

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-501178  
(P2010-501178A)

(43) 公表日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2006.01)  
C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00  
C 12 N 15/00A  
Z N A A  
A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2009-525578 (P2009-525578)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月17日 (2007.8.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年4月17日 (2009.4.17)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/018344  
 (87) 國際公開番号 WO2008/024293  
 (87) 國際公開日 平成20年2月28日 (2008.2.28)  
 (31) 優先権主張番号 60/839,865  
 (32) 優先日 平成18年8月24日 (2006.8.24)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

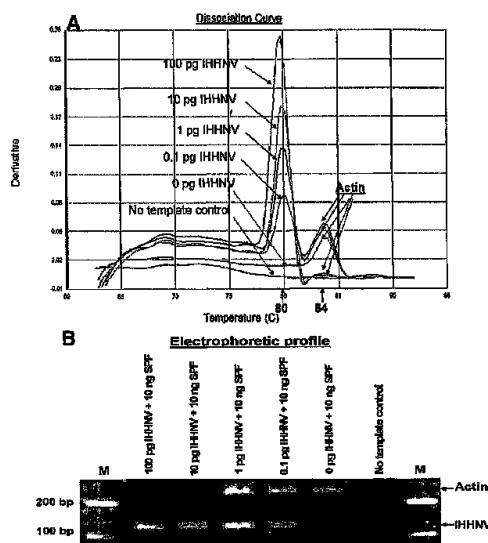
(71) 出願人 390023674  
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・  
 アンド・カンパニー  
 E. I. DU PONT DE NEMO  
 URS AND COMPANY  
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミ  
 ントン、マーケット・ストリート 100  
 7  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (74) 代理人 100091731  
 弁理士 高木 千嘉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エビ病原体の診断用配列

## (57) 【要約】

伝染性皮下造血器壞死症ウイルス(IHHNV)を検出するための診断用に単離されたプライマー。このプライマーはIHHNVゲノムの新規部分に基づき、プライマー特異的増幅法又は核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法において使用され得る。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 1 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 2】**

配列番号 2 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 2 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 3】**

配列番号 3 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 3 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 4】**

配列番号 4 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 4 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 5】**

配列番号 5 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 5 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 6】**

配列番号 6 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 6 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 7】**

配列番号 7 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 7 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 8】**

配列番号 8 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 8 と完全に相補的な単離核酸分子。

**【請求項 9】**

I H H N V ゲノム内の核酸の領域を増幅する核酸増幅反応をプライムする能力を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の 2 つの異なる I H H N V 診断用プライマー配列の対。

**【請求項 10】**

配列番号 1 及び 2 、配列番号 3 及び 4 、配列番号 5 及び 6 、配列番号 7 及び 8 、並びに配列番号 1 及び 4 からなる群から選択される、請求項 9 に記載の 2 つの異なる I H H N V 診断用プライマー配列の対。

**【請求項 11】**

請求項 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対を含む I H H N V の検出用キット。

**【請求項 12】**

耐熱性ポリメラーゼ、4 つの異なるデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物、核酸結合性蛍光分子、試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対、少なくとも 1 つの鑄型内部対照及び鑄型内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対、並びに I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により増幅可能な I H H N V ゲノム内の核酸の少なくとも 1 つの領域の一部分と相補的な配列を含むプローブからなる群から選択された少なくとも 1 つの試薬をさらに含む、請求項 10 に記載の I H H N V の検出用キット。

**【請求項 13】**

試料中の I H H N V の存在を検出するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、及び  
( i i ) 好適なハイブリダイゼーション条件下で、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列に由来するプローブにより上記 D N A を探索する工程、

を含み、ハイブリダイズ可能な核酸断片が同定されると、それが I H H N V の存在の確証

10

20

30

40

50

となる、上記方法。

**【請求項 14】**

単離された IHHNV 診断用プライマー配列に由来するプローブが、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及びそれらの完全相補配列からなる群から選択される、請求項 13 に記載の試料中の IHHNV の存在を検出するための方法。

**【請求項 15】**

プローブが 3' 末端に複製阻害部分を含む、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 16】**

複製阻害部分が、ジデオキシヌクレオチド、3' デオキシヌクレオチド、ミスマッチヌクレオシド又はヌクレオチドの配列、3' リン酸基及び化学剤からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

10

**【請求項 17】**

3' デオキシヌクレオチドがコルジセピンである、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

試料中の IHHNV の存在を検出するための方法であって、

(i) IHHNV を含むことが疑われる試料から DNA を提供する工程、及び

(ii) 増幅産物が生成されるよう、請求項 9 に記載の IHHNV 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 DNA を増幅する工程、

を含み、増幅産物が存在すると、それが IHHNV の存在の確証となる上記方法。

20

**【請求項 19】**

(i) の増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、請求項 18 に記載の試料中の IHHNV の存在を検出するための方法。

**【請求項 20】**

(ii) の増幅工程が核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下で行われ、増幅産物の存在が蛍光検出を用いて確認される、請求項 18 に記載の試料中の IHHNV の存在を検出するための方法。

**【請求項 21】**

蛍光標識プローブが、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対が (i) の増幅工程に含まれることにより試料内部対照産物が產生される、請求項 18 に記載の方法。

30

**【請求項 23】**

試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対が、配列番号 13, 14 及び配列番号 15, 16 からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 24】**

鋳型内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対及び少なくとも 1 つの鋳型内部対照が、(i) の増幅工程に含まれることにより鋳型内部対照産物が產生される、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 25】**

試料中の IHHNV の量を定量するための方法であって、

(i) IHHNV を含むことが疑われる試料から DNA を提供する工程、

(ii) 核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下での少なくとも変性温度と伸長温度との間の熱サイクリングによって、請求項 9 に記載の IHHNV 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 DNA を増幅する工程、

(iii) 上記熱サイクリング中に上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成される蛍光量を測定する工程、

(iv) 上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成された蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの閾値サイクル数を決定する工程、及び

(v) 上記試料中の IHHNV について決定された上記閾値サイクル数を、既知の濃度

40

50

の標準溶液を用いて決定された鋳型濃度の対数に対する閾値サイクル数の標準曲線と比較することにより、該試料中の IHHNV の量を計算する工程、を含む、上記方法。

【請求項 26】

蛍光標識プローブが、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

DNA 損傷又は IHHNV 不活化の評価に用いられる、請求項 13、18、又は 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

エビの健康及び発育を向上させるために化学的処置と組み合わせて用いられる、請求項 13、18、又は 25 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第 119 条に基づき、2006 年 8 月 24 日出願の米国仮特許出願第 60/839865 号明細書からの優先権を主張する。

【0002】

本発明は、診断検査の分野に関する。より具体的には、エビの伝染性皮下造血器壊死症ウイルス病原体の検出に用いるための新規プライマーが開発されている。

【背景技術】

【0003】

商業的なエビ養殖場は、数多くの一般的な病原体の影響により多大な損失を被っている。伝染性皮下造血器壊死症ウイルス (IHHNV) は、養殖クルマエビの最も深刻なウイルス性病原体の 1 つである。このウイルスは多くの国に広く分布しており、広範な宿主域を有する。例えば、IHHNV はウェスタンブルーシュリンプ (ペナエウス・ステイリロストリス (Penaeus stylirostris)) に大量死を、及びパシフィックホワイトシュリンプ (ペナエウス・バナメイ (Penaeus vannamei)) に重度の奇形を引き起こす。IHHNV は小さい一本鎖 DNA を含むパルボウイルスであり、その完全ゲノムは配列決定されている (非特許文献 1)。

【0004】

IHHNV は世界規模での壊滅的な流行の原因となり、エビ養殖業にとって極めて有害である。孵化場の種親及び後期幼生において IHHNV を検出することで、商業生産システムに侵入する前に感染したエビを除去することが可能となる。その結果、エビにおいて IHHNV を検出するための様々な方法が、核酸ベースの方法及び免疫学的方法を含めて開発してきた (非特許文献 2)。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 及び等温增幅などの核酸增幅法は、単純で高速、且つ感度が高いことから特に興味深い。IHHNV を検出するための、ゲノムの種々の診断領域の増幅に基づく PCR 法については、説明がなされている (例えば非特許文献 3; 非特許文献 4; 非特許文献 5; 非特許文献 6; 及び非特許文献 7 を参照)。加えて、IHHNV を検出するためのループ媒介等温法が Sun らにより記載されている (非特許文献 8 を参照)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】 Bonamici, J. Gen. Virology 71 (第 11 部) : 657 - 2664 頁 (1990 年); GenBank AF218266

【非特許文献 2】 Lightner, A. Aquaculture 164 (1) : 201 - 220 頁 (1998 年)

【非特許文献 3】 Nunan, M. Biotechnol. 2 (4) : 319 - 3

10

20

30

40

50

28頁(2000年)

【非特許文献4】Yueら、J. AOAC International 89(1):  
240-244頁(2006年)

【非特許文献5】Tangら、Dis. Aquat. Org. 44(2):79-85頁  
(2001年)

【非特許文献6】Huら、CN 1410549

【非特許文献7】Dharら、J. Clin. Microbiol. 39(8):283  
5-2845頁(2001年)

【非特許文献8】J. Virol. Methods 131(1):41-46頁(20  
06年)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記の方法はいずれもIHHNVの検出に有用であるが、概して、特異性、感度の不足が弱点となっているか、又は複雑で時間がかかる。加えて、ウイルスは遺伝子の突然変異率が高いため、ゲノムの種々の領域を対象とした検査が有用であり得る。従って、IHHNVについての高速で正確、且つ現場での使用が容易な高感度アッセイが必要とされている。本明細書では、指摘された問題が、IHHNVゲノムの新規部分に基づくプライマーの発見により対処される。本明細書で同定されるプライマーをプライマー特異的増幅法又は核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法で使用することにより、先行の方法論に付随する問題なしにIHHNVを検出できる。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

一実施形態において、本発明は配列番号1~8のいずれか1つに記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列、又は配列番号1~8と完全に相補的な単離核酸分子を提供する。

【0008】

別の実施形態において、本発明は本明細書に開示されるとおりの2つの異なるIHHNV診断用プライマー配列の対を提供し、この対は、IHHNVゲノム内の核酸領域を増幅する核酸増幅反応をプライムする能力を有する。

30

【0009】

別の実施形態において、本発明はIHHNVの検出用キットを提供し、これは本明細書に開示されるIHHNV診断用プライマー配列の少なくとも1つの対を含む。

【0010】

別の実施形態において、本発明は試料中のIHHNVの存在を検出するための方法を提供し、これは、

(i) IHHNVを含むことが疑われる試料からDNAを提供するステップと、  
(ii) 好適なハイブリダイゼーション条件下で配列番号1~8のいずれかの単離されたIHHNV診断用プライマー配列に由来するプローブを用いてDNAを探索するステップと、

40

を含み、ここでハイブリダイズ可能な核酸断片が同定されると、それがIHHNVの存在の確証となる。

【0011】

他の実施形態において、この検出方法はIHHNVに感染していないDNA試料を同定する。

【0012】

別の実施形態において、本発明は試料中のIHHNVの存在を検出するための方法を提供し、これは、

(i) IHHNVを含むことが疑われる試料からDNAを提供するステップと、  
(ii) 増幅産物が生成されるように本明細書に開示されるIHHNV診断用プライマー

50

配列の少なくとも 1 つの対により DNA を增幅するステップと、  
を含み、ここで増幅産物が存在すると、それが IHHNV の存在の確証となる。

#### 【0013】

別の実施形態において、本発明は試料中の IHHNV の量を定量するための方法を提供し、これは、

- (i) IHHNV を含むことが疑われる試料から DNA を提供するステップと、
- (ii) 核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下での少なくとも変性温度と伸長温度との間の熱サイクリングによって、本明細書に開示される IHHNV 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により DNA を増幅するステップと、
- (iii) 热サイクリング中に核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブにより生成された蛍光量を測定するステップと、

(iv) 核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブにより生成された蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの閾値サイクル数を決定するステップと、

(v) 試料中の IHHNV について決定された閾値サイクル数を、既知の濃度の標準溶液を用いて決定された錆型濃度の対数に対する閾値サイクル数の標準曲線と比較することにより、試料中の IHHNV の量を計算するステップと、

を含む。

#### 【0014】

##### 図面の簡単な説明及び配列説明

本発明の様々な実施形態が、本願の一部をなす以下の詳細な説明及び添付の配列説明からさらに十分に理解され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図 1】 A は、実施例 10 に記載されるとおり、IHHNV ウィルス DNA とアクチン DNA との同時 PCR 増幅により形成された IHHNV 4 産物及びアクチン試料内部対照産物についての融解曲線を示す。IHHNV 産物及びアクチン産物の融解温度 (Tm) の値は、それらの対応する融解曲線上に示される。B は、実施例 10 に記載されるとおり、IHHNV ウィルス DNA とアクチン DNA との同時 PCR 増幅により形成された IHHNV 4 産物及びアクチン試料内部対照産物を含む試料のアガロースゲル電気泳動による分離結果を示す。IHHNV 及びエビ DNA の量は各レーンの上側に示される。「M」は 100 bp の DNA ラダーである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0016】

以下の配列は、米国特許法施行規則第 1.821 ~ 1.825 条（「ヌクレオチド配列及び / 又はアミノ酸配列の開示を含む特許出願に関する要件 - 配列規則 (Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules)」）に準拠し、世界知的所有権機関 (World Intellectual Property Organization : WIPO) 標準 ST.25 (1998 年) 及び EPO 及び PCT の配列記要件 (規則 5.2 及び 49.5 (a) の 2 )、並びに実施細則の第 208 条及び付録 C ) と整合性を有している。ヌクレオチド及びアミノ酸配列データに使用される記号及び形式は、米国特許法施行規則第 1.822 条に定められる規則に従う。

#### 【0017】

配列番号 1 ~ 8 は、IHHNV の検出に有用な IHHNV 診断用プライマーのヌクレオチド配列である。

#### 【0018】

配列番号 9 ~ 12 は、実施例の一般的方法の節に記載される IHHNV 合成錆型のヌクレオチド配列である。これらの配列は、本明細書に開示される IHHNV 診断用プライマ

10

20

30

40

50

ーの対を使用して得られる増幅産物のヌクレオチド配列である。

【0019】

配列番号13～16は、実施例10に記載される試料内部対照プライマーのヌクレオチド配列である。

【0020】

配列番号17及び18は、蛍光標識プローブのヌクレオチド配列である。

【0021】

本明細書では、伝染性皮下造血器壊死症ウイルス(IHHNV)を検出するためのアッセイにおいて有用なプライマーが開示される。このプライマーを核酸増幅法並びにハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いることにより、毒性の伝染性皮下造血器壊死症ウイルスを効率的に検出及び定量し得る。10

【0022】

本開示では、数多くの用語及び略語が使用される。以下に定義が提供され、これらは特許請求の範囲及び本明細書を解釈するために参照されるものとする。

【0023】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCRと略記される。

【0024】

「伝染性皮下造血器壊死症ウイルス」はIHHNVと略記される。

【0025】

用語「単離されたIHHNV診断用プライマー配列」は、IHHNVゲノムのなかでIHHNVの存在について診断される部分に相当する配列を指す。20

【0026】

本明細書で使用されるとき、「単離核酸断片」は、一本鎖又は二本鎖のRNA又はDNAの重合体であり、場合により合成の、非天然の、又は改変されたヌクレオチド塩基を含む。DNAの重合体の形態の単離核酸断片は、cDNA、ゲノムDNA又は合成DNAの1つ又は複数のセグメントからなり得る。

【0027】

用語「増幅産物」又は「アンプリコン」は、プライマー特異的増幅反応において產生される核酸断片を指す。典型的なプライマー特異的増幅法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)、又は他の等温増幅プロセスが挙げられる。PCR法が選択される場合、複製の組成は典型的には、例えば、デオキシヌクレオチド三リン酸、然るべき配列の2つのプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼ及びタンパク質を含み得る。これらの試薬及び核酸の増幅におけるその使用についての手順を説明する詳細は、米国特許第4,683,202号明細書(1987年、Mu1lisl)及び米国特許第4,683,195号明細書(1986年、Mu1lisl)に提供される。LCR法が選択される場合、核酸複製の組成は、例えば、耐熱性リガーゼ(例えば、T. aquaticus(T. aquaticus)リガーゼ)、2組の隣接オリゴヌクレオチド(ここで各組のうち一方のメンバーは標的鎖の各々と相補的である)、トリス-HCl緩衝液、KCl、EDTA、NAD、ジチオスレイトール及びサケ精子DNAを含んでなり得る(例えば、Taborら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、82:1074-1078頁(1985年)を参照)。30

【0028】

用語「プライマー」は、相補鎖(complementary strand)の合成がポリメラーゼにより触媒される条件下に置かれると、相補鎖に沿った核酸合成又は複製の開始点として作用する能力を有するオリゴヌクレオチド(合成又は天然)を指す。

【0029】

用語「熱サイクリング」は、PCR及びLCRなどの特定の核酸増幅法において用いられる温度の全体的な変化パターンを指す。この過程は一般的であり、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrook, J.、Fritsch, E. F. 及びManiatis, T.、「Molecular Cloning: A Laboratory

10

20

30

40

50

*Manual*」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor、NY(1989年);並びにMullisらに対する米国特許第4,683,202号明細書及びMullisらに対する米国特許第4,683,195号明細書を参照のこと。一般にPCR熱サイクリングは、高温での初期変性ステップと、それに続く、鑄型変性、プライマーのアニーリング、及びポリメラーゼによるアニュールされたプライマーの伸長を可能にするよう設計された温度サイクルを含む。

#### 【0030】

用語「閾値サイクル数」は、本明細書では「CT」とも称され、産物形成による蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの熱サイクリングにおけるサイクル数を指す。

10

#### 【0031】

用語「プローブ」は、標的配列と相補性の高いオリゴヌクレオチド（合成又は天然）を指し、本明細書では「断片」とも称され（すなわち、検出対象の配列又は検出対象の配列の一部分）、標的配列の少なくとも1本の鎖とハイブリダイズすることにより二重鎖構造を形成する。プローブは、例えば蛍光標識又はリガンド標識を使用して標識されることにより、検出が容易になり得る。

#### 【0032】

用語「複製阻害部分」は、オリゴヌクレオチドの3'末端ヒドロキシル基に結合する任意の原子、分子又は化学基を指し、核酸鎖を複製するための鎖伸長の開始を阻止するものである。例としては、限定はされないが、3'デオキシヌクレオチド（例えば、コルジセピン）、ジデオキシヌクレオチド、リン酸塩、リガンド（例えば、ビオチン及びジニトロフェノール）、レポーター分子（例えば、フルオレセイン及びローダミン）、炭素鎖（例えば、プロパノール）、ミスマッチヌクレオチド若しくはポリヌクレオチド、又はペプチド核酸単位が挙げられる。

20

#### 【0033】

用語「非関与型」は、核酸分子を増幅するための反応におけるプローブ又はプライマーの関与の欠如を指す。具体的には、非関与型プローブ又はプライマーは、DNAポリメラーゼの基質として働いたり、又はDNAポリメラーゼによって伸長されたりすることのないものである。「非関与型プローブ」は本質的にポリメラーゼによる鎖伸長が不可能である。これは複製阻害部分を有することも、又は有しないこともある。

30

#### 【0034】

温度及び溶液のイオン強度が好適な条件下で一本鎖形態の核酸分子が他の核酸分子にアニュールできるとき、その核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、又はRNAなどの別の核酸分子と「ハイブリダイズ可能」である。ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件は周知であり、Sambrook, J.、Fritsch, E. F. 及びManiatis, T.、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor、NY(1989年)、特にこの文献中の第11章及び第11.1表に例示される（全体として参照により本明細書に援用される）。温度及びイオン強度の条件が、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。相同意的な核酸の予備スクリーニングについては、55の融解温度(Tm)に相当する低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件を用いることができ、例えば、5×SSC、0.1%SDS、0.25%乳、及びホルムアミド無し；又は30%ホルムアミド、5×SSC、0.5%SDSである。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件はより高いTmに相当し、例えば、40%ホルムアミド、5×又は6×SSCである。ハイブリダイゼーションでは2つの核酸が相補配列を含むことが要求されるが、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーによっては塩基間のミスマッチは可能である。核酸のハイブリダイゼーションに適したストリンジェンシーは、核酸の長さ及び相補性の程度といった当該技術分野において周知の変数に依存する。2本のヌクレオチド配列間の類似性又は相同性の程度が大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッド

40

50

用のTm値は上がる。核酸のハイブリダイゼーションの相対的な安定性（より高いTmに相当する）は、RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNAの順に低下する。100ヌクレオチド長より大きいハイブリッドについては、Tmの計算式が導かれている（Sambrookら、上記、9.50～9.51を参照）。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションについては、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Sambrookら、上記、11.7～11.8を参照）。一実施形態において、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくとも約10ヌクレオチドである。好ましくは、ハイブリダイズ可能な核酸の最小長さは少なくとも約15ヌクレオチドであり、より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドであり、及び最も好ましくは長さは少なくとも30ヌクレオチドである。さらに当業者は、プローブの長さなどの因子に従い必要に応じて温度及び洗浄溶液の塩濃度が調整され得ることを認識するであろう。

10

## 【0035】

「遺伝子」は、特異的タンパク質を発現する核酸断片を指し、調節配列をコード配列の前（5'非コード配列）、及び後ろ（3'非コード配列）に含む。「天然遺伝子」は、独自の調節配列を有する天然に存在するとおりの遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」は、天然遺伝子ではない任意の遺伝子を指し、天然には同時に存在しない調節配列及びコード配列を含んでなる。従ってキメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する調節配列及びコード配列、又は同じ供給源に由来するが天然に存在するものとは異なる様式で配列されている調節配列及びコード配列を含んでなり得る。「内在性遺伝子」は、生物体のゲノムにおいてその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来」遺伝子は、宿主生物中には通常存在しないが、遺伝子導入により宿主生物中に導入される遺伝子を指す。外来遺伝子は、天然でない生物体に挿入される天然遺伝子か、又はキメラ遺伝子を含んでなり得る。「導入遺伝子」は、形質転換手法によりゲノムに導入された遺伝子である。

20

## 【0036】

用語「機能的に連結された」は、一方の機能が他方により影響を受けるような单一の核酸断片上の核酸配列の結合を指す。例えば、プロモーターは、それがコード配列の発現を生じさせる能力を有する（すなわち、そのコード配列がプロモーターの転写制御下にある）場合、当該コード配列と機能的に連結される。コード配列はセンス方向又はアンチセンス方向で調節配列に機能的に連結できる。

30

## 【0037】

用語「発現」は、本明細書で使用されるとき、本発明の核酸断片に由来するセンス(mRNA)又はアンチセンスRNAの転写及び安定的な蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳も指す。

## 【0038】

用語「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」は、多くの場合に細胞の中央代謝の一部ではなく、通常は環状二本鎖DNA分子の形態の遺伝子を保有する染色体外要素を指す。かかる要素は、直鎖状又は環状の、任意の供給源に由来する一本鎖又は二本鎖DNA又はRNAの自己複製配列、ゲノム組込み配列、ファージ又はヌクレオチド配列であってもよく、ここでは多数のヌクレオチド配列が、選択された遺伝子産物のプロモーター断片及びDNA配列を然るべき3'非翻訳配列と共に細胞中に導入する能力を有する独自の構造と連結されるか、又はそれに組み換えられている。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含み、さらに外来遺伝子に加え、特定の宿主細胞の形質転換を促進する要素を有する特異的ベクターを指す。「発現カセット」は、外来遺伝子を含み、さらに外来遺伝子に加え、外来宿主中の当該遺伝子の発現を可能にする要素を有する特異的ベクターを指す。

40

## 【0039】

用語「配列分析ソフトウェア」は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の分析に有用な任意のコンピュータアルゴリズム又はソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は市販のものであってもよく、又は独自に開発したものであってもよい。典型的

50

な配列分析ソフトウェアとしては、限定はされないが、G C G suite プログラム ( Wisconsin Package、バージョン 9.0、Genetics Computer Group ( GCG )、Madison、WI ) 、BLASTP、BLASTN、BLASTX ( Altschulら、J. Mol. Biol. 215 : 403 - 410 頁 ( 1990 年 ) 、DNASTAR ( DNASTAR, Inc. 、Madison、WI ) 、及び Vector NTI ( 登録商標 ) ソフトウェア、バージョン 7.0 を挙げることができる。本願に関連するなかで、配列分析ソフトウェアを用いて分析される場合、特記されない限り、分析の結果は参照されるプログラムの「初期値」に基づくことは理解されるであろう。本明細書で使用されるとき、「初期値」は、初めて初期化したときに最初にソフトウェアに取り込まれる任意の値又はパラメータのセットを意味するものとする。

10

#### 【 0040 】

本明細書で用いられる標準的な組換えDNA及び分子クローン技術は、当該技術分野において周知であり、Sambrook, J. 、Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. 、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY ( 1989 年 ) ( これ以降、「Maniatis」 ) ; 及びAusubel, F. M. ら、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 発刊 ( 1987 年 ) により記載される。

20

#### 【 0041 】

##### 伝染性皮下造血器壊死症ウイルスゲノム

伝染性皮下造血器壊死症ウイルス ( IHHNV ) は高死亡率及び広範な宿主域を伴う主要なエビ病原体である。IHHNVの完全ゲノムは配列決定されている ( Bonamiら、J. Gen. Virology 71 ( 第11部 ) : 657 - 2664 頁 ( 1990 年 ) ; GenBank AF218266 ) 。このゲノムは 4,075 塩基及び 3 つのオープンリーディングフレーム ( ORF ) を含む一本鎖DNAからなる。

30

#### 【 0042 】

##### IHHNV 診断用プライマー配列

本明細書には、IHHNVの高感度検出のための様々なアッセイフォーマットにおいて有用な診断用プライマー配列が開示される。これらのプライマーは、IHHNVゲノムのなかでこれまでIHHNV検出に使用されていない領域を対象とする。

#### 【 0043 】

一連の「インシリコ ( in silico ) 」( すなわちコンピュータベースの ) 配列分析ツールを使用して、プライマー配列を実験的に同定した。このプロセスでは、既知のあらゆるIHHNV配列を含むデータベースを構築した。まず初めにこれらの配列を整列させ、次にプライマー部位について、Vector NTI ( 登録商標 ) ソフトウェア ( Informax Inc. 、Bethesda、MD ) を使用して、他のIHHNV配列との相同性、特定のアンブリコンの長さ、塩濃度、Tm ( 融解温度 ) 、C + G 含量並びにヘアピン及び二次構造パラメータの不在に基づき分析した。次に有望なプライマーをGenBank配列に対しスクリーニングした。他の非標的遺伝子配列との相同性が 5 塩基未満しか含まれないことが確立されたプライマーを、PCR増幅効率及び最小限のプライマーダイマー形成から実験的調査のために選択した。高い増幅効率及び最小限のプライマーダイマー形成の双方を示したプライマーを、様々なエビ病原体に感染したエビから単離されたDNA及び疾患にかかっていないことが証明されているエビ由来のDNAのパネルによる検査のために選択した。全てのIHHNV株を増幅し、且つ非IHHNV病原体に感染したエビ由来のDNA及び様々な種の疾患にかかっていないことが証明されているエビから単離されたDNAのいずれにも反応を示さなかったプライマーを、有用なプライマーとして選択した。

40

50

## 【0044】

IHHNVの検出に有用であることが分かったプライマー配列、及びそれらのIHHNVゲノムにおける位置が、表1に示される。これらのプライマーは標準的なホスホラミダイト化学反応を用いて合成してもよく、又はSigma Genosys(The Woodslands、TX)などの企業から購入してもよい。

## 【0045】

## 【表1】

表1  
IHHNV 診断用プライマー配列

10

プライマー、方向	配列番号	IHHNV ゲノム位置 (GenBank AF218266)
IHHNV1F、フォワード	1	682-705
IHHNV1R、リバース	2	779-800
IHHNV2F、フォワード	3	1062-1086
IHHNV2R、リバース	4	1137-1161
IHHNV3F、フォワード	5	1749-1773
IHHNV3R、リバース	6	1832-1856
IHHNV4F、フォワード	7	3417-3440
IHHNV4R、リバース	8	3508-3532

20

## 【0046】

## アッセイ法

本明細書に開示されるプライマー配列は、様々なアッセイフォーマットで用いてIHHNVを検出及び定量し得る。最も簡便な2つのフォーマットは、核酸ハイブリダイゼーションの方法か、又はPCRなどのプライマー特異的増幅法を利用するものである。

## 【0047】

## プライマー特異的増幅アッセイ法

一実施形態において、本IHHNV診断用プライマー配列はプライマー特異的核酸増幅に用いることで、IHHNVの存在を検出し得る。様々なプライマー特異的核酸増幅法が当該技術分野において周知であり、本明細書に開示されるプライマーと共に使用するのに好適である。これらの核酸増幅法としては、熱サイクリング法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びリガーゼ連鎖反応（LCR））、並びに等温法及び鎖置換増幅（SDA）が挙げられる。

## 【0048】

LCR法は当該技術分野において周知である（例えば、Taborら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、82:1074-1078頁（1985年）を参照）。典型的には、LCR核酸複製の組成は、例えば、耐熱性リガーゼ（例えば、T.アクアチカス（T. aquaticus）リガーゼ）、2組の隣接オリゴヌクレオチドプライマー（各組のうち一方のメンバーは標的鎖の各々と相補的である）、トリス-HCl緩衝液、KCl、EDTA、NAD、ジチオスレイトール及びサケ精子DNAを含んでなる。

40

## 【0049】

SDA法もまた当該技術分野において周知である。SDAの方法論についての詳しい考察は、Walkerら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、89:392頁（1992年））により提供される。典型的には、SDAでは2つのオリゴヌクレオチドプライマーが使用され、各々が標的中の一方の鎖のみに相補的な領域を有する。

50

熱変性後、一本鎖の標的断片は過剰に存在するそれぞれのプライマーと結合する。双方のプライマーとも、標的結合配列の5'に位置する非対称の制限酵素認識配列を含む。各プライマー-標的複合体は、制限酵素、DNAポリメラーゼ並びに3つのデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)及び1つのデオキシヌクレオチド-チオ三リン酸(dNTP[αS])の存在下で、ニッキング及び重合/置換ステップを繰り返す。

#### 【0050】

本明細書に開示される診断用プライマー配列を用いてIHHNVを検出するための好ましい方法はPCRであり、これはMullisらにより米国特許第4,683,202号明細書及び米国特許第4,683,195号明細書に記載され、これらの文献は双方とも具体的に参照により本明細書に援用される。PCR法では、本明細書に開示されるIHHNV診断用プライマー配列及びそれらの完全相補(complementary)配列が、IHHNVゲノム内の領域を増幅する核酸増幅反応のプライミングが可能な対で使用される。IHHNV診断用プライマー配列及びそれらの相補体(complement)の様々な組み合わせを用いることができる。好適なプライマー対としては、限定はされないが、配列番号1及び2、配列番号3及び4、配列番号5及び6、配列番号7及び8、並びに配列番号1及び4が挙げられる。

10

#### 【0051】

一般に、2つのプライマーは、試料DNA、4つのデオキシヌクレオチド三リン酸(すなわち、dATP、dCTP、dTTP、及びdGTP)の混合物、耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばTaq DNAポリメラーゼと共に緩衝溶液中に混合される。次にこの混合物がサーマルサイクラー機を用いて熱サイクルにかけられ、所望の標的領域が増幅される。サーマルサイクラーは多くの供給元から市販されている(例えば、Applied Biosystems(Foster City, CA); Brinkmann(Westbury, NY); MJ Research(Waltham, MA); 及びStratagene(La Jolla, CA))。

20

#### 【0052】

一般に、PCR熱サイクリングは高温での初期変性ステップと、それに続く、鑄型変性、プライマーのアニーリング、及びアニーリングされたプライマーのポリメラーゼによる伸長を可能にするよう設計された一連の温度サイクルの繰り返しを含む。一般的には、試料は最初に約2~10分間、約95°の温度で加熱され、二本鎖DNA試料が変性される。次に、各サイクルの始めに、試料及び使用される機器のタイプに応じて試料が約10~60秒間変性される。変性後、プライマーがより低温の約40°~約60°で約20~60秒間、標的DNAにアニールされる。ポリメラーゼによるプライマーの伸長は、多くの場合に約60°~約72°の温度範囲で行われる。伸長にかかる時間はアンブリコンのサイズ及び増幅に使用される酵素の種類に依存し得るが、所定の実験により容易に決定される。加えて、アニーリングステップを伸長ステップと組み合わせて2ステップサイクリングとすることができます。熱サイクリングはまた、PCRアッセイにおいてさらなる温度変更も含み得る。アッセイで用いられるサイクル数は多くの要因に依存し、使用されるプライマー、存在する試料DNAの量、及び熱サイクリング条件が挙げられる。任意のアッセイで用いられるサイクル数は、所定の実験を用いて当業者により容易に決定され得る。場合により、全ての増幅産物の合成を確実にするため、熱サイクリングの完了後に最終伸長ステップが追加されてもよい。

30

#### 【0053】

増幅後、増幅されたヌクレオチド配列は好適なベクターにライゲートされ、続いて前記ベクターにより好適な宿主生物が形質転換され得る。これにより、増幅された配列がより容易に利用可能な供給形態で確保される。或いは、増幅後、増幅された配列又はその一部分は、以下に記載されるとおり、ハイブリダイゼーションアッセイ用のヌクレオチドプローブとして使用するために化学的に合成されてもよい。いずれの場合にも、可変領域のDNA配列がジデオキシ法などの方法を用いて構築され得る(Sanger, F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467頁(1977年))。得

40

50

られる配列を用いることでその生物体に対するプローブの選択肢が導かれ、最も適切な配列が選択される。

#### 【0054】

IHHNVを含むことが疑われる試料（例えば、エビ又は他の甲殻類）中のIHHNVの存在を、プライマー特異的核酸増幅法を用いて検出するため、試料からのDNAは増幅可能な形態で提供されなければならない。典型的には、DNAは無細胞でなければならず、試料材料は処理されてタンパク質及び他の細胞成分が除去され得る。DNAは任意の好適な組織、液体又は試料材料から得ることができ、限定はされないが、エビ組織（例えば、鰓、腹肢、血リンパ、筋肉、尾、眼柄、胃、脚、及び結合組織）、洗浄液、及び池水試料が挙げられる。試料は、既知の汚染物質に近接していることなどを含む様々な理由からIHHNVを含むことが疑われ得るか、又は単にエビ産業にIHHNVの存在がよく見られることから汚染が疑われ得る。従って、IHHNVを含むことが疑われる試料は上記の任意のDNA試料であり得る。

10

#### 【0055】

増幅に好適なDNAを組織から提供するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、DNAは、Nunanら(Mar. Biotechnol. 2(4):319-328頁(2000年))により記載されるとおり、試料材料又は組織をNaClを含有するトリス-HCl緩衝液でホモジナイズし、遠心して固形細片を除去し、得られた上清液をPCR反応に使用することによって試料から抽出され得る。或いは、Yogandan和ら(Aquaculture Research 34(12):1093-1097頁(2003年))及びKouら(米国特許第6,190,862号明細書)により記載される様々な組織からホワイトスポットシンドロームウイルスDNAを単離するための方法が用いられてもよい。DNAはまた、QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen、Valencia CA)、又はDNAzol(登録商標)ゲノムDNA単離試薬(Molecular Research Center, Inc.、Cincinnati、OH)などの市販のDNA単離キットを使用した増幅に好適な形態で提供されてもよい。

20

#### 【0056】

次にDNAは、上記のとおり核酸増幅法を用いて、本明細書に開示される診断用プライマー配列の少なくとも1つの対により増幅される。診断用プライマー配列の異なる対の組み合わせもまた使用され得る。増幅産物の存在が以下に記載されるとおり検出されると、それが試料中のIHHNVの存在の確証となる。一実施形態においては、PCRを用いてDNAが増幅される。

30

#### 【0057】

核酸増幅法においては、試薬の不具合、手順の間違い、及び機器の誤動作から検査結果が誤って解釈され得る。加えて、試料材料中の阻害物質の存在、又は試料を処理し、核酸を回収する間の試料DNA若しくはRNAの分解によって問題が生じる。これらの問題を克服するため、IHHNVアッセイと組み合わせて内部対照試験を実施することで、使用者にこの種のエラーに対する注意を喚起し、検査結果の定量を補助することができる。

40

#### 【0058】

2種類の内部対照試験を用いることができる。一手法は、「鋳型内部対照」(ITC)の共増幅に基づき、ITCは反応前に核酸増幅試薬混合物に添加される。第2の手法は試料に含まれる「試料内部対照」(ISC)の共増幅に基づく。いずれの場合にも、内部対照DNA又はRNAの配列はIHHNV DNAの配列と異なる。

#### 【0059】

試料内部対照は、試料材料（例えばエビ組織及び血リンパ）中に保存された、又は常に存在するDNA又はRNA遺伝子配列であり得る。ISC標的DNA又はRNAを増幅するために使用されるプライマーは、IHHNV DNAを増幅しないよう選択され、IHHNV検査プライマーは試料内部対照DNA又はRNA標的を増幅しないよう選択される。このようにして、ISC標的及びIHHNV標的が独立して増幅する。アッセイでは、

50

I S C 標的及びI H H N V 標的の双方が同じ試薬及び条件を用いてプロセシングされる。さらに、双方の標的錫型とも、同じ試薬及び反応条件を用いて増幅される。I S C 錫型及びプライマーは検査試料中に存在するため、増幅中にI S C 産物が產生されるはずである。I S C 産物が形成されない場合、それは検査の化学反応が正しく機能しなかったことを示すものであり、そのI H H N V 検査結果は誤っており、信頼してはならない。正しいI S C 産物形成が生じた場合、それは検査の化学反応が正しく作用したことを示すものであり、そのI H H N V 試料のプロセシング及び検査反応は正しく機能したと考えられ、従つてそのI H H N V 検査はより正確に解釈され得る。

## 【0060】

I S C プライマーは、I H H N V に感染し易い病原体宿主種の構造タンパク質、代謝酵素又はリボソーム産物をコードする遺伝子の遺伝子配列から選択できる。例えば、I S C プライマーは、エビアクチン遺伝子、又はエビの18S、23S若しくは5Sリボソーム遺伝子、又は他の構成遺伝子に由来する遺伝子配列であり得る。I S C プライマー対の好適な例としては、限定はされないが、表2に示されるとおりのウシエビ(*Penaeus monodon*)アクチン1遺伝子(GenBank AF100986)に由来する配列番号13, 14、及び配列番号15, 16が挙げられる。

10

## 【0061】

## 【表2】

表2  
試料内部対照(I S C)プライマー配列

20

プライマー、方向	配列番号	アクチン1遺伝子位置 (GenBank AF100986)
アクチンF2、フォワード	13	391-411
アクチンR2、リバース	14	608-629
アクチンF3、フォワード	15	326-346
アクチンR3、リバース	16	553-574

30

## 【0062】

一実施形態において、増幅反応で試料内部対照産物が產生されるよう、I S C プライマーの少なくとも1つの対が核酸増幅試薬混合物に含まれる。一実施形態において、I S C プライマーの少なくとも1つの対は、配列番号13, 14、及び配列番号15, 16からなる群から選択される。

## 【0063】

加えて、錫型内部対照(I T C)をI H H N V 検査プライマーと共に有利に使用することにより、検査反応の定量を補助できる。I T Cについてのプライマー要件は、I T C 錫型とプライマーとの双方が増幅試薬混合物に添加される点を除いてI S C プライマーの要件と同じである。I T C プライマーは、I H H N V に感染し易いエビなどの被験種由来のゲノムDNA又はRNAを増幅しないように選択される。I T C 錫型は既知の濃度で添加されるため、1反応当たりのコピー数が分かる。I T C 錫型は増幅試薬混合物中に含まれるため、増幅中にI T C 産物が產生される。I T C 産物の量は反応の増幅効率及び他の変数に応じて反応毎に異なり得る。これらの同じ変数はI H H N V DNA 増幅にも影響するため、產生されるI H H N V 産物の量は反応で產生されるI T C 産物の量に比例することになる。従つて、アッセイにおけるI H H N V 錫型のコピー数は、当初加えられたI T Cと、形成されたI T C 産物と、產生されたI H H N V 産物との間の比例関係から推測できる。相対的な産物形成は、標識された内部プローブが用いられる場合はC T 単位で、又は産物それぞれの融解温度における融解曲線の微分係数により決定できる。

40

## 【0064】

50

ITC プライマー配列は理論的に設計されてもよく、又は被験試料に存在しない植物及び動物からの他のウイルス又は遺伝子などの非被験種からの遺伝子配列に由来してもよい。このように、試料材料は ITC プライマーによって増幅される可能性のある他の DNA 又は RNA を含まない。

#### 【 0 0 6 5 】

一実施形態において、増幅反応で少なくとも 1 つの ITC 産物が產生されるよう、少なくとも 1 つの鑄型内部対照及び ITC プライマーの少なくとも 1 つの対が核酸増幅試薬混合物に含まれる。

#### 【 0 0 6 6 】

当該技術分野において周知の様々な検出方法が、本明細書に開示される方法に用いられ得る。これらの検出方法としては、限定はされないが、標準未変性ゲル電気泳動法（例えば、アクリルアミド又はアガロース）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、温度勾配ゲル電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、及び蛍光検出が挙げられる。10

#### 【 0 0 6 7 】

蛍光検出方法は高速で高感度の増幅産物の検出を提供する。蛍光検出はまた、リアルタイムでの検出能力も提供し、ここでは熱サイクリングプロセス中の増幅産物の形成がモニタされる。加えて、初期標的の量が蛍光検出を用いて定量され得る。蛍光検出は、熱サイクリングプロセスの前か、又はその後に、核酸結合性蛍光剤を反応混合物に添加することにより行われ得る。好ましくは、核酸結合性蛍光剤は、核酸の二重らせんにおける積み重なった塩基対の間への非共有結合性の挿入が可能なインターラート色素である。しかしながら、インターラートされない核酸結合性蛍光剤もまた好適である。本発明の方法において有用な核酸結合性蛍光剤の非限定的な例は、臭化工チジウム及び SYBR (登録商標) Green I (Molecular Probes; Eugene, OR から入手可能) である。熱サイクリング前に反応混合物に核酸結合性蛍光剤を添加することで、Higuchi (米国特許第 5,994,056 号明細書) により記載されるとおり、増幅産物の形成をリアルタイムでモニタすることが可能となる。リアルタイム蛍光測定が可能なサーマルサイクラーは、Applied Biosystems (Foster City, CA)、MJ Research (Waltham, MA)、及び Stratagene (La Jolla, CA) などの企業から市販されている。増幅後の増幅産物の確認は、当該技術分野において周知の方法を用いて、例えば、蛍光測定値を使用して融解曲線を生成することにより、産物の融解温度を決定することで評価できる。20

#### 【 0 0 6 8 】

増幅産物の蛍光検出は当該技術分野において周知の他の方法、例えば蛍光標識プローブの使用を用いても達成され得る。プローブは増幅産物の少なくとも一部分と相補的な (complementary) 配列を含んでなる。かかるプローブの非限定的な例としては、TaqMan (登録商標) プローブ (Applied Biosystems) 及び Molecular Beacons (Goelら、J. Appl. Microbiol. 99 (3) : 435 - 442 頁 (2005 年)) が挙げられる。例えば、本明細書に開示される IHNV プライマーと共に使用される蛍光標識プローブを構築するための遺伝子配列は、以下の実施例 11 に詳細に記載されるとおり、Primer Express (登録商標) v2.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City カリフォルニア州) などの市販の分析ソフトウェアを使用した IHNV 遺伝子及び被験アンプリコンの分析により選択され得る。プローブ配列は特異的 IHNV 被験アンプリコンの近位末端の範囲内に收まるよう選択される。好適なプローブ配列としては、限定はされないが、配列番号 17 及び 18 に示される配列が挙げられる。プローブは、以下に記載されるハイブリダイゼーションプローブを標識するための方法など、当該技術分野において周知の方法を用いて蛍光標識されてもよい。リアルタイム蛍光検出用には、プローブは二重標識され得る。例えば、プローブの 5' 末端を 6 FAM (商標) (Applied Biosystems) などのフルオロフォアで標識でき、3' 末端を 6 -カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) などのクエンチャー色素で標識でき40

C ハイブリダイゼーションプローブを標識するための方法など、当該技術分野において周知の方法を用いて蛍光標識されてもよい。リアルタイム蛍光検出用には、プローブは二重標識され得る。例えば、プローブの 5' 末端を 6 FAM (商標) (Applied Biosystems) などのフルオロフォアで標識でき、3' 末端を 6 -カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) などのクエンチャー色素で標識でき50

る。副溝結合性プローブの場合、3'末端をクエンチャーカラーと副溝結合剤との複合体で標識できる。蛍光標識プローブは、Applied Biosystemsなどの商業的供給元から入手してもよい。

#### 【0069】

一実施形態において、本発明は、試料中のIHHNVの量を定量するための方法を提供する。本実施形態において、DNAは上記のとおり、IHHNVを含むことが疑われる試料から提供される。DNAは、核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下での少なくとも変性温度と伸長温度との間の熱サイクリングによって、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも1つの対により増幅される。熱サイクリング中、核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブにより生成される蛍光量が測定される。蛍光測定から、核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブにより生成される蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの閾値サイクル数が決定される。閾値サイクル数は本明細書ではCT数又はCT値と称される。CT数は手動で決定されてもよく、又は機器により自動的に決定されてもよい。CT数を決定するため、初回の増幅サイクル中に各試料についてベースラインの蛍光が決定される。次に数学的アルゴリズムを用いて、蛍光シグナルがバックグラウンドを上回るには蛍光にどのような統計的に有意な変化が必要とされ得るかが設定される。蛍光(fluorescence)がこの閾値を超えるときのサイクル数がCT数と称される。典型的には、熱サイクリングの開始時の試料中に存在するDNAが多いほど、閾値に達するために費やすサイクル数が少なくなる。従って、CT数は試料中のIHHNVの初期量に反比例する。IHHNV試料についてCT数が決定されると、試料中のIHHNVについて決定された閾値サイクル数を、当該技術分野において周知のとおり既知の濃度の標準溶液を使用して決定された錆型濃度の対数に対する閾値サイクル数の標準曲線と比較することにより、試料に当初存在するIHHNVの量を計算できる。

10

20

30

#### 【0070】

##### 核酸ハイブリダイゼーション法

IHHNVについての核酸ハイブリダイゼーション検査の基本要素としては、DNAプローブ、IHHNVを含むことが疑われる試料、及び特異的ハイブリダイゼーション法が挙げられる。本発明のプローブは、検出対象の核酸配列と相補的であり、且つそれと「ハイブリダイズ可能」な一本鎖核酸配列である。典型的にはハイブリダイゼーション法では、プローブの長さは5塩基ほどの短いものから数キロベースまで異なり得るとともに、これは行われる特異的な検査に依存するであろう。検出対象の核酸配列と相補的である必要があるのは、プローブ分子の一部のみである。加えて、プローブと標的配列との間の相補性は完全でなくともよい。ハイブリダイゼーションは不完全に相補的な分子間にも確かに起こり、その結果、ハイブリダイズされた領域の塩基のうちある割合は適切な相補塩基と対合しない。

40

#### 【0071】

本明細書に開示されるDNAプローブは、上記のIHHNV診断用プライマー配列に由来する。本明細書で使用されるとき、語句「IHHNV診断用プライマー配列に由来する」は、そのDNAプローブが、IHHNV診断用プライマー配列、それから核酸増幅法を用いて得られる増幅産物配列、IHHNV診断用プライマー配列若しくは増幅産物配列の一部分、又は前述の配列のいずれかの完全相補配列であり得ることを意味する。上記で使用されるときの用語「一部分」は、IHHNV診断用プライマー配列又はそれから得られる増幅産物の完全配列より短い任意の一部を指す。好ましくは、プローブとして使用するための一部分の長さは、少なくとも約15塩基、より好ましくは、少なくとも約20塩基である。IHHNV診断用プライマー配列に由来するDNAプローブの非限定的な例としては、配列番号1～8として示されるIHHNV診断用プライマー配列、配列番号9、10、11、及び12として示される増幅産物配列、及び配列番号1～12の完全相補(complementary)配列が挙げられる。

#### 【0072】

プローブが標識されることで検出が促進され得る。核酸プローブに標識を結合させる方

50

法は、当該技術分野において周知である。例えば、プローブは標識されたヌクレオチドを取り込むことによって合成中に標識できる。或いは、プローブ標識はニックトランスレーション又は末端標識により行うことができる。標識は蛍光検出用のフルオロフォア、又はリガンド、例えばビオチンを含んでなってもよく、リガンドはハイブリダイゼーション後にリガンド（例えば、酵素標識ストレプトアビシン）と結合する酵素標識された結合分子を使用して検出される。

#### 【0073】

エビ又は他の甲殻類などのIHHNVを含むことが疑われる試料中のIHHNVの存在を検出するため、上記のとおり、試料からDNAが提供される。試料DNAは、プローブと標的分子との任意のハイブリダイゼーションが起こる前に、プローブと接触可能となる。従って、DNAは無細胞で、ハイブリダイゼーションが起こる前は適切な条件下に置かなければならない。加えて、ある実施形態においては、DNAを精製してタンパク質、脂質、及び他の細胞成分を除去することが望ましいこともある。様々な核酸精製方法、例えばフェノール-クロロホルム抽出が当業者には周知である（Maniatis、上記）。加えて、DNAの抽出及び精製用のキットを商業的供給元から入手できる（例えば、IsoQuick（登録商標）核酸抽出キット（MicroProbe Corp.、Bothell、WA）；及びQIAamp DNA Mini Kit（Qiagen、Valencia CA））。プレハイブリダイゼーション精製は、特に標準フィルターハイブリダイゼーションアッセイに有用である。

10

#### 【0074】

一実施形態において、ハイブリダイゼーションアッセイは核酸抽出の必要なしに細胞溶解物上で直接行われ得る。これにより試料処理プロセスから数ステップが削減され、アッセイの速度が速まる。かかるアッセイを粗細胞溶解物上で実施するため、典型的にはカオトロピック剤が上記のとおり調製された細胞溶解物に添加される。カオトロピック剤はヌクレアーゼ活性を阻害することにより核酸を安定化させる。さらに、カオトロピック剤は短鎖オリゴヌクレオチドプローブのDNAとの室温での高感度及びストリングエントなハイブリダイゼーションを可能にする（Van Ness及びChen、Nucleic Acids Res. 19: 5143-5151頁（1991年））。好適なカオトロピック剤としては、とりわけ、塩化グアニジン、チオシアン酸グアニジン、チオシアン酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸リチウム、過塩素酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸ルビジウム、ヨウ化カリウム、及びトリフルオロ酢酸セシウムが挙げられる。典型的には、カオトロピック剤は約3Mの最終濃度で存在する。必要に応じて、ハイブリダイゼーション混合物にホルムアミドを、典型的には30～50容量%で添加できる。

20

#### 【0075】

ハイブリダイゼーション法は確立されており、溶液（すなわち、同種）及び固相（すなわち、異種）ハイブリダイゼーション法が挙げられる。典型的には、試料DNAが本明細書に開示されるIHHNV診断用プライマー配列に由来するプローブにより探索される（すなわち核酸ハイブリダイゼーションを可能にする条件下でプローブと接触する）。これは、無機塩又は有機塩の存在下で適切な濃度及び温度条件のもとプローブと試料DNAとを接触させることを伴う。プローブ及び試料核酸は十分に長い時間接触させて、プローブと試料核酸との間のあらゆる可能なハイブリダイゼーションが起こり得るようにしなければならない。混合物中のプローブ又は標的の濃度により、ハイブリダイゼーションが起るのに必要な時間が決定され得る。プローブ又は標的の濃度が高いほど、ハイブリダイゼーションで必要なインキュベート時間は短くなる。

30

#### 【0076】

様々なハイブリダイゼーション溶液を用いることができる。典型的には、これらは約20～60容量%、好ましくは30%の極性有機溶媒を含んでなり得る。一般的なハイブリダイゼーション溶液は、約30～50容量%のホルムアミド、約0.15～1Mの塩化ナトリウム、約0.05～0.1Mの緩衝液、例えばクエン酸ナトリウム、トリスHCl、PIPES又はHEPES（pH範囲は約6～9）、約0.05～0.2%の界面活性剤

40

50

、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5～20 mMのEDTA、FICOL（Amersham Bioscience Inc.、Piscataway、NJ）（分子量が約300～500キロダルトン）、ポリビニルピロリドン（分子量が約250～500キロダルトン）、及び血清アルブミンを用いる。また、典型的なハイブリダイゼーション溶液には、約0.1～5 mg/mLの未標識キャリア核酸、断片化された核DNA（例えば、仔ウシ胸腺若しくはサケ精子DNA、又は酵母RNA）、及び場合により単位容量当たり約0.5～2重量%のグリシンも含まれ得る。様々な極性水溶剤又は膨潤剤（例えば、ポリエチレングリコール）、アニオン性ポリマー（例えば、ポリアクリレート又はポリメチルアクリレート）、及びアニオン性糖ポリマー（例えば、硫酸デキストラン）を含む体積排除剤などの他の添加剤が含まれてもよい。

10

## 【0077】

核酸ハイブリダイゼーションは様々なアッセイフォーマットに適応性を有する。最も好適な1つはサンドイッチアッセイフォーマットである。サンドイッチアッセイは特に非変性条件下でのハイブリダイゼーションに適応性を有する。サンドイッチ型アッセイの主な要素は固体担体である。固体担体は、標識されておらず試料DNA配列の一部分と相補的な固定化された核酸捕捉プローブに吸収されているか、又はそれと共有結合している。本発明において特に有用なプローブは、上記のとおりの、本IHHNV診断用配列に由来するものである。捕捉されたDNAは、上記のとおり標識されていて、且つ試料DNA配列の異なる部分と相補的な第2のプローブを使用して検出される。標識は当該技術分野において周知の方法（例えば、蛍光、化学発光及び結合対酵素アッセイなど）を用いて検出され得る。

20

## 【0078】

ハイブリダイゼーション法はまた、PCRなどの核酸増幅法と組み合わせて用いられてもよい。例えば、本IHHNV診断用配列は、同種又は異種アッセイフォーマットのいずれにおいても3'末端がブロックされた検出プローブとして用いられ得る。例えば、本配列から生成されたプローブは3'末端がブロックされているか、又は非関与型であってもよく、核酸増幅反応によっては伸長されないか、又はそれに関与しないであろう。加えて、プローブは、プローブ／分析物ハイブリッドを固定化するための結合点として、又は検出可能なシグナルを生成するためのレポーターとして作用する反応性リガンドとして働き得る標識を取り込む。従って、IHHNVを保因していると疑われる試料から単離されたゲノムDNAは過剰量の3'末端がブロックされた検出プローブの存在下で標準プライマー特異的増幅プロトコルにより増幅され、増幅産物を产生する。プローブは3'末端がブロックされているため、標的の増幅に関与したり、又はそれを妨害したりすることはない。最後の増幅サイクルの後、検出プローブは増幅されたDNAの関連する部分にアニールされ、次にアニールされた複合体が反応性リガンドを介して担体に捕捉される。

30

## 【0079】

本プローブは用途が広く、いくつかの代替的形態で設計され得る。プローブの3'末端は、複製阻害部分の結合によってプライマー伸長反応への関与が阻止され得る。典型的な複製阻害部分としては、限定はされないが、ジデオキシヌクレオチド（dideoxy nucleotide）、3'デオキシヌクレオチド、ミスマッチヌクレオシド又はヌクレオチドの配列、3'リン酸基及び化学剤、例えば、ビオチン、ジニトロフェノール、フルオレセイン、ローダミン、及び炭素鎖が挙げられる。複製阻害剤は標準シアノエチルホスホラミダイト化学反応を用いて、化学合成中に非関与プローブの3'末端ヌクレオチドの3'ヒドロキシ基と共有結合する。このプロセスは固相合成化学反応を用いるもので、ここでは3'末端が不溶性担体（コントロールド・ポア・グラス、すなわち「CPG」）と共有結合し、一方で新しく合成された鎖が5'末端に成長する。本発明に関連するなかでは、3'-デオキシリボヌクレオチドが好ましい複製阻害剤である。コルジセピン（3'-デオキシアデノシン）は最も好ましい。コルジセピンはプローブの3'末端の終端に結合するため、合成は、CPGと共有結合したコルジセピン、5'-ジメトキシリチル-N-ベンゾイル-3'-デオキシアデノシン（コルジセピン）、2'-サクシノイル-長鎖アルキルア

40

50

ミノCPG (Glen Research, Sterling, VA) から開始される。ジメトキシトリチル基が外れ、鎖合成の開始が固相コルジセピンの脱保護された5'ヒドロキシリル基から始まる。合成の完了後、オリゴヌクレオチドプローブは固体担体から切断されて外れ、3'末端に結合したコルジセピンの遊離2'ヒドロキシリル基が残る。他の試薬もまた非関与型プローブの合成中に3'末端に結合して複製阻害剤として働くことができる。これらとしては、限定はされないが、他の3'-デオキシリボヌクレオチド、ビオチン、ジニトロフェノール、フルオレセイン、及びジゴキシゲニンが挙げられる。これらの試薬の各々で誘導体化されたCPG担体は、商業的供給元から入手可能である（例えば、Glen Research, Sterling, VA；及びCLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA）。

10

## 【0080】

或いは、非対称増幅を使用して検出プローブと相補的な鎖を生成してもよい。一本鎖DNAを产生するための非対称PCR条件はPCRについての上記の条件と同様だが、プライマー濃度は一方のプライマーが過剰で、他方のプライマーが限定的であるように調整される。この手順により方法の感度が高まるであろうことが企図される。この感度の向上は、検出プローブとの結合に利用可能な一本鎖の数が増えることにより起こり得る。

## 【0081】

## 感染リスク及びDNA損傷又はIHHNV不活化の評価

本明細書に開示される試料中のIHHNVの存在を検出し、その量を定量するための方法は、DNA損傷又はIHHNV不活化の程度を評価するために用いられ得る。例えば、本明細書に開示される方法は化学的処置と組み合わせて用いることによりエビの健康及び発育を向上させ得る。具体的には、エビを生産し、発育させる間に、生産施設から採取された試料、又はエビの生存環境から採取された試料がサンプリングされ、IHHNVの存在について本明細書に開示される方法を用いて検査され得る。IHHNVが見つかった場合、施設及び／又はエビには、ウイルスを死滅させるか、又は制圧するための処置が施され得る。この検査は高感度であるため、IHHNVはその生産群が壊滅し損失を被る前に早期に検出され得る。従って、本明細書に開示される方法を化学的介入と組み合わせて用いることで、生産の効率性及び生産高を向上させることができる。化学的な処置の例としては、限定はされないが、Virkon（登録商標）S殺菌剤（E.I. Du Pont de Nemours and Co.の登録商標）、過酢酸、過酸化水素、過マンガン酸塩、一過硫酸カリウム、次亜塩素酸、次亜塩素酸塩及びヨウ素などの酸化殺菌剤；プロバイオティクス、免疫賦活剤、飼料補助剤、及びウイルスの宿主結合を妨げる組換えタンパク質／核酸が挙げられる。化学的処置の後、エビはサンプリングされ、再検査によって処置が成功してウイルスが根絶されたかどうかが判定され得る。

20

## 【0082】

別の実施形態において、本明細書に開示されるプライマーを様々な組み合わせで使用することにより、完全性及び化学的処置によって生じたウイルスゲノムの損傷程度を確認しえることが考えられる。例えば、フォワードプライマーのIHHNV1F（配列番号1）とリバースプライマーのIHHNV2R（配列番号4）とを組み合わせて用いることにより480塩基の増幅産物が產生され得る。このより長い産物はウイルスゲノムが無傷で損傷を受けていない状態にある場合にのみ形成され得る。従って、より小さい産物（配列番号9又は配列番号10）の、増幅中に形成されたより長い産物（又はより長い産物の不在）に対する比を比較することにより、化学的処置又は介入によって生じたウイルスゲノムの損傷の程度を評価できる。これは化学的処置又は介入の効力を確定するのに役立ち得る。同様に、配列番号1又は配列番号8を本明細書に開示される他のプライマーと組み合わせて使用することにより、IHHNVゲノムのより長いセグメントの完全性を調べてもよい。

30

## 【0083】

## 検出キット

別の実施形態において、本発明は核酸増幅法に基づくIHHNVの検出用キットを提供

40

50

する。このキットは、上記のとおりの I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対を含む。加えて、このキットはさらに、以下の試薬、すなわち、耐熱性 D N A ポリメラーゼ、4 つの異なるデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物、核酸結合性蛍光剤、試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対、少なくとも 1 つの錫型内部対照及び錫型内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対、及びキットに含まれる I H H N V 診断用プライマー配列による增幅が可能な I H H N V ゲノム内の核酸の少なくとも 1 つの領域の一部分と相補的な配列を含んでなるプローブのなかの少なくとも 1 つを含む。キットのプライマー及び他の試薬は、液状、乾燥状態、又は錠剤などの様々な形態であってもよく、バイアル、試験管などの 1 つ又は複数の任意の好適な容器中に存在し得る。

## 【0084】

10

別の実施形態において、本発明はサンドイッチアッセイハイブリダイゼーション法に基づく I H H N V の検出用キットを提供する。このキットは、I H H N V にかかっていることが疑われるエビ又は他の甲殻類から試料を採取するための第 1 の要素と、試料を投入 (disbursement) し、溶解させるための緩衝液とを含む。第 2 の要素としては、標的核酸とプローブ核酸とをハイブリダイズすると同時に、望ましくない、ハイブリダイズしない形態のものを洗浄により除去するための、乾燥形態又は液状形態の媒質が挙げられる。第 3 の要素としては固体担体 (例えば、ディップスティック、ビーズなど) が挙げられ、その上に本明細書に開示される単離された I H H N V 診断用プライマー配列に由来する未標識核酸プローブが固定される (又はそれとコンジュゲートされる)。第 4 の要素は同じ D N A 鎖のなかの第 2 の異なる領域と相補的な標識プローブを含み、それに対し、第 3 の要素の固定化された未標識の核酸プローブがハイブリダイズされる。標識プローブはまた、本明細書に開示される単離された I H H N V 診断用プライマー配列に由来してもよい。

20

## 【実施例】

## 【0085】

本発明は、以下の実施例においてさらに定義される。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものではあるが、例示として提示されるに過ぎないことは理解されたい。上記の考察及びこれらの実施例から、当業者は本発明の本質的な特徴を確認でき、且つ本発明の趣旨及び精神から逸脱することなく、本発明の様々な変更及び修正を行って本発明を様々な用途及び条件に適応させることができる。

30

## 【0086】

略語の意味は次のとおりである：「sec」は秒を意味し、「min」は分を意味し、「hr」は時間を意味し、「d」は日を意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、「μM」はマイクロモル濃度を意味し、「mM」はミリモル濃度を意味し、「nM」はナノモル濃度を意味し、「M」はモル濃度を意味し、「mmol」はミリモルを意味し、「μmol」はマイクロモルを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「fg」はフェムトグラムを意味し、「μg」はマイクログラムを意味し、「mg」はミリグラムを意味し、「g」はグラムを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「mU」はミリ単位を意味し、「U」は単位を意味し、「rxn」は反応を意味し、「PCR」はポリメラーゼ連鎖反応を意味し、「OD」は光学濃度を意味し、「OD<sub>260</sub>」は 260 nm の波長で測定された光学濃度を意味し、「OD<sub>280</sub>」は 280 nm の波長で測定された光学濃度を意味し、「OD<sub>280/260</sub>」は OD<sub>280</sub> 値の OD<sub>260</sub> 値に対する比を意味し、「rpm」は毎分回転数を意味し、「CT」は反応における蛍光の増加が検出閾値を超えるときのサイクル数を意味し、及び「SPF」は特定病原体を含まないことが証明されていることを意味する。

40

## 【0087】

## 一般的方法

本実施例で用いられる標準的な組換え D N A 及び分子クローン技術は当該技術分野において周知であり、Sambrook, J.、Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T.、「Molecular Cloning: A Laboratory Ma

50

n u a l」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年と、T.J.Silhavy、M.L.Bennan、及びL.W.Enquist、「Experiments with Gene Fusions」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1984年と、Ausubel, F.M.ら、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience、NY、1987年により記載されている。

## 【0088】

10

ゲノム配列の分析及びプライマーの指定は、InforMax Inc. (Bethesda、MD) から入手可能なVector NTI (登録商標) Software Suiteを使用して達成された。

## 【0089】

本明細書で使用される酵素及び試薬は、以下の業者から購入した：

Applied Biosystems、Foster City、CA : AmpliTaq (カタログ番号N808-0160) ;

New England Biolabs、Beverly、MA : デオキシヌクレオチド溶液混合物 (カタログ番号N0447S) ;

Sigma Genosys、The Woodlands、TX : オリゴヌクレオチド；

Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、CA : 4%アガロースE-gel (カタログ番号G6018-02) ;

Qiagen、Valencia、CA : プロティナーゼK (カタログ番号19131) ; 及びRNase A、DNaseフリー (カタログ番号19101)。

## 【0090】

加えて、キット及び試薬は以下の業者から購入した：SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA; カタログ番号4309155) ; 及びQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen、Valencia、CA; カタログ番号51304)。

30

## 【0091】

全てのエビDNA試料は、Donald V. Lightner、アリゾナ大学獣医学・微生物学科 (Department of Veterinary Science and Microbiology, The University of Arizona)、Tucson、AZ 85721、米国から入手した。これらには、疾患にかかっていないことが証明されているエビ(SPF)及びペナエウスモノドン(Penaeus monodon)型バキュロウイルス(MBV)、タウラ症候群ウイルス(TSV)、ホワイトスポットシンドロームウイルス(WSSV)、P.モノドン(P. monodon)のイエロー・ヘッド病ウイルス(YHV)、伝染性皮下造血器壊死症ウイルス(IHHNV)及び伝染性筋壊死ウイルス(IMNV)を含む感染エビからのDNA試料が含まれた。

40

## 【0092】

## 鉄型及びプライマー

IHHNV合成鉄型を合成するためのDNAオリゴヌクレオチド配列を伝染性皮下造血器壊死症ウイルス(IHNNV)のDNAゲノム(GenBank受託番号AF218266; Bonami, J.R.ら、J.Gen.Virology 71(第11部): 657-2664頁(1990年))から調製し、標準的なホスホラミダイト化学反応を用いて合成するか、又は市販品を購入した(Sigma Genosys Company、The Woodlands、TX)。合成鉄型標的及び試料のDNA濃度及びコピー数を分光光度法により260nmで測定した(OD<sub>260</sub>)。鉄型を特定のコピー数ま

50

で精製水で希釈し、これをアッセイ定量の陽性対照及び標準として使用した。表3は、ゲノム位置、配列番号、及び鑄型標的の長さを提示する。IHHNV検出に有用なプライマーの配列は配列番号1～8として示される。

## 【0093】

## 【表3】

表3  
鑄型配列

鑄型	サイズ(bp)	配列番号	IHHNV ゲノム位置 (GenBank AF218266)
IHHNV 1T	119	9	682-800
IHHNV 2T	100	10	1062-1161
IHHNV 3T	108	11	1749-1856
IHHNV 4T	116	12	3417-3532

10

## 【0094】

## 実施例1～4

## 合成標的を使用したIHHNVアッセイの実証

20

これらの実施例の目的は、本明細書に開示されるプライマーによるPCR增幅を用いたIHHNV合成鑄型の検出を実証することであった。

## 【0095】

IHHNV合成鑄型（上記）をDNaseフリー水で10倍連続希釈することにより鑄型標準を調製した。概して、標準の鑄型濃度は $10^7$ ～0コピー/ $\mu\text{L}$ の範囲であった。表4に示されるとおりの然るべきIHHNVフォワードプライマー及びリバースプライマーを各125nM含む25 $\mu\text{L}$ のSYBR（登録商標）Green PCR Master Mix（Applied Biosystems、Foster City、CA；カタログ番号4309155）、及び45 $\mu\text{L}$ /反応の最終容量を作成するのに十分なDNaseフリー水を添加することにより、マスター混合物を調製した。マスター混合物は使用するまで氷上で保管した。

30

## 【0096】

各反応について、まず初めに5 $\mu\text{L}$ の鑄型標準をPCR反応ウェルに添加し、次に45 $\mu\text{L}$ のマスター混合物を添加した。次に反応液を、95℃で10分間の初期変性ステップで、95℃で15秒間及び60℃で1分間の温度プログラムを用いた40サイクルの熱サイクルにかけた。增幅は、MicroAmp光学96ウェル反応プレートにおいて、ABI PRISM 7900サーマルサイクラー（Applied Biosystems、Foster City、CA）を用いて行った。各サイクル中、SYBR（登録商標）Greenレポーター色素のDNA増幅産物との相互作用により生じる蛍光の増加をモニタすることにより、PCR産物の形成を検出した。PCRの完了後、60～95℃の範囲にわたり解離曲線（融解曲線）を生成した。ABI PRISM 7900 SDSソフトウェアを用いてデータを分析した。さらに、PCR産物の形成について、4%アガロースE gel（Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、CA；カタログ番号G6018-02）及びゲル製造者のプロトコルを用いたアガロースゲル電気泳動により分析した。

40

## 【0097】

表4に要約される結果は、然るべきIHHNV鑄型が存在するとき、各プライマーセットについて然るべきサイズのアンプリコン産物が產生されたことを実証している。鑄型の最小検出レベルは、使用されるプライマーに応じて2～100コピー/rxnであった。鑄型を含まない試料からは検出可能な産物は產生されなかった。

50

## 【0098】

増幅（C T）及びアンプリコン産物の形成は、鑄型の出発濃度の対数にそれぞれ反比例及び正比例した。

## 【0099】

## 【表4】

表4  
合成標的を使用したPCR増幅の結果

実施例	フォワード プライマー、 配列番号	リバース プライマー、 配列番号	鑄型の 配列番号	産物サイズ (bp)	最小検出鑄型 (コピー／rxn)
1	1	2	9	119	2~10
2	3	4	10	100	2~10
3	5	6	11	108	2~10
4	7	8	12	116	100~500

## 【0100】

## 実施例5~8

## 感染エビ組織からのIHHNV DNAの検出及び定量

これらの実施例の目的は、本明細書に開示されるプライマーによるPCRアッセイを用いた感染エビにおけるIHHNVの検出及び定量を実証することであった。

## 【0101】

これらの実施例では、実施例1~4に記載される条件を用いて、1反応当たり $10^6$ ~ $10^0$ コピーの範囲の然るべき合成鑄型IHHNV DNA(上記)の連続希釈液を増幅した。合成鑄型濃度の各々から決定されたC T値を用いて、95%信頼区間のC T値を標準における初期鑄型コピー数の対数に対しプロットすることにより標準曲線(図示せず)を生成した。次にこの曲線の傾き(すなわち、log濃度に対するC T)を用いて、未知の試料におけるウイルスゲノムのコピーをそれぞれのC T値から推定した。

## 【0102】

IHHNVのハワイ分離株に感染させたエビ由来のゲノムDNAを使用した。感染エビ鰓から単離された全てのDNA( $347\text{ng}/\mu\text{L}$ )を精製水で連続希釈し、これを用いてDNA濃度が総DNAの $1\text{ng}/\mu\text{L}$ ~ $1\text{fg}/\mu\text{L}$ の範囲の一連の試料を提供した。陰性対照としては、鑄型を含まない水対照と、2つの非感染(SPF)エビ株(バナメイエビ(Litopenaeus vannamei)及びウシエビ(Penaeus monodon))からDNAを抽出することにより得られた2つのDNAエビ試料( $50\text{ng}/\text{rxn}$ )とを含んだ。

## 【0103】

次に、プライマー対(表5を参照)の1つ、並びに実施例1~4に記載されるものと同じ増幅、マスター混合物、熱サイクリングの条件及び機器を用いて希釈された試料を増幅した。次に、希釈された各DNA試料のC T値をPCR増幅反応から評価した。次に、試料中のウイルスゲノムのコピーを、鑄型 $10\text{g}$ 濃度のプロットに対する標準C TのC T値及び傾きから推定した。PCR産物もまた、実施例1~4に記載されるとおりアガロースゲル電気泳動により分析した。

## 【0104】

結果は表5に要約される。表では、3回反復した平均として95%信頼区間と共に1反応当たりのIHHNVコピー数が示される。結果は、全てのプライマーセットが感染エビのDNAから正しいアンプリコン産物サイズを產生し、感染エビ試料においてIHHNV DNAを検出したことを示す。検出限界は、使用されるプライマー対に応じて約2コピ

10

20

30

40

50

- / rxn ~ 約 40 コピー / rxn のウイルスゲノムの範囲であった。水対照試料又は 2 つの SPF エビ試料からは増幅産物は検出されなかった。陰性対照試料により得られた結果は、このアッセイが 2 つの被験エビ株由来の非ウイルス性 DNA に対し反応性を有しないことを実証している。

【 0 1 0 5 】

【 表 5 】

表 5  
IHHNV 感染エビ組織からの DNA の検出結果

実施例	フォワード プライマー 配列番号	リバース プライマー 配列番号	感染エビ DNA/rxn (ng)	CT	IHHNV コピー / rxn
5	7	8	1	18.9	$46 \pm 2 \times 10^4$
5	7	8	0.1	21.2	$3.9 \pm 0.2 \times 10^4$
5	7	8	0.01	25.1	$1.0 \pm 0.1 \times 10^3$
5	7	8	0.001	30.4	$51 \pm 0.5 \times 10^2$
5	7	8	0.0001	34.9	$4 \pm 0.2 \times 10^1$
5	7	8	0.00001	> 40	0
5	7	8	0.000001	> 40	0
5	7	8	0 (水)	> 40	0
5	7	8	0 (SPF バナメイ エビ(50 ng))	> 40	0
5	7	8	0 (SPF ウシエビ (50 ng))	> 40	0
6	1	2	1	25.3	$1324 \pm 83$
6	1	2	0.1	28.7	$138 \pm 4$

10

20

30

【 0 1 0 6 】

【表6】

6	1	2	0.01	32.2	$13 \pm 2$
6	1	2	0.001	35.7	$2 \pm 1$
6	1	2	0.0001	> 40	0
6	1	2	0.00001	> 40	0
6	1	2	0.000001	> 40	0
6	1	2	0 (水)	> 40	0
6	1	2	0 (SPF バナメイ エビ(50 ng))	> 38	0
6	1	2	0 (SPF ウシエビ (50 ng))	> 38	0
7	3	4	1	24.8	$868 \pm 21$
7	3	4	0.1	27.9	$113 \pm 12$
7	3	4	0.01	31.9	$9 \pm 2$
7	3	4	0.001	35.2	$1 \pm 1$
7	3	4	0.0001	> 40	0
7	3	4	0.00001	> 40	0
7	3	4	0.000001	> 40	0
7	3	4	0 (水)	> 40	0
7	3	4	0 (SPF バナメイ エビ(50 ng))	> 40	0
7	3	4	0 (SPF ウシエビ (50 ng))	> 40	0

【0 1 0 7】

10

20

30

40

【表7】

8	5	6	1	26.6	$4800 \pm 280$
8	5	6	0.1	30.0	$433 \pm 3$
8	5	6	0.01	33.7	$35 \pm 4$
8	5	6	0.001	36.7	$5 \pm 1$
8	5	6	0.0001	> 40	0
8	5	6	0.00001	> 40	0
8	5	6	0.000001	> 40	0
8	5	6	0 (水)	> 40	0
8	5	6	0 (SPF バナメイ エビ(50 ng))	>38	0
8	5	6	0 (SPF ウシエビ (50 ng))	> 38	0

10

20

30

40

50

## 【0108】

## 実施例9

これらの実施例の目的は、本明細書に開示されるプライマーが、世界の種々の地域からのIHHNV株由来のDNAは増幅するが、他のエビ病原体に感染したエビのDNA又はRNAは増幅しないことを実証することである。

## 【0109】

この実施例では、他のエビ病原体に感染したエビのDNAを使用した。具体的には、種々の地理的領域（ハワイ、フィリピン、タイ、パナマ、メキシコ、モザンビーク及びマダガスカル）のIHHNV株、並びに非IHHNVエビウイルス（MBV、WSSV、YHV及びIMNV）に感染させたエビから単離されたDNA試料を、実施例5～8に記載されるプライマー及びPCR法を用いて試験した。

## 【0110】

全てのIHHNV株が、実施例5～8に記載される株と同様の検出限界で検出された。非IHHNVに感染させたエビのDNA試料を検査すると、PCR増幅は観察されなかった。これらの所見をまとめて考えれば、これは本明細書に開示されるIHHNV PCRプライマー及び方法がIHHNVに対し選択性を有し、これらのプライマーがエビDNA又は他のエビウイルスには反応しないことを実証している。

## 【0111】

## 実施例10

## PCRを用いた試料内部対照との組み合わせによるIHHNV DNAの検出

この実施例の目的は、本明細書に開示されるIHHNVプライマーを試料内部対照（ISC）プライマーと組み合わせて使用することにより、IHHNV産物に加えISC産物を產生できることを実証することであった。以下に提示される結果は、ISCプライマーが独立して試料DNAを増幅し、IHHNV DNAの増幅を妨害しないことを実証している。ISC産物の存在により、検査に十分な量及び質の試料DNAが回収されたことの指標として用いることのできるマーカーが提供される。

## 【0112】

I S C プライマーはウシエビ (*Penaeus monodon*) アクチン 1 遺伝子配列 (GenBank : AF100986) に由来した。I H H N V アンプリコンの選択的増幅を促進するため、I S C プライマーは標的 I H H N V アンプリコンより大きいDNA断片を増幅するよう設計した。I S C プライマー対の配列は、配列番号 13, 14、及び配列番号 15, 16 として示される（表 2 を参照）。

#### 【0113】

I H H N V に感染したエビ（ウシエビ (*Penaeus monodon*)）からのゲノム DNA 調製物を DNase フリー水で 10 倍連続希釈することにより、I H H N V 及びエビアクチン (actin) DNA を含む試料を調製した。試料の DNA 含量は 1 反応当たり 0.1 ng ~ 0.1 pg の範囲であった。次に非感染エビ由来のゲノムエビ DNA (10 ng) を、各 I H H N V 試料及び I H H N V DNA を含まない陰性対照試料に添加した。

10

#### 【0114】

15 μL / 反応の SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA ; カタログ番号 4309155) を、I H H N V 4 フォワードプライマー及びリバースプライマー（それぞれ、配列番号 7 及び 8）の各々について 125 nM、及びアクチン 2 フォワードプライマー及びリバースプライマー（配列番号 13 及び 14）の各々について 32 nM の最終濃度を得るのに十分な量のプライマー原液（I H H N V プライマーの各々について 20 μM 及びアクチンプライマーの各々について 10 μM）と組み合わせることにより、マスター PCR 混合物を調製した。DNase フリー水を添加して 25 μL / 反応の最終容量を作成した。マスター混合物は使用するまで氷上で保管した。

20

#### 【0115】

各反応について、まず初めに 5 μL の試料を PCR 反応ウェルに添加し、次に 25 μL のマスター混合物を添加した。次に反応液を、95 °C で 5 分間の初期変性ステップで、95 °C で 15 秒間及び 60 °C で 1 分間の温度プログラムを用いた 40 サイクルの熱サイクルにかけた。増幅は、MicroAmp 光学 96 ウェル反応プレートにおいて、ABI PRISM 7900 サーマルサイクラー (Applied Biosystems、Foster City、CA) を用いて行った。

30

#### 【0116】

各サイクル中、上記のとおり SYBR (登録商標) Green レポーター色素の DNA 増幅産物との相互作用により生じる蛍光の増加から決定される CT 値により、産物の形成をモニタした。40 サイクル後、60 °C ~ 95 °C の範囲にわたり解離曲線（融解曲線）を生成した。ABI PRISM 7900 SDS ソフトウェアを用いてデータを分析した。さらに、PCR 産物の形成について、4% アガロース Gel (Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、CA ; カタログ番号 G6018-02) 及びゲル製造者のプロトコルを用いたアガロースゲル電気泳動により分析した。

#### 【0117】

I S C プライマーのアクチン F 2 (配列番号 13) 及びアクチン R 2 (配列番号 14) を使用して得られた結果が図 1 A 及び 1 B に示され、これらの結果は双方の鑄型標的の同時増幅を実証している。特異的 I H H N V DNA は、80 °C の融解温度で 116 bp の産物を產生した。アクチン I S C は 239 bp の産物を產生した (Tm = 83.8 °C)。I H H N V 産物及びアクチン内部対照産物は、双方の融解曲線分析（図 1 A）及びゲル電気泳動（図 1 B）によりそれらのサイズ及び融解温度の差に基づいて検出された。I H H N V 標的の不在下では様々な I H H N V 標的濃度において、I S C 産物の形成は 83.8 °C の単一の融解温度ピークとして（図 1 A に示されるとおり）、及び電気泳動法（図 1 B に示されるとおり）により検出された。

40

I H H N V 鑄型を含む全ての試料において、特異的 I H H N V アンプリコンが融解温度 (Tm = 80 °C) 及びゲル電気泳動の双方により検出された。これらの結果は、アクチン I S C 鑄型が I H H N V 鑄型と共に増幅し、且つ PCR

50

R 増幅及びPCR アッセイの検出限界(0.1 pg の IHHNV DNA)がISC の存在により影響を受けないことを実証している。

【0118】

実施例 11

蛍光標識プローブを用いたIHHNV DNA のリアルタイム検出

この実施例は、本明細書に開示されるIHHNV プライマーが蛍光標識プローブと組み合わせてIHHNV のリアルタイム検出及び定量に使用できることを実証する。

【0119】

蛍光標識プローブを構築するための遺伝子配列を、Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA 94404) から購入したPrimer

10

Express (登録商標) v2.0 ソフトウェアを用いたIHHNV 遺伝子及び被験アンプリコンの分析により選択した。プローブ配列は、特異的IHHNV 被験アンプリコンの近位末端の範囲内に収まるよう選択し、アンプリコンのサイズ及び配列に応じて50 ~ 110 塩基長であった。プローブ配列の選択性は、G/C 含量が30~80%で、C 含量がG 含量より高く、且つ5' 末端のGがない領域に付与した。概して、プローブ配列はTm が被験プライマーのそれぞれのTm を上回る8~10 であるものを選択した。使用に際し他の種とクロスハイブリダイズするプローブ配列は選択しなかった。これらの基準を満たすよう選択されたプローブ配列が、表6 に列挙される。

【0120】

リアルタイム検出のため、プローブ配列を二重標識した。2つの異なる標識手法を用いた。プローブの5' 末端はフルオロフォア(6FAM (商標)、Applied Biosystems)で標識した。3' 末端はクエンチャーカラムで標識するか、又は副溝(minor groove)結合性(MGB)プローブの場合には、3' 末端はクエンチャーカラムと副溝(minor groove)結合剤との複合体で標識した。標識プローブを調製し、Applied Biosystems から購入した。以下に提示されるデータは、IHHNV4PT プローブ(配列番号18)を使用して得られた。同様にIHHNV4PM プローブ(配列番号17)を用い得ることも考えられる。

20

【0121】

【表8】

30

表6  
蛍光標識(Fluorescent Labeled)プローブ配列

プローブ	配列番号	GenBank 番号	位置	5'標識	3'標識
IHHNV4PM	17	AF218266	3444-3459	FAM <sup>1</sup>	MGB <sup>2</sup>
IHHNV4PT	18	AF218266	3481-3505	FAM	TAMRA <sup>3</sup>

40

<sup>1</sup>FAM は、6FAM<sup>TM</sup> 試薬、Applied Biosystems

<sup>2</sup>MGB は、MGB<sup>TM</sup> Applied Biosystems

<sup>3</sup>TAMRA は、6-カルボキシテトラメチルローダミン

【0122】

IHHNV 合成鑄型(上記)をDNase フリー水で10倍連続希釈することにより鑄型標準を調製した。概して、標準の鑄型濃度は10<sup>7</sup>~0 コピー / μL の範囲であった。

25 μL / 反応のTaqMan (登録商標) Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号4326708)を、表7 に示されるとおりの然るべきIHHNV フォワードプライマ

50

ー及びリバースプライマーの各々について 125 nM の最終濃度を得るのに十分な量のプライマー原液 (I H H N V プライマーの各々について 20 μM) 、 50 nM の最終濃度を得る量のプローブ原液、及び 45 μL / 反応の最終容量を作成するのに十分な D N a s e フリー水と組み合わせることにより、マスター混合物を調製した。マスター混合物は使用するまで氷上で保管した。

#### 【 0 1 2 3 】

各反応について、 5 μL の鑄型標準及び次に 45 μL のマスター混合物を各 P C R 反応ウェルに添加した。次に反応液を、 95 で 10 分間の初期変性ステップで、 95 で 15 秒間及び 60 で 1 分間の温度プログラムを用いた 40 サイクルの熱サイクルにかけた。增幅は、 M i c r o A m p 光学 96 ウェル反応プレートにおいて、 A B I P R I S M 7900 サーマルサイクラー ( A p p l i e d B i o s y s t e m s 、 F o s t e r C i t y 、 C A ) を用いて行った。各サイクル中、蛍光標識プローブから生じる蛍光の増加をモニタすることにより P C R 産物の形成を検出した。

#### 【 0 1 2 4 】

A B I S D S 2.2 ソフトウェアを用いてデータを分析した。さらに、 P C R 産物の形成について、 4 % アガロース E g e l ( I n v i t r o g e n L i f e T e c h n o l o g i e s 、 C a r l s b a d 、 C A ; カタログ番号 G 6 0 1 8 - 0 2 ) 及び製造者のプロトコルを用いたアガロースゲル電気泳動により分析した。

#### 【 0 1 2 5 】

表 7 に要約される結果は、然るべき I H H N V 鑄型が存在するとき、各プライマー / プローブセットについて然るべきサイズのアンプリコン産物が産生されたことを実証している。鑄型の最小検出レベルは、使用されるプライマー及びプローブに応じて 50 コピー / rxn であった。鑄型を含まない試料は、検出可能な産物を產生しなかった。

#### 【 0 1 2 6 】

増幅 ( C T ) 及びアンプリコン産物の形成は、鑄型の出発濃度の対数にそれぞれ反比例及び正比例した。

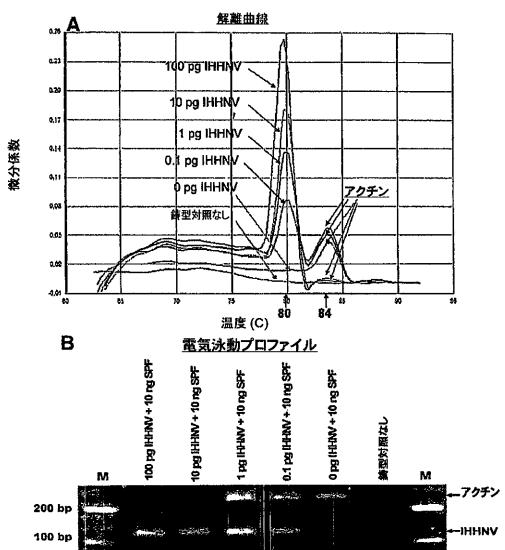
#### 【 0 1 2 7 】

#### 【 表 9 】

表 7  
合成標的を用いた P C R 増幅の結果

フォワード プライマー、 配列番号	リバース プライマー、 配列番号	鑄型の 配列番号	プローブの 配列番号	産物 サイズ (bp)	最小検出鑄型 (コピー / rxn)
7	8	12	18	116	50

【図1】



## 【配列表】

2010501178000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/018344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. 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)  
C12Q

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE Geneseq [Online] 15 April 2004 (2004-04-15), "PCR primer 1 used to amplify IHHNV." XP002465601 retrieved from EBI accession no. GSN:ADI14145 Database accession no. ADI14145 abstract -&amp; CN 1 410 549 A (SOUTH CHINA SEA INST OF OCEANO [CN]) 16 April 2003 (2003-04-16)</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-28

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 document 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.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

22 January 2008

11/02/2008

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitt, Anja

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/018344
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>YANG B ET AL: "A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp." JOURNAL OF FISH DISEASES MAY 2006, vol. 29, no. 5, May 2006 (2006-05), pages 301-305, XP002465598 ISSN: 0140-7775 page 302, column 1 - column 2; figures 1,2</p>	1-28
Y	<p>DHAR A K ET AL: "Detection and quantification of infectious hypodermal and hemotopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 39, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 2835-2845, XP002967188 ISSN: 0095-1137 cited in the application page 2837 - page 2838; tables 1,2 the whole document</p>	1-28
Y	<p>TANG K F ET AL: "Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR." DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS 9 MAR 2001, vol. 44, no. 2, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 79-85, XP002465599 ISSN: 0177-5103 cited in the application page 80 - page 81; figure 1; table 1</p>	1-28
Y	<p>SHIKE H ET AL: "Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus of Shrimp Is Related to Mosquito Brevidensoviruses" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 277, no. 1, 10 November 2000 (2000-11-10), pages 167-177, XP004435873 ISSN: 0042-6822 figure 2; table 1 the whole document</p>	1-28
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/018344
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUN ET AL: "Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 131, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 41-46, XP005204318 ISSN: 0166-0934 cited in the application page 42, column 2, paragraph 3 - paragraph 4; figure 1	1-28
Y	NUNAN L M ET AL: "Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp" MARINE BIOTECHNOLOGY (NEW YORK), vol. 2, no. 4, July 2000 (2000-07), pages 319-328, XP002465600 ISSN: 1436-2228 cited in the application page 321	1-28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2007/018344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 1410549	A 16-04-2003	NONE	

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リチャード・シー・エバーソウル

アメリカ合衆国デラウェア州 19810 . ウィルミントン . デイシアドライヴ 2412

(72)発明者 ジャンチョン・チャン

アメリカ合衆国デラウェア州 19803 . ウィルミントン . フォウルクロード 402 . アパートメント 6B10

(72)発明者 クリストイアン・ペーター・レンゲス

アメリカ合衆国デラウェア州 19810 . ウィルミントン . パワーアーレーン 3

(72)発明者 マリオ・ダブリュー・チェン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317 . チャップズフォード . ブルックレーン 23

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA09 CA20 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ43 QR32 QR56 QR62 QS16 QS25 QS34 QX02