



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202204635 A

(43) 公開日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 01 日

(21) 申請案號：110111989

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 31 日

(51) Int. Cl. :

*C12Q1/68 (2018.01)**C12Q1/686 (2018.01)**C12Q1/689 (2018.01)**C12Q1/6837 (2018.01)**C12N15/09 (2006.01)**C12N15/11 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12N1/21 (2006.01)*

(30) 優先權：2020/03/31 日本

2020-062646

(71) 申請人：日商電化股份有限公司 (日本) DENKA COMPANY LIMITED (JP)

日本

學校法人東邦大學 (日本) TOHO UNIVERSITY (JP)

日本

(72) 發明人：館田一博 TATEDA, KAZUHIRO (JP)；宮武佑弥 MIYATAKE, YUYA (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：10 共 49 頁

(54) 名稱

銀色葡萄球菌之檢測用之引子組及探針

(57) 摘要

本發明提供一種引子組，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌(*Staphylococcus argenteus*)之存在，且包含以銀色葡萄球菌之 *nuc* 基因為靶之第一引子及第二引子。



202204635

【發明摘要】

【中文發明名稱】

銀色葡萄球菌之檢測用之引子組及探針

【中文】

本發明提供一種引子組，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌 (Staphylococcus argenteus) 之存在，且包含以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第一引子及第二引子。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

銀色葡萄球菌之檢測用之引子組及探針

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用以檢測銀色葡萄球菌(*Staphylococcus argenteus*)之存在之引子組及探針等。

【先前技術】

【0002】 作為感染症致病菌之檢測方法，已知有培養鑑定法及基因法等，上述培養鑑定法係將致病菌分離培養，根據其生物化學性狀鑑定細菌，上述基因法係藉由PCR(Polymerase chain reaction，聚合酶鏈反應)法等基因法擴增致病菌特異性基因來進行檢測。

【0003】 銀色葡萄球菌係頻度較低但偶爾於血液等檢體中觀測到之菌種。其臨床意義尚不明確。然而，若藉由即時PCR等基因法測定銀色葡萄球菌，則存在容易將其錯誤鑑定為引起食物中毒之金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之類的其他葡萄球菌屬菌種之問題(專利文獻1、2)。

先前技術文獻

專利文獻

【0004】 專利文獻1：日本專利特開2017-163969號公報

專利文獻2：日本專利特開2017-163970號公報

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0005】 鑒於上述情況，本發明之目的在於提供一種用以檢測銀色

葡萄球菌之存在之引子組及探針等。

[解決問題之技術手段]

【0006】 本發明人等藉由著眼於銀色葡萄球菌之nuc(耐熱性核酸酶)基因之序列，發現了能夠將先前多顯示假陰性結果之銀色葡萄球菌與其他葡萄球菌屬菌種加以鑑別之序列，從而完成了本發明。

【0007】 即，本案包含以下發明。

[1]一種引子組，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌(*Staphylococcus argenteus*)之存在，且

包含以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第一引子及第二引子。

[2]如[1]所記載之引子組，其中nuc基因具有序列編號3或4所示之鹼基序列，或者具有序列編號3或4之任一者所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列，且編碼TNase。

[3]如[1]或[2]所記載之引子組，其中作為靶之nuc基因具有包含序列編號3或4所示之鹼基序列之217位至331位之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列。

[4]如[1]至[3]中任一項所記載之引子組，其中第一引子具有序列編號9所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號9所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號9所記載之鹼基序列相同之功能。

[5]如[1]至[4]中任一項所記載之引子組，其中第二引子具有序列編號10所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號10所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號10所記載之鹼基序列相同之功能。

[6]如[1]至[5]中任一項所記載之引子組，其進而包含以施韋策葡萄球菌(*Staphylococcus schweitzeri*)之nuc基因為靶之第三引子。

[7]如[1]至[6]中任一項所記載之引子組，其中第三引子具有序列編號11所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號11所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號11所記載之鹼基序列相同之功能。

[8]如[1]至[7]中任一項所記載之引子組，其進而包含以金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之nuc基因為靶之第四引子及第五引子。

[9]如[1]至[8]中任一項所記載之引子組，其中第四引子具有序列編號6所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號6所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號6所記載之鹼基序列相同之功能。

[10]如[1]至[9]中任一項所記載之引子組，其中第五引子具有序列編號7所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號7所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號7所記載之鹼基序列相同之功能。

[11]如[1]至[10]中任一項所記載之引子組，其中引子經生物素標記。

[12]一種探針，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在，且以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶。

[13]如[12]所記載之探針，其中nuc基因具有序列編號3或4所示之鹼基序列，或者具有序列編號3或4所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列，且編碼Nuc蛋白質。

[14]如[12]或[13]所記載之探針，其中作為靶之nuc基因具有包含序列

編號3或4所示之鹼基序列之217位至331位之鹼基序列中之至少8個連續鹼基的鹼基序列。

[15]如[12]至[14]中任一項所記載之探針，其具有序列編號12所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號12所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號12所記載之鹼基序列相同之功能。

[16]一種套組，其包含如[1]至[11]中任一項所記載之引子組及如[12]至[15]中任一項所記載之探針。

[17]如[16]所記載之套組，其進而包含以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之探針。

[18]如[17]所記載之套組，其中以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之探針具有序列編號8所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號8所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少8個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號8所記載之鹼基序列相同之功能。

[19]一種方法，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在，且使用如[1]至[11]中任一項所記載之引子組。

[20]如[19]所記載之方法，其包括如下步驟：使用第一、第二及第三引子來鑑別銀色葡萄球菌與施韋策葡萄球菌或其以外之葡萄球菌屬細菌。

[21]如[19]或[20]所記載之方法，其進而使用如[12]至[15]中任一項所記載之探針。

[22]如[19]至[21]中任一項所記載之方法，其中其以外之葡萄球菌屬細菌為金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或凝固酶陰性葡萄球菌屬

細菌。

[23]如[19]至[22]中任一項所記載之方法，其中凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌為選自由如下葡萄球菌所組成之群中之1種或2種以上：表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、耳葡萄球菌(*Staphylococcus auricularis*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、調料葡萄球菌(*Staphylococcus condimentii*)、*Staphylococcus debuckii*、馬賽葡萄球菌(*Staphylococcus massiliensis*)、魚醃酵葡萄球菌(*Staphylococcus piscifermentans*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*)、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)、溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)、德氏葡萄球菌(*Staphylococcus devriesei*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、豬葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)、阿根提葡萄球菌(*Staphylococcus agnetis*)、產色葡萄球菌(*Staphylococcus chromogenes*)、*Staphylococcus cornubiensis*、貓葡萄球菌(*Staphylococcus felis*)、海豚葡萄球菌(*Staphylococcus delphini*)、中間葡萄球菌(*Staphylococcus intermedius*)、水獺葡萄球菌(*Staphylococcus lutrae*)、田鼠葡萄球菌(*Staphylococcus microti*)、蠅葡萄球菌(*Staphylococcus muscae*)、假中間葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*)、豬鼻葡萄球菌(*Staphylococcus rostri*)、施氏葡萄球菌(*Staphylococcus schleiferi*)、路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、阿爾萊特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)、*Staphylococcus caeli*、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、馬胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、雞葡

萄球菌(*Staphylococcus gallinarum*)、克氏葡萄球菌(*Staphylococcus kloosii*)、李氏葡萄球菌(*Staphylococcus leei*)、尼泊爾葡萄球菌(*Staphylococcus nepalensis*)、琥珀葡萄球菌(*Staphylococcus succinus*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)、福氏葡萄球菌(*Staphylococcus fleurettii*)、緩慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*)、斯氏葡萄球菌(*Staphylococcus stepanovicii*)、小牛葡萄球菌(*Staphylococcus vitulinus*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)及沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)。

[24]如[23]所記載之方法，其中其以外之葡萄球菌屬細菌為金黃色葡萄球菌，且上述方法進而使用以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之第四引子、第五引子及/或探針。

[發明之效果]

【0008】 根據本發明之引子及/或探針，能夠較先前高精度地將容易被錯誤鑑定之銀色葡萄球菌與其他葡萄球菌屬細菌加以鑑別。

【圖式簡單說明】

【0009】 圖1表示金黃色葡萄球菌之NCTC13626株、AR221株之nuc基因(序列編號1、2)、銀色葡萄球菌之NCTC13711株、XNO106株之nuc基因(序列編號3、4)、施韋策葡萄球菌FSCB5株之nuc基因(序列編號5)的多重序列比對結果。

圖2表示使用序列編號6、7之引子組所得之擴增產物之增殖曲線之結果。實線表示金黃色葡萄球菌JCM5676株之結果，虛線表示銀色葡萄球菌JCM31982株之結果。

圖3表示使用序列編號9、10、11之引子組所得之擴增產物之增殖曲線之結果。實線表示金黃色葡萄球菌JCM5676株之結果，虛線表示銀色葡萄球菌JCM31982株之結果。

圖4表示使用以金黃色葡萄球菌及銀色葡萄球菌之基因組DNA為對象之DNA探針的基板上之檢測結果。縱軸表示 π Code中測得之螢光強度。

圖5表示使用以臨床檢體為對象之DNA探針的基板上之檢測結果。縱軸表示 π Code中測得之螢光強度。

圖6表示使用序列編號6、7、9、10、11之引子組所得之擴增產物之增殖曲線之結果。

圖7表示使用序列編號13、14之引子組所得之擴增產物之增殖曲線之結果。

圖8表示使用序列編號6、7、9、10、11之引子組時PCR產物之熱熔解曲線分析結果。

圖9表示使用序列編號13、14之引子組時PCR產物之熱熔解曲線分析結果。

圖10表示使用序列編號6、7、9、10、11之引子組及序列編號13、14之引子組的金黃色葡萄球菌及銀色葡萄球菌之基因組DNA於基板上之檢測結果。縱軸表示 π Code中測得之螢光強度。

【實施方式】

【0010】 以下，對本發明之實施方式(以下，稱為「本實施方式」)進行說明，但本發明之範圍並不限定於以下之實施方式來解釋。

【0011】 (引子組)

於第一態樣中，提供一種用以檢測檢體中銀色葡萄球菌

(*Staphylococcus argenteus*)之存在之引子組。引子組包含以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第一引子及第二引子。

【0012】 已知葡萄球菌屬細菌中之nuc基因編碼葡萄球菌屬中之金黃色葡萄球菌所特有之熱穩定性核酸酶即TNase，適合作為基因法中之靶基因(Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1654-1660, 1992.)。

【0013】 檢體並無特別限定，只要為懷疑存在包含銀色葡萄球菌之葡萄球菌屬菌種者即可，可例舉：源自人類或非人類之血液、血清、血漿、尿液、糞便、唾液、痰、組織液、腦脊液、拭液等體液等或其等之稀釋物等，較佳為血液、血清、血漿、尿液、糞便、腦脊液或其等之稀釋物。檢體亦可為食品。

【0014】 作為銀色葡萄球菌之nuc基因之例，可例舉如下者：具有序列編號3或4所示之鹼基序列，或者具有序列編號3或4所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列，且編碼TNase。

【0015】 例如，作為正向引子之第一引子只要為可於嚴格條件下與序列編號3或4所示之鹼基序列、或者序列編號3或4所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列雜交者即可，可具有任一序列。

【0016】 同樣地，作為反向引子之第二引子只要為可於嚴格條件下與序列編號3或4所示之鹼基序列之互補鏈、或者序列編號3或4所示之鹼基序列之互補鏈中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列雜交者即可，可具有任一序列。

【0017】 於在本說明書中使用之情形時，「嚴格條件」意指所謂形成

特異性雜種且不形成非特異性雜種之條件，例如可根據鹼基序列之長度等資訊適當決定。例如，嚴格條件可參照分子選殖(Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)進行設定。嚴格條件亦可謂為如下條件：同源性(較佳為同一性)較高之聚核苷酸彼此雜交，例如具有70%以上、較佳為80%以上、更佳為90%以上、進而更佳為95%以上、特佳為99%以上之同源性之聚核苷酸彼此雜交，且顯示低於其之同源性之聚核苷酸彼此不雜交。

【0018】 具體之嚴格條件為如下條件：於雜交液(50%甲醯胺，10×SSC(0.15 M之NaCl，15 mM之檸檬酸鈉，pH7.0)，5×Denhart溶液，1%SDS(Sodium Dodecyl Sulfate，十二烷基硫酸鈉)，10%硫酸葡聚糖，10 μg/ml之改性大馬哈魚精子DNA及50 mM之磷酸緩衝液(pH7.5))中，將與所需鹼基序列互補之鹼基序列及懷疑存在銀色葡萄球菌之檢體於約42°C～約50°C下進行培養，然後使用0.1×SSC、0.1%SDS於約65°C～約70°C下洗淨。

【0019】 引子、探針係以不與其他近緣種之序列產生交叉反應之方式進行設計，可根據用於檢測擴增產物等之系統或其他條件適當變更。於生成長度為100～200個鹼基之擴增產物之情形時，例如，較佳為將序列編號3或4所示之鹼基序列之217位至331位之鹼基序列作為靶。引子及探針係以具有包含構成此種靶之鹼基序列中之至少10個連續鹼基之鹼基序列的方式進行設計。較佳為以於引子之末端、尤其是3'末端存在與除銀色葡萄球菌以外之葡萄球菌細菌之失配的方式進行設計。

【0020】 作為以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第一引子之例，可例舉如下者：具有以下之序列編號9所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號9所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基

序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號9所記載之鹼基序列相同之功能。

5'-GGTGAACACCCTGGTCTC-3'(序列編號9)

【0021】 作為以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第二引子之例，可例舉如下者：具有以下之序列編號10所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號10所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號10所記載之鹼基序列相同之功能。

5'-GATATTCCGGCCCCATAATG-3'(序列編號10)

【0022】 第一及第二引子之長度任意，例如可於約10個鹼基～約35個鹼基之範圍內適當設定，較佳為至少10個鹼基以上。

【0023】 第一引子與第二引子之比率並無特別限定，可相同，亦可互不相同。於引子組用於非對稱PCR法之情形時，可調整為一引子之濃度高於另一引子之濃度。

【0024】 葡萄球菌屬細菌分為凝固酶陽性者及凝固酶陰性者，例如，銀色葡萄球菌為凝固酶陽性。凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌(CNS)中存在表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)這一臨床材料中頻繁出現之葡萄球菌屬細菌，從而銀色葡萄球菌亦必須與此種凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌加以鑑別。凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌中不存在nuc基因片段，因此適合鑑別。

【0025】 以序列編號10之鹼基序列為基礎之引子亦能用作用以檢測施韋策葡萄球菌(*Staphylococcus schweitzeri*)之存在的正向引子。已知為凝固酶陽性之施韋策葡萄球菌為金黃色葡萄球菌之近緣種，但序列上更接

近銀色葡萄球菌。

【0026】 第一及第二引子可特異性地擴增銀色葡萄球菌之nuc基因之全部或一部分區域，藉此，能夠與其他葡萄球菌屬菌種加以鑑別。或者，利用熔解曲線分析第一及第二引子之擴增產物，將其熔解溫度與藉由其他引子組所得之擴增產物之熔解溫度進行比較，藉此亦可區別銀色葡萄球菌與其他葡萄球菌菌種。

【0027】 第一及第二引子可特異性地擴增銀色葡萄球菌之nuc基因之一部分區域，藉此，能夠與其他葡萄球菌屬菌種加以鑑別。作為其他葡萄球菌屬菌種，有金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌等。

【0028】 葡萄球菌屬(genus *Staphylococcus*)目前分為36個菌種、19個亞種，於自然界中廣泛分佈於包含人類、家畜之哺乳動物、鳥類。作為金黃色葡萄球菌而廣為人知之*Streptococcus aureus*於葡萄球菌屬中病原性最高，會引起人類之化膿性疾病或葡萄球菌食物中毒。金黃色葡萄球菌為凝固酶陽性。

【0029】 凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌並無特別限定，包含耳葡萄球菌(*Staphylococcus auricularis*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、調料葡萄球菌(*Staphylococcus condimentii*)、*Staphylococcus debuckii*、馬賽葡萄球菌(*Staphylococcus massiliensis*)、魚醃酵葡萄球菌(*Staphylococcus piscifermentans*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*)、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)、溶血葡萄球菌(*Staphylococcus*

haemolyticus)、德氏葡萄球菌(*Staphylococcus devriesei*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、豬葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)、阿根廷葡萄球菌(*Staphylococcus agnetis*)、產色葡萄球菌(*Staphylococcus chromogenes*)、*Staphylococcus cornubiensis*、貓葡萄球菌(*Staphylococcus felis*)、海豚葡萄球菌(*Staphylococcus delphini*)、中間葡萄球菌(*Staphylococcus intermedius*)、水獺葡萄球菌(*Staphylococcus lutrae*)、田鼠葡萄球菌(*Staphylococcus microti*)、蠅葡萄球菌(*Staphylococcus muscae*)、假中間葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*)、豬鼻葡萄球菌(*Staphylococcus rostri*)、施氏葡萄球菌(*Staphylococcus schleiferi*)、路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、阿爾萊特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)、*Staphylococcus caeli*、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、馬胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、雞葡萄球菌(*Staphylococcus gallinarum*)、克氏葡萄球菌(*Staphylococcus kloosii*)、李氏葡萄球菌(*Staphylococcus leei*)、尼泊爾葡萄球菌(*Staphylococcus nepalensis*)、琥珀葡萄球菌(*Staphylococcus succinus*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)、福氏葡萄球菌(*Staphylococcus fleurettii*)、緩慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*)、斯氏葡萄球菌(*Staphylococcus stepanovicii*)、小牛葡萄球菌(*Staphylococcus vitulinus*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)、沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)等。

【0030】引子組可包含除第一及第二引子以外之引子，例如第三、第四、第五、第六等追加之引子。藉由使用適當之追加引子，能夠提高檢測

感度。作為此種引子，例如設想用於檢測預測包含於檢體中之銀色葡萄球菌或其他葡萄球菌屬菌種之引子等。作為其他葡萄球菌屬菌種，可例舉施韋策葡萄球菌。

【0031】 作為用以檢測施韋策葡萄球菌之正向引子，有上述序列編號10所記載者，作為反向引子，可例舉如下者：具有序列編號11所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號11所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號11所記載之鹼基序列相同之功能。

【0032】 藉由使用上述引子之核酸擴增反應，可檢測檢體所含之銀色葡萄球菌之存在，進而可與其他葡萄球菌屬細菌加以鑑別。例如，藉由使用以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之第四引子及第五引子，可提高鑑別之精度。

【0033】 作為第四引子之例，可例舉如下者：具有序列編號6所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號6所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號6所記載之鹼基序列相同之功能。

【0034】 作為第五引子之例，可例舉如下者：具有序列編號7所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號7所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號7所記載之鹼基序列相同之功能。

【0035】 作為核酸擴增法，有PCR法，可例舉：多重PCR、LAMP(Loop-mediated isothermal AMPlification，環介導等溫擴增)法、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic

acids, 等溫嵌合引子起始核酸擴增)法、RCA(Rolling Circle Amplification, 滾環擴增)法、LCR(Ligase Chain Reaction, 連接酶鏈反應)法、SDA(Strand Displacement Amplification, 鏈替代擴增)法等。於預測檢體中包含大量葡萄球菌屬細菌之情形時, 較佳為能夠綜合性地同時檢測複數種菌之多重PCR。

【0036】 擴增產物之檢測方法可藉由使用聚丙烯醯胺或瓊脂糖凝膠之電泳法等已知之方法進行。例如, 於電泳中, 可根據擴增產物之移動率相對於分子量已知之標記物之移動率的比率, 鑑定擴增產物之存在。

【0037】 核酸擴增反應後之擴增產物可利用能夠特異性地識別擴增產物之標記物進行檢測。作為此種標記物, 可例舉: 螢光色素、生物素、地高辛等。於使用螢光作為標記物之情形時, 可使用螢光顯微鏡、螢光讀板儀等檢測該螢光。

【0038】 (探針)

於第二態樣中, 提供一種用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在的探針。探針可以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶。

【0039】 探針較佳為以其內部包含與除銀色葡萄球菌以外之葡萄球菌屬細菌之失配的方式設計。藉此, 雜交時全匹配部分之鹼基長度變短, 能夠提高特異性, 能夠降低假陽性。

【0040】 作為銀色葡萄球菌或施韋策葡萄球菌用探針之例, 可例舉如下者: 具有以下之序列編號12所記載之鹼基序列, 或者具有包含序列編號12所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少8個連續鹼基的鹼基序列, 且具有與序列編號12所記載之鹼基序列相同之功能。5'-CATATTTTCAACGCCT-3'(序列編號12)

【0041】亦可組合除銀色葡萄球菌或施韋策葡萄球菌以外之葡萄球菌屬細菌用探針。作為金黃色葡萄球菌用探針之例，可例舉如下者：具有以下之序列編號8所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號18所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少50個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號8所記載之鹼基序列相同之功能。

【0042】探針可與珠粒等固相體結合。作為此種固相體之例，可例舉適合多重分析之珠粒，例如WO2018052464A1所揭示之具有用以記憶關於多重分析之資訊之固有模擬編碼識別碼的珠粒。

【0043】(套組)

於第三態樣中，提供一種套組，其包含用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在的引子組、及用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在的探針。

【0044】套組中可包含用於檢測銀色葡萄球菌之試劑，例如用以進行擴增反應之試劑。進行擴增反應之試劑例如包含緩衝液、鹽類、引子、脫氧核糖核苷酸類、耐熱性DNA聚合酶等。關於套組之內容物或試劑，業者可根據擴增方法適當決定，套組可進而包含使用引子所得之擴增產物、或用以與探針雜交之固相體。

【0045】套組可進而包含用以檢測預測包含於檢體中之金黃色葡萄球菌或表皮葡萄球菌、或者其他葡萄球菌菌種的引子或探針。作為用以檢測金黃色葡萄球菌之引子、探針之例，可例舉：具有序列編號6及7所示之鹼基序列之引子、具有序列編號8所示之鹼基序列之探針。

【0046】(檢測方法)

於第四態樣中，提供一種用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在之方

法。銀色葡萄球菌之存在可使用上述引子組及/或探針進行檢測。

【0047】藉由使用序列編號9及10之引子組，能夠自金黃色葡萄球菌或其他葡萄球菌屬細菌鑑別出銀色葡萄球菌。藉由組合序列編號10之反向引子與序列編號11之正向引子，亦可檢測施韋策葡萄球菌之存在。

【0048】藉由進而對檢體進行ANI(Average Nucleotide Identity，平均核苷酸同一性)分析，可判斷經檢測之細菌之異同。

【0049】以下舉出實施例更具體地說明本發明，但本發明並不限定於該等。

實施例

【0050】實施例1：使用以金黃色葡萄球菌、銀色葡萄球菌之基因組DNA為對象之DNA探針，於基板上進行檢測

【0051】引子、探針之設計

根據圖1所示之金黃色葡萄球菌之NCTC13626株、AR221株之nuc基因(序列編號1、2)、銀色葡萄球菌之NCTC13711株、XNO106株之nuc基因(序列編號3、4)、施韋策葡萄球菌之FSCB5株之nuc基因(序列編號5)多重序列比對之結果，設計序列編號6~12之引子、探針。

[表1]

序列編號6：金黃色葡萄球菌引子	GGTGAACACCCTGGTTTC
序列編號7：金黃色葡萄球菌引子	CGATATTCCGGCCCCATG
序列編號8：金黃色葡萄球菌探針	GTTGCAGCAGTTTGAG
序列編號9：銀色葡萄球菌引子	GGTGAACACCCTGGTCTC
序列編號10：銀色葡萄球菌/施韋策葡萄球菌引子	GATATTCCGGCCCCATAATG
序列編號11：施韋策葡萄球菌引子	GAAGTGCAGCATTTTG
序列編號12：銀色葡萄球菌/施韋策葡萄球菌探針	GAAGTGCAGCATTTTG

【0052】核酸擴增之確認

以自金黃色葡萄球菌JCM5676株、銀色葡萄球菌JCM31982株提取之

基因組DNA為模板，使用序列編號6、7之引子或9、10、11之引子，藉由即時PCR進行擴增。用於擴增之試劑使用TaKaRa多重分析套組Ver.2(塔卡拉生物公司)，嵌入染料使用EvaGreen(biotium公司)。各引子以最終濃度成為0.2 μ M之方式添加，模板之基因組DNA以成為10 μ g/L之方式添加，TaKaRa多重分析套組Ver.2內之2 \times 反應緩衝液使用1 \times ，多重酶混合物使用1U，將模板DNA等混合來製備PCR反應液。測定裝置使用Light Cycler 480 System II(Roche Diagnostics公司)。

【0053】 使用之擴增反應條件如下所述。

94 $^{\circ}$ C：30秒

60 $^{\circ}$ C：60秒->94 $^{\circ}$ C：30秒(循環數45次)

72 $^{\circ}$ C：600秒

【0054】 將使用序列編號6、7之引子時之測定結果示於圖2，將使用序列編號9、10、11之引子時之測定結果示於圖3。關於序列編號6、7之引子組，僅於金黃色葡萄球菌JCM5676株中確認到擴增，相對於此，關於序列編號9、10、11之引子組，僅於銀色葡萄球菌JCM31982株中確認到擴增。根據以上結果可知，序列編號6、7之引子組及9、10、11之引子組均具有使作為靶之核酸成分擴增之功能。

【0055】 核酸擴增及檢測

使用金黃色葡萄球菌JCM5676株、銀色葡萄球菌JCM31982株，使用序列編號6、7、9、10、11之引子組，進行利用PCR之擴增、以及基板上之雜交反應及標記化、螢光測定。此時，使用於序列編號7及11之5'末端經由連接子進行生物素修飾之引子。

【0056】 擴增中使用TaKaRa多重分析套組Ver.2(塔卡拉生物公司)。

各引子以最終濃度成為0.2 μM 之方式添加，模板之基因組DNA以成為10 $\mu\text{g/L}$ 之方式添加，TaKaRa多重分析套組Ver.2內之2 \times 反應緩衝液使用1 \times ，多重酶混合物使用1U，將模板DNA等混合來製備PCR反應液。核酸擴增裝置使用T100 Thermal Cycler(Bio-Rad公司)。擴增反應結束後，於供於基板上之雜交反應之前，藉由該機器進行熱改性反應。

【0057】 關於基板上之雜交反應所使用之試劑，將包含固定有序列編號8之探針之基板1及固定有序列編號12之探針之基板2的溶液、鹽水磷酸鈉EDTA緩衝液(SSPE緩衝液)、實施了熱改性之PCR反應液加以混合。

【0058】 標記化中使用鏈黴親和素-藻紅蛋白(PlexBio公司)作為試劑。關於基板上之雜交反應及標記化，機器使用IntelliPlex 1000 π Code Processor(PlexBio公司)。

【0059】 螢光測定裝置使用PlexBio(註冊商標)100螢光分析儀(PlexBio公司)。

【0060】 使用之反應條件如下所述。

擴增反應條件

94 $^{\circ}\text{C}$ ：30秒

60 $^{\circ}\text{C}$ ：60秒->94 $^{\circ}\text{C}$ ：30秒(循環數30次)

72 $^{\circ}\text{C}$ ：600秒

【0061】 熱改性條件

95 $^{\circ}\text{C}$ ：5分鐘->急冷至4 $^{\circ}\text{C}$

【0062】 雜交條件

37 $^{\circ}\text{C}$ ：培養20分鐘

【0063】 標記化條件

37°C：培養10分鐘

【0064】 將測定結果示於圖4。於將金黃色葡萄球菌JCM5676株作為模板之情形時，於基板1中觀測到螢光，又，於將銀色葡萄球菌JCM31982株作為模板之情形時，於基板2中觀測到螢光。又，作為陰性對照，將水作為模板，於此情形時未觀測到螢光。根據以上結果，藉由使用序列編號6、7、9、10、11之引子以及序列編號8及序列編號12之探針，可期待能夠將先前無法鑑別之金黃色葡萄球菌與銀色葡萄球菌加以鑑別。又，可確認到，即便使序列編號6、7、9、10、11之引子組共存於同一系統中亦發揮功能。

【0065】 實施例2：使用以3種臨床檢體(血液培養液)為對象之DNA探針，於基板上進行檢測

【0066】 核酸擴增及檢測

於培養鑑定法中，對於鑑定為金黃色葡萄球菌之檢體1及2、鑑定為表皮葡萄球菌之檢體3，使用QIAamp BiOstic Bacteremia DNA套組(QIAGEN公司)，將根據試劑附帶之標準方案提取之基因組DNA作為模板，使用序列編號6、7、9、10、11之引子組，進行藉由PCR之擴增、以及基板上之雜交反應及標記化、螢光測定。此時，使用於序列編號7及11之5'末端經由連接子進行生物素修飾之引子。

【0067】 擴增中使用TaKaRa多重分析套組Ver.2(塔卡拉生物公司)。各引子以最終濃度成為0.2 μM 之方式添加，模板之基因組DNA以成為10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之方式添加，TaKaRa多重分析套組Ver.2內之2 \times 反應緩衝液使用1 \times ，多重酶混合物使用1U，將模板DNA等混合來製備PCR反應液。核酸擴增裝置使用T100 Thermal Cycler(Bio-Rad公司)。擴增反應結束後，於供於基板上之雜交反應之前，藉由該機器進行熱改性反應。

【0068】關於基板上之雜交反應所使用之試劑，將包含固定有序列編號8之探針之基板1及固定有序列編號12之探針之基板2的溶液、鹽水磷酸鈉EDTA緩衝液(SSPE緩衝液)、實施了熱改性之PCR反應液加以混合。

【0069】標記化中使用鏈黴親和素-藻紅蛋白(PlexBio公司)作為試劑。關於基板上之雜交反應及標記化，機器使用IntelliPlex 1000 π Code Processor(PlexBio公司)。

【0070】螢光測定裝置使用PlexBio(註冊商標)100螢光分析儀(PlexBio公司)。

【0071】使用之反應條件如下所述。

擴增反應條件

94°C：30秒

60°C：60秒->94°C：30秒(循環數30次)

72°C：600秒

【0072】熱改性條件

95°C：5分鐘->急冷至4°C

【0073】雜交條件

37°C：培養20分鐘

【0074】標記化條件

37°C：培養10分鐘

【0075】將測定結果示於圖5。於將檢體1作為模板之情形時，於基板1中觀測到螢光，又，於將檢體2作為模板之情形時，於基板2中觀測到螢光。由此，鑒於實施例1，提示了檢體2可能為銀色葡萄球菌。於之後之驗證1中，對於檢體1及2，使用下一代定序儀進行全基因組分析並利用ANI進行菌種

鑑定，結果可知，檢體1為金黃色葡萄球菌，相對於此，檢體2被分類為銀色葡萄球菌，與實施例1合併，使用序列編號6、7、9、10、11之引子組，使用序列編號8及序列編號12之探針，藉此能夠將先前無法鑑別之金黃色葡萄球菌與銀色葡萄球菌加以鑑別。

【0076】 又，對於檢體3，自任一基板均未觀測到螢光，因此可知即便使用序列編號6、7、9、10、11之引子組，使用序列編號8及序列編號12之探針，亦不會錯誤檢測出作為其他葡萄球菌屬細菌之表皮葡萄球菌。

【0077】 驗證1：檢體1及2之使用下一代定序儀之全基因組分析及利用ANI之菌種鑑定

於使用基因之序列資訊之菌種鑑定中，先前一直使用DDH(DNA-DNA雜交)法，但目前被作為標準方法之ANI(Average Nucleotide Identity，平均核苷酸同一性)所取代。

ANI係如下方法：基於分析對象之全基因組之序列相對於資料庫上登記之何種參考序列具有較高之序列類似性的計算結果，進行菌種鑑定。

【0078】 i)自分離菌落鈎菌及提取基因組

自分離菌落鈎菌，藉由苯酚/氯仿/異戊醇(NIPPON Genetics公司)進行處理，對於所得之上清液，使用FastGene Gel/PCR提取套組(NIPPON Genetics公司)，根據試劑附帶之標準方案，提取基因組。

【0079】 ii)基因庫製備

使用QIAseq FX DNA庫套組(QIAGEN公司)，根據試劑附帶之標準方案，製備基因庫。

【0080】 iii)序列反應

使用MiSeq試劑套組v3 600個循環，根據試劑附帶之標準方案，機器

使用MiSeq(illumina公司)，進行300 bp×2之雙端測序反應。

【0081】 iii)利用ANI之菌種鑑定

對於自機器獲取之原始資料，使用Trimmomatic版本0.38進行修整，使用SPAdes版本3.13.0從頭組裝(de novo assembly)，製作全基因組之序列。資料庫使用美國生物技術資訊中心之NCBI RefSeq，藉由BBTools進行利用ANI之菌種鑑定。

【0082】 檢體1與資料庫上之金黃色葡萄球菌表現出最高之類似性(ANI值：98.62%)，其次為施韋策葡萄球菌(ANI值：93.56%)。又，檢體2與資料庫上之銀色葡萄球菌表現出最高之類似性(ANI值：99.09%)，其次為施韋策葡萄球菌(ANI值：94.87%)。通常，於利用ANI之菌種鑑定中，判定為同一菌種之閾值設為95~96%(Kim, M, HS Oh, SC Park, J Chun. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 64: 346-351.)，根據本閾值，檢體1被鑑定為金黃色葡萄球菌，檢體2被鑑定為銀色葡萄球菌。根據以上結果，全基因組分析與利用ANI之菌種鑑定亦支持實施例2之結果之有效性。

【0083】 比較例1：與先前技術之比較 引子組之擴增效率之調查

【0084】 將日本專利特開2017-163969號公報(上述)所記載之銀色葡萄球菌引子即序列編號13、14(表2)與本案之序列編號6、7、9、10、11之作為引子性能之擴增能力進行比較。

【0085】 [表2]

序列編號13：銀色葡萄球菌引子	GAAACAAAGCATCCTAAAAAAGG
序列編號14：銀色葡萄球菌引子	AAGCCTTGACGAACTAAAGC

【0086】 核酸擴增之確認

將自金黃色葡萄球菌JCM5676株、銀色葡萄球菌JCM31982株提取之基因組DNA作為模板，使用序列編號13、14、或序列編號6、7、9、10、11之引子組，藉由即時PCR進行擴增。用於擴增之試劑使用TaKaRa多重分析套組Ver.2(塔卡拉生物公司)，嵌入染料使用EvaGreen(biotium公司)。各引子以最終濃度成為0.2 μM 之方式添加，模板之基因組DNA以成為10 $\mu\text{g/L}$ 之方式添加，TaKaRa多重分析套組Ver.2內之2 \times 反應緩衝液使用最終濃度1 \times ，多重酶混合物使用1U，將模板DNA等混合來製備PCR反應液。測定裝置使用Mic即時PCR(Bio Molecular Systems公司)，進行三重測定。

【0087】 使用之條件如下所述。

擴增反應

94 $^{\circ}\text{C}$ ：30秒

60 $^{\circ}\text{C}$ ：60秒->94 $^{\circ}\text{C}$ ：30秒(循環數40次)

72 $^{\circ}\text{C}$ ：600秒

【0088】 熱溶解反應

95 $^{\circ}\text{C}$ ：5秒

65 $^{\circ}\text{C}$ ：30秒

65 $^{\circ}\text{C}$ ->95 $^{\circ}\text{C}$ 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{秒}$

【0089】 將使用序列編號6、7、9、10、11之引子組時之測定結果示於圖6，將使用序列編號13、14之引子組時之測定結果示於圖7。序列編號6、7、9、10、11之引子組、序列編號13、14之引子組均確認到金黃色葡萄球菌JCM5676株及銀色葡萄球菌JCM31982株之擴增。根據以上結果可知，序列編號6、7、9、10、11及序列編號13、14之引子組均具有使作為靶之核酸成分擴增之功能。

【0090】 將使用序列編號6、7、9、10、11之引子組時之PCR產物之熱熔解曲線分析結果示於圖8，將使用序列編號13、14之引子組時之分析結果示於圖9。

【0091】 熱熔解曲線分析為如下方法：於PCR反應後將反應液設為低溫，於反應液中形成互補鏈而引入嵌入劑後，對反應液進行加熱，進行經時螢光測定，從而觀測伴隨互補鏈背離之嵌入劑之釋放過程，分析反應液中存在之核酸分子之成分。互補鏈背離之溫度為由鹼基長度或組成等決定之各核酸分子所固有之參數，因此藉由確認該溫度，可確認液體中存在何種核酸分子，從而廣泛用於分析以引子二聚物為代表之非特異性擴增產物。

【0092】 藉由序列編號6、7、9、10、11之引子組及序列編號13、14擴增之金黃色葡萄球菌JCM5676株及銀色葡萄球菌JCM31982株之PCR產物之熱熔解曲線分析結果均為單峰分佈。由於分佈具有單峰性，因此確認到反應液中之核酸成分為單一成分，且產生目標特異性擴增產物，可知兩個引子組為特異性引子組。

【0093】 為了比較各引子組之擴增能力，算出Cq值，將其結果示於表3。Cq值為超過判定閾值時之PCR之循環數，於擴增同一靶之情形時，引子組之Cq值越小則可謂擴增效率越高。可知，於銀色葡萄球菌JCM31982株之Cq值中，序列編號6、7、9、10、11之引子組較序列編號13、14之引子組小6.6。由此可知，於擴增銀色葡萄球菌時，序列編號6、7、9、10、11之引子組優於序列編號13、14之引子組。另一方面，金黃色葡萄球菌JCM5676株之Cq值於引子組間幾乎無差別，可知，於擴增金黃色葡萄球菌時，兩個引子組之性能相同。

【0094】 [表3]

	金黃色葡萄球菌(JCM 31982)	銀色葡萄球菌(JCM 5676)
序列編號6、7、9、10、11	27.46±0.15	23.30±0.04
序列編號13、14	27.20±0.08	29.97±0.23

【0095】 比較例2：與先前技術之比較 鑑別能力之比較**【0096】 核酸擴增及檢測**

將自金黃色葡萄球菌JCM5676株、銀色葡萄球菌JCM31982株提取之基因組DNA作為模板，使用序列編號6、7、9、10、11或序列編號13、14之引子組，進行藉由PCR之擴增、以及基板上之雜交反應及標記化、螢光測定。此時，使用於序列編號7及11之5'末端經由連接子進行生物素修飾之引子。各引子以最終濃度成為0.2 μ M之方式添加，模板之基因組DNA以成為10 μ g/L之方式添加，TaKaRa多重分析套組Ver.2內之2 \times 反應緩衝液使用最終濃度1 \times ，多重酶混合物使用1U，將模板DNA等混合來製備PCR反應液。核酸擴增裝置使用T100 Thermal Cycler(Bio-Rad公司)。擴增反應結束後，於供於基板上之雜交反應之前，藉由該機器進行熱改性反應。

【0097】 關於基板上之雜交反應所使用之試劑，將包含固定有序列編號8之探針之基板1的溶液、包含固定有序列編號12之探針之基板2之溶液、包含固定有序列編號15(ATAAGCTAAGCCACGTCC)之探針之基板3的溶液、鹽水磷酸鈉EDTA緩衝液(SSPE緩衝液)、實施了熱改性之PCR反應液加以混合。

【0098】 標記化中使用鏈黴親和素-藻紅蛋白(PlexBio公司)作為試劑。關於基板上之雜交反應及標記化，機器使用IntelliPlex 1000 π Code Processor(PlexBio公司)。

【0099】 螢光測定裝置使用PlexBio(註冊商標)100螢光分析儀(PlexBio公司)。

【0100】 使用之反應條件如下所述。

擴增反應條件

94°C：30秒

60°C：60秒->94°C：30秒(循環數30次)

72°C：600秒

【0101】 熱改性條件

95°C：5分鐘->急冷至4°C

【0102】 雜交條件

37°C：培養20分鐘

【0103】 標記化條件

37°C：培養10分鐘

【0104】 將測定結果示於圖10。關於基板1、基板2，可知如實施例1中所評價，具有鑑別金黃色葡萄球菌與銀色葡萄球菌之能力。關於基板3，金黃色葡萄球菌、銀色葡萄球菌均未觀測到螢光，幾乎無法大幅地進行檢測。

【0105】 根據以上結果可知，關於對包含固定有序列編號8之探針之基板1或固定有序列編號12之探針之基板2之溶液使用序列編號6、7、9、10、11之引子組的分析，擴增效率優於先前技術。

【序列表】

<110> 日商電化股份有限公司(Denka Company Limited)
學校法人東邦大學(Toho University)

<120> 銀色葡萄球菌之檢測用之引子組及探針

<130> PU005489W001

<150> JP2020-062646

<151> 2020-03-31

<160> 15

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 687

<212> DNA

<213> 金黃色葡萄球菌菌株 NCTC13626

<400> 1

ttattgacct gaatcagcgt tgtcttcgct ccaaataatt aatttctctt tttttgcttg 60

tgcttcactt tttcttaaaa gttgttcatg tglattgta ggtttataaa cataagcaac 120

tttagccaag ccttgacgaa ctaaagcttc gtttaccatt ttccatcag cataaatata 180

cgctaagcca cgtccatatt tatcagttct ttgaccttg tcaaactega cttcaatttt 240

ccttgcatth tctaccattt ttttcgtaaa tgcacttgct tcaggacat atttctctac 300

acctttttta ggatgctttg tttcaggtgt atcaaccaat aatagtctga atgtcattgg 360

ttgaccttg tacattaatt taaccgtatc accatcaatc gctttaatta atgtcgcagg 420

ttctttatgt aattttttag ttgaagttgc actatatact gttggatctt cagaaccact 480

tctatttacg ccattatctg tttgtgatgc atttgctgag ctacttagac ttgaaactac 540

aactaaagtt aacactaaac aactagtagc gaaatagaaa aacctctttg cgtattgccc 600

tttcgaaaca ttactgatag ccattccctat aagtaatatt gaaacgattg ccatacatat 660

gccagcactt aataagtatt ctgtcat 687

<210> 2

<211> 687

<212> DNA

<213> 金黃色葡萄球菌菌株 AR221

<400> 2

ttattgacct gaatcagcgt tgtcttcgct ccaaatatTT aatttctctt tttttgcttg 60
 tgcttcactt tttcttaaaa gttgttcacg tgtattgta ggtttataaa cataagcaac 120
 tttagccaag ccttgacgaa ctaaagcttc gtttaccatt tttccatcag cataaatata 180
 cgctaagcca cgtccatatt tatcagttct ttgacctttg tcaaaactcga cttcaatTTT 240
 ctttgcaTTT tctaccatTT ttttcgtaaa tgcacttgct tcaggacctt atttctctac 300
 acctTTTTta ggatgctTTg tttcaggtgt atcaaccaat aatagtctga atgtcattgg 360
 ttgacctttg tacattaatt taaccgtatc accatcaatc gctttaatta atgtcgcagg 420
 ttctttatgt aattTTTTtag ttgaagttgc actatatact gttggatctt cagaaccact 480
 tctatttacg ccattatctg tttgtgatgc atttgctgag ctacttagac ttgaaactac 540
 aactaaagtt aacactaaac aactagtagc gaaatagaaa aacctctttg cgtattgccc 600
 tttcgaaaca ttactgatag ccatccctat aagtaatatt gaaacgattg ccatacatat 660
 gccagcactt aataagtatt ctgtcat 687

<210> 3

<211> 669

<212> DNA

<213> 銀色葡萄球菌菌株 NCTC13711

<400> 3

ttattctgcg ttaccttcac tccaaatatt taaatgttct tttttgctt gtgcttcact 60
 ttttcttaat agttgttcat gtgtgttatt aggtttataa acatagcaa cttttgctag 120
 accttgacgc actaaagctt ggtaaccat ctaccatca gcatagatat aagctaagcc 180
 acgtccatat ttatctgtct tttgacctt gicaaattcc acttctatTT tcttagcatt 240
 ctctaccata ttcttcgtaa atgcacttgc tctgggcca tatttttcaa cgcctTTTT 300
 aggatgtttc gtttcaggcg tatcaattaa taacaatcta aatgtcattg gctttccttt 360
 atacattaac ttaaccgat caccatcgat cgttttaatt aatgtcgcag gttctttatg 420
 taatttagtc gttgctgatt tactgtattc agttgcattg ctatttccct ctteatcagt 480

tagttgggat gctcctgcag attgattaaa attagaaact acaactaatg ttaacactaa 540
gcaactaata gagaaaaata aaaatctttt cgtgtttgc ttttagaaa atttacttat 600
agccatcact acaagtacta atgaaacaat tgcgtaaat atgccagcac ttaaaaagta 660
ttctgtcat 669

<210> 4

<211> 669

<212> DNA

<213> 銀色葡萄球菌菌株 XN0106

<400> 4

ttattctgcg ttaccttcac tccaaatatt taaatgttct ttttcgctt gtgcttact 60
ttttcttaat agttgttcat gtgtgttatt aggtttataa acatagcaa cttttgctag 120
accttgacgc actaaagctt ggtaaccat cttaccatca gcatagatat aagctaagcc 180
acgtccatat ttatctgtct ttgaccttt gtc aaattcc acttctattt tcttagcatt 240
ctctaccata ttcttcgtaa atgcacttgc ttctgggcca ttttttcaa cgcctttttt 300
aggatgttcc gtttcaggcg tatcaattaa taacaatcta aatgtcattg cttttccttt 360
atacattaac ttaaccgtat caccatcgat cgttttaatt aatgtcgcag gttctttatg 420
taatttagtc gttgctgatt tactgtattc agttgcattg ctatttcctt cttcatcagt 480
tagttgggat gctcctgcag attgattaaa attagaaact acaactaatg ttaacactaa 540
gcaactaata gagaaaaata aaaatctttt cgtgtttgc ctttagaaa atttacttat 600
agccatcact acaagtacta atgaaacaat tgcgtaaat atgccagcac ttaaaaagta 660
ttctgtcat 669

<210> 5

<211> 669

<212> DNA

<213> 施韋策葡萄球菌菌株 FSCB5

<400> 5

ttattctgcg ttaccttcac tccaaatatt tagatgttct ttttcgctt gtgcttact 60
tttccttaat agttgttcat gtgtattatt aggtttatat acatagcaa cttttgctaa 120

tccttgacgt actaacgctt gattaacat tttgcatct gcataaatat aagctaatcc 180
 acgtccatat ttatcagttt tttgtccttt gtcaaattca acttcaattt tcttagcatt 240
 ctctaccatt tttttcgtaa acgcgcttgc tcttgggtccg tatttttcaa cgctttttt 300
 aggatgtttc gtttcgggcg tatcaattaa taacaatcta aatgtcattg gttgtccttt 360
 gtacattaac ttaacagtat caccatcaat tgctttgatt aatgtcgcag gctctttatg 420
 taatttagtc gttactgatt tgctatattc agttgcattg ctatttccat cttcatcagt 480
 taattgggaa gctccagcag tttgattaaa attagaaatt acaactaatg ttaacactac 540
 gcaactagta gagaaaaata aaaatctttt cgcggtttgc ctttgagaaa gtttacttat 600
 agccatcact ataagtacta atgaaacaat tgccgtaaat atgccagcac ttaaaaagta 660
 ttctgtcat 669

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 金黄色葡萄球菌引子

<400> 6
 gtagcgaaw agaaaaacct c 21

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 金黄色葡萄球菌引子

<400> 7
 atactatta agtgcctggca tatg 24

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 金黃色葡萄球菌探針

<400> 8

ccctataagt aatattgaaa c

21

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 銀色葡萄球菌引子

<400> 9

ttccacttct attttcttag cattc

25

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 銀色葡萄球菌或施韋策葡萄球菌引子

<400> 10

attaattgat acgccygaaa cg

22

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 施韋策葡萄球菌引子

<400> 11

ttcaacttca attttyttag cattc

25

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 銀色葡萄球菌或施韋策葡萄球菌探針

<400> 12

catatttttc aacgcct

17

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 先前技術引子

<400> 13

gaaacaaagc atcctaaaaa agg

23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 先前技術引子

<400> 14

aagccttgac gaactaaagc

20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 先前技術探針

<400> 15

ataagctaag ccacgtcc

18

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種引子組，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌(*Staphylococcus argenteus*)之存在，且

包含以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶之第一引子及第二引子。

【請求項2】

如請求項1之引子組，其中nuc基因具有序列編號3或4所示之鹼基序列，或者具有序列編號3或4之任一者所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列，且編碼TNase。

【請求項3】

如請求項1或2之引子組，其中作為靶之nuc基因具有包含序列編號3或4所示之鹼基序列之217位至331位之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之引子組，其中第一引子具有序列編號9所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號9所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號9所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之引子組，其中第二引子具有序列編號10所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號10所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號10所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之引子組，其進而包含以施韋策葡萄球菌 (*Staphylococcus schweitzeri*)之nuc基因為靶之第三引子。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之引子組，其中第三引子具有序列編號11所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號11所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號11所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之引子組，其進而包含以金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)之nuc基因為靶之第四引子及第五引子。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之引子組，其中第四引子具有序列編號6所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號6所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號6所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之引子組，其中第五引子具有序列編號7所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號7所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號7所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之引子組，其中引子經生物素標記。

【請求項12】

一種探針，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在，且以銀色葡萄球菌之nuc基因為靶。

【請求項13】

如請求項12之探針，其中nuc基因具有序列編號3或4所示之鹼基序列，或者具有序列編號3或4所示之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列，且編碼Nuc蛋白質。

【請求項14】

如請求項12或13之探針，其中作為靶之nuc基因具有包含序列編號3或4所示之鹼基序列之217位至331位之鹼基序列中之至少8個連續鹼基的鹼基序列。

【請求項15】

如請求項12至14中任一項之探針，其具有序列編號12所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號12所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少10個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號12所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項16】

一種套組，其包含如請求項1至11中任一項之引子組及如請求項12至15中任一項之探針。

【請求項17】

如請求項16之套組，其進而包含以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之探針。

【請求項18】

如請求項17之套組，其中以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之探針具有序列編號8所記載之鹼基序列，或者具有包含序列編號8所記載之鹼基序列中一個或數個鹼基經缺失、置換、插入或附加之鹼基序列中之至少8個連續鹼基的鹼基序列，且具有與序列編號8所記載之鹼基序列相同之功能。

【請求項19】

一種方法，其用以檢測檢體中銀色葡萄球菌之存在，且使用如請求項1至11中任一項之引子組。

【請求項20】

如請求項19之方法，其包括如下步驟：使用第一、第二及第三引子來鑑別銀色葡萄球菌與施韋策葡萄球菌或其以外之葡萄球菌屬細菌。

【請求項21】

如請求項19或20之方法，其進而使用如請求項12至15中任一項之探針。

【請求項22】

如請求項19至21中任一項之方法，其中其以外之葡萄球菌屬細菌為金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌。

【請求項23】

如請求項19至22中任一項之方法，其中凝固酶陰性葡萄球菌屬細菌為選自由如下葡萄球菌所組成之群中之1種或2種以上：表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、耳葡萄球菌(*Staphylococcus auricularis*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、調料葡萄球菌(*Staphylococcus condimentii*)、*Staphylococcus debuckii*、馬賽葡萄球菌(*Staphylococcus massiliensis*)、魚醃酵葡萄球菌(*Staphylococcus piscifermentans*)、模仿葡

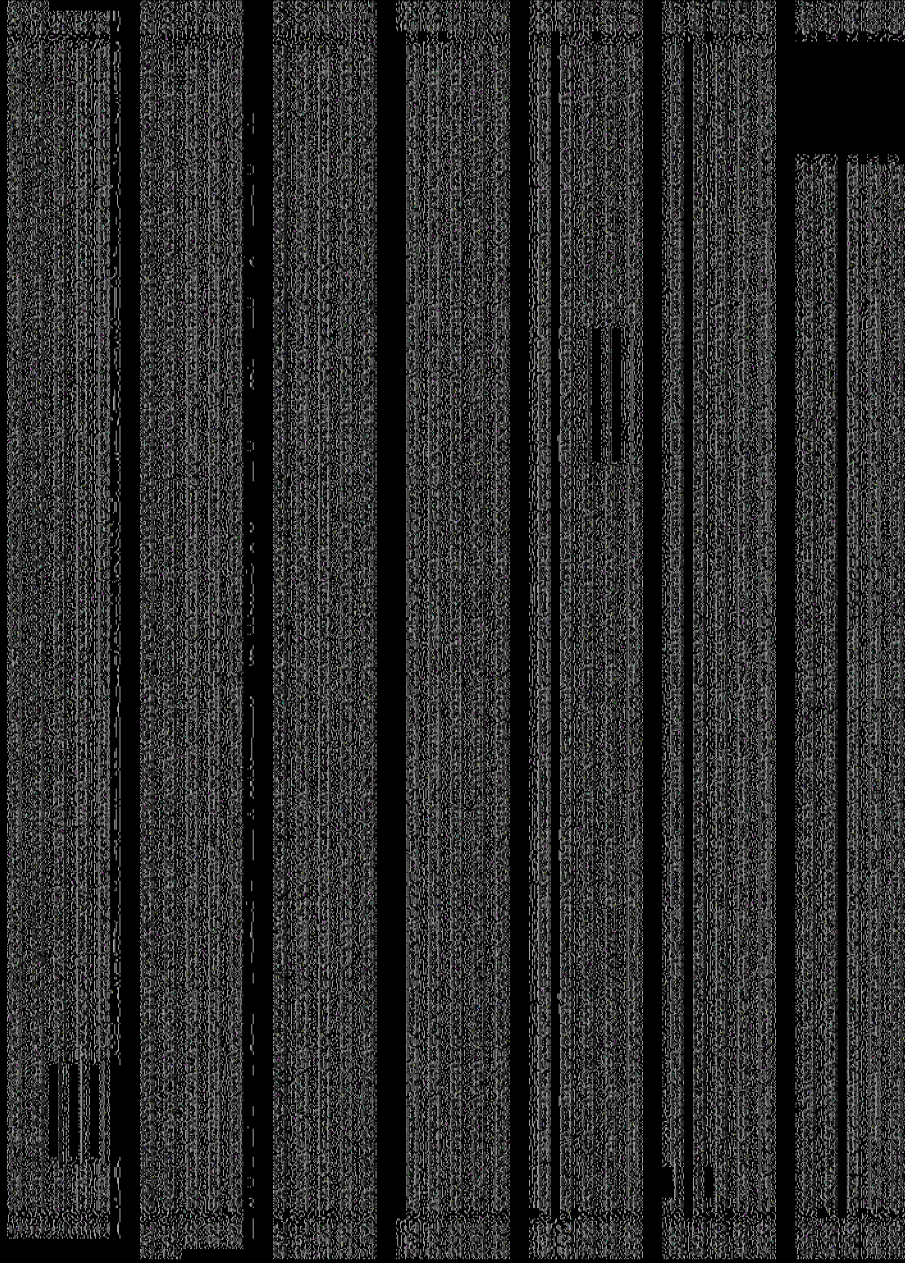
萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、頭狀葡萄球菌(*Staphylococcus capitis*)、山羊葡萄球菌(*Staphylococcus caprae*)、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)、溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)、德氏葡萄球菌(*Staphylococcus devriesei*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、豬葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*)、阿根廷葡萄球菌(*Staphylococcus agnetis*)、產色葡萄球菌(*Staphylococcus chromogenes*)、*Staphylococcus cornubiensis*、貓葡萄球菌(*Staphylococcus felis*)、海豚葡萄球菌(*Staphylococcus delphini*)、中間葡萄球菌(*Staphylococcus intermedius*)、水獺葡萄球菌(*Staphylococcus lutrae*)、田鼠葡萄球菌(*Staphylococcus microti*)、蠅葡萄球菌(*Staphylococcus muscae*)、假中間葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*)、豬鼻葡萄球菌(*Staphylococcus rostri*)、施氏葡萄球菌(*Staphylococcus schleiferi*)、路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugudnensis*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、阿爾萊特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)、*Staphylococcus caeli*、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)、馬胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、雞葡萄球菌(*Staphylococcus gallinarum*)、克氏葡萄球菌(*Staphylococcus kloosii*)、李氏葡萄球菌(*Staphylococcus leei*)、尼泊爾葡萄球菌(*Staphylococcus nepalensis*)、琥珀葡萄球菌(*Staphylococcus succinus*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)、福氏葡萄球菌(*Staphylococcus fleurettii*)、緩慢葡萄球菌(*Staphylococcus lentus*)、斯氏葡萄球菌(*Staphylococcus stepanovicii*)、小牛葡萄球菌(*Staphylococcus vitulinus*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、巴氏葡萄球菌

(*Staphylococcus pasteurii*)及沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)。

【請求項24】

如請求項23之方法，其中其以外之葡萄球菌屬細菌為金黃色葡萄球菌，且上述方法進而使用以金黃色葡萄球菌之nuc基因為靶之第四引子與第五引子及/或探針。

(發明圖式)



綠黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06
 金黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06
 金黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06
 金黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06
 金黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06
 金黃色層狀複合纖維 Nc-C-3626
 金黃色層狀複合纖維 A3022
 深藍色層狀複合纖維 8C35
 棕色層狀複合纖維 Nc-C-37
 銀白色層狀複合纖維 XN0-06

(圖式)



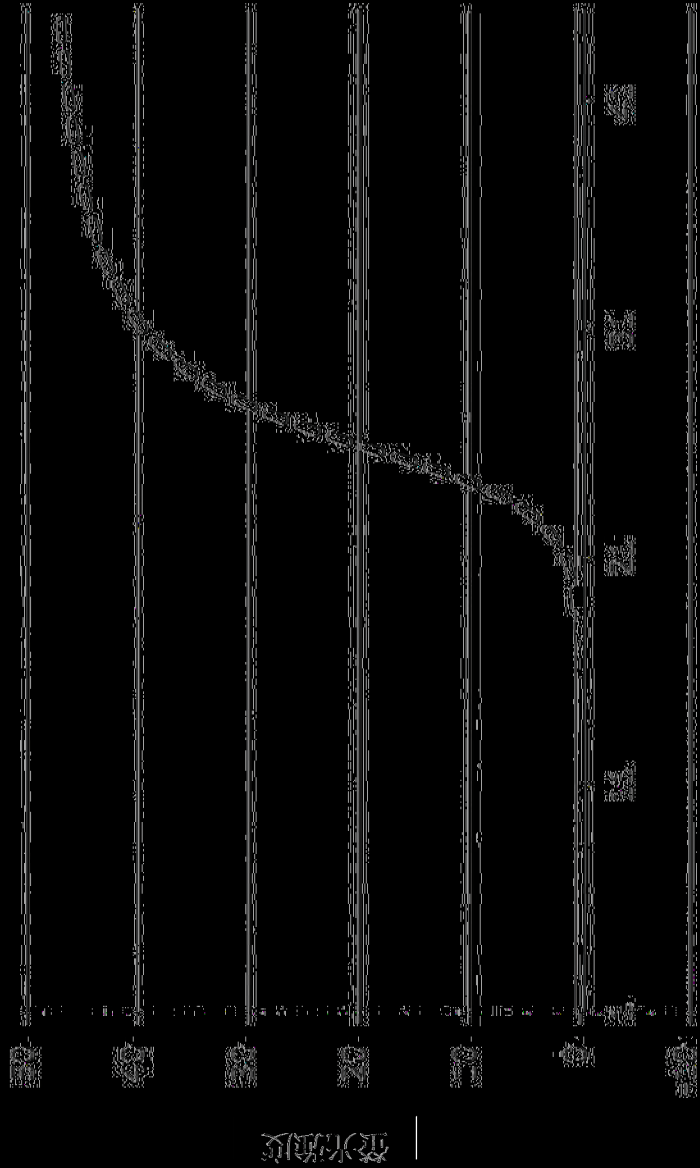
金黃色葡萄球菌, C.V.5676株

銀色葡萄球菌, C.V.3:982株

2CA箱環數

[圖2]

葉水溫度

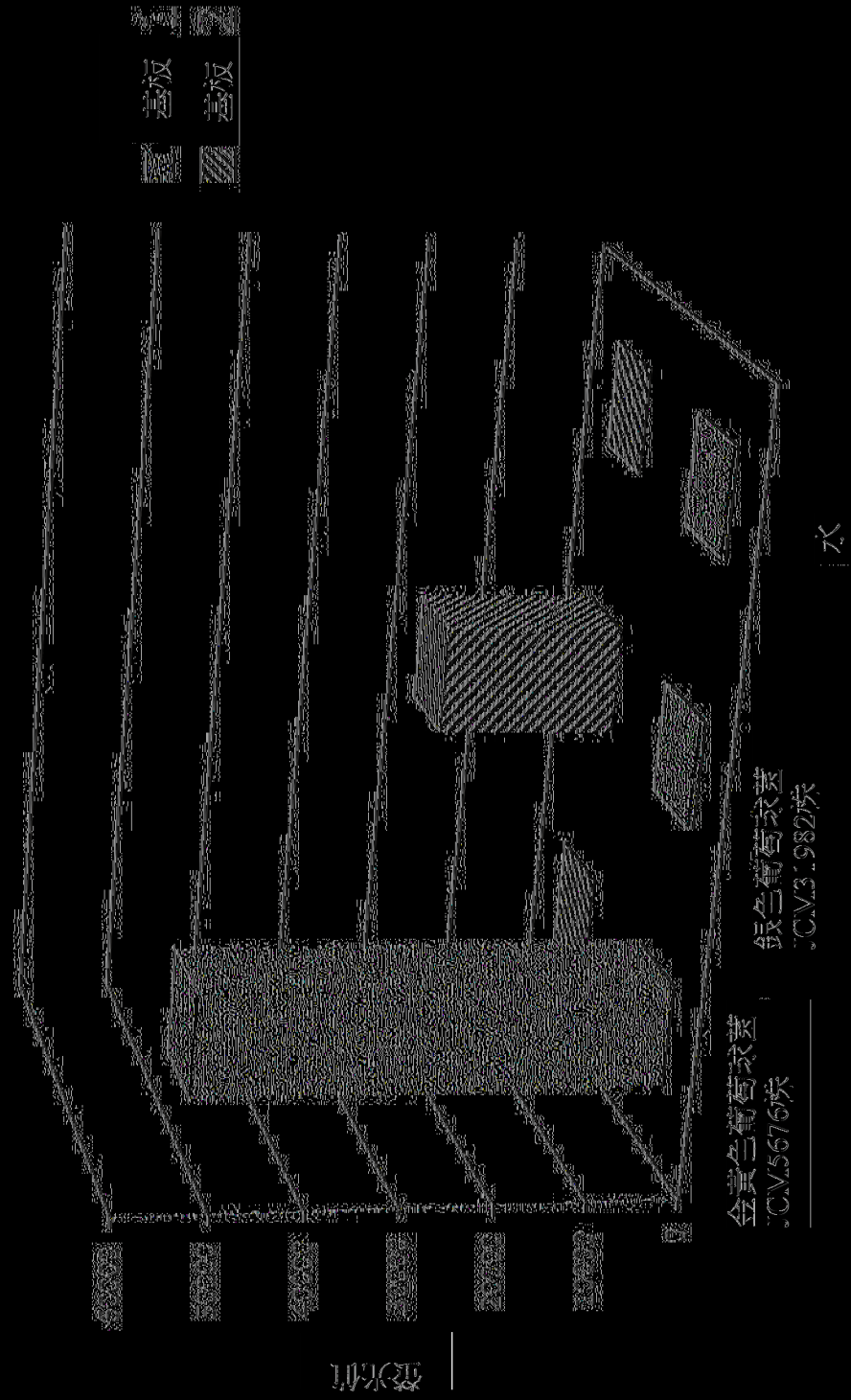


金賞名葡萄球菌, C.V.5676株

銀賞名葡萄球菌, C.V.5982株

PCR循環數

[圖3]

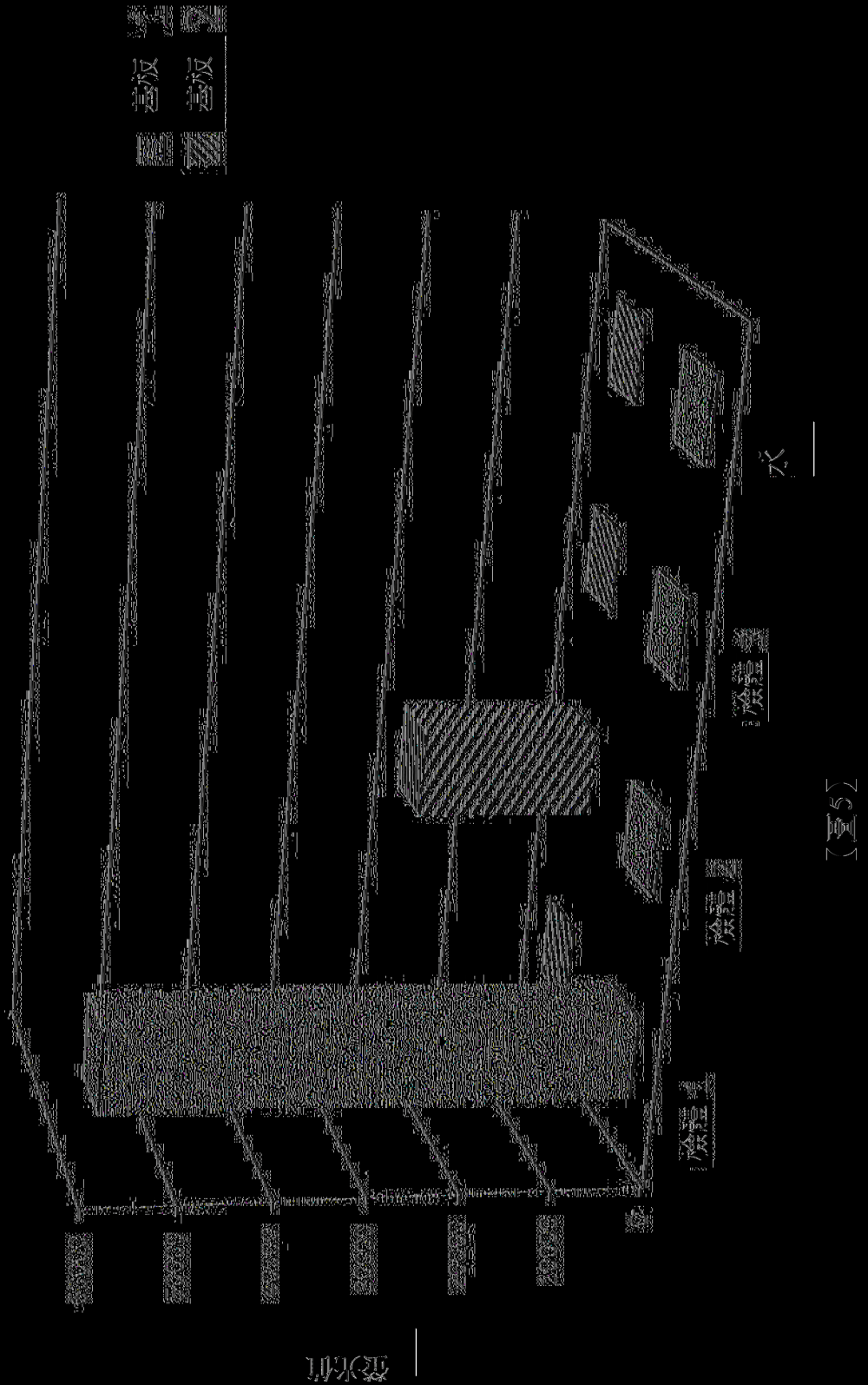


銀色葡萄紋
:CM31982灰

金黃色葡萄紋
:CM5676灰

(圖 1)

圖 1



蓋板

(圖5)

水

蓋板

蓋板

蓋板

	蓋板
	蓋板

金賞白葡萄酒
基, C.V. 5676

銀白葡萄酒
基, C.V. 9826

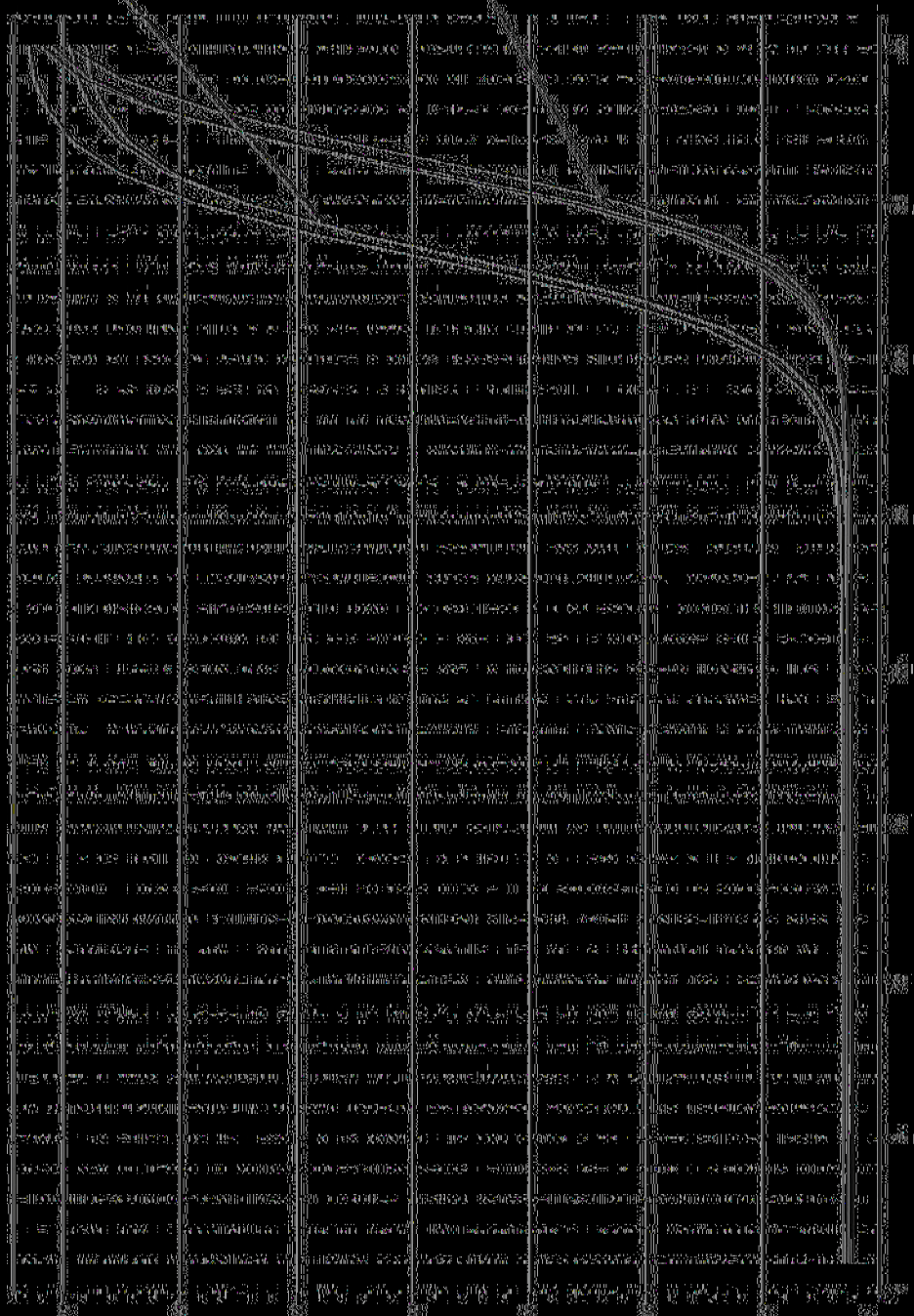


圖 1

圖 1

圖 1



透視

(圖8)



16
16

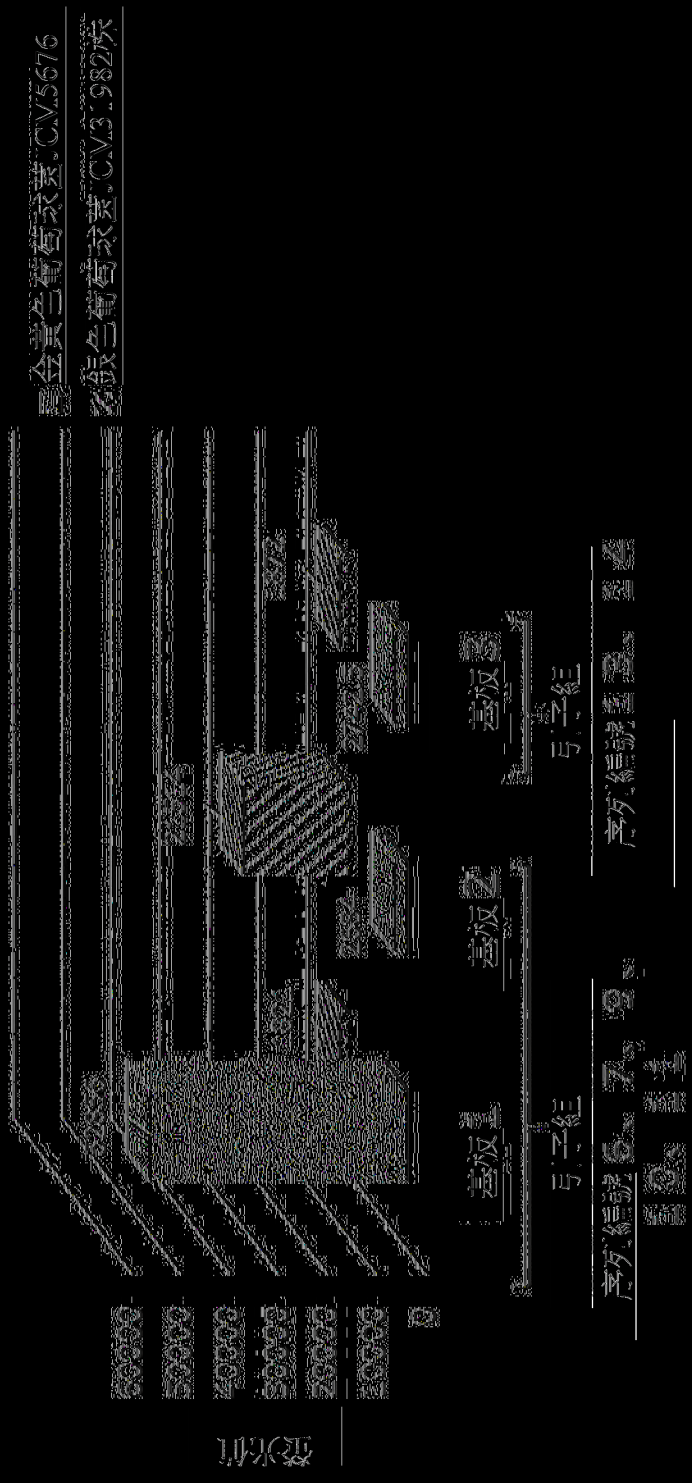


圖 1

圖 2