

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4819064号
(P4819064)

(45) 発行日 平成23年11月16日 (2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月9日 (2011.9.9)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 38 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2007-556338 (P2007-556338)	(73) 特許権者	500506530
(86) (22) 出願日	平成18年2月17日 (2006.2.17)		ジェン-ブローブ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2008-529553 (P2008-529553A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(43) 公表日	平成20年8月7日 (2008.8.7)		21, サン ディエゴ, ジェネティッ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/005725		ク センター ドライブ 10210
(87) 国際公開番号	W02006/089154	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成18年8月24日 (2006.8.24)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成21年1月28日 (2009.1.28)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/654,199		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成17年2月18日 (2005.2.18)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/669,192	(72) 発明者	ガオ, クイ
(32) 優先日	平成17年4月6日 (2005.4.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(33) 優先権主張国	米国 (US)		31, サン ディエゴ, アイビー ヒ
			ル ドライブ 10964 ナンバー2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルカリショックを取り入れたサンプル調製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体サンプルを処理する方法であって、

(a) 該生体サンプルと、pH緩衝液および界面活性剤とを合わせ、それによって、第1のpHを有する第1の液体組成物を作製するステップと、

(b) 該第1の液体組成物を、アルカリ組成物と混合し、それによって第2のpHを有する第2の液体組成物を作製するステップであって、該第2のpHが、該第1のpHよりも少なくとも0.2pH単位高く、かつ、前記の第2のpHがpH9.5よりも低いステップと、

(c) 該第2の液体組成物から1種以上の核酸を固体支持体上に捕獲するステップと、

(d) 該1種以上の核酸のいずれかが上に捕獲されている固体支持体を単離するステップと

を含む、方法。

【請求項2】

ステップ(a)における前記pH緩衝液および前記界面活性剤が、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、前記合わせるステップが、前記生体サンプルを、該緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記第2のpHがpH8.0～pH9.2の範囲である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

10

20

ステップ(c)において捕獲される前記1種以上の核酸のうち少なくとも1種がRNA分子を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(c)において捕獲される前記1種以上の核酸のうち少なくとも1種がDNA分子を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

前記第1のpHが6.5～8.0の範囲である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

ステップ(c)が、前記の1種以上の核酸を、それに相補的な1種以上の、固定されているかまたは固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含む、請求項3に記載の方法。

10

【請求項8】

ステップ(a)における前記pH緩衝液および前記界面活性剤が、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、前記生体サンプルを、該緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記緩衝界面活性剤溶液が、前記1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記第1のpHが6.5～8.0の範囲である、請求項1に記載の方法。

20

【請求項11】

ステップ(c)が、前記1種以上の核酸を、それに相補的な1種以上の、固定されているかまたは固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(a)における前記pH緩衝液および前記界面活性剤が、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、前記生体サンプルを、該緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記緩衝界面活性剤溶液が、前記1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項12に記載の方法。

30

【請求項14】

ステップ(d)が、前記固体支持体を、その上に捕獲されていない物質と分離するステップと、次いで、前記1種以上の核酸のうちのいずれかが上に捕獲されている固体支持体を洗浄するステップとを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(a)～(d)の各々を単一反応容器中で実施する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

ステップ(c)が、前記の1種以上の核酸を、それに相補的な1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項17】

ステップ(a)における前記pH緩衝液および前記界面活性剤が、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、前記生体サンプルを、該緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記緩衝界面活性剤溶液が、前記1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記界面活性剤が陰イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤からなる群から選択され

50

る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記アルカリ組成物が、NaOHおよびLiOHからなる群から選択される強塩基を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ステップ (a) ～ (d) の各々を単一反応容器中で実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

ステップ (b) が、(i) 軌道振盪による攪拌または (ii) ボルテックス処理のいずれかを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記固体支持体がビーズを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ビーズが磁性ビーズである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 pH 緩衝液の pKa が 6.0 ～ 9.0 の間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

ステップ (c) において捕獲された前記 1 種以上の核酸のうち少なくとも 1 種が、RNA 分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

ステップ (c) において捕獲された前記 1 種以上の核酸のうち少なくとも 1 種が DNA 分子を含む、請求項 1 に記載の方法

【請求項 2 8】

前記第 1 の pH が pH 6.5 ～ 8.0 の範囲であり、かつ、前記第 2 の pH が pH 8.2 ～ 9.2 の範囲である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

(e) 鑄型として、ステップ (d) で単離された前記固体支持体上に捕獲されている前記 1 種以上の核酸のうち少なくとも 1 種を用いるインビトロ核酸増幅反応を実施するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記第 2 の pH が pH 8.0 ～ pH 9.2 の範囲である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記第 1 の pH が 6.5 ～ 8.0 の範囲である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記第 1 の pH が 6.5 ～ 8.0 の範囲である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第 2 の pH が pH 8.2 ～ 9.2 の範囲である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記インビトロ核酸増幅反応がマルチプレックス反応である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

ステップ (c) において捕獲された前記 1 種以上の核酸が 2 種以上の捕獲されている核酸を含み、ステップ (d) において単離された前記 1 種以上の核酸が 2 種以上の単離核酸を含み、前記マルチプレックス反応が、鑄型として、ステップ (c) において捕獲され、次いで、ステップ (d) において単離された、前記 2 種以上の核酸を用いる、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記マルチプレックス反応において鑄型として用いられる前記 2 種の核酸が、RNA 分子および DNA 分子を含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

ステップ (a) ～ (e) の各々を単一反応容器中で実施する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 8】

10

20

30

40

50

ステップ (b) が、(i) 軌道振盪による攪拌または (i i) ボルテックス処理のいずれかを含む、請求項 37 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、2005年2月18日に出願された米国仮特許出願番号60/654,199 および2005年4月6日に出願された米国仮特許出願番号60/669,192の利益を主張する。これらの先行出願の開示は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

10

(発明の分野)

本発明は、核酸増幅技術に関する。より詳しくは、本発明は、インビトロ核酸増幅反応を実施するのに先立ってサンプルを調製する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

インビトロ核酸増幅技術は、合成および、おそらくは、ほとんどないに等しいほど少量の核酸標的の検出のために、今ではよく用いられている。これらの技術は、従来、1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび核酸重合酵素を用いて、核酸鋳型の一方または両方の鎖のコピーを合成する。増幅手順に先立って生体サンプルを調製するには、多数の異なる方法が用いられてきた。

20

【0004】

単一反応で、試験サンプルから複数の異なる核酸標的のいずれをも増幅できるマルチプレックス化アッセイは、特別な設計課題を提示する。例えば、マルチプレックスアッセイにおいて増幅可能な標的は、RNA標的、DNA標的またはRNAとDNA標的の組み合わせでさえもあり得る。1つの課題は、RNAおよびDNA核酸は異なる化学安定性を示すという事実から生じる。もう1つの課題は、単一の標的種の種々の関連サブタイプのいずれも最大感度で検出したいというよくある要望から生じる。反応においてサブタイプ特異的プライマーを用いる場合であっても、単一の生物種の異なるサブタイプに対して実質的に同様の検出感度を達成することは困難であり得る。

30

【0005】

したがって、核酸増幅反応において個々の標的の検出能を増強できる一般的な技術が必要である。マルチプレックス増幅反応において、同一反応におけるその他の標的の検出能を実質的に犠牲にすることなく、1種以上の標的の検出能を増強することがさらに必要である。

【0006】

実際、本明細書に開示される本発明は、インビトロ核酸増幅を用いて核酸標的の存在について試験される予定の生体サンプルを調製するための好都合な方法を提供する。この方法は、種々の核酸含有生体サンプルについて、信頼できる結果を提供しながら、特定の核酸標的の検出能を大幅に改善することが有利である。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

一般的に言えば、本発明は生体サンプルを処理する方法に関する。この方法は、生体サンプルを、pH緩衝液および界面活性剤と合わせ、その結果、第1のpHを有する第1の液体組成物が得られるステップで開始する。合わせるステップを単純にするには、pH緩衝液が、および界面活性剤が、液体の形であることが好都合である。次いで、第1の液体組成物をアルカリ組成物と混合し、その結果、第2のpHを有する第2の液体組成物が得られるステップがある。第2のpHは、第1のpHよりも少なくとも0.2pH単位高く

50

なくてはならないことが重要であるが、これは添加されたアルカリによるものである。また、第2のpHがpH9.5よりも低いということも良好な結果を達成するために重要である。これに、第2の液体組成物から1種以上の核酸を固体支持体上に捕獲するステップを続ける。最後に、1種以上の核酸のうちいずれかが上に捕獲されている固体支持体を単離するステップがある。これは、例えば、液相中に残る結合していない物質を吸引することによって、固体支持体およびその上に捕獲されている核酸をいずれも物理的に単離するステップを含み得る。

【0008】

一実施形態では、合わせるステップに用いられるpH緩衝液および界面活性剤は、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、生体サンプルを、緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含む。

10

【0009】

もう1つの実施形態では、生体サンプル、緩衝液およびアルカリ組成物を含む混合物のpHを意味する第2のpHは、pH8.0～pH9.2の範囲である。捕獲ステップは、第2のpHがpH8.0～9.2の範囲に入る場合に、固体支持体に1種以上のRNA種を捕獲するステップまたは1種以上のDNA種を捕獲するステップを含むことが好ましい。もう1つの好ましい実施形態では、第1のpHは、第2のpHがpH8.0～9.2の範囲に入る場合には、6.5～8.0の範囲である。さらにもう1つの好ましい実施形態では、捕獲ステップは、第2のpHがpH8.0～9.2の範囲に入る場合に、第2の液体組成物から得られた1種以上の核酸を、それに相補的な、1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含み得る。合わせるステップにおけるpH緩衝液および界面活性剤は、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、生体サンプルを、緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含むことがより好ましい。pH緩衝液および界面活性剤を含む緩衝界面活性剤溶液は、混合ステップに由来する第2の液体組成物から得られた核酸のハイブリダイズおよび捕獲に使用できる、固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含むことが、さらにより好ましい。

20

【0010】

もう1つの好ましい実施形態では、生体サンプル、緩衝液および界面活性剤を合わせたもののpHを意味する第1のpHは、6.5～8.0の範囲である。この場合には、捕獲ステップが、捕獲される1種以上の核酸を、それに相補的な、1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含むことが好ましい。合わせるステップに用いられるpH緩衝液および界面活性剤は、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、生体サンプルを、緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含むことがより好ましい。緩衝界面活性剤溶液が、第2の液体組成物から得られる核酸を捕獲するのに使用される、1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含むことがさらにより好ましい。単離ステップが、固体支持体を、上に捕獲されていない物質から分離するステップと、次いで、いずれかの核酸が上に捕獲されている固体支持体を洗浄するステップとを含むことが、なおさらにより好ましい。上記のステップのすべてを単一の反応容器中で実施することが

30

40

【0011】

もう1つの好ましい実施形態では、捕獲ステップが、捕獲される1種以上の核酸を、それに相補的な1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるステップを含む。この場合には、合わせるステップに用いられるpH緩衝液および界面活性剤が、各々、緩衝界面活性剤溶液の成分であり、合わせるステップが、生体サンプルを、緩衝界面活性剤溶液のアリコートと合わせるステップを含むことが好ましい。この緩衝界面活性剤溶液は、第2の液体組成物からの核酸の捕獲に使用できる、1種以上の固定されているか、または固定可能なオリゴヌクレオチドをさらに含むことがより好ましい。

50

【0012】

もう1つの好ましい実施形態では、合わせるステップに用いられる界面活性剤は、陰イオン界面活性剤または非イオン界面活性剤である。この場合には、混合ステップに用いられるアルカリ組成物は、強塩基、例えば、NaOHおよびLiOHであることが好ましい。

【0013】

もう1つの実施形態では、合わせるステップ、混合ステップ、捕獲ステップおよび単離ステップのすべてを単一反応容器中で実施する。この場合には、混合ステップは軌道振盪またはボルテックス処理のいずれかによる攪拌を含むことが好ましい。

【0014】

もう1つの実施形態では、捕獲ステップにおける固体支持体は、ビーズ、例えば、磁性ビーズを含む。

【0015】

もう1つの実施形態では、合わせるステップに用いられるpH緩衝液のpKaは、6.0～9.0の間である。

【0016】

もう1つの実施形態では、捕獲ステップにおいて捕獲される1種以上の核酸のうち少なくとも1種は、RNA分子である。

【0017】

もう1つの実施形態では、捕獲ステップにおいて捕獲される1種以上の核酸のうち少なくとも1種は、DNA分子である。もう1つの好ましい実施形態では、第1のpHはpH 6.5～8.0の範囲に入り、第2のpHはpH 8.2～9.2の範囲に入る。この関係は、DNA鋳型とRNA鋳型両方の処理にとって一様に良好な結果を与えた。したがって、この組み合わせの範囲は、本発明を実施するために高度に好ましい。

【0018】

本発明のもう1つの一般的な態様は、生体サンプルを処理して核酸を得、次いで、特定の適用において、得られた核酸を用いる方法に関する。上記のように、この方法は、生体サンプルを、pH緩衝液および界面活性剤と合わせ、その結果、第1のpHを有する第1の液体組成物が得られるステップで開始する。次いで、第1の液体組成物をアルカリ組成物と混合し、その結果、第2のpHを有する第2の液体組成物が得られるステップがある。やはり、良好な結果を達成するには、第2のpHが、第1のpHよりも少なくとも0.2 pH単位高く、かつ、第2のpHがpH 9.5よりも低いことが重要である。これに、第2の液体組成物から1種以上の核酸を固体支持体上に捕獲するステップを続ける。次に、1種以上の核酸のいずれかが上に捕獲されている固体支持体を単離するステップがある。これは、例えば、液相中に残る結合していない物質を吸引することによって、固体支持体およびその上に捕獲されている核酸のいずれをも物理的に単離するステップを含み得る。最後に、鋳型として、固体支持体上に捕獲され、単離ステップにおいて単離された核酸のうち少なくとも1種を用いるインビトロ核酸増幅反応を実施するステップがある。

【0019】

好ましい実施形態では、第2のpHはpH 8.0～pH 9.2の範囲である。この場合には、第1のpHは6.5～8.0の範囲であることが好ましい。

【0020】

もう1つの好ましい実施形態では、第1のpHは6.5～8.0の範囲である。第1のpHが6.5～8.0の範囲に入る場合には、第2のpHがpH 8.2～9.2の範囲に入ることが高度に望ましい。実際、このセットの範囲は、DNA鋳型とRNA鋳型両方の処理に一様に良好な結果を与えた。したがって、この組み合わせの範囲は、本発明を実施するために高度に好ましい。

【0021】

異なる好ましい実施形態では、インビトロ核酸増幅反応は2種以上の核酸配列を増幅できるマルチプレックス反応である。この場合には、捕獲ステップにおいて捕獲される1種

10

20

30

40

50

以上の核酸は、2種以上の捕獲される核酸を含み、単離ステップにおいて単離される1種以上の核酸単離は、2種以上の単離核酸を含み、マルチプレックス反応は、捕獲および単離された核酸のうち2種を鋳型として用いる。実際、マルチプレックス反応において鋳型として用いられる2種の核酸が、RNA分子およびDNA分子を含むことが高度に好ましい。

【0022】

さらに異なる好ましい実施形態では、合わせるステップ、混合ステップ、捕獲ステップ、単離ステップおよび核酸増幅反応を実施するステップのすべてを単一反応容器中で実施する。この場合には、混合ステップが軌道振盪またはボルテックス処理のいずれかによる攪拌を含むことが好ましい。

10

【0023】

定義

以下の用語は、本明細書において別段明示的な記載のない限り、この開示内容の目的上、以下の意味を有する。

【0024】

本明細書において「アルカリショック」とは、最初に、生体サンプルを、pH緩衝液および界面活性剤と合わせ、その結果、第1の組成物が得られるステップと、次いで、その第1の組成物を、得られる混合物のpHを高めるのに十分な量のアルカリ組成物と混合するステップとによって達成される、一時的な高pHを指す。第1の組成物のpHの有用な開始範囲およびアルカリ組成物の添加後の混合物のpHの有用な最終範囲は、本明細書に

20

【0025】

本明細書において、「生体サンプル」とは、ヒト、動物または環境サンプルから得られた、いずれかの組織またはポリヌクレオチドを含有する物質である。本発明に従う生体サンプルとしては、末梢血、血漿、血清またはその他の体液、骨髄またはその他の器官、生検組織または生体起源のその他の物質が挙げられる。生体サンプルを、組織または細胞構造を破壊するよう処理し、それによって、酵素、緩衝液、塩、界面活性剤などを含み得る細胞内成分を溶液中に放出させることができる。

【0026】

本明細書において、「ポリヌクレオチド」とは、配列中に存在し得、相補配列を有する第2の分子とのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを妨げない、RNAまたはDNAのいずれか、ならびにいずれかの合成ヌクレオチド類似体またはその他の分子を意味する。

30

【0027】

本明細書において、「検出可能な標識」とは、検出され得るか、または検出可能な反応をもたらし得る化学種である。本発明に従う検出可能な標識はポリヌクレオチドプローブと直接または間接的のいずれかで結合でき、これとしては、放射性同位体、酵素、ハプテン、発色団、例えば、色素または検出可能な色を付与する粒子（例えば、ラテックスビーズまたは金属粒子）、発光化合物（例えば、生体発光部分、リン光性発光部分または化学発光部分）および蛍光化合物が挙げられる。

40

【0028】

「均一検出可能標識」とは、標識が、標的配列とハイブリダイズされているプローブ上にあるかどうかを調べることによって均一様式で検出され得る標識を指す。すなわち、均一検出可能標識は、ハイブリダイズ型の標識または標識化プローブを、非ハイブリダイズ型の標識または標識化プローブから物理的に回収することなく検出できる。均一検出可能標識は、増幅された核酸を検出するために標識化プローブを用いる場合に好ましい。均一標識の例は、Arnold et al.、米国特許第5,283,174号、Woodhead et al.、米国特許第5,656,207号およびNelson et al.、米国特許第5,658,737号によって詳細に記載されている。均一アッセイにおいて用いるのに好ましい標識としては、化学発光化合物が挙げられる（例えば、Wo

50

odhead et al.、米国特許第5,656,207号、Nelson et al.、米国特許第5,658,737号およびArnold, Jr., et al.、米国特許第5,639,604号参照のこと）。好ましい化学発光標識としては、アクリジニウムエステル（「AE」）化合物、例えば、標準AEまたはその誘導体（例えば、ナフチル-AE、オルト-AE、1-もしくは3-メチル-AE、2,7-ジメチル-AE、4,5-ジメチル-AE、オルト-ジブプロモ-AE、オルト-ジメチル-AE、メタ-ジメチル-AE、オルト-メトキシ-AE、オルト-メトキシ（シンナミル）-AE、オルト-メチル-AE、オルト-フルオロ-AE、1-もしくは3-メチル-オルト-フルオロ-AE、1-もしくは3-メチル-メタ-ジフルオロ-AEおよび2-メチル-AE）がある。

10

【0029】

「均一アッセイ」とは、特異的プローブハイブリダイゼーション度の測定に先立って、ハイブリダイズしているプローブの、ハイブリダイズしていないプローブからの物理的な分離を必要としない検出手順を指す。例示的均一アッセイ、例えば、本明細書に記載されるものは、分子指標または適当な標識とハイブリダイズしている場合に蛍光シグナルを発するその他の自己報告性プローブ、ハイブリッド二本鎖中に存在しない場合は化学的手段によって選択的に破壊され得る化学発光アクリジニウムエステル標識および当業者によく知られるその他の均一検出可能標識を用いることができる。

【0030】

本明細書において、「核酸増幅」または簡単に「増幅」とは、標的核酸配列、その相補体またはその断片のマルチプルコピーを得るためのインビトロ手順を指す。

20

【0031】

「標的核酸」または「標的」とは、標的核酸配列を含む核酸を意味する。一般に、増幅される標的核酸配列は、2つの反対に配置した増幅オリゴヌクレオチドの間に配置し、増幅オリゴヌクレオチドの各々と十分に相補的である標的核酸の一部を含む。

【0032】

「標的核酸配列」または「標的配列」または「標的領域」とは、一本鎖核酸分子のヌクレオチド配列のすべてまたは一部およびそれに相補的なデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド配列を含む特定のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド配列を意味する。

30

【0033】

「転写関連増幅」とは、核酸鋳型からRNAポリメラーゼを用いて複数のRNA転写物を製造する、いずれかの種類の核酸増幅を意味する。転写関連増幅法の1つの例は、「転写媒介性増幅」（TMA）と呼ばれ、通常、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、リボヌクレオチド三リン酸およびプロモーター鋳型相補的オリゴヌクレオチドを用い、場合により、1種以上の類似のオリゴヌクレチドを含み得る。TMAの変法は、Burg et al.、米国特許第5,437,990号、Kacian et al.、米国特許第5,399,491号および同5,554,516号、Kacian et al.、PCT番号WO93/22461、Gingeras et al.、PCT番号WO88/01302、Gingeras et al.、PCT番号WO88/10315、Malek et al.、米国特許第5,130,238号、Urdea et al.、米国特許第4,868,105号および同5,124,246号、McDonough et al.、PCT番号WO94/03472およびRyder et al.、PCT番号WO95/03430に詳細に開示されるように、当技術分野では周知である。本明細書に開示される種類の核酸増幅手順を実施するには、Kacian et al.の方法が好ましい。

40

【0034】

本明細書において、「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」は、少なくとも2個の、通常、約5〜約100個の間の化学サブユニットからなり、各サブユニットがヌクレオチド塩基部分と、糖部分と、線形空間配置にサブユニットを連結する結合部分とを含む

50

ポリマー鎖である。一般的なヌクレオチド塩基部分は、グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）およびウラシル（U）であるが、その他の、水素結合できる稀な、または修飾されたヌクレオチド塩基は当業者には周知である。オリゴヌクレオチドは、場合により、糖部分、塩基部分および骨格成分のいずれかの類似体を含み得る。本発明の好ましいオリゴヌクレオチドは、約10～約100残基のサイズ範囲に入る。オリゴヌクレオチドは、天然供給源から精製できるが、種々の周知の酵素法または化学法のいずれかを用いて合成することが好ましい。

【0035】

本明細書において、「プローブ」とは、検出可能なハイブリッドを形成するためにハイブリダイゼーションを促進する条件下で、核酸中、好ましくは増幅された核酸中の標的配列と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。プローブは、場合により、プローブの末端に付着できるか、またはプローブの内部にあり得る検出可能な部分を含み得る。検出可能部分がプローブの配列の内部である場合のように、標的ポリヌクレオチドと合わせるプローブのヌクレオチドは厳密に隣接している必要はない。検出は直接（すなわち、標的配列または増幅された核酸との直接的なプローブハイブリダイジングに起因する）または間接（すなわち、プローブを標的配列または増幅された核酸とつなぐ中間体分子構造とのプローブハイブリダイジングに起因する）のいずれかであり得る。プローブの「標的」とは、通常、標準水素結合形成（すなわち、塩基対形成）を用いて少なくともプローブオリゴヌクレオチドの一部と特異的にハイブリダイズする、増幅された核酸配列内に含まれる配列を指す。プローブは、標的特異的配列と、場合により、検出される予定の標的配列と非相補的であるその他の配列とを含み得る。これらの非相補的配列は、プロモーター配列と、制限エンドヌクレアーゼ認識部位またはプローブの三次元コンホメーションに寄与する配列（例えば、Lizardi et al.、米国特許第5,118,801号および同5,312,728号に記載されるような）とを含み得る。「十分に相補的な」配列により、プローブオリゴヌクレオチドの、プローブの標的特異的配列と完全に相補的でない標的配列との安定なハイブリダイゼーションが可能となる。

【0036】

「増幅オリゴヌクレオチド」とは、核酸増幅反応に参加し、鋳型核酸配列またはその相補体のマルチプルコピーの合成をもたらすことができるオリゴヌクレオチドを意味する。増幅反応にとって少なくとも2種の増幅オリゴヌクレオチドを用い、増幅オリゴヌクレオチドの少なくとも一方が増幅プライマーとして働くことはよくあることである。

【0037】

本明細書において、「増幅プライマー」またはより単純に「プライマー」とは、標的核酸またはその相補体とハイブリダイズし、鋳型依存性プライマー伸長反応において伸長できるオリゴヌクレオチドである。例えば、増幅プライマーは、場合により、鋳型核酸とハイブリダイズでき、DNAポリメラーゼ活性によって伸長され得る3'末端を有する修飾されたオリゴヌクレオチドであり得る。一般に、プライマーは、下流の標的に相補的な配列と、場合により、標的核酸と相補的でない上流の配列を有する。任意の上流配列は、例えば、RNAポリメラーゼプロモーターとして働く場合もあるし、または制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む場合もある。

【0038】

「実質的に相同」、「実質的に対応する（substantially corresponding）」または「実質的に対応する（substantially corresponds）」とは、主題オリゴヌクレオチドが、参照塩基配列中に存在する少なくとも10個の連続する塩基領域（RNAおよびDNA同等物を除く）と、少なくとも70%相同である、好ましくは、少なくとも80%相同である、より好ましくは、少なくとも90%相同である、最も好ましくは、少なくとも100%相同である、少なくとも10個の連続する塩基領域を含む塩基配列を有することを意味する。当業者には、容認できないレベルの非特異的ハイブリダイゼーションを防ぎながら、オリゴヌクレオチドの、標的配列とのハイブリダイゼーションを可能にする、種々の相同パーセンテージでのハイブリダ

イゼーションアッセイ条件に行うことができる修飾は容易に理解されよう。類似度は、2種の配列をなすヌクレオ塩基の順序を比較し、構造上の相違が相補塩基との水素結合形成を妨げないならば、2種の配列間に存在し得るその他の構造上の相違を考慮しないことによって求める。2種の配列間の相同期度はまた、比較されている少なくとも10個の連続する塩基の各セット中に存在する塩基ミスマッチ数の点から表すことができ、これは0～2塩基の相違の範囲であり得る。

「実質的に相補的」とは、主題オリゴヌクレオチドが、標的核酸配列中に存在する少なくとも10個の連続する塩基領域（RNAおよびDNA同等物を除く）と、少なくとも70%相補的な、好ましくは、少なくとも80%相補的な、より好ましくは、少なくとも90%相補的な、最も好ましくは、100%相補的な、少なくとも10個の連続する塩基領域を含む塩基配列を有することを意味する。（当業者には、容認できないレベルの非特異的ハイブリダイゼーションを防ぎながら、オリゴヌクレオチドの、標的配列とのハイブリダイゼーションを可能にする、種々の相補性パーセンテージでのハイブリダイゼーションアッセイ条件に行うことができる修飾は容易に理解されよう。）相補性度は、2種の配列をなすヌクレオ塩基の順序を比較し、構造上の相違が相補塩基との水素結合形成を妨げないならば、2種の配列間に存在し得るその他の構造上の相違を考慮しないことによって求める。2種の配列間の相補性度はまた、比較されている少なくとも10個の連続する塩基の各セット中に存在する塩基ミスマッチ数の点から表すことができ、これは0～2塩基のミスマッチの範囲であり得る。

【0039】

「十分に相補的」とは、一連の相補的塩基の間での水素結合形成によって別の塩基配列とハイブリダイズできる連続する核酸塩基配列を意味する。相補的な塩基配列は、標準塩基対形成（例えば、G：C、A：TまたはA：U対形成）を用いてオリゴヌクレオチドの塩基配列中の各位置で相補的であり得、または標準水素結合形成（例えば、脱塩基「ヌクレオチド」）を用いて相補的でない1個以上の残基を含み得るが、全相補的塩基配列は、適当なハイブリダイゼーション条件下で別の塩基配列と特異的にハイブリダイズできる。連続する塩基は、オリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズする予定である配列に対して、少なくとも約80%相補的であることが好ましく、少なくとも約90%がより好ましく、約100%が最も好ましい。適当なハイブリダイゼーション条件は、当業者には周知であり、塩基配列組成に基づいて容易に予測できるか、または慣例の試験を用いて実験的に決定できる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)の§§1.90～1.91、7.37～7.57、9.47～9.51および11.47～11.57、特に、§§9.50～9.51、11.12～11.13、11.45～11.47および11.55～11.57）。

【0040】

「捕獲オリゴヌクレオチド」とは、塩基対ハイブリダイゼーションによって標的配列と固定されたオリゴヌクレオチドを特異的に連結する手段を提供する少なくとも1種の核酸オリゴヌクレオチドを意味する。捕獲オリゴヌクレオチドは、通常、同一オリゴヌクレオチド上で連続している、2つの結合領域：標的配列結合性領域と固定されたプローブ結合性領域とを含むことが好ましいが、捕獲オリゴヌクレオチドは、1種以上のリンカーによって一緒に連結された2つの異なるオリゴヌクレオチド上に存在する標的配列結合性領域と固定されたプローブ結合性領域とを含み得る。例えば、固定されたプローブ結合性領域が、第1のオリゴヌクレオチド上に存在し得、標的配列結合性領域が第2のオリゴヌクレオチド上に存在し得、2つの異なるオリゴヌクレオチドが、第1および第2のオリゴヌクレオチドの配列と特異的にハイブリダイズする配列を含む第3のオリゴヌクレオチドであるリンカーを用いる水素結合形成によって連結されている。

【0041】

「固定されたオリゴヌクレオチド」または「固定された核酸」およびその変種とは、捕獲オリゴヌクレオチドを、固定された支持体と直接または間接的に連結する核酸を意味する。固定されたプローブは、サンプルにおいて結合している標的配列を結合していない物質と分離するのを容易にする固体支持体と連結しているオリゴヌクレオチドである。「固定可能な」オリゴヌクレオチドとは、固体支持体に直接固定されたオリゴヌクレオチドとの相補的塩基相互作用によって、固体支持体に固定されるようになり得るオリゴヌクレオチドである。

【0042】

「分離」または「精製」とは、生体サンプルの1種以上の成分が、サンプルの1種以上のその他の成分から取り除かれることを意味する。サンプル成分は、通常、水性の溶液相中に核酸を含み、これはまた、タンパク質、炭水化物、脂質および標識されたプローブなどの物質を含み得る。分離または精製ステップは、サンプル中に存在するその他の成分の少なくとも約70%を除去することが好ましく、少なくとも約90%がより好ましく、少なくとも約95%がさらに好ましい。

10

【0043】

「RNAおよびDNA同等物」または「RNAおよびDNA同等塩基」とは、同様の相補的な塩基対ハイブリダイゼーション特性を有するRNAおよびDNAなどの分子を意味する。RNAおよびDNA同等物は異なる糖部分を有し（すなわち、リボース対デオキシリボース）、またRNA中のウラシルおよびDNA中のチミンの存在によって異なり得る。RNAとDNA同等物間の相違は、相同性の相違に寄与しないが、これは同等物が特定の配列に対して同程度の相補性を有するからである。

20

【0044】

「本質的にからなる」とは、本発明の基本的および新規特徴を著しく変更しない、さらなる成分（類）、組成物（類）または方法ステップ（類）が、本発明の組成物またはキットまたは方法中に含まれ得ることを意味する。このような特徴としては、生体サンプル、例えば、全血または血漿中の標的核酸を選択的に検出する能力が挙げられる。本発明の基本的および新規特徴に対して重大な影響を有する成分（類）、組成物（類）または方法ステップ（類）はいずれも、この用語に入らない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0045】

（発明の詳細な説明）

本明細書には、核酸含有生体サンプルを調製する方法が開示されている。本方法を用いて、ウイルス、細菌または真核生物供給源からDNAとRNA鑄型の両方を調製でき、またこれを用いて、調製された核酸を鑄型として用いて実施される増幅反応の感度を高めることができる。驚くべきことに、これらの利点のすべては、核酸検出手順の標的捕獲、増幅または検出ステップにおいて用いられるオリゴヌクレオチドのいずれも再設計することなく達成できる。

30

【0046】

一般的に言えば、本発明の主題は、混合後のpHが指定の範囲内に入るような、生体サンプルを含む緩衝界面活性剤溶液へのアルカリ溶液の添加が、続いて、核酸増幅反応において、処理されたサンプルが鑄型の供給源として働く場合に特定の利点を提供するという予期しない発見に関する。発明されたサンプル処理手順は、標的捕獲成分を含み、ここで、アルカリの添加後の条件は、固定された捕獲オリゴヌクレオチドと生体サンプルから遊離されたポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドハイブリッドの形成と適合していることが好ましい。以下に示される証拠によって示されるように、アルカリおよびpH緩衝界面活性剤溶液をまず合わせ、次いで、生体サンプルに添加される場合には本発明の利点は達成されない。

40

【0047】

本発明の開発を引き起こした知見は、増幅されたアッセイの、種々のHBVサブタイプを検出する能力の差に関するものであった。より詳しくは、HIV-I、HCVおよびH

50

B V核酸標的をいずれも増幅および検出できるマルチプレックス化アッセイは、種々のH B Vサブタイプに対して大きく異なる感度を示すことがわかった。以下に示されるように、アッセイによって、サブタイプーAおよびーCに対してはほぼ同等の感度が得られたが、サブタイプーBに対しては、16倍近く低下した。これは、H B Vの3種のサブタイプが密接な系統発生関係を共有するという事実にかかわらず、またアッセイ手順において共通のプライマーおよびプローブのセットを使用できるという事実にかかわらずそうであった。種々のサブタイプのすべてを高い感度で検出することが望ましかったので、その他のサブタイプの検出を実質的に損なうことなく1種のウイルスサブタイプの検出のためのアッセイ感度を高めることは興味深いことであった。

【0048】

10

H B VサブタイプーB検出の感度を向上させることは、あるいは、いくつかのアプローチのいずれかによって達成されている可能性がある。例えば、アッセイに用いるオリゴヌクレオチド成分を再設計することが向上をもたらした可能性がある。しかし、このことが達成されていた可能性があるとしても、その解決法は再設計されたアッセイにとって特有であっただけである。より望ましい解決法は、H B VサブタイプーB検出性およびおそらくは、その他のアッセイの性能も同様に向上させるための一般的な手段を提供する。したがって、本発明の1つの目的は、マルチプレックス化アッセイにおいて少なくとも1種の標的の検出性を向上させる方法に関するものであった。

【0049】

好ましい緩衝液およびpH範囲

20

発明されたアルカリショックに基づくサンプル調製法を実施するのに有用な緩衝液は、約6.0～約9.0の範囲のpKa値を有することが好ましい。本発明の有用性を実証するのに用いられる例示的緩衝液としては、20℃で7.55というpKaを有し、6.8～8.2のpH範囲において最強の緩衝能を有するHEPES（N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸）がある。もちろん、本技術の成功は、いずれかの特定の緩衝液に使用によって制限されるものではない。

【0050】

本発明を実施するための好ましい方法によれば、生体サンプルをまず、pH緩衝液および界面活性剤と合わせて第1の組成物を得、次いで、これを濃水酸化物溶液のアリコートと合わせてアルカリショックを達成する。緩衝液および界面活性剤は、互いに合わせることができ、その結果、試薬添加ステップにおいて、緩衝界面活性剤溶液の単一のアリコートを分配できることが好都合である。緩衝界面活性剤溶液が、1種以上の任意の固定可能なまたは固定された捕獲オリゴヌクレオチドをさらに含み、試薬添加ステップの複雑性をさらに低減し、それによって、本方法をロボット分注器の使用による自動化に特に適合させることが好ましい。液体または液化生体サンプルのアリコートを、緩衝液と、界面活性剤と捕獲オリゴヌクレオチドと固体支持体（すなわち、ビーズ）とを含む単一試薬組成物と合わせ、捕獲を達成することによってアルカリショックサンプル調製法を実施する場合には、試薬組成物は「溶解／捕獲試薬」と呼ばれる。溶解／捕獲試薬を生体サンプルと合わせた後に、約90mM～約355mMの範囲の最終緩衝液濃度が生じた、約200mM～約800mMの範囲の緩衝液濃度を有する溶解／捕獲試薬を用いて優れた結果が達成された。もちろん、緩衝液強度の変更は、添加されるアルカリ性水酸化物の量が、混合物の最終pHを、本明細書において指定される範囲の1つ中にするよう調整されることを必要とする。したがって、本技術の成功は、アルカリショックを達成するアルカリ溶液を添加する前の混合物中の緩衝液の量または濃度によって制限されるものではない。

30

40

【0051】

そのアルカリショックを達成するためのアルカリの添加前の生体サンプルと混合された緩衝界面活性剤溶液の組み合わせの出発pH範囲は、pH6.5～8.0の範囲であることが好ましく、pH7.0～8.0の範囲にあることがさらに好ましく、またはpH7.0～7.5の範囲にあることがなおさらに好ましい。7.0、7.5および8.0という出発pHを有する緩衝界面活性剤溶液を用いて実施した試験は、アルカリシ

50

ショックプロトコールに従って核酸鋳型を調製し、次いで、それらの鋳型を増幅および検出すると、すべて良好な結果をもたらした。これらの結果は、アルカリ組成物の添加前の、試料処理を受けている生体サンプルと、pH緩衝液と界面活性剤とを含む第1の組成物の出発pHの有用な範囲を裏付けた。この試験は、同時増幅可能なRNA内部対照を用いて実施されたので、また、すべての試験が妥当な結果をもたらしたので、RNAはこの範囲の出発pH条件にわたって安定であると結論付けられたことは注目される。本発明の記載を簡単にするために、以下に示される実施例はすべて、アルカリ性水酸化物の添加の前に約7.5という出発pHを有する生体サンプル／緩衝液／界面活性剤の組合せを用いた。やはり、アルカリショックサンプル処理技術の成功は、広い出発pH範囲にかけて達成され得る。

10

【0052】

処理方法ーアルカリおよび界面活性剤条件

発明された方法の好ましい実施形態では、生体サンプルと、pH緩衝液と界面活性剤とを含む第1の組成物を、アルカリ組成物を含む第2の組成物と合わせる。この合わせたものを混合し、固定された捕獲プローブおよび、おそらくはまた、固定されたプローブと注目される標的核酸の間に架橋を形成できる可溶性捕獲プローブとともにインキュベートすることを可能にすることが好ましい。通常、本方法を実施する際に、アルカリ性水酸化物を、すでに第1の組成物を含んでいる試験管またはその他の反応容器に添加する。高度に好ましい実施形態では、第1の組成物はまた、アルカリ性水酸化物の添加に先立って、可溶性捕獲プローブと固定された捕獲プローブとを含むか、または合わせる。

20

【0053】

アルカリショックを達成するためにアルカリ組成物として使用できる物質は、水溶液に溶解した場合に強力なアルカリ溶液を生じる、固体、液体またはガス状物質のいずれであってもよい。強力な塩基としては、本発明に関連して有用な高度に好ましいアルカリ組成物（以下、一般に「アルカリ性水酸化物」と呼ぶ）がある。発明されたサンプル調製法を実施するために使用できる好ましいアルカリ性水酸化物の例として、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウムなどが挙げられる。固体アルカリ組成物を、緩衝界面活性剤と、生体サンプル溶液とを含む第1の組成物と合わせるができる（測定された量の乾燥アルカリ性水酸化物試薬をあらかじめ含んでいる試験管への第1の組成物の添加によって達成され得るように）ということが考慮されるが、溶液の形でアルカリ組成物を用

30

【0054】

本発明の利益を達成するには、生体サンプルと、pH緩衝液と、界面活性剤とを含む組成物に添加されるアルカリ組成物の量が決定的であり、完全混合物の最終pHによって容易に評価できる。添加されるアルカリ性水酸化物の量は、得られる混合物のpHを少なくとも0.2pH単位高めるのに十分であるが9.5を超えてpHを高めるほどではないことが好ましく、9.2を超えないことがより好ましく、9.0を超えないことがより好ましく、8.8を超えないことがさらにより好ましい。試験結果により、有用な量の添加されるアルカリ性水酸化物は、混合物の最終pHを指定の範囲内に入れさせる量であることが確認される。好ましい最終pH範囲は約pH8.0～9.2の間であり、pH8.2～9.2の間がより好ましく、pH8.2～8.8の間がさらにより好ましい。以下に繰り返すように、アルカリショック後の混合物の最終pHがpH8.2～9.2の範囲中に入る場合に、一様に良好な結果が達成された。これは、DNAおよびRNA鋳型の両方に当てはまった。添加されるアルカリ性水酸化物の量が混合物を9.5という最終pHを越えさせた場合には、悪い結果が達成された。

40

【0055】

好ましい界面活性剤

本発明に関連して使用できる界面活性剤は、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、両性イオン界面活性剤または陽イオン界面活性剤であり得る。もちろん、陰イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤が最も好ましい。溶解／捕獲試薬中の界面活性剤濃度は

50

、0.01～15重量%の間が好ましく、0.05～10重量%の間の範囲の濃度が特に好ましい。400 μ lの溶解／捕獲試薬および500 μ lの生体サンプルという実証された使用に基づいて、緩衝液と、界面活性剤と、生体サンプルとを含む混合された組成物の界面活性剤の最終濃度は、約0.01重量%～約6.7重量%の範囲に入ることが好ましい。強力な陰イオン界面活性剤、例えば、アルキルアルコールの硫酸塩およびN-アシル-アミノ酸が高度に好ましい。アルカリショックに基づくサンプル調製手順を実施するために用いられる界面活性剤の厳密な性質は決定的であるとは考えられないが、特に好ましい界面活性剤の例としては、ラウリル硫酸リチウム（LLS）およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が挙げられる。

【0056】

処理期間

好ましい実施形態では、アルカリ性水酸化物溶液のアリコートと、反応容器中で、生体サンプルと、緩衝液と、界面活性剤と、配列特異的標的捕獲が実施される予定である場合には、1種以上の固定可能な捕獲オリゴヌクレオチドを含む組成物と合わせる。約1秒～約1時間の期間の後、内容物を攪拌し、確実に均一混合させ、生体サンプルから遊離されたポリヌクレオチドと、固定されたオリゴヌクレオチドの直接か間接の固定化を含む標的捕獲プロセスが続く。もちろん、非特異的標的捕獲も使用できる。実験室生産性を促進するためには、標的捕獲ステップが実施される期間の長さが必要とされるだけであることが望ましい。しかし、生体サンプルから遊離された核酸は、アルカリ性水酸化物の添加後、混合された組成物中で安定であるので、混合物を最大少なくとも数時間静置させることは標的核酸にとって有害であるとは考えられない。したがって、アルカリショックと関連する処理条件は非常に穏やかであると考えられる。

【0057】

自動分析装置において使い捨てされるプラスチック容器

発明されたサンプル調製法は、プラスチック試験管などの使い捨ての反応容器または複数の試験管を間隙を介した配置で含む使い捨てユニット中で実施されることが好ましい。例えば、使い捨ての反応容器は、アルカリ性水酸化物溶液が添加される時点で分析装置内に配置されていることが好ましく、添加ステップは手動または自動化またはロボットピペティング装置によって実施されることが好ましい。高度に好ましい実施形態では、使い捨て反応容器は分析装置中に搭載されており、手動または自動化またはロボットピペティング装置が、生体サンプルのアリコートと、生体膜、例えば、細胞膜、ウイルスエンベロープなどを溶解または破壊するためのpH緩衝液および界面活性剤を含む溶解／捕獲試薬のアリコートとを容器に加える。溶解／捕獲試薬はまた、生体サンプルから遊離されたポリヌクレオチドを捕獲するための、固定可能な捕獲オリゴヌクレオチドと不溶性ビーズとを含むことが好ましい。その後、同一または異なる自動化またはロボットピペティング装置が、アルカリ性水酸化物溶液のアリコートを試験管に加える。次いで、試験管の内容物を攪拌し、確実に完全混合し、混合されたサンプルを一定温度で遊離されたポリヌクレオチドの捕獲が可能となるのに十分な期間インキュベートすればよい。アルカリショック条件は穏やかであるので、異なる分析プロトコルを実験室試験の単一の1日サイクルにおいて自動化分析器で実施した場合に生じ得るような、長期間または不定期間の静置によって生じることがわかっている実質的な化学分解はない。

【0058】

標的捕獲—方法およびオリゴヌクレオチド

開示されたアルカリショックに基づくサンプル調製法は、サンプルを核酸に富むものにする標的捕獲手順と相まった場合に特に価値が高いと実証された。個々の好ましい実施形態は、非特異的標的捕獲（すなわち、核酸が、核酸の塩基配列と実質的に無関係な方法で捕獲される場合）および配列特異的標的捕獲に依存する。これらの方法のいずれかまたは両方とも、固定可能であるか、または固定されている捕獲オリゴヌクレオチドを使用できる。

【0059】

好ましい捕獲オリゴヌクレオチドは、固体支持体上への固定化の標的として働く第2の配列（すなわち、「テール」配列）と共有結合によって結合している、増幅される予定の標的配列を含むポリヌクレオチドと相補的である第1の配列を含む。捕獲オリゴヌクレオチドの塩基配列と結合する骨格はいずれも使用できる。特定の好ましい実施形態では、捕獲オリゴヌクレオチドは、骨格中に少なくとも1つのメトキシ結合を含む。捕獲オリゴヌクレオチドの3'末端であることが好ましいテール配列を用いて相補塩基配列とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしている標的核酸を生体サンプル中のその他の成分に優先して捕獲するための手段を提供する。

【0060】

相補塩基配列とハイブリダイズする塩基配列はいずれもテール配列中に使用できるが、ハイブリダイズする配列は約5～50ヌクレオチド残基の長さに及ぶことが好ましい。特に好ましいテール配列は実質的にホモポリマー状であり、約10～約40ヌクレオチド残基を含み、約14～約30残基がより好ましい。本発明の捕獲オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドと特異的に結合する第1の配列と、固体支持体に固定されているオリゴ（dT）ストレッチと特異的に結合する第2の配列とを含み得る。

【0061】

図1に示される成分を用いる、生体サンプルにおいて核酸配列を検出するための1つのアッセイは、捕獲オリゴヌクレオチドを用いて標的核酸を捕獲するステップと、少なくとも2種の増幅オリゴヌクレオチドまたは少なくとも2種のプライマーを用いて捕獲された標的領域を増幅するステップと、まず、標識されたプローブを増幅された核酸中に含まれる配列とハイブリダイズさせ、次いで、結合している標識されたプローブに起因するシグナルを検出することによって増幅された核酸を検出するステップとを含む。

【0062】

捕獲ステップは、捕獲オリゴヌクレオチドを用いることが好ましく、これではハイブリダイジング条件下では、捕獲オリゴヌクレオチドのある部分が標的核酸中の配列と特異的にハイブリダイズし、テール部分が結合対の1つの成分、例えば、リガンド（例えば、ビオチン-アビジン結合対）として働き、これによって標的領域がサンプルのその他の成分から分離されることが可能となる。捕獲オリゴヌクレオチドのテール部分は、固体支持体粒子に固定されている相補配列とハイブリダイズする配列であることが好ましい。まず、捕獲オリゴヌクレオチドと標的核酸を溶解して、溶液相ハイブリダイゼーション動力学を利用することが好ましい。ハイブリダイゼーションにより、捕獲オリゴヌクレオチドのテール部分と、相補的な固定された配列とのハイブリダイゼーションによって固定されたプローブと結合できる捕獲オリゴヌクレオチド：標的核酸複合体が生じる。したがって、ハイブリダイゼーション条件下で、標的核酸と、捕獲オリゴヌクレオチドと、固定されているプローブとを含む複合体が形成される。固定されたプローブは、繰り返しの多い配列であることが好ましく、テール配列と相補的であり、固体支持体と結合されている、ホモポリマー状配列（例えば、ポリ-A、ポリ-T、ポリ-Cまたはポリ-G）がより好ましい。例えば、捕獲オリゴヌクレオチドのテール部分がポリA配列を含む場合には、固定されたプローブはポリT配列を含むが、いずれの組み合わせの相補配列も使用できる。捕獲オリゴヌクレオチドはまた、標的とハイブリダイズする塩基配列と、固定されたプローブとハイブリダイズするテールの塩基配列の間に位置する1個以上の塩基である、「スパーサー」残基も含み得る。固体支持体はいずれも、標的核酸：捕獲オリゴヌクレオチド複合体を結合するために使用できる。有用な支持体は、マトリックスまたは溶液中で遊離型の粒子のいずれか（例えば、ニトロセルロース、ナイロン、ガラス、ポリアクリレート、混合ポリマー、ポリスチレン、シランポリプロピレン、および好ましくは、磁力によって引き寄せられる粒子）であり得る。固定されるプローブを固体支持体と結合する方法は周知である。支持体は、標準法（例えば、遠心分離、磁性粒子の磁力など）を用いて溶液から回収できる粒子であることが好ましい。好ましい支持体としては、常磁性単分散粒子（すなわち、サイズが均一±約5%）がある。

【0063】

標的核酸：捕獲オリゴヌクレオチド：固定されたプローブ複合体を回収することにより、標的核酸を効率的に濃縮し（生体サンプル中のその濃度と比べて）、生体サンプル中に存在し得る増幅阻害剤から標的核酸を精製する。捕獲された標的核酸は1回以上洗浄し、例えば、洗浄溶液に、結合している標的核酸：捕獲オリゴヌクレオチド：固定されたプローブ複合体を含む粒子を再懸濁し、次いで、上記のように洗浄溶液から、結合している複合体を含む粒子を回収することによって標的をさらに精製してもよい。好ましい実施形態では、捕獲ステップは、捕獲オリゴヌクレオチドを標的核酸と逐次的にハイブリダイズさせ、次いで、ハイブリダイゼーション条件を調整して、捕獲オリゴヌクレオチドのテール部分と固定された相補配列とのハイブリダイゼーションを可能にすることによって起こる（例えば、PCT番号WO98/50583に記載されるとおり）。捕獲ステップおよび何らかの任意の洗浄ステップが完了した後、次いで、標的核酸を増幅することができる。処理ステップの数を制限するために、場合により、標的核酸を捕獲オリゴヌクレオチドから放出させずに増幅することができる。

10

【0064】

有用な捕獲オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ配列が、増幅されようとする配列を含む核酸とハイブリダイズする限りは、上記で示される配列に対してミスマッチを含み得る。

【0065】

有用な増幅法

本発明に関連して有用な増幅法としては、転写媒介性増幅（TMA）、ヌクレイック・アシッド・シークエンスベースド・アンプリフィケーション（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification）（NASBA）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ストランド・ディスプレイスメント・アンプリフィケーション（Strand Displacement Amplification）（SDA）および自己複製ポリヌクレオチド分子および複製酵素、例えば、MDA-1 RNA および Q-β 酵素を用いる増幅法が挙げられる。これらの種々の増幅技術を実施する方法は、それぞれ、米国特許第5,399,491号、公開された欧州特許出願EP0525882、米国特許第4,965,188号、同5,455,166号、同5,472,840号およびLizardi et al., BioTechnology 6:1197（1988）に見出すことができる。核酸増幅反応を実施するための方法を説明するこれらの文書の開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0066】

本発明の好ましい実施形態では、標的核酸配列をTMAプロトコルを用いて増幅する。このプロトコルによれば、DNAポリメラーゼ活性を提供する逆転写酵素はまた、内因性RNAアーゼH活性も保持する。この手順に用いられるプライマーの1種は、増幅される標的核酸の一方の鎖と相補的である配列の上流に位置するプロモーター配列を含む。増幅の第1のステップでは、プロモータープライマーが標的RNAと規定の部位でハイブリダイズする。逆転写酵素により、プロモータープライマーの3'末端から伸長することによって標的RNAの相補的DNAコピーが生じる。反対の鎖のプライマーと新規に合成されたDNA鎖との相互作用の後、逆転写酵素によって、DNAの第2の鎖がプライマーの末端から合成され、それによって二本鎖DNA分子が生じる。RNAポリメラーゼは、この二本鎖DNA鋳型中のプロモーター配列を認識し、転写を開始する。新規に合成されたRNAアンプリコンは各々、TMAプロセスに再度入り、複製の新規ラウンドの鋳型として働き、それによって、RNAアンプリコンの指数増大がもたらされる。DNA鋳型の各々は100～1000コピーのRNAアンプリコンを作製し得るので、この増大は、1時間未満で100億個のアンプリコンの製造をもたらし得る。全プロセスは自己触媒的であり、一定温度で実施される。

40

【0067】

キット

本発明はまた、アルカリショックに基づくサンプル調製手順を実施するために使用できるキットも包含する。本発明のキットは、分離しているバイアルまたは容器中に、溶解／

50

捕獲試薬と、アルカリ性水酸化物とを含む。本発明の特定の実施形態では、これらの試薬のうち一方または両方とも、使用前に水などの液体成分で再構成され得る、乾燥した、凍結乾燥した、または半固体の組成物である。特定の高度に好ましい実施形態では、アルカリ性水酸化物組成物は、使用前に液体物質での再構成を必要とする。その他の実施形態では、アルカリ性水酸化物は、液体組成物としてキット中にパッケージングされている。溶解／捕獲試薬は、再構成が必要である場合には、再構成時に pH が 8.0 未満である、界面活性剤および緩衝液を含むことが好ましい。

【0068】

本発明の好ましい実施形態

核酸増幅に基づくアッセイにおいて、RNA 標的の検出能を実質的に損なうことなく DNA 標的の検出能を増強するための一般的な手順を確実に開発するために、その開示内容が参照により組み込まれる、公開された国際特許出願番号 PCT/US03/18993 の実施例 7 に本質的に記載されるモデルマルチプレックスアッセイを用いて本発明の特定の態様を作製した。RNA 標的 (HIV-1 および HCV) と DNA 標的 (HBV) の双方を増幅できるこのアッセイは、HBV サブタイプ A~C を増幅するために共通セットのプライマーを用いる。したがって、以下に記載される手順は、サンプル調製を変量として本質的に単離した。

【0069】

本明細書に記載される手順に用いられるモデルアッセイは、すべて単一の試験管中で起こる 3 つの主なステップ：サンプル調製：HIV-1 または HCV RNA または HBV DNA 標的増幅：ハイブリダイゼーション保護アッセイ (HPA) による増幅産物 (アンプリコン) の検出を含んでいた。サンプル調製の際に、標的捕獲の使用によって血漿試料からウイルス RNA および DNA を単離した。血漿を緩衝界面活性剤溶液と合わせて、試料に含まれる、ウイルスエンベロープの可溶化、タンパク質の変性ならびにウイルス粒子からのウイルスゲノム RNA および／または DNA の放出を容易にする。アルカリ性水酸化物溶液のさらなる添加によって達成されるアルカリショックは、本発明の開発の間の試験ステップとして働く。簡単にするために、血漿試料と合わせた緩衝界面活性剤溶液は、「溶解／捕獲試薬」と呼んだ。HIV-I、HCV および HBV の保存された領域と相同であったオリゴヌクレオチド (捕獲オリゴヌクレオチド) を、試験試料中の、存在すれば、HIV-I または HCV RNA または HBV DNA 標的とハイブリダイズさせた。次いで、ハイブリダイズした標的を磁性微粒子上に捕獲し、磁場においてバルク血漿から分離した。洗浄ステップを用いて、無関係な血漿成分を反応試験管から除去した。次いで、捕獲したウイルス核酸のいずれかをプライマー依存性インビトロ核酸増幅反応において鋳型として用いた。モデルアッセイにおける標的増幅は、TMA、2 種の酵素、MMLV 逆転写酵素および T7 RNA ポリメラーゼを用いる転写に基づく核酸増幅法によって生じた。モデルアッセイは、HIV-I RNA、HCV RNA および／または HBV DNA の領域を増幅できた。アンプリコンの検出は、アンプリコンと相補的である一本鎖核酸プローブの混合物を用いる HPA によって達成した。各核酸プローブは、化学発光標識を有し、アンプリコンの 1 種と特異的にハイブリダイズする。「選択」試薬は、ハイブリダイズしていないプローブ上の標識を不活化することによって、ハイブリダイズしているプローブとハイブリダイズしていないプローブ間を区別した。検出ステップの際、ハイブリダイズしているプローブによって生じた化学発光シグナルを、ルミノメーターで測定し、相対発光量 (RLU) として報告した。

【0070】

アッセイ結果の整合性は、溶解／捕獲試薬の作用を介して、各試験試料に添加された内部対照 (IC)、外部対照またはアッセイ校正試験管の使用によって確認した。この試薬中の IC は試料処理、増幅および検出ステップを制御した。各試験管またはアッセイ反応物中の IC シグナルは、異なる標識を含むプローブからの光発光の異なる動力学によって HIV-1/HCV/HBV シグナルと区別した。IC アンプリコンは、光を迅速発光 (フラッシャーシグナルと呼ばれる) を有するプローブを用いて検出した。HIV-1/H

10

20

30

40

50

C V / H B V に特異的なアンプリコンは、光発光の相対的に遅い動力学（グラウアシグナルと呼ばれる）を有するプローブを用いて検出した。当業者には理解されるであろうが、二重キネティックアッセイ（Dual Kinetic Assay）（DKA）は、フラッシャー標識とグラウア標識からのシグナル間を区別するために用いられる標準法である。H I V - I、H C V および H B V の同時検出に用いられる場合は、モデルアッセイは、I C と、合わせた H I V - I / H C V / H B V シグナル間を区別したが、個々の H I V - I、H C V および H B V シグナル間は区別しなかった。

【0071】

アッセイ結果の解釈は、標的核酸の1種ならびに I C の検出を表すシグナルに依存した。より詳しくは、各アッセイに対して2つのカットオフ：分析物カットオフと呼ばれる分析物シグナル（グラウアシグナル）のためのものと、I C カットオフと呼ばれる、I C シグナル（フラッシャーシグナル）のためのものを決定した。各サンプルについて、分析物シグナル R L U 値および I C シグナル R L U 値を求めた。分析物カットオフで除した分析物シグナル R L U を、分析物シグナル / カットオフ、すなわち、「S / C O」と呼んだ。分析物カットオフ未満の分析物シグナル（すなわち、分析物 S / C O < 1.00）を有するサンプルについては、結果が妥当であるには、内部対照（I C）シグナルは内部対照カットオフ（I C カットオフ）以上でなくてはならない。この場合には、内部対照結果は妥当であると考えられ、サンプルは反応なしとして報告される。分析物カットオフ未満の分析物シグナル（すなわち、分析物 S / C O < 1.00）および内部対照カットオフ未満の内部対照シグナルを有するサンプルについては、内部対照結果は妥当でないと考えられ、サンプル結果は妥当でない。すべてのサンプルについて、内部対照シグナルが 475,000 R L U を超えることはない。このような場合には、サンプルは自動的に妥当でないと報告される。

【0072】

上記で示したように、本発明を例示するために用いた増幅技術は、転写媒介性増幅であった。しかし、開示されたサンプル調製法は、当業者によく知られるいずれのインビトロ核酸増幅技術と併用してもよい。これは、発明された方法が、核酸増幅手順と独立している、溶解および標的捕獲ステップを改善する働きをするためである。

【0073】

以下の実施例は、溶解／捕獲試薬のサンプルに、混合物の緩衝能を完全に越えることなく添加できるアルカリ性水酸化物溶液の量を実験的に定めた予備実験を説明する。この場合には、例示的緩衝界面活性剤溶液は、捕獲オリゴヌクレオチドおよび磁性ビーズを含んだ H E P E S 緩衝ラウリル硫酸リチウム溶液であった。これらの手順を用いて、p H プロファイルのみを定め、核酸増幅は含まなかった。溶解／捕獲試薬の H E P E S（N-2-ヒドロキシエチルピペリジン-N'-2-エタンスルホン酸）成分の p K a は約 7.5 であり、従来、p H 6.8 ~ 8.2 の範囲の緩衝溶液に用いられている。添加されるアルカリ溶液が最終 p H を以下に指定される範囲内に入れるような量で添加されるという条件で、H E P E S 以外の緩衝液を用いて、発明されたサンプル調製手順を実施できる。もちろん、緩衝界面活性剤溶液の出発 p H は、約 p H 6.5 ~ 約 8.0 の範囲を意味するほぼ中性 ~ わずかにアルカリ性であることが好ましく、約 p H 7.0 ~ 約 8.0 がより好ましく、または約 p H 7.0 ~ 約 7.5 がさらに好ましい。

【実施例】

【0074】

実施例 1 は、添加された血漿サンプルを含んでいたか、または含んでいなかった H E P E S 緩衝界面活性剤溶液へのアルカリ性水酸化物溶液の添加の効果を説明する。この手順から得た結果は、種々の量の水酸化物溶液を用いて生じた混合物の最終 p H を求めるための経験的基礎を提供した。

【0075】

（実施例 1）

血漿サンプルを含む緩衝界面活性剤溶液へのアルカリ添加の p H 効果の測定

10

20

30

40

50

溶解／捕獲試薬（すなわち、緩衝界面活性剤溶液）のアリコート（ $400\mu\text{l}$ ）をプラスチック反応試験管に分配した。溶解／捕獲試薬は、可溶性捕獲オリゴヌクレオチドと、ポリ（dT₁₄）と共有結合している約 $40\mu\text{g}$ の $0.7\sim 1.05\mu\text{m}$ 常磁性粒子（Seradyn, Indianapolis, IN）とを含んでいた。捕獲オリゴヌクレオチドは、粒子結合型ポリ（dT）と、およびHBVサブタイプA、-Bまたは-Cの核酸と同時ハイブリダイズできた。溶解／捕獲試薬は、HIV-1内部増幅コントロール鑄型と、HIV-1およびHCV特異的捕獲オリゴヌクレオチドと、約 800mM HEPES（pH 7.5）と、約10%重量／容積ラウリル硫酸リチウムとをさらに含んでいた。また、反応試験管の半分には、フィブリンを含まない処理対照血漿のアリコート（ $500\mu\text{l}$ ）を加えた。次いで、これらの試験管に、 $1.0\sim 2.5\text{N}$ の範囲の濃度を有するNaOH溶液の $100\mu\text{l}$ のアリコートを加えた。溶解／捕獲試薬、または溶解／捕獲試薬と血漿サンプルを合わせたものを含有する1セットの試験管を、NaOH溶液のアリコートを加えなかった対照として用意した。すべてのサンプルを、機械的ボルテクサーを用いて混合し、得られた混合物のpH値は、VWR Scientific Products（Chester, PA）製のモデル9100pHメーターを用いて測定した。これらの手順から得られた結果を表1に示す。

【0076】

【化1】

表1
血漿サンプルと合わせた
緩衝界面活性剤溶液へのアルカリの滴定

添加された NaOHの濃度	混合後 pH	
	サンプル： 溶解／捕獲試薬	サンプル： 溶解／捕獲試薬＋血漿
なし	7.45	7.45
1.0 N	8.05	8.05
1.4 N	8.31	8.35
1.8 N	8.65	8.76
2.2 N	9.85	10.62
2.5 N	13.2	12.6

表1に示される結果は、 2.2N 以上の濃度を有するNaOH溶液 $100\mu\text{l}$ の添加は、血漿サンプルが加えられていようがいまいが、緩衝界面活性剤溶液の緩衝能を超え始めたことを示した。これは、 2.2N 以上のNaOHの濃度を用いた場合のみ、混合物の最終pHを1pH単位を超えて高めたという知見に基づくものであった。これらの結果は、インビトロ増幅反応においてDNA標的を検出する能力に対する、添加されたアルカリの効果の定量化を目的としたさらなる研究のための基礎を提供し、また、手順を、高pHという条件下では加水分解に付され得るRNA標的の使用に適応させるのに有用な手引きを提供した。

【0077】

以下の実施例により、可変量の添加されたアルカリが、ウイルス溶解と、放出された核酸の捕獲と、増幅と、検出ステップとを含む、インビトロ増幅システムにおけるHBVサブタイプ-Bの検出にどのように影響を及ぼしたかを説明する。この手順では、モニターされたアッセイパラメーターは、検出の陽性％と、CV（変動の係数）％と、平均定量的シグナル強度（相対発行量、すなわち、「RLU」で測定した）を含んでいた。当業者には理解されるであろうが、低CV％値が高レベルのアッセイ精度を示すことが有利であり、そして極めて好ましい。

【0078】

実施例2は、インビトロ核酸増幅反応を実施するのに先立って、ウイルス含有血漿と、溶解／捕獲試薬との混合物に添加できる有用な量のアルカリを規定する手順を説明する。

【0079】

(実施例2)

アルカリショックを含むサンプル調製はアッセイ性能を向上させる

プラスチック反応試験管中で、実施例1に記載された溶解／捕獲試薬のアリコート400 μ lを、HBVサブタイプBに感染した個体から得た血漿サンプル500 μ lと合わせた。対照試験管は、ウイルス陽性サンプルの代わりにウイルス陰性血漿を含んでいた。この手順においてウイルス鑄型の供給源として用いたすべての血漿サンプルは、ウイルス陰性処理対照血漿で1：3希釈されていた。次いで、種々の濃度のNaOH溶液のアリコート100 μ lを、溶解／捕獲試薬と血漿を合わせたものを含む種々の試験管に添加した。この手順に用いたアルカリ溶液は、0.05～2.5Nの範囲のNaOH濃度を有していた。対照試験管は、NaOH溶液の代わりに水を含んでいた。混合物を短時間ボルテックス処理して確実に混合し、60℃で約20分間加熱し、次いで、室温に15分間冷却し、ハイブリダイゼーションおよび標的捕獲を可能にした。Wangによって米国特許第4,895,650号に記載されたものなどの手順を用い、磁場を加えて、固定された捕獲オリゴヌクレオチドと、HBV DNAを含む粒子複合体を集めた。次いで、1mlの洗浄緩衝液(pH7.5の10mM HEPES、6.5mM NaOH、1mM EDTA、0.3%(v/v)エタノール、0.02%(w/v)メチルパラベン、0.01%(w/v)プロピルパラベン、150mM NaCl、0.1%(w/v)ラウリル硫酸ナトリウム)で粒子を2回洗浄した。洗浄した粒子を、75 μ lの増幅試薬に再懸濁し、蒸発を防ぐために、試験管の内容物を不活性オイルで表面を覆った。増幅試薬は、塩、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、HBV特異的プライマーならびにHIV-1およびHCV標的配列を増幅できるプライマーを含んでいた。短時間ボルテックス処理した後、混合物をまず60℃で10分間インキュベートしてプライマーアニーリングを促進し、次いで、41.5℃で10分間平衡にした。次いで、予め加温した、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素(5,600ユニット／反応物)と、T7 RNAポリメラーゼ(3,500ユニット／反応物)とを含む酵素試薬のアリコートを混合物に添加した。41.5℃で1時間インキュベートした後、反応が完了し、公開された国際特許出願番号PCT/US03/18993の実施例1のもとで本質的に説明される均一保護アッセイにおいてアクリジニウムエステル標識したハイブリダイゼーションプローブを用いてHBV増幅産物を検出した。内部対照アンプリコンに特異的なプローブと、またはHBVアンプリコンに特異的なプローブとハイブリダイズした場合に、陽性シグナルを生じた反応を、有効な実施として記録した。有効な実施を、HBVアンプリコンの存在について陽性と考えするには、アッセイにおいて、プローブハイブリダイゼーションを示す化学発光シグナルが50,000RLUを超えなくてはならない。これらの手順から得られた結果を表2および図2A～2Cに示す。

【0080】

【化 2】

表 2

アルカリショックのための条件の最適化

添加物	血漿サンプル	陽性%	CV %	平均 R L U
水 (対照)	対照	0	37	2231
	HBV-B 1:3	10	144	296066
0.05N NaOH	対照	0	23	2709
	HBV-B 1:3	10	195	232295
0.1N NaOH	対照	0	33	2248
	HBV-B 1:3	50	64	721476
0.3N NaOH	対照	0	20	3546
	HBV-B 1:3	60	34	898200
0.6N NaOH	対照	0	37	4023
	HBV-B 1:3	60	36	930407
1.0N NaOH	対照	0	17	5017
	HBV-B 1:3	90	10	1136773
1.4N NaOH	対照	0	42	4387
	HBV-B 1:3	100	4	1183610
1.8N NaOH	対照	0	24	4216
	HBV-B 1:3	100	5	1184132
2.2N NaOH	対照	0	16	4559
	HBV-B 1:3	90	8	1166869
2.5N NaOH	対照	0	211	13087
	HBV-B 1:3	0	47	5931

これらの手順から得られた結果は、アルカリショックステップを含むサンプル調製は大幅に改善されたアッセイ性能をもたらしたことが有利であると示した。アルカリショックステップの性質によってのみ異なっているすべてのアッセイによって、アルカリショックの使用によって達成可能な利益は、この手順に用いられる特定のオリゴヌクレオチドに依存しないことが確認されたという事実が注目される。実際、NaOH溶液の代わりに水のアリコートを加えた対照試験は、相対的に低い陽性レベル%と、望ましくない高CV%値を示した。逆に、0.1～2.2Nの範囲の濃度を有するNaOH溶液を用いて実施したアルカリショックは大幅に高い陽性レベル%と、CV%値の低下によって判断される高い精度を示した。

【0081】

これらの結果がまた、アルカリショック手順において使用できる最適範囲の水酸化物濃度についての証拠を提供したことは重要である。より詳しくは、データは、最高濃度のNaOHの使用は、アッセイ性能を陽性%がゼロに低下する点まで実質的に損なうことを示した。この量の水酸化物溶液は、溶解／捕獲試薬と、血漿サンプルを混合した場合に、12.6という最終pHをもたらした（表1参照のこと）。したがって、12.6という最終pHをもたらすのに十分なアルカリ性水酸化物量を添加することは、アッセイの、標的を検出する能力をなくす。逆に、最終pHを、約8.0～約10.6の範囲に上昇させる

のに十分な量のNaOH溶液の添加が良好な結果を示した。この実験では、最終pHを約8.3～約8.8の範囲に上昇させるのに十分な量のNaOH溶液を添加することによって最良の結果が達成された。この範囲は、以下の実施例8において定められるpH8.2～9.2という好ましい範囲とほぼ同一であったことが注目される。これらの範囲は、生体サンプルを含有する緩衝界面活性剤溶液への、適当な量のアルカリ溶液、好ましくは、アルカリ性水酸化物溶液の添加から得られる好ましいpH範囲を規定する。

【0082】

以下の手順は、アッセイ感度の改善を達成するには、一時的な高pH（すなわち、「アルカリショック」）が必要であるということを証明した。この実施例では、3種の試薬を合わせる順序を変えて、本明細書に記載される有益な効果がサンプルの最終pHの変更に起因するのか、または異なる機構に起因するのかを調べた。

【0083】

実施例3は、アルカリ条件への一時的な曝露に由来するアルカリショック法の有益な効果を証明した手順を説明する。

【0084】

（実施例3）

アッセイ性能を改善するには一時的なアルカリショックが必要である

異なる順序で3種の試薬（アルカリ性水酸化物、血漿サンプルおよび溶解／捕獲試薬）を合わせることを含んでいたサンプル調製法を用いて、観察されたアッセイ改善の根底にある作用機序に取り組んだ。手順に用いた試薬およびその量は、溶解／捕獲試薬400μl、HBVサブタイプBウイルス粒子を含有する血漿サンプル（すなわち、ウイルス陰性処理血漿で1：10希釈した、ヒトドナーから得たウイルス感染血漿）500μlおよび1.6N NaOH100μlとした。アルカリ性水酸化物溶液の濃度は、前記の実施例において良好な結果をもたらしたものの範囲内であるので選択した。すべての試薬は、プラスチック反応試験管にピペットで入れ、標的捕獲、増幅および検出は、前記の実施例に記載されたとおりに実施した。1：10希釈したHBV陽性血漿と、溶解／捕獲試薬とを用い、NaOHを全く添加せずに実施した対照反応は、40%の陽性反応性を示し、それによって、比較基準を規定した。表に列挙される条件のすべてについて、HBV陽性血清サンプル（表2中「HBVサンプル」）の代わりにHBV陰性血漿を用いて実施した陰性対照反応は、予想されるとおり、増幅および検出反応において陽性反応性0%を一様に示した。1：10希釈されたサンプルの代わりに、1：20希釈されたHBV陽性血漿サンプルを用いて実施した手順は、表3に示されるものと一致した結果を示した。各試験条件（n=10）についての3種の試薬の添加順序を表に示す。

【0085】

【化3】

表3

一時的なアルカリショックは有益な結果をもたらす

第1の試薬	第2の試薬	第3の試薬	陽性 %
溶解／捕獲試薬	HBVサンプル	アルカリ	100
	アルカリ	HBVサンプル	20
HBVサンプル	溶解／捕獲試薬	アルカリ	90
	アルカリ	溶解／捕獲試薬	100
アルカリ	溶解／捕獲試薬	HBVサンプル	40
	HBVサンプル	溶解／捕獲試薬	80

表3の結果は、試薬添加の順序がアッセイ結果に大いに影響を及ぼすことを示した。ま

ず、溶解／捕獲試薬とアルカリ性水酸化物溶液を、反応試験管へのこれらの試薬の添加順序にかかわらず、互いに合わせることは、アルカリショックを省いた対照と同様の結果をもたらした。したがって、溶解／捕獲試薬とアルカリ性水酸化物をすでに合わせた後に、ウイルス含有サンプルを添加することによって、陽性％によって測定可能な利益は全くもたらされなかった。逆に、まず、溶解／捕獲試薬とHBVウイルス粒子を含有するサンプルを合わせる（いずれかの順序で）と、その後、アルカリ性水酸化物溶液をその混合物と合わせることで、この高度に好ましい添加順序によって濃水酸化物溶液への生体サンプルの直接曝露を避けられることは有利であり、そのようにして、RNA鋳型のアルカリ加水分解を最小にするはずであることも有利である。

【0086】

10

いずれかの特定の動作理論に拘束されようとは思わないが、前記結果は、溶解／捕獲試薬とウイルスサンプルとを含有する反応試験管内の局所的、一時的な高pHが、本明細書に開示された有利な点をもたらすいくつかの効果を有していたという機構を支持する。技術の成功は一時的な高pH曝露に起因するものであるため、本明細書に開示される方法を「アルカリショック」と名づけた。

【0087】

上記で示される結果はまた、反応混合物の最終pH（実施例1に記載される）を用いて、良好な結果が生じるのに必要とされるアルカリ溶液の量を判断できることを示したが、混合物の最終pHは手順の成功を予測するものではなかった。実際、混合物の最終pHがアッセイの結末を決定するならば、表3に示される試験条件のすべてが同一の結果をもたらすが、それは事実ではなかった。したがって、本発明の好ましい実施様式は、pH緩衝液と、界面活性剤と、特定の核酸の存在について試験されようとする生体サンプルとを含むサンプルにアルカリ溶液を添加するステップを含む。高度に好ましい実施形態では、生体サンプルは、体液、例えば、全血、血漿、血清などである。

20

【0088】

以下の実施例は統計分析を用い、サンプル調製手順の間にアルカリショックを含めることによって種々のHBVサブタイプについてのアッセイ感度がどのように改善されるかを測定した。この実証の目的上、本質的に、公開された国際特許出願PCT/US03/18993の実施例7のもとで開示されるマルチプレックスアッセイは、唯一の本質的差異はサンプル調製手順の間のアルカリショックステップの付加である状態で用いた。

30

【0089】

実施例4は、アルカリショック技術が複数のHBVサブタイプについて定量的アッセイ性能をどのように改善したかを説明する。

【0090】

（実施例4）

アルカリショック技術の効果の定量化

既知量のHBVサブタイプA、BまたはCウイルス粒子を含有する血漿サンプルのパネルを、当業者によく知られる方法によって製造した。サンプルは、プラスチック反応試験管中で溶解／捕獲試薬400μlと個々のパネルメンバー500μlをまず合わせ、1.6N NaOH100μlを添加し、その後、試験管を攪拌して混合を確実に完了させるアルカリショックプロトコルを用いて調製した。標的捕獲、増幅および増幅産物の検出は、上記の通りに実施した。アルカリショック手順を省いた対照反応を平行して実施した。SAS（登録商標）システムソフトウェア（バージョン8.02）（Cary, NC）においてプロビット関数を用いる回帰分析を用いて、95%および50%検出レベルを算出した。妥当でない反応は再試験せず、分析感度の解析に含めなかった。これらの手順から得られた結果を図3A～3Cに示し、プロビット分析は表4に要約する。

40

【0091】

【化 4】

表 4

HBVサブタイプ検出に対するアルカリショックの効果の定量化

HBV 遺伝子型	検出確率	アッセイ感度 (コピー／ml)		感度の増加倍数
		対照	アルカリショック	
B	95%	1405 (1168-1792)	78 (61-116)	18x
	50%	504 (440-623)	22 (14-29)	23x
C	95%	98 (78-134)	26 (21-35)	3.8x
	50%	37 (29-49)	10 (8-13)	3.7x
A	95%	74 (58-108)	40 (32-57)	1.9x
	50%	26 (20-34)	12 (9-16)	2.2x

95%信頼区間が括弧中に示されている

表 4 に要約された結果により、アルカリショック手順は、少し違う程度にはあるが、HBV の 3 種のサブタイプすべての検出能を増強することが確認された。アルカリショックを用いなかった従来手順を用いると、95%検出確率でのサブタイプ B ウイルスのアッセイ感度は、その他のサブタイプよりも約 16 倍低かった。標的捕獲および増幅の前にアルカリショック手順を組み込んだ、改善されたサンプル調製法を用いると、100 コピー／ml より低いレベルのサンプルですべてのサブタイプが検出され得るまでにアッセイ性能を著しく改善した。アルカリショックサンプル調製法はサブタイプ B ウイルスのアッセイ感度を最も大幅に改善したことが興味深い。この異なった改善は、この提示の前には予測され得なかったことであり、発明された方法の効果の基礎をなす機構に関する洞察を提供し得る。

【0092】

前記の実施例に示された結果は、サンプル調製手順の間の一時的なアルカリショックはその後の核酸標的の検出を大幅に改善することを示した。以下の実施例に記載される試験は、この改善の基礎をなす機構に取り組んだ。より詳しくは、溶解／捕獲試薬と生体サンプルの混合物へのアルカリ性水酸化物溶液の添加が、サンプル中のタンパク質および核酸に対する変性作用のみを有し、それによって、その後の増幅および検出に対するウイルス核酸のアベイラビリティを高めたかどうかを調べるために実験を実施した。アルカリ条件はタンパク質および核酸を変性させることがわかっているが、以下に示される結果は、本明細書に記載された手順によって観察された有益な結果はアルカリ変性によって十分に説明されないということを示した。

【0093】

実施例 5 は、アルカリショック現象は、タンパク質および／または核酸のアルカリ変性によって主として媒介されるわけではないということを証明した手順を説明する。

【0094】

(実施例 5)

アルカリショックはアルカリと界面活性剤の合わせた効果を必要とする

0%、5%または10%のいずれかのラウリル硫酸リチウム (LLS) 界面活性剤を含むよう特殊化した溶解／捕獲試薬を調製した。本明細書に記載されるすべてのその他の場合の溶解／捕獲試薬は10% LLSを用いて調製したことは注目される。まず、1種の標的捕獲試薬のアリコート (400 μ l) を、HBVサブタイプ B に感染した患者から得られた血清サンプルの1:10希釈物のアリコート (500 μ l) と合わせた。すべての試験は、約100コピーのHBVゲノムを含んでいた。その後、アルカリ性水酸化物で処理される予定の試験には、1.6N NaOH 100 μ lを加え、短時間ボルテックス処理した。対照試験にはNaOH溶液の代わりに100 μ lの水を加えた。標的捕獲、増幅

10

20

30

40

50

および増幅産物の検出は、上記のとおりを実施した。すべての試験は、10の複製で実施した。これらの手順から得られた結果を表5に示す。

【0095】

【化5】

表5

アルカリショックは界面活性剤とアルカリを合わせることを必要とする

溶解／捕獲試薬中の界面活性剤%	HBVの検出%	
	対照	アルカリ処理
0	0	0
5	10	80
10	20	90

10

表5に示される結果は、アルカリショックを達成するには界面活性剤とアルカリを合わせるが必要とされることを示した。実際、界面活性剤を省いた溶解／捕獲試薬を用いて調製したサンプルは、アルカリ性水酸化物を加えた試験においても、HBV検体を検出できなかった。したがって、指定のpH条件下での界面活性剤の不在下でのアルカリでの処理は良好な結果を生じるのに十分ではなかった。このことは、アルカリショックが達成される機構は、完全にタンパク質および核酸のアルカリ媒介性変性によるものではないということを示した。そうではなく、生体サンプルを緩衝液および界面活性剤とまず合わせるステップと、その後、アルカリ性水酸化物を添加するステップとを必要とする相乗効果があった。

20

【0096】

DNA標的のモデル供給源としてHBV粒子を用いて実施した手順に加えて、さらなる実験を実施して、RNA標的に対するサンプル調製の間のアルカリショックの効果を調べた。前記の実施例におけるのと同様、HIV-1、HCVおよびHBV核酸を増幅および検出できるマルチプレックスアッセイを用いてRNA標的に対するアルカリショックの効果を調べた。実際、加水分解に対するRNAの既知の感度は、アルカリショック手順は、増幅および検出に先立つDNA標的の単離に関連して有用であるだけであるということを示唆した。

30

【0097】

実施例6は、RNA標的が、アルカリショックを含んでいた手順で調製した核酸鋳型を用いて増幅および検出され得なかったことを実証した手順を説明する。

【0098】

(実施例6)

HIV-1およびHCVの検出に対するアルカリショックの効果

既知量の、以下のRNAウイルスのうちの1種を有する血漿サンプルのパネルを標準法によって作製した：HCV-1a、HCV-2bおよびHIV-1b。サンプルは、まず、プラスチック反応試験管中で、溶解／捕獲試薬400μlと個々のパネルメンバー500μlを合わせ、1.6N NaOH100μlを添加し、その後、試験管を攪拌して混合を確実に完了させるアルカリショックプロトコルを用いて調製した。標的捕獲、増幅および増幅産物の検出は、増幅手順の終わりで適当な検出プローブを用い、上記のとおり本質的に実施した。アルカリショック手順を省いた対照反応を平行して実施した。最高のウイルス力価を用いて実施した試験を除き、すべての反応は、20の複製を用いて実施した。300コピー／mlの血漿サンプルの同等物を用いて実施した反応は、10の複製を用いて行った。これらの手順から得られた結果を表6～8に、および図4A～4Cに要約する。表9は、表6～8のデータのプロビット解析から得られた結果を示す。

40

【0099】

50

【化 6】

表 6
HCV-1 a 増幅および検出に対する
アルカリショックの効果

	HCV-1 a サンプル (RNAコピー/μl)	陽性 %	試験数	平均 I C RLU	平均アンプリコン RLU	妥当でない 数
対照	300	100	10	185354	1453346	0
	100	100	20	182303	1368094	0
	30	95	20	185996	1165246	0
	10	52.6	20	199793	458035	1
	3	38.9	20	201781	352694	2
アルカリショック	300	100	10	162777	1398738	0
	100	100	20	170729	1411556	0
	30	95	20	170932	1157907	0
	10	75	20	179854	865606	0
	3	46.7	20	182010	530033	5

表 7
HCV-2 b 増幅および検出に対する
アルカリショックの効果

	HCV-2 b サンプル (RNAコピー/μl)	陽性 %	試験数	平均 I C RLU	平均アンプリコン RLU	妥当でない 数
対照	300	100	10	265152	1272494	0
	100	100	20	251077	1190681	0
	30	95	20	241570	911405	0
	10	73.7	20	236737	514461	0
	3	15	20	235306	67760	1
アルカリショック	300	100	10	242148	1287926	0
	100	100	20	260091	1020347	0
	30	90	20	246163	530746	0
	10	55	20	232982	244802	0
	3	5.3	20	224816	43514	1

【0100】

【化 7】

表 8
HCV-1 b 増幅および検出に対する
アルカリショックの効果

	HCV-1 b サンプル (RNA コピー/ ml)	陽性 %	試験数	平均 I C R L U	平均 アンブリコン R L U	妥当でない 数
対 照	300	100	10	11883	35509	0
	100	100	20	11824	103981	0
	30	100	20	22536	179092	1
	10	80	20	7814	115883	0
	3	40	20	4167	52622	0
アルカリショック	300	100	10	11738	19499	0
	100	100	20	13823	110696	0
	30	90	20	10468	166067	0
	10	68	20	22082	169677	1
	3	21	20	21784	53292	1

表 6 ～ 8 に、および図 4 A ～ 4 C に示される結果は、RNA ウイルスの存在について試験されているサンプルのアルカリショック処理の効果はいずれも、極めて小さいことを示した。例えば、HCV-1 a のアッセイ感度はわずかに増加すると思われたが、HCV-2 b および HIV-1 b の感度はわずかに低下した場合があった。極めて低いウイルス力価でのみ記載されたこれらの相違が、統計上有意であったかどうかは不明確であることは注目される。全体的に、結果から、アルカリショックは、RNA および DNA 標的を単離するための単一のサンプル調製手順に統合され得ることが確認された。処理が、DNA 標的の実質的な濃縮を提供するのに適当でありながら、RNA 標的のその後の検出を可能にするのに十分なほど穏やかであり得るということは幾分か驚くべきことであった。

【 0 1 0 1 】

【化 8】

表 9
RNA 標的の検出に対するアルカリショックの効果の定量化

RNA 標的	検出確率	アッセイ感度 (コピー/ ml)	
		対照	アルカリショック
HCV-1a	95%	32 (22-69)	28 (18-93)
	50%	8 (0-13)	3 (0-8)
HCV-2b	95%	23 (16-52)	31 (23-54)
	50%	8 (4-13)	13 (8-19)
HIV-1b	95%	16 (11-42)	32 (23-65)
	50%	5 (0-8)	9 (3-15)

95%信頼区間が括弧中に示されている

表 9 に示される、表にされた、プロビット解析から得られた結果は、アルカリショック処理は RNA 標的の検出能を実質的に損なわないということを示した。したがって、HBV サブタイプ B 核酸の検出を増強した同一のアルカリショック条件は RNA 標的の検出

を実質的に損なわなかった。

【0102】

前記の実施例は、アルカリショックを組み込んだサンプル調製手順を用いて、DNA鋳型の他にRNA鋳型を単離できることを実証した。RNAはアルカリ条件下で加水分解を受けることがわかっているため、この結果は幾分か驚くべきことであった。以下の実施例によって、既知量のHIV-OBピリオンを含有する生体サンプルを、pH緩衝液および界面活性剤の添加に先立って、アルカリ性水酸化物とまず合わせるよう、サンプル調製手順が変更された場合にこの感受性が確認された。

【0103】

実施例7は、アルカリ処理の、RNA標的の完全性に対する効果を評価するために続けた手順を説明する。これらの手順から得られた結果は、RNA加水分解は、HIV-OBピリオンを含有する生体サンプルとアルカリ性水酸化物溶液間を接触させた後極めて迅速であることを示した。

【0104】

(実施例7)

試薬添加順序はRNA完全性に大きく影響を及ぼす

HIV-OBピリオンを含有する血清サンプルを、ウイルス陰性血清を用いて既知力価に希釈した。ピリオン含有血清（すなわち、30コピー／mlを含有）のアリコート（500μl）を、まずプラスチック反応試験管に入れた。その後、1.8N LiOHのアリコート100μlを添加し、この試験管を可変の期間静置させた。次いで、溶解／捕獲試薬のアリコート（400μl）を添加し、短時間ボルテックス処理した。アルカリ性水酸化物溶液とpH緩衝界面活性剤溶液（すなわち、溶解／捕獲試薬）の添加間の遅延時間は、0分～1時間の範囲とした。残存するRNA鋳型を、本質的に上記のとおり捕獲、増幅および検出した。この手順におけるpH緩衝溶解／捕獲試薬は、内部増幅対照として働く合成HIV-1転写物を含んでいたことが注目される。すべての試験は、10の複製で実施した。

【0105】

【化9】

表10

RNA完全性に対するアルカリの効果の評価

サンプル	遅延時間（分）	%CV ICRLU	試験数	妥当でない 数	陽性 %
陰性血清	0	13	10	0	0
HIV-OB 30コピー／ml	0	5	10	0	10
	2.5	9	10	0	0
	5	3	10	0	0

表10に示される結果は、HIV-OB RNA標的の加水分解は、アルカリ性水酸化物溶液がpH緩衝液の不在下で生体サンプルに添加された場合に極めて迅速であることを示した。予備試験から得られた結果が、HIV-OB標的は、アルカリ性水酸化物が手順から省かれるか、ウイルス含有サンプルを、まず、溶解／捕獲試薬（すなわち、pH緩衝界面活性剤溶液）と合わせた後に添加された場合のいずれかで、30コピー／mlレベルで100%の効率で検出されることを示したことは注目される。表に示されるように、ウイルス含有血清をアルカリ性水酸化物溶液と混合し、その後直ちに、pH緩衝液を含む溶解／捕獲試薬の添加によって中和した場合には、10の複製のうち1しか検出可能なRNA鋳型を生じなかった。アルカリ処理ウイルスサンプルへのpH緩衝溶液の添加間の遅延を最大1時間に延ばしたその他の時点からもまた、検出可能なRNA鋳型は得られず、そのため表から省かれている。すべての試験が妥当であると考えられたという事実から判断され

る、RNA内部対照が手順で残存したという事実が予想された。総合すると、これらの結果から、pH緩衝液の添加に先立って、RNA標的を含有する生体サンプルを、アルカリ性水酸化物溶液と混合することによって、RNA鋳型の完全性が完全に損なわれたということが確認された。他方、アルカリ性水酸化物溶液との混合に先立って、まず、RNA鋳型をpH緩衝液と合わせることによって鋳型の完全性が保たれた。

【0106】

アルカリショックを組み込んだ共通サンプル調製法を用いるマルチプレックスアッセイにおいてRNAおよびDNA標的が検出され得るという成果を考えると、最終アッセイ性能に対する、サンプル調製手順の間のpHの効果をより十分に調査することは興味深いことであった。以下に示されるように、サンプル調製手順に用いたアルカリ性水酸化物の量が、9.5を超える最終pHをもたらした場合には、アッセイは不十分に実施された。以下の実施例に記載される手順が、アルカリショックを達成するためにNaOHの代わりにLiOHを用い、また、手順において用いられるアルカリ性水酸化物の同一性はサンプル調製法の成功にとって重大なことではないと示したことは注目される。

10

【0107】

実施例8は、アルカリショックに基づくサンプル調製手順を実施するのに有用なpH範囲の上限を調べるために続けた手順を説明する。

【0108】

(実施例8)

アルカリショックを実施するために用いられるアルカリ性水酸化物の量の最適化

20

RNAまたはDNAウイルス標的を含有する生体サンプルを、モデルマルチプレックスアッセイにおいて試験し、サンプル調製手順の間に、ウイルス含有血漿または血清サンプルと、緩衝界面活性剤溶液（すなわち、溶解／捕獲試薬）と、アルカリ性水酸化物とを含む混合物の最終pHによってアッセイ性能がどのように影響を受けるかを調べた。この手順では、1.6N NaOHの代わりに1.9N LiOHを用いてアルカリショックを達成した。種々の量のLiOH溶液の添加に起因する最終pHを調べるための予備手順を、3の複製で実施し、それらの読み取り値から平均pHを求めた。これらの予備手順では、溶解／捕獲試薬400μlを、ウイルス陰性血清500μlおよび種々の容積の1.9N LiOHと合わせ、混合物の最終pHを上記の通り調べた。試験した生体サンプルは、（1）30コピー／mlのウイルスRNAの相当物を含有するHIV-1 O群陽性血漿、（2）30コピー／mlのウイルスRNAの相当物を含有するHCV-1 a陽性血漿、（3）200コピー／ml未満のレベルにウイルス陰性対照血清に希釈したHBVサブタイプB。この手順ではウイルス陰性血清は対照として働いた。すべての例において、生体サンプルをまず、溶解／捕獲試薬と合わせ、アルカリ性水酸化物溶液のアリコートを追加し、その後混合した。増幅および検出手順の後、妥当なおよび妥当でない実施の数を記録し、陽性反応性試験を妥当な実施のパーセンテージとして求めた。すべての反応は、10の複製を用いて実施した。個々の手順は本質的に同様の方法を含んでいたが、サンプル調製ステップの間にわずかに異なるpH範囲をもたらす量でのLiOHの添加を中心に考え、HBVサブタイプB含有血清サンプルと、HBVサブタイプC含有血清サンプルと、HIV-1 O群陽性血漿とを試験した。これらの手順から得られた結果を表11および12に要約する。

30

40

【0109】

【化 1 0】

表 11
有用な pH 範囲の上限の設定

サンプル	1.9 N LiOH 容積 (μ l)	陽性%	妥当でない 数	妥当な数	反応性数	平均 pH (n=3)
HIV-1 O 群	100	100	0	10	10	8.6
HCV-1a		100	0	10	10	
HBV-B		100	0	10	10	
陰性血清		0	0	10	0	
HIV-1 O 群	120	100	2	8	8	9.2
HCV-1a		100	3	7	7	
HBV-B		100	2	8	8	
陰性血清		0	0	10	0	
HIV-1 O 群	122.5	75	2	8	6	9.5
HCV-1a		88	1	9	8	
HBV-B		100	2	8	8	
陰性血清		0	5	5	0	
HIV-1 O 群	125	0	8	1	0	10.7
HCV-1a		0	10	0	0	
HBV-B		100	7	3	3	
陰性血清		0	8	2	0	

10

20

【 0 1 1 0】

30

【化 1 1】

表 12
有用な pH 範囲の上限の設定

サンプル	1.9N LiOH 容積 (μ l)	陽性%	妥当でない 数	妥当な数	平均 pH (n=3)
HBV-B	70	100	0	10	8.02
	85	100	0	10	8.22
	100	90	0	10	8.46
	115	100	0	10	8.73
	130	なし	10	0	10.08
HBV-C	70	60	0	10	8.02
	85	70	0	10	8.22
	100	100	0	10	8.46
	115	100	0	10	8.73
	130	なし	10	0	10.08
HIV-1 O 群	70	80	0	10	8.02
	85	90	0	10	8.22
	100	70	0	10	8.46
	115	80	0	10	8.73
	130	なし	10	0	10.08

表 1 1 に示される結果により、試験したすべての pH レベルで HBV が検出され得ることが確認され、RNA 検体または RNA 内部対照を含むアッセイの有用な pH 範囲の上限を設定した。より詳しくは、表 1 1 は、HBV サブタイプ B を標的として用いて反応を実施し、添加されたアルカリ性水酸化物のすべてのレベルで妥当な反応において 100% の検出能を示したことを示す。しかし、最高 pH 条件下では、HBV 検体について反応性試験の数は 1/2 より低く低下した。したがって、添加されるアルカリ性水酸化物の量が pH 10 を越える pH をもたらず場合には、また、方法が、増幅に先立って検体核酸を捕獲するステップを含む場合には、アルカリショックに基づくサンプル調製を実施することはあまり好ましくない。RNA 標的を検出するよう設計されたアッセイまたは RNA を含む、コントロールまたは標準物質に依存するアッセイは、DNA 標的を用いる結果と比較した場合に、pH 条件に対して明らかに異なる感度を示した。アルカリショックを達成するために用いたアルカリ性水酸化物の量が、9.5 以上の最終 pH を有する混合物をもたらした場合、9.2 以下の最終 pH 条件を用いて実施した試験の結果と比較して、妥当でない実施数は著しく増大した。さらに、陽性%結果が、HIV-1 O 群および HCV-1a RNA 標的を用いて実施した試験は、混合物の最終 pH が 9.2 以下であった場合には、妥当な結果を生じた反応の 100% で検出されたことを示した。最終 pH が 9.5 であった場合には陽性%値は幾分か低下し、最終 pH が 10.7 であった場合には全く損なわれた。いずれかの特定の動作理論に拘束されたいとは思わないが、これらの結果は、最終 pH が約 9.5 を超えた場合に、その後の増幅のために無傷の標的を捕獲する効率の低下と一致した。

【0 1 1 1】

表 1 2 に示される結果は、すべての実施は妥当であり、また、生体サンプルと、緩衝界面活性剤溶液（すなわち、溶解／捕獲試薬）の混合物に添加されたアルカリ性水酸化物の量が、約 pH 8.0 から最大約 pH 10 未満の範囲内に入る pH をもたらすのに十分であ

った場合に、良好な結果が達成されたことを示した。添加されたアルカリ性水酸化物の量が、約 8.0～最大約 8.7 の範囲に入る pH をもたらすのに十分であった場合に優れた結果が達成された。表 12 に現れる結果を生じた手順は、アルカリショックを達成するために使用できるアルカリ性水酸化物の上限を明確には設定していなかった。その決定は、表 11 中の結果に基づいて行った。

【0112】

本明細書に示される集められた結果に基づき、緩衝界面活性剤溶液（すなわち、溶解／捕獲試薬）と、生体サンプル（例えば、血液、血漿または血清のサンプル）と、アルカリ性水酸化物を含む混合物の pH に好ましい上限があった。より詳しくは、混合物中に用いられるアルカリ性水酸化物の量は、少なくとも pH 8.0 の最終 pH をもたらすことが好ましいが約 pH 10.0 を超えてはならない。特に、RNA 標的が捕獲および増幅される場合には、混合物中に用いられるアルカリ性水酸化物の量は少なくとも 8.0 の最終 pH をもたらすはずであることが好ましいが pH 9.5 未満がより好ましい。混合物中に用いられるアルカリ性水酸化物の量は、少なくとも pH 8.0 の最終 pH をもたらすはずであることが好ましいが、約 9.2 以下であるはずであること（すなわち、pH 8.0～9.2 の範囲の最終 pH）がさらにより好ましい。混合物中に用いられるアルカリ性水酸化物の量は、少なくとも pH 8.0 の最終 pH をもたらすはずであることが好ましいが、約 pH 8.73 以下（すなわち、pH 8.0～8.73 の範囲の最終 pH）がさらにより好ましい。混合物中に用いられるアルカリ性水酸化物の量は、少なくとも pH 8.0 の最終 pH をもたらすはずであることが好ましいが、約 pH 8.6 以下（すなわち、pH 8.0～8.6 の範囲の最終 pH）がなおさらにより好ましい。すべての場合において、生体サンプルと、緩衝液と、界面活性剤とを合わせたもの（すなわち、アルカリショックを達成するために用いられるアルカリ組成物の添加の前）が、6.5～8.0 の範囲に入る pH を有することが好ましく、pH 7.0～8.0 の範囲がより好ましく、7.0～約 7.5 の範囲がより好ましい。実際、生体サンプルと、緩衝液と、界面活性剤とを合わせたものが、pH 6.5～8.0 の範囲に入る pH をもたらす場合、アルカリショックを達成するためのアルカリ組成物の添加が少なくとも 0.2 pH 単位の増大をもたらす場合、およびアルカリショック後の混合物の最終 pH が pH 8.2～9.2 の範囲に入った場合、DNA および RNA 鋳型の調製について優れた結果が達成された。

【0113】

前記の実証は、RNA および DNA ウイルスからの核酸の調製の間にアルカリショック技術を用いることの利益を中心に考えた。以下の実施例は、同一のアルカリショック技術が細菌からの核酸の調製にどのように拡張されたかを説明する。この例示では、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*)、B 群連鎖球菌 (GBS) のメンバーから核酸を調製した。当業者には理解されるであろうが、GBS 細菌は溶解するのが困難であることが知られている。したがって、以下に示される例示は、アルカリショックサンプル調製法の厳しい試験に相当し、本技術はいずれの細菌種からの核酸の調製にとっても有用であるということを示すものとすることができる。

【0114】

実施例 9 では、細菌から核酸を調製および検出するために用いた手順を詳述する。この手順は、アルカリショックステップを含むか含まずに実施された、十分に統合された溶解、標的捕獲、増幅および検出プロトコルを含んでいた。これによって、細菌からの核酸鋳型の調製に関するアルカリショック手順の効果を単離した。インビトロ増幅は、転写媒介性増幅 (TMA) プロトコルを用いて実施した。

【0115】

(実施例 9)

細菌核酸の調製および検出

アルカリショック技術を用いるサンプル調製の効率を試験するのに、培養 S. アガラクチア (*agalactiae*) 細菌を用いた。液体培養培地で一晩増殖させた細菌を、穏やかな遠心分離によって集め、次いで、PBS で 10 回洗浄し、培養培地中に放出された

可能性がある核酸の残りの痕跡を除去した。得られた細菌ペレットをPBSに取り入れ、次いで、段階希釈した。種々の希釈物のアリコート血液寒天プレート上に広げて正確な力価を調べた。サンプルの残りの部分を、アルカリショックを含むか含まない核酸の調製に用い、調製したサンプルをTMA増幅反応における核酸鋳型の供給源として用いた。プラスチック反応試験管中で、4 pmolの配列番号1を有する捕獲オリゴヌクレオチドを、約40 µgの、ポリー(dT₁₄)と共有結合している0.7~1.05 µ磁性粒子(Seradyn, Indianapolis, IN)とともに含有する溶解/捕獲試薬のアリコート(400 µl)を、既知数の生物を含有する希釈されたGBSのアリコート(500 µl)と合わせる。捕獲オリゴヌクレオチドは、粒子結合型ポリー(dT)と、または細菌rRNAと同時ハイブリダイズできる。サンプルは、試験を受けている細菌の各レベルについて9の複製で調製した。対照試験管は、細菌細胞の代わりに1,000コピーの精製細菌rRNAを含有するPBS 500 µlを含む各セットを含んでいた。次いで、100 µlの水対照か、1.6 N NaOHのいずれかを各試験管に加えてアルカリショックを達成した。10秒間ボルテックス処理した後、混合物を水浴中、60℃で15分間インキュベートし、続いて、室温でさらに15分間インキュベートして磁性粒子上でのハイブリダイゼーションおよび標的捕獲を可能にした。上記に記載されるように、磁場を加えて、固定された捕獲オリゴヌクレオチドとrRNAとを含む粒子複合体を集め、集めた粒子を1 mlの洗浄緩衝液で2回洗浄した。洗浄した粒子を75 µlの増幅試薬に再懸濁し、蒸発を防ぐために、試験管の内容物を不活性オイルで表面を覆った。上記のように、増幅試薬は、塩、ヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび配列番号3および配列番号2の配列を有する2種のrRNA特異的プライマー各々約5 pmol/反応を含んでいた。短時間ボルテックス処理した後、混合物を60℃で10分間インキュベートし、プライマーアニーリングを促進し、次いで、41.5℃で10分間平衡にした。次いで、予め加温した、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素(5,600ユニット/反応物)と、T7 RNAポリメラーゼ(3,500ユニット/反応物)とを含む酵素試薬のアリコートを混合物に添加した。41.5℃で1時間インキュベートした後、反応が完了し、公開された国際特許出願番号PCT/US03/18993の実施例1のもとで本質的に説明される標準均一保護アッセイにおいて配列番号4の配列を有するアクリジニウムエステル標識したハイブリダイゼーションプローブを用いてrRNA増幅産物を検出した。GBS細菌を増幅および検出するのに用いた関連オリゴヌクレオチドの配列は表13中に表示される。

【0116】

【化12】

表 13

細菌標的核酸を検出するためのオリゴヌクレオチド

オリゴ機能	オリゴ配列	オリゴ識別子
標的捕獲	GUUACGGGGCCAUUUUGCCGAGUUCCTTTA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	配列番号1
T7プロモーター プライマー	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACT ACCTGTGTCGGTTTGCGGT	配列番号2
非T7プライマー	GCGAAGTTTAGTAGCGAAGTTAGTGATGT	配列番号3
プローブ	GCUUCUAGCGAUACAUAUACUCUACCC	配列番号4

図5に示された結果により、アルカリショックを含むサンプル調製手順は、標準手順を上回る大幅に改善された結果をもたらすということが確認された。どの場合においても、サンプルは、rRNAアンプリコンの検出を示す化学発光シグナルが、1000コピーのrRNA鋳型を用いて実施された対照試験において検出されたシグナルを超えた場合に陽性と判断された。図に示されるように、核酸鋳型の供給源として少なくとも20種のGB

S 細菌を用いて実施した試験は、サンプル調製手順にアルカリショックが含まれていたかどうかにかかわらず、一様に陽性結果を示した。しかし、標準サンプル調製手順は、インビトロ増殖および検出アッセイと併用した場合に、わずか約 10 種の G B S 細菌についての確実な検出にとって有用であったのに対し、アルカリショックを含んでいた手順は、わずか 1 種の細菌の確実な検出に使用できた。これらの結論は統計分析に基づいており、1 種の細菌を含むよう意図されたアリコートを加えた複製サンプルの集合物の中でも、含まないサンプルもあり、2 種の細菌を含むサンプルもある。アルカリショックサンプル調製手順が、細菌標的核酸の検出を大幅に改善したことは明らかである。

【0117】

本発明はいくつかの特定の実施例およびその実施形態を参照して記載されている。もちろん、当業者には前記の詳細な説明を見直すと、本発明のいくつかの異なる実施形態から、それ自体が示唆される。したがって、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲を参照した際に決定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1】図1は、モデル標的核酸内の標的領域（太い水平線によって表される）を検出するために使用できる種々のポリヌクレオチドを示す模式図である。以下の核酸の位置は、標的領域に対して示される：「捕獲オリゴヌクレオチド」とは、増幅に先立って、標的核酸とハイブリダイズし、捕獲するために用いられる核酸を指し、ここで、「T」は、相補的な配列を有する固定されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするために用いられるテール配列を指し（示していない）；「非T7プライマー」および「T7プロモータープライマー」とは、TMAを実施するために用いられる2種の増幅プライマーを表し、ここで、「P」は、T7プロモータープライマーのプロモーター配列を示し；「プローブ」とは、増幅された核酸を検出するために用いられるプローブを指す。

【図2】図2A～2Cは、種々の濃度のNaOH溶液を用いて実施された試験から得られた結果を示す一連の棒グラフを示す図である。図2Aは、アルカリショックステップにおいて用いたNaOHの濃度の関数として陽性%として測定された結果を示す。図2Bは、アルカリショックステップにおいて用いたNaOHの濃度の関数としてCV（変動の係数）%として測定された結果を示す。図2Cは、アルカリショックステップにおいて用いたNaOHの濃度の関数として平均RLUとして測定された結果を示す。

【図3】図3A～3Cは、種々のレベルの投与HBVウイルスに対する反応%として測定された結果を示す一連の棒グラフを示す図である。図3Aは、HBVサブタイプ-Bの結果を示す。図3Bは、HBVサブタイプ-Cの結果を示す。図3Cは、HBVサブタイプ-Aの結果を示す。対照試験は白抜きバーによって示されている。アルカリショックを与えた試験から得られた結果は、黒バーによって示されている。

【図4】図4A～4Cは、種々のレベルの投与RNAウイルスに対する反応%として測定される結果を示す一連の棒グラフを示す図である。図4Aは、HCV-1aウイルスの結果を示す。図4Bは、HCV-2bウイルスの結果を示す。図4Cは、HIV-1bウイルスの結果を示す。対照試験は白抜きバーによって示されている。アルカリショックを与えた試験から得られた結果は、黒バーによって示されている。

【図5】図5は、種々の数のGBS細菌から単離した鋳型核酸を用いる増幅反応において求められる陽性%を示す一連の棒グラフを示す図である。アルカリショックなしで処理された酸鋳型を用いる試験は、白抜きバーによって示されている。アルカリショックを用いて処理された核酸鋳型を用いる試験は黒バーによって示されている。

【図 1】

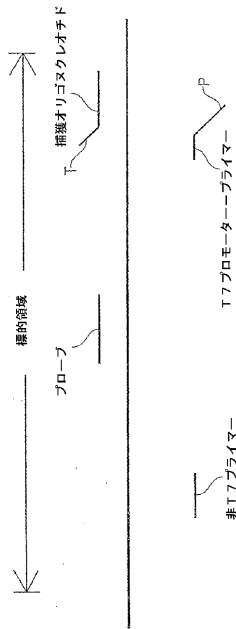


FIG. 1

【図 2】

FIG. 2A

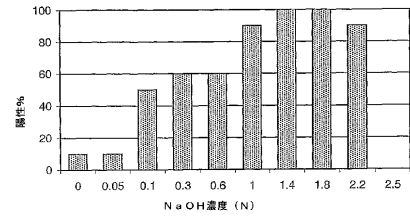


FIG. 2B

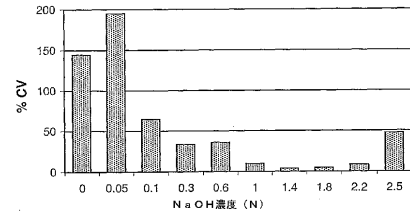
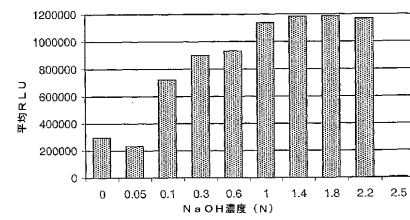


FIG. 2C



【図 3】

FIG. 3A

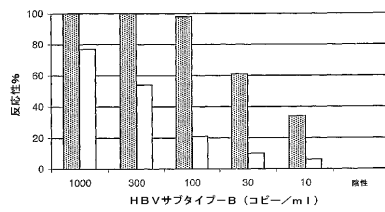


FIG. 3B

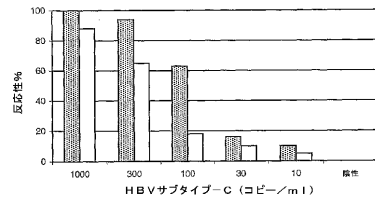
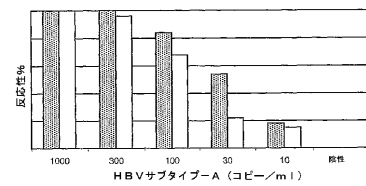


FIG. 3C



【図 4】

FIG. 4A

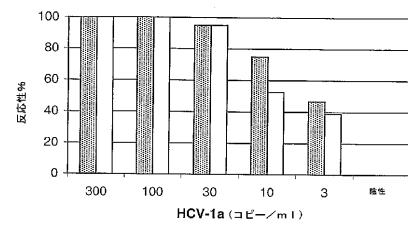


FIG. 4B

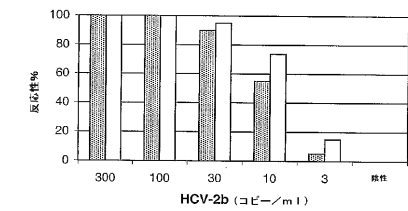
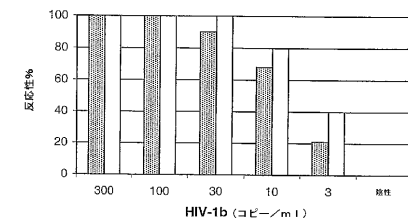


FIG. 4C



【図 5】

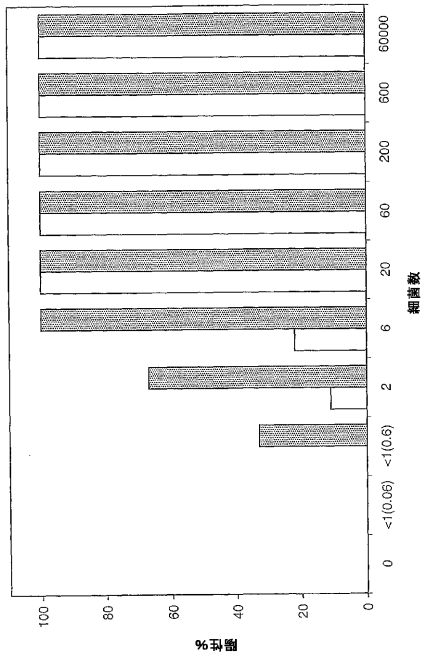


FIG. 5

【配列表】

0004819064000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ベッカー, マイケル エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92131, サン ディエゴ, メドーデール レーン 1
2819
- (72)発明者 ウー, ウェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92009, カールズバッド, ターンストーン ロード
1054
- (72)発明者 リネン, ジェフリー エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92064, ポウエイ, コーポレイジ コート 1322
8

審査官 神谷 昌男

- (56)参考文献 特開平11-169170 (JP, A)
特表2004-521881 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/
WPIDS(STN)