

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4271944号  
(P4271944)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 22 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2002-582264 (P2002-582264)  
 (86) (22) 出願日 平成14年4月17日 (2002.4.17)  
 (65) 公表番号 特表2004-532027 (P2004-532027A)  
 (43) 公表日 平成16年10月21日 (2004.10.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/012035  
 (87) 国際公開番号 W02002/083927  
 (87) 国際公開日 平成14年10月24日 (2002.10.24)  
 審査請求日 平成17年4月18日 (2005.4.18)  
 (31) 優先権主張番号 60/284,334  
 (32) 優先日 平成13年4月17日 (2001.4.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 592239833  
 ニューヨーク・ブラッド・センター・イン  
 コーポレーテッド  
 NEW YORK BLOOD CENT  
 ER INC.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006  
 5, ニューヨーク, イースト シック  
 スティセブンス ストリート 310  
 (74) 代理人 100107489  
 弁理士 大塩 竹志  
 (72) 発明者  
 アンドラス リンダ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100  
 21 ニューヨーク イースト セヴンテ  
 イシックス ストリート 370 アパ  
 ートメント シー 1406

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ユニバーサルマルチ変異体検出システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のターゲット核酸分子の存在を決定するプライマー伸長連鎖反応法において、以下の工程を含む前記方法：

(a) リバースプライマーをターゲット核酸分子と、プライマー伸長連鎖反応を行うのに適した条件下でハイブリダイズする工程；

(b) ターゲット核酸分子を鋳型として用いてリバースプライマーを伸長して、リバースプライマー伸長産物を形成する工程、ここでリバースプライマー伸長産物と結合したリバースプライマーはリバースプライマー増幅産物を構成する；

(c) 前記鋳型由来のリバースプライマー増幅産物を変性させる工程；

(d) フォワードプライマーを以下のものとハイブリダイズする工程：

(i) 存在する場合には、ターゲット核酸分子と相補的な核酸分子；又は

(ii) リバースプライマー増幅産物；

(e) 存在する場合には、相補的ターゲット核酸分子又はリバースプライマー増幅産物を鋳型として用いてフォワードプライマーを伸長する工程、ここでフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーはフォワードプライマー増幅産物を構成する；

(f) 前記鋳型由来のフォワードプライマー増幅産物を変性させる工程；

(g) リバースプライマーをフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズする工程；

(h) フォワードプライマー増幅産物を鋳型として用いてリバースプライマーを伸長して、追加のリバースプライマー伸長産物を形成する工程、ここで追加のリバースプライマー

10

20

伸長産物と結合したリバースプライマーは追加のリバースプライマー増幅産物を構成する；

( i ) 前記鋳型由来の追加のリバースプライマー増幅産物を変性させる工程；  
 ( j ) フォワードプライマーをリバースプライマー増幅産物とハイブリダイズする工程；  
 ( k ) リバースプライマー増幅産物を鋳型として用いてフォワードプライマーを伸長して、追加のフォワードプライマー伸長産物を形成する工程、ここで追加のフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーは追加のフォワードプライマー増幅産物を構成する；

( l ) 前記鋳型由来の追加のフォワードプライマー増幅産物を変性させる工程；  
 ( m ) 追加のリバースプライマー増幅産物と追加のフォワードプライマー増幅産物をそれぞれフォワードプライマーとリバースプライマー用の鋳型として用いて、検出可能な量の追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物を產生するのに十分な回数、工程 ( g ) から ( l ) を繰り返す工程；及び  
 ( n ) 追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在を検出する工程；

10

ここで、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドは以下のものとハイブリダイズし；

( i ) フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチド；又は

( ii ) フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとはヌクレオチドのギャップで離れたヌクレオチド、ここで前記ギャップは1～5個のヌクレオチドを含み、前記ギャップが2～5個のヌクレオチドを含む場合1又は2個のヌクレオチドはミスマッチであってもよく、前記ギャップが1個のヌクレオチドである場合このヌクレオチドはミスマッチであってもよい；及び

20

フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドは以下のものとハイブリダイズする；

( i ) リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチド；又は

( ii ) リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとはヌクレオチドのギャップで離れたヌクレオチド、ここで前記ギャップは1～5個のヌクレオチドを含み、前記ギャップが2～5個のヌクレオチドを含む場合1又は2個のヌクレオチドはミスマッチであってもよく、前記ギャップが1個のヌクレオチドである場合このヌクレオチドはミスマッチであってもよい。

30

#### 【請求項2】

ターゲット核酸分子が変異体配列を有する、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

プライマー伸長連鎖反応がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項4】

ターゲット核酸分子がウイルスである、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項5】

ウイルスがヒト免疫不全症ウイルス (HIV) である、又はウイルスがC型肝炎ウイルス (HCV) 若しくはB型肝炎ウイルス (HBV) である、請求項4に記載の方法。

40

#### 【請求項6】

ギャップが2個のヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項7】

工程 ( d ) ( i ) のターゲット核酸分子と相補的である核酸分子がターゲット核酸分子のcDNAとして単独に与えられる、請求項3に記載の方法。

#### 【請求項8】

追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在を検出する工程が以下の工程を含む、請求項1に記載の方法；

( A ) 自己変性シグナル発生プローブを用意する工程、ここで前記プローブは以下のもの

50

を含む：

( i ) 検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分に付着した第1核酸配列；

( ii ) ( a ) 第1核酸配列に相補的であり、

( b ) 第1核酸配列と第2核酸配列が互いにハイブリダイズする場合にレポーター部分のシグナルを変えることができる相互作用部分に付着した第2核酸配列；及び

( iii ) 第1核酸配列と第2核酸配列を繋ぐプローブ配列、ここで前記プローブ配列は以下のもののいずれかである：

( a ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列及びリバースプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( b ) リバースプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列及びフォワードプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( c ) ( 1 ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列、( 2 ) リバースプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列、及び( 3 ) 前記ギャップに完全に相補的である配列、1又は2個のヌクレオチドを除いてすべてのヌクレオチドが前記ギャップに相補的である2～5個のヌクレオチドを有する配列、又は1個のヌクレオチドが前記ギャップに相補的でない1個のヌクレオチドを有する配列；又は

( d ) ( 1 ) リバースプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列、( 2 ) フォワードプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列、及び( 3 ) 前記ギャップに完全に相補的である配列、1又は2個のヌクレオチドを除いてすべてのヌクレオチドが前記ギャップに相補的である2～5個のヌクレオチドを有する配列、又は1個のヌクレオチドが前記ギャップに相補的でない1個のヌクレオチドを有する配列；又は

( e ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( f ) リバースプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列；及び

( B ) 前記増幅産物を前記プローブと接触させる工程；

ここで、前記プローブのプローブ配列は追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズする場合、第1及び第2核酸配列は変性し、それによってレポーター部分によりシグナルを発生し、

レポーター部分によって発生したシグナルはターゲット分子の存在を示す。

【請求項 9】

前記プローブによって発生した検出可能なシグナルのレベルがサンプル中のターゲット核酸分子の量に比例する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

60～95%の、工程 ( iii ) ( a ) - ( d ) で定義される前記プローブ配列が以下のいずれかのものを含む、請求項 8 に記載の方法：

( i ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( ii ) リバースプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列。

【請求項 11】

前記プローブ配列がリバースプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列を含む場合に、リバースプライマーとフォワードプライマーのモル比が1:5～1:20の範囲であるか、又は

前記プローブ配列がフォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列を含む場合に、フォワードプライマーとリバースプライマーのモル比が1:5～1:20の範囲である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記プローブ配列が10～30個のヌクレオチド残基を含む、又は前記プローブ配列が18～24個のヌクレオチド残基を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

検出可能なシグナルが発光シグナルである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

発光シグナルが蛍光シグナル又は化学発光シグナルである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

レポーター部分が自己変性シグナル発生プローブの5'末端又は3'末端で付着する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

相互作用部分が自己変性シグナル発生プローブの5'末端又は3'末端で付着する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 17】

レポーター部分がフルオロフォアである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

相互作用部分がクエンチャーである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 19】

クエンチャーがDABCYL、アントロキノン、ニトロチアゾール、ニトロイミダゾール又はマラカイトグリーンである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

相互作用部分がフルオロフォアである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 21】

増幅産物が、増幅反応が完了した後に、又は増幅反応の各熱サイクル後に、検出可能なシグナルを測定することにより測定及び定量化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

サンプル中のターゲット核酸分子の検出用キットであって、前記ターゲット核酸分子は変異体配列を有する、以下のものを含む前記キット：

( i ) 請求項 1 に記載の方法に用いられる一組のプライマー；

( ii ) プライマー伸長連鎖反応を行うための試薬；及び

( iii ) プライマー増幅産物の存在を検出する自己変性シグナル発生プローブ、ここで前記プローブは検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分に付着した第1核酸配列、レポーター部分のシグナルを変えることができる相互作用部分に付着した第2核酸配列、並びに第1及び第2核酸配列を繋ぐプローブ配列を含み、ここで前記プローブ配列は以下のもののいずれかである：

( a ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列及びリバー  
スプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( b ) リバープライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列及びフォー  
ワードプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( c ) ( 1 ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列、( 2 ) リバープライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列、及び( 3 ) 前記ギャップに完全に相補的である配列、1又は2個のヌクレオチドを除いてすべてのヌクレオチドが前記ギャップに相補的である2～5個のヌクレオチドを有する配列、又は1個のヌクレオチドが前記ギャップに相補的でない1個のヌクレオチドを有する配列；  
又は

( d ) ( 1 ) リバープライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列、( 2 ) フォワードプライマーに相補的である配列の全体又は一部のヌクレオチド配列、及び( 3 ) 前記ギャップに完全に相補的である配列、1又は2個のヌクレオチドを除いてすべてのヌクレオチドが前記ギャップに相補的である2～5個のヌクレオチドを有する配列、又は1個のヌクレオチドが前記ギャップに相補的でない1個のヌクレオチドを有する配列；  
又は

( e ) フォワードプライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列；又は

( f ) リバープライマーの全体又は一部のヌクレオチド配列。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は2001年4月17日に提出された米国仮出願第60/284,334号の利益を要求し、それは参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

## 【0002】

## 発明の背景

密接に関連している遺伝的変異体の検出は、分析診断の重要な課題である。例えば、ウイルス及びバクテリアのような病原体は、一般にしばしば変異して、前記遺伝的変異体を形成する。

10

例えば、異なる起源を持っているヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の核酸配列は、互いに異なっている。異なるタイプのHIV-1はいくつかのグループ及びサブタイプに分けられる。主要なグループMは10個の現在明らかにされているサブタイプから構成され、前記サブタイプはサブタイプA~H、J及びKと呼ばれる。M-グループ・ウイルスに加えて、他の2つのグループ、NとOは、明らかにされている(Simonら、1998, Nature Med, 4:1032-1037)。HIV-1複製機構の誤りがちな性質のために、グループ及びサブタイプ内に、新しいウイルスの種は連続的に発生している。

同様に、C型肝炎ウイルス(HCV)は、同種のRNA個体群として存在しない。単一の感染した個体内でさえ、多くの異種ウイルスゲノム(準種(quasispecies))が共存するかもしれない。さらに、HCVの多数の遺伝子型は、異なる地域から単離したウイルス変異体のヌクレオチド配列分析に基づいて明らかにされた。1から6まで数によって分類された6つの主なHCV遺伝子型が現在ある。遺伝子型は、サブタイプに従ってさらに細分化される。

20

## 【0003】

種内の病原体の前記遺伝的変異のために、信頼できる結果を提供する診断テストの範囲はかなり制限される。サンプル中の病原体を検出するために現在利用できる大抵の検出方法は、病原体の抗原、病原体誘発抗体、又は病原体固有酵素、例えば固有のHIV逆転写酵素の検出のいずれかを基礎とする。不便なことに加えて、前記方法は、しばしばあまり敏感でない。例えば、献血者のHIV-1感染をスクリーニングするために血液銀行で現在実施されている方法は、ウイルス蛋白質に対する抗体の検出である。この方法は、まだウイルスに対する診断抗体を発生していない感染者の急性期の早い段階で個体を検出できない。

30

核酸配列の検出に基づくスクリーニング方法は、敏感で、簡便である。しかし、これらの検査は、必ずしも密接に関連した遺伝的変異体の検出にとって信頼できるとは限らない。

現在利用できる核酸配列に基づく検出方法の1つは、分子ビーコンを利用する(Tyagi and Kramer, 1996, Nat. Biotechnol., 14(3):303-308)。分子ビーコンは、基部-ループ(stem-loop)構造を有する一本鎖オリゴヌクレオチドプローブである(図1参照)。分子のループ部分はターゲット核酸分子に相補的なプローブ配列である。基部は、プローブ配列の末端で相補的なアーム配列のアニーリングによって形成される。蛍光性部分は一つのアームの末端に付着し、クエンチング部分はもう一つのアームの末端に付着している。基部のアームの互いへのハイブリダイゼーションはこれら二つの部分を極めて接近した状態に保ち、フルオロフォアの蛍光がエネルギー移動によってクエンチされる(図1a)。ビーコンの相補的DNAターゲットの存在下で、前記ループ構造は前記ターゲットとハイブリダイズし、基部のアームがハイブリダイズしたまま残らないようにする。フルオロフォアとクエンチャーは物理的に離されて、蛍光が得られる(図1b)。

40

分子ビーコンはリアルタイム定量的PCRのために現在使用される。PCRプライマーは、通常長さが20塩基対未満で、DNAの特定のセグメントを増幅するようにデザインされている。そのループが増幅されたDNA鎖の1つの短い(20~25b.p.)領域に相補的であるように、ビーコンは一般的にデザインされる。前記増幅されたDNA鎖の相補的な領域は前記鎖の一部であり、前記プライマーに加えられている。

## 【0004】

50

分子ビーコンは極めて配列特異的である。実際、この技術の原理的用途の一つは、近年、対立遺伝子の識別又は“分子の遺伝形質を決める (genotyping)” ためにある。分子ビーコンの配列変異に対する感受性は、単一のヌクレオチドであっても与えられたターゲット配列における多形の識別を与える (Tyagiら、1998, Nat. Biotechnol., 16(1):49-53; Kostrikisら、1998, Science, 279:5354:1228-9; Marrasら、1999, Genet. Anal., 14(5-6):151-6; Tappら、2000, Biotechniques, 28(4):732-8)。

現在まで、配列変異に対するこの感受性は、ウイルス感染の診断への分子ビーコン技術の適用を厳しく制限している。分子ビーコンは、DNA又はRNAターゲットの変異体配列を効率的に検出することができない。例えば、HIV株AからのPCR産物を認識するためにデザインされたビーコンは、HIV株BからのPCR産物を認識することができない (図2参照)。

このように、前記技術は、ウイルスのすべての異なる遺伝子型の検出を可能にするために、いくつかの異なるビーコンを必要とするであろう。すなわち、HIV-1のゲノムのある保存性の高い領域が存在することが知られていても、いくつかの異なるビーコンがこのウイルスのすべての知られているサブタイプを検出するために必要とされる可能性が高い。さらに、いくつかの異なるビーコンを使用しても、明らかにされていないHIV-1のその他の変異体は検出されないかもしれない。

このように、前記技術は、病原体のすべての関連した遺伝的変異体の検出のために便利な又は効率的な診断アッセイを提供しない。

非常に密接な遺伝的変異体を検出することができる敏感で、便利な核酸に基づくスクリーニングアッセイの差し迫った必要性が存在する。すなわち、直接汚染された血において、ウイルス、バクテリア及びその他の病原体を検出することができるアッセイが必要である。このようなアッセイは、病原体感染の急性期の早い段階、例えば個体がウイルスに対する診断抗体を発生する前に、個体から血又は血漿単位を検出するために必要とされる。

従って、本発明の目的の1つは、特定のターゲット核酸分子の多数の変異体の検出に便利で、効率的な診断アッセイを提供することによって従来技術における上記制限を克服することである。

#### 【0005】

##### 発明の要約

これらとその他の目的は、当業者にとって明らかであるよう、HIV、C型肝炎、B型肝炎 (HBV)、パルボウイルスB19といった与えられた病原体の変異体を、単一の検出プローブの使用、すなわちユニバーサルマルチ変異体検出システムによって、診断上検出する方法を提供することにより達成される。一の実施態様において、前記単一の検出プローブは分子ビーコンである。

#### 【0006】

##### 好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、単一の検出プローブの使用により生物学的サンプル中のターゲット核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

前記方法は、プライマー伸長連鎖反応によるターゲット核酸分子の増幅を含み、前記反応のプライマーは、以下に記載されるように、フォワード及びリバースプライマーを含む一組の“向かい合う (nose-to-nose)” プライマーである (図3及び4参照)。

ターゲット核酸分子は、その全配列又は部分配列がプライマー伸長連鎖反応プライマーを作製するためによく知られている核酸分子である。ターゲット核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよい。

ターゲット核酸分子は相同性の高い配列のファミリーとして存在する。ファミリー内のこれらの異なる配列は変異体として参照される。変異体の起源は、例えば遺伝子変異及び遺伝子多形を含む。

変異体を有することが知られている核酸分子としては、例えばウイルスとバクテリアが挙げられる。ウイルスの例としては、HIV、HCV、HBV及びヒトパルボウイルスB19が挙げられる。バクテリアの例としては、大腸菌 (E. coli)、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae)、髄膜炎菌 (N. meningitidis)、淋菌 (N. gonorrhoeae)、結核菌 (M. Tuberculosis)

10

20

30

40

50

及びボレリア属 (*Borrelia*) 種 (ライム病) が挙げられる。

ターゲット核酸分子が検出され得る生物学的サンプルは、任意の体液、細胞又は細胞片である。生物学的サンプルの例としては、血、血清、精液、粘液又はその他の滲出液が挙げられる。

本発明は、ターゲット核酸分子又は前記分子の小領域の増幅をもたらす任意のタイプのプライマー伸長連鎖反応で使用する。増幅反応は、例えば定量的PCR等のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ストランド置換増幅 (SDA)、転写媒介増幅 (TMA)、及び核酸配列に基づく増幅 (NASBA) が挙げられる。NASBAはRNAを増幅する。NASBAはEP-A-0 329 822に記載される。

従来のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅方法は、当該技術においてよく知られている。ポリメラーゼ連鎖反応を実行するのに適した条件は、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,965,188号に記載されている。パーキン・エルマー (ノーウォーク、コネチカット) のような商業上のベンダーは、PCR試薬を市場に出し、PCRプロトコルを公表する。PCR増幅反応混合物は、増幅反応を実行するのに必要な試薬を含む。一般的に、前記混合物は、好適な緩衝剤中に熱安定性DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド5'三リン酸 (dNTP's)、及び2価の金属陽イオンのような重合剤を含む。

【0007】

DNA又はRNAターゲット配列のいずれかは、本発明の方法によって増幅できる。ウイルスのゲノムの核酸のようなRNAターゲットのPCR増幅の場合、第一工程は、ターゲット配列のDNAコピー (cDNA) の合成である。逆転写は、別々の工程として、又は好ましくは、複合逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) で実行できる。RNAのRT-PCR増幅は、当該技術においてよく知られ、米国特許第5,322,770号及び及び5,310,652号; Myers and Gelfand, 1991, *Biochemistry* 30(31):7661-7666; 米国特許第5,527,669号; Youngら、1993, *J. Clin. Microbiol.* 31(4):882-886; 及びYoungら、1995, *J. Clin. Microbiol.* 33(3):654-657に記載されている。

プライマーは前記PCR反応混合物にも含まれる。プライマーはオリゴヌクレオチドであり、鋳型核酸分子にハイブリダイズするときに、増幅反応中に合成開始点としての機能を果たすことができる。鋳型核酸は最初のターゲット核酸分子であり、増幅産物は前記分子から産生される。

本発明のプライマーの長さは重要ではない。一般的に、プライマーの長さは、約15~55個のヌクレオチドの範囲であり、より一般的には約20~45個のヌクレオチド、最も一般的には約25~35個のヌクレオチドである。好ましくは、プライマーは、プライマーとその鋳型の間に許容できるミスマッチの数を最大限にする相対的な長さ (>30塩基) であると考えられる。プライマー対は、同じ長さである必要はない。例えば、フォワードプライマーは29個のヌクレオチドで構成されていてもよく、リバースプライマーは22個のヌクレオチドで構成されていてもよい。

前記プライマーは天然又は合成であってもよい。PCRについて、前記プライマーは、好ましくは一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドである。

ハイブリダイゼーションは、相補的な塩基の対形成の結果、2つの一本鎖核酸によって二重構造の形成を参照する。ハイブリダイゼーションは、完全に相補的である核酸ストランド間で、又はミスマッチのより少ない領域を含む “実質的に相補的である” 核酸ストランド、すなわち変異体間で起こり得る。ミスマッチの許容される程度は、ハイブリダイゼーション条件の適切な調整によって調整できる。完全に相補的である核酸ストランドがハイブリダイズする条件は、“ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件” 又は“配列-特異的ハイブリダイゼーション条件” と呼ばれる。実質的に相補的な配列の安定な二重鎖は、より少ないストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で達成できる。

【0008】

プライマーがプライマーと鋳型の間のミスマッチを許容することができるよう、本発明のハイブリダイゼーション条件、すなわちストリンジェンシーがセットされ、それによってすべての遺伝的変異体へのハイブリダイゼーションを可能にする。例えば、条件は、

プライマーと鋳型との間のハイブリダイゼーションがプライマーと鋳型との間に最大20%の塩基対のミスマッチを生じるようにセットされる。

当該技術によって与えられるガイダンスに従って、核酸技術の当業者は、経験的に多くの変数、例えばオリゴヌクレオチドの長さ及び塩基対濃度、イオン強度、ミスマッチした塩基対の発生率、及びオリゴヌクレオチドアニリングで選ばれた温度を考慮して適したハイブリダイゼーション条件を決めることができる（例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリング港, ニューヨーク; Wetmur, 1991, Critical Reviews in Biochem. And Mol. Biol. 26(3/4):227-259; Ausubelら（編集）、1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク) at Unit 2.10; 及び米国特許第5,789,550号）

10

本発明のプライマー伸長連鎖反応のサイクルの詳細な記述は以下の通りである。記載される特定の反応はPCRである。しかし、その他のタイプのプライマー伸長連鎖反応は、本発明の方法で使用することができる。

図10は、本発明の増幅反応の段階的な例を与える。ターゲット核酸分子はTで表される。ターゲット配列内のXは可能性がある変異のサイトを表す。

ターゲット核酸分子は、一本鎖分子として、又は二本鎖分子の一部として存在することができる。図10で説明された例において、前記ターゲット核酸分子は二本鎖である。TCは、Tに相補的である核酸分子を表す。

従来のPCRでのように、増幅反応の各サイクルにおいて、サンプルにおける任意の二本鎖核酸分子は、変性によって一本鎖化される。次いで、ハイブリダイゼーションは、プライマーとターゲット核酸分子の間に生じる。図10(a)は、リバースプライマー(RP)とターゲット核酸配列(T)の間のハイブリダイゼーションを説明する。

20

#### 【0009】

図10(b)に示されるように、リバースプライマーは、鋳型としてターゲット核酸分子を用いて、リバースプライマー増幅産物(RPA)を形成するために広げられる。リバースプライマー増幅産物(RPA)は、リバースプライマー伸長産物(RPE)と結合したリバースプライマー(RP)を含む。この明細書の目的のために、リバースプライマー伸長産物は、リバースプライマーに加えられる核酸セグメントである。

図10(b)を見ても分かるように、ターゲット配列に含まれる変異(X)の一部は、RPAに現れない。特異的に、RPで構成されているRPAの一部分は、変異を含まない。

30

図10(c)に示されるように、工程(b)で形成されたリバースプライマー増幅産物は、その鋳型から変性される。

フォワードプライマー(FP)は、(i)存在する場合、ターゲット核酸分子(TC)に相補的である核酸分子；又は(ii)リバースプライマー増幅産物(RPA)のいずれかとハイブリダイズする。図10(d)は前者の実施態様を説明する。ターゲット核酸分子に相補的である核酸分子は、ターゲット核酸分子が二本鎖分子の一部であった場合、存在するであろう。

フォワードプライマーは、鋳型として相補的である核酸分子(TC)又はリバースプライマー増幅産物(RPA)を用いて、広げられる。図10(e)は前者の実施態様を説明する

40

図10(e)に示されるように、フォワードプライマーは、フォワードプライマー増幅産物(FPA)を形成するために、広げられる。フォワードプライマー増幅産物(FPA)は、フォワードプライマー伸長産物(FPE)と結合したフォワードプライマー(FP)を含む。この明細書の目的のために、フォワードプライマー伸長産物は、フォワードプライマーに加えられる核酸セグメントである。

図10(e)に示されるように、ターゲット配列と比較した場合、ターゲット配列に含まれる変異(X)の一部は、FPAに現れない。

#### 【0010】

特異的に、FPで構成されているFPAの一部分は変異を含まない。

50



図10(f)に示されるように、図10(e)で形成されるフォワードプライマー増幅産物はその鋳型から変性される。

図10(g)に示されるように、リバースプライマーはFPAのFPE部分にハイブリダイズする。

図10(h)に示されるように、リバースプライマーは、鋳型としてFPAのFP部分を用いて、追加のリバースプライマー増幅産物(ARPA)を形成するために伸長され、追加のリバースプライマー伸長産物(ARPE)と結合したリバースプライマーはARPAを構成する。

図10(i)に示されるように、ARPA産物はその鋳型から変性される。

図10(j)に示されるように、フォワードプライマーはRPAのRPE部分にハイブリダイズする。

10

図10(k)に示されるように、フォワードプライマーは、鋳型としてRPAのRP部分を用いて、追加のフォワードプライマー増幅産物を形成するために伸長され、追加のフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーはAFPAを構成する。

図10(l)に示されるように、AFPA産物はその鋳型から変性される。

リバース及びフォワードプライマーのために鋳型として追加のリバースプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマー増幅産物を用いて、追加のリバースプライマー増幅産物及び/又は追加のフォワードプライマー増幅産物の検出可能な量を産生するのに十分な回数、工程(g)から(l)は繰り返される。好ましくは、前記工程は、自動サイクリング装置を用いて繰り返し行われる。十分な回数は、少なくとも約10回、好ましくは少なくとも約20回、より好ましくは少なくとも約30回、最も好ましくは少なくとも約40回である。

20

#### 【0011】

プライマーがある方法で増幅産物とハイブリダイズするときに、本発明者らは利点を発見し、発明者はそれを“向かい合う(nose-to-nose)”と呼ぶ。

図10(g)を見ても分かるように、フォワードプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマー増幅産物の配列は、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドがフォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

同じように、図10(j)を見ても分かるように、リバースプライマー増幅産物及び追加のリバースプライマー増幅産物の配列は、フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドがリバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

30

図10はただ1つの変異体のプライマー伸長連鎖反応を説明する。上で示したように、病原体のファミリーのすべての変異体は、発明の方法によって増幅できる。

どちらの変異体からそれらが産生されたかにかかわらず、追加の増幅産物は同一である。このように、図10に示される例において、追加のリバースプライマー増幅産物は、追加のリバースプライマー伸長産物と直接結合したリバースプライマーの配列を有する。追加のリバースプライマー伸長産物は、フォワードプライマーと相補的である(フォワードプライマー補体)。図10(h)参照のこと。

同じように、追加のフォワードプライマー増幅産物は、追加のフォワードプライマー伸長産物に直接に結合したフォワードプライマーの配列を有する。追加のフォワードプライマー伸長産物は、リバースプライマーと相補的である(リバースプライマー補体)。図10(k)を参照のこと。

40

従って、すべての追加のプライマー増幅産物は、リバースプライマーとフォワードプライマー補体、又はリバースプライマー補体とフォワードプライマーのいずれかの組み合わせである配列を有する。リバース及びフォワードプライマーすべてが同じ配列を有するために、すべての追加のプライマー増幅産物は同じ配列を有する。つまり、すべての可能な変異は排除される。

#### 【0012】

別の実施態様において、フォワードプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマ

50

ー増幅産物の配列は、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドが、フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドからヌクレオチドのギャップによって隔てられたヌクレオチドとハイブリダイズするものである。同様に、リバースプライマー増幅産物及び追加のリバースプライマー増幅産物の配列は、フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドが、リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドからヌクレオチドのギャップによって隔てられたヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

両方の場合において、ギャップは保存性の高いことが知られた配列を含む。ウイルス及びバクテリアのゲノムの保存性の高い領域は知られている。例えば、HCVの公表された配列において、ウイルスゲノムの5'非翻訳領域における核酸の短い広がりは、HCV遺伝子型間で高く保存されていることが知られている (Okamotoら、J. Gen. Virol., 1991, 2697-2704; Smithら、J. Gen. Virol., 1995, 76:1749-1761; Simmondsら、J. Gen. Virol., 1993, 74:2391-2399)。

ギャップは、好ましくは5個以下のヌクレオチドを含む。ギャップが2~5個のヌクレオチドを含む場合、1又は2個のヌクレオチドはミスマッチであってもよく、プローブ配列とまだハイブリダイズすることができる。ギャップが1個のヌクレオチドを含む場合、このヌクレオチドはミスマッチであってもよい。好ましくは、いかなるミスマッチもない。

一旦増幅反応が完了すると、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在は、当該技術において知られている方法によって検出される。

好ましくは、検出の方法は、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の核酸配列の検出に基づく。このような方法で使われる検出プローブは、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズすることができる配列を含む。これらの増幅産物は同一であるため、ただ1つの検出プローブがすべての増幅産物を正確に検出するために必要とされる。

#### 【0013】

さらに、増幅産物の同定は、検出にとって必須のハイブリダイゼーションの間に使われるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を与える。ストリンジェントな条件の使用は、偶然によく似た非ターゲット配列に由来する偽陽性の可能性を減少させることによってより正確な結果をもたらす。

検出プローブは、DNA、RNA、又はその組み合わせであってもよい。修正されたヌクレオチドとしては、例えばペプチド核酸 (PNA)、ニトロピロール-ベースのヌクレオチド、又は2'-O-メチルリボヌクレオチドが挙げられる。核酸又は修正された核酸分子のヌクレオシドは、通常の方法で、すなわちリン酸リンケージにより連結してもよい。あるいは、ヌクレオシドは、修正されたリンケージ、例えばホスホロチオエートにより連結してもよい。

一の実施態様において、プローブ配列は、増幅産物における結合を越えてハイブリダイズする。すなわち、プローブ配列は、AFPAのFP配列とAFPE配列の両方の一部にハイブリダイズし、又はプローブ配列は、ARPAのRP配列及びARPE配列の両方の一部にハイブリダイズする。

この実施態様において、プローブ配列は、1つのプライマーのセグメントのヌクレオチド配列及びもう1つのプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列を含む。より詳細には、プローブ配列は、(i) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列とリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列、又は(ii) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列とフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列のいずれかを含む。プローブ配列は、プライマーの全体又は一部の配列のいずれかと、もう1つのプライマーの補体を含むことができる。

プローブ配列は、1つのプライマーのヌクレオチド配列ともう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列の等しい部分で構成されていてもよい。このような場合、プローブ配列は、増幅産物に“対称的にハイブリダイズ”する (図5A (I) 参照)。

#### 【0014】

好ましくは、改善された感受性のために、プローブ配列は増幅産物に“非対称にハイブリダイズする”ようにデザインできる。特に、プローブ配列は、1つのプライマーのヌクレオチド配列ともう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列の等しくない部分で構成できる(図5A(II-IV)参照)。例えば、約60%から約99%のプローブ配列は1つのプライマーのヌクレオチド配列を含む。プローブ配列の残り(例えば、約1%~約40%)は、もう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、1つのプライマーの配列と一致するプローブ配列の割合は、約80%から約97%である。

追加の増幅産物の配列がもう1つのプライマーの補体のセグメントに直接隣接した1つのプライマーのセグメントを含む場合、プローブ配列は、追加の増幅産物のすべて、又は一部に正確にハイブリダイズするようにデザインできる。

追加の増幅産物が介在ギャップを含む場合、ギャップは、プローブ配列がギャップと完全に相補的であるようにデザインできるように、好ましくは知られた配列である。しかし、プローブ配列は、上述のように、ギャップにおけるいくつかのミスマッチ残基を含む追加の増幅産物にハイブリダイズできる。

連結部をまたがってハイブリダイズする代わりに、プローブ配列は、またプライマーに相補的である追加の増幅産物のセグメントでのみハイブリダイズできる。従って、この実施態様において、プローブ配列は以下のいずれかを含む：フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、かつリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列ではない；又はリバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、かつフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列ではない。

本発明のプライマー伸長連鎖反応の一の実施態様において、等しい濃度のフォワードプライマーとリバースプライマーが使用される。この実施態様において、濃度は対称であるといわれている。

#### 【0015】

好ましい実施態様において、フォワード及びリバースプライマーの“非対称濃度”が使用される。特に、改善された感受性のために、ヌクレオチド配列がプローブ配列の一部を構成するプライマーは、もう1つのプライマーと比較してサンプル中により低い濃度で与えられる。プローブ配列が追加の増幅産物と“非対称にハイブリダイズする”場合、又はプライマーに相補的である追加の増幅産物のセグメントでのみハイブリダイズする場合、プライマーの“非対称濃度”は特に好ましい。

例えば、プローブ配列がフォワードプライマーのヌクレオチド配列のセグメントを含む場合、フォワードプライマーとリバースプライマーのモル比(FP:RP)は約1:5から約1:20である。同様に、プローブ配列がリバースプライマーのヌクレオチド配列のセグメントを含む場合、リバースプライマーとフォワードプライマーのモル比(RP:FP)は、約1:5から約1:20であり、好ましくは約1:6から約1:15であり、最も好ましくは約1:10である。

増幅反応が生体サンプルで十分な回数起こった後、検出プローブをサンプルと接触させる。検出プローブのプローブ配列は、サンプル中に存在するかもしれないどんな追加の増幅産物ともハイブリダイズする。プローブ配列がフォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む(単独に、又はさらにリバースプライマー補体のセグメントのヌクレオチド配列を含む)場合、プローブ配列は追加のリバースプライマー増幅産物とハイブリダイズするであろう。同様に、プローブ配列がリバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む(単独に、又はさらにフォワードプライマー補体のセグメントのヌクレオチド配列を含む)場合、プローブ配列は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズするであろう。

#### 【0016】

好ましい実施態様において、検出プローブは自己改変シグナル発生プローブである。このプローブは、第1核酸配列；第1核酸配列に相補的である第2核酸配列；及び第1核酸配列を第2核酸配列と連結するプローブ配列を含む。第1核酸配列は、検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分と結合する。レポーター部分及び相互作用部分が互いに十分に近接している場合、第2核酸配列は、レポーター部分によって発生したシグナル

10

20

30

40

50

を変えることができる相互作用部分と結合する。例えば、第1及び第2核酸配列が互いに“クロズドコンホメーション”として知られているハイブリダイズする場合、レポーター部分は相互作用部分と近接される。従って、シグナルは改変される。シグナルを改変することは、低減、すなわちクエンチング；増加；又はシグナルの強度又は波長のようなシグナルを変える別の方法を含む。シグナルをクエンチングすることはシグナルを低減又は取り除くことを含む。

レポーター及び相互作用部分は、追加の増幅産物の検出のためにレポーター部分によって発生したシグナルの相互作用部分による改変を与える検出プローブの任意の点で結合できる。好ましい実施態様において、レポーター部分及び相互作用部分は、自己改変シグナル発生プローブの末端に結合される。

10

追加の増幅産物がない場合、検出プローブはクロズドコンホメーションにある。レポーター及び相互作用部分は互いに近接している。従って、シグナルは改変される。

追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物を有するプローブ配列のハイブリダイゼーションにより、検出プローブの第1及び第2核酸配列は変性する。このことは、“オープンコンホメーション”として知られている。

変性により、相互作用部分は、シグナルを変えるために、もはやレポーター部分と十分に近接していない。変えられたシグナルと不変のシグナルの間の違いが検出される。相互作用部分がシグナルをクエンチするとき、例えば不変シグナルが増え；又はクエンチングが完全である場合、シグナルは生成される。

第1及び第2核酸の間で形成されたハイブリダイゼーション（すなわちプローブの茎）の強度は、完全な機能を達成するルーチン実験によって調節できる。例えば、強度はヌクレオチドの長さの関数である。第1及び第2核酸配列の長さは、約3～15の範囲が好ましく、より好ましくは約4～7ヌクレオチドである。長さに加えて、ハイブリダイゼーションの強度はG-C含有量を減少させることによって、及びヌクレオチドのミスマッチを不安定化することを組み入れることによって低減できる。

20

#### 【0017】

プローブ配列の長さは重要ではない。しかし、長さは、追加の増幅産物と効果的に結合できないほど短くはできない。さらに、長さは、プローブ配列が産物とハイブリダイズされるにもかかわらずレポーター部分と相互作用部分を分離できないほど長くできない。好ましくは、プローブ配列は約10～約30のヌクレオチドを含み、より好ましくは約18～約24のヌクレオチド、最も好ましくは約19～約22のヌクレオチドである。プローブは溶液中では遊離することができ、又は固体表面に拘束することができる。

30

検出可能なシグナルを生じる検出プローブのどんな濃度も、本方法で使用できる。例えば、検出プローブの濃度はプライマーの1つ、又は両方とほぼ同じ濃度でサンプルに与えられる。

好ましくは、検出プローブの濃度はプライマーの濃度よりも多い。このように、検出プローブは、核酸配列がプローブ配列の一部であるプライマーと追加の増幅産物のための検出プローブの間での競争で有利である。プローブ配列が増幅産物に“非対称にハイブリダイズする”かあるいは上述のようにプライマーに相補的である追加の増幅産物の一部分にのみハイブリダイズする場合、検出プローブの濃度のこの増加は特に好ましい。例えば、検出プローブは、核酸配列がプローブ配列の一部でないプライマーの濃度の約1.3～約5倍、より好ましくは約1.5～約3倍、最も好ましくは約2倍である濃度で提供される。

40

好ましい実施態様において、プローブ配列は、例えば、フォワードプライマーの少なくとも65%の配列で作製され、フォワードプライマーはリバースプライマーの濃度約10分の1よりも少ない濃度で提供され、検出プローブはリバースプライマーの2倍の濃度で提供される。

#### 【0018】

レポーター部分によって生成された不変シグナルは、ターゲット核酸分子がサンプルに存在する指標である。プローブによって生成された検出可能な不変シグナルのレベルは、サンプル中のターゲット核酸分子の量に比例する。

50

検出プローブの検出可能なシグナルは、例えば、発光シグナル、色染料シグナル、又は放射性シグナル等の任意の種類のシグナルであってもよい。好ましい実施態様において、検出可能なシグナルは発光シグナルである。発光シグナルは蛍光シグナル又は化学発光シグナルであってもよい。

一の実施態様において、本発明のレポーター及び相互作用部分は、“FRET”対を構成する (Selvin, P.R., “Fluorescence Resonance Energy Transfer”, Methods in Enzymology 246: 300-335 (1995).)。FRET対はシグナル発生をエネルギー移動に頼る。レポーター部分は、第1波長のエネルギーを吸収し、第2の、より長い波長を放出する。相互作用部分は、相互作用部分のスペクトルが放射スペクトルと重なる程度まで放出したエネルギーの一部又はほとんどを吸収する。相互作用部分がクエンチャーである場合、クエンチャーは熱としてエネルギーを放出する。相互作用部分がフルオロフォアである場合、相互作用部分は、第3の、さらに長い波長で再放出する。FRET対相互作用のメカニズムは、相互作用部分の吸収スペクトルがレポーター部分の放射スペクトルと重なることを要求する。FRET相互作用の効率は、その重なりと正比例する。

#### 【0019】

別の実施態様において、レポーター部分と相互作用部分は、非FRET対である。特に、相互作用部分は、レポーター部分の放射スペクトルと重なる吸収スペクトルを有する必要はない。すなわち、相互作用部分の吸収波長は、レポーターの励起最大波長と放射波長よりも短くてもよい。非FRET対は米国特許第6,150,097号に記載され、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。非FRET対の検出可能なシグナルは、発光における変化に代わるものとして、吸収スペクトルの変化であってもよい。

好ましくは、本発明の方法で使用される検出プローブのレポーター部分は、フルオロフォアである。フルオロフォアは、キサンテン染料、シアニン染料、ダンシル誘導体、EDANS、3-フェニル-7-イソシアナトクマリン (isocyanatocoumarin) のようなクマリン、ルシファーイエロー、BODIPY、Cy3、Cy5、Cy7、テキサスレッド、エリトロシン、ナフチルアミン、オレゴングリーン、ALEXA蛍光色素、9-イソチオシアナトアクリジン (isothiocyanatoacridine) 及びアクリジンオレンジのようなアクリジン類、N-(p-(2-ベンゾキサゾリル)フェニル)マレイミド、ベンゾキサジアゾール類、スチルベン類及びピレン類であってもよい。

キサンテン染料は、フルオレセイン又はローダミンであってもよい。好ましくは、フルオレセインは、5-カルボキシフルオレセイン (5-FAM) ; 6-カルボキシフルオレセイン (6-FAM) ; 2',4',1,4,-テトラクロロフルオレセイン (TET) ; 2',4',5',7',1,4-ヘキサクロロフルオレセイン (HEX) ; エオシン ; カルシウムグリーン ; フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ; 又はNEDである。好ましくは、ローダミン染料は、テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA) ; テトラプロパノ-6-カルボキシローダミン (ROX) ; 2',7'ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシローダミン (JOE) 又はテトラメチルローダミン (TMR) である。多くの適した形態のこれらの化合物は、結合部位として、又はオリゴヌクレオチドとの結合の機能の結合として使用できるそのキサンテン環に様々な置換基を有するものとして市販されている。

また、フルオロフォアはナフチルアミン化合物であってもよい。ナフチルアミン化合物はアルファ又はベータ位にアミノ基を有する。このようなナフチルアミノ化合物としては、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート及び2-p-トルイジニル-6-ナフタレンスルホネートが挙げられる。

また、フルオロフォアは組み合わせフルオロフォアであってもよい。組み合わせフルオロフォアの例は、例えばLeeら(1997), Nucleic Acids Research 25:2816に記載されたフルオレセイン-ローダミンダイマーである。フルオロフォアは、可視スペクトル内で、又は可視スペクトルの外側、例えば紫外線又は赤外線範囲で吸収及び放射するように選んでもよい。

#### 【0020】

好ましくは、本発明の方法で使用される検出プローブの相互作用部分はクエンチャーで

ある。クエンチャーは、DABCYL、アントロキノン、ニトロチアゾール、ニトロイミダゾール又はマラカイトグリーンであってもよい。また、DABSYL、DABMI又はメチルレッドのようなDABCYLの変異体も適している。また、米国特許第6,080,868号に開示される非対称シアニン染料化合物は、クエンチング部分として使用でき、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。

さらにまた、フルオロフォアはクエンチャーとして使用できる。例えば、プローブがオープンコンホメーションである場合に検出範囲で蛍光を発しないフルオロフォアは、他の特定のフルオロフォアに接近する場合に蛍光をクエンチできる。

自己改変シグナル発生プローブの例は、分子ビーコンプローブである。分子ビーコンプローブのループは、上述のようにプローブ配列と一致する。“アーム”と呼ばれるヌクレオチド配列は、上述のように第1及び第2ヌクレオチド配列と一致する。分子ビーコンプローブは、米国特許第5,925,517号;PCT出願WO95/13399;PCT出願WO97/39008;及びTyagi and Kramer (1996) Nature Biotechnology 14:303に記載され、それらは参照により本明細書に組み込まれるものとする。

さらに、分子ビーコンプローブは、増幅産物の検出を可能にするどんな様式で修正してもよい。修正されたプローブとしては、例えば米国特許第6,037,130号に記載される“波長シフト”分子ビーコンプローブが挙げられ、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。特に、これらの修正されたプローブは、基本的分子ビーコンプローブ構造、すなわちループ;茎デュプレックス;一端のクエンチャー;及びもう一方の端にクエンチャーとは逆のレポーター部分、一般的にはフルオロフォアを有する。レポーターは“ハーベスターレポーター”とも呼ばれる。プローブの修正は、プローブが“ハーベスターレポーター”の後にいくつかのヌクレオチドの延長を含むことである。延長は、“エミッタレポーター”、一般的には他のフルオロフォアと結合するヌクレオチドで終結する。ターゲット核酸分子の存在下で、クエンチャーはレポーターから分離する。このオープンコンホメーションにおいて、“ハーベスターレポーター”は励起源からエネルギーを吸収するが、エネルギーの有意な部分を、いくつかの構成においては大部分のエネルギーを“エミッタレポーター”に移し、前記エミッタレポーターは移されたエネルギーを受け取り、その特徴であるより長い波長で放射する。

#### 【0021】

別の実施態様において、検出プローブは、追加の増幅産物の隣接領域に相補的である1対のオリゴデオキシヌクレオチドを含む(Cardulloら、(1988), Proc. Nat'l. Acad. Sci. 85:8790-8794及びHellerら、EP 00 70685)。1つのオリゴデオキシヌクレオチドは、その5'末端にレポーター部分を含み、もう1つのオリゴデオキシヌクレオチドは、その3'末端に相互作用部分を含む。プローブがターゲット配列にハイブリダイズする場合、2つの部分は互いに接近する。サンプルが適切な振動数の光によって刺激される場合、蛍光共鳴エネルギーは1つの部分からもう1つの部分に移動し、前記部分からスペクトル応答における測定可能な変化を生じ、その結果ターゲットの存在を示唆する。

更に別の実施態様において、検出プローブは1対のオリゴデオキシヌクレオチドを含む。前記1対はお互いに相補的である。また、前記1対の1つはターゲット核酸分子の配列を有し、前記1対のもう1つはターゲット核酸分子に相補的である配列を有する(Morrison and Stols, "Sensitive Fluorescence-Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in Solution", Biochemistry 32: 309-3104 (1993)及びMorrison EP 0 232 967 A2,、1986年1月10日に出願された米国出願番号第817,841号の優先権主張)。プローブの各オリゴデオキシヌクレオチドは、その3'末端と結合したレポーター部分及びその5'末端と結合した相互作用部分を含む。プローブの2つのオリゴヌクレオチドが互いにアニールされる場合、それぞれのレポーター部分はもう一方の相互作用部分へ近づく。このコンホメーションにおけるプローブにより、レポーターが適切な波長の光によって刺激される場合、シグナルは相互作用の部分によって変えられ、好ましくはクエンチされる。しかし、どちらかのプローブ分子がターゲットと結合した場合、プローブの相補的であるオリゴデオキシヌクレオチドの変性効果は存在しない。このコンホメーションにおい

て、シグナルは生成する。ターゲット結合コンホメーションにおける場合、プローブのオリゴデオキシヌクレオチドが長すぎてFRETによって自己クエンチできない。

#### 【0022】

検出プローブによって発生するシグナルは、信頼性のある検出及び測定を提供する当該技術においてどのような公知の方法によっても検出及び測定できる。

例えば、ABI-7700（アプライドバイオシステム社製、フォスターシティ、CA）をシグナル放射、一般的には蛍光放射を測定するために改造する。ABI-7700は、96ウェル増幅反応チューブ配列で各ウェルと連結した光ファイバーを使用する。装置は、レポーター部分を励起するためにレーザーを具備し、増幅の際に連続監視により各チューブからシグナル強度、一般的には蛍光スペクトル強度を測定できる。

10

追加の増幅産物は、エンドポイント及びリアルタイム測定によって定量化できる。エンドポイントモードにおいて、シグナル測定は増幅反応が完了した後、例えば増幅反応のすべて又は実質的にすべてのサイクルが完了した後行われる。リアルタイムモードにおいて、シグナル測定は増幅反応の間複数回、例えば増幅反応の各熱サイクル後行われる。ターゲット核酸分子の最初の量の定量的測定、例えばサンプル中に存在するウイルスの又はバクテリアの核酸のコピー数が要求される場合、リアルタイムモードが好ましい。

増幅前の検査サンプルに存在するターゲット核酸分子の絶対量は、標準曲線を用いて決定できる。例えば、標準曲線は、一連の平行のプライマー伸長連鎖反応から得られる結果から作成することができる。これらの平行反応は、ターゲット核酸分子と同様である既知の量の核酸分子を含む一連の標準サンプルで行われる。異なる既知の量の一連の約5～約20の標準サンプルが用いられる。平行の伸長反応は、ターゲット核酸分子の伸長反応で使用するものと同じ反応条件及び試薬を使用する。

20

各平行の反応において、ベースラインシグナル強度と比較したシグナル強度の増加（デルタRn）は、各増幅サイクルのアニール温度で測定される。ベースライン値は追加の増幅産物の形成前に検出されるシグナルの大きさである。しきい値（Ct）は各反応で計算される。Ctは、発生したシグナル強度がベースラインシグナル強度から区別できる増幅サイクル数である。各標準サンプルにおける核酸の開始量は、その対応するCt値に対してプロットできる。このプロットは標準の曲線である。

一般に、しきい値は、ベースライン値と統計的に異なるのに十分に高くなければならないが、増幅反応に関連した飽和現象で得られるシグナルよりも低くなければならない。一般的には、しきい値は、平均ベースラインシグナル強度よりも約10標準偏差大きく設定される（例えば、Heidら、Genome Research 6:986-994（1996）参照）。

30

#### 【0023】

また、ターゲット核酸分子を含むサンプルのCt値は計算される。このCt値は標準曲線に対してプロットできる。検査サンプルでターゲット核酸分子の量は、標準曲線を用いて外挿により定量化できる。図9は、以下の実施例に記載された“向かい合う（nose-to-nose）”PCRプライマー及び反応条件を用いたPCRターゲットのこの定量方法（HCV RNAの場合）を示す。

検出装置、例えばABI 7700で用意されるソフトウェアは、増幅の過程中シグナル強度を記録できる。これらの記録された値は、継続する形態でシグナル強度の増加を計算するために使用してもよい。ABI 7700装置は一般的に蛍光をモニターするために使用されるが、Ct値は、蛍光測定から決定される必要がない。Ct値は、多様な異なるタイプのシグナルの測定から決定できるであろう。

40

本発明は、またキットである本発明の方法を実施するための有用な構成要素を含む多重容器（multicontainer）ユニットに関する。キットは、特定の病原体の変異体の増幅のために1組の向かい合う（nose-to-nose）プライマー及び上述の自己改変シグナル発生プローブのようなプローブを含む。いくつかの場合には、プローブは適切な支持膜に固定される。キットの他の任意要素としては、例えばプライマー伸長産物の合成を触媒する物質、基質ヌクレオシド三リン酸、増幅及び/又はハイブリダイゼーション反応のための適切な緩衝剤、検査サンプルにおける鋳型分子の定量を与えるための核酸参照標準、及び本発明

50

の方法を行うための装置が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

#### 実施例

以下に示される本発明の実施例は、説明することのみを目的として与えられ、本発明の範囲を制限するものではない。実施例に従う特許請求の範囲に記載される範囲内の多くの本発明の実施態様は、前述の詳細な説明及び以下の実施例を読む当業者にとって明らかであろう。

【 0 0 2 5 】

#### HCV変異体の検出

比較は、主なHCV遺伝子型とサブタイプのためのプロトタイプである8つのHCV系の核酸ベース検出のための3つの異なる方法で行われた。使用した4つの検出方法は、(A)本発明の向かい合う(nose-to-nose)ビーコンRT-PCR、(B)従来のビーコンRT-PCR、及び(C)COBAS AMPLICOR HCVモニター検査バージョン2.0(COBAS HCM-2; Roche Diagnostic Systems Inc, Branchburg, NJ)。RT-PCRベースアッセイであるCOBAS HCM-2は、メーカーの取扱説明書に従って行った。従来のビーコンRT-PCR及び“向かい合う(nose-to-nose)”ビーコンRT-PCRは、以下のように行った。

PCRプライマーをHCVゲノムのRNAの5'非翻訳領域のセグメントを増幅するようにデザインした。ゲノムのこの領域の核酸配列は、HCV遺伝子型とサブタイプの間に比較的高く保存される。

ビーコンPCRのための従来のプライマーをHCV-Hの公表配列のヌクレオチド66~166に一致するDNAの101b.p.セグメントを増幅するようにデザインした[Inchauspeら、Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463]。2つの従来のRT-PCRプライマーの間の介在ギャップは、長さが61b.p.である。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCA-3' (配列番号1)；

リバープライマー：5'-GTACTCACC GGTTCCGCAGA-3' (配列番号2)。

本発明の“向かい合う(nose-to-nose)”RT-PCRのためのプライマーは、2つのプライマーの間に介在ヌクレオチドギャップがないようにデザインした。増幅された領域は、HCV-Hの公表配列のヌクレオチド83~133に一致する51b.p.セグメントである。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGC-3' (配列番号3)；

リバープライマー：5'-CCCGGGAGGGGGGGTCTGGAG-3' (配列番号4)。

従来のPCRと“向かい合う(nose-to-nose)”PCRの両方について、PCR産物検出で使用する分子ビーコンは、5'-FAM-ccgggcTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTgcccgg-DABCYL-3' (配列番号5)であった。茎核酸は小文字で示され、プローブループ核酸(HCV-H配列のヌクレオチド91~113と一致する)は、大文字で示される。

【 0 0 2 6 】

相補的DNAは、従来のリバープライマー、又は上述の向かい合う(nose-to-nose)リバープライマーのいずれかを使用する抽出した血漿RNAから逆転写された。各20ulの反応は、2.5uMのリバープライマー、1ユニットのMoMuLV逆転写酵素(GIBCO BRL, Grand Island, NY)、1x逆転写酵素バッファー(GIBCO BRL)、5mMのジチオスレイトール(DTT)、0.06ユニットのRNasin(Promega, Madison, WI)、及び0.5mMのdNTP、すなわちdATP、dTTP、dCTP及びdGTP(Pharmacia, Piscataway, NJ)を含む。反応は、45分間42℃でインキュベートした。次いで、逆転写酵素を2分間95℃でさらにインキュベートすることによって不活性化した。

PCR増幅及び検出のために、逆転写の産物をフォワードプライマー(“向かい合う(nose-to-nose)”PCRのために0.1µM及び従来のPCRのために1µM)、1µMのリバープライマー、1.25ユニットのAmpliAq Goldポリメラーゼ(Applied Biosystems, Foster City, CA)、1xAmpliAq Gold Buffer II(Applied Biosystems)、2mMのMgCl<sub>2</sub>、0.2mMのdNTPs、及び10ngの分子ビーコンを含む50µMの最終容積の反応混合物でインキュベートした。PCR増幅は、以下のサイクリングパラメータを用いてApplied Biosystems 7700 Sequence D

10

20

30

40

50



etectorで行った：10分間95（酵素活性化）、続いて44サイクル[95、30秒（変性）；60、1分（アニーリング）；72（伸長）]。分子ビーコンの相対的蛍光は、アニーリング温度で測定した。HCV鋳型分子の定量化は、各RT-PCR実験でRNA標準曲線の算入により求めた。標準曲線は、1 $\mu$ g/mlのイーストtRNA（Ambion, Austin, TX）に希釈した10、25、50、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>又は10<sup>6</sup>の分子の合成HCV RNA転写物を用いて作成した。

表1は、HCVの8つの菌株の検出のための3つの異なる方法の比較を示す。前記菌株はHCVの主遺伝子型とサブタイプのためのプロトタイプである。本発明の向かい合う（nose-to-nose）ビーコンアッセイ（A）は8つのすべての遺伝子型/サブタイプを検出するが、従来のビーコンPCR（B）は、遺伝子型4aと5aを検出することができない。

COBAS-HCM-2アッセイの結果は、国際単位（I.U.）で示される。種々の変換因子が提案されているが（Saldanhaら、Vox Sang, 1999; 76(3):149-158; Cuijpersら、2001;81(1):12-20）、I.U.とHCV RNAコピー数の間の正確な関係は、特に1a及び1b以外のHCV遺伝子型について検討中である。このため、Roche Diagnostic Systemsは、COBAS-HCM-2アッセイで得られた結果について変換因子を現在示唆しない。従って、分析のために、I.U.及びRNAコピー数が同等であると仮定される。COBAS-HCM-2アッセイと比較すると、向かい合う（nose-to-nose）ビーコンRT-PCRアッセイは遺伝子型1a、1b、2b及び6aと同等であるか、又はわずかに敏感であるが、遺伝子型4aについて1log（10倍）敏感であり、遺伝子型2a及び5aについて0.5log（3.2倍）敏感であり、遺伝子型3aについて0.3log（2倍）敏感である。2つのアッセイの相対的感受性を比較する統計分析を表2に示す。

10

20

30

40

【表 1】

表1

検査サンプル <sup>1</sup>				
HCV 遺伝子型 /サブタイプ	ウィルス 株名	A.  向い合う ビーコン PCR (Log <sub>10</sub> RNA 分子 / ml)	B.  従来の ビーコンPCR (Log <sub>10</sub> RNA 分子 / ml)	C.  COBAS HCM-2 (Log <sub>10</sub> 国際 単位 / ml)
1a	H 株	5.1	5.0	4.9
1b	HC-J4/91	4.7	4.7	4.6
2a	HC-J6	5.1	4.2	4.6
2b	HC-J8	4.0	3.7	3.9
3a	S52	4.3	3.7	4.0

【表 2】

表1続き

4a	ED43	6.3	<2.6	5.3
5a	SA13	5.2	<2.6	4.7
6a	HK6a	4.8	4.4	4.7

10

## 【 0 0 2 9 】

1. 検査したサンプルは、各プロトタイプHCV株で感染したチンパンジー由来の血漿である :H株 [ Inchauspeら、Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M6746 3 ]、HC-J4/91 [ Okamotoら、Virology, 190:894-899, 1992; Genbank D10750 ]、HC-J6 [ Okamotoら、J Gen Virol, 72:2697-2704, 1991; Genbank D00944 ]、HC-J8 [ Okamotoら、Virology, 188:331-341, 1992; Genbank D10988 ]、S52 [ Bukhら、Proc Natl Acad Sci ( USA) 89:4942-4946, 1992; Genbank M84837 ]、ED43 [ Chamberlainら、78:1341-1347, 19 97; Genbank Y11604 ]、SA13 [ Bukhら、J Infect Dis, 178:1193-1197; Genbank AF06449 0 ]、HK6a [ Adamsら、Biochem Biophys Res Commun, 234:393-396, 1997; Genbank Y12083 ]。

20

30

40

## 【 0 0 3 0 】

【表3】

表2

向かい合うビーコンPCR及びCOBAS HCM-2アッセイによるHCV遺伝子型の検出

HCV 遺伝子型	向かい合うビーコン PCR (Log <sub>10</sub> RNA 分子/ml) x +/- s.d. (n) <sup>1</sup>	COBAS HCM-2 (Log <sub>10</sub> I.U./ml) x +/- s.d. (n)	差
1a	5.1 +/- 0.25 (7)	4.9 +/- 0.12 (2)	1.6x
1b	4.7 +/- 0.19 (7)	4.6 +/- 0.12 (5)	1.3x
2a	5.1 +/- 0.18 (6)	4.6 +/- 0.22 (6)	3.2x (p=0.0013)
2b	4.0 +/- 0.22 (7)	3.9 +/- 0.32 (6)	1.3x
3a	4.3 +/- 0.11 (7)	4.0 +/- 0.12 (6)	2.0x (p=0.0032)
4a	6.3 +/- 0.12 (7)	5.3 +/- 0.33 (6)	10x (p<0.0001)
5a	5.2 +/- 0.12 (6)	4.7 +/- 0.26 (6)	3.2x (p=0.0002)
6a	4.8 +/- 0.19 (7)	4.7 +/- 0.90 (2)	1.3x

## 【0031】

1. 結果は (n) 反復アッセイの平均 +/- 標準偏差で表される。COBAS HCM-2アッセイの結果は、国際単位 (I.U.) で表される。

2. 2つのアッセイの感受性の差は、向かい合う (nose-to-nose) ビーコンPCRによって得られた値とRoche Monitorアッセイによって得られた値との算術比として計算される。両側P値をGraphPad InStatソフトウェアを用いて計算した。

## 【0032】

10

20

30

40

50

### 様々なHCV遺伝子型に感染した個体由来の血漿サンプルのスクリーニング

本発明の“向かい合う(nose-to-nose)”PCRを用いてICBS HCVマスターパネルから患者血漿サンプルのサブセットをスクリーニングした。連続して伸長される前記パネルは、International Consortium for Blood Safety (ICBS) と共同して疾病管理センター (CDC) によって編集される。前記パネルは、種々の地理上の領域から集められた血漿サンプルから構成される。すべてのサンプルは、HCV抗体に関してスクリーニングされ、CDC及びVisible Genetics Inc. (VGI) の2つの独立した検査室で遺伝子型分析される。

エジプト、ベトナム及びインドネシアで集められた血漿サンプルを含む合計192のサンプルは、CDCによって提供された。これらのうちで、CDC、VGI又は両方によって得られたPCR-遺伝子型データに基づいてHCV RNAに関して明確に陽性のものとして、134がリストアップされた。5つのサンプルは、不確かな又は矛盾するPCR-遺伝子型データを有するものとしてリストアップされた。53のサンプルは、遺伝子型でないものとしてリストアップされた(すなわち、HCV RNAに対して陰性)。

RNAが結合し、96ウェルプレート型のPVDF膜から抽出されるロボット抽出手段を用いて、総RNAを70  $\mu$ lの新たに解凍した血漿から抽出した(Lee and Prince, 2001, Transfusion; 41:483-487)。総RNAを50  $\mu$ lの量のヌクレアーゼを含まない水で得た。次いで、この10  $\mu$ l (14  $\mu$ lの血漿と等価である)を、上述の向かい合う(nose-to-nose)プライマー(配列番号3及び配列番号4)及び分子ビーコン(配列番号5)を用いて逆転写及びPCRに供した。

パネルに存在する134の明確にHCV-陽性のサンプルについてのRT-PCRの結果を表3に示す。“向かい合う(nose-to-nose)”PCRは、すべての遺伝子型由来のHCV単離物の大部分を首尾よく検出した。遺伝子型アッセイでHCV RNAに関して陽性でない53のサンプルのうちで、1つのサンプルのみが弱い陽性PCRシグナルを与えた( $10^{3.1}$  RNA分子/ml)。

約700コピー/ml (9.9コピー/14  $\mu$ l血漿)未満のウイルス負荷を有するサンプルは、上述のロボット抽出と“向かい合う(nose-to-nose)”RT-PCRの組み合わせを使用しても検出されないであろう。表3に示される結果は、本発明が“向かい合う(nose-to-nose)”プライマーと分子ビーコンの1つのセットで種々のHCV遺伝子型の検出を与えることを明確に示す。

【0033】

【表4】

表3

遺伝子型	検出された合計／ 検査した合計	範囲 (Log <sub>10</sub> RNA 分子／ml 血漿)	(%)
1a	22/23	3.13 – 6.93	95.7
1b	19/20	3.18 – 7.13	95.0
1c	3/3	5.84 – 6.72	100
2a	3/3	3.85 – 6.85	100
2e	1/1	6.69	100
3a	3/3	4.36 – 6.8	100
3b	1/1	4.93	100
4a	43/43	3.78 – 7.0	100
4d	9/9	5.08 – 6.56	100
4l	1/1	6.25	100
6a	8/8	3.28 – 6.37	100
10a (3)	5/6	4.22 – 7.23	83.3
不明瞭 ***	12/13	4.11 – 6.85	92.3
合計	130/134		97.0

\*\*\*混ざっている感染を示す遺伝子型分析又は未だに不確定の分類が別々にリストアップ

されているサンプル。

【 0 0 3 4 】

HIV-1グループMサブタイプB変異体の検出のための向かい合うPCR (nose-to-nose) と従来のPCRとの比較

図 6 a は、4つの異なるHIV変異体、グループM (メジャー) サブタイプBのすべて (HIV/RT-1、HIV/RT10、HIV-38-1及びHIV/38/3) のV3領域及びフランキング配列に相当するプロウイルスDNA配列のアラインメントを示す。V3領域は、HIVゲノムの最も高く変化しやすいセグメントである。分子ビーコンは、変異体HIV/RT-1と全く同一のプロローブ-ループ構造でデザインされた (示されたV3配列のヌクレオチド76-97)。このプロローブ配列は、変異体HIV/RT-10、HIV/38-1及びHIV/38-3と1、3又は4つのミスマッチをそれぞれ有する (図 6 a)。

10

“ 向かい合う (nose-to-nose) ” PCRのためのPCRプライマーは、以下のようにデザインされた。フォワードプライマー (5'-acaatacaagaaaaaggataactatgggac-3') (配列番号 6) は図 6 a に示されるHIV/RT-1の配列のヌクレオチド65-94と一致する。フォワードプライマーは、NBFとして知られている。リバープライマー (5'tttctcctgttgtataaagtactctccccg-3') (配列番号 7) は同じ配列のヌクレオチド95-124と一致する。リバープライマーは、NBRとして知られている。

従来のPCRのためのプライマーは、177b.p.のPCR産物を産生するように以下のようにデザインされた。フォワードプライマー (5'taatgtacagctgaatgaatctg-3') (配列番号 8) は図 6 a に示されるHIV/RT-1の配列のヌクレオチド14-37と一致する。リバープライマー (5'gttttaaagtgttattccatgc-3') (配列番号 9) は同じ配列のヌクレオチド168-190と一致する。

20

図 6 a で示される4つの各HIV変異体の検出のために向かい合う (nose-to-nose) PCRで従来のビーコンPCRの能力を比べるために実験の結果を図 7 に示す。PCR反応は、HIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1又はHIV/38-3の $10^6$ の鋳型分子、図 6 b に示される分子ビーコン、及び上述の従来又は向かい合う (nose-to-nose) プライマーのいずれかを含んでいた。コントロールPCR反応は鋳型がないか、又は150ngのヒトのゲノムのDNAを含んでいた。以下のサイクルパラメータを用いて、増幅をPerkin Elmer 7700で行った: 95 で10分間、続いて95 で30秒間 (変性)、50 で1分間 (アニーリング) 及び72 で30秒間 (伸長) を40サイクル。分子ビーコンの蛍光は、50 のアニーリング温度で測定した。次いで、蛍光をPCRサイクル数に対してグラフにプロットした。PCR増幅/検出の効率は“ しきいサイクル”、すなわちポジティブ蛍光シグナルを生じるのに必要な最低PCRサイクル数によって決められる。

30

図 7 a に示すように、後者の場合に得られる蛍光のピーク・レベルが正確に一致する鋳型のものの約2分の1であったが、従来のビーコンPCR技術は、同じしきいサイクル (サイクル23) でHIV/RT-1 (ビーコンと正確に一致する) 及びHIV/RT-10 (1つのミスマッチ) の両方を検出することができた。ゲル分析 (図 8) で示されるように、PCR産物が4つのすべての変異体から産生された事実にもかかわらず、従来のビーコンPCR技術はHIV/38-1 (3つのミスマッチ) 又はHIV/38-3 (4つのミスマッチ) のいずれも検出できなかった。

対照的に、向かい合う (nose-to-nose) PCR技術は、類似のしきいサイクルで4つのすべてのHIV変異体 (0、1、3又は4つのミスマッチ) を検出することができた (図 7 b)。重要なことには、いかなるシグナルも、鋳型を含まない、又は150ngのヒトゲノムDNAを含む反応管で検出されなかった。

40

【 0 0 3 5 】

HIV-1グループMの異なるサブタイプの検出

PCRプライマーはHIV-1ゲノムRNAのgag遺伝子のセグメントを増幅するようにデザインされ、HIV-1グループMの異なるサブタイプ間で比較的良好に保存されている。この相対的な保存にもかかわらず、個々のHIV-1サブタイプは、ゲノムのこの領域内に20%までのヌクレオチド配列多様性を示す (Robertsonら、1999: Human Retroviruses and AIDS 1999, pp 4 92-505, Editors Kuikenら、ロスアラモス国立研究所、ロスアラモス、ニューメキシコ)

50

。

ビーコンPCRのための従来のプライマーは、サブタイプB HIV-1単離HXB2の公開配列のヌクレオチド1478～1571に対応するRNAの94b.p.セグメントを増幅するようにデザインされていた [ラトナーら、1985, Nature, 313(6000):277-284; Genbank K03455]。2つの従来のRT-PCRプライマーの間の介在ギャップは53b.p.である。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-AACCAAGGGGAAGTGACATA-3' (配列番号 1 0)；

リバースプライマー：5'-ATTTCTCCTACTGGGATAGGT-3' (配列番号 1 1)。

本発明の“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRのためのプライマーは、HIV-1 HXB2の公開配列のヌクレオチド1502～1558に対応する57b.p.セグメントを増幅するようにデザインされた。2つのプライマーの間に介在ギャップは存在しない。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-GAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAG-3' (配列番号 1 2)；

リバースプライマー：5'-GGATAGGTGGATTATTTGTCATCCATC-3' (配列番号 1 3)。

従来及び“向かい合う (nose-to-nose)” PCRの両方について、PCR産物の検出に使用した分子ビーコンは5'-FAM-cgcctTACCCTTCAGGAACAAATAGaggcg-DABCYL-3' (配列番号 1 4)であった。茎核酸は小文字で示され、プローブループ核酸 (HIV-1 HXB2配列のヌクレオチド1512～1530と一致する) は大文字で示される。

HIV-1サブタイプA、B、C、D、F及びG由来のウイルス単離物は、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIHから細胞を含まない培養上清として得られた。RNAは、140ulの新たに解凍した培養上清から抽出した。相補DNAは、従来のリバースプライマー、又は上述の向かい合う (nose-to-nose) リバースプライマーのいずれかを用いて抽出したRNAから逆転写された。cDNA合成及びPCR増幅の両方についての反応条件は、HCVについて上述のものと本質的に同じであった。すべてのアッセイは3通の行った。HIV鑄型分子の定量化は、各RT-PCR実験でRNA標準曲線の算入によって達成された。標準曲線は、1 µg/mlのイーストtRNA (Ambion、オースティン、TX) に希釈された1、10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>又は10<sup>6</sup>分子のHIV-1 RNAを用いて作成された。

HIV-1サブタイプの検出のための従来のRT-PCR及び“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRの比較を表 4 に示す。本発明の“向かい合う (nose-to-nose)” アッセイ (A) は、検査した6つのHIV-1サブタイプのすべてを検出したが、従来のアッセイはサブタイプA、D及びGを検出できなかった。

【 0 0 3 6 】

10

20

30

40

50

【表5】

表4

検査サンプル <sup>1</sup>		Log <sub>10</sub> 検出された培養上清のml当たりのRNA分子	
HIV-1 サブタイプ <sup>2</sup>	ウイルス株名	従来の ビーコンRT-PCR	"向かい合う" ビーコンRT-PCR
A	92UG029 <sup>2</sup>	<3.9	9.7 +/- 0.05
B	92BR014 <sup>2</sup>	9.3 +/- 0.3	9.3 +/- 0.1
C	92BR025 <sup>2</sup>	9.4 +/- 0.2	9.2 +/- 0.3
D	94UG114 <sup>2</sup>	<3.9	10.2 +/- 0.06
F	93BR020 <sup>2</sup>	4.8 +/- 0.6	5.6 +/- 0.2
G	Jv1083 <sup>3</sup>	<3.9	9.8 +/- 0.2
鑄型なし	-	<3.9	<3.9

1. 検査サンプルは、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIHから細胞を含まない培養上清として得られたウイルス単離物であった。

2. 単離物は、UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization、及びDAIDS, NIAIDから得た。

3. Abimikuら、1994, AIDS Res Hum Retroviruses, 10(11):1581-1583。

【 0 0 3 7 】

HIV-1グループM及びHIV-1グループO変異体の両方を同時に検出する方法の適応

HIV-1グループO（アウトライアー）由来のウイルス単離物はHIV-1グループM（メジャー）のメンバー由来のマーク配列変異体を示す。グループOウイルスはアフリカの一部で主に流行しているが、アフリカの外の血液銀行によって集められたサンプルの中の頻度は、



増加しているようである (Jaffe and Schochetman, 1998, Infect Dis Clim North Am; 12(1):39-46; Couturierら, 2000, AIDS;14(3):289-296; Fed Regist, 1997, Sept 23;62(184):49695)。本発明は、“向かい合う (nose-to-nose)” プライマー及び分子ビーコンの1つのセットを用いて、グループM及びグループ0の両方のメンバーの検出を可能にする

。

本発明の“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRのためのプライマーは、HIV-1ゲノムRNAのpol遺伝子の64b.p.セグメントを増幅するようにデザインされ、HIV-1 HXB2の公開配列のヌクレオチド4750～4813と一致している。2つのプライマーの間の介在ギャップは存在しない。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-CAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTT-3' (配列番号 15)

；

リバースプライマー：5'-CTGTATCCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTA-3' (配列番号 16)。

PCR産物検出で使用した分子ビーコンは、5'-FAM-cgcacgGCAGTATTCATTCACCAATTTTcgtgcg-DABCYL-3' (配列番号 17) であった。茎核酸は小文字で示され、ブローブルー核酸は大文字で示される。

次いで、新しいプライマー及びビーコンは、HIV-1グループM (サブタイプA、B、C、D、F及びG) 及びグループ0由来のウイルス単離物を増幅及び検出する能力について試験され、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID/NIHからの細胞を含まない培養上清として得られた。RNA抽出の前に、すべての細胞上清は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で1000倍に希釈された。RNA抽出は、以下の単離物を除いては、上述のように希釈上清で実質的に行われ、すべてのRNAサンプルはRNaseを含まないDNase (Ambion、オースティン、TX) で処理されてプロウイルスDNAの汚染の除去を確実にする。相補DNAは、上述の向かい合う (nose-to-nose) リバースプライマー (配列番号 16) を用いて抽出RNAから逆転写された。cDNA合成及びPCR増幅の両方のための反応条件は、上述のものと本質的に同じであった。HIV-1鑄型分子の定量化は、各RT-PCR実験におけるRNA標準曲線の算入によって達成された。

表5は、本発明のpol領域“向かい合う (nose-to-nose)” プライマーを用いるRT-PCRの結果、及びCOBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay Version 1.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) との比較を示す。“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRアッセイは、COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0) と同じ (グループM、サブタイプB及びC) 又はより高い (グループM、サブタイプA、D及びF) 感受性で、検査されたすべてのグループM及びグループ0単離物を検出できた。後者のアッセイは、検査されたグループ0ウイルス単離物のいずれも検出できず、またグループMサブタイプGも検出できなかった。これらのデータは、COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0) 又はもその改良バージョン (1.5) のいずれもグループ0ウイルスを検出できないという最近の報告 (Yangら、Transfusion, 2001; 41:643-651) と一致している。対照的に、本発明は、“向かい合う (nose-to-nose)” プライマー及び分子ビーコンの1つのセットですべてのウイルス単離物の検出を可能にする。

【0038】

【表 6】

表5

検査サンプル <sup>1</sup>		Log <sub>10</sub> 検出された希釈培養上清のml当たりのRNA分子	
HIV-1 サブタイプ <sup>2</sup>	ウイルス 株 <sup>2</sup> 名	"向かい合う" ビーコンRT-PCR	COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0
A	92UG029	5.1 +/- 0.17	3.5 +/- 0.10
B	92BR014	5.4 +/- 0.62	5.2 +/- 0.03
C	92BR025	5.6 +/- 0.04	5.5 +/- 0.04
D	94UG114	5.9 +/- 0.46	5.2 +/- 0.05
F	93BR020	5.7 +/- 0.80	3.7 +/- 0.09
G	Jv1083	7.3 +/- 0.08	陰性
O	L20571	5.4 +/- 0.66	陰性
O	Y14496	6.0 +/- 0.38	陰性
ヒト DNA (100 ng) <sup>3</sup>		<3.0	検査せず
ヒト RNA (100 ng) <sup>3</sup>		<3.0	検査せず

1. RNA抽出の前に、すべての細胞を含まない上清をPBS（“向かい合う”RT-PCRについて）又は普通のヒトの血漿（COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0について）のいずれかで1000倍に希釈した。2. ウイルス単離物は表4に記載される；単離物L20571, Gurtler LGら, 1994, J Virol, 68:1581；単離物Y14496, Loussert-Ajaka Iら, J Virol 69:5640, 1995。3. “向かい合う”PCR又はRT-PCRは、また観測されたシグナルがウイルス増幅によるものであり、ヒトの核酸を汚染するものの増幅によるものではないことを証明するために100ngのヒトのDNA又はRNAで行った。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】分子ビーコンのグラフィカルな例である。適切なアニール温度で、ビーコンは：（A）相補的ターゲット配列の非存在下で、レポーター部分（ ）の発光をクエンチするクエンチング部分（ ）を生じる基部ループ構造を形成し；又は（B）相補的ターゲットの存在下で、レポーターがそのシグナルを出すことを可能にするターゲットと結合する。

【図2】分子ビーコンを利用した従来のPCRである。PCRプライマーは、ウイルスRNAのセグメントを増幅するようにデザインされている。そのプローブが2つのPCRプライマーに内在的であるPCR産物のセグメントにハイブリダイズするように、分子ビーコンはデザインされる。ビーコンは、ウイルスの菌種AのPCR産物とハイブリダイズできるが、ターゲット配列（小文字で示される）におけるミスマッチのためにウイルスの菌種BのPCR産物を検出することができない。

【図3】本発明の原理の1つのグラフィカルな例である。（a）リバーズ及びフォワードPCRプライマー（>30b.p.）は、ターゲットRNA（又はDNA）及びその相補的DNA鎖に直接“向かい合って（nose-to-nose）”ハイブリダイズするようにデザインされ、その結果産生したPCR産物は介在配列を持たない。分子ビーコンのターゲット-特異的ループは、プライマ

ーの1つのジャンクション及びその他のプライマーの補体によって生じるDNA配列にハイブリダイズするようにデザインされている。PCRプライマーは、ミスマッチ残基（“X”で示される）を有するターゲット鋳型にハイブリダイズする。点線はハイブリダイゼーションを示す。（b）すべての鋳型から増幅されたPCR産物のDNA配列は、プライマーの1つとその他のプライマーの補体の組み合わせた配列と一致する。このように、分子ビーコンは、すべての鋳型から産生されるPCR産物とハイブリダイズすることができる。

【図4】本発明の方法の例である。“向かい合う（nose-to-nose）”プライマー及び1つのプライマーともう1つのプライマーの補体のジャンクションによって作られる配列を認識するようにデザインされた分子ビーコンを用いるHIVの異なるサブタイプの増幅である。HIV変異体の配列とプライマー又はビーコンループのいずれかとの間のミスマッチは、小文字のボールド体で示される。

10

【図5】プライマーの位置の変異の例である。（A）ビーコンループは、（I）に示される2個のPCRプライマーによって等しく作られる増幅配列にハイブリダイズするようにデザインできる。あるいは、ビーコンは、（II）～（IV）に示されるフォワード又はリバースプライマーのいずれかによって主として作られる増幅配列に“非対称に”ハイブリダイズするようにデザインできる。（B）別の変異において、フォワード及びリバースプライマーは、ウイルスゲノムの保存性の高い領域と一致するヌクレオチドギャップによって分離される。

【図6】従来のPCR及び“向かい合う（nose-to-nose）”PCRの両方について分子ビーコン及びプライマーの位置を示すHIVの4つの変異体のV3ループ及びフランキング領域のDNA配列アラインメントである。（a）HIV/RT-1のタンパク質コーディング鎖は、3つのその他のウイルス変異体、HIV/RT-10、HIV-38-1及びHIV/38-3のタンパク質コーディング鎖と並べられる。HIV/RT-1の配列及び分子ビーコンとのミスマッチは、下部ケースにおいてボールド体で示される。従来のPCRについてフォワード及びリバースプライマーの相対的な位置は、それぞれ点線（ ）及び破線（-----）で示される。向かい合う（nose-to-nose）PCRについてフォワード及びリバースプライマーの相対的な位置は、それぞれ二重線（=）及び実線（-）で示される。ビーコンプローブの位置は、配列上に示される。すべてのプライマー及びビーコンプローブ配列は、HIV/RT-1の配列から誘導される。（b）分子ビーコンの構造である。プローブルーブは大文字で示され、相補的な基部ヌクレオチドは小文字で示される。フルオロフォアFAMは5'末端と結合し、クエンチャーDABCYLは3'末端と結合する。

20

30

【図7】従来のPCR及び向かい合う（nose-to-nose）PCRの実時間定量PCR法の比較である。（a）従来のPCR法又は（b）“向かい合う（nose-to-nose）”PCR法を用いる4つの異なるHIV変異体の実時間定量PCRである。 $10^6$ のコピーを含むPCR反応、HIV/RT-1（ ）、HIV/RT-10（ ）、HIV/38-1（ ）、HIV/38-3（ ）、鋳型を含まい（+）又は150ngのヒトDNA（x）。

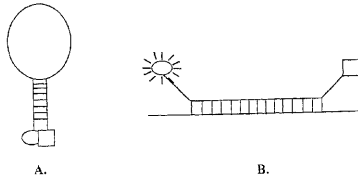
【図8】従来のPCRにより産生される産物のアガロースゲル分析である。ゲルは、従来のPCR法によりHIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1、及びHIV/38-3から産生されるPCR産物を示す。レーン1：50bpラダー、レーン2：鋳型を含まない、レーン3：HIV/RT-1、レーン4：HIV/RT-10、レーン5：HIV/38-1、レーン6：HIV/38-3。

40

【図9】分子ビーコンを用いた産物検出で“向かい合う（nose-to-nose）”RT-PCRを用いたHCV RNAの定量化のための標準曲線の例である。（a）HCV RNAについて“向かい合う（nose-to-nose）”RT-PCRを、RT-PCR反応当りの0、10、25、50、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 又は $10^6$ の合成HCV RNA分子の入力により実施した。蛍光の変化（ $\Delta R_n$ ）は、ABI7700配列検出器において各PCRサイクルについてアニーリング温度で測定した。しきい値（ $C_t$ ）は、機器に付属のソフトウェアを用いて計算した。（b）各標準サンプルのRNAコピー数は、その $C_t$ 値に対してプロットした（ ）。未知の検査サンプルの $C_t$ 値（ ）は、標準曲線に対してプロットし、RNAコピー数はX軸から外挿される。

【図10】本発明の増幅反応の段階的な例である。

【 図 1 】



**Figure 1: Molecular Beacon**

【 図 2 】

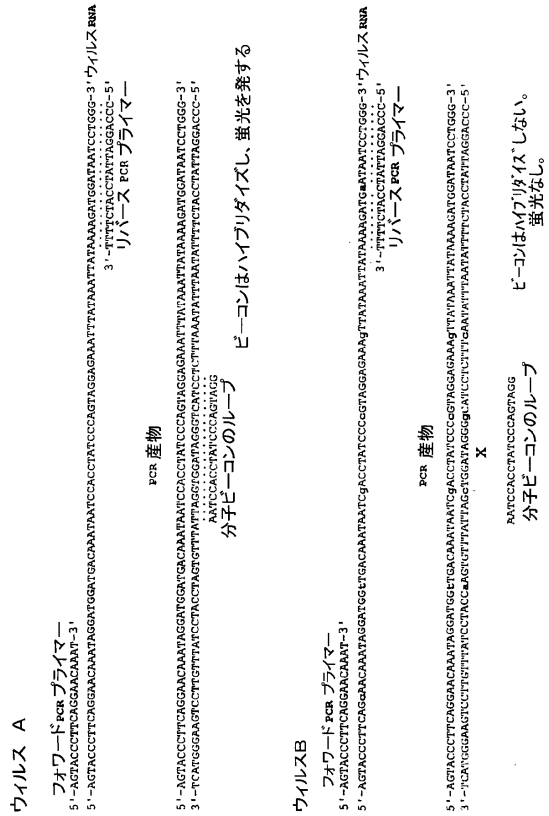
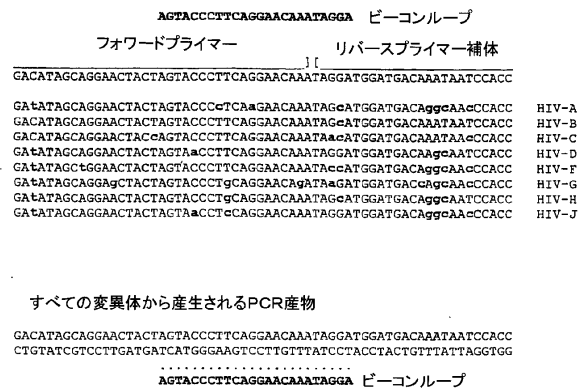


Figure 2: Conventional PCR using molecular beacons.

【 図 3 】



【 図 4 】



**Figure 4:** Example of method.

b.

すべての鋳型からの二本鎖PCR産物

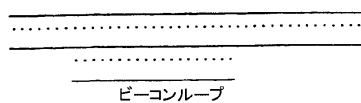


Figure 3: A graphical representation of one of the principles of the invention.

【図 5】

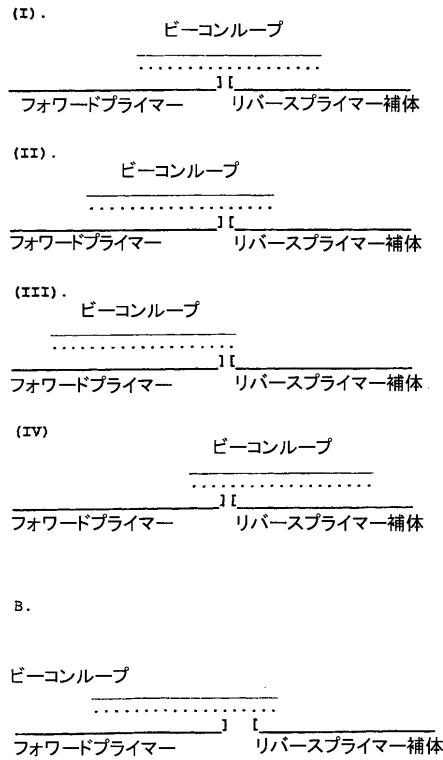


Figure 5: Illustration of variations on primer location.

【図 6】

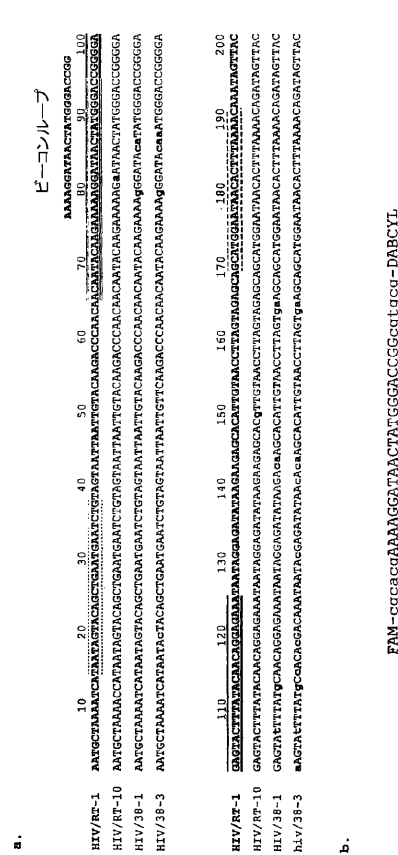


FIGURE 6: Sequence alignment of the Y3 loop and flanking regions of four variants of HIV showing the positions of molecular beacon and primers for both conventional and "nose-to-nose" PCR. (a). The protein coding strand of HIV/RT-1 is aligned with that of 3 other virus variants, HIV/RT-10, HIV/38-1, and HIV/38-3. Mutations to the sequence of HIV/RT-1 and to the molecular beacon are shown in lower case in bold. The relative location of forward and reverse primers for conventional PCR are indicated by dotted (---) and dashed (---) lines respectively. The relative location of forward and reverse primers for nose-to-nose PCR are indicated by double (==) and solid (—) lines respectively. The location of the beacon probe is shown above the sequence. All primers and the beacon probe sequences are derived from the sequence of HIV/RT-1. (b). Structure of the molecular beacon. The probe loop is shown in upper case, the complementary stem nucleotides are shown in lower case. The fluorophore FAM is conjugated to the 5' end, the quencher DABCYL is conjugated to the 3' end.

【図 7】

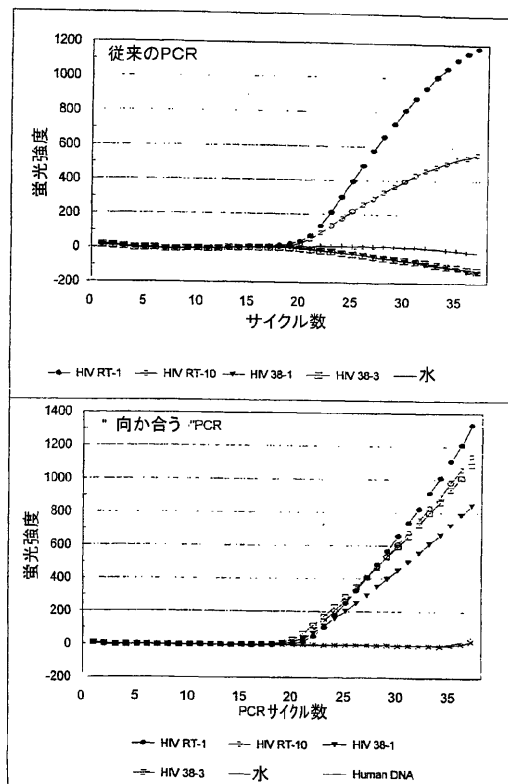


Figure 7: 図6に記載される4つのHIV変異体の検出について、従来の及び“向かい合う”実時間定量PCRの比較

【図 8】

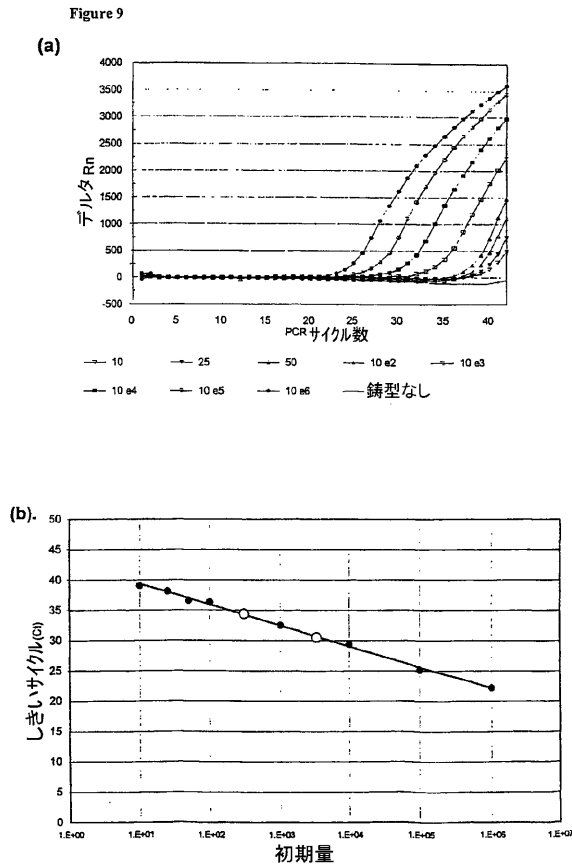


Figure 8: Agarose Gel Analysis of Products Generated by Conventional PCR. Gel shows PCR products generated from HIV/RT-1, HIV/RT-10, HIV/38-1, and HIV/38-3 by the conventional PCR method. Lane 1 50bp ladder, Lane 2 No template, Lane 3 HIV/RT-1, Lane 4 HIV/RT-10, Lane 5 HIV/38-1, Lane 6 HIV/38-3.

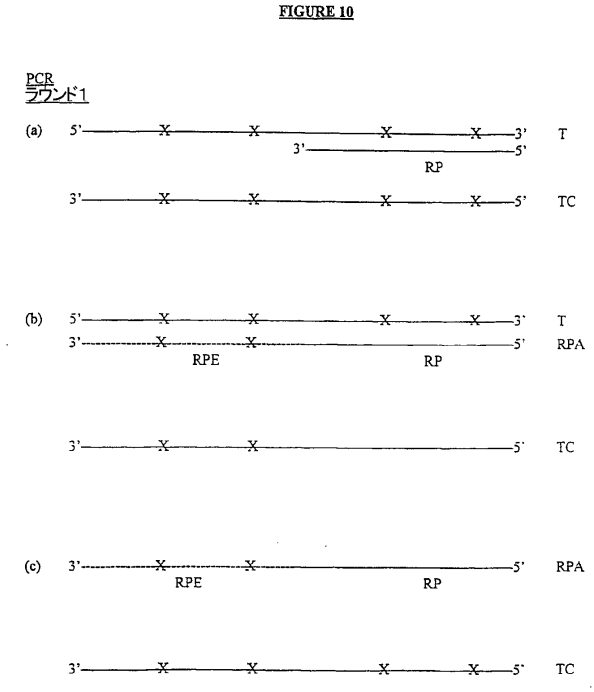
(A).

(B).

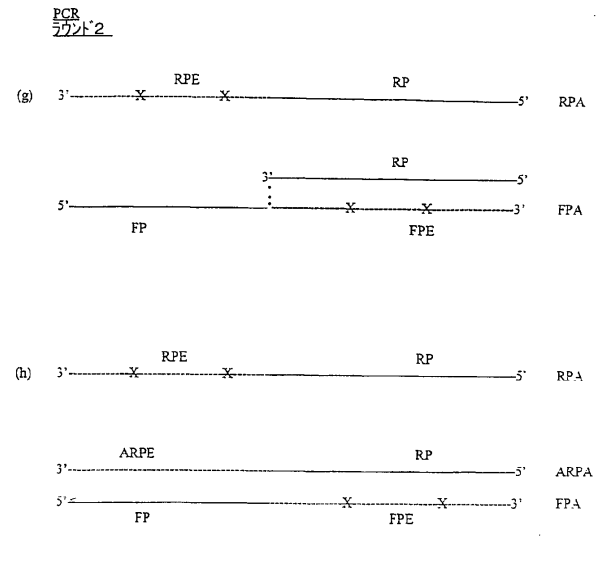
【図 9】

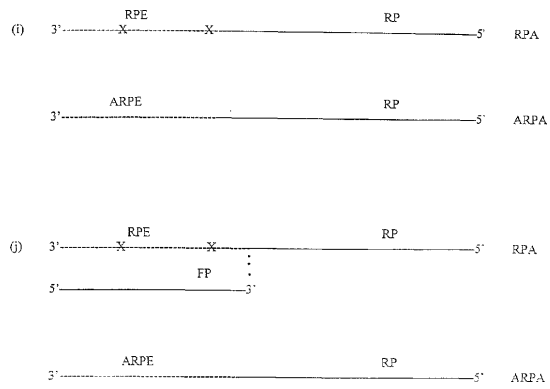


【図 10】

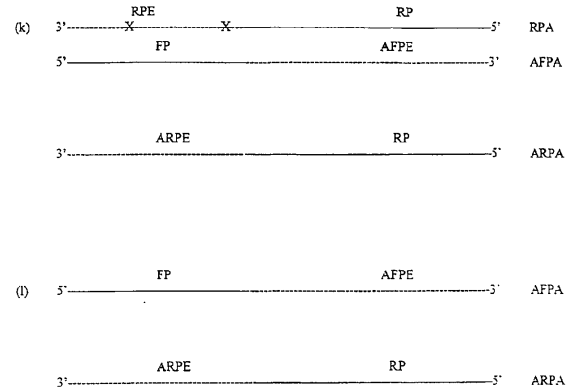


【図 10 - 1】

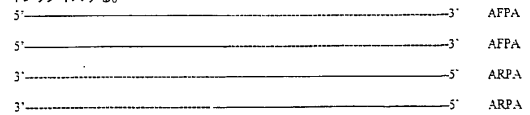




## 【図 10 - 2】

PCR  
ラウンド 3

(m) 工程(g)~(l)を繰り返す。RP及びFRは、それぞれAFPA及びARPAとハイブリダイズする。



## 【図 10 - 3】

図 10 の定義

T = ターゲット核酸分子  
 TC = ターゲット核酸補体  
 RP = リバースプライマー  
 RPE = リバースプライマー伸長産物  
 RPA = リバースプライマー増幅産物  
 FP = フォワードプライマー  
 FPE = フォワードプライマー伸長産物  
 FPA = フォワードプライマー増幅産物  
 ARPE = 追加のリバースプライマー伸長産物  
 ARPA = 追加のリバースプライマー増幅産物  
 AFPE = 追加のフォワードプライマー伸長産物  
 AFPA = 追加のフォワードプライマー増幅産物

---

フロントページの続き

(72)発明者 ニコルズ カーメン ニコラ  
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19107 フィラデルフィア サウス イレヴンス スト  
リート 324 アpartment 1

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 J. Clin. Microbiol., (1998), 36, [3], p.614-617

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

PubMed