(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2004-65244
(P2004-65244A)
(43)公開日　平成16年3月4日(2004.3.4)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	C12Q	1/68	A	4B063

審査請求 未請求　請求項の数 6　OL　（全 34 頁）

(21)出願番号　特願2003-159573(P2003-159573)
(22)出願日　平成15年6月4日(2003.6.4)
(31)優先権主張番号　特願2002-168696(P2002-168696)
(32)優先日　平成14年6月10日(2002.6.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　591245772
北海道
北海道札幌市中央区北３条西６丁目１番地
(71)出願人　000120456
栄研化学株式会社
東京都文京区本郷１丁目３３番８号
(71)出願人　501203344
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
茨城県つくば市観音台３－１－１
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヨーネ菌検出用プライマーおよびこれを用いたヨーネ病の診断法

(57)【要約】
【目的】ヨーネ菌挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列の効率的増幅、およびこれを利用したヨーネ病の簡便な遺伝子診断法の提供。
【解決手段】ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００（配列番号１）またはその相補鎖上から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、
（１）第１領域として、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列、および
（２）第２領域として、第１領域の３’側の塩基配列に相補的配列からなり、第１領域の５’側に位置する塩基配列を含むことを特徴とする、新規プライマー。
ならびに、前記プライマーによるＬＡＭＰ法を利用したヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列の増幅。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヨーネ菌検出のための核酸増幅法に用いるヨーネ菌検出用プライマーであって、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００（配列番号１）またはその相補鎖上から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、
（１）第１領域として、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列、および
（２）第２領域として、第１領域の３’側の塩基配列に相補的であり、第１領域の５’側に位置する塩基配列
を含むことを特徴とする、新規プライマー。
【請求項２】
配列番号２～１３および配列番号２０～２９に示される塩基配列、あるいはこれらに相補的な塩基配列から選ばれるいずれか１の塩基配列上の、少なくとも連続する１５塩基を含む、請求項１に記載のプライマー。
【請求項３】
以下の１）～６）から選ばれるいずれか１のオリゴヌクレオチドを含む、請求項１に記載のプライマー。
１）配列番号２の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号３の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
２）配列番号５の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号６の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド
３）配列番号８の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号９の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
４）配列番号１１の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号１２の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド
５）配列番号２０の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号２１の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
６）配列番号２３の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号２４の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド
【請求項４】
核酸増幅法がＬＡＭＰ法であることを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載のプライマー。
【請求項５】
請求項１～３のいずれか１項に記載のプライマーを用いることを特徴とする、ＬＡＭＰ法によるヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列の増幅法。
【請求項６】
請求項５記載の増幅法を用いて、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を検出することを特徴とする、ヨーネ病の遺伝子診断法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列に基づいて設計された新規プライマーと該プライマーを用いたヨーネ病の遺伝子診断法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
ヨーネ病は、ヨーネ菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｖｉｕｍ ｓｕｂｓ． Ｐａｒａｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）によって牛やめん羊などの反芻動物が経口感染し、慢性腸炎と体重の著しい減少を主症状とする伝染病で、昭和４６年に法定伝染病に指定されている。また、ヨーネ病は病気の経過が極めて長く、感染から発病までに、１～数年、時には１０年もの潜伏期間がある。しかも、この無症状感染している牛は大量の菌を糞便中に排

泄するため、多数の同居牛に病気を伝染させる。現在、本病の予防・治療が難しいことから、伝播を防ぐ最も効果的な防疫手段は、罹患牛を早く見つけて、排除することであり、家畜伝染病予防法のもとで殺処分という強制的な措置がとられている。このように、ヨーネ病は、発生頭数が多いため、酪農や肉牛経営にとっては最も被害の大きい重要疾病の一つであり、病畜による生産性低下や殺処分による直接的損害だけでなく、清浄化のための長期間にわたる定期診断や病畜の移動制限により、大きな経済的負担となっている。したがって、ヨーネ病を早期に診断して、清浄化することは重要である。

【０００３】

ヨーネ病の診断には、血清を用いたＥＬＩＳＡ法、抗原を皮内に接種するヨーニン反応、および家畜の糞便からヨーネ菌を検出する方法がある。この糞便を用いたヨーネ病の診断には、１）細菌学的診断として、糞便培養法、２）遺伝子診断法として、ＰＣＲ法がある。

【０００４】

１）糞便培養法：

糞便培養法は、マイコバクチン添加ハロルド（Ｈｅｒｒｏｌｄ）培地を用いて希釈した糞便を培養する方法であり、ヨーネ病検査として最も信頼性のある生前診断法である。しかし、判定に１～３ヶ月の長い時間を要する

【０００５】

２）ＰＣＲ法：

培養を必要としない迅速診断法としてＰＣＲ法がある。希釈した糞便からＤＮＡを抽出し、そのＤＮＡを鋳型にしてＰＣＲを行って、増幅産物（ＰＣＲ産物）をアガロース電気泳動にかけて、ヨーネ菌を検出している。

【０００６】

ＰＣＲ法は、標的配列の両端の一方のセンス鎖を認識するオリゴヌクレオチドと、両端の他方のアンチセンス鎖を認識するオリゴヌクレオチドよりなる２種類のプライマーを用いた核酸増幅法である。ＰＣＲ法では、まず、相補的な２本鎖核酸を熱処理により１本鎖核酸に変性させる。次に、各々の１本鎖核酸に３’側からプライマーを相補的に結合（アニール）させ、引き続き、鋳型依存性核酸合成酵素により結合したプライマーからＤＮＡ伸長させる。ここまでの工程で、元の鋳型から増幅したい領域は２倍に増幅することになる。これを１サイクルとすると、ＰＣＲ法は、このサイクルを繰り返し行うことによって、標的配列を指数関数的に増幅することができる。ただし、ＰＣＲ法は各段階で反応温度が異なるため、反応の段階に応じて温度を制御する必要がある。

【０００７】

ＰＣＲ法を用いたヨーネ菌の検出は、ヨーネ菌に特異的な塩基配列を増幅できる１組のプライマーを用い、希釈した糞便から得られたＤＮＡ試料を鋳型としてＰＣＲを行うものである。上記特異的配列を有するヨーネ菌があるＤＮＡ試料では鋳型ＤＮＡが増幅されて検出が可能となるが、ヨーネ菌がない場合は増幅されず検出されない。しかし、プライマーの塩基配列によっては、目的以外の塩基配列にわずかでもアニーリングした場合、標的配列以外の塩基配列が増幅してしまう。したがって、プライマーの選定は特に重要となる。現在、ヨーネ菌検出用プライマーとしては、マクファデンらの米国特許（特許文献１）に記載されたヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００検出用のプライマーが知られている。

【０００８】

また、希釈した糞便からから抽出できるＤＮＡ試料は非常に微量であるため、例えば、ヨーネ菌挿入配列ＩＳ９００検出用の１組のプライマーを用いてＰＣＲを行い、この増幅したＰＣＲ産物を鋳型として、他の１組のプライマーを用いて再びＰＣＲを行うｎｅｓｔｅｄ　ＰＣＲが行われている。

【０００９】

本発明者らは、コリンズらのヨーネ菌検出用のｎｅｓｔｅｄ　ＰＣＲ用のプライマーセット（例えば、非特許文献１参照）を改変して、新たなＩＳ９００のｎｅｓｔｅｄＰＣＲ用のプライマーを開発している。

【００１０】
一方、本発明者らは遺伝子増幅法として、ループ媒介等温増幅法（Ｌｏｏｐ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ　ＡＭＰｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ：ＬＡＭＰ法）を完成している（例えば、特許文献２および非特許文献２参照）。ＬＡＭＰ法は鋳型となるヌクレオチドに自身の３’末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせることにより、等温での相補鎖合成反応を可能とした。またＬＡＭＰ法では、プライマーの３’末端が常に試料に由来する領域に対してアニールするために、塩基配列の相補的結合によるチェック機構が繰り返し機能する。その結果、特異性の高い遺伝子増幅反応が可能となった。
【特許文献１】
米国特許明細書　５，２２５，３２４号
【特許文献２】
国際公開００／２８０８２号パンフレット
【非特許文献１】
「ベタリナリー　ミクロバイオロジー（Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）」，　１９９３，　Ｖｏｌ．３６，　ｐ２８９－２９９
【非特許文献２】
「ヌクレイック　アシッド　リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．）」，　２０００，Ｖｏｌ．２８，　Ｎｏ．１２，　ｅ６３
【００１１】
【発明が解決しようとする課題】
すなわち、本発明は、ヨーネ菌挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を検出するための新規プライマーと、該プライマーを用いたＬＡＭＰ法によるヨーネ病の簡便な遺伝子診断を提供することを目的とする。
【００１２】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは、上記問題を解決するため鋭意研究を行なった結果、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００に特異的な塩基配列と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＬＡＭＰ法によりヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００に特異的な塩基配列を増幅する事により、ヨーネ病を診断できる事を見出し本発明を完成した。
【００１３】
すなわち、本発明は、ヨーネ菌検出のための核酸増幅法に用いる、ヨーネ菌検出用プライマーであって、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００（配列番号１）またはその相補鎖上から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、
（１）第１領域として、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列、および
（２）第２領域として、第１領域の３’側の塩基配列に相補的であり、第１領域の５’側に位置する塩基配列
を含むことを特徴とする、新規プライマーを提供する。
【００１４】
また本発明は、配列番号２～１３および配列番号２０～２９に示される塩基配列、あるいはこれらに相補的な塩基配列から選ばれるいずれか１の塩基配列上の、少なくとも連続する１５塩基を含む、前記プライマー。
【００１５】
また本発明は、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００に特異的なヨーネ病診断の塩基配列を増幅できる、以下の１）～６）から選ばれるいずれか１のオリゴヌクレオチドを含む、前記プライマーを提供する。
１）配列番号２の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号３の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

２）配列番号５の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号６の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド
３）配列番号８の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号９の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
４）配列番号１１の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号１２の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド
５）配列番号２０の塩基配列に相補的な配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号２１の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
６）配列番号２３の塩基配列、塩基数０から５０の任意の塩基配列および配列番号２４の塩基配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド

【００１６】
さらに本発明は、核酸増幅法がＬＡＭＰ法である前記プライマー、および該プライマーを用いたＬＡＭＰ法によるヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列の増幅法を提供する。
さらにまた、本発明は前記増幅法を利用して、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を検出することを特徴とするヨーネ病の遺伝子診断法を提供する。
以下、本発明について詳細に説明する。

【００１７】
【発明の実施の形態】
核酸増幅法によるヨーネ病の遺伝子診断用の試料としては、糞便を希釈した溶液（糞便希釈溶液）、もしくは数日から数週間の短期間の糞便培養を行った培地表面を掻き取って希釈した液（短期培養希釈液）を使用する。ＬＡＭＰ法の試料としては、この糞便希釈溶液または短期培養希釈液から、熱、アルカリ等で適宜選択された処理法により抽出された核酸が使用される。

【００１８】
本発明において標的配列とは、増幅すべきポリヌクレオチドの塩基配列を意味する。一般にポリヌクレオチドの塩基配列は、５’側から３’側に向けてセンス鎖の塩基配列を記載する。本発明において、連続的に新たな標的塩基配列が合成される事を増幅と呼ぶ。更に本発明において、相補鎖合成の起点を与えることとは、鋳型となるポリヌクレオチドに対して、相補鎖合成に必要なプライマーとして機能するポリヌクレオチドの３’末端をハイブリダイズさせることを言う。また本発明において、３’末端、あるいは５’末端とは、単にいずれかの末端の１塩基のみならず、末端の１塩基を含み、かつ末端に位置する領域を意味する。本発明において、プライマーセットとは同時に用いられるプライマーの組み合せをいう。

【００１９】
ＰＣＲ法は、標的配列の両端の一方のセンス鎖を認識するオリゴヌクレオチドと、両端の他方のアンチセンス鎖を認識するオリゴヌクレオチドよりなる２種類のプライマーを用いた核酸増幅法である。まず、相補的な二本鎖核酸を熱処理により一本鎖核酸に変性させる。次に、各々の一本鎖核酸に３’側からプライマーを相補的に結合（アニール）させ、引き続き、鋳型依存性核酸合成酵素により結合したプライマーからＤＮＡ伸長させる。ここまでの工程で元の鋳型から増幅したい領域は２倍に増幅したことになる。ここまでを１サイクルとすると、ＰＣＲ法は、このサイクルを繰り返し行なうことによって、標的配列を指数関数的に増幅することができる。ただし、ＰＣＲ法は各段階で反応温度が異なるため、反応の段階に応じて変更する必要がある。

【００２０】
これに対してＬＡＭＰ法は、プライマーとして少なくとも４種類のオリゴヌクレオチドを用いる核酸増幅法で、このうち２種類をインナープライマー（Ｉｎｎｅｒ　Ｐｒｉｍｅｒ）、残りの２種類をアウタープライマー（Ｏｕｔｅｒ　Ｐｒｉｍｅｒ）と呼ぶ。ＬＡＭＰ法は、これら４種類のプライマー、鎖置換合成活性を有する鋳型依存性核酸合成酵素、および基質を用いて、熱変性を必要とせずに、終始等温で速やかに特異性の高い遺伝子増幅

反応が進行することを特徴とする。

【００２１】

前記プライマー設計のために、標的塩基配列の３’末端から当該ポリヌクレオチド鎖の３’末端方向に向かって順に、第１の任意配列Ｆ１ｃ、第２の任意配列Ｆ２ｃ、第３の任意配列Ｆ３ｃをそれぞれ選択し、標的領域の５’末端から当該ヌクレオチド鎖の５’末端方向に向かって順に、第４の任意配列Ｒ１、第５の任意配列Ｒ２、第６の任意配列Ｒ３それぞれ選択する。Ｆ１ｃ、Ｆ２ｃ、Ｆ３ｃの相補配列をそれぞれＦ１、Ｆ２、Ｆ３、またＲ１、Ｒ２、Ｒ３の相補鎖をＲ１ｃ、Ｒ２ｃ、Ｒ３ｃと呼ぶ。

【００２２】

インナープライマー（Ｉｎｎｅｒ　Ｐｒｉｍｅｒ）とは、標的遺伝子上の「ある特定のヌクレオチド配列領域」を認識し、かつ合成起点を与える塩基配列を３’末端に有し、同時にこのプライマーを起点とする核酸合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を５’末端に有することを特徴としたオリゴヌクレオチドである。ここで、Ｆ２より選ばれた塩基配列、およびＦ１より選ばれた塩基配列と相補的な塩基配列を含むプライマーをインナープライマーＦ、Ｒ２より選ばれた塩基配列およびＲ１より選ばれた塩基配列と相補的な塩基配列を含むからなるプライマーをインナープライマーＲと呼ぶ。

【００２３】

アウタープライマー（Ｏｕｔｅｒ　Ｐｒｉｍｅｒ）とは、標的塩基配列上の『「ある特定のヌクレオチド配列領域」の下流に存在するある特定のヌクレオチド配列領域』を認識かつ合成起点を与える塩基配列を有することを特徴としたオリゴヌクレオチドである。Ｆ３より選ばれた塩基配列を含むプライマーをアウタープライマーＦ、Ｒ３より選ばれた塩基配列を含むプライマーをアウタープライマーＲと呼ぶ。インナープライマーおよびアウタープライマーにおいて、Ｆは、標的遺伝子のセンス鎖と相補的に結合し、合成起点を提供するプライマーの表示であり、Ｒは、標的遺伝子のアンチセンス鎖と相補的に結合し、合成起点を提供するプライマーの表示である。

【００２４】

標的遺伝子に選択的にアニールしたインナープライマーからの核酸合成反応が進行すると同時に、アウタープライマーを起点とするその下流からの核酸合成反応によって鎖置換反応が起こる。そのためにインナープライマーを起点とする伸長鎖が鋳型である標的遺伝子から分離し、自身の５’末端でループ構造を形成する。インナープライマーの３’末端を起点とした伸長鎖に、もうひとつのインナープライマーが選択的にアニールし、合成起点となり核酸合成が進行する。同時にもうひとつのアウタープライマーを起点とする核酸合成反応によって鎖置換反応が起こる。その結果、自己を鋳型としながら合成起点となる３’末端を有し、両端にそれぞれループ構造を有することを特徴とする「ダンベル型」ヌクレオチドが形成される。

【００２５】

上述の「ダンベル型」ヌクレオチドのループの塩基配列は、３’末端側のループの一本鎖部分にインナープライマーが相補的にアニールして合成起点を与えるので、ループ構造を有する中間産物は連続的にインナープライマーの鋳型として機能し、核酸合成が進行する。特に、ループ構造を複数有する中間産物は、複数の核酸合成反応が同時多発的に進行する鋳型となりながら、鎖置換反応によってまた新たなループ構造を有する中間産物を生成させる。このように、ＬＡＭＰ法では、等温条件下で連続的かつ大量に標的遺伝子の特定のヌクレオチド配列を増幅することが可能になる。

【００２６】

ＬＡＭＰ法においては、インナープライマーとアウタープライマーに加え、さらにこれらとは別のプライマー、すなわち、ループプライマーを用いることができる。ループプライマー（Ｌｏｏｐ　Ｐｒｉｍｅｒ）は、ダンベル構造の５’末端側のループ構造の一本鎖部分の塩基配列に相補的な塩基配列を持つプライマーである。このプライマーを用いると、核酸合成の起点が増加し、反応時間の短縮と検出感度の上昇が可能になる（ＰＣＴ／ＪＰ０１／０８１４２）。ループプライマーの塩基配列は上述のダンベル構造の５’末端側の

ループの１本鎖部分の塩基配列に相補的であれば、標的遺伝子の塩基配列あるいはその相補鎖から選ばれてもよく、他の塩基配列でもよい。また、ループプライマーは１種類でも２種類でも良い。

【００２７】

本発明において、インナープライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドの長さは、３０塩基以上、好ましくは３５塩基以上で、化学合成あるいは天然の核酸のどちらでもよい。Ｆ側のインナープライマーは、その塩基配列として標的遺伝子配列のある配列よりなるオリゴヌクレオチドを３’側に、そしてそれより下流の別の塩基配列の相補鎖よりなるオリゴヌクレオチドを５’側に持ち、その間には０から５０塩基よりなる任意のオリゴヌクレオチドを持っても良い。Ｒ側のインナープライマーの塩基配列は、Ｆ側のインナープライマーより下流の、標的遺伝子配列のある配列の相補鎖よりなるオリゴヌクレオチドを３’側に、そしてそれより上流の別の塩基配列を５’側に持ち、その間には０から５０塩基よりなる任意の塩基配列を持ってもよい。また、プライマーは検出可能なように標識されていてもよい。アウタープライマーならびにループプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドの長さは、１０塩基以上、好ましくは１５塩基以上で、化学合成あるいは天然のどちらでも良い。

また、ＬＡＭＰ法で使用する各プライマーは単一のオリゴヌクレオチドであっても、複数のオリゴヌクレオチドの混合物であっても良い。

【００２８】

したがって、本発明にかかる、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を増幅するためのインナープライマーは、

（１）第１の任意配列（第１領域）として、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列、および

（２）第２の任意配列（第２領域）として、第１領域の３’側の塩基配列に相補的であり、第１領域の５’側に位置する塩基配列、を有するものとして設計される。

【００２９】

前記第１の任意配列またはその相補配列としては、例えば、配列番号３、配列番号６、配列番号９、配列番号１２、配列番号２１および配列番号２４に示される塩基配列を挙げることができる。また、第２の任意配列またはその相補配列としては、例えば、配列番号２、配列番号５、配列番号８、配列番号１１、配列番号２０および配列番号２３を挙げることができる。

さらに、アウタープライマーのための第３の任意配列またはその相補配列として、例えば、配列番号４、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３、配列番号２２および配列番号２５を挙げることができる。

さらにまた、ループプライマーのための任意配列およびその相補配列として、例えば、配列番号２６～２９を挙げることができる。

5'-GACGACTCGACCGCTAATTGA-3'（配列番号２）
5'-GTTGGATGGCCGAAGGAGAT-3'（配列番号３）
5'-GGGTATGGCTTTCATGTGGT-3'（配列番号４）
5'-TGCGATTGGATCGCTGTGTA-3'（配列番号５）
5'-GTCTGCTGGGTTGATCTGGA-3'（配列番号６）
5'-AATGACGGTTACGGAGGTG-3'（配列番号７）
5'-TCGAGCTGCGCATCCTGAC-3'（配列番号８）
5'-CCACGACTTGCAGCCTCTG-3'（配列番号９）
5'-CGATCATCGCCGATCAGG-3'（配列番号１０）
5'-CGATCGAACCGAATGCGCG-3'（配列番号１１）
5'-CCTTCGACTACAACAAGAGCC-3'（配列番号１２）
5'-GCTGATCCTGCTTACTGGC-3'（配列番号１３）
5'-GCGTTGCTGATCGCCTTGCTCA-3'（配列番号２０）
5'-GCCGATGGAGGCGAGGTC-3'（配列番号２１）
5'-TTGATTGCGGCGGTGAC-3'（配列番号２２）
5'-GGCTGCTTTATATTCCCGGGC-3'（配列番号２３）
5'-AAGACCGACGCCAAAGACG-3'（配列番号２４）
5'-TCATCGCCGATCAGGCC-3'（配列番号２５）
5'-GCGCCGGCGATGACATCGCA-3'（配列番号２６）
5'-CTGGAATACTTTCGGCGCTG-3'（配列番号２７）
5'-ATCGACCTCAACGCCGG-3'（配列番号２８）
5'-GGTAGTTACCGCGGCGA-3'（配列番号２９）

【００３０】
こうして設計される、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を迅速に増幅できるＬＡＭＰ法用プライマーセットの好適な例として、以下のＡ、Ｂ、Ｃの３組を挙げることができる。

＜プライマーセットＡ＞
インナープライマーＦ：
5'-TCAATTAGCGGTCGAGTCGTCGTTGGATGGCCGAAGGAGAT-3'（配列番号１４）
インナープライマーＲ：
5'-TGCGATTGGATCGCTGTGTATCCAGATCAACCCAGCAGAC-3'（配列番号１５）
アウタープライマーＦ：
5'-GGGTATGGCTTTCATGTGGT-3'（配列番号４）
アウタープライマーＲ：
5'-CACCTCCGTAACCGTCATT-3'（配列番号１６）

【００３１】
<プライマーセットＢ>
インナープライマーＦ：
5'-GTCAGGATGCGCAGCTCGACCACGACTTGCAGCCTCTG-3'（配列番号１７）
インナープライマーＲ：
5'-CGATCGAACCGAATGCGCGGGCTCTTGTTGTAGTCGAAGG-3'（配列番号１８）
アウタープライマーＦ：
5'-CGATCATCGCCGATCAGG-3'（配列番号１０）
アウタープライマーＲ：
5'-GCCAGTAAGCAGGATCAGC-3'（配列番号１９）
ループプライマーＦ：
5'-TGCGATGTCATCGCCGGCGC-3'（配列番号３０）
ループプライマーＲ：
5'-CTGGAATACTTTCGGCGCTG-3'（配列番号２７）

【００３２】
<プライマーセットＣ>
インナープライマーＦ：
5'-TGAGCAAGGCGATCAGCAACGCGCCGATGGAGGCGAGGTC-3'（配列番号３１）
インナープライマーＲ：
5'-GGCTGCTTTATATTCCCGGGCCGTCTTTGGCGTCGGTCTT-3'（配列番号３２）
アウタープライマーＦ：
5'-TTGATTGCGGCGGTGAC-3'（配列番号２２）
アウタープライマーＲ：
5'-GGCCTGATCGGCGATGA-3'（配列番号３３）
ループプライマーＦ：
5'-CCGGCGTTGAGGTCGAT-3'（配列番号３４）
ループプライマーＲ：
5'-GGTAGTTACCGCGGCGA-3'（配列番号２９）

これらのプライマーは、その塩基配列を設定されれば、市販のＤＮＡ合成機あるいはＤＮＡ合成を専門に取り扱う機関に委託することによって、慣用の方法で容易に合成することができる。

【００３３】
本発明に使用するプライマーは、マクファデンらが考案したヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００検出用のＤＮＡプローブおよびプライマー（米国特許５２２５３２４号）と一部重複している。しかし、本発明にかかるプライマーは、第１領域と第２領域からなる特異な構造を有するＬＡＭＰ法用プライマーであるという点で、マクファデンらのＤＮＡプローブやプライマーとは、構造も目的も異なっている。

【００３４】

本発明の増幅法において、鋳型依存性核酸合成反応で使用する酵素は、鎖置換活性を有する鋳型依存性核酸合成酵素であれば特に限定されない。このような酵素としては、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（ラージフラグメント）、Ｂｃａ（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ、大腸菌ＤＮＡ　ポリメラーゼＩのクレノウフラグメント、Ｖｅｎｔ（Ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ（Ｖｅｎｔ　ＤＮＡポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）、ＤｅｅｐＶｅｎｔ（Ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ（ＤｅｅｐＶｅｎｔ　ＤＮＡポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）およびＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ等が挙げられ、好ましくはＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（ラージフラグメント）が挙げられる。Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼを用いる場合は、その反応至適温度である６５℃付近で反応を行うのが望ましい。

【００３５】

増幅産物の検出には公知の技術が適用できる。例えば増幅された遺伝子配列を特異的に認識する標識オリゴヌクレオチドを用いたり、あるいは、反応終了後の反応液をそのままアガロース電気泳動にかけても容易に検出できる。ＬＡＭＰ法では塩基長の異なる多数のバンドがラダー（はしご）状に検出される。

【００３６】

さらに、ＬＡＭＰ法による遺伝子増幅は加速度的かつ効率的に行なわれるので、反応液中にあらかじめ二本鎖核酸の分子内に特異的に取り込まれるインターカレーターであるエチジウムブロマイドやＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　社製）等を添加することにより増幅を確認できる（特開２００１－２４２１６９）。また、経時的に蛍光強度を観察することができるＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の連続蛍光光度計で、増幅の有無の確認や速度論的解析をすることも可能である。

【００３７】

その他、ＬＡＭＰ法では核酸の合成により基質が大量に消費され、副産物であるピロリン酸が、共存するマグネシウムと反応してピロリン酸マグネシウムとなり、肉眼でも確認できる程に白濁する。この白濁を反応終了後の観察、もしくは反応中の濁度の上昇を経時的に光学的に観察できる測定機器、例えば４００ｍｍの吸光度の変化を通常の分光光度計を用いて増幅の確認が可能である（ＷＯ０１／８３８１７）。

【００３８】

また、増幅された遺伝子配列を特異的に認識する担体固相オリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションまたはそれを起点とした伸長反応により、増幅の確認が可能である（特開２００２－２０１２６９）。

【００３９】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例１

１．プライマーの合成

プライマーは、ＩＳ９００の塩基配列（配列番号１）に基づいてその塩基配列を設定し、ＤＮＡ合成を専門に取り扱う機関に委託して、当該機関所有のＤＮＡ合成機で、ホスホアミダイド法により化学合成した。合成したプライマーは、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでさらに精製した。

こうして合成された、プライマーセットＡ、Ｂ、Ｃの塩基配列を以下に示す。

【００４０】

<プライマーセットA>
インナープライマーF：
5'-TCAATTAGCGGTCGAGTCGTCGTTGGATGGCCGAAGGAGAT-3'（配列番号１４）
インナープライマーR：
5'-TGCGATTGGATCGCTGTGTATCCAGATCAACCCAGCAGAC-3'（配列番号１５）
アウタープライマーF：
5'-GGGTATGGCTTTCATGTGGT-3'（配列番号４）
アウタープライマーR：
5'-CACCTCCGTAACCGTCATT-3'（配列番号１６）

【００４１】
<プライマーセットB>
インナープライマーF：
5'-GTCAGGATGCGCAGCTCGACCACGACTTGCAGCCTCTG-3'（配列番号１７）
インナープライマーR：
5'-CGATCGAACCGAATGCGCGGGCTCTTGTTGTAGTCGAAGG-3'（配列番号１８）
アウタープライマーF：
5'-CGATCATCGCCGATCAGG-3'（配列番号１０）
アウタープライマーR：
5'-GCCAGTAAGCAGGATCAGC-3'（配列番号１９）
ループプライマーF：
5'-TGCGATGTCATCGCCGGCGC-3'（配列番号３０）
ループプライマーR：
5'-CTGGAATACTTTCGGCGCTG-3'（配列番号２７）
【００４２】

<プライマーセットC>

インナープライマーF：

5'-TGAGCAAGGCGATCAGCAACGCGCCGATGGAGGCGAGGTC-3'（配列番号３１）

インナープライマーR：

5'-GGCTGCTTTATATTCCCGGGCCGTCTTTGGCGTCGGTCTT-3'（配列番号３２）

アウタープライマーF：

5'-TTGATTGCGGCGGTGAC-3'（配列番号２２）

アウタープライマーR：

5'-GGCCTGATCGGCGATGA-3'（配列番号３３）

ループプライマーF：

5'-CCGGCGTTGAGGTCGAT-3'（配列番号３４）

ループプライマーR：

5'-GGTAGTTACCGCGGCGA-3'（配列番号２９）

【００４３】

２．ＬＡＭＰ法で使用する試料および試薬の調整

１）試料の調製（核酸抽出法）

ヨーネ菌標準株およびヨーネ菌類似の他のマイコバクテリウム属菌の菌株を培養して、形成されたコロニーを掻き取り、Ｉｎｓｔａ　Ｇｅｎｅ　Ｍａｔｒｉｘ（ＢｉｏＲａｄ社）で抽出した溶液あるいはさらにこの抽出液をフェノール・クロロフォルム法で抽出して調製した溶液を試料とした。

【００４４】

２）対照用試料

陰性対照として滅菌水を使用した。また陽性対照の鋳型ＤＮＡとして、ヨーネ菌標準株ＡＴＣＣ１９６９８から抽出したＤＮＡ（ゲノムＤＮＡ）あるいはＩＳ９００の遺伝子（１番から１４５１番の塩基配列）をクローニングしたプラスミドＤＮＡ（クローニングベクターｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ）を試料とした。

【００４５】

３．糞便から分離したヨーネ菌のＬＡＭＰ法による反応

Ｉ　ＬＡＭＰ法に用いる試薬組成及び濃度

１）１０倍濃度の反応用緩衝液

２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　８．８）

１００ｍＭ　ＫＣｌ

１００ｍＭ　（ＮＨ４）２ＳＯ４

８０ｍＭ　ＭｇＳＯ４

１　％　Ｔｗｅｅｎ　２０

２）基質溶液

ｄＡＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＴＴＰの最終濃度２５ｍＭ混合液

３）Ｂｅｔａｉｎｅ溶液：Ｂｅｔａｉｎｅを溶解し、５Ｍに調整したもの

４）プライマー混合溶液

各セットのＰｒｉｍｅｒについて、２５μｌ反応溶液中の最終濃度が以下になるように６μｌ／１　ｓａｍｐｌｅでプライマー混合溶液を調整した。

インナープライマーＦ，Ｒ　　２．４μＭ

アウタープライマーＦ，Ｒ　　０．２μＭ

ループプライマー　Ｆ，Ｒ　　０．８μＭ

５）Ｂｓｔ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂ社製） ８０００Ｕ／ｍｌ

【００４６】

ＩＩ ＬＡＭＰ法による反応

１０倍濃度反応用緩衝液 ２．５μｌ、基質溶液 １．４μｌ、Ｂｅｔａｉｎｅ溶液 ４μｌおよびプライマーセットＡ、Ｂ、Ｃの各プライマー混合溶液 ６．０μｌ、Ｂｓｔ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ １μｌに滅菌水 ５．１μｌを１サンプルあたりの量で混合し、反応溶液とする。この混合液２０μｌを０．２ｍｌの専用チューブに分注した。これらに、陽性対照としてプラスミドＤＮＡおよびヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡ、または糞便から分離したヨーネ菌野外株から抽出したＤＮＡを５μｌ添加し試料として反応させた。また、陰性対照として、滅菌水５μｌを添加し反応させた。各反応試料 ２５μｌについて、６５℃で９０～１２０分間ＬＡＭＰ反応を行い、３％アガロースゲルによる電気泳動により増幅産物を確認した。

【００４７】

４．結果

図１に示すように、挿入配列ＩＳ９００のプラスミドＤＮＡおよびヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡは同様のラダー状のバンドが検出された。また、野外株でも同様のラダー状のバンドが検出されたことから、ヨーネ菌特異的なＤＮＡの増幅が見られたと考えられる。この時、陰性対照の増幅はみられなかった。したがって、ヨーネ菌野外株は、ＬＡＭＰ法によりＤＮＡは増幅され、その泳動像はＩＳ９００のプラスミドＤＮＡおよびヨーネ菌標準株のＤＮＡと同じであり、ヨーネ菌は特異的に検出できることが明らかとなった。

【００４８】

実施例２：ＰＣＲ法との比較

表１に、挿入配列ＩＳ９００のプラスミドＤＮＡにおけるヨーネ菌遺伝子のＬＡＭＰ法およびＰＣＲ法による検出限界を示す。また、表２に、ヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡにおけるヨーネ菌遺伝子のＬＡＭＰ法およびＰＣＲ法による検出限界を示す。プラスミドＤＮＡの場合、ｎｅｓｔｅｄ ＰＣＲは０．００５ｐｇ／μｌまで検出され、ＬＡＭＰ法では、プライマーセットＡが０．００５ｐｇ／μｌ、プライマーセットＢが０．０５ｐｇ／μｌ、プライマーセットＣが０．００５ｐｇ／μｌまで検出された。さらに、現実のヨーネ菌ゲノムＤＮＡであるヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡの場合、プライマーセットＡ及びＣを用いたＬＡＭＰ法では０．５ｐｇ／μｌまで検出され、ｎｅｓｔｅｄ ＰＣＲの１ｐｇ／μｌより検出感度は高かった。また、プライマーセットＢを用いたＬＡＭＰ法の検出限界は１０ｐｇ／μｌで、ＰＣＲ法の検出限界の１００ｐｇ／μｌより感度が高かった。

【００４９】

【表１】

プラスミドＤＮＡにおけるヨーネ菌遺伝子の検出限界

プラスミドＤＮＡ量（pg/ml）	100	10	1	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001
プライマーＡによるＬＡＭＰ	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
プライマーＢによるＬＡＭＰ	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
プライマーＣによるＬＡＭＰ	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
Nested PCR	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－

【００５０】

【表２】

ヨーネ菌標準株ＤＮＡにおけるヨーネ菌遺伝子の検出限界

ヨーネ菌標準株のＤＮＡ量 (pg/ml)	100	10	5	1	0.5	0.1
プライマーＡによるＬＡＭＰ	＋	＋	＋	＋	＋	－
プライマーＢによるＬＡＭＰ	＋	＋	－	－	－	－
プライマーＣによるＬＡＭＰ	＋	＋	＋	＋	＋	－
ＰＣＲ	＋	－	－	－	－	－
NestedＰＣＲ	＋	＋	＋	＋	－	－

【００５１】

実施例３：プライマーの特異性

（類似の他のマイコバクテリウム属菌における反応）

表３に、ＬＡＭＰ法とｎｅｓｔｅｄＰＣＲ法との検出結果の比較を示す。ＮｅｓｔｅｄＰＣＲ法での検出結果は、ヨーネ菌標準株以外全て陰性であり、ＬＡＭＰ法でも、プライマーセットＢ、Ｃにおいては、ヨーネ菌標準株（Ｍ．ａｖｉｕｍ ｓｕｂｓｐ ｐａｒａｔｂ）以外全て陰性であった。プライマーセットＡは、１７ｎｇ／μｌより高濃度の場合、マイコバクテリウム シュクロフィラセウム菌（Ｍ．ｓｃｒｏｆｕｌａｃｅｕｍ）において増幅がみられたが、０．１ｎｇ／μｌより低濃度では増幅はみられないため、特異性においてはＢ、Ｃよりやや低い傾向であった。したがって、本発明の挿入配列ＩＳ９００に特異的なプライマーセットとして、プライマーセットＡ、Ｂ、Ｃを用いると、ＬＡＭＰ法によるヨーネ菌の検出精度が非常に高いことが確認された。また、ＩＳ９００遺伝子と９５％の相同性を持つマイコバクテリウム２３３３株（Ｅｎｇｌｕｎｄ，Ｓ．，Ｂｏｅｌｓｋｅ，Ｇ．ａｎｄ Ｊｏｈａｎｓｓｏｎ，Ｋ．ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．２０９（２），２６７－２７１（２００２））の挿入配列についても特異性を確認したところ、プライマーセットＡでは１ｐｇ／μｌで、プライマーセットＢでは高濃度ながら１０ｎｇ／μｌで検出された。しかし、プライマーセットＣにおいては１０ｎｇ／μｌでも検出されなかった。

【００５２】

【表３】

ＬＡＭＰ法とnested ＰＣＲ法との検出結果の比較

菌種名	血清型	菌株名	nested PCR	プライマーセットA		プライマーセットB	プライマーセットC
		濃度ng/μl	17<	<0.1	17<	17<	17<
M. avium	1	ATCC15769	-	-	-	-	-
M. avium	2	14141-1395	-	-	-	-	-
M. avium	3	6195	-	-	-	-	-
M. intracellulare	4	13528-1079	-	-	-	-	-
M. intracellulare	5	4443-1237	-	-	-	-	-
M. intracellulare	6	34540	-	-	-	-	-
M. intracellulare	7	Manten 157	-	-	-	-	-
M. intracellulare	8	14658-1686	-	-	-	-	-
M. intracellulare	9	6450-204	-	-	-	-	-
M. intracellulare	10	1602-1965	-	-	-	-	-
M. intracellulare	11	14186-1424	-	-	-	-	-
M. intracellulare	12	P42	-	-	-	-	-
M. intracellulare	13	Chance	-	-	-	-	-
M. intracellulare	14	P39	-	-	-	-	-
M. intracellulare	15	Simpson	-	-	-	-	-
M. intracellulare	16	ATCC15987	-	-	-	-	-
M. intracellulare	17	Comell	-	-	-	-	-
M. intracellulare	18	Melnick	-	-	-	-	-
M. intracellulare	19	Darden	-	-	-	-	-
M. intracellulare	20	P40	-	-	-	-	-
M. avium	1	11907-300	-	-	-	-	-
M. avium	3	128-Germany	-	-	-	-	-
M. intracellulare	19	Darden	-	-	-	-	-
M. intracellulare	20	TMC1419	-	-	-	-	-
M. intracellulare	21	2993	-	-	-	-	-
M. intracellulare	22	5154 O'Conner	-	-	-	-	-
M. intracellulare	23	CDC 1214	-	-	-	-	-
M. intracellulare	24	12645	-	-	-	-	-
M. intracellulare	25	CDC 1195	-	-	-	-	-
M. intracellulare	27	Lane 3081	-	-	-	-	-
M. intracellulare	28	Matthews 9055	-	-	-	-	-
M. scrofulaceum	41	Bridge	-	-	+	-	-
M. scrofulaceum	42	CDC 1198	-	-	+	-	-
M. scrofulaceum	43	Underson	-	-	-	-	-
M. smegmatis		155	-	-	-	-	-
M. avium	?	FKS-1-1	-	-	-	-	-
M. avium	?	FKS10-1	-	-	-	-	-
M. avium	?	FMS-11-1	-	-	-	-	-
M. avium subsp paratb.		ATCC19698	+	+	+	+	+
M. bovis BCG			-	-	-	-	-
M. bovis		牛10	-	-	-	-	-
M. tuberculosis		青山B	-	-	-	-	-
M.kansasii		S-55322	-	-	-	-	-
M.avium	8	Kumamoto	-	-	-	-	-
M.2333			NT	+	NT	+>10ng	-

いずれも　＜１００ng/μlのＤＮＡ濃度

【００５３】

実施例４：ＬＡＭＰ法の吸光度（濁度）による測定

（ヨーネ菌およびマイコバクテリウム　シュクロフィラセウム菌におけるＬＡＭＰ）

１０倍濃度反応用緩衝液　２．５μｌ、基質溶液　１．４μｌ、Ｂｅｔａｉｎｅ溶液　４μｌおよびプライマーセットＢ、Ｃの各プライマー混合溶液　６．０μｌに、Ｂｓｔ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　１　μｌ、滅菌水　５．１μｌを加えて混合する。この混合溶液　２０μｌを、０．２ｍｌの専用チューブに分注する。これらに、プラスミドＤＮＡおよび菌株から抽出したＤＮＡ５μｌを試料として反応させた。また、陰性対照として、滅菌水５μｌを用いて反応させた。各反応試料　２５μｌについて、６５℃で９０分間ＬＡＭＰ反応を行い、分光光度計を用いて、波長６５０ｎｍでの吸光度（濁度）を反応開始から経時的に観察した。ＬＡＭＰ反応９０分後の吸光度を測定した。

【００５４】
図２に、挿入配列ＩＳ９００のプラスミドＤＮＡ、ヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡおよび抽出ＤＮＡのＬＡＭＰ反応９０分後の吸光度を示した。
図２から明らかなように、プライマーセットＢ、Ｃを用いた挿入配列ＩＳ９００のプラスミドＤＮＡおよびヨーネ菌標準株から抽出したＤＮＡのＬＡＭＰ反応では、吸光度はいずれもおよそ０．５の値を示したのに対し、陰性対照およびマイコバクテリウム　シュクロフィラセウム菌では増幅がみられず、吸光度はおよそ０であった。マイコバクテリウム２３３３株では、プライマーセットＢでは陽性対象より吸光度は低い（およそ０．３程度）であるが反応が見られた。しかしプライマーセットＣでは反応は見られなかった。したがって、ＬＡＭＰ法で増幅を行えば、吸光度によってヨーネ菌を容易に検出でき、また、増幅に伴って生成する濁度は肉眼でも観察できるため、目視によるヨーネ病の簡便な診断が可能であることが確認された。
【００５５】
【発明の効果】
本発明によれば、ヨーネ菌の挿入配列ＩＳ９００上の特異的塩基配列を効率的に増幅することができる。したがって、この増幅法を利用することにより、ヨーネ病の簡便な遺伝子診断が可能となる。すなわち、従来のＰＣＲ法では増幅時間の短縮に限界があり、診断のために電気泳動が必要であったが、本発明の方法は操作が簡便で、極めて単時間に標的塩基配列を増幅でき、迅速なヨーネ病診断を可能とする。しかも、ＬＡＭＰ法副産物によって生じる濁りは、肉眼でも確認できるため、検出限界が非常に高いという利点も有する。
【００５６】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 NIAH;
Hokkaido prefecture;
EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

〈120〉 Primers for Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis detecting and the Johne's disease diagnosis by using the primers

〈130〉 P03-0450

〈140〉
〈141〉

〈150〉 JP2002-168696
〈151〉 2002-06-10

〈160〉 34

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

〈210〉 1
〈211〉 1451
〈212〉 DNA
〈213〉 Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis

〈400〉 1
tccttacctt tcttgaaggg tgttcggggc cgtcgcttag gcttcgaatt gcccagggac 60
gtcgggtatg gctttcatgt ggttgctgtg ttggatggcc gaaggagatt ggccgcccgc 120

ggtcccgcga cgactcgacc gctaattgag agatgcgatt ggatcgctgt gtaaggacac 180
gtcggcgtgg tcgtctgctg ggttgatctg gacaatgacg gttacggagg tggttgtggc 240
acaacctgtc tgggcgggcg tggacgccgg taaggccgac cattactgca tggttattaa 300
cgacgacgcg cagcgattgc tctcgcagcg ggtggccaac gacgaggccg cgctgctgga 360
gttgattgcg gcggtgacga cgttggccga tggaggcgag gtcacgtggg cgatcgacct 420
caacgccggc ggcgccgcgt tgctgatcgc cttgctcatc gctgccgggc agcggctgct 480
ttatattccc gggcgcacgg tccatcacgc cgcgggtagt taccgcggcg aaggcaagac 540
cgacgccaaa gacgctgcga tcatcgccga tcaggcccgg atgcgccacg acttgcagcc 600
tctgcgcgcc ggcgatgaca tcgcagtcga gctgcgcatc ctgaccagcc gacgttccga 660
tctggtggct gatcggaccc gggcgatcga accgaatgcg cgcccagctg ctggaatact 720
ttcggcgctg gaacgcgcct tcgactacaa caagagccgt gccgcgctga tcctgcttac 780
tggctaccaa actcccgacg cgctgcgcag cgccggtggc gctcgagtag ccgcgttctt 840
gcgtaaacgc aaggcccgca acgccgatac cgtcgcagcc accgcgctgc aggccgctaa 900
cgcccaacac agcatcgtgc ccggccaaca actggcggcc actgtggtgg cccgcctggc 960
caaggaggtg atggccctcg acaccgaaat cggcgacacc gacgcgatga tcgaggagcg 1020
atttcgccgc caccgccacg ccgaaatcat cctgagcatg cccggattcg gcgtcatcct 1080
gggcgctgag ttcctcgccg ccaccggcgg ggacatggcc gcattcgcct ccgccgaccg 1140
cctcgccggc gtcgccggcc tggcgccggt accacgagat tccggccgca tcagcggaaa 1200
cctcaaacgc ccccgacgct acgaccggcg cctgctgcgc gcctgctacc tgtcggcctt 1260
ggtcagcatc cgcaccgacc cctcctcgcg cacctactac gaccgaaaac gcaccgaagg 1320
aaaacgccac acccaagccg tcctcgccct ggcccgccgc cgcctcaacg tcctgtgggc 1380
catgctgcgc gaccacgctg tctaccaccc cgcaaccact accgcggcgg cttgacaacg 1440
tcattgagaa t 1451

〈210〉 2
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 2
gacgactcga ccgctaattg a 21

〈210〉 3
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 3
gttggatggc cgaaggagat 20

〈210〉 4
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 4

gggtatggct ttcatgtggt 20

〈210〉 5
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 5
tgcgattgga tcgctgtgta 20

〈210〉 6
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 6
gtctgctggg ttgatctgga 20

〈210〉 7
〈211〉 19

〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 7
aatgacggtt acggaggtg 19

〈210〉 8
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 8
tcgagctgcg catcctgac 19

〈210〉 9
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 9
ccacgacttg cagcctctg 19

〈210〉 10
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 10
cgatcatcgc cgatcagg 18

〈210〉 11
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 11
cgatcgaacc gaatgcgcg 19

〈210〉 12
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 12
ccttcgacta caacaagagc c 21

〈210〉 13
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 13
gctgatcctg cttactggc 19

〈210〉 14
〈211〉 41
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 14
tcaattagcg gtcgagtcgt cgttggatgg ccgaaggaga t 41

〈210〉 15
〈211〉 40
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 15
tgcgattgga tcgctgtgta tccagatcaa cccagcagac 40

〈210〉 16
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 16
cacctccgta accgtcatt 19

〈210〉 17
〈211〉 38
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 17
gtcaggatgc gcagctcgac cacgacttgc agcctctg 38

〈210〉 18
〈211〉 40
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 18
cgatcgaacc gaatgcgcgg gctcttgttg tagtcgaagg 40

〈210〉 19
〈211〉 19
〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 19

gccagtaagc aggatcagc 19

〈210〉 20

〈211〉 22

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 20

gcgttgctga tcgccttgct ca 22

〈210〉 21

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 21
gccgatggag gcgaggtc 18

〈210〉 22
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 22
ttgattgcgg cggtgac 17

〈210〉 23
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 23
ggctgcttta tattcccggg c 21

〈210〉 24

〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 24
aagaccgacg ccaaagacg 19

〈210〉 25
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 25
tcatcgccga tcaggcc 17

〈210〉 26
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 26
gcgccggcga tgacatcgca 20

〈210〉 27
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 27
ctggaatact ttcggcgctg 20

〈210〉 28
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 28
atcgacctca acgccgg 17

〈210〉 29
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 29
ggtagttacc gcggcga 17

〈210〉 30
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 30
tgcgatgtca tcgccggcgc 20

〈210〉 31
〈211〉 40
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 31
tgagcaaggc gatcagcaac gcgccgatgg aggcgaggtc 40

〈210〉 32
〈211〉 40
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 32
ggctgcttta tattcccggg ccgtctttgg cgtcggtctt 40

〈210〉 33
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 33

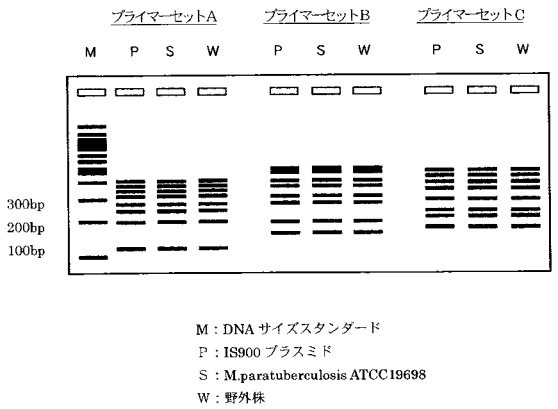
ggcctgatcg gcgatga 17

〈210〉 34
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

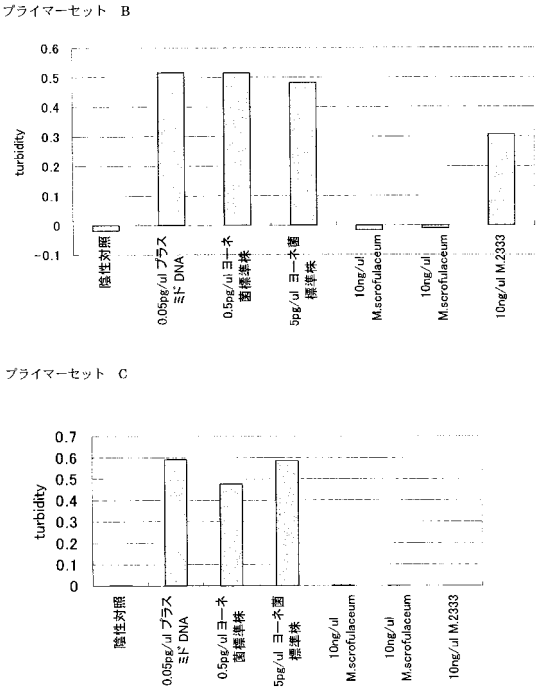
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 34
ccggcgttga ggtcgat 17

【配列表フリーテキスト】
配列番号２～３４：　人工配列の説明：プライマー
【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、ヨーネ菌野外株によるＬＡＭＰ反応結果を示す。
【図２】図２は、吸光度によるＬＡＭＰ反応測定結果を示す。
【図３】図３は、ヨーネ菌特異的配列（ＩＳ９００）プライマー設計概念図である。
【図１】



【図２】



【図３】

ヨーネ菌特異的配列（ＩＳ９００）　プライマー設計概念図

1 tccttacctt tcttgaaggg tgttcggggc cgtcgcttag gcttcgaatt gcccagggac
F3（Seq4） F2（Seq3）
61 gtcgggtatg gcttcatgtggttgctgtg ttggatggcc gaaggagatt ggccgcccgc
F1（Seq2） R1c（Seq5）
121 ggtcccgcga cgactggacc gctaattgag agatgcgatcgatcgctgtgtgtaaggacac
R2c（Seq6） R3c（Seq7）
181 gtcggcgtgg tcgtctgcrdrgttgatctctgac aatgacgctttacggaggctggttgtggc

241 acaacctgtc tgggcgggcg tggacgccgg taaggccgac cattactgca tggttattaa

301 cgacgacgcg cagcgattgc tctcgcagcg ggtggccaac gacgaggccg cgctgctgga
F3（Seq22） F2（Seq21） Loop-F 設定領域
361 gttgattgcg gcggtgacga cgttggccga tggaggcgag gtgacgtggg cgatcgacct
（Seq28） F1（Seq20） R1c（Seq23）
421 caacgccggc ggcgccgcgt tgctgatcgc cttgctcatc gctgccgggc agcgactgct
Loop-R 設定領域（Seq29）
481 ttatattccc gggcgcacgg tccatcacgc cgcgggtagt taccgcggcg aaggcaagac
R2c（Seq24） R3c（Seq25） F2（Seq9）
541 cgacgccaaa gacgctgcga tcatcgccga tcaggcccgg atgcgccacgactctgaagcc
F3;R3c と一部重複（Seq10）
cgaatcatcdccgatcadg
Loop-F 設定領域(Seq26) F1（Seq８）
601 tctgcgcgcc ggcgatgaca tcgcagtcgacgctcgcatcctgacagcc gacgttccga
R1c（Seq11） Loop-R 設定領域
661 tctggtggct gatcggaccc gggtcgatcga accgaatgcg cgcccagctg ctggaatact
（Seq27） R2c（Seq12） R3c（Seq13）
721 ttcggcgctg gaacgcgcctcgactacatccaagagccgt gccgcgctgaatcctgctac

781 tggtaccaa actcccgacg cgctgcgcag cgccggtggc gctcgagtag ccgcgttctt
841 gcgtaaacgc aaggcccgca acgccgatac cgtcgcagcc accgcgctgc aggccgctaa
901 cgcccaacac agcatcgtgc ccggccaaca actggcggcc actgtggtgg cccgcctggc
961 caaggaggtg atggccctcg acaccgaaat cggcgacacc gacgcgatga tcgaggagcg
1201 cctcaaacgc ccccgacgct acgaccggcg cctgctgcgc gcctgctacc tgtcggcctt
1261 ggtcagcatc cgcaccgacc cctcctcgcg cacctactac gaccgaaaac gcaccgaagg
1321 aaaacgccac acccaagccg tcctcgccct ggcccgccgc cgcctcaacg tcctgtgggc
1381 catgctgcgc gaccacgctg tctaccaccc cgcaaccact accgcggcggcttgacaacg
1441 tcattgagaa t

フロントページの続き

(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷　優子
(72)発明者　陰山　聡一
北海道上川郡新得町字新得西５線３９番地　北海道立畜産試験場内
(72)発明者　澤井　健
北海道上川郡新得町字新得西５線３９番地　北海道立畜産試験場内
(72)発明者　繪野澤　真樹
北海道上川郡新得町字新得西５線３９番地　北海道立畜産試験場内
(72)発明者　尾上　貞雄
北海道上川郡新得町字新得西５線３９番地　北海道立畜産試験場内
(72)発明者　渡辺　恵子
栃木県大田原市下石上１３８１－３　栄研化学株式会社那須工場内
(72)発明者　森　康行
茨城県つくば市要１－２
(72)発明者　吉原　一浩
千葉県柏市篠籠田１００３－１６
(72)発明者　宗田　吉広
茨城県つくば市吾妻２－１１－８０７－７０７
(72)発明者　横溝　祐一
茨城県つくば市並木４－９１９－１０３

Ｆターム(参考)　4B024　AA11　CA01　HA20
4B063　QA01　QA18　QQ03　QQ06　QQ43　QR07　QR32　QR42　QR62　QR66
QS24　QS36　QX02