

(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

C12N 15/09

C12Q 1/68

F 1

C 12 N 15/00

C 12 Q 1/68

Z N A A

A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 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

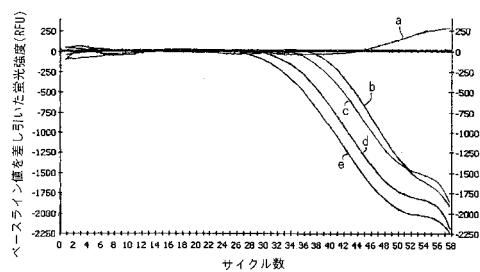
(54) 【発明の名称】クラミジア・トラコマティスの検出方法およびそのためのキット

(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を錠型として用いて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を鑄型として用いて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を鑄型として用いて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】**【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2719225号公報

【特許文献2】

特許第3127135号公報

10

20

30

40

50

【 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 を鑄型として用いて 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。

【 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 を鑄型として用いて 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。

【 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、さらには好ましくは、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。

【 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 アクセッション番号 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】****< 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 を鑄型として用いて 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

10

20

30

40

50

る条件での通常の方法により D N A を得ることができる。

【 0 0 1 3 】

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

【 0 0 1 4 】

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 5 1 5 7 ~ 5 2 0 1 に相当する領域（第 1 領域）および 5 2 4 5 ~ 5 2 7 6 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。

【 0 0 1 5 】

プライマーの長さは、通常には、 1 0 ~ 4 0 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、 P C R のアニーリング温度を比較的高く設定できるように、 T m 値が 5 5 ~ 7 0 となるように設定することが好ましい。ここで、 T m 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、 T m 値がほぼ同一となるように設定することが好ましい。

10

【 0 0 1 6 】

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 5 1 5 7 ~ 5 1 8 5 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 5 1 7 1 ~ 5 2 0 1 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 5 1 7 1 ~ 5 1 9 6 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 5 2 7 6 ~ 5 2 5 2 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 5 2 7 6 ~ 5 2 4 6 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。

20

【 0 0 1 7 】

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。

30

【 0 0 1 8 】

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。

40

【 0 0 1 9 】

上記の特定の領域におけるプライマーペアの設定は、 P C R 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ープログラムに基づいて行うことができる。

【 0 0 2 0 】

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

50

上げることができる。

【0021】

P C R の条件は、通常の、P C R 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P C R の条件を設定してもよい。

【0022】

代表的なP C R 反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0023】

D N A 断片	1 分子以上	10
プライマー	1 0 0 ~ 2 0 0 0 n M	
ヌクレオチド	各 1 0 0 ~ 5 0 0 μ M	
D N A ポリメラーゼ	0 . 2 5 ~ 1 . 2 5 単位 / μ l	
T r i s - H C l (p H 7 ~ 9)	1 ~ 5 m M	
M g C l ₂	1 . 5 ~ 5 m M	
界面活性剤またはゼラチン	0 ~ 2 5 %	
(最終液量 : 2 5 ~ 1 0 0 μ l)		

【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。 20

【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P C R 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增幅産物の検出は、通常の、增幅産物の検出方法に従って行うことができる。例えば、增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、增幅産物に結合して蛍光が変化する物質（例えば、二本鎖D N A 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D N A 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（F R E T ）等により蛍光強度が変化するように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P C R を行って蛍光を測定するリアルタイムP C R 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、P C R 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增幅も軽減する。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P C R を行うことも可能である。結果として、より迅速な遺伝子增幅が可能となる。 40

【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 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Tm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、Tm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Tm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Tm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增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增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/または增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いてもよい。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アクセスション番号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Tm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:

C T - F 5 1 5 7 - 2 9 : c a g t c a c a c c a 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)

【0041】

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25μLは、1×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0.5μM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)×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。

【0042】

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。

【0043】

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。

【0044】

【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25μLは、1×Tthバッファー、0.625UのTth(TOYOBO)、各0.2mMのdGTP, dCTP, dATP, dUTP、各0.5μM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)×2サイクル、(90 15秒、65 または68 20秒)×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。

【0045】

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。

【0046】

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。

【0047】

【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25μLは、1×Tthバッファー、0.625UのTth(

10

20

30

40

50

TOYOBONO (トヨボノ) 、各 0.2 mM の dGTP, dCTP, dATP, dUTP、1 μM の上流プライマー - 、0.5 μM の下流プライマー - 、0.2 μM リアルタイム検出用プローブ (5FL-CT-5210-36 : 5' - c a a a g c t a g a a c a a c g c c g c c t t c c a t t c t t g a t g c - 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。ycler (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(Arkay, 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 ttggtagacttgcac tcttgggtt agactttgca actcttggtg 60

gttagactttg caactcttgg tggtagactt ggtcataatg gactttgtt gaaaaatttc 120

ttaaaatctt agagctccga ttttgaatag ctttggtaa gaaaatggc tcgatggctt 180

tccataaaag tagtttggtc ttaacttttgc gggacgcgtc gggaaatttgg ttatctactt 240

tatctcatct aactagaaaa aattatgcgt ctgggattaa ctttttgtt tcttttagaga 300

ttctggattt atcggaaacc ttgataaagg ctatttcttgc tgaccacagc gaatcttgc 360

ttaaaatcaa gtctctagat gtttttaatg gaaaagtgcgt ttcagaggcc tctaaacagg 420

30

ctagagcggc atgctacata tctttcacaa agttttgtt tagatttgcacc aaggatata 480

ttaaaccgc tattccatttgc aaagattttgc gaaacactac atttttaaa atccgagaca 540

aaatcaaaac agaatcgatt tctaaaggcagg aatggacagt tttttttgaa ggcgtccggaa 600

tagtgaatta tagagactat ttaatcggtt aatttgcgtt acaaggatc cgttaagtttgc 660

acgaaatttt gtctttgcgc acagacgtt tttttttgc atccaatcgtt atttcccttc 720

gcattaaaaaa aagacagaat aaagaaacca aaattctaat cacatttcctt atcagctttaa 780

tggaggagtt gcaaaaatac acttgcgtt gaaatgggatc agtatttgcgtt tctaaatag 840

40

ggattccgtt aacaacaagt caggttgcgc ataattttgcgtt gcttgcagag ttctatagtg 900

ctatgaaaat aaaaattact cctagagtac ttctgtcaag cgctttgatt catitaaagc	960	
aaataggatt aaaagatgag gaaatcatgc gtatitcctg tctttcatcg agacaaagtg	1020	
tgtgttcita ttgttctggg gaagaggtaa gtcctctagt acaaacaccc ccaatattgt	1080	
gatataatta aaattatatt catattctgt tgccagaaaa aacacttttta ggctatatta	1140	
gagccaatct tctttgaagc gttgtttctcgagaagatt tatcgtacgc aaatatcatc	1200	
tttgcggttg cgtgtcctgt gacccttcatt atgtcggagt ctgagcaccc taggcgtttg	1260	
tactccgtca cagcggttgc tcgaagcacg tgcggggtta tcttaaaagg gattgcagct	1320	10
tgttagtcctg cttgagagaa cgtgcggcgcg atttgcctta accccaccat ttttccggag	1380	
cgagttacga agacaaaacc tcttcgttga ccgtatgtact ctgttagaaa gtgcataaac	1440	
ttctgaggat aagttataat aatcctcttt tctgtctgac gtttcttaag ctgggagaaaa	1500	
gaaatggtag ctgttggaa acaaatctga ctaatctcca agcttaagac ttcaagaggag	1560	
cgtttacctc cttggagcat tgtctggcgcg atcaaccaat cccgggcatt gattttttt	1620	
agctctttta ggaaggacgc tggttgcaaa ctgttcatcg catctgttt tactatttcc	1680	
ctggtttaaa aaaatgttcg actatttct tggttttagaag gtgcgcstat agcgactatt	1740	
cctttagtca tcctgttttag gaatcttgc aaggaaatat agcttgctgc tcgaacttgt	1800	
tttagtacctt cggtccaaga agtcttggca gagggaaactt ttttaatcgc atctagaatt	1860	
agattatgtat taaaaggaa aaactcttgc agattcatat ccaaggacaa tagaccaatc	1920	
ttttctaaag acaaaaaaaga tcctcgatat gatctacaag tatgtttgtt gagtgatgcg	1980	
gtccaatgca taataacttc gaataaggag aagctttca tgcgtttcca ataggattct	2040	
tggcgaattt taaaacttc ctgataagac ttttcgctat attctaacga catttttgc	2100	
tgcaaagata aaatcccttt acccatgaaa tccctcgta tataacctat ccgtaaaaatg	2160	30
tcctgattag taaaataatc aggttggtaa caggatagca cgctcggtat ttttttat	2220	
aaacatgaaa actcggtccg aaatagaaaa tcgcatgcaa gatatcgagt atgcgttgc	2280	
aggtaaagct ctgatatttg aagactctac tgagttatatt ctgagggcgc ttgctaatta	2340	
ttagtttaag tggttctcatc ataaaaacat attcatagta tttaaataact taaaagacaa	2400	
tggattacct ataactgttag actcggttg ggaagagctt ttgcggcgtc gtatcaaaga	2460	
tatggacaaa tcgtatctcg ggttaatgtt gcatgatgct ttatcaaatg acaagcttag	2520	
atccgtttct catabggttt tcctcgatga tttagggcgtg tggcgctg aagaaaaattt	2580	
gagtaatttc atttccgct cggttaatga gtacaatgaa aatccatttc gtagatctcc	2640	40

gtttctattg cttgagcgta taaagggaaag gcttgacagt gctatagcaa agacttttc	2700	
tattcgcagc gctaggaggcc ggtctattta tgatataattc tcacagttag aaattggagt	2760	
gctggctcgta ataaaaaaaaa gacgagcaac gttctctgag aatcaaaatt ctttcattga	2820	
tgccctccca acaggataca aggatattga tgataaagga gttatcttag ctaaaggtaa	2880	
tttcgtgatt atagcagctt ggccatctat agggaaaact gcttagctt tagacatggc	2940	
gataaaatctt gcggttactc aacagcgttag agttggtttc ctatctctag aaatgagcgc	3000	
aggtaaaattt gttgagcgga ttattgctaa ttaaacagga atatctggtg aaaaattaca	3060	10
aagaggggat ctctctaaag aagaattattt ccgagtagaa gaagctggag aaacagttttag	3120	
agaatcacat tttataatct gcagtgtatag tcagtataag cttttttaa tcgcgaatca	3180	
gatccggtttgc tgagaaaaag aagatcgagt agacgtataa tttatcgatt acttgcagtt	3240	
gatcaactca tcggttggag aaaatcgtaa aaatgaaata gcagatataat ctggaaaccc	3300	
aagaggttttgc ctctcagagc taaacattcc tatagttgc ttatccaaac tatctagaaa	3360	
agttgaggat agagcaaata aagttcccat gcttcagat ttgcgagaca gcggtcaaat	3420	
agagcaagac gcagatgtga tttttttat caataggaag gaatcgtttt ctaattgtga	3480	
gataactgtt gggaaaaata gacatggatc gttttctct tcggatttttccatccatcc	3540	
aaaaattagt aaattctccg ctattaaaaa agtatggtaa attatagtaa ctggccacttc	3600	
atcaaaatgtc ctatccaccc tggaaatcgaa aagtttgaa gaagacccgg tcaatctatt	3660	
aagatatctc ccaaattggc tcaaaatggg atggtttagaaatggatct tggatccat	3720	
tcatctcatt accatgcatt agcagctatc caaagattgc tgactgcaac gaattacaag	3780	
ggaaacacaa aaggggttgtt tttatccaga gaatcaaata gtttcaatt tgaaggatgg	3840	
ataccaagaa tccgttttac aaaaactgaa ttcttagagg ctatggagt taagcggtat	3900	30
aaaacatcca gaaataagta tgagtttagt ggaaaagaag ctgaaactgc tttagaagcc	3960	
ttataccatt taggacatca accgtttta atagggcaa ctggaaactcg atggactaat	4020	
ggaaacacaaa tagtagaccg ttaccaaact ctttctccga tcattaggat ttacgaagga	4080	
tggaaagggtt taactgacga agaaaatata gatataactt taacaccctt taattcacca	4140	
tctacacggaa acataaaagg gttcggttgc gagccatgtc ctatcttggt agatcaaata	4200	
gaatccactt ttgtatcaaa gcttgcaaat gtataccaag aaataaaaat gcgctccca	4260	
aatgcataaa agtatgcata cacatttac gactgggtga ttacagcagc tgcgaaaaag	4320	
agacgaaaat taactaagga taattcttgg ccagaaaaact tggcttaaaa cgttaacgtt	4380	40

aaaagcttg catatatitt aaggatgaat cggtaacattt gtacaaggaa ctggaaaaaa	4440
atcgaggtag ctatcgataa atgtatagaa atcgccattc agcttggttg gttatctaga	4500
agaaaaacgca ttgaatttct ggattcttct aaactctcta aaaaagaaaat tctatatcta	4560
aataaagagc gtttgaaga aataaccaag aatctaaag aacaaatgga acaattagaa	4620
caagaatcta ttaattaata gcaaacttga aactaaaaac ctaatttatt taaagctcaa	4680
aataaaaaag agttttaaaa tggaaattc tggttttat ttgtataaca ctcaaaactg	4740
cgtcttgct gataatatca aagttggca aatgacagag ccgctcaagg accagcaa	4800
aatccttggg acaacatcaa cacctgtcgc agccaaaatg acagcttctg atgaaatatc	4860
tttaacagtc tccaataatc catcaaccaa tgcttctatt acaattggtt tggatgcgga	4920
aaaagcttac cagcttattc tagaaaagtt gggagatcaa attcttggtg gaattgtgta	4980
tactattgtt gatagtacag tccaagatattttagacaaa atcacaacag acccttctt	5040
aggtttttg aaagctttt acaactttcc aatcactaat aaaattcaat gcaacgggtt	5100
attcactccc aggaacattt aactttattt aggaggaact gaaataggaa aattcacagt	5160
cacacccaaa agctctggga gcatgttctt agtctcagca gatatttttg catcaagaat	5220
ggaaggcggc gtgttctag ctttggtacg agaagggtat tctaaggccct acgcgattag	5280
ttatggatac tcatcaggcg ttcttaattt atgtatctta agaaccagaa ttatataac	5340
aggatttact ccgacaacgt attcattacg ttaggcgtt ttagaaagcg gtgggtatg	5400
ggtaatgcc ctttctaatg gcaatgatattttaggaata acaaatactt ctaatgtatc	5460
tttttggag gtaatacctc aaacaaacgc ttaaacaattt tttatggat ttttttata	5520
ggttttatattttagagaaaaa aagttcgaat tacgggtttt gttatgcaaa ataaaagcaa	5580
agtgagggac gattttattttaa aatttttaa agatgtgaaa aagatttcc ccgaattttaga	5640
cctaaaaata cgagtaaaca aggaaaaagt aactttctta aatttccct tagaactcta	5700
ccataaaaagt gtctcactaa ttctaggact gcttcaacaa atagaaaact cttttaggatt	5760
attccctagac tctctgttc ttgaaaaattt agaggataac agtttaaagc taaaaaaaggc	5820
tttgattatg ctatcttgc ttagaaaaga catgttttcc aaggctgaat agataactta	5880
ctcttaacgtt ggagttgatt tgcacacctt agtttttgc tcttttaagg gaggaactgg	5940
aaaaacaaca ctttctctaa acgtggatg caacttggcc caattttag ggaaaaaaagt	6000
gttacttgct gaccttagacc cgcaatccaa ttatcttct ggattgggg ctagtgcag	6060
aagtaaccaa aaaggcttac acgacatagt atacacatca aacgatttaa aatcaatcat	6120

ttgcgaaaca aaaaaagata gtgtggacct aattccgtca tcattttat ccgaacagtt	6180	
tagagaattg gatattcata gaggacctag taacaactta aagttatitc tgaatgagta	6240	
ctgcgcctt tttatgaca tctgcataat agacactcca cctagcctag gagggtaac	6300	
gaaagaagct ttgttgcag gagacaaatt aattgcttgt ttaactccag aaccttttc	6360	
tattctaggg ttacaaaaga tacgtgaatt cttaaaggcgt gtcggaaaac ctgaagaaga	6420	
acacattctt ggaatagctt tgccttttg ggatgatcgt aactcgacta accaaatgta	6480	
tatagacatt atcgagtcta ttacaaaaaa caagctttt tcaacaaaaa ttgcgtcgaga	6540	10
tatccatctc agccgttctc ttcttaaaga agattctgtc gctaattgtct atccaaattc	6600	
tagggccgca gaagatattc tgaagttAAC gcatgaaata gcaaataattt tgcataatcga	6660	
atatgaacga gattactctc agaggacaac gtgaacaaac taaaaaaaaga agcgaatgtc	6720	
ttttttaaaaaaa aaaatcaaac tgccgttctt ttagattttt agaagacgct tccctccatt	6780	
gaactattct cagcaacttt gaattctgag gaaagtccaga gtttggatca attatttttta	6840	
tcagagtccc aaaactattc ggatgaagaa ttttatcaag aagacatcct agcggtaaaa	6900	
ctgcttactg gtcagataaa atccatacag aagcaacacg tactttttt aggagaaaaaa	6960	
atctataatg cttagaaaaat cctgagtaag gatcacttct cctcaacaac tttttcatct	7020	
tggatagagt tagtttttag aactaagtct tctgcgttaca atgcttttgc atattacgag	7080	
ctttttataa acctccccaa ccaaactcta caaaaagagt ttcaatcgat cccctataaa	7140	
tccgcatata tttggccgc tagaaaaggc gatttaaaaa ccaaggtcga tgcgttaggg	7200	
aaagttatgtg gaatgtcgaa ctcatggcg ataagggtgt tggatcaatt tcttccttca	7260	
tctagaaaaca aagacgttag agaaacgata gataagtctg attcagagaa gaatgccaa	7320	
ttatctgatt tcttaataga gatacttcgc atcatgtgtt ccggagtttc ttgtcctcc	7380	30
tataacgaaa atcttctaca acagctttt gaactttta agcaaaagag ctgatccctcc	7440	
gtcagctcat atatataatct attatataata tatatttagg gatttgatt tacgagagag	7500	
a	7501	

(210) 2

(211) 29

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 2

cagtcacacc caaaagctct gggagcatg

29

10

〈210〉 3

〈211〉 31

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

20

〈400〉 3

agctctggga gcatgttctt agtctcagca g

31

〈210〉 4

〈211〉 26

〈212〉 DNA

30

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 4

agctctggga gcatgttctt agtctc

26

40

〈210〉 5
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 5
tcgcgttaggg cttagaatca ccttc

〈210〉 6
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 6
tcgcgttaggg cttagaatca ccttctcgta c

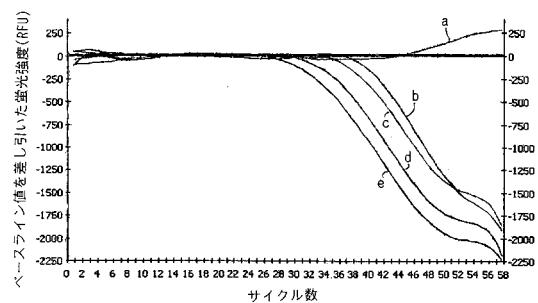
〈210〉 7
〈211〉 36
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 probe

〈400〉 7
caaagctaga acaacgcccgc cttccattct tcatgc

【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