

原 著

65 kDa 抗原遺伝子を検出するプライマーによる
各種抗酸菌のPCR産物のシークエンス

山崎利雄・中村玲子

国立予防衛生研究所細菌部

受付 平成4年12月1日

ANALYSIS OF PCR PRODUCTS FROM VARIOUS MYCOBACTERIA USING
A PRIMER PAIR FOR THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF 65
KIRODALTON ANTIGEN

Toshio YAMAZAKI * and Reiko M. NAKAMURA

(Received for publication December 1, 1992)

Sequences of the DNA fragments amplified in PCR using a primer pair YNP-1 and YNP-2 and template DNAs from various mycobacteria were analysed with the kit Sequenase Ver. 2.0. The size of each PCR product was as follows ; 164 bp for *M. tuberculosis* and *M. bovis*, 137 bp for *M. kansasii*, 109 bp for *M. intracellulare*, 136 bp for *M. gordonae*. Homology of the sequences to *M. tuberculosis* was 100% to *M. bovis*, 76% to *M. kansasii*, 64% to *M. intracellulare*, and 74% to *M. gordonae*. Only 2 of 12 strains belonging to *M. avium* were positive in PCR in this experiment. The sequence of these PCR products was 100% homologous to that of *M. intracellulare*.

RFLP using Mbo I and BstE II was examined in each PCR product. Theoretically, it is expected that the product of *M. tuberculosis* complex is cut into 119 bp and 45 bp fragments by BstE II and 140 bp and 24 bp fragments by Mbo I ; *M. kansasii* is cut by only Mbo I into 102 bp and 35 bp fragments ; *M. gordonae* 92 bp and 44 bp fragments by BstE II and 112 bp and 24 bp fragments by Mbo I ; Neither enzyme can cut the product of *M. intracellulare*.

The results of the enzyme digestion were consistent with the expectation. Thus, it is suggested that the combination of PCR and RFLP would become a powerful tool for the detection and identification of mycobacteria from the clinical isolates within a short time as 48 hours.

Key words : PCR, Mycobacteria, Nucleotide-sequence, RFLP

キーワード : ポリメラーゼ鎖反応 (PCR), 抗酸菌, 塩基配列, 制限酵素切断様式

* From the Department of Bacteriology, National Institute of Health, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan.

緒 言

わが国の結核は、化学療法剤の開発や、生活水準の向上で国民の栄養状態が改善されたことにより、患者数は激減したとはい、いまだに年間5万人の結核患者が新規に登録されている最大の細菌感染症である。欧米の先進国においてはAIDSの流行に伴い、結核患者の増加がみられている。日本ではAIDS患者数が少ないためこのような傾向はまだ認められていないが、将来同様な危険が考えられる。また、結核感染率の高いアジア諸国からの人の流入、日本からのこれら地域への旅行者の増加による日本への結核の持ち込みの可能性が増え結核対策はますます重要になってきた¹⁾。

結核の確定診断には、菌の分離と同定が必要である^{2)~4)}。しかし、結核菌の発育が遅いため現行の分離培養法では確定診断に4~8週間を必要とする。迅速な患者の発見、治療のために迅速な菌の検出・鑑別同定法の開発が望まれている。近年、Polymerase chain reaction (PCR) 法を使った抗酸菌の迅速検出法が報告されてきている^{5)~13)}。われわれも喀痰より直接PCR法を用いて、抗酸菌を検出する方法を報告¹⁴⁾した。Paoらは結核菌の65 kDa 抗原遺伝子の一部をコードするプライマーを用いてPCRを行うと抗酸菌の種によって増幅されるDNA断片の大きさが異なると報告しているが、今回われわれは、これを追試し確認した。さらにこの各種抗酸菌の増幅されたPCR断片の塩基配列を決定し種間の異同を比較検討した。また、塩基配列の特異性を利用して適当な制限酵素を選択しRFLPによる菌種の同定を検討したのであわせて報告する。

材料と方法

抗酸菌：当研究室保存菌を用いた。*M. tuberculosis* H37Rv NIHJ1633, *M. tuberculosis* H37Ra NIHJ1634, *M. bovis* BCG-Japan NIHJ1608, *M. bovis* Ravenel NIHJ1607, *M. kansasii* NIHJ1619, *M. intracellulare* NIHJ1618, *M. gordonae* NIHJ1617の5菌種7株を、また、*M. avium*に関しては、*M. avium* NIHJ1605のほか、臨床分離株でGen-probe法により*M. avium*と同定された11株、計12株をそれぞれ1%小川培地に継代し、37°C 2~3週間培養した菌を用いた。

DNA抽出法：DNA抽出方法は、すでに報告¹⁴⁾した。すなわち、1%小川培地37°C 2~3週間培養菌を1白金耳取り、1.5 ml エッペンドルフチューブ内で滅菌精製水にて洗浄後、アセトンにて脱脂、37°C 1時間プロテナーゼK (1 mg/ml) 处理、60°C 2時間SDS(最終濃度1%) 处理後、フェノール法によって抽出、エタノール沈殿によって精製した。抽出したDNA量

を測定後、その50 ngをPCRに用いた。

プライマー：Paoらは、Shinnickらの報告⁶⁾した結核菌エルドマン株の65 kDa 抗原遺伝子の塩基配列とともにプライマーを作成し、塩基配列91~254のDNA断片が増幅されることを示した⁵⁾。その塩基配列は、センス側が、5' C T A G G T C G G G A C G G T G A G G C C A G G 3'、アンチセンス側が、5' C A T T G C G A A G T G A T T C C T C C G G A T 3'である。われわれはこれらのプライマーを合成し、それぞれYNP-1, YNP-2と命名して用いた。プライマーの合成は、株式会社種橋器械店(東京)に依託した。

PCR：PCR反応は、DNAサーマルシーカンサー(岩城硝子社、TSR-300型)を用い、初めに94°C 1分間加熱後、DNA変性94°C 1分間、アニーリング60°C 1分間、DNAの合成72°C 1.5分間に30サイクル行った後、72°C 10分間DNAの合成を行った。PCR反応終了後、10 μlを2%アガロース電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

増幅DNA断片のシークエンス法：U. S. Biochemical社キットSequenase Ver. 2.0 (TOYOB) 使用による、ジデオキシ法¹⁵⁾を用いた。PCRによって増幅したDNA断片を電気泳動後、アガロースゲルよりMERmaid™キット(BIO 101, Inc.)にてDNA断片を精製し、テンペレートDNAとした。Winshipの方法¹⁷⁾により、1.5 ml エッペンドルフチューブ中にテンペレートDNA 0.25 pmol、プライマー(YNP-1またはYNP-2) 20 pmol、ジメチルスルフォキシド(DMSO) 1 μl、Sequence buffer(キットに含まれるもの) 2 μl、精製水を加え全量10 μlにし、95°Cで3分間処理し熱変性後、直ちにドライアイスに接触させ凍結する。再融解後、このチューブ中でキットの指示に従い、0.1 M DDT 1 μl、Labeling mixture(キットに含まれるもの) 2 μl、[α-³²P] ATP (10 μCi/ml) 0.5 μl、8倍に希釈したSequence enzyme(キットに含まれるもの) 2 μlを加え室温に5分間放置し、標識を行う。ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTPをそれぞれ2.5 μl入れたチューブに標識済み混合液3.5 μlずつ添加後37°C、5分間ターミネーション反応を行った。その後、Stop solution(キットに含まれるもの) 4 μlをそれぞれのチューブに加え、沸騰水中で2分間煮沸し、氷水中で急冷し、8%アクリラミドゲル内にて1500Vで1.5~3時間電気泳動した。ゲルをガラス板からはがし、ラップに包み、X線フィルムをセットして-80°C 1晩オートラジオグラフィーを行い、フィルムを現像して検出した。プライマーはYNP-1またはYNP-2を用い、センス側およびアンチセンス側からそれぞれ塩基配列を読み、比較して確認した。

RFLP法：プライマーYNP-1, YNP-2により

増幅した DNA 断片を、制限酵素 *BstE* II (日本ジーン) および *Mbo* I (宝酒造) で切断した。PCR 後の反応液をエタノール沈殿し、精製水 30 μ l に再溶解後、その 8 μ l に 10 倍酵素バッファー 1 μ l、制限酵素 1 μ l (10 unit) 加え、*BstE* II は 60°C 1 時間、*Mbo* I は、37°C 1 時間、反応後、BPB を加え、4% アガロース電気泳動を行い、そのパターンを比較した。

結 果

1. YNP-1, YNP-2 によって増幅される DNA 断片の大きさ

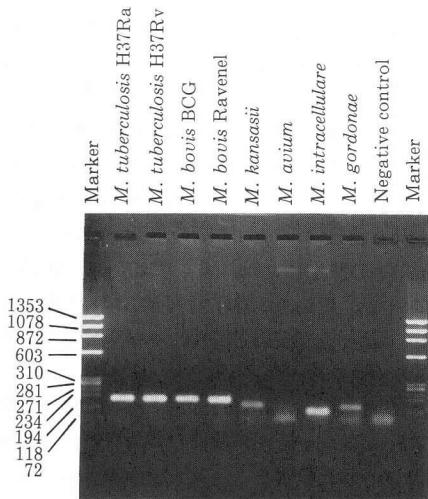


図 1 抗酸菌 DNA とプライマー YNP-1, YNP-2 を用いた PCR

多くの抗酸菌は YNP-1, YNP-2 をプライマーとする PCR によって増幅される DNA 部分をもっている。しかしその増幅 DNA 断片の大きさは菌種によって異なり、図 1 に示すように結核菌群では予想される大きさの位置にバンドが見られるが、非定型抗酸菌では、結核菌群よりわずかに小さな DNA 断片が生じることが知られた。中でも *M. intracellulare* は、特に小さかった。また、*M. avium* は使用した 12 株中臨床分離の 2 株だけが増幅されたが、他の株ではプライマー YNP-1, YNP-2 によって PCR で DNA が増幅されなかつた。なお、図 1 の Negative control に見られる染色バンドは、プライマーの結合体であり、約 10 kbp 付近に見られる染色バンドは、PCR を行わないテンペレート DNA (10 ng) のみでも出現するので抽出過程で切断された菌の DNA であると思われる。

2. PCR 産物のシーケンス法の検討

M13 mp 系ファージや pUC 系プラスミドのサブクローンング作業をせず、PCR に用いたプライマーを使って、直接 DNA の塩基配列を読むための条件を検討した。Sequenase Ver 2.0 U. S. Biochemical 社キットを用い Winship の方法を一部修正して実施した。PCR 産物の DNA 断片をテンペレートとし、YNP-1、または YNP-2 のプライマーのモル比を 1 : 80 にし、DMSO を最終濃度 10% に加えた。すなわち、1.5 ml エッペンドルフチューブ中にテンペレート DNA 0.25 pMol, プライマー 20 pMol, DMSO 1 μ l, 5×Sequence buffer 2 μ l, 精製水を加え総量 10 μ l にした後、沸騰水中で 3 分間加熱後直ちにドライアイス中で急冷した。

Labeling mixture (キット中に含まれる) は、通常

	1	10	20	30	40	50	60
<i>M. tuberculosis</i>	5'	CTAGGT CGGGACGGTGAGGCCAGGCCGTCGTCGCAGCGAGTGGCAGCGAGGACAACATTG					
<i>M. bovis</i>	5'	CTAGGT CGGGACGGTGAGGCCAGGCCGTCGTCGCAGCGAGTGGCAGCGAGGACAACATTG					
<i>M. kansasii</i>	5'	CTAGGT CGGGACGGTGAGGCCAGGAC-G-CG-CT-G---TG-A-----T--					
<i>M. intracellulare</i>	5'	CTAGGT CGGGACGGTGAGGCCAGG---TC-CA-A-CGA---CAGC----C-C-G					
<i>M. gordonaiae</i>	5'	CTAGGT CGGGACGGTGAGGCCAGGA-GACA-C-C----TGG-G-G-----T--					
	61	70	80	90	100	110	120
<i>M. tuberculosis</i>	AGCCGT TCGT CGCGGGC ACT TCGGCCAGCGTAAGTAGCGGGTTGCCGT CACCGG						
<i>M. bovis</i>	AGCCGT TCGT CGCGGGC ACT TCGGCCAGCGTAAGTAGCGGGTTGCCGT CACCGG						
<i>M. kansasii</i>	--C-TCCGT CGGG-C ACT TCGGCCAGCGTAAGAACGGGTTGTCGT CACCGG						
<i>M. intracellulare</i>	--GTCGT TCGT CGCGGGC ACT TCGGCCAGCGTAAGAACGGGTTGTCGT CACCGG						
<i>M. gordonaiae</i>	--C-GTCCGT CGCGGGC ACT TCGGCCAGCGTAAGAACGGGTTGTCGT CACCGG						
	121	130	140	150	160		
<i>M. tuberculosis</i>	TGACCCCCGTTCATCCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAATG					3'	
<i>M. bovis</i>	TGACCCCCGTTCATCCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAATG					3'	
<i>M. kansasii</i>	CGGCCCCAGTTCATCCCAATCCGGAGGAATCACTTCGCAATG					3'	
<i>M. intracellulare</i>	T---CCCC-----A-----ATCCGGAGGAATCACTTCGCAATG					3'	
<i>M. gordonaiae</i>	TCACCCG-GTGT CATCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAATG					3'	

図 2 プライマー YNP-1, YNP-2 を用いた PCR 産物の塩基配列

—は、*M. tuberculosis* の塩基配列と最も一致率が高くなるように比較したときの塩基の欠損部位を表す

表 プライマー YNP-1, YNP-2 による PCR 産物のシーケンス

番号	菌名		NIHJ No.	サイズ (bp)	A	C	G	T	GC 含有 (%)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv との比較 (%)
1	<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	1633	164	27	54	57	26	68	100
2	<i>M. tuberculosis</i>	H37Ra	1634	164	27	54	57	26	68	100
3	<i>M. bovis</i>	Ravenel	1607	164	27	54	57	26	68	100
4	<i>M. bovis</i>	BCG-Japan	1608	164	27	54	57	26	68	100
5	<i>M. kansasii</i>	P-16	1619	137	23	43	45	26	64	76
6	<i>M. intracellulare</i>	E-1	1618	109	22	37	34	16	65	64
7	<i>M. gordonae</i>	D-1	1617	136	25	40	47	23	64	74

5倍に希釈し、プライマーから30 bp以内をシーケンスする場合は15倍に希釈するよう指示されているが、10倍希釈が最もよい結果が得られた。また、ターミネーション反応を行わせる過程においてもチューブあたりDMSOを0.5 μl添加した。これ以外の操作は、キット使用説明書にしたがって作業を進めた。

3. プライマー YNP-1, YNP-2 により合成される DNA 断片の塩基配列

1% 小川培地培養菌より抽出した DNA 50 ng をプライマー YNP-1, YNP-2 によって PCR を行い、その増幅された DNA 断片の塩基配列を調べ、*M. tuberculosis* H37Rv と最も一致率が高くなるようにして比較したものを図2に、その結果を表に示した。

M. tuberculosis H37Rv の DNA 断片は、大きさ 164 bp (A27, C54, G57, T26) であり、GC 含有量 68 % であった。同様にして *M. bovis* Ravenel の PCR 増幅 DNA をシーケンスし、*M. tuberculosis* H37Rv の塩基配列と比較したところ完全に一致していた。また、*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG-Japan の DNA の塩基配列は、いずれも *M. tuberculosis* H37Rv と 100 % 一致していた。*M. kansasii*

の DNA 断片は、大きさ 137 bp (A23, C43, G45, T26) であり、GC 含有量 64 % であった。これを *M. tuberculosis* H37Rv の塩基配列と比較すると 76 % 一致していた。*M. intracellulare* の DNA 断片は、大きさ 109 bp (A22, C37, G34, T16) であり、GC 含有量 65 % であった。これを *M. tuberculosis* H37Rv の塩基配列と比較すると 64 % の一致であった。*M. gordonae* の DNA 断片は、大きさ 136 bp (A25, C40, G47, T23) であり、GC 含有量 64 % であった。これを *M. tuberculosis* H37Rv の塩基配列を比較すると 74 % の一致であった。

図2に示した *M. kansasii* と *M. gordonae* の塩基配列を、*M. kansasii* を基準にして両者の一致率が最も高くなるように比較すると、*M. gordonae* は、83 % 一致していた。*M. avium* に関しては、先に述べたようにテストした12株中2株を除き、プライマー YNP-1, YNP-2 をそれぞれ用いての PCR が陰性であった。そこで、陽性であった（この PCR によって DNA が増幅された）2株の PCR 産物をシーケンスしたところ、その塩基配列は *M. intracellulare* と 100 % 一致した。

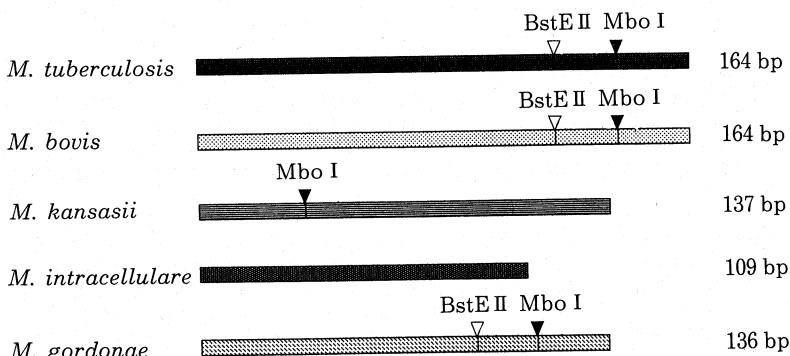


図3 プライマー YNP-1, YNP-2 を用いた PCR 増幅産物の BstE II, Mbo I による制限酵素マッピング

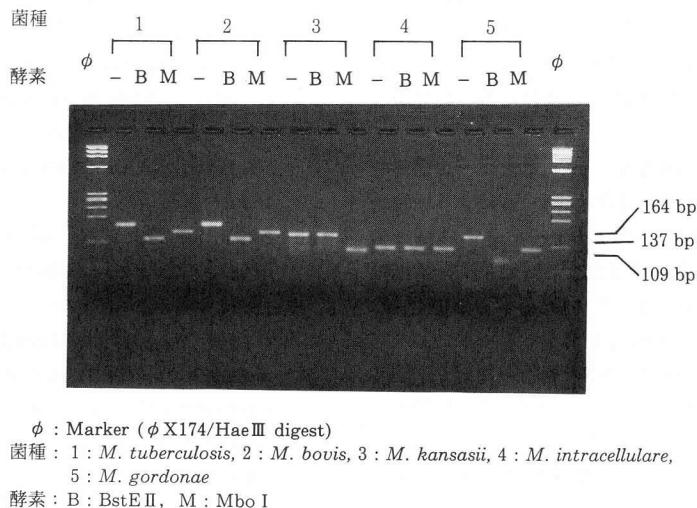


図4 プライマー YNP-1, YNP-2 を用いた PCR 増幅産物の制限酵素 BstE II, Mbo I による切断パターン

4. PCR-RFLP 法による抗酸菌の鑑別

PCR 産物のシークエンスを確認するために、表に示した抗酸菌の塩基配列の制限酵素切断部位を DNASIS (宝酒造) を使って、使用可能な制限酵素の検索をし、BstE II と Mbo I を選択した。図3は、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* の BstE II と Mbo I で切断される部位を示したものである。したがって制限酵素処理によって、理論的には次のような大きさの断片が生じるはずである。すなわち、*M. tuberculosis* complex は、BstE II で切断すると 119 bp と 45 bp の断片が生じ、Mbo I では 140 bp と 24 bp の断片が生ずる。*M. kansasii* は、BstE II では切断されないが、Mbo I では 102 bp と 35 bp の断片が生ずる。*M. intracellulare* は、BstE II と Mbo I の両者には切断されない。*M. gordonae* は、BstE II で切断すると 92 bp と 4 bp の断片が生じ、Mbo I では 112 bp と 24 bp の断片が生ずる。

図4に実際の PCR 産物を BstE II と Mbo I で切断した後、5%アガロース電気泳動の結果を示した。予想どおりの大きさのバンドが得られ、この切断様式 (RFLP) を確認した。また、PCR と RFLP を組み合わせることにより抗酸菌種の同定の可能性が示唆された。

考 察

塩基配列を調べる場合、通常 M13 ファージベクターでサブクローニング後、M13 のプライマーを用いてシークエンスを行う¹⁵⁾¹⁶⁾。その場合はクローンを選択したり、DNA を精製するという手間がかかる。そこで、PCR 後の DNA 断片を鋳型とし、プライマーとして PCR に

用いたものと同じプライマーを用いることによってシークエンスを行なう方法について検討した。おもに Winship の方法¹⁷⁾ に従い、Sequenase Ver 2.0 U. S. Biochemical 社キット中の試薬類を使うことによって簡単にシークエンスができるようになった。また、センス側 (YNP-1 使用) と、アンチセンス側 (YNP-2 使用) の両側からシークエンスが可能なので、より正確なシークエンス決定方法である。

結核菌の 65 kDa 抗原遺伝子の塩基配列は、Shinnick ら⁶⁾ により明らかにされたが、Pao らは、この塩基配列 91~254 をコードするプライマーを用いて、結核菌群では 165 bp、非定型抗酸菌ではそれより 20~40 bp 小さなバンドが検出されると報告⁵⁾ している。

われわれは、Pao らの報告⁵⁾に基づいてプライマーを合成し便宜上 YNP-1, YNP-2 と名付けた。これを用いて PCR を行い、その増幅された DNA 断片のシークエンスを行なった。われわれの結果では、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の PCR 産物はいずれも 164 bp で、そのシークエンスは完全に一致することがわかった。さらに、*M. kansasii* は 137 bp, *M. intracellulare* は 109 bp, *M. gordonae* は 136 bp であることがわかった。

また、本実験で確認した *M. tuberculosis* complex の DNA 塩基配列を Shinnick ら⁶⁾ の *M. tuberculosis* Erdman 株の 65 kDa の塩基配列 91~254 と比較したところ、*M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* Ravelin, *M. bovis* BCG-Japan の各株は完全に一致することが明らかとなった。*M. avium* NIHJ1605 のレファレンス株はプライマー YNP

-1, YNP-2で増幅されなかった。そこでGen-probe法によって*M. avium*と同定された臨床分離の11株について実験したところ、2株だけがYNP-1, YNP-2によって増幅されたが、残りの9株は増幅されなかった。

一般にターゲットDNAが、ヘアピンループ構造をとるか、G+C含量が高い場合は、PCRによる増幅が難しいと言われ、7-deaza-2'-deoxyguanosine triphosphate (C⁷dGTP)を添加することによって増幅されやすくなるという報告¹⁸⁾がある。そこで、*M. avium* NIHJ1605株のDNAをテンペレートとし反応液にC⁷dGTPを添加してPCRを行ったが、増幅されたバンドは検出されなかった。YNP-1, YNP-2により増幅された*M. avium* 2株のシークエンスをしたところ、大きさは109 bpで、塩基配列は*M. intracellularare*のそれと完全に一致した。また、この2株は、DNA-DNAマイクロプレートハイブリダイゼーションによる抗酸菌同定^{19)~21)}キット(小林製薬株式会社)を用いた結果では、相対類似度が、それぞれ70と94%であり*M. intracellularare*に非常に近い株であると考えられる。

プライマーYNP-1, YNP-2は幅広く抗酸菌を検出する。しかし、本実験の結果、PCRにより増幅されるDNA断片の塩基配列には種によって差異があり、大きさも異なることがわかった。このことは適当な制限酵素を選べばその切断様式(RFLP)によって、菌種の同定鑑別が可能なことを示唆している。そこで、各種抗酸菌のこの部分の塩基配列をコンピュータで解析し、制限酵素BstE IIとMbo Iを選びだした。PCR後のDNA断片をこれらの酵素で切断したところ、予想どおりの大きさのバンドが生じた。このことからPCRとRFLPを組み合わせDNAの切断パターンを調べることにより、簡便に菌種の同定鑑別が可能であることが示唆される。

これは、患者の検体より、抗酸菌を検出し同定するのに2日で完了することを意味し、実用化すれば極めて有利な検査法になるであろう。さらに他のプライマーと制限酵素の組み合わせを検討中である。

文 献

- 1) 島尾忠男著：結核対策。「結核対策」、結核予防会、東京、1989、1-43。
- 2) 室橋豊穂、伊藤忠雄、小川辰次、他：分離培養法。「結核菌検査指針」、厚生省監修、日本公衆衛生協会、東京、1979、21-30。
- 3) 工藤祐是、斎藤肇、高橋宏：結核菌。「微生物検査必携、細菌・真菌検査」、第3版、厚生省監修、日本公衆衛生協会、東京、1987、90-133。
- 4) 高橋 宏：抗酸菌の培養同定検査。Medical Technology. 1988; 16: 135-142.
- 5) Pao CC, Benedict yen TS, Jinn-Bang You, et al. : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1877-1880.
- 6) Shinnick TM : The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1987; 169: 1080-1088.
- 7) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, et al. : Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol. 1989; 3: 843-849.
- 8) 永井良三、竹脇俊一、和田昭仁：PCRとその応用—基礎研究から臨床まで、第5章細菌学への応用、抗酸菌検出への応用、実験医学。1990; 8: 214-217。
- 9) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239: 487-491.
- 10) Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, et al. : Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 513-518.
- 11) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1990; 161: 977-981.
- 12) 永井良三、和田昭仁、竹脇俊一：抗酸菌の迅速同定、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)の応用、臨床検査。1990; 34: 429-431。
- 13) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB, et al. : Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 2200-2204.
- 14) 山崎利雄、中村玲子：ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(PCR)法による抗酸菌の検出、結核。1992; 67: 441-447。
- 15) 石川芳明、奥田晶彦、加藤宏幸：DNAシークエンス法。「ラボマニュアル遺伝子工学」、村松正實編、丸善、東京、1988、115-127。
- 16) Perbal B : DNA塩基配列の決定。「遺伝子操作

- 実験用ハンドブック』、小林茂保監訳、ジャテック出版、東京、1985、431-437.
- 17) Winship PR : An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. Nucleic Acids Res. 1989 ; 17 : 1266.
- 18) Innis MA : PCR with 7-deaza-2'-Deoxy-guanosine Triphosphate. PCR Protocols, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T J, eds, Academic Press, Inc. New York, 1990, 54-59.
- 19) 山崎利雄、高橋 宏、中村玲子：マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討、結核。1993；68：5-11。
- 20) 楠 伸治、為定 誠、畠中康代、他：マイクロプレートハイブリダイゼーション法によるマイコバクテリウム属菌の同定。「第13回臨床抗酸菌研究会講演内容」、斎藤 肇、臨床抗酸菌研究会事務局、出雲市、1990、9-16。
- 21) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al. : Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 mycobacterium species. J Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 1596-1603.