

(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2009-133814

(P2009-133814A)

(43) 公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 Z N A F	4 B O 2 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-146645 (P2008-146645)
 (22) 出願日 平成20年6月4日(2008.6.4)
 (31) 優先権主張番号 11/948, 389
 (32) 優先日 平成19年11月30日(2007.11.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508167841
 亞洲基因科技股▲ふん▼有限公司
 台灣台南縣新市鄉台南科學園區南科3路3
 號4樓
 (74) 代理人 100107711
 弁理士 磯兼 智生
 (72) 発明者 周 錦生
 台灣台南縣新市鄉台南科學園區南科3路3
 號4樓
 (72) 発明者 伊 央撒耘
 台灣台南縣新市鄉台南科學園區南科3路3
 號4樓
 (72) 発明者 朱 志鋒
 台灣台南縣新市鄉台南科學園區南科3路3
 號4樓

最終頁に続く

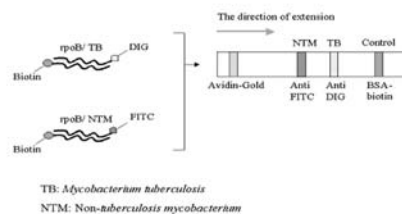
(54) 【発明の名称】 ヒト結核菌と非結核性抗酸菌のヌクレオチド増幅産物を検出するストリップと方法

(57) 【要約】

【課題】 ヒト結核菌と非結核性抗酸菌のヌクレオチド増幅産物を検出するテストストリップと方法を提供する。

【解決手段】 ヒト結核菌と非結核性抗酸菌のヌクレオチド増幅産物を検出するテストストリップは、(a) アビジン-金開放領域と、(b) テストバンドと、からなる。更に、ヒト結核菌TBと非結核性抗酸菌のヌクレオチドNTMを検出する方法は、(a) 標識プライマーを有するサンプルDNAを増幅する工程と (b) 増幅したDNA産物とランニングバッファを混合する工程と、;(c) テストストリップを混合物に浸し塗りする工程と (d)混合物がストリップの反応領域に移動できるようにする工程と、からなる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト結核菌 T B と非結核性抗酸菌 N T M のヌクレオチド増幅産物を検出するストリップであって、(a) アビジン-金開放領域と、(b) テストバンドと、からなり、前記テストバンドは、T B テストバンド、或いは、N T M テストバンドを含むことを特徴とするストリップ。

【請求項 2】

更に、制御バンドを有することを特徴とする請求項 1 に記載のストリップ。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド増幅産物は、標識プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により増幅した D N A であることを特徴とする請求項 1 に記載のストリップ。

10

【請求項 4】

前記標識プライマーは、一ストランドでビオチンと、別のストランドで免疫原生分子と標識されることを特徴とする請求項 3 に記載のストリップ。

【請求項 5】

前記免疫原生分子は、ジゴキシゲニン D I G、或いは、フルオレセイン F I T C であることを特徴とする請求項 4 に記載のストリップ。

【請求項 6】

前記 T B テストバンドは、標識 T B D N A に結合される抗体に被覆されることを特徴とする請求項 1 に記載のストリップ。

20

【請求項 7】

前記 T B テストバンドは、抗 D I G 抗体に被覆されることを特徴とする請求項 6 に記載のストリップ。

【請求項 8】

前記 N T M テストバンドは、標識 N T M D N A に結合される抗体に被覆されることを特徴とする請求項 1 に記載のストリップ。

【請求項 9】

前記 N T M テストバンドは、抗 F I T C 抗体に被覆されることを特徴とする請求項 8 に記載のストリップ。

【請求項 10】

前記制御バンドは、B S A - 共役ビオチンに被覆されることを特徴とする請求項 2 に記載のストリップ。

30

【請求項 11】

ヒト結核菌 T B と非結核性抗酸菌のヌクレオチド N T M を検出する方法であって、
(a) 標識プライマーを有するサンプル D N A を増幅する工程と、
(b) 増幅した D N A 産物とランニングバッファを混合する工程と、
(c) テストストリップを混合物に浸し塗りする工程と、
(d) 混合物がストリップの反応領域に移動できるようにする工程と、
からなることを特徴とするストリップ。

【請求項 12】

前記標識プライマーは、一ストランドでビオチンと、別のストランドで免疫原生分子と標識されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記免疫原生分子は、ジゴキシゲニン D I G、或いは、フルオレセイン F I T C であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記テストストリップは、前記請求項 1 で記述されるストリップであることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

50

【0001】

本発明は、ヒト結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) と非結核性抗酸菌 (*non-tuberculous mycobacteria*) の増幅DNA産物の存在を快速に同定するストリップと方法に関するものである。

【0002】

ヒト結核菌は、多くの結核 (TB) の症例を引き起こすバクテリアであり、誰でもよく知っている死に至る危険な伝染病である。バクテリアは、呼吸器系を攻撃するが、身体の別の部分にも作用する。人が、咳、くしゃみや会話でTBを運び、空気を通じて拡散する。2004年、死亡と疾病率の統計値は、1460万の慢性活動性TB患者、890万の新患者、160万の死者があり、多くは発展途上国で発生する。しかし、免疫システムが、

10

【0003】

非結核性抗酸菌 (*Nontuberculous mycobacteria*、NTM) は、結核と呼ばれる疾病を引き起こさない。これらの有機体の感染は伝染性ではなく、公衆衛生と密接な関わりがなく、これらによる疾病は、M.結核とは違い、届出義務がない。しかし、ミコバクテリウムに感染する組織は、乾酪壊死に至る特徴を伴う肉芽腫形成のM.結核に感染するのと同じのものである可能性が高い。直接塗抹の状態、全ミコバクテリウム染色は、抗酸性、抗アルコールのチールニールゼンであり、お互い区別できない。培養液だけが、種特異特徴を同定できる。その結果、NTMに肺感染した患者は、まず、結核の可能性があると診断される。培養物が約6週間有効である時、診断が修正され、患者と医師に混乱が生じる。

20

【0004】

感染者の臨床治療と危険にさらされる暴露群の同定にとって、臨床サンプル中のM.結核の早期で正確な検出は重大性が增大している。ミコバクテリウム種の特定のDNAのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の分子技術は、快速で、特定の高感度診断の有望で、目新しいやり方の一つである。

【0005】

カナダ特許第02223705号、Jia Bei Zhu等により、免疫原生分子、或いは、親和性リガンドコンパウンドによるDNA増幅に用いるプローブを標識したヌクレオチド増幅産物の最終生産物を検出し、抗体、及び/又は、リガンドの二種を予固定化したテストストリップを有する最終生産物を検出する方法が開示された。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ヒト結核菌と非結核性抗酸菌のヌクレオチド増幅産物を検出するテストストリップと方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、ヒト結核菌TBと非結核性抗酸菌のヌクレオチドNTMの増幅産物を検出するテストストリップを提供し、(a) アビジン-金開放領域と、(b) テストバンドと、からなる。本発明は、更に、ヒト結核菌TBと非結核性抗酸菌のヌクレオチドNTMを検出する方法を提供し、(a) 標識プライマーを有するサンプルDNAを増幅する工程と、(b) 増幅したDNA産物とランニングバッファを混合する工程と、(c) テストストリップを混合物に浸し塗りする工程と (d) 混合物がストリップの反応領域に移動できるようにする工程と、からなる。

40

【発明の効果】

【0008】

本発明により、公知の診断法のように、多大な時間を必要とせず、臨床治療を容易にし、感染のリスクを減少させることができる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

結核は、ヒト結核菌により発症し、感染病中で、死亡率と疾病率が一番高い。しかし、ヒト結核菌と非結核性抗酸菌により発生する同様の臨床症状により、公知の診断法は、多大な時間を必要とするだけでなく、わずらわしい。ミコバクテリア種の迅速診断法と正確な同定は、臨床治療を容易にし、感染のリスクを減少させることができる。本発明のストリップと方法は、患者から作られたサンプルからミコバクテリアを同定する快速で簡単な手段を提供し、一ストリップで、TBとNTMなどの二ミコバクテリアをテストすることができる。

【0010】

ストリップは、吸水性のある紙で、左から右に、アビジン-金開放領域と、テストバンドを有するテスト領域と、からなる。テストバンドの後に制御バンドを含んでもよい。アビジン-金開放領域は、アビジンと連結するコロイド金粒子により被覆される。更に、免疫原生の標識プライマーに対する二種の抗体は、二つのテストバンドでそれぞれ予固定化され、制御バンドで、BSA共役ビオチンがプレフィックスされる。

【0011】

本方法は、四工程からなる。第一工程は、特別に設計されたプライマーは、一ストランドでビオチンを含み、別のストランド中、DIG、或いは、FITC等の免疫原生分子は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、患者から作られたサンプルDNAを増幅するために用いられる。プライマーは、rpoB 遺伝子などの遺伝子に狙いを定め、全ミコバクテリア種中で検出され、各種と見分けられる高い保存領域を含む。増幅後、DNA産物は、ランニングバッファに混合される。次に、テストストリップの左側が混合物に浸漬され、混合物が、毛管現象により、ストリップの左側から右側に移動する。

【0012】

ターゲットDNAがサンプル中に存在し、増幅した場合、DNA産物は一面でビオチンを、もう一面で、免疫原生分子を含む。DNA産物中のビオチンは、ビオチン化により、アビジン-金開放領域で、アビジンに結合し、よって、コロイド金粒子と結びつく。テスト領域に達する時、テストバンド上の抗免疫原生分子抗体が、DNA産物中の免疫原生分子と結合する。コロイド金粒子は、ビオチンがサンプル中に存在する間は、制御バンドに結合し、アビジン-金開放領域で、アビジン-金と有効に働き、アビジン-金が、ストリップの右側に移動するようにする。コロイド金の赤色性質により、テストバンドと制御バンドは、赤色バンドとして出現する。テストバンド上に出現する赤色バンドは、陽性結果を意味する。テストターゲットが混合物中存在しない場合、即ち、DNAが増幅しない時、標識DNAは存在しない。ストリップ上で、テストバンド中に反応が生じず、赤色バンドは、サンプル中のターゲットDNAの存在にかかわらず、制御バンド上にだけ出現する。

【0013】

もう一つの具体例において、左から右のストリップ上の領域とバンドの順序は、アビジン-金開放領域、TBテストバンド、NTMテストバンド、及び、制御バンドである。TBテストバンドは、予固定化した抗DIG抗体により被覆され、NTMテストバンドは予固定化抗FITC抗体により被覆される。制御バンドはBSA-ビオチンにより被覆される。

【0014】

TB DNAに狙いを定めたプライマーペアは、一ストランドでビオチンで、別のストランドのDIGで標識される。NTM DNAに狙いを定めたプライマーペアは、一ストランドでビオチンで、別のストランドでFITCで標識される。TBがサンプル中存在する場合、TB DNAは増幅し、よって、TBテストバンドと制御バンドは赤を呈する。NTMがサンプル中存在する場合、NTM DNAは増幅し、よって、NTMテストバンドと制御バンドは赤を呈する。TBとNTMがサンプル中存在する場合、TB DNAとNTM DNAは増幅し、よって、TBテストバンド、NTMテストバンド、及び、制御バンドは赤を呈する。TBとNTMがサンプル中にない場合、増幅するDNAはなく、よって、赤を呈するテストバンドがなく、制御バンドだけ赤を呈する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

本実施例は、本発明に限定されるものではなく、単に、様々な側面と本発明の特徴を代表するものである。

図 1 は、設計例のコンセプトを示す図である。

【 0 0 1 6 】

例 1

ターゲットDNAの増幅

図 2 は、プライマーの相対位置を示す図である。

T B / N T M の rpoB 遺伝子は、まず、RpoB プライマーを用いて、PCR により増幅される。

センスプライマー RpoBF3 の配列は、SEQ ID NO: 1. で示されるように、

10

5' -ACCGACGACATCGACCACTT-3' である。アンチセンスプライマー RpoBR2 の配列は、SEQ ID NO: 2. で示されるように、5' -AGCCGATCAGACCGATGTT-3' である。第一PCR状態は：

95°C	5分	
95°C	1分	
54 °C	1分	} 30 サイクル
72°C	1分	
72°C	5分	
4°C	維持	

20

10x 延長バッファ	5μl
dNTP (10mM)	1μl
rpoBF3 (10uM)	1μl
rpoB R2(10uM)	1μl
Power Taq (5U/ul)	0.4μl
水	36.5μl
テンプレートDNA	5μl
合計	50μl

30

【 0 0 1 7 】

第一PCR産物は、その後、第二PCRのためのテンプレートとして用いられる。第二PCRに用いられるプライマーは、T B プライマーとN T M プライマーである。T B センスプライマー

— T B c1 の配列は、SEQ ID NO: 3 で示されるように、5-CGTACGGTCGGCGAGCTGATCCAA-3'

である。T B アンチプライマー T B cR の配列は、SEQ ID NO: 4 で示されるように、5'

-GACCTCCAGCCCGGCACGCTCACGT-3' である。N T M センスプライマー N T M M5 の配列は

、SEQ ID NO: 5 で示されるように、5' -GGAGCGGATGACCACCCAGGACGTC-3' である。N T

M アンチセンスプライマー N T M RM3 の配列は、SEQ ID NO: 6 で示されるように、5' -

CAGCGGTTGTTCTGGTCCATGAAC-3' である。T B プライマーとN T M プライマーの比率は

、その後、テストされ、その結果は、最適比率が、0.3 μl の T B のプライマーに、1

μl の N T M プライマーを加えたものである (表 1) (図 3)。

40

【 0 0 1 8 】

表 1

	1	2	3	4	5	6	7	8
10xBuffer	5	5	5	5	5	5	5	5
dNTP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tbc1-biotin	0.5	1	1	1.5	0.5	0.3	0.5	0.3
TbcR7-DIG	0.5	1	1	1.5	0.5	0.3	0.5	0.3
NTMM5-biotin	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1.5	1.5
NTMRM3-FITC	0.5	1	0.5	0.5	1	1	1.5	1.5
Taq	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DNA	5	5	5	5	5	5	5	5
H ₂ O	37.3	35.3	36.3	35.3	36.3	36.7	35.3	35.7
Total	50	50	50	50	50	50	50	50

10

95°C 5分
 95°C 30秒
 72°C 60秒 } 35 サイクル
 72°C 5分
 4°C 維持

10x 延長バッファ	5μl
dNTP (10mM)	0.5μl
Tbc1-ビオチン (10uM)	0.3μl
TbcR7-DIG (10uM)	0.3μl
NTMM5-Biotin (10uM)	1μl
NTMRM3-FITC (10uM)	1μl
Power Taq (5U/ul)	0.4μl
水	36.5 μl
テンプレート DNA	5μl
合計	50μl

20

30

テスト結果によると、第二PCR状態は以下のものである：

【 0 0 1 9 】

例 2

ランニングバッファ

三種のランニングバッファがテストされる。バッファAは、10 mMのHEPES、1%のBSA、及び、0.1%のTween 20を含む。バッファBは、10 mMの Tris、1%のBSA、及び、0.1%のTween 20を含む。バッファCは、1×PBS、1%のBSA、及び、0.1%のTween 20を含む。その結果は、バッファBは、最適な状態である（図4）。

40

【 0 0 2 0 】

例 3

プライマーとTB/NTMストリップの特異度

プライマーの特異度をテストするため、気道によく存在する四種のバクテリアのゲノムが、テスト工程に取り込まれる。それらは、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、肺炎桿菌、肺炎連鎖球菌である。その結果は、プライマーとストリップは、TBとNTMに特異的である（図5）。

【 0 0 2 1 】

例 4

TB/NTMストリップの感度

50

T B / N T M ストリップの感度をテストするため、T B / N T M 二本鎖 PCR と T B / N T M ネスト化二本鎖 PCR が DNA を増幅するのに用いられる。その結果は、T B / N T M 二本鎖 PCR により、T B と N T M を検出する制限は 2 0 0 0 0 以上である。T B / N T M ネスト化二本鎖 PCR により、T B を検出する制限は 1 0 で、N T M を検出する制限は 2 0 である (図 6)。ストリップの発色結果は、電気泳動法に適合する。T B / N T M ネスト化二本鎖 PCR により、T B を検出する制限は 1 0 で、N T M を検出する制限は 2 0 である (図 7)。

【 0 0 2 2 】

例 5

臨床サンプルの T B / N T M ストリップの特異性と感度

テストストリップの実際の特異性と感度を確認するため、全部で 2 3 9 の臨床サンプルが収集されて、比較のために、T B / N T M テストストリップ、或いは、公知の培養試験によりテストされる。結果は以下のものである：

臨床サンプル	1	2	3	4	5	6	7	8	9
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	10	11	12	13	14	15	16	17	18
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	19	20	21	22	23	24	25	26	27
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	28	29	30	31	32	33	34	35	36
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	37	38	39	40	41	42	43	44	45
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

10

20

30

臨床サンプル	46	47	48	49	50	51	52	53	54
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	55	56	57	58	59	60	61	62	63
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	64	65	66	67	68	69	70	71	72
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	73	74	75	76	77	78	79	80	81
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	82	83	84	85	86	87	88	89	90
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	91	92	93	94	95	96	97	98	99
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	100	101	102	103	104	105	106	107	108
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	109	110	111	112	113	114	115	116	117
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	118	119	120	121	122	123	124	125	126
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	127	128	129	130	131	132	133	134	135
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

10

20

30

臨床サンプル	136	137	138	139	140	141	142	143	144
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	145	146	147	148	149	150	151	152	153
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	154	155	156	157	158	159	160	161	162
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	163	164	165	166	167	168	169	170	171
培養テストの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB
TB/NTM テスト ストリップの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	NTM	TB	TB

臨床サンプル	172	173	174	175	176	177	178	179	180
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	181	182	183	184	185	186	187	188	189
培養テストの結果	NTM	NTM	TB	NTM	NTM	NTM	NTM	TB	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	TB	NTM	NTM	NTM	NTM	TB	NTM

臨床サンプル	190	191	192	193	194	195	196	197	198
培養テストの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	NTM	NTM

臨床サンプル	199	200	201	202	203	204	205	206	207
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	208	209	210	211	212	213	214	215	216
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	TB	TB	TB	NTM	TB	TB
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	TB	TB	TB	NTM	TB	TB

臨床サンプル	217	218	219	220	221	222	223	224	225
培養テストの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB
TB/NTM テスト ストリップの結果	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB

臨床サンプル	226	227	228	229	230	231	232	233	234
培養テストの結果	TB	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM
TB/NTM テスト ストリップの結果	TB	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM

臨床サンプル	235	236	237	238	239				
培養テストの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM				
TB/NTM テスト ストリップの結果	NTM	NTM	NTM	NTM	NTM				

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

T B / N T M テストストリップによりテストされた 2 3 9 臨床サンプルの 1 サンプル (サンプル 1 6 9) だけは、培養によりテストされた結果に符合しない。よって、T B 検出の T B / N T M テストストリップの感度は 9 7 % で、特異性は 1 0 0 % であり、N T M 検出の T B / N T M テストストリップの感度は 1 0 0 % で、特異性は 9 7 % である。

【 0 0 2 4 】

本発明では好ましい実施例を前述の通り開示したが、これらは決して本発明に限定するものではなく、当該技術を熟知する者なら誰でも、本発明の精神と領域を脱しない範囲内で各種の変動や潤色を加えることができ、従って本発明の保護範囲は、特許請求の範囲で指定した内容を基準とする。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】設計例のコンセプトを示す図である。

【図2】プライマーの相対位置を示す図である。

【図3A】TBとNTMプライマーの比率差動の効果を示す図である。

【図3B】TBとNTMプライマーの比率差動の効果を示す図である。

10

【図4】異なるランニングバッファの効果を示す図で、C：制御バンド、T：TBテストバンド、N：NTMテストバンド、TB(+)：TBポジティブ、NTM(+)：NTMポジティブ、TB(-)：TBネガティブ、及び、NTM(-)：NTMネガティブである。

【図5A】プライマーとストリップの特異度を示す図で、TB：ヒト結核菌、NTM：非結核性抗酸菌、H：インフルエンザ菌、S：黄色ブドウ球菌、K：肺炎桿菌、及び、P：肺炎連鎖球菌である。

【図5B】プライマーとストリップの特異度を示す図で、TB：ヒト結核菌、NTM：非結核性抗酸菌、H：インフルエンザ菌、S：黄色ブドウ球菌、K：肺炎桿菌、及び、P：肺炎連鎖球菌である。

【図5C】プライマーとストリップの特異度を示す図で、TB：ヒト結核菌、NTM：非結核性抗酸菌、H：インフルエンザ菌、S：黄色ブドウ球菌、K：肺炎桿菌、及び、P：肺炎連鎖球菌である。

20

【図5D】プライマーとストリップの特異度を示す図で、TB：ヒト結核菌、NTM：非結核性抗酸菌、H：インフルエンザ菌、S：黄色ブドウ球菌、K：肺炎桿菌、及び、P：肺炎連鎖球菌である。

【図6A】TB/NTM二本鎖PCRとTB/NTMネスト化二本鎖PCRの制限検出を示す図である。

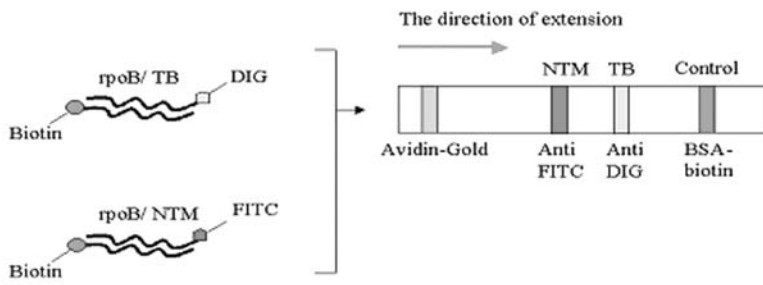
【図6B】TB/NTM二本鎖PCRとTB/NTMネスト化二本鎖PCRの制限検出を示す図である。

【図7A】DNAがTB/NTMネスト化二本鎖PCRにより増幅する時のストリップの制限検出を示す図である。

30

【図7B】DNAがTB/NTMネスト化二本鎖PCRにより増幅する時のストリップの制限検出を示す図である。

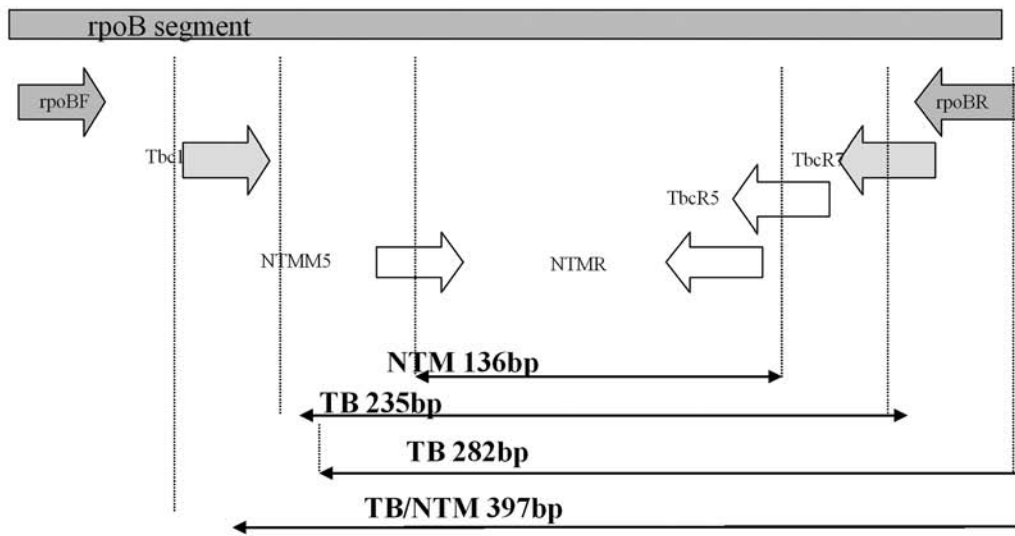
【 図 1 】



TB: *Mycobacterium tuberculosis*

NTM: *Non-tuberculosis mycobacterium*

【 図 2 】



RpoB プライマー

RpoBF3 5'-ACCGACGACATCGACCACTT-3'

RpoBR2 5'-AGCCGATCAGACCGATGTT-3'

TB プライマー :

TbcI 5'-CGTACGGTCGGCGAGCTGATCCAA-3'

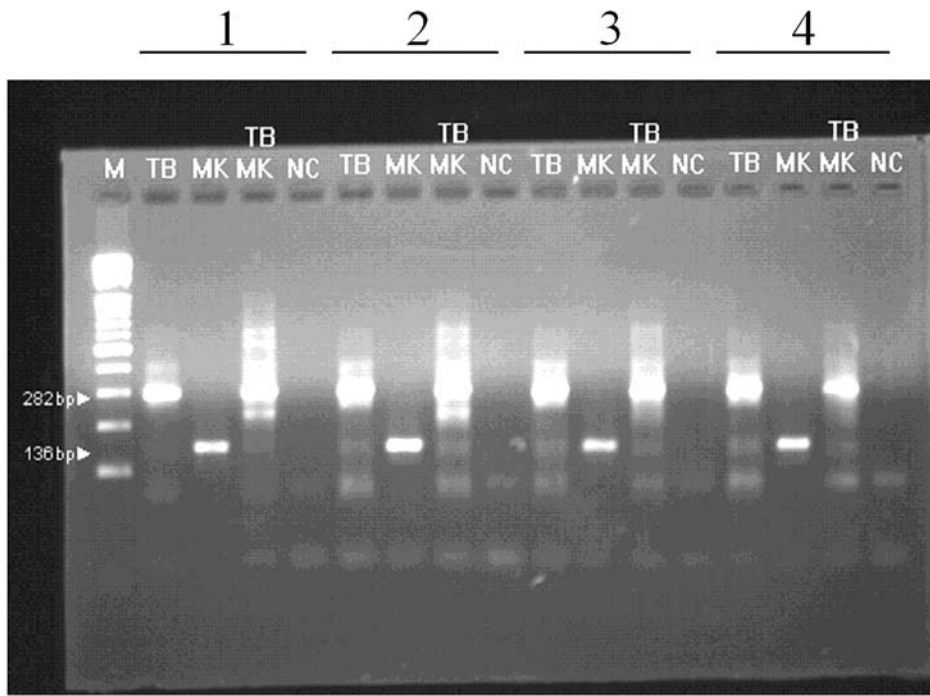
TbcR7 5'-GACCTCCAGCCCGGCACGCTCACGT-3'

NTM プライマー

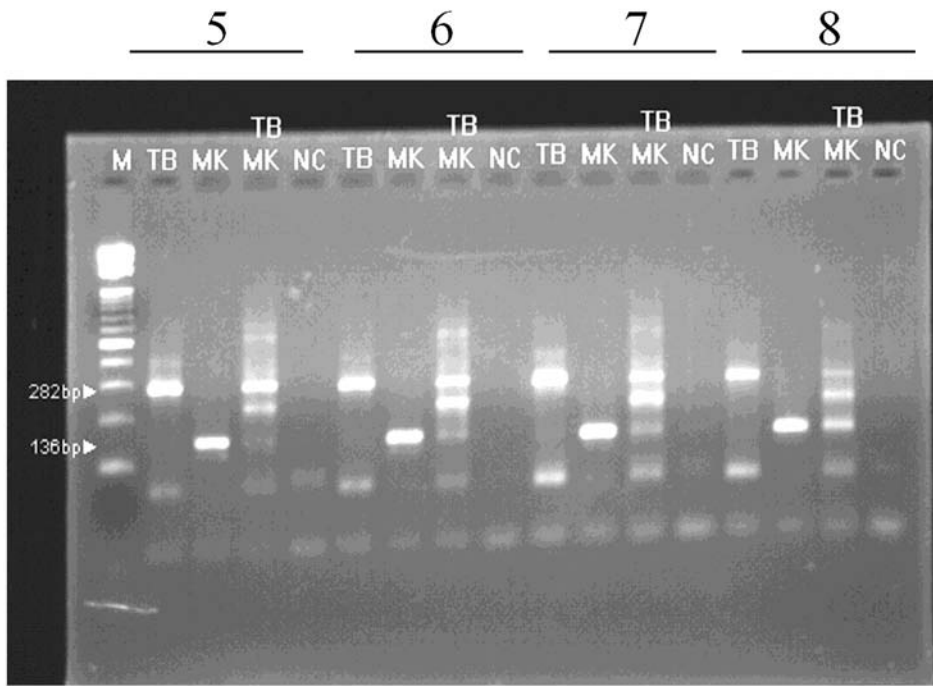
NTMM5 5'-GGAGCGGATGACCACCCAGGACGTC-3'

NTMRM3 5'-CAGCGGGTTGTTCTGGTCCATGAAC-3'

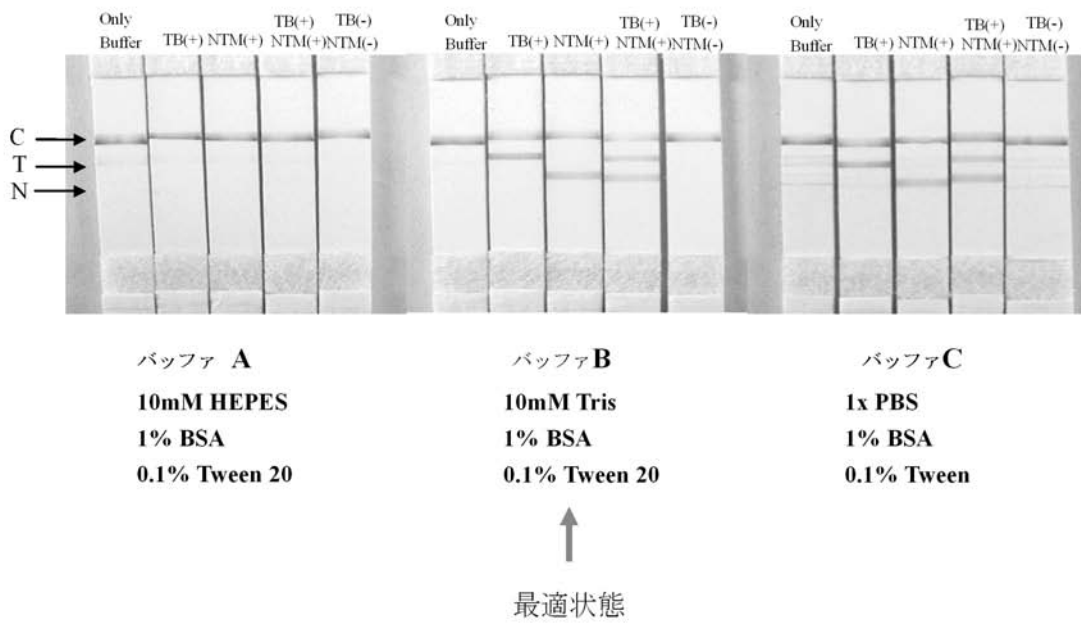
【 図 3 A 】



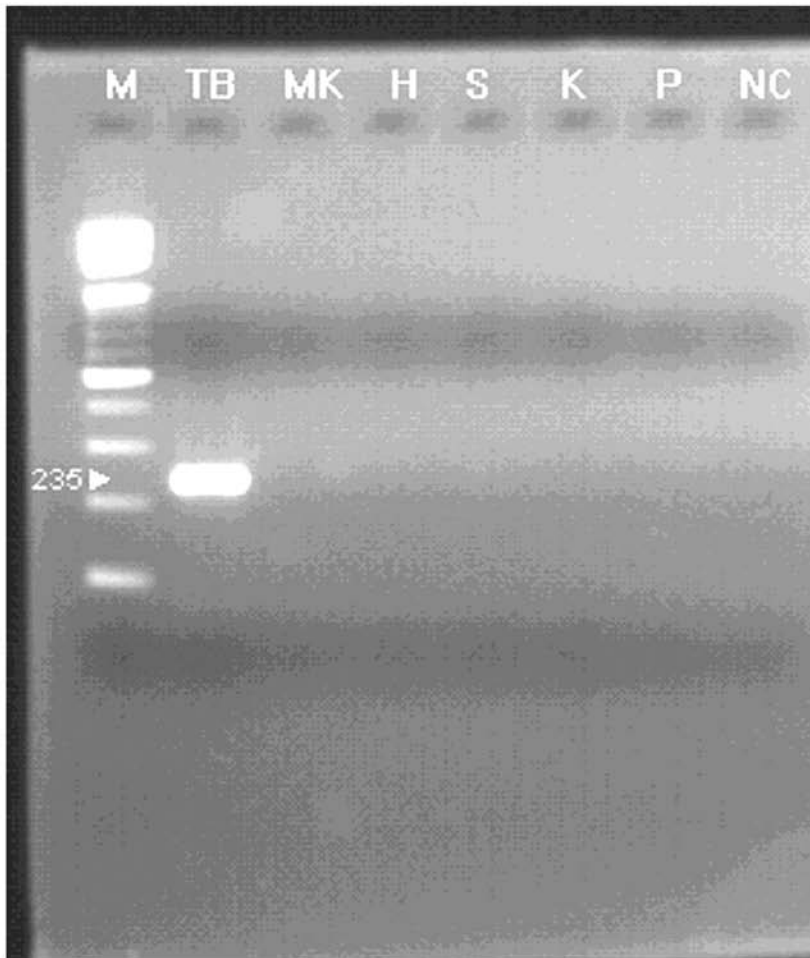
【 図 3 B 】



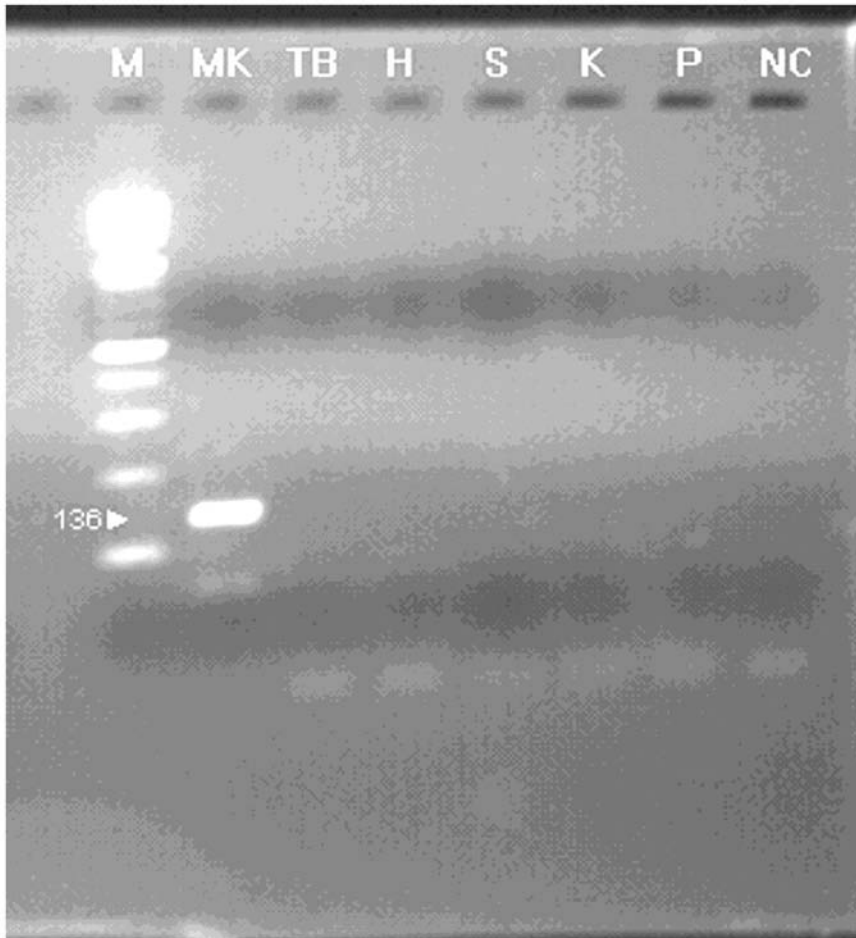
【 図 4 】



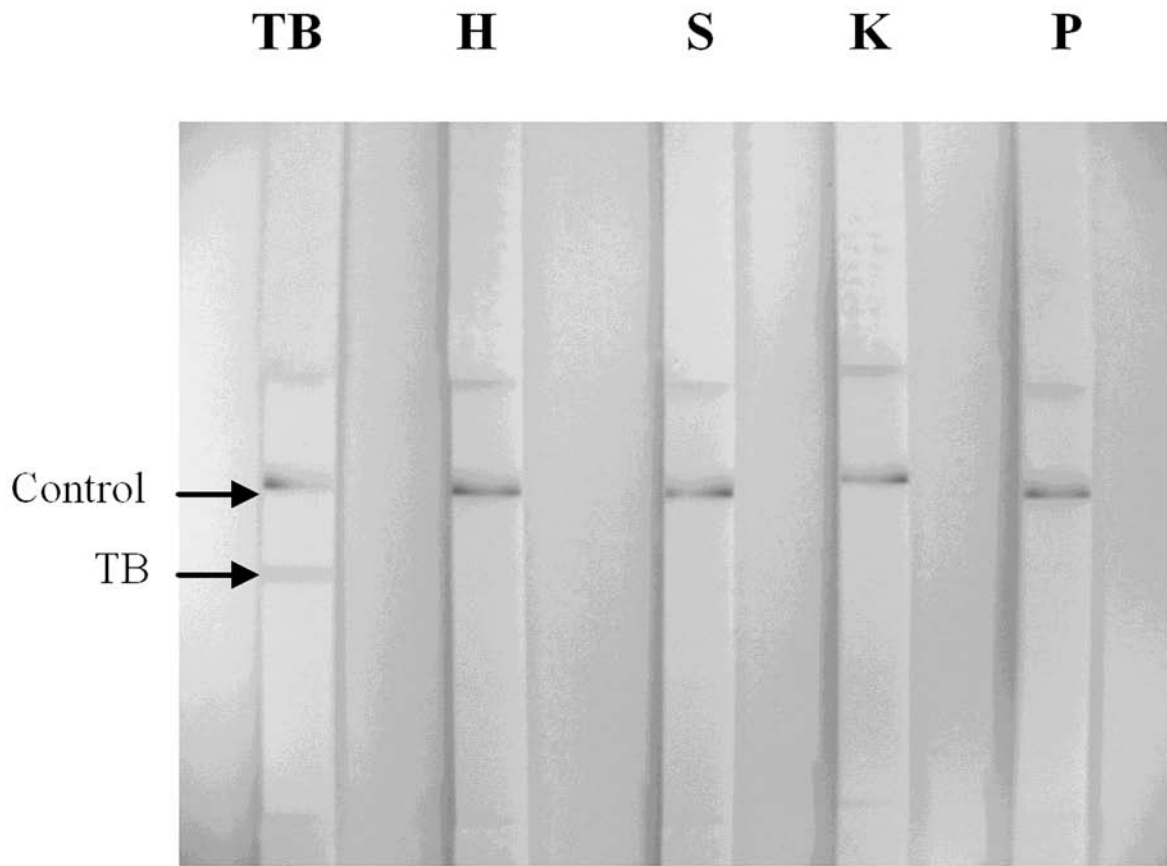
【 図 5 A 】



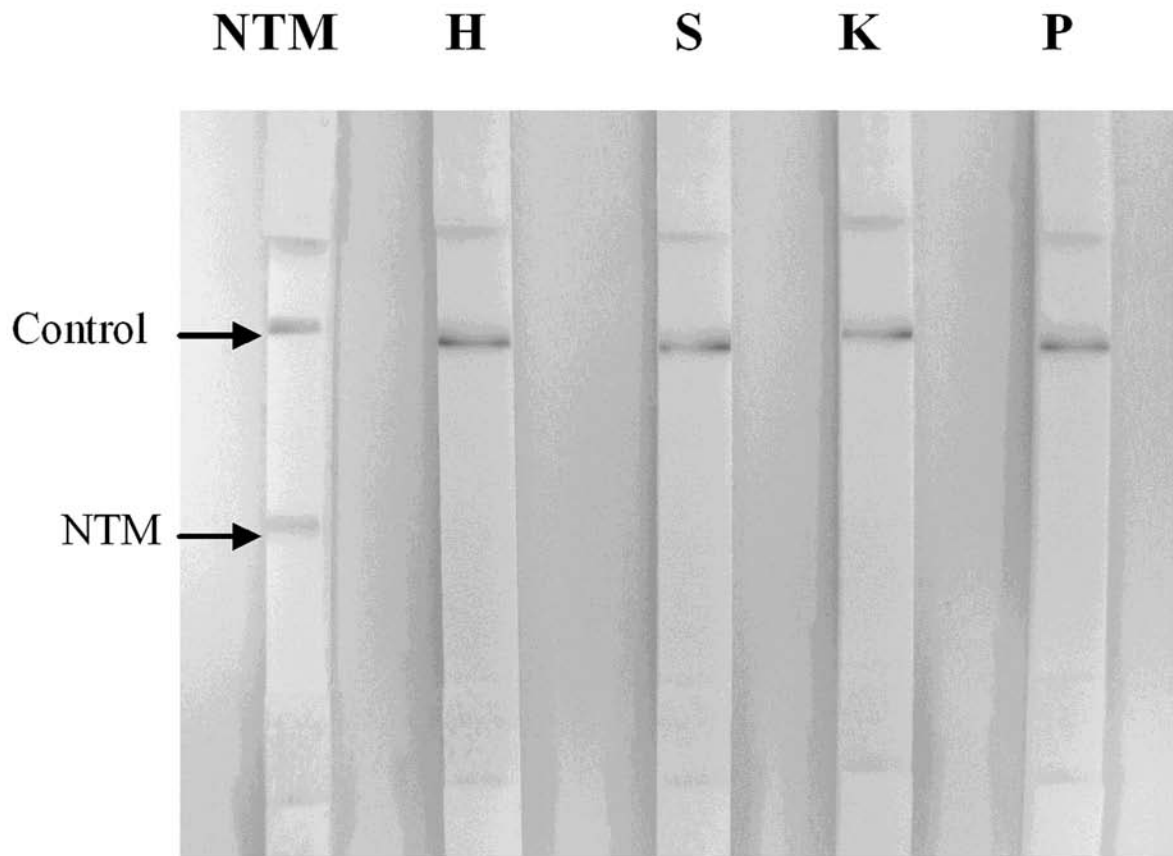
【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



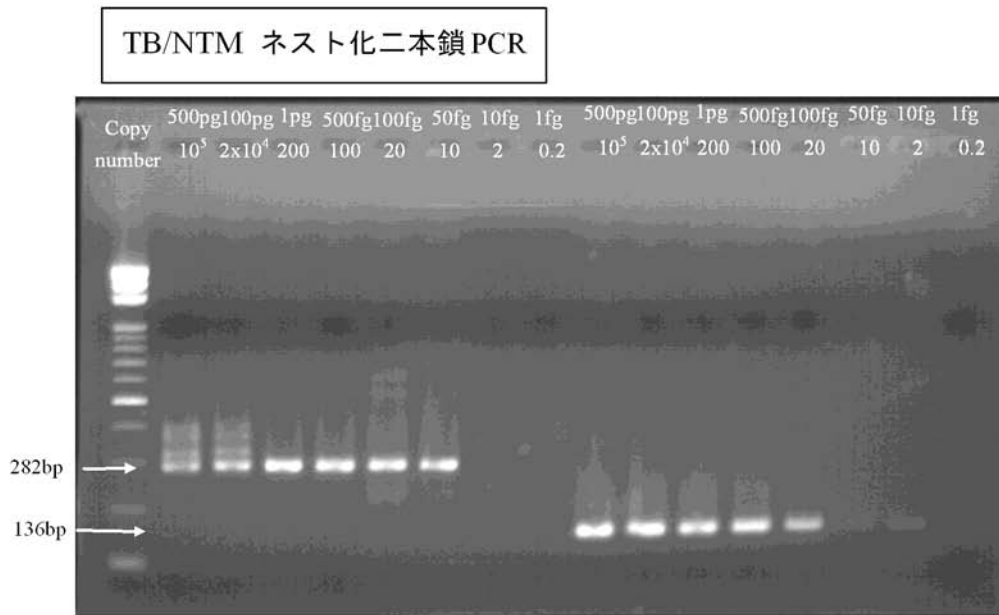
【 図 5 D 】



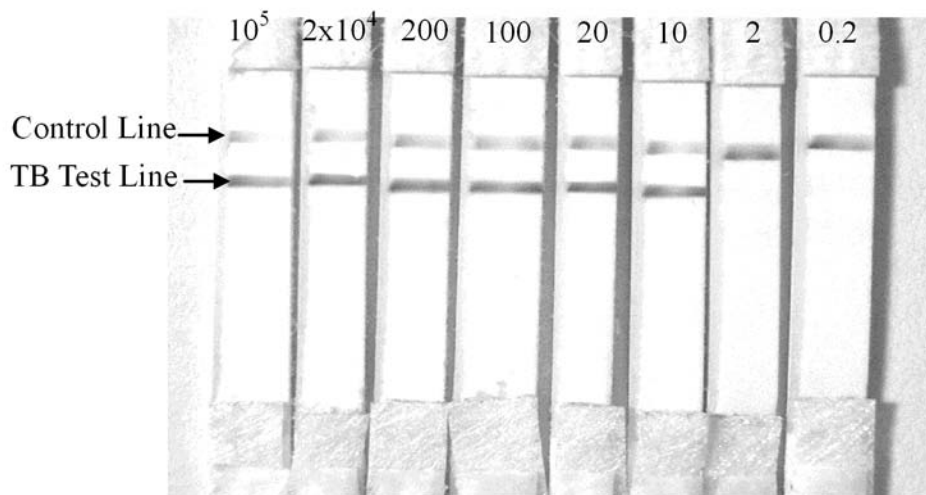
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

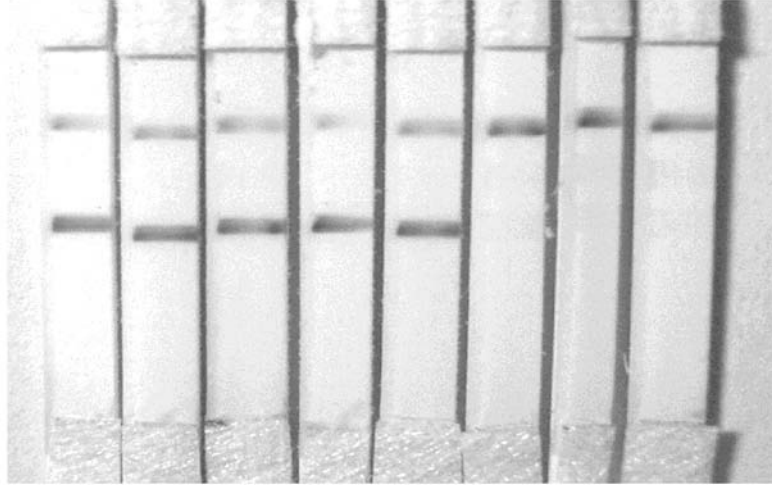


【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

Control Line
NTM Test Line



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 15/00

A

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA09

4B063 QA18 QQ43 QR48 QR62 QS25 QS33 QX02

专利名称(译)	用于检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的核苷酸扩增产物的条带和方法		
公开(公告)号	JP2009133814A	公开(公告)日	2009-06-18
申请号	JP2008146645	申请日	2008-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	亚洲基因科技股ふん		
申请(专利权)人(译)	亚洲基因科技股▲ふん▼有限公司		
[标]发明人	周錦生 伊央撒耘 朱志鋒		
发明人	周 錦生 伊 央撒耘 朱 志鋒		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N33/558		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.F G01N33/543.521 G01N33/53.U G01N33/53.M C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/569.FZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	矾兼 智生		
优先权	11/948389 2007-11-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种测试条和一种检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的核苷酸扩增产物的方法。用于检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的核苷酸扩增产物的测试条包括 (a) 亲和素-金释放区和 (b) 测试带。此外，检测结核分枝杆菌TB和非结核分枝杆菌的核苷酸NTM的方法如下：(a) 扩增具有标记引物的样品DNA。(c) 将测试条浸入混合物中，(d) 使混合物移至测试条的反应区。[选型图]图1

