

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年11月25日(2010.11.25)

【公表番号】特表2010-514429(P2010-514429A)

【公表日】平成22年5月6日(2010.5.6)

【年通号数】公開・登録公報2010-018

【出願番号】特願2009-543399(P2009-543399)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月6日(2010.10.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する方法であつて、

(a)試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に增幅産物を生成することを含む增幅ステップを行なう工程、

(b)工程(a)の増幅産物と一対のMRSAプローブとを接触させることを含むハイブリダイズステップを行なう工程、該一対のMRSAプローブの第一MRSAプローブがドナー蛍光部分で標識され、該一対のMRSAプローブの第二MRSAプローブが対応するアクセプター蛍光部分で標識される；および

(c)第一MRSAプローブのドナー蛍光部分と第二MRSAプローブのアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の存在または非存在を検出する工程、FRETの存在が試料中のMRSAの存在を示し、FRETの非存在が試料中のMRSAの非存在を示すを含み、

MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI～Vのそれぞれを検出することができ、

一組のプライマーが、

(i)MRSAタイプRE2に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-TGA AAT GAA AGA CTG CGG A G-3'(MRSAダイレクトRE2_fwd; 配列番号:92)を含むまたは該核酸配列からなるプライマー；

および

(ii)MRSAタイプRE3に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-CCA CAT CTC ATT AAA TTT TTA AAT TAT ACA C-3'(MRSAダイレクトRE3_fwd; 配列番号:93)を含むまたは該核酸配列からなるプライマー；

および

(iii)MRSAタイプRE7に特異的なプライマー、即ち、核酸配列5'-CAA TCC TTT TTA TAT TTA AAA TAT ATT ATA CAC-3'(MRSAダイレクトRE7_fwd; 配列番号:94)を含むまたは該核酸配列からなるプライマー

を含む、方法。

【請求項 2】

一組のプライマーが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)に特異的なさらなるプライマーをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

さらなるプライマーが、核酸配列5'-CAA GGA AAG ATG CTA TCT TCC G-3' (MRSAダイレクトrev; 配列番号:95)を含むまたは該核酸配列からなる、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

- 一組のプライマーが最大3個、4個または5個のプライマーからなる、および/または
- 一組のプライマーが、MRSAダイレクトRE2 fwd、MRSAダイレクトRE3 fwdおよびMRSAダイレクトRE7 fwdならびにリバースプライマーを含むまたはこれらからなる、請求項1～3いずれかに記載の方法。

【請求項 5】

リバースプライマーが、MRSAダイレクトrevである、請求項1～4いずれかに記載の方法。

【請求項 6】

一対のプローブの少なくとも1つのプローブが、蛍光部分ならびに
- 5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3' (MRSAダイレクトFluos標識なし; 配列番号:96)、および
- 5'-CAT GCG TTG GTT CGA TTC TTG-3' (MRSAダイレクトRed 610標識なし; 配列番号:97)からなる群より選択される核酸配列を含むまたはこれらからなる、請求項1～5いずれかに記載の方法。

【請求項 7】

第一標識を含む第一プローブが5'-AAG TCG CTT TGC CCT TGG G-3' - フルオレセイン(MRSAダイレクトFluos)であり、第二標識を含む第二プローブがLC-Red 610-5'-CAT GCG TTG G TT CGA TTC TTG-3' (MRSAダイレクトRed 610)である、請求項1～6いずれかに記載の方法。

【請求項 8】

- 一対のMRSAプローブのメンバーが、5ヌクレオチド以下、4ヌクレオチド以下または3ヌクレオチド以下の範囲で増幅産物にハイブリダイズする；および/または
- (a)ドナー蛍光部分がフルオレセインである；および/または
- (b)アクセプター蛍光部分がLC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、およびCy5.5からなる群より選択される、

請求項1～7いずれかに記載の方法。

【請求項 9】

試料中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の存在または非存在を検出する方法であつて、

(a)試料と一組のMRSAプライマーとを接触させてMRSAが試料中に存在する場合に増幅産物を生成することを含む増幅ステップを行なう工程、

(b)工程(a)の増幅産物とMRSAプローブとを接触させることを含むハイブリダイズステップを行なう工程、MRSAプローブがドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分で標識される；ならびに

(c)MRSAプローブのドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の存在または非存在を検出する工程、FRETの存在または非存在が試料中のMRSAの存在または非存在を示す

を含み、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI～Vのそれぞれを検出でき、該一組のプライマーが請求項1～6いずれかに記載される通りである、方法。

【請求項 10】

a)プローブが、2つの蛍光部分を含むまたはこれらからなる、
b)プローブが、2つの蛍光部分を含むまたはこれらからなる、

ドナー蛍光部分がフルオレセインである；および／またはアクセプター蛍光部分がLC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、Cy5、およびCy5.5からなる群より選択される；

c)増幅ステップで5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素が使用される；

d)ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分がプローブ上で互いに5ヌクレオチド以下の範囲に存在する；

e)プローブが二次構造形成を可能にする核酸配列を含み、該二次構造形成によってドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間で空間近接がもたらされる；および／または

f)アクセプター蛍光部分がクエンチャーである、

請求項9記載の方法。

【請求項11】

a)検出工程がドナー蛍光部分によって吸収される波長で試料を励起することならびにアクセプター蛍光部分によって放出される波長を視覚化および／または測定することを含む；

b)検出がFRETの量を計ることを含む；

c)55サイクル、45サイクルまたは35サイクル内でのFRETの存在が試料中のMRSAの存在を示す；

d)検出工程が増幅およびハイブリダイゼーションの各ステップの後および／またはリアルタイムで行なわれる；

e)(1つまたは複数の)プローブの1つまたは両方と増幅ステップの増幅産物との間で融解温度を決定する工程をさらに含み、該融解温度によってMRSAの存在または非存在が確認される；

f)夾雑核酸の増幅を妨げる工程をさらに含む；

g)ウラシルの存在下で増幅ステップを行なうことにより夾雫核酸の増幅を妨げる工程、および第一増幅ステップの前に試料をウラシルDNAグリコシラーゼで処理する工程をさらに含む；

h)対照試料で行なわれる；

i)試料が生物試料である；および／または

j)試料が、感染傷のスワブ、皮膚のスワブ、鼻のスワブ、咽喉のスワブ、鼠蹊部のスワブ、腋窩のスワブ、侵襲性デバイス部位からのスワブ、感染の可能性のある部位からのスワブ、体液、血液試料、尿試料および会陰のスワブからなる群より選択される、

請求項1～10いずれかに記載の方法。

【請求項12】

請求項1～5いずれかに記載の一組のプライマーを含む組成物。

【請求項13】

請求項6～8いずれか一項に記載のプローブおよび／または一対のプローブをさらに含む、請求項12記載の組成物。

【請求項14】

(a)請求項1～5いずれかに記載の一組のプライマー；

(b)請求項6もしくは8記載の一対のプローブまたは請求項10記載のプローブ；ならびに

(c)ドナー蛍光部分および(1つまたは複数の)プローブを標識する対応する蛍光部分を含むキットであって、MRSAのブドウ球菌染色体カセット(SCCmec)タイプI～Vのそれぞれを検出することができる、キット。

【請求項15】

a)請求項1～11いずれかに記載の方法を行なうのに適切である；

b)試料中のMRSAの存在または非存在を検出する一組のMRSAプライマーおよび一対のMRSAプローブを使用するための説明書を有するパッケージラベルまたはパッケージ挿入物をさらに含む；および／または

c) ウラシル-DNA-グリコシラーぜおよび / またはDNAポリメラーぜおよび / または適切な
バッファをさらに含む、
請求項 1_4 記載のキット。