

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] （参考）
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 21/78	C 2 G 0 5 4
	ZNA	33/53	M 4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/78		33/566	4 B 0 6 3
33/53		33/58	A
審査請求 未請求 予備審査請求（全 91数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－512926(P2001－512926)	(71)出願人	ジェン－プローブ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州92121,サ ン・ディエゴ,ジェネティック・センター・ ドライブ 10210
(86)(22)出願日	平成12年7月21日(2000.7.21)	(72)発明者	布村 清忠
(85)翻訳文提出日	平成14年1月23日(2002.1.23)		東京都西東京市向台町4－15－35
(86)国際出願番号	PCT/US00/20034	(74)代理人	弁理士 社本 一夫（外5名）
(87)国際公開番号	W001/007661		
(87)国際公開日	平成13年2月1日(2001.2.1)		
(31)優先権主張番号	60/145,432		
(32)優先日	平成11年7月23日(1999.7.23)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチド増幅方法

(57)【要約】

酵素ベースのポリヌクレオチド増幅反応により得られる結果を改善するのに有用な方法。より具体的には、本発明は（１）低レベルの被分析体ポリヌクレオチドを用いて開始した反応においてすら、生成アンプリコン量が増幅前の被分析体量を反映するように鋳型特異的生成物の増幅を促進する；（２）生物検体処理を容易に、これにより後続の増幅反応において生成するアンプリコン量が検体からの被分析体ポリヌクレオチド単離効率に実質的に非依存性であるようにする；（３）増幅反応において生成する被分析体アンプリコンの量を制御するために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドを定量するための、下記の工程を含む方法：

未知量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する被験試料を入手し；

予め定めた量の被験試料を予め定めた量の擬似ターゲットと混和し；

ポリヌクレオチド増幅反応において、擬似ターゲットと被験試料に含有される被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを共増幅して増幅生成物集合体を調製し、該集合体は被験試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有する場合は被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンの両方を含み；そして

擬似ターゲットアンプリコンの量と関係なく被分析体アンプリコンを定量し、これにより被分析体アンプリコンの量は被験試料に含有されていた被分析体ポリヌクレオチドの未知量と用量依存関係にある。

【請求項2】 さらに、擬似ターゲットアンプリコンを検出する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 定量工程が、共増幅工程からの増幅生成物集合体を、被分析体アンプリコンに特異的であるが擬似ターゲットアンプリコンには特異的でない標識プローブとハイブリダイズさせ、次いで被分析体アンプリコンを特異的にハイブリダイズした標識プローブがあればそれを検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 共増幅工程のポリヌクレオチド増幅反応が、転写仲介増幅反応、NASBA反応およびポリメラーゼ連鎖反応よりなる群から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 ポリヌクレオチド増幅反応が転写仲介増幅反応である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 入手工程が、まず生物検体を採集し、次いでそれに含有される核酸を放出させて、未知量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する被験試料を得ることを含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 共増幅工程の前にさらに、被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に捕獲する工程を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 固体支持体が合成ポリヌクレオチドで誘導体化したビーズである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1.0 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1.0 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1.0 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 生物検体が血液試料または血漿試料であり、核酸がウイルス核酸を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項13】 被分析体ポリヌクレオチドがHIVウイルス粒子(virus)から放出される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項6に記載の方法。

【請求項15】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 混和工程における擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 混和工程の後であって共増幅工程の前に、さらに、被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットを単離する工程を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項18】 擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項5に記載の方法。

【請求項19】 擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 擬似ターゲットの予め定めた量が $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 標識プローブがアクリジニウムエステルで標識されている、請求項3に記載の方法。

【請求項22】 定量工程が、被分析体アンプリコンと特異的にハイブリダイズしたアクリジニウムエステル標識プローブをルミノメトリーにより測定することを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 被分析体ポリヌクレオチドがウイルスポリヌクレオチドである、請求項6に記載の方法。

【請求項24】 さらに、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づける標準曲線を参照する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項25】 さらに、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づける標準曲線を参照する工程を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項26】 さらに、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づける標準曲線を参照する工程を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項27】 転写仲介増幅反応に、配列番号：1および配列番号：2の配列を有する一対のオリゴヌクレオチドプライマーセットを使用する、請求項5に記載の方法。

【請求項28】 擬似ターゲットが、配列番号：4および配列番号：9よりなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を有する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づけるための、下記の工程を含む方法：

複数の対照試料を入手し、対照試料はそれぞれ予め定めた異なる量の被分析体ポリヌクレオチドを含有し；

複数の対照試料をそれぞれ予め定めた一定量の擬似ターゲットと混和して、複数の混合対照試料を調製し；

複数の増幅反応において、擬似ターゲットと複数の混合対照試料それぞれに存在する被分析体ポリヌクレオチドの両方を共増幅して、擬似ターゲットアンプリコンおよび被分析体アンプリコンを含有する増幅生成物集合体を調製し；

増幅生成物集合体中に存在する擬似ターゲットアンプリコンの量と関係なく、複数の増幅反応それぞれについての被分析体アンプリコンを定量し；そして

予め定めた異なる被分析体ポリヌクレオチド量を複数の増幅反応それぞれにおいて生成した定量された被分析体アンプリコン量に対してプロットした標準曲線を作成し、これにより複数の対照試料中の増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と複数の増幅反応で合成された増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づける。

【請求項30】 さらに、擬似ターゲットアンプリコンを検出する工程を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 被分析体ポリヌクレオチドがウイルスポリヌクレオチドである、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 ウイルスポリヌクレオチドがHIVポリヌクレオチドである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 擬似ターゲットの予め定めた一定量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項29に記載の方法。

【請求項34】 擬似ターゲットの予め定めた一定量が $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 擬似ターゲットの予め定めた一定量が $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 共増幅工程における複数の増幅反応が、複数の転写仲介増幅反応、複数のNASBA反応および複数のPCR反応よりなる群から選択される、請求項29に記載の方法。

【請求項37】 共増幅工程における複数の増幅反応が複数の転写仲介増幅反応である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 定量工程が、共増幅工程からの増幅生成物集合体を、被分析体アンプリコンに特異的であるが擬似ターゲットアンプリコンには特異的でない標識プローブとハイブリダイズさせ、次いで被分析体アンプリコンと特異的にハイブリダイズした標識プローブがあればそれを定量検出することを含む、請求項36または37に記載の方法。

【請求項39】 標識プローブがアクリジニウムエステルで標識されている

、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 共増幅工程の前にさらに、被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に捕獲する工程を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 生物試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有するかを判定するための、下記の工程を含む方法：

被分析体ポリヌクレオチドの存在について検査する生物試料を入手し；

生物試料を擬似ターゲットと混和して混合試料を調製し；

混合試料から核酸を単離し、これにより擬似ターゲットおよび生物試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを含む分子集合体を得られ；

ポリヌクレオチド増幅反応を実施し、分子集合体に含有される擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを共増幅して増幅生成物を調製し、これにより擬似ターゲットアンプリコンが形成され、かつ分子集合体が被分析体ポリヌクレオチドを含有する場合は被分析体アンプリコンが形成され；

増幅生成物中において、擬似ターゲットアンプリコンを検出せずに被分析体アンプリコンがあればそれを検出し；そして

増幅生成物中に被分析体アンプリコンが検出された場合は、生物試料が該被分析体ポリヌクレオチドを含有すると判定する。

【請求項42】 増幅反応が、転写仲介増幅反応、NASBA反応およびPCR反応よりなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 増幅反応が転写仲介増幅反応である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 入手工程が採血を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 検出工程が、まず被分析体アンプリコンに対する結合特異性を有する標識ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせ、次いで標識ポリヌクレオチドプローブと被分析体アンプリコンの特異的結合度を測定することを含む、請求項42または43に記載の方法。

【請求項46】 単離工程が、擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に固定化することを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 検出工程がルミノメトリーによる検出を含む、請求項45

に記載の方法。

【請求項48】 被分析体ポリヌクレオチドがHIVウイルス粒子に由来する、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 擬似ターゲットが、配列番号：4および配列番号：9よりなる群から選択される配列を有する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 被分析体ポリヌクレオチドが被験試料中に予め定めた値より多量存在するか、少量存在するかを判定するための、下記の工程を含む方法：

被分析体ポリヌクレオチドの存在について分析する被験試料を入手し；

被験試料をある量の擬似ターゲットと混和し；

ポリヌクレオチド増幅反応において、擬似ターゲットと被験試料に含有される被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを共増幅して擬似ターゲットアンプリコンおよび被分析体アンプリコンを含む増幅生成物を調製し、被分析体アンプリコンは被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドの量に対し用量依存性の量で存在し；そして

該量の擬似ターゲットと予め定めた値に対応する量の被分析体ポリヌクレオチドの共増幅により発生する信号強度に対応する検出閾値を有するように目盛定めた検出系を用いて被分析体アンプリコンを定量検出し、その際、検出閾値より高い信号または低い信号の検出は被分析体ポリヌクレオチドが被験試料中に予め定めた値よりそれぞれ多量または少量存在することを示す。

【請求項51】 被分析体ポリヌクレオチドを鋳型として用いてポリヌクレオチド増幅反応を実施するための、下記を含むキット：

擬似ターゲット；

擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを共増幅するための、少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマー；

ポリヌクレオチド増幅反応を実施するための試薬であって、デオキシヌクレオチド三リン酸およびDNA重合酵素を含む試薬；ならびに

まず増幅反応を実施し、次いで増幅反応において生成した被分析体アンプリコンのみを検出するための指示を含む印刷した説明書。

【請求項52】 さらに、増幅反応において生成した被分析体アンプリコン

があればそれを検出するための標識プローブを含む、請求項51に記載のキット

。

【請求項53】 試薬がさらに、ヌクレオチド三リン酸およびRNA重合酵素を含む、請求項51に記載のキット。

【請求項54】 DNA重合酵素が逆転写酵素である、請求項53に記載のキット。

【請求項55】 逆転写酵素により供給されるもの以外にRNase Hを使用しない、請求項54に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**発明の分野

本発明は、分子遺伝学研究室で普通に行われるポリヌクレオチド増幅反応の精度および定量能を改善するのに有用な方法および組成物に関する。

【0002】発明の背景

ポリヌクレオチド増幅のための酵素ベースの方法は、現在では診断、環境および法医学検査のための確立された手段である。臨床検査室でのDNAプローブ診断薬の市場は、現在では年間数億ドルとなっている。臨床診断—プローブビジネスは、活発な市場開拓の主な領域であるウイルススクリーニングおよびウイルス負荷測定に伴って生長すると予測される。この技術の商業的価値のため、改良された増幅法の探査および開発に多大な努力が払われてきた（Genetics Engineering News, 17:6 (1997) 参照）。

【0003】

被分析体ポリヌクレオチド増幅のために最近開発された方法は、当初のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プロトコルに基づく方法に対する有用な代替法を提供する。1方法によれば、代わりにガラス、プラスチック、半導体チップまたはファイバーオプティックスアレイにより作製された固相支持体上でDNA増幅反応を実施する。標識したターゲットDNAを固体支持体上でオリゴヌクレオチドプライマー対間の分子橋として合成し、したがって増幅生成物は固体表面に結合したままである。USP 5, 399, 491には、ターゲットポリヌクレオチドを実質的に一定の温度、イオン強度およびpHの条件下で自触媒増幅させる別法が開示されている。転写仲介増幅（Transcription Mediated Amplification, TMA）と呼ばれるこの方法では、ターゲット配列の多重RNAコピーを合成できる。将来出現と思われる新たな方法により、ポリヌクレオチド増幅法により対処できる適用範囲は拡大し続けるであろう。

【0004】

定量増幅アッセイ法は、鋳型の単離および増幅効率の標準化を含めて、操作のあらゆる観点に厳しい要求を課する一連のアッセイ法のひとつである。増幅反応に関与する内標準を用いる方法は反応効率を基準化するためのものであるが、反応に装入される被分析体ポリヌクレオチドレベルの変動を評価することはできない。被分析体ポリヌクレオチドと構成性発現するハウスキーピング遺伝子に由来する対照ポリヌクレオチドとを同時増幅する関連方法も、増幅反応の実施に複数のプライマーセットが必要であるため完璧ではない。

【0005】

定量PCR増幅に際して内標準の使用に基づく方法の一例がUSP 5, 219, 727に開示されている。この特許に開示される方法によれば、内標準を増幅反応に含有させてターゲットポリヌクレオチドと同様な効率で増幅するように設計する。内標準として使用するための構成性発現遺伝子生成物を共増幅する方法と同様に、USP 5, 219, 727に開示された方法は被分析体ポリヌクレオチドを定量するために内標準由来のアンプリコンを検出および増幅することを必要とする。したがって、内標準を検出および定量しなければならない場合、被分析体ポリヌクレオチドの定量のためにさらに数工程が必要である。

【0006】

通常のPCR法およびTMA法では増幅ポリヌクレオチド（“アンプリコン（amplicon）”）が溶液中に自由な分子として合成されるという事実は、被分析体検出の不正確さのもうひとつの原因である。これらのアンプリコンは試料間で移動しやすく、汚染反応で偽陽性結果をもたらす可能性がある。キャリーオーバーDNA鋳型による汚染が原因となる偽陽性結果を減らすための標準的注意事項には、分注器具を紫外線照射すること、使い捨てガラス器具やプラスチック器具を使用すること、増幅反応実施用の隔離された研究室や研究室領域を使用すること、エアロゾル発生を避けることが含まれる。PCR生成物が後続反応で再増幅し得ないことを保証するための周到な方法のひとつは、前のPCR増幅からの生成物を分解する特殊な試薬を用いる一連の工程を伴う。しかしこの方法は若干複雑であり、まずPCR混合物中のdTTPをdUTPに置換し、次いで後続PCR混合物すべてをPCR増幅前にウラシルN-グリコシラーゼ（UNG）

酵素で前処理する。こうしてウラシル残基をUNGで切除し、生成した無塩基ポリヌクレオチドを分解することにより、前のPCR増幅の生成物を除去する（Longo, et al., Gene, 93:125 (1990)）。これらの方法が高処理能アッセイ法とならないのは明らかである。

【0007】

したがって、ポリヌクレオチド増幅法の精度を高めるのに使用できる技術が絶えず求められている。さらに、陽性キャリーオーバー汚染により生じる偽陽性結果を減らすために使用できる技術が求められている。本発明はこれらの要望に応じるものである。

【0008】

発明の概要

本発明の第1態様は、被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドを定量するための方法に関する。本方法は、下記の工程を含む：（1）未知量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する被験試料を入手し；（2）予め定めた量のこの被験試料を予め定めた量の擬似ターゲットと混和し；（3）ポリヌクレオチド増幅反応において、被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを共増幅して、試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有する場合は被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンの両方を含む増幅生成物集合体を調製し；そして（4）反応において生成した擬似ターゲットアンプリコンの量に関する情報に依存せずに被分析体アンプリコンを定量し、これにより被分析体アンプリコンの量は当初の被験試料中に存在していた被分析体ポリヌクレオチドの未知量と用量依存関係にある。所望により、擬似ターゲットアンプリコンを検出する工程を追加してもよい。この任意工程は、たとえば増幅反応に対する陽性対照として役立ちうる。本発明の特定の好ましい態様において、定量工程は、まず共増幅工程からの増幅生成物集合体を、被分析体アンプリコンに特異的であるが擬似ターゲットアンプリコンには特異的でない標識プローブとハイブリダイズさせ、次いで被分析体アンプリコンと特異的にハイブリダイズした標識プローブがあればそれを検出することを含む。もちろん、被分析体アンプリコン特異的プローブはそれに相補的な被分析体ポリヌクレオチドまたは核酸鎖に結合しうるプローブであってもよいことを

理解すべきである。他の態様において、共増幅工程のポリヌクレオチド増幅反応は、転写仲介増幅反応（TMA）、NASBA反応およびポリメラーゼ連鎖反応のいずれであってもよく、TMA反応が本発明のきわめて好ましい態様である。用いる増幅反応のタイプに関係なく、入手工程は、まず生物検体を採集し、次いで検体に含有される核酸を放出させて、未知量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する被験試料を得ることを伴ってもよい。あらゆるタイプの増幅反応について、混和工程における擬似ターゲットの量は好ましくは $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子、さらに好ましくは $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である。所望により、共増幅工程の前に被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に捕獲する追加工程を含むことができる。追加の捕獲工程を用いる本発明方法の態様において、混和工程に用いる擬似ターゲットの量は好ましくは $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子、さらに好ましくは $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である。固体支持体の例は、合成ポリヌクレオチドで誘導体化したビーズである。本方法に使用する生物検体は血液試料または血漿試料であってもよく、検体に含有される核酸にはウイルス核酸を含めることができる。本発明の1態様において、本方法に使用する被分析体ポリヌクレオチドはHIVウイルス粒子（v i r i o n）から放出される核酸である。本発明方法に用いるポリヌクレオチド増幅反応がTMA反応である場合、本方法には、混和工程の後であって共増幅工程の前に、被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットを単離する追加工程が含まれてもよい。転写仲介増幅反応を用いる本発明方法の態様において、本反応に用いる擬似ターゲットの量は好ましくは $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分子、さらに好ましくは $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である。定量検出工程が被分析体アンプリコンに特異的な標識プローブのハイブリダイゼーションを伴う場合、標識プローブをアクリジニウムエステルで標識することができ、この場合、定量検出工程はルミノメトリーの実施を伴うことができる。入手工程が生物検体を採集してそれに含有される核酸を放出させることを伴う本発明の態様において、被分析体ポリヌクレオチドはウイルスポリヌクレオチドであってもよい。一般に本発明は、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づけ

る標準曲線を参照する追加工程を含むことができる。標準曲線を参照するこの工程は、アクリジニウムエステルで標識したプローブのハイブリダイゼーションを測定するためにルミノメトリーを用いる場合、または増幅反応が特に転写仲介増幅反応である場合にも適用できる。転写仲介増幅反応を用いるさらに他の好ましい態様においては、配列番号：1および配列番号：2の配列を有する一对のオリゴヌクレオチドプライマーセットを反応の実施に使用することができ、擬似ターゲットは、配列番号：4および配列番号：9よりなる群から選択されるポリヌクレオチド配列をもつことができる。

【0009】

本発明の他の態様は、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づけるための方法に関する。本方法は下記の工程を含む：（1）予め定めた異なる量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する複数の対照試料を入手し；（2）複数の対照試料をそれぞれ一定量の擬似ターゲットと混和して、複数の混合試料を調製し；（3）複数の増幅反応において、擬似ターゲットと複数の混合試料それぞれに存在する被分析体ポリヌクレオチドの両方を共増幅して増幅生成物を調製し、増幅生成物は、複数の混合試料それぞれについての擬似ターゲットアンプリコンおよび被分析体ポリヌクレオチドを含有していた複数の混合試料それぞれについての被分析体アンプリコンを含有し；（4）増幅生成物集合体中に存在する擬似ターゲットアンプリコンの量と関係なく、複数の増幅反応それぞれについて被分析体アンプリコンを定量し；そして（5）予め定めた異なる被分析体ポリヌクレオチド量を複数の増幅反応それぞれについての定量された被分析体アンプリコン量に対してプロットした標準曲線を作成し、これにより複数の対照試料それぞれに存在していた増幅前の被分析体ポリヌクレオチドの量とそれぞれの増幅反応で合成された増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づける。所望により、擬似ターゲットアンプリコンを検出する工程を追加してもよい。この任意工程は、たとえば増幅反応の陽性対照として役立つ。好ましい態様において、被分析体ポリヌクレオチドはウイルスポリヌクレオチド、たとえばHIVポリヌクレオチドである。一般に、予め定めた一定の擬似ターゲット量は好ましくは $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 分

子、さらに好ましくは $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 分子である。本発明の他の態様によれば、共増幅工程における複数の増幅反応は、複数の転写仲介増幅反応、複数のNASBA反応および複数のPCR反応のいずれかであってよい。一連のきわめて好ましい態様において、共増幅工程における増幅反応は複数の転写仲介増幅反応である。用いる増幅反応のタイプに関係なく、定量工程は、共増幅工程からの増幅生成物をまず被分析体アンプリコンに特異的であるが擬似ターゲットアンプリコンには特異的でない標識プローブとハイブリダイズさせ、次いで特異的にハイブリダイズした標識プローブがあればそれを定量検出することを伴うことができる。ある場合には、標識プローブをアクリジニウムエステルで標識する。増幅工程が被分析体アンプリコン特異的な標識プローブとのハイブリダイゼーションを伴うさらに他の好ましい態様においては、共増幅工程の前に被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に捕獲する追加工程があってもよい。

【0010】

本発明のさらに他の態様は、被分析体ポリヌクレオチド鋳型を用いてポリヌクレオチド増幅反応を実施するためのキットに関する。キットの例は下記を含むことができる：擬似ターゲット；擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを共増幅するための、少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマー；ポリヌクレオチド増幅反応を実施するための試薬であって、デオキシヌクレオチド三リン酸およびDNA重合酵素を含む試薬；ならびにまず増幅反応を実施し、次いで増幅反応において生成した被分析体アンプリコンのみを検出するための指示を含む印刷した説明書。1態様において本発明のキットは、増幅反応において生成した被分析体アンプリコンを検出するための標識プローブを含むことができる。他の態様によれば、本発明のキットはさらに、ヌクレオチド三リン酸およびRNA重合酵素を含む。キットに含まれるDNA重合酵素は逆転写酵素であってもよい。きわめて好ましい態様においては、逆転写酵素により供給されるもの以外にRNase Hをキットに使用しない。

【0011】

さらに他の本発明の態様は、生物試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有するかを判定するための定量方法に関する。この方法は下記の工程を含む：（1）被

分析体ポリヌクレオチドの存在について検査する生物試料を入手し；（２）生物試料を擬似ターゲットと混和して混合試料を調製し；（３）混合試料から核酸を単離し、これにより擬似ターゲットおよび生物試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを含む分子集合体を得られ；（４）ポリヌクレオチド増幅反応を実施し、分子集合体に含有される擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドがあればそれを共増幅して増幅生成物を調製し、これにより擬似ターゲットアンプリコンが形成され、かつ分子集合体が被分析体ポリヌクレオチドを含有する場合は被分析体アンプリコンが形成され；（５）増幅生成物中において、擬似ターゲットアンプリコンを検出せずに被分析体アンプリコンがあればそれを検出し；そして（６）増幅生成物中に被分析体アンプリコンが検出された場合は、生物試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有すると判定する。ある態様において、増幅反応は転写仲介増幅反応、N A S B A 反応およびP C R 反応のいずれかである。あるきわめて好ましい態様において、増幅反は転写仲介増幅反応である。転写仲介増幅反応を用いる場合、入手工程は採血を含むことができる。用いる増幅反応のタイプに関係なく、検出工程は、まず被分析体アンプリコンに対する結合特異性を有する標識ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせ、次いで標識ポリヌクレオチドプローブの特異的結合度を測定することを伴ってもよい。検出工程が被分析体アンプリコン特異的な標識プローブとのハイブリダイゼーションを伴う場合、単離工程は擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドを固体支持体に固定化することを伴ってもよい。他の好ましい態様によれば、検出工程はルミノメトリーによる検出を含む。さらに他の好ましい態様において、被分析体ポリヌクレオチドはH I V ウイルス粒子に由来する。この場合、擬似ターゲットは配列番号：4 または配列番号：9 のいずれかの配列をもつことができる。

【0012】

定義

本明細書中で用いる下記の用語は、特に別途記載しない限り下記の意味をもつ：

”ポリヌクレオチド”は、別途記載しない限りRNAまたはDNAである。

【0013】

”オリゴヌクレオチド”は、10～100ヌクレオチド、より好ましくは10～50ヌクレオチドの長さをもつポリヌクレオチド分子である。通常、オリゴヌクレオチドは化学的方法で合成され、別途記載しない限り一本鎖である。オリゴヌクレオチドは検出可能な標識で標識されていてもよい。

【0014】

”アンプリコン”は増幅反応において生成したポリヌクレオチド生成物である。

”被分析体アンプリコン”は、被分析体ポリヌクレオチドをポリヌクレオチドコピーまたは増幅生成物の合成の鋳型として用いる増幅反応のポリヌクレオチド生成物である。

【0015】

”被分析体ポリヌクレオチド”は、TMAプロトコルなどの核酸増幅プロセスで複製すべきターゲットポリヌクレオチドであるが、擬似ターゲットポリヌクレオチドとは構造的に識別できる。これら2ポリヌクレオチドは、たとえば制限酵素開裂部位の存否またはハイブリダイゼーションプローブが識別できる内部配列差により識別できる。

【0016】

”ターゲットポリヌクレオチド”は、複製すべきターゲット配列をもち、一本鎖または二本鎖であってよく、ターゲット配列のほかに配列を含むことができ、これらの追加配列は増幅されなくてもよい。

【0017】

”ターゲット配列”は、ターゲットポリヌクレオチドの増幅すべき特定のヌクレオチド配列を表す。ターゲット配列には、増幅反応に有用なオリゴヌクレオチドプライマーがDNAポリメラーゼによる延長の前にハイブリダイズしうる複合体形成性配列も含まれる。ターゲットポリヌクレオチドが当初一本鎖である場合、”ターゲット配列”という用語はターゲットポリヌクレオチドに相補的な配列をも表す。ターゲットポリヌクレオチドが当初二本鎖である場合、”ターゲット配列”という用語は互いに相補的な（＋）および（－）鎖の両方を表す。

【0018】

”擬似ターゲット”は、単一の増幅反応で被分析体ポリヌクレオチドと共増幅しうるポリヌクレオチドである。擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは同一のオリゴヌクレオチドプライマーセットを用いて増幅できる。しかし、擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは独立したプライマーセットを用いて増幅させることもできる。擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは同一分子ではなく、したがって。擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは互いに識別できる。

【0019】

”擬似ターゲットアンプリコン”は、擬似ターゲットをポリヌクレオチドコピーまたは増幅生成物の合成の鋳型として用いる増幅反応のポリヌクレオチド生成物である。

【0020】

”ポリヌクレオチド増幅反応”は、ターゲットポリヌクレオチド数を増加させるための鋳型依存性インビトロ酵素触媒反応である。

本発明に関して”定量的に検出する”または”定量する”とは、ポリヌクレオチドまたはアンプリコン生成度を測定するプロセスを表す。

【0021】

”標識プローブ”は、検出可能な部分を含み、かつ相補的な一本鎖ターゲット核酸配列と結合して二本鎖ハイブリッドを形成しうるヌクレオチドポリマーである。この用語には、天然ヌクレオチドの類似体も含まれ、特にリボースの2'位にメトキシ基をもつ類似体(OMe)が含まれる。検出可能な部分はプローブ末端(1以上)に結合していてもよく、プローブ配列内部に位置していてもよい。一般に標識プローブは、約10～約100ヌクレオチドの長さであるが、100ヌクレオチドより長い、または10ヌクレオチドより短くてもよい。

【0022】

”検出可能な部分”は、標識プローブに結合しているか、あるいはその一部として合成されてもよい分子である。この分子は特異的に検出されなければならない、結果的にプローブを検出できる。これらの検出可能な部分は、しばしば放射性

同位体、化学発光分子、酵素、ハプテン、またはユニークオリゴヌクレオチド配列である。

【0023】

”被分析体アンプリコンに特異的な標識プローブ”は、被分析体ポリヌクレオチドを増幅生成物合成の鋳型として用いる増幅反応で合成されたポリヌクレオチド生成物に相補的なポリヌクレオチド配列を有する標識プローブである。アンプリコンは増幅反応において生成するポリヌクレオチド生成物であるので、被分析体アンプリコンに特異的な標識プローブは反応において生成するいずれのポリヌクレオチド鎖に対しても相補的となりうる。したがって、被分析体ポリヌクレオチドがターゲット配列を含む一本鎖分子である場合、かつ増幅反応においてターゲット配列のコピーおよびその相補配列が生成する場合、被分析体アンプリコンに特異的な標識プローブはターゲット配列またはその相補配列に相補的となりうる。

【0024】

本明細書中で用いる”共増幅”は、ポリヌクレオチド増幅反応において1より多いターゲットポリヌクレオチド種が増幅されるプロセスを表す。たとえば”被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットを共増幅させる”は、これら2ポリヌクレオチド種を同時に増幅させて、それぞれ被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンを形成するプロセスを表すものとする。

【0025】

本明細書中で用いる、被分析体ポリヌクレオチドを含有する、または含有する可能性がある試料を”入手する”とは、ヒトなどの生物対象から得ること、または業者などの試薬貯蔵所から入手することを意味する。動物またはヒトから試料を入手する場合、当業者に周知の適切な任意数の手段を用いてもよいことは理解されるであろう。たとえば血液試料を入手する場合、血管穿刺による採血により得るか、あるいは法医学試料として得られる可能性もある。

【0026】

本明細書中で用いる”擬似ターゲットアンプリコンの量と関係なく”という句は、増幅系内の他のパラメーターに関して決定を行うために、増幅反応で合成さ

れた擬似ターゲットアンプリコンの量に関する量的情報が必要ないことを意味する。たとえば、増幅系内で合成された被分析体アンプリコンの量またはその量のアンプリコンを形成した被分析体ポリヌクレオチドの量は、本明細書に開示する方法によれば、同じ反応での擬似ターゲットアンプリコンの形成に関する量的情報なしに測定できる。実際に、本明細書に記載する定量法の達成のために擬似ターゲットアンプリコンを検出する必要すらない。本発明は、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の被分析体アンプリコン量を関連づけるための方法をも提供する。この関係は、増幅反応で被分析体アンプリコンと共増幅した擬似ターゲットアンプリコンの量に依存することなく、あるいはそれを知らなくても確立できる。したがって、実験操作で擬似ターゲットアンプリコンを検出または定量したとしても、増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量と増幅後の対応する被分析体アンプリコン量を関連づける際に、その情報を採用する必要はない。

【0027】

本明細書中で用いる“標準曲線”は、増幅前のポリヌクレオチド量と増幅後の対応するアンプリコン量を関連づける表示である。たとえば標準曲線は装入鋳型分子の既知数をx軸、アンプリコン生成物のRLU値またはpmolをy軸にプロットしたグラフであってもよい。標準曲線は一般に、既知数のポリヌクレオチド鋳型を含む対照ポリヌクレオチド標準を用いて作成される。標準曲線は電子形態で記憶させておくか、またはグラフで表示することができる。

【0028】

“生物検体”は、生物由来の材料の試料である。

好ましい態様の詳細な説明

本明細書には、擬似ターゲットを含むポリヌクレオチド増幅反応は、合成される被分析体アンプリコンの量に関して精度が改善されるという利点をもつことを開示する。さらに、擬似ターゲットを反応に含有させ、次いで合成された被分析体アンプリコンの量を定量測定することにより、定性増幅反応を定量アッセイに変換できる。検体から核酸を単離する効率に関係なく、後続の増幅反応において予め定めた比率の擬似ターゲットアンプリコンと被分析体アンプリコンの生成を保証するという利点をもつ新規な検体処理方法をも開示する。この方法によれば

、検体から核酸を単離する前に、擬似ターゲットを生物検体に添加する。擬似ターゲット増幅を利用して定性方式で実施され、被験試料中の被分析体ポリヌクレオチドの量についての準定量情報を提供するアッセイ法をも記載する。

【0029】

序論と概説

本発明を開発するに至った所見は、標準TMA反応に固有の特性に関するものであった。より具体的には、きわめて低い量のターゲットポリヌクレオチドのみを用いて反応を開始した場合、非特異的増幅生成物の酵素合成が実質的割合を占めることが認められた。電気泳動により視覚化すると、非特異的増幅生成物は広いサイズ範囲にわたってスミアとして現われた。この結果を図1に示す。

【0030】

重要な点は、ターゲットポリヌクレオチド鑄型の使用量を漸増させて実施したTMA反応で非特異的生成物の相対割合が漸減することが認められた点である。この結果も図1に示される。高濃度のターゲットポリヌクレオチドを用いて開始した反応ほど、多量の特異的生成物が形成され、非特異的生成物は少量にすぎなかった。この逆関係から、反応開始時に反応混合物中に増幅可能な鑄型を含有させることにより非特異的反応生成物の形成を抑制しうると推測した。

【0031】

特定の理論に拘束されたくはないが、この逆関係はTMA反応のような自己触媒反応に特に顕著となる可能性があった。この反応の性質は、早期に中断しない限り利用可能な反応体の供給が枯渇してそれ以上の合成が起き得ない終末点まで進行するものだからである。ターゲットポリヌクレオチドの不存在下で無制限に進行するTMA反応は、反応体が枯渇してそれ以上の合成が起きない時点まで非特異的生成物を生成するであろう。無制限に実施したPCR反応も、反応体が枯渇してアンプリコン生成が止む時点まで進行し、同様に非特異的生成物を生成する可能性がある（たとえばD. Persing, Diagnostic Molecular Microbiology; Ch 3, p. 58 (1993) 参照）。

【0032】

本明細書に開示する方法は常法により実施されるので、核酸分子集団中における被分析体ポリヌクレオチドの存在を指示するために被分析体アンプリコンの検出を利用する。たとえばヒト免疫不全ウイルス（HIV）ウイルス粒子の血清中濃度をモニターするための方法は、HIVゲノムの一部を増幅し、次いでその増幅生成物を検出および定量することを伴う。その方法がさらに擬似ターゲットの増幅を含む場合、擬似ターゲットアンプリコンの検出は任意工程であり、アッセイの達成に必要ではない。擬似ターゲットアンプリコンの検出は、増幅反応が起きたことを指示する陽性対照操作として利用できる（すなわち内部増幅対照）。しかし、増幅反応で合成された被分析体アンプリコンの量、すなわちその被分析体アンプリコン量の形成をもたらした被分析体ポリヌクレオチド鋳型の量の定量解析は、増幅反応で合成された擬似ターゲットアンプリコンの量を知ることには依存しない。したがって、本明細書に開示する方法によれば、増幅反応で合成された擬似ターゲットアンプリコンの量に関係なく被分析体アンプリコンを定量できる。本明細書に開示する方法の重大な特色は、被分析体アンプリコンを擬似ターゲットアンプリコンから識別できなければならないことである。より具体的には、擬似アンプリコンをも検出することなく、被分析体アンプリコンを検出できなければならない。好ましい態様において、被分析体アンプリコンと擬似ターゲットは少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブに異なる状態で結合し、したがって2つのアンプリコン種を独立して検出できる。

【0033】

増幅プロトコルを用いる臨床操作に特に関連のある1つの点は、異なる生物検体からのポリヌクレオチド鋳型採集の変動性に関係する。たとえば異なる組織から採集したあるポリヌクレオチドの分子数が、試料サイズの変動性や異なる試料取扱い方法の複雑さのため変動することは、一般にみられる。核酸はガラス、プラスチックおよびクロマトグラフィー媒体（たとえば架橋ポリアクリルアミドおよびデキストラン）に非特異的に結合して、その後の処理中に試料回収効率を低下させる可能性がある。さらに、生物検体から回収したRNAは、化学的または酵素による加水分解の結果、種々の程度に分解している可能性がある。酵素による加水分解は高濃度のリボヌクレアーゼを含有する生物試料においては特に著し

い。

【0034】

定量ポリヌクレオチド増幅アッセイ

擬似ターゲットをポリヌクレオチド増幅反応に取り込ませると、試料間の増幅変動性を少なくすることができるだけでなく、十分に最適化された定性アッセイですら定量アッセイに変換することもできる。特異的増幅生成物のみを合成するポリヌクレオチド増幅系の場合（ターゲット非特異的生成物は形成されないことを意味する）、当初のターゲットポリヌクレオチドから増幅される最終生成物の量は、反応に含有されていたターゲットポリヌクレオチドの出発量に関係なく一定であろう。これは、反応体の1つが反応停止に十分なほど枯渇する時点まで進行する自己触媒型増幅反応、たとえばTMA反応の場合に当てはまる。この状況で合成される生成物の全量は、大部分は反応に含まれる反応体の初期濃度により決まる。そのような最適化ポリヌクレオチド増幅系は、反応体の1つの濃度が制限となる時点まで反応を実施する場合には、定性的ではあるが定量的ではない。これは、反応中に生成する最終生成物の量がポリヌクレオチドターゲットの出発量ではなく出発反応体濃度に依存するからである。

【0035】

TMAなどの増幅反応に擬似ターゲットを含有させる場合、好ましくは擬似ターゲットはターゲットポリヌクレオチドと比較して高いコピー数で存在するであろう。増幅反応は、ターゲットポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットから増幅する生成物の量が反応体の1つが枯渇するのに十分な量に達した時点で停止する。擬似ターゲットは通常は優勢増幅種であろうから、ターゲットポリヌクレオチドの増幅度はターゲットポリヌクレオチドの出発量ではなく擬似ターゲットの出発量により決まる。したがって、増幅反応における擬似ターゲットの量を制御することにより、ターゲットポリヌクレオチドの増幅度を反応におけるターゲットポリヌクレオチドの出発量に関係なく制御できる。反応体濃度を一定に維持すれば増幅生成物の総量は一定であるが、反応中に生成する被分析体アンプリコンの量は擬似ターゲットの出発濃度に対する被分析体ポリヌクレオチドの出発割合を実質的に反映する。ターゲットポリヌクレオチドは予め定めた程度に増幅するの

で、こうしてポリヌクレオチド増幅アッセイを定量アッセイにすることができる。これを図2～4に模式的に示す。

【0036】

一般に、擬似ターゲットポリヌクレオチドを反応に含有させることにより定性ポリヌクレオチド増幅反応を定量反応に変換する方法は、PCR、NASBA（核酸配列ベース増幅）、SDA（標準置換増幅）、ならびに自己複製型ポリヌクレオチド分子および複製酵素（MDV-1 RNAおよびQ-βータ酵素など）を用いる増幅方法を含めたすべての既知ポリヌクレオチド増幅系に適用できる。これらの各種増幅方法を実施するための方法は、それぞれUSP 4, 965, 188; EP A0 525 882; USP 5, 455, 166; USP 5, 472, 840; および Lizardi et al., BioTechnology, 6: 1197 (1988) 中にみられる。

【0037】

擬似ターゲットを含む増幅反応の定量態様

ポリヌクレオチド増幅は指数的プロセスであり、反応速度に影響する変数のいずれかがわずかに異なっても被分析体特異的アンプリコンの収量が著しく異なることは、核酸検査の分野で認識されている。本明細書には、増幅反応において生成した非特異的増幅生成物がアンプリコン生成物の総量に著しく関与し、被分析体特異的増幅生成物に用いられるはずの反応体を消費する可能性があるという新規所見を提示する。増幅生成物のプールに対する非特異的生成物の関与は、非特異的増幅生成物量のわずかな変化が被分析体アンプリコン生成量に強い影響を及ぼす可能性をもつのに十分なほど著しい。したがって、増幅反応で形成される非特異的生成物の量を減らすと被分析体アンプリコン生成の精度が改善され、定性増幅アッセイが定量アッセイに変換されるという利点のあることが、本発明の開発に際して見いだされた。

【0038】

非特異的生成物の形成を減らすための好ましい方法は、擬似ターゲットを増幅反応に含有させ、次いでこの反応で合成された被分析体アンプリコンを定量検出することを伴う。こうして被分析体アンプリコンの生成を、増幅反応開始時に存

在する被分析体ポリヌクレオチドの量と用量依存的に関連づけることができる。さらに本発明方法によれば、被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチド数を定量するために擬似ターゲットアンプリコンを検出する必要がない。

【0039】

したがって本明細書には、内標準に由来する増幅生成物の検出によらない被分析体ポリヌクレオチドの定量方法が開示される。この方法の開発は、被分析体アンプリコン生成の変動性の原因となる問題の根源を認識し、増幅反応に擬似ターゲットを含有させてこれを制御することにより可能となった。擬似ターゲットは増幅反応の鋳型として作用するが、被分析体ポリヌクレオチドの定量のために擬似ターゲットアンプリコンの検出は必要ない。アンプリコン合成に必要な反応体に対して被分析体ポリヌクレオチドと競合する鋳型を反応に添加することにより増幅反応の精度が改善されるというのは直観に反するが、以下に提示する結果がこの方法の有用性を明らかに証明する。同様に、本明細書に開示する方法は、増幅はされるが検出または定量の必要はない鋳型ポリヌクレオチドを系に導入することにより、通常は変動性の高い非特異的増幅生成物の生成を制御する方法を提供する。

【0040】

増幅反応の精度および定量能の改善の原理

図3a～3bは、擬似ターゲットが定性的ポリヌクレオチド増幅反応を定量アッセイに変換しうる様子を示す。図3aは、最適化反応によりターゲット被分析体(TA)ポリヌクレオチドを鋳型として用いて反応体プール(図中に八角形で表す)を特異的増幅生成物(SP)に変換する様子を示す。擬似ターゲットの不存在下では反応において生成する被分析体アンプリコンの量はターゲット被分析体ポリヌクレオチドの出発濃度に対して定量関係にはないので、アッセイは定性的である。被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルが多量であっても少量であっても、反応において合成される被分析体アンプリコンの量には変化しない。反応において生成する可能性のある被分析体アンプリコンの量は、被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルではなく出発反応体プールにより決まる。したがって、反応体が枯渇する時点まで増幅反応を実施すると、一定量のアンプリコンが生成する

。逆に、図3 bは、擬似ターゲットの存在下で実施した増幅反応により、並行する反応が擬似ターゲットを含有する場合、出発被分析体ポリヌクレオチドの量に比例して被分析体特異的生成物が合成される様子を示す。より具体的には、ポリヌクレオチド増幅反応に擬似ターゲットが含有される場合、被分析体アンプリコンの最終量は反応において鋳型として作用する被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルと用量依存関係にある。したがって、反応における被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルについての情報を得るためには、被分析体アンプリコン（擬似ターゲットアンプリコンではなく）のみを定量すればよい。このポリヌクレオチド定量方法は、被分析体アンプリコン以外のアンプリコンを検出する必要性、または異なるアンプリコン種の識別のために異なるプローブを用いる必要性がないという利点をもつ。したがって、被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットの両方を増幅するために同一対のオリゴヌクレオチドプライマーセットを使用できる。これら2種類の増幅反応生成物は、被分析体特異的ハイブリダイゼーションプローブを用いて識別できるからである。

【0041】

図4 a～4 dは、2つの競合する増幅反応が同時に起きた場合に、被分析体アンプリコン合成が被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルを広範囲にわたって定量的に反映する様子を示す。図4 aは、非特異的生成物の形成がない状態で起きる理想化した増幅反応について予想される結果を示す。被分析体ポリヌクレオチドのすべての装入レベルで一定レベルの被分析体アンプリコン形成が予想される。この例は図3 aに示した反応を反映する。図4 bは、低レベルの非特異的増幅生成物を自然生成する増幅反応について予想される結果を示す。きわめて低いレベルの装入被分析体ポリヌクレオチドにおいてのみ、狭い範囲の用量依存性がある。図4 cは、高レベルの非特異的増幅生成物を自然生成する増幅反応について予想される結果を示す。この例では、任意レベルの被分析体ポリヌクレオチドにおいて実施した増幅反応で、グラフのY軸上に示すある範囲に入る量のアンプリコンが生成する。非特異的生成物の形成が関与する程度により、図4 bと4 cに示す結果が区別される。被分析体ポリヌクレオチドの装入レベルと被分析体アンプリコン合成に関連する線が幅広いのは、被分析体アンプリコン形成の精度が低

いことを反映し、非特異的増幅生成物の自然形成の変動性が高いという事実に起因する。図4 dは、擬似ターゲットを含有する理想化した増幅反応について予想される結果を示す。反応において生成する被分析体アンプリコンの量は、広範な被分析体ポリヌクレオチド装入レベルにわたって改善された精度および用量依存関係を共に示す。この例は図3 bに示した理想化した反応を反映する。

【0042】

このように、本発明方法に従って実施した増幅反応の精度と定量性の観点は、被分析体と被分析体でないポリヌクレオチドが共増幅し、反応体に対して競合する、競合反応の存在および制御性により相関性をもつ。第2の増幅反応が反応体に対して被分析体特異的の反応と競合する場合、動的範囲が改善される。典型的反応が100 μ lの容量をもつとして、増幅反応に反応当たり $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子のレベルで擬似ターゲットを含有させることにより第2反応の制御性を高めると、被分析体アンプリコン合成量の精度が改善される。

【0043】

標準曲線の使用—増幅前被分析体ポリヌクレオチドの定量

擬似ターゲットを含有する増幅反応は、反応に装入した被分析体ポリヌクレオチド数と合成された被分析体アンプリコンの数の間に定量関係を示すという利点をもつので、被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドの数を標準曲線により判定できる。より具体的には、一定量の擬似ターゲットおよび既知量の被分析体ポリヌクレオチドを含有する複数の増幅反応を、未知数の被分析体ポリヌクレオチドを含有する被験試料を用いて行う増幅反応と並行して実施することができる。あるいは、分析操作を実施する度に曲線を作成する必要があるように、予め標準曲線を作成しておくこともできる。予め作成したそのような曲線を、試験機の記憶デバイスに電子的に蓄積しておくこともできる。好ましい増幅反応には、転写仲介増幅反応、NASBA反応およびポリメラーゼ連鎖反応が含まれる。転写仲介増幅反応がきわめて好ましい。擬似ターゲットの使用量は各反応について同一であり、好ましくは反応当たり $10^3 \sim 2 \times 10^8$ 、 $10^4 \sim 2 \times 10^8$ 、 $10^5 \sim 2 \times 10^8$ 、または $10^7 \sim 2 \times 10^8$ の擬似ターゲット分子である。擬似ターゲットを含有する反応は、本明細書に記載する方法に従って実施でき、各反応

で合成される被分析体アンプリコンの数は標準的なハイブリダイゼーション法および検出法により定量される。増幅前の被験試料中の被分析体ポリヌクレオチドを定量するために擬似ターゲットアンプリコンを検出する必要はないが、所望により擬似ターゲットアンプリコンの検出を増幅反応達成の確認に用いることもできる。この方法では擬似ターゲットアンプリコンが内部増幅対照として作用する。次いで、第1軸上に増幅前の被分析体ポリヌクレオチド標準の量、第2軸上に対応する増幅後の被分析体アンプリコンの量をもつ標準曲線を作成する。次いで、被験反応について測定した増幅後の被分析体アンプリコンの量を、標準曲線の増幅後軸上に配置する。他方の軸上の対応する数値が、被験反応に存在していた被分析体ポリヌクレオチドの増幅前の量を表す。こうして、標準曲線を参照することにより、より具体的には被験試料について得られた定量結果と標準曲線を比較することにより、被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドの分子数を判定できる。これは当業者に周知の方法である。

【0044】

本明細書に記載する方法は、被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレオチドを定量するために容易に使用できる。実際に、既知数の被分析体ポリヌクレオチド標準を用いて擬似ターゲットを含有する複数の対照増幅反応を開始し、かつ未知数の被分析体ポリヌクレオチド分子を用いて擬似ターゲットを含有する被験反応を開始すると、各反応の被分析体アンプリコン数の定量により被験試料中に存在していたはずの被分析体ポリヌクレオチド分子数を判定することができる。たとえば500、1,000および1,500分子の被分析体ポリヌクレオチド標準を含有する標準反応が被分析体特異的プローブベースのハイブリダイゼーション操作によりそれぞれ1×、2×および3×の被分析体アンプリコン信号を発し、かつ被験試料が1.5×に対応する被分析体アンプリコン信号を発した場合、被験試料は750の被分析体ポリヌクレオチド分子を含有していたにちがいない。この例では、500～1,500分子の被分析体ポリヌクレオチド標準から生成するアンプリコンが発する信号間に直線関係がある。標準増幅反応に装入した被分析体ポリヌクレオチド分子数とアンプリコン特異的信号強度の関係は、グラフを用いて確立するのが簡便である。被験試料中に存在する被分析体ポリヌクレ

オチド分子数の判定は、測定した被分析体アンプリコン信号強度に対応する被分析体ポリヌクレオチド分子数を標準グラフから容易に判定できる。これは、ポリヌクレオチド増幅反応に被分析体ポリヌクレオチド標準を擬似ターゲットと共に用いて、被験試料に含有されていた増幅前の被分析体ポリヌクレオチドを定量する方法を説明する。

【0045】

有用な擬似ターゲットポリヌクレオチドの構造特性

本明細書に開示する方法に用いる擬似ターゲットポリヌクレオチドの設計には下記の情報を採用できる。この情報があれば、検出および定量すべき任意数の被分析体ポリヌクレオチドに対応する有用な擬似ターゲットを作製できる。擬似ターゲットをポリヌクレオチド増幅操作に関して使用できる用途例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：（１）細菌性またはウイルス性病原体の検出；（２）疾病プロセスの指示体として定量が役立つ場合のポリヌクレオチド定量；および（３）法医学分析、環境検査および食品検査を含めた他の多数の用途。

【0046】

本発明の好ましい１態様において、擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドは同一セットの２種類のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅できる。この例においては、擬似ターゲット上に相補的結合部位をもつ単一オリゴヌクレオチドプライマーが被分析体ポリヌクレオチド上にも相補的結合部位をもつ。

【0047】

他の好ましい態様において、増幅反応に際して鋳型として作用する擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドは実質的に同様な効率で増幅する。したがって、増幅をTMA、PCR、または他の何らかの方法、たとえばSDA（標準置換増幅）、もしくは自己複製性ポリヌクレオチド分子および複製酵素（MDV-1 RNAおよびQ-βータ酵素など）を用いる方法のいずれにより実施しても、擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは同様な増幅効率をもつことが好ましい。

【0048】

擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチド鑄型が同様な増幅効率をもつことを保証するための1方法では、2鑄型は近似するが、操作中に増幅される配列全体においては同一でないポリヌクレオチド配列を示す必要がある。たとえば、被分析体ポリヌクレオチド配列の内部の部分を乱すことにより擬似ターゲットポリヌクレオチドを作製でき、その際、乱された配列は被分析体ポリヌクレオチド特異的プローブによりハイブリダイズする分子の部分として作用する部分の被分析体ポリヌクレオチドに対応する。擬似ターゲットポリヌクレオチドの長さは、本明細書に開示する方法の実施操作にとって重大ではない。

【0049】

擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドが単一反応で共増幅できること、および得られる2つのアンプリコン種を独立して検出できることが必須である。より具体的には、擬似ターゲット増幅生成物と被分析体ポリヌクレオチド増幅生成物が互いに異なる配列をもち、したがって、長さ、検出プローブとハイブリダイズする能力その他の方法により識別できることが必須である。増幅反応において増幅したポリヌクレオチド鑄型は、通常は増幅反応の実施に用いるプライマー結合部位と相同または相補的な領域間に挿入された実質数のヌクレオチド塩基を含むであろうから、これらの挿入配列は選択したハイブリダイゼーションプローブがここに結合しうる領域として作用することができる。ハイブリダイゼーションプローブおよび検出プローブの選択に有用な基準は、当業者に周知であろう。本発明に関して有用なプローブには、標識ポリヌクレオチド、および後続の増幅反応においてプライマーとして有用なオリゴヌクレオチドが含まれる。

【0050】

被分析体ポリヌクレオチドを生物検体から単離する前の時点で、たとえば試料処理の補助として検体に擬似ターゲットを添加する場合、擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドを同じ試料処理操作により検体から回収できることが重要である。たとえば、DNAを変性させ、RNAを加水分解するような強アルカリ性条件下で被分析体ポリヌクレオチドを回収できる場合、擬似ターゲットも同じ条件下で構造的に無傷の分子として回収できなければならない。たとえばア

ルカリ性緩衝液条件を用いて、添加した擬似ターゲットポリヌクレオチドの存在下で被分析体ポリヌクレオチドを単離する場合は、被分析体も擬似ターゲットもRNA分子ではない。これはこの単離操作中に分解するであろう。同様に、擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチドをたとえばエタノールなどのアルコール類の添加により沈殿させる場合、擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドは実質的に同様な効率で沈殿しなければならない。

【0051】

擬似ターゲット配列と被分析体ポリヌクレオチド配列の関係

擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを同一セットの2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて共増幅できることが好ましいが、必須でないことは明らかである。より具体的には、一对の被分析体特異的プライマーセットを用いて被分析体ポリヌクレオチドを検出するための定性ポリヌクレオチド増幅アッセイを、さらに擬似ターゲット、および擬似ターゲット増幅のためのプライマーセットを反応に含有させることにより、定量アッセイに変換できる。本発明方法の1態様においては、被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを同一の2種類のプライマーにより共増幅させる。

【0052】

” 普遍 (universal) 擬似ターゲット ” および擬似ターゲット特異的プライマーセットを用いて定量増幅反応を実施することもできる。本発明方法の1態様においては、普遍擬似ターゲットの増幅に用いるプライマーは被分析体ポリヌクレオチドの増幅に用いるプライマーと同一であってもよい。普遍擬似ターゲットは被分析体ポリヌクレオチドと構造関係がある必要はなく、被分析体ポリヌクレオチドと同様な増幅効率で共増幅する必要もない。低い、または高い出発レベルの被分析体ポリヌクレオチドを用いて実施した増幅反応で、増幅反応開始時に存在する被分析体ポリヌクレオチドの出発量に依存性の様式で被分析体アンプリコンが合成されるであろう。この方法を用いると、2種類以上の増幅反応を被分析体アンプリコンの生成について評価でき、被分析体アンプリコンレベルは各試料中の被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルに用量依存関係にある。

【0053】

被分析体ポリヌクレオチドに関連のない擬似ターゲットおよびそれに付随するプライマーを用いても良好な結果を達成できるが、同一のプライマーセットにより被分析体ポリヌクレオチドと共増幅する擬似ターゲットを用いることが好ましい。この好ましい方法は、増幅反応にアンプリコン合成のための供給源として用いる試薬プールの組成の多様性が少なくなるという利点をもつ。本発明を説明するために本明細書に提示した具体例では、共通のオリゴヌクレオチドプライマーセットを用いて共増幅する擬似ターゲットおよび被分析体ポリヌクレオチド例を用いる。

【0054】

増幅反応に含有させる擬似ターゲット量の選択

一般にポリヌクレオチド増幅反応に擬似ターゲットを含有させることにより得られる利点は、きわめて広範な擬似ターゲット濃度にわたって得られる。より具体的には、TMA反応などの増幅反応に $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^8$ 分子の量で擬似ターゲットを含有させると、(1) より高い増幅精度、(2) 陽性キャリーオーバーの可能性の低下、および(3) ターゲット回収変動性の基準化が達成される。これらについてはすべて本明細書に開示されている。実施上の制限内で、増幅反応における擬似ターゲットの出発レベルが高いほど、上記3つのパラメーターがより改善されるであろう。

【0055】

通常は被分析体アンプリコンの合成に使用できないヌクレオチド三リン酸反応体を用いても擬似ターゲットアンプリコンが合成されるので、増幅反応に擬似ターゲットが存在すると被分析体アンプリコン合成が低下するであろう。これが、限定された反応体プールから被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンの両方が合成される理由である。したがって、擬似ターゲットの出発レベルが漸増すると、増幅反応において生成する被分析体アンプリコン量が漸減する。このため、増幅反応における擬似ターゲットの出発濃度の上限は、実際には被分析体アンプリコンの検出に用いる方法の感度に依存する。

【0056】

増幅反応に含有させることができ、かつ検出に適したレベルの被分析体アンプ

リコンを生成する擬似アンプリコンの上限量または上限濃度は、ルーティン実験できわめて容易に決定できる。この場合も、反応体枯渇時点まで実施した増幅反応における擬似ターゲットのレベルが高いほど反応において生成する被分析体アンプリコン量が低くなることは、当業者に自明であろう。これは、増幅反応において擬似ターゲットアンプリコンが被分析体アンプリコンの犠牲において合成されるからである。したがって、きわめて高いレベルの擬似ターゲットを含有する増幅反応では、生成する被分析体アンプリコンのレベルは低くなる。被分析体アンプリコン検出のための高感度アッセイ法は、これら低レベルの被分析体アンプリコンの検出に特に有用である。これに対し、陽性の検出信号を得るために多量の被分析体アンプリコンを必要とする低感度アッセイ法は、多量の被分析体アンプリコンの検出には有用であろう。これはごく低い出発レベルの擬似ターゲットを含有し、かつ高レベルの被分析体アンプリコンを生成する増幅反応から得られる。このように、増幅反応の実施に使用できる擬似ターゲット量の上限は、増幅反応自体ではなく、被分析体アンプリコン検出のために最終的に採用するアッセイの感度に依存する。

【0057】

TMA反応などの反応では擬似ターゲット装入レベルが高いほど非特異的増幅生成物が少ないというのは一般に当てはまるので、増幅反応に含有される擬似ターゲットの量は好ましくは可能な限り高くすべきであるということになる。後記実施例に開示した最高擬似ターゲットレベルは、100 μ lの反応物中、 2×10^8 分子であった。もちろん、被分析体アンプリコンの検出に用いる検出系は、出発試料中に被分析体ポリヌクレオチドが存在し、したがって増幅反応において被分析体アンプリコンが合成される場合は、陽性信号を発するのに十分な感度をもたなければならない。実際には、ある範囲の擬似ターゲット濃度を試験し、被分析体アンプリコンに対する与えられた感度をもつ検出系を用いる被分析体アンプリコン検出性により測定して、良好な結果が増幅反応において得られる最適量を判定することができる。通常は、被分析体ポリヌクレオチドを含有する増幅反応および含有しない増幅反応についてそれぞれ予想される結果を指示するために、陽性および陰性対照がこの操作に含まれる。

【0058】

増幅反応の実施のために選択する擬似ターゲットの量は、増幅の規模、反応における被分析体ポリヌクレオチドの出発数、および被分析体アンプリコンを検出するために用いる検出系の感度により影響される可能性がある。標準的TMA反応は、一般に出発ポリヌクレオチドレベルを $10^{12} \sim 10^{13}$ 倍増幅する。ポリヌクレオチド検出系の一例は、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて約 6×10^7 分子を検出できる。増幅反応において鋳型供給源として作用する試料中の被分析体ポリヌクレオチド100分子を検出するためには、約 6×10^5 倍（約 6×10^7 を100で割ったもの）の増幅を達成する必要がある。被分析体ポリヌクレオチド100分子を少なくとも 6×10^5 倍増幅するためには、増幅反応には 1×10^7 を超える擬似ターゲット分子が含まれてはならない。これは、 6×10^{12} （前記 $10^{12} \sim 10^{13}$ 倍の範囲内の一例）を 1×10^7 で割ると、 6×10^5 倍となるからである。含有される擬似ターゲット数が多いほど、増幅倍率は許容できる 6×10^5 の数値より低下するであろう。代わりに 1×10^9 倍にまで達するPCRプロトコルを用いると、増幅反応における擬似ターゲットの最大許容量は 1×10^9 を 6×10^5 で割ったもの、すなわち 1.7×10^3 分子となる。したがって下記のことことが明らかである：（1）本明細書に開示する方法の実施には広範な擬似ターゲット濃度を採用できる；（2）増幅プロトコルにおいて検査する試料中の被分析体ポリヌクレオチド数が未知である場合、擬似ターゲットの最適量を経験的に判定できる。

【0059】

増幅反応の実施に採用できる好ましい擬似ターゲット量は、典型的反応を100 μ lの容量で実施する場合、一般に反応当たり $10^3 \sim 10^9$ 分子である。たとえばHIV感染ヒトから採取した血清試料中のHIVポリヌクレオチドを検出するためのアッセイは、反応当たり $10^3 \sim 2 \times 10^8$ 、 $10^4 \sim 2 \times 10^8$ 、 $10^5 \sim 2 \times 10^8$ 、または $10^7 \sim 2 \times 10^8$ 分子の擬似ターゲットを用いて実施できる。きわめて好ましい態様において、増幅反応はTMA反応であり、これらの擬似ターゲット量を用いて実施した増幅反応において生成した被分析体アンプリコンの検出にはHPA（”均質保護アッセイ”）法を採用する。後記実施例に示す

ように、広範な擬似ターゲット濃度を試験し、良好な結果が得られることが示された。

【0060】

本発明のポリヌクレオチド増幅方法を実施するためのキット

本明細書に記載するポリヌクレオチド増幅方法の実施に有用なキットは、下記のものを含む：（１）擬似ターゲット；（２）擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを共増幅するための、少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマー；（３）ポリヌクレオチド増幅反応を実施するための試薬；ならびに（４）増幅反応を実施し、反応において生成した被分析体アンプリコンのみを検出するための指示を含む印刷した説明書。所望により、キットは被分析体アンプリコンを検出するための標識プローブを含むことができる。キットと共に含まれる試薬は、デオキシヌクレオチド三リン酸およびDNA重合酵素を含み、逆転写酵素であってもよい。ヌクレオチド三リン酸およびRNA重合酵素は、キットに含まれてもよい任意試薬である。

【0061】

この背景において、本発明の３つの具体的態様を以下に詳述する。

I. 被分析体ポリヌクレオチド増幅の感度向上

増幅方法は、定量および定性のいずれも、痕跡量の特異的ターゲットポリヌクレオチドですら検出および測定するための有力な手段となる。しかし異なる反応間で均一な増幅効率を得るのが困難なことは、増幅度の変動性が精確な定量および少量のターゲットを検出する可能性の妨害となることを意味する。本発明者は、非特異的生成物の形成を最小限に抑え、被分析体アンプリコン合成量の精度を高め、かつ定量増幅反応の実施しやすさを最大限に高めることができる方法の開発を試みた。

【0062】

増幅度の変動性は、一部は酵素による非特異的反応生成物の合成に起因すると思われる。これらの非特異的生成物の形成は、増幅鑄型として作用するターゲットポリヌクレオチドがきわめて低い出発レベルで反応に含まれるにすぎない場合に、最も顕著であった。ターゲットポリヌクレオチドレベルが高いほど、非特異

的生成物の形成は少なくなり、反応の全生成物のうちごく小さな割合になる。したがって本発明の目的は、反応混合物中の被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルがきわめて低い場合ですら、高いターゲットポリヌクレオチド濃度の特徴的な反応条件を模倣することであった。より具体的には、図2に示すように、非特異的生成物の形成を最小限に抑える好ましい反応条件を模倣することが望ましい。

【0063】

被分析体ポリヌクレオチドと共増幅する擬似ターゲットポリヌクレオチドを補給した増幅反応により、これらの目的を達成するために望ましい反応条件が得られた。これにより増幅反応は、増幅反応における真の被分析体レベルが低い場合ですら、高レベルの被分析体が存在するかのような挙動を示した。後記の実験結果が示すように、 10^5 コピーを超える擬似ターゲットポリヌクレオチドの添加により、相対光単位（RLU）の変動係数（CV%）の改善により測定した増幅精度が改善された。ここでRLUはハイブリダイズしたプローブの量の測定可能な指標である。これに関してCV%は、データコレクションについての標準偏差（SD）をそのコレクションについての正味平均で割り、次いでその商を100倍することにより計算した統計値である。低いCV%値はデータのばらつきが少ないことを反映し、実験精度がより高いことの指標と受け取れる。したがって本明細書に記載する方法は、被分析体ポリヌクレオチド増幅の精度を改善し、一方では規模の変動する非特異的反応生成物の形成を少なくする手段を提供する。

【0064】

本明細書に開示する方法はさらに、被分析体ポリヌクレオチドが擬似ターゲットのコピー数より低いコピー数で存在する限り、被分析体ポリヌクレオチドの出発レベルに関係なくポリヌクレオチド増幅反応の結果を基準化する機序を提供する。後記に例示する方法では、被分析体ポリヌクレオチドが $10^1 \sim 10^5$ 分子の出発レベルで一連の増幅反応混合物中に存在し、一方では擬似ターゲットがすべての混合物中に 10^6 分子のレベルで存在した。これは、すべての増幅反応が実質的に 10^6 のポリヌクレオチド鑄型から開始したことを意味する。鑄型の総数に対する被分析体ポリヌクレオチドの寄与は、いずれの混合物においてもきわめて低かったからである。したがって、被分析体ポリヌクレオチド数は広く変動し

たにもかかわらず、すべての増幅反応がほぼ 10^6 の鋳型を含有するような挙動を示した。これにより、実際の被分析体レベルに関係なく、増幅反応は 10^6 の鋳型ポリヌクレオチドに基準化された。

【0065】

II. アンプリコン生成の制御

さらに、高い装入レベルのターゲットポリヌクレオチドの定量を不正確にする可能性のある被分析体アンプリコンの”過剰生成”に伴う障害を克服するために、擬似ターゲットを使用しうることが見いだされた。増幅反応において過剰量のアンプリコンが生成し、検出プローブを飽和するまでハイブリダイズさせることによりこれらのアンプリコンを定量すると、必然的にアッセイの検出工程で多量の検出プローブが消費される。逆に、低レベルのアンプリコンが生成する場合、検出工程の実施に必要な検出プローブは少なくなるであろう。増幅反応において生成するアンプリコンの量を少なくすることの他の利点は、アンプリコンの検出に用いる検出装置という他の観点に関係する。ルミノメトリーなどの検出手段はしばしば直線的応答範囲をもち、これを高い信号レベルで飽和させることができるので、検出工程で発せられる信号は検出装置の直線応答範囲内に含まれる。このように、アンプリコン合成を制御しうるとは後続の検出工程に関して有益である。

【0066】

増幅反応において生成する被分析体アンプリコンの量は、増幅反応に擬似ターゲットを含有させてアンプリコン合成に対しターゲットポリヌクレオチドと競合させることにより制御できる。擬似ターゲットが存在する場合、増幅反応混合物中の反応体は被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンの両方の合成に用いられるであろう。試薬が消費されるまで増幅反応が進行し、かつ被分析体アンプリコンを犠牲にしてより多数の擬似ターゲットアンプリコンが生成すれば、増幅反応における擬似ターゲットの出発量の増加により被分析体アンプリコンの相対割合を低下させることができる。増幅反応に含有させるのに適切な擬似ターゲットレベルは、ルーティン実験程度で判定できる。

【0067】

TMA反応などのポリヌクレオチド増幅反応における被分析体アンプリコン生成を少なくするための別法は、準最適条件で反応を実施するもの、たとえばUSP 5, 705, 365および5, 710, 029に記載される方法である。この別法は、検出すべき異なる被分析体を”脱最適化”するために異なる条件を必要とするので、前記方法より望ましくないことがある。これに対し、擬似ターゲットを含有させることにより反応において生成する被分析体アンプリコン量を少なくすると、すべての反応を最適条件下で実施できる。

【0068】

このように、増幅反応に擬似ターゲットを含有させると、高レベルのターゲットとより高いレベルの擬似ターゲットを競合させることにより、定量増幅反応を”調整”する手段が得られる。

【0069】

III. 添加した擬似ターゲットの存在下での検体処理

多くの定量アッセイについて、異なる生物試料からターゲットポリヌクレオチドを均一に回収することはきわめて重要である。たとえば血漿中HIVウイルス粒子濃度を測定するためのアッセイ法は、ターゲットポリヌクレオチド回収精度が低いと、血漿中ウイルス粒子濃度の推定が不正確になりやすい。本明細書には、被分析体ポリヌクレオチドレベルの変動性に比較的耐容性である別法を記載する。

【0070】

本発明の1態様は、増幅反応において鋳型として作用するポリヌクレオチドの定量的回収を試みるのではなく、検体処理工程でのターゲットポリヌクレオチド回収の変動性を基準化する方法に関する。この方法によれば、擬似ターゲット増幅が真のターゲット増幅と競合するのに十分なほど高い場合、かつ擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドが同様な増幅効率で共増幅する場合、ターゲットポリヌクレオチド増幅生成物の最終量を容易に制御できる。この範囲で、被分析体アンプリコンの量は擬似ターゲットの装入レベルに反比例する。たとえば擬似ターゲットの装入レベルをX倍高めると、被分析体アンプリコンは $1/X$ に減少する。検体処理工程中に擬似ターゲットが存在する場合、擬似ターゲットと真の

ターゲットは同様な効率で回収される。したがって被分析体ポリヌクレオチドの回収効率がK%であれば、擬似ターゲットもK%の効率で回収される。

【0071】

他の点で等しい条件下では、反応により生成するアンプリコンの量は比較的一定である。したがって擬似ターゲットを添加すると、反応成分は非特異的アンプリコン形成から外れ、反応において生成するアンプリコンはすべて効率的に擬似ターゲットアンプリコンであるか、または被分析体ポリヌクレオチドの増幅生成物の被分析体アンプリコンであることが保証される。擬似ターゲットアンプリコンおよび被分析体アンプリコンは、増幅反応開始時の擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドの比率と等しい比率で生成する。

【0072】

被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを同時に単離し、次いで増幅反応に添加して反応体が枯渇するまで進行させると、生成する被分析体アンプリコンと擬似ターゲットアンプリコンの相対割合は生物検体から単離した試料中の被分析体と擬似ターゲットの相対割合と等しいであろう。これは、検体処理におけるポリヌクレオチド回収効率に関係なく、増幅反応で合成された被分析体アンプリコンの量は100%の被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットが検体処理工程で回収された場合に合成されたであろう量と同一であることを意味する。したがって、後続の増幅のためにポリヌクレオチドを単離する処理の時点で生物検体に擬似ターゲットを添加することにより、後続の増幅工程におけるターゲット回収効率は基準化される。

【0073】

擬似ターゲットを含有する増幅反応

後記実施例で用いたTMA反応の実施には2つの好都合な方式を採用できる。第1方式では、すべての材料がすべての時点で液体である。たとえば試薬、鋳型および酵素の溶液を反応器内で混和し、増幅を進行させる。これは、ターゲットポリヌクレオチドが精製または準精製状態で得られる場合に最も好都合である。第2方式では、TMA反応で増幅すべきポリヌクレオチド鋳型をまず固相（たとえばビーズ）上に採集し、固相と鋳型を含むこの複合体を増幅反応における他の

試薬と混和する。有用な固相には、ニトロセルロース、ナイロン、ガラス、被覆磁性粒子、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、および誘導体化したポリマー、たとえばエポキシ樹脂が含まれるが、これらに限定されない。この第2方式は、入手できる鋳型ポリヌクレオチドの量が限定される場合に特に好都合である。少量のポリヌクレオチド試料の操作をより多量の、より取扱いやすいビーズの懸濁液の操作に置き換えることが容易であるのは、当業者に自明であろう。さらに、ビーズは鋳型精製工程の1成分であってもよい。たとえばオリゴ(dT)ポリヌクレオチドを配置したビーズを細胞溶解物と混合すると、ポリ(A)⁺mRNAがビーズに固定化される。次いで、ビーズおよび固定化mRNAを含有するこの複合体を試薬および酵素と混和すると、ビーズに結合したRNAを増幅のための鋳型として用いてTMA反応を実施できる。この場合、ビーズを反応器に直接添加できる。オリゴ(dT)ポリヌクレオチドの代わりに、配列の異なるポリヌクレオチドをビーズに固定化すると、ポリヌクレオチド集合体から相補的被分析体ポリヌクレオチドまたは擬似ターゲットを捕獲するためにその異なる配列を使用できる。特定のポリヌクレオチドを固体支持体に固定化する方法は、特定のポリヌクレオチドをポリヌクレオチドの複合体混合物から単離する手段を提供できる。ポリヌクレオチドを単離するための他の方法は、標準法、たとえばフェノールとクロロホルムの混合物などの有機試薬による抽出を伴うものであり、所望によりアルコール沈殿工程を含む。

【0074】

後記実施例は、擬似ターゲットの存在により、オリゴ(dT)誘導体化磁性ビーズを含むTMA反応におけるアンプリコン生成の変動性が低下することを証明した。この変動性の低下は、増幅”精度”の向上と表現することもできる。より具体的には、後記の結果は、実質的に同一量の出発鋳型ポリヌクレオチドを用いて実施した異なる反応が試料間変動性の低下した再現性の高い結果を与える利点をもつことを証明する。

【0075】

本発明に関しては増幅ポリヌクレオチド検出のための多様な方法を採用できるが、USP 5,639,604(その開示内容を本明細書に援用する)に開示さ

れる”ハイブリダイゼーション保護アッセイ（HPA）”が特に有用な方法である。1態様においてHPA検出法は、増幅ポリヌクレオチドと化学発光性アクリジニウムエステルで標識した相補的ポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを伴う。二重らせん構造とハイブリダイズした場合、アクリジニウムエステルは緩和な加水分解条件下での分解から保護される。ハイブリダイズしていないプローブ中のアクリジニウムエステルはそのような分解を受けやすく、適宜な化学処理で選択的に分解される。分解していないアクリジニウムエステル量の測定により、相補的ポリヌクレオチドとハイブリダイズしたプローブの量が指示される。この測定工程は、過酸化水素を混合物に添加し、後続の塩基触媒—化学発光反応において発する光の量を測定することを伴う。アンプリコン合成を定量するHPA法は、除去しなければ高レベルのバックグラウンドハイブリダイゼーションを生じるハイブリダイズしていない過剰のプローブを除去するための時間のかかる冗長な工程を必要としないので、好ましい。しかしアンプリコンを検出および定量するための他の方法、たとえば放射性、蛍光性もしくは酵素標識プローブを用いる方法、または分離法を採用する他の検出法（固相支持体方式、HPLCおよび電気泳動を含むが、これらに限定されない）を本発明の実施に用いても、同様に良好な結果が得られる。実際に、アンプリコンの検出に用いる方法が下記の方法で得られる結果の質に影響を与えないとは考えられない。

【0076】

好ましい被分析体ポリヌクレオチド

本明細書に記載するように、擬似ターゲットを用いる定量法は被分析体ポリヌクレオチドの由来に関係なく増幅反応を実施するために利用である。好ましい被分析体ポリヌクレオチドには、ウイルス、細菌、真菌および原虫を含めた病原性微生物に由来する核酸が含まれる。ウイルス由来のきわめて好ましい被分析体ポリヌクレオチドの例は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1およびHIV-2）、B型肝炎ウイルス（HBV）およびC型肝炎ウイルス（HCV）である。本明細書に開示する方法で定量できる細菌、真菌および原虫に由来する好ましい被分析体ポリヌクレオチドにはリボソームRNA（rRNA）が含まれる。被分析体ポリヌクレオチド源としてきわめて好ましい細菌の例には、下記のものが含まれ

る：クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) (細胞内偏性生物であるグラム陰性菌)、カンピロバクター属 (*Campylobacter*) のメンバー (カンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*)、カンピロバクター・コリ (*C. coli*)、カンピロバクター・ラリディス (*C. lariidis*))、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*) のメンバー (エンテロコッカス・アビウム (*E. avium*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*E. casseliflavus*)、エンテロコッカス・デュランス (*E. durans*)、エンテロコッカス・フェーカリス (*E. faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・ハイレ (*E. hirae*)、エンテロコッカス・ムンチイ (*E. mundtii*)、エンテロコッカス・シュードアビウム (*E. pseudoavium*)、エンテロコッカス・マロドラタス (*E. malodoratus*) およびエンテロコッカス・ラフィノーサス (*E. raffinosus*))、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、B群ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 菌、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*M. intracellulare*)、マイコバクテリウム・ゴルドネ (*M. goodii*)、マイコバクテリウム・カンサシイ (*M. kansasii*)。被分析体ポリヌクレオチド源としてきわめて好ましい真菌の例には、下記のものが含まれる：ブラストセス・デルマチジス (*Blastomyces dermatitidis*)、カンジダ属 (*Candida*) のメンバー (カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*)、カンジダ・グラブラタ (*C. glabrata*)、カンジダ・パラプシローシス (*C. parapsilosis*)、カンジダ・ダイバーサス (*C.*

. *diversus*)、カンジダ・トロピカリス (*C. tropicalis*)、カンジダ・ギリエルモンディ (*C. guilliermondii*)、カンジダ・デュブリニエンシス (*C. dubliniensis*)、ヒストプラスマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、コクシディオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)。被分析体ポリヌクレオチド源としてきわめて好ましい原虫の例には、血液性および組織性原虫、たとえばプラスモジウム属 (*Plasmodium*) のメンバー (四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*))、ならびに消化管に感染する原虫、たとえばランブル鞭毛虫 (*Guardia lamblia*) およびクリプトスポリジウム・パルバム (*Cryptosporidium parvum*) が含まれる。

【0077】

本発明方法は、ヒト由来の核酸、たとえば癌を含めた疾病状態で過剰発現または過少発現するmRNAの定量にも利用できる。胸部腺癌および卵巣腺癌においてコピー数の増加した状態で存在する遺伝子の一例はHER-2/neu癌遺伝子であり、これは上皮成長因子受容体 (EGFR) と共通なある特色をもつチロシンキナーゼをコードする。USP4, 968, 603には、増加したHER-2/neu遺伝子またはHER-2/neu mRNAのコピー数測定が癌性疾病状態の判定のための手段として有用であると記載されている。たとえば、本明細書に記載する方法を定量核酸増幅プロトコルに利用し、これにより細胞のHER-2/neuポリヌクレオチド含量を測定することができる。

【0078】

実際に、本明細書に記載するポリヌクレオチド増幅法は多数の核酸ターゲットに広範囲に適用でき、被験試料中のいずれか任意の被分析体ポリヌクレオチドの増幅方法にまで容易に拡張される。

【0079】

本明細書に記載するものと類似または均等な他の材料および方法を本発明方法の実施または試験に使用できるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。

種々の核酸の操作および処理を実施するために使用できる方法についての全般的参考は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら編, Cold Spring Harbor Lab社, 1989) および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) 中にみられる。TMA反応を実施するための方法は、USP 5, 399, 491に開示されている。TMA反応プロトコルの改善、たとえばUSP 5, 786, 183に開示されている方法は、本発明の目的に関して転写仲介増幅の範囲に含まれる。アクリジニウムエステル標識プローブの調製および使用のための方法は、ArnoldによりUSP 5, 639, 604に挙げられている。これら3特許の開示内容を本明細書に援用する。本発明に至った実験および結果について以下に記載する。

【0080】

実施例1には、擬似ターゲットを含有するポリヌクレオチド増幅反応がアンプリコン生成の変動性を低下させることを証明した方法を記載する。

実施例1

擬似ターゲットアンプリコンはTMAにおいて生成するアンプリコン量の変動性を低下させる

HIV pol 転写体のセグメントに特異的なプライマーを用いて、一連のTMA反応物を調製した。すべての反応を8回反復実施した。各反応に、10mMのHEPES (pH7.5) および1mMのEDTAよりなる検体緩衝液中に希釈した、完全HIVゲノムのRNA転写体60コピーを含有する50 μ lを装入した。プラスミドBH10を鋳型として用いてRNA転写体を合成した。この操作では、このBH10 RNAを被分析体ポリヌクレオチドの一例として用いた。BH10 RNAのポリヌクレオチド配列は配列番号: 3の配列により示される。反応には、反応番号: 4のIAC-Asc r 擬似ターゲットRNA 0、10⁵、10⁶または10⁷コピーをも含有させた。これに下記のものを含む増幅試薬25 μ lを添加した:

下記配列のT7A(一)4190プライマー10pmol:

【0081】

【化1】

AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA

【0082】

(配列番号:1);

下記配列の同(+)4108プライマー10pmol:

【0083】

【化2】

ACAGCAGTACAAATGGCAG

【0084】

(配列番号:2);

160mMのトリス緩衝液(pH7.5);各16mMのATP、CTP、GTPおよびUTP;各4mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP;10mMのMgCl₂;70mMのKCl;20%のグリセロール;0.6mMの酢酸亜鉛;ならびに20%ポリビニルピロリドン。次いで試料に200μlの鉱油を積層し、まず65℃で10分間インキュベートしてプライマーターゲットをアニーリングさせ、次いで42℃で5分間インキュベートした。次いで各反応に下記のものを含む25μlアリコートの酵素混合物を添加した:2,000GP単位のMMLV逆転写酵素;2,000GP単位のT7RNAポリメラーゼ;140mMのトリス緩衝液(pH8.0);100mMのN-アセチルシステイン(還元剤);20%のグリセロール;70mMのKCl;70mMのトレハロース;8mMのHEPES;1.04mMのEDTA;10%のTRITON X-102および0.01%のフェノールレッド。1GP単位の逆転写酵素は、RNA鋳型から37℃、15分で5.75fmolのcDNAを合成する酵素量に相当する。1GP単位のRNAポリメラーゼは、プロモーター配列を含

む二本鎖DNA鋳型から37℃、20分で5 fmolのRNA転写体を合成する酵素量と定義される。反応物を42℃でさらに60分間インキュベートした。次いで100 μlの反応混合物試料を、等容量のHIV特異的AE (+) 4134プローブと混和した。このプローブは標識としてのアクリジニウムエステル部分を保有し、下記の配列をもつ：

【0085】

【化3】

CCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG

【0086】

(配列番号：5)。

この標識ポリヌクレオチドプローブは、本質的にUSP 5, 639, 604に開示される方法に従って調製および使用され、100mMのコハク酸リチウム緩衝液(pH4.7)、2%(w/v)のラウリル硫酸リチウム、1.2Mの塩化リチウム、15mMのアドリチオール-2 (adri-thiol-2)、20mMのEDTA、20mMのEGTAおよび3%のエタノールを含有する溶液に分散された。ハイブリダイゼーション反応を促進するイオン強度は実質的にすべて、最終ハイブリダイゼーション溶液中の600mMの塩化リチウム成分および1%のラウリル硫酸リチウム成分により供給された。重要なことは、AE (+) 4134プローブの配列は相補的塩基対合により被分析体アンプリコンとのみハイブリダイズでき、擬似ターゲットアンプリコンとはハイブリダイズできないことである。混合物を60℃で15分間ハイブリダイズした後、600mMのホウ酸ナトリウム(pH8.5)および1%のTRITON X-100を含有する選択試薬300 μlを添加し、混合物を60℃でインキュベートして、ハイブリダイズしていないプローブを不活性化した。最後に、混合物を室温に冷却し、ルミノメーターに装入し、化学発光反応で発せられた光を測定することにより(RLUで)被分析体アンプリコンを定量した。検出試薬Iは、0.001N硝酸中に過酸化水素溶液を含有していた。検出試薬IIは、1N NaOH溶液を含有していた。発光を促進するために、各反応試験管にまず検出試薬I、次いで検出

試薬 I I を注入した。被分析体アンプリコンの検出および定量に用いたプローブは下記のものであった：擬似ターゲットを装入していない反応は 100 fmol の標識 A E (+) 4 1 3 4 プローブ（配列番号：5）および 3.9 pmol の非標識 2'-メトキシリボヌクレオチド (2' OMe) (+) 4 1 3 4 を用いて調べられた； 10^5 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 fmol の標識プローブおよび 3.9 pmol の非標識 2' OMe (+) 4 1 3 4 を用いて調べられた； 10^6 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 fmol の標識プローブおよび 0.2 pmol の非標識 2' OMe (+) 4 1 3 4 を用いて調べられた； 10^7 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 fmol の標識プローブのみを用いて調べられた。2' OMe は RNA 中のリボースの 2' 位のヒドロキシ部分をメトキシ部分で置換したものである。(+) 4 1 3 4 ポリヌクレオチドは A E (+) 4 1 3 4 ポリヌクレオチドと同一塩基配列をもつが、N-アクリジニウムエステル標識をもたないことを留意すべきである。直線的検出範囲でルミノメトリーの読みを容易にするために、異なるプローブ比活性を用いた。

【0087】

表 1 に提示する結果は、擬似ターゲットを含有する増幅反応が試料コレクション間の変動性が低い、より均一な結果を与えるという利点をもつことを示す。表 1 には、各反応に含有されていた I A C - A s c r 擬似ターゲットおよび B H 1 0 RNA 被分析体ポリヌクレオチドのコピー数を示す。反応からの発光を表す粗データ (R L U で)、および陰性対照反応において測定したバックグラウンド発光を差し引いて補正した正味発光をも示す。" 均一比活性に補正 " と表示した欄は、すべての H P A アッセイが同一比活性のプローブを用いて実施された場合に得られるであろう正味 R L U 値を示す。異なる反応を直接比較できるように、この数値を分析に含めた。一定の反応条件についてのすべての測定値の正味平均値も、標準偏差 (S D) および変動係数 (C V %) の計算値と共に示す。この表の最後の欄は、C V % 値が反応中における擬似ターゲットのコピー数増加と共に低下したことを示す。この結果は、異なる反応において生成したアンプリコン量の変動性が擬似ターゲット量の増加に伴って低下したことを定量的に示す。

【0088】

【表1】

表 1
可溶性ポリヌクレオチドを用いる疑似ターゲット増幅および
被分析体アンプリコン合成（純系）

IAC-Ascr (コピー)	BH10 RNA	RLUs	正味 RLUs	均一比活性 に補正	正味平均	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	60	60758	55366	2214640	2340305	1465936	62.6
		100316	94924	3796960			
		116898	111506	4460240			
		80682	73500	3012000			
		78084	72692	2907680			
		31443	26051	1042040			
		29419	24027	961080			
		13587	8195	327800			
	無し	5392	0	0	0		
1.0×10^5	60	85700	78257	3130280	3029790	1891104	62.4
		64487	57044	2281760			
		54852	47409	1896360			
		41357	33914	1356560			
		51353	43910	1756400			
		93974	86531	3461240			
		190926	183483	7339320			
		82853	75410	3016400			
	無し	7443	0	0	0		
1.0×10^6	60	580816	572789	1718367	1036444	323123	31.2
		401651	393624	1180872			
		302690	294663	883989			
		222165	214138	642414			
		275810	267783	803349			
		322421	314394	943182			
		349792	341765	1025295			
		372722	364695	1094085			
	無し	8027	0	0	0		
1.0×10^7	60	155174	146863	146863	134795	30825	22.9
		138647	130336	130336			
		102893	94582	94582			
		157291	148980	148980			
		166824	158513	158513			
		149727	141416	141416			
		181812	173501	173501			
		92482	84171	84171			
	無し	8311	0	0	0		

【0089】

実施例2には、アンプリコン生成の精度の向上が疑似ターゲットを含有する反応の一般的特色であることを証明するために用いた方法を記載する。より具体的

には、下記の操作により I A C - B s c r と呼ばれる第 2 例の擬似ターゲットも TMA 反応の一例においてアンプリコン生成の変動性を低下させた。

【0090】

実施例 2

TMA による被分析体アンプリコン生成の変動性低下は擬似ターゲットを含有する反応の一般的特色である

検体緩衝液（1 mM の E D T A、10 mM の H E P E S）中に希釈した 60 分子の B H 10 RNA を含有する 30 μ l を、一連の反応試験管に添加した。検体緩衝液中に 0、 10^5 、 10^6 、 10^7 または 10^6 の I A C - B s c r 擬似ターゲット RNA 分子（配列番号：9）を含有する 20 μ l を適宜な試験管に添加した。ボルテックス攪拌後、各試験管に実施例 1 に記載した増幅試薬 25 μ l アリコートを入れた。ただし T 7 A（-）4190 および（+）4108 プライマーを 10 p m o l ではなく、それぞれ 5 p m o l の濃度で用いた。次いで、蒸発を防ぐために 200 μ l の油を各試験管の液体内容物に積層した。試験管を 65 $^{\circ}$ C で 10 分間、次いで 42 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。次いで各試験管に実施例 1 に記載した酵素試薬 25 μ l アリコートを添加した。すべての試験管の内容物を混合し、反応物を 42 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応期間が終了した時点ですべての試料を標準 H P A により分析した。したがって、100 μ l の標識 2'-メトキシ A E（+）4134 プロブ溶液を各試験管に添加した。異なる量の I A C - B s c r 擬似ターゲットを用いて試料中に生成した被分析体アンプリコンの検出のために、異なる比活性のプロブを用いた。これにより、検出操作における発光の読みが、被分析体アンプリコンの定量に用いたルミノメーターの直線範囲に確実に入るようにした。被分析体アンプリコンの検出および定量に用いたプロブは下記のものであった：擬似ターゲットを装入していない反応は 100 f m o l の標識 2'-OMe（+）4134 および 20.0 p m o l の非標識プロブを用いて調べられた； 10^5 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 f m o l の標識プロブおよび 3.0 p m o l の非標識プロブを用いて調べられた； 10^6 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 f m o l の標識プロブおよび 0.4 p m o l の非標識プロブを用いて調べられた

； 10^7 または 10^8 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は 100 fmol の標識プローブのみを用いて調べられた。増幅生成物とプローブの混合物を 60°C で15分間インキュベートし、選択試薬 $300\text{ }\mu\text{l}$ と混合し、次いで 60°C でさらに10分間インキュベートした。混合物を室温に冷却し、検出試薬IおよびIIを添加した後、化学発光を読み取った。

【0091】

表2に示す結果から、擬似ターゲットを含有する増幅反応は試料の読みのコレクション間で変動性が少なく、より均一な量の被分析体アンプリコンを有利に生成することが確認された。表2には、各レベルの装入擬似ターゲットについて実施した8回の反復増幅反応それぞれに含有されていたIAC-Bscr擬似ターゲットおよびBH10 RNA被分析体ポリヌクレオチドのコピー数を示す。すべてのHPA反応からの平均正味発光の読みを表す結果も示される。擬似ターゲットを含有するがモデル被分析体ポリヌクレオチドを含有しない反応について測定したバックグラウンド発光値を差し引いて、正味結果を求めた。プローブとハイブリダイズした異なるHPA反応の生成物を異なる比活性のプローブと直接比較できるように、各反応条件について生成した被分析体アンプリコンの平均量（”アンプリコン”）を示した。その反応条件についてのすべてのルミノメトリー測定値について計算した標準偏差（SD）および変動係数（CV%）の値も示す。この結果から、擬似ターゲットを含有する反応において合成された被分析体アンプリコンの量は擬似ターゲットを含有しない反応の場合より高い精度で生成したことが確認された。より具体的には、 1×10^5 を超える擬似ターゲット分子を用いて実施した反応では、擬似ターゲットの不存在下で実施した反応から得られたデータセットについて得たCV%値より低いCV%値が得られた。実際に、本発明のデータセットでは少なくとも 10^6 分子の擬似ターゲットを用いて実施した反応についての統計的”p”値は0.05未満であった。これにより、擬似ターゲットが存在する場合は異なる反応において生成するアンプリコン量の変動性が低下することが定量的に確認された。

【0092】

【表2】

表 2
疑似ターゲット増幅および被分析体アンプリコン合成

IAC-Bscr (コピー)	BH10 RNA (コピー)	正味平均 (RLU)	アンプリコン (pmols)	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	60	165085	1.84	103009	62.4
1×10^5	60	193642	0.29	134671	69.5
1×10^6	60	164908	0.039	46096	28.0
1×10^7	60	96749	0.0029	30116	31.1
1×10^8	60	10199	0.0003	2475	24.3

【0093】

実施例3には、誘導体化した磁性ビーズの存在下でも増幅精度が向上するかを調べるために用いた方法を記載する。この方法では、合成”ターゲット捕獲用ポリヌクレオチド”を含有する検体の標準処理方法に従ってビーズを処理した。

【0094】

実施例3

処理した磁性ビーズの存在下で実施した反応について改善されたアンプリコン合成の精度

100 μ lのターゲット捕獲試薬を等容量のHIV血清陰性血漿と混和した。ターゲット捕獲試薬は下記のものを含んでいた：17%のラウリル硫酸リチウム；190mMのコハク酸；250mMの水酸化リチウム；3mMのEDTA；3mMのEGTA；下記配列のデオキシ（-）3737捕獲プローブ3.5nM：

【0095】

【化4】

CCCTGTTTCTGCTGGAATAACTTCTGCTTCTATATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

【0096】

（配列番号：6）；

および下記配列の2'-メトキシ（-）4258 A30捕獲プローブ3.5n

M:

【0097】

【化5】

TCTGCTGTCCCTGTAATAAACCCGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

【0098】

(配列番号: 7)。

混合物を60℃で20分間インキュベートし、次いでオリゴ(dT) (Novagen; ワイオミング州マディソン) で誘導体化した磁性ビーズ120μgを含有するビーズ懸濁液20μlと混和した。次いで反応物を15分かけて室温に冷却し、捕獲プローブと固定化オリゴ(dT)をハイブリダイズさせた。磁性ホルダー内に15分間配置することによりビーズを容器側壁に集め、上清を吸引した。洗浄液1mlアリコートを用いてビーズを3回洗浄し、実施例1に記載したTMA反応に用いた。ただし100コピーのBH10 RNA、および0、10³、10⁴または10⁵コピーのIAC-Asc r擬似ターゲットを用いた。100 fmolの標識AE (+) 4134プローブおよび200 fmolの非標識 (+) 4134を用いて、前記方法に従ってHPAを実施した。

【0099】

表3に示した結果から、擬似ターゲットを含有する増幅反応はより均一な被分析体アンプリコンを生成する利点をもつことが確認された。より具体的には、各レベルの装入擬似ターゲットについて実施した8回の反復増幅反応に基づくこれらの結果からも、擬似ターゲットの存在量を漸増させて実施した試験についてCV%が低下したことを示した。明らかに、10⁴コピーより高いレベルの擬似ターゲットが被分析体アンプリコン合成の精度を統計的に有意に改善した。

【0100】

【表3】

表 3
誘導体化磁性ビーズの存在下での疑似ターゲット増幅
および被分析体アンプリコン合成

IAC-Ascr (コピー)	BH10 RNA (コピー)	正味平均 (RLU)	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	100	97105	37798	39.0
1.0×10^3	100	152313	38630	25.4
1.0×10^4	100	155062	67377	43.5
1.0×10^5	100	12385	19655	15.9

【0101】

下記の実施例に示す結果から、疑似ターゲットを含有し、固定化支持体に捕獲した被分析体ポリヌクレオチドを用いたTMA反応が、増幅反応で合成した被分析体アンプリコンの量に関して精度の向上を示したことが確認された。実施例3に記載した方法は固相捕獲基質の存在がTMA反応に不都合な影響を与えないことを証明するが、下記の方法は本発明に従って診断検査を実施する様式とさらに密接に関連する。より具体的には、下記の実施例に用いた方法では捕獲されたHIV RNAを増幅鋳型として使用した。増幅精度を個別に試験しうるように、これらの方法におけるターゲット回収率の不一致により生じる変動性を基準化した。より具体的には、標準的な検体処理プロトコルに従ってHIV RNAをまず磁性ビーズ上に採取し、次いでプールし、そしてすべての増幅反応を等量のHIV RNAにより開始できるように個々の試験管に再分配し、ただし異なる量の疑似ターゲットを用いた。

【0102】

実施例4には、疑似ターゲットおよび固体支持体に捕獲した被分析体ポリヌクレオチド鋳型を用いて実施したTMA反応が増幅反応におけるアンプリコン生成の精度を向上させることを証明するために用いた方法を記載する。

【0103】

実施例4

疑似ターゲットは捕獲された被分析体ポリヌクレオチドを鋳型として用いる増幅反応の精度を向上させる

血清陰性血漿中に希釈したターゲット捕獲試薬およびHIVウイルス粒子の懸濁液100 μ lアリコート（0または200コピー当量のHIV RNAを血漿100 μ l中に含有）を、個々の試験管内で混和した。ターゲット捕獲試薬は下記の試薬を記載濃度で含有していた：3mMのEDTA二ナトリウム；3mMのEGTA；17%のラウリル硫酸リチウム；190mMのコハク酸（最終pH5.1に調整）；250mMの水酸化リチウム；3.5nMのデオキシHIV（-）3837（配列番号：6）；および3.5nMの2'-メトキシHIV（-）4258 A30（配列番号：7）。試料を60℃で20分間インキュベートしてウイルス粒子からHIV RNAを遊離させ、すべてのポリヌクレオチドを変性させ、捕獲プローブをターゲットpol配列とハイブリダイズさせた。次いでオリゴ（dT）で誘導体化したビーズ120 μ gを含有するオリゴ（dT）ビーズ懸濁液20 μ lアリコートを各反応試験管に添加した。十分に混合した後、試料を15分かけて室温に冷却し、捕獲プローブのオリゴ（dA）テイルとビーズ固定化オリゴ（dT）をハイブリダイズさせた。これにより被分析体ポリヌクレオチドは架橋性ポリヌクレオチドにより磁性ビーズに結合した。試験管を磁性ラックに5分間乗せてビーズを各試験管の内面に集めることにより、ビーズおよびそれに固定化されたポリヌクレオチドを血漿および遊離ポリヌクレオチドから単離した。上清を吸引し、単離したビーズを1mlアリコートの洗浄試薬（0.1%のSDS、10mMのHEPES（pH7.5）、150mMのNaCl）で3回洗浄し、各工程間でビーズを磁気単離した。次いでビーズを40 μ lの検体緩衝液（1mMのEDTA、10mMのHEPES）と混和し、混合し、プールした。次いで、プールしたビーズ懸濁液40 μ lアリコートを、すべての試料が実質的に等量のビーズ捕獲被分析体ポリヌクレオチドを含有するように、新たな反応試験管に分配した。検体緩衝液（1mMのEDTA、10mMのHEPES）に希釈した10 μ lアリコートの擬似ターゲットを適宜な試験管に分配した。各アリコートは0、 2×10^6 、 2×10^7 または 2×10^8 分子のIAC-Asc rまたはIAC-Bsc r擬似ターゲットRNAを含有していた。前記実施例2の記載に従ってTMA増幅反応を実施した。”付加物促進型加水分解”（APH）と呼ばれるHPA法の変法を用いて被分析体アンプリコンを検出した。増幅

反応後、各試験管に100 μ l アリコートのアクリジニウム標識 2' OMe (+) 4134 プローブを装入した。異なる量の擬似ターゲット (IAC-Ascr または IAC-Bscr) を用いて実施した増幅反応がルミノメトリーについて直線応答範囲に入る読みを与えるように、異なる比活性をもつプローブをこの操作に用いた。これらの異なる比活性は、標識プローブと非標識プローブの混合により達成された。被分析体アンプリコンの検出および定量に用いたプローブは下記のものであった：擬似ターゲットを装入していない反応は1.0 pmol の標識 2' OMe (+) 4134 および100.0 pmol の非標識プローブを用いて調べられた； 10^6 、 10^7 または 10^8 コピーの擬似ターゲットを含有する反応は1.0 pmol の標識プローブおよび1.0 pmol の非標識プローブを用いて調べられた。反応物を60℃で15分間インキュベートし、メタ亜ヒ酸ナトリウムを含有する選択試薬300 μ l と混合し、60℃で20分間インキュベートした。混合物を室温に冷却し、検出試薬 I および II を添加した後、化学発光を読み取った。

【0104】

表4および5の結果から、擬似ターゲットを含有する増幅反応は試料の読みのコレクション間で変動性が少なく、より均一な量の被分析体アンプリコンを生成する利点をもつことが確認された。これらの表は、0または200 RNA当量のHIVウイルス粒子(株HIV IIB)を被分析体ポリヌクレオチドとして用い、7中1の擬似ターゲット条件で各反応を開始したことを示す。第1条件は、擬似ターゲットの不存在下で反応を実施した陰性対照である。残りの条件は、IAC-Ascr (表4) または IAC-Bscr (表5) 擬似ターゲットを3種類の量のいずれかで用いた。両表にまとめたデータは、各レベルの装入擬似ターゲットについて8回の反復実験結果を示す。擬似ターゲットを含有するがモデル被分析体ポリヌクレオチドを含有しない反応において生じたバックグラウンド発光値を差し引いて、正味結果を求めた。予想どおり、これらの結果は反応中の擬似ターゲット数が増加するのに伴って反応において生成するアンプリコン量が減少することを明らかに示した。擬似ターゲットを含有するすべての増幅反応において、より均一な量の被分析体アンプリコンが生成した。より具体的には、

擬似ターゲットの不存在下で実施した陰性対照と比較して、擬似ターゲットを含有する反応から得られたすべてのデータセットにおいてCV%値が低かった。これらの結果は、反応に擬似ターゲットを含有させることにより、増幅反応において生成する被分析体アンプリコン量の精度を向上させることができるという結論を支持した。2種類の異なる擬似ターゲットが同様に良好な結果を与えたという結果は、精度の向上が特定の配列の擬似ターゲットによるものではないことを示した。これらの結果からさらに、固体支持体（たとえば磁性ビーズ）に捕獲した被分析体ポリヌクレオチドを増幅反応の鋳型として用いる反応に擬似ターゲットを含有させることにより、増幅反応において生成する被分析体アンプリコン量の精度を向上させることが示された。

【0105】

【表4】

表 4
各種の擬似ターゲットによる被分析体アンプリコン生成の精度向上

IAC-Ascr 擬似ターゲット (コピー)	HIV ウイルス粒子 (コピー)	正味平均 (RLU)	アンプリコン (pmol)	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	200	69858	0.95	57195	81.9
2×10^6	200	166824	0.03	62799	37.6
2×10^7	200	26733	0.0041	13616	50.9
2×10^8	200	3043	0.0005	585	19.2

【0106】

【表5】

表 5
各種の擬似ターゲットによる被分析体アンプリコン生成の精度向上

IAC-Bscr 擬似ターゲット (コピー)	HIV ウイルス粒子 (コピー)	正味平均 (RLU)	アンプリコン (pmol)	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	200	69858	0.95	57195	81.9
2×10^6	200	109125	0.0166	37519	34.4
2×10^7	200	14904	0.0023	10669	71.6
2×10^8	200	1492	0.0002	697	46.8

【0107】

増幅反応を擬似ターゲットの存在下で実施することのさらに他の利点は、装入する被分析体ポリヌクレオチドが生物試料から定量的収率未満で回収された場合に、生成アンプリコン量を基準化することに関連する。図5に示すこの利点の原理は、前記に述べた。下記実施例は、生物試料からの被分析体ポリヌクレオチド回収量が実質的に異なる状態をモデル化するために採用された。より具体的には、試験した条件は回収率100%から25%までに相当した。被分析体ポリヌクレオチド回収効率のこのような差は、フェノール抽出法、エタノール沈殿法、検体採集の難易度もしくは抽出条件、または実験中のこぼれによる試料損失による回収率変動などの理由で生じうる。それぞれの場合、被分析体ポリヌクレオチドの回収量は定量的収率より低い。

【0108】

下記のように、3種類の異なる条件下で増幅反応を実施することにより、被分析体ポリヌクレオチド回収効率の変動性をモデル化した。第1条件下では、3種類の異なる量の装入被分析体ポリヌクレオチドを用い、擬似ターゲットを用いずに反応を実施した。第2条件は、同じく3種類の異なる量の装入被分析体ポリヌクレオチドおよび一定量の擬似ターゲットを用いて反応を実施した。最後に、第3の反応条件では、同じく3種類の異なる量の装入被分析体ポリヌクレオチドを用い、その際、被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットの量の比率が一定であった。この第3条件が、被分析体を含有する生物試料に、試料から核酸を単離する前の時点で擬似ターゲットを添加した際に得られる例を表すことは明らかであろう。この状態で、処理工程中の試料の一部が失われると被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットの両方が等しい%で失われ、これら2種の比率は一定のままである。下記の結果から明らかなように、一定比率の擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを含有する増幅反応では被分析体アンプリコンの合成が向上する。したがって、被分析体ポリヌクレオチドの装入数が限られている反応ですら、鑄型の出発数がより多いかのような挙動を示す。

【0109】

下記の実施例で得られた結果は、核酸の単離前の検体に擬似ターゲットを添加することを含む改良された生物検体処理方法の原理を示す。増幅反応において生

成する被分析体アンプリコンレベルを基準化する1方法は、まず生物検体に擬似ターゲットを添加し、次いで検体からポリヌクレオチドを単離した後、こうして単離したポリヌクレオチドを用いて増幅反応を実施することを伴う。

【0110】

実施例5には、異なる量の被分析体ポリヌクレオチドを用いて開始する増幅反応を示すために採用した方法を記載する。より具体的には、被分析体ポリヌクレオチドが”100%”、“50%”および”25%”の値となるように反応を実施した。

【0111】

実施例5

異なる量の被分析体ポリヌクレオチドを用いて開始した増幅反応におけるアンプリコン合成の基準化

実施例1の方法に従い、下記の点を変更して増幅反応物を調製した。第1に、8回ではなく10回の反復試験反応物を調製した。第2に、反応に用いたプライマー量を各10 pmolではなく各5 pmolに減らした。第3に、20%ポリビニルピロリドンの代わりに10%トレハロースを用いた。第4に、被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットの量は表6に示すとおりであった。本発明方法においては、この表に示すポリヌクレオチド混合物をまず混和し、次いで反応混合物中の他の試薬と混合し、最後に2種類のポリメラーゼ酵素と混合してTMA反応を開始した。

【0112】

【表6】

表 6
被分析体ポリヌクレオチドと疑似ターゲットの混合物

条件	BH10 RNA (コピー)	IAC-Ascr (コピー)
疑似ターゲット 無し	500	0
	1000	0
	2000	0
一定の 疑似ターゲット	500	6×10^6
	1000	6×10^6
	2000	6×10^6
一定比率の 疑似ターゲットと 被分析体ポリヌクレオチド	500	1.5×10^6
	1000	3.0×10^6
	2000	6.0×10^6

【0113】

増幅反応が終了した時点で、すべての反応混合物を前記実施例4に記載したA PHプロトコルに従って検査し、被分析体アンプリコンを検出および定量した。異なる量の疑似ターゲット（IAC-AscrまたはIAC-Bscr）を用いて実施した増幅反応がルミノメトリーについて直線応答範囲に入る読みを与えるように、異なる比活性をもつAE標識した配列CCACAATTTTAAAAGAAAAGGG（配列番号：8）のHIV（+）4134プローブをこの操作に用いた。この場合もこれらの異なる比活性は、異なる量の標識プローブと非標識プローブの混合により達成された。被分析体アンプリコンの検出および定量に用いたプローブは下記のものであった：疑似ターゲットを装入していない反応は1.3 pmolの標識プローブおよび400 pmolの非標識プローブを用いて調べられた； 1.5×10^6 、 3×10^6 または 6×10^6 コピーの疑似ターゲットを含有する反応は1.3 pmolの標識プローブおよび8.7 pmolの非標識プローブを用いて調べられた。

【0114】

表7～9および図6に示す定量結果は、疑似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドの比率を一定に維持した反応では、異なる装入量の被分析体ポリヌクレオ

チドから合成した被分析体アンプリコンの量の差が実質的に小さかったことを明らかに示す。結果はすべて、各装入レベルの被分析体ポリヌクレオチド鑄型について10回の反復実験に基づいた。図6に、100%の装入被分析体ポリヌクレオチドを2000コピーのBH10 RNAにより表す。擬似ターゲットの不存在下では、被分析体ポリヌクレオチド装入レベルの低下に伴う被分析体アンプリコン量を表す直線の傾きは、これらの鑄型数が2000から500に低下するのに伴って急激に下降している。一定レベルの擬似ターゲットを含有する実験においても同様な結果が得られた。したがって、低い装入レベルの被分析体ポリヌクレオチドを含む試料に擬似ターゲットを添加するだけの方法は、合成される被分析体アンプリコン量の増加に実質的に影響を与えなかった。しかし一定モル比の擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを用いて実施した増幅反応では、異なる装入量の被分析体ポリヌクレオチドから合成された被分析体アンプリコン量の差が小さかった。たとえばこの図に示す結果は、500コピーの装入BH10

RNAでは被分析体アンプリコンの収率（RLUで測定）が2000コピーの鑄型を用いて得た数値の約68%であり、一方、擬似ターゲットの不存在下、または擬似ターゲットを一定に維持した場合に得られた対応する結果は約22%であったことを示す。一定比率の擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチドを用いて増幅反応を実施すると、増幅反応で合成される被分析体アンプリコンの量が基準化される傾向を示した。この比率は、装入レベルおよび目的とする定量精度に応じて若干変更することもできる。磁性ビーズおよび捕獲試薬の存在下で反応を実施した場合も、実施例3および4に記載するように明らかに実質的に類似の結果が得られた。さらに表7～9に示すデータは、増幅反応に擬似ターゲットを含有させることにより増幅反応の精度が向上したことを示す。

【0115】

【表7】

表 7
疑似ターゲットの不存在下で実施したTMA反応

BH10 RNA (コピー)	正味平均 (RLU)	% 2000	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	0	0	N/A	N/A
500	35279	22.4	10033	28.4
1000	70202	44.7	36070	51.4
2000	157176	100	26792	17.0

【0116】

【表8】

表 8
一定の疑似ターゲットレベルをもつTMA反応

BH10 RNA (コピー)	正味平均 (RLU)	% 2000	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	0	0	N/A	N/A
500	96434	22.2	23442	24.3
1000	224493	51.6	49903	22.2
2000	434899	100	30382	7.0

【0117】

【表9】

表 9
一定比率の被分析体ポリヌクレオチドと疑似ターゲットをもつTMA反応

BH10 RNA (コピー)	正味平均 (RLU)	% 2000	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV%)
無し	0	0	N/A	N/A
500	294660	67.8	43197	14.7
1000	340594	78.3	72128	21.2
2000	434899	100	30382	7.0

【0118】

下記の実施例は、増幅反応への擬似ターゲットの装入により反応において生成するアンプリコンの量を制御できることを示すために実施した実験を記載する。前記のように、反応において生成するアンプリコンの量を減らすことにより下記の利点を得られる：（１）陽性キャリーオーバー汚染の可能性が少なくなる；（２）標識プローブをより効率的に使用できる；（３）ルミノメーターなどの検出装置の直線範囲内に入るように信号強度を”調整”するために利用できる。この第２点に関して、反応において生成する生成物アンプリコン数の減少により、プローブ過剰となるのに十分な量のきわめて高い比活性のプローブの使用が可能になる。ハイブリダイゼーションプローブの比活性がプローブ分子当たりの検出可能な標識量を表すことは、当業者に自明であろう。高比活性プローブは、少量の相補的ポリヌクレオチドを検出するために有用である。プローブの調製に経費がかかる場合、あるいは特殊な取扱いおよび廃棄対策を必要とする放射性標識で標識する場合、プローブ過剰条件で定量ハイブリダイゼーションを実施する必要がある高比活性プローブを多量に使用するの望ましくない。したがって、増幅反応において生成する被分析体アンプリコンの量を減らすと、アンプリコン検出に使用するプローブを効率的に利用できる利点がある。

【0119】

実施例６には、増幅反応において生成する被分析体アンプリコン量の制御に擬似ターゲットを使用できることを示すために用いた方法を記載する。

実施例６

被分析体アンプリコンの生成を制御するための擬似ターゲットの使用

100 μ l のターゲット捕獲試薬（17%のラウリル硫酸リチウム；190mMのコハク酸；250mMの水酸化リチウム；3mMのEDTA；3mMのEGTA；3.5nMの2'-メトキシ（-）3837捕獲プローブ（配列番号：6）；および3.5nMの2'-メトキシ（-）4258 A30捕獲プローブ（配列番号：7））を、HIV血清陰性血漿中に希釈したHIVウイルス粒子100 μ l と混和した。試料はHIV RNA 0；200；2,000；20,000；200,000；2,000,000 RNA当量／血漿mlを含有していた。混合物を60℃で20分間インキュベートして、捕獲プローブをターゲッ

トポリヌクレオチド中に存在する p o l 遺伝子配列とハイブリダイズさせ、次いで 20 μ l のオリゴ (d T) ビーズ懸濁液 (オリゴ (d T) ビーズ 120 μ g / 20 μ l) と混和した。十分に混合した後、試料を 15 分かけて室温に冷却し、捕獲プローブのオリゴ (d A) とビーズ固定化オリゴ (d T) をハイブリダイズさせた。これにより p o l 遺伝子配列と磁性ビーズが結合した。磁性ラックによりビーズを試験管の側面に集め、上清を吸引した。ビーズを容量 1 m l の洗浄試薬 (0.1% の S D S ; 10 m M の H E P E S (p H 7.5) ; 150 m M の N a C l) で 3 回洗浄した。擬似ターゲットを添加しなかった試験管に、50 μ l アリコートの検体緩衝液 (10 m M の H E P E S ; 1 m M の E D T A) を添加した。擬似ターゲットを添加した試験管には、検体緩衝液中に希釈した擬似ターゲット 50 μ l アリコートを添加した。混合後、各試料に下記のものを含有する増幅試薬 25 μ l アリコートを添加した：5 p m o l の T 7 A (－) 4190 プライマー；5 p m o l の同 (+) 4108 プライマー；160 m M のトリス緩衝液 (p H 7.5) ；各 16 m M の A T P、C T P、G T P および U T P ；各 4 m M の d A T P、d C T P、d G T P および d T T P ；100 m M の M g C l₂ ；70 m M の K C l ；20% のグリセロール；0.6 m M の酢酸亜鉛；ならびに 10% のトレハロース。試料に 200 μ l の鉱油を積層し、次いで 42℃で 10 分間インキュベートした。下記のものを含有する 25 μ l アリコートの酵素試薬を添加して増幅反応を開始した：2000 G P 単位の M M L V 逆転写酵素；2000 G P 単位の T 7 RNA ポリメラーゼ；140 m M のトリス緩衝液 (p H 8.0) ；100 m M の N-アセチルシステイン (還元剤) ；20% のグリセロール；70 m M の K C l ；80 m M のトレハロース；8 m M の H E P E S ；1.04 m M の E D T A ；10% の T R I T O N X-102 および 0.01% のフェノールレッド。すべての反応体を混合し、42℃で 1 時間インキュベートした。

【0120】

反応期間が終了した時点で、前記 A P H 法により被分析体アンプリコンを定量した。100 μ l アリコートのアクリジニウム標識プローブ A E (+) 4134 b を各試料に添加した。擬似ターゲットを含有する反応に相当する試料に 1.3 p m o l の標識プローブおよび 38.7 p m o l の非標識プローブを添加し、一

方、擬似ターゲットを含有しない反応に相当する試料には1.3 pmolの標識プローブおよび400 pmolの非標識プローブを添加した。混合物を60℃で15分間インキュベートし、次いでメタ亜ヒ酸ナトリウムを含有するAPH選択試薬300 μlと混合した。反応混合物を60℃で20分間インキュベートし、次いで室温に冷却した。検出試薬IおよびIIを添加した後、化学発光を読み取った。

【0121】

本発明の実験に用いたルミノメーターの直線検出範囲内に入る結果を与える条件を確認するために、ある範囲の比活性を用いてルーティンAPH操作を実施する予備実験を行った。信号強度と信号発生物質量が直線関係または指数関係にある範囲をもつ検出装置はルミノメーターまたはX線フィルムなど多数あることは、当業者に自明であろう。この範囲より上では、この対応性が維持されない。したがって、そのような直線範囲を判定することは当業者が容易になしうる。

【0122】

本発明方法で被分析体アンプリコンの検出に用いたプローブ混合物は下記のものであった：擬似ターゲットの不存在下で実施する反応については1.3 pmolの標識プローブおよび400 pmolの非標識プローブからなる401.3 pmolのプローブ；擬似ターゲットを含有する反応については1.3 pmolの標識プローブおよび38.7 pmolの非標識プローブからなる40 pmolのプローブ。アッセイ結果を基準化するために、光強度の読み（RLUで測定）を、平均正味RLU値に換算係数を掛けることにより、ハイブリダイゼーション工程におけるアンプリコンのpmolに換算した。この換算係数は、並行反応において既知量のターゲットポリヌクレオチドと過剰量の標識プローブをハイブリダイズし、次いでこの既知量のターゲットが発する光出力を測定することにより決定された。これにより、光出力とプローブにハイブリダイズしたアンプリコンの量との相関が得られた。

【0123】

表10および11ならびに図7に示す結果は、増幅反応に擬似ターゲットが存在しても被分析体ポリヌクレオチド装入量と増幅反応において生成した被分析体

アンプリコン量との相関は損なわれないことを示した。結果はすべて、操作に用いた装入HIV IIIb RNAの各装入レベルについて5回の反復実験に基づいた。図7に示した対数プロットは、反応に装入したHIV IIIb RNA当量と生成した被分析体アンプリコン量の強い関係を明らかに示す。増幅反応が擬似ターゲットをさらに含有する場合もこれと同じ強い直線関係が支配することは明らかである。擬似ターゲット含有反応において生成した被分析体アンプリコンを表す線についてみられた下方シフトは、擬似ターゲットを含有しない反応と比較して少ない分子が生成したことを示す。たとえば表10に示す結果は、200,000 HIV RNA当量を含有する反応において約520 pmolの被分析体アンプリコンが生成し、擬似ターゲットを反応に含有させるとこの数値が約10倍低下したことを示す。このように、反応に擬似ターゲットを含有させることにより、増幅反応において生成する被分析体アンプリコン数は減少した。

【0124】

【表10】

表 10
擬似ターゲットによる被分析体アンプリコン生成の制御

HIV IIIb RNA 当量/反応	擬似ターゲット無し		
	正味平均 (RLU)	アンプリコン (pmols)	標準偏差 (SD)
無し	0	0	N/A
20	47878	2.5	55529
200	137756	7.2	143360
2000	794621	41.7	174616
20,000	4762815	250	609171
200,000	9908427	520	639895

【0125】

【表11】

表 11
疑似ターゲットによる被分析体アンプリコン生成の制御

HIV IIIb RNA 当量/反応	2 x 10 ⁶ 分子 疑似ターゲット (IAC-Ascr)		
	正味平均 (RLU)	アンプリ コン (pmols)	標準偏差 (SD)
無し	0	0	N/A
20	1623	0.01	2224
200	10473	0.067	8000
2000	84435	0.54	8449
20,000	802975	5.1	189079
200,000	8083585	51.5	1567615

【0126】

定性方式アッセイ

以上の記載は定量アッセイに関するが、疑似ターゲットを増幅反応に使用する他の有用な方法は、被験試料中の被分析体ポリヌクレオチドの存否についての情報を提供する定性アッセイに関する。定性試験は、被験試料中に被分析体ポリヌクレオチドが特定範囲のレベルで存在するか否かを指示するためにも利用できる。これらのアッセイ法は、たとえば薬物療法に対する患者の反応をモニターするために利用できる。たとえば血液性ウイルスに感染した患者は薬物療法により血漿力価が変化する可能性がある。医師は、疑似ターゲット増幅を採用した定性アッセイにより、その閾値に関して患者のウイルス力価の増大または低下をモニターすることができる。定性試験方式は信号の検出を伴うだけであり、診断アッセイ法の末端利用者が必ずしも信号の定量または標準曲線の作成および使用を行う必要はないことを理解すべきである。

【0127】

本発明のある好ましい態様においては、生物試料が被分析体ポリヌクレオチドを含有するかを指示するために定性アッセイを行う。本発明の他の好ましい態様においては、定性結果のみ（すなわち結果は陽性か陰性か）が得られるが、試料中の被分析体ポリヌクレオチドについて準定量情報も得ることができる。

【0128】

被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを共増幅する定性アッセイは、特定の検出閾値をもつ検出プロトコルと組み合わせた場合に特に有用である。これらの閾値は、ハイブリダイゼーションプローブの比活性を調整するか、あるいはある数値未満では陰性結果を特定し、または特定の数値より上では陽性結果を特定するように検出装置を目盛定めすることにより操作できる。たとえばある閾値レベルより大きいRLU値については陽性結果を指示するようにルミノメーターを設定できる。あるいは、あるレベルの被分析体アンプリコンがその装置の検出限界より上または下で検出可能な信号を発するように、増幅反応に含有させる擬似ターゲット量を増減してもよい。たとえば診断アッセイのための増幅反応に装入する擬似ターゲット量は、目的範囲に入る検出信号を発するようにルーティン実験で調節または”調整”できる。

【0129】

前記方法で被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを共増幅する場合、反応において合成される被分析体アンプリコン量はもちろん反応に装入した被分析体ポリヌクレオチドの量に関連する。ハイブリダイゼーション信号の大きさは前記方法のいずれかにより調整でき、擬似ターゲットを含有する増幅反応は精度向上を特色とする利点を持ち、かつあるレベルの装入被分析体ポリヌクレオチドが検査機器の検出閾値より上または下のハイブリダイゼーション信号を発するように診断反応を調整できるので、定量情報をも提供する定性アッセイ法を得ることができる。

【0130】

下記の実施例は、陽性または陰性の結果のみを示す定性アッセイ法を用いて被験試料中の被分析体ポリヌクレオチド量についての準定量情報を得る方法を示す。例示にすぎないが、HIVポリヌクレオチドを被分析体ポリヌクレオチドとして用い、示した力価範囲は前記の実施例に示した結果に基づく。もちろん他の被分析体ポリヌクレオチドおよび異なる閾値範囲もこの定性試験方式に使用できる。ルミノメトリーによる検出の代わりに蛍光その他の光学的または電気化学的検出法も採用できる。擬似ターゲットを生物試料と混和した後に核酸を分離するか

、あるいは予め単離した被分析体ポリヌクレオチドを共増幅前に単に混和することができる。この実施例において、検出系は検出装置（ルミノメーター）、この検出装置で検出できる標識したハイブリダイゼーションプローブを含む。前記の記載によれば、標識プローブの比活性、および共増幅工程に含有される擬似ターゲット量は両方とも、検出系の検出閾値を制御するために操作できる変数であることは明らかである。

【0131】

実施例7には、擬似ターゲットを含有する増幅反応を増幅前の被分析体ポリヌクレオチド量についての準定量情報を得るための定性アッセイに利用する方法を記載する。

【0132】

実施例7

定性アッセイ方式

HIV感染患者を治療する医師は、薬物療法プロトコルの有効性をモニターすることを望む。医師は、特に患者の血漿力価が高い出発レベルから約200 RNA当量/血漿100 µl未満に相当する低いレベルにまで低下した時点を知りたいと望む。

【0133】

患者から薬物療法開始前と後の第1および第2血漿試料を得る。本質的には実施例6に記載した増幅反応用に試料を調製および使用する。各100 µlアリコートの血漿試料を100 µlアリコートのターゲット捕獲試薬と混合し、混合物をインキュベートし、オリゴ(dT)ビーズ懸濁液と混和し、再び混合し、次いで室温に冷却する。ビーズを採集して洗浄し、検体緩衝液中に希釈した 2×10^6 コピーの擬似ターゲットを含有する50 µlアリコートと混和する。混合後、各試料にプライマーおよびヌクレオチド反応体を含有する増幅試薬25 µlアリコートを添加する。試料に200 µlの鉱油を積層し、次いで42℃で10分間インキュベートする。2000 GP単位のMMLV逆転写酵素および2000 GP単位のT7 RNAポリメラーゼを緩衝液に含有する25 µlアリコートの酵素試薬を添加して増幅反応を開始する。すべての反応体を混合し、42℃で1時

間インキュベートする。増幅した試料について次いでA PH検出操作を実施する。アクリジニウム標識プローブA E (+) 4 1 3 4 bの溶液を各試料に添加する。各試料に1. 3 pmo lの標識プローブおよび3 8. 7 pmo lの非標識プローブを添加する。その際、各プローブは標準H I Vアンプリコンには特異的であるが擬似ターゲットには特異的でない。これらの量のプローブは、被分析体アンプリコンを定量検出する飽和ハイブリダイゼーション量である。混合物を6 0℃で1 5分間インキュベートし、次いでメタ亜ヒ酸ナトリウムを含有するA PH選択試薬3 0 0 μ lと混合する。反応混合物を6 0℃で2 0分間インキュベートし、次いで室温に冷却する。検出試薬I およびI Iを添加した後、1 0, 0 0 0以上のR L U値について陽性結果を指示し、1 0, 0 0 0未満のR L U値について陰性結果を指示するようにプログラミングしたルミノメーターを用いて化学発光を読み取る。処理前の血漿試料は陽性結果を与え、これにより少なくとも約2 0 0 RNA当量のレベルが指示される。これに対し処理後の血漿試料は陰性結果を与え、これにより1 0 0 μ lの試料中2 0 0 RNA当量未満のレベルが指示される。医師はその薬物療法がウイルス負荷の低下に有効であると判断する。

【0 1 3 4】

本発明をその多数の具体例および態様に関して記載した。もちろん、以上の詳細な記述を考慮すると本発明の多数の異なる態様が当業者に自明であろう。したがって本発明の真の範囲は特許請求の範囲に基づいて判断すべきである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> GEN-PROBE INCORPORATED

<120> POLYNUCLEOTIDE AMPLIFICATION METHOD

<130> GP104-PCT

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer T7A(-)4190

<400> 1

aatttaataac gactcactat agggagagtt tgtatgtctg ttgctattat gtcta 55

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer (+)4108

<400> 2

acagcagtag aaatggcag 19

<210> 3

<211> 8933

<212> RNA

<213> Human Immunodeficiency Virus

<220>

<221> source

<222> (1)...(8933)

<223> Sequence of transcripts produced from the BH10 plasmid.

<400> 3

gagcucucuc	gacgcaggac	ucggcuugcu	gaagcgcgca	cggcaagagg	cgaggggagg	60
cgacuggguga	guacgcacaa	aaauuugacu	agcggaggcu	agaaggagag	agaugggugc	120
gagagcgucu	guauuaagcg	ggggagaaau	agauagauug	gaaaaaauc	gguaaaggcc	180
aggggggaaag	aaaaaaaua	aaauaaaaa	uauagauug	gcaagcagg	agcuagaacg	240
auucgcaguu	aaucugggc	uguuagaaac	aucagaaggc	uguagacaaa	uacugggaca	300
gcuacaacca	uccuucaga	caggauca	agaacuuaga	ucauuaua	auacaguagc	360
aaccucua	ugugugcauc	aaaggauaga	gaauaaagac	accaaggag	cuuagacaa	420
gauagaggaa	gagcaaaaca	aaaguaagaa	aaaagcacag	caagcagcag	cugacacagg	480
acacagcagu	caggucagcc	aaaauuaccc	uauagugcag	aacauccagg	ggcaaauggu	540
acauaggcc	auaucaccua	gaacuuuaaa	ugcaugggua	aaaguaguag	aagagaaggc	600
uuucagccca	gaaguaauac	cauguuuuc	agcauuauca	gaaggagcca	ccccacaaga	660
uuuaaaacac	augcuuaaca	cagugggggg	acaucaagca	gccaugcaaa	uguuuaaaga	720
gaccaucaau	gaggaagcug	cagaauaggga	uagaguacau	ccagugcaug	cagggccuau	780
ugcaccaggc	cagaugagag	aaccaagggg	aagugacaua	gcaggaacua	cuaguacccu	840
ucaggaacaa	auaggaugga	ugacaaaaua	uccaccuau	ccaguaggag	aaauuuauaa	900
aagauggaua	auccugggau	uaauuaaaau	aguaagaau	uauagccua	ccagcauucu	960
ggacauaaga	caaggaccaa	aagaaccuu	uagagacuau	guagaccggu	ucuaaaaaac	1020
ucuaagagcc	gagcaagcuu	cacaggaggu	aaaaaaugg	augacagaaa	ccuuguuggu	1080
ccaaaugcg	aaaccagauu	guaagacuau	uuuaaaagca	uugggaccag	cggcuacacu	1140

agaagaaaug	augacagcau	gucagggagu	aggagggacc	ggccauaagg	caagaguuuu	1200
ggcugaaagca	augagcccaag	uaacaaauac	agcuaccuau	augaugcaga	gagggcauuu	1260
uaggaaccaa	agaaagauug	uuaguguuu	cauuuguggc	aaagaagggc	acacagccag	1320
aaauggcagg	gccccuagg	aaaaggccug	uuggaaaugu	ggaaaaggag	gacaccaau	1380
gaaagauugu	acugagagac	aggcuauuu	uuuagggag	aucuggccuu	ccuacaagg	1440
aaggccagg	aauuuuucuu	agagcagacc	agagcccaaca	gccccaccu	uuuuucagag	1500
cagaccagag	ccaacagccc	caccagaaga	gagcuucagg	ucuggggug	agacaacaac	1560
uccccucag	aagcaggagc	cgauagacaa	ggaacugua	ccuuuaacuu	ccucagau	1620
acucuuuggc	aacgaccccu	cgucacaua	aagauagggg	ggcaacuaaa	ggaagcucua	1680
uuagauacag	gagcagaua	uacaguuua	gaagaauga	guuugccagg	aagauggaaa	1740
ccaaaaauga	uagggggau	uggagguuu	aucaaaugaa	gacagaua	ucagauacuc	1800
auagaaaucu	guggacauaa	agcuauaggu	acaguuuag	uaggaccuac	accugucaac	1860
auaaauagg	gaaauucugu	gacucagau	gguggcacuu	uaaaauuucc	cauuagcccu	1920
auugagacug	uaccaguaaa	auuaaagcca	ggaauggaug	gccccaaagu	uaaacaauug	1980
ccauugacag	aagaaaaau	aaaagcauu	guagaaauu	guacagaaau	ggaaaaggaa	2040
gggaaaaauu	caaaaaauug	gcccugaga	ccauacaaua	cuccaguuu	ugccauaaag	2100
aaaaaaagca	guacuaaaug	gagaaaauu	guaguuuua	gagaacuuua	uaagagacu	2160
caagacuucu	gggaaguuca	auuaggaua	ccacaucccg	caggguuaaa	aaagaaaaaa	2220
ucaguacacag	uacuggaugu	ggguugaug	uaauuuucag	uucccuuaga	ugaagacuuc	2280
aggaauguua	cugcauuuac	cauaccuagu	auaaacaau	agacaccagg	gaauagauu	2340
caguaacaau	ugcuuccaca	gggauggaaa	ggaucaccag	caauauucca	aagauagcag	2400
acaaaaaucu	uagagccuuu	uaaaaaacaa	auuccagaca	uaguauucua	ucaauacau	2460
gaugauuuu	auguaggauc	ugacuuagaa	auagggcagc	auagaacaaa	aaauagagg	2520
cugagacaac	aucuguuag	gugggggacuu	accacaccag	acaaaaaaca	ucagaaagaa	2580
ccuccauucc	uuuggauggg	uuaugaacuc	cauuccugau	aauggacagu	acagccuaua	2640
gugcugccag	aaaaagacag	cuggacuguc	aaugacauac	agaaguuagu	ggggaaaauug	2700
aauggggcaa	gucagauuu	cccaggguuu	aaaguuaggc	aaauauguaa	acuccuuag	2760
ggaaccaaa	cacuaacaga	aguauuacca	cuaacagaag	aagcagagcu	agaacuggca	2820
gaaaaacag	agauucuaaa	agaaccagua	caugggagugu	auuugagccc	aucaaaagac	2880
uuauuagcag	aaauacagaa	gcaggggcaa	ggccaaugga	cauaucaau	uuaucaagag	2940
ccauuuuaaa	aucugaaaac	aggaaaaau	gcaagaauga	ggggugccca	cacuaaugau	3000
guaaaaaau	uaacagaggc	agugcaaaaa	auaacaccag	aaagcauagu	aaauagggga	3060
aagacuucca	aauuuaaacu	accacuaaca	aaggaaaacu	gggaaacau	guggacagag	3120
uaauuggcaa	ccaccugga	uccugagug	gaguuuguua	auacccucc	uuuagugaaa	3180
uuaugguaac	aguuagagaa	agaacccaua	guaggagcag	aaaccuuucua	uguagauugg	3240
gcagcuuaaca	gggagacuaa	auuaggaaaa	gcaggauaug	uuacuaacaa	aggaaagaca	3300
aagguugucc	cccuuacuaa	cacaacaaau	cagaaaacug	aguuacaagc	aauuuacua	3360
gcuuugcagg	auucaggauu	agaaguaaac	auaguaacag	acucacaaau	ugcauuagg	3420
aucauucaag	cacaaccaga	uaaaagugaa	ucagaguuag	ucaaucaau	aaauagagcag	3480
uuauuaaaaa	aggaaaaggu	cuauucggca	uggguaccag	cacacaaagg	aaauugggga	3540
aaugaacaag	uagauaaaa	agucagugcu	ggaaucagg	aaauacuaau	uuuagauugg	3600
auagauaagg	cccaagaua	acauagagaa	uaucacagua	auuggagagc	aauggcuagu	3660
gauuuuaacc	ugccaccu	aguagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuguga	uaaaugucag	3720
cuaaaaggag	aagccauuca	uggacaagua	gacugaugcu	caggaaauag	gcaacuagau	3780
uguacacauu	uagaaggaaa	aguuaucucg	guagcaguu	auguagccag	uggauauaua	3840
gaagcagaag	uuauuccagc	agaaaacagg	caggaaaacag	cauauuuucu	uuuaaaauu	3900
gcagggaagau	ggccaguaaa	aaacaauacu	acagacaau	gcagcauuu	caccagugcu	3960
acggguuagg	ccgccuguu	guggggcgga	aucaagcagg	aaauuggaa	ucccuacau	4020
ccccaaaguc	aaggagaua	agaaucuaug	aaauaagaa	uaaagaaaau	uuuaggacag	4080
guaaagagau	aggcugaaca	ucuuagagca	gcaguuacaaa	uggcaguuu	cauccacau	4140
uuuaaaagaa	aagggggggu	uggggggguac	agugcagggg	aaagaaaua	agacauaaua	4200
gcaacagaca	uacaaacuaa	agaaauacaa	aaacaaaua	caaaaaauca	aaauuuucg	4260
guuuauuaca	gggacagcag	aaauccacuu	uggaaaggac	cagcaaaagc	ccucuggaaa	4320
ggugaagggg	caguaguuau	acaagauaa	agugacauaa	aaguagugcc	aagaagaaaa	4380
gcaaaagauca	uuagggaaua	uggaaaacag	auggcagvug	augauugugu	ggcaaguuaga	4440
caggauagag	auuagaaacu	ggaaaaguuu	aguuaaacac	cauauguaug	uuucagggga	4500
agcuaggggga	ugguuuuaua	gacauacua	ugaaaggccu	cauccaagaa	uaaguuacga	4560
aguacacau	ccacuagggg	augcuagauu	gguaauaaca	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacuggcuuu	ugggucagg	agucuccaua	gaauaggagga	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	guagaccucg	aacuagcaga	ccaaacuaau	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	ucugcuauaa	gaaaggccuu	auuaggcac	auaguagcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaagga	ucuacaauac	uuggcacuag	cagcauuaua	4860
aaacccaaaa	aagauaaagc	caccuuugcc	uaguguuacg	aaacugacag	aggauagau	4920
gaacaagccc	cagaagacca	agggccacag	aggagccac	acaaugaaug	gacacagag	4980
cuuuuagagg	agcuuaagaa	ugaagcuguu	agacauuuuc	cuaggauuug	gcuuccaugc	5040
uuagggcaac	auaucuuaga	aacuuauugg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaaua	5100

agaaauucgc	aacaacucgc	guuuauccau	uuucagaaau	gggugucgac	auagcagaau	5160
aggcgguuacu	cgacagagga	gagcaagaaa	uggagccagu	agauccuaga	cuagagcccu	5220
gggaagcaucc	aggaagucag	ccuaaaacug	cuuguaacca	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucauug	ccaaguuugu	uucuaaacia	aagccuuagg	caucuccuau	ggcaggaaga	5340
agcggagaca	gcgacgaaga	ccuccucaag	gcagucagac	ucaucaaguu	ucucuaucaa	5400
agcaguaagu	aguacaugua	augcaaccua	uacaaauagc	aaauaguagca	uuaguaguag	5460
caauaauaau	agcaauaguu	guguggucca	uaguaaucau	agaauauagg	aaaaauuuua	5520
gacaaaagaaa	aaauagacagg	uuauuugaua	gacuaauaga	aagagcagaa	gacaguggca	5580
augagaguga	aggagaaaua	ucagcacuug	uggagauugg	gguggagauug	gggcaccuag	5640
cuccuugggg	uguugaugau	cuguaugugc	acagaaaaau	ugugggucac	agucuaauau	5700
gggguaaccug	uguggaaggga	agcaaccacc	acucuaauuu	gugcaucaga	ugcuaaagca	5760
uaugauacag	agguaacaua	uguuuggggc	acacaugccu	guguacccac	agaccccaac	5820
ccacaagaag	uaguauuggu	aaauugugaca	gaaaaauuuu	acauugggaa	aaauagcaug	5880
guagaacaga	ugcaugaggga	uuuaauucagu	uuauugggag	aaagccuaaa	gccauuggua	5940
aaauuaacccc	cacucugugu	uaguuuaaag	ugcacugauu	ugagaauuga	uacuaauaac	6000
aaauaguagua	gcgggagaa	gaaauuggag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuuucaa	6060
aucagacaaa	gcauaagagg	uaaggugcag	aaagaauaug	cauuuuuuua	uaaacuugau	6120
auaaauaccaa	uagauaauga	uacuaccagc	uaucuguga	caaguuguaa	caccucaguc	6180
auuacacagg	ccuguccaaa	gguaucuuuu	gagccaaauu	ccauacauua	uugugccccg	6240
gcugguuuug	cguuucuaaa	auguaauaau	aagacguuca	auggaacagg	accauguaa	6300
aaugucagca	caguacaaug	uacacauugga	auuaggccag	uaguaucac	uccacugcug	6360
uuaaauggca	gucuggcaga	agaagaggua	guauuagau	cugccauuu	cacagacaa	6420
gcuaaaaacca	uaauaguaca	gcugaaacca	ucuguaagaa	uuauuugua	aagacccaac	6480
aacaaauaca	geaaaaaguu	ccguauccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaaau	6540
ggaaaaauag	gaaauuugag	acaagcacau	uguaacauua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaauuug	gaaauaauua	aaacaauaac	6660
uuuaagcagu	ccucaggagg	ggacccagaa	auuguaacgc	acaguuuuua	uuguggaggg	6720
gaaauuuucu	acuguaauuc	aacacaacug	uuuaauagua	cuugguuuaa	uaguacuuug	6780
aguacuuaag	ggucuaauaa	cacugaaggga	agugacacaa	ucacccuccc	augcagaaua	6840
aaacaaauua	uaacacauug	gcaggaaagua	ggaaaaagca	uguaugcccc	ucccaucagu	6900
ggacaaauua	gauguucauc	aaauauuaca	gggcugcuau	uaacaagaga	uggugguuau	6960
agcaacaauu	aguccgagau	cuucagaccu	ggaggaggag	auauaggagg	caauuggaga	7020
agugaaauua	auaaauaaua	aguaguaaaa	auugaaacca	uaggagauag	acccaccaag	7080
gcaaagagaa	gaguggguca	gagagaaaaa	agagcagugg	gaauaggagc	uuuguuuccu	7140
ggguucuuug	gagcagcagg	gggcacuaug	gggcagcgu	caaugacgcu	gacgguaacag	7200
ggcagacaa	uauugucugg	uauagugcag	cagcagaaca	auuugcugag	ggcuauugag	7260
ggcgaacagc	aucuguuuca	acucacaguc	uggggcauca	agcagcucca	ggcaagaau	7320
cuggcugugg	aaagauaccc	cagcuccugg	cagcuccugg	ggauuugggg	uugcucugga	7380
aaacucuuuu	gcaccacugc	ugugccuuug	aaugcuaguu	ggaguaauua	aucucuggga	7440
cagauuugga	auaacaugac	cuggauuggag	ugggacagag	aaauuaacaa	uaacacaagc	7500
uuauuacacu	ccuuuaauuga	agaaucgcaa	aaccagcaag	aaagaagauga	acaagaauua	7560
uuggaaauag	auaaaugggc	aaauuugugg	aaauugguuu	acauaacaau	uuggcugugg	7620
uaauuaaaaa	uaaucauaau	gauguaaggga	ggcuugguag	guuaaagaau	aguuuuugcu	7680
guacuuucug	uagugaauag	aguuaggcag	ggauauucac	cauuauucgu	ucagacccac	7740
cucccaaucc	cgaaggggacc	cgacaggccc	gaagggaauag	aaagaagaagg	uggagagaga	7800
gacagagaca	gauccauucg	auuagugaac	ggauccuuag	cacuuauucg	ggacgaucug	7860
cgagaccug	gcccucucag	cuaccacccg	uugagagacu	uacucuuugu	uguaaccagg	7920
auuguggaac	uucuggggacg	cagggggugg	gaagcccuca	aaauuuggug	gaaucuccua	7980
caguauugga	gucaggagcu	aaagaauagu	gcuguuagcu	ugcucaauug	cacagcuaua	8040
gcagugagcug	aggggagcaga	uaggguuaua	gaaguagua	aaaggagcuu	uagagcuauu	8100
cgccacauac	cuagaagaa	aagacagggc	uuggaaaggga	uuuugcuaua	agaugggugg	8160
caagugguca	aaaaguagug	ugguuggaug	gccugcugua	agggaaagaa	ugagacgagc	8220
ugagccagca	gcagauuggg	ugggagcagc	aucucgagac	cuagaaaaac	auggagcaau	8280
cacaaguagc	aacacagcag	cuaacaauug	ugauuugucc	uggcuagaag	cacaagagga	8340
ggaggagug	gcuuuuccag	ucacaccuca	gguaacuuua	agaccaauua	cuaacaaggc	8400
agcuguagau	cuaagccacu	uuuuuaaaga	aaagggggga	cuggaagggc	uaauucacuc	8460
ccaacgaaga	caagauaucc	uugaucugug	gaucuaaccac	acacaaggcu	acuuuccuga	8520
uuagcagaac	uacacaccag	ggccaggga	cagauaucca	cugaccuuug	gauggugcua	8580
caagcuagua	ccaguuagagc	cagagaaguu	agaagaagcc	aacaaaggag	agaacaccag	8640
cuuguuacac	ccugugagcc	ugcauggaau	ggauagaccg	gagagagaag	uguuagagug	8700
gagguuugac	agccggcuag	cauuucauca	cauggcccg	gagcugcauc	cgagguacuu	8760
caagaacugc	ugacauccag	cuugcuacaa	gggacuuucc	gcugggggac	uuccaggag	8820
gcggggccug	ggcgggacug	gggaguggcg	agcccuacaga	uccugcauau	aagcagcugc	8880
uuuuugccug	uacugggucu	cucugguuag	accagaucug	agccugggag	cuc	8933

<210> 4
 <211> 8933
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequence of the IAC-Asrc pseudo target

<221> mutation
 <222> (4135)...(4155)
 <223> Mutated positions: 4135, 4140-1, 4145, 4150,
 4152-3, 4155

<400> 4
 gagcucucuc gacgcaggac ucggcuugcu gaagcgcgca cggcaagagg cgaggggccc 60
 cgacugguga guacgccaaa aaauuugacu agcggaggcu agaaggagag agaugggugc 120
 gagagcguca guauuaagcg ggggagaaau agaucgaugg gaaaaaaauu gguaaaggcc 180
 aggggggaaag aaaaaauaau aaauaaaaaca uauaguauug gcaagcaggg agcuagaacg 240
 auucgcaguu aaucucggcc uguuagaaac aucagaaggc uguagacaaa uacugggaca 300
 gcuacaacca ucccuucaga caggauacaga agaacuuaga ucauuauua auacaguagc 360
 aaccucuaau ugugugcauc aaaggauaga gaaaaaagac accaaggag cuuuagacaa 420
 gauagaggaa gagcaaaaaca aaaguaagaa aaaagcacag caagcagcag cugacacagg 480
 acacagcagu caggucagcc aaaaauaccc uauagugcag acauuccagg ggcaaauggu 540
 acaucaggcc auaucaccua gaacuuuaaa ugcaugggna aaaguagug aagagaaggc 600
 uuucagccca gaaguaauac ccauguuuuc agcauuuaca gaaggagcca cccacaaga 660
 uuuaaacacc augcuaaaaca cagugggggg acaucaagca gccaugcaaa uguuaaaaga 720
 gaccaucaau gaggaagcug cagaauggga uagaguacau ccagugcag caggggccuau 780
 ugcaccaggc cagaugagag aaccaagggg aagugacaua gcaggaaacua cuaguacccu 840
 ucaggaaaca auaggauugga ugacaaauaa uccaccuau ccaguaggag aaauuuauaa 900
 aagauggaua auccugggga uaaaaaaaau aguaagaug uauagccua ccagcauuc 960
 ggacauaaga caaggacca aagaaccuuu uagagacua guagaccgu ucuauaaaac 1020
 ucuaagagcc gagcaagcuu cacaggaggu aaaaaauugg augacagaaa ccuuguggu 1080
 ccaaaauagg aaccagauu guaaagacua uuuaaaagca uugggaccag cggcuacacu 1140
 agaagaaaug augacagcau gucagggaug agggaggacc gcccauaagg caagaguuuu 1200
 ggcugaagca augagccaag uaacaaauac agcuaccua augaugcaga gaggcauuu 1260
 uaggaaccaa agaaagauug uuaaguguuu caauuguggc aaagaagggc acacagccag 1320
 aaauugcagg gcccuaagga aaaaaggcug uuggaaaugu ggaaaggag gacaccaaau 1380
 gaaagauugu acugagagac aggcuaauuu uuuaagggaag aucuggccuu ccuacaagg 1440
 aaggccaggg aaauuuucuc agagcagacc agagccaaac gccccaccu uucucagag 1500
 cagaccagag ccaacagccc caccagaaga gagcuucagg ucuggggugag agacaacaac 1560
 ucccucucag aagcaggagc cgauagacaa ggaaacugua ccuuuaacuu cccuacaguc 1620
 acucuuuggc aacgaccccu cgucacaua aagauagggg ggcaacuaaa ggaagcucua 1680
 uuagauacag gagcagauga uacagauuuu gaagaaauga guuugccagg aagauggaaa 1740
 ccaaaaaua uagggggaau ugaggguuuu aucaaaauaa gacagauaga ucagauacuc 1800
 auagaaaauu guggacauaa agcuauaggu acaguuuag uaggaccuac accugucaac 1860
 auauuuggaa gaaauucugu gacucagauu gguugcacuu uaaaauuucc cauugcccu 1920
 auugagacug uaccaguaaa auuaaagcca ggaauuggau gcccuaaagu uaaacaaug 1980
 ccuugacag aagaaaaauu aaaaagcauu guagaaauu guacagaaau ggaaaggaa 2040
 gggaaaaauu caaaaauugg gccugagaa ccauacaaua cuccaguuu ugccauaaag 2100
 aaaaaagaca guacuaaaug gaaaaauua guaguuuua gagaacuaa uaagagaacu 2160
 caagacuuc gggaauguu auaaggaua ccacauccg caggguuaa aaagaaaaaa 2220
 ucaguaacag uacuggaugu gggugaugca uauuuuucag uucccuaga ugaagacuuc 2280
 aggaaguuu cugcauuuac cauaccuagu auaaacaaug agacaccagg gauuagauu 2340
 caguacaaug ugcuuccaca gggauggaaa ggaucaccag caauuuucca aaguagcag 2400
 acaaaaauc uagagccuuu uaaaaaacaa aaucagaca uaguuaucua ucauacaug 2460
 gaugauuugu auguaggauc ugacuuagaa auagggcagc auagaacaaa aaugaggag 2520
 cugagacaac aucuguugag guggggacu accacaccag acaaaaaaca ucagaaagaa 2580
 ccuccauucc uuuggauggg uuauagaac cauccugaua aauggacagu acagccuaua 2640
 gugcugccag aaaaagacag cuggacuguc aaugacauac agaaguuagu ggggaaauug 2700
 aauggggcaa gucagauuuu cccagggau aaaguaaggc aaauaugua acuccuaga 2760
 ggaaccaaag cacuaacaga aguaauacca cuaacagaag aagcagagcu agaacuggca 2820
 gaaaaacag agauucuaaa agaaccagua cauggagugu auuauagacc aucaaaagac 2880
 uuauuagcag aaauacagaa gcaggggcaa ggccaaugga cauaucaau uuaucaagag 2940
 ccuuuuuaaa aucugaaaac aggaaaaau gcaagaauga ggggugccca cacuaugau 3000
 guaaaaaaau uaacagagggc agugcaaaaa auaccacag aaagcauagu aaauugggga 3060
 aagacuccua aaauuaaaac acccauacaa aaggaaacau gggaacaug guggacagag 3120

uuuuggcaag	ccaccugga	uccugagugg	gaguuugua	uuacccucc	uuuagugaaa	3180
uuuugguacc	aguuagagaa	agaacccaua	guaggagcag	aaaccuucua	uguagauugg	3240
gcagcuacaa	gggagacuaa	auuaggaaaa	gcaggauaug	uuacuaacaa	agggaagacaa	3300
aagguugucc	cccuuacuaa	cacaaacaa	cagaaacug	aguuaacagc	aaauuauca	3360
gcuuugcagg	auucaggauu	agaauguaaa	auaguuaacag	acucacaa	ugcauuaggga	3420
aucauucaag	cacaaccaga	uaaaagugaa	ucagagruag	ucaaucaaa	aaauagagcag	3480
uuauuaaaaa	eggaaaaggu	cuauucggca	uggguuaccag	cacacaaagg	aaauaggagga	3540
aaugaacaag	uagauaaaau	agucagugcu	ggaucagga	aaauacuauu	uuuagauugga	3600
auagauaagg	cccaagaua	acauagagaa	uaucacagua	auuggagagc	aauggcuagu	3660
gauuuuaacc	ugccaccugu	aguagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuguga	uaauugucag	3720
cuaaaaggag	aagccaugca	uggacaagua	gacuguaugc	caggaaauag	gcaacuagau	3780
uguacacauu	uagaaaggaaa	aguuauccug	guagcaguu	auguagccag	uggauauua	3840
gaagcagaag	uuauuccagc	agaaacagg	caggaaacag	cauauuuucu	uuuaaaauua	3900
gcagggaagau	ggccaguaaa	aacaauacau	acagacaaug	gcagcaauuu	caccagugcu	3960
acgguuagg	ccgccugug	guuggcgga	aucaagcagg	aaauuggaa	uccuacauu	4020
cccaaaaguc	aaggagugau	agaaucuaug	aaauaaagau	uaaagaaaau	uauggagacag	4080
guaaaggauc	agggcugaaca	ucuaagaca	gcaguaacaa	uggcaguuu	caucuaacag	4140
cuuagaagau	agagagggau	uggggggua	agugcagggg	aaagaauagu	agacauaaua	4200
gcaacagaca	uacaaacuaa	agaaauacaa	aaacaaauua	caaaaaauca	aaauuuucgg	4260
guuuauuaca	gggacagcag	aaauccacu	uggaaaaggac	cagcaaaagcu	ccucvggaaa	4320
ggugaagggg	caguaguaau	acaagauaa	agugacauaa	aauguugcc	aaagaagaaa	4380
gcaaaagauca	uuagggaaua	uggaaaacag	auggcaggug	augauuugug	ggcaaguga	4440
caggauaggg	auuagaacau	ggaaaaguuu	aguuaaaacac	cauauugau	uuucagggga	4500
agcuaggggg	ugguuuuua	gacuaacua	ugaaagcccu	cauccaagaa	uaagruucaga	4560
aguacacau	ccacuagggg	augcuagauu	gguaauaaca	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacuggcauu	ugggucagg	agucuccaua	gaauggagga	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	guagaccucg	aacuaagcaga	ccaacuaauu	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	ucugcuauaa	gaaaggccuu	auuaggacac	auaguuagcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaggau	ucuaacauac	uuggcacuag	cagcauuaua	4860
aacaccaaaa	aaagauaaagc	caccuuugcc	uaguguuacg	aaacugacag	aggauagau	4920
gaacaagccc	cagaagacca	agggccacag	agggagccac	acaauagaug	gacacuagag	4980
cuuuuagagg	agcuuaagaa	ugaagcuguu	agacauuuuc	cuaggauuug	gcucauugc	5040
uuaggggcaac	auaucuaua	aacuuauugg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaaua	5100
agaauucugc	aaacaacugcu	guuuauccau	uuucagaaau	gggugucgac	auagcagaau	5160
agggcuuacu	cgacagagg	gagcaagaaa	uggagccagu	agauccuaga	cuagagcccu	5220
ggaggaucac	aggagucag	ccuaaaacug	cuuguaccaa	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucuuug	ccaaguuugu	uucuaaaca	aagccuuagg	caucuccuau	ggcaggaga	5340
agcgagagaca	ggagcgaaga	ccuccucaag	gcagucagac	ucaucaaguu	ucucuaucua	5400
agcaguaagu	agucacaua	augcaaccua	uacaaauagc	aaugauagca	uaaguguaag	5460
caauaauaau	agcaauaguu	guguggucca	uaguaaucau	agaaauaag	aaaauuuua	5520
gacaaagaaa	aaugagacag	uuauuugaua	gacuaauaga	aaagagcaga	gacaguggca	5580
augagaguga	aggagaguga	uagagagugg	uggagagugg	gguggagag	gggacccau	5640
cuccuuggga	uguuagugau	cuguaugugcu	acagaaaaau	uugggguac	agucuaauau	5700
gggguaaccug	uugggagga	agcaaccacc	acucuauuu	gugcaucaga	ugcuuaagca	5760
uauuuuacag	agguacauaa	uguuugggoc	acacugccu	guguaaccac	agaccccaac	5820
ccacaagaag	uaguuuuggu	aaaugugaca	gaaaauuua	acauguggaa	aaaugacau	5880
guagaacaga	ugcaugagga	uauaaucagu	uuauugggag	aaagccuaaa	gccauugua	5940
aaauuaaccc	cacucugugu	uaguuuaaag	ugcacugauu	ugaagaaua	uacuaauacc	6000
aaugauagau	gggggagaa	gauaauggag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuuucaa	6060
aucagacaca	gcauaagagg	uaaggugcag	aaagaauaug	cauuuuuuua	uaaacuugau	6120
auaaauacca	uagauaauga	uacuaccagc	uauacguuga	caaguuugaa	caccucaguc	6180
auuacacagg	ccuguccaaa	gguaucuuu	gagccaaau	ccauacauua	uugugcccg	6240
gcugguuuug	cgaauuuaaa	auguaauaau	aagacguuca	auggaacagg	accauguaa	6300
aaugucagca	caguacaaug	uacacauugg	auuaggccag	uaguuuacac	ucaacugcug	6360
uuaaauggca	gucuggcaga	agaagaggua	guauuuagau	cugccaaauu	cacagacau	6420
gcuaaaaacca	uaauaguaca	gcugaaccua	ucuguaagaa	uuauuugua	aaagaccac	6480
aaacaauacaa	gaaaaaguu	ccguauccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaua	6540
ggaaaaauag	gaaauaugag	acaagcacau	uguaacauua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaaauug	gaaauaaua	aaacauaac	6660
uuuaagcagu	ccucaggagg	ggacccagaa	auuguaacgc	acaguuuuua	uuguggagg	6720
gaauuuuucu	acuguaauuc	aaacacacug	uuuaauagua	cuugguuuaa	uagucuuug	6780
aguacuaaag	ggucaaaaua	cacugaaagg	agugacacaa	ucaaccuccc	augcagaaua	6840
aaacaaaaua	uaaacaugug	gcaggagaua	ggaaaaagcaa	uguaugcccc	ucccaucagu	6900
ggacaaaaua	gauguucauc	aaauauuaca	gggucgcuau	uaacaaagaga	uggugguaua	6960
agcaacaaug	aguccgagau	cuucagaccu	ggagagggag	auaugaggga	caauuggaga	7020
agugaaauau	auaaauaaua	aguagaaaaa	auugaaaccau	uaggagagac	accacacag	7080

```

gcaaagagaa gaguggugca gagagaaaaa agagcagugg gaauaggagc uuuguuccuu 7140
ggguucuuug gagcagcagg aagcacuauug ggcgagcgu caaugacgcu gacgguacag 7200
gccagacaau uauugucugg uauagugcag cagcagaaca auuugcugag ggcuaauugag 7260
gcgcaacagc aucugugcag acucacaguc ugggggcauca agcagcucca ggcaagaauuc 7320
cuggcugugg aaagauaccu aaaggaucaa cagcuccugg ggauuugggg uugcucugga 7380
aaacucauuu gcaccacugc ugugccuugg aaugcuaguu ggaguaauaa aucucuggaa 7440
cagauuugga auaacauagc cuggaugggag ugggacagag aaauuaacaa uuacacaagc 7500
uuauuacacu ccuuauuuga agaauccgcaa aaccagcaag aaaagaaua acaagaauua 7560
uuggaauuag auaaaugggc aaguuuuggg aaauugguuu acauaacaaa uuggcugugg 7620
uauauaaaau uauucauaau gauaguagga ggcuuugguag guuuagaauu aguuuuugcu 7680
guacuuucug uagugaaauag aguuaaggcag ggauauucac cauuaucguu ucagaccac 7740
cucccaaucc cgagggggacc cgacaggccc gaaggaaauag aagaagaagg uggagagaga 7800
gacagagaca gaucuuucg auuagugaac ggauccuug cacuuaucug ggacgaucug 7860
cggagccug ugcucucucag cuaccaccgc uugagagacu uacucugau uguaacgagg 7920
auuguggaac uucugggacg cagggggugg gaagcccuca aaauuuggug gaauuccua 7980
caguauugga gucaggagcu aaagaauagu gcuguuagcu ugcucaaugc cacagcuaua 8040
gcaguagcug aggggacaga uaggguuaua gaaguaguac aaggagcuua uagagcuauu 8100
cgccacauac cuagaagaau aagacagggc uuggaaaagg uuugcuaua agaugggugg 8160
caagugguca aaaaguagug ugguuggaug gccugcugua agggaaaagg uagagcagc 8220
ugagccagca gcagaugggg ugaggagcag aucucgagac cuagaaaaac auggagcau 8280
cacaaguagc aacacagcag cuaacaaugc ugaauugucc uggcuagaag cacaagagga 8340
ggaggagug gguuuuccag ucacaccuca gguaccuuua agaccaauga cuuacaaggc 8400
agcugugau cuuagccacu uuuaaaaaga aaagggggga cuggaagggc uauuacuc 8460
ccaacgaaga caagauaucc uugaucugug gaucuaccac acacaaggcu acuuuccuga 8520
uuagcagaac uacacaccag ggccagggaug cagauaucca cugaccuuug gauggugcua 8580
caagcuagua ccaguugagc cagagaaguu agaagaaggc aacaaaggag agaaccaccag 8640
cuuguuacac ccugugagcc ugcauggaau ggaugacccg gagagagaag uguuagagug 8700
gagguuugac agccgcuag cauucacua cauggcccga gagcugcauc cggaguacuu 8760
caagaacugc ugacaucgag cuugcuacaa gggacuucc gcuggggacu uuccagggag 8820
gcguggccug ggcgggacug gggaguggcg agcccucaga uccugcauau aagcagcugc 8880
uuuuugccug uacugggucu cucugguuag accagaucug agccugggag cuc 8933

```

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> HIV

<220>
 <221> source
 <222> (1)...(30)
 <223> Sequence of AE(+)4134 HIV-specific probe.

```

<400> 5
ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg 30

```

<210> 6
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequence of (-)3837 A30 capture probe.

```

<400> 6
ccctgtttct gctggaataa cttctgcttc tatattttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
aaaaaaa 67

```

<210> 7
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sequence of the (-)4258 A30 capture probe.

<400> 7
tctgtctgtcc ctgtaataaaa cccgttttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> HIV

<220>
<221> source
<222> (0)...(0)
<223> Sequence of the AE(+)4134b probe

<400> 8
ccacaatttt aaaagaaaag gg 22

<210> 9
<211> 8933
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequence of the IAC-Bscr pseudo target

<221> mutation
<222> (4140)...(4159)
<223> Mutated positions: 4140-42, 4145-47, 4152, 4156-57, 4159

<400> 9

gagcucucuc	gacgcaggac	ucggcuugcu	gaagcgcgca	cggcaagagg	cgaggggagg	60
cgacugguga	guacgccaaa	aauiiugacu	agcggaggcu	agaaggagag	agaugggugc	120
gagagcguca	guauuaagcg	ggggagaaau	agaucgaugg	gaaaaaaauuc	gguaaaggcc	180
aggggggaaag	aaaaaaauua	aauiiaaaca	uauaguaugg	gcaagcaggg	agcuagaacg	240
auucgcaguu	aauccuggcc	uguuagaaac	aucagaaggc	uguagacaaa	uacuggggaca	300
gcuacaacca	ucccuucaga	caggauccaga	agaacuuaga	ucauuauua	auacaguagc	360
aaaccucua	ugugugcauc	aaaggauaga	gauaaaaagac	accaagggaag	cuuagacaa	420
gauagaggaa	gagcaaaaaca	aaaguaagaa	aaaagcacag	caagcagcag	cugacacagg	480
acacagcagu	caggucagcc	aaaauuaccc	uauagugcag	aacauccagg	ggcaaauggu	540
acaucaggcc	auaucaccua	gaacuuuaaa	ugcaugggua	aaaguaguag	aagagaaggc	600
uuucagccca	gaaguaauac	ccauguuuuc	agcauuauca	gaaggagcca	ccccacaaga	660
uuuaaaacac	agcuaaaaca	cagugggggg	acaucaagca	gccaugcaaa	uguuaaaaga	720
gaccaucaau	gagggaagcug	cagaauugga	uagaguacau	ccagugcaug	cagggccuau	780
ugcaccaggc	cagaugagag	aaccaagggg	aagugacaua	gcagggaacua	cuaguacccu	840
ucaggaaaca	auagggaugga	ugacaaaaua	uccaccuauc	ccaguaggag	aaaauuaaua	900
aagauggaua	auccugggau	uaaaauaaa	aguaagaaug	uauagcccu	ccagcauucu	960
ggacauaaga	caaggaccua	aagaaccuuu	uagagacuau	guagaccggu	ucuaaaaaac	1020
ucuaagagcc	gagcaagcuu	cacaggagg	aaaaaaauug	augacagaaa	ccuuuguuggu	1080
ccaaaaugcg	aaccagauu	guaagacuau	uuuaaaagca	uugggaccag	cggcuacacu	1140
agaagaaaug	augacagcau	gucagggagu	aggaggaccc	ggccauaagg	caagaguuuu	1200
ggcugaagca	augagccaa	uaacaaauac	agcuaccua	augaugcaga	gaggcauuu	1260
uaggaaacca	agaaagaugg	uuaguguuu	caauugggc	aaagaagggc	acacagccag	1320
aaauugcagg	gccccuagga	aaaaggggcug	uuggaaaugu	ggaaagggaag	gacaccaaau	1380
gaaagauugu	acugagagac	aggcuauuuu	uuuagggaag	aucuggccuu	ccuacaaggg	1440
aaggccaggg	aauiiucuu	agagcagacc	agagccaaca	gccccaccau	uucuuacag	1500
cagaccagag	ccaacagccc	caccagaaga	gagcuucagg	ucuggggua	agacaacaac	1560
uccccucag	aagcaggagc	cgauagacaa	ggaaacugau	ccuuuaacuu	ccucagau	1620
acucuuuggc	aacgaccccu	cgucacaa	aagauagggg	ggcaacuaaa	ggaagcucua	1680
uuagauacag	gagcagauga	uacaguauua	gaagaaauga	guuugccagg	aagauggaaa	1740
ccaaaaauga	uagggggaau	uggagguuuu	aucaaaagua	gacagauaga	ucagauacuc	1800
auagaaaau	guggacauaa	agcuauaggu	acaguauuag	uaggaccuac	accugucaac	1860
auaaauugga	gaaauucugu	gacucagauu	ggguugcacuu	uaaauiiucc	cauiiagccu	1920
auugagacug	uaccaguaaa	auuaaagcca	ggaauggaug	gcccuaaagu	uaaacaauug	1980
ccauugacag	aagaaaaauu	aaaagcauuu	guagaaaauu	guacagaaa	ggaaaaggaa	2040
gggaaaaauu	caaaaauugg	gccugagaa	ccauacaaua	cuccagauu	ugccauaaag	2100
aaaaaagaca	guacuaaaug	gagaaaaaua	guagauuuca	gagaacuaa	uaagagaacu	2160

caagacuuc	gggaaguuca	auuaggaaua	ccacaucccg	caggguuaaa	aaagaaaaaa	2220
ucaguaacag	uacuggaugu	gggugaugca	uauuuuucag	uucccuuaga	ugaagacuuc	2280
agggaaguu	cugcauuuac	cauaccuagu	auaaacaau	agacaccagg	gauuagauau	2340
caguacaau	ugcuuccaca	gggauggaau	ggauccaccg	caauauucca	aaguagcaug	2400
acaaaaaucu	uagagccuuu	uaaaaaacaa	aauccagaca	uaguuauua	ucauuacau	2460
gaugauuuu	auguaggau	ugacuuaaga	auaggggcag	auagaacaaa	auuagaggag	2520
cugagacaac	aucuguuag	gugggggacu	accacaccag	acaaaaaaca	ucagaaagaa	2580
ccuccauucc	uuuggauggg	uuauagaacuc	cauccugaua	aauggacagu	acagccuua	2640
gugcugccag	aaaaagacag	cugggacuguc	aaugacauac	agaaguuagu	ggggaaauug	2700
aauggggcaa	gucagauuaa	cccaagggaau	aaaguaaggc	aaauauugua	acuccuuga	2760
ggaaaccaa	cacuaacaga	aguaauacca	cuacacagaag	aagcagagcu	agaacuggca	2820
gaaaacagag	agauucuaaa	agaaccagua	cauggagug	auuauagacc	aucaaaagac	2880
uuauuagcag	aaauacagaa	gcagggggcaa	ggccaaugga	cauaucaaaa	uuaucaagag	2940
ccauuuaaaa	aucugaaaaa	aggaaaaaua	gcaagaaua	ggggugccca	cacuaaua	3000
guaaaaaau	uaacagaggg	agugcaaaaa	auaaccacag	aaagcauagu	aaauugggga	3060
aagacuccua	aaauuaaacu	acccauacaa	aaaggaaacu	gggaaacau	guggacagag	3120
uuuugggcaa	ccaccuggau	uccugagugg	gaguuugua	auacccucc	uuuagugaaa	3180
uuauugguacc	aguuuagagaa	agaaccacua	guaggagcag	aaaccuucua	uguagugggg	3240
gcagcuacaa	ggggagacuaa	auuaggaaaa	gcaggauaug	uuacuacaa	agggaagcaa	3300
aggguugucc	cccuuaacuaa	cacaacaaa	cagaaaacug	aguuacaagc	aauuuauua	3360
gcuuugcgag	auucaggaau	agaaguaaac	auagguaacg	acucacaa	ugcauuagg	3420
aucauucaag	cacaaccaga	uaaaagugaa	ucagaguuag	ucaaucaaa	aaauagagcag	3480
uuauaaaaaa	aggaaaggg	cuauucggca	uggguuaccag	cacacaaagg	aauggaggg	3540
aaugaacaag	uagauaaaa	agucagugcu	ggaauacagg	aaauacuau	uuuagguagg	3600
auagauaagg	cccaagauga	acauagagaa	uaucacagua	auuggagagc	aaugggcuag	3660
gauuuuaacc	ugccaccugu	aguagcaaaa	gaaauaguag	ccagcuguga	uaaaugucag	3720
cuaaaaggag	aagccaugca	uggacaagua	gacugauag	caggaaauag	gcaacuagau	3780
uguaacacau	uagaagga	aguuaucug	guagcaguuc	auguagccag	uggauauua	3840
gaagcagga	uuauuccagc	agaaacagg	caggaaacag	cauauuuuc	uuuaaaaua	3900
gcaggaagau	ggccaguaaa	aaacauacau	acagacaaug	gcagcauuu	caccagugcu	3960
acggguuagg	ccgcuuguu	gugggcgga	aucaagcag	aaauuggaa	ucccuacaa	4020
ccccaaaguc	aaggaguu	agaauucua	aaauaagaa	uaaagaaa	uauggagcag	4080
guagagauag	agcgugaaca	ucuuuagaca	gcagucacaa	uggcaguuu	cauccagaaa	4140
aatatttgaa	aggggaagct	tggggggguc	agugcaggg	aaagaauagu	agcauuaua	4200
gcaacagaca	uacaaaacua	agaauuacaa	aaacaaaua	caaaaaaua	aaauuuucg	4260
guuuuuuaca	gggacagcag	aaauccacu	uggaaaggac	cagcaaaag	ccucuggaa	4320
ggugaagggg	caguaguuau	acaagauaa	agugacauaa	aaguagugcc	aagaagaaa	4380
gcaaaagauca	uuagggaaua	uggaaaacag	auggcaggu	augauugugu	ggcaaguga	4440
caggauaggg	auuagaacau	ggaaaaguu	aguuaaacac	cauauugau	uuucagggaa	4500
agcuaggggg	ugguuuuaua	gacauacua	ugaaagcccu	cauccaagaa	uaaguucaga	4560
cguaacacac	ccacuagggg	augcuagau	gguuaaua	acauauuggg	gucugcauac	4620
aggagaaaga	gacuggcacu	ugggucagg	agucuccaua	gaauggagga	aaaagagaua	4680
uagcacacaa	ugagacccug	aacuagcaga	ccaacuaau	caucuguaau	acuuugacug	4740
uuuuucagac	cugcuaaua	gaaaggccu	auuaggacac	auaguuagcc	cuagguguga	4800
auaucaagca	ggacauaaca	agguaggau	ucuaacauac	uuggcacuag	cagcauuau	4860
aaacacaaaa	aagauaaagc	caccuuugcc	uaguguuacg	aaacugacag	aggauagau	4920
gaacaagccc	cagaagacca	agggccacag	agggagccac	acaaugaug	gacacuagag	4980
uuuuuagagg	agcuuaagaa	ugaagcuguu	agacauuuuc	cuaggauuug	gcuccauggc	5040
uuaggggcaac	auaucuaua	aacuuuagg	gauacuuggg	caggagugga	agccauaau	5100
agaaauucug	aacaacugcu	guuuauccau	uuucagaaau	gggugucgac	auagcagaau	5160
agggcuuacu	cgacagagga	gagcaagaaa	uggagccagu	agaucuaaga	cuagagcccu	5220
ggaggaucac	agggaugcag	ccuaaaacug	cuuguaccac	uugcuauugu	aaaaaguguu	5280
gcuuucacu	ccaaguuugu	uucuaaaca	aaagccuua	caucuccuau	ggcagggaaga	5340
agcggagaca	gcgacgaaga	ccuccucaag	gcagucagac	ucaucaaguu	ucucuaucac	5400
agcaguuagu	aguacaugua	augcaaccua	uacaaauagc	aaauagugca	uuaguagug	5460
caauaauaau	agcaauaguu	gugugucca	uaguuaucau	agaauauagg	aaaaauuaa	5520
gacaaagaaa	aaauagacag	uuauuagaa	gacuaauaga	aagagcagaa	gacaguggca	5580
uagagaguga	aggagaaaua	ucagcacuug	uggagauugg	gguggagau	gggcaccag	5640
cuccuuggg	uguuuagau	cuguaugcu	acagaaaaau	uuggggucac	agucuaauu	5700
ggguuaccug	uguggaagga	agcaaccacc	acucuaauuu	gugcauccag	ugcuaaagca	5760
uauugauacag	agguuacaua	uguuugggccc	acacaugccu	guguacccac	agaccccaac	5820
ccacaagaa	uaguuuuggu	aaaugugaca	gaaaauuuua	acauguggaa	aaauagacug	5880
guagaacaga	ugcaugagga	uuauuucagu	uuauugggac	aaagccuaaa	gccauuguga	5940
aaauuaaccc	cacucugugu	uaguuuaag	ugcagugauu	ugaagaauga	uacuaauacc	6000
aaauagaua	gcgggagaa	gaaauuggag	aaaggagaga	uaaaaaacug	cucuuuacau	6060
aucagcacaa	gcauaagagg	uaaggugcag	aaagaauaug	cauuuuuuua	uaaacuugau	6120

auaauaccaa	uagauaauaga	uacuaccagc	uauacguuga	caaguuguuaa	caccucaguc	6180
auuacacagc	ccuguccaaa	ggauuccuuu	gagccaaauu	ccauacauua	uugugccccc	6240
gcugguuuug	cgauuccaaa	auguaauaau	aagacguuca	auggaacagg	accauguaa	6300
aaugucagca	caguacaauu	uacacauugga	auuaggccag	uaguaucaac	ucaacugcug	6360
uuaaauggca	gucuggcaga	agaagaggua	guaauuagau	cugccaauuu	cacagacaau	6420
gcuaaaacca	uaauaguaca	gcugaaccac	ucuguagaaa	uuauuuguac	aagaccacac	6480
aaacaauaca	gaaaaaguau	ccguauccag	agaggaccag	ggagagcauu	uguuacaaua	6540
ggaaaaauag	gaaauaugag	acaagcacau	uguaacauua	guagagcaaa	auggaauaac	6600
acuuuaaaac	agauagauag	caaaauaaga	gaacaauuug	gaaauaauaa	aaacaauaac	6660
uuuaagcagu	ccucaggagg	ggaccacaga	auuguaacgc	acaguuuuaa	uuguggaggg	6720
gaaauuuuuc	acuguaauuc	aacacaacug	uuuaauagua	cuugguuuua	uaguacuugg	6780
aguuacuaag	ggucacaaaua	cacugaaagg	agugacacaa	ucaccucccc	augcagaaua	6840
aaacaaauua	uaaacaugug	gcaggaaagua	ggaaaagcaa	uguaugcccc	ucccaucagu	6900
ggacaaauua	gauguucauc	aaauauuaca	gggcugcuau	uaacaagaga	uggugguauu	6960
agcaacaauu	aguccgagau	cuucagaccu	ggaggaggag	auaugaggga	caauuggaga	7020
agugaauuau	auaaauauaa	aguaguaaaa	auugaaccac	uaggagugac	accacacaa	7080
gcaaaagagaa	gagugguuca	gagagaaaaa	agagcagugg	gaauaggagc	uuuguuccuu	7140
ggguucuuug	gagcagcagg	aagcacuauu	ggcgacgcgu	cauagacgcg	gacgguacag	7200
gccagacaa	uuuugucugg	uauagugcag	cagcagaaca	auuugcugag	ggcuauugag	7260
gcgcaacagc	aucuguguca	acucacaguc	uggggcaca	agcagcucca	ggcaagaauu	7320
cuggcugugg	aaagauaccu	aaaggaucaa	cagcuccugg	ggauuugggg	uugcucugga	7380
aaacucuuuu	gcaccacugc	ugugccuugg	aaugcuaguu	ggaguaauaa	aucucuggaa	7440
cagauuuugga	auaacaugac	cuggauuggag	ugggacagag	aaauuaacaa	uuacacaagc	7500
uuauuacacu	ccuuauuuga	agaaucgcaa	aaccagcaag	aaaagaaua	acaagaauua	7560
uugggaaauu	auaaaauggg	aaauuuguuu	aaauaacaau	uugcugugg	uugcugugg	7620
uauauaaaa	uuuucuuauu	gauagugaga	ggcuugguag	guuuagaauu	aguuuuugcu	7680
guacuucucg	uagugaauag	aguuaggcag	ggauauuac	cauuauugcu	ucagacccac	7740
cucccaauuc	cgaggggacc	cgacaggccc	gaaggaaau	aaagaagaag	uggagagaga	7800
gacagagaca	gaucuuuucg	auuagugaac	ggauccuug	cauuauucg	ggagcagucg	7860
cggagccucg	gcccucucag	cuaccacccg	uugagagacu	uacucuuug	uguaacgagg	7920
auuguggaac	uucugggacg	cagggggugg	gaagccucca	aaauuuggug	gaauuccua	7980
caguuuuugg	gucaggagcu	aaagaauagu	gcuguuagcu	ugcucaauug	cacagcuaua	8040
gcaguagcug	aggggacaga	uaggguuaua	gaaguaguac	aaggagcuua	uagagcuauu	8100
cgccacauac	cuagaagaau	aaagacaggg	uuggaaagga	uuuugcuua	agaugggugg	8160
caagugguca	aaaaguagug	ugguuggaug	gccugcuua	agggaaagaa	ugagacgagc	8220
ugagccagca	gcagaugggg	ugggagcagc	aucucgagac	cuagaaaaac	auggagcaau	8280
cacaaguagc	aacacagcag	cuacacauug	ugauuugucc	uggcuagaag	cacaagagga	8340
ggaggaggug	gguuuuccag	ucacaccuca	gguaaccuuu	agaccaauga	cuuacaaggc	8400
agcuguagau	cuuagccacu	uuuuuuuaga	aaagggggga	cuggaagggc	uaauuacac	8460
ccaacgaaga	caagauaucc	uugauucug	gaucuaacc	acacaaggcu	acuucccuga	8520
uuagcagaac	uacacaccag	ggccaggga	cagauaucca	cugaccuuug	gauggugcua	8580
caagcuagua	ccaguugagc	cagagaaguu	agaaagagcc	aaacaaggag	agaacaccag	8640
cuuguuacac	ccugugagcc	ugcauggaau	ggauagcccg	gagagagaag	uguuagagug	8700
gagguuugac	agccgcucag	cauuuauuca	caugggcccg	gagcugcauc	cggagucuuu	8760
caagaacugc	ugacaucgag	cuugcuacaa	gggacuuucc	gcuggggacu	uuccagggag	8820
gcgugggcug	ggcgggacug	gggaguggcg	agccucacga	uccugcauau	aagcagcugc	8880
uuuuugccug	uacugggucu	cucugguuag	accagaucug	agccugggag	cuc	8933

【図面の簡単な説明】

【図1】

異なる量の装入ターゲットポリヌクレオチド鑄型を用いて合成したTMA反応生成物を電気泳動により分離したものを模式的に示す。"Neg"と表示した列は装入鑄型を含有しなかった反応を表す。残りの列は装入ターゲットポリヌクレオチド量を漸増させて実施した反応を表す。ゲル上においてターゲットポリヌクレオチド由来の特異的増幅生成物の位置を矢印で示した。

【図2】

図2 a～2 cは、TMAについて3つの異なる反応条件を模式的に示す。他の変量、たとえば酵素、プライマーおよびNTP濃度を一定に維持すると、低い被分析体ポリヌクレオチド装入レベル条件下では(図2 a)、反応生成物の主要部

分は鋳型非依存性の非特異的生成物 (NP) であり、被分析体アンプリコンまたは特異的生成物 (SP) は全反応生成物の副成分であるにすぎない。高い被分析体ポリヌクレオチド装入レベル条件下では (図2b)、被分析体アンプリコン (SP) が全反応生成物の主要部分であり、鋳型非依存性の非特異的生成物 (NP) は副成分である。装入被分析体ポリヌクレオチドレベルは低い擬似ターゲットレベルは高い条件下では (図2c)、擬似ターゲット特異的生成物 (PTSP) 形成は非特異的生成物の犠牲においてなされる。

【図3】

図3a～3bは、非特異的増幅生成物を生成しない理想化した反応において擬似ターゲットの含有が定性アッセイを定量アッセイに変換する様子を模式的に示す。図3aは、低い、または高い出発レベルの被分析体ポリヌクレオチド (TA) が反応体 (R) を同様な量の被分析体特異的生成物 (SP) に変換するための鋳型として作用する様子を示す。図3bは、低い、または高い出発レベルの被分析体ポリヌクレオチドを含む増幅反応に擬似ターゲット (PsT) を含有させると、反応で合成された被分析体特異的生成物のレベルと鋳型の装入レベルとの間に定量関係が得られることを示す。この図は、擬似ターゲットが擬似ターゲット特異的生成物 (PTSP) 合成反応の鋳型として作用し、一方、被分析体ポリヌクレオチドは被分析体特異的生成物合成の鋳型として作用することを示す。

【図4】

図4a～4dは、反応に擬似ターゲットを含有させるとポリヌクレオチド増幅反応の動的範囲および精度が改善される様子を説明する理想化したグラフである。図4aは、被分析体特異的アンプリコンのみを生成する理想化した増幅反応について予想される結果を示す。図4bは、被分析体ポリヌクレオチドと無関係な低レベルの非特異的増幅生成物を自然に生成する増幅反応について予想される結果を示す。図4cは、被分析体ポリヌクレオチドと無関係な高レベルの非特異的増幅生成物を自然に生成する増幅反応について予想される結果を示す。図4dは、擬似ターゲットを含有する反応について予想される理想化した結果を示す。

【図5】

被分析体ポリヌクレオチドおよび擬似ターゲットを含有するポリヌクレオチド

集合体の回収効率が変動しても、増幅反応によって同様な量のアンプリコンを得るのが可能であることを示す模式図である。被分析体ポリヌクレオチドと擬似ターゲットを図の上方に一定の出発比率で示す。増幅反応に装入されるポリヌクレオチド試料が100%であっても50%であっても、アンプリコン生成物の最終量は同様である。

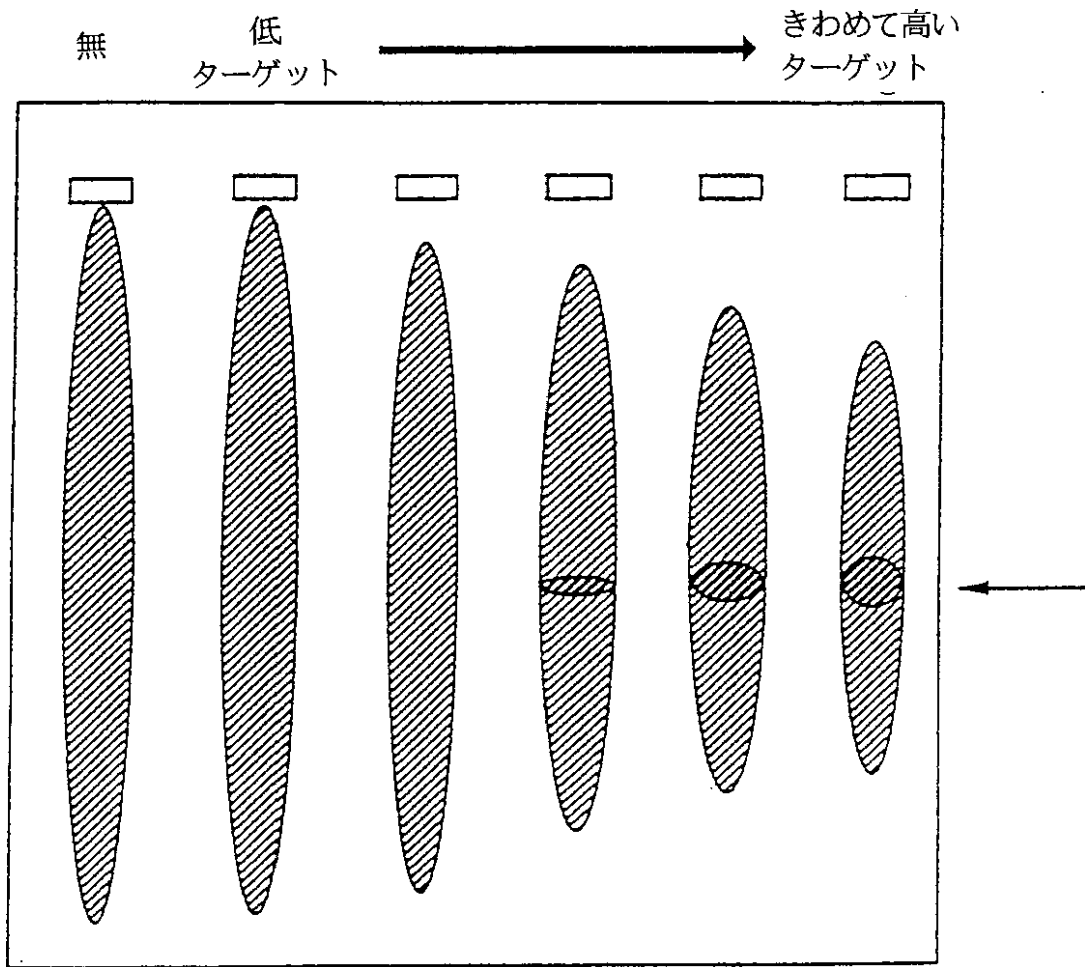
【図6】

異なる量の被分析体ポリヌクレオチドを装入した増幅反応において、擬似ターゲットを用いるとアンプリコン合成を基準化しうることを示す線グラフである。グラフに示した3つの状態は、擬似ターゲットなし（黒菱形）；一定量の擬似ターゲット（黒四角）；一定比率の擬似ターゲットと被分析体ポリヌクレオチド（白四角）である。

【図7】

擬似ターゲットを用いると被分析体アンプリコンの生成を制御しうることを示す線グラフである。グラフに示した2つの状態は、擬似ターゲットなし（黒丸）；反応当たり 2×10^6 コピーの擬似ターゲット（黒四角）である。

【図1】



【図2a】

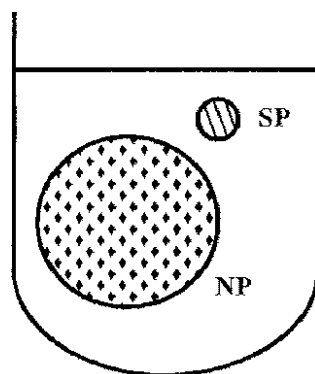


Fig. 2a

【図2b】

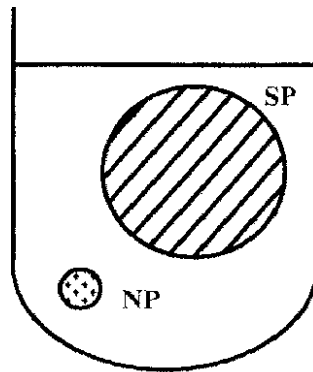


Fig. 2b

【図2c】

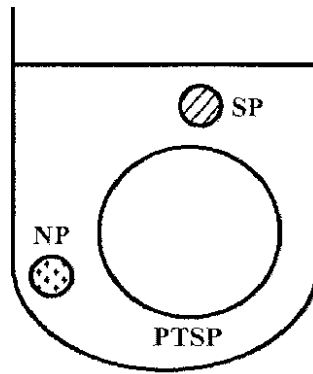


Fig. 2c

【図3】

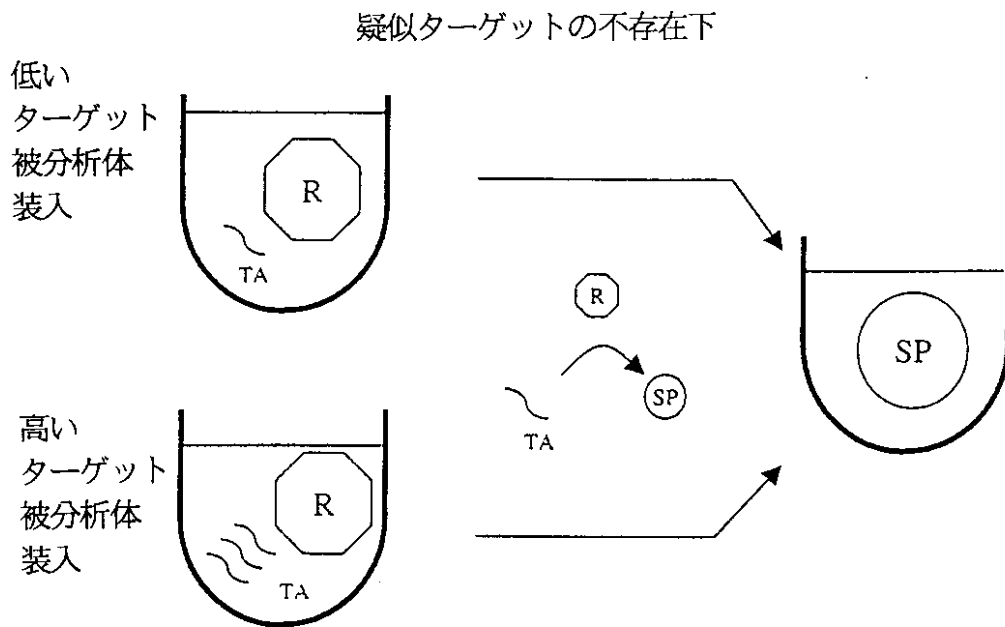


Fig. 3a

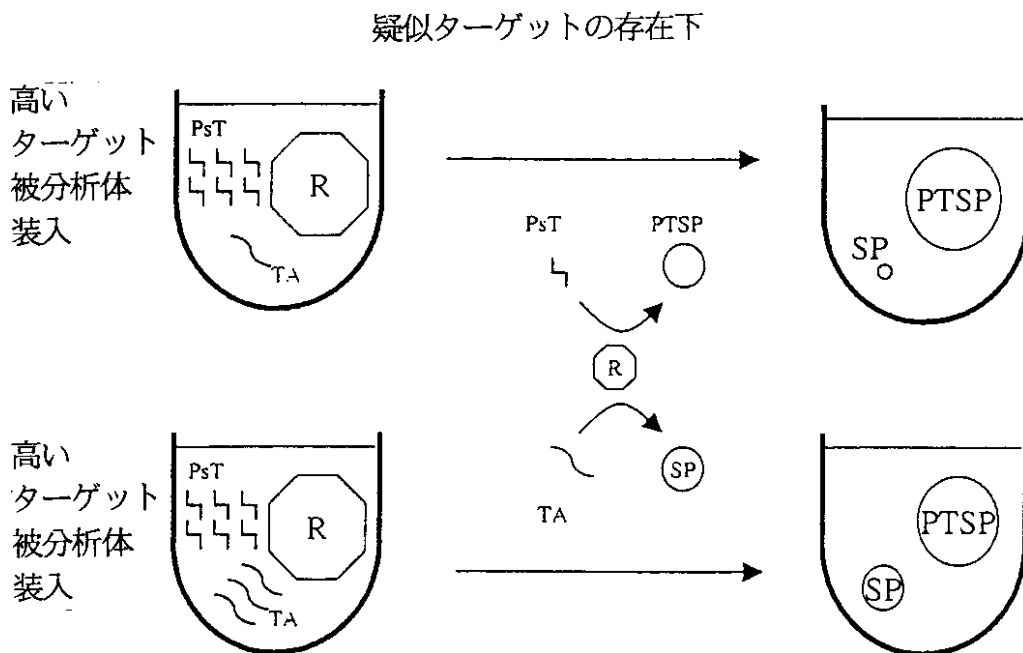
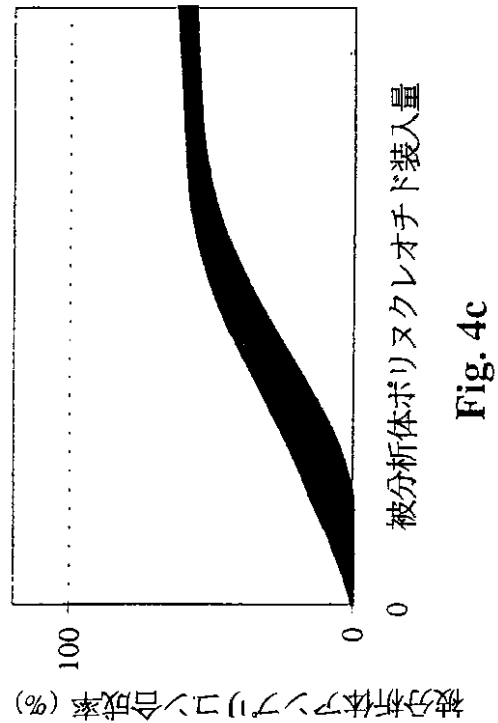
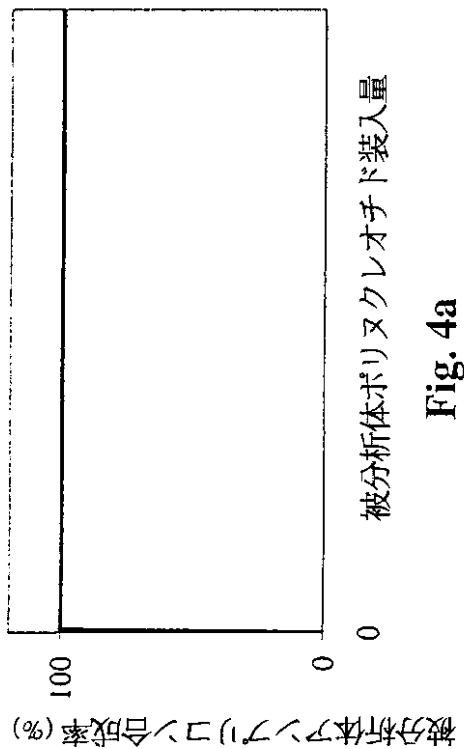
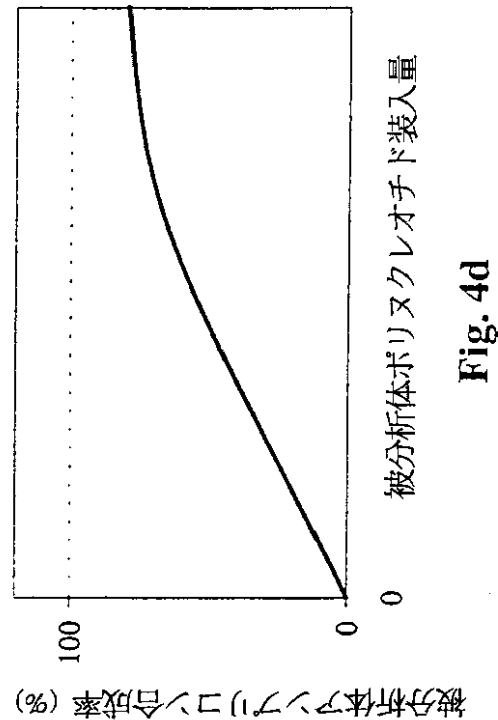
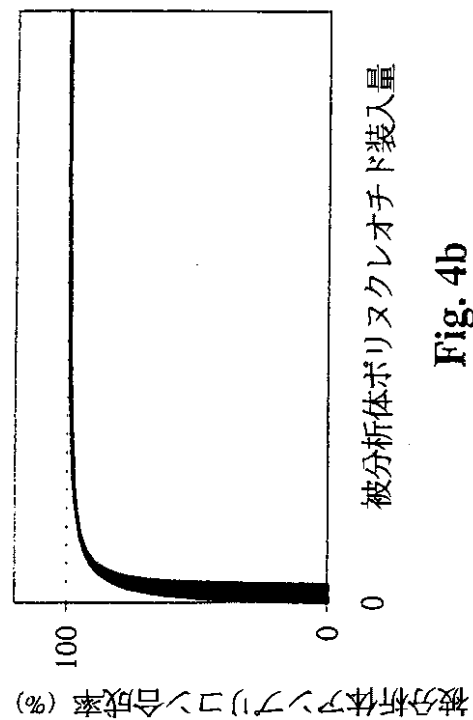
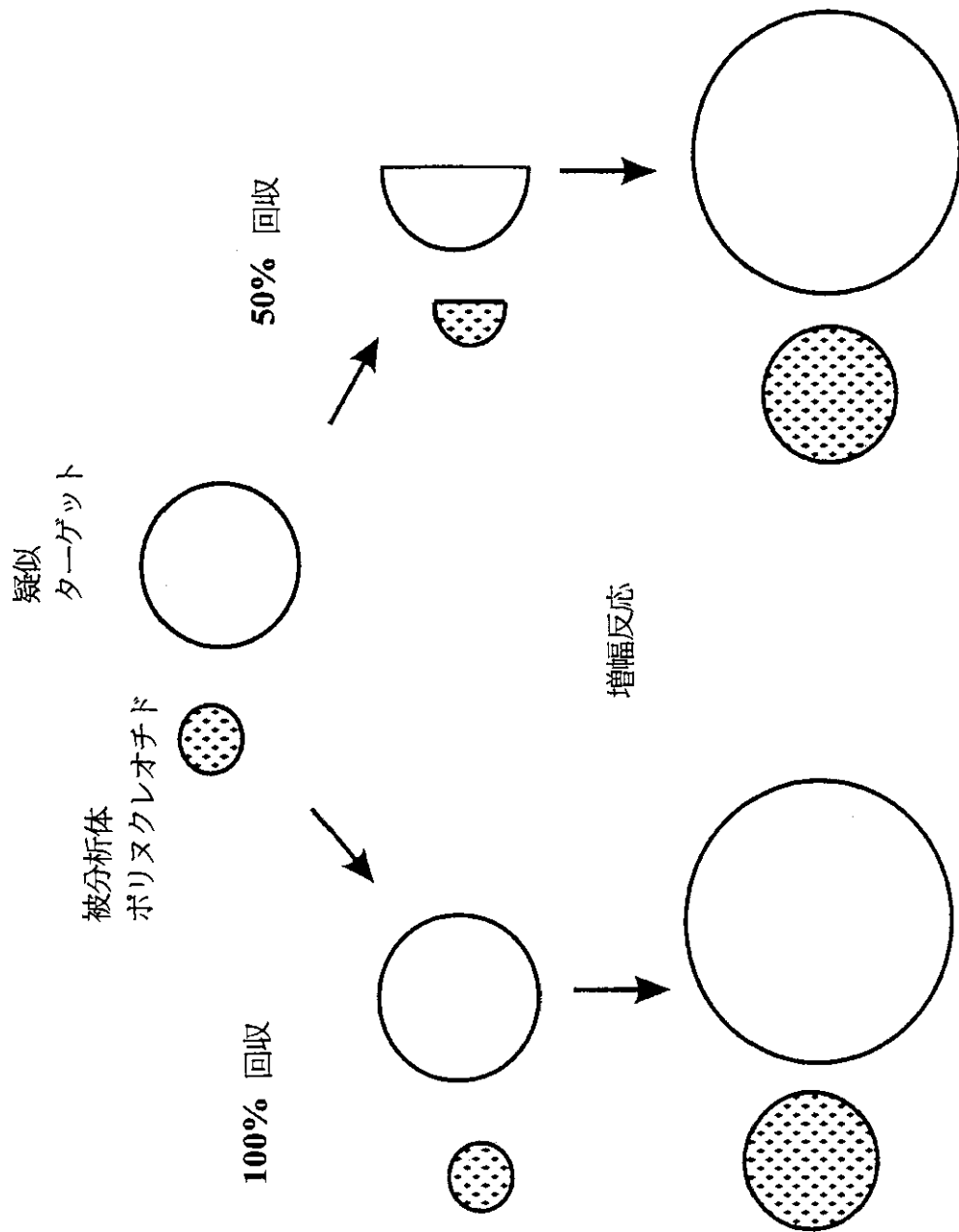


Fig. 3b

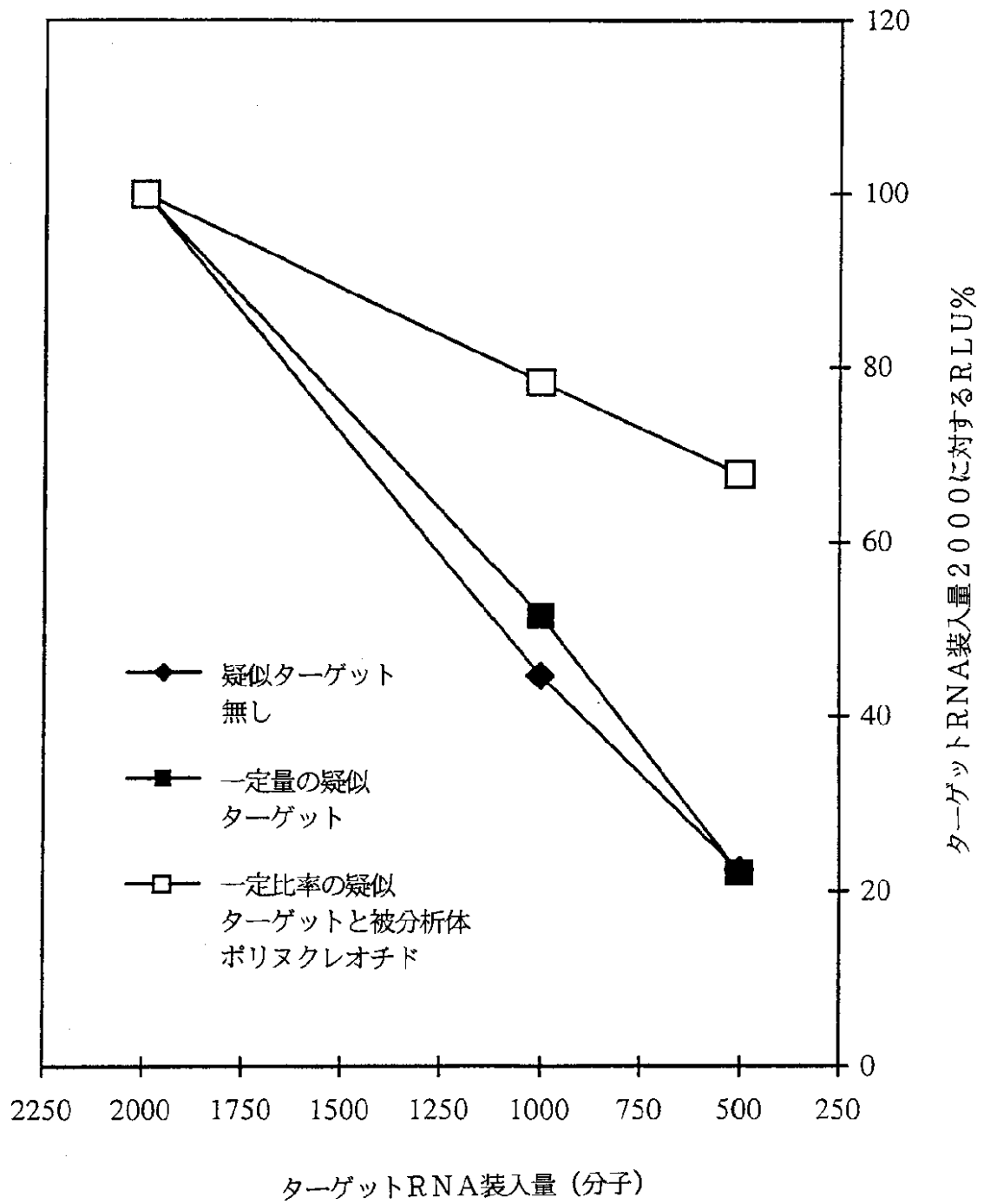
【図4】



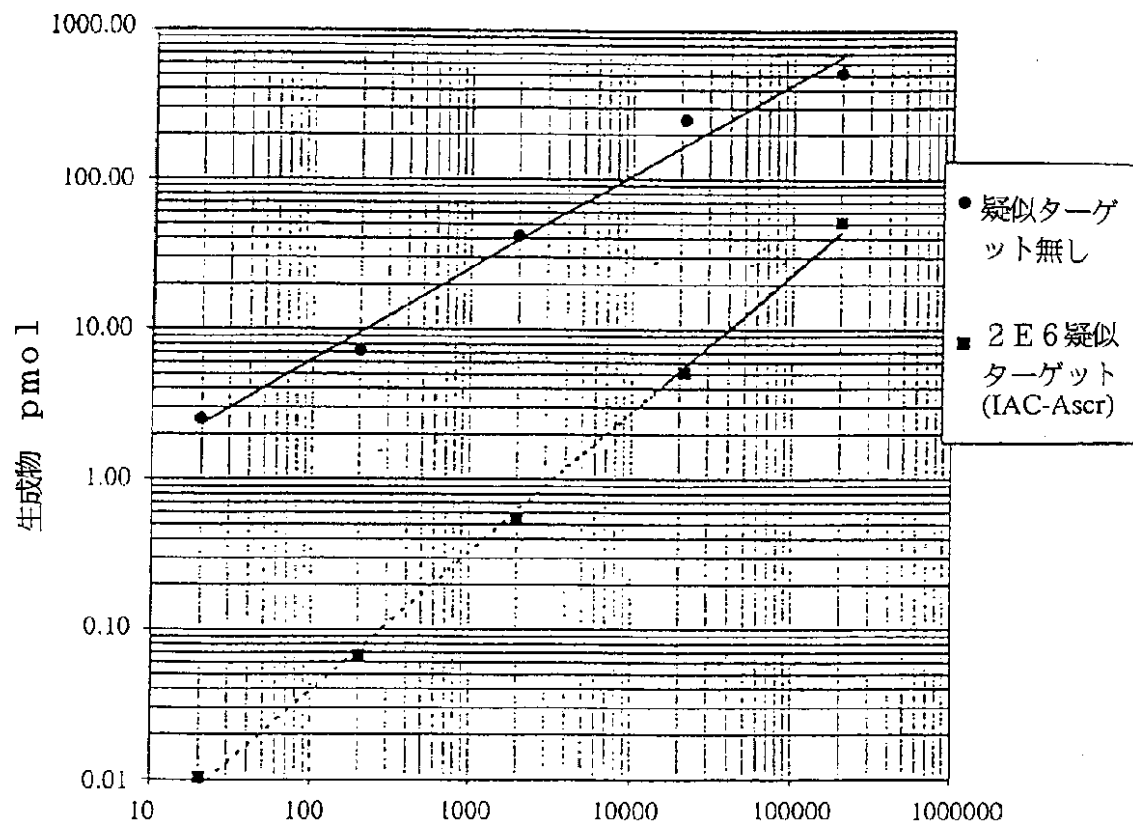
【図5】



【図6】



【図7】



HIV IIIb ウイルス粒子/アッセイ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/20034

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GEMEN VAN B ET AL: "THE ONE-TUBE QUANTITATIVE HIV-1 RNA NASBA: PRECISION, ACCURACY, AND APPLICATION" PCR METHODS & APPLICATIONS, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 4, no. 4, 1 February 1995 (1995-02-01), pages S177-S184, XP000579764 ISSN: 1054-9803	41-49
A	the whole document	1-40, 50-55
Y	--- DATABASE EMBL 'Online! ID: HIVBH102, 7 May 1992 (1992-05-07) WONG-STAL ET AL.: "HIV-1, isolate BH10, genome" XP002183254 abstract	28, 49
Y	--- WO 98 58086 A (ABBOTT LAB) 23 December 1998 (1998-12-23) see HIV-1 consensus probe sequence of primer/probe set 1, claim 1, page 4. the whole document	27
Y	--- EP 0 731 174 A (GEN PROBE INC) 11 September 1996 (1996-09-11) see HIV probe #4, claim 8, page 38. the whole document	27
A	--- KELLOGG DE ET AL.: "Quantitation of HIV-1 Proviral DNA Relative to Cellular DNA by the Polymerase Chain Reaction" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 189, 1990, pages 202-208, XP000386282 page 204 figures 1,3	1-55
A	--- PIATAK M ET AL.: "Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction for Accurate Quantitation of HIV DNA and RNA Species" BIOTECHNIQUES, vol. 14, no. 1, 1993, pages 70-81, XP000331780 page 76 -page 78	1-55
A	--- ERLICH HA: "PCR Technology" 1989, STOCKTON PRESS, NEW YORK XP002183252 Chapter 1: "The Design and Optimization of the PCR" (R. Saiki) page 14 -page 15	1-55
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/20034

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INNIS MA ET AL.: "PCR Protocols - A Guide to Method and Applications" 1989, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US XP002183253 page 10 -----	1-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/20034

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5710029	A	20-01-1998	AU 709292 B2	26-08-1999
			AU 5674896 A	30-12-1996
			CA 2223241 A1	19-12-1996
			EP 0747488 A1	11-12-1996
			JP 11506013 T	02-06-1999
			WO 9640990 A1	19-12-1996
WO 9502067	A	19-01-1995	AT 178946 T	15-04-1999
			AU 668659 B2	09-05-1996
			AU 7492894 A	06-02-1995
			DE 69417863 D1	20-05-1999
			DE 69417863 T2	07-10-1999
			DK 662156 T3	25-10-1999
			WO 9502067 A1	19-01-1995
			EP 0662156 A1	12-07-1995
			ES 2131699 T3	01-08-1999
			FI 951082 A	08-03-1995
			GR 3030554 T3	29-10-1999
			JP 8501222 T	13-02-1996
			US 5837501 A	17-11-1998
			ZA 9405010 A	21-02-1995
WO 9858086	A	23-12-1998	US 5962665 A	05-10-1999
			EP 0991782 A2	12-04-2000
			JP 2000512160 T	19-09-2000
			WO 9858086 A2	23-12-1998
			US 6232455 B1	15-05-2001
EP 0731174	A	11-09-1996	EP 0731174 A2	11-09-1996
			EP 0731175 A2	11-09-1996
			AT 141956 T	15-09-1996
			AU 650622 B2	30-06-1994
			AU 6166390 A	22-02-1991
			AU 677418 B2	24-04-1997
			AU 7415694 A	24-11-1994
			CA 2020958 A1	12-01-1991
			DE 69028257 D1	02-10-1996
			DE 69028257 T2	09-01-1997
			DK 408295 T3	16-09-1996
			EP 0408295 A2	16-01-1991
			ES 2091225 T3	01-11-1996
			GR 3021704 T3	28-02-1997
			IE 902539 A1	27-02-1991
			JP 11046778 A	23-02-1999
			JP 4500759 T	13-02-1992
			JP 2000350592 A	19-12-2000
			KR 242252 B1	02-03-2000
			PT 94662 A	20-03-1991
			WO 9101384 A1	07-02-1991
			US 5766849 A	16-06-1998
			US 5780219 A	14-07-1998
			US 5888779 A	30-03-1999
			US 5856088 A	05-01-1999
			US 5824518 A	20-10-1998
			US 5908744 A	01-06-1999
			US 5712385 A	27-01-1998
			US 5480784 A	02-01-1996
			US 5399491 A	21-03-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/58			A
F ターム(参考)	2G045 AA35 BB50 BB51 DA13 FB01		
	FB02 FB12 FB14 FB15 GC15		
	2G054 AA06 CA22 EA01		
	4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20		
	HA08 HA12 HA13 HA20		
	4B063 QA01 QQ03 QQ10 QQ41 QR07		
	QR32 QR41 QR42 QR56 QR62		
	QR66 QR82 QS12 QS25 QS34		
	QS36 QX02		

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003510020A5	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2001512926	申请日	2000-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	简·探针公司		
申请(专利权)人(译)	根 - Probe公司		
当前申请(专利权)人(译)	根 - Probe公司		
[标]发明人	布村清忠		
发明人	布村 清忠		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6851 C12Q1/6865 C12Q2545/107		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/FB14 2G045/FB15 2G045/GC15 2G054/AA06 2G054/CA22 2G054/EA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA13 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ41 4B063/QR07 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	60/145432 1999-07-23 US		
其他公开文献	JP4796252B2 JP2003510020A		

摘要(译)

一种有用的方法，用于改善通过基于酶的多核苷酸扩增反应获得的结果。更具体地，本发明提供了（1）模板特异性的产生，使得即使在由低水平的分析物多核苷酸引发的反应中，所产生的扩增子的量也反映了扩增之前的分析物的量。（2）促进了生物样品的处理，由此在随后的扩增反应中产生的扩增子的量基本上与从样品中分析物多核苷酸的分离效率无关。（3）用于控制在扩增反应中产生的分析物扩增子的量。