

(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 - 231575**

( P 2 0 0 1 - 2 3 1 5 7 5 A )

(43)公開日 平成13年 8月28日 (2001.8.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/04	4B024
C12Q 1/04		1/68	A 4B063
1/68		C12N 15/00	ZNA A

審査請求 有 請求項の数15 O L (全14頁)

(21)出願番号	特願2000 - 49760 ( P 2000 - 49760 )	(71)出願人	391030284 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長 茨城県つくば市大わし 1 - 2
(22)出願日	平成12年 2月25日 (2000.2.25)	(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4丁目 1番 8号
		(72)発明者	畠山 吉則 茨城県牛久市田宮町144 - 1 G S - カー ムクリーク T 602
		(72)発明者	早坂 昭二 茨城県牛久市中根町ひたち野東73 - 1 - 1
		(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】 マルチプライマー P C R 法による病原生物検出法

(57) 【要約】

【解決手段】 被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法を提供する。

【効果】 本発明により、一個体につき一本のチューブを使用した一回の検査のみで複数の病原を検出することができる。また、各病原生物ごとに異なる大きさの DNA 断片が増幅されるように設定することにより、病原の同定も容易に行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法。

【請求項 2】 検出しようとする前記複数種の微胞子虫が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 検出しようとする前記複数種の微胞子虫が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記混合プライマーが、(i) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 前記混合プライマーが、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 前記被検動物が昆虫である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 被検昆虫体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の昆虫病原生物それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検昆虫体内の該複数種の昆虫病原生物を同時に検出し得る方法。

【請求項 8】 前記昆虫病原生物が微胞子虫である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 検出しようとする前記複数種の微胞子虫が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫である請求項 8 記載の方

法。

【請求項 10】 検出しようとする前記複数種の微胞子虫が、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 前記混合プライマーが、(i) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】 前記混合プライマーが、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD のゲノム DNA の部分領域を増幅し得るプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセット。

【請求項 14】 (i) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(ii) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、(iii) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに (iv) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、請求項 13 記載の微胞子虫検出用プライマーセット。

【請求項 15】 配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 14 記載の微胞子虫検出用プライマーセット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物に感染した病

原生物の検出方法に関し、より詳細には、動物に感染した微胞子虫、又は昆虫に感染した昆虫病原生物の PCR による検出方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】現在、動物に対する病原生物としては、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原生動物など、様々なものが知られている。上記病原生物の一種である微胞子虫類 (Microsporida) は、Microspora (微胞子虫門) に属する原虫であり、原生生物から哺乳動物まで広範な動物細胞に寄生することが知られている。また、寄生した微胞子虫は、その宿主において様々な病害を惹き起こすことが知られている。例えば、微胞子虫の一種であるノセマ・ボンビシス (*Nosema bombycis*) は主として蚕に寄生し、微粒子病を惹き起こす。従って、蚕等の有用動物に微胞子虫が感染しているかどうかをできるだけ迅速に検定する必要がある。

【 0 0 0 3 】従来、一般に、病原が判定できない感染症の場合に病原生物を検出するためには、その症状から病原生物を予想し、それぞれを検出するための検査を個別に行っていた。従って、一個体につき複数の検査を行う必要があったが、このような検査の方法としては、検出対象である病原に対する抗体を用いる方法、病原菌の菌体を培養する方法等が主に用いられるため、大量の個体を検査するためには多くの時間を必要とした。

【 0 0 0 4 】特に、蚕に感染する微胞子虫の検定は、各微胞子虫の孢子に反応する特異的な抗体を用いる方法によって行われるため、熟練の技師が検定を行う必要があった。また、孢子が未形成の場合には検出することができず、さらに感染量の少ない卵の検定は非常に困難であった。そこで、熟練者でなくても簡便に微胞子虫を検出できる方法が開発されれば便利である。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、操作が簡単で、視覚的に検出でき、さらに一回の操作で行うことができる微胞子虫の検出方法を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討を行った結果、マルチプライマー PCR 法において検出対象となる複数の病原生物それぞれに特異的な複数のプライマーペアを用いることにより、これらの病原生物を同時に検出することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 7 】すなわち、本発明は、被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検動物体内の該複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法を提供する。この本発明の方法を、以下「第 1 の本発明の方法」とい

う。

【 0 0 0 8 】上記方法において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、好ましくは、ノセマ・ボンビシス、パイリモルファ sp. M11、パイリモルファ sp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫であり、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス、パイリモルファ sp. M11、パイリモルファ sp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である。

【 0 0 0 9 】前記混合プライマーは、好ましくは、( i ) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( ii ) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( iii ) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに ( iv ) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。また、前記被検動物は昆虫であることが好ましい。

【 0 0 1 0 】さらに、本発明は、被検昆虫体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の昆虫病原生物それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得る少なくとも 2 種のプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことを含む、該被検昆虫体内の該複数種の昆虫病原生物を同時に検出し得る方法を提供する。この本発明の方法を、以下「第 2 の本発明の方法」という。

【 0 0 1 1 】上記方法において、前記昆虫病原生物が微胞子虫であることが好ましい。この場合において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、好ましくは、ノセマ・ボンビシス、パイリモルファ sp. M11、パイリモルファ sp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫であり、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス、パイリモルファ sp. M11、パイリモルファ sp. M12、パイリモルファ・ネカトリクス及びプレストフォラ sp. PSD である。

【 0 0 1 2 】前記混合プライマーは、好ましくは、( i ) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( ii ) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチ

ド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( iii ) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに ( iv ) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 3 】さらに、本発明は、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレイストフォラ sp. PSD のゲノム DNA の部分領域を増幅し得るプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセットを提供する。

【 0 0 1 4 】上記プライマーセットは、好ましくは、( i ) 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及び配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( ii ) 配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、( iii ) 配列番号 5 で表わされる塩基配列を含む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含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペア、並びに ( iv ) 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及び配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーペアからなる群より選択される少なくとも 2 種のプライマーペアを含み、より好ましくは、配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。  
〔第 1 の本発明の方法〕本発明は、被検動物体内に存在する複数種の微胞子虫を同時に検出し得る方法に関し、この検出は、該被検動物体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の微胞子虫それぞれのゲノム DNA の部分領域を増幅し得るプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことにより実施することができる。ここで、該混合プライマーは少なくとも 2 種のプライマーペアを含む。

【 0 0 1 6 】第 1 の本発明の方法において、検出しようとする前記複数種の微胞子虫は、微胞子虫門 (Microspora) に属する原生生物であればよく、特に限定されないが、好ましくは微胞子虫類 (Microsporida) に属する原生生物、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス (*Nosema bombycis*)、バイリモルファ sp. M11 (*Vairimorpha* sp. M11)、

バイリモルファ sp. M12 (*Vairimorpha* sp. M12)、バイリモルファ・ネカトリクス (*Vairimorpha necatrix*) 及びプレイストフォラ sp. PSD (*Pleistophora* sp. PSD) からなる群より選択される少なくとも 2 種の微胞子虫、最も好ましくは、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレイストフォラ sp. PSD である。前記ノセマ・ボンビシスには、強毒系統及び弱毒系統の両方が含まれる。

10 【 0 0 1 7 】第 1 の本発明の方法において使用する混合プライマーに含まれるプライマーは、検出対象とする複数の微胞子虫由来の DNA を、相互に配列比較することによって設計することができる。配列比較に用いる DNA の領域は、いずれの遺伝子であってもよく、特に限定されないが、例えば、ミトコンドリア熱ショックタンパク質 70 (HSP70) 遺伝子、ペプチド延長因子 1 遺伝子、小サブユニット rRNA 遺伝子等が挙げられる。配列比較に用いる DNA の塩基配列は公知のものであってもよく、例えば、GenBank等のデータベースから  
20 取得することができる。当業者であれば、データベースに登録された配列の中から、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて適切な配列を検索し、容易に取得することができる。このようにして取得される塩基配列としては、例えば、下記表 1 に示されるものを挙げるこ

【 0 0 1 8 】

【表 1】

プライマーの設計に使用可能なデータベース上のヌクレオチド配列

登録名称	GenBank 登録番号
<i>Vairimorpha necatrix</i> mitochondrial Hsp70 homolog mRNA	AF008215
<i>Nosema locustae</i> mitochondrial-type HSP70 gene	U97520
<i>Glugea plecoglossi</i> DNA for peptide elongation factor 1 alpha	D84253
<i>Vairimorpha necatrix</i> small subunit rRNA gene	Y00266
<i>Pleistophora</i> sp. Sd-NU178201 (PSD)	D85500
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11 (M11)	D85501
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12 (M12)	D85502
<i>Nosema bombycis</i> SBS-NU (強毒系統)	D85503
<i>Nosema bombycis</i> Sd-NU 178401 (弱毒系統)	D85504
<i>Nosema bombycis</i> HSP70	AB009599
<i>Nosema bombycis</i> Elongation Factor 1 alpha	AB009600

30 40 50 【 0 0 1 9 】上記のような配列比較に基づいて、検出対象とする各微胞子虫に対するプライマーを設計するには、まず、取得した複数の塩基配列のアライメントをとる。アライメントは、解析ソフトウェア、例えば、クラスタル X (ClustalX、フリーウェア) を用いてとることができる。その際のソフトウェアのパラメータは、全て初期値のままであってもよく、また、必要に応じて変更してもよい。このようなパラメータの変更は、当業者であれば容易に行うことができる。次に、このようなアライメント (配列比較の結果) に基き、以下の基準：( 1 ) 原則として 1 種の微胞子虫につき 1 種類の増幅産物が形成されるようにする；( 2 ) プライマーを混合したとき

に、混在しているプライマーどうしが目的外の部位を増幅しないように設計する（目的外の部位を増幅してしまう場合にはプライマー配列を変更する）；（3）増幅する目的配列は必ずしも同じ遺伝子である必要はなく、生物ごとに異なってもよい；（4）増幅される産物が電気泳動で分離できるようにプライマーを設計する；に従って、プライマーとして適切な配列を選択することができる。この際に、各プライマーの塩基数は特に限定されないが、好ましくは15塩基以上、より好ましくは20塩基以上とする。

【0020】また、各プライマーペアにより増幅されるDNA断片のサイズは、通常の電気泳動により検出され得る範囲であればよく、特に限定されないが、好ましくは100塩基～3000塩基、より好ましくは100塩基～2000塩基とする。ここで、各プライマーペアに

微胞子虫検出用に設計したプライマー一覧

<b>N. bombycis</b> 検出用 (EFl $\alpha$ 遺伝子配列より設計)	
NBEF 35F : 5'-TGGCGCTGTTGATAAGAGATT-3'	(配列番号 1)
NBEF957R : 5'-AATTTAGCAACACAAGCCTTAT-3'	(配列番号 2)
<b>Vairimorpha</b> sp. M11 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より設計)	
M11-96F : 5'-TACTTTATTTAATGTACATTTGAAA-3'	(配列番号 3)
M11-822R : 5'-CTCGAATTAGAAAATCTCTCAA-3'	(配列番号 4)
<b>Vairimorpha</b> sp. M12 検出用 (HSP70 遺伝子配列より設計)	
V70-176F : 5'-CAAATGACAGGAAAGAAATAAGTTCCA-3'	(配列番号 5)
V70-1898R : 5'-TTAAATATTTGTGCTATAGCTACTC-3'	(配列番号 6)
<b>Pleistophora</b> sp. PSD 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より設計)	
PSDF1 : 5'-CACCAGGTTGATTCTGCCTGACG-3'	(配列番号 7)
PSDR 450 : 5'-GCTCCGCCTCTCTTCCGTCTCC-3'	(配列番号 8)

【0022】上記表2において、NBEF35F及びNBEF957Rは、ノセマ・ボンピシス延長因子1 遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、ノセマ・ボンピシスの弱毒系統及び強毒系統の両方を検出することができる。M11-96F及びM11-822Rは、バイリモルファsp. M11の小サブユニットrRNA遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、バイリモルファsp. M11のみを検出することができる。V70-176F及びV70-1898Rは、バイリモルファsp. M12のHSP70遺伝子配列に基いて設計したプライマーであり、バイリモルファsp. M12及びバイリモルファ・ネカトリクス（外国種）を検出することができる。PSDF1は、微胞子虫小サブユニットrRNA遺伝子の共通配列に基いて設計したプライマーであり、PSDR450は、プレストフォラsp. PSDの小サブユニットrRNA遺伝子配列に基いて設計したプライマーである。PSDF1及びPSDR450は、プレストフォラsp. PSDのみを検出することができる。なお、各プライマーの名称の最後の数字は、そのプライマーの設計の基礎とした配列における、各プライマーの3'末端塩基の塩基番号を示している。これらのプライマーは特異性が非常に高いため、その検出対象として示したものの以外の微胞子虫及び他の病

より増幅されるDNA断片のサイズを、電気泳動により各DNA断片のバンドが相互に明確に分離される程度に分散させておくと、上記方法により各微胞子虫の同時検出だけでなく、同定をも行うことができる。ただし、このような同定は、必ずしも検出対象とする微胞子虫の全てを区別するものでなくてもよい。すなわち、区別する必要のない微胞子虫の間では、それぞれに由来する増幅断片のサイズが、電気泳動により明確に分離される程度に異なっていなくてもよい。上述のようにして設計されるプライマーの塩基配列は特定の配列に限定されるものではないが、例えば、下記の表2に示される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0021】

【表2】

30 原生物には反応しない。また、上記のようにして設計したオリゴヌクレオチド（プライマー）は、当業者に公知の方法、例えば化学合成等により容易に作製することができる。

【0023】第1の本発明の方法において使用する混合プライマーは、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、以上のようにして設計される2種以上のプライマーペアを含む。例えば、上記表2に記載したプライマーを用いる場合には、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、全プライマーペアのうちの2種以上を混合して混合プライマーとすることができるが、好ましくは、これらのプライマーの全てを混合して混合プライマーとする。

40 【0024】第1の本発明の方法において用いる増幅処理は特に限定されないが、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。ここで、該増幅処理に用いる鋳型は被検動物体内に存在する核酸であり、好ましくはDNAである。このような核酸は、当業者に公知の方法により被検動物から抽出することができる。プライマーとしては、上述の混合プライマーを用いる。鋳型及びプライマーの他、増幅処理に必要な試薬、処理条件等は、当業者であれば適切に設定することができる。例えば、P

PCRを行う場合には、鋳型及びプライマーの他に、Tris-HCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、各dNTP、Taq DNAポリメラーゼ等の試薬類を混合してPCR反応液とすることができ、このような試薬類はPCR用キットとしても市販されている。次いで、このようにして調製したPCR反応液を、サーマルサイクラー等の装置に投入し、温度サイクル反応を行うことによって増幅処理を行うことができる。

【0025】増幅処理により得られる増幅産物の検出は、該産物のサイズ(塩基長)によって分離することのできる公知の方法、好ましくはアガロースゲル電気泳動等の電気泳動法により行うことができる。このような方法により、増幅処理に使用した各プライマーペアから予測されるサイズの増幅断片が検出されるか否かを調べることができ、これにより、被検動物体内に存在する核酸が上記混合プライマーによって増幅されるか否かを調べることができる。ここで、プライマーペアからの増幅断片のサイズの予測は、当業者であれば容易に行うことができる。上述のように、上記混合プライマーに含まれる各プライマーペアが、相互に異なるサイズのDNA断片を与えるものであれば、微胞子虫の検出のみならず、その同定(各種微胞子虫の特異的検出)をも行うことができる。例えば、表2に記載の各プライマーペアから予測される増幅断片の塩基長は、NBEF35F及びNBEF957Rについては943塩基、M11-96F及びM11-822Rについては752塩基、V70-176F及びV70-1898Rについては1750塩基、PSDF1及びPSDR450については450塩基である。

【0026】第1の本発明の方法を適用することのできる動物、すなわち前記被検動物は、微胞子虫が感染しうる動物であればよく、特に限定されないが、好ましくは哺乳類、魚類又は昆虫類に属する動物、より好ましくはカイコガ(*Bombix mori*)である。また、被検動物はいかなる成長段階にあるものでもよく、卵であってもよいが、好ましくは成虫又は卵、より好ましくは成虫の段階である。本発明の方法においては、被検動物から核酸を取得する必要があるが、上記のような被検動物からの核酸抽出は、液体窒素を用いる摩砕及びフェノール法等の当業者に公知の方法により行うことができ、また、市販のキットを用いて行うこともできる。前記被検動物がヒトである場合には、被験者からの組織、細胞等から当業者に公知の方法により核酸試料を得ることができる。

【0027】〔第2の本発明の方法〕本発明はまた、被検昆虫体内に存在する複数種の昆虫病原生物を同時に検出する方法に関し、この検出は、該被検昆虫体内に存在する核酸を鋳型とし、検出しようとする複数種の昆虫病原生物それぞれのゲノムの部分領域を増幅し得るプライマーペアを含む混合プライマーを用いて増幅処理を行うことによって実施することができる。ここで、該混合プライマーは少なくとも2種のプライマーペアを含む。

【0028】第2の本発明の方法において、検出しよう

とする前記複数種の昆虫病原生物は、昆虫体内に入り込んで何らかの疾患、障害等の病的状態を引き起こすものであればよく、特に限定されない。このような昆虫病原生物としては、例えば、ウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、細菌、真菌、リケッチア、原生動物(原虫)、寄生虫等が挙げられるが、好ましくはカイコガ体内に入り込む病原生物、より好ましくは微胞子虫である。微胞子虫としては、微胞子虫門(Microspora)に属する原生生物であればよく、特に限定されないが、好ましくは微胞子虫類(Microsporida)に属する原生生物、より好ましくは、ノセマ・ボンビシス(*Nosemabombicis*)、バイリモルファsp. M11(*Vairimorpha* sp. M11)、バイリモルファsp. M12(*Vairimorpha* sp. M12)、バイリモルファ・ネカトリクス(*Vairimorpha necatrix*)、プレイストフォラsp. PSD(*Pleistophora* sp. PSD)等が挙げられる。前記ノセマ・ボンビシスには、強毒系統及び弱毒系統の両方が含まれる。

【0029】第2の本発明の方法において使用する混合プライマーに含まれるプライマーは、検出対象とする複数の昆虫病原生物由来のDNA又はRNAを、相互に配列比較することによって設計することができる。配列比較に用いるDNA又はRNAの塩基配列は公知のものであってもよく、例えば、GenBank等のデータベースから取得することができる。当業者であれば、データベースに登録された配列の中から、検出対象とする昆虫病原生物の種類に応じて適切な配列を検索し、容易に取得することができる。検出対象が微胞子虫である場合には、このようにして取得される塩基配列としては、例えば、上記表1に示されるものを挙げるることができる。

【0030】上記のような配列比較に基づくプライマーの設計は、第1の本発明の方法について述べた手法に従って、同様に行うことができる。検出対象が微胞子虫である場合には、このようにして設計されるプライマーとしては、例えば、上記表2に示されるものを挙げるができる。

【0031】第2の本発明の方法において使用する混合プライマーは、検出対象とする昆虫病原生物の種類に応じて、以上のようにして設計される2種以上のプライマーペアを含む。例えば、検出対象が微胞子虫である場合において、上記表2に記載したプライマーを用いる場合には、検出対象とする微胞子虫の種類に応じて、全プライマーペアのうちの2種以上を混合して混合プライマーとすることができるが、好ましくは、これらのプライマーの全てを混合して混合プライマーとする。

【0032】第2の本発明の方法において用いる増幅処理及び該増幅処理により得られる増幅産物の検出は、第1の本発明の方法について述べた手法に従って、同様に行うことができる。また、ゲノムRNAを有する昆虫病原生物を検出対象とする場合には、通常のPCRに代えてRT-PCRを行うことができる。このRT-PCR

は、鋳型であるRNAからリバースプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを取得し、RNAアーゼを用いてRNAを分解した後に、該一本鎖cDNAを鋳型として通常のPCRを行うことにより二本鎖cDNAを取得する手法である。ここで、逆転写酵素としては、モロニーマウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素などの公知のものを用いることができる。その他、RT-PCRにおいて用いる試薬、反応条件等は、当業者であれば容易に選択及び設定できる。

【0033】第2の本発明の方法を適用することのできる動物、すなわち前記被験昆虫は、特に限定されないが、好ましくはカイコガ (*Bombix mori*) である。また、前記被験昆虫はいかなる成長段階にあるものでもよく、卵であってもよいが、好ましくは成虫又は卵、より好ましくは成虫の段階である。第2の本発明の方法においては、被験昆虫から核酸を取得する必要があるが、上記のような被験昆虫からの核酸抽出は、液体窒素を用いる摩砕及びフェノール法等の当業者に公知の方法により行うことができ、また、市販のキットを用いて行うこともできる。

【0034】〔本発明のプライマーセット〕本発明はまた、本発明の方法を使用するためのプライマーセット、すなわち、ノセマ・ボンビシス、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス及びプレイストフォラsp. PSDのゲノムDNAの部分領域を増幅し得るプライマーペアからなる群より選択される少なくとも2種のプライマーペアを含む、微胞子虫検出用プライマーセットに関し、好ましくは、該プライマーペアの全てを含む。

【0035】本発明のプライマーセットに含まれる上記プライマーペアは、上述のように設計し、調製することができる。また、こうして調製されるプライマーペアの具体例は、上記表2に示したとおりである。従って、本発明のプライマーセットは、好ましくは、上記表2に記載のプライマーセットのうちの少なくとも2種類を含み、より好ましくは、その全て(配列番号1~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド)を含む。

【0036】さらに、本発明の方法に使用する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、微胞子虫検出用キットとすることもできる。このような試薬類としては、Tris-HCl、EDTA、SDS、プロテイナーゼK、RNaseA、フェノール、酢酸ナトリウム、エ

タノール等のDNA抽出用試薬、Tris-HCl、KCl、MgCl2、各種dNTP、Taq DNAポリメラーゼ等のPCR用試薬、TEバッファー、40%スクロースDye、アガロースゲル等の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。

【0037】

【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〕検出用プライマーの設計及び調製  
データベースに登録されている、種々の微胞子虫由来のヌクレオチド配列を比較し、検出対象となる各微胞子虫にのみ特異的な領域を数カ所ずつ選択した。ここで、配列比較に使用したヌクレオチド配列は、下記の表3に記載したとおりであり、これらの配列の比較は、解析ソフトウェアであるクラスタルX (ClustalX、フリーウェア)を用いて行った。該ソフトウェアのパラメータは、全て初期値のままとした。また、配列比較した比較図の一部を図1に示した。

【0038】

【表3】

プライマーの設計に用いたデータベース上のヌクレオチド配列

登録名称	GenBank登録番号
<i>Yairimorpha necatrix</i> mitochondrial Hsp70 homolog mRNA	AF008215
<i>Nosema locustae</i> mitochondrial-type HSP70 gene	U97520
<i>Glugea plecoglossi</i> DNA for peptide elongation factor 1 alpha	D84253
<i>Yairimorpha necatrix</i> small subunit rRNA gene	Y00266
<i>Pleistophora</i> sp. Sd-NU178201 (PSD)	D85500
<i>Yairimorpha</i> sp. NIS-M11 (M11)	D85501
<i>Yairimorpha</i> sp. NIS-M12 (M12)	D85502
<i>Nosema bombycis</i> SES-NU (強毒系統)	D85503
<i>Nosema bombycis</i> Sd-NU IW8401 (弱毒系統)	D85504
<i>Nosema bombycis</i> HSP70	AB009599
<i>Nosema bombycis</i> Elongation Factor 1 alpha	AB009600

【0039】次に、選択した各領域をプライマーにした場合にPCRによって増幅される産物の大きさを推定し、これらの増幅産物が混在していても電気泳動によって分離・識別が可能となるような大きさの産物を増幅する配列の組み合わせを選定し、下記表4に示すプライマーを設計した。これらのプライマーは、常法に従って合成した。

【0040】

【表4】

10  
20  
30  
40

微胞子虫検出用に設計したプライマー一覧

<b>N. bombycis</b> 検出用 (EF1 $\alpha$ 遺伝子配列より作成)	
NBEF 35F : 5'-TGCCGCTGTTGATAAGAGATT-3'	(配列番号 1)
NBEF957R : 5'-AATTTAGCAACACAAGCCTTAT-3'	(配列番号 2)
<b>Vairimorpha</b> sp. M11 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より作成)	
M11-96F : 5'-TACTTTATTTAATGTACATTTGAAA-3'	(配列番号 3)
M11-822R : 5'-CTCGAATTAGAAAATTCTCTCAA-3'	(配列番号 4)
<b>Vairimorpha</b> sp. M12 検出用 (HSP70 遺伝子配列より作成)	
V70-176F : 5'-CAAATGACAGGAAAGAAATAAGTTCCA-3'	(配列番号 5)
V70-1898R : 5'-TTAAATATTTTGTGCTATAGCTTACTC-3'	(配列番号 6)
<b>Pleistophora</b> sp. PSD 検出用 (SSUrRNA 遺伝子配列より作成)	
PSDF1 : 5'-CACCAGGTGATTCTGCCTGACG-3'	(配列番号 7)
PSDR 450 : 5'-GCTCCGCTCTCTTCCGTCTCC-3'	(配列番号 8)

【 0 0 4 1 】〔調製例 1〕PCR 用の鋳型として使用するための DNA 試料の調製

( 1 ) 各微胞子虫の感染したカイコガ及び未感染カイコガからの DNA 抽出

微胞子虫の感染したカイコガ又は未感染カイコガ一個体を乳鉢に取り、液体窒素を加えて摩砕した。得られた粉末を 50ml 容遠心チューブに取り、32mM Tris-HCl (pH8.0)、8mM EDTA (pH8.0)、3.2% SDS、32 $\mu$ g/ml Proteinase K、160 $\mu$ g/ml RNase A の反応系において、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応後、フェノール抽出を行い、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を加え、2 倍量のエタノールを加えて DNA を回収した。

【 0 0 4 2 】( 2 ) 各微胞子虫の胞子からの DNA 抽出  
1.5ml 容チューブに胞子 10mg を取り、STE バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 10mM NaCl) で洗浄した。その後、胞子に 50mg のグラスビーズ (SIGMA 社、G-8772) 及び 200 $\mu$ l の STE バッファーを加え、ボルテックスを用いて 30 秒間破砕処理した。処理後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間の熱処理を行い、150 $\mu$ l の上清を回収した。回収した上清に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 及び 2.5 倍量の 99.5% エタノールを加え、エタノール沈澱を行った。遠心 (10000 $\times$  g、4 分間) した後、70% エタノールを用いてリンスし、回収した沈澱を 20 $\mu$ l の TE バッファー中に懸濁した。

【 0 0 4 3 】〔実施例 2〕各微胞子虫検出用プライマーの特異性実験

実施例 1 で調製した各プライマーを用い、各プライマーが増幅対象とする微胞子虫胞子からの DNA 試料を鋳型として PCR を行い、目的産物の増幅を確認した。また、これらのプライマーが目的とする微胞子虫以外の微胞子虫のゲノムを鋳型にした場合に増幅産物を形成するか否かを確かめるために、それぞれのプライマーをその検出対象以外の微胞子虫からの DNA 試料と混合し、PCR を行った。さらに、これらのプライマーが、カイコガゲノム由来の DNA 断片を増幅するか否かを調べた。

【 0 0 4 4 】すなわち、ノセマ・ボンピシス強毒系統

(微粒子病病原) 及び弱毒系統、バイリモルファ sp. M11、バイリモルファ sp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス (外国種)、プレイストフォラ sp. PSD、並びにノセマ・フルナカリス (外国種) からの各 DNA 試料並びにカイコガからの DNA 試料と、上記表 4 に記載の 4 種の各プライマーペアとの全ての組み合わせにおいて PCR を行った。

【 0 0 4 5 】PCR 反応液は、終濃度で 10mM Tris-HCl (pH8.9)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM 各 dNTP、2.5U nit Taq DNA ポリメラーゼ (Sawady テクノロジー社製)、各 0.5 $\mu$ M の相同プライマー及び相補プライマーを含み、さらに 10ng の鋳型 DNA を含む計 100 $\mu$ l の溶液とした。PCR は、アステック PC800 サーマルサイクラーを用い、94 $^{\circ}$ C で 2 分の熱処理後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒 - 55 $^{\circ}$ C で 30 秒 - 72 $^{\circ}$ C で 30 秒の反応を 35 サイクルという条件で行った。

【 0 0 4 6 】PCR 後の反応液 2.5 $\mu$ l を採取し、等量の TE バッファー及び 1 $\mu$ l の 40% スクロース Dye (0.03% B P B、50mM EDTA、pH8.0、40% スクロース) を加えて電気泳動用試料とした。電気泳動は 2% アガロースゲル (Sigma 社、Type-II medium EEO A-6877) 及び電気泳動装置 Mupid 21 (コスモバイオ社) を用い、100V で 30 分間行った。

【 0 0 4 7 】電気泳動の結果を図 2 に示す。図 2 において、パネル A は、ノセマ・ボンピシス強毒系統及び弱毒系統を検出対象とするプライマー-NBEF35F 及び NBEF957R を用いた PCR の結果を示し、パネル B は、バイリモルファ sp. M11 を検出対象とするプライマー-M11-96F 及び M11-822R を用いた PCR の結果を示し、パネル C は、バイリモルファ sp. M12 及びバイリモルファ・ネカトリクスを検出対象とするプライマー-V70-176F 及び V70-1898R を用いた PCR の結果を示し、パネル D は、プレイストフォラ sp. PSD を検出対象とするプライマー-PSDF1 及び PSDR 450 を用いた PCR の結果を示す。

【 0 0 4 8 】これらの結果によれば、各プライマーは目的とする微胞子虫からの DNA 試料を鋳型にした場合に



のみ特異的な産物を増幅し、他の微胞子虫からのDNA試料を鋳型にした場合には産物の増幅が認められなかった。さらに、いずれのプライマーを用いた場合にも、カイコゲノム由来の増幅産物は検出されなかった。

【0049】〔実施例3〕混合プライマーによる微胞子虫の検出

各微胞子虫に特異的なプライマーを複数種混合させ、目的の遺伝子以外の部位を増幅するか否かを調べた。また、このような混合プライマーが、宿主であるカイコゲノム由来のDNA断片を増幅するか否かを調べた。すなわち、ノセマ・ボンピシス強毒系統（微粒子病病原）及び弱毒系統、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス（外国種）、並びにプレストフォラsp. PSDからの各DNA試料並びにカイコガからのDNA試料を鋳型とし、上記表4に記載の4種のプライマーペアを混合した混合プライマーを用いてPCRを行った。

【0050】PCR反応液は、終濃度で10mM Tris-HCl (pH8.9)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM 各dNTP、2.5U nit Taq DNAポリメラーゼ (Sawady テクノロジー社製)、各0.5μMのプライマーを含み、さらに10ngの鋳型DNAを含む計100μlの溶液とした。PCRは、アステックPC800サーマルサイクラーを用い、94 で2分の熱処理後、94 で30秒 - 55 で30秒 - 72 で30秒の反応を35サイクルという条件で行った。

【0051】PCR後の反応液2.5μlを採取し、等量のTEバッファー及び1μlの40%スクロースDye (0.03% B P B、50mM EDTA、pH8.0、40%スクロース)を加えて電気泳動用試料とした。電気泳動は2%アガロースゲル (Sigma社、Type-II medium EE0 A-6877) 及び電気泳動装置Mupid 21 (コスモバイオ社)を用い、100Vで30分間行った。

【0052】電気泳動の結果を図3に示す。図3において、左側の4つの矢印は、そこに示されているとおり、それぞれNB (*Nosema bombycis*) を検出するプライマー (NBEF35F及びNBEF957R)、M11 (*Vairimorpha* sp. M11) を検出するプライマー (M11-96F及びM11-822R)、M12 (*Vairimorpha* sp. M12) を検出するプライマー (V70-176F及びV70-1898R)、及びPSD (*Pleistophora* sp. PSD) を検出するプライマー (PSDF1及びPSDR450) により増幅されるPCR産物の推定泳動度を示す。図3によれば、各プライマーは予想される大きさの産物を増幅し、それ以外の産物の増幅は確認されなかった。また、上記混合プライマーは、カイコゲノム由来のDNA断片を増幅しなかった。

【0053】〔実施例4〕宿主に感染した状態での各微胞子虫の検出・判別実験

宿主に感染した状態でも微胞子虫が検出できるか否かを調べるために、微胞子虫に感染したカイコガ成虫からのDNA試料を鋳型として、PCRを行った。すなわち、

ノセマ・ボンピシス強毒系統（微粒子病病原）及び弱毒系統、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、バイリモルファ・ネカトリクス（外国種）、並びにプレストフォラsp. PSDをそれぞれ感染させた各カイコガ成虫からの各DNA試料を鋳型とする以外は、実施例3と同様にPCRを行った。

【0054】電気泳動の結果を図4に示す。図4によれば、上記のPCRの結果は、各微胞子虫の孢子からのDNA試料を鋳型として用いた場合との差を示さなかった。従って、上記のような混合プライマーを用いるマルチプライマーPCRにより、微胞子虫に感染したカイコガからのDNA試料から、各微胞子虫を判別可能な形で検出することができることが分かった。

【0055】〔実施例5〕微胞子虫感染時期による影響カイコガの成長段階によって検出精度に影響がどうかを検討した。すなわち、ノセマ・ボンピシス強毒系統（微粒子病病原）及び弱毒系統、バイリモルファsp. M11、バイリモルファsp. M12、並びにプレストフォラsp. PSDをそれぞれ感染させたカイコガ（1齢、2齢、3齢、4齢及び5齢サナギ、並びに成虫）からの各DNA試料を鋳型とする以外は、実施例3と同様にPCRを行った。その結果、カイコガの成長は検出結果には直接影響しないことが明らかとなった。

【0056】〔実施例6〕混合プライマーの目的外生物に対する反応

表4に記載の全プライマーを含む混合プライマーが微胞子虫以外の生物であって、微胞子虫と同じ環境で生育するもののゲノム由来のDNA断片を増幅するか否かを調べるため、カイコ核多角体病ウイルス (*BmNPV*)、白きょう病菌ポーベリア・バシアナ (*B. bassiana*)、パチルス・チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*)、及び大腸菌 (*E. coli*) から調製したDNA試料を鋳型とする以外は実施例3と同様にPCRを行った。

【0057】これらの結果のうち、ポーベリア・バシアナ及びパチルス・チューリンゲンシスについての結果を図5に示す。図5からわかるように、上記混合プライマーはこれら2種の生物由来のDNA断片を増幅しなかった。また、*BmNPV*及び大腸菌に由来するDNA断片も増幅されなかった。

【0058】〔実施例7〕微胞子虫が共感染していた場合の微胞子虫の検出及び識別

検出対象となっている微胞子虫が2種類感染していた場合でも、カイコガ成虫からこれらの微胞子虫を識別できる形で検出できるか否かを調べた。すなわち、ノセマ・ボンピシスからのDNA試料及びプレストフォラsp. PSDからのDNA試料を混合して鋳型とする以外は実施例3と同様にPCRを行った。この際に、これらのDNA試料のそれぞれを鋳型とする別々のPCRを行った後にPCR産物を混合して電気泳動を行う実験と、これらのDNA試料の混合物にさらにカイコガからのDNA試

料を添加したものを鋳型とする実験を同時に行った。その結果を図 6 に示す。図 6 からわかるように、感染している二種類の微胞子虫に特異的な産物がそれぞれ増幅され、電気泳動によって二種類の微胞子虫の感染が確認された。

## 【 0 0 5 9 】

【発明の効果】本発明により、一個体につき一本のチューブを使用した一回の検査のみで複数の病原を検出することができる。また、各病原生物ごとに異なる大きさの DNA 断片が増幅されるように設定することにより、病原の同定も容易に行うことができる。さらに、本発明は、農業分野以外に、医療現場で緊急診断に用いること

も可能である。さらに、この検出方法では、病原体の種類を一種類に限定する必要がないため、ウイルスとバクテリアなど異生物集団の比較も可能である。

【 0 0 6 0 】蚕微粒子病の検定の場合には、増殖状態や感染量に依存せずに微胞子虫を検出できるため、従来困難であった胞子を形成していない状態での検出も行うことができ、さらに卵の検定も容易に行える。また、検定が形質に依存しないため、微胞子虫と他の病原菌を見誤ることがない。

## 10 【 0 0 6 1 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

```

<110> Director-General of National Institute of Sericultural
and Entomological Science
Japan Science and Technology Corporation
<120> Method for Identifying Pathogenic organisms using
multi-primer PCR
<130> P99-0623
<160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 1
tggcgctggt gataagagat t                21
<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 2
aatttagcaa cacaagcctt at                22
<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer
<400> 3
tactttatctt aatgtacatt tgaaaa                26
<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

19

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 4

ctcgaattag aaaattctct caa

23

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 5

caaatgacag ggaagaaat aagttcca

28

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 6

ttaaataattt tggctatag cttactc

27

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 7

caccaggttg attctgcctg acg

23

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Primer

&lt;400&gt; 8

gtccgcctc tcttccgctc tcc

23

## 【 0 0 6 2 】

【配列表フリーテキスト】配列番号 1 ~ 8 : プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】6 種類の微胞子虫及び大腸菌 (E. coli) 由来の DNA 部分配列のアライメントを示す図である。

【図 2】4 種のプライマーペアをそれぞれ単独で用いた場合における、各種微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

【図 3】4 種のプライマーペアからなる混合プライマーを用いた場合における、各種微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

【図 4】各種微胞子虫を感染させたカイコガから取得した DNA 試料からの微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

【図 5】微胞子虫以外の生物 (ポーベリア・バシアナ及びバチルス・チューリングシス) から取得した DNA 試料を鋳型とし、微胞子虫検出用混合プライマーを用いる PCR の結果を示す電気泳動写真である。

【図 6】2 種類の微胞子虫を同時感染させたカイコガから取得した DNA 試料からの、微胞子虫の検出結果を示す電気泳動写真である。

40

【 図 1 】

```

NISM11 -ATTGGAG-----GGCAAAATCAAGTCCAGCA-GCCGCGGTAATA 411
NBSI3 -ATCGGAG-----GGCAAAATCAAGTCCAGCA-GCCGCGGTAATA 415
NBS3NU -ATCGGAG-----GGCAAAATCAAGTCCAGCA-GCCGCGGTAATA 415
NISM12 -ATTGGAG-----GGCAAAATCAAGTCCAGCA-GCCGCGGTAATA 413
Ecoli  CATTTACGCTTACCCGACAGAGAGACACCGGCTACTCCGTCCAGCA-GCCGCGGTAATA 534
          * * * * *
V.necat CTT--GTTCGAGAGTGTGATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TAAAA 452
PSD CCG--ACTCCAGAGTGTGATGA-GAGATG-----CTCCAG-----TAAAA 436
NISM11 CTT--GTTCGAGAGTGTGATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TAAAA 451
NBSI3 CTT--GTTCGAGAGTGTGATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TAAAA 455
NBS3NU CTT--GTTCGAGAGTGTGATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TAAAA 455
NISM12 CTT--GTTCGAGAGTGTGATGA-TGATTC-----ATGCAG-----TAAAA 453
Ecoli  CCGAGGCTGCAAGCCATTATCCGAAATTAATCGGCTAAGCCAGCCAGCCGTTTGTTA 594
          * * * * *

```

```

V.necat AGTCCGAGCTTAA-----PSD-M11-----TATTAAAGAA--GCAAT---- 480
PSD AGTCCGAGCTTAA-----AGAGTCCGAGCTTAA-----TCTTTTAAAT--GCTCTGAGAA 493
NISM11 AGTCCGAGCTTAA-----TAAATTAAGAA--GCAAT---- 479
NBSI3 AGTCTGAGCTTAA-----TAAATTAAGAA--GCAAT---- 483
NBS3NU AGTCTGAGCTTAA-----TAAATTAAGAA--GCAAT---- 483
NISM12 AGTCCGAGCTTAA-----TATTAAAGAA--GCAAT---- 481
Ecoli  AGTCAGATGTAAATCCCGGGCTCAACCTCGGACATGCATCTGATACTGCCAGCTGAA 654
          * * * * *
V.necat -----AT-GAGGTTGACTGTATGTTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 534
PSD ACGCAAC-AGGAGGACAGATATACAGGSCGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 552
NISM11 -----AT-GAGGTTGACTGTATGTTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 533
NBSI3 -----GT-AAGGTTGACTGTATGTTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 537
NBS3NU -----GT-AAGGTTGACTGTATGTTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 537
NISM12 -----AT-GAGGTTGACTGTATGTTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCCTGACTGGA 535
Ecoli  GTCCTGTAGAGGGGGTAGAAATCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGGTAGAGATCTGGAGGA 714
          * * * * *

```

```

V.necat CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAATTTTAAACAGGACGTAAGCTGGAG 594
PSD CTGAGCGAGGCGAAAGCTGTACACTTGTGTGCTTCCGTTGATCAACAGGACGTAAGCTGGAG 612
NISM11 CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAATTTTAAACAGGACGTAAGCTGGAG 593
NBSI3 TBAACAGAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAATTTTAAACAGGACGTAAGCTGGAG 597
NBS3NU TGACAGAGAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAATTTTAAACAGGACGTAAGCTGGAG 597
NISM12 CGAACAGAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAATTTTAAACAGGACGTAAGCTGGAG 595
Ecoli  ATACCGTGTGCGAAGCGCGCCCTCGACGAAAGCTGACGCTCAGGTTCCGAAAGCGTGGG 774
          * * * * *
V.necat GAGCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 654
PSD GATCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 671
NISM11 GAGCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 653
NBSI3 GATCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 657
NBS3NU GATCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 657
NISM12 GAGCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 655
Ecoli  GAGCGAAGATGATATGATACCATTTAGTTCACAGCAATTAATCCGACGATGATGATA 833
          * * * * *

```

```

V.necat TGAATATATTTTATATGATGATATGATATTTT-GAGTTTTTTT-GGCTTGGGGATAGTATG 712
PSD TGCACACAGCGG-----CGAGGAGAAATCTT-TAGAGTTCG-CGCTTGGGGATAGTATG 724
NISM11 TGAATATATTTTATATGATGATATGATATTTT-GAGTTTTTTT-GGCTTGGGGATAGTATG 711
NBSI3 TATTTTGAATATATATTTTATGATGATATTTT-GAGTTTTTTT-GGCTTGGGGATAGTATG 716
NBS3NU TATTTTGAATATATATTTTATGATGATATTTT-GAGTTTTTTT-GGCTTGGGGATAGTATG 716
NISM12 TGAATATATTTTATATGATGATATGATATTTT-GAGTTTTTTT-GGCTTGGGGATAGTATG 713
Ecoli  TGTCCCTTGAGGCGTGGTTCCGAGCTACAGCGTTAAGTCCAGCCCTGGGAGTACG 893
          * * * * *
V.necat ATCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 772
PSD CTCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 784
NISM11 ATCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 771
NBSI3 ATCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 776
NBS3NU ATCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 776
NISM12 ATCCGAAAGATGAAAAATTAAGAAAAATGACGGAAGAAATCCAGAGGAGATGATGTCGG 773
Ecoli  GCCGAAAGCTTAAATCAATGAAATGACGAGGAGCCGCG-ACAGCGGATGAAAGATGATG 952
          * * * * *

```

```

V.necat GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----TTCA 817
PSD GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----TTCA 830
NISM11 GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----TTAT 816
NBSI3 GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----ATTGA 821
NBS3NU GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----ATTGA 821
NISM12 GCTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----TTAT 818
Ecoli  GTTAAATTTGACTCAA-CGCGAGGTAACCTACCCAAATTTTAA-----TTCA 1011
          * * * * *
V.necat GAGAAAGATTTTC-----GATCTGAGA-ATGATTAATAGTGTGTCATGCCCCCTTTCATGGA 872
PSD GTGCAAGAA-----G-----GAGC-AGGACAGAGATGCTGTCATGCTCTGGAATTTGA 878
NISM11 T A T C H C H N H H T T T C T H H T C C H H -----A-ATGATTAATAGTGTGTCATGCCCCCTTTCATGGA 874
NBSI3 T A T A A T A T T T T -----M11-M12-----ATCATAAGTGTGTCATGCCCCCTTTCATGGA 866
NBS3NU T A T A A T A T T T T -----ATCATAAGTGTGTCATGCCCCCTTTCATGGA 866
NISM12 T G C G A G A A T T T T C -A A T T G A G A -A T G A T T A A T A G T G T C A T G C C C T T T T C A A T G G A 876
Ecoli  GAGAAAGATTTGCCCTTCGGAACCGTACAGAGGTTGTCATGTCATGCTCTGCTACCTCC 1071
          * * * * *

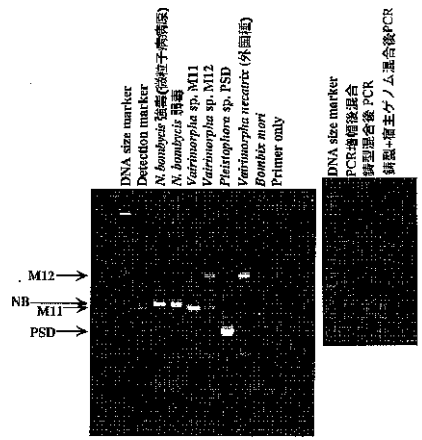
```

```

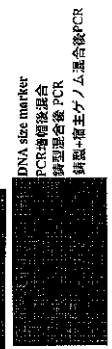
V.necat TGCCTGAGGT-TTTGATTAATTTACCAAGACGTGAGACCGT-----TTTATTAATA-- 924
PSD TGCAGATC-T-TTCCCTTAATCTGTAATGA-GTGAAGATC-----TTTGACATG-- 925
NISM11 TGCCTGAGGT-TTTGATTAATTTACCAAGACGTGAGACCGT-----TTTATTAATA-- 928
NBSI3 TGCCTGAGGT-AATGATTAATTTACCAAGATGTAAGACCGT-----GATTTAGACA-- 918
NBS3NU TGCCTGAGGT-AATGATTAATTTACCAAGATGTAAGACCGT-----GATTTAGACA-- 918

```

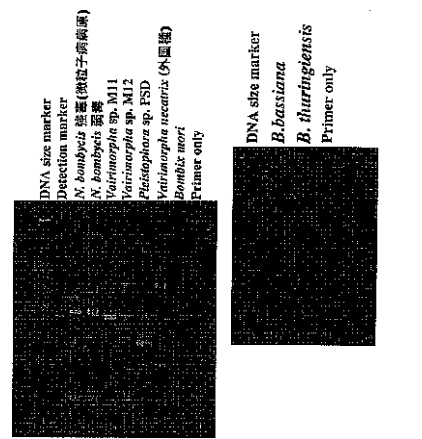
【 図 3 】



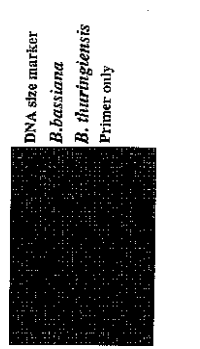
【 図 6 】



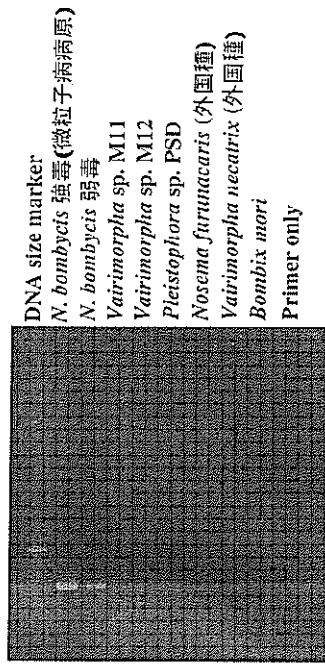
【 図 4 】



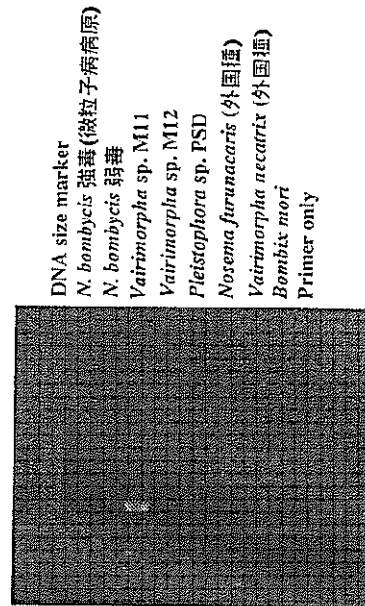
【 図 5 】



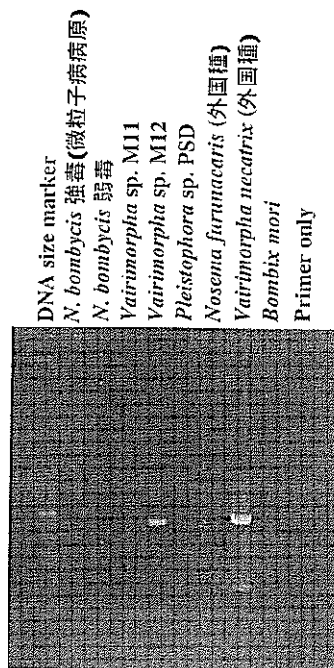
【 図 2 】



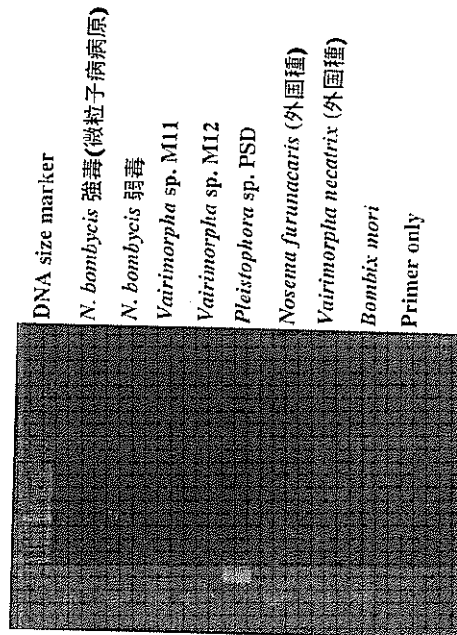
(A)



(B)



(C)



(D)

フロントページの続き

(72)発明者 米村 真之

茨城県つくば市吾妻2-3-2-708-607

F ターム(参考) 4B024 AA10 AA13 CA01 CA11 CA20  
HA11  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ05  
QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35  
QR40 QR42 QR62 QS16 QS25  
QX01