

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5156726号
(P5156726)

(45) 発行日 平成25年3月6日(2013.3.6)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(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 5 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2009-279519 (P2009-279519)	(73) 特許権者	399044160
(22) 出願日	平成21年12月9日(2009.12.9)		イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ ンノートシャップ
(62) 分割の表示	特願2004-558030 (P2004-558030) の分割		I N N O G E N E T I C S N. V.
原出願日	平成15年12月8日(2003.12.8)		ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノ ロギーパルク6番
(65) 公開番号	特開2010-88447 (P2010-88447A)	(73) 特許権者	591005589
(43) 公開日	平成22年4月22日(2010.4.22)		ロッシュ デイアグノスティクス ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクテル ハ フツング
審査請求日	平成21年12月9日(2009.12.9)		ドイツ連邦共和国、68305 マンハイ ム、ザントホーフアー シュトラーセ 1 16
(31) 優先権主張番号	02447247.4	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成14年12月6日(2002.12.6)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーションアッセイを使用する真正細菌群の検出、同定および区別

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

スタフィロコッカス・アウレウスの検出および/または同定のための2つのポリヌクレオチドプローブの組であって、前記2つのプローブは、配列番号1もしくは配列番号2、あるいはそれらのRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、あるいはそれらの相補形態に特異的にハイブリダイズし、ここで、前記2つのプローブ間には25以下のヌクレオチドが存在し、配列番号15および20、または配列番号15および21、または配列番号17および16、または配列番号17および19、または配列番号27および28、または配列番号29および22、または配列番号30および18からなる、2つのポリヌクレオチドプローブの組。

【請求項2】

請求項1に記載の2つのポリヌクレオチドプローブの組を含んでなる組成物。

【請求項3】

(i) サンプル由来のポリ核酸と、少なくとも1つの請求項1に記載の2つのポリヌクレオチドプローブの組とをハイブリダイズさせる工程、

(ii) 形成されたハイブリッドを、融解曲線解析を実施することによって検出する工程、ならびに

(iii) 得られるシグナルを解釈し、スタフィロコッカス・アウレウスの存在を推論し、サンプル中のスタフィロコッカス・アウレウスを同定する工程、

を含んでなる、サンプル中のスタフィロコッカス・アウレウスの検出および/または同定

のための方法。

【請求項 4】

(i) サンプル中のポリ核酸を遊離、単離および / または濃縮する工程、
(i i) 配列番号 6 1 および 5 8、ならびに配列番号 6 8 および 5 8 からなる群から選
択される順方向プライマーポリヌクレオチドおよび逆方向プライマーポリヌクレオチドの
任意の組み合わせよりなる少なくとも 1 つの適切なプライマー対で、1 6 S ~ 2 3 S r
R N A スペース領域、または標的配列を含んでなるフラグメント、または標的配列もし
くはそのフラグメントを増幅する工程、
(i i i) 工程 (i) または (i i) のポリ核酸と、少なくとも 1 つの請求項 1 に記載
の 2 つのポリヌクレオチドプローブの組とをハイブリダイズさせる工程、
(i v) 形成されたハイブリッドを、融解曲線解析を実施することによって検出する工
程、ならびに
(v) 得られるシグナルを解釈し、スタフィロコッカス・アウレウスの存在を推論し、
サンプル中のスタフィロコッカス・アウレウスを同定する工程、
を含んでなる、サンプル中のスタフィロコッカス・アウレウスの検出および / または同定
のための方法。

10

【請求項 5】

以下の成分：

- ・ 少なくとも 1 つの請求項 1 に記載の 2 つのポリヌクレオチドプローブの組、
- ・ ハイブリダイゼーション緩衝液、または前記緩衝液を生成するのに必要な成分

を含んでなる、スタフィロコッカス・アウレウスの検出および / または同定のためのキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ITS (転写領域内部のスペース) 領域から誘導される新規の核酸配列を使用する、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の特異的検出ならびに / あるいは同定のための方法に関する。

【0002】

本発明はまた、生物学的サンプルにおいて、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、*S. aureus* の特異的検出ならびに / あるいは同定のために使用すべき 1 6 S および 2 3 S リボソームリボ核酸 (rRNA) または rRNA 遺伝子間の ITS 領域から誘導される前記新規の核酸配列に関する。

30

【0003】

それはまた、サンプル中のスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種の前記スペース領域の増幅のために使用すべき核酸プライマーにも関する。

【背景技術】

【0004】

スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属は、現在、32 種の記載された種および 15 種の亜種を含む。ヒトの臨床的見地から、*S. aureus* が最も重要な種であるが、いくつかのコアグラエゼ陰性種は、特に重症患者間の院内感染における突発出現病原体である。

40

【0005】

スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属の特定の種は、ヒトにおける様々な感染の病因として、より頻繁に単離される。最も重要な因子は、*S. aureus*、*S. エピダーミジス* (*S. epidermidis*)、*S. ハエモリティカス* (*S. haemolyticus*)、*S. ルグデュネンシス* (*S. lugdunensis*)、*S. ワルネリ* (*S. warneri*) および *S. サプロフィティカス* (*S. saprophyticus*) である。

50

【 0 0 0 6 】

S . シュレイフェリ (S . s c h l e i f e r i) は、いくつかの欧州国において重要な病原体とみなされているが、米国ではごく稀にしか報告されておらず、病原体の地方疫学の多様性を実証している。

【 0 0 0 7 】

獣医学では、S . アウレウス (S . a u r e u s) 、 S . インターメディウス (S . i n t e r m e d i u s) および S . ヒカス (S . h y i c u s) は、最も顕著な病原体である。

【 0 0 0 8 】

スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) は最も一般的な院内病原体の1つである。それは、表皮膿瘍から生命を脅かす血管内感染までの範囲のいくつかの疾患の原因である。入院患者環の長期の保菌および抗生物質に対する耐性の増加を確立するその経口は、病院内におけるこの生物体の制御を極めて困難にする。

10

【 0 0 0 9 】

患者間の S . アウレウス (S . a u r e u s) コロニー化の疫学に関する知識により、院内感染を妨害することが潜在的に困難であることが、新たに解明されている。病院ならびに共同体内における S . アウレウス (S . a u r e u s) の有効な制御には、補筋患者の早期診断を含む、言い換えれば、スクリーニングの工程を含むより積極的な手段が必要である。

20

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

スタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 菌血症の頻度はなお増加しているため、より感受性かつより特異的なプローブおよび/またはプライマーを使用する、検出ならびに/あるいは同定のためのより迅速な方法を提供することが、必要かつ急務である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明の目的は、スタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 種、特に、S . アウレウス (S . a u r e u s) の検出ならびに/あるいは同定のために使用することができるスタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 種の ITS の特定の領域から誘導される新規の核酸配列を提供することである。

30

【 0 0 1 2 】

従って、本発明は、配列番号 1、前記配列番号 1 の RNA 形態 (ここで、T は U によって置き換えられる)、前記配列番号 1 の相補形態、または任意の相同物よりなる単離された核酸分子、およびスタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 種の検出および/または同定のための標的としての前記核酸分子の使用を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の態様は、標的として、スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) の 1 6 S ~ 2 3 S rRNA スペーサー領域の特定の領域を有し、スタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) の検出ならびに/あるいは同定を可能にするプローブおよび/またはプライマーとしての使用のための新規のポリヌクレオチドに関する。

40

【 0 0 1 4 】

従って、本発明は、スタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c u s) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) の検出ならびに/あるいは同定のための配列番号 1、または前記配列番号 1 の RNA 形態 (ここで、T は U によって置き換えられる)、あるいは前記配列番号 1 の相補形態、あるいは

50

その任意の相同配列、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントに特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。

【0015】

本発明の別の態様は、サンプルにおけるスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出ならびに/あるいは同定のためのプローブの組に関する。

【0016】

本発明の別の態様は、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、*S. aureus* の16S~23S rRNAスペーサー領域の特異的増幅を可能にするプライマーに関する。

10

【0017】

本発明の目的は、本発明のいずれかの新規の配列、または本発明のプローブおよび/もしくはプライマーのいずれかの新規の組、あるいはそれらの組み合わせを含有する組成物である。

【0018】

本発明の別の目的は、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出ならびに/あるいは同定のために、前記プローブおよび/またはプライマーが使用されるキットである。

【0019】

本発明の別の目的は、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出ならびに/あるいは同定のための迅速かつ信頼できるハイブリダイゼーション方法である。

20

【0020】

本発明の別の目的は、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種、特に、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出ならびに/あるいは同定のためのリアルタイムPCRに基づくハイブリダイゼーション方法である。

【0021】

表の説明

表1：配列表。

表2：プライマー対。

表3：プローブの組。

表4：スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下の説明は、以下に記載の本発明の異なる実施形態において使用される用語および表現を例示するのに役立つ。

【0023】

用語「スペーサー」および「ITS」（転写領域内部のスペーサー）は、両方とも、16Sと23S rRNAとの間または16Sと23S rRNA遺伝子との間の領域を指す省略形用語である。

40

【0024】

用語「プローブ」は、検出しようとする標的配列にハイブリダイズするのに十分相補的である配列を有する1本鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを指す。

【0025】

好ましくは、本発明のプローブは、検出しようとする標的配列の正確な相補体に70%、80%、90%、または95%を超えて相同である。これらの標的配列は、ゲノムDNAもしくは前駆体RNA、またはそれらの増幅されたバージョンのいずれかである。

50

【 0 0 2 6 】

本発明のプローブは、対応するヌクレオチド配列を含む挿入物を含有する組換えプラスミドのクローニングによって、必要であれば、適切なヌクレアーゼを使用して、クローニングされたプラスミドから該配列を切り出し、例えば、分子量に従う分画によってそれらを回収することにより、形成することができる。

【 0 0 2 7 】

本発明に従うプローブはまた、化学的、例えば、従来のホスホ - トリエステル法によって合成することもできる。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用する用語「相補的」核酸は、核酸配列が、相互に完全な塩基対形成された二重螺旋を形成し得ることを意味する。

10

【 0 0 2 9 】

用語「ポリ核酸」、「核酸」、および「ポリヌクレオチド」は、少なくとも5、10、20、30、40もしくは50連続ヌクレオチドを含有する2本鎖もしくは1本鎖のcDNAまたはゲノムDNAまたはRNAのいずれかに対応する。100ヌクレオチド長より短いポリ核酸は、「オリゴヌクレオチド」と称される。

【 0 0 3 0 】

それらはまた、イノシンなどの修飾されたヌクレオチドまたはそれらのハイブリダイゼーション特徴を本質的に変更しない修飾された基を含有するヌクレオチドを指す。

【 0 0 3 1 】

1本鎖のポリ核酸配列は、本発明においては、常に5'末端~3'末端で提示する。

20

【 0 0 3 2 】

それらはそのままの形、またはそれらの相補形態、またはRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)で使用することができる。

【 0 0 3 3 】

用語「最も緊密な近傍」は、DNA相同性について最も緊密に関連することが公知であるかまたは予想され、目的の生物体と区別されるべきであるタクソンを意味する。

【 0 0 3 4 】

表現「タクソン特異的ハイブリダイゼーション」または「タクソン特異的プローブ」は、プローブが、それが設計されたタクソン由来のDNAまたはRNAにのみハイブリダイズし、他の分類群からのDNAまたはRNAにはハイブリダイズしないことを意味する。

30

【 0 0 3 5 】

タクソンという用語は、完全な属または属内のサブグループ、種または種内のサブタイプ(亜種、血清型、配列型(sequence variant)、生物型...)を指すことができる。

【 0 0 3 6 】

用語「特異的増幅」または「特異的プライマー」は、前記プライマーが、それらが設計されたこれらの生物体由来のスペーサー領域のみを増幅し、他の生物体由来のスペーサー領域は増幅しないという事実を指す。

【 0 0 3 7 】

用語「感受性」は、偽陰性の数を指し、即ち、検出すべき100株のうち1株が見過ごされる場合、試験は $(100 - 1 / 100) \% = 99\%$ の感受性である。

40

【 0 0 3 8 】

用語「特異性」は、偽陽性の数を指し、即ち、検出された100株に対し、2株は、試験が設計されていない生物体に属するようと思われる場合、試験の特異性は $(100 - 2 / 100) \% = 98\%$ である。

【 0 0 3 9 】

「優先的」であるとして選択されるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、80%を超える、好ましくは90%を超えるおよび最も好ましくは95%を超える感受性ならびに特異性を示す。

【 0 0 4 0 】

50

用語「固相支持体」は、ポリヌクレオチドプローブを結合させることができる任意の基体を指すことができるが、但し、それは、そのハイブリダイゼーション特徴を保持し、かつ但し、ハイブリダイゼーションのバックグラウンドレベルは低いままである。通常、固相基体は、マイクロタイタプレート、膜（例えば、ナイロンもしくはニトロセルロース）または微小球（ビーズ）である。膜への適用または固定化の前に、固定化を容易にするかまたはハイブリダイゼーション効率を改善するためには、核酸プローブを修飾することが簡便であり得る。そのような修飾は、ホモポリマーテーリング、脂肪族基、NH₂基、SH基、カルボキシル基などの異なる反応基とのカップリング、またはビオチン、ハプテンもしくはタンパク質とのカップリングを包含し得る。

【0041】

用語「標識された」は、標識された核酸の使用を指す。標識化は、サイキ (Saiki) ら (1988) またはベジュ (Bej) ら (1990) によって例示されるような増幅のポリメリゼーション工程中に組み入れられた標識されたヌクレオチドの使用または標識されたプライマーの使用、または当業者に既知の他の任意の方法によって行うことができる。標識の性質は、同位体 (³²P、³⁵S など) であってもまたは非同位体 (ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光染料、ビオチン、酵素など) であってもよい。

【0042】

用語「シグナル」は、一連の電磁波（例えば、蛍光）、または情報を担持する電流の変化を指す。シグナルは、直接目視することができるか、あるいは異なる手段またはデバイスによって可視化および/もしくは解釈可能にすることができる。

【0043】

「サンプル」は、任意の生物学的材料であってもよい。この生物学的材料は、感染したヒト、もしくは動物から直接、または培養もしくは富化後に、または食物、環境などから採取することができる。

【0044】

生物学的材料は、例えば、任意の種類の特出物、気管支洗浄、血液、皮膚組織、生検、リンパ球血液培養材料、コロニーなどであってもよい。前記サンプルは、当該分野において公知である任意の技術に従って調製または抽出することができる。

【0045】

本発明の意味において臨床的に関連性のあるスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種は、*S. アウレウス* (*S. aureus*)、*S. アウリクラシス* (*S. auricularis*)、*S. カピティス* (*S. capitis*)、*S. カプラレ* (*S. caprae*)、*S. コーニー* (*S. cohnii*)、*S. エピダーミジス* (*S. epidermidis*)、*S. ハエモリティカス* (*S. haemolyticus*)、*S. ホミニス* (*S. hominis*)、*S. ルグデュネンシス* (*S. lugdunensis*)、*S. パステウリ* (*S. pasteurii*)、*S. サッカロライティカス* (*S. saccharolyticus*)、*S. サプロフィティカス* (*S. saprophyticus*)、*S. シュレイフェリ* (*S. schleiferi*)、*S. シムラン* (*S. simulans*)、*S. ワルネリ* (*S. warneri*)、および *S. キシロサス* (*S. xyloso*) である (表4)。

【0046】

ITSは、いくつかのスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種について既に公知である (国際公開第96/00298号パンフレット)。

【0047】

さらなる研究では、異なるスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種の全ゲノム配列決定により、これらの生物体が、それらのゲノムにおいて5つのリボソームRNAオペロンで含有することが示されている。

【0048】

特に、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種内では、*S. アウレウス* (*S. aureus*) 株は1つの単一単離体内でさえも様々なスペーサー配列を示す。

10

20

30

40

50

【0049】

それらの異なるITSは、16を超えるタイプの配列であり、その長さも300～550塩基対の範囲で変動する。

【0050】

この極めて高い多様性によって発生する問題を解決するために、本発明は、すべてのスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種、特に、臨床的に関連するすべてのスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種、より詳細には*S.アウレウス*(*S. aureus*)の検出ならびに/あるいは同定のための独特な標的配列を付与するその大きな利点について同定され、範囲設定されたITSの特定の領域を提供する。

【0051】

実際、すべてのスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種、特に、臨床的に関連するすべてのスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種のすべてのタイプのスペーサーにおいて、本発明の標的配列が認められることを発見した。

【0052】

ITSのこの特定の領域はまた、「標的領域」または「標的配列」とも呼ばれ、配列番号1もしくは配列番号2よりなる核酸分子、または配列番号1もしくは2に相同である核酸分子、それらのRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、あるいはそれらの相補形態として規定することができる。

【0053】

用語「標的配列」は、任意のスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種のITSにおいて見出されるすべての相同配列を含み、以後、前記相同配列はまた、本明細書において「相同物」と称される。次いで、相同性の程度は、75%より高い、一般的に、80%より高い、さらに90%より高い。

【0054】

本発明の体系において、次いで、「相同物」は、配列番号1もしくは2または任意のスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種のITS領域に位置するその任意のフラグメントに対する相同配列であり、配列番号1および2は、それぞれ*S.アウレウス*(*S. aureus*)株から誘導される。

【0055】

スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種の検出ならびに/あるいは同定のために本発明の標的配列から設計されたプローブおよび/またはプライマーとしての使用のための新規のポリヌクレオチドもまた、本発明の目的である。

【0056】

言い換えれば、本発明の目的は、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種の検出ならびに/あるいは同定のために本発明の標的配列とハイブリダイズするプローブおよび/またはプライマーとしての使用のための新規のポリヌクレオチドに関する。

【0057】

特に、本発明の目的は、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種、特に、*S.アウレウス*(*S. aureus*)の検出ならびに/あるいは同定のための配列番号1もしくは2、または前記配列番号1もしくは2のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、あるいは前記配列番号1もしくは2の相補形態、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメント、あるいはそれらのいずれかの相同物に特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子である。

【0058】

好適なポリヌクレオチドプローブは、約5～約50塩基長、より好ましくは、約10～約25ヌクレオチドの間であり、標的配列に十分に相同である。

【0059】

配列番号1～70のポリヌクレオチドおよびそれらの任意の相同物は、プローブとして使用することができる。

【0060】

10

20

30

40

50

好適なプローブは、配列番号14、16~23、25~32、35~42のポリヌクレオチドおよび相同物である。

【0061】

本発明の好適なプライマーは、本発明の標的配列の合成の開始点として作用することが可能である1本鎖DNAポリヌクレオチドである。本発明のプライマーの長さおよび配列は、それらが、伸張産物の合成を誘導(prime)することが可能であるようなものでなければならない。

【0062】

好ましくは、本発明のプライマーは、約5~約50ヌクレオチド長、好ましくは約15~約25である。その特定の長さならびに配列は、温度およびイオン強度などの使用される条件に依存して選択されるべきである。

【0063】

本発明の好適なプライマーは標的配列を増幅する。言い換えれば、本発明の好適なプライマーは、配列番号1もしくは配列番号2および/または相同物を増幅する。

【0064】

本発明の好適なプライマーは、配列番号51、52、53、55、58、65、67、68、69、70、および相同物である。

【0065】

増幅プライマーは、適切な増幅を保障するために、必ずしも対応するテンプレート配列に正確に一致する必要はないという事実が、参考文献(クウォク(Kwok)ら、1990)に詳細に記載されている。

【0066】

使用される増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR、サイキ(Saiki)ら、1988)、リガーゼ連鎖反応(LCR、ランドグレン(Landgren)ら、1988;ウー(Wu)&ウォーレス(Wallace)、1989;バーラーニ(Barany)、1991)、核酸配列に基づく増幅(NASBA;グアテリ(Guatelli)ら、1990;コンプトン(Compton)、1991)、転写に基づく増幅システム(TAS、クウォホ(Kwoh)ら、1989)、鎖置換増幅(SDA、ダック(Duck)ら、1990;ウォーカー(Walker)ら、1992)もしくはQレプリカーゼによる増幅(リザーディ(Lizardi)ら、1988;ローメリ(Lomeli)ら、1989)または当該分野において既知の核酸分子を増幅するための他の任意の適切な方法のいずれかであり得る。

【0067】

プライマーまたはプローブとしての使用のための本発明の好適なポリヌクレオチドを表1に列挙する。

【0068】

本発明のポリヌクレオチドは、1つもしくはいくつかのヌクレオチドのそれらの任意の代表的末端への付加または除去、あるいは前記配列内の1つもしくはそれ以上のヌクレオチドの変更、あるいはそれらの両方の組み合わせのいずれかによって、表1において特定されたいずれのポリヌクレオチド、またはそれらの相同物と配列が異なってもよいが、但し、次いで得られる等価物はなお、対応する修飾されていないポリヌクレオチドとして標的配列とハイブリダイズする。前記等価なポリヌクレオチドは、対応する修飾されていないポリヌクレオチドと少なくとも75%同一性、好ましくは80%を超える、より好ましくは85%を超える同一性を共有する。

【0069】

ポリヌクレオチドの等価物を使用する場合、対応する修飾されていないポリヌクレオチドと同じ特異性を得るために、ハイブリダイゼーション条件を修飾する必要があり得る。

【0070】

結果として、ポリヌクレオチドを同じハイブリダイゼーション条件下の組で使用すべき場合、従って、他のポリヌクレオチドの配列を修飾する必要があり得る。これらの修飾は

10

20

30

40

50

、例えば、ヘイムズB (Hames B) およびヒギンズS (Higgins S) (編) : Nucleic acid hybridization. Practical approach. IRLプレス(Press)、オックスフォード(Oxford)、英国(UK)、1985などの当該分野において公知の原理に従って行うことができる。
【0071】

本発明のポリヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブもまた、ホスホロチオエート(マツクラ(Matsukura)ら、1987)、アルキルホスホロチオエート(ミラー(Miller)ら、1979)またはペプチド核酸(ニールセン(Nielsen)ら、1991;ニールセン(Nielsen)ら、1993)などのヌクレオチド類似体を含んでなり得るか、あるいは挿入剤(アッセライン(Asseiline)ら、1984)などを含有し得る。

10

【0072】

修飾されたプライマーまたはプローブは、要求される特異性および感受性を得るためにそれらが使用される条件に関する適応性を必要とする。しかし、ハイブリダイゼーションの結果は、依然として、修飾されていないポリヌクレオチドで得られる結果と本質的に同じものであるべきである。

【0073】

これらの修飾の導入は、ハイブリダイゼーション動力学、ハイブリッド形成の可逆性、ポリヌクレオチド分子の生物学的安定性などのいくつかの特徴に影響を及ぼすために有利であり得る。

20

【0074】

本発明のプローブおよびプライマーは、スタフィロコッカス(Staphylococcus)種、特に、S.アウレウス(S.aureus)の検出ならびに/あるいは同定のための本発明の方法、また目的において使用される。

【0075】

標的配列の検出および/または同定は、電気泳動方法、ハイブリダイゼーション方法もしくは配列決定方法を使用することによって実施することができる。

【0076】

サンプル中の1種もしくはそれ以上のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種の検出のための本発明の方法は、以下の工程を含んでなる。

30

・第1に、必要であれば、サンプル中に存在する核酸を、増幅および/またはハイブリダイゼーションに利用可能な状態にする。

・第2に、また必要であれば、核酸が存在するならば、以下に特定するように、1つもしくは別の標的増幅システムで増幅する。通常、増幅は、後のハイブリダイゼーションシグナルを増強するのに必要である。しかし、いくつかのサンプル、またはいくつかの高感度シグナル増幅システムでは、増幅は必要ないかもしれない。

・第3に、サンプル中に存在する核酸または得られる増幅された産物をプローブと接触させ、ハイブリダイゼーションを進行させる。

・最後に、簡便かつ互換性の検出システムを使用してハイブリッドを検出する。観察されるハイブリダイゼーションシグナルまたはパターンから、1種もしくは数種のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種の有無を推測することができる。

40

【0077】

使用される増幅システムは、必要とされる特定のアプリケーションに依存して、多かれ少なかれ普遍的であり得る。

【0078】

rRNAスパーサーの保存されたフランキング領域(16Sおよび23S遺伝子)に位置する普遍的プライマーを使用することによって、腸球菌由来のすべてではないがほとんどの生物体のスパーサー領域が増幅される。

【0079】

いくつかのアプリケーションでは、サンプル中に存在するすべての生物体ではないが、

50

1種もしくは数種のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種を増幅することが適切であり得る。これは、スタフィロコッカス(Staphylococcus)種の標的領域に位置する特異的プライマーを使用して達成することができ、例えば、配列番号69および70のポリヌクレオチドまたはそれらの相同物をそのままプライマー対として、または好ましくは配列番号58および68のポリヌクレオチドもしくはそれらの相同物を使用してもよい。

【0080】

特に、サンプル中のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種、とりわけ、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)の検出ならびにノあるいは同定のための本発明の方法は、

(i)必要であれば、サンプル中のポリ核酸を遊離、単離およびノまたは濃縮する工程、

(ii)必要であれば、少なくとも1つの適切なプライマー対で、16S~23S rRNAスペーサー領域、または標的配列を含んでなるフラグメント、または標的配列もしくはそのフラグメントを増幅する工程、

(iii)工程(i)または(ii)のポリ核酸と、標的配列(ここで、標的配列は、配列番号1もしくは2またはその相同物よりなる)、あるいはそれらのRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、あるいはそれらの相補形態、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントにハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせる工程、

(iv)形成されたハイブリッドを検出する工程、ならびに

(v)得られるシグナルを解釈し、スタフィロコッカス(Staphylococcus)種の存在を推論し、およびノまたはサンプル中のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種を同定する工程、を含んでなる。

【0081】

好ましくは、本発明のプローブは、高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする。

【0082】

高いストリンジェンシー条件下では、相補的核酸ハイブリッドのみが形成される。従って、アッセイ条件のストリンジェンシーは、ハイブリッドを形成する2つの核酸鎖間に必要な相補性の量を決定する。ストリンジェンシーは、標的および非標的核酸により形成されるハイブリッド間の安定性の差異を最大にするために、選択される。

【0083】

ハイブリダイゼーション条件は、本発明のポリヌクレオチドが標的配列に特異的にハイブリダイズする場合に得られるハイブリダイゼーションのシグナルが、前記ポリヌクレオチドが非特異的様式で標的配列にハイブリダイズする場合に得られるシグナルと異なるような方法で選択される。

【0084】

実際には、例えば、標的に対する特異的ハイブリダイゼーションにより、標的配列に対する非特異的ハイブリダイゼーションと比較して、シグナルの強度が2、5、10倍もしくはそれ以上強度である(例えば、LiPAシステム)場合、異なるシグナルが可視化され得る。

【0085】

融解曲線解析において異なるピークが描かれる場合、例えば、リアルタイムPCR方法を使用する場合にも、異なるシグナルが可視化され得る。

【0086】

本発明の任意の方法の増幅またはハイブリダイゼーション工程において言及されるフラグメントは、配列番号1または2あるいは任意の相同物の20~50、20~80もしくは20~100連続ヌクレオチドを含んでなり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 7 】

1つの実施形態では、サンプル中に潜在的に存在する標的配列の検出に極めて簡便かつ有利な技術は、リアルタイムPCRである。

【 0 0 8 8 】

増幅されたDNAの検出のための異なる形式、とりわけタックマン (TaqMan)^T Mプローブ、モレキュラー・ビーコンズ (Molecular Beacons)プローブ、FRETハイブリダイゼーションプローブが存在する。

【 0 0 8 9 】

タックマン (TaqMan)^T Mプローブに関して、1本鎖ハイブリダイゼーションプローブは2つの成分で標識される。蛍光共鳴エネルギー移動の原理に従い、第1の成分、
10
いわゆる蛍光剤を適切な波長の光で励起する場合、吸収されたエネルギーが第2の成分、
いわゆる消光剤に移動する。PCR反応のアニーリング工程中、ハイブリダイゼーション
プローブは標的DNAに結合し、伸張相中、ポリメラーゼ、例えば、タック・ポリメラー
ゼ (Taq Polymerase) の5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性によって消化
される。結果として、励起された蛍光成分および消光剤は、空間的に相互に離れており、
従って、第1の成分の蛍光放射を測定することができる (EP B 0 5 4 3 9 4 2
号明細書および米国特許第5, 210, 015号明細書)。

【 0 0 9 0 】

モレキュラー・ビーコンズ (Molecular Beacons)プローブに関して
20
、プローブもまた、第1の成分および消光剤で標識され、標識は、好ましくは、少なくと
も部分的に自己相補的なプローブの異なる末端に位置する。プローブの2次構造の結果と
して、両方の成分は、溶液において空間的に近接する。適切な波長の光による励起後、第
1の成分の蛍光放射を測定することができるように、標的核酸のハイブリダイゼーション
後、両方の成分は相互に分離される (米国特許第5, 118, 801号明細書)。

【 0 0 9 1 】

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)ハイブリダイゼーションプローブ試験形式は、す
べての種類の相同ハイブリダイゼーションアッセイに特に有用である (マシューズ、J .
A . (Matthews , J . A .) およびクリッカ、L . J . (Kricka , L . J .)、Anal Biochem 169 (1988) 1 - 25)。それは、同時に使用
30
され、(増幅される) 標的核酸の同じ鎖の隣接部位に相補的である2つの1本鎖ハイブリ
ダイゼーションプローブを特徴とする。両方のプローブは、異なる蛍光成分で標識される
。適切な波長の光で励起される場合、両方のハイブリダイゼーションプローブが、検出し
ようとする標的分子の隣接位置に結合する場合にのみ、第2の成分を測定することができ
るように、蛍光共鳴エネルギー移動の原理に従って、第1の成分は吸収されたエネルギー
を第2の成分に伝達する。

【 0 0 9 2 】

標的配列に対してアニールされる場合、ハイブリダイゼーションプローブは、頭尾整列
で相互に極めて近傍に位置しなければならない。通常、第1のプローブの標識された3'
末端と第2のプローブの標識された5'末端との間のギャップはできるだけ小さく、とり
40
わけ、約0 ~ 25塩基、好ましくは約1 ~ 約5塩基よりなる。このことは、典型的に10
~ 100オングストロームであるFRET供与化合物およびFRET受容化合物の緊密な
接近を可能にする。

【 0 0 9 3 】

あるいは、FRET受容化合物の蛍光の増加をモニターするために、ハイブリダイゼー
ション事象の定量測定としてFRET供与化合物の蛍光減少をモニターすることも可能で
ある。

【 0 0 9 4 】

リアルタイムPCRの分野において公知のすべての検出形式の間で、FRET - ハイブ
リダイゼーションプローブ形式は、高感度、正確かつ信頼できることが証明されている (国
50
際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレッ

ト、国際公開第97/46714号パンフレット)。なお、適切なFRETハイブリダイゼーションプローブ配列の設計は、時々、検出しようとする標的核酸配列の空間的特徴によって制限され得る。

【0095】

2つのFRETハイブリダイゼーションプローブの使用に対する代替物として、蛍光標識プライマーおよびただ1つの標識されたポリヌクレオチドプローブを使用することも可能である(バーナード、P.S.(Bernard, P.S.)ら、Anal. Biochem. 255(1998)101-7)。このことに関して、プライマーをFRET供与またはFRET受容化合物のいずれで標識するかを任意に選択することができる。

【0096】

融解曲線解析のために、FRETハイブリダイゼーションプローブ(ハイブプローブ(Hybprobe)またはFRET-プローブ)を使用することもできる(国際公開第97/46707号パンフレット、国際公開第97/46712号パンフレット、国際公開第97/46714号パンフレット)。そのようなアッセイでは、標的核酸は、最初に、適切な増幅プライマーにより典型的なPCR反応において増幅される。ハイブリダイゼーションプローブは、増幅反応中、常に存在し得るかまたはその後添加され得る。PCR反応の完了後、サンプルの温度は連続して増加する。蛍光は、ハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに結合する限り検出される。融解温度で、ハイブリダイゼーションプローブはそれらの標的から遊離し、蛍光シグナルはバックグラウンドレベルにまで直ちに減少する。この減少は、1次導関数(a first derivative function)の負の値が計算できるように、適切な蛍光対温度-時間プロットでモニターされる。次いで、そのような関数の得られる最大値に対応する温度の値を、FRETハイブリダイゼーションプローブの前記の対の決定された融解温度として採用する。

【0097】

標的核酸内の点変異または多型は、標的核酸とFRETプローブとの間の100%未満の相補性を生じ、従って、融解温度の減少を生じる。このことは、FRET-ハイブプローブ(Hybprobe)ハイブリダイゼーションによる配列変異体のプールの共通検出を可能にする一方、以後、前記プールの異なるメンバーは、融解曲線解析を実施することによって、識別されるようになり得る。

【0098】

FRETハイブリダイゼーションプローブの代わりに、融解曲線解析のためにモレキュラー・ビーコンズ(Molecular Beacons)を代替的に使用してもよい。

【0099】

リアルタイムPCRおよび相同なリアルタイムPCR融解曲線解析が利用可能であるとき、サイバー・グリーン(SybrGreen)TM Iなどの2本鎖DNA結合染料が、または代替的に、異なるが類似の標的配列にハイブリダイズするように特異的に設計されたハイブリダイゼーションプローブのいずれかを使用して、特定のタイプの種または株の識別が可能になった。

【0100】

第1の場合、作製された2本鎖PCR産物の融解温度を決定しなければならない。なお、配列の変動が少ないとわずかな融解温度の差異しか生じないことから、少量の差異を効率的にモニターすることができないため、この方法は極限られた用途しか有さない。

【0101】

あるいは、プローブ/標的核酸ハイブリッドの融解温度が決定されるような方法で、ハイブリダイゼーションプローブを使用してもよい。

【0102】

ABI/PrismTM設備、特にライトサイクラー(LightCycler)TM装置などの異なるリアルタイムPCRプラットフォームが存在し、それらはすべて、光放射を測定すること、融解サイクル中の放射ピークを連続的にモニターすること、標識されたプローブが増幅産物から分離する温度(融解ピーク)を決定および可視化することより

10

20

30

40

50

なる同じ原理に基づく。プローブと標的との間のミスマッチは、融解の動力学に影響を及ぼし、目的のそれぞれの種に対して異なる融解ピークを生じるため、融解ピークのデータは、特定の[プローブ：標的]配列の特徴である。

【0103】

ライトサイクラー(LightCycler)TMプラットフォームは、多くの利点、特に、時間を稼ぐことおよびハイブリダイゼーションプローブ(ハイブプローブ(Hyb Probe))、タックマン(TaqMan)TMプローブ、モレキュラー・ビーコンズ(Molecular Beacons)およびビプローブ(biprobe)(サイバー・グリーン(SYBR Green)I)などのいくつかの異なる配列特異的蛍光プローブ検出システムの可能な使用を付与する。

10

【0104】

本発明の好適な方法では、頭尾配向において、数ヌクレオチド、一般に、0~25、好ましくは、約1~約5の間隔を置いた、本発明の標的領域から誘導される2つの隣接するポリヌクレオチドプローブよりなるハイブプローブ(Hyb Probe)システムが使用される。プローブの一方は、供与染料によって3'末端で標識され、他方は、5'末端で受容分子により標識され、(プライマーとして作用することを防止するために)3'末端でリン酸ブロックされる。供与染料は、一般にフルオレセインであり、受容分子は、一般にLCレッド(LC Red)640または705である。

【0105】

本発明の標的配列の検出は、内部標識PCR鎖および対向鎖に位置する検出プローブによっても達成することができる。シグナルは、染料の空間的接近に依存し、標的の量に依存する。

20

【0106】

両プローブをそれらの標的配列にハイブリダイズさせる場合、供与体の放射光は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって、受容体フルオロフォアに移動し、放射された蛍光(640または705nm)を検出することができる。放射された蛍光の強度は、標的DNA、増幅の産物と平行して増加する。

【0107】

ライトサイクラー(LightCycler)プローブは、加水分解を必要とせず、および従って、PCR時間(アニーリング~伸張12秒)のさらなる延長を必要としない点で、タックマン(TaqMan)TMプローブよりも有利である。従って、ライトサイクラー(LightCycler)の高速熱サイクルを利用し、わずか45分間でPCRプログラムを完了することが可能である。

30

【0108】

そして、このリアルタイムPCRプラットフォームの極最近の世代は、単一反応においていくつかのプローブをモニターすることが可能であり、種レベルおよびまたより低い分類学的レベルでの異なるブドウ球菌(Staphylococci)の検出ならびに/あるいは同定を可能にする。

【0109】

さらに、タックマン(TaqMan)技術のために設計された方法は、等価な結果を伴うハイブプローブ(Hyb Probe)技術に容易に変換することができることが明らかにされている(Haematologica 85巻(12)1248~1254頁、2000年12月)。

40

【0110】

従って、本発明の別の目的は、ハイブプローブ(Hyb Probe)とも称される少なくとも2つのポリヌクレオチドプローブの組に関し、両方のハイブプローブ(Hyb Probe)は、前記2つのハイブプローブ(Hyb Probe)間が、25ヌクレオチド以下、好ましくは、10ヌクレオチド以下、特に5ヌクレオチド以下で相互に隣接する同じ標的配列にハイブリダイズする。

【0111】

50

標的配列と2つのハイブプローブ (Hyb Probe) をハイブリダイゼーションすると、供与体および受容体フルオロフォアが相互に0～25ヌクレオチド内、好ましくは、相互に0～5ヌクレオチド内にあるように、一方のハイブプローブ (Hyb Probe) は受容体フルオロフォアで標識され、他方は蛍光エネルギー移動対の供与体フルオロフォアで標識される。

【0112】

スタフィロコッカス (Staphylococcus) 種、特に、臨床的に関連するスタフィロコッカス (Staphylococcus) 種を検出および/または同定するために、2つのポリヌクレオチドプローブの組を使用することができ、前記2つのプローブは、配列番号1もしくは配列番号2、または前記配列番号1もしくは2のRNA形態 (ここで、TはUによって置き換えられる)、または前記配列番号1もしくは2の相補形態、あるいは相補物にハイブリダイズし、ここで、前記2つのプローブ間に25以下のヌクレオチド、好ましくは5以下のヌクレオチドが存在する。

10

【0113】

本発明のプローブの組はまた、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上のプローブよりなるが、好ましくは、それは2～5つのプローブ、より好ましくは2または3つのプローブよりなる。

【0114】

表3に列挙したプローブの組およびそれらの相同物は本発明の好適な組である。

【0115】

2つのポリヌクレオチドの組 (一方はプライマーとしての使用のためであり、他方はプローブとしての使用のためである) も使用することができ、前記プライマーおよびプローブの両方は、配列番号1もしくは配列番号2、前記配列番号1もしくは2のRNA形態 (ここで、TはUによって置き換えられる)、前記配列番号1もしくは2の相補形態、または相補物よりなる標的配列にハイブリダイズし、ここで、前記プライマーおよび前記プローブ間に25以下のヌクレオチド、好ましくは5以下のヌクレオチドが存在する。

20

【0116】

本発明の少なくとも2つのポリヌクレオチドの組は、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 種、特に、S. アウレウス (S. aureus) の検出ならびに/あるいは同定のための方法に使用される。

30

【0117】

サンプル中のスタフィロコッカス (Staphylococcus) 種の検出および/または同定のための本発明の方法は、

(i) 必要であれば、サンプル中のポリ核酸を遊離、単離および/または濃縮する工程、

(ii) 少なくとも1つの適切なプライマー対で、16S～23S rRNAスペーサー領域、または標的配列、または標的配列を含んでなるスペーサーの部分、または標的配列の部分を増幅する工程、

(iii) ポリ核酸と標的配列にハイブリダイズする少なくとも2つのハイブプローブ (Hyb Probe) の少なくとも1つの組とをハイブリダイズさせる工程であって、ここで、標的配列は、配列番号1もしくは2、または前記配列番号のRNA形態 (ここで、TはUによって置き換えられる)、または前記配列番号の相補形態、あるいは任意の相補物、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントよりなる上記工程、

40

(iv) 工程 (iii) において形成されたハイブリッドを検出する工程、

(v) 工程 (iv) において得られる特異なハイブリダイゼーションシグナルから、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 種の存在を推論し、またはサンプル中のスタフィロコッカス (Staphylococcus) 種を同定する工程、を含んでなる。

【0118】

例えば、増幅工程において使用されるプライマー対は、配列番号45、49、50、5

50

2、56、61、63、64、65、66、67、68またはそれらの相同物よりなる順方向プライマー、および配列番号46、47、48、51、53、54、55、57、58、59、60、62またはそれらの相同物よりなる逆方向プライマーの任意の組み合わせである。

【0119】

例えば、ハイブリダイゼーション工程において使用される2つのハイブプローブ(Hyb Probe)の組は、配列番号3~70またはそれらの相同物のポリヌクレオチドの間から選択される2つのハイブプローブ(Hyb Probe)の任意の組み合わせであるが、但し、標的配列にハイブリダイズする場合の前記2つのハイブプローブ(Hyb Probe)間のギャップは、25ヌクレオチド未満、好ましくは5ヌクレオチド未満である。

10

【0120】

ハイブプローブ(Hyb Probe)システムの利点の1つは、該システムが、以下の分子概念に基づいて、変異、多型および他の変異核酸種を含む配列のバリエーションの検出を可能にするという事実にある。ハイブプローブ(Hyb Probe)の1つは強固に結合する「アンカープローブ」である一方、隣接する「センサープローブ」は配列のバリエーションの領域に渡る。最終的なPCR産物の融解の間、配列の変更は、センサープローブの融解温度(T_m)の変化として、検出される。

【0121】

例えば、サンプルが配列番号1のみを含有する場合、前記配列番号1に特異的にハイブリダイズするハイブプローブ(Hyb Probe)を使用して、単一の融解ピークが作製される。サンプル中に相同物も存在する場合、一般に、容易に観察することが可能な温度シフトを誘導する1つのミスマッチした塩基が存在する限り、同じ2つのハイブプローブ(Hyb Probe)を使用することによって、2つのピークが作製される。

20

【0122】

選択されたポリヌクレオチド、それらの T_m およびハイブリダイゼーション条件に依存して、増幅工程中に蛍光を測定することができ、次いで、増幅曲線を作成するか、または増幅工程後、融解曲線解析のための融解曲線を作成する。

【0123】

従って、得られるシグナルは、増幅曲線の形かまたは融解曲線の形で可視化することができ、該シグナルから、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種の存在を推論するおよび/またはブドウ球菌(*Staphylococci*)のどの種が存在するかを推論することが可能である。

30

【0124】

特に、サンプル中のスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種の検出および/または同定のための方法はまた、

(i) 必要であれば、サンプル中のポリ核酸を遊離、単離および/または濃縮する工程、

(ii) 標識されたプライマー対で、標的配列、またはその部分を増幅する工程、

(iii) ポリ核酸と、間に25未満のヌクレオチドを伴って前記標識されたプライマーに隣接する、配列番号1、または前記配列番号1のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、または前記配列番号1の相補形態、あるいは任意の相補物、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントにハイブリダイズする少なくとも1つのハイブプローブ(Hyb Probe)とをハイブリダイズさせる工程、

40

(iv) 形成されたハイブリッドを検出する工程、

(v) 工程(iv)において得られるシグナルから、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種の存在を推論し、および/またはサンプル中のスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)種を同定する工程、を含んでなる。

【0125】

ハイブプローブ(Hyb Probe)システムを使用する本発明の方法を、スタフィロ

50

コッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出ならびに同定に適応し、他の種から *S. aureus*、特にコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (*Staphylococci*) (CoNS) を区別することが可能である。

【0126】

次いで、増幅工程では、適切なプライマーは、配列番号 1、または前記配列番号の RNA 形態 (ここで、T は U によって置き換えられる)、または前記配列番号の相補形態よりなる標的配列を特異的に増幅するプライマー対である。

【0127】

ハイブリダイゼーション工程では、ハイブプローブ (Hyb Probe) は、配列番号 1 もしくは 2、または RNA 形態 (ここで、T は U によって置き換えられる)、または相補形態に特異的にハイブリダイズすべきである。

10

【0128】

従って、*S. aureus* 株は、融解曲線解析によって試験される他のすべての生物体から明白に識別することができる。

【0129】

さらに、CoNS のみが融解ピークを生じ、関連のないシグナルは、非ブドウ菌 (non-*Staphylococci*) またはヒトゲノム DNA によって得られる。

【0130】

この特定の例で使用される好適なプライマー対は、配列番号 68 もしくは 69 またはそれらの相同物の中で選択される順方向プライマーおよび配列番号 58 もしくは 70 またはそれらの相同物の中で選択される逆方向プライマーの任意の組み合わせである。

20

【0131】

表 3 に列挙されたハイブプローブ (Hyb Probe) またはそれらの相同物の組は、本発明のハイブプローブ (Hyb Probe) の好適な組である。2 つのハイブプローブ (Hyb Probe) のより好適な組は、配列番号 17 または相同物および配列番号 19 または相同物よりなる。

【0132】

配列番号 17 および 19 よりなるハイブプローブ (Hyb Probe) の組は、高い感受性で *S. aureus*、*S. epidermidis*、および *S. haemolyticus* を検出することが可能である。

30

【0133】

配列番号 1 ~ 配列番号 70 およびそれらの任意の相同物に対応する表 1 に列挙した各ポリヌクレオチドは、プライマーおよび / またはプローブとして、本発明の任意の方法において、単独あるいは組み合わせて使用することができる。

【0134】

ハイブリダイゼーション方法にも基づく第 2 の実施形態は、ライン・プローブ・アッセイ (Line Probe Assay) 技術である。ライン・プローブ・アッセイ (Line Probe Assay) (LiPA) は、いくつかのポリヌクレオチドプローブ (陰性または陽性コントロールポリヌクレオチドを含む) が平行ラインとして簡便に適用することができる膜ストリップを使用する逆ハイブリダイゼーション形式 (サイキ (Saiiki) ら、1989) である。

40

【0135】

ストイフェル (Stuyver) ら (1993) および国際出願国際公開第 94/12670 号パンフレットに記載の LiPA 技術は、迅速かつ使い勝手がよいハイブリダイゼーション試験を提供する。結果は、増幅の開始後、4 時間以内に読み取ることができる。通常、非同位体標識が増幅された産物に組み入れられる増幅、およびアルカリ変性後、増幅された産物は、膜上でプローブと接触され、約 1 ~ 1.5 時間、ハイブリダイゼーションが行われる。従って、形成されるハイブリッドは、酵素の手順によって検出され、目に見える紫褐色の沈殿を生じる。LiPA 形式は、市販のスキャニングデバイスと完全に互

50

換性があり、従って、結果の自動的解釈を可能にする。それらのすべての利点は、LiPA形式を日常の設定での使用に対して信頼可能にする。

【0136】

LiPA形式は、種レベル、しかしまた、より高いまたはより低い分類学的レベルでの病原体の検出ならびに／あるいは同定のための有利な道具である。例えば、LiPAストリップに対するプローブ形状構成は、それらが、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) の完全な属を検出することができるか、あるいは属内の種 (例えば、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、およびエピダーミジス (*epidermidis*) など) を同定することができるか、あるいは場合により、種内のサブタイプ (亜種、血清型、配列型 (*sequovar*)、生物型など、臨床的に関連するあらゆるもの) を検出することができるような様式で、選択することができる。

10

【0137】

多数のプローブによってハイブリダイゼーション結果を同時に作成する能力は、LiPA技術の別の利益である。多くの場合、プローブの特定の組み合わせによって得ることができる情報の量は、単一のプローブアッセイを使用することによって得られるデータよりも顕著に多い。従って、プローブの最適化された組は最大限の情報を可能にするため、膜ストリップに対するプローブの選択は最も重要である。

【0138】

これらのプローブは、異なる位置で膜ストリップに適用することができ、これらのプローブのうち少なくとも1つが陽性である場合、結果は陽性と解釈される。あるいは、これらのプローブは、同じ位置に混合物として適用することができ、それによって、ストリップ上のラインの数が減少する。ストリップをより簡潔にするか、1つのストリップ上のプローブの合計数を拡張することを可能にするために、このような減少は簡便であり得る。

20

【0139】

実際の有益性の観点において、別の代替的アプローチは、次いで、さらに処理され、1つのポリヌクレオチド分子としてストリップに適用することができる変性プローブと称される2つもしくはそれ以上の異なるプローブの配列を有するポリヌクレオチドの合成である。このアプローチは、LiPA-ストリップの製造手順をかなり簡単にする。例えば、ヌクレオチド配列AおよびBを伴うプローブは、両方ともタクソンXのすべての株を検出することが必要である。後者の代替物では、ヌクレオチド配列ABを有するプローブを合成することができる。このプローブは、プローブAおよびBの組み合わせられた特徴を有する。

30

【0140】

上記で言及した特性によって、LiPAシステムは、ハイブリダイゼーション方法のための効率的な形式とみなすことができ、ここで、いくつかの生物体がサンプルにおいて同時に検出される必要がある。

【0141】

しかし、他の任意のハイブリダイゼーションアッセイでは、それによって、異なるプローブが同じハイブリダイゼーション下で使用され、上記で言及した検出および／または選択方法のための洗浄条件が使用され得ることが明らかであるべきである。例えば、標的核酸を固相支持体に固定化し、すべてが別に標識された異なるプローブの混合物を使用することが可能であり得、標的にハイブリダイズされたそれぞれのプローブに対して異なる検出シグナルを生じる。そして、現在、異なる多くの支持体が利用可能である。

40

【0142】

例として、LiPA形式を使用するサンプル中の1つもしくはそれ以上のスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 種の検出のための従うべき手順を以下に概説する。

・第1に、必要であれば、サンプル中に存在する核酸を、増幅および／またはハイブリダ

50

イゼーションに利用可能な状態にする。

・第2に、存在するならば、核酸を、以下に記載のように、1つもしくは別の標的増幅システムで増幅させる。通常、増幅は、以後のハイブリダイゼーションシグナルを増強するのに必要である。

・第3に、最終的に、変性工程後、サンプル中に存在する核酸または得られる増幅された産物を、目的の生物体の検出を可能にする1つもしくはそれ以上のプローブ(DNA-、RNA-、変性もしくは修飾されたプローブ)が固定化されたLiPAストリップと接触させ、ハイブリダイゼーションを進行させる。

・最後に、最終的に洗浄工程を実施した後、簡便かつ互換性の検出システムを使用してハイブリッドを検出する。観察されるハイブリダイゼーションシグナルまたはパターンから、特定の生物学的サンプルにおいてスクリーニングされた1つもしくは数種の生物体の有無を推測することができる。

10

【0143】

使用される増幅システムは、必要とされる特定のアプリケーションに依存して、多かれ少なかれ普遍的であり得る。

【0144】

rRNAスペーサーの保存されたフランキング領域、即ち、16Sおよび23S遺伝子に位置する普遍的プライマーを使用することによって、真正細菌由来のすべてではないがほとんどの生物体のスペーサー領域が増幅される。

【0145】

いくつかのアプリケーションでは、サンプル中に存在するすべての生物体ではないが、スタフィロコッカス(Staphylococcus)種をより特異的に増幅することが適切であり得る。これは、スタフィロコッカス(Staphylococcus)の標的領域に位置する特異的プライマーを使用して達成することができ、例えば、配列番号69および70のポリヌクレオチドまたはそれらの相同物をそのようなプライマー対として使用することができる。

20

【0146】

サンプル中のスタフィロコッカス(Staphylococcus)種の検出ならびに/あるいは同定のための本発明の方法は、

(i) 必要であれば、サンプル中に存在するポリ核酸を遊離、単離および/または濃縮する工程、

30

(ii) 必要であれば、少なくとも1つの適切なプライマー対で、16S~23S rRNAスペーサー領域、またはその部分を増幅する工程、

(iii) ポリ核酸と、配列番号1もしくは2、または前記配列番号1もしくは2のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、または前記配列番号の相補形態、あるいは任意の相同物、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントよりなる標的配列にハイブリダイズする少なくとも1つのプローブとをハイブリダイズさせる工程、

(iv) 工程(iii)において形成されたハイブリッドを検出する工程、

(v) 工程(iv)において得られる異なるハイブリダイゼーションシグナルからサンプル中に存在する微生物を同定する工程、

40

【0147】

増幅の工程において言及されるITSの部分は、標的配列を含んでなるポリヌクレオチド、または標的配列自体、配列番号1もしくは2、または前記配列番号1もしくは2のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、または前記配列番号1もしくは2の相補形態、あるいは任意の相同物、あるいはその少なくとも20連続ヌクレオチドのフラグメントよりなる標的配列である。

【0148】

好ましくは、本発明は、上記の方法を提供し、ここで、少なくとも2種の微生物が同時

50

に検出される。

【0149】

工程(iii)に記載のプロープの組は、本発明の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくはそれ以上のプロープ、またはその等価物を含んでなる。

【0150】

本発明の好適な実施形態では、工程(iii)に記載のプロープの組は少なくとも2つのプロープを含んでなる。

【0151】

好適なプロープは配列番号1~70およびそれらの相同物のポリヌクレオチドである。

【0152】

本発明はまた、上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)において特定されるプロープが、好ましくは16S~23S rRNAスペーサー領域由来の少なくとも1つの他のプロープと組み合わせられ、サンプル中に存在しやすい異なる病原性細菌の同時検出を可能にする。

【0153】

好適なプロープは、それらを同時ハイブリダイゼーションのための組で使用することができるような同じハイブリダイゼーション条件下での最適な実施を達成するために設計され、これは、これらのプロープの有用性を高度に増加し、時間および労力が顕著に獲得される。

【0154】

本発明の任意のポリヌクレオチドを含有するキットもまた、本発明の目的である。

【0155】

本発明のキットは、以下の成分、

- ・配列番号1もしくは2よりなる標的配列、前記配列番号1もしくは2のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、前記配列番号1もしくは2の相補形態、またはそれらのいずれかの相同物にハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチド、
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液、または前記緩衝液を生成するのに必要な成分を含んでなる。

【0156】

好適なキットは、

- ・25ヌクレオチド未満、好ましくは、5ヌクレオチド未満で相互に隣接する、配列番号1もしくは2よりなる標的配列、前記配列番号1もしくは2のRNA形態(ここで、TはUによって置き換えられる)、前記配列番号1もしくは2の相補形態、またはそれらのいずれかの相同物にハイブリダイズする2つのハイブプロープ(Hyb Probe)の少なくとも1つの組、
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液、または前記緩衝液を生成するのに必要な成分を含んでなる。

【0157】

10

20

30

【表 1 - 1】

配列番号	用途	参照	長さ	配列
配列番号 1				TTTGTACATTGAAACTAGATAAGTAAAGTAXAATATAGATTTTACCAYGCAAAACCGAGTGAAT AAAGYGTTTTYAAZAAGCWTGAATTCATAAATAAAT AATCGZTAGZGTTTCGAYAGAACAACACTCAC AAGUTTAATAACWSGT
配列番号 2				TTTGTACATTGAAACTAGATAAGTAAAGTAA AATATAGATTTTACCAAGCAAAACCGAGTGAAT AAAGAGTTTTAAATAAGCTTGAATTCATAAGAAAT AATCGCTAGTGTTCCGAAAGAACAACACTCAC AAGATT AATAACGCGT
配列番号 3	CO	RStau6WTcompl.1b	63	ACGCTCACATACG GCTTCGTTTTTCATTATTTTAAATGCTCATTTACATAAGTAAACTCTGCTT
配列番号 4	CO	W ToligoHP 5	69	CTTATGAATTCAAGCTTATTTAAAACCTCTTTATTCACCTCGGTTTTGCTTGGTAAATCTATATTT T ACT
配列番号 5	CO	W ToligoHP 6	70	CGAACACTAGCGATTTTCTTATGAATTCAAGCTTATTTAAAACCTCTTTATTCCTACTCGTTTT G CTTGG
配列番号 6	CO	RStau7WTcompl.1b	81	TTATAAGTCAAACGTTAACATGAAGTACGTTCTTTTATAAAAAGATTTAAACGCGTTATT AAT CTTGTGAGTGTTCTTTC
配列番号 7	CO	RStau6WTcompl.1a	83	TATAAGTCAAACGCTCACATACGGCTTCGTTTCAATTTTAAATGCTCATTACATAAGTAA A CTCTGCITTA AATAATT
配列番号 8	CO	RStauHP1WTcompl.1	88	CTTATTTAAAACCTCTTTATTCCTACTCGGTTTTGCTTGGTAAATCTATATTTACTTACTTATCTA G TTTTCAATGTACAATAATGGT
配列番号 9	CO	W Toligo-StauHP4	88	ATTTAAAACCTCTTTATTCCTACTCGTTTTGCTTGGTAAATCTATATTTACTTACTTATCTAGTT TTCAATGTACAATTTCTTTTAG
配列番号 10	CO	RStauHP2WTcompl.1	89	GTGAGTGTTCTTTGAAACACTAGCGATTATTTCTTATG AATTCAAGCTTATTTAAAACCTTTTA TTCACTCGTTTTGCTTGGTAAAAT
配列番号 11	CO	RStauHP2cWtcompl.1	89	ATTTTACCAAGCAAAACCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTGAAATTCATAAGAAATAAT CGCTAGTGTTTCGAAGAACAACACTCAC

10

20

30

【表 1 - 2】

配列番号 12	CO	RStauHP3WTcompl.1	91	TTTAAACGCGTTATTATCTTGTGAGTGTCTTTCGAACACTAGCGATTATTTCTTATGAATTC A AGCTTATTTAAACTCTTTATCACT
配列番号 13	CO	RStau7WTcompl.1a	101	TCCACCATTTTTATAAGTCAAACGTTAAACATGAAGTTACGTTCTTTTATAAAAAGATTTAAACG CGTTATTAATCTTGTGAGTGTCTTTCGAACTAGC
配列番号 14	HP	RStaphSP-5LC6.1	21	AGATTTTACCAAGCAAACCG
配列番号 15	HP	RStauHP5-3FI.1	21	AGATTTTACCAAGCAAACCG
配列番号 16	HP	RStauHP6a-5LC6.1	21	AAGCTTGAATTCATAAGAAAT
配列番号 17	HP	RStauHP6-3FI.1	23	CCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAA
配列番号 18	HP	RStauHP4-5LC6.1	24	CCAAGCAAAAACGAGTGAATAAAAG
配列番号 19	HP	RStauHP6b-5LC6.1	24	GCTTGAATTCATAAGAAATAATCG
配列番号 20	HP	RStauHP5b-5LC6.1	25	GAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTG
配列番号 21	HP	RStauHP5a-5LC6.1	27	GTGAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTG
配列番号 22	HP	RStauHP9-5LC6	27	AAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGC
配列番号 24	HP	RStau63FI.1	29	AAGCAGAGTTTACTTATGTAATGAGCAT
配列番号 25	HP	RStauHP1-5LCR64.1	29	TACCAAGCAAACCGAGTGAATAAAGAGT
配列番号 26	HP	RStaphSP-3FI.1	29	TTTGTACATTGAAAACCTAGATAAGTAAGT
配列番号 27	HP	RStauHP7-3FI	29	GCAAACCGAGTGAATAAGAGTTTTAAA
配列番号 28	HP	RStauHP7a-5LCR6	30	AAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGCTAG
配列番号 29	HP	RStauHP9-3FI	30	AGCAAAAACCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAA
配列番号 30	HP	RStauHP4-3FI.1	31	ATTGTACATTGAAACCTAGATAAGTAAGTAA
配列番号 31	HP	RStauHP3-LC6.1	32	AGTGTTGAAAGAACCACTCACAAGATTAAATA
配列番号 32	HP	RStauHP8-3FI	32	AGCTTATTTAAACTCTTTATCACTCGGTTT
配列番号 33	HP	RStau65LC6.1	33	TAAAAT AATGAAACGAAGCCGTATGTGAGCGT
配列番号 34	HP	RStau65LC7.1	33	TAAAAT AATGAAACGAAGCCGTATGTGAGCGT
配列番号 35	HP	RStauHP2-LC6.1	33	GAATTCATAAGAAATAATCGCTAGTGTTCGAAA
配列番号 36	HP	RStauHP2c-3FI.1	33	TTTCGAACA CTAGCGATTATTTCTTATGAATTC
配列番号 37	HP	RStauHP2-3FI.1	34	GCAAACCGAGTGAATAAGAGTTTTAAATAAGC
配列番号 38	HP	RStauHP2c-LC6.1	34	GCTTATTTAAACTCTTTATCACTCGGTTTTGC
配列番号 39	HP	RStauHP8-5LCR6	36	GCTTGGTAAAATCTATATTTACTTACTTATCTAGT
配列番号 40	HP	RStauHP1-3FI.1	38	GTACATTGAAAACCTAGATAAGTAAGTAAATAATAGATT

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

配列番号 41	HP	RStauHP3-3Fl.1	38	GAGTTTTAAATAAGCTTGAAATTCATAAGAAATAATCGC
配列番号 42	HP	RStau73Fl.1	39	GAAGAACACTCACAA GATT AATAACGCGTTAAATCTT
配列番号 43	HP	RStau75LC6.1	41	TTATAAAGAACGTAACCTCATGTTAACGTTTGACTTATAA
配列番号 44	HP	RStau75LC7.1	41	TTATAAAGAACGTAACCTCATGTTAACGTTTGACTTATAA
配列番号 45	Pr	RStauFP18.1	17	CTTCAGAAGATGCGGAA
配列番号 46	Pr	RStauRP22.1	18	TTTCGAACACTAGCGATT
配列番号 47	Pr		20	GTTATTAAUUCTTG TGAGTGT
配列番号 48	Pr		20	ACSXGTTATTAAUUCTTGTGAG
配列番号 49	Pr	RStauFP19.1	19	CTTCAGAAGATGCGGAATA
配列番号 50	Pr	RStauFP20.1	19	TTCTTCAGAAGATGCGGAA
配列番号 51	Pr	Staph-P26rev	19	TTCTTTGAACTAGCGGA
配列番号 52	Pr	StauP01	20	ACCAAGCAAAACCGAGTGAA
配列番号 53	Pr	Staph-P25rev	20	GTTCTTCGAACACTAGCGA
配列番号 54	Pr		20	SXGTTATTAAUUCTTG TGAGTG
配列番号 55	Pr	StaphP28rev	20	CGCGTTATTAACTTGTGAG

10

【 0 1 5 8 】

20

【表 2】

配列番号	用途	参照	長さ	配列
配列番号 56	Pr		20	CATTGAAXACTAGATAAGTA
配列番号 57	Pr		20	GTTATTAAUUCTTGAGTGTT
配列番号 58	Pr	StaphP31rev	22	ACGCGTTATTAACTTGTGAGT
配列番号 59	Pr	RstauRP21.1	23	CGAACACTAGCGATTATTCTTA
配列番号 60	Pr	RstauRP23.1	23	ACTAGCGATTATTTCTTATGAAT
配列番号 61	Pr	StaphP34	23	CATATTGTATTAGTTTTGAATG
配列番号 62	Pr		18	SXGTTATTAAUUCTTGTGAG
配列番号 63	Pr	StaphP32	24	CATATTGTATTAGTTTTGAATGC
配列番号 64	Pr	StaphP33	24	CATATTGTATTAGTTTTGAATGT
配列番号 65	Pr	StauP11	25	CATAAGAAATAATCGCTAGTGTTCG
配列番号 66	Pr	Staph-P24	25	GACATATTGTATTAGTTTTGAATG
配列番号 67	Pr	StaphP29	26	GAAACTAGATAAGTAAGTAAATAT
配列番号 68	Pr	StaphP30	26	TGTACATTGAAACTAGATAAGTAAG
配列番号 69	Pr		24	TTTGTACATTGAAXACTAGATAAG
配列番号 70	Pr		24	ACSXGTTATTAAUUCTTGTGAGTGT

30

用途は、HP=ハイブプローブ(HybProbe)、Pr=プライマー、CO=相補的ポリヌクレオチドとして、
事実上好適な用途である

S=A、T、CまたはG

U=AまたはT

V=GまたはC

W=TまたはG

X=AまたはC

Y=AまたはG

Z=TまたはC

40

【 0 1 5 9 】

【表 3】

<SEQ ID NO:1;DNA;staphylococcus> TTTGTACATTGAAMACTAGATAAGTAAGTAMAATATAGATTTTACCARGCAAAACCGAGTGAATA AAGRGTTTTAAAYAAAGCKTGAATTCATAAASAAATAATCGYTAGYGTTCGARAGAACACTCACAAAG WTTAATAACKNGT	
<SEQ ID NO:2;DNA;staphylococcus> TTTGTACATTGAAAACCTAGATAAGTAAATATAGATTTTACCAAGCAAAACCGAGTGAATAA AGAGTTTTAAATAAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGCTAGTGTTTCAAAGAACACTCACAAAGAT TAATAACGCGT	
<SEQ ID NO:3;DNA;staphylococcus> ACGCTCACATACGGCTTCGTTTTTCATTATTTAAATGCTCATTACATAAGTAAACTCTGCTT	10
<SEQ ID NO:4;DNA;staphylococcus> CTTATGAATTCAAGCTTATTTAAAACCTTTTATTCACTCGGTTTTGCTTGGTAAAATCTATATTTTAC T	
<SEQ ID NO:5;DNA;staphylococcus> CGAACACTAGCGATTATTTCTTATGAATTCAAGCTTATTTAAAACCTTTTATTCACTCGGTTTTGCTT GG	
<SEQ ID NO:6;DNA;staphylococcus> TTATAAGTCAAACGTTAACATGAAGTTACGTTCTTTTATAAAAAGATTTAAACGCGTTATTAATCTT GTGAGTGTTCTTTC	20
<SEQ ID NO:7;DNA;staphylococcus> TATAAGTCAAACGCTCACATACGGCTTCGTTTTTCATTATTTAAATGCTCATTACATAAGTAAACT CTGCTTTAAAATAATT	
<SEQ ID NO:8;DNA;staphylococcus> CTTATTTAAAACCTTTTATTCACTCGGTTTTGCTTGGTAAAATCTATATTTACTTACTTATCTAGTTT TCAATGTACAAATAATGGT	
<SEQ ID NO:9;DNA;staphylococcus> ATTTAAAACCTTTTATTCACTCGGTTTTGCTTGGTAAAATCTATATTTACTTACTTATCTAGTTTTC AATGTACAATTTCTTTTTAG	
<SEQ ID NO:10;DNA;staphylococcus> GTGAGTGTTCTTTTCAAACACTAGCGATTATTTCTTATGAATTCAAGCTTATTTAAAACCTTTTATTCA CTCGGTTTTGCTTGGTAAAAT	30
<SEQ ID NO:11;DNA;staphylococcus> ATTTTACCAAGCAAAACCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCG CTAGTGTTTCAAAGAACACTCAC	
<SEQ ID NO:12;DNA;staphylococcus> TTTAAACGCGTTATTAATCTTGTGAGTGTTCTTTTCAAACACTAGCGATTATTTCTTATGAATTCAAG CTTATTTAAAACCTTTTATTCACT	
<SEQ ID NO:13;DNA;staphylococcus> TCCACCATTTTTATAAGTCAAACGTTAACATGAAGTTACGTTCTTTTATAAAAAGATTTAAACGCGTTA TTAATCTTGTGAGTGTTCTTTTCAAACACTAGC	40
<SEQ ID NO:14;DNA;staphylococcus> AGATTTTACCAAGCAAAACCG	
<SEQ ID NO:15;DNA;staphylococcus> AGATTTTACCAAGCAAAACCG	

【表 4】

<SEQ ID NO:16;DNA;staphylococcus> AAGCTTGAATTCATAAGAAAT	
<SEQ ID NO:17;DNA;staphylococcus> CCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAA	
<SEQ ID NO:18;DNA;staphylococcus> CCAAGCAAAACCGAGTGAATAAAG	
<SEQ ID NO:19;DNA;staphylococcus> GCTTGAATTCATAAGAAATAATCG	10
<SEQ ID NO:20;DNA;staphylococcus> GAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTG	
<SEQ ID NO:21;DNA;staphylococcus> GTGAATAAAGAGTTTTAAATAAGCTTG	
<SEQ ID NO:22;DNA;staphylococcus> AAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGC	
<SEQ ID NO:24;DNA;staphylococcus> AAGCAGAGTTACTTATGTAAATGAGCAT	
<SEQ ID NO:25;DNA;staphylococcus> TACCAAGCAAAACCGAGTGAATAAAGAGT	20
<SEQ ID NO:26;DNA;staphylococcus> TTTGTACATTGAAAAGTAAAGTAAGT	
<SEQ ID NO:27;DNA;staphylococcus> GCAAAACCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAA	
<SEQ ID NO:28;DNA;staphylococcus> AAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGCTAG	
<SEQ ID NO:29;DNA;staphylococcus> AGCAAAACCGAGTGAATAAACAGTTTTAAA	30
<SEQ ID NO:30;DNA;staphylococcus> ATTGTACATTGAAAAGTAAAGTAAGTAA	
<SEQ ID NO:31;DNA;staphylococcus> AGTGTTCGAAAGAACACTCACAAAGATTAATAA	
<SEQ ID NO:32;DNA;staphylococcus> AGCTTATTTAAAAGTCTTTATTCACCTCGGTTT	
<SEQ ID NO:33;DNA;staphylococcus> TAAAATAATGAAAACGAAGCCGTATGTGAGCGT	40
<SEQ ID NO:34;DNA;staphylococcus> TAAAATAATGAAAACGAAGCCGTATGTGAGCGT	
<SEQ ID NO:35;DNA;staphylococcus>	

【表 5】

GAATTCATAAGAAATAATCGCTAGTGTTCGAAA

<SEQ ID NO:36;DNA;staphylococcus>
TTTCGAACACTAGCGATTATTTCTTATGAATTC

<SEQ ID NO:37;DNA;staphylococcus>
GCAAAAACCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAATAAGC

<SEQ ID NO:38;DNA;staphylococcus>
GCTTATTTAAAACCTTTTATTCACCTCGGTTTTGC

10

<SEQ ID NO:39;DNA;staphylococcus>
GCTTGGTAAAATCTATATTTTACTTACTTATCTAGT

<SEQ ID NO:40;DNA;staphylococcus>
GTACATTGAAAACCTAGATAAGTAAGTAAAATATAGATT

<SEQ ID NO:41;DNA;staphylococcus>
GAGTTTTAAATAAGCTTGAATTCATAAGAAATAATCGC

<SEQ ID NO:42;DNA;staphylococcus>
GAAAGAACACTCACAAGATTAATAACGCGTTTAAATCTT

<SEQ ID NO:43;DNA;staphylococcus>
TTATAAAAGAACGTAACCTCATGTTAACGTTTGACTTATAA

20

<SEQ ID NO:44;DNA;staphylococcus>
TTATAAAAGAACGTAACCTCATGTTAACGTTTGACTTATAA

<SEQ ID NO:45;DNA;staphylococcus>
CTTCAGAAGATGCGGAA

<SEQ ID NO:46;DNA;staphylococcus>
TTTCGAACACTAGCGATT

<SEQ ID NO:47;DNA;staphylococcus>
GTTATTAAWCTTGTGAGTGTT

30

<SEQ ID NO:48;DNA;staphylococcus>
ACNMGTTATTAAWCTTGTGAG

<SEQ ID NO:49;DNA;staphylococcus>
CTTCAGAAGATGCGGAATA

<SEQ ID NO:50;DNA;staphylococcus>
TTCTTCAGAAGATGCGGAA

<SEQ ID NO:51;DNA;staphylococcus>
TTCTTTCGAACACTAGCGA

40

<SEQ ID NO:52;DNA;staphylococcus>
ACCAAGCAAACCGAGTGAA

<SEQ ID NO:53;DNA;staphylococcus>
GTTCTTTCGAACACTAGCGA

<SEQ ID NO:54;DNA;staphylococcus>
NMGTTATTAAWCTTGTGAGTG

<SEQ ID NO:55;DNA;staphylococcus>

【表 6】

CGCGTTATTAATCTTGTGAG

<SEQ ID NO:56;DNA;staphylococcus>
CATTGAAMACTAGATAAGTA<SEQ ID NO:57;DNA;staphylococcus>
GTTATTAAWCTTGTGAGTGTT<SEQ ID NO:58;DNA;staphylococcus>
ACGCGTTATTAATCTTGTGAGT

10

<SEQ ID NO:59;DNA;staphylococcus>
CGAACACTAGCGATTATTTCTTA<SEQ ID NO:60;DNA;staphylococcus>
ACTAGCGATTATTTCTTATGAAT<SEQ ID NO:61;DNA;staphylococcus>
CATATTGTATTCAGTTTTGAATG<SEQ ID NO:62;DNA;staphylococcus>
NMGTTATTAAWCTTGTGAG

20

<SEQ ID NO:63;DNA;staphylococcus>
CATATTGTATTCAGTTTTGAATGC<SEQ ID NO:64;DNA;staphylococcus>
CATATTGTATTCAGTTTTGAATGT<SEQ ID NO:65;DNA;staphylococcus>
CATAAGAAATAATCGCTAGTGTTCCG<SEQ ID NO:66;DNA;staphylococcus>
GACATATTGTATTCAGTTTTGAATG

30

<SEQ ID NO:67;DNA;staphylococcus>
GAAAACACTAGATAAGTAAGTAAAATAT<SEQ ID NO:68;DNA;staphylococcus>
TGTACATTGAAAACACTAGATAAGTAAG<SEQ ID NO:69;DNA;staphylococcus>
TTTGTACATTGAAMACTAGATAAG<SEQ ID NO:70;DNA;staphylococcus>
ACNMGTTATTAAWCTTGTGAGTGTT

40

【表 7】

表 2

配列番号	62 (RP)	57 (RP)	59 (RP)	46 (RP)	60 (RP)	53 (RP)	51 (RP)	54 (RP)	55 (RP)	58 (RP)
52 (FP)	1									
65 (FP)		2								
45 (FP)			3	4	5					
49 (FP)			6	7	8					
50 (FP)			9	10	11					
66 (FP)	32					12	13	14	15	16
67 (FP)									17	18
68 (FP)	33								19	20
63 (FP)	21								22	23
64 (FP)	24									
61 (FP)	25		31			26		27	28	29

FP/RP = 順方向プライマー/逆方向プライマー

= 最適なプライマーの組み合わせ

【 0 1 6 4 】

【表 8】

表 3

配列番号	ハイブプローブ(Hybprobe)	プライマーの組み合わせ	プロトコル PCR	実施例の特定の条件における成績
24 / 33	RStau63Fl.1 / RStau65LC6.1(LCR640)	1, 2	$t_a = 60^\circ\text{C}$	+
24 / 34	RStau63Fl.1 / RStau65LC7.1 (LCR705)	1	$t_a = 60^\circ\text{C}$	+
42 / 43	RStau73Fl.1 / RStau75LC6.1 (LCR640)	1, 2	$t_a = 60^\circ\text{C}$	+
42 / 44	RStau73Fl.1 / RStau75LC7.1 (LCR705)	1	$t_a = 60^\circ\text{C}$	+
40 / 25	RStauHP1-3Fl.1 / RStauHP1-5LCR64.1	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 27, 29, 31	$t_a = 55^\circ\text{C}$	++
37 / 35	RStauHP2-3Fl.1 / RStauHP2-LC6.1	12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 28	$t_a = 55^\circ\text{C}$	++
36 / 38	RStauHP2c-3Fl.1 / RStauHP2c-LC6.1	14, 20, 33	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
41 / 31	RStauHP3-3Fl.1 / RStauHP3-LC6.1	14, 25, 33	$t_a = 55^\circ\text{C}$	++
26 / 14	RStaphSP-3Fl.1 / RStaphSP-5LC6.1	6, 12, 14, 21, 24, 25, 27, 29, 32	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
30 / 18	RStauHP4-3Fl.1 / RStauHP4-5LC6.1	29	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
15 / 21	RStauHP5-3Fl.1 / RStauHP5a-5LC6.1	20	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
15 / 20	RStauHP5-3Fl.1 / RStauHP5b-5LC6.1	20	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
17 / 16	RStauHP6-3Fl.1 / RStauHP6a-5LC6.1	20	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
17 / 19	RStauHP6-3Fl.1 / RStauHP6b-5LC6.1	20	$t_a = 50^\circ\text{C}$	+++
27 / 28	RStauHP7-3Fl.1 / RStauHP7a-5LCR6	20	$t_a = 50^\circ\text{C}$	+
32 / 39 / 23	RStauHP8.3Fl.1 / RStauHP8.5LCR6 / RStepHP8.5LCR6	29	$t_a = 55^\circ\text{C}$	+
29 / 22	RStauHP9-3Fl.1 / RStauHP9-5LC6	20	$t_a = 50^\circ\text{C}$	+

* 太字で表したプライマー対は最も良好な成績を示した

【 0 1 6 5 】

【表 9】

表 4

ブドウ球菌				
種 (32)	亜種 (15)	臨床的関連 性	コアグララーゼ 反応	本研究における 試験結果
S. アウレウス	アウレウス	++++	+	+
	アネアロビウス (<i>anearobius</i>)	++++	+	+
S. エピダーミジス		+++	-	+
S. カピティス	カピティス	+	-	+
	ウレオリティカム (<i>ureolyticus</i>)	+	-	+
S. カブラエ		+	-	+
S. サッカロリティカス		+	-	+
S. ワルネリ		+	-	+
S. パステウリ		+	-	+
S. ハエモリティカス		+++	-	+
S. ホミニス	ホミニス	+	-	+
	ノボビオセプティカム (<i>novobiosepticum</i>)	+	-	-
S. ルグジュネンシス (<i>S. lugdunensis</i>)		+	-	+
S. シュレイフェリ	シュレイフェリ	+	-	+
	コアグラランス (<i>coagulans</i>)	+	+	+
S. ムスカエ (<i>S. muscae</i>)		-	-	-
S. アウリクラリス (<i>S. auricularis</i>)		+	-	+
S. サプロフィティカス	サブロフィティカス	++	-	+
	ボビス (<i>bovis</i>)	+	-	-
S. コーニー	コーニー	+	-	+
	ウレアリティカム (<i>urealyticum</i>)	+	-	+
S. キシロサス		- (+)	-	+
S. クローシー (<i>S. kloosii</i>)		-	-	-
S. エクオラム (<i>S. equorum</i>)		-	-	-
S. アルレタエ (<i>S. arletae</i>)		-	-	-
S. ガリナルム (<i>S. gallinarum</i>)		-	-	-
S. シムランズ		+	-	+
S. カルノサス (<i>S. carnosus</i>)		-	-	-
S. ピシフェルメンタンス (<i>S. piscifermentans</i>)		-	-	-
S. フェリックス (<i>S. felix</i>)		-	-	-
S. ルトラエ (<i>S. lutrae</i>)		-	+	-
S. インターメディアウス		-	+	-
S. デルフィニ (<i>S. delphini</i>)		-	+	-
S. ヒカス		-	(+)	+
S. クロモゲネス		-	-	+
S. シウリ	シウリ	-	-	+
	カルナティカス (<i>carnaticus</i>)	-	-	-
	ローデンティウム (<i>rodentium</i>)	-	-	-
S. レンタス (<i>S. lentus</i>)		-	-	-
S. ビタラス (<i>S. vitulus</i>)		-	-	-

【実施例】

【0166】

実施例において使用する方法は、配列番号17および19のハイブプローブ (Hyb Probe) を、配列番号58および68のスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属プライマー組との組み合わせで使用する、ブドウ球菌 (*Staphylococci*)、特に、S. アウレウス (*S. aureus*)、S. エピダーミジス (*S. epidermidis*) および S. ハエモリティカス (*S. haemolyticus*)

10

20

30

40

50

の検出のための方法である。

【0167】

ハイブプローブ (Hyb Probe) は、配列番号17の3'側がフルオレセインで、配列番号19の5'側がLCレッド (LC Red) 640で標識される。

【0168】

合計で、地理的由来が異なる63株のS.アウレウス (S. aureus) 単離物 (S.アウレウス (S. aureus) 亜種嫌気性細菌の代表を1つ含む)、48株のS.エピダーミディス (S. epidermidis) 単離物、および16株のS.ハエモリテュカス (S. haemolyticus) 単離物について調べた。

【0169】

単離体が予想される結果を与えなかった場合、t-RNA PCR (ベインエコッテ、M. (Vanechoutte, M.) ら、1998、Int. J. Syst. Bacteriol. (48) 127-139) によりgDNAを再分類し、および/または培養物をApiSTAPH (バイオメリエックス (Biomerieux)) によって再分類した。

【0170】

器具は、リアルタイム蛍光PCR検出を可能にする適切なソフトウェア (LC-ソフトウェア、バージョン3.5) を備えたライトサイクラー (LightCycler) TM (バージョン1.2) である。

【0171】

実施例1：試験しようとするサンプルの調製

1 / . 純培養物由来のDNA

純培養物由来のDNAを調製するために、異なる精製方法を使用することができる。

- ・リソスタフィン (5 µg / µl) で1時間、37 °Cでの溶解およびQIAamp血液DNA単離キット (キアゲン (Qiagen)) による精製
- ・ピッチャー (Pitcher) らの方法 (1989)
- ・MagnaPure 器具上のMagnaPure LC DNA単離キットIII (細菌、真菌)。LBプレートまたはスラント上O/Nで増殖させた細菌細胞を、-20 °Cでの保存のために100 ~ 1000 µl TE pH 8に懸濁させた。製造者の推奨に従って、2 µl ~ 20 µlを抽出のために使用した。
- ・QIAamp DNAミニキット (カタログ番号51306 - キアゲン (QIAGEN))。リゾチームおよびリソスタフィンを使用して、培養物を酵素的に前処置した。

【0172】

2 / . 陽性血液培養ボトル由来のDNA

血液サンプルを通気血液培養ボトル (Bact/ALERT FA) に播種し、Bact/Alert 3Dシステム (オルガノン・テクニカ (Organon Teknika)) 中、37 °C、陽性になるまでインキュベートした。暗緑色から黄色への色の変化によって、陽性をモニターした。

【0173】

血液培養物のアリコート (1.5 ml) を、使用するまで -70 °C で凍結した。

【0174】

ゲノムDNAを、MPLC DNA単離キットIIIの包装挿入物に記載のように、調製した。オルガノン・テクニカ (Organon Teknika) 血液培養ボトルについて推奨されているように、PCRの前に、溶出物を10秒間、14000 rpmで遠心分離して、抽出された炭素粒子をスピンドウンした。

【0175】

実施例2：ライトサイクラー (LightCycler) (LC) プロトコル

キットLC-ファストスタート (LC-FastStart) DNAマスター (Master) ハイブリダイゼーションプローブ (カタログ番号3003248または2239272) の製造者の指示に従って、

10

20

30

40

50

- ・精製、濃縮、および阻害剤の非存在について、PCRに適切な任意のサンプル材料を使用することができる、
- ・プライマーは、それぞれ0.3～1 μMの最終濃度であるべきである、
- ・それぞれ0.2 μM、または2倍の最終濃度のハイブプローブ(Hyb Probe)、
- ・MgCl₂の濃度は最適化されるべきであり、1～5 mMに変動し得る、
- ・そして、陰性コントロールを稼働させるべきである。

【0176】

増幅および融解条件を以下に記載する。LCソフトウェアのバージョン3.5を使用した。定量設定はF2/back F1(サンプル)であった。ベースラインの調整については、算術モードを使用した。クロスポイント(crossing point)(Ct)の計算は、2次最大微分(the second derivative maximum)に基づいた。融解ピークの計算方法は多項式法であった。ピーク面積を使用して、T_mを計算した。

【0177】

【表10】

増幅および融解曲線プログラム:

	温度(°C)	保持時間	傾き(°/秒)	獲得形態
変性	95	10分	20	なし
45x { サイクル	95	10秒	20	なし
	50	15秒	20	単一
	72	10秒	20	なし
融解	95	60秒	20	なし
	40	60秒	20	なし
	80	0秒	0.1	連続
冷却	40	0秒	20	なし

【0178】

実施例3：精製されたDNA、包括性および交差反応性試験の結果

1 / 包括性

試験したすべてのS.アウレウス(S. aureus)単離物(n=63)を首尾よく増幅(Ct範囲17.25～33.51)し、どのような地理的または種由来についても53.13 ± 0.52の平均T_mを有する1つの均質な融解ピークを得た。

【0179】

S.アウレウス(S. aureus)種と共に亜種のS.アウレウス(S. aureus)亜種嫌気性細菌も属することに留意すべきである。

【0180】

S.エピダーミディス(S. epidermidis)単離物(n=48)、およびS.ハエモリティカス(S. haemolyticus)(n=16)として受容されたすべての単離物を、融解曲線を使用して、検出することができた。定量曲線は、通常観察されなかった。S.エピダーミディス(S. epidermidis)単離物の平均T_m値は44.55 ± 0.21であり、S.ハエモリティカス(S. haemolyticus)では、それは44.96 ± 0.24であった。異なる地理的または種由来の単離物間で差異は認められなかった。

【0181】

S.アウレウス(S. aureus)またはS.ハエモリティカス(S. haemolyticus)として受容されたすべての単離物は、予想通りに反応した。しかし、5つのS.エピダーミディス(S. epidermidis)単離物については、逸脱した結果が得られた。

【0182】

これらのうち2株（1つは英国（UK）由来であり、1つはイタリア（Italy）由来である）は、後に*S.ホミニス*（*S. hominis*）として同定された。英国由来の別の*S.エピダーミディス*（*S. epidermidis*）単離物は、49.02のTm値を示し、後に、*Staphylococcus*種（*S.アウレウス*（*S. aureus*）、*S.エピダーミディス*（*S. epidermidis*）または*S.ハエモリティカス*（*S. haemolyticus*）以外）として決定することができた。該英国の単離物は後に*S.ハエモリティカス*（*S. haemolyticus*）として再分類された。そして、特徴的でない小さな融解ピークを生じるスペイン（Spain）由来の1つの単離物は、*S.インターメディウス*（*S. intermedius*）または*S.クロモゲネス*（*S. chromogenes*）として再分類された。

10

【0183】

2 / . 交差反応性

50を超える異なる細菌種について試験し（*Mycobacteria*）、*Pseudomonas*）、連鎖球菌（*Streptococci*）など）、また若干の真菌についても試験した。試験した生物体のうち、アッセイにより定量曲線または融解ピークを作成したものは認められなかった。

【0184】

3 / . 結果：

調査したすべての*S.アウレウス*（*S. aureus*）単離物が検出され（100%の感受性）、研究した他のすべての単離物から明白に識別することができた。

20

【0185】

S.エピダーミディス（*S. epidermidis*）および*S.ハエモリティカス*（*S. haemolyticus*）についても、感受性は100%であった。

【0186】

従って、配列番号17および19のハイブプローブ（Hyb Probe）のこの特定の組を使用して、相互または他のCONSから識別することなく、両方の種が検出される。

【0187】

試験した病原体由来の生物体との所望されない交差反応は観察されなかった。

【0188】

30

【表11】

感受性および特異性試験の概要

タクソン	試験した株の番号	株の番号		
		53℃でのピーク	49℃未満のピーク	ピークなし
<i>S.アウレウス</i>	63	63	0	0
<i>S.エピダーミディス</i>	43	0	43	0
<i>S.ハエモリティカス</i>	16	0	16	0
交差確認のリスト	55	0	0	55
ヒトDNA	1	0	0	1

40

【0189】

実施例4：血液培養物の結果

患者サンプルと共に播種された合計で16個の陽性血液培養ボトルのアリコートについて試験した。

【0190】

S.アウレウス（*S. aureus*）が増殖した5つのボトルから、4つはそのまま同定することができた。1つはピークを示さなかった。実際、サンプルのDNAは、*S.シ*

50

シュレイフェリ (*S. schleiferi*) として再分類された。

【0191】

S. エピダーミディス (*S. epidermidis*) に対して陽性が認められた10個のボトルのうち、7つが44 ~ 45 のピークを示し(予想した通り)、一方3つが47 にシフトしたピークを示した。逸脱したサンプルのDNAを再分類した後、それらは*S. ホミニス* (*S. hominis*) として同定された。

【0192】

S. ハエモリティカス (*S. haemolyticus*) について陽性である1つのボトルは、44.59 の予想された溶解ピークを生じた。

【0193】

実施例5：他の検出

S. エピダーミディス (*S. epidermidis*) および *S. ハエモリティカス* (*S. haemolyticus*) 以外の合計で51株のCoNS株について研究した。結果を以下の表にまとめる。

【0194】

結果が不明瞭である2種(*S. シュレイフェリ* (*S. schleiferi*) および *S. シウリ* (*S. sciuri*)) を除くすべての種のすべての株について、ゲル上において増幅が観察された(以下にも示す)。いくつかのCoNSは、対応するCt値で増殖曲線(増幅)を生じたが、エンドポイントの蛍光は、*S. アウレウス* (*S. aureus*) について得られる値(例えば、 10^3 コピーについて0.03)と比較して極めて低かった(0.004以下)。

【0195】

試験したほとんどの種は、*S. クロモゲネス* (*S. chromogenes*)、*S. ヒカス* (*S. hyicus*) および *S. シムランス* (*S. simulans*) を除いて、融解曲線解析によって検出可能であった。

【0196】

S. シュレイフェリ (*S. schleiferi*) および *S. シウリ* (*S. sciuri*) の結果は不明瞭であり、両方の種については、融解ピークが観察されたが、潜在的な混入因子から確実に識別することはできなかった。普遍的プライマーで得られた結果より、両方の種がおそらく検出可能ではないことが示唆され、ゲル上での明確な証拠は認められたが、ハイブプローブ(HybProbe)は、LCにおいてシグナルを生じなかった。

【0197】

CoNSについて観察されるTmの範囲は、39 ~ 48 である。これは、*S. アウレウス* (*S. aureus*) の場合とは明らかに異なるが、*S. エピダーミディス* (*S. epidermidis*) および *S. ハエモリティカス* (*S. haemolyticus*) の範囲に完全に重複する。

【0198】

10

20

30

【表 1 2】

試験したスタフィロコッカス種の株について得られた LC 結果の概要

種	試験した株の番号	ゲル上のアンプリコン (+/-140 bp)	Ct 検出	融解ピークの Tm(°C)範囲	融解ピークの検出
<i>S. アウレウス</i>	70	+	あり	52-54	あり
<i>S. エピダーミティス</i>	12	+	なし	43-45	あり
<i>S. ハエモリティカス</i>	21	+	なし	44-46 (47)	あり
<i>S. アウリクラリス</i> (<i>S. auricularis</i>)	3	+	なし	39-40	(あり)
<i>S. カピティス</i>	4	+	なし	46-47	あり
<i>S. カブラエ</i>	2	+	なし	45-46	あり
<i>S. クロモゲネス</i>	1	+	なし	-	なし
<i>S. コーニー</i>	3	+	(あり)	46-48	あり
<i>S. ホミニス</i>	6	+	なし	46-48	あり
<i>S. ヒカス</i>	1	+	なし	-	なし
<i>S. ルグジュネンシス</i> (<i>S. lugdunensis</i>)	12	+	(あり)	46-48	あり
<i>S. パステウリ</i>	1	+	(あり)	47	あり
<i>S. サッカロリティカス</i>	1	+	なし	45	あり
<i>S. サプロフィティカス</i>	5	+	なし	42-43	あり
<i>S. シュレイフェリ</i>	4	?	なし	?	?
<i>S. シウリ</i>	1	?	なし	?	?
<i>S. シムランス</i>	1	+	なし	-	なし
<i>S. ワルネリ</i>	5	+	(あり)	(42) 46-47	あり
<i>S. キシロサス</i>	1	+	なし	42	あり
合計	154				

10

20

【配列表】

0005156726000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
- (74)代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
- (72)発明者 ソフィー・クライス
ベルギー、ペー - 8 3 1 0 ブルッヘ - シント - クライス、ブリーフェルスウェッヒ 3 6 5 番
- (72)発明者 ヘールト・ヤネス
ベルギー、ペー - 3 0 1 0 ルーヴェン、エー・ファンホーレンベケラーン 2 3 / 1 番
- (72)発明者 ゲルト・ハーバーハウゼン
ドイツ連邦共和国デー - 8 2 3 7 7 ペンツベルク、カベレンヴィーゼ 3 5 番
- (72)発明者 トーマス・エムリッヒ
ドイツ連邦共和国デー - 8 2 3 9 3 イツフェルドルフ、プロムベルクシュトラーセ 7 番
- (72)発明者 リア・フェルドート
ベルギー、ペー - 9 8 4 0 デ・ピンテ、ウィーレワールパルク 1 0 番

審査官 引地 進

- (56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 1 9 7 6 (J P , A)
特開平 0 9 - 3 2 2 7 8 1 (J P , A)
Int. J. Syst. Bacteriol. , 1 9 9 8 年 , Vol.48 , pp.1049-1055
Microbiology , 1 9 9 5 年 , Vol.141 , pp.1255-1265
FEMS Microbiology Letters , 1 9 9 4 年 , Vol.119 , pp.167-174
FEMS Microbiology Letters , 1 9 9 7 年 , Vol.146 , pp.271-278

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
J S T P l u s (J D r e a m I I)
B I O S I S / W P I (D I A L O G)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / P D B / G e n e S e q