

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 539769

(P2002 - 539769A)

(43)公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
// G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		33/569	H
33/569		C 1 2 N 15/00	ZNA A
		審査請求 未請求 予備審査請求 (全 47数)	

(21)出願番号 特願2000 - 596175(P2000 - 596175)

(86)(22)出願日 平成12年1月28日(2000.1.28)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月25日(2001.7.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/00677

(87)国際公開番号 W000/44935

(87)国際公開日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(31)優先権主張番号 PA 1999 00114

(32)優先日 平成11年1月29日(1999.1.29)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(71)出願人 ババリアン・ノルディック・アクティーゼ
ルスカブ

BAVARIAN NORDIC A /
S

デンマーク国、ディー・ケー-1620 コペ
ンハーゲン、ベスタープロガーデ 149

(72)発明者 クレイン、ディーター

オーストリア国、エー - 3430 トウ-
ルン、モラズドルフ 50

(72)発明者 ギュンズブルグ、バルター

オーストリア国、エー - 2340 メード
リンク、ベイプレヒトガッセ 10

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重リアルタイムPCR

(57)【要約】

本発明は、プローブ結合部位が異なるバリエーションの核酸配列を検出、および定量するための、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法に関する。前記方法は、バリエーションの同じ領域を完全にまたは部分的に増幅することと、二以上のオリゴヌクレオチドプローブを同じPCR混合液に添加することに基づいており、各プローブは、少なくとも一つのバリエーションのプローブ結合部位に特異的である。前記方法は、たとえばサンプル中のウイルスロードを評価するために、ウイルス種間のサブグループ、サブタイプ、単離株、もしくはクレードを分類するために、または腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を評価するために適用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための多重リアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの同じ領域が完全にまたは部分的に増幅され、前記各バリエーションはプローブ結合部位内の一以上のヌクレオチドが異なり、前記方法は二以上のオリゴヌクレオチドプローブを同じPCR反応液に添加することを含み、その各プローブは少なくとも一つのバリエーションのプローブ結合部位に特異的である方法。

【請求項2】 請求項1に記載のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列はプライマー結合部位内のヌクレオチドが一以上異なっており、かつ一対以上のプライマー対を前記反応混合液に添加して、各プライマーは少なくとも一つのサブタイプのプライマー結合部位と特異的にアニーリングする方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載のリアルタイムPCR法であって、該領域の二以上の部分が増幅されて、該領域の各部分にはプローブ結合領域を一つだけしか含まない方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法であって、前記異なったプローブは異なった蛍光レポーター色素でラベルされる方法。

【請求項5】 請求項4に記載のリアルタイムPCR法であって、前記プローブは、FAMTMまたはVICTMでラベルされる方法。

【請求項6】 ウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項1～5のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項7】 レトロウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項6のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項8】 レンチウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項7のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項9】 ネコ免疫不全症ウイルス(FIV)の核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項8のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項10】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号3

および6に記載のプロープが反応混合液に添加される方法。

【請求項11】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号3および9に記載のプロープが反応混合液に添加される方法。

【請求項12】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号1および/または12に記載の順向きプライマー、並びに配列番号2に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項13】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号4、14および/または15に記載の順向きプライマー、並びに配列番号5および/または13に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項14】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号7、20および/または21に記載の順向きプライマー、並びに配列番号8に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項15】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号16に記載の順向きプライマー、並びに配列番号17および/または19に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項16】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号12および/または13に記載のプライマー、並びに請求項10に記載のプロープが反応混合液に添加される方法。

【請求項17】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号12および/または14に記載のプライマー、並びに請求項11に記載のプロープが反応混合液に添加される方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法であって、前記PCRは逆転写(RT)PCRである方法。

【請求項19】 請求項1～18のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列は、ある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列。

【請求項20】 ウイルスのバリエーションの核酸配列を含むサンプル全体のウイルスロード(load)を測定するための、請求項6～19のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法の使用。

【請求項21】 請求項20に記載のリアルタイムPCR法の使用であって、前記バリエーションは、ある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列に由来する使用。

【請求項22】 腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を調査するための、請求項20または21に記載のリアルタイムPCR法の使用。

【請求項23】 以下のプローブを含む群から選択される、リアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチド：

(a) 配列番号3、および/または配列番号6、および/または配列番号9、および/または、配列番号18に記載の核酸配列、

(b) それらの相補鎖、および/または

(c) 配列番号3、および/または配列番号6、および/または配列番号9、および/または、配列番号18に記載の核酸配列と少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列。

【請求項24】 以下のプライマーを含む群から選択される、リアルタイムPCR法に使用するためのプライマー：

(a) 配列番号1、2、4、5、7または、8または、10または、17または、19または21に記載のプライマー、

(b) 前記配列の一つと相補的なプライマー、および/または

(c) 前記プライマーの核酸配列と少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【請求項25】 以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号1および/または12に記載の、並びに配列番号2に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【請求項26】 以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号4、14、および/または15に記載の、並びに配列番号5、および/または13に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【請求項27】 以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号7、20、および/または21に記載の、並びに配列番号8に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【請求項28】 以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号16に記載の、並びに配列番号17、および/または19に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【請求項29】 リアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチドセットであって、請求項25～28のいずれか一項に記載のプライマーセットの群から選択されたプライマーセット、および請求項23に記載のプローブ群から選択されたプローブを含むオリゴヌクレオチドセット。

【請求項30】 請求項9に記載の方法に使用するための、請求項29に記載のオリゴヌクレオチドセット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、プローブ結合部位が異なるバリエーションの核酸配列を検出および定量するための、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法に関する。この方法は、バリエーションの同じ領域を完全にまたは部分的に増幅することと、二以上のオリゴヌクレオチドプローブを同じPCR混合液に添加することに基づいており、各プローブは、少なくとも一種のバリエーションのプローブ結合部位に特異的である。前記方法は、たとえばサンプル中のウイルスロードを見積もるために、ウイルス種間のサブグループ、サブタイプ、単離株、もしくはクレードを分類するために、または腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を評価するために適用することができる。

【0002】**【発明の背景】**

核酸配列の検出および定量は、幅広い実験および用途において重要とされる。核酸配列を検出および定量するためのいくつかの方法が、以前に報告されている。ほとんどの方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づくものである。PCRは、DNA断片の横に位置する既知配列を伸長して、DNA断片を増幅するために使用される。これらの既知のフランキング配列と結合する二つのオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼによって触媒される一連のインビトロ反応においてプライマーとして使用される。概して、これらのオリゴヌクレオチド配列は異なった配列を有し、（1）テンプレートDNAの反対鎖にあり、且つ（2）増幅されるDNA断片と側面を接する配列に対して相補的である。最初に、二つのオリゴヌクレオチドと4種のdNTPsがそれぞれ大過剰モル存在する条件下で加熱することによって、前記テンプレートDNAを変性させる。次に、オリゴヌクレオチドプライマーがその標的配列とアニールすることが可能な温度まで、前記混合液を冷却する。その後、アニールしたプライマーは、DNAポリメラーゼによって伸長される。その後、変性、アニーリング、およびDNA合成のサイクルが約10から50回繰り返される。一サイクル後の産物は、次のサイクルのテンプレートとして使用されるので、増

幅されたDNA断片の量は、理論的には各サイクルで二倍となり、100%のPCR効率を生じる。

【0003】

前記プライマーがDNAの相補的な領域とアニーリングすることによって、標的配列が特異的に増幅される。もし、前記プライマーの配列が標的DNAのアニーリング領域の配列と異なっていれば、PCRは失敗するであろう。従って、サンプル間でプライマー - アニーリング領域が異なっている標的配列を解析した場合、あるサンプルでは標的配列の増幅に失敗するか、または低効率となるであろう。従って、縮重プライマー、すなわちサンプル間で配列が異なる部位において非特異的なヌクレオチド類似体を有するプライマーがよく使用される。

【0004】

二以上の標的配列が、同一のPCR反応において同時に増幅される多重PCRを実施する場合、一以上のプライマー対をPCR反応液に添加して、各プライマー対が一つの標的配列を特異的に増幅することが可能である。

【0005】

PCRで使用される酵素はDNA特異的である。RNAテンプレートをPCRで増幅するならば、まずRNAを逆転写酵素によって相補DNA (cDNA) に転写しなければならない。その後、cDNAをPCRのテンプレートとして使用する。従って、RNAを増幅する方法は、逆転写 (RT) PCRと呼ばれる。

【0006】

PCRは、プライマーの横に接する配列のコピーを多数生じる。この配列が多数コピーされることで、PCR反応後に標的配列を検出すること、および定量することが可能となる。増幅産物の検出は、通常、ゲル電気泳動およびDNA染色によって実施される。ゲル電気泳動後のバンドの強度からでも、コピー数のわかっている基準と比較することにより、元のサンプル中の興味ある配列のコピー数を見積もることがたいがい可能である (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, p. 14.30)。

【0007】

従来のPCRは広く使用されている。しかし、この方法は、主に増幅産物をゲル

電気泳動で検出する点に関して、いくつかの欠点がある。ゲル電気泳動は、時間のかかる余分なサンプル操作が必要であり、サンプルを取り換えやすい。さらに、該検出方法の感度は低い。最後に、テンプレート配列のコピー数を定量するためには基準が必要であり、かつ多くの場合は困難である。

【0008】

つい最近、標的配列を検出および定量するための新しい技術が開発された。この方法は、上述された不便な点が見られない。前記方法は「リアルタイム」PCRと呼ばれる。ここで、PCR反応の際にPCRで産生されたDNAが、サイクルごとに検出される。DNAの量がより早く増加すれば、元のサンプル内には、より多くのテンプレート配列が存在する。十分な増幅産物が作られたとき、PCR産物を検出できる閾値にまで達する。従って、増幅と検出が同じチューブ内で同時に行われる。

【0009】

リアルタイムPCRに使用されるほとんどの装置は、PCR産物の量が増加した結果として生じる特定波長の蛍光の増大を検出する。たとえば、Applied Biosystems Prism 7700配列検出システムは、PCRと蛍光源である標的特異的なプローブのハイブリダイゼーションとの組合せに基づいている。前記プローブは、レポーター色素およびクエンチャー色素の両方が、それぞれ5'および3'末端に結合されたオリゴヌクレオチドである。両蛍光発色団がかなり近くに存在する限り、レポーター色素の蛍光は、効率的にクエンチャー色素によってクエンチされる。標的配列が存在すると、前記プローブは、順向きプライマーと逆向きプライマーの間にアニールする。PCRの増幅および該プライマーの伸長の際に、前記プローブはDNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によって切断される。このプローブの切断により、クエンチャー色素からレポーター色素が引き離され、レポーター色素のシグナルを検出することが可能となる。追加のレポーター色素分子が、各サイクルにおいてそのプローブからそれぞれ切り離されて、レポーター色素の蛍光強度を比例的に増加させ、またクエンチャー色素の蛍光強度を比例的に減少させる。前記装置のソフトウェアのアルゴリズムは、PCRの間、数秒ごとに一度、レポーター色素の発光とクエンチャー色素の発光を比較して、正規化されたレポーターシ

グナル R_n を生じる。正規化されたレポーターシグナルが定義された閾値を越えた最初のサイクルは、閾値サイクル C_T として定義される。 C_T 値はテンプレートのコピー数に比例し、定量に使用される(Heid, et al., Genome Reserch, 6: 986 ff)。リアルタイムPCRは、他の定量的PCR法と比較して、より高い定量精度、かつより広いダイナミックレンジを提供し、かつ操作が容易である。

【0010】

前記テンプレートがDNAではなくRNAならば、リアルタイム逆転写(RT)PCRが行われる。通常のPCRに記載されているように、実際のリアルタイムPCRを行う前に、まずRNAがcDNAに転写される。

【0011】

【発明の詳細な記載】

同じタイプのウイルスが感染した動物に由来するサンプルのウイルスロードを測定するために、リアルタイムPCRを実施した。リアルタイムPCRによってウイルスの核酸配列を検出して定量した後、ウイルスロードを見積もった。サンプル間には、かなりの変動が見出された。あるサンプルでは、見積もられた標的配列のコピー数が非常に少ないか、または標的配列が全く検出されなかった。予想外なことに、見積もられたウイルスロードは、前記サンプルを調製したこれらの動物における疾患の重篤さと関連はなかった。リアルタイムPCRの結果を確かめるために、増幅したDNAをゲルで電気泳動した後に染色する従来のPCRを行った。この方法は、リアルタイムPCR法と比較して感度はよくないが、以外にも、解析した全てのサンプルにおいて増幅産物が検出された。すなわち、リアルタイムPCRでは検出されなかったウイルス配列のサンプルでさえ、従来のPCRでは陽性の結果が得られた。

【0012】

さらなる研究によって、サンプルを採取した動物は、同じウイルスの様々なサブタイプに感染していることが示された。前記サブタイプは、ウイルスのバリエーションの核酸配列によって特徴づけられた。外見上、特定のウイルスサブタイプに存在する核酸配列バリエーションのいくつかのは、リアルタイムPCRでは検出されなかった。

【0013】

従って、バリエーションの核酸配列を検出、および/または定量するためのリアルタイムPCR法を提供することが、本発明の目的であった。

【0014】

本発明の根底にある問題は、プローブ結合部位内のヌクレオチドに変異を有するバリエーションの核酸配列の同一領域を完全にまたは部分的に増幅することと、二以上のオリゴヌクレオチドプローブ（各プローブは少なくとも一つのプローブ結合部位に特異的である。）を同じPCR混合液に添加することによって解決される。前記バリエーションの核酸配列は、たとえば、ファミリーのサブタイプ、属、および種などの系統発生的に関連した生物群において、異なったサブタイプに見出される。本発明による方法で解析されるバリエーションは、好ましくはクレード、単離株、品種など、種のサブタイプに由来する。バリエーションの核酸配列は、50~70%、好ましくは70~90%、および最も好ましくは90~99%のヌクレオチドが一致する可能性がある。

【0015】

異なったサブタイプの核酸配列は、プローブ結合部位だけでなくプライマー結合部位においても異なっているだろう。この場合、プライマーはプライマー結合部位にアニールできずに、PCRは失敗に終わるのである。従って、本発明の好ましい態様によれば、一以上のプライマー対（それぞれのプライマーが少なくとも一つのサブタイプの核酸配列と特異的にアニールする）が反応混合液に添加される（多重リアルタイムPCR）。

【0016】

本発明による方法で使用されるプライマーおよびプローブは、少なくとも一種のバリエーションの核酸配列の核酸配列と、少なくとも60~80%、好ましくは80~90%、最も好ましくは90~100%の相同性を有するべきである。

【0017】

前記の完全にまたは部分的に増幅された領域には、二以上のプローブ結合部位が含まれる。このような場合に、完全な領域が増幅されれば、前記増幅産物は二以上のプローブ結合部位を有し、二以上のプローブが増幅産物にアニールするで

あろう。これにより、たとえば異なったプローブがアニールし、レポーターおよびクエンチャー色素間の相互作用を引き起こして、定量に影響を及ぼすであろう。従って、本発明の好ましい態様によれば、各バリエーションの前記領域において二以上の部分が増幅され、前記領域の各部分にはプローブ結合部位を一つだけ含む。

【0018】

前記領域の核酸配列において二以上の部分が増幅されたときには、一つのバリエーションに特異的なプライマー対とプローブを選択すればよい。この場合、特定のプローブの蛍光シグナルは、特定のバリエーションに特徴的であろう。

【0019】

前記プローブは、3-プライム末端がクエンチャー色素でラベルされ、かつ5-プライム末端がレポーター色素でラベルされている。本発明の好ましい態様に従えば、異なったプローブを同じクエンチャー色素でラベルするが、異なったレポーター色素ではラベルしない。その場合、前記異なった増幅産物を区別することができる。如何なるレポーター色素でもプローブに付着させることができる。しかし、好ましくはFAMTM又はVICTMが、レポーター色素として使用される。

【0020】

種々のレポーター色素を使用して、増幅産物間の違いをサブタイプの分類に利用してもよい。まず、発明者等は、単一リアルタイムPCRによる分類を試みた。この場合、一对のプライマーと一種類のプローブを反応混合液に添加する。前記プライマー対とプローブは一種類のサブタイプに特異的であるものが選択される。もし、この特定のサブタイプがサンプル中に存在すれば、その場合にのみ、PCR産物が検出されるはずである。しかし、ある場合には、非特異的な増幅および/または検出が観測されて、サブタイプの分類を誤ってしまう結果となる。次に、発明者等は、本発明による多重リアルタイムPCRを使用して分類した。PCR混合液に、いくつかのサブタイプの特異的なプライマーおよびプローブを添加した。前記異なったプローブは、異なったレポーター色素でラベルした。この場合、それぞれのプローブの蛍光シグナルが検出されたとき、特定のサブタイプが同定される。この多重リアルタイムPCR法を使用することにより、全てのサブタイプを

正確に分類できるであろう。従って、本発明の好ましい態様によれば、サブタイプの分類をするために、サブタイプ特異的なプライマーとプローブを用いた多重リアルタイムPCRが実施される。このとき前記プローブは、異なったレポーター色素でラベルされる。

【0021】

本発明は、レンチウイルスによって引き起こされる病気など、ウイルス性疾患の研究に使用してもよい。レンチウイルスは、免疫欠損症および悪性疾患に関与している。腫瘍形成に関与するメカニズムは、未だ完全に理解されていないが、腫瘍形成とウイルスロードの間に関連性があると疑われている。フェリーニ免疫欠損症ウイルス(FIV)に感染したネコは、腫瘍、特にリンパ腫を形成することが極めて多いので、FIVに感染したネコは、腫瘍の病原論におけるウイルスロードの役割のモデルとなる。従って、本発明の好ましい態様において、前記リアルタイムPCRは、とりわけレンチウイルス、特にFIVの種々のサブタイプの核酸配列を検出/または定量するために使用される。

【0022】

レンチウイルスはレトロウイルスであるので、前記ウイルス粒子に存在するゲノムの核酸配列はRNAからなる。レトロウイルスのライフサイクルに従って、前記RNAゲノムは宿主細胞に感染した後、DNAに転写される。次に、転写されたレトロウイルスDNAは、宿主細胞のゲノムに組み込まれて、いわゆるプロウイルスを形成するのである。すでに組み込まれたウイルスゲノムを増幅することによって解析するのであれば、リアルタイムPCRを行う前の逆転写を必要としない。しかし、ウイルス粒子を解析するのであれば、逆転写(RT)リアルタイムPCRが実施される。

【0023】

既知および未知のバリエーションのウイルス核酸配列を含むFIV単離株を、FIV特異的リアルタイムPCRで解析した。したがって、本発明は、FIVに由来するバリエーションの核酸配列を検出および/または定量するためのオリゴヌクレオチドプローブ、並びにプライマー対をも提供する。好ましくは、配列番号1~21に記載のプローブとプライマー対が提供される。FIVのクレードBを検出および/または定量す

るためには、配列番号7～9に記載のオリゴヌクレオチドがとりわけ使用されるが、FIVのクレードAを検出および/または定量するためには、配列番号1～3に記載のプライマーとプローブがとりわけ使用される。好ましくは、両オリゴヌクレオチドセットは、多重リアルタイムPCRにおいて同時に使用される。従って、二つのオリゴヌクレオチドセットを使用した方法が提供され、サンプル中のFIVのクレードAとBを区別することが可能である。とりわけ、未知のFIV単離株を含むFIVサンプルを解析する場合、配列番号3、6または9に記載のプローブを、配列番号1、2、4、5、7、または8に記載のものと異なったプライマーと組み合わせてもよい。本発明の一つの態様において、配列番号1に記載の順向きプライマーは、配列番号12に記載のプライマーによって置換される。配列番号6に記載のプローブは、配列番号4、14または15に記載の順向きプライマー、および配列番号5または13に記載の逆向きプライマーと組み合わせ使用してもよい。配列番号9に記載のプローブは、配列番号7、20または21に記載の順向きプライマー、および配列番号8に記載の逆向きプライマーと組み合わせ使用してもよい。さらに、配列番号18に記載のプローブ、配列番号16に記載の順向きプライマー、および配列番号17または19に記載の逆向きプライマーを含むオリゴヌクレオチドセットが提供される。

【0024】

配列番号1～21に記載の配列を有するプライマーとプローブ、並びに配列番号1～21に記載の配列と少なくとも70%のホモロジーを有するプライマーおよびプローブは、一般的に、FIV特異的な配列を増幅するために使用してもよい。さらに、リアルタイムPCRの代わりに通常のPCRを行う場合、前記プライマー対には、前記プローブを適用しなくても可能である。

【0025】

要約すると、本発明は、高い信頼性と再現性を持った様々な核酸配列を検出および定量するための方法である。

【0026】

【表の簡単な説明】

表1：四種の異なったFIV単離株におけるPCR効率、および対応するPCR産物の配

列を列挙した。前記順向きプライマーと比較して、前記プローブおよび前記逆向きプライマーは相補鎖に結合するという事実にも関わらず、この表に与えられた配列は、常に同一鎖に由来する。プライマーおよびプローブの正確な配列(5'-3'向き)を上記した。

【0027】

表2：リアルタイムPCRの結果と、四種の単離株に由来するPCR産物のプローブ結合部位における配列の比較。表中の核酸配列は、使用したプローブの配列と相補的である。(nd)は未測定。

【0028】

表3：30種の未知FIV単離株の増幅結果。単離株のサブタイプをリアルタイムPCRの結果に従って同定した。：(+)PCR産物がこのアッセイで検出された。；(-)このアッセイを使用して、PCR産物は検出されなかった。；(*)サブタイプは、多重リアルタイムPCRによってのみ検出することができる。

【0029】

【発明の概要】

核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための多重リアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの同じ領域が完全にまたは部分的に増幅され、前記各バリエーションはプローブ結合部位内の一以上のヌクレオチドが異なり、前記方法は二以上のオリゴヌクレオチドプローブを同じPCR反応液に添加することを含み、その各プローブは少なくとも一つのバリエーションのプローブ結合部位に特異的である方法。

【0030】

上記のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列はプライマー結合部位内の一以上のヌクレオチドが異なり、かつ二以上のプライマー対を前記反応混合液に添加し、各プライマーは少なくとも一つのサブタイプのプライマー結合部位と特異的にアニーリングする方法。

【0031】

上記のリアルタイムPCR法であって、各バリエーションにおいて該領域の二以上の部分が増幅され、該領域の各部分にはプローブ結合領域を一つだけしか含まない

方法。

【0032】

上記のリアルタイムPCR法であって、前記異なったプローブは異なった蛍光レポーター色素でラベルされる方法。

【0033】

上記のリアルタイムPCR法であって、前記プローブは、FAMTMまたはVICTMでラベルされる方法。

【0034】

ウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、上記のリアルタイムPCR法。

【0035】

レトロウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、上記のリアルタイムPCR法。

【0036】

レンチウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、上記のリアルタイムPCR法。

【0037】

ネコ免疫不全症ウイルス(FIV)の核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、上記のリアルタイムPCR法。

【0038】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号3および6に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【0039】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号3および9に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【0040】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号1および/または12に記載の順向きプライマー、並びに配列番号2に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【0041】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号4、14および/または15に記載の順向きプライマー、並びに配列番号5および/または13に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【0042】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号7、20および/または21に記載の順向きプライマー、並びに配列番号8に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【0043】

上記のリアルタイムPCR法であって、配列番号16に記載の順向きプライマー、並びに配列番号17および/または19に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【0044】

上記のリアルタイムPCR法であって、上記列挙されたプライマーおよびプローブが反応混合液に添加される方法。

【0045】

上記のリアルタイムPCR法であって、前記PCRは逆転写(RT)PCRである方法。

【0046】

上記のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列は、ある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列。

【0047】

ウイルスのバリエーションの核酸配列を含むサンプル全体のウイルスロードを測定するための、上記のリアルタイムPCR法の使用。

【0048】

上記のリアルタイムPCR法の使用であって、前記バリエーションはある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列に由来する使用。

【0049】

腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を調査するための、上記リアルタイムPCR法の使用。

【0050】

以下のプローブを含む群から選択される、リアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチド：

(a) 配列番号3、および/または配列番号6、および/または配列番号9、および/または、配列番号18、

(b) それらの相補鎖、および/または

(c) 配列番号3、および/または配列番号6、および/または配列番号9、および/または、配列番号18に記載の核酸配列と少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列。

【0051】

以下のプライマーを含む群から選択される、リアルタイムPCR法に使用するためのプライマー：

(a) 配列番号1、2、4、5、7または、8または、10または、17または、17または、19または21、

(b) 前記配列の一つと相補的なプライマー、および/または

(c) 前記プライマーの核酸配列と少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列。

【0052】

以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号1および/または12に記載の、および配列番号2に記載のプライマー、

(b) (a) に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a) に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【0053】

以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号4、14、および/または15に記載の、および配列番号5、および

/または13に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【0054】

以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号7、20、および/または21に記載の、および配列番号8に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【0055】

以下のプライマーセットを含む群から選択されるプライマーセット：

(a) 配列番号16に記載の、および配列番号17、および/または19に記載のプライマー、

(b) (a)に記載の一以上のプライマーと相補的な核酸配列のプライマー、

(c) (a)に記載のプライマーと少なくとも約70%のホモロジーを有する核酸配列のプライマー。

【0056】

リアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチドセットであって、上記のプライマーセット群から選択されたプライマーセット、および上記のプロープ群から選択されたプロープを含むオリゴヌクレオチドセット。

【0057】

上記の方法に使用するための、上記のオリゴヌクレオチドセット。

【0058】

【実施例】

プロウイルスDNAの検出

以下の実施例は本発明をさらに例示するものである。提供された実施例は、如何なる意味においても、本発明によって提供される技術の応用が本実施例に限定

されるようには解釈され得ないことを、当業者は十分に理解するであろう。

【0059】

最近、ABI770システム (Perkin Elmer, Foster City, California) に基づいたFIVプロウイルスおよびウイルスロードを定量するための方法が確立され、確認された (Leutenegger et al. J Virol Methods 1999, 78(1):105-116)。この方法では、Taqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により、ラベルされたプローブが開裂し、結果としてレポーター蛍光色素の遊離が可能となる。レポーター蛍光色素は、アルゴンレーザーで励起して光の放射を導くことができる。放出された蛍光量は、PCRの際に産生されたDNA量に比例する。この蛍光量は、PCRの際に一定の間隔で測定され、リアルタイムな方法でPCRをモニターすることを可能にする。本方法は、唯一の単離株を使用する場合は、ウイルスロードの測定に非常に有用であることが示されている (たとえば、単離株が既知であり、最適化されたプライマーとプローブが使用可能なワクチン接種試験のチャレンジ実験において)。しかし、異なった単離株のウイルスロードを比較すべきときには直ちに、当該異なった単離株におけるPCR効率の同等性を確認しなければならない。以下の実施例では、プライマーおよびプローブの結合部位における変異の影響、並びにウイルスロード測定に対する影響を解析する。腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を測定するための基礎として、異なった単離株に感染した患者のウイルスロードを見積もることが可能なリアルタイムPCRシステムを確立した。

【0060】

1 FIV配列を解析するための、リアルタイムPCRの条件およびパラメーター

まず、リアルタイムPCRによってFIV配列を増幅するための条件を確立して、評価した。FIVのgag遺伝子を増幅並びに検出するためのプライマー、およびプローブを設計した。FIV単離株の対応する領域を含むプラスミドを使用して、テンプレートのコピー数が直線的に定量できる範囲を見積もった。PCR効率は、このプラスミドおよびゲノム標準で見積もった。

【0061】

1.1 リアルタイムPCRプライマー、プローブ、およびサイクリングの条件

リアルタイムPCRのために、以後に記載されたプライマーおよびプローブ配列

は、Primer Express software (Perkin Elmer, Foster City, California)を使用して設計した。全てのオリゴヌクレオチドは、高速液体クロマトグラフィーによって精製し、およびPerkin Elmer (Weiterstadt, Germany)から購入した。

【0062】

三種の異なったリアルタイムPCRアッセイ (FIV1010p/v、FIV1416p、およびFIV1372p)を開発した。FIV1010pアッセイでは、使用したPCRプライマーは、FIV0771f (5'-AGA ACC TGG TGA TAT ACC AGA GAC-3')、およびFIV1081r (5'-TTG GGT CAA GTG CTA CAT ATT G-3')である。前記プライマーは、クレードA FIV単離株の配列と100%相同的に設計した。この単離株には、他の系統間のPetaluma(Gene bank 登録番号M25381)、San Diego PPR(M36968)、Zurich1(X57002)、Utrecht113(X68019)単離株を含む。効率的に増幅するためには、増幅する断片のサイズは350bpよりも小さく、もし可能なら、100bpより小さくするべきであることも考慮した。

【0063】

単一PCRのために、前記プローブは5'末端をレポーターフルオロクロムとして機能するフルオロクロムFAM (6 - カルボキシ - フルオレセイン) で、3'末端をクエンチャーとして機能するフルオロクロムTAMRA (6 - カルボキシ - テトラメチル - ローダミン) でラベルした。多重PCRにおいては、同じプローブをレポーターフルオロクロムVICでラベルして、異なったPCR系のシグナル間を区別した。

【0064】

前記プローブはいくつかの基準に基づいて設計した。: (i) 前記プライマーの融点より8-10 高いことと、(ii) 前記プローブの5'末端はGではないことと、(iii) 四以上のヌクレオチドが一致しないこと、特にGが一致しないことと、(iv) セルフアニーリングしないことと、(v) 対応するプライマーと予想されるダイマー形成をしないことである。さらに、前記プローブは、増幅の際の伸長を妨げるために、3'末端がブロックされている。前記プローブは、種々のFIV単離株の配列と、少なくとも80%、しかし好ましくは95~100%の類似性を有した。標準的なアッセイ条件を確立するために使用したプローブは、FIV1010p/v (5'-FAM/VIC-TAT GCC YGY GGA GGG CCT TCC T TAMRA-3')であった。

【0065】

FIV1010pアッセイにおける記載と同じ考えに基づいて、二種類の他のアッセイが設計された。FIV1416pアッセイは、クレードA単離株Glasgow8 (Hosie, M.J., Jarrett, O. AIDS 1990, 4, 215-220) および西ドイツまたはオーストラリア由来のいくつかの単離株に特異的である。前記システムはプライマーFIV1360f (5'-GCA GAA GCA AGA TTT GCA CCA-3') とプライマーFIV1437r (5'-FAM-TGC CTC AA G ATA CCA TGC TCT ACA CTG CA-TAMRA-3')、およびプローブFIV1416p (5'-FAM-TGCCTC AAG ATA CCA TGC TCT ACA CTG CA-TAMRA-3') からなる。FIV1372pアッセイはクレードB FIV単離株Italy-M2(Y13867)、Italy-M3(Y13866)、Italy-M8(Z96111)、Amori-1 (D37823)、Amori-2 (D37824)、Sendai-2(D37821)、Yokohama(D37819)、および、局地的なサブタイプB様の単離株と100%のホモロジーであるように設計された。前記システムは、プライマーFIV1280f(5'-ATC CTC CYG ATG GG C CTA GAC-3')とFIV1426r (5'-ACT TTC CTA ATG CTT CAA GGT ACC A-3') およびプローブFIV1372p(5'-TTT GCA CCA GCC AGA ATG CAG TGT AG-3')からなる。

【0066】

標的配列は、以下のPCR条件を使用して25 μ lの反応液量で増幅した。10mM Tris(pH8.3), 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 200nM dATP, dCTP, dGTP, 400nM dUTP, 300nMのプライマー、200nMの蛍光源プローブ、および2.5ユニットのTaqDNAポリメラーゼを使用した。最初の変性(95 で2分)後、95 で15秒、60 で60秒を含む各サイクルを45回行った。多重PCRには、同じ反応条件を適用した。

【0067】

1.2 DNAの調製

FIV Zurich 2単離株の構築物(プラスミド、pBSCompZ2[Allenspach, et al., Schweiz Arch Tierheilkd 1996, 138, 87-92])は、リアルタイムPCRがリニアである範囲を測定するためのコントロールとして使用した。前記プラスミドを大腸菌細胞内で増殖させて、Quiagen Plasmid Kit を使用して製造者の説明書に従って抽出した(Qiagen, Hilden, Germany)。プラスミドのコピー数は、260nmの吸収から見積もった。キャリアーとして30 μ g/mlのウシ胸腺DNAを含む、PCRグレードの水で10倍希釈の調製を行った。

【0068】

ゲノムDNA標準は、細胞のゲノムDNAに組み込まれたインビボの状態をまねして以前に開発した。CrFK細胞[Crandell, et al., In Vitro 1973, 9, 176-185]由来のDNAには、様々なFIV単離株を安定的に感染させた(Petaluma[Pedersen, et al., Science 1987, 235, 790-793], Glasgow 8[Hosie & Jarrett, Aids 1990, 4, 215-220], Amsterdam 6[Siebelink, et al., Vet Immunol Immunopathol 1995, 46, 61-69], Utrecht 113[Verschoor, et al., J Clin Microbiol 1993, 31, 2350-2355])をQIAamp Kit (Qiagen, Hilden Germany) を使用して製造者の説明書に従って抽出した。DNA濃度は、260nmのODを測定することによって見積もり、30 µg/mlの細胞DNAを含むPCRグレードの水で一連の10倍希釈を行った。

【0069】

プロウイルスロードを研究する場合には、DNAを末梢血白血球から抽出した。あるいは、感染させたCrFK細胞からDNAを抽出するためには、上に記載のように行った。

【0070】

1.3 テンプレートコピー数の計測

配列検出ソフトウェアのアルゴリズムでは、PCR増幅の際、数秒毎に一回クエンチャー色素の発光(Q)とレポーター色素の発光量(R)を比較して、正規化されたレポーターシグナル R_n を生じる。この値はレポーター色素の蛍光シグナル(クエンチャーシグナルの蛍光シグナルにより隔離されている)から、PCRの最初の数サイクル(この時、切断されたプローブは通常検出することができない)で確定したベースラインシグナルを引いた値である。 R_n 値をPCRサイクルの関数としてプロットした。定義された閾値を越えた最初のサイクルは、閾値サイクル C_T として定義される(通常バックグラウンド蛍光の標準偏差の十倍)。テンプレート濃度がある範囲内であると、前記 C_T 値は反応の最初に存在しているテンプレートのコピー数に比例して、かつテンプレートの定量において最初の機会を反映する(Heid et al., 1996, Genome Research, 6, p.986ff)。

【0071】

1.4 コントロールDNAの定量精度

プラスミドpBSCompZ2の希釈を上記のように行い、各希釈サンプルのためにFIV1010pアッセイを使用して、三回の独立したリアルタイムPCRで濃度を見積もった。C_T値の標準偏差が0.13~2.99%の範囲で小さいことが示されたので、Rnを使用した最初のコピー数の計算には、高い再現性がある。テンプレートコピー数が減少すると、サイクル数が増加して標準偏差が大きくなる。従って、測定の精度が悪化する。

【0072】

上記PCR条件を使用した、九つのログユニット(5×10⁰~5×10⁹コピー)において、C_Tと標準テンプレート濃度の間にリニアな相関が達成された。閾値のサイクル数における標準偏差の百分率として定義される相関係数は、0.9977である。この高い相関係数が、PCR効率の計測には必要条件である。前記結果より、本方法は、幅広いテンプレート濃度で非常に正確であることが確かめられる。

【0073】

2.4 PCR効率の計測

前記PCR効率を、前記PCR条件を測定するために使用できる。もしPCR効率が100%であれば、標的配列の濃度が各サイクルで2倍となるはずである。しかし、通常、PCR効率(E)は100%よりも少なく、最初のコピー数から、nサイクル後に増幅されたPCR産物(Y)の量は、以下の式 $Y=Zx(1+E)^n$ または対数変換後では $\log Y= \log Z+nx\log(1+E)$ に従って計測できる。PCR効率Eは、C_T値は希釈系において、コピー数の対数に対してプロットした標準曲線の傾きから計測できる。今では、PCR効率は $E=10^{1/s}-1$ として記載できる。sは直線の傾きを示す。

【0074】

FIVプラスミドの10倍希釈の調製は、上記のように行った。FIV1010pアッセイを使用したリアルタイムPCRを各希釈液で行って、標準曲線を得た。標準曲線の傾きから、PCR効率は0.9815と計測された。

【0075】

さらに、CrFK細胞から得られたゲノム標準のPCR効率を、上記のように計測した。リアルタイムPCRを行って、PCR効率を計測した。PCR効率は、0.9742と0.8711

の間で変化した。PCR効率の最大値 (FIV Petalumaが感染したCrFK細胞において、0.9742) は、プラスミド希釈系のPCR効率とほぼ同じであった。

【0076】

全ての構築物において、相関係数が0.99より大きかったことは、PCR効率を比較可能であることを示している。前記結果は、選択したPCR条件がFIV断片の効率的増幅に適していることを示す。

【0077】

2.5 ミスマッチのPCR効率に対する影響

もし異なったサンプルのPCR効率が似ているならば、すなわち、反応条件が特定のテンプレートの増幅に適している場合、ウイルスロードは異なったサンプル間でしか比較できない。特定のウイルスサブタイプを成体にチャレンジする予防接種試験において、この特定ウイルスサブタイプにPCR条件を最適化して、同じ単離株に感染した患者間のデータを比較することが可能となり得る。自然に感染した患者 (核酸配列の異なる多くのウイルスが存在し得る) で行うためには、同様の精度が必要である。PCR効率に対するミスマッチの影響を調査するために、FIVモデルを選択した。

【0078】

2.5.1

プライマーFIV566f(5'-ACC TTC AAG CCA GGA GAT TC-3')およびFIV2167r(5'-CCT CCT CCT ACT CCA ATC AT-3')を使用して、特徴づけられたFIV単離株 (Petaluma, Glasgow 8, Amsterdam 6 およびUtrecht113) の完全なgag遺伝子 (1.6kB) を増幅して、かつシーケンスした。さらに、分類されていない単離株 (Munich 3, 4, 6, および7) のFIVgag遺伝子の311bp領域を、FIV1010pアッセイと同じプライマーで増幅してシーケンスした。使用したプライマーはFIV0771f(5'-AGA ACC TGG TGA TAT ACC AGA GAC-3')および(5'-TTG GGT CAA GTG CTA CAT ATT G-3')である。

【0079】

従来のPCRは、9600サーマルサイクラー (Perkin Elmer, Foster City, California) で行った。PCR反応液には、10mM Tris(pH8.3), 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 20

0nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 300nMの各プライマー、および2.5ユニットのTaqDNAポリメラーゼを含んでいた。増幅は、95 で3分、51 で60秒、および72 で3分を1サイクルの後、94 で15秒、51 で40秒、および72 で90秒を39サイクル行った。PCR産物を0.8%のアガロースゲルで分離して、Eagle Eye system(Stratagene, Heidelberg, Germany)で臭化エチジウム染色した後に可視化した。適切なバンドを単離して、QIAamp gel extraction Kit(Qiagen, Heiden Germany)を使用して製造者の説明書に従ってDNAを精製した。約20-50ngのPCR産物を次のシーケンス反応混合液に使用した。混合液は、4 μ l BigDye premix(Perkin Elmer, Foster City, California)、4pmolのプライマーFIV0771f、および水を総量10 μ lに含む。9600サーモサイクラー(Perkin Elmer, Foster City, California)で以下のプログラムを使用してサイクルを行った。: 96 で30秒、50 で10秒、60度で4分を30サイクル。シーケンス反応液は、製造者の説明書に従って精製した。シーケンス解析は、ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Foster City, California)。

【0080】

2.5.2 シーケンスデータと標準単離株のリアルタイムPCR - 効率の比較

シーケンスと平行して、上記のようにFIV1010pアッセイを使用したリアルタイムPCRにより4種の単離株を増幅した。シーケンスデータおよび対応するPCRの効率を表1に列挙する。四種の単離株のいずれにおいても、順向きプライマー(FIV0771f)の領域に変異は見出されなかった。プローブFIV1010pがアニールする領域には、一つだけ変異が見出された。Amsterdam 6単離株の配列[Siebeling et al., Vet Immunol Immunopathol 1995, 46, 61-69]を、FIV Petaluma の配列(Genbank登録番号M25381)と比較した場合、1020bpにおいてTからCへの変異が見出された。逆向きプライマーFIV1081rの領域には、一つの点変異が見出された。Glasgow 8単離株において、1071部位にAからTの変異が検出された。これが、二番目に低いPCR効率0.9284と関連していた。要約すると、四種類の標準単離株において二種の点変異が見出され、これがPCR効率を減少させた。

【0081】

2.5.3 シーケンスデータとフィールド単離株のPCR効率の比較

自然に感染した10匹のネコにおいて、リアルタイムPCR系でFIV単離株の解析を行った。前記ネコは、北ドイツおよびオーストリアから選択した。この地域は、外来のFIV集団を含むことが以前に示されていた。その地域では、三種の異なったサブタイプに由来し、およびいくつか他の遺伝的アウトライナーに由来する単離株が発見された[Bachmann, M. H., et al., J Virol 1997, 71, pp.4241ff]。

【0082】

未知のFIV単離株に感染した10匹のテストされたネコのうち、5匹がリアルタイムPCRアッセイで陽性であった(表2)。しかし、PCR産物をアガロースゲル電気泳動で解析した場合、リアルタイムPCRに陰性であった5匹のネコのうち2匹(Munich3および4)が、陽性であった。シーケンスにより、FIV単離株Munich3および4の二種類の配列は、プローブ結合部位に、それぞれ三個および四個の変異があり、すでに公表された配列と異なっていることが示された。ミスマッチは前記プローブ部位に位置する。この部位は、前記プローブがTaqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によって切断される前には、Taqポリメラーゼによる置換がなされておらず、かつプローブ結合に応答可能である。前記増幅が失敗したのは、結合能の欠失、または適切な切断前にプローブが置換することのいずれによっても説明することができる。

【0083】

逆に、従来のPCRおよびリアルタイムPCRにおいて陽性であった二種の単離株のプローブ結合部位には、全く変異が見出されなかった(表2)。プラスミド標準において見られたものと同様に、リアルタイムPCRの曲線が、蛍光シグナルの指数関数的な増加を示したことから、これら二種のサンプルではPCR効率が高いことを示される。結論として、プローブ結合部位の変化は、明らかにPCR効率を減少するか、またはPCRを失敗させる結果となる。

【0084】

6 多重リアルタイムPCRによる様々なFIVクレードの検出

本発明に従って、FIVに感染したネコのサンプルにおけるプロウイルスロードを研究した。一以上のプライマー対およびプローブを使用することで、多数のウイルス株の検出と、サブタイプ間の区別が可能となることが示された。

【0085】

未知のサブタイプのFIV単離株は、上に記載された条件を使用して解析した。三種の単一リアルタイムPCRを行った。：FIV単離株クレードAに特異的なFIV1010v、およびFIV1416pアッセイ、およびクレードBサブタイプに特異的なFIV1372pアッセイである。二種の多重PCRを行った。：多重リアルタイムPCRにFIV1010V-およびFIV1416p - アッセイを使用して、クレードA FIV単離株を検出した。多重構成のFIV1010vおよびFIV1372pアッセイを使用して、クレードAおよびクレードB FIV単離株を検出した。様々なレポーター色素を使用することにより（FIV1010vにはVICTM、並びにFIV1372p、およびFIV1416pアッセイにはFAMTM）、二種の多重構成PCR系において、シグナル間の区別をすることが可能となった。

【0086】

FIV1010p、FIV1416p、またはFIV1372pの単一リアルタイムPCRの結果を、FIV1010v/FIV1416p、およびFIV1010v/FIV1372pの多重リアルタイムPCRと比較する。FIV1010pおよびFIV1372pアッセイの結果は、表3に要約されている。一種の単一リアルタイムPCRで解析したサンプルの3分の1以上では、全くシグナルが検出されなかった。驚くべきことに、FIV1010vとFIV1372pアッセイの組合せでは、30サンプルのうち陰性のものはなかった。従って、一对以上のプライマー対と一以上のプローブを使用することで、一種の単一リアルタイムPCRでは検出されなかったサンプルの全てを検出することが可能になった。

【0087】

本発明者らは、前記結果を使用して、様々なウイルスサンプルをクレードにグループ化した。30サンプルのうち6サンプルにおいて、二種の単一リアルタイムPCRの結果が確定しなかった。逆に、一種の多重リアルタイムPCRの結果により、全てのサンプルをクレードAまたはBにグループ化することが可能となった。結論として、本発明は様々なウイルスクレードの配列を検出して、かつそれらの配列によりウイルスを異なったクレードにグループ化することも可能とする。

【0088】

しかし、最終的な目的は、様々な単離株を同等のPCR効率で広範囲に検出すること、および定量することが可能な系であろう。この最適化された系に基づいて

、様々なFIV単離株に感染したネコのウイルスロードの比較をより正確に行うことができる。このような最適化された系は、レンチウイルス感染による癌の発達において、ウイルスロードが及ぼす影響について調査するための道具を提供し、並びに自然に感染したネコにおいてテストされた治療薬の効果を調査するための基礎を提供する。さらに、リアルタイムPCR戦略としては、生検材料（腫瘍および正常細胞が存在しているであろう）に存在する癌遺伝子の変異を検出するために設計できる。このような場合に、リアルタイムPCRが、存在する腫瘍細胞数の定量を可能にする。

【0089】

【表1】

表1: FIV1010pアッセイのPCR効率とオリゴヌクレオチド結合部位の配列変化の比較

PCRの起原	配列	効率	FIV0771f	FIV1010p	FIV1081r
Oligonucl.			agaacc1gg1gata1accagagac	aggaggccctccacaggcala	caata1gtagcact1gacccaa
Petaluma	0.9742		-----	-----	-----
Glasgow8	0.9284		-----	-----	-----t-----
Amsterdam6	0.8711		-----	-----c-----	-----
Utrecht113	0.9485		-----	-----	-----

【0090】

【表2】

表2:リアルタイム PCR の結果とプローブ結合部位の配列変化の比較

フィールド 単離株	アガロースゲル 電気泳動	リアルタイム PCR	FIV1010P結合部位
Oligonucl.			agg agg gcc ctc cac agg cat a
Munich 3	+	-	-a- --- -a- --- --- -t- -
Munich 4	+	-	-g- --a aa- --- --- --- -
Munich 5	-	-	nd
Munich 6	+	+	--- --- --- --- --- -
Munich 7	+	+	--- --- --- --- --- -
Munich 1	+	+	nd
Munich 2	+	+	nd
Munich 8	-	-	nd
Munich 9	+	+	nd
Munich 10	-	-	nd

【0091】

【表3】

表3:3種の単一または2種の多重リアルタイム PCR
による、25種の未知 FIV 単離株の増幅

FIV単離株	PCRアッセイ			サブタイプ
	1010p	1372p	1010v/1372p	
Munich 11	+	-	+/-	A
Munich 14	-	+	-/+	B
Munich 18	-	+	-/+	B
Munich 20	-	+	-/+	B
Munich 27	-	+	-/+	B
Munich 29	-	+	-/+	B
Munich 31	+	-	+/-	A
Munich 32	+	-	+/-	A
Munich 35	+	-	+/-	A
Munich 36	+	-	+/-	A
Munich 38	-	+	-/+	B
Munich 39	-	+	-/+	B
Munich 40	-	+	-/+	B
Munich 41	+	-	+/-	A
Munich 43	-	+	-/+	B
Munich 44	+	-	+/-	A
Munich 49	-	+	-/+	B
Munich 50	-	+	-/+	B
Munich 52	+	-	+/-	A
Munich 53	+	-	+/-	A
Utrecht 113	+	-	+/-	A
Petaluma	+	-	+/-	A
Amsterdam 6	+	-	+/-	A
Italy M2*	+	+	-/+	B
Italy M20*	+	+	-/+	B
Austria 01*	+	+	-/+	B
Austria 02	+	-	+/-	A
Austria TE*	+	+	-/+	B
Austria 05*	+	+	-/+	B
Austria 06*	+	+	-/+	B

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic Research Institute A/S

<120> Multiplex Real-Time PCR

<130> Sequence listing for BN29PCT

<140>

<141>

<150> PA 1999 00114

<151> 1999-01-29

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV0771f)

<400> 1

agaacctggt gatataccag agac

24

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1081r)

<400> 2

ttgggtcaag tgctacatat tg

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for the
 detection of a FIV sequence (FIV1010p)

<400> 3
 tatgcctgtg gagggccttc ct 22

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1360f)

<400> 4
 gcagaagcaa gatttgcacc a 21

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1437r)

<400> 5
 tatggcggcc aattttcct 19

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for the
 detection of a FIV sequence (FIV1416p)

<400> 6
 tgcctcaaga taccatgctc tacactgca 29

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1280f)

<400> 7
atcctcctga tgggcctaga c 21

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1426r)

<400> 8
actttcctaa tgcttcaag tacca 25

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Probe for the
detection of a FIV sequence (FIV1372p)

<400> 9
tttgcaccag ccagaatgca gtgtag 26

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV566f)

<400> 10
accttcaagc caggagatc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV2167r)

<400> 11
cttcctccta ctccaatcat 20

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV0754f)

<400> 12
aatgtatcta caggacgaga acct 24

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1437rb)

<400> 13
tatggctgcc aactttcct 19

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1366fa)

<400> 14
gcaagatttg caccagctag g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1366fb)

<400> 15
gcaagatttg caccagccag a 21

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1182f)

<400> 16
atggccacat taataatggc 20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
amplification of a FIV sequence (FIV1307r)

<400> 17
ggtaatggtc taggaccatc a 21

<210> 18

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Probe for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1212v)

<400> 18
 tcatccaata tttctttatc tgcagcgca

29

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1307z)

<400> 19
 ggtaatggtc tgggagcatc a

21

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1332f)

<400> 20
 gggaatagga ttaactcaag aacaaca

27

<210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for the
 amplification of a FIV sequence (FIV1324f)

<400> 21

gagattatgg gaataggatt aactcaaga

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年1月17日(2001.1.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための多重リアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの同じ領域が完全にまたは部分的に増幅され、前記各バリエーションはプローブ結合部位内の一以上のヌクレオチドが異なり、前記方法は二以上のオリゴヌクレオチドプローブを同じPCR反応液に添加することを含み、その各プローブは少なくとも一つのバリエーションのプローブ結合部位に特異的である方法。

【請求項2】 請求項1に記載のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列はプライマー結合部位内のヌクレオチドが一以上異なっており、かつ一対以上のプライマー対を前記反応混合液に添加して、各プライマーは少なくとも一つのサブタイプのプライマー結合部位と特異的にアニーリングする方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載のリアルタイムPCR法であって、該領域の二以上の部分が増幅されて、該領域の各部分にはプローブ結合領域を一つだけしか含まない方法。

【請求項4】 請求項1~3のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法であって、前記異なったプローブは異なった蛍光レポーター色素でラベルされる方法。

【請求項5】 請求項4に記載のリアルタイムPCR法であって、前記プローブは、FAMTMまたはVICTMでラベルされる方法。

【請求項6】 ウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項1~5のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項7】 レトロウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/また

は定量するための、請求項6のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項8】 レンチウイルスの核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項7のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項9】 ネコ免疫不全症ウイルス(FIV)の核酸配列のバリエーションを検出および/または定量するための、請求項8のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法。

【請求項10】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号3および6に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【請求項11】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号3および9に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【請求項12】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号1および/または12に記載の順向きプライマー、並びに配列番号2に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項13】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号4、14および/または15に記載の順向きプライマー、並びに配列番号5および/または13に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項14】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号7、20および/または21に記載の順向きプライマー、並びに配列番号8に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項15】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号16に記載の順向きプライマー、並びに配列番号17および/または19に記載の逆向きプライマーが反応混合液に添加される方法。

【請求項16】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号12および/または13に記載のプライマー、並びに請求項10に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【請求項17】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法であって、配列番号12および/または14に記載のプライマー、並びに請求項11に記載のプローブが反応混合液に添加される方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法で

あって、前記PCRは逆転写（RT）PCRである方法。

【請求項19】 請求項1～18のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法であって、前記バリエーションの核酸配列は、ある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列。

【請求項20】 ウイルスのバリエーションの核酸配列を含むサンプル全体のウイルスロード（load）を測定するための、請求項6～19のいずれか一項に記載のリアルタイムPCR法の使用。

【請求項21】 請求項20に記載のリアルタイムPCR法の使用であって、前記バリエーションは、ある種のサブタイプ、単離株、クレード、または他のサブグループのいずれかに由来する核酸配列に由来する使用。

【請求項22】 腫瘍形成に対するウイルスロードの影響を調査するための、請求項20または21に記載のリアルタイムPCR法の使用。

【請求項23】 以下のプローブを含む群から選択される、請求項9に記載のリアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチド：

(a) 配列番号6、および/または配列番号9、および/または、配列番号18に記載の核酸配列、

(b) それらの相補鎖。

【請求項24】 以下のプライマーを含む群から選択される、請求項9に記載のPCR法に使用するためのプライマー：

配列番号4、5、7または、8または、10または、17または、19または21に記載のプライマー。

【請求項25】 以下のプライマーセットを含む群から選択される、請求項9に記載のPCR法に使用するためのプライマーセット：

配列番号12に記載の、および配列番号2に記載のプライマー。

【請求項26】 以下のプライマーセットを含む群から選択される、請求項9に記載のPCR法に使用するためのプライマーセット：

配列番号4、14、および/または15に記載の、並びに配列番号5、および/または13に記載のプライマー。

【請求項27】 以下のプライマーセットを含む群から選択される、請求項

9に記載のPCR法に使用するためのプライマーセット：

配列番号7、20、および/または21に記載の、並びに配列番号8に記載のプライマー。

【請求項28】 以下のプライマーセットを含む群から選択される、請求項9に記載のPCR法に使用するためのプライマーセット：

配列番号16に記載の、並びに配列番号17、および/または19に記載のプライマー。

【請求項29】 請求項9に記載のリアルタイムPCR法に使用するためのオリゴヌクレオチドセットであって、請求項25~28のいずれか一項に記載のプライマーセットの群から選択されたプライマーセット、および請求項23に記載のプローブ群から選択されたプローブを含むオリゴヌクレオチドセット。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 00/00677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12Q1/70		
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 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LETTENEGGER C ET AL: "Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TAQMAN.RTM. fluorescent real-time detection system" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, NL, AMSTERDAM, vol. 78, no. 78, January 1999 (1999-01), pages 105-116, XP002103560 ISSN: 0166-0934 cited in the application the whole document --- -/-	1-9, 12, 16-21, 23-25, 29, 30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 24 August 2000		Date of mailing of the international search report 19/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knehr, M

I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/00677

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HEID C A ET AL: "REAL TIME QUANTITATIVE PCR" GENOME RESEARCH,US,COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, vol. 6, no. 10, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 986-994, XP000642795 ISSN: 1088-9051 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>VAHLENKAMP T W ET AL: "COMPETITIVE REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION FOR QUANTITATION OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS,NL,AMSTERDAM, vol. 52, no. 3, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 335-346, XP000609892 ISSN: 0166-0934 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>GERARD ET AL: "IMPROVED QUANTITATION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA USING REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION AND PLASMID-DNA COMPLEMENTARITY DETERMINING REGION III STANDARDS" CANCER RESEARCH,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 58, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 3957-3964, XP002095189 ISSN: 0008-5472 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 96 40268 A (AMERICAN HOME PROD) 19 December 1996 (1996-12-19) abstract page 15, line 14</p> <p>---</p>	
P, X	<p>KLEIN D ET AL.: "Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: Influence of mismatches on quantification" ELECTROPHORESIS, vol. 20, 1999, pages 291-299, XP000924950 the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-9, 12, 16-25, 29, 30</p>

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/00677

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YET J A M ET AL.: "Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 96, 1999, pages 6394-6399, XP002145609 the whole document -----	1-5,7, 18-22, 29,30

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/00677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9640268 A	19-12-1996	US 5820869 A	13-10-1998
		AU 699794 B	17-12-1998
		AU 5973196 A	30-12-1996
		BR 9609089 A	02-02-1999
		CA 2224257 A	19-12-1996
		EP 0831921 A	01-04-1998
		JP 11506614 T	15-06-1999
		US 5989562 A	23-11-1999

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, 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 サーモンズ、ブライアン
ドイツ連邦共和国、デー - 85229 ア
インホーフエン、ミッターフェルトシュト
ラーセ 11

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA14 BA31 CA03 CA09
FA10 HA12
4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ10 QQ43
QR08 QR33 QR42 QR56 QS25
QS34 QX02

