

DNA マイクロアレイを用いた文化財劣化真菌検出法の開発

青木 俊介, 加瀬谷 泰介, 田辺 卓*, 竹治 仁詩*, 平山 幸一**

Development of A Molecular Method by DNA Microarrays for The Rapid and Simultaneous Identification of Xerophilic Fungi Causing Deterioration of Cultural Properties

Shunsuke Aoki, Taisuke Kasetani, Suguru Tanabe*, Hitoshi Takeharu* and Koichi Hirayama**

Fungi grow on cultural properties and deteriorate them. To avoid the deterioration of works of art by common fungi, they are kept under low humidity condition, but xerophilic fungi often cause deterioration. In many cases, causal xerophilic fungi are *Eurotium* spp. and *Aspergillus penicillioides*.

Detection and identification of the fungi should be rapid for conservation of cultural properties. However, morphological identification requires long culture term, and which is often not capable for lack of sporogony.

Therefore, we examined a molecular biological method by DNA microarrays based on probes of internal transcribed spacer (ITS) regions to detect rapidly and simultaneously *Eurotium* spp. and *Aspergillus penicillioides*.

Sixteen strains including 8 type strains and 12 wild strains of these species were detectable and identified by our method. Wild strains of 7 untargeted strains didn't arise false positive.

To construction of probes with high sensitivity, it is important to choose probe region at the side of 3' end of amplicon. Probe region requires *ca.* 20 bases containing *ca.* 10 or more specific bases with its *T_m* is 50–60°C and GC content is 48–60%.

Key words: cultural properties, xerophilic fungi, *Eurotium* spp., *Aspergillus penicillioides*, ITS, DNA microarray, PCR, probe

真菌は、食品のみならず、絵画等の文化財にも生育し、劣化をもたらす^{1,2)}。そのため文化財は多くの真菌が生育しにくい低湿環境で保存・管理されているが、好乾性真菌は低湿状態でも生育し、文化財を劣化させる。劣化防止には保存環境における当該真菌の早期発見および同定が重要であるが、従来から用いられていた形態同定は比較的長時間の培養と熟練を要する一方で、場合によっては同定の判断基準となる胞子が認められないなどの理由で困難となる場合もある。

近年、生物同定には、特定領域のDNA塩基配列を基に行う手法や、ITS領域などのPCR増幅産物と分子交雑するプローブ（オリゴヌクレオチド）を搭載したDNAマイクロアレイを用いる手法が開発され^{3,4)}、普及しつつある。DNAマイクロアレイには複数の生物の種あるいは属を同時に同定できる利点がある。

そこで、好乾性真菌で文化財劣化被害事例の多くを占める^{1,2)} *Eurotium* 属と *Aspergillus penicillioides* を短時間に検出し、同時に同定するための新しい手法としてDNAマイクロアレイを試作し、その性能を検証した。

実験方法

1. 材料および試験装置

1-1 供試菌株

供試菌株一覧を表1に示した。*Eurotium* 属の各菌種の野生株（#7～#18）はイカリ消毒(株)殿より試験菌株として分譲して頂き、形態同定をNPO法人カビ相談センターに依頼した。野生株（#7～#18）はイカリ消毒(株)殿が各地の文化財保管現場から分離した菌株である。

1-2 DNA抽出キット

イージー・ビーズ（エーエムアール）と、自動核酸抽出装置 QuickGene-810 およびその専用キットである組織抽出用 DT-S（クラボウ）を用いた。

1-3 蛍光標識 PCR 試薬

Ampdirect 東洋銅鋳仕様（島津製作所）および NovaTaq Hot Start DNA Polymerase（Novagen）、Cy5-dCTP（GEヘルスケア）を用いた。Ampdirect 東洋銅鋳仕様はPCR阻害物質の影響を軽減する3種類の緩衝液（5×buffer A, 5×buffer B, 5×buffer C）のセットであり、各緩衝液

*：東洋製罐(株) テクニカル本部

**：東洋銅鋳(株) 技術研究所

表1 供試菌株

No.	Species	Strain	Culture medium
#1	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	JCM 1565 ^T	M40Y agar
#2	<i>E. chevalieri</i> L. Mangin	JCM 1568 ^T	M40Y agar
#3	<i>E. herbariorum</i> (F. H. Wiggers) Link	JCM 1575 ^T	M40Y agar
#4	<i>E. repens</i> de Bary	JCM 1580 ^T	M40Y agar
#5	<i>E. rubrum</i> König et al.	JCM 22942 ^T	M40Y agar
#6	<i>E. tonophilum</i> Ohtsuki	NBRC 8157 ^T	M40Y agar
#7	<i>E. repens</i>	wild 1*	M40Y agar
#8	<i>E. amstelodami</i>	wild 2*	M40Y agar
#9	<i>E. rubrum</i>	wild 3*	M40Y agar
#10	<i>E. chevalieri</i>	wild 4*	M40Y agar
#11	<i>E. herbariorum</i>	wild 5*	M40Y agar
#12	<i>E. herbariorum</i>	wild 6*	M40Y agar
#13	<i>E. amstelodami</i>	wild 7*	M40Y agar
#14	<i>E. amstelodami</i>	wild 8*	M40Y agar
#15	<i>E. herbariorum</i>	wild 9*	M40Y agar
#16	<i>E. rubrum</i>	wild 10*	M40Y agar
#17	<i>E. herbariorum</i>	wild 11*	M40Y agar
#18	<i>E. herbariorum</i>	wild 12*	M40Y agar
#19	<i>Aspergillus penicillioides</i> Spegazzini	JCM 22961 ^T	M40Y agar
#20	<i>A. penicillioides</i>	JCM 22962	M40Y agar
#21	<i>A. penicillioides</i>	JCM 22963	M40Y agar
#22	<i>A. penicillioides</i>	JCM 22968	M40Y agar
#23	<i>A. penicillioides</i>	JCM 22971	M40Y agar
#24	<i>A. penicillioides</i>	JCM 10256	M40Y agar
#25	<i>A. penicillioides</i>	ATCC 66597	M40Y agar
#26	<i>A. penicillioides</i>	NBRC 100539	M40Y agar
#27	<i>A. penicillioides</i> (“ <i>A. vitricola</i> ” ^T) Ohtsuki)	NBRC 8155	M40Y agar
#28	<i>A. penicillioides</i> (“ <i>A. vitricola</i> ”)	JCM 22670	M40Y agar

*wild 1~12 はイカリ消毒(株)LC 環境センターより提供して頂き、形態同定を NP O 法人カビ相談センターに依頼した。

には PCR 増幅の基質となる dNTPs (デオキシリボヌクレオチド) は含まれていない。

1-4 PCR プライマー

真菌ゲノム DNA の ITS1 領域増幅用プライマーとして、18S rDNA の 3' 末端側および 5.8S rDNA の 5' 末端側の塩基配列から Fw および Rv プライマーを設計して用いた (表 2)。

1-5 DNA マイクロアレイの試作

Eurotium 属の各菌種の基準株と *A. penicillioides* 基準株 (JCM 22961 および NBRC 8155) の ITS1 領域の塩基配列から、各種で 10 塩基程度異なる約 20 塩基の配列を選抜し、その主鎖および相補鎖配列をオリゴヌクレオチドプローブ (表 3) とした。東洋鋼飯に依頼して各プローブをジーンシリコン (東洋鋼飯) に固定し、これを DNA マイクロアレイとした (図 1)。Eurotium 属検出用には主鎖プローブの Eu-1 ~ 3 および相補鎖プローブの Eu-1c ~ 3c を、*A. penicillioides* 検出用には主鎖プローブの Ap-1 ~ 7 および

表2 プライマーセット

Primer	Sequence (5' to 3')	Length (nt)	GC (%)	Tm (°C)
ITS1-Fw	TTG GTC ATT TAG AGG AAG TAA AAG TC	26	34.6	55.8
ITS1-Rv	CTG CGT TCT TCA TCG ATG C	19	52.6	56.1

表3 試作プローブ

Probe	Sequence (5' to 3')	Locus	Proposed specificity	Length (nt)	GC (%)	Tm (°C)
Eu-1	CGG CGT GGC TAC GGC CCG CC	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	85	70.7
Eu-1c	GGC GGG CCG TAG CCA CGC CG	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	85	70.7
Eu-2	CGG CGT GGC CAC GGC CCG CC	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	90	72.7
Eu-2c	GGC GGG CCG TGG CCA CGC CG	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	90	72.7
Eu-3	GAA GAC TAA CAT TTG AAC AC	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	35	50.1
Eu-3c	GTG TTC AAA TGT TAG TCT TC	ITS1	<i>Eurotium</i> spp.	20	35	50.1
Ap-1	CCC GCT GGC TGC CCC CTC CT	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	20	80	68.6
Ap-1c	AGG AGG GGG CAG CCA GCG GG	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	20	80	68.6
Ap-2	GGG ACA CCA ACA CTG AAC AC	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	20	55	58.4
Ap-2c	GTG TTC AGT GTT GGT GTC CC	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	20	55	58.4
Ap-3	TTT GGA TGC CCC TTC TCG GG	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	20	60	60.4
Ap-3c	CCC GAG AAG GGG CAT CCAA	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	20	60	60.4
Ap-4	GAG ACC TCA ACC ATG AAC ACT	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	21	48	56.5
Ap-4c	AGT GTT CAT GGT TGA GGT CTC	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	21	48	56.5
Ap-5	GGC TTC CCT GCC CCC G	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	16	81	62.8
Ap-5c	CGG GGG CAG GGA AGC C	ITS1	<i>A. penicillioides</i>	16	81	62.8
Ap-6	CTG GCT GCC CCC TCC T	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	16	75	60.3
Ap-6c	AGG AGG GGG CAG CCA G	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	16	75	60.3
Ap-7	CTG AGT TTT CAT AAA GAAAAA TTG	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	24	25	50.2
Ap-7c	CAA TTT TTC TTT ATG AAA ACT CAG	ITS1	" <i>A. vitricola</i> "	24	25	50.2

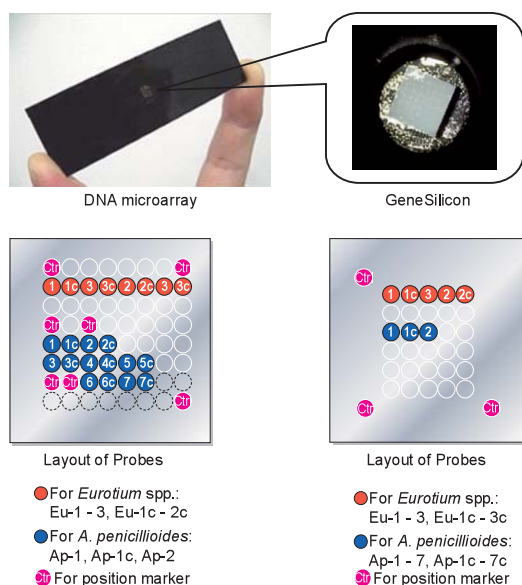


図1 試作 DNA microarray の概要

相補鎖プローブの Ap-1c ~ 7c を搭載した。

1-6 スライドガラス型 DNA マイクロアレイスキャナ

スライドガラス型 DNA マイクロアレイスキャナ GenePix 4100A (モレキュラーデバイス) を用い、DNA マイクロアレイのスキャン画像と各プローブの蛍光強度値を取得した。

2. 実験方法

2-1 ゲノム DNA 抽出

表1の #1 ~ #28 の各菌株は、使い捨てメス刃を用い、寒天培地上のコロニー中心付近の約 25 mm² を寒天培地ごと切り出し、イージービーズに1菌株ずつ移した。

図書館書庫雰囲気よりエアサンプリング法で M40Y 寒天培地およびローズベンガル添加 MY 寒天培地に採取し、25°C で一週間培養して生育した #29 ~ #35 の菌株は、各コロニーを約 25 mm² ずつ切り出し、平板培地毎に1本の

イーザービーズにまとめて以後の操作を行った。

イーザービーズを液体窒素中に10秒間浸漬し、凍結させ、2,500 rpm, 30秒間の条件で凍結破砕し、自動核酸抽出装置 QuickGene-810 と組織抽出キット (DT-S) の標準プロトコルに従いゲノム DNA を抽出、精製し、100 µl のゲノム DNA 抽出液を得た。

2-2 図書館書庫雰囲気からの野生株採取

学校法人 東洋食品工業短期大学の図書館書庫雰囲気よりエアサンプリング法 (40 l / min, 2分間) で M40Y 寒天培地およびローズベンガル添加 MY 寒天培地に真菌胞子および菌糸を採取し、25℃で一週間培養して野生株 #29 ~ #35 を得た。これらについて、形態同定を NPO 法人カビ相談センターに依頼するとともに、ゲノム DNA を抽出して以後の試験に用いた。

2-3 Cy5 蛍光標識 PCR

Ampdirect 東洋銅飯仕様および NovaTaq Hot Start DNA Polymerase の標準プロトコルに従い、反応液は 20 µl のスケールとした。1反応あたり、Ampdirect 東洋銅飯仕様の 5 × buffer A, 5 × buffer B, 5 × buffer C を 5 µl, プライマーを 10 pmol, Cy5-dCTP を 0.2 µl, ゲノム DNA を 1 µl 用いた。dNTPs は、dCTP を 40 µM, dATP および dTTP および dGTP を 50 µM の終濃度となるよう加えた。反応プログラムは、95℃ 10分間の変性後、94℃ 30秒間 -56℃ 30秒間 -72℃ 1分間を 40 サイクル繰り返す、さらに 72℃ 10分間の伸長とした。

2-4 DNA マイクロアレイへの分子交雑とその検出

Cy5 蛍光標識 PCR 増幅産物 2 µl と分子交雑緩衝液 (3 × SSC, 0.3% (w/v) SDS) 1 µl を混合したものを DNA マイクロアレイに滴下し、専用のカバーガラスを被せてハイブリダイゼーションチャンバー (タカラバイオ) 内に静置し、ウォーターバスインキュベータを用いて 45℃ で 1時間加温した。

DNA マイクロアレイを洗浄液 1 (2 × SSC, 0.2% (w/v) SDS) で 2回、洗浄液 2 (2 × SSC) で 2回洗浄し、GenePix 4100A でスキャン画像と各プローブの蛍光強度値を測定した。

結果

1. *Eurotium* 属菌株の分子交雑

試作 DNA マイクロアレイを用いた *Eurotium* 属菌株の基準株および野生株における分子交雑の結果をそれぞれ図 2 および図 3 に示した。供試した全ての *Eurotium* 属菌株で、*A. penicillioides* 検出用プローブへの偽陽性反応は認められなかった (図 2 および図 3 青色点線枠内)。Eu-3 プローブの蛍光強度値は供試菌株全てで約 5,000 と高く、Eu-1 および Eu-2 プローブの蛍光強度値は供試菌株全てで 700 以下と低かった。これらの相補鎖プローブである

Eu-3c, Eu-1c および Eu-2c プローブの蛍光強度値は、主鎖プローブの 50% 以下であった。

Eu-3 プローブは供試菌株の全てを高感度で検出でき、*Eurotium* 属検出用プローブとして有効である可能性が示唆された。

2. *A. penicillioides* 菌株の分子交雑

試作 DNA マイクロアレイを用いた *A. penicillioides* 菌株の分子交雑結果を図 4 に示した。供試した全ての *A. penicillioides* 菌株で、*Eurotium* 属検出用プローブへの偽陽性反応は認められなかった (図 4 赤色点線枠内)。*A. penicillioides* 菌株は、分子交雑したプローブの組み合わせにより 2つのグループに大別された。すなわち、プローブ上から 5行目の左から Ap-1, 1c, 2 および 7行目の左から Ap-6, 6c, 7 のプローブが分子交雑した *A. penicillioides* (#27 NBRC 8155 および #28 JCM 22670) と、プローブ上から 6行目の左から Ap-3c, 4, 5, 5c のプローブが分子交雑した他の *A. penicillioides* 8 菌株 (#19 ~ #26) である。NBRC によれば、*A. penicillioides* (#27 NBRC 8155) は *A. penicillioides* の基準株とも取れる表記がされているが、厳密には synonym とされる “*A. vitricola*” の基準株で、*A. penicillioides* (#19 JCM 22961) 基準株とは別株である。プローブ設計の際に取得した ITS1 領域の塩基配列にも差違があり、そのため、分子交雑するプローブが他の *A. penicillioides* 8 菌株とは異なっただと思われる。また、*A. penicillioides* (#28 JCM 22670) は #27 NBRC 8155 に近い系統であると思われる。

A. penicillioides (#27 NBRC 8155 および #28 JCM 22670) は Ap-2 プローブ、他の *A. penicillioides* 8 菌株は Ap-4 プローブが蛍光強度値 5,000 程度と高く、*Eurotium* 属の場合と同様に主鎖プローブで高かった。他のプローブの蛍光強度値は概ね 1,000 以下であった。

Ap-2, 5 プローブは供試菌株の全てを高感度で検出でき、*A. penicillioides* 検出用プローブとして有効と考えられた。

3. 図書館書庫雰囲気から採取した野生株の分子交雑

図書館書庫雰囲気から採取した野生株について、形態同定結果を表 4 に、M40Y 寒天培地とローズベンガル添加 MY 寒天培地の 25℃, 1週間培養時点の写真と、これらを試料として用いた分子交雑の結果を図 5 に示した。

好乾性培地の M40Y 培地に生育したコロニーは好湿性真菌の *A. alternata*, *C. cladosporioides* および *A. paheospermum* であり、好湿性真菌も好乾性真菌用の培地に生育する可能性があることが示唆された。好湿性真菌用のローズベンガル添加 MY 培地では、好湿性真菌の *A. paheospermum* および *Pestalotiopsis* sp. が生育した。

形態同定の結果を併せると、図書館書庫雰囲気から採取した野生株には DNA マイクロアレイの検出対象種が含まれておらず、また、これら検出対象外の菌種による偽陽性反応は認められなかった。DNA マイクロアレイに適用し

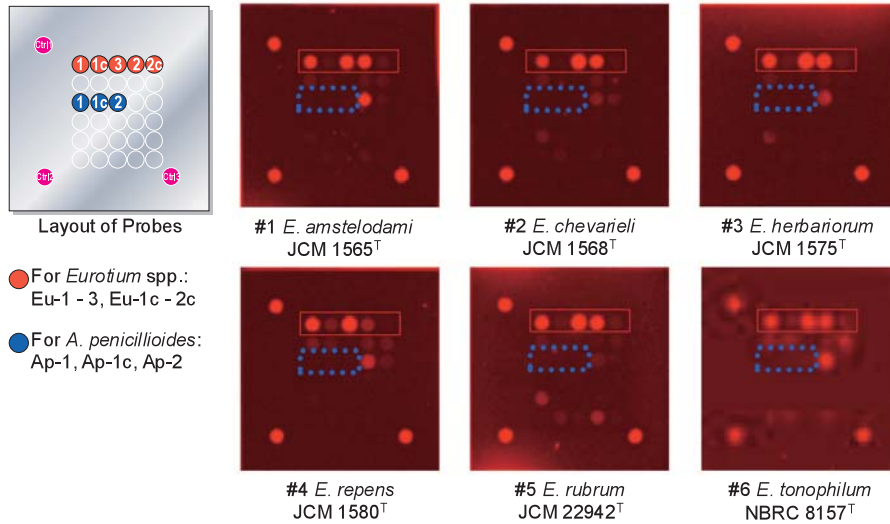


図2 *Eurotium* 属の各菌種の基準株における分子交雑結果

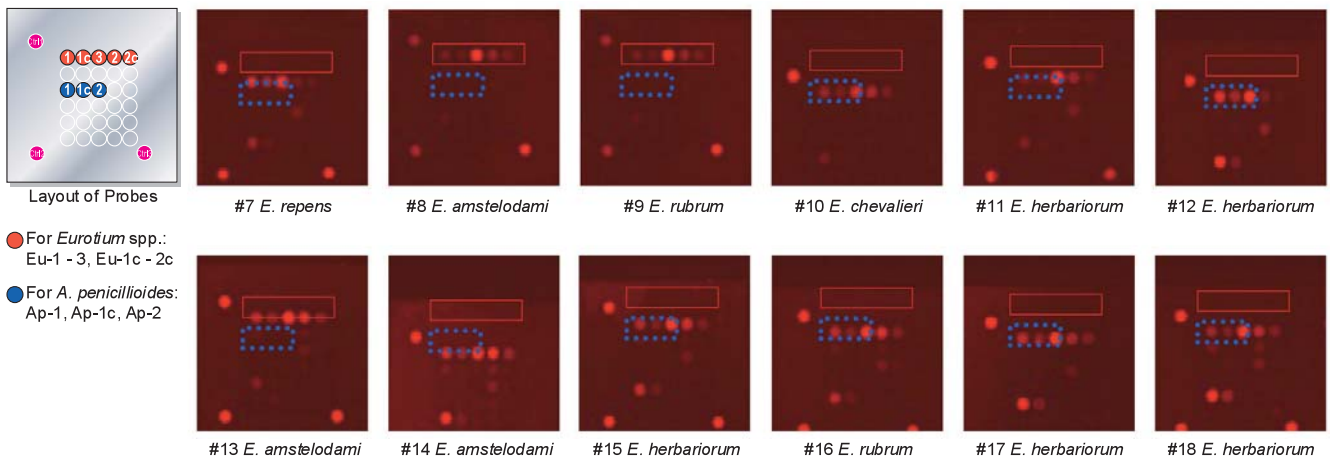


図3 *Eurotium* 属の各菌種の野生株における分子交雑結果

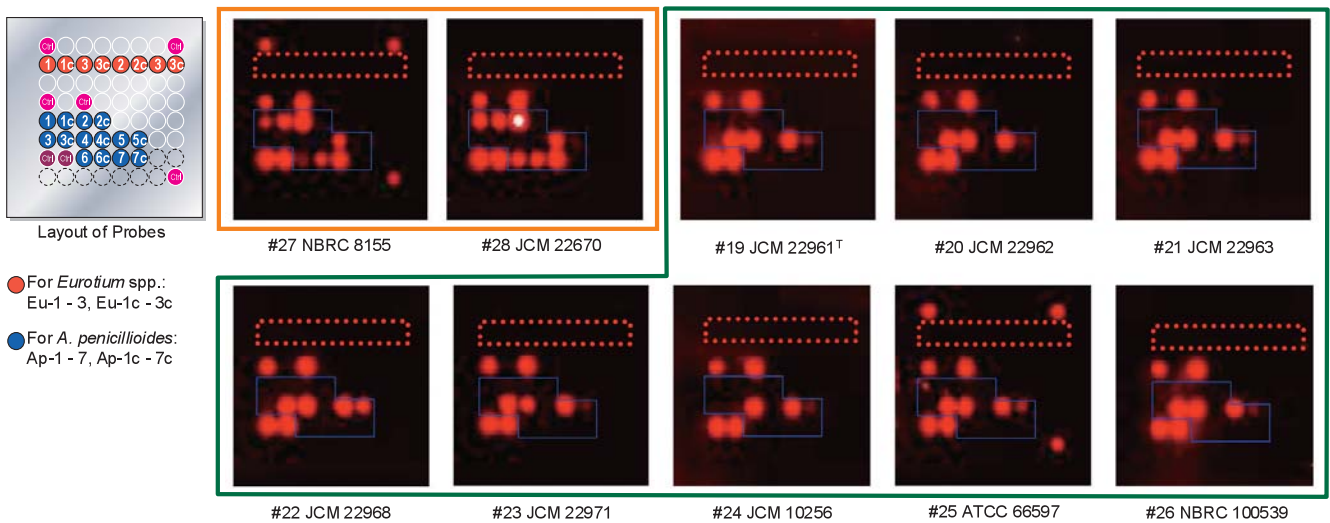


図4 *A. penicillioides* 各菌株における分子交雑結果

表 4 図書館書庫雰囲気から採取した野生株の形態同定結果

No.	Species	Strain	Culture midium
#29	<i>Alternaria alternata</i>	wild 13*	M40Y agar
#30	<i>Arthrimum phaespermum</i>	wild 14*	M40Y agar
#31	<i>A. phaespermum</i>	wild 15*	M40Y agar
#32	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	wild 16*	M40Y agar
#33	<i>A. phaespermum</i>	wild 17*	Rose bengal MY agar
#34	<i>A. phaespermum</i>	wild 18*	Rose bengal MY agar
#35	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	wild 19*	Rose bengal MY agar

*形態同定を NPO 法人カビ相談センターに依頼した。

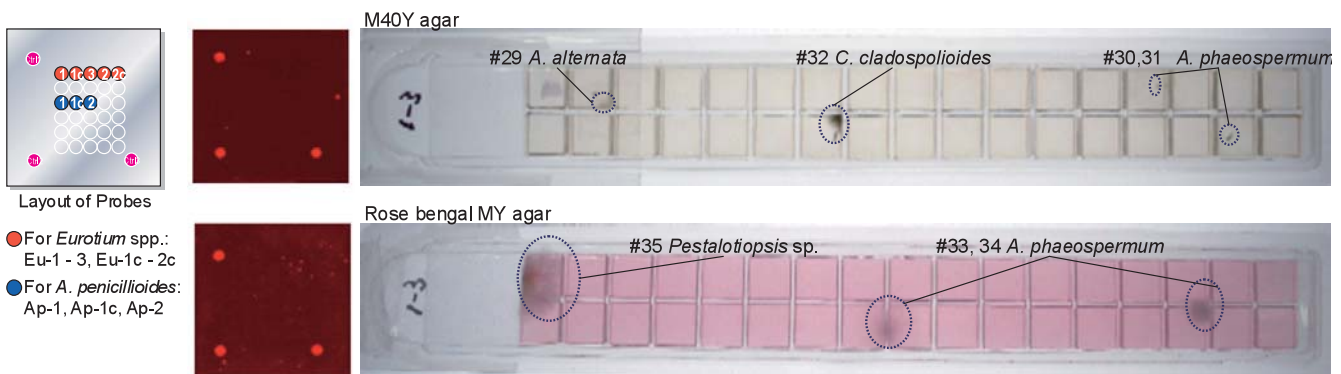


図 5 図書館書庫雰囲気から採取した野生株および分子交雑結果 (左) と 1 週間培養時点の写真 (右)

た野生株の蛍光標識 PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動に供して 300 bp 程度の増幅産物を確認しており (データ省略), DNA マイクロアレイの結果は試作プローブと分子交雑しなかったためと判断した。

考 察

好乾性真菌で文化財被害事例の多い *Eurotium* 属, *A. penicillioides* を検出可能なプローブを試作し検証した範囲では, 偽陰性および偽陽性検出は認められなかった。一方, プローブごとに蛍光強度値が大幅に異なり, 各プローブの分子交雑の効率に差が見られた。差を生じる要因としては, 各プローブにおける T_m 値および GC 含量の差違と, これに付随するプローブの立体構造の影響, PCR 増幅産物におけるプローブ配列の存在位置が考えられる。

T_m 値と GC 含量は密接な関係があり, 同じ塩基長のプローブであれば GC 塩基の含量が高いほど T_m 値が高くなる。本報において, 分子交雑時の温度を 45°C とした条件で蛍光強度値が高かった Eu-3, Ap-2, Ap-4 プローブはいずれも T_m 値が 50°C -60°C, GC 含量は 48% -60% の範囲であり, この範囲より T_m 値および GC 含量が高い他のプローブでは蛍光強度値が大幅に低下した。GC 含量が高いプローブでは, 自己塩基配列内で相補的な塩基同士が水素結合してプローブ自身が折り畳まれ, 高次構造 (ヘアピン構造など) を形成する可能性が高く, そのため PCR 増幅産物と分子交雑しにくくなることが予想される。これに

対し, 一般に, T_m 値の近傍の温度で分子交雑反応を行うと, 二本鎖 DNA が乖離してプローブとの分子交雑が起こるとされているため, 分子交雑反応時の温度を上げて検証してみたものの, 高次構造の影響が強いためか, 蛍光強度値は向上しなかった (データ省略)。

検証したいいずれのプローブにおいても, 相補鎖プローブは主鎖プローブと T_m 値および GC 含量が同一であるにもかかわらず, その蛍光強度値が大幅に低下したことから, PCR 増幅産物におけるプローブ配列の存在位置の関与が示唆された。蛍光強度値が高かった主鎖プローブの Eu-3, Ap-2, Ap-4 プローブと, これらの相補鎖プローブである Eu-3c, Ap-2c, Ap-4c プローブに対する PCR 増幅産物との分子交雑について, 考えられる位置関係を図 6 で示した。PCR 増幅産物分子の塩基長はプローブ分子の約 10 倍であるため, 図 6-(b) では PCR 増幅産物分子が部分的に折れ曲がった状態で分子交雑し, 図 6-(c) では折れ曲がる必要性が無い状態で分子交雑していると考えられる。これと, DNA マイクロアレイには直径約 10 μm の各々のスポット位置に膨大な数のプローブ分子が固定されていることを併せると, 分子交雑は図 6-(b) の方が起こりにくいと思われるが, 蛍光強度値が高かったのは図 6-(b) の場合であった。

プローブの PCR 増幅産物における相対位置と分子交雑時の蛍光強度の関係については Zhang ら⁶⁾ が報告している。彼等によれば, プローブと分子交雑していない 5' 末端側の塩基長が長い PCR 増幅産物ではその可動性が高く

(本報では図6-(c)), PCR増幅の際に取り込んだ蛍光標識色素と衝突・会合し, ある種の塩基配列と蛍光標識色素との間で生じるとされる消光現象⁷⁾が起きることで蛍光強度値が低くなると推測している。分子交雑の効率ではなく, 蛍光標識色素の蛍光が低下するというものである。

本報において, プローブの相対位置と蛍光強度に関する結果はZhangらの報告と一致した。消光現象を要因として想定した試験は行っていないが, 図6-(b)ではPCR増幅産物の可動性が低く消光現象が起きにくいと推測され, 図6-(c)と比較して相対的に蛍光強度値が高くなった可能性が示唆される。

今後, 他の検出対象種を追加する場合においても, PCR増幅産物の中央より3'末端側において検出対象種で10塩基程度異なる約20塩基の配列を選抜し, T_m 値を50-60°C, GC含量を48-60%の範囲とすることで高検出感度のプローブ開発に繋がるとと思われる。

要約

主要な文化財劣化真菌である*Eurotium*属菌と*A. penicillioides*を短時間に検出し, 同時に同定するための新しい手法としてDNAマイクロアレイを作製した。検出対象菌種の基準株および野生株を用いた検証試験では偽陰性検出は認められなかった。

図書館書庫雰囲気から採取した野生株にはDNAマイクロアレイの検出対象種が含まれておらず, また, これら検出対象外の菌種による偽陽性反応は認められなかった。

検出感度の高いプローブの設計には, PCR増幅産物の中央より3'末端側において検出対象種で10塩基程度異なる約20塩基の配列を選抜し, T_m 値を50-60°C, GC含量を48-60%の範囲とすることが重要と思われる。

謝辞

*Eurotium*属の野生株を提供して頂いたイカリ消毒(株)LC環境センター 微生物検査グループ グループ長の吉浪 誠氏に感謝の意を表す。

形態観察による同定を行って頂いたNPO法人 カビ相談センター 理事長 高鳥 浩介氏に深謝する。

文献

- 1) 公益財団法人 文化財虫害研究所, 「文化財の虫菌害と防除の基礎知識」, (2007).
- 2) 川上裕司, 杉山真紀子, 「博物館・美術館の生物学—カビ・害虫対策のためのIPMの実践—」, 第1版(雄山閣, 東京), (2009).
- 3) 加瀬谷泰介, 青木俊介, 平山幸一, 近藤隆一郎, 堤祐司, 須原弘登, ハウスダストの原因となるダニ類・真菌類の検出・識別用DNAマイクロアレイ, 日本ペストロジー学会誌, **23**(1), 27-30 (2008).
- 4) 青山冬樹, カビ同定用DNAアレイの開発, 日本清涼飲料研究会 第18回研究発表会講演要旨集, 16, 東京 (2008).
- 5) Gardes, M. and Bruns, T. D., ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.*, **2**, 113-118 (1993).
- 6) Zhang, L., Hurek, T. and Reinhold-Hurek B., Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations, *Nucleic Acids Res.*, **33**(19), e166 (2005).
- 7) Marras, S. A., Kramer, F. R. and Tyagi, S., Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Res.*, **30**, e122 (2002).

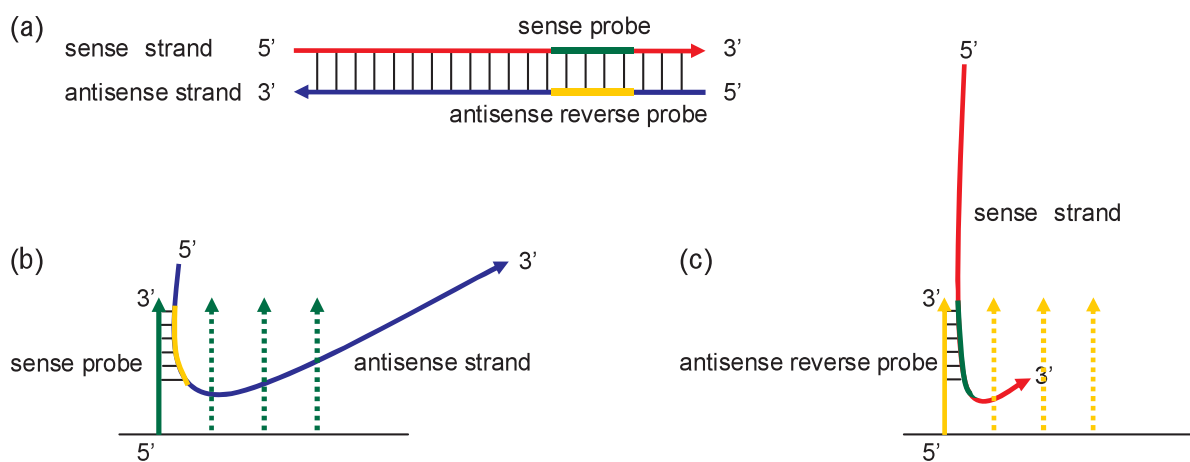


図6 アンチセンスリバーブプローブおよびセンスプローブにおける分子交雑

- (a) PCR増幅産物上のセンスプローブ (Eu-3, Ap-2, Ap-4) およびアンチセンスリバーブプローブ (Eu-3c, Ap-2c, Ap-4c) の位置
- (b) センスプローブとアンチセンス鎖との分子交雑
- (c) アンチセンスリバーブプローブとセンス鎖との分子交雑