

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4634604号
(P4634604)

(45) 発行日 平成23年2月16日 (2011. 2. 16)

(24) 登録日 平成22年11月26日 (2010. 11. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 19 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2000-528711 (P2000-528711)	(73) 特許権者	394010986
(86) (22) 出願日	平成11年1月19日 (1999. 1. 19)		アクゾ・ノベル・エヌ・ペー
(65) 公表番号	特表2002-500893 (P2002-500893A)		オランダ国、6824・ペー・エム・アー
(43) 公表日	平成14年1月15日 (2002. 1. 15)		ネム、フエルベルウエヒ・76
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/000323	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W01999/037804		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成11年7月29日 (1999. 7. 29)	(74) 代理人	100105393
審査請求日	平成18年1月11日 (2006. 1. 11)		弁理士 伏見 直哉
(31) 優先権主張番号	98200184.4	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成10年1月23日 (1998. 1. 23)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バクテリアの生存率に関するマーカーとしての E F - T u m R N A

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

伸長因子 E F - T u をコードする m R N A が核酸増幅反応における標的として用いられ、かつ該 m R N A の存在及び／又は量が決定される、バクテリアの生存率の評価のための方法。

【請求項 2】

核酸増幅反応が転写依拠増幅反応である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

転写依拠増幅反応が N A S B A である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

増幅された m R N A が、相補的な標識されたプローブを用いて検出される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

プローブに電気化学発光標識が供与されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

バクテリアがミコバクテリア (M i c o b a c t e r i a) である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ミコバクテリアエの種が結核菌 (M. t u b e r c u l o s i s) 又はらい菌 (M. l e p r a e) である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

15～50ヌクレオチド長であり、かつ配列番号1～6または8に記された配列のうちの一つ又はそれらの相補的配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法において使用するための、バクテリアEF-Tu mRNA配列の配列と相補的なプローブまたはプライマー。

【請求項 9】

15～50ヌクレオチド長であり、かつ配列番号7に記された配列またはその相補的配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法において使用するための、バクテリアEF-Tu mRNA配列の配列と相補的なプローブまたはプライマー。

【請求項 10】

それぞれ、配列番号9に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドと、配列番号2に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドとからなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法において使用するための、結核菌のEF-Tu遺伝子内の配列の増幅のためのプライマー対。

【請求項 11】

それぞれ、配列番号10に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号4に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む第二のオリゴヌクレオチドとからなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法において使用するための、らい菌のEF-Tu遺伝子内の配列の増幅のためのプライマー対。

【請求項 12】

それぞれ、配列番号11に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む第一のオリゴヌクレオチドと、配列番号6に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む第二のオリゴヌクレオチドとからなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法において使用するための、大腸菌(E. coli)のEF-Tu遺伝子内の配列の増幅のためのプライマー対。

【請求項 13】

第一のオリゴヌクレオチドがRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターの配列をさらに含む、請求項11または12に記載のプライマー対。

【請求項 14】

プロモーターの配列がT7RNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターの配列である、請求項13に記載のプライマー対。

【請求項 15】

それぞれ請求項12、13、又は14に記載のプライマー対がEF-Tu mRNAを増幅するために用いられ、かつ増幅された核酸の存在及び／又は量が検出される、結核菌、らい菌、又は大腸菌の生存率の評価のための方法。

【請求項 16】

配列番号7に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有する捕捉プローブと、配列番号8に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有する標識された検出プローブとを用いたサンドイッチ・ハイブリダイゼーション・アッセイを用いて、結核菌又はらい菌の生存率が評価され、かつ増幅された核酸の検出が実施される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

配列番号12に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有する捕捉プローブ、及び配列番号13に記された配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを有する標識された検出プローブを用いたサンドイッチ・ハイブリダイゼーション・アッセイを用いて、大腸菌の生存率が評価され、かつ増幅された核酸の検出が実施される、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

－請求項10又は11に記載のプライマー対、
－検出可能な標識が供与された、増幅された核酸配列の少なくとも一部と相補的な核酸配列を含む少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、
－適当な増幅試薬を含む、試料中のミコバクテリアEF-Tu mRNAの検出のための試験キット。

【請求項19】

－請求項12に記載のプライマー対、
－検出可能な標識が供与された、増幅された核酸配列の少なくとも一部と相補的な核酸配列を含む少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、
－適当な増幅試薬を含む、試料中の大腸菌バクテリアEF-Tu mRNAの検出のための試験キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、血液、痰、及び尿のようなヒト又は動物の体液中のミコバクテリア (*Mycobacteria*) のようなバクテリアの検出に関する。本発明は、バクテリアを繁殖させる必要のない、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) のようなバクテリアの生存率を評価するための方法を提供する。

【0002】

例えば、結核菌により引き起こされる結核 (TB) は、世界中の多くの国における主要な公衆衛生問題であり、発展途上国においては特に重要である。結核抑制計画は、増加した症例の荷重、肺外症例又はスミア陰性症例のような診断がより困難な患者カテゴリーへのシフト、及び結核菌の多剤耐性株の出現に直面している。改良された診断は、この世界的な公衆衛生における緊急事態を解決するための苦闘において貴重な貢献をするであろう。

【0003】

本発明の方法は、特定の核酸配列の増幅に関する。

【0004】

核酸増幅反応は、古典的な方法の感度及び特異性をしのぎつつ、診断のための時間を数週間から数時間に減少させることを約束する。診断における潜在的な価値の他、増幅反応は、迅速な同定及び薬剤感受性決定の可能性を提供する。DNA標的分子のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出可能レベルへの増幅は、ミコバクテリアを検出するための最もよく分析されている系である。

【0005】

「ポリメラーゼ連鎖反応」 (PCR) は、ヨーロッパ特許出願EP200362及びEP201148に記載されている。PCRは、二本鎖DNAを標的として有するサイクル過程である。PCR過程における各サイクルは、二本鎖DNA標的のその2つの相補鎖への分離で開始する。各鎖に、プライマーがアニールし、存在するDNAポリメラーゼが、プライマーがアニールしたDNA鎖に沿ってプライマーを伸長し、このようにして2つの新たなDNA二重鎖が形成される。反応混合物が加熱されると、DNA二重鎖の鎖が再び分離し、新たなPCRサイクルが開始することができる。このようにして、PCR過程は、DNA標的の多数のDNAコピーを生成させる。PCRを用いた増幅は、RNA鋳型に基づき行うこともできる。実際のPCRの前に、RNAからDNAを複写するための逆転写段階が必要となる (RT-PCR)。しかし、RT-PCRを転写物の検出に用いる場合には、mRNAに由来するPCR産物とDNAに由来するPCR産物とを区別する必要がある。RT-PCR前のDNAse処理を使用することができるが (Bitsch, A. ら, *J Infect. Dis.* 167, 740-743., 1993; Meyer, T. ら, *Mol. Cell Probes.* 8, 261-271., 1994)、混入したDNAを十分に除去できない場合がある [Bitsch, A. ら, 1993]。

【0006】

さらに最近、異なるクラスの核酸増幅法、即ち「転写依拠増幅技術」が開発された。この技術は、RNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターを含む鋳型からの、多数のR

10

20

30

40

50

NAコピーの転写を含む。該コピーが、さらなる増幅のための投入物として用いられる。そのような方法は、WO 88/10315においてGingerasらにより、WO 89/1050においてBurgらにより記載されている。等温転写依拠増幅技術は、EP 323822 (NASBA法に関する)においてDaveyらにより、EP 373960においてGingerasらにより、そしてEP 408295 (TMA法)においてKacianらにより記載されている。転写依拠増幅反応は、熱安定酵素を用いても実施される。そのような熱安定法は、Toyo Boseki KKの名称で出願されたEP 682121に記載されている。

【0007】

いずれも16SリボソームRNAを標的とする、NASBA法 [Vliet, G. M. E. van der, Schukkin, R. A. F., Gemen, B. van, Schepers, P. and Klatser, P. R. (1993) ミコバクテリアの同定のための核酸配列基本増幅 (NASBA) (Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria.) J. Gen. Microbiol. 139, 2423-2429] 及びもう一つの転写介在RNA増幅試験 (TMA) [Jonas, V., Alden, M. J. Curry, J. I., Kamisango, K., Knott, C. A., Lankford, R., Wolfe, J. and Moore, D. F. (1993) rRNAの増幅による痰沈殿物からの直接的な結核菌の検出及び同定 (Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of rRNA) J. Clin. Microbiol. 31, 241] のような、等温転写依拠増幅技術が、ミコバクテリアを検出するために利用されている。

【0008】

16S rRNA又はそれをコードする遺伝子を標的とする増幅反応は、通常、種特異的可変配列を含む保存領域に対して行われる [Vliet, G. M. E. van der, Shukkin, R. A. F., Gemen, B. van, Schepers, P. and Klatser, P. R. (1993) ミコバクテリアの同定のための核酸配列依拠増幅 (NASBA) J. Gen. Microbiol. 139, 2423-2429. , Jonas, V., Alden, M. J., Curry, J. I., Kamisango, K., Knott, C. A., Lankford, R., Wolfe, J. and Moore, D. F. (1993) rRNAの増幅による痰沈殿物からの直接的な結核菌の検出及び同定 J. Clin. Microbiol. 31, 241]。それらは、1回の増幅反応でミコバクテリアの種を同定することができるという利点を有する。16S rRNAを標的とする転写介在RNA増幅アッセイのもう一つの利点は、細胞1個当たりの標的分子の数が±2000と多いことであり、従って感度が有利である。

【0009】

RNA、特にmRNAは一般的にDNAよりもはるかに短い半減期を有するため、その検出は、薬剤耐性及び患者の伝染性の問題と関連しているミコバクテリアの生存率の評価に有用であろう [Moore, D. F., Curry, J. I., Knott, C. A., and Jonas, V. (1996) 抗菌療法における肺結核患者の治療応答の評価のためのrRNAの増幅 (Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy.) J. Clin. Microbiol. 34, 1745-1749. , Vliet, G. M. E. van der, Schepers, P., Schukkin, R. A. F., Gemen, B. van and Klatser, P. R. (1994) RNA増幅によるミコバクテリアの生存率の評価 (Assessment of mycobacterial viability by RNA am

10

20

30

40

50

plification.) Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1959-1965]。

【0010】

本発明は、伸長因子EF-TuをコードするmRNAの検出に基づく。

【0011】

伸長因子EF-Tuは、(ミコ)バクテリアの翻訳に必須である。伸長因子は、翻訳の伸長段階において補助的な役割を果たし、従って細胞の代謝活性の指標である。あらゆる翻訳にEF-Tuが必要である。EF-Tuタンパク質の量は、活発に増殖する細胞においては、総タンパク質含量の50%もの高さでありうる。

【0012】

EF-Tuコーディング遺伝子配列(DNA)は、バクテリア細胞の存在を検出するためのマーカーとして用いられている。

【0013】

EP133288においては、tuf又はfus遺伝子の一方の鎖の少なくとも一部の塩基配列を含むプローブを用いた、バクテリアDNAの検出のための方法が開示されている。消化されたミコプラズマDNAと、大腸菌(E. coli)の伸長因子(EF-Tu)遺伝子tufとのサザンブロット・ハイブリダイゼーションが、ミコプラズマ株における多型を検出するための基礎として用いられた[Yogevら, FEMS Microbiol. Lett., 50(2-3), 145-9, 1988]。

【0014】

標的配列として伸長因子Tuをコードする遺伝子(tuf)を用いた、ミコプラズマ・ツベルクロシス(Mycoplasma tuberculosis)及びミコプラズマ・ファーマンタンス(Mycoplasma fermentans)の検出のためのPCRに基づくアッセイも、記載されている[Bergら, Mol. Cell. Probes, 10(1), 7-14, 1996及びLunebergら, J. Clin. Microbiol. 31(5), 1088-94, 1993]。

【0015】

しかし、本発明は、バクテリアの生存率に関するマーカーとしてのEF-Tu mRNAの検出に関する。

【0016】

従って、本発明は、伸長因子EF-TuをコードするmRNAが核酸増幅反応における標的として用いられ、かつ該mRNAの存在及び／又は量が決定される、バクテリアの生存率の評価のための方法を提供する。

【0017】

おそらく生存期間の短い、EF-TuをコードするmRNAは、(ミコ)バクテリアの細胞に極めて豊富に存在する可能性が最も高く、その減少は代謝活性の減弱を示すであろう。さらに、EF-Tuは、その必須の役割のため、全てのミコバクテリア種に存在すると推定することができ、従って、16S rRNA NASBA設計[Vliet, G. M. E. van der, Schukkin, R. A. F., Gemen, B. van, Schepers, P. and Klatser, P. R. (1993) ミコバクテリアの同定のための核酸配列基本増幅(NASBA) J. Gen. Microbiol. 139, 2423-2429.]に類似した、種特異的なプライマー及び／又はプローブを用いた一般的な増幅系の開発が可能である。

【0018】

本発明の方法により、好ましくは、NASBAのような転写依拠増幅技術が、バクテリアEF-Tu mRNAの増幅のために用いられる。RT-PCRとは対照的に、T7 RNAポリメラーゼ(Kievitsら, 1991; Compton, 1991)によるRNA転写に基づくNASBAは、RNAをその主要な標的として用いるため、RNAに由来する増幅産物とDNAに由来する増幅産物とを区別する必要がない。

【0019】

増幅産物は、相補的な標識されたプローブを用いて検出されうる。

【0020】

増幅産物の検出のための多数のプロトコルが記載されている [Klatser, P.R. (1995) ミコバクテリア研究における増幅反応 (Amplification reactions in mycobacteriology) J. Microbiol. Meth. 23, 75-87.]。増幅が開始される前に増幅反応混合物を密封することが可能であるため、好ましくは均一アッセイが用いられる。そのような系の一つ、電気化学発光 (ECL) は、既に NASBA における増幅産物の検出への適用に成功している [Gemen, B. van, Beuningen, R. van, Nabbe, A., Strijp, D. van, Jurriaans, S., Lens. P., Kievits, T. (1994) 電気化学発光 (ECL) 標識プローブを用いた1チューブ定量的 HIV-1 RNA NASBA 核酸増幅アッセイ (A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes.) J. Virol. Methods, 49, 157-167.]。

10

【0021】

本発明の方法は、結核菌又はらい菌 (M. leprae) のようなミコバクテリア種の生存率を評価するために特に有用である。

【0022】

本発明により、バクテリア EF-Tu mRNA の増幅のためのプライマー及びプローブとして用いられうるオリゴヌクレオチドも提供される。

20

【0023】

本発明に係るオリゴヌクレオチドの使用は、任意の特定の増幅技術又はそれらの任意の特定の変法に限定されない。本発明に係るオリゴヌクレオチドには、多くの異なる核酸増幅技術、及び (増幅された) バクテリア EF-Tu mRNA の存在を検出するための様々な方法における用途があることは明白である。本発明のオリゴヌクレオチドは、同様に、定量的増幅法において用いられうる。そのような、定量的方法の一例は、EP 5 258 82 に記載されている。

【0024】

本明細書において用いられるように、「オリゴヌクレオチド」という用語は、2個又はそれ以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからなる分子をさす。そのようなオリゴヌクレオチドは、プライマー及びプローブとして用いられうる。

30

【0025】

当然、本発明のオリゴヌクレオチドの配列に基づき、オリゴヌクレオチドの類似体を調製することもできる。そのような類似体は、「PNA」 (通常の核酸のリン酸糖骨格の代わりにペプチド様骨格をもつ分子) などのような代替的構造で構成されていてもよい。本発明の配列を表すこれらの代替的構造も同様に本発明の一部であることは明白である。

【0026】

本明細書において用いられるように、「プライマー」という用語は、ヌクレオチド及び DNA 依存性又は RNA 依存性ポリメラーゼのような核酸重合のための因子の存在下で、適当な条件下 (例えば、緩衝液、塩、温度、及び pH) におかれた場合に、核酸鎖 (鋳型又は標的配列) と相補的なプライマー伸長産物の合成の開始点として機能することができる、(例えば、制限断片として) 天然に存在するか、又は合成的に作製されたオリゴヌクレオチドをさす。プライマーは、重合のための因子の存在下で伸長産物の合成をプライムするために十分な長さを有していなければならない。典型的なプライマーは、少なくとも約 10 ヌクレオチド長の、標的配列と実質的に相補的又は相同である配列を含むが、それよりも幾分長いプライマーが好ましい。通常、プライマーは、約 15 ~ 26 ヌクレオチドを含むが、プライマーが特定のポリメラーゼのためのプロモーター配列のような付加的な配列を含む場合には特に、それより長いプライマーも使用されうる。

40

50

【0027】

通常、プライマー・セットは、協同して増幅物（該プライマーを用いて増幅されるであろう配列）を定義する、少なくとも2つのプライマー、「上流」プライマーと「下流」プライマーとからなる。

【0028】

主に転写依拠増幅技術における使用のため、本発明に係るオリゴヌクレオチドはプロモーター配列と連結していてもよい。「プロモーター配列」という用語は、認識された配列に結合し、RNA転写物が作製される転写の過程を開始するRNAポリメラーゼにより、特異的に認識される核酸配列の領域を定義する。原則的に、開始配列を認識することができる既知かつ利用可能なポリメラーゼが存在する任意のプロモーター配列が使用されうる。既知かつ有用なプロモーターは、バクテリオファージT3、T7、又はSP6のようなある種のバクテリオファージRNAポリメラーゼにより認識されるものである。プロモーター配列と連結したオリゴヌクレオチドは、一般的に「プロモーター・プライマー」と呼ばれる。

10

【0029】

本発明に係るオリゴヌクレオチドは、バクテリアEF-Tu mRNAの配列と実質的に相補的であり、10～50ヌクレオチド長であり、かつ配列番号1～8に記された配列のうちの一つ又はそれらの相補的配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む。

【0030】

配列番号1及び2（の一部）を含むオリゴヌクレオチドは、結核菌のEF-Tu mRNA配列の増幅に適していることが立証されている。増幅が転写依拠増幅技術を用いて実施される場合には、該オリゴヌクレオチドの一つがプロモーター配列を含んでいてもよい。当然、そのような「プロモーター・オリゴヌクレオチド」は、同様に、本発明の技術である。配列番号9に記された配列においては、T7プロモーターが配列番号1に記された配列と連結している。本願の実験的部分において、これらの配列は、TUF15（配列番号9）及びTUF18（配列番号2）として示されている。

20

【0031】

本発明は、らい菌由来のEF-Tu配列の増幅のためのオリゴヌクレオチド対も提供する。この対は、それぞれ、配列番号3に記された配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドと、配列番号4に記された配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドとからなる。

30

【0032】

ここでも、転写依拠法における使用のため、オリゴヌクレオチドの一つがプロモーター配列と連結していてもよく、T7プロモーター配列が供与されたオリゴヌクレオチドが配列番号10に記されている。本願の実験的部分において、そのような対は、TUF20（配列番号10）及びTUF22（配列番号4）と呼ばれている。

【0033】

本発明は、大腸菌由来のEF-Tu配列の増幅に適したオリゴヌクレオチド対をさらに提供する。

【0034】

この対は、それぞれ、配列番号5に記された配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドと、配列番号6に記された配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドとからなる。

40

【0035】

ここでも、転写依拠法における使用のため、オリゴヌクレオチドの一つがプロモーター配列と連結していてもよく、T7プロモーター配列が供給されたオリゴヌクレオチドが配列番号11に記されている。本願の実験的部分において、そのような対は、TUF27（配列番号11）及びTUF27（配列番号6）と呼ばれている。

【0036】

従って、これらのオリゴヌクレオチドは、結核菌、らい菌、又は大腸菌の生存率の評価に

50

において特に有用である。

【0037】

本発明の配列からなるオリゴヌクレオチドは、得られる収量又は産物に有意な程度の負の影響を与えない限りにおいて、核酸塩基の小さな欠失、付加、及び／又は置換を含んでいてもよい。本発明に係るオリゴヌクレオチドがプローブとして用いられる場合、変化はプローブのハイブリダイゼーション効率の低下をもたらすものであってはならない。

【0038】

例えば、一つ又は複数のプライマーにプロモーター配列が供給されうる、転写依拠増幅技術の場合、プロモーター配列の直後へのプリン・リッチ（＝G又はA）なハイブリダイズ配列の導入は、転写に対する正の効果を有しうる（C及びTが存在する場合、転写が失敗に終わることもある）。標的核酸内にそのような配列が利用可能でない場合には、オリゴヌクレオチドのプロモーター配列の最後の3個のG残基の直後にプリン・リッチな配列を挿入することができる。

【0039】

本発明の配列は、DNA配列として反映される。これらの配列のRNA等価物は、同様に、本発明の一部である。

【0040】

本発明に係るオリゴヌクレオチドの一部は、本発明に係るオリゴヌクレオチド対を用いて増幅された核酸の検出におけるプローブとしての使用に特に適している。プローブとして用いられる場合、該オリゴヌクレオチドには、検出可能な標識が供与されうる。様々な標識部分が当分野において既知である。該部分は、例えば、放射性化合物、検出可能酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP））、ハプテン様ビオチン、又は比色シグナル、蛍光シグナル、化学発光シグナル、もしくは電気化学発光シグナルのような検出可能なシグナルを生じることができる任意のその他の部分であり得る。

【0041】

本発明に係るオリゴヌクレオチドと（増幅された）標的核酸とのハイブリッドは、当業者に既知のその他の方法によっても検出されうる。ミコバクテリアEF-Tu配列の検出のためのプローブとして特に適当な本発明に係るオリゴヌクレオチドは、配列番号7及び8に記された配列から本質的になる（実験的部分において、該配列は、それぞれTUF25及びTUF26として記されている）。

【0042】

一方が捕捉プローブとして用いられ、他方が検出可能標識で標識されていてもよい、サンドイッチ・ハイブリダイゼーション・アッセイにおいて、これらのプローブを共に用いることができる。

【0043】

試料中のミコバクテリアEF-Tu mRNAの検出のための試験キットも、同様に、本発明の一部である。そのようなキットは、以下のものを含むうる。

【0044】

本発明に係るオリゴヌクレオチド対、及び検出可能な標識が供与された、増幅された核酸配列の少なくとも一部と実質的に相補的な核酸配列を含む少なくとも一つのオリゴヌクレオチド、並びに適当な増幅試薬。

【0045】

これらの試薬は、例えば、増幅反応の実施のために適当な酵素である。例えばNASBAによる使用に適用されるキットは、適当な量の逆転写酵素、RNaseH及びT7RNAポリメラーゼを含むうる。該酵素は、緩衝溶液に含まれてキットに存在してもよいが、凍結乾燥組成物、例えば凍結乾燥球状粒子として提供されてもよい。そのような凍結乾燥粒子は、PC-T出願第WO95/27721号に開示されている。キットは、増幅反応の実施に適した緩衝組成物をさらに備えていてもよい。該緩衝剤は、キットが目的とする特定の増幅技術のため、そしてキットに供給された特定のオリゴヌクレオチドの使用のため、最適化されうる。NASBAのような転写依拠増幅技術において、該緩衝剤は、例えば、

(PCT出願第WO91/02818号に開示されているような)増幅反応を増強するDMSOを含む。

【0046】

さらに、キットには、増幅進行の確認として、そして増幅進行の失敗による偽陰性試験結果の発生を予防するため、内部対照が供給されてもよい。転写依拠増幅技術における内部対照の使用は、PCT出願第WO94/04706号に記載されている。最適な対照配列は、増幅反応において標的核酸と競合しないように選択される。キットは、増幅の前に生物学的標本から核酸を単離するための試薬を含んでいてもよい。核酸の単離のための適当な方法は、EP389063に開示されている。

【0047】

実施例：

実施例1：

結核菌、らい菌、及び大腸菌のEF-Tu mRNAの増幅のためのプライマー及びプローブの選択：

RNAの起源。表1は、本実施例及び以下の実施例において記載された実験において用いられたRNAの起源を示す。培養可能なミコバクテリアは、ローエンスタイン・ジェンセン(Lowenstein-Jensen)斜面において2〜3週間増殖させた。らい菌は、世界保健機関の推奨に従い[WHO Expert Committee on Leprosy, (1988) Sixth Report Tech. Rep. Ser. 8, 768, World Health Organization, Geneva]、実験的に感染させたアルマジロの脾組織から単離した。ヒト及び／又は動物の試料に見出されるか、又はミコバクテリアと密接に関連するその他のバクテリア(表1参照)を、対照として用いた。アクチノミセス・イスラエリ(Actinomycetes israelii)に関しては、凍結乾燥されたバクテリアを用いた。インビトロRNAの作製に用いられた株は以下に記載されている。

【0048】

【表1】

10

20

表1 RNAの起源及びNASBAの特異性

	種	株／起源	供給元	ECLシグナル 結核菌プライマー	ECLシグナル らい菌プライマー
1.	ミコバクテリウム・アフリカナム (<i>Mycobacterium africanum</i>)	myc 5544	RIVM	20810	+ 2065
2.	ミコバクテリウム・アビウム (<i>Mycobacterium avium</i>)	3875 (serovar 2)	RIVM	1523 1344	- 1031 1217
3.	ミコバクテリウム・ボビス (<i>Mycobacterium bovis</i>)	8316	RIVM	1E+08 2109782	+ 970 1006
4.	ミコバクテリウム・ボビス	ATCC 19210	RIVM	36497 246050	+ 1964
5.	ミコバクテリウム・ボビス BCG	ATCC 35733	SSI	117186 472834	+ 1089 1067
6.	ミコバクテリウム・イントラセルラレ (<i>Mycobacterium intracellulare</i>)	IWGMT3 (serovar 4)	RIVM	1322 1310	- 920 1052
7.	ミコバクテリウム・カンザシ (<i>Mycobacterium kansasii</i>)	1012	RIVM	1418 1341	- 1060 1135
8.	らい菌	アルシロ 単離物	KIT	1001 3592	- 1543836 1E+08
9.	ミコバクテリウム・パラチューブクルーシス (<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>)	138601-24	CDI	1146 1125	- 851 1019

【 0 0 4 9 】

【表2】

10

20

30

40

	種	株／起源	供給元	ECLシグナル 結核菌アッセイ	ECLシグナル らい菌アッセイ
10.	ミコバクテリウム・スクロfulaceum (<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>)	3442	RIVM	1143 1167	- 870 1097
11.	ミコバクテリウム・スメグマチス (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	ATCC 14468	RIVM	1365 1289	- 954 1058
12.	結核菌	4514	RIVM	401796 24398	+ 902 1914
13.	結核菌	H37RV	RIVM	144963	+ 2051
14.	結核菌	M. tub 193	KIT	1417077	+ 501
15.	アウチミセス・イスラエリ	103.62	CBS	886 1104	- 972 1974
16.	コリネバクテリウム・ベルファントイ (<i>Corynebacterium belfanti</i>)	臨床単離物	AMC	1048 1029	- 966 1818
17.	コリネバクテリウム J.K.	臨床単離物	AMC	1108 1113	- 966 2082
18.	大腸菌	臨床単離物	AMC	1129 1062	- 884 2219
18a.	大腸菌	INVaF	Invitrogen (K2000-01)	NT	NT

【 0 0 5 0 】

【表 3】

10

20

30

40

	種	株/起源	供給元	ECL シグナル 結核菌アライマー	ECL シグナル らい菌アライマー	
19.	ヘモフィルス・インフルエンザ (<i>Hemophilus influenza</i>)	臨床分離物	AMC	1097 1113	1042 2085	-
20.	クレブシエラ・ニューモニエ (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	臨床分離物	AMC	1137 1117	1022 1957	-
21.	レジオネラ・ニューモフィラ (<i>Legionella pneumophila</i>)	臨床分離物	AMC	1017 954	999 1914	-
22.	ノカルディア・アステロイデス (<i>Nocardia asteroides</i>)	臨床分離物	AMC	970 1037	1239 2079	-
23.	シュードモナス・アエリギナサ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	臨床分離物	AMC	981 937	965 1757	-
24.	スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)	臨床分離物	AMC	932 1006	967 2214	-
25.	ストレプトコッカス・ニューモニエ (<i>Staphylococcus pneumoniae</i>)	臨床分離物	AMC	909 985	977 2081	-
26.	ホモ・サピエンス (<i>Homo sapiens</i>)	胎盤	AMC	1041	2073	-
27.	ホモ・サピエンス	胎盤 ロット番号 BD 41191901	ファルミンシア	991	1986	-

【 0 0 5 1 】

【表 4】

10

20

30

40

	種	株／起源	供給元	ECL シグナル 結核菌プロライマー	ECL シグナル らい菌プロライマー
28.	インビトロ RNA1054 結核菌 H37RV	PCR-II ベクター内の 764bp pTHT1054(フォラスミト) S1418(INVaF' 株)	KIT	409019 1E+08	2088 809
29.	インビトロ RNA1055 らい菌 アルマシロ単離物	PCR-II ベクター内の 764bp pTHT1055(フォラスミト) S1419(INVaF' 株)	KIT	992 764	1431525 624966
30.	インビトロ RNA1057 大腸菌 臨床単離物	PCR-II ベクター内の 764bp pTHT1057(フォラスミト) S1420(INVaF' 株)	KIT	986 984	1896 776
31.	Boom ら 1991[9]に従 い精製された水		Baker	1194 960	1136 2062
32.	水		Baker	995 678	2256 612

AMC=Academic Medical Centre(オランダ、アムステルダム); CBS=Netherlands Culture Collections of Micro-Organisms(オランダ、Baam);
 CDI=Central Veterinary Institute(オランダ、Lelystad); KIT=Royal Tropical Institute(オランダ、アムステルダム);
 RIVM=National Institute of Public Health and Environment(オランダ、Bilthoven);
 SSI=Statens Serum Institute(デンマーク、コペンハーゲン); ATCC=American Type Culture Collection(米国、ロックスビル)

【0052】

核酸 (NA) の単離。全ての実施例に記載された実験を実施するため、本発明者らが以前に記載したようにして核酸を単離した [Vliet, G. M. E. van der, Schepers, P., Schukink, R. A. F., Gemen, B. van and Klatser, P. R. (1994) RNA増幅によるミコプラズマの生存率の評価 Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1959-1

965.]。要約すると、全てのバクテリア株を、以前に記載されたような第4 McFarland 硫酸バリウム比濁計標準の濁度当量に調整した [Verstijnen, C. P. H. J., H. M. Ly, K. Polman, C. Richter, S. P. Smits, S. Y. Maselle, P. Peerbooms, D. Rienthong, N. Montreewasuwat, S. Koanjanart, D. D. Trach, S. Kuijper, and A. H. J. Kolk (1991) 初期培養物からのミコバクテリアの同定のためのモノクローナル抗体を用いた酵素結合イムノソルベント・アッセイ J. Clin. Microbiol. 29, 1372-1375.]。50 μ l の希釈された試料は、約 10^5 個の生存ミコバクテリアを含むことが、コロニー形成単位の数で計数することにより決定された（らい菌に関しては行われていない）。Boomら (1990) により記載された「プロトコル Y/SC」に従い、この量を溶解及び NA 単離に用いた [Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen and J. Van der Noordaa (1990). 核酸の精製のための迅速かつ簡便な方法 J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.]。50 μ l 又は 100 μ l の RNase を含まない H_2O を用いてシリカから NA を溶離させ、 $-20^\circ C$ で保存した。

10

【0053】

ヒト胎盤 NA は、同様にして単離された (Dr. H. Smits, Department of Virology, Academic Medical Hospital (オランダ、アムステルダム) より提供された)。270 ng の NA を含む 2 μ l を試験した。この量は、約 4×10^5 個の二倍体ヒト細胞に相当する。ヒト NA の他のバッチは、Pharmacia (スウェーデン、ウプサラ) から商業的に入手した。

20

【0054】

実施例 2：

結核菌、らい菌、及び大腸菌の Ef-Tu mRNA の増幅における NASBA の感度及び特異性：

プライマー及びプローブの選択。この研究において用いられたプライマー及びプローブを表 2 に挙げる。

【0055】

30

【表 5】

表2 プライマーおよびプローブ

プライマー/ プローブ	起源	位置	配列 (5'-3')
TUF 4	MTTUF	1302-1284	GTR CGG AAG TAG AAC TGC G
TUF 7	MTTUF	539-560	GAC IIC CCI GGI CAC GCC GAC T
TUF 3F	MTTUF	917-936	70オレセイン -GAC AAG CCG TTC CTG MTG CC
TUF 4F	MTTUF	1302-1284	70オレセイン -GTR CGG AAG TAG AAC TGC G
TUF 8F	MTTUF	936-917	70オレセイン -GGC AKC AGG AAC GGC TTG TC
TUF 15	MTTUF	1057-1039	aat tcl aat acg act cac tat agg gAG AGC TTG GTG GTC GAT GGG CGA
TUF 18	MTTUF	855-875	CCT CTG TCG AGG AAC TGA TGA
TUF 20	MLTUF	977-958	aat tcl aat acg act cac tat agg gAG AGG GTC GTC TGA CGA ATG CCG A
TUF 22	MLTUF	781-801	AGT CTG TCA CAC AGT TGA TGG
TUF 24	MLTUF MTTUF	862-843 936-917	ジゴキシン・ニン-GGC ATC AGG AAC GGC TTG TC
TUF 25	MLTUF MTTUF	920-937 994-1011	ヒチオン-GCG CGG CGT GGT CAA CGT [@]
TUF 26	MLTUF MTTUF	940-957 1014-1031	ルテニウム -ACG AGG AAG TTG AGA TCG
TUF 27	ECTUF	756-737	aat tcl aat acg act cac tat agg gAG AGC TGA GTC TCT TTG ATA CCA A
TUF 28	ECTUF	560-580	CGA AAA TCC TGG AAC TGG CTG
TUF 29	ECTUF	699-716	ヒチオン-ACG CGG TAT CAT CAA AGT
TUF 30	ECTUF	719-736	ルテニウム -GTG AAG AAG TTG AAA TCG

略語: ECTUF=大腸菌Ef-Tu遺伝子配列(GenBank登録番号J01717)

MTTUF=結核菌Ef-Tu遺伝子配列(GenBank登録番号X63539)

MLTUF=らい菌Ef-Tu遺伝子配列(GenBank登録番号D13869)

I=イノシン、M=[A、C]、K=[G、T]、R=[A、G]

@示された配列は、MLTUFとは相同であるが、MTTUF(下線付きのGがAである)とは相同でない。

TUF15、20、及び27は、小文字で示されたT7プロモーター配列を含む。

プロモーター配列の後にはイタリック体で示されたプリン・リッチな領域(AGAG)が存在する。

【0056】

結核菌(GenBank登録番号X63539)、らい菌(GenBank登録番号D13869)、大腸菌(GenBank登録番号J01717)、マイクロコッカス・ルテウス(Micrococcus luteus)(GenBank登録番号M17788)、及びストレプトミセス・コエリカラー(Streptomyces coelicolor)(GenBank登録番号X77039)のEf-Tu遺伝子の公開されたヌクレオチド配列を、適当なハードウェアにインストールされたソフトウェア・プログラムGCG(米国国立衛生研究所)を用いて整列させた。縮重プライマーTUF4及びTUF7(表2)は、表1に列挙された全ての生物から、PCRによりEf-Tu遺伝子の764bp DNA断片を増幅するために選択された。PCRは、75mMトリスHCl、pH9.0、20mM(NH₄)₂SO₄、0.01%(v/v)Tween20、4mM MgCl₂、0.2mMの各dNTP、125ngの各プライマー、及び1U/反応のGoldstar(TM) DNAポリメラーゼ(Eurogentec、ベルギー)を用いて実施された。PCRは、94℃3分間のインキュベーションにより開始され、その後94℃1.15分、55℃1分、72℃2分のサイクルが35回行われた。C. ベルファンティ、H. インフルエンザ、S. アウレウス、S. ニューモニエ、及びH. サピエンスを除く、表1に列挙された生物のDNAの作製されたPCR断片は、過剰のプライマーを除去するためMicroSpin(TM) Sephacryl(TM) 300 HRカラ

ム (Pharmacia) を用いて精製された。精製された断片は、Autocycle Sequencing Kit (Pharmacia) 及び A. L. F. 自動 DNA シーケンサー (Pharmacia) を適用することにより、プライマー TUF3F、4F、及び 8F を用いて、直接的に配列決定された。配列は、DNASIS (TM) ソフトウェア・プログラム (Pharmacia) を用いることにより編集され、その後 PC Gene ソフトウェア・プログラムを用いてクラスタル・アラインメント (clustal alignment) が作製された。

【0057】

プライマー及びプローブの選択。表3は、クラスタル・アラインメントに基づき決定された Ef-Tu 配列の7つの可変領域を示す。これらの可変領域から、異なる生物の Ef-Tu mRNA の種特異的検出を可能にするプライマー及びプローブを選択することが可能である (表4)。

10

【0058】

表5は、NASBAによる結核菌、らい菌、及び大腸菌の Ef-Tu mRNA の特異的増幅のためのプライマー及びプローブの選択の基礎となった、Ef-Tu 配列の7つの可変領域のうちの2つ (領域IV及びVI) のクラスタル・アラインメントを示す。これらの2つの区域を選択するための基準は、種特異的プライマー、属特異的プローブ、及び±200ヌクレオチド長の増幅すべき断片が入手可能であることであった。

【0059】

【表6】

20

表3 Ef-Tu配列上の7つの可変領域

可変領域	結核菌AC X63539のEF-Tu配列上の位置 (bp)
I.	673-703
II.	774-793
III.	820-823
IV.	852-871
V.	955-970
VI.	1039-1051
VII.	1123-1142

30

【0060】

【表7】

表4 異なる生物由来のEf-Tu mRNAの種特異的検出を可能にするプライマー及び／又はプローブの選択に用いられるEf-Tu mRNA可変配列の部分

領域	配列	特異的である種
I.	AGTGGGTGTGCCCTACATCCTGGTAGCGCTG	ミコバクテリウム・ツベルクルーシス・コンプレックス (<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>)
	GGTGGGTGTACCTTACATCCTGGTCGCACTT	らい菌
	GGTCGGGTGTGCCCTACATCCTGGTCGCGCTG	ミコバクテリウム・アビウム及びミコバクテリウム・ハラツベルクローシス
	GGTCGGCGTGC GGCCCTGCTCGTGGCCCTG	ミクロコッカス・ルテウス
	GGTCGGCGTTCGGTACATCGTGGTCGCCCTG	ストレプトミセス・コエリカラ
	GGTTGGCGTTCCTTACATCCTCGTTGCTCTT	コリネバクテリウム・グルタミカム(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
	GGTTGGCGTTCCTTACATCCTCGTTGCACTG	コリネバクテリウムJJK
	GGTAGGCGTTCGGTACATCATCGTGTTCCTG	大腸菌、カルディア・アステロイデス、及びクレブシエラ・ニューモニア
	GGTAGGCGTTCCTTACATCGTGTGTTCCTG	シュートモナス・アエルギノサ
II.	CTGCCCAGGAATTCGACGAG	ミコバクテリウム・ツベルクルーシス・コンプレックス及びらい菌
	CCGCCCCAGGAGTTCGACGAG	ミコバクテリウム・アビウム及びミコバクテリウム・ハラツベルクローシス

【0061】

【表8】

10

20

30

40

領域	配列	特異的である種
	CCGCCCAGGAGTTC	ミコバクテリウム・イントラセルラレ
	TCTCAGTACGACTTCCCGGGC	大腸菌
	TCTCAGTACGATTTCCCGGGC	カルディ・アステロイデス及びクレブシエラ・ニューモニエ
	CCTCCAGGAGCTTCGACGTC	マイクロコカス・ルテウス
	CTCCGAGTACGAGTTCGCGGGAC	ストレプトミセス・コエリカラー
	CTGAGCAGGACTACGAC	コリネバクテリウム・グルタミカム
	AACACCTACGACTTCCCGGGC	シュードモナス・アエルギノサ
III.	GCTC	ミコバクテリウム・ツベルクローシス・コンプレックス、ミコバクテリウム・アピウム、 ミコバクテリウム・ハラツベルクローシス、及びミコバクテリウム・イントラセルラレ
	ATTG	らい菌
	TCTG	マイクロコカス・ルテウス、ストレプトミセス・コエリカラー、コリネバクテリウム・グルタミカム、 大腸菌、カルディ・アステロイデス、クレブシエラ・ニューモニエ、 及びアクチノミセス・イスラエリ
	GCTG	シュードモナス・アエルギノサ
IV.	TTCCTCTGTCGAGGAAGTATGA	ミコバクテリウム・ツベルクローシス・コンプレックス
	TTCCTCTGTCGAGGAAGTATGA	結核菌(登録番号X63539)
	TCGAGTCTGTCACACAGTTGATGG	らい菌
	TCAAGTCCGTCGAGGACCTCATGG	マイクロコカス・ルテウス

【 0 0 6 2 】

【表 9】

10

20

30

40

領域	配列	特異的である種
	GCAACTCGGTCCTCGAGCTCATGA	ストレプトミセス・コエリカラー
	GCAAGCAGATCCTTGAGCTCATGC	コリネバクテリウム・グルタミカム
	TGGAGTCCGTCGAGCAG	ミコバクテリウム・アピウム及びミコバクテリウム・ハラツベルクローシス
	AAGCGAAATCCTTGGAACTGGCTGGC	大腸菌
	AAGCGAAATC	カルディ・ア・アステロイデス及びクレブシエラ・ニューモニエ
V.	CATTACCGGCGCGGA	結核菌
	TATCACCGGTGCTGGC	らい菌
VI.	TCGGCAITCGCCCATCGACCACCAAG	ミコバクテリウム・ツベルクローシス・コンプレックス
	TCGGCATTCGTCAGACGACCACCAAG	らい菌
	TCGGCATCCGCCCGACGACGACCAAG	ミコバクテリウム・イントラセルラレ
	TCGGCATCCGCCCGCTCCAGCACCACCAAG	ミコバクテリウム・アピウム及びミコバクテリウム・ハラツベルクローシス
	TCGGCATCCGCCCGGAGACCCACCAAG	ミコバクテリウム・スメグマチス
	TTGGTATCAAGAGAGACTCAGAAGT	大腸菌
	TTGGTATCAAGAGAGACCGCGGAAA	クレブシエラ・ニューモニエ
	TCGGCATCAAGGCGACCCACCAAGA	シュート・モナス・アエルギ・ノサ
	CATTAGCCGCGGAGACCCACCAAGA	ミコバクテリウム・スクロワラセウム
	TCGGCATCCGTCGACACCCACCAAGA	ミコバクテリウム・カンザシ
VII.	TGGTTGCTGCTGCGGGGCG	ミコバクテリウム・ツベルクローシス・コンプレックス
	TGGTCTGTTGTTGCGTGGCA	らい菌
	CGGTCGCTGCTGCGGTGGTA	ミコバクテリウム・イントラセルラレ、ミコバクテリウム・アピウム、及びミコバクテリウム・ハラツベルクローシス
	TGGTAACCTGCTGCGCTGGCA	シュート・モナス・アエルギ・ノサ
	CGGTCGTTGCTCCGTTGGCA	ミコバクテリウム・スクロワラセウム
	CGGTCGTTGCTGCGGTGGTG	ミコバクテリウム・カンザシ
	AGGTGTTCTGCTGCGCGGTA	大腸菌
	AGGTGTTCTGCTGCGTGGTA	クレブシエラ・ニューモニエ

【0063】

【表10】

10

20

30

表5 E_f-T_u配列の可変領域の2つのクラスタル・アラインメント(領域IV及びVI)

種	登録番号又は 表1の番号	配列(領域IV)
結核菌	X63539	TTGCCTCTGTC--GAGGAA--CT-GATGA
らい菌	D13869	TCGAGTCTGTC--ACACAG--TT-GATGG
ミクロコッカス・ルテウス	M17788	TCAA----GTCCGTCGAGGACCT-CATGG
ストレプトミセス・コエリカラー	X77039	GCAACTCGGTCC-TCGAG---CT-CATGA
コリネバクテリウム・ゲルタミカム	X77034	GCAAG-CAGATC--CTTGAGC-T-CATGC
らい菌	8	TCGAGTCTGTCA--AC
結核菌 H37R _v	13	TTG---C--TCTGTCGAGGAACT-GAT
ミコバクテリウム・ホビス	3,4	TTG---C--TCTGTCGAGGAACT-GAT
ミコバクテリウム・ホビスBOG	5	TTG---C--TCTGTCGAGGAACT-GAT
ミコバクテリウム・アヒウム	2	TGG---A-GTCCGTCGAGCAGCT-GAT
ミコバクテリウム・ハッザベルクローシス	9	TGG---A-GTCCGTCGAGCAG
結核菌	12	TTG---C--TCTGTCGAGG
大腸菌	J01717	AAGCGAAAAATC---CTGGAAGCTGGCTGGC
大腸菌	18	AAGCGAAAAATC---CTGGAAGCTG
ノカルディア・アステロイデス	22	AAGCGAAAAATC

【0064】

【表11】

10

20

30

40

らい菌	D13869	TCGGCATTTCGTCAGA-CGACCACCAAG
結核菌	X63539	TCGGCATTTCGCCCCAT-CGACCACCAAG
ミコバクテリウム・ホビス	4	TCGGCATTTCGCCCCAT-CGACCACCAAG
らい菌	8	TCGGCATTTCGTCAGA-CGACCACCAAG
ミコバクテリウム・イントラセルレ	6	TCGGCATCCGCCCCGA-CCAGCACCAAG
ミコバクテリウム・ホビスBCG	5	TCGGCATTTCGCCCCAT-CGACCACCAAG
結核菌	12	TCGGCATTTCGCCCCAT-CGACCACCAAG
結核菌H37Rv	13	TCGGCATTTCGCCCCAT-CGACCACCAAG
ミコバクテリウム・アビウム	2	TCGGCATCCGCCCGT-CCAGCACCAAG
ミコバクテリウム・ハラツベルグロース	9	TCGGCATCCGCCCGT-CCAGCACCAAG
ミコバクテリウム・スメグマチス	11	TCGGCATCCGCCCGGA-GACCACCAAG
ミコバクテリウム・スクロフラセウム	10	TCAGCATTAAAGCCGC-CCAGCACCAAG
ミコバクテリウム・カンサシ	7	TCGGCATCCGTCCGA-CACCACC-AAG
大腸菌	18	TTGGTAT----CAAAGAGA-CTCAGAAGT
クレブシエラ・ニューモニイ	20	TTGGTAT----CAAAGAGA-CCGCGAAAA
9シュートモナス・アエルギノサ	23	TCGGCAT----CAAGGCCGA-CCACCAGA

【0065】

これらのアラインメントに基づき、結核菌（TUF15及び18）、らい菌（TUF20及び22）、及び大腸菌（TUF27及び28）について、NASBAにおける使用のための種特異的プライマーを選択した。電気化学発光（ECL）によるミコバクテリアRNAアンプリコンの検出のため、属共通の捕捉プローブTUF25及び検出プローブTUF26を選択した。プローブTUF25は、らい菌のE f -T u配列とは相同であるが、結核菌とは相同でない。差異は、一個のヌクレオチドである（G→A；表2参照）。しかし、この差異は、結核菌由来のRNAから作製されたアンプリコンの検出に影響を与えなかった。大腸菌RNAアンプリコンの検出のため、本発明者らは、特異的な捕捉プローブT

U F 2 9 及び検出プローブ T U F 3 0 を用いた。

【 0 0 6 6 】

領域 I V において、結核菌の E f - T u の公開された配列 [G e n B a n k 登録番号 X 6 3 5 3 9] との 1 ヌクレオチドの差異が見出された。M. ツベルクロシス・コンプレックスに属する株のいずれにおいても、8 5 5 位に C が見出されなかった。しかし、プライマーの位置は、この不一致が増幅反応に影響を与えないような方法で選択された。

【 0 0 6 7 】

実施例 3 :

E F - T u m R N A の増幅による大腸菌の特異性及び感度の試験

インビトロ RNA の単離

前記のようにして、プライマー・セット T U F 4 及び T U F 7 (表 2) を用いた P C R を介して、結核菌 H 3 7 R v 、らい菌、及び大腸菌の E F - T u 遺伝子の 7 6 4 b p 断片 (表 1) を増幅した。製造業者の指示に従い T A クローニング・キット (I n v i t r o g e n) を用いて増幅産物を p C R I I ベクターにクローニングした。正しい方向、大きさ、及び特異性で挿入配列を有する適当なクローンの選択が、制限酵素分析及び P C R により決定された。

【 0 0 6 8 】

制限酵素 B a m H I 及び H i n d I I I によるプラスミドの直鎖化の後、ポリリンカー領域内にクローニングされた挿入配列を、S P 6 / T 7 転写キット (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) を用いて T 7 プロモーター部位から転写した。R Q I D N A s e (P r o m e g a) による消化により DNA 鋳型を除去し、製造業者のプロトコルに従い Q i a g e n からの R N e a s y キットにより RNA を精製した。標準的な手順に従い、アガロースゲル電気泳動及びジゴキシゲニン標識プローブ T U F 2 4 を用いたノーザンブロッティングにより純度を確認した。2 6 0 n m における吸光度を測定することにより、インビトロ RNA を定量した。

【 0 0 6 9 】

RNA 増幅

以前の記載 [V l i e t , G . M . E . v a n d e r , S c h e p e r s , P . , S c h u k k i n k , R . A . F . , G e m e n , B . v a n a n d K l a t s e r , P . R . (1 9 9 4) RNA 増幅によるミコバクテリア生存率の評価 A n t i m i c r o b . A g e n t s C h e m o t h e r . 3 8 , 1 9 5 9 - 1 9 6 5] に本質的に従い、N A S B A 技術により、結核菌、らい菌、及び大腸菌の E F - T u m R N A のそれぞれ 2 0 3 、 1 9 7 、 及び 1 9 8 ヌクレオチドの断片を増幅した。2 0 μ l の反応混合物は、4 0 m M トリス H C l 、 p H 8 . 5 、 1 2 m M M g C l 2 、 7 0 m M K C l 、 5 m M D T T 、 1 . 5 M ソルビトール、2 . 1 m g の B S A 、 1 m M の各 d N T P 、 2 m M の A T P 、 C T P 、 U T P 、 1 . 5 m M の G T P 、 及び 0 . 5 m M I T P 、 1 5 % (v / v) D M S O 、 0 . 2 m M のプライマー 1 及びプライマー 2 、 0 . 0 8 U R N a s e H 、 3 2 U T 7 R N A ポリメラーゼ、6 . 4 U A M V - R T ポリメラーゼ、及び RNA 標的からなっていた。RNA 標的の等温増幅を、4 1 ° C で 2 . 0 時間これらの試料をインキュベートすることにより実施した。

【 0 0 7 0 】

増幅された RNA の検出を、以前の記載 [G e m e n , B . v a n , B e u n i n g e n , R . v a n , N a b b e , A . , S t r i j p , D . v a n , J u r r i a a n s , S . , L e n s . P . , K i e v i t s , T . (1 9 9 4) 電気化学発光 (E C L) 標識プローブを用いた 1 チューブ定量的 H I V - 1 R N A N A S B A 核酸増幅アッセイ J . V i o l . M e t h o d s , 4 9 , 1] に、5 μ l の N A S B A 増幅 RNA を R N a s e を含まない水で 2 0 倍に希釈するか、又は未希釈で使用するというわずかな改変を加え、E C L 検出アッセイにおける溶液内ハイブリダイゼーションにより行った。N A S B A 産物の捕捉には 5 ' - ビオチン化プローブを用いた。用いた検出プローブは、標識されたトリス [2 , 2 - ビピリジン] ルテニウム [I I] 複合体であった。この標識は、電極の表

10

20

30

40

50

面で起こる化学反応の結果として光を放出する。カットオフ値は3000に設定した。ECL検出アッセイは0から 10^8 の規模で測定した。

【0071】

増幅の対照

NA抽出及び増幅の間に持ち越された混入物を確認するため、各実験に陰性対照（水のみ）を含ませた。これらの対照試料は、前記と同様にして抽出され、NASBAにより増幅された。

【0072】

ミコバクテリアNASBAの感度及び特異性

NASBAの感度の決定のため、37℃で液体Tween (TM) / アルブミン培地において結核菌ATCC 35801を増殖させた。培養開始時の濃度は 8×10^6 バクテリア/mlであった。420nmにおける吸光度を測定することにより、バクテリアの増殖をモニターした。培養の13日後、試料を採取し、溶解緩衝液で希釈した [Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen and J. Van der Noorda (1990) 核酸の精製のための迅速かつ簡便な方法 J. Clin. Microbiol. 28, 495-503]。溶解緩衝液で段階希釈物を作製し、RNAを精製し [Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen and J. Van der Noorda (1990) 核酸の精製のための迅速かつ簡便な方法 J. Clin. Microbiol. 28, 495-503]、陽性NASBAシグナルを与える最も高い希釈率を決定するため、各希釈物をNASBAで試験した。さらに、インビトロRNA（前記参照）の段階希釈物を用いて、NASBAの分析感度を決定した。NASBAの特異性を、異なる生物由来の精製されたRNAを用いて決定した（表1、前記参照）。

【0073】

大腸菌NASBAの感度及び特異性

大腸菌をルリア・ブロス (LB) 液体培地で37℃で18時間増殖させた。このようにして得られた懸濁液を新鮮な培地 (1:200) ($OD_{600nm} = 0.015$) に接種し、旋回振とう機中で37℃で3時間15分間インキュベートした ($OD_{600nm} = 0.430$)。段階希釈物を作製し、mRNAを前記のようにして精製した。さらに、同希釈物をLB寒天プレートに播き、それを37℃で18時間インキュベートした後、コロニーを計数した。

【0074】

インビトロRNA（前記参照）の段階希釈物を用いて、NASBAの分析感度を決定した。

【0075】

結果：

NASBAの感度。インビトロ作製されたEf-Tu RNAを用いたNASBAの分析感度を、図1a及び1bに図示する。結核菌NASBA及びらい菌NASBAの両方が、50分子のRNAを検出した（図1a）。検出のための出発材料としてバクテリアを用いた場合の結核菌NASBAの検出限界は、12,000であった（結果は示していない）。

【0076】

大腸菌NASBAの分析感度は100分子であることが示された（図1b）。検出のための出発材料としてバクテリアを用いた場合の大腸菌NASBAの検出限界は、0.4であった（結果は示していない）。

【0077】

NASBAの特異性。結核菌NASBA及びらい菌NASBAの特異性を、それぞれ図2及び3に図示する。

【0078】

結核菌NASBAは、M. ツベルクローシス・コンプレックスに属するバクテリアから精製されたRNAにのみ特異性を示した。さらに、図2に図示されるように、結核菌NASBAは、相同なインビトロ作製されたEF-Tu RNAを標的として用いた場合に、陽性反応を示した。

【0079】

らい菌NASBAは、らい菌RNA及びその相同なインビトロ作製されたRNAにのみ特異性を示した。

【0080】

実施例4：

大腸菌の生存率試験

LB液体培地で37℃で18時間大腸菌を増殖させた。このようにして得られた懸濁液を新鮮な培地に接種し(1:1000)(OD600nm=0.001)に接種し、旋回振とう機中で37℃で4時間インキュベートした。次に、懸濁液を二等分した。一方には、殺菌のための抗生物質：アンピシリン、リファンピリン、及びカナマイシン(それぞれ50µg/ml)の混合物を添加した。もう一方は未処理のままにしておいた。両者を37℃でさらに3時間30分間インキュベートした。30分毎に、600nmにおけるODをモニターし、各培養物から100の試料を採取し900の溶解緩衝液に添加した。mRNAを前記のようにして精製した。さらに、試料(100)をLB寒天プレートに重層することにより、大腸菌の生存率をモニターした。37℃で18時間インキュベートした後、コロニーを計数した。

【0081】

大腸菌を未処理のまま増殖させた場合、NASBAシグナルは増加し、その最大レベルに達した(図4)。しかし、対数増殖期の大腸菌培養物に抗生物質を添加した場合には、NASBAシグナルは抗生物質の添加の1時間後に減少した。このNASBAにより測定されたmRNAの減少は、生存数の減少と一致していた(図4)。

【図面の簡単な説明】

【図1a】 インビトロ作製されたミコバクテリアEF-Tu RNAを用いたNASBAの分析感度。

【図1b】 インビトロ作製されたミコバクテリアEF-Tu RNAを用いたNASBAの分析感度。

【図2】 結核菌NASBAの特異性。

【図3】 らい菌NASBAの特異性。

【図4】 生存率評価のためのNASBA。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: Akzo Nobel N.V.
- (B) STREET: Velperweg 76
- (C) CITY: Arnhem
- (E) COUNTRY: The Netherlands
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 6824 BM
- (G) TELEPHONE: 0412 666379
- (H) TELEFAX: 0412 650592

10

(ii) TITLE OF INVENTION: EF-TU mRNA as a marker for viability of bacteria

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 95

20

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGC TTGGTGGTCG ATGGGCGA 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs 10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

CCTCTGTCGA GGAAGTATG A 21 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 49 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear 30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGG GTCGTCTGAC GAATGCCGA 49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

AGTCTGTCAC ACAGTTGATG G

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 49 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

30

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGC TGAGTCTCTT TGATACCAA

49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

CGAAAATCCT GGAAGTGGCT G

21

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

GCGCGGCGTG GTCAACGT

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

ACGAGGAAGT TGAGATCG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

CTTGGTGGTC GATGGGCGA

19

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

GGTCGTCTGA CGAATGCCGA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

CTGAGTCTCT TTGATACCAA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

ACGCGGTATC ATCAAAGT

18

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

GTGAAGAAGT TGAAATCG

18

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

GTCGGAAGTA GAACTGCG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

GACCCCGGCA CGCCGACT

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

GACAAGCCGT TCCTGTGCC

19

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

GTCGGAAGTA GAACTGCG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

GGCACAGGAA CGGCTTGTC

19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

GGCATCAGGA ACGGCTTGTC

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

AGTGGGTGTG CCCTACATCC TGGTAGCGCT G

31

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

GGTGGGTGTA CCTTACATCC TGGTCGCACT T

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

GGTCGGTGTG CCCTACATCC TGGTCGCGCT G

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

GGTCGGCGTG CCGGCCCTGC TCGTGGCCCT G

31

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:

GGTCGGCGTT CCGTACATCG TGGTCGCCCT G

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

GGTTGGCGTT CCTTACATCC TCGTTGCTCT T

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

GGTTGGCGTT CCTTACATCC TGGTTGCACT G

31

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

GGTAGGCGTT CCGTACATCA TCGTGTCCT G

31

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

GGTAGGCGTT CCCTACATCG TCGTGTCCT G

31

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:

CTGCCCAGGA ATTCGACGAG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

CCGCCCAGGA GTTCGACGAG

20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 14 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

CCGCCCAGGA GTTC

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

TCTCAGTACG ACTTCCCGGG C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 33:

TCTCAGTACG ATTTCCCGGG C

21

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 34:

CCTCCAGGAG CTTGACGTC

20

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 35:

CTCCGAGTAC GAGTCCCGG GCGAC

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 36:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 36:

CTGAGCAGGA CTACGAC

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 37:

AACACCTACG ACTCCCGGG C

21

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 4 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 38:

GCTC

4

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 39:

ATTG 4

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 4 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 40:

TCTG 4

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:

GCTG

4

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42:

TTGCTCTGTC GAGGAACTGA TGA

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 43:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 43:

TTGCCTCTGT CGAGGAACTG ATGA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:

TCGAGTCTGT CACACAGTTG ATGG

24

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 45:

TCAAGTCCGT CGAGGACCTC ATGG

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:

GCAACTCGGT CCTCGAGCTC ATGA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 47:

GCAAGCAGAT CCTTGAGCTC ATGC

24

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 48:

TGGAGTCCGT CGAGCAG

17

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:

AAGCGAAAAT CCTGGAACTG GCTGGC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 50:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 11 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 50:

AAGCGAAAAT C

11

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 16 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 51:

CATTACCGGC CGCGGA

16

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 16 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 52:

TATCACCGGT CGTGGC

16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 53:

TCGGCATTTCG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 54:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 55:

TCGGCATCCG CCCGACCAGC ACCAAG

26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 56:

TCGGCATCCG CCCGTCCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 57:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 57:

TCGGCATCCG CCCGGAGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 58:

TTGGTATCAA AGAGACTCAG AAGT

24

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 59:

TTGGTATCAA AGAGACCGCG AAAA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 60:

TCGGCATCAA GGCGACCACC AAGA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 23 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 61:

CATTAAGCCG CCCAGCACCA AGA

23

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 62:

TCGGCATCCG TCCGACACCA CCAAGA

26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 63:

TGGTTTGCTG CTGCGGGGCG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 64:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 64:

TGGTCTGTTG TTGCGTGGCA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs 10
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 65:

CGGTCTGCTG CTGCGTGGTA 20 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear 30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 66:

TGGTAACCTG CTGCGCTGGC A 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 67:

CGGTCTGTTG CTC CGTGGCA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 68:

CGGGTCTGTT TGCTGCGTGG TG

22

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 69:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 69:

AGGTGTTCTG CTGCGCGGTA

20

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 70:

AGGTGTTCTG CTGCGTGGTA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 71:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 71:

TTGCCTCTGT CGAGGAACTG ATGA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 72:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 72:

TCGAGTCTGT CACACAGTTG ATGG

24

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 73:

TCAAGTCCGT CGAGGACCTC ATGG

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 74:

GCAACTCGGT CCTCGAGCTC ATGA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 75:

GCAAGCAGAT CCTTGAGCTC ATGC

24

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 76:

TCGAGTCTGT CAAC

14

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 77:

TTGCTCTGTC GAGGAACTGA T

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 78:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 78:

TGGAGTCCGT CGAGCAGCTG AT 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 79:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 base pairs 10
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 79:

TGGAGTCCGT CGAGCAG 17 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear 30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 80:

TTGCTCTGTC GAGG 14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 81:

AAGCGAAAAT CCTGGAAGT GCTGGC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 82:

AAGCGAAAAT CCTGGAAGT

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 11 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 83:

AAGCGAAAAT C

11

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 84:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 85:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 85:

TCGGCATTTCG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 86:

TCGGCATTTCG TCAGACGACC ACCAAG

26

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 87:

TCGGCATCCG CCCGACCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 88:

TCGGCATTCTG CCCATCGACC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 89:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 89:

TCGGCATCCG CCCGTCCAGC ACCAAG

26

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 90:

TCGGCATCCG CCCGGAGACC ACCAAG

26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 91:

TCAGCATTAA GCCGCCAGC ACCAAG

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 92:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 92:

TCGGCATCCG TCCGACACCA CCAAG

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 93:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

10

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 93:

TTGGTATCAA AGAGACTCAG AAGT

24

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 94:

TTGGTATCAA AGAGACCGCG AAAA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

10

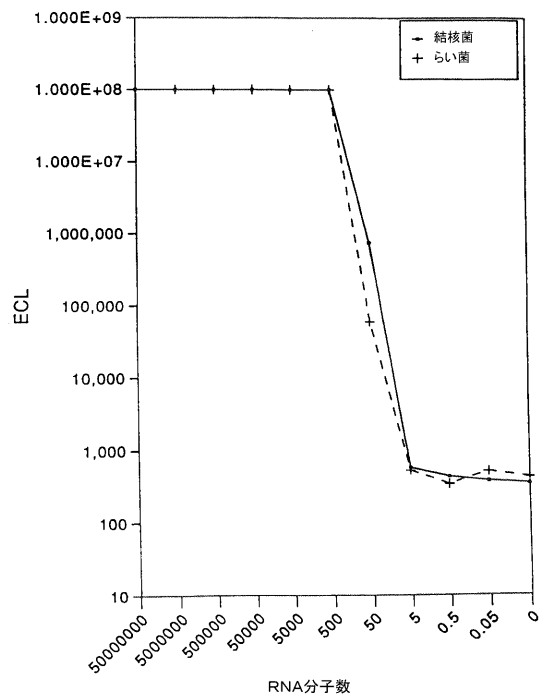
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 95:

TCGGCATCAA GGCGACCACC AAGA

24

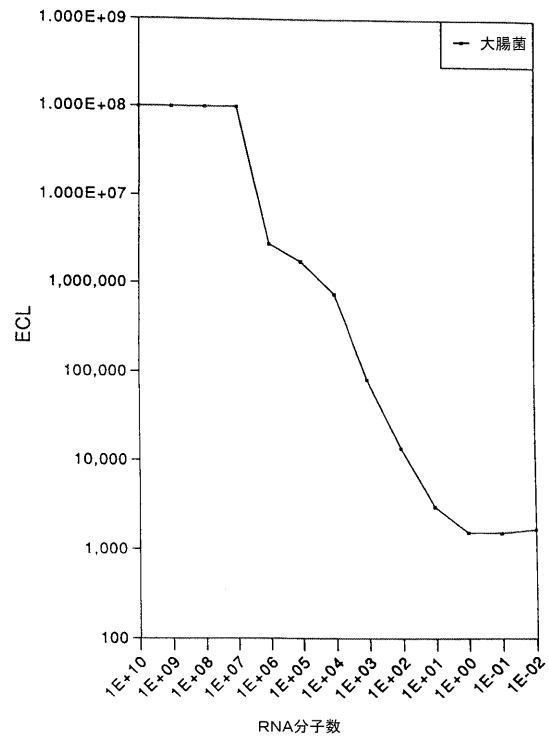
【図 1 a】

図1a: インビトロ作製されたミコバクテリアEf-Tu RNAを用いた
NASBAの分析感度



【図 1 b】

図1b: インビトロ作製された大腸菌Ef-Tu RNAを用いたNASBAの分析感度



【図 3】

図3: らい菌NASBAの特異性

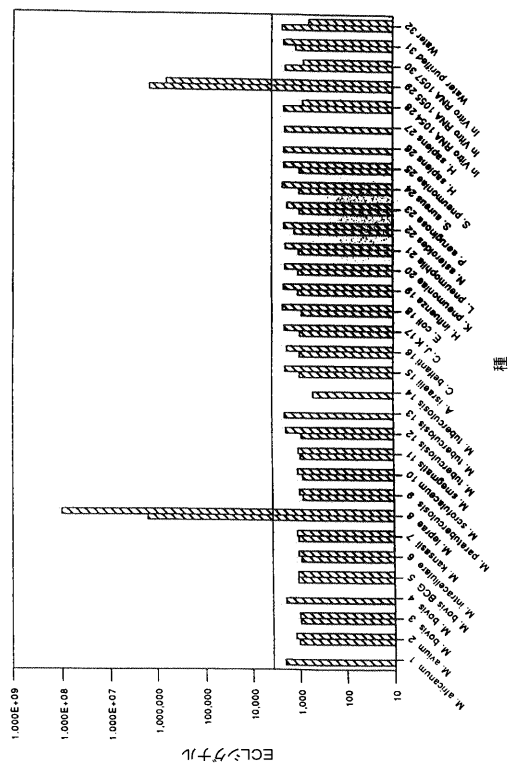
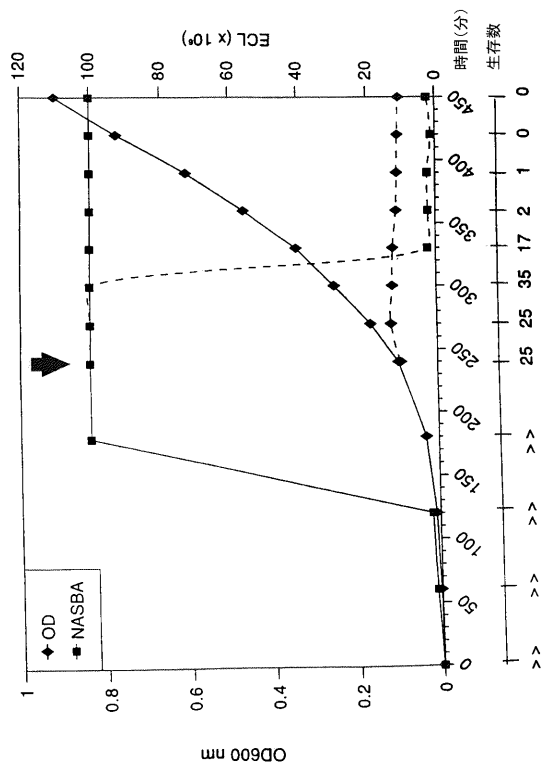


図4: 生存率評価のためのNASBA



フロントページの続き

- (72)発明者 オウトシヨーン, ピーテル
オランダ国、エヌ・エルー 5 2 7 1、イエー・ハー・シント・ミヒエルズヘステル、ウイルヘンストラート・6
- (72)発明者 クラーツエル, パウル
オランダ国、エヌ・エルー 1 0 1 1、エー・デー・アムステルダム、レフトボームスロート・9 2

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 1 8 9 5 8 (WO, A 1)
特開平 0 9 - 2 4 8 1 8 6 (JP, A)
Antimicrobial agents and chemotherapy. 1994, Vol.38, No.9, p.1959-1965
International journal of food microbiology. 1997, Vol.37, No.1, p.13-20
Journal of virological methods. 1994, Vol.49, No.2, p.157-167
(CARLIN, N. I. A.によって、1 9 9 3 年 7 月 2 0 日に、EMBL/Genbank/DDBJにおけるデータベース上で、「M.tuberculosis tuf gene for elongation factor TU. [online]. 20-JUL-1993. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION X63539, VERSION X63539 GI:44686 [Retrieved on 2009-01-22]. Retrieved from the internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?44686:OLD02:35275>>」として公開)
(DHANDAYUTHAPANI, S.によって、1 9 9 7 年 5 月 2 2 日に、EMBL/Genbank/DDBJにおけるデータベース上で、「M. leprae Tuf gene for elongation factor Tu, complete cds. [online]. 22-MAY-1997. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION D13869, VERSION D13869 GI:434782 [Retrieved on 2009-01-22]. Retrieved from the internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?434782:OLD02:170511>>」として公開)
(CONTRERAS, R.,等によって、1 9 9 4 年 4 月 1 5 日に、EMBL/Genbank/DDBJにおけるデータベース上で、「E.coli tufB gene coding for elongation factor Tu & four tRNAs. [online]. 15-APR-1994. NCBI Entrez Nucleotide, ACCESSION J01717, VERSION J01717.1 GI:147968 [Retrieved on 2009-01-22]. Retrieved from the internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?147968:NCBI:27125>>」として公開)
Journal of clinical microbiology. 1993, Vol.31, No.5, p.1088-1094
Molecular and cellular probes. 1996, Vol.10, No.1, p.7-14
FEMS microbiology letters. 1988, Vol.50, No.2-3, p.145-149

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq