

|       |                       |                                  |
|-------|-----------------------|----------------------------------|
| Set 1 | RT primer ; A12RT379R | GCTAGTCAAATTTAACCGAATTTTTTCCCAT  |
|       | PCRf ; 295F           | GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA             |
|       | PCRr ; 374R           | CGAATTTTTTCCCATCGCGA             |
|       | Probe ; E-326A-F      | GCGTC(A)GTATTA                   |
| Set 2 | RT primer ; A12RT379R | GCTAGTCAAATTTAACCGAATTTTTTCCCAT  |
|       | PCRf ; 295F           | GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA             |
|       | PCRr ; 374R           | CGAATTTTTTCCCATCGCGA             |
|       | Probe ; E-326G-F      | GCGTCA(G)TATTA                   |
| Set 3 | RT primer ; A12RT384R | GCTAGTCAAATTTGGCCTTAACCGAATTTTTT |
|       | PCRf ; 295F           | GGAGGCTAGAAGGAGAGAGA             |
|       | PCRr ; 379R           | TTAACCGAATTTTTTCCCAT             |
|       | Probe ; E-326G-F      | GCGTCA(G)TATTA                   |

表 2-2 : Cycleave RT-PCR 法で用いた primer 配列. (斜字) は RNA 配列を示す.

| primer | HIV-1 LTR | HIV-1 psi |
|--------|-----------|-----------|
| 陽性数    | 42 ± 5    | 46 ± 7    |
| %      | 平均 28.0   | 平均 30.7   |

表 3-2 : 7400 コピーのモデルレトロウイルス核酸を 150 等分して定量的 PCR をかけたときの陽性検体数

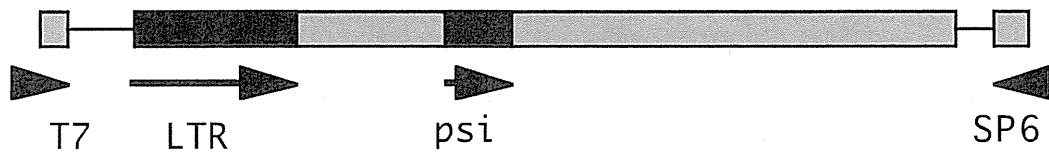


図 2-1 : モデルレトロウイルス核酸を作製するために利用した鋳型 DNA

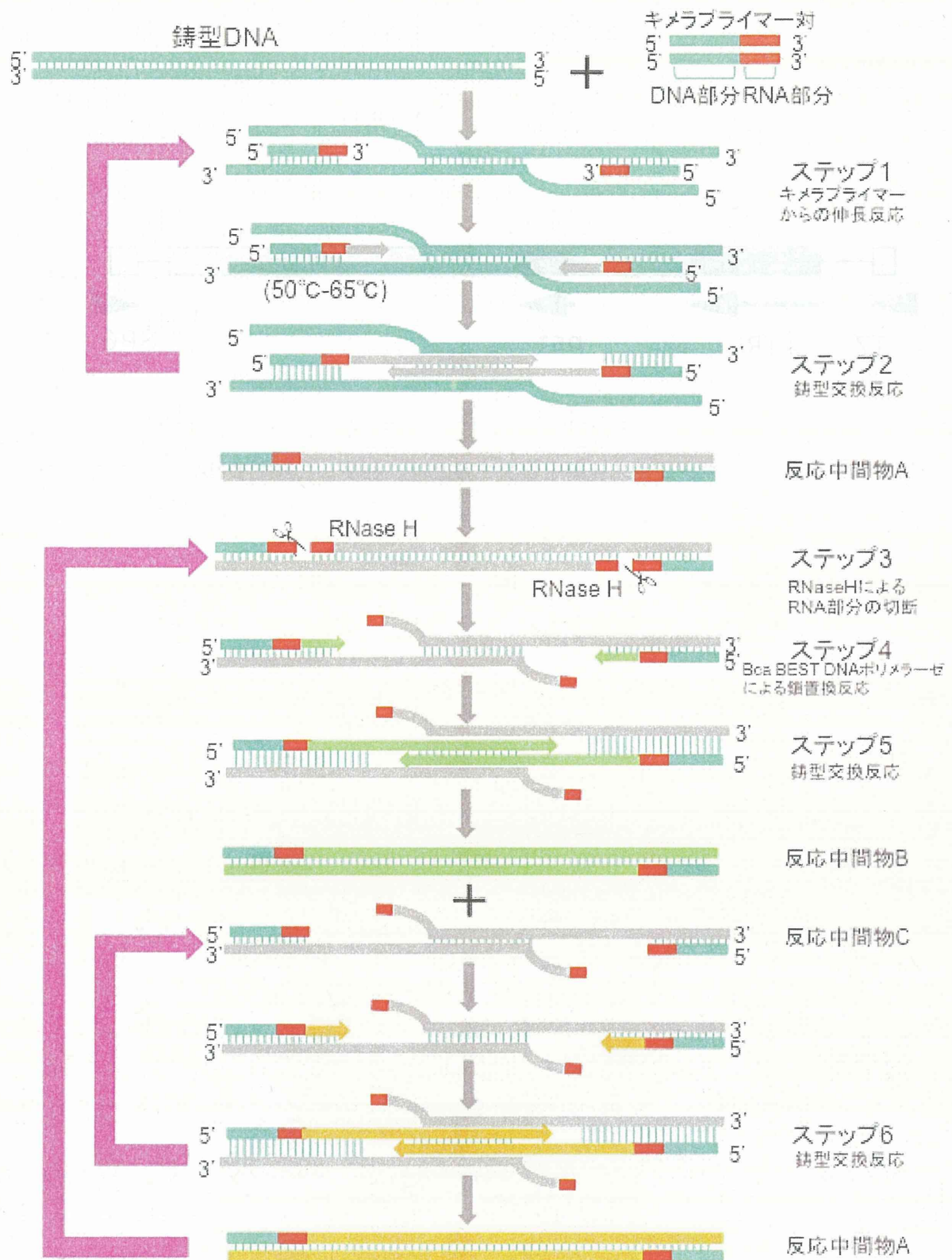


図 2-2 : ICAN 反応の基本原理

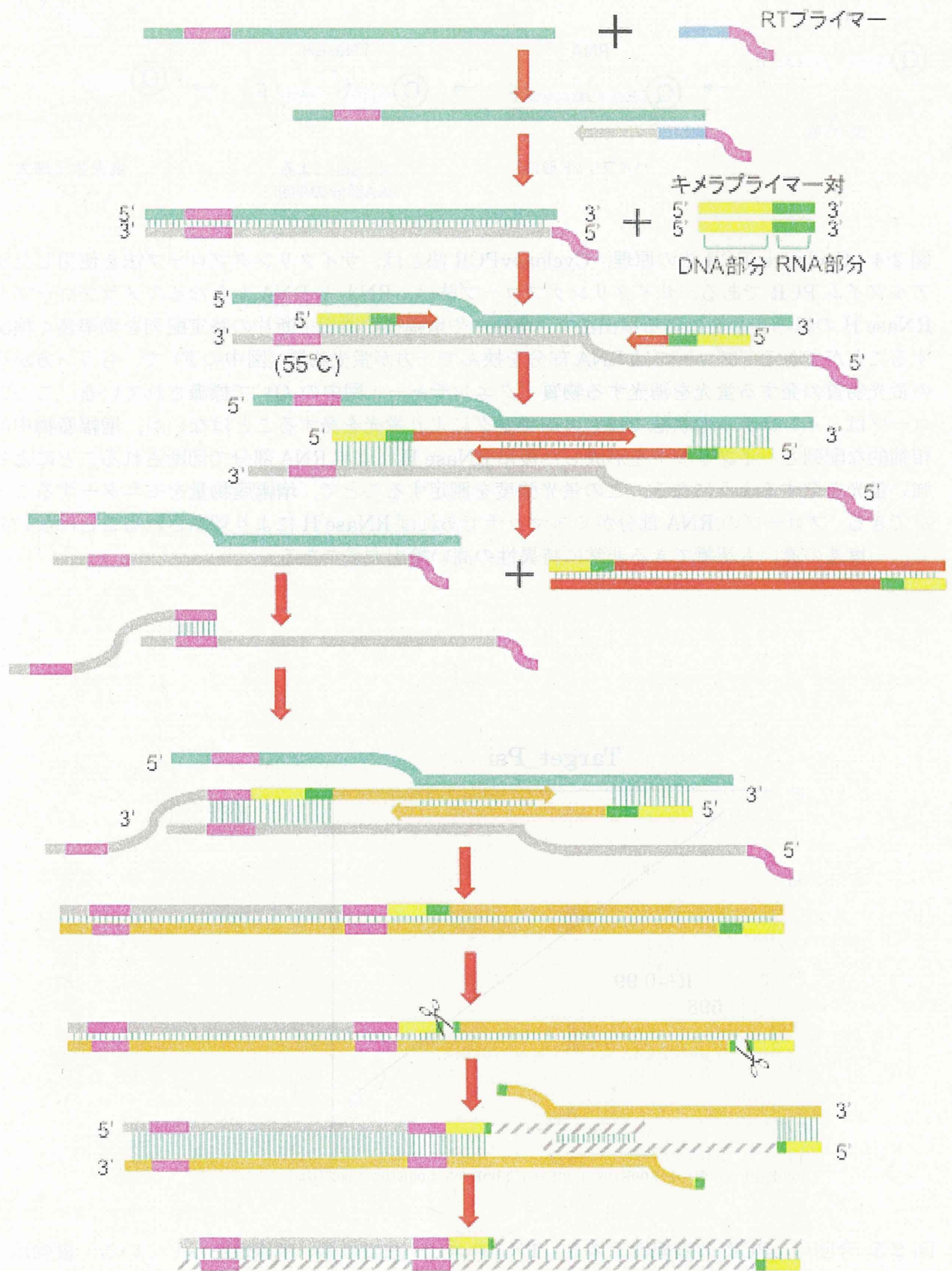


図 2-3 : Ladder Forming ICAN 法の原理

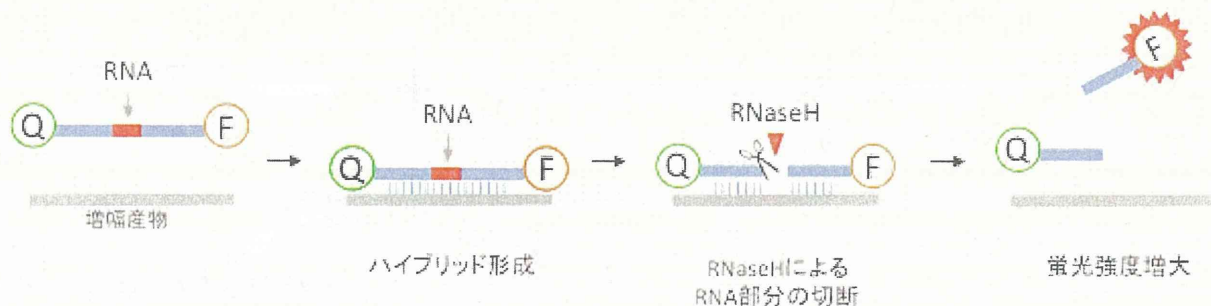


図 2-4 : Cyclecleave PCR 法の原理. CyclecleavePCR 法とは, サイクリングプローブ法を使用したリアルタイム PCR である. サイクリングプローブ法は, RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる検出法で, 増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができる. プローブは RNA 部分を挟んで一方が蛍光物質 (図中の F) で, もう一方がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質 (クエンチャー: 図中の Q) で標識されている. このプローブは, インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはないが, 増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより, 強い蛍光を発するようになる. この蛍光強度を測定することで, 増幅産物量をモニターすることができる. プローブの RNA 部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないのので, 一塩基の違いも認識できる非常に特異性の高い検出方法である.

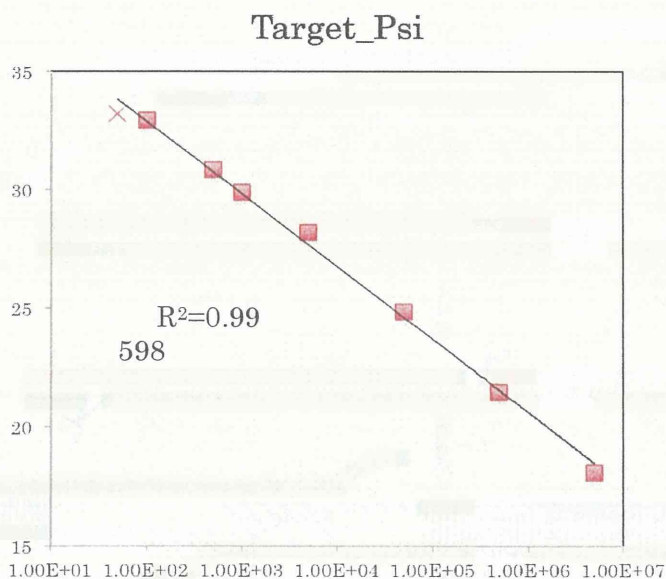


図 2-5: 今回の qPCR の直線性テスト.  $1 \times 10^2$  コピーまでは高い直線性を示している. 縦軸は, Ct 値 (PCR 増幅産物 (Psi 配列) がある一定量 (閾値) に達したときのサイクル数) を示し, 横軸はモデルウイルスゲノム RNA のコピー数を示している.



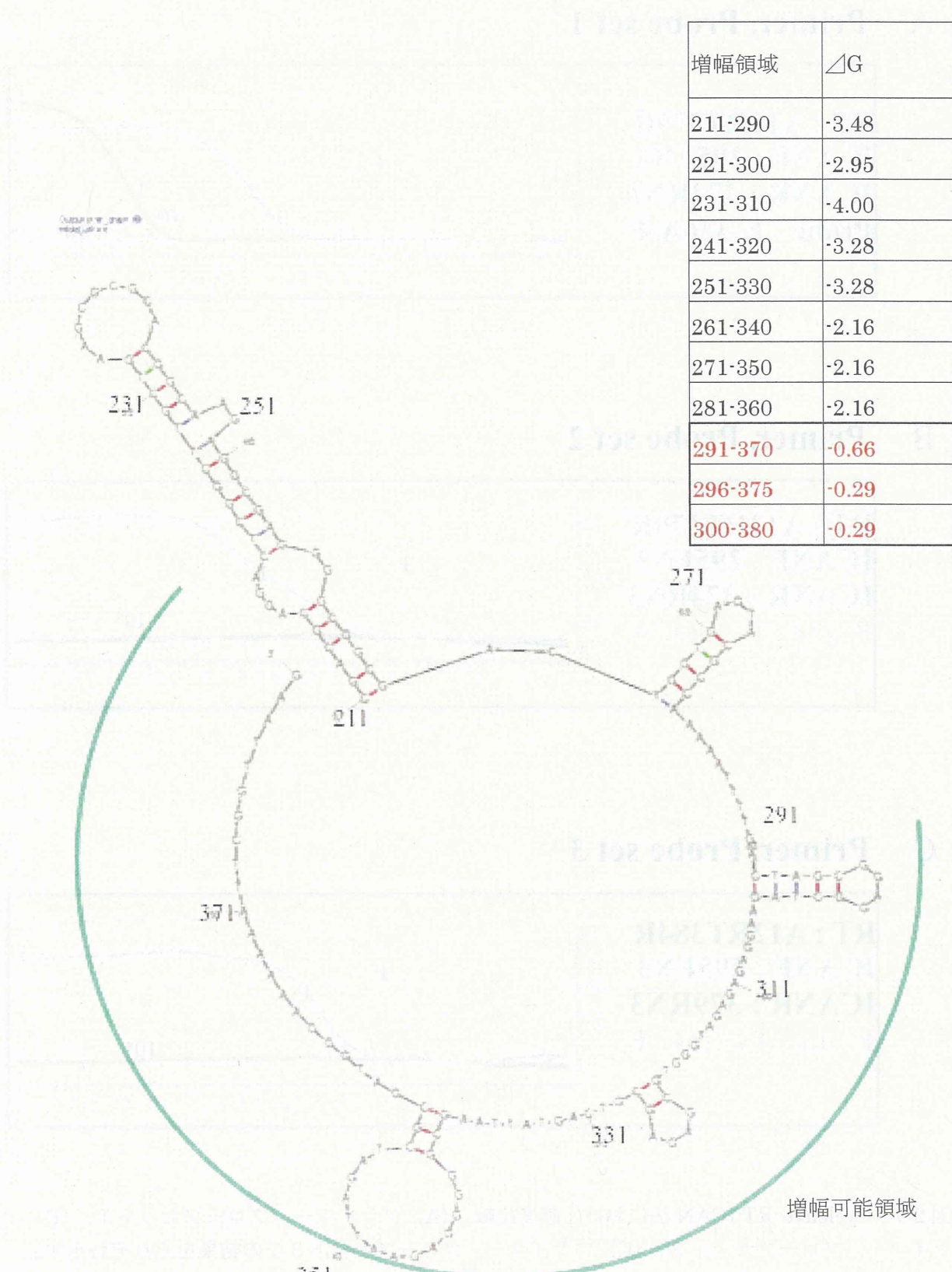
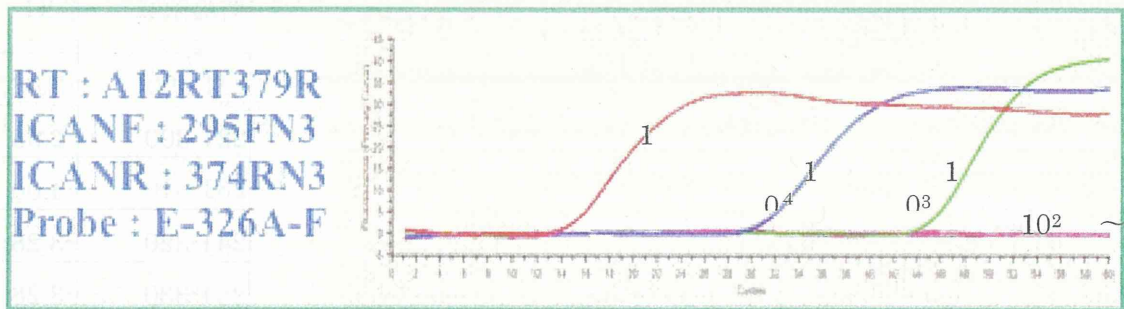


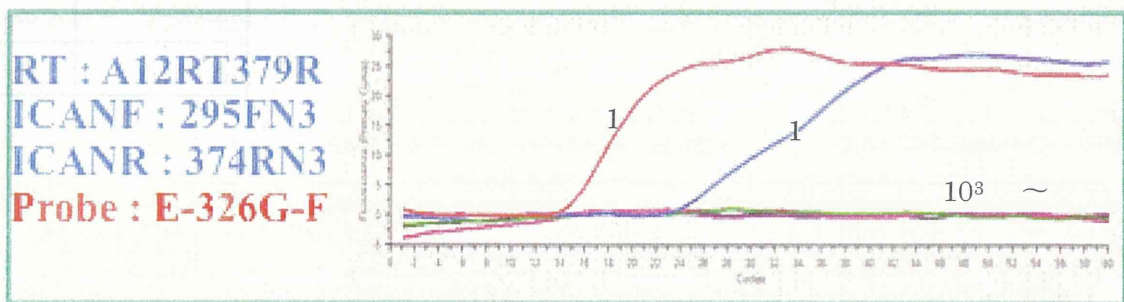
図 2-6 : 増幅可能領域の選定.

dG - 15.23 (7Nov27 20:38:37)

### A Primer, Probe set 1



### B Primer, Probe set 2



### C Primer, Probe set 3

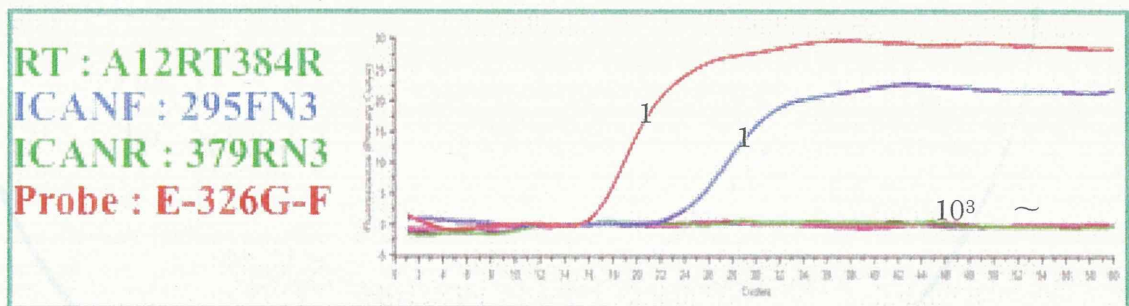
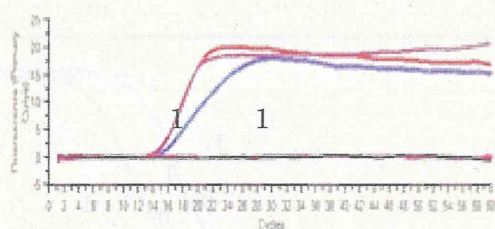
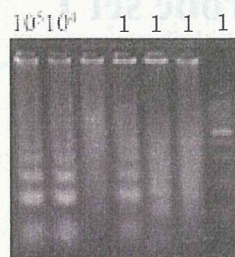


図 2-7 : Cycleleave RT-ICAN 法における感度比較. (A) プライマー, プローブセット 1, (B) プライマー, プローブセット 2, (C) プライマー, プローブセット 3 での結果をそれぞれ示す.

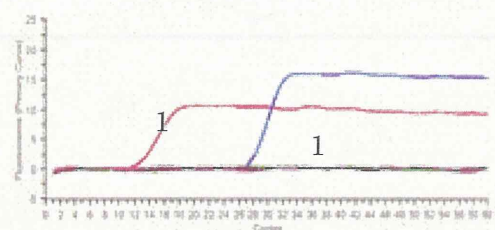
A Tli RNaseH 7.5U



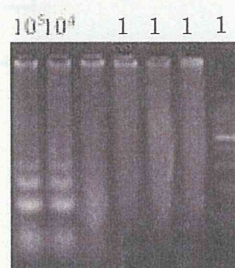
B



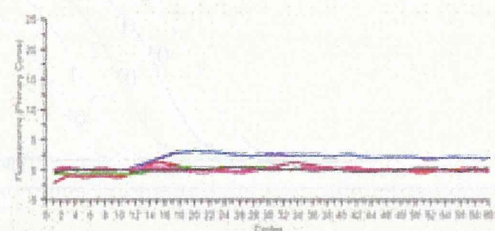
C Tli RNaseH 5U



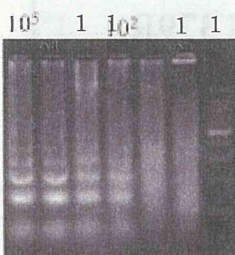
D



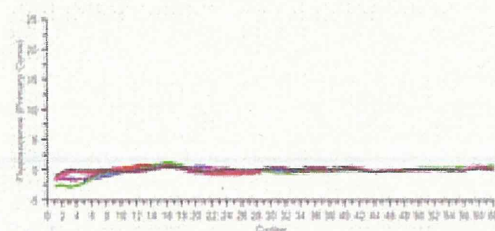
E Tli RNaseH 2.5U



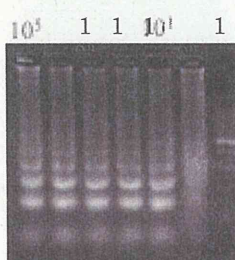
F



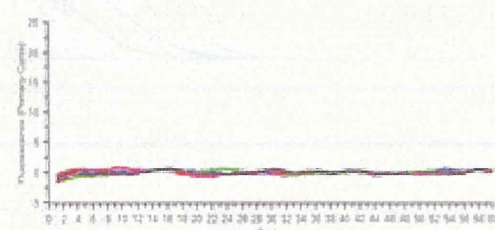
G Tli RNaseH 1U



H



I Tli RNaseH 0.5U



J

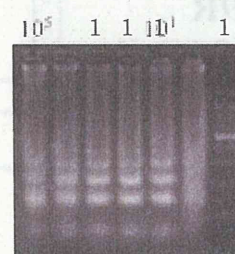
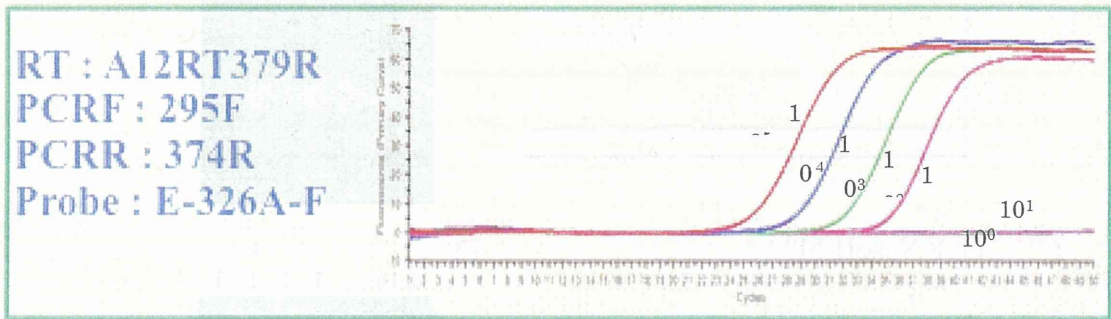


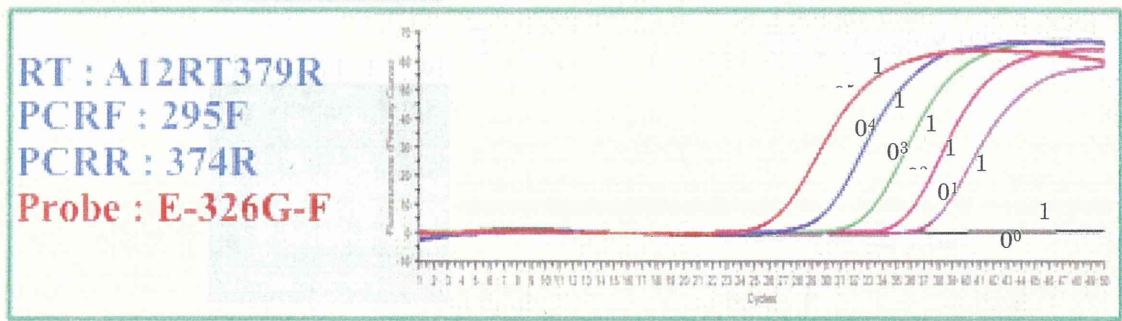
図 2-8: Cycleleave RT-ICAN 法の反応条件検討. 各 Tli RNaseH 濃度において, Cycleleave RT-ICAN 反応を, リアルタイム蛍光検出法 (A, C, E, G, I) ならびにアガロースゲル電気泳動法 (B, D, F, H, J) による検出で確認した. (A, B) Tli RNaseH 濃度 7.5 ユニット, (C, D) Tli RNaseH 濃度 5 ユニット, (E, F) Tli RNaseH 濃度 2.5 ユニット, (G, H) Tli RNaseH 濃度 1 ユニット, (I, J) Tli RNaseH 濃度 0.5 ユニット使用での結果をそれぞれ示す.



### A Primer, Probe set 1



### B Primer, Probe set 2



### C Primer, Probe set 3

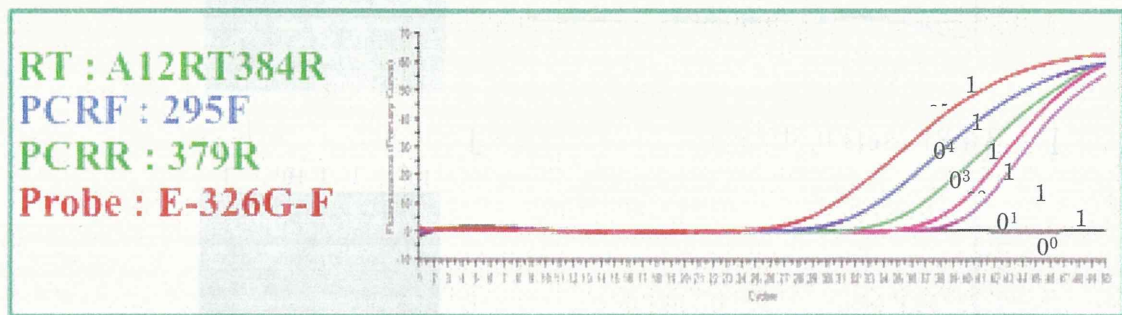


図 2-9 : Cycleleave RT-PCR 法の検出感度. 各モデルレンチウイルス核酸コピー数において, Cycleleave RT-PCR 反応を行った. (A)プライマー, プローブセット 1, (B)プライマー, プローブセット 2, (C)プライマー, プローブセット 3 を用いた結果をそれぞれ示す.

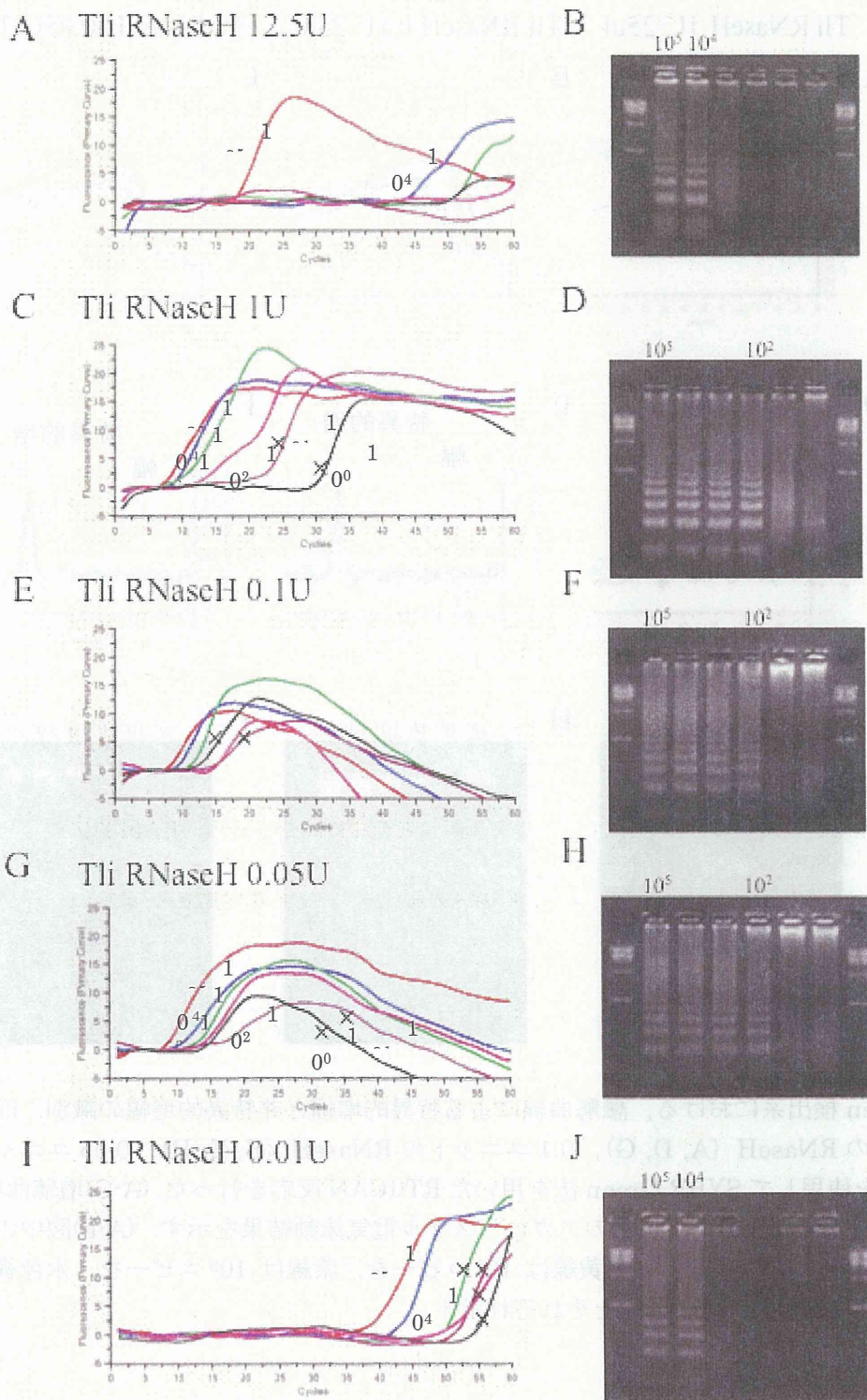


図 2-10 : SYBR Green 検出系を用いた RT-ICAN 法による検出感度. 各 Tli RNaseH 濃度において, SYBR RT-ICAN 反応を, リアルタイム蛍光検出法 (A, C, E, G, I) ならびにアガロースゲル電気泳動法 (B, D, F, H, J) による検出で確認した. (A, B) Tli RNaseH 濃度 12.5 ユニット, (C, D) Tli RNaseH 濃度 1 ユニット, (E, F) Tli RNaseH 濃度 0.1 ユニット, (G, H) Tli RNaseH 濃度 0.05 ユニット, (I, J) Tli RNaseH 濃度 0.01 ユニット使用での結果をそれぞれ示す.



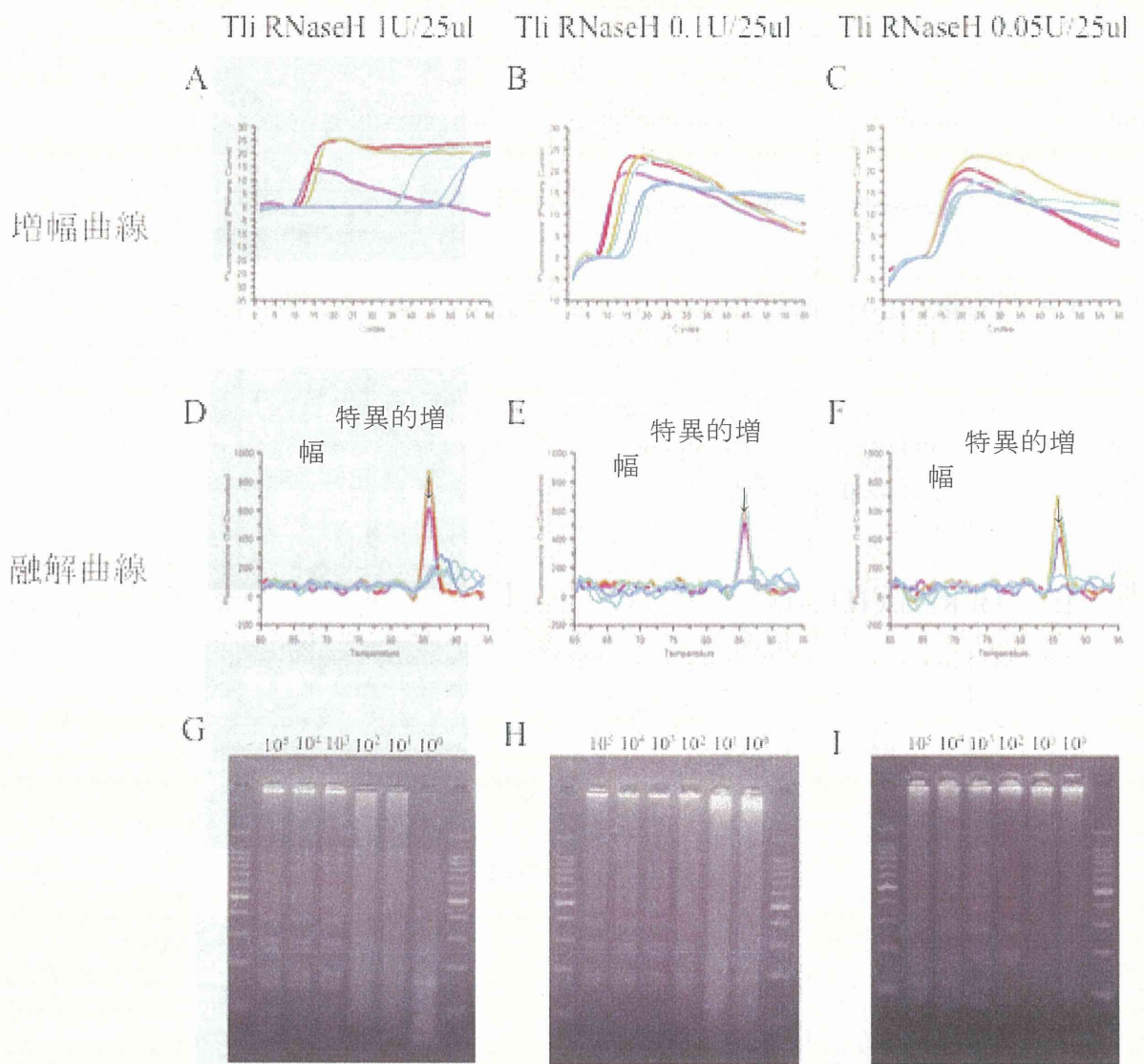
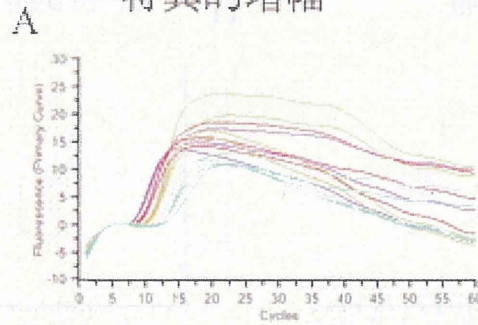


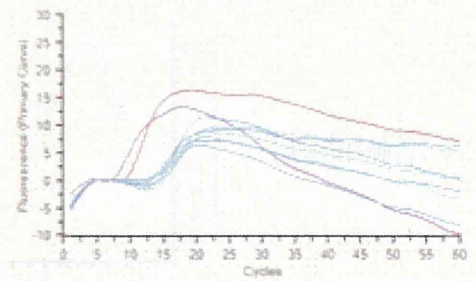
図 2-11 : SYBR Green 検出系における，融解曲線による特異的増幅と非特異的増幅の識別．反応系あたり 1 ユニットの RNaseH (A, D, G)，0.1 ユニットの RNaseH (B, E, H)，0.05 ユニットの RNaseH (C, F, I) を使用して SYBR Green 法を用いた RT-ICAN 反応を行った．(A-C) 増殖曲線，(D-F) 融解曲線，(G-I) RT-ICAN 反応産物のアガロースゲル電気泳動結果を示す．(A-F) 図中の赤線は  $10^5$  コピーを，橙線は  $10^4$  コピーを，黄線は  $10^3$  コピーを，紫線は  $10^2$  コピーを，水色線は  $10^1$  コピーを，青線は  $10^0$  コピーでの結果をそれぞれ示す．

反応液量25 $\mu$ lにおける感度 Tli RNaseH: 0.05U/25 $\mu$ l

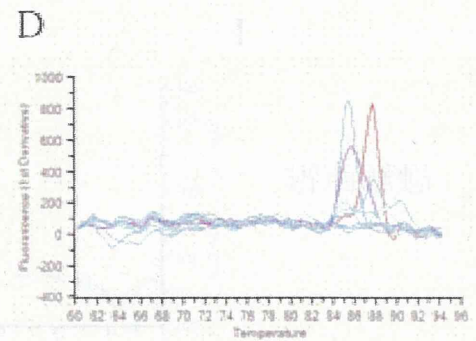
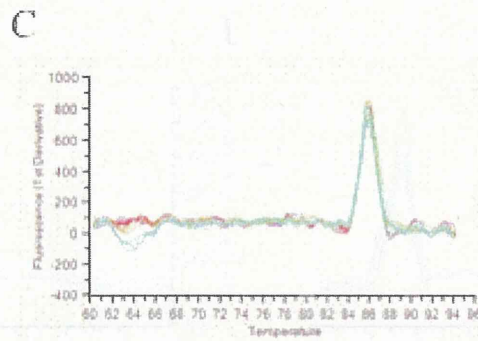
増幅曲線 特異的増幅



増幅曲線 非特異的増幅



融解曲線



E

|                 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|---|---|---|---|
| 10 <sup>7</sup> | A | U | U | U |
| 10 <sup>4</sup> | B | U | U | U |
| 10 <sup>3</sup> | C | U | U | U |
| 10 <sup>2</sup> | D | U | U | U |
| 10 <sup>1</sup> | E | U | U | U |
| NTC             | F | U | U | U |
|                 | G |   |   |   |
|                 | H |   |   |   |

F

|                 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|---|---|---|---|
| 10 <sup>5</sup> | A | U | U | U |
| 10 <sup>4</sup> | B | U | U | U |
| 10 <sup>3</sup> | C | U | U | U |
| 10 <sup>2</sup> | D | U | U | U |
| 10 <sup>1</sup> | E | U | U | U |
| NTC             | F | U | U | U |
|                 | G |   |   |   |
|                 | H |   |   |   |



反応液量200 $\mu$ Lにおける感度 Tli RNaseH:0.4U/200 $\mu$ L

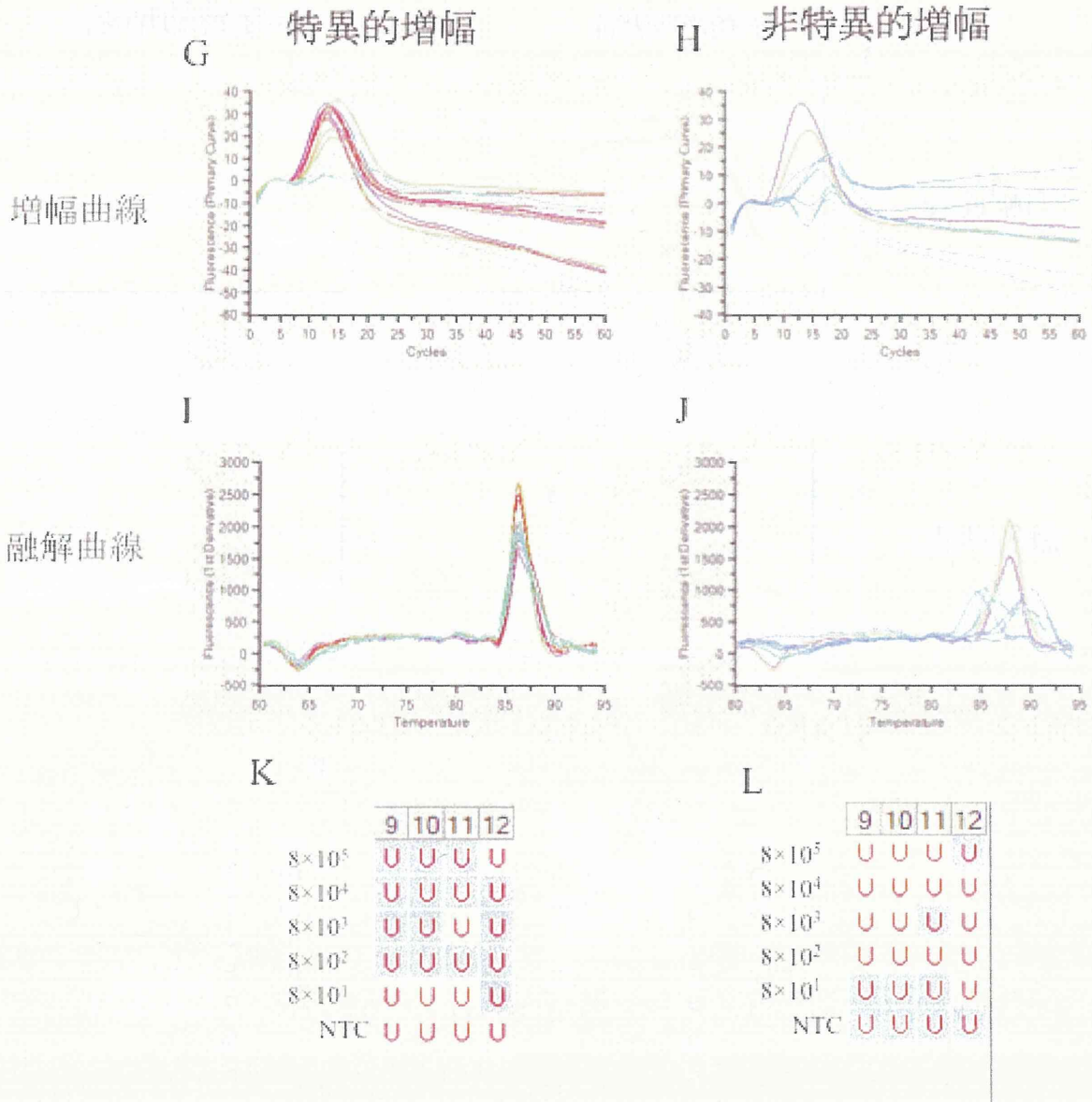


図 2-12 : SYBR Green 検出系を用いた RT-ICAN 法の反応液量における条件検討. (A-F) 反応液量 25  $\mu$ L における RT-ICAN 反応. (G-L) 反応液量 200  $\mu$ L における RT-ICAN 反応. (E, F, K, L) それぞれ, モデルレンチウイルス核酸の各希釈系列を鋳型に, 反応を quadruplicate (4 重) で行った. (A, B, G, H) 増殖曲線, (C, D, I, J) 融解曲線を示す. (A, C, G, I) は融解曲線から判断した特異的増幅を, (B, D, H, J) は融解曲線から判断した非特異的増幅を示す. (E, K) は特異的増幅を示したウェルを水色で示した. (F, L) は非特異的増幅を示したウェルを水色で示した.

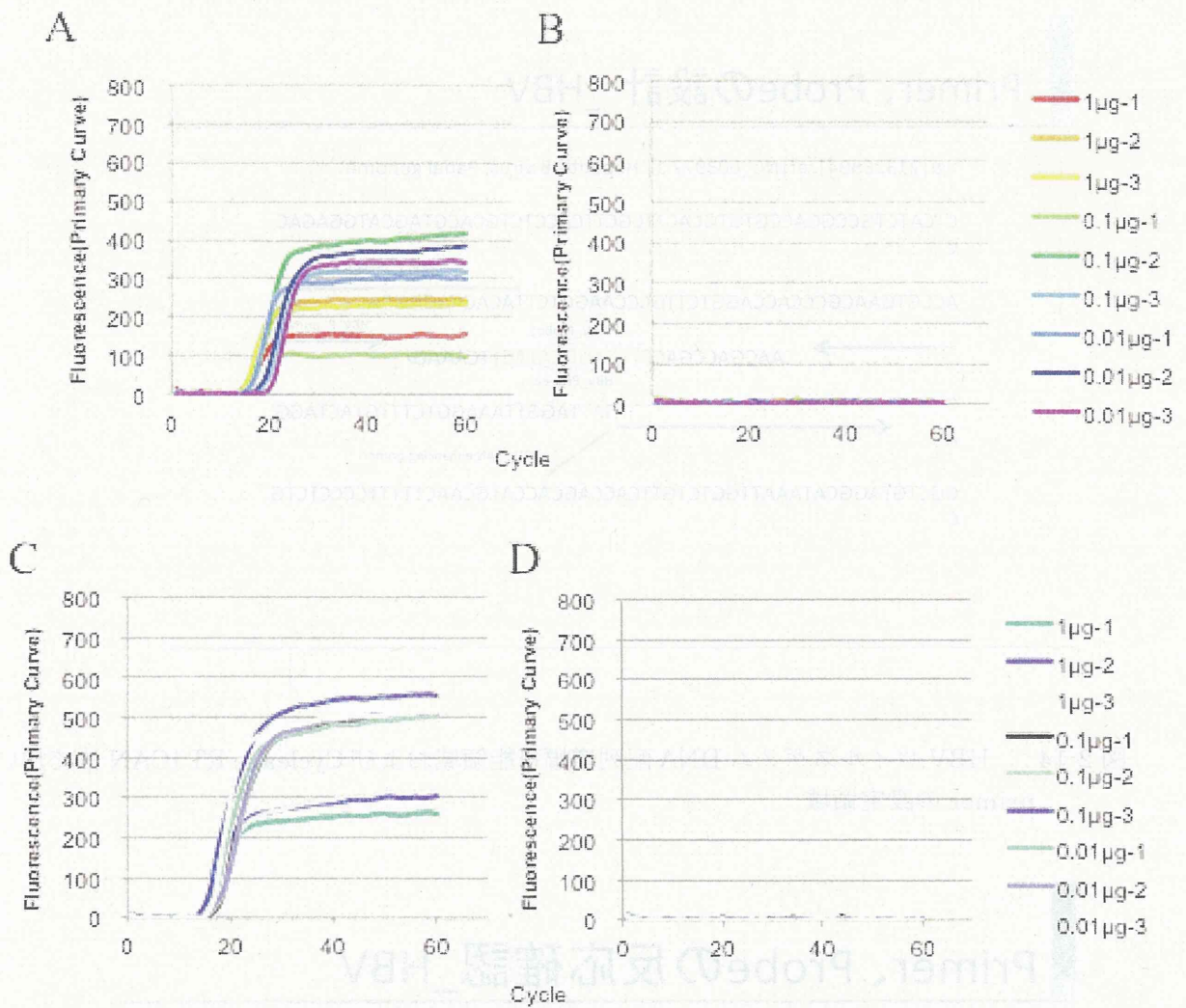


図 2-13: 幹細胞を用いたウイルス否定試験の実施例. (A, B) hADMPC 細胞, (C, D) iPS 細胞 (Tic, 動物成分不含・フィーダーフリー培養) の結果を示す. (A, C) それぞれの細胞より採取した RNA 各重量に,  $10^4$  コピーのモデルウイルス核酸を混入させたもので Cycleave RT-ICAN を行った増殖曲線. (B, D) それぞれの細胞より採取した RNA より Cycleave RT-ICAN を行った増殖曲線.

## Primer、Probeの設計\_HBV

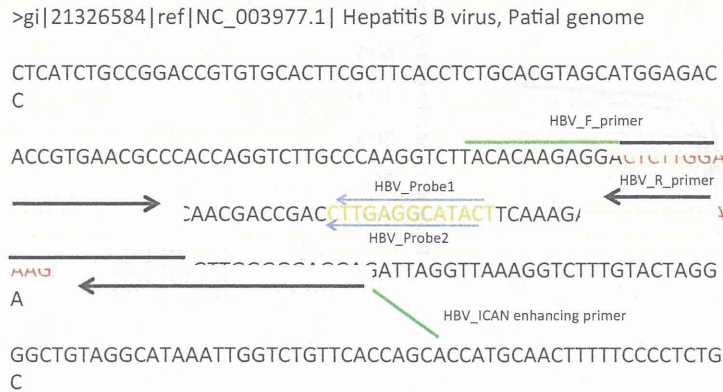


図 2-14: HBV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

## Primer、Probeの反応確認\_HBV

### Primer, Probe set 1

ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe1  
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

### Primer, Probe set 2

ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe2  
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

(斜字)はRNA

### Primer, Probe set 3

HBV\_ICAN enhancing primer  
tcctcttgtaCTCCTCCCCAACTCCTCCC  
ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe1  
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

### Primer, Probe set 4

HBV\_ICAN enhancing primer  
tcctcttgtaCTCCTCCCCAACTCCTCCC  
ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe2  
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

図 2-15: HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報



## Primer、Probeの反応確認\_HBV

### ICAN反応

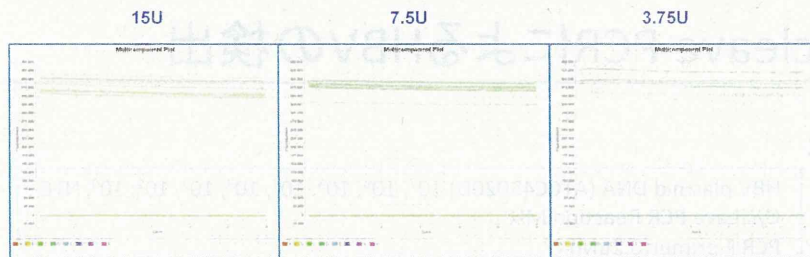
HBV plasmid DNA (ATCC45020D)  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , NTC  
 ICAN buffer  
 ICAN F primer(1uM)  
 ICAN R primer (1uM)  
 ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)  
 Cycling probe (0.2uM)  
 BcaBEST DNA Pol. 11U  
 Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul  
 55C, 90min

図 2-16 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法の確認反応条件

## Primer、Probeの反応確認\_HBV

Primer, Probe set 1

Probeによる検出されず。



Primer, Probe set 2

Probeによる検出されず。

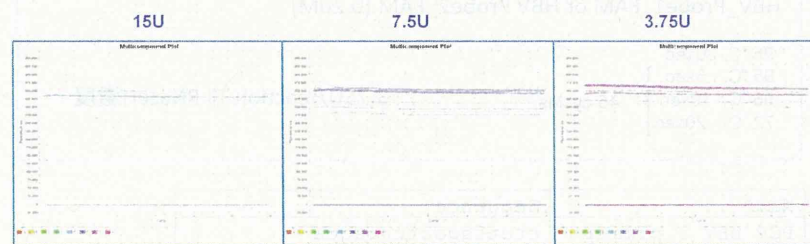


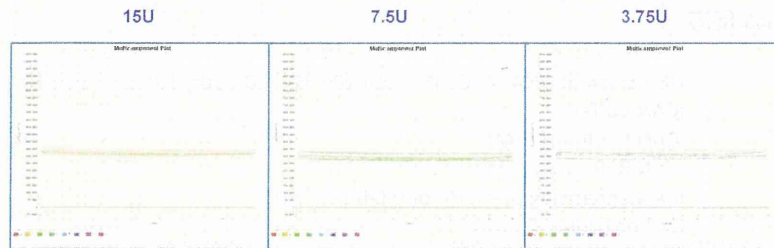
図 2-17 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験



# Primer、Probeの反応確認\_HBV

Primer, Probe set 3

Probeによる検出されず。



Primer, Probe set 4

10<sup>3</sup> copyのtemplateを検出

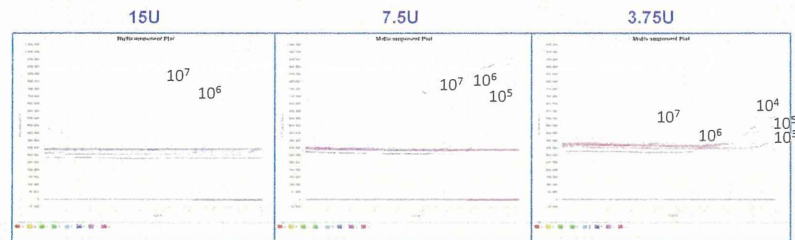


図 2-18: HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Primer, Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設計した Primer,Probe を用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

# Cycleave PCRによるHBVの検出

## PCR

HBV plasmid DNA (ATCC45020D) 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, NTC  
 Cycleave PCR Reaction Mix  
 PCR F primer(0.2uM)  
 PCR R primer (0.2uM)  
 HBV\_Probe1\_FAM or HBV Probe2\_FAM (0.2uM)

95 °C, 30sec  
 95 °C, 5sec  
 55 °C, 10sec  
 72 °C, 20sec } 45 cycles                      3.75U/reaction Tli RNaseH濃度

| Name             | Sequence                             |
|------------------|--------------------------------------|
| PCR HBV F primer | ctcttgactctcagca                     |
| PCR HBV R primer | tcctcccagctctttaaca                  |
| HBV_Probe1_FAM   | Eclips-AGT <sup>a</sup> TGCCTCAA-FAM |
| HBV_Probe2_FAM   | Eclips-GT <sup>a</sup> TGCCTCAAG-FAM |

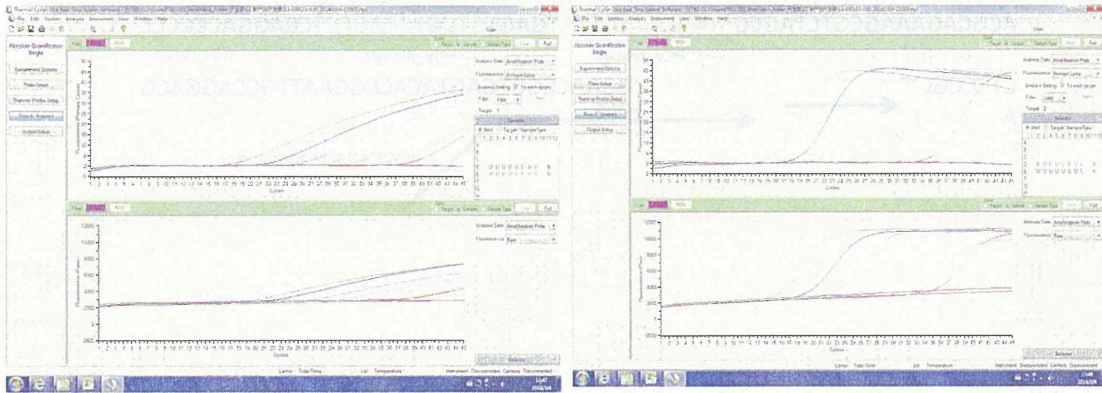
図 2-19: Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出のための反応条件

# Cycleave PCRによるHBVの検出

DNA プライマー

HBV\_Probe1\_FAM

HBV\_Probe2\_FAM



Cycleave PCRによる検出感度は10 copy  
HBV\_Probe2の方が切断効率が良い。

図 2-20 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出

## Primer、Probeの設計 \_ HCV

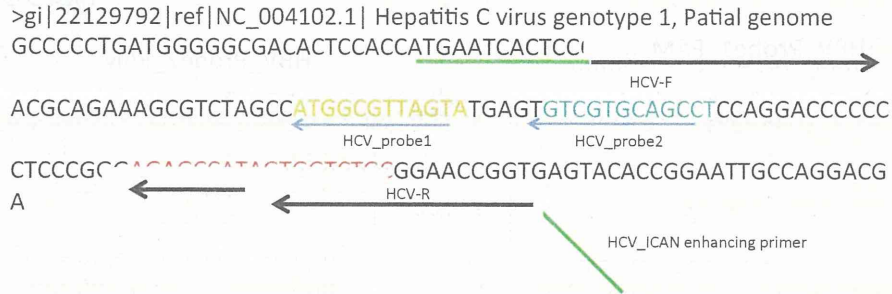


図 2-21: HCV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

### Primer, Probe set 1

ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe1  
 Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

### Primer, Probe set 2

ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe2  
 Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

(斜字)はRNA

### Primer, Probe set 3

HCV\_ICAN enhancing primer  
 gggagtgattcaCTCACCGGTTCCGAGACCA  
 ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe1  
 Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

### Primer, Probe set 4

HCV\_ICAN enhancing primer  
 gggagtgattcaCTCACCGGTTCCGAGACCA  
 ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe2  
 Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

図 2-22: HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報



## Primer、Probeの反応確認\_HCV

### ICAN反応

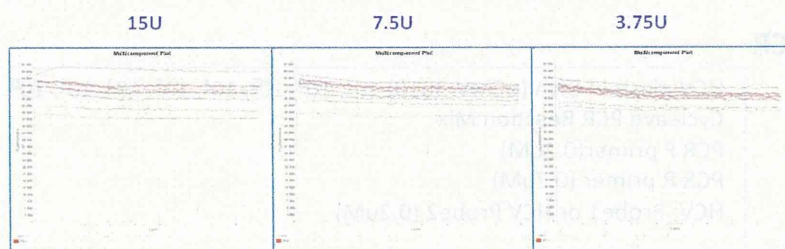
HCV plasmid DNA (pCMV-3010)  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , NTC  
ICAN buffer  
ICAN F primer(1uM)  
ICAN R primer (1uM)  
ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)  
Cycling probe (0.2uM)  
BcaBEST DNA Pol. 11U  
Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul  
55C, 90min

図 2-23 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleleave RT-ICAN 法の確認反応条件

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

Primer, Probe  
set 1

Probeによる  
検出されず。



Primer, Probe  
set 2

Probeによる  
検出されず。

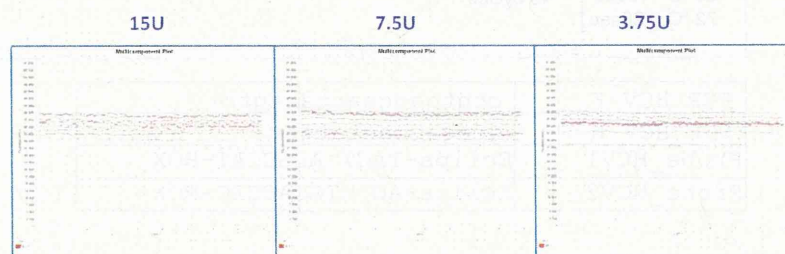


図 2-24 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験