

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-269172
(P2001-269172A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 6 3
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		C 1 2 Q 1/68	A
5/10		C 1 2 R 1:91)	

審査請求 有 請求項の数13 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-84213(P2000-84213)

(22) 出願日 平成12年3月24日 (2000.3.24)

(71) 出願人 591025303

農林水産省果樹試験場長
茨城県つくば市藤本2-1

(72) 発明者 中原 健二

秋田県南秋田郡大瀧村字西2丁目4番地17

(72) 発明者 吉田 幸二

岩手県盛岡市北松園2丁目11番9号

(72) 発明者 北川 良親

秋田県秋田市下北手松崎字大巻26-75

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なcDNAサブトラクション法

(57) 【要約】

【解決手段】 ある生物組織(テスト)と別の生物組織(ドライバ)由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅する方法であって、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相同的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする前記方法を提供する。

【効果】 本発明により、広範の機能又は形質を示す細胞組織に特異的に発現する遺伝子や病原体のRNA由来の部分配列を有する核酸を単離・増幅することが可能となり、さらに、これらをクローニングすることが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ある生物組織（テスト）と別の生物組織（ドライバ）由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅する方法であって、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相動的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする前記方法。

【請求項2】 以下の工程：

（A）テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型として、テストの抽出RNAに相補若しくは相同な任意の部分塩基配列を含む一本鎖核酸、及びドライバの抽出RNAに相同若しくは相補な任意の部分塩基配列を含む一本鎖核酸を増幅する工程；

（B）テスト由来の一本鎖核酸と過剰量のドライバ由来の一本鎖核酸との間でハイブリダイゼーションを行って、二本鎖を形成した核酸を除去する工程；及び

（C）前記（B）の工程においてハイブリダイゼーションされなかった一本鎖核酸に相同又は相補な一本鎖核酸を増幅する工程；を含む請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記一本鎖核酸が一本鎖RNAである請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記（A）及び（C）の工程が、任意の複数の塩基配列からなる混合プライマーのペアを用いるNASBAによって一本鎖RNAを増幅することをを含む請求項3記載の方法。

【請求項5】 以下の工程：

（D）前記（C）の工程で増幅される一本鎖核酸を鋳型として、二本鎖DNAを増幅する工程；

をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項6】 ある生物組織（テスト）と別の生物組織（ドライバ）由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含むDNAをクローニングする方法であって、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相動的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする前記方法。

【請求項7】 以下の工程：

（A）テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型として、テストの抽出RNAに相補若しくは相同な任意の部分塩基配列を含む一本鎖核酸、及びドライバの抽出RNAに相同若しくは相補な任意の部分塩基配列を含む一本鎖核酸を増幅する工程；

（B）テスト由来の一本鎖核酸と過剰量のドライバ由来の一本鎖核酸との間でハイブリダイゼーションを行って、二本鎖を形成した核酸を除去する工程；

（C）前記（B）の工程においてハイブリダイゼーションされなかった一本鎖核酸に相同又は相補な一本鎖核酸

を増幅する工程；

（D）前記（C）の工程で増幅される一本鎖核酸を鋳型として、二本鎖DNAを増幅する工程；及び

（E）前記（D）の工程で増幅される二本鎖DNAをベクター中に組み込み、得られる組換えベクターを用いて宿主を形質転換する工程；

を含む請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記一本鎖核酸が一本鎖RNAである請求項6又は7記載の方法。

【請求項9】 前記（A）及び（C）の工程が、任意の複数の塩基配列からなる混合プライマーのペアを用いるNASBAによって一本鎖RNAを増幅することをを含む請求項8記載の方法。

【請求項10】 以下のプライマーペア：

（A）（i）任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに（ii）任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型としてそれぞれの任意の部分に相補な一本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

（B）（i）前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに（ii）前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト由来の相補的一本鎖RNAを鋳型として該RNAに相動的な一本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

（C）（i）前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー；並びに（ii）前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、ドライバ由来の相補的一本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な一本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

（D）（i）前記第3のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；及び（ii）前記第1の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、一本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な一本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア、又は（i）前記第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；及び（ii）前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、一本鎖RNAを鋳型として該RNAに相動的な一本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；を含む、テストとドライバ由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核

酸を単離及び増幅するためのプライマーセット。

【請求項 1 1】 前記第 1 の混合オリゴヌクレオチドが配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 2 の混合オリゴヌクレオチドが配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 3 のオリゴヌクレオチドが配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである請求項 1 0 記載のプライマーセット。

【請求項 1 2】 以下のプライマーペア：

(A) (i) 任意の複数の塩基配列からなる第 1 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された T 7 プロモータからなるプライマー：並びに (ii) 任意の複数の塩基配列からなる第 2 の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー：からなる、テスト及びドライバから抽出した RNA を鋳型としてそれぞれの任意の部分に相補的な 1 本鎖 RNA を増幅するための NASBA 用プライマーペア；

(B) (i) 前記第 1 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された任意の 1 種の塩基配列からなる第 4 のオリゴヌクレオチドからなるプライマー：並びに (ii) 前記第 2 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された T 7 プロモータからなるプライマー：からなる、テスト由来の相補的 1 本鎖 RNA を鋳型として該 RNA に相補的な 1 本鎖 RNA を増幅するための NASBA 用プライマーペア；

(C) (i) 前記第 1 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された T 7 プロモータからなるプライマー：並びに (ii) 前記第 2 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加されたオリゴ d T からなるプライマー：からなる、ドライバ由来の相補的 1 本鎖 RNA を鋳型として該 RNA に相補的な 1 本鎖 RNA を増幅するための NASBA 用プライマーペア；

(D) (i) 前記第 4 のオリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された T 7 プロモータからなるプライマー：及び (ii) 前記第 2 の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー：からなる、1 本鎖 RNA を鋳型として該 RNA に相補的な 1 本鎖 RNA を増幅するための NASBA 用プライマーペア；又は (i) 前記第 4 のオリゴヌクレオチドからなるプライマー：及び (ii) 前記第 2 の混合オリゴヌクレオチド及びその 5' 末端に付加された T 7 プロモータからなるプライマー：からなる、1 本鎖 RNA を鋳型として該 RNA に相補的な 1 本鎖 RNA を増幅するための NASBA 用プライマーペア；を含む、テストとドライバ由来の mRNA を含む RNA において、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅するためのプライマーセット。

【請求項 1 3】 前記第 1 の混合オリゴヌクレオチドが配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 2 の混合オリゴヌクレオチドが配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド

であり、前記第 4 のオリゴヌクレオチドが配列番号 7 で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである請求項 1 2 記載のプライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は任意の組織に特異に存在する RNA の部分配列の単離及び増幅に関する。詳しくは、任意の生物機能・形質の異なる細胞及び組織間において、その機能若しくは形質を示す細胞若しくは組織に特異に存在する RNA 断片の単離及び増幅に関する。

【0002】

【従来の技術】組織特異的に発現する遺伝子を濃縮してクローニングする方法として、cDNA サブトラクション法が知られる。多細胞生物は、同一の遺伝情報を持ちながら、その発現様式の違いにより、別の機能・形質を示す細胞へと分化していると考えられている。組織特異的に発現する遺伝子を単離することは、その機能若しくは形質発現の機構解明のために重要な第一歩となるばかりでなく、それらの遺伝子は、その機能・形質を司る重要な作用を持つ有用な機能タンパク質である可能性があり、さまざまな産業上の利用が期待できる。

【0003】cDNA サブトラクション法は、機能・形質の異なる細胞組織間で発現量の違う遺伝子の部分的な cDNA を濃縮してクローニングする方法であり、該方法では、まず、ある機能・形質を示す組織（以下「テスト (tester)」という。）と、それらを示さない若しくはそれらとは違う組織（以下「ドライバ (driver)」という。）から mRNA を抽出して、2 本鎖 cDNA の合成を行う。次いで、テスト及びドライバ由来の cDNA をそれぞれ別々の（異なった切断面を生じる）制限酵素で切断し、両 cDNA を熱変性等で 1 本鎖に解離させた後に、テスト由来の cDNA に過剰量のドライバ由来の cDNA を加えて 2 本鎖を再形成させる（サブトラクティブハイブリダイゼーション）。このとき、テスト由来の cDNA 群において、ドライバのそれと共通の配列を有する、すなわち、テストとドライバの両組織で発現している遺伝子由来の cDNA は、過剰量加えたドライバ由来の cDNA とハイブリッドを形成するが、テストでのみ発現している遺伝子由来の cDNA は、もとの 2 本鎖を形成する。その後、テスト由来の cDNA と同じ制限酵素で切断したプラスミドベクターにライゲーションすることにより、テスト由来の cDNA において、元と同じ 2 本鎖を形成した cDNA だけがクローニングされる。

【0004】しかし、上記の方法では、テストとドライバの双方において発現する遺伝子由来の cDNA であっても、その一部はもとの 2 本鎖を形成し、その結果、両組織で発現している遺伝子、すなわち、その機能・形質の発現にはあまり関わりのない遺伝子（以下、「非特異

遺伝子」という。)のcDNAもクローニングされることになる。従って、上記の方法では、テストで特異的に発現する遺伝子(以下「特異遺伝子」という。)のcDNAを濃縮することはできるが、単離してクローニングすることはできない。

【0005】このような非特異遺伝子のcDNAのクローニングを回避するために、ドライバ由来のcDNAをより過剰に加えることが考えられるが、その場合、特異遺伝子がもとの2本鎖を形成する可能性を低くすることとなり、特に、少量しか発現していない特異遺伝子の単離が困難となる。

【0006】ところで、特定のDNA断片を指数関数的に増幅する方法としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法がある。このPCRを工程に加えたりプレゼンテーション・ディフェレンス・アナリシス(RDA)法(Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, M., Science 259 (1993) p.946)が報告され、さらに、その改良法(Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A. and Sverdlov, E.D., Analytical Biochemistry 240 (1996) p.90)が報告された。これは、上記のサブトラクティブハイブリダイゼーションを行い、テスト由来で元の2本鎖を形成した分子だけがPCRにより指数関数的に増幅されることを特徴とする方法で、その利点としては、最初の過程でcDNAの合成に用いるmRNAの量が少なくすむこと、特異遺伝子を増幅して単離することから、少量しか発現していない特異遺伝子をクローニングできる可能性が従来法に比べて高まったことが挙げられる。

【0007】しかし、サブトラクティブハイブリダイゼーションを2本鎖DNAで行うために非特異遺伝子の増幅を回避できず、従って、特異遺伝子と非特異遺伝子を完全に分離できないという欠点は、従来法と変わらない。一方、特定のRNA断片を指数関数的に増幅する方法として、Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)法が考案された(Davey and Malek, 1989, 欧州特許第0329822号公報)。NASBA法は、PCR法と比較して、いくつかの点で違う特徴がある。その特徴の1つに、PCRがDNAを鋳型にして2本鎖DNAを増幅するのに対し、NASBAは、基本的に1本鎖RNAを鋳型にそれに相補的な1本鎖RNAを増幅できるという点がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ある機能・形質を示す細胞組織に特異的に発現する遺伝子が低発現量のものであってもよく、かつ、非特異的なものと完全に分離することのできる、前記特異的遺伝子の塩基配列を含む核酸の効果的な単離及び増幅方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、テスト及びドライバ組織から抽出した少量のRNAから、部分的な一本鎖の相補RNA(テスト由来)と相同RNA(ドライバ由来)をNASBA法により増幅し、テストの相補RNAと過剰量のドライバの相同RNA間でハイブリダイゼーションを行うことにより、ドライバの相同RNAに相補性をもつテストの相補RNAを全て2本鎖のハイブリッドとし、その後にドライバの相同RNAを取り除くことにより、テストに特異的に存在するRNAの相補RNAを単離できることを見出し、本発明に至った。

【0010】すなわち、本発明は、ある生物組織(テスト)と別の生物組織(ドライバ)由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅する方法であって、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相同的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする前記方法を提供する。

【0011】上記方法は、好ましくは、以下の工程：

(A)テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型として、テストの抽出RNAに相補若しくは相同な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸、及びドライバの抽出RNAに相同若しくは相補な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸を増幅する工程；

【0012】(B)テスト由来の1本鎖核酸と過剰量のドライバ由来の1本鎖核酸との間でハイブリダイゼーションを行って、2本鎖を形成した核酸を除去する工程；及び(C)前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖核酸に相同又は相補な1本鎖核酸を増幅する工程；を含む。ここで、前記1本鎖核酸は、好ましくは1本鎖RNAである。

【0013】前記(A)及び(C)の工程は、好ましくは、任意の複数の塩基配列からなる混合プライマーのペアを用いるNASBAによって1本鎖RNAを増幅することを含む。前記(A)の工程は、好ましくは、以下の工程：

(a)テスト由来の抽出RNA及びドライバ由来の抽出RNAをそれぞれ鋳型として、(i)任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii)任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、それぞれの抽出RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0014】(b)上記工程(a)で得られるテスト由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加さ

れた任意の1種の塩基配列からなる第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0015】(c)上記工程(a)で得られるドライバ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー、並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；を含む。

【0016】この場合において、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i)前記第3のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。あるいは、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i)前記第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー、並びに(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。

【0017】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0018】あるいは、前記(A)の工程は、好ましくは、以下の工程：

(a) テスタ由来の抽出RNA及びドライバ由来の抽出RNAをそれぞれ鋳型として、(i) 任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、それぞれの抽出RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0019】(b) 上記工程(a)で得られるテスト由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第4のオリゴヌクレオチ

ドからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0020】(c) 上記工程(a)で得られるドライバ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；を含む。

【0021】この場合において、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第4のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。あるいは、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。

【0022】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第4のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0023】本発明の上記方法は、好ましくは、以下の工程：

(D) 前記(C)の工程で増幅される1本鎖核酸を鋳型として、2本鎖DNAを増幅する工程；をさらに含む。さらに、本発明は、ある生物組織(テスト)と別の生物組織(ドライバ)由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含むDNAをクローニングする方法であって、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする前記方法を提供する。

【0024】上記方法は、好ましくは、以下の工程：

(A) テスタ及びドライバから抽出したRNAを鋳型として、テスタの抽出RNAに相補若しくは相同な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸、及びドライバの抽出RNAに相同若しくは相補な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸を増幅する工程；

(B) テスタ由来の1本鎖核酸と過剰量のドライバ由来の1本鎖核酸との間でハイブリダイゼーションを行って、2本鎖を形成した核酸を除去する工程；

(C) 前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖核酸に相同又は相補な1本鎖核酸を増幅する工程；

【0025】(D) 前記(C)の工程で増幅される1本鎖核酸を鋳型として、2本鎖DNAを増幅する工程；及び

(E) 前記(D)の工程で増幅される2本鎖DNAをベクター中に組み込み、得られる組換えベクターを用いて宿主を形質転換する工程；

を含む。ここで、前記1本鎖核酸は、好ましくは、1本鎖RNAである。前記(A)及び(C)の工程は、好ましくは、任意の複数の塩基配列からなる混合プライマーのペアを用いるNASBAによって1本鎖RNAを増幅することを含む。

【0026】前記(A)の工程は、好ましくは、以下の工程：

(a) テスタ由来の抽出RNA及びドライバ由来の抽出RNAをそれぞれ鋳型として、(i) 任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、それぞれの抽出RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0027】(b) 上記工程(a)で得られるテスタ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0028】(c) 上記工程(a)で得られるドライバ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；を含む。

【0029】この場合において、前記(C)の工程は、

好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、

(i) 前記第3のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 前記第1の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。あるいは、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー、並びに(ii) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。

【0030】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0031】あるいは、前記(A)の工程は、好ましくは、以下の工程：

(a) テスタ由来の抽出RNA及びドライバ由来の抽出RNAをそれぞれ鋳型として、(i) 任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、それぞれの抽出RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0032】(b) 上記工程(a)で得られるテスタ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；

【0033】(c) 上記工程(a)で得られるドライバ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として、(i) 前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii) 前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記相補的1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程；を含む。

【0034】この場合において、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、

(i)前記第4のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー、並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。あるいは、前記(C)の工程は、好ましくは、前記(B)の工程においてハイブリダイゼーションされなかった1本鎖RNAを鋳型として、(i)前記第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー、並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマーを用いてNASBAを行うことにより、前記1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する工程を含む。

【0035】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第4のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0036】さらに、本発明は、以下のプライマーペア：

(A)(i)任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型としてそれぞれの任意の部分に相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0037】(B)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト由来の相補的な1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0038】(C)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、ドライバ由来の相補的な1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0039】(D)(i)前記第3のオリゴヌクレオチ

ド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；及び(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア、又は(i)前記第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；及び(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；を含む、テストとドライバ由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅するためのプライマーセットを提供する。

【0040】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0041】さらに、本発明は、以下のプライマーペア：

(A)(i)任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型としてそれぞれの任意の部分に相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0042】(B)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、テスト由来の相補的な1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0043】(C)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー；からなる、ドライバ由来の相補的な1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0044】(D)(i)前記第4のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；及び(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオ

チドからなるプライマー：からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア、又は(i)前記第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー：及び(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー：からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；を含む、テストとドライバ由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅するためのプライマーセットを提供する。

【0045】この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第4のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0046】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の方法

本発明は、ある生物組織(テスト)と別の生物組織(ドライバ)由来のmRNAを含むRNAにおいて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む核酸を単離及び増幅する方法に関し、該方法は、テスト及びドライバの一方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸と、他方に由来するRNAに相補的な一本鎖核酸との間でのハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする。さらに、該方法により単離及び増幅された核酸を用いて、テストに特異的に存在する遺伝子の部分塩基配列を含む2本鎖DNAをクローニングすることができる。

【0047】本発明の方法は、テスト及びドライバ組織からのRNAの抽出、各抽出RNAに対する部分的な1本鎖核酸の増幅、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションによるテストに特異的な1本鎖核酸の単離、単離された1本鎖核酸に相同又は相補な1本鎖核酸の増幅の各工程により行うことが好ましい。以下、これらの工程を分説する。

【0048】(1)テスト及びドライバ組織からのRNAの抽出

テストとドライバの両細胞組織からRNA、好ましくは全RNAを抽出する。生物組織からのRNAの抽出は、当業者に公知の方法を用いて行うことができ、また、市販のキットを用いて行うこともできる。例えば、生物組織からの全RNAの抽出は、液体窒素で凍結後、細胞組織を磨砕し、グアニジウムチオシアネートやフェノール・クロロホルム溶液等で全RNAを抽出してエタノール沈殿等によりこれを回収することにより行うことができ

る。その具体的な操作方法は、Molecular Cloning (Maniatisら、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1982)等に記載されている。

【0049】(2)各抽出RNAに対する部分的な1本鎖核酸の増幅

テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型として、テストの抽出RNAに相補若しくは相同な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸、及びドライバの抽出RNAに相同若しくは相補な任意の部分塩基配列を含む1本鎖核酸を増幅する。ここで、前記1本鎖核酸は、DNAまたはRNAのどちらであってもよいが、好ましくはRNAである。前記1本鎖核酸がRNAである場合には、上記増幅は、例えば、NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) によって行うことができる。

【0050】通常のNASBA法は、特定の塩基配列の増幅を目的に行われる。その場合、目的とする塩基配列の両端の配列に相当する2つのオリゴヌクレオチドプライマーの中で、その5'末端側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列が付加された相補プライマーと標的RNAとのアニーリング、逆転写酵素によるcDNAの合成、前記反応で生じたRNA-DNAのハイブリッドにおけるRNAのRNA分解酵素による分解、前記反応で合成されたcDNAへの相同プライマーのアニーリングと逆転写酵素によるDNA合成、前記反応で生じたRNAポリメラーゼのプロモーター配列の下流に標的配列が続く2本鎖DNAを鋳型にしたRNAポリメラーゼによる相補RNAの大量合成、合成された相補RNAを鋳型として上記一連の反応が繰り返されることにより前記の相補RNAが指数関数的に増幅される。ここで、RNAポリメラーゼとしては、当業者に公知のものを用いることができるが、好ましくはT7 RNAポリメラーゼを用いる。逆転写酵素としては、当業者に公知のものを用いることができるが、好ましくはAMV-RTを用いる。また、RNA分解酵素としては、当業者に公知のものを用いることができるが、好ましくはRNaseHを用いる。その他、各種ヌクレオチド、DTT、MgCl₂、DMSO、KCl溶液、水等、必要となる試薬は、当業者であれば容易に選択することができる。また、反応温度、反応時間等の反応条件も、当業者であれば容易に設定することができる。あるいは、NASBAは、NASBA Amplification Kit (ORGANON TEKNIKA)等の市販のキットを用い、添付の説明書に従って行ってもよい。なお、NASBAの詳細な原理、具体的な操作方法は、例えばMolecular Methods for Virus Detection (Sooknananら、pp. 261-285, Academic Press)に掲載されている。本発明の好ましい実施形態では、本工程において、上記(1)で得られる各抽出RNAから任意の同等の部分相補RNAを増幅するための第1のNASBA、及び該部分的相補RNAから相補又は相同RNAを増幅するための第2のNASBAを行う。

【0051】第1のNASBAは、上記(1)で得られる各抽出RNAから同等的部分的相補RNAを増幅するために、各NASBAを同一のプライマーペアを用いて行う。また、各抽出RNA、すなわち、鑄型にする抽出RNA集団の多様性をできるだけ保存した相補RNAが増幅されるように、プライマーとしては、好ましくは128~256種類の複数の塩基配列からなる混合オリゴヌクレオチドを用いる。但し、該混合ヌクレオチドは、若干の特異性を確保するために3'末端の3塩基は共通の塩基とすることが好ましい。第1のNASBAでは、テスト由来の抽出RNA及びドライバ由来の抽出RNAから同等な部分的相補RNAが得られればよく、特定の領域を標的とするものではないため、プライマーの塩基配列はいかなるものであってもよい。また、プライマーの塩基数は特に制限されないが、好ましくは16塩基以上、より好ましくは23塩基以上とする。ここで、第1のNASBAにおいて用いられる、抽出RNAに相補的なプライマーとして用いることが意図されるオリゴヌクレオチドを「第1の混合オリゴヌクレオチド」、相補的なプライマーとして用いることが意図されるオリゴヌクレオチドを「第2の混合オリゴヌクレオチド」という。第1の混合オリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1で表わされる塩基配列を有するものが挙げられ、第2の混合オリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号4で表わされる塩基配列を有するものが挙げられる。

【0052】さらに、NASBAにおいて使用する相補プライマーは、その5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させておく必要がある。このようなプロモーターはいずれのRNAポリメラーゼに対するものであってもよいが、好ましくはT7RNAポリメラーゼのプロモーター、すなわちT7プロモーターである。従って、第1のNASBAで用いる相補プライマーとしては、例えば、配列番号1で表わされる塩基配列の5'末端にT7プロモーター配列を付加した塩基配列、すなわち、配列番号2で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられ、相同プライマーとしては、例えば、配列番号4で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる(図1中の(1)を参照されたい)。

【0053】このようにして得られる第1のNASBA反応液中には、指数関数的に増幅した相補RNAの他に、その転写の鑄型となった2本鎖DNAと2種類のプライマーが含まれている。これらが次に行う第2のNASBAの反応液に混入すると、再度第1のNASBA産物と同一の相補RNAが増幅する可能性があるため、これらを取り除く必要がある。その方法としては、大腸菌由来のDNA分解酵素(例えば、DNase I)で処理して、ゲル濾過マイクロスピナラム等(例えば、MicroSpin S-400 HR Columns、アマシャムファルマシア社)で、増幅した相補RNAと分離して低分子化したDNA

を取り除くことができる。

【0054】次いで、上記のようにしてテスト及びドライバの両組織から増幅した相補RNAを鑄型として、さらに、それぞれ別々のプライマーを用いた第2のNASBAを行う。第2のNASBAでは、テストからの相補RNAに相補的な1本鎖RNA及びドライバからの相補RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するか(本発明の第1の実施形態)、あるいは、テストからの相補RNAに相補的な1本鎖RNA及びドライバからの相補RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する(本発明の第2の実施形態)。いずれの場合においても、プライマーとしては、第1の混合オリゴヌクレオチドを有するプライマー及び第2の混合オリゴヌクレオチドを有するプライマーを用いる。

【0055】本発明の第1の実施形態では、テストからの相補RNAに相補的な1本鎖RNA及びドライバからの相補RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する。この場合において、前者の増幅のためのNASBAでは、前記第1の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させ、後者の増幅のためのNASBAでは、前記第2の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる。また、前者の増幅のためのNASBAでは、後で行うサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション後にテスト由来のRNAだけが増幅可能となるように、前記第2の混合オリゴヌクレオチドの5'末端に任意の1種の(共通の)オリゴヌクレオチドを付加させる。該オリゴヌクレオチドはいかなる配列を含んでいてもよいが、その塩基数はそれ自体が単独でプライマーとして機能し得る程度とし、好ましくは16塩基~25塩基、より好ましくは約20塩基とする。ここで用いる該オリゴヌクレオチドを「第3のオリゴヌクレオチド」という。第3のオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号7で表わされる塩基配列を有するものが挙げられる。一方、後者の増幅のためのNASBAでは、後で行うサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション後に、ドライバ由来のRNAを取り除くために、前記第1の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にオリゴdTを付加させる。該オリゴdTの塩基数は、特に制限されないが、好ましくは20塩基~50塩基、より好ましくは25塩基~30塩基とする。

【0056】従って、上記の場合には、テストからの相補RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するための第2のNASBAでは、例えば、配列番号2で表わされる塩基配列を有する混合オリゴヌクレオチド及び配列番号6で表わされる塩基配列を有する混合オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる。また、ドライバからの相補RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するための第2のNASBAでは、例えば、配列番号3で表わされる塩基配列を有する混合オリゴヌクレオチド及び配列番号5で

表わされる塩基配列を有する混合オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる(図1中の(2)を参照されたい)。

【0057】本発明の第2の実施形態では、テストからの相補RNAに相補的な1本鎖RNA及びドライバからの相補RNAに相同的な1本鎖RNAを増幅する。この場合において、前者の増幅のためのNASBAでは、前記第2の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させ、後者の増幅のためのNASBAでは、前記第1の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる。また、前者の増幅のためのNASBAでは、後で行うサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション後にテスト由来のRNAだけが増幅可能となるように、前記第1の混合オリゴヌクレオチドの5'末端に任意の1種の(共通の)オリゴヌクレオチドを付加させる。該オリゴヌクレオチドはいかなる配列を含んでいてもよいが、その塩基数はそれ自身が単独でプライマーとして機能し得る程度とし、好ましくは16塩基~25塩基、より好ましくは約20塩基とする。ここで用いる該オリゴヌクレオチドを「第4のオリゴヌクレオチド」という。第4のオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号7で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を有するものが挙げられる。一方、後者の増幅のためのNASBAでは、後で行うサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション後に、ドライバ由来のRNAを取り除くために、前記第2の混合オリゴヌクレオチドの5'末端に上記オリゴdTを付加させる。

【0058】このようにして得られる第2のNASBA反応液中には、指数関数的に増幅した1本鎖RNAの他に、その転写の鋳型となった2本鎖DNAと2種類のプライマーが含まれている。これらが後に行うNASBAの反応液に混入すると、再度上記第2のNASBA産物と同一の1本鎖RNAが増幅する可能性があるため、これらを取り除く必要がある。その方法としては、大腸菌由来のDNA分解酵素(例えば、DNase I)で処理して、ゲル濾過マイクロスピナラム等(例えば、MicroSpin S-400 HR Columns、アマシャムファルマシア社)で、増幅した相補RNAと分離して低分子化したDNAを取り除くことができる。

【0059】(3)サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションによるテストに特異的な1本鎖核酸の単離
上記(2)で増幅したテスト由来の1本鎖核酸とドライバ由来の1本鎖核酸との間で、サブトラクティブハイブリダイゼーションを行う。ここで、前記1本鎖核酸は、DNAまたはRNAのどちらであってもよいが、好ましくはRNAである。

【0060】両1本鎖核酸を熱変性後、急冷して高次構造を解いて解離した1本鎖核酸の状態にする。0.5M程度のナトリウム塩を含む適当な緩衝液、例えば、HEPES緩

衝液中で、テスト由来の1本鎖核酸とその10倍量のドライバ由来の1本鎖核酸を加えて、一晚ハイブリダイゼーションを行う。ここで、ハイブリダイゼーション後の溶液に、さらに、10倍量のドライバ由来の相同RNAを加えてもう一晚ハイブリダイゼーションしてもよく、これにより、より強いストリンジェンシーで特異遺伝子の単離ができる。

【0061】次いで、前記ハイブリダイゼーション溶液において、ドライバ由来の1本鎖核酸を取り除く。これにより、ハイブリッドを形成したテスト由来の1本鎖核酸をも取り除くことができる。ドライバ由来の1本鎖核酸は、上記(2)で述べたようにアデニンの連続配列(ポリA鎖)が付加されている場合には、オリゴdTカラムやオリゴdTビーズ、オリゴdTラテックス等で簡便に取り除くことができる。このような操作は、当業者であれば容易に行うことができる(図2中の(3)を参照されたい)。

【0062】(4)単離された1本鎖核酸に相同又は相補な1本鎖核酸の増幅

上記(3)で得られるテスト由来の1本鎖核酸だけを増幅する。ここで、前記1本鎖核酸は、DNAまたはRNAのどちらであってもよいが、好ましくはRNAである。前記1本鎖核酸がRNAである場合には、該増幅は、NASBA法により行うことができる。

【0063】上記(2)において本発明の第1の実施形態に従った場合には、上記(3)で得られる1本鎖核酸は、3'末端に第3のオリゴヌクレオチドの相補鎖が付加した1本鎖RNAである。従って、この場合には、第1の混合オリゴヌクレオチド及び第3のオリゴヌクレオチドをプライマーを用いるNASBAを行う。ここで、該1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する場合には、前記第3のオリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる。また、該1本鎖RNAに相同的な1本鎖RNAを増幅する場合には、前記第1の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる(図2中の(4)を参照されたい)。

【0064】上記(2)において本発明の第2の実施形態に従った場合には、上記(3)で得られる1本鎖核酸は、3'末端に第4のオリゴヌクレオチドの相補鎖が付加した1本鎖RNAである。従って、この場合には、第2の混合オリゴヌクレオチド及び第4のオリゴヌクレオチドをプライマーを用いるNASBAを行う。ここで、該1本鎖RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅する場合には、前記第4のオリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる。また、該1本鎖RNAに相同的な1本鎖RNAを増幅する場合には、前記第2の混合オリゴヌクレオチドの5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを付加させる。

【0065】但し、上記のいずれのNASBAにおいて

も、最初の熱変性過程を除いて行うことが好ましい。これにより、たとえ前記溶液中にドライバ由来の1本鎖RNAやそれとハイブリッドを形成しているテスト由来の1本鎖RNAが残っていても、これらは増幅されない。なぜなら、ドライバ由来の1本鎖RNAに上記第3又は第4のオリゴヌクレオチドがアニーリングしないことと、2本鎖RNAはNASBA反応の鑄型にならないからである。

【0066】以上のようにして選択的に増幅したRNAは、そのまま標識することにより、cDNAライブラリーやESTライブラリーから特異遺伝子を選抜するためのプローブとして用いることができる。例えば、テストのmRNAから作製したcDNAライブラリーをDNAチップ上に並べ、前記の増幅RNAを標識してプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより、その機能又は形質発現に関与する遺伝子を選抜することができる。また、このような選抜をゲノミックライブラリーについて行うことにより、特異遺伝子のプロモーターを選抜することができる。

【0067】また、本工程により得られる反応溶液には増幅したRNAの転写の鑄型となる2本鎖DNAも含まれていることから、そのまま15サイクル程度のPCRにより単離した特異配列のcDNAを合成し、適当なベクター、例えばプラスミドベクターにつなぎ、該ベクターを用いて大腸菌を形質転換することにより、テストに特異的な遺伝子をクローニングすることができる。このようなクローニングを簡便に行うために、本発明の方法において使用するプライマーに制限酵素認識部位を含ませてもよい。さらに、クローニングしたDNAの塩基配列を調べて特異的プライマーを設計し、3'及び5'RACE法により特異的遺伝子の全長cDNAを得ることができ、また、TAIL-PCRによりそのプロモーター配列を得ることができる。

【0068】上記の一連の工程で使用したオリゴヌクレオチドのセットと同様の効果が期待できる別の塩基配列のオリゴヌクレオチドセット数種を用いて、上記の工程を行うことにより、プライマーの配列による選択性を排除して、特異遺伝子を完全にプロファイルできるであろう。本発明の方法の利用方法についてより詳細に説明すると、以下のとおりである。

【0069】(イ)本発明の方法により増幅した組織特異的なcDNAの塩基配列からプライマーを設計し、テスト由来のmRNAを鑄型にした3'及び5'RACE法により組織特異的な遺伝子の全長cDNAが得られる。

(ロ)組織特異的な増幅RNA又はcDNAをプローブとして、テスト由来のmRNAを鑄型にしたcDNA若しくはESTライブラリーとハイブリダイゼーションを行い遺伝子を選抜する。例えば、DNAチップ(アレイ)において、抽出したmRNAに代わって、上記の増幅RNA又はcDNAをプローブとすると、mRNAのポピ

ュレーションに比べてハウスキッピング遺伝子の部分配列は除かれていることと、組織特異的に発現はしていても微量しか発現していない遺伝子のそれは、逆にNASBAにより指数関数的に増幅していることから、組織特異的な発現遺伝子を強調して選抜できると思われる。

【0070】(ハ)ある機能・形質を示す組織において特異的に働くプロモーターを組織特異的な増幅cDNAの塩基配列からプライマーを設計し、TAIL-PCRを行うか、それらをプローブとしてゲノミックライブラリーとのハイブリダイゼーションから選抜できる。

(ニ)未知病原体を検出できる可能性がある。詳しくは、組織特異的な増幅cDNAをクローニングし、サブトラクティブcDNAライブラリーとする。健全組織から抽出したゲノムDNAと罹病組織から抽出したmRNA群をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、罹病組織のmRNA群にのみ反応したcDNAが未知病原体由来である可能性がある。

【0071】上記の特異遺伝子をin vitroで発現することにより有用な生物機能・形質に関わるタンパク質の生産により医薬や農薬等の物質生産への利用、また、最近の遺伝子導入技術を用いてそれらの遺伝子を導入した形質転換動植物の育成による分子育種や遺伝子治療への利用、生物機能・形質発現機構の解明、未知病原体の同定により医療、農業や環境保全に貢献できる。

【0072】2. 本発明のプライマーセット

本発明は、上記本発明の方法を実施するために使用するプライマーセットに関する。上記第1節(2)における本発明の第1の実施形態に用いる場合には、本発明のプライマーセットは、以下のプライマーペア：

【0073】(A)(i)任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモーターからなるプライマー：並びに(ii)任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー：からなる、テスト及びドライバから抽出したRNAを鑄型としてそれぞれの任意の部分に相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0074】(B)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモーターからなるプライマー：並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー：からなる、テスト由来の相補的1本鎖RNAを鑄型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0075】(C)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー：並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモーターからなるプライマー：からなる、ドライバ由来の相補的1本

鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0076】(D)(i)前記第3のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；及び(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア、又は(i)前記第3のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；及び(ii)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；を含む。この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。上記第1節(2)における本発明の第2の実施形態に用いる場合には、本発明のプライマーセットは、以下のプライマーペア；

【0077】(A)(i)任意の複数の塩基配列からなる第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)任意の複数の塩基配列からなる第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、テスト及びドライバから抽出したRNAを鋳型としてそれぞれの任意の部分に相補な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0078】(B)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加された任意の1種の塩基配列からなる第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、テスト由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0079】(C)(i)前記第1の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；並びに(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたオリゴdTからなるプライマー；からなる、ドライバ由来の相補的1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；

【0080】(D)(i)前記第4のオリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；及び(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチドからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳

型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア、又は(i)前記第4のオリゴヌクレオチドからなるプライマー；及び(ii)前記第2の混合オリゴヌクレオチド及びその5'末端に付加されたT7プロモータからなるプライマー；からなる、1本鎖RNAを鋳型として該RNAに相補的な1本鎖RNAを増幅するためのNASBA用プライマーペア；を含む。この場合において、前記第1の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の混合オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第4のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号7で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。

【0081】さらに、上記のプライマー以外の試薬類を本発明のプライマーセットに加えて、本発明の方法を実施するためのキットとすることもできる。このような試薬類としては、RNA抽出用試薬、NASBA用試薬、電気泳動用試薬などが挙げられるが、これらに限定されない。前記RNA抽出用試薬としては、例えば、粉碎用緩衝液、グアニジウムチオシアン酸塩、フェノール、クロロホルム、SDS、 β -メルカプトエタノール等が挙げられる。前記NASBA用試薬としては、例えば、AMV-RT、RNaseH、T7RNAポリメラーゼ、BSA(ウシ血清アルブミン)、ヌクレオチド混合物、DTT、MgCl₂、72%DMSO、2M KCl、水等が挙げられる。前記電気泳動用試薬としては、例えば、アガロース又はポリアクリルアミドゲル、ローディング緩衝液、臭化エチジウム染色用試薬等が挙げられる。

【0082】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

〔実施例1〕キュウリモザイクウイルスY株(CMV-Y)に感染したトマト葉と、CMV-Yに感染していない健全トマト葉に対して、本発明のcDNAサブトラクション法を行った。なお、以下の実験において、NASBAはNASBA増幅キット(オルガノテクニカ)を用い、添付の説明書に従って行った。

【0083】(1)トマト葉からのRNAの抽出
接種3週間後のキュウリモザイクウイルス(CMV-Y)感染トマトと、同様に育てた健全トマトの葉をそれぞれ100mgずつ採取し、これを液体窒素で凍結し、RNA抽出キットであるRNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)により全RNAを抽出した。

【0084】(2)NASBA法による1本鎖RNAの増幅
上記(1)で得られた各抽出RNA約300ngを鋳型と

し、以下の配列を有するT7DP1及びDP2Ecoをプライマーとして用いるN A S B Aを行った。N A S B Aの温度条件は、65 で5分間、酵素溶液を加えて30 で2分間、さらに41 で90分間とした。

T7DP1 : AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGTCGACAGCRTKTGHA WCDKCCA (配列番号2)

DP2Eco : AGGCGTGAGWGHCTTVMGKRTGA (配列番号4)

【0085】DNase I (RNase free、TaKaRa) 溶液1 μ lを加え、37 で1時間保温してフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈殿により核酸を回収した。滅菌蒸留水100 μ lに溶解させ、ゲル濾過マイクロスピナラム (MicroSpin Columns S-400、アマシャムファルマシア) により、添付の説明書に従って、低分子化したDNAを取り除き、増幅した相補RNAを分画した。

【0086】上記のように得られたCMV感染トマト由来の相補RNA (1 μ l/100 μ l) を鋳型とし、上記T7DP1と以下の配列を有するDP32をプライマーとして用いるN A S B Aにより、3'末端にDP3の配列を付加した相補RNAを41 で増幅した。

DP32: AGAAGGCTGCAGCTGATCTGTAAAGGCGTGAGWGHCTTVMGKRTGA (配列番号6)

DP3: AGAAGGCTGCAGCTGATCTGTA (配列番号7)

【0087】同様にして、上記のように得られた健全トマト由来の相補RNA (1 μ l/100 μ l) を鋳型とし、以下の配列を有するTTTDP1とT7DP2Ecoをプライマーとして用いるN A S B Aにより、抽出RNAに対する相同RNAを増幅した。

TTTDP1: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCGACAGCRTKTGHA WCDKCCA (配列番号3)

T7DP2Eco: GGAATTATAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCGTGAGWGHCTTVMGKRTGA (配列番号5)

【0088】DNase I (RNase free、TaKaRa) 溶液1 μ lを加え、37 で1時間保温してフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈殿により核酸を回収した。滅菌蒸留水100 μ lに溶解させ、ゲル濾過マイクロスピナラム (MicroSpin Columns S-400、アマシャムファルマシア) により、添付の説明書に従って、低分子化したDNAを取り除き、増幅したRNAを分画した。

【0089】(3) サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション

HEPES緩衝液 (100mM HEPES、1M NaCl、0.04mM EDTA) 10 μ lと1 μ l (/100 μ l) のCMV感染トマト由来の相補RNA、9 μ l (/100 μ l) の健全トマト由来の相同RNAを混合し、98 で1.5分間変性後、68 で一晩ハイブリダイゼーションを行った。98 で1.5分間変性した健全トマト由来の相同RNA 10 μ lとHEPES緩衝液10 μ lを前記のハイブリダイゼーション溶液に加え、さらに一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0090】前記のハイブリダイゼーション溶液2 μ lとHEPES緩衝液8 μ l、オリゴdトラテックス懸濁溶液 (ol

igotex-dT30、TaKaRa) 10 μ lを混合し、65 で5分間、37 で10分間保温した。15,000 rpmで3分間遠心分離して上清を採取した。こうして、健全トマト由来のアデニン基の連続配列が付加された相同RNAと、これとハイブリッドを形成したCMV感染トマト由来の相補RNAを取り除き、CMV感染トマトにおける特異RNA由来のRNA断片を単離した。

【0091】(4) 単離した塩基配列のN A S B A及びPCRによる増幅

上記(3)で得られた遠心分離後の上清1 μ lを鋳型とし、オリゴヌクレオチドT7DP3及びDP1SaIをプライマーとして用いるN A S B Aにより、単離した相補RNAから相同RNAを増幅した。温度条件は、65 $^{\circ}$ Cで5分間、酵素混合液を加えて41 $^{\circ}$ Cで30分間とし、その後、この反応液を氷上に置いて反応を停止した。特異遺伝子から増幅した部分的相同RNAを5%未変性アクリルアミドゲルで電気泳動して銀染色した結果を図3に示す。

【0092】図3において、レーンC/Hhは、サブトラクティブハイブリダイゼーションとその後の操作により単離したRNA断片からの増幅産物を示し、レーンCは、CMV感染トマト由来の相補RNAからサブトラクションを経ずに増幅した産物を示す。レーンHとH/Hhは、陰性の対照として健全トマトからの抽出RNAから同様に単離した増幅産物を示す。すなわち、レーンH/Hhは、健全トマトからの抽出RNAから相補RNAを増幅し、同じ健全トマトからの抽出RNAから増幅した相同RNAとの間でサブトラクティブハイブリダイゼーションを行って単離した増幅産物を示し、レーンHは、健全トマト由来の相補RNAからサブトラクションを経ずに増幅した産物を示す。レーンMは、1本鎖RNAのサイズマーカーを示す。

【0093】レーンC/Hhでは、レーンCと比較して、いくつかのバンドが選択的に増幅されている。同じ抽出RNA由来の相補RNAと相同RNAの間でサブトラクティブハイブリダイゼーションしたレーンH/Hhは、予測されたとおり全てのバンドが取り除かれ、ほとんど増幅断片が見られなかった。また、レーンCとレーンHの間で同じ位置に検出されたバンドの中には、共通に発現している遺伝子由来のRNA断片が含まれていると考えられ、もし、そのバンド中の全ての断片が共通に発現している遺伝子由来であれば、サブトラクションにより取り除かれるはずである。実際に、それらのバンドのいくつかは、サブトラクションを経たレーンC/Hhにおいて消失し、感染と健全の両トマトで発現している遺伝子由来のRNAは取り除かれていると考えられた。

【0094】次いで、上記のようにして単離した相補RNAからの増幅産物 (1 μ l/20 μ l) を鋳型としてPCRを行った。該PCRは、増幅集団の各分子種の比率を保つために定量的PCR (18サイクル) とし、DP3 (T7D

P3においてプロモーター配列を除いたもの)とDP1Salをプライマーとして用いた。

DP3: AGAAGGCTGCAGCTGATCTGTA (配列番号7)

DP1Sal: GAGTCGACAGCRTKTGHAWCDKCCA (配列番号1)

なお、上記PCRは、PCR用DNAポリメラーゼ: Ex-Taq (TaKaRa社製)を用い、添付の説明書に従って行った。温度条件は、94 で2分間に続いて、94 で1分間 - 60 で1分間 - 72 で2分間を18サイクル、その後、72 で8分間とした。増幅産物をアガロースゲルで電気泳動した結果を図4に示す。

【0095】図4において、レーンC及びC/Hhは、それぞれ、図3における同じ名称のレーンの増幅産物から増幅したDNA断片を示す。レーンC/2Hhは、一晚サブトラクティブハイブリダイゼーションをした後、さらに健全トマト由来の相同RNAを加えてもう一晚ハイブリダイゼーションした結果で、レーンC//Hhは、オリゴdトラテックス粒子による非特異断片の除去を2回行ったものである。レーンC及びC/Hhは、それぞれ、図3の結果を反映した結果となった。また、レーンC/2Hhにおいて、増幅バンドの選択の強度が増していると思われた。

【0096】レーンC/2HhのcDNAを、プラスミドベクターpGEM-T (プロメガ)に組み込んでクローニングした。40のクローンについて塩基配列を調べた結果、5ク

ローンはCMVの分節ゲノム3における一部分の配列であることがわかった。CMVゲノムは、当然のことながら、感染トマトにのみ存在するのであるから、上記のサブトラクティブハイブリダイゼーション法により感染トマトに特異的なRNAを選択できることがわかった。他のクローンについては、約10種類ほどに分けられ、DDBJ (DNA Data Bank of Japan、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)により相同性探索を行った結果、両組織に存在するリボゾームRNAやトランスファーRNA由来と思われるcDNA断片はなく、またORFと思われるフレームが存在することから何らかの遺伝子をコードするmRNAの一部配列であることが考えられた。その中の1クローンはムギの機能不明のタンパク質をコードする遺伝子と約80%の相同性があった。

【0097】

【発明の効果】本発明により、広範の機能又は形質を示す細胞組織に特異的に発現する遺伝子や病原体のRNA由来の部分配列を有する核酸を単離・増幅することが可能となり、さらに、これらをクローニングすることが可能となる。

【0098】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; Director-General of National Institute of Fruit Tree
Science, Ministry of Agriculture, Forestry and
Fisheries
<;120>; Novel cDNA Subtraction Method
<;130>; P00-0049
<;160>; 8
<;170>; PatentIn Ver. 2.0
<;210>; 1
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<;400>; 1
gagtcgacag crtktghawc dkcca                25
<;210>; 2
<;211>; 50
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide
<;400>; 2
aattctaata cgactcacta taggggagtc gacagcrtkt ghawcdkcca                50

```

<;210>; 3
 <;211>; 50
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide
 <;400>; 3
 tttttttttt tttttttttt tttttttgtc gacagcrtkt ghawcdkcca 50
 <;210>; 4
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide
 <;400>; 4
 aggcgtgagw ghcttvmgkr tga 23
 <;210>; 5
 <;211>; 53
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide
 <;400>; 5
 ggaattataa tacgactcac tatagggaga aggcgtgagw ghcttvmgkr tga 53
 <;210>; 6
 <;211>; 45
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide
 <;400>; 6
 agaaggctgc agctgatctg taaggcgtga gwghcttvmg krtga 45
 <;210>; 7
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized
 oligonucleotide
 <;400>; 7
 agaaggctgc agctgatctg ta 22
 <;210>; 8
 <;211>; 49
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

<220>;

<223>; Description of Artificial Sequence:Synthesized oligonucleotide

<400>; 8

ggaattctaa tacgactcac tatagggaga aggctgcagc tgacatgta

49

【0099】

【配列表フリーテキスト】配列番号1～8：合成オリゴヌクレオチド

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の具体的な実施形態を示す図である。

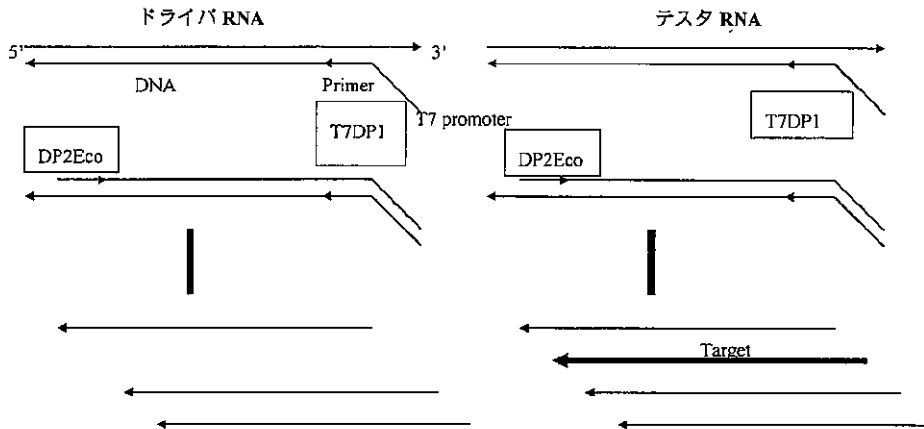
【図2】本発明の具体的な実施形態を示す図である。

【図3】NASBAを用いる本発明の方法により、CMV感染トマト及び健全トマトから増幅されたRNA断片の電気泳動写真である。

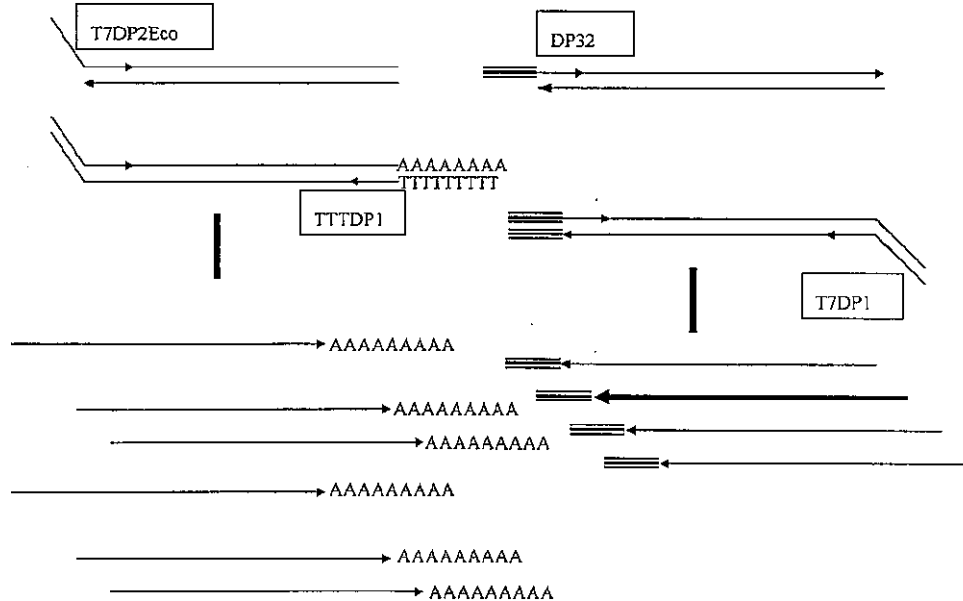
【図4】NASBAを用いる本発明の方法により、CMV感染トマト及び健全トマトから増幅されたRNA断片のcDNAの電気泳動写真である。

【図1】

(1) ドライバ組織及びテスト組織の抽出RNAからのcRNAの増幅 (第1のNASBA)

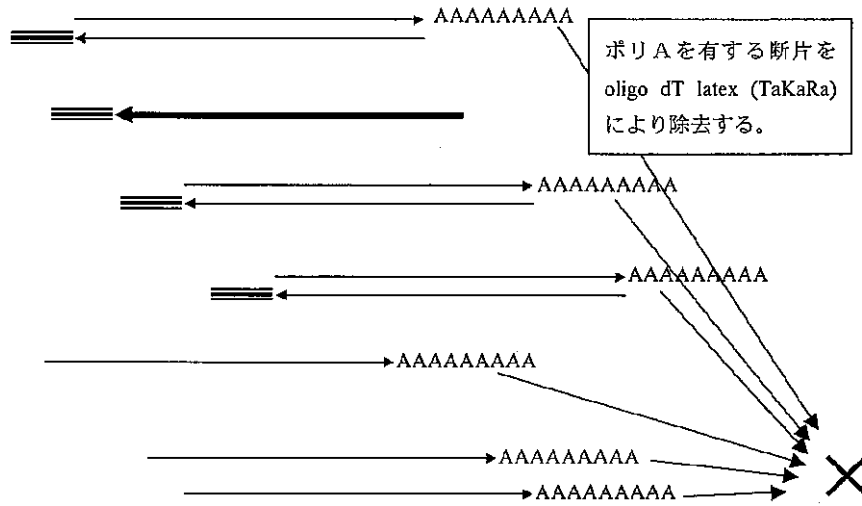


(2) 第1のNASBAにより得られる増幅断片を鋳型とする第2のNASBA

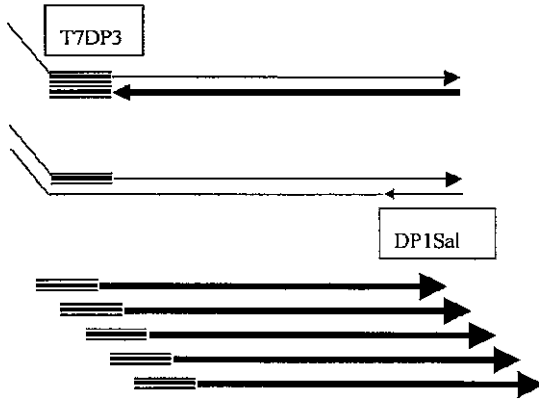


【図2】

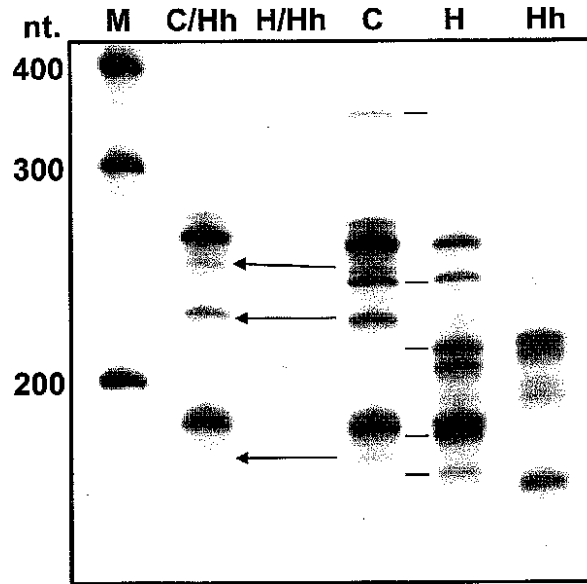
(3) テスタ由来増幅断片と過剰量のドライバ由来増幅断片との間のハイブリダイゼーション



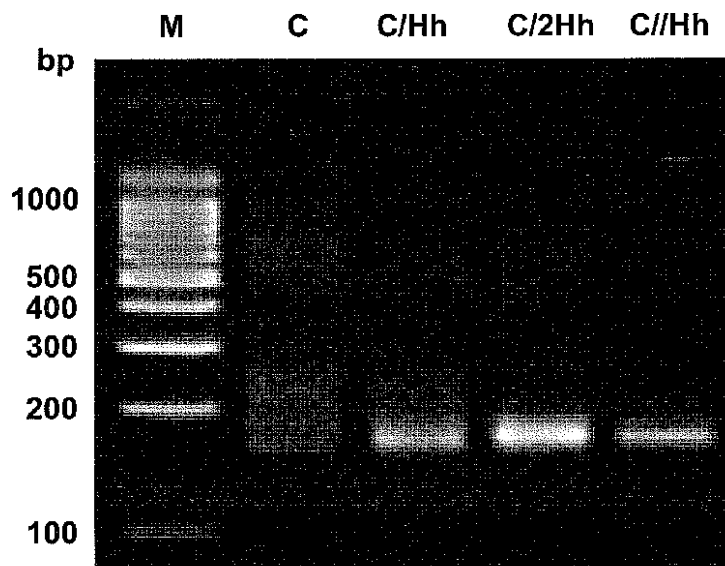
(4) T7DP3 及び DP1Sal を用いるNASBAによる、テスタ由来の残存増幅断片のRNA増幅



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

C 1 2 Q 1/68

//(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

5/00

C 1 2 R 1:91)

テームコード' (参考)

Z N A A

A

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA03 DA01
DA06 EA04 FA02 HA14 HA19
4B063 QA01 QQ04 QQ52 QR36 QR62
QS25
4B065 AA89X AA95Y AB01 BA02
CA24 CA46 CA60