



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104066842 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201380006301. 9

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 24

(30) 优先权数据

2012-013087 2012. 01. 25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/051389 2013. 01. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/111800 JA 2013. 08. 01

(71) 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 水谷壮利 石坂彩

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 蒋亭

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

HIV 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种 HIV 检测用寡核苷酸、以及使用该寡核苷酸的 HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法,所述 HIV 检测用寡核苷酸的特征在于,与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 80% 以上的同源性。

1. 一种 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 80% 以上的同源性。

2. 如权利要求 1 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 90% 以上的同源性。

3. 如权利要求 1 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 95% 以上的同源性。

4. 如权利要求 1 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 98% 以上的同源性。

5. 如权利要求 1 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其具有由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列。

6. 一种 HIV 检测试剂盒, 其特征在于, 含有权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的 HIV 检测用寡核苷酸。

7. 一种 HIV 检测方法, 其特征在于, 使用权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的 HIV 检测用寡核苷酸或 HIV 检测试剂盒。

8. 一种 HIV 检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(a) 在核酸试样中的 mRNA 的 3' 末端附加 polyA 的步骤;

(b) 使用具有 polyT 和在该 polyT 的 5' 侧具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸, 通过逆转录反应由所述 mRNA 合成与该 mRNA 互补的 cDNA 的步骤;

(c) 使用权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的 HIV 检测用寡核苷酸和具有所述与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸, 由所述 cDNA 对具有 HIV 的 cDNA 序列的靶碱基序列进行扩增的步骤; 以及

(d) 对所述靶碱基序列的扩增产物进行检测的步骤。

HIV 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus ;以下称为 HIV) 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法。

[0002] 本申请基于 2012 年 1 月 25 日在日本提出的日本特愿 2012-013087 号要求优先权, 将其内容援引到本说明书中。

背景技术

[0003] 对于作为获得性免疫缺陷综合征 (Acquired Immune Deficiency Syndrome ;以下称为艾滋病) 的原因的 HIV 感染, 重要的是确立对 HIV 感染进行根本性的预防、并且在产生万一已经感染的怀疑时能够早期诊断感染的有无的技术。

[0004] 另外, 即使通过治疗使 HIV 看起来从体内消失, 在诊断技术的病毒检测灵敏度低的情况下, 尽管 HIV 还潜伏在体内, 也可能被误诊为 HIV 已经从体内“消失”, 从而残留艾滋病复发的祸根。

[0005] 在 HIV 感染后的急性感染期, HIV 侵入宿主细胞内, 对自身的病毒 RNA 进行逆转录而合成 DNA, 并将该 DNA 插入到宿主细胞的 DNA 中而形成前病毒。在宿主细胞内, 该前病毒表达病毒基因, 通过自身的病毒蛋白质对病毒 RNA 进行包装而形成病毒颗粒, 该病毒颗粒输出到宿主细胞外。

[0006] 目前, 作为临床上的抗 HIV 治疗方法, 通常为多剂联合疗法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy ;以下称为 HAART 疗法)。HAART 疗法是施用对上述急性感染期中的病毒 RNA 的逆转录、病毒 DNA 向基因组 DNA 中的插入等进行抑制的多种抑制剂的方法。通过 HAART 疗法, 抗 HIV 治疗实现了显著的发展。

[0007] 另一方面, 在利用 HAART 疗法的治疗过程中, 一部分感染细胞获得了针对 HAART 疗法的耐药性 (以下, 将该感染细胞称为潜伏感染细胞)。潜伏感染细胞中虽然具有前病毒, 但是在急性感染期中观察到的病毒的生命周期休止, 不产生病毒 RNA。由于 HAART 疗法如上所述是对病毒增殖的各步骤进行抑制的疗法, 因此通过 HAART 疗法难以将病毒从潜伏感染细胞中除去。但是, 如果中断 HAART 疗法, 则潜伏感染细胞中的病毒的生命周期会重新启动。

[0008] 因此, 如果不能将病毒从潜伏感染细胞中除去, 则会对 HIV 患者的 QOL (Quality of Life, 生活质量) 产生不利影响。

[0009] 对此, 本发明人构建了模型细胞系, 使用该模型细胞系分析了潜伏感染细胞的表型, 结果发现, 潜伏感染细胞生产出约 60 个碱基的短链 RNA (参照非专利文献 1)。

[0010] 在 HIV 感染的诊断方法中, 对感染者的血液中的病毒量进行定量作为掌握病情程度、治愈经过的指标是很重要的。

[0011] 目前, 以实时 PCR 法作为靶核酸的扩增、检测原理的 HIV 的 RNA 定量法已知为 HIV 感染的快速诊断方法之一。

[0012] 作为使用实时 PCR 法的 HIV 的 RNA 定量法, 可以列举例如专利文献 1 记载的方法。

专利文献 1 记载的方法是使用以能够识别 HIV-1 的各种亚型的方式设计的简并引物对插入到基因组中的 HIV-1 前病毒进行扩增、定量的方法。该方法的优点在于不仅能够应对作为日本人感染者的主要感染源的亚型 B, 而且该能够应对除此以外的各种亚型。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献 1 : 日本特开 2007-295896 号公报

[0016] 非专利文献

[0017] 非专利文献 1 : 水谷等、J Virol.、第 83 卷、第 11569 ~ 11580 页、2009 年

发明内容

[0018] 发明所要解决的问题

[0019] 但是, 由于 HIV 具有保真性(准确性)低的逆转录酶, 因此是非常容易突变的病毒。专利文献 1 记载的识别 HIV 的寡核苷酸的序列来源于位于转录起始点下游约 500 个碱基处的编码结构蛋白 GAG 的 gag 基因区, 使用该序列对于高精度地检测突变的所有病毒来说是不充分的。

[0020] 另外, 在感染细胞中, 从感染暴露日(感染暴露日)起到能够定量地检测到包含 GAG 区域的转录延伸后的病毒 RNA, 需要与病毒的增殖相伴随的 12 天这样的天数。因此, 期望能够更早期地以高灵敏度检测病毒的技术。

[0021] 而且, 即使使用专利文献 1 记载的寡核苷酸, 也不能检测出上述的潜伏感染细胞所产生的短链 RNA, 因而尚有改善的余地。

[0022] 本发明是鉴于上述情况而进行的, 其课题在于提供能够高精度且高灵敏度地早期检测 HIV 的 HIV 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法。

[0023] 用于解决问题的手段

[0024] 本发明人为了解决上述问题进行了深入研究, 结果发现, 在潜伏感染期间的 HIV 感染细胞中特定的 RNA 被转录、以及在 HIV 的病毒 RNA 中存在逆转录时不易受到突变的序列, 从而完成了本发明。

[0025] 本发明提供具有下述特征的 HIV 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法。

[0026] (1) 一种 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 80% 以上的同源性。

[0027] (2) 如 (1) 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 90% 以上的同源性。

[0028] (3) 如 (1) 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 95% 以上的同源性。

[0029] (4) 如 (1) 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其特征在于, 与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 98% 以上的同源性。

[0030] (5) 如 (1) 所述的 HIV 检测用寡核苷酸, 其具有由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列。

[0031] (6) 一种 HIV 检测试剂盒, 其特征在于, 含有 (1) ~ (5) 中任一项所述的 HIV 检测

用寡核苷酸。

[0032] (7) 一种 HIV 检测方法,其特征在于,使用 (1) ~ (6) 中任一项所述的 HIV 检测用寡核苷酸或 HIV 检测试剂盒。

[0033] (8) 一种 HIV 检测方法,其特征在于,包括如下步骤:(a) 在核酸试样中的 mRNA 的 3' 末端附加 polyA 的步骤;(b) 使用具有 polyT 和在该 polyT 的 5' 侧具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸,通过逆转录反应由所述 mRNA 合成与该 mRNA 互补的 cDNA 的步骤;(c) 使用 (1) ~ (5) 中任一项所述的 HIV 检测用寡核苷酸和具有所述与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸,由所述 cDNA 对具有 HIV 的 cDNA 序列的靶碱基序列进行扩增的步骤;以及 (d) 对所述靶碱基序列的扩增产物进行检测的步骤。

[0034] 发明效果

[0035] 根据本发明,即使在 HIV 感染细胞中 HIV 产生了突变,也能够高精度地对该病毒进行检测。

[0036] 另外,根据本发明,即使在潜伏感染期间,也能够早期且高灵敏度地对 HIV 进行检测。

附图说明

[0037] 图 1 是实施例 1、实施例 2 和比较例 1 中的、使用实时 PCR 的 HIV-1 短链 RNA 的检测结果。

[0038] 图 2 是实验例 2 中的、约 60 个碱基的短链 RNA 的碱基序列分析结果。

[0039] 图 3 是实验例 3 中的定量 PCR 的结果。

[0040] 图 4 是实验例 3 中的标准曲线。

[0041] 图 5 是本发明的 HIV 感染细胞中产生的短链 RNA 的检测系统的说明图。

具体实施方式

[0042] [HIV 检测用寡核苷酸]

[0043] 本发明的 HIV 检测用寡核苷酸与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 80% 以上的同源性。本发明的 HIV 检测用寡核苷酸可以在该同源性的范围内对序列号 1 或 6 所示的碱基序列进行 1 个至多个碱基的缺失、插入或置换。

[0044] 此外,优选本发明的 HIV 检测用寡核苷酸与由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列具有 90% 以上的同源性,更优选具有 95% 以上的同源性,特别优选具有 98% 以上的同源性。另外,更优选具有由序列号 1 或 6 所示的碱基序列中的 10 个以上的连续碱基构成的碱基序列。

[0045] 序列号

[0046] 1 (5' -GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAGCTAGGGAACCCACTGCTT-3' :65 个碱基) 所示的碱基序列和序列号

[0047] 6 (5' -GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAGCTAGGGAACCCACTGCTTAAAGCCT-3' :71 个碱基) 所示的碱基序列是存在于病毒基因组中的 HIV LTR(Long Terminal Repeat,长末端重复序列) 内的 TAR(Trans Activation Responsive region,反

式激活应答区)序列的一部分。

[0048] 作为 HIV,可以列举 HIV-1 和 HIV-2 这两种。本发明的 HIV 检测用寡核苷酸能够特异性地仅检测 HIV-1 而不依赖于亚型。

[0049] HIV 的 TAR 序列参与病毒基因的转录调控,其存在于位于病毒基因组的 5' 末端和 3' 末端的 LTR 内。TAR 序列在 HIV-1 的亚型间高度保守,通过转录活性因子 tat (Trans Activator, 反式激活蛋白) 与该 TAR 序列结合而促进病毒基因的转录。

[0050] 这样,从 TAR 序列是转录活性因子所结合的部位并且病毒基因的转录通过该结合被严格地调控的观点出发,本发明人发现 TAR 序列是不易受到突变的部位。

[0051] 因此,本发明的 HIV 检测用寡核苷酸通过包含识别 TAR 序列的序列,连突变的 HIV 也能够识别,因此能够高精度地检测 HIV。

[0052] 本发明的 HIV 检测用寡核苷酸优选 DNA,只要是具有与 DNA 同样的功能的寡核苷酸,则不受天然、非天然的限制,也可以是包含 PNA(肽核酸)、LNA(Locked Nucleic Acid, 锁核酸)等人工核酸的寡核苷酸。

[0053] 本发明的 HIV 检测用寡核苷酸的长度只要是对于作为引物或探针发挥功能所需要的长度则没有特别限定,优选 10 ~ 40 个碱基,更优选 20 ~ 30 个碱基。

[0054] 如上所述,本发明人构建了模型细胞系,使用该模型细胞系对潜伏感染细胞的表型进行了分析,结果发现,潜伏感染细胞生产出约 60 个碱基的短链 RNA。

[0055] 进一步明确了该约 60 个碱基的短链 RNA 是自 HIV-1mRNA 的转录起始点起,在核苷酸位置为 50 至 70 个碱基的地方终止转录而得到的转录产物的复合体。另外还明确了该约 60 个碱基的短链 RNA 是自 HIV-1mRNA 的转录起始点起,在核苷酸位置为 50 ~ 71 个碱基的地方终止转录而得到的转录产物的复合体。即,明确了短链 RNA 相当于从病毒 RNA 的 5' 末端存在的 TAR 序列的核苷酸位置 1(转录起始点)到位置 50 至位置 70、或位置 50 至位置 71 的 mRNA。

[0056] 以往,识别 HIV 的寡核苷酸的序列来源于位于转录起始点下游约 500 个碱基处的编码结构蛋白质 GAG 的 gag 基因区。该寡核苷酸无法检测出潜伏感染细胞生产的短链 RNA。另外,在感染细胞中,从感染暴露日起到能够定量地检测到包含 GAG 区域的转录延伸后的病毒 RNA,需要与病毒的增殖相伴随的 12 天这样的天数。

[0057] 另一方面,潜伏感染细胞中的病毒的生命周期处于血清中的病毒产生为检测限以下但转录并未完全停止、虽然开始转录但转录延伸未有效进行的状态。该状况与病毒感染初期相似,认为在病毒感染初期也产生短链 RNA。因此,利用本发明的 HIV 检测用寡核苷酸,从感染暴露起不必等待经过 12 天就能够早期地检测到病毒。

[0058] 另外,HIV-1 不仅在病毒基因组的 5' 末端具有 TAR 序列,而且在 3' 末端也具有 TAR 序列。因此,利用本发明的 HIV 检测用寡核苷酸,不仅能够进行短链 RNA 的检测,而且还能够进行 HIV-1RNA 全长的检测,因此能够高灵敏度地检测病毒。

[0059] [HIV 检测方法]

[0060] 第一实施方式

[0061] 本实施方式的 HIV 检测方法包括:

[0062] (a) 在核酸试样中的 mRNA 的 3' 末端附加 polyA 的步骤;

[0063] (b) 使用 polyT 和在该 polyT 的 5' 侧具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷

酸,通过逆转录反应由上述 mRNA 合成与该 mRNA 互补的 cDNA 的步骤;

[0064] (c) 使用本发明的 HIV 检测用寡核苷酸和上述具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸,由上述 cDNA 对具有 HIV 的 cDNA 序列的靶碱基序列进行扩增的步骤;以及

[0065] (d) 对上述靶碱基序列的扩增产物进行检测的步骤。

[0066] 以下,对各步骤进行说明。

[0067] 首先,在步骤(a)中,在核酸试样中的 mRNA 的 3' 末端附加 polyA。

[0068] 核酸试样只要是含有核酸的试样则没有特别限定,优选为从确认 HIV 感染的感染者或怀疑 HIV 感染的疑似感染者、或者正在接受抗 HIV 治疗的患者等受试者的血液、淋巴液、脑脊液、精液等样品中提取核酸而得到的核酸试样。从这些样品中提取核酸可以通过使用 Trizol 等的常规方法进行,在以上述的约 60 个碱基的短链 RNA 作为检测对象的情况下,优选利用提取微 RNA 等低分子 RNA 的方法。

[0069] 如上所述,由潜伏感染细胞生产出的短链 RNA 是在转录过程中终止而得到的 RNA,因此,在 3' 末端不具有 polyA 序列。本实施方式中,通过使用 polyA 聚合酶在短链 RNA 的 3' 末端附加 polyA,能够使短链 RNA 由规定的碱基数构成。由此,能够提高步骤(b)中的逆转录反应和步骤(c)中的靶碱基序列的扩增反应的效率。

[0070] polyA 的长度没有特别限定,优选 10 ~ 40 个碱基,更优选 20 ~ 30 个碱基。

[0071] 接着,在步骤(b)中,使用 polyT 和在该 polyT 的 5' 侧具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸(以下也称为 polyT 寡核苷酸),通过逆转录反应由上述 mRNA 合成与该 mRNA 互补的 cDNA。

[0072] polyT 寡核苷酸所具有的 polyT 退火至步骤(a)中附加在 mRNA 上的 polyA 上。polyT 寡核苷酸可以在 3' 末端具有简并序列,通过以该 3' 末端作为合成起点的逆转录反应,合成与上述 mRNA 互补的 cDNA。作为逆转录中使用的逆转录酶,可以使用现有公知的逆转录酶,可以列举例如来源于莫洛尼鼠白血病病毒的逆转录酶等。

[0073] polyT 寡核苷酸所具有的与接头序列互补的碱基序列只要不抑制逆转录反应则没有特别限定,优选为不与生物体内的已知基因互补的碱基序列,更优选为不与 HIV 基因互补的碱基序列。

[0074] polyT 寡核苷酸的长度与通常使用的引物的长度相同,优选 10 ~ 40 个碱基,更优选 20 ~ 30 个碱基。

[0075] 另外,步骤(a)与步骤(b)可以同时进行。

[0076] 另外,通过逆转录反应合成的 cDNA 与作为模板的 mRNA 形成杂交体,因此,优选使用 RNaseH 等 RNA 酶,在步骤(c)之前预先将 mRNA 分解。

[0077] 接着,在步骤(c)中,使用本发明的 HIV 检测用寡核苷酸和上述具有与接头序列互补的碱基序列的寡核苷酸(以下也称为接头序列识别寡核苷酸),由上述 cDNA 对具有 HIV 的 cDNA 序列的靶碱基序列进行扩增。

[0078] 本发明中,上述靶碱基序列详细而言是指具有 TAR 序列的 cDNA 的一部分碱基序列的碱基序列。

[0079] 接头序列识别寡核苷酸的长度与通常的引物相同,优选 10 ~ 40 个碱基,更优选 20 ~ 30 个碱基。

[0080] 作为靶序列的扩增方法,可以列举:PCR(Polymerase Chain Reaction,聚

合酶链式反应)、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification, 环介导等温扩增)、NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification, 基于核酸序列的扩增)、ICAN(Isothermal and Chimerical primer-initiated Amplification of Nucleic acids, 等温的嵌合引物引发的核酸扩增)、TRC(Transcription Reverse-Transcription Concerted, 转录逆转录协同)、SDA(Strand Displacement Amplification, 链置换扩增)、TMA(Transcription Mediated Amplification, 转录介导扩增)、SMAP(SMART Amplification Process, 智能扩增过程)、RPA(Recombines polymerase amplification, 重组聚合酶扩增)、HDA(Helicase-dependent amplification, 依赖解旋酶的扩增)等现有公知的方法。

[0081] DNA 聚合酶是指合成具有与引物退火的模板 DNA 互补的碱基序列的 DNA 链的酶的统称。

[0082] 作为本发明中使用的 DNA 聚合酶, 没有特别限定, 优选使用 Taq DNA 聚合酶、Tth DNA 聚合酶、Vent DNA 聚合酶等热稳定性 DNA 聚合酶, 为了防止试验开始前的延伸, 更优选使用具有热启动功能的 DNA 聚合酶。在步骤 (c) 中, 在进行后述的实时 PCR 的情况下, 特别优选使用具有 3' → 5' 核酸外切酶活性的 Taq DNA 聚合酶。

[0083] 作为靶碱基序列的扩增方法, 列举 PCR 为例, 使本发明的 HIV 检测用寡核苷酸退火至步骤 (b) 中合成的 cDNA 的 3' 末端侧, 进行延伸反应, 合成上述 cDNA 的互补链 (以下称为延伸产物 A)。

[0084] 接着, 使接头序列识别寡核苷酸退火至延伸产物 A 的 3' 末端侧, 进行延伸反应, 合成延伸产物 A 的互补链 (以下称为延伸产物 B)。

[0085] 接着, 使本发明的 HIV 检测用寡核苷酸退火至延伸产物 B 的 3' 末端侧, 进行延伸反应, 合成延伸产物 B 的互补链 (以下称为延伸产物 C)。

[0086] 之后, 重复进行合成延伸产物 B 的步骤和合成延伸产物 C 的步骤, 由此对靶碱基序列进行扩增。

[0087] 另外, 对于 PCR 中的温度等扩增程序的设定, 可以根据常规方法进行。

[0088] 使本发明的 HIV 检测用寡核苷酸或接头序列识别寡核苷酸退火至靶碱基序列上的反应条件没有特别限定, 可以在考虑各寡核苷酸的 T_m 值等的基础上, 在温度、pH、盐浓度、缓冲液等通常的条件下设定。

[0089] 在本实施方式中, 使用由本发明的 HIV 检测用寡核苷酸和接头序列识别寡核苷酸构成的引物组。如上所述, 本发明的 HIV 检测用寡核苷酸对不易受到突变的部位进行识别。此外, 由于上述引物组仅具有 1 处 HIV 的识别位点, 因此不易受到病毒 RNA 的突变带来的影响。

[0090] 因此, 根据本实施方式, 能够高精度地检测突变的所有病毒。

[0091] 接着, 在步骤 (d) 中, 对上述靶碱基序列的扩增产物进行检测。

[0092] 作为步骤 (d) 中的代表性的检测方法, 可以列举在反应后对是否扩增出靶碱基序列进行评价的终点检测法和经时 (实时) 地对靶碱基序列的扩增进行测定的实时检测法。

[0093] 作为终点检测法, 可以列举通过电泳对靶碱基序列的扩增进行评价的方法。该方法为如下方法: 对靶碱基序列的扩增产物和核酸分子量标志物进行电泳, 通过对比两者的迁移率来评价是否扩增出了具有预定分子量的靶碱基序列。

[0094] 作为利用电泳的检测中使用的试剂, 优选与双链 DNA 结合而发出荧光的溴化乙锭

或 SYBR Green。

[0095] 作为实时检测法,可以列举使用实时 PCR 装置的评价方法。实时 PCR 为如下方法:使用阶梯稀释的已知量的 DNA 作为标准,经时地对利用 PCR 的标准 DNA 和靶碱基序列的扩增进行测定,在标准 DNA 以指数函数方式扩增的分子数的范围内,对核酸试样中存在的靶碱基序列的分子数进行定量。

[0096] 实时 PCR 的优点在于,不仅能够测定 HIV 感染的有无,而且能够对 HIV 感染者或 HIV 患者的血液中的病毒量进行定量,由此能够掌握病情的程度和治愈过程。

[0097] 作为实时 PCR 中的定量方法,可以列举使用荧光色素的方法,具体而言,可以列举使用特异性地插入到双链 DNA 中并发出荧光的 SYBRGreen 等色素的方法、对进行扩增的 DNA 使用在特异性的寡核苷酸上结合有荧光色素的探针的方法。从更特异地检测靶碱基序列的扩增的观点考虑,可以优选列举后者的方法。

[0098] 后者的方法中使用的探针是将能够与靶碱基序列的一部分杂交的寡核苷酸的两端分别用荧光物质和消光物质进行修饰的探针。该探针中,荧光物质与消光物质接近,因此荧光物质所具有的发出荧光信号的功能受到消光物质的阻碍。

[0099] 在上述步骤 (c) 中,在使本发明的 HIV 检测用寡核苷酸退火至靶碱基序列上的条件下,探针与靶碱基序列杂交。接着,在延伸反应的过程中,利用 Taq DNA 聚合酶所具有的 5' → 3' 核酸外切酶活性将探针分解。结果,探针上修饰的荧光物质和消光物质在空间上相互分离,从而使得荧光物质能够发出荧光信号。该荧光信号与扩增得到的靶碱基序列的分子数成比例。

[0100] 作为荧光物质,可以列举 FAM(羧基荧光素)、JOE(6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素)、FITC(异硫氰酸荧光素)、TET(四氯荧光素)、HEX(5'-六氯-荧光素-CE 亚磷酸胺)、Cy3、Cy5、Alexa568 等。

[0101] 另外,作为消光物质,可以列举 TAMRA(四甲基罗丹明)、4-(4-二甲氨基苯基偶氮)苯甲酸(DABCYL)、BHQ 等。

[0102] 作为用作探针的寡核苷酸的碱基序列,只要是能够识别 TAR 序列的碱基序列、或能够与 TAR 序列的互补序列杂交的碱基序列则没有特别限定,作为优选的碱基序列,可以列举序列号 2(5'-CTAGCTAGCCAGAGAGCTCCCAGG-3';24 个碱基)所示的碱基序列。

[0103] 通过使用该探针,能够更特异地检测靶碱基序列的扩增。

[0104] 作为步骤 (d) 中的其他检测方法,没有特别限定,可以列举利用荧光色素等的寡核苷酸的标记、高效液相色谱、质谱、溶解曲线分析、增殖曲线分析等。

[0105] 作为利用荧光色素等的寡核苷酸的标记,可以列举例如将 HIV 检测用寡核苷酸或接头序列识别寡核苷酸预先用标记物质进行标记的方法。通过该方法,能够以标记物质为指标来检测靶碱基序列的扩增。作为这样的标记物质,可以列举例如荧光色素、能量吸收性物质、放射性同位素、化学发光体、酶、抗体等。对于使用该标记物质对寡核苷酸进行标记的位置,没有特别限定,优选不会抑制延伸反应的位置。

[0106] 本实施方式的 HIV 检测方法具有在核酸试样中的来源于 HIV 的 mRNA 的 3' 末端附加 polyA 的步骤 (a),但在以 HIV 的 RNA 全长作为检测对象的情况下,由于其 3' 末端已经附加有 polyA,因此可以不具有步骤 (a)。

[0107] 另外,在以 HIV 的 RNA 全长作为检测对象的情况下,在步骤 (c) 中,可以使用具有

与来源于 HIV 的碱基序列互补的碱基序列的寡核苷酸、或能够与来源于 HIV 的碱基序列杂交的寡核苷酸来代替接头序列识别寡核苷酸。

[0108] 这种情况下,从扩增效率的观点考虑,优选本发明的 HIV 检测用寡核苷酸识别位于病毒基因组的 3' 末端的 TAR 序列。

[0109] [HIV 检测试剂盒]

[0110] 本发明的 HIV 检测试剂盒含有上述本发明的 HIV 检测用寡核苷酸。此外,本发明的 HIV 检测试剂盒也可以含有用于核酸试样预处理的细胞裂解试剂、上述本发明的 HIV 检测方法的各步骤中说明过的试剂。

[0111] 这样,通过将本发明的 HIV 检测方法所需要的试剂等制成试剂盒,能够更简便地且在短时间内进行 HIV 的检测。

[0112] 综上,在本发明中,发现在 HIV 的病毒 RNA 中存在逆转录时不易受到突变的序列。通过将该序列用于 HIV 诊断,即使在 HIV 感染细胞中 HIV 产生了突变,也能够高精度地对 HIV 进行检测。

[0113] 另外,在本发明中,发现在潜伏感染期间的 HIV 感染细胞中特定的 RNA 被转录,从而确立了 HIV 所表达的初期转录产物的检测方法。由此,缩短了 HIV 检测天数,能够进行高灵敏度的检测,有助于 HIV 感染的早期诊断。进而,通过早期诊断,能够推迟艾滋病的发病时期和治疗开始时期。

[0114] 本发明中,能够早期判断抗病毒药施用下的艾滋病治疗中的患者体内的病毒的再活化。

[0115] 另外,可以将本发明的 HIV 检测方法的原理应用于其他已知潜伏感染的病毒等的检测。

[0116] 实施例

[0117] 接着,示出实施例进一步详细地说明本发明,但本发明不限定于以下的实施例。

[0118] [实验例 1]

[0119] (短链 RNA 的检测)

[0120] 使用定量 PCR 构建了 HIV 感染细胞中产生的短链 RNA 的检测系统(图 5)。作为定量 PCR 试剂,使用 premix Extaq 试剂盒(Takara 公司制造)。

[0121] 使用序列号 3(5' -GGGTCTCTCTGGTTAGACCAG-3';21 个碱基)所示的寡核苷酸作为正向引物,使用 miScript 引物检测试剂盒所附带的接头序列识别寡核苷酸作为反向引物。使用在序列号 2(5' -CTAGCTAGCCAGAGAGCTCCCAGG-3';24 个碱基)所示的寡核苷酸的 5' 末端修饰有 FAM、在 3' 末端修饰有 TAMRA 的寡核苷酸作为 Taqman 探针。将这些寡核苷酸的合成委托给 Oligo House 公司。

[0122] 将上述定量 PCR 试剂、上述寡核苷酸和每孔 75ng 的 cDNA 的混合溶液 10 μ l 分装到 96 孔板的各孔中。

[0123] 使用 ABI7300(Life Technology 公司制造)作为定量 PCR 装置,在 95°C 30 秒的反应后,将 95°C 5 秒、60°C 34 秒的两步反应进行 40 次循环。

[0124] 使用 GAPDH 作为标准 DNA,进行定量 PCR,制作标准曲线。

[0125] <实施例 1>

[0126] 根据 J Virol.、第 83 卷、第 11569 ~ 11580 页、2009 年中记载的方法,将表达从

HIV-1 的 RNA 的转录起始点开始在位置 61 的尿嘧啶处终止转录的转录产物的载体导入到 J ViroL.、第 72 卷、第 1666 ~ 1670 页、1998 年公开的 HIV-1 的潜伏感染细胞的模型细胞 U1 细胞系中,制作稳定细胞系 U1-mU6-TAR。使用 mirVana 微 RNA 分离试剂盒 (Ambion 公司制造),从该细胞中提取总 RNA,使用 miScript 引物检测试剂盒 (Qiagen 公司制造),由总 RNA 中的短链 RNA 合成 cDNA。

[0127] 使用该 cDNA,进行定量 PCR,对稳定细胞系 U1-mU6-TAR 中的靶碱基序列的拷贝数进行定量。

[0128] < 实施例 2 >

[0129] 通过与实施例 1 同样的方法由 J ViroL.、第 72 卷、第 1666 ~ 1670 页、1998 年公开的、作为潜伏感染细胞的模型细胞的具有野生型 HIV-1 的 U1 细胞系合成 cDNA,对 U1 细胞系中的靶碱基序列的拷贝数进行定量。

[0130] < 比较例 1 >

[0131] 除了使用无菌水代替 cDNA 的溶解液以外,通过与实施例 1 同样的方法进行定量 PCR。

[0132] 将实施例 1 ~ 2 和比较例 1 中的、使用定量 PCR 装置的测定结果示于图 1 中。如图 1 所示,确认了实施例 1 ~ 2 的反应中随着循环数的增加信号增强。另一方面,在反应体系中不具有 cDNA 的比较例 1 中,即使增加循环数,也未确认到信号的增强。

[0133] 由使用标准曲线得到的计算结果可知,在实施例 1 中使用的稳定细胞系 U1-mU6-TAR 中,与实施例 2 中使用的潜伏感染细胞系 U1 相比,确认到拷贝数约为 8 倍的短转录物。

[0134] 以上,由实施例 1 和 2 的结果确认,根据本发明,能够对感染细胞中产生的短链 RNA 进行定量。由此可知,能够早期发现感染初期的 HIV。

[0135] [实验例 2]

[0136] (短链 RNA 的鉴定)

[0137] 使用实施例 2 的 PCR 产物,利用 Illumina GAIIx (Illumina 公司制造) 进行深度序列分析,对约 60 个碱基的短链 RNA 的碱基序列进行了分析。将结果示于图 2 中。

[0138] 如图 2 所示可知,该约 60 个碱基的短链 RNA 是从 HIV-1 的 RNA 的转录起始点起在位置 50 至 70 个碱基处终止转录的转录产物。另外还可知,该约 60 个碱基的短链 RNA 是从 HIV-1 的 RNA 的转录起始点起在位置 50 至 71 个碱基处终止转录的转录产物。

[0139] [实验例 3]

[0140] (短链 RNA 的拷贝数的定量)

[0141] 使用体外合成的序列号 4 (5' -GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAGCTAGGGAACCC-3' :58 个碱基) 作为标准 RNA,通过与实施例 1 同样的方法将 cDNA 制成从 10^8 拷贝 ~ 10 拷贝的 10 倍稀释的稀释系列,如下进行定量 PCR,制作标准曲线。

[0142] 使用序列号 5 (5' -CTGGTTAGACCAGATCTGAGCC-3' :22 个碱基) 所示的寡核苷酸作为正向引物,使用 miScript 引物检测试剂盒所附带的接头序列识别寡核苷酸作为反向引物。使用在序列号 2 (5' -CTAGCTAGCCAGAGAGCTCCCAGG-3' :24 个碱基) 所示的寡核苷酸的 5' 末端修饰有 FAM、在 3' 末端修饰有 BHQ-1 的寡核苷酸作为 Taqman 探针。将这些寡核苷酸的合成委托给 Oligo House 公司。

[0143] 将上述定量 PCR 试剂、上述寡核苷酸和每孔 75ng 的 cDNA 的混合溶液 20 μ l 分装到 96 孔板的各孔中。

[0144] 使用 CFX-96 (BIO RAD 公司制造) 作为定量 PCR 装置, 在 95°C 30 秒的反应后, 将 95°C 5 秒、60°C 10 秒的两步反应进行 50 次循环。

[0145] 将定量 PCR 的结果示于图 3 中, 将标准曲线示于图 4 中。能够由 108 拷贝 ~ 100 拷贝的 RNA 定量地检测信号。

[0146] 由以上的结果可知, 根据本发明, 能够高精度且高灵敏度地早期检测 HIV。

[0147] 产业上的可利用性

[0148] 根据本发明, 即使在 HIV 感染细胞中 HIV 产生了突变, 也能够高精度地对该病毒进行检测, 另外, 即使在潜伏感染期间, 也能够早期且高灵敏度地对 HIV 进行检测, 因此在产业上有用。

[0001]

序列表

- <110> 独立行政法人科学技术振兴机构
 <120> HIV 检测用寡核苷酸、HIV 检测试剂盒及 HIV 检测方法
 <130> PC-16400
 <150> JP2012-013087
 <151> 2012-01-25
 <160> 6
 <170> Patent 3.1 版
- <210> 1
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述： 基于 HIV-1 TAR 茎区的靶序列。
 <400> 1
 ggtctctctg gtagaccag atctgagcct gggagctctc tggctagcta gggaaccac 60
 tgctt
 65
- <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述： HIV-1 探针。
 <400> 2
 ctagctagcc agagagctcc cagg 24
- <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述： HIV-1 引物。
 <400> 3
 gggtctctct gtagacca g 21
- <210> 4
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

[0002]

<223>	人工序列描述：基于 HIV-1 TAR 茎区的靶序列.	
<400>	4	
	ggctctctcg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctagcta gggaaccc	58
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：HIV-1 引物.	
<400>	5	
	ctggftagac cagatctgag cc	22
<210>	6	
<211>	71	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：基于 HIV-1 TAR 茎区的靶序列.	
<400>	6	
	ggctctctcg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctagcta gggaaccac	60
	tgcttaagcc t	71

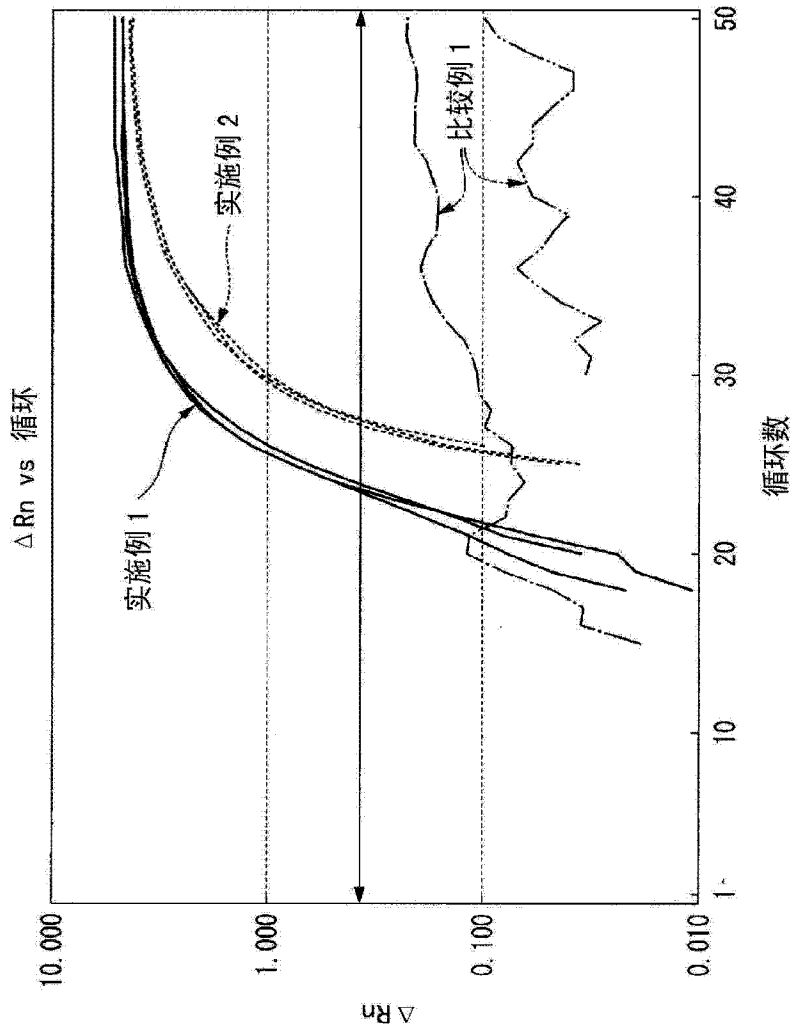


图 1

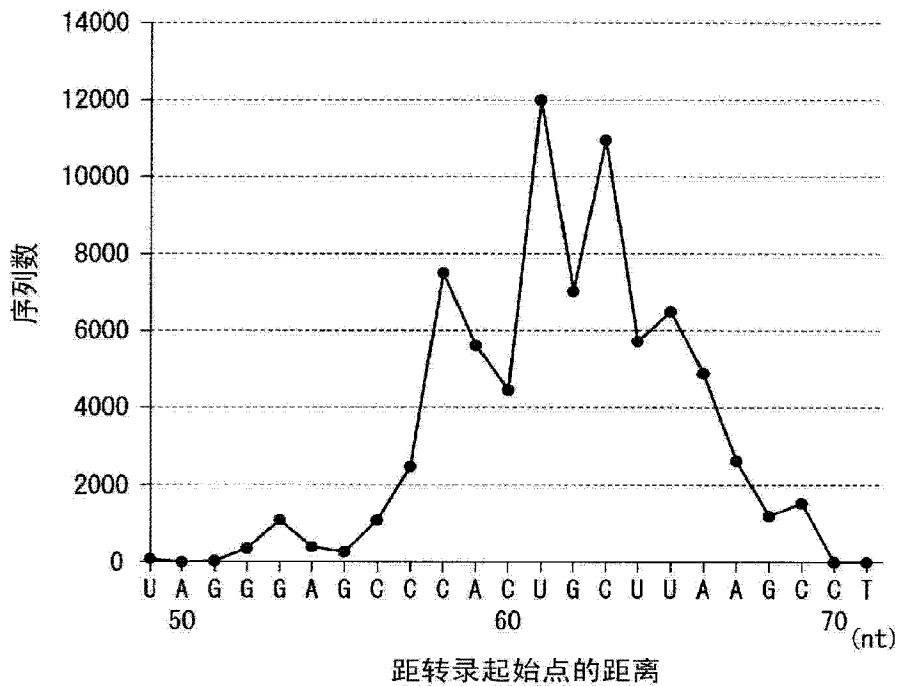


图 2

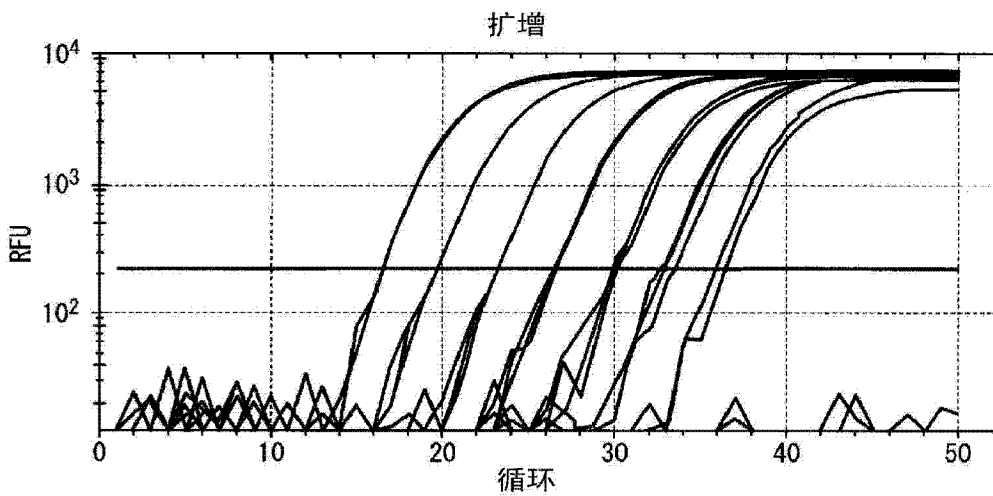


图 3

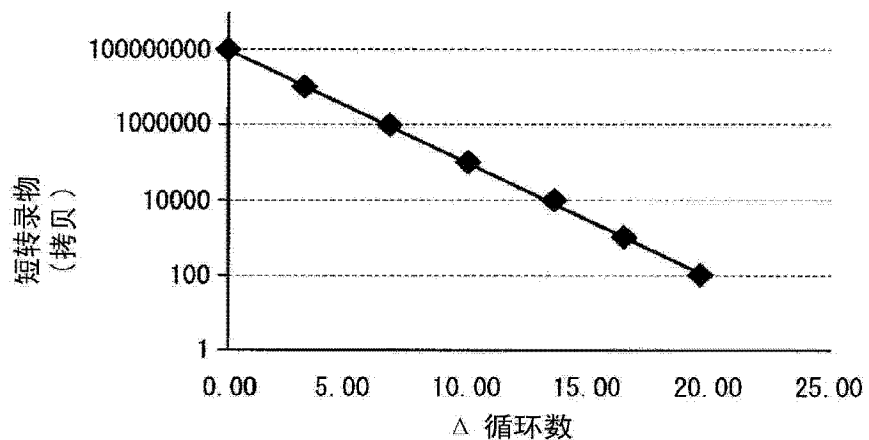


图 4

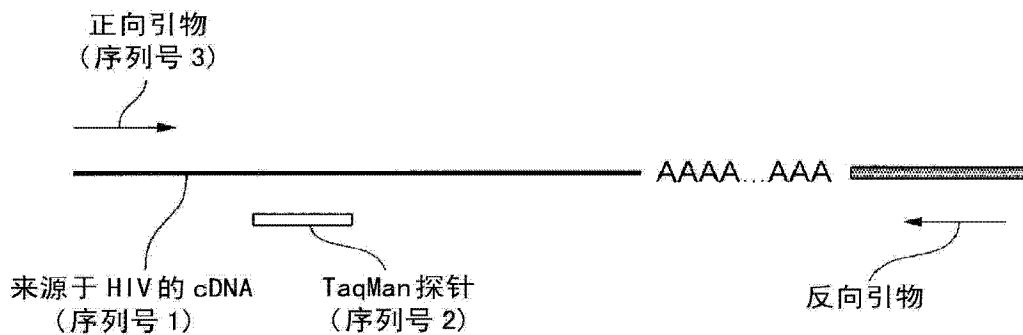


图 5