

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2000 - 279198

(P2000 - 279198A)

(43)公開日 平成12年10月10日(2000.10.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68			C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 N 15/00	ZNA A
//(C 1 2 N 15/09	ZNA			
C 1 2 R 1:92)				

審査請求 未請求 請求項の数 42 O L (全 49数)

(21)出願番号	特願2000 - 30237(P2000 - 30237)	(71)出願人	594199337 オルソ - クリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650, ロチェスター, インディゴ クリーク ドライブ 100
(22)出願日	平成12年2月2日(2000.2.2)	(72)発明者	ケビン エム . ゴルマン アメリカ合衆国, ニューヨーク 14616, ロチェスター, コンラド ドライブ 204
(31)優先権主張番号	60/118498	(74)代理人	100077517 弁理士 石田 敬 (外 4 名)
(32)優先日	平成11年2月3日(1999.2.3)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス (H C V) およびヒト免疫不全ウイルス (H I V) の効率的な多重検出のためのオリゴヌクレオチドプライマー並びにそれらの使用方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト被検者からの生物学的試料中のC型肝炎ウイルスとヒト免疫不全ウイルスの同時検出のための方法およびキットを提供する。

【解決手段】 本発明の方法は生物学的試料より誘導したRNAを鋳型として使用し、RNAからDNAへの逆転写を開始する。この反応により生成した特異的逆転写物をHCV特異的プローブおよびHIV特異的プローブで検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの共同検出方法であって、

(A) 前記試料から誘導したRNAを鋳型として使用し、そしてHCV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーおよびHIV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して逆転写反応を実施することにより、(a) HCV特異的逆転写生成物、(b) HIV特異的逆転写生成物または(c) (a) と (b) の組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ； (B) HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使って前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) HCV特異的増幅生成物、(b) HIV特異的増幅生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、

ここで前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGCTCTCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号1〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号2〕とを含んで成り、

HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配列(1) 5'-GGGTCTGAGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、

HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列：5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR e)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列：5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成り；そして

(C) 前記増幅生成物を検出するという各段階を含んで成り、

ここでHCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAとHIV RNAの存在を示すことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記逆転写反応がランダムオリゴヌクレオチドプライマーを使って行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記逆転写反応が、HCV RNA中の配列に相当する配列を有する1または複数のオリゴヌク

レオチドプライマーとHIV RNA中の配列に相当する配列を有する1または複数のオリゴヌクレオチドプライマーとを使って行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、核酸塩基増幅および転写媒介増幅から成る群より選ばれた方法により行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を視覚化することを含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記検出が、(a) 1または複数のHCV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1または複数のHIV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c) (a) と(b) の組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記HCV特異的プローブが5'-CCTTCGCGACCAACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記HIV特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕；

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕；および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記試料が、血液、血清、血漿、尿、唾液および脳脊髄液から成る群より選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記共同検出が同時である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 C型肝炎ウイルス(HCV)DNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)DNAとの共同増幅方法であって、

(A) HCV DNA, HIV DNAまたはHCV DNAとHIV DNAの組合せを含む疑いのあるDNA試料において、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使ってポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) HCV特異的増幅生成物、(b) HIV特異的増幅生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ；ここでHCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号1〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号2〕とを含んで成り、HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配列:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、そしてHIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR e)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項11】 (B) 前記増幅生成物を検出するという段階を更に含んで成り、

ここでHCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV DNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV DNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV DNAとHIV DNAの存在を示す、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を視覚化することを含んで成る、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記検出が、(a) 1または複数のHCV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1または複数のHIV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c) (a) と(b) の組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 前記HCV特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCAACACTACTCGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記HIV特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕; および

(c) 5'-CCACGCTTGCTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記共同増幅が同時である、請求項10に記載の方法。

【請求項16】 生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの共同検出方法であって、

(A) 鋳型としての前記試料から誘導したRNAと内部陽性対照(IPC)、IPC RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、HCV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、および

HIV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して、逆転写反応を実施することにより、(a) IPC特異的逆転写生成物、(b) HCV特異的逆転写生成物、(c) HIV特異的逆転写生成物または(c) 前記のいずれかの任意組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ;

(B) IPCに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) IPC特異的増幅生成物、(b) IPC特異的増幅生成物とHCV特異的増幅生成物、(c) IPC特異的生成物とHIV特異的増幅生成物または(d) 前記のいずれかの任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、

ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(1) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCA TCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と(2) 逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕とを含んで成り、

前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGCCATAGTGGTCTCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCCATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成り、

HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配

列(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、

HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列: 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR e)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列: 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成り;そして

(C) 前記増幅生成物を検出するという各段階を含んで成り、ここでIPC特異的増幅生成物の検出が前記試料中のIPC RNAの存在を示し、HCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAとHIV RNAの存在を示すことを特徴とする方法。

【請求項17】 前記逆転写反応がランダムオリゴヌク

レオチドプライマーを使って行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記逆転写反応が、IPC RNA中の配列に相当する配列を有する1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー、HCV RNA中の配列に相当する配列を有する1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー、およびHIV RNA中の配列に相当する配列を有する1または複数のオリゴヌクレオチドプライマーを使って行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、核酸-塩基増幅および転写媒介増幅から成る群より選ばれた方法により行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を可視化することを含んで成る、請求項16に記載の方法。

【請求項21】 前記検出が、(a) 1または複数のIPC特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1または複数のHCV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(c) 1または複数のHIV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c)(a)、(b)および(c)のいずれかの組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項16に記載の方法。

【請求項22】 前記IPC特異的プローブが5'-CTGCC TTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3'〔配列番号17〕から成り、前記HCV特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACA CTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記HIV特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕;および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTCTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記試料が、血液、血清、血漿、尿、唾液および脳脊髄液から成る群より選ばれる、請求項16に記載の方法。

【請求項24】 前記共同検出が同時である、請求項16に記載の方法。

【請求項25】 内部陽性対照(IPC)DNA、C型肝炎ウイルス(HCV)DNAおよびヒト免疫不全ウイルス(HIV)DNAの共同増幅方法であって、

(A) IPC DNAを含有しており且つHCV DNA、HIV DNAまたは前記のいずれかの組合せを含む疑いのあるDNA試料において、IPCに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1ま

たは複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) IPC増幅生成物、(b) IPC増幅生成物とHCV特異的増幅生成物、(c) IPC増幅生成物とHIV特異的増幅生成物または(d) (a)、(b)および(c)の任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成せしめ、ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPC1)

〔配列番号8〕と(ii)逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAG CAGACACTGAAGA-3' (IPC1)〔配列番号9〕とを含んで成り、

前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成り、

HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配

列(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTGGGCCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、

HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列: 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTr e)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列: 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTr-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項26】 (B) 前記増幅生成物を検出するという段階を更に含んで成り、

ここでIPC特異的増幅生成物の検出が前記試料中のIPC DNAの存在を示し、HCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV DNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV DNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV DNAとHIV DNAの存在を示す方法。

【請求項27】 前記検出がゲル電気泳動により前記増幅生成物を視覚化することを含んで成る、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記検出が、(a) 1または複数のIPC特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(b) 1または複数のHCV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、(c) 1または複数のHIV特異的オリゴヌクレオチドプローブ、または(c)前記のいずれかの任意組合せを含有する固体支持体上に前記増幅生成物を捕捉し、そして前記捕捉された生成物を比色アッセイを使って定量することを含んで成る、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記IPC特異的プローブが5'-CTGCC

TTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3'〔配列番号17〕から成り、前記H C V特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACA CTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記H I V特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕；

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕；および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 前記共同検出が同時である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 生物学的試料中のH C V RNAとH I V RNAの共同検出のためのキットであって、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成るH C Vの5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたH I V-1に特異的な逆プライマーとを含んで成るH I V-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；並びに

(c) 配列 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTrE)〔配列番号6〕を有する正プライマーと配列 5'-GCGACTAGGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するH I V-2に特異的な逆プライマーとを含んで成るH I V-2に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成ることを特徴とするキット。

【請求項32】 I P Cに特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを更に含んで成り、前記I P Cに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対が、正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕を含んで成る、請求項31に記載のキット。

【請求項33】 1または複数のプローブを更に含んで成る、請求項31に記載のキット。

【請求項34】 1または複数のプローブを更に含んで成る、請求項32に記載のキット。

【請求項35】 前記プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACA CTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕、5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕、5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕および5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項3

3に記載のキット。

【請求項36】 前記I P C特異的プローブが5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P)〔配列番号17〕から成り、前記H C V特異的プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACA CTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記H I V特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕；

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕；および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項34に記載のキット。

【請求項37】 DNA試料中のH C V DNAとH I V DNAの共同増幅のためのキットであって、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成るH C Vの5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと配列：

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたH I V-1に特異的な逆プライマーとを含んで成るH I V-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；および

配列 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTrE)〔配列番号6〕を有する正プライマーと配列 5'-GCGACTAGGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するH I V-2に特異的な逆プライマーとを含んで成るH I V-2に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成るキット。

【請求項38】 I P Cに特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを更に含んで成り、前記I P Cに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対が、正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1)〔配列番号8〕と逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACTGAAGA-3' (IPCR1)〔配列番号9〕を含んで成る、請求項37

に記載のキット。

【請求項39】 1または複数のプローブを更に含んで成る、請求項37に記載のキット。

【請求項40】 1または複数のプローブを更に含んで成る、請求項38に記載のキット。

【請求項41】 前記プローブが5'-CCTTTCGCGACCCAACA CTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕、5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕、5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕および5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項3

9に記載のキット。

【請求項42】 前記IPC特異的プローブが5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P)〔配列番号17〕から成り、前記HCV特異的プローブが5'-CCTTTCGGCACCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB)〔配列番号12〕から成り、そして前記HIV特異的プローブが

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3' (JBLTRpr3)〔配列番号13〕；

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3' (JBLTRpr4)〔配列番号16〕；および

(c) 5'-CCACGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1)〔配列番号14〕から成る群より選ばれる、請求項40に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、生物学的試料中の核酸配列、特に感染性微生物に由来する配列の改良検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は世界中の何百万という人々に感染しており、従って深刻な社会的健康問題の代表である。汚染された血液製剤を介したHIV感染の伝播は、患者試料中の少量のHIV RNAを検出することができるスクリーニング法が必要であることを意味する。更に、HIV感染の改善療法の入手可能性が増大してきていることは、適当な療法介入を開始するために患者における乾癬の早期検出がきわめて重大であることを意味する。

【0003】C型肝炎ウイルス(HCV)は、大部分の輸血後肝炎の症例とかなりの部分の世界的散在性(または地域社会獲得性)肝炎の症例の原因である非経口的に伝染するウイルスである。世界人口の1%超がHCVに感染していると見積もられている。HCV感染は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変および後の肝細胞癌に関係がある。

【0004】HCVは現在フラビウイルス科(Flaviviridae)の中の独自のヘパチウイルス属(Hepacivirus)として分類されている。そのゲノムは、約3,000アミノ酸のポリタンパク質前駆体をコードする単一の大きな転写解読枠(ORF)を有する約9,500ヌクレオチドの正鎖RNA分子から成る。この大きなORFの上流には、ゲノムの最も高度に保存された領域である約340ヌクレオチドの5'非コード(NC)領域がある。このORFの5'領域は(5'→3'方向で)キャプシドタンパク質、2つのエンベロープ糖タンパク質(E1とE2)および未知の機能を有する小さなタンパク質(P7)をコードする。このORFの3'領域は、プロテアーゼ、プロテアーゼ/ヘリカーゼ二機能性タンパク質、RNAポリメラーゼおよび調節タンパク質を包含する非構造タンパク質をコードする。

【0005】世界中からのHCVコード配列の分析により、個々のウイルス分離株間で相当な配列変異が明らかになった。更に、個々の患者からのHCV配列の分析により、関連するが同一でない配列を含むいわゆる「準種"quasi-species"」としてウイルスは流布することが示された。分離株間と個々の患者間で存在する変異は、ウイルスによりコードされるRNAに依存するRNAポリメラーゼが低い信頼度を有することの結果であると考えられる。HCVの遺伝的変異の程度は、感染の予防、診断および制御にとって重要な意味を持つ。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】HCV感染の血清学的診断は、典型的には組換えHCVタンパク質またはペプチドを結合する抗体を検出する市販のエンザイムイムノアッセイ(EIA)により測定される。陽性EIA結果は組換え免疫ブロットアッセイ(RIBA)により確かめることができるが、EIAもRIBAアッセイも現在の感染と過去の感染を区別することはできない。循環しているウイルスは典型的には低いウイルス価であるために、ウイルスタンパク質についての直接アッセイの開発は成功していない。更に、抗体に依存するアッセイは、一般に暴露後2~3カ月間はHCV感染を検出することができない。

【0007】従って、HIVとHCVの両方についての患者試料の同時スクリーニングを考慮に入れた改良アッセイが当該技術分野で必要とされている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、多重アッセイを使った、生物学的試料におけるC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの存在の同時検出方法を提供する。

【0009】一観点では、本発明は、生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの共同検出方法に向けられる。この方法は

(A) 前記試料から誘導したRNAを鋳型として使用し、そしてHCV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーおよびHIV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して逆転写反応を実施することにより、(a) HCV特異的逆転写生成物、(b) HIV特異的逆転写生成物または(c) (a)と(b)の組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ；
(B) HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使って前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) HCV特異的増幅生成物、(b) HIV特異的増幅生成物または(c) (a)と(b)の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、ここで前記HCVに特異的なオリゴヌクレオ

チドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号1〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号2〕とを含んで成り、HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配列(1) 5'-GGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列: 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列: 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成り;そして

(C) 前記増幅生成物を検出するという各段階を含んで成り、ここでHCV特異的な増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAの存在を示し、HIV特異的な増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示し、そしてHCV特異的な増幅生成物とHIV特異的な増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAとHIV RNAの存在を示すことを特徴とする。

【0010】第二の面では、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)DNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)DNAとの共同増幅方法に向けられる。この方法は、(A) HCV DNA, HIV DNAまたはHCV DNAとHIV DNAの組合せを含む疑いのあるDNA試料において、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対とを使ってポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a) HCV特異的な増幅生成物、(b) HIV特異的な増幅生成物または(c) (a) と(b) の組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ;ここでHCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号1〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号2〕とを含んで成り、HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配列: (1) 5'-GGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、そしてHIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が次の配列5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、次の

配列5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成ることを特徴とする。

【0011】第三の面では、本発明は、生物学的試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)RNAとヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの共同検出方法に向けられる。この方法は、

(A) 鋳型試料としての前記試料から誘導したRNAと内部陽性対照(IPC)、IPC RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、HCV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマー、およびHIV RNAからDNAへの逆転写を開始させるであろう少なくとも1つの逆転写プライマーを使用して、逆転写反応を実施することにより、(a) IPC特異的な逆転写生成物、(b) HCV特異的な逆転写生成物、(c) HIV特異的な逆転写生成物または(c) 前記のいずれかの任意組合せを含んで成る逆転写生成物を生成させ;

(B) IPCに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、前記逆転写生成物を増幅させることにより、(a) IPC特異的な増幅生成物、(b) IPC特異的な増幅生成物とHCV特異的な増幅生成物、(c) IPC特異的な生成物とHIV特異的な増幅生成物または(d) 前記のいずれかの任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(1) 正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCf1)〔配列番号8〕と(2) 逆プライマー 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCf1)〔配列番号9〕とを含んで成り、前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25)〔配列番号10〕と(ii)逆プライマー 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25)〔配列番号11〕とを含んで成り、HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4)〔配列番号3〕を有する正プライマーと、配列(1) 5'-GGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6)〔配列番号4〕および(2) 5'-TGTTCCGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8)〔配列番号5〕から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列: 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe)〔配列番号6〕を有する正プライマーと、配列: 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成り;そして

(C) 前記増幅生成物を検出するという各段階を含んで成

り、ここでIPC特異的増幅生成物の検出が前記試料中のIPC RNAの存在を示し、HCV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAの存在を示し、HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示し、そしてHCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHCV RNAとHIV RNAの存在を示すことを特徴とする。

【0012】第四の面では、本発明は、内部陽性対照(IPC)DNA、C型肝炎ウイルス(HCV)DNAおよびヒト免疫不全ウイルス(HIV)DNAの共同増幅方法に向けられる。この方法は、(A)IPC DNAを含有しており且つHCV DNA、HIV DNAまたは前記のいずれかの組合せを含む疑いのあるDNA試料において、IPCに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、HCVの5'非コード領域に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対、およびHIVに特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプライマー対を使って、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、(a)IPC増幅生成物、(b)IPC増幅生成物とHCV特異的増幅生成物、(c)IPC増幅生成物とHIV特異的増幅生成物または(d) (a)、(b)および(c)の任意組合せを含んで成る増幅生成物を生成させ、ここで前記IPCに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i)正プライマー 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPC1) [配列番号8]と(ii)逆プライマー 5'-CAGCATCTGGAGCAGACTGAAGA-3' (IPC2) [配列番号9]とを含んで成り、前記HCVに特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が(i)正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号10]と(ii)逆プライマー 5'-CGGGCAGCTCGCAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号11]とを含んで成り、HIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTGA-3' (JBLTR4) [配列番号3]を有する正プライマーと、配列(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号4]および(2) 5'-TGTTCCGGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号5]から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成り、HIV-2に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対の各々が配列: 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe) [配列番号6]を有する正プライマーと、配列: 5'-GCGACTAGGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) [配列番号7]を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成ることを特徴とする。

【0013】本発明の別の面では、逆転写反応がランダムオリゴヌクレオチドプライマーを使って行われ;あるいは、1または複数のHCV特異的逆転写プライマーと1または複数のHIV特異的逆転写プライマー、即ち、HCVまたはHIV RNA中の配列に相当する配列を

有するオリゴヌクレオチド、を使ってもよい。

【0014】増幅の検出方法としては、非限定的に、(a)電気泳動および(b)IPC-, HCV-またはHIV-特異的プローブが取り付けられた固体支持体上への増幅生成物の捕捉に続き、比色アッセイを使った結合した生成物の定量、が挙げられる。有用なIPC特異的捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3' [配列番号17]が挙げられる。有用なHCV特異的捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' [配列番号12]が挙げられる。有用なHIV-1特異的捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3' [配列番号13]が挙げられ、そして有用なHIV-2特異的捕捉プローブとしては、非限定的に、5'-CCACGCTTGCTTAAAGACCTC-3' [配列番号14]が挙げられる。

【0015】別の面では、本発明は、生物学的試料中のHCV RNAとHIV RNAの共同検出のためのキットに向けられる。このキットは、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号10]と(ii)逆プライマー 5'-CGGGCAGCTCGCAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号11]とを含んで成るHCVの5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー; (b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTGA-3' (JBLTR4) [配列番号3]を有する正プライマーと(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号4]および(2) 5'-TGTTCCGGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号5]から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成るHIV-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー; 並びに (c) 配列 5'-GGGAGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe) [配列番号6]を有する正プライマーと配列 5'-GCGACTAGGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) [配列番号7]を有するHIV-2に特異的な逆プライマーとを含んで成るHIV-2に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る。

【0016】更に別の面では、本発明は、DNA試料中のHCV DNAとHIV DNAの共同増幅のためのキットに向けられる。このキットは、

(a) (i) 正プライマー 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) [配列番号10]と(ii)逆プライマー 5'-CGGGCAGCTCGCAGCACCTATCA-3' (C294R25) [配列番号11]とを含んで成るHCVの5'非コード領域に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマー; (b) 配列 5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTGA-3' (JBLTR4) [配列番号3]を有する正プライマーと配列: (1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGT-3' (JBLTR6) [配列番号4]および(2) 5'-TGTTCCGGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) [配列番号5]から成る群より選ばれたHIV-1に特異的な逆プライマーとを含んで成るHIV

- 1 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー；および配列 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTrE)〔配列番号6〕を有する正プライマーと配列 5'-GCGACTAGGAGATGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)〔配列番号7〕を有する HIV-2 に特異的な逆プライマーとを含んで成る HIV-2 に特異的な一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る。

【0017】

【発明の実施態様】本発明者らは、多重アッセイにおいて、生物学的試料中の低レベルの C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA とヒト免疫不全ウイルス (HIV) RNA の同時検出が、(i) 前記試料から誘導された RNA に対して逆転写反応を行い、そして(ii) HCV RNA と HIV RNA 中に存在する一定の配列に相補的な配列を有する特定のオリゴヌクレオチド対を使って、逆転写生成物を増幅せしめることにより達成できることを発見した。従って、本発明は、同一試料において低コピーレベルの HCV RNA と HIV RNA を検出する、改善された、1 回の、逆転写 / 増幅多重アッセイを提供する。

【0018】オリゴヌクレオチドプライマーは、配列保存、分子内または分子間相互作用、およびアンプリコンと周囲配列の推定二次構造に基づいて選択される。更に、プライマーとアッセイ方法は、HCV ゲノムと HIV ゲノムの多領域、多ウイルス種、および内部陽性対照 (IPC) RNA (または DNA) の共同増幅を可能にするようにデザインされる。ウイルスゲノムの多領域の同時増幅 / 検出はアッセイ感度を増加させ、そして IPC の同時増幅は PCR の障害による偽陽性結果の可能性を減少させる。

【0019】分子生物学、微生物学、組換え DNA およびタンパク質生化学の多数の技術、例えば Current Protocols in Molecular Biology, 第 I, II および III 巻, 1997 (F.M. Ausubel 編); Sambrook 他, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; DNA Cloning: A Practical Approach, 第 I および II 巻, 1985 (D.N. Glover 編); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M.L. Gait 編); Transcription and Translation, 1984 (Hames & Higgins 編); A Practical Guide to Molecular Cloning; 双書, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Protein Purification: Principles and Practice, 第 2 版 (Springer-Verlag, N.Y.) 中に説明された技術を、本発明を実施する際に使用する。

【0020】本明細書中で用いる「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、ポリリボヌクレオチドかポリデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのプリンおよびピリミジン含有ポリマーを言う。これには一本鎖および二本鎖分子、例えば DNA - DNA, DNA -

RNA および RNA - RNA ハイブリッド、並びにアミノ酸主鎖に塩基を結合することにより形成された「タンパク質核酸」(PNA) が含まれる。これには修飾塩基を含有する核酸も含まれる。

【0021】本明細書中で用いる核酸配列の「相補体」とは、元の配列と共にワトソン - クリック塩基対合に参加するアンチセンス配列を言う。

【0022】本明細書中で用いる「プライマー」は、着目の一本鎖核酸配列と共に二本鎖を形成しそして例えば逆転写酵素または DNA ポリメラーゼを使って相補鎖の重合を可能にする、長さ約 5 ~ 約 50 ヌクレオチド、好ましくは長さ約 6 ~ 約 25 ヌクレオチド、最も好ましくは約 6 ~ 約 18 ヌクレオチドの単離されたオリゴヌクレオチドである。

【0023】本明細書中で用いる「単離された」核酸とは、その元の環境 (例えば、それが天然に存在する混合物であるならその天然の環境、それが合成物であるなら反応混合物) から分離されている成分を言う。単離された核酸は、典型的には、最初にそれと関連していた成分の約 50% 未満、好ましくは約 75% 未満、そして最も好ましくは約 90% 未満を含有する。

【0024】指摘した配列「から誘導された」核酸配列とは、その指摘した配列の一領域に相当する配列を言う。これには、その配列に相同であるかまたは相補的である配列も含まれる。

【0025】内部陽性対照 (= IPC) 標的核酸とは、典型的には制限エンドヌクレアーゼ的作用により後で直鎖状にされるプラスミドベクター中にクローニングされた合成核酸配列を指して言う。IPC は、典型的には一般的なプローブ結合領域を取り囲む複数のプライマー結合配列を有し、そして核酸増幅反応において偽陽性結果に対する包括的な対照として働く。

【0026】好ましい内部陽性対照標的 DNA の配列は下記のものである: 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGACGCACGGACGAGGACATCATAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGTCTAACGCAGCAGTCAGTGTATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTAGTGTCTGCTCCAGGATCGTG-3'〔配列番号15〕。

【0027】本明細書中に開示するいずれかの配列またはその部分配列を含んで成る核酸は、常法により調製することができる。例えば、Matteucci 他, 1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 のホスホロアミダイト固体支持体法、Yoo 他, 1989, J. Biol. Chem. 764:17078 の方法、または他の周知の方法を使って、DNA を化学合成することができる。当該技術分野で既知である多数の手段により核酸を修飾することもできる。そのような修飾の非限定例としては、メチル化、「キャップ付加」、類似体による 1 もしくは複数の天然ヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間修飾、例えば無電荷結合 (例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど) もしくは荷電結合 (例えばホス

ホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)が挙げられる。核酸は1または複数の追加の共有結合した成分、例えば、タンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)、挿入剤(例えばアクリジン、ソラレンなど)、キレート化剤(例えば金属、放射性金属、鉄、酸化的金属など)およびアルキル化剤を含んでもよい。「核酸」なる用語にはPNAも含まれる。核酸は、メチルもしくはエチルホスホトリエステルまたはアルキルホスホロアミデート結合の形成により誘導体にすることができる。更に、本発明の核酸配列は、直接または間接的に検出可能なシグナルを提供することができる標識により修飾されてもよい。典型的な標識としては、放射性同位体、蛍光分子、ビオチンなどが挙げられる。

【0028】本明細書中で用いる「増幅」とは、非限定的に、核酸がコピーされる相互作用工程を言う。適当な増幅方法としては、非限定的に、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、核酸一塩基増幅、および転写媒介増幅が挙げられる。

【0029】本発明は、生物学的試料中のHCVとHIVの検出方法を提供する。この方法は、

(i) 試料中に含まれるかまたは試料から誘導されるRNAを鋳型として使って逆転写反応を行い;

(ii) もしあるなら、HCVのゲノム内の配列(好ましくはHCVの5'非コード領域)に相当する配列を有する少なくとも1つの増幅プライマー対、およびHIVのゲノム内の配列に相当する配列を有する少なくとも1つの増幅プライマー対を使って、逆転写生成物を増幅させることにより、HCV特異的増幅生成物とHIV特異的増幅生成物を生成させ;

(iii) 前記HCV特異的増幅生成物と前記HIV特異的増幅生成物を検出することにより実施される。HCV特異的またはHIV特異的増幅生成物の検出が、試料中のHCV RNAおよびHIV RNAそれぞれの存在を示す。

【0030】本発明によれば、任意の常法により患者から生物学的試料が得られる。適当な生物学的試料としては、非限定的に、血液、血清、血漿、尿、母乳および脳脊髄液が挙げられる。好ましくは、血漿がウイルスRNAの入手源として使われる。

【0031】生物学的試料は、試料中に含まれるRN

A、特にウイルスRNAに対する逆転写試薬の接近を与えるようなやり方で処理する。生物学的試料に「から誘導された」RNAは、最初は試料中に存在していたもので且つ試料を処理することによってそのRNAへの接近が増大された任意のRNAである。好ましくは、当該技術分野で周知の方法、例えばチオシアン酸グアニジウムを使用する方法、またはGentra Systems, Inc. (Minneapolis MN)からのPureScriptのような市販の試薬と方法を使う方法を用いて、試料からRNAを抽出する。RNAアーゼからのRNA、別のタンパク質、および/または逆転写反応を妨害する可能性のある他の成分からの分離をもたらすいずれの抽出方法を使ってもよい。

【0032】次いで、試料を(a)ランダムプライマー、例えばPharmacia Biotech, Piscataway, NJから得られるランダムヘキサマープライマー、および/または(b)HCV RNAゲノム配列の5'もしくは3'非コード領域から誘導されたプライマーを使って逆転写反応にかけます。逆転写は、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, 第I, IIおよびIII巻, 1997 (F.M. Ausubel編); 米国特許第5,322,770号明細書; Young他, J. Clin. Microbiol. 31(4):882 (1993); Myers他, Biochemistry 30(3):7661 (1991)または同時係属米国特許出願第号, 代理人書類番号2094/0E287中に記載されたような、常用手段を使って実施される。

【0033】逆転写反応の後、生成物を増幅させる。任意の増幅方法を使ってもよく、増幅方法の非限定例としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応、鎖置換反応、転写媒介増幅または核酸一塩基増幅が挙げられる。好ましくはPCRが使われる。典型的には、PCRに必要な全ての成分を含む反応混合物に直接逆転写反応混合物を添加する。次いで、使用するプライマー対により特定される条件を使って増幅反応を実施する。

【0034】本発明者らは、特定のHCV特異的およびHIV特異的増幅プライマー対を使って、患者試料中の低レベルのHCV RNAとHIV RNAの両方を同時に検出することができることを発見した。本発明を実施する上で使用できるプライマーの非限定例として、下の第1表に列挙されたプライマーが挙げられる。

【0035】

【表1】

第1表			
ID	起源	配列	配列番号
JBLTR4	HIV-1 (s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1 (as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	4
JBLTR8	HIV-1 (as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA -3'	5
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA -3'	6
2LTR-R1	HIV-2 (as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	7
C131F25	HCV5' (s)	5'-GGG AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3'	10
C294R25	HCV5' (as)	5'-CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC A-3'	11

(S)=センス鎖；(as)=アンチセンス鎖

【0036】増幅後、増幅生成物は、当該技術分野で周知の任意方法、例えば非限定的に、アガロースまたはアクリルアミドゲル中でのゲル電気泳動法；非同位体比色検出法、例えばOrtho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY から入手可能なSureCell系（例えば下記の実施例1を参照のこと）；ECi検出法；化学発光法；および蛍光検出法を使って検出することができる。

【0037】ウイルス特異的増幅生成物の検出は、試料中にウイルスRNAが存在することを示す。ゲル電気泳動を用いた場合、ウイルス特異的増幅生成物は、反応に用いた増幅プライマーに相当する配列を有する各ウイルスRNAの位置により推定されるような、それらのサイズにより確認される。

【0038】本発明は、患者におけるHIVおよびHCV感染の診断において；抗ウイルス療法処置の効能についての試験において；並びにHCV感染およびHIV感染試料についての血液製剤のスクリーニングにおいて、利用することができる。

【0039】

【実施例】下記の実施例は非限定的に本発明を例証する。

実施例1：生物学的試料中のHCVとHIVの多重検出
下記の実験は、本発明の方法に従ってHCVおよびHIVの多重検出の感度を測定するために行った。

【0040】A.方法

1.患者試料：製造業者の指示に従ってRoche AmpliCor Assayを使って、HIV陽性患者の血漿とHCV陽性患者の血漿のウイルス価を定量した。まず、HIV含有血

漿試料とHCV含有血漿試料をそれぞれ1,000コピー数/mlと10,000コピー数/mlに希釈した。次いでそれらを次のようにして混合した：PCR反応あたり25コピーのウイルスゲノムRNAを提供するために、50 LのHCV血漿と500 LのHIV血漿を450 Lの陰性血漿に添加した。PCR反応あたり5コピーを提供するために、10 LのHCV血漿と100 LのHIV血漿を890 Lの陰性血漿に添加した。

【0041】2.試料調製：血漿試料から、PureScript™ RNA単離試薬（Genra Systems, MinneapolisMN）を使ってRNAを調製した。体液についての製造業者のプロトコルへの変更として、20 gではなく40 gのグリコーゲンをウイルスRNAの沈澱に役立つ担体として使用することを含んだ。更に、大部分において、RNAのイソプロピルアルコール沈澱とエタノールによるRNAベレットの洗浄の後に、製造業者により与えられたRNAハイブリダイゼーション溶液ではなく、RT緩衝液混合物中にRNAベレットを再懸濁した。

【0042】3.逆転写：ジエチルピロカルボネート（DEPC）で処理した水の中に50 mM Tris-HCl（pH 8.3）、75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.4 mM 各dNTP（Pharmacia Biotech）、4 Mのランダムヘキサマー（Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）または特異的逆転写プライマーおよび20単位のRNasin（Promega, Madison, Wisconsin）を含有する溶液50 L中の100 Uの組換えモロニーマウス白血球ウイルス（M-MLV）逆転写酵素（RT）（Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland）を添加することにより、RNAからのcDNAの合成を触

媒した。42 で30分間のインキュベーション後、RT反応液を100 に5分間維持してRT活性を破壊した。各反応液を1分間冷却した後、16000 × gで4秒間超遠心した。

【0043】4. PCR増幅: PCRは、25 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.725 mM EDTA, 54 mM KCl, 3.72 mM NaCl, 40 M DTT, 108 g/mlのゼラチン(IV型), 9.5 %グリセロール, 0.02%Tween 20, 0.02%NP40, 子ウシ胸腺DNA(2 g), 1.2 mM の各dNTP, 0.4 M の各プライマー, 10コピーの線状化した内部陽性対照(IPC)プラスミドDNAおよび16UのTaq ポリメラーゼを含む溶液 100 L中でPE9600サーモサイクラー(Perkin-Elmer)で行った。Taq に対するモノクローナル抗体 TP1-12とTP4-9(それらの調製は米国特許第5,338,671号明細書に開示されている)をそれぞれ50:1と5:1のモル比で反応液に添加して、Taq ポリメラーゼに対する抗体のモル比55:1を提供した。96 で3分間の最初の変性の後、96 で5秒と68 で40秒から成る40サイクルの増幅を行った。サイクルの終了後、103 で5分間の最終加熱段階を行ってTaq ポリメラーゼを失活させた。

【0044】5. PCR生成物の検出: PCR生成物は、4%アガロースゲル中での電気泳動に続いて臭化エチジウム染色により検出した。あるいは、増幅中に5-ビオチン標識プライマー(センス鎖)を使用してPCR生成物をビオチン化した。フロースルー膜の表面上に付着させたラテックス粒子に共有結合せしめたオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションによ

*り、生成物を捕捉した(SureCell™試験)。HIV-1プローブは5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3'(JBLTRpr)〔配列番号13〕および5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3'(JBLTRpr4)〔配列番号14〕であり; HIV-2プローブは5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1)〔配列番号14〕であり; そしてHCVプローブは5'-CCT TTC GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT-3'(C252-27P)〔配列番号12〕であった。生じたプローブ/生成物複合体を、色素前駆体から色素(青色)への酸化的変換を触媒するストレプトアビジン(SA)-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)接合体で処理した。色の強度を色標準に比較することにより、青色の強度を目視により採点した(0~10)。目に見える色の得点>3は、全て陽性結果であると見なした。

【0045】B. 結果

ゲル電気泳動は次の増幅生成物を明らかにした: 188 nt(HCV), 160 nt(IPC)および150 nt(HIVLTR長鎖生成物)。HIVとHCVの組合せアッセイは、PCR試験あたり25コピー(500個のウイルス粒子/ml血漿)のレベルでHIVとHCVの混合試料を全て検出することができた。加えて、混合陽性試料の50%~90%を、PCR試験あたり5コピー(100個のウイルス粒子/ml血漿)のレベルで検出することができた。これらの結果を下記第2表に要約する。

【0046】

【表2】

第2表		
PCR反応あたりの ウイルスRNAの コピー数	n = 8	n = 8
	HCVプローブ陽性	HIVプローブ陽性
0	0%	0%
5	88%	50%
25	100%	100%

フロントページの続き

(72)発明者 デビット アール・パッターソン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92128,
サン ディエゴ, ウィンドクレスト レー
ン 11553, アパートメント ナンバー245

(72)発明者 ジェフリー エム・リネン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92129,
サン ディエゴ, エリンハム ストリート
8978

(72)発明者 ケミン ソン
アメリカ合衆国, ミズーリ 63021, ポー
ルウィン, アーバー グレン 379

【外国語明細書】

1. Title of Invention

**OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR EFFICIENT MULTIPLEX
DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) AND HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) AND METHODS OF USE THEREOF**

2. Claims

1. A method for co-detecting Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample, said method comprising:

(A) performing a reverse transcription reaction using RNA derived from said sample as a template and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HCV RNA and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HIV RNA to produce reverse transcription products comprising (a) HCV-specific reverse transcription products, (b) HIV-specific reverse transcription products, or (c) a combination of (a) and (b);

(B) amplifying said reverse-transcription products using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) HCV-specific amplification products, (b) HIV-specific amplification products, or (c) a combination of (a) and (b);

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>,

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR_e) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>; and

(C) detecting said amplification products;

wherein detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA in said sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA in said sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA and HIV RNA in said sample.

2. A method as defined in claim 1, wherein said reverse transcription reaction is performed using random oligonucleotide primers.

3. A method as defined in claim 1, wherein said reverse transcription reaction is performed using one or more oligonucleotide primers having sequences corresponding to sequences in HCV RNA and one or more oligonucleotide primers having sequences corresponding to sequences in HIV RNA.

4. A method as defined in claim 1, wherein said amplifying is performed by a method selected from the group consisting of polymerase chain reaction, ligase chain reaction, strand displacement amplification, nucleic acid single base amplification, and transcription mediated amplification.

5. A method as defined in claim 1, wherein said detecting comprises visualizing said amplification products by gel electrophoresis.

6. A method as defined in claim 1, wherein said detecting comprises capturing said amplification products on a solid support containing (a) one or more HCV-specific oligonucleotide probes, (b) one or more HIV-specific oligonucleotide probes, or (c) a combination of (a) and (b) and quantifying said captured products using a colorimetric assay.

7. A method as defined in claim 6, wherein said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12> and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3)
<SEQ ID NO. 13>;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4)
<SEQ ID NO. 16>; and

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'
(2LTRpr1)
<SEQ ID NO. 14>.

8. A method as defined in claim 1, wherein said sample is selected from the group consisting of blood, serum, plasma, urine, saliva, and cerebrospinal fluid.

9. A method as defined in claim 1, wherein said co-detecting is simultaneous.

10. A method for co-amplifying Hepatitis C Virus (HCV) DNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) DNA, said method comprising:

(A) performing a polymerase chain reaction on a DNA sample suspected to contain HCV DNA, HIV DNA, or a combination of HCV DNA and HIV DNA, using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) HCV-specific amplification products, (b) HIV-specific amplification products, or (c) a combination of (a) and (b);

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>; and

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>.

11. A method as defined in claim 10, further comprising:

(B) detecting said amplification products,

wherein detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV DNA in said sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV DNA in said sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV DNA and HIV DNA in said sample.

12. A method as defined in claim 11, wherein said detecting comprises visualizing said amplification products by gel electrophoresis.

13. A method as defined in claim 11, wherein said detecting comprises capturing said amplification products on a solid support containing (a) one or more HCV-specific oligonucleotide probes, (b) one or more HIV-specific oligonucleotide probes, or (c) a combination of (a) and (b) and quantifying said captured products using a colorimetric assay.

14. A method as defined in claim 13, wherein said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12> and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3'

(JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3'

(JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>; and

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'

(2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

15. A method as defined in claim ¹⁰4, wherein said co-amplifying is simultaneous.

16. A method for co-detecting Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample, said method comprising:

(A) performing a reverse transcription reaction using RNA derived from said sample and internal positive control (IPC) RNA as a template, at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from IPC RNA, at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HCV RNA, and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HIV RNA to produce reverse transcription products comprising (a) IPC-specific reverse transcription products and (b) HCV-specific reverse transcription products, (c) HIV-specific reverse transcription products, or (d) any combination of any of the foregoing;

(B) amplifying said reverse-transcription products using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for IPC, one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV, and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) IPC-specific amplification products (b) IPC-specific amplification products and HCV-specific amplification products, (c) IPC-specific amplification products and HIV-specific amplification products, or (d) a combination of any of the foregoing;

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for IPC comprises:

(1) forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1) <SEQ ID NO. 8>, and

(2) reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1) <SEQ ID NO. 9>;

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>; and

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>,

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>; and

(C) detecting said amplification products

wherein detection of IPC-specific amplification products indicates the presence of IPC RNA in said sample, detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA in said sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA in said sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific

amplification products indicates the presence of HCV RNA and HIV RNA in said sample.

17. A method as defined in claim 16, wherein said reverse transcription reaction is performed using random oligonucleotide primers.

18. A method as defined in claim 16, wherein said reverse transcription reaction is performed using one or more oligonucleotide primers having sequences corresponding to sequences in IPC RNA, one or more oligonucleotide primers having sequences corresponding to sequences in HCV RNA and one or more oligonucleotide primers having sequences corresponding to sequences in HIV RNA.

19. A method as defined in claim 16, wherein said amplifying is performed by a method selected from the group consisting of polymerase chain reaction, ligase chain reaction, strand displacement amplification, and transcription mediated amplification.

20. A method as defined in claim 16, wherein said detecting comprises visualizing said amplification products by gel electrophoresis.

21. A method as defined in claim 16, wherein said detecting comprises capturing said amplification products on a solid support containing (a) one or more IPC-specific oligonucleotide probes, (b) one or more HCV-specific oligonucleotide probes, (c) one or more HIV-specific oligonucleotide probes, or (d) a combination of any of (a), (b), and (c) and quantifying said captured products using a colorimetric assay.

22. A method as defined in claim 21, wherein said IPC-specific probe consists of 5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3' <SEQ ID NO. 17>, said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12> and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

- (a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>;
- (b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>; and
- (c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

23. A method as defined in claim 16, wherein said sample is selected from the group consisting of blood, serum, plasma, urine, saliva, and cerebrospinal fluid.

24. A method as defined in claim 16, wherein said co-detecting is simultaneous.

25. A method for co-amplifying Internal Positive Control (IPC) DNA, Hepatitis C Virus (HCV) DNA, and Human Immunodeficiency Virus (HIV) DNA, said method comprising:

- (A) performing a polymerase chain reaction on a DNA sample containing IPC DNA and suspected to contain HCV DNA, HIV DNA, or any combination of any of the foregoing, using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for IPC, one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV, and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) IPC amplification

products, (b) IPC amplification products and HCV-specific amplification products, (c) IPC amplification products and HIV-specific amplification products, or (d) a combination of any of (a), (b), and (c);

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for IPC comprises:

(i) forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1) <SEQ ID NO. 8>, and

(ii) reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1) <SEQ ID NO. 9>;

wherein each of said pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>; and

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>,

wherein each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a

reverse primer specific for HIV-2 with the sequence 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>.

26. A method as defined in claim 10, further comprising:

(B) detecting said amplification products,

wherein detection of IPC-specific amplification products indicates the presence of IPC DNA in said sample, detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV DNA in said sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV DNA in said sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV DNA and HIV DNA in said sample.

27. A method as defined in claim 26, wherein said detecting comprises visualizing said amplification products by gel electrophoresis.

28. A method as defined in claim 26, wherein said detecting comprises capturing said amplification products on a solid support containing (a) one or more IPC-specific oligonucleotide probes, (b) one or more HCV-specific oligonucleotide probes, (c) one or more HIV-specific oligonucleotide probes, or (d) any combination of any of the foregoing and quantifying said captured products using a colorimetric assay.

29. A method as defined in claim 28, wherein said IPC-specific probe consists of 5'-CTGCGTTAGACCGAGAAGTGTGGATAAAGG-3' <SEQ ID NO. 17>, said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12> and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

- (a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'
(JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>;
- (b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'
(JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>; and
- (c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'
(2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

30. A method as defined in claim 29, wherein said co-amplifying is simultaneous.

31. A kit for co-detecting HCV RNA and HIV RNA in a biological sample, said kit comprising:

(a) a pair of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV comprising:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>; and

(b) oligonucleotide primers specific for HIV-1 which comprise a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and a pair of oligonucleotide primers specific for HIV-2 which comprise a forward primer with the sequence 5'-

GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence: 5'-

GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)

<SEQ ID NO. 7>.

32. A kit as defined in claim 31, further comprising a pair of oligonucleotide primers specific for IPC, wherein said pair of oligonucleotide primers specific for IPC comprises forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1) <SEQ ID NO. 8> and reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1) <SEQ ID NO. 9>.

33. A kit as defined in claim 31, further comprising one or more probes.

34. A kit as defined in claim 32, further comprising one or more probes.

35. A kit as defined in claim 33, wherein said probes are selected from the group consisting of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12>, 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>, 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>, and 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

36. A kit as defined in claim 34, wherein said IPC-specific probe consists of 5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P) <SEQ

ID NO. 17>, said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12>, and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

- (a) 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>;
- (b) 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>; and
- (c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

37. A kit for co-amplifying HCV DNA and HIV DNA in a DNA sample, said kit comprising:

(a) a pair of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV comprising:

- (i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and
- (ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>;

(b) oligonucleotide primers specific for HIV-1 which comprise a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

- (1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and
- (2) 5'-TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and a pair of oligonucleotide primers specific for HIV-2 which comprise a forward primer with the sequence 5'-

GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence: 5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>.

38. A kit as defined in claim 37, further comprising a pair of oligonucleotide primers specific for IPC, wherein said pair of oligonucleotide primers specific for IPC comprises forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCf1) <SEQ ID NO. 8> and reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCr1) <SEQ ID NO. 9>.

39. A kit as defined in claim 37, further comprising one or more probes.

40. A kit as defined in claim 38, further comprising one or more probes.

41. A kit as defined in claim 39, wherein said probes are selected from the group consisting of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12>, 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr3) <SEQ ID NO. 13>, 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>, and 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>.

42. A kit as defined in claim 40, wherein said IPC-specific probe consists of 5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3' (IPC1P) <SEQ

ID NO. 17>, said HCV-specific probe consists of 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' (C252-27-PRB) <SEQ ID NO. 12>, and said HIV-specific probe is selected from the group consisting of:

(a) 5'-CAACAGACGGGCACACTACT-3'

(JBLTRpr3)

<SEQ ID NO. 13>;

(b) 5'-GAACAGATGGGCACACTGCT-3'

(JBLTRpr4)

<SEQ ID NO. 16>; and

(c) 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'

(2LTRpr1)

<SEQ ID NO. 14>.

3. Detailed Description of Invention

Field of the Invention

The present invention pertains to improved methods for detecting nucleic acid sequences in biological samples, particularly sequences derived from infectious microorganisms.

Background of the Invention

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infects millions of individuals world-wide and consequently represents a serious public health concern. Spread of HIV infection via contaminated blood products means that there is a need for screening methods that can detect small amounts of HIV RNA in patient samples. Furthermore, the increasing availability of ameliorative treatments for HIV infection means that early detection of infection in a patient is vital in order to initiate appropriate therapeutic interventions.

Hepatitis C Virus (HCV) is a parenterally transmitted virus responsible for the majority of cases of post-transfusion hepatitis and a substantial portion of sporadic (or community acquired) hepatitis cases worldwide. It is estimated that more than 1% of the world's population is infected with HCV. HCV infection is associated with acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, and subsequent hepatocellular carcinoma.

HCV is currently classified as a separate genus, Hepacivirus, in the family Flaviviridae. Its genome consists of a positive-stranded RNA molecule of about 9,500 nucleotides with a single, large open reading frame (ORF) which encodes a polyprotein precursor of about 3,000 amino acids. The large ORF is preceded by a 5' non-coding (NC) region of about 340 nucleotides, which is the

most highly conserved region of the genome. The 5' region of the ORF encodes (in a 5'-to-3' direction) a capsid protein, two envelope glycoproteins (E1 and E2), and a small protein of unknown function (P7). The 3' portion of the ORF encodes nonstructural proteins which include a protease, protease/helicase bi-functional protein, RNA polymerase, and regulatory peptides.

Analysis of HCV coding sequences from around the world has revealed considerable sequence variation among individual viral isolates. Furthermore, analyses of HCV sequences from individual patients have shown that the virus circulates as so-called "quasi-species," which contain related but not identical sequences. The variation that exists among isolates and within individual patients is believed to be the result of the low fidelity of the virally-encoded RNA-dependent RNA polymerase. The degree of genetic variability of HCV has important implications for prevention, diagnosis, and control of infection.

Serodiagnosis of HCV infection is typically determined by commercially available enzyme immuno-assays (EIA) which detect antibodies that bind recombinant HCV proteins or peptides. Positive EIA results can be confirmed by a recombinant immunoblot assay (RIBA), but neither EIA nor RIBA assays distinguish past from present infections. Because of the typically low titer of circulating virus, a direct assay for viral proteins has not been successfully developed. Furthermore, antibody-based assays usually fail to detect HCV infection for 2 to 3 months after exposure.

Thus, there is a need in the art for improved assays that allow for the simultaneous screening of patient samples for both HIV and HCV.

Summary of the Invention

The present invention provides methods for the simultaneous detection of the presence of Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample using a multiplex assay.

Thus, in one aspect, the invention is directed to a method for co-detecting Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample. The method comprises:

(A) performing a reverse transcription reaction using RNA derived from the sample as a template and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HCV RNA and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HIV RNA to produce reverse transcription products comprising (a) HCV-specific reverse transcription products, (b) HIV-specific reverse transcription products, or (c) a combination of (a) and (b);

(B) amplifying the reverse-transcription products using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) HCV-specific amplification products, (b) HIV-specific amplification products, or (c) a combination of (a) and (b);

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and
 (ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'

(JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1)
<SEQ ID NO. 7>; and

(C) detecting the amplification products, where detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA in the sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA in the sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA and HIV RNA in the sample.

In a second aspect, the invention is directed to a method for co-amplifying Hepatitis C Virus (HCV) DNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) DNA. The method comprises:

(A) performing a polymerase chain reaction on a DNA sample suspected to contain HCV DNA, HIV DNA, or a combination of HCV DNA and HIV DNA, using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) HCV-specific amplification products, (b) HIV-specific amplification products, or (c) a combination of (a) and (b);

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3'
(C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'

(JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-

R1)

<SEQ ID NO. 7>.

In a third aspect, the invention is directed to a method for co-detecting Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample. The method comprises:

(A) performing a reverse transcription reaction using RNA derived from the sample and internal positive control (IPC) RNA as a template, at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from IPC RNA, at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HCV RNA, and at least one reverse transcription primer that will prime reverse transcription of DNA from HIV RNA, to produce reverse transcription products comprising (a) IPC-specific reverse transcription products

and (b) HCV-specific reverse transcription products, (c) HIV-specific reverse transcription products, or (d) a combination of any of the foregoing;

(B) amplifying the reverse-transcription products using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for IPC, one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV, and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) IPC-specific amplification products (b) IPC-specific amplification products and HCV-specific amplification products, (c) IPC-specific amplification products and HIV-specific amplification products, or (d) a combination of any of the foregoing;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for IPC comprises:

(i) forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGT AGTAA-3' (IPCF1) <SEQ ID NO. 8>, and

(ii) reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACT GAAGA-3' (IPCR1) <SEQ ID NO. 9>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCT GCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACC CTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4), <SEQ ID NO. 3> and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR_e) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>; and

(C) detecting the amplification products, where detection of IPC-specific amplification products indicates the presence of IPC RNA in the sample, detection of HCV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA in the sample, detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA in the sample, and the detection of HCV-specific amplification products and HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV RNA and HIV RNA in the sample.

In a fourth aspect, the invention is directed to a method for co-amplifying Internal Positive Control (IPC) DNA, Hepatitis C Virus (HCV) DNA, and Human Immunodeficiency Virus (HIV) DNA. The method comprises:

(A) performing a polymerase chain reaction on a DNA sample suspected to contain IPC DNA, HCV DNA, HIV DNA, or a combination of any of the foregoing, using one or more pairs of oligonucleotide primers specific for IPC, one or more pairs of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV, and one or more pairs of oligonucleotide primers specific for HIV to produce amplification products comprising (a) IPC amplification products, (b) HCV-specific amplification products, (c) HIV-specific amplification products, or (d) a combination of any of (a), (b), and (c);

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for IPC comprises:

- (i) forward primer 5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAA-3' (IPCF1) <SEQ ID NO. 8>, and
 (ii) reverse primer 5'-CACGATCCTGGAGCAGACACTGAAGA-3' (IPCR1) <SEQ ID NO. 9>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HCV comprises:

- (i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 10>, and
 (ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 11>;

where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-1 comprises a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3' (JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3' (JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, where each of the pairs of oligonucleotide primers specific for HIV-2 comprises a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTR_e) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCCACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>.

In other aspects of the invention, the reverse transcription reaction is performed using random oligonucleotide primers; alternatively, one or more HCV-specific and one or more HIV-specific reverse transcription primers, i.e., oligonucleotides having sequences that correspond to sequences in HCV or HIV RNA, may be used.

Methods for detection of amplification include, without limitation, (a) electrophoresis and (b) capture of amplification products on a solid support to which IPC-, HCV- or HIV-specific probes are attached followed by quantifying the bound products using a colorimetric assay. Useful IPC-specific capture probes include, without limitation, 5'-CTGCGTTAGACCGAGAACTGTGGATAAAGG-3' <SEQ ID NO. 17>. Useful HCV-specific 5' capture probes include, without limitation, 5'-CCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCT-3' <SEQ ID NO. 12>. Useful HIV-1 specific capture probes include, without limitation, 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' <SEQ ID NO. 13> and useful HIV-2 specific capture probes include, without limitation, 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' <SEQ ID NO. 14>.

In another aspect, the invention is directed to a kit for co-detecting HCV RNA and HIV RNA in a biological sample. The kit comprises:

(a) a pair of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV comprising:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

(b) oligonucleotide primers specific for HIV-1 which comprise a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>, and

(2) 5'-TGTTCTGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'

(JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and (c) oligonucleotide primers specific for HIV-2 which comprise a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-R1) <SEQ ID NO. 7>.

In yet another aspect, the invention is directed to a kit for co-amplifying HCV DNA and HIV DNA in a DNA sample. The kit comprises:

(a) a pair of oligonucleotide primers specific for the 5' noncoding region of HCV comprising:

(i) forward primer 5'-GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA-3' (C131F25) <SEQ ID NO. 1>, and

(ii) reverse primer 5'-CGGGGCACTCGCAAGCACCTATCA-3' (C294R25) <SEQ ID NO. 2>;

(b) oligonucleotide primers specific for HIV-1 which comprise a forward primer with the sequence:

5'-CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3'

(JBLTR4) <SEQ ID NO. 3>, and a reverse primer specific for HIV-1 selected from the group consisting of:

(1) 5'-GGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC AGAGT-3' (JBLTR6) <SEQ ID NO. 4>.

(2) 5'-TGTTTCGGGCGCCACTGCTAGAGA-3'

(JBLTR8) <SEQ ID NO. 5>, and (c) oligonucleotide primers specific for HIV-2 which comprise a forward primer with the sequence 5'-GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA-3' (2LTRe) <SEQ ID NO. 6>, and a reverse primer specific for HIV-2 with the sequence:

5'-GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA-3' (2LTR-

R1)

<SEQ ID NO. 7>.

Detailed Description of the Invention

The present inventors have discovered that simultaneous detection of low levels of Hepatitis C Virus (HCV) RNA and Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in biological samples containing HCV and HIV RNA can be achieved in a multiplex assay by (i) performing a reverse transcription reaction on RNA derived from the sample and (ii) amplifying the reverse transcription products using particular pairs of oligonucleotides having sequences complementary to certain sequences present in HCV and HIV RNA. The present invention thus provides improved single-round, multiplex reverse transcription/amplification assays which detect low copy levels of HCV and HIV RNA in the same samples.

Oligonucleotide primers are selected based on considerations of sequence conservation, intra- and inter-molecular interactions, and the predicted secondary structures of the amplicon and surrounding sequence. Furthermore, the primers and assay system are designed to allow the co-amplification (and co-detection) of multiple regions of the HCV and HIV genomes, multiple viral species, and an internal positive control (IPC) RNA (or DNA). Simultaneous amplification/detection of multiple regions of the viral genomes increases assay sensitivity and the co-amplification of an IPC decreases the likelihood of false negative results because of PCR inhibition.

Many techniques in molecular biology, microbiology, recombinant DNA, and protein biochemistry are used in practicing the present invention, such as those explained in, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes I, II, and III, 1997 (F.M. Ausubel ed.); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II, 1985 (D.N. Glover ed.); *Oligonucleotide Synthesis*, 1984, (M.L. Gait ed.); *Transcription and Translation*, 1984 (Hames and Higgins eds.); *A Practical Guide to Molecular Cloning*; the series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); and *Protein Purification: Principles and Practice*, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.).

"Nucleic acid" or "polynucleotide" as used herein refers to purine- and pyrimidine-containing polymers of any length, either polyribonucleotides or polydeoxyribonucleotides or mixed polyribo-polydeoxyribo nucleotides. This includes single- and double-stranded molecules, such as, for example, DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA hybrids, as well as "protein nucleic acids" (PNA) formed by conjugating bases to an amino acid backbone. This also includes nucleic acids containing modified bases.

A "complement" of a nucleic acid sequence as used herein refers to the antisense sequence that participates in Watson-Crick base-pairing with the original sequence.

A "primer" as used herein is an isolated oligonucleotide between about 5 and about 50 nucleotides in length, preferably between about 6 and about 25 nucleotides in length and most preferably between about 6 and about 18 nucleotides in length, that forms a duplex with a single-stranded nucleic acid sequence of interest and allows polymerization of a complementary strand using, e.g., reverse transcriptase or DNA polymerase.

An "isolated" nucleic acid as used herein refers to a component that is removed from its original environment (for example, its natural environment if it is naturally occurring or a reaction mixture if it is synthetic). An isolated nucleic acid typically contains less than about 50%, preferably less than about 75%, and most preferably less than about 90%, of the components with which it was originally associated.

A nucleic acid sequence that is "derived from" a designated sequence refers to a sequence that corresponds to a region of the designated sequence. This encompasses sequences that are homologous or complementary to the sequence.

An internal positive control (IPC) target nucleic acid refers to a synthetic nucleic acid sequence cloned into a plasmid vector which is subsequently linearized, typically by the action of a restriction endonuclease. An IPC will typically have multiple primer binding sequences surrounding a generic probe-binding region, and acts as a generic control against false negative results in nucleic acid amplification reactions.

The sequence of a preferred internal positive control target DNA is:

5'-
CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGAACGCACGGACGAGGACATCA
TAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGGTCTAACGCAGCAGTCAGTG
TATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTCAGTGTCTGCTCCAGGATCGT
G-3'
<SEQ ID NO. 15>.

Nucleic acids comprising any of the sequences disclosed herein or subsequences thereof can be prepared by conventional methods. For example, DNA can be chemically synthesized using, e.g., the phosphoramidite solid support method of Matteucci *et al.*, 1981, *J. Am. Chem. Soc.* **103**:3185, the method of Yoo *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* **764**:17078, or other well known methods. The nucleic acids may also be modified by many means known in the art. Non-limiting examples of

such modifications include methylation, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, and internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.) or charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.). Nucleic acids may contain one or more additional covalently linked moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), chelators (e.g., metals, radioactive metals, iron, oxidative metals, etc.), and alkylators. PNAs are also encompassed by the term "nucleic acid". The nucleic acid may be derivatized by formation of a methyl or ethyl phosphotriester or an alkyl phosphoramidate linkage. Furthermore, the nucleic acid sequences of the present invention may also be modified with a label capable of providing a detectable signal, either directly or indirectly. Exemplary labels include radioisotopes, fluorescent molecules, biotin, and the like.

Amplification as used herein refers to an iterative process by which a nucleic acid is copied. Suitable methods for amplification include without limitation polymerase chain reaction, ligase chain reaction, strand displacement amplification, and nucleic acid single base amplification, and transcription mediated amplification.

The present invention provides methods for detection of HCV and HIV in biological samples. The methods are carried out by

(i) performing a reverse transcription reaction using as a template RNA contained within or derived from the sample;

(ii) amplifying the reverse-transcription products, if any, using at least one pair of amplification primers having sequences corresponding to sequences within the genome of HCV, preferably in the 5' noncoding region of HCV, and at least one pair of amplification primers having sequences corresponding to sequences within the genome of HIV, to produce HCV-specific and HIV-specific amplification products; and

(iii) detecting the HCV-specific and HIV-specific amplification products. Detection of HCV-specific or HIV-specific amplification products indicates the presence of HCV and HIV RNA, respectively, in the sample.

According to the invention, a biological sample is obtained from a patient by any conventional means. Suitable biological samples include, without limitation, blood, serum, plasma, urine, breast milk, and cerebrospinal fluid. Preferably, plasma is used as the source of viral RNA.

The biological sample is treated in any manner that provides access of the reverse transcription reagents to RNA, specifically viral RNA, contained within the sample. RNA "derived from" a biological sample is any RNA which was originally present in the sample and to which access has been gained by treating the sample. Preferably, RNA is extracted from the sample using any method well known in the art, such as, e.g., methods employing guanidinium thiocyanate, or using commercially available reagents and methods such as, e.g., PureScript[®] from Gentra Systems, Inc. (Minneapolis MN). Any extraction procedure may be used that results in separation from the RNA of RNases, other proteins, and/or any other components that might interfere with reverse transcription.

The sample is then subjected to reverse transcription using (a) random primers, such as random hexamer primers obtained from Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, and/or (b) primers derived from the 5' or 3' non-coding regions of the HCV RNA genomic sequence. Reverse transcription is carried out using conventional procedures, such as are described in *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes I, II, and III, 1997 (F.M. Ausubel ed.); in U.S. Patent 5,322,770; in Young, et al., *J. Clin. Microbiol.* 31(4):882 (1993); Myers et al., *Biochemistry* 30(3):7661 (1991); or as described in copending patent application Serial No. _____, attorney docket number 2094/0E287.

Following the reverse transcription reaction, the products are amplified. Any method for amplification may be used, including, without

limitation, polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction, strand displacement reaction, transcription mediated amplification, or nucleic acid single base amplification. Preferably, PCR is used. Typically, a reaction mixture containing all of the necessary components for PCR is added directly to the reverse transcription reaction mixture. Amplification is then carried out using conditions specified by the primer pairs that are used.

The present inventors have discovered certain pairs of HCV-specific and HIV-specific amplification primers may be used simultaneously to detect low levels of both HCV and HIV RNA in patient samples. Non-limiting examples of primers that may be used in practicing the invention include those listed in Table 1 below.

TABLE 1			
<u>ID</u>	<u>Source</u>	<u>Sequence</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
JBLTR4	HIV-1(s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1(as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	4
JBLTR8	HIV-1(as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA-3'	5
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA-3'	6
2LTR-R 1	HIV-2 (as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	7
C131F2 5	HCV5'(s)	5'-GGG AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3'	10
C294R2 5	HCV5'(a s)	5'-CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC A -3	11

(s) = sense strand; (as) = antisense strand

Following amplification, the amplified products may be detected using any method known in the art, including, without limitation, gel electrophoresis in agarose or acrylamide gels; non-isotopic colorimetric detection such as the SureCell9 system, available from Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY (see, e.g., Example 1 below); ECi detection; chemiluminescence, and fluorescence.

The detection of viral-specific amplification products indicates the presence of viral RNA in the sample. When gel electrophoresis is used, viral-specific amplification products are confirmed by their size, as predicted by the location in the respective viral RNA of the sequences corresponding to the amplification primers used in the reaction.

The present invention finds use in the diagnosis of HIV and HCV infection in patients; in testing the efficacy of anti-viral therapeutic regimens; and in screening the blood supply for HCV-infected and HIV-infected samples.

Description of the Preferred Embodiments

The following examples illustrate the present invention without limitation.

Example 1: Multiplex Detection of HCV and HIV in Biological Samples:

The following experiments were performed to determine the sensitivity of multiplex detection of HCV and HIV according to the methods of the present invention.

A. Methods:

1. Patient samples:

Viral loads in HIV positive patient plasma and HCV positive patient plasma were quantified using the Roche Amplicor Assay according to the manufacturer's instructions. HIV-containing and HCV-containing plasma samples were first diluted to contain 1,000 copies/ml and 10,000 copies/ml respectively.

They were then combined as follows: To provide 25 copies of viral genomic RNA/PCR reaction, 50 μ l of HCV and 500 μ l HIV plasma were added to 450 μ l negative plasma. To provide 5 copies/PCR reaction, 10 μ l of HCV and 100 μ l HIV plasma were added to 890 μ l negative plasma.

2. Sample preparation:

RNA was prepared from plasma samples using PureScript[®] RNA isolation reagents (Gentra Systems, Minneapolis MN). Modifications to the manufacturer's protocol for body fluids included use of 40 μ g glycogen, rather than 20 μ g, as a carrier to aid in the precipitation of viral RNA. Additionally, in most cases, after isopropyl alcohol precipitation of the RNA and washing the RNA pellet with ethanol, the RNA pellet was resuspended in the RT buffer mix, rather than in the RNA hydration solution provided by the manufacturer.

3. Reverse Transcription:

The synthesis of cDNA from RNA was catalyzed by the addition of 100 U recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (RT) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) in a 50 μ l solution of 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.4 mM of each dNTP (Pharmacia Biotech), 4 μ M random hexamers (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) or specific reverse transcription primer, and 20 units RNasin (Promega, Madison, Wisconsin) in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. After incubation at 42°C for 30 min, the RT reaction was held at 100°C for 5 min to destroy RT activity. Each reaction was chilled for 1 min followed by microcentrifugation at 16000 x g for 4 seconds.

4. PCR amplification:

PCR was carried out IN A PE9600 thermocycler (Perkin-Elmer) in a 100 μ l solution of 25 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.725 mM EDTA, 54 mM KCl, 3.72 mM NaCl, 40 μ M DTT, 108 μ g/mL gelatin (type IV), 9.5% glycerol, 0.02%

Tween 20, 0.02% NP40, calf thymus DNA (2 g), 1.2 mM of each dNTP, 0.4 M of each primer, 10 copies linearized internal positive control (IPC) plasmid DNA, and 16 U of Taq polymerase. Monoclonal antibodies to Taq, TP1-12 and TP4-9, the preparation of which are disclosed in U.S. Patent 5,338,671, were added to the reaction at a 50:1 and 5:1 molar ratio, respectively, to provide a 55:1 molar ratio of antibody to Taq polymerase. After initial denaturation at 96EC for 3 min, 40 cycles of amplification were performed at 96EC for 5 sec and 68EC for 40 sec. At the conclusion of cycling, a post-heat step was performed for 5 min at 103EC to inactivate Taq polymerase.

5. Detection of PCR products:

PCR products were detected by electrophoresis in 4% agarose gels followed by ethidium bromide staining. Alternatively, PCR products were biotinylated by use of 5'-biotin-labeled primers (sense strand) during amplification. Product was captured by hybridization to oligonucleotide probes covalently attached to latex particles, which were deposited on the surface of a flow through membrane (SureCell[®] tests). The HIV-1 probes were: 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr) <SEQ ID NO. 13> and 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4) <SEQ ID NO. 16>; the HIV-2 probe was 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1) <SEQ ID NO. 14>; and the HCV probe was 5'-CCT TTC GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT -3' (C252-27P) <SEQ ID NO. 12>. The probe/product complex was reacted with streptavidin (SA)-horseradish peroxidase (HRP) conjugate, which catalyzes the oxidative conversion of a dye precursor to a dye (blue color). The blue color intensity was scored visually (0-10) by comparing color intensity to color standards. All visual color scores > 3 were considered to be positive results.

B. Results:

Gel electrophoresis revealed the following amplification products: 188 nt (HCV), 160 nt (IPC), and 150 nt (HIV LTR-long product). The combined HIV and HCV assay was able to detect all combined HIV and HCV samples at 25 copies per PCR test (500 viral particles/ml plasma). In addition, between 50-90% of the combined positive samples were detected at 5 copies/PCR test (100 viral particles/ml plasma). The results are summarized in Table 2, below.

Table 2		
# copies viral RNA per PCR reaction.	n=8 HCV probe positive	n=8 HIV probe positive
0	0%	0%
5	88%	50%
25	100%	100%

1. Abstract

Disclosed herein are methods and kits for the simultaneous detection of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in biological samples from human subjects.

2. Representative Drawing

None

专利名称(译)	用于有效多重检测丙型肝炎病毒 (HCV) 和人免疫缺陷病毒 (HIV) 的寡核苷酸引物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2000279198A	公开(公告)日	2000-10-10
申请号	JP2000030237	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
[标]发明人	ケビンエムゴルマン デビットアールパッターソン ジェフリーエムリネン ケミンソン		
发明人	ケビン エム.ゴルマン デビット アール.パッターソン ジェフリー エム.リネン ケミン ソン		
IPC分类号	C12N15/09 C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/70 C12R1/92 G01N33/53 G01N33/569 G01N37/00		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/FA01 4B024/HA12 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32		
优先权	60/118498 1999-02-03 US		
其他公开文献	JP5442917B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用来自生物样品的RNA作为模板进行逆转录，同时检测HCV和HIV，通过使用分别对HCV和HIV特异的引物扩增形成的逆转录产物，并检测扩增的材料。解决方案：通过使用源自生物样品的RNA作为模板进行逆转录反应，并且对丙型肝炎病毒 (HCV) RNA特异性且对人免疫缺陷病毒 (HIV) 特异的逆转录引物提供每个逆转录反应转录产物和转录产物通过使用对HCV的5'非编码区特异的寡核苷酸引物对和对HIV特异的寡核苷酸引物对来扩增，以提供每种扩增产物。检测扩增产物以检测人受试者的生物样品中的丙型肝炎病毒和人免疫缺陷病毒。

29

第1表

ID	起源	配列	配列番号
JBLTR4	HIV-1 (s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	3
JBLTR6	HIV-1 (as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	4
JBLTR8	HIV-1 (as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA -3'	5
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA -3'	6
2LTR-R1	HIV-2 (as)	5'-GGG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	7
C131F25	HCV5' (s)	5'-GGG AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3'	10
C294R25	HCV5' (as)	5'-CGG GGC ACT CCC AAG CAC CCT ATC A-3'	11