

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-261017

(P2004-261017A)

(43) 公開日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 Q 1/68

Z N A A

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2003-50662 (P2003-50662)

(22) 出願日 平成15年2月27日(2003.2.27)

(71) 出願人 000141897

アークレイ株式会社

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(74) 代理人 100090516

弁理士 松倉 秀実

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(72) 発明者 猪瀬 健

京都府京都市南区東九条西明田町57 ア

ークレイ株式会社内

(72) 発明者 堀井 美希

京都府京都市南区東九条西明田町57 ア

ークレイ株式会社内

最終頁に続く

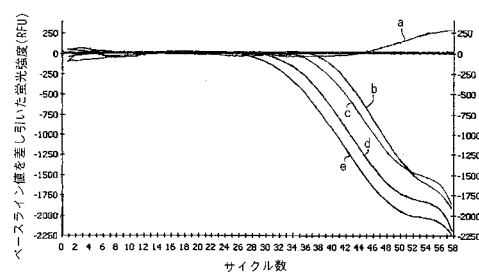
(54) 【発明の名称】 クラミジア・トラコマティスの検出方法およびそのためのキット

(57) 【要約】

【課題】 感度および特異性に優れかつ迅速なクラミジア・トラコマティスの検出方法を提供する。

【解決手段】 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、クラミジア・トラコマティスの検出方法であって、PCRで用いるプライマーペアを、PCRにおけるアニーリング温度を高く設定できる特定の領域に設定する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料から得られる DNA を鋳型として用いて PCR を行い、増幅産物を検出することを含む、クラミジア・トラコマティスの検出方法であって、PCR で用いられるプライマーペアが、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されている前記方法。

【請求項 2】

プライマーペアが、配列番号 2、3 または 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 または 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなる請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

プライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチド、または、配列番号 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

試料から得られる DNA を鋳型として用いて PCR を行うことによるクラミジア・トラコマティスの検出用のキットであって、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ、両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されたプライマーペアを含む前記キット。 20

【請求項 5】

プライマーペアが、配列番号 2、3 または 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 または 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなる請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

プライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチド、または、配列番号 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなる請求項 5 に記載のキット。 30

【請求項 7】

配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 2 1 0 ~ 5 2 4 5 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定されたオリゴヌクレオチドと、標識とを含むハイブリダイゼーションプローブ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、クラミジア・トラコマティス (Chlamydia trachomatis) の検出方法および検出キットに関する。

【0002】 40

【従来の技術】

クラミジア・トラコマティスは、非淋菌性尿道炎の病原体の一つであり、その検出方法としては、クラミジア・トラコマティスの菌内に複数コピー存在する潜在プラスミドの一部配列を遺伝子増幅法により増幅し、増幅産物を検出する方法が知られている (特許文献 1、特許文献 2)。

【0003】

【特許文献 1】

特許第 2 7 1 9 2 2 5 号公報

【特許文献 2】

特許第 3 1 2 7 1 3 5 号公報

【 0 0 0 4 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、感度および特異性に優れかつ迅速なクラミジア・トラコマティスの検出方法およびそのためのキットを提供することを課題とする。

【 0 0 0 5 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、クラミジア・トラコマティスの潜在プラスミド p L G V 4 4 0 の特定の領域にプライマーを設定して P C R を行うと、クラミジア・トラコマティスの検出を迅速に実施できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 6 】

本発明は、試料から得られる D N A を鋳型として用いて P C R を行い、増幅産物を検出することを含む、クラミジア・トラコマティスの検出方法であって、P C R で用いられるプライマーペアが、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されている前記方法（本発明検出方法）を提供する。

10

【 0 0 0 7 】

また、本発明は、本発明方法のためのキット、すなわち、試料から得られる D N A を鋳型として用いて P C R を行うことによるクラミジア・トラコマティスの検出用のキットであって、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ、両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されたプライマーペアを含む前記キット（本発明検出キット）を提供する。

20

【 0 0 0 8 】

本発明において、プライマーペアは、好ましくは、配列番号 2、3 または 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 または 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなり、さらに好ましくは、プライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチド、または、配列番号 4 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号 6 に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドからなる。

【 0 0 0 9 】

また、本発明は、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 2 1 0 ~ 5 2 4 5 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定されたオリゴヌクレオチドと、標識とを含むハイブリダイゼーションプローブを提供する。

30

【 0 0 1 0 】

なお、配列番号 1 に示す塩基配列は、クラミジア・トラコマティスの潜在プラスミド p L G V 4 4 0 の塩基配列（G e n B a n k アクセス番号 X 0 6 7 0 7）であり、当業者であれば、p L G V 4 4 0 に変異を有する株についても、個体間等に存在し得る塩基配列の相違を考慮して、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号により特定された領域に相当する領域を容易に特定・認識することができる。

【 0 0 1 1 】

【 発明の実施の形態 】

40

< 1 > 本発明検出方法

本発明検出方法は、試料から得られる D N A を鋳型として用いて P C R を行い、増幅産物を検出することを含む、クラミジア・トラコマティスの検出方法であり、P C R で用いられるプライマーペアが、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されていることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

試料は、クラミジア・トラコマティスを含むか又は含む可能性があるものであれば特に限定されない。例としては、初尿、尿道スワブ、頸管スワブ等を挙げることができる。これらの試料から、クラミジア・トラコマティスの潜在的プラスミドを含む D N A が調製され

50

る条件での通常の方法によりDNAを得ることができる。

【0013】

本発明検出方法におけるPCRは、試料から得られるDNAを鋳型とし、特定のプライマーペアを使用する他は、通常の、PCRの方法に従って行うことができる。

【0014】

本発明において用いられるプライマーペアは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号5157～5201に相当する領域（第1領域）および5245～5276に相当する領域（第2領域）の塩基配列に基づいて設定され、かつ両領域間の塩基配列を増幅できるように設定される。

【0015】

プライマーの長さは、通常には、10～40塩基である。また、プライマーの各領域内の位置および長さは、PCRのアニーリング温度を比較的高く設定できるように、Tm値が55～70となるように設定することが好ましい。ここで、Tm値は最近接塩基対法による算出値である。プライマーペアを構成する各プライマーは、Tm値がほぼ同一となるように設定することが好ましい。

【0016】

プライマーの具体例としては、第1領域に設定されるものとして、配列番号2に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列において塩基番号5157～5185に相当）またはその相補的塩基配列を有するプライマー、配列番号3に示す塩基配列に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列において塩基番号5171～5201に相当）またはその相補的塩基配列を有するプライマー、および、配列番号4に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列において塩基番号5171～5196に相当）またはその相補的塩基配列を有するプライマー、第2領域に設定されるものとして、配列番号6に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列において塩基番号5276～5252に相当）またはその相補的塩基配列を有するプライマー、および、配列番号7に示す塩基配列（配列番号1に示す塩基配列において塩基番号5276～5246に相当）またはその相補的塩基配列を有するプライマーが挙げられる。

【0017】

プライマーペアは、両領域間の塩基配列を増幅できるように、すなわち、一方がセンスプライマーとなり他方がアンチセンスプライマーとなるように設定される。潜在プラスミドは環状であるため、両領域間の塩基配列は2つあるが、通常には短い方の塩基配列が増幅されるように設定される。例えば、第1領域にセンスプライマーが設定された場合は、第2領域にアンチセンスプライマーが設定され、逆に第1領域にアンチセンスプライマーが設定された場合は、第2領域にセンスプライマーが設定される。

【0018】

好ましいプライマーペアとしては、好ましくは、配列番号2、3または4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号5または6に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドの組み合わせが挙げられる。また、さらに好ましいプライマーペアとしては、配列番号3に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号5に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドの組み合わせ、ならびに、配列番号4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号6に示す塩基配列を示すオリゴヌクレオチドの組み合わせが挙げられる。

【0019】

上記の特定の領域におけるプライマーペアの設定は、PCRの条件を考慮して当業者に公知の方法に従って行えばよい。プライマーペアの設定は、プライマー設定用のコンピュータプログラムに基づいて行うことができる。

【0020】

プライマーは、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの一方又は両方について、複数のプライマーを混合したミックスプライマーとして設定してもよい。プライマー設定部分に塩基の変異が存在する場合には、ミックスプライマーを用いることで検出効率を

10

20

30

40

50

上げることができる。

【0021】

PCRの条件は、通常の、PCRの方法に従って設定すればよいが、上記の特定のプライマーペアが使用されるため、アニーリング温度が比較的高く設定されることになる。通常には、アニーリング温度は50から70である。アニーリング温度が比較的高いため、アニーリングと伸長を同一の条件で行う2ステップPCRの条件を設定してもよい。

【0022】

代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0023】

DNA断片	1分子以上	10
プライマー	100～2000 nM	
ヌクレオチド	各100～500 μM	
DNAポリメラーゼ	0.25～1.25 単位 / μl	
Tris-HCl (pH 7～9)	1～5 mM	
MgCl ₂	1.5～5 mM	
界面活性剤またはゼラチン	0～25 %	
(最終液量: 25～100 μl)		

【0024】

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常30～60回繰り返す。

【0025】

- (1) 変性、90～95、1～60秒
- (2) アニーリング、55～70、6～60秒
- (3) 伸長、72～75、6～60秒

【0026】

2ステップPCRの代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常30～60回繰り返す。

【0027】

- (1) 変性、90～95、1～60秒
- (2) アニーリング及び伸長、55～70、6～60秒

【0028】

本発明検出方法における増幅産物の検出は、通常の、増幅産物の検出方法に従って行うことができる。例えば、増幅産物をアガロースゲル電気泳動に付して検出してもよいし、増幅産物に結合して蛍光が変化する物質（例えば、二本鎖DNAに結合し、結合により蛍光強度が変化する蛍光色素、一本鎖DNAにハイブリダイズし、ハイブリダイズしたときに蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)等により蛍光強度が変化するよう設計されたハイブリダイゼーションプローブ等）の存在下でPCRを行って蛍光を測定するリアルタイムPCRにより検出を行ってもよい。

【0029】

本発明検出方法によれば、特定された領域では、T_m値が比較的高いプライマーを設定できるため、PCRにおけるアニーリング温度を比較的高くすることができ、従って、変性温度からアニーリング温度まで下げる時間が減少する。また、高いアニーリング温度により非特異的増幅も軽減する。さらに、アニーリング及び伸長を同じ条件で行う2ステップPCRを行うことも可能である。結果として、より迅速な遺伝子増幅が可能となる。

【0030】

本発明は、ハイブリダイゼーションによる検出に用いるのに適したハイブリダイゼーションプローブも提供する。このようなハイブリダイゼーションプローブとしては、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号5210～5245に相当する領域の塩基配列に基づいて設定されたオリゴヌクレオチドと、標識とを含むものが挙げられる。このオリゴヌクレオチドは、センス鎖に相補的であってもよいし、アンチセンス鎖に相補的なものであってもよ

10

20

30

40

50

い。

【0031】

ハイブリダイゼーションプローブのオリゴヌクレオチドの鎖長やT_m値は、ハイブリダイズさせるときの条件に応じて適宜設定される。このオリゴヌクレオチドの長さは、通常には、25～45塩基であり、T_m値は、通常には、50～70である。ハイブリダイゼーションプローブがリアルタイムPCRに用いるものである場合には、オリゴヌクレオチドのT_m値は、プライマーより標的配列に先にハイブリダイズするように、プライマーのT_m値に比べて、2～5高くなるように設定することが好ましい。このようなオリゴヌクレオチドの例としては、配列番号7に示す塩基配列を有するものが挙げられる。

【0032】

ハイブリダイゼーションプローブの標識は、ハイブリダイズさせるときの条件でのハイブリダイゼーションを妨げないような様式で行うことができる。リアルタイムPCR用のハイブリダイゼーションプローブの標識は、それが一本鎖DNAにハイブリダイズしたときに蛍光強度が変化するような態様でされることが好ましい。

【0033】

本発明の検出方法においては、本発明のハイブリダイゼーションプローブを用いる検出方法により増幅産物の検出を行うことが好ましい。

【0034】

<2>本発明検出キット

本発明検出キットは、本発明検出方法に用いることのできるキット、すなわち、試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行うことによるクラミジア・トラコマティスの検出用のキットであり、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号5157～5201および5245～5276に相当する領域の塩基配列に基づいて設定され、かつ、両領域間の塩基配列を増幅できるように設定されたプライマーペアを含むことを特徴とする。

【0035】

プライマーペアについては、本発明検出方法に関し、上記に説明した通りである。

【0036】

本発明キットにおいてプライマーペアは、混合物とされていてもよいし、別個に収容されていてもよい。

【0037】

本発明キットは、プライマーペアの他に、PCRおよび/または増幅産物の検出を行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでもよい。このような試薬類の例には、上記のハイブリダイゼーションプライマーも含まれる。

【0038】

【実施例】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0039】

【実施例1】PCRによる検出

クラミジア・トラコマティス(GenBankアクセッション番号X06707)の潜在プラスミドの塩基配列(配列番号1)の第1の領域(塩基番号5157～5201)および第2の領域(塩基番号5245～5276)において、GC含量に富み(48-55%)、高いT_m値を有する(63-65(最近接塩基対法により算出))塩基配列を選択した。すなわち、4種類の上流プライマー(配列番号:3、4、6)および3種類の下流プライマー(配列番号:5、7)の標的結合配列を選択した。そしてこれらの標的結合配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成した。

【0040】

【表1】

上流(フォワード)プライマー:

CT-F5157-29: c a g t c a c a c c a a a g c t c t g
g g a g c a t g (配列番号2)

10

20

30

40

50

C T - F 5 1 7 1 - 3 1 : a g c t c t g g g a g c a t g t t c t t a
g t c t c a g c a g (配 列 番 号 3)

C T - F 5 1 7 1 - 2 6 : a g c t c t g g g a g c a t g t t c t t a
g t c t c (配 列 番 号 4)

下 流 (リ バ ー ス) プ ラ イ マ ー :

C T - R 5 2 7 6 - 2 5 : t c g c g t a g g g c t t a g a a t c a c
c t t c (配 列 番 号 5)

C T - R 5 2 7 6 - 3 1 : t c g c g t a g g g c t t a g a a t c a c
c t t c t c g t a c (配 列 番 号 6)

【 0 0 4 1 】

上記の上流および下流増幅プライマーの3対の組み合わせ(配列番号:2-5、3-5および4-6)をPCRに用いた。反応液25 μ Lは、1 \times GeneTaqバッファー、0.625UのGeneTaqポリメラーゼ(ニッポンジーン)、各0.2mMのdGTP、dCTP、dATP、dUTP、各0.5 μ Mの上流および下流プライマー、およびクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA(ATCC株CT-VR878)2~2000コピーを含んだ。適切な反応温度を検討するため、増幅反応はiCycler(BIO-RAD)を用いてアニーリング温度にグラジエント機能を適用し、PCRを行った。反応温度は次の通りであった。95 4分、(95 30秒、62-72 グラジエント30秒、72 30秒) \times 50サイクル、72 7分。増幅の有無は、生成物を3%アガロースゲル電気泳動にかけることにより確認を行った。

【 0 0 4 2 】

どのプライマーペアを用いた場合も、アニーリング温度が64.0-68.2の比較的高温の条件下で、クラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA2コピーを検出可能であった。

【 0 0 4 3 】

以上の結果から、上記プライマー配列は、感度および特異性に優れ、反応時間短縮にも有効であることが示された。

【 0 0 4 4 】

【 実施例 2 】 2ステップPCRを用いる検出

実施例1で用いたプライマーペアのうち、配列番号3-5および4-6のプライマーペアを2ステップPCRに用いた。反応液25 μ Lは、1 \times Tthバッファー、0.625UのTth(TOYOBO)、各0.2mMのdGTP、dCTP、dATP、dUTP、各0.5 μ Mの上流および下流プライマー、およびクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA(ATCC株CT-VR878)2~2000コピーを含んだ。反応温度は次の通りであった。95 1分、(95 15秒、65 または68 20秒) \times 2サイクル、(90 15秒、65 または68 20秒) \times 58サイクル。サーマルサイクラー(Takara)で反応を行った。増幅の有無は、生成物を3%アガロースゲル電気泳動にかけることにより確認を行った。

【 0 0 4 5 】

配列番号:4-5のプライマーペアについては、アニーリング温度68でクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA2コピーを検出可能であった。配列番号:6-7のプライマーペアについては、アニーリング温度65でクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA2コピーを検出可能であった。

【 0 0 4 6 】

以上の結果から、さらに反応時間の短縮が可能な2ステップPCRを行うことができることが示された。

【 0 0 4 7 】

【 実施例 3 】 リアルタイムPCRを用いる検出

実施例1で用いたプライマーペアのうち配列番号3-5のプライマーペアを2ステップPCRに用いた。反応液25 μ Lは、1 \times Tthバッファー、0.625UのTth(

10

20

30

40

50

TOYOBO)、各0.2mMのdGTP、dCTP、dATP、dUTP、1μMの上流プライマー、0.5μMの下流プライマー、0.2μMリアルタイム検出用プローブ(5'FL-CT-5210-36: 5'-caa agc tag aac aac gcc gcc ttc cat tct tga tgc-3'(配列番号7)、5'末端のcを蛍光色素で標識。標識の種類: BODIPY-FL(モレキュラープローブ社)、及びクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA(ATCC株CT-VR878)2~2000コピーを含んだ。反応温度は次の通りであった。95 1分、(95 15秒、65 20秒)×2サイクル、(90 15秒、65 20秒)×58サイクル。iCycler(BIO-RAD)で反応を行った。リアルタイム検出手法は特開2001-286300号に記載の方法に従った。

10

【0048】

結果を図1に示す。本実施例で用いたプライマーペアではアニーリング温度65 でクラミジア・トラコマティス菌体ゲノムDNA 2コピーをリアルタイムで検出可能であった。

【0049】**【発明の効果】**

本発明により、感度および特異性に優れかつ迅速なクラミジア・トラコマティスの検出方法が提供される。

【0050】**【配列表】**

〈110〉 アークレイ株式会社(Arkray, Inc.)

〈120〉 クラミジア・トラコマティスの検出方法およびそのためのキット

〈130〉 P-B0616

〈160〉 7

10

〈210〉 1

〈211〉 7501

〈212〉 DNA

〈213〉 *Chlamydia trachomatis*

〈400〉 1

20

```

tttgcaactc ttggtaggtag actttgcaac tcttggtagg agactttgca actcttggtag   60
gtagactttg caactcttgg tggtagactt ggtcataatg gacttttggt gaaaaatttc   120
ttaaaatctt agagctccga ttttgaatag ctttgggttaa gaaaatgggc tcgatggcct   180
tccataaaaag taggttggtc ttaacttttg gggacgcgc ggaatatttg ttaactactt   240
tatctcatct aactagaaaa aattatgcgt ctgggattaa ctttcttggt tctttagaga   300
ttctggattt atcggaacc ttgataaagg ctatttctct tgaccacagc gaatctttgt   360
ttaaaatcaa gtctctagat gtttttaatg gaaaagtcgt ttcagaggcc tctaaacagg   420
ctagagcggc atgctacata tctttcaca agtttttgta tagattgacc aagggatata   480
ttaaacccgc tatccattg aaagattttg gaaacactac attttttaa atccgagaca   540
aatcaaaac agaatcgatt tctaagcagg aatggacagt ttttttgaa gcgctccgga   600
tagtgaatta tagagactat ttaatcggta aattgattgt acaaggatc cgtaagttag   660
acgaaatttt gtctttgcgc acagacgac tattttttgc atccaatcag atttcctttc   720
gcattaaaaa aagacagaat aaagaaacca aaattcta atcacattcct atcagcttaa   780
tggaggagtt gcaaaaatac acttgtggga gaaatgggag agtatttggt tctaaaatag   840
ggattccigt aacaacaagt caggttgcgc ataattttag gcttgcagag ttctatagtg   900

```

30

40

ctatgaaaat aaaaattact cctagagtac ttcgtgcaag cgctttgatt catitaaagc 960
 aaataggatt aaaagatgag gaaatcatgc gtatttccctg tctttcatcg agacaaagtg 1020
 tgtgttccta ttgttctggg gaagaggtaa gtccctctagt acaaacaccc ccaatatgtt 1080
 gatataatta aaattatatt catattctgt tgccagaaaa aacacttita ggctatatta 1140
 gagccaatct tcttgaagc gttgtcttct cgagaagatt tatcgtacgc aaatatcatc 1200
 tttgcggttg cgtgtcctgt gaccttcatt atgtcggagt ctgagcacc ctaggcgtttg 1260
 tactccgta cagcggttgc tcgaagcacg tgcggggta tcttaaaagg gattgcagct 1320
 ttagtccctg cttgagagaa cgtgcgggcg atttgcctta accccacat ttttccggag 1380
 cgagttacga agacaaaacc tcttcgttga ccgaigtact cttgtagaaa gtgcataaac 1440
 tttcaggat aagttataat aatcctcttt tctgtctgac ggttcttaag ctgggagaaa 1500
 gaaatggtag ctgtttgaa acaaactga ctaatctca agcttaagac ttcagaggag 1560
 cgtttacct cttggagcat tgtctgggcg atcaaccaat cccgggcatt gatTTTTTT 1620
 agctcttita ggaaggacgc tgtttgcaa ctgttcacg catctgttt tactatttcc 1680
 ctggttttta aaaaatgttc actattttct tgtttagaag gttgcgctat agcgactatt 1740
 cctgagica tctgttttag gaatcttgtt aaggaaatat agcttgcctc tcgaacttgt 1800
 ttagtacctt cggccaaga agtcttggca gaggaaactt ttttaatcg atctagaatt 1860
 agattatgat ttaaaaggga aaactctgc agattcatai ccaaggacaa tagaccaatc 1920
 ttttctaaag acaaaaaaga tcttcgatat gatctacaag tatgtttgtt gattgatgcg 1980
 gtccaatgca taataacttc gaataaggag aagcttttca tgcgtttcca ataggattct 2040
 tggcgaattt ttaaaacttc ctgataagac ttttcgctat attctaacga catctcttgc 2100
 tgc aaagata aaatcccttt acccatgaaa tccctcgtga tataacctat ccgtaaaatg 2160
 tcttgattag tgaataatc aggttgttta caggatagca cgctcgggtat tttttatat 2220
 aaacatgaaa actcgttccg aaatagaaaa tgcgatgcaa gatatcgagt atgcgttgtt 2280
 aggtaaagct ctgatatttg aagactctac tgagtatatt ctgaggcagc ttgctaatta 2340
 tgagttaag tgttctcatc ataaaaacat attcatagta tttaaatact taaaagacaa 2400
 tggattacct ataactgtag actcggcttg ggaagagctt ttgcggcgtc gtatcaaaga 2460
 tatggacaaa tcgtatctcg ggtaatgtt gcatgatgtt ttatcaaag acaagcttag 2520
 atccgtttct catacggttt tcttcgatga tttgagcgtg ttagcgcgtg aagaaaattt 2580
 gagtaatttc atttccgct cgtttaatga gtacaatgaa aatccattgc gtagatctcc 2640

10

20

30

40

gtttctattg cttagagcgt taaaggggaag gcttgacagt gctatagcaa agactttttc 2700
 tattcgcagc gctagaggcc ggtctattta tgatatattc tcacagtcag aaattggagt 2760
 gctggctcgt ataaaaaaaa gacgagcaac gttctctgag aatcaaaatt ctttctttga 2820
 tgccttccca acaggataca aggatattga tgataaagga gttatcttag ctaaaggtaa 2880
 tttcgigatt atagcagcta ggccatctat agggaaaact gctttagcta tagacatggc 2940
 gataaatctt gcggttactc aacagcgtag agttggtttc ctatctctag aaatgagcgc 3000
 aggtcaaaatt gttgagcggg ttattgctaa tttaacagga atatctggtg aaaaattaca 3060
 aagaggggat ctctctaaag aagaattatt ccgagtagaa gaagctggag aaacagttag 3120
 agaatcacat ttttatatct gcagtgatag tcagtataag ctttaatttaa tcgcgaatca 3180
 gatccggttg ctgagaaaag aagatcgagt agacgtaata tttatcgatt acttgcagtt 3240
 gatcaacica tcggttggag aaaatcgta aaatgaaata gcagatatat ctagaacctt 3300
 aagaggttta gccicagagc taaacattcc tatagtttgc ttatcccaac tatctagaaa 3360
 agttgaggat agagcaaata aagttcccat gcttccagat ttgcgagaca gcggtcaaat 3420
 agagcaagac gcagatgtga ttttgtttat caataggaag gaatcgctct ctaattgtga 3480
 gataactggt gggaaaaata gacatggatc ggttttctct tcggtattac atttcgatcc 3540
 aaaaattagt aaattctccg ctattaaaaa agtatggtaa attatagtaa ctgccacttc 3600
 atcaaaagtc ctatccacct tgaaaatcag aagtttggaa gaagacctgg tcaatctatt 3660
 aagatatctc ccaaattggc tcaaaatggg atggtagaag ttataggctt tgattttctt 3720
 tcatctcatt accatgcatt agcagctatc caaagattgc tgactgcaac gaattacaag 3780
 ggaacacaaa aaggggttgt tttatccaga gaatcaaata gttttcaatt tgaaggatgg 3840
 ataccaagaa tccgttttac aaaaactgaa ttcttagagg cttatggagt taagcggtat 3900
 aaaacatcca gaaataagta tgagtttagt ggaaaagaag ctgaaactgc tttagaagcc 3960
 ttataccatt taggacatca accgttttta atatiggcaa ctagaactcg atggactaat 4020
 ggaacacaaa tagtagaccg ttaccaaaact ctttctccga tcattaggat ttacgaagga 4080
 tgggaagggt taactgacga agaaaatata gatatagact taacaccitt taattcacca 4140
 tctacacgga aacataaagg gttcgttgta gagccatgtc ctatcttggg agatcaaata 4200
 gaatcctact ttgtaatcaa gcctgcaaat gtataccaag aaataaaaaat gcgcttccca 4260
 aatgcatcaa agtatgctta cacatttatt gactgggtga ttacagcagc tgcgaaaaag 4320
 agacgaaaat taactaagga taattcttgg ccagaaaact tgttcttaaa cgttaacgtt 4380

10

20

30

40

aaaagcttg catatattt aaggatgaat cggtagatt gtacaaggaa ctggaaaaa 4440
 atcgagtag ctatcgataa atgtatagaa atcgccattc agcttgggtg gttatctaga 4500
 agaaaacgca ttgaatttct ggattcttct aaactctcta aaaaagaaat tctatatcta 4560
 aataaagagc gttttgaaga aataaccaag aaatctaaag aacaaatgga acaattagaa 4620
 caagaatcta ttaattaata gcaaacttga aactaaaaac ctaatttatt taaagctcaa 4680
 aataaaaaag agttttaaaa tgggaaattc tggttttat ttgtataaca ctcaaaactg 4740
 cgtctttgct gataatatca aagttgggcaaatgacagag ccgctcaagg accagcaaat 4800
 aatcccttggg acaacatcaa caccgtcgc agccaaaatg acagcttctg atggaataatc 4860
 ttaacagtc tccaataatc catcaaccaa tgcttctatt acaattgggt tggatgcgga 4920
 aaaagcttac cagcttattc tagaaaagt gggagatcaa attcttgggt gaattgctga 4980
 tactattgtt gatagtacag tccaagatat tttagacaaa atcacaacag acccttctct 5040
 aggtttgttg aaagctttta acaactttcc aatcactaat aaaattcaat gcaacgggtt 5100
 attcactccc aggaacattg aaactttatt aggaggaact gaaataggaa aattcacagt 5160
 cacacccaaa agctctggga gcatgttctt agctcagca gatattattg catcaagaat 5220
 ggaaggcggc gtgttcttag ctttggtagc agaaggtagt tctaagccct acgcgattag 5280
 ttatggatac tcatcaggcg ttcttaattt atgtagtcta agaaccagaa ttattaatac 5340
 aggatigact ccgacaacgt attcattacg ttagggcggg tttagaaagcg gtgtggtagt 5400
 ggtaaatgcc ctttctaatt gcaatgatat tttaggaata acaataactt ctaatgtatc 5460
 tttttggag gtaatactc aaacaaacgc ttaacaatt ttatttggat tttcttata 5520
 ggttttatat tttagagaaa agttcgaat tacgggggtt gttatgcaa ataaaagcaa 5580
 agtaggggac gatattatta aaattgttaa agatgtgaaa aaagatttcc ccgaattaga 5640
 cctaaaaata cgagtaaaca aggaaaaagt aactttctta aattctccct tagaactcta 5700
 ccataaaagt gtctactaa ttctaggact gcitcaaaa atagaaaact ctttaggatt 5760
 attcccagac tctctgttc ttgaaaaatt agaggataac agtttaaagc taaaaaggc 5820
 ttgattatg cttatcttgt ctagaaaaga catgtttcc aaggctgaat agataactta 5880
 ctctaacgtt ggagttgatt tgcacacctt agttttttgc tcttttaagg gaggaactgg 5940
 aaaaacaaca ctttctctaa acgtgggatg caacttggcc caatttttag ggaaaaaagt 6000
 gttacttgct gacctagacc cgcaatccaa ttatcttctt ggattggggg ctagtgtcag 6060
 aagtaaccaa aaaggcttac acgacatagt atacacatca aacgatttaa aatcaatcat 6120

10

20

30

40

```

ttgcgaaaca aaaaaagata gtgtggacct aattcctgca tcatttttat ccgaacagtt 6180
tagagaattg gatattcata gaggacctag taacaactta aagttatttc tgaatgagta 6240
ctgcgctcct ttttatgaca tctgcataat agacactcca cctagcctag gagggttaac 6300
gaaagaagct tttgttgca gagaacaatt aattgcttgt ttaactccag aacctttttc 6360
tattctaggg ttacaaaaga tacgtgaatt ctttaagttcg gtcggaaaac ctgaagaaga 6420
acacattctt ggaatagctt tgtctttttg ggatgatcgt aactcgacta accaaatgta 6480
tatagacatt atcgagtcta ttacaaaaa caagcttttt tcaacaaaaa ttcgtcgaga 6540
tatttctctc agccgttctc ttcttaaaga agattctgta gctaattgtc atccaaattc 6600
tagggccgca gaagatattc tgaagttaac gcatgaaata gcaaataatt tgcatatcga 6660
atatgaacga gattactctc agaggacaac gtgaacaaac taaaaaaga agcgaatgtc 6720
tttttataaa aaaatcaaac tgccgttctt ttagatttta agaagacgct tcttccatt 6780
gaactattct cagcaacttt gaattctgag gaaagtcaga gtttggatca attattttta 6840
tcagagtcct aaaactattc ggatgaagaa ttttatcaag aagacatcct agcggtaaaa 6900
ctgcttactg gtcagataaa atccatacag aagcaacacg tacttctttt aggagaaaaa 6960
atctataatg ctagaaaaat cctgagtaag gatcattctt cctcaacaac ttttcatct 7020
tggatagagt tagtttttag aactaagtct tctgcttaca atgctcttgc atattacgag 7080
ctttttataa acctcccaa ccaaactcta caaaaagagt ttcaatcgat cccctataaa 7140
tccgcatata ttttggccgc tagaaaaggc gatttaaaaa ccaaggtcga tgtgataggg 7200
aaagtaigtg gaatgtcga ctcatcggcg ataagggtgt tggatcaatt tcttcttca 7260
tctagaaaca aagacgttag agaaacgata gataagtcgt attcagagaa gaatcgccaa 7320
ttatcigatt tcttaataga gatacttcgc atcaigtgtt ccggagtttc tttgtcctcc 7380
tataacgaaa atcttctaca acagcttttt gaacttttta agcaaaagag ctgatcctcc 7440
gtcagctcat atatatatct attatatata tatatttagg gatttgattt tacgagagag 7500
a 7501

```

10

20

30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> primer

<400> 2

cagtcacacc caaaagctct gggagcatg 29

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

agctctggga gcatgttctt agtctcagca g 31

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

agctctggga gcatgttctt agtctc 26

10

20

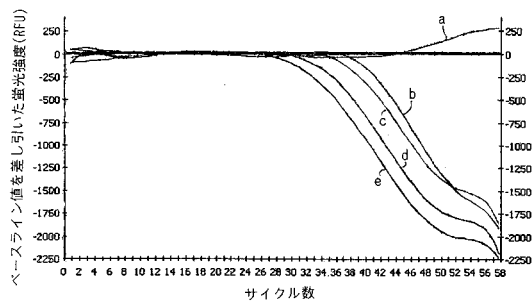
30

40

<210>	5		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	primer		10
<400>	5		
	tcgcgtaggc cttagaatca ccttc	25	
<210>	6		
<211>	31		
<212>	DNA		20
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	primer		
<400>	6		
	tcgcgtaggc cttagaatca ccttcctcgta c	31	30
<210>	7		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			40
<223>	probe		
<400>	7		
	caaagctaga acaacgccgc ctccattct tgatgc	36	

【図 1】増幅産物の生成の経過（リアルタイムPCRの検出結果）を示す。a：コピー無し、b：2コピー、c：20コピー、d：200コピー、e：2000コピー。

【図 1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 GA19 HA08 HA12 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QR08 QR32 QR41 QR42
QR55 QR62 QR66 QR82 QS10 QS12 QS25 QS34 QS36 QX02