

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4808345号
(P4808345)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月26日(2011.8.26)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q	1/42	(2006.01)	C 1 2 Q 1/42
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M

請求項の数 14 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2001-507084 (P2001-507084)	(73) 特許権者	501494539
(86) (22) 出願日	平成12年6月16日 (2000.6.16)		カビディ、テック、アクチボラダ
(65) 公表番号	特表2003-503073 (P2003-503073A)		CAVIDI TECH AB
(43) 公表日	平成15年1月28日 (2003.1.28)		スウェーデン国ウブサラ、ウブサラ、サイエ ンス、パーク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/005563	(74) 代理人	100075812
(87) 国際公開番号	W02001/001129		弁理士 吉武 賢次
(87) 国際公開日	平成13年1月4日 (2001.1.4)	(74) 代理人	100091487
審査請求日	平成19年3月13日 (2007.3.13)		弁理士 中村 行孝
(31) 優先権主張番号	9902410-1	(74) 代理人	100094640
(32) 優先日	平成11年6月24日 (1999.6.24)		弁理士 紺野 昭男
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 逆転写酵素アッセイキット、その使用および生物学的サンプルにおけるRT活性の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

逆転写酵素 (RT) アッセイキットであって、

ポリスチレン系固相を、1-メチルイミダゾールならびにポリリボアデニル酸 (prA) および/またはポリデオキシアデニル酸 (pdA) を含む結合溶液と接触させ、その後、インキュベーション、洗浄緩衝液による洗浄、乾燥およびパッケージングを行うことによって得ることができる固相結合型のprAテンプレートおよび/またはpdAテンプレートを含有する1つまたは数個のパッケージ、

pH7~8の緩衝液、二価金属イオン、キレート化剤、ポリアミン、RNase阻害剤、還元剤、塩、安定化剤および界面活性剤の混合物またはそれらの単独からなる群から選

10

択されるRTタイプに適合して個々にパッケージされたアッセイ成分、ならびに凍結乾燥されたデオキシヌクレオチド三リン酸、プライマー、保護剤および高濃度洗浄緩衝液の混合物またはそれらの単独、ならびに

アッセイキットの使用に関する文書化された説明書を含むRTアッセイキット。

【請求項2】

凍結乾燥された参照用酵素をさらに含む、請求項1に記載のRTアッセイキット。

【請求項3】

凍結乾燥されたアルカリホスファターゼ結合抗Brduモノクローナル抗体、アルカリホスファターゼ基質緩衝剤およびアルカリホスファターゼ基質を含む検出システムの成分

20

をさらに含む、請求項 1 および 2 のいずれかに記載の RT アッセイキット。

【請求項 4】

前記固相はマイクロタイタープレートであり、100 mM の pH 5 ~ 7 の 1 - メチルイミダゾールならびに 0.5 ~ 2 mg/ml の p r A および / または p d A を含む前記結合溶液のアリコートが各ウエルに加えられ、その後、インキュベーションが 10 ~ 60 の温度で 0.5 ~ 10 時間にわたって行われ、そして 1 - メチルイミダゾールを除くために、pH 5 ~ 7 の B i s - T r i s プロパンを含む前記洗浄緩衝液で各ウエルが洗浄され、そしてプレートを乾燥してパッケージングされる、請求項 1 に記載の RT アッセイキット。

【請求項 5】

100 mM の pH 6.25 の 1 - メチルイミダゾールならびに 1 mg/ml の p r A および / または p d A を含む前記結合溶液の 100 μl が各ウエルに加えられ、その後、インキュベーションが室温で行われ、10 mM の pH 6.25 の B i s - T r i s プロパンを含む前記洗浄緩衝液の 300 μl で各ウエルが 2 回洗浄され、プレートを 37 で乾燥して、プレートをホイルバッグに入れ、バッグが真空シールされる、請求項 4 に記載の RT アッセイキット。

【請求項 6】

前記アッセイ成分は、緩衝剤として pH 7 ~ 8 の T r i s および H e p e s、二価金属イオンとして Mg^{2+} および Mn^{2+} 、キレート化剤としてエチレンジアミン四酢酸 (E D T A) およびエチレングリコールビス(- アミノエチルエーテル) N, N, N', N' - 四酢酸 (E G T A)、ならびにポリアミンとしてスペルミンおよびスペルミジン、R N a s e 阻害剤としてヘパリン硫酸およびデキストラン硫酸、還元剤としてジチオスレイトール (D T T)、ジチオエリトール (D T E) およびグルタチオン、塩として N a C l および K C l、安定化剤として新生児ウシ血清 (N C S) およびウシ血清アルブミン (B S A)、界面活性剤として T w e e n 2 0 (登録商標) および T r i t o n X - 1 0 0 (登録商標)、デオキシヌクレオチド三リン酸として B r d U T P、プライマーとしてオリゴ d T、ならびに保護剤として A T P、G T P および C T P からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の RT アッセイキット。

【請求項 7】

生物学的サンプルにおける RT 活性の定性的および定量的な分析を行うための請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載されるアッセイキットの使用。

【請求項 8】

前記生物学的サンプルは生物学的流体および細胞抽出物から選択される、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記生物学的流体は、血漿、血清、脊髄液、滑液および胸膜液から選択される、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

RT 活性分析の結果に基づいて、異なる時間で行われた測定から得られた結果が比較されるレトロウイルス逆転写に関連する疾患または異常をモニタリングすることを伴う、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 11】

生物学的サンプルにおける RT 活性の定性的および定量的な分析方法であって、生物学的サンプルにおける RT 活性を測定するための請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載される RT アッセイキットを使用する、方法。

【請求項 12】

前記生物学的サンプルは生物学的流体および細胞抽出物から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記生物学的流体は、血漿、血清、脊髄液、滑液および胸膜液から選択される、請求項

10

20

30

40

50

12に記載の方法。

【請求項14】

RT活性分析の結果に基づいてレトロウイルス逆転写に関連する異常または疾患の状態をモニタリングすることを伴う請求項11～13のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、生物学的サンプルにおけるRT活性を分析するための逆転写酵素(RT)アッセイキットに関する。本発明はまた、RT活性分析の結果に基づいてRT活性に関連する異常または疾患の状態を評価することを必要に応じて伴う、生物学的サンプルにおけるRT活性の定性的および定量的な分析を行うための方法およびRTアッセイキットの使用に

10

【0002】

(発明の背景)

逆転写酵素(RT)は、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)を含むすべてのレトロウイルスにとってウイルスRNAからのDNA合成を担う極めて重要な酵素である(Baltimore-70、Temin-70、Barre-Sinoussi他-83)。このプロセスは、第1DNA鎖の合成、DNA/RNAハイブリッドにおけるウイルスRNA鎖の分解、および第2DNA鎖の合成の3つの異なる酵素活性を伴う(総説については、Goffを参照のこと)。

【0003】

レトロウイルスは、外因性形態または内因性形態のいずれかで、あるいはその両方で存在し得る。その主な違いは、その特定ウイルスに対する適した受容体を有する細胞に進入し得るだけの外因性レトロウイルスとは対照的に、内因性レトロウイルスは生殖細胞に進入しているということ、従ってそのDNAが生物のすべての細胞に存在するということである。ヒトにおける内因性レトロウイルス(ERV)は、HERVと呼ばれている。内因性レトロウイルスのこの組み込まれたプロウイルス形態は、外因性レトロウイルスの機能的構造と同じ機能的構造を有する。一部のHERVの生殖細胞内への組み込みは3500万年前～4500万年前に生じたと考えられている。これらのレトロウイルス配列は哺乳動物ゲノムの1%を構成し、従って同様にヒトゲノムの1%を構成している。従って、レトロウイルス配列はすべてのヒト細胞に存在し、通常メンデル則に従って遺伝している。

20

【0004】

HERVの多くのファミリーがヒトのゲノムに存在している。半数体のヒトゲノムあたりのHERVのコピー数は、種々のファミリーについて1コピーから数1000コピーの間で変化している。最も大きなヌクレオチド配列保存がpol遺伝子において見出されている。この特徴は、HERVファミリー間の関係を導き出すために使用されている。多くのHERVおよびそのORFは不完全であるが、mRNA転写物が、いくつかの組織タイプにおいてほとんどのHERVファミリーから検出されている(Wilkinson他(1994)、Leib-MoschおよびSeifarth(1996)に総説される)。さらに、ポリメラーゼ活性およびプロテアーゼ活性を有するビリオン粒子が、正常なヒトの胎盤、卵母細胞、奇形ガン、乳ガン組織において、そして一部の自己免疫患者の唾液腺

30

40

【0005】

いくつかのHERVはゲノム内の染色体中断点に局在化している(DiCristofano他、1995;Meese他、1996)。種々の染色体部位に存在するHERV配列間の組換えは、転座、逆位、重複および欠失を含むゲノムの再配置を生じさせることがある。そのような組換え事象は、進化の重要な特徴であるゲノムの不安定性を生じさせるもとである。さらに、多くの腫瘍は、腫瘍形成において極めて重要な役割を果たしてい

50

ると考えられる特定のゲノム再配置によって特徴付けられる。宿主における感染性レトロウイルスの存在と腫瘍発達との関係は、HERVがガンと関連していることを示唆している。ビリオン粒子およびレトロウイルス関連抗原が、非感染性ウイルスの非存在下でもまた、原発性腫瘍サンプルにおいて頻繁に認められている(Weiss、1984; Faff他、1992)。さらに、レトロウイルスタンパク質に対する抗体がガン患者の血清において明らかにされている(Weiss、1984)。その上、HERV配列が、ある種の腫瘍由来細胞株において非常に発現していることが見出されている(Lower他(1996)に総説される)。

【0006】

内因性プロウイルスもまた外因性変化体との組換えをもたらし得る(Martinellic他、1990)。新規な組み換え体は、変化した表現型を受け取る。これは、新しい感染性レトロウイルスが迅速に進化することの一因になり得る。env遺伝子が主に影響を受ける。これは、他の部分における変異は有害であり、粒子形成と両立し得ないからである。レトロウイルス株の中には、ある種においては共生的であり、別の種では病原性であるものが見出されている。これらの発見は、異種移植における重大な問題を示している。移植された組織によってもたらされる共生的なERVは、新しい宿主において病原性となり得る。そのようなERVは、新しい宿主の細胞表面に存在する、レトロウイルス融合に必要な細胞表面受容体と相互作用し得る場合がある。さらに、組織受容者のゲノム内の内因性レトロウイルス配列との組換えが生じることがあり、そして集団内に広がり得る新しい感染性レトロウイルスを生じさせることがある。内因性レトロウイルスおよび外因性レトロウイルスはともに、種内および種間における遺伝物質の垂直伝搬および水平伝搬に寄与し、かつ新しい病原性因子の進化に対する機構を提供し得る。

【0007】

感染性レトロウイルスおよびERVはともに様々な免疫調節機能を示すことが見出されている(Krieg他(1992)に総説される)。これらの作用は、主としてマウスで研究されているが、HERVについて類似した機構が存在することを裏付ける観測結果がいくつか得られている。HERV配列が免疫応答を脱調節し得る場合、HERV配列により自己免疫疾患が生じ得る。これらの作用は、HERVタンパク質によって直接的に調節され得るか、あるいは免疫応答に関与する分子の発現に影響を及ぼすことによって間接的に調節され得る。HERVタンパク質は細胞表面に露出し得る。これらのタンパク質配列に対する自己耐性の喪失は、それらにさらされている細胞に対する自己免疫反応を生じさせることがある。レトロウイルス感染後に産生される抗体は、HERVによってコードされるタンパク質との交差反応性を有する場合があり、耐性を喪失させるもとであり得る。この現象はトランスジェニックマウスで認められている(Zinkernagel他、1990)。さらに、ERVによってコードされるenvタンパク質に対する耐性の喪失が、自己免疫性の腎系球体症を自発的に発症するマウスで認められた(Krieg他(1990および1992)に総説される)。ヒトにおけるいくつかの観測結果により、内因性レトロウイルスタンパク質と外因性レトロウイルスタンパク質との交差反応性抗体の存在を裏付けることができる。レトロウイルスタンパク質に対する抗体が自己免疫患者の血清中に検出されている(Krieg他(1992)、UrnovitzおよびMurphy(1996)に総説される)。ある種の場合には、血清が外因性レトロウイルスとも反応することが見出された。レトロウイルスの感染は自己免疫疾患の発症と関連している(Krieg他(1990および1992)に総説される)。さらに、感染性レトロウイルスのタンパク質は、自己抗体に対する高頻度の標的である自己抗原に対する部分的な類似性を示す(Krieg他(1992)に総説される)。自己抗体は、そのような標的に対する自己免疫応答を開始させることができる。これは、分子模倣と呼ばれる機構である。しかし、知られている自己抗原に対するHERVタンパク質の類似性は未だ検出されていない。

【0008】

RT活性に関するアッセイは、細胞培養物におけるレトロウイルスの検出および定量に対

10

20

30

40

50

する受け入れられる技術になっている。それらは、HIVの単離に対する確認試験として使用されるp24抗原アッセイと一緒にになっている(Jackson-88、Gupta-87)。RTはまた、HIVに対する効率的な抗ウイルス剤を見出す試みにおける主要な標的の1つである。従来のRT活性アッセイは、人工的なテンプレート-プライマー構築物およびヌクレオチド基質としてのトリチル化デオキシヌクレオチド三リン酸を用いた可溶性酵素のアッセイを利用することによって行われている(Baltimore-71、Lee他-87)。この初期のシステムは、トリクロロ酢酸(TCA)によって沈殿し得るRNA/DNAハイブリッドへの放射能取込みを検出することに基づいていた。線放射性ヌクレオチドの使用は、放射能を検出するためにシンチレーション液を使用することを必要とし、これは、多くの場合、クエンチング問題のために良好な再現性をもたしていない。この方法は比較的面倒であり、非常に多くのサンプルを大規模にスクリーニングすることに適合させることは容易ではない。この方法また、サンプル中の妨害因子の作用に対して非常に敏感である。

10

【0009】

HIVに関する集中的な研究が行われたこの10年間において、RTアッセイは、種々の技術を使用して改善されている。I¹²⁵で標識された基質の導入は、増大した感度をもたらし、そしてシンチレーション液のクエンチングをなくし、その使用が不要になった(Neumuller他-90)。固相に結合させたテンプレートまたはプライマーの導入は、基質と生成物との分離を単純化し、TCA沈殿の必要性をなくし、そして「ワンチューブRTアッセイ」をもたらした(Gronowitz他-90、EP0447442B1)。

20

【0010】

より近年において、RTアッセイにおける標識としての放射能の使用は、規定されたりガンドに対して大きな親和性を有する抗原性のエピトープまたは構造のいずれかを含有する修飾されたヌクレオチド塩基の使用によって少なくなっている。これらのエピトープまたは構造を新しく合成されたRNA/DNAハイブリッドに存在させることは、その後、例えば、ELISA酵素などと結合した抗体またはリガンドを結合させるために使用されている。その後、結合したELISA酵素の量が二次酵素アッセイにおいて測定される。

【0011】

Porstmann他(1991)は、5-プロモ-デオキシウリジン(BrdU)三リン酸をRTアッセイにおけるヌクレオチド基質として利用している。取り込まれたBrdUMPの量が、二次的な工程において、アルカリホスファターゼ結合モノクローナル抗BrdU抗体を使用する免疫アッセイで測定される。

30

【0012】

EberleおよびR. Seibl(1992)は、放射能標識されたdTTPの代わりに、ジゴキシゲニンで標識されたdUTPの新しく合成されたDNA内への取込みを測定している。取り込まれなかったヌクレオチドを新しく合成されたDNAから分離することを可能にするために、ビオチンで標識されたdUTPもまた反応混合物に加えられている。逆転写後、新しく合成された二重標識DNAが、ストレプトアビジンがコーティングされたELISAウエルに固定化され、ペルオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体を結合させることによって光度測定的に評価される。この手法は、Boehringer Mannheimから市販されているRTアッセイキットの基礎である。

40

【0013】

Urabe他(1994)は、固定化されたodT/prA構築物におけるビオチン-dUTPの取込みに基づく非放射性RTアッセイを開発している。取り込まれたヌクレオチド基質の量が、ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼの添加後に光度測定的に測定される。本発明に最も近い先行技術が、Ekstrand他(1996)によって開発された。そのアッセイにおいて、96ウエルマイクロタイタープレートのウエルに共有結合させたポリ(rA)は、逆転写工程時におけるBrdUMPの取込みに対するテンプレートとして役立つ。DNAに取り込まれたBrdUMPの量が、その後、Porstm

50

その他(1991)によって使用されたように同様な手法に従って免疫学的に測定される。この方法は、RT測定キットとしてCavidi Tech(Uppsala、スウェーデン)から入手することができる。

【0014】

NEN(New England Nuclear、米国)によって商業的に利用されている、RT活性を検出するための別の原理は、新しく合成されたcDNAを検出するために配列特異的プローブを利用することである。この酵素反応では、5'端に近いRNA配列に対して相補的な20塩基のオリゴヌクレオチドプライマーとのヘテロポリマーRNA分子が利用されている。完全なcDNA鎖がRT反応のときに産生される。テンプレートRNAを加水分解した後、cDNAは2つの異なるオリゴヌクレオチドプローブ(捕獲プローブおよび検出プローブ)とハイブリダイゼーションさせられる。捕獲プローブは、cDNAをマイクロプレートのウェルに結合させるために使用される。検出プローブは西洋ワサビペルオキシダーゼに結合しており、これは、使用されなかったヌクレオチド基質および遊離のプローブを除くための洗浄を行った後、発色反応をもたらす。

10

【0015】

最後のタイプのアッセイにおける検出感度は、RT反応により得られたcDNAのポリメラーゼ連鎖反応によって増大させることができる。増幅されたDNAは、その後、種々のタイプの標識プローブを用いて検出することができる(Silver(93)、Heneline(1995)、米国特許第5817457号、米国特許第5849494号)。

【0016】

生物学的サンプルにおけるRT活性の知識を何らかの適用のために使用する場合、定量的な結果をもたらすRTアッセイを使用することが望ましい。そのような適用は、異なる時間で行われた測定に由来するRTアッセイの結果が比較される疾患または異常のモニタリング、およびRT活性のレベルを標準的なレベルと比較したときに、患者が、問題としている疾患または異常の危険性を有しているかどうか、あるいは実際に問題としている疾患または異常に罹患しているかどうかを示される疾患または異常の診断を含む。

20

【0017】

いくつかの場合には、できる限り高感度であるアッセイ、すなわち、できる限り小さい量のRT活性を生物学的サンプルにおいて測定することができ、その結果、RT活性の存在および大きさを初期段階の異常および疾患と関連させることができるアッセイを使用することが望ましい。

30

【0018】

(発明の説明)

本発明は、スクリーニング目的のために容易に使用され、かつRT活性に対して非常に高感度であるRTアッセイを提供する。

【0019】

より詳しくは、本発明は、ポリスチレン系固相を、1-メチルイミダゾールならびにポリリボアデニル酸(prA)および/またはポリデオキシアデニル酸(pdA)を含む結合溶液と接触させ、その後、インキュベーション、洗浄緩衝液による洗浄、乾燥およびパッケージングを行うことによって得ることができる固相結合型のprAテンプレートおよび/またはpdAテンプレートを含有する1つまたは数個のパッケージを含む逆転写酵素(RT)アッセイキットに関する。このキットはまた、緩衝液(pH約7~8)、二価金属イオン、キレート化剤、ポリアミン、RNAse阻害剤、還元剤、塩、安定化剤および界面活性剤の混合物またはそれらのそれぞれからなる群から選択されるRTタイプに適合して個々にパッケージ包装されたアッセイ成分、ならびに凍結乾燥されたデオキシヌクレオチド三リン酸、プライマー、保護剤および高濃度洗浄緩衝液の混合物またはそれらの単独、ならびにアッセイキットの使用に関する文書化された説明書を含む。必要に応じて、このキットは、凍結乾燥された参照用酵素(1つまたは複数)を含む。必要に応じて、このキットはさらに、凍結乾燥されたアルカリホスファターゼ結合抗BrdUモノクローナル抗体、アルカリホスファターゼ基質緩衝剤およびアルカリホスファターゼ基質(pNPP

40

50

錠剤など)を含む検出システムの成分を含む。

【0020】

本発明によるRTアッセイキットの好ましい実施形態において、固相はマイクロタイタープレートであり、そして100mMの1-メチルイミダゾール(pH約5~7)ならびに0.5~2mg/mlのprAおよび/またはpdAを含む結合溶液のアリコートが各ウエルに加えられ、その後、インキュベーションが10~60の温度で0.5~10時間にわたって行われ、そして1-メチルイミダゾールを除くために、Bis-Trisプロパン(pH約5~7)を含む洗浄緩衝液で各ウエルが洗浄される。

【0021】

本発明によるRTアッセイキットの特に好ましい実施形態において、100mMの1-メチルイミダゾール(pH約6.25)ならびに1mg/mlのprAおよび/またはpdAを含む結合溶液の100μlが各ウエルに加えられ、その後、インキュベーションが室温で約2時間行われ、そして10mMのBis-Trisプロパン(pH約6.25)を含む洗浄緩衝液の2x300μlで各ウエルが洗浄され、そしてプレートを37で約25分間乾燥して、プレートをホイルバッグに入れ、バッグが真空シールされる。

10

【0022】

本発明によるRTアッセイキットのさらなる実施形態において、アッセイ成分は、緩衝剤としてTrisおよびHepes(pH約7~8)、二価金属イオンとしてMg²⁺およびMn²⁺、キレート化剤としてエチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびエチレングリコールビス(-アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、ならびにポリアミンとしてスペルミンおよびスペルミジン、RNase阻害剤としてヘパリン硫酸およびデキストラン硫酸、還元剤としてジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリトール(DTE)およびグルタチオン、塩としてNaClおよびKCl、安定化剤として新生児ウシ血清(NCS)およびウシ血清アルブミン(BSA)、界面活性剤としてTween20およびTritonX-100、デオキシヌクレオチド三リン酸としてBrdUTP、プライマーとしてオリゴdTまたはオリゴdN(この場合、NはUなどの別のTアナログである)、ならびに保護剤としてATP、GTPおよびCTPからなる群から選択される。

20

【0023】

本発明はまた、生物学的サンプル、例えば、血漿、血清、脊髄液、滑液および胸膜液などの、細胞抽出物および生物学的流体から選択される生物学的サンプルにおけるRT活性の定性的および定量的な分析を行うための本発明によるアッセイキットの使用に関する。

30

【0024】

好ましい実施形態において、本発明による使用は、RT活性分析の結果に基づいてRT活性に関連する異常または疾患の状態を評価することを伴う。

【0025】

さらに、本発明は、生物学的サンプルにおけるRT活性の定性的および定量的な分析方法に関する。この方法は、生物学的サンプル、例えば、血漿、血清、脊髄液、滑液および胸膜液などの、細胞抽出物および生物学的流体から選択される生物学的サンプルにおけるRT活性を測定するための本発明によるRTアッセイキットに関する文書化された説明書を使用する工程、および前記説明書に従う工程を含む。

40

【0026】

好ましい実施形態において、本発明による方法は、RT活性分析の結果に基づいてRT活性に関連する異常または疾患の状態を評価することを伴う。

【0027】

次に、本発明は、図面の参照および実施形態のより詳しい説明によって例示されるが、これらの実施形態は、特許請求の範囲の請求項において規定される保護の範囲に対する限定と見なしてはならない。

【0028】

(発明の実施形態の詳細な説明)

50

本発明のRTアッセイキットは3つの異なるタイプの成分を含む：すなわち、

- 1) 固相に結合させたポリリボアデニル酸 (prA) またはポリデオキシアデニル酸 (pdA) からなるテンプレート。
- 2) 結合させたテンプレートポリヌクレオチドを使用してプライマーに依存する様式で新しいDNA鎖を酵素に重合させることができる反応混合物。
- 3) インビトロで合成されたDNA鎖を免疫学的に検出するための検出システムの成分。

【0029】

1) 固相結合テンプレート

ポリヌクレオチドがウイルスおよび細胞のRNAおよびDNA依存性のDNAポリメラーゼ (逆転写酵素、RT) によるプライマー依存的なdNTP取込みのテンプレートとして役立ち得る様式でprAまたはpdAをある種のタイプのマイクロタイタープレートに結合させることができる方法が開発された。2つの市販されているマイクロタイタープレート (Nalge Nunc Internationalから得られるCovalinkTMおよびNucleoLinkTM) において機能することが示された。本発明によるアッセイキットのために使用されるprA結合型マイクロタイタープレートが、NucleoLinkTM細片から製造される。手順および緩衝液は表1に記載されている。結合機構は、手順が製造者によって推奨または示唆されている方法に対応しておらず、あるいは文献にも明示的に述べられていないので不明である。考えられる反応機構は、その特異的な表面の知られている使用および意図された使用のためにグラフト化された反応性基ではなく、製造手順のときに持ち込まれた反応性基が関わっている。同様の結果が、他の市販供給物から得られる他のポリスチレン系マイクロタイタープレートを用いて得られることが予想される。CovalinkTMの性質と等しい性質を有する表面を得るためにポリスチレンを化学的に活性化する方法が発表されている (Zammattéo他 - 96)。ポリヌクレオチドをプラスチック表面に結合させるためのいくつかの他の方法もまた発表されている (Zammattéo他 - 96、Gregorius - 95、Niveleau - 93、Rasmussen他 - 91、GhoshおよびMusso - 87)。

【0030】

2) RTタイプに適合した反応混合物

精製された酵素を使用する可溶性システムにおけるRNA依存性DNAポリメラーゼおよびDNA依存性DNAポリメラーゼによるヌクレオチド取込みを得るための一般的な条件は単純であり、よく知られている。そのようなシステムは、pHを約7.5に保つ緩衝液、二価金属イオンのMg²⁺または時にはMn²⁺、イオン強度を調節するための塩、一部の酵素の場合には還元剤および少量の界面活性剤を含む。この単純な反応緩衝液が提供された場合、酵素は、加えられたテンプレート、プライマーおよびデオキシヌクレオチド三リン酸を利用して、DNA鎖を合成することができる。この一般的な概念は、異なるクラスまたはタイプの逆転写酵素の間における、必要とされる最適な反応条件または特に適合させた反応条件の違いを考慮していない。別の重要な局面は、RT酵素活性の供給源として未処理の生物学的流体または細胞抽出物を添加することに耐える反応混合物の所望される能力である。

【0031】

細胞培養上清などの粗サンプルおよび精製酵素の両方を使用した系統だった試験により、特定の逆転写酵素のために最適化された反応混合物、または特定の逆転写酵素のために特に適合化された反応混合物を作製するために使用される他の反応成分が明らかにされた。

【0032】

表2は、個々のRTタイプに適合した反応混合物を組み立てるために使用される成分の概要を含む。典型的な反応混合物の組成は表3に示されている。

【0033】

本発明の逆転写酵素アッセイ法は、下記に記載されているように行われる。アッセイの最初の工程は、100μlの反応混合物をprA結合型マイクロタイタープレートの各ウェルに加え、その後、20分~60分のプレインキュベーションを33°Cで行うことである

10

20

30

40

50

。その後、逆転写酵素を含有するサンプルを50 μ lの緩衝液において加える。これにより150 μ lの最終アッセイ容量になる。その後、マイクロタイタープレートは33でインキュベーションされる。それぞれのサンプルが、3時間および一晩(16時間~20時間を意味する)に規格化された2つのアッセイ時間を考慮した二連のマイクロタイタープレートに加えられる。段階的な手順は、それぞれのキットに含まれる文書化された説明書または使用者マニュアルに示されている。そのような説明書または使用者マニュアルは、下記の適用のいくつかまたはすべてのために一般的な逆転写酵素アッセイ成分をどのように適合させるかに関する示唆または指示を含む：1) RT活性の定量化、2) 細胞抽出物、細胞上清および/または生物学的流体(血漿、血清、脊髄液、滑液および胸膜液(これら限定されない)を含む)におけるRT活性のスクリーニング、3) RT活性阻止抗体の測定、4) RT活性阻害物質のIC₅₀値の測定。

10

【0034】

これらの反応混合物および固相結合型テンプレートを使用して、本発明者らは、固相結合型テンプレートに基づく他の以前に記載されたアッセイよりもRT活性の直接測定において高感度であるか、あるいはこれまで知られていない逆転写酵素活性の検出を可能にする特許請求の範囲に記載されたアッセイを設計した。

【0035】

3. インビトロ合成されたDNA鎖の免疫学的検出

サンプル中のポリメラーゼは、反応混合物に提供されたプロモデオキシウリジン三リン酸(BrdUTP)を使用してDNA鎖を合成する。

20

【0036】

取り込まれたBrdUMPは、アルカリホスファターゼに結合させたBrdU結合モノクローナル抗体によって検出される。その後、結合した抗体のアルカリホスファターゼ活性が、パラ-ニトロフェニルホスフェート(pNPP)を含有する基質溶液を加えることによって定量される。基質溶液は、pNPPがアルカリホスファターゼによって切断されたときに黄色く変色する。光学密度(OD)が標準的なELISA読み取り装置で405nmの波長において測定される。バックグラウンドに対して補正されたOD値はサンプル中のRT活性に比例する。

【0037】

検出工程は、下記に記載されているように行われる。段階的な手順は、それぞれのキットに含まれる文書化された説明書または使用者マニュアルに示されている。緩衝液溶液の組成は表4に示されている。

30

【0038】

逆転写酵素アッセイの後、マイクロタイタープレートは、市販のELISAプレート洗浄機のいずれかを使用して、あるいは洗浄緩衝液を含むバケツにプレートを順次浸漬することによって洗浄される。結合化抗体が、必要に応じて、凍結乾燥形態でキットに提供される。2回蒸留した水における1%のTriton X-100で再構成した後、100 μ lの抗体溶液が各ウエルに加えられ、そしてマイクロタイタープレートは33で90分間インキュベーションされる。過剰な抗体を除くために、プレートは、再度、同じ様式で続いて洗浄される。基質溶液が、キットとともに必要に応じて提供される緩衝液およびpNPPの錠剤から調製される。その後、OD値が好適な時間間隔で測定される。

40

【0039】

結合したアルカリホスファターゼ酵素の量と黄色生成物の濃度との直線関係は、OD値が大きいところで崩れる。種々の時間でODを測定することによって、逆転写酵素アッセイ工程のときに形成される生成物の大きな量および少ない量の両方について有用な値(すなわち、特定の装置の直線的な読み取り範囲内にあるOD値)を得ることができる。すべてではないが、一部のキットには必要に応じて含まれる参照用RT酵素は、30分後、2時間後および16時間後~20時間後(すなわち、一晩)にODが測定されたときに有用なOD値を有する滴定曲線を得るために校正される。

【0040】

50

本発明のRTアッセイキットを用いて得られる改善された性能が表5に明らかにされている。HIV-1のRT滴定曲線が、以前に知られているLentiRTキット(Cavidi Tech AB)を用いて、そして本発明のアッセイキットを用いて得られた。OD値はRT酵素の濃度に対してプロットすることができ、そして最小二乗適合法を使用して直線にフィットさせることができる。表6におけるk値は、計算された直線の傾きであり、アッセイ感度の尺度である。本発明のアッセイキットは1桁大きいk値を有することが理解され得る。実用的な面で、このことは、はるかに低い濃度のHIV-1逆転写酵素を含有するサンプルから有用な測定値をもたらし、かつ/または時間の節約になる。逆転写酵素アッセイ時間が短くなること、および/またはアルカリホスファターゼの読み取り時間が短くなることは、本発明のキットの使用者には所要時間の短縮を意味する。

10

【0041】

本発明のキットの典型的な構成要素

A. p r Aおよび/またはp d Aを結合させた2つの96ウエルマイクロタイタープレート。

B. 表2に列記された成分I~IXのRTタイプに適合した混合物を含有するサンプル希釈用および反応の緩衝液。

C. 別のバイアルで混合されるか、または別のバイアルで提供される凍結乾燥された反応成分X~XII。

D. 組換え体、精製された天然型またはウイルス粒子のいずれかである凍結乾燥された参照用酵素。

20

E. 高濃度の洗浄緩衝液。

F. 凍結乾燥されたアルカリホスファターゼ結合抗Brduモノクローナル抗体(「RT産物トレーサー」と表示される)。

G. アルカリホスファターゼ基質緩衝液およびpNPPの錠剤。

H. 文書化された説明書またはマニュアル。

【0042】

【実施例】

実施例1

細胞上清におけるPERV(ブタ内因性レトロウイルス)RTの改善された検出
ブタの細胞株PK-15(ブタ腎臓)は、少量のPERVを絶えず産生していることが知られている。PK15細胞の培養物に由来する上清を順次希釈した。Cavidi Tech ABのCタイプRTアッセイおよび本発明のMn²⁺アッセイの各希釈におけるRT活性検出能を調べた。図1に示すデータは、一晚のRT活性から得られたものである。

30

【0043】

本発明のアッセイキットは、先行技術のアッセイキットと比較して約25倍増大した活性を示している。検出感度における差を補償するために、より多くのサンプルを使用することはできなかった。C型アッセイは、より大きな上清濃度(>2μl/ウエル)での時間および/またはサンプル量の場合、増大したバックグラウンドレベルおよび直線性からのずれに悩まされたからである。

【0044】

本発明のアッセイキットは、外因性レトロウイルスの考えられる転移に関する研究、および/または異種移植に関連する内因性レトロウイルスの活性化に関する研究において使用することができる。

40

【0045】

実施例2

滑液における逆転写酵素の直接測定

近年のDNAハイブリダイゼーション実験は、ある種のリウマチ性異常と、レトロウイルス関連配列の存在との関連を示唆している。慢性関節リウマチ患者に由来する滑液の凍結サンプルをKarolinska sjukhuset(Stockholm、スウェーデン)のリウマチ学部門から得た。サンプルは、凍結前の低速遠心分離により細胞および細

50

胞片が除かれていた。サンプルを解凍し、順次希釈して、RT活性について調べた。

【0046】

得られた活性を OD_{405} / h に再計算した。図2には、本発明の滑液RTアッセイにおいて $1 \mu l$ のサンプルおよび一晚の酵素反応を使用して見出されたRT活性が示されている。RT活性は、Cavidi Tech ABのLentiまたはC対応のRTアッセイにより調べられたサンプルのいずれにおいても検出されなかった。

【0047】

実施例3

ヒト乳ガンに由来する抽出物におけるRT活性の検出

MMTV（マウス乳腫瘍ウイルス）に対する外因性または内因性のヒト対応体はヒト乳ガンの病因に関与している。MMTVの組換えRTを使用して、アッセイ条件を最適化することによって、RT活性を、事前の濃縮または精製を行うことなく乳ガンに由来する抽出物において検出することができる。ヒト乳ガンに由来する凍結された抽出物をAkademiska sjukhuset（Uppsala、スウェーデン）の腫瘍学部門から得た。腫瘍組織はホモジネートされ、標準緩衝液（pH7.4）に懸濁された。上清が低速遠心分離による清澄化の後に回収された。サンプルを解凍し、順次希釈し、そして本発明の Mg^{2+} RTアッセイおよびCavidi Tech ABのLentiまたはCタイプのRTアッセイにおいてRT活性の存在について調べた。

【0048】

図3には、2時間のAP反応と組み合わせた一晚のRT反応を使用して得られた結果の代表的な例が示されている。本発明の Mg^{2+} RTアッセイとCavidi Tech ABのLenti RTアッセイとの検出感度の差は約400倍であった。Cavidi Tech ABのCタイプRTアッセイでは活性は検出されなかった。

【0049】

図4には、種々の患者に由来する腫瘍抽出物において本発明の Mg^{2+} RTアッセイによって検出されたRT活性の変動が例示されている。

【0050】

本発明のアッセイキットは、乳ガンの病因における外因性レトロウイルスまたは内因性レトロウイルスの考えられる役割に関する研究において使用することができる、そして診断目的のために使用することができる。

【0051】

実施例4

細胞培養物に由来する上清におけるHTLV（ヒトT細胞白血病ウイルス）様ウイルスの検出

一部のHTLV感染者は腫瘍学的異常または脊髄障害性異常を発症し続ける。日本および南アジアの特定地域において、関連した疾患の成人T細胞白血病が最初に記載された。神経学的異常である熱帯性痲痺対不全麻痺がカリブ出身者の患者において最初に記載された。ウイルスに対する曝露および/または低レベルのウイルス活性の持続した存在を検出することができる方法が望まれる。

【0052】

非常に関連するウシウイルスのウシ白血病ウイルス（BLV）は、酪農業および牧畜業にとって大きな経済的結果を伴うウシの病原体である。BLVを使用して、BLV/HTLVのRT活性に対するアッセイを最適化した。

【0053】

図5Aには、本発明のアッセイキットとCavidi Tech ABのLenti RTアッセイとの検出感度の差が例示されている。HTLV1で形質転換された細胞株MT-2に由来する細胞培養上清を順次希釈して、2つのRTアッセイを、それぞれのサンプルにおけるRT活性の量を測定するために使用した。使用したRT反応時間は一晚（14時間）であった。

【0054】

10

20

30

40

50

図5Bには、FLK-BLV細胞に由来する1組の希釈された上清の対応するデータが示されている。(この細胞株はBLVが慢性的感染している)。

【0055】

検出感度の全体的な利得は、それぞれ、HTLV酵素の場合には約25倍であり、BLV酵素の場合には30倍であった。感度の増大は、MT-2細胞の上清から有意なシグナルを得るためには必須であった。

【0056】

実施例5

SIV感染マカークに由来する粗血清におけるRT活性の直接測定

血清中のRT活性の定量を、急性レンチウイルス感染時のウイルス複製を検出するために使用した。血清中RT活性は、その後、RT阻害抗体の産生により抑えられた。

10

【0057】

4頭のカニクイサル(*Macaca fascicularis*)の一群を使用し、処置研究における未処置コントロールには10サル感染量(MID50)のSIVsmを感染させた。感染後の示された時間においてサンプリングされた血清を順次希釈し、本発明のLentiRTアッセイを用いてRT活性についてアッセイした。5 μ lの血清サンプルが4時間のRT反応に含まれ、得られた吸光度の値をOD₄₀₅/hに再計算して、感染後の日数に対してプロットした。図6を参照のこと。

【0058】

本発明のLentiRTアッセイは、感染の急性期のときにサンプリングされた血清の分析によってウイルス複製を検出するのに十分な感度を有する。ヒト献血者におけるHIV陽性に対するスクリーニングのために現在使用されている試験は、HIV-1タンパク質に対する抗体の検出に基づいており、感染の急性期の段階にある感染者を検出することができない。これらの試験は、一部の国においては、ELISAでウイルス抗原を検出することによって、またはPCRでウイルスゲノムを検出することによって補われている。両タイプの試験は、HIVウイルス間の大きな遺伝子学的および免疫学的な変化のために、変化したウイルス株を検出することができない場合がある。RTは、すべてのレトロウイルスの複製にとって不可欠な機能を有し、このアッセイは、急性感染を検出するための注目される代替法を提供する。

20

【0059】

30

表1

prAコーティングNucleoLinkTMマイクロタイタープレートを製造するための手順

結合液	100mM	1-メチルイミダゾール (pH6.25)
	1mg/ml	ポリリボアデニル酸

洗浄緩衝液	10mM	Bis-Trisプロパン (pH6.25)
-------	------	-----------------------

100 μ lの結合液を各ウエルに加える。

プレートを室温で2時間インキュベーションする。

各ウエルを2 \times 300 μ lの洗浄緩衝液で洗浄する。

プレートを37 $^{\circ}$ Cで25分間乾燥する。

プレートをホイルバッグに入れ、真空シールする。

-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

40

【0060】

表2

RTタイプに適合した逆転写酵素アッセイを組み立てるために使用される成分

成分	物質	最終反応混合物における有用濃度範囲	
I 緩衝液	Tris, Hepes	10~100mM; pH7.0~8.0	
II 二価金属イオン	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	0~20mM	
III キレート化剤	EDTA, EGTA	0~0.5mM	
IV ポリアミン	スペルミン スペルミジン	0~20mM	
V RNase阻害剤	ヘパリン硫酸 デキストラン硫酸	0~100μg/ml	
VI 還元剤	DTT, DTE グルタチオン	0~5mM	10
VII 塩	NaCl, KCl	0~100mM	
VIII 安定化剤	NCS, BSA	0~1mg/ml	
IX 界面活性剤	Tween20 TritonX-100	0~1.0%	
X デオキシヌクレオチド三リン酸	BrdUTP	1~50μM	
XI プライマー	オリゴdT	5~100ng/ml	
XII 保護剤	ATP, GTP, CTP	0~5mM	

略号

20

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

EGTA: エチレングリコール-ビス(-アミノエチルエーテル)N, N, N', N' - 四酢酸

DTT: ジチオスレイトール

DTE: ジチオエリトリトール

NCS: 新生児ウシ血清

BSA: ウシ血清アルブミン

【0061】

表3

本発明の最適化されたLenti逆転写酵素アッセイの成分

30

成分	物質	最終反応混合物における濃度	
I 緩衝液	Hepes-HCl	10mM; pH7.6	
II 二価金属イオン	MgCl ₂	4mM	
III キレート化剤	EGTA	0.2mM	
IV ポリアミン	スペルミン	2mM	
V RNase阻害剤	デキストラン硫酸	50μg/ml	
VI 還元剤			
VII 塩			
VIII 安定化剤	BSA	0.5mg/ml	
IX 界面活性剤	Tritonx-100	0.5%	40
X デオキシヌクレオチド三リン酸	BrdUTP	16μM	
XI プライマー	オリゴdT	80ng/ml	
XII 保護剤	GTP	0.5mM	
保存剤	NaN ₃	1.92mM	

表3(続き)

本発明の最適化されたBLV/HTLV逆転写酵素アッセイの成分

成分	物質	最終反応混合物における濃度	
I 緩衝液	Hepes-HCl	10mM ; pH7.8	
II 二価金属イオン	MgCl ₂	8mM	
III キレート化剤	EGTA	0.2mM	
IV ポリアミン	スベルミジン	1mM	
V RNase阻害剤	デキストラン硫酸	2μg/ml	
VI 還元剤	グルタチオン	0.6mM	
VII 塩			
VIII 安定化剤	BSA	0.5mg/ml	
	NCS	0.5%	10
IX 界面活性剤	Tritonx-100	0.5%	
X デオキシヌクレオチド三リン酸			
	BrdUTP	16μM	
XI プライマー	オリゴdT	80ng/ml	
XII 保護剤	GTP	0.5mM	
保存剤	NaN ₃	1.92mM	
本発明の最適化されたMg ²⁺ 逆転写酵素アッセイの成分			
成分	物質	最終反応混合物における濃度	
I 緩衝液	Hepes-HCl	10mM ; pH7.6	
II 二価金属イオン	MgCl ₂	25mM	20
III キレート化剤	EGTA	2.5mM	
IV ポリアミン	スベルミン	0.15mM	
	スベルミジン	3mM	
V RNase阻害剤			
VI 還元剤	グルタチオン	1mM	
VII 塩			
VIII 安定化剤	BSA	0.5mg/ml	
	NCS	0.25%	
IX 界面活性剤	Tritonx-100	0.5%	
X デオキシヌクレオチド三リン酸			30
	BrdUTP	16μM	
XI プライマー	オリゴdT	80ng/ml	
XII 保護剤	ATP、GTP	0.5mM	
保存剤	NaN ₃	1.92mM	

表3 (続き)

本発明の最適化されたMg²⁺逆転写酵素アッセイの成分

成分	物質	最終反応混合物における濃度	
I 緩衝液	Hepes-HCl	10mM; pH7.5	
II 二価金属イオン	MgCl ₂	6mM	
III キレート化剤	EDTA	0.3mM	
IV ポリアミン	スベルミジン	12mM	
V RNase阻害剤			
VI 還元剤	グルタチオン	4mM	
VII 塩			
VIII 安定化剤	BSA	0.2mg/ml	
IX 界面活性剤	Tritonx-100	0.5%	10
X デオキシヌクレオチド三リン酸			
	BrdUTP	16μM	
XI プライマー	オリゴdT	80ng/ml	
XII 保護剤	ATP, GTP	0.5mM	
保存剤	NaN ₃	1.92mM	

本発明の最適化された滑液逆転写酵素アッセイの成分

成分	物質	最終反応混合物における濃度	
I 緩衝液	Hepes-HCl	10mM; pH7.6	
II 二価金属イオン	MgCl ₂	1.2mM	
III キレート化剤	EDTA	0.13mM	20
IV ポリアミン	スベルミジン	8mM	
V RNase阻害剤	デキストラン硫酸	17μg/ml	
VI 還元剤	グルタチオン	0.3mM	
VII 塩	KCl	20mM	
VIII 安定化剤	BSA	0.3mg/ml	
IX 界面活性剤	Tritonx-100	0.5%	
X デオキシヌクレオチド三リン酸			
	BrdUTP	16μM	
XI プライマー	オリゴdT	80ng/ml	
XII 保護剤	GTP	0.5mM	30
保存剤	NaN ₃	1.92mM	

【0062】

表4

検出システムの成分

洗浄緩衝液			
3mM	Tris-HCl, pH8.6		
0.01%	Tween-20		
0.75%	TritonX-100		
抗BrdUTPモノクローナル抗体用の緩衝液			
25mM	Bis-Trisプロパン, pH8.9		40
250mg/ml	脱脂乾燥乳		
0.01%	Tween-20		
1%	TritonX-100		
1.92mM	NaN ₃		
アルカリホスファターゼ基質溶液			
200mM	Tris-HCl, pH9.8		
1mM	MgCl ₂		
0.5mg/ml	pNPP		
3.9mM	NaN ₃		

【0063】

表 5

RT酵素濃度と、Cavidi TechのLenti RTアッセイおよび本発明の改善されたアッセイを用いて得られたOD値との相関

Cavidi Techの改善されたアッセイ
Lenti RTアッセイ

pg/ml	3時間RT / 30分AP	3時間RT / 30分AP	
1240	1.274	nd	
551	0.594	nd	
245	0.332	9.999	
109	0.175	1.837	10
48.4	0.108	0.989	
21.5	0.070	0.525	
9.6	0.052	0.264	
4.25	0.046	0.174	
1.89	0.054	0.121	
0.839	0.041	0.101	
0.373	0.042	0.091	
0.166	0.040	0.081	
0.074	nd	0.075	
0.033	nd	0.075	20
0	0.042	0.078	
pg/ml	一晚RT / 2時間AP	一晚RT / 2時間AP	
1240	9.999	nd	
551	9.999	nd	
245	9.999	9.999	
109	9.999	9.999	
48.4	1.91	9.999	
21.5	0.961	9.999	
9.6	0.55	9.999	
4.25	0.267	2.283	30
1.89	0.148	1.134	
0.839	0.094	0.6	
0.373	0.075	0.334	
0.166	0.056	0.198	
0.074	nd	0.144	
0.033	nd	0.124	
0	0.048	0.094	
pg/ml	一晚RT / 一晚AP	一晚RT / 一晚AP	

1240	9.999	nd
551	9.999	nd
245	9.999	9.999
109	9.999	9.999
48.4	9.999	9.999
21.5	9.999	9.999
9.6	9.999	9.999
4.25	2.217	9.999
1.89	1.155	9.999
0.839	0.595	9.999
0.373	0.403	2.289
0.166	0.191	1.171
0.074	nd	0.701
0.033	nd	0.577
0	0.115	0.251

10

nd = 実施せず

【 0 0 6 4 】

表 6

C a v i d i T e c h の L e n t i R T ア ッ セ イ お よ び 本 発 明 の 改 善 さ れ た
L e n t i R T ア ッ セ イ を 用 い て 得 ら れ た k 値
C a v i d i T e c h の 改 善 さ れ た ア ッ セ イ
L e n t i R T ア ッ セ イ

20

	k 値		k 値
3時間RT/30分AP	0.0012	3時間RT/30分AP	0.0165
一晚RT/2時間AP	0.0432	一晚RT/2時間AP	0.5145
一晚RT/一晚AP	0.5453	一晚RT/一晚AP	5.2827

(参 考 文 献)

【 0 0 6 5 】

【 表 1 】

- Baltimore D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Baltimore D, Smoler D (1971) Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. *PNAS* 68, 1507-11.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):868-71. 10
- Bird RE, Chang-Yeh A. (1996) Methods and kits for detecting viral transcriptase activity in a sample using an acidic pH or an elevated temperature. *US5817457*.
- Di Cristofano A, Strazullo M, Longo L, La Mantia G (1995) Characterization and genomic mapping of the ZNF80 locus: expression of this zinc-finger gene is driven by a solitary LTR of ERV9 endogenous retroviral family. *Nucleic Acids Res* 23(15):2823-30.
- Duvic M (1995) Human immunodeficiency virus and the skin: selected controversies. *J Invest Dermatol* 105(1 Suppl):117S-121S. 20
- Eberle J, and R. Seibl. (1992) A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA. *J.Virol.Methods* 40:347-356.
- Ekstrand D.H.L., Awad R.J-K., Källander C.F.R. and Gronowitz J.S. (1996) A sensitive assay for the detection and quantification of RT activity, based on the use of carrier bound template and non-radioactive product detection, with special reference to HIV isolation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 23, 95-105.
- Faff O, Murray AB, Schmidt J, Leib-Mösch C, Erfle V, Hehlmann R, Thelen K, Löwer J, Kurth R (1992). Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin. *J Gen Virol* 73: 1087-97. 30
- Ghosh SS, Musso GF (1987) Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res* 15(13):5353-72.
- Goff S.P. (1990) Retrovirus reverse transcriptase: Synthesis, Structure and Function. Review. *J.Acquir.Imm.Defic.Syndr.* 3:817-31. 40

【 0 0 6 6 】

【 表 2 】

- Gregorius K, Mouritsen S, Elsner HI (1995) Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid phases. *J Immunol Methods* 181(1):65-73.
- Gronowitz JS., Neumüller M., Lennerstrand J., Bhikabhai R., Unge T., Weltman H & Källander CFR. (1991) Carrier bound templates for single tube reverse transcriptase assays and for combined purification and activity analyses, with special reference to HIV. *Biotech. Appl. Biochem* 13:127-142.
- Gupta, P., Balachandran, Grovit, K., Webster, D., and Rinaldo. C. (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25, 1122-1125. 10
- Heneine W, Yamamoto S, Switzer WM, Spira TJ, Folks TM. (1995) Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 171:1210-1216
- Heneine W, Folks; Thomas M, Switzer W M, Yamamoto S. (1995) Methods for sensitive detection of reverse transcriptase. *US5849494*:
- Jackson, B., Sannerud, K., Rhame, F., Tsang, R., and Balfour, H.H. (1987) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 185-192. 20
- Krieg AM, Steinberg AD (1990) Retroviruses and autoimmunity. *J Autoimmun.* 3(2):137-66
- Krieg AM, Gourley MF, Perl A (1992) Endogenous retroviruses: potential etiologic agents in autoimmunity. *FASEB J* 6(8):2537-44.
- Källander CFR, Gronowitz JS, Neumüller TM, Karlström RA, Långström-Persson UM. (1988). Method for polymerase activity determination. Svensk patent no 8804344-3, *EP 0 447 442 B1.* 30
- Lee M., Sano K., Morales F.E., and D.T. Imagawa. (1987) Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 25:1717-21.
- Leib-Mösch C and Seifarth W (1996) Evolution and biological significance of human retroelements. *Virus genes* 11: 133-145.
- Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11):5177-84. 40

【 0 0 6 7 】

【 表 3 】

- Martinelli SC, Goff SP (1990) Rapid reversion of a deletion mutation in Moloney murine leukemia virus by recombination with a closely related endogenous provirus. *Virology* 174(1):135-44.
- Meese E, Gottert E, Zang KD, Sauter M, Schommer S, Mueller-Lantzsch N (1996) Human endogenous retroviral element k10 (HERV-K10): chromosomal localization by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 72(1):40-2.
- Neumüller M., Karlström A.R., Källander C.F.R., and J.S. Gronowitz. (1990) Improved assays for DNA-polymerizing enzymes by the use of enzymatically synthesized 5-(¹²⁵I)iodo-2'-deoxyuridine triphosphate, illustrated by direct quantitation of anti-HIV reverse transcriptase antibody and by serum DNA polymerase analyses. *Biotech.Appl.Biochem.* 12:34-56. 10
- Niveleau A, Sage D, Reynaud C, Bruno C, Legastelois S, Thomas V, Dante R (1993) Covalent linking of haptens, proteins and nucleic acids to a modified polystyrene support. *Immunol Methods* 159(1-2):177-87.
- Porstmann T., Meissner K., Glaser R., Döpel S-H., and G. Sydow. (1991) A sensitive non radioactive assay specific for HIV associated reverse transcriptase. *J. Virol.Meth.* 31:181-188. 20
- Rasmussen SR, Larsen MR, Rasmussen SE (1991) Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Anal Biochem* 198(1):138-42.
- Silver J, Maudru T, Fujita K and Repaske R. (1993) An RT-PCR assay for the enzyme activity of reverse transcriptase capable of detecting single virions. *Nucleic Acids Res* 21:3593-3594. 30
- Temin HM, Mizutani S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.
- Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R. Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses.(1997) *Virology* 233(2):280-91.
- Urabe T, Sano K, Nakano T, Odawara F, Lee MH, Otake T, *et al.* (1994) Differentiation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 isolates by nonradioisotopic reverse transcriptase-typing assay. *J Clin Microbiol*; 32:1870-75. 40

【 0 0 6 8 】

【 表 4 】

Urnovitz HB, and Murphy WH (1996) Human endogenous retroviruses: Nature, occurrence, and clinical implications in human disease. Clin Microbiol Rev 9: 72-99.

Weiss R: The search for human RNA tumor viruses. In R Weiss, N Teich, H Varmus, and J Coffin (eds) RNA Tumor viruses (2nd ed vol 1) 1205 1281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, . Cold Spring Harbor, New York, 1984.

Wilkinson DA Mager DL and Leong J-A (1994). Endogenous human retroviruses. In “The Retroviridae”(JA Levy, Ed), vol 3,pp 465-535. 3 vols Plenum Press, New York.

10

Zammatteo N, Girardeaux C, Delforge D, Pireaux JJ, Remacle J (1996) Amination of polystyrene microwells: application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays. Anal Biochem 236(1):85-94.

Zinkemagel RM, Cooper S, Chambers J, Lazzarini RA, Hengartner H, Amheiter H (1990) Virus-induced autoantibody response to a transgenic viral antigen. Nature 345: 68-71.

【図面の簡単な説明】

20

【図 1】 R T 活性を P K 1 5 細胞ラインの培養物に由来する培地において 2 つの方法で測定した説明図。得られた吸光度の値を、反応混合物に添加された培地の量に対してプロットした。

【図 2】 慢性関節リウマチ患者から採取された滑液サンプルにおける直接的な R T 測定の説明図。プロットされた値は 1 μ l のサンプルおよび一晩の R T 反応から得られた。

【図 3】 R T 活性を乳ガンに由来する抽出物において 2 つの方法で測定した説明図。得られた吸光度の値は、反応混合物に添加された抽出物の量に対してプロットされる。

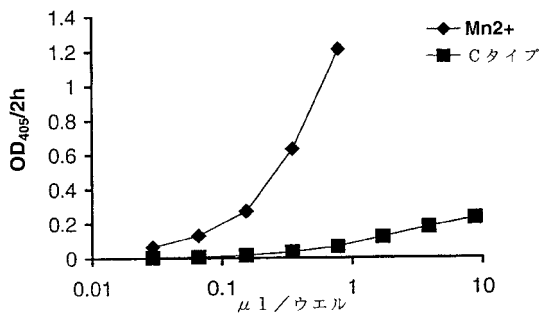
【図 4】 乳ガン生検物に由来する抽出物における R T 活性の直接測定の説明図。各サンプル中のタンパク質濃度に対してプロットされた吸光度の値は、1 μ l の抽出物および一晩の R T 反応から得られた。

30

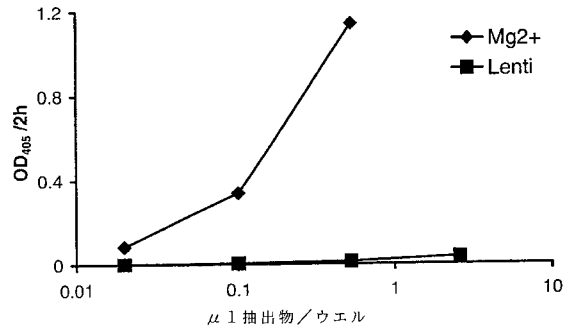
【図 5】 R T 活性を A) H T L V 1 形質転換細胞の培養物の培地および B) B L V 感染培養物に由来する培地において 2 つの方法で測定した説明図。得られた吸光度の値を、反応混合物に添加されたサンプルの量に対してプロットした。

【図 6】 S I V 感染マカクに由来する血清における R T 活性の直接測定の説明図。4 時間の R T アッセイで得られた吸光度の値を血清のサンプリング日に対してプロットした。

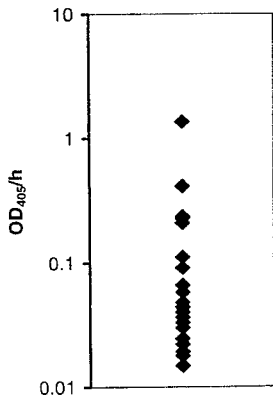
【 図 1 】



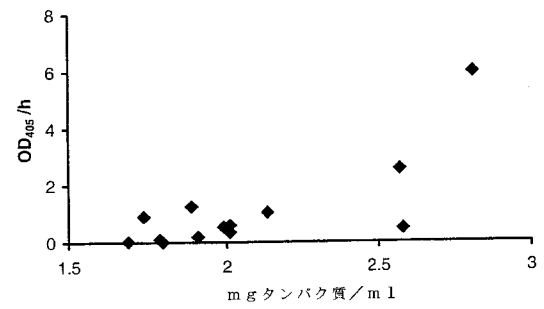
【 図 3 】



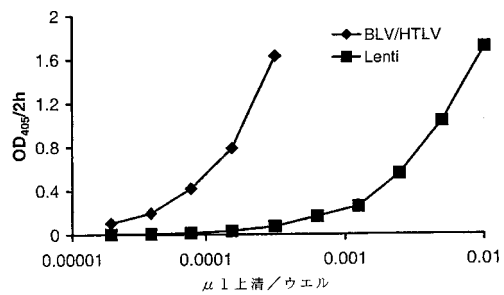
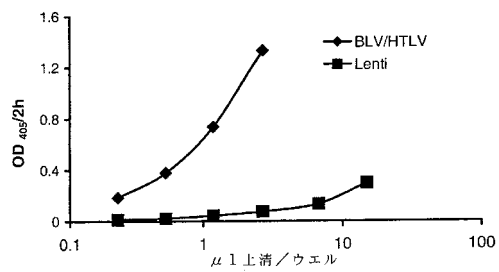
【 図 2 】



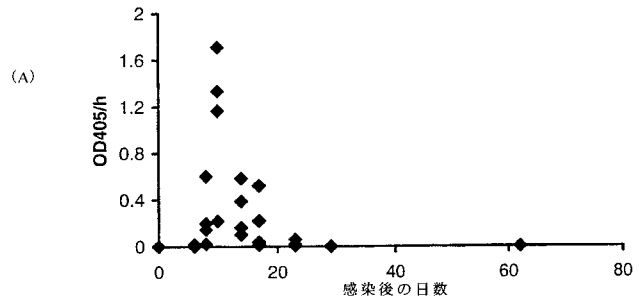
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



(B)

フロントページの続き

- (72)発明者 クラス、ケーランダー
スエーデン国ウプサラ、ヒュスビボルグ、ヒュスビガルド
- (72)発明者 サイモン、グロノビッツ
スエーデン国ウプサラ、ノルビベーゲン、5 1
- (72)発明者 イングバル、ペッターソン
スエーデン国ウプサラ、スタグネリウズガタン、2

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 EKSTRAND D HENRIC L , BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY , 1 9 9 6 年 , V23 N2 , P95-105
SHAO X , ANTIVIRAL CHEMISTRY AND CHEMOTHERAPY , 1 9 9 7 年 , V8 N2 , P149-159

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12Q 1/00-1/70
PubMed

专利名称(译)	逆转录酶测定试剂盒，其用途和分析生物样品中RT活性的方法		
公开(公告)号	JP4808345B2	公开(公告)日	2011-11-02
申请号	JP2001507084	申请日	2000-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	模具技术迪激活Boragu 卡维迪技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Kabidi, 技术, Akuchiboragu		
当前申请(专利权)人(译)	Kabidi, 技术, Akuchiboragu		
[标]发明人	クラスケーランダー サイモングロノビッツ イングバールペッターソン		
发明人	クラス、ケーランダー サイモン、グロノビッツ イングバール、ペッターソン		
IPC分类号	C12Q1/48 C12Q1/42 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/48		
FI分类号	C12Q1/48.Z C12Q1/42 G01N33/53.M		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	9902410 1999-06-24 SE		
其他公开文献	JP2003503073A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于分析生物样品中的RT活性的逆转录酶 (RT) 测定试剂盒。该试剂盒包含固相结合的prA和/或pdA模板，其可通过使基于聚苯乙烯的固相与含1-甲基咪唑的偶联溶液接触而获得，并且RT型适应的测定组分选自缓冲液，二价金属离子，螯合剂，多胺，RNase抑制剂，还原剂，盐，稳定剂和去污剂，三磷酸脱氧核苷酸，引物，保护剂和浓缩洗涤缓冲液，以及任选的冻干参比酶，以及任选地冻干的碱性磷酸酶缀合的抗BrdU单克隆抗体，碱性磷酸酶底物缓冲液和碱性磷酸酶底物，以及使用该测定试剂盒的书面说明。此外，该测定试剂盒用于定性和定量分析生物样品中RT活性的方法和用途，任选地随后基于RT分析的结果评估RT活性相关病症或疾病的状态。活动，被披露。

【图3】

