

(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
2006年11月16日 (16.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/121134 A1

(51) 国際特許分類:

CI2N 15/09 (2006.01) CI2Q I/68 (2006.01)
CI2Q I/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2006/309514

(22) 国際出願日:

2006年5月11日 (11.05.2006)

(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2005-141153 2005年5月13日 (13.05.2005) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 和光純薬工業株式会社 (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5408605 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 石川友一 (ISHIKAWA, Tomokazu) [JP/JP]; 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町6番1号 Hyogo (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: PRIMER AND PROBE FOR USE IN DETECTION OF MYCOBACTERIUM KANSASII AND METHOD FOR DETECTION OF MYCOBACTERIUM KANSASII USING THE SAME

(54) 発明の名称: マイコバクテリウム・カンサシ検出用プライマー及びプローブ、並びにこれを用いたマイコバクテリウム・カンサシの検出方法

(57) Abstract: An oligonucleotide which comprises a part or the entire of the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:1, 2, 3 or 4 or a part or the entire of a sequence complementary to the nucleotide sequence and is capable of hybridizing with the nucleotide sequence for *Mycobacterium kansasii* gene; a primer and a probe for use in the detection of *Mycobacterium kansasii* comprising the oligonucleotide; and a method for detecting *Mycobacterium kansasii* using the primer and/or probe. The method for detecting *Mycobacterium kansasii* enables the detection of *M. kansasii* more rapidly and with higher accuracy compared with a conventional bacterium identification method performed by culture examination on a bacterium. Further, the method can exclude any false positive result for the diagnosis and can also detect and diagnose *M. kansasii* with higher accuracy compared with a diagnosis method performed by PCR using a conventional primer and/or probe. Still further, the method can quantify a *M. kansasii* cell.

(57) 要約: 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ (*Mycobacterium kansasii*) 遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含有する、マイコバクテリウム・カンサシ検出用プライマー並びにプローブ、該プライマ及び/又はプローブを用いるマイコバクテリウム・カンサシの検出方法を開示する。 本発明のM.カンサシの検出方法によれば、従来の菌の培養検査等により菌種を同定する方法と比較して、はるかに迅速且つ高精度に、M.カンサシの検出を行うことができる。また、従来のプライマー又は/及びプローブを用いたPCR法による診断方法に比較して、診断上の偽陽性が排除可能となり、より高精度にM.カンサシの検出及び診断を行うことができる。更にM.カンサシ菌体の定量も行うこともできる。

WO 2006/121134 A1

明細書

マイコバクテリウム・カンサシ検出用プライマー及びプローブ、並びにこれを用いたマイコバクテリウム・カンサシの検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸の増幅およびその検出系を利用した、臨床検査におけるM.カンサシ(Mycobacterium kansasii、以下、M.カンサシと記載する。)を検出及び／又は同定する方法に関するものである。

背景技術

[0002] 非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacterium, NTM)は、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属に分類される抗酸性の性質を持つグラム陽性桿菌で、結核菌群及びMycobacterium.leprae以外の抗酸菌の一種である。

[0003] 非結核性抗酸菌のうち、臨床上問題となる菌種としては、M.カンサシ、Mycobacterium marinum(マイコバクテリウム・マリナム)、Mycobacterium gordonaiae(マイコバクテリウム・ゴルドネア)、Mycobacterium szulgai(マイコバクテリウム・スズルガイ)、Mycobacterium avium(マイコバクテリウム・アビウム)、Mycobacterium intracellulare(マイコバクテリウム・イントラセルラーレ)、Mycobacterium xenopi(マイコバクテリウム・ゼノピ)、Mycobacterium fortuitum(マイコバクテリウム・フォーチュイタム)、Mycobacterium chelonei(マイコバクテリウム・セロネイ)、Mycobacterium abscessus(マイコバクテリウム・アブセッサス)、等が知られている。特にM.カンサシとM. aviumの2種類の菌による感染症で、非結核性抗酸菌症全体の90%以上を占める。

[0004] 通常、非結核性抗酸菌は健常人に対しては無害であると言われているが、まれにヒトに対して感染性を示し非結核性抗酸菌症を引き起こす。特にAIDSウイルスに感染しているような免疫不全者においては重大な感染起因菌となる。非結核性抗酸菌症は、従来はまれな疾患であったが、近年増加傾向にあるため、結核菌と非結核性抗酸菌を短時間で鑑別する方法の開発が強く望まれている。更に、M. avium及びM. intracellulareの核酸増幅検出・診断法が健康保険の適用となってから全国で急速にしていることからも、その診断上の意義は大きい。

- [0005] 非結核性抗酸菌は多くが抗結核薬に対して抵抗性を示すため、患者に抗酸菌感染症の疑いがある場合、結核症か非結核性抗酸菌症かの鑑別診断が、治療方針を決定する上で重要である。また、非結核性抗酸菌による病気は、その菌の種類によって治療法がそれぞれ異なるので、その菌種を決めることが非常に重要である。しかし、非結核性抗酸菌症には特異的な臨床症状がないため、臨床的所見、病理組織学的所見から結核症と非結核性抗酸菌症を鑑別し、更に非結核性抗酸菌の種類を特定することは極めて困難である。そのため、結核症か非結核性抗酸菌症かの診断は菌の同定によってなされなければならない。
- [0006] 一般的な診断法としては、まず喀痰塗沫検査を行う。この検査では「抗酸菌陽性」ということが判るだけで、結核菌か非結核性抗酸菌かは鑑別できない。そこで、喀痰塗末検査で陽性だった場合には、小川培地等の培地上で分離培養して菌の培養検査を行い、結核菌か非結核性抗酸菌かを鑑別する。そして、さらに生化学的試験を行い、菌種の同定をする。しかしながら、一般にマイコバクテリウム属は発育が遅いので、培養にはかなりの時間を要する。そのため、従来の基本法である塗抹検査や培養検査を行った場合、結核症か否かの診断結果を得るためにには菌の分離培養だけで3～4週間を要する。そして、菌種を同定するための各種生化学的試験にさらに2～3週間を要するという問題がある。
- [0007] また、M.カンサシの同定も、生化学的試験によっておこなわれる。M.カンサシの生化学的試験による主な同定方法は、細菌が光に露呈されると色素を生産する性質を利用するものであるが、いくつか他のマイコバクテリア属の種もM・カンサシと同様な生物化学的特性を示すため、通常、発色性によるM.カンサシの同定には問題がある。
- [0008] 近年、遺伝子レベルで菌を検出する技術が開発されてきた。例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の核酸増幅技術を利用した診断技術が有用な手段として検討されている。この方法は、感度が高く、数個の菌があれば検出できること、短時間(長くても4日)で検出できるという利点がある。しかし、通常のPCR法では、生菌でも死菌でも同様に検出してしまう。また菌数の多少に関わらず陽性と判定され、菌数がわからないため、感染性の有無の診断が不確実になる。更に、感度が高すぎるため、偽陽

性の判定が出やすい等の問題点を有している。

- [0009] M.カンサシについては、M.カンサシのゲノムライブラリからDNAプローブ(pMK1-9)を得たという研究がある(非特許文献1)。このDNAプローブ(pMK1-9)は、M・カンサシのDNAとの相補的ハイブリッドを形成できるが、他の種のマイコバクテリアとも同様にハイブリッドを形成してしまい、M.カンサシに特異的ではない。
- [0010] M.カンサシの同定に、pMK1-9プローブ及びM.カンサシのrRNA遺伝子と特異的にハイブリッド結合する市販のDNAプローブ(ACCUTM PROBE, GenProbe, San Diego, カリフォルニア州)を用いることに注目した研究もある(非特許文献2)。しかし、この研究では、pMK1-9プローブ及び市販のDNAプローブ(ACCUTM PROBE)のいずれとも相当数のM.カンサシ株種を検出できなかつたことを報告している。
- [0011] さらに、M.カンサシの検出に市販のDNAプローブ(ACCUTM PROBE)を用いて評価した別の研究もある(非特許文献3)。その研究者らはACCUTM PROBEが100%種特異的であり、他のマイコバクテリア種に対するクロス反応を示さないが、実験中では、M.カンサシ株の中の73%しか検出することができなかつた。
- [0012] M.カンサシ特異的なDNAハイブリッド形成プローブ(p6123)をM.カンサシの臨床分離体から精製することができたという報告がある(非特許文献4)。このプローブ(p6123)は実験に用いたすべてのM.カンサシ株に対してハイブリッド結合ができ、ロスらのDNAプローブ(pMK1-9)に反応しなかつたサブグループをも含む。米国特許第5,500,341号(特許文献2)は、p6123プローブから精製したM.カンサシ特異的増殖プライマーを開示している。
- [0013] さらにB.ボディングハウスら(B.Boddinghaus et al.)は、特異的に増殖し、マイコバクテリアDNAにハイブリッド結合する、16SのrRNAから精製分離したマイコバクテリア属特異的オリゴヌクレオチドを開示している(非特許文献5)。
- [0014] 更に例えばM.カンサシの検出に有効なDNA領域の同定に関する研究もなされている(例えば特許文献1等)が、未だM.カンサシに特異的な診断法は確立されていないのが現状である。
- [0015] 以上のことから、新たな非結核性抗酸菌を特異的に検出する方法を確立することが望まれている現状にあつた。

[0016] 特許文献1:特開平11-155589号公報

特許文献2:米国特許第5,500,341号公報

特許文献3:特開昭60-281号公報

非特許文献1:Z. H. Huang et. al., J. Clin. Microbiol., 1991, 29, p.2125

非特許文献2:B.C.Ross et al., J.Clin. Microbiol., 1992, 30, p.2930

非特許文献3:Tortoli et al., Eur.J Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1994, 13, p.264

非特許文献4:M. Yang et al., J.Clin. Microbiol., 1993, 31, p.2769

非特許文献5:B.Boddinghaus et al., J. Clin. Microbiol., 1990, 28, p.1751

非特許文献6:F.Poly et al., J. Bacteriology, 2004, 186, 14, p.4781-4795

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、診断上の偽陽性を排除した新規なM.カンサシ検出用プライマー、及びこれを用いた簡便、迅速且つ精度の高いM.カンサシの検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明は上記課題を解決する目的で成されたもので、以下の構成よりなる。

(1)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されていてもよい。以下同じ。)の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。

(2)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する、マイコバクテリウム・カンサシ検出用プライマー。

(3)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する、

マイコバクテリウム・カンサシ検出用プローブ。

(4)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー及び／又はプローブとして用いることを特徴とするマイコバクテリウム・カンサシの検出方法。

(5)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー及び／又はプローブとして含んでなるマイコバクテリウム・カンサシ検出用試薬キット。

[0019] 本発明者らは、現在までに決定されたM.カンサシとその他の生物の各種遺伝子について、各種間の各遺伝子配列の相同性の理論的検証と実験的検証を重ねた結果、マイクロアレイ法を用いた方法により得られたM.カンサシ由来の核酸配列の断片の中に、M.カンサシの遺伝子配列の特定領域に特異的にハイブリダイズし、M.カンサシの検出に有用となる塩基配列が存在することを見出した。

[0020] そこで、これらの知見をもとに更に鋭意研究の結果、M.カンサシに特異的なオリゴヌクレオチド(配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4で表される核酸配列)を得、これらの核酸配列がM.カンサシの検出に有用であることを見出した。そして更にこれらの配列をもとにM.カンサシ検出用プライマー及びプローブを開発し、これらを用いたM.カンサシの検出方法を確立するに至った。

発明の効果

[0021] 本発明のプライマー又は／及びプローブを用いたM.カンサシの検出方法によれば、従来の菌の培養検査等により菌種を同定する方法と比較して、はるかに迅速且つ高精度に、M.カンサシの検出を行うことができる。また、本発明の検出方法でM.カンサシの検出を行うことにより、従来のプライマー又は／及びプローブを用いたPCR法による診断方法に比較して、診断上の偽陽性が排除可能となり、より高精度にM.カンサシの検出及び診断を行うことができる。更に、本発明の検出方法を用いることにより、M.カンサシ菌体の定量も行うこともできる。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1]候補クローン1の塩基配列と、設計されたプライマーの所在位置を矢印で示す。
- [図2]候補クローン2の塩基配列と、設計されたプライマーの所在位置を矢印で示す。
- [図3]候補クローン3の塩基配列と、設計されたプライマーの所在位置を矢印で示す。
- [図4]候補クローン4の塩基配列と、設計されたプライマーの所在位置を矢印で示す。
- [図5]実験例1で、M.カンサシ由来ゲノムを用いて得られたPCR産物、M.カンサシのKATS2配列、及び特願2004-129272号明細書で配列番号8として示された配列(本明細書では配列番号81として示す。)を用いて得られた、Cy3/Cy5の蛍光強度をもとに作製された散布図(スキャッタープロット)である。
- [図6]実施例1において得られた電気泳動の結果である。尚、各レーンの数字は、夫々以下の試料を用いた場合の結果を夫々示す。M4:分子量マーカー(マーカー4)、a:Escherichia coli(大腸菌)、b:Mycobacterium tuberculosis(マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ヒト型結核菌)、c:Mycobacterium kansasii(M.カンサシ)、d:Mycobacterium marinum(マイコバクテリウム・マリナム)、e:Mycobacterium simiae(マイコバクテリウム・シミアエ)、f:Mycobacterium scrofulaceum(マイコバクテリウム・スクロフラセウム)、g:Mycobacterium gordonaie(マイコバクテリウム・ゴルドネア)、h:Mycobacterium szulgai(マイコバクテリウム・スズルガイ)、i:Mycobacterium avium(マイコバクテリウム・アビウム)、j:Mycobacterium intracellulare(マイコバクテリウム・イントラセルラーレ)、k:Mycobacterium gastri(マイコバクテリウム・ガストリ)、l:Mycobacterium xenopi(マイコバクテリウム・ゼノピ)、m:Mycobacterium nonchromogenicum(マイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム)、n:Mycobacterium terrae(マイコバクテリウム・テレ)、o:Mycobacterium triviale(マイコバクテリウム・トリビアレ)、p:Mycobacterium fortuitum(マイコバクテリウム・フォーチュイタム)、q:Mycobacterium chelonei(マイコバクテリウム・セロネイ)、r:Mycobacterium abscessus(マイコバクテリウム・アプセッサス)、s:Myco

bacterium peregrinum(マイコバクテリウム・ペレグリナム)。

[図7]実施例4で行ったリアルタイムPCR検出結果を示し、各PCR用DNA試料のゲノムのコピー数(x軸、対数値)に対するCt値(y軸)をプロットした検量線である。

符号の説明

- [0023] 図5において、各記号は、それぞれ以下を示す。
- (1)M. カンサシに対する特異性が高いと判断された候補クローン、
 - (2)特開平11-155589号に記載されたM.カンサシのKAS配列を用いた結果
 - (3)特願2004-129272号明細書に記載されたM.tuberculosis由来の配列番号8(本明細書では配列番号81)を用いた場合の結果
 - (a) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 10.0 を示すライン
 - (b) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 5.0 を示すライン
 - (c) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 2.0 を示すライン
 - (a') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 10.0 を示すライン
 - (b') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 5.0 を示すライン
 - (c') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 2.0 を示すライン。

発明を実施するための最良の形態

- [0024] 本発明に於いて、M.カンサシ遺伝子とは、Mycobacterium kansasiiの持つ全ゲノム配列における任意の核酸配列単位(領域)をいう。M.カンサシの全ゲノム配列は、まだ解読されていない。
- [0025] 本発明に係るオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが挙げられる(以下、本発明のオリゴヌクレオチドと略記する場合がある。)。
- [0026] 本発明に係る配列番号1で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドは517塩基、配列番号2で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドは596塩基、配列番号3で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドは636塩基、配列番号4で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドは、726塩基の大きさである。

- [0027] 本発明に係る配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌクレオチドとしては、例えば、(1)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、更に好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するオリゴヌクレオチド、又は(2)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列のうち、連続する10塩基以上、好ましくは20塩基以上からなることを特徴とするオリゴヌクレオチド等が挙げられる。
- [0028] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドとしては、配列番号5～79で表される核酸配列の一部若しくは全部を含有し、且つ連続する10塩基以上を含有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。
- [0029] 配列番号1で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば配列番号5～12又は配列番号53～56で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられ、配列番号2で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドの具体例としては、配列番号13～26又は配列番号57～64で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられ、配列番号3で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば配列番号27～40又は配列番号65～72で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられ、配列番号4で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば配列番号41～52又は配列番号73～79で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられる。
- [0030] 本発明に係る配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌクレオチドとしては、例えば本発明の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列の、一部若しくは全部を有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。
- [0031] 上記の、本発明に係る配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする塩基配列の一部若し

くは全部を有するオリゴヌクレオチドとは、具体的には、本発明の配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドとハイストリンジエントな条件又はストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列の、一部若しくは全部を有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

- [0032] 尚、ここでいう「ハイストリンジエントな条件」とは、具体的には例えば50%ホルムアミド中で42～70°Cで、好ましくは60～70°Cでのハイブリダイゼーション、その後の0.2～2×SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)中で25～70°Cでの洗浄という条件である。
- [0033] また、「ストリンジエントな条件」とは、具体的には例えば6×SSC又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、50～70°Cの温度の条件下で16時間ハイブリダイゼーションを行い、6×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、1×SSC又はこれと同等の塩濃度の溶液等で洗浄という条件である。
- [0034] 本発明に係るM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドとは、前記したM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイストリンジエントな条件又はストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。そのハイストリンジエントな条件及びストリンジエントな条件は、前記したとおりである。
- [0035] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドとしては、「配列番号5～79で表される核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドに相補的な配列の一部若しくは全部を含有し、且つ連続する10塩基以上を含有するもの」が挙げられる。
- [0036] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドの具体例としては、配列番号5～79で表される核酸配列から選ばれる配列のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を含有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。
- [0037] 尚、本発明のオリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸(DNA)でもリボ核酸(RNA)でもよい。リボ核酸の場合はチミジン残基(T)をウリジン残基(U)と読み替えることは言

うまでもない。また合成に際して任意の位置のTをUに変えて合成を行ない、ウリジン残基を含むDNAであってもよい。同様に任意の位置のUをTに変えたチミジン残基を含むRNAであってもよい。また、1若しくは複数のヌクレオチドが欠失、挿入或いは置換されており、イノシン(I)のような修飾ヌクレオチドがあってもよい。

- [0038] 本発明のオリゴヌクレオチドを得るには、自体公知の化学合成法により調製したもの用いればよい。そのため、クローン化したオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに比べ、容易、大量且つ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。
- [0039] 例えば、DNAの合成に通常行われている、DNAシンセサイザーを用い、通常のホスホアミダイト法にてオリゴヌクレオチドを合成し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いる常法により精製すれば、目的とする本発明のオリゴヌクレオチドを得ることができる。
- [0040] その他、本発明の目的を達成し得るオリゴヌクレオチドを探索(スクリーニング)する手段としては、FEMS Microbiology Letters 166: 63-70, 1998 あるいはSystematic and Applied Microbiology 24: 109-112, 2001などに示されているサブトラクション法があり、標的であるゲノムDNAフラグメントから区別したい生物種由来のゲノムDNAフラグメントと反応したものを差し引く事で、候補配列を濃縮する方法論がある。
- [0041] また、特開平11-155589号公報(特許文献1)に示されているように、標的であるゲノムDNAおよび区別したい生物種由来のゲノムDNAからの増幅産物のディファレンシャルディスプレイを作成するといったアプローチ、すなわち任意にプライムされたボリメラーゼ連鎖反応(AP-PCR)を利用する方法論が考えられる。
- [0042] 更に、いわゆるマイクロアレイ法と呼ばれる方法を利用することによっても、本発明のオリゴヌクレオチドを得ることができる。それは、例えばM.カンサシゲノムDNAのショットガン・クローンを作成し、得られたショットガン・クローン由来の精製DNAをスライドグラス上に配置したマイクロアレイを作成する。別に、標的であるM.カンサシのゲノムDNAフラグメントを蛍光標識(標識1)したものを作成する。一方、区別したい生物種由来のゲノムDNAフラグメントを蛍光標識(標識2)したものを作成し、対照実験を行う。すなわち、標識1および標識2の各々を同一反応系で用いる競合ハイブ

リダイゼーション法によって、マイクロアレイ上の配列との反応性(結合性)を検定する。これにより、標的であるM.カンサシのゲノムDNAフラグメント(標識1)とより特異的に反応する配列候補群の選定が可能となる(例えば非特許文献6等)ため、これにより目的のオリゴスクレオチドを選別するというものである。以下にマイクロアレイ法を用いた、本発明のオリゴスクレオチドの選定方法の一例について詳説する。

[0043] (1) Whole Genome Shotgun libraryの作製

Venter et al., Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304–1351 に記載のWhole Genome Shotgun法を改変して、下記の方法で、M.カンサシのWhole Genome Shotgun libraryの作製を行う。

[0044] まず、M.カンサシ菌株を、常法(例えばオートクレーブ処理とガラスビーズ等を用いた菌体の粉碎処理)によって処理し、更に常法に従って、DNAの抽出、精製を行う。得られた精製DNA試料を、例えば終濃度20%のグリセロール存在下、5kPa～9kPaの圧力下、ネビュライザーを用いて約1～5分間処理し、DNAの断片化処理を行う。この処理により、目的とする500～1000bpのサイズ分画を効率よく回収する事ができる。得られた分画を市販の抽出カラムを利用して精製する。

[0045] その後、得られた分画(DNA断片)を、常法に従いライゲーションによってベクターDNAに組み込んだ組み換えDNA(M.カンサシのWhole Genome Shotgun library)を得る。そのために用いられるベクターDNAとしては、後で形質転換する宿主細胞が大腸菌の場合には、例えば、pBS[例えばpBSII sk+ベクター(Stratagene社)]、pQE-TRIプラスミド(Qiagen社製)、pBluescript、pET、pGEM-3Z、pGEX等のベクターが挙げられる。ライゲーションの前に、予めDNAポリメラーゼによる処理を行って、DNA断片の末端を平滑化処理する等は任意である。

[0046] 次いで、得られた組み換えDNAを用いて、適当な宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。その為に用いられる宿主細胞としては例えば、大腸菌(E.coli)が挙げられ、好ましくはJM109、DH5 α 、TOP10等が挙げられる。宿主細胞としては、このほかによりプラスミドやファージDNAの導入効率の高い、Competent Cell(コンピテントセル)を用いても良い。例えば、E. coli JM109 Competent Cells(タカラバイオ社製)等が挙げられる。

- [0047] 形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法(Method in Enzymology, 68, 326–331, 1979)等により行うことができる。また、市販のCompetent Cellを用いる場合には、その製品プロトコールに従って、形質転換を行えばよい。
- [0048] 目的のDNA断片を組み込んだ組換えDNAが導入された形質転換体を選別するには、例えば、形質転換のために用いたベクターの性質を利用する方法が挙げられる。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を含有するベクターを用いれば、アンピシリンを含有する培地上で形質転換体を培養し、得られたクローンを選択することにより、目的のDNA断片を組み込んだ組換えDNAが導入された形質転換体(M.カンサシゲノムのWhole Genome Shotgun クローン)のlibraryが容易に得られる。
- [0049] (2)マイクロアレイ作製
　　続いて、下記の方法でマイクロアレイを作製する。
- [0050] 即ち、上記(1)で得られたM.カンサシゲノムのWhole Genome Shotgunクローンから常法に従いDNAを精製し、これをPCR用反応液に懸濁添加したものをPCR用試料として用い、適当なプライマー[市販のプライマーでも良い。例えばM13 Primer M1(タカラバイオ社製)及びプライマーM13 Primer RV(タカラバイオ社製)等]を用い、常法に従ってPCRを行った後、得られたPCR産物を精製する。次いで常法に従ってPCR産物をマイクロアレイ用スライドガラス上にスポットし、これに150mJ/cm²のUV照射を行ない、スライドガラス上にPCR産物(ターゲットのM.カンサシ由来DNAを含む)を固定し、マイクロアレイを作成する。
- [0051] 尚、必要に応じポジティブコントロールとして、例えばM.tuberculosis(マイコバクテリウム・ツベルクリーシス、ヒト型結核菌)等の結核菌に特異的な配列のDNAや、M.カンサシゲノムの持つ配列のDNA等を用い、ネガティブコントロールとして例えば大腸菌由来のDNA等を用いて夫々同様にDNAの断片化、ベクターへのライゲーション及び大腸菌の形質転換を行い、同様にPCRを行って得られたPCR産物をスライドグラス上に固定して、夫々のマイクロアレイも作製する。
- [0052] (3)標的ゲノムDNAの蛍光色素標識
　　別に、M.カンサシ菌株から抽出、精製したゲノムDNAおよび対照用ゲノム(例えばウシ型結核菌等の結核菌)DNAを、ヘキシリアミノ-UTPを用いた間接標識法により

、夫々Cy3、及びCy5でラベリングする。

- [0053] 例えばDeRisi研究室(www.microarrays.org)が発表したプロトコールを改変した間接標識法を例にとって説明する。この方法は、アミノ基をもつ α -UTPを使い、酵素伸長反応によりこれを分子内に取り込ませたDNA鎖を作成する。そしてそのアミノ基に蛍光色素(サクシニイミド体)を化学的に結合させることによってDNAをラベリングしようというものである。
- [0054] まず、出発材料(M.カンサシ由来ゲノムDNAおよび対照用ゲノムDNA)を、常法に従い熱変性処理する[BioPrime DNA labeling system(インビトロジェン社製)等の市販キットを用いてもよい]。次いで、DTT 2 μ l、dATP/dCTP/dGTPの混合液、dTTP、Ha-dUTP、Klenow酵素を添加し、37°Cで3時間程度の伸長反応を行う。得られた反応産物を限外ろ過カラムにのせ14000rpmで4分程度遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機等を用いて完全に乾燥させる。次に、乾燥させた上記反応産物にNaHCO₃を加えて混合し、2~3分常温静置する。
- [0055] 別にCy3(またはCy5)をDMSOに溶かしたものと調製(Cy-dye Solution Cy3、Cy-dye Solution Cy5)する。このCy-dye Solution Cy3を対照用ゲノムDNAを用いて得られた上記反応産物に、Cy-dye Solution Cy5をM.カンサシゲノムを用いて得られた上記反応産物に、各々加え、40°Cで60分程度インキュベート(遮光)する。さらに、それぞれの反応産物に4M NH₂OH(使う直前に作成する)を加え、攪拌後に15分程度インキュベート(遮光)することにより、それぞれのゲノムDNAの標識化産物を得る。その後、得られた標識化産物を、限外ろ過カラムにのせ14000rpmで4分程度遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機で完全に乾燥させる。
- [0056] 得られた各々の乾燥状態のゲノムDNAの標識化産物に対して、終濃度が0.04M Tris-acetate(pH8.1)、0.1M 酢酸カリウム、0.03M酢酸マグネシウム四水和物の組成の溶液を調製し、これに乾燥状態のゲノムDNAの標識化産物を懸濁混和させる。94°Cで15分間加熱処理し、100base~300 baseのゲノムDNAの標識化産物を断片化した生成物を得る(Cy3標識産物、Cy5標識産物)。
- [0057] Cy3標識産物及びCy5標識産物の各々を限外ろ過カラムにのせ14000rpmで4分程度遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機等で完全

に乾燥させる。

- [0058] マイクロチューブに、 $40\ \mu\text{L}$ 、salmon sperm DNA (10mg/mL)、 $0.5\ \mu\text{L}$ 、formamide 5 μL を含有し、ArrayHyb Hybridization buffer (SIGMA社製)で全量を $40\sim50\ \mu\text{l}$ に調整した試薬溶液(後に使用するマイクロアレイのカバーガラスが $24\times55\text{mm}$ の大きさの場合の組成である)を加え、上記で得たCy3標識産物とCy5標識産物を同一の溶液中で懸濁混和懸濁混和後、 95°C で5 分インキュベートし、Cy3Cy5標識産物溶液を調製する。続く(4)のマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションに用いるまで 70°C に保つておく。
- [0059] (4)マイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(アレイ上でDNA-DNA hybridization)
前記(2)で作製したマイクロアレイ(DNAチップ)上に、上記(3)で調製したCy3Cy5標識産物溶液を全てのせ、気泡が入らないようにカバーガラスをかぶせる。これをハイブリカセットにセットし、タッパーなどに蒸留水で湿らせたキムタオル等をひいて密閉し、 65°C で8 時間以上反応させて(遮光)、ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイをカバーガラスごと $2\times\text{SSC}-0.1\%\text{SDS}$ 溶液に室温で浸し、溶液中でマイクロアレイを静かに揺らしてカバーガラスをはずす。 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.03\%\text{SDS}$ 溶液(60°C)で10 分間洗浄、 $0.2\times\text{SSC}$ 溶液(42°C)で10 分間洗浄、 $0.05\times\text{SSC}$ 溶液(室温)で10 分間洗浄後、新しい乾いたラックにマイクロアレイをすばやく移し、すぐに800prm で5 分間遠心を行って乾燥させる。
- [0060] (5)蛍光強度の測定;シグナル検出から数量化まで
蛍光読み取りスキャナーを用いて、上記(4)でマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション処理したマイクロアレイ上の蛍光強度を測定し、Cy3及びCy5の、2チャンネルでの蛍光強度を測定して、蛍光検出データを得る。蛍光シグナルの数量化は市販のDNAチップ発現イメージ解析ソフトウェア等を用い、ソフトの操作手順に従って、スポット自動認識、バックグラウンド計算、蛍光強度比の正規化を行えば良い。
- [0061] ハイブリダイゼーションに用いたCy5標識産物は、M.カンサシ由来ゲノムを標識したものであり、Cy3標識産物は対照用ゲノムDNAを標識したものである。そのため、Cy3とCy5の夫々の蛍光強度を測定した結果、Cy5の蛍光の方が強く検出されれば、対象のマイクロアレイのPCR産物がM.カンサシにハイブリダイズしたということを意味

し、M.カンサシに対する特異性が高いと判断される。一方、Cy3の蛍光の方が強く検出された場合には、対象のマイクロアレイのPCR産物は、対照用ゲノムDNAとハイブリダイズしたことを意味し、また、同じ程度の強さのCy3及びCy5の蛍光が検出されたり、何れも検出されなかつた場合には、M.カンサシに対する特異性が低いと判断される。

- [0062] 尚、マイクロアレイ上にポジティブコントロール(例えばM. tuberculosisに特異的なDNAの断片、M.カンサシに特異的なDNAの断片等)およびネガティブコントロール(例えば大腸菌由来DNAの断片等)がスポットされていれば、夫々のCy3/Cy5蛍光強度を測定して、その蛍光強度の傾向をみれば、蛍光スキャナー測定における1つのデータ評価基準として利用する事ができる。
- [0063] さらに、M.カンサシ特異的検出のための候補配列をスクリーニングするために、DNAチップ上で検出されたCy3/Cy5の蛍光強度比(Ratio)を基に、散布図(スキャッタープロット)を作成して、次のように解析を行う。
- [0064] 解析においては、用いたポジティブコントロール配列のうちM.カンサシに特異的なDNA断片のCy3/Cy5 Ratioの数値が特異性評価のための有用な基準値となる。即ち、スクリーニングを行った候補の中から、Cy3/Cy5 Ratioの数値解析の結果、有意にM.カンサシ特異的なシグナルが得られ(Cy5の蛍光強度が強い場合)、なおかつ上述のM.カンサシに特異的なポジティブコントロールのスポットに比べてRatioの数値が大きいクローンを選択する。
- [0065] 更に、例えばABI PRISM310キャピラリーシーケンサー(アプライドバイオ社)等の機器を利用した常法に従い、得られた候補クローンの塩基配列決定を行えばよい。
- [0066] 本発明に係るM.カンサシ検出用プライマーとしては、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有するプライマーが挙げられる(以下、本発明のプライマーと記載する場合がある。)。
- [0067] また、本発明のプライマーは、PCR、核酸ハイブリダイゼーション等の条件に合わせて、配列番号1～4で表される核酸配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌク

レオチド、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌクレオチドの中から、解離温度(T_m 値)などを考慮して、適當な領域の適當な長さを選択して使用すればよいが、好ましくはプライマー配列としての特異性を維持するために必要な塩基数と考えられている10～50塩基、より好ましくは10～35塩基、更に好ましくは18～25塩基の長さを有しているものがよい。

- [0068] プライマーの設計方法は、プライマー設計のために一般に用いられているソフトや、例えばプライマーデザイン用のWebツールPrimer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research.)等を用いて設計すればよい。
- [0069] 本発明のプライマーに用いられる、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(本発明のオリゴヌクレオチド)の具体例は、前記の本発明のオリゴヌクレオチドの説明に於いて記載したものと同じである。
- [0070] このようなプライマーの具体例としては、例えば配列番号5～52で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有するものが挙げられる。
- [0071] 本発明のプライマーのより好ましい具体例としては、配列番号5～52で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するもの、又は配列番号5～52で表される核酸配列から選ばれる配列に相補的な配列を含有するものが挙げられる。中でも、配列番号5、6、13～16、27～30、41～44で表される核酸配列から選ばれる配列、又は配列番号5、6、13～16、27～30、41～44で表される核酸配列から選ばれる配列に相補的な配列を含有するプライマーが挙げられる。
- [0072] 尚、配列番号5～12で表される核酸配列を持つプライマーは、配列番号1で表される核酸配列をもとに設計されたものである。配列番号13～26で表される核酸配列を持つプライマーは、配列番号2で表される核酸配列をもとに設計されたものである。配列番号27～40で表される核酸配列を持つプライマーは、配列番号3で表される核酸配列をもとに設計されたものである。配列番号41～52で表される核酸配列を持つ

プライマーは、配列番号4で表される核酸配列をもとに設計されたものである。

- [0073] 図1に、配列番号1で表される核酸配列上の、配列番号5及び6で表される核酸配列を持つプライマーの所在位置を、1c_plate1_Fw1及び1c_plate1_Rv1として、夫々矢印で示す。
- [0074] 図2に、配列番号2で表される核酸配列上の、配列番号13、14、15及び16で表される核酸配列を持つプライマーの所在位置を、6c_plate1_Fw1、6c_plate1_Rv1、6c_plate1_Fw2、6c_plate1_Rv2として、夫々矢印で示す。
- [0075] 図3に、配列番号3で表される核酸配列上の、配列番号27、28、29及び30で表される核酸配列を持つプライマーの所在位置を、8d_plate1_Fw1、8d_plate1_Rv1、8d_plate1_Fw2、8d_plate1_Rv2として、夫々矢印で示す。
- [0076] 図4に、配列番号4で表される核酸配列上の、配列番号41、42、43及び44で表される核酸配列を持つプライマーの所在位置を、9c_plate1_Fw1、9c_plate1_Rv1、9c_plate1_Fw2、9c_plate1_Rv2として、夫々矢印で示す。
- [0077] また、配列番号1で表される核酸配列上の、配列番号7～12で表される核酸配列を持つプライマーの所在部位は、夫々次の通りである。
- 配列番号7(1c_plate1_Fw3) : 33位～51位、
配列番号8(1c_plate1_Fw4) : 212位～231位、
配列番号9(1c_plate1_Fw5) : 315位～334位、
配列番号10(1c_plate1_Rv3) : 185位～204位、
配列番号11(1c_plate1_Rv4) : 411位～430位、
配列番号12(1c_plate1_Rv5) : 461位～481位。
- [0078] 配列番号2で表される塩基配列上の、配列番号17～26で表される核酸配列を持つプライマーの所在部位は、夫々次の通りである。
- 配列番号17(6c_plate1_Fw3) : 4位～21位、
配列番号18(6c_plate1_Fw4) : 48位～67位、
配列番号19(6c_plate1_Fw5) : 229位～247位、
配列番号20(6c_plate1_Fw6) : 279位～296位、
配列番号21(6c_plate1_Fw7) : 380位～399位、

配列番号22(6c_plate1_Rv3):166位～184位、
配列番号23(6c_plate1_Rv4):195位～214位、
配列番号24(6c_plate1_Rv5):368位～387位、
配列番号25(6c_plate1_Rv6):428位～445位、
配列番号26(6c_plate1_Rv7):523位～542位。

[0079] 配列番号3で表される塩基配列上の、配列番号31～40で表される核酸配列を持つプライマーの所在部位は、夫々次の通りである。

配列番号31(8d_plate1_Fw3):5位～22位、
配列番号32(8d_plate1_Fw4):54位～72位、
配列番号33(8d_plate1_Fw5):207位～226位、
配列番号34(8d_plate1_Fw6):289位～308位、
配列番号35(8d_plate1_Fw7):472位～490位、
配列番号36(8d_plate1_Rv3):151位～169位、
配列番号37(8d_plate1_Rv4):220位～239位、
配列番号38(8d_plate1_Rv5):335位～353位、
配列番号39(8d_plate1_Rv6):408位～427位、
配列番号40(8d_plate1_Rv7):616位～635位。

[0080] 配列番号4で表される塩基配列上の、配列番号45～52で表される核酸配列を持つプライマーの所在部位は、夫々次の通りである。

配列番号45(9c_plate1_Fw3):17位～36位、
配列番号46(9c_plate1_Fw4):117位～135位、
配列番号47(9c_plate1_Fw5):405位～424位、
配列番号48(9c_plate1_Fw6):492位～512位、
配列番号49(9c_plate1_Rv3):182位～201位、
配列番号50(9c_plate1_Rv4):263位～281位、
配列番号51(9c_plate1_Rv5):528位～547位、
配列番号52(9c_plate1_Rv6):654位～673位。

[0081] 尚、上記に於いて配列番号の後の()内に、本発明に於いて命名したプライマー

の名称を示した。

- [0082] 本発明のプライマーを得る方法は、前記の本発明のヌクレオチドを得る方法に於いて記載した通りである。
- [0083] また、本発明のプライマーは、標識物質で標識化されていてもよい。
- [0084] 本発明のプライマーを標識物質で標識するために用いられる標識物質としては、放射性同位体や酵素、蛍光物質、発光物質、ビオチンなど公知の標識物質であれば何れも用いることができる。
- [0085] 例えば、放射性同位体としては³²P, ³³P, ³⁵S等、酵素としてはアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等、蛍光物質としてはCyanine Dye系のCy3, Cy5(アマシャムバイオサイエンス株式会社)、フルオレセイン等、発光物質としてはAcridinium Esterを含む化学発光試薬等が挙げられる。
- [0086] 本発明のプライマーを放射性同位体により標識する場合は、プライマーを合成する際に、放射性同位体で標識されたヌクレオチドを取り込ませることによって、プライマーを標識する方法や、プライマーを合成した後、放射性同位体で標識する方法等が挙げられる。具体的には、一般によく用いられているランダムプライマー法、ニックトランスレーション法、T4ポリヌクレオチドキナーゼによる5'-末端標識法、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを用いた3'-末端標識法、RNAラベリング法等が挙げられる。
- [0087] 本発明のプライマーを酵素で標識する場合は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素分子を、標識するプライマーに直接共有結合させる等の、この分野に於ける常法である直接標識法を用いればよい。
- [0088] 蛍光物質により標識する場合は、例えばフルオレセイン標識したヌクレオチドをこの分野に於ける常法の標識手法によりプライマーに取り込まれればよい。また、リンカーアームを有するヌクレオチドを配列のオリゴヌクレオチドの一員として置換する方法(例えば、Nucleic Acids Res., 1986年, 第14巻, p.6115参照)でもヌクレオチドを蛍光物質で標識することができる。その場合、5位にリンカーアームを有するウリジンを開昭60-500717号公報に開示された合成法によりデオキシリジンから化学合成し、上記オリゴヌクレオチド鎖に蛍光物質を導入する方法もある。

- [0089] 発光物質で標識する方法及びビオチンで標識する方法は、通常この分野で行われているヌクレオチドを発光標識又はビオチン標識する常法に従って行えばよい。
- [0090] 本発明に係るM.カンサシ検出用プローブとしては、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有するプローブが挙げられる(以下、本発明のプローブと記載する場合がある。)。
- [0091] 本発明のプローブに用いられる、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(本発明のオリゴヌクレオチド)の具体例は、前記の本発明のオリゴヌクレオチドの説明に於いて記載したものと同じである。
- [0092] 本発明のプローブは、PCR(リアルタイムPCRを含む)、核酸ハイブリダイゼーション等の条件に合わせて、配列番号1～4記載で表される核酸配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌクレオチド、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有するオリゴヌクレオチドから、解離温度(Tm値)などを計算し、適当な領域の適当な長さを選択して使用すればよい。但し、プローブに十分な特異性を持たせたいのならば、プローブ配列としての特異性を維持するために必要な塩基数を考慮して設計することが望ましい。
- [0093] 例えば、核酸ハイブリダイゼーション法(例えばサザン・ハイブリダイゼーション等)等に用いるプローブとしては、10～700塩基、好ましくは100～600塩基、更に好ましくは200～500塩基の長さを有しているものが挙げられる。
- [0094] また、例えばリアルタイムPCR增幅系(例えばTaqManTM法、Molecular Beacon法等)等に用いるプローブとしては、10～50塩基、好ましくは15～40塩基、更に好ましくは20～30塩基の長さを有しているものが挙げられる。
- [0095] このようなプローブの具体例としては、例えば、配列番号5～79で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有するプローブ

から選ばれるものが挙げられる。

- [0096] 本発明のプローブの好ましい具体例としては、配列番号5～79で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられる。中でも、配列番号5、6、13～16、27～30、41～44、53、57～59、65～67、73～75で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するプローブが好ましい。特に、配列番号53、57～59、65～67、73～75で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するプローブが好ましい。
- [0097] 尚、配列番号53～79で表される核酸配列は、本発明のプライマーを用いたPCRにより増幅される核酸配列である。フォワードプライマーとリバースプライマーの組合せと、それを用いたPCRにより増幅される核酸配列の配列番号を表1に併せて示す。例えば、配列番号53で表される核酸配列は、配列番号5で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、配列番号6で表される核酸配列のオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いたPCRにより増幅される配列であることを示す。

[0098] [表1]

フォワード プライマー	リバース プライマー	増幅される 配列	フォワード プライマー	リバース プライマー	増幅される 配列
5	6	53	31	36	68
7	10	54	32	37	69
8	11	55	33	38	70
9	12	56	34	39	71
13	14	57	35	40	72
15	16	58	41	42	73
13	16	59	43	44	74
17	22	60	41	44	75
18	23	61	45	49	76
19	24	62	46	50	77
20	25	63	47	51	78
21	26	64	48	52	79
27	28	65			
29	30	66			
27	30	67			

- [0099] 本発明のプローブを得る方法は、前記の本発明のヌクレオチドを得る方法に於いて

記載した通りである。

- [0100] 本発明のプローブは、標識物質で標識化されていてもよい。
- [0101] 本発明のプローブを標識物質で標識するために用いられる標識物質としては、放射性同位体や酵素、蛍光物質、発光物質、ビオチンなど公知の標識物質であれば何れも用いることができる。
- [0102] 本発明のプローブを標識する標識物質の具体例及び標識化方法は、本発明のプライマーの標識方法の説明に於いて記載したとおりである。
- [0103] また、後述するリアルタイムPCR検出法に於いて用いられる標識プローブとしては、本発明のプローブを、リアルタイム検出法において通常用いられている標識物質で標識化したものが挙げられる。例えば、5'末端がレポーター蛍光物質(カルボキシフルオレセイン(FAM)、ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、テトラクロロフルオレセイン(TET)等)で標識化され、3'末端がクエンチャーカラム[例えばカルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)等の蛍光物質、Black Hole Quencher色素(BHQ), 4-((4-(dimethylamino) phenyl)azo)benzoic acid (DABCYL)等の非蛍光物質]で標識化された本発明のプローブが挙げられる。
- [0104] 本発明に係るM.カンサシの検出に用いられる試料としては、喀痰、血液、咽頭粘液、胃液、気管支洗浄液、経気管支採取物、胸水などの穿刺液、尿、膿等の各種臨床材料が挙げられる。また、検体から単離、培養された培養菌体、これらより単離、精製された核酸、又は核酸増幅検出系等で増幅された核酸でもよい。
- [0105] 上記試料からDNAを抽出・精製するには、検体からの抗酸菌(結核菌)DNA抽出に用いられる常法に従って行えばよい。
- [0106] 例えば菌体を試料とする場合には、例えばSDS等の界面活性剤や、グアニジンチオシアネート(GTC)等の蛋白変性剤で菌体を処理指定結核菌の膜構造を破壊する方法、菌体をガラスピーブ等によって物理的に破碎する方法等が挙げられる。
- [0107] 咳痰を試料とする場合には、前処理として、米国疾病管理予防センター(Centers for Disease Control and Prevention、略称CDC)で推奨しているNALC (N-acetyl-L-cysteine) -NaOH法(Kent PT, Kubica GP, Public Health Mycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory, U.S. Department of Health and Human Services, Publi

c Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, U.S.A., 1985年, p.31–55)による検体の均質化を行えばよい。

- [0108] その後、一般的なDNAの調製法(フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿法等 Rapid and simple method for purification of nucleic acids, J. Clin. Microbiol., 1990, Mar;28 (3), 495–503, Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dilen PM, van der Noordaa J)によりDNAの抽出及び精製を行えばよい。
- [0109] 検体から単離、培養された培養菌体を、M.カンサシを検出する試料として用いる場合を例にとって示すと、例えば小川培地上のコロニーを採取し、滅菌蒸留水に懸濁、遠心分離して菌体を集めた後、蒸留水に再懸濁し、オートクレーブ処理した後、菌体の粉碎処理(ガラスビーズによる物理的破碎等)を経て、さらに遠心分離して上清を回収する。得られた上清からDNAを抽出精製すればよい。DNAの抽出精製には、そのための様々なキットが市販されているので、それを用いてもよいし、この分野に於ける常法(例えば、フェノール・クロロホルム抽出法、エタノールやイソプロパノール等を用いて沈殿させる方法等)に従って行ってもよい。例えば(株)キアゲン製イオン交換樹脂タイプ DNA抽出精製キットGenomic-tip等を用いてDNAの抽出、精製を行えばよい。
- [0110] 本発明に係るM.カンサシの検出方法としては、例えば
- (A)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(本発明のオリゴヌクレオチド)をプライマーとして用いる方法、
- (B)本発明のオリゴヌクレオチドを標識物質で標識化したものを標識プローブとして用いる方法、
- 等が挙げられる。以下に、夫々の方法について説明する。
- [0111] (A)本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる方法
- (A)の方法としては、本発明のプライマーを用い、試料中の核酸を鑄型として核酸増幅反応を行い、得られたプライマー伸長物を検出する方法が挙げられ、具体的には例えば、本発明のプライマーを用いて、これを試料中の核酸とハイブリダイゼーション

ンさせ、DNAポリメラーゼ等による核酸増幅[例えばPCR;特許文献3、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法(Tsugunori Notomi et al., Nucleic Acid Res., 28, e63, 2000)、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法(臨床病理, 51(11), 1061–1067, 2003, Nov)、LCR(ligase chain reaction)法(特開平4-211399号)、SDA(strand displacement amplification)法(特開平8-19394号)]を行ってプライマー伸長させる方法が挙げられ、これによりM.カンサシの核酸配列の特定の領域の配列を増幅させることができるので、得られたプライマー伸長物を測定することにより、M.カンサシを検出することができる。

- [0112] PCRに於いて用いられる本発明のプライマーの具体例は、前記したとおりである。
- [0113] 好ましくは、フォワードプライマーとしては配列番号5、7～9、13、15、17～21、27、29、31～35、41、43、45～48で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであり、リバースプライマーとしては配列番号6, 10～12、14, 16、22～26、28、30, 36～40, 42, 44、49～52で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが挙げられる。
- [0114] より好ましくは、フォワードプライマーとしては配列番号5、7～9、13、15、17～21、27、29、31～35、41、43、45～48で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられ、リバースプライマーとしては配列番号5, 10～12、14, 16、22～26、28、30, 36～40, 42, 44、49～52で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが挙げられる。
- [0115] 更に好ましくは、フォワードプライマーとしては配列番号5, 13、15, 27、29、41、43で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するもの、リバースプライマーとしては配列番号6, 14, 16, 28, 30、42、44で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものが特に好ましい。
- [0116] 好ましいフォワードプライマーとリバースプライマーの組合せとしては、前記表1で示される組合せが挙げられる。
- [0117] その中でも特に好ましいフォワードプライマーとリバースプライマーの組合せとして

は、

- (1)フォワードプライマーが配列番号5で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号6で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (2)フォワードプライマーが配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号14で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (3)フォワードプライマーが配列番号15で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (4)フォワードプライマーが配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (5)フォワードプライマーが配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号28で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (6)フォワードプライマーが配列番号29で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (7)フォワードプライマーが配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (8)フォワードプライマーが配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号42で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、
- (9)フォワードプライマーが配列番号43で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、

(10)フォワードプライマーが配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドで、リバースプライマーが配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドである組合せ、等が挙げられる。

[0118] 上記プライマーを用いたPCRの条件、操作法等は、この分野で通常行われている常法に従えばよい。

[0119] 得られたプライマー伸長物を測定する方法としては、(A-1)ポリメラーゼ連鎖反応を行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、その結果に基づいて行う方法、(A-2)リアルタイムPCR法による方法、(A-3)標識プライマーを用いたPCRを行って得られたプライマー伸長物の標識を測定する方法、等が挙げられる。

[0120] 以下に、それぞれの方法について説明する。

(A-1)ポリメラーゼ連鎖反応を行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、その結果に基づいて行う方法

この方法としては、例えば

「下記工程

(i)配列番号1、配列番号2、配列番号3、又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシの遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー(本発明のプライマー)として用い、試料中の核酸を錆型としてPCRを行う、

(ii)上記(i)で得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、その結果に基づいてM.カンサシを検出する、

を包含することを特徴とするM.カンサシの検出方法」が挙げられる。

[0121] 電気泳動を行い、その結果からM.カンサシを検出する方法としては、例えば(A-1-1)目的とする大きさ(塩基対数)のプライマー伸長物画分を確認することにより判定する方法、(A-1-2)標識プローブを用いたハイブリダイゼーションにより判定する方法等が挙げられる。

[0122] 電気泳動法の条件、操作方法等は、この分野で通常行われている常法に従えばよい。

- [0123] (A-1-1) 目的とする塩基対数のプライマー伸長物画分を確認することにより判定する方法

上記の、目的とする大きさ(塩基対数)のプライマー伸長物画分を確認することにより判定する方法としては、例えば、まずPCRを行い、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行う。PCRで用いるフォワードプライマーとリバースプライマーから、増幅産物の大きさ(塩基対数)を予測しておき、得られた泳動画分が予測された大きさの増幅産物に該当するか否かを、常法により確認すればよい。例えば、得られた画分をエチジウムプロマイド等で染色して核酸種を視覚化するといった方法で、その増幅産物の特徴的大きさにより検出する等の方法が挙げられる。

- [0124] (A-1-1) の方法による具体的な判定方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。

- [0125] (1) フォワードプライマーとして配列番号5で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号6で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、167塩基対の画分又は配列番号56で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0126] (2) フォワードプライマーとして配列番号7で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号10で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号54で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0127] (3) フォワードプライマーとして配列番号8で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号11で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号55で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0128] (4) フォワードプライマーとして配列番号9で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号12で表される核酸配列を持つオリゴ

スクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号56で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0129] (5) フォワードプライマーとして配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号14で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、216塩基対の画分又は配列番号57で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0130] (6) フォワードプライマーとして配列番号15で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、168塩基対の画分又は配列番号58で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0131] (7) フォワードプライマーとして配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、336塩基対の画分又は配列番号59で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0132] (8) フォワードプライマーとして配列番号17で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号22で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号60で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0133] (9) フォワードプライマーとして配列番号18で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号23で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号61で表される核酸配列を持つオリゴスクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0134] (10) フォワードプライマーとして配列番号19で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号24で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号62で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0135] (11) フォワードプライマーとして配列番号20で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号25で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号63で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0136] (12) フォワードプライマーとして配列番号21で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号26で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号64で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0137] (13) フォワードプライマーとして配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号28で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、156塩基対の画分又は配列番号65で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0138] (14) フォワードプライマーとして配列番号29で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、156塩基対の画分又は配列番号66で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0139] (15) フォワードプライマーとして配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気

泳動を行い、358塩基対の画分又は配列番号67で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0140] (16) フォワードプライマーとして配列番号31で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号36で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号68で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0141] (17) フォワードプライマーとして配列番号32で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号37で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号69で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0142] (18) フォワードプライマーとして配列番号33で表されるオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号38で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号70で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0143] (19) フォワードプライマーとして配列番号34で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号39で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号71で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0144] (20) フォワードプライマーとして配列番号35で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号40で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号72で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0145] (21) フォワードプライマーとして配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌク

レオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号42で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、163塩基の画分又は配列番号73で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0146] (22) フォワードプライマーとして配列番号43で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、158塩基対の画分又は配列番号74で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0147] (23) フォワードプライマーとして配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、387塩基対の画分又は配列番号75で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0148] (24) フォワードプライマーとして配列番号45で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号49で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号76で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0149] (25) フォワードプライマーとして配列番号46で表されるオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号50で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号77で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0150] (26) フォワードプライマーとして配列番号47で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号51で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号78で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確

認されたものを陽性と判定する方法。

- [0151] (27) フォワードプライマーとして配列番号48で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号52で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号79で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドの画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0152] 以上の中でも(1)、(5)～(7)、(13)～(15)、(21)～(23)の方法が好ましい。
- [0153] (A-1-2) 標識プローブを用いたハイブリダイゼーションにより判定する方法
標識プローブを用いたハイブリダイゼーションにより判定する方法としては、例えば電気泳動を行った後、得られた電気泳動画分について、本発明のプローブを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブとハイブリダイズした画分の存在の有無を、該標識プローブの標識を検出することによって確認したものを陽性と判定する方法が挙げられる。
- [0154] 用いられるプローブ及びプローブを標識する標識物質の具体例、並びにプローブの標識化方法は、前記したとおりである。
- [0155] (A-1-2) の方法による具体的な判定方法としては、例えば下記の方法が挙げられる。
- [0156] (1) フォワードプライマーとして配列番号5で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号6で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、得られた画分について配列番号53で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0157] (2) フォワードプライマーとして配列番号7で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号10で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号54で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を

持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0158] (3) フォワードプライマーとして配列番号8で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号11で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号55で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0159] (4) フォワードプライマーとして配列番号9で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号12で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号56で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0160] (5) フォワードプライマーとして配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号14で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号57で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0161] (6) フォワードプライマーとして配列番号15で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号58で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を

持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0162] (7) フォワードプライマーとして配列番号13で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号16で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号59で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0163] (8) フォワードプライマーとして配列番号17で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号22で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号60で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0164] (9) フォワードプライマーとして配列番号18で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号23で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号61で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0165] (10) フォワードプライマーとして配列番号19で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号24で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号62で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列

を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0166] (11) フォワードプライマーとして配列番号20で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号25で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号63で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0167] (12) フォワードプライマーとして配列番号21で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号26で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号64で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0168] (13) フォワードプライマーとして配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号28で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号65で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0169] (14) フォワードプライマーとして配列番号29で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号66で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列

を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0170] (15) フォワードプライマーとして配列番号27で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号30で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号67で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0171] (16) フォワードプライマーとして配列番号31で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号36で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号68で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0172] (17) フォワードプライマーとして配列番号32で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号37で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号69で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0173] (18) フォワードプライマーとして配列番号33で表されるオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号38で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号70で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌ

クレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0174] (19) フォワードプライマーとして配列番号34で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号39で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号71で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0175] (20) フォワードプライマーとして配列番号35で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号40で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号72で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0176] (21) フォワードプライマーとして配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号42で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号73で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0177] (22) フォワードプライマーとして配列番号43で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号74で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列

を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0178] (23) フォワードプライマーとして配列番号41で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号44で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号75で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0179] (24) フォワードプライマーとして配列番号45で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号49で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号76で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0180] (25) フォワードプライマーとして配列番号46で表されるオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号50で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号77で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0181] (26) フォワードプライマーとして配列番号47で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号51で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号78で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列

を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。

- [0182] (27) フォワードプライマーとして配列番号48で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号52で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った後、得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、配列番号79で表される核酸配列の一部又は全部を含有する核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する方法。
- [0183] 以上の中でも(1)、(5)～(7)、(13)～(15)、(21)～(23)の方法が好ましい。
- [0184] 本発明に係るM.カンサシの検出方法の詳細を、例えばフォワードプライマーとして配列番号5で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして配列番号6で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチドを用いたPCR、及び電気泳動を行った後、目的とする塩基対数のプライマー伸長物画分を確認する方法によって検出する場合(上記の(A-1-1)の(1)の方法)を例に挙げて説明すると、以下の通りである。
- [0185] まず、前記した方法に従い、M.カンサシの有無を検出すべき試料中から精製DNA試料を得る。別に、前記した方法で、本発明に係るヌクレオチドから、DNAシンセサイザーを用いてホスホアミダイト法にて、配列番号5で表される配列を持つオリゴヌクレオチド(以下、Ic_plate1_Fw1と記載する。)及び配列番号6で表される核酸配列を持つオリゴヌクレオチド(以下、Ic_plate1_Rv1と記載する。)を合成する。
- [0186] Ic_plate1_Fw1及びIc_plate1_Rv1、1.0～4.0mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1% コール酸ナトリウム、0.005～0.2% ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、夫々0.1～0.6mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよび10～80単位/mlのTaq DNAポリメラーゼを含有する10mM Tris-HCl(pH8.9)緩衝液を調製し、PCR用反応液とする。
- [0187] PCR用反応液に精製DNA試料を添加したものをPCR用試料として用い、DNAサ

一マルサイクラーにて、20-40回PCRを行う。得られたPCR後の反応液を、1.5%アガロースゲル電気泳動する。次いでエチジウムプロマイド染色した後、紫外線での蛍光を検出する。また、分子量マーカーも反応液と同時に泳動し、相対泳動度の比較により、検出されたDNA断片の長さを算出する。フォワードプライマーとしてIc_plate1_Fw1、及びリバースプライマーとしてIc_plate1_Rv1を用いたPCRでは、M.カンサシの核酸配列中の167塩基対のDNA断片(配列番号53)が複製されると予測される。そこで、167塩基対の蛍光バンドが確認されたものを陽性と判定すればよい。

[0188] (A-2)リアルタイムPCR法による方法

本発明のM.カンサシの検出方法には、リアルタイム增幅検出系(例えば米国特許第5210015号、米国特許第5538848号の記載参照)も用いることができる。

[0189] リアルタイム増幅検出系による検出系の例として、例えばリアルタイムPCR検出系が挙げられる。

[0190] 例えば、TaqManTMリアルタイムPCR法(例えば米国特許第5538848号の記載参照)、MGB Eclipse Probe System法(例えば米国特許第5,801,155号の記載参照)、Molecular Beacons Probe Technology法(例えば米国特許第5925517号の記載参照)、LU X Fluorogenic Primer法(Invitrogen Corporation)、Quenching probe-PCR(QP)法(例えば米国特許第6,492,121号の記載参照)など、様々にリアルタイムPCR検出法が本発明のM.カンサシの検出方法に用いることができる。

[0191] より具体的には、5'末端を例えばFAM等の蛍光色素(レポーター)で、3'末端をたとえばTAMRA等のクエンチャー色素で標識したプローブを用いたリアルタイムPCR法(例えば米国特許第5538848号の記載参照)により、目的の微量なDNAを高感度かつ定量的に検出できる。

[0192] 即ち、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー(本発明のプライマー)として用い、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(本発明

のオリゴヌクレオチド)の5'末端がレポーター蛍光色素で標識化され、3'末端がクエンチャー色素で標識化されたものを標識プローブとして用いて、試料中の核酸を鋳型としてPCRを行い、該標識プローブから遊離された標識物質を検出することにより行うである。

- [0193] 上記のリアルタイムPCR法の原理は以下の通りである。

すなわち、5'末端を蛍光色素(レポーター)で、3'末端をクエンチャー色素で標識した、目的遺伝子の特定領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブが使用される。該プローブは、通常の状態ではクエンチャー色素によってレポーターの蛍光が抑制されている。この蛍光プローブを目的遺伝子に完全にハイブリダイズさせた状態で、その外側からDNAポリメラーゼを用いてPCRを行う。DNAポリメラーゼによる伸長反応が進むと、そのエキソヌクレアーゼ活性により蛍光プローブが5'端から加水分解され、レポーター色素が遊離し、蛍光を発する。リアルタイムPCR法は、この蛍光強度をリアルタイムでモニタリングすることにより、鋳型DNAの初期量を正確に定量することができる。

- [0194] 本発明に係るリアルタイムPCR検出系に用いられる5'末端を蛍光色素(レポーター)で、3'末端をクエンチャー色素で標識したプローブに用いられるプローブとしては、前記した本発明のプローブであればよい。実際には、選択したフォワードプライマーとリバースプライマーの組合せでリアルタイムPCRを行った場合に得られる増幅産物の塩基配列を持つプローブ、又は更にその配列から設計される塩基配列を持つプローブが用いられる。例えば、配列番号5と配列番号6のプライマーを用いてリアルタイムPCRを行う場合に用いられるプローブは、そのリアルタイムPCRで増幅されると予想される配列暗号53の塩基配列を持つヌクレオチドか、配列番号53の塩基配列から設計される配列(例えば配列番号80)を持つオリゴヌクレオチドが挙げられる。

- [0195] また、5'末端を標識するレポーター蛍光物質としてはFAM、HEX、TET、Cy5、VIC等が挙げられるが、中でもFAMが好ましい。3'末端を標識するクエンチャー色素としては、TAMRA等の蛍光物質、BHQ(例えばBHQ2), DABCYL等の非蛍光物質が挙げられるが、中でもTAMRAが好ましい。

- [0196] 本発明に係るリアルタイムPCR検出系に用いられるフォワードプライマー及びリバ

ースプライマーとしては、前記のPCR法において用いられるものが挙げられ、その好ましい具体例及び好ましい組合せも前記したとおりである。

- [0197] リアルタイムPCR検出系に用いられるその他のデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、DNAポリメラーゼ等の試薬は、通常のリアルタイムPCRで用いられているものを用いればよく、リアルタイムPCRの手法は、本発明のプライマー及びプローブを用いる以外は、リアルタイムPCRの一般的なプロトコルに従って行えばよい。
- [0198] 本発明に係るリアルタイムPCR検出系によるM.カンサシの検出方法の一例を説明すると、以下の通りである。
- [0199] まず、前記した方法に従い、M.カンサシを検出すべき試料中から精製DNA試料を得る。別に、DNAシンセサイザーを用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号5に示される配列(Ic_plate1_Fw1)、配列番号6に示される配列(Ic_plate1_Rv1)のオリゴヌクレオチドを合成する。
- [0200] また、Ic_plate1_Fw1およびIc_plate1_Rv1をプライマーとして用いたPCRで増幅される配列番号53の核酸配列から、プローブとして利用するための配列(例えば配列番号80)を設計し、この配列のオリゴヌクレオチドを合成する。このオリゴヌクレオチドの5'末端にレポーター色素のFAMを、3'末端にレポーター消光体のTAMRAを常法により結合し、蛍光標識プローブを得る。
- [0201] 上記で調製したIc_plate1_Fw1をフォワードプライマーとして、Ic_plate1_Rv1をリバースプライマーとして用い、例えば下記の通りリアルタイムPCRを行う。
- [0202] 即ち、各 $1\mu M$ のプライマーIc_plate1_Fw1、及びプライマーIc_plate1_Rv1、100~1000nMの蛍光標識プローブ、1.0~4.0mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1%コール酸ナトリウム、0.005~0.2%TritonX-100、夫々0.2mM のdATP、dCTP、dGTP、dTTP、10~80単位/mlのTaq DNA ポリメラーゼを含有する10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.9)を調製し、反応液とする。反応液20 μlに精製DNA試料1ngを加えたものをPCR用試料とし、これを96穴反応プレートのウェルに入れ、適当なリアルタイムPCR検出装置等を用いてリアルタイムPCRを行う。反応は30~50回サイクル繰り返し、1サイクル毎にレポーター色素の発光量を測定する。

- [0203] M.カンサシの判定においては、レポーター色素の発光量が測定された場合に、M.カンサシ陽性と判定すればよい。
- [0204] また、リアルタイムPCR法では、検量線を作成することができるので、試料中のM.カンサシのゲノムDNAの数(コピー数)を得ることができる。また、その数はM.カンサシの数に比例するので、試料中のM.カンサシの数も得ることができる。検量線の作成方法は、リアルタイムPCR法において通常行われている常法に従えばよい。例えば、標準としてコピー数既知のM.カンサシのゲノムDNA試料を用い、希釈系列の濃度(コピー数)のPCR用DNA試料を調製する。次いで各希釈系列のPCR用DNA試料を用いて上記方法に従いリアルタイムPCRを行い、レポーター色素の発光量を測定する。各希釈系列のPCR用DNA試料毎に、PCRの各サイクル数(x軸)に対する、測定した発光量の測定値(R_n 、y軸)をプロットした増幅曲線を作成する。次いで、発光量が指數関数的に増幅している R_n 部を選択し、Threshold line (Th)を引く。Thと各PCR用DNA試料の増幅曲線が交差した点をThreshold cycle (C_t)値とする。次いで用いた各PCR用DNA試料のコピー数の対数値(x軸)に対する C_t 値(y軸)をプロットし、各 C_t に対して得られた近似曲線を検量線とすればよい。
- [0205] 試料中のM.カンサシのゲノムDNAの数(コピー数)を定量するには、先ずM.カンサシを検出すべき試料中からDNAを分離精製した後、得られたDNA試料についてリアルタイムPCRを行い、同様に増幅曲線を作成する。検量線を作成したときのThと得られた増幅曲線が交差した C_t 値を得る。その C_t 値を検量線に当てはめることにより、試料中のM.カンサシのゲノムDNA量(コピー数)を得ることができる。
- [0206] また本発明は、核酸増幅工程において、RNA転写産物を利用した検出法を適用する事ができる。例えば、NASBA (nucleic acid sequence based amplification) 法(特許第2650159号)、3SR (self-sustained sequence replication) 法(特公平7-114718号)、TAS (transcription based amplification system) 法(特表平2-500565号:国際公開WO88/10315号)、TMA (transcription mediated amplification) 法(特開平11-46778号)などが挙げられるが、中でも逆転写酵素およびRNAポリメラーゼの協奏的作用(逆転写酵素およびRNAポリメラーゼが協奏的に作用するような条件下で反応させる。)を利用する一定温度核酸増幅法が測定系の自動化には適する。

[0207] (A-3)標識プライマーを用いたPCRを行って得られたプライマー伸長物の標識を測定する方法、

この方法としては、本発明のプライマーを前記した方法で標識化した標識プライマーを用いて試料中の核酸を錆型としたPCRを行い、得られたプライマー伸長物の標識を測定することによって、標識を検出できた場合には、M.カンサシ陽性と判定する方法が挙げられる。この方法に用いられるフォワードプライマー及びリバースプライマーとしては、前記のPCR法において用いられるものが挙げられ、その好ましい具体例及び好ましい組合せも前記したとおりである。

[0208] 上記方法の場合、PCRを行ったのち、遊離の標識プライマーを除き、プライマー伸長物の標識を測定し、標識を検出できた場合に、M.カンサシ陽性と判定すればよい。

[0209] 遊離の標識プライマーを除く方法としては、PCR反応を行って得られた反応物中のプライマー伸長物を、核酸を沈殿させる常法(エタノール沈殿法、イソプロパノールを用いた沈殿法等)により沈殿させた後、沈殿しなかった遊離の標識プライマーを含有する上清を除去する方法等が挙げられる。

[0210] また、PCR反応を行って得られた反応物を適当な条件下、ゲルクロマトグラフィーで処理して、プライマー伸長物と遊離の標識プライマーを分離する方法、電気泳動法により分離する方法等も挙げられる。

[0211] (B)本発明のオリゴヌクレオチドを標識物質で標識化したものを標識プローブとして用いる方法、

更に、本発明のM.カンサシの検出方法として、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(本発明のオリゴヌクレオチド)を標識物質で標識化したものを標識プローブとして用い、該標識プローブを試料中の核酸とハイブリダイゼーションさせ、遊離の標識プローブを除いた後、ハイブリダイズした複合体の標識を検出する方法が挙げられる。

[0212] 具体的には、例えば

(B-1) 本発明のオリゴヌクレオチドを固相担体に結合して、捕捉プローブとして用い、試料中の核酸とハイブリダイゼーションさせて、試料中のM.カンサシ由来の核酸を固相上に固定化させる検出法、(例えば、特開昭62-265999号の記載参照)、

(B-2) (B-1)の捕捉プローブと、本発明のプローブを標識した標識プローブを用い、試料中の核酸とハイブリダイゼーションさせて、固相担体上に補足プローブとM.カンサシ由来の核酸と標識プローブの複合体を形成させて、標識プローブの標識を測定するサンドイッチアッセイ(例えば、特開昭58-40099号の記載参照)を行う方法、

(B-3) ビオチンで標識した本発明のプローブを用い、試料中の核酸とハイブリダイゼーション後、試料中のM.カンサシ由来の核酸をアビジン結合担体で捕捉する方法等が、挙げられる。

- [0213] 尚、本発明のM.カンサシの検出方法に用いられる試薬中には、通常この分野で用いられる試薬類、例えば緩衝剤、安定化剤、防腐剤等であって、共存する試薬等の安定性を阻害せず、PCRやハイブリダイゼーション反応を阻害しないものを用いることができる。また、その濃度も、通常この分野で通常用いられる濃度範囲から適宜選択すればよい。
- [0214] 緩衝液の具体例を挙げると、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ベロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、通常のPCRやハイブリダイゼーション反応を実施する場合に用いられている緩衝液は全て挙げられ、そのpHも特に限定されないが、通常5~9の範囲が好ましい。
- [0215] また、必要に応じて核酸合成酵素(DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素など)、酵素に応じた基質(dNTP、rNTPなど)、また二本鎖インターラーカー(エチジウムプロマイド、SYBRTM Greenなど)あるいはFAMやTAMRA等の標識検出物質などが用いられる。
- [0216] 本発明に係るM.カンサシ検出用試薬キットとしては、「配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー(本発明のプライマー)又は／及びプローブ(本発明のプローブ)として含んでなるM.カンサシ検出用試薬キット。」が挙げられる。プライマー

は標識物質で標識化されたものであってもよい。その標識物質の具体例は前記したとおりである。

[0217] 本発明のプライマーを含んでなるキットには、フォワードプライマーとリバースプライマーの一組のプライマーを含む組成も含まれる。その好ましい実施態様としては、たとえば下記のものが挙げられる。

(1)配列番号5で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号6で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(2)配列番号13で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号14で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(3)配列番号15で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号16で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(4)配列番号13で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号16で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬と

して含んでなるもの。

(5)配列番号27で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号28で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(6)配列番号29で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号30で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(7)配列番号27で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号30で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(8)配列番号41で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号42で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(9)配列番号43で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号44で表される核酸配列の一部又は

全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

(10) 配列番号41で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるフォワードプライマーと、配列番号44で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し、且つM.カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであるリバースプライマー、を構成試薬として含んでなるもの。

- [0218] 上記キットは、更に、本発明のオリゴヌクレオチドを標識物質で標識化したものを標識プローブとして含んでいてもよい。
- [0219] 更に、「本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして含んでなるM.カンサシ検出用試薬キット。」が挙げられる。該プローブは標識物質で標識化されたものであってよい。
- [0220] これらのキットを構成する構成試薬の好ましい態様及び具体例は前記したとおりである。
- [0221] 尚、本発明のM.カンサシの検出用試薬キットには、例えば緩衝剤、安定化剤、防腐剤等であって、共存する試薬等の安定性を阻害せず、PCRやハイブリダイゼーション反応を阻害しないものが含まれていてもよい。また、その濃度も、通常この分野で通常用いられる濃度範囲から適宜選択すればよい。
- [0222] 緩衝液の具体例を挙げると、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ベロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、通常のPCRやハイブリダイゼーション反応を実施する場合に用いられている緩衝液は全て挙げられ、そのpHも特に限定されないが、通常5～9の範囲が好ましい。
- [0223] また、必要に応じて核酸合成酵素(DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素など)、酵素に応じた基質(dNTP、rNTPなど)、また二本鎖インターラーカー(エチジウムプロマイド、SYBRTM Greenなど)あるいはFAMやTAMRA等の標識検出物質などを含んでいてもよい。

[0224] 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、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

[0225] 尚、実施例で用いられる細菌はいずれも臨床分離株であり、培養後、コロニーの形状や従来の各種生化学的試験などによって菌種がすでに鑑別されているものである。

実施例

[0226] 実験例1. M.カンサシゲノム由來のクローンの選択

(1) DNA試料の調製

まず、小川培地上で培養したM.カンサシ(*Mycobacterium kansasii*)のコロニーを精製水に懸濁し、オートクレーブ処理(120°C・2気圧、20分)した後、菌体の粉碎処理(直径2mmガラスビーズによる物理的破碎)を経て、遠心分離し、上清を得た。得られた上清から、(株)キアゲン製のイオン交換樹脂タイプDNA抽出精製キットGenomic-t ipを用いてDNAの抽出、精製を行い、M.カンサシ由來のゲノムDNAを得た。

[0227] 得られた精製DNAを、最終400ng／μl(10mM Tris-HCl緩衝液、pH8.9)になるよう調製し、DNA試料とした。

[0228] 別に、ポジティブコントロールとして特開平11-155589号に記載されたM.カンサシのKATS2、及び特願2004-129272号明細書に配列番号8として記載された*M.tuberculosis*(マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ヒト型結核菌)に特異的な配列(本明細書では配列番号81として示す。)、ネガティブコントロールとして大腸菌のDNA抽出方法の常法に従いDNAを抽出、精製した大腸菌由來のDNAを用いて同様にDNA試料を調製し、同様に以下の処理を行った。

[0229] (2) Whole Genome Shotgun libraryの作製

上記(1)で得られたDNA試料24 μgを材料として、以下の方法(Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51 Venter et al.に記載のWhole Genome Shotgun法を改変)で、Whole Genome Shotgun libraryの作製を行った。

[0230] まず、ネビュライザー(インビトロジェン社製)を利用し、終濃度20%のグリセロール存在下、5kPa～9kPaの圧力下で約10分間処理して、DNA試料を断片化し、目的とする500～1000bpのサイズ分画を効率よく回収する事ができた。得られた分画を(株)キ

アゲン製の抽出カラムを利用して精製した。

- [0231] 次に、タカラバイオ社製のDNA Blunting Kitを用い、T4 DNA Polymeraseの5'→3' polymerase活性と3'→5' exonuclease活性を利用して、得られたDNA断片の末端を平滑化した。これを平滑末端処理済みpBSII sk+ベクター(Stratagene社)とのライゲーション反応を行い、DNA断片をpBSII sk+ベクター(amp^r)に組み込んだ組み換えDNAを作製した。
- [0232] タカラバイオ社製E. coli JM109 Competent Cellsを用い、その製品プロトコールに従って、上記で得られた組み換えDNAを用いてE. coli JM109 Competent Cellsの形質転換を行い、得られた形質転換体を100 μg/mlのアンピシリン、0.2 mM IPTG、40 μg/ml X-Galを含むLB-寒天培地にプレート培養した後、白色コロニーをピックアップし、目的のDNA断片を組み込んだ組み換えDNAが導入された形質転換体(M. カンサシゲノムのWhole Genome Shotgun クローン)のlibraryを得た。
- [0233] (3)マイクロアレイ作製
下記の方法で、上記(2)で得られたM.カンサシゲノムのWhole Genome Shotgunクローンを用いてPCRを行い、スライドガラス上に固定するプローブ材料を調製した。
- [0234] 各1 μMのプライマーM13 Primer M1(タカラバイオ社製)及びプライマーM13 Primer RV(タカラバイオ社製)、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1% コール酸ナトリウム、0.1% Triton X-100(トリトンX-100、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ローム アンド ハース社商品名)、夫々0.2mM のdATP、dCTP、dGTP、dTTP およびTaq DNA ポリメラーゼ((株)ニッポン・ジーン製)40単位/ml を含有する10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.9)を調製し、PCR用反応液とした。
- [0235] 上記(1)で得られたM.カンサシゲノムのWhole Genome Shotgunクローンから常法に従いDNAを精製し、これをPCR用反応液20 μlに懸濁添加したものをPCR用試料(テンプレートとなる)として用い、MJ Research社のDNAサーマルサイクラー(DNA Engine PTC200)にて、下記の反応条件で30サイクルPCRを行った。
- [0236] PCR反応条件:
熱変性: 94°C、0. 5分
アニーリング: 55°C、1分

重合反応: 75°C、0. 5分。

- [0237] 得られたPCR産物を精製後、固定化Buffer(終濃度3x SSC)と混合した。
- [0238] タイピング用装置(GTMAS Stamp II; 日本レーザ電子社製)を使用し、スポットされるPCR産物の終濃度が300ng/ μ Lとなるように調整し、装置内の湿度を55%に設定して、スライドガラス(CMT GAPS-II; Corning社製)上に、得られたPCR産物をスポットした(スポット径150–250 μ m)。スポットが終了したスライドガラスをUVクロスリンカー(UV Stratalinker1800; Stratagene社製)に移し、150mJ/cm²のUV照射を行なって、PCR産物(目的のDNA)を固定化し、マイクロアレイを作成した。
- [0239] (4)標的ゲノムDNAの蛍光色素標識とマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション
 - i)標的ゲノムDNAの蛍光色素標識
まず、BioPrime DNA labeling system(インビトロジェン社製)を利用し、M.カンサシ(ATCC12478)由来ゲノムおよび、対照用ゲノム(ウシ型結核菌、ATCC19274))DNAの各々2 μ gに対してそれぞれ製品中のrandom primer solution; 20 μ Lを混合し、熱変性(95°C、5分間)処理を行った。
- [0240] ついで、それぞれの熱変性処理物に、0.1M DTT 2 μ l、dATP/dCTP/dGTP(各5mM)の混合液 2 μ l、2.5mM dTTP 0.8 μ l、5mM Ha-dUTP 1.6 μ l、Klenow酵素(40U/ μ L) 1 μ lを添加し、total volume=50 μ Lとなるように脱イオン化滅菌水を加え、37°Cで3時間の伸長反応を行った。マイクロコンYM-30(ミリポア社製)の限外ろ過カラムを付属の1.5ml チューブにセットし、上記反応産物をカラムにのせ14000rpmで4分遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機(Centrifuge concentrator; LABCONCO社製)で完全に乾燥させた。
- [0241] 得られた乾燥反応産物に50mM NaHCO₃を10 μ l加え混合し、2~3分常温で静置した。
- [0242] 別に、1mg のCy3(アマシャムバイオサイエンス株式会社)またはCy5(アマシャムバイオサイエンス株式会社)を105 μ lのDMSOに溶かしたものを作製した。このCy-dye Solution Cy3 10 μ lを対照用ゲノム(ウシ型結核菌)を用いて得られた上記反応産物に加え、Cy-dye Solution Cy5 10 μ lをM.カンサシゲノムを用いて得られた上記反応産物に加え、それぞれ40°Cで60分インキュベート(遮光)を行った。

- [0243] さらに、それぞれの上記反応産物に4M NH₂OH(使う直前に作成する)を10 μL加え、攪拌後、15分インキュベート(遮光)を行い、夫々の標識化産物、即ちCy3標識対照用ゲノム(ウシ型結核菌)DNA及びCy5標識M.カンサシゲノムDNAを得た。
- [0244] 得られた標識化産物を、マイクロコンYM-30(ミリポア社製)の限外ろ過カラムを付属の1.5mlチューブにセットし、上記で得られたゲノムDNAの標識化産物をカラムにのせ14000rpmで4分遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機(Centrivap concentrator; LABCONCO社製)で完全に乾燥させた。
- [0245] ii) 標識化産物の断片化工程
上記(4) i)で得られた乾燥状態のゲノムDNAの標識化産物に対して、終濃度が0.04M Tris-acetate(pH8.1)、0.1M 酢酸カリウム、0.03M酢酸マグネシウム四水和物の組成の溶液40 μLを調製したものを加え、懸濁混和させた。次いで94°Cで15分間加熱処理し、100base～300 base の、ゲノムDNAの標識化産物で断片化した生成物を得た。
- [0246] なお、BcaBEST DNA Polymerase(タカラバイオ社製)及びrBst DNA Polymerase(E PICENTRE社製)を用いてラベル化効率(base/dye)を調べた結果、対照用ゲノム(ウシ型結核菌)DNAの約20塩基にdye 1分子が取り込まれ、M.カンサシゲノムDNAの約10塩基にdye 1分子が取り込まれている事を確認している。
- [0247] Cy3標識産物溶液およびCy5標識産物溶液の各々をマイクロコンYM-10(ミリポア社製)の限外ろ過カラムにのせ14000rpmで4分遠心した後、濃縮液をマイクロチューブに回収して、真空乾燥遠心機(Centrivap concentrator; LABCONCO社製)で完全に乾燥させた。次いでマイクロチューブに以下の試薬を加え(後に使用するマイクロアレイ用のカバーガラスが24×55mmの場合)、上記で得たCy3標識産物とCy5標識産物を同一の溶液中で懸濁混和させた。
- [0248] ArrayHyb Hybridization buffer(SIGMA社製); 40 μL
salmon sperm DNA(10mg/mL) ; 0.5 μL
formamide ; 5 μL
Total 40～50 μL
懸濁混和後、95°Cで5分インキュベートし、ハイブリダイゼーションまで70°Cに保つ

ておいた。

[0249] iii) マイクロアレイ・ハイブリダイゼーション

前記(3)で得られたマイクロアレイ(DNAチップ)上に、上記(4)ii)で得られたCy3標識産物とCy5標識産物の混合溶液を全てのせ、気泡が入らないようにカバーガラスをかぶせた。これをハイブリカセットにセットし、タッパーに蒸留水で湿らせたキムタオルをひいいたもののに載せて密閉し、65°Cで8時間以上反応させてハイブリダイゼーションを行った(遮光)。ハイブリダイゼーション後、DNAチップをカバーガラスごと2×SSC-0.1%SDS溶液に室温で浸し、溶液中でDNAチップを静かに揺らしてカバーガラスをはずした。次いで1×SSC、0.03%SDS溶液(60°C)で10分間洗浄、0.2×SSC溶液(42°C)で10分間洗浄、0.05×SSC溶液(室温)で10分間洗浄した後、新しい乾いたラックにDNAチップをすばやく移し、すぐに800prmで5分間遠心を行って乾燥させた。

[0250] (5) 蛍光強度の測定:シグナル検出から数量化まで

蛍光読み取りスキャナー(Protein Array Scanner; 日本レーザ電子社製)を用いて、上記4)iii)で得られたマイクロアレイ上の蛍光強度を測定し、2ch(Cy3、Cy5)での蛍光検出データを得た。蛍光シグナルの数量化は日立ソフト社製のDNASISTM-Array(DNAチップ発現イメージ解析ソフトウェア)を用い、ソフトの操作手順に従って、スポット自動認識、バックグラウンド計算、蛍光強度比の正規化を行った。また、信頼性限界ラインを定め、それ以下の領域のデータは扱わない事で正規化され信頼性のある蛍光強度比を求めた。

[0251] 尚、マイクロアレイ上には、ポジティブコントロール(M.tuberculosisに特異的なDNAの断片、M.カンサシのKATS2配列の断片)及びネガティブコントロール(大腸菌由來のDNAの断片)がスポットされている。

[0252] さらに、M.カンサシ特異的検出のための候補配列をスクリーニングするために、DNAチップ上で検出されたCy3/Cy5の蛍光強度比(Ratio)を基に、散布図(スキャッタープロット)解析を行った。結果を図5に示す。

[0253] 比較として、特開平11-155589号に記載されたM.カンサシのKATS2配列、及び特願2004-129272号明細書に記載されたM.tuberculosis由來の配列番号8(本明細書

では配列番号81)を用いて、同様に処理し、Cy3及びCy5の蛍光を検出した結果も図5に併せて示す。

- [0254] 図5には、散布図の全体と、プロットが集中した(点線で丸く囲んだ)一部を拡大したものとを示している。散布図は、横軸のCy3の蛍光強度に対するCy5の蛍光強度を縦軸に、両対数グラフで示している。図5に於いて、(2)及び(3)以外のスポットは、各マイクロアレイ上のPCR産物を用いた結果を示し、(2)として丸く囲んで示したスポットは、特開平11-155589号に記載されたM.カンサシのKAS配列を用いた結果であり、(3)として丸く囲んで示したスポットは、特願2004-129272号明細書に記載されたM.tuberculosis由来の配列番号8(本明細書では配列番号81)を用いた場合の結果を夫々示す。
- [0255] また、図5上の各ラインの意味は、以下の通りである。
- [0256] (a) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 10.0 を示すライン
(b) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 5.0 を示すライン
(c) Cy5蛍光強度/Cy3蛍光強度の比率 ≥ 2.0 を示すライン
(a') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 10.0 を示すライン
(b') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 5.0 を示すライン
(c') Cy3蛍光強度/Cy5蛍光強度の比率 ≥ 2.0 を示すライン
- [0257] 即ち、(a)の線より上にあるスポットは、Cy5の蛍光強度がCy3の蛍光強度に比較して10倍以上強いことを示し、(b)の線より上にあるスポットは、Cy5の蛍光強度がCy3の蛍光強度に比較して5~10倍強いことを示し、(c)の線より上にあるスポットは、Cy5の蛍光強度がCy3の蛍光強度に比較して2~5倍強いことを夫々示す。また、(a')の線より下にあるスポットは、Cy3の蛍光強度がCy5の蛍光強度に比較して10倍以上強いことを示し、(b')の線より下にあるスポットは、Cy3の蛍光強度がCy5の蛍光強度に比較して5~10倍強いことを示し、(c')の線より下にあるスポットは、Cy3の蛍光強度がCy5の蛍光強度に比較して2~5倍強いことを夫々示す。
- [0258] 図5から明らかな如く、(3)のスポットはライン(b')とライン(c')の間にがあるので、Cy3の蛍光強度がCy5の蛍光強度よりも5~10倍強いことを示し、このスポットはウシ型結核菌ゲノムDNAとハイブリダイズしたことがわかる。一方、(2)のスポットはライン(c)とライ

ン(b)の間にがあるので、Cy5の蛍光強度がCy3の蛍光強度よりも2～5倍強いことを示し、このスポットは、M.カンサシのゲノムDNAとハイブリダイズしたことがわかる。

- [0259] 尚、ネガティブコントロールとして大腸菌のゲノムDNAを用いた場合は、散布図上のスポットはCy5蛍光強度／Cy3蛍光強度の比率が1付近で蛍光強度の非常に低い位置にあるため、図5には示していない。
- [0260] ここで、図5に於いて、スクリーニングを行った各マイクロアレイのPCR産物の中から、(1)として丸く囲んで示した8つのスポットは(スポットが重なっているので5つのように見えるが、実際は8つのスポットがある。)、(2)よりも更に強いCy5の蛍光が検出されたことから、(2)(特開平11-155589号に記載されたM.カンサシのKATS2配列)よりもM.カンサシに対する特異性が高いと判断された。そこで、この8クローンを候補クローンとして選択した。
- [0261] (6) 候補クローンの塩基配列決定
上記(5)で選択された、候補8クローンについて、下記の方法で塩基配列決定を行った。
- [0262] 即ち、Big Dye Terminatorキット(アプライドバイオシステムズ社製)を使用し、製品プロトコールに従い以下の手順でシークエンス解析を行った。
- [0263] 候補DNA(候補クローン) ; 2 μL(100ng)
M13 Primer M1 ; 1 μL(5pmol)
premix ; 8 μL
上記の混合物に、総volume=20 μLとなるように脱イオン化滅菌水を加え、MJ Research社のDNAサーマルサイクラー(DNA Engine PTC200)にて、下記の反応条件で30サイクルのシークエンス反応を行った。
96°C 2 min → (96°C 10sec→50°C 5sec→60°C 4min) × 25 → 4°C
- [0264] 得られたシークエンス反応産物をQIAGEN社製ゲルろ過カラムで精製後、MJ Research社製のシークエンサー(BaseStation)を用い、機器付属の手順書に従い候補配列すべてのシークエンス解読を完了した。
- [0265] 得られた結果をデータベース(NCBI BLAST)で検索した結果、M.カンサシがゲノム配列未解読の生物種であるにも起因するが、データベース上では候補の8クロー

ン全てが、未登録の新規な配列であった。

[0266] 実施例1. 候補クローンのM.カンサシ特異性評価

実験例1で得られた候補8クローンについてPCR増幅系を利用したアガロースゲル電気泳動検出による評価実験を実施し、これらの候補クローンが、遺伝子増幅検出系を用いたM.カンサシの特異的検出系に利用できるかどうかを調べた。

[0267] (1) PCRプライマーの合成

まず、決定された候補クローン1のシークエンスの解析結果に基づき、プライマーデザイン用のWebツールPrimer3(Whitehead Institute for Biomedical Research.)を用いてPCR増幅検出のためのプライマー配列を設計した。設計した「CGGCCATTGTTC TACAGTCT」(配列番号5、以下、1c_plate1_Fw1と呼ぶ)および「TAGAGATCCATC GCTTTGGT」(配列番号6、以下、1c_plate1_Rv1と呼ぶ)を用い、下記の通りPCRを行った。ABI社DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、設計したオリゴヌクレオチドを合成した。合成手法はABI社マニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はオリゴヌクレオチドのアンモニア水溶液を55°Cで一夜加熱することにより実施した。次いでファルマシア社製FPLCを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、合成オリゴヌクレオチドを精製した。

[0268] 尚、シークエンスの解析結果から得られた、候補クローン1の塩基配列は、配列番号1で示されるものである。

[0269] (2) 試料の調製

以下に示す細菌を用い、下記の方法でDNAを抽出・精製し、DNA試料を得た。細菌はいずれも臨床分離株であり、培養後、コロニーの形状や従来の各種生化学的試験などによって菌種がすでに鑑別されているものである。

[0270] a:Escherichia coli (大腸菌)

b:Mycobacterium tuberculosis(マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ヒト型結核菌)

c:Mycobacterium kansasii(M.カンサシ)

d:Mycobacterium marinum(マイコバクテリウム・マリナム)

e:Mycobacterium simiae(マイコバクテリウム・シミアエ)

f:Mycobacterium scrofulaceum(マイコバクテリウム・スクロフラセウム)

- g:Mycobacterium gordonaе(マイコバクテリウム・ゴルドネア)
h:Mycobacterium szulgai(マイコバクテリウム・スズルガイ)
i:Mycobacterium avium(マイコバクテリウム・アビウム)
j:Mycobacterium intracellulare(マイコバクテリウム・イントラセルラーレ)
k:Mycobacterium gastri(マイコバクテリウム・ガストリ)
l:Mycobacterium xenopi(マイコバクテリウム・ゼノピ)
m:Mycobacterium nonchromogenicum(マイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム)
n:Mycobacterium terrae(マイコバクテリウム・テレ)
o:Mycobacterium triviale(マイコバクテリウム・トリビアレ)
p:Mycobacterium fortuitum(マイコバクテリウム・フォーチュイタム)
q:Mycobacterium chelonei(マイコバクテリウム・セロネイ)
r:Mycobacterium abscessus(マイコバクテリウム・アプセッサス)
s:Mycobacterium peregrinum(マイコバクテリウム・ペレグリナム)

- [0271] まず、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)属細菌については、小川培地上のコロニーを精製水に懸濁し、オートクレーブ処理(120°C・2気圧、20分)した後、菌体の粉碎処理(直径2mmガラスピーズによる物理的破碎)を経て、遠心分離し、上清を得た。得られた上清から、(株)キアゲン製のイオン交換樹脂タイプ DNA抽出精製キットGenomic-tipを用いてDNAの抽出、精製を行った。また、大腸菌については、大腸菌のDNA抽出方法の常法に従い、DNAを抽出、精製した。
- [0272] 得られた精製DNAを、最終1ng／μl(10mM Tris-HCl緩衝液、pH8.9)になるように調製し、DNA試料とした。
- [0273] (3)PCR
候補クローンの塩基配列(配列番号1)をもとに、上述の方法で設計、合成したプライマー配列である1c_plate1_Fw1および1c_plate1_Rv1を用い、下記の通りPCRを行った。尚、候補クローン1の塩基配列上の、各プライマーの所在位置は図1に示した通りである。
- [0274] まず、各1 μMのプライマー1c_plate1_Fw1及びプライマー1c_plate1_Rv1、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 μg/ml BSA、0.1% コール酸ナトリウム、0.1% Triton X-100(トリト

ンX-100、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ローム アンド ハース社商品名)、夫々 0.2mM のdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびTaq DNA ポリメラーゼ((株)ニッポン・ジーン製)40単位/ml を含有する10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.9)を調製し、PCR用反応液とした。

[0275] PCR用反応液20 μlにDNA試料1ngを添加したものをPCR用試料として用い、MJ Research社のDNAサーマルサイクラー(DNA Engine PTC200)にて、下記の反応条件で30サイクル PCRを行った。

[0276] PCR反応条件:

熱変性: 94°C、0. 5分
アニーリング: 55°C、1分
重合反応: 75°C、0. 5分。

[0277] (4)電気泳動

上記(3)で得られたPCR後の反応液5 μlを、1.5%アガロースゲル電気泳動した。電気泳動の電気的条件は、定電圧100V、30分行った。操作方法並びに他の条件はバイオ実験イラストレイティッド2巻, p53-63(秀潤社、中山広樹 著)に記載の一般的に用いられる方法に従った。次いでエチジウムプロマイド染色した後、UVサンプル撮影装置FAS-IIIシステム(東洋紡績(株)製)を用いて紫外線での蛍光を検出した。また、分子量マーカーも反応液と一緒に泳動し、相対泳動度の比較により、検出されたDNA断片の長さを算出した。尚、分子量マーカーは、X174/HaeIII digest(マーカー4、(株)ニッポン・ジーン製)を使用した。

[0278] 得られた電気泳動の結果を図6に示す。

[0279] 図6に於いて、各レーンの数字は、夫々以下の試料を用いた場合の結果を夫々示す。

M4: 分子量マーカー(マーカー4)

a: Escherichia coli (大腸菌)

b: Mycobacterium tuberculosis (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ヒト型結核菌)

c: Mycobacterium kansasii (M. カンサシ)

d: Mycobacterium marinum (マイコバクテリウム・マリナム)

- e:Mycobacterium simiae(マイコバクテリウム・シミアエ)
f:Mycobacterium scrofulaceum(マイコバクテリウム・スクロフラセウム)
g:Mycobacterium gordonaee(マイコバクテリウム・ゴルドネア)
h:Mycobacterium szulgai(マイコバクテリウム・スズルガイ)
i:Mycobacterium avium(マイコバクテリウム・アビウム)
j:Mycobacterium intracellulare(マイコバクテリウム・イントラセルラーレ)
k:Mycobacterium gastri(マイコバクテリウム・ガストリ)
l:Mycobacterium xenopi(マイコバクテリウム・ゼノピ)
m:Mycobacterium nonchromogenicum(マイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム)
n:Mycobacterium terrae(マイコバクテリウム・テレ)
o:Mycobacterium triviale(マイコバクテリウム・トリビアレ)
p:Mycobacterium fortuitum(マイコバクテリウム・フォーチュイタム)
q:Mycobacterium chelonei(マイコバクテリウム・セロネイ)
r:Mycobacterium abscessus(マイコバクテリウム・アプセッサス)
s:Mycobacterium peregrinum(マイコバクテリウム・ペレグリナム)

- [0280] フォワードプライマー1c_plate1_Fw1、及びリバースプライマー1c_plate1_Rv1を用いたPCRにより、M.カンサシゲノム中に位置する候補配列1の167塩基対のDNA断片(配列番号53)が複製されると予測される。そこで、167塩基対の蛍光バンドが確認されたものを陽性と判定した。
- [0281] 図6の結果から明らかな如く、本発明のプライマー1c_plate1_Fw1、及びプライマー1c_plate1_Rv1を用いてPCRを行った結果、M.カンサシを試料とした場合(c)のみに167塩基対の蛍光バンドが確認でき、陽性と判定できた。これに対し、その他のマイコバクテリウム属細菌や他の属の細菌である大腸菌の試料を試料とした場合(aおよびb、d～s)には、該当する蛍光バンドが確認できず、すべて陰性と判定できた。
- [0282] 以上のことから、候補クローン1は、M.カンサシに特異的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドであり、これをもとに設計されたプライマーを用いてPCRを行う方法により、M.カンサシを特異的に検出することができる事が判った。また、PCRなどの核酸増幅による検出は高感度が期待できるため、細菌を単離する必要がなく、臨床材料を

そのまま検出に用いることが可能であるため、従来の細菌を培養してから検出する方法では培養に数週間かかっていたM.カンサシの検出を、長くても1日以内に終わらせることができる。

[0283] 実施例2. 本発明のプライマーを用いたM.カンサシの検出1

実験例1(6)で得られた候補クローン2について、その塩基配列をもとに実施例1(1)と同様の方法でフォワードプライマーとして6c_plate1_Fw1(候補配列13)及びリバースプライマーとして6c_plate1_Rv1(候補配列14)のプライマーを設計し、合成を行った。次いで、実施例1(2)～(4)と同様の試料及び試薬を用いて、同様の方法でPCR、及び電気泳動を行った。

[0284] 尚、シークエンスの解析結果から得られた、候補クローン2の塩基配列は、配列番号2で示されるものであり、候補クローン2の塩基配列上の、設計された各プライマーの所在位置は図2に示した通りである。

[0285] フォワードプライマー6c_plate1_Fw1、及びリバースプライマー6c_plate1_Rv1を用いたPCRにより、M.カンサシゲノム中に位置する候補配列2の216塩基対のDNA断片(配列番号57)が複製されると予測される。そこで216塩基対の蛍光バンドが確認されたものを陽性と判定した。

[0286] その結果、この場合もM.カンサシを試料とした場合(c)のみに216塩基対の蛍光バンドが確認でき、陽性と判定できた。これに対し、他のマイコバクテリウム属細菌や他の属の細菌である大腸菌の試料を試料とした場合(aおよびb、d～s)には、該当する蛍光バンドが確認できず、すべて陰性と判定できた。

[0287] 以上のことから、候補クローン2も、M.カンサシに特異的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドであり、これをもとに設計されたプライマーを用いてPCRを行う方法により、M.カンサシを特異的に検出することができることがわかった。

[0288] 実施例3. 本発明のプライマーを用いたM.カンサシの検出2

実験例1(6)で得られた候補クローン3～8について、その塩基配列をもとに実施例1(1)と同様の方法でプライマーの設計、合成を行い、夫々のプライマーを用いる以外は実施例1(2)～(4)と同様の試料及び試薬を用いて、同様の方法でPCR、及び電気泳動を行った。

- [0289] その結果、M.カンサシに対する特異性を考慮した場合には、候補配列3及び4が、M.カンサシに対する特異性が高く、その判定に有効であることがわかった。
- [0290] 尚、シークエンスの解析結果から得られた、候補クローン3の塩基配列は、配列番号3で示されるものであり、候補クローン3の塩基配列上の、設計された各プライマーの所在位置は図3に示した通りである。
- [0291] また、シークエンスの解析結果から得られた、候補クローン4の塩基配列は、配列番号4で示されるものであり、候補クローン4の塩基配列上の、設計された各プライマーの所在位置は図4に示した通りである。
- [0292] 実施例4. リアルタイムPCR増幅系によるM.カンサシの検出
- [0293] (1) M.カンサシ検出用PCRプライマーの合成
実施例1(1)と同じ機器を用い、同様の操作で1c_plate1_Fw1(配列番号5)、及び1c_plate1_Rv1(配列番号6)のオリゴヌクレオチドを合成した。
- [0294] (2) M.カンサシ検出用プローブの作製
1c_plate1_Fw1および1c_plate1_Rv1をプライマーとして用いたPCRで増幅される配列番号53のオリゴヌクレオチド配列(167塩基対)から、プローブとして利用するための配列「ACTCAATGCCCTTCGATCCGGCGAAC」を設計し、この配列のオリゴヌクレオチドを合成した(以下、KAN1c_F1R1_FAMTAMと記載する。配列番号80)。このオリゴヌクレオチドの5'末端にレポーター色素FAMを、3'末端にレポーター消光体のTAMRAを結合し、標識オリゴヌクレオチドプローブ(TaqManTMフルオレセント・プローブ、アプライドバイオシステムズジャパン社製)を得た。
- [0295] (3) PCR用DNA試料の調製
実験例1(1)で調製したM.カンサシ試料から得られたDNA試料について、吸光度を測定して試料中のDNA量を測定した。得られたDNA量を、既知のM.カンサシのゲノムDNA量と比較することにより、試料中のゲノムDNA量(ゲノムコピー数)を決定した。 10^8 コピー／ μ lのゲノムDNAが得られた。
- 次いで10mM Tris-HCl緩衝液、pH8.9を用いてDNA試料を 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 5, 2コピー／ μ Lの希釈系列に希釈したものを調製し、PCR用DNA試料とした。
- [0296] (4)リアルタイムPCR

上記(1)で調製した1c_plate1_Fw1をフォワードプライマーとして、1c_plate1_Rv1をリバースプライマーとして用い、下記の通りリアルタイムPCRを行った。

- [0297] 即ち、各 $1\mu M$ のプライマー1c_plate1_Fw1、及びプライマー1c_plate1_Rv1、195nMの上記(2)で調製した蛍光標識プローブKAN1c_F1R1_FAMTAM、1.5mM MgCl₂、80mM KCl、500 $\mu g/ml$ BSA、0.1%コール酸ナトリウム、0.1%TritonX-100、夫々0.2mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP及びTaq DNA ポリメラーゼ((株)ニッポン・ジーン製)40単位/mlを含有する10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.9)を調製し、反応液とした。
- [0298] 反応液20 μl に各希釈系列のDNA試料1 μL を加えたものをPCR用試料とし、これを96穴反応プレート(マイクロアンプ・オプチカル・96 ウェル・リアクション・プレート、アプライドバイオシステムズジャパン社製)のウェルに入れ、TaqManTM PCR 専用サーマルサイクラー・検出器(ABI7500、アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いてリアルタイムPCRを行った。反応は、95°Cで10分間保温の後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間の反応を50サイクル繰り返し、1サイクル毎にレポーター色素の発光量を測定した。尚、発光量は、測定に用いたサーマルサイクラーの、測定に供した96穴反応プレート1プレート毎に相対的な蛍光強度比を数値化する機能を用いて求めた。

[0299] (5)結果

得られた実験データから、リアルタイムPCR法において行われている常法に従って、検量線を作成した。

- [0300] 即ち、各PCR用DNA試料毎に、PCRのサイクル数(x軸)に対するレポーター色素の発光量(Rn、y軸)をプロットした増幅曲線を作成した。次いで、発光量が指数関数的に増幅しているRn部を選択し、Threshold line(Th)を引いた。Thと各PCR用DNA試料の発光量が交差した点をThreshold cycle(Ct)値とした。次いで用いた各PCR用DNA試料のゲノムのコピー数(x軸、対数値)に対するCt値(y軸)をプロットし、各Ctに対して得られた近似曲線を検量線とした。得られた検量線を図7に示す。

$$y = -3.348x + 32.61$$

$$R^2 = 0.995$$

- [0301] 以上のことより、リアルタイムPCRで発光が検出されたことから、本発明によるオリゴ

スクレオチドをプライマーとしてPCRに用い、その増幅領域となる配列から標識プローブを設計し、リアルタイムPCRを行う事でM.カンサシが検出できることが判った。

- [0302] また、検量線が作成できることより、本発明のプライマー及びプローブを用いたリアルタイムPCR法によれば、M.カンサシの定量が可能であることが判った。更に、図7より、本発明のプライマー及びプローブを用いたリアルタイムPCR法では、M.カンサシのゲノムDNAが初期量として2コピー存在する条件でもM.カンサシの検出が可能である事がわかる。
- [0303] 更に、リアルタイムPCR法を利用した場合では、この蛍光強度をリアルタイムでモニタリングするので、鑄型DNAの初期量を正確に定量することができ、M.カンサシの検出に有効である。

産業上の利用可能性

- [0304] 本発明のプライマー又は／及びプローブを用いたM.カンサシの検出方法によれば、従来の菌の培養検査等により菌種を同定する方法と比較して、はるかに迅速且つ高精度に、M.カンサシの検出を行うことができる。また、本発明の検出方法でM.カンサシの検出を行うことにより、従来のプライマー又は／及びプローブを用いたPCR法による診断方法に比較して、診断上の偽陽性が排除可能となり、より高精度にM.カンサシの検出及び診断を行うことができる。更に、本発明の検出方法を用いることにより、M.カンサシ菌体の定量も行うこともできるという効果を奏する。

請求の範囲

- [1] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されていてもよい。以下同じ。)の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ(Mycobacterium kansasii)遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。
- [2] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～79で表される核酸配列の一部若しくは全部を含有するものであり、
配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～79で表される核酸配列を含有するオリゴヌクレオチドに相補的な配列の一部若しくは全部を含有するものであり、
且つ連続する10塩基以上を含有するものである、請求項1で表されるオリゴヌクレオチド。
- [3] 配列番号1で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～12又は配列番号53～56で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号2に示す核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号13～26又は配列番号57～64で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号3で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号27～40又は配列番号65～72で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号4で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号41～52又は配列番号73～79で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、
配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～79で表される核酸配列から選ばれる配列に相補的な配列を含有するものである、
請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

- [4] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する、マイコバクテリウム・カンサシ検出用プライマー。
- [5] 配列番号1で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～12で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号2に示す核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号13～26で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号3で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号27～40で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、配列番号4で表される核酸配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号41～52で表される核酸配列から選ばれる配列を含有するものであり、
- 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列に対する相補配列の一部を含有するオリゴヌクレオチドが、配列番号5～52で表される核酸配列から選ばれる配列に相補的な配列を含有するものである、
請求項4に記載のプライマー。
- [6] プライマーを構成するヌクレオチドの数が10～50個である、請求項4に記載のプライマー。
- [7] 標識物質で標識化された、請求項4に記載のプライマー。
- [8] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである、請求項7に記載のプライマー。
- [9] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有する、マイコバクテリウム・カンサシ検出用プローブ。
- [10] 標識物質で標識化された、請求項9に記載のプローブ。
- [11] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである、請求項10に記載のプローブ。

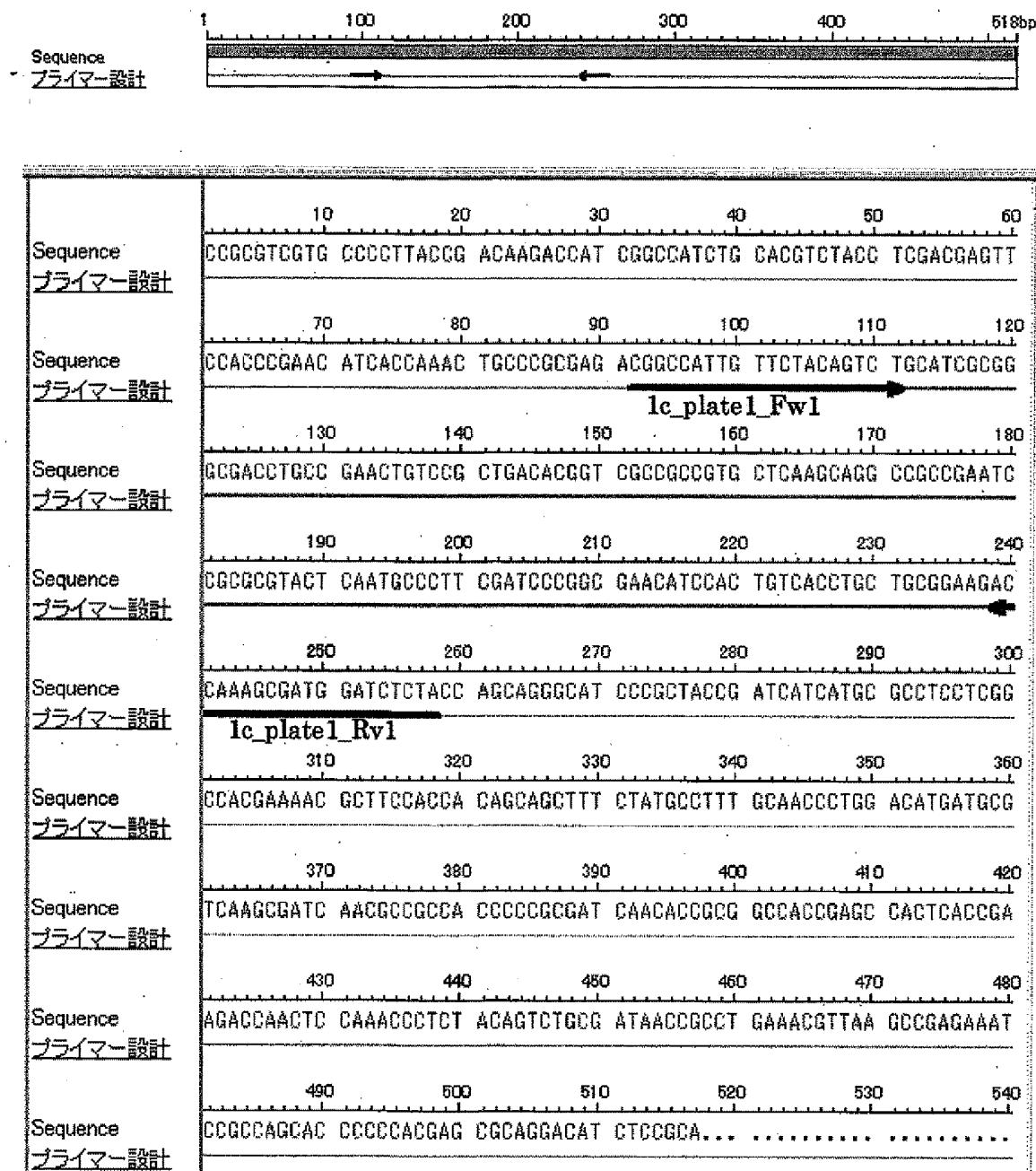
- [12] 5'末端がレポーター蛍光色素で標識化され、3'末端がクエンチャー蛍光色素で標識化された、請求項9に記載のプローブ。
- [13] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー及び／又はプローブとして用いることを特徴とするマイコバクテリウム・カンサシの検出方法。
- [14] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載の核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、試料中の核酸を錆型として核酸増幅反応を行い、得られたプライマー伸長物を検出することを特徴とする、請求項13に記載の検出方法。
- [15] 下記工程を包含することを特徴とする、請求項13に記載の検出方法、
 - (1)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4に記載の核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、試料中の核酸を錆型として核酸増幅反応を行う、
 - (2)(1)で得られたプライマー伸長物について電気泳動を行い、その結果からマイコバクテリウム・カンサシを検出する。
- [16] 電気泳動を行った後、得られた塩基泳動画分について、目的とする塩基対数のプライマー伸長物の画分を確認することにより行う、請求項15記載の検出方法。
- [17] 電気泳動を行った後、得られた電気泳動画分について、配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを標識物質で標識した標識プローブに対するハイブリダイゼーションを行い、該標識プローブの標識を検出することによって該標識プローブとハイブリダイズした画分が確認されたものを陽性と判定する、請求項15に記載の検出方法。

- [18] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである、請求項17に記載の検出方法。
- [19] プライマーが標識物質で標識化されており、当該プライマーを用いて試料中の核酸を鑄型としたポリメラーゼ連鎖反応を行い、得られたプライマー伸長物の標識を測定する、請求項13記載のマイコバクテリウム・カンサシの検出方法。
- [20] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである、請求項19に記載の検出方法。
- [21] ポリメラーゼ連鎖反応を行ったのち、遊離の標識プライマーを除き、プライマー伸長物の標識を測定する、請求項19に記載の検出方法。
- [22] ポリメラーゼ連鎖反応を行って得られた反応物中のプライマー伸長物を沈殿させた後、上清を除去することにより遊離の標識プライマーを除く、請求項21に記載の検出方法
- [23] ポリメラーゼ連鎖反応を行って得られた反応物をゲルクロマトグラフィーで処理して、遊離の標識プライマーを除く、請求項21に記載の検出方法。
- [24] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部若しくは全部、又はその相補配列の一部若しくは全部を含有し、且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを標識物質で標識化したものを標識プローブとして用い、該標識プローブを試料中の核酸とハイブリダイゼーションさせ、遊離の標識プローブを除いた後、ハイブリダイズした複合体の標識を検出することを特徴とする、請求項13に記載のマイコバクテリウム・カンサシの検出方法。
- [25] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである、請求項24に記載の検出方法。
- [26] 配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表される核酸配列の一部又は全部、又はその相補配列の一部又は全部を含有し且つマイコバクテリウム・カンサシ遺伝子の核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマー及び／又はプローブとして含んでなる、マイコバクテリウム・カンサシ検出用試薬キット。
- [27] プライマー及び／又はプローブが標識物質で標識化されたものである、請求項26に

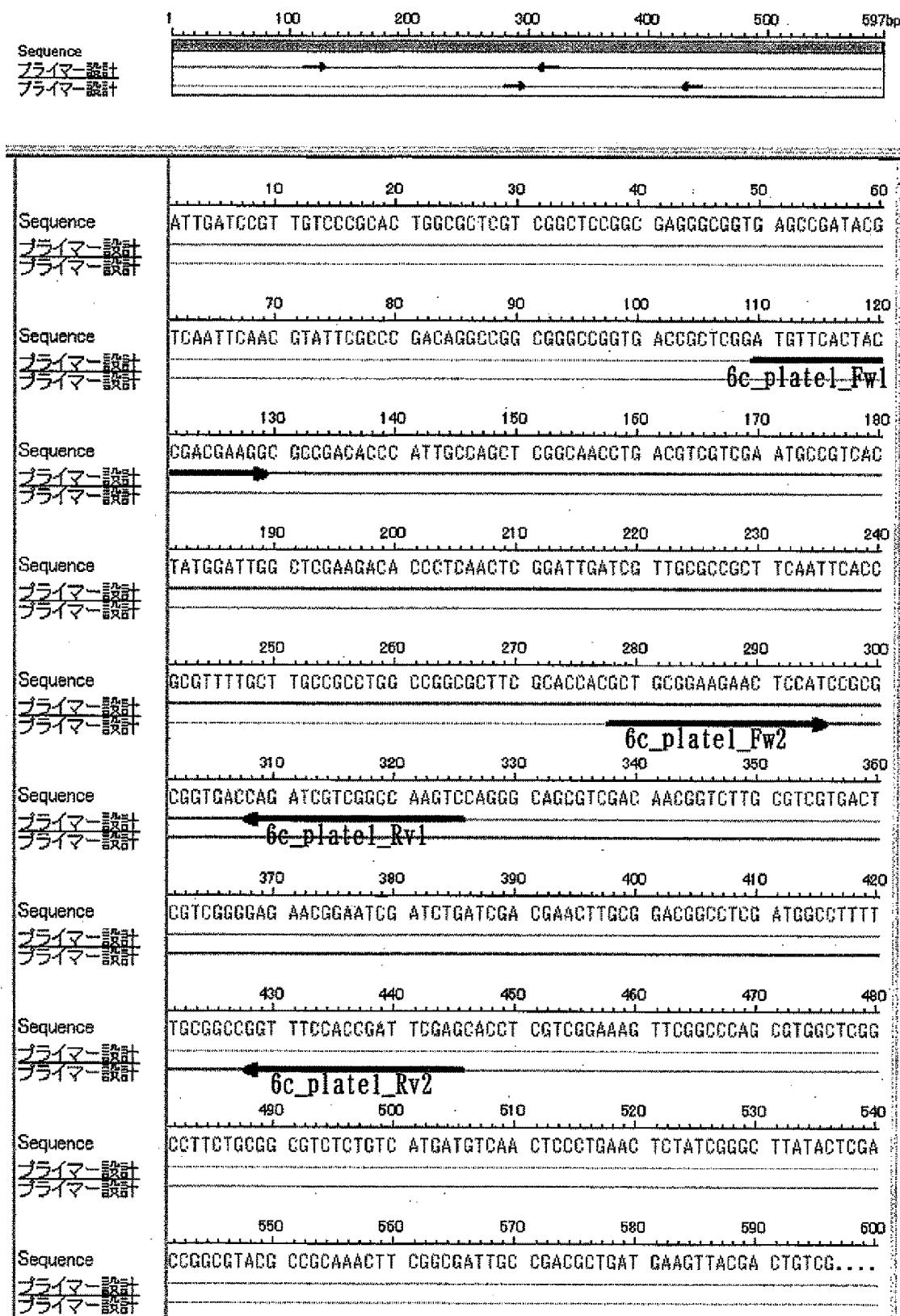
記載のキット。

- [28] 標識物質が放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質又はビオチンから選択されるものである請求項27に記載のキット。
- [29] プローブが、5'末端がレポーター蛍光色素で標識化され、3'末端がクエンチャーカラムで標識化されたものである、請求項27に記載のキット。

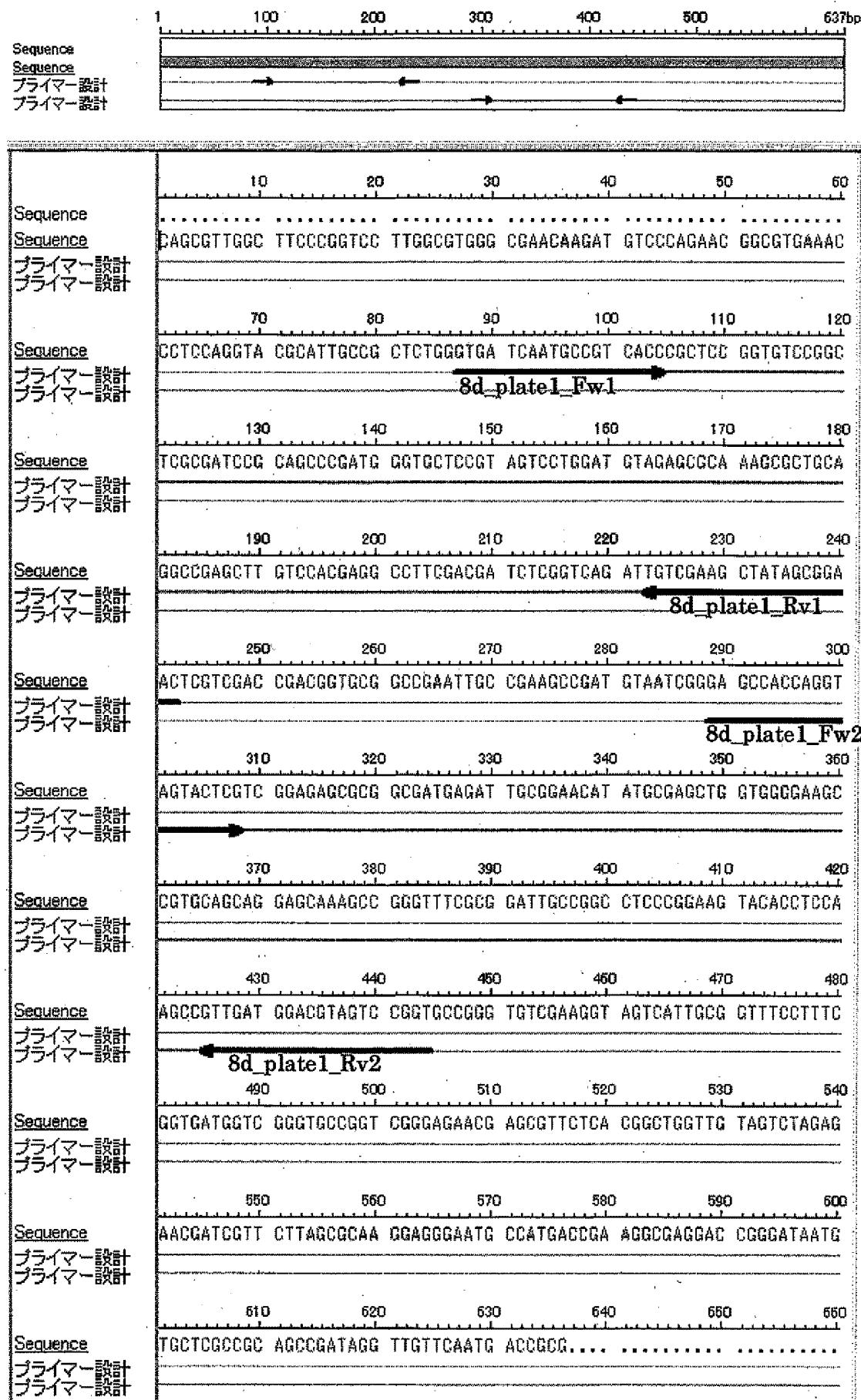
[図1]



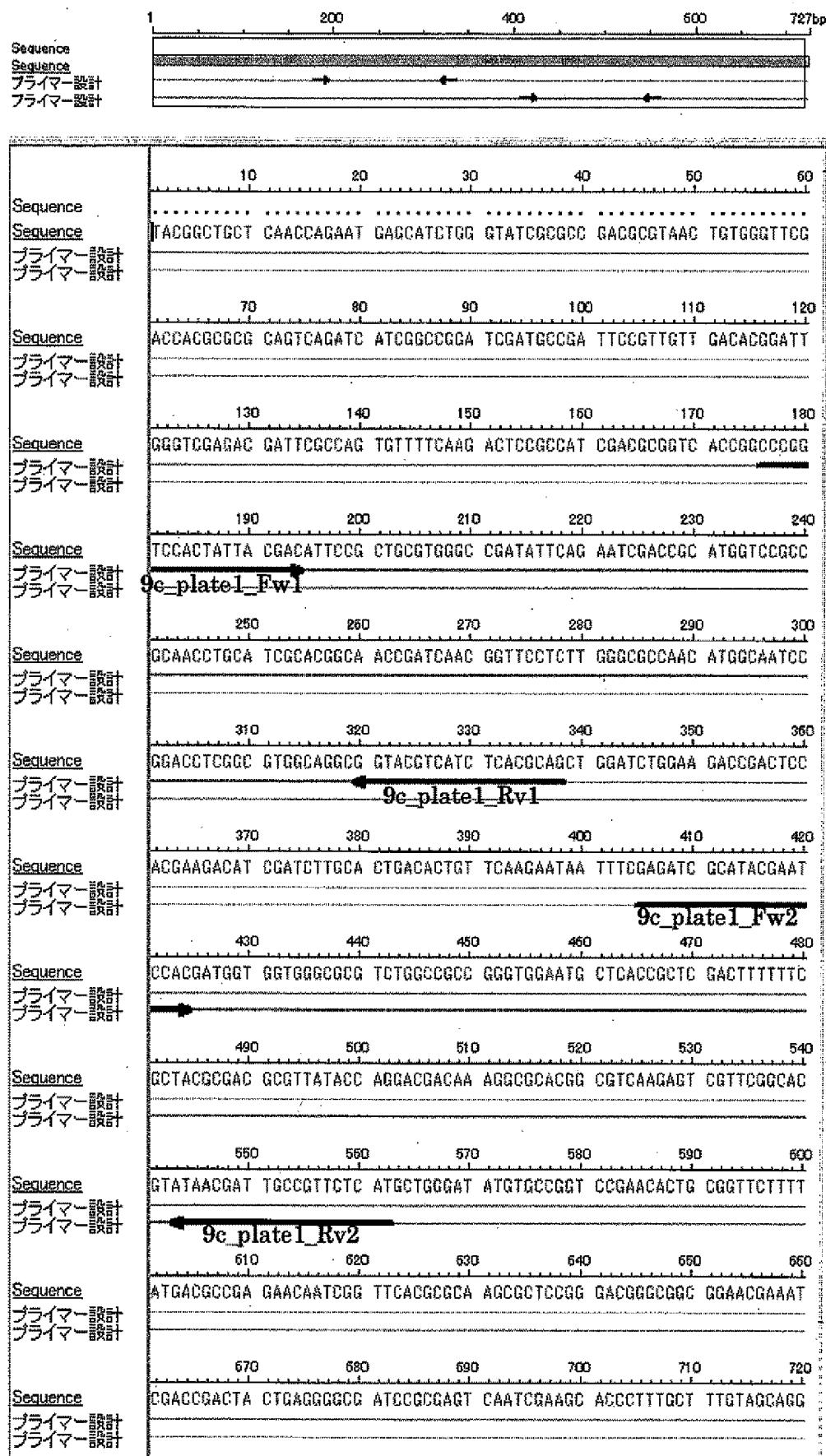
[図2]



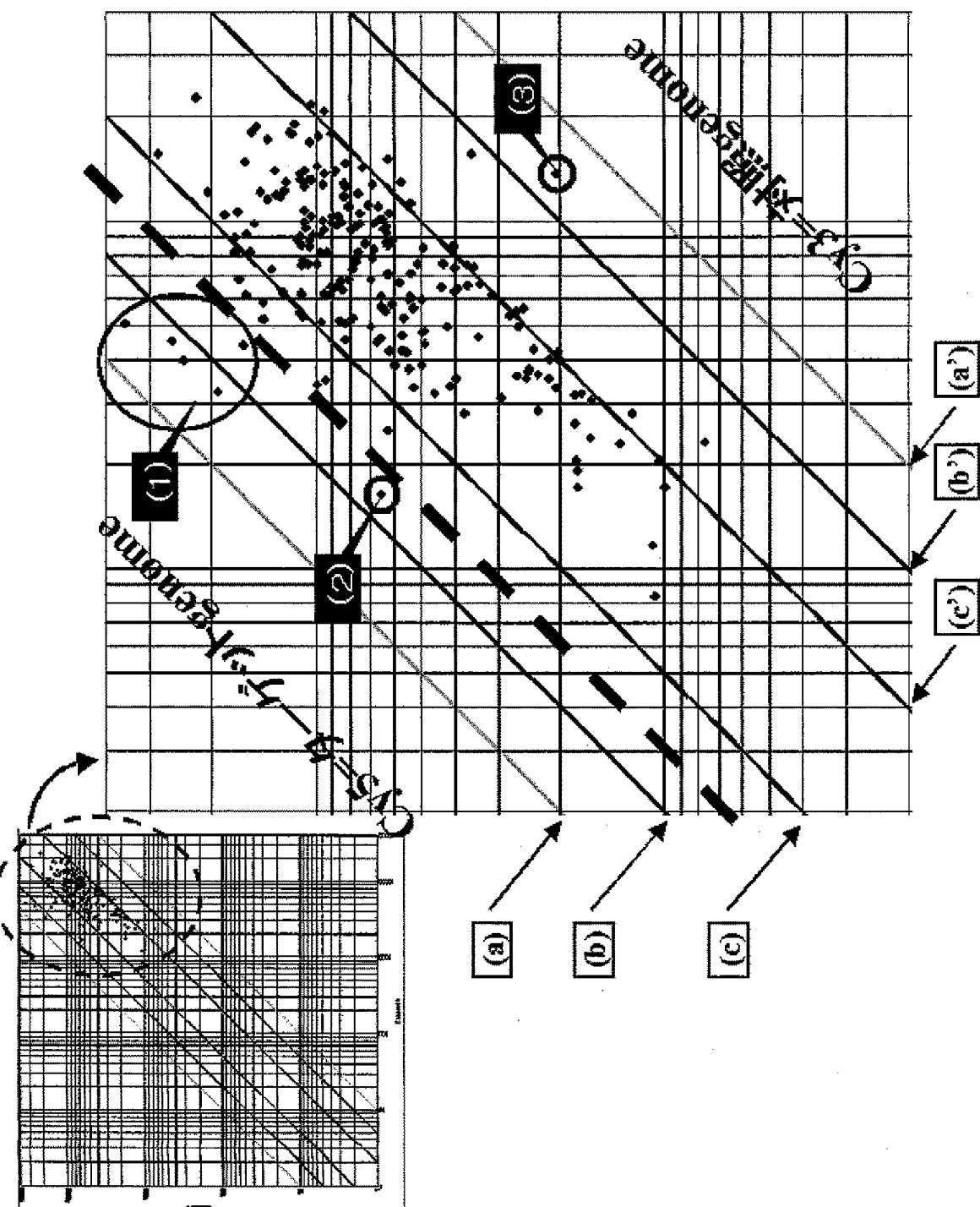
[図3]



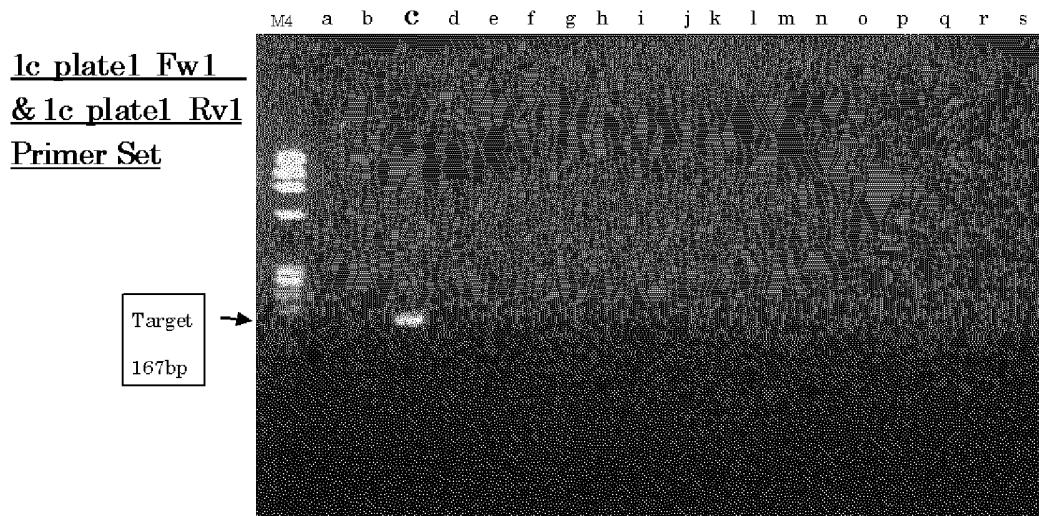
[図4]



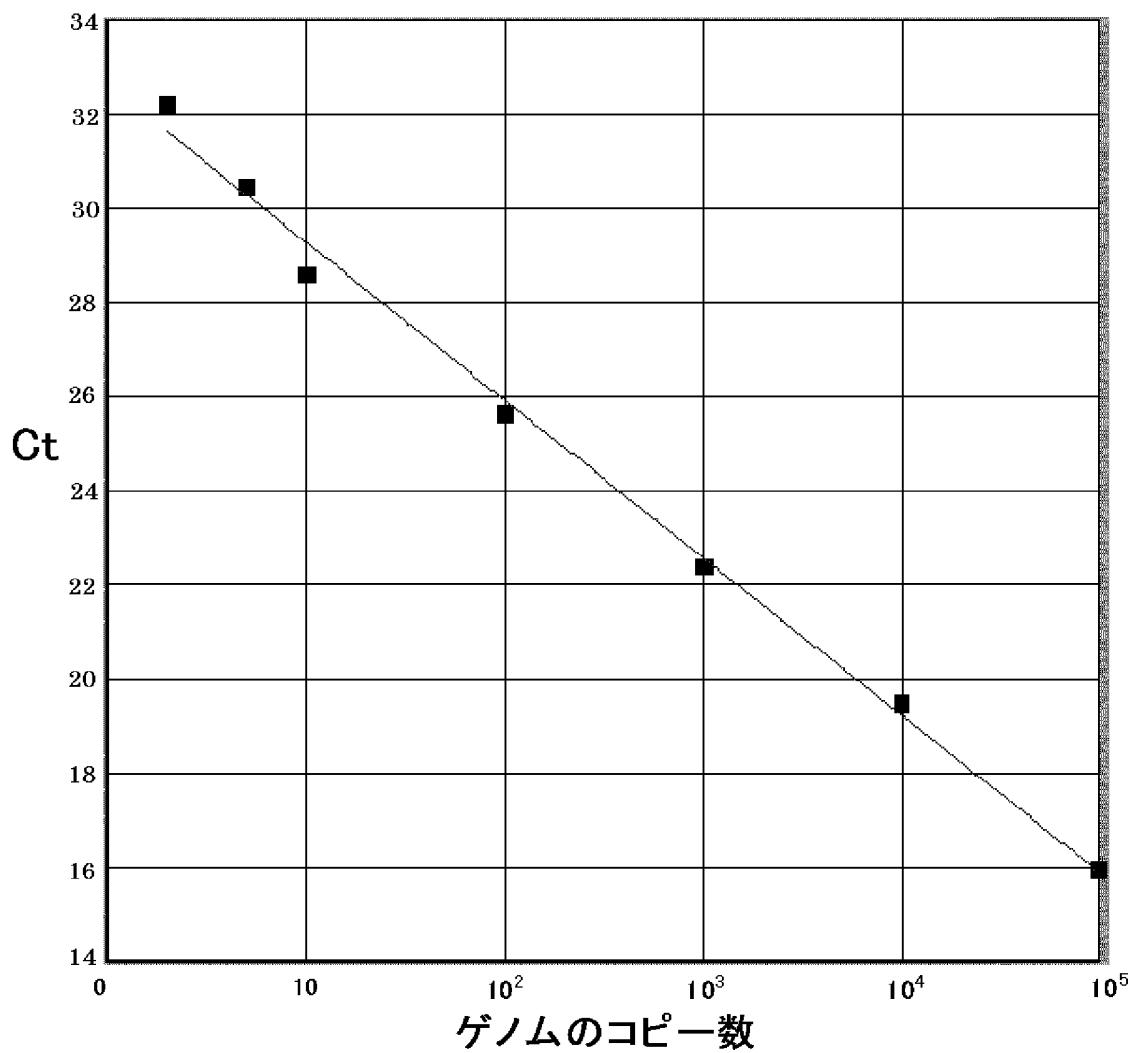
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(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)

C12N15/00-15/90, C12Q1/04, C12Q1/68

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

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Databesu
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	YANG, Miao, et al., Isolation of a DNA probe for identification of <i>Mycobacterium kansasii</i> , including the genetic subgroup., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1993, Vol.31, No.10, pages 2769 to 2772.	1-3 4-29
X A	ROSS, Bruce C., et al., Identification of a genetically distinct subspecies of <i>Mycobacterium kansasii</i> ., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1992, Vol.30, No.11, pages 2930 to 2933	1-3 4-29
X A	HUANG, Z. H., et al., Identification of <i>Mycobacterium kansasii</i> by DNA hybridization., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1991, Vol.29, No.10, pages 2125 to 2129.	1-3 4-29

 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
 04 August, 2006 (04.08.06)

 Date of mailing of the international search report
 15 August, 2006 (15.08.06)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 11-155589 A (Becton Dickinson and Co.), 15 June, 1999 (15.06.99), Full text & EP 905259 A1 & JP 11-155589 A & CA 2244937 A1 & US 6013510 A & US 6291176 B1 & CA 2244937 C	1-3 4-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2006/309514**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) in the international application shall be fulfilled only when there is a technical relationship among a group of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, and the expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). Further, the determination of the requirement of unity of invention shall be made without regard to whether the group of inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim

(continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-29 (a part relating to SEQ ID NO:1 in each of these claims)

**Remark on Protest
the**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309514

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

(PCT Rule 13.3).

The DNA sequences depicted in SEQ ID NOS:1, 2, 3 and 4 in claims 1-29 do not share a common chemical structure or function and the matter common to these DNA sequences is only a fact that they are derived from *Mycobacterium kansasii*.

However, since the fact that DNA is obtained from *Mycobacterium kansasii* is known as disclosed in documents 1-4 below, this matter is not a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence. In addition, there is also found no other common matter in the inventions relating to the DNA sequences of SEQ ID NOS:1, 2, 3 and 4 in claims 1-29 which can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Such being the case, these inventions cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and it is considered that these inventions include four groups of inventions relating to different four DNA sequences, respectively.

Document 1: YANG, Miao, et al., Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1993, Vol.31, No.10, pages 2769-2772.

Document 2: ROSS, Bruce C., et al., Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1992, Vol.30, No.11, pages 2930-2993.

Document 3: HUANG, Z. H., et al., Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1991, Vol.29, No.10, pages 2125-2129.

Document 4: JP 11-155589 A (Becton, Dickinson and Co.) Jun. 15, 1999 (15. 06. 99)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(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（IPC））

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/04, C12Q1/68

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

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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	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 請求の範囲の番号
X A	YANG, Miao, et al., Isolation of a DNA probe for identification of Mycobacterium kansasii, including the genetic subgroup., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1993, Vol.31, No.10, pages 2769-2772.	1-3 4-29
X A	ROSS, Bruce C., et al., Identification of a genetically distinct subspecies of Mycobacterium kansasii., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1992, Vol.30, No.11, pages 2930-2933.	1-3 4-29

 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」国際出願目前で、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 0 4 . 0 8 . 2 0 0 6	国際調査報告の発送日 1 5 . 0 8 . 2 0 0 6
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許序審査官（権限のある職員） 清水 晋治 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4 B 3535

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
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	
X A	HUANG, Z. H., et al., Identification of <i>Mycobacterium kansasii</i> by DNA hybridization., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1991, Vol.29, No.10, pages 2125-2129.	<u>1-3</u> <u>4-29</u>
X A	J P 11-155589 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 1999. 06. 15, 全文 & EP 905259 A1 & JP 11-155589 A & CA 2244937 A1 & US 6013510 A & US 6291176 B1 & CA 2244937 C	<u>1-3</u> <u>4-29</u>

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲_____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求の範囲_____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（PCT規則13.3）。

（特別ページに続く）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-29（各請求の範囲における配列番号1に関連する部分）

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立て手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立て手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかつた。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかつた。

請求の範囲1-29に記載された配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号4で表されるDNAは共通の化学構造や機能を有するものではなく、マイコバクテリウム・カンサシに由来することにおいてのみ共通する。

しかしながら、マイコバクテリウム・カンサシからDNAが得られたことは、文献1-4に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、請求の範囲1-29に記載された、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4それぞれで表されるDNAに関する発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいはず、異なった4個のDNAに関する4個の発明からなる発明群であると認める。

文献1：YANG, Miao, et al., Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1993, Vol.31, No.10, pages 2769-2772.

文献2：ROSS, Bruce C., et al., Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1992, Vol.30, No.11, pages 2930-2933.

文献3：HUANG, Z. H., et al., Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1991, Vol.29, No.10, pages 2125-2129.

文献4：JP 11-155589 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー)
1999.06.15