

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月20日(20.10.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/220141 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/50 (2006.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/016224

(22) 国際出願日: 2022年3月30日(30.03.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2021-067394 2021年4月12日(12.04.2021) JP
特願 2021-084043 2021年5月18日(18.05.2021) JP
特願 2021-086150 2021年5月21日(21.05.2021) JP
特願 2021-101975 2021年6月18日(18.06.2021) JP
特願 2021-117646 2021年7月16日(16.07.2021) JP
特願 2021-144170 2021年9月3日(03.09.2021) JP
特願 2021-185187 2021年11月12日(12.11.2021) JP
特願 2021-213154 2021年12月27日(27.12.2021) JP

(71) 出願人: タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号 Shiga (JP).

(72) 発明者: 秋友 美和(AKITOMO, Miwa). 相良 武宏(SAGARA, Takehiro). 齋藤 憲介(SAITO, Kensuke). 上森 隆司(UEMORI, Takashi). 寺林 靖宣(TERABAYASHI, Yasunobu).

(74) 代理人: 細田 芳徳(HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MUTANT SARS-COV-2

(54) 発明の名称: 変異型SARS-CoV-2の検出方法

(57) Abstract: The present invention relates to: an oligonucleotide to be used in the detection of mutant SARS-CoV-2, wherein the oligonucleotide is selected from oligonucleotides that include a base sequence represented by SEQ IDS NO: 35, 36, 61, 88, 113, 137, 138, 162, 163, 250, 251, 252, 253, 254, or 255, or a sequence complementary to said sequence; and a method for detecting mutant SARS-CoV-2 using the oligonucleotide. According to the present invention, it is possible to provide a method for detecting mutant SARS-CoV-2 in a short time using nucleic acid amplification.

(57) 要約: 本発明は、変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチドであって、配列番号35、36、61、88、113、137、138、162、163、250、251、252、253、254又は255に示される塩基配列又は当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドから選択されるオリゴヌクレオチド、並びに該オリゴヌクレオチドを用いる変異型SARS-CoV-2を検出する方法に関する。本発明によれば、変異型SARS-CoV-2を核酸増幅法を利用して短時間に検出する方法が提供できる。

WO 2022/220141 A1

明 細 書

発明の名称：変異型SARS-CoV-2の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチド、当該オリゴヌクレオチドを使用する変異型SARS-CoV-2の検出方法ならびに当該検出方法に使用されるキットに関する。

背景技術

[0002] 細菌やウイルスによりヒトに引き起こされる感染症の中には、もっぱら局地的な感染にとどまるもの、地理的条件とはかかわりなく広く蔓延する可能性のあるものが存在する。ヒト-ヒト間で感染が成立する感染症は後者に該当し、その感染力や感染患者が呈する症状の重篤度によっては社会問題化することもある。天然痘、ペスト、インフルエンザ（スペイン風邪）等、大規模な流行を起こしてその後の歴史に影響を与えた感染症も少なくない。

[0003] 多くの感染症について治療や予防の方法が開発された現代でも、引き続き注意を要する感染症が残されているのに加え、さらに新興感染症のリスクが存在している。2003年に発見されたSARSコロナウイルス（SARS-CoV）は重篤な呼吸器疾患を引き起こすウイルスであることが明らかとされた。さらに、2019年には新たなコロナウイルスであるSARS-CoV-2が出現し、2020年には世界的に蔓延している。

[0004] 感染症への対応手段としては治療薬等の開発と普及、ならびに衛生面での環境整備が挙げられる。加えて、病原体の存在や感染者を特定して早期に隔離措置を講じ、感染経路を遮断することは、感染症の蔓延防止において極めて重要である。上記のSARS-CoV-2を検出する方法としては、ウイルスRNAを標的とする核酸検査法（例えば非特許文献1）、ウイルスタンパク質を標的とする抗原検査法、感染が疑われるヒトの血液を試料とする抗体検査法等がすでに開発されている。現在は、主に検出感度の観点から核酸検査法がウイルス検査の主流となっている。一方、当該ウイルスからは複数

の変異ウイルス（変異株）が発生しており、これらは元のウイルスとは異なる性質を持つと報告されている（例えば非特許文献2、非特許文献3）。

[0005] これらの変異株は、これまでに構築されたウイルス検出方法では元のウイルスと区別することが難しく、ウイルスの変異を疫学的に検討する上では問題を有している。さらに、変異株は変異前のウイルスの情報に基づいて構築されたウイルス検出系では検出できない、もしくは検出感度が低下する可能性がある。ウイルスゲノムの塩基配列を解読することにより変異を網羅的に検出することは可能であるが、高速シーケンサーを必要とするなど、迅速、簡便に実施可能な方法ではない。

[0006] 以上のとおり、変異が生じたSARS-CoV-2を特異的にかつ簡便に検出できる方法が求められていた。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Japanese Journal of Infectious Diseases (2020)、73 (4)、320-322

非特許文献2: Science (2021)、372 (6538)、eabg3055

非特許文献3: Cell Mol. Immunol. (2021)、18 (4)、1058-1060

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 変異型SARS-CoV-2の多くはスパイクタンパク質に多重変異が生じている。代表的なものとして、発生国を基に3系統〔英国VOC-202012/01 (B. 1. 1. 7)、南アフリカ501Y. V2 (B. 1. 351)、ブラジル501Y. V3 (P. 1)〕が報告されている。変異株については感染伝播力の上昇およびワクチン効果を減弱させる免疫逃避の可能性が指摘されている。これら変異株のスパイクタンパク質に生じている変異

に関する、国立感染症研究所の報告（2021年4月7日付）に記載された情報を表1に示す。

[0009] [表1]

表 1

変異株	スパイクタンパク質の主要変異
B.1.1.7	69/70欠失、144欠失、N501Y、A570D、P681H
501Y.V2	242/244欠失、K417N、E484K、N501Y
501Y.V3	K417T、E484K、N501Y

[0010] 一方、変異株B.1.617系統はスパイクタンパク質にL452R、D614GおよびP681R変異を共通に有している（国立感染症研究所、2021年5月12日付報告）。本系統の変異株はインドにおいて多く検出されており、従来の流行株より高い増加率を示していると言われている。同系統に含まれるB.1.617.1およびB.1.617.3はE484Q変異を、B.1.617.2はT478K変異を、それぞれ有している（欧州疾病予防管理センター、2021年5月24日付報告）。

[0011] 新たな変異株は随時に報告されている。2021年8月5日付の欧州疾病予防管理センターの報告には上記のものを含む複数の変異株が「Variants of Concern (VOC)」、「Variants of Interest (VOI)」として挙げられている。このうち、上記報告にVOIとして記載されているC.37系統（特徴的な変異としてスパイクタンパク質にL452Q、F490S変異を有している）は、南米において感染者が多発している。さらに2021年10月14日付の欧州疾病予防管理センターの報告にVOIとして記載されたB.1.621系統はスパイクタンパク質にR346K、E484K、N501Y、D614GおよびP681Hの変異を有している。なお、世界保健機構（WHO）は地球規模の広がりを見せている変異株系統について、ギリシャ文字のラベル（WHO label）を付している。上記の系統に付されたWHOラベルを以下に示す。
B.1.1.7: Alpha

501Y, V2 (B. 1. 351) : Beta

501Y, V3 (P. 1) : Gamma

B. 1. 617. 2 : Delta

C. 37 : Lambda

B. 1. 621 : Mu

[0012] 2021年11月に、南アフリカに新たな変異株 (B. 1. 1. 529 ; WHOラベルはOmicron) の急拡大が報告された。2021年12月8日に国立感染症研究所より公開された「SARS-CoV-2の変異株B. 1. 1. 529系統 (オミクロン株) について (第3報)」によれば、本変異株はスパイクタンパク質に30か所程度のアミノ酸置換、3か所の小欠損と1か所の挿入部位を持つとされている。これらの変異に起因して、感染性の増加、抗体 (承認されているモノクローナル抗体医薬を含む) からの逃避の可能性が懸念されている。

[0013] スパイクタンパク質の受容体結合領域 (RBD ; 319-541位) に生じた変異はSARS-CoV-2の感染能や抗体との反応性に影響を与える可能性があると考えられている。このため、前記領域に存在するN501、E484、L452、T478、F490等が変異した変異型SARS-CoV-2、ならびにFurin様プロテアーゼによる切断部位 (R685-S686) に近接するアミノ酸が変異した変異型SARS-CoV-2については、その伝播の状況を把握することが特に重要である。さらに、Omicron株に関しては、同株に特徴的な変異、例えばG339D、S371L、E484A、T547K、N856Kのアミノ酸置換や、R214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異等を指標とした検出方法が求められている。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、SARS-CoV-2ならびにその変異株のゲノムRNA配列を比較、検討し、スパイクタンパク質に特定の変異が生じたウイルス変異株を核酸増幅法により検出するのに有用なオリゴヌクレオチドを見出した

。さらに、当該オリゴヌクレオチドを使用する変異型SARS-CoV-2の検出方法を構築し、本発明を完成させた。

[0015] 本発明は以下に概説するとおりである。

[1] 変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチドであって、

(a) 配列番号35に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 配列番号36に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 配列番号61に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 配列番号88に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 配列番号113に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(f) 配列番号137に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(g) 配列番号138に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(h) 配列番号162に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(i) 配列番号163に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(j) 配列番号250に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(k) 配列番号251に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(l) 配列番号252に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な

配列を含むオリゴヌクレオチド、

(m) 配列番号 2 5 3 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(n) 配列番号 2 5 4 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、および

(o) 配列番号 2 5 5 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

から選択されるオリゴヌクレオチド。

[2] (a) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 4、8、12、14 および 16 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[3] (b) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 24、27、30、32、34、37、44、45 および 46 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[4] (c) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 53、54、55、56 および 57 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[5] (d) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 68、69、70、71、81、82、83、84 および 85 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[6] (e) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 95、96、97、98、99 および 100 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[7] (f) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 122、123 および 124 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[8] (g) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 131、132 および 133 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[9] (h) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 152、153、154、155 および 156 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[10] (i) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 157、158、159、160 および 161 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[11] (j) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 165、166 および 167 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[12] (k) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 170、174 および 178 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[13] (l) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 186、187、188 および 189 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[14] (m) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 198、199、200、201、202 および 203 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[15] (n) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 228、229、230 および 231 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[16] (o) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 243、244、245

、246および247から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、前記[1]記載のオリゴヌクレオチド。

[17] 蛍光物質および／または消光物質で標識されている前記[1]～[16]いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[18] 副溝結合剤(MGB)が付加されている前記[1]～[17]いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[19] bridged nucleic acid (BNA)を含む前記[1]～[18]いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[20] 試料中の変異型SARS-CoV-2を検出する方法であって、

(1) 試料に含まれるSARS-CoV-2ゲノムに相補的なDNAまたはその断片を合成する工程、および

(2) 前記[1]～[19]いずれか記載のオリゴヌクレオチドの一種または二種以上を使用して、工程(1)で得られたDNAまたはその断片に含まれる変異型スパイクタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を検出する工程、

を包含することを特徴とする方法。

[21] 工程(1)が、合成されたDNAまたはその断片を増幅する工程をさらに含む前記[20]記載の方法。

[22] 工程(2)において、DNAまたはその断片とハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの分解により変異型スパイクタンパク質をコードする塩基配列またはその一部の検出が実施される、前記[20]または[21]記載の方法。

[23] 試料中の変異型SARS-CoV-2を検出するためのキットであって、

(1) 前記[1]～[19]いずれか記載のオリゴヌクレオチドの一種または二種以上、および

(2) SARS-CoV-2ゲノムに相補的なDNAまたはその断片を

合成するための試薬
を含むキット。

[24] SARS-CoV-2 ウイルスゲノムに相補的なDNAまたはその断片を増幅する試薬をさらに含む前記[23]記載のキット。

[25] SARS-CoV-2 ウイルスゲノムに相補的なDNAまたはその断片を増幅に使用されるプライマー対をさらに含む前記[23]または[24]記載のキット。

発明の効果

[0016] 本発明により、スパイクタンパク質においてN501Y、E484K、E484Q、E484A、L452R、L452Q、T478K、F490S、P681H、P681R、G339D、S371L、T547KまたはN856Kのアミノ酸置換変異、あるいはR214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異を生じた変異型SARS-CoV-2を、核酸増幅法を利用して短時間に検出する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0017] [図1] N501Y 変異検出
[図2] E484K 変異検出
[図3] E484K 変異検出
[図4] E484K 変異検出
[図5] N501Y、E484K 変異同時検出

発明を実施するための形態

[0018] 「本発明のオリゴヌクレオチド」

[0019] 本発明は、変異型SARS-CoV-2、具体的にはSARS-CoV-2のスパイクタンパク質においてN501Y、E484K、E484Q、E484A、L452R、L452Q、T478K、F490S、P681H、P681R、G399D、S371L、T547KおよびN856Kのアミノ酸置換変異、ならびにR214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異から選択される変異を有する変異株ウイルスを検出するためのオリゴヌク

レオチドを提供する。本明細書において「変異型SARS-CoV-2」とは、特に本発明を限定するものではないが、Wuhan株SARS-CoV-2のスパイクタンパク質とは異なるアミノ酸配列のスパイクタンパク質（変異型スパイクタンパク質）および当該タンパク質をコードする塩基配列を含むゲノムRNAを保持するSARS-CoV-2株（変異株）を指す。なお、本明細書ではWuhan株SARS-CoV-2を野生型と記載することがある。

[0020] 本明細書において、N501Y変異とは、GeneBankにNC__045512.2のアクセッション番号で公開されているWuhan株SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列（YP__009724390.1）中、501番目のアスパラギン（N）がチロシン（Y）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のアスパラギンに対応するコドンであるAATがTATに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの最初の塩基がAからTに変化している塩基配列を検出することにより、N501Y変異を有する変異株を検出することができる。

[0021] 本明細書において、E484K変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、484番目のグルタミン酸（E）がリジン（K）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のグルタミン酸に対応するコドンであるGAAがAAAに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの最初の塩基がGからAに変化している塩基配列を検出することにより、E484K変異を有する変異株を検出することができる。また、E484Q変異とは、前記484番目のグルタミン酸がグルタミン（Q）に置換されている変異を指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のGAAがCAAに変化していることに起因する。したが

って、前記トリプレットの最初の塩基がGからCに変化している塩基配列を検出することにより、E 4 8 4 Q変異を有する変異株を検出することができる。さらに、E 4 8 4 A変異とは、前記4 8 4番目のグルタミン酸がアラニン（A）に置換されている変異を指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のGAAがGCAに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がAからCに変化している塩基配列を検出することにより、E 4 8 4 A変異を有する変異株を検出することができる。

[0022] 本明細書において、L 4 5 2 R変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、4 5 2番目のロイシン（L）がアルギニン（R）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のロイシンに対応するコドンであるCTGがCGGに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がTからGに変化している塩基配列を検出することにより、L 4 5 2 R変異を有する変異株を検出することができる。また、L 4 5 2 Q変異とは、前記4 5 2番目のロイシンがグルタミンに置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のCTGがCAGに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がTからGに変化している塩基配列を検出することにより、L 4 5 2 Q変異を有する変異株を検出することができる。

[0023] 本明細書において、T 4 7 8 K変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、4 7 8番目のスレオニン（T）がリジンに置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のEに対応するコドンであるACAがAAAに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がCからAに変化している塩基配列を

検出することにより、T 4 7 8 K変異を有する変異株を検出することができる。

[0024] 本明細書において、F 4 9 0 S変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、490番目のフェニルアラニン（F）がセリン（S）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のフェニルアラニンに対応するコドンであるTTTがTC Tに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がTからCに変化している塩基配列を検出することにより、F 4 9 0 S変異を有する変異株を検出することができる。

[0025] 本明細書において、P 6 8 1 H変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、681番目のプロリン（P）がヒスチジン（H）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のプロリンに対応するコドンであるCCTがCATに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がCからAに変化している塩基配列を検出することにより、P 6 8 1 H変異を有する変異株を検出することができる。また、P 6 8 1 R変異とは、前記681番目のプロリンがアルギニンに置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のCCTがCGTに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がCからGに変化している塩基配列を検出することにより、P 6 8 1 R変異を有する変異株を検出することができる。

[0026] 本明細書において、G 3 9 9 D変異とは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、339番目のグリシン（G）がアスパラギン酸（D）に置換されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前

記のグリシンに対応するコドンであるG G TがG A Tに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目の塩基がGからAに変化している塩基配列を検出することにより、G 3 3 9 D変異を有する変異株を検出することができる。

[0027] 本明細書において、S 3 7 1 L変異とは、S A R S－C o V－2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、3 7 1番目のセリンがロイシンに置換されていることを指す。ここで、この変異はS A R S－C o V－2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のセリンに対応するコドンであるT C CがC T Cに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの1番目のTおよび2番目CがそれぞれCおよびTに変化している塩基配列を検出することにより、S 3 7 1 L変異を有する変異株を検出することができる。

[0028] 本明細書において、T 5 4 7 K変異とは、S A R S－C o V－2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、5 4 7番目のスレオニンがリジンに置換されていることを指す。ここで、この変異はS A R S－C o V－2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のスレオニンに対応するコドンであるA C AがA A Aに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの2番目CがAに変化している塩基配列を検出することにより、T 5 4 7 K変異を有する変異株を検出することができる。

[0029] 本明細書において、N 8 5 6 K変異とは、S A R S－C o V－2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、8 5 6番目のアスパラギンがリジンに置換されていることを指す。ここで、この変異はS A R S－C o V－2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のアスパラギンに対応するコドンであるA A CがA A Aに変化していることに起因する。したがって、前記トリプレットの最後CがAに変化している塩基配列を検出することにより、S 3 7 1 L変異を有する変異株を検出することができる。

[0030] 本明細書において、R 2 1 4とD 2 1 5の間への3アミノ酸の挿入変異とは、S A R S－C o V－2のスパイクタンパク質のアミノ酸配列中、2 1 4

番目のアルギニンと215番目のアスパラギン酸の間に「グルタミン酸ープロリンーグルタミン酸」が挿入されていることを指す。ここで、この変異はSARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域において、前記のアルギニンに対応するコドンであるCGTとアスパラギン酸に対応するコドンGATの間に「GAGCCAGAA」の9塩基からなる配列が挿入されていることに起因する。したがって、この挿入配列を検出することにより、前記の挿入変異を有する変異株を検出することができる。

[0031] 本発明の、N501Y変異を有するSARS-CoV-2変異株を検出可能なオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、N501位に該当するコドンがチロシンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号35に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（a））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては13塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号4、8、12、14および16から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0032] E484K変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、E484位に該当するコドンがリジンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号36に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（b））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては13塩基以上の鎖長のものが例示され

る。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号24、27、30、32、34、37、44、45および46から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0033] E484Q変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、E484位に該当するコドンがグルタミンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号61に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（c））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては13塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号53、54、55、56および57から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0034] E484A変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、E484位に該当するコドンがアラニンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号250に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（j））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては14塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号1

65、166および167から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0035] L452R変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、L452位に該当するコドンがアルギニンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号88に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（d））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては13塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号68、69、70、71、81、82、83、84および85から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0036] T478K変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、T478位に該当するコドンがリジンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号113に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（e））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては13塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号95、96、97、98、99および100から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0037] L 4 5 2 Q 変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2 ゲノムRNA のスパイクタンパク質をコードする領域中の、L 4 5 2 位に該当するコドンがグルタミンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 3 8 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（g））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては 1 3 塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は 3 0 塩基以下、好ましくは 2 5 塩基以下、さらに好ましくは 2 3 塩基以下である。例えば、配列番号 1 3 1、1 3 2 および 1 3 3 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0038] F 4 9 0 S 変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2 ゲノムRNA のスパイクタンパク質をコードする領域中の、F 4 9 0 位に該当するコドンがセリンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 3 7 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（f））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては 1 3 塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は 3 0 塩基以下、好ましくは 2 5 塩基以下、さらに好ましくは 2 3 塩基以下である。例えば、配列番号 1 2 2、1 2 3 および 1 2 4 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0039] P 6 8 1 H 変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2 ゲノムRNA のスパイクタンパク質をコードする領域中の、P 6 8 1 位に該当するコドンがヒスチジンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド

である。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 6 2 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（h））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては 9 塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は 3 0 塩基以下、好ましくは 2 5 塩基以下、さらに好ましくは 2 3 塩基以下である。例えば、配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 5 および 1 5 6 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0040] P 6 8 1 R 変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2 ゲノム RNA のスパイクタンパク質をコードする領域中の、P 6 8 1 位に該当するコドンがアルギニンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 1 6 3 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（i））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては 1 1 塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は 3 0 塩基以下、好ましくは 2 5 塩基以下、さらに好ましくは 2 3 塩基以下である。例えば、配列番号 1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0 および 1 6 1 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0041] G 3 3 9 D 変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2 ゲノム RNA のスパイクタンパク質をコードする領域中の、G 3 3 9 位に該当するコドンがアスパラギン酸に対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 2 5 3 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリ

ゴヌクレオチド（m））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては10塩基以上の鎖長のもものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号198、199、200、201、202および203から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0042] S371L変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、S371位に該当するコドンがロイシンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号252に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（l））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては19塩基以上の鎖長のもものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号186、187、188および189から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0043] T547K変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、T547位に該当するコドンがリジンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号255に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（o））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては7塩基以上の鎖長のもものが例示され

る。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号243、244、245、246および247から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0044] N856K変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、N856位に該当するコドンがリジンに対応するコドンに変化している塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号254に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（n））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては12塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは23塩基以下である。例えば、配列番号228、229、230および231から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0045] さらに、R214とD215の間に3アミノ酸の挿入変異を有する変異株を検出可能な本発明のオリゴヌクレオチドは、SARS-CoV-2ゲノムRNAのスパイクタンパク質をコードする領域中の、R214位とD215位に該当するコドンの間に9塩基が挿入されてなる塩基配列またはこれと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。当該オリゴヌクレオチドとしては、配列番号251に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド（k））を挙げることができる。特に本発明を限定するものではないが、前記のオリゴヌクレオチドとしては18塩基以上の鎖長のものが例示される。また、当該オリゴヌクレオチドの鎖長は30塩基以下、好ましくは25塩基以下、さらに好ましくは

23塩基以下である。例えば、配列番号170、174および178から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが好ましいものとして挙げられる。

[0046] 当然のことながら、本発明のオリゴヌクレオチドは変異株のゲノムRNA由来の核酸と特異的にハイブリダイズする。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、本発明のオリゴヌクレオチドが、親株（野生型）のゲノムRNA由来の核酸とはハイブリダイズしない条件において変異株のゲノムRNA由来の核酸とハイブリダイズすることができ、変異株由来の核酸と親株由来の核酸とを区別することができることを意味する。

[0047] 本発明のオリゴヌクレオチドは、変異型SARS-CoV-2由来の核酸、例えば変異株のゲノムRNAに相補的なDNA（cDNA）またはその断片を検出するプローブとして使用することができる。したがって、変異株の検出に使用される検出方法に応じてオリゴヌクレオチドの鎖長や塩基配列、付加する標識を適宜選択することにより、効率よく変異型SARS-CoV-2を検出可能なプローブを設計することができる。

[0048] 標的核酸をプローブにより検出する技術としては、古典的なハイブリダイゼーション手法に加え、TaqMan法、サイクリングプローブ法、モレキュラービーコン法等、種々の方法が知られている。TaqMan法はPCRによる核酸増幅と並行して標的核酸とハイブリダイズしたプローブを分解する方法であり、核酸増幅に5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを使用することを特徴とする。サイクリングプローブ法に使用されるプローブは分子内にRNAを含有しており、標的核酸とハイブリダイズした場合にはリボヌクレアーゼHにより切断される。モレキュラービーコン法に使用されるプローブは分子内で二本鎖を形成しており、標的核酸とハイブリダイズすると分子内二本鎖構造が解消される。これらのプローブは、適切な標識を施すことにより、いずれも標識由来のシグナル（例えば蛍光）の発生を指標とした標的核酸の検出に使用することができる。

[0049] 以下、TaqManプローブとして使用される本発明のオリゴヌクレオチ

ドを例にとって説明する。本発明のオリゴヌクレオチドは、当該方法に好適に使用でき、その配列や鎖長は適宜調整することができる。特に本発明を限定するものではないが、配列番号4、8、12、14および16から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、N501Y変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号24、27、30、32、34、37、44、45および46から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、E484K変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号53、54、55、56および57から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、E484Q変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号165、166および167から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、E484A変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号68、69、70、71、81、82、83、84および85から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、L452R変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号95、96、97、98、99および100から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、T478K変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号131、132および133から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、L452Q変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号122、123および124から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、F490S変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号152、

153、154、155および156から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、P681H変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号157、158、159、160および161から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、P681R変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号198、199、200、201、202および203から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、G339D変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号186、187、188および189から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、S371L変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号243、244、245、246および247から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、T547K変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号228、229、230および231から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、N856K変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチド；配列番号170、174および178から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を有する、好ましくは当該配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる、R214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異を有する変異株検出に使用可能なオリゴヌクレオチドは、本発明の好適な態様である。さらに、本発明を特に限定するものではないが、これらのオリゴデオキシヌクレオチドの3'末端は、当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長反応を防止するための修飾を施されていてもよい。前記修飾としては、例えば蛍光物質及び／又は消光物質による標識が例示される。

[0050] 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明を特に限定するものではないが、通常、デオキシリボヌクレオチド（DNA）で構成され、当業者に周知の方法で合成することができる。なお、検出しようとする変異型SARS-CoV-2由来の核酸とハイブリダイズする性質を失わない範囲で、本発明のオリゴヌクレオチドはDNA以外のヌクレオチド、例えばRNA、非天然型の塩基（例えばデオキシウリジン、イノシン、7-デアザグアノシン、7-デアザアデノシン等）を有するヌクレオチド、架橋構造を有するリボースを含むヌクレオチド（bridged nucleic acid; BNA）を含んでいてもよい。BNAはリボースの2'位の酸素原子と4'位の炭素原子間が架橋された構造を持つRNAアナログで、2', 4'-BNA（LNA）、3'-amino-2', 4'-BNA等が知られている。DNA以外のヌクレオチドの含量には特に限定はなく、ハイブリダイゼーションの安定性や特異性を考慮して適宜設定すればよい。例えば、全ヌクレオチドの半数程度までをこのようなヌクレオチドとすることができる。

[0051] 標的核酸（変異株ゲノムRNA由来の核酸）と本発明のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出するため、本発明のオリゴヌクレオチドは適切な標識を付加されていてもよい。蛍光物質および消光物質の両方で、両者の間に適切な距離を保って標識された当該オリゴヌクレオチドは、そのままでは蛍光を発することはないが、当該オリゴヌクレオチドの分解、切断等によって蛍光物質と消光物質の距離が増加すると蛍光が発せられるようになる。使用する蛍光物質、消光物質には特に限定はないが、蛍光物質としては6-FAM、VIC、HEX、ROX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5等、消光物質としてはDABCYL、Eclipse（登録商標）、TAMRA、BHQ（登録商標、black hole quencher）等が挙げられる。これらを適宜組み合わせ、二重標識された本発明のオリゴヌクレオチドを作製することができる。蛍光物質および消光物質を付加する位置は、両者が適切な距離を保つ限りにおいて特に限定はない。例えば、蛍光物質および消光物質は本発明のオリゴヌクレオチドの両端に付加しても

よく、そのいずれか一方もしくは両方を末端以外の位置に付加してもよい。

[0052] 本発明のオリゴヌクレオチドには副溝結合剤（マイナー・グループ・バインダー：MGB）が付加されていてもよい。MGBは二本鎖DNAの副溝（minor groove）に入り込む性質を有する物質であり、MGBが付加されたオリゴヌクレオチドは、MGBを付加されていない場合に比べ、相補的な配列を有する核酸との間で形成した二本鎖核酸のT_m値が上がる（例えば、WO 96/32496）。MGB修飾されたオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズする核酸の1塩基の違いによりT_m値により大きな差が生じることから、バックグラウンドを低減して標的核酸を検出することができる。一般的に、MGBは三日月型の三次元構造と約150～約2000ダルトンの分子量を有する。MGBの例として、ネトロプシン、ジスタマイシン、ジスタマイシンA、レキシトロプシン、ミトラマイシン、クロモマイシンA3、オリボマイシン、アントラマイシン、シビロマイシン、ペンタミジン、スチルバミジン、ブレニル、CC-1065、ヘキスト33258、4'-6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAP1）、CDP13およびそれらの誘導体が挙げられる。本発明のオリゴヌクレオチドにおいてMGBを付加する位置には特に限定はないが、例えば3'末端や5'末端が挙げられる。

[0053] 「本発明の変異型SARS-CoV-2検出方法」

[0054] 本発明は、前記の本発明のオリゴヌクレオチドを使用して試料中の変異型SARS-CoV-2を検出する方法を提供する。

[0055] 本発明の変異型SARS-CoV-2の検出方法は、スパイクタンパク質においてN501Y、E484K、E484Q、E484A、L452R、L452Q、T478K、F490S、P681H、P681R、G339D、S371L、T547KおよびN856Kのアミノ酸置換変異、ならびにR214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異から選択される変異の少なくとも一つを有する変異型SARS-CoV-2を検出する方法である。具体的には、試料に含まれるSARS-CoV-2ゲノムに相補的なDN

Aまたは相補的なDNAの断片を合成し、次いでこれと本発明のオリゴヌクレオチドの一種または二種以上とを接触させる。変異型スパイクタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含むDNAは本発明のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするため、こうして試料中に変異株が存在するかどうかを判断することができる。

[0056] なお、本発明の方法は、少なくともN501Y、E484K、E484Q、E484A、L452R、L452Q、T478K、F490S、P681H、P681R、G339D、S371L、T547KおよびN856Kのアミノ酸置換変異、ならびにR214とD215の間への3アミノ酸の挿入変異から選択される変異を有する変異株であれば、さらに他の変異が生じている変異型SARS-CoV-2であっても検出することが可能である。

[0057] SARS-CoV-2はRNAウイルスであり、ウイルス粒子はRNAゲノムを保持している。RNAゲノムに相補的な配列を有するDNA、すなわちcDNAまたはその断片は、ゲノムRNAを鋳型とした逆転写反応により合成される。逆転写反応は逆転写酵素と適切なプライマーを含む、逆転写反応において一般的に使用される反応液を使用して実施することができる。この工程により合成されたcDNAまたはcDNA断片は当業者に周知の方法で二本鎖DNAに変換されてもよい。

[0058] 逆転写酵素としては、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 由来の逆転写酵素またはその変異体、トリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) 由来の逆転写酵素またはその変異体、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼ (Tth DNAポリメラーゼ、Bca DNAポリメラーゼ等) またはその変異体を使用できるが、これらに限定されるものではない。前記の変異体としては、耐熱性の向上した変異体、ヌクレアーゼ活性 (リボヌクレアーゼH活性等) が低下または消失した変異体等が例示される。様々な逆転写酵素が多数市販されているが、それらを本発明の方法に使用することもできる。

[0059] 逆転写反応に使用するプライマーはウイルスゲノム上の特定の配列に相補的なもの、ランダムな配列を持つもの、のいずれも本発明に使用することが

できる。特に本発明を限定するものではないが、ウイルスゲノム上の、スパイクタンパク質をコードする領域に対応する、好ましくはN501、E484、L452、T478、F490、P681、G339、S371、T547、N856、R214／D215に対応するコドンを含む領域に対応するcDNAが合成されるように設計されたプライマーを好適に使用することができる。

[0060] 本発明の好適な態様においては、ウイルスの検出感度を向上させる観点から、本発明のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズし得る領域を含むcDNA断片の増幅が実施される。当該工程に使用される核酸増幅法には限定はなく、PCR法、LAMP法をはじめとする公知の方法を使用することができる。前記の核酸増幅法は、ウイルスゲノムRNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAまたはcDNA断片を鋳型として実施され、増幅産物として変異箇所を含む核酸（DNA）断片を生成する。

[0061] 本発明の好適な態様においては、核酸増幅法としてPCR法が使用される。PCR法は1以上のプライマー対、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTPsを主な構成要素とする反応液を温度サイクル装置で処理する核酸検出技術として広く普及している。使用される耐熱性DNAポリメラーゼとしてはThermus属細菌由来のTaqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼやそれらの変異体、好熱性古細菌由来のPfuポリメラーゼ、KODポリメラーゼやそれらの変異体が例示される。複数種のDNAポリメラーゼを混合してPCRを行うこともできる。PCRに適した耐熱性DNAポリメラーゼが多数市販されているが、それらを本発明の方法に使用することもできる。

[0062] cDNA断片の合成とその増幅は一連の反応で行うことができる。本発明を限定するものではないが、逆転写とPCRを一つの反応容器中で実施する1ステップRT-PCRは本発明の方法に好適な態様である。RT-PCR反応液は使用する酵素が異なるなど種々のものが知られており、また、キットの形態で市販されているものも多い。本発明の方法を1ステップのRT-PCRで実施する場合、逆転写酵素と耐熱性DNAポリメラーゼの2つの酵

素を含むものを使用してもよく、逆転写活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼ（例えばTth DNAポリメラーゼ）を単独で含む反応液を使用してもよい。

[0063] 本発明の方法においてcDNA断片の増幅に使用されるプライマー対は、本発明のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズし得る領域を含むcDNA断片を増幅できるように設計されているものであれば、その配列には特に限定はない。このような1対のプライマーを1ステップRT-PCR反応液に添加することにより、その一方のプライマーはcDNA合成用のプライマーとしても機能する。本発明に使用されるプライマーは、増幅することが望まれるcDNA断片に対応するウイルスゲノムRNA上の領域において存在する可能性のある変異を考慮して設計される。例えば、塩基置換の存在が懸念される場合には当該塩基部分を混合塩基としてプライマーを設計する、野生型ゲノムRNA配列と塩基置換の生じたゲノムRNA配列のそれぞれに対応する複数のプライマーを作製して併用する、等により、塩基置換の有無にかかわらず増幅されたcDNA断片を得ることができる。特に本発明を限定するものではないが、N501Y変異を有する変異株の検出には配列番号1、5、9、17、19、21から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号2、6、10、18、20、25から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対、E484K、E484QまたはE484A変異を有する変異株の検出には配列番号21、28、9、17から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号22、25、6、10、18から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、L452RまたはL452Q変異を有する変異株の検出には配列番号64、66、75、77、79、125、127、129から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号65、67、76、78、80、126、128、130から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、T478K変異を有する変異株の検出には配列番号91、93、107、109、28、64から選択される塩基配列の

フォワードプライマーおよび配列番号 92、94、108、110、6、65 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、F490S 変異を有する変異株の検出には配列番号 114、115、116 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 117、118、119 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、P681H または P681R 変異を有する変異株の検出には配列番号 139、140、141、142 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 143、144、145、146 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、G339D 変異を有する変異株の検出には配列番号 204、206、208、211、213、214 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 205、207、209、210、212 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、S371L 変異を有する変異株の検出には配列番号 180、182、184 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 181、183、185 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、T547K 変異を有する変異株の検出には配列番号 232、234、236 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 233、235、237 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、N856K 変異を有する変異株の検出には配列番号 215、217、219、221 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 216、218、220、222 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、R214 と D215 の間への 3 アミノ酸の挿入変異を有する変異株の検出には配列番号 168、172、176 から選択される塩基配列のフォワードプライマーおよび配列番号 169、173、177 から選択される塩基配列のリバースプライマーからなるプライマー対が、それぞれ好適である。例えば、上記の配列番号 5 の塩基配列を有するプライマーがアニーリングする SARS-CoV-2 ゲノム上の領域には、既知の変異である S4

77N、T478Kと関連する塩基置換が生じている可能性がある。このため、配列番号5のプライマーを使用する際には、前記の2種の塩基置換を有するRNA配列に対応している配列番号62、配列番号63のプライマーを併用して本発明の方法を実施してもよい。上記の、本発明の方法においてcDNA断片の増幅に使用される各プライマーも本発明に包含される。

[0064] さらに、適切に修飾した本発明のオリゴヌクレオチドを共存させてRT-PCRを実施する場合、標的核酸、すなわち変異株のゲノム由来のcDNA断片をDNAの増幅と並行して検出することができる。前記のTaqMan法、サイクリングプローブ法、モレキュラービーコン法等に適したデザインとした本発明のオリゴヌクレオチドを作製し、かつ反応液組成を検出手段に適したものとするにより、経時的、光学的に標的核酸の増幅をモニターする定量的RT-PCRを実施することができる。

[0065] 本発明の好適な態様では、1ステップRT-PCR法により、変異型SARS-CoV-2をリアルタイムに検出する方法が提供される。当該方法では、逆転写酵素および耐熱性DNAポリメラーゼ（もしくは逆転写活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼ）、少なくとも1つのプライマー対、dNTPs、蛍光物質および消光物質で標識された本発明のオリゴヌクレオチドならびにRT-PCRに必要なその他の成分を含む反応液が調製され、さらに試料が添加される。この反応液は逆転写反応に適した温度で保温された後、そのまま温度サイクル反応に移行してcDNA断片が増幅される。温度サイクル反応中にcDNA断片の増幅量に応じた蛍光が反応液より発せられるため、それを指標として試料中に変異型SARS-CoV-2が存在することが確認できる。

[0066] SARS-CoV-2が有している複数の変異を1回のRT-PCRで検出することができる。即ち、本発明のオリゴヌクレオチド(a)～(o)は、一種を単独で使用してもよく、二種以上を併用してもよい。このような反応系（マルチプレックスRT-PCR）は当業者に周知である。検出しようとする変異に対応する本発明のオリゴヌクレオチドのそれぞれを極大蛍光波

長が異なる蛍光物質で標識しておくことにより、反応液が発する蛍光がどの蛍光物質に由来するかに基づいて、試料中に存在するSARS-CoV-2に生じている変異の種類を知ることができる。例えば、N501Y変異検出用オリゴヌクレオチドとE484K変異検出用オリゴヌクレオチドの両方を含むRT-PCR反応液を使用した場合、試料中のN501Y変異を有する変異株、E484K変異を有する変異株、ならびにN501Y変異とE484K変異の両方を有する変異株を一度に検出することができる。また、あるアミノ酸残基に起こりうる複数のアミノ酸置換のそれぞれを検出し得るオリゴヌクレオチドと野生型の配列に対応するオリゴヌクレオチドとを含むRT-PCR反応液は、一度の反応で当該アミノ酸残基の変異のタイピングを実施することが可能である。このように、一度の反応でウイルスゲノム上の複数の変異を検出するためのマルチプレックスRT-PCR系、等も本発明により提供される。

[0067] マルチプレックスRT-PCRによる本発明の検出方法は、複数の本発明のオリゴヌクレオチド、当該オリゴヌクレオチドに対応する変異位置を含むSARS-CoV-2ゲノム由来のcDNA断片を生成、増幅するための逆転写用プライマーおよび増幅用プライマー対、を含む反応液を使用して実施される。逆転写用プライマーと増幅用プライマー対の組合せは検出しようとする変異ごとに複数の組合せが使用されてもよく、複数の変異箇所を含むcDNA断片を生成・増幅することができる1種の組合せであってもよい。前記のとおり、逆転写用プライマーは増幅用プライマー対の一方が兼ねていてもよい。

[0068] PCRを利用する本発明の検出方法においては、試料中のPCR阻害物質等の影響を調べるため、さらに陽性対照核酸の増幅と検出を組み合わせてもよい。前記陽性対照核酸は、試料中に存在する、検出の対象となる遺伝子と異なる遺伝子（例えば、ハウスキーピング遺伝子など）由来の核酸であってもよい。試料中に存在する遺伝子を陽性対照核酸とする場合は、当該遺伝子の任意の領域を増幅させるためのプライマー対と検出用プローブを組み合わせ

せて使用する。また、人工核酸を調製して試料にあらかじめ添加してもよく、例えば、標的核酸及び非標的核酸の増幅領域と同じ塩基配列を有する核酸あるいはこれらとは異なる塩基配列の核酸であってもよい。人工核酸を陽性対照核酸とする場合は、その塩基配列に応じて、標的核酸及び非標的核酸の増幅に使用されるプライマー対を使用して増幅してもよく、標的核酸及び非標的核酸の増幅領域とは異なるプライマー対を使用してよい。当該陽性対照核酸を検出するためのプローブは、これらの陽性対照核酸を選択的に検出できるものを使用する。本発明の標的核酸の検出と同時にこれらの陽性対照核酸の検出を行うことにより、本発明の検出系での増幅に異常かないかどうかの確認、並びに増幅曲線の比較による標的核酸の初期量の半定量的な解析が可能となる。

[0069] さらに、本発明の検出方法はPCRに有用な公知の成分を含む反応液を使用して実施してもよい。前記成分には特に限定はないが、例えば、界面活性剤、タンパク質（ウシ血清アルブミン、ゼラチン、核酸結合性タンパク質等）、両性物質（ベタイン等）、酸性高分子物質、PCNA（P r o l i f e r a t i n g C e l l N u c l e a r A n t i g e n）等が挙げられる。

[0070] 1ステップRT-PCRにおける逆転写反応、PCRの条件（反応温度、保持時間、熱サイクルの回数等）は適宜設定すればよい。例えば、市販のRT-PCRキット（SARS-CoV-2検出キット等）で推奨されている条件や、それを改変した条件で反応を実施してもよい。本発明のオリゴヌクレオチドの塩基配列や鎖長、使用するプライマーの塩基配列や鎖長、増幅されるDNA断片の鎖長等を考慮して反応条件を設定すべきことは、当業者には周知である。

[0071] 並行して複数のPCR試験を実施する場合、反応後に生成した増幅DNA断片が反応前の他の反応液へ混入すると誤った試験結果を生み出す。このような反応液の汚染を防止する方法が知られている。鎖中にウラシル（U）が取り込まれているDNAにウラシル-N-グリコシラーゼ（UNG）を作用

させると、このDNAはウラシルの位置で切断される。dUTPを含有するPCR反応液を用いて増幅されたDNA断片はウラシルを含有するが、この増幅DNA断片が反応実施前の他の反応液（dUTPと易熱性UNGを含有する反応液）に混入した場合には、反応開始前に反応液をUNGの作用する温度に保温することで、混入DNAを分解して鋳型としての機能を失わせることができる。続いて行われるPCRの温度サイクルでUNGは失活するため、増幅時にはUを取り込んだDNAの分解は起こらない。本発明の検出方法においても、dUTPと易熱性のUNGを含む反応液を使用して相互汚染を防ぐことができる。

[0072] 本発明の方法が適用される試料には特に限定はない。変異型SARS-CoV-2が存在していると疑われるすべての試料、例えば生体由来試料や環境由来試料が本発明の方法の対象となる。前記の生体由来試料は特に限定はされないが、口腔内擦過物、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻咽頭拭い液、鼻腔吸引液、喀痰、気管支洗浄液、肺胞洗浄液、直腸拭い液、各種の体液（唾液、血液、脳脊髄液、汗）、組織、尿または便懸濁液が例示される。また環境由来試料として、環境水（海水、河川水、湖沼水、下水、家庭排水、産業排水等）、スワブなどによる物体表面の拭取り操作で得られた採取物や空気からの捕集物の懸濁液が挙げられる。これら試料はそのまま本発明の方法に供してもよいが、簡易的な処理（熱処理、希釈、濃縮、不溶物除去、可溶化処理、細胞溶解処理、夾雑タンパク質の変性または分解等）あるいは核酸の精製を行った後に使用することもできる。処理の方法は、試料中に含まれる核酸量や夾雑物の性質および量を考慮して選択される。前記の試料は、それぞれを個別に本発明の検出方法に供してもよく、複数の試料を混合したうえで本発明の検出方法に供してもよい。

[0073] 「本発明のキット」

[0074] 本発明は、本発明の変異型SARS-CoV-2の検出方法に使用されるキットを提供する。

[0075] 本発明のキットは、前記の本発明のオリゴヌクレオチドと、SARS-CoV-2

○ V-2 ゲノムに相補的な DNA またはその断片を合成するための試薬を含むことを特徴とする。

[0076] 「SARS-CoV-2 ゲノムに相補的な DNA を合成するための試薬」としては、逆転写酵素または cDNA 合成用プライマーが挙げられる。本発明のキットには、例えば、本発明のオリゴヌクレオチドと SARS-CoV-2 ゲノムを鋳型とした cDNA の合成に使用されるプライマーとを含むキット、本発明のオリゴヌクレオチド、cDNA 合成用プライマーに加えて逆転写酵素を含むキット、等が包含される。後者は、さらに、逆転写反応液の調製に使用されるその他の成分（例えば緩衝成分、2 価金属塩、dNTPs 等）を含んでいてもよい。これらはそれぞれ、本発明の検出方法において説明されたものを使用することができる。

[0077] さらに、本発明のキットは cDNA を増幅するための試薬を含むことができる。特に本発明を限定するものではないが、例えば PCR 法により cDNA を増幅するための試薬、すなわち耐熱性 DNA ポリメラーゼ、ウイルスゲノム上の、スパイクタンパク質をコードする領域に相当する cDNA を増幅できるように設計されたプライマー対、PCR 用の反応液を調製するための各種の成分を含むことができる。

[0078] 本発明の好適な態様においては、1 ステップの RT-PCR によってウイルスゲノムからの cDNA 断片の合成、cDNA 断片の増幅、標的核酸の検出、を一つの反応容器で実施するための各種試薬を含むキットが提供される。当該キットは、標的核酸を光学的に検出できるよう設計、標識された本発明のオリゴヌクレオチド、逆転写酵素および耐熱性 DNA ポリメラーゼ（もしくは逆転写活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼ）、少なくとも 1 対のプライマー、RT-PCR 用の反応液を調製するための各種成分（緩衝成分、2 価金属塩、dNTPs、等）を含む。さらに、複数種の本発明のオリゴヌクレオチドを含むキットや、本発明のオリゴヌクレオチドと他の変異を検出するためのオリゴヌクレオチドとを含むキットとしてもよい。本発明の一つの態様としては、例えば N501Y 変異と E484K 変異の両方を検出可

能なマルチプレックスRT-PCR用のキットや、E484位、L452位、P681位等における変異のタイピングキットが例示される。

[0079] 前記の各種成分は、それぞれ別の容器に収納され、用時にRT-PCR用の反応液を調製するように構成されていてもよく、複数の成分からなる混合物としてキットに含まれていてもよい。試料以外の反応に必要な成分のすべてを含み、適切に処理および／または希釈した試料と混合するだけで反応液を調製できるプレミックス形態の試薬を含むキットも本発明に包含される。さらに、本発明のキットは、試料の処理や試料からの核酸精製に使用される試薬や器具、反応阻害物質の存在を判断するための指標となる陽性対照と陽性対照増幅・検出用のプライマー、プローブ等を含んでもよい。

[0080] 本発明のキットはPCRに有用な公知の成分を含んでいてもよい。前記成分には特に限定はないが、例えば、界面活性剤、タンパク質（ウシ血清アルブミン、ゼラチン、核酸結合性タンパク質等）、両性物質（ベタイン等）、酸性高分子物質、PCNA等が挙げられる。

実施例

[0081] 以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0082] 実施例 1

N501Y変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるN501Y変異株の検出について検討した。まず、表2に記載したフォワードプライマー（名称中にFを含むもの）、リバースプライマー（名称中にRを含むもの）、プローブ（野生型SARS-CoV-2検出用、変異型SARS-CoV-2検出用の2種）で構成される#1～#8のセットをそれぞれ構築した。プローブの3'末端にはMGBを付加するとともに、その5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。

[0083] また試験用の検体として、野生型のSARS-CoV-2ウイルスゲノムの配列を有する合成一本鎖RNA（製品名 Twist Synthetic

c SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3)、Twist Bioscience社製)と、変異型(N501Y変異及びE484K変異を含む)SARS-CoV-2ウイルスゲノムの配列を有する合成一本鎖RNA(製品名 Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16 (B.1.351, EPI_ISL_678597)、Twist Bioscience社製)を用意した。この二つの合成RNAを本明細書中ではそれぞれ野生型RNA、変異型RNAと記載する。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0084]

[表2]

表 2

セット #	配列番号	プライマー・プローブ名	配列 (5'-3')
1	1	N501Y_1FV 2	CTTGTAATGGTGTTRAAGGTTTAAATTGT
	2	N501Y_1R	GGTGTCATGTAGAAGTTCAAAAGAAAG
	3	N501-1c-MGB (WT)	(FAM)CCAACACCATTAGTGGGTTG(MGB)
	4	501Y-1c-MGB (FAM)	(FAM)CCAACACCATAAGTGGGTTG(MGB)
2	5	N501Y-MGB-F1	GGCCGGTAGCACACCTTGTA
	6	N501Y-MGB-R1-E484K-3R	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
	7	N501Y-MGB-P-wild1	(FAM)TTCCAACCCACTAATGG(MGB)
	8	N501Y-MGB-P-mut1	(FAM)TTCCAACCCACTTATGG(MGB)
3	9	N501Y-MGB-F2-E484K-4F	TGAAATCTATCAGGCCGGTAGC
	10	N501Y-MGB-R2-2-E484K-4R	ACAGTTGCTGGTGCATGTAGAAG
	11	N501Y-MGB-P-wild2	(FAM)TTCCAACCCACTAATG(MGB)
	12	N501Y-MGB-P-mut2	(FAM)TTCCAACCCACTTATG(MGB)
4	5	N501Y-MGB-F1	GGCCGGTAGCACACCTTGTA
	6	N501Y-MGB-R1-E484K-3R	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
	13	N501Y-MGB-P-wild3	(FAM)TTTCCAACCCACTAATG(MGB)
	14	N501Y-MGB-P-mut3 (FAM)	(FAM)TTTCCAACCCACTTATG(MGB)
5	5	N501Y-MGB-F1	GGCCGGTAGCACACCTTGTA
	6	N501Y-MGB-R1-E484K-3R	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
	15	N501Y-MGB-P-wild4	(FAM)TCCAACCCACTAATGG(MGB)
	16	N501Y-MGB-P-mut4 (FAM)	(FAM)TCCAACCCACTTATGG(MGB)
6	17	JP-MGB-F1-E484K-5F	ATCTATCAGGCCGGTAGCACA
	18	JP-MGB-R1-E484K-5R	AAACAGTTGCTGGTGCATGTAGA
	3	N501-1c-MGB (WT)	(FAM)CCAACACCATTAGTGGGTTG(MGB)
	4	501Y-1c-MGB (FAM)	(FAM)CCAACACCATAAGTGGGTTG(MGB)
7	19	JP-MGB-F2	AACTGAAATCTATCAGGCCGGTAG
	20	JP-MGB-R2	AACCATTGAAGTTGAAATTGACACA
	3	N501-1c-MGB (WT)	(FAM)CCAACACCATTAGTGGGTTG(MGB)
	4	501Y-1c-MGB (FAM)	(FAM)CCAACACCATAAGTGGGTTG(MGB)
8	9	N501Y-MGB-F2-E484K-4F	TGAAATCTATCAGGCCGGTAGC
	10	N501Y-MGB-R2-2-E484K-4R	ACAGTTGCTGGTGCATGTAGAAG
	3	N501-1c-MGB (WT)	(FAM)CCAACACCATTAGTGGGTTG(MGB)
	4	501Y-1c-MGB (FAM)	(FAM)CCAACACCATAAGTGGGTTG(MGB)

[0085] 1. RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μlとなる

ように野生型RNAと変異型RNAをそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1 μ lと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15 μ l、フォワードプライマー（最終濃度0.2 μ M）、リバープライマー（最終濃度0.2 μ M）、及びプローブ（最終濃度0.2 μ M；野生型RNA検出用または変異型RNA検出用のいずれか）を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。キットに付属する試薬Solution Aは未精製試料前処理試薬のため本試験では使用しなかった。

[0086] 2. 表2記載の各セットで調製した反応液を作製し、実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0087] サーマルサイクラーは、Thermal Cycler Dice（登録商標）Real Time System III（Cy5）with PC（タカラバイオ社製、製品#TP990）を用いた。PCR条件は、52℃5分、95℃10秒の後、95℃5秒、60℃30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表3及び図1（各反応の増幅曲線）に示した。

[0088]

[表3]

表 3

セット #	検出目標	野生型RNA	変異型RNA
		平均Ct値	平均Ct値
1	野生型 (w i l d)	34.1	38.9
	変異型 (m u t)	42.8	28.9
2	野生型	32.7	--
	変異型	--	28.7
3	野生型	33.5	--
	変異型	--	28.5
4	野生型	33.8	--
	変異型	--	29.6
5	野生型	33.1	--
	変異型	--	28.3
6	野生型	32.2	--
	変異型	--	28.0
7	野生型	32.7	--
	変異型	--	27.5
8	野生型	33.0	--
	変異型	--	28.1

[0089] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#2及び#5の反応は野生型RNA検出、変異型RNA検出ともにCt値は小さく、SN比は高く、N501における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0090] 実施例2

E484K変異株検出用プライマー・プローブ

実施例1と同様に5セットのプライマー・プローブ、#9、#10、#11、#12、#13を合成し、E484K変異を有する変異型RNA検出に

ついて試験を行った。このうち、他のセットに比べて良好な性能を有すると判断された#10、#11、#12のセットに含まれるプライマー・プローブの組み合わせを変更し、新たに#14、#15のプライマー・プローブセットを構築した。この2つのセットについて実施例1同様の操作で反応確認を行った。以上の試験に使用されたプライマー・プローブセットに含まれるフォワードプライマー、リバースプライマー、3'末端MGB標識プローブの塩基配列を表4に示した。なお、両セットに含まれる、野生型RNA検出用プローブは5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識し、野生型RNA検出用プローブは5'末端をVIC、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。試験検体としては、野生型RNAと変異型RNAには実施例1と同じRNAを使用し、それぞれRNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μl、500コピー/μl、500コピー/μl、となるように系列希釈した溶液を調製した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0091]

[表4]

表 4

セット #	配列番号	プライマー・プローブ名	配列 (5' - 3')
9	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	22	E484K-1R	GTGGGTTGGAAACCATATGATTG
	23	E484_FAM-MGB1	(FAM)TGGTGTGAAGGTTTAAATTG(MGB)
	24	484K_VIC-MGB1	(VIC)TGGTGTTAAAGGTTTAAATTG(MGB)
10	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	26	E484_FAM-MGB2	(FAM)TTGTAATGGTGTGAAGGTT(MGB)
	27	484K_VIC-MGB2	(VIC)TTGTAATGGTGTTAAAGGTT(MGB)
11	28	E484K-3F	CAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGT
	6	N501Y-MGB-R1-E484K-3R	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
	29	E484_FAM-MGB3	(FAM)ATGGTGTGAAGGTTTAAAT(MGB)
	30	484K_VIC-MGB3	(VIC)ATGGTGTTAAAGGTTTAAAT(MGB)
12	9	N501Y-MGB-F2-E484K-4F	TGAAATCTATCAGGCCGGTAGC
	10	N501Y-MGB-R2-2-E484K-4R	ACAGTTGCTGGTGCATGTAGAAG
	31	E484_FAM-MGB4	(FAM)TGTAATGGTGTGAAGGTT(MGB)
	32	484K_VIC-MGB4	(VIC)TGTAATGGTGTTAAAGGTT(MGB)
13	17	JP-MGB-F1-E484K-5F	ATCTATCAGGCCGGTAGCACA
	18	JP-MGB-R1-E484K-5R	AAACAGTTGCTGGTGCATGTAGA
	33	E484_FAM-MGB5	(FAM)AATGGTGTGAAGGTTTAAAT(MGB)
	34	484K_VIC-MGB5	(VIC)AATGGTGTTAAAGGTTTAAAT(MGB)
14	28	E484K-3F	CAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGT
	6	N501Y-MGB-R1-E484K-3R	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
	26	E484_FAM-MGB2	(FAM)TTGTAATGGTGTGAAGGTT(MGB)
	30	484K_VIC-MGB3	(VIC)ATGGTGTTAAAGGTTTAAAT(MGB)
15	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	29	E484_FAM-MGB3	(FAM)ATGGTGTGAAGGTTTAAAT(MGB)
	30	484K_VIC-MGB3	(VIC)ATGGTGTTAAAGGTTTAAAT(MGB)

[0092] 実施例 1 と同様に、各検体を含有する 1 ステップ R T - P C R 反応液を調

製した。また、サーマルサイクラーは、Applied Biosystems（登録商標）7500FastリアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表5及び図2（各反応の増幅曲線）に示した。

[0093] [表5]

表 5

セット #	検出目標	鋳型濃度 (コピー/反応)	野生型RNA	変異型RNA
			平均Ct値	平均Ct値
1 4	野生型 (w i l d)	50	35.2	--
		500	31.8	--
		5000	28.4	--
	変異型 (m u t)	50	--	35.8
		500	--	32.2
		5000	--	28.9
1 5	野生型	50	34.4	--
		500	30.9	--
		5000	27.6	--
	変異型	50	--	35.6
		500	--	32.3
		5000	--	28.9

[0094] 結果

検討の結果、両方のセットにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特に# 1 5の反応は野生型RNA検出、変異型RNA検出ともにCt値は小さく、SN比は高く、E 4 8 4 Kにおける一塩基置換を高感度に判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0095] 実施例 3

LNA (Locked Nucleic Acid) 技術を用いたE 4 8 4 K変異株検出用プライマー・プローブによる検出を検討した。まず、表6

に示されるフォワードプライマー（名称中にFを含むもの）、リバープライマー（名称中にRを含むもの）、プローブ（野生型SARS-CoV-2検出用、変異型SARS-CoV-2検出用の2種）で構成される#16、#17、#18、#19、#20、#21のセットをそれぞれ構築した。またプローブの一部のヌクレオチドをLNAに置き換えた。野生型を検出するためのプローブはその5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。変異型を検出するためのプローブはその5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0096] また試験用の検体及び試薬は実施例1と同様に用意した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0097]

[表6]

表 6

セット #	配列 番号	プライマー・プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
16	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	38	E484K-LNA-W1(TBD)	(FAM)TGGT+GT+T+GAAGG+TT(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
17	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	39	E484K-LNA-W2(TBD)	(FAM)ATGGT+GT+T+GAA+GGT(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
18	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
19	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	41	E484K-LNA-W4(TBD)	(FAM)AT+G+GTG+TT+G+A+AG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
20	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	42	E484K-LNA-W5(TBD)	(FAM)A+T+G+GT+GTT+G+AA(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
21	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	43	E484K-LNA-W6(TBD)	(FAM)AT+GGTG+TT+G+AAGGTT(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)

[0098] 実施例2と同様に、各検体を含有する1ステップRT-PCR反応液を調製した。また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標）5 リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフ

イック社製)を用いた。RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表7、表8及び図3、図4（各反応の増幅曲線）に示した。

[0099] [表7]

表 7

セット #	検出目標	鋳型濃度 (コピー/反応)	野生型RNA	変異型RNA
			Ct値	Ct値
16	野生型 (w i l d)	50	36.93	--
		500	33.09	--
		5000	29.42	--
	変異型 (m u t)	50	--	36.19
		500	--	32.69
		5000	--	29.07
17	野生型	50	36.00	--
		500	32.79	--
		5000	29.13	--
	変異型	50	--	36.00
		500	--	32.56
		5000	--	29.05
18	野生型	50	37.31	--
		500	33.45	--
		5000	29.72	--
	変異型	50	--	35.86
		500	--	32.34
		5000	--	28.82
19	野生型	50	36.50	--
		500	32.54	--
		5000	29.19	--
	変異型	50	--	35.94
		500	--	32.55
		5000	--	29.00

[0100]

[表8]

表 8

セット #	検出目標	鋳型濃度 (コピー/反応)	野生型RNA	変異型RNA
			Ct値	Ct値
2 0	野生型 (w i l d)	50	36.57	--
		500	33.02	--
		5000	29.49	--
	変異型 (m u t)	50	--	35.88
		500	--	32.47
		5000	--	28.94
2 1	野生型	50	36.17	--
		500	32.84	--
		5000	29.05	--
	変異型	50	--	35.69
		500	--	32.14
		5000	--	28.95

[0101] 結果

検討の結果、すべてのセットにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特に# 1 8の反応は野生型RNA検出、変異型RNA検出ともにCt値は小さく、SN比は高く、E 4 8 4 Kにおける一塩基置換を高感度に判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0102] 実施例4

N 5 0 1 Y変異検出用プライマー・プローブとE 4 8 4 K変異株検出用プライマー・プローブによるマルチプレックスPCR検出を検討した。まず、表9、表10に示されるフォワードプライマー（名称中にFを含むもの）、リバースプライマー（名称中にRを含むもの）、プローブ（野生型SARS-CoV-2検出用、変異型SARS-CoV-2検出用、野生型）で構成される# 2 2、# 2 3、# 2 4、# 2 5のセットをそれぞれ構築した。すべ

てのセットはSARS-CoV-2ゲノムRNAを検出するためのプライマー・プローブセットであるN1、N2、ならびにN501、E484に対応する領域を含むcDNAを合成、増幅するためのプライマー対である配列番号21、25のオリゴヌクレオチドを含む。また、E484K変異型を検出するためのプローブの5'末端はCy5、3'末端はBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識し、いくつかのプローブについてはその一部のヌクレオチドをLNAに置き換えた。N501Y変異型を検出するためのプローブはその5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識し、さらに3'末端にMGBを付加した。N1、N2を検出するためのプローブは5'末端をHEX、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。

[0103] 野生型RNAと変異型RNAの両方が終濃度5000コピー/ μ l、5000コピー/ μ l、50コピー/ μ lで含まれる系列希釈液をRNase Free H₂Oを用いて調製し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1 μ lと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15 μ l、最終濃度0.2 μ Mの各プライマー、最終濃度0.2 μ Mの各プローブを混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。キットに付属する試薬Solution Aは未精製試料前処理試薬のため本試験では使用しなかった。

[0104] こうして調製された反応液を1ステップRT-PCRに供した。サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標）5 リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。反応条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、58℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表11及び図5（各反応の増幅曲線）に示した。

[0105] [表9]

表 9

セット #	配列 番号	名前	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
22	47	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
	48	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	49	2019-nCoV_N1-P_HEX	(HEX)ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC(BHQ1)
	50	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	51	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	52	2019-nCoV_N2-P_HEX	(HEX)ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG(BHQ1)
	21	E484K-1F-E484K_2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	16	N501Y-MGB-P-mut4(FAM)	(FAM)TCCAACCCACTTATGG(MGB)
	44	E484K_MGB_3	(Cy5)ATGGTGTAAAGGTTTTAAT(MGB)
23	47	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
	48	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	49	2019-nCoV_N1-P_HEX	(HEX)ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC(BHQ1)
	50	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	51	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	52	2019-nCoV_N2-P_HEX	(HEX)ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG(BHQ1)
	21	E484K-1F-E484K_2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	16	N501Y-MGB-P-mut4(FAM)	(FAM)TCCAACCCACTTATGG(MGB)
	45	E484K(mut)_LNA2	(Cy5)ACCT+T+T+AACAC+CAT+TACA(BHQ2)
24	47	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
	48	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	49	2019-nCoV_N1-P_HEX	(HEX)ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC(BHQ1)
	50	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	51	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	52	2019-nCoV_N2-P_HEX	(HEX)ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG(BHQ1)
	21	E484K-1F-E484K_2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAA
	16	N501Y-MGB-P-mut4(FAM)	(FAM)TCCAACCCACTTATGG(MGB)
	46	TBD-LNA-mut-3	(Cy5)AT+GG+TGT+T+A+AAGG+TTT(BHQ2)

[0106]

[表10]

表 1 0

セット #	配列番号	名前	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
25	47	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT
	48	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	49	2019-nCoV_N1-P_HEX	(HEX)ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC(BHQ1)
	50	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	51	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	52	2019-nCoV_N2-P_HEX	(HEX)ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG(BHQ1)
	21	E484K-1F-E484K_2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	16	N501Y-MGB-P-mut4(FAM)	(FAM)TCCAACCCACTTATGG(MGB)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)

[0107] [表11]

表 1 1

セット#	鋳型RNA	Ctrl16 変異型RNA(N501Y・E484K)		
	蛍光色素	FAM	Cy5	HEX
	検出対象	N501Y	E484K	N1-N2
	鋳型濃度 (コピー/反応)	平均Ct値	平均Ct値	平均Ct値
22	50	35.50	36.13	34.79
	500	32.20	32.86	31.25
	5000	28.82	29.57	27.87
23	50	36.94	36.22	34.65
	500	33.91	33.14	31.20
	5000	30.37	29.80	27.81
24	50	35.86	35.77	34.70
	500	32.04	32.00	31.14
	5000	28.63	28.61	27.80
25	50	35.34	35.28	34.66
	500	31.81	31.95	31.19
	5000	28.70	28.52	27.79

[0108] 結果

表 1 1 および図 5 に示されるように、すべてのセットで野生型、N 5 0 1 Y 変異型、E 4 8 4 K 変異型の RNA が検出された。セットごとの C t 値には大きな差異は見られず、また S N 比も高いことから、いずれのセットも変異型 S A R S - C o V - 2 の検出に有用であることが示された。

[0109] 実施例 5

E 4 8 4 Q、K 変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法による E 4 8 4 Q 変異株、E 4 8 4 K 変異株の検出について検討した。まず、表 4 に記載した、配列番号 2 1 のフォワードプライマーおよび配列番号 2 5 のリバースプライマーをそれぞれ合成した。次に、これらのプライマー対と、表 1 2 に記載した、配列中に L N A を含む 3 種のプローブ（名称に「W」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「M」を含む E 4 8 4 K 変異検出用および名称に「Q」を含む E 4 8 4 Q 変異検出用）で構成される # 2 6 ~ # 3 0 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また E 4 8 4 K 変異検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。また E 4 8 4 Q 変異検出用のプローブの 5' 末端を H E X、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。

[0110] また試験用の検体として、野生型の S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノム RNA の配列を有する合成一本鎖 RNA（E 4 8 4 E - C O N T R O L _ R N A _ W i l d : 配列番号 5 8）、変異型（E 4 8 4 K）S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノム RNA の配列を有する合成一本鎖 RNA（E 4 8 4 K - C O N T R O L _ R N A _ M u t : 配列番号 5 9）と、変異型（E 4 8 4 Q）S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノム RNA の配列を有する合成一本鎖 RNA（E 4 8 4 Q - C O N T R O L _ R N A _ M u t : 配列番号 6 0）をそれぞれ使用した。これら一本鎖 RNA は、その塩基配列に対応する二本鎖 D

NAを組み込んだプラスミドDNAを構築し、これを鋳型とした *in vitro* の転写反応を実施して調製した。この3種のRNAを本明細書中ではそれぞれE484E__RNA、E484K__RNA、E484Q__RNAと記載する。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0111] [表12]

表 1 2

セット#	配列番号	名前	配列 (5' -3')
26	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
	53	E484Q-LNA-1_P_HEX	(HEX)TG+G+TGTT+CAAG+GTTT(BHQ1)
27	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
	54	E484Q-LNA-2_P_HEX	(HEX)ATG+G+TGTT+CAAG+GTT(BHQ1)
28	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
	55	E484Q-LNA-4_P_HEX	(HEX)TG+GT+GT+T+C+AA+GGTTT(BHQ1)
29	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
	56	E484Q-LNA-5_P_HEX	(HEX)TAA+TGG+TG+TT+CA+AGG+TT(BHQ1)
30	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K_2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3(TBD)	(FAM)A+TG+GTG+TT+GAA+GG(BHQ1)
	37	TBD-LNA-M2	(Cy5)TG+GT+GT+T+A+AA+GGTTT(BHQ2)
	57	E484Q-LNA-6_P_HEX	(HEX)A+TGG+TG+TT+CA+AGG+TT(BHQ1)

[0112] RNase Free H₂Oに5000コピー/μl、500コピー/μl、50コピー/μl、5コピー/μlまたは、5000コピー/μl、5

00コピー/ μ l、50コピー/ μ lとなるようにE484E__RNA、E484K__RNA、E484Q__RNAのそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1 μ lと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15 μ l、加熱処理済みのSolution A 1.2 μ l、ROX Reference Dye II (50X) 0.6 μ l、フォワードプライマー（最終濃度0.2 μ M）及びリバースプライマー（最終濃度0.2 μ M）、3種のプローブ（それぞれ最終濃度0.2 μ M）を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0113] 上記の組成で、表12記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0114] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標） 5リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表13に示した。

[0115]

[表13]

表 1 3

	鋳型RNA	E484E_RNA		E484K_RNA		E484Q_RNA	
	蛍光色素	FAM		Cy5		HEX	
	検出対象	E484E（野生型）		E484K（変異型）		E484Q（変異型）	
セット #	コピー数 /反応	平均 Ct値	平均 蛍光値	平均 Ct値	平均 蛍光値	平均 Ct値	平均 蛍光値
26	5	40.19	0.57	38.79	0.81	40.30	0.30
	50	36.58	0.83	35.90	1.00	36.24	0.45
	500	32.96	0.90	32.40	1.00	32.93	0.46
	5000	29.75	0.90	29.37	0.93	29.66	0.45
27	5	40.34	0.53	39.83	0.68	40.11	0.31
	50	36.54	0.82	35.82	0.94	36.32	0.45
	500	33.18	0.86	32.80	0.93	32.97	0.46
	5000	29.74	0.90	29.67	0.88	29.62	0.45
28	50	36.97	0.89	36.79	1.03	36.50	0.56
	500	33.77	0.96	33.00	1.09	33.23	0.57
	5000	30.23	0.98	29.83	1.02	29.84	0.57
29	50	37.44	0.11	36.91	0.11	37.94	0.60
	500	33.55	0.11	33.17	0.11	34.23	0.66
	5000	30.02	0.11	29.81	0.11	30.91	0.66
30	50	36.96	0.93	36.27	1.02	37.28	0.58
	500	33.47	1.00	32.97	1.05	34.07	0.61
	5000	30.03	1.04	29.82	1.01	30.66	0.63

[0116] 結果

検討の結果、E 4 8 4 E _ R N A（野生型）、E 4 8 4 K _ R N A、E 4 8 4 Q _ R N Aを同時検出するマルチプレックスR T - P C R系は、野生型、変異型（E 4 8 4 KまたはE 4 8 4 Q）のR N Aをそれぞれ検出できており、当該反応液を用いて4 8 4位のタイピング、すなわち野生型（E）、K、またはQの判別が可能であることが示された。また# 2 8、# 3 0は特に良好な結果を示した。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0117] 実施例 6

L 4 5 2 R変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるL452R変異株の検出について検討した。まず、表14に記載したフォワードプライマー（名称中に「F」を含むもの）およびリバースプライマー（名称中に「R」を含むもの）を合成した。次に、これらのプライマー対と、表15、表16に記載した、配列中にLNAを含むプローブ（名称に「W」を含む野生型SARS-CoV-2検出用または名称に「M」を含む変異型SARS-CoV-2検出用のいずれか）で構成される#31～#71のセットをそれぞれ構築した。野生型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。また変異型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0118] また試験用の検体として、野生型のSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAの配列を有する合成一本鎖RNA（L452R-CONTROL__RNA__Wild：配列番号89）と、変異型（L452R）SARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAの配列を有する合成一本鎖RNA（L452R-CONTROL__RNA__Mut：配列番号90）を使用した。これら一本鎖RNAは、その塩基配列に対応する二本鎖DNAを組み込んだプラスミドDNAを構築し、これを鋳型とした*in vitro*の転写反応を実施して調製した。この二つのRNAを本明細書中ではそれぞれ野生型RNA452、変異型RNA452と記載する。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0119]

[表14]

表 1 4

プライマ ー対 #	配列番 号	プライマー名	配列 (5'-3')
# 1	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
# 2	66	L452R-S477N-F2	TTACAGGCTGCGTTATAGCTTGG
	67	L452R-S477N-R2	GTGGGTTGGAACCATATGATTGTA
# 3	75	L452R-F3	TACAGGCTGCGTTATAGCTTGG
	76	L452R-R3	CCATTACAAGGTGTGCTACCG
# 4	77	L452R-F4	TTTACAGGCTGCGTTATAGCTTG
	78	L452R-R4	CCATTACAAGGTGTGCTACCG
# 5	79	L452R-F5	CAGATGATTTTACAGGCTGCGTTAT
	80	L452R-R5	TCAACACCATTACAAGGTGTGCTAC

[0120]

[表15]

表 1 5

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
31	# 1	68	L452R-LNA-M1	(Cy5)TA+A+TTAC+C+G+GTATAG+AT(BHQ2)
32		69	L452R-LNA-M2	(Cy5)TAA+T+TAC+C+G+GT+ATAGAT(BHQ2)
33		70	L452R-LNA-M3	(Cy5)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ2)
34		71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
35		72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
36		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
37		74	L452R-LNA-W3	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+T+AGA(BHQ1)
38	# 2	68	L452R-LNA-M1	(Cy5)TA+A+TTAC+C+G+GTATAG+AT(BHQ2)
39		69	L452R-LNA-M2	(Cy5)TAA+T+TAC+C+G+GT+ATAGAT(BHQ2)
40		70	L452R-LNA-M3	(Cy5)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ2)
41		71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
42		72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
43		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
44		74	L452R-LNA-W3	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+T+AGA(BHQ1)
45	# 3	81	L452R-LNA-M5	(Cy5)TA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GA(BHQ2)
46		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
47		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
48		84	L452R-LNA-M8	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GAT(BHQ2)
49		85	L452R-LNA-M9	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GTATA+GATT(BHQ2)
50		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
51		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)
52		70	L452R-LNA-M3	(Cy5)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ2)
53		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)

[0121]

[表16]

表 1 6

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
54	# 4	81	L452R-LNA-M5	(Cy5)TA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GA(BHQ2)
55		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
56		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
57		84	L452R-LNA-M8	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GAT(BHQ2)
58		85	L452R-LNA-M9	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GTATA+GATT(BHQ2)
59		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
60		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)
61		70	L452R-LNA-M3	(Cy5)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ2)
62		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
63	# 5	81	L452R-LNA-M5	(Cy5)TA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GA(BHQ2)
64		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
65		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
66		84	L452R-LNA-M8	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GT+ATA+GAT(BHQ2)
67		85	L452R-LNA-M9	(Cy5)TT+ATA+ATT+AC+C+G+GTATA+GATT(BHQ2)
68		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
69		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)
70		70	L452R-LNA-M3	(Cy5)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ2)
71		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)

[0122] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／μlとなるように野生型RNA452と変異型RNA452をそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1μlと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15μl、加熱処理済みのSolution A 1.2μl、ROX Reference DyeII (50X) 0.6μl、フォワードプラ

イマー（最終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ ）及びリバースプライマー（最終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ ）、プローブ（最終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ ；野生型RNA検出用または変異型RNA検出用のいずれか）を混合し、RNase Free H_2O で、最終容量 $30 \mu\text{l}$ の1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0123] 上記の組成で、表15、表16記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0124] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標）5リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR条件は、 52°C 5分、 95°C 10秒の後、 95°C 5秒、 60°C 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表17、表18に示した。

[0125]

[表17]

表 1 7

セット#	検出目標	平均Ct値		平均蛍光値	
		野生型RNA	変異型RNA	野生型RNA	変異型RNA
31	変異型 (mut)	--	30.71	0.00	0.22
32	変異型	--	30.34	0.00	0.04
33	変異型	--	30.81	0.00	0.35
34	変異型	--	30.68	0.00	0.21
35	野生型 (wild)	33.00	--	0.25	0.00
36	野生型	32.03	--	0.71	0.00
37	野生型	32.01	--	0.23	0.00
38	変異型	--	31.84	0.00	0.16
39	変異型	--	31.55	0.00	0.03
40	変異型	--	31.77	0.00	0.25
41	変異型	--	31.77	0.00	0.15
42	野生型	32.93	--	0.48	0.00
43	野生型	32.73	--	0.56	0.00
44	野生型	32.72	--	0.24	0.00
45	変異型	--	29.23	0.00	0.06
46	変異型	--	29.42	0.00	0.18
47	変異型	--	29.36	0.00	0.48
48	変異型	--	29.39	0.00	0.13
49	変異型	--	29.31	0.00	0.16
50	野生型	30.12	--	0.49	0.00
51	野生型	28.75	--	0.66	0.00
52	変異型	--	29.49	0.00	0.15
53	野生型	28.99	--	0.65	0.00

[0126]

[表18]

表 1 8

セット #	検出目標	平均Ct値		平均蛍光値	
		野生型RNA	変異型RNA	野生型RNA	変異型RNA
54	変異型 (mut)	--	31.14	0.00	0.05
55	変異型	--	31.42	0.00	0.20
56	変異型	--	31.39	0.00	0.50
57	変異型	--	31.49	0.00	0.13
58	変異型	--	31.81	0.00	0.20
59	野生型 (wild)	32.71	--	0.34	0.00
60	野生型	32.35	--	0.86	0.00
61	変異型	--	31.60	0.00	0.18
62	野生型	32.26	--	0.46	0.00
63	変異型	--	29.66	0.00	0.08
64	変異型	--	29.69	0.00	0.26
65	変異型	--	29.86	0.00	0.80
66	変異型	--	29.44	0.00	0.20
67	変異型	--	29.82	0.00	0.25
68	野生型	30.76	--	0.53	0.00
69	野生型	30.00	--	1.09	0.00
70	変異型	--	29.84	0.00	0.23
71	野生型	30.13	--	0.62	0.00

[0127] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#33、#36、#40、#43、#47、#51、#53、#65、#69反応は、それぞれ野生型RNAまたは変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号83、70のオリゴヌクレオチドはL452R変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0128] 実施例 7

L 4 5 2 R 変異株検出用プライマー・プローブ

表 1 9 に示す 4 セットのプライマー・プローブ、# 7 2、# 7 3、# 7 4、# 7 5 を構築し、L 4 5 2 R 変異を有する変異型 R N A 検出について試験を行った。表中、プライマーの名称は「F」または「R」を含む。これらのセットは野生型 S A R S - C o V - 2 検出用プローブ、変異型 S A R S - C o V - 2 検出用プローブの両方を含む（野生型検出用プローブの名称は「W」を、変異型検出用プローブの名称は「M」をそれぞれ含む）。野生型 R N A 検出用プローブは 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識し、変異型 R N A 検出用プローブは 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。R T - P C R 反応液は、2 種のプローブを含む他は実施例 1 同様と同様に調製し、反応確認を行った。試験検体としては、野生型 R N A 4 5 2 と変異型 R N A 4 5 2 には実施例 6 と同じ R N A を使用し、それぞれ R N a s e F r e e H₂O に終濃度が 5 0 0 0 コピー／ μ l、5 0 0 コピー／ μ l、5 0 コピー／ μ l、5 コピー／ μ l となるように系列希釈した溶液を調製した。またネガティブコントロールとしては R N a s e F r e e H₂O を用意した。さらに、R T - P C R 条件は、5 2℃ 5 分、9 5℃ 1 0 秒の後、9 5℃ 5 秒、5 8℃ 3 0 秒を 1 サイクルとする 4 5 サイクル反応とした。その結果を表 2 0 に示した。

[0129]

[表19]

表 1 9

セット #	配列 番号	プライマー／プロ ープ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
72	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
	72	L452R-LNA-W1	(Cy5)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ2)
	68	L452R-LNA-M1	(FAM)TA+A+TTAC+C+G+GTATAG+AT(BHQ1)
73	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
	72	L452R-LNA-W1	(Cy5)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ2)
	70	L452R-LNA-M3	(FAM)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ1)
74	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
	73	L452R-LNA-W2	(Cy5)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ2)
	68	L452R-LNA-M1	(FAM)TA+A+TTAC+C+G+GTATAG+AT(BHQ1)
75	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
	73	L452R-LNA-W2	(Cy5)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ2)
	70	L452R-LNA-M3	(FAM)AT+AA+TTAC+C+G+GT+ATAGATT(BHQ1)

[0130]

[表20]

表 2 0

セット #	コピー/ 反応	平均Ct値		平均蛍光値	
		野生型RNA	変異型RNA	野生型RNA	変異型RNA
72	5	--	--	0.00	0.00
	50	40.10	39.38	0.22	0.26
	500	36.58	35.36	0.29	0.32
	5000	32.95	31.61	0.27	0.30
73	5	--	41.71	0.00	0.09
	50	40.05	38.67	0.23	0.32
	500	36.50	35.09	0.31	0.37
	5000	32.79	31.45	0.30	0.36
74	5	42.67	43.53	0.15	0.03
	50	39.58	37.92	0.75	0.32
	500	36.24	34.68	0.97	0.34
	5000	32.65	31.28	0.95	0.33
75	5	--	41.51	0.00	0.10
	50	40.01	38.74	0.65	0.32
	500	36.68	34.88	0.88	0.38
	5000	33.00	31.46	0.88	0.37

[0131] 結果

検討の結果、野生型RNA、変異型RNAを同時検出するマルチプレックスRT-PCR系としたことによる不都合は見られなかった。変異型RNA検出用プローブとしては配列番号68のオリゴヌクレオチドよりも配列番号70のオリゴヌクレオチドの方が、また野生型RNA検出用プローブとしては配列番号72のオリゴヌクレオチドよりも配列番号73のオリゴヌクレオチドの方が、それぞれ良好な結果を示した。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0132] 実施例8

T478K変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるT478K変異株の検出について検討した。まず

、表 2 1 に記載したフォワードプライマー（名称中に「F」を含むもの）およびリバースプライマー（名称中に「R」を含むもの）を合成した。次に、これらのプライマー対と表 2 2、表 2 3、表 2 4 に記載した、配列中に L N A を含むプローブ（名称に「W」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用または名称に「M」を含む変異型 S A R S - C o V - 2 検出用のいずれか）で構成される # 7 6 ~ 1 4 8 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また変異型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。

[0133] また試験用の検体として、野生型の S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノム R N A の配列を有する合成一本鎖 R N A（T 4 7 8 K - C O N T R O L _ R N A _ W i l d : 配列番号 1 1 1）と、変異型（T 4 7 8 K）S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノム R N A の配列を有する合成一本鎖 R N A（T 4 7 8 K - C O N T R O L _ R N A _ M u t : 配列番号 1 1 2）を使用した。これら一本鎖 R N A は、その塩基配列に対応する二本鎖 D N A を組み込んだプラスミド D N A を構築し、これを鋳型とした *i n v i t r o* の転写反応を実施して調製した。この二つの R N A を本明細書中ではそれぞれ野生型 R N A 4 7 8、変異型 R N A 4 7 8 と記載する。またネガティブコントロールとしては R N a s e F r e e H₂O を用意した。

[0134]

[表21]

表 2 1

プライマ ー対 #	配列 番号	プライマー名	配列(5'-3')
# 1	91	T478K-F1	CTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAA
	92	T478K-R1	GTACTACTACTCTGTATGGTTGGTAACCAAC
# 2	93	T478K-F1	CTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAA
	94	T478K-R2	GGAAACCATATGATTGTAAAGGAAAGTAAC
# 3	28	MGB-F3	CAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGT
	6	MGB-R3	GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAA
# 4	64	L452R-S477N-F1	CAGATGATTTTACAGGCTGCGT
	65	L452R-S477N-R1	GTTGGAAACCATATGATTGTAAAGGA
# 5	107	T478K F3	AGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACC
	108	T478K R3	CTCTGTATGGTTGGTAACCAACACC
# 6	109	T478K F4	GTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGAT
	110	T478K R4	GGAAACCATATGATTGTAAAGGAAAGT

[0135]

[表22]

表 2 2

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
76	# 1	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
77		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
78		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
79		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
80		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
81		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
82		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
83		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
84		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
85		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
86		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
88		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)
89	# 2	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
90		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
91		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
92		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
93		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
94		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
95		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
96		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
97		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
98		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
99		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
100		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)

[0136]

[表23]

表 2 3

セット #	プライマ ー対#	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
101	# 3	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
102		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
103		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
104		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
105		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
106		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
107		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
108		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
109		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
110		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
111		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
112		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)
113	# 4	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
114		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
115		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
116		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
117		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
118		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
119		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
120		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
121		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
122		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
123		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
124		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)

[0137]

[表24]

表 2 4

セット#	プライマ-対 #	配列番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
125	# 5	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
126		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
127		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
128		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
129		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
130		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
131		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
132		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CCGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
133		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
134		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
135		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
136		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)
137	# 6	95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
138		96	T478K-LNA-M2	(Cy5)A+GC+A+AA+CCT+TG+TAAT(BHQ2)
139		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
140		98	T478K-LNA-M4	(Cy5)T+TA+CAA+GGT+TTG+CTA(BHQ2)
141		99	T478K-LNA-M5	(Cy5)C+AC+CATTAC+AAG+GT+T+TG(BHQ2)
142		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
143		101	T478K-LNA-W1	(FAM)GCCGGTAGCA+CACC(BHQ1)
144		102	T478K-LNA-W2	(FAM)CCGGTAGCA+CAC+CTTG(BHQ1)
145		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
146		104	T478K-LNA-W4	(FAM)CA+CCATTA+CAAGGT+GTG(BHQ1)
147		105	T478K-LNA-W5	(FAM)GGT+GTGCT+ACCGGC(BHQ1)
148		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)

[0138] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／μlとなるように野生型RNA478と変異型RNA478をそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち

前記した試験検体溶液 $1\ \mu\text{l}$ と酵素・基質等を含む RT-qPCR Mix $15\ \mu\text{l}$ 、加熱処理済みの Solution A $1.2\ \mu\text{l}$ 、ROX Reference Dye II (50X) $0.6\ \mu\text{l}$ 、フォワードプライマー（最終濃度 $0.2\ \mu\text{M}$ ）及びリバースプライマー（最終濃度 $0.2\ \mu\text{M}$ ）、プローブ（最終濃度 $0.2\ \mu\text{M}$ ；野生型 RNA 検出用または変異型 RNA 検出用のいずれか）を混合し、RNase Free H_2O で、最終容量 $30\ \mu\text{l}$ の 1 ステップ RT-PCR 反応液を調製した。

[0139] 上記の組成で、表 22、表 23、表 24 記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため 2 連で試験を実施した。

[0140] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標）5 リアルタイム PCR システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR 条件は、 52°C 5 分、 95°C 10 秒の後、 95°C 5 秒、 60°C 30 秒を 1 サイクルとする 45 サイクル反応とした。その結果を表 25、表 26、表 27 に示した。

[0141]

[表25]

表 2 5

セット #	プライマ ー対 #	検出目標	野生型RNA478		変異型RNA478	
			平均Ct値	平均 蛍光値	平均Ct値	平均 蛍光値
76	# 1	変異型 (mut)	--	0.00	36.89	0.18
77		変異型	--	0.00	37.28	0.12
78		変異型	--	0.00	37.16	0.23
79		変異型	--	0.00	37.73	0.20
80		変異型	--	0.00	36.44	0.13
81		変異型	--	0.00	36.72	0.42
82		野生型 (wild)	39.96	0.02	--	0.00
83		野生型	37.95	0.06	--	0.00
84		野生型	37.13	0.22	--	0.00
85		野生型	36.62	0.09	--	0.00
86		野生型	36.69	0.08	--	0.00
88		野生型	36.92	0.25	--	0.00
89	# 2	変異型	--	0.00	36.62	0.85
90		変異型	--	0.00	35.81	0.74
91		変異型	--	0.00	36.91	1.22
92		変異型	--	0.00	36.08	1.14
93		変異型	--	0.00	34.94	0.32
94		変異型	--	0.00	34.91	1.29
95		野生型	35.69	0.29	--	0.00
96		野生型	35.05	0.52	--	0.00
97		野生型	35.43	2.15	--	0.00
98		野生型	33.21	0.43	--	0.00
99		野生型	33.23	0.34	--	0.00
100		野生型	34.62	2.56	--	0.00

[0142]

[表26]

表 2 6

セ ット #	プライマー 対 #	検出目 標	野生型RNA478		変異型RNA478	
			平均Ct値	平均蛍 光値	平均Ct値	平均 蛍光値
101	# 3	変異型 (mut)	--	0.00	32.01	1.38
102		変異型	--	0.00	34.27	1.05
103		変異型	--	0.00	32.33	1.86
104		変異型	--	0.00	33.08	1.31
105		変異型	--	0.00	31.81	0.37
106		変異型	--	0.00	32.03	1.60
107		野生型 (wild)	30.94	0.43	--	0.00
108		野生型	30.58	0.74	--	0.00
109		野生型	31.57	2.51	--	0.00
110		野生型	30.43	0.50	--	0.00
111		野生型	30.65	0.39	--	0.00
112		野生型	31.09	2.89	--	0.00
113	# 4	変異型	--	0.00	33.30	1.22
114		変異型	--	0.00	33.31	0.89
115		変異型	--	0.00	33.46	1.59
116		変異型	--	0.00	34.14	1.33
117		変異型	--	0.00	32.89	0.34
118		変異型	--	0.00	33.09	1.36
119		野生型	31.83	0.39	--	0.00
120		野生型	31.54	0.70	--	0.00
121		野生型	31.94	2.63	--	0.00
122		野生型	31.23	0.64	--	0.00
123		野生型	31.27	0.39	--	0.00
124		野生型	32.87	2.78	--	0.00

[0143]

[表27]

表 2 7

セット #	プライマー対 #	検出目標	野生型RNA478		変異型RNA478	
			平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
125	# 5	変異型 (mut)	--	0.00	31.83	0.91
126		変異型	--	0.00	32.44	0.67
127		変異型	--	0.00	31.74	1.17
128		変異型	--	0.00	34.00	0.85
129		変異型	--	0.00	31.43	0.21
130		変異型	--	0.00	31.80	1.10
131		野生型 (wild)	30.60	0.26	--	0.00
132		野生型	30.43	0.44	--	0.00
133		野生型	30.82	1.63	--	0.00
134		野生型	30.16	0.41	--	0.00
135		野生型	30.97	0.28	--	0.00
136		野生型	31.05	2.13	--	0.00
137	# 6	変異型	--	0.00	34.29	0.79
138		変異型	--	0.00	34.27	0.66
139		変異型	--	0.00	34.76	1.15
140		変異型	--	0.00	33.99	0.73
141		変異型	--	0.00	33.51	0.25
142		変異型	--	0.00	33.57	0.99
143		野生型	33.07	0.27	--	0.00
144		野生型	32.67	0.39	--	0.00
145		野生型	33.28	1.94	--	0.00
146		野生型	32.35	0.42	--	0.00
147		野生型	32.15	0.31	--	0.00
148		野生型	34.11	2.11	--	0.00

[0144] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検

出することが確認できた。特にセット#101、#103、#106、#109、#112、#113、#115、#118、#121、#124、#127、#133、#139、#145の反応は、それぞれ野生型RNAまたは変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号95、97、100のオリゴヌクレオチドはT478K変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0145] 実施例9

T478K変異株検出用プライマー・プローブ

表28に示す9セットのプライマー・プローブセット#149、#150、#151、#152、#153、#154、#155、#156、#157を構築し、T478K変異を有する変異型RNA検出について試験を行った。これらのセットは野生型SARS-CoV-2検出用プローブ、変異型SARS-CoV-2検出用プローブの両方を含む（野生型検出用プローブの名称は「W」を、変異型検出用プローブの名称は「M」をそれぞれ含む）。野生型RNA検出用プローブは5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識し、変異型RNA検出用プローブは5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。RT-PCR反応液は、2種のプローブを含む他は実施例7同様に調製し、反応確認を行った。試験検体としては、野生型RNA478と変異型RNA478を使用し、それぞれRNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μl、500コピー/μl、50コピー/μl、5コピー/μlとなるように系列希釈した溶液を調製した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、58℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表29に示した。

[0146]

[表28]

表 2 8

セット #	プライマー 対#	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
149	# 3	103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
150		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
151		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
152		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)
		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
153	# 4	103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		95	T478K-LNA-M1	(Cy5)G+CCGGTAGC+A+AACC(BHQ2)
154		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
155		103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)
156	# 5	103	T478K-LNA-W3	(FAM)AG+CA+CAC+CT+TG+TAAT(BHQ1)
		97	T478K-LNA-M3	(Cy5)GC+CCGGTAGC+A+AA+CC(BHQ2)
157		106	T478K-LNA-W6	(FAM)T+TA+CA+AG+GT+GTG+CTA(BHQ1)
		100	T478K-LNA-M6	(Cy5)T+TA+CA+AG+GT+TTG+CTA(BHQ2)

[0147]

[表29]

表 2 9

セット #	コピー/ 反応	野生型RNA478		変異型RNA478	
		平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
149	50	39.30	2.0	38.98	1.37
	500	35.26	2.72	35.09	1.63
	5000	31.70	2.93	31.85	1.68
150	50	39.30	2.01	39.26	1.50
	500	35.70	2.66	34.99	1.75
	5000	31.68	2.93	31.61	1.75
151	50	39.20	2.04	39.00	1.23
	500	35.56	2.89	35.69	1.53
	5000	31.53	3.20	32.02	1.65
152	50	39.00	1.72	38.82	0.92
	500	35.19	2.22	35.52	1.09
	5000	31.76	2.32	31.70	1.11
153	50	38.14	2.53	39.38	1.24
	500	34.68	3.16	35.56	1.60
	5000	31.16	3.33	32.08	1.68
154	50	38.34	2.10	39.27	1.46
	500	34.90	2.77	35.72	1.61
	5000	31.24	2.98	32.01	1.68
155	50	39.81	2.10	39.15	1.18
	500	35.63	3.11	35.58	1.54
	5000	32.24	3.39	32.11	1.72
156	50	38.14	1.42	38.75	1.07
	500	34.49	1.62	35.68	1.18
	5000	30.78	1.66	32.08	1.17
157	50	37.92	1.88	38.01	0.92
	500	34.60	2.07	34.69	0.98
	5000	31.18	2.10	31.43	0.96

[0148] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検

出することが確認できた。特にセット#149、#150、#151、#153、#154、#155の反応は、それぞれ野生型RNA478または変異型RNA478を小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号、95、97のオリゴヌクレオチドはT478K変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0149] 実施例10

本発明の検出方法によるF490S変異株の検出について検討した。まず、表30に記載したフォワードプライマー（名称中に「F」を含むもの）およびリバースプライマー（名称中に「R」を含むもの）を合成した。次に、これらのプライマー対と表31-1、表31-2、表32に記載した、配列中にLNAを含むプローブ（名称に「W」を含む野生型SARS-CoV-2検出用または名称に「M」を含む変異型SARS-CoV-2検出用のいずれか）で構成される#158～#202のセットをそれぞれ構築した。野生型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。また変異型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0150] また試験用の検体として、野生型のSARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAの配列を有する合成一本鎖RNA（WILD__RNA__CONTROL2：配列番号134）と、変異型（F490S）SARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAの配列を有する合成一本鎖RNA（F490S__RNA__CONTROL__RNA__Mut：配列番号136）を使用した。これら一本鎖RNAは、その塩基配列に対応する二本鎖DNAを組み込んだプラスミドDNAを構築し、これを鋳型とした*in vitro*の転写反応を実施して調製した。この二つのRNAを本明細書中ではそれぞれ野生型RNA2、変異型RNA F490Sと記載する。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0151] [表30]

表 3 0

プライマー 対 #	配列番 号	プライマー名	配列(5'-3')
# 1	114	F490S-F1	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAAC
	117	F490S_LNA_R4	CATWAGTGGGTGGAACCATAT
# 2	115	F490S-F2	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACT
	117	F490S_LNA_R4	CATWAGTGGGTGGAACCATAT
# 3	116	F490S-F3	AACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGA
	117	F490S_LNA_R4	CATWAGTGGGTGGAACCATAT
# 4	114	F490S-F1	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAAC
	118	F490S_LNA_R5	AGTACTACTACTCTGTATGGTTGGT
# 5	115	F490S-F2	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACT
	118	F490S_LNA_R5	AGTACTACTACTCTGTATGGTTGGT
# 6	116	F490S-F3	AACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGA
	118	F490S_LNA_R5	AGTACTACTACTCTGTATGGTTGGT
# 7	114	F490S-F1	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAAC
	119	F490S_LNA_R6	AGTTCAAAAGAAAGTACTACTACTCT
# 8	115	F490S-F2	TCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACT
	119	F490S_LNA_R6	AGTTCAAAAGAAAGTACTACTACTCT
# 9	116	F490S-F3	AACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGA
	119	F490S_LNA_R6	AGTTCAAAAGAAAGTACTACTACTCT

[0152]

[表31-1]

表 3 1 - 1

セット #	プライマー 対#	配列 番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
158	#1	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
159		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
160		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
161		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
162		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
163	#2	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FA)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
164		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FA)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
165		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
166		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
167		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
168	#3	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
169		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
170		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
171		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
172		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)

[0153]

[表31-2]

表 3 1 - 2

セット #	プライマー 対#	配列 番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
173	#4	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
174		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
175		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
176		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
177		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
178	#5	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
179		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
180		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
181		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
182		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
183	#6	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
184		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
185		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
186		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
187		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)

[0154]

[表32]

表 3 2

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
188	#7	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
189		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
190		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
191		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
192		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
193	#8	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
194		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
195		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
196		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
197		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)
198	#9	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
199		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
200		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
201		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
202		124	F490S_LNA_Mut_7P	(Cy5)TGT+TACT+CTC+CTTTA+CA(BHQ2)

[0155] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／μlとなるように野生型RNA2と変異型RNA F490Sをそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1μlと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15μl、加熱処理済みのSolution A 1.2μl、ROX Reference Dye II (50X) 0.6μl、フォワードプライマー（最終濃度0.2μM）及びリバースプライマー（最終濃度0.2μM）、プローブ（最終濃度0.2μM；野生型RNA検出用または変異型RNA検出用のいずれか）を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30μlの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0156] 上記の組成で、表 3 1 - 1、表 3 1 - 2、表 3 2 記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため 2 連で試験を実施した。

[0157] また、サーマルサイクラーは、Q u a n t S t u d i o（登録商標） 5 リアルタイム P C R システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。R T - P C R 条件は、5 2 ° C 5 分、9 5 ° C 1 0 秒の後、9 5 ° C 5 秒、6 0 ° C 3 0 秒を 1 サイクルとする 4 5 サイクル反応とした。その結果を表 3 3、表 3 4 に示した。

[0158]

[表33]

表 3 3

セット#	プライマー対#	配列番号	鋳型RNA	野生型RNA2		変異型RNAF490S	
			検出目的	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
158	#1	120	野生型 (wild)	33.44	0.28	--	0.00
159		121	野生型	33.47	0.50	--	0.00
160		122	変異型 (mut)	--	0.00	34.00	0.68
161		123	変異型	--	0.00	33.95	0.79
162		124	変異型	--	0.00	35.12	0.48
163	#2	120	野生型	33.44	0.31	--	0.00
164		121	野生型	33.23	0.59	--	0.00
165		122	変異型	--	0.00	33.95	0.72
166		123	変異型	--	0.02	33.83	0.79
167		124	変異型	--	0.00	34.97	0.50
168	#3	120	野生型	33.00	0.27	--	0.00
169		121	野生型	33.08	0.51	--	0.00
170		122	変異型	--	0.00	33.43	0.70
171		123	変異型	--	0.00	33.54	0.73
172		124	変異型	--	0.00	34.69	0.51
173	#4	120	野生型	29.87	0.32	--	0.00
174		121	野生型	29.83	0.55	--	0.00
175		122	変異型	--	0.00	29.54	0.73
176		123	変異型	--	0.00	29.59	0.75
177		124	変異型	--	0.00	31.05	0.52
178	#5	120	野生型	30.00	0.35	--	0.00
179		121	野生型	29.83	0.59	--	0.00
180		122	変異型	--	0.00	29.75	0.85
181		123	変異型	--	0.00	29.73	0.81
182		124	変異型	--	0.00	31.23	0.60
183	#6	120	野生型	29.57	0.32	--	0.00
184		121	野生型	29.74	0.56	--	0.00
185		122	変異型	--	0.00	29.53	0.77
186		123	変異型	--	0.00	29.60	0.83
187		124	変異型	--	0.00	31.02	0.58

[0159]

[表34]

表 3 4

			鋳型RNA	野生型RNA2		変異型RNAF490S	
セット #	プライ マー対 #	配列 番号	検出目的	平均Ct値	平均蛍 光値	平均Ct値	平均蛍光 値
188	#7	120	野生型 (wild)	31.72	0.31	--	0.00
189		121	野生型	31.53	0.49	--	0.00
190		122	変異型 (mut)	--	0.00	31.48	0.67
191		123	変異型	--	0.00	31.39	0.68
192		124	変異型	--	0.00	33.15	0.41
193	#8	120	野生型	32.02	0.26	--	0.00
194		121	野生型	31.89	0.42	--	0.00
195		122	変異型	--	0.00	31.73	0.59
196		123	変異型	--	0.00	31.57	0.62
197		124	変異型	--	0.00	33.51	0.46
198	#9	120	野生型	32.62	0.16	--	0.00
199		121	野生型	31.93	0.37	--	0.00
200		122	変異型	--	0.00	31.60	0.59
201		123	変異型	--	0.00	31.48	0.66
202		124	変異型	--	0.00	32.98	0.41

[0160] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#174、#175、#176、#179、#180、#181、#184、#185、#186の反応は、それぞれ野生型RNA2または変異型RNAF490Sを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号121、122、123のオリゴヌクレオチドはF490S変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0161] 実施例 1 1

F 4 9 0 S 変異株検出用プライマー・プローブ

表 3 5 に示す 4 セットのプライマー・プローブセット # 2 0 3、# 2 0 4、# 2 0 5、# 2 0 6 を構築し、F 4 9 0 S 変異を有する変異型 R N A 検出について試験を行った。プライマー対としては、実施例 1 0 で用意した表 3 0 に記載の # 4 を使用した。これらのセットは野生型 S A R S - C o V - 2 検出用プローブ、変異型 S A R S - C o V - 2 検出用プローブの両方を含む（野生型検出用プローブの名称は「W」を、変異型検出用プローブの名称は「M」をそれぞれ含む）。野生型 R N A 検出用プローブは 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識し、変異型 R N A 検出用プローブは 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。R T - P C R 反応液は、2 種のプローブを含む他は実施例 1 0 と同様に調製し、反応確認を行った。試験検体としては、野生型 R N A 2 または変異型 R N A F 4 9 0 S を使用し、それぞれ R N a s e F r e e H₂O に終濃度が 5 0 0 0 コピー／ μ l、5 0 0 コピー／ μ l、5 0 コピー／ μ l、5 コピー／ μ l となるように系列希釈した溶液を調製した。またネガティブコントロールとしては R N a s e F r e e H₂O を用意した。さらに、R T - P C R 条件は、5 2℃ 5 分、9 5℃ 1 0 秒の後、9 5℃ 5 秒、5 8℃ 3 0 秒を 1 サイクルとする 4 5 サイクル反応とした。その結果を表 3 6 に示した。

[0162]

[表35]

表 3 5

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
203	# 4	120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
204		120	F490S_LNA_Wild_2P	(FAM)T+GT+TA+CT+TT+C+CT(BHQ1)
		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)
205		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
		122	F490S_LNA_Mut_1P	(Cy5)T+TAATT+GT+TA+CT+CT+CC(BHQ2)
206		121	F490S_LNA_Wild_4P	(FAM)A+CT+TT+C+CT+T+TA+C(BHQ1)
		123	F490S_LNA_Mut_2P	(Cy5)TAAT+TGT+TA+CT+CTC+CT(BHQ2)

[0163] [表36]

表 3 6

セット#	鋳型RNA	野生型RNA(FAM)		変異型RNA F490S(Cy5)	
	鋳型濃度 (コピー/反応)	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
203	50	37.48	0.21	37.28	0.70
	500	33.95	0.27	34.43	0.73
	5000	30.77	0.26	30.75	0.75
204	50	37.97	0.20	37.42	0.72
	500	34.17	0.26	35.03	0.74
	5000	30.87	0.26	30.63	0.77
205	50	37.59	0.38	37.91	0.53
	500	33.94	0.56	33.98	0.72
	5000	30.58	0.55	30.45	0.71
206	50	37.66	0.40	37.23	0.58
	500	34.07	0.49	34.01	0.72
	5000	30.62	0.49	30.72	0.72

[0164] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#204、#205、#206の反応は、それぞれ野生型RNA2または変異型RNA F490Sを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号122、123のオリゴヌクレオチドはF490S変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0165] 実施例12

L452Q、R変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるL452Q変異株、L452R変異株の検出について検討した。まず、配列番号125～130のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、表37のプライマー対#1～#3とした。次に、これらのプライマー対と、表38に記載した、配列中にLNAを含む3種のプローブ（名称に「W」を含む野生型SARS-CoV-2検出用、名称に「Q」を含むL452Q変異検出用および名称に「M4、M6またはM7」を含むL452R変異検出用）で構成される#207～#236のセットをそれぞれ構築した。野生型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。またL452R変異検出用のプローブの5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。またL452Q変異検出用のプローブの5'末端をHEX、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。

[0166] また試験用の検体として、実施例10に使用された野生型RNA2、実施例6に使用された変異型RNA452、変異型（L452Q）SARS-CoV-2ウイルスゲノムRNAの配列を有する合成一本鎖RNA（L452Q__RNA__CONTROL__RNA__Mut：配列番号134）をそれぞれ使用した。配列番号134のRNAは、その塩基配列に対応する二本鎖D

NAを組み込んだプラスミドDNAを構築し、これを鋳型とした *in vitro* の転写反応を実施して調製した。このRNAを本明細書中では変異型RNA L452Qと記載する。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0167] [表37]

表 3 7

プライマー対 #	配列番号	プライマー名	配列(5' -3')
#1	125	L452Q-F1	GGCTGCGTTATAGCTTGAA
	126	L452Q-R1	CGGCCTGATAGATTTTCAGTTGAA
#2	127	L452Q-F2	CAGGCTGCGTTATAGCTTGG
	128	L452Q-R2	CCGGCCTGATAGATTTTCAGTTG
#3	129	L452Q-F3	GCTGCGTTATAGCTTGAA
	130	L452Q-R3	GGCCTGATAGATTTTCAGTTGAA

[0168]

[表38]

表 3 8

セット#	プライマ ー対#	配列 番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
207	#1	131	L452Q-LNA-Mut-1	(HEX)A+AT+TAC+C+A+GTAT+A+GA(BHQ1)
208		132	L452Q-LNA-Mut-2	(HEX)ATTA+C+C+A+GTA+T+AG(BHQ1)
209		133	L452Q-LNA-Mut-3	(HEX)A+T+TAC+C+A+G+TA+TA+G(BHQ1)
210		71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
211		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
212		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
213		72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
214		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
215		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
216		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)
217	#2	131	L452Q-LNA-Mut-1	(HEX)A+AT+TAC+C+A+GTAT+A+GA(BHQ1)
218		132	L452Q-LNA-Mut-2	(HEX)ATTA+C+C+A+GTA+T+AG(BHQ1)
219		133	L452Q-LNA-Mut-3	(HEX)A+T+TAC+C+A+G+TA+TA+G(BHQ1)
220		71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
221		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
222		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
223		72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
224		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
225		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
226		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)
227	#3	131	L452Q-LNA-Mut-1	(HEX)A+AT+TAC+C+A+GTAT+A+GA(BHQ1)
228		132	L452Q-LNA-Mut-2	(HEX)ATTA+C+C+A+GTA+T+AG(BHQ1)
229		133	L452Q-LNA-Mut-3	(HEX)A+T+TAC+C+A+G+TA+TA+G(BHQ1)
230		71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
231		82	L452R-LNA-M6	(Cy5)TAATTA+C+C+GGT+ATA+G+AT(BHQ2)
232		83	L452R-LNA-M7	(Cy5)TA+ATTAC+C+G+GTATA+G+ATT(BHQ2)
233		72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
234		73	L452R-LNA-W2	(FAM)TAA+TTA+C+C+TGTA+TA+GAT(BHQ1)
235		86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
236		87	L452R-LNA-W5	(FAM)TA+CC+T+GTA+TAG+ATT+GT+TTA(BHQ1)

[0169] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μlとなるように野生型RNA2、変異型RNA452、変異型RNAL452Qをそれぞれ

れ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ社製、製品#RC300A) のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液 1 μ l と酵素・基質等を含む RT-qPCR Mix 15 μ l、加熱処理済みの Solution A 1.2 μ l、ROX Reference Dye II (50X) 0.6 μ l、フォワードプライマー (最終濃度 0.2 μ M) 及びリバープライマー (最終濃度 0.2 μ M)、プローブ (最終濃度 0.2 μ M; 野生型 RNA 検出用または変異型 RNA 検出用のいずれか) を混合し、RNase Free H₂O で、最終容量 30 μ l の 1 ステップ RT-PCR 反応液を調製した。

[0170] 上記の組成で、表 38 記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため 2 連で試験を実施した。

[0171] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio (登録商標) 5 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いた。RT-PCR 条件は、52℃ 5 分、95℃ 10 秒の後、95℃ 5 秒、60℃ 30 秒を 1 サイクルとする 45 サイクル反応とした。その結果を表 39-1 及び表 39-2 に示した。

[0172]

[表39-1]

表 3 9 - 1

	鋳型RNA	野生型RNA2		変異型RNA452		変異型RNAL452Q	
セット#	検出目標	平均Ct 値	平均蛍 光値	平均Ct 値	平均蛍 光値	平均Ct 値	平均蛍 光値
207	L452Q変異型 (mut)	--	0.00	--	0.00	28.69	0.27
208	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.63	0.14
209	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.82	0.26
210	L452R変異型 (mut)	--	0.00	29.26	0.29	--	0.00
211	L452R変異型	--	0.00	29.48	0.21	--	0.00
212	L452R変異型	--	0.00	29.36	0.44	--	0.00
213	野生型 (Wild)	29.01	0.22	--	0.00	--	0.00
214	野生型	28.87	0.69	--	0.00	--	0.00
215	野生型	29.15	0.36	--	0.00	--	0.00
216	野生型	28.70	0.96	--	0.00	--	0.00
217	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.75	0.23
218	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.84	0.15
219	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	29.05	0.27
220	L452R変異型	--	0.00	29.49	0.23	--	0.00

[0173]

[表39-2]

表 3 9 - 2

セット#	鋳型RNA	野生型RNA2		変異型RNA452		変異型RNAL452Q	
	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
221	L452R変異型	--	0.00	29.53	0.20	--	0.00
222	L452R変異型	--	0.00	29.47	0.43	--	0.00
223	野生型	29.00	0.12	--	0.00	--	0.00
224	野生型	28.94	0.57	--	0.00	--	0.00
225	野生型	29.24	0.30	--	0.00	--	0.00
226	野生型	28.81	0.90	--	0.00	--	0.00
227	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.64	0.20
228	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.57	0.13
229	L452Q変異型	--	0.00	--	0.00	28.76	0.26
230	L452R変異型	--	0.00	29.52	0.30	--	0.00
231	L452R変異型	--	0.00	29.41	0.21	--	0.00
232	L452R変異型	--	0.00	29.10	0.51	--	0.00
233	野生型	28.92	0.15	--	0.00	--	0.00
234	野生型	28.83	0.61	--	0.00	--	0.00
235	野生型	29.09	0.59	--	0.00	--	0.00
236	野生型	28.63	0.95	--	0.00	--	0.00

[0174] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#207、#210、#213、#217、#220、#223、#227、#230、#233の反応は、野生型RNA2、変異型RNA452、変異型RNAL452Qを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号131、71、72のオリゴヌクレオチドは変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0175] 実施例13

L452Q、R変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるL 4 5 2 Q変異株、L 4 5 2 R変異株の検出について検討した。まず、実施例12で用意した表37に記載のプライマー対#1と、表40に記載した、配列中にLNAを含む3種のプローブ（名称に「W」を含む野生型SARS-CoV-2検出用、名称に「Q」を含むL 4 5 2 Q変異検出用およびL 4 5 2 R変異検出用のL 4 5 2 R-LNA-M4）で構成される#237～#242のセットをそれぞれ構築した。野生型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。またL 4 5 2 R変異検出用のプローブの5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。またL 4 5 2 Q変異検出用のプローブの5'末端をHEX、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。

[0176] また試験用の検体として、実施例12に使用された野生型RNA2、変異型RNA452、変異型RNAL452Qをそれぞれ使用した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0177]

[表40]

表 4 0

セット#	プライマー対#	濃度	配列番号	プローブ名	配列(5' -3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
237	# 1	2X	72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
		2X	131	L452Q-LNA-Mut-1	(HEX)A+AT+TAC+C+A+GTAT+A+GA(BHQ1))
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
238		2X	72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
		2X	132	L452Q-LNA-Mut-2	(HEX)ATTA+C+C+A+GTA+T+AG(BHQ1)
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
239		2X	72	L452R-LNA-W1	(FAM)A+ATTA+C+C+TGTA+TA+GA(BHQ1)
		2X	133	L452Q-LNA-Mut-3	(HEX)A+T+TAC+C+A+G+TA+TA+G(BHQ1)
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
240		1X	86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
		2X	131	L452Q-LNA-Mut-1	(HEX)A+AT+TAC+C+A+GTAT+A+GA(BHQ1))
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
241		1X	86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
		2X	132	L452Q-LNA-Mut-2	(HEX)ATTA+C+C+A+GTA+T+AG(BHQ1)
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)
242		1X	86	L452R-LNA-W4	(FAM)C+C+T+GT+ATA+GATT+GTTTA+G(BHQ1)
		2X	133	L452Q-LNA-Mut-3	(HEX)A+T+TAC+C+A+G+TA+TA+G(BHQ1)
		2X	71	L452R-LNA-M4	(Cy5)TAATTAC+C+G+GT+ATA+G+AT(BHQ2)

[0178] RNase Free H₂Oに50コピー/μl、500コピー/μl、5000コピー/μlとなるように野生型RNA2、変異型RNA452、

変異型RNA L452Qのそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1 μ lと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15 μ l、加熱処理済みのSolution A 1.2 μ l、ROX Reference Dye II (50X) 0.6 μ l、フォワードプライマー（最終濃度0.8 μ M）及びリバースプライマー（最終濃度0.8 μ M）、3種のプローブ（それぞれ最終濃度0.2 μ M（1×）、または0.4 μ M（2×））を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0179] 上記の組成で、表40記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0180] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標）5リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、58℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表41に示した。

[0181]

[表41]

表 4 1

セット #	鋳型濃度 (コピー /反応)	野生型RNA2		変異型RNA452		変異型RNAL452Q	
		平均Ct 値	平均蛍 光値	平均Ct 値	平均蛍 光値	平均Ct 値	平均蛍 光値
237	50	38.55	0.97	37.89	0.64	37.78	0.59
	500	35.22	1.40	34.50	0.82	34.00	0.84
	5000	31.81	1.73	31.56	0.95	30.79	0.94
238	50	38.33	0.98	38.56	0.59	37.80	0.39
	500	35.19	1.28	34.92	0.78	34.59	0.51
	5000	31.92	1.52	31.47	0.90	31.28	0.62
239	50	39.27	0.91	38.25	0.57	37.67	0.47
	500	35.22	1.50	35.01	0.76	34.24	0.65
	5000	32.07	1.83	31.60	0.88	30.96	0.76
240	50	38.34	1.20	38.56	0.63	37.31	0.66
	500	35.02	1.58	34.69	0.81	34.29	0.81
	5000	31.98	1.79	31.45	0.93	30.88	0.92
241	50	38.59	1.18	38.09	0.66	38.30	0.38
	500	35.41	1.66	34.80	0.88	34.55	0.58
	5000	32.09	2.02	31.19	1.02	31.21	0.69
242	50	38.88	1.09	38.57	0.56	37.47	0.52
	500	36.05	1.39	35.22	0.72	34.46	0.65
	5000	32.44	1.67	31.75	0.84	31.16	0.77

[0182] 結果

検討の結果、野生型RNA2、変異型RNA452、変異型RNAL452Qを同時検出するマルチプレックスRT-PCR系は、野生型、変異型（L452RまたはL452Q）のRNAをそれぞれ検出できており、当該反応液を用いてL452位のタイピング、すなわち野生型（L）、R、またはQの判別が可能であることが示された。また#237、#238は特に良好な結果を示した。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0183] 実施例 1 4

P 6 8 1 H、R 変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法による P 6 8 1 H 変異株、P 6 8 1 R 変異株の検出について検討した。まず、配列番号 1 3 9 ~ 1 4 6 のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、そのうちから 2 組のプライマー対を選び # 1 ~ 2 として表 4 2 に記載した。次に、これらのプライマー対と、表 4 3 に記載した、配列中に L N A を含む計 1 5 種のプローブ（名称に「W」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「H」を含む P 6 8 1 H 変異検出用および名称に「R」を含む P 6 8 1 R 変異検出用）で構成される # 2 4 5 ~ 2 7 4 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また P 6 8 1 H 変異検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。また P 6 8 1 R 変異検出用のプローブの 5' 末端を H E X、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。

[0184] また試験用の検体として、S A R S - C o V - 2 ウイルスゲノムのスパイクタンパク領域配列を有する野生型の 1 本鎖 R N A（配列番号 1 6 4）と P 6 8 1 H 及び P 6 8 1 R に対応する変異を有する 1 本鎖 R N A を各種用意した。野生型の 1 本鎖 R N A は、その塩基配列に対応する二本鎖 D N A を人工合成してプラスミド p V A X 1 のマルチクローニングサイト（N h e I - X b a I）に既知の手法で挿入した後、この組換えプラスミドを鋳型とした *i n v i t r o* の転写反応によって調製した。また P 6 8 1 H 変異（6 8 1 番目のプロリンに対応するコドンである C C T が C A T に変換されている）及び P 6 8 1 R 変異（6 8 1 番目のプロリンに対応するコドンである C C T が C G T に変換されている）を有する R N A は、配列番号 1 6 4 の D N A にそれぞれの変異を導入したうえ、野生型 R N A と同様の方法により調製した。これらの R N A を本明細書中では野生型 R N A P 6 8 1、変異型 R N A P 6 8 1 H、変異型 R N A P 6 8 1 R と記載する。またネガティブコント

ロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0185] [表42]

表 4 2

プライマー対#	配列番号	プライマー名	配列 (5' -3')
#1	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	143	P681_R1	GCACCAAGTGACATAGTGTAGG
#2	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	145	P681_R3	GATGGATTGACTAGCTACACTAC

[0186] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／ μ lとなるように野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rをそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ社製、製品#RC300A)のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1 μ lと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15 μ l、加熱処理済みのSolution A 1.2 μ l、ROX Reference Dye II (50X) 0.6 μ l、フォワードプライマー (最終濃度0.2 μ M) 及びリバースプライマー (最終濃度0.2 μ M)、プローブ (最終濃度0.2 μ M; 野生型RNA検出用または変異型RNA検出用のいずれか) を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0187] 上記の組成で、表43記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製し試験を実施した。

[0188]

[表43]

表 4 3

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列 (5' -3')※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
245	#1	147	P681-Wild-LNA-1	(FAM) CGCCG+A+GGAG+AAT (BHQ1)
246		148	P681-Wild-LNA-5	(FAM) CGCCG+A+G+GAGAA (BHQ1)
247		149	P681-Wild-LNA-6	(FAM) CCGCCGA+GGAG+AA (BHQ1)
248		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM) CCGCCG+A+GGAGA (BHQ1)
249		151	P681-Wild-LNA-10	(FAM) CGCCG+A+G+GAGA (BHQ1)
250		152	P681H-Mut-LNA-1	(Cy5) CGC+CGA+T+GAGAA (BHQ2)
251		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5) C+C+G+A+T+GAG+AA (BHQ2)
252		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5) C+CG+A+T+GA+G+AATT (BHQ2)
253		155	P681H-Mut-LNA-8	(Cy5) C+C+G+A+T+GA+GA (BHQ2)
254		156	P681H-Mut-LNA-9	(Cy5) CGC+CG+A+T+GAGA (BHQ2)
255		157	P681R-Mut-LNA-2	(HEX) CG+CCGA+CGAGAAT (BHQ1)
256		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX) CCG+CCGA+CGAGA (BHQ1)
257		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX) CCGCCG+A+C+GAG (BHQ1)
258		160	P681R-Mut-LNA-8	(HEX) CCGCCGA+CGAGAATT (BHQ1)
259		161	P681R-Mut-LNA-9	(HEX) CCGCCGA+CGAG+AA (BHQ1)
260	#2	147	P681-Wild-LNA-1	(FAM) CGCCG+A+GGAG+AAT (BHQ1)
261		148	P681-Wild-LNA-5	(FAM) CGCCG+A+G+GAGAA (BHQ1)
262		149	P681-Wild-LNA-6	(FAM) CCGCCGA+GGAG+AA (BHQ1)
263		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM) CCGCCG+A+GGAGA (BHQ1)
264		151	P681-Wild-LNA-10	(FAM) CGCCG+A+G+GAGA (BHQ1)
265		152	P681H-Mut-LNA-1	(Cy5) CGC+CGA+T+GAGAA (BHQ2)
266		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5) C+C+G+A+T+GAG+AA (BHQ2)
267		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5) C+CG+A+T+GA+G+AATT (BHQ2)
268		155	P681H-Mut-LNA-8	(Cy5) C+C+G+A+T+GA+GA (BHQ2)
269		156	P681H-Mut-LNA-9	(Cy5) CGC+CG+A+T+GAGA (BHQ2)
270		157	P681R-Mut-LNA-2	(HEX) CG+CCGA+CGAGAAT (BHQ1)
271		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX) CCG+CCGA+CGAGA (BHQ1)
272		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX) CCGCCG+A+C+GAG (BHQ1)
273		160	P681R-Mut-LNA-8	(HEX) CCGCCGA+CGAGAATT (BHQ1)
274		161	P681R-Mut-LNA-9	(HEX) CCGCCGA+CGAG+AA (BHQ1)

[0189] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio（登録商標） 5 リアルタイムPCRシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いた。RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表44に示した。

[0190] [表44]

表 4 4

セ ット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	検出目的	CT値	蛍光値	CT値	蛍光値	CT値	蛍光値
245	wild	30.12	0.29	—	—	—	—
246		30.39	0.32	—	—	—	—
247		30.93	0.67	—	—	—	—
248		30.10	1.14	—	—	—	—
249		30.81	0.17	—	—	—	—
250	P681H	—	—	31.87	0.11	—	—
251		—	—	30.30	0.31	—	—
252		—	—	30.40	0.53	—	—
253		—	—	31.37	0.09	—	—
254		—	—	32.51	0.15	—	—
255	P681R	—	—	—	—	29.41	0.31
256		—	—	—	—	29.34	0.75
257		—	—	—	—	29.01	0.46
258		—	—	—	—	29.41	0.40
259		—	—	—	—	30.36	0.50
260	wild	30.03	0.33	—	—	—	—
261		30.41	0.37	—	—	—	—
262		29.78	0.45	—	—	—	—
263		29.83	0.88	—	—	—	—
264		31.29	0.23	—	—	—	—
265	P681H	—	—	30.79	0.14	—	—
266		—	—	30.02	0.32	—	—
267		—	—	30.04	0.67	—	—
268		—	—	30.15	0.11	—	—
269		—	—	30.85	0.15	—	—
270	P681R	—	—	—	—	29.05	0.14
271		—	—	—	—	28.82	0.32
272		—	—	—	—	28.67	0.67
273		—	—	—	—	28.86	0.11
274		—	—	—	—	29.17	0.15

[0191] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#248、#251、#252、#256、#257、#262、#263、#266、#267、#271、#

272の反応は、野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号149、150、153、154、158、159のオリゴヌクレオチドは変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0192] 実施例15

P681H、R 変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるP681H変異株、P681R変異株の検出について検討した。まず、実施例14で合成した配列番号139～146のフォワードプライマーおよびリバースプライマーで表45のプライマー対を作成した。

[0193]

[表45]

表 4 5

プライマ ー対#	配列番号	プライマー名	配列 (5' -3')
#1	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	143	P681_R1	GCACCAAGTGACATAGTGTAGG
#2	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	144	P681_R2	AGGCAATGATGGATTGACTAGC
#3	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	145	P681_R3	GATGGATTGACTAGCTACACTAC
#4	139	P681_F2	ACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
	146	P681_R4	CCAAGTGACATAGTGTAGGCAATG
#5	140	P681_F3	GTGCAGGTATATGCGCTAG
	143	P681_R1	GCACCAAGTGACATAGTGTAGG
#6	140	P681_F3	GTGCAGGTATATGCGCTAG
	144	P681_R2	AGGCAATGATGGATTGACTAGC
#7	140	P681_F3	GTGCAGGTATATGCGCTAG
	145	P681_R3	GATGGATTGACTAGCTACACTAC
#8	140	P681_F3	GTGCAGGTATATGCGCTAG
	146	P681_R4	CCAAGTGACATAGTGTAGGCAATG
#9	141	P681_F4	CGTGCAGGCTGTTTAATAGGG
	143	P681_R1	GCACCAAGTGACATAGTGTAGG
#10	141	P681_F4	CGTGCAGGCTGTTTAATAGGG
	144	P681_R2	AGGCAATGATGGATTGACTAGC
#11	141	P681_F4	CGTGCAGGCTGTTTAATAGGG
	145	P681_R3	GATGGATTGACTAGCTACACTAC
#12	141	P681_F4	CGTGCAGGCTGTTTAATAGGG
	146	P681_R4	CCAAGTGACATAGTGTAGGCAATG
#13	142	P681_F5	TGCGCTAGTTATCAGACTCAGA
	143	P681_R1	GCACCAAGTGACATAGTGTAGG
#14	142	P681_F5	TGCGCTAGTTATCAGACTCAGA
	144	P681_R2	AGGCAATGATGGATTGACTAGC
#15	142	P681_F5	TGCGCTAGTTATCAGACTCAGA
	145	P681_R3	GATGGATTGACTAGCTACACTAC
#16	142	P681_F5	TGCGCTAGTTATCAGACTCAGA
	146	P681_R4	CCAAGTGACATAGTGTAGGCAATG

[0194] 次にこれらのプライマー対と実施例 1 4 で作製した蛍光標識プローブ（名称に「W」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「H」を含む P 6 8 1 H 変異検出用および名称に「R」を含む P 6 8 1 R 変異検出用）から選択されたプローブで構成される # 2 7 5 ~ 3 7 0 のセットをそれぞれ構

築した。

[0195] [表46]

表 4 6

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+ C) は LNA
275	#1	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
276		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
277		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
278		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
279		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
280		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
281	#2	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
282		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
283		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
284		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
285		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
286		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
287	#3	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
288		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
289		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
290		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
291		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
292		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
293	#4	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
294		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
295		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
296		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
297		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
298		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
299	#5	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
300		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
301		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
302		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
303		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
304		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)

[0196]

[表47]

表 4 7

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
305	#6	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
306		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
307		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
308		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
309		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
310		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
311	#7	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
312		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
313		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
314		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
315		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
316		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
317	#8	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
318		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
319		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
320		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
321		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
322		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
323	#9	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
324		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
325		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
326		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
327		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
328		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
329	#10	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
330		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
331		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
332		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
333		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
334		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)

[0197]

[表48-1]

表 4 8 - 1

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+ C) はLNA
335	#11	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
336		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
337		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
338		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
339		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
340		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
341	#12	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
342		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
343		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
344		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
345		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
346		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
347	#13	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
348		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
349		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
350		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
351		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
352		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)

[0198]

[表48-2]

表 4 8 - 2

セット #	プライマー対 #	配列番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
353	#14	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
354		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
355		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
356		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
357		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
358		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
359	#15	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
360		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
361		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
362		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
363		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
364		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)
365	#16	149	P681-Wild-LNA-6	(FAM)CCGCCGA+GGAG+AA(BHQ1)
366		150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
367		153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
368		154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ2)
369		158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
370		159	P681R-Mut-LNA-7	(HEX)CCGCCG+A+C+GAG(BHQ1)

[0199] RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／μlとなるように野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rをそれぞれ添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1μlと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15μl、加熱処理済みのSolution A 1.2μl、ROX Reference Dye II (50X) 0.6μl、フォワードプライマー（最終濃度0.2μM）及びリバープライマー（最終濃度0.2μM）、プローブ（最終濃度0.2μM；野生型RNA検出用または変異型RNA検出用のいずれか）を混合し、RNA

se Free H₂Oで、最終容量30 μ lの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0200] また試験用の検体として、実施例14に使用された野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rをそれぞれ使用した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0201] 上記の組成で、表46、47、48-1及び48-2に記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0202] 実施例14と同じサーマルサイクラー、RT-PCR条件で反応を実施した。その結果を表49、50、51、52に示した。

[0203]

[表49]

表 4 9

セ ット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	検出目的	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値
275	野生型 (wild)	31.08	0.73	-	-	-	-
276		30.28	1.24	-	-	-	-
277	P681H	-	-	29.12	0.36	-	-
278	変異型 (mut)	-	-	28.91	0.69	-	-
279	P681R	-	-	-	-	29.32	0.68
280	変異型	-	-	-	-	29.33	0.52
281	野生型	31.61	0.46	-	-	-	-
282		30.87	0.92	-	-	-	-
283	P681H	-	-	29.95	0.30	-	-
284	変異型	-	-	30.11	0.62	-	-
285	P681R	-	-	-	-	32.17	0.42
286	変異型	-	-	-	-	30.39	0.35
287	野生型	30.31	0.58	-	-	-	-
288		30.11	1.02	-	-	-	-
289	P681H	-	-	29.02	0.40	-	-
290	変異型	-	-	33.93	0.72	-	-
291	P681R	-	-	-	-	29.01	0.48
292	変異型	-	-	-	-	29.04	0.35
293	野生型	31.92	0.55	-	-	-	-
294		30.84	1.00	-	-	-	-
295	P681H	-	-	30.86	0.42	-	-
296	変異型	-	-	31.21	0.74	-	-
297	P681R	-	-	-	-	30.43	0.51
298	変異型	-	-	-	-	29.90	0.34
299	野生型	31.31	0.59	-	-	-	-
300		30.29	1.02	-	-	-	-
301	P681H	-	-	28.93	0.38	-	-
302	変異型	-	-	28.81	0.70	-	-
303	P681R	-	-	-	-	28.99	0.62
304	変異型	-	-	-	-	28.89	0.35

[0204]

[表50]

表 5 0

セ ット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	検出目的	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値
305	野生型 (wild)	27.78	0.06	-	-	-	-
306		27.96	0.18	-	-	-	-
307	P681H	-	-	26.99	0.07	-	-
308	変異型 (mut)	-	-	27.22	0.10	-	-
309	P681R	-	-	-	-	28.47	0.06
310	変異型	-	-	-	-	27.93	0.10
311	野生型	31.22	0.54	-	-	-	-
312		30.41	0.97	-	-	-	-
313	P681H変 異型	-	-	28.87	0.44	-	-
314		-	-	28.74	0.79	-	-
315	P681R	-	-	-	-	28.63	0.45
316	変異型	-	-	-	-	28.99	0.36
317	野生型	32.16	0.46	-	-	-	-
318		30.86	0.87	-	-	-	-
319	P681H	-	-	30.31	0.36	-	-
320	変異型	-	-	30.80	0.72	-	-
321	P681R変 異型	-	-	-	-	29.78	0.48
322		-	-	-	-	29.54	0.36

[0205]

[表51]

表 5 1

セ ット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	検出目的	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値	平均 CT値	平均 蛍光値
323	野生型 (wild)	30.77	0.67	—	—	—	—
324		29.97	1.06	—	—	—	—
325	P681H 変異型 (mut)	—	—	28.94	0.32	—	—
326		—	—	28.73	0.62	—	—
327	P681R	—	—	—	—	28.97	0.56
328	変異型	—	—	—	—	28.80	0.36
329	野生型	31.53	0.44	—	—	—	—
330		30.88	0.86	—	—	—	—
331	P681H	—	—	30.07	0.33	—	—
332	変異型	—	—	30.09	0.57	—	—
333	P681R	—	—	—	—	32.14	0.44
334	変異型	—	—	—	—	30.35	0.35
335	野生型	30.44	0.59	—	—	—	—
336		30.18	1.05	—	—	—	—
337	P681H	—	—	29.03	0.37	—	—
338	変異型	—	—	28.87	0.68	—	—
339	P681R	—	—	—	—	28.89	0.48
340	変異型	—	—	—	—	28.96	0.33
341	野生型	32.03	0.55	—	—	—	—
342		30.88	0.95	—	—	—	—
343	P681H	—	—	30.48	0.36	—	—
344	変異型	—	—	30.97	0.62	—	—
345	P681R	—	—	—	—	30.15	0.51
346	変異型	—	—	—	—	29.79	0.34
347	野生型	31.61	0.62	—	—	—	—
348		30.12	1.01	—	—	—	—
349	P681H	—	—	28.92	0.37	—	—
350	変異型	—	—	28.68	0.69	—	—
351	P681R	—	—	—	—	28.89	0.65
352	変異型	—	—	—	—	28.59	0.36

[0206]

[表52]

表 5 2

セット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	検出目的	平均CT値	平均蛍光値	平均CT値	平均蛍光値	平均CT値	平均蛍光値
353	野生型 (wild)	31.33	0.37	-	-	-	-
354		29.99	0.60	-	-	-	-
355	P681H	-	-	29.49	0.28	-	-
356	変異型 (mut)	-	-	29.46	0.54	-	-
357	P681R	-	-	-	-	31.00	0.38
358	変異型	-	-	-	-	29.54	0.33
359	野生型	30.97	0.50	-	-	-	-
360		29.98	0.91	-	-	-	-
361	P681H	-	-	28.94	0.41	-	-
362	変異型	-	-	28.41	0.67	-	-
363	P681R	-	-	-	-	28.58	0.44
364	変異型	-	-	-	-	28.62	0.34
365	野生型	32.30	0.42	-	-	-	-
366		30.67	0.88	-	-	-	-
367	P681H	-	-	30.19	0.36	-	-
368	変異型	-	-	30.40	0.69	-	-
369	P681R	-	-	-	-	29.69	0.51
370	変異型	-	-	-	-	29.19	0.33

[0207] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#275、#276、#287、#288、#323、#324、#335、#336の反応は、野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。実施例14同様に、配列番号153、154、158、159のオリゴヌクレオチドは変異における一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0208] 実施例16

P681位のタイピング

本発明の検出方法によるP681位のタイピングについて検討した。まず、実施例15で用意した表45に記載のプライマー対#9と、実施例14で作製したプローブ(P681-Wild-LNA-7、P681H-Mut-LNA-6またはP681H-Mut-LNA-7、P681R-Mut-LNA-6)で構成される#371~373のセットをそれぞれ構築した。

[0209] また試験用の検体として、実施例14に使用された野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rをそれぞれ使用した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0210] RNase Free H₂Oに50コピー/μl、500コピー/μl、5000コピー/μlとなるように野生型RNA2、変異型RNA452、変異型RNAL452Qのそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ社製、製品#RC300A)のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1μlと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15μl、加熱処理済みのSolution A 1.2μl、ROX Reference Dye II (50X) 0.6μl、フォワードプライマー(最終濃度0.8μM)及びリバースプライマー(最終濃度0.8μM)、3種のプローブ(それぞれ最終濃度0.2μM(1×)、または0.4μM(2×))を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30μlの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0211] 上記の組成で、表53記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0212]

[表53]

表 5 3

セット #	プライマ ー対#	プロー ブ濃 度	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
371	#9	× 1	150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
		× 1	153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
		× 1	158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
372		× 1	150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
		× 2	153	P681H-Mut-LNA-6	(Cy5)C+C+G+A+T+GAG+AA(BHQ2)
		× 1	158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)
373		× 1	150	P681-Wild-LNA-7	(FAM)CCGCCG+A+GGAGA(BHQ1)
		× 1	154	P681H-Mut-LNA-7	(Cy5)C+CG+A+T+GA+G+AATT(BHQ 2)
		× 1	158	P681R-Mut-LNA-6	(HEX)CCG+CCGA+CGAGA(BHQ1)

[0213] 実施例 1 4 と同じサーマルサイクラー、RT-PCR 条件で反応を実施した。その結果を表 5 4 に示した。

[0214] [表54]

表 5 4

セット #	鋳型RNA	野生型RNAP681		変異型RNAP681H		変異型RNAP681R	
	鋳型濃度 (コピー/反応)	平均 Ct値	平均 蛍光値	平均 Ct値	平均 蛍光値	平均 Ct値	平均 蛍光値
371	5	39.84	0.39	39.52	0.16	39.32	0.33
	50	37.18	0.65	36.59	0.19	35.92	0.45
	500	33.53	0.77	32.88	0.25	32.75	0.55
	5000	30.27	0.77	29.65	0.24	29.30	0.62
372	5	38.58	0.22	40.97	0.06	40.49	0.12
	50	36.72	0.63	36.07	0.32	36.59	0.44
	500	33.60	0.77	33.03	0.35	32.81	0.53
	5000	30.26	0.77	29.63	0.35	29.46	0.56
373	5	40.69	0.28	40.21	0.27	39.47	0.15
	50	36.72	0.59	36.60	0.44	36.10	0.40
	500	33.57	0.73	32.95	0.47	33.00	0.49
	5000	30.28	0.72	29.67	0.48	29.18	0.64

[0215] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#371、#372の反応は、野生型RNAP681、変異型RNAP681H、変異型RNAP681Rを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号153、154、158のオリゴヌクレオチドはP681位の一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0216] 実施例17

E484A変異検出用プライマー・プローブ

まず、配列番号165～167のプローブを合成した。次に実施例2で使ったプライマー・プローブと組み合わせて表55に示すプライマー・プローブセット#374、#375、#376を構築し、E484A変異を有する変異型RNA検出について試験を行った。これらのセットは野生型SARS-CoV-2検出用プローブ、変異型SARS-CoV-2検出用プローブの両方を含む（野生型検出用プローブの名称は「W」を、変異型検出用プローブの名称は「Mut」をそれぞれ含む）。野生型RNA検出用プローブは5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識し、変異型RNA検出用プローブは5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0217]

[表55]

表 5 5

セット#	配列番号	プライマー・プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) は LNA
374	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3 (TBD)	(FAM) A+TG+GTG+TT+GAA+GG (BHQ1)
	165	E484A-Mut-LNA-1	(Cy5) TGG+TGTT+G+CAGGTTTT (BHQ2)
375	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3 (TBD)	(FAM) A+TG+GTG+TT+GAA+GG (BHQ1)
	166	E484A-Mut-LNA-4	(Cy5) ATG+GTGTT+G+CAGGTTT (BHQ2)
376	21	E484K-1F-E484K-2F	TTCAACTGAAATCTATCAGGCCG
	25	E484K-2R	TGGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAA
	40	E484K-LNA-W3 (TBD)	(FAM) A+TG+GTG+TT+GAA+GG (BHQ1)
	167	E484A-Mut-LNA-5	(Cy5) AAT+GGTGT+G+CAGGTT (BHQ2)

[0218] 試験用の検体として、SARS-CoV-2 ウイルスゲノムのスパイクタンパク領域配列を有する野生型の1本鎖RNA（配列番号248）と現在オミクロン株について報告されている変異、A67V、H69del、V70del、T95I、G142D、V143del、Y144del、Y145del、N211del、L212I、ins214EPE、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493R、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969K、L981F、に対応するすべての変異を有する1本鎖RNA（配列番号249）を用意した（なお、delは当該アミノ酸の欠失を、ins214EPEはR214とD215の間への3アミノ酸の挿入を、それぞれ意味する）。これらの1本鎖RNAは、その塩基配列に対応する二本鎖DNAを人工合成してプラスミドpVAX1のマルチクローニングサイ

ト (Nhe I-Xba I) に既知の手法で挿入した後、この組換えプラスミドを鋳型とした *in vitro* の転写反応によって調製した。これらの RNA を本明細書中ではオミクロン__野生型 RNA、オミクロン__変異型 RNA と記載する。またネガティブコントロールとしては RNase Free H₂O を用意した。

[0219] RNase Free H₂O に 5000 コピー/ μ l、500 コピー/ μ l、50 コピー/ μ l、5 コピー/ μ l となるようにオミクロン__野生型 RNA、オミクロン__変異型 RNA のそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ社製、製品 # RC300A) のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液 1 μ l と酵素・基質等を含む RT-qPCR Mix 15 μ l、加熱処理済みの Solution A 1.2 μ l、ROX Reference Dye II (50X) 0.6 μ l、フォワードプライマー (最終濃度 0.2 μ M) 及びリバースプライマー (最終濃度 0.2 μ M)、3 種のプローブ (それぞれ最終濃度 0.2 μ M) を混合し、RNase Free H₂O で、最終容量 30 μ l の 1 ステップ RT-PCR 反応液を調製した。

[0220] 上記の組成で、表 55 記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため 2 連で試験を実施した。

[0221] また、サーマルサイクラーは、Quant Studio (登録商標) 5 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いた。RT-PCR 条件は、52℃ 5 分、95℃ 10 秒の後、95℃ 5 秒、60℃ 30 秒を 1 サイクルとする 45 サイクル反応とした。その結果を表 56 に示した。

[0222]

[表56]

表 5 6

鋳型RNA		オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
セット#	鋳型濃度 (コピー/ 反応)	平均Ct値	平均蛍光 値	平均Ct値	平均蛍光 値
374	5	39.68	0.32	39.46	0.40
	50	38.05	0.74	36.00	0.54
	500	33.97	0.90	32.79	0.55
	5000	30.61	0.92	29.35	0.52
375	5	40.32	0.53	39.56	0.36
	50	37.66	0.80	36.14	0.50
	500	34.05	0.89	32.88	0.51
	5000	30.50	0.96	29.51	0.48
376	5	41.34	0.41	38.51	0.46
	50	37.70	0.78	35.80	0.59
	500	34.08	0.89	32.95	0.60
	5000	30.66	0.94	29.39	0.57

[0223] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#374、#376の反応は、オミクロン_野生型RNA、オミクロン_変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号165、167のオリゴヌクレオチドはE484位の一塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0224] 実施例18

i n s 2 1 4 E P E 挿入検出用プライマー・プローブ

まず、配列番号168～179のプライマーとプローブを合成した。次に表57に示すプライマー・プローブセット#377、#378、#379を構築し、i n s 2 1 4 E P E 挿入を有する変異型RNA検出について試験を

行った。これらのセットは野生型SARS-CoV-2検出用プローブ、変異型SARS-CoV-2検出用プローブの両方を含む（野生型検出用プローブの名称は「Wild」を、変異型検出用プローブの名称は「omicron」をそれぞれ含む）。野生型RNA検出用プローブは5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識し、変異型RNA検出用プローブは5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0225] [表57]

表 5 7

セット#	配列番号	プライマー・プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
377	168	D215 insertion F-2	AGGGAATTTGTGTTTAAGAATATTG
	169	D215 insertion R-2	GGCAAATCTACCAATGGTTC
	170	D215 insertion P-omicron-2	(Cy5)ATAGTGCGTGAGCCAGAAGATCTCCC (BHQ2)
	171	D215 insertion P-Wild-2	(FAM)AATTTAGTGCGTGATCTCCCTCAGGGT (BHQ1)
378	172	D215 insertion F-3	TAGGGAATTTGTGTTTAAGAATA
	173	D215 insertion R-3	CTACCAATGGTTCTAAAGC
	174	D215 insertion P-omicron-3	(Cy5)ATTATAGTGCGTGAGCCAGAAGATCTC (BHQ2)
	175	D215 insertion P-Wild-3	(FAM)CGCCTATTAATTTAGTGCGTGATCTCC (BHQ1)
379	176	D215 insertion F-4	GGGAATTTGTGTTTAAGAATATTG
	177	D215 insertion R-4	TGGCAAATCTACCAATGG
	178	D215 insertion P-omicron-4	(Cy5)CGCCTATTATAGTGCGTGAGCCAGAA (BHQ2)
	179	D215 insertion P-Wild-4	(FAM)AAGCACACGCCTATTAATTTAGTGCGTG (BHQ1)

[0226] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン

変異型RNAを使用した。またネガティブコントロールとしてはRNAse Free H₂Oを用意した。

[0227] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表58示した。

[0228] [表58]

表 5 8

	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
セット #	鋳型濃度 (コピー/反応)	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
377	5	40.04	0.67	39.25	0.66
	50	36.67	0.97	35.70	0.89
	500	33.38	1.11	32.48	0.96
	5000	29.87	1.16	29.23	0.95
378	5	--	0.00	--	0.00
	50	42.85	0.14	43.66	0.06
	500	39.43	0.36	39.91	0.22
	5000	36.27	0.52	36.53	0.34
379	5	43.60	0.17	43.27	0.13
	50	40.08	0.52	39.19	0.40
	500	36.27	0.83	35.93	0.54
	5000	33.10	0.96	32.53	0.61

[0229] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#377、#379の反応は、オミクロン_野生型RNA、オミクロン_変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号170、178のオリゴヌクレオチドはins214EPEの挿入を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物

は確認されなかった。

[0230] 実施例 19

S 3 7 1 L 変異検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法による S 3 7 1 L 変異の検出について検討した。まず、配列番号 180～185 のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、プライマー対として表 59 の # 1～3 に記載した。次にこれらのプライマー対と、表 60 に記載した、配列中に L N A を含む計 8 種のプローブ（名称に「W i l d」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「M u t」を含む S 3 7 1 L 変異検出用）で構成される # 380～403 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また S 3 7 1 L 変異検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。

[0231] [表59]

表 5 9

プライマー対#	配列番号	プライマー名	配列(5' -3')
#1	180	G371L-F-1	GGAAGAGAATCAGCAACTG
	181	G371L-R-1	GTAGGAGACACTCCATAACA
#2	182	G371L-F-2	CTTGGAACAGGAAGAGAATCA
	183	G371L-R-2	GTAGGAGACACTCCATAACAC
#3	184	G371L-F-3	CCACCAGATTTGCATCTGTTTA
	185	G371L-R-3	AGGAGACACTCCATAACACTTAA

[0232]

[表60]

表 6 0

セット #	プライマー対 #	配列番号	プローブ名	配列 (5' -3')※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) は LNA
380	#1	186	S371L-Mut-LNA-1	(Cy5) ATTCTGTCCTATATAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
381		187	S371L-Mut-LNA-2	(Cy5) TTCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
382		188	S371L-Mut-LNA-3	(Cy5) TCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
383		189	S371L-Mut-LNA-4	(Cy5) CTGTCCTATA+TAAT+C+T+CGCA (BHQ2)
384		190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
385		191	S371L-Wild-LNA-2	(FAM) TTCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
386		192	S371L-Wild-LNA-3	(FAM) TCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
387		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
388	#2	186	S371L-Mut-LNA-1	(Cy5) ATTCTGTCCTATATAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
389		187	S371L-Mut-LNA-2	(Cy5) TTCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
390		188	S371L-Mut-LNA-3	(Cy5) TCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
391		189	S371L-Mut-LNA-4	(Cy5) CTGTCCTATA+TAAT+C+T+CGCA (BHQ2)
392		190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
393		191	S371L-Wild-LNA-2	(FAM) TTCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
394		192	S371L-Wild-LNA-3	(FAM) TCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
395		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
396	#3	186	S371L-Mut-LNA-1	(Cy5) ATTCTGTCCTATATAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
397		187	S371L-Mut-LNA-2	(Cy5) TTCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
398		188	S371L-Mut-LNA-3	(Cy5) TCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BHQ2)
399		189	S371L-Mut-LNA-4	(Cy5) CTGTCCTATA+TAAT+C+T+CGCA (BHQ2)
400		190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
401		191	S371L-Wild-LNA-2	(FAM) TTCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
402		192	S371L-Wild-LNA-3	(FAM) TCTGTCCTATATAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)
403		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BHQ1)

[0233] RNase Free H₂Oに5000コピー/μlとなるように実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAのそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0234] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。
 さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃
 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その
 結果を表61に示した。

[0235] [表61]

表 6 1

セット #	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
	検出目的	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
380	変異型 (mut)	--	0.00	39.90	0.32
381	変異型	--	0.00	38.34	0.59
382	変異型	--	0.00	38.07	0.66
383	変異型	--	0.00	38.95	0.53
384	野生型 (wild)	38.25	1.18	--	0.00
385	野生型	39.36	0.53	--	0.00
386	野生型	39.15	0.56	--	0.00
387	野生型	38.48	0.92	--	0.00
388	変異型	--	0.00	37.10	0.65
389	変異型	--	0.01	34.49	0.94
390	変異型	--	0.00	34.53	0.98
391	変異型	--	0.00	34.25	0.93
392	野生型	34.07	1.98	--	0.00
393	野生型	35.49	1.91	--	0.00
394	野生型	35.40	1.76	--	0.00
395	野生型	34.57	1.89	--	0.00
396	変異型	--	0.00	29.91	0.70
397	変異型	--	0.00	28.81	0.64
398	変異型	--	0.00	28.96	0.75
399	変異型	--	0.00	29.09	0.78
400	野生型	29.54	2.19	--	0.00
401	野生型	30.38	2.00	--	0.00
402	野生型	30.11	1.74	--	0.00
403	野生型	29.67	1.94	--	0.00

[0236] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#389～#403の反応は、オミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号186、187、188、189のオリゴヌクレオチドはS371L変異に係る塩基置換を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0237] 実施例20

S371L 変異株検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるS371L変異の検出について検討した。まず、実施例19で合成したプライマー対とプローブで表62のセットを作成した。

[0238]

[表62]

表 6 2

セット #	プライマ ー対#	配列 番号	プローブ名	配列 (5' -3')※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C)は LNA
404	#3	190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
		187	S371L-Mut-LNA-2	(Cy5) TTCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (B HQ2)
405		190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
		188	S371L-Mut-LNA-3	(Cy5) TCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BH Q2)
406		190	S371L-Wild-LNA-1	(FAM) TCTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGC (BHQ1)
		189	S371L-Mut-LNA-4	(Cy5) CTGTCCTATA+TAAT+C+T+CGCA (BHQ 2)
407		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BH Q1)
		187	S371L-Mut-LNA-2	(Cy5) TTCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (B HQ2)
408		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BH Q1)
		188	S371L-Mut-LNA-3	(Cy5) TCTGTCCTATA+TAA+T+C+T+CGC (BH Q2)
409		193	S371L-Wild-LNA-4	(FAM) CTGTCCTATA+TAA+T+T+C+CGCA (BH Q1)
		189	S371L-Mut-LNA-4	(Cy5) CTGTCCTATA+TAAT+C+T+CGCA (BHQ 2)

[0239] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを使用した。またネガティブコントロールとしてはRNAse Free H₂Oを用意した。

[0240] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表63に示した。

[0241]

[表63]

表 6 3

	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
セット #	鋳型濃度 (コピー /反応)	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
404	50	36.16	1.78	35.65	0.76
	500	33.00	1.92	32.32	0.75
	5000	29.40	1.96	29.13	0.73
405	50	36.35	1.63	35.93	0.76
	500	32.99	1.90	32.53	0.79
	5000	29.36	1.94	29.14	0.78
406	50	36.70	1.56	36.42	0.66
	500	33.07	1.74	32.85	0.69
	5000	29.69	1.78	29.67	0.68
407	50	36.82	1.54	36.35	0.66
	500	33.01	1.83	32.89	0.70
	5000	29.86	1.88	29.42	0.69
408	50	36.59	1.67	36.03	0.66
	500	33.18	1.80	32.86	0.69
	5000	29.93	1.85	29.63	0.70
409	50	36.61	1.72	36.57	0.63
	500	33.10	1.87	33.00	0.69
	5000	29.89	1.92	29.40	0.73

[0242] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#404、#405、#409の反応は、オミクロン_野生型RNA、オミクロン_変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号187、188、189のオリゴヌクレオチドはS371L変異を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0243] 実施例 2 1

G 3 3 9 D 変異検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法による G 3 3 9 D 変異の検出について検討した。まず、配列番号 2 0 4 ~ 2 1 4 のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、プライマー対として表 6 4 の # 1 ~ 7 に記載した。次にこれらのプライマー対と、表 6 5 - 1 及び表 6 5 - 2 に記載した、配列中に L N A を含む計 1 0 種のプローブ（名称に「W i l d」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「M u t」を含む G 3 3 9 D 変異検出用）で構成される # 4 1 0 ~ 4 3 9 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また G 3 3 9 D 変異検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。

[0244] [表64]

表 6 4

プライマー対#	配列番号	プライマー名	配列(5' -3')
# 1	208	G339D_1_F	CCAACCAACAGAATCTATTGTTAGA
	210	G339D-R-1	CCAAGCATAAACAGATGCAAATC
# 2	211	G339D-F-2	GTCCAACCAACAGAATCTATTG
	212	G339D-R-2	TCCTGTTCCAAGCATAAACA
# 3	204	G339D_3_F	GTCCAACCAACAGAATCTATTGTTA
	205	G339D_3_R	GCTGATTCTCTTCCTGTTCCAA
# 4	213	G339D-F-4	AGTCCAACCAACAGAATCTATTG
	210	G339D-R-1	CCAAGCATAAACAGATGCAAATC
# 5	214	G339D-F-5	GAGTCCAACCAACAGAATCTATTG
	205	G339D_3_R	GCTGATTCTCTTCCTGTTCCAA
# 6	206	G339D_6_F	CCAACCAACAGAATCTATTGTTAG
	207	G339D_6_R	AGATGCAAATCTGGTGGCGTTA
# 7	208	G339D-F-1	CCAACCAACAGAATCTATTGTTAGA
	209	G339D_7_R	TGTTCCAAGCATAAACAGATGCA

[0245] [表65-1]

表 6 5 - 1

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
410	#3	194	G339D-Wild-LNA-1	(FAM) CC+CT+TT+TG+GT+GA (BHQ1)
411		195	G339D-Wild-LNA-2	(FAM) T+T+T+G+G+T+GA+A (BHQ1)
412		196	G339D-Wild-LNA-3	(FAM) CT+TT+TG+G+TGA+AGT (BHQ1)
413		197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM) CC+TT+TTG+G+TGA+AGT (BHQ1)
414		198	G339D-Mut-LNA-1	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGA (BHQ2)
415		199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGAA (BHQ2)
416		200	G339D-Mut-LNA-3	(Cy5) CC+CT+TT+TG+AT+GA+AG (BHQ2)
417		201	G339D-Mut-LNA-4	(Cy5) C+CT+TTT+G+ATGA+A+GT (BHQ2)
418		202	G339D-Mut-LNA-5	(Cy5) C+CT+TT+TG+AT+GAA+GTT (BHQ2)
419		203	G339D-Mut-LNA-6	(Cy5) CTT+TT+G+A+T+GAA+GT+TT (BHQ2)
420	#6	194	G339D-Wild-LNA-1	(FAM) CC+CT+TT+TG+GT+GA (BHQ1)
421		195	G339D-Wild-LNA-2	(FAM) T+T+T+G+G+T+GA+A (BHQ1)
422		196	G339D-Wild-LNA-3	(FAM) CT+TT+TG+G+TGA+AGT (BHQ1)
423		197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM) CC+TT+TTG+G+TGA+AGT (BHQ1)
424		198	G339D-Mut-LNA-1	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGA (BHQ2)
425		199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGAA (BHQ2)
426		200	G339D-Mut-LNA-3	(Cy5) CC+CT+TT+TG+AT+GA+AG (BHQ2)
427		201	G339D-Mut-LNA-4	(Cy5) C+CT+TTT+G+ATGA+A+GT (BHQ2)
428		202	G339D-Mut-LNA-5	(Cy5) C+CT+TT+TG+AT+GAA+GTT (BHQ2)
429		203	G339D-Mut-LNA-6	(Cy5) CTT+TT+G+A+T+GAA+GT+TT (BHQ2)

[0246]

[表65-2]

表 6 5 - 2

セット #	プライ マー対 #	配列 番号	プローブ名	配列 (5' -3') ※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C) はLNA
430	#7	194	G339D-Wild-LNA-1	(FAM) CC+CT+TT+TG+GT+GA (BHQ1)
431		195	G339D-Wild-LNA-2	(FAM) T+T+T+G+G+T+GA+A (BHQ1)
432		196	G339D-Wild-LNA-3	(FAM) CT+TT+TG+G+TGA+AGT (BHQ1)
433		197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM) CC+TT+TTG+G+TGA+AGT (BHQ1)
434		198	G339D-Mut-LNA-1	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGA (BHQ2)
435		199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5) TGCC+CT+TT+TG+ATGAA (BHQ2)
436		200	G339D-Mut-LNA-3	(Cy5) CC+CT+TT+TG+AT+GA+AG (BHQ2)
437		201	G339D-Mut-LNA-4	(Cy5) C+CT+TTT+G+ATGA+A+GT (BHQ2)
438		202	G339D-Mut-LNA-5	(Cy5) C+CT+TT+TG+AT+GAA+GTT (BHQ2)
439		203	G339D-Mut-LNA-6	(Cy5) CTT+TT+G+A+T+GAA+GT+TT (BHQ2)

[0247] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを使用した。RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー／μlとなるようにそれぞれのRNAを添加し、試験検体溶液とした。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0248] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、58℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表66-1及び表66-2に示した。

[0249]

[表66-1]

表 6 6 - 1

セット#	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
410	野生型 (wild)	29.36	0.14	--	--
411	野生型	28.85	0.03	--	--
412	野生型	29.34	0.35	--	--
413	野生型	29.28	0.40	--	--
414	変異型 (mut)	--	--	29.16	0.41
415	変異型	--	--	29.15	0.56
416	変異型	--	--	29.86	0.08
417	変異型	--	--	29.28	0.08
418	変異型	--	--	29.27	0.39
419	変異型	--	--	29.41	0.28
420	野生型	28.70	0.18	--	--
421	野生型	28.57	0.04	--	--
422	野生型	28.83	0.40	--	--
423	野生型	28.91	0.44	--	--
424	変異型	--	--	28.42	0.44
425	変異型	--	--	28.42	0.53

[0250]

[表66-2]

表 6 6 - 2

セット#	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
426	変異型	--	--	28.97	0.09
427	変異型	--	--	28.68	0.12
428	変異型	--	--	28.56	0.38
429	変異型	--	--	28.29	0.28
430	野生型	29.69	0.16	--	--
431	野生型	28.95	0.05	--	--
432	野生型	29.83	0.43	--	--
433	野生型	29.71	0.39	--	--
434	変異型	--	--	28.85	0.43
435	変異型	--	--	28.94	0.54
436	変異型	--	--	29.46	0.09
437	変異型	--	--	29.04	0.12
438	変異型	--	--	29.01	0.34
439	変異型	--	--	28.78	0.27

[0251] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#422、#423、#424、#425、#428、#429の反応は、オミクロン_野生型RNA、オミクロン_変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号198、199、202、203のオリゴヌクレオチドはG339D変異を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0252] 実施例22

G339位のタイピング

本発明の検出方法によるG339位のタイピングについて検討した。まず、実施例21で用意した表67に記載のプライマー対#1、#6と、実施例21で作製したプローブ（G339D-Wild-LNA-4、G339D

－Mut－LNA－2）で構成される#440～447のセットをそれぞれ構築した。

[0253] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを使用した。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0254] RNase Free H₂Oに50コピー／μl、500コピー／μl、5000コピー／μlとなるようにオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAそれぞれを添加し、試験検体溶液とした。試験検体の検出には、市販されている製品名SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ社製、製品#RC300A）のコンポーネントを使用した。すなわち前記した試験検体溶液1μlと酵素・基質等を含むRT-qPCR Mix 15μl、加熱処理済みのSolution A 1.2μl、ROX Reference Dye II（50X） 0.6μl、フォワードプライマー（最終濃度0.4μM（1×） 又は0.8μM（1×））及びリバースプライマー（最終濃度0.4μM（1×） 又は0.8μM（1×））、2種のプローブ（それぞれ最終濃度0.2μM（1×）、または0.4μM（2×））を混合し、RNase Free H₂Oで、最終容量30μlの1ステップRT-PCR反応液を調製した。

[0255] 上記の組成で、表68記載の各セットのプライマー・プローブを含む反応液を調製した。実験精度を高めるため2連で試験を実施した。

[0256]

[表67]

表 6 7

反応 セット #	プライ マー 対 #	プライ マー 濃 度	プロ ーブ 濃 度	配列 番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
440	# 1	1X	1X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
199				G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)	
441		2X	2X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
				199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)
442			1X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
				199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)
443	1X	2X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)	
199			G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)		
444	# 6	1X	1X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
199				G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)	
445		2X	2X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
				199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)
446			1X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)
				199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)
447	1X	2X	197	G339D-Wild-LNA-4	(FAM)CC+TT+TTG+G+TGA+AGT(BHQ1)	
			199	G339D-Mut-LNA-2	(Cy5)TGCC+CT+TT+TG+ATGAA(BHQ2)	

[0257] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。

さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃

5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その

結果を表 6 8 に示した。

[0258] [表68]

表 6 8

	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
セット#	鋳型濃度	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
440	50	36.10	0.30	35.61	0.34
	500	33.02	0.34	32.32	0.35
	5000	29.74	0.35	28.81	0.35
441	50	36.84	0.92	36.64	0.80
	500	33.54	1.10	32.86	0.91
	5000	30.04	1.20	29.39	0.96
442	50	36.84	0.52	36.06	0.53
	500	33.56	0.62	32.73	0.59
	5000	29.97	0.68	29.29	0.61
443	50	36.88	0.64	36.13	0.58
	500	32.92	0.75	32.21	0.63
	5000	29.50	0.78	28.79	0.64
444	50	36.33	0.39	35.65	0.45
	500	32.62	0.42	32.03	0.44
	5000	29.17	0.44	28.70	0.42
445	50	37.10	1.04	36.09	1.06
	500	33.48	1.39	32.66	1.07
	5000	30.05	1.50	29.33	1.05
446	50	37.20	0.58	35.91	0.58
	500	33.35	0.71	32.53	0.61
	5000	29.85	0.76	29.15	0.60
447	50	36.34	0.70	35.70	0.61
	500	32.73	0.78	32.05	0.61
	5000	29.13	0.81	28.63	0.58

[0259] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット# 443、# 444、# 445、# 446、# 447の反応は、オミクロン_野生型RNA、オミクロン_変異型

RNAをいずれも小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号199のオリゴヌクレオチドはG339D変異を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0260] 実施例23

N856K 変異検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法によるN856K変異の検出について検討した。まず、配列番号215～222のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、プライマー対として表69の#1～4に記載した。次にこれらのプライマー対と、表70-1及び表70-2に記載した、配列中にLNAを含む計9種のプローブ（名称に「Wild」を含む野生型SARS-CoV-2検出用、名称に「Mut」を含むN856K変異検出用）で構成される#448～483のセットをそれぞれ構築した。野生型SARS-CoV-2検出用のプローブの5'末端をFAM、3'末端をBHQ（登録商標）1でそれぞれ標識した。またN856K変異検出用のプローブの5'末端をCy5、3'末端をBHQ（登録商標）2でそれぞれ標識した。

[0261] [表69]

表 6 9

プライマー対#	配列番号	プライマー名	配列(5' -3')
#1	215	N856K-F1	TGCTGGCTTCATCAAACAATATGG
	216	N856K-R1	TGAGCAATCATTTCATCTGTGAGC
#2	217	N856K-F2	CTTGGTGATATTGCTGCTAGAG
	218	N856K-R2	CGCTAACAGTGCAGAAGTG
#3	219	N856K-F3	GCTGCTAGAGACCTCATTGTG
	220	N856K-R3	TGCAGAAGTGTATTGAGCAATCA
#4	221	N856K-F4	GGTGATTGCCTTGGTGATATTG
	222	N856K-R4	CAGTGCAGAAGTGTATTGAGC

[0262]

[表70-1]

表 7 0 - 1

セット #	プ ラ イ マ ー 対 #	配 列 番 号	プ ロ ー ブ 名	配列 (5' -3')※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
448	#1	223	N856K-Wild-LNA-1	(FAM) CAAAAG+TT+TA+A+C+GGC (BHQ1)
449		224	N856K-Wild-LNA-2	(FAM) AA+AAG+TTTA+A+C+GGCC (BHQ1)
450		225	N856K-Wild-LNA-3	(FAM) CAAAAGTTTA+A+C+GGCCT (BHQ1)
451		226	N856K-Wild-LNA-4	(FAM) AAAGT+TTA+A+C+GGCCTT (BHQ1)
452		227	N856K-Wild-LNA-5	(FAM) AG+TTTA+A+C+GGCC+TTA (BHQ1)
453		228	N856K-Mut-LNA-1	(Cy5) CAAAAG+TT+TA+A+A+G+GC (BHQ2)
454		229	N856K-Mut-LNA-2	(Cy5) AA+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
455		230	N856K-Mut-LNA-3	(Cy5) A+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
456		231	N856K-Mut-LNA-4	(Cy5) AAGTT+TA+A+A+GG+CCT (BHQ2)
457	#2	223	N856K-Wild-LNA-1	(FAM) CAAAAG+TT+TA+A+C+GGC (BHQ1)
458		224	N856K-Wild-LNA-2	(FAM) AA+AAG+TTTA+A+C+GGCC (BHQ1)
459		225	N856K-Wild-LNA-3	(FAM) CAAAAGTTTA+A+C+GGCCT (BHQ1)
460		226	N856K-Wild-LNA-4	(FAM) AAAGT+TTA+A+C+GGCCTT (BHQ1)
461		227	N856K-Wild-LNA-5	(FAM) AG+TTTA+A+C+GGCC+TTA (BHQ1)
462		228	N856K-Mut-LNA-1	(Cy5) CAAAAG+TT+TA+A+A+G+GC (BHQ2)
463		229	N856K-Mut-LNA-2	(Cy5) AA+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
464		230	N856K-Mut-LNA-3	(Cy5) A+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
465		231	N856K-Mut-LNA-4	(Cy5) AAGTT+TA+A+A+GG+CCT (BHQ2)

[0263]

[表70-2]

表 7 0 - 2

セット #	プ ラ イ マ ー 対 #	配 列 番 号	プ ロ ー ブ 名	配列 (5' -3')※ (+A)、(+T)、(+G)、(+C)はLNA
466	#3	223	N856K-Wild-LNA-1	(FAM) CAAAAG+TT+TA+A+C+GGC (BHQ1)
467		224	N856K-Wild-LNA-2	(FAM) AA+AAG+TTTA+A+C+GGCC (BHQ1)
468		225	N856K-Wild-LNA-3	(FAM) CAAAAGTTTA+A+C+GGCCT (BHQ1)
469		226	N856K-Wild-LNA-4	(FAM) AAAGT+TTA+A+C+GGCCTT (BHQ1)
470		227	N856K-Wild-LNA-5	(FAM) AG+TTTA+A+C+GGCC+TTA (BHQ1)
471		228	N856K-Mut-LNA-1	(Cy5) CAAAAG+TT+TA+A+A+G+GC (BHQ2)
472		229	N856K-Mut-LNA-2	(Cy5) AA+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
473		230	N856K-Mut-LNA-3	(Cy5) A+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
474		231	N856K-Mut-LNA-4	(Cy5) AAGTT+TA+A+A+GG+CCT (BHQ2)
475	#4	223	N856K-Wild-LNA-1	(FAM) CAAAAG+TT+TA+A+C+GGC (BHQ1)
476		224	N856K-Wild-LNA-2	(FAM) AA+AAG+TTTA+A+C+GGCC (BHQ1)
477		225	N856K-Wild-LNA-3	(FAM) CAAAAGTTTA+A+C+GGCCT (BHQ1)
478		226	N856K-Wild-LNA-4	(FAM) AAAGT+TTA+A+C+GGCCTT (BHQ1)
479		227	N856K-Wild-LNA-5	(FAM) AG+TTTA+A+C+GGCC+TTA (BHQ1)
480		228	N856K-Mut-LNA-1	(Cy5) CAAAAG+TT+TA+A+A+G+GC (BHQ2)
481		229	N856K-Mut-LNA-2	(Cy5) AA+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
482		230	N856K-Mut-LNA-3	(Cy5) A+AG+TT+TA+A+A+GGCC (BHQ2)
483		231	N856K-Mut-LNA-4	(Cy5) AAGTT+TA+A+A+GG+CCT (BHQ2)

[0264] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを使用した。RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μlとなるようにそれぞれのRNAを添加し、試験検体溶液とした。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用意した。

[0265] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表71-1及び表71-2に示した。

[0266]

[表71-1]

表 7 1 - 1

	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
セット#	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
448	野生型 (Wild)	30.52	0.67	--	0.00
449		29.46	1.43	--	0.00
450		30.41	0.87	--	0.00
451		29.52	0.95	--	0.00
452		29.37	1.01	--	0.00
453	変異型 (mut)	--	0.00	30.47	0.28
454		--	0.00	28.66	1.02
455		--	0.00	28.62	0.82
456		--	0.00	29.84	0.07
457	野生型	31.81	0.79	--	0.00
458		30.94	1.48	--	0.00
459		31.49	0.96	--	0.00
460		31.01	1.07	--	0.00
461		31.03	1.12	--	0.00
462	変異型	--	0.00	32.10	0.33
463		--	0.00	30.64	1.02
464		--	0.00	30.47	0.79
465		--	0.00	31.49	0.07

[0267]

[表71-2]

表 7 1 - 2

セ ット #	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
466	野生型	29.92	0.69	--	0.00
467		29.40	1.35	--	0.00
468		29.82	0.78	--	0.00
469		29.41	0.92	--	0.00
470		29.43	0.95	--	0.00
471	変異型	--	0.00	30.44	0.24
472		--	0.00	28.63	0.95
473		--	0.00	28.58	0.70
474		--	0.00	29.92	0.05
475	野生型	30.30	0.70	--	0.00
476		29.55	1.44	--	0.00
477		30.23	0.91	--	0.00
478		29.65	0.99	--	0.00
479		29.56	1.07	--	0.00
480	変異型	--	0.00	29.99	0.24
481		--	0.00	28.73	0.99
482		--	0.00	28.71	0.81
483		--	0.00	29.64	0.06

[0268] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#449、#451、#452、#454、#455、#467、#469、#470、#472、#473、#476、#478、#479、#481、#482の反応は、オミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号229、230のオリゴヌクレオチドはN856K変異を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

[0269] 実施例24

T 5 4 7 K 変異検出用プライマー・プローブ

本発明の検出方法による N 8 5 6 K 変異の検出について検討した。まず、配列番号 2 3 2 ～ 2 3 7 のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ合成し、プライマー対として表 7 2 の # 1 ～ 3 に記載した。次にこれらのプライマー対と、表 7 3 に記載した、配列中に L N A を含む計 9 種のプローブ（名称に「W i l d」を含む野生型 S A R S - C o V - 2 検出用、名称に「M u t」を含む T 5 4 7 K 変異検出用）で構成される # 4 8 4 ～ 5 1 3 のセットをそれぞれ構築した。野生型 S A R S - C o V - 2 検出用のプローブの 5' 末端を F A M、3' 末端を B H Q（登録商標）1 でそれぞれ標識した。また T 5 4 7 K 変異検出用のプローブの 5' 末端を C y 5、3' 末端を B H Q（登録商標）2 でそれぞれ標識した。

[0270] [表72]

表 7 2

プライマー対#	配列番号	プライマー名	配列5' -3'
#1	232	T547K-F1	CACCAGCAACTGTTTGTG
	233	T547K-R1	TGCCAAATTGTTGGAAAGG
#2	234	T547K-F2	GCAACTGTTTGTGGACCTA
	235	T547K-R2	CAGCAATGTCTCTGCCAA
#3	236	T547K-F3	GCAACTGTTTGTGGACCTAAA
	237	T547K-R3	TCTGCCAAATTGTTGGAAAGG

[0271]

[表73]

表 7 3

セット#	プライマー対#	配列番号	プローブ名	配列(5'-3')※(+A), (+T), (+G), (+C)はLNA
484	#1	238	T547K-Wild-LNA-1	(FAM)CTTCAATGGTT+TA+A+C+AGG(BHQ1)
485		239	T547K-Wild-LNA-2	(FAM)TTCAATGGTTTA+A+C+AGGC(BHQ1)
486		240	T547K-Wild-LNA-3	(FAM)CAATGGTTTA+A+C+AGGCAC(BHQ1)
487		241	T547K-Wild-LNA-4	(FAM)TGGTTTA+A+C+AGGCACAG(BHQ1)
488		242	T547K-Wild-LNA-5	(FAM)TTA+A+C+AGGCACAGGTG(BHQ1)
489		243	T547K-Mut-LNA-1	(Cy5)T+CAA+TGG+TT+TA+A+A+AGG(BHQ2)
490		244	T547K-Mut-LNA-2	(Cy5)T+G+GTTTA+A+A+AGG+CA(BHQ2)
491		245	T547K-Mut-LNA-3	(Cy5)T+TTA+A+A+A+GG+CA+CAG(BHQ2)
492		246	T547K-Mut-LNA-4	(Cy5)T+TA+A+A+AGG+CAC+AGG(BHQ2)
493		247	T547K-Mut-LNA-5	(Cy5)TA+A+A+AGG+CA+CAGGT(BHQ2)
494	#2	238	T547K-Wild-LNA-1	(FAM)CTTCAATGGTT+TA+A+C+AGG(BHQ1)
495		239	T547K-Wild-LNA-2	(FAM)TTCAATGGTTTA+A+C+AGGC(BHQ1)
496		240	T547K-Wild-LNA-3	(FAM)CAATGGTTTA+A+C+AGGCAC(BHQ1)
497		241	T547K-Wild-LNA-4	(FAM)TGGTTTA+A+C+AGGCACAG(BHQ1)
498		242	T547K-Wild-LNA-5	(FAM)TTA+A+C+AGGCACAGGTG(BHQ1)
499		243	T547K-Mut-LNA-1	(Cy5)T+CAA+TGG+TT+TA+A+A+AGG(BHQ2)
500		244	T547K-Mut-LNA-2	(Cy5)T+G+GTTTA+A+A+AGG+CA(BHQ2)
501		245	T547K-Mut-LNA-3	(Cy5)T+TTA+A+A+A+GG+CA+CAG(BHQ2)
502		246	T547K-Mut-LNA-4	(Cy5)T+TA+A+A+AGG+CAC+AGG(BHQ2)
503		247	T547K-Mut-LNA-5	(Cy5)TA+A+A+AGG+CA+CAGGT(BHQ2)
504	#3	238	T547K-Wild-LNA-1	(FAM)CTTCAATGGTT+TA+A+C+AGG(BHQ1)
505		239	T547K-Wild-LNA-2	(FAM)TTCAATGGTTTA+A+C+AGGC(BHQ1)
506		240	T547K-Wild-LNA-3	(FAM)CAATGGTTTA+A+C+AGGCAC(BHQ1)
507		241	T547K-Wild-LNA-4	(FAM)TGGTTTA+A+C+AGGCACAG(BHQ1)
508		242	T547K-Wild-LNA-5	(FAM)TTA+A+C+AGGCACAGGTG(BHQ1)
509		243	T547K-Mut-LNA-1	(Cy5)T+CAA+TGG+TT+TA+A+A+AGG(BHQ2)
510		244	T547K-Mut-LNA-2	(Cy5)T+G+GTTTA+A+A+AGG+CA(BHQ2)
511		245	T547K-Mut-LNA-3	(Cy5)T+TTA+A+A+A+GG+CA+CAG(BHQ2)
512		246	T547K-Mut-LNA-4	(Cy5)T+TA+A+A+AGG+CAC+AGG(BHQ2)
513		247	T547K-Mut-LNA-5	(Cy5)TA+A+A+AGG+CA+CAGGT(BHQ2)

[0272] 試験用の検体として実施例17のオミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを使用した。RNase Free H₂Oに終濃度が5000コピー/μlとなるようにそれぞれのRNAを添加し、試験検体溶液とした。またネガティブコントロールとしてはRNase Free H₂Oを用

意した。

[0273] RT-PCR反応液は、実施例17と同様に調製し、反応確認を行った。

さらに、RT-PCR条件は、52℃ 5分、95℃ 10秒の後、95℃ 5秒、60℃ 30秒を1サイクルとする45サイクル反応とした。その結果を表74に示した。

[0274] [表74]

表 7 4

セット#	鋳型RNA	オミクロン_野生型RNA		オミクロン_変異型RNA	
	検出目標	平均Ct値	平均蛍光値	平均Ct値	平均蛍光値
484	野生型 (wild)	34.14	0.37	--	0.00
485	野生型	33.94	0.53	--	0.00
486	野生型	33.88	0.82	--	0.00
487	野生型	33.52	0.79	--	0.00
488	野生型	34.53	1.04	--	0.00
489	変異型 (mut)	--	0.00	32.00	0.68
490	変異型	--	0.00	32.15	0.46
491	変異型	--	0.00	31.71	1.01
492	変異型	--	0.00	31.96	1.00
493	変異型	--	0.00	31.75	1.03
494	野生型	30.68	0.45	--	0.00
495	野生型	30.60	0.68	--	0.00
496	野生型	30.45	0.98	--	0.00
497	野生型	30.37	0.94	--	0.00
498	野生型	31.11	1.31	--	0.00
499	変異型	--	0.00	29.91	0.78
500	変異型	--	0.00	30.03	0.58
501	変異型	--	0.00	29.62	1.20
502	変異型	--	0.00	29.77	1.10
503	変異型	--	0.00	29.42	1.17
504	野生型	33.72	0.43	--	0.00
505	野生型	33.72	0.68	--	0.00
506	野生型	33.49	0.99	--	0.00
507	野生型	33.41	0.95	--	0.00
508	野生型	34.06	1.15	--	0.00
509	変異型	--	0.00	32.32	0.71
510	変異型	--	0.00	32.37	0.48
511	変異型	--	0.00	31.84	1.07
512	変異型	--	0.00	32.21	1.06
513	変異型	--	0.01	31.88	1.14

[0275] 結果

検討の結果、すべての組み合わせにおいてプローブに対応するRNAを検出することが確認できた。特にセット#496、#497、#498、#501、#502、#503の反応は、オミクロン__野生型RNA、オミクロン__変異型RNAを小さなCt値、高い蛍光強度で検出できた。すなわち、配列番号246、247のオリゴヌクレオチドはT547K変異を高感度で判別できることが分かった。なお、検体に変えてネガティブコントロールを加えた反応液のすべてで増幅産物は確認されなかった。

産業上の利用可能性

[0276] 変異型遺伝子の特異的に増幅し、高感度に検出することができる本発明の技術を用いて変異型SARS-CoV-2を検出することが出来る。当該方法は、遺伝子工学、生物学、医学等幅広い分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0277] SEQ ID N01 : N501Y_1Fv2.Position 15 "R" is A or G.

SEQ ID N02 : N501Y_1R.

SEQ ID N03 : N501-1c-MGB(WT).

SEQ ID N04 : 501Y-1c-MGB(FAM).

SEQ ID N05 : N501Y-MGB-F1.

SEQ ID N06 : N501Y-MGB-R1-E484K-3R.

SEQ ID N07 : N501Y-MGB-P-wild1.

SEQ ID N08 : N501Y-MGB-P-mut1.

SEQ ID N09 : N501Y-MGB-F2-E484K-4F.

SEQ ID N010 : N501Y-MGB-R2-2-E484K-4R.

SEQ ID N011 : N501Y-MGB-P-wild2.

SEQ ID N012 : N501Y-MGB-P-mut2.

SEQ ID N013 : N501Y-MGB-P-wild3.

SEQ ID N014 : N501Y-MGB-P-mut3(FAM).

SEQ ID N015 : N501Y-MGB-P-wild4.
SEQ ID N016 : N501Y-MGB-P-mut4(FAM).
SEQ ID N017 : JP-MGB-F1-E484K-5F.
SEQ ID N018 : JP-MGB-R1-E484K-5R.
SEQ ID N019 : JP-MGB-F2.
SEQ ID N020 : JP-MGB-R2.
SEQ ID N021 : E484K-1F-E484K-2F.
SEQ ID N022 : E484K-1R.
SEQ ID N023 : E484_FAM-MGB1.
SEQ ID N024 : 484K_VIC-MGB1.
SEQ ID N025 : E484K-2R.
SEQ ID N026 : E484_FAM-MGB2.
SEQ ID N027 : 484K_VIC-MGB2.
SEQ ID N028 : E484K-3F.
SEQ ID N029 : E484_FAM-MGB3.
SEQ ID N030 : 484K_VIC-MGB3.
SEQ ID N031 : E484_FAM-MGB4.
SEQ ID N032 : 484K_VIC-MGB4.
SEQ ID N033 : E484_FAM-MGB5.
SEQ ID N034 : 484K_VIC-MGB5.
SEQ ID N035 : N501Y-MGB-P_12_BASE.
SEQ ID N036 : E484K-MGB-P_13_BASE.
SEQ ID N037 : TBD-LNA-M2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N038 : E484K-LNA-W1(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N039 : E484K-LNA-W2(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N040 : E484K-LNA-W3(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N041 : E484K-LNA-W4(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N042 : E484K-LNA-W5(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.

SEQ ID N043 : E484K-LNA-W6(TBD).Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N044 : E484K_MGB_3.
SEQ ID N045 : E484K(mut)_LNA2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N046 : TBD-LNA-mut-3.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N047 : 2019-nCoV_N1-F.
SEQ ID N048 : 2019-nCoV_N1-R.
SEQ ID N049 : 2019-nCoV_N1-P_HEX.
SEQ ID N050 : 2019-nCoV_N2-F.
SEQ ID N051 : 2019-nCoV_N2-R.
SEQ ID N052 : 2019-nCoV_N2-P_HEX.
SEQ ID N053 : E484Q-LNA-1_P_HEX.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N054 : E484Q-LNA-2_P_HEX.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N055 : E484Q-LNA-4_P_HEX.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N056 : E484Q-LNA-5_P_HEX.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N057 : E484Q-LNA-6_P_HEX.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N058 : E484E-CONTROL_RNA_Wild.
SEQ ID N059 : E484K-CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N060 : E484Q-CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N061 : E484Q-P_13_BASE.
SEQ ID N062 : N501Y-MGB-F(S477N).
SEQ ID N063 : N501Y-MGB-F(T478K).
SEQ ID N064 : L452R-S477N-F1.
SEQ ID N065 : L452R-S477N-R1.
SEQ ID N066 : L452R-S477N-F2.
SEQ ID N067 : L452R-S477N-R2.
SEQ ID N068 : L452R-LNA-M1.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N069 : L452R-LNA-M2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N070 : L452R-LNA-M3.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.

SEQ ID N071 : L452R-LNA-M4.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N072 : L452R-LNA-W1.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N073 : L452R-LNA-W2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N074 : L452R-LNA-W3.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N075 : L452R-F3.
SEQ ID N076 : L452R-R3.
SEQ ID N077 : L452R-F4.
SEQ ID N078 : L452R-R4.
SEQ ID N079 : L452R-F5.
SEQ ID N080 : L452R-R5.
SEQ ID N081 : L452R-LNA-M5.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N082 : L452R-LNA-M6.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N083 : L452R-LNA-M7.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N084 : L452R-LNA-M8.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N085 : L452R-LNA-M9.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N086 : L452R-LNA-W4.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N087 : L452R-LNA-W5.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N088 : L452R-LNA_BASE9.
SEQ ID N089 : L452R-CONTROL_RNA_Wild.
SEQ ID N090 : L452R-CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N091 : T478K-F1.
SEQ ID N092 : T478K-R1.
SEQ ID N093 : T478K-F1.
SEQ ID N094 : T478K-R2.
SEQ ID N095 : T478K-LNA-M1.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N096 : T478K-LNA-M2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N097 : T478K-LNA-M3.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N098 : T478K-LNA-M4.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.

SEQ ID N099 : T478K-LNA-M5.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0100 : T478K-LNA-M6.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0101 : T478K-LNA-W1.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0102 : T478K-LNA-W2.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0103 : T478K-LNA-W3.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0104 : T478K-LNA-W4.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0105 : T478K-LNA-W5.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0106 : T478K-LNA-W6.Locked Nucleic Acid (LNA) Probe.
SEQ ID N0107 : T478K F3.
SEQ ID N0108 : T478K R3.
SEQ ID N0109 : T478K F4.
SEQ ID N0110 : T478K R4.
SEQ ID N0111 : T478K-CONTROL_RNA_Wild.
SEQ ID N0112 : T478K-CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N0113 : T478K-LNA_BASE6.
SEQ ID N0114 : F490S-F1.
SEQ ID N0115 : F490S-F2.
SEQ ID N0116 : F490S-F3.
SEQ ID N0117 : F490S_LNA_R4.
SEQ ID N0118 : F490S_LNA_R5.
SEQ ID N0119 : F490S_LNA_R6.
SEQ ID N0120 : F490S_LNA_Wild_2P.
SEQ ID N0121 : F490S_LNA_Wild_4P.
SEQ ID N0122 : F490S_LNA_Mut_1P.
SEQ ID N0123 : F490S_LNA_Mut_2P.
SEQ ID N0124 : F490S_LNA_Mut_7P.
SEQ ID N0125 : L452Q-F1.
SEQ ID N0126 : L452Q-R1.

SEQ ID N0127 : L452Q-F2.
SEQ ID N0128 : L452Q-R2.
SEQ ID N0129 : L452Q-F3.
SEQ ID N0130 : L452Q-R3.
SEQ ID N0131 : L452Q-LNA-Mut-1.
SEQ ID N0132 : L452Q-LNA-Mut-2.
SEQ ID N0133 : L452Q-LNA-Mut-3.
SEQ ID N0134 : WILD_RNA_CONTROL2.
SEQ ID N0135 : L452Q_RNA_CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N0136 : F490S_RNA_CONTROL_RNA_Mut.
SEQ ID N0137 : F490S-LNA_BASE7.
SEQ ID N0138 : L452QR-LNA_BASE9.
SEQ ID N0139 : P681_F2.
SEQ ID N0140 : P681_F3.
SEQ ID N0141 : P681_F4.
SEQ ID N0142 : P681_F5.
SEQ ID N0143 : P681_R1.
SEQ ID N0144 : P681_R2.
SEQ ID N0145 : P681_R3.
SEQ ID N0146 : P681_R4.
SEQ ID N0147 : P681-Wild-LNA-1.
SEQ ID N0148 : P681-Wild-LNA-5.
SEQ ID N0149 : P681-Wild-LNA-6.
SEQ ID N0150 : P681-Wild-LNA-7.
SEQ ID N0151 : P681-Wild-LNA-10.
SEQ ID N0152 : P681H-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0153 : P681H-Mut-LNA-6.
SEQ ID N0154 : P681H-Mut-LNA-7.

SEQ ID N0155 : P681H-Mut-LNA-8.
SEQ ID N0156 : P681H-Mut-LNA-9.
SEQ ID N0157 : P681R-Mut-LNA-2.
SEQ ID N0158 : P681R-Mut-LNA-6.
SEQ ID N0159 : P681R-Mut-LNA-7.
SEQ ID N0160 : P681R-Mut-LNA-8.
SEQ ID N0161 : P681R-Mut-LNA-9.
SEQ ID N0162 : P681H-LNA_BASE9.
SEQ ID N0163 : P681R-LNA_BASE10.
SEQ ID N0164 : P681_WILD_RNA_3860.
SEQ ID N0165 : E484A-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0166 : E484A-Mut-LNA-4.
SEQ ID N0167 : E484A-Mut-LNA-5.
SEQ ID N0168 : D215 insertion F-2.
SEQ ID N0169 : D215 insertion R-2.
SEQ ID N0170 : D215 insertion P-omicron-2.
SEQ ID N0171 : D215 insertion P-Wild-2.
SEQ ID N0172 : D215 insertion F-3.
SEQ ID N0173 : D215 insertion R-3.
SEQ ID N0174 : D215 insertion P-omicron-3.
SEQ ID N0175 : D215 insertion P-Wild-3.
SEQ ID N0176 : D215 insertion F-4.
SEQ ID N0177 : D215 insertion R-4.
SEQ ID N0178 : D215 insertion P-omicron-4.
SEQ ID N0179 : D215 insertion P-Wild-4.
SEQ ID N0180 : G371L-F-1.
SEQ ID N0181 : G371L-R-1.
SEQ ID N0182 : G371L-F-2.

SEQ ID N0183 : G371L-R-2.
SEQ ID N0184 : G371L-F-3.
SEQ ID N0185 : G371L-R-3.
SEQ ID N0186 : S371L-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0187 : S371L-Mut-LNA-2.
SEQ ID N0188 : S371L-Mut-LNA-3.
SEQ ID N0189 : S371L-Mut-LNA-4.
SEQ ID N0190 : S371L-Wild-LNA-1.
SEQ ID N0191 : S371L-Wild-LNA-2.
SEQ ID N0192 : S371L-Wild-LNA-3.
SEQ ID N0193 : S371L-Wild-LNA-4.
SEQ ID N0194 : G339D-Wild-LNA-1.
SEQ ID N0195 : G339D-Wild-LNA-2.
SEQ ID N0196 : G339D-Wild-LNA-3.
SEQ ID N0197 : G339D-Wild-LNA-4.
SEQ ID N0198 : G339D-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0199 : G339D-Mut-LNA-2.
SEQ ID N0200 : G339D-Mut-LNA-3.
SEQ ID N0201 : G339D-Mut-LNA-4.
SEQ ID N0202 : G339D-Mut-LNA-5.
SEQ ID N0203 : G339D-Mut-LNA-6.
SEQ ID N0204 : G339D_3_F.
SEQ ID N0205 : G339D_3_R.
SEQ ID N0206 : G339D_6_F.
SEQ ID N0207 : G339D_6_R.
SEQ ID N0208 : G339D_1_F.
SEQ ID N0209 : G339D_7_R
SEQ ID N0210 : G339D-R-1.

SEQ ID N0211 : G339D-F-2.
SEQ ID N0212 : G339D-R-2.
SEQ ID N0213 : G339D-F-4.
SEQ ID N0214 : G339D-F-5.
SEQ ID N0215 : N856K-F1.
SEQ ID N0216 : N856K-R1.
SEQ ID N0217 : N856K-F2.
SEQ ID N0218 : N856K-R2.
SEQ ID N0219 : N856K-F3.
SEQ ID N0220 : N856K-R3.
SEQ ID N0221 : N856K-F4.
SEQ ID N0222 : N856K-R4.
SEQ ID N0223 : N856K-Wild-LNA-1.
SEQ ID N0224 : N856K-Wild-LNA-2.
SEQ ID N0225 : N856K-Wild-LNA-3.
SEQ ID N0226 : N856K-Wild-LNA-4.
SEQ ID N0227 : N856K-Wild-LNA-5.
SEQ ID N0228 : N856K-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0229 : N856K-Mut-LNA-2.
SEQ ID N0230 : N856K-Mut-LNA-3.
SEQ ID N0231 : N856K-Mut-LNA-4.
SEQ ID N0232 : T547K-F1.
SEQ ID N0233 : T547K-R1.
SEQ ID N0234 : T547K-F2.
SEQ ID N0235 : T547K-R2.
SEQ ID N0236 : T547K-F3.
SEQ ID N0237 : T547K-R3.
SEQ ID N0238 : T547K-Wild-LNA-1.

SEQ ID N0239 : T547K-Wild-LNA-2.
SEQ ID N0240 : T547K-Wild-LNA-3.
SEQ ID N0241 : T547K-Wild-LNA-4.
SEQ ID N0242 : T547K-Wild-LNA-5.
SEQ ID N0243 : T547K-Mut-LNA-1.
SEQ ID N0244 : T547K-Mut-LNA-2.
SEQ ID N0245 : T547K-Mut-LNA-3.
SEQ ID N0246 : T547K-Mut-LNA-4.
SEQ ID N0247 : T547K-Mut-LNA-5.
SEQ ID N0248 : Omicron_Wild_RNA_3860.
SEQ ID N0249 : Omicron_Mut_RNA_3835.
SEQ ID N0250 : E484A-LNA_BASE14.
SEQ ID N0251 : ins214EPE_BASE18.
SEQ ID N0252 : S371L-LNA_BASE19.
SEQ ID N0253 : G339D-LNA_BASE10.
SEQ ID N0254 : N856K-LNA_BASE12.
SEQ ID N0255 : T547K-LNA_BASE7.

請求の範囲

[請求項1] 変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチドであって、

(a) 配列番号35に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 配列番号36に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 配列番号61に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 配列番号88に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 配列番号113に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(f) 配列番号137に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(g) 配列番号138に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(h) 配列番号162に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(i) 配列番号163に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(j) 配列番号250に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(k) 配列番号251に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(l) 配列番号252に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(m) 配列番号253に示される塩基配列もしくは当該配列に相

補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、

(n) 配列番号 254 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、および

(o) 配列番号 255 に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、
から選択されるオリゴヌクレオチド。

[請求項2] (a) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 4、8、12、14 および 16 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項3] (b) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 24、27、30、32、34、37、44、45 および 46 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項4] (c) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 53、54、55、56 および 57 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項5] (d) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 68、69、70、71、81、82、83、84 および 85 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項6] (e) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 95、96、97、98、99 および 100 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項7] (f) のオリゴヌクレオチドが、配列番号 122、123 および 124 から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなる

るオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項8] (g) のオリゴヌクレオチドが、配列番号131、132および133から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項9] (h) のオリゴヌクレオチドが、配列番号152、153、154、155および156から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項10] (i) のオリゴヌクレオチドが、配列番号157、158、159、160および161から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項11] (j) のオリゴヌクレオチドが、配列番号165、166および167から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項12] (k) のオリゴヌクレオチドが、配列番号170、174および178から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項13] (l) のオリゴヌクレオチドが、配列番号186、187、188および189から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項14] (m) のオリゴヌクレオチドが、配列番号198、199、200、201、202および203から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項15] (n) のオリゴヌクレオチドが、配列番号228、229、230および231から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配

列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項16] (o) のオリゴヌクレオチドが、配列番号243、244、245、246および247から選択される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項17] 蛍光物質および／または消光物質で標識されている請求項1～16いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項18] 副溝結合剤(MGB)が付加されている請求項1～17いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項19] bridged nucleic acid (BNA) を含む請求項1～18いずれか記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項20] 試料中の変異型SARS-CoV-2を検出する方法であって、
(1) 試料に含まれるSARS-CoV-2ゲノムに相補的なDNAまたはその断片を合成する工程、および
(2) 請求項1～19いずれか記載のオリゴヌクレオチドの一種または二種以上を使用して、工程(1)で得られたDNAまたはその断片に含まれる変異型スパイクタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を検出する工程、
を包含することを特徴とする方法。

[請求項21] 工程(1)が、合成されたDNAまたはその断片を増幅する工程をさらに含む請求項20記載の方法。

[請求項22] 工程(2)において、DNAまたはその断片とハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの分解により変異型スパイクタンパク質をコードする塩基配列またはその一部の検出が実施される、請求項20または21記載の方法。

[請求項23] 試料中の変異型SARS-CoV-2を検出するためのキットであって、

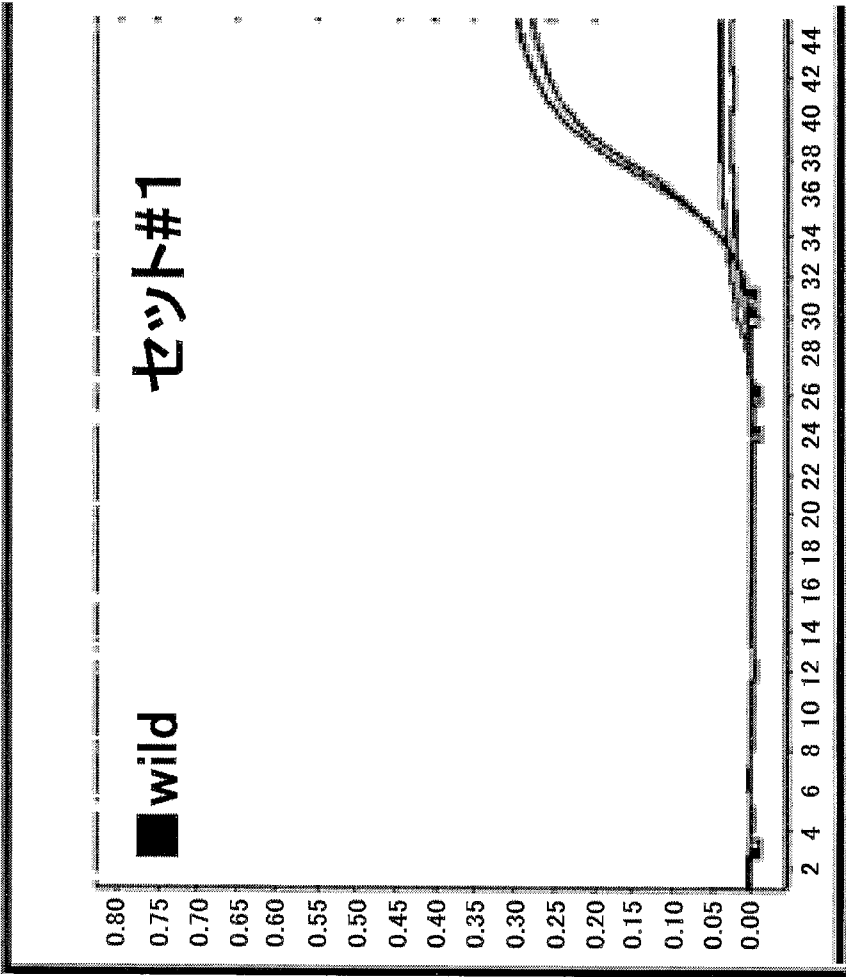
(1) 請求項1～19いずれか記載のオリゴヌクレオチドの一種または二種以上、および

(2) SARS-CoV-2 ゲノムに相補的なDNAまたはその断片を合成するための試薬を含むキット。

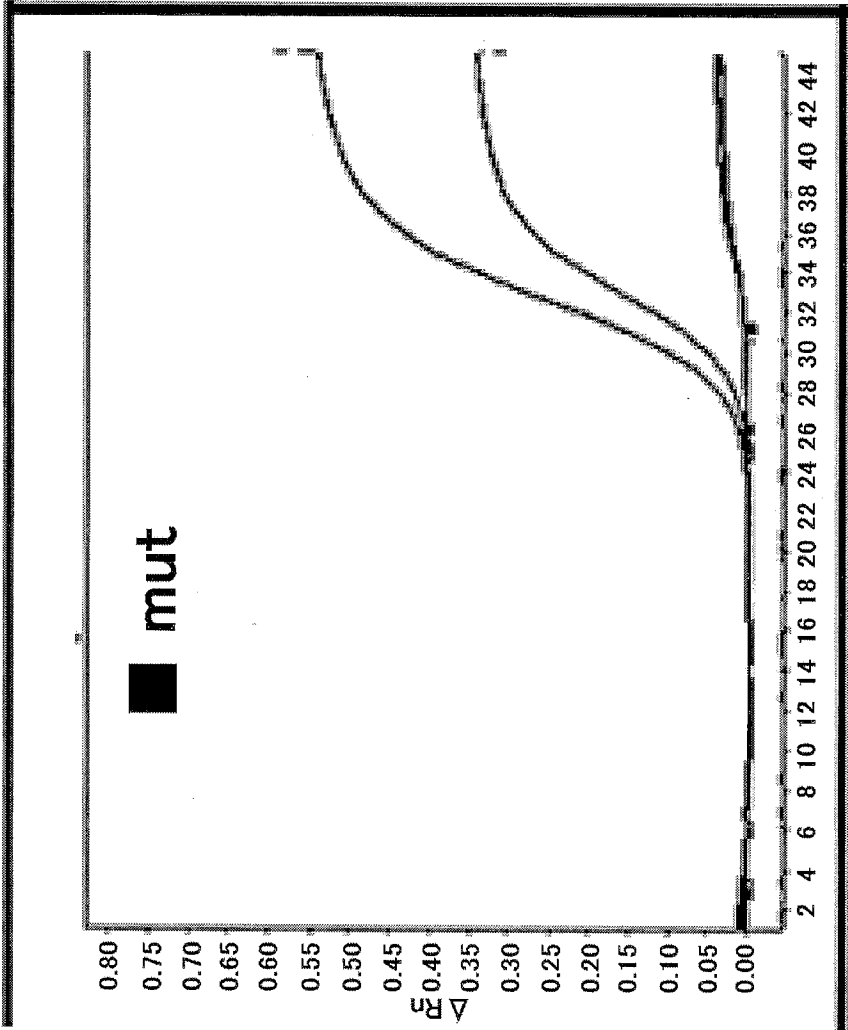
[請求項24] SARS-CoV-2 ウイルスゲノムに相補的なDNAまたはその断片を増幅する試薬をさらに含む請求項23記載のキット。

[請求項25] SARS-CoV-2 ウイルスゲノムに相補的なDNAまたはその断片の増幅に使用されるプライマー対をさらに含む請求項23または24記載のキット。

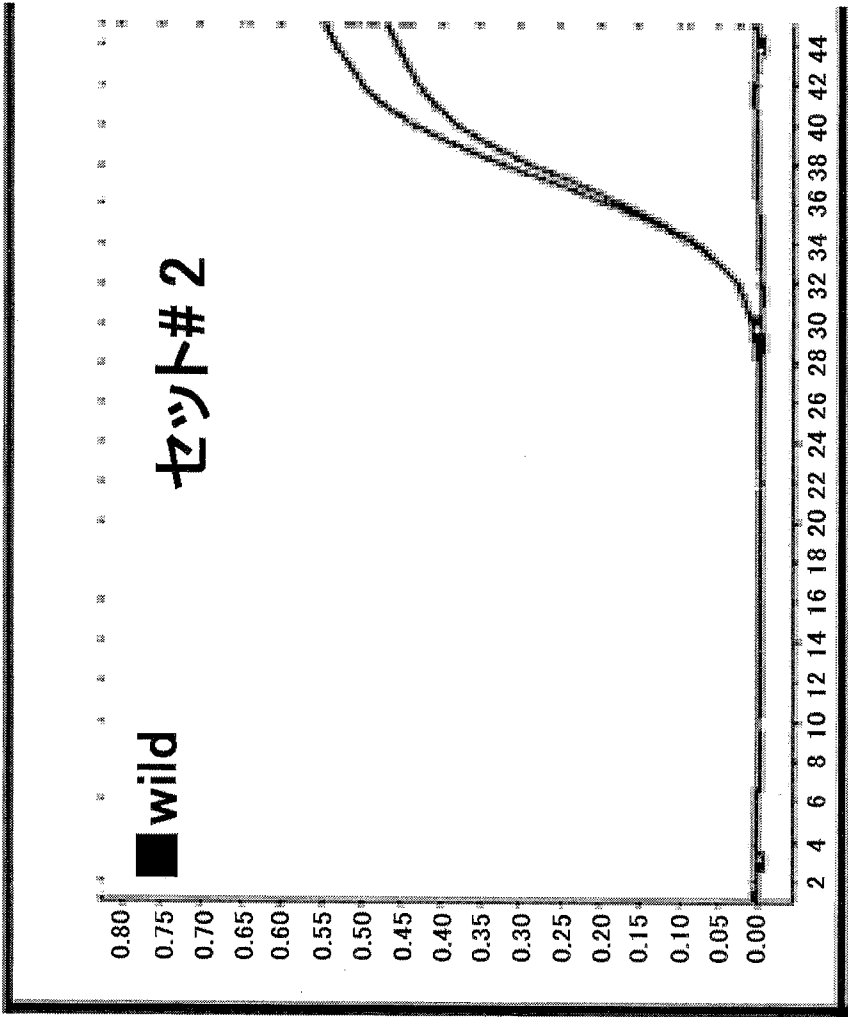
[図 1]



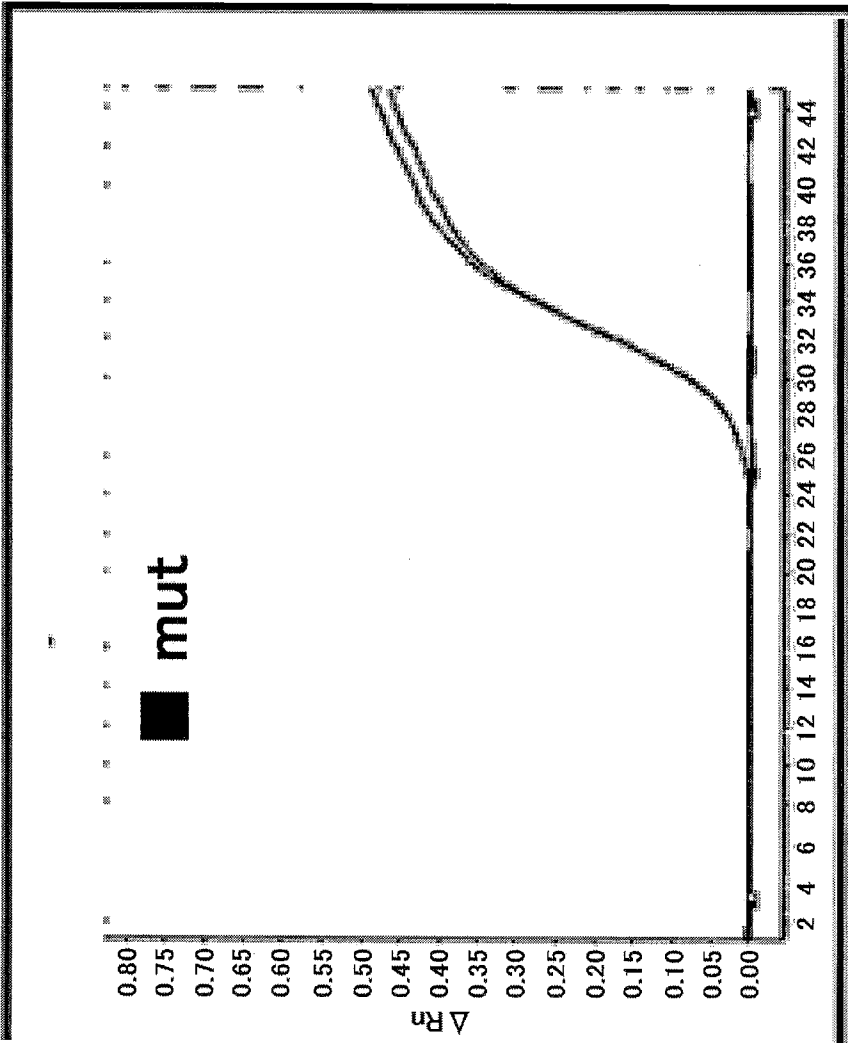
[図 1]の続き



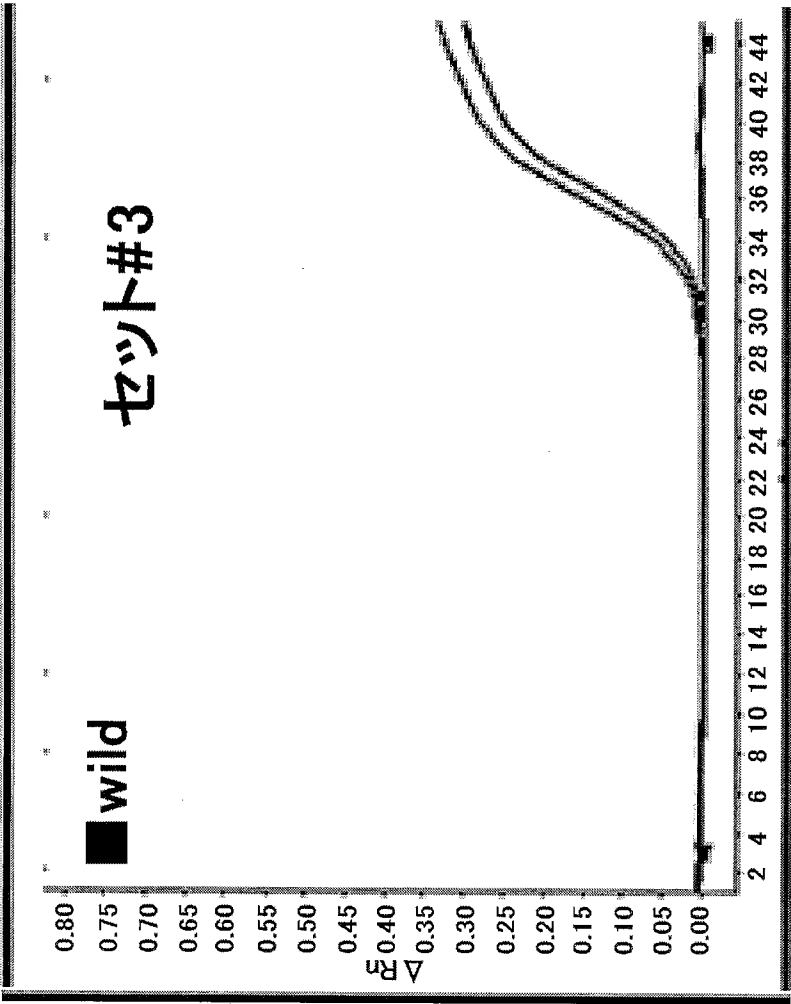
[図 1]の続き



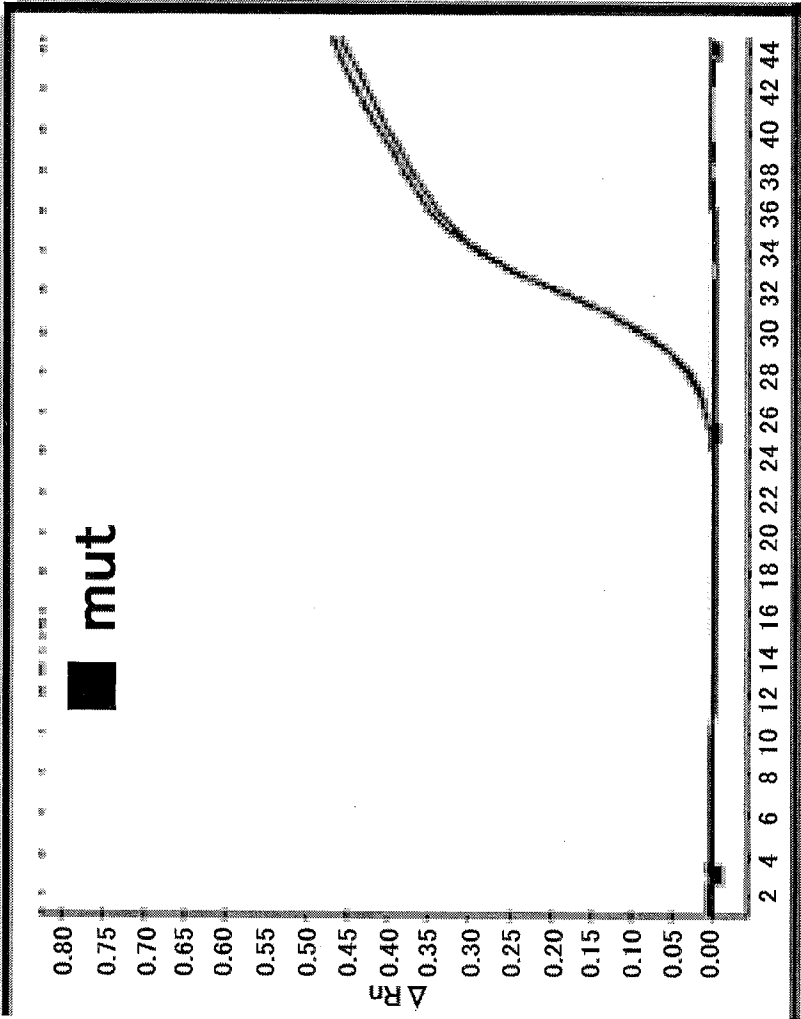
[図 1]の続き



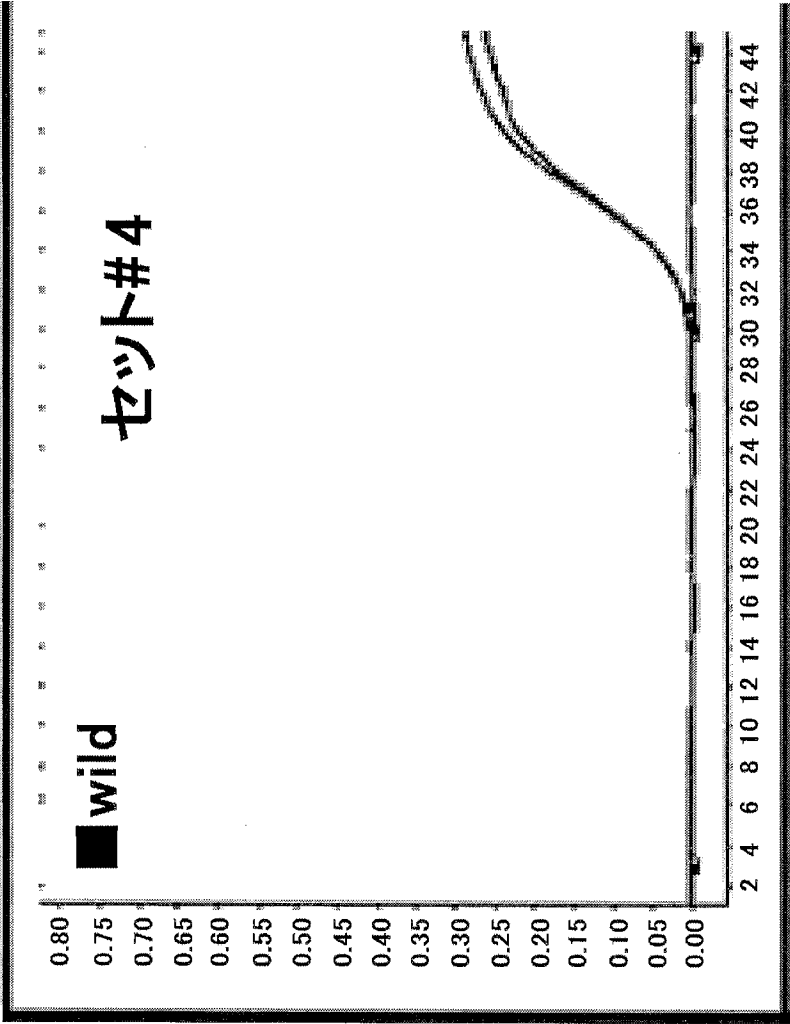
[図 1]の続き



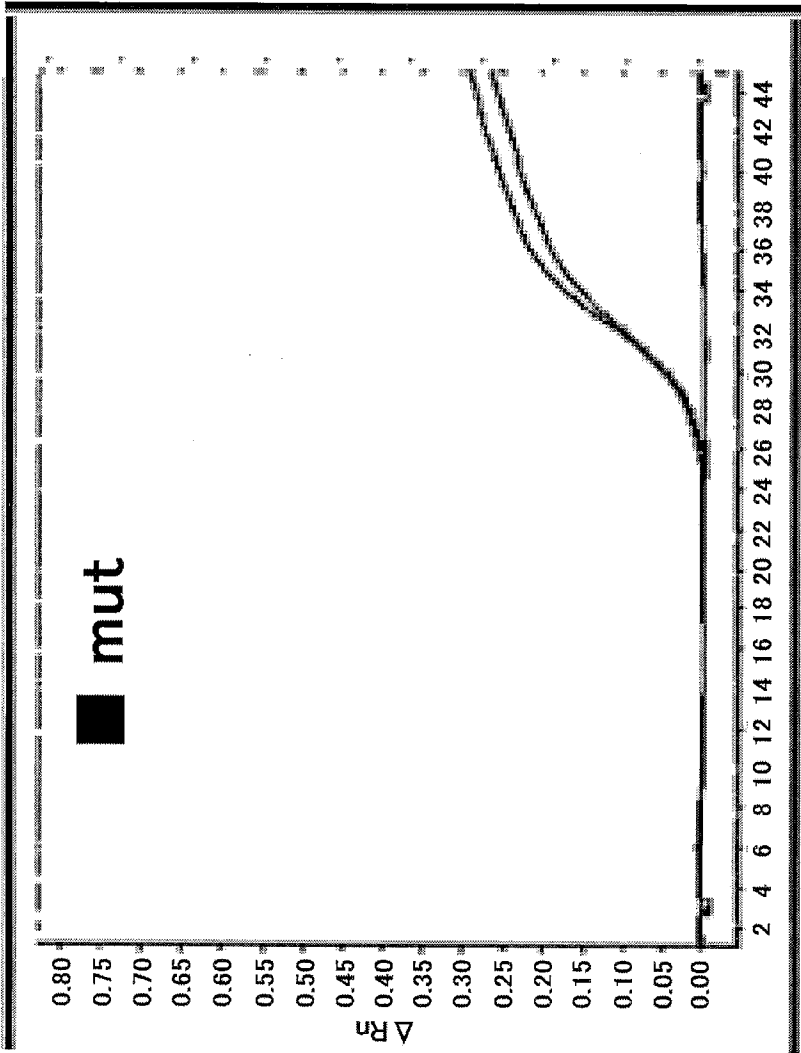
[図 1]の続き



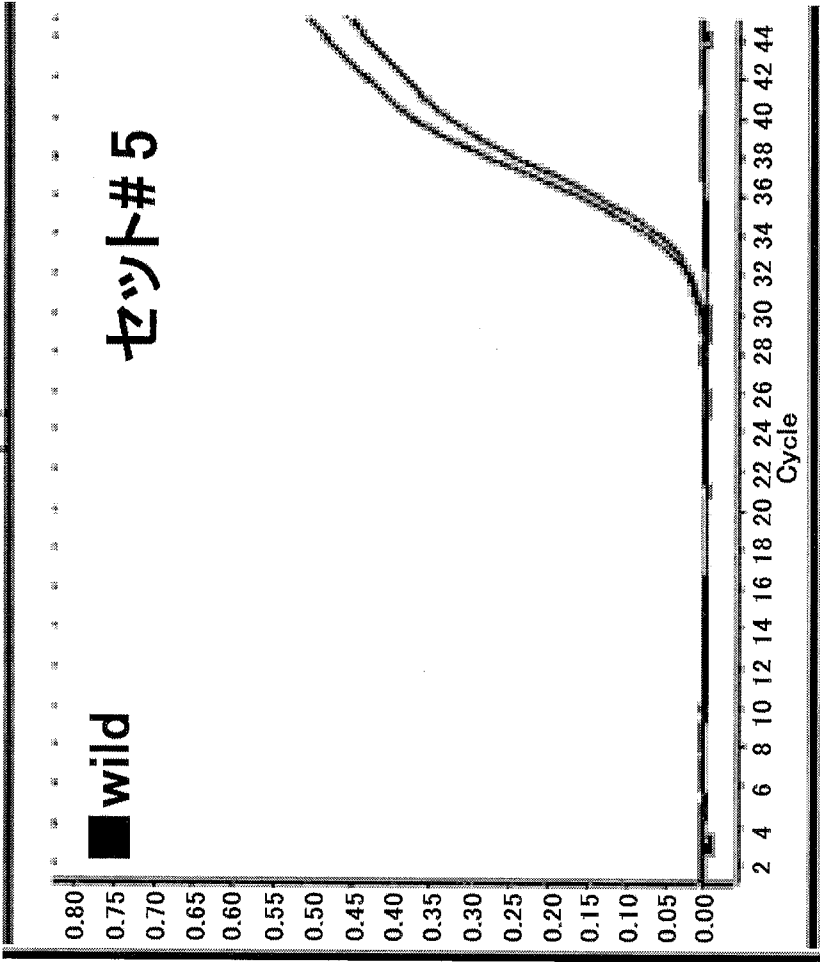
[図 1]の続き



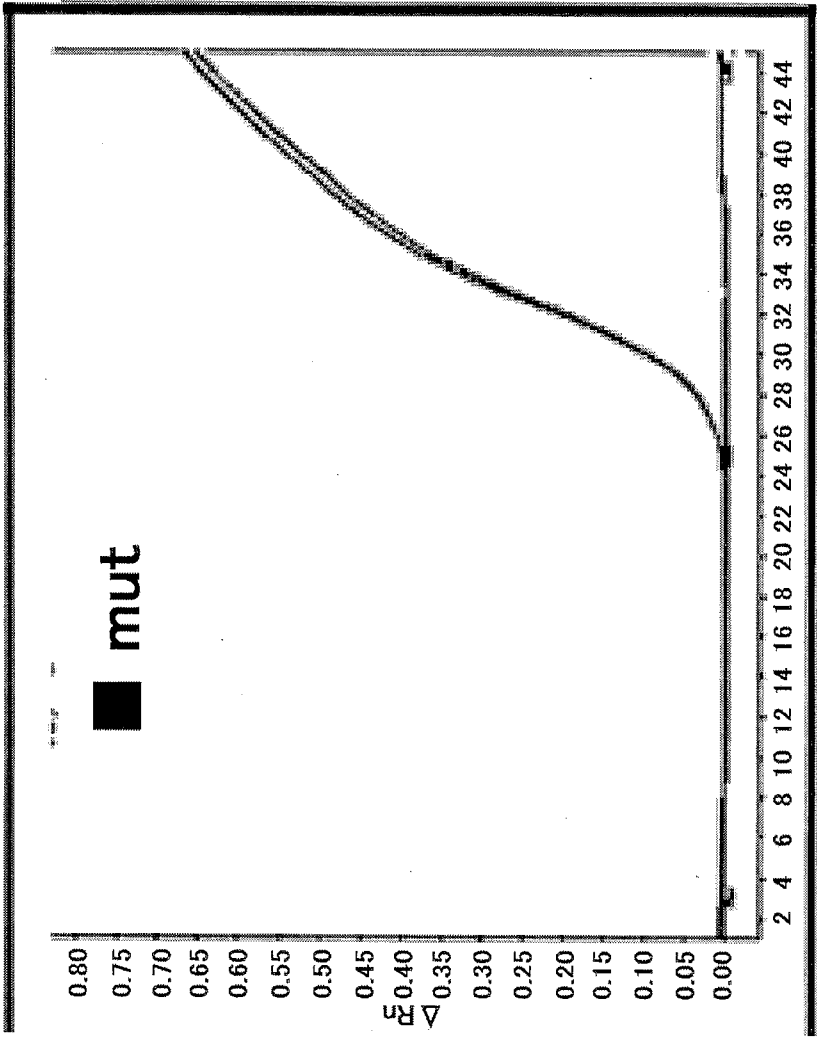
[図 1]の続き



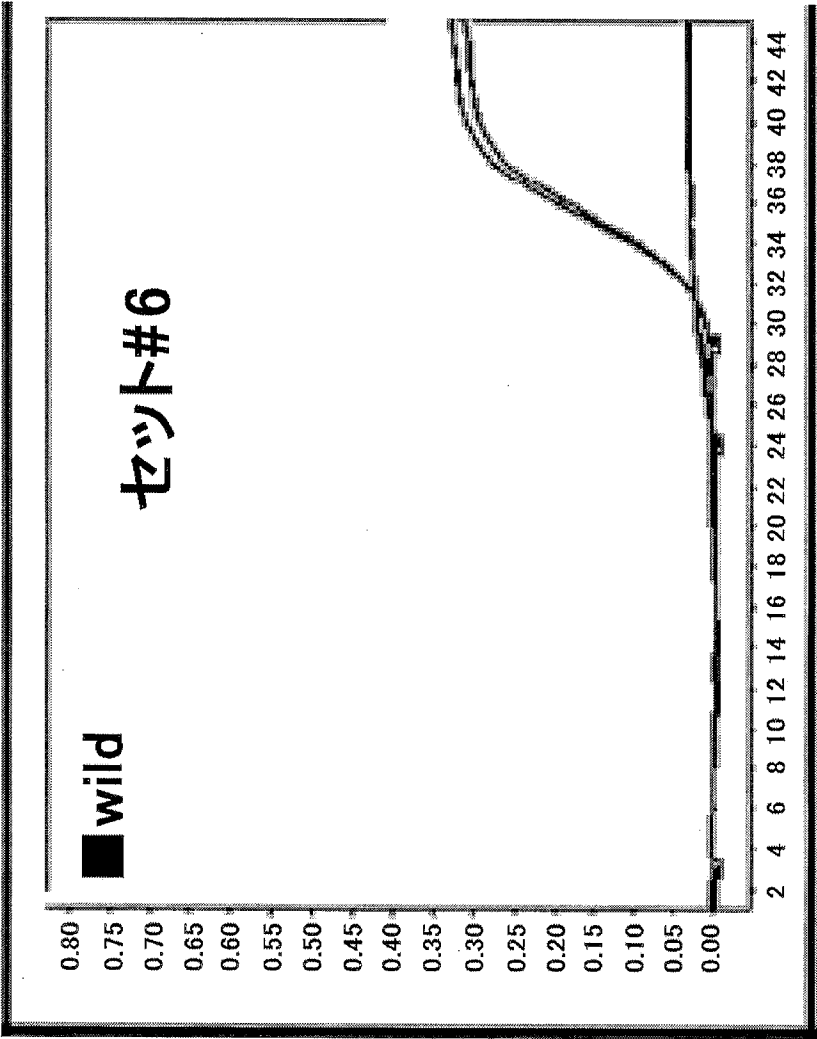
[図 1]の続き



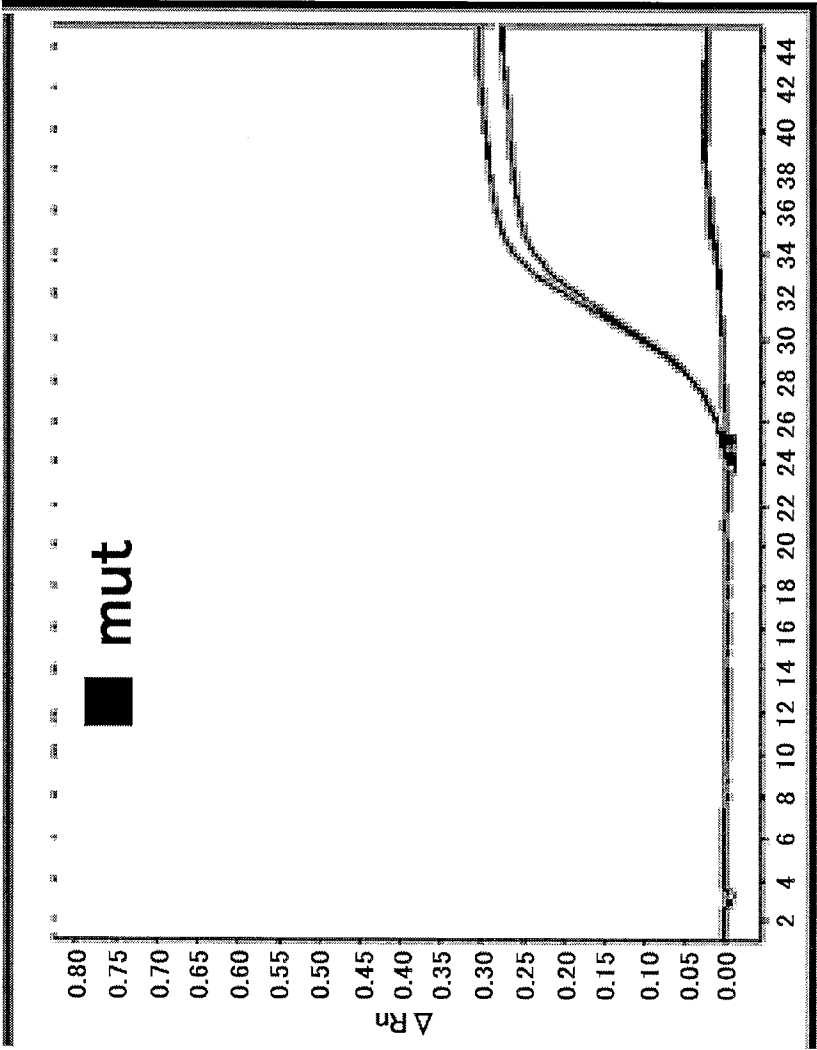
[図 1]の続き



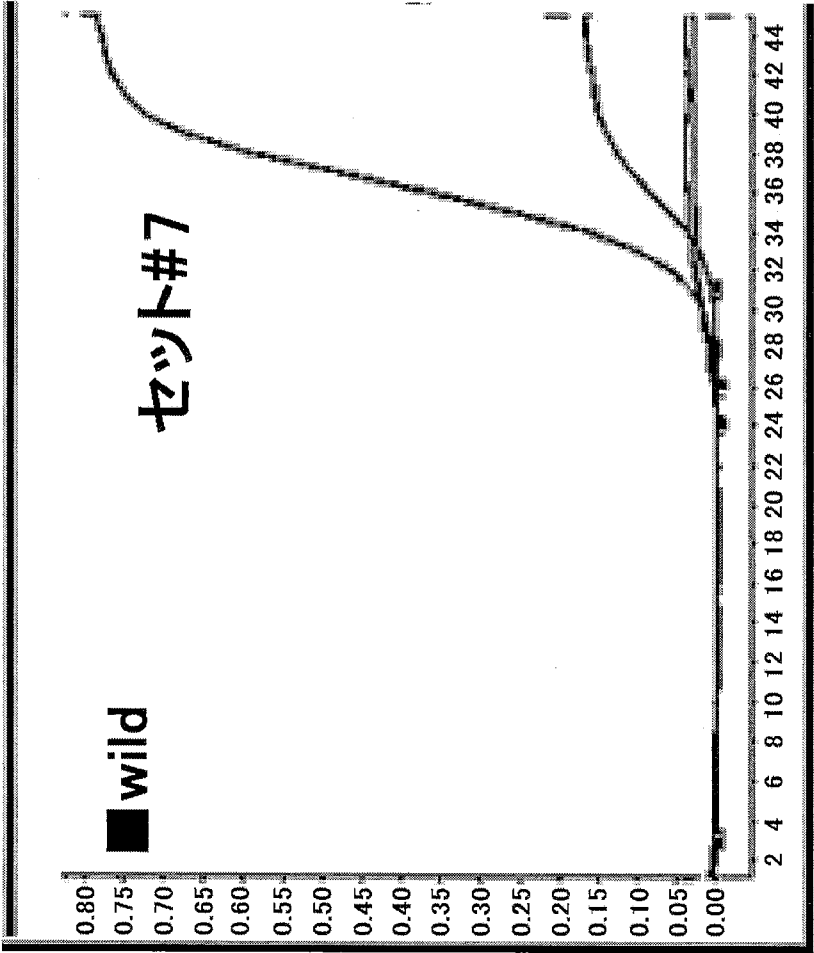
[図 1]の続き



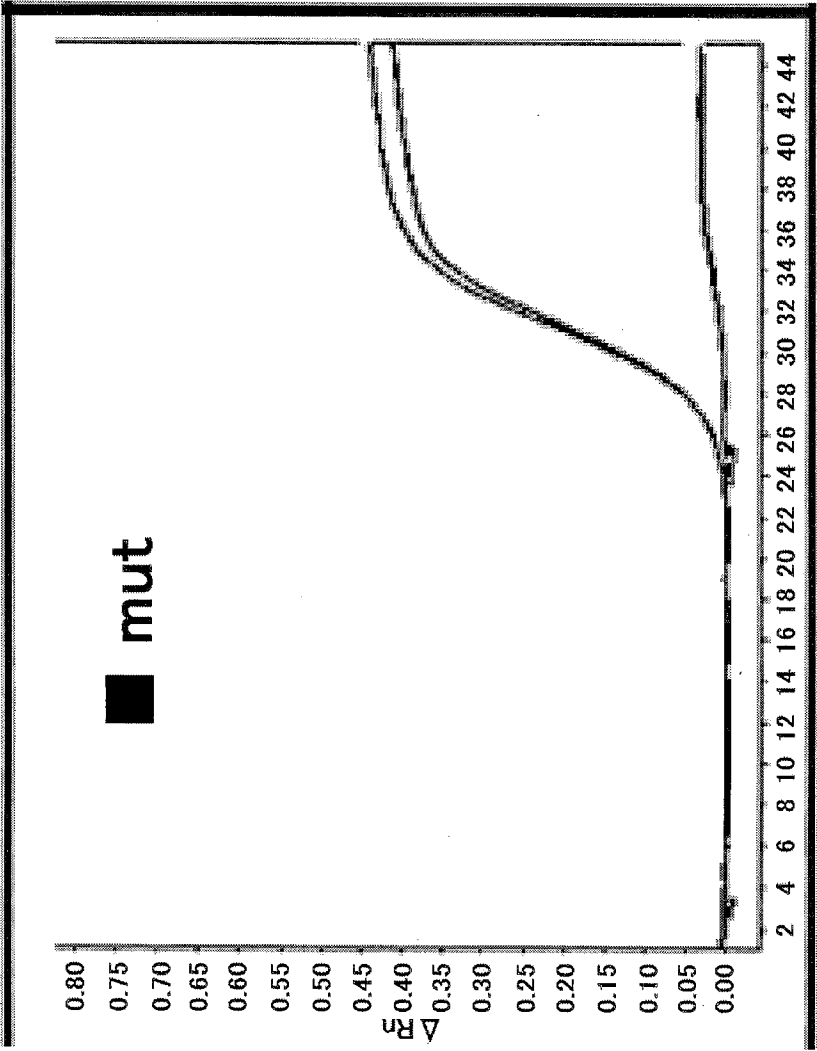
[図 1]の続き



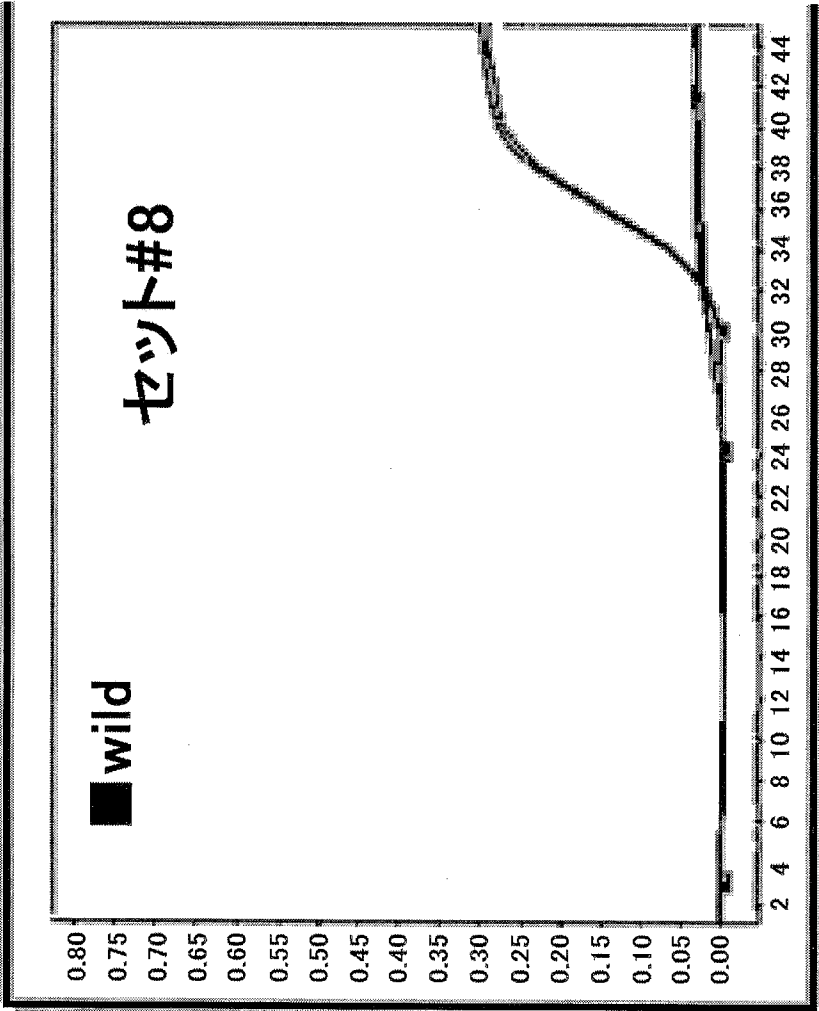
[図 1]の続き



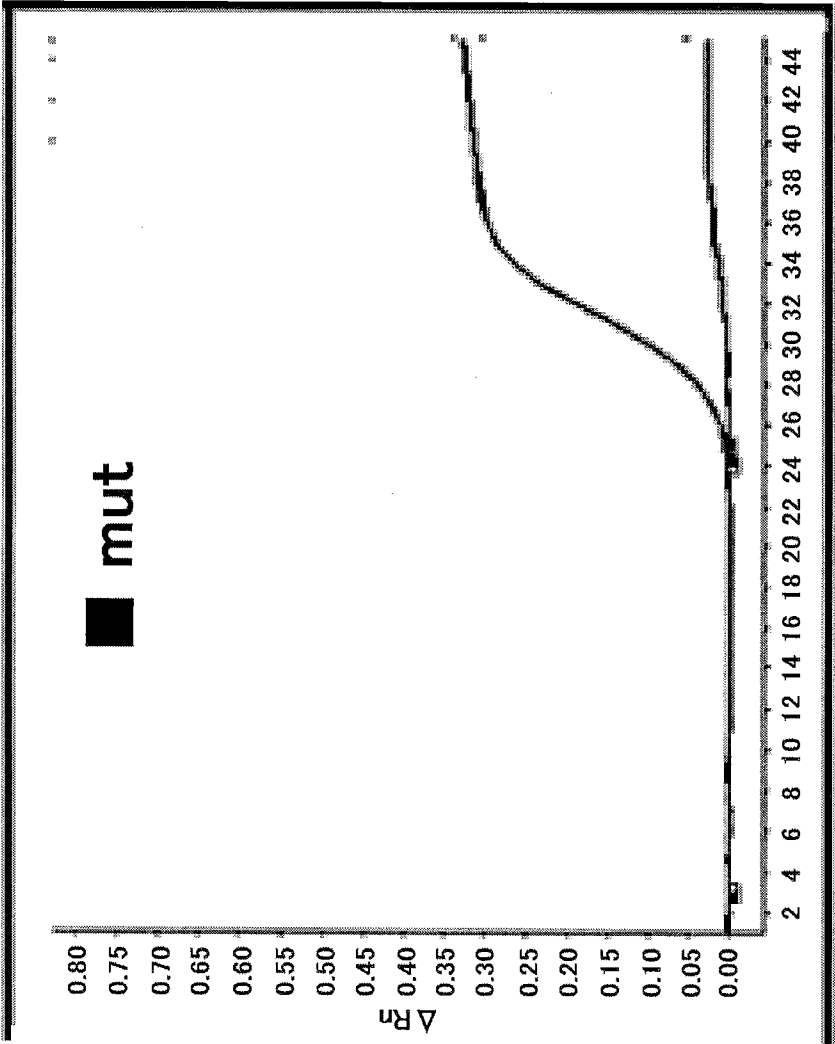
[図 1]の続き



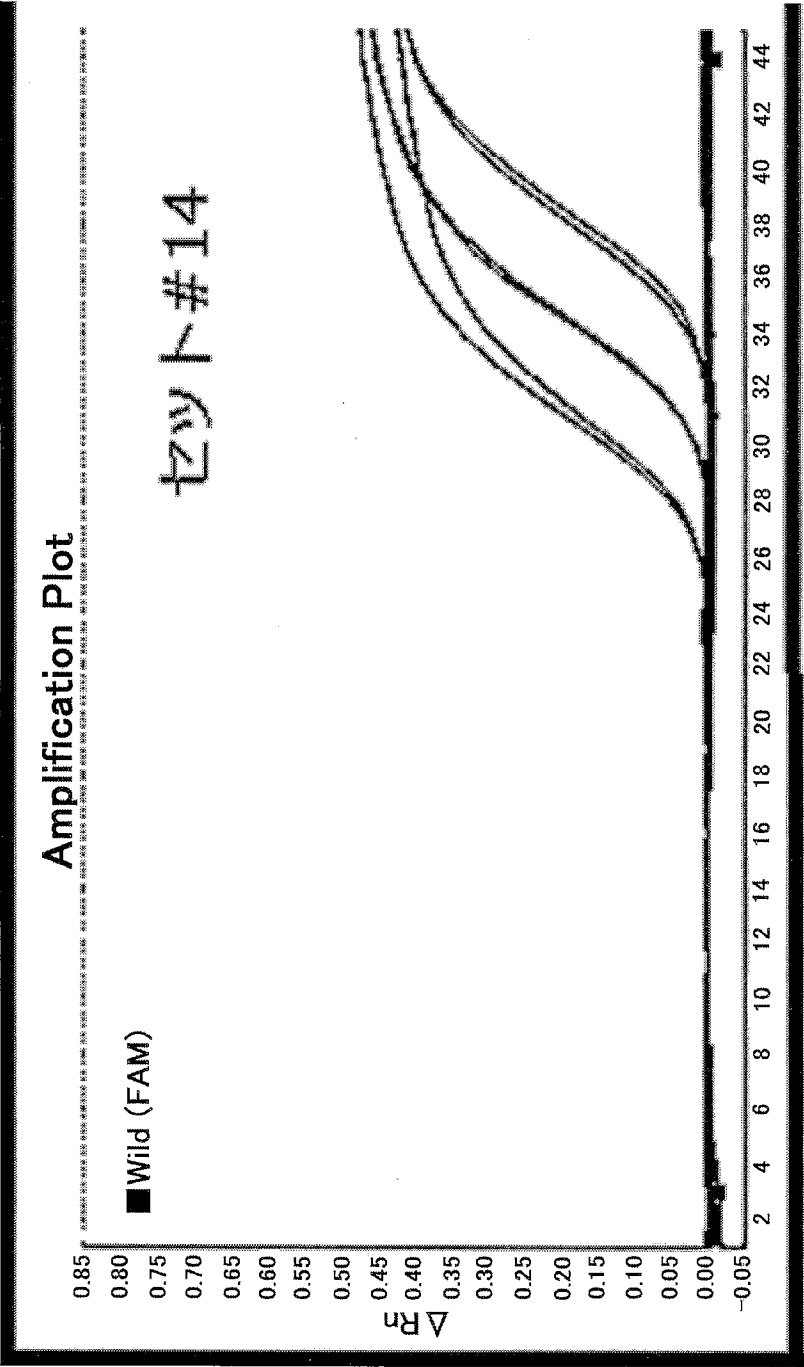
[図 1]の続き



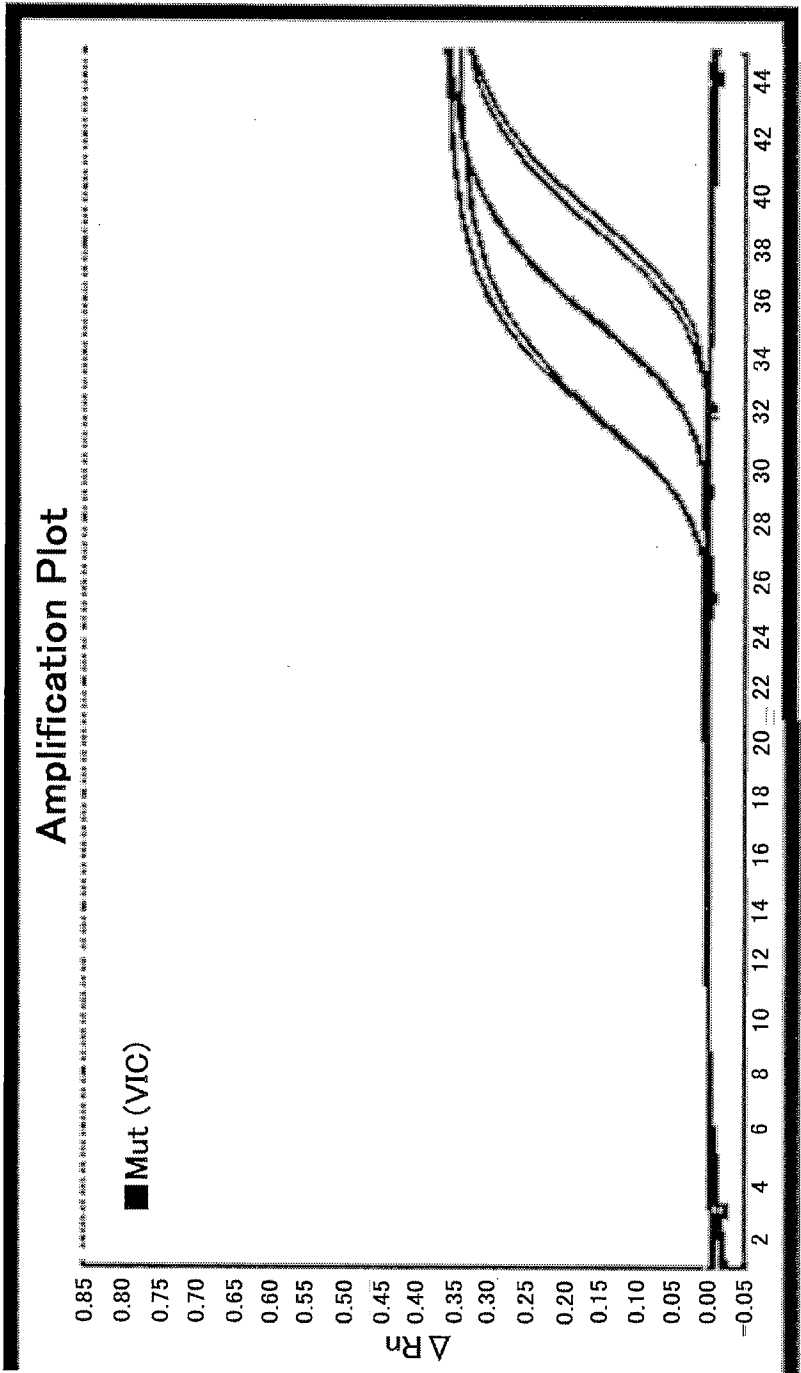
[図 1]の続き



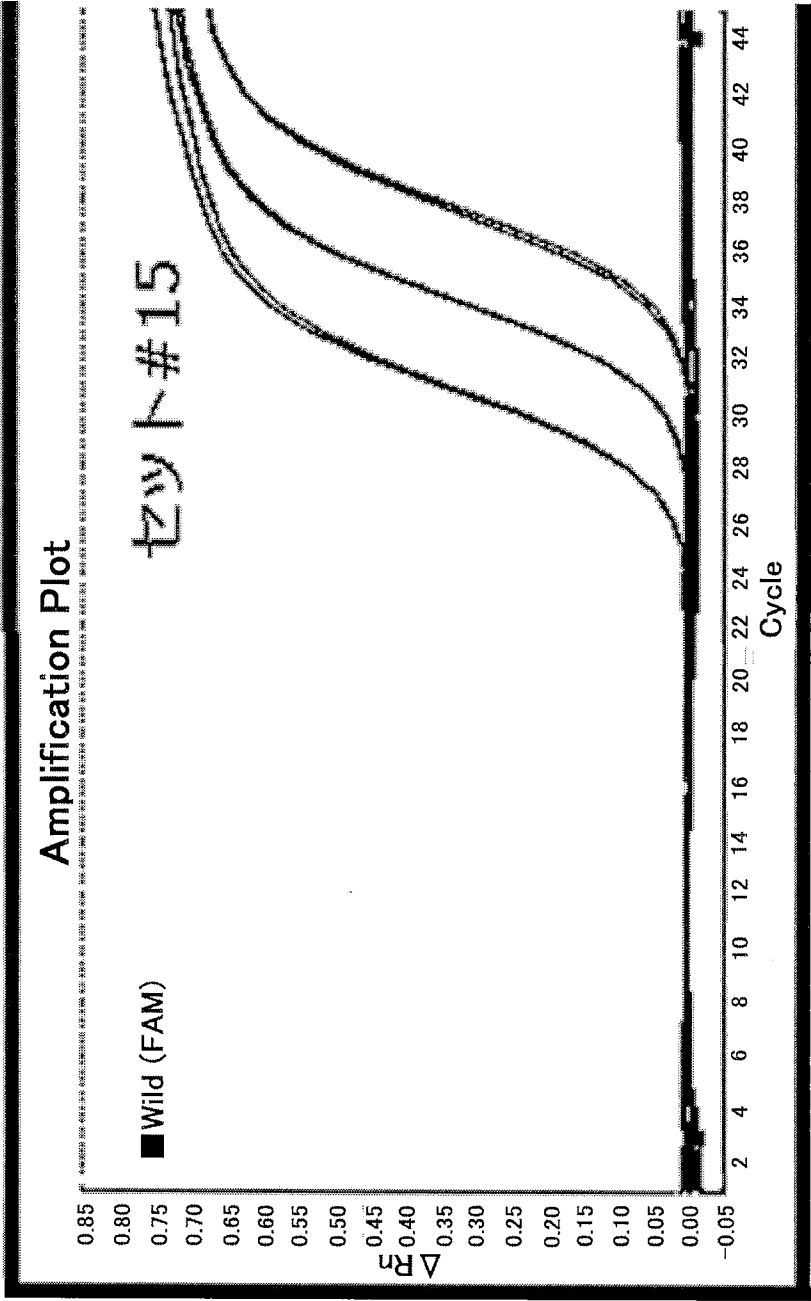
[図 2]



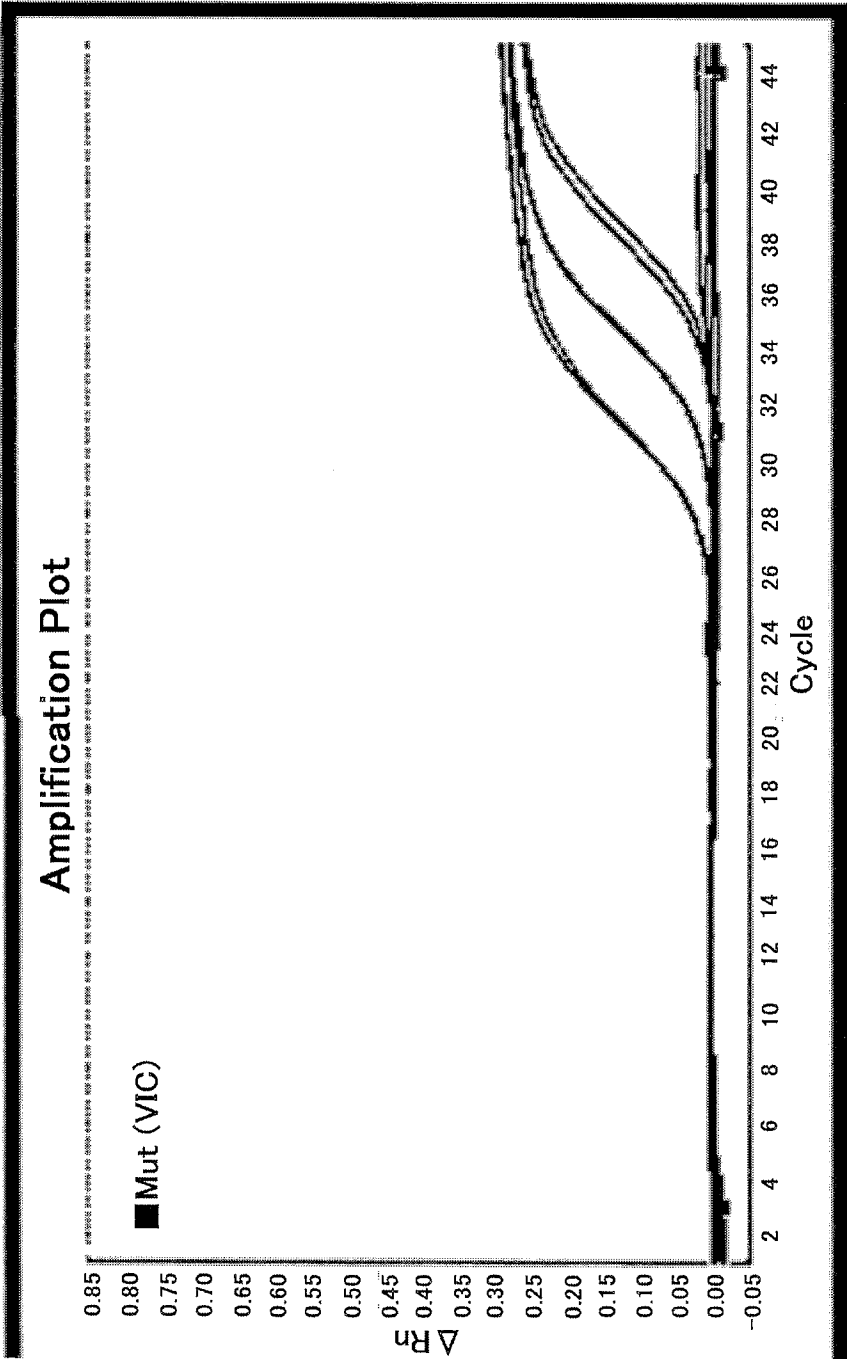
[図 2]の続き



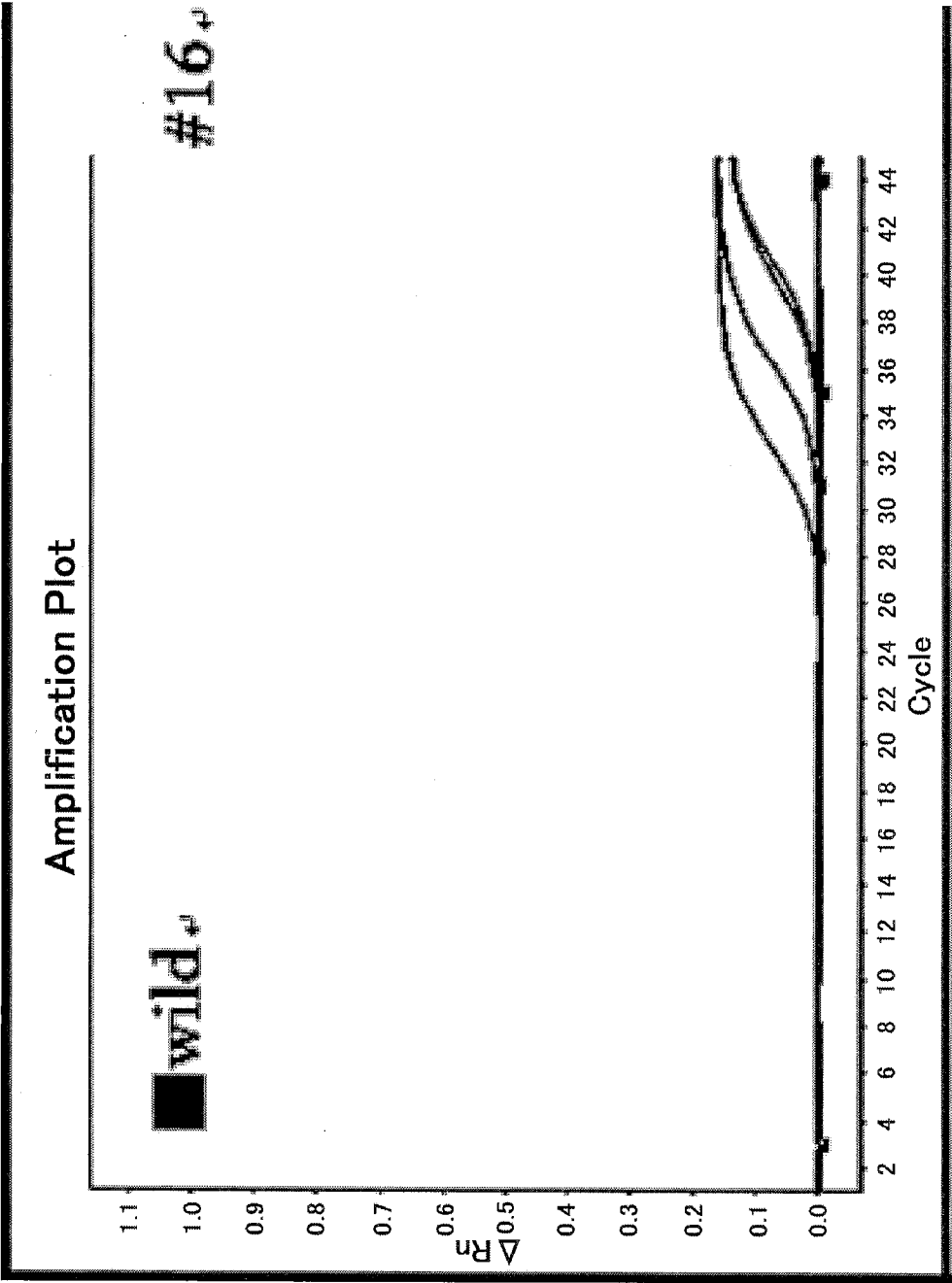
[図 2]の続き



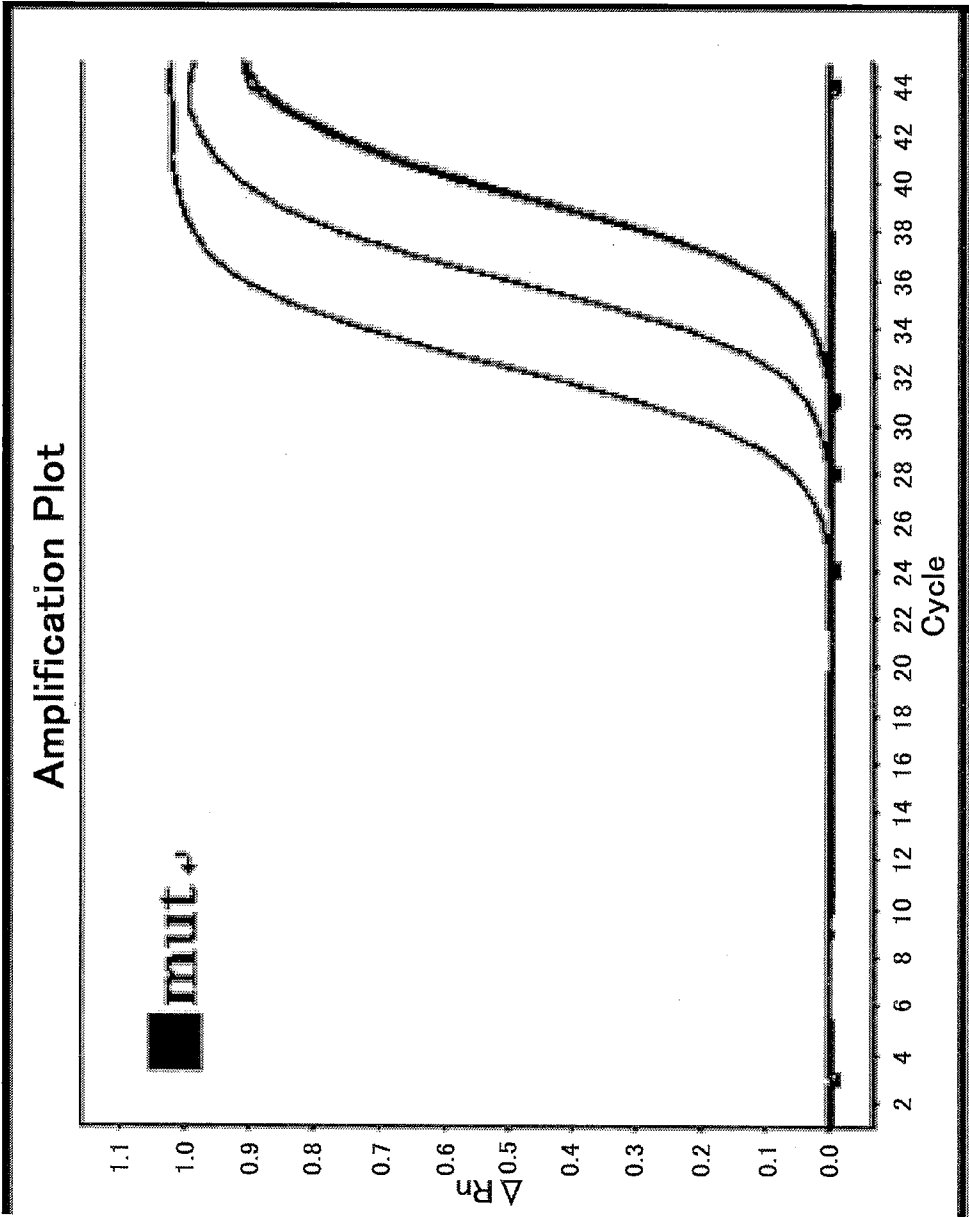
[図 2]の続き



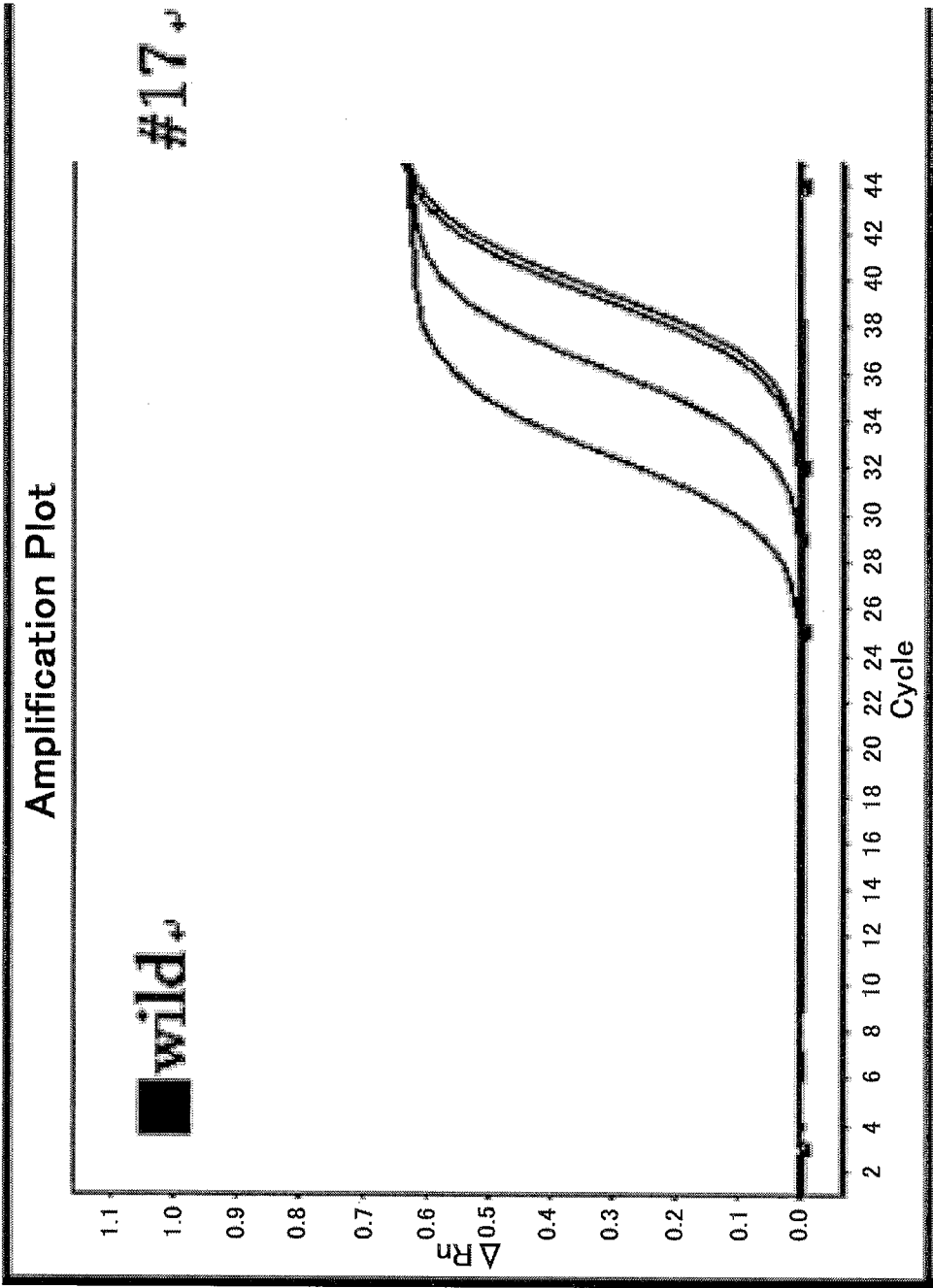
[図 3]



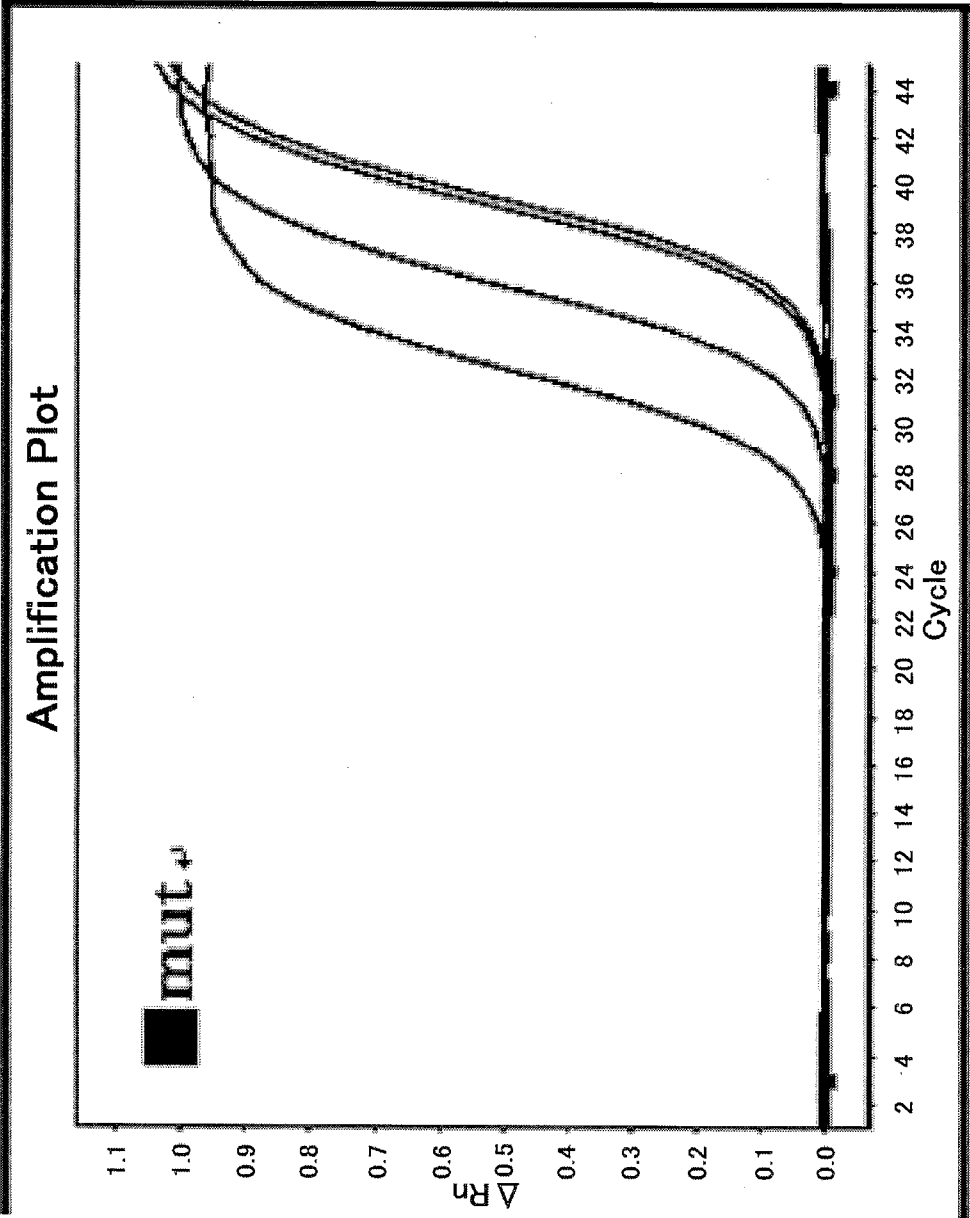
[図 3]の続き



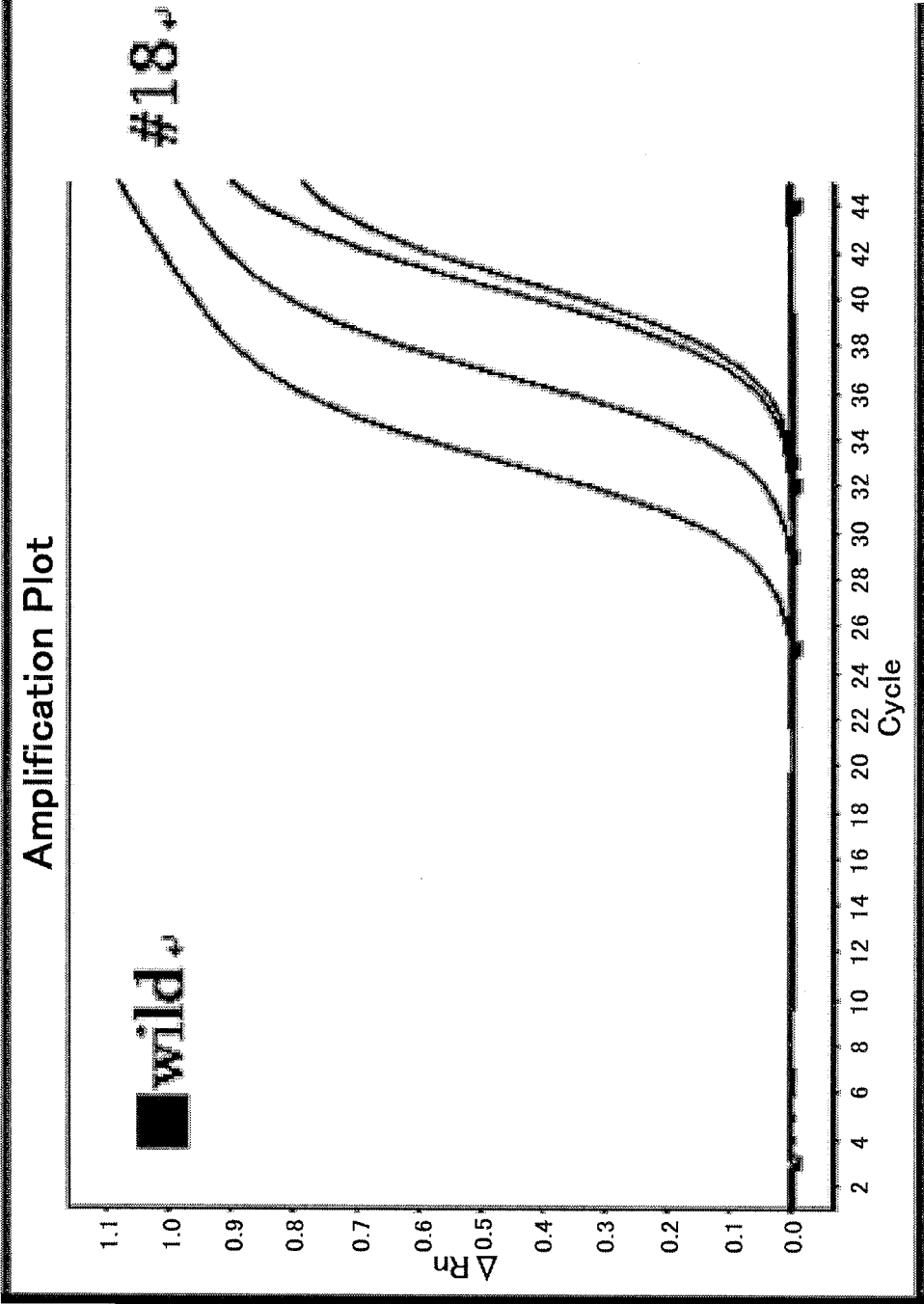
[図 3]の続き



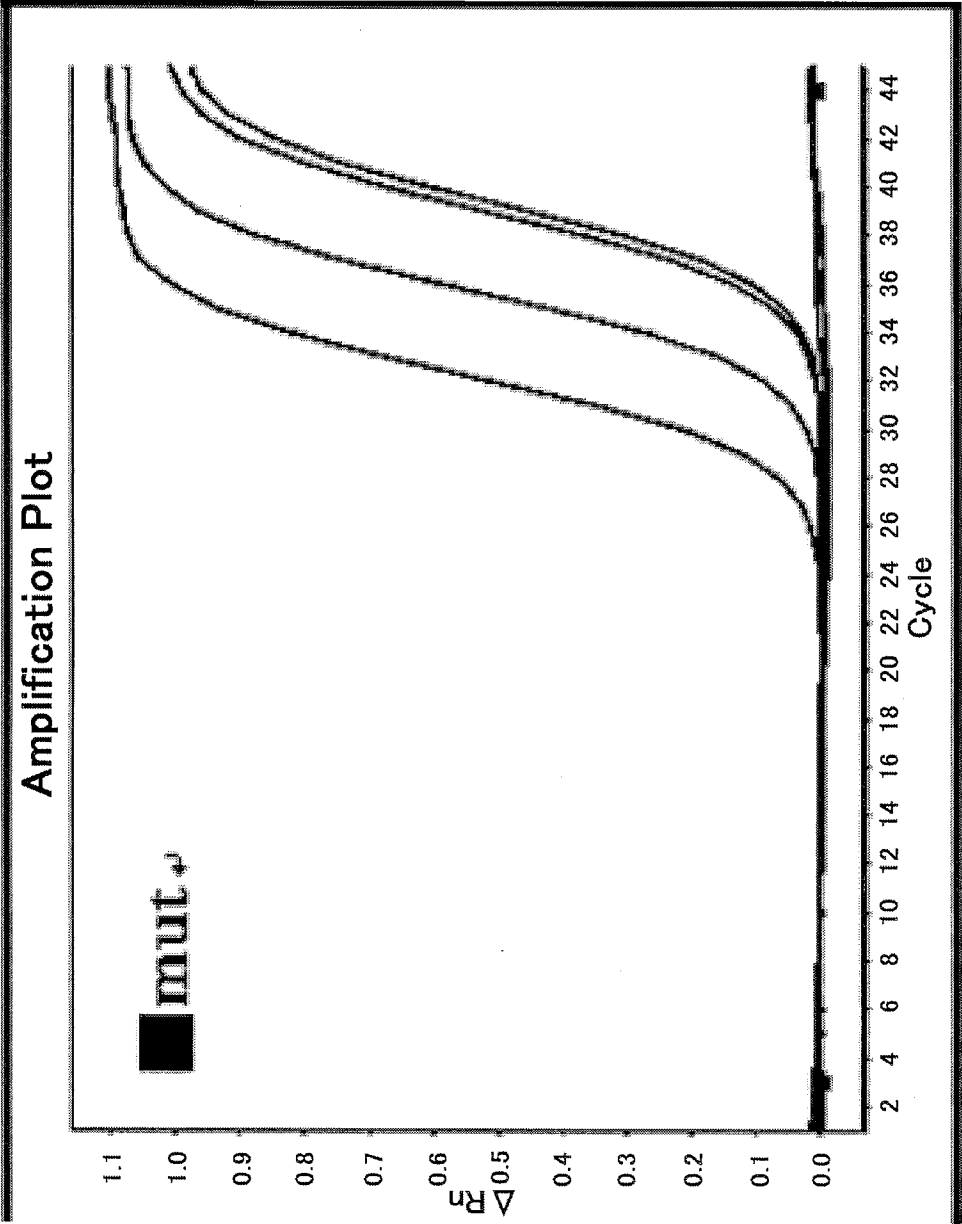
[図 3]の続き



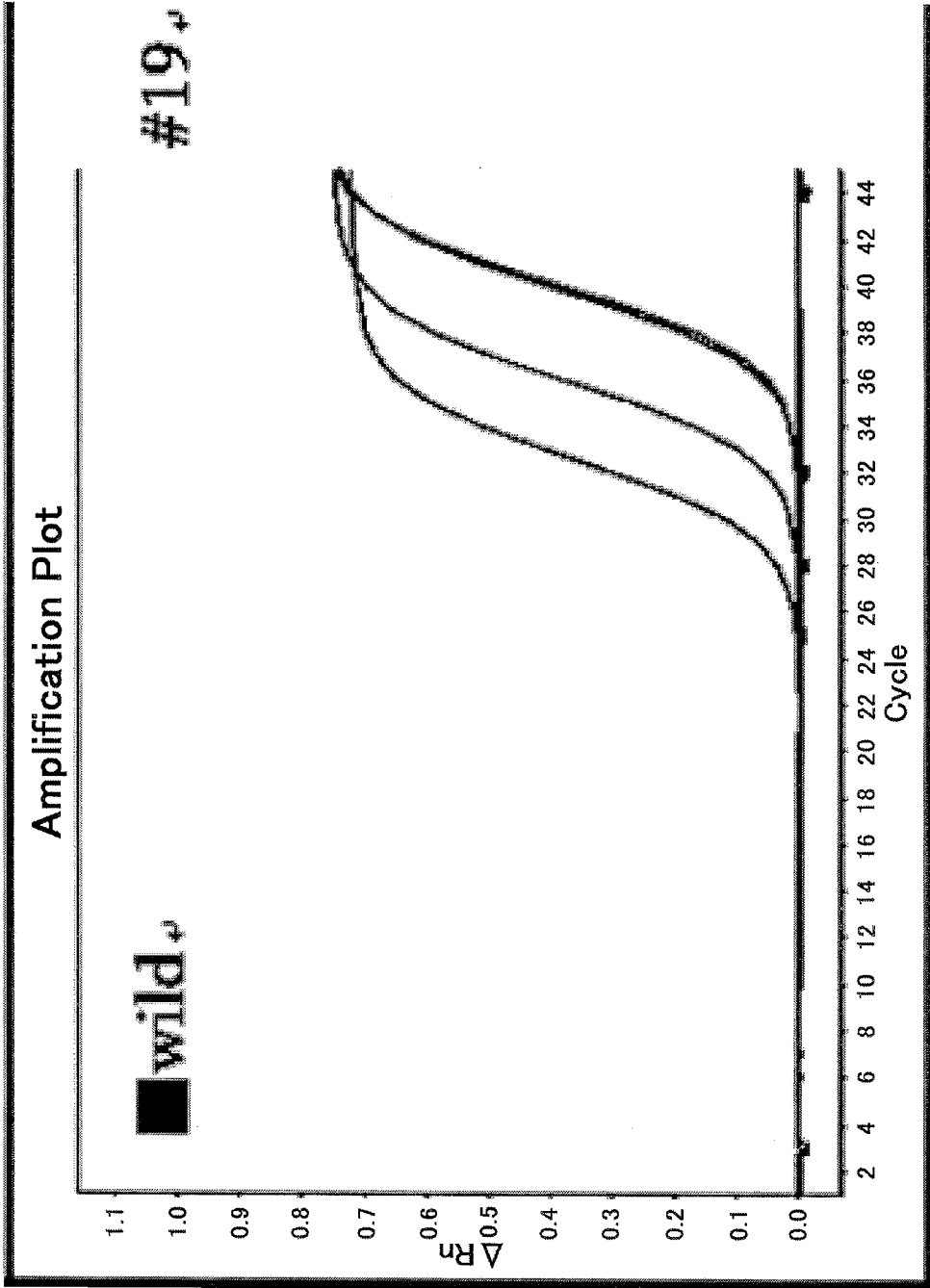
[図 3]の続き



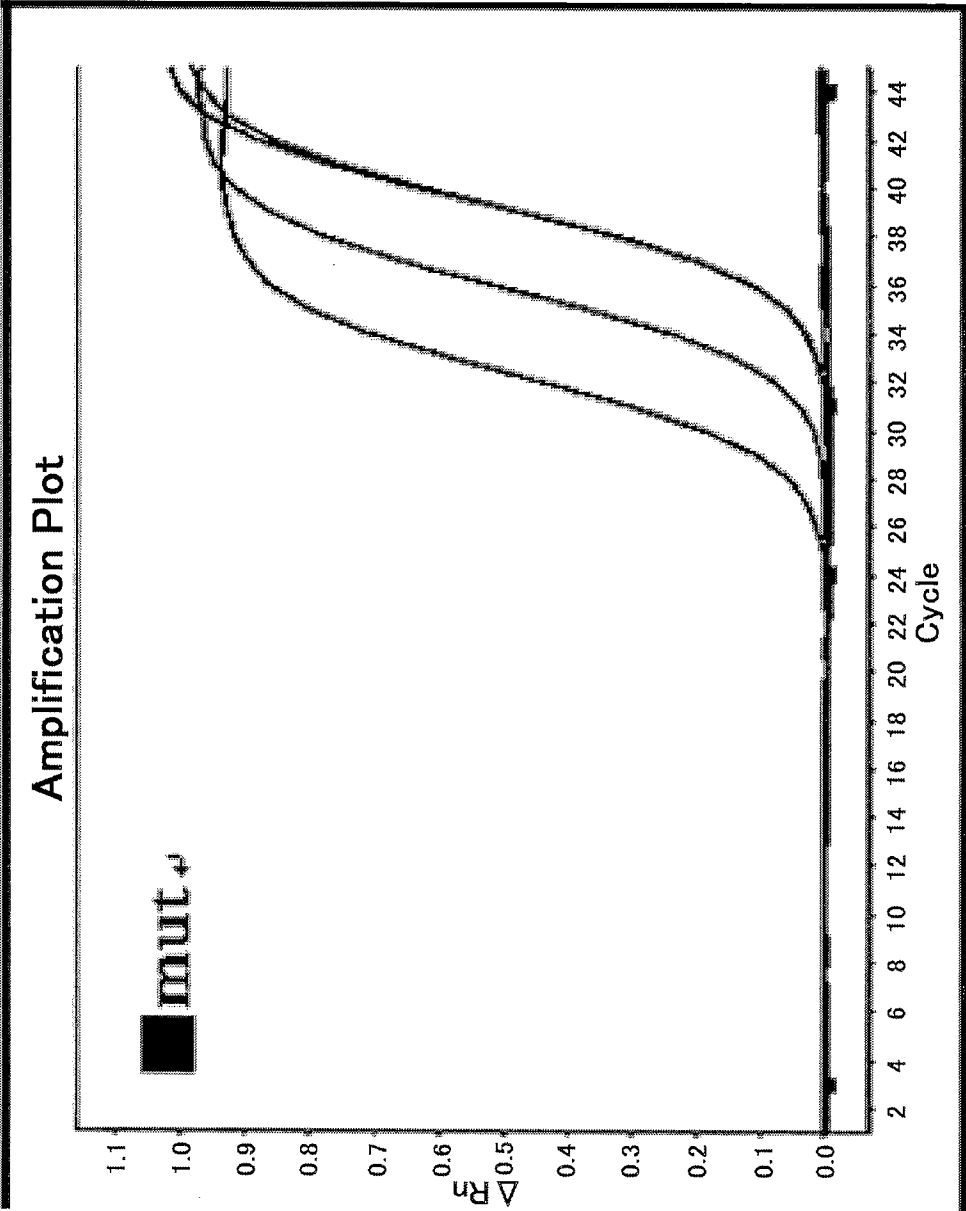
[図 3]の続き



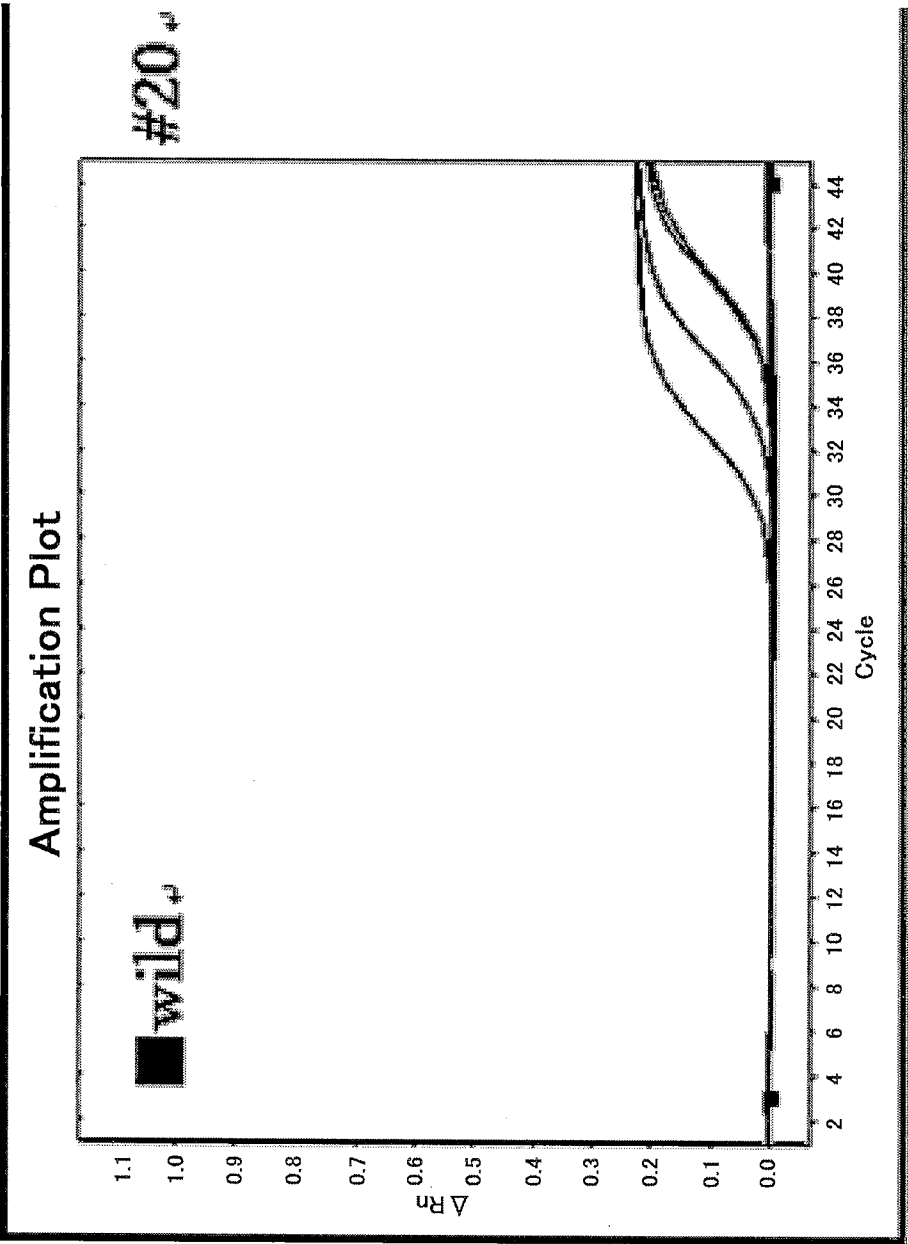
[図 3]の続き



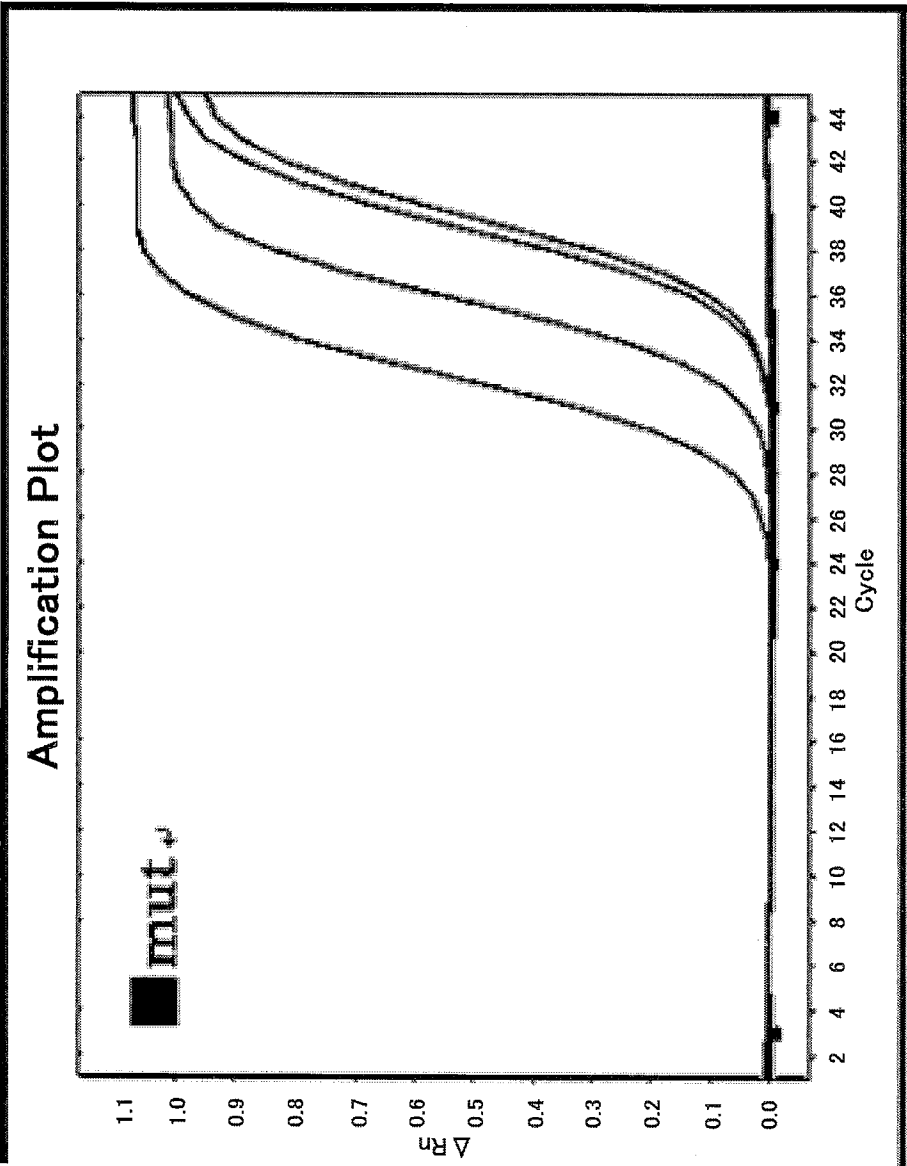
[図 3]の続き



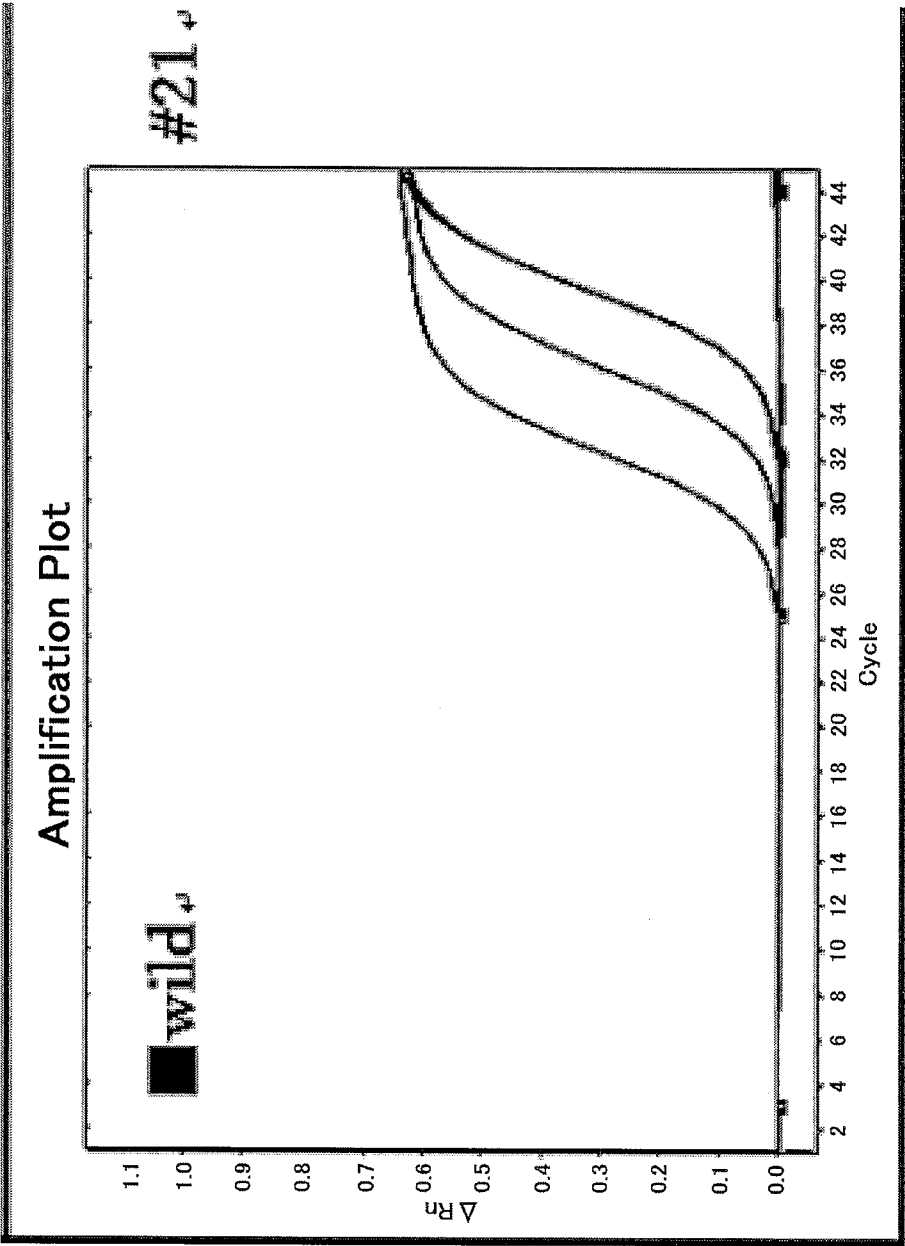
[図 4]



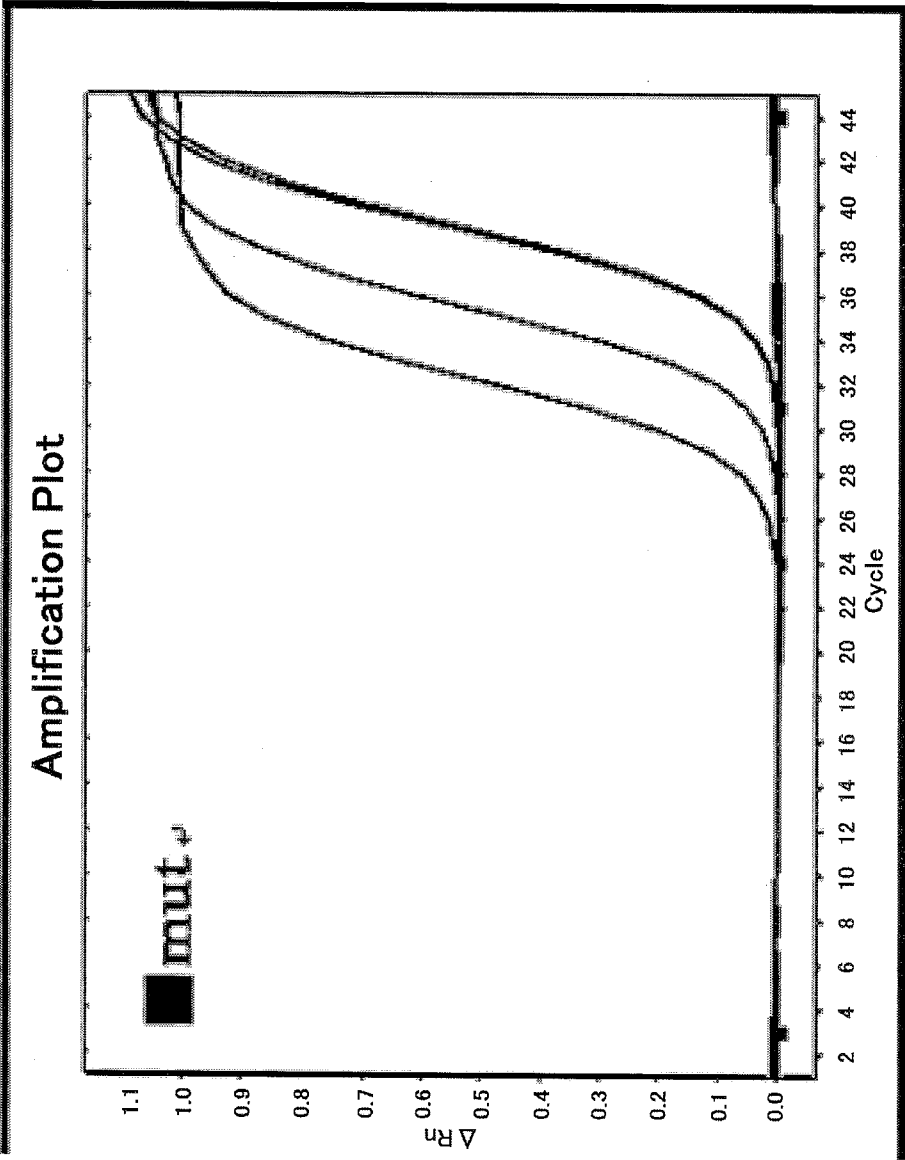
[図 4]の続き



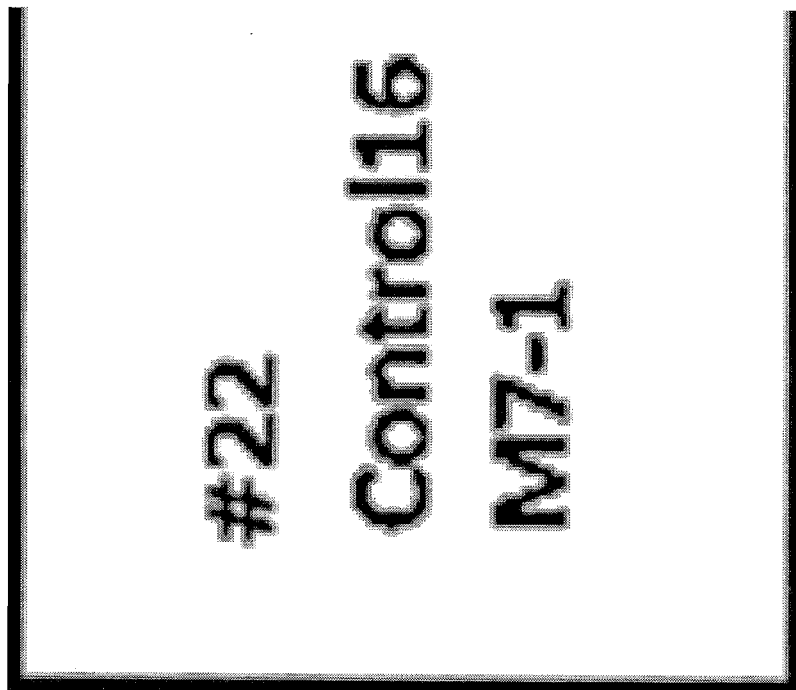
[図 4]の続き



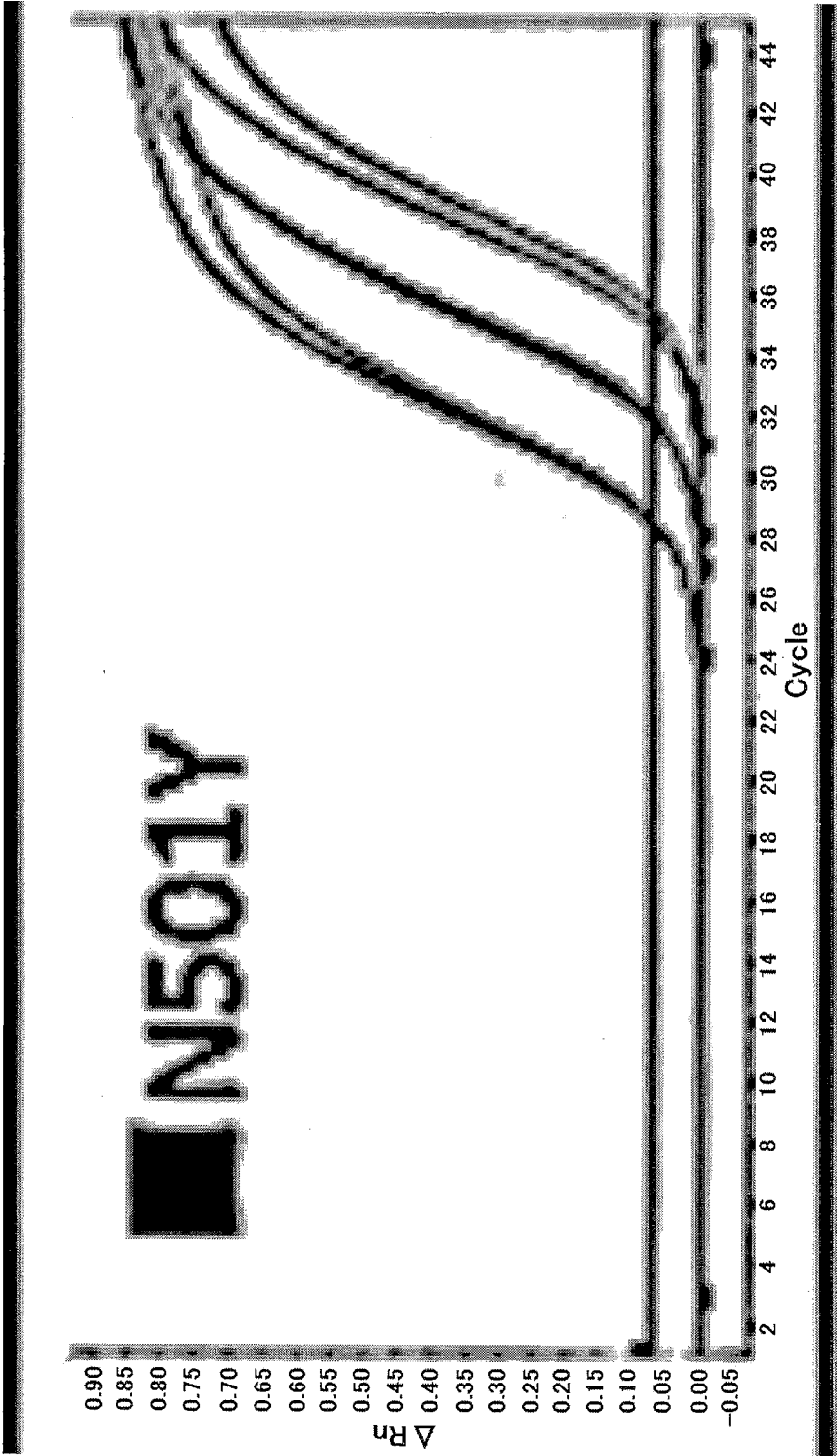
[図 4]の続き



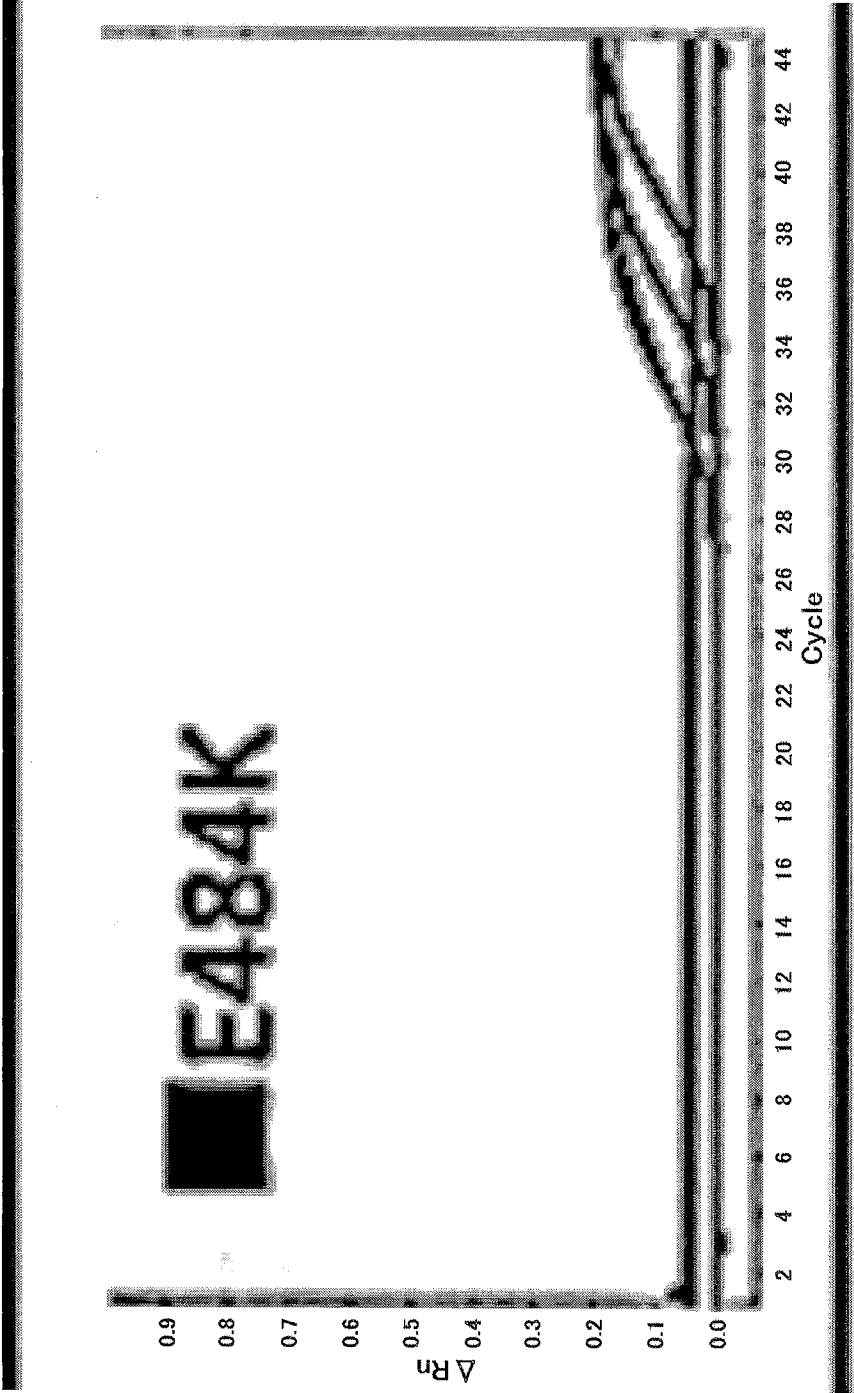
[図 5]



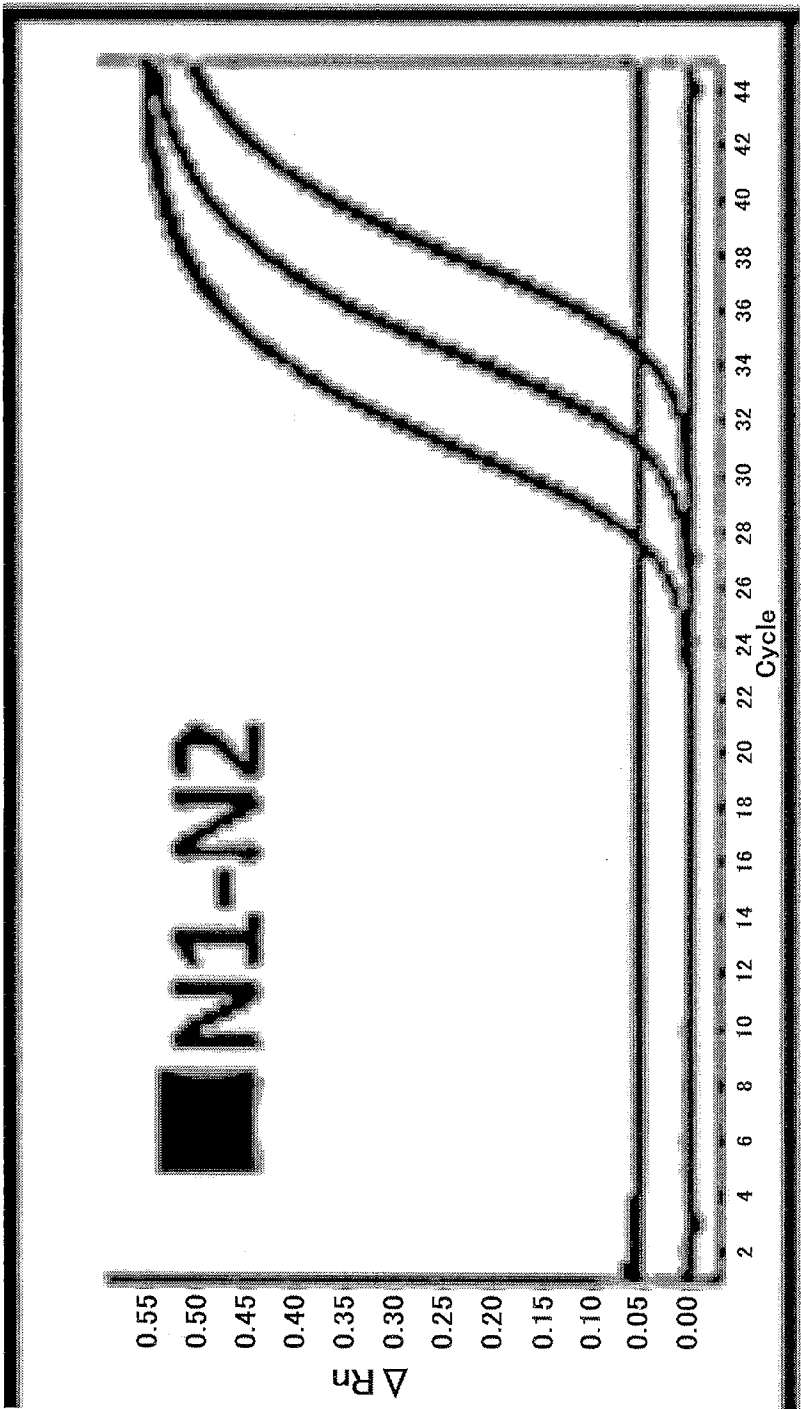
[図 5]の続き



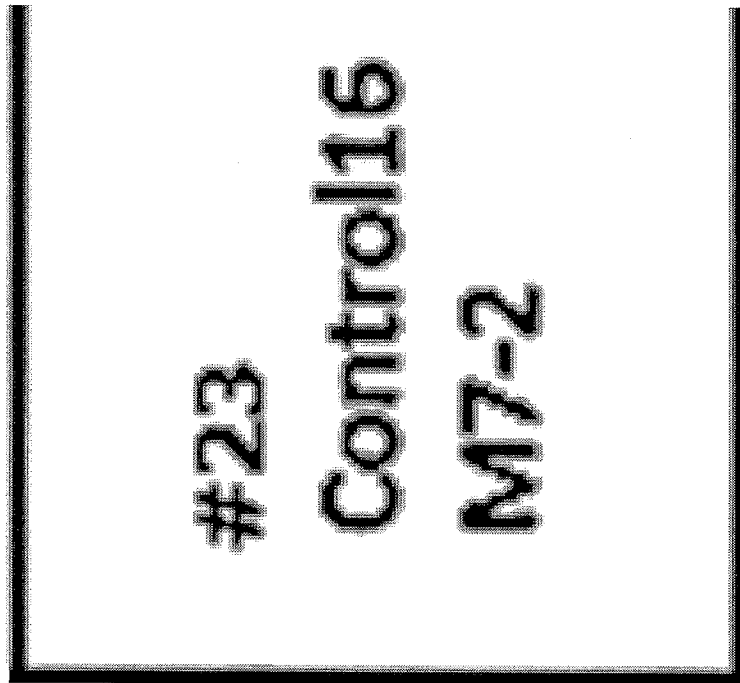
[図 5]の続き



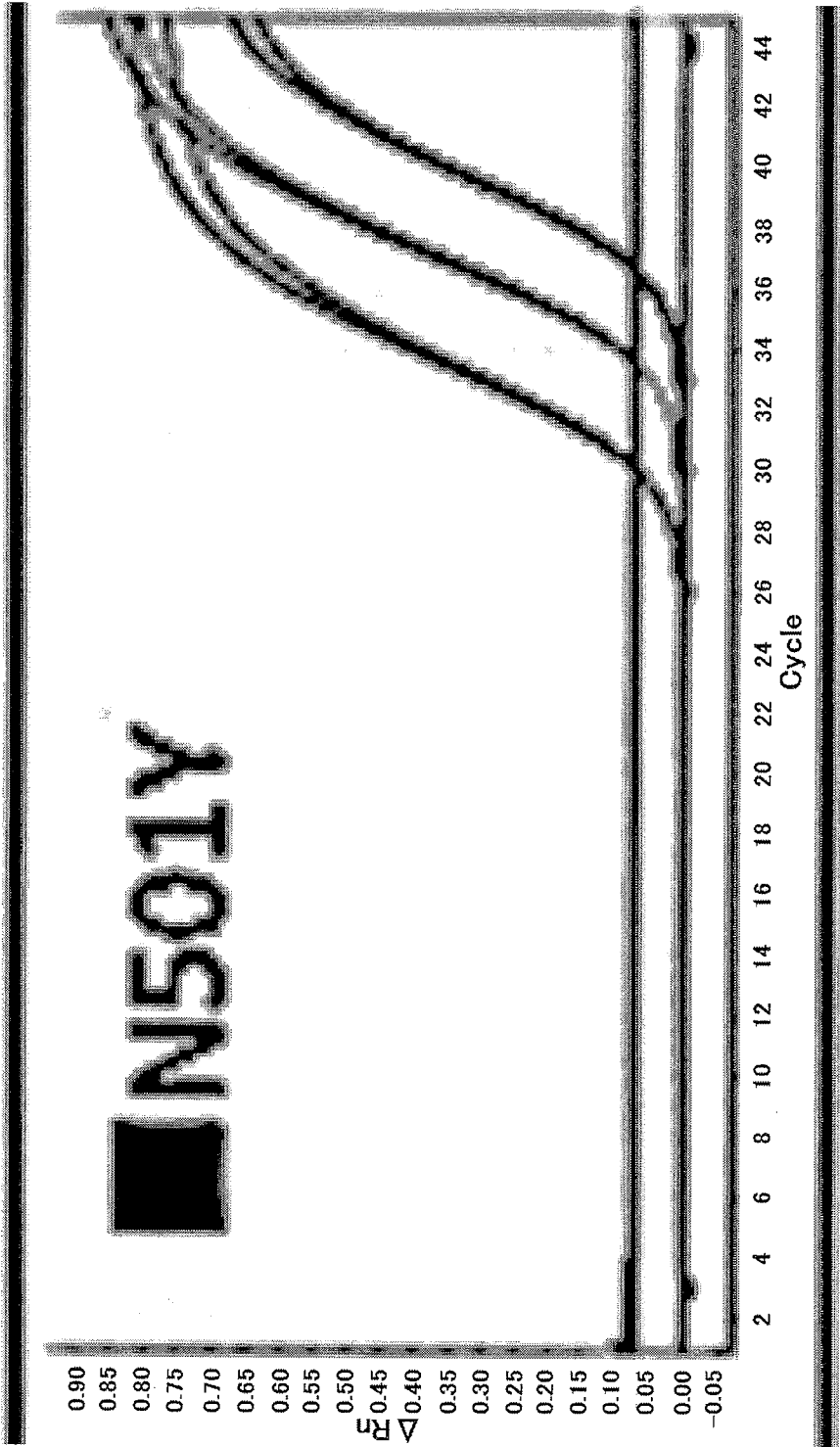
[図 5]の続き



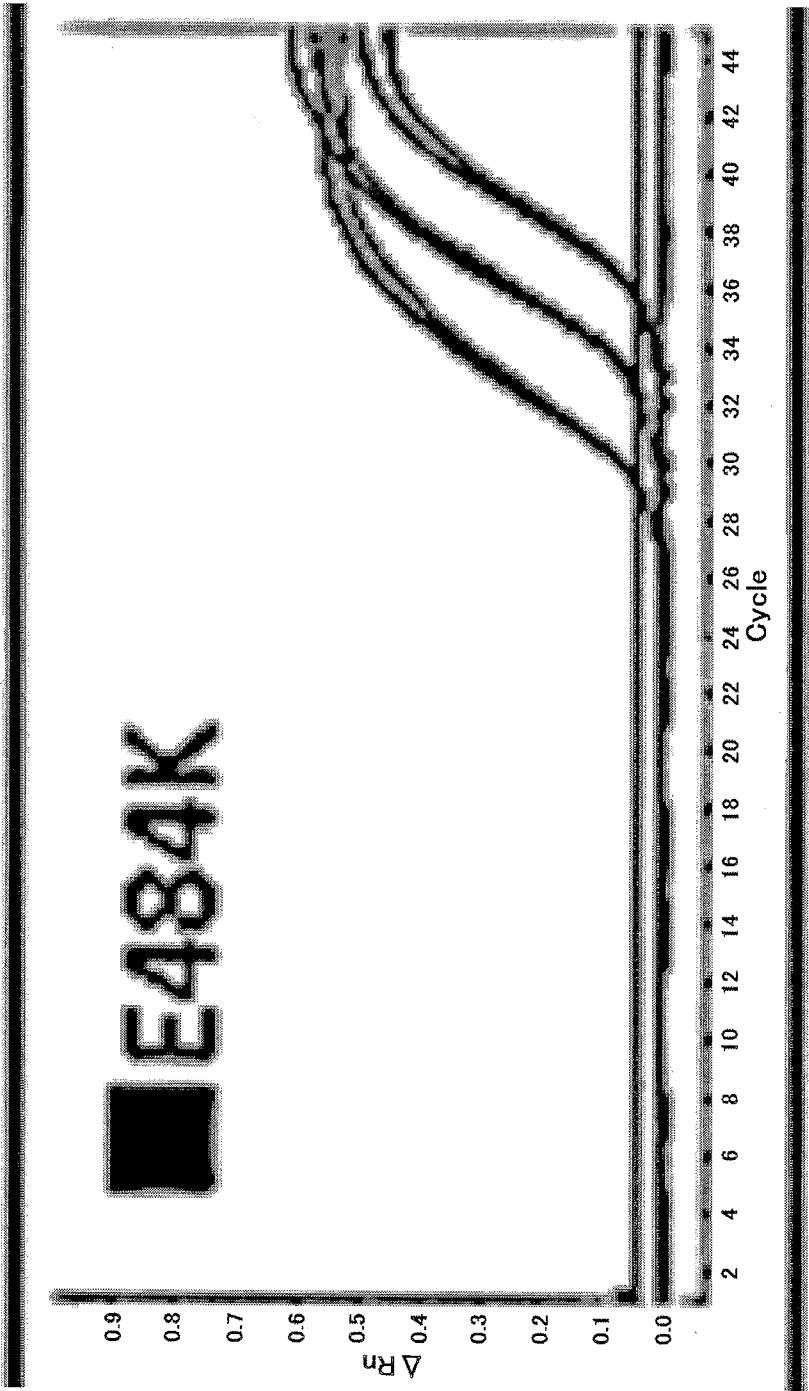
[図 5]の続き



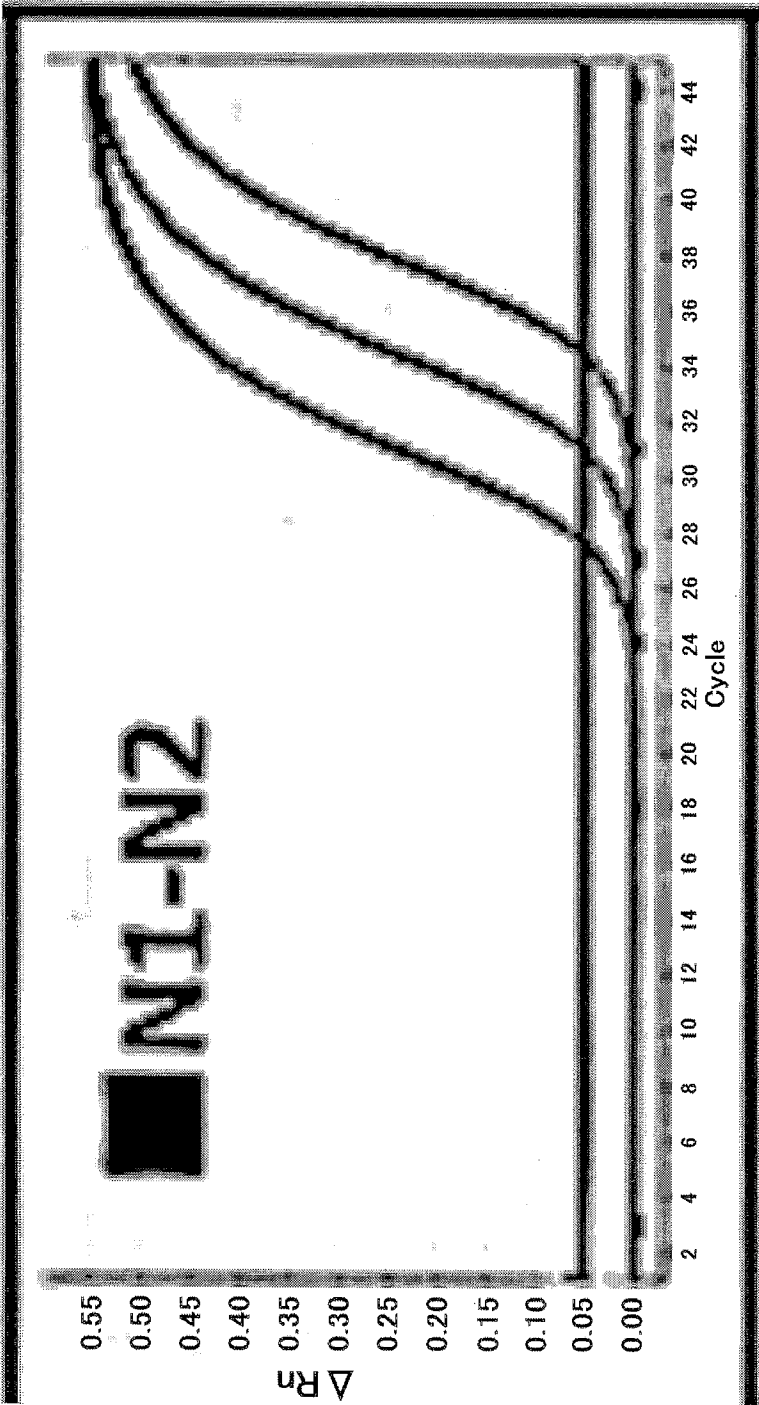
[図 5]の続き



[図 5]の続き



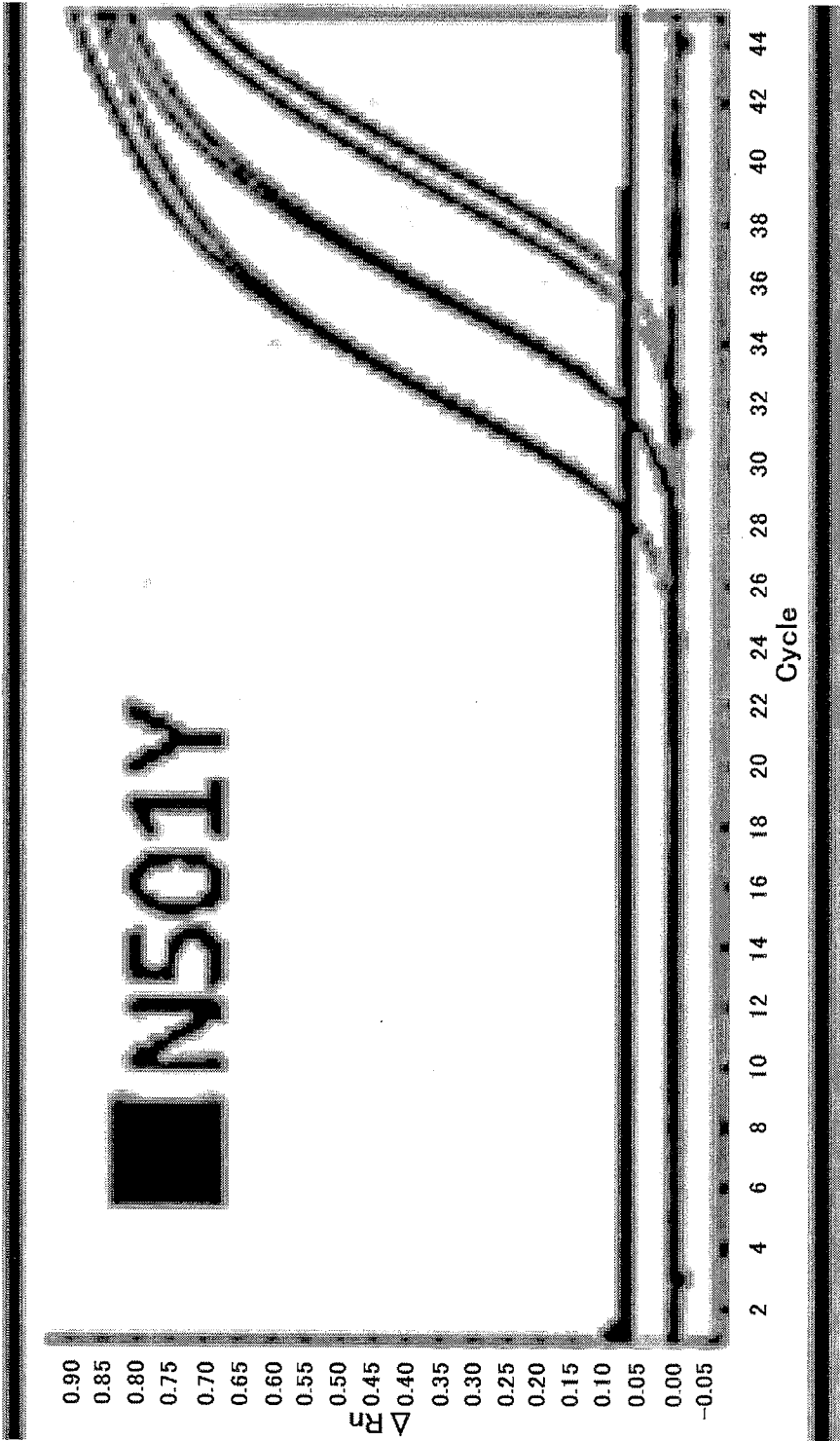
[図 5]の続き



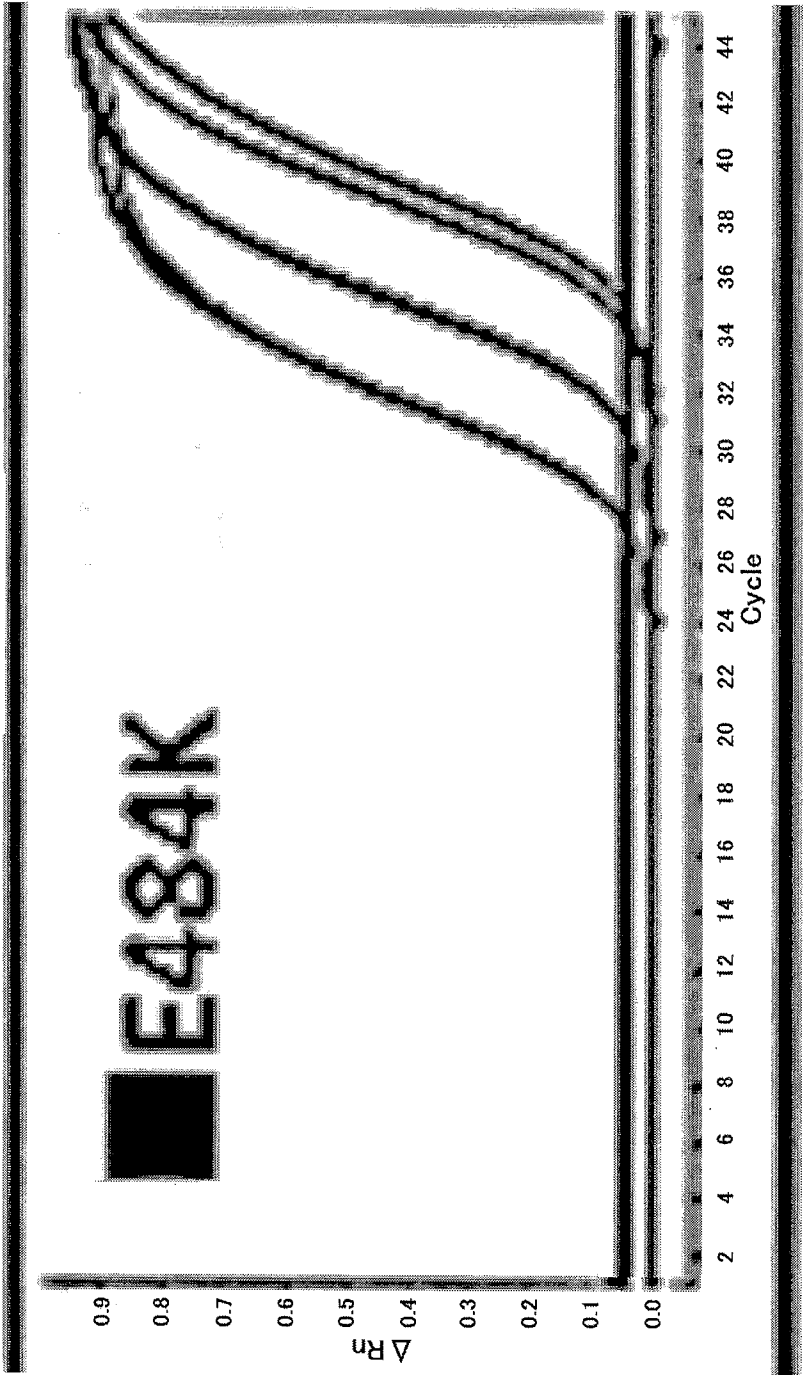
[図 5]の続き



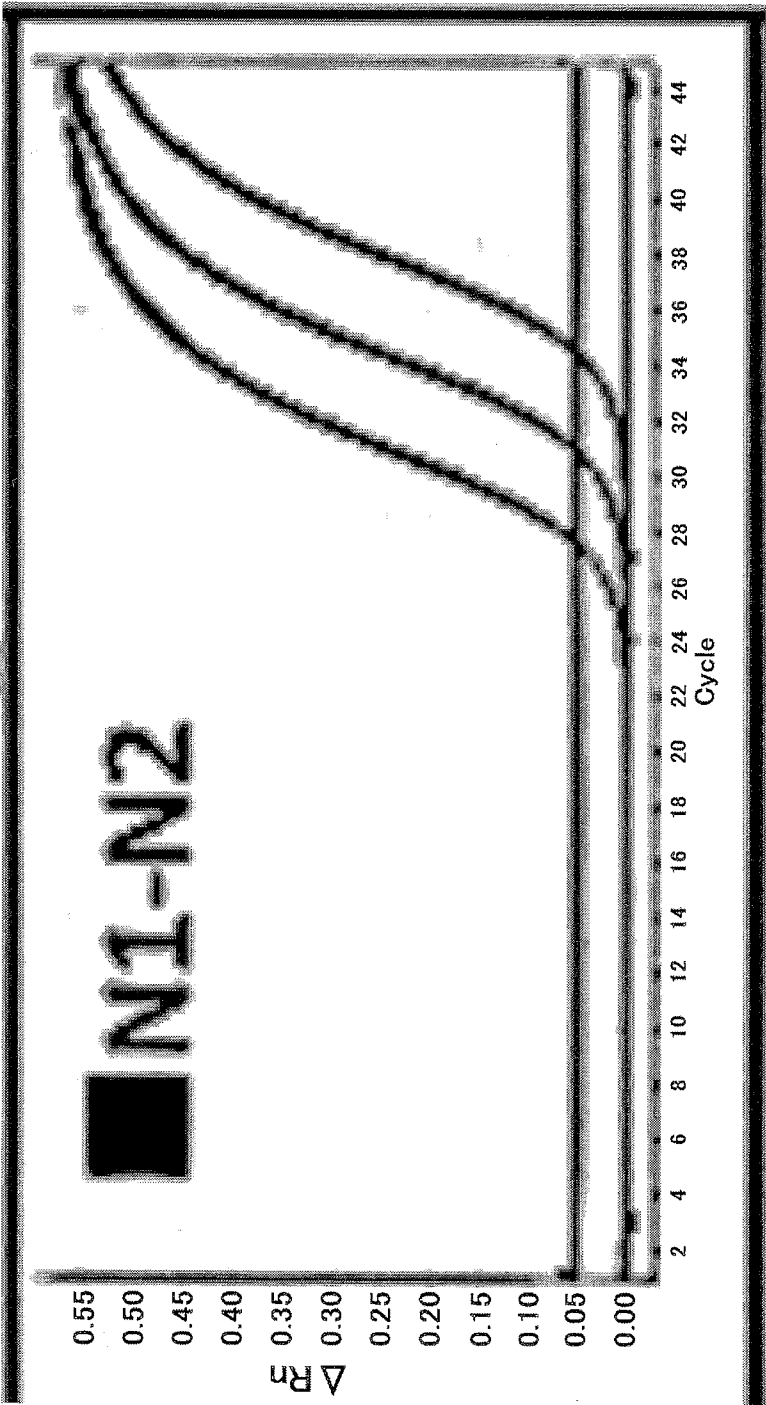
[図 5]の続き



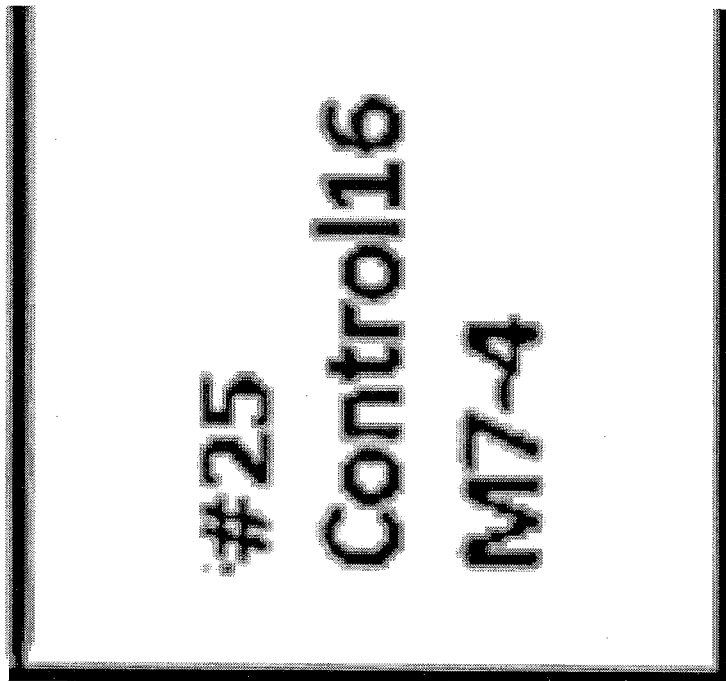
[図 5]の続き



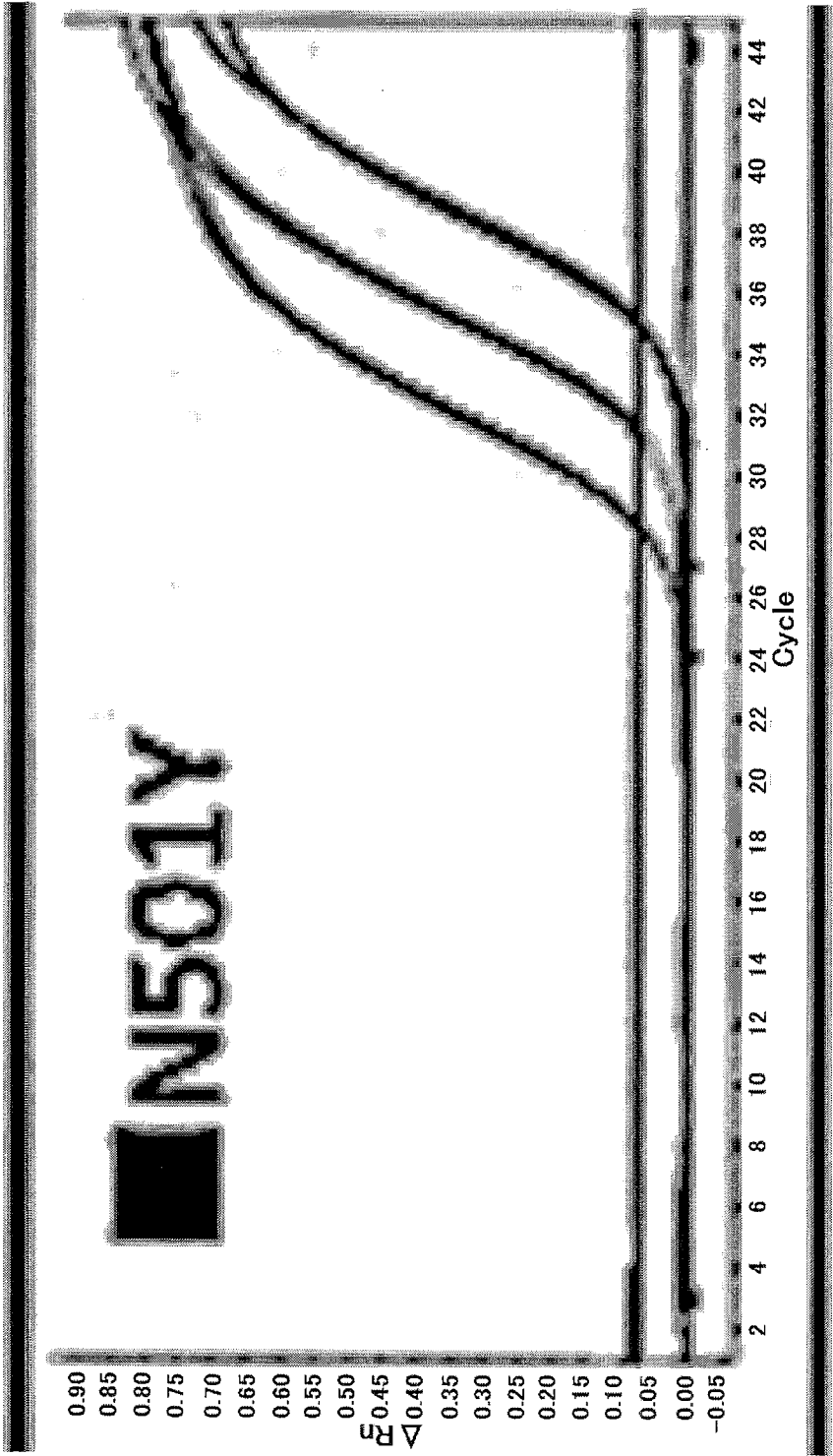
[図 5]の続き



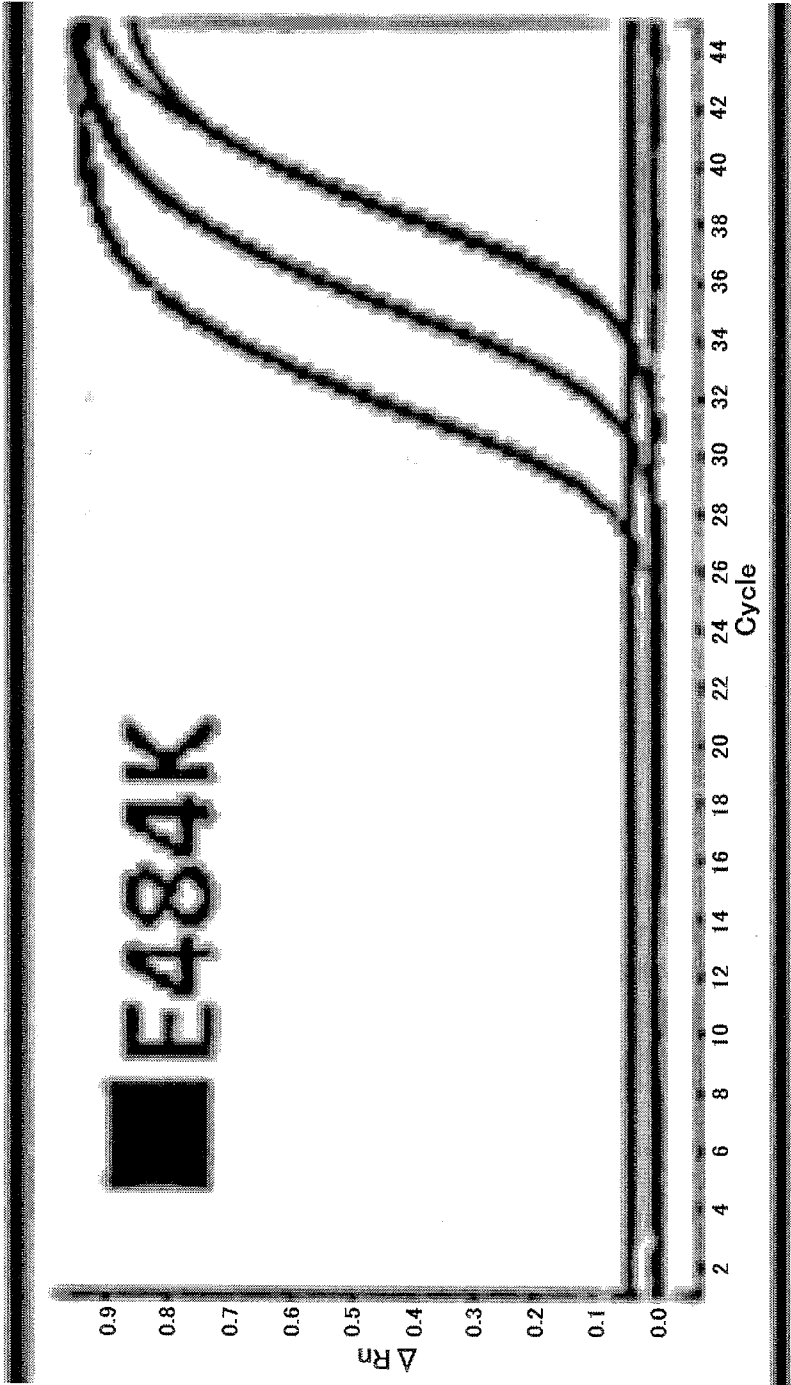
[図 5]の続き



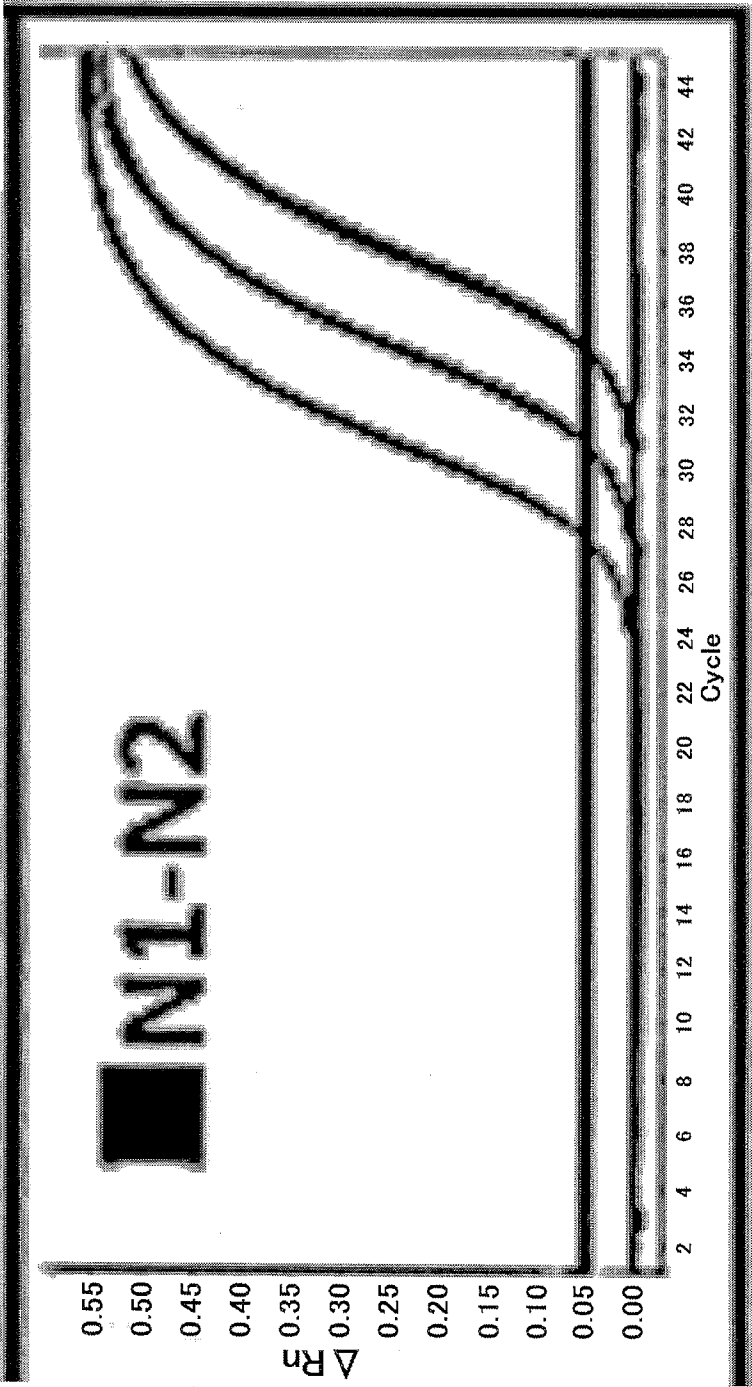
[図 5]の続き



[図 5]の続き



[図 5]の続き



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/50(2006.01)i; *C12N 15/11*(2006.01)i; *C12Q 1/6827*(2018.01)i; *C12Q 1/6851*(2018.01)i; *C12Q 1/70*(2006.01)i
FI: C12N15/50 ZNA; C12N15/11 Z; C12Q1/6827 Z; C12Q1/6851 Z; C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/50; C12N15/11; C12Q1/6827; C12Q1/6851; C12Q1/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112626267 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 09 April 2021 (2021-04-09) example 1, SEQ ID NO. 8	1, 17-18
X	WO 2004/061125 A2 (MMI GENOMICS, INC.) 22 July 2004 (2004-07-22) in particular, SEQ ID NO. 6596	1
X	WO 2017/176214 A1 (ANGSANA MOLECULAR AND DIAGNOSTICS LABORATORY PTE. LTD.) 12 October 2017 (2017-10-12) in particular, SEQ ID NO. 347	1
Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 30 March 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_20m41503y1403k1027998231_210330.html > entire text, (TAKARA BIO INC, news release [online])	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 11 May 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m0511g897436T7243h.html > entire text, (TAKARA BIO INC, news release [online])	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2022

Date of mailing of the international search report

31 May 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016224

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 19 August 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m0819oKes73knbVck7255.html > entire text, (TAKARA BIO INC, news release [online])	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 28 October 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m1028Qwheusg348Yk.html > entire text, (TAKARA BIO INC, news release [online])	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 15 December 2021 [retrieval date 18 May 2022], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m1215Wsue8327yh3Ohj.html > entire text, (TAKARA BIO INC, news release [online])	1-25
P, Y	ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社メディアリリース [online], 08 December 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://www.roche-diagnostics.jp/ja/media/releases/2021_12_8.html > entire text, non-official translation (ROCHE DIAGNOSTICS K.K., media release [online])	1-25
P, Y	感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の新規変異株について (第9号), 国立感染症研究所 [online], 14 June 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2484-idsc/10434-covid19-43.html > abstract, table 2, (NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES [online]), non-official translation (Regarding new mutants of new coronavirus (SARS-CoV-2), which cause an increase in infection and transmission and a change in antigenicity (No. 9))	1-25
P, Y	SARS-CoV-2の変異株B.1.1.529系統 (オミクロン株) について (第3号), 国立感染症研究所 [online], 08 December 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10817-cepr-b11529-3.html > "About Omicron variant", (NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES [online]), non-official translation (Regarding variant of SARS-CoV-2 classification B.1.1.529 (Omicron strain) (No. 3))	1-25
Y	原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド, 株式会社羊土社, 10 October 2013 p. 37, fig. 1, (YODOSHA CO., LTD.), non-official translation (Real-time PCR complete experiment guide that can be understood from the principle)	1-25
Y	猪狩敦子ほか, 遺伝子多型・総論 (網羅的解析方法: SNP解析・DNAチップ・GWAS), 血栓止血誌, 2012, vol. 23, no. 5, pp. 436-442 p. 439, left column, "TaqMan PCR method", (IGARI, Atsuko et al. General remarks on the genetic polymorphism (global analysis: SNP and DNA Chip, GWAS). Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis.)	1-25
Y	JP 2008-306974 A (SAITAMA MEDICAL UNIV) 25 December 2008 (2008-12-25) paragraph [0006]	19
P, X	US 2021/0292820 A1 (APPLIED DNA SCIENCES, INC.) 23 September 2021 (2021-09-23) paragraph [0042], SEQ ID: 10, 20, 24, 32	1, 3, 17, 19-25
A	OSORIO, S. N. et al. Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays. The Lancet Infectious Diseases. 28 May 2020, vol. 21, issue 2, pp. 166-167 p. 166, right column, second paragraph	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016224

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016224**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 4: タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 30 March 2021 [retrieval date 18 May 2022], internet: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_20m41503y1403k1027998231_210330.html>, (TAKARA BIO INC, news release [online])

(Invention 1)

Claim 1 is an invention of an oligonucleotide used for detection of mutant SARS-CoV-2, and specifically includes 15 inventions specified by options of 15 base sequences.

Among them, an invention specified by the originally written option of “(a) containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 35 or a sequence complementary to the sequence” is classified as invention 1.

Similarly, the invention in claim 2 and parts specified by the (a) option in the invention in claims 17-25 are also classified as invention 1.

(Inventions 2-15)

Meanwhile, in claim 1, the invention specified by the (a) option shares, with the inventions specified by the other options, the common technical feature of an “oligonucleotide used for detection of mutant SARS-CoV-2”. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 4 and thus cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there are no other same or corresponding special technical features among these inventions.

Accordingly, the inventions specified by the other options in claim 1 cannot be classified as invention 1.

In addition, in claim 1, the invention specified by a (b) option has the special technical feature of *Ruminococcus* “containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 36 or a sequence complementary to the sequence”, and is thus classified as invention 2.

Similarly, the inventions specified by (c)-(o) options are classified as inventions 3-15, respectively.

Invention 1: (a) in claim 1, claim 2, and claims 17-25 (parts specified by (a))

Invention 2: (b) in claim 1, claim 3, and claims 17-25 (parts specified by (b))

Invention 3: (c) in claim 1, claim 4, and claims 17-25 (parts specified by (c))

Invention 4: (d) in claim 1, claim 5, and claims 17-25 (parts specified by (d))

Invention 5: (e) in claim 1, claim 6, and claims 17-25 (parts specified by (e))

Invention 6: (f) in claim 1, claim 7, and claims 17-25 (parts specified by (f))

Invention 7: (g) in claim 1, claim 8, and claims 17-25 (parts specified by (g))

Invention 8: (h) in claim 1, claim 9, and claims 17-25 (parts specified by (h))

Invention 9: (i) in claim 1, claim 10, and claims 17-25 (parts specified by (i))

Invention 10: (j) in claim 1, claim 11, and claims 17-25 (parts specified by (j))

Invention 11: (k) in claim 1, claim 12, and claims 17-25 (parts specified by (k))

Invention 12: (l) in claim 1, claim 13, and claims 17-25 (parts specified by (l))

Invention 13: (m) in claim 1, claim 14, and claims 17-25 (parts specified by (m))

Invention 14: (n) in claim 1, claim 15, and claims 17-25 (parts specified by (n))

Invention 15: (o) in claim 1, claim 16, and claims 17-25 (parts specified by (o))

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/016224

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	112626267	A	09 April 2021	(Family: none)	
WO	2004/061125	A2	22 July 2004	US	2005/0260603 A1
				US	2005/0287531 A1
				US	2007/0031845 A1
				US	2008/0268454 A1
				US	2009/0221432 A1
				US	2011/0212441 A1
				US	2012/0090040 A1
				US	2013/0217018 A1
				US	2014/0134621 A1
				US	2016/0024584 A1
				US	2017/0096716 A1
				US	2017/0362655 A1
				US	2018/0334714 A1
				US	2019/0345554 A1
				US	2021/0340623 A1
				WO	2004/061124 A2
				EP	1590471 A2
				BR	317329 A
				CA	2512134 A1
				AU	2003303599 A1
				AU	2010202253 A1
				CA	2512110 A1
				ZA	200506094 B
				CN	101405404 A
				AU	2003303598 A1
				CN	104131063 A
WO	2017/176214	A1	12 October 2017	(Family: none)	
JP	2008-306974	A	25 December 2008	(Family: none)	
US	2021/0292820	A1	23 September 2021	WO	2021/188881 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/50(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6827(2018.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i FI: C12N15/50 ZNA; C12N15/11 Z; C12Q1/6827 Z; C12Q1/6851 Z; C12Q1/70		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/50; C12N15/11; C12Q1/6827; C12Q1/6851; C12Q1/70 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	CN 112626267 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 09.04.2021 (2021-04-09) 実施例 1、SEQ ID NO.8	1, 17-18
X	WO 2004/061125 A2 (MMI GENOMICS, INC.) 22.07.2004 (2004-07-22) 特にSEQ ID NO.6596	1
X	WO 2017/176214 A1 (ANGSANA MOLECULAR AND DIAGNOSTICS LABORATORY PTE. LTD.) 12.10.2017 (2017-10-12) 特にSEQ ID NO.347	1
Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.03.30 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_20m41503yl403k1027998231_210330.html > 全文	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.05.11 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m0511lg897436T7243h.html > 全文	1-25
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 18.05.2022		国際調査報告の発送日 31.05.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 中山 基志 4B 5086 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.08.19 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m0819oKes73kxbVck7255.html > 全文	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.10.28 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m1028Qwheusg348Yk.html > 全文	1-25
P, Y	タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.12.15 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_21m1215Wsue8327yh30hj.html > 全文	1-25
P, Y	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社メディアリリース [online], 2021.12.08 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://www.roche-diagnostics.jp/ja/media/releases/2021_12_8.html > 全文	1-25
P, Y	感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の新規変異株について (第9報), 国立感染症研究所[online], 2021.06.14 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2484-idsc/10434-covid19-43.html > 要約、表2	1-25
P, Y	SARS-CoV-2の変異株B.1.1.529系統 (オミクロン株) について (第3報), 国立感染症研究所 [online], 2021.12.08 [検索日 2022.05.18], インターネット: <URL: https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10817-cepr-b11529-3.html > 「オミクロン株について」	1-25
Y	原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド, 株式会社羊土社, 2013.10.10 P 3 7 図 1	1-25
Y	猪狩敦子ほか, 遺伝子多型・総論 (網羅的解析方法: SNP解析・DNAチップ・GWAS), 血栓止血誌, 2012, 第23巻第5号, pp. 436-442 P439 左欄「TaqManPCR法」	1-25
Y	JP 2008-306974 A (学校法人埼玉医科大学) 25.12.2008 (2008 - 12 - 25) [0006]	19
P, X	US 2021/0292820 A1 (APPLIED DNA SCIENCES, INC.) 23.09.2021 (2021 - 09 - 23) [0042], SEQ ID 10, 20, 24, 32	1, 3, 17, 19-25
A	OSORIO, S. N. et al., Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays, The Lancet Infectious Diseases, 2020.05.28, Volume 21, Issue 2, pp. 166-167 第166頁右欄第2段落	1-25

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献4：タカラバイオ株式会社ニュースリリース [online], 2021.03.30 [検索日 2022.05.18], インターネット：<URL: https://ir.takara-bio.co.jp/ja/news_all/news_Release/newsr_20m41503y1403k1027998231_210330.html>

（発明1）

請求項1は、変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチドの発明であって、具体的に15の塩基配列の選択肢で特定される15個の発明を包含するものである。

このうち、最初に記載された「（a）配列番号35に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含む」という選択肢で特定される発明を、発明1に区分する。

同様に、請求項2に係る発明、及び請求項17乃至25に係る発明のうち前記（a）の選択肢で特定される部分についても、発明1に区分する。

（発明2乃至15）

一方、請求項1のうち、前記（a）の選択肢で特定される発明と、その他の選択肢で特定される発明とは、「変異型SARS-CoV-2の検出に使用されるオリゴヌクレオチド」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献4の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、両者の間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

したがって、請求項1のうち、前記（a）の選択肢で特定される発明は、発明1に区分できない。

そして、請求項1のうち、（b）の選択肢で特定される発明は、「配列番号36に示される塩基配列もしくは当該配列に相補的な配列を含む」ルミノコッカスという特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

同様に、（c）乃至（o）の選択肢で特定される発明は、それぞれ発明3乃至15に区分する。

発明1：請求項1（a）、請求項2、請求項17乃至25（（a）で特定される部分）

発明2：請求項1（b）、請求項3、請求項17乃至25（（b）で特定される部分）

発明3：請求項1（c）、請求項4、請求項17乃至25（（c）で特定される部分）

発明4：請求項1（d）、請求項5、請求項17乃至25（（d）で特定される部分）

発明5：請求項1（e）、請求項6、請求項17乃至25（（e）で特定される部分）

発明6：請求項1（f）、請求項7、請求項17乃至25（（f）で特定される部分）

発明7：請求項1（g）、請求項8、請求項17乃至25（（g）で特定される部分）

発明8：請求項1（h）、請求項9、請求項17乃至25（（h）で特定される部分）

発明9：請求項1（i）、請求項10、請求項17乃至25（（i）で特定される部分）

発明10：請求項1（j）、請求項11、請求項17乃至25（（j）で特定される部分）

発明11：請求項1（k）、請求項12、請求項17乃至25（（k）で特定される部分）

発明12：請求項1（l）、請求項13、請求項17乃至25（（l）で特定される部分）

発明13：請求項1（m）、請求項14、請求項17乃至25（（m）で特定される部分）

発明14：請求項1（n）、請求項15、請求項17乃至25（（n）で特定される部分）

発明15：請求項1（o）、請求項16、請求項17乃至25（（o）で特定される部分）

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/016224

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
CN	112626267	A	09.04.2021	(ファミリーなし)			
WO	2004/061125	A2	22.07.2004	US	2005/0260603	A1	
				US	2005/0287531	A1	
				US	2007/0031845	A1	
				US	2008/0268454	A1	
				US	2009/0221432	A1	
				US	2011/0212441	A1	
				US	2012/0090040	A1	
				US	2013/0217018	A1	
				US	2014/0134621	A1	
				US	2016/0024584	A1	
				US	2017/0096716	A1	
				US	2017/0362655	A1	
				US	2018/0334714	A1	
				US	2019/0345554	A1	
				US	2021/0340623	A1	
				WO	2004/061124	A2	
				EP	1590471	A2	
				BR	317329	A	
				CA	2512134	A1	
				AU	2003303599	A1	
				AU	2010202253	A1	
				CA	2512110	A1	
				ZA	200506094	B	
				CN	101405404	A	
				AU	2003303598	A1	
				CN	104131063	A	
WO	2017/176214	A1	12.10.2017	(ファミリーなし)			
JP	2008-306974	A	25.12.2008	(ファミリーなし)			
US	2021/0292820	A1	23.09.2021	WO	2021/188881	A2	