

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3814352号

(P3814352)

(45) 発行日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(24) 登録日 平成18年6月9日(2006.6.9)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	

請求項の数 4 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平8-318027	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成8年11月28日(1996.11.28)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開平9-163991		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成9年6月24日(1997.6.24)		E AKTIENGESELLSCHAFT
審査請求日	平成14年12月4日(2002.12.4)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	007739		グレンツアーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成7年11月29日(1995.11.29)	(74) 代理人	100066692
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅村 皓
前置審査		(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV核酸増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 1 (ST280A) 及び SEQ ID NO: 2 (ST778A)、または SEQ ID NO: 1 (ST280A) 及び SEQ ID NO: 3 (ST678A) からなる群から選択される配列からなる C 型肝炎ウイルス (HCV) 核酸のポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対。

【請求項2】

C 型肝炎ウイルス (HCV) 核酸の検出のためのキットであって、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドプライマー対を含んでなる上記キット。

【請求項3】

C 型肝炎ウイルス (HCV) 核酸の増幅のための方法であって、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応を実施することを含んでなる上記方法。

【請求項4】

試料中の C 型肝炎ウイルス (HCV) 核酸の検出方法であって、  
(a) 前記試料を、オリゴヌクレオチドプライマー対を含んだポリメラーゼ連鎖反応増幅混合物中において、存在する場合に HCV 核酸が増幅されるような増幅条件下において処理し；そして

(b) HCV 核酸の存在を示す増幅が起こるかどうかを検出することを含んでなり、

10

20

前記プライマー対の配列が、SEQ ID NO: 1 (ST280A) 及びSEQ ID NO: 2 (ST778AA)、またはSEQ ID NO: 1 (ST280A) 及びSEQ ID NO: 3 (ST678A) からなる、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分子生物学及び核酸化学の分野に関するものである。さらに特定的には、本発明はC型肝炎ウイルス(HCV)核酸の増幅のための方法および試薬に関するものである。従って、本発明は、HCVの検出、一般的な医学的診断の分野、及び分子生物学の分野において応用される。

10

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

C型肝炎ウイルスは、単一の正のセンスの、約10,000ヌクレオチドの長さを有するRNA分子を含んだ小型のRNAウイルスである。原型的HCVは、Choo等、1989, Science 244: 359-362; Choo等、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455; 及び欧州特許公開第318,216; 288,232; 及び398,748号に記述されている。ゲノムは、単一の大きいポリタンパク質に翻訳され、次いで加工をうける単一の長い開放された読み枠を含むものと考えられている。該ゲノムは、開放された読み枠の上流に、5'非翻訳領域(UTR)を含むことが知られている。

【0003】

20

HCVのゲノムは、株及び単離物間で程度の大きい核酸異種性を示す(Simmonds, 1995, Hepatology 21: 570-583、及びBukh等、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8239-8243 参照)。しかしながら、5'UTR配列は比較的保存されていることが知られている。

【0004】

特定の核酸の増幅方法であるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の発明は、以前は検出不能なほど少量の試料中に存在する核酸の迅速な検出を可能とする(米国特許4,683,195; 4,683,202; 及び4,965,188 参照)。HCVゲノムRNAは、HCVゲノムRNAを逆転写し、得られたcDNAをPCRにより増幅し、及び増幅生成物の存在を検出することにより検出されうる。

30

【0005】

HCVゲノム配列のPCR増幅に基づくHCV検出アッセイは、米国特許5,527,699; 欧州特許公開529,493; Young等、1993, J. Clin. Microbiol. 31(4): 882-886; 及びYoung等、1995, J. Clin. Microbiol. 33(3): 654-657に記述されている。それらに記述されるように、HCV RNAの増幅は、結合逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)増幅により実施され得、これにおいては単一の酵素が、最初のゲノムRNAテンプレートからのプライマー伸長(即ち、逆転写)及び増幅工程にて合成されるDNAテンプレートからのプライマー伸長の両方について触媒作用する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

40

本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)ゲノムの5'非翻訳領域の効率的な逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)増幅のための改良されたオリゴヌクレオチドプライマー類を提供する。

【0007】

本発明のプライマーの、従来技術に記載されるプライマーを上回る重要な優位点は、本発明のプライマーが顕著に高い効率をもってHCV核酸の増幅を可能とすることである。例に示されるように、本発明のプライマーを使用するHCV核酸の増幅は、従来技術に記載されるプライマーを使用する増幅より効率が100倍高い。本発明のプライマーを使用して得られる有意に高い増幅効率は、従来技術から見て驚くべきものであり、かつ予期されないものである。

50

## 【0008】

本発明の別の側面は、本発明のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応を実施することを含むHCVゲノム領域の増幅方法に関する。本発明のプライマーを使用して得られる有意に向上した増幅効率のために、本発明の増幅方法は、有意に増量した増幅生成物を与え、その一方で形成されるプライマー-二量体の量を低減する。結果として、本発明の方法は、有意に向上した感度のHCV検出アッセイを可能とする。従って、本発明は、試料中のHCV核酸の存在の検出方法であって：

(a) 前記試料を、本発明のプライマーを含むPCR反応混合物中において増幅条件下で、HCV核酸が存在する場合に増幅すべく処理し；及び

(b) HCV核酸の存在を示す増幅が起きたか否かを検出すること、  
を含んでなる試料中のHCV核酸の存在の検出方法をも提供する。

10

## 【0009】

本発明の他の側面は、本発明の増幅プライマーを含んでなるキットに関するものである。これらのキットは、増幅核酸の検出のためのオリゴヌクレオチドプローブ、並びにポリメラーゼ、緩衝剤及びヌクレオシド三リン酸等の付加的試薬を含みうる。

本発明の理解の手助けとして幾つかの用語が以下に定義される。

## 【0010】

“核酸”及び“オリゴヌクレオチド”なる用語は、プライマー類、プローブ類及び増幅または検出されるべきオリゴマー断片を指し、ポリデオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含む)について、またポリリボヌクレオチド(D-リボースを含む)について、並びに他のプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾されたプリンもしくはピリミジン塩基のNグリコシドであるポリヌクレオチドの何れかのタイプについて総称的である。“核酸”及び“オリゴヌクレオチド”なる用語の間で、長さにおける意図的な区別はなく、従って、これらの用語は、可換的に使用されるであろう。これらの用語は、分子の一次構造のみを指す。従ってこれらの用語は、二重鎖及び単鎖DNA、並びに二重鎖及び単鎖RNAを含む。

20

## 【0011】

オリゴヌクレオチドは、例えば、クローニング及び適切な配列への制限、並びにNarang等、1979、Meth. Enzymol. 68: 90-99のホスホトリエステル法；Brown等、1979、Meth. Enzymol. 68: 109-151のホスホジエステル法；Beaucage等、1981、Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862のジエチルホスホラミダイト法；及び米国特許第4,458,066号の固体支持方法等の直接化学合成を含む適当な方法により調製され得る。標識オリゴヌクレオチドの合成方法は、Agrawal及びZamecnik、1990、Nucl. Acids. Res. 18(18): 5419-5423；MacMillan及びVerdine、1990、J. Org. Chem. 55: 5931-5933；Pieles等、1989、Nucl. Acids. Res. 17(22): 8967-8978；Rogert等、1989、Nucl. Acids. Res. 17(19): 7643-7651；及びTesler等、1989、J. Am. Chem. Soc. 111: 6966-6976に記述されている。合成方法の総説は、Goodchild、1990、Bioconjugate Chemistry 1(3): 165-187に提供される。

30

40

## 【0012】

“ハイブリダイゼーション”なる用語は、相補的塩基対形成による2本の単鎖核酸による二重構造の形成を指す。ハイブリダイゼーションは、完全に(正確に)相補的な核酸鎖の間、または僅かな食い違い領域を含む“実質的に相補的な”核酸鎖の間で起こりうる。完全に相補的な核酸鎖においてのみハイブリダイズするであろう条件は、“緊縮なハイブリダイゼーション条件”または“配列特異的なハイブリダイゼーション条件”と称される。実質的に相補的な配列の安定な二重鎖は、より緊縮さが低いハイブリダイゼーション条件下で達成され得る。核酸技術における当業者は、この技術により提供される案内(例えば

50

、 Sambrook 等、1985、Molecular Cloning - A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY) に従って、二重鎖の安定性を経験的に決定しうる。

【0013】

一般的に、緊縮な条件は、規定されたイオン強度及びpHにおいて、特定の配列についての熱的融点 ( $T_m$ ) より約5℃低く選択される。 $T_m$ は、50%の塩基対が解離する温度(所定のイオン強度及びpHにて)である。ハイブリダイゼーション条件の緊縮性の緩和は、配列の不一致を許容するようにし; また許容される不一致の程度は、ハイブリダイゼーション条件の適当な調節により制御可能である。

10

【0014】

“プライマー”なる用語は、核酸鎖に対して相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下、即ち適切な緩衝溶液及び適当な温度にて4種類の異なるヌクレオシド三リン酸及びポリマー化試薬(即ち、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素)の存在下でのDNA合成の開始点として作用しうるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、好ましくは単鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーの適切な長さは、プライマーの使用目的に依存するが、典型的には15から35ヌクレオチドの範囲である。短いプライマー分子は、一般的にテンプレートと十分に安定したハイブリッド複合体を形成するために、より低い温度を必要とする。プライマーは、テンプレート核酸の正確な配列を反映する必要はないが、テンプレートにハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。プライマーは、該プライマーの検出または固定を可能とするが、DNA合成の開始点として作用するプライマーの基本的性質を変更しない付加的特徴を組み入れ得る。例えば、プライマーは、標的核酸配列にハイブリッドしないが、増幅生成物のクローニングを容易にする付加的な核酸配列を5'末端に含みうる。ハイブリダイズするためにテンプレートに十分に相補的なプライマーの領域は、ここにおいてはハイブリダイズ領域と称される。

20

【0015】

ここにおいて使用されるように、“上流”プライマーは、その伸長生成物がコード配列の結果を生じるプライマーを指し; “下流”プライマーは、その伸長生成物が相補的非コード鎖の結果を生じるプライマーを指す。“RTプライマー”と称される逆転写に使用されるプライマーは、コード鎖にハイブリダイズし、従って、下流プライマーである。

30

【0016】

ここにおいて使用される“オリゴヌクレオチドプローブ”なる用語は、相補的塩基対形成のために標的核酸の配列と二重鎖構造を形成するオリゴヌクレオチドを指す。プローブは、標的核酸の検出または捕捉のために使用される。プローブは、好ましくは単鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プローブは、典型的には標的配列の領域に対応する好ましくは10から50ヌクレオチド、さらに好ましくは15から35ヌクレオチドからなる“ハイブリッド領域”からなるか、またはそれを含んでなる。“対応する”は、指定される核酸またはその相補体の何れかに対して少なくとも実質的に相補的であることを意味する。プローブは、標的核酸の正確な配列を反映する必要はないが、選択されるハイブリダイゼーション条件下で標的とハイブリッドするために充分相補的でなければならない。プローブオリゴヌクレオチドは、該プローブの検出または固定化を許容するが、ハイブリダイズ領域のハイブリダイゼーションの特徴を著しく変更しない付加的特徴を含みうるか、あるいはそれに結合され得る。例えば、プローブは放射標識ヌクレオチドの取り込みにより、または独立した検出可能な残基に結合されることにより標識されうる。

40

【0017】

ここにおいて使用されるように、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブは、該オリゴヌクレオチドと標的配列との間の不一致の個数が、該オリゴヌクレオチドと非標的配列との間の不一致の個数より少ない場合において、標的配列に対して“特異的”である。ハイブリダイゼーション条件は、存在する不一致の個数がオリゴヌクレオチドと標的配列

50

との間の不一致の個数を越えない場合にのみ安定な二重鎖が形成されるよう選択されうる。そのような条件下では、標的特異的オリゴヌクレオチドは標的配列とのみ安定な二重鎖を形成しうる。適当な緊縮増幅条件下での標的特異的プライマーの使用は、標的プライマー結合部位を含むそれらの標的配列の特異的増幅を可能とする。同様に、適当な緊縮ハイブリダイゼーション条件下での標的特異的プローブの使用は、特異的標的配列の検出を可能とする。

【0018】

“標的領域”及び“標的核酸”なる用語は、増幅、検出または別途分析されるべき核酸の領域を指す。

【0019】

“熱安定性なポリメラーゼ”なる用語は、熱に対して相対的に安定であり、ヌクレオシド三リン酸のポリマー形成に触媒作用して、標的配列の核酸鎖のひとつに対して相補的なプライマー伸長生成物を形成する酵素を指す。該酵素は、プライマーの3'末端から合成を開始し、テンプレートの5'末端に向けて合成が終了するまで進行する。精製熱安定性DNAポリメラーゼは、Perkin-Elmer、Norwalk、CTから商業的に入手可能である。

【0020】

“増幅反応混合物”及び“ポリメラーゼ連鎖反応混合物”なる用語は、ポリメラーゼ連鎖反応を実施するために好適な試薬の組合せを指す。該反応混合物は、典型的にはオリゴヌクレオチドプライマー、ヌクレオチド三リン酸、及びDNAポリメラーゼを、適当な緩衝溶液中に含む。好適な増幅反応混合物は、例中に与えられる。

【0021】

“増幅条件”なる用語は、ここにおいて使用されるように標的核酸配列の増幅のために好適な反応条件を指す。増幅条件は、増幅反応混合物及び反応の間に使用される温度サイクル条件の両者を指す。本発明のプライマーを使用する増幅条件下では、存在する場合にはHCV核酸の増幅が起こるのである。好ましい増幅条件は、例中に与えられる。

【0022】

“増幅効率”なる用語は、ここにおいて使用されるように所定の増幅サイクル数において、標的配列の所定の初期個数から生成される生成物の量を指す。従って、プライマーにおいてのみ異なる二つの反応の増幅効率は、それぞれの反応で形成される生成物の量を定量的に測定することによって比較される。

【0023】

図1は、例2に記述されるように、プライマー対(A)KY78(SEQ ID NO:5)/KY80(SEQ ID NO:4)、(B)ST778AA(SEQ ID NO:2)/KY80(SEQ ID NO:4)、(C)ST778AA(SEQ ID NO:2)/ST280A(SEQ ID NO:1)(40ピコモル)及び(D)ST778AA(SEQ ID NO:2)/ST280A(SEQ ID NO:1)(60ピコモル)をそれぞれ使用した場合の増幅反応の比較を示す。

【0024】

図2は、下記例3に記述されるように、5'末端ヌクレアーゼアッセイに基づくプライマー対KY78/KY80(- - -)、ST778AA/KY80(- -)及びST778AA/ST280(- -)を使用する増幅反応の比較を示す。

【0025】

図3は、下記例4に記述されるように、5'末端ヌクレアーゼアッセイに基づくプライマー対KY78/KY80(- - -)、ST678AA/ST280(- -)及びST778AA/ST280(- x -)を使用する増幅反応の比較を示す。

【0026】

この技術の熟練の内にある分子生物学及び核酸化学の慣用の技術は、文献中に完全に記述されている。例えば、Sambrook等、1985、Molecular Cloning - A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, 編, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames 及び S. J. Higgins 編, 1984); 及び Methods in Enzymology のシリーズ (Academic Press, Inc.) を参照。上記及び下記の両者においてここに述べる全ての特許、特許出願及び刊行物を、参考として組み入れる。

【0027】

#### HCV増幅プライマー

プライマー類のヌクレオチド配列は、5' から 3' の方向で示して表1に掲げられている。上流プライマーを何れかの下流プライマーと共に用いる増幅は、HCVゲノムの5' 非翻訳領域からの240塩基対の生成物を増幅する。該プライマーは、HCVゲノムの5' 非翻訳領域内の比較的保存された領域にハイブリダイズし、他のウイルス由来またはヒトゲノムDNA由来の非標的配列の同時的増幅を伴うことなく、既知のHCV単離物由来の核酸の増幅を可能とする。

【0028】

【表1】

表1

#### HCV増幅プライマー

##### 上流 SEQ ID NO

ST280A 1 5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA

##### 下流 (RT)

ST778AA 2 5'-GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA

ST678A 3 5'-GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACA

【0029】

#### 増幅

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅工程は、この技術分野において周知であり、また米国特許第4,683,195号; 4,683,202号; 及び4,965,188号に記述されている。Perkin Elmer (Norwalk, CT) 等の商業的販売者は、PCR試薬を販売し、またPCRプロトコルを発行している。本発明により提供される優位点の理解を容易にするために、PCRの要点を示す。

【0030】

PCR増幅の各サイクルにおいて、二重鎖標的配列は変性され、プライマーが該変性された標的の各鎖にアニールされ、該プライマーは、DNAポリメラーゼの作用により伸長される。該工程は、典型的には少なくとも25回反復される。2種のプライマーは、標的核酸配列の反対側の末端に、各プライマーの伸長生成物が標的配列の相補的複写物となり、かつその相補体から分離された場合に他方のプライマーにハイブリッドしうるような配向をもってアニールする。100%の効率を仮定すると、各サイクルは存在する標的配列数の二倍化を生じるであろう。

【0031】

DNAまたはRNA標的配列のいずれもが、PCRにより増幅されうる。ここに記述されるように、HCVゲノム核酸の増幅のようにRNA標的の場合には、第一工程は、標的配列のDNA複写物 (cDNA) の合成からなる。逆転写は、独立した工程として、または好ましくはRNA増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応の変法である組み込み逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) において実施され得る。RNAのRT-PCR増幅はこの分野で周知であり、米国特許第5,322,770号及び5,310,652号; Myers 及び Gelfand, 1991, Biochemistry 30(31): 7

10

20

30

40

50

661-7666; 米国特許第5,527,669号; Young等、1993、J. Clin. Microbiol. 31(4): 882-886; 及びYoung等、1995、J. Clin. Microbiol. 33(3): 654-657に記述されている。

#### 【0032】

RT-PCRに好適な種々の試料調製方法が、文献中に記述されている。例えば、生物学的試料からのリボ核酸の抽出技術は、Rotbart等、1989、PCR Technology (Erllich編、Stockton Press、New York)中、及びHan等、1987、Biochemistry 26: 1617-1625に記述されている。使用される個別の方法は、本発明の重要な部分ではない。当業者は、既知の試料調製方法を用いて使用する反応条件の至適化を行い得る。HCV RNAの検出に使用するための好ましい試料調製方法は、米国特許第5,527,669号、前出のYoung等、1993及び前出のYoung等、1995に記述されている。

10

#### 【0033】

PCR工程をもって膨大な増幅が可能であるため、高いDNA濃度を持った試料、正の対照テンプレート、または先行する増幅に由来する低濃度のDNA夾雑物は、目的を持って添加したテンプレートDNAが存在しない場合にもPCR生成物を生じうる。交差夾雑を最小とするであろう実験器具及び技術は、Kwok及びHiguchi、1989、Nature、339: 237-238並びにInnis等編、1990、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press, Inc. San Diego, CA中のKwok及びOrregoに議論されている。先行する反応に由来する増幅核酸によるPCRの夾雑の問題を低減するための酵素的方法は、ここにそれぞれ参考として取り入れるPCT特許公開US91/05210、米国特許第5,418,149号及び米国特許第5,035,996号、並びに前出のYoung等、1995に記述されている。

20

#### 【0034】

増幅反応混合物は、典型的にはプライマーハイブリダイゼーション特異性を保証するために必要な温度より十分に低い室温にて組み上げられる。室温においては、プライマーが部分的にのみ相補的な核酸配列を持つ他のものに非特異的に結合するであろうから、非特異的な増幅が生じて、望まれない核酸配列の合成が開始される。これらの新たに合成された望まれない配列は、増幅反応の間に所望の標的配列と競合しえて、所望の配列の増幅効率を顕著に低減しうる。非特異的増幅は、温度が必要とされるハイブリダイゼーション特異性を与える為に十分に上昇するまでプライマー伸長が阻害される“ホットスタート”を使用して低減されうる。

30

#### 【0035】

ホットスタートの1方法においては、温度が必要とされるハイブリダイゼーション特異性を与える為に十分に上昇するまで、1種以上の試薬が反応混合物に与えられない。反応成分を分離または隔離するための口ウ等の熱不安定性材料を使用するホットスタート法は、米国特許第5,411,876号及びChou等、1992、Nucl. Acids Res. 20(7): 1717-1723に記述されている。他のホットスタート法においては、増幅に先行して、または増幅の第1工程として高温度のインキュベーションにより活性化されるまでプライマー伸長に触媒作用しない、可逆的に不活性化されたDNAポリメラーゼが使用される。この様な可逆的に不活性化されたDNAポリメラーゼの例は、AmpliTaq<sup>TM</sup> GOLDである(総説としてBilch等、1996、Nature 381: 445-446参照)。非特異的増幅は、米国特許第5,418,149号に記述されるように増幅の初期の高温工程に先立って形成される伸長生成物を、酵素的に分解することによっても低減される。

40

#### 【0036】

##### 増幅生成物の分析

本発明の好ましい実施態様において、HCVゲノム核酸の増幅は、HCV検出アッセイの

50

一部として実施される。増幅は、HCV核酸の量を検出可能な水準まで増大させる。PCR増幅核酸の検出方法は、この技術において周知である。例えば、増幅生成物の存在及び量は、この技術において周知のプロトコールを使用してゲル電気泳動を用い直接にアッセイされうる（例えば、Sambrook等、1989の前出文献参照）。

#### 【0037】

増幅生成物の検出は、増幅HCV核酸に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを使用して実施され得る。プローブと標的核酸配列との間に形成されるハイブリッドを検出するための好適なプロトコールは、この技術において知られている。表1のプライマーを使用して増幅されるHCV核酸は、米国特許第5,527,669号；Young等の1993前出文献；及びYoung等の1995前出文献に記述されるプローブ及び方法を使用して検出されうる。

10

#### 【0038】

5'-ヌクレアーゼアッセイとして引用される好適なアッセイ法は、米国特許第5,210,015号及びHolland等、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280に記述されている。5'-ヌクレアーゼアッセイにおいては、標識された検出プローブはPCR増幅反応混合物に含まれる。該プローブは、DNA合成のプライマーとして作用することが阻害されるように修飾される。合成工程、即ちプライマー伸長の間に標的DNAとハイブリダイズする任意のプローブは、DNAポリメラーゼ、例えばrTthDNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性により切り取られる。切り取られたプローブの存在は、プローブと標的DNAのハイブリダイゼーションが起きたこと、及び増幅が起きたことの両方を示している。プローブ切断物の検出方法は、米国特許第5,210,015号、EP-A-699768、EP-A-713921及び下記例に記述されている。

20

#### 【0039】

上述したプローブに基づくアッセイ構成は、典型的にはハイブリッド二重鎖の検出を容易にするために標識オリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチドは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段により検出可能な標識を取り込むことにより標識されうる。有用な標識は、<sup>32</sup>P、蛍光染料、電子密度試薬、酵素（ELISAにおいて通常使用されると同様に）、ビオチン、またはハプテン並びに抗血清またはモノクローナル抗体が入手可能なタンパク質を含む。本発明の標識オリゴヌクレオチドは、上述の技術を使用して合成されうる。

30

#### 【0040】

反応混合物中の二重鎖DNAの全量について増加がモニターされる、HCV核酸増幅の検出のための別の方法は、Higuchi等、1992、Bio/Technology 10:413-417；Higuchi等、1993、Bio/Technology 11:1026-1030；並びにヨーロッパ特許公開487,218及び512,334号に記述されている。二重鎖標的DNAの検出は、二重鎖DNAに結合した場合にエチジウムブロマイド（EtBr）及び他のDNA結合標識が示す増大した蛍光に依っている。増幅は二重鎖DNAの量を増大させ、蛍光における検出可能な増大を生じる。非特異的増幅、及び特にはプライマー二量体は、二重鎖DNAの形成を生じるため、非特異的増幅の低減が望ましい。本発明のプライマーは、非特異的増幅生成物の予想されない低水準の背景をもって増幅を可能とすることから、特に有用である。

40

#### 【0041】

本発明の増幅方法及びプライマーは、検出アッセイにおけるように限定されるものではない。例えばこの技術でよく知られているように、増幅される核酸は、クローニングまたは配列決定において使用され得る（例えば、米国特許第4,683,195号参照）。本発明のプライマーは、増幅核酸の高い収率及び得られる非特異的増幅生成物のより低い水準のために概して有用である。

#### 【0042】

本発明は、キット、換言すると本方法を実施するために有用な成分を含む複数の容器ユニ

50

ットにも関連する。有用なキットは、HCV核酸の増幅のためのプライマーを含む。キットは、オリゴヌクレオチドプローブ等の増幅HCV核酸検出の為の手段を含むことができる。キットの他の選択的成分は、例えばプライマー伸長生成物の合成を触媒する試薬、ヌクレオチド三リン酸基質、増幅またはハイブリダイゼーション反応の適当な緩衝溶液、及び本方法を実施するための指示書を含む。下記に提示される本発明の例は、例示の目的のために提供されるもので、本発明の範囲を制限するものではない。例に従った特許請求の範囲内の発明の多くの実施態様は、上述の説明及び以下の例を読むことにより当業者には明らかなものとなる。

【0043】

【実施例】

10

例1

HCV RNAの増幅

HCV RNAの増幅を、下記のプロトコールを使用して実施した。

【0044】

試料の調製

増幅を、合成RNAテンプレートの使用、及び臨床的試料から単離されたRNAの使用の両者にて実施した。合成テンプレートの使用は、各反応物に添加される標的RNA分子の数に亘って、調整を可能とした。合成RNAは、Young等、1993前出文献に記述されているように、HCV RNA転写ベクターを使用して、転写された。臨床的試料由来のHCV RNAの増幅のために、RNAをYoung等、1995前出文献に記述され

20

【0045】

増幅

増幅を、100µlの反応体積にて実施した。各反応物は、以下の試薬を含んでいた。

HCV RNAテンプレート

400nMの各プライマー（特記しない限り）

1µMの標識プローブ

50mM ピシン（pH8.3）

100mM KOAc

200µM 各dATP、dCTP、dGTP及びdUTP

30

3.6mM Mn(OAc)<sub>2</sub>

8% グリセロール

20単位のrTth DNAポリメラーゼ<sup>\*</sup>、並びに

2単位のUNG<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Hoffmann-Larocheにより製造及び開発され、PerkinElmer、Norwalk、CTにより販売される。

【0046】

検出プローブは、下記の通り5'-ヌクレアーゼアッセイを使用して増幅生成物を検出可能とするために、各反応混合物に含まれていた。使用されたプローブは、米国特許第5,527,669号及びYoung等、1995前出文献に記述されるKY150であった

40

【0047】

増幅は、GeneAmpTC9600 DNA熱サイクラー中で薄壁のMicroAmp反応チューブ（共にPerkinElmer、Norwalk、CT）を使用し、下記の温度プロフィールにて実施された：

反応前インキュベーション 50 にて2分間；

逆転写 60℃にて30分間

2サイクル:

変性 95℃にて15秒間

アニール/伸長 60℃にて20秒間

46サイクル:

変性 90℃にて15秒間

アニール/伸長 60℃にて20秒間

保持 72℃にて15分間以上。

10

温度サイクルに次いで、反応物を分析前には - 20℃ に維持した。

【0048】

#### 増幅生成物の検出

増幅されたHCV核酸は、ゲル電気泳動、及び5'-ヌクレアーゼアッセイの両者により分析された。ゲル電気泳動は、増幅生成物の存在の容易に視覚的に確認すること、および生成した増幅生成物の相対量の大きき評価を与える。5'-ヌクレアーゼアッセイは、生成した増幅生成物の量の正確な定量的評価を与えるために使用された。

【0049】

20

#### A. ゲル電気泳動

増幅生成物の存在は、以下のようにしてゲル電気泳動により検出された。反応生成物をアガロースゲル(3% NuSieve™及び1% SeaChem™)並びに1X TBE(0.089M トリス、0.089M ほう酸、0.0025M EDTA二ナトリウム)操作緩衝溶液を使用して分画した。電気泳動を100ボルトにて約1時間実施した。電気泳動に続いて、存在する任意のDNAを染色するためにエチジウムブロマイド(0.5µg/ml)を添加した。ゲルを水中で大ききに脱色し、DNAのエチジウムブロマイド染色バンドをUV輻射を使用して可視化した。

【0050】

#### B. 5'-ヌクレアーゼアッセイ

30

上述したように、増幅は、フルオレセイン標識され、DNAポリメラーゼによる伸長を妨害すべく修飾されたHCV-特異的検出プローブの存在下で実施された。2個のプライマー結合部位の間に位置するHCV標的配列の領域に相補的なプローブは、プライマー伸長の間にrTth DNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性により切断される。増幅に続いて、残留する非切断プローブは反応混合物から分離され、次いで残留する切断プローブ断片の蛍光が、合成された増幅生成物の量を示すものとして測定される。

【0051】

非切断プローブは、増幅に続いて、完全長の非切断プローブに結合するが、切断プローブ断片に感知可能に結合しないポリエチレンイミン(PEI)にて被覆されたビーズを用いて反応混合物から抽出される。PEIビーズは、反応混合物に添加され、非切断プローブの結合が許容され、得られたPEI-プローブ複合体が遠心分離により除去される。残留するプローブ切断断片の量は、蛍光測定により決定される。PEIビーズ抽出の詳細は以下に記述される。

40

【0052】

使用に先立って、PEIビーズ(J. T. Baker, Phillipsburg, NJからのBaker Bond広孔PEIビーズ)は、4℃にて少なくとも数時間(または一夜)蒸留脱イオン(dd)水に浸漬された。該PEIビーズは、下記を使用して順次洗浄された:(1) dd水、(2) エタノール、(3) dd水、(4) 1M トリス(pH 8.3)、(5) 50mM トリス(pH 8.3)、1M NaCl、及び(6) 結合緩衝溶液(10mM トリス、50mM KCl、1mM EDTA、500mM NaCl

50

1 及び 8 M 尿素)。最後の洗浄の後、ビーズは 300  $\mu$ l の結合緩衝溶液あたり 60 mg (湿重量) の PEI ビーズとなるように結合緩衝溶液中に再懸濁された。

【0053】

非結合プローブの捕捉のために、75  $\mu$ l の PCR 反応混合物が 300  $\mu$ l の PEI ビーズ懸濁物 (約 60 mg の PEI ビーズ) に添加された。該混合物を 10 分間回転攪拌して混合し、PEI ビーズに非切断プローブを結合させる。微量遠心機 (Microfuge) 中で最高速度にて 2 分間遠心分離して PEI - プローブ複合体を除去した後、200  $\mu$ l の上澄みをピペットにてマイクロウエルプレートのウエルに移した。蛍光を、Cytometer<sup>TM</sup> マイクロタイタープレート読み取り装置 (Perceptive Biosystems、Bedford、MA) において、室温にて 485 nm の励起フィルタ (20 nm の透過バンド幅) 及び 530 nm の輻射フィルタ (25 nm の透過バンド幅) を使用して測定した。

10

【0054】

例 2

先行技術プライマーとの比較 - ゲル電気泳動による分析

この例は、本発明のプライマーと、本プライマーに最も類似する先行技術に記載されたプライマーとの比較を記述する。比較されるプライマーの性質は、所定数の増幅サイクルにおいて生成される生成物の量として定義される増幅効率である。

【0055】

本発明のプライマーに最も類似する先行技術に記載のプライマーは、米国特許第 5,527,669 号; ヨーロッパ特許公開 529,493 号; 及び Young 等の、1993 前出文献に記載された KY80 (SEQ ID NO: 4) 及び KY78 (SEQ ID NO: 5) である。これらの先行技術プライマー及び本発明のプライマーの配列の比較は下記に示される。

20

【0056】

【表 2】

プライマー配列の比較

上流 SEQ ID NO

ST280A 1 5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA

30

KY80 4 5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT

下流

ST778AA 2 5'-GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA

ST678A 3 5'-GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACA

KY78 5 5'-CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT

【0057】

増幅を、合成 HCV RNA テンプレートの 0、10、25 及び 100 コピーを含む試料を使用して、例 1 に記述されるように実施した。反応を、下記に示されるプライマーの組合せを使用して実施した。反応 (a)、(b) 及び (c) は、それぞれのプライマーを 400 nM 含んでいた。反応 (d) は、プライマー濃度を 600 nM に増大した点で (c) とは異なっていた。

40

(a) KY80 (SEQ ID NO: 4) 及び KY78 (SEQ ID NO: 5)

(b) KY80 (SEQ ID NO: 4) 及び ST778AA (SEQ ID NO: 2)

(c) ST280A (SEQ ID NO: 1) 及び ST778AA (SEQ ID NO: 2)

(d) ST280A (SEQ ID NO: 1) 及び ST778AA (SEQ ID NO: 2)

【0058】

それぞれのプライマー対を使用した増幅及び標的数の投入を、3 組にて実施した。増幅生

50

成物を、前述したようにゲル電気泳動にて分析した。結果を図1に示してある。増幅HCV標的配列に対応するバンドが示され；下方のバンドは非特異的増幅生成物（プライマー二量体）に対応する。

【0059】

それぞれのHCV標的濃度について、最大量の増幅生成物に対応する最も強度が高いバンドは、プライマー対ST280A（SEQ ID NO：1）及びST778AA（SEQ ID NO：2）を使用して生成された。このプライマー対のみが、10コピーの標的から検出可能な量の増幅生成物を生じた。また明らかなことは、特に100コピーの標的を使用した増幅において、ST280A（SEQ ID NO：1）及びST778AA（SEQ ID NO：2）を使用して非特異的増幅生成物の量が顕著に減少すること

10

【0060】

本発明のRTプライマーに起因する改良点を評価するために、KY80（SEQ ID NO：4）及びST778AA（SEQ ID NO：2）を使用して実施する増幅を含めた。25及び100コピーの標的配列を用いた増幅（a）及び（b）で得られた結果は、本発明のRT及び上流プライマーの両者の組合せを使用した増幅（c）及び（d）により得られるほどに優れるものではないが、本発明のRTプライマーの従来技術の上流プライマーとの組合せにおける使用が、生成物の収率においてかなりの改良をもたらすことを示している。

20

【0061】

ゲル分析は、プライマーST280A（SEQ ID NO：1）及びST778AA（SEQ ID NO：2）の優位性の容易に視覚化される証拠を提供するものではあるが、バンドの強度は、増幅生成物の正確な定量的比較を与えるものではない。定量的比較のために、5'-ヌクレアーゼアッセイが使用された。

【0062】

例3

従来技術プライマーとの比較 - 5'-ヌクレアーゼ分析

この例は、例2に記述したプライマーの組合せを使用し、増幅生成物の分析が5'-ヌクレアーゼアッセイを使用して行われた増幅を記述するものである。増幅は、合成HCV RNAテンプレートを0、10、25、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 及び $10^6$ コピー含む試料並びに各プライマーについて400nMのプライマー濃度を使用して例1に記述されるのと同様に実施された。各プライマー対による増幅及び標的数の投入は、3組にて実施された。上記例2と同様に、下記のプライマーの組合せが使用された。

30

（a）KY80（SEQ ID NO：4）及びKY78（SEQ ID NO：5）

（b）KY80（SEQ ID NO：4）及びST778AA（SEQ ID NO：2）

（c）ST280A（SEQ ID NO：1）及びST778AA（SEQ ID NO：2）

【0063】

増幅生成物は、例1に記述されると同様に5'-ヌクレアーゼアッセイを使用して分析された。データは、初期HCV標的配列のコピー数の対数に対する、切断プローブ断片の蛍光シグナルとしてプロットして図2に示される。各蛍光値は、反復測定の平均値である。各値の標準誤差は、図2に示されている。

40

【0064】

図2に示されるデータは、上述した図1に示されるゲル電気泳動分析にて観察されるのと同様に、本発明のプライマーを使用して得られる増幅効率における顕著な改善の確認を与える。プライマー対ST280A（SEQ ID NO：1）及びST778AA（SEQ ID NO：2）を使用して得られる標的配列の $10 - 10^5$ コピーの増幅にて生じる蛍光シグナルは、プライマー対KY80（SEQ ID NO：4）及びKY78（SEQ ID NO：5）を使用して対応する増幅により生じる蛍光シグナルに比べて顕著に大きい。さらに、図1においても分かるように、本発明のRTプライマー、ST778

50

AA (SEQ ID NO: 2) を従来技術の上流プライマー、KY80 (SEQ ID NO: 4) との組合せにおいて使用する増幅は、本発明のRT及び上流プライマーの両者の組合せを使用して得られるほどに優れるものではないが、生成物の収率においてかなりの改良をもたらすことを示している。

【0065】

相対的増幅効率のひとつの基準が、所定の蛍光シグナルを得るために必要なHCVの投入コピー数の比較により与えられる。図2に示されるように、プライマー対ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST778AA (SEQ ID NO: 2) を使用して10コピーのHCV標的の増幅から得られる平均シグナルは、プライマー対KY80 (SEQ ID NO: 4) 及びKY78 (SEQ ID NO: 5) を使用して $10^3$  コピーのHCVの増幅から得られる平均蛍光シグナルとほぼ等しい。従って、100倍少ない投入コピー数から同様な量の増幅生成物が得られ、あるいは換言すれば、プライマー対ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST778AA (SEQ ID NO: 2) を使用する増幅は、従来技術のプライマーを使用する増幅に比べて約100倍効率が高い。

10

【0066】

相対的増幅効率の別の基準は、検出可能な最小HCV標的数の比較により与えられる。プライマー対ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST778AA (SEQ ID NO: 2) を使用して、10コピーのHCV RNAの増幅は明確に検出可能なシグナルを与えた。対照的に、プライマー対KY80 (SEQ ID NO: 4) 及びKY78 (SEQ ID NO: 5) を使用すると10コピーのHCV RNAの増幅は検出可能なシグナルを生じなかった。100コピーより少ないHCVでは、プライマー対KY80 (SEQ ID NO: 4) 及びKY78 (SEQ ID NO: 5) を使用して検出可能なシグナルが生じなかった。

20

【0067】

上流プライマーST280A (SEQ ID NO: 1) とKY80 (SEQ ID NO: 4) との間の配列の類似性、並びに下流プライマーST778AA (SEQ ID NO: 2) とKY78 (SEQ ID NO: 5) との間の配列の類似性が与えられても、増幅効率におけるこの様な劇的な改善を予期しうる理由は存在しない。本発明のプライマーを使用して得られた観察される改善は、驚くべきものであり、従来技術から見ても予期されないものである。

30

【0068】

例4

従来技術プライマーとの比較：5' -ヌクレアーゼアッセイ

この例は、下記のプライマーの組合せを使用する増幅の比較を記述する。

- (a) KY80 (SEQ ID NO: 4) 及びKY78 (SEQ ID NO: 5)
- (b) ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST678A (SEQ ID NO: 3)
- (c) ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST778AA (SEQ ID NO: 2)

【0069】

増幅は、合成HCV RNAテンプレートをも、10、25、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$  及び $10^6$  コピー含む試料並びに各プライマーについて400nMのプライマー濃度を使用して上述されるのと同様に実施された。各プライマー対による増幅及び標的数の投入は、3組にて実施された。増幅生成物は、上述と同様に5' -ヌクレアーゼアッセイを使用して分析された。データは、初期HCV標的配列のコピー数の対数に対する、切断プローブ断片の蛍光シグナルとしてプロットして図3に示される。各蛍光値は、反復測定

40

【0070】

プライマー対ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST678A (SEQ ID NO: 3)、またはプライマー対ST280A (SEQ ID NO: 1) 及びST778AA (SEQ ID NO: 2) の何れかを使用した $10 - 10^4$  コピーの標的の増幅から生じた蛍光シグナルは、プライマー対KY80 (SEQ ID NO: 4) 及びK

50

Y78 (SEQ ID NO: 5) を使用した対応する増幅から生じた蛍光シグナルを上回った。この結果は、本発明の両プライマー対が、従来技術のプライマーより高い効率で HCV 標的 RNA を増幅したことを示している。

【0071】

プライマー対 ST280A (SEQ ID NO: 1) 及び ST778AA (SEQ ID NO: 2) を使用した 10 コピーの HCV 標的の増幅から得られる平均シグナルの、プライマー対 KY80 (SEQ ID NO: 4) 及び KY78 (SEQ ID NO: 5) を使用した  $10^2$  コピーの HCV 標的の増幅から得られる平均シグナルに対する比較は、プライマー対 ST280A (SEQ ID NO: 1) 及び ST778AA (SEQ ID NO: 2) を使用した増幅が 10 倍以上に効率的であることを示している。同様に、プライマー対 ST280A (SEQ ID NO: 1) 及び ST678A (SEQ ID NO: 3) も、初期 HCV 標的コピー数の同じ範囲内で、ほぼ 10 倍ほど効率的であることを示している。

【0072】

例 5

トリシン緩衝溶液中での増幅

上述の 5' -ヌクレアーゼアッセイは、5' 末端がフルオレセイン (FAM) にて標識され、DNA ポリメラーゼによる伸長を阻止するために 3' -OH に代えて 3' -PO<sub>4</sub> を有するプローブを使用する。増幅は、やはり PerkinElmer、Applied Biosystems Division (Foster City, CA) から入手されるヘキサクロフルオレセイン (HEX) を使用しても実施される。FAM - 標識プローブとは異なって、HEX - 標識プローブは例 1 に記述されるピシン増幅緩衝溶液中では不安定であった。しかしながら、HEX - 標識プローブが、トリシン増幅緩衝溶液中で安定であることが見い出された。

【0073】

試薬濃度の型どおりの再至適化が推奨されるが、ピシン及びトリシンを使用する増幅は、本質的に同等である。トリシン緩衝溶液を使用する増幅のために指摘であることが見い出された反応混合物は下記に示される。温度サイクルの変更は必要でない。

【0074】

HCV RNA テンプレート  
 400 nM の各プライマー  
 1 μM の HEX - 標識プローブ  
 200 μM 各 dATP、dCTP、dGTP 及び dUTP  
 55 mM トリシン (pH 8.3)  
 90 mM KOAc  
 3.0 mM Mn(OAc)<sub>2</sub>  
 8% グリセロール  
 20 単位の rTth DNA ポリメラーゼ\*、並びに  
 2 単位の UNG\*

\* Hoffmann - La Roche により製造及び開発され、PerkinElmer、Norwalk、CT により販売される。

【0075】

配列表

配列番号 (SEQ ID NO): 1

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26 塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 単鎖

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子型: DNA (ゲノム性)

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 1  
 GCAGAAAGCG TCTAGCCATG GCGTTA  
 【0076】

配列番号 (SEQ ID NO) : 2

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 28 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 単鎖

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム性)

10

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 2  
 GCAAGCACCC TATCAGGCAG TACCACAA  
 【0077】

配列番号 (SEQ ID NO) : 3

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 27 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 単鎖

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム性)

20

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 3  
 GCAAGCACCC TATCAGGCAG TACCACA  
 【0078】

配列番号 (SEQ ID NO) : 4

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 24 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 単鎖

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム性)

30

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 4  
 GCAGAAAGCG TCTAGCCATG GCGT  
 【0079】

配列番号 (SEQ ID NO) : 5

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 24 塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 単鎖

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム性)

40

(xi) 配列 : SEQ ID NO : 5  
 CTCGCAAGCA CCCTATCAGG CAGT  
 【0080】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、例2に記述されるプライマー対(A)KY78 (SEQ ID NO : 5) / KY80 (SEQ ID NO : 4)、(B)ST778AA (SEQ ID NO : 2) / KY80 (SEQ ID NO : 4)、(C)ST778AA (SEQ ID NO : 2) / ST280A (SEQ ID NO : 1) (40ピコモル)及び(D)ST778AA (SEQ ID NO : 2) / ST280A (SEQ ID NO : 1) (60ピコモル)をそれぞれ使用した場合の増幅

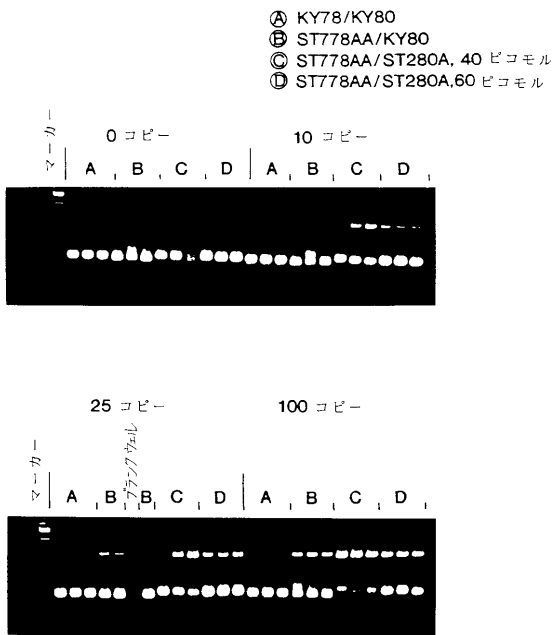
50

反応の比較を示す電気泳動図である。

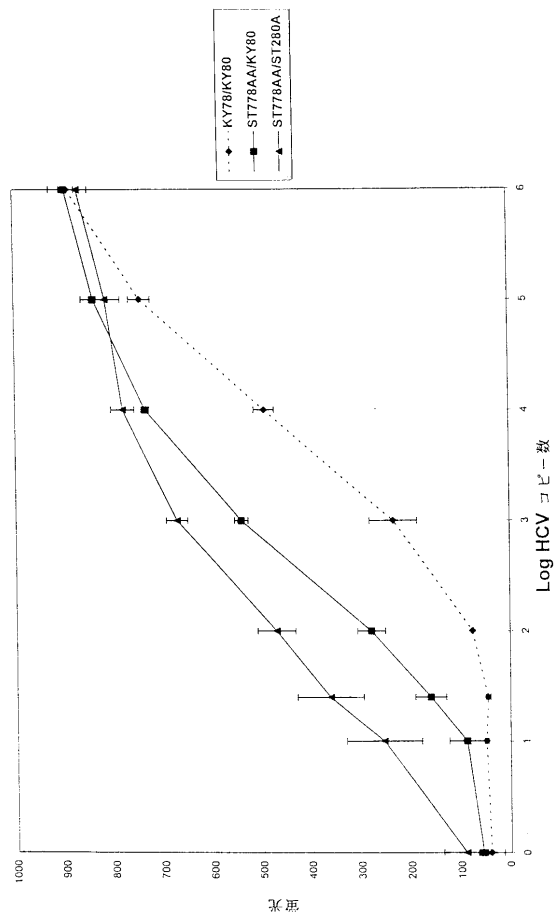
【図2】 図2は、例3に記述される5'末端ヌクレアーゼアッセイに基づくプライマー対KY78/KY80(---)、ST778AA/KY80(- -)及びST778AA/ST280(- -)を使用する増幅反応の比較を示すグラフである。

【図3】 図3は、例4に記述される5'末端ヌクレアーゼアッセイに基づくプライマー対KY78/KY80(---)、ST678AA/ST280(- -)及びST778AA/ST280(-x-)を使用する増幅反応の比較を示すグラフである。

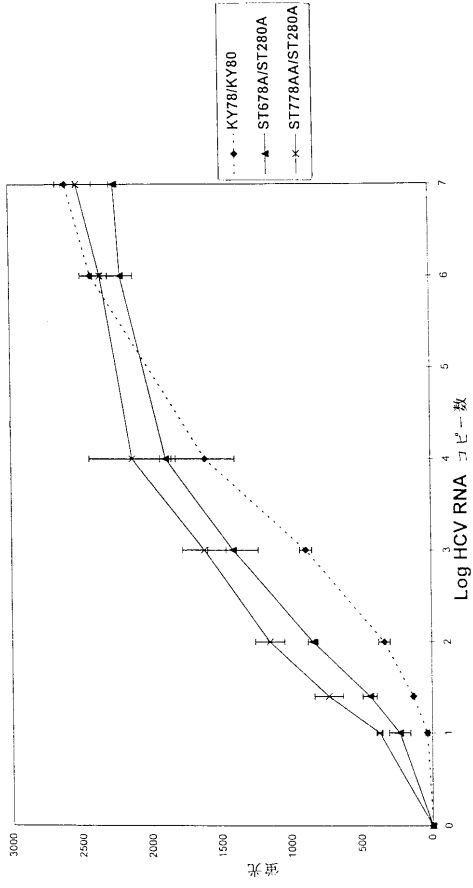
【図1】



【図2】



【 図 3 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 スー イェン ツァン

アメリカ合衆国カリフォルニア州ウォールナット クリーク , ルロイ レーン 1053

審査官 坦ヶ 隆幸

(56)参考文献 国際公開第95/006753(WO, A1)

Journal of Clinical Microbiology, 1993, Vol.31, p.882-886

Jpn. J. Clin. Pathol., 1993, Vol.41, p.1255-1259

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

JSTPlus(JDream2)