



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112166200 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 201980034841.5

(22) 申请日 2019.05.24

(30) 优先权数据

2018-100475 2018.05.25 JP

2019-026519 2019.02.18 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/020610 2019.05.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/225732 JA 2019.11.28

(71) 申请人 三菱化学株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 百濑一树 原爱 外川直之

佐藤荣治

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 陈彦 张默

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6851 (2006.01)

C12Q 1/6813 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/689 (2006.01)

权利要求书7页 说明书46页

序列表49页 附图7页

(54) 发明名称

目标核酸的定量方法

(57) 摘要

本发明的目的在于,提供能够同时确定试样中2种以上目标核酸的绝对量的简便的方法。本发明人等提供一种确定试样中2种以上目标核酸的绝对量的方法,包括:(a)将试样和已知量的对照核酸混合的工序,(b)使试样中全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组以及对照核酸共同扩增的工序,(c)根据扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标确定试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的工序,以及(d)由从扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标和扩增的目标核酸的量的指标算出的、各个目标核酸在全部目标核酸和前述特定核酸组的合计中的占有率,算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序。

1. 一种确定试样中2种以上目标核酸的绝对量的方法,包括
 - (a) 将试样和已知量的对照核酸混合的工序,
 - (b) 使试样中全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组以及对照核酸共同扩增的工序,
 - (c) 根据扩增的全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标确定试样中全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的工序,以及
 - (d) 由从扩增的全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的指标与扩增的各个目标核酸的量的指标算出的、各个目标核酸在全部目标核酸和所述特定核酸组的合计中的占有率,算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,对照核酸为由扩增所需的碱基序列、和一部分或全部碱基随机组合而成的碱基序列构成的人工序列。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,试样中全部目标核酸和所述特定核酸组的合计以及对照核酸的共同扩增通过选自由聚合酶链式反应 (PCR) 法、环介导等温扩增 (LAMP) 法、体外 (In vitro) 转录组成的组的方法来进行。
4. 根据权利要求3所述的方法,试样中全部目标核酸和所述特定核酸组的合计以及对照核酸的共同扩增通过PCR法来进行。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其特征在于,试样为选自由食品饮料、生物试样、环境试样和来自工业过程的试样组成的组的至少一种。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,试样为选自由从活性污泥、土壤、河水、海水、温泉水、饮用水、加工食品、发酵罐培养物以及真核生物采集的组织、细胞和体液组成的组的至少一种。
7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,生物试样为选自由从哺乳动物采集的唾液、牙菌斑、牙龈沟渗出液 (GCF)、粪便和皮肤来源试样组成的组的至少一种。
8. 根据权利要求1~7中任一项所述的方法,其特征在于,目标核酸为细菌的核糖体RNA (rRNA) 基因。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,目标核酸为选自由贫养菌属 (Abiotrophia 属)、无色杆菌属 (Achromobacter 属)、不动杆菌属 (Acinetobacter 属)、放线菌属 (Actinomyces 属)、气球菌属 (Aerococcus 属)、聚杆菌属 (Aggregatibacter 属)、拟普雷沃氏菌属 (Alloprevotella 属)、异斯卡多维氏菌属 (Alloscardovia 属)、厌氧球菌属 (Anaerococcus 属)、厌氧球状菌属 (Anaeroglobus 属)、隐秘杆菌属 (Arcanobacterium 属)、阿托波氏菌属 (Atopobium 属)、杆菌属 (Bacillus 属)、拟杆菌属 (Bacteroides 属)、双歧杆菌属 (Bifidobacterium 属)、博德特氏菌属 (Bordetella 属)、短波单胞菌属 (Brevundimonas 属)、布鲁氏菌属 (Brucella 属)、伯克霍尔德菌属 (Burkholderia 属)、弯曲杆菌属 (Campylobacter 属)、暂定隐细菌 (SR1) (Candidatus Absconditabacteria (SR1))、暂定螺旋体门 (TM7) (Candidatus Saccharibacteria (TM7))、二氧化碳嗜纤维菌属 (Capnocytophaga 属)、心杆菌属 (Cardiobacterium 属)、卡托氏菌属 (Catonella 属)、衣原体属 (Chlamydia 属)、嗜衣原体属 (Chlamydophila 属)、金黄杆菌属 (Chryseobacterium 属)、柠檬酸杆菌属 (Citrobacter 属)、梭菌属 (Clostridium 属)、柯林斯菌属 (Collinsella 属)、棒杆菌属 (Corynebacterium 属)、考克斯氏体属 (Coxiella 属)、克罗诺杆菌属 (Cronobacter

属)、隐藏杆菌属(*Cryptobacterium*属)、弯钩菌属(*Curvibacter*属)、戴阿利斯特属(*Dialister*属)、爱格士氏菌属(*Eggerthella*属)、艾肯氏菌属(*Eikenella*属)、伊丽莎白金菌属(*Elizabethkingia*属)、肠杆菌属(*Enterobacter*属)、肠球菌属(*Enterococcus*属)、埃希菌属(*Escherichia*属)、真杆菌属(*Eubacterium*属)、产线菌属(*Filifactor*属)、芬戈尔德菌属(*Fingoldia*属)、梭杆菌属(*Fusobacterium*属)、加德纳菌属(*Gardnerella*属)、孪生球菌属(*Gemella*属)、颗粒链球菌属(*Granulicatella*属)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*属)、螺杆菌属(*Helicobacter*属)、金氏菌属(*Kingella*属)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*属)、考克氏菌属(*Kocuria*属)、毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*属)、乳杆菌属(*Lactobacillus*属)、乳球菌属(*Lactococcus*属)、口动菌属(*Lautropia*属)、军团菌属(*Legionella*属)、纤毛菌属(*Leptotrichia*属)、李斯特氏菌属(*Listeria*属)、巨球形菌属(*Megasphaera*属)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*属)、微杆菌属(*Microbacterium*属)、微球菌属(*Micrococcus*属)、光岗菌属(*Mitsuokella*属)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*属)、艰难杆菌属(*Mogibacterium*属)、莫拉氏菌属(*Moraxella*属)、摩根氏菌属(*Morganella*属)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*属)、支原体属(*Mycoplasma*属)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*属)、诺卡氏菌属(*Nocardia*属)、欧陆森氏菌属(*olsenella*)、口腔菌属(*Oribacterium*属)、副球菌属(*Paracoccus*属)、类斯卡多维亚氏菌属(*Parascardovia*属)、微单胞菌属(*Parvimonas*属)、嗜脲菌属(*Peptoniphilus*属)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*属)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*属)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*属)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*属)、变形菌属(*Proteus*属)、普罗威登斯菌属(*Providencia*属)、假单胞菌属(*Pseudomonas*属)、假丙酸杆菌属(*Pseudopropionibacterium*属)、假支杆菌属(*Pseudoramibacter*属)、锥形杆菌属(*Pyramidobacter*属)、罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*属)、罗氏菌属(*Rothia*属)、斯卡多维亚菌属(*Scardovia*属)、施莱格尔氏菌属(*Schlegelella*属)、塞巴鲁德菌属(*Sebaldella*属)、月形单胞菌属(*Selenomonas*属)、沙雷氏菌属(*Serratia*属)、西蒙斯氏菌属(*Simonsiella*属)、斯奈克氏菌属(*Slackia*属)、斯尼斯菌属(*Sneathia*属)、索拉杆菌属(*Solobacterium*属)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*属)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*属)、口腔杆菌属(*Stomatobaculum*属)、链球菌属(*Streptococcus*属)、坦纳菌属(*Tannerella*属)、密螺旋体属(*Treponema*属)、尿支原体属(*Ureaplasma*属)、韦荣球菌属(*Veillonella*属)和依赖杆菌属(*Fretibacterium*属)的细菌组成的组的至少2种细菌的rRNA基因。

10. 根据权利要求8所述的方法, 其特征在于, 目标核酸为选自自由软弱贫养菌(*Abiotrophia defectiva*)、木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)、琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、齿状放线菌(*Actinomyces dentalis*)、乔格放线菌(*Actinomyces georgiae*)、戈氏放线菌(*Actinomyces gerencseriae*)、墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzi*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、约翰逊放线菌(*Actinomyces johnsonii*)、麦尔放线菌(*Actinomyces meyeri*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、口腔放线菌(*Actinomyces oris*)、图列茨放线菌(*Actinomyces turicensis*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、

伴放线聚杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、嗜沫凝聚杆菌 (*Aggregatibacter aphrophilus*)、灰色拟普雷沃氏菌 (*Alloprevotella rava*)、坦纳拟普雷沃氏菌 (*Alloprevotella tannerae*)、异斯卡多维亚菌 (*Alloscardovia omnicolens*)、厌氧双球状菌 (*Anaeroglobus geminatus*)、极小阿托波氏菌 (*Atopobium parvulum*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、短小双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、齿双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentium*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*)、简明弯曲杆菌 (*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌 (*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌 (*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌 (*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌 (*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌 (*Capnocytophaga sputigena*)、人心杆菌 (*Cardiobacterium hominis*)、疾病卡托氏菌 (*Catonella morbi*)、鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、产吡啶金黄杆菌 (*Chryseobacterium indologenes*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、产气柯林斯菌 (*Collinsella aerofaciens*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、硬棒杆菌 (*Corynebacterium durum*)、马氏棒杆菌 (*Corynebacterium matruchotii*)、假白喉棒杆菌 (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*)、假结核棒杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、肾棒杆菌 (*Corynebacterium renale*)、纹带棒杆菌 (*Corynebacterium striatum*)、结膜干燥棒杆菌 (*Corynebacterium xerosis*)、贝纳柯克斯体 (*Coxiella burnetii*)、变短隐藏杆菌 (*Cryptobacterium curtum*)、纤细弯钩菌 (*Curvibacter delicatus*)、难见戴阿利斯特杆菌 (*Dialister invisus*)、微好气戴阿利斯特菌 (*Dialister microaerophilus*)、侵肺戴阿利斯特杆菌 (*Dialister pneumosintes*)、缓慢爱格士氏菌 (*Eggerthella lenta*)、嗜蚀艾肯氏菌 (*Eikenella corrodens*)、脑膜败血伊丽莎白金菌 (*Elizabethkingia meningoseptica*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、暗沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、鸟肠球菌 (*Enterococcus avium*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、尿肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、短真杆菌 (*Eubacterium brachy*)、娇弱真杆菌 (*Eubacterium infirmum*)、粘液真杆菌 (*Eubacterium limosum*)、细小真杆菌 (*Eubacterium minutum*)、缠结真杆菌 (*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌 (*Eubacterium sapenum*)、沟迹真杆菌 (*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌 (*Filifactor alocis*)、苛求依赖杆菌 (*Fretibacterium fastidiosum*)、坏死梭杆菌 (*Fusobacterium necrophorum*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种 (*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*)、具核梭杆菌具核亚种 (*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*)、具核梭杆菌多形亚种 (*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)、具核梭杆菌文森亚种 (*Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*)、牙周梭杆菌 (*Fusobacterium periodonticum*)、猴梭杆菌 (*Fusobacterium simiae*)、溶血孪生球菌 (*Gemella haemolysans*)、麻疹孪生球菌 (*Gemella morbillorum*)、血孪生球菌 (*Gemella sanguinis*)、

毗邻颗粒链球菌 (*Granulicatella adiacens*)、貂鲸颗粒链球菌 (*Granulicatella balaenopterae*)、细长颗粒链球菌 (*Granulicatella elegans*)、杜克雷氏嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、溶血性嗜血杆菌 (*Haemophilus haemolyticus*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、反硝化金氏菌 (*Kingella denitrificans*)、金氏金氏菌 (*Kingella kingae*)、口腔金氏菌 (*Kingella oralis*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、口腔毛绒厌氧杆菌 (*Lachnoanaerobaculum orale*)、砂毛绒厌氧杆菌 (*Lachnoanaerobaculum saburreum*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、布赫内氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)、类干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、奇异口动菌 (*Lautropia mirabilis*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、口腔纤毛菌 (*Leptotrichia buccalis*)、纤毛菌属OT 215种 (*Leptotrichia* sp.OT 215)、纤毛菌属OT 417种 (*Leptotrichia* sp.OT 417)、纤毛菌属OT 462种 (*Leptotrichia* sp.OT 462)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、微核巨球形菌 (*Megasphaera micronuciformis*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、分生艰难杆菌 (*Mogibacterium diversum*)、难养艰难杆菌 (*Mogibacterium neglectum*)、短小艰难杆菌 (*Mogibacterium pumilum*)、胆怯艰难杆菌 (*Mogibacterium timidum*)、弱小艰难杆菌 (*Mogibacterium vescum*)、黏膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)、结膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella lacunata*)、摩氏摩根氏菌 (*Morganella morganii*)、脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、龟分枝杆菌 (*Mycobacterium chelonae*)、偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)、戈登分枝杆菌 (*Mycobacterium gordonae*)、嗜血分枝杆菌 (*Mycobacterium haemophilum*)、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)、海鱼分支杆菌 (*Mycobacterium marinum*)、斯氏分枝杆菌 (*Mycobacterium szulgai*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、蟾蜍分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)、生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*)、人型支原体 (*Mycoplasma hominis*)、口腔支原体 (*Mycoplasma orale*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、唾液支原体 (*Mycoplasma salivarium*)、长奈瑟氏菌 (*Neisseria elongata*)、黄色奈瑟氏菌 (*Neisseria flava*)、浅黄奈瑟氏菌 (*Neisseria flavescens*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、粘液奈瑟氏菌 (*Neisseria mucosa*)、干燥奈瑟氏菌 (*Neisseria sicca*)、微黄奈瑟氏菌 (*Neisseria subflava*)、星形诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、巴西诺卡氏菌 (*Nocardia brasiliensis*)、皮疽诺卡氏菌 (*Nocardia farcinica*)、新星诺卡氏菌 (*Nocardia nova*)、齿龈欧氏菌 (*Olsenella uli*)、不解糖口腔菌 (*Oribacterium asaccharolyticum*)、短小口腔菌 (*Oribacterium parvum*)、居齿类斯卡多维亚氏菌 (*Parascardovia denticolens*)、微小微单胞菌 (*Parvimonas micra*)、口炎消化链

球菌 (*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌 (*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌 (*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌 (*Porphyromonas pasteri*)、齿普雷沃氏菌 (*Prevotella dentalis*)、栖牙普雷沃氏菌 (*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌 (*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌 (*Prevotella loescheii*)、产黑素普雷沃氏菌 (*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌 (*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella oralis*)、口普雷沃氏菌 (*Prevotella oris*)、苍白普雷沃氏菌 (*Prevotella pallens*)、唾液普雷沃氏菌 (*Prevotella salivae*)、赛赫普雷沃氏菌 (*Prevotella shahii*)、真口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella veroralis*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*))、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum* (*Cutibacterium granulosum*))、丙酸丙酸杆菌 (*Propionibacterium propionicus* (*Pseudopropionibacterium propionicum*))、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*)、司氏普罗菲登斯菌 (*Providencia stuartii*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、非解乳糖假支杆菌 (*Pseudoramibacter alactolyticus*)、皮氏罗尔斯顿菌 (*Ralstonia pickettii*)、空间罗氏菌 (*Rothia aeria*)、龋齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌 (*Rothia mucilaginosa*)、异形斯卡多维亚菌 (*Scardovia inopinata*)、水生施莱格尔氏菌 (*Schlegelella aquatica*)、白蚁塞巴鲁德菌 (*Sebaldella termitidis*)、福氏月形单胞菌 (*Selenomonas flueggei*)、有害月形单胞菌 (*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌 OT 478 种 (*Selenomonas* sp. OT 478)、生痰月形单胞菌 (*Selenomonas sputigena*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、米氏西蒙斯氏菌 (*Simonsiella muelleri*)、弱生斯奈克氏菌 (*Slackia exigua*)、莫雷索拉杆菌 (*Solobacterium moorei*)、SR1 OT 345 种、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、解糖葡萄球菌 (*Staphylococcus saccharolyticus*)、嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎链球菌 (*Streptococcus anginosus*)、澳大利亚链球菌 (*Streptococcus australis*)、星座链球菌 (*Streptococcus constellatus*)、峭链球菌 (*Streptococcus cristatus*)、牙菌链球菌 (*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*)、婴儿链球菌 (*Streptococcus infantis*)、中间链球菌 (*Streptococcus intermedius*)、米勒链球菌 (*Streptococcus milleri*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)、口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*)、副血链球菌 (*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)、血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*)、远缘链球菌 (*Streptococcus sobrinus*)、虎链球菌 (*Streptococcus tigurinus*)、前庭链球菌 (*Streptococcus vestibularis*)、福赛斯坦纳菌 (*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、解卵磷脂密螺旋体 (*Treponema lecithinolyticum*)、媒介密螺旋体 (*Treponema medium*)、梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、索氏密螺旋体 (*Treponema socranskii*)、文氏密螺旋体 (*Treponema vincentii*)、解脲尿支原体 (*Ureaplasma*

urealyticum)、非典型韦荣球菌 (*Veillonella atypica*)、殊异韦荣球菌 (*Veillonella dispar*)、小韦荣球菌 (*Veillonella parvula*) 和罗戈沙韦荣球菌 (*Veillonella rogosa*) 组成的组的至少2种细菌的rRNA基因。

11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法, 工序(c) 如下:

(c1) 使用目标核酸的一部分或全部和所述特定核酸组以及对照核酸, 针对扩增前的量与扩增后的量的指标之间的关系制作校正曲线的工序, 以及

(c2) 将从试样扩增的全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标对应于(c1)的工序中制作的校正曲线, 算出试样中全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的工序。

12. 根据权利要求11所述的方法, 工序(c1)中使用的核酸为目标核酸的一部分和所述特定核酸组。

13. 根据权利要求11或12所述的方法, 其特征在于, 校正曲线表示目标核酸的一部分或全部和所述特定核酸组的合计量的指标相对于扩增后的对照核酸的量的指标之比、与目标核酸的一部分或全部和所述特定核酸组的合计量相对于扩增前的对照核酸的量的指标之比的关系。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的方法, 工序(c)和(d)中的、扩增的各个目标核酸的量的指标、扩增的全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标是通过分别与搭载于DNA芯片的以下的探针(x)~(z)的杂交而得到的信号强度:

(x) 与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针,

(y) 与试样中全部目标核酸和所述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针,

(z) 与对照核酸的扩增产物杂交的探针。

15. 根据权利要求14所述的方法, 工序(d) 如下:

(d1) 对2种以上目标核酸中的每一个即各个目标核酸, 进行与DNA芯片的杂交, 算出与各个目标核酸杂交的探针(x)与探针(y)的信号强度的关系式的工序,

(d2) 将使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针(x)的信号强度根据工序(d1)中算出的关系式换算为与各个目标核酸杂交的探针(y)的信号强度所对应的值的工序,

(d3) 算出工序(d2)中算出的探针(y)的信号强度所对应的值相对于使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针(y)的信号强度的比例的工序, 以及

(d4) 用工序(c)中算出的、试样中全部目标核酸和所述特定核酸组的合计量乘以工序(d3)中算出的占有率, 算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序。

16. 根据权利要求14或15所述的方法, 工序(b)包括使扩增后的核酸在与搭载于DNA芯片的探针杂交的单链上进行富集的工序。

17. 根据权利要求16所述的方法, 在单链上进行富集的工序是通过非对称PCR或 λ 核酸外切酶处理来进行的。

18. 根据权利要求14~17中任一项所述的方法, 探针(x)为以下的任一序列:

(I) 选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列,

(II) (I)的互补序列, 或

(III) 与 (I) 或 (II) 的序列实质上相同的序列。

19. 根据权利要求14~18中任一项所述的方法, DNA芯片为纤维型DNA芯片。

20. 一种试剂盒, 包括用于通过PCR法对试样中全部目标核酸和所述特定核酸组以及对照核酸进行共同扩增的1对或2对引物对、对照核酸、以及搭载有以下的探针(x)~(z)的DNA芯片:

(x) 与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针,

(y) 与试样中全部目标核酸和所述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针,

(z) 与对照核酸的扩增产物杂交的探针。

21. 根据权利要求20所述的试剂盒, 探针(x)为以下的任一序列:

(I) 选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列,

(II) (I) 的互补序列, 或

(III) 与 (I) 或 (II) 的序列实质上相同的序列。

22. 一种DNA芯片, 搭载有以下的探针(x)~(z):

(x) 与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针,

(y) 与试样中全部目标核酸和所述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针,

(z) 与对照核酸的扩增产物杂交的探针;

探针(x)为以下的任一序列:

(i) 选自由序列编号43~191所示碱基序列组成的组的序列,

(ii) (i) 的互补序列, 或

(iii) 与 (i) 或 (ii) 的序列实质上相同的序列。

目标核酸的定量方法

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸的定量方法和利用其的分析试剂盒。

背景技术

[0002] 有很多领域需要同时对试样中的多种核酸进行定量,作为其中之一,可列举菌群分析。

[0003] 近年来,人类健康与口腔菌群、肠内菌群的关系越来越清晰,正在寻找在检测用途中简便地对菌群进行分析的方法。

[0004] 作为对菌群进行评价的工具,传统上使用的是显微镜法、培养法,但存在能够判断、定量的菌种有限的问题。代替这些方法,近年来,使用了基于核酸的序列特异性的分子生物学方法。作为分子生物学方法,已知有定量PCR(qPCR)、竞争性PCR、DNA芯片、新一代测序仪(NGS)。

[0005] 通用的qPCR法虽然能够以高灵敏度进行定量,但操作复杂,与竞争性PCR同样,能够检测的项目数是有限的。此外,DNA芯片虽然是高通量的,但使用其的定量是相对定量。NGS的操作复杂而且价格昂贵,因此在以日常诊断为目的的使用中还存在问题。

[0006] 目前,在使用DNA芯片的菌群分析中是无法进行绝对定量的。用DNA芯片、NGS进行菌群分析的情况下,有必要通过PCR等方法对含有目标核酸的核酸组进行扩增。这里,得到的测定结果成为通过扩增来显示多个目标间的相对关系的结果。

[0007] 作为简便地确定核酸的绝对量的方法,有竞争性PCR。竞争性PCR是下述方法:在扩增前添加浓度已知且与目标共同扩增的对照核酸,从而根据扩增后的量的指标来确定扩增前的绝对量。但该竞争性PCR中,作为定量对象的核酸仅为一种,难以同时对多种核酸进行定量。

[0008] 此外,菌群分析中,已知在扩增前添加浓度已知的对照核酸来研究其存在量的方法(专利文献1、非专利文献1)。例如非专利文献1中,加入对照核酸,在PCR扩增后利用DNA芯片对样品间的相对量进行比较。DNA芯片中,各个探针的杂交效率是不同的,无法比较不同探针间的信号,因此无法通过该方法来确定绝对量。

[0009] 另一方面,专利文献1中,公开了以利用NGS进行绝对定量为目的,扩增前添加多个对照核酸,仅用该多个对照核酸制作校正曲线,确定各个目标核酸的量的方法。该方法的前提是对照核酸与目标核酸的扩增效率相同,专利文献1中提出了以扩增效率相同的方式人工设计的序列。该方法是使用价格昂贵的NGS、进一步使用多个对照核酸的复杂方法。而且,存在要使试样中目标核酸和多个对照核酸间的扩增效率相同这样的极为困难的课题。

[0010] 如上所述,还不知道能够同时对多种目标核酸的绝对量进行定量的简便的方法。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:日本特开2015-204813号

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Treimo,J.等,J Appl Microbiol,100,985-998,2006

发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 因此,本发明的课题在于,提供一种能够同时确定试样中2种以上目标核酸的绝对量的简便的方法。

[0018] 用于解决课题的方法

[0019] 为了解决上述课题,本发明人进行了深入研究,结果发现,通过使用对照核酸算出试样中全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组的合计的绝对定量及其细项的工序,能够对试样中2种以上目标核酸中的每一个进行绝对定量,从而完成了本发明。

[0020] 即,本发明如下所述。

[0021] [1]一种确定试样中2种以上目标核酸的绝对量的方法,包括:

[0022] (a)将试样和已知量的对照核酸混合的工序,

[0023] (b)使试样中全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组以及对照核酸共同扩增的工序,

[0024] (c)根据扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标确定试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的工序,以及

[0025] (d)由从扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标与扩增的各个目标核酸的量的指标算出的、各个目标核酸在全部目标核酸和前述特定核酸组的合计中的占有率,算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序。

[0026] [2]根据上述[1]所述的方法,其特征在于,对照核酸为由扩增所需的碱基序列和一部分或全部碱基随机组合而成的碱基序列构成的人工序列。

[0027] [3]根据上述[1]或[2]所述的方法,试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计以及对照核酸的共同扩增通过选自由聚合酶链式反应(PCR)法、环介导等温扩增(LAMP, Loop-Mediated Isothermal Amplification)法、体外(In vitro)转录组成的组的方法来进行。

[0028] [4]根据上述[3]所述的方法,试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计以及对照核酸的共同扩增通过PCR法来进行。

[0029] [5]根据上述[1]~[4]中任一项所述的方法,其特征在于,试样为选自由食品饮料、生物试样、环境试样和来自工业过程的试样组成的组的至少一种。

[0030] [6]根据上述[5]所述的方法,其特征在于,试样为选自由从活性污泥、土壤、河水、海水、温泉水、饮用水、加工食品、发酵罐培养物以及真核生物采集的组织、细胞和体液组成的组的至少一种。

[0031] [7]根据上述[5]所述的方法,其特征在于,生物试样为选自由从哺乳动物采集的唾液、牙菌斑、牙龈沟渗出液(GCF)、粪便和皮肤来源试样组成的组的至少一种。

[0032] [8]根据上述[1]~[7]中任一项所述的方法,其特征在于,目标核酸为细菌的核糖体RNA(rRNA)基因。

[0033] [9]根据上述[8]所述的方法,其特征在于,目标核酸为选自由贫养菌属(Abiotrophia属)、无色杆菌属(Achromobacter属)、不动杆菌属(Acinetobacter属)、放线

菌属(*Actinomyces*属)、气球菌属(*Aerococcus*属)、聚杆菌属(*Aggregatibacter*属)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*属)、异斯卡多维亚氏菌属(*Alloscardovia*属)、厌氧球菌属(*Anaerococcus*属)、厌氧球状菌属(*Anaeroglobus*属)、隐秘杆菌属(*Arcanobacterium*属)、阿托波氏菌属(*Atopobium*属)、杆菌属(*Bacillus*属)、拟杆菌属(*Bacteroides*属)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*属)、博德特氏菌属(*Bordetella*属)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*属)、布鲁氏菌属(*Brucella*属)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*属)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*属)、暂定隐细菌(SR1)(*Candidatus Absconditabacteria*(SR1))、暂定螺旋体门(TM7)(*Candidatus Saccharibacteria*(TM7))、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*属)、心杆菌属(*Cardiobacterium*属)、卡托氏菌属(*Catonella*属)、衣原体属(*Chlamydia*属)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*属)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*属)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*属)、梭菌属(*Clostridium*属)、柯林斯菌属(*Collinsella*属)、棒杆菌属(*Corynebacterium*属)、考克斯氏体属(*Coxiella*属)、克罗诺杆菌属(*Cronobacter*属)、隐藏杆菌属(*Cryptobacterium*属)、弯钩菌属(*Curvibacter*属)、戴阿利斯特属(*Dialister*属)、爱格士氏菌属(*Eggerthella*属)、艾肯氏菌属(*Eikenella*属)、伊丽莎白金菌属(*Elizabethkingia*属)、肠杆菌属(*Enterobacter*属)、肠球菌属(*Enterococcus*属)、埃希菌属(*Escherichia*属)、真杆菌属(*Eubacterium*属)、产线菌属(*Filifactor*属)、芬戈尔德菌属(*Finegoldia*属)、梭杆菌属(*Fusobacterium*属)、加德纳菌属(*Gardnerella*属)、孪生球菌属(*Gemella*属)、颗粒链球菌属(*Granulicatella*属)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*属)、螺杆菌属(*Helicobacter*属)、金氏菌属(*Kingella*属)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*属)、考克氏菌属(*Kocuria*属)、毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*属)、乳杆菌属(*Lactobacillus*属)、乳球菌属(*Lactococcus*属)、口动菌属(*Lautropia*属)、军团菌属(*Legionella*属)、纤毛菌属(*Leptotrichia*属)、李斯特氏菌属(*Listeria*属)、巨球形菌属(*Megasphaera*属)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*属)、微杆菌属(*Microbacterium*属)、微球菌属(*Micrococcus*属)、光岗菌属(*Mitsuokella*属)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*属)、艰难杆菌属(*Mogibacterium*属)、莫拉氏菌属(*Moraxella*属)、摩根氏菌属(*Morganella*属)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*属)、支原体属(*Mycoplasma*属)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*属)、诺卡氏菌属(*Nocardia*属)、欧陆森氏菌属(*olsenella*)、口腔菌属(*Oribacterium*属)、副球菌属(*Paracoccus*属)、类斯卡多维亚氏菌属(*Parascardovia*属)、微单胞菌属(*Parvimonas*属)、嗜脲菌属(*Peptoniphilus*属)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*属)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*属)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*属)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*属)、变形菌属(*Proteus*属)、普罗威登斯菌属(*Providencia*属)、假单胞菌属(*Pseudomonas*属)、假丙酸杆菌属(*Pseudopropionibacterium*属)、假支杆菌属(*Pseudoramibacter*属)、锥形杆菌属(*Pyramidobacter*属)、罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*属)、罗氏菌属(*Rothia*属)、斯卡多维亚菌属(*Scardovia*属)、施莱格尔氏菌属(*Schlegelella*属)、塞巴鲁德菌属(*Sebaldella*属)、月形单胞菌属(*Selenomonas*属)、沙雷氏菌属(*Serratia*属)、西蒙斯氏菌属(*Simonsiella*属)、斯奈克氏菌属(*Slackia*属)、斯尼斯菌属(*Sneathia*属)、索拉杆菌属(*Solobacterium*属)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*属)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*属)、口腔杆菌属(*Stomatobaculum*属)、链球菌属(*Streptococcus*属)、坦纳菌属(*Tannerella*属)、密螺旋体属(*Treponema*属)、尿支原体属

(*Ureaplasma*属)、韦荣球菌属(*Veillonella*属)和依赖杆菌属(*Fretibacterium*属)的细菌组成的组的至少2种细菌的rRNA基因。

[0034] [10]根据上述[8]所述的方法,其特征在于,目标核酸为选自由软弱贫养菌(*Abiotrophia defectiva*)、木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)、琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、齿状放线菌(*Actinomyces dentalis*)、乔格放线菌(*Actinomyces georgiae*)、戈氏放线菌(*Actinomyces gerencseriae*)、墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzi*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、约翰逊放线菌(*Actinomyces johnsonii*)、麦尔放线菌(*Actinomyces meyeri*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、口腔放线菌(*Actinomyces oris*)、图列茨放线菌(*Actinomyces turicensis*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)、灰色拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella rava*)、坦纳拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella tannerae*)、异斯卡多维亚菌(*Alloscardovia omnicolens*)、厌氧双球状菌(*Anaeroglobus geminatus*)、极小阿托波氏菌(*Atopobium parvulum*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、短小双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、简明弯曲杆菌(*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌(*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌(*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、疾病卡托氏菌(*Catonella morbi*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、产气柯林斯菌(*Collinsella aerofaciens*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、硬棒杆菌(*Corynebacterium durum*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、假白喉棒杆菌(*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*)、假结核棒杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、肾棒杆菌(*Corynebacterium renale*)、纹带棒杆菌(*Corynebacterium striatum*)、结膜干燥棒杆菌(*Corynebacterium xerosis*)、贝纳柯克斯体(*Coxiella burnetii*)、变短隐藏杆菌(*Cryptobacterium curtum*)、纤细弯钩菌(*Curvibacter delicatus*)、难见戴阿利斯特杆菌(*Dialister invisus*)、微好气戴阿利斯特菌(*Dialister microaerophilus*)、侵肺戴阿利斯特杆菌(*Dialister pneumosintes*)、缓慢爱格士氏菌(*Eggerthella lenta*)、嗜蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)、脑膜败血伊丽莎白金菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、暗沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、鸟肠球菌

(*Enterococcus avium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、短真杆菌(*Eubacterium brachy*)、娇弱真杆菌(*Eubacterium infirmum*)、粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)、细小真杆菌(*Eubacterium minutum*)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌(*Eubacterium sapheum*)、沟迹真杆菌(*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌(*Filifactor alocis*)、苛求依赖杆菌(*Fretibacterium fastidiosum*)、坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*)、具核梭杆菌具核亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*)、具核梭杆菌多形亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)、具核梭杆菌文森亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*)、牙周梭杆菌(*Fusobacterium periodonticum*)、猴梭杆菌(*Fusobacterium simiae*)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)、血孪生球菌(*Gemella sanguinis*)、毗邻颗粒链球菌(*Granulicatella adiacens*)、貂鲸颗粒链球菌(*Granulicatella balaenopterae*)、细长颗粒链球菌(*Granulicatella elegans*)、杜克雷氏嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、溶血性嗜血杆菌(*Haemophilus haemolyticus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、反硝化金氏菌(*Kingella denitrificans*)、金氏金氏菌(*Kingella kingae*)、口腔金氏菌(*Kingella oralis*)、产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、口腔毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum orale*)、砂毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum saburreum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、布赫内氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、类干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、路氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、奇异口动菌(*Lautropia mirabilis*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、口腔纤毛菌(*Leptotrichia buccalis*)、纤毛菌属OT 215种(*Leptotrichia sp. OT 215*)、纤毛菌属OT 417种(*Leptotrichia sp. OT 417*)、纤毛菌属OT 462种(*Leptotrichia sp. OT 462*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、微核巨球形菌(*Megasphaera micronuciformis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、分生艰难杆菌(*Mogibacterium diversum*)、难养艰难杆菌(*Mogibacterium neglectum*)、短小艰难杆菌(*Mogibacterium pumilum*)、胆怯艰难杆菌(*Mogibacterium timidum*)、弱小艰难杆菌(*Mogibacterium vescum*)、黏膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、结膜炎莫拉氏菌(*Moraxella lacunata*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)、偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、戈登分枝杆菌(*Mycobacterium goodii*)、嗜血分枝杆菌(*Mycobacterium haemophilum*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、海鱼分

支杆菌 (*Mycobacterium marinum*)、斯氏分枝杆菌 (*Mycobacterium szulgai*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、蟾蜍分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)、生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*)、人型支原体 (*Mycoplasma hominis*)、口腔支原体 (*Mycoplasma orale*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、唾液支原体 (*Mycoplasma salivarium*)、长奈瑟氏菌 (*Neisseria elongata*)、黄色奈瑟氏菌 (*Neisseria flava*)、浅黄奈瑟氏菌 (*Neisseria flavescens*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、粘液奈瑟氏菌 (*Neisseria mucosa*)、干燥奈瑟氏菌 (*Neisseria sicca*)、微黄奈瑟氏菌 (*Neisseria subflava*)、星形诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、巴西诺卡氏菌 (*Nocardia brasiliensis*)、皮疽诺卡氏菌 (*Nocardia farcinica*)、新星诺卡氏菌 (*Nocardia nova*)、齿龈欧氏菌 (*Olsenella uli*)、不解糖口腔菌 (*Oribacterium asaccharolyticum*)、短小口腔菌 (*Oribacterium parvum*)、居齿类斯卡多维亚氏菌 (*Parascardovia denticolens*)、微小微单胞菌 (*Parvimonas micra*)、口炎消化链球菌 (*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌 (*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌 (*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌 (*Porphyromonas pasteri*)、齿普雷沃氏菌 (*Prevotella dentalis*)、栖牙普雷沃氏菌 (*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌 (*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌 (*Prevotella loescheii*)、产黑素普雷沃氏菌 (*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌 (*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella oralis*)、口普雷沃氏菌 (*Prevotella oris*)、苍白普雷沃氏菌 (*Prevotella pallens*)、唾液普雷沃氏菌 (*Prevotella salivae*)、赛赫普雷沃氏菌 (*Prevotella shahii*)、真口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella veroralis*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*))、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum* (*Cutibacterium granulosum*))、丙酸丙酸杆菌 (*Propionibacterium propionicus* (*Pseudopropionibacterium propionicum*))、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*)、司氏普罗菲登斯菌 (*Providencia stuartii*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、非解乳糖假支杆菌 (*Pseudoramibacter alactolyticus*)、皮氏罗尔斯顿菌 (*Ralstonia pickettii*)、空间罗氏菌 (*Rothia aeria*)、龋齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌 (*Rothia mucilaginosa*)、异形斯卡多维亚菌 (*Scardovia inopinata*)、水生施莱格尔氏菌 (*Schlegelella aquatica*)、白蚁塞巴鲁德菌 (*Sebaldella termitidis*)、福氏月形单胞菌 (*Selenomonas flueggei*)、有害月形单胞菌 (*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌 OT 478 种 (*Selenomonas* sp. OT 478)、生痰月形单胞菌 (*Selenomonas sputigena*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、米氏西蒙斯氏菌 (*Simonsiella muelleri*)、弱生斯奈克氏菌 (*Slackia exigua*)、莫雷索拉杆菌 (*Solobacterium moorei*)、SR1 OT 345 种、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、解糖葡萄球菌 (*Staphylococcus saccharolyticus*)、嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎链球菌 (*Streptococcus anginosus*)、澳大利亚链球菌 (*Streptococcus australis*)、星座链球菌 (*Streptococcus*

constellatus)、峭链球菌 (*Streptococcus cristatus*)、牙菌链球菌 (*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*)、婴儿链球菌 (*Streptococcus infantis*)、中间链球菌 (*Streptococcus intermedius*)、米勒链球菌 (*Streptococcus milleri*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)、口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*)、副血链球菌 (*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)、血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*)、远缘链球菌 (*Streptococcus sobrinus*)、虎链球菌 (*Streptococcus tigurinus*)、前庭链球菌 (*Streptococcus vestibularis*)、福赛斯坦纳菌 (*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、解卵磷脂密螺旋体 (*Treponema lecithinolyticum*)、媒介密螺旋体 (*Treponema medium*)、梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、索氏密螺旋体 (*Treponema socranskii*)、文氏密螺旋体 (*Treponema vincentii*)、解脲尿支原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、非典型韦荣球菌 (*Veillonella atypica*)、殊异韦荣球菌 (*Veillonella dispar*)、小韦荣球菌 (*Veillonella parvula*) 和罗戈沙韦荣球菌 (*Veillonella rogosae*) 组成的组的至少2种细菌的rRNA基因。

[0035] [11]根据上述[1]~[10]中任一项所述的方法,工序(c)如下:

[0036] (c1)使用目标核酸的一部分或全部和前述特定核酸组以及对照核酸,针对扩增前的量与扩增后的量的指标之间的关系制作校正曲线的工序,以及

[0037] (c2)将从试样扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标对应于(c1)的工序中制作的校正曲线,算出试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的工序。

[0038] [12]根据上述[11]所述的方法,工序(c1)中使用的核酸为目标核酸的一部分和前述特定核酸组。

[0039] [13]根据上述[11]或[12]所述的方法,其特征在于,校正曲线表示目标核酸的一部分或全部和前述特定核酸组的合计量的指标相对于扩增后的对照核酸的量的指标之比、与目标核酸的一部分或全部和前述特定核酸组的合计量相对于扩增前的对照核酸的量的比的关系。

[0040] [14]根据上述[1]~[13]中任一项所述的方法,工序(c)和(d)中的、扩增的各个目标核酸的量的指标、扩增的全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标是通过分别与搭载于DNA芯片的以下的探针(x)~(z)的杂交而得到的信号强度。

[0041] (x)与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针

[0042] (y)与试样中全部目标核酸和前述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针

[0043] (z)与对照核酸的扩增产物杂交的探针

[0044] [15]根据上述[14]所述的方法,工序(d)如下。

[0045] (d1)对于试样中全部目标核酸中的每一个(各个目标核酸),进行与DNA芯片的杂交,算出与各个目标核酸杂交的探针(x)与探针(y)的信号强度的关系式的工序,

[0046] (d2)将使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针(x)的信号强度根据工序(d1)中算出的关系式换算为与各个目标核酸杂交的探针(y)的信号强度所对应的值的工

序,

[0047] (d3) 算出工序 (d2) 中算出的探针 (y) 的信号强度所对应的值相对于使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针 (y) 的信号强度的比例的工序, 以及

[0048] (d4) 用工序 (c) 中算出的试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量乘以工序 (d3) 中算出的占有率, 算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序。

[0049] [16] 根据上述 [14] 或 [15] 所述的方法, 工序 (b) 包括使扩增后的核酸在与搭载于DNA芯片的探针杂交的单链上进行富集的工序。

[0050] [17] 根据上述 [16] 所述的方法, 在单链上进行富集的工序是通过非对称PCR或 λ 核酸外切酶处理来进行的。

[0051] [18] 根据上述 [14] ~ [17] 中任一项所述的方法, 探针 (x) 为以下的任一序列。

[0052] (I) 选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列,

[0053] (II) (I) 的互补序列, 或

[0054] (III) 与 (I) 或 (II) 的序列实质上相同的序列。

[0055] [19] 根据上述 [14] ~ [18] 中任一项所述的方法, DNA芯片为纤维型DNA芯片。

[0056] [20] 一种试剂盒, 用于通过PCR法对试样中全部目标核酸和前述特定核酸组以及对照核酸进行共同扩增的1对或2对引物对、对照核酸、以及搭载有以下的探针 (x) ~ (z) 的DNA芯片。

[0057] (x) 与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针

[0058] (y) 与试样中全部目标核酸和前述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针

[0059] (z) 与对照核酸的扩增产物杂交的探针。

[0060] [21] 根据上述 [20] 所述的试剂盒, 探针 (x) 为以下的任一序列。

[0061] (I) 选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列,

[0062] (II) (I) 的互补序列, 或

[0063] (III) 与 (I) 或 (II) 的序列实质上相同的序列。

[0064] [22] 一种DNA芯片, 搭载有以下的探针 (x) ~ (z) :

[0065] (x) 与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针

[0066] (y) 与试样中全部目标核酸和前述特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针

[0067] (z) 与对照核酸的扩增产物杂交的探针;

[0068] 探针 (x) 为以下的任一序列:

[0069] (i) 选自由序列编号43~191所示碱基序列组成的组的序列,

[0070] (ii) (i) 的互补序列, 或

[0071] (iii) 与 (i) 或 (ii) 的序列实质上相同的序列。

[0072] 发明效果

[0073] 根据本发明, 能够通过简便的方法同时确定试样中2种以上目标核酸的绝对量。

附图说明

[0074] [图1] 为显示校正用核酸和对照核酸的、扩增前的量比与扩增后的量的指标之比的关系的图。

[0075] [图2] 为显示探针间信号强度的关系的图。

[0076] [图3]为显示校正用核酸和对照核酸的、扩增前的量比与扩增后的量的指标之比的关系的图。

[0077] [图4A]为用本发明实施方式的一例来表明原理的示意图,为显示工序(a)的图。

[0078] [图4B]为用本发明实施方式的一例来表明原理的示意图,为显示工序(b)的图。

[0079] [图4C]为用本发明实施方式的一例来表明原理的示意图,为显示工序(c)的图。

[0080] [图4D]为用本发明实施方式的一例来表明原理的示意图,为显示工序(d)的图。

[0081] [图5]为显示校正用核酸和对照核酸的、扩增前的量比与扩增后的量的指标之比的关系的图。

[0082] [图6]为显示探针间信号强度的关系的图。

[0083] [图7]为显示校正用核酸和对照核酸的、扩增前的量比与扩增后的量的指标之比的关系的图。

[0084] [图8]为显示探针间信号强度的关系的图。

[0085] [图9]为显示校正用核酸和对照核酸的、扩增前的量比与扩增后的量的指标之比的关系的图。

[0086] [图10]为显示探针间信号强度的关系的图。

具体实施方式

[0087] 以下详细地对本发明进行说明。以下的实施方式是用于对本发明进行说明的例示,其宗旨并非将本发明仅限定为这些实施方式。在不脱离其宗旨的范围内,本发明可以通过各种方式来实施。此外,本说明书包括作为本申请优先权主张的基础的2018年5月25日申请的日本专利申请(特愿2018-100475号)和2019年2月18日申请的日本专利申请(特愿2019-026519号)的说明书和附图记载的内容。

[0088] 1. 目标核酸的绝对量的确定

[0089] (1) 目标核酸

[0090] 本发明中,目标核酸是作为定量对象的核酸。例如,在含有作为测定对象的细菌的基因组DNA、非测定对象的细菌的基因组DNA和其他DNA的试样中,目标核酸是来源于作为测定对象的细菌的核酸。本发明中,即便在假设来源于非测定对象的细菌的核酸的一部分与目标核酸一并扩增的情况下,该扩增的核酸的一部分也不是目标核酸。关于该“与目标核酸一并扩增的特定核酸组”在下文描述。

[0091] 对菌群进行评价的情况下,作为目标核酸,可以使用含有作为测定对象的多个细菌的基因组DNA间保守的共有序列的核酸。此外,作为目标核酸,可以使用含有作为测定对象的细菌各自的特异性碱基序列的核酸。

[0092] 通过目标核酸含有多个细菌的共有序列,能够用1种探针捕捉多种细菌的目标核酸(全部目标核酸)。此外,通过目标核酸含有作为测定对象的细菌各自的特异性碱基序列,能够特异性检测目的细菌的目标核酸(各个目标核酸)。

[0093] 目标核酸有时是1分子核酸,有时在1分子核酸中作为部分序列而存在多个。例如,细菌的16SrRNA基因(例如编码16SrRNA的DNA)在1分子基因组DNA中存在多个拷贝,以此为目标核酸的情况下,可以将各拷贝分别视为1分子目标核酸。核酸可以是DNA和RNA中的任一种。

[0094] 进一步,本发明中,目标核酸包括在获得量的指标时能够视为1种的核酸的集合体。具体地,可以将含有相同碱基序列部分的核酸的集合视为1种。例如,使用DNA芯片的情况下,对于具有部分地共同的序列的核酸的集合,通过作为与该共同序列杂交的探针的信号强度而获得量的指标,可以视为一种目标核酸。例如,这种情况可以具体地例示下述情况:以试样中链球菌属(*Streptococcus*属)细菌的16SrRNA基因作为目标核酸,根据与其共同序列对应的探针来获得量的指标的情况等。

[0095] 作为目标核酸,可列举例如基因组DNA、基因组DNA中的目的基因、mRNA等。更具体地,优选为细菌的基因组DNA,更优选为细菌的基因组DNA中的rRNA基因,特别优选为细菌的基因组DNA中16SrRNA基因。

[0096] 进行口腔菌群的评价的情况下,例如可以以贫养菌属(*Abiotrophia*属)、无色杆菌属(*Achromobacter*属)、不动杆菌属(*Acinetobacter*属)、放线菌属(*Actinomyces*属)、气球菌属(*Aerococcus*属)、聚杆菌属(*Aggregatibacter*属)、普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*属)、异斯卡多维亚氏菌属(*Alloscardovia*属)、厌氧球菌属(*Anaerococcus*属)、厌氧球状菌属(*Anaeroglobus*属)、隐秘杆菌属(*Arcanobacterium*属)、阿托波氏菌属(*Atopobium*属)、杆菌属(*Bacillus*属)、拟杆菌属(*Bacteroides*属)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*属)、博德特氏菌属(*Bordetella*属)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*属)、布鲁氏菌属(*Brucella*属)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*属)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*属)、暂定隐细菌(SR1)(*Candidatus Absconditabacteria* (SR1))、暂定螺旋体门(TM7)(*Candidatus Saccharibacteria* (TM7))、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*属)、心杆菌属(*Cardiobacterium*属)、卡托氏菌属(*Catonella*属)、衣原体属(*Chlamydia*属)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*属)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*属)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*属)、梭菌属(*Clostridium*属)、柯林斯菌属(*Collinsella*属)、棒杆菌属(*Corynebacterium*属)、考克斯氏体属(*Coxiella*属)、克罗诺杆菌属(*Cronobacter*属)、隐藏杆菌属(*Cryptobacterium*属)、弯钩菌属(*Curvibacter*属)、戴阿利斯特属(*Dialister*属)、爱格士氏菌属(*Eggerthella*属)、艾肯氏菌属(*Eikenella*属)、伊丽莎白金菌属(*Elizabethkingia*属)、肠杆菌属(*Enterobacter*属)、肠球菌属(*Enterococcus*属)、埃希菌属(*Escherichia*属)、真杆菌属(*Eubacterium*属)、产线菌属(*Filifactor*属)、芬戈尔德菌属(*Finnegoldia*属)、梭杆菌属(*Fusobacterium*属)、加德纳菌属(*Gardnerella*属)、孪生球菌属(*Gemella*属)、颗粒链球菌属(*Granulicatella*属)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*属)、螺杆菌属(*Helicobacter*属)、金氏菌属(*Kingella*属)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*属)、考克氏菌属(*Kocuria*属)、毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*属)、乳杆菌属(*Lactobacillus*属)、乳球菌属(*Lactococcus*属)、口动菌属(*Lautropia*属)、军团菌属(*Legionella*属)、纤毛菌属(*Leptotrichia*属)、李斯特氏菌属(*Listeria*属)、巨球形菌属(*Megasphaera*属)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*属)、微杆菌属(*Microbacterium*属)、微球菌属(*Micrococcus*属)、光岗菌属(*Mitsuokella*属)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*属)、艰难杆菌属(*Mogibacterium*属)、莫拉氏菌属(*Moraxella*属)、摩根氏菌属(*Morganella*属)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*属)、支原体属(*Mycoplasma*属)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*属)、诺卡氏菌属(*Nocardia*属)、欧陆森氏菌属(*olsenella*)、口腔菌属(*Oribacterium*属)、副球菌属(*Paracoccus*属)、类斯卡多维亚氏菌属(*Parascardovia*属)、微单胞菌属(*Parvimonas*属)、嗜脲菌属(*Peptoniphilus*

属)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*属)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*属)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*属)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium* (*Cutibacterium*)属)、变形菌属(*Proteus*属)、普罗威登斯菌属(*Providencia*属)、假单胞菌属(*Pseudomonas*属)、假丙酸杆菌属(*Pseudopropionibacterium*属)、假支杆菌属(*Pseudoramibacter*属)、锥形杆菌属(*Pyramidobacter*属)、罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*属)、罗氏菌属(*Rothia*属)、斯卡多维亚菌属(*Scardovia*属)、施莱格尔氏菌属(*Schlegelella*属)、塞巴鲁德菌属(*Sebaldella*属)、月形单胞菌属(*Selenomonas*属)、沙雷氏菌属(*Serratia*属)、西蒙斯氏菌属(*Simonsiella*属)、斯奈克氏菌属(*Slackia*属)、斯尼斯菌属(*Sneathia*属)、索拉杆菌属(*Solobacterium*属)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*属)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*属)、口腔杆菌属(*Stomatobaculum*属)、链球菌属(*Streptococcus*属)、坦纳菌属(*Tannerella*属)、密螺旋体属(*Treponema*属)、尿支原体属(*Ureaplasma*属)、韦荣球菌属(*Veillonella*属)和依赖杆菌属(*Fretibacterium*属)的细菌的rRNA基因等为目标核酸,可以更优选以放线菌属(*Actinomyces*属)、聚杆菌属(*Aggregatibacter*属)、普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*属)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*属)、暂定隐细菌(SR1) (*Candidatus Absconditabacteria* (SR1))、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*属)、棒杆菌属(*Corynebacterium*属)、艾肯氏菌属(*Eikenella*属)、真杆菌属(*Eubacterium*属)、产线菌属(*Filifactor*属)、梭杆菌属(*Fusobacterium*属)、孪生球菌属(*Gemella*属)、颗粒链球菌属(*Granulicatella*属)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*属)、螺杆菌属(*Helicobacter*属)、乳杆菌属(*Lactobacillus*属)、纤毛菌属(*Leptotrichia*属)、巨球形菌属(*Megasphaera*属)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*属)、微单胞菌属(*Parvimonas*属)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*属)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*属)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*属)、罗氏菌属(*Rothia*属)、月形单胞菌属(*Selenomonas*属)、索拉杆菌属(*Solobacterium*属)、链球菌属(*Streptococcus*属)、坦纳菌属(*Tannerella*属)、密螺旋体属(*Treponema*属)、韦荣球菌属(*Veillonella*属)的细菌的rRNA基因等为目标核酸,但不限于此。

[0097] 进一步,作为目标核酸,考虑到与人类的健康相关,可以优选以软弱贫养菌(*Abiotrophia defectiva*)、木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)、琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、齿状放线菌(*Actinomyces dentalis*)、乔格放线菌(*Actinomyces georgiae*)、戈氏放线菌(*Actinomyces gerencseriae*)、墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzi*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、约翰逊放线菌(*Actinomyces johnsonii*)、麦尔放线菌(*Actinomyces meyeri*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、口腔放线菌(*Actinomyces oris*)、图列茨放线菌(*Actinomyces turicensis*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)、灰色拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella rava*)、坦纳拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella tannerae*)、异斯卡多维亚菌(*Alloscardovia omnicolens*)、厌氧双球状菌(*Anaeroglobus geminatus*)、极小阿托波氏菌(*Atopobium parvulum*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、青春双歧杆菌

(*Bifidobacterium adolescentis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、短小双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、简明弯曲杆菌(*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌(*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌(*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、疾病卡托氏菌(*Catonella morbi*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、产气柯林斯菌(*Collinsella aerofaciens*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、硬棒杆菌(*Corynebacterium durum*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、假白喉棒杆菌(*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*)、假结核棒杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、肾棒杆菌(*Corynebacterium renale*)、纹带棒杆菌(*Corynebacterium striatum*)、结膜干燥棒杆菌(*Corynebacterium xerosis*)、贝纳柯克斯体(*Coxiella burnetii*)、变短隐藏杆菌(*Cryptobacterium curtum*)、纤细弯钩菌(*Curvibacter delicatus*)、难见戴阿利斯特杆菌(*Dialister invisus*)、微好气戴阿利斯特菌(*Dialister micraerophilus*)、侵肺戴阿利斯特杆菌(*Dialister pneumosintes*)、缓慢爱格士氏菌(*Eggerthella lenta*)、嗜蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)、脑膜败血伊丽莎白金菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、暗沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、鸟肠球菌(*Enterococcus avium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、尿肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、短真杆菌(*Eubacterium brachy*)、娇弱真杆菌(*Eubacterium infirmum*)、粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)、细小真杆菌(*Eubacterium minutum*)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌(*Eubacterium saphenum*)、沟迹真杆菌(*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌(*Filifactor alocis*)、苛求依赖杆菌(*Fretibacterium fastidiosum*)、坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*)、具核梭杆菌具核亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*)、具核梭杆菌多形亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*)、具核梭杆菌文森亚种(*Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*)、牙周梭杆菌(*Fusobacterium periodonticum*)、猴梭杆菌(*Fusobacterium simiae*)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)、血孪生球菌(*Gemella sanguinis*)、毗邻颗粒链球菌(*Granulicatella adiacens*)、貂鲸颗粒链球菌(*Granulicatella balaenopterae*)、细长颗粒链球菌(*Granulicatella elegans*)、杜克雷氏嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、溶血性嗜血杆菌(*Haemophilus haemolyticus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、反硝化金氏菌(*Kingella denitrificans*)、金氏金氏菌

(*Kingella kingae*)、口腔金氏菌(*Kingella oralis*)、产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、口腔毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum orale*)、砂毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum saburreum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、布赫内氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、类干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、路氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、奇异口动菌(*Lautropia mirabilis*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、口腔纤毛菌(*Leptotrichia buccalis*)、纤毛菌属OT 215种(*Leptotrichia* sp.OT 215)、纤毛菌属OT 417种(*Leptotrichia* sp.OT 417)、纤毛菌属OT 462种(*Leptotrichia* sp.OT 462)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、微核巨球形菌(*Megasphaera micronuciformis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、分生艰难杆菌(*Mogibacterium diversum*)、难养艰难杆菌(*Mogibacterium neglectum*)、短小艰难杆菌(*Mogibacterium pumilum*)、胆怯艰难杆菌(*Mogibacterium timidum*)、弱小艰难杆菌(*Mogibacterium vescum*)、黏膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、结膜炎莫拉氏菌(*Moraxella lacunata*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)、偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、戈登分枝杆菌(*Mycobacterium gordonae*)、嗜血分枝杆菌(*Mycobacterium haemophilum*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、海鱼分支杆菌(*Mycobacterium marinum*)、斯氏分枝杆菌(*Mycobacterium szulgai*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、蟾蜍分枝杆菌(*Mycobacterium xenopi*)、生殖道支原体(*Mycoplasma genitalium*)、人型支原体(*Mycoplasma hominis*)、口腔支原体(*Mycoplasma orale*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、唾液支原体(*Mycoplasma salivarium*)、长奈瑟氏菌(*Neisseria elongata*)、黄色奈瑟氏菌(*Neisseria flava*)、浅黄奈瑟氏菌(*Neisseria flavescens*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、粘液奈瑟氏菌(*Neisseria mucosa*)、干燥奈瑟氏菌(*Neisseria sicca*)、微黄奈瑟氏菌(*Neisseria subflava*)、星形诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)、巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)、皮疽诺卡氏菌(*Nocardia farcinica*)、新星诺卡氏菌(*Nocardia nova*)、齿龈欧氏菌(*Olsenella uli*)、不解糖口腔菌(*Oribacterium asaccharolyticum*)、短小口腔菌(*Oribacterium parvum*)、居齿类斯卡多维亚氏菌(*Parascardovia denticolens*)、微小微单胞菌(*Parvimonas micra*)、口炎消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌(*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌(*Porphyromonas pasteri*)、齿普雷沃氏菌(*Prevotella dentalis*)、栖牙普雷沃氏菌(*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌(*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌(*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌(*Prevotella*

loescheii)、产黑素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌(*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃氏菌(*Prevotella oralis*)、口普雷沃氏菌(*Prevotella oris*)、苍白普雷沃氏菌(*Prevotella pallens*)、唾液普雷沃氏菌(*Prevotella salivae*)、赛赫普雷沃氏菌(*Prevotella shahii*)、真口腔普雷沃氏菌(*Prevotella veroralis*)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*(*Cutibacterium acnes*))、颗粒丙酸杆菌(*Propionibacterium granulosum*(*Cutibacterium granulosum*))、丙酸丙酸杆菌(*Propionibacterium propionicus*(*Pseudopropionibacterium propionicum*))、奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、司氏普罗菲登斯菌(*Providencia stuartii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、非解乳糖假支杆菌(*Pseudoramibacter alactolyticus*)、皮氏罗尔斯顿菌(*Ralstonia pickettii*)、空间罗氏菌(*Rothia aerea*)、龋齿罗氏菌(*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌(*Rothia mucilaginosa*)、异形斯卡多维亚菌(*Scardovia inopinata*)、水生施莱格尔氏菌(*Schlegelella aquatica*)、白蚁塞巴鲁德菌(*Sebaldella termitidis*)、福氏月形单胞菌(*Selenomonas flueggei*)、有害月形单胞菌(*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌OT 478种(*Selenomonas* sp.OT 478)、生痰月形单胞菌(*Selenomonas sputigena*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、米氏西蒙斯氏菌(*Simonsiella muelleri*)、弱生斯奈克氏菌(*Slackia exigua*)、莫雷索拉杆菌(*Solobacterium moorei*)、SR1 OT 345种、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎链球菌(*Streptococcus anginosus*)、澳大利亚链球菌(*Streptococcus australis*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、峭链球菌(*Streptococcus cristatus*)、牙菌链球菌(*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、婴儿链球菌(*Streptococcus infantis*)、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、米勒链球菌(*Streptococcus milleri*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)、副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)、远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、虎链球菌(*Streptococcus tigurinus*)、前庭链球菌(*Streptococcus vestibularis*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、解卵磷脂密螺旋体(*Treponema lecithinolyticum*)、媒介密螺旋体(*Treponema medium*)、梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*)、索氏密螺旋体(*Treponema socranskii*)、文氏密螺旋体(*Treponema vincentii*)、解脲尿支原体(*Ureaplasma urealyticum*)、非典型韦荣球菌(*Veillonella atypica*)、殊异韦荣球菌(*Veillonella dispar*)、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)和罗戈沙韦荣球菌(*Veillonella rogosa*)等细菌的rRNA基因为目标核酸,更优选以墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzi*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、伴放线聚杆菌

(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、灰色拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella rava*)、拟普雷沃氏菌OT 308种(*Alloprevotella* sp.OT 308)、简明弯曲杆菌(*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌(*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌(*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、啮蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)、暗沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌(*Eubacterium saphenum*)、沟迹真杆菌(*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌(*Filifactor alocis*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*animalis*)、具核梭杆菌多形亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*polymorphum*)、具核梭杆菌文森亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*vincentii*)、牙周梭杆菌(*Fusobacterium periodonticum*)、血孪生球菌(*Gemella sanguinis*)、毗邻颗粒链球菌(*Granulicatella adiacens*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、纤毛菌属OT 215种(*Leptotrichia* sp.OT 215)、纤毛菌属OT 417种(*Leptotrichia* sp.OT 417)、纤毛菌属OT 462种(*Leptotrichia* sp.OT 462)、微核巨球形菌(*Megasphaera micronuciformis*)、浅黄奈瑟氏菌(*Neisseria flavescens*)、微小微单胞菌(*Parvimonas micra*)、口炎消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌(*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌(*Porphyromonas pasteri*)、栖牙普雷沃氏菌(*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌(*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌(*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌(*Prevotella loescheii*)、产黑素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌(*Prevotella nigrescens*)、苍白普雷沃氏菌(*Prevotella pallens*)、赛赫普雷沃氏菌(*Prevotella shahii*)、普雷沃氏菌OT 306种(*Prevotella* sp.OT 306)、普雷沃氏菌OT 313种(*Prevotella* sp.OT 313)、真口腔普雷沃氏菌(*Prevotella veroralis*)、龋齿罗氏菌(*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌(*Rothia mucilaginosa*)、有害月形单胞菌(*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌OT 478种(*Selenomonas* sp.OT 478)、生痰月形单胞菌(*Selenomonas sputigena*)、莫雷索拉杆菌(*Solobacterium moorei*)、SR1 OT 345种、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、牙菌链球菌(*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、媒介密螺旋体

(*Treponema medium*)、索氏密螺旋体(*Treponema socranskii*)、非典型韦荣球菌(*Veillonella atypica*)、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)和罗戈沙韦荣球菌(*Veillonella rogosae*)的rRNA基因等为目标核酸,但不限于此。

[0098] (2) 绝对量

[0099] 本发明中目标核酸的绝对量意思是目标核酸的物质质量、拷贝数或重量。NGS的结果(读数)和DNA芯片的信号强度是相对定量值,因此虽然能够对各自的存在比或在试样间对值的大小进行比较,但不表示绝对量。

[0100] 2. 关于工序(a)

[0101] (1) 试样

[0102] 本发明方法包括(a)将试样和已知量的对照核酸混合的工序(图4A)。

[0103] 本发明中的试样只要含有核酸即可,没有特别限制。对于试样,可以使用例如食品饮料、生物试样、环境试样和来自工业过程的试样等。

[0104] 作为食品饮料,可列举例如天然来源的食品和饮用水、加工食品、加工饮料等,但不限于此。

[0105] 作为生物试样没有限定,可列举例如从真核生物(例如哺乳动物、鸟类、植物等)得到的(例如采集的)组织、细胞、体液、牙菌斑(牙垢)、粪便等。作为哺乳动物,可列举例如小鼠、大鼠、兔子、狗、猴子、人,但不限于此。作为组织,只要是从各种器官得到的组织即可,没有限定,可列举例如皮肤组织、口腔组织、粘膜组织、肠道组织、癌组织等。作为细胞,只要是这些组织来源的细胞即可,没有限定,可列举例如口腔组织来源的细胞、粘膜组织来源的细胞、皮肤来源的细胞等。作为体液没有限定,可列举例如唾液、牙龈沟渗出液(GCF)、血液、尿、母乳、羊水等。

[0106] 作为环境试样,可列举例如土壤、河水、海水、温泉水等。

[0107] 作为来自工业过程的试样,可列举例如活性污泥等。

[0108] 作为其他试样,可列举使人工微生物增殖而得的培养物,可列举例如发酵罐培养物。

[0109] 一个方式中,本发明中的试样为选自由活性污泥、土壤、河水、海水、温泉水、饮用水、加工食品、发酵罐培养物、以及从真核生物采集的组织、细胞和体液组成的组的至少一种。

[0110] 此外,在另一方式中,本发明中的试样为选自由从哺乳动物采集的、唾液、牙菌斑、牙龈沟渗出液(GCF)、粪便和皮肤来源试样组成的组的至少一种。

[0111] 本发明中,作为“试样”,除了上述例示的试样以外,还可以使用从上述例示的试样提取的核酸和含有提取的核酸的组合物。

[0112] 本发明中从试样提取核酸的方法没有限定,可以使用公知的方法。可列举例如利用市售的核酸提取试剂盒的方法、用蛋白酶K处理后进行苯酚-氯仿提取的方法等。提取细菌DNA的情况下,还包括溶菌处理。作为溶菌处理,可列举例如酶处理、加热处理、珠子破碎等。此外,也可以将试样的悬浊液直接用于扩增反应。

[0113] 本发明的试样中可以含有2种以上目标核酸。关于试样所含目标核酸的种数没有特别的上限,可以根据评价目的适当选择。

[0114] (2) 对照核酸

[0115] 本发明中对照核酸是通过反应前在扩增反应液中添加已知量而作为目标核酸等的定量对照的核酸。

[0116] 通过对照核酸的添加,能够根据全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组(以下也将“与目标核酸一并扩增的特定核酸组”称为“特定核酸组”)的扩增后的量的指标来确定扩增前的量。例如使用PCR法扩增的情况下,利用竞争性PCR法的原理,得到依赖于扩增前的量的量的指标。

[0117] 对照核酸优选为不对获得目标核酸的量的指标、目标核酸和特定核酸组的合计量的指标产生影响的序列,例如获得量的指标的方法为DNA芯片的情况下,优选为不会与针对目标核酸以及目标核酸和特定核酸组的探针非特异性杂交的序列,更具体地,优选为与针对目标核酸以及目标核酸和特定核酸组的探针的互补序列的同一性、相似性低的特异性序列。

[0118] 对照核酸必须含有扩增所需的部位。例如使用PCR法扩增的情况下,前述“扩增所需的部位”为引物结合部位。此时,引物结合部位的碱基序列可以与目标核酸的引物结合部位的碱基序列相同,也可以不同。

[0119] 虽然使对照核酸的扩增效率与目标核酸和特定核酸组相同是困难的,但另一方面,认为如果扩增效率极端不同则会对定量产生影响,因而优选两者的扩增效率尽量接近。为了使对照核酸与目标核酸和特定核酸组的扩增效率尽量接近,优选对照核酸的碱基长度与由目标核酸和特定核酸组扩增的部位的碱基长度的差别不大。例如,如果目标核酸和特定核酸组来源的扩增产物为500bp左右,则对照核酸的扩增产物优选为300bp至1000bp左右。

[0120] 关于对照核酸的碱基序列,作为设计方法,可列举随机生成碱基序列的方法、使用与目标核酸和特定核酸组的碱基序列具有部分同源性的序列的方法等。本发明中,特别优选随机生成碱基序列的方法。这是因为,在来源于人的试样中的菌群那样的、目标核酸的碱基序列多样性高且相互的相似性也高的试样中,随机设计时,例如在DNA芯片的情况下能够抑制非特异性杂交对定量的影响的可能性更高。

[0121] 对照核酸的设计例如可以使用Microsoft公司的软件“EXCEL”的RANDBETWEEN函数,随机产生X个(X为任意的数)1至4的整数,与之对应地,设为仅由1至4的数值构成的X位的数值,将1替换为A、将2替换为T、将3替换为C、将4替换为G,从而得到多个由ATGC的X个碱基组成的随机序列。基于这些序列,仅选取G和C的和与A和T的和为同一数字的序列,用选取的序列在NCBI的GenBank等数据库中进行Blast检索,选择类似序列少的序列,例如通过PCR法扩增的情况下,可以通过在序列的两个末端添加扩增所需的部位来进行设计。此时添加的扩增所需的部位例如可以是与上述同样地随机设计的序列,也可以与目标核酸的引物结合部位的序列相同。此外,还可以将设计的序列适当连接而延长或者部分除去而缩短。

[0122] 本发明中使用的对照核酸的种数没有限定,从简便性的观点出发,优选其数量尽可能少,例如为1种。

[0123] (3) 混合

[0124] 工序(a)中,在将试样与对照核酸“混合”时,包括在试样中添加对照核酸或在含有对照核酸的组合物中添加试样。

[0125] 3. 关于工序(b)

[0126] (1) 与目标核酸一并扩增的特定核酸组

[0127] 本发明方法包括使试样中全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组以及对照核酸共同扩增的工序(工序(b)) (图4B)。

[0128] 本发明中,“全部目标核酸”意思是试样或扩增产物所含多种目标核酸的总和(全部)。

[0129] 本发明中,试样中可以含有测定对象的细菌的基因组DNA、非测定对象的细菌的基因组DNA和/或其他核酸(图4A)。而且,该试样所含的非测定对象的细菌的基因组DNA含有相比于全部目标核酸(例如16SrRNA基因)的碱基序列的一部分而言共同的碱基序列(共有序列)的情况下,如果对该试样或提取的核酸中全部目标核酸(例如16SrRNA基因)进行扩增,则非测定对象的细菌的基因组DNA中16SrRNA基因也一并扩增(图4B)。本发明中,将以这种方式与全部目标核酸一并(同时)扩增的目标核酸以外的核酸组称为“与目标核酸一并扩增的特定核酸组”或“特定核酸组”。

[0130] 此外,例如,在含有作为测定对象的mRNA和非测定对象的mRNA的试样中以作为测定对象的mRNA为目标核酸的情况下,作为扩增方法,可以选择利用多聚A序列的逆转录后的体外(In vitro)转录。这种情况下,非测定对象的mRNA也一并获得,该mRNA也相当于“与目标核酸一并扩增的特定核酸组”或“特定核酸组”。

[0131] 即,本发明中,“与目标核酸一并扩增的特定核酸组”(也称为“特定核酸组”)是指除了目标核酸以外,与试样中全部目标核酸的扩增同时一并扩增的核酸的组。

[0132] 如上所述,试样中的全部目标核酸和特定核酸组均为同时一并扩增的核酸。因此,本发明中,“全部目标核酸和特定核酸组”可以理解为含有共同的序列的归拢到一起的核酸的组。此外,本发明中,有时将全部目标核酸和特定核酸组加起来的量称为“全部目标核酸和特定核酸组的合计”。

[0133] (2) 共同扩增

[0134] 本发明中,“共同扩增”意思是在同一核酸扩增反应体系中一起扩增。

[0135] 本发明中,核酸的扩增方法没有限定,可以使用公知的方法。例如目标为DNA的情况下,可列举PCR法、LAMP(环介导等温扩增)法等,目标为RNA的情况下,可列举逆转录后的体外(In vitro)转录、PCR法。特别优选利用PCR法。使用DNA芯片的情况下,例如通过预先对引物进行荧光标记,得到作为信号强度的量的指标。

[0136] 例如通过PCR法扩增细菌的16SrRNA基因的情况下,可以在反应液中来自试样的提取DNA量为1pg~10ng、对照核酸的浓度为0.0001~1pM、引物各自的浓度为0.01~10μM、总液量为1~100μL的条件下进行。可以更优选在反应液中的来自试样来源的提取DNA量为50pg~200pg、对照核酸的浓度为0.01~0.05pM、引物各自的浓度为0.1~2μM、总液量为20μL的条件下进行。这种情况下,例如循环数可以按10~50次来进行。可以更优选将循环数按15~40次来进行。这里使用的DNA聚合酶没有特别限制,可以利用市售的耐热性DNA聚合酶。此外,温度、时间、缓冲液的组成等也没有特别限制,可以考虑到所使用的DNA聚合酶和目标核酸的扩增区域的大小等适当设定。本发明的定量方法中,使用市售的DNA聚合酶的情况下,DNA聚合酶的反应时间优选设为操作说明书等记载的推荐时间以上的充分的反应时间。具体地,各步骤的扩增反应时间优选为操作说明书等中推荐作为所用DNA聚合酶的反应时间的1.2倍以上3倍以下。进一步,可以根据需要在最终延伸步骤中将所谓最终延伸

设为5~15分钟。如此操作,使目标核酸等的全长均匀扩增。

[0137] 以菌数的测定为目的、对rRNA基因进行定量的情况下,rRNA基因在1个基因组中存在多个拷贝,因而为了获得菌数,将定量值除以1个基因组内的拷贝数(除法)即可。1个基因组内的rRNA基因的拷贝数根据菌种的不同而不同,其值可以使用公知的信息(例如Genbank)。

[0138] 本发明中使用DNA芯片的情况下,共同扩增的工序可以包括使扩增后的核酸在与搭载于DNA芯片的探针杂交的单链(1条链)上进行富集(enrichment)的工序。在本发明人等的研究中第一次发现,本发明的定量方法中,相比于双链DNA,与单链DNA杂交不仅灵敏度提高,而且其精度也提高。

[0139] 作为在单链上进行富集的工序,例如可以作为本发明方法中的共同扩增的反应条件而使用在单链上进行富集的扩增反应条件,也可以在共同扩增的反应后进一步包括在单链上进行富集的处理。

[0140] 在单链上进行富集的扩增反应条件例如可列举所谓形成非对称PCR的条件。作为形成非对称PCR的条件,具体地,可以在PCR中使用的一组引物间,单独或组合采用改变浓度、在熔点中产生差别、在碱基长度中产生差别等条件。进一步,可以调整PCR反应组合物中影响核酸熔点的化合物(例如盐、dNTP、寡聚核苷酸、变性剂)的浓度,形成更有效的向单链富集的条件。此外,也可以在非对称PCR中,在PCR反应中途补加单方的引物,或者改变退火条件(温度或反应液中的化合物浓度)。

[0141] 作为在共同扩增的反应后在单链上进行富集的处理,例如可列举使共同扩增后的双链DNA在单链DNA上物理分离的方法(例如变性高速液相色谱等)和化学方法(例如 λ 核酸外切酶处理)。本发明中,虽然没有特别限定,但从其操作性方面出发,优选利用 λ 核酸外切酶(酶编号(Enzyme Commission numbers):EC 3.1.11.3)处理的方法。

[0142] 实施该处理工序的情况下,作为工序(b)的共同扩增中使用的引物对中的一方的引物,有必要使用5'末端经磷酸化的引物。 λ 核酸外切酶反应时,含有扩增片段、缓冲液和酶等的反应液组成、反应温度、反应时间和酶失活条件等反应条件没有特别限定,例如可以按照市售 λ 核酸外切酶的推荐条件适当设定。此外,也可以不对工序(b)的共同扩增反应后的产物实施纯化工序,直接进行 λ 核酸外切酶处理。

[0143] 4.关于工序(c)

[0144] 本发明包括根据扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标以及扩增的对照核酸的量的指标确定试样中全部目标核酸和特定核酸组的合计量的工序(工序(c))(图4C)。这里,“扩增的全部目标核酸和特定核酸组”、以及“扩增的对照核酸”分别是指上述共同扩增的扩增产物中,全部目标核酸和特定核酸组来源的扩增产物、以及对照核酸来源的扩增产物。

[0145] 该工序优选包括预先使用目标核酸的一部分或全部和特定核酸组以及对照核酸,针对目标核酸的一部分或全部和特定核酸组的合计以及对照核酸的扩增前的量与扩增后的量的指标之间的关系制作校正曲线的工序(工序(c1))。这是因为,全部目标核酸和特定核酸组的合计量与对照核酸的量之间的关系在两者扩增效率不同时在扩增前后会发生变化。

[0146] 专利文献1中,对于相当于细菌16SrRNA基因和对照核酸的核酸,将扩增后的量的

指标之比视为扩增前的量之比或与之成比例的值进行分析。但是,能够这样操作的是两者扩增效率相同的情况。此外,虽然对照核酸使用人工设计的序列,但是难以使其扩增效率与全部目标核酸的扩增效率相同,前述扩增后的量的指标之比相当于扩增前的量之比的假设不成立的可能性很高。

[0147] 本发明中,通过预先得到校正曲线、以此为基础确定全部目标核酸和特定核酸组的合计量,能够实现准确的定量。

[0148] 这里,量的指标例如如果是DNA芯片则为对应探针的信号强度,例如如果是NGS则为对应序列的读数。

[0149] 本发明中,校正曲线制作中使用的核酸可以使用目标核酸的一部分或全部和特定核酸组。以下,将校正曲线的制作中使用的“目标核酸的一部分或全部和特定核酸组”称为“校正用核酸”。

[0150] 本发明中,作为校正用核酸,例如在目标核酸为2种以上特定细菌16SrRNA基因、且特定核酸组为细菌16SrRNA基因的情况下,可以使用在某单一细菌的基因组DNA中作为部分序列包含的16SrRNA基因、或在多个细菌的基因组DNA的混合物中作为部分序列包含的16SrRNA基因。也可以对于这些细菌16SrRNA基因的全长或含有扩增部位的部分序列,获取公知的序列信息,使用该序列的合成核酸作为校正曲线核酸。这里,细菌可以从具有作为目标核酸的16SrRNA基因的细菌选择,也可以从除此之外的细菌选择。或者也可以从这两者选择。即,本发明中,在校正曲线的制作中,没有必要使用可作为目标核酸的全部核酸,可以使用目标核酸的部分种类和/或特定核酸组。因此,试样中目标核酸为多种的情况下,可以省略使用它们中的全部来制作校正曲线的操作,成为了简便的方法。

[0151] 校正曲线的制作中,校正用核酸的浓度条件优选在包括假定于试样中所含的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的范围内进行。例如在唾液中的16SrRNA基因的测定中,以在扩增反应液中含有100pg从唾液提取的DNA的方式进行试样的测定的情况下,可以推定假设100pg全部为细菌基因组DNA时16SrRNA基因的物质质量。例如,对于唾液中的细菌,将基因组的分子量的平均值设为 2.2×10^6 、将1个基因组内16SrRNA的拷贝数的平均值设为4.5,则100pg细菌基因组DNA中16SrRNA基因的物质质量推测为0.31amol左右。这里,上述推定中使用的唾液中细菌基因组的分子量的平均值和1个基因组内16SrRNA的拷贝数的平均值是本发明人等从Oral Dis.21,748-54 (2015) 中报道的健康人唾液中菌的组成数据的平均值和各菌的信息推算的值。

[0152] 此外,根据Microbiome 6,42 (2018) (<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0426-3>),从唾液提取的DNA中86%~97%左右是人基因组DNA,即,推测细菌来源DNA为3%~14%左右。因此,可以以包括其的方式确定校正曲线制作中反应液中的校正用核酸的浓度条件。校正曲线制作有必要在至少2种条件以上的浓度条件下进行,此时最大的浓度条件例如在扩增反应液量为20μL时可以设为从0.050pM~500pM选择的浓度条件。可以更优选设为从0.050pM~50pM选择的浓度条件。此外,最小的浓度条件例如在扩增反应液量为20μL时可以设为从0.10aM~0.10fM选择的浓度条件。可以更优选设为从0.010fM~0.10fM选择的浓度条件。

[0153] 特别优选校正曲线表示[(目标核酸的一部分或全部和特定核酸组的合计量的指标)相对于(扩增后的对照核酸的量的指标)之比]与[(目标核酸的一部分或全部和特定核

酸组的合计量)相对于(扩增前的对照核酸的量)之比]之间的关系。可以对它们之间的关系进行回归分析,作为校正曲线使用。最简单的方法是直线回归,也可以使用采用其他非线性模型的非线性回归。假设对照核酸与目标核酸的一部分或全部和特定核酸组的合计的扩增效率相同,该关系式用一次函数表示。但实际上,多数情况下扩增效率是不同的。这种情况下,为曲线性关系,例如取两个对数时,可以用一次函数来近似。

[0154] 即,将扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标设为 I_T 、将对照核酸的量的指标设为 I_C 、将扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量设为 C_T 、将扩增前的对照核酸的量设为 C_C ,则这些值的关系可以用下式近似。

[0155] $\log_{10}(I_T \div I_C) = a \times \log_{10}(C_T \div C_C) + b \cdots$ (式1)

[0156] 该系数 a 和 b 可以根据校正曲线制作用的实验数据用例如Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数求出。

[0157] 或者,也可以制作Sigmoid那样的非线性回归的校正曲线。例如,使用PCR法作为扩增反应的情况下,对于扩增的饱和状态,全部目标核酸和特定核酸组的合计与对照核酸之间部分分别发生的机制、以及体系的核酸整体发生的机制两者都起作用。由于它们的组合,[(目标核酸的一部分或全部和特定核酸组的合计量的指标)相对于(扩增后的对照核酸的量的指标)之比]相对于[(目标核酸的一部分或全部和特定核酸组的合计量)相对于(扩增前的对照核酸的量)之比]的变化并非是单调变化的。这种情况下,通过使用非线性的校正曲线,可以在更宽的浓度范围内实现高精度的定量。

[0158] 只要是一般的采用Sigmoid那样的曲线的函数即可,没有特别限制,例如将扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标设为 I_T 、将对照核酸的量的指标设为 I_C 、将扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量设为 C_T 、将扩增前的对照核酸的量设为 C_C ,则这些值的关系可以用下式近似。

[0159] $\log_{10}(I_T \div I_C) = b \times (\log_{10}(C_T \div C_C) - c) \div (a - |\log_{10}(C_T \div C_C) - c|) \cdots$ (式2)

[0160] 该系数 a 和 b 、 c 可以根据校正曲线制作用的实验数据使用例如Microsoft公司的软件“EXCEL”的“Solver”功能进行回归而求出。

[0161] 下面给出本说明书中使用的标号的说明。

[0162] I_T : 扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标 (Intensity, Total bacteria)

[0163] I_C : 扩增的对照核酸的量的指标 (Intensity, Control)

[0164] C_T : 扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量 (Concentration, Total bacteria)

[0165] C_C : 扩增前的对照核酸的量 (Concentration, Control)

[0166] C_{TM} : 扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的测定值 (Concentration, Total bacteria, Measurement)

[0167] I_{TM} : 扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标的测定值 (Intensity, Total bacteria, Measurement)

[0168] I_{CM} : 扩增的对照核酸的量的指标的测定值 (Intensity, Control, Measurement)

[0169] I_{US} : 各个目标核酸 S 来源的探针(x)的信号强度 (Intensity, Unique, Species) ($S=A, B, \cdots$)

[0170] I_{TS} :各个目标核酸S来源的探针(y)的信号强度(Intensity, Total bacteria, Species) (S=A,B,...)

[0171] E_S :各个目标核酸S的系数(Efficiency, Species) (S=A,B,...)

[0172] I_{TSM} :各个目标核酸S来源的探针(y)的信号强度所对应的值的测定值(Intensity, Total bacteria, Species, Measurement) (S=A,B,...)

[0173] I_{USM} :对应于各个目标核酸S的探针(x)的信号强度的测定值(Intensity, Unique, Species, Measurement) (S=A,B,...)

[0174] R_S :各个目标核酸S的占有率(Rate, Species) (S=A,B,...)

[0175] 本发明中,工序(c)优选包括:使从试样扩增的全部目标核酸和与目标核酸一并扩增的特定核酸组的合计量的指标以及对照核酸的量的指标与前工序中制作的校正曲线对应,算出试样中全部目标核酸和前述特定核酸组的合计量的工序(工序(c2))。

[0176] 该工序中,例如如果将从试样扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标设为 I_{TM} 、将对照核酸的量的指标设为 I_{CM} ,与上述制作的校正曲线(式1)对应,则扩增前(即试样中)的全部目标核酸和特定核酸组的合计量 C_{TM} 可以用下式算出。

[0177] $C_{TM} = C_C \times 10^{\left((\log_{10}(I_{TM} \div I_{CM}) - b) \div a \right) \cdots}$ (式3)

[0178] 关于Sigmoid那样的校正曲线,也对应于该近似式,因此能够同样地算出。例如,如果将扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标设为 I_{TM} 、将对照核酸的量的指标设为 I_{CM} ,对应于上述制作的校正曲线(式2),则扩增前(即试样中)的全部目标核酸和特定核酸组的合计量 C_{TM} 可以用下式算出。

[0179] $C_{TM} = C_C \times 10^{(a \times \log_{10}(I_{TM} \div I_{CM}) \div (b + |\log_{10}(I_{TM} \div I_{CM})|) + c)}$ (式4)

[0180] 5.关于工序(d)

[0181] 本发明包括从扩增的全部目标核酸和特定核酸组的合计量的指标和扩增的各个目标核酸的量的指标算出各个目标核酸在全部目标核酸和特定核酸组的合计中的占有率、从该占有率算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序(工序(d)) (图4D)。

[0182] 本发明中,“各个目标核酸”意思是试样中或扩增产物中所含多种目标核酸中的每一个。

[0183] 该工序中,通过用工序(c)中得到的全部目标核酸和特定核酸组的合计的绝对量乘以该占有率,能够确定试样中各个目标核酸的绝对量。

[0184] 本发明的特征在于,分为求出全部目标核酸和特定核酸组的合计量的工序和求出各个目标核酸的占有率的工序。本发明中,各个目标核酸在全部目标核酸和特定核酸组的合计中的占有率例如在量的指标为NGS读数的情况下是各个目标核酸的扩增产物的读数相对于全部目标核酸和特定核酸组的扩增产物的读数的比例。

[0185] 本发明中使用DNA芯片的情况下,量的指标为以下的探针(x)~(z)的信号强度。

[0186] (x)与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针

[0187] (y)与试样中全部目标核酸和特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针

[0188] (z)与对照核酸的扩增产物杂交的探针

[0189] 这里,探针(x)优选为与目标核酸各自的扩增产物特异性杂交的探针。

[0190] 关于DNA芯片的详细说明如后所述。

[0191] 工序(d)中,占有率的算出优选通过以下所示工序(d1)~(d3)来进行。

[0192] (d1) 预先对于2种以上目标核酸中的每一个(各个目标核酸)与DNA芯片进行杂交,算出与各个目标核酸杂交的探针(x)与探针(y)的信号强度的关系式的工序,

[0193] (d2) 根据上述(d1)中算出的关系式将使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针(x)的信号强度转换为与各个目标核酸杂交的探针(y)的信号强度所对应的值的工序,以及

[0194] (d3) 算出上述(d2)中算出的探针(y)的信号强度所对应的值相对于使从试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的探针(y)的信号强度的比例的工序。

[0195] 这里,工序(d1)中使用的目标核酸例如可以是人工合成的,也可以是生物来源的核酸、例如如果是细菌基因组DNA则为从分离的菌中提取的核酸。

[0196] DNA芯片中,即使杂交的核酸的量相同,如果探针的种类不同,则由于杂交效率或各项条件的不同,信号强度也会产生不同。即,为了从探针(x)和探针(y)的信号强度求出各个目标核酸在全部目标核酸和特定核酸组的合计中的占有率,有必要将探针(x)的信号强度换算为探针(y)的信号强度所对应的值(工序(d2))。为此,上述(d1)的工序中,有必要预先得到探针(x)与探针(y)的信号强度的关系式。该关系式可以从实验中适当确定,例如可以按比例关系进行近似。

[0197] 即,将与单一目标核酸S(S为各个目标核酸的种类的索引)杂交的探针(x)的信号强度设为 I_{US} 、将探针(y)的信号强度设为 I_{TS} ,则 I_{US} 与 I_{TS} 的关系例如可以用下式近似。

[0198] $I_{TS} = E_S \times I_{US} \cdots$ (式5)

[0199] 该系数 E_S 可以根据工序(d1)中得到的各自的探针的信号例如使用Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数求出。

[0200] 此时,将使由试样扩增的产物与DNA芯片杂交而得到的针对各个目标核酸S的探针(x)的信号强度设为 I_{USM} 、探针(y)的信号强度设为 I_{TM} ,则工序(d2)中求出的各个目标核酸来源的探针(y)的信号强度所对应的值 I_{TSM} 用下式表示。

[0201] $I_{TSM} = E_S \times I_{USM} \cdots$ (式6)

[0202] 进一步,此时,各个目标核酸S的占有率 R_S 可以使用下式算出(工序(d3))。

[0203] $R_S = I_{TSM} \div I_{TM} \cdots$ (式7)

[0204] 本发明中,工序(d)进一步包括用工序(c)中算出的试样中全部目标核酸和特定核酸组的合计量乘以工序(d3)中算出的占有率,算出试样中各个目标核酸的绝对量的工序(工序(d4))。

[0205] 该工序中,通过用工序(d3)中算出的占有率乘以工序(c)中算出的核酸组的量,能够算出试样中各个目标核酸的绝对量。

[0206] 6. DNA芯片

[0207] 本发明中,DNA芯片只要是探针以独立且能够确定位置的方式固定即可,对于任何器件也没有限定,菌群分析中要求宽的动态范围,因而与简单地将探针固定在平面基板上相比,探针固定量多的阵列是更合适的。作为这样的DNA芯片,可特别列举借助凝胶将探针三维固定的纤维型DNA芯片。

[0208] 关于DNA芯片,其支撑体的形态没有特别限定,平板、棒状、珠子等任一形态均可使用。使用平板作为支撑体的情况下,可以在该平板上隔开规定间隔按种类固定规定探针(点样法等,参照Science 270,467-470(1995)等)。此外,也可以在平板上的特定位置按种类依

次合成规定探针(光刻法等,参照Science 251,767-773(1991)等)。

[0209] 作为其他优选支撑体的形态,可列举使用中空纤维的支撑体。使用中空纤维作为支撑体的情况下,可以优选列举按种类将寡核苷酸探针固定于各中空纤维,将全部中空纤维集束固定后,在纤维的长度方向上重复切割从而得到的器件。该器件可以作为将寡核苷酸探针固定在通孔基板的类型的器件来说明(参照日本特许第3510882号公报的图1等)。

[0210] 向支撑体固定探针的方法没有特别限定,为何种结合方式均可。此外,也不限定为直接固定于支撑体,例如,可以预先将支撑体用聚赖氨酸等聚合物涂覆处理,将探针固定于处理后的支撑体。进一步,使用中空纤维等管状体作为支撑体的情况下,也可以在管状体中保持凝胶状物,将探针固定在该凝胶状物中。

[0211] 7. 探针

[0212] 探针是通过杂交捕捉核酸的物质,可以使用与该捕捉对象核酸的特异性序列杂交的DNA。

[0213] 一般,使用一并搭载有多种探针的DNA芯片的情况下,为了将多种探针在相同条件下用于杂交反应,优选使探针间的杂交效率尽可能一致。由于这样的目的,探针有必要在设计时调整GC含量、序列长度,使 T_m 值在可能的范围内保持一定且一致。搭载于DNA芯片的探针的种类、数量没有特别限定。

[0214] 本发明中,探针的序列优选为由捕捉对象的特异性碱基序列的互补序列构成的序列。

[0215] 关于本发明中与2种以上目标核酸各自的扩增产物杂交的探针(前述探针(x)),例如,在捕捉木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzi*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、麦尔放线菌(*Actinomyces meyeri*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、图列茨放线菌(*Actinomyces turicensis*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、灰色拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella rava*)、拟普雷沃氏菌属 sp.OT 308(*Alloprevotella* sp.OT 308)、极小阿托波氏菌(*Atopobium parvulum*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、简明弯曲杆菌(*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌(*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌(*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、纹带棒杆菌(*Corynebacterium striatum*)、嗜蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、暗沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、暗沟肠杆菌泄殖腔亚种(*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*)、暗沟肠杆菌暗沟肠杆菌溶解亚种(*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*)、尿肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌(*Eubacterium*

saphenum)、沟迹真杆菌 (*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌 (*Filifactor alocis*)、坏死梭杆菌基形亚种 (*Fusobacterium necrophorum* subsp.funduliforme)、坏死梭杆菌坏死亚种 (*Fusobacterium necrophorum* subsp.necrophorum)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种 (*Fusobacterium nucleatum* subsp.animalis)、具核梭杆菌多形亚种 (*Fusobacterium nucleatum* subsp.polymorphum)、具核梭杆菌文森亚种 (*Fusobacterium nucleatum* subsp.vincentii)、牙周梭杆菌 (*Fusobacterium periodonticum*)、血孪生球菌 (*Gemella sanguinis*)、毗邻颗粒链球菌 (*Granulicatella adiacens*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae* subsp.pneumoniae)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、嗜肺军团菌费城嗜肺亚种费城株 (*Legionella pneumophila* subsp.pneumophila str.Philadelphia)、纤毛菌属OT 215种 (*Leptotrichia* sp.OT 215)、纤毛菌属OT 417种 (*Leptotrichia* sp.OT 417)、纤毛菌属OT 462种 (*Leptotrichia* sp.OT 462)、微核巨球形菌 (*Megasphaera micronuciformis*)、黏膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)、摩氏摩根氏菌 (*Morganella morganii*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、浅黄奈瑟氏菌 (*Neisseria flavescens*)、巴西诺卡氏菌 (*Nocardia brasiliensis*)、微小微单胞菌 (*Parvimonas micra*)、口炎消化链球菌 (*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌 (*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌 (*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌 (*Porphyromonas pasteri*)、齿普雷沃氏菌 (*Prevotella dentalis*)、栖牙普雷沃氏菌 (*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌 (*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌 (*Prevotella loescheii*)、产黑素普雷沃氏菌 (*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌 (*Prevotella nigrescens*)、口普雷沃氏菌 (*Prevotella oris*)、苍白普雷沃氏菌 (*Prevotella pallens*)、赛赫普雷沃氏菌 (*Prevotella shahii*)、真口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella veroralis*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*))、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、龋齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌 (*Rothia mucilaginosa*)、有害月形单胞菌 (*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌OT 478种 (*Selenomonas* sp.OT 478)、生痰月形单胞菌 (*Selenomonas sputigena*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、粘质沙雷氏菌粘质亚种 (*Serratia marcescens* subsp.marcescens)、莫雷索拉杆菌 (*Solobacterium moorei*)、SR1 OT345种、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎链球菌 (*Streptococcus anginosus*)、星座链球菌 (*Streptococcus constellatus*)、牙菌链球菌 (*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*)、中间链球菌 (*Streptococcus intermedius*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、变异链球菌

(*Streptococcus mutans*)、副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、媒介密螺旋体(*Treponema medium*)、索氏密螺旋体(*Treponema socranskii*)、非典型韦荣球菌(*Veillonella atypica*)、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)、罗戈沙韦荣球菌(*Veillonella rogosae*)、总链球菌属(*Streptococcus*属)的16SrRNA基因的情况下,优选为选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列。这种情况下,也可以是选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列的互补序列,还可以是与选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列或其互补序列实质上相同的序列。

[0216] 这里,实质上相同的序列是在严格条件下与选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列或互补序列杂交的序列。

[0217] 作为探针的长度,例如为13碱基以上、优选为15碱基以上、更优选为17碱基以上的序列。这里,严格条件意思是形成特异性杂交而不形成非特异性杂交的条件。即,严格条件是指一对具有高同源性(同源性或同一性为95%以上、优选96%以上、更优选97%以上、进一步优选98%以上、最优选为99%以上)的多核苷酸杂交的条件。

[0218] 本发明中,严格条件可以是低严格条件、中严格条件和高严格条件中的任一种。“低严格条件”例如是5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、32℃的条件。此外,“中严格条件”例如是5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、42℃的条件。“高严格条件”例如是5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5%SDS、50%甲酰胺、50℃的条件。这些条件中,可以期待温度越高越能有效捕捉具有高同源性的DNA。但作为影响杂交严格性的要素,可以考虑温度、探针浓度、探针的长度、离子强度、时间、盐浓度等多个要素,本领域技术人员可以适当选择这些要素从而实现同样的严格性。关于杂交法的详细步骤,可以参照《分子克隆实验手册(第四版)(Molecular Cloning, A Laboratory Manual (4th edition))》(冷泉港出版社(2012))等。

[0219] 此外,严格条件可以设定为本领域公知惯用的方法、例如Northern印迹法、点印记法、菌落杂交法、牙菌斑杂交法或Southern印迹杂交法等中采用的条件。

[0220] 本发明中,与全部目标核酸和特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针(前述探针(y))优选是全部目标核酸和特定核酸组所含序列的扩增产物共同含有的序列的互补序列。例如在捕捉细菌16SrRNA基因的情况下,探针可以是细菌16SrRNA基因的共有序列的一部分的互补链。作为此时的探针,可列举例如含有序列编号2所示碱基序列的探针。

[0221] 本发明中与对照核酸的扩增产物杂交的探针(前述探针(z))优选是对照核酸的扩增产物的一部分的互补序列。例如使用序列编号196所示碱基序列作为对照核酸的序列的情况下,作为探针,可列举含有序列编号1所示碱基序列的探针。

[0222] 8. 试剂盒

[0223] 本发明提供一种用于实现上述定量方法的试剂盒,包括用于通过PCR法对全部目标核酸和特定核酸组以及对照核酸进行共同扩增的1对或2对引物对、对照核酸、以及搭载有上述探针(x)~(z)的DNA芯片。

[0224] 例如,以木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、鲍曼不动杆菌

(*Acinetobacter baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、墓地放线菌(*Actinomyces graevenitzii*)、伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、麦尔放线菌(*Actinomyces meyeri*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、图列茨放线菌(*Actinomyces turicensis*)、粘液放线菌(*Actinomyces viscosus*)、伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、灰色拟普雷沃氏菌(*Alloprevotella rava*)、拟普雷沃氏菌属 sp.OT 308(*Alloprevotella* sp.OT 308)、极小阿托波氏菌(*Atopobium parvulum*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、简明弯曲杆菌(*Campylobacter concisus*)、细弯曲杆菌(*Campylobacter gracilis*)、直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)、昭和弯曲杆菌(*Campylobacter showae*)、牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、肺炎衣原体(*Chlamydophila* (*Chlamydia*) *pneumoniae*)、产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、纹带棒杆菌(*Corynebacterium striatum*)、啮蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、暗沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、暗沟肠杆菌泄殖腔亚种(*Enterobacter cloacae* subsp.*cloacae*)、暗沟肠杆菌暗沟肠杆菌溶解亚种(*Enterobacter cloacae* subsp.*dissolvens*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)、隐藏真杆菌(*Eubacterium saphenum*)、沟迹真杆菌(*Eubacterium sulci*)、龈沟产线菌(*Filifactor alocis*)、坏死梭杆菌基亚种(*Fusobacterium necrophorum* subsp.*funduliforme*)、坏死梭杆菌坏死亚种(*Fusobacterium necrophorum* subsp.*necrophorum*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、具核梭杆菌动物亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*animalis*)、具核梭杆菌多形亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*polymorphum*)、具核梭杆菌文森亚种(*Fusobacterium nucleatum* subsp.*vincentii*)、牙周梭杆菌(*Fusobacterium periodonticum*)、血孪生球菌(*Gemella sanguinis*)、毗邻颗粒链球菌(*Granulicatella adiacens*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* subsp.*pneumoniae*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、嗜肺军团菌费城嗜肺亚种费城株(*Legionella pneumophila* subsp.*pneumophila* str.*Philadelphia*)、纤毛菌属OT 215种(*Leptotrichia* sp.OT 215)、纤毛菌属OT 417种(*Leptotrichia* sp.OT 417)、纤毛菌属OT 462种(*Leptotrichia* sp.OT 462)、微核巨球形菌(*Megasphaera micronuciformis*)、黏膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、浅黄奈瑟氏菌(*Neisseria flavescens*)、巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)、微小微单胞菌(*Parvimonas micra*)、口炎消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)、卡氏卟啉单胞菌

(*Porphyromonas catoniae*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、狗齿龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、巴斯德卟啉单胞菌(*Porphyromonas pasteri*)、齿普雷沃氏菌(*Prevotella dentalis*)、栖牙普雷沃氏菌(*Prevotella denticola*)、栖组织普雷沃氏菌(*Prevotella histicola*)、中间普雷沃氏菌(*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃氏菌(*Prevotella loescheii*)、产黑素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogenica*)、变黑普雷沃氏菌(*Prevotella nigrescens*)、口普雷沃氏菌(*Prevotella oris*)、苍白普雷沃氏菌(*Prevotella pallens*)、赛赫普雷沃氏菌(*Prevotella shahii*)、真口腔普雷沃氏菌(*Prevotella veroralis*)、痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*))、奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、龋齿罗氏菌(*Rothia dentocariosa*)、黏液罗氏菌(*Rothia mucilaginosa*)、有害月形单胞菌(*Selenomonas noxia*)、月形单胞菌OT 478种(*Selenomonas sp.* OT 478)、生痰月形单胞菌(*Selenomonas sputigena*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、粘质沙雷氏菌粘质亚种(*Serratia marcescens subsp. marcescens*)、莫雷索拉杆菌(*Solobacterium moorei*)、SR1 OT345种、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎链球菌(*Streptococcus anginosus*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、牙菌链球菌(*Streptococcus dentisani*)、戈登氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、媒介密螺旋体(*Treponema medium*)、索氏密螺旋体(*Treponema socranskii*)、非典型韦荣球菌(*Veillonella atypica*)、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)、罗戈沙韦荣球菌(*Veillonella rogosae*)、总链球菌属(*Streptococcus*属)的16SrRNA基因为目标核酸的情况下,探针(x)为选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列。这种情况下,探针可以为选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列的互补序列,也可以为与选自由序列编号3~191所示碱基序列组成的组的序列或其互补序列实质上相同的序列。“实质上相同的序列”的意义如上所述。

[0225] 此外,本发明提供一种DNA芯片,其搭载有上述探针(x)~(z),探针(x)为选自由序列编号43~191所示碱基序列组成的组的序列、选自由序列编号43~191所示碱基序列组成的组的序列的互补序列、或选自由与序列编号43~191所示碱基序列组成的组的序列或其互补序列实质上相同的序列。

[0226] 将本发明中使用的探针示于下述表1。

[0227] 表1

[0228] [表1-1]

[0229]

序列编号	名称	探针序列
1	对照核酸用探针	CTATTGACCAGCGATATCACTACGTAGGC
2	总16SrRNA基因用探针	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

3	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>) 用探针	GTCAATTTGGCATGCTATTAACACACC
4	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>) 用探针	GTCAAGTTGGCATGCTATTAACACACC
5	直肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter rectus</i>) 用探针	GTCAATAATCTTTCCCAAGA
6	牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga gingivalis</i>) 用探针	TACACGTACACCTTATTCTT
7	具核梭杆菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>) 用探针	TACATTCCGAAAAACGTCAT
8	狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) 用探针	TTCAATGCAATACTCGTATC
9	中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>) 用探针	CGAAGGGTAAATGCAAAAGGGC
10	中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>) 用探针	CGAAGGGTAAATGCAAAAGGGC
11	变黑普雷沃氏菌 (<i>Prevotella nigrescens</i>) 用探针	CTTTATTCCACATAAAAGC
12	有害月形单胞菌 (<i>Selenomonas noxia</i>) 用探针	TTGCGATTAGGCACGTTT
13	星座链球菌 (<i>Streptococcus constellatus</i>) 用探针	AAGTACCGTCACTGTGTG
14	戈登氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>) 用探针	CACCGCTTCTTCTTACA
15	中间链球菌 (<i>Streptococcus intermedius</i>) 用探针	ACAGTATGAACCTTCCATTCT
16	福赛斯坦纳菌 (<i>Tannerella forsythia</i>) 用探针	CACGTATCTCATTTTATCCCTGT
17	齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>) 用探针	CCTTCTTCTTATTCTTCTATCTGC
18	小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>) 用探针	TCCTTCTAACTGTTGCG
19	龋齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>) 用探针	AAGTCAGCCCGTACCCA
20	粘液放线菌 (<i>Actinomyces viscosus</i>) 用探针	CCACCCACAAGGAGCAG
21	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>) 用探针	GTCAATTTGGCATGCTATTA
22	简明弯曲杆菌 (<i>Campylobacter concisus</i>) 用探针	CCCAAGCAGTTCTATGGT
23	细弯曲杆菌 (<i>Campylobacter gracilis</i>) 用探针	GCCTTCGCAATAGGTATT
24	昭和弯曲杆菌 (<i>Campylobacter showae</i>) 用探针	CAATGGGTATTCTTCTTGAT
25	黄褐二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga ochracea</i>) 用探针	CAACCATTCAAGACCAACA
26	生痰二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga sputigena</i>) 用探针	TCAAAGGCAGTTGCTTAGT
27	嗜蚀艾肯氏菌 (<i>Eikenella corrodens</i>) 用探针	CTCTAGCTATCCAGTTCAG
28	具核梭杆菌动物亚种 (<i>Fusobacterium nucleatum subsp. animalis</i>) 用探针	TTTCTTCTTCCCACTGAA
29	具核梭杆菌多形亚种 (<i>Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum</i>) 用探针	CCAGTACTCTAGTTACACA
30	具核梭杆菌文森亚种 (<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i>) 用探针	TAGTTATACAGTTTCCAACG
31	牙周梭杆菌 (<i>Fusobacterium periodonticum</i>) 用探针	TATGCAGTTTCCAACGCAA
32	唾液乳杆菌 (<i>Lactobacillus salivarius</i>) 用探针	GCCGTGACTTGCTGGTT
33	干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus casei</i>) 用探针	CTGTCTCTTCTGCACT
34	中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>) 用探针	GGGTAATGCAAAAGGCA
35	总链球菌属 (<i>Streptococcus</i> 属) 用探针	TTAGCCGTCCCTTCTGG
36	牙菌链球菌 (<i>Streptococcus dentisani</i>) 用探针	TCCCTCTTGCACTCAAGT
37	缓症链球菌 (<i>Streptococcus mitis</i>) 用探针	TCTCCCTCTTGCACTCA
38	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>) 用探针	CACACGTTCTTGACTTAC
39	远缘链球菌 (<i>Streptococcus sobrinus</i>) 用探针	CCGTCACTGTGAAGCTT
40	福赛斯坦纳菌 (<i>Tannerella forsythia</i>) 用探针	CACGTATCTCATTTTATCC
41	齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>) 用探针	CCTTCTTCTTATTCTTCAT
42	小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>) 用探针	TATTGCAAGAAGGCCTT
43	墓地放线菌 (<i>Actinomyces graevenitzi</i>) 用探针	AAAAAGCAGTGCCTTGTCC
44	伊氏放线菌 (<i>Actinomyces israelii</i>) 用探针	GGCTTCATAACCCGGCTAC
45	内氏放线菌 (<i>Actinomyces naeslundii</i>) 用探针	AACCCACCCACAACGA
46	灰色拟普雷沃氏菌 (<i>Alloprevotella rava</i>)、拟普雷沃氏菌 OT 308 种 (<i>Alloprevotella sp. OT 308</i>) 用探针	TTCCCACTAAAAGCAGTTTA
47	马氏棒杆菌 (<i>Corynebacterium matruchotii</i>) 用探针	TCTTAACAAAGTACCGTCACC
48	缠结真杆菌 (<i>Eubacterium nodatum</i>) 用探针	CCTACGCTTACTTAACCACTA
49	隐藏真杆菌 (<i>Eubacterium saphenum</i>) 用探针	CCCTAGGACAGAGGCTTACA
50	沟迹真杆菌 (<i>Eubacterium sulci</i>) 用探针	AAACCTGCGCTTAAGGTGC
51	龈沟产线菌 (<i>Filifactor alocis</i>) 用探针	CCCCACTACAGAGTTTACGA
52	血李生球菌 (<i>Gemella sanguinis</i>) 用探针	CCGTCTCTACTGTATATAGT
53	毗邻颗粒链球菌 (<i>Granulicatella adiacens</i>) 用探针	GTCAGGCGCTAACAGTTAC
54	副流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus parainfluenzae</i>) 用探针	AGTTAACGTCAATCACCTAG
55	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 用探针	GCGGGATAGTCAGTCAGGTG
56	嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) 用探针	CAGTTCCGATGCGAGTTCC
57	纤毛菌属 OT 415、417、462 种 (<i>Leptotrichia</i> spp. OT 415、417、462) 用探针	CGTGAGTTCCGTCCACCTC
58	微核巨球形菌 (<i>Megasphaera micronuciformis</i>) 用探针	TAACCACAAGATTATTCGTC
59	浅黄奈瑟氏菌 (<i>Neisseria flavescens</i>) 用探针	AGCTGTCGATATTAGCAACAG
60	微小微单胞菌 (<i>Parvimonas micra</i>) 用探针	GTGCTTAATGAGGTTAAGCC
61	口炎消化链球菌 (<i>Peptostreptococcus stomatis</i>) 用探针	ACCACCGACTTGAAGGACCA

62	卡氏叶淋单胞菌(<i>Porphyromonas catoniae</i>)用探针	GGTACATTCACTATGGTACACG
63	牙髓叶淋单胞菌(<i>Porphyromonas endodontalis</i>)用探针	TACATGCATCTCAGCTACACGT
64	巴斯德叶淋单胞菌(<i>Porphyromonas pasteri</i>)用探针	ACACGTGACTCTTGTATTTC
65	齿普雷沃氏菌(<i>Prevotella dentalis</i>)用探针	AGTCAGACGTTGGCGCCTA

[0230] [表1-2]

[0231]

66	栖组织普雷沃氏菌(<i>Prevotella histicola</i>)用探针	CACGTGACTGACTTTATCCC
67	洛氏普雷沃氏菌(<i>Prevotella loescheii</i>)用探针	CCTACTTTCAGCGCACTCAA
68	产黑素普雷沃氏菌(<i>Prevotella melaninogenica</i>)用探针	AATAGGGACACGTCCTAAC
69	苍白普雷沃氏菌(<i>Prevotella pallens</i>)用探针	CACGTGCATCAAATTATTCTCG
70	赛赫普雷沃氏菌(<i>Prevotella shahii</i>)用探针	ACGTGGGCTCTTTATCCCC
71	真口腔普雷沃氏菌(<i>Prevotella veroralis</i>)用探针	ACACGTGATTGACTTTATCC
72	龋齿罗氏菌(<i>Rothia dentocariosa</i>)用探针	ACCCACTGCAAAACCAAGGT
73	黏液罗氏菌(<i>Rothia mucilaginosa</i>)用探针	TCTCTCTTCCTGCTAACA
74	月形单胞菌OT 478种(<i>Selenomonas</i> sp.OT 478)用探针	ACTATTCGCACTAGGCACGT
75	生痰月形单胞菌(<i>Selenomonas sputigena</i>)用探针	GTACCGTCACCAAACCTAATA
76	莫雷索拉杆菌(<i>Solobacterium moorei</i>)用探针	CCAACAATTTAACCACTTAC
77	SR1 OT 345种用探针	CGTCATTCGCTTCTGCCAA
78	副血链球菌(<i>Streptococcus parasanguinis</i>)用探针	CTGGTAAGTTACCGTCAC
79	唾液链球菌(<i>Streptococcus salivarius</i>)用探针	CACACTCGTCTTGACTTAC
80	远缘链球菌(<i>Streptococcus sobrinus</i>)用探针	TACACACGTTCTTCCCTAC
81	媒介密螺旋体(<i>Treponema medium</i>)用探针	GTCGATTACCGTCATCAGATG
82	索氏密螺旋体(<i>Treponema socranskii</i>)用探针	TTCTCCAAAACCTATTCCCT
83	非典型韦荣球菌(<i>Veillonella atypica</i>)用探针	CGTCAAATCTCGCACTATTC
84	罗戈沙韦荣球菌(<i>Veillonella rogosa</i>)用探针	ACCGTCAATTCCTCTAACTATT
85	木糖氧化无色杆菌(<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)用探针	CAGTTTCGCGAGGTATTAAC
86	木糖氧化无色杆菌(<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)用探针	CACCAGACGAAGTCGGTCT
87	鲍曼不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)用探针	CTAGGTCCGGTAGCAAGCTACC
88	鲍曼不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)用探针	TACCTTCCCCGCTCGACTT
89	醋酸钙不动杆菌(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)用探针	ATCAGTAGCAAGCTACCTCTCTC
90	醋酸钙不动杆菌(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)用探针	CGTAAGATCAGTAGCAAGCTA
91	鲁氏不动杆菌(<i>Acinetobacter lwoffii</i>)用探针	GTATTAATCTCGGTAGCCTCC
92	鲁氏不动杆菌(<i>Acinetobacter lwoffii</i>)用探针	CTAGGTTAGGTAGCAAGCTACATT
93	伊氏放线菌(<i>Actinomyces israelii</i>)用探针	CACCAAAACACCACAAAAGTGA
94	伊氏放线菌(<i>Actinomyces israelii</i>)用探针	ACTAACCCACCCGCAAAAA
95	麦尔放线菌(<i>Actinomyces meyeri</i>)用探针	TCCAGTATTAGCACCCATT
96	龋齿放线菌(<i>Actinomyces odontolyticus</i>)用探针	ATGCGAAGATCAGTGAATATCC
97	图列茨放线菌(<i>Actinomyces turicensis</i>)用探针	AAGTTGGAGCATCATCGTTC
98	图列茨放线菌(<i>Actinomyces turicensis</i>)用探针	GCCAATGAGTGAATATCCAG
99	极小阿托波氏菌(<i>Atopobium parvulum</i>)用探针	GGAAGTCTCGAAGTATTCGGT
100	极小阿托波氏菌(<i>Atopobium parvulum</i>)用探针	GAGCTTTCTCGAGTCTTCCATG
101	脆弱拟杆菌(<i>Bacteroides fragilis</i>)用探针	CGGAATCATTATGCTATCGGGT
102	脆弱拟杆菌(<i>Bacteroides fragilis</i>)用探针	CAAGCTTTCTCTGATGCC
103	洋葱伯克霍尔德菌(<i>Burkholderia cepacia</i>)用探针	TAGAGCCAAGGATTTCTTTCCG
104	洋葱伯克霍尔德菌(<i>Burkholderia cepacia</i>)用探针	ACTACAGGACATGTTCCGAT
105	产吡啶金杆菌(<i>Chryseobacterium indologenes</i>)用探针	CTCTCAAGATCCCGAAAGATC
106	产吡啶金杆菌(<i>Chryseobacterium indologenes</i>)用探针	GTACGCCGCTCTCAAGATCC
107	弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)用探针	TAACCAACACGCCTTCTCTCC
108	弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)用探针	GTCACCCAAGGAGCAAGCTC
109	纹带棒杆菌(<i>Corynebacterium striatum</i>)用探针	CTGACACTAAACAGTGGTCTTA
110	纹带棒杆菌(<i>Corynebacterium striatum</i>)用探针	TCGAGTACCCGAGCAAGCT
111	嗜蚀艾肯氏菌(<i>Eikenella corrodens</i>)用探针	CGGACAGTAGTGAAGCACT
112	嗜蚀艾肯氏菌(<i>Eikenella corrodens</i>)用探针	AATAACGCGAGGTCTTGCGA

113	产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>) 用探针	TTAACCTTAACGCCCTCTCTC
114	产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>) 用探针	CCTCGCTGAAAGTACTTTACAA
115	暗沟肠杆菌泄殖腔亚种 (<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>) 用探针	CGGTATTATAACCACAACACC
116	暗沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>) 用探针	AGCTCTCTGTGCTACCGTTC
117	暗沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>) 用探针	TCTCTGTGCTACCGTTCGAC
118	暗沟肠杆菌暗沟肠杆菌溶解亚种 (<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>) 用探针	TCTTTGGTCTTGCGACGTTA
119	屎肠球菌 (<i>Enterococcus faecium</i>) 用探针	CTCTCAGGTGCGGCTATGCA
120	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) 用探针	AGGTCCCGCTCTTTGTGCTT
121	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) 用探针	CGTCAATGAGCAAAGGTATT
122	坏死梭杆菌坏死亚种 (<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>necrophorum</i>) 用探针	GACATACGTAATTACCGCGG
123	坏死梭杆菌坏死亚种 (<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>necrophorum</i>) 用探针	GCTTGCGACATACGTAATTA
124	坏死梭杆菌基形亚种 (<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>) 用探针	ATGTTGTCCCGGTCTAAGAG
125	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	CTTCAAGGCATATTCTACG
126	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	TTACAACCTCAGGCTTCT
127	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	TTACAACCTCAGGCTTCTT
128	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	CCTCTTCAAGGCATATTCTAC
129	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	CAGTATTATCTGACCGTCCC
130	嗜肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>) 用探针	AGGCTAATCTTAAAGCGCCAGG

[0232] [表1-3]

[0233]

131	嗜肺军团菌费城嗜肺亚种费城株 (<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. <i>Philadelphia</i>) 用探针	CAGCTTTCGTCTCAGACATT
132	黏膜炎莫拉氏菌 (<i>Moraxella catarrhalis</i>) 用探针	GCTTCTAACTTCGTTGAC
133	黏膜炎莫拉氏菌 (<i>Moraxella catarrhalis</i>) 用探针	GTCAGGGCTTATGGGTATTA
134	摩氏摩根氏菌 (<i>Morganella morganii</i>) 用探针	ACATCTGACTCAATCAACCGC
135	摩氏摩根氏菌 (<i>Morganella morganii</i>) 用探针	TATTAACCTTGACACCTTCCTC
136	鸟分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) 用探针	CAGAAGACATGCGTCTTGAG
137	鸟分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) 用探针	GAGTACCTCCGAAGAGGCCTTT
138	胞内分枝杆菌 (<i>Mycobacterium intracellulare</i>) 用探针	ATTGCCACGTGTACTCAC
139	胞内分枝杆菌 (<i>Mycobacterium intracellulare</i>) 用探针	CTTCTTCTCCACCTACCGTC
140	堪萨斯分枝杆菌 (<i>Mycobacterium kansasii</i>) 用探针	CCACTCGAGTGCTCCGAAG
141	堪萨斯分枝杆菌 (<i>Mycobacterium kansasii</i>) 用探针	AGGCTTATCCCGGTGTGAG
142	巴西诺卡氏菌 (<i>Nocardia brasiliensis</i>) 用探针	ACCAACAGCATGCACTGAAA
143	巴西诺卡氏菌 (<i>Nocardia brasiliensis</i>) 用探针	GTCAGTATTCCAGAGAC
144	口炎消化链球菌 (<i>Peptostreptococcus stomatis</i>) 用探针	CCGCTTGTTTGTCTCAGAATT
145	口炎消化链球菌 (<i>Peptostreptococcus stomatis</i>) 用探针	ACTCAATACGTAGCAAAACCTC
146	齿普雷沃氏菌 (<i>Prevotella dentalis</i>) 用探针	GAGGACCTCGTTGAATACATA
147	齿普雷沃氏菌 (<i>Prevotella dentalis</i>) 用探针	CTGCTTGAAGGTAGGTTGGATA
148	产黑素普雷沃氏菌 (<i>Prevotella melaninogenica</i>) 用探针	CCCTAACTTATCCCATACA
149	产黑素普雷沃氏菌 (<i>Prevotella melaninogenica</i>) 用探针	GTATGTAACCTGCAAAATAGG
150	口普雷沃氏菌 (<i>Prevotella oris</i>) 用探针	CTTTAATCGTGTGATGTC
151	口普雷沃氏菌 (<i>Prevotella oris</i>) 用探针	AGACGATGCCATGAGTATT
152	痤疮丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i> (<i>Cutibacterium acnes</i>)) 用探针	TCTTTACCAATTACCGTCAC
153	痤疮丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i> (<i>Cutibacterium acnes</i>)) 用探针	CCCAAGATTACACTTCGAC
154	奇异变形菌 (<i>Proteus mirabilis</i>) 用探针	GATTAAACGCTGCACCTCC
155	奇异变形菌 (<i>Proteus mirabilis</i>) 用探针	CGCTGCACCTCCGTATTA
156	普通变形菌 (<i>Proteus vulgaris</i>) 用探针	TACCGCTCGATTGCATGTGT
157	普通变形菌 (<i>Proteus vulgaris</i>) 用探针	AACTTTATCACTTCTCTCC
158	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) 用探针	GCGGTTCATATATTATCCG
159	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) 用探针	ATAAGTGACAGCAAAACCGT
160	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>) 用探针	TTAGCCAGCTGGATTCTTT
161	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>) 用探针	CGACAGATAGATCCGATG
162	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>) 用探针	AGTCTAGTGTAACACCAAACTC
163	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>) 用探针	ACTCTACCAACGTTCTCTC
164	咽喉炎链球菌 (<i>Streptococcus anginosus</i>) 用探针	CATCTACTACGATGCAATTG
165	咽喉炎链球菌 (<i>Streptococcus anginosus</i>) 用探针	TTAAGTACCGTCACAGCATG
166	非典型韦荣球菌 (<i>Weillonella atypica</i>) 用探针	ACCTTTCATCCAGTCTCGAT
167	非典型韦荣球菌 (<i>Weillonella atypica</i>) 用探针	CGTCAATCTCGCACTATT

168	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 用探针	CACACCTGACTGACTATCCC
169	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 用探针	CCACTAATCAGCACTTAGCA
170	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 用探针	AAACTAAGAGGCACATGACC
171	肺炎衣原体 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) 用探针	GTTTAAATGCTGACTTGGGG
172	肺炎衣原体 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) 用探针	GCATAACTCTTCTCAACC
173	肺炎衣原体 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) 用探针	AACCGTTATCCCAAGTTGA
174	流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>) 用探针	TCTCAGTCCCGCACTTTCAT
175	肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>) 用探针	TATTAACCTCATCGCTTCC
176	肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>) 用探针	GTAACGTCAATCGATGAGGT
177	肺炎支原体 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>) 用探针	AAATGGTACAGTCAAACTCTA
178	肺炎支原体 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>) 用探针	CATGCGAACCAGGTTCTTA
179	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 用探针	CCGACGTTATCCCCACTA
180	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 用探针	GCTGAATCCAGGAGCAAGCT
181	粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescens</i>) 用探针	GCGAGTAACGTCAATTGATGA
182	粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescens</i>) 用探针	CCCTTCTACGAGACTTAGC
183	粘质沙雷氏菌粘质亚种 (<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>) 用探针	GTATTAAGCTCACCACCTTCTT
184	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 用探针	CTAACATCAGAGAAGCAAGC
185	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 用探针	AAGACCGTCTTCACTTTTG
186	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 用探针	CTTACACATGTTCTTCCC
187	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) 用探针	ATGCAACATCCACTCTTATG
188	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) 用探针	CAAGTGCACTTTTAAGCAA
189	化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 用探针	CATGCGTTAGTCTCTTATGC
190	化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 用探针	CCATCTCATAGTGGAGCAAT
191	化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 用探针	CCCACCATCATTCTTCTAA

[0234] 以下,通过实施例详细地对本发明进行说明,但本发明不受这些实施例的限定。

[0235] [实施例1]

[0236] 本实施例中,对于试样中所含多种细菌,确定来源于各细菌的目标核酸(各个目标核酸)的绝对量。具体地,如下进行校正曲线的制作、探针间信号强度关系式的算出和试样中目标核酸的绝对量的确定。

[0237] 1.校正曲线的制作

[0238] 关于目标核酸的一部分和特定核酸组的合计(校正用核酸)以及对照核酸的、扩增前的量与扩增后的量涉及的指标的关系制作校正曲线。具体地,关于[(目标核酸的一部分和特定核酸组的合计量涉及的指标)相对于(扩增后的对照核酸的量涉及的指标)之比]与[(目标核酸的一部分和特定核酸组的合计量)相对于(扩增前的对照核酸的量)之比]的关系制作校正曲线。扩增前的对照核酸的量是已知的,因此可以基于该校正曲线确定扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量。

[0239] 校正曲线的制作中,使用11种细菌的基因组DNA的混合液作为校正用核酸。使用的混合液的组成如表2所示。使用的各基因组DNA是从ATCC(注册商标)(American Type Culture Collection)购入的表2记载的ATCC编号的产品。

[0240] 使用16SrRNA基因作为目标核酸。

[0241] [表2]

[0242] 表2

[0243]

所用菌株	ATCC编号	16SrRNA基因的浓度 (pM)
伴放线聚杆菌 (Aggregatibacter actinomycetemcomitans)	700685D-5	11. 2
牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (Capnocytophaga gingivalis)	33624D-5	9. 41
具核梭杆菌具核亚种 (Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum)	25586D-5	12. 4
狗齿龈叶淋单胞菌 (Porphyromonas gingivalis)	33277D-5	10. 0
中间普雷沃氏菌 (Prevotella intermedia)	25611D-5	7. 38
戈登氏链球菌 (Streptococcus gordonii)	35105D-5	10. 0
福赛斯坦纳菌 (Tannerella forsythia)	43037D-5	10. 0
齿垢密螺旋体 (Treponema denticola)	35405D-5	10. 1
小韦荣球菌 (Veillonella parvula)	10790D-5	9. 98
变异链球菌 (Streptococcus mutans)	700610D-5	9. 99
直肠弯曲杆菌 (Campylobacter rectus)	33238D-5	3. 32
合计	-	104

[0244] 将上述混合液 (104pM) 以PCR反应液中16SrRNA基因的浓度合计为0.24pM和其0.25ⁿ倍 (n=1, 2, …, 9) 的方式加入至PCR反应液。关于PCR反应液的其他组成, 如表3所示。总液量调整为20μL。各条件分别进行2个反应。

[0245] [表3]

[0246] 表3

[0247]

	终浓度
无核酸酶水	-
F引物 (16SrRNA基因用)	0.20μM
R引物 (16SrRNA基因用)	0.20μM
F引物 (对照核酸用)	0.20μM
R引物 (对照核酸用)	0.20μM
对照核酸	0.012pM
Premix Ex Taq HS	1x

[0248] 这里, 各引物和对照核酸的序列分别如表4、表5所示, F (Forward, 正向) 引物是5'端Cy5修饰的引物。表4序列中的R、Y表示混合碱基, R表示A和G, Y表示C和T。各引物以与各细菌16SrRNA基因的共有序列结合的方式设计。对照核酸是含有由扩增所需的碱基序列和碱基随机组合而成的碱基序列构成的人工序列的核酸 (表5)。

[0249] [表4]

[0250] 表4

序列编号	名称	序列
192	F引物 (16SrRNA基因用)	TACGGGAGGCAGCAG
193	R引物 (16SrRNA基因用)	CRGGGTATCTAATCCYGT
194	F引物 (对照核酸用)	GAGAAGCCTACACAAACGTAACGT C
195	R引物 (对照核酸用)	CTCTAAAGACCGCTCTATCTCGG

[0252] [表5]

[0253] 表5

序列编号	名称	序列
196	对照核酸	GTGAGAAGCCTACACAAACGTAACGTCAGGGCTAAGACAAACGC TAACGGTACACCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGT CCTACCGACATGTAGGCATACTCACGAAGGCAATTCCTGAAAG CCTCGTCTTATCCCGAACTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTG AACGCGTACATTTACCTGTCATGCGTGGGCCTTCTCCGAATAGC CTACGTAGTGATATCGCTGGTTCGAATAGGCGGATTGCTCATAAA TGCACATTGGCTAAGGCCCACGGAACACGAATCACGTGAGATCA CTTACTATTTCGACGGAAGTACTATACGCACCGGGACATGCAAGT AGCGTCCCACAAGCATAAGGAACTCTATACTCGCCATCTACGCA GCTACAGGGGATACAGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGCCGAG ATAGAGCGGTCTTTAGAG

[0255] 此外,所使用的PCR用酶是Premix Ex Taq (注册商标)Hot Start Version (TaKaRa),将包括酶和缓冲液的以2x的浓度提供的试剂以成为1x的浓度的方式进行调整,进行反应。

[0256] PCR反应用热循环仪在表6所示条件下进行。

[0257] [表6]

[0258] 表6

95℃	98℃	55℃	72℃	4℃
1分钟	10秒	30秒	20秒	∞
	40个循环			

[0260] PCR结束后,在各反应液(20μL总量)中添加杂交反应液(1M Tris-HCl48μL、1M NaCl 48μL、0.5%吐温2020μL、无核酸酶水64μL)。使用该液体和DNA芯片,用自动杂交洗涤装置(三菱化学)在50℃进行16小时杂交。然后进行洗涤。

[0261] 本实施例中使用的DNA芯片是三菱化学制的DNA芯片GenoPearl(注册商标)。该DNA芯片上搭载的与各细菌中的特异性序列杂交的探针(探针(x))为序列编号3~18所示碱基序列(表7),与全部目标核酸和特定核酸组两者的扩增产物共同杂交的探针(探针(y))和与对照核酸的扩增产物杂交的探针(探针(z))分别使用序列编号2和1的探针。其中,关于伴放

线聚杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 和中间普雷沃氏菌 (*Prevotella intermedia*) 来源核酸的检测, 分别使用序列编号3和4所示碱基序列的核苷酸混合物以及序列编号9和10所示碱基序列的核苷酸混合物作为探针。使用GenoPearl的平台对这些序列5末端乙烯基化的寡聚DNA进行阵列化(日本特许第6299660号)。

[0262] 检测使用GenoPearlReader (三菱化学)。将基于检测到的荧光信号换算出的数值数据用于分析。关于16SrRNA基因的浓度合计为0.24pM的 0.25^n 倍 ($n=8, 9$) 的条件, 因为即使改变浓度, 信号强度比也不会变化, 所以判断为定量下限以下, 不在校正曲线的制作中使用。

[0263] 11种细菌基因组DNA的混合液和对照核酸的扩增产物中, 含有该11种细菌来源的全部16SrRNA基因(总16SrRNA基因)和对照核酸的扩增产物。

[0264] 将与总16SrRNA基因杂交的探针(序列编号2)的信号强度(表示扩增后的16SrRNA基因的量的指标)设为 I_T 、将与对照核酸杂交的探针(序列编号1)的信号强度设为 I_C 、将扩增前的16SrRNA基因的量设为 C_T 、将扩增前的对照核酸的量设为 C_C , 将其用[式1: $(\log_{10}(I_T \div I_C) = a \times \log_{10}(C_T \div C_C) + b)$]近似(图1)。使用Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数求出近似直线的斜率、截距, 关于(式1)的参数, 确定 $a=0.389$, $b=0.581$ 。

[0265] 利用该校正曲线, 可以确定扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量。该“扩增前的全部目标核酸和特定核酸组的合计量”在最终求出来源于各细菌的目标核酸(各个目标核酸)的绝对量时是必要的。

[0266] 2. 探针间信号强度的关系式的算出

[0267] 后面的试验中, 为了基于来源于各细菌的目标核酸(各个目标核酸)在“全部目标核酸和特定核酸组的合计”中的占有率来确定各个目标核酸的绝对量, 有必要将与各个目标核酸杂交的各探针(x)的信号强度和与“全部目标核酸和特定核酸组”杂交的探针(y)的信号强度适用于同一算式进行计算。另一方面, 探针(x)和探针(y)的信号强度绝对值有可能产生差异, 因此为了将两者适用于同一算式进行计算, 有必要在获得两者的信号强度的关系式的基础上, 将探针(x)的信号强度换算为探针(y)的信号强度所对应的值。

[0268] 因此, 本实施例中, 对于每个细菌种类, 算出与14种细菌(表7)各自的特异性序列杂交的探针(探针(x)) (序列编号3~18)的信号强度和与来源于该14种细菌的全部16SrRNA基因(总16SrRNA基因)杂交的探针(探针(y)) (序列编号2)的信号强度的关系式。

[0269] 使用的各基因组DNA是从ATCC(注册商标)(American Type Culture Collection)或DSMZ(Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen)购入的表7记载的编号产品。

[0270] [表7]

[0271] 表7

探针的序列编号	细菌名称	编号
[0272]	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>)	ATCC 700685D-5
	5 直肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter rectus</i>)	ATCC 33238D-5
	6 牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga gingivalis</i>)	ATCC 33624D-5
	7 具核梭杆菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	ATCC 25586D-5
	8 狗齿龈叶淋单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	ATCC 33277D-5
	9, 10 中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>)	ATCC 25611D-5
	11 变黑普雷沃氏菌 (<i>Prevotella nigrescens</i>)	DSMZ NO. 13386
	12 有害月形单胞菌 (<i>Selenomonas noxia</i>)	DSMZ NO. 19578
	13 星座链球菌 (<i>Streptococcus constellatus</i>)	DSMZ NO. 25819
	14 戈登氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>)	ATCC 35105D-5
	15 中间链球菌 (<i>Streptococcus intermedius</i>)	DSMZ NO. 20573
	16 福赛斯坦纳菌 (<i>Tannerella forsythia</i>)	ATCC 43037D-5
	17 齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>)	ATCC 35405D-5
	18 小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>)	ATCC 10790D-5

[0273] 对于各基因组DNA,分别进行以下的实验。

[0274] 首先,以反应液中所含基因组DNA的重量为1pg、0.5pg、0.1g的方式制备PCR反应液。其他组成和液量与上述“1.校正曲线的制作”是同样的。

[0275] 与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应、杂交和检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。具体地,通过PCR反应扩增来源于上述14种细菌的全部16SrRNA基因的DNA,与搭载于DNA芯片的探针杂交。将与各细菌各自的特异性碱基序列杂交的各探针(探针(x))的信号强度设为 I_{US} ,将与总16SrRNA基因杂交的探针(探针(y))的信号强度设为 I_{TS} ,对于每个细菌种类,将它们用[式5: $I_{TS} = E_S \times I_{US}$]进行近似。对于全部14种细菌,求出该关系式、即各探针(x)的信号强度与探针(y)的信号强度的关系式。

[0276] 作为代表,将伴放线聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)和直肠弯曲杆菌(*Campylobacter rectus*)的基因组DNA的结果示于图2。利用Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数,使用将截距设为0的选项求出近似直线的斜率,结果,关于(式5)的参数 E_S ,确定为如表8所示。

[0277] [表8]

[0278] 表8

探针的编号	细菌名称	E_s
3, 4	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>)	0.526
5	直肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter rectus</i>)	0.708
6	牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga gingivalis</i>)	0.447
7	具核梭杆菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	0.572
8	狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	1.15
[0279] 9, 10	中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>)	0.804
11	变黑普雷沃氏菌 (<i>Prevotella nigrescens</i>)	2.62
12	有害月形单胞菌 (<i>Selenomonas noxia</i>)	0.925
13	星座链球菌 (<i>Streptococcus constellatus</i>)	2.78
14	戈登氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>)	0.488
15	中间链球菌 (<i>Streptococcus intermedius</i>)	0.427
16	福赛斯坦纳菌 (<i>Tannerella forsythia</i>)	0.258
17	齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>)	0.175
18	小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>)	2.95

[0280] 3. 试样中目标核酸的绝对量的确定

[0281] 在1名健康成人(受试者)的协助下实施唾液评价试验。

[0282] 采集起床后的唾液,进行珠子破碎、蛋白酶K(QIAGEN)处理并利用QIAamp 96 DNA Blood Kit(QIAGEN)进行DNA提取。从唾液提取的DNA中含有作为测定对象的上述14种细菌基因组DNA、除了作为测定对象的细菌以外的细菌的基因组DNA和其他DNA(图4A)。

[0283] 用NanoDrop(商标)(Thermo Fisher Scientific)测定提取的DNA的浓度,基于测得的浓度,以液中所含提取DNA的重量为100pg的方式调制PCR反应液。其他组成和液量与上述“1.校正曲线的制作”是同样的。

[0284] 与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应、杂交、检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。

[0285] 从唾液试样提取的DNA和对照核酸的扩增产物中,含有(i)作为测定对象的来源于上述14种细菌的16SrRNA基因(目标核酸)、(ii)作为除了作为测定对象的细菌以外的细菌来源的16SrRNA基因的、通过全部目标核酸的扩增而与目标核酸一并扩增的特定核酸组(特定核酸组)、以及(iii)扩增的对照核酸(图4B)。

[0286] 上述(i)与(ii)的合计相当于上述“全部目标核酸和特定核酸组的合计”或“总16SrRNA基因”。

[0287] 根据总16SrRNA基因的探针的信号强度 I_{TM} 和“1.校正曲线的制作”中求出的参数,利用式3 $[C_{TM} = C_C \times 10^{((\log_{10}(I_{TM} \div I_{CM}) - 0.581) \div 0.389)}]$ 算出PCR反应液中加入的总16SrRNA基因的物质质量(mol) C_{TM} (图4C),用其乘以阿伏伽德罗常数,算出拷贝数。基于提取工序和PCR反应液制备工序中的稀释率,算出1mL唾液中总16SrRNA基因的拷贝数。

[0288] 接下来,由与各菌特异性杂交的各探针(x)的信号强度 I_{US} 和“2.探针间信号强度的关系式的算出”中求出的参数和上述每1mL唾液中总16SrRNA基因的拷贝数,按照式6($I_{TSM} =$

$E_S \times I_{USM}$) 和式7 ($R_S = I_{TSM} \div I_{TM}$) ,算出各菌的16SrRNA基因的拷贝数(图4D)。

[0289] 算出的每1mL唾液中各16SrRNA基因的拷贝数如表9所示。

[0290] [表9]

[0291] 表9

[0292]

探针的序列编号	名称	拷贝数
2	总16SrRNA基因	4. 3. E+07
3, 4	伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>)	4. 6. E+04
5	直肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter rectus</i>)	7. 4. E+04
6	牙龈二氧化碳嗜纤维菌 (<i>Capnocytophaga gingivalis</i>)	6. 4. E+04
7	具核梭杆菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	5. 0. E+05
8	狗齿龈叶淋单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	1. 4. E+05
9, 10	中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>)	7. 1. E+04
11	变黑普雷沃氏菌 (<i>Prevotella nigrescens</i>)	1. 1. E+05
12	有害月形单胞菌 (<i>Selenomonas noxia</i>)	2. 2. E+04
13	星座链球菌 (<i>Streptococcus constellatus</i>)	1. 9. E+04
14	戈登氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>)	2. 8. E+05
15	中间链球菌 (<i>Streptococcus intermedius</i>)	1. 4. E+05
16	福赛斯坦纳菌 (<i>Tannerella forsythia</i>)	1. 6. E+04
17	齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>)	4. 1. E+04
18	小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>)	3. 1. E+05

[0293] [实施例2]

[0294] 本实施例中,在与实施例1不同的条件下进行校正曲线的制作。

[0295] 作为校正用核酸使用的混合液的组成与实施例1相同。

[0296] 以PCR反应液中16SrRNA基因的浓度合计为24pM和其 $(1/16)^n$ 倍($n=1,2,\dots,5$)的方式在PCR反应液中加入上述混合液。关于PCR反应液的其他组成,如表10所示。总液量调整为20 μ L。各条件分别进行1个反应。

[0297] [表10]

[0298] 表10

[0299]

	终浓度
无核酸酶水	—
F引物(16SrRNA基因用)	1.0 μ M
R引物	1.0 μ M
对照核酸	0.025pM
Premix Ex Taq HS	1x

[0300] 这里,各引物和对照核酸的序列分别如表11、表12所示,F引物是5'端Cy5修饰的引物。表11的序列中的I表示肌苷。

[0301] [表11]

[0302] 表11

[0303]	序列编号	名称	序列
	192	F引物 (16SrRNA基因用)	TACGGGAGGCAGCAG
	197	R引物	TACCIGGGTATCTAATCC

[0304] [表12]

[0305] 表12

	序列编号	名称	序列
[0306]	198	对照核酸	GTTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGCTAAGACAAACGCTAACGG TACACCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGTCCTACC GACATGTAGGCATACTCACGAAGGCAATTCCTGAAAGCCTCGT CTTATCCCGAACTTGGCATCTGCTGATACGTCAGGTTGAACGCG TACATTTACCTGTCATGCGTGGGCCCTTCTCCGAATAGCCTACGT AGTGATATCGCTGGTCAATAGGCGGATTGCTCATAAATGCACA TTGGCTAAGGCCACGGAACACGAATCACGTGAGATCACTTACT ATTCGACGGAATACTATACGCACCGGGACATGCAAGTAGCGTC CCACAAGCATAAGGAACTCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACA GGGGATACACGTATGAGCGGTTACGAAGTAAAGGGTAGCAAACA GGATTAGATACCCTGAAA

[0307] PCR反应用热循环仪在表13所示条件下进行。

[0308] [表13]

[0309] 表13

	95℃	98℃	55℃	72℃	4℃
[0310]	1分钟	10秒	30秒	20秒	∞
	25个循环				

[0311] 与实施例1的“1.校正曲线的制作”同样地进行杂交、检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。

[0312] 将与总16SrRNA基因杂交的探针(序列编号2)的信号强度设为 I_T 、将与对照核酸杂交的探针(序列编号1)的信号强度设为 I_C 、将扩增前的16SrRNA基因的量设为 C_T 、将扩增前的对照核酸的量设为 C_C ,将它们用[式1: $(\log_{10}(I_T \div I_C) = a \times \log_{10}(C_T \div C_C) + b)$]近似(图3)。使用Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数求出近似直线的斜率、截距,关于(式1)的参数,确定 $a=0.730$, $b=1.85$ 。

[0313] 根据本实施例1、2,表明本发明的方法能够同时且简便地确定试样所含多种目标核酸的绝对量。此外还表明,本发明方法中,作为对照核酸,只要使用一种核酸即可,没有必要使用多种对照核酸。

[0314] [实施例3]

[0315] 本实施例中,在与实施例1不同的条件下,对于试样中所含细菌,确定来源于各细菌的目标核酸(各个目标核酸)的绝对量。使用组成已知的标准样品作为试样,进行测定值

与理论值的比较。

[0316] 1.校正曲线的制作

[0317] 校正曲线的制作中,作为校正用核酸,以市售的20Strain Even Mix Genomic Material (ATCC (注册商标)MSA-1002™)和20Strain Staggerd Mix Genomic Material (ATCC (注册商标)MSA-1003™)、进一步加上表14所示组成的7种细菌的基因组DNA的混合液合计3种溶液为标准样品。

[0318] [表14]

[0319] 表14

所用菌株	ATCC编号	16SrRNA基因的浓度 (pM)
伴放线聚杆菌 (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>)	700685D-5	14.3
具核梭杆菌具核亚种 (<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>)	25586D-5	14.3
狗齿龈叶单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	33277D-5	13.6
中间普雷沃氏菌 (<i>Prevotella intermedia</i>)	25611D-5	14.3
戈登氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>)	35105D-5	14.3
变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	700610D-5	14.3
小韦荣球菌 (<i>Veillonella parvula</i>)	10790D-5	14.3
合计	—	99.4

[0321] 用上述标准样品在表15所示条件(模板浓度、重复次数(N数))下进行PCR反应,使用得到的PCR产物,用DNA芯片进行测定。关于PCR反应液的校正用核酸以外的组成,如表16所示。

[0322] [表15]

[0323] 表15

校正用核酸	16SrRNA基因的浓度 (pM)	重复次数 (N数)
MSA1003 Staggerd Mix	9.39×0.25^n ($n=1, 2, \dots, 9$)	各3
	8.79	3
	9.50	2
MSA1002 Even Mix	2.43	3
	2.79	2
OC93 MIX	24.8×0.0625^n ($n=1, 2, \dots, 6$)	各2 ($n=1, 4$) 或 4 ($n=2, 3, 5, 6$)

[0325] [表16]

[0326] 表16

[0327]

成分	终浓度
无核酸酶水	—
F引物 (16SrRNA基因用)	1.0μM
R引物	1.0μM
对照核酸	0.025pM

Premix Ex Taq HS	1x
------------------	----

[0328] 这里,使用的引物与实施例2是同样的,对照核酸的碱基序列如表17所示。

[0329] [表17]

[0330] 表17

序列编号	名称	序列
[0331] 199	对照核酸	GTTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGCTAAGACAAACGCTAA CGGTACACCCTAGATGGGAGCTTGTAGCTAGATCGCTAAGT CCTACCGACATGTAGGCATACTACGAAGGCAATTCCCTGA AAGCCTCGTCTTATCCCGAACTTGGCATCTGCTGATACGTC AGGTTGAACGCGTACATTTACCTGTCATGCGTGGGCCTTCT CCGAATAGCCTACGTAGTGATATCGCTGGTCAATAGGCGG ATTGCTCATAAATGCACATTGGCTAAGGCCACGGAACACG AATCACGTGAGATCACTTACTATTTCGACGGAAGTACTATAC GCACCGGGACATGCAAGTAGCGTCCCACAAGCATAAGGAAC TCTATACTCGCCATCTACGCAGCTACAGGGGATACACGTAT GAGCGGTTACGAAGTAAAGGGTAGCAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCAC

[0332] PCR反应使用热循环仪在与实施例1的“1.校正曲线的制作”同样的条件下进行。本实施例中使用的DNA芯片是与实施例1同样的构成,但重新制备。了在与各细菌中特异性序列杂交的探针(探针(x))中追加搭载龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)用探针(序列编号19)和变异链球菌(*Streptococcus mutans*)用探针(序列编号38)的芯片。

[0333] 与实施例1的“1.校正曲线的制作”同样地进行杂交和检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。

[0334] 将与总16SrRNA基因杂交的探针(序列编号2)的信号强度设为 I_T 、将与对照核酸杂交的探针(序列编号1)的信号强度设为 I_C 、将扩增前的16SrRNA基因的量设为 C_T 、将扩增前的对照核酸的量设为 C_C ,将它们用[式2: $\log_{10}(I_T \div I_C) = b \times (\log_{10}(C_T \div C_C) - c) \div (a - |\log_{10}(C_T \div C_C) - c|)$]近似(图5)。使用Microsoft公司的软件“EXCEL”的“Solver”等功能制作近似式,关于(式2)的参数,确定 $a=8.07$, $b=3.43$, $c=0.119$ 。此外,确认到不管使用的校正用核酸的种类如何,得到的信号强度均落在大体相同的曲线上。

[0335] 2. 探针间信号强度的关系式的算出

[0336] 这里,对于每个细菌种类,算出与3种细菌(表18)各自的特异性碱基序列杂交的探针(探针(x))(序列编号8、19、38)的信号强度和与来源于该3种细菌的全部16SrRNA基因(总16SrRNA基因)杂交的探针(探针(y))(序列编号2)的信号强度的关系式。

[0337] 使用的DNA是表18中说明的碱基序列的合成核酸。

[0338] [表18]

[0339] 表18

[0340]

探针的序列编号	细菌名称	所用合成核酸的碱基序列
8	狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	GenBank的ID: AB035459.1的序列
19	龋齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>)	GenBank的ID: AAYI02000004.1序列 的第1281646号碱基开始的1499个碱基的序列
38	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	GenBank的ID: AY188348的序列

[0341] 对于该3种细菌的各DNA,分别进行以下的实验。

[0342] 首先,以液中所含DNA的物质量为0.5amol、0.05amol、0.005amol的方式制备PCR反应液。其他组成和液量与本实施例的上述“1.校正曲线的制作”是同样的。

[0343] 与本实施例的上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应、杂交和检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。

[0344] 具体地,通过PCR反应扩增上述3种DNA,与搭载于DNA芯片的探针杂交。将与各细菌各自的特异性碱基序列杂交的各探针(探针(x))的信号强度设为 I_{US} 、将与总16SrRNA基因杂交的探针(探针(y))的信号强度设为 I_{TS} ,使用[式5: $I_{TS}=E_S \times I_{US}$]对于每个细菌种类对它们进行近似。对于全部3种细菌求出该关系式、即各探针(x)的信号强度与探针(y)的信号强度的关系式。

[0345] 将3种DNA的结果示于图6。利用Microsoft公司的软件“EXCEL”的LINEST函数,使用将截距设为0的选项求出近似直线的斜率,结果,关于(式5)的参数 E_S ,确认为如表19所示。

[0346] [表19]

[0347] 表19

[0348]

细菌名称	E_S
狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	1.45
龋齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>)	3.30
变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	1.15

[0349] 3. 试样中目标核酸的绝对量的确定

[0350] 使用20Strain Even Mix Genomic Material (ATCC (注册商标) MSA-1002™) 作为已知浓度的样品,实施定量性的验证。可见该样品所含上述表18的3种菌的基因组DNA的拷贝数分别为全体的5%。即,可以从该基因组DNA的组成信息和各菌的基因组DNA的1个基因组内16SrRNA的拷贝数、基因组大小等信息,计算每单位重量该样品中各菌的基因组DNA拷贝数的理论值。

[0351] 以液中所含样品DNA的重量为211pg的方式制备PCR反应液。其他组成和液量与上述“1.校正曲线的制作”是同样的。

[0352] 与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应、杂交、检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。

[0353] 由总16SrRNA基因探针的信号强度 I_{TM} 和“1.校正曲线的制作”中求出的参数,利用式4 [$C_{TM}=C_C \times 10^{(8.43 \times \log_{10}(I_{TM} \div I_{CM}) \div (3.43 + |\log_{10}(I_{TM} \div I_{CM})|) + 0.119)}$], 算出PCR反应液中加入的总16SrRNA基因的物质质量(mol) C_{TM} (图4C), 将其乘以阿伏伽德罗常数, 算出拷贝数。

[0354] 接下来,由与各菌特异性杂交的各探针(x)的信号强度 I_{US} 以及“2.探针间信号强度

的关系式的算出”中求出的参数和上述中算出的总16SrRNA基因的拷贝数,按照式6 ($I_{TSM}=E_S \times I_{USM}$) 和式7 ($R_S=I_{TSM} \div I_{TM}$),算出各菌16SrRNA基因的拷贝数(图4D)。

[0355] 进一步,根据算出的3种菌16SrRNA基因的拷贝数和各菌的1个基因组内的16SrRNA的拷贝数(分别参照Genbank的ID为AP009380.1、NZ_DS264586.1、AE014133.2的序列的注解信息),算出各菌基因组DNA的拷贝数。关于总基因组DNA的拷贝数,使用作为样品使用的20Strain Even Mix Genomic Material (ATCC (注册商标) MSA-1002™) 的菌组成的加权平均值即5.25进行计算。

[0356] 将PCR反应液中加入的各基因组DNA的拷贝数的测定值和理论值示于表20。除了龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*) 以外,测定值与理论值的差在2倍左右的误差范围内是一致的。

[0357] [表20]

[0358] 表20

[0359]	细菌名称	拷贝数 (测定值)	拷贝数 (理论值)	测定值/理论值
	总基因组DNA	8.65.E+04	5.74.E+04	1.51
	狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	4.96.E+03	2.87.E+03	1.73
	龋齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>)	5.55.E+02	2.87.E+03	0.193
	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	6.69.E+03	2.87.E+03	2.33

[0360] 上述结果表明,本发明的方法可以以高的精度确定试样中2种以上目标核酸的绝对量。

[0361] [实施例4]

[0362] 本实施例中,在PCR扩增后增加λ核酸外切酶处理,确定绝对量,与理论值进行比较。

[0363] 1.校正曲线的制作

[0364] 作为校正曲线的制作中的校正用核酸,使用市售的20 Strain Even Mix Genomic Material (ATCC (注册商标) MSA-1002™)。将上述溶液以PCR反应液中16SrRNA基因的浓度合计为1.60pM和其0.25n倍 ($n=1,2,\dots,8$) 的方式添加在PCR反应液中。关于PCR反应液的其他组成,与实施例3是同样的。总液量调整为20μL。各条件分别进行1个反应。

[0365] 这里,使用的F引物和对照核酸与实施例3是同样的。但R引物使用的是具有与实施例3相同的序列、5'端经磷酸化的引物。

[0366] 与实施例3同样地进行PCR反应后,使用PCR反应液总量按表21所示组成将λ核酸外切酶处理的反应液调整为总液量50μL。λ核酸外切酶处理的反应利用热循环仪在表22所示条件下进行。使用的λ核酸外切酶和缓冲液是NEW ENGLAND BioLabs公司制造的。

[0367] [表21]

[0368] 表21

[0369]	成分	终浓度
	无核酸酶水	—
	PCR反应液	—
	Lambda Exonuclease Reaction Buffer	1×
	λ外切核酸酶	0.3Unit/μl

[0370] [表22]

[0371] 表22

[0372]	37℃	75℃	4℃
	30分钟	10分钟	∞

[0373] λ核酸外切酶的反应结束后,在各反应液(总量50μL)中添加杂交反应液(1M Tris-HCl 48μL、1M NaCl 48μL、0.5%吐温2020μL、无核酸酶水34μL)。使用该液和DNA芯片,利用自动杂交洗涤装置(三菱化学)在50℃进行16小时杂交。然后进行洗涤。DNA芯片使用与实施例3相同的芯片。

[0374] 与实施例3的“1.校正曲线的制作”同样地进行检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。利用(式2)的近似也与实施例3的“1.校正曲线的制作”同样地进行(图7),关于参数,确认 $a=7.29$, $b=2.94$, $c=0.0746$ 。

[0375] 2. 探针间信号强度的关系式的算出

[0376] 这里,对于每个细菌种类,算出与实施例3中定量的3种细菌(表18)各自的特异性序列杂交的探针(探针(x))(序列编号8、19、38)的信号强度和与来源于该3种细菌的全部16SrRNA基因(总16SrRNA基因)杂交的探针(探针(y))(序列编号2)的信号强度的关系式。即,与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应后的λ核酸外切酶处理和杂交反应液的添加,其他与实施例3的“2.探针间信号强度的关系式的算出”同样地进行,关于全部3种细菌,求出各探针(x)的信号强度与探针(y)的信号强度的关系式。

[0377] 将3种细菌的DNA的结果示于图8。(式5)的参数 E_s 确定如表23所示。

[0378] [表23]

[0379] 表23

[0380]	探针的 序列编号	细菌名称	E_s
	8	狗齿龈卟啉单胞菌(<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	1.82
	19	龋齿放线菌(<i>Actinomyces odontolyticus</i>)	1.20
	38	变异链球菌(<i>Streptococcus mutans</i>)	1.74

[0381] 3. 试样中目标核酸的绝对量的确定

[0382] 实施作为标准样品的市售20Strain Even Mix Genomic Material(ATCC(注册商标)MSA-1002™)的定量实验。

[0383] 与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应后的λ核酸外切酶处理和杂交反应液的添加,其他与实施例3的“3.试样中目标核酸的绝对量的确定”同样地进行,关于全部3种细菌,算出各菌基因组DNA的拷贝数。

[0384] PCR反应液中各基因组DNA的拷贝数的算出的测定值和理论值如表24所示。

[0385] [表24]

[0386] 表24

[0387]

细菌名称	拷贝数 (测定值)	拷贝数 (理论值)	测定值/理论值
总基因组DNA	5.02. E+04	5.74. E+04	0.874
狗齿龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	2.56. E+03	2.87. E+03	0.892
龋齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>)	2.34. E+03	2.87. E+03	0.814
变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)	5.75. E+03	2.87. E+03	2.00

[0388] 上述结果表明,拷贝数的测定值与理论值之差越小(测定值/理论值接近1),绝对量测定的精度越高。

[0389] 上述结果表明,本发明的方法通过包括使扩增后的核酸在单链(1条链)上进行富集的工序,与实施例3的结果(表20)相比,能够以进一步高的精度确定试样中2种以上目标核酸的绝对量。特别是确认到,在实施例4中龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)的目标核酸的绝对量的确定中,与实施例3的结果(表20)相比,绝对量的测定精度显著提高。

[0390] [实施例5]

[0391] 本实施例中,改变一部分PCR反应条件,与实施例3同样地进行理论值的比较。

[0392] 1.校正曲线的制作

[0393] 校正曲线的制作中使用的校正用核酸、PCR反应液的组成、使用的引物和对照核酸与实施例4是同样的。

[0394] 用热循环仪在表25所示条件下进行PCR反应后,与实施例1的“1.校正曲线的制作”同样地进行杂交和检测,将基于检测到的荧光信号换算得到的数值数据用于分析。DNA芯片使用与实施例3相同的芯片。

[0395] [表25]

[0396] 表25

[0397]

95℃	98℃	55℃	72℃	72℃	4℃
1分钟	10秒	30秒	20秒	10分钟	∞
	40个循环				

[0398] 与实施例3的“1.校正曲线的制作”同样地进行利用(式2)的近似(图9),关于参数,确定 $a=4.74$, $b=0.834$, $c=-0.593$ 。

[0399] 2.探针间信号强度的关系式的算出

[0400] 这里,关于实施例3中定量的3种细菌(表18)中的2种菌即龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)和变异链球菌(*Streptococcus mutans*),分别对于每个细菌种算出与特异性序列杂交的探针(探针(x))(序列编号19、38)的信号强度和与来源于该2种细菌的全部16SrRNA基因(总16SrRNA基因)杂交的探针(探针(y))(序列编号2)的信号强度的关系式。即,与上述“1.校正曲线的制作”同样地进行PCR反应,其他与实施例3的“2.探

针间信号强度的关系式的算出”同样地进行,关于2种细菌,求出各探针(x)的信号强度与探针(y)的信号强度的关系式。

[0401] 将2种DNA的结果示于图10。确定(式5)的参数 E_s 如表26所示。

[0402] [表26]

[0403] 表26

[0404]	探针的 序列编号	细菌名称	E_s
	19	龋齿放线菌 (Actinomyces odontolyticus)	1.79
	38	变异链球菌 (Streptococcus mutans)	1.21

[0405] 3. 试样中目标核酸的绝对量的确定

[0406] 实施作为标准样品的市售20 Strain Even Mix Genomic Material (ATCC(注册商标)MSA-1002™)的定量实验。

[0407] PCR反应与上述“1. 校正曲线的制作”同样地进行,其他与实施例3的“3. 试样中目标核酸的绝对量的确定”同样地进行,对于2种细菌,算出各菌基因组DNA的拷贝数。

[0408] 算出PCR反应液中各基因组DNA的拷贝数的测定值和理论值如表27所示。

[0409] [表27]

[0410] 表27

[0411]	细菌名称	拷贝数 (测定数)	拷贝数 (理论值)	测定值/理论值
	总基因组DNA	8.74.E+04	5.74.E+04	1.52
	龋齿放线菌 (Actinomyces odontolyticus)	2.83.E+03	2.87.E+03	0.986
	变异链球菌 (Streptococcus mutans)	4.42.E+03	2.87.E+03	1.54

[0412] 上述结果表明,与实施例3的结果(表20)相比,本发明的方法能够以进一步高的精度确定试样中2种以上目标核酸的绝对量。特别是在实施例5中的龋齿放线菌(Actinomyces odontolyticus)的目标核酸的绝对量的确定中,确认到与实施例3的结果(表20)相比,绝对量测定的精度显著提高。

[0413] 产业可利用性

[0414] 根据本发明,能够通过简便的方法对多种目标核酸中的每一个(各个目标核酸)进行绝对定量。

[0415] 序列自由文本

[0416] 序列编号1~199:合成DNA

序列表

	<110> 三菱化学株式会社	
	<120> 目标核酸的定量方法	
	<130> G2063WO	
	<150> JP 2018-100475	
	<151> 2018-05-25	
	<150> JP 2019-026519	
	<151> 2019-02-18	
	<160> 199	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0001]	<223> 合成 DNA	
	<400> 1	
	ctattcgacc agcgatatca ctacgtaggc	30
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 2	
	cgtattaccg cggctgctgg cac	23
	<210> 3	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	

	<400> 3 gtcaatttg catgctatta acacacc	27
	<210> 4 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 4 gtcaagttgg catgctatta acacacc	27
	<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0002]	<400> 5 gtcataattc tttccaaga	20
	<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 6 tacacgtaca ccttattctt	20
	<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 7 tacattccga aaaacgtcat	20

	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 8	
	ttcaatgcaa tactcgatc	20
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 9	
	cgaagggtaa atgcaaagg gc	22
[0003]		
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 10	
	cgaagggtaa atgcaaaaag gc	22
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 11	
	ctttattccc acataaaagc	20

	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 12	
	ttcgcattag gcacgttc	18
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 13	
	aagtaccgtc actgtgtg	18
[0004]	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 14	
	cacccgttct tctctaca	19
	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 15	
	acagtatgaa cttccattc t	21
	<210> 16	
	<211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 16	
	cacgtatctc attttattcc cctgt	25
	<210> 17	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 17	
	cctcttcttc ttattcttca tctgc	25
[0005]	<210> 18	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 18	
	tccttctaac tgttcgc	17
	<210> 19	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 19	
	aagtcagccc gtaccca	17
	<210> 20	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 20 ccaccacaa ggagcag	17
	<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 21 gtcaatttg catgctatta	20
	<210> 22 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
[0006]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 22 ccaagcagt tctatggt	18
	<210> 23 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 23 gccttcgcaa taggtatt	18
	<210> 24 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成 DNA	
	<400> 24 caatgggtat tcttcttgat	20
	<210> 25 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 25 caaccattca agaccaaca	19
	<210> 26 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
[0007]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 26 tcaaaggcag ttgcttagt	19
	<210> 27 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 27 ctctagctat ccagttcag	19
	<210> 28 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 28 tttctttctt cccaactgaa	20
	<210> 29 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 29 ccagtactct agttacaca	19
	<210> 30 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0008]	<400> 30 tagttataca gttccaacg	20
	<210> 31 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 31 tatgcagttt ccaacgcaa	19
	<210> 32 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 32 gccgtgactt gctgggt	17

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 33
ctgtcctctt ctgcact 17

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 34
gggtaaatgc aaaaaggca 19

[0009]

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 35
ttagccgtcc ctttctgg 18

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 36
tcccctcttg cactcaagt 19

	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 37	
	tctcccctct tgcactca	18
	<210> 38	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 38	
	cacacgttct tgacttac	18
[0010]	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 39	
	ccgtcactgt gtaagctt	18
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 40	
	cacgtatctc atttattcc	20
	<210> 41	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 41	
	cctcttcttc ttattcttca t	21
	<210> 42	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 42	
	tattcgcaag aaggcctt	18
[0011]	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 43	
	aaaaagcagt gccttggtcc	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 44	
	gcgcttcata acccggtac	20
	<210> 45	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 45	
	aaccaccca caaacga	17
	<210> 46	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 46	
	ttccaacta aaagcagttt a	21
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0012]	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 47	
	tcttaacaaa ggtaccgtca cc	22
	<210> 48	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 48	
	cctacgctta cctaaccacc ta	22
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成 DNA	
	<400> 49 ccctaggaca gaggcttaca	20
	<210> 50 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 50 aaaccctgcg cttaggtgc	20
	<210> 51 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
[0013]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 51 cccctactac agagttttac ga	22
	<210> 52 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 52 ccgtctctac tgtatatagt	20
	<210> 53 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 53 gtcaaggcgc taacagttac	20
	<210> 54 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 54 agttaacgtc aatcacctag	20
	<210> 55 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0014]	<400> 55 gcgggatagt cagtcaggtg	20
	<210> 56 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 56 cagtttccga tgcagttcc	19
	<210> 57 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 57 cgtgcagttc cgtccacctc	20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 58
taaccacaag attattcgtc 20

<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 59
agctgtcgat attagcaaca g 21

[0015]

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 60
gtgcttaatg aggtaagcc 20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 61
accaccgact tgaaggacca 20

	<210> 62	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 62	
	ggtacattca ctatggtaca cg	22
	<210> 63	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 63	
	tacatgcatc tcagctacac gt	22
[0016]	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 64	
	acacgtgact cttgtattc	20
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 65	
	agtcagacgt tgggcgccta	20
	<210> 66	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 66	
	cacgtgactg actttatccc	20
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 67	
	cctactttca gcgcactcaa	20
	<210> 68	
	<211> 20	
[0017]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 68	
	aatagggaca cgtccctaac	20
	<210> 69	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 69	
	cacgtgcatc aaattattct cg	22
	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 70		
	acgtgggctc tttatcccc	20	
	<210> 71		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 71		
	acacgtgatt gactttatcc	20	
	<210> 72		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0018]	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 72		
	accactgca aaaccagggt	20	
	<210> 73		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 73		
	tctcttctc cctgctaaca	20	
	<210> 74		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 合成 DNA	
	<400> 74 actattcgca ctaggcacgt	20
	<210> 75 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 75 gtaccgtcac ccaaactcaa ta	22
	<210> 76 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0019]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 76 ccaacaattt aaccacttac	20
	<210> 77 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 77 cgtcattcgt cttctgcaa	20
	<210> 78 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 78 ctggttaagtt accgtcac	18
	<210> 79 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 79 cacactcggtt cttgacttac	20
	<210> 80 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0020]	<400> 80 tacacacggtt cttcccctac	20
	<210> 81 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 81 gtcgattacc gtcacagat g	21
	<210> 82 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 82 ttcctcaaaa acttattcct	20

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 83
cgtcaaatcc tcgcactatt c 21

<210> 84
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 84
accgtcaatt cctctaacta tt 22

[0021]

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 85
cagtttcgcg aggtattaac 20

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 86
caccagacga agtccgtgct 20

	<210> 87	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 87	
	ctaggtccgg tagcaagcta cc	22
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 88	
	taccttcccc cgctcgactt	20
[0022]	<210> 89	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 89	
	atcagtagca agctacctct ctc	23
	<210> 90	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 90	
	cgctaagatc agtagcaagc ta	22
	<210> 91	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 91	
	gtattaatct cggtagcctc c	21
	<210> 92	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 92	
	ctaggtagg tagcaagcta catt	24
[0023]	<210> 93	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 93	
	caccaaaaca ccacaaaagt ga	22
	<210> 94	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 94	
	actaaccac cccgcaaaaa	20
	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 95 tccagtatta gcacccattt	20
	<210> 96 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 96 atgcgaagat cagtgaatat cc	22
	<210> 97 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0024]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 97 aagttggagc atcatcggtc	20
	<210> 98 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 98 gccaatgagt gaatatccag	20
	<210> 99 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成 DNA	
	<400> 99 ggaagtctcg aagtattcgg t	21
	<210> 100 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 100 gagctttctc gagtcttcca tg	22
	<210> 101 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
[0025]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 101 cggaatcatt atgctatcgg gt	22
	<210> 102 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 102 caagctttct tcctgatgcc	20
	<210> 103 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 103 tagagccaag gatttcttc cg	22
	<210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 104 actacaggac atgttccgat	20
	<210> 105 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0026]	<400> 105 ctctcaagat cccgaaagat c	21
	<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 106 gtacgccgct ctcaagatcc	20
	<210> 107 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 107 taaccacaac gccttctcc	20

	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 108	
	gtcacccaag gagcaagctc	20
	<210> 109	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 109	
	ctgacactaa acagtgtgcc ta	22
[0027]		
	<210> 110	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 110	
	tcgagtaccc gcagcaagct	20
	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 111	
	cggacagtag tgcaagcact	20

	<210> 112	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 112	
	aataacgcga ggtcttgcga	20
	<210> 113	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 113	
	ttaaccttaa cgccttcctc	20
[0028]	<210> 114	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 114	
	cctcgctgaa agtactttac aa	22
	<210> 115	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 115	
	cggttattaa ccacaacacc	20
	<210> 116	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 116	
	agctctctgt gctaccgttc	20
	<210> 117	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 117	
	tctctgtgct accgttcgac	20
	<210> 118	
	<211> 20	
[0029]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 118	
	tctttggtct tgcgacgtta	20
	<210> 119	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 119	
	ctctcaggtg cggctatgca	20
	<210> 120	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 120		
	aggtccccct cttgtgctt	20	
	<210> 121		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 121		
	cgtcaatgag caaaggatt	20	
	<210> 122		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0030]	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 122		
	gacatacgta attaccgcg	20	
	<210> 123		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 123		
	gcttgcgaca tacgtaatta	20	
	<210> 124		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 合成 DNA	
	<400> 124 atgttgtccc ggtctaagag	20
	<210> 125 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 125 cttcaaggca tattcctacg	20
	<210> 126 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0031]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 126 ttacaaccct caggccttct	20
	<210> 127 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 127 ttacaaccct caggccttct t	21
	<210> 128 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 128 cctcttcaag gcatattcct ac	22
	<210> 129 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 129 cagtattatc tgaccgtccc	20
	<210> 130 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0032]	<400> 130 aggctaattct taaagcgcca gg	22
	<210> 131 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 131 cagctttcgt cctcagacat t	21
	<210> 132 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 132 gcttcctaac ttcggtcgac	20

<210> 133
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 133
gtcagggctt atgggtatta 20

<210> 134
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 134
acatctgact caatcaaccg c 21

[0033]

<210> 135
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 135
tattaacctt gacaccttc tc 22

<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 136
cagaagacat gcgtcttgag 20

	<210> 137	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 137	
	gagtacctcc gaagaggcct tt	22
	<210> 138	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 138	
	attgcccacg tggtactcac	20
[0034]	<210> 139	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 139	
	cttcttctcc acctaccgtc	20
	<210> 140	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 140	
	ccactcgagt gtctccgaag	20
	<210> 141	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 141	
	aggcttatcc cggtgtgcag	20
	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 142	
	acccaacagc atgcactgaa a	21
	<210> 143	
	<211> 20	
[0035]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 143	
	gtcagttact tccagagac	20
	<210> 144	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 144	
	ccgcttggtt ttgctcagaa tt	22
	<210> 145	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 145		
	actcaatact gagcaaaccc tc	22	
	<210> 146		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 146		
	gaggacctcg ttggaataca ta	22	
	<210> 147		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0036]	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 147		
	ctgcttgaag gtaggttgga ta	22	
	<210> 148		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 148		
	ccctaacttt atccccatac a	21	
	<210> 149		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 合成 DNA	
	<400> 149 gtatggtacc tgcaaatagg	20
	<210> 150 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 150 ctttaatcgt cggtggatgc c	21
	<210> 151 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0037]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 151 agacgatgcc atgaggtatt	20
	<210> 152 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 152 tctttaccca ttaccgtcac	20
	<210> 153 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 153 cccaagatta cacttccgac	20
	<210> 154 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 154 gattaacgcc tgcaccctcc	20
	<210> 155 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0038]	<400> 155 cgctgcacc ctccgtatta	20
	<210> 156 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 156 taccgctcga ttgcatgtgt	20
	<210> 157 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 157 aactttatca ccttctccc	20

<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 158
gcggttcaat atattatccg 20

<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 159
ataagtgaca gcaaaaccgt 20

[0039]

<210> 160
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 160
ttagccagct ggatttcttt 20

<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 161
cgacagagta gattccgatg 20

	<210> 162	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 162	
	agtctagtgt aaacaccaaa cctc	24
	<210> 163	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 163	
	actcctacca acgttcttct c	21
[0040]	<210> 164	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 164	
	catctactag cgatgcaatt g	21
	<210> 165	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 165	
	ttaagtaccg tcacagcatg	20
	<210> 166	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 166	
	acctttcatc cagtctcgat	20
	<210> 167	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 167	
	cgtcaaatcc tcgcactatt	20
	<210> 168	
	<211> 20	
[0041]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 168	
	cacacctgac tgactatccc	20
	<210> 169	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 169	
	ccactaatca gcactctagc a	21
	<210> 170	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 170		
	aaactaagag gcacatgacc	20	
	<210> 171		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 171		
	gttttaaag ctgacttggg g	21	
	<210> 172		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
[0042]	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 172		
	gcataaactc ttcctcaacc	20	
	<210> 173		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成 DNA		
	<400> 173		
	aaccgttatc cccaagttga	20	
	<210> 174		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

	<223> 合成 DNA	
	<400> 174 tctcagtccc gcactttcat	20
	<210> 175 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 175 tattaacctc atcgcttcc	20
	<210> 176 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0043]	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 176 gtaacgtcaa tcgatgaggt	20
	<210> 177 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 177 aaatgtaca gtcaaactct a	21
	<210> 178 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	

	<400> 178 catgcgaacc aaagttctta	20
	<210> 179 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 179 ccggacgtta tccccacta	20
	<210> 180 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
[0044]	<400> 180 gctgaatcca ggagcaagct	20
	<210> 181 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 181 gcgagtaacg tcaattgatg a	21
	<210> 182 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成 DNA	
	<400> 182 cccctctacg agactctagc	20

<210> 183
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 183
gtattaagct caccaccttc ct 22

<210> 184
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 184
ctaacatcag agaagcaagc 20

[0045]

<210> 185
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 185
aagaccgtct ttcacttttg 20

<210> 186
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成 DNA

<400> 186
cttacacata tgttcttccc 20

	<210> 187	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 187	
	atgcaacatc cactcttatg	20
	<210> 188	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 188	
	caagtgcacc tttaagcaa	20
[0046]	<210> 189	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 189	
	catgcgttag tctcttat gc	22
	<210> 190	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 190	
	ccatctcata gtggagcaat	20
	<210> 191	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 191	
	cccacatca ttcttctta a	21
	<210> 192	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 192	
	tacgggaggc agcag	15
	<210> 193	
	<211> 19	
[0047]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 193	
	crgggtatct aatccygtt	19
	<210> 194	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 194	
	gagaagccta cacaaacgta acgtc	25
	<210> 195	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>	
<223> 合成 DNA	
<400> 195	
ctctaaagac cgctctatct cgg	23
<210> 196	
<211> 458	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成 DNA	
<400> 196	
gtgagaagcc tacacaaacg taacgtcagg gctaagacaa acgctaacgg tacaccctag	60
atgggagcct gtagctagat cgctaagtcc taccgacatg taggcatact cacgaaggca	120
attccctgaa agcctcgtct tatcccgaac ttggcatctg ctgatacgtc aggttgaacg	180
cgtaacatta cctgtcatgc gtgggccttc tccgaatagc ctacgtagtg atatcgctgg	240
[0048] tcgaataggc ggattgctca taaatgcaca ttggctaagg cccacggaac acgaatcacg	300
tgagatcact tactattcga cggaactact atacgcaccg ggacatgcaa gtagcgtccc	360
acaagcataa ggaactctat actcgccatc tacgcagcta caggggatac acgtatgagc	420
ggttacgaag taaagccgag atagagcggg cttagag	458
<210> 197	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成 DNA	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (5)..(5)	
<223> n 为肌苷	
<400> 197	
taccngggta tctaattc	18

<210> 198
 <211> 458
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成 DNA

<400> 198
 gttctacgg gaggcagcag tagggctaag acaaacgcta acggtacacc ctagatggga 60
 gctttagct agatcgctaa gtcctaccga catgtaggca tactcacgaa ggcaattccc 120
 tgaaagcctc gtcttatccc gaacttggca tctgctgata cgtcagggtg aacgcgtaca 180
 ttacctgtc atgctgtggc cttctccgaa tagcctacgt agtgatatcg ctggtcgaat 240
 aggcggattg ctataaatg cacattggct aaggccacg gaacacgaat cacgtgagat 300
 cacttactat tcgacggaac tactatacgc accgggacat gcaagtagcg tcccacaagc 360
 ataaggaact ctatactcgc catctacgca gctacagggg atacacgtat gagcggttac 420
 gaagtaaagg gtagcaaaca ggattagata ccctgaaa 458

[0049]

<210> 199
 <211> 463
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成 DNA

<400> 199
 gttctacgg gaggcagcag tagggctaag acaaacgcta acggtacacc ctagatggga 60
 gctttagct agatcgctaa gtcctaccga catgtaggca tactcacgaa ggcaattccc 120
 tgaaagcctc gtcttatccc gaacttggca tctgctgata cgtcagggtg aacgcgtaca 180
 ttacctgtc atgctgtggc cttctccgaa tagcctacgt agtgatatcg ctggtcgaat 240
 aggcggattg ctataaatg cacattggct aaggccacg gaacacgaat cacgtgagat 300
 cacttactat tcgacggaac tactatacgc accgggacat gcaagtagcg tcccacaagc 360
 ataaggaact ctatactcgc catctacgca gctacagggg atacacgtat gagcggttac 420
 gaagtaaagg gtagcaacag gattagatac cctggtagtc cac 463

[0050]

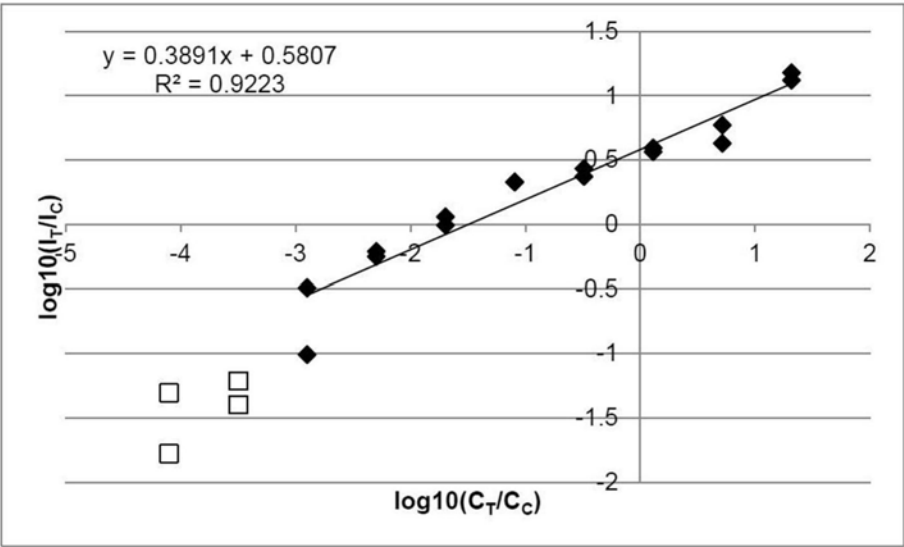


图1

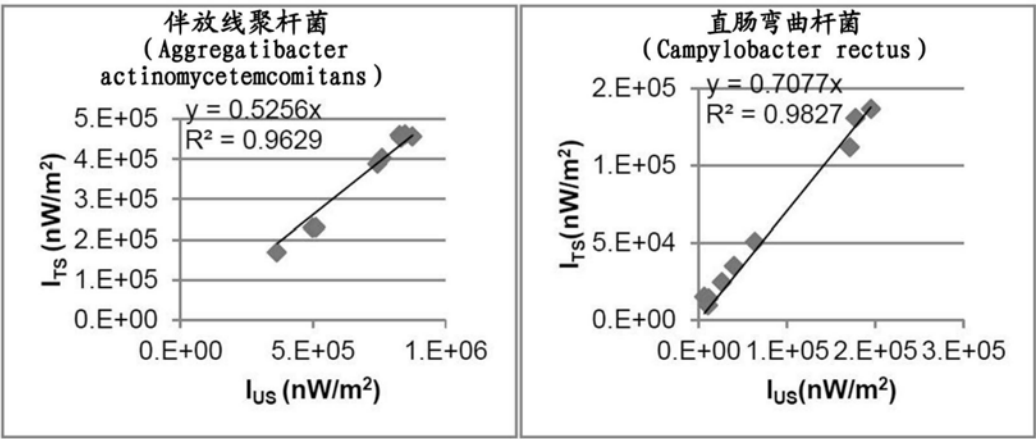


图2

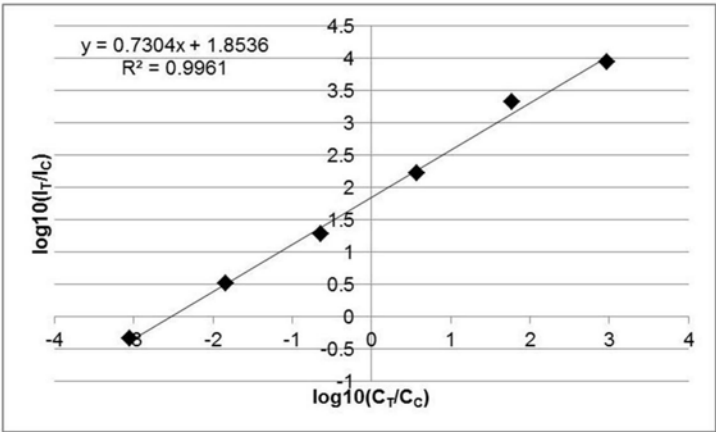


图3

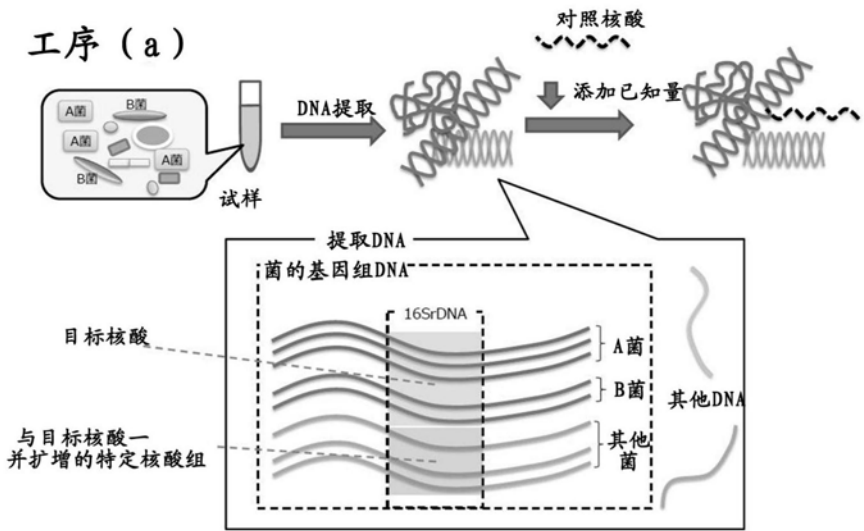


图4A

工序 (b)

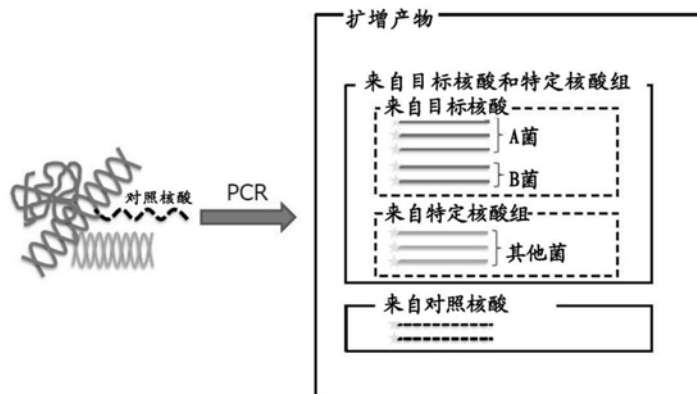


图4B

工序 (c)

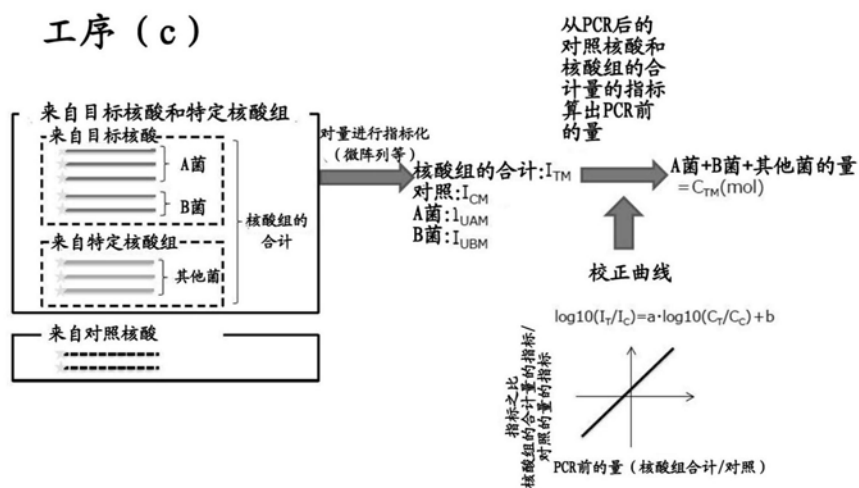


图4C

工序 (d)

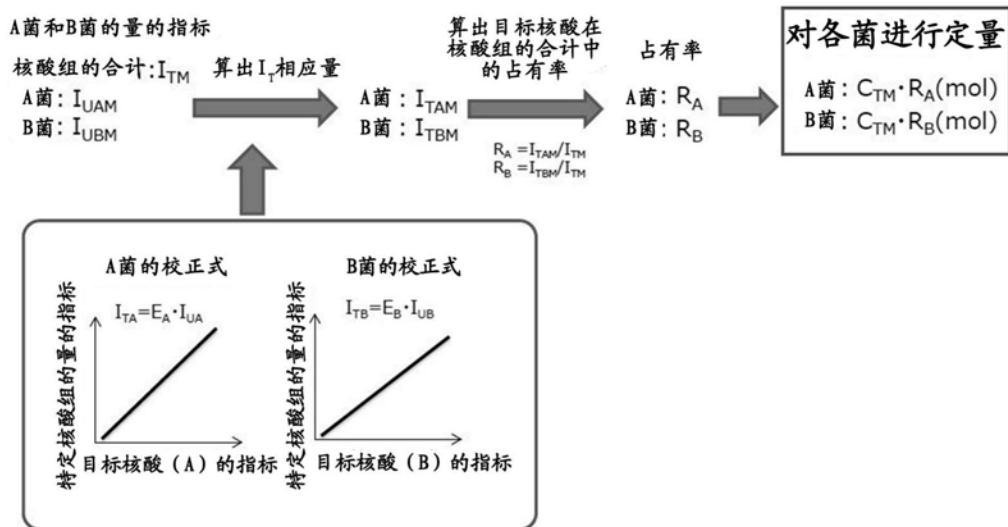


图4D

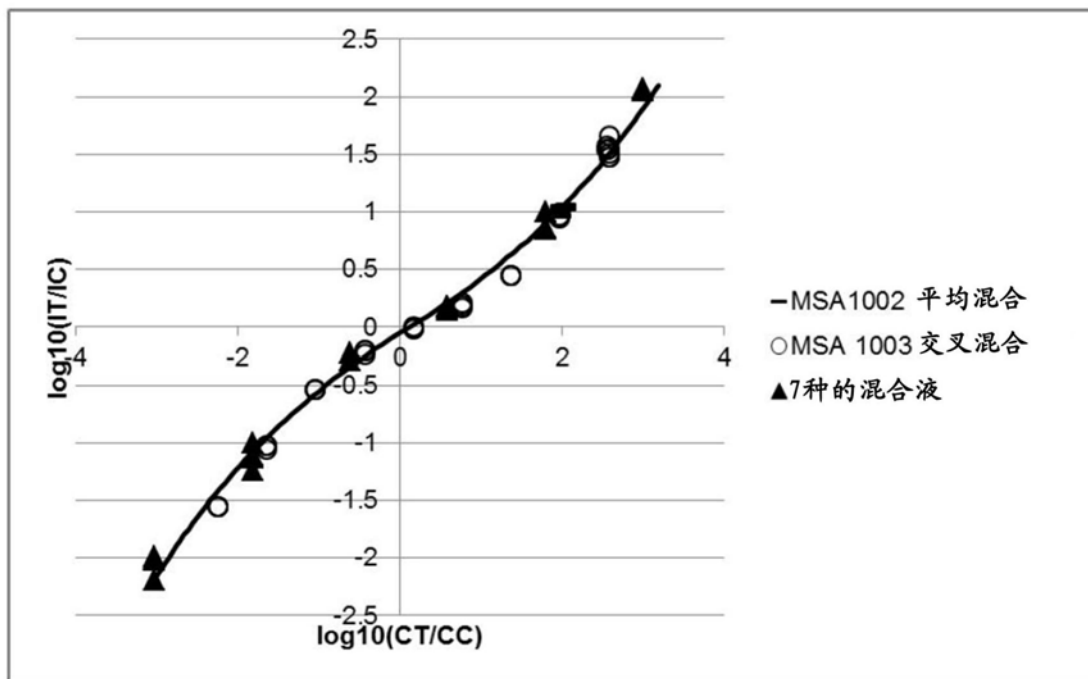


图5

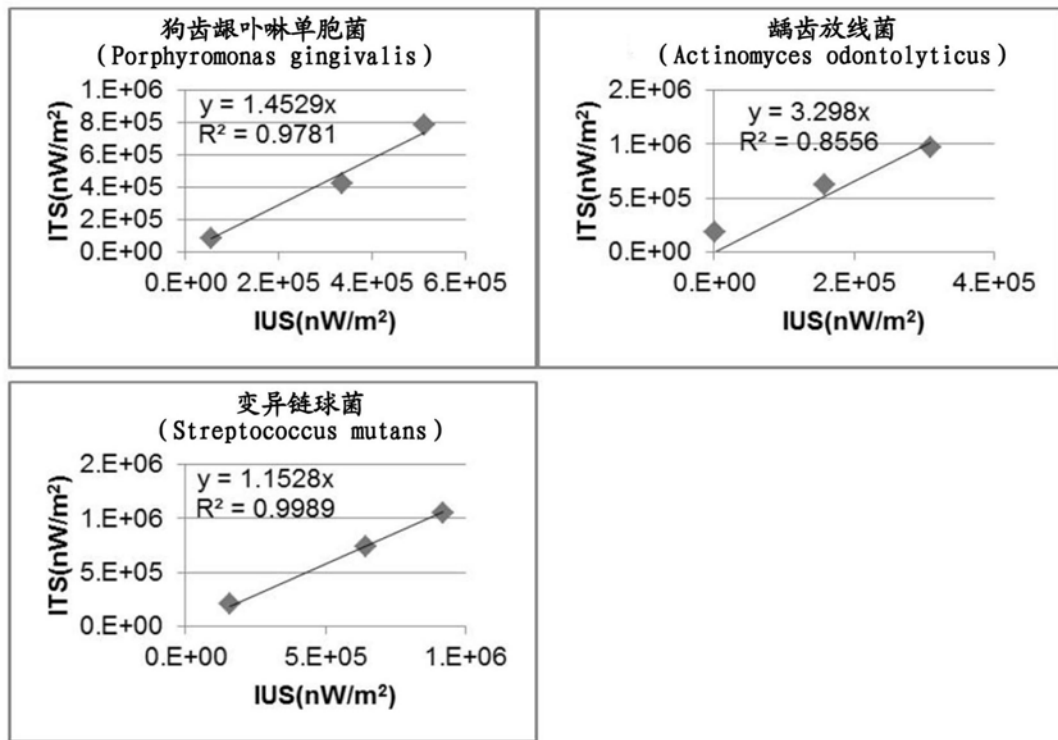


图6

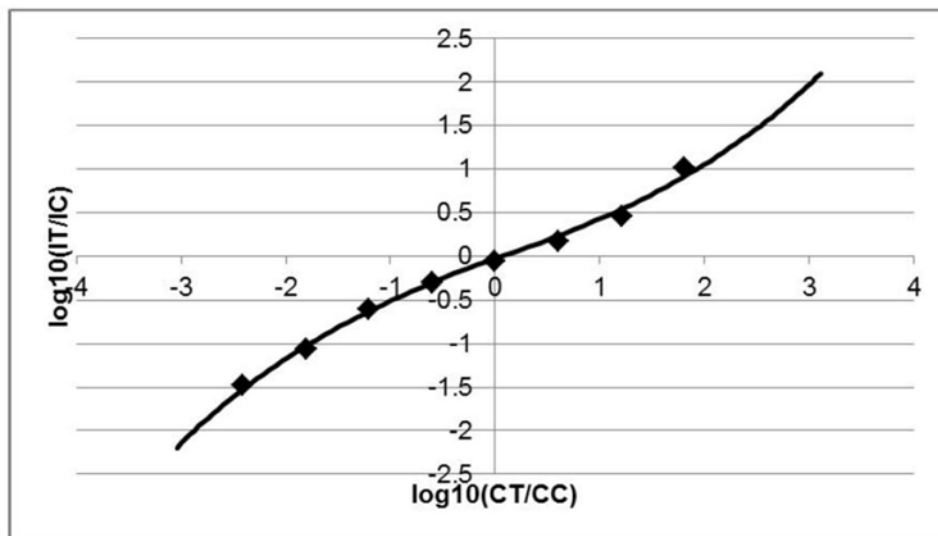


图7

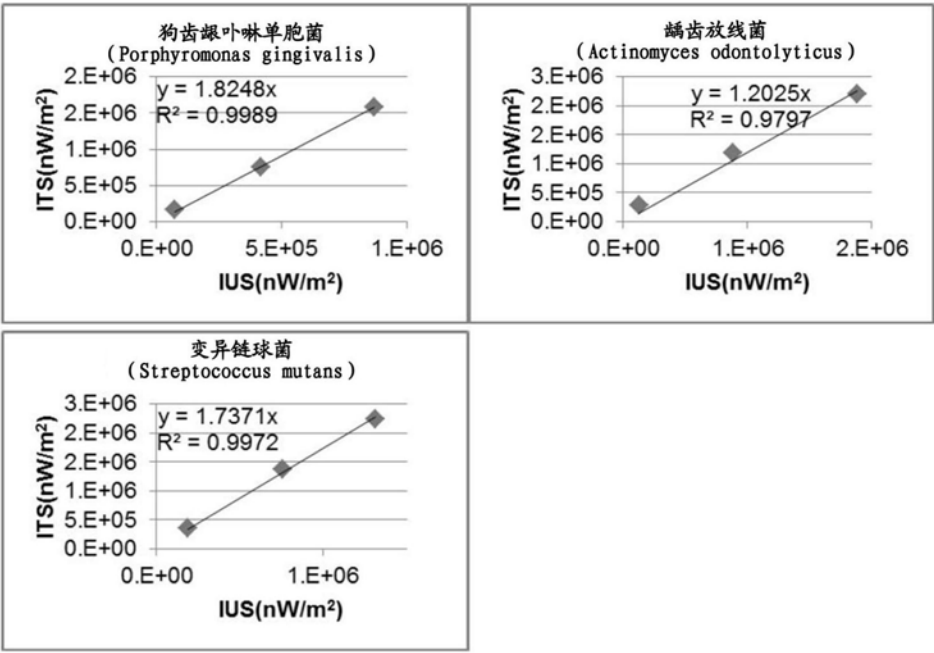


图8

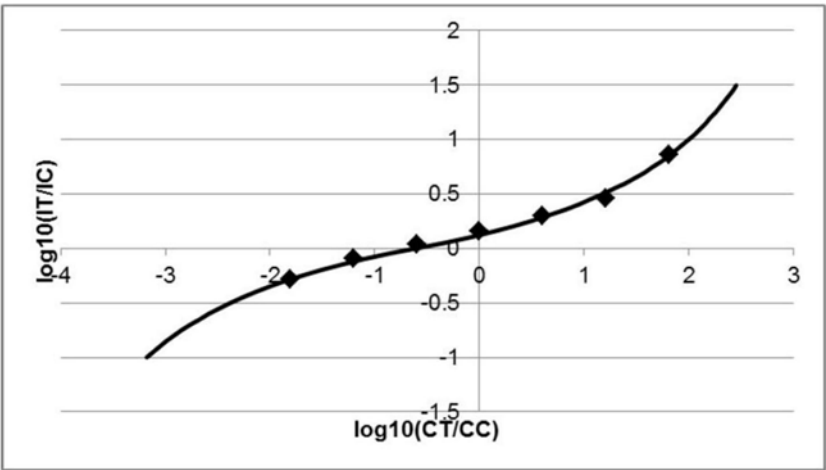


图9

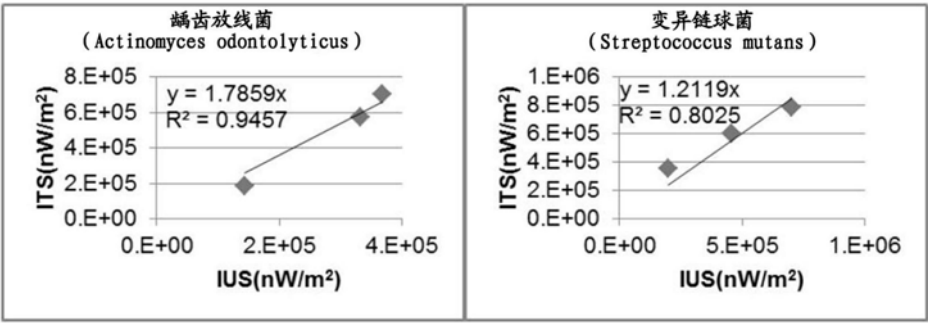


图10