AGAGAGAGAT ACCTGGGAGC        1500
AGTGGTGGGA TAACTACTGG CAAGTAACAT GGATCCCAGA CTGGGACTTT        1550
GTATCTACCC CACCACTGGT CAGGCTAGCA TTTAACCTGG TAGGAGAGCC        1600
TGTACCAGGC GCAGAAACTT TCTACACAGA TGGATCCTGC AATAGGCAGT        1650
CAAAAGAAGG GAAAGCAGGA TATATAACAG ATAGAGGGAG AGACAGGGTA        1700
AAAGTATTAG AGCAAACTAC CAATCAGCAA GCAGAATTAG AAGCCTTTGC        1750
AATGGCACTA ACAGACTCAG GTCCAAAAGC TAATATTATA GTAGACTCAC        1800
AATATGTAAT GGGGATAGTA GCAGGCCAAC CAACAGAGTC AGAGAATAGA        1850
ATAGTAAATC AGATCATAGA AGAAATGATA AAGAAAGAAG CAATCTATGT        1900
TGCGTGGGTC CCAGCCCACA AAGGCATAGG AGGAAACCAG GAAGTAGATC        1950
ATTTAGTAAG TCAGGGCATT AGACAAGTAT TATTCCTAGA GAAAATAGAA        2000
CCCGCGCAGG AAGAACATGA AAAATATCAT AGCAATATAA AAGAACTGTC        2050
CCATAAATTT GGAATACCCA AGCTAGTGGC AAGACAAATA GTAAACACAT        2100
GTGCCCATGT GCAACAGAAA GGGGAGGCTA TACATGGGCA AGTAAATGCA        2150
GAACTAGGCA CTTGGCAAAT GGACTGCACA CATTTAGAAG GAAAAGTCAT        2200
TATAGTAGCA GTACATGTTG CAAGTGGATT TATAGAGGCA GAAGTTATCC        2250
CACAGGAATC AGGAAGGCAA ACAGCACTGT TCTTACTGAA ACTGGCCAGT        2300
AGGTGGCCAA TAACACACCT GCACACAGAT AATGGTGCCA ACTTCACTTC        2350
ACAGGAAGTG AAAATGGTAG CATGGTGGGT AGGTATAGAA CAAACCTTTG        2400
GAGTGCCTTA CAATCCACAA AGCCAAGGAG TAGTAGAAGC AATGAATCAT        2450
CATCTAAAAA ATCAGATAGA CAGAATTAGA GAGCAGGCAA ATACAGTAGA        2500
AACAATAGTA TTAATGGCAG TTCATTGCAT GAATTTTAAA AGAAGGGGAG        2550
GAATAGGGGA TATGACCCCA GCAGAAAGAA TAATCAATAT GATCACCACA        2600
GAACAAGAAA TACAATTCCT CCAAGCAAAA AATTCAAAAT TAAAAAATTT        2650
TCGGGTCTAT TTCAGAGAAG GCAGAGATCA GCTGTGGAA                    2689
```

配列番号：１６
配列の長さ：３３
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列

```
NCTGATGGCA GTTCATTGCA TGAATTTTAA AAG                          33
```

配列番号：１７

配列の長さ：２７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
TTCCACAGCT GATCTCTGCC TTCTCTG 27

配列番号：１８
配列の長さ：２０
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
CAGAACAAGA AATACAATTC 20

配列番号：１９
配列の長さ：２６
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
CCTCAATTCT CTCTTTGGAA AAGACC 26

配列番号：２０
配列の長さ：２６
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
AAATGTTGAT TGGGGTATCT CCTGTC 26

配列番号：２１
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
CCAAAAATAG TAGGGGG 17

配列番号：２２
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列
ATAGTAGCAG GAATAGA 17

配列番号：２３
配列の長さ：２５

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列

CAATAGTAGC AGGAATAGAG TTAGG 25

配列番号：２４
配列の長さ：３２
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成ＤＮＡ
配列

CACAGCTGAT CTCTGCCTTC TCTGTAATAG AC 32

フロントページの続き

(72)発明者 クローガー，ポール・イー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４６、リンデンハースト、デイアパス・ドライブ・２４１６
(72)発明者 アブラバヤ，クララ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００９１、ウイルメツト、レミントン・６０６
(72)発明者 エスピング，クローデイア・エイ・サイガン
アメリカ合衆国、イリノイ・６０１３４、ジエニーバ、クリツシー・アベニユー・３２１
(72)発明者 ゴルゾウスキー，ヤセツク・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００７３、ラウンド・レイク・パーク、ノース・リンデン・ドライブ・２１０
(72)発明者 ホーンル，ロバート・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００１４、クリスタル・レイク、テインバー・ヒル・ドライブ・９７
(72)発明者 ムーア，ジエニフアー・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６０６１４、シカゴ、アパートメント・１、ノース・セミナリー・２５２０

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特開平０８－２４２８９８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９７／００７２３５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/68
BIOSIS/CA/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq