

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509648

(P2004-509648A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/569	L
//(C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-532686 (P2002-532686)	(71) 出願人	503128744
(86) (22) 出願日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		ホンコン ディーエヌエー チップス リ
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月7日 (2003.4.7)		ミティド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2001/001458		香港, カオルーン, ウィン イブ ストリ
(87) 国際公開番号	W02002/029118		ート 2, ル プラザ, エイティーンス
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		フロア, 1805-6
(31) 優先権主張番号	00106310.0	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成12年10月5日 (2000.10.5)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 非病原性又は病原性インフルエンザAサブタイプH5ウイルス検出キット

(57) 【要約】

インフルエンザAサブタイプH5ウイルスの検出のための現行法、例えば細胞培養、赤血球凝集抑制、蛍光抗体、及び酵素免疫測定法、並びに逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は、低い感度と低い特異性の欠点を持っている。さらに、そのような方法は、比較的難しく、日常的な所定の検出のために好適ではない。H5ウイルスを検出するための本発明のキットは、比較的により感度が高く、かつH5ウイルスに特異的である、使いやすい選択肢を提供する。この検出キットは、H5ウイルスの複製のための2種類の特別に設計されたプライマーAとB、並びに増幅されたウイルスRNAを固定化するための特異的な捕獲プローブを利用する。病原性H5ウイルスの検出のために、さらにプライマーCが設計されもする。前記検出キットによるH5ウイルスの検出は、所望であれば1日以内に完了する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体サンプル中の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットであって、以下の：

- 上記生体サンプルから H 5 ウイルスの R N A 分子を単離するための単離作用物質；
- ターゲット分子を複製するための核酸複製作用物質であって、以下の：
- ・ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列；及び
- ・ 検出分子に結合するための核酸配列；

を含むもの；並びに

- 上記ターゲット分子を検出するための核酸検出作用物質であって上記検出分子を含むもの、
- を含む上記検出キット。

【請求項 2】

前記検出キットが、前記生体サンプル中の核酸を安定化させるための溶解作用物質をさらに含む、請求項 1 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 3】

前記ターゲット分子が R N A 分子である、請求項 1 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 4】

前記核酸複製作用物質が以下の：

- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するための第 1 の D N A 配列；及び
 - R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、
- を含む最初の精製・単離された D N A 分子を含み、
上記最初の精製・単離された D N A 分子が、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するとき、上記最初の精製・単離された D N A 分子を、酵素及び D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：

- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列；及び
 - R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする D N A 配列、
- を含む D N A 配列を作製する、請求項 1 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 5】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 1、2、又は 3 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、請求項 4 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 6】

前記 R N A ポリメラーゼが、バクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼであり、かつ、前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 4 に示す D N A 配列をコードする、請求項 4 又は 5 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 7】

前記核酸複製作用物質が、以下の

- 非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列；及び
 - 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、
- を含む 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含み、
上記 2 番目の精製・単離された D N A 分子が、非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列を含む D N A 分子に結合するとき、上記 2 番目の精製・単離された D N A 分子を、酵素と D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：

10

20

30

40

50

- 非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする D N A 配列；及び

- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする D N A 配列、
を含む D N A 配列を作製する、請求項 4 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サ
ブタイプ H 5 ウイルス検出キット。

【請求項 8】

- 前記 H 5 ウイルスが非病原性であり、かつ
- 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 5、6、又は 7 に示す D N A 配列のいずれか 1 つ
をコードする、

請求項 7 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キッ
ト。 10

【請求項 9】

- 前記 H 5 ウイルスが病原性であり、かつ
- 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 9、10、又は 11 に示す D N A 配列のいずれか
1 つをコードする、

請求項 7 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キッ
ト。

【請求項 10】

前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 8 に示す D N A 配列をコードする、請求項 7 ～ 9 のい
ずれか 1 項に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キ
ット。 20

【請求項 11】

前記核酸複製作用物質が、配列番号 5、6、7、9、10、又は 11 に示す D N A 配列の
いずれか 1 つをコードする第 1 の D N A 配列から成る、2 番目の精製・単離された D N A
分子を含む、請求項 4 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイ
ルス検出キット。

【請求項 12】

前記核酸検出作用物質が、以下の：

・ ターゲット分子に結合するための、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコ
ードする第 1 の D N A 配列；及び 30

・ 固定化物質、
を含む精製・単離された D N A 分子をさらに含み、
上記精製・単離された D N A 分子に結合するとき、上記ターゲット分子が固定化される、
請求項 1 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キッ
ト。

【請求項 13】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 12、13、又は 14 に示す D N A 配列のいずれか 1
つをコードする、請求項 12 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H
5 ウイルス検出キット。

【請求項 14】 40

前記検出分子が、以下の

・ ターゲット分子に結合するための、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコ
ードする第 1 の D N A 配列；及び

・ シグナル生成物質、
を含み、
上記検出分子と前記精製・単離された D N A 分子が、上記ターゲット分子の異なる部分に
結合する、請求項 12 に記載の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイ
ルス検出キット。

【請求項 15】

以下の：

- インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するための第 1 の D N A 配列；及び
- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、を含む精製・単離された D N A 分子、又は相補的な D N A 分子であって、上記最初の精製・単離された D N A 分子が、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するとき、上記精製・単離された D N A 分子を、酵素及び D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：
- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列；及び
- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする D N A 配列、を含む D N A 配列を作製する、上記精製・単離された D N A 分子又は相補的な D N A 分子

10

【請求項 16】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 1、2、又は 3 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、請求項 15 に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的な D N A 分子。

【請求項 17】

前記 R N A ポリメラーゼが、バクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼであり、かつ、前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 4 に示す D N A 配列をコードする、請求項 15 に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的な D N A 分子。

【請求項 18】

以下の：

20

- 非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列；及び
- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子であって、上記精製・単離された D N A 分子が、非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列を含む D N A 分子に結合するとき、上記精製・単離された D N A 分子を、酵素と D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：
- 非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする D N A 配列；及び
- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする D N A 配列、を含む D N A 配列を作製する、上記精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

30

【請求項 19】

- 前記 H 5 ウイルスが非病原性であり、かつ
 - 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 5、6、又は 7 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、
- 請求項 18 に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

【請求項 20】

- 前記 H 5 ウイルスが病原性であり、かつ
 - 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 9、10、又は 11 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、
- 請求項 18 に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

40

【請求項 21】

前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 8 に示す D N A 配列をコードする、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

【請求項 22】

配列番号 5、6、7、9、10、又は 11 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする第 1 の D N A 配列から成る精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

【請求項 23】

以下の：

- ターゲット分子に結合するための、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N

50

A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列、ここで、上記ターゲット分子が、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含む；及び

- 固定化物質、

を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子であって、

上記精製・単離された D N A 分子に結合するとき、上記ターゲット分子が固定化される、上記精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子。

【請求項 2 4】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 1 2、1 3、又は 1 4 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、請求項 2 3 に記載の精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子 10

【請求項 2 5】

以下の：

- ターゲット分子に結合するための、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列、ここで、上記ターゲット分子は、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含む；及び

- シグナル生成物質

を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子であって、

上記ターゲット分子が、上記精製・単離された D N A 分子に結合するとき、シグナルがターゲット分子から生み出される、上記精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子 20

【請求項 2 6】

- H 5 ウイルスの R N A 分子を、単離作用物質により生体サンプルから単離し；

- 以下の：

・ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列；及び

・ 検出分子に結合するための核酸配列、

を含むターゲット分子を、最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含む核酸複製作用物質により複製し；そして

- 上記ターゲット分子を、検出分子を含む核酸検出作用物質により検出する、 30
生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 2 7】

前記核酸を安定化させるための溶解作用物質を、H 5 ウイルスの R N A 分子を単離する前に生体サンプルに適用する、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 2 8】

前記ターゲット分子が、R N A 分子である、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D 40
N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 2 9】

前記最初の精製・単離された D N A 分子が、以下の：

- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するための第 1 の D N A 配列；及び

- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、
を含み、

上記最初の精製・単離された D N A 分子が、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するとき、上記最初の精製・単離された D N A 分子を、酵素及び D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：

- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列；及び
- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする D N A 配列、
を含む D N A 配列を作製する、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サ
ブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び
2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 3 0】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 1、2、又は 3 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコ
ードする、請求項 2 9 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイル
ス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離
された D N A 分子の使用。

10

【請求項 3 1】

前記 R N A ポリメラーゼが、バクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼであり、かつ
、前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 4 に示す D N A 配列をコードする、請求項 2 9 又は
3 0 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製
造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子
の使用。

【請求項 3 2】

前記核酸複製作用物質が、以下の

- 非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の
D N A 配列；及び

20

- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、
を含む 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含み、

上記 2 番目の精製・単離された D N A 分子が、非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A
配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列を含む D N A 分子に結合するとき、上記 2 番
目の精製・単離された D N A 分子を、酵素と D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、
以下の：

- 非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする D N A
配列；及び

- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする D N A 配列、

を含む D N A 配列を作製する、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サ
ブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び
2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

30

【請求項 3 3】

- 前記 H 5 ウイルスが非病原性であり、かつ

- 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 5、6、又は 7 に示す D N A 配列のいずれか 1 つ
をコードする、

請求項 3 2 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キッ
トの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N
A 分子の使用。

【請求項 3 4】

40

- 前記 H 5 ウイルスが病原性であり、かつ

- 前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 9、1 0、又は 1 1 に示す D N A 配列のいずれか
1 つをコードする、

請求項 3 2 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キッ
トの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N
A 分子の使用。

【請求項 3 5】

前記第 2 の D N A 配列が、配列番号 8 に示す D N A 配列をコードする、請求項 3 2 ~ 3 4
のいずれか 1 項に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出
キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された

50

D N A 分子の使用。

【請求項 3 6】

前記核酸複製作用物質が、配列番号 5、6、7、9、10、又は 11 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする第 1 の D N A 配列から成る 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含む、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 3 7】

前記核酸検出作用物質が、以下の：

- ・ ターゲット分子に結合するための、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列；及び
- ・ 固定化物質、

を含む精製・単離された D N A 分子をさらに含み、

上記精製・単離された D N A 分子に結合するとき、上記ターゲット分子が固定化される、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 3 8】

前記第 1 の D N A 配列が、配列番号 1 2、1 3、又は 1 4 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする、請求項 3 7 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 3 9】

前記検出分子が、以下の

- ・ ターゲット分子に結合するための、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列；及び
- ・ シグナル生成物質、

を含み、

上記検出分子と上記精製・単離された D N A 分子が、上記ターゲット分子の異なる部分に結合する、請求項 2 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【請求項 4 0】

前記ターゲット分子が、請求項 3 4 に記載の 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含む核酸複製作用物質により複製される前に、請求項 3 3 に記載の 2 番目の精製・単離された D N A 分子を含む核酸複製作用物質により複製される、請求項 3 6 に記載の生体サンプル中のインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットの製造における最初の精製・単離された D N A 分子及び 2 番目の精製・単離された D N A 分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明の分野

本願発明は、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスを検出するための装置に関する。

【0 0 0 2】

本発明の背景

鳥類のインフルエンザ（インフルエンザ A）ウイルスは、ヒト、豚、馬、海洋哺乳動物、及び鳥を含む種々の動物に感染する。最近のインフルエンザ A ウイルスの系統発生の研究が、ウイルス遺伝子の種特異系統を明らかにし、そして種間の伝染の罹患率が動物種に依存することを証明した。彼らは、水鳥が他の種の全てのインフルエンザ・ウイルスの起源であることを明らかにした。

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

ヒトの「新しい」インフルエンザ A ウイルスの出現は、可能である。血清学とウイルス学の証拠は、1889 以来、ある期間ヒトの母集団には存在しなかった H A サブタイプを伴うインフルエンザ・ウイルスの出現の 6 つの例が存在することを示唆する。H A についての 3 種類のヒト・サブタイプが、周期的に現われた - 1889 年にサブタイプ H 2、1900 年に H 3、1918 年に H 1、1957 年に再び H 2、1968 年に再び H 3、そして 1977 年に再び H 1。鳥類のインフルエンザ A サブタイプ H 5 N 1 のヒトへの最初の感染が、1997 年に報告され、3 歳の少年の死をもたらした。この最初の報告は、ウイルスの広がりをもめるための、動物、特にニワトリの H 5 ウイルスに関する日常的なスクリーニングの必要性をもたらす。

【0004】

細胞培養、赤血球凝集抑制、蛍光抗体、及び酵素免疫測定法、及び逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を含む多くの方法が、現在、ウイルスの同定に使用されている。しかし、これらの方法の全てが同じ問題を共有している - それらは、比較的に低い感度と低い特異性を有している。さらに、日常的な検出目的のためには検出時間が長すぎ、しかも前述の方法は、利用されるには比較的に難しい。

【0005】

インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの検出に適用されている現在の方法は、免疫診断アッセイとウイルス培養を含む。免疫診断アッセイの例は、赤血球凝集素抑制アッセイと免疫アッセイを含む。しかし、免疫診断アッセイは、低い感度の問題点を持つ。さらに、免疫診断アッセイのターゲットは、通常特定のタンパク質なので、ターゲットを構成する遺伝子の性質は直接的には得ることができない。さらに、抗体の最初の誘導は、免疫宿主動物におけるタンパク質解析の抗原性に結果的に依存しているので、交差感受性が生じるかもしれない。

【0006】

ウイルス培養は、正確で、低コストの検出方法であるが、比較的に労働集約的であり、インキュベーションのためのたくさんのスペースを必要とする。この培養工程は遅く、毎日の検査の需要を満たすことができない。さらに、ウイルス培養は、直接的に検出結果を提供することができず、非常に高価な他の検出方法によるさらなる確認によって返答しなくてはならない。

【0007】

本発明の目的

従って、感度及び特異性が改善されうるような H 5 ウイルスを検出するための使いやすい診断キットを設計することが本願発明の目的である。

検出時間及び検出のための費用を軽減しうるようなインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの検出のためのキットを設計することが本願発明の他の目的である。

H 5 ウイルスの病原性を直接的に検出しうるようなインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの検出のためのキットを設計することが本願発明のさらに他の目的である。

少なくとも、一般大衆に有用な選択肢を提供することが本発明の目的である。

【0008】

本発明の概要

従って、本願発明は、生体サンプル中の非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス検出キットを提供し、上記キットは以下の：

- 上記生体サンプルから H 5 ウイルスの R N A 分子を単離するための単離作用物質 (i s o l a t i n g a g e n t) ；
- ターゲット分子を複製するための核酸複製作用物質であって、以下の：
 - ・ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列；及び
 - ・ 検出分子に結合するための核酸配列

を含むもの；並びに

- 上記ターゲット分子を検出するための核酸検出作用物質であって上記検出分子を含むもの、

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 0 0 9 】

以下の：

- インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するための第 1 の D N A 配列；及び

- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、を含む精製・単離された D N A 分子、又は相補的な D N A 分子を提供することが本願発明の他の側面であり、

上記最初の精製・単離された D N A 分子が、H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に結合するとき、上記精製・単離された D N A 分子を、酵素及び D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：

- H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列；及び

- R N A ポリメラーゼのプロモーター D N A 配列をコードする D N A 配列、を含む D N A 配列を作製する。

【 0 0 1 0 】

以下の：

- 非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列；及び

- 検出分子に結合するための D N A 配列をコードする第 2 の D N A 配列、を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子を提供することが本願発明のさらに他の側面であり、

上記精製・単離された D N A 分子が、非病原性又は病原性 H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な D N A 配列を含む D N A 分子に結合するとき、上記精製・単離された D N A 分子を、酵素と D N A ヌクレオチドの存在下で伸長させて、以下の：

- 非病原性又は病原性インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする D N A 配列；及び

- 検出分子の結合のための D N A 配列をコードする D N A 配列、を含む D N A 配列を作製する。

【 0 0 1 1 】

本願発明は、配列番号 5、6、7、9、10、又は 11 に示す D N A 配列のいずれか 1 つをコードする第 1 の D N A 配列から成る精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子をも提供する。

以下の：

- ターゲット分子に結合するための、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列、ここで、上記ターゲット分子が、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含む；及び

- 固定化物質 (i m m o b i l i z e r)、を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子を提供することが本願発明のさらに他の側面であり、

上記精製・単離された D N A 分子に結合するとき、上記ターゲット分子が固定化される。

【 0 0 1 2 】

以下の：

- ターゲット分子に結合するための、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の D N A 配列、ここで、上記ターゲット分子は、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの R N A 配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含む；及び

- シグナル生成物質

を含む精製・単離された D N A 分子又は相補的 D N A 分子を提供することが本願発明の他の目的であり、

10

20

30

40

50

上記ターゲット分子が、上記精製・単離されたDNA分子に結合するとき、シグナルがターゲット分子から生み出される。

【0013】

本願発明は、生体サンプル中のインフルエンザAサブタイプH5ウイルスの検出のためのキットの製造における最初の精製・単離されたDNA分子及び2番目の精製・単離されたDNA分子の使用をも提供し、ここで：

- H5ウイルスのRNA分子を、単離作用物質により上記生体サンプルから単離し；
- ターゲット分子を、上記最初の精製・単離されたDNA分子及び2番目の精製・単離されたDNA分子を含む核酸複製作用物質により複製し、ここで、上記ターゲット分子は、以下の：

10

- ・ H5ウイルスのRNA配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列；及び
- ・ 検出分子に結合するための核酸配列、

を含む；

- 上記ターゲット分子を、核酸検出作用物質により検出する、ここで、上記核酸検出作用物質は、検出分子を含む。

【0014】

好ましい態様の詳細な説明

本願発明の好ましい態様を、図面を参照してここで説明する。一覧表1は、図面中の参照数字を容易に参照しうる部品リストである。

生体サンプル、例えばニワトリ血液中のインフルエンザAサブタイプH5の濃度は、H5ウイルスRNAの存在の検出が、生体サンプルで直接実施しえないくらい非常に低いかもしれない。検出目的のために十分な量までウイルスRNA分子の数を増やすために、好適な増幅技術を必要とする。核酸配列ベースの増幅(NASBA)は、RNAの増幅のために特別な用途を有する柔軟な技術であることが知られている。次に、増幅されたRNA分子を好適な技術により検出する。NASBAは、インフルエンザ・ウイルス・サブタイプH5の検出のための迅速で、高感度で、高度に特異的な方法である。結果を、1日位の短期間で得ることができる。さらに、それは直接的に病原性と非病原性H5菌株を区別することができる。

20

【0015】

インフルエンザ・ウイルスは、ウイルス性のリボ核酸(RNA)の1本鎖の形態でその遺伝物質を含んでいる。インフルエンザAサブタイプH5ウイルスのRNAは、その増殖に必要な遺伝子を含んでいて、必須遺伝子の1つは赤血球凝集素と呼ばれる。この遺伝子は、約1756ヌクレオチドの長さで、そしてこのヌクレオチドは分子の5末端から番号を付されている。

30

【0016】

図1は、検出キットによるH5ウイルスの検出に関する全体的な手順を示す。図1で示されるように、RNA分子の1本鎖の形態のターゲットH5ウイルス核酸分子は、まず生体サンプルから抽出される。適合する生体サンプルの種類は、血、血清/血漿、末梢血単核細胞/末梢血リンパ球(PBMC/PBL)、痰、尿、糞便、咽喉スワブ、真皮病変スワブ、脳脊髄液、子宮頸管スミア、膿サンプル、食物基質、並びに脳、脾臓、及び肝臓を含む身体の様々な部分からの組織を含む。列挙されていない他のサンプルが、適用されもする。本願発明の検出キットの核酸抽出過程は、単離作用物質により達成される。

40

【0017】

ターゲットH5ウイルスRNA分子を生体サンプルから抽出した後、サンプル中のRNA分子の量は検出に十分でないかもしれない。従って、H5ウイルス性のRNA分子の一部を、適切な増幅技術、例えばNASBAによりターゲット核酸分子に複製する。次に、このターゲット核酸分子を好適な方法により検出する。

本発明の検出キットの全体的な手順を説明した後、各々の手順の詳細を本明細書中で議論する。

【0018】

50

H5 ウイルス RNA 分子は、好適な単離作用物質を生体サンプルに適用することにより生体サンプルから単離されうる。好ましくは、溶解作用物質が、単離作用物質の前に用いられうる。溶解作用物質、例えば溶解バッファーは、それらの物質がサンプルからより容易に取り除かれうるような、タンパク質及び脂質の溶解、及び生体サンプル中のタンパク質の変性を担う。さらに、溶解作用物質は、長期保存目的のために RNA 分子を安定化するためのバッファーとして働くかもしれない。図 2 に示されるように、RNA 分子は、溶解バッファー中、室温で 48 時間まで安定しており、そして -70 で無期限に保存される。そのようにする利点は、そのような方法の実行にふさわしくないサンプル採取場での解析を実施する必要をなくすことである。

【0019】

好適な溶解バッファーの例は、5 M のグアニジンチオシアネート及び Tris / HCl を含む。溶解バッファーは、この検出キットの発明を形成せず、そしてその目的に好適な組成物は本技術分野に周知である。従って、溶解バッファーの詳細な組成を、ここで議論しない。依然としてタンパク質及び脂質の溶解、タンパク質の変性、並びに RNA 分子の安定化の目的を達成することができる異なる組成物を持つ溶解作用物質を、本願発明の検出キットで利用しうる。

【0020】

溶解作用物質を生体サンプルに適用した後、次のステップは、単離作用物質の使用によるサンプルからの核酸分子の単離である。図 3 は、前記検出キットにおける全体的な単離手順を表す。溶解作用物質を生体サンプルに適用した後に、核酸 (10) は、他の不必要な成分と一緒に溶液の形態で存在する。次に、核酸 (10) を吸着するために吸着剤、例えばシリカ (12) をこの溶液中に添加し、核酸 / シリカ混合物 (14) を得る。その後、溶液中のタンパク質及び脂質、並びに他の不必要な物質を、好適な溶離剤、例えば 5 M のグアニジンチオシアネート及び Tris / HCl 溶液、Tris / HCl 溶液、70 % のエタノール、又はアセトン、あるいはそれらの組み合わせ物により洗浄されうる。混合物 (14) を、十分な量の溶離剤で洗浄した後、次にシリカ (12) 中の核酸 (10) を、遠心分離により単離する。

【0021】

サンプル中に含まれる核酸 (12) を単離した後、H5 ウイルス RNA 分子が検出目的、例えば NASBA 技術のために複製されるように、次に増幅作用物質を核酸の混合物に適用する。3 種類の精製・単離された DNA 分子が、増幅目的のために設計され、これらはプライマー A ~ C と呼ばれる。

図 4 は、本願発明における NASBA による H5 ウイルス RNA の増幅に関する模式図を示す。図面に示されるように、増幅プロセスは、プライマー A (22) の、1 本鎖 RNA 分子であるターゲット H5 ウイルス RNA (20) へのアニーリングにより開始される。プライマー A (22) は、ターゲット RNA 分子に結合できるように、そしてさらに RNA ポリメラーゼ、好ましくはバクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼのためのプロモーターをコードする DNA 配列を含むように設計されている。結合の正確な位置は、検査されたウイルスの種類に依存する。結合部位は、ある期間の後に変化するかもしれない。プライマー A の重要な技術的特徴は、なおも、それが H5 ウイルスの一部に結合することができる状態にあることである。

【0022】

従って、プライマー (22) は、H5 ウイルス RNA (20) の少なくとも一部に相補的な DNA 配列をコードする結合配列を含んでいる。本願発明の目的のために、H5 ウイルス RNA (20) への結合に好適な部位が、結合機能のための最小限の数のヌクレオチドを含むことが発見されている H5 ウイルスの赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド 1107 ~ 1132 の部位であることが分かっている。従って、プライマー A の結合配列は、図 6 の配列番号 1 に記載される、H5 ウイルスの赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド 1107 ~ 1132 の部位に相補的な DNA 配列を好ましくは含んでいる。配列番号 1 が、5' - 3' 方向に形式的に書かれることに留意すべきである。結果として、ウイルス遺伝子に対

10

20

30

40

50

する結合の方向は、「後方」から「前方」の形態である。

【0023】

選択肢として、H5ウイルスの赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド1060～1140（配列番号2、図7）、又はヌクレオチド1040～1160（配列番号3、図8）が、プライマーA（22）の結合目的のために使用されうる。

明細書中でより詳細に記載される増幅目的のために、プライマー（22）は、RNAポリメラーゼ、例えばバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼのプロモーターをコードするDNA配列をさらに含んでいる。好適なプロモーターDNA配列は、配列番号4（図9）に記載されている。プライマーAがH5ウイルスRNAに結合した時に、結合配列が3'末端で伸長するように、プロモーター配列は、好ましくは結合配列の5'末端に付着される。他のRNAポリメラーゼが利用される場合、前記プロモーター配列は、当然変更されなくてはならない。

10

【0024】

H5ウイルスRNAにプライマーAが結合した後、このプライマーAを、プライマーAの3'末端で、好適なヌクレオチドの存在下、好適な逆転写酵素、例えば鳥類の筋芽細胞症ウイルス-逆転写酵素（AMV-RT）の作用により伸長される。従って、以下の配列を含めた伸長されたプライマーA（24）が得られる：

（a） H5ウイルスRNAの一部に相補的なDNA配列；及び

（b） RNAポリメラーゼのためのプロモーターをコードするDNA配列。

【0025】

得られたDNA：RNAハイブリッドのH5 RNA部分（26）は、RNase Hの作用により除去される。これが、プライマーB（28）に、プライマーA（22）のアニール部位の上流の位置での伸長したプライマーA（24）へのアニールを可能にする。従って、プライマーB（28）に関して伸長したプライマーA（24）に結合するために、プライマーB（28）は、H5ウイルス赤血球凝集素遺伝子配列の一部をコードする第1の結合DNA配列を含んでいる。好ましくは、プライマーB（28）のこの第1のDNA配列は、H5ウイルスの赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド914～940をコードする（配列番号5、図10）。選択肢として、H5ウイルス赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド866～961（配列番号6、図11）、又はヌクレオチド846～981（配列番号7、図12）を利用しうる。

20

30

【0026】

検出目的を果たすために、プライマーB（28）は、検出分子の核酸配列に相補的な第2のDNA配列をさらに含んでいる。増幅されたRNA分子に結合するように、H5ウイルスのRNA配列の一部をコードするDNA配列を含むようにこの検出分子がある程度設計されれば、プライマーBが第2のDNA配列を含む必要がないかもしれない。このケースにおいて、プライマーBは、単なる第1のDNA配列から成る。

【0027】

選択肢として、配列番号8（図13）の示されるDNA配列をコードする第2のDNA配列が、プライマーBに含まれる。好ましくは、第2のDNA配列は、プライマーBの結合配列の5'末端に付着する。他の検出核酸配列が使用される場合、配列番号8が、変更の対象となる。

40

伸長したプライマーA（24）へのプライマーB（28）のアニール後、プライマーB（28）を、プライマーA（24）の末端で、AMV-RTの作用によりT7 RNAポリメラーゼ・プロモーターを通じて下流に伸長する。結果として、一方の末端に完全なT7 RNAポリメラーゼ・プロモーターを、そしてもう一方の末端にH5ウイルスRNA配列の一部をコードする、元のH5ウイルスRNAターゲット配列の2本鎖DNAコピー（30）を生じる。次に、このプロモーターをT7 RNAポリメラーゼにより認識させ、元のH5ウイルスRNA配列の一部に相補的なRNA配列を含む、大量のターゲットRNA分子（32）の製造をもたらす。

【0028】

50

プライマー B は、インフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの非病原性菌株を決定するために使用される。病原性 H 5 ウイルスの検出のために、プライマー B の代わりにプライマー C が使用される。同様に、プライマー C は、以下の DNA 配列：

- 病原性 H 5 ウイルスの RNA 配列の少なくとも一部をコードする第 1 の DNA 配列；及び

- 検出 DNA 配列に相補的な DNA 配列をコードする第 2 の DNA 配列、を含む精製・単離された DNA 分子である。プライマー B の場合のように、この第 2 の DNA 配列は、単に任意の成分であるかもしれない。

【 0 0 2 9 】

ターゲットが病原性 H 5 ウイルスである以外、プライマー C の機能及び働きはプライマー B と同じものである。 10

好ましくは、プライマー C の第 1 の DNA 配列は、H 5 ウイルスの赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド 1 0 1 7 ~ 1 0 4 2 をコードする（配列番号 9、図 1 4）。選択肢として、H 5 ウイルス赤血球凝集素遺伝子のヌクレオチド 9 7 0 ~ 1 0 6 3（配列番号 1 0、図 1 5）、又はヌクレオチド 9 5 0 ~ 1 0 8 3（配列番号 1 1、図 1 6）が、利用されうる。

【 0 0 3 0 】

プライマー C は、プライマー A（2 2）によりサンプルから新しく単離された核酸から H 5 ウイルス RNA ターゲットを効率よく複製しないことが分かる。従って、プライマー A（2 2）及び B（2 8）を使用して H 5 ウイルスに関して検査で陽性を示したサンプルからの増幅した RNA にプライマー C を適用することが好ましい。 20

増幅工程の産物は、以下の RNA 配列：

- （ a ） 元の H 5 ウイルス RNA（病原性又は非病原性）の一部に相補的な RNA 配列；及び

- （ b ） プライマー B 又は C が対応する第 2 の DNA 配列を含んでいれば、検出分子の核酸配列に相補的な RNA 配列、を各々含む、大量のターゲット RNA 分子（3 2）である。

【 0 0 3 1 】

この特定の態様のターゲット RNA 分子（3 2）は、T 7 RNA ポリメラーゼによる増幅工程中に自動的に含まれている、T 7 RNA ポリメラーゼのためのプロモーターをコードする RNA 配列をさらに含んでいる。しかし、RNA 配列のこのセグメントは、検出ステップに機能を持っていない。 30

ターゲット RNA 分子（3 2）の検出を、図 5 で説明する。ターゲット RNA 分子（3 2）は、シグナルを生じることができる検出分子、例えば検出プローブ（4 0）に結合することにより検出されうる。シグナルは、検出プローブ（4 0）に付されたシグナル生成物質（4 1）から生じる。図 5 示されるように、この特に好ましい態様において、シグナル生成物質（4 1）は、ルテニウム - ビピリジン複合体 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ である。選択肢として、シグナル生成物質（4 1）は、放射性（例えば、 ^{32}P ）、化学発光性（例えば、ルシフェリン / ルシフェラーゼ）、蛍光性（例えば、フルオレセイン）、酸素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ）、又は他の電気化学発光分子である。 40

【 0 0 3 2 】

プライマー B 又は C が検出 DNA 配列に相補的である対応の第 2 の DNA 配列を含む場合、前記ターゲット RNA 分子（3 2）は、検出分子の核酸配列に相補的な RNA 配列を含む。そのようなデザインを利用する利点は、商業的に入手可能な検出分子を使用しうることである。

プライマー B 又は C が単に H 5 ウイルスの赤血球凝集素遺伝子配列の一部をコードする第 1 の DNA 配列から成る場合、新しい検出分子が必要とされる。この場合、前記検出分子は、以下の：

- ・ ターゲット RNA 分子（3 2）にコードされているものに相補的な H 5 ウイルス RNA 50

A 配列の一部をコードする核酸配列；及び

・ シグナル生成物質、

を含むかもしれない。

【0033】

ターゲットRNA分子(32)は、元のサンプル中に含まれる増幅されていない核酸、プライマーA、B、及びC、反応しなかったヌクレオチド、並びに最も重要なことに、結合しなかった検出分子を含めた他の望ましくない成分と一緒に混合物中に含まれている。従って、望ましくない成分を洗浄しうるように、ターゲットRNA分子(32)を捕獲分子、例えば捕獲プローブ(42)で固定化する。捕獲プローブ(42)は、ターゲットRNA分子(32)に結合することができる。これは、ターゲットRNA分子(32)にコードされているものに相補的なH5ウイルスRNA配列の一部をコードする核酸配列を含むことにより達成される。この捕獲プローブ(42)は、さらに固定化物質(44)に付着する。他の望ましくない成分を洗浄しうるように、前記固定化物質はターゲットDNA分子(32)を固定化する。図5で示される固定化物質(44)は、作用電極に引き付けられうる磁性粒子である。他の固定化物質、例えばその上に付着した相当数の捕獲プローブ(42)を有する重合体の小片が利用されもする。

10

【0034】

検出プローブの配列は、その末端がプライマーAとB、又はプライマーAとCにより確定される増幅されたRNA産物のいずれかの部位に相補的である。しかし、これが捕獲プローブと増幅されたRNA、その逆もまた同様、の相互作用に影響するので、この検出プローブ配列は、捕獲プローブのそれに重複させることができない。

20

【0035】

図5で示されるように、ターゲットDNA分子は、検出プローブ(40)と一緒に固定化される。従って、混合物への捕獲プローブ(42)の添加のタイミングに対する制限はない。捕獲プローブが洗浄ステップの前に添加される限り、捕獲プローブ(42)は、検出プローブ(40)の添加後、又はその前に添加される。

プライマーA、B、及びC、並びに捕獲プローブの核酸配列が、ここで既知の場合、対応する相補的DNA分子の合成は、当業者にとって明白である。そのような相補的DNA分子は、プライマーA、B、及びC、並びに捕獲プローブの合成の鋳型として使用されうる。

30

【0036】

本発明を、制限することのない以下の実施例によりここで説明する。様々な変更と修飾が、本発明の範囲から逸脱することなく以下の実施例及び方法に適用されうることに留意すべきである。従って、以下の実施例が、説明のみとして解釈され、そしてあらゆる意味においても制限することがないことに留意すべきである。

【0037】

実施例

この実施例の検出キットの詳細な構成要素を以下の通り列挙する：

A．溶解バッファー

・ 50 × 0.9 ml の溶解バッファー (5 M グアニジンチオシアネート、トリトン X - 100、Tris / HCl)

40

B．核酸単離成分

・ 5 × 22 ml の洗浄バッファー (5 M グアニジンチオシアネート、Tris / HCl)

・ 5 × 0.8 ml のシリカ (塩酸により活性的にされた二酸化ケイ素粒子)

・ 5 × 1.5 ml の溶離バッファー (Tris / HCl)

【0038】

C．核酸増幅成分

・ 5 × 60 µl の酵素溶液 (鳥類の筋芽細胞症ウイルス - 逆転写酵素 (AMV - RT)

、RNase - H、牛血清アルブミンにより安定化したT7 RNAポリメラーゼ

50

- ・ 5×10 mg の試薬玉（ヌクレオチド、ジチオスレイトール、及び $MgCl_2$ を凍結乾燥した球）。シリカゲル乾燥剤とホイル包装の状態で含んだ
- ・ 1×0.6 ml の試薬玉希釈液（Tris-HCl、45% DMSO）
- ・ 1×1.6 ml の KCl 溶液
- ・ 1×70 μ l の H5 - プライマー混合物

【0039】

D．核酸検出成分

- ・ 1×0.9 ml の、ノーブランドの ECL 検出プローブ（ルテニウム・ラベルした DNA オリゴヌクレオチド、保存剤：5 g/L 2-クロロアセトアミド）
- ・ 1×0.7 ml の H5 捕獲プローブ（ビオチニル化オリゴヌクレオチド、保存剤：5 g/L 2-クロロアセトアミド）
- ・ 2×1.7 ml の装置標準液（ルテニウム・ラベルした常磁性ビーズ）

先に列挙した材料は、50回の試験反応のために使用することを意図している。

試験反応に使用される、検出キットに含まれていないすぐに利用可能な材料を以下のとおり列挙する：

【表1】

材料	推奨される製造業者
70% (v/v) エタノール (96-100% (v/v) エタノールから調製した、ACS等級) ; 希釈のためにヌクレアーゼを含まない水を使用	Merck 1.00983
アセトン、分析用等級	SIGMA A4206
RNaseを含まない水の調製のためのジエチルピロカーボネート	SIGMA D5758

20

30

【0040】

試薬の調製

A．溶解バッファー

- ・ 溶解バッファーを、この放出手順を始める前に37℃で30分間、前もって温める。
- ・ 全ての結晶が完全に溶解していることを確実にするためにインキュベーションの間、上記溶解バッファー・バイアルを10分ごとに混合する。
- ・ 上記溶解バッファーを室温まで冷ます。
- ・ 過度の熱又は光から上記溶解バッファーを保護する。

【0041】

B．核酸単離試薬

- ・ 全ての試薬を使用前に室温にする。
- ・ 試薬の再利用：10点未満のサンプルをアッセイする場合、単離試薬の余りは、-20℃で2週間まで保存しうる。

1．洗浄バッファー

- ・ 洗浄バッファーを、単離手順を始める前に37℃で30分間、前もって温める。

50

- ・全ての結晶が完全に溶解していることを確実にするためにインキュベーションの間、上記溶解バッファー・バイアルを10分ごとに混合する。
- ・上記溶解バッファーを室温まで冷ます。
- ・過度の熱又は光から上記溶解バッファーを保護する。

【0042】

C．核酸増幅作用物質

- ・全ての試薬を使用前に室温にする。
- ・試薬の再利用：もどした試薬玉及び未使用の酵素溶液は、それらを-70℃で保存した場合、2週間以内は再利用することができる。未使用の部分を-20℃で保存した場合、全ての他の増幅試薬の再使用が可能である。

10

【0043】

1．試薬玉/KCl溶液の調製

- ・80 µlの試薬玉希釈液を凍結乾燥した試薬玉に添加し、そしてすぐによくボルテックスする。遠心分離はしないこと。
- ・希釈した球に30 µlのKCl溶液を添加し、そしてボルテックスする。

2．ターゲットRNA特異的プライマーの溶液の調製

- ・110 µlの試薬玉/KCl溶液を、新しい試験管に移し、10 µlのH5プライマー混合物を添加する。ボルテックスすることによりよく混合する。遠心分離はしないこと。

【0044】

3．酵素溶液

- ・室温で酵素溶液を解凍し、指で試験管を軽くはじいて優しく混合する。酵素を含むあらゆる溶液はボルテックスしないこと。使用前に試験管の内容物を遠心分離する。

20

D．核酸検出試薬

- ・未使用の試薬が2～8℃に保存されている場合、検出試薬の再利用が可能である。

【0045】

1．捕獲及び検出プローブ

- ・特定のRNA単位複製配列の検出を、前もって常磁性ビーズ結合したH5捕獲プローブと組み合わせて、このキットのノーブランドの検出プローブを用いて実行する。

2．H5 RNAハイブリダイゼーション溶液

- ・不透明な溶液を形成するまでH5捕獲ビーズをボルテックスする。
- ・N個のH5 RNA特異的反応のために：

新しい試験管に $(N+2) \times 10 \mu\text{l}$ のH5 RNA特異的捕獲ビーズを添加し、 $(N+2) \times 10 \mu\text{l}$ のノーブランドのECLプローブを添加する。

- ・使用前にハイブリダイゼーション溶液をボルテックスする。

30

【0046】

インピットロにおけるRNA増幅

A．核酸の放出と単離

- 1．核酸放出を始める前に、一様に前もって溶解バッファーの試験管を30分間温め、そしてボルテックスする。
- 2．溶解バッファーの試験管を10,000 × gで30秒間遠心分離しする。

40

【0047】

- 3．100 µlのターゲットRNAを溶解バッファーの試験管に添加し、そしてボルテックスする。溶解バッファー中、試料は：

- 70℃で無期限に、
 - 2～8℃で14日まで、
 - 25℃で48時間まで、
- 保存することができる。

【0048】

- 4．シリカ懸濁液をボルテックスし、そして各々のサンプルRNA/溶解バッファー試験

50

管に 50 μ l を添加する。

5. RNA / 溶解バッファー / シリカの試験管を、室温で 10 分間インキュベートする（シリカが底に堆積するのを防ぐために 2 分ごとに試験管をボルテックスする）。

6. RNA / 溶解バッファー / シリカの試験管を 10,000 $\times$ g で 30 秒間、遠心分離する。

【0049】

7. 慎重に上清を取り除いて（ペレットを乱さないこと）、各々の試験管に 1 ml の洗浄バッファーを添加する。

8. ペレットが完全に再懸濁するまで試験管をボルテックスする。

9. 試験管を 10,000 $\times$ g で 30 秒間、遠心分離する。

10. ステップ（7）～（9）を、

- ・ 洗浄バッファーにより 1 回、
- ・ 70 % のエタノールにより 2 回、
- ・ アセトンにより 1 回繰り返す。

【0050】

11. 最後の洗浄ステップの後、100 μ l ピペットを用いて全ての残留アセトンを慎重に取り除く。

12. 加熱ブロック上の 56 $^{\circ}$ C で 10 分間、開口した試験管中、シリカ・ペレットを乾燥させる。

13. 乾燥した時点で、各々の試験管に 50 μ l の溶離バッファーを添加する。

【0051】

14. ペレットを完全に懸濁するまで試験管をボルテックスする。

15. 再懸濁したシリカを 56 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、核酸を溶離する（5 分後、試験管をボルテックスする）。

16. 試験管を、10,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離する。

17. 5 μ l の各々の核酸上清を、新しい試験管に移し、そして 1 時間以内に増幅反応を始める。

【0052】

B. 核酸の増幅

1. 各々の H5 RNA 反応物について、5 μ l の核酸抽出物を新しい試験管中にピペットで移す。

2. 10 μ l の H5 RNA 特異的増幅溶液を添加する。上記増幅溶液は、非病原性 H5 ウイルスの検出のためのプライマー A 及び B を含む。

【0053】

3. 加熱ブロックにより 65 $^{\circ}$ C で 5 分間、試験管をインキュベートする。

4. 加熱ブロックにより 41 $^{\circ}$ C で 5 分間、試験管を冷却する。

5. 5 μ l の酵素溶液を添加し、そして指で試験管をはじいてよく混成する。

6. 試験管を、直ちに 41 $^{\circ}$ C で 10 分間に戻す。

7. 上記試験管を軽く遠心分離し、そして水浴中、41 $^{\circ}$ C で 90 分間それらをインキュベートする。

【0054】

8. 増幅産物の検出をここで実施する。選択肢として、この増幅産物を -20 $^{\circ}$ C で 1 ヶ月まで保存しうる。

9. 非病原性 H5 ウイルスの存在に関する検出結果が陽性の場合、病原性 H5 ウイルスの検出のためのプライマー A 及び C を含む増幅溶液を、ステップ 2 ~ 8 を繰り返すことにより上記増幅産物にここで適用する。

【0055】

C. 核酸の検出

1. 不透明になるまでハイブリダイゼーション溶液をボルテックスする。20 μ l のターゲット RNA ハイブリダイゼーションを、各々のハイブリダイゼーション試験管に添加

10

20

30

40

50

する。

2. 増幅反応のために：

- ・ 5 μ l の H 5 RNA 増幅反応物を添加し、
- ・ 粘着テープを用いてハイブリダイゼーション試験管を覆い、
- ・ 不透明な溶液を形成するまでハイブリダイゼーション試験管を混合する。

【0056】

3. ハイブリダイゼーション試験管を覆うために粘着テープを使用する。これは、蒸発と汚染を防ぐ。

4. 41 で30分間、ハイブリダイゼーション試験管をインキュベートする。

5. 300 μ l のアッセイ・バッファーをハイブリダイゼーション試験管に添加する。

10

【0057】

前記サンプルを、好適な検出装置によりH5ウイルスの存在について検出する準備がこの時できている。この実施例の検出は、光電子増倍管を備えた好適なシステムにより実施される。

H5ウイルス検出の結果を以下の表に列挙する。結果を、Perkin Elmer ABI 310 Genetic Analyzerを使用して、DNA配列決定法により確認する。

【表2】

表 1. プライマー A 及び B を用いた検出キットによる非病原性 H 5 ウイルスの検出の結果

患者／サンプル番号	H 5 亜種検出	
	検出可能なカウント	得られた分類
258/97	4229	陽性
977/97-2	6961	陽性
1000/97	33835	陽性
1258/97-2	2500	陽性
1258/97-3	2400	陽性
1258/97-4	10494	陽性
1258/97-5	3089	陽性
1258/97-9	4883	陽性
1258/97-10	プロトコールの最適化	
437/99-4	5165	陽性
437/99-6	22200	陽性
437/99-8	5142	陽性
437/99-10	511	陽性
陰性対照 1	1	陰性
陰性対照 2	1	陰性
陰性対照 3	35	陰性

10

20

30

【 表 3 】

表2. プライマーA及びCを用いた検出キットによる病原性H5ウイルスの検出の結果

患者／サンプル番号	H5 病原性検出	
	検出可能なカウント ($\times 10^3$)	得られた分類
258/97	11800	陽性
977/97-2	5300	陽性
1000/97	23100	陽性
1258/97-2	61800	陽性
1258/97-3	85100	陽性
1258/97-4	68400	陽性
1258/97-5	15800	陽性
1258/97-9	5400	陽性
1258/97-10	プロトコールの最適化	
437/99-4	48400	陽性
437/99-6	27100	陽性
437/99-8	21100	陽性
437/99-10	11600	陽性
陰性対照 1	1	陰性
陰性対照 2	3	陰性
陰性対照 3	2	陰性

10

20

30

40

50

【0058】

前述の実施例で示されるように、農場を含む様々な検査場において前記検出キットが都合よく使用されることを実現することができる。さらに、前記検出キットは、既存の方法より使用が比較的簡単で、そしてより短い時間に検出結果を提供することができるかもしれない - 検出結果は、所望であれば1日以内に利用可能であるかもしれない。RNAベースの検出システムであるので、特異性と感度が高められた検出キットは、H5ウイルスに特異的であり、そしてサンプル中のH5ウイルスの濃度は、ウイルスは検出のためのターゲット分子に複製されるのでもはや重要ではないかもしれない。

【0059】

プライマー、検出プローブ、及び捕獲プローブがRNA分子の形成に有用でもあることは当業者にとって明白である。DNA分子は、安定性の理由のため好ましい。

本願発明の好ましい態様を先の段落で述べたが、本願発明の修飾と代替型は、可能であり、そしてそのような修飾と代替型が、前記請求項に記載する本願発明の範囲内に依然として存在することは当業者にとって明白である。さらに、本願発明の態様は、実施例又は図

面のみにより限定的に解釈されないものとする。

【表 4】

参照番号	説明
10	サンプル中の核酸
12	シリカ
14	核酸／シリカ混合物
20	H 5 ウイルス RNA
22	プライマー A
24	伸長したプライマー A
26	伸長したプライマー A (DNA) : H 5 ウイルス RNA 混成物
28	プライマー B
30	H 5 ウイルスの 2 本鎖 DNA のコピー
32	標的 RNA 分子
40	検出プローブ
41	シグナル生成物質
42	捕獲プローブ
44	固定化物質 (immobilizer)

一覧表 1

【 0 0 6 0 】

本願発明の好ましい態様を、以下の図面に関してここで説明する：

ここで、図 6 ～ 1 9 は、増幅及び検出目的のために検出キットの D N A 分子に使用される、本願発明に関する核酸配列の配列番号 1 ～ 1 4 のそれぞれを示していた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本願発明のキットによるインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの検出の全体的な手順のフローチャートを示す。

【図 2】

本願発明の検出キットによるインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルスの検出に関する詳細な手順を示す。

【図 3】

生体サンプルからのウイルス R N A 分子の単離を示す。

【図 4】

2 種類 の D N A 分子、プライマー A 及び B によるインフルエンザ A サブタイプ H 5 ウイルス R N A 分子の一部の増幅を示す。

【 図 5 】

検出プローブに結合した間の増幅された R N A 分子の固定化を示す。

【 図 1 】

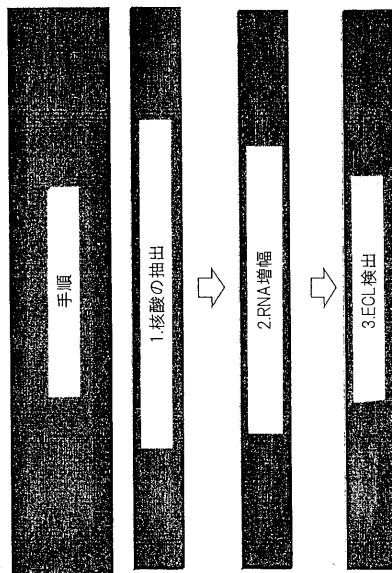


Figure 1

【 図 2 】

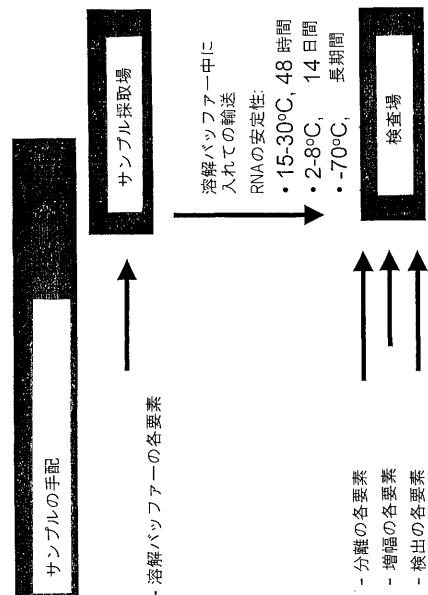


Figure 2

【 図 3 】

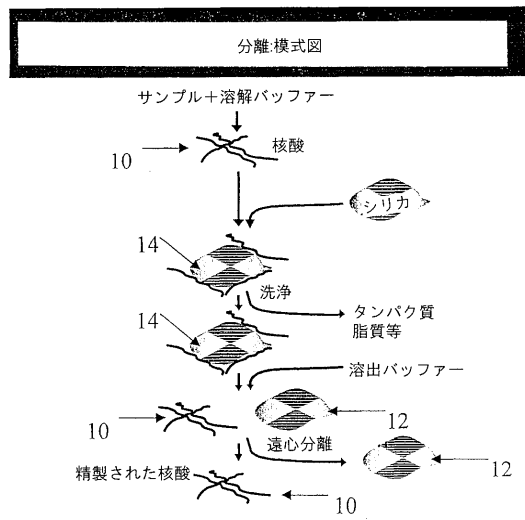


Figure 3

【 図 4 】

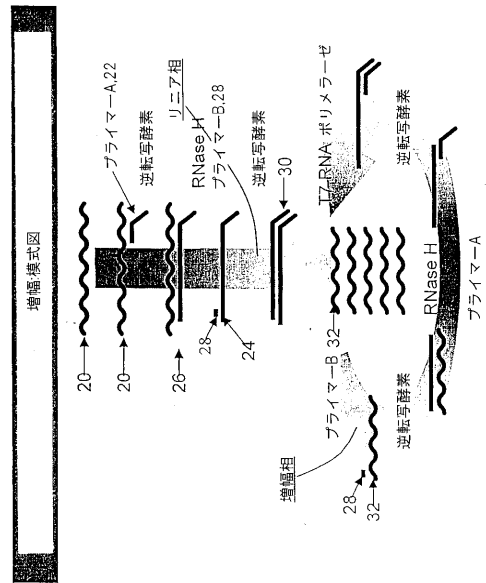


Figure 4

【 図 5 】

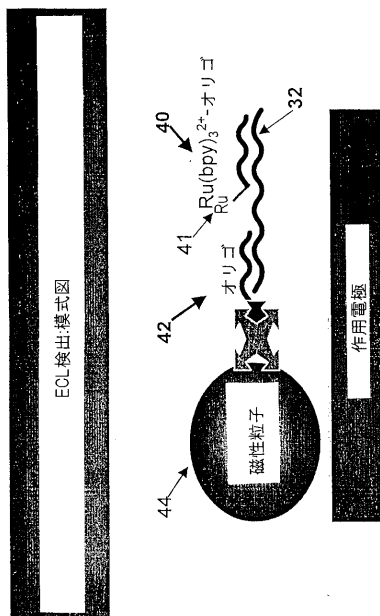


Figure 5

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/29118 A1(51) International Patent Classification: C12Q 1/70, 1/68
// (C12Q 1/70, C12R 1:93)

(21) International Application Number: PCT/CN01/01458

(22) International Filing Date:
27 September 2001 (27.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00106310.0 5 October 2000 (05.10.2000) CN

(71) Applicant (for all designated States except US): HONG KONG DNA CHIPS LIMITED [CN/CN], 1805-6, 18th Floor, Lu Plaza, 2 Wing Yip Street Kowloon, Hong Kong (CN).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YU, Albert Cheung Hoi [CN/CN]; Room 5B, Tower 9, HKUST Senior Staff Quarter HKUST, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong (CN). SO, Ka-Lun [CN/CN]; Department of Biology, HKUST, Clear Water Bay, Hong Kong (CN). KO, Lung-Sang [CN/CN]; Room 1930, Fu Shun House, Fu Shan Estate, Kowloon, Hong Kong (CN). LAU, Lok-Ting [CN/CN]; Room 1906, Heung Tung House, Yu Tung Court, Tung Chung, Lantau, New Territories, Hong Kong (CN).

(74) Agent: BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD., No 40 North Sanhuanzhonglu Road, Beijing 100088 (CN).

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BR, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/29118 A1

(54) Title: A KIT FOR DETECTING NON-PATHOGENIC OR PATHOGENIC INFLUENZA A SUBTYPE H5 VIRUS

(57) Abstract: Current methods for detecting influenza A subtype H5 virus, for example cell culture, haemagglutination-inhibition, fluorescent antibody and enzyme immunoassay, and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) may have the disadvantages of low sensitivity and low specificity. Furthermore, such methods are relatively difficult to use, and may not be suitable for routine detection on a daily basis. The kit for detecting H5 virus of this invention may provide a user-friendly alternative that is relatively more sensitive and specific to H5 virus. The detection kit utilizes two specially designed primers A and B for the replication of H5 virus, and a specific capture probe for immobilizing the amplified viral RNA. An additional primer C is also designed for the detection of pathogenic H5 virus. The detection of H5 virus by the detection kit may be accomplished within one day if desired.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

**A KIT FOR DETECTING NON-PATHOGENIC OR
PATHOGENIC INFLUENZA A SUBTYPE H5 VIRUS**

5 **FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates to apparatus for detecting influenza A subtype H5 virus.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

Avian influenza (Influenza A) viruses infect a variety of animals, including humans, pigs, horses, sea mammals, and birds. Recent phylogenetic studies of Influenza A viruses have revealed species-specific lineages of viral
15 genes and have demonstrated that the prevalence of interspecies transmission depends on the animal species. They have also revealed that aquatic birds are the source of all influenza viruses in other species.

The emergence of a "new" Influenza A virus in humans is possible.
20 Serological and virological evidence suggests that since 1889 there have been six instances of the introduction of an influenza virus with an HA subtype that had been absent from human population for some time. Three human subtypes of HA have appeared cyclically — subtype H2 in 1889, H3 in 1900, H1 in 1918, H2 again in 1957, H3 again in 1968, and H1 again in 1977. The
25 first human infection with avian influenza A subtype H5N1 was reported in 1997, which resulted in the death of a 3-year-old boy. This first report leads to the need for the routine screening for H5 virus in animals, particularly chicken, in stopping the spread of the viruses.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

Many methods for viral identification are currently being used, including cell culture, haemagglutination-inhibition, fluorescent antibody and enzyme immunoassay, and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). However, these methods all share the same problems — they have relatively low sensitivity and low specificity. Furthermore, the detection time may be too long for routine detection purposes, and such methods are relatively difficult to be utilized.

The current methodologies applied for detecting influenza A subtype H5 virus includes immunodiagnostic assay and virus culture. Examples of immunodiagnostic assay include haemagglutinin inhibition (HI) assay and immuno assay. However, immunodiagnostic assay may have the disadvantage of low sensitivity. Furthermore, as the target of immunodiagnostic assay is usually a specific protein, the underlying genetic nature of a target may not be obtained directly. In addition, the initial derivation of antibodies is ultimately dependent upon the antigenicity of the protein analysis in the immune host animal and therefore, cross-reactivity may occur.

Although virus culture is an accurate and low cost detection method, it is relatively labour intensive and requires a lot of space for incubation. The culturing process may be slow and cannot meet the demand of daily inspection. In addition, virus culture can not provide the detection results directly and has to reply upon further confirmation by other detection methods, which may be very expensive.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

OBJECT FOR THE INVENTION

Therefore, it is an object of this invention to design a user-friendly diagnostic kit for detecting H5 virus such that the sensitivity and specificity
5 may be improved.

Another object of this invention to design a kit for detecting influenza A subtype H5 virus such that the detection time and the overall costs for detection may be reduced.

It is yet another object of this invention to design a kit for detecting
10 influenza A subtype H5 virus such that the pathogenicity of the H5 virus may be detected directly.

As a minimum, it is an object of the present invention to provide the public with a useful choice.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, this invention provides a kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus in a biological sample including:

- an isolating agent for isolating the RNA molecules of H5 virus
20 from the biological sample;
- a nucleic acid replicating agent for replicating a target molecule, wherein the target molecule includes:
 - a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of
the RNA sequence of H5 virus; and
 - 25 ▪ a nucleic acid sequence for binding to a detection molecule;
- a nucleic acid detecting agent for detecting the target molecule, wherein the nucleic acid detecting agent includes the detection molecule.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

It is another aspect of this invention to provide a purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:

- a first DNA sequence for binding to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and
- 5 - a second DNA sequence encoding a promoter DNA sequence of a RNA polymerase

such that the purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:

- 10 - a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
- a DNA sequence encoding the promoter DNA sequence of a RNA polymerase

when the first purified and isolated DNA molecule binds to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus.

It is yet another aspect of this invention to provide a purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:

- 20 - a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus; and
- a second DNA sequence encoding a DNA sequence for binding to a detection molecule

such that the purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:

- 25 - a DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus; and

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- a DNA sequence encoding the DNA sequence for binding a detection molecule
- when the purified and isolated DNA molecule binds to a DNA molecule including a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus.

This invention also provides a purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule consisting of a first DNA sequence encoding either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, 7, 9, 10, or 11.

It is yet another aspect of this invention to provide a purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:

- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus for binding to a target molecule, wherein the target molecule includes a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and
 - an immobilizer
- such that the target molecule is immobilized when bound to the purified and isolated DNA molecule.

It is another aspect of this invention to provide a purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:

- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus for binding to a target molecule, wherein the target molecule includes a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- a signal generator

such that a signal is generated from the target molecule when the target molecule is bound to the purified and isolated DNA molecule.

5 This invention also provides the use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample, wherein:

- the RNA molecule of H5 virus is isolated from the biological sample by an isolating agent;
- 10 - a target molecule is replicated by a nucleic acid replicating agent including the first and the second purified and isolated DNA molecules, wherein the target molecule includes:
 - a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
 - 15 ▪ a nucleic acid sequence for binding to a detection molecule;
- the target molecule is detected by a nucleic acid detecting agent, wherein the nucleic acid detecting agent includes the detection molecule.

20 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

A preferred embodiment of this invention will now be described with reference to the following figures:

25 Figure 1 shows the flow chart of the overall procedures of the detection of influenza A subtype H5 virus by the kit of this invention.

Figure 2 shows the detailed procedures for the detection of influenza A subtype H5 virus by the detection kit of this invention.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

Figure 3 shows the isolation of the viral RNA molecules from the biological sample.

Figure 4 shows the amplification of a portion of the influenza A subtype H5 viral RNA molecule by two DNA molecules, primers A and B.

5 Figure 5 shows the immobilization of the amplified RNA molecule while bound to a detection probe.

Figures 6-19 show the nucleic acid sequences SEQ ID Nos. 1-14 for this invention, respectively, which are used in the DNA molecules of the detection kit for amplification and detection purposes.

10

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

Preferred embodiments of this invention are now described with reference to the figures. List 1 is a part list so that the reference numerals in
15 the figures may be easily referred to.

The concentration of influenza A subtype H5 in a biological sample, for example chicken blood, may be very low such that detection of the presence of H5 viral RNA may not be performed on the biological sample
20 directly. In order to increase the number of the viral RNA molecules to a sufficient amount for the detection purpose, a suitable amplification technology is required. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) is known to be a flexible technology with particular use for the amplification of RNA. The amplified RNA molecules may then be detected by suitable
25 technology. NASBA is a rapid, highly sensitive and highly specific method for the detection of influenza virus subtype H5. Results can be obtained in as little as one day. In addition, it can discriminate between pathogenic and non-pathogenic H5 strains directly.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

Influenza virus contains its genetic material in the form of a single strand of viral ribonucleic acid (RNA). Influenza A subtype H5 viral RNA contains the genes necessary for its reproduction and one of the essential genes is called haemagglutinin. This gene is approximately 1756 nucleotides in length, and the nucleotides are numbered from the 5' end of the molecule.

Figure 1 shows the overall procedures for the detection of H5 virus by the detection kit. As shown in Figure 1, the target H5 viral nucleic acid molecule, which is in the form of a single strand of RNA molecule, is firstly extracted from a biological sample. The compatible biological sample types may include blood, serum/plasma, peripheral blood mononuclear cells/peripheral blood lymphocytes (PBMC/PBL), sputum, urine, faeces, throat swabs, dermal lesion swabs, cerebrospinal fluids, cervical smears, pus samples, food matrices, and tissues from various parts of the body including brain, spleen, and liver. Other samples that have not been listed may also be applicable. The nucleic acid extraction process of the detection kit of this invention is accomplished by an isolating agent.

After the target H5 viral RNA molecule is extracted from the biological sample, the amount of RNA molecules in the sample may not be sufficient to be detected. Therefore, a portion of the H5 viral RNA molecule is replicated to a target nucleic acid molecule by an appropriate amplification technique, for example, NASBA. The target nucleic acid molecules may then be detected by suitable methods.

After the overall procedures of the detection kit of the invention described, the details of each procedure will now be discussed.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

The H5 viral RNA molecule may be isolated from the biological sample by applying a suitable isolating agent to the biological sample. Preferably, a lysis agent may be applied before the isolating agent. The lysis agent, for example, a lysis buffer, is responsible for dissolving the proteins and lipids, and denaturing the proteins in the biological sample such that these materials may be removed from the sample more easily. Furthermore, the lysis agent may also serve as a buffer for stabilizing the RNA molecule for long term storage purposes. As shown in Figure 2, the RNA molecule may be stable in the lysis buffer for up to 48 hours at room temperature and may be stored indefinitely at -70°C. The advantages for doing so is that it may not be necessary to perform the analysis at the sampling site, which may not be suitable for carrying out such processes.

An example of suitable lysis buffer may include 5M guanidine thiocyanate and Tris/HCl. The lysis buffer forms no invention of the detection kit and the compositions suitable for its purpose are well known to the art. Therefore, the detailed composition of the lysis buffer will not be discussed here. Lysis agents having different compositions that can still achieve the purposes of dissolving proteins and lipids, denaturing proteins, and stabilizing the RNA molecules may be utilized in the detection kit of this invention.

After the lysis agent has been applied to the biological sample, the next step is the isolation of the nucleic acid molecules from the sample through the use of an isolating agent. Figure 3 describes the overall isolation procedure in the detection kit. After the lysis agent is applied to the biological sample, nucleic acids (10) together with other unwanted components are in the form of a solution. An adsorbent, for example silica (12), may then be added into the solution to adsorb the nucleic acids (10), resulting in a nucleic acids/silica

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

mixture (14). After that, proteins and lipid and other unwanted materials in the solution may be washed away by suitable eluents, for example, 5M guanidine thiocyanate and Tris/HCl solution, Tris/HCL solution, 70% ethanol, or acetone, or their combinations. After the mixture (14) is washed with
5 sufficient amount of eluents, the nucleic acids (10) in the silica (12) may then be isolated by centrifugation.

After the nucleic acids (12) contained in the sample are isolated, an amplification agent may then be applied to the mixture of nucleic acid such
10 that the H5 viral RNA molecule is replicated for detection purposes, for example NASBA technique. Three purified and isolated DNA molecules are designed for the amplification purpose, which are termed primers A to C.

Figure 4 shows a schematic diagram for the amplification of the H5
15 viral RNA by NASBA in this invention. As shown in the figure, the amplification process is initiated by the annealing of primer A (22) to the target H5 viral RNA (20), which is a single-stranded RNA molecule. The primer A (22) is designed such that it is capable of binding to the targeted RNA molecule, and further includes a DNA sequence encoding the promoter
20 for a RNA polymerase, preferably bacteriophage T7 RNA polymerase. The precise location of binding depends upon the strain of virus examined. The binding site may change after a certain period of time. The important technical feature of Primer A is that it remains capable of binding to a portion of H5 virus.

25 Accordingly, primer A (22) includes a binding sequence encoding a DNA sequence complementary to at least a portion of the H5 viral RNA (20). For the purpose of this invention, it is found that the region suitable for binding in the H5 viral RNA (20) is a region between nucleotides 1107 to

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

1132 of the haemagglutinin gene of H5 virus, which is found to contain the least number of nucleotides for the binding function. Therefore, the binding sequence of Primer A preferably includes a DNA sequence that is complementary to region between nucleotide 1107 to 1132 of the haemagglutinin gene of H5 virus, which is set forth in SEQ ID No. 1 in Figure 6. It should be noted that SEQ ID No. 1 is formally written in the 5'-3' direction. As a result, the orientation of binding with respect to the viral gene is from "back" to "front".

10 As an alternative, nucleotides 1060 to 1140 (SEQ ID No.2, Figure 7) or nucleotides 1040 to 1160 (SEQ ID No.3, Figure 8) of the haemagglutinin gene of H5 virus may be used for the binding purpose in primer A (22).

15 For the amplification purpose, which will be described in more detail in the specification, primer A (22) further includes a DNA sequence encoding a promoter of a RNA polymerase, for example bacteriophage T7 RNA polymerase. A suitable promoter DNA sequence is set forth in SEQ ID No.4 (Figure 9). The promoter sequence is preferably attached to the 5' end of the binding sequence, such that the binding sequence may extend at the 3' end when Primer A binds to H5 viral RNA. If other RNA polymerase is utilized, the promoter sequence will have to be changed accordingly.

25 After the primer A binds to the H5 viral RNA, the primer A is extended through the action of a suitable reverse transcriptase, for example Avian Myoblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT) in the presence of suitable nucleotides at the 3' end of Primer A. Therefore, an extended Primer A (24) including the following sequences is resulted:

- (a) a DNA sequence that is complementary to a portion of H5 viral RNA; and

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

(b) a DNA sequence encoding a promoter for a RNA polymerase.

5 The H5 RNA portion of the resulting DNA:RNA hybrid (26) is eliminated through the action of RNase H. This allows for the primer B (28) to anneal to the extended Primer A (24) at a position that is upstream from the primer A (22) annealing site. Therefore, in order for the primer B (28) to bind to the extended Primer A (24), primer B (28) includes a first binding DNA sequence encoding a portion of the H5 viral haemagglutinin gene sequence. Preferably, this first DNA sequence of primer B (28) encodes nucleotides 914 to 940 of the haemagglutinin gene of H5 virus (SEQID No.5, Figure 10). As
10 an alternative, nucleotides 866 to 961 (SEQID No.6, Figure 11) or nucleotides 846 to 981 (SEQID No.7, Figure 12) of H5 viral haemagglutinin gene may be utilized.

15 To achieve the detection purpose, primer B (28) may further include a second DNA sequence that is complementary to the nucleic acid sequence of a detection molecule. If the detection molecule is designed in a way such that it includes a DNA sequence encoding a portion of the RNA sequence of H5 virus such that it may bind to the amplified RNA molecules, it may not be
20 necessary for primer B to include the second DNA sequence. In this case, primer B may consist of merely the first DNA sequence.

As an alternative, a second DNA sequence encoding the DNA sequence set forth in SEQ ID No.8 (Figure 13) is included in Primer B. The second
25 DNA sequence is preferably attached to the 5' end of the binding sequence of Primer B. SEQ ID No. 8 is subjected to change if other detection nucleic acid sequences are used.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

After the annealing of primer B (28) to the extended Primer A (24), primer B (28) extends down through the T7 RNA polymerase promoter at the end of the extended primer A (24) through the action of AMV-RT. As a result, a double-stranded DNA copy (30) of the original H5 viral RNA target sequence is produced, encoding an intact T7 RNA polymerase promoter at one end and a portion of H5 viral RNA sequence at the other end. This promoter is then recognized by the T7 RNA polymerase, resulting in the production of large amount of target RNA molecules (32) that include a RNA sequence complementary to a portion of the original H5 viral RNA sequence.

10

Primer B may be used to determine non-pathogenic strains of influenza A subtype H5 virus. For the detection of the pathogenic H5 virus, a primer C is used in place of primer B. Again primer C is a purified and isolated DNA molecule including the following DNA sequences:

- 15 - a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of pathogenic H5 virus; and
- a second DNA sequence encoding a DNA sequence complementary to a detection DNA sequence. As in the case of Primer B, this second DNA sequence may be a purely optional
- 20 component.

The function and working of Primer C is the same as Primer B, except that the target is pathogenic H5 virus.

25 Preferably, the first DNA sequence of primer C encodes nucleotide 1017 to 1042 of the haemagglutinin gene of H5 virus (SEQ ID No.9, Figure 14). As an alternative, nucleotide 970 to 1063 (SEQ ID No.10, Figure 15) or nucleotide 950 to 1083 (SEQ ID No.11, Figure 16) of H5 viral haemagglutinin gene may be utilized.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

It is found that Primer C does not replicate the target H5 viral RNA efficiently from freshly isolated nucleic acids from the samples with Primer A (22). Therefore, it is preferred that Primer C is applied to amplified RNA
5 from samples testing positive for H5 virus using Primers A (22) and B (28).

The product of the amplification process is a large quantity of target RNA molecules (32) each containing the following RNA sequences:

- 10 (a) a RNA sequence complementary to a portion of the original H5 viral RNA (pathogenic or non-pathogenic); and
- (b) a RNA sequence complementary to the nucleic acid sequence of a detection molecule, if Primer B or C includes the corresponding second DNA sequence.

15 The target RNA molecule (32) of this particular embodiment further includes a RNA sequence encoding the promoter for T7 RNA polymerase, which is automatically included during the amplification process by the T7 RNA polymerase. However, this segment of RNA sequence may have no function in the detection step.

20 The detection of the target RNA molecule (32) is illustrated in Figure 5. The target RNA molecule (32) may be detected by binding to the detection molecule that is capable of generating a signal, for example the detection probe (40). The signal may be generated from a signal generator (41) that is
25 attached to the detection probe (40). In this particular preferred embodiment as shown in Figure 5, the signal generator (41) is a ruthenium-bipyridine complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. As an alternative, the signal generator (41) may be radioactive (e.g. ^{32}P), chemiluminescent (e.g. luciferin/luciferase), fluorescent

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

(e.g. fluorescein), enzymatic (e.g. alkaline phosphatase, horseradish peroxidase), or other electrochemiluminescence molecules.

5 If primers B or C includes the corresponding second DNA sequence that is complementary to a detection DNA sequence, the target RNA molecule (32) includes a RNA sequence complementary to the nucleic acid sequence of the detection molecule. The advantage of utilizing such a design is that commercially available detection molecules may be used.

10 If primers B or C consists of merely the first DNA sequence that encodes a portion of the H5 viral haemagglutinin gene sequence, a new detection molecule is required. In this case, the detection molecule may include:

- 15 ▪ a nucleic acid sequence encoding a portion of H5 viral RNA sequence that is complementary to that encoded in the target RNA molecule (32); and
- a signal generator.

20 The target RNA molecule (32) is contained in a mixture together with other undesired components including the unamplified nucleic acids contained in the original sample, the primers A, B, and C, the unreacted nucleotides, and most importantly, the unbound detection molecules. Therefore, the target RNA molecule (32) may be immobilized by a capture molecule, for example the capture probe (42), such that the undesired
25 components may be washed away. The capture probe (42) is capable of binding to the target RNA molecule (32). This may be achieved by including a nucleic acid sequence encoding a portion of H5 viral RNA sequence that is complementary to that encoded in the target RNA molecule (32). The capture probe (42) is further attached to an immobilizer (44), which may immobilize

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

the target RNA molecule (32) so that other undesired components may be washed away. The immobilizer (44) as shown in Figure 5 is a magnetic particle that may be attracted to a working electrode. Other immobilizers may also be utilized, for example, a piece of polymer with a number of capture probes (42) attached on.

The sequence of the detection probe may be complementary to any region of the amplified RNA product whose ends are defined by primers A and B or by primers A and C. However, the detection probe sequence cannot overlap that of the capture probe, as this would affect the interaction of the amplified RNA with the capture probe and vice versa.

As shown in Figure 5, the target RNA molecule may be immobilized together with the detection probe (40). Therefore, there may be no restriction on the timing of the addition of the capture probe (42) into the mixture. The capture probe (42) may be added after or before the addition of the detection probe (40), as long as the capture probe is added before the washing step.

As the nucleic acid sequences of Primers A, B, and C, and the capture probe are now known, the synthesis of the corresponding complementary DNA molecules will be apparent to one skilled in the art. Such complementary DNA molecules may be used as templates in the synthesis of Primers A, B, and C, and the capture probe.

The present invention is now illustrated by the following non-limiting examples. It should be noted that various changes and modifications can be applied to the following example and processes without departing from the scope of this invention. Therefore, it should be noted that the following

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

example should be interpreted as illustrative only and not limiting in any sense.

Example

5

The detailed components of the detection kit of this example are listed as follows:

A. Lysis buffer

- 10 ▪ 50 x 0.9 ml Lysis buffer (5M guanidine thiocyanate, Triton X-100, Tris/HCl)

B. Nucleic acid isolation components

- 15 ▪ 5 x 22 ml Wash Buffer (5M guanidine thiocyanate, Tris/HCl)
 ▪ 5 x 0.8 ml Silica (Hydrochloric acid-activated silicon dioxide particles)
 ▪ 5 x 1.5 ml Elution buffer (Tris/HCl)

C. Nucleic acid amplification components

- 20 ▪ 5 x 60 µl Enzyme solution (Avian Myoblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT), RNase-H, T7 RNA polymerase stabilized with bovine serum albumin)
 ▪ 5 x 10 mg Reagent spheres (lyophilised spheres with nucleotides, dithiothreitol and MgCl₂). Contained in a foil pack with silica gel desiccant
 ▪ 1 x 0.6 ml Reagent sphere diluent (Tris-HCl, 45% DMSO)
 25 ▪ 1 x 1.6 ml KCl solution
 ▪ 1 x 70 µl H5-primer mixture

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

D. Nucleic acid detection components

- 1 x 0.9ml Generic ECL detection probe (Ruthenium-labelled DNA oligonucleotide Preservative: 5 g/L 2-chloroacetamide)
- 1 x 0.7 ml H5-capture probe (Biotinylated-oligonucleotide Preservative: 5 g/L 2-chloroacetamide)
- 2 x 1.7 ml Instrument Reference Solution (Ruthenium-labelled paramagnetic beads)

The materials as listed above are intended to be used for 50 test reactions.

10

Readily available materials not included in the detection kit that will be used in the test reactions are listed as follows:

Material	Recommended Source
70% (v/v) Ethanol (prepared from 96-100% (v/v) ethanol, ACS quality); use nuclease-free water for dilution	Merck 1.00983
Acetone, analytical grade	SIGMA A4206
Diethylpyrocarbonate for the preparation of RNase-free water	SIGMA D5758

15 **Preparation of reagents****A. Lysis buffer**

- Pre-warm Lysis buffer for 30 min at 37°C before starting the release procedure.
- Mix the Lysis buffer vial every 10 min during the incubation to ensure that any crystals have fully dissolved.
- Allow Lysis buffer to cool to room temperature.
- Protect Lysis buffer from excessive heat or light.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

B. Nucleic acid isolation reagents

- Bring all reagents to room temperature before use.
- Re-use of reagents: If less than 10 samples are being analysed, the
5 remainder of the isolation reagents may be stored at -20°C for up to two weeks.

1. Wash buffer

- Pre-warm Wash buffer for 30 min at 37°C before starting the isolation
10 procedure.
- Mix the Wash buffer vial every 10-min during the incubation to ensure that any crystals have fully dissolved.
- Allow Wash buffer to cool to room temperature.
- Protect Wash buffer from excessive heat or light.

C. Nucleic acid amplification reagents

- Bring all reagents to room temperature before use.
- Re-use of reagents: The reconstituted Reagent spheres and the unused
Enzyme solution can be re-used within two weeks provided they have
20 been stored at -70°C. Re-use of all other amplification reagents is possible if the unused portions have been stored at -20°C.

1. Preparation of Reagent spheres/KCl solution

- Add 80 µl Reagent sphere diluent to the lyophilised Reagent spheres and
25 immediately vortex well. DO NOT centrifuge.
- Add 30 µl of KCl solution to the diluted spheres and vortex.

2. Preparation of the target RNA-specific primer solution

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- Transfer 110 µl of the Reagent sphere/KCl solution into a fresh test tube and add
10 µl of the H5-primer mixture. Mix well by vortexing. DO NOT centrifuge.

5

3. Enzyme solution

- Thaw the Enzyme solution at room temperature and mix gently by flicking the tube with fingers. **DO NOT** vortex any solution containing enzymes. Centrifuge tube contents before use.

10

D. Nucleic acid detection reagents

- Re-use of detection reagents is possible if the unused reagents have been stored at 2-8 °C.

15

1. Capture and detection probe

- Detection of specific RNA amplicons is carried out with the generic detection probe in the kit in combination with an H5-capture probe previously coupled to paramagnetic beads.

20

2. H5 RNA hybridisation solution

- Vortex H5-capture beads until an opaque solution has formed.
- For N H5 RNA-specific reactions:
add (N+2) x 10 µl H5 RNA-specific capture beads to a fresh test tube
add (N+2) x 10 µl generic ECL probe

25

- Vortex hybridisation solution before use.

RNA amplification *in vitro*

A. Nucleic acid release and isolation

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

1. Pre-warm Lysis buffer tubes for 30 min and vortex regularly before starting nucleic acid release.
2. Centrifuge Lysis buffer tubes for 30 sec at 10,000 x g.
3. Add 100 µl target RNA to Lysis buffer tubes and vortex.
- 5 In Lysis buffer, specimens can be stored:
indefinitely at -70 °C
up to 14 days at 2-8 °C
up to 48 hours at 25 °C
- 10 4. Vortex the Silica suspension and add 50 µl to each sample RNA/
Lysis buffer tube.
5. Incubate RNA/Lysis buffer/Silica tubes for 10 min at room temperature (vortex tubes every 2 min to prevent silica from settling to the bottom).
- 15 6. Centrifuge RNA/Lysis buffer/Silica tubes for 30 sec at 10,000 x g.
7. Carefully remove the supernatant (do not disturb the pellets) and add 1 ml Wash buffer to each tube.
8. Vortex tubes until the pellets have resuspended completely.
9. Centrifuge tubes for 30 sec at 10,000 x g.
10. Repeat steps (7) to (9)
- 20 ▪ Once with Wash buffer
 ▪ Twice with 70% ethanol
 ▪ Once with acetone.
11. After the final wash step, carefully remove any residual acetone with a 100 µl pipette.
- 25 12. Dry the silica pellets in open test tubes for 10 min at 56°C on a heating block.
13. When dry, add 50 µl Elution buffer to each test tube.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

14. Vortex tubes until the pellets have resuspended completely.
15. Incubate the resuspended silica for 10 min at 56°C to elute the nucleic acid (vortex the test tubes after 5 min).
16. Centrifuge tubes for 2 min at 10,000 x g.
- 5 17. Transfer 5 µl of each of the nucleic acid supernatants to a fresh tube and begin the amplification reaction within 1 hr.

B. Nucleic acid amplification

- 10 1. For each H5 RNA reaction, pipette 5 µl of the nucleic acid extract into a fresh test tube.
2. Add 10 µl of the H5 RNA-specific amplification solution. The amplification solution contains Primers A and B for the detection of non-pathogenic H5 virus.
3. Incubate tubes for 5 min at 65°C in a heating block.
- 15 4. Cool tubes for 5 min at 41°C in heating block.
5. Add 5 µl of Enzyme solution and mix well by flicking the test tube with finger.
6. Immediately return test tubes to 41°C for 10 min.
7. Briefly centrifuge the tubes and incubate them for 90 min at 41°C in a water bath.
- 20 8. Detection of the amplification products may now be performed. As an alternative, the amplification products may be stored at -20°C for up to 1 month.
9. If the detection result for the presence of non-pathogenic H5 virus is positive, an amplification solution containing Primers A and C for the detection of pathogenic H5 virus may now be applied onto the amplification products by repeating steps 2-8.
- 25

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

C. Nucleic acid detection

1. Vortex the hybridisation solutions until opaque. Add 20 µl of target RNA hybridisation to each of the hybridisation tubes.
2. For the amplification reactions:
 - 5 ▪ Add 5 µl H5 RNA amplification reaction.
 - Cover the hybridisation tubes with adhesive tape.
 - Mix the hybridisation tubes until an opaque solution forms.
3. Use adhesive tape to cover the hybridisation tubes. This is to prevent evaporation and contamination.
- 10 4. Incubate hybridisation tubes for 30 min at 41°C.
5. Add 300 µl assay buffer to each hybridisation tube.

The samples are now ready to be detected for the presence of H5 virus by a suitable detection equipment. The detection in this example is performed
 15 on a suitable system equipped with a photomultiplier tube.

The results of H5 virus detection are listed in the following tables. The results are confirmed by DNA sequencing using a Perkin Elmer ABI 310 Genetic Analyzer.

20

Table 1. Results of the detection for non-pathogenic H5 virus by the detection kit using Primers A and B

Case /sample no.	H5 Subtype Detection	
	Detectable Count	Result Classification
258/97	4229	Positive
977/97-2	6961	Positive
1000/97	33835	Positive

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

1258/97-2	2500	Positive
1258/97-3	2400	Positive
1258/97-4	10494	Positive
1258/97-5	3089	Positive
1258/97-9	4883	Positive
1258/97-10	Protocol optimization	
437/99-4	5165	Positive
437/99-6	22200	Positive
437/99-8	5142	Positive
437/99-10	511	Positive
Negative control 1	1	Negative
Negative control 2	1	Negative
Negative control 3	35	Negative

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

Table 2. Results of the detection for pathogenic H5 virus by the detection kit using Primers A and C

Case /sample no.	H5 Pathogenicity Detection	
	Detectable Count ($\times 10^3$)	Result Classification
258/97	11800	Positive
977/97-2	5300	Positive
1000/97	23100	Positive
1258/97-2	61800	Positive
1258/97-3	85100	Positive
1258/97-4	68400	Positive
1258/97-5	15800	Positive
1258/97-9	5400	Positive
1258/97-10	Protocol optimization	
437/99-4	48400	Positive
437/99-6	27100	Positive
437/99-8	21100	Positive
437/99-10	11600	Positive
Negative control 1	1	Negative
Negative control 2	3	Negative
Negative control 3	2	Negative

- 5 As shown in the above example, it can be realized that the detection kit may be used conveniently in various testing sites including farms. Furthermore, the detection kit is relatively easier to use than existing methods, and may be able to provide the detection results in a shorter time - the detection results may be available within one day if desired. As it is a RNA-
- 10 based detection system, the specificity and the sensitivity may be enhanced -

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

the detection kit is specific to H5 virus, and the concentration of the H5 virus in the sample may no longer be important as the virus will be replicated to a target molecule for detection.

5 It will be apparent to one skilled in the art that the primers, detection probe, and capture probe may be also useful in the form of RNA molecules. DNA molecules are preferred due to stability reason.

10 Although the preferred embodiment of this invention has been described in previous paragraphs, it should be apparent to one skilled in the art that modifications and alternative editions of this invention are possible, and such modifications and editions are still within the scope of this invention, which is set forth in the following claims. In addition, the embodiments of this invention shall not be interpreted restrictively by the examples or figures
15 only.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

Reference No.	Description
10	nucleic acids in sample
12	silica
14	nucleic acids/silica mixture
20	H5 viral RNA
22	Primer A
24	Extended Primer A
26	Extended Primer A(DNA):H5 viral RNA hybrid
28	Primer B
30	double-stranded DNA copy of H5 virus
32	target RNA molecule
40	detection probe
41	signal generator
42	capture probe
44	immobilizer

List 1

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

CLAIMS

1. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus in a biological sample including:
 - 5 - an isolating agent for isolating the RNA molecules of H5 virus from the biological sample;
 - a nucleic acid replicating agent for replicating a target molecule, wherein the target molecule includes:
 - 10 - a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
 - a nucleic acid sequence for binding to a detection molecule;
 - a nucleic acid detecting agent for detecting the target molecule, wherein the nucleic acid detecting agent includes the detection molecule.
- 15 2. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 1, wherein the kit further includes a lysis agent for stabilizing nucleic acids in the biological sample.
- 20 3. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 1, wherein the target molecule is a RNA molecule.
- 25 4. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 1, wherein the nucleic acid replicating agent includes a first purified and isolated DNA molecule including:
 - a first DNA sequence for binding to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- a second DNA sequence encoding a promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- such that the first purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:
- a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
 - a DNA sequence encoding the promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- when the first purified and isolated DNA molecule binds to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus.
5. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 4, wherein the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID Nos.1, 2, or 3.
6. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic H5 virus as claimed in Claims 4 or 5, wherein the RNA polymerase is bacteriophage T7 RNA polymerase, and the second DNA sequence encodes the DNA sequence set forth in SEQ ID No.4.
7. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 4, wherein the nucleic acid replicating agent includes a second purified and isolated DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus; and
 - a second DNA sequence encoding a DNA sequence for binding to the detection molecule

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

such that the second purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:

- a DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus; and
- a DNA sequence encoding the DNA sequence for binding a detection molecule

when the second purified and isolated DNA molecule binds to a DNA molecule including a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus.

8. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 7, wherein
 - the H5 virus is non-pathogenic; and
 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, or 7.
9. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 7, wherein
 - the H5 virus is pathogenic; and
 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No. 9, 10, or 11.
10. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claims 7 to 9, wherein the second DNA sequence encodes the DNA sequence set forth in SEQ ID No.8.
11. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 4, wherein the nucleic acid replicating

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- agent includes a second purified and isolated DNA molecule consisting of a first DNA sequence encoding either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, 7, 9, 10, or 11.
- 5 12. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claim 1, wherein the nucleic acid detection agent further includes a purified and isolated DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of H5 virus for binding to the target molecule; and
 - 10 ▪ an immobilizer
- such that the target molecule is immobilized when bound to the purified and isolated DNA molecule.
13. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claims 12, wherein the first DNA sequence encodes any one of the DNA sequences set forth in SEQ ID Nos. 12, 13 or 14.
14. A kit for detecting non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus as claimed in Claims 12, wherein the detection molecule includes:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of H5 virus for binding to the target molecule; and
 - a signal generator
- 25 such that the detection molecule and the purified and isolated DNA molecule bind to different portion of the target molecule.
15. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- a first DNA sequence for binding to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and
 - a second DNA sequence encoding a promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- 5 such that the purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:
- a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
 - 10 - a DNA sequence encoding the promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- when the first purified and isolated DNA molecule binds to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus.
- 15 16. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule as claimed in Claim 15, wherein the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID Nos. 1, 2, or 3.
- 20 17. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule as claimed in Claim 15, wherein the RNA polymerase is bacteriophage T7 RNA polymerase, and the second DNA sequence encodes the DNA sequence sets forth in SEQ ID No. 4.
- 25 18. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus; and

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

- a second DNA sequence encoding a DNA sequence for binding to a detection molecule
- such that the purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:
- a DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic influenza A subtype H5 virus; and
 - a DNA sequence encoding the DNA sequence for binding a detection molecule
- when the purified and isolated DNA molecule binds to a DNA molecule including a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus.
- 15 19. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule as claimed in Claim 18, wherein
- the H5 virus is non-pathogenic; and
 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, or 7.
- 20 20. A purified and isolated DNA molecule as claimed in Claim 18, wherein
- the H5 virus is pathogenic; and
 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No. 9, 10, or 11.
- 25 21. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule as claimed in any one of Claims 18 to 20, wherein the second DNA sequence encodes the DNA sequence set forth in SEQ ID No.8.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

22. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule consisting of a first DNA sequence encoding either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, 7, 9, 10, or 11.
- 5 23. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus for binding to a target molecule, wherein the target molecule includes a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and
 - 10 - an immobilizer
- such that the target molecule is immobilized when bound to the purified and isolated DNA molecule.
- 15 24. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule as claimed in Claim 23, wherein the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID Nos. 12, 13 or 14.
- 20 25. A purified and isolated DNA molecule or the complementary DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus for binding to a target molecule, wherein the target molecule includes a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of influenza A subtype H5 virus; and
 - 25 - a signal generator

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

such that a signal is generated from the target molecule when the target molecule is bound to the purified and isolated DNA molecule.

26. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
5 the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample, wherein:
- the RNA molecule of H5 virus is isolated from the biological
sample by an isolating agent;
 - a target molecule is replicated by a nucleic acid replicating agent
10 including the first and the second purified and isolated DNA
molecules, wherein the target molecule includes:
 - a nucleic acid sequence complementary to at least a portion of
the RNA sequence of H5 virus; and
 - a nucleic acid sequence for binding to a detection molecule;
 - 15 - the target molecule is detected by a nucleic acid detecting agent,
wherein the nucleic acid detecting agent includes the detection
molecule.
27. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
20 the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein a lysis
agent for stabilizing nucleic acids is applied onto the biological sample
before isolating the RNA molecule of H5 virus.
28. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
25 the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the target
molecule is a RNA molecule.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

29. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the first purified and isolated DNA molecule includes:
- 5 - a first DNA sequence for binding to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
- a second DNA sequence encoding a promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- such that the first purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:
- 10 - a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus; and
- a DNA sequence encoding the promoter DNA sequence of a RNA polymerase
- 15 when the first purified and isolated DNA molecule binds to at least a portion of the RNA sequence of H5 virus.
30. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 29, wherein the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID Nos.1, 2, or 3.
- 20 31. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claims 29 or 30, wherein the RNA polymerase is bacteriophage T7 RNA polymerase, and the second DNA sequence encodes the DNA sequence set forth in SEQ ID No.4.
- 25

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

32. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the nucleic acid replicating agent includes a second purified and isolated DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus; and
 - a second DNA sequence encoding a DNA sequence for binding to the detection molecule
- such that the second purified and isolated DNA molecule extends in the presence of an enzyme and DNA nucleotides to generate a DNA sequence including:
- a DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus; and
 - a DNA sequence encoding the DNA sequence for binding a detection molecule
- when the second purified and isolated DNA molecule binds to a DNA molecule including a DNA sequence complementary to at least a portion of the RNA sequence of non-pathogenic or pathogenic H5 virus.
33. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 32, wherein
- the H5 virus is non-pathogenic; and
 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, or 7.

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

34. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 32, wherein
- the H5 virus is pathogenic; and
 - 5 - the first DNA sequence encodes either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No. 9, 10, or 11.
35. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in any one of Claims 32 to 34, wherein the second DNA sequence encodes the DNA sequence set forth in SEQ ID No.8.
36. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the nucleic acid replicating agent includes a second purified and isolated DNA molecule consisting of a first DNA sequence encoding either one of the DNA sequences set forth in SEQ ID No.5, 6, 7, 9, 10, or 11.
37. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5 virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the nucleic acid detection agent further includes a purified and isolated DNA molecule including:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA sequence of H5 virus for binding to the target molecule; and
 - an immobilizer

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

such that the target molecule is immobilized when bound to the purified and isolated DNA molecule.

38. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
5 the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample as claimed in Claim 37, wherein the first
DNA sequence encodes any one of the DNA sequences set forth in
SEQ ID Nos. 12, 13 or 14.
- 10 39. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample as claimed in Claim 26, wherein the
detection molecule includes:
- a first DNA sequence encoding at least a portion of the RNA
15 sequence of H5 virus for binding to the target molecule; and
 - a signal generator
- such that the detection molecule and the purified and isolated DNA
molecule bind to different portion of the target molecule.
- 20 40. The use of a first and a second purified and isolated DNA molecules in
the manufacture of a kit for the detection of influenza A subtype H5
virus in a biological sample as claimed in Claim 36, wherein target
molecules is replicated by the nucleic acid replicating agent including
the second purified and isolated DNA molecule as claimed in Claim 33
25 before replicated by the nucleic acid replicating agent including the
second purified and isolated DNA molecule as claimed in Claim 34.

1/5

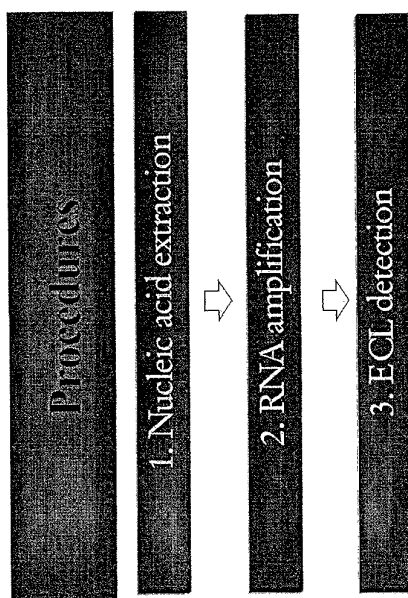


Figure 1

2/5

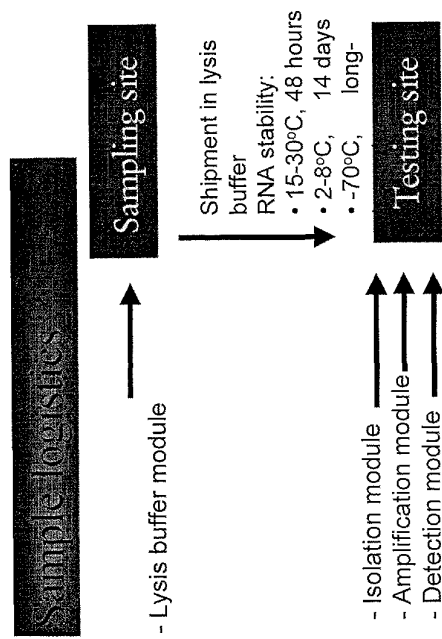


Figure 2

3/5

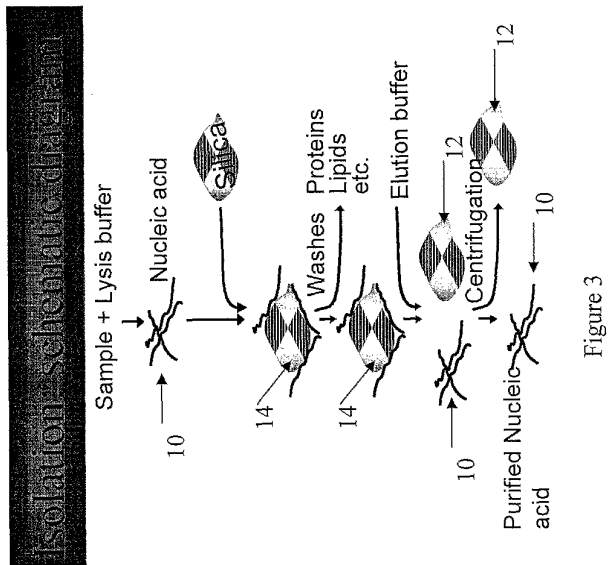
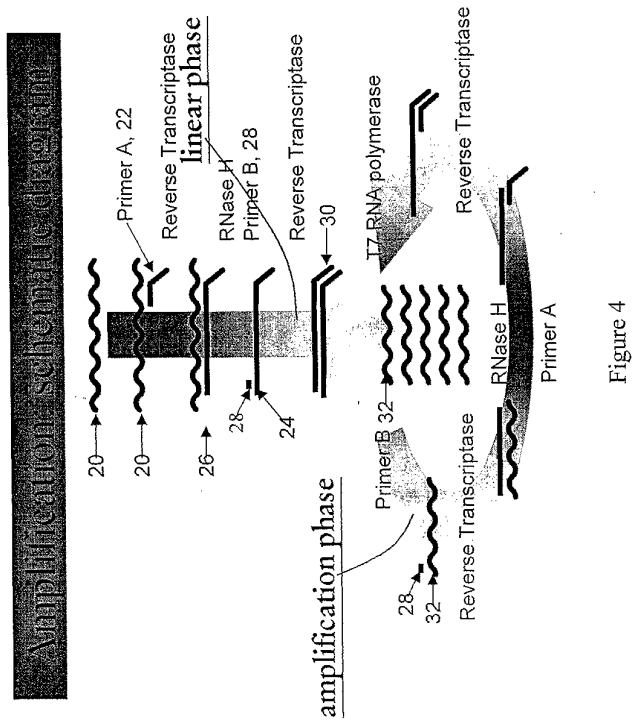


Figure 3

4/5



5/5

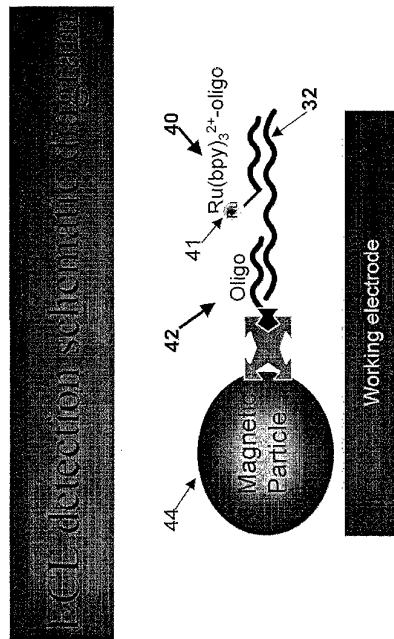


Figure 5

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

SEQUENCE LISTING

SEQ ID No. 1

5'-TCC CCT GCT CAT TGC TAT GGT GGT A-3'

SEQ ID No. 2

5'-GTA TCC ACT CCC CTG CTC ATT GCT ATG GTG GTA CCC ATA
CCA ACC ATC TAC CAT GCC CTG CCA TCC TCC CTC TAT AAA
ACC-3'

SEQ ID No. 3

5'-GTG GAT TCT TTG TCT GCA GCG TAT CCA CTC CCC TGC TCA
TTG CTA TGG TGG TAC CCA TAC CAA CCA TCT ACC ATG CCC
TGC CAT CCT CCC TCT ATA AAA CTG CTA TAG CTC CAA ATA
GTC-3'

SEQ ID No. 4

5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG G-3'

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

SEQ ID No. 5

5'-TGC CAT TCC ACA ACA TAC ACC CCC TCA-3'

SEQ ID No. 6

5'-ACT GCA ACA CCA AGT GTC AAA CTC CAA TGG GGG CGA TAA
ACT CTA GTA TGC CAT TCC ACA ACA TAC ACC CCC TCA CCA
TCG GGG AAT GCC CCA AAT-3'

SEQ ID No. 7

5'-AAG TGA ATT GGA ATA TGG TAA CTG CAA CAC CAA GTG TCA
AAC TCC AAT GGG GGC GAT AAA CTC TAG TAT GCC ATT CCA
CAA CAT ACA CCC CCT CAC CAT CGG GGA ATG CCC CAA ATA
TGT GAA ATC AAA CAG ATT A-3'

SEQ ID No. 8

5'-GAT GCA AGG TCG CAT ATG AG -3'

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

SEQ ID No. 9

5'-GAG AGA AGA AGA AAA AAG AGA GGA C -3'

SEQ ID No. 10

5'-TCA AAC AGA TTA GTT CTT GCG ACT GGA CTC AGA AAT ACC
CCT CAA AGG GAG AGA AGA AGA AAA AAG AGA GGA CTA TTT
GGA GCT ATA GCA GGT T-3'

SEQ ID No. 11

5'-AAT GCC CCA AAT ATG TGA AAT CAA ACA GAT TAG TTC TTG
CGA CTG GAC TCA GAA ATA CCC CTC AAA GGG AGA GAA GAA
GAA AAA AGA GAG GAC TAT TTG GAG CTA TAG CAG GTT TTA
TAG AGG GAG GAT GGC AG-3'

SEQ ID No. 12

5'-CTA TTT GGA GCT ATA GCA GGT T-3'

WO 02/29118

PCT/CN01/01458

SEQ ID No. 13

5'-GGA CTC AGA AAT ACC CCT CAA AGG GAG AGA AGA AGA
AAA AAG AGA GGA CTA TTT GGA GCT ATA GCA GGT TTT ATA
GAG GGA GGA TGG CAG G-3'

SEQ ID No. 14

5'-ACA GAT TAG TTC TTG CGA CTG GAC TCA GAA ATA CCC CTC
AAA GGG AGA GAA GAA GAA AAA AGA GAG GAC TAT TTG GAG
CTA TAG CAG GTT TTA TAG AGG GAG GAT GGC AGG GCA TGG
TAG ATG GTT GGT AT-3'

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN01/01458
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ⁷ : C12Q1/70 , C12Q1/68/(C12Q1/70,C12R1:93)		
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols) IPC ⁷ : C12Q1/70 , C12Q1/68/(C12Q1/70,C12R1:93)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched		
Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used) WPI,GenBank+EMBL+DDBJ+Swiss-Prot+PIR+PDB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	WO2000/17391 A1 , 2000-03-30 See the abstract.	1-18
A	WO96/40993 A1 ,1996-12-19 See the abstract.	1-18
A	WO95/20055 A1 ,1995-07-27 See the abstract.	1-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 November 2001 (19.11.01)	Date of mailing of the international search report 17 JAN 2002 (17.01.02)	
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-010-62019451	Authorized officer ZENG,Fanhui Telephone No. 62093733	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. PCT/CN01/01458
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO2000/17391 A1	2000-03-30	AU6194999 A	2000-04-10
WO96/40993 A1	1996-12-19	JP11506606T	1999-06-15
		US5660989 A	1997-08-26
		EP0832292 A1	1998-04-01
WO95/20055 A1	1995-07-27	EP0690929 A1	1996-01-10
		US5582978 A	1996-12-10
		JP8510920T	1996-11-19

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
 C 1 2 R 1:92) C 1 2 R 1:92

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ユ, アルバート チェウン ホイ
 香港, カオルーン, クリア ウォーター ベイ, クスト シニア スタッフ クォーター クスト
 , タワー 9, ルーム 5 ビー

(72) 発明者 ソ, カ - ルン
 香港, カオルーン, クリア ウォーター ベイ, クスト, デパートメント オブ バイオロジ

(72) 発明者 コ, ルン - サン
 香港, カオルーン, フ シャン エステート, フ シュン ハウス, ルーム 1 9 3 0

(72) 発明者 ラウ, ロク - ティン
 香港, ニュー テリトリーズ, ランタウ, トゥン チュン, ユ トゥン コート, ヘウン トゥン
 ハウス, ルーム 1 9 0 6

F ターム (参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA08 HA12
 4B063 QA01 QQ10 QQ52 QR08 QR14 QR32 QR41 QR42 QR56 QR62
 QS12 QS24 QS34

专利名称(译)	非致病性或致病性甲型流感病毒亚型H5病毒检测试剂盒		
公开(公告)号	JP2004509648A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002532686	申请日	2001-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	香港DeNA的超过晶片开发有限公司三通德		
申请(专利权)人(译)	香港DeNA的芯片上Rimitido		
[标]发明人	ユアルバートチェウンホイ ソカルン コルンサン ラウロクティン		
发明人	ユ,アルバート チェウン ホイ ソ,カ-ルン コ,ルン-サン ラウ,ロク-ティン		
IPC分类号	G01N33/53 C07H21/04 C12N15/09 C12Q C12Q1/68 C12Q1/70 C12R C12R1/92 C12R1/93 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/701 Y02P20/582		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/569.L C12R1/92		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS34		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	00106310.0 2000-10-05 CN		
其他公开文献	JP2004509648A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

目前用于检测H5亚型禽流感病毒的方法如细胞培养，血凝抑制，荧光抗体和酶免疫测定以及逆转录酶聚合酶链反应（RT-PCR）具有低灵敏度和低特异性它有缺点。而且，这样的方法相对困难并且不适合于例行的预定检测。本发明的用于检测H5病毒的试剂盒提供了对H5病毒相对更敏感和特异的易于使用的替代方法。该检测试剂盒利用两种专门设计的引物A和B用于H5病毒复制，并使用特异性捕获探针来固定扩增的病毒RNA。引物C也被设计用于检测致病性H5病毒。如果需要，检测试剂盒检测H5病毒在1天内完成。

(P2004-5098)
(43) 公表日
平成16年4月2日 (2004.

(51) Int. Cl.⁷
F I
テーマコード (参考)

C 12 N 15/09
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
G 01 N 33/569
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
G 01 N 33/569
C 12 Q 1/68
Z N A A
A
M
L
A
4 B 0 2 4
4 B 0 6 3

審査請求
未請求
予備審査請求
有
(全 75 頁)
最終頁に

(21) 出願番号
特願2002-532686 (P2002-532686)
(71) 出願人
503128744

(86) (22) 出願日
平成13年9月27日 (2001. 9. 27)
(74) 代理人
ホンコン ディーエヌエー チップス

(85) 翻訳文提出日
平成15年4月7日 (2003. 4. 7)
(74) 代理人
ミティド

(86) 国際出願番号
PCT/CN2001/001458
(74) 代理人
香港, カオルーン, ウィン イブ ス

(87) 国際公開番号
W02002/029118
(74) 代理人
ート 2, ル プラザ, エイティーン:

(87) 国際公開日
平成14年4月11日 (2002. 4. 11)
(74) 代理人
フロア, 1 8 0 5 - 6

(31) 優先権主張番号
00106310.0
(74) 代理人
100077517

(32) 優先日
平成12年10月5日 (2000. 10. 5)
(74) 代理人
弁理士 石田 敬

(33) 優先権主張国
中国 (CN)
(74) 代理人
100082624

(74) 代理人
弁理士 鶴田 準一

(74) 代理人
100082898

(74) 代理人
弁理士 西山 雅也

(74) 代理人
100081330

(74) 代理人
弁理士 樋口 外治