

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-313181

(P2004-313181A)

(43) 公開日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	F 4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	Z 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 49 O L (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-77045 (P2004-77045)	(71) 出願人	000001007
(22) 出願日	平成16年3月17日 (2004.3.17)		キヤノン株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2003-99452 (P2003-99452)		東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)	(74) 代理人	100076428
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 大塚 康德
(31) 優先権主張番号	特願2003-99453 (P2003-99453)	(74) 代理人	100112508
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)		弁理士 高柳 司郎
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100115071
(31) 優先権主張番号	特願2003-99454 (P2003-99454)		弁理士 大塚 康弘
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)	(74) 代理人	100116894
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 木村 秀二
(31) 優先権主張番号	特願2003-99455 (P2003-99455)	(72) 発明者	山本 伸子
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)		東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		ヤノン株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 感染症起炎菌検出用プローブ及びプローブセット、ならびに担体及び遺伝子検査方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供する。

【解決手段】感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットは、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、特定の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含む。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、

SEQ ID No.1~14の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No.15~24の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQ ID No.25~36の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No.37~47の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ ID No.48~57の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No.58~68の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No.69~77の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQ ID No.78~85の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No.86~97の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ ID No.98~106の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含むことを特徴とする感染症起炎菌検出用プローブセット。

10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の感染症起炎菌検出用プローブセットに含まれるプローブが化学的に固定されている担体。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の担体を用いて感染症起炎菌遺伝子を検出する遺伝子検査方法。

## 【請求項 4】

SEQ ID No.1~14の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

20

## 【請求項 5】

SEQ ID No.1~14の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの 1 種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の担体を用いて黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

30

## 【請求項 8】

SEQ ID No.15~24の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

## 【請求項 9】

SEQ ID No.15~24の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの 1 種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

40

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の担体を用いて表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

## 【請求項 12】

SEQ ID No.25~36の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る、大腸菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

## 【請求項 13】

50

SEQ ID No.25～36の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含む、大腸菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項14】

請求項12に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項15】

請求項13に記載の担体を用いて大腸菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項16】

SEQ ID No.37～47の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする肺炎桿菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項17】

SEQ ID No.37～47の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする肺炎桿菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項18】

請求項17に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項19】

請求項18に記載の担体を用いて肺炎桿菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項20】

SEQ ID No.48～57の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする緑膿菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項21】

SEQ ID No.48～57の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする緑膿菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項22】

請求項21に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項23】

請求項22に記載の担体を用いてセラチア球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項24】

SEQ ID No.58～68の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするセラチア菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項25】

SEQ ID No.58～68の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするセラチア菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項26】

請求項25に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項27】

請求項26に記載の担体を用いてセラチア球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 28】

SEQ ID No.69～77の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

## 【請求項 29】

SEQ ID No.69～77の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

## 【請求項 30】

請求項 29 に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。 10

## 【請求項 31】

請求項 30 に記載の担体を用いて肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

## 【請求項 32】

SEQ ID No.78～85の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

## 【請求項 33】

SEQ ID No.78～85の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。 20

## 【請求項 34】

請求項 33 に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

## 【請求項 35】

請求項 34 に記載の担体を用いてインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

## 【請求項 36】

SEQ ID No.86～97の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするエンテロバクタークロアカエ菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。 30

## 【請求項 37】

SEQ ID No.86～97の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするエンテロバクタークロアカエ菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

## 【請求項 38】

請求項 37 に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。 40

## 【請求項 39】

請求項 38 に記載の担体を用いてエンテロバクタークロアカエ菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

## 【請求項 40】

SEQ ID No.98～106の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするエンテロコッカウフェカリス菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

## 【請求項 41】

SEQ ID No.98～106の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含む 50

ことを特徴とするエンテロコッカウフェカリス菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも 1 種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の担体を用いてエンテロコッカス フェカリス菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項 4 4】

感染症起炎菌の 16s rRNA 遺伝子配列を P C R 増幅させるのに用いられるプライマーであって、 10

SEQ ID No.73~78 の塩基配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

【請求項 4 5】

ヒトゲノム DNA の塩基配列と 3 塩基以上配列が異なることを特徴とする請求項 4 4 に記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

【請求項 4 6】

感染症起炎菌の 16s rRNA 遺伝子配列を P C R 増幅させるのに用いられるプライマーセットであって、

SEQ ID No.107~109 の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上と、SEQ ID No.110~112 の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上の複数の塩基配列の各々を有するオリゴヌクレオチドからなる複数のプライマーを含むことを特徴とする感染症起炎菌増幅反応用プライマーセット。 20

【請求項 4 7】

ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR 反応させることを特徴とする請求項 4 6 記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマーセット。

【請求項 4 8】

請求項 4 6 に記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマーセットを用いて P C R 増幅処理を行なって D N A プローブによる感染症起炎菌の検出を行なうことを特徴とする感染症起炎菌検出方法。 30

【請求項 4 9】

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、

SEQ ID No.1~9 の塩基配列及びその相補配列を含む第 1 群と、SEQ ID No.15~21 の塩基配列及びその相補配列を含む第 2 群と、SEQ ID No.25~31 の塩基配列及びその相補配列を含む第 3 群と、SEQ ID No.37~42 の塩基配列及びその相補配列を含む第 4 群と、SEQ ID No.48~55 の塩基配列及びその相補配列を含む第 5 群と、SEQ ID No.58~62 の塩基配列及びその相補配列を含む第 6 群と、SEQ ID No.69~75 の塩基配列及びその相補配列を含む第 7 群と、SEQ ID No.78~84 の塩基配列及びその相補配列を含む第 8 群と、SEQ ID No.86~92 の塩基配列及びその相補配列を含む第 9 群と、SEQ ID No.98~105 の塩基配列及びその相補配列を含む第 10 群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含むことを特徴とする感染症起炎菌検出用プローブセット。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染症疾患の原因菌である感染症起炎菌の検出及び / 又は同定に関する。特に、感染症疾患の原因菌の検出および同定に有用な感染症起炎菌由来のプローブ及び、プローブセットならびに担体、遺伝子検査方法に関するものである。

【0002】

また、感染症起炎菌の検出及び / 又は同定に好適な感染症起炎菌の P C R 増幅処理に関 50

する。

【背景技術】

【0003】

近年、DNAチップ（またはDNAマイクロアレイともいう。以下同じ）を用いた遺伝子発現解析が創薬を初め種々の領域で行なわれている。それは、各種遺伝子セット（プローブ）が配置されたDNAマイクロアレイに、それぞれ異なった検体DNAを反応させ、各検体に存在するそれぞれの遺伝子量を比較して、各ステージで大量に存在する（発現量の高い）遺伝子、或いは逆に不活性化している（発現量の低い）遺伝子を分類し、機能と関連付けて解析するものである。

【0004】

感染症の起炎菌検査はその一例であり、江崎らは特許文献1において、DNAプローブとして染色体DNAが固定化されたDNAチップを用いる微生物同定法を提案している。この方法によれば、互いにGC含量の異なる複数の既知微生物由来の染色体DNAと、検体中の未知微生物由来の染色体DNAとを反応させ、生じたハイブリダイゼーション複合体を検出することで検体中の未知微生物を検出することが可能である。

【0005】

また、大野らは感染症の起炎菌検査のためのDNAチップに用いるプローブとして、特許文献2で制限酵素断片を利用した真菌の検出用プローブを、特許文献3で緑膿菌の検出用プローブを、特許文献4でEscherichia coli（エシェリキア コリ）菌、Klebsiella pneumoniae（クレブシエラ ニューモニエ）菌ならびにEnterobacter cloacae（エンテロバクター クロアカエ）菌の制限酵素断片を利用した検出用プローブをそれぞれ提案している。

【0006】

また、上記マイクロアレイとしては、例えば、スタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によるマイクロアレイが知られており、例えば、宝酒造株式会社からがん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布したDNAチップ、ヒト由来既知遺伝子約1000種類のcDNA断片をスライドガラスに貼り付けたチップが市販されている。

【0007】

一方、Affymetrixのチップは、上記既知遺伝子cDNAを元にオリゴヌクレオチドプローブセットを設計し、基板上の合成によりプローブを配置したもので、一枚のチップ上に高密度にオリゴプローブが配置され、一度に一万を超える遺伝子の発現レベルを解析できるように設計されている。

【特許文献1】特開2001-299396号公報

【特許文献2】特開平6-133798号公報

【特許文献3】特開平10-304896号公報

【特許文献4】特開平10-304897号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、上記従来技術に示したDNAチップは、染色体DNA或いは制限酵素断片等のDNAプローブを利用するものであり、いずれも微生物から直接取り出したDNAを材料としている。このため、一度に大量に調製することは困難であり、臨床診断用には適さないという問題があった。これは臨床診断用に用いるためには、安価で均質なDNAチップの大量生産が必要であり、このためにプローブ溶液として均質なDNAの大量調製が不可欠となってくるところ、DNAプローブでは、このような大量調製ができないからである。なお、DNAプローブであっても、PCR増幅反応を利用することで当該DNAを徐々に増加させていくことは可能であるが、PCR反応では、一度に大量調製することは困難であることから、臨床診断用に利用することは難しい。

【0009】

10

20

30

40

50

また、DNAプローブは塩基長が長いため、類似菌種間における菌種の同定が困難であり、例えば感染症検出用には適さないという問題があった。これは、感染症の治療においては菌種の特定とそれに応じた抗生剤の選択・投与が必要であり、このために感染症検出用プローブには、同種内の詳細な区別までは必要としないまでも（つまり同種内は一括検出でき）、類似する他の種の細菌は区別して検出できるような機能が求められるからである。一方、例えば特許文献4で示されているエシェリキア コリ菌、クレブシエラ ニューモニエ菌、エンテロバクター クロアカエ菌の制限酵素断片を用いたDNAチップでは、プローブの塩基長が長いために、これら3菌種相互間に交差反応が生じてしまい、類似する個々の菌を区別することができず、感染症検出用に利用することは難しい。

【0010】

10

また、以上のようなマイクロアレイの用途として、感染症の起炎菌検査が注目されており、感染症起炎菌検査を目的としたプローブセットの提案もいくつかなされている。

【0011】

マイクロアレイを用いた細菌検査における重要なポイントは、感染菌数が少なくても検出できることである。そのために、プライマーを用いたPCR反応等による感染菌のDNAの塩基配列における特定の部位を増幅することが有効である。例えば、16s rRNA遺伝子配列はおよそ1700塩基対の情報中に菌種特有な配列を含み、その配列を利用することによりある程度の分類が可能であると考えられている。したがって、細菌の検出/同定においては、細菌のDNA塩基配列中の16srRNA部分を用いるのが好ましい。したがって、この16s rRNA部分を増幅することが要望されている。

20

【0012】

しかしながら、種々の菌の遺伝子配列は部分的には明らかにされていても、16s rRNAの全長が解明されている訳ではなく、PCR増幅反応用のプライマーの設計は容易ではない。

【0013】

本発明は、上記に鑑みてなされたものであり、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することを目的とする。

【0014】

より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プローブセットを提供することを目的とするものである。

30

【0015】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することを目的とする。

【0016】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することを目的とする。

【0017】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することを目的とする。

40

【0018】

また、感染症起炎菌の検出及び/又は同定を目的に、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反応用プライマーを提供することを目的とする。

【0019】

また、本発明の他の目的は、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16s rRNAを増幅可能なプライマーセットを提供することにある。

【0020】

更に、本発明の他の目的は、複数種類の起炎菌の16s rRNAを同一PCR条件で増幅可能

50

であるようなプライマーセットを提供することにある。

【0021】

また、ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR反応を行なうことにより、ヒトゲノム由来の遺伝子を増幅することなく、上記菌種のいずれも増幅可能であることを特徴とするプライマーセットを提供する。具体的には、ヒトゲノム遺伝子と3塩基以上異なる配列を持つプライマーセットを提案する。

【課題を解決するための手段】

【0022】

上記の目的を達成するための本発明の一態様によれば、以下の感染症起炎菌検出用プローブセットが提供される。すなわち、

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、SEQ ID No.1~14の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No.15~24の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQ ID No.25~36の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No.37~47の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ ID No.48~57の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No.58~68の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No.69~77の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQ ID No.78~85の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No.86~97の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ ID No.98~106の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含む。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することができる。より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プローブセットを提供することが可能となる。

【0024】

或いは、感染症の原因菌である例えば上記10種類の菌の検出に適した感染症検出用プローブを提供することが可能となる。

【0025】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することが可能となる。

【0026】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することができる。

【0027】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体が提供できる。

【0028】

また、本発明によれば、感染症起炎菌の検出及び/又は同定を目的とした、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反应用プライマーが提供される。

また、本発明によれば、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16srRNAを増幅可能なプライマーセットが提供される。

更に、本発明によれば、複数種類の起炎菌の16srRNAを同一PCR条件で増幅可能であるようなプライマーセットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

以下の実施形態では、感染症の起炎菌同定の為のオリゴヌクレオチドプローブ、より具体的には、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、

10

20

30

40

50



肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数菌を検出する為のプローブが示される。すなわち、上記 10 種類の感染症起炎菌の遺伝子のうちの 16s rRNA 遺伝子配列を過不足なく検出するための核酸プローブ或いは核酸プローブセットが開示される。

#### 【0030】

本実施形態によれば、上記感染症起炎菌の遺伝子の核酸配列を含む検査溶液と反応せしめるための上記オリゴヌクレオチドプローブは、後述の表示 1 に示す第 1 群（添付配列表の配列番号（SEQ ID No.）1～14）、表 2 に示す第 2 群（配列番号 15～24）、表 3 に示す第 3 群（配列番号 25～36）、表 4 に示す第 4 群（配列番号 37～47）、表 5 に示す第 5 群（配列番号 48～57）、表 6 に示す第 6 群（配列番号 58～68）、表 7 に示す第 7 群（配列番号 69～77）、表 8 に示す第 8 群（配列番号 78～85）、表 9 に示す第 9 群（配列番号 86～97）、表 10 に示す第 10 群（配列番号 98～106）のうちの一つの群に属する 1 つの塩基配列からなる。ここで、第 1 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは黄色ブドウ球菌を検出し、第 2 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは表皮ブドウ球菌を検出し、第 3 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは大腸菌を検出し、第 4 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎桿菌を検出し、第 5 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは緑膿菌を検出し、第 6 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはセラチア菌を検出し、第 7 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎連鎖球菌を検出し、第 8 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはインフルエンザ菌を検出し、第 9 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロバクター クロアカエ菌（以下、腸球菌）を検出し、第 10 群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロコッカス・フェカリス菌を検出する。

#### 【0031】

なお、これらのプローブ配列の相補的な配列（上記第 1 群の相補的な配列は添付配列表の配列番号 113～126、第 2 群の相補的な配列は配列番号 127～136、第 3 群の相補的な配列は配列番号 137～148、第 4 群の相補的な配列は配列番号 149～159、第 5 群の相補的な配列は配列番号 160～169、第 6 群の相補的な配列は配列番号 170～180、第 7 群の相補的な配列は配列番号 181～189、第 8 群の相補的な配列は配列番号 190～197、第 9 群の相補的な配列は配列番号 198～209、第 10 群の相補的な配列は配列番号 210～218 である）もまた、同じ機能を有するためにプローブ配列として有効である。

#### 【0032】

各菌のプローブの設計は、16s rRNA をコーディングしているゲノム部分より、当該菌に対し非常に特異性が高く、また、それぞれのプローブ塩基配列でばらつきがなく、十分なハイブリダイゼーション感度が期待できるように行なった。

#### 【0033】

これらのオリゴヌクレオチドプローブは、担体上に結合された 2 種以上のプローブと検体とのハイブリダイゼーション反応において、安定なハイブリッド体を形成し、良好な結果を与えるように設計されている。

#### 【0034】

さらに、本発明にかかる感染症検出用プローブが固定された担体は、オリゴヌクレオチドを B J プリントを用いて吐出し、化学的に結合させることで作製することを特徴としている。これにより、従来法に比べ、プローブがはがれにくくなるうえ、感度が向上するという付加的な効果も得られる。つまり、従来から一般的に用いられるスタンフォード法と呼ばれるスタンピング法により DNA チップを生成した場合（例えば、宝酒造は、がん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子の cDNA 断片をスポット或いはスタンプにより塗布することで DNA チップを生成している）、塗布した DNA がはがれやすいという欠点があった。また、従来のように、DNA チップ上で合成によりプローブを配置した場合（例え

10

20

30

40

50

ば、AffymetrixのDNAチップ等)は、各プローブ配列毎の合成収量が異なる為に、正確な評価ができないという欠点があった。本発明にかかる担体は、かかる点についても考慮して作製されており、従来に比べ安定に固定されはがれにくく、高感度と高精度の検出ができる点を特徴としている。以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

#### 【0035】

本実施形態のDNAチップが検査の対象とする検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、髄液、喀痰、胃液、膺分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような自然環境中の水、空気清浄機や浄水器のフィルタ等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象とする。

10

#### 【0036】

また、本実施形態のDNAチップが対象とする検体としては、抽出した核酸そのものでも良いが、16s rRNA検出用に設計されたPCR反应用プライマーを用いて調製された増幅検体、或いはPCR増幅物を元にさらにPCR反応等を行なって調製された検体、PCR以外の増幅方法により調製された検体、可視化のために各種標識法により標識された検体等、いずれの調製法により調製された検体をも含む。

#### 【0037】

また、本実施形態のDNAチップに用いられる担体は、ガラス基板、プラスチック基板、シリコンウェハー等の平面基板、凹凸のある三次元構造体、ビーズのような球状のもの、棒状、紐状、糸状のもの等あらゆるものを含む。さらに、その基板の表面をプローブDNAの固定化が可能なように処理したのものを含む。特に、表面に化学反応が可能となるように官能基を導入したものは、ハイブリダイゼーション反応の過程でプローブが安定に結合している為に、再現性の点で好ましい形態である。

20

#### 【0038】

本発明に用いられる固定化方法としては、例えば、マレイミド基とチオール(-SH)基との組合わせを用いる例が挙げられる。即ち核酸プローブの末端にチオール(-SH)基を結合させておき、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された核酸プローブのチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して核酸プローブを固定化する。

30

#### 【0039】

マレイミド基の導入方法としては、まず、ガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基とEMCS試薬(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide : Dojin社製)との反応によりマレイミド基を導入する。DNAへのSH基の導入は、DNA自動合成機でDNAを合成する際に、5'-Thiol-ModifierC6(GlenResearch社製)を用いることにより行なうことができる。

#### 【0040】

固定化に利用する官能基の組合わせとしては、上記したチオール基とマレイミド基の組合わせ以外にも、例えばエポキシ基(固相上)とアミノ基(核酸プローブ末端)の組合わせ等が挙げられる。また、各種シランカップリング剤による表面処理も有効であり、該シランカップリング剤により導入された官能基と反応可能な官能基を導入したオリゴヌクレオチドが用いられる。さらに、官能基を有する樹脂をコーティングする方法も利用可能である。

40

#### 【0041】

以下、上述した10種の感染症起炎菌のそれぞれを検出するための感染症起炎菌検出用プローブを用いた実施例により、更に詳細に説明する。

#### 【0042】

<実施例1> 1 Step PCR法を用いた微生物の検出

[1. プローブDNAの準備]

上記10種の起炎菌の株検出用プローブとして表1~10に示す核酸配列を設計した。

50

具体的には、各菌の16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、以下に示したプローブ塩基配列を選んだ。これらのプローブ塩基配列群は、当該菌に対し非常に特異性が高く、それぞれのプローブ塩基配列でばらつきのない、十分なハイブリダイゼーション感度が期待できるように設計されている。なお、表1～10に示す各プローブ塩基配列はこれに完全に一致したもの限定される必要はなく、各プローブ塩基配列を含む20から30程度の塩基長を有するプローブ塩基配列も各表に示す各プローブ塩基配列に含まれるものとする。また、上述のように各表に示した塩基配列の相補的な配列（相補鎖）を用いてもよい。

#### 【0043】

なお、以下の各表において、Probe No.は便宜的に割り当てた符号であり、配列番号は添付の配列表における配列番号と一致している。また、上述したように、配列番号1～106に対応する相補鎖配列は配列番号113～218に示してある。

10

#### 【0044】

表1 黄色ブドウ球菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
黄色ブドウ球菌	PA-1	1	5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3'
	PA-2	2	5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'
	PA-3	3	5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3'
	PA-4	4	5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'
	PA-5	5	5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'
	PA-6	6	5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'
	PA-7	7	5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'
	PA-8	8	5' TTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'
	PA-9	9	5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'
	PA-10	10	5' ACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT 3'
	PA-11	11	5' TGTCACCTATAGATGGATCCGCGCT 3'
	PA-12	12	5' TGTAAGTAAGTGTGCACATCTTGACG 3'
	PA-13	13	5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCC 3'
	PA-14	14	5' GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCC 3'

20

30

#### 【0045】

表2 表皮ブドウ球菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
表皮ブドウ球菌	PB-1	15	5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'
	PB-2	16	5' TAGTGAAAGACGGTTTGTGCTCACT 3'
	PB-3	17	5' TAAGTAAGTATGCACGTCTTGACGGT 3'
	PB-4	18	5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3'
	PB-5	19	5' AGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTC 3'
	PB-6	20	5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'
	PB-7	21	5' AGCCGGTGGAGTAACCATTTGG 3'
	PB-8	22	5' AGACGAGGAGCTTGCTCCTCTG 3'
	PB-9	23	5' AGAACAAATGTGTAAGTAAGTATGCACGT 3'
	PB-10	24	5' ACCATTTGGAGCTAGCCGTCGA 3'

40

#### 【0046】

50

表3 大腸菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
大腸菌	PC-1	2 5	5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCCA 3'
	PC-2	2 6	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'
	PC-3	2 7	5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'
	PC-4	2 8	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'
	PC-5	2 9	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'
	PC-6	3 0	5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'
	PC-7	3 1	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'
	PC-8	3 2	5' TAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTG 3'
	PC-9	3 3	5' TTGCCATCGGATGTGCCCAGAT 3'
	PC-10	3 4	5' GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC 3'
	PC-11	3 5	5' ATCTTTTGTGTCAGCGGTCCG 3'
	PC-12	3 6	5' AAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG 3'

10

【 0 0 4 7 】

表4 肺炎桿菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
肺炎桿菌	PD-1	3 7	5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'
	PD-2	3 8	5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGA 3'
	PD-3	3 9	5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAAT 3'
	PD-4	4 0	5' TTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'
	PD-5	4 1	5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3'
	PD-6	4 2	5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'
	PD-7	4 3	5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGAT 3'
	PD-8	4 4	5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAA 3'
	PD-9	4 5	5' TTATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'
	PD-10	4 6	5' CATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTC 3'
	PD-11	4 7	5' CCTTTGTTGCCAGCGGTAGGC 3'

20

30

【 0 0 4 8 】

表5 緑膿菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
緑膿菌	PE-1	4 8	5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'
	PE-2	4 9	5' TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC 3'
	PE-3	5 0	5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'
	PE-4	5 1	5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTT 3'
	PE-5	5 2	5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'
	PE-6	5 3	5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'
	PE-7	5 4	5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'
	PE-8	5 5	5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'
	PE-9	5 6	5' TGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTAC 3'
	PE-10	5 7	5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3'

40

50

【 0 0 4 9 】

表 6 セラチア菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
セラチア菌	PF-1	5 8	5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'
	PF-2	5 9	5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'
	PF-3	6 0	5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3'
	PF-4	6 1	5' ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA 3'
	PF-5	6 2	5' TTATCCTTTGTTGCAGCTTCGGCC 3'
	PF-6	6 3	5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'
	PF-7	6 4	5' GGTAGCACAGGGAGCTTGCTC 3'
	PF-8	6 5	5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3'
	PF-9	6 6	5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3'
	PF-10	6 7	5' GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGA 3'
	PF-11	6 8	5' TTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCG 3'

10

【 0 0 5 0 】

表 7 肺炎連鎖球菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
肺炎連鎖球菌	PG-1	6 9	5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'
	PG-2	7 0	5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3'
	PG-3	7 1	5' TGAGAGTGGAAGTTACACTGTGAC 3'
	PG-4	7 2	5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3'
	PG-5	7 3	5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAGT 3'
	PG-6	7 4	5' TAGACCTTTCCGGGGTTTAGTGC 3'
	PG-7	7 5	5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3'
	PG-8	7 6	5' GACATTTGCTTAAAGGTGCACTTGCA 3'
	PG-9	7 7	5' GTTGTAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTG 3'

20

30

【 0 0 5 1 】

表 8 インフルエンザ菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
インフルエンザ 菌	PH-1	7 8	5' GCTTGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'
	PH-2	7 9	5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'
	PH-3	8 0	5' CTTGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'
	PH-4	8 1	5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'
	PH-5	8 2	5' TACAGAGGAAGCGAAGCTGCG 3'
	PH-6	8 3	5' GCGGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3'
	PH-7	8 4	5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'
	PH-8	8 5	5' TATCGGAAGATGAAAGTGCGGGACT 3'

40

【 0 0 5 2 】

表9 腸球菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
腸球菌	PI-1	8 6	5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'
	PI-2	8 7	5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3'
	PI-3	8 8	5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3'
	PI-4	8 9	5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'
	PI-5	9 0	5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'
	PI-6	9 1	5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'
	PI-7	9 2	5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'
	PI-8	9 3	5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3'
	PI-9	9 4	5' CGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTA 3'
	PI-10	9 5	5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'
	PI-11	9 6	5' GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTA 3'
	PI-12	9 7	5' AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG 3'

10

【0053】

表10 エンテロコッカス フェカリス菌株検出用プローブ

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
エンテロコッカス フェカリス菌	PJ-1	9 8	5' TTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCA 3'
	PJ-2	9 9	5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3'
	PJ-3	1 0 0	5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'
	PJ-4	1 0 1	5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'
	PJ-5	1 0 2	5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCT 3'
	PJ-6	1 0 3	5' CTCAACCGGGGAGGTCATTGG 3'
	PJ-7	1 0 4	5' TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 3'
	PJ-8	1 0 5	5' ATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAA 3'
	PJ-9	1 0 6	5' CGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCT 3'

20

30

【0054】

上記各表中に示したプローブは、DNAマイクロアレイに固定するための官能基として、合成後、定法に従って核酸の5'末端にチオール基を導入した。官能基の導入後、精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥したプローブは、-30℃の冷凍庫に保存した。

【0055】

[2. 検体増幅用PCRプライマーの準備]

上記の起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子(標的遺伝子)増幅用PCRPrimerとして以下の表11に示す核酸配列を設計した。具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分の特異的に増幅するプローブセット、つまり約1400~1700塩基長の16srRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度をできるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。なお、起炎菌の16srRNAコーディング領域に対して共通にほぼ全長を増幅できるプライマーセットであれば、下記の表11に挙げたプライマセットに限定する必要はないのは言うまでもない。

40

【0056】

表 1 1

	Primer No.	配列番号	配列
Forward Primer	F-1	107	5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
	F-2	108	5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3'
	F-3	109	5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3'
Reverse Primer	R-1	110	5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'
	R-2	111	5' ATCCAACCGCAGGTCCCCCTAC 3'
	R-3	112	5' ATCCAGCCGCAGGTCCCCCTAC 3'

10

## 【 0 0 5 7 】

表 1 1 中に示したPrimerは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製し、ForwardPrimerを3種、Reverse Primerを3種を混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10pmol/ $\mu$ lとなるようにTE緩衝液に溶解した。

## 【 0 0 5 8 】

[ 3 . 各起炎菌Genome DNA（モデル検体）の抽出 ]

[ 3-1 ] 微生物の培養 & Genome DNA 抽出の前処理

まず、上記各起炎菌の標準株（黄色ブドウ球菌標準株（ATCC12600）、表皮ブドウ球菌標準株（ATCC14990）、大腸菌標準株（ATCC11775）、肺炎桿菌標準株（ATCC13883）、緑膿菌標準株（ATCC10145）、セラチア菌株、肺炎連鎖球菌標準株、インフルエンザ菌株、腸球菌標準株（ATCC13047）、エンテロコッカス フェカリス菌標準株（ATCC19433））を定法に従って培養し、微生物培養液を生成した。これらの微生物培養液のそれぞれを1.5 ml容量のマイクロチューブに1.0ml（OD<sub>600</sub>=0.7）採取し、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。次に、上精を捨てた後、EnzymeBuffer（50mM Tris-HCl：p.H. 8.0、25mM EDTA）300 $\mu$ lを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は、再度、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。上精を捨てた後、回収された菌体に、以下の酵素溶液を加え、ミキサーを用いて再懸濁した。

20

## 【 0 0 5 9 】

Lysozyme 50  $\mu$ l （20 mg/ml in Enzyme Buffer）

N-Acetylmuramidase SG 50  $\mu$ l （0.2 mg/ml in Enzyme Buffer）。

30

## 【 0 0 6 0 】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37℃のインキュベーター内で30分間静置し、細胞壁の溶解処理を行った。

## 【 0 0 6 1 】

[ 3-2 ] Genome抽出

以下に示す微生物のGenome DNA抽出は、核酸精製キット（MagExtractor-Genome-：TOYOBO社製）を用いて行った。

## 【 0 0 6 2 】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750 $\mu$ lと磁性ビーズ40 $\mu$ lを加え、チューブミキサーを用いて、10分間激しく攪拌した（ステップ1）。次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ2）。次に、洗浄液900 $\mu$ lを加え、ミキサーで5 sec程度攪拌して再懸濁を行った（ステップ3）。次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ4）。

40

50

## 【 0 0 6 3 】

上記ステップ 3、4 を繰り返して 2 度目の洗浄を行なう（ステップ 5）。その後、70% エタノール 900  $\mu$ l を加え、ミキサーで 5sec 程度攪拌して再懸濁した（ステップ 6）。次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30 秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ 7）。

ステップ 6、7 を繰り返して 70% エタノールによる 2 度目の洗浄（ステップ 8）を行った後、回収された磁性粒子に純水 100  $\mu$ l を加え、チューブミキサーで 10 分間攪拌を行った（ステップ 9）。

次に分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30sec 静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を新しいチューブに回収した。 10

## 【 0 0 6 4 】

## [ 3-3 ] 回収した Genome D N A の検査

回収された微生物（各起炎菌株）の Genome D N A は、定法に従って、アガロース電気泳動と 260/280nm の吸光度測定を行い、その品質（低分子核酸の混入量、分解の程度）と回収量を検定した。本実施例では、それぞれの菌において、約 9 ~ 10  $\mu$ g の Genome D N A が回収され、Genome D N A のデグラデーションや r RNA の混入は認められなかった。回収した Genome D N A は、最終濃度 50ng/ $\mu$ l となるように T E 緩衝液に溶解し、以下の実施例に使用した。 20

## 【 0 0 6 5 】

## [ 4 . D N A マイクロアレイの作製 ]

D N A マイクロアレイを、特開平 1 1 - 1 8 7 9 0 0 号公報に開示された方法に従って用意した。

## [ 4-1 ] ガラス基板の洗浄

合成石英のガラス基板（サイズ：25mm  $\times$  75mm  $\times$  1mm、飯山特殊ガラス社製）を耐熱、耐アルカリのラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晚洗浄液中で浸した後、20 分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で 20 分超音波洗浄をおこなった。次に 8 0  $^{\circ}$ C に加熱した 1 N 水酸化ナトリウム水溶液中に 10 分間基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、D N A マイクロアレイ用の石英ガラス基板を用意した。 30

## 【 0 0 6 6 】

## [ 4-2 ] 表面処理

シランカップリング剤 KBM-603（信越シリコン社製）を、1% の濃度となるように純水中に溶解させ、2 時間室温で攪拌した。続いて、先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20 分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で表面を洗浄した後、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を 1 2 0  $^{\circ}$ C に加熱したオーブン中で 1 時間バークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製の N - マレイミドカプロイロキシスクシイミド（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido）（以下 E M C S と略す）を、ジメチルスルホキシドとエタノールの 1:1 混合溶媒中に最終濃度が 0.3mg/ml となるように溶解した E M C S 溶液を用意した。 40

## 【 0 0 6 7 】

バークの終了したガラス基板を放冷し、調製した E M C S 溶液中に室温で 2 時間浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基と E M C S のスクシイミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。E M C S 溶液から引き上げたガラス基板を、先述の E M C S を溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

## 【 0 0 6 8 】

## [ 4-3 ] プローブ D N A



実施例 1 で作製した微生物検出用プローブを純水に溶解し、それぞれ、最終濃度（インク溶解時） $10\ \mu\text{M}$ となるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

# 【0069】

[4-4] B J プリントによる DNA 吐出、および基板への結合

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH（川研ファインケミカル社製）1.0wt%を含む水溶液を用意した。続いて、先に用意した7種類のプローブ（表1）の夫々を上記の混合溶媒に規定濃度なるように溶解した。得られたDNA溶液をバブルジェット（登録商標）プリンタ（商品名：BJF-850 キヤノン社製）用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

# 【0070】

なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンタは平板への印刷が可能のように改造を施したものである。またこのバブルジェット（登録商標）プリンタは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約 $120\ \mu\text{m}$ ピッチでスポッティングすることが可能となっている。

# 【0071】

続いて、この改造バブルジェット（登録商標）プリンタを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、DNAマイクロアレイを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30分間加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基と核酸プローブ末端のチオール基とを反応させた。

# 【0072】

[4-5] 洗浄

30分間の反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液（pH7.0）により表面に残ったDNA溶液を洗い流し、ガラス基板表面に一本鎖DNAが固定した遺伝子チップ（DNAマイクロアレイ）を得た。

# 【0073】

[5. 検体の増幅と標識化（PCR増幅 & 蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅、および、標識化反応を以下に示す。

# 【0074】

Premix PCR 試薬(TAKARA ExTaq)	25 $\mu\text{l}$	
Template Genome DNA	2 $\mu\text{l}$	(100ng)
Forward Primer mix	2 $\mu\text{l}$	(20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 $\mu\text{l}$	(20pmol/tube each)
Cy-3 dUTP (1mM)	2 $\mu\text{l}$	(2nmol/tube)
H <sub>2</sub> O	17 $\mu\text{l}$	
Total	50 $\mu\text{l}$	

# 【0075】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

# 【0076】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	←
55°C	45 sec.	35 Cycles
72°C	45 sec.	→
72°C	10 min.	

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 7 】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて Primer を除去 (精製) した後、増幅産物の定量を行い、標識化検体とした。

## 【 0 0 7 8 】

## [ 6 . ハイブリダイゼーション ]

上述の [ 4 . DNA マイクロアレイの作製 ] で作製した遺伝子チップと [ 5 . 検体の増幅と標識化 (PCR 増幅 & 蛍光標識の取り込み) ] で作製した標識化検体を用いて検出反応を行った。

## 【 0 0 7 9 】

## [ 6-1 ] DNA マイクロアレイのブロッキング

BSA (牛血清アルブミン Fraction V: Sigma 社製) を 1wt% となるように 100mM NaCl / 10mM Phosphate Buffer に溶解し、この溶液に [ 4 . DNA マイクロアレイの作製 ] で作製した遺伝子チップを室温で 2 時間浸し、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、0.1wt% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含む 2xSSC 溶液 (NaCl 300mM、Sodium Citrate (trisodium citrate dihydrate,  $C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$ ) 30mM、pH 7.0) で洗浄を行った後、純水でリンスしてからスピンドライ装置で水切りを行った。

10

## 【 0 0 8 0 】

## [ 6-2 ] ハイブリダイゼーション

水切りした遺伝子チップをハイブリダイゼーション装置 (Genomic Solutions Inc. Hybridization Station) にセットし、以下に示すハイブリダイゼーション溶液、条件でハイブリダイゼーション反応を行った。

20

## 【 0 0 8 1 】

## [ 6-3 ] ハイブリダイゼーション溶液

6xSSPE / 10% Formamide / Target (2nd PCR Products 全量)  
(6xSSPE: NaCl 900mM、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  60mM、EDTA 6mM、pH 7.4)。

## 【 0 0 8 2 】

## [ 6-4 ] ハイブリダイゼーション条件

65 3min 92 2min 45 3hr Wash 2xSSC / 0.1% SDS at 25  
Wash 2xSSC at 20 (Rinse with  $H_2O$ : Manual) Spin dry (65 で 3  
分、92度で2分、45 で3時間ハイブリダイゼーション反応させた後、2xSSC / 0.1% SDS、  
25 で洗浄、2xSSC、20 で洗浄後、純水でリンスしスピンドライした)。

30

## 【 0 0 8 3 】

## [ 7 . 微生物の検出 (蛍光測定) ]

上記ハイブリダイゼーション反応終了後の遺伝子チップを遺伝子チップ用蛍光検出装置 (Axon 社製、GenePix 4000B) を用いて蛍光測定を行った。その結果、以下の表 1 2 ~ 2 1 に示すように、各菌において、再現性良く、十分なシグナルで各菌を検出することができた。また、他の菌のプロープに対するハイブリッド体は検出されなかった。

## 【 0 0 8 4 】

なお、本実施例では、2 回ずつ蛍光測定を実施しており、それぞれの結果を以下に示した。

40

## 【 0 0 8 5 】

表 1 2 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PA-1	5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3'	3000	42.9	2900	40.8
PA-2	5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'	7700	110.0	7700	108.5
PA-3	5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3'	6400	91.4	6400	90.1
PA-4	5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'	2500	35.7	2500	35.2
PA-5	5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'	7800	111.4	7800	109.9
PA-6	5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'	4800	68.6	4800	67.6
PA-7	5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'	4500	64.3	4300	60.6
PA-8	5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'	4800	68.6	4800	67.6
PA-9	5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'	5300	75.7	5200	73.2

10

【 0 0 8 6 】

表 1 3 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PB-1	5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'	1000	14.5	1100	15.7
PB-2	5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCCT 3'	1800	26.1	1800	25.7
PB-3	5' TAAGTAACTATGCACGCTTGACGGT 3'	1400	20.3	1400	20
PB-4	5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCC 3'	1000	14.5	1100	15.7
PB-5	5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3'	1800	26.1	2000	28.6
PB-6	5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'	1200	17.4	1300	18.6
PB-7	5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3'	1100	15.9	1100	15.7

20

【 0 0 8 7 】

表 1 4 大腸菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PC-1	5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCCA 3'	1200	17.6	1200	17.9
PC-2	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'	1500	22.1	1600	23.9
PC-3	5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCG 3'	1100	16.2	1200	17.9
PC-4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'	2000	29.4	2100	31.3
PC-5	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'	1500	22.1	1500	22.4
PC-6	5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'	2400	35.3	2600	38.8
PC-7	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'	1200	17.6	1200	17.9

40

【 0 0 8 8 】

表 1 5 肺炎桿菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PD-1	5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'	500	7.6	600	9
PD-2	5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGA 3'	600	9.1	600	9
PD-3	5' CGGGGAGGAAGGCCGATAAGGTTAAT 3'	700	10.6	700	10.4
PD-4	5' TTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'	1000	15.2	1200	17.9
PD-5	5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3'	2700	40.9	2700	40.3
PD-6	5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'	3400	51.5	3300	49.3

10

【 0 0 8 9 】

表 1 6 緑膿菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PE-1	5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'	3500	50.0	3600	50
PE-2	5' TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC 3'	1600	22.9	1400	19.4
PE-3	5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'	3500	50.0	3400	47.2
PE-4	5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTT 3'	3100	44.3	3100	43.1
PE-5	5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'	1600	22.9	1600	22.2
PE-6	5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'	1200	17.1	1200	16.7
PE-7	5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'	1000	14.3	1200	16.7
PE-8	5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'	1100	15.7	1100	15.3

20

【 0 0 9 0 】

表 1 7 セラチア菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PF-1	5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'	600	8.8	600	8.7
PF-2	5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'	700	10.3	600	8.7
PF-3	5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3'	2000	29.4	2200	31.9
PF-4	5' ACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGA 3'	2800	41.2	2700	39.1
PF-5	5' TTATCCTTTGTTGCAGCTTCGGCC 3'	700	10.3	700	10.1
PF-6	5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'	3400	50.0	3300	47.8

30

40

【 0 0 9 1 】

表18 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PG-1	5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'	1000	14.9	1100	16.2
PG-2	5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3'	1200	17.9	1300	19.1
PG-3	5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3'	1000	14.9	1100	16.2
PG-4	5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3'	1800	26.9	1900	27.9
PG-5	5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAC 3'	1300	19.4	1500	22.1
PG-6	5' TAGACCCCTTCCGGGGTTTAGTGC 3'	1300	19.4	1300	19.1
PG-7	5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3'	2000	29.9	2100	30.9

10

【 0 0 9 2 】

表19 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PH-1	5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'	3500	50.0	3600	50
PH-2	5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'	600	8.8	700	10.1
PH-3	5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'	600	8.8	600	8.7
PH-4	5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'	1100	16.2	1200	17.4
PH-5	5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'	700	10.3	600	8.7
PH-6	5' GCGGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3'	1300	19.1	1300	18.8
PH-7	5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'	2100	30.9	2200	31.9
PH-8	5' TATCGGAAGATGAAAGTGCAGGACT 3'	700	10.3	600	8.7

20

【 0 0 9 3 】

表20 腸球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PI-1	5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'	2100	29.2	2200	31
PI-2	5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3'	7900	109.7	7900	111.3
PI-3	5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3'	1000	13.9	1300	18.3
PI-4	5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'	6400	88.9	6400	90.1
PI-5	5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'	9400	130.6	9200	129.6
PI-6	5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'	4700	65.3	4800	67.6
PI-7	5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'	4600	63.9	4500	63.4

30

40

【 0 0 9 4 】

表21 エンテロコッカス フェカリス菌株検出用プローブの蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PJ-1	5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'	1500	22.1	1500	20.8
PJ-2	5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3'	2400	35.3	2700	37.5
PJ-3	5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'	5600	82.4	5600	77.8
PJ-4	5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'	2300	33.8	2300	31.9
PJ-5	5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCT 3'	1000	14.7	1400	19.4
PJ-6	5' CTCAACCGGGGAGGGTCATTGG 3'	4400	64.7	4400	61.1
PJ-7	5' TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 3'	1700	25	1800	25

10

## 【0095】

表12～21の蛍光輝度の数値（フォトマル電圧400V）は、ピクセル平均輝度（解像度5 $\mu$ m）を示した。また、S/N比は、測定機付属の解析ソフト（Axon社製、GenePixPro Ver. 3.0）で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものを示した。

## 【0096】

表12～21で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで各起炎菌を検出することができる。

20

## 【0097】

<実施例2> 2 Step PCR法を用いた微生物の検出

実施例1同様に、プローブDNA、検体増幅用PCRプライマー、各起炎菌のGenome DNA、DNAマイクロアレイを用意し、以下の実験を行った。

## 【0098】

[1. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅（1st PCR）、および、標識化（2ndPCR）反応を以下に示す。

## 【0099】

30

[2. 増幅反応液組成：1st PCR]

## 【0100】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 $\mu$ l	
Template Genome DNA	2 $\mu$ l	(10ng)
Forward Primer mix	2 $\mu$ l	(20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 $\mu$ l	(20pmol/tube each)
H <sub>2</sub> O	19 $\mu$ l	
Total	50 $\mu$ l	

40

## 【0101】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

## 【0102】

95°C 10 min.  
 92°C 45 sec. ←  
 55°C 45 sec. 25 Cycles  
 72°C 45 sec. —  
 72°C 10 min.

## 【 0 1 0 3 】

10

反応終了後、精製用カラム ( QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit ) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行った。

## 【 0 1 0 4 】

[ 3 . 標識化反応液組成 : 2nd PCR ]

## 【 0 1 0 5 】

Enzyme (QIAGEN Hotstar Taq Polymerase)	0.5 $\mu$ l	(2.5u)	
Template DNA (1st PCR Product)	10 $\mu$ l	( 30ng)	
dNTP mix (Low dTTP)*	2 $\mu$ l		
Cy-3 dUTP (1mM)	2 $\mu$ l	(2nmol/tube)	20
Reverse Primer mix	5 $\mu$ l	(50pmol/tube each)	
10 x Buffer	5 $\mu$ l		
H <sub>2</sub> O	25.5 $\mu$ l		
Total	50 $\mu$ l		

\*dNTP mix (Low dTTP) :

dATP, dCTP, dGTP / 5mM (final : 10 nmol/tube)

30

dTTP / 4mM (final : 8 nmol/tube)

## 【 0 1 0 6 】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

## 【 0 1 0 7 】

95°C 10 min.  
 92°C 45 sec. ←  
 55°C 45 sec. 25 Cycles  
 72°C 45 sec. —  
 72°C 10 min.

40

## 【 0 1 0 8 】

反応終了後、精製用カラム ( QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit ) を用いて精製し、標識化検体とした。

## 【 0 1 0 9 】

[ 4 . ハイブリダイゼーション ]

実施例 1 と同様に行った。

50

## 【 0 1 1 0 】

## [ 5 . 微生物の検出 ( 蛍光測定 ) ]

ハイブリダイゼーション反応終了後の DNA マイクロアレイを DNA マイクロアレイ用蛍光検出装置 ( Axon社製、GenePix 4000B ) を用いて蛍光測定を行った。測定結果を表 2 2 ~ 3 1 に示す。

## 【 0 1 1 1 】

なお、本実施例においても、2回ずつ蛍光測定を実施し、それぞれの結果を表 2 2 ~ 3 1 に示した。

## 【 0 1 1 2 】

表 2 2 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PA-1	5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3'	14000	186.7	13000	173.3
PA-2	5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'	36000	480	35000	466.7
PA-3	5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3'	31000	413.3	29000	386.7
PA-4	5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'	10000	133.3	10000	133.3
PA-5	5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'	39000	520	38500	513.3
PA-6	5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'	22000	293.3	22100	294.7
PA-7	5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'	22000	293.3	21800	290.7
PA-8	5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'	25000	333.3	24000	320
PA-9	5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'	26000	346.7	25500	340

10

20

## 【 0 1 1 3 】

表 2 3 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PB-1	5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'	4500	62.5	4700	67.1
PB-2	5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACT 3'	9000	125	8900	127.1
PB-3	5' TAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGT 3'	7100	98.6	7300	104.3
PB-4	5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCC 3'	4800	66.7	5200	74.3
PB-5	5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3'	9100	126.4	9300	132.9
PB-6	5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'	5800	80.6	6300	90
PB-7	5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3'	5400	75	5500	78.6

30

## 【 0 1 1 4 】



表 2 4 大腸菌の蛍光測定結果

Probe N o.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PC-1	5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'	5600	76.7	6200	83.8
PC-2	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'	7600	104.1	7500	101.4
PC-3	5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'	5600	76.7	5700	77
PC-4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'	9400	128.8	9300	125.7
PC-5	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'	7200	98.6	7200	97.3
PC-6	5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'	11500	157.5	11500	155.4
PC-7	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'	5600	76.7	5500	74.3

10

【 0 1 1 5 】

表 2 5 肺炎桿菌の蛍光測定結果

Probe N o.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PD-1	5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'	2000	28.6	2100	30
PD-2	5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGA 3'	2500	35.7	2600	37.1
PD-3	5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTAAAT 3'	2900	41.4	2900	41.4
PD-4	5' TTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'	4500	64.3	4700	67.1
PD-5	5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3'	9900	141.4	10100	144.3
PD-6	5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'	13000	185.7	13400	191.4

20

【 0 1 1 6 】

表 2 6 緑膿菌の蛍光測定結果

Probe N o.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PE-1	5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'	17000	239.4	17300	240.3
PE-2	5' TCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGC 3'	8300	116.9	8600	119.4
PE-3	5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'	17400	245.1	17000	236.1
PE-4	5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTC 3'	15000	211.3	16000	222.2
PE-5	5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'	8000	112.7	8300	115.3
PE-6	5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'	5400	76.1	5800	80.6
PE-7	5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'	5300	74.6	5100	70.8
PE-8	5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'	5400	76.1	5000	69.4

30

40

【 0 1 1 7 】

表 2 7 セラチア菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PF-1	5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'	3100	43.7	3300	45.2
PF-2	5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'	3300	46.5	3200	43.8
PF-3	5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3'	10100	142.3	10000	137
PF-4	5' ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA 3'	12000	169	11800	161.6
PF-5	5' TTATCCTTTGTTGCAGCTTCGGCC 3'	4100	57.7	4200	57.5
PF-6	5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'	14300	201.4	14300	195.9

10

【 0 1 1 8 】

表 2 8 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PG-1	5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'	4500	63.4	4300	60.6
PG-2	5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3'	5800	81.7	5600	78.9
PG-3	5' TGAGAGTGGAAGTTCACACTGTGAC 3'	5000	70.4	4900	69
PG-4	5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3'	8700	122.5	8800	123.9
PG-5	5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAGT 3'	7200	101.4	7300	102.8
PG-6	5' TAGACCCTTCCGGGGTTTAGTGC 3'	6700	94.4	7000	98.6
PG-7	5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3'	10200	143.7	9900	139.4

20

【 0 1 1 9 】

表 2 9 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PH-1	5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'	3100	44.3	3200	45.1
PH-2	5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'	3200	45.7	3200	45.1
PH-3	5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'	4900	70	5600	78.9
PH-4	5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'	3900	55.7	3800	53.5
PH-5	5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'	6700	95.7	6500	91.5
PH-6	5' GCGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3'	10200	145.7	11000	154.9
PH-7	5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'	4200	60	4100	57.7
PH-8	5' TATCGGAAGATGAAAGTGCGGGACT 3'	3200	45.7	3500	49.3

30

40

【 0 1 2 0 】

表 3 0 腸球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PI-1	5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'	10000	133.3	9900	133.8
PI-2	5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3'	38000	506.7	38000	513.5
PI-3	5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3'	4700	62.7	4700	63.5
PI-4	5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'	31000	413.3	32000	432.4
PI-5	5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'	47500	633.3	45000	608.1
PI-6	5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'	23600	314.7	24000	324.3
PI-7	5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'	21500	286.7	22700	306.8

10

## 【 0 1 2 1 】

表 3 1 エンテロコッカス フェカリス菌株検出用プローブの蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PJ-1	5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'	7000	98.6	7300	101.4
PJ-2	5' AACACGTGGGTAACTACCCATCAG 3'	12300	173.2	12000	166.7
PJ-3	5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'	25000	352.1	27400	380.6
PJ-4	5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'	10000	140.8	11000	152.8
PJ-5	5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCT 3'	5600	78.9	5200	72.2
PJ-6	5' CTCAACCGGGGAGGGTCATTGG 3'	22100	311.3	22200	308.3
PJ-7	5' TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 3'	8800	123.9	9000	125

20

## 【 0 1 2 2 】

表 2 2 ~ 3 1 の蛍光輝度の数値（フォトマル電圧400V）は、ピクセル平均輝度（解像度 5 $\mu$ m）を示した。また、S / N 比は、測定機付属の解析ソフト（Axon社製、GenePixPro Ver.3.0）で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものを示した。

30

## 【 0 1 2 3 】

表 2 2 ~ 3 1 で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで各種起炎菌を検出することができる。

## 【 0 1 2 4 】

< 実施例 3 > 2 Step PCR法を用いた微生物の検出

実施例 1、2 同様に、プローブ DNA、検体増幅用 PCR プライマー、各起炎菌の Genome DNA、DNA マイクロアレイを用意し、以下の実験を行った。

## 【 0 1 2 5 】

[ 1 . 検体の増幅と標識化（蛍光標識付き PCR プライマーの使用）]

40

検体となる微生物遺伝子の増幅（1st PCR）、および、標識化（2nd PCR）反応を以下に示す。

## 【 0 1 2 6 】

[ 2 . 増幅反応液組成 ; 1st PCR ]

## 【 0 1 2 7 】



AmpliTaQ Gold LD(5U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Template DNA	variable
dNTP mis(2.5mM/each)	4.0 $\mu$ L
x10 PCR buffer	5.0 $\mu$ L
25mM MgCl <sub>2</sub>	7.0 $\mu$ L
Forward Primer Mix(10 $\mu$ M/each)	0.25 $\mu$ L
Reverse Primer Mix(10 $\mu$ M/each)	0.25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	variable
Total	50 $\mu$ L

10

## 【 0 1 2 8 】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行なった。

## 【 0 1 2 9 】

95°C 10 min.  
 92°C 45 sec.   
 67°C 45 sec. 39 Cycles  
 72°C 45 sec.   
 72°C 10 min.

20

## 【 0 1 3 0 】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR PurificationKit) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行なった。

## 【 0 1 3 1 】

[ 3 . 標識化反応組成 : 2nd PCR ]

## 【 0 1 3 2 】

30



Premix PCR reagent(TAKARA ExTaq)	25 $\mu$ l
Template DNA (1st PCR Product)	Variable ( 30ng/tube )
Cy3 Labeled Reverse primer Mix	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Variable
Total	50 $\mu$ l

## 【 0 1 3 3 】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

40

## 【 0 1 3 4 】

95°C 10 min.  
 92°C 45 sec.   
 65°C 45 sec. 24 Cycles  
 72°C 45 sec.   
 72°C 10 min.

## 【 0 1 3 5 】

50

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR PurificationKit) を用いて精製し、標識化検体とした。

【 0 1 3 6 】

[ 4 . ハイブリダイゼーション ]

実施例 1 と同様に行った。

【 0 1 3 7 】

[ 5 . 微生物の検出 (蛍光測定) ]

ハイブリダイゼーション反応終了後の DNA マイクロアレイを DNA マイクロアレイ用蛍光検出装置 (Axon社製、GenePix 4000B) を用いて蛍光測定を行った。測定結果を表 3 2 ~ 4 1 に示す。

10

【 0 1 3 8 】

なお、本実施例においては、2 回ずつ蛍光測定を実施し、それぞれの結果を表 3 2 ~ 4 1 に示した。

【 0 1 3 9 】

表 3 2 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PA-10	5' ACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT 3'	247	3.4	146	2.1
PA-11	5' TGTCAGTTATAGATGGATCCGCGCT 3'	4177	57.9	3083	43.4
PA-12	5' TGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACG 3'	4686	64.9	3768	53.1
PA-13	5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCC 3'	2612	36.2	2709	38.2
PA-14	5' GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCC 3'	26505	367.2	17560	247.3

20

【 0 1 4 0 】

表 3 3 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PB-2	5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCAGT 3'	7000	94.1	1800	25.7
PB-4	5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3'	3274	44.0	1100	15.7
PB-8	5' AGACGAGGAGCTTGCTCCTCTG 3'	111	1.5	59	0.8
PB-9	5' AGAACAAATGTGTAAGTAACTATGCACGT 3'	6920	93.0	4910	70.1
PB-10	5' ACCATTTGGAGCTAGCCGTCGA 3'	15244	205.0	18136	259.1

30

【 0 1 4 1 】

表 3 4 大腸菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PC-4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'	5416	74.7	2100	31.3
PC-8	5' TAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTG 3'	160	2.2	112	1.7
PC-9	5' TTGCCATCGGATGTGCCAGAT 3'	4133	57.0	4581	68.4
PC-10	5' GGAAGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC 3'	4194	57.8	5349	79.8
PC-11	5' ATCTTTTGTGTCAGCGGTCCG 3'	6719	92.7	2594	38.7
PC-12	5' AAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG 3'	3984	58.6	4021	60.0

40

【 0 1 4 2 】

50

表 3 5 肺炎桿菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PD-7	5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGAT 3'	5414	40.0	4171	62.3
PD-8	5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTAA 3'	4096	30.2	6227	93.0
PD-9	5' TTATCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3'	4122	30.4	3269	48.8
PD-10	5' CATTGAACTGGCAGGCTAGAGTC 3'	9474	70.0	6486	96.9
PD-11	5' CCTTGTGTCAGCGGTTAGGC 3'	10648	78.6	2754	41.1

10

【 0 1 4 3 】

表 3 6 緑膿菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PE-1	5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 3'	6175	82.2	3600	50.0
PE-6	5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTC 3'	8159	108.6	1200	16.7
PE-7	5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'	3277	43.6	1200	16.7
PE-9	5' TGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTAC 3'	6626	88.2	7432	103.4
PE-10	5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3'	5734	76.3	3365	46.8

20

【 0 1 4 4 】

表 3 7 セラチア菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PF-7	5' GGATGACAGGGGAGCTTGCTC 3'	4482	66.4	1040	15.1
PF-8	5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3'	6362	94.2	3199	46.3
PF-9	5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3'	4569	67.7	2884	41.8
PF-10	5' GAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGA 3'	7905	117.1	6786	98.3
PF-11	5' TTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCG 3'	12787	189.4	3849	55.7

30

【 0 1 4 5 】

表 3 8 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PG-1	5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'	10078	70.3	1100	16.2
PG-5	5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAT 3'	4331	30.2	1500	22.1
PG-6	5' TAGACCCCTTTCCGGGTTTAGTGC 3'	4730	33.0	1300	19.1
PG-8	5' GACATTTGCTTAAAAGGTGCACTTGCA 3'	7128	49.7	7720	113.6
PG-9	5' GTTGTAAAGAGAAGACGAGTGTGAGAGTG 3'	6665	46.5	3297	48.5

40

【 0 1 4 6 】

表 3 9 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PH-1	5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'	11106	150.3	3600	50.0
PH-2	5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'	7056	95.5	700	10.1
PH-4	5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'	100	1.4	1200	17.4
PH-5	5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'	11237	152.1	600	8.7
PH-7	5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'	5054	68.4	2200	31.9

10

【 0 1 4 7 】

表 4 0 腸球菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PI-8	5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3'	2221	30.1	582	8.2
PI-9	5' CGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTA 3'	5484	74.2	2193	30.9
PI-10	5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'	3325	45.0	646	9.1
PI-11	5' GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG 3'	7574	102.5	3039	42.8
PI-12	5' AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG 3'	5768	78.0	5701	80.3

20

【 0 1 4 8 】

表 4 1 エンテロコッカス フェカリス菌の蛍光測定結果

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
PJ-1	5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'	1012	14.9	1500	20.8
PJ-3	5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'	4266	62.6	5600	77.8
PJ-5	5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCT 3'	652	9.6	1400	19.4
PJ-8	5' ATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAA 3'	3232	47.5	810	11.2
PJ-9	5' CGAGGTCATGCAATCTCTTAAAGCTTCT 3'	11411	167.6	18776	260.7

30

【 0 1 4 9 】

表 2 2 ~ 3 1 で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで各種起炎菌を検出することができる。

【 0 1 5 0 】

以上説明したように、上記実施例によれば、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、腸球菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌の 10 種菌を検出可能なプローブセットをそれぞれ別々に、或いは組み合わせて固定したマクロアレイを用いて、感染症起炎菌を同定することが可能になり、微生物由来の DNA プローブの問題を解決した。すなわち、オリゴヌクレオチドプローブは、その塩基数の少なさゆえに、化学的に大量合成が可能であり、精製や濃度のコントロールが可能である。また、細菌の種による分類を目的に、同じ種の菌種は一括検出が可能で、しかも、他の種の細菌は区別して検出できるようなプローブセットが提供できた。

40

【 0 1 5 1 】

また、これらの差異が DNA マイクロアレイ上で精度良く評価できるよう、プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することができる。さらにはこれらのプローブ DNA と検体との反応を行なう為に、これらのプローブ DNA が

50

固定された担体を提供することができる。このプローブ及びプローブセットと検体溶液とを反応せしめる過程で、これらのプローブDNAが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することができる。

【0152】

また、上記実施形態によれば、感染症起炎菌遺伝子の16s rRNA遺伝子配列を過不足なく検出することにより、該感染症起炎菌の存在を効率良く、また高い精度で判定することができる。

【0153】

<実施例4> プライマーセットについて

上記実施例において、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター・クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数の16s rRNA遺伝子配列を増幅するのに用いられたプライマーセット(表11)を説明する。

【0154】

本実施形態のプライマーセットは、感染症起炎菌同定のために行なわれるPCR反応において良好な増幅結果を与えるように設計されている。ここで「良好な」とは、目的の16s rRNAが十分増幅されていることのみならず、16s rRNA以外の産物が無いことを意味する。

【0155】

また、ここで「良好な」とは、検体中に含まれる検体由来のヒトゲノム遺伝子を増幅せずに、感染症起炎菌16srRNAのみを増幅することをも意味する。

【0156】

本実施形態に用いられる検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、喀痰、胃液、膈分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等、細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような自然環境中の水、空気清浄機や浄水器のフィルタ等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象となり得る。

【0157】

また、本実施形態に用いられるPCR反応とは、抽出した核酸そのものを鋳型として用いたPCR反応、或いは該PCR増幅物を鋳型として、さらに配列番号107~109(表11のF1~F3)、或いは配列番号110~112(表11のR1~R3)の片側のプライマーを用いた非対称PCR反応、可視化のために標識物を取り込ませるPCR法等いずれの反応をも含む。

【0158】

[1. 検体増幅用PCR Primerの準備]

起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子(標的遺伝子)増幅用PCR Primerとして表11に示す核酸配列を設計した。

【0159】

具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1500塩基長の16srRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度をできるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。

【0160】

表11中に示したプライマーは、合成後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製され、3種のForward Primerと3種のReverse Primerの全てを混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10 pmol/μlとなるようにTE緩衝液に溶解した。なお、本実施例では全てのForward PrimerとReverse Primerを用いたが、Forward PrimerとReverse Primerの夫々から1~3種類ずつを用いるようにしてもよい。

【0161】

10

20

30

40

50



以上により生成したForward PrimerとReverse Primerの溶液 (ForwardPrimer mix及びReverse Primer mix) を用いて、[ 3 . 各起炎菌Genome DNA (モデル検体) の抽出 ] で説明した方法で抽出したGenome DNAを、[ 5 . 検体の増幅と標識化 (PCR増幅 & 蛍光標識の取り込み) ] で説明した手法により増幅する。

【 0 1 6 2 】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いてPrimerを除去した後、増幅産物をゲル電気泳動により検討した。1500塩基対領域に1バンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物はなかった。

【 0 1 6 3 】

なお、表11のプライマーを用いることにより、例えば上述した10種の感染症起炎菌 (黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、腸球菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌) の全てにおいて、良好なPCR増幅の増幅結果を得ることができた。

【 0 1 6 4 】

< 実施例5 > 血液と菌液の混合物からの16sRNA遺伝子の増幅

ヒトの血液200 $\mu$ l (採血EDTA血) に実施例1で説明し手順で培養した腸球菌を10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>加え、菌血症モデル系とした。この溶液のそれぞれにN-アセチルムラミダーゼ溶液 (0.2mg/ml in Enzyme Buffer) を加え、37<sup>°</sup>C 30分加温した後、Qiaamp Blood mini Kit (キアゲン社製) を用いてDNAを抽出し、PCR反応用のテンプレートとした。

【 0 1 6 5 】

これらのDNAに対して実施例4と同様、表11のプライマーセットを用いてPCR反応を行った。

【 0 1 6 6 】

その結果、実施例4と同様、1500塩基対長領域にバンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物はなく、そのバンドから求めたPCR増幅産物の量は、加えた菌量に比例していた。このことは、このプライマーセットを用いた際に、ヒトゲノムのPCR産物はなく、腸球菌の16sRNAのみが増幅されたことを示している。

【 0 1 6 7 】

以上説明したように、本実施形態によれば、複数種類の感染症起炎菌の遺伝子中の16srRNA部分を効率良く、また高い純度で増幅することができる。また、ヒトゲノムDNA存在時においても感染症起炎菌の16srRNAのみを効率よく増幅することができる。

【 配列表 】

2004313181000001.app

10

20

30

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	Z N A A

(31)優先権主張番号 特願2003-99456(P2003-99456)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99457(P2003-99457)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99458(P2003-99458)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99459(P2003-99459)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99460(P2003-99460)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99461(P2003-99461)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99462(P2003-99462)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2003-99463(P2003-99463)

(32)優先日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(72)発明者 川口 正浩

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 鈴木 智博

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 吉井 裕人

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 石井 美絵

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 塚田 護

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 小倉 真哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 福井 寿文

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 HA08 HA12 HA14 HA19

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12

4B063 QA01 QA18 QA20 QQ06 QQ43 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62

QR66 QR82 QS12 QS25 QS34 QS36 QX02