

(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 - 342274

(P2000 - 342274A)

(43)公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(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 N 15/09	ZNA		C 1 2 N 15/00	ZNA A
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 Q 1/68			C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	M
	33/566		33/566	

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 37数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 25419(P2000 - 25419)

(22)出願日 平成12年2月2日(2000.2.2)

(31)優先権主張番号 60/118417

(32)優先日 平成11年2月2日(1999.2.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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

(72)発明者 デビッド アール . パターソン

アメリカ合衆国,カリフォルニア 92128,サン
ディエゴ,ウインドクレスト レーン
11553,アパートメント ナンバー245

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H I V - 1 および H I V - 2 の効率的検出のためのオリゴヌクレオチド逆転写プライマー並びに
その使用方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】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の提供。

【解決手段】ヒト被検者からの生物学的試料中のヒト免疫不全ウイルスの検出方法及びそのためのキット。さらにそのようなヒト免疫不全ウイルスの検出方法及びそのためのキットに使われるオリゴヌクレオチド逆転写プライマー。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料中のヒト免疫不全ウイルス（HIV）RNAを逆転写する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドプライマーが前記RNAの少なくとも一部分に相補的なDNAの合成を開始させるような条件下で、前記オリゴヌクレオチドを前記試料から誘導したRNAと接触させることを含んで成り、ここで前記オリゴヌクレオチドが

- (i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕、
- (ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、
- (iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、
- (iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および
- (v) 前記のもの任意の組合せから成る群より選ばれ

ることを特徴とする方法。
【請求項2】 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3】 前記cDNAを回収することを更に含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 生物学的試料中のヒト免疫不全ウイルス（HIV）RNAの存在の検出方法であって、

(a) 前記試料から誘導したRNAを鋳型として使用しそして前記RNA中に含まれるヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドを逆転写プライマーとして使用して逆転写反応を行うことにより、HIV特異的逆転写生成物を生成させ、

ここで前記逆転写プライマーは

- (i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕
- (ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、
- (iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、
- (iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および
- (v) 前記のもの任意の組合せから成る群より選ばれ

る；
(b) 前記逆転写生成物を増幅させることにより増幅生成物を生成させ；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、

前記増幅の増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示す方法。

【請求項5】 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4に記載の方法。

【請求項6】 前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応および鎖置換増幅から成る群より選ばれる、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 前記検出が、増幅生成物のゲル電気泳動、固体支持体上への増幅生成物の捕捉および増幅生成物の化学発光検出から成る群より選ばれた方法により行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 オリゴヌクレオチド 5'-CTTGTATTACTACT*50

*G-3'〔配列番号1〕。

【請求項9】 オリゴヌクレオチド 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕。

【請求項10】 オリゴヌクレオチド 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕。

【請求項11】 オリゴヌクレオチド 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕。

【請求項12】 オリゴヌクレオチド 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕を含んで成る、HIV特異的逆転写プライマー。

【請求項13】 オリゴヌクレオチド 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕を含んで成る、HIV特異的逆転写プライマー。

【請求項14】 オリゴヌクレオチド 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕を含んで成る、HIV特異的逆転写プライマー。

【請求項15】 オリゴヌクレオチド 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕を含んで成る、HIV特異的逆転写プライマー。

【請求項16】 生物学的試料中のHIV-1、HIV-2またはそれらの組合せの検出のためのキットであって、

- (a) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕
- (b) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、
- (c) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、
- (d) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および
- (e) 前記のもの任意の組合せから成る群より選ばれた逆転写プライマーを含んで成るキット。

【請求項17】 ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドプライマーが前記RNAの少なくとも一部分に相補的なDNAの合成を開始するような条件下で、前記試料から誘導されたRNAを前記ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドと同時に接触させることを更に含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドも逆転写プライマーとして段階(a)において使用される、請求項4に記載の方法。

【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いて感染の早期検出がきわめて重大であることを意味する。

【0003】従って、診断とスクリーニングに利用することができる、HIVについての高感度の検出方法が当該技術分野で必要とされている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、生物学的試料中のヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAを逆転写する方法であって、(a) オリゴヌクレオチドプライマーが前記RNAの少なくとも一部分に相補的なDNAの合成を開始させるような条件下で、前記オリゴヌクレオチドを前記試料から誘導したRNAと接触させることを含んで成り、ここで前記オリゴヌクレオチドが

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕、(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および(v) 前記のもの任意の組合せから成る群より選ばれることを特徴とする方法を提供する。

【0005】別の面によれば、本発明は、生物学的試料中のヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの存在の検出方法であって、

(a) 前記試料から誘導したRNAを鋳型として使用しそして前記RNA中に含まれるヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドを逆転写プライマーとして使用して逆転写反応を行うことにより、HIV特異的逆転写生成物を生成させ、ここで前記逆転写プライマーは

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および(v) 前記のもの任意の組合せから成る群より選ばれ；

(b) 前記逆転写生成物を増幅させることにより増幅生成物を生成させ；そして

(c) 前記増幅生成物を検出することを含んで成り、前記増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示す方法を提供する。

【0006】増幅は、どんな方法で行ってもよく、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により行うことができる。本発明に従ったHIV特異的逆転写プライマーの使用は、試料中の、好ましくは血漿中のHIV-1および/またはHIV-2の高感度検出方法を提供する。

【0007】更に別の面によれば、本発明は、生物学的試料中のHIV-1、HIV-2またはそれらの組合せの検出のためのキットであって、(a) 5'-CTTGTATTACTACTG-3'〔配列番号1〕

(b) 5'-CCCTGTGGCGCC-3'〔配列番号2〕、(c) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3'〔配列番号3〕、(d) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3'〔配列番号4〕および(e) 前記のもの任意の組合せ

から成る群より選ばれた逆転写プライマーを含んで成るキットを提供する。このキットは、逆転写、増幅および生成物検出のための試薬や使用説明書を更に含んでもよい。

【0008】

【発明の実施態様】本発明者らは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNA中に存在する特定の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写反応に用いると、生物学的試料中のHIV RNAの検出がより一層効率的であることを発見した。好ましくは、それらのプライマーの配列はHIV RNAの3'末端付近の配列に相当する。

【0009】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。

【0010】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。

【0011】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。

【0012】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。

【0013】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。

【0014】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。

【0015】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の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。

【0016】好ましいIPC標的DNAの配列は下記のものである：

5'-CGCCAGCGTGGACCATCAAGTAGTAATGAACGCACGGACGAGGACATCATAGAGATTACACCTTTATCCACAGTTCTCGGTCTAACGCAGCAGTCAGTGTATCAGCACCAGCATCCGTAGTGAGTCTTCAGTGTCTGCCAGGATCGTG-3' [配列番号5]。

【0017】本明細書中で用いる、逆転写に適した条件、即ち、オリゴヌクレオチドがcDNA合成を開始させるような条件は、cDNAの合成をもたらす温度と時間でのRNAおよびプライマーオリゴヌクレオチドと逆転写酵素およびヌクレオチドとのインキュベーションを包含する。

【0018】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、プソラレンなど)、キレート化剤(例えば金属、放射性金属、鉄、被酸化性金属など)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。

【0019】本明細書中で用いる「増幅」とは核酸がコピーされる相互作用工程を指して言う。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。

【0020】本明細書中で用いる「ヒト免疫不全ウイルス(HIV)」は、レトロウイルス属の種を指し、HIV-1, HIV-2, SIVおよびそれらの変異株を包含する。本発明により検出可能であるHIVの分離株としてはHIV-1とHIV-2が挙げられるが、それらの限定されない。

【0021】本発明は生物学的試料からのHIV RNAの逆転写方法を提供する。この方法は、生物学的試料中のHIVのHIVの検出に有用である。HIV特異的増幅生成物の検出が前記試料中のHIV RNAの存在を示す。

【0022】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、組織試料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。

【0023】生物学的試料は、試料中に含まれるRNA、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「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Genra 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。

【0024】次いで、試料から抽出されたRNAを、オリゴヌクレオチドプライマーが前記抽出されたRNAの少なくとも一部分に相補的なDNAの合成を開始させるような条件下で、前記オリゴヌクレオチドプライマーと接触させる。オリゴヌクレオチドプライマーの配列はHIVの配列に由来する。それらのプライマーはHIV RNAの一領域に相当するが、その領域は検出が所望される領域より下流、即ち3'側であってもよい。それらの領域としては、例えば、LTR領域(long terminal region)、ウイルス逆転写酵素(Pol)をコードする領域、Gag タンパク質、Tat タンパク質、エンベローブ糖タンパク質、Vif タンパク質、Vpr タンパク質およびVpu タンパク質、並びに転写因子応答要素をコードするRev 領

域が挙げられる。好ましくは、プライマーはHIVゲノムの3'末端付近の配列に相当する。プライマー配列はHIVの特定の分離株（例えばHIV-1およびHIV-2の分離株）を具体的に同定するために使うことができる。プライマーは、それが異なる分離株からのRNAにはハイブリダイズしないような条件下で特定の分離株に由来するRNAにハイブリダイズすることにより特定の分離株を同定してもよく、即ちプライマーそれ自体が分離株間で異なる配列を含んでもよい。あるいは、プライマー配列は分離株間で異なるHIV RNAの断片の合成を開始させるのに使ってもよく、即ち、分離株間で異なる配列がプライマー配列の下流にあってもよい。*

*【0025】本発明の実施に際して有用な逆転写プライマーは、配列保存、分子内および分子間相互作用、並びにアンプリコンおよび隣接配列の推定上の二次構造の理論的考察に基づいて選択される。更に、本発明のプライマーおよびアッセイ系は、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）の同時増幅（および同時検出）を可能にするようにデザインされる。本発明の逆転写プライマーの非限定例を、下の第1表に示す。

【0026】
【表1】

第1表			
起源	名称	配列	配列番号
HIV-1	POL3RT	5'-CTTGTATTACTACTG-3'	1
HIV-1	LTR8RT	5'-CCCTGTGGCGCC-3'	2
HIV-2	2LTR1RT	5'-GCGACTAGGAGAGA-3'	3
HIV-2	2Env2RT	5'-CCCAGACGGTCAGT-3'	4

【0027】逆転写は上記プライマーの1つまたは複数を使って行われる。ランダムプライマー、例えば、ランダムヘキサマー逆転写プライマー（N6, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）を加えてもよい。逆転写は、例えばCurrent Protocols inMolecular 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。

【0028】逆転写反応の後、1または複数のcDNA生成物を常法により単離・回収することができる。好ましくは、1または複数のcDNA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（HIV特異的増幅プライマーを含む）を含有する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。適当な増幅プライマー対は、例えば米国特許出願第号, 代理人書類番号2094/0E285および下記の実施例中に開示されている。

【0029】増幅後、任意の方法を使って増幅生成物を検出することができ、そのような方法としては、非限定的に、アガロースまたはアクリルアミド中での電気泳動；固体支持体上への増幅生成物の捕捉とそれに続く比色検出法（例えば下記の実施例1を参照のこと）；EC

i 検出法；蛍光検出法、放射性同位体標識検出法および化学発光法が挙げられる。そのような検出方法のための試薬は、例えば、Molecular Probes, Eugene, OregonおよびOrtho-Clinical Diagnostics, Rochester, NYから市販されている。

【0030】HIV特異的増幅生成物の検出は、試料中にHIV RNAが存在することを示す。ゲル電気泳動を用いる場合、HIV特異的増幅生成物は、反応に使用した増幅プライマーに対応する配列のHIV RNA中の位置により推測されるようなそれらのサイズによって確認される。

【0031】本発明は、上記第1表に示した1または複数の逆転写プライマーを含んで成る、生物学的試料中のHIV RNAの検出用のキットを提供する。このキットは、逆転写用の試薬に加えて、例えばPCRによる、HIV cDNAの検出のための追加の試薬を含んでもよい。

【0032】

【実施例】次の実施例は、非限定的に、本発明を説明する。

方法

1. 試料調製：血漿試料から、チオシアン酸グアジニウムまたはPureScript™ RNA単離試薬（Genra Systems, Minneapolis MN）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、20gではなく40gのグリコーゲンを用いることを含んだ。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ペ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ペレットを再懸濁した。

【0033】2. 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) および/または特異的逆転写プライマー並びに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 Maus 白血病ウイルス(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。

【0034】3. PCR増幅: PCRは、25 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.725 mM EDTA, 54 mM KCl, 3.72 mM *
第2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'	6
JBLTR6	HIV-1 (as)	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA GT-3'	7
JBLTR8	HIV-1 (as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA -3'	8
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GGA -3'	9
2LTR-R1	HIV-2 (as)	5'-GGC ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA-3'	10

【0036】4. PCR生成物の検出: PCR生成物は、(i) ゲル電気泳動後の臭化エチジウム染色または(ii) 増幅中の5'-ビオチン標識プライマー(センス鎖)の使用のいずれかにより検出した。この場合、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, Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY)。HIV-1プローブは5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3' (JBLTRpr) [配列番号11] および5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3' (JBLTRpr4) [配列番号12] であり、そしてHIV-2プローブは5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3' (2LTRpr1) [配列番号13] 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ibel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。

【0037】実施例1: HIV特異的プライマーまたはランダムプライマーを使った逆転写の効率

*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)中で行った。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。使用した増幅プライマーを下記の第2表に示す。

【0035】

【表2】

30 本発明のHIV特異的プライマーまたはランダムヘキサマー逆転写プライマー(N6, Pharmacia Biotech)を使って、ヒト血漿試料から誘導したHIV RNAの逆転写の効率を比較するために、下記の実験を行った。

【0038】反応あたり約100コピーのHIV RNAを提供するために、100 Lあたり1000コピーのHIV RNAを含むようにヒト血漿を希釈した。RNAはチオシアン酸グアニジウムを使って血漿から抽出した。RNAペレットを26 Lのジエチルピロカルボネート処理した水に溶かした。

40 【0039】逆転写反応液は、13 LのRNA、および10 Lの逆転写混合物[第一鎖緩衝液、0.1 M DTT, 20 U RNasin (Promega, Madison, WI), 0.4 mMの各dNTPおよび200 Uのモロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)逆転写酵素を含む]を含んだ。更に2 Lの下記のプライマー混合物(全て50 Mずつ)を試験条件に従って添加した: (1) 2 LのN6ランダムプライマー; (2) 1 LのN6ランダムプライマー+1 LのLTR8RTプライマー; (3) 1 LのN6ランダムプライマー+1 LのPOL3RTプライマー; (4) 1 LのLTR8RT+1 LのPOL3RT。逆転写反応液は、42で30分間インキュベートし; 100で5分間加熱し;

次いで氷上で1分間冷却した。次いで75 LのPCRマスタ混合物をcDNA含有反応混合物に添加し、そして次の条件下でPCRを行った：96 で3分間余熱；次いで96 での融解と62 で5秒間のアニーリングと増幅を5サイクル；次いで96 での融解と68 で40秒間のアニーリングと増幅を35サイクル。増幅生成物を4%アガロースゲル中での電気泳動により分離しそして臭化エチジウムで視覚化した。

【0040】結果：図1と2に描写されるように、単独でまたはランダムヘキサマープライマーと組み合わせた HIV特異的逆転写プライマーの使用は、かなり多くの HIV特異的増幅生成物の検出をもたらした。図1のレーン2~10(ランダムプライマーのみ)を図1のレーン12~20(LTR8RT+ランダムプライマー)、図2のレーン2~10(POL3RT+ランダムプライマー)および図2のレーン12~20(LTR8RT+POL3RT)と比較されたい。この結果は、100 Mまたは200 Mのランダムプライマーを使った場合にも観察された。

【0041】実施例2：患者試料中のHIV RNAの検出

次の実験は、ランダムヘキサマー逆転写プライマーのみかまたはHIV特異的逆転写プライマーと組み合わせたランダムプライマーのいずれかを使って、患者試料中のHIV RNAの検出を比較するために行った。CD4 T

細胞計数が500より大きい患者(これらの患者は無症状であり比較的低いウイルス負荷量を有する)からHIV血漿試料を採取した。

【0042】上記実施例1に記載したのと同様に、血漿試料からRNAを抽出した。13LのRNA溶液を15Lの水に希釈した。各試料を逆転写用に2つの12Lアリコートに分けた。上記実施例1に記載した通りに2つの逆転写反応混合物を調製した。各混合物は2Lの100Mランダムプライマー+1Lの水か、2Lの100Mランダムプライマー+等量の次のプライマー：(1) POL3RT, (2) LTR8RT, (3) 2LTRRTおよび(4) 2EnvRTを含む1Lの50M HIV特異的プライマー混合物、のいずれかを含有した。逆転写反応および増幅反応は上記実施例1に記載した通りに実施した。

【0043】臭化エチジウム染色した4%アガロースゲル上でのゲル電気泳動および更に上述したSureCell比色法により、HIV特異的増幅生成物を検出した。

【0044】結果：図3および図4はゲル電気泳動により検出した増幅生成物を描写する。比色法によるHIV特異的増幅生成物の検出は、第3表において相対値として示される。IPCは陽性対照プライマーを意味する。

【0045】

【表3】

試料	ランダムプライマーのみ			N6+RTプライマー		
	LTR	POL	IPC	LTR	POL	IPC
	3/4	3/4	1P	3/4	3/4	1P
1	0	0	8	0	0	8
2	8	7	8	8	7	7.5
3	5	6	8	7	7	7.5
4	5	5	8	5	5	8
5	7	5	8	7.5	7.5	8
6	na	na	na	na	na	na
7	6	7	8	5	7.5	8
8	8	8	8	8	8	8
9	2	2	8	3	0	8
10	5	7	8	7	8	8
11	6	7	8	6	6	8
12	8	8.5	8	7.5	9	7.5
13	8	7.5	8	8	7.5	8
14	0	0	8	0	0	9
15	0	0	8	0	0	8
16	2	0	8	7	8	9
17	7.5	7.5	8	7.5	7.5	8
18	6	7	8	6	7	8

【0046】

* * 【表4】

試料	ランダムプライマーのみ			N6+RTプライマー		
	LTR	POL	IPC	LTR	POL	IPC
	3/4	3/4	1P	3/4	3/4	1P
19	7.5	7.5	7.5	7.5	8	8
20	2	1	8	5	5	8
21	6.5	6.5	8	7	7.5	7
22	1	1	8	3	5	8
23	3	1	8	2	2	8
24	7	9	8	7	9	7
25	na	na	na	na	na	na
26	9	9	7	9	9	6.5
27	3	4	7	5	7	8.5
28	2	2	8	2	2	8.5
Neg	0	0	7	0	0	7
Pos	5	5	7	5	5	7

【0047】試料3と10で、ランダムヘキサマーへのH IV特異的RTプライマーの添加は、ランダムプライマ

ーのみを使うよりも大きな増幅の度合いをもたらした。比色法によりそれらの試料中に検出される生成物の量も、HIV特異的RTプライマーを使用するとより大きかった。

【0048】試料16, 20および22は、逆転写反応においてランダムプライマーのみを使うと、ゲル電気泳動または比色法により検出されなかった。しかしながら、それらの試料は、ランダムプライマーに加えてHIV特異的RTプライマーを使うと陽性であった。

【0049】これらの結果は、本発明の方法および組成物が、HIVについての患者または血液製剤のスクリーニングにおいて、偽陽性結果の発生率を減少できることを示す。

【図面の簡単な説明】

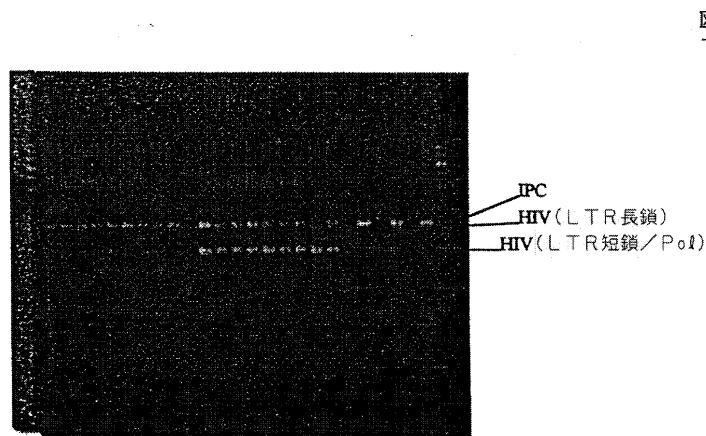
【図1】図1は、逆転写プライマーとして(a) ランダムヘキサマープライマーのみ(レーン2~10);または(b) ランダムヘキサマープライマーとLTR8RTの混合物(レーン12~20)を使って得られたHIV-1特異的増幅生成物を示す、臭化エチジウム染色した4%アガロースゲルの写真を描写する図面である。レーン1はマーカーを含み、そしてレーン22, 24および26は対照試料である。

【図2】図2は、逆転写プライマーとして(a) ランダムヘキサマープライマーとPOL3RTの混合物(レーン2~10)または(b) LTR8RTとPOL3RTの混合物(レーン12~20)を使って得られたHIV-1特異的増幅生成物を示す、臭化エチジウム染色した4%アガロースゲルの写真を描写する図面である。レーン1はマーカーを含み、そしてレーン22, 24および26は対照試料である。

【図3】図3は、逆転写プライマーとして(a) ランダムヘキサマープライマーのみ(レーン2~13)または(b) ランダムヘキサマーとPOL3RT, LTR8RT, 2LTRRTおよび2EnvRTとの混合物(レーン15~26)を使って得られたHIV-1特異的増幅生成物を示す、臭化エチジウム染色した4%アガロースゲルの写真を描写する図面である。レーン1はマーカーを含む。

【図4】図4は、(a) ランダムヘキサマープライマーのみ(レーン2~15)または(b) ランダムヘキサマーとPOL3RT, LTR8RT, 2LTRRTおよび2EnvRTとの混合物(レーン16~29)を使って得られたHIV-1特異的増幅生成物を示す、臭化エチジウム染色した4%アガロースゲルの写真を描写する図面である。レーン1と30はマーカーを含む。

【図1】



【図2】

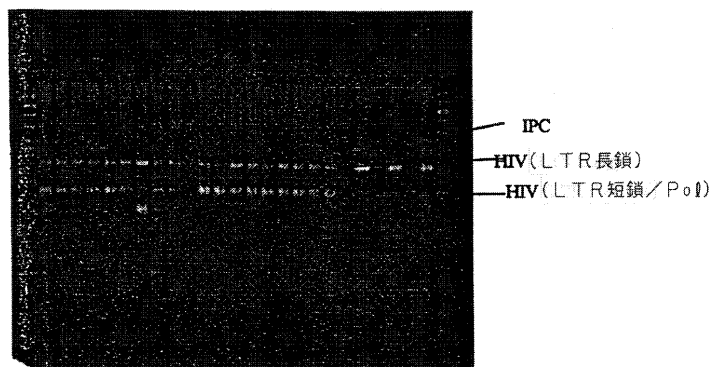


図
2

【図3】

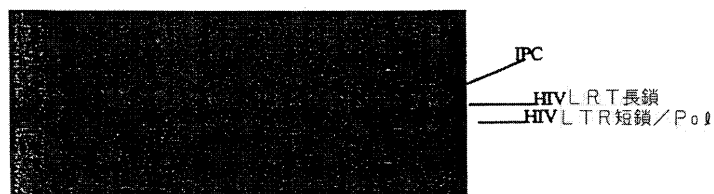


図
3

【図4】



図
4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/569

識別記号

F I
G 0 1 N 33/569

テ-マコ-ド^{*}(参考)
H

(72)発明者 ジョン エー. プスカス
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14613,
ロチェスター, ケイ テラス 19

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

(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

【外国語明細書】

1. Title of Invention

OLIGONUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTION PRIMERS FOR EFFICIENT DETECTION OF HIV-1 AND HIV-2 AND METHODS OF USE THEREOF

2. Claims

(1) A method for reverse transcribing Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample, said method comprising:

(a) contacting RNA derived from said sample with an oligonucleotide under conditions in which said oligonucleotide primes synthesis of DNA complementary to at least a portion of said RNA;

wherein said oligonucleotide is selected from the group consisting of:

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,

(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,

(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>,

(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>,

and

(v) any combination of any of the foregoing.

(2) 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.

(3) A method as defined in claim 1, further comprising (b) recovering said cDNA.

(4) A method for detecting the presence of 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 using an oligonucleotide complementary to a nucleotide sequence contained within said RNA as a reverse transcription primer to produce HIV-specific reverse transcription products,

wherein said reverse transcription primer is selected from the group consisting of:

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,

(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,

(iii) 5'-GCCACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>,

(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>,
and

(v) any combination of any of the foregoing;

(b) amplifying said reverse transcription products to produce amplification products; and

(c) detecting said amplification products;

wherein detection of said amplification products of said amplification indicates the presence of HIV RNA in said sample.

(5) A method as defined in claim 4, wherein said sample is selected from the group consisting of blood, serum, plasma, urine, saliva, and cerebrospinal fluid.

(6) A method as defined in claim 4, wherein said amplifying is performed by a method selected from the group consisting of polymerase chain reaction, ligase chain reaction, and strand displacement amplification.

(7) A method as defined in claim 4, wherein said detecting is performed by a method selected from the group consisting of gel electrophoresis of amplification products, capture of amplification products on solid supports, and chemiluminescent detection of amplification products.

(8) The oligonucleotide 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>.

(9) The oligonucleotide 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>.

(10) The oligonucleotide 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>.

(11) The oligonucleotide 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>.

(12) An HIV-specific reverse transcription primer comprising the oligonucleotide 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>.

(13) An HIV-specific reverse transcription primer comprising the oligonucleotide 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>.

(14) An HIV-specific reverse transcription primer comprising the oligonucleotide 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>.

(15) An HIV-specific reverse transcription primer comprising the oligonucleotide 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>.

(16) A kit for detection of HIV-1, HIV-2, or a combination thereof, in a biological sample, said kit comprising a reverse transcription primer selected from the group consisting of:

- (a) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,
- (b) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,
- (c) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>,
- (d) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>,
- (e) any combination of any of the foregoing.

(17) A method as defined in claim 1, further comprising simultaneously contacting RNA derived from said sample with random hexamer oligonucleotides under conditions in which said random hexamer oligonucleotides prime synthesis of DNA complementary to at least a portion of said RNA.

(18) A method as defined in claim 4, wherein in step (a) random hexamer oligonucleotides are also used as reverse transcription primers.

3. Detailed Description of the Invention

{Technical Field to Which the Invention Pertains}

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

{Prior Art}

Millions of individuals world-wide are infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). Consequently, HIV infection 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.

{Problems to be Solved by the Invention}

Thus, there is a need in the art for highly sensitive detection methods for HIV that can be used in diagnosis and screening.

{Means for Solving the Problems}

The present invention provides a method for reverse transcribing Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample, where the method comprises:

(a) contacting RNA derived from said sample with an oligonucleotide under conditions in which said oligonucleotide primes synthesis of DNA complementary to at least a portion of said RNA;

wherein said oligonucleotide is selected from the group consisting of

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,

(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,

(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>, (iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>, or

(v) any combination of any of the foregoing.

In another aspect, the invention provides a method for detecting the presence of Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in a biological sample, where the method comprises:

(a) performing a reverse transcription reaction using as a template RNA derived from the sample and using, as a primer, an oligonucleotide complementary to a nucleotide sequence contained within the RNA to produce HIV-specific reverse transcription products,

where the primer is selected from the group consisting of:

(i) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,

(ii) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,

(iii) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>,

(iv) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID

NO 4>, or

(v) any combination of any of the

foregoing;

(b) amplifying products of the reverse transcription reaction to produce amplification products; and

(c) detecting the amplification products;

where detection of the amplification products indicates the presence of HIV RNA in the sample.

Amplification may be carried out by any method, preferably polymerase chain reaction (PCR). The use of HIV-specific reverse transcription primers according to the invention provides a sensitive method for detecting HIV-1 and/or HIV-2 in a sample, preferably plasma.

In yet another aspect, the invention provides kits for the detection of HIV-1, HIV-2, or a combination thereof in a biological sample, where the kit comprises a reverse transcription primer selected from the group consisting of:

(a) 5'-CTTGTATTACTACTG-3' <SEQ ID NO 1>,

(b) 5'-CCCTGTGGCGCC-3' <SEQ ID NO 2>,

(c) 5'-GCGACTAGGAGAGA-3' <SEQ ID NO 3>,

(d) 5'-CCCAGACGGTCAGT-3' <SEQ ID NO 4>, or

(e) any combination of any of the foregoing. The kits

may additionally comprise reagents and instructions for reverse transcription, amplification, and product detection.

[Mode for Carrying out the Invention]

The present inventors have discovered that detection of Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA in biological samples is more efficient when oligonucleotides having sequences complementary to certain sequences present in HIV RNA are used as primers for reverse transcription. Preferably, the sequences of the primers correspond to sequences near the 3' end of HIV RNA.

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 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 or polypeptide 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 or polypeptide 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 5>.

As used herein, conditions appropriate for reverse transcription, i.e., conditions in which an oligonucleotide will prime cDNA synthesis, encompass incubation of RNA and primer oligonucleotides with a reverse transcriptase enzyme and nucleotides at a temperature and for a time that results in synthesis of cDNA.

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 the polymerase chain reaction, the ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification.

Human Immunodeficiency Virus (HIV) as used herein refers to species in the genus of Retroviridae, including HIV-1, HIV-2, and SIV, and variant strains thereof. Isolates of HIV that may be detected by the present invention include, but are not limited to, HIV-1 and HIV-2.

The present invention provides methods for reverse transcribing HIV RNA from biological samples, which methods are useful for detection of HIV in biological samples. Detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA 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, tissue samples, and cerebrospinal fluid. Preferably, plasma is used as the source of HIV RNA.

The biological sample is treated in any manner that provides access of the reverse transcription reagents to RNA, specifically HIV 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 Genra 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 RNA extracted from the sample is then contacted with oligonucleotide primers under conditions where the oligonucleotides prime the synthesis of DNA complementary to at least a portion of the extracted RNA. The sequences of the oligonucleotide primers are derived from the sequence of HIV. The primers correspond to regions of HIV RNA that may be downstream, i.e., 3', to regions whose detection is desired. These regions may include, e.g., the long terminal repeat (LTR) region, the region encoding the viral reverse transcriptase (Pol), Gag protein, Tat protein, envelope glycoprotein, Vif, Vpr, and Vpu proteins, and the Rev region, which encodes a transcription factor response element. Preferably, the primers correspond to sequences near the 3' end of the HIV genome. The primer sequences may be used to specifically identify particular isolates of HIV (e.g., isolates of HIV-1 and HIV-2). A primer may identify a particular isolate by hybridizing to RNA derived from that isolate under conditions in which it does not hybridize to RNA from a different isolate, i.e., the primer itself may comprise a sequence that differs between isolates. Alternatively, the primer sequence may be used to prime synthesis of a fragment of HIV RNA that differs between isolates, i.e.,

the sequence that differs between the isolates may be downstream of the primer sequence.

Reverse transcription primers useful in practicing the present invention are selected based on theoretical 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 HIV genome, multiple viral species, and an internal positive control (IPC) RNA (or DNA).

Non-limiting examples of reverse transcription primers according to the invention are shown in Table 1.

TABLE 1			
SOURCE	DESIGNATION	SEQUENCE	SEQ ID NO.
HIV-1	POL3RT	5'-CTTGTATTACTACTG-3'	1
HIV-1	LTR8RT	5'-CCCTGTGGCGCC-3'	2
HIV-2	2LTR1RT	5'-GCGACTAGGAGAGA-3'	3
HIV-2	2Env2RT	5'-CCCAGACGGTCAGT-3'	4

Reverse transcription is performed using one or more of the above primers. Random primers, such as, e.g., random hexamer reverse transcription primers (N6, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) may also be added. 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 cDNA product or products can be isolated and recovered by conventional methods. Preferably, the cDNA product or products are amplified. Any method for amplification may be used, including, without limitation, polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction, strand displacement amplification, transcript mediated amplification, and nucleic acid single base amplification. Preferably, PCR is used. Typically, a reaction mixture containing all of the necessary components for PCR (including HIV-specific amplification primers) is added directly to the reverse transcription reaction mixture. Amplification is then carried out using conditions specified by the primer pairs that are used. Suitable amplification primer pairs are disclosed, e.g. in U.S. Patent application Serial No. _____, attorney docket number 2094/0E285, and in the Examples below.

Following amplification, the amplification products may be detected using any method known in the art, including, without limitation, gel electrophoresis in agarose or acrylamide; capture of the amplification products on a solid support followed by colorimetric detection (see, e.g., Example 1 below); ECi detection; fluorescence, radioisotopic detection, and chemiluminescence. Reagents for such detection methods are commercially available from, e.g. Molecular Probes, Eugene, Oregon and Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY.

The detection of HIV-specific amplification products indicates the presence of HIV RNA in the sample. When gel electrophoresis is used, HIV-specific amplification products are confirmed by their size, as predicted by the

location in HIV RNA of the sequences corresponding to the amplification primers used in the reaction.

The present invention provides kits for detection of HIV RNA in biological samples, which comprise one or more of the reverse transcription primers shown in Table 1 above. The kits may also comprise reagents for reverse transcription, as well as additional reagents for detection of HIV cDNA by, e.g., PCR.

[Examples]

The following examples illustrate the present invention without limitation.

Methods:

1. Sample preparation:

RNA was prepared from plasma samples using guanidinium thiocyanate or PureScript® RNA isolation reagents (Gentra Systems, Minneapolis MN). Modifications to the manufacturer's protocol for body fluids included use of 40 g glycogen, rather than 20 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.

2. 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 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 M random hexamers (Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ) and/or specific reverse transcription primer, and 20 units RNasin (Promega, Madison, Wisconsin) in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. After incubation at 42EC for 30 min, the RT reaction was held at 100EC for 5 min to destroy RT activity. Each reaction was chilled for 1 min followed by microcentrifugation at 16000 x g for 4 seconds.

3. 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 μ g), 1.2 mM of each dNTP, 0.4 μ 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. The amplification primers used are shown in Table 2 below.

TABLE 2

ID	Source	Sequence	SEQ ID NO.
JBLT R4	HIV-1(s)	5'-CTG CTT AAG CCT CAA TAA AGC TTG CCT TGA-3'	6
JBLT	HIV-	5'-GGG TCT GAG GGA TCT CTA GTT ACC AGA	7

R6	1(as)	GT-3'	
JBLT R8	HIV- 1(as)	5'-TGT TCG GGC GCC ACT GCT AGA GA-3'	8
2LTRe	HIV-2 (s)	5'-GGG AGG TTC TCT CCA GCA CTA GCA-3'	9
2LTR- R1	HIV-2 (as)	5'-GCG ACT AGG AGA GAT GGG AAC ACA CA- 3'	10

4. Detection of PCR products:

PCR products were detected either by (i) gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining; or (ii) use of 5'-biotin-labeled primers (sense strand) during amplification. In this case, the amplification products were captured by hybridization to oligonucleotide probes covalently attached to latex particles, which were deposited on the surface of a flow through membrane (SureCell9 tests, Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY). The HIV-1 probes were: 5'-CAACAGACGGGCACACACTACT-3'(JBLTRpr) <SEQ ID NO 11> and 5'-GAACAGATGGGCACACACTGCT-3'(JBLTRpr4) <SEQ ID NO 12>;and the HIV-2 probe was 5'-CCACGCTTGCTTGCTTAAAGACCTC-3'(2LTRpr1) <SEQ ID NO 13> . 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.

Example 1: Efficiency of Reverse Transcription Using HIV-Specific Primers or Random Primers

The following experiment was performed to compare the efficiency of reverse transcription of HIV RNA derived from human plasma samples using HIV-specific primers according to the invention or random hexamer reverse transcription primers (N6, Pharmacia Biotech).

Human plasma was diluted to contain 1000 copies of HIV RNA per 100 μ l, to yield approximately 100 copies of HIV RNA per reaction. RNA was extracted from the plasma using guanidinium thiocyanate. The RNA pellet was dissolved in 26 μ l of diethylpyrocarbonate-treated water.

The reverse transcription reaction contained: 13 μ l RNA, 10 μ l reverse transcription mix (which contained first-strand buffer, 0.1 M DTT, 20 U RNasin (Promega, Madison, WI), 0.4 mM of each dNTP, and 200 Units of Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase). An additional 2 μ l of the following primer mixes (all at 50 μ M) were added according to the condition being tested: (1) 2 μ l N6 random primers; (2) 1 μ l N6 random primers + 1 μ l TR8RT primer; (3) 1 μ l N6 random primers + 1 μ l POL3RT primer; (4) 1 μ l TR8RT + 1 μ l POL3RT.

The reverse transcription reaction was incubated at 42°C for 30 minutes; heated to 100°C for 5 minutes; and then chilled on ice for 1 minute. A 75 μ l PCR master mix was then added to the cDNA-containing reaction mixture and PCR was performed under the following conditions: a 3 minute preheat at 96 °C, followed by 5 cycles of melting at 96 °C followed by annealing and amplification at 62 °C for 5 seconds, followed by 35 cycles of melting at 96 °C and annealing and amplifying at 68 °C for 40 seconds. The amplification products were then resolved in a 4% agarose gel and visualized using ethidium bromide.

Results: As illustrated in Figures 1 and 2, the use of HIV-specific reverse transcription primers, either alone or in conjunction with random hexamer

primers, results in the detection of significantly more HIV-1-specific amplification products. Compare Figure 1, lanes 2-10 (random primer alone) with Figure 1, lanes 12-20 (LTR8RT + random primer); Figure 2, lanes 2-10 (POL3RT + random primer); and Figure 2, lanes 12-20 (LTR8RT + POL3RT). This result was also observed in when 100 M or 200 M random primers were used.

Example 2: Detection of HIV RNA in Patient Samples

The following study was performed to compare the detection of HIV RNA in patient samples using either random hexamer reverse transcription primers or random primers in conjunction with HIV-specific reverse transcription primers.

HIV-positive plasma samples were collected from patients having CD4 T-cell counts greater than 500, indicating that they were asymptomatic and had a relatively low viral load.

RNA was extracted from the plasma samples as described in Example 1 above. 13 l of the RNA solution were diluted in 15 l water. Each sample was split into two 12-l aliquots for reverse transcription. Two reverse transcription reaction mixes were prepared with as described in Example 1 above. Each mix contained either 2 l of 100 M random primer + 1 l water or 2 l of 100 M random primer + 1 l of a 50 M HIV-specific primer mix containing equal amounts of the following primers: (1) POL3RT; (2) LTR8RT; (3) 2LTRRT; and (4) 2EnvRT. The reverse transcription and amplification reactions were performed as described in Example 1 above.

HIV-specific amplification products were detected by gel electrophoresis on 4% agarose gels stained with Ethidium Bromide and also by the SureCell[®] colorimetric method described above.

Results: Figures 3 and 4 illustrate the amplification products detected by gel electrophoresis. Detection of HIV-specific amplification products by the

colorimetric method is indicated in relative values in Table 3. IPC indicated
 A internal positive control \cong primers.

TABLE 3						
Sample	RANDOM PRIMERS ONLY			N6 + RT PRIMERS		
	LTR	POL	IPC	LTR	POL	IPC
	3/4	3/4	1P	3/4	3/4	1P
1	0	0	8	0	0	8
2	8	7	8	8	7	7.5
3	5	6	8	7	7	7.5
4	5	5	8	5	5	8
5	7	5	8	7.5	7.5	8
6	na	na	na	na	na	na
7	6	7	8	5	7.5	8
8	8	8	8	8	8	8
9	2	2	8	3	0	8
10	5	7	8	7	8	8
11	6	7	8	6	6	8
12	8	8.5	8	7.5	9	7.5
13	8	7.5	8	8	7.5	8
14	0	0	8	0	0	9
15	0	0	8	0	0	8
16	2	0	8	7	8	9
17	7.5	7.5	8	7.5	7.5	8
18	6	7	8	6	7	8

19	7.5	7.5	7.5	7.5	8	8
20	2	1	8	5	5	8
21	6.5	6.5	8	7	7.5	7
22	1	1	8	3	5	8
23	3	1	8	2	2	8
24	7	9	8	7	9	7
25	na	na	na	na	na	na
26	9	9	7	9	9	6.5
27	3	4	7	5	7	8.5
28	2	2	8	2	2	8.5
Neg	0	0	7	0	0	7
Pos	5	5	7	5	5	7

In samples 3 and 10, the addition of HIV-specific RT primers to the random hexamer primers resulted in a greater degree of amplification than using random primers alone. The amount of product detected by the colorimetric method was also greater in these samples when HIV-specific RT primers were used.

Samples 16, 20, and 22 were not detected using only random primers in the reverse transcription reaction, either by gel electrophoresis or by colorimetry. These samples, however, were positive when HIV-specific RT primers were used in addition to random primers.

These results indicate that the methods and compositions of the present invention can reduce the incidence of false negative results in screening of patients or blood supply for HIV.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a photographic illustration of a 4% agarose gel stained with ethidium bromide showing HIV-1-specific amplification products obtained using as a reverse transcription primer (a) random hexamer primers (lanes 2-10); or

(b) a mixture of random hexamer primers and LTR8RT (lanes 12-20). Lane 1 contains markers, and lanes 22, 24, and 26 are control samples.

Figure 2 is a photographic illustration of a 4% agarose gel stained with ethidium bromide showing HIV-1-specific amplification products obtained using as a reverse transcription primer (a) a mixture of random hexamer primers and POL3RT (lanes 2-10) or (b) a mixture of LTR8RT and POL3RT (lanes 12-20). Lane 1 contains markers, and lanes 22, 24, and 26 are control samples.

Figure 3 is a photographic illustration of a 4% agarose gel stained with ethidium bromide showing HIV-1-specific amplification products obtained using (a) random hexamer primers (lanes 2-13) or (b) random hexamer and a mixture of POL3RT, LTR8RT, 2LTRRT and 2EnvRT (lanes 15-26). Lane 1 contains markers.

Figure 4 is a photographic illustration of a 4% agarose gel stained with ethidium bromide showing HIV-1-specific amplification products obtained using (a) random hexamer primers (lanes 2-15) or (b) random hexamer and a mixture of POL3RT, LTR8RT, 2LTRRT and 2EnvRT (lanes 16-29). Lanes 1 and 30 contain markers.

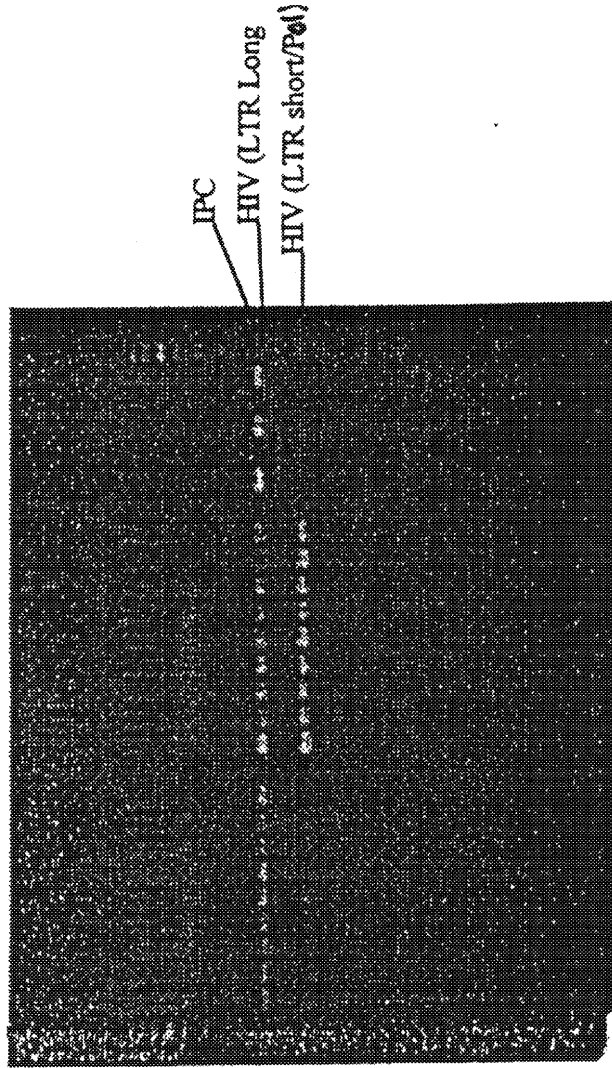


Fig. 1

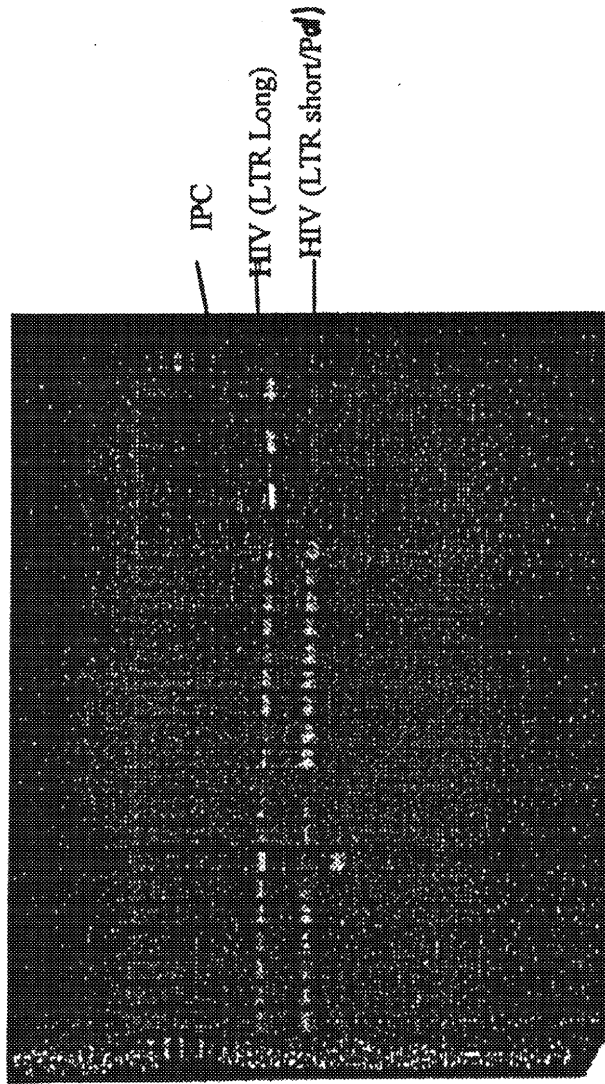


Fig. 2

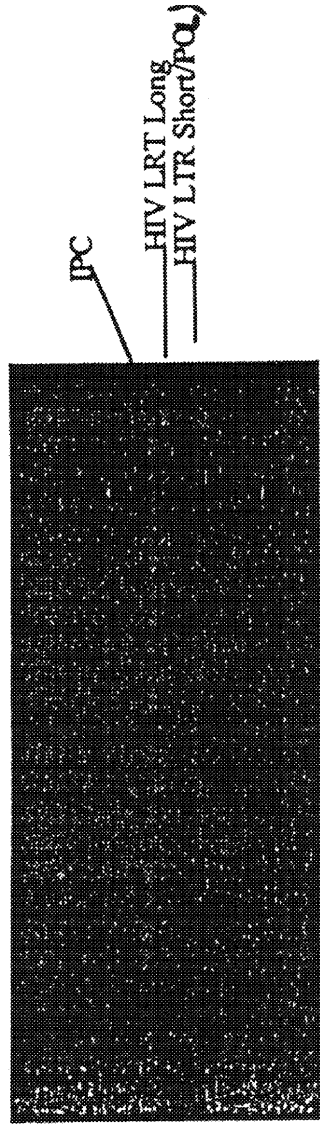


FIG. 3

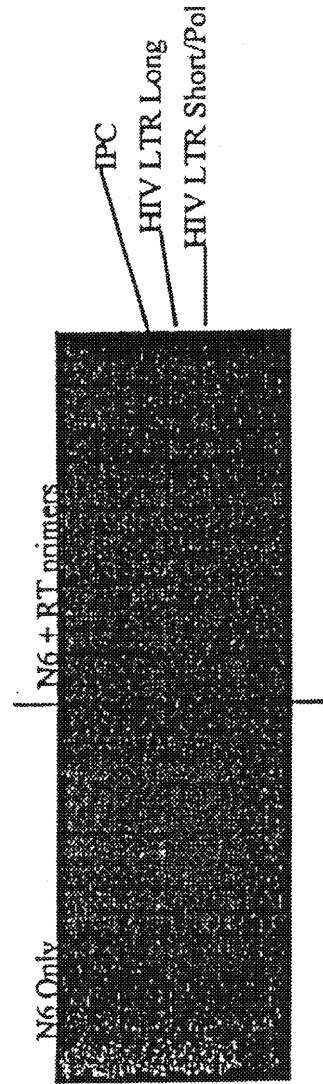


Fig. 4

1. Abstract

Disclosed herein are methods and kits for the detection of human immunodeficiency virus in biological samples from human subjects. Oligonucleotide reverse transcription primers for use in such methods and kits for detection of human immunodeficiency virus are also described.

2. Representative Drawing

None

专利名称(译)	用于有效检测HIV-1和HIV-2的寡核苷酸逆转录引物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2000342274A	公开(公告)日	2000-12-12
申请号	JP2000025419	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	デビッドアールパターソン ジョンエープスカス ケミンソン ジェフリーエムリネン		
发明人	デビッドアール.パターソン ジョン エー.プスカス ケミン ソン ジェフリー エム.リネン		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/569 G01N37/00 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.H C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/EA02 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/FA05 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR39 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS36		
优先权	60/118417 1999-02-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	5' -CTTGTATTACTACTG-3'	I
(经修改) 要解决的问题: 提供一种改进生物样品中核酸序列检测的方法, 特别是衍生自感染性微生物的序列。一种检测来自人受试者的生物样品中的人免疫缺陷病毒的方法及其试剂盒。此外, 用于检测这种人免疫缺陷病毒的方法中使用的寡核苷酸逆转录引物及其试剂盒。	5' -CCCTGTGGCGCC-3'	II
	5' -GGGACTAGGAGAGA-3'	III
	5' -CCCAGACGGTCAGT-3'	IV