

200933003B

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成22（2010）年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス肝炎感染予防体制の確立に関する総合研究

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 浜口 功

平成22（2010）年3月

研究組織

研究代表者

浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

研究分担者

高橋孝喜 東京大学・医学部附属病院・輸血部

半田 誠 慶応義塾大学・医学部・輸血・細胞療法部

田所憲治 日本赤十字中央血液研究所

高松純樹 名古屋大学・医学部附属病院・輸血部

大戸 斉 福島医科大学・臨床検査・輸血部

古田里佳 大阪赤十字血液センター・研究部

水谷哲也 国立感染症研究所・ウイルス一部

山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

紀野修一 旭川医科大学病院・臨床検査・輸血部

目次

I. 総括研究報告

マイクロアレイを用いた病原体検出システムの構築 (浜口功、半田誠、山口一成) ——	6
表 1: ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット ——	18
表 2: ウイルス検出用プローブ一覧 ——	19
表 3: 検出用プローブテスト用 Cy3 標識合成オリゴヌクレオシド一覧 ——	20
表 4: 人工合成オリゴヌクレオシドの作製 ——	21
表 5: 人工合成オリゴヌクレオシド配列 ——	22
図 1: スポット配置とプローブ ID、及び精度管理用コントロール ——	27
図 2: 蛍光標識合成オリゴを用いた検出用プローブの変異株に対するバリデーション ——	28
図 3: 人工合成オリゴヌクレオシドを用いた変異株に対するバリデーション ——	29
図 4: マイクロアレイによるウイルス核酸の検出 ——	30
図 5: 複数ウイルス核酸の同時検出 ——	31
表 6: NAT(TMA Assay)による血漿中のウイルス核酸の検出 ——	32
図 6: 血漿中のウイルス核酸の検出のマイクロアレイによる検出	

II. 分担研究報告

1. ウイルス種・株間共通プライマーを用いた信頼性の高いウイルス検出方法の開発 (遠藤大二) ——	33
表 1: 塩基配列のコードと degeneracy ——	56
表 2: 塩基配列分析事例における 3mer 頻度	
表 3: 塩基配列分析事例における 3mer 位置	
表 4: 塩基配列分析事例における相互に相補的な 3mer 位置 ——	57
表 5: 塩基配列分析事例における RCR 位置に存在する 3mer	
表 6: 塩基配列分析事例における相互に相補的な 3mer の組み合わせと仮想 RCR での利用 RCR 数	
表 7: 塩基配列分析事例における相互に相補的な 3mer のうち一方の削除 ——	58
表 8: 塩基配列分析事例における選択された 3mer による仮想 PCR	
表 9: SARS コロナウイルスへの適応実験に用いたプライマー ——	59
表 10: HIV1 第 1 二次グループ内共通 degenerate プライマー ——	61
表 11: HIV1 第 2 二次グループ内共通 degenerate プライマー	
表 12: HIV1 第 3 二次グループ内共通 degenerate プライマー	
表 13: GenBank から入手した HCV ウイルス塩基配列の一次グループ化 ——	62
表 14: HCV ゲノム塩基配列のサブグループ間を網羅する degenerate プライマー ——	68
表 15: HCV Genotype 共通プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列 (平成 20 年度) ——	69
表 16: CoCoMo プログラムによって予想された HCV Genotype 共通プライマーセット ——	70
表 17: HCV ウイルス Genotype 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント ——	73
表 18: HCV ウイルス人工ゲノムフラグメントのグループ分け	

表 19 : HCV ゲノムフラグメント合成のための OE-PCR オリゴマー	74
表 20 : HBV Genotype 共通プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	75
表 21 : HBV Genotype 共通プライマー	76
表 22 : HBV 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント	77
表 23 : HBV ゲノムフラグメント合成用オリゴマー	78
表 24 : HIV-1 Genotype 共通プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	79
表 25 : HIV-1 Genotype 共通プライマー	80
表 26 : HIV-1 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント	83
表 27 : HIV-1 ゲノムフラグメント合成用オリゴマー	
表 28 : HEV Genotype 共通プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	84
表 29 : HEV Genotype 共通プライマー	
表 30 : HEV 共通プライマー検証用ゲノムフラグメント	86
表 31 : HEV ゲノムフラグメント合成用オリゴマー	
表 32 : West nile virus 用プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	87
表 33 : West nile virus 用プライマー	88
表 34 : Human parvovirus B19 用プライマー設計対象ウイルスゲノム塩基配列	89
表 35 : Human parvovirus B19 用プライマー	
表 36 : HHV-5, HHV6 及び HHV-7 共通検出プライマー設計対象とした遺伝子群	91
表 37 : プライマー設計対象クラスターごとの CoCoMo プログラムによる設計プライマー数	92
表 38 : HHV-5, HHV6 及び HHV-7 遺伝子群の第 6 クラスターから予測された最適プライマー	
表 39 : ヒトアデノウイルスプライマー設計用の DNA polymerase 遺伝子を選択したゲノムデータ	
表 40 : ヒトアデノウイルスの各亜属に含まれる血清型	93
表 41 : ヒトアデノウイルス A, B1, B2, D および E 各亜種から予想された亜族共通プライマーセット	
表 42 : ヒトアデノウイルス亜族共通プライマーセットのうち、適用範囲の最大だったプライマー によって増幅されるヒトアデノウイルス血清型	94
表 43 : ヒトアデノウイルス共通プライマーの PCR 試験用鋳型合成用オリゴマー	95
図 1 : CoCoMo における PCR 位置モチーフ選定アルゴリズムの流れ図	96
図 2 : CoCoMo プログラムの模式図	97
図 3 : degenerate プライマーの高速 Homology 検索モジュール(Estimate)	100
図 4 : OE-PCR 法の概念図	101
図 5 : コロナウイルス科の遺伝的近縁性相関図	102
図 6 : SARS コロナウイルス感染細胞由来 cDNA を鋳型とした PCR	103
図 7 : HIV-1 ゲノムデータの social network analysis	104
図 8 : HCV ゲノム共通 degenerate primer による HCV cDNA 増幅	105
図 9 : HCV ゲノム断片の OE-PCR	
図 10 : HCV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	106

図 11: HBV ゲノム断片の OE-PCR	107
図 12: HBV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	108
図 13: HIV-1 ゲノム断片の OE-PCR	109
図 14: HIV-1 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	110
図 15: HEV ゲノム断片の OE-PCR	111
図 16: HEV OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	112
図 17: HIV-5, HIV-6 および HIV-7 ウイルス遺伝子群のクラスターとプライマー設計対象グループ	113
図 18: HIV-5, HIV-6A, HIV-6B および HIV-7 の major capsid protein を合成するための OE-PCR 結果	114
図 19: HIV-5, HIV-6A, HIV-6B および HIV-7 の major capsid protein OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	
図 20: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子の相同性に基づくグループマップ	115
図 21: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子断片を合成するための OE-PCR 結果	
図 22: ヒトアデノウイルス DNA polymerase 遺伝子 OE-PCR フラグメントの degenerate プライマーによる増幅	116
2. ウイルス遺伝子の非特異的増幅方法の確立、および検出の自動化の試み (水谷哲也)	
図 1: RDV ver4.0 の反応の概要	128
図 2: ダイレクトシーケンス不可能な PCR における RDV 法の応用	129
図 3: 非特異的増幅の効果	130
図 4: 自動化への試み	131
3. 国内技術を基盤としたウイルス検出用新規核酸増幅法の開発 (古田里佳、田所憲治)	
図 1: ICAN 反応系樹立アルゴリズム	138
表 1: プライマーおよびプローブ配列	
表 2: 反応組成および反応条件	139
図 2: ICAN 法によるウイルス検出の実際	140
表 3: ICAN 感度	141
4. 肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化の研究 (紀野修一、大戸斉、高橋孝喜、高松純樹)	
別添: 輸血前検体保管を含めた輸血前後の感染症を効果的・効率的に実施するための提言	146
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	170
IV. 研究成果の別刷	171

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急研究事業）
総括研究報告書（平成 19 年度～平成 21 年度）

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究（H19-肝炎-一般-003）

マイクロアレイを用いた病原体検出システムの構築

研究代表者： 浜口功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
研究分担者： 水谷哲也 国立感染症研究所・ウイルス 1 部
半田誠 慶応義塾大学・医学部・輸血・細胞療法部
山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
研究協力者： 遠藤大二 酪農学園大・獣医学部
中島龍生 日本パーカーライジング広島工場
水上拓郎 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
滝沢和也 国立感染症研究所・血液・安全性研究部

研究要旨

輸血用血液を介した感染症の伝播を防止するため、現在、HIV, HCV, HBV, といった一部のウイルスに関しては抗体測定、NAT 検定、TaqMan-PCR 等の検出法を用いてスクリーニングが行われ、輸血による感染の伝播が抑制されている。しかし、感染症を引き起こす病原体のほとんどが検査されておらず、また依然として感染初期の検出が困難な期間（Window period）が問題視されている。感染検体がスクリーニングをすり抜けることを阻止するために、より高感度な病原体検出システムを開発することは重要な課題である。同時に、今後流行が危惧されている血液を介した新興・再興感染に対しても、迅速に対応できる検出システムの確立が急務となっている。本研究では独自のプログラムにより網羅的に設計された Degenerate プライマーを用いることで、PCR により効率よく病原体核酸を増幅し、DNA-Chip 上に固定化した検出用プローブとハイブリダイズさせることで高感度に病原体核酸を検出できるマイクロアレイシステムを開発した。平成 20 年度には血漿中の HIV、HCV、HBV のウイルス核酸を対象として、既存の NAT 検査と同等以上（1PCR 反応液中に 5-8IU/cp）の検出感度を得ることに成功した。その後、Degenerate プライマーの改良と検出システムの精度向上を重ね、平成 21 年度には、更に PvB19 と WNV を加えた 5 種類のウイルスに対応したアレイシステムへと発展させた。血漿中から調整したウイルス核酸を用いて検出感度の評価を行った結果、1PCR 反応液中に 2-10IU/cp という高感度が得られた上、各ウイルス核酸の増幅産物を混ぜた合わせた状態で検出を行っても、交差することなく目的のウイルス核酸のみを検出することができた。これにより 1 枚の DNA-chip 上で複数の病原体を同時に検出するシステムという大きな目標が達成された。また、ウイルス変異株の配列を基に作製した合成オリゴを用いて検証した結果、Degenerate プライマーと検出用プローブを組み合わせることで、ほぼ全ての変異株に対応することが可能であることも示唆された。この汎用性の高さから、本研究の検出システムを応用することで、今後、新規の病原体に対する検査が必要となった際、迅速に検出系を構築することが可能になると期待される。

A. 研究目的

血液製剤を含む輸血用血液を介した感染症の伝播を防止するために、国内では日本赤十字により、エイズウイルス (HIV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、B 型肝炎ウイルス (HBV) を対象とした血液検体のスクリーニングが行われている。以前より行われていた抗体を用いた血清学的検査に加え、1999 年以降、核酸増幅法 (NAT) による検査が導入されたことにより、抗体産生までに生じる検出困難な期間 (Window period) の問題が改善され、それらのウイルスが輸血を介して感染する危険性は大幅に減少した。しかし、いまだ感染血液がスクリーニングをすり抜ける可能性を完全に否定するまでには至っておらず、特に HBV においては、NAT による検出限界以下の極めて低量のウイルス保持者が存在しており、輸血後にウイルスが再活性化するのではないかと問題視されている。また、ウイルスには多数の変異株 (Genotype/Subtype/Variant) が存在するため、現在、感染が流行しているウイルス株以外にも、常に新しい変異株の出現を考慮しなければならない。これらの課題を解決するため、より高感度で網羅的なウイルス検出システムの構築が必要である。

また別の問題として近年、新興あるいは再興の感染症が国内で流行する危険性が指摘されている。世界的に見るとウエストナイル熱、デング熱、ハンタウイルス感染症、重症急性呼吸器症候群 (SARS) の流行に見られるような比較的局地的に発生していた感染症が、急速に世界中に拡大していく事例が増

えている。それら中には輸血により感染の伝播が危惧される病原体も多く、今後、国内の血液検査の対象に加えられることも想定される。それら、新たに出現した病原体に対して迅速に対応することができる検出システムの開発は社会的な貢献度も高いといえる。

本研究で開発するマイクロアレイを用いた病原体検出システムは、あらかじめ独自のプログラムにより変異株を網羅的に増幅できるよう設計された Degenerate プライマーを用いて、PCR により検体中の病原体核酸を効率良く増幅し、DNA-Chip 上に固定された増幅領域内配列を標的とする高感度なウイルス検出用プローブによってシグナル検出することができるよう設計されている。平成 19 年度、平成 20 年度を通じて、検出システムの基本的なプロトコールが構築され、現在血液検査が行われている、HIV、HCV、HBV を対象として行った検出性能試験において、良好な結果が得られた。そこで最終年度に当たる平成 21 年度には検出対象に、今後検査対象として追加される可能性の高いと予想される、ヒトパルボウイルス B19 (human Parvovirus B19 : PvB19) とウエストナイルウイルス (West Nile virus : WNV) を加えた 5 種類のウイルスを検出するシステムとして開発を行った。最終的には対象のウイルスを既存の病原体検出システム、特に NAT によるウイルス検出限界 (10-30IU/ml、一般的には 100IU/ml とされる) と同等、またはそれ以上の感度で検出することを目標とした。また、マイクロアレイの特性を生かして 1 枚 DNA-chip 上で複

数の病原体を一括検出できるシステムとして構築することを目指した。

B. 研究方法

I. マイクロアレイ

1) 検体の調整。

標準検体として HIV-RNA 国内標準品 (Subtype B, 1.4×10^5 IU/ml)、HCV-RNA 国内標準品 (Subtype 1b, 1.0×10^5 IU/ml)、HBV-DNA 国内標準品 (Subtype C, 4.4×10^5 IU/ml) の各プール血漿から、希釈検体 (1×10^4 IU 等量) を調整し、 $100 \mu\text{l}$ に分注後、 -80°C にて保存した。また、市販の標準品として SeraCare 社製 ACCURUN 315 HIV-RNA positive Quality control (Subtype B, 2.1×10^5 copies/ml)、ACCURUN 305 HCV-RNA positive Quality control (Subtype 1b, 1.7×10^5 IU/ml)、ACCURUN 305 HBV-DNA positive Quality control (Subtype A, 8.1×10^6 IU/ml)、及び Zeptomatrix 社製 Parvovirus B19 NATtrol (1×10^6 IU/ml)、West Nile virus NATtrol (Strain NY 2001-6263, 5×10^5 cp/ml) を使用し、日本赤十字社より分与された陰性血漿 (HIV-, HCV-, HBV-) または、SeraCare 社製の脱繊維素処理済みヒト血漿 (Basematrix53) を用いて、希釈検体 (10^5 IU/ml) に調整し、 -80°C にて保存した。

検査時には、同様の血漿を用いて検体のウイルス濃度が $10,000$ IU \sim 1 IU/ml となる一次希釈系列を調整した。また、平成 21 年度より、サンプルの核酸抽出時には内部標準 (Internal Control) として 5ng の Human 18S ribosomal RNA 配列の増幅断片を加えることとした。

2) 核酸抽出

RNA 抽出

HIV、HCV、WNV-RNA は High Pure Viral RNA Kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 $200 \mu\text{l}$ (2×10^4 IU 等量) を poly A Carrier RNA $4 \mu\text{l}$ ($20 \mu\text{g}$) を加えた Binding Buffer $400 \mu\text{l}$ に加え、よくボルテックスし、室温で 10 分間静置した後、軽くスピンドウンした。検体液を High pure filter tube に移し、 8000 G で 15 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Inhibitor Removal Buffer $500 \mu\text{l}$ を filter tube に加えて、 8000 G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer $450 \mu\text{l}$ を加え、 8000 G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、 13000 G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer $50 \mu\text{l}$ を加えて、 8000 G で 1 分間遠心し、Total RNA を溶出した。遠心には卓上微量遠心機 MiniSpin (Eppendorf) を用いた。抽出された RNA は SUPERase-In RNase Inhibitor (Ambion) $1 \text{U}/\mu\text{l}$ を添加した Ultra pure distilled water (Gibco) を用いて希釈し、 $5,000$ IU \sim 2 IU/ μl の二次希釈系列を調整した。

DNA 抽出

HBV、PvB19-DNA は High Pure Viral Nucleic Kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 $200 \mu\text{l}$ (2×10^4 IU 等量) を poly A Carrier RNA $2 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g}$) と Proteinase K $50 \mu\text{l}$ を加えた、Binding Buffer $200 \mu\text{l}$ に加え、よくボルテックスし、 72°C で 10 分間インキュベートした後、軽くスピンドウンした。

検体液を High pure filter tube に移し、8000 G で 15 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Inhibitor Removal Buffer 500 μ l を filter tube に加えて、8000 G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer 450 μ l を加え、8000 G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、13000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer 50 μ l を加えて、8000 G で 1 分間遠心し、Total RNA を溶出した。遠心には卓上微量遠心機 MiniSpin(eppendorf)を用いた。抽出された DNA は RNA と同様に RNase Inhibitor を添加した Distilled water を用いて希釈し、10,000IU \sim 1IU/ μ l の二次希釈系列を調整した。

RNA-DNA 同時抽出

High Pure Viral Nucleic Large Volume kit (Roche) 添付のプロトコールに従い、希釈検体 2.5ml (HIV、HCV、HBV 各 5,000IU 等量) を poly A Carrier RNA 15 μ l (75 μ g) と Proteinase K 250 μ l を加えた、Binding Buffer 2.5ml に加え、よくボルテックスし、70°C で 15 分間インキュベートした後、Binding Buffer 1ml に加え、よくボルテックスし、軽くスピンドウンした。検体液を High Pure Extender Assembly に移し、4000 G で 5 分間遠心した。High Pure Extender Assembly から High Pure Filter Tube を取り外し Collection tube にセットし、Inhibitor Removal Buffer 500 μ l を filter tube に加えて、8000 G で 1 分間遠心した。Collection tube を交換し、Wash Buffer 450 μ l を

加え、8000 G で 1 分間遠心した。同様にもう一度 Wash を行った後、13000G で 10 秒間遠心した。Collection tube を交換し、Elution Buffer 50 μ l を加えて、8000 G で 1 分間遠心し、Total RNA 核酸を溶出した。遠心には大型遠心機 AX-310 (Tomy) と卓上微量遠心機 MiniSpin(eppendorf)を用いた。抽出された核酸から必要に応じて二次希釈系列を調整した

3) cDNA 合成

Superscript III RT cDNA synthesis kit (Invitrogen) 添付のプロトコールに従い、Total RNA 溶液 5 μ l (2,000 \sim 2IU/cp 当量) に 50ng/ μ l Random primer 1 μ l、10mM dNTP mix 1 μ l を加え、65°C で 5 分間処理し、氷上で 1 分間放置した後、逆転写反応液 (10 \times RTbuffer 2 μ l、25mM MgCl₂ 4 μ l、0.1M DTT 2 μ l、RNase out (40U/ μ l) 1 μ l、Superscript III RT (200U/ μ l) 1 μ l) を加えて、25°C で 10 分間、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間反応した。この反応液に RNase H 1 μ l を加え、37°C で 20 分間処理した。逆転写反応にはサーマルサイクラー iCycler (BIORAD) を使用した。

4) Degenerate プライマー

データベースに登録された HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の全てのウイルスゲノム配列を収集し、コンピューターによるアラインメントとクラスタリングの解析を行なった後、Cordination of Common Motifs (CoCoMo) Algorithm に基づいて各ウイルスに特異的なプライマ

一の設計を行なった (表 1)。

5) ウイルス検出用プローブ

HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の各ウイルス特異的プライマーによる増幅領域を基に 30-42mer の検出用プローブを設計した (表 2)。また同時に、検出系の精度管理 (Quality control) のための、30-34mer の対象配列を持たないオリゴヌクレオシドを設定した。合成されたプローブ用オリゴヌクレオシドをスライドガラス上に DLC (diamond like carbon) 表面処理を施したチップ (3mm×3mm 角) に固定した (図 2A)。

6) 鋳型オリゴヌクレオシドの合成 蛍光標識合成オリゴヌクレオシド

HIV、HCV、HBV の各ウイルス変異株のゲノム配列と完全に一致するように、ウイルス検出用プローブの標的となるオリゴヌクレオチドを合成した (表 3)。合成オリゴヌクレオチドの 5' 末端側には蛍光色素 Cyanine 3 を修飾した。蛍光測定は、FLA-8000 (富士フイルム社) により 532nm (解像度 10 nm) の蛍光検出により判定を行った。

人工合成オリゴヌクレオシド

HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の各ウイルス変異株の鋳型として使用するため、変異株のゲノム配列を基に、特異的プライマーによる増幅領域をカバーするよう 136-312bp のオリゴヌクレオシドを合成した (表 4、表 5)。効率的に試験を行うため、合成するのは検出用プライマーの標的となる領域のみを対象とし、配列が複数の変異株に共通する

ものは、代表的な変異株一つに絞り選択した。

鋳型オリゴヌクレオシドの合成は Prime Star PCR kit (Takara-bio) を用いた、Overlap-extension PCR (OE-PCR ; HIV、HBV、PvB19、WNV) 法および、Invitrogen 社のカスタム DNA 合成サービス (HCV) への委託により行った。OE-PCR は DNA works 2 プログラム (Hoover and Lubkowski, 2002) に基づいて設計された、19-60 mer からなる 6-8 つのオリゴヌクレオシド断片を 2 ステップの PCR より結合、伸長するもので。初めの PCR により、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、2 pmol の各 Oligomer、および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl に Distilled water を加えて 50 μl とし、98°C で 10 秒、60°C で 5 秒、72°C で 10 秒で 30 サイクル行い、一次鋳型を作製した。続けて、1st-PCR 産物 1 μl を取り、5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μl、1×dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μl、20 pmol 5' 端の Oligomer、20 pmol 3' 端の Oligomer および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.5 μl に Distilled water を加えて 50 μl とし、再度 98°C で 10 秒、60°C で 5 秒、72°C で 10 秒で 30 サイクル行い、プライマー評価用の鋳型オリゴヌクレオシドを合成した。作製したオリゴヌクレオシドの分子量は Multina202 chip electrophoresis system (Shimazu) を用いて測定した。

7) マイクロアレイ

DNA-labeling PCR

検体液から得られた DNA 10 μ l (1,000~1IU 等量)に 5 \times Green GoTaq Flexi Buffer 5 μ l, 10mM Cy-5/ Cy-3 dCTP 0.5 μ l, PCR Nucleotide Mix (2.5mM dATP, dGTP, dTTP, 0.25mM dCTP) 1 μ l, Forward Primer (50 μ M) 0.5 μ l, Reverse Primer (50 μ M) 0.5 μ l, GoTaq Polymerase (5U/ μ l,) 0.25 μ l, DW 7.25 μ l を加えて、95 $^{\circ}$ C 2 分間加熱した後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 30 秒間を 50 サイクル行った。PCR には GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用した。

Hybridization

Hybridization Buffer 1 μ l と Sample DNA 2 μ l を混ぜ合わせ DNA Chip 上に滴下する。ハイブリオープン内で 50 $^{\circ}$ C、2 時間ハイブリダイズさせ、Washing Buffer で 2 回洗浄する。遠心により乾燥 (1~2min) した後、蛍光スキャナ-、FLA-8000 (富士フイルム社) により Cy3 は 532nm (解像度 10 nm)、Cy5 は 635nm (解像度 10 nm) の蛍光検出によりシグナルの判定を行った。

II. NAT

1) 検体の調整

マイクロアレイに順じて、SeraCare 社製 ACCURUN 315 HIV-RNA positive Quality control (Subtype B, 2.1 \times 10⁵ copies/ml)、ACCURUN 305 HCV-RNA positive Quality control (Subtype 1b, 1.7 \times 10⁵ IU/ml)、ACCURUN 305 HBV-DNA positive Quality control (Subtype A, 8.1 \times 10⁶ IU/ml)、及び Zeptomatrix 社製

Parvovirus B19 NATtrol (1 \times 10⁶ IU/ml)、West Nile virus NATtrol (Strain NY 2001-6263, 5 \times 10⁵ cp /ml) をヒト陰性血漿 (日本赤十字、または SeraCare) を用いて段階希釈し、検体のウイルス濃度が 10,000~1 IU /ml となる一次希釈系列を調整した。検査は各ウイルス毎に同一の 2 検体を用いて行い、実施日を変えて独立して 2 回行った。

2) TMA Assay

検出には、PROCLEIX ULTRIO System (Chiron) を用いた。TTU (Ten Tube Unit) に Internal control を加えた TCR を 400 μ l 分注入し、500 μ l の HIV、HCV HBV の各陰性キャリブレーター、陽性キャリブレーター、コントロール、サンプルを加え、ボルテックスでよく攪拌する。TTU ラックごと 60 $^{\circ}$ C 20 分間インキュベートする。TTU ラックごと室温で 15 分間放置し、TCS (Target Capture system) 磁性分離部にセットし、10 分間放置した後、TCS で溶液を吸引する。各 TTU に Wash solution を 1. ml 注入し、20 秒間ボルテックスでよく攪拌する。TTU ラックごと TCS にセットし 5 分間放置する。もう一度 TCS で溶液を吸引し、Wash solution を 1. ml 注入し、20 秒間ボルテックスでよく攪拌する。TTU ラックごと TCS にセットし 5 分間放置した後、TCS で吸引し溶液を取り除く。各 TTU に 75 μ l の Amp Reagent を注入し、200 μ l の Oil を注入し、20 秒間ボルテックスでよく攪拌する。TTU ラックごと 60 $^{\circ}$ C 10 分間インキュベートする。TTU ラックごと 41.5 $^{\circ}$ C 10 分間インキュベートした後、Enzyme Reagent を 25 μ l

素早く注入し、41.5°C 60 分間インキュベートする。100 μ l の Probe Reagent を注入し、20 秒間ボルテックスでよく攪拌した後、62°C 15 分間インキュベートする。250 μ l の加水分解試薬を加えて、20 秒間ボルテックスでよく攪拌した後、62°C 10 分間インキュベートする。TTU ラックごと 19~27°C の水中で 10 分間冷却し、ルミノメーター（バイエルルミノメーター HC+）の専用フォルダーに TTU を移動する。

蛍光を測定し、データを収集した。陰性、陽性の判定は TMA Data Reduction software (DRS) を用いて行なった

C. 研究結果

1. マイクロアレイを用いた検出システムの構築（平成 19 年度、平成 20 年度）

研究開始当初、遺伝子データベース上に登録されているウイルス核酸の塩基配列情報をコンピューターにより一括して解析し、独自のプログラム（CoCoMo アルゴリズム：協力研究者、遠藤の項参照）により、目的とするウイルスの全変異株（Genotypes / Sabtypes）を対象とした網羅的で、かつ増幅効率の高い degenerate プライマーを設計する方法が開発された。そこで本研究において、まず、目的のウイルス核酸をウイルス特異的な Degenerate プライマーを用いた PCR により増幅と蛍光標識を行い、次に DNA Chip (DLC : diamond like carbon による表面処理を施した高品質チップ) 上に固定したウイルス検出用プローブ（増幅領域内の配列を標的とするオリ

ゴヌクレオチド）に結合してシグナルとして検出する、マイクロアレイシステムを構築することを目指した。平成 19 年度には、HCV, HBV を対象として、100IU/ml までのウイルス核酸の検出が可能であることを示した。しかし、10IU/ml 以下では急激に検出効率が低下してしまうため、更なる検出感度の向上が望まれた。

2. 検出システムの精度向上（平成 20 年度、21 年度）

マイクロアレイによるウイルス検出システムの性能向上のため、平成 20 年度以降、いくつかの改善を行った。まず、対象とするウイルスを輸血血液検査の対象となっている HIV, HCV, HBV の 3 種として、それらのウイルス核酸を増幅するための特異的な Degenerate プライマーの候補を複数、新規に設計した。また、検出システムの評価を行うための標準検体として、国内標準品（NAT 検定用国内標準品、感染研）に加え、ウイルス濃度が高く、入手が容易である市販の標準品（Zeptomatrix 社製の NATrol : HIV, HCV, HBV、及び SeraCare 社製 ACCURUN : HIV, HCV, HBV）を用いることとした。これら標準品から抽出したウイルス核酸を用いて Degenerate プライマーの増幅効率を評価し、もともと増幅効率が良く、また非特異的な増幅が起こらないものを選択した。その結果、HIV, HCV, HBV の各ウイルスにおいて、低濃度の各ウイルス核酸であっても効率良く増幅できる Degenerate プライマーを得ることができた（平成 21 年度報告）。続けて、

それらの Degenerate プライマーを用いて増幅したウイルス核酸を検出用プローブが感度良く検出できるかの評価を行った。検出用プローブは多数存在するウイルスの変異株に対応することができるように共通性が高い領域を複数選択して設計された。検証の結果、平成20年度には血漿検体中のHIV、HCV、HBVのウイルス核酸を、1PCR反応液中に5~8IUという低濃度でも高感度にシグナル検出することができた（平成21年度報告）。これにより、当初目的としていた、NATを用いた場合と同等以上の検出感度を達成することができた。しかし、HIVに関してはDegenerateプライマーによる増幅効率が伸びず、HCV、HBVについても一部非特異的な増幅が見られたため、Degenerateプライマーの更なる改善を行った（協力研究者、遠藤の項参照）。また、複数のウイルス検出に対応できる1枚DNA-chipを用いた検出システムの構築という目標に合わせて、対象とするウイルス種をHIV、HCV、HBV、PvB19、WNVの5種に増やした。

平成21年度には、これまで行ってきた研究結果を基に、HIV、HCV、HBV、PvB19、WNVの各ウイルスゲノムを変異株を含めて最も感度良く検出できると思われるプローブ（HIV：20スポット、HCV：7スポット、HBV：12スポット、PvB19：6スポット、WNV：8スポット）を選択し、5つのウイルス検出用プローブを1枚のDNA-chip上に再配置した（図1A、2B）。合わせて、検出システムとしての精度向上を図るために、平成21年度より、2つの精度管理用コント

ロールを追加した。1つ目は、検体からの核酸抽出、逆転写反応、増幅の各ステップが正常に行われているかを確認するための内部標準（Internal Control）であり、検体にHuman 18S ribosomal RNAのcDNA増幅断片を加えることとした。HIVを増幅した場合を例にとると、PCRによる増幅産物を3%ゲル電気泳動にて目視で確認できる限界、すなわち、HIVの増幅産物のバンドが明瞭に確認できなくなる5cp以下の検体においても、Internal Controlの増幅産物はバンドとして明確に検出できることを確認した（図1C）。このIC増幅産物をDNA-Chipに滴下し、ハイブリダイズを行うと、IC用の規定のスポットでシグナルを検出できることを確認した（図1D）。2つ目は、増幅産物が検出用プローブと適切にハイブリダイズしているかの確認を行うためのもので、精度管理用（Quality control）プローブとして、全く対象配列を持たないオリゴヌクレオシドを全ての検出用プローブと一緒にスポットした。またこのQuality control用プローブは検出用プローブのスポット状態を確認するためにも使用する。Cy3標識したQCプローブの相補配列オリゴヌクレオチドを反応液に加え、DNA-Chipに滴下し、ハイブリダイズを行うと、規定の位置に強いシグナルが検出され、すべてのプローブが精確にスポットされていることが確認された（図1E）。

3. 合成オリゴヌクレオシドを用いたウイルス変異株の検出（平成20年度、平成21年度）

平成 20 年度には HIV、HCV、HBV のウイルス検出用プローブが各ウイルスの変異株を全て検出することができるのかを、変異株のゲノム配列を基に末端に蛍光標識を加えるように合成したオリゴヌクレオチドを用いて試験した。その結果、反応液中に 100fmol の合成オリゴヌクレオチドを加え試験した全ての変異株について、複数ある検出用プローブのいずれかと結合し、強いシグナルが検出できることを確認した (図 2)。また、合成オリゴヌクレオチドの配列が検出用プローブと全く相補的な配列であった場合 (表 3、テスト用)、HIV で 100amol、HCV で 10amol、HBV で 10amol での検出が可能であり、検出用プローブが標的配列に対して強い結合能力を持っていることを提示した (平成 21 年度報告))。この結果から DNA Chip 上の各ウイルス検出用プローブを用いることで、ほぼ全ての変異株に対応することが可能であることが示唆された。

更に、平成 21 年度には HIV、HCV、HBV、PvB19、WNV の全ての変異株を検出することができるかを検証するために、Degenerate プライマーにより増幅される領域をカバーするように 136-312bp の人工合成オリゴヌクレオチドを作製し、マイクロアレイによる検出システムを評価した。人工合成オリゴヌクレオチドは各ウイルスの変異株のゲノム配列を基に、検出用プローブ領域内の配列が重複しているものを除いた、HIV : 14 タイプ、HCV : 9 タイプ、HBV : 8 タイプ、PvB19 : 6 タイプ、WNV : 10 タイプを作製し、PCR 反応液中に 1ng

の合成オリゴヌクレオチドを加え、マイクロアレイによる検出が可能であるかを試験した。

まずはじめに、ウイルス特異的に設計された Digenerate プライマーが変異株の各ウイルスゲノムを増幅可能であるかの検証を行った (図 3 左パネル)。その結果、HIV の Genotype G と K に対して増幅効率が低かったものの、その他の変異株に対しては効率良く増幅することができた。またその他の 4 つのウイルス (HCV、HBV、PvB19、WNV) に関しては、Digenerate プライマーが全ての変異株のウイルスゲノムを効率良く増幅することが可能であった。

続けて、ウイルスゲノムの増幅産物を各ウイルスの検出用プローブで検出できるかを検証した (図 3 右パネル)。前年度までの結果を基に、試験にはそれぞれ HIV : 20 スポット、HCV : 7 スポット、HBV : 12 スポット、PvB19 : 6 スポット、WNV : 8 スポットのプローブを使用した。その結果、全てのウイルスの変異株が、複数あるプローブのいずれかのスポットによって検出することが可能であった。特にそのうち、HIV の 3 つのプローブは全ての変異株を検出することができた。同様にその他のウイルスにおいては、HCV で 5 つ、HBV で 5 つ、PvB19 で 6 つ、WNV で 4 つのプローブが全ての変異株を検出することが可能であった。

4. マイクロアレイシステムによるウイルス核酸の検出感度 (平成 21 年度)

本研究のウイルス検出システムを使

用した際の実際のウイルス検出能力を評価するために、市販の標準品 (SeraCare 社製 ACCURUN : HIV、HCV、HBV、及び Zeptomatrix 社製の NAT trol : PvB19、WNV) を用いて、各ウイルスに対する検出感度を測定した。検体から抽出したウイルス核酸を段階希釈した二次希釈系列を用いて、最終濃度として1回のPCR反応液中に1,000、100、20、10、5、2、1IU/cp当量のウイルス核酸が含まれるように調整した。PCRによる増幅とDNAの蛍光標識を行った後、ハイブリダイズを行い、各ウイルスの検出用プローブが検出できる限界濃度を測定した(図4)。その結果、ウイルス濃度が100 IU/cp以上の場合、各ウイルス検出用プローブによって全てのウイルスを確実に検出することができた(Data not shown)。また、各ウイルス検出プローブの最低検出限界は1PCR反応液中にHIV(B)では5cp、HCV(1b):2IU、HBV(A):1cp、PvB19:1IU、WNV(NY 2001-6263):5cpであり、十分な再現性を保証できる範囲はHIV:10cp、HCV:5IU、HBV:2cp、PvB19:2IU、WNV:5cpまでであった。この結果から、このシステム全体としてのウイルス検出感度は1PCR反応液中に2-10 IU/cpであることが示された。

4. 複数ウイルスの同時検出(平成21年度)

独自のプログラムにより設計されたHIV、HCV、HBV、PvB19、WNVの各ウイルス特異的なDigenerateプライマーを使用することによって、ウイルスゲノムを効率良く特異的に増幅することがで

きた(図5A)。そこで、各ウイルスの増幅産物を混ぜ合わせたものをサンプルとして用い、1枚のDNA-chip上で5つのウイルスの同時検出が可能であるかを検証した。5つのウイルスのうち、任意の1つのウイルスを除いた、4つのウイルスを混ぜあわせたものをハイブリダイズし、シグナルの検出感度に影響しないかを確認した。その結果、各ウイルスの検出用プローブは、クロスハイブリダイズすることなく対応したウイルス核酸のみを的確に検出することができ、検出感度の低下も見られなかった(図5B)。

5. NAT 検定を用いたマイクロアレイシステムの評価(平成20年度)

既存のNAT検査と比較して、本研究の検出システムがどの程度の精度を持っているかを評価するため、実際のNAT検査に準じてヒト陰性血漿を用いて標準品のウイルス核酸を1,000IU(cp)/ml、100IU(cp)/ml、10IU(cp)/ml、1IU(cp)/mlの希釈系列で調整したものを検体として検証を行った。検体のウイルス核酸の希釈系列をChiron社のNATシステムを用いて検定した結果、検出限界(95% confidence interval)はHIV:10cp/ml、HCV:100IU/ml、HBV:100cp/mlであった(表6)。次に、NATに用いた検体と同じ検体を用いて、マイクロアレイによる検出を行った(図6)。マイクロアレイによる検出システムでは、途中の工程によりウイルス核酸をロスしてしまうことを考慮して、ウイルス核酸の検出にはHigh Pure Viral Nucleic Large Volume kitを使用して

2.5ml の検体から核酸を抽出した。最終的に PCR 反応液中に持ち込まれるウイルス濃度は $100\text{IU}(\text{cp})/\text{ml} = 50\text{IU}(\text{cp})/\text{Reaction}$ 、 $10\text{IU}(\text{cp})/\text{ml} = 5\text{IU}(\text{cp})/\text{Reaction}$ 、 $1\text{IU}(\text{cp})/\text{ml} = 0.5\text{IU}(\text{cp})/\text{Reaction}$ に相当すると換算される。また、ヒト血漿中からの核酸抽出条件での検出感度を比較するため、同様の条件に調整した PvB19 と WNV についてもマイクロアレイによるウイルス核酸の検出を試験した。その結果、いずれのウイルスにおいても $10\text{IU}(\text{cp})/\text{ml}$ まで高い再現性での検出ができることが確認された。HBV のみは $1\text{cp}/\text{ml}$ においても再現良く検出が可能であった。また、HIV と WNV では $1\text{cp}/\text{ml}$ でも検出できる場合があったが、十分な再現性は得られなかった。同一条件の検体を用いて比較した結果から、このアレイシステムによるウイルス検出能力は NAT 検査と同等以上の精度を持っていることが示唆された。また、ヒト血漿中から抽出したウイルス核酸を用いた試験で $10\text{IU}(\text{cp})/\text{ml}$ という高い検出感度が得られたことから、実際の血液検体中のウイルス核酸についても高い検出感度が得られることが予想される。

D. 考察

平成 19 年度に始まった、マイクロアレイを用いた新規の病原体検出システムの構築という本研究は、年度を重ね、ウイルス特異的 Digenerate プライマーの改善、最適な検出用プローブの選別、ステップ毎の核酸操作プロトコールの見直し等を繰り返しながら、更なる検

出精度の向上を目指して進み、着実に成果を上げることができた。最終年度に当たる平成 21 年度には、平成 20 年度までに作製された HIV、HCV、HBV の検出システムを改良するとともに、新たに PvB19 と WNV を加えた 5 種類のウイルス核酸に対する検出システムを構築することができた。その平成 21 年度の研究結果から本研究のマイクロアレイを用いた検出システムが各ウイルス核酸を高感度（PCR 反応液中に $1\text{--}10\text{IU}/\text{cp}$ ）に検出する能力を持っていることが確認された。また同時に、このシステムに用いた新規 Digenerate プライマーと検出用プローブが、それらのウイルスの変異株に対しても網羅的に対応できることを提示した。一般的に行われている NAT 検査における有効な検出限界は HIV で 30IU 、HCV で 10IU 、HBV で 15IU とされ、全ての変異株をカバーするには HIV で 100IU 、HCV で 30IU 、HBV で 100IU が限界とされていることから、このアレイシステムによるウイルス検出能力は NAT 検査と同等以上の精度を持っていることが示された。これは、既存の NAT 検査における Window period をカバーしうる十分な検出感度であるといえる。

高い検出感度という点では、近年、TaqMan-probe による Real-time PCR 法を応用した COBAS AMPLICOR System (Roche) や、標的遺伝子の 6 つの領域を 4 種類ののプライマーの組み合わせと鎖置換反応を利用して増幅させる LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification: 栄研化学) など、非常に高感度な病原体検出システムが開発

されている。しかし、それらのシステムは各病原体に特化した設計となっているため、同一検体中の複数の病原体を同時に検出することができない。その点、本研究により開発したウイルス検出システムは、対象とする病原体核酸に対して、特異的プライマーによる増幅を行い、また各病原体に対応した複数の検出用プローブを利用することができるため、同一検体中の複数の病原体核酸を1枚のDNA Chip上で同時に検出することが可能である。複数行わなければならない検査を一度に行うことができるため、検査全体に要する時間とコストを削減することができる。同時に、本検出システムの病原体のゲノム配列を基に、変異株を含めた網羅的なプライマーの設計し、共通性の高い検出用プローブを設定できるという特徴から、汎用性が高く、必要に応じてDNA Chip上の病原体検出用のプローブを追加、修正していくも容易なため、新規の病原体に迅速に対応することが可能であると期待される。

E. 結論

3年間の研究成果として、1枚のDNA-chip上で複数の病原体を同時に検出することが可能な、マイクロアレイを用いた病原体検出システムを構築した。本研究において開発されたウイルス検出システムは、既存の病原体検出システムと比較しても優れて有用性が高いものであることが提示できた。そこで、本研究の成果を基に平成21年末に特許出願の申請を行った。今後、更に検出対象となる病原体を増やしていけば、

輸血血液のみならず、移植臓器や再生医療に用いられる各種の細胞等についても応用可能であると考えられる。また、検出システムをKit化、自動化することにより、最終的には医療・検査機関において使用することを想定した安全、簡便、迅速な検出システムとして利用されることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許名称：「複数の遺伝子型を有するHIV、HCV、HBV、PvB19及びWNVの5種類のウイルスの網羅的な検出方法、ウイルス検出用プライマーセット、マイクロアレイ及びウイルス検出用キット」、出願番号：特願 2009-283366、提出日：H21. 12. 14、発明者：中島龍生、浜口功、滝澤和也、水谷哲也、遠藤大二

表 1. ウイルス特異的 Degenerate プライマーセット

Target-pathogen	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	GenBank Accession No - Position (nt)	Gene	Amplicons (bp)	
HIV	hiv-4F	ACAATTTTAAAGAARARGGG	NC_001802	4323 - 4343	Integrase	142
	hiv-4R	CTGTCYCTGWAAAYARACCCGR		4444 - 4464		
HCV	HCV-7F	GAAAGCGYCTAGCCATGGCGT	D90208	59 - 327	5'-UTR	269
	HCV-7R	TGCACGGTCTACGAGACCTCC		307 - 327		
HBV	hbv-7F	AYTAYCAAGGTATGTTGCCCG	X70185	450 - 470	S	266
	hbv-7R	GGAAAGCCCKRCGMACCACTG		695 - 715		
PvB19	PvB19-1F	AGTGGTGGTGAAAGCTCTGAA	NC_000883	2148 - 2168	NS1	122
	PvB19-1R	TCTCCTGAACTGGTCCCG		2252 - 2269		
WNV	WNV-1F	GGHTGTTGGTATGGNATGGA	NC_009942	3451 - 3590	NS1	141
	WNV-1R	CTCCTGGGTGRCCAAGAAC		3573 - 3591	NS2A	
IC	IC-5F	TCGAAGACGATCAGATACCGT	M10098	1147 - 1157	18s rRNA	129
	IC-6R	ATACTCCCCCGGAACC		1259 - 1275		

PCRによるウイルス核酸、及びICの増幅用いたプライマー（平成21年度）。塩基表記M: A/C、R: A/G、W: A/T、S: C/G、Y: C/T、K: G/T、V: A/C/G、H: A/C/T、D: A/G/T、B: C/G/T、N: A/T/C/G。

表 2. ウイルス検出用プローブ一覧

ID	Name	sequence (5'-3')	Target	Tm (°C)
1	IF1-1	GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT	HIV probe set1_Sense	78.33
2	IF1-2	GGGAAAAGAAATAGTAGACATAATAGCAACAGA		65.99
3	IF1-3	GTAGACATAATAGCAACAGACATACAAAATAAAG		62.86
4	IF1-4	CAGACATACAACTAAAGAAATTACAAAACAAATTAC		65.66
5	IF1-5	CAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGG		71.04
6	IR1-1	ACTATTCTTCCCTGCACTGTACCCCAATCC	HIV probe set1_Anti-sense	78.33
7	IR1-2	TCTGTGCTATTATGTCTACTATTCTTCCCC		65.99
8	IR1-3	CTTTAGTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTAC		62.86
9	IR1-4	GTAATTTGTTTTGTAATCTTTAGTTTGTATGTCTG		65.66
10	IR1-5	CCCTGTAATAAACCCGAAAATTTTGAATTTTTG		71.04
11	IF3-1	AATCAAGCAGGAATTTGGAATTCCTACAATCCC	HIV probe set3_Sense	75.66
12	IF3-2	TGGAATCCCTACAATCCCAAGTCAAGGAGTAGTAGAATC		78.38
13	IF3-3	CAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATGAATAAGAAATTAAG		68.74
14	IF3-4	AAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAAATC		73.58
15	IF3-5	CTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATT		73.58
16	IR3-1	GGGATTGTAGGGAATTCAAAATTCCTGCTTGATT	HIV probe set3_Anti-sense	75.66
17	IR3-2	GATTCTACTACTCCTTGACTTTGGGGATTGTAGGGAATCCA		78.38
18	IR3-3	CTTTAATCTTTATTATAGATTCTACTACTCCTTGACTTTG		68.74
19	IR3-4	GATGTTGAGGCTGATCTCTTACCTGTCTATAATTTCTT		73.58
20	IR3-5	AATTGGGATGAATACTGCCATTTGACTGCTGTCTTAAG		73.58
21	CF1-1	AACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGAC	HCV probe set1_Sense	77.46
22	CF1-2	TTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGCG		88.14
23	CF1-3	TGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGG		85.30
24	CF1-4	AACAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGA		80.24
25	CF1-5	ACGTCAAGTTCGGGGTGGCGGTCAGATCGTT		83.17
26	CF1-6	TCAGATCGTTGGTGGAGTTACTTGTGGCCGCGCAG		83.43
27	CR1-1	GTCTGGCAATTCGGGTACTACCCGTT	HCV probe set1_Anti-sense	77.46
28	CR1-2	CGCCAAATCTCCAGGCATTGAGCGGTTGATCCAAGAAA		88.14
29	CR1-3	CCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTTTCGGGGGCA		85.30
30	CR1-4	TCCTGTGGGCGACGGTTGGTGTACGTTTTGTT		80.24
31	CR1-5	AACGATCTGACCCGCCACCGGGAACTTGACGT		83.17
32	CR1-6	CTGCCGCAACAAGTAACTCCACCAACGATCTGA		83.43
33	BF23-1	TCTGTGCCCTTCTCATCTGCCGTCGCTGTGCACTT	HBV probe set2 or 3_Sense	84.58
34	BF23-2	ACCTCTGCACGTTGCATGGAGACCACCGTGAA		81.66
35	BF23-3	TGAACGCCCATCAGATCCTGCCCAAGGCTTACATAAG		81.71
36	BF23-4	GACCACCGTGAACGCCCATCAGATCCTGCCAAGGCTTAC		87.69
37	BF23-5	ATGTCAACGACCGACCTTGAGGCCTACTTCAAAGAC		78.70
38	BF23-6	ACTGTGTGTTAAGGACTGGGAGGAGCTGGGGGAG		80.15
39	BF23-7	AGGAGATTAGTTAAAGGCTTTGATTAGGAGGC		69.72
40	BR23-1	AAGTGACACGGCCGCGCAGATGAGAAGGCACAGA	HBV probe set2 or 3_Anti-sense	84.58
41	BR23-2	TTACCGGTGGTCTCCATGCAACGTCAGAGGT		81.66
42	BR23-3	CTTATGTAAGACCTTGGCAGGATCTGATGGCGTTCA		81.71
43	BR23-4	GTAAGACCTTGGCAGGATCTGATGGCGTTACCGGTGGTC		87.69
44	BR23-5	GTCTTTGAAGTAGGCTCAAGGTCGGTCTGATGACAT		78.70
45	BR23-6	CTCCCCAGCTCCTCCAGTCTTAAACACACAGT		80.15
46	BR23-7	GCTCTAATAACAAAGACCTTTAACCTAATCTCCT		69.72
47	BF4-1	CTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGG	HBV probe set4_Sense	75.27
48	BF4-2	CTTCTGATTATCAAGGTATGTTGCCGTTTGTCTCTC		77.84
49	BF4-3	TGCTCTAATTCAGGATCAACAAACACAGTAC		73.16
50	BF4-4	ATTCCATCCCATCCTGCTGGCTTTTCGAAAATACC		84.11
51	BF4-5	CCTATGGGAGTGGCCCTCAGTCCGTTTCTTGTGGTC		83.69
52	BF4-6	GTCCGTTTCTTGGCTCAGTTTACTAGTCCATTGTTCAG		80.06
53	BR4-1	CCAGAAGAACAACAAGAAGATGAGGCATAGCAG	HBV probe set4_Anti-sense	75.27
54	BR4-2	GAGGACAAACGGGCAACATACCTTGATAATCCAGAAG		77.84
55	BR4-3	GTAAGGTTGTTGTTGATCCTGGAATTAGAGGACA		73.16
56	BR4-4	GGTATTTGCGAAAGCCAGGACGATGGGATGGGAAT		84.11
57	BR4-5	GAGCCAAGAGAAACGGACTGAGGCCACTCCATAGG		83.69
58	BR4-6	CTGAACAAATGGCACTAGTAACTGAGCCAAGAGAAACGGAC		80.06
59	CF2-1	AGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGA	HCV probe set4_Sense	86.12
60	CF2-2	CTAGCCGAGTAGTGTGGTCCGCAAGGCCTTG		81.47
61	CF2-3	GCGAAAGGCCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCT		81.68
62	CR2-1	TCCGGTGTACTCACCGGTTCCGACAGCACTATGGCTCT	HCV probe set4_Anti-sense	86.12
63	CR2-2	CAAGGCCCTTCCGCAACCAACGCTACTCGGCTAG		81.47
64	CR2-3	AGCACCCATCAGGCACTACCAAGGCCTTTCGC		81.68
65	PvB19F-1	GGCGCCTGGAACACTGAGACCCCGCCTCTAGTAC	PvB19 probe set1_Sense	84.65
66	PvB19F-2	GGCGCCTGGAACACTGAAACCCCGCCTCTAGTAC		84.30
67	PvB19F-3	GAACTCAGTGAAGCAGCTTTTCAACCTCATCACTCC		77.89
68	PvB19R-1	GTAAGAGCGCGGGGCTCAGTGTTCAGGCGCC	PvB19 probe set1_Anti-sense	84.65
69	PvB19R-2	GTAAGAGCGCGGGGTTTCAAGTGTTCAGGCGCC		84.30
70	PvB19R-3	GGAGTGATGAGGTTGAAAAGCTGCTTCACTGAGTTC		77.89
71	WNVF-1	ATGATTGATCCTTTTCAAGCTGGGCTTCTGGT	WNV probe set1_Sense	76.55
72	WNVF-2	ATGATTGACCCCTTTTCAAGTGGGCTTCTGGTCTG		79.87
73	WNVF-3	ATGATTGATCCTTTTCAAGCTGGGCTTCTGGT		76.55
74	WNVF-4	ACGCCGACATGATTGATCCTTTTCAAGTGGGCTT		81.41
75	WNVF-1	ACCAGAAGGCCCAAGCTGAAAAGGATCAATCAT	WNV probe set1_Anti-sense	76.55
76	WNVF-2	CGACCAGAAGGCCCAAGCTGAAAAGGATCAATCAT		79.87
77	WNVF-3	ACCAGAAGGCCCAAGCTGAAAAGGATCAATCAT		76.55
78	WNVF-4	AGGCCAAGCTGAAAAGGATCAATCATGTCGGCGT		81.41
79	IC-1	GTCGTAGTCCGACCATAAACGATGCCGACCGG	Internal Control (IC)	81.27
80	IC-2	GGCGATGCGGCGGCTTATTCACGACCC		86.04
81	IC-3	CCGCCGGGAGCTTCCGGGAAACCAAGTCTTTG		86.89
82	IC-4	TCGAAGACGATCAGATACCGTCGATGTTCCGACC		78.14
83	QC	TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGG	Quality control prob (QC)	68.77
84	Anti-QC	CCCATATCGTTTCATAGCTTCTGCCAA	Antisense-QC	68.77

*Calculate the melting temperature(Tm) using online software NetPrimer provide for PREMIER Biosoft International