明　細　書

発明の名称 ：

ｍｅｃＡ遺伝子増幅用プライマーペア、ｍｅｃＡ遺伝子検出キット及びｍｅｃＡ遺伝子検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、メチシリン耐性の特異的な遺伝要素である、ｍｅｃＡ遺伝子を簡便、迅速かつ高感度に検出するためのプライマーペア、キット及び検出方法に関する。

背景技術

[0002] メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ｍｅｔｈｉｃｉｌｌｉｎ ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、以下「ＭＲＳＡ」と略称する）は世界中で院内感染の主要な原因菌となっており、多くの国で臨床上最も重要な薬剤耐性菌として重要視されている。ＭＲＳＡのメチシリン耐性に関わる遺伝子であるｍｅｃＡはＰＢＰ（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｐｒｏｔｅｉｎ）－２’をコードしている（ＰＢＰ－２ａとも呼ばれる）。通常、黄色ブドウ球菌は主に４つのＰＢＰを産生する。ＰＢＰは細胞壁のペプチドグリカン合成に関与しているタンパク質であり、トランスペプチダーゼ活性を有している。β－ラクタム系抗生物質はＰＢＰの活性部位に結合しトランスペプチダーゼ活性を阻害、ペプチドグリカン合成を阻害することで作用する。しかし、ＰＢＰ－２’はβ－ラクタム系抗生物質との親和性を低下させることでペプチドグリカン合成阻害効果を回避している（非特許文献１）。

黄色ブドウ球菌及びコアグラーゼ陰性ブドウ球菌において、メチシリン耐性の有無は感染患者の診断と治療方針の決定において非常に重要な情報である。黄色ブドウ球菌は病原性が強いため、他のコアグラーゼ陰性ブドウ球菌と比較して重要視されているが、メチシリン耐性を獲得した黄色ブドウ球菌及びコアグラーゼ陰性ブドウ球菌についてもコンプロマイズドホストへの感

染が大きな問題となっている。そのためメチシリン耐性ブドウ球菌の院内感染への対策として、迅速な診断、治療のためにメチシリン耐性の迅速な検出が望まれてきた。

メチシリン耐性を試験する方法としては、薬剤感受性試験、イミュノアッセイ、ＰＣＲ（polymerase chain reaction）による検出といった方法が実施されている（非特許文献２）。

薬剤感受性試験では、患者から採取された血液を一日以上培養しブドウ球菌を増やす必要がある。また、イミュノアッセイもブドウ球菌を培養する工程が必要であるため、メチシリン耐性試験の結果が得られるまでに一日以上を要する。

これらと比較して、ＰＣＲなどの核酸増幅検査は感度が非常に高いため培養の過程を必要とせず、患者血液から直接試験を行うことが可能である。そのため、患者血液検体が到着後数時間で試験結果を提出することが出来る（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2007/097323号

[0004] 非特許文献1：Journal of Bacteriology, May 1980 p.275

非特許文献2：Journal of Clinical Microbiology, July 1992, p.1685

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 既にＰＣＲなどの核酸増幅によるメチシリン耐性遺伝子の検出方法は幾つか報告されているが、具体的な検出感度が明記されていない報告が多い。検出感度が明記されていても臨床の現場で使用するに十分な検出感度を達成していないとする報告しかない（非特許文献２）。

一方で、メチシリン耐性遺伝子の検出は、患者の診断、治療方針に大きく影響するため、迅速に正確かつ確実に検出する方法の開発は臨床上の急務で

ある。そのため本発明では迅速に正確かつ確実にメチシリン耐性遺伝子を検出することを課題とする。特に感度の高いメチシリン耐性遺伝子検出を実現するためのプライマーペアを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、核酸増幅法を用いることで患者検体から直接メチシリン耐性遺伝子を迅速に同定するとともに、従来法よりも高い検出感度にて確実に検出する方法である。本発明者は、高感度かつ迅速なメチシリン耐性遺伝子の検出方法の確立を目指して、ＰＣＲ法に着目した。特に高感度にメチシリン耐性遺伝子を検出するためにＰＣＲ法で使用するプライマーの検討を行った。

プライマーの設計に当たっては以下のような条件とした。

増幅効率が低下しない範囲で増幅されるＤＮＡ断片のサイズを大きくした。具体的にはＤＮＡ断片のサイズを１５０ｂｐ以上７００ｂｐ以下とした。増幅されるＤＮＡ断片のサイズを大きくすることにより、PCR反応時の増幅曲線の蛍光強度を高くし、Melting analysisで得られるピークのheightについても高くなるようにした。

ｍｅｃＡホモログの配列を確認し、保存性が高い部分でのみプライマーペアの塩基配列を設計する。具体的には、プライマーの３’末端から５塩基以内に保存性の低い配列を含むものを除外し、塩基配列を修正して保存性の高い配列とした。

以上のようなコンセプトに基づき、特定のＦｗｄ、及びＲｅｖプライマーをそれぞれ３２本作製し、それらを組み合わせて有望と考えられる３１３のプライマーペアを作製し、その中から最適の組み合わせを検討することで、先願である特許文献１と比較して高い検出感度を達成し得るプライマーペアを選抜した。

すなわち本発明にかかるプライマーペアは、

ｍｅｃＡ遺伝子（メチシリン耐性遺伝子）を検出するためのプライマーペアであって、

前記プライマーペアが、以下の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択された

１つのプライマーペアであることを特徴とする。

（ａ）配列番号３と配列番号７の組み合わせ、配列番号２と配列番号９の組み合わせ、配列番号１と配列番号８の組み合わせ、配列番号１と配列番号９の組み合わせ、配列番号４と配列番号１１の組み合わせ、配列番号５と配列番号１２の組み合わせ、配列番号６と配列番号１０の組み合わせ又は配列番号６と配列番号１２の組み合わせからなるプライマーペア、

（ｂ）前記（ａ）において、一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１～２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、

（ｃ）前記（ａ）又は（ｂ）の塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[0007] 本発明にかかるｍｅｃＡ遺伝子検出キットは、上記の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択された少なくとも１つのプライマーペアを含むことを特徴とする。

本発明にかかる検体中のｍｅｃＡの検出方法は、

検体中から調製したＤＮＡと、ＤＮＡを増幅するためのプライマーペアとを用いてＰＣＲを行うＰＣＲ工程と、

前記ＰＣＲ工程により得られる増幅産物中でのｍｅｃＡ遺伝子の検出により、または、該増幅産物の分析により、前記検体中におけるｍｅｃＡ遺伝子の検出を行う工程と、

を有し、

前記ＰＣＲ工程において用いられるプライマーペアが、上記の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択された少なくとも一つのプライマーペアである

ことを特徴とする。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、高感度でのｍｅｃＡ遺伝子検出のためのＰＣＲ用のプライマーペア及びｍｅｃＡ遺伝子検出キット、並びにｍｅｃＡ遺伝子の検出方法を提供することができる。従って、本発明によれば、医療分野、食品分野

等における検体中の微量なｍｅｃＡ遺伝子を検出することを従来の検査キットよりも高感度、高精度に実施することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]メチシリン耐性株とメチシリン感受性株での測定結果の比較を示す図である。図１（ａ）はメチシリン耐性株からのサンプルを用いた場合の増幅曲線とＴｍ値の測定結果を、図１（ｂ）はメチシリン感受性株からのサンプルを用いた場合の増幅曲線とＴｍ値の測定結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] ＜プライマー＞

本発明においてプライマーとは、ＰＣＲ法におけるＤＮＡ複製時に起点となるＤＮＡを指す。本明細書においては、断わりのない限り、プライマーとはＤＮＡプライマーを指す。

本発明のポイントは、検出感度向上という効果が享受できる特定のプライマーペアにある。

特許文献１に記載の配列番号４５の塩基配列からなるプライマーと配列番号４６の塩基配列からなるプライマーのペアは、メチシリン耐性遺伝子（ｍｅｃＡ）の構造遺伝子内の配列にハイブリダイズするＤＮＡ配列を有する。なお、特許文献１に記載の配列番号４５の塩基配列及び配列番号４６の塩基配列を、本明細書では、それぞれ配列番号１３及び１４と表記する。

しかし、上記のプライマーペアでもＰＣＲを用いた検出方法では、十分な検出感度を有しておらず、低濃度のｍｅｃＡを検出することができなかった（後述する実施例５及び表２）。これは低濃度のＭＲＳＡを含む検体を分析した際に、検出感度不足による偽陰性を示す可能性がある。

[0011] ｍｅｃＡ遺伝子の構造遺伝子はおおよそ２１００ｂｐで構成されており、構造遺伝子内にハイブリダイズするように本発明者らにより設計された以下のａ群に含まれる各プライマーペアのそれぞれを用いてＰＣＲを行うことでさらに高感度にｍｅｃＡ遺伝子を検出可能であることが判明した。

（ａ）群：

（ａ１）配列番号３からなるプライマーと、配列番号７からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ２）配列番号２からなるプライマーと、配列番号９からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ３）配列番号１からなるプライマーと、配列番号８からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ４）配列番号１からなるプライマーと、配列番号９からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ５）配列番号４からなるプライマーと、配列番号１１からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ６）配列番号５からなるプライマーと、配列番号１２からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ７）配列番号６からなるプライマーと、配列番号１０からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ａ８）配列番号６からなるプライマーと、配列番号１２からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

[0012] 本発明の効果を享受できる範囲であれば、上記の各プライマー構成するDNA断片（オリゴヌクレオチド）が有する塩基配列中の一部の塩基を変換して得られる改変塩基配列からなる改変プライマーも適用できる。原則、改変プライマーが、上記の各プライマーの相補ＤＮＡ鎖とハイブリダイズ可能であれば各プライマーと同等とみなされる。更に、この同等とみなされる改変プライマーは、元のプライマーの相補ＤＮＡ鎖とハイブリダイズするプライマーとしての機能を有し、かつ、元のプライマーの塩基配列に置いて１または２つの塩基が付加、欠失または置換した改変塩基配列を有するプライマーであることが好ましい。

従って、以下の（ｂ）群に含まれるプライマーペアもｍｅｃＡ遺伝子検出用プライマーペアとして利用することができる。

（ｂ）群：

（ｂ１－１）配列番号３の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号７からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ１－２）配列番号３からなるプライマーと、配列番号７の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ１－３）配列番号３の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号７の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ２－１）配列番号２の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号９からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ２－２）配列番号２からなるプライマーと、配列番号９の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ２－３）配列番号２の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号９の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ３－１）配列番号１の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号８の塩基配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ３－２）配列番号１からなるプライマーと、配列番号８の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ３－３）配列番号１の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号８の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ４－１）配列番号１の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号９からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ４－２）配列番号１からなるプライマーと、配列番号９の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ４－３）配列番号１の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号９の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ５－１）配列番号４の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１１からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ５－２）配列番号４からなるプライマーと、配列番号１１の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ５－３）配列番号４の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１１の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ６－１）配列番号５の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１２からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ６－２）配列番号５からなるプライマーと、配列番号１２の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ６－３）配列番号５の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ７－１）配列番号６の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１０からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ７－２）配列番号６からなるプライマーと、配列番号１０の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ７－３）配列番号６の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１０の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ８－１）配列番号６の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１２からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ８－２）配列番号６からなるプライマーと、配列番号１２の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｂ８－３）配列番号６の改変塩基配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の改変塩基配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

[0013] 更に、上記の各プライマーペアを構成するプライマーの相補配列からなる相補プライマーのペアも、ｍｅｃＡ遺伝子検出用プライマーペアとして利用することができる。すなわち、以下の（ｃ）群に含まれるプライマーペアもｍｅｃＡ遺伝子検出用プライマーペアとして利用することができる。

（ｃ）群：

（ｃ１－１）配列番号３の相補配列からなるプライマーと、配列番号７の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ１－２）配列番号３の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号７の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ１－３）配列番号３の相補配列からなるプライマーと、配列番号７の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ１－４）配列番号３の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号７の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ２－１）配列番号２の相補配列からなるプライマーと、配列番号９の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ２－２）配列番号２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号９の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ２－３）配列番号２の相補配列からなるプライマーと、配列番号９の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ２－４）配列番号２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号９の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ３－１）配列番号１の相補配列からなるプライマーと、配列番号８の相

補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ３－２）配列番号１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号８の塩基配列の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ３－３）配列番号１の相補配列からなるプライマーと、配列番号８の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ３－４）配列番号１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号８の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ４－１）配列番号１の相補配列からなるプライマーと、配列番号９の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ４－２）配列番号１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号９の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ４－３）配列番号１の相補配列からなるプライマーと、配列番号９の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ４－４）配列番号１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号９の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ５－１）配列番号４の相補配列からなるプライマーと、配列番号１１の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ５－２）配列番号４の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１１の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ５－３）配列番号４の相補配列からなるプライマーと、配列番号１１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプラ

イマーペア。

（ｃ５－４）配列番号４の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１１の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ６－１）配列番号５の相補配列からなるプライマーと、配列番号１２の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ６－２）配列番号５の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ６－３）配列番号５の相補配列からなるプライマーと、配列番号１２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ６－４）配列番号５の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ７－１）配列番号６の相補配列からなるプライマーと、配列番号１０の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ７－２）配列番号６の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１０の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ７－３）配列番号６の相補配列からなるプライマーと、配列番号１０の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ７－４）配列番号６の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１０の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ８－１）配列番号６の相補配列からなるプライマーと、配列番号１２の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ８－２）配列番号６の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の相補配列からなるプライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ８－３）配列番号６の相補配列からなるプライマーと、配列番号１２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

（ｃ８－４）配列番号６の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーと、配列番号１２の改変塩基配列の相補配列からなる改変プライマーの組み合わせからなるプライマーペア。

[0014] これらのプライマーペアの中では、プライマーペア（ａ７）、並びに、プライマーペア（ｂ７－１）～（ｂ７－３）、（ｃ７－１）～（ｃ７－４）のプライマーペアが好ましい。

なお、上記の（ａ）群～（ｃ）群に含まれる各プライマーペアは、ｍｅｃＡ遺伝子が有する構造遺伝子内に特異的にハイブリダイズしてｍｅｃＡ遺伝子に特異的なＤＮＡ断片を増幅する点において共通の機能を有する。

[0015] 本発明のプライマーペアは、種々のプライマーの相当量の組み合わせに基づき効果の有無を確認した上で初めて見出したものであり、単なる効果の追認のレベルではなし得ないものであることを付記する。また、配列検索の結果、ｍｅｃＡ遺伝子検出用プライマーペアとしては新規な組み合わせであることを確認していることを付記する。

本発明は、本発明のプライマーペア以外に、細菌、真菌、ウイルスについての公知プライマーを複数併用することを妨げるものではない。

ＰＣＲにおけるＰｒｉｍｅｒ濃度は特に限定されないが、一般的には０．０５μＭ～１．０μＭの範囲で、検討に応じて適宜設定する。

[0016] ＜ＰＣＲ用の酵素＞

本発明で使用されるＰＣＲ用の酵素は、好ましくは耐熱性を有する生物由来の耐熱性ＤＮＡポリメラーゼであり、より好ましくはメタン菌、好熱好酸菌、好熱菌、超好熱菌などの原核生物由来のものである。

本発明に用いられる耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの具体例としては、サーマス・アクアティカス（Ｔｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ）、サーマス・サーモフィラス（Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、バチルス・ステアロサーモフィラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、サーモコッカス・ゴルゴナリウス（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｇｏｒｇｏｎａｒｉｕｓ）、サーモコッカス・コダカラエンシスＫＯＤ１（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｋｏｄａｋａｒａｅｎｓｉｓ　ＫＯＤ１）、パイロコッカス・ウォエセイ（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｗｏｅｓｅｉ）、パイロコッカス・フリオシス（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｕｒｉｏｓｕｓ）、エアロパイラム・ペルニクス（Ａｅｒｏｐｙｒｕｍ　ｐｅｒｎｉｘ）、アクイフェックス・アエオリカス（Ａｑｕｉｆｅｘ　ａｅｏｌｉｃｕｓ）、スルホロブス・トコダイイ（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ　ｔｏｋｏｄａｉｉ）、パイロロバス・フマリ（Ｐｙｒｏｌｏｂｕｓ　ｆｕｍａｒｉｉ）、またはメタノパイラス・カンドレリ（Ｍｅｔｈａｎｏｐｙｒｕｓ　ｋａｎｄｌｅｒｉ）由来の耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを挙げることができる。

また、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼは遺伝子工学的に人工的に合成された耐熱性ＤＮＡポリメラーゼであってもよい。

[0017] ＜その他試薬＞

本発明でＰＣＲ分析のために使用されるプライマーペア以外の試薬は、公知のものを公知の組み合わせで使用することが出来る。測定に必要な試薬はＰＣＲ用の酵素、ｐＨ緩衝液、ｄＮＴＰ、Mg^{2+}源、滅菌水などがあげられる。また、リアルタイムＰＣＲ分析においては蛍光色素等の標識物質が上記に加えて必要となる。

ｐＨ緩衝液は、ＰＣＲ分析に供する試料として、ｐＨ＝７．０～１０．０（より好ましくは、ｐＨ８．０～９．０）に調整するために用いられる。具体的には、Ｔｒｉｓ塩酸緩衝液などが挙げられる。例えば、Ｔｒｉｓ塩酸緩衝液の場合、５ｍＭ～１００ｍＭで使用する。

ｄＮＴＰは、ＰＣＲによるＤＮＡ増幅のためのヌクレオシド源であり、ｄ

ＡＴＰ，ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰの４種類が必要である。また、ｄＮＴＰはホットスタート法に用いるために化学修飾されたもの、例えばＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．製のＣｌｅａｎＡｍｐ™　ｄＮＴＰを用いても良い。使用量は、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰを各々０．１～０．２ｍＭ前後の濃度で使用する。

ＰＣＲによるＤＮＡ増幅においては、Mg^{2+}が必要である。Mg^{2+}源としては$MgCl_2$、$MgSO_4$などが挙げられる。好ましいのは$MgCl_2$であり、その使用量は０．５ｍＭ～５．０ｍＭの範囲で検討に応じて適宜使用する。

蛍光色素は、リアルタイムＰＣＲによるＤＮＡ増幅産物の検出、さらには、増幅されたＤＮＡ断片のＴｍ値の測定目的で用いられ、例えば、標識機能を有するインターカレーターを用いる方法が挙げられる。インターカレーターとしては、エチジウムブロマイド、サイバー・グリーンＩ（ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ Ｉ）やＲｅｓｏｌｉｇｈｔ（Ｒｏｃｈｅ社製）、ＥｖａＧｒｅｅｎ（Ｂｉｏｔｉｕｍ社製）、ＢＯＸＴＯ（ｔａｔａａ　ｂｉｏｃｅｎｔｅｒ製）などが挙げられる。好ましいインターカレーターとしては、ＥｖａＧｒｅｅｎやＲｅｓｏｌｉｇｈｔである。使用量は、使用する蛍光色素の製造販売メーカーの推奨に従う。

その他キットには、ＰＣＲの陽性対照として使用する細菌のゲノムＤＮＡや、陰性対照として使用する滅菌水が含まれていても良い。

[0018] 本発明において用いられるＰＣＲ分析測定用容器（例えば分析測定用チューブ）としては、測定機器に応じた形状や構造を有するものを選択して用いることができる。測定機器の入手先によって推奨されたものを用いれば、特に問題なく測定に用いることができる。

本発明を実施するに際してその他に必要な器具としては、ピペット、ピペット用チップ、１．５ｍｌマイクロチューブなど広く分子生物学の実験に使用される器具類が挙げられ、装置類としてはＰＣＲ、クリーンベンチ、チューブ用遠心機など広く分子生物学の実験に使用される機器が挙げられる。

[0019] ＜キットの態様＞

本発明のｍｅｃＡ遺伝子検出キットは、本発明のプライマーペアによって増幅されるＤＮＡ断片を解析することでｍｅｃＡ遺伝子を検出するキットである。増幅産物としてのＤＮＡ断片の解析は、公知の方法により行うことができる。例えば、ＤＮＡ断片の分子量解析、Ｔｍ値測定（融解曲線分析）などにより、増幅産物としてのＤＮＡ断片の解析を行うことができる。２種以上の解析方法を組み合わせてもよい。好ましくはＴｍ値の測定であり、この目的においてリアルタイムＰＣＲが好適に使用される。分子量の解析は、電気泳動や質量分析計などにより行うことができる。

本発明にかかるｍｅｃＡ遺伝子検出キットは、上述した（ａ）群～（ｃ）群のプライマーペアの１つ以上を含んで構成される。このプライマーの他に、必要に応じて、ＰＣＲ用の酵素、ｐＨ緩衝液、$MgCl_2$、ｄＮＴＰ(又はＣｌｅａｎＡｍｐ™　ｄＮＴＰ)及び滅菌水等の試薬、ＰＣＲ分析測定用容器（例えば分析測定用チューブ）やその他に必要な器具などの部品から選択される少なくとも１種の試薬及び／または部品を含むことができる。更に、リアルタイムＰＣＲでの解析においては蛍光色素を成分として加えることができる。また、ＰＣＲ法の各種態様によっては、これらの成分の他に用いるＰＣＲ法に必要な成分をキットに加えてもよい。これらの各試薬または各部品は、個別に、またはその一部毎に、あるいは全部が一体など、いかなる形態で包装されていても良い。具体的には、例えば以下のような態様である。

１）用いる試薬毎に個分けする。

２）ｐＨ緩衝液、$MgCl_2$、ｄＮＴＰ（又はＣｌｅａｎＡｍｐ™　ｄＮＴＰ）、リアルタイムＰＣＲでの解析においては蛍光色素を予め混合した混合物、一つのプライマー対及びＰＣＲ用の酵素の３つに個分け、すなわち別々に分けて包装する。

３）ｐＨ緩衝液、$MgCl_2$、ｄＮＴＰ（又はＣｌｅａｎＡｍｐ™　ｄＮＴＰ）、リアルタイムＰＣＲでの解析においては蛍光色素、一つのプライマー対を予め混合した混合物、及びＰＣＲ用の酵素の２つに個分け、すなわち別々

に分けて包装する。

４）ｐＨ緩衝液、$MgCl_2$、ｄＮＴＰ（又はＣｌｅａｎＡｍｐ™　ｄＮＴＰ）、リアルタイムＰＣＲでの解析においては蛍光色素、一つのプライマー対及びＰＣＲ用の酵素の全てを予め混合した混合物をパッケージする。

なお、キットが複数のプライマー対を有する場合は、複数のプライマー対を別々に分けて包装する。異なるプライマー対を含む複数の混合物をキットの構成に用いる場合についても、各混合物を別々に分けて包装する。

＜用途分野・検体＞

本発明のｍｅｃＡ遺伝子検出キットは、医療分野、食品分野、環境分析等、様々な分野においてｍｅｃＡ遺伝子検出のために使用できる。また、特許文献１にある感染症起因菌の迅速同定方法と組み合わせて使用し、起因菌同定とｍｅｃＡ遺伝子検出を同時かつ迅速に行うために使用できる。

検査に供される検体としては、特に限定されずに広範囲な検体に適用可能である。具体的には、医療分野において血液、髄液、涙液、眼房水、羊水、関節液、唾液、鼻ぬぐい液、尿、その他体液、カテーテル等医療器具付着物などがあげられる。食品分野においては、食品自体、生産途中の液体、または固体飼料、製造工程内の機器付着物などが挙げられる。

[0020] ＜ＤＮＡ抽出処理＞

本発明のｍｅｃＡ遺伝子検出キットを用いて検体中のｍｅｃＡ遺伝子検出を実施する場合、検体中に存在するであろう細菌からあらかじめＤＮＡを抽出しておく必要がある。ＤＮＡ抽出方法としては、現在、アルカリ溶解法、ボイリング法、フェノール抽出法、ビーズ破砕法などが知られており、また、メーカー各社から様々なＤＮＡ抽出キットも販売されている。

本発明におけるＤＮＡ抽出方法は特に限定されないが、検体により最適な方法は異なるため、対象検体に相応した方法を選択することが望ましい。

＜ＰＣＲ分析＞

本発明のプライマーペアは、ＰＣＲ法において使用される。ＰＣＲ法としては、ｍｅｃＡ遺伝子を検出するための目的遺伝子増幅のためのＰＣＲ法で

あれば種々のＰＣＲ法を利用できる。好ましい分析法としては、リアルタイムＰＣＲであり、より好ましくはリアルタイムＰＣＲとＴｍ値測定のための融解曲線分析の組み合わせである。この場合、使用するリアルタイムＰＣＲ機器は特に限定されない。なお、本願実施例において使用している株式会社キアゲン製Ｒｏｔｏｒ　Ｇｅｎｅ　Ｑは好適に使用可能なリアルタイムＰＣＲ機器の一例である。

ＰＣＲおよびリアルタイムＰＣＲにおいては、装置、手法など通常知られたものを使用すればよい。

ＰＣＲにおける温度サイクルの条件（温度、時間、昇降温速度、サイクル数）は特に限定されず、使用するプライマーやＰＣＲ用の酵素、鋳型などの性質やＰＣＲ後のＤＮＡ検出方法の感度に応じて適宜設定すればよい。こうした条件の設定については多くの文献が既に知られている。

ＰＣＲにおいて、一般的には、鋳型二本鎖ＤＮＡの熱変性ステップ、プライマーのアニーリングステップ、ＰＣＲ用の酵素によるＤＮＡ伸長ステップを繰り返す。熱変性のステップは鋳型二本鎖ＤＮＡが一本鎖に解離する温度と時間であればよく、例えば９０℃～９８℃で数秒～数分を設定する。またＰＣＲ開始時にはその１回目のサイクルにのみ、数分～１０分の熱変性の過程を追加することも多い。プライマーのアニーリングステップはプライマーの塩基配列、塩基数に応じ設定するが、４０℃～７２℃で数秒～数十秒を設定することが多い。ＤＮＡ伸長ステップにおいては、温度についてはＰＣＲ用の酵素の最適温度などの性質に応じ、例えば、５８℃～７６℃が一般的であり、ＤＮＡ伸長ステップの時間については増幅させたいＤＮＡの鎖長とＰＣＲ用の酵素のＤＮＡ合成速度から必要時間を概算し設定する。熱変性、アニーリング、伸長のステップを繰り返すことで目的のＤＮＡを増幅させるが、この繰り返し回数は、鋳型ＤＮＡの量や、ＰＣＲ用の酵素の量、ＰＣＲ後のＤＮＡ検出方法の感度に応じて、適宜変更すればよいが、一般的な例として１０～５０回が例示される。また、アニーリングの温度とＤＮＡ伸長の温度が同程度である場合、両ステップを同時に行うことも可能である。

リアルタイムＰＣＲにおいても、ＤＮＡ増幅に必要な熱変性、アニーリング、ＤＮＡ伸長についての条件設定、さらにはそれらのステップの繰り返し回数は、上記のＰＣＲについての記載と同様である。リアルタイムＰＣＲにおいては、ＤＮＡ伸長のステップの前後などに、インターカレーターに由来する蛍光強度を測定することで増幅されたＤＮＡ量を定量ないしは見積もることが可能である。蛍光強度を測定する温度は、例えばインターカレーターを用いての実施の場合は、ＤＮＡ伸長時の温度そのままでも良く、また、増幅される目的ＤＮＡの鎖長が比較的長く、そのＴｍ値が比較的高い場合には、プライマーダイマーなどの比較的鎖長が短い非特異的に増幅された目的外ＤＮＡ（非特異的増幅ＤＮＡともいう）はそのＴｍ値が比較的低いことを利用して、目的ＤＮＡのＴｍ値と非特異的増幅ＤＮＡのＴｍ値の中間値をはじめとする、これらの間の温度に設定しても良い。こうすることで、特にインターカレーターを用いての実施ではプライマーダイマーなどの非特異的増幅ＤＮＡのみが二本鎖から一本鎖に解離し、蛍光強度から定量ないしは見積もられるＤＮＡ量は目的ＤＮＡについてのものとすることが可能である。

さらに、リアルタイムＰＣＲにおいてはＤＮＡ増幅工程の終了後、融解曲線解析により、増幅されたＤＮＡのＴｍ値を測定できる。融解曲線分析では、温度変化に応じたＤＮＡの二本鎖から一本鎖への解離を観察するが、その温度および検出条件は特に限定はない。一般的に、熱変性（Ｄｅｎａｔｕｒａｔｉｏｎ）（９０℃から９８℃）、二本鎖形成（Ａｎｎｅａｌｉｎｇ）（４０℃から８０℃）、融解（Ｍｅｌｔｉｎｇ）（二本鎖形成の温度から９８℃前後まで徐々に昇温）の段階をへて、融解のステップでの蛍光強度の変化をモニターすることで、融解曲線を得て、そこからＴｍ値を得ることができる。こうした測定はリアルタイムＰＣＲ装置の多くの機種で可能であり、機器の使用方法に準じて実施可能である。

[0021] ＜検出方法＞

本発明にかかる検体中のｍｅｃＡ遺伝子検出方法としては、以下の工程を有する方法を用いることができる。

（１）前記検体から調製した細菌のゲノムＤＮＡと、ｍｅｃＡ遺伝子を含む増幅産物を得るためのプライマーペアと、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼをはじめとするＰＣＲ用試薬を用いてＰＣＲを行う工程。

（２）前記ＰＣＲにおける増幅産物中でのｍｅｃＡ遺伝子の検出、または、該増幅産物の分析により、前記検体中におけるｍｅｃＡ遺伝子の検出を行う工程。

なお、複数のプライマーペアを用いる場合は、ＰＣＲ工程（１）を複数のプライマーペア毎に別々に行う。すなわち、PCR用の１つの反応液中に１つのプライマーペアを添加して、異なるプライマーペアを添加した複数の反応液をそれぞれ個々に用いてPCR工程（１）を行う。

ｍｅｃＡ遺伝子を含む増幅産物を得るためのプライマーペアとして本発明にかかるプライマーペアの少なくとも１種を用いることによって、高感度なメチシリン耐性遺伝子（ｍｅｃＡ）の検出を行うことができる。

この検出方法では、増幅工程を、目的遺伝子としてのｍｅｃＡ遺伝子以外の遺伝子（目的外遺伝子）の増幅抑制下で行うことが好ましい。この目的外遺伝子の増幅抑制には、ホットスタート法ＰＣＲが利用できる。一例として、抗ＤＮＡポリメラーゼ抗体を用いるホットスタート法が挙げられる。その際、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ１Ｕに対して、過剰量の抗ＤＮＡポリメラーゼ抗体を用いることが好ましい。また、特許文献１及び国際公開第２０１０／０８２６４０号明細書に開示されているようにＤＮＡポリメラーゼに対して、可逆的な化学修飾を施すことによるホットスタート法も好適に利用できる。さらには、化学修飾されたｄＮＴＰを用いたり、米国特許出願公開第20070281308号明細書（US2007/0281308A1）に記載のように化学修飾されたプライマーを用いたホットスタート法も好適に利用できる。また、加熱により溶融するワックスなどを用いて、ＤＮＡポリメラーゼと、ＤＮＡポリメラーゼによるＤＮＡ増幅に必要不可欠な構成成分（例えば、プライマーやｄＮＴＰやMg^{2+}塩）とを物理的に隔離することによるホットスタート法も好適に利用できる。

[0022] 増幅産物の検出工程における増幅産物中での目的遺伝子の検出は、検出用の蛍光標識を有するインターカレーターを用いたリアルタイムＰＣＲによりＴｍ値を測定することで実施可能である。好ましいインターカレーターはサイバー・グリーンＩ、ＥｖａＧｒｅｅｎ、ＲｅｓｏｌｉｇｈｔやＢＯＸＴＯ、より好ましくはＥｖａＧｒｅｅｎやＲｅｓｏｌｉｇｈｔである。

リアルタイムＰＣＲを用いたＴｍ値測定による検出工程では、目的遺伝子の増幅産物を検出可能とし、それ以外の目的外遺伝子の増幅産物は非検出として行うことができる。そのための方法としては、目的遺伝子の増幅産物を検出可能とし、それ以外の目的外遺伝子の増幅産物を非検出とする条件を、

（１）目的遺伝子増幅産物の融解温度（ＴｍＡ）が、目的外遺伝子の増幅産物の融解温度（ＴｍＢ）よりも高くなるプライマーを選択し、

（２）増幅産物の検出を、ＴｍＡとＴｍＢとの間の温度で行う

ことにより設定し、目的遺伝子の増幅産物のみを検出する方法が好ましい。

更に、増幅工程と検出工程を、増幅産物の量を表示する表示装置を用いるリアルタイムＰＣＲにより行い、目的外遺伝子の増幅産物が前記表示装置において非表示となる方法を用いることができる。

検出工程における増幅産物の分析は、増幅産物をゲル上などでの電気泳動により展開、可視化する増幅産物の解析により行うことができる。また、増幅産物の分析は、増幅産物の塩基配列を解読することによる増幅産物の解析により行うことも可能である。さらに、増幅産物の分析は増幅産物の分子量を質量分析計で測定して解析する方法によって行うことにもできる。

実施例

[0023] （実施例１）１次スクリーニング

ＭＲＳＡ（理研分譲株，ＪＣＭ３１４５３）の培養液からＨｉｇｈ ｐｕｒｅ ＰＣＲ ｔｅｍｐｌａｔｅ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を使って抽出したゲノムＤＮＡを鋳型に配列番号１５と配列番号１６のプライマーを用いて表１に示した反応液組成でＰＣＲを行いｍｅｃＡＯＲＦ全長を増幅した。次に、ｍｅｃＡの増幅産物の希釈系列を作製し、

配列番号１３からなるフォワードプライマーと配列番号１４からなるリバースプライマーからなる比較用プライマーペアを用いて表１に示した反応液組成でＰＣＲを行い、立ち上がりサイクル数がおおよそ２０サイクルになるｍｅｃＡの増幅産物の濃度を決定し、鋳型として用いた。なお、メチシリン耐性Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ，ＪＣＭ３１４５３は微生物材料開発室（〒３０５－００７４、茨城県つくば市高野台３－１－１、国立研究開発法人　理化学研究所　バイオリソースセンター　微生物材料開発室（ＲＩＫＥＮ　ＢＲＣ－ＪＣＭ）より公的に入手可能である。

次に、作製したプライマーの評価を行うために、３１３のプライマーペアについて表１に示した反応液組成でＰＣＲをおこなった。リアルタイムＰＣＲ装置はローターゲーンＱ　ＭＤｘ　５ｐｌｅｘ　ＨＲＭ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。ＰＣＲの反応条件は、９５℃　５分間加熱した後に、９４℃　１０秒、６５℃　１０秒、７２℃　３０秒を４０回繰り返した。評価は、立ち上がりサイクル数、Ｈｉｇｈ　ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｍｅｌｔｉｎｇ　ａｎａｌｙｓｉｓ（ＨＲＭ）でのピークの形状、電気泳動でのバンドの強度、電気泳動での非特異的産物の有無について、比較用プライマーペアでの結果と比較し改善が認められるもの、８８ペアを選抜した。

[0024]（実施例２）２次スクリーニング

ＭＲＳＡ（理研分譲株，ＪＣＭ３１４５３）の培養液からＨｉｇｈ　ｐｕｒｅ　ＰＣＲ　ｔｅｍｐｌａｔｅ　ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　ｋｉｔ　（Ｒｏｃｈｅ）を使って抽出したゲノムＤＮＡの濃度を、５０μｇ／ｍｌ　ｈｕｍａｎ　ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ溶液（ｉｎｖｉｒｏｇｅｎ）で立ち上がりサイクル数がおおよそ２０サイクルになるよう調整した溶液を鋳型として用いた。

８８のプライマーペアについて表１に示した反応液組成でＰＣＲを行うことで評価した。リアルタイムＰＣＲ装置はローターゲーンＱ　ＭＤｘ　５ｐｌｅｘ　ＨＲＭ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。ＰＣＲの反応条件は、９５℃　５分間加熱した後に、９４℃　１０秒、６５℃　１０秒、７２℃　３０秒を

４０回繰り返した。評価は、立ち上がりサイクル数、ＨＲＭでのピークの形状、電気泳動でのバンドの強度、電気泳動での非特異的産物の有無について、比較用プライマーペアでの結果と比較し改善が認められた５７ペアを選抜した。

[0025]（実施例３）３次スクリーニング

ＭＲＳＡ（理研分譲株，ＪＣＭ３１４５３）の培養液からＨｉｇｈ ｐｕｒｅ ＰＣＲ ｔｅｍｐｌａｔｅ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を使って抽出したゲノムＤＮＡの濃度を、５０μｇ／ｍｌ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ溶液（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で１０．４分子／反応液になるよう調整した溶液を鋳型として用いた。５７のプライマーペアについて表１に示した反応液組成を用いた３重測定でＰＣＲを行うことで評価した。リアルタイムＰＣＲ装置はローターシーンＱ ＭＤｘ ５ｐｌｅｘ ＨＲＭ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。ＰＣＲの反応条件は、９５℃ ５分間加熱した後に、９４℃ １０秒、６５℃ １０秒、７２℃ ３０秒を４０回繰り返した。評価は、３重測定の全てで増幅が見られるか、ＨＲＭでのｄＦ／ｄＴのＨｅｉｇｈｔ（ｃｈａｎｎｅｌＡ）、プライマーダイマーの有無、非特異的産物のピークの有無について、比較用プライマーペアでの結果と比較し改善が認められた９ペアを選抜した。

[0026]（実施例４）最終スクリーニング

ＭＲＳＡ（理研分譲株，ＪＣＭ３１４５３）の培養液からＨｉｇｈ ｐｕｒｅ ＰＣＲ ｔｅｍｐｌａｔｅ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ）を使って抽出したゲノムＤＮＡを５０μｇ／ｍｌ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ溶液（ｉｎｖｉｒｏｇｅｎ）で各濃度（コピー数／反応液：表２ではCopies/Reactionと表示）になるよう調整した溶液を鋳型として用いた。９のプライマーペアについて表１に示した反応液組成で、３重測定でＰＣＲを行うことで評価した。リアルタイムＰＣＲ装置はローターシーンＱ ＭＤｘ ５ｐｌｅｘ ＨＲＭ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。ＰＣＲの反応条件は、９５℃ ５分間加熱した後に、９４℃ １０秒、６５℃ １０

秒、７２℃　３０秒を４０回繰り返した。３重測定の全てで増幅が見られる最低濃度を検出限界とした。なお、目的とする増幅産物が得られたかどうかはＴｍ値の測定により確認した。

その結果、先願である特許文献１で示された比較用プライマーペアを用いて検出を行った場合よりも検出限界の向上が見られた８ペアを選抜した。その結果を表２に示す。また、比較用のプライマーペアが有する配列番号１３、１４、選抜された８ペアが有する各塩基配列を表３に示す。

[0027]（実施例５）メチシリン耐性株、メチシリン感受性株での比較

Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ（メチシリン感受性　理研分譲株，ＪＣＭ２１５１）及びＭＲＳＡ（メチシリン耐性　理研分譲株，ＪＣＭ１６５５５）の培養液からＨｉｇｈ　ｐｕｒｅ　ＰＣＲ　ｔｅｍｐｌａｔｅ　ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　ｋｉｔ　（Ｒｏｃｈｅ）を使って抽出したゲノムＤＮＡ溶液を鋳型として用いた。配列番号６と配列番号１０のプライマーペアについて表１に示した反応液組成で、ＰＣＲを行うことで評価した。リアルタイムＰＣＲ装置はローターゲーンＱ　ＭＤｘ　５ｐｌｅｘ　ＨＲＭ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いた。ＰＣＲの反応条件は、９５℃　５分間加熱した後に、９４℃　１０秒、６５℃　１０秒、７２℃　３０秒を４０回繰り返した。なお、目的とする増幅産物が得られたかどうかはＴｍ値の測定により、８１℃付近でのピークの有無にて確認した。メチシリン耐性株の結果を図１（ａ）に、メチシリン感受性株の結果を図１（ｂ）に示す。

[0028]

[表1]

表1 反応液組成

試薬名	容量
鋳型	2.0 μL
10X Thnuder Taq Buffer	2.0 μL
25mM $MgCl_2$	1.6 μL
e-DNAP	1.0 Unit
2mM CleanAmp-dNTP	2.0 μL
EvaGreen (Biotium)	1.0 μL
10mM forward primer	0.6 μL
10mM reverse primer	0.6 μL
DW	適量
Total	20.0 μL

（DW：脱イオン水）

[0029] [表2]

表２：

Primer Pair	Forward primer	Reverse primer	検出限界 (Copies/Reaction)
a1	配列番号３	配列番号７	5.2
a2	配列番号２	配列番号９	5.2
a3	配列番号１	配列番号８	2.6
a4	配列番号１	配列番号９	10.4
a5	配列番号４	配列番号１１	5.2
a6	配列番号５	配列番号１２	5.2
a7	配列番号６	配列番号１０	2.6
a8	配列番号６	配列番号１２	2.6
比較用	配列番号１３	配列番号１４	100.4

[0030]

[表3]

表３

	sequence (5'→3')
配列番号1	CTGCTATCCACCCTCAAACAG
配列番号2	ACTGCTATCCACCCTCAAAC
配列番号3	GAAGATGGCTATCGTGTCAC
配列番号4	ATCTTGGGGTGGTTACAACG
配列番号5	TAGCACTCGAATTAGGCAGTAAG
配列番号6	AGCTGATTCAGGTTACGGAC
配列番号7	AATCTGGAACTTGTTGAGCAG
配列番号8	AACGTTGTAACCACCCCAAG
配列番号9	TGTAACGTTGTAACCACCCC
配列番号10	GATTTTGGCATTGTAGCTAGCC
配列番号11	ACCACCCAATTTGTCTGCC
配列番号12	GTACCGGATTTGCCAATTAAG
配列番号13	CAAACTACGGTAACATTGATCGC
配列番号14	ATGTATGCTTTGGTCTTTCTGC
配列番号15	ATGAAAAAGATAAAAATTGTTC
配列番号16	TTATTCATCTATATCGTAT

産業上の利用可能性

[0031] 表２に記載の試験結果から、本発明のプライマーペアを用いる本発明の検出方法は、１反応中１０コピー以下という極めて微量なｍｅｃＡ遺伝子を検出可能であることがわかった。本発明の検出方法は、極少量の検体中の極めて希薄なｍｅｃＡ遺伝子を高感度、高精度、かつ迅速に検出可能であることから、十分な実用性と広い応用性を備えている。本発明のプライマーペア、検出方法及び検出キットは、医療分野、食品分野、環境分析において生じる、様々な検体中の微量のｍｅｃＡ遺伝子の検出に利用することが可能である。

請求の範囲

[請求項1] ｍｅｃＡ遺伝子（メチシリン耐性遺伝子）を検出するためのプライマーペアであって、

前記プライマーペアが、以下の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択された１つのプライマーペアであることを特徴とするｍｅｃＡ遺伝子を検出するためのプライマーペア。

（ａ）配列番号３と配列番号７の組み合わせ、配列番号２と配列番号９の組み合わせ、配列番号１と配列番号８の組み合わせ、配列番号１と配列番号９の組み合わせ、配列番号４と配列番号１１の組み合わせ、配列番号５と配列番号１２の組み合わせ、配列番号６と配列番号１０の組み合わせ又は配列番号６と配列番号１２の組み合わせからなるプライマーペア、

（ｂ）前記（ａ）において、一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、

（ｃ）前記（ａ）又は（ｂ）の塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[請求項2] 前記プライマーペアが、配列番号６と配列番号１０の組み合わせからなるプライマーペア、または当該組み合わせの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペアである、請求項１に記載のプライマーペア。

[請求項3] プライマーペアを含む、ｍｅｃＡ遺伝子検出キットであって、

前記プライマーペアが、以下の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択されたすくなくとも１つのプライマーペアであることを特徴とするｍｅｃＡ遺伝子検出キット。

（ａ）配列番号３と配列番号７の組み合わせ、配列番号２と配列番号９の組み合わせ、配列番号１と配列番号８の組み合わせ、配列番号１

と配列番号９の組み合わせ、配列番号４と配列番号１１の組み合わせ、配列番号５と配列番号１２の組み合わせ、配列番号６と配列番号１０の組み合わせ又は配列番号６と配列番号１２の組み合わせからなるプライマーペア、

（ｂ）前記（ａ）において、一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、

（ｃ）前記（ａ）又は（ｂ）の塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[請求項4] 前記プライマーペアが、配列番号６と配列番号１０の組み合わせからなるプライマーペア、または当該組み合わせの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペアである、請求項３に記載のキット。

[請求項5] ＰＣＲ用の酵素、ＰＣＲ用の試薬及びＰＣＲ用の器具の少なくとも１種を含む、請求項３または４に記載のキット。

[請求項6] 検体中のｍｅｃＡの検出方法であって、

検体中から調製したＤＮＡと、ＤＮＡを増幅するためのプライマーペアとを用いてＰＣＲを行うＰＣＲ工程と、

前記ＰＣＲ工程により得られる増幅産物中でのｍｅｃＡ遺伝子の検出により、または、該増幅産物の分析により、前記検体中におけるｍｅｃＡ遺伝子の検出を行う工程と、

を有し、

前記ＰＣＲ工程において用いられるプライマーペアが、以下の（ａ）～（ｃ）からなる群から選択されたすくなくとも１つのプライマーペアであることを特徴とするｍｅｃＡ遺伝子の検出方法。

（ａ）配列番号３と配列番号７の組み合わせ、配列番号２と配列番号９の組み合わせ、配列番号１と配列番号８の組み合わせ、配列番号１

と配列番号９の組み合わせ、配列番号４と配列番号１１の組み合わせ、配列番号５と配列番号１２の組み合わせ、配列番号６と配列番号１０の組み合わせ又は配列番号６と配列番号１２の組み合わせからなるプライマーペア、

（ｂ）前記（ａ）において、一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、

（ｃ）前記（ａ）又は（ｂ）の塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[請求項7] 前記プライマーペアが、配列番号６と配列番号１０の組み合わせからなるプライマーペア、または当該組み合わせの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で１または２の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペアである、請求項６に記載の検出方法。