

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 11 月 28 日(28.11.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/176136 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064101
- (22) 国際出願日: 2013 年 5 月 21 日(21.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-117979 2012 年 5 月 23 日(23.05.2012) JP
- (71) 出願人: タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者: 田畑 早苗(TABATA, Sanae); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 上森 隆司(UEMORI, Takashi); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 磨谷 昌(TOGIYA, Sakae); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号 梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MYCOPLASMA- AND ACHOLEPLASMA-DETECTING COMPOSITION

(54) 発明の名称: マイコプラズマ及びアコレプラズマ検出用組成物

(57) Abstract: Provided are: a composition that contains a primer for detecting Mycoplasma bacteria and Acholeplasma bacteria; a probe-containing composition; a method for detecting Mycoplasma bacteria and Acholeplasma bacteria; a kit that contains a primer for detecting Mycoplasma bacteria and Acholeplasma bacteria; and a probe-containing kit.

(57) 要約: マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌を検出するためプライマーを含む組成物、更にプローブを含む組成物、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌の検出方法、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌を検出するためプライマーを含むキット、更にプローブを含むキットを提供する。



WO 2013/176136 A1

明 細 書

発明の名称：マイコプラズマ及びアコレプラズマ検出用組成物 技術分野

[0001] 本発明は、マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するための組成物、検出方法、及びキットに関する。

背景技術

[0002] マイコプラズマ属細菌 (*Mycoplasma*) は、真正細菌の一種であり、広く動物界、植物界で生息する。その一部は、例えば、ヒトの原発性異型肺炎、ニワトリの呼吸器マイコプラズマ症、ブタのマイコプラズマ肺炎等の疾病の原因となっており、その診断、治療、予防などの研究が活発に行われている。また、マイコプラズマは、細胞壁を有さず、細菌の中でも非常に小さな形態をしているため、一般的な濾過滅菌用のフィルターを通過し得る。そのため、細胞の培養に使用する培地中にマイコプラズマが存在していた場合、培地を濾過滅菌してもマイコプラズマのコンタミネーション（汚染）が除去できないことが問題となっている。

[0003] アコレプラズマ属細菌 (*Acholeplasma*) は、真正細菌の一種であり、広く動物界、植物界で生息する。アコレプラズマは、マイコプラズマと同じく細胞壁を有さず、細菌の中でも非常に小さな形態をしているため、一般的な濾過滅菌用のフィルターを通過し得る。そのため、細胞の培養に使用する培地中にアコレプラズマが存在していた場合、培地を濾過滅菌してもアコレプラズマのコンタミネーション（汚染）が除去できないことが問題となっている。コンタミネーションの原因となるアコレプラズマ属細菌の例として、*Acholeplasma laidlawii* が知られている。

[0004] 細胞培養用の培地のマイコプラズマ及びアコレプラズマによるコンタミネーションの影響としては、培養細胞の成長阻害、代謝や遺伝子発現の変動等が挙げられる。このような影響が発生すると、培養細胞を用いた実験について正しい評価を行うことができなくなる。そのため、動物細胞を培養する際

には、培地中のマイコプラズマ及びアコレプラズマの存在（コンタミネーション）を、高感度なマイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法により否定することが重要である。

[0005] マイコプラズマを検出する方法としては、直接培養方法、DNA 蛍光染色方法、ELISA 法、及びPCR 法等が知られている。このうちPCR 法が感度、迅速性、簡便性の観点において優れており、広く利用されている。

[0006] 既存技術の一例として、rRNA をコードする遺伝子を標的としたPCR と電気泳動との組み合わせ（エンドポイントPCR 法）によるマイコプラズマの検出方法が知られている（特許文献1）。しかしながら、この方法において設計されたプライマーは、わずか11種のマイコプラズマのrRNA をコードする遺伝子間の塩基配列のみを比較し、その菌種間で保存されている領域にプライマーを設計しており、検出可能な種が限定されている。また、この方法は、高感度ではあるが、2段階のPCR の後に電気泳動によりバンドを検出する方法であるため、操作が煩雑であり検出に時間がかかる。

[0007] その他の既存技術として、リアルタイムPCR 法が知られている。この方法はPCR の増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。リアルタイムPCR によるマイコプラズマの検出方法についても検討されているが、これもわずか8種間の配列を比較して設計されているに過ぎず、検出可能な種が限定されている（特許文献2）。

[0008] 更に、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌の検出において、偽陽性（false positive）とならないよう、哺乳類に広く存在している常在菌を検出しないプライマー、プローブ、及び反応系が必要であるが、既知の方法においてはこれが十分に検討されていない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特許第3016395号公報

特許文献2：米国特許出願公開第2005／0250112号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] マイコプラズマの検出について種々の方法が検討、開発されてきたが、現在においても様々な種のマイコプラズマ全般を迅速、簡便に、網羅的かつマイコプラズマ特異的に検出できる系は構築されていない。そのため、マイコプラズマ検出系のさらなる改善が望まれている。本発明の目的は、マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するための組成物、検出方法、及びキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌のDNAを増幅し、かつその他の生物由来のDNAは増幅しないプライマーを設計するとともに、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌のDNAの検出に有用なプローブを設計し、鋭意検討を行うことによって本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち本発明は、

[1] マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するための組成物であって、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを含む組成物、

[2] 更に、配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含む、[1]記載の組成物、

[3] 更に、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを含む、[1]又は[2]記載の組成物、

[4] プローブが、DNA/RNA/DNAキメラプローブである、[3]記載の組成物、

[5] マイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法であって、

(a) 検体を配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを用いた核酸増幅反応に供する工程、並びに(b)工程(a)により得られた増幅産物

を検出する工程、を含む方法、

[6] 工程(a)において、更に配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを使用する、[5]記載の方法、

[7] 工程(b)における工程(a)により得られた産物の検出が、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを用いて行われる、[5]又は[6]記載の方法、

[8] プローブが、DNA/RNA/DNAキメラプローブである、[7]記載の方法、

[9] マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するためのキットであって、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを含むキット、

[10] 更に、配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含む、[9]記載のキット、

[11] 更に、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを含む、[9]又は[10]記載のキット、

[12] プローブが、DNA/RNA/DNAキメラプローブである、[11]記載のキット、

に関する。

発明の効果

[0013] 本発明により、マイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌由来のDNAを検出するための組成物、検出方法、及びキットが提供される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1におけるリアルタイムPCRの解析結果を示す図である。

[図2]実施例1におけるリアルタイムPCRの解析結果を示す図である。

[図3]実施例2におけるリアルタイムPCRの結果を示す図である。

[図4]実施例2におけるリアルタイムPCRの結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、

及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを提供する。これら本発明のプライマーを用いることにより、様々な種 (species) のマイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌を簡便かつ迅速に検出することが可能である。

[0016] 本発明のプライマーはマイコプラズマ由来16S rRNAをコードする遺伝子及びアコレプラズマ由来16S rRNAをコードする遺伝子にアニールし、環境中に常在する微生物（例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、大腸菌 (*E. coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas* sp.) 等) 由来の16S rRNAをコードする遺伝子にはアニールしない配列となるよう設計されている。

[0017] 上記の、本発明のプライマーのセットに加え、本発明は更に配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを提供する。このプライマーは、マイコプラズマ16S rRNAをコードする遺伝子上で、上記の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマーと同じ領域にアニーリングする。これら3本のプライマーのセットを用いたPCRを行うことにより、更に広範囲の種のマイコプラズマ属細菌由来のDNAを増幅することが可能である。

[0018] また、本発明は、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを提供する。このプローブはマイコプラズマ由来16S rRNAをコードする遺伝子及びアコレプラズマ由来16S rRNAをコードする遺伝子にアニールし、他の生物種由来のDNAにはアニールしない配列となるよう設計されている。更に、該プローブは、上記の本発明のプライマーセットを用いてマイコプラズマ又はアコレプラズマのゲノムDNAより増幅されるDNA断片にアニールし、かつ前記プライマーと相互作用を生じないよう（該プローブを鋳型としたプライマー伸長反応や本プローブと前記プライマーとによるリボヌクレアーゼHの基質の形成が起きないように）設計されている。本発明のプローブは、好適には、DNAポリメラーゼによる伸長を防ぐために、その3'末端が例えば蛍光色素、消光物質、リン酸、又はアミノ基に

より修飾されている。修飾の一例として、5'末端に蛍光色素を、3'末端に消光物質を付加したプローブが挙げられる。当該蛍光色素としては、特に限定は無いが、例えば、6-FAM (6-carboxyfluorescein)、HEX (4, 7, 2', 4', 5', 7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein)、ROX (6-carboxy-X-rhodamine)、TET (tetrafluorescein) (いずれもLife Technologies社製) が好適に使用できる。当該消光物質としては、特に限定は無いが、例えば、Eclipse (Epoch Biosciences社製)、DABCYL (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfone) が好適に使用できる。

[0019] このプローブはDNAで構成されるオリゴヌクレオチドでもよく、DNA/RNA/DNAで構成されるキメラオリゴヌクレオチドでもよい。これらプローブは、例えば公知の方法で化学的に合成される。又、これらプローブは、ヌクレオチドアナログ及び/又は修飾ヌクレオチドを含有していてもよい。

[0020] 本発明の配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブは、好ましくはDNA/RNA/DNAで構成されるキメラプローブとすることができる。より好ましくは配列表の配列番号4で表される塩基配列の9番目に位置する塩基をRNAに変更したプローブであり、当該プローブは、配列表の配列番号28で表される。また、本発明のプローブは、好ましくは、一方の末端に蛍光色素を、もう一方の末端に消光物質が付加されたプローブである。

[0021] 本発明はマイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するためのキット並びに組成物を提供する。前記のキット、組成物は、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマー、更に任意に配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含む。本発明の好適な態様においては、前記のキット

、組成物は、更に配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを含む。これら本発明の組成物は、核酸増幅反応によるマイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌の検出に有用である。

[0022] 本発明は前記の本発明のプライマー及び／又は本発明のプローブを使用するマイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法を提供する。本発明の方法は、(a) 検体を配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを用いた核酸増幅反応に供する工程、並びに(b) 工程(a)により得られた増幅産物を検出する工程を含む。

[0023] 本発明によるマイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法にて解析される検体は、特に限定はないが、例えば細胞を培養するための培地、培養された細胞、及びその培養上清等がある。培養後の検体の場合、好ましくは、培養上清が解析に供される。

[0024] この検体を準備する方法に特に限定はないが、検体として培養上清を用いる場合、例えば、下記工程によって検体を調製することができる。

細胞培養液を遠心機にセットし、細胞と培養上清を分離する。遠心の条件は、当業者に周知である。回収した培養上清をそのまま検体として解析することも可能である。好ましくは、既知のDNA抽出方法又は市販のキット等を用いてDNAを抽出・濃縮する。市販のキットに何ら限定はなく、例えば、NucleoSpin(登録商標) Tissue XS(マッハライ・ナーゲル社製)が例示される。

[0025] 本発明によるマイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法においては、前記の本発明の組成物を用いてマイコプラズマ及びアコレプラズマのゲノムDNAの特定領域を増幅して、マイコプラズマ全般を網羅的かつアコレプラズマ属細菌を検出することが可能である。当該マイコプラズマとしては、特に限定はないが、例えば、Mycoplasma hominis、Mycoplasma arginini、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma hyorhinitis、Mycoplasma

ma orale、Mycoplasma pirum、Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma salivarium、Mycoplasma bovisが挙げられる。当該アコレプラズマとしては、特に限定はないが、例えば、Acholeplasma laidlawii、Acholeplasma granularum、Acholeplasma modicum、Acholeplasma morum、Acholeplasma oculiが挙げられる。例えば、マイコプラズマ属細菌及びAcholeplasma laidlawiiを特異的に検出することが可能である。また、本発明のキットや組成物は、様々な種のマイコプラズマ属細菌及びアコレプラズマ属細菌の簡便かつ迅速な検出に有用である。なお、上記のプライマー、プローブは公知の方法で化学的に合成できる。

本発明の方法における核酸増幅反応としては、DNA又はRNAを鋳型としてこれに相補的なDNAを合成する反応であれば特に限定はないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）等の当分野で周知の核酸合成反応が例示される。

[0026] PCRの温度サイクル条件としては一般的な条件が適用できる。例えば、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップからなる反応によりPCRが実施される。各ステップの条件は、当業者により適宜設定される。

[0027] 本発明のマイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法において、上記核酸増幅反応により得られた増幅産物を検出する方法としては、増幅産物を検出可能な方法であれば特に限定は無いが、リアルタイムPCR法が例示される。リアルタイムPCR法における検出方法は、インターカレーターを用いる方法と蛍光プローブを用いる方法の2種類に大別される。蛍光プローブを用いる方法としては、サイクリングプローブ法、TaqManプローブ法、モレキュラービーコンプローブ法等が例示される。インターカレーター法は

、実験コストが安く、反応系の構築が容易であるが、検出の特異性はプライマーの配列のみに依存する。一方、蛍光プローブ法は、実験コストはかかるが、プライマーおよびプローブ両者の配列が検出の特異性に寄与する。サイクリングプローブ法は、RNAとDNAからなるキメラプローブとエンドヌクレアーゼを組み合わせることで検出するため、蛍光プローブ法の中でも配列特異性の非常に高い検出が可能となる。本発明を限定するものではないが、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを使用する本発明の態様においては、サイクリングプローブ法が好適に使用される。

[0028] インターカレーター法は、PCR反応によって合成された二本鎖DNAに結合し、励起光の照射により蛍光を発する物質（インターカレーター）を用い、この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターすることが可能な検出法である。一般的にSYBR（登録商標）Green Iがインターカレーターとして使用される。インターカレーター法では、ターゲットに特異的な蛍光標識プローブを設計・合成する必要がない。

[0029] サイクリングプローブ法は、RNAとDNAからなるキメラプローブとエンドヌクレアーゼの組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することが可能である。プローブはRNA部分を挟んで一方が蛍光色素で、またもう一方がその蛍光色素の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されている。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより強い蛍光を発しないが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後にエンドヌクレアーゼによりRNA部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになる。この蛍光強度を測定することにより、増幅産物量をモニターすることが可能になる。

[0030] TaqManプローブ法は、一方の末端が蛍光色素で、もう一方の末端が消光物質で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（TaqManプローブ）とDNAポリメラーゼのもつ5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性とを利用する方法である。TaqManプローブは、アニーリングステップで鋳型D

N Aに特異的にアニールするが、プローブ末端に消光物質が存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制される。伸長反応ステップのときに、DNAポリメラーゼのもつ5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にアニールしたTaqManプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、消光物質による抑制が解除されて蛍光が発せられる。この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターすることが可能である。

[0031] モレキュラービーコンプローブ法は、一方の末端が蛍光色素で、もう一方の末端が消光物質で標識され、かつステムループ構造を有するオリゴヌクレオチド（モレキュラービーコン）をプローブとして用いる方法である。モレキュラービーコンは通常、単鎖の状態では、ステム領域が二重鎖を形成し、両末端の蛍光色素と消光物質が近接し、消光状態となっている。一方、プローブ中のループ領域の塩基配列と相補的であるオリゴヌクレオチドとアニールしたときには、蛍光色素と消光物質が離れ、蛍光シグナルが発せられる。この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターすることが可能である。

[0032] 本発明の方法におけるマイコプラズマ及びアコレプラズマ検出のための反応液は、DNAポリメラーゼ、反応緩衝剤、少なくとも2種の本発明のプライマー、所望により本発明のプローブやその他の成分を組み合わせ、更に検体又は検体より調製した検体由来の核酸を加えて調製することができる。DNAポリメラーゼ、反応緩衝剤、本発明のプライマー、本発明のプローブを含有する組成物は、本発明の一態様である。

[0033] DNAポリメラーゼは、DNA又はRNAを鋳型としてこれに相補的なDNAを合成する活性を有するものであれば本発明に使用できる。本発明に使用されるDNAポリメラーゼとしては、特に耐熱性のDNA依存性DNAポリメラーゼが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、Thermus属細菌由来DNAポリメラーゼ（Thermusaquaticus由来DNAポリメラーゼ等）に代表される真正細菌由来の耐熱性DNAポリ

リメラーゼ、及び *Pyrococcus* 属古細菌由来 DNA ポリメラーゼ (*Pyrococcus* sp. 由来 DNA ポリメラーゼ等) や *Thermococcus* 属古細菌由来 DNA ポリメラーゼ (*Thermococcus kodakaraensis* 由来 DNA ポリメラーゼ等) の古細菌由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼが例示される。

[0034] DNA ポリメラーゼとして 2 種以上の DNA ポリメラーゼを組み合わせて使用してもよい。2 種類以上の DNA ポリメラーゼとしては、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さない DNA ポリメラーゼとの組み合わせが例示される。なお、このような 2 種類の DNA ポリメラーゼを含む反応液で PCR を行う技術は、LA-PCR (Long and Accurate PCR) として知られている。

[0035] 前記のサイクリングプローブ法を本発明に使用する場合、反応液には増幅産物依存的にプローブを切断するエンドヌクレアーゼが添加される。当該エンドヌクレアーゼは、マイコプラズマ属細菌又はアコレプラズマ属細菌由来の増幅産物にアニーリングした本発明のプローブのリボヌクレオチド部分を特異的に切断する酵素であれば特に限定は無いが、リボヌクレアーゼ H (RNase H) が例示される。また、リボヌクレアーゼ H としては、好ましくは耐熱性のリボヌクレアーゼ H が、より好ましくは古細菌由来の耐熱性のリボヌクレアーゼ H が例示される。

[0036] 本明細書において反応緩衝剤とは、反応液の水素イオン濃度 (pH) の変動を和らげる作用を持つ化合物又は混合物のことをいう。一般に弱酸とその塩、あるいは弱塩基とその塩の混合溶液は、強い緩衝作用を持つため反応緩衝剤として pH コントロールの目的で広く用いられている。本発明には生化学分野で公知の、各種の反応緩衝剤を使用することができる。当該反応緩衝剤としては、特に限定は無いが、例えば、ビシン (bicine)、トリシン (tricine)、ヘペス (HEPES)、トリス (tris)、リン酸塩が好適に使用できる。当該反応緩衝剤の最終濃度は、特に限定は無いが

、5～100mM、好ましくは20～50mMの範囲が好適に使用できる。
本発明の方法における反応液のpHは、遺伝子増幅反応が実施される通常の範囲、例えば25℃におけるpHが8.0～9.5の範囲に設定されるのが適当である。

実施例

[0037] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。なお、以下の実施例におけるリアルタイムPCRの反応装置としては、Thermal Cycler Dice（登録商標）Real Time System II（タカラバイオ社製）を使用した。

[0038] 実施例1 プライマー及びプローブの設計、スクリーニング

（1）プライマー設計

16S rDNAをコードする遺伝子領域を対象とし、動物細胞培養時に培養液から検出される代表的なマイコプラズマ（*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma hyorhini*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma pirum*、及び*Mycoplasma pneumoniae*等）、*Acholeplasma laidlawii*、代表的な常在菌（*Bacillus subtilis*、*E. coli*、及び*Pseudomonas* sp.等）、マイコプラズマ以外に検出された常在菌（*Sphingomonas* sp.、*Staphylococcus* sp.等）の塩基配列情報より、マイコプラズマ及び*Acholeplasma laidlawii*に特異的な領域で5'側プライマー及び3'側プライマーを設計した。5'側プライマーは、F12（配列番号5）、F233（配列番号6）、F259（配列番号1）、F344（配列番号7）、F362（配列番号8）、及びF534（配列番号9）の6種類である。3'側プライマーは、R605（配列番号10）、R750（配列番号11）、R827（配列番号12）、R

850（配列番号2）、R1131（配列番号13）、R1155（配列番号14）、R1207（配列番号15）、R1238（配列番号16）、R1352（配列番号17）、及びR1440（配列番号18）、の10種類である。

[0039] （2）プローブ設計

設計したプライマーでの増幅領域において、動物細胞培養時に培養液から検出される代表的なマイコプラズマ及び*Acholeplasma laidlawii*を特異的に検出するサイクリングプローブを設計した。サイクリングプローブは、Probe 1（配列番号19）、Probe 2（配列番号20）、Probe 3（配列番号21）、Probe 4（配列番号22）、Probe 5（配列番号23）、Probe 6（配列番号24）、Probe 7（配列番号25）、Probe 8（配列番号26）、Probe 9（配列番号27）、Probe 10（配列番号28）、及びProbe 11（配列番号29）の11種類である。

設計は、国際公開公報第2012/014988号記載のアルゴリズムに従い設計を行い、マイコプラズマ全般と*Acholeplasma laidlawii*とに共通で、常在菌は検出しない、また、上記（1）で設計したプライマーと相互作用しないものを採用した。なお、Probe 4及びProbe 5はProbe 3を基にして位置を1塩基ずつずらしたもの、Probe 7及びProbe 8はProbe 6を基にして位置を1塩基ずつずらしたもの、Probe 10はProbe 9を基にして位置を1塩基ずらしたもの、並びにProbe 11はProbe 9の鎖長を一塩基伸ばしたものである。

[0040] （3）スクリーニング

前記（1）で設計したプライマーを組み合わせた60通りのプライマーセット及びProbe 1、Probe 2、Probe 3、Probe 6、Probe 9の5種のプローブを使用して、*Acholeplasma laidlawii*の未精製DNAを鋳型として反応を行い、良好な増

幅が確認されるプライマーセットをスクリーニングした。

スクリーニングには、Cyc le a v e P C R（登録商標） R e a c t i o n M i x（タカラバイオ社製、コード C Y 5 0 5）を使用し、以下の反応組成で行った。Cyc le a v e P C R（登録商標） R e a c t i o n M i x（2×c o n c.） 12.5 μ L、各5 μ M プライマーミックス 1 μ L、5 μ M サイクリングプローブ（R O X 標識） 1 μ L、鋳型 0.5 μ Lを混合し、滅菌水にて全量を25 μ Lにした。反応及び検出は、T h e r m a l C y c l e r D i c e（登録商標） R e a l T i m e S y s t e m I I（タカラバイオ株式会社 コード T P 9 0 0）を使用し、以下の条件で反応を行った。95℃、10秒（初期変性）の後、95℃、5秒、55℃、30秒、72℃、30秒のサイクルを45サイクル。検出は72℃のステップで行った。

結果を図1に示した。図中、○は良好な増幅シグナルが認められた組み合わせ、△は増幅シグナルは認められるが、蛍光強度の低い組み合わせ、×は増幅シグナルが認められない組み合わせ、をそれぞれ示す。

この結果より、プライマーの組み合わせとしては、F 3 4 4 / R 6 0 5、F 3 6 2 / R 6 0 5、F 2 5 9 / R 6 0 5、F 3 4 4 / R 8 2 7、F 3 6 2 / R 8 2 7、F 3 4 4 / R 8 5 0、F 3 6 2 / R 8 5 0、F 2 5 9 / R 8 5 0、サイクリングプローブはP r o b e 6あるいはP r o b e 9が有望であった。

次に、鋳型を加えずにP r o b e 6を使用して上記と同様の反応を行った。

結果を図2に示した。図中、○は良好な増幅シグナルが認められた組み合わせ、△は増幅シグナルは認められるが、蛍光強度の低い組み合わせ、×は増幅シグナルが認められない組み合わせ、をそれぞれ示す。

この結果より、F 3 4 4 / R 6 0 5、F 3 6 2 / R 6 0 5、F 3 4 4 / R 8 2 7、F 3 6 2 / R 8 2 7、F 3 4 4 / R 8 5 0、F 3 6 2 / R 8 5 0の組み合わせでは、鋳型を加えない場合においてもシグナルが得られるため、

不具合が生じることが考えられた。

以上の結果より、F 2 5 9 / R 6 0 5、F 2 5 9 / R 8 5 0 の 2 組のプライマーの組み合わせを選出した。

[0041] 実施例 2 マイコプラズマ検体を使用した検討

(1) プライマーセットの検討

前記実施例 1 にて選出した 2 組のプライマーの組み合わせ F 2 5 9 / R 6 0 5、F 2 5 9 / R 8 5 0 について、*Acholeplasma laidlawii*、およびマイコプラズマ検体 (*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma hyorhinitis*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma pirum*、及び *Mycoplasma pneumoniae*) から抽出した各 DNA を鋳型として、反応の比較を行った。サイクリングプローブは Probe 10 を使用した。反応は Cycleave PCR (登録商標) Reaction Mix (タカラバイオ社製、コード CY505) を使用し、以下の反応組成で行った。Cycleave PCR (登録商標) Reaction Mix (2×conc.) 12.5 μL、各 5 μM プライマーミックス 1 μL、5 μM サイクリングプローブ (ROX 標識) 1 μL、鋳型 0.5 μL を混合し、滅菌水にて全量を 25 μL にした。反応及び検出は、Thermal Cycler Dice (登録商標) Real Time System II (タカラバイオ株式会社 コード TP900) を使用し、以下の条件で反応を行った。95℃、10 秒 (初期変性) の後、95℃、5 秒、55℃、30 秒、72℃、30 秒のサイクルを 45 サイクル。検出は 72℃ のステップで行った。

結果を図 3 に示す。図 3 (a) は F 2 5 9 / R 6 0 5、図 3 (b) は F 2 5 9 / R 8 5 0 の測定結果である。

F 2 5 9 / R 6 0 5 及び F 2 5 9 / R 8 5 0 いずれのプライマーの組み合わせにおいても、良好な検出が行えることが確認された。

[0042] (2) サイクリングプローブの検討

次に、同じく *Acholeplasma laidlawii* およびマイコプラズマ検体から抽出した各DNAを鋳型として、検出に用いるサイクリングプローブの比較を行った。反応組成及び反応条件は上記と同じで行った。サイクリングプローブはProbe 1、Probe 3、Probe 4、Probe 5、Probe 6、Probe 7、Probe 8、Probe 9、Probe 10、Probe 11を使用した。

結果を図4に示す。図4 (a) はProbe 1、図4 (b) はProbe 3、図4 (c) はProbe 4、図4 (d) はProbe 5、図4 (e) はProbe 6、図4 (f) はProbe 7、図4 (g) はProbe 8、図4 (h) はProbe 9、図4 (i) はProbe 10、図4 (j) はProbe 11の測定結果である。

Probe 1は、高い蛍光値が得られているが、他のプローブに比べて検出できるマイコプラズマの種類が少ない結果であった。Probe 3、Probe 4、Probe 5は、蛍光値が低い結果であった。Probe 6、Probe 7、Probe 8はどれも良好な結果であった。Probe 9、Probe 10、Probe 11では、Probe 10が他に比べて蛍光値が高く良好であると考えられた。

以上の結果より、Probe 10を選出した。

また、*Acholeplasma laidlawii*、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma hyorhinis*、及び*Mycoplasma orale*は増幅シグナルが得られたが、*Mycoplasma pirum*および*Mycoplasma pneumoniae*は増幅シグナルが得られなかった。

[0043] 実施例3 プライマー追加の検討

上記実施例1及び実施例2で使したプライマーセット、サイクリングプローブでの反応において、*Mycoplasma pirum*、*Mycop*

*lasma pneumoniae*のDNAを用いた場合では増幅シグナルが得られなかった。そのため、*Mycoplasma*属細菌におけるプライマーF259及びR850それぞれに相応する塩基配列（配列番号30～配列番号227）を比較し、新たな追加プライマーF259P（配列番号3）を設計した。

Mycoplasma pirum、*Mycoplasma pneumoniae*、及び*Mycoplasma orale*より調製したDNAを鋳型とした。プライマーは、F259とF259Pを1：1の比率で混合したフォワードプライマー及びR850リバープライマーを使用した。プローブは、上記実施例2で良好な結果が得られたProbe 10を使用した。

反応はCycleavePCR（登録商標）Reaction Mix（タカラバイオ株式会社製、コード CY505）を使用し、以下の反応組成で行った。CycleavePCR（登録商標）Reaction Mix（2×conc.） 12.5 μL、各5 μM プライマーミックス 1 μL、5 μM サイクリングプローブ（ROX標識） 1 μL、鋳型 0.5 μLを混合し、滅菌水にて全量を25 μLにした。反応及び検出は、Thermal Cycler Dice（登録商標）Real Time System II（タカラバイオ社製、コード TP900）を使用し、以下の条件で反応を行なった。95℃、10秒（初期変性）の後、95℃、5秒、55℃、30秒、72℃、30秒のサイクルを45サイクル。検出は72℃のステップで行った。

その結果、*Mycoplasma pirum*、*Mycoplasma pneumoniae*、及び*Mycoplasma orale*のいずれにおいても増幅シグナルが得られた。

産業上の利用可能性

[0044] 本発明は、遺伝子工学、生物学、医学、農業等の幅広い分野において有用である。

配列表フリーテキスト

- [0045] SEQ ID NO:1 ; Oligonucleotide primer F259 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma
- SEQ ID NO:2 ; Oligonucleotide primer R850 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma
- SEQ ID NO:3 ; Oligonucleotide primer F259P to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma
- SEQ ID NO:4 ; Oligonucleotide probe 10 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:5 ; Oligonucleotide primer F12 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:6 ; Oligonucleotide primer F233 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:7 ; Oligonucleotide primer F344 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:8 ; Oligonucleotide primer F362 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:9 ; Oligonucleotide primer F534 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:10 ; Oligonucleotide primer R605 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:11 ; Oligonucleotide primer R750 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:12 ; Oligonucleotide primer R827 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:13 ; Oligonucleotide primer R1131 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.
- SEQ ID NO:14 ; Oligonucleotide primer R1155 to amplify the DNA fragment

nt of 16S rRNA gene from Mycoplasma.

SEQ ID NO:15 ; Oligonucleotide primer R1207 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.

SEQ ID NO:16; Oligonucleotide primer R1238 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.

SEQ ID NO:17 ; Oligonucleotide primer R1352 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.

SEQ ID NO:18 ; Oligonucleotide primer R1440 to amplify the DNA fragment of 16S rRNA gene from Mycoplasma.

SEQ ID NO:19 ; Oligonucleotide probe 1 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 4 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:20 ; Oligonucleotide probe 2 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 4 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:21 ; Oligonucleotide probe 3 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma."Oligonucleotide 7 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:22 ; Oligonucleotide probe 4 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma."Oligonucleotide 6 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:23 ; Oligonucleotide probe 5 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 5 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:24 ; Oligonucleotide probe 6 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 9 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:25 ; Oligonucleotide probe 7 to detect 16S rRNA gene from M

ycoplasma. "Oligonucleotide 8 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:26; Oligonucleotide probe 8 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 7 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:27 ; Oligonucleotide probe 9 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 10 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:28 ; Oligonucleotide probe 10 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 9 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

SEQ ID NO:29 ; Oligonucleotide probe 11 to detect 16S rRNA gene from Mycoplasma. "Oligonucleotide 10 is ribonucleotide - other nucleotides are deoxyribonucleotide."

請求の範囲

- [請求項1] マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するための組成物であって、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを含む組成物。
- [請求項2] 更に、配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含む、請求項1記載の組成物。
- [請求項3] 更に、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを含む、請求項1又は2記載の組成物。
- [請求項4] プローブが、DNA/RNA/DNAキメラプローブである、請求項3記載の組成物。
- [請求項5] マイコプラズマ及びアコレプラズマの検出方法であって、
 (a) 検体を配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを用いた核酸増幅反応に供する工程、並びに
 (b) 工程(a)により得られた増幅産物を検出する工程、を含む方法。
- [請求項6] 工程(a)において、更に配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを使用する、請求項5記載の方法。
- [請求項7] 工程(b)における工程(a)により得られた産物の検出が、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを用いて行われる、請求項5又は6記載の方法。
- [請求項8] プローブが、DNA/RNA/DNAキメラプローブである、請求項7記載の方法。
- [請求項9] マイコプラズマ及びアコレプラズマを検出するためのキットであって、配列表の配列番号1で表される塩基配列からなるプライマー、及び配列表の配列番号2で表される塩基配列からなるプライマーを含むキット。

- [請求項10] 更に、配列表の配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含む、請求項9記載のキット。
- [請求項11] 更に、配列表の配列番号4で表される塩基配列からなるプローブを含む、請求項9又は10記載のキット。
- [請求項12] プローブが、DNA／RNA／DNAキメラプローブである、請求項11記載のキット。

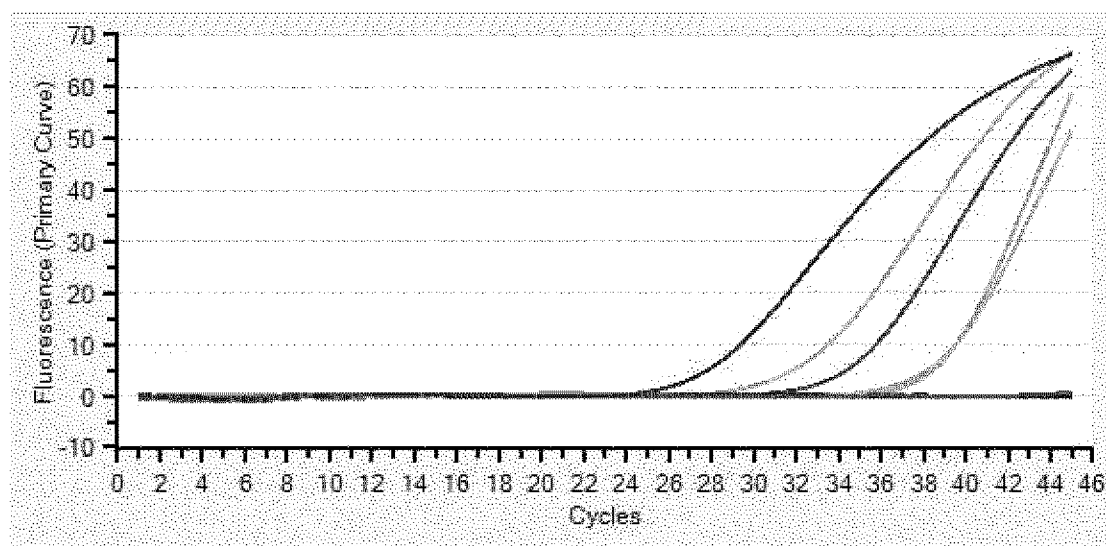
[illegible]

[図2]

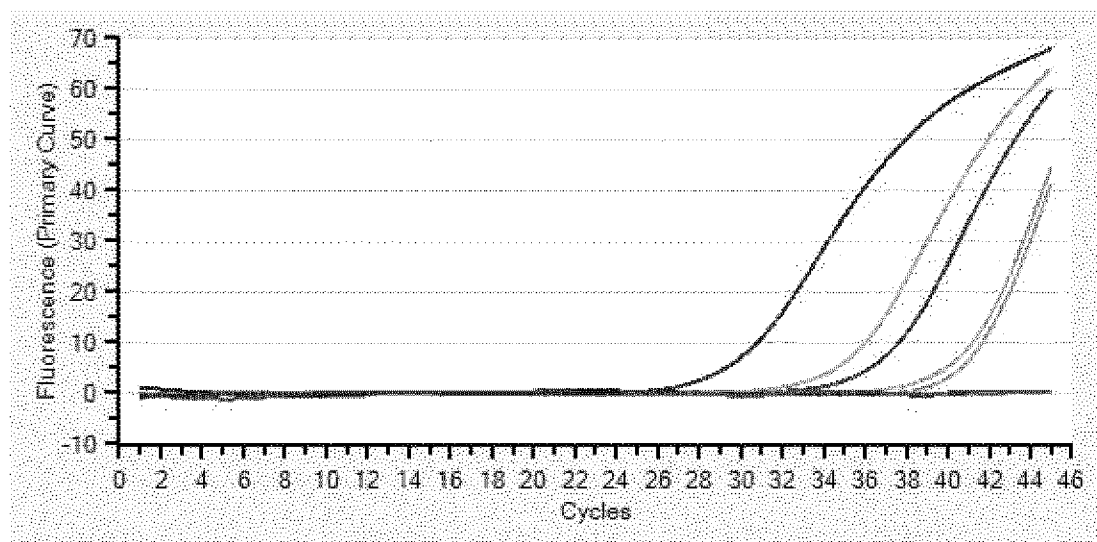
Probe 6										
	R605	R827	R1131	R1352	R1155	R1207	R1238	R750	R850	R1440
F534	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
F344	○	○	×	×	×	×	×	×	○	×
F233	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
F362	○	○	×	×	×	×	×	×	○	×
F259	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
F12	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

[図3]

(a) F259/R605

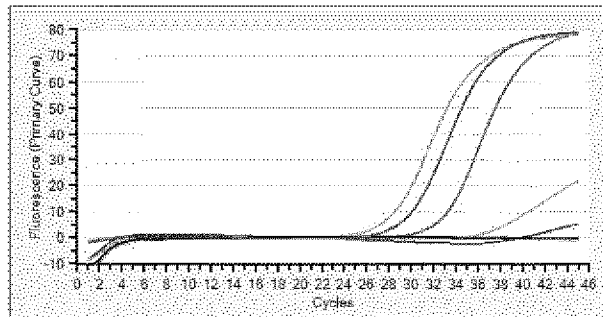


(b) F259/R850

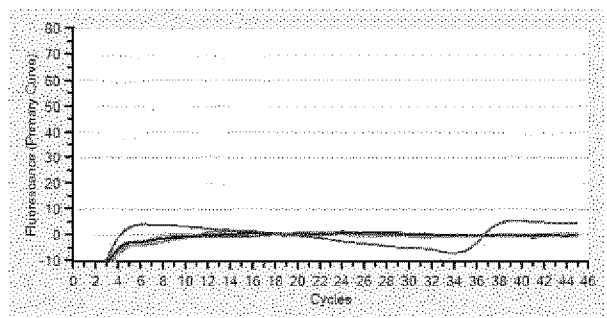


[圖4]

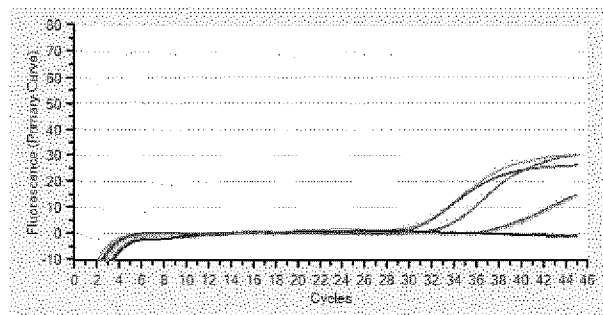
(a) Probe 1



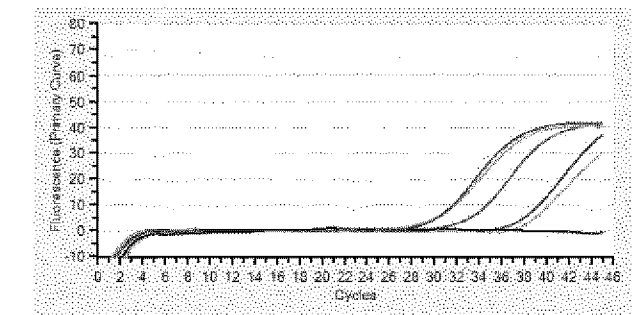
(b) Probe 3



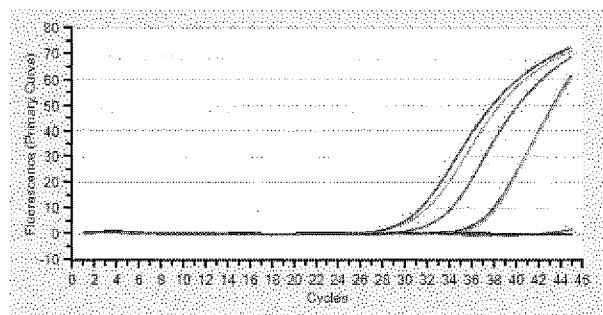
(c) Probe 4



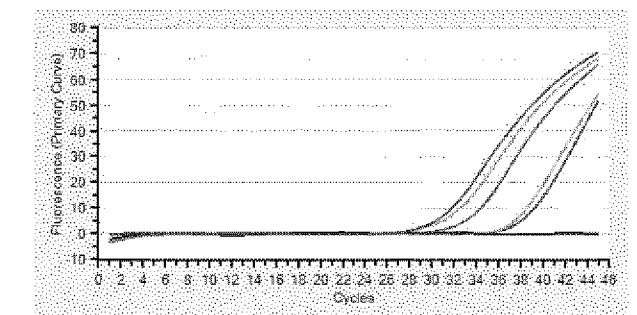
(d) Probe 5



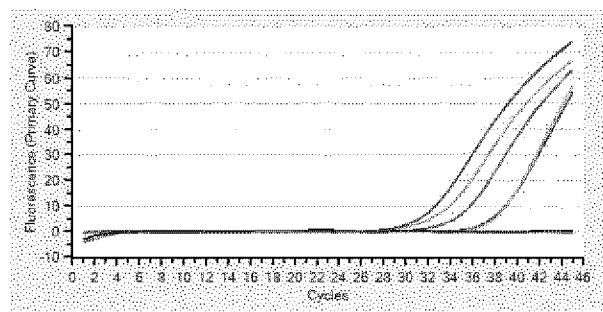
(e) Probe 6



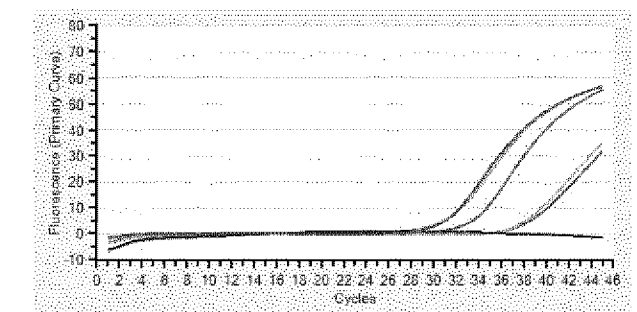
(f) Probe 7



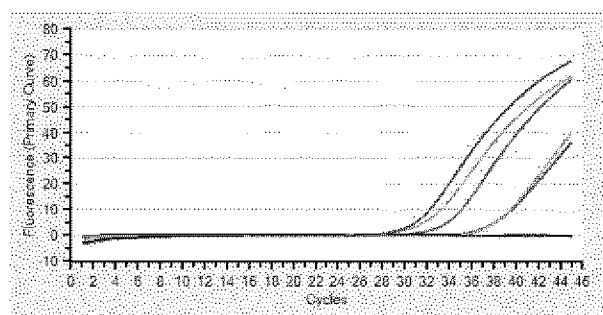
(g) Probe 8



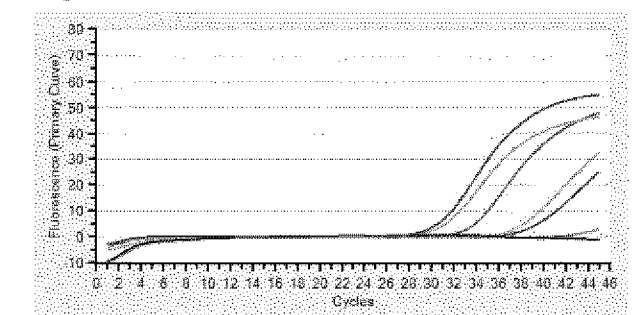
(h) Probe 9



(i) Probe 10



(j) Probe 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WIRTH M.et al., Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction, Cytotechnology, 1994, Vol.16 No.2 p.67-77	1-12
Y	KOBAYASHI H.et al., In Vitro Amplificatin of the 16S rRNA Genes from Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma alkalescens and Mycoplasma bovirgenitalium by PCR, J Vet Med Sci, 1998, Vol.60 No.12 p.1299-1303	1-12
Y	KOBAYASHI H.et al., Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J Vet Med Sci, 1995, Vol.57 No.4 p.769-771	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 July, 2013 (26.07.13)

Date of mailing of the international search report
06 August, 2013 (06.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064101

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PEREDELTCOUK M.et al., Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays, J Appl Microbiol, 2011, Vol.110 No.1 p.54-60	1-12
Y	WO 2012/014988 A1 (Takara Bio Inc.), 02 February 2012 (02.02.2012), entire text (Family: none)	1-12
Y	JP 2007-228977 A (Takara Bio Inc.), 13 September 2007 (13.09.2007), entire text & US 2005/0059000 A1 & EP 1396538 A1 & WO 2002/101041 A1	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WIRTH M. et al., Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction, Cytotechnology, 1994, Vol.16 No.2 p. 67-77	1 - 1 2
Y	KOBAYASHI H. et al., In Vitro Amplificatin of the 16S rRNA Genes from Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma alkalescens and Mycoplasma bovirgenitalium by PCR, J Vet Med Sci, 1998, Vol.60 No.12 p.1299-1303	1 - 1 2

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 7 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松原 寛子

4 N

4 1 5 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KOBAYASHI H. et al., Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J Vet Med Sci, 1995, Vol.57 No.4 p.769-771	1 - 1 2
Y	PEREDELTCOUK M. et al., Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays, J Appl Microbiol, 2011, Vol.110 No.1 p.54-60	1 - 1 2
Y	WO 2012/014988 A1 (タカラバイオ株式会社) 2012.02.02, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 2
Y	JP 2007-228977 A (タカラバイオ株式会社) 2007.09.13, 全文 & US 2005/0059000 A1 & EP 1396538 A1 & WO 2002/101041 A1	1 - 1 2