



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103103181 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310019369. 2

(22) 申请日 2006. 05. 11

(30) 优先权数据

141153/2005 2005. 05. 13 JP

(62) 分案原申请数据

200680016568. 6 2006. 05. 11

(73) 专利权人 和光纯药工业株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 石川友一

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡志君 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0905259 A1, 1999. 03. 31, 全文.

CN 1339583 A, 2002. 03. 13, 全文.

Ross et al. Identification of a Genetically Distinct Subspecies of *Mycobacterium kansasii*. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 1992, 第 30 卷 (第 11 期), 2930-2933.

Huang et al. Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA Hybridization. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 1991, 第 29 卷 (第 10 期), 2125-2129.

Yang et al. Isolation of a DNA Probe for Identification of *Mycobacterium kansasii*, Including the Genetic Subgroup. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 1993, 第 31 卷 (第 10 期), 2769-2772.

审查员 王斌

权利要求书1页 说明书36页

序列表34页 附图7页

(54) 发明名称

堪萨斯分枝杆菌检测用的引物和探针、以及使用它们检测堪萨斯分枝杆菌的方法

(57) 摘要

本发明公开了含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部, 并且与堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*) 基因的核酸序列杂交的寡核苷酸、含有该寡核苷酸的堪萨斯分枝杆菌检测用引物和探针、使用该引物和 / 或探针的堪萨斯分枝杆菌的检测方法。使用本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测方法, 与现有的通过菌的培养检查等鉴定菌种的方法比较, 可以极其迅速且高精度地进行堪萨斯分枝杆菌的检测。另外与现有的通过使用引物或 / 和探针的 PCR 法的诊断方法比较, 有可能排除诊断上的假阳性, 可以更高精度地进行堪萨斯分枝杆菌的检测和诊断。另外也可以进行堪萨斯分枝杆菌菌体的定量。

1. 由序列号 2 所示的核酸序列或其完全互补序列组成并且与堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*) 基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

2. 由序列号 2 所示的核酸序列或其完全互补序列组成并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的用途, 用于设计堪萨斯分枝杆菌检测用引物或探针。

3. 堪萨斯分枝杆菌检测用引物对, 所述引物对由以下寡核苷酸组成, 所述寡核苷酸由作为序列号 2 的部分的序列号 13 所示的核酸序列和作为序列号 2 的部分的序列号 14 所示的核酸序列组成。

4. 权利要求 3 所述的引物对, 其中引物是用标记物质标记的, 所述标记物质选自 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、碱性磷酸酶、西洋辣根过氧化物酶、Cy3、Cy5、荧光素、吖啶酯 (Acridinium Ester)、或生物素。

5. 堪萨斯分枝杆菌检测用探针, 所述探针由以下寡核苷酸组成, 所述寡核苷酸是由序列号 2、作为序列号 2 的部分的序列号 57 所示的核酸序列或序列号 2、57 所示的核酸序列的完全互补序列组成, 并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

6. 权利要求 5 所述的探针, 其中探针是用标记物质标记的, 所述标记物质选自 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、碱性磷酸酶、西洋辣根过氧化物酶、Cy3、Cy5、荧光素、吖啶酯 (Acridinium Ester)、或生物素。

7. 权利要求 6 所述的探针, 其中 5' 末端用选自 FAM、HEX、TET 的报告荧光色素标记, 3' 末端用选自 TAMRA、BHQ、DABCYL 的猝灭荧光色素标记。

8. 堪萨斯分枝杆菌检测用试剂盒, 其包含以下 (1) 或 (2) :

(1) 由以下寡核苷酸组成的引物对, 所述寡核苷酸由序列号 13 所示的核酸序列和序列号 14 所示的核酸序列组成 ;

(2) 由以下寡核苷酸组成的引物对, 所述寡核苷酸由序列号 13 所示的核酸序列和序列号 14 所示的核酸序列组成 ; 以及

由以下寡核苷酸组成的探针, 所述寡核苷酸由序列号 2、57 所示的核酸序列或序列号 2、57 所示的核酸序列的完全互补序列组成。

9. 权利要求 8 所述的试剂盒, 其中引物和 / 或探针是用标记物质标记的, 所述标记物质选自 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、碱性磷酸酶、西洋辣根过氧化物酶、Cy3、Cy5、荧光素、吖啶酯 (Acridinium Ester)、或生物素。

10. 权利要求 9 所述的试剂盒, 其中探针的 5' 末端用选自 FAM、HEX、TET 的报告荧光色素标记, 3' 末端用选自 TAMRA、BHQ、DABCYL 的猝灭色素标记。

堪萨斯分枝杆菌检测用的引物和探针、以及使用它们检测 堪萨斯分枝杆菌的方法

[0001] 本申请是中国专利申请 200680016568.6 的分案申请,原申请的申请日是 2006 年 5 月 11 日,发明名称是“堪萨斯分枝杆菌检测用的引物和探针、以及使用它们检测堪萨斯分枝杆菌的方法”。

技术领域

[0002] 本发明涉及利用核酸扩增及其检测体系,在临床检查中检测和 / 或鉴定堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*, 以下称为 *M. kansasii*) 的方法。

背景技术

[0003] 非结核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacterium, NTM) 是被分类在分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 属的具有抗酸性性质的革兰氏阳性杆菌,是结核菌群和 *Mycobacterium leprae* 以外的一种抗酸菌。

[0004] 在非结核性抗酸菌中,临床上引人注目的菌种已知有堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)、戈氏分枝杆菌 (*Mycobacterium goodii*)、斯氏分枝杆菌 (*Mycobacterium szulgai*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、蟾分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)、偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)、龟分枝杆菌 (*Mycobacterium chelonae*)、脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*) 等。特别是由堪萨斯分枝杆菌和鸟分枝杆菌这 2 种菌引起的感染症占非结核性抗酸菌症全体的 90% 以上。

[0005] 通常,人们认为非结核性抗酸菌对健康人是无害的,但偶尔对人也表现出感染性,引起非结核性抗酸菌症。特别是对于象感染了 AIDS 病毒那样的免疫功能缺陷者,成了重大的感染起因菌。虽然非结核性抗酸菌症一直是很稀少的疾病,但由于近年有增加倾向,所以期盼开发在短时间能够鉴别结核菌和非结核性抗酸菌的方法。加之鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌的核酸扩增检测和诊断法适用于健康保险,在全国急速推广之后,其诊断上的意义很大。

[0006] 由于非结核性抗酸菌大多数对抗结核药表现出抗性,当患者存在抗酸菌感染症的嫌疑时,结核症还是非结核性抗酸菌症的鉴别诊断在决定治疗方针上很重要。另外由非结核性抗酸菌引起的疾病因其菌的种类不同,治疗法也各异,所以确定其菌种也非常重要。然而,由于非结核性抗酸菌症没有特异的临床症状,所以根据临床所见、病理组织学所见鉴别结核症和非结核性抗酸菌症,以及进一步确定非结核性抗酸菌的种类极其困难。因此,结核症还是非结核性抗酸菌症的诊断必须通过菌的鉴定进行。

[0007] 作为一般的诊断法,首先进行咯痰涂抹检查。该检查仅判断所谓的“抗酸菌阳性”,不能鉴别是结核菌还是非结核性抗酸菌。因此在咯痰涂抹检查中为阳性时,通过在小川培养基等培养基上分离培养,进行菌的培养检查,鉴别是结核菌还是非结核性抗酸菌。然后再进行生物化学的试验,鉴定菌种。然而分枝杆菌属发育一般比较慢,培养需要相当长的时

间。因此,当进行作为现在基本法的涂抹检查或培养检查时,为了获得是否是结核症的诊断结果,仅菌的分离培养就需要 3 ~ 4 周时间。而且还存在着为了鉴定菌种而进行的各种生物化学的试验还需要 2 ~ 3 周时间的问题。

[0008] 另外堪萨斯分枝杆菌的鉴定也要通过生物化学的试验进行。通过生物化学的试验鉴定堪萨斯分枝杆菌的主要鉴定方法是利用细菌暴露于光就生产色素的性质,但由于几个其它的分枝杆菌属的菌种也表现出与堪萨斯分枝杆菌同样的生物化学的特性,所以通常利用发色性鉴定堪萨斯分枝杆菌也存在问题。

[0009] 近年来,一直在开发于基因水平检测菌的技术。例如,研究了作为有用的手段利用聚合酶链反应 (PCR) 等核酸扩增技术的诊断技术。该方法具有灵敏度高,可以检测数个菌、时间短 (最长 4 日) 的优点。而且,运用通常的 PCR 法无论是活菌还是死菌都可同样检测。然而无论菌数多少都被判定为阳性,由于不知道菌数,有无感染性的诊断变得不确实。加之灵敏度过高,具有容易出现假阳性的判定等问题。

[0010] 就堪萨斯分枝杆菌来说,有从堪萨斯分枝杆菌的基因组文库获得 DNA 探针 (pMK1-9) 的研究 (非专利文献 1)。该 DNA 探针 (pMK1-9) 虽然可以与堪萨斯分枝杆菌的 DNA 形成互补的杂化体,但与其它种的分枝杆菌也同样可形成杂化体,所以对堪萨斯分枝杆菌不特异。

[0011] 在堪萨斯分枝杆菌的鉴定中还有着着眼于使用 pMK1-9 探针和与堪萨斯分枝杆菌的 rRNA 基因特异杂交结合的市售的 DNA 探针 (ACCUPROBE™, GenProbe, San Diego, 加利福尼亚州) 的研究 (非专利文献 2)。然而,在该研究中报告了 pMK1-9 探针和市售的 DNA 探针 (ACCU-PROBETM) 中的任一个都不能检测相当数量的堪萨斯分枝杆菌株种。

[0012] 另外,在堪萨斯分枝杆菌的检测中还有使用市售的 DNA 探针 (ACCU-PROBETM) 进行评价的其它研究 (非专利文献 3)。这些研究者们的实验中,ACCU-PROBE™ 是 100% 种特异的,对于其它的分枝杆菌种没有表现出交叉反应,但只可检测出堪萨斯分枝杆菌株中的 73%。

[0013] 有报告称可以从堪萨斯分枝杆菌的临床分离体纯化堪萨斯分枝杆菌特异的 DNA 杂化体形成探针 (p6123) (非专利文献 4)。该探针 (p6123) 对实验中使用的所有堪萨斯分枝杆菌株都可形成杂化体,也包括对 Ross 等人的 DNA 探针 (pMK1-9) 没有反应的亚类。美国专利第 5, 500, 341 号 (专利文献 2) 公开了由 p6123 探针纯化的堪萨斯分枝杆菌特异的增殖引物。

[0014] 另外,B. Boddinhaus 等人报道了特异增殖的、与分枝杆菌 DNA 杂交结合的,从 16S 的 rRNA 纯化分离的分枝杆菌属特异的寡核苷酸 (非专利文献 5)。

[0015] 另外还进行了例如有关对堪萨斯分枝杆菌检测有效的 DNA 区域的鉴定的研究 (例如专利文献 1 等),但现状是还没有确立对堪萨斯分枝杆菌特异的诊断法。

[0016] 以上所述可知现状是希望确立新的特异检测非结核性抗酸菌的方法。

[0017] 【专利文献 1】特开平 11-155589 号公报

[0018] 【专利文献 2】美国专利第 5, 500, 341 号公报

[0019] 【专利文献 3】特开昭 60-281 号公报

[0020] 【非专利文献 1】Z. H. Huang 等人, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, p. 2125

[0021] 【非专利文献 2】B. C. Ross 等人, J. Clin. Microbiol., 1992, 30, p. 2930

[0022] 【非专利文献 3】Tortoli 等人, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1994, 13,

p. 264

[0023] 【非专利文献 4】M. Yang 等人, J. Clin. Microbiol., 1993, 31, p. 2769

[0024] 【非专利文献 5】B. Boddinhaus 等人, J. Clin. Microbiol., 1990, 28, p. 1751

[0025] 【非专利文献 6】F. Poly 等人, J. Bacteriology, 2004, 186, 14, p. 4781-4795

发明内容

[0026] 发明要解决的课题

[0027] 本发明是鉴于上述所述状况形成的发明, 目的在于提供排除诊断上假阳性的新的堪萨斯分枝杆菌检测用引物、以及使用该引物的简便、迅速且精度高的堪萨斯分枝杆菌的检测方法。

[0028] 用于解决课题的手段

[0029] 本发明是以解决上述课题为目的形成的发明, 构成以下。

[0030] (1) 含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列 (其中, A 表示腺嘌呤、C 表示胞嘧啶、G 表示鸟嘌呤、T 表示胸腺嘧啶。另外, 任意位置的 T 可以被替换为尿嘧啶 (U)。下同) 的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部, 并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

[0031] (2) 含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部, 并且含有与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的堪萨斯分枝杆菌检测用引物。

[0032] (3) 含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部, 并且含有与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的堪萨斯分枝杆菌检测用探针。

[0033] (4) 堪萨斯分枝杆菌的检测方法, 其特征是使用含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部, 并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸作为引物和 / 或探针。

[0034] (5) 堪萨斯分枝杆菌检测用试剂盒, 其包含作为引物和 / 或探针的含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部, 并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

[0035] 本发明者等就到现在为止已确定的堪萨斯分枝杆菌和其它生物的各种基因, 反复进行了各种间的各基因序列同源性的理论检证与实验检证, 结果发现在通过使用微阵列法的方法得到的来自堪萨斯分枝杆菌的核酸序列的片段中, 存在着与堪萨斯分枝杆菌的基因序列的特定区域特异杂交, 对堪萨斯分枝杆菌的检测有用的碱基序列。

[0036] 以这些见识作为基础再进行锐意研究, 结果得到了对堪萨斯分枝杆菌特异的寡核苷酸 (序列号 1、序列号 2、序列号 3、序列号 4 所示的核酸序列), 发现这些核酸序列对堪萨斯分枝杆菌的检测有用。然后再以这些序列为基础开发堪萨斯分枝杆菌检测用引物和探针, 直至确立了使用这些引物和探针的堪萨斯分枝杆菌的检测方法。

[0037] 发明的效果

[0038] 通过使用本发明的引物或 / 和探针的堪萨斯分枝杆菌的检测方法, 与通过现有的菌的培养检查等鉴定菌种的方法进行比较, 前者可以极其迅速且高精度进行堪萨斯分枝杆

菌的检测。通过用本发明的检测方法进行堪萨斯分枝杆菌的检测,与通过使用现有的引物或/和探针的PCR法进行的诊断方法比较,诊断上的假阳性可能被排除,可以更高精度进行堪萨斯分枝杆菌的检测和诊断。另外,通过使用本发明的检测方法,也可以进行堪萨斯分枝杆菌菌体的定量。

[0039] 附图的简单说明

[0040] 【图 1】候补克隆 1 的碱基序列和设计的引物的所在位置(箭头指示)。

[0041] 【图 2】候补克隆 2 的碱基序列和设计的引物的所在位置(箭头指示)。

[0042] 【图 3】候补克隆 3 的碱基序列和设计的引物的所在位置(箭头指示)。

[0043] 【图 4】候补克隆 4 的碱基序列和设计的引物的所在位置(箭头指示)。

[0044] 【图 5】在实验例 1 中,使用来自堪萨斯分枝杆菌基因组得到的 PCR 产物、使用堪萨斯分枝杆菌的 KATS2 序列、以及日本专利申请 2004-129272 号说明书中以序列号 8 表示的序列(本说明书中以序列号 81 表示。)得到的以 Cy3/Cy5 的荧光强度为基础制作的散点图(scatter plot)。

[0045] 【图 6】实施例 1 中得到的电泳结果。

[0046] 其中各泳道的数字分别表示使用以下各个样品时的结果。

[0047] M4:分子量标记(标记 4)、

[0048] a:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、

[0049] b:结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*;人型结核菌)、

[0050] c:堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、

[0051] d:海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、

[0052] e:猿分枝杆菌(*Mycobacterium simiae*)、

[0053] f:瘰癧分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*)、

[0054] g:戈氏分枝杆菌(*Mycobacterium gordonae*)、

[0055] h:斯氏分枝杆菌(*Mycobacterium szulgai*)、

[0056] i:鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、

[0057] j:胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、

[0058] k:胃分枝杆菌(*Mycobacterium gastri*)、

[0059] l:蟾分枝杆菌(*Mycobacterium xenopi*)、

[0060] m:无色分枝杆菌(*Mycobacterium nonchromogenicum*)、

[0061] n:地分枝杆菌(*Mycobacterium terrae*)、

[0062] o:次要分枝杆菌(*Mycobacterium triviale*)

[0063] p:偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、

[0064] q:龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)、

[0065] r:脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、

[0066] s:外来分枝杆菌(*Mycobacterium peregrinum*)。

[0067] 【图 7】表示实施例 4 中进行的实时 PCR 检测结果,绘制对应于各 PCR 用 DNA 样品的基因组的拷贝数(x 轴、对数值)的 Ct 值(y 轴)的校正曲线。

[0068] 符号说明

[0069] 图 5 中的各记号分别如以下所示。

- [0070] (1) 被判断为对堪萨斯分枝杆菌特异性高的候补充克隆、
- [0071] (2) 使用特开平 11-155589 号所述的堪萨斯分枝杆菌的 KAS 序列的结果
- [0072] (3) 使用日本专利申请 2004-129272 号说明书中记载的来自结核分枝杆菌的序列号 8(本说明书中为序列号 81) 时的结果
- [0073] (a) 表示 Cy5 荧光强度 /Cy3 荧光强度的比率 ≥ 10.0 的线
- [0074] (b) 表示 Cy5 荧光强度 /Cy3 荧光强度的比率 ≥ 5.0 的线
- [0075] (c) 表示 Cy5 荧光强度 /Cy3 荧光强度的比率 ≥ 2.0 的线
- [0076] (a') 表示 Cy3 荧光强度 /Cy5 荧光强度的比率 ≥ 10.0 的线
- [0077] (b') 表示 Cy3 荧光强度 /Cy5 荧光强度的比率 ≥ 5.0 的线
- [0078] (c') 表示 Cy3 荧光强度 /Cy5 荧光强度的比率 ≥ 2.0 的线。
- [0079] 用于实施发明的最好方式
- [0080] 本发明中所谓堪萨斯分枝杆菌基因指的是堪萨斯分枝杆菌具有的全基因组序列内的任意的核酸序列单位(区域)。堪萨斯分枝杆菌的全基因组序列还没有被破译。
- [0081] 作为本发明涉及的寡核苷酸,如含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或全部、或者含有其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸(以下有时略记为本发明的寡核苷酸)。
- [0082] 本发明涉及的序列号 1 所示的核酸序列的寡核苷酸大小为 517 个碱基、序列号 2 所示的核酸序列的寡核苷酸大小为 596 个碱基、序列号 3 所示的核酸序列的寡核苷酸大小为 636 个碱基、序列号 4 所示的核酸序列的寡核苷酸大小为 726 个碱基。
- [0083] 作为本发明涉及的含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部的寡核苷酸,例如 (1) 含有与序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列具有约 70% 以上、优选约 80% 以上、更优选约 90% 以上、更优选约 95% 以上同源性的碱基序列的寡核苷酸、或 (2) 特征为包含序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列中连续的 10 个碱基以上、优选 20 个碱基以上的寡核苷酸等。
- [0084] 作为含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分的寡核苷酸如含有序列号 5 ~ 79 所示的核酸序列的部分或全部,并且含有连续的 10 个碱基以上的寡核苷酸等。
- [0085] 作为含有序列号 1 所示的核酸序列的部分的寡核苷酸的具体例子,如含有选自序列号 5 ~ 12 或序列号 53 ~ 56 所示的核酸序列的序列的寡核苷酸;作为含有序列号 2 所示的核酸序列的部分的寡核苷酸的具体例子,如含有选自序列号 13 ~ 26 或序列号 57 ~ 64 所示的核酸序列的序列的寡核苷酸;作为含有序列号 3 所示的核酸序列的部分的寡核苷酸的具体例子,如含有选自序列号 27 ~ 40 或序列号 65 ~ 72 所示的核酸序列的序列的寡核苷酸;作为含有序列号 4 所示的核酸序列的部分的寡核苷酸的具体例子,如含有选自序列号 41 ~ 52 或序列号 73 ~ 79 所示的核酸序列的序列的寡核苷酸。
- [0086] 作为本发明涉及的含有与序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列互补的互补序列的部分或全部的寡核苷酸,例如具有与含有本发明的序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的寡核苷酸杂交的碱基序列的部分或全部的寡核苷酸等。
- [0087] 上述的所谓具有与含有本发明涉及的序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所

示的核酸序列的寡核苷酸杂交的碱基序列的部分或全部的寡核苷酸具体的如具有与含有本发明的序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的寡核苷酸在高度严格的条件或严格的条件下杂交的碱基序列的部分或者全部的寡核苷酸等。

[0088] 其中这里所说的“高度严格的条件”具体的例如于 50% 甲酰胺中在 42 ~ 70℃、优选 60 ~ 70℃ 的杂交、然后于 0.2 ~ 2×SSC、0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 中在 25 ~ 70℃ 清洗的条件。

[0089] 而所谓的“严格的条件”，具体的例如在 6×SSC 或与它同等盐浓度的杂交溶液中，于 50 ~ 70℃ 温度条件下杂交 16 小时，用 6×SSC 或与它同等的盐浓度的溶液等根据需要进行预清洗后，用 1×SSC 或与它同等的盐浓度的溶液等清洗的条件。

[0090] 所谓与本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸为如具有与上述的堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列在高度严格的条件或严格的条件下杂交的碱基序列的寡核苷酸等。该高度严格的条件和严格的条件如上所述。

[0091] 作为含有与序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列互补的互补序列的部分的寡核苷酸，如“含有与含有序列号 5 ~ 79 所示的核酸序列的寡核苷酸互补的序列的部分或者全部，并且含有连续的 10 个碱基以上的寡核苷酸”。

[0092] 作为含有与序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列互补的互补序列的部分的寡核苷酸的具体例子，如含有与选自序列号 5 ~ 79 所示的核酸序列中的序列的寡核苷酸互补的序列的寡核苷酸。

[0093] 本发明的寡核苷酸既可以是脱氧核糖核酸 (DNA)，也可以是核糖核酸 (RNA)。当为核糖核酸时，不用说可以将胸苷残基 (T) 替换为尿苷残基 (U)。而在合成时，可以将任意位置的 T 变成 U 进行合成，含有尿苷残基的 DNA 也可以。同样含有将任意位置的 U 变为 T 的胸苷残基的 RNA 也可以。另外，1 个或者多个核苷酸缺失、插入或被替换，即使象次黄苷 (I) 那样的修饰核苷酸也可以。

[0094] 为了获得本发明的寡核苷酸，可以使用通过同行众所周知的化学合成法制备的寡核苷酸。因此，与克隆的寡核苷酸或多核苷酸相比，可以容易、大量且便宜地获得一定品质的寡核苷酸。

[0095] 例如，使用通常进行 DNA 合成的 DNA 合成仪，根据通常的磷酸胺法合成寡核苷酸，通过使用阴离子交换柱层析的常规方法进行纯化，可以得到作为目标的本发明的寡核苷酸。

[0096] 另外，作为可达到本发明目的的探索（筛选）寡核苷酸的手段，有 FEMS Microbiology Letters 166 :63-70, 1998 或 Systematic and Applied Microbiology 24 :109-112, 2001 等报道的扣除法，有通过从作为目标的基因组 DNA 片段扣除与来自要区别的生物种的基因组 DNA 片段反应的片段，将候补序列浓缩的方法论。

[0097] 另外，就像特开平 11-155589 号公报（专利文献 1）报道的那样，可以考虑利用所谓的制备来自作为目标的基因组 DNA 和来自要区别的生物种的基因组 DNA 的扩增产物的差异显示的方法，即利用任意引物的聚合酶链反应 (AP-PCR) 的方法论。

[0098] 另外，通过利用称之为所谓的微阵列法的方法也可以获得本发明的寡核苷酸。该方法首先做成例如堪萨斯分枝杆菌基因组 DNA 的鸟枪法克隆，然后做成将来自得到的鸟枪法克隆的纯化 DNA 配置于载玻片上的微阵列。另外，将作为目标的堪萨斯分枝杆菌的基因

组 DNA 片段做成荧光标记（标记 1）的片段。另一方面，也将来自要区分的生物种的基因组 DNA 片段做成荧光标记（标记 2）的片段，进行对照实验。即通过在同一反应体系使用各个标记 1 和标记 2 的竞争杂交法，检定与微阵列上的序列的反应性（结合性）。通过这样的操作，由于有可能选定与作为目标的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 片段（标记 1）更特异反应的序列候补群（例如非专利文献 6 等），由此可选择目标寡核苷酸。以下就使用微阵列法的本发明的寡核苷酸的选定方法的一个例子进行详细说明。

[0099] (1) 全基因组鸟枪法文库 (Whole Genome Shotgun library) 的制作

[0100] 对 Venter 等人, Science. 2001 年 2 月 16 日 ;291(5507) :1304-1351 所述的全基因组鸟枪法进行改变,用下述方法进行堪萨斯分枝杆菌的全基因组鸟枪法文库的制作。

[0101] 首先用常规方法（例如高压蒸气灭菌处理和使用玻璃珠等进行菌体的破碎处理）对堪萨斯分枝杆菌菌株进行处理,再按照常规方法进行 DNA 的提取、纯化。将得到的纯化 DNA 样品在例如终浓度 20% 甘油存在下、5kPa ~ 9kPa 压力下、雾化处理约 1 ~ 5 分钟,进行 DNA 的片段化处理。通过这样处理,可以有效回收 500 ~ 1000bp 大小目标级分。将得到的级分利用市售的提取柱进行纯化。

[0102] 然后将得到的级分 (DNA 片段) 按照常规方法通过连接整合到载体 DNA,得到重组 DNA (堪萨斯分枝杆菌的全基因组鸟枪法文库)。作为为此目的使用的载体 DNA,当以后转化的宿主细胞为大肠杆菌时,为例如 pBS [例如 pBSII sk+ 载体 (Stratagene 公司)], pQE-TRI 质粒 (Qiagen 公司生产)、pBluescript、pET、pGEM-3Z、pGEX 等载体。在连接之前,可预先任意用 DNA 聚合酶进行处理,将 DNA 片段的末端进行平端处理等。

[0103] 然后,用得到的重组 DNA 转化适当的宿主细胞,得到转化体。作为为此目的使用的宿主细胞,例如大肠杆菌 (E. coli),优选 JM109、DH5 α 、TOP10 等。作为宿主细胞,此外也可使用质粒和噬菌体 DNA 导入效率高的 Competent Cell (感受态细胞)。例如大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Takara Bio 公司生产) 等。

[0104] 转化可以根据例如 D. M. Morrison 的方法 (Method in Enzymology, 68, 326-331, 1979) 等进行。而当使用市售的感受态细胞时,可以根据该制品的说明书进行转化。

[0105] 为了挑选导入整合了目标 DNA 片段的重组 DNA 的转化体,例如利用用于转化的载体的性质的方法。例如,如果使用含有氨苄青霉素抗性基因的载体,通过在含有氨苄青霉素的培养基上对转化体进行培养,对得到的克隆进行选择,可以容易获得导入整合了目标 DNA 片段的重组 DNA 的转化体 (堪萨斯分枝杆菌基因组的全基因组鸟枪法克隆) 的文库。

[0106] (2) 微阵列制作

[0107] 接下来用下述方法制作微阵列。

[0108] 即根据常规方法从上述 (1) 得到的堪萨斯分枝杆菌基因组的全基因组鸟枪法克隆纯化 DNA,作为 PCR 用样品使用将该 DNA 悬浮添加到 PCR 用反应液中,使用适当的引物 [市售的引物也可以。例如 M13 Primer M1 (Takara Bio 公司生产) 和引物 M13 Primer RV (Takara Bio 公司生产) 等], 根据常规方法进行 PCR 后,对得到的 PCR 产物进行纯化。然后根据常规方法将 PCR 产物点印到微阵列用载玻片上,然后对该载玻片进行 150mJ/cm² 的 UV 照射,将 PCR 产物 (含有来自目标的堪萨斯分枝杆菌的 DNA) 固定在载玻片上,做成微阵列。

[0109] 另外,根据需要,作为阳性对照,可使用例如对结核分枝杆菌 (人型结核菌) 等结核菌特异的序列的 DNA 或堪萨斯分枝杆菌基因组具有的序列的 DNA 等,作为阴性对照,使用

例如来自大肠杆菌的 DNA 等,分别同样地进行 DNA 的片段化、连接载体以及进行大肠杆菌的转化,同样进行 PCR,将得到的 PCR 产物固定在载玻片上,也制作它们各自的微阵列。

[0110] (3) 目标基因组 DNA 的荧光色素标记

[0111] 另外,对从堪萨斯分枝杆菌菌株提取、纯化的基因组 DNA 以及对照用基因组(例如牛型结核菌等的结核菌)DNA 通过使用己氨基-UTP 的间接标记法,分别用 Cy3 和 Cy5 进行标记。

[0112] 以例如对 DeRisi 研究室(www.microarrays.org)发表的方法进行改变的间接标记法为例进行说明。该方法使用带有氨基的 α UTP,通过酶延伸反应做成将该 α UTP 掺入到分子内的 DNA 链。然后通过使荧光色素(琥珀酰亚胺体)化学键合在该氨基上,就可以对 DNA 进行标记了。

[0113] 首先对起始材料(来自堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 和对照用基因组 DNA)根据常规方法进行热变性处理[可以使用 BioPrime DNA labelingsystem(Invitrogene 公司生产)等市售试剂盒]。然后添加 DTT 2 μ l、dATP/dCTP/dGTP 的混合液、dTTP、Ha-dUTP、Klenow 酶,于 37℃ 进行 3 小时左右的延伸反应。将得到的反应产物装到超滤柱中,以 14000rpm 离心 4 分钟左右后,将浓缩液回收到微管中,用真空干燥离心机等使其完全干燥。然后向干燥的上述反应产物中加 NaHCO_3 ,混合后常温下静置 2~3 分钟。

[0114] 另外,制备将 Cy3(或 Cy5)溶于 DMSO 的溶液(Cy-dye Solution Cy3、Cy-dye Solution Cy5)。分别将该 Cy-dye Solution Cy3 加到使用对照用基因组 DNA 得到的上述反应产物中,而将 Cy-dye Solution Cy5 加到使用堪萨斯分枝杆菌基因组得到的上述反应产物中,于 40℃ 温育 60 分钟左右(避光)。再分别向各个反应产物中加 4M NH_2OH (使用前制备),搅拌后通过温育 15 分钟左右(避光),得到各个基因组 DNA 的标记产物。然后将得到的标记产物加到超滤柱中,于 14000rpm 下离心 4 分钟左右后,将浓缩液回收到微管中,用真空干燥离心机使其完全干燥。

[0115] 对于得到的各个干燥状态的基因组 DNA 的标记产物,制备终浓度为 0.04M Tris-醋酸(pH8.1)、0.1M 醋酸钾、0.03M 醋酸镁四水合物组成的溶液,然后使干燥状态的基因组 DNA 的标记产物悬浮混合到该溶液中。于 94℃ 加热处理 15 分钟,可得到 100 个碱基~300 个碱基的基因组 DNA 的标记产物片段化的生成物(Cy3 标记产物、Cy5 标记产物)。

[0116] 将各个 Cy3 标记产物和 Cy5 标记产物加到超滤柱中,于 14000rpm 下离心 4 分钟左右后,将浓缩液回收到微管中,用真空干燥离心机等使其完全干燥。

[0117] 向微管中加入含有鲑精 DNA(10mg/mL)0.5 μ l、甲酰胺 5 μ l 的 40 μ l ArrayHyb 杂交缓冲液(SIGMA 公司生产),将全量调整到 40~50 μ l 的试剂溶液(是后面使用的微阵列的盖玻片为 24×55mm 大小的组成),将上述得到的 Cy3 标记产物和 Cy5 标记产物在同一溶液中悬浮混合后,于 95℃ 温育 5 分钟,制备 Cy3Cy5 标记产物溶液。然后在用于接下来的(4)的微阵列杂交之前保存在 70℃。

[0118] (4) 微阵列杂交(在阵列上的 DNA-DNA 杂交)

[0119] 将上述(3)制备的 Cy3Cy5 标记产物溶液都加到上述(2)制作的微阵列(DNA 芯片)上,盖上盖玻片,但不要进入气泡。将它装到杂交盒中,密闭于铺有蒸馏水弄湿的无尘纸(kimtowel)等的 Tupper 等容器内,于 65℃ 反应 8 小时以上(避光),进行杂交。杂交后,通过于室温下将微阵列连同盖玻片一起浸入到 2×SSC-0.1% SDS 溶液中,于溶液中轻轻地

摇动微阵列,使盖玻片脱离。用 $1\times\text{SSC}$ 、 0.03% SDS 溶液 (60°C) 清洗 10 分钟,用 $0.2\times\text{SSC}$ 溶液 (42°C) 清洗 10 分钟,用 $0.05\times\text{SSC}$ 溶液 (室温) 清洗 10 分钟后,将微阵列迅速移到新的干的管架中,立刻于 800rpm 下离心 5 分钟使其干燥。

[0120] (5) 荧光强度的测定;从信号检测至数量化

[0121] 使用荧光解读扫描仪,测定上述 (4) 中的微阵列杂交处理的微阵列上的荧光强度,测定 Cy3 和 Cy5 的 2 通道的荧光强度,得到荧光检测数据。荧光信号的数量化使用市售的 DNA 芯片发现图像解析软件等,按照软件的操作步骤,可进行点自动识别、背景计算、荧光强度比的规一化。

[0122] 杂交中使用的 Cy5 标记产物是对来自堪萨斯分枝杆菌的基因组进行了标记的产物,Cy3 标记产物是对对照用基因组 DNA 进行了标记的产物。因此,测定 Cy3 与 Cy5 的各个荧光强度的结果,如果 Cy5 的荧光一方明显被检测到,就意味着对象的微阵列的 PCR 产物与堪萨斯分枝杆菌杂交了,判断为对堪萨斯分枝杆菌的特异性高。另一方面 Cy3 的荧光一方如果明显被检测到的话,意味着对象的微阵列的 PCR 产物与对照用基因组 DNA 杂交了,而有时检测到同样程度的强度的 Cy3 和 Cy5 的荧光,或什么也没有检测到时,判断为对堪萨斯分枝杆菌的特异性低。

[0123] 另外如果在微阵列上点加阳性对照(例如对结核分枝杆菌特异的 DNA 片段,对堪萨斯分枝杆菌特异的 DNA 片段等)和阴性对照(例如来自大肠杆菌的 DNA 片段等),测定各自的 Cy3/Cy5 荧光强度,如果看到其荧光强度的倾向,可以作为荧光扫描测定中的 1 个数据评价基准。

[0124] 另外,为了筛选用于堪萨斯分枝杆菌特异检测的候补序列,可以 DNA 芯片上检测到的 Cy3/Cy5 的荧光强度比 (Ratio) 为基础,做成散点图 (scatterplot),像下面那样进行解析。

[0125] 在解析中,使用的阳性对照序列中,对堪萨斯分枝杆菌特异的 DNA 片段的 Cy3/Cy5 比的数值成为用于特异性评价的有用的基准值。即,从进行筛选的候补中选择根据 Cy3/Cy5 比的数值解析的结果得到的显著的堪萨斯分枝杆菌特异性信号 (Cy5 的荧光强度强时),并且与上述对堪萨斯分枝杆菌特异的阳性对照点相比,比率数值大的克隆。

[0126] 再根据利用例如 ABI PRISM310 毛细管测序仪 (Applied bio 公司) 等仪器的常规方法,确定得到的候补克隆的碱基序列。

[0127] 作为本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌检测用引物,如含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的引物(以下有时记为本发明的引物)。

[0128] 另外,本发明的引物考虑要适合 PCR、核酸杂交等条件,考虑解链温度 (T_m 值) 等因素后从含有序列号 1 ~ 4 所示的核酸序列的部分或者全部的寡核苷酸、或含有其互补序列的部分或者全部的寡核苷酸中选择适当区域的适当长度后使用,优选为维持作为引物序列的特异性所必需的碱基数的具有 10 ~ 50 个碱基、更优选 10 ~ 35 个碱基、更优选 18 ~ 25 个碱基长度的寡核苷酸。

[0129] 引物的设计方法可以使用引物设计一般使用的软件,例如引物设计用的 Web tool Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research.) 等进行设计。

[0130] 可用于本发明的引物的含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸

序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸(本发明的寡核苷酸)的具体例子与上述的本发明的寡核苷酸的说明中所述相同。

[0131] 作为象这样的引物的具体例子,例如含有序列号 5 ~ 52 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部,并且含有与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

[0132] 作为本发明的引物更优选的具体例子,如含有选自序列号 5 ~ 52 所示的核酸序列中的序列的引物、或含有与选自序列号 5 ~ 52 所示的核酸序列中的序列互补的序列的引物。其中,如含有选自序列号 5、6、13 ~ 16、27 ~ 30、41 ~ 44 所示的核酸序列中的序列的引物,或含有与选自序列号 5、6、13 ~ 16、27 ~ 30、41 ~ 44 所示的核酸序列中的序列互补的序列的引物。

[0133] 而具有序列号 5 ~ 12 所示的核酸序列的引物是以序列号 1 所示的核酸序列为基础设计的引物。具有序列号 13 ~ 26 所示的核酸序列的引物是以序列号 2 所示的核酸序列为基础设计的引物。具有序列号 27 ~ 40 所示的核酸序列的引物是以序列号 3 所示的核酸序列为基础设计的引物。具有序列号 41 ~ 52 所示的核酸序列的引物是以序列号 4 所示的核酸序列为基础设计的引物。

[0134] 图 1 中,序列号 1 所示的核酸序列上的具有序列号 5 和 6 所示的核酸序列的引物的所在位置分别以 1c_plat1_Fw1 和 1c_plat1_Rv1 用箭头标出。

[0135] 图 2 中,序列号 2 所示的核酸序列上的具有序列号 13、14、15 和 16 所示的核酸序列的引物的所在位置分别以 6c_plat1_Fw1、6c_plat1_Rv1、6c_plat1_Fw2、6c_plat1_Rv2 用箭头标出。

[0136] 图 3 中,序列号 3 所示的核酸序列上的具有序列号 27、28、29 和 30 所示的核酸序列的引物的所在位置分别以 8d_plat1_Fw1、8d_plat1_Rv1、8d_plat1_Fw2、8d_plat1_Rv2 用箭头标出。

[0137] 图 4 中,序列号 4 所示的核酸序列上的具有序列号 41、42、43 和 44 所示的核酸序列的引物的所在位置分别以 9c_plat1_Fw1、9c_plat1_Rv1、9c_plat1_Fw2、9c_plat1_Rv2 用箭头标出。

[0138] 另外,序列号 1 所示的核酸序列上的具有序列号 7 ~ 12 所示的核酸序列的引物的所在部位分别表示如下。

[0139] 序列号 7(1c_plat1_Fw3) :33 位 ~ 51 位、

[0140] 序列号 8(1c_plat1_Fw4) :212 位 ~ 231 位、

[0141] 序列号 9(1c_plat1_Fw5) :315 位 ~ 334 位、

[0142] 序列号 10(1c_plat1_Rv3) :185 位 ~ 204 位、

[0143] 序列号 11(1c_plat1_Rv4) :411 位 ~ 430 位、

[0144] 序列号 12(1c_plat1_Rv5) :461 位 ~ 481 位。

[0145] 序列号 2 所示的碱基序列上的具有序列号 17 ~ 26 所示的核酸序列的引物的所在部位分别如下所示。

[0146] 序列号 17(6c_plat1_Fw3) :4 位 ~ 21 位、

[0147] 序列号 18(6c_plat1_Fw4) :48 位 ~ 67 位、

[0148] 序列号 19 (6c_plate1_Fw5) :229 位~ 247 位、
[0149] 序列号 20 (6c_plate1_Fw6) :279 位~ 296 位、
[0150] 序列号 21 (6c_plate1_Fw7) :380 位~ 399 位、
[0151] 序列号 22 (6c_plate1_Rv3) :166 位~ 184 位、
[0152] 序列号 23 (6c_plate1_Rv4) :195 位~ 214 位、
[0153] 序列号 24 (6c_plate1_Rv5) :368 位~ 387 位、
[0154] 序列号 25 (6c_plate1_Rv6) :428 位~ 445 位、
[0155] 序列号 26 (6c_plate1_Rv7) :523 位~ 542 位。
[0156] 序列号 3 所示的碱基序列上的具有序列号 31 ~ 40 所示的核酸序列的引物的所在部位分别如下所示。

[0157] 序列号 31 (8d_plate1_Fw3) :5 位~ 22 位、
[0158] 序列号 32 (8d_plate1_Fw4) :54 位~ 72 位、
[0159] 序列号 33 (8d_plate1_Fw5) :207 位~ 226 位、
[0160] 序列号 34 (8d_plate1_Fw6) :289 位~ 308 位、
[0161] 序列号 35 (8d_plate1_Fw7) :472 位~ 490 位、
[0162] 序列号 36 (8d_plate1_Rv3) :151 位~ 169 位、
[0163] 序列号 37 (8d_plate1_Rv4) :220 位~ 239 位、
[0164] 序列号 38 (8d_plate1_Rv5) :335 位~ 353 位、
[0165] 序列号 39 (8d_plate1_Rv6) :408 位~ 427 位、
[0166] 序列号 40 (8d_plate1_Rv7) :616 位~ 635 位。
[0167] 序列号 4 所示的碱基序列上的具有序列号 45 ~ 52 所示的核酸序列的引物的所在部位分别如下所示。

[0168] 序列号 45 (9c_plate1_Fw3) :17 位~ 36 位、
[0169] 序列号 46 (9c_plate1_Fw4) :117 位~ 135 位、
[0170] 序列号 47 (9c_plate1_Fw5) :405 位~ 424 位、
[0171] 序列号 48 (9c_plate1_Fw6) :492 位~ 512 位、
[0172] 序列号 49 (9c_plate1_Rv3) :182 位~ 201 位、
[0173] 序列号 50 (9c_plate1_Rv4) :263 位~ 281 位、
[0174] 序列号 51 (9c_plate1_Rv5) :528 位~ 547 位、
[0175] 序列号 52 (9c_plate1_Rv6) :654 位~ 673 位。

[0176] 其中上述的序列号后的 () 内表示本发明中命名的引物的名称。

[0177] 获得本发明的引物的方法如上述获得本发明的核苷酸的方法中所述那样。

[0178] 另外,本发明的引物也可以用标记物质标记。

[0179] 作为用标记物质对本发明的引物进行标记中使用的标记物质,只要是放射性同位素或酶、荧光物质、发光物质、生物素等众所周知的标记物质,无论哪一种都可以使用。

[0180] 例如,作为放射性同位素,如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 等,作为酶,如碱性磷酸酶、西洋辣根过氧化物酶等,作为荧光物质,如 Cyanine Dye 系的 Cy3、Cy5 (Amasham Bioscience 公司)、荧光素等,作为发光物质,如含有 Acridinium Ester 的化学发光试剂等。

[0181] 当本发明的引物用放射性同位素标记时,如在合成引物时通过掺入用放射性同位

素标记的核苷酸而标记引物的方法,和合成引物后用放射性同位素标记的方法等。具体来说,如一般常用的随机引物法、切口平移法、通过T4多核苷酸激酶进行的5'-末端标记法、使用末端转脱氧核苷酰酶的3'-末端标记法、RNA标记法等。

[0182] 当本发明的引物用酶标记时,可以使用使碱性磷酸酶、西洋辣根过氧化物酶等酶分子与欲进行标记的引物直接共价结合等该领域中常规方法的直接标记法。

[0183] 当通过荧光物质进行标记时,例如可以通过该领域中常用方法的标记手法将荧光素标记的核苷酸掺入到引物中。另外,用带有连接臂的核苷酸作为序列的寡核苷酸的一员进行替换的方法(例如、参照Nucleic Acids Res., 1986年,第14卷, p. 6115)也可以将核苷酸用荧光物质进行标记。此时,也有将5位带有连接臂的尿苷通过特开昭60-500717号公报报道的合成法由脱氧尿苷化学合成,在上述寡核苷酸链中导入荧光物质的方法。

[0184] 用发光物质标记的方法以及用生物素标记的方法可以按照通常该领域进行的对核苷酸进行发光标记或生物素标记的常法进行。

[0185] 作为本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌检测用探针,例如含有序列号1、序列号2、序列号3或序列号4所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部、并且含有与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的探针(以下有时称为本发明的探针)。

[0186] 在本发明的探针中使用的含有序列号1、序列号2、序列号3或序列号4所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部、并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸(本发明的寡核苷酸)的具体例子与上述的本发明的寡核苷酸的说明中所述的例子相同。

[0187] 本发明的探针在符合PCR(包括实时PCR)、核酸杂交等条件下,可以由含有序列号1~4所述的核酸序列的部分或全部的寡核苷酸,或含有其互补序列的部分或全部的寡核苷酸计算解链温度(T_m 值)等,选用适当区域的适当长度。但是,如果要使探针具有充分的特异性,希望在考虑为维持作为探针序列的特异性所必需的碱基数之后进行设计。

[0188] 例如,作为在核酸杂交法(例如,Southern杂交等)等使用的探针,如10~700个碱基、优选具有100~600个碱基、更优选200~500个碱基长度的探针。

[0189] 例如,作为实时PCR扩增体系(例如TaqManTM法、Molecular Beacon法等)等中使用的探针,如具有10~50个碱基、优选15~40个碱基、更优选20~30个碱基长度的探针。

[0190] 作为象这样的探针的具体例子,如可从含有序列号5~79所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部、并且含有与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的探针中选择。

[0191] 作为本发明的探针的优选的具体例子,如含有选自序列号5~79所示的核酸序列中的序列的探针。其中优选含有选自序列号5、6、13~16、27~30、41~44、53、57~59、65~67、73~75所示的核酸序列中的序列的探针。特别优选含有选自序列号53、57~59、65~67、73~75所示的核酸序列中的序列的探针。

[0192] 而序列号53~79所示的核酸序列是通过使用本发明的引物的PCR扩增的核酸序列。表1一并给出了正向引物和反向引物的组合、通过使用这些组合的PCR扩增的核酸序列的序列号。例如,序列号53所示的核酸序列是通过使用序列号5所示的核酸序列的寡核

苷酸作为正向引物,序列号6所示的核酸序列的寡核苷酸作为反向引物,通过PCR扩增的序列。

[0193] 【表1】

[0194]

正向引物	反向引物	被扩增的序列	正向引物	反向引物	被扩增的序列
5	6	53	31	36	68
7	10	54	32	37	69
8	11	55	33	38	70
9	12	56	34	39	71
13	14	57	35	40	72
15	16	58	41	42	73
13	16	59	43	44	74
17	22	60	41	44	75
18	23	61	45	49	76
19	24	62	46	50	77
20	25	63	47	51	78
21	26	64	48	52	79
27	28	65			
29	30	66			

[0195] 获得本发明的探针的方法如上述获得本发明的核苷酸的方法中所述。

[0196] 本发明的探针可以用标记物质进行标记。

[0197] 作为用于对本发明的探针用标记物质进行标记的标记物质,只要是放射性同位素或酶、荧光物质、发光物质、生物素等众所周知的标记物质,可以使用任一个。

[0198] 对本发明的探针进行标记的标记物质的具体例子以及标记方法就像本发明的引物的标记方法说明中所述。

[0199] 另外,作为下述的实时PCR检测法中使用的标记探针,如通过用在实时检测法中通常使用的标识物质对本发明的探针进行了标记的探针。例如,5'末端使用报告荧光物质(羧基荧光素(FAM)、六氯荧光素(HEX)、四氯荧光素(TET)等)标记的,3'末端使用猝灭剂色素[(例如羧基四甲基若丹明(TAMRA)等荧光物质、Black Hole Quencher色素(BHQ), 4-((4-二甲氨基)苯基)偶氮)苯甲酸(DABCYL)等非荧光物质]标记的本发明的探针。

[0200] 作为本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌检测中使用的样品,如喀痰、血液、咽头粘液、胃液、支气管洗液、经支气管采取物、胸水等穿刺液、尿、脓等各种临床材料。另外也可以是从检体分离、培养的培养菌体、从这些菌体分离、纯化的核酸、或通过核酸扩增检测系统等扩增的核酸。

[0201] 为了从上述样品中提取、纯化DNA,可以根据从检体提取抗酸菌(结核菌)DNA中使用的常用方法进行。

[0202] 如以菌体作为样品时,例如通过 SDS 等表面活性剂、硫氰酸胍 (GTC) 等蛋白变性剂对菌体进行处理,破坏指定结核菌的膜结构的方法、用玻璃珠等对菌体进行物理破碎的方法等。

[0203] 以咯痰作为样品时,作为前处理,可以通过美国疾病管理预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, 简称 CDC) 推荐的 NALC (N-乙酰-L-半胱氨酸)-NaOH 法 (Kent PT, Kubica GP, Pubric HealthMycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, U.S.A., 1985 年, p. 31-55) 进行检体的匀浆化。

[0204] 然后,可以通过一般的 DNA 制备法 (酚/氯仿提取、乙醇沉淀法等, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, J.Clin.Microbiol., 1990 年 3 月; 28(3), 495-503, Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J) 进行 DNA 的提取和纯化。

[0205] 对于从检体中分离、培养的培养菌体用作检测堪萨斯分枝杆菌的样品时的例子,有例如收集小川培养基上的菌落,悬浮在灭菌蒸馏水中,离心分离收集菌体后,再悬浮在蒸馏水中,高压灭菌釜处理后,经菌体的粉碎处理 (通过玻璃珠进行物理破碎等),再离心分离回收上清。从所得的上清中可以提取纯化 DNA。对于 DNA 的提取、纯化,由于市售有各种试剂盒,因此可以使用这些试剂盒进行,也可以根据该领域中的常规方法 (例如,酚/氯仿提取法、使用乙醇或异丙醇等使沉淀的方法等) 进行。例如,可以使用 Qiagen 公司生产的离子交换树脂类型的 DNA 提取纯化试剂盒 Genomic-tip 等进行 DNA 的提取、纯化。

[0206] 作为本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌的检测方法,例如

[0207] (A) 将含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 中所述的核酸序列的部分或全部,或含有其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸 (本发明的寡核苷酸) 作为引物使用的方法。

[0208] (B) 将本发明的寡核苷酸经标记物质标记后的产物作为标记探针使用的方法等。以下分别就各个方法进行说明。

[0209] (A) 将本发明的寡核苷酸作为引物使用的方法

[0210] 作为 (A) 的方法,如使用本发明的引物,以样品中的核酸作为模板进行核酸扩增反应,对得到的引物延伸物进行检测的方法,具体的例子,如使用本发明的引物与样品中的核酸杂交,通过 DNA 聚合酶等进行核酸扩增 [例如 PCR; 专利文献 3、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法 (Tsugunori Notomi 等人, Nucleic Acid Res., 28, e63, 2000)、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法 (临床病理, 51(11), 1061-1067, 2003 年 11 月)、LCR (ligase chain reaction) 法 (特开平 4-211399 号)、SDA (strand displacement amplification) 法 (特开平 8-19394 号)], 使引物延伸的方法,由此可使堪萨斯分枝杆菌的核酸序列的特定区域的序列扩增,通过测定得到的引物延伸物可以检测堪萨斯分枝杆菌。

[0211] PCR 中使用的本发明的引物的具体例子如上述那样的例子。

[0212] 优选的具体例子,作为正向引物的是含有序列号 5、7 ~ 9、13、15、17 ~ 21、27、29、31 ~ 35、41、43、45 ~ 48 所示的核酸序列的部分或全部、或者含有其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸,作为反向引物的是如含有序

列号 6、10～12、14、16、22～26、28、30、36～40、42、44、49～52 所示的核酸序列的部分或全部、或者含有其互补序列的部分或全部，并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸。

[0213] 更优选的具体例子，作为正向引物的是如含有选自序列号 5、7～9、13、15、17～21、27、29、31～35、41、43、45～48 所示的核酸序列中的序列的引物，作为反向引物的是如含有选自序列号 5、10～12、14、16、22～26、28、30、36～40、42、44、49～52 所示的核酸序列中的序列的引物。

[0214] 更优选的具体例子，作为正向引物的是如含有选自序列号 5、13、15、27、29、41、43 所示的核酸序列的序列的引物，作为反向引物的是如选自序列号 6、14、16、28、30、42、44 所示的核酸序列中的序列的引物。

[0215] 作为优选的正向引物和反向引物的组合，如上述表 1 给出的组合。

[0216] 其中特别优选的正向引物和反向引物的组合，如

[0217] (1) 正向引物是具有序列号 5 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 6 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0218] (2) 正向引物是具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 14 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0219] (3) 正向引物是具有序列号 15 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0220] (4) 正向引物是具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0221] (5) 正向引物是具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 28 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0222] (6) 正向引物是具有序列号 29 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0223] (7) 正向引物是具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0224] (8) 正向引物是具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 42 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0225] (9) 正向引物是具有序列号 43 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，

[0226] (10) 正向引物是具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸，反向引物是具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸的组合，等等。

[0227] 使用上述引物的 PCR 的条件、操作法等根据该领域中通常使用的常用方法进行。

[0228] 作为对得到的引物延伸物进行测定的方法，如 (A-1) 进行聚合酶链反应后，对得到的引物延伸物进行电泳，根据其结果进行测定的方法，(A-2) 通过实时 PCR 法进行的方法，(A-3) 进行使用标记引物的 PCR，对得到的引物延伸物的标记进行测定的方法等。

[0229] 以下就各个方法进行说明。

[0230] (A-1) 进行聚合酶链反应后，对得到的引物延伸物进行电泳，根据其结果进行测定的方法

[0231] 作为该方法,如

[0232] “以包括如下步骤为特征的堪萨斯分枝杆菌的检测方法:

[0233] (i) 作为引物(本发明的引物)使用含有序列号 1、序列号 2、序列号 3、或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部、并且与堪萨斯分枝杆菌的基因的核酸序列杂交的寡核苷酸,以样品中的核酸作为模板进行 PCR,

[0234] (ii) 对上述(i)得到的引物延伸物进行电泳,根据该结果检测堪萨斯分枝杆菌”。

[0235] 作为进行电泳,根据其结果检测堪萨斯分枝杆菌的方法,例如(A-1-1)通过确认作为目标的寡核苷酸大小(碱基对数)的引物延伸物级分进行判定的方法、(A-1-2)通过使用标记探针的杂交进行判定的方法等。

[0236] 电泳法的条件、操作方法等可以根据该领域中通常使用的常用方法进行。

[0237] (A-1-1) 通过确认作为目标的碱基对数的引物延伸物级分进行判定的方法

[0238] 上述的通过确认作为目标寡核苷酸大小(碱基对数)的引物延伸物级分进行判定的方法,例如,首先进行 PCR,对得到的引物延伸物进行电泳。由在 PCR 使用的正向引物和反向引物对扩增产物的大小(碱基对数)进行预测,预测得到的泳动级分的大小是否与扩增产物相当通过常用方法进行确认。例如,将得到的级分用溴乙锭等染色后,通过肉眼判断核酸种类的方法由该扩增产物的特征的大小进行检测等方法。

[0239] 作为通过(A-1-1)的方法进行的具体的判定方法,例如以下的方法。

[0240] (1) 作为正向引物使用具有序列号 5 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 6 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 167 碱基对的级分或确认具有序列号 56 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0241] (2) 作为正向引物使用具有序列号 7 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 10 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 54 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0242] (3) 作为正向引物使用具有序列号 8 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 11 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 55 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0243] (4) 作为正向引物使用具有序列号 9 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 12 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 56 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0244] (5) 作为正向引物使用具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 14 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 216 个碱基对的级分或确认具有序列号 57 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0245] (6) 作为正向引物使用具有序列号 15 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 168 个碱基对的级分或确认具有序列号 58 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0246] (7) 作为正向引物使用具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物

使用具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 336 个碱基对的级分或确认具有序列号 59 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0247] (8) 作为正向引物使用具有序列号 17 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 22 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 60 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0248] (9) 作为正向引物使用具有序列号 18 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 23 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 61 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0249] (10) 作为正向引物使用具有序列号 19 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 24 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 62 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0250] (11) 作为正向引物使用具有序列号 20 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 25 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 63 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0251] (12) 作为正向引物使用具有序列号 21 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 26 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 64 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0252] (13) 作为正向引物使用具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 28 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,就得到的引物延伸物进行电泳,将 156 个碱基对的级分或确认具有序列号 65 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0253] (14) 作为正向引物使用具有序列号 29 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,就得到的引物延伸物进行电泳,将 156 个碱基对的级分或确认具有序列号 66 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0254] (15) 作为正向引物使用具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 358 个碱基对的级分或确认具有序列号 67 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0255] (16) 作为正向引物使用具有序列号 31 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 36 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 68 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0256] (17) 作为正向引物使用具有序列号 32 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 37 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 69 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0257] (18) 作为正向引物使用具有序列号 33 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 38 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 70 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0258] (19) 作为正向引物使用具有序列号 34 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 39 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 71 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0259] (20) 作为正向引物使用具有序列号 35 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 40 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 72 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0260] (21) 作为正向引物使用具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 42 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 163 个碱基对的级分或确认具有序列号 73 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0261] (22) 作为正向引物使用具有序列号 43 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 158 个碱基对的级分或确认具有序列号 74 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0262] (23) 作为正向引物使用具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将 387 个碱基对的级分或确认具有序列号 75 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0263] (24) 作为正向引物使用具有序列号 45 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 49 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 76 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0264] (25) 作为正向引物使用具有序列号 46 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 50 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 77 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0265] (26) 作为正向引物使用具有序列号 47 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 51 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 78 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0266] (27) 作为正向引物使用具有序列号 48 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 52 所示的核酸序列的寡核苷酸进行 PCR 后,对得到的引物延伸物进行电泳,将确认具有序列号 79 所示的核酸序列的寡核苷酸的级分的产物判定为阳性的方法。

[0267] 上述方法中,优选 (1)、(5) ~ (7)、(13) ~ (15)、(21) ~ (23) 的方法。

[0268] (A-1-2) 通过使用标记探针的杂交进行判定的方法

[0269] 作为通过使用标记探针的杂交进行判定的方法,例如将电泳后得到的电泳级分与用标记物质标记的本发明探针的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记确认与该标记探针杂交的级分是否存在来判定阳性的方法。

[0270] 使用的探针和标记探针的标记物质的具体例子、以及探针的标记方法如上所述。

[0271] 作为通过 (A-1-2) 的方法进行的具体的判定方法,例如下述的方法。

[0272] (1) 作为正向引物使用具有序列号 5 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 6 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电

泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 53 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0273] (2) 作为正向引物使用具有序列号 7 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 10 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 54 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0274] (3) 作为正向引物使用具有序列号 8 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 11 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 55 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0275] (4) 作为正向引物使用具有序列号 9 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 12 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 56 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0276] (5) 作为正向引物使用具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 14 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 57 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0277] (6) 作为正向引物使用具有序列号 15 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 58 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0278] (7) 作为正向引物使用具有序列号 13 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 16 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 59 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0279] (8) 作为正向引物使用具有序列号 17 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 22 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 60 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0280] (9) 作为正向引物使用具有序列号 18 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物

使用具有序列号 23 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 61 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0281] (10) 作为正向引物使用具有序列号 19 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 24 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 62 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0282] (11) 作为正向引物使用具有序列号 20 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 25 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 63 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0283] (12) 作为正向引物使用具有序列号 21 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 26 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 64 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0284] (13) 作为正向引物使用具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 28 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 65 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0285] (14) 作为正向引物使用具有序列号 29 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 66 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0286] (15) 作为正向引物使用具有序列号 27 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 30 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 67 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0287] (16) 作为正向引物使用具有序列号 31 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 36 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 68 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0288] (17) 作为正向引物使用具有序列号 32 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 37 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 69 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0289] (18) 作为正向引物使用具有序列号 33 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 38 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 70 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0290] (19) 作为正向引物使用具有序列号 34 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 39 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 71 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0291] (20) 作为正向引物使用具有序列号 35 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 40 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 72 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0292] (21) 作为正向引物使用具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 42 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 73 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0293] (22) 作为正向引物使用具有序列号 43 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 74 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0294] (23) 作为正向引物使用具有序列号 41 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 44 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 75 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0295] (24) 作为正向引物使用具有序列号 45 所示的核酸序列的寡核苷酸, 作为反向引物使用具有序列号 49 所示的核酸序列的寡核苷酸, 进行 PCR 后, 对于得到的引物延伸物进行电泳, 将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 76 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交, 通过检测该标记探针的标记, 将确认与

该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0296] (25) 作为正向引物使用具有序列号 46 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 50 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 77 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0297] (26) 作为正向引物使用具有序列号 47 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 51 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 78 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0298] (27) 作为正向引物使用具有序列号 48 所示的核酸序列的寡核苷酸,作为反向引物使用具有序列号 52 所示的核酸序列的寡核苷酸,进行 PCR 后,对于得到的引物延伸物进行电泳,将得到的级分与用标记物质标记的具有含有序列号 79 所示的核酸序列的部分或全部的核酸序列的寡核苷酸的标记探针进行杂交,通过检测该标记探针的标记,将确认与该标记探针杂交的级分判定为阳性的方法。

[0299] 上述方法中优选 (1)、(5) ~ (7)、(13) ~ (15)、(21) ~ (23) 的方法。

[0300] 若对于本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌的检测方法通过以例如作为正向引物使用具有序列号 5 所示的核酸序列,作为反向引物使用具有序列号 6 所示的核酸序列的寡核苷酸的 PCR、以及电泳后,确认目标碱基对数的引物延伸物级分的方法进行检测的情况(上述的(A-1-1)中的(1)的方法)为例进行详细说明,如下所述。

[0301] 首先根据上述的方法,从要检测有无堪萨斯分枝杆菌的样品中得到纯化 DNA 样品。然后,用上述方法从本发明涉及的核苷酸使用 DNA 合成仪根据亚磷酰胺法合成具有序列号 5 表示的序列的寡核苷酸(以下记为 Ic_plate1_Fw1。)以及具有序列号 6 所示的核酸序列的寡核苷酸(以下记为 Ic_plate1_Rv1)。

[0302] 制备含有 Ic_plate1_Fw1 以及 Ic_plate1_Rv1、1.0 ~ 4.0mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1%胆酸钠、0.005 ~ 0.2%聚氧乙烯辛基酚醚、各 0.1 ~ 0.6mM 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 10 ~ 80 单位/ml 的 Taq DNA 聚合酶的 10mM Tris-HCl (pH8.9) 缓冲液,作为 PCR 用反应液。

[0303] 将纯化 DNA 样品添加到 PCR 用反应液中作为 PCR 用样品使用,通过 DNA 热循环仪进行 20-40 个循环的 PCR。将得到的 PCR 后的反应液进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。然后进行溴乙锭染色后,检测紫外线下的荧光。而分子量标记也与反应液同时电泳,通过相对迁移率的比较,算出检测的 DNA 片段的长度。可预测在作为正向引物使用 Ic_plate1_Fw1、以及作为反向引物使用 Ic_plate1_Rv1 的 PCR 中,堪萨斯分枝杆菌的核酸序列中的 167 个碱基对的 DNA 片段(序列号 53)被复制。其中,被确认的 167 个碱基对的荧光带的产物判定为阳性。

[0304] (A-2) 利用实时 PCR 法的方法

[0305] 在本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测方法中,也可以使用实时扩增检测系统(参照例如美国专利第 5210015 号、美国专利第 5538848 号所述)。

[0306] 作为利用实时扩增检测系统的检测系统的例子,例如实时 PCR 检测系统。

[0307] 在本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测方法中可以使用例如 TaqMan™ 实时 PCR 法(例如参照美国专利第 5538848 号所述)、MGB Eclipse ProbeSystem 法(例如参照美国专利第 5,801,155 号所述)、Molecular BeaconsProbe Technology 法(例如参照美国专利第 5925517 号所述)、LUXFluorogenic Primer 法(Invitrogen 公司)、Quenching probe-PCR(QP) 法(例如参照美国专利第 6,492,121 号所述)等各种实时 PCR 检测法。

[0308] 更具体地讲,通过使用 5' 末端用例如 FAM 等荧光色素(报告分子)、3' 末端用例如 TAMRA 等猝灭色素标记的探针的实时 PCR 法(例如参照美国专利第 5538848 号所述),可以高灵敏度并且定量地检测目标的微量 DNA。

[0309] 即,用含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部、并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸作为引物(本发明的引物),使用含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部或其互补序列的部分或者全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸(本发明的寡核苷酸)的 5' 末端用报告荧光色素标记的、3' 末端用猝灭色素标记的寡核苷酸作为标记探针,用样品中的核酸作为模板进行 PCR,通过检测对从该标记探针游离的标记物质来进行。

[0310] 上述的实时 PCR 法的原理如下所述。

[0311] 即,使用 5' 末端用荧光色素(报告分子)、3' 末端用猝灭色素标记的与目的基因的特定区域杂交的寡核苷酸探针。该探针在通常的状态下报告的荧光被猝灭色素抑制。在使该荧光探针完全与目的基因杂交的状态下,由其外侧使用 DNA 聚合酶进行 PCR。一旦 DNA 聚合酶推进延伸反应,其外切核酸酶活性催化荧光探针从 5' 端水解,报告色素游离,发荧光。实时 PCR 法通过对该荧光强度进行实时监测,可以正确地定量模板 DNA 的初期量。

[0312] 作为本发明涉及的实时 PCR 检测系统中使用的 5' 末端用荧光色素(报告分子)、3' 末端用猝灭色素标记的探针中使用的探针,可以是上述的本发明的探针。实际上,可以使用具有通过选择的正向引物和反向引物的组合进行实时 PCR 时得到的扩增产物的碱基序列的探针、或具有进一步由该序列设计的碱基序列的探针。例如,在使用序列号 5 和序列号 6 的引物进行实时 PCR 时使用的探针如经该实时 PCR 扩增具有预想的序列号 53 的碱基序列的核苷酸,或具有由序列号 53 的碱基序列设计的序列(例如序列号 80)的寡核苷酸。

[0313] 而作为对 5' 末端进行标记的报告荧光物质,如 FAM、HEX、TET、Cy5、VIC 等,其中优选 FAM。作为对 3' 末端进行标记的猝灭色素,如 TAMRA 等荧光物质、BHQ(例如 BHQ2)、DABCYL 等非荧光物质,其中优选 TAMRA。

[0314] 作为本发明涉及的实时 PCR 检测系统中使用的正向引物和反向引物,如上述 PCR 法中使用的引物,其中优选的具体例子以及优选的组合如上所述。

[0315] 实时 PCR 检测系统中使用的其它的脱氧核糖核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、DNA 聚合酶等试剂可以使用通常实时 PCR 中使用的试剂,实时 PCR 的方法除了使用本发明的引物和探针以外,可根据实时 PCR 的一般程序进行。

[0316] 就利用本发明涉及的实时 PCR 检测系统的堪萨斯分枝杆菌的检测方法的一个例子说明如下。

[0317] 首先根据上述的方法,从要检测的堪萨斯分枝杆菌的样品中获得纯化 DNA 样品。

然后使用 DNA 合成仪,通过亚磷酰胺法合成序列号 5 所示的序列 (Ic_plate1_Fw1)、序列号 6 所示的序列 (Ic_plate1_Rv1) 的寡核苷酸。

[0318] 根据作为引物使用 Ic_plate1_Fw1 和 Ic_plate1_Rv1 经 PCR 扩增的序列号 53 的核酸序列,设计用作探针的序列 (例如序列号 80),合成该序列的寡核苷酸。通过常规方法在该寡核苷酸的 5' 末端结合报告色素 FAM,在 3' 末端结合报告猝灭物 TAMRA,得到荧光标记探针。

[0319] 使用上述制备的 Ic_plate1_Fw1 作为正向引物,Ic_plate1_Rv1 作为反向引物,例如像下述那样进行实时 PCR。

[0320] 即,制备含有各 $1\mu\text{M}$ 的引物 Ic_plate1_Fw1、以及引物 Ic_plate1_Rv1、 $100\sim 1000\text{nM}$ 的荧光标记探针、 $1.0\sim 4.0\text{mM}$ MgCl_2 、 80mM KCl 、 $500\mu\text{g/ml}$ BSA、 0.1% 胆酸钠、 $0.005\sim 0.2\%$ TritonX-100、各 0.2mM 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP、 $10\sim 80$ 单位/ml 的 Taq DNA 聚合酶的 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.9),作为反应液。将向反应液 $20\mu\text{l}$ 中加有纯化 DNA 样品 1ng 的溶液作为 PCR 用样品,然后加入到 96 孔反应板的孔中,使用适当的实时 PCR 检测仪器等进行实时 PCR。反应反复进行 $30\sim 50$ 个循环,每 1 循环都测定报告色素的发光量。

[0321] 在堪萨斯分枝杆菌的判定中,测定到报告色素的发光量的情况可判定为堪萨斯分枝杆菌阳性。

[0322] 在实时 PCR 法中由于可做成校正曲线,所以可得到样品中堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 数 (拷贝数)。而该数值与堪萨斯分枝杆菌的数成比例,所以也可得到样品中的堪萨斯分枝杆菌的数。校正曲线的作成方法可以是根据实时 PCR 法通常运用的常规方法。例如,作为标准使用拷贝数已知的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 样品,制备稀释系列浓度 (拷贝数) 的 PCR 用 DNA 样品。然后使用各稀释系列的 PCR 用 DNA 样品根据上述方法进行实时 PCR,测定报告色素的发光量。对于各稀释系列的每个 PCR 用 DNA 样品,做成将测定的发光量的测定值 (R_n 、y 轴) 对 PCR 的各循环数 (x 轴) 作图的扩增曲线。然后,选择发光量指数函数扩增的 R_n 部分,画临界线 (Threshold line (Th))。将 Th 与各 PCR 用 DNA 样品的扩增曲线交叉的点作为临界循环 (Threshold cycle (Ct)) 值。然后将 Ct 值 (y 轴) 对所用的各 PCR 用 DNA 样品的拷贝数的对数值 (x 轴) 作图,可将相对于各 Ct 得到的近似曲线作为校正曲线。

[0323] 为了对样品中的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 数 (拷贝数) 进行定量,首先从要检测堪萨斯分枝杆菌的样品中分离纯化 DNA 后,对得到的 DNA 样品进行实时 PCR,同样做成扩增曲线。得到做成校正曲线时的 Th 与得到的扩增曲线交叉的 Ct 值。通过将该 Ct 值应用于校正曲线,由此可以获得样品中的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 量 (拷贝数)。

[0324] 本发明在核酸扩增步骤中可以利用 RNA 转录产物的检测法。例如, NASBA (基于核酸序列的扩增) 法 (日本专利第 2650159 号)、3SR (自我维持的序列扩增) 法 (特公平 7-114718 号)、TAS (基于转录的扩增系统) 法 (特表平 2-500565 号;国际公开 W088/10315 号)、TMA (转录介导的扩增) 法 (特开平 11-46778 号) 等,其中利用逆转录酶和 RNA 聚合酶的协同作用 (在逆转录酶和 RNA 聚合酶协同作用那样的条件下反应) 的特定温度核酸扩增法适于测定系统的自动化。

[0325] (A-3) 对使用标记引物进行 PCR 得到的引物延伸物的标记进行测定的方法

[0326] 作为该方法,如使用将本发明的引物用上述方法标记的标记引物,以样品中的核酸作为模板进行 PCR,通过测定得到的引物延伸物的标记,当可检测到标记时,判定为堪萨斯分枝杆菌阳性的方法。作为该方法中使用的正向引物和反向引物,如在上述的 PCR 法中使用的引物,其中优选的具体例子和优选的组合如上所述。

[0327] 当利用上述方法进行 PCR 之后,除去游离的标记引物,测定引物延伸物的标记,可以检测到标记时,判定为堪萨斯分枝杆菌阳性。

[0328] 作为除去游离的标记引物的方法,将经 PCR 反应得到的反应物中的引物延伸物通过使核酸沉淀的常规方法(使用乙醇沉淀法、异丙醇的沉淀法等)沉淀后,除去没有沉淀的含有游离的标记引物的上清的方法等。

[0329] 另外,如将经 PCR 反应得到的反应物在适当的条件下通过凝胶层析处理后使引物延伸物与游离的标记引物分离的方法,通过电泳法分离的方法等。

[0330] (B) 使用本发明的寡核苷酸经标记物质标记后作为标记探针的方法

[0331] 作为本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测方法,如作为标记探针使用含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或者全部、或其互补序列的部分或者全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸(本发明的寡核苷酸)经标记物质标记的寡核苷酸,使该标记探针与样品中的核酸杂交,除去游离的标记探针后,对杂交的复合体的标记进行检测的方法。

[0332] 具体的例如

[0333] (B-1) 使本发明的寡核苷酸与固相载体结合,用作捕捉探针,与样品中的核酸杂交,使来自样品中的堪萨斯分枝杆菌的核酸固定在固相上的检测法(例如参照特开昭 62-265999 号所述),

[0334] (B-2) 使用(B-1)的捕捉探针和对本发明的探针进行标记的标记探针与样品中的核酸杂交,使捕捉探针和来自堪萨斯分枝杆菌的核酸与标记探针的复合体在固相载体上形成,对标记探针的标记进行测定的夹心分析(例如参照特开昭 58-40099 号所述)方法,

[0335] (B-3) 使用用生物素标记的本发明的探针,与样品中的核酸杂交后,通过抗生物素蛋白结合载体捕捉样品中的来自堪萨斯分枝杆菌的核酸的方法等。

[0336] 另外,在本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测方法中使用的试剂中,作为通常该领域中使用的试剂类,例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂等,可以使用不抑制共存的试剂等的稳定性,不抑制 PCR 和杂交反应的试剂。而其浓度也适宜从该领域通常使用的浓度范围选择。

[0337] 缓冲液的具体例子,例如 Tris 缓冲液、磷酸缓冲液、巴比妥缓冲液、硼酸缓冲液、优良缓冲液等、实施通常的 PCR 和杂交反应时使用的缓冲液,其 pH 也没有特别限定,通常优选 5~9 的范围。

[0338] 根据需要,可使用核酸合成酶(DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、逆转录酶等)、酶相应的底物(dNTP、rNTP 等)、以及双链嵌入剂(溴乙锭、SYBRTM Green 等)或 FAM 和 TAMRA 等标记检测物质等。

[0339] 作为本发明涉及的堪萨斯分枝杆菌检测用试剂盒,如“包含作为引物(本发明的引物)或/和探针(本发明的探针)的含有序列号 1、序列号 2、序列号 3 或序列号 4 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的堪萨斯分枝杆菌检测用试剂盒”。引物可以用标记物质标记的

引物。该标记物质的具体例子如上所述。

[0340] 在含有本发明的引物的试剂盒中也可包括含有一组正向引物和反向引物的引物组成。作为其优选的实施方式,例如下述的例子。

[0341] (1) 包含作为构成试剂的含有序列号 5 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 6 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0342] (2) 包含作为构成试剂的含有序列号 13 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 14 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0343] (3) 包含作为构成试剂的含有序列号 15 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 16 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0344] (4) 包含作为构成试剂的含有序列号 13 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 16 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0345] (5) 包含作为构成试剂的含有序列号 27 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 28 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0346] (6) 包含作为构成试剂的含有序列号 29 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 30 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0347] (7) 包含作为构成试剂的含有序列号 27 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 30 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0348] (8) 包含作为构成试剂的含有序列号 41 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 42 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0349] (9) 包含作为构成试剂的含有序列号 43 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 44 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0350] (10) 包含作为构成试剂的含有序列号 41 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的正向引物和含有序列号 44 所示的核酸序列的部分或全部、或其互补序列的部分或全部,并且与堪萨斯分枝杆菌基因的核酸序列杂交的寡核苷酸的反向引物。

[0351] 上述试剂盒还可以包含用标记物质标记的本发明的寡核苷酸作为标记探针。

[0352] 另外,如“含有作为探针的本发明寡核苷酸的堪萨斯分枝杆菌检测用试剂盒”。该探针可以是用标记物质标记的探针。

[0353] 构成这些试剂盒的构成试剂的优选方式和具体例子如上所述。

[0354] 另外,在本发明的堪萨斯分枝杆菌的检测用试剂盒中,也可包含例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂等不抑制共存的试剂等的稳定性、不抑制 PCR 和杂交反应的试剂。而其浓度也适宜从该领域通常使用的浓度范围选择。

[0355] 缓冲液的具体例,例如 Tris 缓冲液、磷酸缓冲液、巴比妥缓冲液、硼酸缓冲液、优良缓冲液等、实施通常的 PCR 和杂交反应时使用的缓冲液,其 pH 也没有特别限定,通常优选 5 ~ 9 的范围。

[0356] 根据需要,也可包含核酸合成酶(DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、逆转录酶等)、酶相应的底物(dNTP、rNTP 等)、以及双链嵌入剂(溴乙锭、SYBRTM Green 等)或 FAM 和 TAMRA 等标记检测物质等。

[0357] 以下给出实施例,对本发明进行更具体的说明,但本发明并不受这些例子的任何限定。

[0358] 另外,在实施例中使用的细菌无论那一个都是临床分离株,培养后,通过菌落的形状和现有的各种生物化学试验等,菌种都已经被鉴别。

实施例

[0359] 实验例 1. 来自堪萨斯分枝杆菌基因组的克隆的选择

[0360] (1) DNA 样品的制备

[0361] 首先,使小川培养基上的堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)菌落悬浮在纯化水中,高压灭菌釜处理(120℃,2个大气压,20分钟)后,经菌体的粉碎处理(通过直径2mm玻璃珠物理破碎),离心分离,得到上清。由所得的上清,使用 Qiagen 公司制的离子交换树脂型 DNA 提取纯化试剂盒 Genomic-tip 进行 DNA 的提取、纯化。获得来自堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA。

[0362] 将所得的纯化 DNA 最后配制成 400ng/μl(10mM Tris-HCl 缓冲液、pH8.9),作为 DNA 样品。

[0363] 另外,作为阳性对照制备对特开平 11-155589 号所述的堪萨斯分枝杆菌的 KATS2、以及对日本专利申请 2004-129272 号说明书中以序列号 8 给出的结核分枝杆菌(人型结核菌)特异的序列(本说明书中以序列号 81 表示),作为阴性对照使用根据大肠杆菌的 DNA 提取方法的常规方法对 DNA 进行提取、纯化的来自大肠杆菌的 DNA,同样制备 DNA 样品,同样进行以下处理。

[0364] (2) 全基因组鸟枪法文库的制作

[0365] 以上述 (1) 得到的 DNA 样品 24 μg 作为材料,用以下的方法(对 Science, 2001 年

2月16日;291(5507):1304-51, Venter 等人所述的全基因组鸟枪法进行了改变) 进行全基因组鸟枪法文库的制作。

[0366] 首先,利用雾化器(Invitrogen 公司生产),在终浓度 20% 的甘油存在下,于 5kPa ~ 9kPa 压力下进行约 10 分钟处理,使 DNA 样品片段化,可以有效回收目标 500 ~ 1000bp 大小的级分。将得到的级分利用 Qiagen 公司生产的提取柱进行纯化。

[0367] 然后,使用 Takara Bio 公司生产的 DNA Blunting Kit,利用 T4DNA 聚合酶的 5' → 3' 聚合酶活性和 3' → 5' 外切核酸酶活性,将得到的 DNA 片段的末端平端化。然后将它与已平端化末端处理完的 pBSII sk+ 载体(Stratagene 公司)进行连接反应,制作在 pBSII sk+ 载体(amp^r)中整合了 DNA 片段的重组 DNA。

[0368] 使用 Takara Bio 公司生产的大肠杆菌 JM109 感受态细胞,根据该制品说明书,用上述得到的重组 DNA 进行大肠杆菌 JM109 感受态细胞的转化,将得到的转化体于含有 100 μg/ml 的氨苄青霉素、0.2mM IPTG、40 μg/ml X-Gal 的 LB-琼脂培养基进行平板培养后,挑出白色菌落,获得导入整合了目的 DNA 片段的重组 DNA 的转化体(堪萨斯分枝杆菌基因组的全基因组鸟枪法克隆)的文库。

[0369] (3) 微阵列制作

[0370] 用下述方法,通过使用上述(2)得到的堪萨斯分枝杆菌基因组的全基因组鸟枪法克隆进行 PCR,制备固定于载玻片上的探针材料。

[0371] 制备含有各 1 μM 的引物 M13Primer M1(Takara Bio 公司生产)和引物 M13Primer RV(Takara Bio 公司生产)、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1%胆酸钠、0.1% Triton X-100(聚氧乙烯辛基酚醚,Rohm&Haas 公司商品名)、各 0.2mM 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 Taq DNA 聚合酶(Nippon Gene 公司生产)40 单位/ml 的 10mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.9),作为 PCR 用反应液。

[0372] 根据常规方法从上述(1)中得到的堪萨斯分枝杆菌基因组的全基因组鸟枪法克隆纯化 DNA,把它悬浮添加到 PCR 用反应液 20 μl 后的溶液用作为 PCR 用样品(作为模板),利用 MJ Research 公司的 DNA 热循环仪(DNA Engine PTC200),按照下述的反应条件进行 30 个循环的 PCR。

[0373] PCR 反应条件:

[0374] 热变性:94℃、0.5 分钟

[0375] 退火:55℃、1 分钟

[0376] 聚合反应:75℃、0.5 分钟。

[0377] 将得到的 PCR 产物纯化后,与固定缓冲液(终浓度 3x SSC)混合。

[0378] 使用点印用装置(GTMAS Stamp II;日本激光电子公司生产),被点印的 PCR 产物的终浓度按照 300ng/μL 那样进行调整,将装置内的湿度设定为 55%,在载玻片(CMT GAPS-II;Corning 公司生产)上点印得到的 PCR 产物(点径 150-250 μm)。将点印完了的载玻片移到 UV 交联仪(UVStratalinker1800;Stratagene 公司制),进行 150mJ/cm² 的 UV 照射,将 PCR 产物(目的 DNA)固定,做成微阵列。

[0379] (4) 目标基因组 DNA 的荧光色素标记与微阵列杂交

[0380] i) 目标基因组 DNA 的荧光色素标记

[0381] 首先,利用 BioPrime DNA labeling system(Invitrogen 公司生产),将来自堪

萨斯分枝杆菌 (ATCC12478) 的基因组以及对照用基因组 (牛型结核菌、ATCC19274) DNA 各 2 μ g 与各个制品中的随机引物溶液 20 μ L 进行混合, 进行热变性 (95 $^{\circ}$ C、5 分钟) 处理。

[0382] 然后, 向各个热变性处理物中添加 0.1M DTT 2 μ L、dATP/dCTP/dGTP (各 5mM) 的混合液 2 μ L、2.5mM dTTP 0.8 μ L、5mM Ha-dUTP 1.6 μ L、Klenow 酶 (40U/ μ L) 1 μ L, 按照总体积最终达到 50 μ L 那样加去离子灭菌水, 于 37 $^{\circ}$ C 进行 3 小时的延伸反应。将 microconeYM-30 (Millipore 公司生产) 的超滤柱装到附带的 1.5ml 管中, 将上述反应产物加到柱上, 于 14000rpm 离心 4 分钟后, 将浓缩液回收至微管中, 用真空干燥离心机 (CentriVap 离心浓缩机; LABCONCO 公司生产) 完全干燥。

[0383] 向得到的干燥反应产物中加 10 μ L 50mM NaHCO₃, 并混合, 于常温下静置 2 ~ 3 分钟。

[0384] 另外, 制备将 1mg 的 Cy3 (Amersham Bioscience 株式会社) 或 Cy5 (Amersham Bioscience 株式会社) 溶于 105 μ L DMSO 的溶液中。将该 10 μ L Cy-dye Solution Cy3 加到使用对照用基因组 (牛型结核菌) 得到的上述反应产物中, 将 10 μ L Cy-dye Solution Cy5 加到使用堪萨斯分枝杆菌基因组得到的上述反应产物中, 分别于 40 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟左右 (避光)。

[0385] 再分别向各个反应产物中加 10 μ L 4M NH₂OH (使用前制备), 搅拌后通过温育 15 分钟左右 (避光), 得到各个标记产物, 即 Cy3 标记的对照用基因组 (牛型结核菌) DNA 和 Cy5 标记的堪萨斯分枝杆菌基因组 DNA。

[0386] 将 microconeYM-30 (Millipore 公司生产) 的超滤柱装到附带的 1.5ml 管中, 将上述得到的基因组 DNA 的标记产物加到柱上, 于 14000rpm 下将得到的标记产物离心 4 分钟后, 将浓缩液回收至微管中, 用真空干燥离心机 (CentriVap 离心浓缩机; LABCONCO 公司生产) 完全干燥。

[0387] ii) 标记产物的片段化步骤

[0388] 对于上述 (4) i) 得到的干燥状态的基因组 DNA 的标记产物, 添加制备的 40 μ L 终浓度为 0.04M Tris-醋酸 (pH8.1)、0.1M 醋酸钾、0.03M 醋酸镁四水合物组成的溶液, 使其悬浮混合。然后于 94 $^{\circ}$ C 加热处理 15 分钟, 可得到 100 个碱基 ~ 300 个碱基的基因组 DNA 的标记产物片段化的生成物。

[0389] 另外使用 BcaBEST DNA 聚合酶 (Takara Bio 公司生产) 和 rBst DNA 聚合酶 (EPICENTRE 公司生产) 研究标记效率 (碱基 / 染料), 结果确认在对照用基因组 (牛型结核菌) DNA 的约 20 个碱基中掺入了 1 分子染料, 在堪萨斯分枝杆菌基因组 DNA 的约 10 个碱基中掺入了 1 分子染料。

[0390] 将各个 Cy3 标记产物溶液和 Cy5 标记产物溶液加到 microcone YM-10 (Millipore 公司生产) 的超滤柱中, 于 14000rpm 下离心 4 分钟后, 将浓缩液回收至微管中, 用真空干燥离心机 (CentriVap 离心浓缩机; LABCONCO 公司生产) 使其完全干燥。然后向微管中加以下试剂 (以下使用的微阵列用的盖玻片为 24 $\times$ 55mm 时), 使上述得到的 Cy3 标记产物与 Cy5 标记产物悬浮于同一溶液中, 并混合。

[0391] ArrayHyb 杂交缓冲液 (SIGMA 公司生产); 40 μ L

[0392] 鲑精 DNA (10mg/mL); 0.5 μ L

[0393] 甲酰胺; 5 μ L

[0394] 总共 40 ~ 50 μ L

[0395] 悬浮混合后,于 95℃温育 5 分钟,在杂交前保存在 70℃。

[0396] iii) 微阵列杂交

[0397] 将上述 (4) ii) 制备的 Cy3 标记产物和 Cy5 标记产物的混合溶液都加到上述 (3) 制作的微阵列 (DNA 芯片) 上,盖上盖玻片,但不要进入气泡。将它装到杂交盒中,置于用蒸馏水弄湿的无尘纸 (kintowel) 上的 Tupper 中密闭,于 65℃反应 8 小时以上,进行杂交 (避光)。杂交后,通过于室温下将 DNA 芯片连同盖玻片一起浸入到 2×SSC-0.1% SDS 溶液中,于溶液中轻轻地摇动 DNA 芯片,使盖玻片脱离。然后用 1×SSC-0.03% SDS 溶液 (60℃) 清洗 10 分钟,用 0.2×SSC 溶液 (42℃) 清洗 10 分钟,用 0.05×SSC 溶液 (室温) 清洗 10 分钟后,将 DNA 芯片迅速移到新的干的管架中,立刻于 800rpm 下离心 5 分钟使其干燥。

[0398] (5) 荧光强度的测定;从信号检测至数量化

[0399] 使用荧光解读扫描仪 (Protein Array Scanner; 日本激光电子公司生产),测定上述 (4) iii) 中得到的微阵列上的荧光强度,得到使用 2 通道 (Cy3、Cy5) 的荧光检测数据。荧光信号的数量化使用日立软件公司生产的 DNASIS™-Array (DNA 芯片发现图像解析软件),按照软件的操作步骤,可进行点自动识别、背景计算、荧光强度比的规一化。另外,确定置信界限线,通过对该界限线以下区域的数据不处理,求归一化的可置信的荧光强度比。

[0400] 另外,在微阵列上点印上阳性对照 (对结核分枝杆菌特异的 DNA 片段、堪萨斯分枝杆菌的 KATS2 序列片段) 以及阴性对照 (来自大肠杆菌的 DNA 片段)。

[0401] 为了筛选用于特异检测堪萨斯分枝杆菌的候补序列,以在 DNA 芯片上检测的 Cy3/Cy5 的荧光强度比 (Ratio) 为基础,进行散点图 (scatterblock) 解析。结果如图 5 所示。

[0402] 作为比较,使用特开平 11-155589 号所述的堪萨斯分枝杆菌的 KATS2 序列、以及日本专利申请 2004-129272 号说明书所述的来自结核分枝杆菌的序列号 8 (在本说明书中为序列号 81),进行同样处理,对 Cy3 和 Cy5 的荧光进行检测的结果也一并表示在图 5 中。

[0403] 在图 5 中,给出了整个散点图以及对绘制集中的 (虚线圈起的) 部分放大的图。散点图用双对数图表示,纵轴表示相对于横轴 Cy3 荧光强度的 Cy5 荧光强度。在图 5 中, (2) 和 (3) 以外的点表示各微阵列上使用 PCR 产物的结果,作为 (2) 以圆圈表示的点是使用特开平 11-155589 号所述的堪萨斯分枝杆菌的 KAS 序列的结果,作为 (3) 以圆圈表示的点表示使用日本专利申请 2004-129272 号说明书所述的来自结核分枝杆菌的序列号 8 (本说明书中为序列号 81) 时的结果。

[0404] 图 5 上的各条线的意思如下。

[0405] (a) 表示 Cy5 荧光强度 / Cy3 荧光强度的比率 ≥ 10.0 的线

[0406] (b) 表示 Cy5 荧光强度 / Cy3 荧光强度的比率 ≥ 5.0 的线

[0407] (c) 表示 Cy5 荧光强度 / Cy3 荧光强度的比率 ≥ 2.0 的线

[0408] (a') 表示 Cy3 荧光强度 / Cy5 荧光强度的比率 ≥ 10.0 的线

[0409] (b') 表示 Cy3 荧光强度 / Cy5 荧光强度的比率 ≥ 5.0 的线

[0410] (c') 表示 Cy3 荧光强度 / Cy5 荧光强度的比率 ≥ 2.0 的线。

[0411] 即,表示处于 (a) 的线之上的点, Cy5 的荧光强度与 Cy3 的荧光强度比较, 强 10 倍以上, 处于 (b) 的线之上的点, Cy5 的荧光强度与 Cy3 的荧光强度比较, 强 5 ~ 10 倍以上, 处于 (c) 的线之上的点, Cy5 的荧光强度与 Cy3 的荧光强度比较, 强 2 ~ 5 倍以上。而处于

(a') 的线之下的点, Cy3 的荧光强度与 Cy5 的荧光强度比较, 强 10 倍以上, 处于 (b') 的线之下的点, Cy3 的荧光强度与 Cy5 的荧光强度比较, 强 5 ~ 10 倍以上, 处于 (c') 的线之下的点, Cy3 的荧光强度与 Cy5 的荧光强度比较, 强 2 ~ 5 倍以上。

[0412] 如图 5 表明的那样, 由于 (3) 的点处于线 (b') 与线 (c') 之间, 表示 Cy3 的荧光强度比 Cy5 的荧光强度强 5 ~ 10 倍, 可知该点与牛型结核菌基因组 DNA 杂交。另外, 由于 (2) 的点处于线 (c) 与线 (b) 之间, 表示 Cy5 的荧光强度比 Cy3 的荧光强度强 2 ~ 5 倍, 可知该点与堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 杂交。

[0413] 而当作为阴性对照使用大肠杆菌的基因组 DNA 时, 散点图上的点由于 Cy5 荧光强度 / Cy3 荧光强度的比率在 1 附近, 荧光强度处于非常低的位置, 图 5 没有表示。

[0414] 图 5 中, 由进行筛选的各微阵列的 PCR 产物中, 由于用圆圈圈起来的 (1) 中显示的 8 个点 (由于点重叠, 可看到 5 个, 实际有 8 个点) 检测到比 (2) 更强的 Cy5 荧光, 所以判断与 (2) (特开平 11-155589 号所述的堪萨斯分枝杆菌的 KATS2 序列) 相比对堪萨斯分枝杆菌的特异性高。因此将这 8 个克隆选作为候补克隆。

[0415] (6) 确定候补克隆的碱基序列

[0416] 对上述 (5) 中选择的 8 个候补克隆, 用下面的方法确定碱基序列。

[0417] 即, 使用 Big Dye Terminator 试剂盒 (Applied Biosystems 公司生产), 根据制品说明书, 按照以下的步骤进行序列解析。

[0418] 候补 DNA (候补克隆); 2 μ L (100ng)

[0419] M13Primer M1; 1 μ L (5pmol)

[0420] premix; 8 μ L

[0421] 向上述混合物中加去离子灭菌水使总体积达到 20 μ L, 通过 MJResearch 公司的 DNA 热循环仪 (DNA Engine PTC200) 于下面的反应条件下进行 30 个循环的测序反应。

[0422] 96°C 2 分钟 $\rightarrow$ (96°C 10 秒 $\rightarrow$ 50°C 5 秒 $\rightarrow$ 60°C 4 分钟) $\times$ 25 $\rightarrow$ 4°C

[0423] 将得到的测序反应产物经 QIAGEN 公司制的凝胶过滤柱纯化后, 使用 MJ Research 公司制的测序仪 (BaseStation), 按照仪器附带的操作说明书完成所有候补序列的序列解读。

[0424] 将得到的结果在数据库 (NCBI BLAST) 中进行检索, 结果发现虽然也来源于基因组序列未破译的生物种堪萨斯分枝杆菌, 但就数据库上来说, 候补的所有 8 个克隆都是未登录的新的序列。

[0425] 实施例 1. 候补克隆的堪萨斯分枝杆菌特异性评价

[0426] 对于实验例 1 得到的 8 个候补克隆, 通过利用 PCR 扩增系统的琼脂糖凝胶电泳检测实施评价实验, 研究这些候补克隆是否可以在使用基因扩增检测系统的堪萨斯分枝杆菌特异的检测系统中利用。

[0427] (1) PCR 引物的合成

[0428] 首先, 根据确定的候补克隆 1 的序列的解析结果, 使用引物设计用的 Web tool Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research.) 设计 PCR 扩增检测用的引物序列。使用设计的 "CGGCCATTGTTCTACAGTCT" (序列号 5, 以下称为 1c_plate1Fw1) 和 "TAGAGATCCATCGCTTTGGT" (序列号 6, 以下称为 1c_plate1_Rv1), 进行如下的 PCR。使用 ABI 公司 DNA 合成仪 392 型, 用亚磷酰胺法合成设计的寡核苷酸。合成方法根据 ABI 公司手册,

可通过将寡核苷酸的氨水溶液于 55℃ 加热过夜实施各种寡核苷酸的去保护。然后通过使用 Pharmacia 公司制 FPLC 进行阴离子交换柱层析纯化合成的寡核苷酸。

[0429] 而由序列的解析结果得到的候补克隆 1 的碱基序列如序列号 1 所示。

[0430] (2) 样品的制备

[0431] 使用以下给出的细菌,用下面的方法对 DNA 进行提取和纯化,得到 DNA 样品。细菌都是临床分离株,培养后,菌种已经通过菌落的形状和现有的各种生物化学的试验等被鉴别。

[0432] a:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

[0433] b:结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*;人型结核菌)

[0434] c:堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)

[0435] d:海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)

[0436] e:猿分枝杆菌 (*Mycobacterium simiae*)

[0437] f:瘰癧分枝杆菌 (*Mycobacterium scrofulaceum*)

[0438] g:戈氏分枝杆菌 (*Mycobacterium gordonae*)

[0439] h:斯氏分枝杆菌 (*Mycobacterium szulgai*)

[0440] i:鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)

[0441] j:胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)

[0442] k:胃分枝杆菌 (*Mycobacterium gastri*)

[0443] l:蟾分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)

[0444] m:无色分枝杆菌 (*Mycobacterium nonchromogenicum*)

[0445] n:地分枝杆菌 (*Mycobacterium terrae*)

[0446] o:次要分枝杆菌 (*Mycobacterium triviale*)

[0447] p:偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)

[0448] q:龟分枝杆菌 (*Mycobacterium chelonae*)

[0449] r:脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*)

[0450] s:外来分枝杆菌 (*Mycobacterium peregrinum*)

[0451] 首先,对于分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 属细菌,将小川培养基上的菌落悬浮于纯化水中,高压蒸气灭菌处理 (120℃·2 气压、20 分钟) 后,经菌体的粉碎处理 (通过直径 2mm 玻璃珠物理破碎),离心分离,获得上清。使用 Qiagen 公司制的离子交换树脂型 DNA 提取纯化试剂盒 Genomic-tip 从得到的上清进行 DNA 的提取、纯化。而对于大肠杆菌,根据大肠杆菌的 DNA 提取方法的常规方法,提取、纯化 DNA。

[0452] 将得到的纯化 DNA 制备成最终 1ng/μl (10mM Tris-HCl 缓冲液、pH8.9),作为 DNA 样品。

[0453] (3) PCR

[0454] 使用以候补克隆的碱基序列 (序列号 1) 为基础,用上述方法设计、合成的引物序列 1c_platel_Fw1 和 1c_platel_Rv1,如下那样进行 PCR。而候补克隆 1 的碱基序列上的各引物的所在位置如图 1 所示。

[0455] 首先,制备含有各 1μM 的引物 1c_platel_Fw1 和引物 1c_platel_Rv1、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1% 胆酸钠、0.1% TritonX-100 (聚氧乙烯辛基酚醚、

Rohm&Haas 公司商品名)、各 0.2mM 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 Taq DNA 聚合酶 (Nippon Gene 公司生产) 40 单位 /ml 的 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.9), 作为 PCR 用反应液。

[0456] 使用在 20 μ l 的 PCR 用反应液中添加 1ngDNA 样品的溶液作为 PCR 用样品, 运用 MJ Research 公司的 DNA 热循环仪 (DNA Engine PTC200), 在下面反应条件下进行 30 个循环的 PCR。

[0457] PCR 反应条件:

[0458] 热变性: 94℃、0.5 分钟

[0459] 退火: 55℃、1 分钟

[0460] 聚合反应: 75℃、0.5 分钟。

[0461] (4) 电泳

[0462] 将上述 (3) 中得到的 PCR 后的反应液 5 μ l 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。电泳的电压条件为恒电压 100V, 电泳 30 分钟。操作方法以及其它条件根据生物实验指导 2 卷, p53-63 (秀润社、中山广树著) 所述的一般用的方法。然后经溴乙锭染色后, 用 UV 样品摄影装置 FAS-III 系统 (东洋纺织公司生产) 检测紫外线下的荧光。另外, 分子量标记也与反应液同时电泳, 通过比较相对迁移率, 算出检测的 DNA 片段的长度。而分子量标记使用 X174/HaeIII 消化物 (标记 4、Nippon Gene 公司生产)。

[0463] 得到的电泳的结果如图 6 所示。

[0464] 图 6 中, 各泳道的数字分别表示使用以下各个样品时的结果。

[0465] M4: 分子量标记 (标记 4)

[0466] a: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

[0467] b: 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*; 人型结核菌)

[0468] c: 堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)

[0469] d: 海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)

[0470] e: 猿分枝杆菌 (*Mycobacterium simiae*)

[0471] f: 瘰癧分枝杆菌 (*Mycobacterium scrofulaceum*)

[0472] g: 戈氏分枝杆菌 (*Mycobacterium gordonae*)

[0473] h: 斯氏分枝杆菌 (*Mycobacterium szulgai*)

[0474] i: 鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)

[0475] j: 胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)

[0476] k: 胃分枝杆菌 (*Mycobacterium gastri*)

[0477] l: 蟾分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)

[0478] m: 无色分枝杆菌 (*Mycobacterium nonchromogenicum*)

[0479] n: 地分枝杆菌 (*Mycobacterium terrae*)

[0480] o: 次要分枝杆菌 (*Mycobacterium triviale*)

[0481] p: 偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)

[0482] q: 龟分枝杆菌 (*Mycobacterium chelonae*)

[0483] r: 脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*)

[0484] s: 外来分枝杆菌 (*Mycobacterium peregrinum*)

[0485] 通过使用正向引物 1c_plate1_Fw1 和反向引物 1c_plate1_Rv1 的 PCR 可预测到位

于堪萨斯分枝杆菌基因组中的候补序列 1 的 167 个碱基对的 DNA 片段（序列号 53）被复制。因此，可将确认有 167 个碱基对的荧光带的判定为阳性。

[0486] 就像图 6 的结果表明的那样，使用本发明的引物 1c_plate1_Fw1 和引物 1c_plate1_Rv1 进行的 PCR 的结果可以确认只有堪萨斯分枝杆菌作为样品时（c），可确认 167 个碱基对的荧光带，判定为阳性。而相反，当以其它分枝杆菌属细菌和其它属的细菌大肠杆菌的样品为样品时（a 和 b、d ~ s），不能确认该荧光带，都判定为阴性。

[0487] 由以上实验表明候补克隆 1 是具有对堪萨斯分枝杆菌特异的碱基序列的寡核苷酸，通过使用该序列为基础设计的引物进行 PCR 的方法判断可以特异检测堪萨斯分枝杆菌。另外由于利用 PCR 等核酸扩增进行的检测预期灵敏度高，没有必要分离细菌，有可能可直接对临床材料进行检测，所以对于用以往的在细菌培养之后进行检测的方法要经培养数周的堪萨斯分枝杆菌的检测，最长 1 日以内也可完成检测。

[0488] 实施例 2. 使用本发明的引物进行堪萨斯分枝杆菌的检测 1

[0489] 对于实验例 1(6) 中得到的候补克隆 2，以该碱基序列为基础，通过与实施例 1(1) 同样的方法设计 6c_plate1_Fw1（候补序列 13）作为正向引物和设计 6c_plate1_Rv1（候补序列 14）作为反向引物，进行合成。然后使用与实施例 1(2) ~ (4) 同样的样品和试剂，用同样的方法进行 PCR 和电泳。

[0490] 另外，由序列解析结果得到的候补克隆 2 的碱基序列如序列号 2 所示，候补克隆 2 的碱基序列上的设计的各引物所在位置如图 2 所示。

[0491] 通过使用正向引物 6c_plate1_Fw1 和反向引物 6c_plate1_Rv1 的 PCR，预测位于堪萨斯分枝杆菌基因组中的候补序列 2 的 216 个碱基对的 DNA 片段（序列号 57）被复制。在此 216 个碱基对的荧光带被确认的片断判定为阳性。

[0492] 该结果表明，此时只有以堪萨斯分枝杆菌作为样品时（c）可确认 216 个碱基对的荧光带，判定为阳性。与此相反，当以其它分枝杆菌属细菌或其它属的细菌大肠杆菌的样品作为样品时（a 和 b、d ~ s），不能确认该荧光带，都可判定为阴性。

[0493] 以上实验表明候补克隆 2 也是具有对堪萨斯分枝杆菌特异的碱基序列的寡核苷酸，可知通过使用以此寡核苷酸为基础设计的引物进行 PCR 的方法可以特异检测堪萨斯分枝杆菌。

[0494] 实施例 3. 使用本发明的引物进行堪萨斯分枝杆菌的检测 2

[0495] 对于实验例 1(6) 中得到的候补克隆 3 ~ 8，以该碱基序列为基础，通过与实施例 1(1) 同样的方法进行引物的设计、合成。除了使用的各个引物以外，其它使用与实施例 1(2) ~ (4) 同样的样品和试剂，用同样的方法进行 PCR 和电泳。

[0496] 可知该结果在考虑对堪萨斯分枝杆菌的特异性时，候补序列 3 和 4 对堪萨斯分枝杆菌的特异性高，对该判定是有效的。

[0497] 另外，由序列解析结果得到的候补克隆 3 的碱基序列如序列号 3 所示，在候补克隆 3 的碱基序列上设计的各引物所在位置如图 3 所示。

[0498] 另外，由序列解析结果得到的候补克隆 4 的碱基序列如序列号 4 所示，在候补克隆 4 的碱基序列上设计的各引物所在位置如图 4 所示。

[0499] 实施例 4. 通过实时 PCR 扩增系进行堪萨斯分枝杆菌的检测

[0500] (1) 堪萨斯分枝杆菌检测用 PCR 引物的合成

[0501] 使用与实施例 1(1) 同样的仪器,通过同样的操作合成 1c_plate1_Fw1(序列号 5) 和 1c_plate1_Rv1(序列号 6) 的寡核苷酸。

[0502] (2) 堪萨斯分枝杆菌检测用探针的制作

[0503] 由通过作为引物使用 1c_plate1_Fw1 和 1c_plate1_Rv1 的 PCR 扩增的序列号 53 的寡核苷酸序列(167 个碱基对)设计用作探针的序列“ACTCAATGCCCTTCGATCCCGCGAAC”,合成该序列的寡核苷酸(以下记为 KAN1c_F1R1_FAMTAM,序列号 80)。在该寡核苷酸的 5' 末端结合报告色素 FAM,3' 末端结合报告猝灭物的 TAMRA,得到标记的寡核苷酸探针(TaqManTM M 荧光探针,Applied Biosystems Japan 公司生产)。

[0504] (3)PCR 用 DNA 样品的制备

[0505] 对于由实验例 1(1) 制备的堪萨斯分枝杆菌样品得到的 DNA 样品,通过测定吸光度测定样品中的 DNA 量。通过将得到的 DNA 量与已知的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 量比较,确定样品中的基因组 DNA 量(基因组拷贝数)。得到 10^8 个拷贝/ μ l 的基因组 DNA。

[0506] 然后使用 pH8.9 的 10mM Tris-HCl 缓冲液,制备将 DNA 样品稀释为 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 5, 2 个拷贝/ μ L 的稀释系列样品,作为 PCR 用 DNA 样品。

[0507] (4) 实时 PCR

[0508] 使用上述 (1) 制备的 1c_plate1_Fw1 作为正向引物,1c_plate1_Rv1 作为反向引物,像下面那样进行实时 PCR。

[0509] 即制备含有各 1μ M 的引物 1c_plate1_Fw1 和引物 1c_plate1_Rv1、195nM 的上述 (2) 制备的荧光标记探针 KAN1c_F1R1_FAMTAM、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 μ g/ml BSA、0.1%胆酸钠、0.1% TritonX-100、各 0.2mM 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 以及 Taq DNA 聚合酶(NipponGene 公司生产)40 单位/ml 的 10mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.9),作为反应液。

[0510] 将在 20μ l 反应液中加了各稀释系列的 DNA 样品 1μ L 后的溶液作为 PCR 用样品,将该样品溶液加到 96 孔反应板(Applied Biosystems Japan 公司生产)的孔中,使用 TaqManTM PCR 专用热循环仪检测器(ABI7500、Applied Biosystems Japan 公司生产)进行实时 PCR。反应于 95℃保温 10 分钟后,按照 95℃ 15 秒、60℃ 1 分钟的反应为一个循环,反复进行 50 个循环,每 1 循环都测定报告色素的发光量。而发光量可用测定中使用的热循环仪将供测定的 96 孔反应板每块板相对的荧光强度比数值化的功能求得。

[0511] (5) 结果

[0512] 由得到的实验数据根据实时 PCR 法中运用的常规方法做成校正曲线。

[0513] 对于每个 PCR 用 DNA 样品,制作将报告色素的发光量(Rn,y 轴)对 PCR 的各循环数(x 轴)作图的扩增曲线。然后,选择发光量呈指数函数扩增的 Rn 部,引入临界线(Threshold line)(Th)。Th 和各个 PCR 用 DNA 试样的扩增曲线的交叉点为临界循环(Threshold cycle)(Ct)值。然后将 Ct 值(y 轴)对所用的各 PCR 用 DNA 样品的拷贝数的对数值(x 轴,对数值)作图,可将相对于各 Ct 得到的近似曲线作为校正曲线。得到的校正曲线如图 7 所示。

[0514] $y = -3.348x + 32.61$

[0515] $R^2 = 0.995$

[0516] 以上实验可判定由于通过实时 PCR 可检测发光,所以通过在 PCR 中使用本发明涉及的寡核苷酸作为引物,由成为其扩增区域的序列设计标记探针,进行实时 PCR,可以检测堪萨斯分枝杆菌。

[0517] 而根据能够做成校正曲线,可判定如果通过使用本发明的引物和探针的实时 PCR 法,堪萨斯分枝杆菌的定量是可能的。另外,由图 7 可知如果利用使用本发明的引物和探针的实时 PCR 法,即使作为初期量存在 2 个拷贝的堪萨斯分枝杆菌的基因组 DNA 的条件下,堪萨斯分枝杆菌的检测也是可能的。

[0518] 另外,在利用实时 PCR 法时,由于对该荧光强度可实时监测,所以可对模板 DNA 的初期量正确定量,可有效进行堪萨斯分枝杆菌的检测。

[0519] 产业上利用的可能性

[0520] 通过使用本发明的引物或 / 和探针的堪萨斯分枝杆菌的检测方法,与通过现有的菌的培养检查等鉴定菌种的方法比较,可极其迅速且高精度地进行堪萨斯分枝杆菌的检测。另外通过使用本发明的检测方法进行堪萨斯分枝杆菌的检测,与现有的通过使用引物或 / 和探针的 PCR 法的诊断方法比较,有可能排除诊断上的假阳性,可更高精度地进行堪萨斯分枝杆菌的检测和诊断。另外,通过使用本发明的检测方法,可起到也能够进行堪萨斯分枝杆菌菌体定量的效果。

[0521] 【序列表】

[0522] D:\F-1665.txt

[0001]

序 列 表

<110> 和光纯药工业株式会社

<120> 堪萨斯分枝杆菌检测用的引物和探针、以及使用它们检测堪萨斯分枝杆菌的方法

<130> F1665WAKOPAT

<150> JP2005-141153

<151> 2005-05-13

<160> 81

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 517

<212> DNA

<213> 堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)

<400> 1

ccgcgtcgtg ccccttaccg acaagaccat cggccatctg cagctctacc tcgacgagtt	60
ccacccgaac atcaccaaac tgcccgcgag acggccattg ttctacagtc tgcacgcggg	120
gagacctgcc gaactgtccg ctgacacggt cgccgcggtg ctcaagcagg ccgccgaatc	180
cgcgcgtact caatgccctt cgatcccggc gaacatccac tgtcacctgc tgcggaagac	240
caaagcgatg gatctctacc agcagggcac cccgtaccg atcatcatgc gcctctctgg	300
ccacgaaaac gcttcacca cagcagcttt ctatgccttt gcaaccctgg acatgatgcg	360
tcaagcgatc aacgccgcca ccccgcgat caacaccggg gccaccgagc cactcaccga	420
agaccaactc caaacctct acagtctggg ataaccgct gaaacgttaa gccgagaaat	480

[0002]

ccgccagcac cccccacgag cgcaggacat ctccgca 517

<210> 2

<211> 596

<212> DNA

<213> 堪萨斯分枝杆菌

<400> 2

attgatccgt tgtccgcac tggcgctcgt cggctccggc gagggcgggtg agccgatacg 60

tcaattcaac gtattcgccc gacaggccgg cgggccgggtg accgctcgga tgttcactac 120

cgacgaaggc gccgacaccc attgccagct cggcaacctg acgtcgtcga atgccgtcac 180

tatggattgg ctgaagaca ccctcaactc ggattgatcg ttgcgcgct tcaattcacc 240

gcgttttgct tgccgcctgg ccggcgcttc gcaccacgt gcggaagaac tccatccgcg 300

cggtgaccag atcgtcggcc aagtcagggt cagcgtcgac aacggtcttg cgtcgtgact 360

cgtcggggag aacggaatcg atctgatcga cgaacttgcg gacggcctcg atggcctttt 420

tgcggccgggt ttccaccgat tcgagcacct cgtcggaaag ttcgcccag cgtggctcgg 480

ccttctgcgg cgtctctgtc atgatgtcaa ctccctgaac tctatcgggc ttatactcga 540

ccggcgtagc ccgcaaactt cggcgattgc cgacgctgat gaagttacga ctgtcg 596

<210> 3

<211> 636

<212> DNA

<213> 堪萨斯分枝杆菌

[0003]

<400> 3

cagcgttgge ttcccgggtcc ttggcgtggg ogaacaagat gtcccagaac ggcgtgaaac 60
 cctccaggta cgcattgccg ctctgggtga tcaatgccgt cacccgctcc ggtgtccggc 120
 tegcgatccg cagcccgatg ggtgctccgt agtcctggat gtagagcgca aagcgctgca 180
 ggccgagctt gtccacgagg ccttcgacga tctcggtcag attgtcgaag ctatagcgga 240
 actcgtcgac cgacggtgcg gccgaattgc ogaagccgat gtaatcgga gccaccaggt 300
 agtactcgtc ggagagcgcg gcgatgagat tgcggaacat atgcgagctg gtggggaagc 360
 cgtgcagcag gagcaaagcc gggtttcgcg gattgccggc ctcccggaag tacacctcca 420
 agccgttgat ggacgtagtc cggtgccggg tgtcgaaggt agtcattgcg gtttcctttc 480
 ggtagtggtc gggtgccggt cgggagaacg agcgtttctca cggctggttg tagtctagag 540
 aacgatcggt cttagcgcaa ggagggaatg ccatgaccga aggcgaggac cgggataatg 600
 tgctcgccgc agccgatagg ttgttcaatg accgcg 636

<210> 4

<211> 726

<212> DNA

<213> 堪萨斯分枝杆菌

<400> 4

tacggtgct caaccagaat gagcatctgg gtatcgccg gacgcgtaac tgtgggttcg 60
 accacgcgcg cagtcagatc atcggcggga tcgatgccga ttccgttggt gacaaggatt 120
 gggtcgagac gattcgccag tgttttcaag actccgccat cgacgcggtc accggccccg 180

[0004]

tccactatta cgacattccg ctgcgtgggc cgatattcag aatcgaccgc atggtccgcc	240
gcaacctgca tcgcacggca accgatcaac ggttcctctt gggcgccaac atggcaatcc	300
ggacctcggc gtggcaggcg gtacgtcatc tcacgcagct ggatctggaa gaccgactcc	360
acgaagacat cgatcttgca ctgacactgt tcaagaataa tttcgagatc gcatacgaat	420
ccacgatggg ggtgggcgcg tctggccgcc gggtggaatg ctcaccgctc gacttttttc	480
gctacgcgac gcgttatacc aggacgacaa aggcgcacgg cgtcaagagt cgttcggcac	540
gtataacgat tgccgttctc atgctgggat atgtgccggt ccgaacactg cggttctttt	600
atgacgccga gaacaatcgg ttcacgcgca agcgctccgg gacgggcggc ggaacgaaat	660
cgaccgacta ctgaggggcg atccgcgagt caatcgaage accctttgct ttgtagcagg	720
gacaac	726

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 5

cggccattgt tctacagtct

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

[0005]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 6

tagagatcca tcgctttggt

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 7

gccatctgca cgtctacct

19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 8

aacatccact gtcacctgct

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

[0006]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 9

ccaccacagc agctttctat

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 10

atcgaagggc attgagtacg

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 11

gagttggtct tcggtgagtg

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

[0007]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 12

gatttctcgg cttaacgttt c

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 13

atgttcacta ccgacgaagg

20

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 14

gacttggccg acgatctg

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

[0008]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 15

gctgcggaag aactccat

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 16

ctcgaatcgg tggaaacc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 17

gatccgttgt cccgcact

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 18

gtgagccgat acgtcaattc

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 19

cttcaattca ccgcgtttt

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 20

ctgcggaaga actccatc

18

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

[0010]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 21

gatctgatcg acgaacttgc

20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 22

catagtgaac gcattcgac

19

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 23

atccgagttg aggtgtctt

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

[0011]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 24

atcagatcga ttccgttctc

20

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 25

ctcgaatcgg tggaaacc

18

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 26

ggtogagtat aagcccgata

20

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

[0012]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 27

gtgatcaatg ccgtcacc

18

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 28

gttccgctat agcttcgaca

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 29

gagccaccag gtagtactcg

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 30

accggactac gtccatcaac

20

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 31

gttggettcc cggtcett

18

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 32

gtgaaaccct ccaggtacg

19

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

[0014]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 33

acgatctcgg tcagattgtc

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 34

gagccaccag gtagtactcg

20

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 35

tttcctttcg gtgatggtc

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 36

gcgctctaca tccaggact

19

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 37

ccgctatagc ttgcacaatc

20

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 38

caccagctcg catatgttc

19

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

[0016]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 39

aacggcttgg aggtgtactt

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 40

gcggtcattg aacaacctat

20

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 41

cccggtccac tattacgac

19

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 42

ctgcgtgaga tgacgtacc

19

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 43

gagatcgcat acgaatccac

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 44

atgagaacgg caatcgttat

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

[0018]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 45

gaatgagcat ctgggtatcg

20

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 46

gattgggtcg agacgattc

19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 47

gagatcgcat acgaatccac

20

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

[0019]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 48

cgttatacca ggacgacaaa g

21

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 49

gcggaatgtc gtaatagtgg

20

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 50

caagaggaac cgttgatcg

19

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

[0020]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 51

gttatacgtg ccgaacgact

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 52

cagtagtcgg tcgatttcgt

20

<210> 53

<211> 167

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 53

cggccattgt tctacagtct gcatcgcggg cgacctgcgc aactgtccgc tgacacggtc

60

gccgccgtgc tcaagcaggc cgccgaatcc gcgcgtactc aatgcccttc gatcccggcg

120

aacatccact gtcacctgct gcggaagacc aaagcgatgg atctcta

167

[0021]

<210> 54

<211> 172

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 54

gccatctgca cgtctacctc gacgagttcc acccgaacat caccaaactg ccgcgcgagac 60

ggccattgtt ctacagtctg catcgcgggc gacctgccga actgtccgct gacacggctc 120

ccgccgtgct caagcaggcc gccgaatccg cgcgtactca atgcccttcg at 172

<210> 55

<211> 219

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 55

aacatccact gtcacctgct gcggaagacc aaagcgatgg atctctacca gcagggcatc 60

ccgctaccga tcatcatgeg cctcctcggc cagcaaaacg cttccaccac agcagctttc 120

tatgcctttg caaccctgga catgatgcgt caagcgatca acgcccacac ccccgcgatc 180

aacaccgcgg ccaccgagcc actcaccgaa gaccaactc 219

<210> 56

[0022]

<211> 167

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 56

ccaccacagc agctttctat gcctttgcaa ccctggacat gatgcgtcaa gcgatcaacg 60

ccgccacccc cgcgatcaac accgcggcca cggagccaact oaccgaagac caactccaaa 120

ccctctacag tctgcgataa cggcctgaaa cgttaagcgc agaaatc 167

<210> 57

<211> 216

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 57

atgttcacta cggacgaagg cgcggacacc cattgccagc toggcaacct gacgtcgtcg 60

aatgcggtca ctatggattg gctcgaagac accctcaact cggattgata gttgcgccgc 120

ttcaattcac cgcgttttgc ttgccgctg gccggcgctt cgcaccaagc tgcggaagaa 180

ctccatccgc gcggtgacca gatcgtcggc caagtc 216

<210> 58

<211> 168

<212> DNA

[0023]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 58

gctgcggaag aactccatcc gcgcggtgac cagatcgtcg gccaaagtcca gggcagcgtc 60

gacaacggtc ttgcgtcgtg actcgtcggg gagaacggaa togatctgat cgacgaactt 120

gcggacggcc togatggcct ttttgcggcc ggtttccacc gattcgag 168

<210> 59

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 59

atgttcacta ccgacgaagg cgcgcacacc cattgccagc tcggcaacct gacgtcgtcg 60

aatgccgtca ctatggattg gctcgaagac accctcaact cggattgac gttgcgcgcg 120

ttcaattcac cgcgttttgc ttgccgcctg gccggcgctt cgcaccacgc tgcggaagaa 180

ctccatccgc gcggtgacca gatcgtcggc caagtccagg gcagcgtcga caacggtctt 240

gcgtcgtgac tcgtcgggga gaacggaatc gatctgatcg acgaacttgc ggacggcctc 300

gatggccitt ttgcggccgg tttccaccga ttcgag 336

<210> 60

[0024]

<211> 181

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 60

gatccgttgt cccgcactgg cgctcgtcgg ctccggcgag ggcggtgago cgatacgtca 60

attcaacgta ttgcgccgac aggcggcggg gccggtgacc gctcggtatgt tcaactaccga 120

cgaaggcgcc gacacccatt gccagctcgg caacctgacg tcgtcgaatg ccgtcactat 180

g 181

<210> 61

<211> 167

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 61

gtgagccgat acgtcaattc aacgtattcg ccgcacaggc ogcgggcgcc gtgaccgctc 60

ggatgttcac taccgacgaa ggcgccgaca cccattgccg gctcggcaac ctgacgtcgt 120

cgaatgccgt cactatggat tggctcgaag acaccctcaa ctcggat 167

<210> 62

<211> 159

<212> DNA

[0025]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 62

cttcaattca ccgcgttttg cttgcgcct ggccggogct tgcaccacg ctgcggaaga 60

actccatccg cgcggtgacc agatcgtcgg ccaagtcag ggcagcgtcg acaacgtct 120

tgcgtcgtga ctgctgggg agaacggaat cgatctgat 159

<210> 63

<211> 167

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 63

ctgcggaaga actccatccg cgcggtgacc agatcgtcgg ccaagtcag ggcagcgtcg 60

acaacgtct tgcgtcgtga ctgctgggg agaacggaat cgatctgac gacgaactg 120

cggacggcct cgatggcctt ttgcggccg gttccaccg attcgag 167

<210> 64

<211> 163

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

[0026]

<400> 64
gatctgatcg acgaacttgc ggaaggcctc gatggccttt ttgcggccgg ttccaccga 60
ttcgagcacc tcgtcgaaa gtccggccca gcgtggctcg gccttctgcg gcgtctctgt 120
catgatgtca actccctgaa ctctatcggg cttatactcg acc 163

<210> 65
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸探针

<400> 65
gtgatcaatg ccgtcaccog ctccggtgtc cggtctcgca tccgcagccc gatgggtgct 60
ccgtagtccct ggatgtagag cgcaaagcgc tgcaggccga gcttgccac gaggccttcg 120
acgatctcgg tcagattgtc gaagctatag cggaac 156

<210> 66
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸探针

<400> 66
gagccaccag gtagtactcg tcggagagcg cggcgatgag attgcggaac atatgcgagc 60

[0027]

tggtggggaa gccgtgcagc aggagcaaag ccgggtttcg cggattgccg gcctcccga 120

agtacacctc caagccgttg atggacgtag tccggt 156

<210> 67

<211> 358

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 67

ccggctcgcg atccgcagcc cgatgggtgc tccgtagtcc tggatgtaga gcgcaaagcg 60

ctgcaggccg agcttgtcca cgaggccttc gacgatctcg gtcagattgt cgaagctata 120

gcggaactcg tcgaccgacg gtgcggccga attgccgaag ccgatgtaat cgggagccac 180

caggtagtac tcgtcggaga gcgcggcgat gagattgogg aacatatgcg agctggtggg 240

gaagccgtgc agcaggagca aagccgggtt tcgcggatig ccggcctccc ggaagtacac 300

ctccaagccg ttgatggacg tagtccggtg ccgggtgtcg aaggtagtca ttgcggtt 358

<210> 68

<211> 165

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 68

[0028]

gttggettcc cggtccttgg cgtgggcgaa caagatgtcc cagaacggcg tgaaaccctc 60
caggtacgca ttgccgtctt gggatgatcaa tgccgtcacc cgctccgggtg tccggctcgc 120
gatccgcagc ccgatgggtg ctccgtagtc ctggatgtag agcgc 165

<210> 69

<211> 186

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 69

gtgaaaccct ccaggtacgc attgccgtctc tgggtgatca atgccgtcac ccgtccgggt 60
gtccggctcg cgatccgcag cccgatgggt gctccgtagt cctggatgta gagcgcaaag 120
cgctgcaggc cgagcttgtc cagcagacct tcgacgatct cggtcagatt gtcgaagcta 180
tagcgg 186

<210> 70

<211> 147

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 70

acgatctcgg tcagattgtc gaagctatag cggaactcgt cgaccgacgg tgcggccgaa 60

[0029]

ttgccgaagc cgatgtaatc gggagccacc aggtagtact cgtcggagag cgcggcgatg 120

agattgcgga acatatgcga gctgggtg 147

<210> 71

<211> 139

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 71

gagccaccag gtagtactcg tcggagagcg cggcgatgag attgcggaac atatcgagc 60

tggtggggaa gccgtgcagc aggagcaaag ccgggtttcg cggattgccg gcctcccgga 120

agtacacctc caagccgtt 139

<210> 72

<211> 164

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 72

tttcctttcg gtgatggtcg ggtgccggtc gggagaacga gcgttctcac ggctggttgt 60

agtctagaga acgatcggtc ttagcgcaag gagggaatgc catgaccgaa ggcgaggacc 120

gggataatgt gctcgccgca gccgataggt tgttcaatga ccgc 164

[0030]

<210> 73
<211> 163
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 73

cccgggccac tattacgaca ttccgtgcg tgggccgata ttcagaatcg accgcatggt 60

cgcgcgcaac ctgcatcgca cggcaaccga tcaacggttc ctcttgggcg ccaacatggc 120

aatccggacc tcggcgtggc aggcgggtacg tcattctcag cag 163

<210> 74
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 74

gagatcgcat acgaatccac gatggtgggtg ggcgcgtctg gccgccgggt ggaatgctca 60

ccgctcgact tttttcgcta cgcgacgcgt tataccagga cgacaaagc gcacggcgtc 120

aagagtcggt cggaacgtat aacgattgcc gttctcat 158

<210> 75
<211> 387
<212> DNA

[0031]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 75

```

gggccgatat tcagaatoga ccgcatggtc cgccgcaacc tgcacgcac ggcaaccgat      60
caacggttcc tcttgggcgc caacatggca atccggacct cggcgtggca ggcggtacgt      120
catctcacgc agctggatct ggaagaccga ctccacgaag acatcgatct tgcactgaca      180
ctgttcaaga ataatttoga gatcgatac gaatccacga tggtagtggtg cgcgtctggc      240
cgccgggtgg aatgctcacc gctcgacttt tttcgctacg cgacgcgtta taccaggacg      300
acaaaggcgc acggcgctcaa gagtcgttcg gcacgtataa cgattgccgt tctcatgctg      360
ggatatgtgc cggtcggaac actgcgg                                           387

```

<210> 76

<211> 185

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 76

```

gaatgagcat ctgggtatcg cgccgacgcg taactgtggg ttcgaccacg cgcgcagtca      60
gatcatcggc cggatcgatg ccgattccgt tgtagacacg gattgggtcg agacgattcg      120
ccagtgtttt caagactccg ccacgcacgc ggtcaccggc ccggtccact attacgacat      180

```

[0032]

tccgc	185
<210> 77	
<211> 165	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸探针	
<400> 77	
gattgggtcg agacgattcg ccagtgtttt caagactccg ccatcgacgc ggtcaccggc	60
ccggtccact attacgacat tccgtgcgt gggccgatat tcagaatcga ccgcatggtc	120
cgccgcaacc tgcacgcac ggcaaccgat caacggttcc tcttg	165
<210> 78	
<211> 143	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸探针	
<400> 78	
gagatcgcat acgaatccac gatggtgggtg ggcgctctg gccgccgggt ggaatgctca	60
ccgctcgact tttttcgcta cgcgacgcgt tataccagga cgacaaaggc gcacggcgtc	120
aagagtcgtt cggcacgtat aac	143
<210> 79	

[0033]

<211> 182

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 79

cgttatacca ggacgacaaa ggcgcacggc gtcaagagtc gttgggcacg tataacgatt 60

gccgttctca tgctgggata tgtgccggtc cgaacactgc ggttctttta tgacgccgag 120

aacaatcggt tcacgcgcaa gcgtccggg acgggcggcg gaacgaaac gaccgactac 180

tg 182

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸探针

<400> 80

actcaatgcc cttegatccc ggccaac 27

<210> 81

<211> 324

<212> DNA

<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 81

cgtactcgac ctgaaagacg ttatccacca tacggatagg ggatctcagt acacatcgat 60

[0034]

ccggttcagc gagcggtcg ccgaggcagg catccaaccg tcggtcggag cggtcggaag	120
ctcctatgac aatgcactag ccgagacgat caacggccta tacaagaccg agctgatcaa	180
accggcaag ccctggcggt ccatcgagga tgtcgagttg gccaccgogc gctgggtcga	240
ctggttcaac catcgccgcc tctaccagta ctgcggcgac gtcccgcgg tcgaactcga	300
ggtgcctac tacgtcaac gcca	324

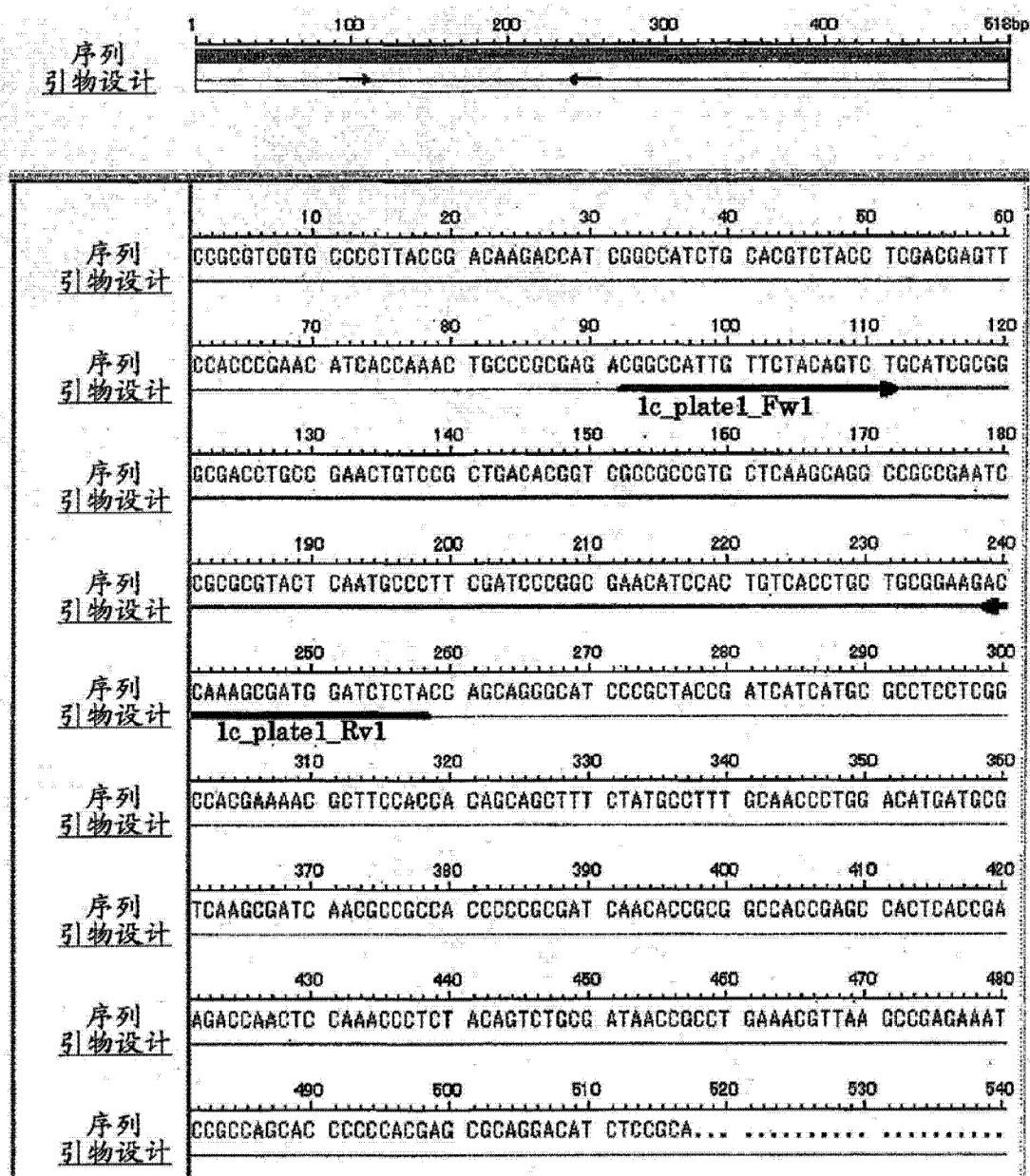


图 1

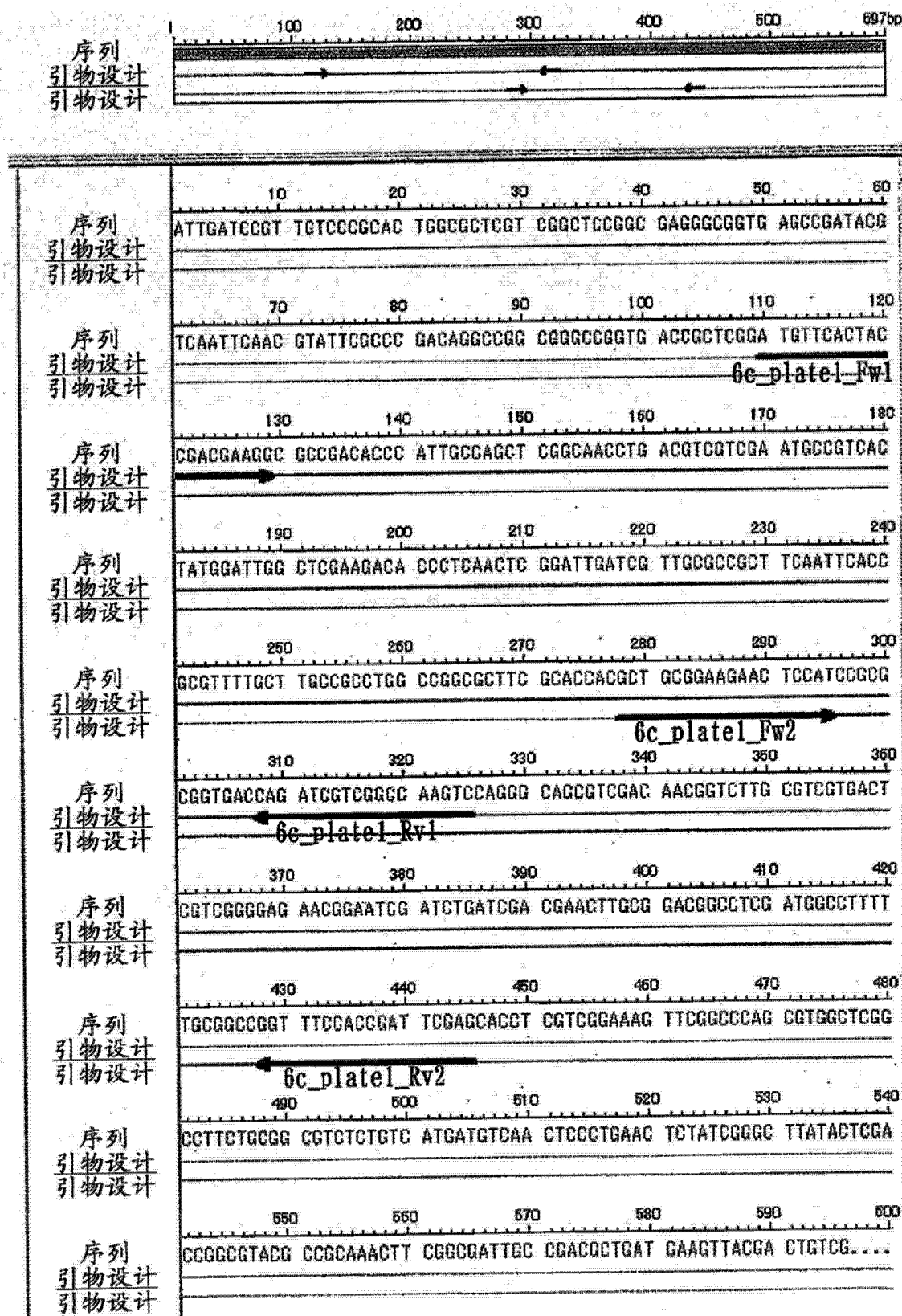


图 2

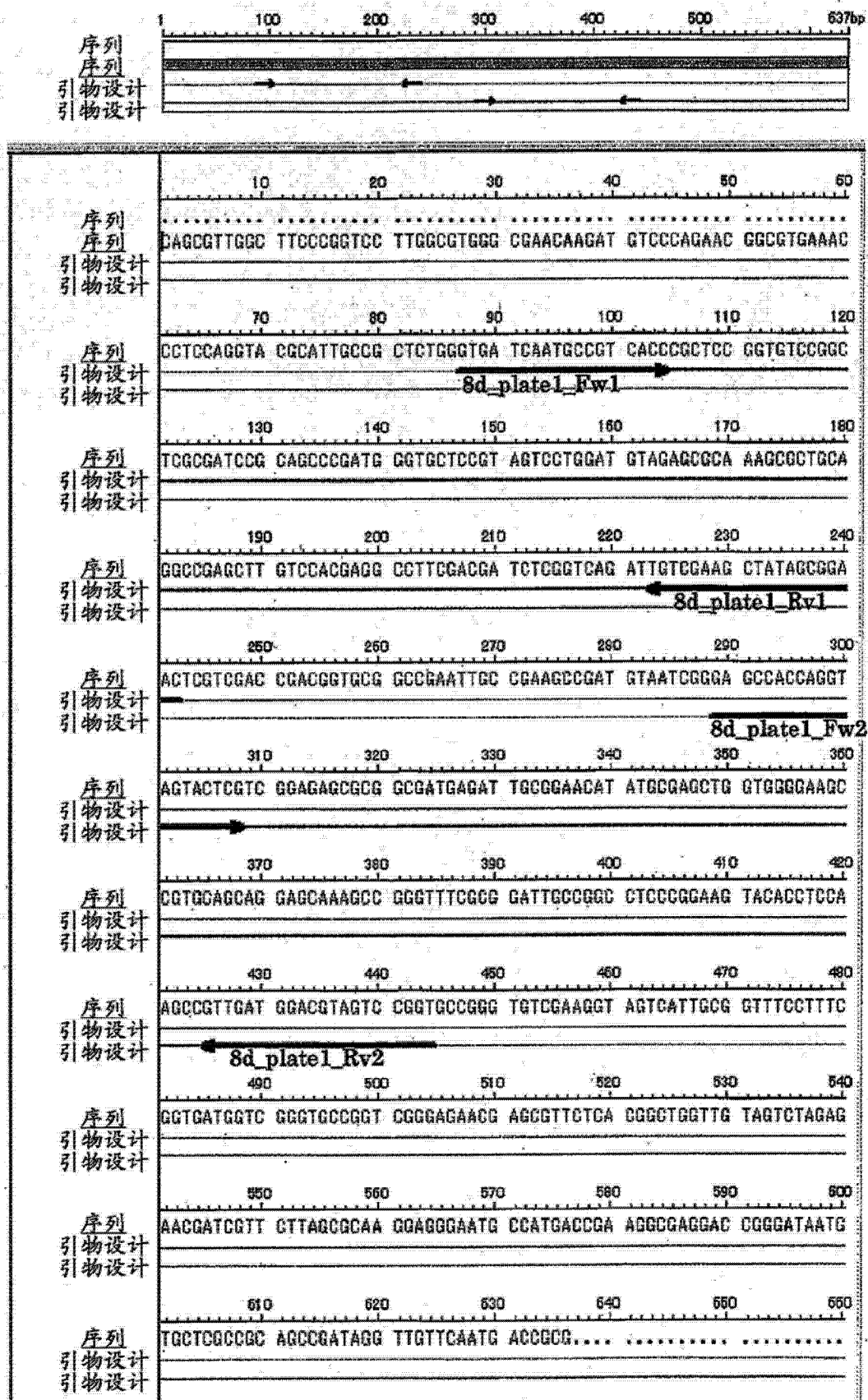


图 3

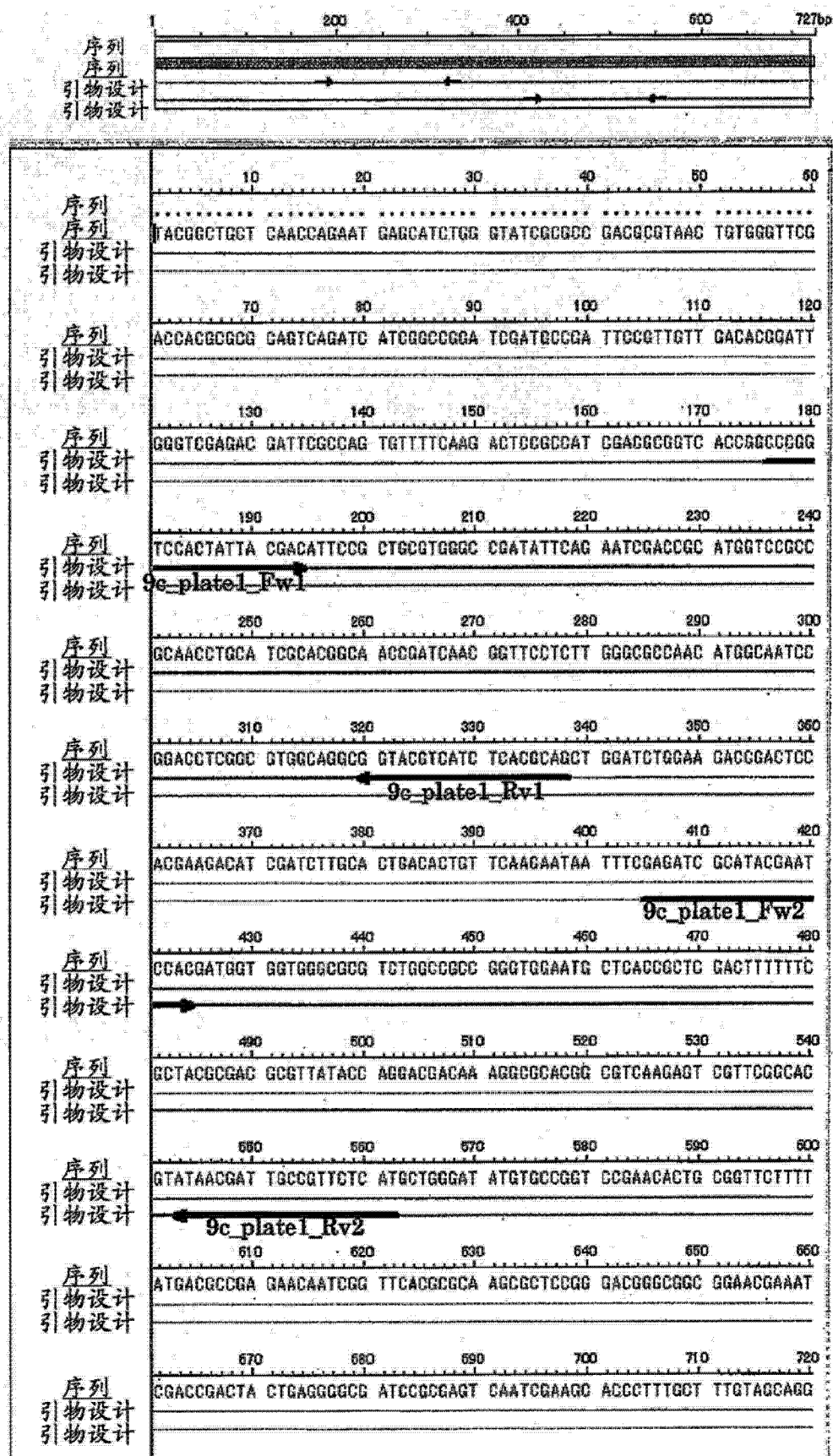


图 4

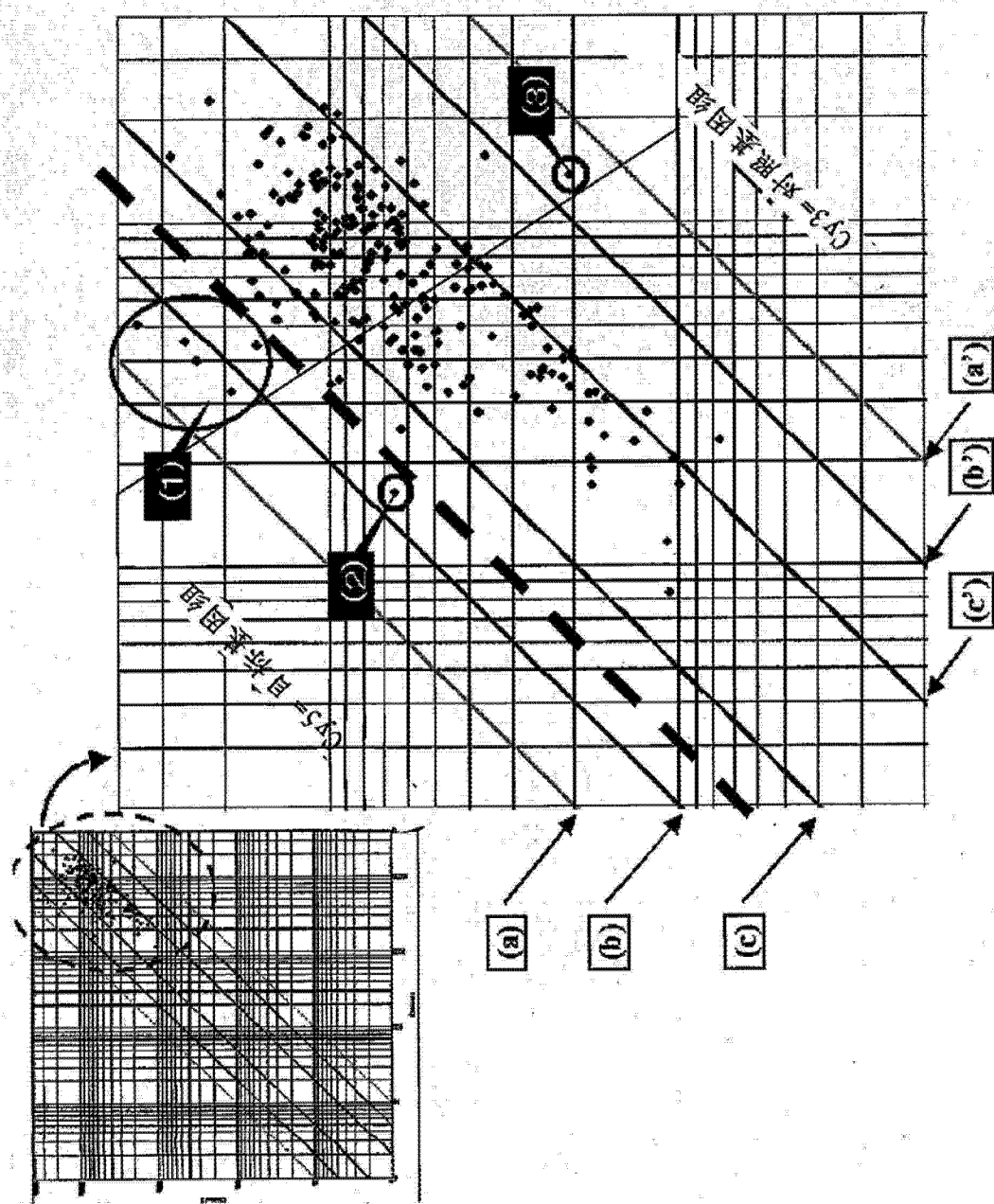


图 5

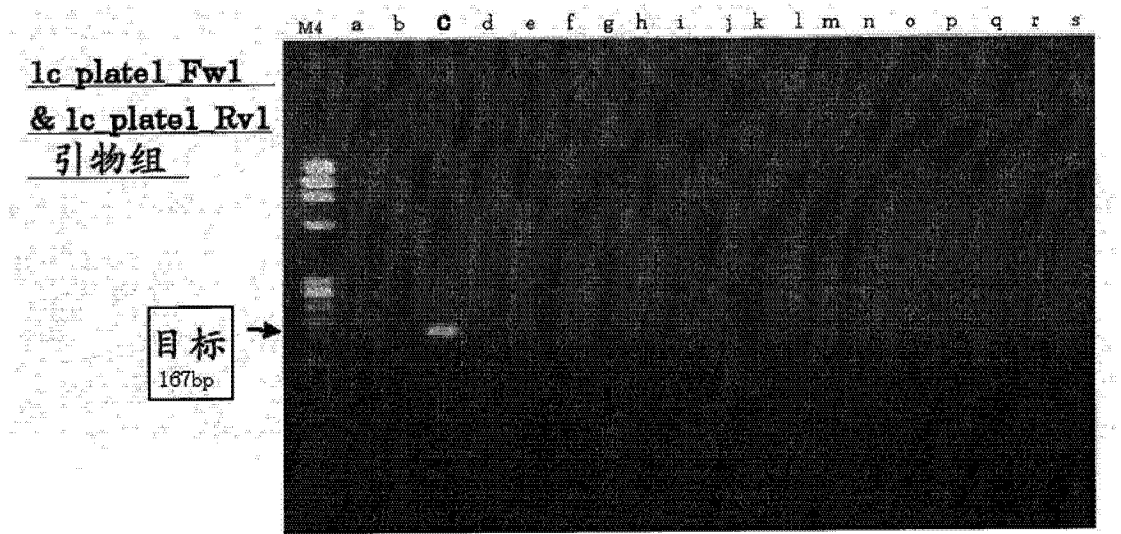


图 6

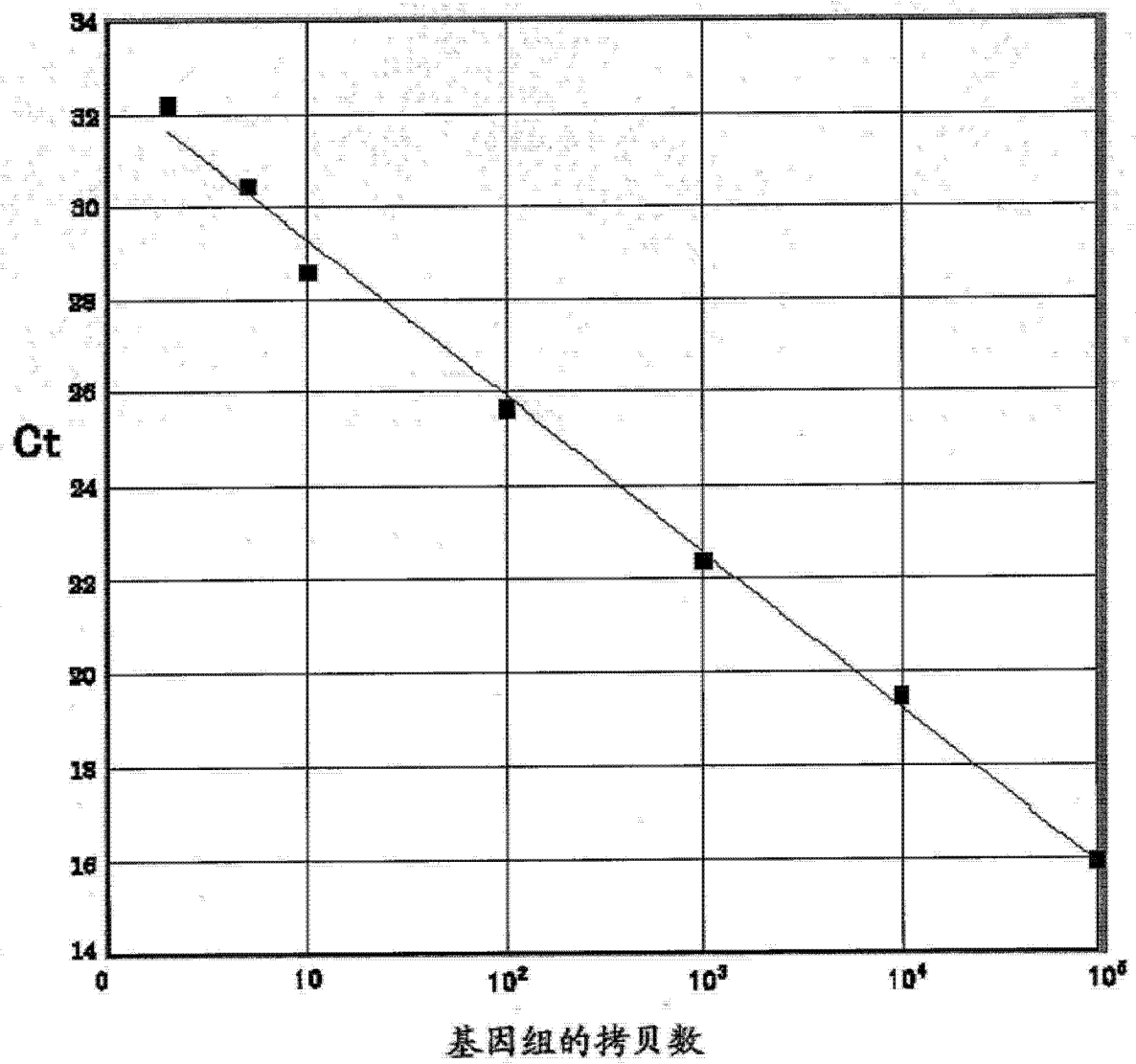


图 7