

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4040675号
(P4040675)

(45) 発行日 平成20年1月30日 (2008. 1. 30)

(24) 登録日 平成19年11月16日 (2007. 11. 16)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 16 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平8-515796	(73) 特許権者	アンスティテュ パストゥール
(86) (22) 出願日	平成7年11月13日 (1995. 11. 13)		フランス国, エフー 7 5 7 2 4 パリ セ
(65) 公表番号	特表平10-508499		デ 1 5, リュ デュ ドクトゥールーロ
(43) 公表日	平成10年8月25日 (1998. 8. 25)		ウ 2 8
(86) 国際出願番号	PCT/FR1995/001491	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W01996/015261	(74) 代理人	弁理士 吉田 維夫
(87) 国際公開日	平成8年5月23日 (1996. 5. 23)	(74) 代理人	弁理士 戸田 利雄
審査請求日	平成14年10月25日 (2002. 10. 25)	(74) 代理人	弁理士 西山 雅也
(31) 優先権主張番号	94/13622		
(32) 優先日	平成6年11月14日 (1994. 11. 14)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
微生物の受託番号	CNCM 1-1491		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンピロバクターのゲノム核酸配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カンピロバクター・コリ (Campylobacter coli) 種に属する株のゲノム核酸と特異的にハイブリダイズし、該株に属さないカンピロバκτηリアの核酸とも、カンピロバクター属に関連するバκτηリアのゲノム核酸とも通常の条件下でハイブリダイズしない核酸であって、該核酸が、配列番号：1、それに相補的な配列、又は1～数個の塩基の変異、挿入、欠失もしくは置換によりそれらから異なる配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする核酸。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のヌクレオチド配列を有する核酸を含むクローニングベクター。

10

【請求項 3】

受託番号No. I-1491として1994年11月14日にナショナル・コレクション・オブ・マイクロオルガニズム・カルチャーズに寄託されたプラスミド。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のヌクレオチド配列の中から選択される少なくとも20の連続ヌクレオチドを含むカンピロバクター・コリの核酸の特異的核酸プローブ。

【請求項 5】

前記プローブが支持体上に固定化され、捕獲プローブとして用いられることを特徴とする請求項 4 に記載の核酸プローブ。

【請求項 6】

20

請求項 1 に記載の配列の中から選択される 18～30ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含んでなる、カンピロバクター・コリの核酸配列を増幅するための特異的オリゴヌクレオチドプライマーの対。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが 18～22ヌクレオチドを有する請求項 6 に記載の特異的オリゴヌクレオチドプライマーの対。

【請求項 8】

下記の配列：

5' -ATA TTT CCA AGC GCT ACT CCC C-3'

5' -CAG GCA GTG TGA TAG TCA TGG G-3'

のオリゴヌクレオチド対により形成される、請求項 6 に記載の特異的オリゴヌクレオチドプライマーの対。

【請求項 9】

請求項 6、7 又は 8 に記載のオリゴヌクレオチドプライマーの対の手段を用いて、遺伝子増幅技術によって、C. コリの核酸を増幅することにより得られる核酸フラグメント。

【請求項 10】

前記遺伝子増幅技術が PCR 技術である、請求項 9 に記載の核酸フラグメント。

【請求項 11】

生物試料中のカンピロバクター・コリの存在を検出する方法であって、該方法が、

a) カンピロバクター・コリに属する核酸とプライマーとのハイブリダイゼーションを許容する条件下で、請求項 6、7 又は 8 に記載のプライマーの対に前記生物試料を接触させるステップと、

b) 前記カンピロバクター・コリに属する核酸を増幅させるステップと、

c) 前記プライマーにより囲まれたフラグメントに相当するカンピロバクター・コリの核酸のフラグメントの増幅を証明するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

前記生物材料が、予め前記ハイブリダイゼーションにアクセス可能にされている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

更に、d) 特異的プローブハイブリダイゼーションにより、配列決定により又は制限部位分析により、前記増幅されたフラグメント配列を確認するステップを含む、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

生物試料中のカンピロバクター・コリの存在を検出するためのキットであって、

請求項 6、7 又は 8 に記載のプライマーの対と、

カンピロバクター・コリの核酸の増幅を行うために必要な試薬と、

を含むことを特徴とするキット。

【請求項 15】

増幅されたフラグメントの配列が確認されるのを許容する構成物を更に含む、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記増幅されたフラグメントの配列が確認されるのを許容する構成物が、請求項 4 又は 5 に記載の核酸プローブである、請求項 15 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、カンピロバクター・コリ (Campylobacter coli) の特定の核酸配列、並びにこの配列の、カンピロバクター・コリ の配列の検出のための特定のヌクレオチドプローブとしての適用、又はこの配列のフラグメントの、生物試料中のカンピロバクター・コリ の DNA もしくは RNA の増幅のためのヌクレオチドプライマーとしての適用に関する。

10

20

30

40

50

カンピロバクター (Campylobacter) 感染は、ヒト及び野生又は家庭内動物に影響を及ぼす世界全部で極めて一般的なものである。

現在カンピロバクターと呼ばれるそのバクテリアは、20世紀の初めに発見されたが、それらの特徴がそれらの同定及びそれらの培養を困難なものにしているのも、長い間、認識されなかった。それはヒツジ及びウシにおいて最初に単離されビブリオ・フェトウス (*Vibrio fetus*) と呼ばれ、次に後にカンピロバクター・フェトウス (*Campylobacter fetus*) が単離された。ヒトカンピロバクター症の最初の症例が記載されたのは1946年の初めであったが、カンピロバクター感染の重要性が証明され、認識され得たのはカンピロバクターのための選択培地が完成し始めた1972年の初めであった。

カンピロバクター・フェトウスタイプの種の命名以来、多数の他の種及び亜種が発見されており、新しい分類基準をしばしば提唱する著者ら及び分類法に従って、その数は種々である。これらの種の中で、ヒト及び／又は動物の病理に最も頻繁に関連するのは、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*) 及びカンピロバクター・フェトウス (*Campylobacter fetus*) である。

現在、カンピロバクター・ジェジュニ及びカンピロバクター・コリが頻繁にヒトにおける感染性の下痢の原因となる。

1986年にフランスにおいて設立された“カンピロバクター感染の国家監督組織”は、報告されるケースの基本的疫学及び臨床学データを明らかにする評価を毎年出版する。

ヒトの種において、*C. ジェジュニ*又は*C. コリ*の腸内の感染の主な症状は下痢である。その最も深刻なケースにおいて、それは、脱水に極めてセンシティブである子供及び乳児に特に危険であり得る水分の深刻な喪失に関連し得る。しかしながら、カンピロバクター腸炎はしばしば合併症を伴うことなく、1週間で自然に下痢がなくなることさえあり得る。しかしながら、その糞培養物が数週間又は数ヶ月間まで陽性であり続けることがあり、そのケースの5～10%は、再発し得る。従って、特に、カンピロバクターが日和見性バクテリアのようにふるまう免疫抑制され、又は深刻な障害 (AIDS、肝臓の肝硬変、癌、白血病等) を有する患者に対する治療及び厳密な継続管理が本質的である。

まれ又は例外的ではあるが、*C. ジェジュニ*又は*C. コリ*感染の他の結果：腸間膜腺炎、胆嚢炎、尿感染、髄膜炎、敗血症、結節性紅斑又はギャンーバレー症候群等も記載されている。

動物において、カンピロバクターは、通常多数の種：ウシ、ヒツジ、ブタ、飼鳥類、野生の鳥類、イヌ及びネコの消化管内に共生して生きている。これらの動物は、病気又は健康な担体のいずれかにかかわらず、微生物の大きな貯蔵所を形成するので、重要な汚染の危険が生ずる。ウシ及びヒツジにおける明らかな感染の場合において、1931年における最初の記載から、“ウシ赤痢”の原因であるとして*C. ジェジュニ*が知られている。それは、ウシへの影響とは別に、その動物の環境 (土、水) に微生物をまきちらすことによりヒトに伝染することとなり得る。無症候の動物、“健康な担体”においてでさえ、ヒトへの伝染がおこり得る：それは、これらの動物もしくはそれらの排出物との直接的接触により、又は汚染された食物もしくは水 (それらの調製の間に汚染され、あまり焼かれていない肉、低温殺菌されていないミルク、汚染された水等) の消費による。

防止の観点から、いずれかの汚染を防止するために、適切な測定的手段により可能な限り早く病原体*C. ジェジュニ*又は*C. コリ*を同定することがヒト及び動物の両方に重要である。これは特に、滅菌状態が重要視されなければならない農産物産業の場合である。いずれかの新しい再発を防止するためにカンピロバクター感染後に治療された病人の正確な継続管理を行うことがヒト病原学において同様に重要である。

最後に、感染を知った場合、感染の進行を防ぎ、又は伝染体の増殖さえ防ぐであろう正確かつ有効な治療を施すことができるように、原因である微生物を正確に同定すること、及び病気の発生後迅速にこれを行うことが極めて重要である。しかしながら、カンピロバクターの同定及び原因とされる種の決定は容易でない。実際、それらの単離は特別の培地を必要とし、少くとも48時間培養することにより豊富にした後でなければ、現在のそれらの慣用的検出は行われ得ない。これは、迅速な診断が必要とされる場合に極めて長い。他方

10

20

30

40

50

、異なる種間に存在する表現型の差異を利用する細胞学的及び／又は生化学的技術により微生物の診断が行われるなら、特に変異体が供された特徴のために現れる場合に、診断の誤差が生ずる。C. ジェジュニ及びC. コリの識別の場合、その差異の特有の判定基準は馬尿酸塩の加水分解であり（C. ジェジュニはそれを加水分解することができるが、C. コリはできない）、馬尿酸塩－陰性C. ジェジュニ株が存在するためこの区別が行われ得ないことが時にある

（Hébert et al., J.Clin.Microbiol., 1984, 20, 138-104, Totten et al., J.Clin.Microbiol., 1987 ; 25, 1747～1752）。

10

カンピロバクター属に属する株を同定するための分子ハイブリダイゼーションを用いる試みが提唱されている。しかしながら、これらの方法は、培養後まで同定を許容せず；それらはその生物サンプル中でこのバクテリアを検出するのに十分にセンシティブでない。これにより、放射能プローブ（Ng et al., Mol.Cell.Probes, 1987, 1, 233～243）又は非放射能プローブ（Chevrier et al., J.Clin.Microbiol., 1989, 27, 321～326）のいずれかを用いるカンピロバクターの同定及び分類の方法が提唱されているが、これらの方法は全体のゲルプローブを用い、検出のしきい値が十分に高く、約 10^5 バクテリアである（Chevrier et al., 前掲）ため、検出されるべき病原体の培養により豊富にすることが必要とされる。

種の診断の目的でのC. ジェジュニの特定の核酸に基づく調査がPicken et al. (Mol.Cell.Probes, 1987, 1, 245～259), Korolik et al., (J.Gen.Microbiol., 1988, 134, 521～529) 及びZhou and Wang (Zbl.Bakt., 1989, 272, 186～190) により行われているが、特異性の問題が残っており、これらの潜在的プローブの配列は決定されていない。

20

現在、本発明の著者である本発明者らは、C. ジェジュニ種の特定のDNA配列を発見した（FR-2701・028）。この配列は、生物試料中でこの種を検出し、同定することができるPCRテストを完了するのに用いられている（Stonnet and Guesdon, FEMS Immunol.Med.Microbiol., 1993, 7, 337～344）。その配列の高い特異性を考慮に入れると、このPCRテストでは、C. ジェジュニと同様に臨床的に重要であるC. コリ種が検出されない。現在、C. コリを含む好熱性カンピロバクターについての同定及び識別の特定の方法は、Eyers et al.により記載されている（J.Clin.Microbiol., 1993, 31, 3340～3343）。しかしながら、種の特定のプライマーは、テストされるべき株のDNAがちょうどプライマーの配列において変異を有する時に“誤った陰性”の結果を得る可能性を排除しない23SリボソームRNAをコードする遺伝子の超可変領域中で選択されている。

30

しかしながら、これらの理由は、本発明者らがカンピロバクター・コリの特定のDNA配列を単離し、これらの配列からPCR技術に基づく同定の方法及び分子のハイブリダイゼーションの技術を開始することを発展させる目的として選択することを導いた。これらの2つの技術の組合せは達成されるべき極めて低い検出しきい値を許容し、これは単一のC. コリバクテリアが生物試料中で検出され、同定されることを許容する。

本発明者らは、カンピロバクター・コリ種の特異的検出に利用できる核酸配列を単離した。

40

これにより本発明は、C. コリ種に属する株のゲノム核酸と特異的にハイブリダイズし、この種に属しないカンピロバクターの核酸と、又はカンピロバクター属に関連するバクテリアのゲノム核酸と通常の条件下でハイブリダイズしないヌクレオチド配列に関する。同様に本発明は、配列番号：1の配列を有する核酸配列、これに相補的な配列、又は1以上の塩基の変異挿入、欠失もしくは置換によりそれから異なる配列に関する。

“1以上の塩基による変異、挿入、欠失又は置換によりそれから異なる配列”は、Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) : Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory (9.47～9.62) により定義される通常のストリンジェンシーの条件下で配列番号：1の配列又はその相補的配列とハイブリダイズする配列を意味するとして理解される。

50

これらの条件は、平均融解温度 T_m から決定される。

好ましくは、最も有利な配列は、温度範囲 ($T_m - 15^\circ\text{C}$) $\sim$ ($T_m - 20^\circ\text{C}$) においてハイブリダイズするものである。

問題の配列は有利には、少なくとも12ヌクレオチドを含む。

本発明はまた、先に規定されるようなヌクレオチド配列、特にNo. I - 1491下で1994年11月14日にNational Collection of Microorganism Culturesに寄託された配列番号：1の配列を含むプラスミドpCS1を含むクローニングベクターに関する。

先に規定されるヌクレオチド配列はDNA配列又はRNA配列であり得る。

配列番号：1の配列のフラグメントの正確なサイズは604bpである。

最初に、各々酵素HindIII、BglII及びEcoRVにより消化されたC. コリ種の異なる株 (C. coli CIP 70.54, C. coli CIP 70.77, C. coli CIP 70.78, C. coli CIP 70.79, C. coli CIP 70.80, C. coli CIP 70.81, C. coli CIP 71.5, C. coli CIP 103753, C. coli A630臨床用単離物) のゲノムDNAに基づくサザン (Southern) の技術に従ってフラグメントCS1をハイブリダイゼーションテストに用いた。全ての株はプローブCS1とハイブリダイズするDNAフラグメントを有する。用いた酵素HindIII、BglII及びEcoRVに従うと、これらのフラグメントは各々2.3kb, 3.5kb又は2.7及び6kbのサイズを有する。

同じタイプの他のテストにおいて、カンピロバクターの他の種 (カンピロバクター・ジェジュニ、C. ラリ (C. lari)、C. フェトゥス亜種フェトゥス、C. フェトゥス亜種ベネレアルリス (venerealis)、C. ハイポインテスチナリス (C. hypointestinalis)、C. スプトルム (C. sputorum) 亜種スプトルム、C. スプトルム亜種ブブルス (bubulus)、C. コンシス (C. concisus)、C. クルブス (C. curvus) 及びC. フェカリス (C. fecalis)) 又は他のバクテリア属 (大腸菌、アルコバクター・クリアエロフィルス (Arcobacter cryaerophylus)、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori)、サルモネラ・チフィムリウム (Salmonella typhimurium)) からの標的DNAに基づくプローブとしてCS1フラグメントを用いた。これらの標的DNAを酵素HindIIIにより消化した。C. コリ (陽性対照) のDNAとの大きなハイブリダイゼーションがオートラジオグラフィー後3時間に観察された。24時間、露出した後、C. ジェジュニのDNAからわずかなシグナルが見られた。このクロスハイブリダイゼーションは、C. ジェジュニとC. コリとの間にゲノムレベルで30~50%の相同性があるので、解釈できない。CS1フラグメントはテストされた他のDNAのいずれともハイブリダイズしない。極めて長い露出時間 (72時間) の後でさえ、オートラジオグラフィーでシグナルを見ることはできなかった。

その部分の、又はこれらの機能的に等価な変異体の配列番号：1の配列は、カンピロバクター・コリの検出及び同定のための分子ハイブリダイゼーション技術に用いられ得る。

機能的に等価な変異体は、これらのフラグメントの特異性に関する本質的特性が影響を受けることなく塩基対が変異され、欠失され、挿入され又は置換されている配列を含む。

本発明によるヌクレオチド配列は、特にカンピロバクター・コリのための特異的核酸プローブとして又はカンピロバクター・コリの特異的配列の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーとしてヒト又は獣医学における診断及び疫学的適用を有する。

本発明によるプローブは、有利には、先に記載の配列又は配列のフラグメント中に少なくとも20の保存性ヌクレオチドを含む。

プローブはDNAプローブ又はRNAプローブである。

本発明に記載されるヌクレオチド配列は、これにより、及び生物試料におけるカンピロバクター・コリの株を特異的に及び直接的に検出するためのプローブとして用いられ得る。

非標識配列がプローブとして直接用いられ得るが、その配列は多くの適用のために利用できるプローブを得るために、放射能因子 (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) により又は非放射能分子 (ビオチン、アセチルアミノフルオレン、ジゴキシゲニン、5-ブromoデオキシウリジン) により一般に標識される。

この最後の場合、FR2 422 956及びFR2 518 755に記載される標識方法の1つを用いることができよう。ハイブリダイゼーション技術は種々の様式で行われ得る (Mattheus, J.A. and Kricka, L.J. Anal. Biochem. 1988, 169, 1~25)。最も一般的な方法は、支持体 (ニ

10

20

30

40

50

トロセルロース、ナイロン、ポリスチレン等) 上にカンピロバクター・コリの細胞から抽出された核酸を固定化すること、並びに十分に規定された条件下でプローブと共に固定化された標的核酸をインキュベートすることからなる。ハイブリダイゼーションの後、過剰のプローブが除去され、その形成されたハイブリッド分子は、適切な方法(プローブに関連した放射能の、蛍光の、又は酵素活性の測定)により検出される。

他の適用において、本明細書に記載される核酸プローブは、捕獲プローブとして用いられ得る。この過程において、そのプローブは支持体上に固定化され、C. コリから抽出された標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションによる捕獲を供する。必要に応じて、固体支持体は試料から分離され、次に捕獲プローブと標的核酸との間に形成された二本鎖は、容易に検出可能な因子で標識された第2の検出プローブにより検出される。

十分な量のカンピロバクター・コリの核酸が分析されるべきサンプルから抽出され得る場合、本願に記載される配列は、これらのサンプル中でカンピロバクター・コリに属する株を直接検出及び同定するのに利用できる。反対の場合、液体培地中の迅速な培養がカンピロバクター・コリの核酸の抽出前に行われ得、又はそのサンプルから抽出されたカンピロバクター・コリの核酸の少量がPCR技術のような増幅技術にかけられ得る。

配列番号：1の配列及びそれ由来の配列は、オリゴヌクレオチドプライマーを選択するために、特にPCR技術のために同様に用いられ得る。

この技術は、増幅されるべきフラグメント周りのオリゴヌクレオチドの対の選択を必要とする(米国特許4 683 202)。これらのオリゴデオキシリボヌクレオチド又はオリゴリボヌクレオチドプライマーは、有利には18~30の間の長さ、好ましくは、18~22ヌクレオチドの長さを有する。その2つのプライマーの1つはそのマトリックスの(+)鎖に相補的であり、他方のプライマーは(-)鎖に相補的である。これらのプライマーが二次構造又は互いに相補的な配列を有さないことが重要である。更に、各々のプライマーの長さ及び配列は、プライマーが原核又は真核細胞からの他の核酸とハイブリダイズしないこと、特にサンプルを汚染するおそれがあり得るコリ種に属さないカンピロバクターの核酸と、及びヒトDNA又はRNAとハイブリダイズしないように選択されなければならない。

カンピロバクター・コリに属する株の核酸配列の増幅のための特異的プライマーとして選択されたアンプリマーは、例えばGriffais et al. (Nucleic Acids Res. 1991, 19, 3887~3891)により記載される方法に従って選択される。

配列番号：1の配列から開始して、本発明者らは、PCRテストを行うためにオリゴヌクレオチドを選択した。これらのオリゴヌクレオチドにより、先に示される10の他のカンピロバクター、特にC. ジェジュニのDNAの、又は大腸菌、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、サルモネラ・タイフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 及びアルコバクター・クリエロフィルス (*Arcobacter cryaerophilus*) のDNAの目に見える増幅なしに、彼らはカンピロバクター・コリの特異的増幅を得た。

極めて特に好ましいプライマーの対は、配列：

CSF プライマー： 5'ATA TTT CCA AGC GCT ACT CCC C3'

CSR プライマー： 5'CAG GCA GTG TGA TAG TCA TGG G3'

の配列番号：1由来のオリゴヌクレオチドCSF及びCSRにより示される。

先に記載されるプライマーにより遺伝増幅により得られた核酸のフラグメントも同様に本発明の対象物を形成する。

その増幅されたフラグメントは、アガロースもしくはポリアクリルアミドゲルでの電気泳動後、又はキャピラリー電気泳動後、あるいはクロマトグラフィー技術(ゲルろ過、又は疎水もしくはイオン交換クロマトグラフィー)後に同定され得る。増幅の特異性は、配列番号：1のヌクレオチド配列、このフラグメント、これらの配列もしくはこれらのフラグメントを含むプラスミド、これらの配列もしくは配列のフラグメントの又は増幅産物の相補的オリゴヌクレオチドをプローブとして用いる分子ハイブリダイゼーションにより制御され得る。

本発明はまた、生物試料中のカンピロバクター・コリの株の存在を検出する方法であって

、
i) 先に定義されるようなプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドフラグメントの対を生物試料に接触させるステップであって、前記試料中に含まれる核酸が、必要に応じて、カンピロバクター・コリに属する株の核酸との前記プライマーのハイブリダイゼーションを許容する条件下で先にハイブリダイゼーションにアクセス可能にされているステップと

、
ii) 前記カンピロバクター・コリの株の核酸を増幅するステップと、

iii) 前記プライマーにより囲まれたフラグメントに対応する核酸のフラグメントの増幅を明らかにするステップと、

iv) 可能であれば、例えば特異的プローブハイブリダイゼーションにより、配列決定することにより、又は制限部位分析により、前記増幅されたフラグメントの配列を立証するステップと、

を特徴とする方法にも関する。

本発明は更に、生物試料中のカンピロバクター・コリに属する株の存在の検出のためのキット又はパックであって、次の要素：

－先に定義されるような一対のオリゴヌクレオチドと、

－カンピロバクター・コリに属する株の核酸の増幅を行うのに必要な試薬と、

－可能であれば、前記増幅されたフラグメントが立証されるのを許容する構成物、特に先に定義されるような核酸プローブと、

を含むことを特徴とするキット又はパックに関する。

このキットは、更に有利には、標識又は非標識プローブを含む。これらは溶液中であり得、又は支持体上に固定化され得る。本キットは、バクテリアの溶菌及び標的核酸の抽出のために必要な試薬、並びに選択された方法に対応したハイブリダイゼーション及び洗浄溶液も含み得る。

本発明は、以下の実施例及び添付の図面に更に詳細に説明される。

図1は、プローブとして用いられるCS1フラグメントとのC. コリの異なる株のDNAのハイブリダイゼーションプロファイルを示す。

図2は、プライマーのCSF及びCSR対でのPCRによる増幅の後に得られた電気泳動結果を示す。

実施例1：

C. コリのゲノムバンクの作製。

そのバンクのスクリーニング及び特異的フラグメントの配列の決定：

C. コリ CIP 70.80のゲノムDNAを、37℃で1時間、製造元により推奨される緩衝液中でDNAの μ g当り0.5Uの酵素を作用させることにより、制限エンドヌクレアーゼHindIIIにより部分的に消化する。これらの条件は、30～40kbの間の長さのフラグメントを有利に得ることを許容する。消化した後、そのDNAフラグメントを含む混合物をフェノール／クロロホルム抽出により精製し、そのDNAをエタノールで沈殿させる。

そのベクターはコスミドpHC79である。それを酵素HindIIIにより消化して、いずれの自己連結をも避けるため脱リン酸化する。

700ngのベクターと3 μ gの30／40kbのDNAフラグメントとを混合することにより、連結を行い、その混合物を適切な緩衝液中5ユニットのT4 DNAリガーゼを添加した後、18時間、12℃で処置する。

その組換えコスミドを試験管内でキャプシドに包み、バクテリア（大腸菌HB101）を形質転換するのに用いる。その形質転換されたバクテリアをLB培地中で37℃で1時間、インキュベートし、次に25 μ g/mlのアンプシリンを含む選択寒天培地上に広げる。次にアンプシリン耐性のコロニーをそれらのテトラサイクリンへのセンシティブティーについて全てテストする；実際、30／40kbのDNAフラグメントは、テトラサイクリンに対する耐性遺伝子（Tet）を不活性化し、アンプシリンに対する耐性遺伝子（Amp）を保護するようにベクター内に挿入される。

アンプシリン耐性（Amp^r）でテトラサイクリンにセンシティブ（Tet^s）な200の最初の形

10

20

30

40

50

質転換体コロニーのDNAのミニ調製をアルカリ溶菌技術に従って行う。次にこれらの調製物のDNAを制限エンドヌクレアーゼHindIIIにより消化し、0.8%アガロースゲル上での電気泳動により分析し、次にナイロンフィルターに移す。そのDNAを3分間、254nmのUVへの露出により不可逆的に固定する。

これらの異なるフィルターを、10%デキストランスルフェートを含む6×SSC緩衝液（1×SSCは0.15M NaCl及び0.015Mクエン酸ナトリウムに相当する）、濃縮Denhardt 5×の溶液（Denhardt 1×の溶液は0.02%のFicoll、0.02%のポリビニルピロリドン及び0.02%のウシ血清アルブミンに相当する）、10mM EDTA、0.5% SDS、100 µg/mlの変性サケ精子DNA及び次の2の種：C. ジェジュニ CIP 70.2、C. コリ CIP 70.80の1の、多重プライミングにより³²Pで放射能標識されたゲノムDNA中で65℃で16～18時間、インキュベートする。

10

ハイブリダイゼーションの後、そのフィルターを65℃で2×SSC中10分間で2回、65℃で2×SSC+0.1% SDS中30分間で1回、そして最後に65℃で0.1×SSC中10分間で1回、洗浄する。そのまだ湿っているフィルターを、15分～3日間、増感紙と共に-80℃でオートラジオグラフィーにかける。

これらのハイブリダイゼーションにより、CS 1 と呼ばれる約2.3kbのフラグメントを含むコスミドクローンが単離される。

そのフラグメントの特異性は実施例2に記載されるように立証された。

2本鎖のDNAのアルカリ変性の後に、コスミドに直接基づくT7シーケンシングキット（Pharmacia）を用いるSanger法に従って、CS 1 フラグメントを配列決定した。³⁵Sで標識されたdATPで全ての配列決定反応を行った。

20

フラグメントの配列決定された部分（600塩基対）は、本記載に添付された配列表に示される。“Genebank”及び“EMBL”データベースとこれにより決定されたフラグメントCS 1の600ヌクレオチドとの比較は、今日知られている配列とのいずれの大きな相同性もない。

実施例2：

本発明の核酸配列をプローブとして用いるサザン技術によるDNA分析：

本研究に用いたバクテリアのリスト及び引用は次の通りである：

カンピロバクター：

C. ジェジュニ亜種ジェジュニ CIP 70.2, CIP 70.86, CIP 81.1

30

C. ジェジュニ亜種ドイレイ (doylei) CIP 103751

C. coli CIP 70.80, CIP 71.5, CIP 70.81, CIP 70.79, CIP 70.78, CIP 70.77, CIP 70.54

C. ラリ CIP 102722

C. アプサリエンシス (C. upsaliensis) CIP 103681

C. フェトウス亜種フェトウス CIP 5395

C. フェトウス亜種ベネレアルリス (venerealis) CIP 6829

C. ハイオインテスチナリス (C. hyointestinalis) (臨床用単離物)

C. スプトルム (C. sputorum) 亜種スプトルム CCUG 9728

C. スプトルム亜種ブブルス (bubulus) CIP 53103

40

C. コンシス (C. concisus) (臨床用単離物)

C. フェカリス (C. fecalis) CIP 12014

C. クルプス (C. Curvus) (臨床用単離物)

非カンピロバクター：

アルコバクター・クリアロフィラ (Arcobacter cryaerophila) CCUG 17801

ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) CIP 101260

大腸菌 HB101

サルモネラ亜属タイフィウム (typhimurium) C 53

サルモネラ亜属サラマエ (salamae)

サルモネラ亜属ジアリゾナエ (diarizonae)

50

エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) JH2-SM

エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) D372 (臨床用単離物)

バクテロイデス・フラギリス (Bacteroides fragilis) E134 (臨床用単離物)

バクテロイデス・フラギリス F238 (臨床用単離物)

結果を図1に示す。ここで、そのトラックの番号は先に列記される株の順番に対応する。

C. コリ以外のカンピロバクター属に属するバクテリアのDNA：

適切な培地

(5%ヒツジ血液寒天、Biomérieux)

中での培養の後、カンピロバクターを次の様に処理する：各々のペトリ皿のバクテリアを2mlのTE-グルコース緩衝液(25mM tris HCl、pH8、10mM EDTA、50mMグルコース)に収集し、5分間、5000gで遠心し、そのペレットをTEグルコース中に再分散して洗浄し、次に再び遠心し、そのバクテリアを100μlのTE緩衝液(10mM tris HCl、pH8、1mM EDTA)中に再懸濁し、そしてそのDNAをPitcher et al.の技術(Lett.Appl.Microbiol., 1989, 8, 151~156)に従って抽出する。これにより抽出されたDNA 2μgを酵素HindIIIにより全て消化する。次に得られたフラグメントを、0.8%のTAEを含アガロースゲル上の電気泳動により分離し、その後サザン技術に従ってナイロン膜に移す。

移されたフラグメントを分子ハイブリダイゼーションにより分析する。³²Pにより標識されたプローブCS1はC. コリのDNAを特異的に検出し、C. ジェジュニのゲノム上に位置したDNAフラグメントと極めて少しハイブリダイズする以外は他のカンピロバクターのゲノムDNAとハイブリダイズしない。このクロスハイブリダイゼーションは18時間の露出の後まで検出されないが、C. コリのDNAは3時間の露出後に検出可能である。

カンピロバクター属に属さないバクテリアのDNA：

これらのバクテリア及び陽性対照として用いたC. コリのDNAを制限酵素HindIIIにより加水分解し、次にそのフラグメントをアガロースゲル上での電気泳動により分離し、Hybond-Nナイロン膜上に移した。これらの異なるDNAフラグメントをランダムプライムDNAラベリングキット(Boehringer)の技術に従って、³²Pで標識されたフラグメントCS1をプローブとして用いて、分子ハイブリダイゼーションにより分析する。オートラジオグラフィは、C. コリの種のみが検出されることを示す。72時間の露出後でさえ非カンピロバクター種のDNAのハイブリダイゼーションは検出され得ない。

実施例3：

本発明に関連する核酸配列で開始する定義されるプライマーでのC. コリのDNAの試験管内酵素増幅。

プライマーの選択：

PCRの特異性を決定するのは本質的にオリゴヌクレオチドプライマーの3'端であることが示されている。これにより、この3'領域が増幅されるべき標的に完全に特異的であることが重要である。

カンピロバクターのゲノムが極めて低い割合のグアニン及びシトシン(G+Cの28~38%の間)を有するなら、本発明者らはその3'端がG+Cで豊富であるプライマーが高い特異性を有し得るだろうと考える。

コンピュータープログラムにより、本発明者らは、配列CS1の内側にCS1上に1回のみ存在するG+Cの豊富な領域があることを発見した。それは、プライマーの配列が位置したこれらの領域から開始し、約20ヌクレオチドの長さを得るように終了する。

オリゴヌクレオチドプライマーの合成：

CSF及びCSRと呼ばれ、22ヌクレオチドの長さを有する配列CS1由来のプライマーを、Institut Pasteurの有機化学サービスによる自動システム上でのホスホルアミジト法により合成した。各々のプライマーの濃度は分光光度計により測定される。

増幅：

1μMのCSF及びCSRオリゴヌクレオチド及び30~100ngのカンピロバクターの異なる株のDNAを、25mM KCl、20mM tris HCl、pH8.5、1.5mM MgCl₂、200μMデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート及び100μg/mlのウシ血清アルブミンを含む緩衝液中0.5ユニットの

10

20

30

40

50

Taqポリメラーゼであって、その反応物の最終容量を50 μ l としたものと共に用いて、Sai ki et al.により記載されるプロトコル (Science, 1988, 239, 487~491) に従って、試験管内酵素増幅技術 (PCR) を行う。PCR段階のパラメーターを次のようにして選択した：94℃で5分、60℃で1分、72℃で1分、次に (94℃で1分、60℃で1分、72℃で1分) を38回、及び94℃で1分、60℃で1分、そして72℃で5分の最後のサイクル。次に自動装置を用いて40サイクルを行う。その最後のサイクルの後、分析するまでその試料を4℃に維持する。

増幅された試料のアガロースゲルでの電気泳動分析：

増幅された試料10 μ l を1 μ g /mlのエチジウムブロミドを含むTBE緩衝液 (0.04M トリス・ボレート、0.001M EDTA) 中で2%アガロースゲル上におく。その増幅されたフラグメントをUV下で視覚化し、そのゲルをPolaroid 667フィルムを用いて写真をとる。

10

異なる種のカンピロバクターのDNA並びにCSF及びCSRプライマーで得られた結果は、得られた増幅フラグメントの長さがこのプライマーの対で予測された258塩基対の理論的長さに相当することを示す。

これらの結果に加えて、分析されたDNAが次の種又は属：C. ジェジュニ亜種ジェジュニ、C. ジェジュニ亜種ドイレイ、C. ラリ、C. アプサリエンシス、C. フェトゥス亜種フェトゥス、C. フェトゥス亜種ベネレアルス、C. ハイオインテスチナリス、C. クリエロフィラ、C. スプトルム亜種スプトルム、C. スプトルム亜種ブブルス、C. フェカリス、C. コンシスス、C. クルプス、大腸菌、ヘリコバクター・ピロリ、アルコバクター・クリエロフィルス、サルモネラ亜種サラマエ、サルモネラ亜種ジアリゾナエ、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、バクテロイドス・フラギリス又はヒト細胞の抽出物である場合、いずれの増幅されたフラグメントも見られない。もちろん、テストされたC. コリの全ての株は陽性結果を示し、病気の人々から収集した株又は単離物であり得る。

20

結論として、全てのこれらの結果は、PCR技術により及び本発明に記載されるプライマーにより、C. コリ種を特異的に検出することが可能となり、それはC. コリに感染した病気の人々及び生物試料の単離物が同定され得ることを考慮させ、これにより本方法が臨床細菌学の分野、獣医学及び農産物工業において利用可能となる。

配列表

II—配列番号：1の情報：

30

配列の特徴：

配列の型：ヌクレオチド

配列の長さ：604塩基対

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の型：DNA

生物名：Campylobacter coli

名 前：CS 1

配列の記載：

```

      10      20      30      40      50
TTAAAAAGAC TTATTTCCAT ACTAAATCAA CCCAAATAAA AATAAAAAAT

      60      70      80      90     100
ATTATACTTA AATATCCATT TAAAGTAAAA AACGCTTTAT CAATGTGAGC

     110     120     130     140     150
AAAATTTTTA TGTACAATTT TATGTTCAAA AGCCAAAATA ATACCGCTGA

     160     170     180     190     200
TAATCATTCG AAATAATGCA ATATTTCCAA GCGCTACTCC CCAAACCTGC

     210     220     230     240     250
CAAACAAAAA GTAGCCAAAA TAATACTGCT AATACATGGC AAAAGCCGAG

     260     270     280     290     300
ATAAATAAAG TCGCCTTAGA GCCAAATTTA GCAGGGATAG AATGAAGTCC

     310     320     330     340     350
TACTTTTTTA TCATACTCCA TATCTTGTA AGAGTAAAGC AAATCAAATC

     360     370     380     390     400
CAGCCGTCCA AAAAGTTACC CCTAAGCATA AAATCACACT ATAAATGTGA

     410     420     430     440     450
ATTTCACCCA TGACTATCAC ACTGCCTGCA ATAGGTGCAA GTCCTAAACA

     460     470     480     490     500
AAATCCTAAA ACTAAATGCG CTAAAGACTA AAGCGTTTAA AAGCAGAATA

     510     520     530     540     550
AATTGCCAAT ACAAAAAGCA CAGGAAAAGA AAGATAAAAA GCCAAAGTAT

     560     570     580     590     600
TGATAAAATA AGAACACAAT ATAAAAATA TCGCATTAGG ATAATAAAT

```

604

CCAA

III－配列番号：2 の情報：

配列の特徴：

配列の型：ヌクレオチド

配列の長さ：22塩基対

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の型：合成オリゴヌクレオチド

生物名：Campylobacter coli

名 前：CSF

配列の記載：

CSFプライマー： 5'ATA TTT CCA AGC GCT ACT CCC C3'

IV－配列番号：3 の情報：

配列の特徴：

配列の型：ヌクレオチド

配列の長さ：22塩基対

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の型：合成オリゴヌクレオチド

生物名：Campylobacter coli

名 前：CSR

配列の記載：

5' CAG GCA GTG TGA TAG TCA TGG G 3'

【図 1】

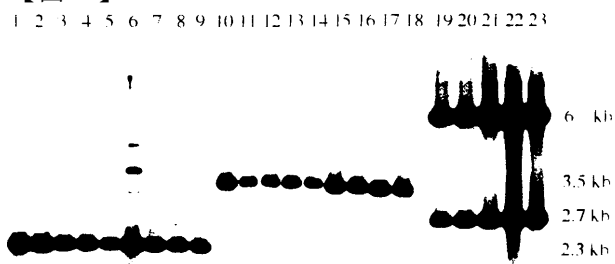


FIG.1

【図 2】

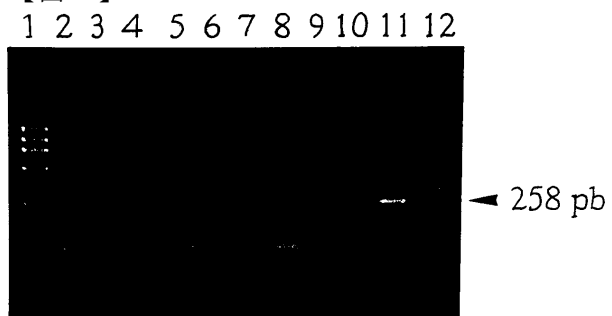


FIG.2

フロントページの続き

- (72)発明者 ストネ, ベロニク
フランス国, エフ-9 2 6 0 0 アズニエーレ, リュ デュ サブリエーレ 2 4
(72)発明者 グェスドン, ジャン-ラク
フランス国, エフ-9 2 3 1 0 セブレ, グラン リュ 3 3

審査官 深草 亜子

- (56)参考文献 特開平2-1 5 4 7 0 0 (J P, A)
J.Clin.Microbiol., 1 9 9 3年, Vol.31, p.3340-3343

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/00 - 3/00
BIOSIS/MEDLINE/CA(STN)