

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4782784号
(P4782784)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04

請求項の数 10 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2007-518325 (P2007-518325)	(73) 特許権者	390023674
(86) (22) 出願日	平成17年6月24日 (2005.6.24)		イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
(65) 公表番号	特表2008-504031 (P2008-504031A)		アンド・カンパニー
(43) 公表日	平成20年2月14日 (2008.2.14)		E. I. DU PONT DE NEMO
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/022542		URS AND COMPANY
(87) 国際公開番号	W02006/012323		アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミ
(87) 国際公開日	平成18年2月2日 (2006.2.2)		ントン、マーケット・ストリート 100
審査請求日	平成20年6月19日 (2008.6.19)		7
(31) 優先権主張番号	60/583,296	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成16年6月25日 (2004.6.25)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140132
			弁理士 竹林 則幸
		(74) 代理人	100091731
			弁理士 高木 千嘉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原性大腸菌の検出および識別のためのDNA配列

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) (i) 配列番号 2 および 3、
(ii) 配列番号 5 および 6、
(iii) 配列番号 8 および 9、および
(iv) 配列番号 10 および 11、

よりなる群から選択されるプライマー対を使用してサンプルのPCR増幅を実施し、PCR増幅結果を生じさせるステップと、

(b) ステップ(a)のPCR増幅結果を調べてプライマー対の増幅生成物を検出し、それによって、プライマー対の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップと

を含んでなる、サンプル中の血清型 O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、O145:HNM または O111:HNM の病原性大腸菌の存在の検出方法。

【請求項 2】

サンプルが食物サンプルまたは水サンプルを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

サンプルが選択的に濃厚化された食物マトリックスを含んでなる請求項 1 に記載の方法

【請求項 4】

- (a) (i) 配列番号 2 および 3、
- (ii) 配列番号 5 および 6、
- (iii) 配列番号 8 および 9、および
- (iv) 配列番号 10 および 11、

よりなる群から選択される 2 つの異なるプライマー対を使用してサンプルの P C R 増幅を実施し、P C R 増幅結果を生じさせるステップと、

(b) ステップ (a) の P C R 増幅結果を調べて 2 つの異なるプライマー対双方の増幅生成物を検出し、それによって、2 つの異なるプライマー対双方の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップと

を含んでなる、サンプル中の血清型 O 1 5 7 : H 7、O 1 5 7 : H N M、O 5 5 : H 7、O 2 6 : H 1 1、O 1 4 5 : H N M または O 1 1 1 : H N M の病原性大腸菌の存在の検出方法。

10

【請求項 5】

- (a) (i) 配列番号 2 および 3、
- (ii) 配列番号 5 および 6、
- (iii) 配列番号 8 および 9、および
- (iv) 配列番号 10 および 11、

よりなる群から選択される少なくとも 1 つのプライマー対、ならびに

(b) 熱安定性 D N A ポリメラーゼ

を含んでなる、血清型 O 1 5 7 : H 7、O 1 5 7 : H N M、O 5 5 : H 7、O 2 6 : H 1 1、O 1 4 5 : H N M または O 1 1 1 : H N M の病原性大腸菌の検出のためのキット。

20

【請求項 6】

- (a) (i) 配列番号 2 および 3、
- (ii) 配列番号 5 および 6、
- (iii) 配列番号 8 および 9、および
- (iv) 配列番号 10 および 11、

よりなる群から選択される少なくとも 1 つのプライマー対、ならびに

(b) 熱安定性 D N A ポリメラーゼ

を含んでなる、P C R の実施において使用するための複製組成物。

30

【請求項 7】

構成要素 (a) が (a) (ii) および (a) (iv) の双方を含んでなる請求項 6 に記載の複製組成物。

【請求項 8】

構成要素 (a) が (a) (ii) および (a) (iii) の双方を含んでなる請求項 6 に記載の複製組成物。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の複製組成物を含んでなる錠剤。

【請求項 10】

サンプル中の血清型 O 1 5 7 : H 7、O 1 5 7 : H N M、O 5 5 : H 7、O 2 6 : H 1 1、O 1 4 5 : H N M または O 1 1 1 : H N M の病原性大腸菌の検出のための請求項 9 に記載の錠剤を含んでなるキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、核酸配列の存在に基づく大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) 細菌の検出および識別のための迅速な方法、特に検出のための P C R ベースの方法、そのために有用なオリゴヌクレオチド分子および試薬およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) (E . c o l i) はグラム陰性桿菌であ

50

る。ほとんどの大腸菌株は無害でヒトおよびその他の動物の正常な腸内細菌叢としてみられるが、いくつかの株は病原性であり、時として致命的疾患を引き起こすことができる。異なる病原性大腸菌株は、それらの疫学、臨床経過、および疾患の突発的大発生を引き起こす潜在性が異なる。疾患移行は概して糞便/経口経路を通じる。

【0003】

病原性はOおよびH抗原によって定義されるように、いくつかの血清型と関係している。異なる病原性血清型は異なる臨床疾患経過と関連し、公衆衛生の観点からそれらを異なるレベルの懸念に関連づけている。いくつかの疾患の突発的大発生は、病原性大腸菌の食物および水媒介起源と突き止められている。

【0004】

1つの血清型、特に大腸菌O157:H7血清型は、いくつかの食物および水媒介突発的大発生と関連しており、USDAによって牛挽肉中の混和物として許容度ゼロの基準で規制される。

【0005】

大腸菌は遍在性でほとんどの血清型は非病原性であるので、病原性血清型を検出し、臨床および公衆衛生に異なるかかわりあいがある病原性血清型を識別する能力は、有用である。

【0006】

したがって病原性大腸菌の迅速な検出のための試験を有して、より大きな公衆衛生および規制懸念があるものを識別することが望ましい。

【発明の開示】

【0007】

発明の要旨

【0008】

本発明は、以下を含む。

(a)(i)配列番号2および3、(ii)配列番号5および6、(iii)配列番号8および9、(iv)配列番号10および11、(v)配列番号13および14、および(vi)配列番号16および17よりなる群から選択されるプライマー対を使用してサンプルのPCR増幅を実施し、PCR増幅結果を生じさせるステップと、(b)ステップ(a)のPCR増幅結果を調べてプライマー対の増幅生成物を検出し、それによって、プライマー対の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップを含んでなる、サンプル中の病原性大腸菌の存在の検出方法。好ましくは、プライマー対は、(a)(ii)、(a)(iii)、および(a)(v)よりなる群から選択される。

【0009】

(a)(i)配列番号2および3、(ii)配列番号5および6、(iii)配列番号8および9、(iv)配列番号10および11、(v)配列番号13および14、および(vi)配列番号16および17よりなる群から選択される2個の異なるプライマー対を使用してサンプルのPCR増幅を実施して、PCR増幅結果を生成するステップと、(b)ステップ(a)のPCR増幅結果を調べて2個の異なるプライマー対双方の増幅生成物を検出し、それによって、2個の異なるプライマー対双方の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップを含んでなる、サンプル中の病原性大腸菌の存在の検出方法。2個の異なるプライマー対は、好ましくは(a)(ii)および(a)(iii)、さらにより好ましくは(a)(ii)および(a)(v)を含んでなる。

【0010】

ステップ(b)において、融解曲線分析を使用して増幅生成物を検出する、上のいずれかの方法。

【0011】

前記ステップ(a)に先だって、PCR増幅のためのサンプルを調製するステップをさらに含んでなる、上のいずれかの方法。好ましくは調製するステップは、(1)細菌濃厚化、(2)サンプルからの細菌細胞の分離、(3)細胞溶解、および(4)全DNA抽出

10

20

30

40

50

のプロセスの少なくとも1つを含んでなる。

【0012】

サンプルが食物サンプル、水サンプル、または選択的に濃厚化された食物マトリックスを含んでなる、上のいずれかの方法。

【0013】

配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号16、または配列番号17を含んでなる、病原性大腸菌の検出のための単離されたポリヌクレオチド。

【0014】

(a)(i)配列番号2および3、(ii)配列番号5および6、(iii)配列番号8および9、(iv)配列番号10および11、(v)配列番号13および14、および(vi)配列番号16および17よりなる群から選択される少なくとも1つのプライマー対、ならびに(b)熱安定性DNAポリメラーゼを含んでなる、病原性大腸菌の検出のためのキット。キットは、好ましくは(a)(ii)および(a)(iii)の双方、さらにより好ましくは(a)(ii)および(a)(iv)の双方を含んでなる。

10

【0015】

(i)配列番号2および3、(ii)配列番号5および6、(iii)配列番号8および9、(iv)配列番号10および11、(v)配列番号13および14、および(vi)配列番号16および17よりなる群から選択される少なくとも1つのプライマー対、ならびに(b)熱安定性DNAポリメラーゼを含んでなる、PCRの実施で使用するための複製組成物。複製組成物は、好ましくは(a)(ii)および(a)(iii)の双方、さらにより好ましくは、(a)(ii)および(a)(iv)の双方を含んでなる。

20

【0016】

上の複製組成物のいずれかを含んでなる錠剤、およびサンプル中の病原性大腸菌の検出のための錠剤を含んでなるキット。

【0017】

配列の要旨

配列番号1は、その検出が血清型O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、またはO145:HNMの病原性大腸菌の存在を特異的に示す、病原性大腸菌のヌクレオチド配列である。配列番号1は、プライマー配列番号2および配列番号3によって境界され、それを含有し、それによって増幅される。

30

【0018】

配列番号2は、細菌DNAと配列番号3とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、またはO145:HNMの病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0019】

配列番号3は、細菌DNAと配列番号2とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、またはO145:HNMの病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する3'プライマーのヌクレオチド配列である。

40

【0020】

配列番号4は、その検出が血清型O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、O26:HNM、O145:HNM、またはO111:HNMの病原性大腸菌の存在を特異的に示す、病原性大腸菌のヌクレオチド配列である。配列番号4は、プライマー配列番号5および配列番号6によって境界され、それを含有し、その使用によって増幅される。

【0021】

配列番号5は、細菌DNAと配列番号6とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157:H7、O157:HNM、O55:H7、O26:H11、O26:HNM、O

50

145 : HNM、または0111 : HNMの病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0022】

配列番号6は、細菌DNAと配列番号5とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7、O157 : HNM、O55 : H7、O26 : H11、O26 : HNM、O145 : HNM、または0111 : HNMの病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する3'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0023】

配列番号7は、その検出が血清型O157 : H7、O157 : HNMまたはO55 : H7の病原性大腸菌の存在を特異的に示す、病原性大腸菌のヌクレオチド配列である。配列番号7はプライマー配列番号8および配列番号9によって境界され、それを含有し、その使用によって増幅される。配列番号5もまた、それぞれ配列番号8および配列番号9の修正である、配列番号10および配列番号11で表されるプライマーの使用によって増幅される。

10

【0024】

配列番号8は、細菌DNAと配列番号9とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7、O157 : HNMまたはO55 : H7の病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0025】

配列番号9は、細菌DNAと配列番号8とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7、O157 : HNMまたはO55 : H7の病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域の3'プライマーのヌクレオチド配列である。

20

【0026】

配列番号10は、配列番号8の修正である。配列番号10は、GC rich clampがそれに付加された、配列番号8の全配列を含む。このclampの付加は標的特異性を変更しないが、増幅生成物の融解温度を変更する。配列番号10は、細菌DNAと配列番号11とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7、O157 : HNMまたはO55 : H7の病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

30

【0027】

配列番号11は、配列番号9の修正である。配列番号11は、GC rich clampがそれに付加された、配列番号9の全配列を含む。このclampの付加は標的特異性を変更しないが、増幅生成物の融解温度を変更する。配列番号11は、細菌DNAと配列番号10とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7、O157 : HNMまたはO55 : H7の病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する3'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0028】

配列番号12は、その検出が血清型O157 : H7を含む病原性大腸菌の存在を特異的に示す病原性大腸菌のヌクレオチド配列である。配列番号12は、プライマー配列番号13および配列番号14によって境界され、それを含有し、それによって増幅される。

40

【0029】

配列番号13は、細菌DNAと配列番号14とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7を含む病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0030】

配列番号14は、細菌DNAと配列番号13とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157 : H7を含む病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する3'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0031】

50

配列番号15は、その検出が血清型O157:H7を含む病原性大腸菌の存在を特異的に示す病原性大腸菌のヌクレオチド配列である。配列番号15は、プライマー配列番号16および配列番号17によって境界され、それを含有し、それによって増幅される。

【0032】

配列番号16は、細菌DNAと配列番号17とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157:H7を含む病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する5'プライマーのヌクレオチド配列である。

【0033】

配列番号17は、細菌DNAと配列番号16とのポリメラーゼ連鎖反応において、血清型O157:H7を含む病原性大腸菌のDNAを特異的に増幅する、病原性大腸菌のゲノム領域に対する3'プライマーのヌクレオチド配列である。

10

【0034】

配列は、37C.F.R.1.821~1.825(「ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件-配列規則」)を満たし、世界知的所有権機関(WIPO)標準ST.25(1998)およびEPOおよびPCTの配列表要件(規則5.2および49.5(a)の2)、および実施細則第208号および附属書C)に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、37C.F.R.1.822で述べられる規則に従う。

【0035】

好適態様の詳細な記述

20

本願明細書に記載される各参考文献の開示は、参照によってその全体を援用する。

【0036】

定義

本願明細書では、いくつかの用語および略語を使用する。以下の定義が提供される。

【0037】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCRと略される。

【0038】

「単離された」という用語は、自然発生的環境において材料に常態で付随する、あるいはそれと相互作用する構成要素から実質的に遊離し、さもなくば除去された、核酸分子および/またはタンパクなどの物質を指す。単離ポリヌクレオチドは、その中でそれらが自然に生じる宿主細胞から精製されても良い。当業者に既知の従来の核酸精製法を使用して、単離ポリヌクレオチドを得ても良い。この用語は、リコンビナントポリヌクレオチドおよび化学的に合成されたポリヌクレオチドも包含する。

30

【0039】

「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」、および「核酸断片」という用語は、ここでは同義的に使用される。これらの用語はヌクレオチド配列などを包含する。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二重鎖で、任意に合成、非天然または変性ヌクレオチド塩基を含有するRNAまたはDNAのポリマーであっても良い。DNAポリマーの形態のポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAの1本またはそれ以上のストランド、またはそれらの混合物を含んでなっても良い。

40

【0040】

「増幅生成物」という用語は、プライマー-誘導増幅反応中に生成された核酸断片を指す。プライマー-誘導増幅の典型的な方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)またはストランド置換増幅(SDA)が挙げられる。PCR法が選択される場合、複製組成物は、例えばヌクレオチド三リン酸、適切な配列がある2個(以上)のプライマー、熱安定性ポリメラーゼ、緩衝液、溶質、およびタンパク質などの核酸複製のための構成要素を含んでなってもよい。これらの試薬および核酸増幅におけるそれらの使用手順を述べた詳細は、1987年にマリス(Mullis)らに付与された米国特許第4,683,202号明細書、および1986年にマリス(Mullis)らに付与された米国特許第4,683,195号明細書で提供される。LCR法が選択さ

50

れる場合、核酸複製組成物は、例えば熱安定性リガーゼ（例えばT. aquaticus）リガーゼ）、2組の隣接するオリゴヌクレオチド（各セットの1つのメンバーが各標的ストランドに相補的である）、トリス-HCl緩衝液、KCl、EDTA、NAD、ジチオトレイトール、およびサケ精子DNAを含んでなってもよい。例えば、タボール（Tabor）ら、Proc. Acad. Sci. U.S.A.、82: 1074~1078頁（1985年）を参照されたい。

【0041】

「プライマー」という用語は、相補的ストランドの合成がポリメラーゼによって触媒される条件下におかれると、相補的ストランドに沿った、核酸合成または複製の開始点として作用できる（合成または天然）オリゴヌクレオチドを指す。

10

【0042】

「プローブ」という用語は、目的のポリヌクレオチドに相補的（必ずしも完全に相補的でなくてもよいが）で、目的のポリヌクレオチドの少なくとも1つのストランドとのハイブリダイズによって二本鎖構造を形成する（合成または天然）オリゴヌクレオチドを指す。

【0043】

「複製阻害物質部分」という用語は、核酸ストランド複製のための連鎖延長の相互反応をブロックする、オリゴヌクレオチドの3'末端水酸基に付着するあらゆる原子、分子または化学基を指す。例としては3'-デオキシヌクレオチド（例えばコルジセピン）、ジデオキシヌクレオチド、ホスフェート、リガンド（例えばピオチンおよびジニトロフェノール）、リポーター分子（例えばフルオレセインおよびローダミン）、炭素鎖（例えばプロパノール）、不適正ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、またはペプチド核酸単位が挙げられるが、これに限定されるものではない。「非参加の」という用語は、核酸分子増幅のための反応におけるプローブまたはプライマーの参加の欠如を指す。具体的には非参加のプローブまたはプライマーは、基材としての機能を果たさない、またはDNAまたはRNAポリメラーゼによって延長されないものである。「非参加プローブ」は、本質的にポリメラーゼによって連鎖延長されることができない。それは複製阻害物質部分を有しても有さなくてもよい。

20

【0044】

核酸分子は、適切な温度および溶液イオン強度条件下で、核酸分子の一本鎖形態がその他の核酸分子とアニールできる場合、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAなどの別の核酸分子と「ハイブリッド形成可能」である。ハイブリッド形成および洗浄条件については良く知られており、サムブルック（Sambrook）、J.、フリッチュ（Fritsch）、E. F. およびマニアティス（Maniatis）、T. 著「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY（1989年）の特に第11章およびその表11.1で例示される（参照によってその全体を本願明細書に援用する）。温度およびイオン強度条件が、ハイブリッド形成の「ストリンジェンシー」を定める。相対的な核酸の予備スクリーニングでは、例えば5×SSC、0.1% SDS、0.25% ミルク、およびホルムアミドなし、または30%ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDSなどの55°のT_mに相当する低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が使用できる。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、例えば5×または6×SSCを伴う40%ホルムアミドなどのより高いT_mに相当する。ハイブリダイズのストリンジェンシー次第で塩基間のミスマッチは可能であるが、ハイブリダイズは、2つの核酸が相補的配列を含有することを要求する。核酸がハイブリダイズする適切なストリンジェンシーは、当該技術分野で良く知られた変数である核酸の長さおよび相補性の程度に左右される。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が高い程、これらの配列を有する核酸ハイブリッドのT_m値は大きくなる。核酸ハイブリダイズの相対安定性（より高いT_mに対応する）は、次の順で低下する。RNA:RNA、DN

30

40

50

A : RNA、DNA : DNA。長さが100ヌクレオチドを超えるハイブリッドでは、 T_m を計算する式が導かれている(サムブルック(Sambrook)ら、前述9.50~9.51参照)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドによるハイブリダイズのためにはミスマッチの配置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さはその特異性を決定する(サムブルック(Sambrook)ら、前述11.7~11.8参照)。好ましい一実施態様では、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくともヌクレオチド約10個である。より好ましくは、ハイブリダイズ可能な核酸の最小の長さは少なくともヌクレオチド約15個、より好ましくは少なくともヌクレオチド約20個、最も好ましくは長さが少なくともヌクレオチド30個である。さらに当業者は、温度および洗浄液の塩濃度が、プローブの長さなどの要因次第で必要に応じて調節できることを認識する。

10

【0045】

「遺伝子」とは、コード配列に先行する制御配列(5'非コード配列)およびその後の制御配列(3'非コード配列)を含めた特異性タンパク質を発現する核酸断片を指す。

【0046】

本明細書で用いられる「発現」という用語は、発明の核酸断片から誘導されるセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写および安定した蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳を指しても良い。

【0047】

ここで使用される標準リコンビナントDNAおよび分子クローニング技術は当該技術分野で良く知られており、サムブルック(Sambrook)、J.、フリッチュ(Fritsch)、E. F.、およびマニアティス(Maniatis)、T.著「分子クローニング:実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor, NY(1989)(以下「マニアティス(Maniatis)」)、およびオスベル(Ausubel)、F. M.ら著「現代分子生物学プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceによる出版(1987)で述べられている。

20

【0048】

プライマー/オリゴヌクレオチド

本発明のオリゴヌクレオチドは、病原性大腸菌の検出および同定のために開発された。

【0049】

本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号1~17で記述される。

【0050】

下の表Iに示すように、本発明の特定のオリゴヌクレオチドをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅のためのプライマーとして使用してもよい。

【0051】

30

【表 1】

表 1

プライマーセット	配列番号
PS1	2 および 3
PS2	5 および 6
PS3	8 および 9
PS4	10 および 11
PS5	13 および 14
PS6	16 および 17

10

【 0 0 5 2 】

プライマーセット P S 1 (配列番号 2 および配列番号 3)、P S 2 (配列番号 5 および配列番号 6)、P S 3 (配列番号 8 および配列番号 9)、P S 5 (配列番号 13 および配列番号 14)、および P S 6 (配列番号 16 および配列番号 17) は、大腸菌 O 157 : H 7 ゲノムの領域の配列分析に基づいてデザインされた。プライマーセット P S 4 (配列番号 10 および配列番号 11) は、プライマー特異性を変更することなく P C R 生成物の融点を上昇させるように生成された P S 3 中のプライマーの修正である。N C B I データベースの B l a s t 検索からは、既知の機能を有する遺伝子との顕著な配列相同性は明らかにされなかった。プライマーデザインは、いかなるソフトウェアプログラムによっても補助されなかった。

20

【 0 0 5 3 】

これらのオリゴヌクレオチドプライマーはまた、リガーゼ連鎖反応 (L C R) (1989 年にベックマン (Backman) らに付与された E P 0 320 308 号明細書、キャリノ (Carrino) ら、J . M i c r o b i o l . M e t h o d s 23 : 3 ~ 20 頁、1995 年)、核酸配列ベースの増幅 (N A S B A) (キャリノ (Carrino) ら、1995 年、前出)、および自立配列複製 (3 S R) および「Qレプリカーゼ増幅」(ペッファー (Pfeffer) ら、V e t e r i n a r y R e s . C o m m .、19 : 375 ~ 407 頁、1995 年)などのその他の核酸増幅法でも有用であるかもしれない。

30

【 0 0 5 4 】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、ハイブリダイズプローブとして使用してもよい。D N A プローブを使用したハイブリダイズは、食物、臨床、および環境サンプル中の病原体の検出のために使用されることが多く、方法は概して当業者に知られている。プローブハイブリダイズの感度および特異性の程度は、前述の増幅技術で得られるよりも低いことが概して認識される。

40

【 0 0 5 5 】

アッセイ方法

病原性大腸菌の検出のために、配列番号 1 ~ 17 を多様な形態で使用してもよい。最も好ましいのは、プライマー - 誘導増幅法および核酸ハイブリダイズ法である。

【 0 0 5 6 】

これらの方法を使用して、例えば汚染が疑われる動物、環境または食物源からのサンプル中の病原性大腸菌を検出してもよい。

【 0 0 5 7 】

本発明の核酸配列およびオリゴヌクレオチドを使用した、増幅ベースおよびハイブリダイズベースの双方の方法もまた使用して、複合体マトリックスまたは精製された培養物中の大腸菌の同定を確認してもよい。本発明の好ましい実施態様は、(1)複合体サンプル

50

混合物を非選択的成長培地中で培養して標的細菌を蘇生するステップと、(2)全標的細菌DNAを放出するステップと、(3)全DNAを本発明のプライマー対と共に増幅プロトコルの対象にするステップを含んでなる。

【0058】

プライマー - 誘導増幅アッセイ方法

好ましい実施態様では、病原性大腸菌の検出のためのプライマー - 誘導核酸増幅で使用するためのプライマーとして、プライマー対 P S 1 - P S 6 を使用してもよい。

【0059】

熱循環方法(例えばPCR、RT-PCR、およびLCR)、ならびに恒温方法およびストランド置換増幅(SDA)をはじめとする、多様なプライマー - 誘導核酸増幅法が当該技術分野で知られている。

10

【0060】

好ましい方法はPCRである。

【0061】

サンプル調製

本発明に従ったオリゴヌクレオチドおよび方法は、いかなるサンプル調製の必要もなしに、あらゆる適切な臨床または環境サンプルと共に直接使用してもよい。より高い感度を達成するために、そして時間が制限要因でない状況において、サンプルを前処理し増幅前濃厚化が実施されることが好ましい。

【0062】

20

食物 - 媒介病原菌の検出のための最小工業基準は、「細菌学的分析マニュアル(Bacteriological Analytical Manual)」第8版、改訂版Aの第1章、アンドリュー(Andrews)ら著「食物サンプルおよびサンプルホモジネートの調製(Food Sample and Preparation of Sample Homogenate)」、公認分析化学者協会、Arlington, VA、1984年で述べられるように、25gの食物マトリックス中に1個の病原体細胞の存在を確実に検出する方法である。この厳しい基準を満たすため、生化学的、免疫学的または核酸ハイブリダイズ手段による検出を容易にするために、濃厚化の方法および培地が開発されており、標的病原体細胞の生育を増強する。典型的な濃厚化手順は、標的細菌の生育および健康を増強し、また存在するあらゆる背景または非標的微生物の生育を阻害する培地を用いる。例えば米国農務省(USDA)は、病原性大腸菌について試験する牛挽肉サンプルの濃厚化のプロトコルを示している。米国食品医薬品局細菌分析マニュアル(Bacterial Analytical Manual)。

30

【0063】

多様な病原菌のために選択的培地が開発されており、当業者は濃厚化する特定の生物体に適した培地を選択することを知っている。非選択的培地の一般的考察および処方については、公認分析化学者協会(Suite 400, 2200 Wilson Blvd, Arlington, VA 22201~3301)が出版、頒布するFDA細菌分析マニュアル(Bacteriological Analytical Manual)(1998年)で述べられる。

40

【0064】

選択的生育後、さらなる分析のために複合体混合物のサンプルを取り出す。サンプリング手順は、当業者によく知られている多様な手段によって達成してもよい。好ましい実施態様では、5μLの濃厚化培養物を取り出して、プロテアーゼを含有する200μLの溶解溶液に入れる。デラウェア州ウィルミントンのクオリコン(Qualicon, Inc. (Wilmington, DE.))からのボックス(BAX)(登録商標)システム使用ガイドで述べられるように、溶解溶液を37℃に20分間加熱し、95℃で10分のプロテアーゼ不活性化がそれに続く。

【0065】

PCRアッセイ方法

50

サンプル中の病原性大腸菌の存在を検出する好ましい方法は、(a) P S 1、P S 2、P S 3、P S 4、P S 5、およびP S 6よりなる群から選択されるサンプルプライマー対を使用してP C R増幅を実施し、P C R増幅結果を生じさせるステップと、(b)ステップ(a)のP C R増幅結果を調べてプライマー対の増幅生成物を検出し、それによって、プライマー対の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップを含んでなる。

【0066】

より好ましくは、上記方法で、プライマー対はP S 2、P S 3、およびP S 4よりなる群から選択される。

【0067】

サンプル中の病原性大腸菌の存在を検出する別の好ましい方法は、(a) P S 1、P S 2、P S 3、P S 4、P S 5、およびP S 6よりなる群から選択される2個の異なるプライマー対を使用してサンプルのP C R増幅を実施し、P C R増幅結果を生じさせるステップと、(b)ステップ(a)のP C R増幅結果を調べて2個の異なるプライマー対双方の増幅生成物を検出し、それによって、2個の異なるプライマー対双方の増幅生成物の陽性検出がサンプル中の病原性大腸菌の存在を示すステップを含んでなる。

【0068】

上記方法で、2個のプライマー対は好ましくはP S 2およびP S 3、より好ましくはP S 2およびP S 4を含んでなる。

【0069】

別の好ましい実施態様では、P C R増幅を実施するのに先だって、サンプルを調製するステップを実施してもよい。調製するステップは、(1)細菌濃厚化、(2)サンプルからの細菌細胞の分離、(3)細胞溶解、および(4)全D N A抽出のプロセスの少なくとも1つを含んでなってもよい。

【0070】

増幅条件

当業者は、本発明のオリゴヌクレオチドを使用して、標的病原性大腸菌細菌を成功裏に検出するのに、あらゆる概して許容可能なP C R条件を使用してもよいこと、そして試験されるサンプルおよびその他の試験室条件次第で、最適感度および特異性を達成するために、P C R条件の日常的最適化が必要かもしれないことを理解するであろう。最適には、
30

【0071】

好ましい実施態様では、以下の試薬およびサイクル条件を使用してもよい。(デラウェア州ウィルミントンのクオリコン(Qualicon, Inc. (Wilmington, DE.)製)1個のボックス(BAX)(登録商標)試薬錠剤、Taq DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド、(オレゴン州ユージーンのもレキユラー・プローブス(Molecular Probes (Eugene, OR)からの)SYBR(登録商標)グリーン(Green)、および緩衝液構成要素を含有する該錠剤、および5 μLのプライマー混合物を含有するP C Rチューブに、45 μLの溶解産物を添加して、各プライマーについてP C R中0.150 μモルの最終濃度を達成する。好ましいP C Rサイクル条件は次のとおり。94 で2分の初期D N A変性後、94 で15秒間を38サイクル、および70 で3分間のアニーリング/延長。
40

【0072】

検出/検査/分析

プライマー-誘導増幅生成物は、様々な方法を使用して分析できる。

【0073】

均質検出とは、増幅生成物検出の好ましい方法を指し、テンプレートまたはプライマーからの増幅生成物分離(ゲル電気泳動法などによる)が必要でない。均質検出は典型的に、蛍光性染料存在下で反応混合物の蛍光レベルを測定して達成される。
50

【0074】

好ましい実施態様では、特にクオリコン (Qualicon Inc.) からのボックス (BAX) (登録商標) システムハードウェアおよび試薬錠剤を用いたDNA融解曲線分析が使用されて、均質検出が行われる。システムの詳細は、それぞれその内容全体を参照により本願明細書に援用した、米国特許第6,312,930号明細書およびPCT公報国際公開第97/11197号パンフレットおよび国際公開第00/66777号パンフレットにある。

【0075】

融解曲線分析は、各増幅サイクル中に選択される時点で、標的増幅生成物(「標的単位複製配列」)の蛍光をモニタリングすることで、二本鎖核酸分子(「dsDNA」または「標的」)を検出および定量する。

10

【0076】

当業者にはよく知られているように、温度がその融解温度よりも高いと、dsDNAの二本鎖は分離または融解する。dsDNA分子の融解はプロセスであり、特定の溶液条件下では、融解は1つの温度で開始し(以下 T_{MS} と称する)、別の温度で完了する(以下、 T_{ME} と称する)。見慣れた項 T_m は融解が50%完了する温度を指す。

【0077】

典型的なPCRサイクルは、標的dsDNAが融解する変性相、温度がプライマーが一本鎖になった標的プライマーに結合するのに最適であるアニーリング相、および温度がDNAポリメラーゼが機能するのに最適である鎖伸长相(温度 T_E)を伴う。

20

【0078】

本発明に従って、 T_{MS} は T_E よりも高くあるべきで、 T_{ME} はDNAポリメラーゼが熱不活性化される温度よりも低くあるべきである(かなりより低くなることが多い)。融解特性はデオキシヌクレオチド組成物などの特定のdsDNA分子の固有特性、およびdsDNAの長さによってもたらされる。

【0079】

挿入染料は二本鎖DNAに結合する。染料/dsDNA複合体は、染料に依存する適切な励起波長の光に曝露すると蛍光を発生し、蛍光の強さはdsDNA濃度に比例してもよい。DNA挿入染料の使用を活用して、dsDNAを検出および定量化する方法は当該技術分野で知られている。これらの目的で多くの染料が当該技術分野で知られており、使用されている。本方法もまた、このような関係を活用する。

30

【0080】

このような染料の例としては、挿入染料が挙げられる。このような染料の例としては、SYBRグリーン(Green)-I(登録商標)、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、トト(TOTO)(登録商標)-1{キノリニウム、1-1'-[1,3-プロパンジイルビス[(ジメチルイミノ)オ]-3,1-プロパンジイル]}ビス[4-[(3-メチル-2(3H)-ベンゾチアゾリリデン)メチル]}-、四ヨウ化物}、およびヨプロ(Yopro)(登録商標){キノリニウム、4-[(3-メチル-2(3H)-ベンゾチアゾリリデン)メチル]-1-[3-(トリメチルアンモニオ)プロピル]}-、二ヨウ化物}が挙げられるが、これに限定されるものではない。本発明で最も好ましいのは、オレゴン州ユージーンのもレキユラー・プローブ(Molecular Probes (Eugene, OR))によって製造されるSYBRグリーン(Green)-I(登録商標)などの非対称性シアン化物染料である。

40

【0081】

融解曲線分析は、温度を上昇させながら蛍光変化をモニタリングして達成される。温度が標的単位複製配列に特異的な T_{MS} に達すると、dsDNAは変性し始める。dsDNAが変性すると、挿入染料はDNAから分離して蛍光が低下する。蛍光の対数の変化の負数を温度変化で除して、温度に対してプロットした数学的分析は、融解曲線として知られているグラフピークをもたらす(一般的融解曲線分析を例示する図6を参照されたい)。

【0082】

50

図1に示されるデータ形質転換プロセスは、以下を伴う。

1. データを補間して等間隔のデータ点を得る
2. 蛍光 (F) の対数を取る
3. $\log F$ を補整する
4. $-d(\log F) / dT$ を計算する
5. (標的生物次第で) データを1度間隔で離れた11 ~ 13個のデータ点に減少させる。

【0083】

本均質検出方法を使用して、標的 dsDNA を検出および定量化でき、それから標的生物体の存在およびレベルを判定できる。この方法は非常に特異的で高感度である。検出可能な最少数の標的 dsDNA は、典型的な反応条件および容量下で1 ~ 10である。

10

【0084】

均質検出を用いて、本発明のプライマー対を使用し、「リアルタイム」プライマー-誘導核酸増幅(例えば「リアルタイム」PCRおよび「リアルタイム」RT-PCR)を行ってもよい。好ましい「リアルタイム」法については、その各内容全体を本願明細書に援用した、米国特許第6,171,785号明細書および米国特許第5,994,056号明細書に記載されている。

【0085】

別の検出方法は、その内容全体を参照により本願明細書に援用した、米国特許第5,804,375号明細書、米国特許第5,538,848号明細書、米国特許第5,487,972号明細書、および米国特許第5,210,015号明細書に記載される5'ヌクレアーゼ検出法である。

20

【0086】

標準非変性ゲル電気泳動法(例えばアクリルアミドまたはアガロース)、変性勾配ゲル電気泳動法、および温度勾配ゲル電気泳動法をはじめとする、多様なその他のPCR検出方法が当該技術分野で知られている。標準非変性ゲル電気泳動法はPCR検出の単純で迅速な方法であるが、あらゆる用途に対しては適切でないかもしれない。

【0087】

変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)は、小型DNA断片(200 ~ 700bp)の変性動態の違いを検出する分離方法である。分離の原理は、断片の長さおよびヌクレオチド配列の双方に基づく。同一長さの断片では、1個の塩基対程度の小さな違いが検出できる。これは、DNA断片がサイズによってのみ分離される非変性ゲル電気泳動法とは、対照的である。非変性ゲル電気泳動法のこの限界は、DNA分子間の電荷密度の違いが中性に近く、それらの分離にほとんど役立たないために帰結する。DNA断片のサイズが増大すると、ゲルを通過するその速度は低下する。

30

【0088】

DGGEは主として、それらの変性プロフィールおよび配列に基づいて、同一サイズのDNA断片を分離するのに使用される。DGGEを使用して、熱または化学変性剤が適用されると、二本鎖のDNA分子は分離または融解する。DNA二本鎖の変性は、1)相補的塩基対間に形成された水素結合(GCに富む領域はATに富む領域よりも高い変性条件で融解するので)、および2)同一ストランドまたは「スタッキング」の隣接塩基間の親和性の2つの要因によって影響される。したがってDNA分子は、それらのヌクレオチド配列によって定まる個々の特徴的な変性条件がある、いくつかの融解ドメインを有してもよい。DGGEは、特異的な変性ドメイン内のただ1個のヌクレオチド以外は、同一の長さおよびDNA配列を有するその他の点では同一のDNA分子が、異なる温度または T_m で変性するという事実を有効に使う。したがって増大する化学変性剤の勾配を通じて二本鎖(ds)DNA断片を電気泳動すると、それは変性し始め、立体配座および移動性変化の双方を被る。分子の一本鎖部分の枝分かれ構造は、ゲルマトリックス内で絡まるので、dsDNA断片は、変性一本鎖(ss)DNA断片よりも早く移動する。変性環境が増大すると、DNAストランドの特定の低変性ドメインが分離する変性剤濃度において、dsD

40

50

NA断片は完全に分離し、ゲルを通過する分子の移動性が遅延する。実際には一定温度（約60℃）で電気泳動法が行われ、100%のDNA分子に変性をもたらす濃度（すなわち40%ホルムアミドおよび7M尿素）で化学変性剤が使用される。この可変変性勾配は、0%変性剤から100%までの変性剤に各DGGEゲルの組成が徐々に変化するように、勾配マーカーを使用して作り出される。もちろん、より低い範囲の変性剤を含有する勾配（例えば35%～60%）もまた、DNAの増大する分離のために注入できる。

【0089】

DGGEで使用される原理はまた、化学変性剤勾配の代わりに温度勾配を使用する第2の方法にも応用できる。この方法は、温度勾配ゲル電気泳動（TGGE）として知られている。この方法は温度勾配を利用して、dsDNAからssDNAへの立体配座変化を誘導して、サイズが等しく配列が異なる断片を分離する。DGGEの場合と同じく、異なるヌクレオチド配列のDNA断片は、ゲルの異なる位置で不動性になる。プライマーデザインのバリエーションを都合良く利用して、PCR生成物の特性決定および同定のためのDGGEの有用性を増大できる。プライマーデザインのバリエーションを使用したこれらの方法および原理については、「PCR技術原理および応用（PCR Technology Principles and Applications）」ヘンリーA.エルリッヒ（Henry A. Erlich）編、M. Stockton Press、NY、71～88頁（1988年）で述べられる。

【0090】

計測手段

好ましい実施態様に従って、デラウェア州ウィルミントンのクオリコン（Qualicon, Inc. (Wilmington, DE.))からのボックス（BAX）（登録商標）システムおよび融解曲線分析を使用した。

【0091】

試薬およびキット

あらゆる形態のあらゆる適切な核酸複製組成物（「複製組成物」）を使用できる。

【0092】

PCR増幅のための典型的な複製組成物は、例えばdATP、dCTP、dGTP、dTTP、標的特異的プライマー、および適切なポリメラーゼを含んでなってもよい。

【0093】

複製組成物が液体形態である場合、当該技術分野で知られている適切な緩衝液を使用してもよい（サムブルック（Sambrook）、J.ら著「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989年））。

【0094】

代案としては、複製組成物が錠剤形態中に含有される場合、安定剤および結合剤などの典型的な錠剤化試薬が含まれてもよい。好ましい錠剤化技術については、それぞれその内容全体を本願明細書に援用した米国特許第4,762,857号明細書および米国特許第4,678,812号明細書で記載される。

【0095】

本発明の好ましい複製組成物は、(a)PS1、PS2、PS3、PS4、PS5、およびPS6よりなる群から選択される少なくとも1つのプライマー対、および(b)熱安定性DNAポリメラーゼを含んでなる。複製組成物はより好ましくはプライマー対PS2およびPS3の双方、さらにより好ましくはプライマー対PS2およびPS4の双方を含んでなる。

【0096】

本発明の好ましいキットは、(a)PS1、PS2、PS3、PS4、PS5、およびPS6よりなる群から選択される少なくとも1つのプライマー対、および(b)熱安定性DNAポリメラーゼを含んでなる。好ましいキットは、より好ましくはプライマー対PS

10

20

30

40

50

2 および P S 3 の双方、さらにより好ましくはプライマー対 P S 2 および P S 4 の双方を含んでなる。

【 0 0 9 7 】

本発明の好ましい錠剤は、(a) P S 1、P S 2、P S 3、P S 4、P S 5、および P S 6 よりなる群から選択される少なくとも 1 つのプライマー対、および (b) 熱安定性 D N A ポリメラーゼを含んでなる。好ましい錠剤は、より好ましくはプライマー対 P S 2 および P S 3 の双方、さらにより好ましくは、プライマー対 P S 2 および P S 4 の双方を含んでなる。さらにより好ましくは、本発明のキットは、前述の好ましい錠剤を含んでなる。

【 0 0 9 8 】

別の好ましい実施態様では、複製組成物は陽性内部対照を含有する。P C R 反応内に含有される陽性内部対照の利点については、その各内容全体を本願明細書に援用した米国特許第 6, 3 1 2, 9 3 0 号明細書および P C T 出願国際公開第 9 7 / 1 1 1 9 7 号パンフレットで以前述べられており、以下が含まれる。(i) 対照を単一プライマーを使用して増幅してもよい、(i i) 対照増幅生成物の量はサンプル中に含有されるあらゆる標的 D N A または R N A から独立している、(i i i) 対照 D N A は手動および自動試験手順の双方において、使用の容易さおよび高度な再現性のために、その他の増幅試薬と共に錠剤にできる、(i v) 対照は均質な検出と共に、すなわち反応物質からの生成 D N A の分離なしに使用できる。(v) 内部対照は、反応中のその他の可能な増幅生成物とははっきりと識別される融解プロフィールを有する。

【 0 0 9 9 】

対照 D N A は、プライマー - 誘導増幅反応において増幅を可能にする適切なサイズおよび塩基組成である。対照 D N A 配列は、大腸菌ゲノムまたは別の供給源から得てもよいが、標的増幅生成物の増幅を可能にする同一条件下で、再現性よく増幅されなくてはならない。

【 0 1 0 0 】

対照反応は、増幅反応を確認するのに有用である。対照 D N A の増幅は試験サンプルと同一の反応チューブ内で起きるので、サンプルが標的陰性である、すなわち標的増幅生成物が生成されない場合に、増幅反応の成功を示す。増幅反応の顕著な確認を達成するために、対照 D N A の適切数のコピーを各増幅反応に含めなくてはならない。

【 0 1 0 1 】

場合によっては、追加的な陰性対照複製組成物を含めることが有用かもしれない。陰性対照複製組成物は、複製組成物と同一の試薬を含有するがポリメラーゼがない。このような対照の主要な機能は、方法が蛍光性検出手段を用いる場合に、均質な形態での偽性の背景蛍光をモニターすることである。

【 0 1 0 2 】

複製組成物は、それらが標的 D N A または対照 D N A を増幅するのに使用されるためにデザインされているかどうかによって、変性されてもよい。標的 D N A (試験複製組成物) を増幅する複製組成物は、(i) ポリメラーゼ (概して熱安定性)、(i i) 標的 D N A にハイブリダイズできるプライマー対、および (i i i) 増幅反応が進行するのに必要な緩衝液を含んでもよい。対照 D N A (陽性対照または陽性複製組成物) を増幅する複製組成物は、(i) ポリメラーゼ (概して熱安定性)、(i i) 対照 D N A、(i i i) 対照 D N A にハイブリダイズできる少なくとも 1 つのプライマー、および (i v) 増幅反応が進行するのに必要な緩衝液を含んでもよい。

【 0 1 0 3 】

核酸ハイブリダイズ法

核酸ハイブリダイズ法で特に有用なプローブは、配列番号 1 ~ 1 7 のいずれか、またはそれから誘導される配列である。

【 0 1 0 4 】

核酸ハイブリダイズ試験の基本的構成要素は、プローブ、病原性大腸菌を含有すること

10

20

30

40

50

が疑われるサンプル、および特異的ハイブリダイズ法を含む。プローブは、検出する核酸配列に相補的な一本鎖核酸配列である。プローブは検出する核酸配列に「ハイブリダイズ可能」である。典型的に、プローブ長はわずか5塩基から大腸菌診断用配列の完全長まで変動でき、行われる特異的試験に依存する。プローブ分子の一部のみが、検出する核酸配列に相補的であればよい。さらにプローブと標的配列間の相補性は、完全でなくてもよい。ハイブリダイズは不完全に相補的な分子間で起き、その結果、ハイブリダイズ領域内の塩基の特定の画分は、適切な相補的塩基と対にならない。プローブはRNAまたはDNAのいずれかから構成されてもよい。核酸プローブの形態は、単に1つの極性の標識一本鎖分子、または双方の極性が存在する標識一本鎖分子であってもよい。プローブの形態は、その長さのように、行われるハイブリダイズ試験のタイプによって定まる。

10

【0105】

サンプルは病原性大腸菌を含有しても、しなくてもよい。サンプルは多様な形態を取ってもよいが、概して汚染が疑われる動物、環境または食物源から抽出される。

【0106】

DNAは直接検出されてもよいが、最も好ましくは、あらゆるプローブおよび標的分子のハイブリダイズが起きる前に、サンプル核酸がプローブと接触できるようにされなくてはならない。したがって生物体のDNAは細胞を含んではならず、ハイブリダイズが起きる前に適切な条件下に置かれる。溶液内ハイブリダイズ法は、サンプルDNAとプローブのハイブリダイズを得られるようにするために、DNAの精製を必要とする。これはサンプル中の標的配列検出のための溶液内法の使用が、サンプルの核酸を最初に精製してタンパク質、脂質、およびその他の細胞構成要素を除去し、次にハイブリダイゼーション条件下でプローブと接触させなくてはならないことを意味する。サンプル核酸の精製方法は当該技術分野で一般的であり、よく知られている(マニアティス(Maniatis)前出)。

20

【0107】

同様に、ハイブリダイズ法は良好に規定されている。典型的にプローブおよびサンプルは、核酸がハイブリダイズできるようにする条件下で混合されなくてはならない。これは適切な濃度および温度条件下において、無機または有機塩存在下でプローブとサンプルを接触させることを伴う。プローブとサンプル核酸は、プローブとサンプル核酸の間にあらゆる可能なハイブリダイズが起きるように、十分長い時間接触させなくてはならない。混合物中のプローブまたは標的の濃度によって、ハイブリダイズが起きるのに必要な時間が定まる。プローブまたは標的濃度が高いほど、必要なハイブリダイズインキュベーション時間は短くなる。

30

【0108】

好ましい一実施態様では、核酸を抽出する必要なしに、ハイブリダイズアッセイを細胞溶解産物に直接行ってよい。これはサンプル取り扱いプロセスからいくつかのステップを排除し、アッセイを加速する。粗製細胞溶解産物においてこのようなアッセイを実施するために、典型的に、上述のように調製された細胞溶解産物にカオトロピック剤が添加される。カオトロピック剤は、ヌクレアーゼ活性を阻害することで核酸を安定化する。さらにカオトロピック剤は、室温において、短いオリゴヌクレオチドプローブのDNAへの高感度およびストリンジентなハイブリダイズを可能にする。(ヴァンネス(Van Ness)およびチェン(Chen)、Nuc l . A c i d s R e s . 1 9 : 5 1 4 3 ~ 5 1 5 1 (1 9 9 1 年))。適切なカオトロピック剤としては、塩化グアニジニウム、チオシアン酸グアニジニウム、チオシアン酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸リチウム、過塩素酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸ルビジウム、ヨウ化カリウム、およびトリフルオロ酢酸セシウムなどが挙げられる。典型的に、カオトロピック剤は約3Mの最終濃度で存在する。所望ならば、ホルムアミドをハイブリダイズ混合物に典型的に30~50%(v/v)で添加できる。

40

【0109】

代案としては、プローブハイブリダイズに先だって、サンプル核酸を精製できる。例え

50

ばフェノール-クロロホルム抽出、ワシントン州ボセルのマイクロプローブ社 (Micro Probe Corp. (Bothell, WA)) からのイソクイック (Iso Quick) 抽出、およびその他の多様な方法が、当業者に知られている。ハイブリダイズ前精製は、標準フィルターハイブリダイズアッセイのために特に有用である。さらに精製は、自立配列複製などの生体外 (in vitro) RNA 増幅法 (例えばフェイ (Fahy) ら著「PCR 方法および応用 (PCR Methods and Applications)」Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1991)、25~33 頁を参照されたい) または逆転写酵素 PCR (カワサキ (Kawasaki) 著「PCR プロトコル: 方法および応用ガイド (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)」M. A. イニス (Innis) ら編、(1990 年)、21~27 頁) を組み込むことにより、アッセイ感度を増大させる手段を容易にする。

10

【0110】

DNA が放出されると、それは多様な方法のいずれかによって検出できる。しかし最も有用な実施態様は、速度、便宜、感度、および特異性の少なくともいくつかの特性を有する。

【0111】

様々なハイブリダイズ溶液を用いることができる。典型的に、これらは約 20~60% 容量、好ましくは 30% の極性有機溶剤を含んでなる。一般的なハイブリダイズ溶液は、約 30~50% v/v のホルムアミドと、約 0.15~1 M の塩化ナトリウムと、クエン酸ナトリウム、トリス HCl、PIPES または HEPEs (pH 範囲約 6~9) などの約 0.05~0.1 M の緩衝液と、ドデシル硫酸ナトリウムなどの約 0.05~0.2% の洗剤と、または 0.5~20 mM の EDTA と、ファーマシア (Pharmacia Inc.) からの FICOLL (約 300~500 キロダルトン) と、ポリビニルピロリドン (約 250~500 kd) と、血清アルブミンを用いる。典型的なハイブリダイズ溶液には、約 0.1~5 mg/mL の未標識のキャリア核酸、断片核 DNA (例えば仔ウシ胸腺またはサケ精子 DNA、または酵母 RNA)、および場合により約 0.5~2% wt/vol のグリシンも含まれる。多様な極性水溶性または膨潤性作用薬 (例えばポリエチレングリコール)、アニオン性ポリマー (例えばポリアクリレートまたはポリメチルアクリレート)、およびアニオン性糖質ポリマー (例えば硫酸デキストラン) をはじめとする体積排除剤などのその他の添加剤もまた含まれてもよい。

20

30

【0112】

核酸ハイブリダイズは、多様なアッセイ様式に適合できる。最も適切な 1 つは、サンドイッチアッセイ様式である。サンドイッチアッセイは、特に非変性条件下でハイブリダイズに適合できる。サンドイッチ-タイプアッセイの主要構成要素は固体担体である。固体担体は、未標識で DNA 配列の一部と相補的な固定化核酸プローブを吸着しており、またはそれと共有結合的に共役している。

【0113】

サンドイッチアッセイは、アッセイキット内に包含されてもよい、このキットは、汚染が疑われるサンプル収集のための第 1 の構成要素、およびサンプルの分配および溶解のための緩衝液を含む。第 2 の構成要素は、標的およびプローブポリヌクレオチドのハイブリダイズのため、ならびに洗浄による望ましくないおよび非二本鎖形態除去のための乾燥または液体いずれかの形態の培地を含む。第 3 の構成要素は、その上に、大腸菌ゲノムの一部と相補的な未標識の核酸プローブ (群) が固定される (または抱合される) 固体担体 (ディップスティック) を含む。第 4 の構成要素は、第 3 の構成要素の固定化未標識核酸プローブがハイブリダイズするのと同じ DNA スtrand の第 2 の異なる領域と相補的な標識プローブを含有する。

40

【0114】

別の好ましい実施態様では、均質または不均一いずれかのアッセイ様式において、3'

50

ブロック化検出プローブとして、配列番号1～17またはそれらの誘導体を使用してもよい。例えばこれらの配列から発生したプローブは、3'ブロックされまたは非参加であってもよく、核酸増幅反応によって延長されずまたはそれに参加しない。さらにプローブには、プローブ/分析物ハイブリッドの固定化付着点として、または検出可能シグナルを生じるリポーターとして作用する反応性リガンドの役割を果たすことができる標識が組み込まれる。したがって大腸菌汚染が疑われるサンプルから単離されたゲノムまたはcDNAは、過剰な3'ブロック化検出プローブの存在下で標準プライマー-誘導増幅プロトコルによって増幅され、増幅生成物が生成する。プローブは3'ブロックされているので、標的の増幅に参加しないまたはそれを妨げない。最終増幅サイクル後、検出プローブは増幅されたDNAの適切な部分にアニールし、次にアニールした複合体は反応性リガンドを通じて担体上に捕捉される。

10

【0115】

場合によっては、複製組成物中の標識プローブと共に、標識dNTPをリガンドに組み込んで、担体上におけるPCR反応生成物の固定化、次に標識プローブ試薬の手段による固定化生成物の検出を容易にすることが望ましい。例えばビオチン、ジゴキシゲニンまたはジゴキシン標識dNTPをPCR反応組成物に添加できる。次にPCR生成物に組み込まれたビオチンまたはジゴキシンは、それぞれストレプトアビジン(streptavidin)、アンチジキソギン、アンチジゴキシゲニン抗体担体上に固定化できる。次にプローブ標識の存在によって、固定化PCR生成物を検出できる。

【0116】

20

本発明のプローブは、いくつかの代案の形態でデザインされてもよい。プローブの3'末端は、複製阻害する部分の付着によって、プライマー延長反応への参加からブロックされる。典型的な複製阻害物質部分としては、ジデオキシヌクレオチド、3-デオキシヌクレオチド、不適正ヌクレオチドまたはヌクレオチド配列、3'ホスフェート基、および化学物質が挙げられるが、これに限定されるものではない。コルジセピン(3'デオキシアデノシン)が好ましい。

【0117】

複製阻害物質は、標準シアノエチルホスホラミダイト化学反応を使用して、化学合成中に、非参加プローブの3'末端ヌクレオチドの3'ヒドロキシ基に共有結合的に付着する。このプロセスは、その中で3'末端が不溶性の担体(調節孔ガラスまたは「CPG」)に共有結合的に付着しながら、新しく合成された鎖が5'末端で成長する、固相合成化学反応を使用する。3-デオキシリボヌクレオチドが好ましい複製阻害物質である。コルジセピン(3-デオキシアデノシン)が最も好ましい。コルジセピンはプローブの3'末端に付着するので、合成は、CPGに共有結合的に付着するコルジセピン、5-ジメトキシトリチル-N-ベンゾイル-3-デオキシアデノシン(コルジセピン)、バージニア州スターリングのグレン・リサーチ(Glen Research (Sterling, VA))からの2-サクシノイル-長鎖アルキルアミノ-CPGから開始する。ジメトキシトリチル基は除去され、連鎖合成惹起は、固相コルジセピンの脱保護された5'水酸基で開始する。合成完了後、オリゴヌクレオチドプローブが固体担体から切断され、3'-末端付着コルジセピン上に遊離2'水酸基が残る。その他の試薬もまた、合成中に、非参加

30

40

【実施例】**【0118】**

以下の実施例で本発明をさらに明確にする。これらの実施例は本発明の好ましい実施態様を示しながら、あくまでも例示の目的で提供されるものとする。

50

【0119】

実施例で使用した一般方法および材料

細菌培養の維持および生育に適した材料および方法は、当該技術分野で良く知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術は、以下で述べられる。「一般微生物学方法マニュアル (Manual of Methods for General Bacteriology)」、フィリップ・ゲアハルト (Phillipp Gerhardt)、R. G. E. マレー (R. G. E. Murray)、ラルフ N. コスティロウ (Ralph N. Costilow)、ユージーン W. ネスター (Eugene W. Nester)、ウィリス A. ウッド (Willis A. Wood)、ノエル R. クリーグ (Noel R. Krieg)、および G. ブリッグス・フィリップス (G. Briggs Phillips) 編、米国微生物学会、Washington, D. C. (1994年)、またはトーマス D. ブロック (Thomas D. Brock) 著「バイオテクノロジー：工業微生物学テキストブック (Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology) 第2版 (1989年) Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989年)、または「細菌学的分析マニュアル (Bacteriological Analytical Manual)」第6版、公認分析化学者協会、Arlington, VA (1984年)。

10

【0120】

病原性大腸菌株および比較非標的菌株を生育させるのに使用した培地は、BBL (ベクトン・ディッキンソン (Becton-Dickinson)) から得られたブレインハートインフュージョンブロス (BHI) であった。病原性大腸菌株サンプルはBHIブロス中で一晚生育させ、0.1%ペプトン水中でおよそ 10^6 cfu/ml に希釈した培養物から得られた。比較非標的菌株のサンプルをBHI中でおよそ 10^9 cfu/ml に濃厚化した。

20

【0121】

プライマー (配列番号 2、3、5、6、8、9、10、11) は、テキサス州ウッドランドのシグマ・ジェノシス (Sigma-Genosys (Woodlands, TX)) によって調製された。

【0122】

PCRで使用した試薬は、デラウェア州ウィルミントンのデュボン・クオリコン (DuPont Qualicon, Inc. (Wilmington, DE.)) からのボックス (BAX) (登録商標) システム試薬錠剤キットからのものであり、オレゴン州ユージーンのマレキュラー・プローブス (Molecular Probes (Eugene, OR)) からのSYBR (登録商標) グリーン (Green)、カリフォルニア州フォスターシティのアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems (Foster City, CA)) からのTaq DNAポリメラーゼ、インディアナ州インディアナポリスのロシュ・ダイアグノスティクス (Roche Diagnostics (Indianapolis, IN)) からのデオキシヌクレオチド、およびニュージャージー州のEMサイエンス (EM Science (New Jersey)) から

30

40

【0123】

全てのPCR反応は、デラウェア州ウィルミントンのデュボン・クオリコン (DuPont Qualicon, Inc. (Wilmington, DE.)) から標準ボックス (BAX) (登録商標) システムを使用して実施した。

【0124】

略語の意味は、次のとおり。「h」は時間を意味し、「min」は分を意味し、「sec」は秒を意味し、「d」は日を意味し、「mL」はミリリットルを意味する。

【0125】

実施例 1 ~ 3

50

病原性大腸菌特異的DNA断片の増幅

大腸菌O157:H7ゲノムの領域の配列分析に基づいて、3個のプライマーセット(P S 1、P S 2、P S 3)をデザインした。1個のプライマーセット(P S 4)は、特異性は変更しないが、増幅生成物の融解温度が変更するP S 3の修正であった。NCBIデータベースのBlast検索からは、既知の機能を有する遺伝子との顕著な配列相同性は明らかにされなかった。プライマーデザインは、いかなるソフトウェアプログラムによっても補助されなかった。

【0126】

上述のプライマーセットについて以下のサイクリング条件で試験した。94 で2分の初期DNA変性後、94 で15秒間を38サイクル、および70 で3分間のアニーリング/延長。

【0127】

病原性および非病原性血清型の複数の大腸菌株を試験した。

【0128】

配列番号1の存在の判定は、上述のようにプライマーセット1(P S 1)およびDNA融解曲線分析で達成される陽性PCRである。プライマーセット1(P S 1)の陽性反応は、およそ83 における融解曲線ピークの外観をもたらす。図2は、プライマーセット1(P S 1)で増幅された標的増幅生成物(配列番号1)に対して陽性の病原性大腸菌の代表的な融解曲線分析を示す。

【0129】

配列番号4の存在の判定は、上述のようにプライマーセット2(P S 2)およびDNA融解曲線分析で達成される陽性PCRである。プライマーセット2(P S 2)の陽性反応は、およそ88 における融解曲線ピークの外観をもたらす。図3は、プライマーセット2(P S 2)で増幅された標的増幅生成物(配列番号4)に対して陽性の病原性大腸菌の代表的な融解曲線分析を示す。

【0130】

配列番号7の存在の判定は、上述のようにプライマーセット3(P S 3)およびDNA融解曲線分析で達成される陽性PCRである。プライマーセット3(P S 3)の陽性反応は、およそ80 における融解曲線ピークの外観をもたらす。図4は、プライマーセット3(P S 3)で増幅された標的増幅生成物(配列番号7)に対して陽性の病原性大腸菌の代表的な融解曲線分析を示す。

【0131】

配列番号7の存在の判定は、上述のように、プライマーセット4(P S 4)およびDNA融解曲線分析で達成される陽性PCRである。プライマーセット4(P S 4)に対する陽性反応は、CC clamp(上で説明したようにプライマーセットP S 4はGC clampのあるプライマーセットP S 3である)のために、およそ83 における融解曲線ピークの外観をもたらす。図5は、プライマーセット4(P S 4)で増幅された病原性大腸菌陽性の代表的な融解曲線分析を示す。

【0132】

完全な結果を表I I(P S 1、実施例1)、表I I I(P S 2、実施例2)、および表I V(P S 3またはP S 4、実施例3)に記載する。

【0133】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

プライマーセット PS1 との PCR による標的配列番号 1 の結果 (実施例 1)

大腸菌血清型 * 病原性を意味する	試験菌株総数	陽性 PCR 生成物数	陰性 PCR 生成物数
O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	3	3	0
O26:H11*	9	8	1
O91:H21*	1	0	1
O91:HNM*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	2	1
O1:H7	1	0	1
O113:H7	1	0	1
O2:H7	1	0	1
O25:H7	1	0	1
O157:H19	1	0	1
O55:H10	1	0	1

10

20

【 0 1 3 4 】

【表 3】

表 3

プライマーセット PS2 との PCR による標的配列番号 4 の結果 (実施例 2)

大腸菌血清型 * 病原性を意味する	試験菌株総数	陽性 PCR 生成物数	陰性 PCR 生成物数
O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	4	4	0
O26:H11*	11	10	1
O26:HNM	1	1	0
O91:H21*	1	0	1
O91:HNM*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	2	1
O111:HNM*	3	2	1
非病原性単離物 93 の 異なる各血清型の 1 つを代表する	93	0	93

30

40

50

【 0 1 3 5 】

【表 4】

表 4

プライマーセット PS3 または PS4 との PCR による標的配列番号 7 の結果 (実施例 3)

大腸菌血清型 *病原性を意味する	試験菌株総数	陽性 PCR 生成物数	陰性 PCR 生成物数
O157:H7*	112	112	0
O157:HNM*	3	3	0
O55:H7*	4	4	0
O26:H11*	11	0	11
O26:HNM	1	0	1
O91:H21*	1	0	1
O91:HNM*	1	0	1
O113:H11*	3	0	3
O146:H21*	2	0	2
O45:H2*	2	0	2
O103:H2*	2	0	2
O125:HNM*	2	0	2
O5:HNM*	2	0	2
O145:HNM*	3	0	3
O111:HNM*	3	0	3
非病原性単離物 93 の 異なる各血清型の 1つを代表する	93	0	93

10

20

【 0 1 3 6 】

実施例 4

同一 PCR 反応における複数プライマーセットおよび内部対照の使用

図 5 は、陽性内部対照を添加したサンプルを示す。陽性内部対照はおよそ 77 ~ 78 で融解し、用いた 2 個のプライマーセット、すなわちおよそ 83 で融点曲線ピークを生じるプライマーセット 4 (PS4) (配列番号 7 検出のためのプライマーセット 3 (PS3) の代わり)、およびおよそ 88 で融点曲線ピークを生じる配列番号 4 検出のためのプライマーセット 1 (PS2) の双方の病原性大腸菌単位複製配列とは、明らかに区別できる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 7 】

【図 1】融解曲線分析のプロセスを示す。標的 DNA の蛍光変化は、融解中に捉えられる。蛍光の対数の変化の負数を温度変化で除して、温度に対してプロットした数学的分析は、融解曲線として知られているグラフピークをもたらす。

【図 2】プライマーセット 1 (PS1) で増幅された病原性大腸菌 O157:H7 陽性サンプルの代表的な融解曲線分析を示す。増幅標的 (配列番号 1) の融解曲線は、およそ 83 である。

40

【図 3】プライマーセット 2 (PS2) で増幅された病原性大腸菌 O157:H7 陽性サンプルの代表的な融解曲線分析を示す。増幅標的 (配列番号 4) の融解曲線は、およそ 88 である。

【図 4】プライマーセット 3 (PS3) で増幅された病原性大腸菌 O157:H7 陽性サンプルの代表的な融解曲線分析を示す。増幅標的 (配列番号 7) の融解曲線は、およそ 80 である。

【図 5】陽性内部対照、およびプライマーセット 2 (PS2) およびプライマーセット 4 (PS4) で増幅された大腸菌 O157:H7 DNA の包含を示す。プライマーセット 2

50

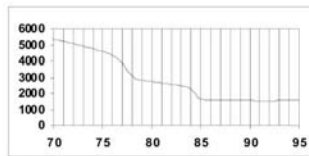
(P S 2) からの増幅標的 (配列番号 4) は、およそ 8 8 の融解曲線を発生させる。5' 末端に G C r i c h 付加を有するプライマーセット 4 (P S 4) は、増幅標的の融解曲線 (G C c l a m p からの G C がある配列番号 7) を配列番号 7 (およそ 8 0) に対して、より高温 (およそ 8 3) にシフトするので、それを陽性内部対照融解曲線 (およそ 8 1) からより容易に識別することができる。

【 図 1 】

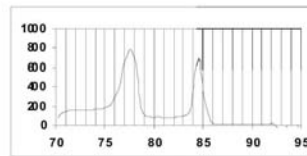
図 1

融解曲線分析のしくみ

データ変換



生データ



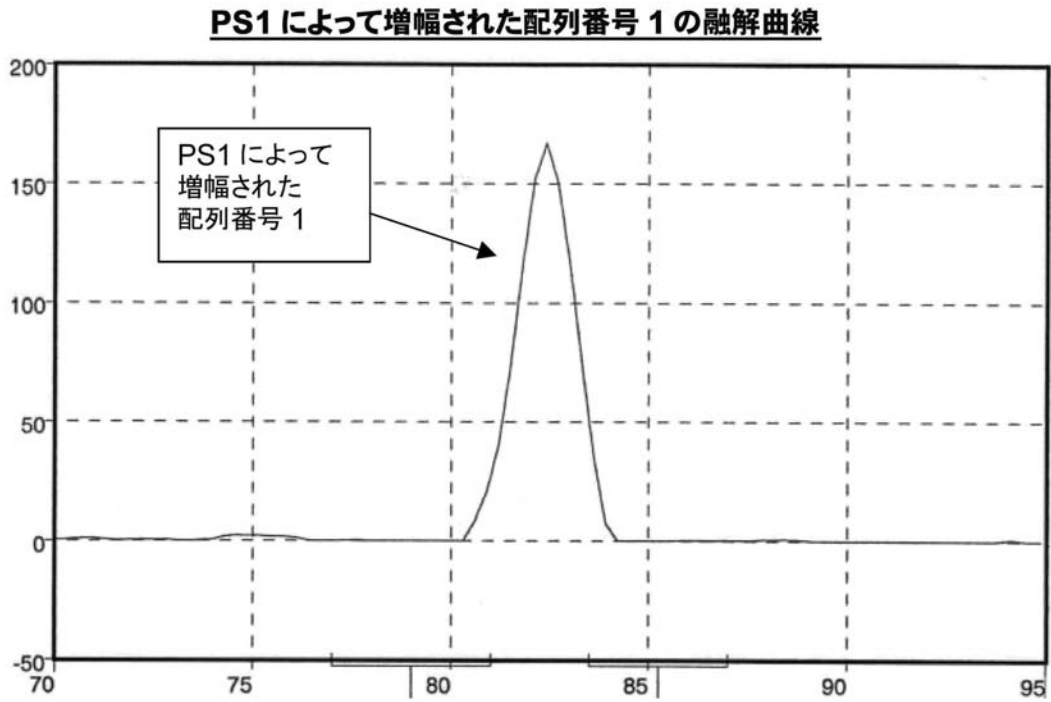
処理済みデータ

データ変換は、以下を伴う：

1. データを補間して等間隔のデータ点を得る
2. 蛍光 (F) の対数を取る
3. $\log F$ を補整する
4. $-d(\log F)/dT$ 、 $-d_f/d_T$ を計算する
5. 標的生物次第でデータを 1 度間隔で離れた 11 ~ 13 個のデータ点に減少させる

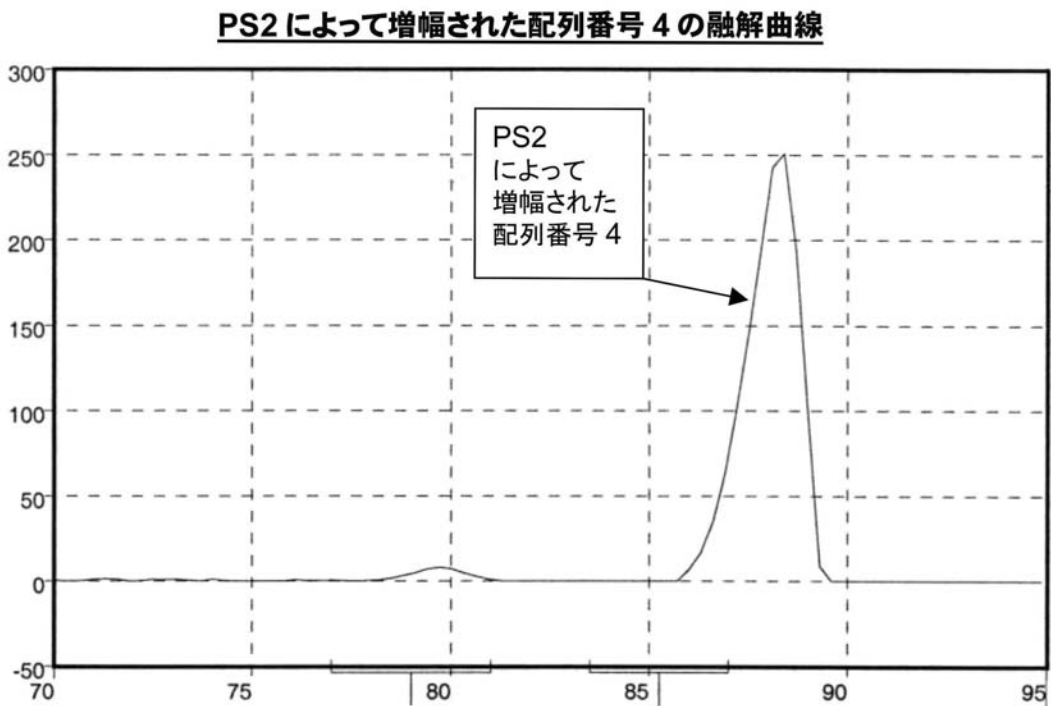
【 図 2 】

図 2



【 図 3 】

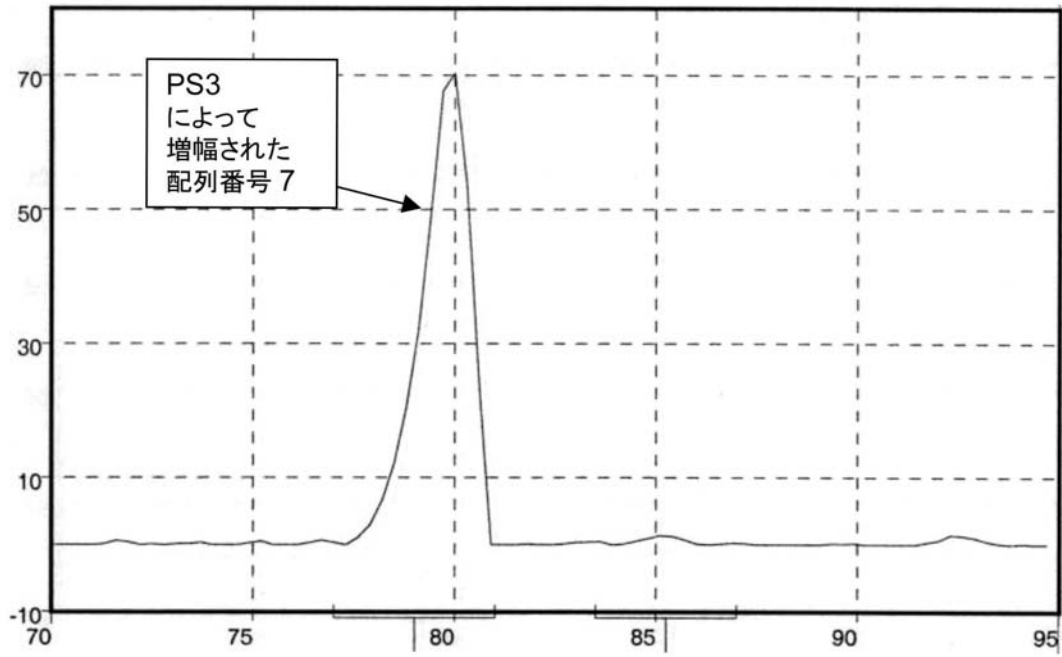
図 3



【 図 4 】

図 4

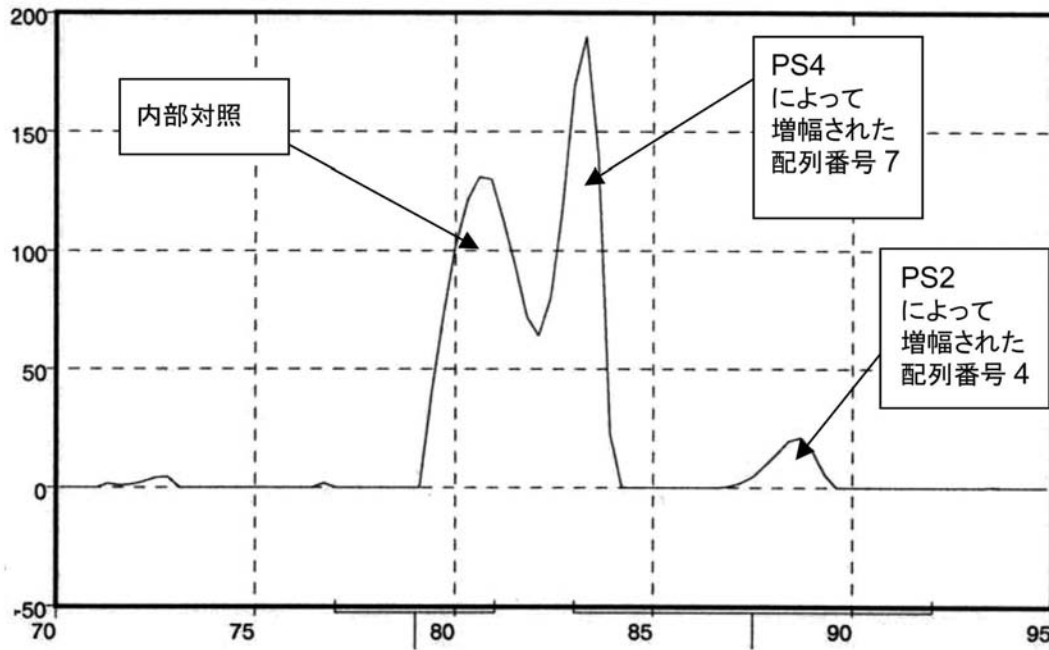
PS3 によって増幅された配列番号 7 の融解曲線



【 図 5 】

図 5

**多標的 PCR、正の内部対照、PS2 によって増幅された配列番号 4、
および PS4 によって増幅された配列番号 7 の融解曲線**



【 配列表 】

[0004782784000001.xml](#)

フロントページの続き

(72)発明者 バーンズ, フランク・アール
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 3 1 フィラデルフィア・ソレントロード 2 6 2 5

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 米国特許第 0 5 6 5 4 4 1 7 (U S , A)
国際公開第 0 0 / 0 7 7 2 4 7 (W O , A 1)
Nature. 2001, Vol.409, No.6819, p.529-533
Molecular and cellular probes. 2004 Jun, Vol.18, No.3, p.185-192

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq