

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3955817号

(P3955817)

(45) 発行日 平成19年8月8日(2007.8.8)

(24) 登録日 平成19年5月11日(2007.5.11)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 27/447 (2006.01)

F I

G O 1 N 27/26 3 1 5 Z

G O 1 N 27/26 3 1 5 F

G O 1 N 27/26 3 1 5 G

G O 1 N 27/26 3 0 1 A

請求項の数 17 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2002-542115 (P2002-542115)	(73) 特許権者	500360460
(86) (22) 出願日	平成13年11月2日 (2001.11.2)		セントロ ナシオナル デ インベスチガ
(65) 公表番号	特表2004-513375 (P2004-513375A)		シオネス シエンテイファイカス
(43) 公表日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		キューバ国、シウダド デ ラ ハバナ、
(86) 国際出願番号	PCT/CU2001/000008		プラヤ、 キュバナカン、アベニダ 2 5
(87) 国際公開番号	W02002/038802		ナンバー 1 5 2 0 2 エスク. ア 1
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)		5 8
審査請求日	平成16年10月26日 (2004.10.26)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	2000/0247		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成12年11月7日 (2000.11.7)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	キューバ (CU)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 迅速微生物型分類法及び関連試薬キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記方法；

細菌DNA制限フラグメントのPFGE分離がCHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) 又はTAFE (Transversal Alternating Field Electrophoresis) システムのミニチャンパー中において7から13時間行われ；該フラグメントのDNA移動 (D) はDNAサイズ (L)、電場 (E)、緩衝液粘度 (η , 緩衝液温度の関数) を代入することにより種々のパルス時間 (tp) において、そして既知の理論式のグループにおけるパルス時間すなわち、式1：

$$\sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$$

10

(n, パルス回ランプの数；Np, パルスの数) としてのD, 式2：

$$'vr \cdot tp_r \cdot \Gamma_r(tp_r - tr) + vm \cdot (tp_r - tr) [1 - \Gamma_r(tp_r - tr)]',$$

としてのd (パルス当りの移動)、式3：

$$'0.0207[QE^{1.45}/8\pi\eta L^{1.35}]'$$

20

としての v_r (DNAリオリエンテーション速度)、式4:

$$0.665[QE^{1.76}/8\pi\eta L^{1.08}]$$

としての v_m (リオリエンテーション後のDNA速度)、 $0.134 (L^{1.14}/Vr)^{0.926}$ としての tr (DNAリオリエンテーション時間) において計算され; 式中、式5:

$$\Gamma_r(tp-tr)=1 \text{ if } tp-tr \leq 0 \text{ and } \Gamma_r(tp-tr)=0 \text{ if } tp-tr > 0$$

そして電気泳動は1.5%アガロースゲル及び0.5X TBE緩衝液中で行われ; その改良が以下を含む: 10

a) 下記により行われる *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 又は *Staphylococcus aureus* 細胞の完全な固定化DNAの調製の段階:

i) それにより固定化完全DNA分子が該細菌細胞から調製される試薬キットを構成する化学試薬の溶液のセット、以下の成分を有するキットの溶液:

- 塩 (0.15 M NaCl) 又は金属キレート剤 (0.01 M EDTA) 及び塩 (0.15 M NaCl)、細菌細胞を洗いそしてアガロースミニプラグ中に包埋する該キットの溶液、
- 金属キレート剤 (0.1 M EDTA)、2種の陰イオン界面活性剤 (1%サルコシル及び1% Nonidet P-40) 及び0.01 M Tris塩基、さらに4 M 尿素を含む溶液、細菌細胞が処理される該キットの溶液、

- 金属キレート剤 (0.1 M EDTA) 及び0.01 M Tris塩基、ミニプラグを洗いそして保存する該キットの溶液;

ii) 細菌細胞を含むアガロースミニプラグを成型するための柔軟な鋳型; 鋳型はシリコンのような材料のシートであり、硝子の蓋で覆われている; シートは0.5 cmまでの厚さでそしてその片面に0.3 cmの大きさのいくつかの正方形で0.03から約0.1 cmの深さの窪みを打ち抜き、その窪みの中でアガロース-細菌細胞混合物が固化しそして該サイズのミニプラグを提供し、その鋳型は該ミニプラグを取り出すことができる十分な柔軟性がありそして高圧蒸気滅菌後に再使用でき、該鋳型と硝子蓋は完全に組み合わせられそして方法にしたがって細菌細胞を固定化するために使用される、

iii) 各細菌種による柔軟性鋳型及び該試薬キットの使用方法、

(b) 該細菌種のDNA制限フラグメントのミニチャンバー中での分離に先立つ計算の段階; ミニCHEFの最適電気泳動実施条件を選択する段階; 段階は以下を含む計算方法によって行われる;

i) 電場1から20 V/cm及び温度4から30°Cに対して d , tr , vr , 及び細菌DNA制限フラグメントの V_m のデータセットの入力、数値のセットはDNAサイズ、電場及び温度を tr , vr , v_m 及び d を記述する既知理論式のグループに代入することにより得られる、

ii) ランプのパルス持続時間又はDNA分子を最も効果的に分離するパルス時間のシリーズの計算、

iii) 段階 (ii) において計算されたパルス持続時間のシリーズに対する総電気泳動時間、又は最も有効な電気泳動時間の計算、

iv) 該最適電気泳動条件又は最も有効なパルス持続および電気泳動時間のランプに対するバンドパターン図の計算、図はこの方法の結果として与えられそしてDNA移動に従って分離された種々の色の線によって描かれたバンドによって示される; 図の中の色によってそれぞれの大きさの制限フラグメントを確認する; そのため単一の対応カラーコードによりフラグメントの大きさを同定する、いくつかの段階により各計算を行う; そしていくつかのタームにより形成されたシリーズ又はランプであり、その中の各タームはパルス持続時間 (tp) であり、そして各タームは最も有効な電気泳動時間を与える対応するパルス数 (N_p) を伴っている、

よりなるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による迅速細菌型分類方法。

【請求項2】

該柔軟性がありそして高圧蒸気滅菌できる鋳型を形成するシートがシリコン、ゴム又はいずれかの柔軟性材料から造られており、シートには片面にいずれかの形、大きさ及び数の同じ正方形の窪み（望ましくは50まで）が打ち抜かれている請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項3】

アガロースミニプラグ中に完全な固定化DNAを作るための該柔軟な鋳型の一つの組み立て及び使用方法が以下の段階を有する：

- i)細菌細胞及びアガロースの懸濁を鋳型の窪みの打ち抜かれた表面に注ぐ；
- ii)該懸濁をスパーテルで該窪みを満たすように均等に配分する；
- iii)鋳型を蓋で覆いそしてミニプラグが形成されるまで置く；
- iv)フラスコ上で鋳型を曲げてミニプラグを取り出す、

10

請求項1及び2に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項4】

該試薬キットの細胞洗浄溶液の組成が0.15 M NaClおよび0.01 M EDTA, pH 8.0（溶液No.1）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項5】

該試薬キットの細胞洗浄溶液の組成が0.15 M NaCl（溶液No.2）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項6】

該試薬キットの細胞包埋溶液の組成が0.15 M NaCl 中の1.5から2 %の低融点アガロース懸濁（溶液No.3）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

20

【請求項7】

該試薬キットの細胞包埋溶液の組成が0.15 M NaClおよび0.01 M EDTA, pH 8.0中の1.5から2 %の低融点アガロース懸濁（溶液No.4）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項8】

該試薬キットの細胞処理溶液の組成が0.1 M EDTA, 1% サルコシル, 1% Nonidet P-40及び0.01 M Tris塩基, pH 8.0（溶液No.5）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項9】

該試薬キットの細胞処理溶液の組成が0.1 M EDTA, 1% サルコシル, 1% Nonidet P-40, 0.01 M Tris塩基, 及び4 M尿素, pH 9.5（溶液No.6）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

30

【請求項10】

該試薬キットのミニプラグ洗浄及び保存溶液の組成が0.1 M EDTA及び0.01 M Tris塩基, pH 8.0（溶液No.7）である請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項11】

P. aeruginosa 細胞の完全固定化DNAを調製するための該試薬キット及び該柔軟な鋳型の一つの使用方法が以下の段階を含む：

- i)ブロス又はプレートから細胞を回収しそして該試薬キットの溶液No.2の中で洗い、
- ii)該試薬キットの溶液No.3 中に細胞を懸濁しそしてその懸濁を柔軟な鋳型に注ぐ、
- iii)アガロースが固化した後該鋳型を曲げるにより鋳型からミニプラグを取り出し、そしてそれを該試薬キットの溶液No.6 中30分間50℃でインキュベートし、
- iv)ミニプラグを2回50℃で10分間該試薬キットの溶液No.7 中で洗い、そしてさらに該溶液中で保存する請求項1～10に記載の迅速細菌型分類方法。

40

【請求項12】

S. aureus 細胞の完全固定化DNAを調製するための該試薬キット及び該柔軟な鋳型の一つの使用方法が以下の段階を含む：

- i)ブロス又はプレートから細胞を回収しそして該試薬キットの溶液No.1の中で洗い、
- ii)該試薬キットの溶液No.4 中に細胞を懸濁しそしてその懸濁を柔軟な鋳型に注ぐ、
- iii)アガロースが固化した後該鋳型を曲げるにより鋳型からミニプラグを取り出し

50

、そしてそれを該試薬キットの溶液No.6 中60分間50℃でインキュベートし、

iv)ミニプラグを2回50℃で10分間該試薬キットの溶液No.7 中で洗い、そしてさらに該溶液中で保存する請求項1~10に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項13】

E. coli 細胞の完全固定化DNAを調製するための該試薬キット及び該柔軟な鋳型の一つの使用方法が以下の段階を含む：

- i)ブロス又はプレートから細胞を回収しそして該試薬キットの溶液No.1の中で洗い、
- ii)該試薬キットの溶液No.3 中に細胞を懸濁しそしてその懸濁を柔軟な鋳型に注ぐ、
- iii)アガロースが固化した後該鋳型を曲げることにより鋳型からミニプラグを取り出し、
- iv)ミニプラグを30分間50℃で該試薬キットの溶液No.6 中でインキュベートし、
- v)ミニプラグを該試薬キットの溶液No.7 で洗い、そしてさらに該溶液中で保存する請求項1~10に記載の迅速細菌型分類方法。

10

【請求項14】

該ミニチャンバーにおいて該細菌種のDNA制限フラグメントを分離するのに先立つ計算の段階がミニCHEFで実施する最適電気泳動条件が選択できる計算方法により達成され、その方法は下記段階を含む：

- i) 計算方法に該細菌種のDNA制限フラグメントのパルス当りの移動 (d)、リオリエンテーション時間 (tr)、リオリエンテーションの間の移動速度 (vr) 及びリオリエンテーション後の移動速度 (vm) のデータセット、DNA分子の tr, vr, vm及びdを記述する既知理論式のグループにDNAサイズ、電場及び実施温度を代入することにより計算されるデータセットを特定する、

20

- ii)パルス持続時間の最も有効なシリーズ (ランプ) を計算する、
- iii)段階 (ii) で計算したパルス持続時間のシリーズに対する最も有効な電気泳動実施時間を計算する、

- iv) 最も有効なパルス持続時間のシリーズ及び最も有効な電気泳動時間に対する全てのDNA制限フラクションの移動距離 (D) を計算する、

- v)推定バンドパターン及びミニゲルの図を描く、図はミニゲルの図にスケールを合わせたDNA移動によって描かれる、

- vi)異なるd, tr, vr及びvmのデータセットで段階 (i) から(v)を反復し、種々の電場及び温度において得られ、そして最後にバンドパターン図において仮説的バンドの最善の分離を与えるパルス持続のシリーズ及びパルス数を選択する、
- 請求項1に記載の迅速細菌型分類方法。

30

【請求項15】

DNA分子を最も有効に分離するパルス持続時間 tp_r のシリーズ (ランプ) を計算する段階が下記段階に従って行われる：

- i) 選択された電場及び温度において最小及び最大のDNAフラグメントのリオリエンテーション時間 (それぞれ、 tr_A 及び tr_B) をこの段階に特定する、

- ii) tr_A より1.5倍少ない値から初めそして tr_B より1.5倍大きい値で終わるパルス持続 ($tp_r = tp_1, tp_2, \dots, tp_n$) のシリーズ (ランプ) のnターム (nは2から1000) を計算する；シリーズの増分 Δ は続くタームの間の共通差である；したがって、最も有効なシリーズは： $tp_1 = tr_A / 1.5, tp_2 = tp_1 + \Delta, tp_3 = tp_1 + 2\Delta, \dots, tp_n = 1.5 \cdot tp_B$ ；式中 $\Delta = |(tp_1 - tp_n)| / (n-1)$ 、そして $n = te / (tp_1 + tp_n)$ ；teは電気泳動実施時間、
- 請求項1及び14に記載の迅速細菌型分類方法。

40

【請求項16】

パルス持続の計算されたシリーズに対する最も有効な電気泳動実施時間を計算する段階が下記段階に従って行われる：

- i) パルス持続の該シリーズ ($r=1..n$ に対する tp_r) のターム ($tp_1, tp_2, \dots, tp_n$) 及び該シリーズのタームの数nをこの段階に特定する、

- ii)最小DNA制限フラグメントのパルス当りの移動 (d_{r_A}) のセットをこの段階に特定す

50

る；その中の該分子のパルス当りの移動のセットは選択したシリーズのパルス（ $tp_1, tp_2, \dots, tp_n$ ）及び電場及び温度に対して決められる；パルス当りの移動のセットは d を記述する既知理論式に最小DNA制限フラグメントの tr, vr 及び vm を代入して計算される、

iii) シリーズの全タームに相当するパルスの数（ Np_r ）の初期値をセットする；1から n の間の r に対する全ての Np_r に対する推奨される初期値は1である、

iv) 各ターム tp_r を伴う Np_r （全ての tp_r, Np_r 、及び $r=1..n$ に対して）を1増加し、そしてシリーズの n タームに対して最小分子の移動 D を計算する；計算は

$$D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$$

10

として行われる；

v) 該分子が該仮説的ミニゲルの端から0.1から1 cm離れたミニゲルの領域に達することを D の値が示すまで段階iv)を反復する；そして、 Np_r の増加を終了し、そして最も有効な実行時間を推測する現在の Np_r 値を選択する、

vi) 総実施時間として

$$2 \cdot \sum_{r=1}^n tp_r \cdot Np_r$$

として計算された値を採る、

20

請求項1, 14及び15に記載の迅速細菌型分類方法。

【請求項17】

所与のミニゲルのスケールに合わせてバンドパターンの図を描くための段階が最も有効なパルス持続のシリーズ（ランプ）及び最も有効な電気泳動実施時間における全てのDNAフラグメントにより移動した距離 D の計算に基づいている；描画は下記段階を含む：

i) パルス持続のシリーズ（ランプ）のターム n の数、シリーズの各タームのパルス持続（ tp_r ）、及び各 tp_r に伴うパルスの数（ Np_r ）、この r は1から n の間、をこの段階に特定する、

ii) 該細菌種の全てのDNA制限フラグメント（ $f_1, f_2, \dots$ ）のパルス当りの移動（ $d_{r1}, d_{r2}, \dots$ ）のセットをこの段階に特定する；該フラグメントのパルス当りの移動の該セットはシリーズのパルス（ $tp_1, tp_2, \dots, tp_n$ ）及び選定される電場及び温度に対して決められる；パルス当りの移動のセットは d を記述する既知理論式に各DNA制限フラグメントの tr, vr 及び vm を代入して計算される； d_{r1}, d_{r2} は二つの異なるフラグメントのパルス当りの移動のセットである、

30

iii) 該DNAフラグメントが仮説的ミニゲル中を移動する距離を計算する、計算においてミニゲル中の各フラグメントの移動距離 D は

$$D = \sum_{r=1}^n d_r \cdot Np_r$$

として得られる、

40

iv) 実際のミニゲルと同じ矩形を描き、そして大きな該矩形の中に種々の小さな矩形を描く、図の中の小さな矩形はDNA検体が仮説的に負荷されたスロットを示す、

v) パターンの図の中で各フラグメントは特定の色が指定される、バンドパターンの推定及び描画の後にその色は該フラグメント及びその大きさを同定する；すなわち、分離図に線として描かれたバンドに仮説的に含まれている分子の大きさを同定するカラーコードを使用する、

vi) フラグメントにより形成される仮説的バンドを示す小さな矩形のそれぞれの下に着色した線を描く、その中の各線は該小さな矩形、又はスロット、対応するフラグメントが実際のミニゲル中を移動した距離 D から離れている、

請求項1及び14～16に記載の迅速細菌型分類方法。

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

備考

国際特許分類：C12N 1/00

【0002】

関連出願の引用

本発明は分子生物学に関するものである。特に、方法が提供される。該方法は迅速に微生物を型分類するための方法及び手順並びに試薬キットの使用を含んでいる。型分類される微生物はイースト、寄生虫及びグラム陽性及びグラム陰性細菌である。微生物型分類はCH EFまたはTAFEシステムのミニ装置で行なうパルスフィールドミニゲル電気泳動により実施される。

10

【0003】

発明の背景

この数年間に、感染症は増加しそして多剤耐性微生物が出現してきた (Acar J and Courv alein P pp50-53; Aubry-Damon H and Andre mot A, pp54-55; Trieu-Cout P and Poyart C, pp62-66, in 'La Recherche', vol 314, 1998)。

【0004】

感染症の多発により原因微生物の型分類の必要性を生じた。型分類は所与の属の微生物の種々の種類をそれぞれの亜群または亜型に分類する方法である (Busch U and Nitschko H, J Chromatogr B, 1999, 722: 263-278)。型分類は疫学的観点から、感染の発生を認識し、医療機関における病原菌の伝染経路を探りそして感染源を検出するために重要である。新しい毒性株を同定しまた予防接種計画を監視するのに有用である。型分類法は以下の基準を充たす場合に適すると見なされている (Maslow JN et al., Clin Infect Dis, 1993, 17: 153-164)：

20

1. 分離したものそれぞれに対して紛らわしくない結果を示す。
2. 再現性のある結果を示す。
3. 種内の関係の無い株を分別する。

【0005】

いくつかの型分類法がある。その一部は表現型特徴の分析に基づいており (表現型法)、またその他は遺伝子型特徴の分析に基づいている (遺伝子型法)。表現型法は微生物によって発現される特徴を検出するが、他方遺伝子型法は微生物のDNAの相違を立証する。表現型法は遺伝的背景の変化を間接的に示すと言う欠点を持っている。該欠点は遺伝子型法を使用する場合には生じない。

30

【0006】

最も広く使用されている遺伝子型型分類法の一つはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) である。この方法は微生物の分子的型分類に対しては金本位制と考えられている。PFGE型分類は、2つの異なる方向に電気パルスの作用を受けたDNA分子がゲル中において分離することによって行なわれる。電気泳動の後、単離した微生物のDNA分子によって示されるバンドパターンは極めて再現性良く、特異的でありそして明確にそのDNAを示す (Oliver DM and Bean P, J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1661-1669)。さらに、多数の単離体の全ゲノムを1枚のゲル上で比較することが可能である。このように、PFGEは理想的型分類法と言われている (Maslow JN, Mulligan ME and Arbeit RD, Clin Infect Dis, 1993(17): 153-164; Busch U and Nitschko H, J Chromatogr B, 1999(722): 263-278)。PFGEにより得られる結果は、DNA分離に使用した実験条件及び試験に使用する微生物の属及び種に影響される。一例として、

40

a) 微生物が10 Mb (1メガ塩基=1 000 000塩基対) よりも小さな数個の線状染色体を持つ場合には、その染色体により示されるバンドパターンが得られる。該バンドパターンは「電気泳動核型」と言われる。例えば、このような微生物にはイースト、単細胞寄生虫などがある。

50

b) 微生物が1つの大きな環状染色体を持つ場合には、該環状DNAのマクロ制限フラグメントにより示されるバンドパターンが得られる。それは特別な実験条件において得られるので、そのパターンはパルス型と呼ばれる。例えば、そのような微生物は*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*などのような細菌である。

【0007】

異なる株の電気泳動核型を比較することによりその特徴づけ及び区別をすることができる。細菌DNAの制限フラグメントについても同じことが生じる。したがって、分子核型及びパルス型の両者共に菌、細菌及び寄生虫の比較試験に使用される。医療細菌学においてPFGEを日常的に使用することから検体調製法の改良の必要性を生じた。また分子を適切に分離し、そして得られた電気泳動パターンを分析するための実施条件を先験的に設計する必要を生じた。

10

【0008】

一般的に、PFGEによる微生物型分類法の操作は以下の段階及び手順からなる：

- 1) 検体調製：栄養ブロス中で微生物を増殖し、細胞をゲル中に包埋し、固定化し、脱タンパクした完全なDNA分子を得る。
- 2) 電気泳動条件の設定：分子間の分離を最良に行なうためのPFGE装置にセットすべき実験条件の選択。
- 3) ゲルに検体を乗せて、DNA分子を分離するためにパルスフィールドゲル電気泳動を実施する。
- 4) 電気泳動により得られたバンドパターンを分析し、そして他の微生物分離体によって得られた成績と比較する。

20

【0009】

PFGEによる微生物型分類に現在使用されている装置と手順を分析する。

【0010】

パルスフィールドゲル電気泳動。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は、Schwartz and Cantor (Cell, 37, 67-75, 1984; US Patent No. 4,473,452) がアガロースゲル中においてある角度をもつ方向に電気パルスを周期的に変えることにより大きな完全なDNA分子がバンドパターンとして分離することを観察した1984年に始まる。

【0011】

30

その著者等はまた、分子の分離は本質的に電気パルスの持続に依存することも認めていた。後に、場力線の角度、電場強度、実験温度、緩衝液のイオン強度、アガロースゲルの濃度及び検体を包埋するアガロースプラグの厚さ、がDNA分子の分離に影響する最も重要な因子であることが判明した (Birren B. and Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis : a practical guide. Academic Press. New York, 1993, p 107, 111, 129, 131,135; Lopez-Canovas L. et al., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139; Lopez-Canovas L. et al., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197)。

【0012】

PFGEを実施する別のシステムが開発された。それらは異なる配置に電極を収めた特徴的な容器を有している。その中にはOFAGE (直交場変換ゲル電気泳動、Carle C.F. and Olson M.V. Nucleic Acids Res. 1984, 12, 5647-5664)、CHEF (「等高線固定均一電場」、Chu G. Science 234, 1986, 1582-1585)、TAFE「交差変換場電気泳動」、米国特許No. 4,740,283)、FIGE(「場反転電気泳動」、Carle G.F. and Olson M.V.の米国特許 No. 4,737,251) 電極配置、及びMiniTAFE及びMiniCHEFのミニ容器 (Riveron, A.M. et al., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; 欧州特許申請EP 0 745 844, Bula, 1996/49; 米国特許申請08/688,607, 1995; キューバ特許RPI Nro. 02/95, 1995) がある。

40

【0013】

PFGEによる微生物型分類に一般的に使用されているシステム

PFGEによるDNA分析に基づく微生物型分類にもっとも良く使用されているシステムはCHEF及びTAFEである。それらはゲルの各レーンに直列的なバンドパターンを示し、そのため1

50

回の電気泳動の中であるいは異なる電気泳動の間で結果の比較が可能である。

【0014】

CHEFシステムの電極はゲルの周囲に六角形に配置されそしてゲル全体に均一な電場を保証するために電圧は固定されている。容器内全体に均一な電場を生じるためにゲルのレーンの中に直線的なバンド及び再現性の良い移動を得ることができる。対極の電極はCHEF容器中33.5 cm離れている。幅と長さ21×14 cmまでのサブマリングルを使用する。ゲルは水平に置く (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. 説明マニュアル及び応用案内。カタログ番号170-3670から170-3673、BioRad, pp 11, 1995)。言及したように、CHEFシステムは微生物型分類に非常に良く使用されている。例えば、細菌 (Beverly, S, Anal Biochem, 1989, 177: 110-114; Dingwall A and Shapiro L, Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 119-123; Ferdows MS and Barbour AG, Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 5960-5973; Kohara Y, Akiyama K and Isono K, Cell, 1987, 50: 495-508; Ohki M and Smith CI, Nucleic Acids Res, 1989, 17: 3479-3490; Schoenline PV, Gallman LM and Ely B, Gene, 1989, 70: 321-329; Ventra L and Weiss AS, Gene, 1989, 78: 29-36), *Pseudomonas* (Bautsch W, Grothues D and Tummeler B, FEMS Microbiol Lett, 1988, 52: 255-258; Romling U and Tummeler B, J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 464-465), *S. cerevisiae* (Albig W and Entian KD, Gene, 1988, 73: 141-152; Zerva L et al., J Clin Microbiol, 1996, 34(12): 3031-3034), *E. histolytica* (Petter R et al., Infect Immun, 1993, 61(8): 3574-3577), *S. pneumoniae* (McEllistrem MC et al., J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 351-353), *S. aureus* (Wichelhaus TA et al., J Clin Microbiol, 1999, 37(3): 690-693), *M. tuberculosis* (Singh SP et al., J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1927-1931), *P. haemolytica* (Kodjo A et al., J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 380-385)など。

【0015】

CHEF容器が大きいために、電極台を被う緩衝液は大量に必要となる。そのために弱い電場を適用したとしても、容器内の電流は大きくなってしまう。したがって、CHEF実験は高出力の電源を必要とする。その上、電場の増加による泳動時間短縮を妨げている大量の熱が容器内に発生する。CHEF容器は*Saccharomyces cerevisiae*染色体 (1.6 Mbより小さな分子、1 Mb = 10^6 塩基対) を11バンドの特徴的なパターンに分離し、そしてこのイーストの異なる株を型分類するために少なくとも20時間の電気泳動を必要とする (Zerva L, et al., J Clin Microbiol, 1996, 34(12): 3031-3034)。CHEF容器は細菌DNA分子のマクロ制限フラグメントを分離するために長時間を要し、20時間かそれ以上必要である (van Belkum A et al., J Clin Microbiol 1998, 36(6): 1653-1659; Marchadin H et al., Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(1): 213-216; Romling U and Tummeler B, J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 464-465)。同様に、*Entamoeba histolytica*のような寄生虫の試験にも長い実施時間が必要である。その染色体を分離するために少なくとも24時間は必要である (Petter R et al., Infect Immun, 1993, 61(8): 3574-3577)。

【0016】

現在使用されているCHEF装置の利点は1回の泳動で40検体の分析ができることである。この高い検体処理能力が多数の単離検体の電気泳動パターンの比較分析を容易にしてきた。

【0017】

TAFEシステムはKJ Gardiner, W Laas and D PattersonによりSomatic Cell Mol Genet, 1986(12): 185に発表した論文において提案された。彼らは最初このシステムを「垂直パルスフィールド電気泳動」(VPFE)と呼び、そして1988年4月26日の米国特許4,740,283により保護された装置を開発した。

【0018】

TAFEシステムにおいては、2対の電極は、容器中に垂直に置かれたサブマリングル (10×7.6×0.64 cm, 長さ×幅×厚さ) の両辺に平行して設置される。該電極配置はゲル上で交差する電場力線を生じ、各パルス毎にゲルの中で分子を移動させる。TAFEでは、同じサイズの分子は同じ距離移動し、ゲルの中の (検体を入れた) ウエルの位置に関係なく、直線

10

20

30

40

50

進路から外れてゲル上の同じ高さに移動する。この様に、多数の単離体検体の電気泳動パターンの比較分析を容易にするので、微生物型分類には有用である。

【0019】

このような原理に基づいて、ベックマン機器会社は、TAFEとしても知られている「Geneline I, または交差変換場電気泳動 (Transverse Alternating Field Electrophoresis System)」を製造した (Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco Division of Beckman Instruments Inc., 1988)。このシステムは20検体を適用できるゲル (11×7.2×0.6 cm, 長さ×幅×厚さ) を使用している。しかし、TAFEはやはり大量の緩衝液 (3.5リッター) 及び生物検体を必要とする。装置は *E. histolytica* の染色体を分離するのに少なくとも20時間を要する (Baez-Camargo M et al., Mol Gen Genet 1996, 253 : 289-296)。したがって、TAFEは微生物型分類においてCHEFと同じ欠点を抱えている。

10

【0020】

結論として、微生物及び寄生虫のゲノムを分析するために最も頻繁に使用される市販装置は、そのバンドパターン中で大きなDNA分子を分離するには長時間の泳動、及び大量の試薬及び生物検体を必要とする。

【0021】

FIGEシステムは細菌の迅速型分類に使用されてきた (Goering RV and Winters MA, J Clin Microbiol, 30(3) : 577-580, 1992; Grothues D et al., J Clin Microbiol, 26(10) : 1973-1977, 1988)。しかし、FIGE実験においてDNAの電気泳動移動性の逆転が報告された。DNAの移動性逆転は正しいサイズ測定をできなくし、また多数の検体から得られるパターンの解明と比較を困難にする。DNA移動性逆転が発生する時を予測できないことが該現象による問題の一つである (Birren B and Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis : a practical guide, pp 10, Academic Press, Inc. San Diego, California, 1993)。移動性逆転の主な欠点は得られたバンド中に存在する分子を明確に同定できないことである。そうするには、バンドを転移して、特別なプローブとハイブリッド形成しなければならない。ハイブリッド形成は特に検定費用を増加させそして時間もかかるので、型分類操作はさらに高額となりまた時間も要するであろう。

20

【0022】

GeneNavigator (Amersham-Pharmacia-LKB, Pharmacia Molecular and Cell Biology Catalogue, Pulsed Field Gel Electrophoresis, Nucleic Acids Electrophoresis, 1998, pp 77-79), CHEF DRII及びCHEF Mapper (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad, pp 11, 1995)のように電極にかける電圧を高くすることにより現行のCHEF装置の電気泳動時間を短縮する試みは殆ど不可能である。電力供給能力及び冷却システムに限界があるからである。したがって、製造会社は該装置に適用する最大電場としては9 V/cmを勧めている (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad, pp 2, 1995)。したがって、電場強度を増加することによる電気泳動時間の短縮はCHEFシステムではできない。現行のTAFE装置も同じ問題を抱えている。

30

【0023】

PFGEミニ装置

ミニPFGE装置、ミニCHEF及びミニTAFE改良型、は1995年に報告された (Riveron AM et al., Anal. Lett., 1995, vol. 28, pp 1973-1991; 欧州特許出願EP 0 745 844, Bull. 1996/49; 米国特許出願08/688,607, 1995; キューバ特許RPI 02/95, 1995)。ミニ装置はPFGE装置の上記欠点のほとんどを解決する。パルスフィールド電気泳動実験は7検体を適用したミニゲル (4×4×0.5 cm; 長さ×幅×厚さ) 中で4から6時間で行われる。ミニCHEFでは16 V/cmに達する電場強度を適用することができるので、2.7時間で電気泳動バンドパターンの良好な分離を行なうことができる。対応電極間の距離が短いので容器を小さくし、電極を被う緩衝液を少量にすることができる。ミニCHEF及びCHEF容器に指定されている電圧 (電場強度値E) を適用することにより、ミニ容器内に発生する熱は市販CHEFで発生する

40

50

熱より常に少ない (Riveron AM et al., Anal. Lett., 1995 vol. 28, pp. 1973-1991)。
。

【0024】

ミニTAFE装置は22 V/cmを許容して、バンド間の分離を達成する (Riveron AM et al., Anal. Lett., 1995 vol. 28, pp. 1973-1991)。ミニTAFEでは*S. cerevisiae*電気泳動核型を5時間で得ることができる。対極間の距離が短い (7.8 cm) ミニTAFE容器は小さく、緩衝液の使用量も少ない。しかし、0.1 cm以上の厚さの検体をミニゲルに適用した場合には、良好な分離の電気泳動パターンを得るにはさらに時間を要す。既報のように、検体の厚さは電気泳動実施時間に影響する (Lopez-Canovas et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806, pp. 187-197)。検体が厚くなるに従って、同じバンドパターンを得るには長いゲルが必要になる。しかし、報告されているミニCHEFミニゲルは7検体しか適用できないのに対して、ミニTAFEは13検体を処理する。これらは臨床検査において微生物単離体型分類のための低処理検体数形式である。

10

【0025】

ミニPFGE装置は現行システムよりも利点があるにもかかわらず、ミニCHEFもミニTAFEも微生物型分類に使用されていない。多分、従来のゲルに使用したのと同じ厚さの検体の使用を試みている。さらに、ミニ装置の実行パラメータを選択する簡便な手順が調っていない。

【0026】

固定化DNAの調製

20

完全なDNA分子の調製法は現行装置またはミニ装置におけるPFGEによる微生物型分類にとって絶対必要なことである。以前に報告された溶液中のDNA単離及び精製方法は該分子の切断を引き起こしている (Schwartz DC and Cantor CR, Cell, 1984, 37, pp. 66-75)。Schwartz and CantorはPFGE用の検体調製の方法を提案し、そして1 Mb (10^6 塩基対) を下回る大きさの分子のみを除去した。方法は培養細胞を採取し、細胞を洗い、アガロースプラグ中に包埋することからなる。その後の段階は、(もしも細胞壁が存在すれば) 「in situ」でスフェロプラストを形成し、さらに該プラグ中で分解する。最後に、固定化DNA分子をタンパク分解酵素Kを使用して脱タンパクする。この方法は種々の属、種及び起源の微生物から検体を調製するのに有効であった。しかし、該微生物が細胞壁を有している場合には、スフェロプラストを形成させる必要があり、スフェロプラストを形成させるのに必要な酵素並びにタンパク分解酵素は高価である。報告されている手順は検体調製に32時間かかる終夜インキュベーションを2回必要としている (米国特許No. 4,473,452, 1984年9月25日)。

30

【0027】

さらに最近、Gardner (Gardner DCJ et al., Yeast, 1993, 9, 1053-1055) はスフェロプラストを形成しない細胞から*S. cerevisiae*染色体のバンドパターンを得た。平行して、Higginson et al (Higginson D. et al., Anal. Lett., 1994, 27: 7, 1255-1264) は*S. cerevisiae* DNAはタンパク分解酵素Kの代わりに8 M尿素を使用して脱タンパクすることができることを示した。しかし、Gardnerにより記述された方法は、DNAの脱タンパクにタンパク分解酵素を使用しているために、依然として高価であり、一方Higginsonにより記述された方法は安価であるが、しかし72時間のインキュベーションのため長時間を要する。後に*S. cerevisiae*検体が調製され、酵素を使用しなかった：プラグは続けてLETK (10 mM Tris, 500 mM EDTA, 600 mM KCl, pH 7.5) で4時間、NDS (10 mM Tris, 500 mM EDTA, 1%サルコシル, pH 9.5) で2時間、そして4 M尿素を加えたNDS (NDSU) で2時間インキュベートした。この方法は検体調製に10時間を要した (Lopez-Canovas L, et al., Anal. Lett, 1996, 29: 12, 2079-2084)。固定化DNA調製の迅速方法も記述されているが、酵素を使用している (例えば、Guidet F and Langridge P, Biotech, 1992, 12: 2, 222-223)。

40

【0028】

原則として、PFGE実験用の固定化DNAは、スフェロプラストの形成及びタンパク分解酵素

50

を使用するDNAの脱タンパクを必要とする。これらの要件は試験する細胞型(細菌、イーストなど)とは無関係である (Maule J, Mol. Biotech. 1998, 9:107-126; Olive DM and Bean P, J. Clin. Microbiol, 1996, 37:6, 1661-1669)。例えば、固定化Staphilococcus aureus DNAは細胞をリゾスタフィンで固定化し、プラグを界面活性剤とインキュベートすることにより2時間で調製され、そして他方Streptococcus fecalis細胞は固定化の前にリゾチーム及びムタノリシンとインキュベートすることが必要である、と報告されている (Goering RV. and Winter MA., J. Clin. Microbiol, 1992, 30:3, 577-580)。上記研究において、著者らは検体をタンパク分解酵素Kとインキュベートしなかった。しかし、Matushek et al. (Matushek MG et al., J. Clin. Microbiol, 1996, 34:10, 2598-2600) は検体をタンパク分解酵素Kとインキュベートしない場合にはバンドパターンを得ることができなかったと報告した。その代わりに、彼らはタンパク分解酵素Kを使用して固定化DNA検体を調製する迅速方法を提案した。最近、McEllistrem et al. (McEllistrem MC et al., J. Clin. Microbiol, 2000, 38:1, 351-353) はStreptococcus pneumoniaeの固定化DNAを調製する完全非酵素的方法を報告した。しかし、この方法には6時間を要し、そして著者らはこの方法の成功はStreptococcusのオートリシンの活性化によると考えている。現在、スフェロプラスト形成酵素およびタンパク分解酵素はS. cerevisiae及びStreptococcus pneumoniaeの完全DNA分子調製操作からのみ削除されたが、これらの調製を完結するのに要する時間はそれぞれ10時間と6時間であり、これは長時間である。微生物の検体調製においてプロトプラスト形成酵素およびタンパク分解酵素を除去することの実現可能性について意見は一致していない。したがって、現行方法は高価でありそして長時間を要する。

10

20

【0029】

これらの方法の殆どは酵素処理に先立って細胞壁を持つ微生物を固定しなければならないという前提に立っている。例外がGoering及びWinter (Goering RV and Winter MA, J. Clin. Microbiol, 1992, 30:3 577-580) により発表された論文に存在する。著者らは固定化に先立ってリゾチーム及びムタノリシン (スフェロプラストを形成するための2酵素) を含む溶液中に細胞を懸濁した。しかし、アガロースゲルに包埋する前に細胞壁を有する微生物を処理する一般的非酵素的方法はこれまで示されていない。そのような方法は検体調製において現行方法より安価で、簡便であろう。

【0030】

微生物細胞壁の透過性を高める試薬の存在下に細胞を加熱することから開始して、溶液中の核酸を単離する方法は報告されている (欧州特許0,657,530, 1994, bulletin 95/24; 米国特許158,940, 1993)。この方法は全体の細胞壁を物理的に破壊せずに微生物から分解していない核酸の大きなフラグメントを遊離させる。この方法は溶菌酵素を必要としない。しかし、DNAは溶液中に遊離されるため、完全なDNA分子は得られない。そのため、著者らは上記微生物の分子核型またはパルス型を得る方法としては勧めていない。著者らは、得られたDNAはハイブリッド形成に適していると報告しているが、エンドヌクレアーゼによるDNA制限の可能性については注目していない。結局、該方法は完全なDNA分子を得ることを保証しておらず、また制限酵素によるそれらの消化の可能性については不明のままである。

30

40

【0031】

したがって、イースト、グラム陽性及びグラム陰性細菌及び寄生虫の固定化完全DNAを非酵素的に短時間で調製する一般的方法は未だ提案されていない。

【0032】

固定化DNA検体を調製するには該検体を形成する鋳型を必要とする。この鋳型は再使用できるかあるいは使い捨てである。再使用型の鋳型は滅菌できるものでなければならない。これは病原性微生物の検体を扱う場合には重要である。使い捨ての鋳型を使用するには継続的に供給される必要があり、これは少ない予算の試験室においては制約因子になり得る。

【0033】

50

既知鋳型は以下のものである：

- a) 独立しそして同種のプラグを形成する鋳型（米国特許4,473,452, 1984年9月25日）；
- b) 切って独立したプラグを作ることができる長いリボンを形成する鋳型；
- c) 切って独立したプラグを作ることができる長い角形の「ヌードル」または長いアガロースの棒を形成する鋳型（Birren B and Lai E. Pulsed field Gel Electrophoresis: a practical guide, Academic Press, Inc. San Diego, California, 1993, pp 29-30）。

【0034】

一般的に、ゲルの溝より大きな検体が該鋳型で作られる。このような理由から、溝の大きさと同様の大きさのプラグを得るためにリボン、ヌードルなどをかみそり刃などで切る必要がある（CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 40, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995）。しかし、リボンまたはヌードルを切ることは一定しない大きさのプラグを生じ、これは電気泳動パターンの質に影響する。ゲル中におけるDNA分子の分離は検体の厚さに依存する。したがって、ゲル上の異なるレーンで得られたパターンの比較は困難である。バンドパターンの比較が困難であることは微生物型分類においては欠点となる。

【0035】

アガロースゲル中に細胞を包埋しそしてプラグを処理するための鋳型が1995年10月10日の米国特許5,457,050に開示された。この鋳型は、それを作るのに使用された材質により、使い捨てまたは再使用できる。該鋳型の中で検体を形成し、処理することができる便利な鋳型であることが主張されている。しかし、これは欠点である。つまり、インキュベーションの間プラグが鋳型の内部に保持されているならば、PFGE分析に適した検体を得るために必要な時間は非常に長くなってしまふ。プラグとインキュベーション溶液の間の接触面積は少なくとも半分に減少してしまふので、分解及び脱タンパク溶液の作用分子は細胞内の標的分子にわずかしに到達できない。

【0036】

PFGE実験条件の選択

実験条件の選択は複雑である。PFGE実施条件を選択する方法は報告されている。

【0037】

例えば、Bio-RadのCHEF Mapperには自動アルゴリズムの選択ともう一つ相互作用アルゴリズムの選択がある（CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. Pp 31- 40 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995）。いずれの選択も、パルス時間、パルスラング持続、リオリエンテーション角度、電場及び所与検体のDNA分子を分離するための最適実施時間を計算することができる。固定実験条件が設定されている自動アルゴリズムに対して、相互作用アルゴリズムでは緩衝液の型、温度及び濃度、及びアガロースの型及び濃度を入力値として変更することができる。両者のアルゴリズムは、5年間の経験中に集められた実験的データ及び理論的データに基づいて作動している（Bio-Rad Catalogue. Life Science Research Products. Bio-Rad Laboratories, pp 185. 1998/99）。しかし、製造会社は検体分子の予想される大きさよりも小さな及び大きなDNAサイズをアルゴリズムに入力するよう勧めている。さらに、もしも極めて幅広いサイズ範囲を自動アルゴリズム、同様に相互作用アルゴリズムに入力すると、ゲルの中間範囲におけるバンド逆転のような誤った結果を生じかねない。

【0038】

定められた値とそれより高い値の間に入る大きさの分子群を分離する電気パルス間隔を示すRSL (Resolution Size Limit) と呼ばれる経験的表現が提案されている（Smith DR. Methods I, 1990, 195-203）。しかし、該表現は特殊な実験条件にのみ有効であり、いずれの2分子間の分離でも予測するものではない。その他の機能が提案されている。それは与えられた分子群を分離するのに必要な電場とパルス時間のおおよその条件を提供する（Gunderson K and Chu G, Mol. Cell. Biol., 1991, 11: 3348-3354）。しかし、該機能は上記2変数の粗い推定をさせるに過ぎず、また全ての実験条件における分子の移動度を示すものでもない。

10

20

30

40

50

【0039】

PFGE中にDNA分子を移動させるための種々な理論的研究がなされているが (Noolandi J, Adv. Electrophoresis, 1992, 5: 1-57; Maule J, Mol. Biotech. 1998, 9: 107-126)、該研究からは未だ試験室において実用的そして有用な成果は得られていない。それらはPFGE利用者に分析する分子を分離するのに必要な実験条件を選択させセットさせる方法を生み出していない。

【0040】

PFGEにおけるDNA分子の移動を記述するためのLopez-Canovas et al. (Lopez-Canovas L et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806: 123-139)により提案されている数式は、パルス回ランプ、電場、温度及び実施時間を変更した時に得られるバンドパターンを予測するためにはこれまで使用されなかった。

10

【0041】

PFGEバンドパターン分析

PFGEゲルのイメージデータ取り込みのコンピューターシステムをバンドパターン分析に使用することができる (Gerner-Smidt P et al., J. Clin. Microbiol, 1998, 37(3): 876-877; Tenover F et al., J. Clin. Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239; van Belkum A et al., J. Clin. Microbiol, 1998, 36(6): 1653-1659)。しかし、制限パターンの比較は個人の操作に残されており、そして完全にしっかりとしたアルゴリズムには出来上がっていない (Tenover F et al., J. Clin. Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239)。コンピューターを使用した分析は行なわれているが、パターンの最終的解釈は過去の視覚的検査に従わざるを得ない。

20

【0042】

自動的及び非自動的バンドパターン分析は結果としてバンドの数及びバンド中の分子のサイズを示す。これは通常未知DNA移動を分子量マーカーの移動と比較することにより行なわれる。しかし、PFGEは比較的新しいので、広範囲のDNAサイズ範囲のサイズマーカーが常に入手できるとは限らない。したがって、PFGEバンドパターンの解釈に基づく細菌型分類に使用される基準は、比較している微生物のDNAを消化した時に生じる種々の制限フラグメントの数を測定することにある。

【0043】

一つのパルスランプ、異なる電場強度、及び異なる温度におけるDNA移動を記述する式は、1.5%アガロース、Lachema及び0.5×TBE、1×TBE: 89 mM Tris, 89 mMホウ酸、2 mM EDTA Aで行われた実験において集積した電気泳動データに基づいて提案されている (Lopez-Canovas L et al., J. Chromatogr. A, 1998, 806: 123-139)。しかし、該式をパルスランプを適用したバンドパターンの分析に拡張及び応用する方法は存在しない。パルスランプの適用は微生物の比較試験では通常行なわれている。

30

【0044】

PFGEによる微生物型分類のための現行方法

微生物型分類の全操作は長時間と多くの資源を必要とする。電気泳動は20時間、製造会社の推奨あるいは文献に報告されているところによると検体調製方法は、大量の酵素 (例えば、80 mg/mlタンパク分解酵素K) 及び長いインキュベーション時間を必要とする (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. pp 40-43 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad. 1995)。微生物型分類のためのPFGEの使用を制約している要因は単離体の分析を完結するのに必要な時間であり (これは2から3日である)、したがって、多数の検体を分析する試験室の能力を低下させている (Olive DM and Bean P, J. Clin. Microbiol, 1999, 37: 6, 1661-1669)。

40

【0045】

発明の詳細な説明

本発明は1作業日 (7から13時間の間) に微生物の単離体を型分類するための方法及び試薬キットを提供するものである。型分類はミニ装置内でパルスフィールド電気泳動を行なうことによりDNA分子を分離して典型的なバンドパターンを得ることにより実施される。特

50

に、

i) 最大60分で、ゲルのミニプラグ中に包埋した完全なDNA検体を調製する方法及び試薬キットがここに提供される。この方法は溶菌酵素を含まない溶液で細胞を処理することに基づいている。該処理はその細胞をゲル中に包埋する前あるいはその後に行なうことができる。その細胞はイースト、寄生虫、グラム陽性及びグラム陰性細菌が可能である。細胞は滅菌することができる柔軟な材料で作られた鑄型によって包埋される。それによって均一な大きさのミニプラグが供給される。ミニプラグの厚さは使用した鑄型の寸法によって0.03から0.1 cmに変動する。

ii) 線状DNA移動度を予測する方法が提供される。この方法は、CHEFシステムにおける電場、温度、パルス持続ランプ及び電気泳動時間がどのような条件であっても線状DNA分子の移動を計算することができる理論式に基づいている。この方法によりゲルに適用する最適の電気泳動条件を選択することができ、同様に電気泳動を実施した後に得られるバンドパターンを分析することができる。

iii) 微生物のDNA分子を分離して分析する方法が提供される。その分離はパルスフィールド電気泳動用ミニ装置中で行われる。ミニCHEFミニ装置は2.5から5時間でバンドパターンを提供し、ミニTAFEでは5から7時間である。この方法では微生物の固定化DNAの27検体まで試験することができる。該検体はa)非酵素的方法で調製され、b)予測方法の支援により選択した最適電気泳動条件においてミニ装置中のミニゲルで分離され、c)DNA分子サイズを測定するために分析される。測定は線状DNA移動分析の方法を用いて行ない、そしてミニゲルのウェル中に入れ、そしてミニ装置中の2つの電場の作用を受けたDNA分子全てについて行なう。分析に先立って、DNA分子はいずれかの染色法によりゲル中に検出される。

【0046】

この発明が提供されている検体調製方法に要する時間は最大でも60分であり、しかも簡便で安価である。微生物細胞をインキュベートしそして完全なDNAを固定化する溶液中に溶菌酵素もタンパク分解酵素も必要としない。完全DNA分子は制限酵素で消化することができ、そしてパルスフィールド電気泳動を行なった時に、完全DNA分子またはその制限フラグメントはミニゲル中を移動し、微生物の分子核型またはパルス型に相当するバンドパターンを形成する。

【0047】

この方法は、微生物を分解させるための細菌壁の化学的修飾、または細胞中の標的分子に対する小さな作用分子の拡散に基づいている。細胞内の好ましくない成分は透析による調製の間に除去される。結果として、細胞が包埋されたミニプラグ中に完全なDNA分子が得られる。

【0048】

この方法は下記の一般的な段階を含んでいる：

- 1) 微生物の細胞は最初に入院患者の体液から、あるいはバイオテクノロジー産物からあるいは、分子生物学、遺伝学などの通常の研究室で行われた実験から単離される。
- 2) 細胞はそれぞれの微生物に適した組成のプロスまたは固形培地で増殖する。
- 3) 細胞を遠心分離で集め、洗う。
- 4) 細胞はa)ゲル中に包埋され非酵素溶液とインキュベートするか、b)該溶液とインキュベートしそしてゲル中に包埋する。aの場合は、固定化細胞を含むミニプラグは最初に非酵素的溶液の中で5から30分50℃でインキュベートする。bの場合は、細胞は非酵素的溶液の中で5から30分50℃でインキュベートした後、細胞をアガロースミニプラグ中に包埋する。
- 5) もし電気泳動を行なおうとするならば、細胞を含むミニプラグを電気泳動用緩衝液に対して透析を行なう。あるいはもしミニプラグを保存しようとするならば、保存用緩衝液に対して透析を行なう。あるいはもしDNA分子を消化しようとするならば、制限エンドヌクレアーゼ緩衝液に対して透析を行なう。

【0049】

固定化に先立って非酵素的溶液の中でインキュベートできる微生物は、*Saccharomyces cere*

10

20

30

40

50

visiae, Hansenula polymorpha, Pichia pastoris及び Staphylococcus aureusである。Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli及びEntamoeba histolyticaは最初に固定化し、次いで非酵素溶液中でインキュベートすべきである。最も効果的な細胞の洗浄液を表Iに示す。

表 I. 固定化DNAを調製するための最も効果的な細胞の洗浄液。

採取微生物	洗浄液組成
酵 母	0.05 M EDTA, pH 7.5
<i>Entamoeba histolytica</i>	PBS, pH 7.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.15 M NaCl
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0

10

【0050】

細胞をインキュベートする非酵素溶液、または細胞を含むミニプラグは陰イオン性界面活性剤、金属キレート剤、水素結合形成に競合し得る薬剤及びTris緩衝液を含有している。最も有効な組成は、1%サルコシル、0.1 M EDTA, 0.01 M Tris-塩基、4 M尿素で、そのpHは9.5 (NDSU) である。グラム陽性及びグラム陰性細菌の細胞をインキュベートするためにはNonidet P-40が添加される (NDSUPlus)。

【0051】

一部の微生物（例えば、Escherichia coli）は最初に非酵素分解液中で10分間37℃でインキュベートすべきである。それは1%サルコシル、1% nonidet P-40, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris-塩基を含み、そしてそのpHは8.0である。次いでそれらはNDSUPlus溶液中で30分間インキュベートする。

20

【0052】

固定化DNAを含むミニプラグの保存用緩衝液はTE-100 (0.01 M Tris-塩基、0.1 M EDTA, pH 8.0)。

【0053】

アガロースミニプラグ中に細胞を包埋する方法は、滅菌し得る柔軟な材質で作られた鋳型を使用することからなる。鋳型はシリコン、ゴムまたはその他の柔軟な物質の0.5 cmまでの幅のシートである（例中の例1参照）。数個の角型の窪みをそのシートの中に付ける。窪みは幅0.3 cmまで及び深さ0.03から0.1 cmが可能である。アガロース-細胞懸濁液を注入するために、この温度に温めた表面上に鋳型をおいて鋳型を42℃に予熱し、その後懸濁液を鋳型中に注ぎ、スパーテルを使用して窪み中に均一に分布させる。次いで鋳型に蓋をし（ガラス、アクリル、プラスチックまたはその他の材料で作ることができる）、ミニプラグが固化するまで4-15℃でインキュベートする。そしてミニプラグ処理用の非酵素溶液の入った容器のなかで周辺部をつまんで鋳型を曲げることにより柔軟な鋳型から均一なサイズのミニプラグを取出す。懸濁液は、0.12から 3×10^8 細菌細胞、 8×10^7 イースト細胞または 6×10^4 Entamoeba histolyticaのトロホゾイトをそれぞれ 0.3×0.07 cmの大きさのミニプラグに包埋するという方法で調整する。言及した全ての微生物はこのタイプの鋳型を使用して調製することができる。要するに、このタイプの鋳型はその他のいずれの細胞を含むミニプラグの調製にも使用することができる。

30

40

【0054】

本発明において、ミニ装置に適用する最適電気泳動条件の選択方法は線状DNA分子の移動度の計算に基づいている。計算は、ミニCHEFミニゲル中の線状DNA分子の移動度、リオリエンテーション時間及び移動速度を記述する一群の理論式を使用することにより行われる。式には電場と温度の値を入力するが、それらはそれぞれ1-20 V/cm及び4-30℃の間でなければならない。式を適用するために、電気泳動が1.5%アガロース中で実施されたと仮定しそして電気泳動緩衝液は44.5 mM Tris, 44.5 mMホウ酸、1 mM EDTA, pH 8.3 (TBE 0.5X) でなければならない。DNA移動度を記述する理論式は以下である：

50

$$D = \sum_{r=1}^n \{ v_r t_{pr} \Gamma_r(t_{pr}-tr) N_{pr} + v_m (t_{pr}-tr)[1-\Gamma_r(t_{pr}-tr)] N_{pr} \} \quad \text{式 1}$$

$$v_r = 0.0207[QE^{1.45}/(8\pi\eta L^{1.35})] \quad \text{式 2}$$

$$v_m = 0.665[QE^{1.76}/(8\pi\eta L^{1.08})] \quad \text{式 3}$$

$$tr = 0.134 (L^{1.14} / v_r)^{0.926} \quad \text{式 4}$$

$$\Gamma_r(t_{pr}-tr) = 1 \text{ if } (t_{pr}-tr) \leq 0 \text{ and } \Gamma_r(t_{pr}-tr) = 0 \text{ if } (t_{pr}-tr) > 0 \quad \text{式 5}$$

式中：

tr：リオリエンテーション時間（s）

vr：新方向の間の移動速度（cm/s）

vm：新方向の後の移動速度（cm/s）

Q： $1e^- \times bp$ （DNAネット電荷、 e^- ：電荷、スタットクーロン）

L：0.34 nm×bp（DNA輪郭長、cm）

E：電場強度、スタットボルト/cm

η ：緩衝液の粘度、ポアズ、そして η は水の粘度と温度を関係づける多項式関数中に実験温度（℃）を内挿して計算した。

D：CHEFのミニゲル中のDNA分子の総移動度（cm）

d：パルス当たりの移動（cm）

n：パルス時間ランプの数

N_{pr} ：ランプrにおけるパルスの数

t_{pr} ：ランプrにおけるパルス持続時間

【0055】

最適電気泳動条件の選択方法は以下の段階を含んでいる。

I. ランプに使用するパルス（ t_{pr} ）の持続時間の計算。それを行なうために、

1) 式に選択した電場及び温度の値を代入する。最小と最大の線状DNA分子のサイズも代入しなければならない。

2) 式4を使用することにより、最小及び最大の線状DNA分子のリオリエンテーション時間が計算される。

3) もし最大及び最小分子の間に含まれるサイズのDNA分子を一つのパターンの中に含まれるようにしたいのであれば、両リオリエンテーション時間の平均（一つの t_{pr} または t_{p1} ）を計算する。

4) パルス持続時間の数式を計算する（ t_{pr} ）。最小分子のリオリエンテーション時間よりも1.5倍少ないパルス持続時間で開始し、最大分子のリオリエンテーション時間よりも1.5倍大きい所で終了する。パルス持続時間の直線的増加を t_{pr} 計算の数式に使用する。

5) 電気泳動を実施するには段階（3）で計算した t_p を使用し得るが、その他には、段階（4）で計算した t_{pr} の数式を使用する。

【0056】

II. 総実施時間の計算。総電気泳動実施時間は最小線状DNA分子の移動度の計算に基づいて算出される。これは以下に行われる。

1) 式2及び3に電場及び電気泳動緩衝液の温度の値を代入する。

2) リオリエンテーション時間及び最小分子の移動速度を計算する。式1に段階Iにおいて求めた電気パルスの持続時間（ t_{pr} ）を代入する。パルス数の初期値は固定する。

3) 各ランプrのパルス数を一つずつ増加し、そして毎回式1及び5を使用して最小分子の移動度を算出する。分子がミニゲルの下辺から0.1から1 cm離れた位置に達するまで繰り返す行なう。

【0057】

III. 式1-5を使用して、分離しようとしている分子の移動度をnランプについて計算し、次いで電場、温度、ランプrの数、電気パルスの持続及びパルスの数（ N_{pr} ）について選択

10

20

30

40

50

した条件におけるミニCHEFのミニゲル中のこれらの分子により生じるバンドパターンを推定する。この計算は以下の段階を含む。

- 1) 電気泳動は1.5%アガロースゲル及び0.5X TBE緩衝液中で実施されることを前提とする。
- 2) 電場及び温度の値（これは実際の実験で使用されることになる）は式2及び3に使用される。
- 3) 前段階において計算された値に従って、ランプの総数（ n ）、各ランプに適用するパルス数（ N_{p_r} ）、及び各ランプにおけるパルスの持続時間（ t_{p_r} ）を式1に使用する。
- 4) 分析する分子のサイズを特定する。
- 5) 式1-5を使用して、（分析しようとする）DNA分子の移動距離を特定した電気泳動条件に対して計算する。
- 6) 線状DNA分子に対して計算した移動を数値またはグラフ形式で示す。
- 7) 予測パターンが線状DNA分子間の最適分離を示すまで、段階2-6を繰り返す。

【0058】

IV. 上記結果に基づいて、線状DNA分子間の最適分離をもたらす実験条件が選択される。次いで、電源、電気泳動調節装置及び冷却システムにこれらのデータを入力する。

【0059】

この方法を実行する望ましい手段は、ミニCHEFにおける種々のサイズのDNA分子の分離のシミュレーションを容易にするコンピュータープログラムであろう。このプログラムはDNA分離のための最適実験条件を計算するであろう。またこのプログラムは本発明のこの部分を実施するために必要な計算を行なうための迅速手段となるであろう。

【0060】

バンドパターンをシミュレートするためのプログラムが創り出された。このプログラムではユーザーは以下の変数を変えることができる。

- 1- ゲル中で分離しようとするDNAフラグメントまたは完全DNA分子のサイズ。
- 2- 緩衝液温度。
- 3- 電圧。
- 4- 各ランプにおいて適用したパルス時間及び電気パルス数。
- 5- パルス時間ランプの数。それは1から1000ランプの間に含まれる。

【0061】

上記値を入力して、プログラムは以下の結果を与える：

- 1- DNAリオリエンテーション中及びその後のDNA分子速度（cm/s）。
- 2- 各DNA分子のリオリエンテーション時間（秒）
- 3- 選択した実施時間に対する各分子のゲル中移動度。
- 4- 各分子の移動度及び電気泳動パターンの図。

【0062】

特定した電気泳動条件において線状DNA分子が移動する距離のグラフ表示は以下のように行なわれる。

- i) 実際のミニゲルと同じ大きさでミニゲルを描き、そして検体を置くと仮定する場所にウェルを描く。
- ii) 各ウェルの下に線をひく。それは分離後に異なるサイズのDNA分子によって作られるバンドを示す。各線はウェルの幅を持っている。これらの線は、実際のミニゲル中でDNA分子が移動する距離ウェルから離れて描かれる。
- iii) 各線または仮定的バンドは色で区別する。色はバンドに含まれる分子のサイズにより変える。すなわち、所定のサイズの分子を同定するカラーコードを使用する。

【0063】

このプログラムはミニCHEFにおけるパルスフィールドゲル電気泳動による完全染色体サイズのDNA分子または大きなDNAフラグメントを分離するための適切な実験条件を選定する方法である。プログラムに実験条件の変数の異なる値を入力した場合には、異なる電気泳動パターンが得られるので、CHEF及びミニCHEFにおいて関心の分子を分離する実験条件を見

10

20

30

40

50

出すことができる。この方法は試薬及び生物検体を消費しない。それはミニCHEFにおける線状DNAの移動を記述する理論式に基づいている。該式は実際のミニCHEF実験において得られた線状DNAの移動データを使用して調整されている。したがって、電気泳動を行なった時に、該分子の移動を正しく示す。さらに、ゲルの中央における移動性逆転の異常な結果をもたらさない。

【0064】

本発明において、ミニ装置ミニCHEF及びミニTAFEにおけるDNAの電気泳動分離による迅速微生物型分類が提案されている。非酵素法を使用して調製した、*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*及び *Entamoeba histolytica*細胞の検体をミニゲルに適用した。従来の酵素法により調製したこれらの検体またはその他の微生物も適用することができる。

10

【0065】

ミニCHEF及びミニTAFEミニ容器が核型またはパルス型を得るために使用される。対極の電極間の距離はミニCHEF及びミニTAFEにおいてそれぞれ約11.6 cm及び7.8 cmである。電場強度はミニCHEFでは20 V/cm及びミニTAFEでは22 V/cmまで適用することができる。

【0066】

本発明のこの部分を実施するために選択した電気泳動装置は、Riveron et al. 1995によって既に記述されているミニCHEF及びミニTAFEミニ容器を含み (Riveron AM et al., Anal. Lett., 1995, 28: 1973-1991; 欧州特許申請EP 0,745,844, Bull. 1996/49; 米国特許申請08/688,607, 1995; キューバ特許RPI Nro. 02/95, 1995)、その開示を引用して全てをここに取り入れた。4から7 cm幅のアガロースミニゲルを支持するためにミニCHEF容器の床は若干修正した。ミニゲルには12から27検体を適用することができる。ミニTAFE容器は7 cm幅のミニゲルを支持するために若干広くなっていた。ミニTAFEミニゲルには27検体を適用することができる。

20

【0067】

ミニゲルのアガロース濃度は0.8から1.5%まで変えることができるが、望ましい値は1.5%である。1×TBE緩衝液は0.089 M Tris塩基、0.089 Mホウ酸及び0.002 M EDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸のナトリウム塩) であり、0.25から1×の範囲の濃度で使用し得るが、望ましいのは0.5×である。緩衝液温度は4から30°Cの間で変えることができる。1×TAE緩衝液 (0.04 M Tris-酢酸塩及び0.001 M EDTA) も使用することができる。ミニCHEF及びミニTAFE容器においてミニCHEF電極の電圧を固定し、そして電場方向を変えるために、Riveron AM et al., Anal. Lett., 1995, 28(5): 845-860; 及びRiveron AM et al., Anal. Lett., 1995, 28(11): 1973-1991により記述されている装置を含めて、目的に合わせて作られた装置であればいずれでも使用できる。

30

【0068】

電極に電気を供給するために、最大出力300ワットの電源であればいずれでも使用することができる。

【0069】

アガロースミニプラグはミニゲルのウェルに挿入される。ミニゲルを挿入するためのウェルは櫛の歯で形成される。幅広いあるいは細いミニプラグを挿入するために異なる櫛が使われる。それは挿入するミニプラグの大きさによる。

40

【0070】

ミニゲルの各バンド中に存在する分子の染色には臭化エチジウムが使用される。ミニゲルを紫外線 (UVトランスイルミネーター) で発光させ、その画像を550 nmフィルターを使用して写真に撮る。その他の染色方法も使用することができる。

【0071】

電場強度、緩衝液温度、パルス時間ランプ、電気泳動時間及び各ランプにおける電気パルスセットの数はシミュレーターの結果 (または分子を分離するための最適条件の選択方法) から、あるいは実験的経験を含めてユーザーが採用するその他の方法の結果から得られ

50

る。シミュレーターを使用する場合には、緩衝液濃度は $0.5\times$ TBE、アガロース（Lachema）ゲルは1.5%、電場は20 V/cmまで、温度は4から30℃の間そして容器はミニCHEFでなければならない。シミュレーターを使用するがミニTAFEの使用を希望する場合には、シミュレーターによって与えられる同じ電場及び温度の条件を使用し得るが、各ランプにおけるパルス数は1.5倍に増加し、そしてパルスの持続時間を1.2倍に増加する必要がある。

【0072】

電場強度及び温度の他の条件の下でも、分離しようとしている検体中に含まれる分子の典型的なバンドパターンをミニ装置中で得ることができる。

【0073】

本発明において電気泳動の後に得られたバンドパターンを分析する望ましい方法はミニゲル中で線状DNA分子が移動した距離を測定し、そして分子のサイズを計算するために式1-5を使用することに基づいている。その方法は、ミニCHEF装置のミニゲル中で1から20 V/cmの間に含まれる電場、4から30℃の間の温度、1.5%アガロース（Lachema）、 $0.5\times$ TBE緩衝液及びパルス時間ランプのいずれかの数 n （1-1000の間）及び電気泳動時間における電気泳動によりバンドパターンが得られることを必要とする。

【0074】

この方法は下記からなる：

i) ミニゲル中において電気泳動及びバンドの染色後、ミニゲル中の線状DNAの移動距離を測定する。

ii) 式1-5に電場、緩衝液温度、ランプの数（ n ）、各ランプにおいて適用したパルス数（ N_{pr} ）及び各ランプにおけるパルスの持続時間（ tp_r ）の値を代入する。

iii) 電気泳動後のバンドから実際の移動距離（ D , cm）をプログラムに入力する。

iv) 移動距離から各バンドの分子サイズを計算する。これは以下に従って行なう。

1) 初期サイズ1000塩基対の仮定DNA分子を設定する。

2) その仮定DNA分子の vr , vm 及び tr をそれぞれ計算するために式2, 3及び4を使用する。

3) 式1及び5を使用して、仮定DNA分子の理論的移動（ Dt , cm）を実験に使用した電気泳動条件に対して計算する。

4) D 及び Dt を比較する。もし Dt が D より大きければ、仮定分子のサイズを1000 bpに増加する。

5) 仮定DNA分子に対して計算した移動がミニゲル中の実際の分子による移動距離（ D ）より少ないか同じになるまで、段階2) から4) を繰り返す。

6) バンド中のDNA分子は4) に示した条件を充たす仮定DNA分子のサイズと同じサイズを持つと仮定する。また、仮定分子に対して計算した tr , vr , 及び vm 値を実際の分子のものと仮定する。

7) 全てのバンドに対して測定された距離について段階1) から6) を繰り返す。すなわちミニゲル中で分離された全ての分子に対して。

【0075】

電気泳動の記述は電気泳動パターン及びマトリックスにより行なうことができる。横列には各フラグメントまたは分離した分子の序列、一方、縦行には分離した分子のサイズ、リオリエンテーション時間及び移動速度が含まれる。

【0076】

コンピュータープログラムは本発明のこの部分を実行する望ましい方法を提供することができる。そのプログラムは電気泳動において分離されるフラグメントまたは完全DNA分子のサイズ及び動力学的パラメーターを推定するための計算を実行する迅速な手段を提供するであろう。ユーザーが以下の変数を変えることができるプログラムが創り出された。

1- ゲル中のパターンの各バンドの位置を示す分子の移動距離。

2- 緩衝液温度。

3- 電気泳動容器中に設定される電圧。

4- 各ランプに設定されるパルス時間及び電気パルスの数。

5- ランプの数（1-1000に制限）。

10

20

30

40

50

【0077】

プログラムに上記値を入力すると、以下の結果が得られる。

- 1- リオリエンテーションの間の及びその後のDNA速度 (cm/s)。
- 2- 各分子のリオリエンテーション時間 (s)。
- 3- キロベースで示した分子サイズ (kb)。

【0078】

ミニCHEFにおける電気泳動条件及びその結果得られた分子の移動距離をプログラムに入力すると、プログラムはゲル中の各バンドに存在する分子のサイズ及び動力学的パラメーターを計算することができる。一般的に、バンドの分子を同定するために分子量マーカを必要としない。この分析によりその動態特性にしたがってDNAフラグメントまたは分子を分類することができる。電気泳動の結果はこの他の通常使用されている方法によっても記述することができる。

10

【0079】

例

例1. 検体ミニプラグの調製用の滅菌可能な鋳型。

滅菌可能でありそして柔軟な材料（シリコン、ゴムあるいはその他の材料）から作られた鋳型の例は図1に図示する。鋳型はアガロースに包埋されたDNA検体を調製するために使用される。シート（1）には49個の窪み（2）がある。アガロース-細胞懸濁液を鋳型またはシートに注ぎ、そして特別なスパーテル（4）で鋳型に分配する。その後、シート（1）を蓋（3）で被い、包埋した細胞を含むミニプラグ（5）を作製する。実際の鋳型のシートは熔融シリコンで作製した。それをシート（1）を作るために別の鋳型に注いだ。例では、ミニプラグの大きさは3×3×0.7 mm（長さ、幅×厚さ）である。シート（1）からミニプラグ（5）を取出すために、該シートの端を持ちそして溶液の入った容器内で曲げる。その結果、ミニプラグはシートから離れて、溶液内に落ちる。

20

【0080】

その他の変形鋳型では、窪みの幅を1.5 mmからミニゲルの幅まで変えることができ、一方厚さは0.5 mmから1.5 mmまで変えることができる。シートにつけた窪みの数もやはり変えることができる。

【0081】

例2. ブロス培地で培養された細胞から出発するアガロース包埋完全イーストDNAの非酵素的調製。

30

イースト（*S. cerevisiae*, *H. polymorpha*または*P. pastoris*）を液体YPG培地（YPG：10 gイースト抽出物、20 gグルコース及び10 gペプトンを1リッターの蒸留水に溶解）中30℃で振とうしつつ対数期後期まで増殖した。細胞を遠心分離により採取し、0.05 M EDTA, pH 7.5（洗浄溶液、表1）で洗った。アガロース包埋完全DNAを次の方法のいずれかを行なって得た：

変法1：細胞をアガロースミニプラグに包埋する前にインキュベートする。

変法2：細胞をアガロースミニプラグに包埋し、次いでミニプラグをインキュベートする。

【0082】

40

両変法いずれにおいても細胞は最初に0.125 M EDTAに溶解した1.5%低融点アガロースに 1.3×10^{10} 細胞/mlの細胞懸濁を調製することにより包埋する。この細胞懸濁を図1に示した鋳型のシートに注ぎ、そして鋳型を蓋（3）で被い、そしてアガロースを固化させて検体ミニプラグを形成する。

【0083】

変法1において、100 mlのブロス培養から得た細胞ペレットを5 mlのNDSUに再懸濁し、そして5分間50℃でインキュベートした。さらに、懸濁をTE-100で5倍に希釈した。細胞を遠心分離により採取し、そして上記のようにアガロースミニプラグに包埋する。

【0084】

変法2では、細胞を採取し、洗い、次いでアガロースミニプラグに包埋する（表1参照）。

50

細胞を含んだミニプラグをNDSU中30分間45℃でインキュベートする。

【0085】

ミニプラグを2回TE-100 (0.01 M Tris塩基、0.1 M EDTA, pH 8.0) 中5分間洗い、そして新鮮TE-100中4℃で保存する。2つの変法のいずれかでミニプラグを処理した後、電気泳動の前に、ミニプラグをTBE中10分間実施温度でインキュベートする。

【0086】

*S. cerevisiae*の染色体(12)及びミトコンドリア(13)のDNAがバンドパターンに分離しているミニゲル(10)の写真を図2に示す。検体はミニプラグ中に細胞を包埋して調製し、NDSU中でインキュベートした(変法2)。最大27検体を適用できる7 cm幅のミニゲル(11)をミニCHEFに使用した。電気泳動実施条件は10 V/cm, 20℃、1.5%アガロース、0.5X TBE, パルス時間50秒及び4時間の電気泳動であった。 10

【0087】

*H. polymorpha*の染色体(17)及びミトコンドリア(18)のDNAがバンドパターンに分離しているミニCHEFミニゲルのレーン(16)の写真も図2に示す。*H. polymorpha*の染色体は変法2に従って調製した。10 V/cm, 20℃、1.5%アガロース、0.5X TBE, パルス時間120秒及び4時間の電気泳動のミニCHEFにおいて分離した。

【0088】

*S. cerevisiae*の染色体は図2に示すミニTAFEミニゲル(20)においてやはり分離された。染色体(21)及びミトコンドリア(22)のDNAバンドパターンも示す。検体は変法1を使用して調製した、すなわち、アガロースに包埋する前に細胞をインキュベートした。該検体を櫛で形成した13穴(23)に適用した。ミニゲルは7 cm幅であった。ミニTAFEには10 V/cm, 20℃、1.5%アガロース、0.5X TBE, パルス時間60秒及び6時間の電気泳動を適用した。 20

【0089】

例3. ブロス培地及び固形培地で増殖した*Pseudomonas aeruginosa*の完全DNAのアガロース包埋の非酵素的調製。

*P. aeruginosa*の2コロニーを血液寒天プレートから単離した。その一つを5 mlのLB培地(10 gイースト抽出物、5 g塩化ナトリウム及び10 gバクトトリプトン、水1リッター)に接種し、もう一つをLBプレートに画線した。

【0090】

両培養を37℃で終夜インキュベートした。ブロス培養は振とうしてインキュベートし、プレートは静置した。ブロスで増殖した細胞を遠心分離により採取し、一方プレートは適当な洗浄液(表1に示す)で洗い、次いで遠心分離により採取した。 30

【0091】

ブロスまたは固形培地で増殖した細胞を表1に示す溶液で洗い、遠心分離により集め、0.15 M NaClに溶解した1.5%低融点アガロースに 2×10^9 細胞/l濃度に再懸濁した。アガロース-細胞混合物を図1に示した鋳型のシート(1)に注ぎ、次いでシートを蓋(3)で被い、プラグ(5)が形成されるまで静置した。ミニプラグをNDSUplusと30分間50℃でインキュベートした。その後、ミニプラグを2回TE-100中50℃10分間洗い、そして新鮮TE-100中4℃で保存した。制限酵素消化を行なう前に、ミニプラグを10分間Xba I制限酵素用緩衝液でインキュベートした。各ミニプラグを20UのXba Iで2時間37℃で消化した。制限フラクションをミニCHEFにおいて10 V/cm, 20℃、1.5%アガロース、0.5X TBE, 20, 15, 10, 5及び3秒のパルスランプ及び5, 15, 320, 1020及び100パルスで分離した。 40

【0092】

ミニCHEFミニゲル(25)において分離したバンドパターン(26)を図3に示す。*P. aeruginosa*ミニプラグ(27)は液状LB培地の培養から調製し、一方ミニプラグ(28)はLBプレート上で行なった培養から調製した。分離されたDNAフラグメントのサイズも図に示す。

【0093】

例4. 固形培地で増殖した*Staphylococcus aureus*のアガロース包埋完全DNAの非酵素的調製。

*S. aureus*のコロニーを血液-寒天培地から単離し、Mueller-Hintonプレート(Oxoid)上 50

に画線した。プレートを終夜37℃でインキュベートした。プレート表面を洗浄液（0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0表1）、そして細胞を遠心分離により採取した。

【0094】

アガロース包埋完全DNAを次の2つの変法のいずれかを行なって調製した：

変法1：細胞をアガロースミニプラグに包埋する前にインキュベートする。

変法2：細胞をミニプラグに包埋し、次いでミニプラグをインキュベートする。

【0095】

両変法いずれにおいても細胞は洗浄液（表1）に溶解した1.5%低融点アガロースに 4×10^{10} 細胞/mlの細胞懸濁を調製することにより包埋した。この細胞懸濁を図1に示した鋳型のシート（1）に注ぎ、そして鋳型を蓋（3）で被い、そしてアガロースを固化させて検体ミニプラグ（5）を形成した。

【0096】

変法1において、細胞ペレットを3 mlのNDSUPlusに再懸濁し、そして30分間50℃でインキュベートした。その後、懸濁をTE-100で5倍に希釈した。細胞を遠心分離により採取し、そして上記のようにアガロースミニプラグに包埋する。

【0097】

変法2では、細胞を採取し、洗い、次いでアガロースミニプラグに包埋した。アガロースミニプラグをNDSUPlus中1時間50℃でインキュベートした。

【0098】

2つの変法のいずれかで処理した後、ミニプラグは2回それぞれ10分間50℃TE-100で洗った。制限酵素消化の前に、ミニプラグを洗い、Sma I制限酵素用緩衝液と10分間インキュベートし氷上に置いた。各ミニプラグを20UのSma Iにより2時間37℃で消化した。ミニゲル（30）中のバンドパターン（31）中で分離した*S. aureus* DNAマクロ制限フラグメントを図4に示す。ミニプラグ（32）は変法2に従って調製し、一方ミニプラグ（33）は変法1に従った。実施条件は10 V/cm, 20℃、1.5%アガロース、0.5X TBE, パルスランプ 1, 5, 9, 13, 17及び21秒であった。全てのランプに130パルスを適用した。分離したDNAフラグメントのサイズも図に示す。

【0099】

例5. *Entamoeba histolytica*の完全DNAアガロース包埋の非酵素的調製。

E. histolytica（クローンA）トロフォゾイトをTYI-S-33培地中对数期まで増殖した。培養フラスコを冷却して採取し、遠心分離によりペレットにした。ペレットを冷PBSで洗浄し、冷高張液（0.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.0）と15分間 2.5×10^6 トロフォゾイト/ml溶液の割合でインキュベートした。さらに、 10^8 トロフォゾイトを高張液に溶解した2%低融点アガロースの1 mlに再懸濁した。この懸濁を図1に示す柔軟シリコン鋳型に注ぎ、ミニプラグを4℃で固化させた。ミニプラグをNDSU（0.01 M Tris-塩基、0.1 M EDTA, 1%サルコシル（w/v）, 4 M尿素、pH 9.5）と45℃1時間インキュベートした。電気泳動の前に、ミニプラグを0.5×TBEを10分間実施温度でインキュベートした。ミニプラグを保存するために、TE-100（0.01 M Tris-塩基、0.1 M EDTA, pH 8.0）で2回各回5分間洗い、新鮮TE-100中4℃で保存した。

【0100】

E. histolytica（38）、*S. cerevisiae*（37）及びラムダ-DNA（39）のDNAバンドパターンを図5に示す。電気泳動は9.3 V/cm電場、120秒のパルス時間、20℃、1 %アガロース（Seakem）、0.5×TBE緩衝液及び電気泳動6時間で実施した。0.1 cmの厚さのミニプラグを適用した。

【0101】

例6. ミニCHEFにおける電気泳動実施条件の設計。

シミュレーターを使用する実験条件の設定（DNA分離のための追加条件の選択方法）。

対極の電極間11.6 cmのミニCHEF容器における*S. cerevisiae*染色体を分離するために必要なパルスランプをシミュレートした。この目的は*S. cerevisiae*染色体によって形成される11バンドを示すパターンを得ることである。電気泳動は1.5%アガロースゲル及び泳動緩

10

20

30

40

50

衝液として0.5×TBE中で行なうと仮定した。Goffeauにより報告されている*S. cerevisiae* 染色体のサイズ値を採用した (Goffeau A et al., Science, 1996, 274:546) : 230 kb (chrom. I), 270 kb (chrom. VI), 315 kb (chrom. III), 440 kb (chrom. IX), 589 kb (chrom. VIII), 577 kb (chrom. V), 667 kb (chrom. XI), 745 kb (chrom. X), 784 kb (chrom. XIV), 813 kb (chrom. II), 924 kb (chrom. XIII), 948 kb (chrom. XVI), 1091 kb (chrom. VII及びchrom. XV), 1554 kb (chrom. IV) 及び2352 kb (chrom. XII)。

【0102】

シミュレーターは、10 V/cm電場強度及び20℃に対する一つのパターンにおいて*S. cerevisiae*染色体の最適分離を達成するために、5, 40, 75及び110秒のパルス時間の4パルスランプ及び各ランプにおける42パルスを予測した。移動、リオリエンテーション時間、移動速度及び各染色体を同定するカラーコードの結果を表IIに示す。

表II. シミュレーターを使用して得た定量的結果。サイズ(kb)及びシミュレーターのカラーコードによる *S. cerevisiae* 染色体に指定された色。

<i>S. cerevisiae</i> の サイズ (kb)	カラー コード	tr (s)	$v_r \times 10^5$ (cm/s)	$v_m \times 10^4$ (cm/s)	Dシミュレーターに よる予想値 (cm)	D実験値 (cm)
250	ブルー	4.9	8.8843	2.7462	2.45	2.67
270	グリーン	5.5	8.6482	2.7293	2.40	2.67
315	赤	6.8	8.1940	2.6959	2.28	2.46
440	シアン	10.8	7.2894	2.6247	1.95	2.22
577	マゼンタ	15.6	6.6297	2.5684	1.59	1.85
589	ダーク グレイ	16.1	6.5821	2.5642	1.57	1.85
667	ブラウン	19.1	6.3017	2.5388	1.42	1.66
745	ライト ブルー	22.2	6.0625	2.5165	1.27	1.49
784	ライト グリーン	23.9	5.9551	2.5062	1.19	1.35
813	ライト レッド	25.1	5.8799	2.4989	1.13	1.18
924	ライト シアン	29.9	5.6223	2.4735	0.92	0.92
948	ライト マゼンタ	31.0	5.5721	2.4684	0.89	0.92
1091	白	37.6	5.3047	2.4408	0.73	0.6
1554	黒	61.3	4.6870	2.3727	0.52	0.4
2352	ブルー	108.6	4.0542	2.2953	0.46	0.17

D実験値：図6のミニゲル(40)において分子が移動した距離。

D予測値：図6の実験において使用された実施条件に対するシミュレーター予測による分子の移動距離。

v_r ：リオリエンテーション中の分子の移動速度。

v_m ：リオリエンテーション後の分子の移動速度。

tr：分子のリオリエンテーション時間。

【0103】

シミュレーターによって予測された条件におけるミニCHEF中に得られた*S. cerevisiae* 1906-2(41)の染色体のバンドパターンを示すミニゲル(40)の写真を図6に示す。仮想的ミニゲル(42)にシミュレートされ、そしてシミュレーターによって描かれたバンドパターンも示す。両パターンは同じである。実際の実験において分離されたアガロース包埋*S. cerevisiae* 1906-2の完全DNA分子は本発明に開示されている非酵素的方法により調製した。

【0104】

本発明に開示したシミュレーターの部分のフローチャートを図7に示す。移動データまたは既知のサイズデータに基づいてパルスランプを推定する計算方法はフローチャートに示されている。

【0105】

ユーザーが移動データを方法に入力すると、シミュレーターは最初該データから分子のサイズを推定する、次いで直線的パルスランプのセットを推定する。ユーザーがサイズデータを方法に入力すると、シミュレーターは直接パルスランプを推定する。パルス数の増加を打ち切る条件は最小分子を2.5 cm移動させるパルス数である。

【0106】

最後に、シミュレーターはプログラムにより計算されそしてユーザーにより特定された分子群に適用されるパルスランプに対してゲル中に観察されるはずである結果（図6のミニゲル43における実際のバンドパターン及び仮説的ミニゲル42におけるシミュレートパターンを参照）を提供する。プログラムは定量的データも提供する。その回答は極く当たり前のことであるのでこの部分の図は示さない。

【0107】

例7：電気泳動核型またはパルス型の分析。

1.5%アガロース、0.5×TBE、10 V/cm、20°C、2.95秒及び453パルス及び21.56秒及び453パルス、の分離条件におけるミニCHEFにおいて得られた*S. cerevisiae*の電気泳動核型（61）を図8に示す。各バンド（62-66）の移動は該核型中で測定された。

【0108】

移動を分析する方法に各バンドの移動データ、電場強度、パルスの持続時間及び数及び泳動緩衝液の温度を入力した。

【0109】

ここに開示した方法によりサイズ、リオリエンテーション時間及び各バンドに分離した分子の移動速度を計算することができる。これらの結果を表IIIに示す。これは本発明のこの部分に開示された移動を分析する手順によって与えられる結果の型である。

表Ⅲ. 各バンド中の分子のサイズ、新方向時間及び移動速度。計算はパルスランプを適用後、ゲル中の各バンドの位置を方法に入力して行なった。

バンド	10 V/cm, 20°C		評価				
	2.95s/453 パルス；		実際のサイズ				
	21.56s/453 パルス		(kb)				
	D 実験値	D 理論値	サイズ(kb)	vr x 10 ³	vm x 10 ³	tr (s)	
				cm	cm		
62	2.36	2.23	230	210	0.09443	0.2785	3.9
63	2.29	2.14	270	226	0.09204	0.2768	4.3
64	1.97	1.96	315	302	0.08310	0.2705	6.4
65	1.55	1.42	440	401	0.07530	0.2644	9.5
66	0.84	0.82	577	564	0.06683	0.2573	15.2

D exp：図8のミニゲル中の分子の移動距離。

D theor：各サイズの実際の分子が図8の実験条件において移動するはずである距離。

vr：リオリエンテーションの間の移動速度。

vm：リオリエンテーション後の分子の移動速度。

tr：リオリエンテーション時間。

【0110】

DNA移動の分析方法のフローチャートを図9に示す。図は1サイズの分子を処理するために

描かれており、この段階を分析する全ての分子について繰り返す。

【0111】

例7に記述した方法に移動データを入力すると、該方法はこの例に記述したように分子のサイズを推定する。

【0112】

例8. *Escherichia coli*単離体のミニCHEF型分類。

表現型レベルで*Escherichia coli*と分析された、各単離体 (INN3及びINN7) の1コロニーを血液寒天プレートから採取した。次いで、5 mlのLB培地 (10 gのイースト抽出物、5 gの塩化ナトリウム、10 gのバクト-トリプトン/蒸留水1リッター) 中で継代培養した。各培養は終夜37℃で振とうしてインキュベートした。

10

【0113】

各培養の細胞を洗い (表Iの洗浄液を参照)、遠心分離し、ペレットを0.15 M NaClに溶解した1.5%低融点アガロースに 2×10^9 細胞/mlの割合で再懸濁した。各アガロース-細胞混合物を図1に示した鋳型のシート (1) に注いだ。シートを蓋 (3) で被い、そしてアガロースを固化させてミニプラグを形成させた (5)。両群のミニプラグをNDSUplusと30分50℃でインキュベートした。その後、ミニプラグを洗い、そして10分間Xba I制限酵素用緩衝液とインキュベートし、それぞれ20UのXba Iで2時間37℃において消化した。

【0114】

ミニCHEFのミニゲル (86) 中で分離されたバンドパターン (87) を図10に示す。INN3 (88) 及びINN7 (89) *E. coli*単離体のXba I-消化総DNAのミニCHEFで行われた分離により、それらに共通の6フラグメント (90) を同定することができた。次いで、Tenover (Tenover F et al., J. Clin. Microbiol., 1995, 33: 9, 2233-2239) に従い、それらを2つの異なる*E. coli*垂型に分類した。DNA制限フラグメントは10 V/cm、20℃、1.5%アガロース及び0.5×TBEにおいて、25, 20, 15, 及び5秒のパルスランプ及び35, 40, 50, 140, 及び800パルスをそれぞれ適用したミニCHEF中で分離した。

20

【0115】

開示した解決策の利点

1- いずれかのゲルの薄いミニプラグ中に包埋された微生物の完全DNA分子の調製は5分から1時間の間で行われる。調製には酵素の使用の必要はなく、したがって迅速に安価に行われる。

30

2- PFGE用のDNA検体の非酵素的調製法は液体培地または固形培地で増殖した細胞に使用して有効である。ある型の細胞はそれを包埋する前に非酵素溶液中でインキュベートすることができる。この改良により検体調製に要する時間を短縮される。

3- 開示した方法により調製されるゲル包埋DNA分子は制限エンドヌクレアーゼを阻害しない。これらの分子は2時間で制限酵素により消化され、ミニ装置で実施されるパルスフィールドゲル電気泳動実験において典型的なバンドパターンを示す。

4- 微生物の固定化DNAを含む均一な大きさのミニプラグが得られるので、電気泳動に適用する前に切り揃える必要はない。一定のミニプラグは結果の再現性を保証する。

5- 多数の検体 (27まで) の分子核型またはパルス型が2.5から7時間の泳動時間で得られる。分離用の緩衝液及びマトリックスの消費が少ない。分離に必要な時間は、試験する微生物及び使用する装置、並びに電場、実施温度及び使用するパルスランプに依存する。

40

6- ミニ装置中のパルスフィールドミニゲル電気泳動により微生物のゲノムを分析するために使用される装置は実験室空間を少ししか必要としない。

7- バンドパターンは実験を実施する前に、必要に応じて何度でも、コンピュータにおいてシミュレートすることができる。このシミュレーションにより、試薬及び生物検体を消費することなく、分子間の最良の分離を生じる電場、温度及びパルスランプを選択することができる。

8- パルスランプの選択は、ミニCHEFミニゲル中のDNA分子を記述する式に基づく方法により行われる。次いで、ランプを選択するこの方法は分子間の分離の最適パターンを図示する。

50

- 9- DNA分子のサイズ、リオリエンテーション時間及び移動速度を推定するのにサイズマーカーは必要ない。ここに開示したこれらのパラメーターを推定する方法はゲル中の分子の移動距離に基づいてこれらの情報を提供する。どのようなパルスランプ及び1-20 V/cmの電場強度、4-30℃の間の温度の条件が電気泳動に使用されても、この方法を適用することができるが、実験は1.5%アガロースゲル及び0.5×TBE中で行われることが前提である。
- 10- 電気泳動パターン中で分離したバンドは各バンドに移動した分子のサイズ、該分子のリオリエンテーション時間及びその移動速度について分析される。
- 11- ここに開示した方法は時間、化学試薬及び生物検体を節約する。
- 12- DNA検体調製及び27微生物のゲノムの分析を含めて、この方法は1作業日を要する。
- 13- 微生物の完全DNA調製を簡便化する試薬のキットが提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 ミニプラグを鑄造するための鑄型の図。アガロース-細胞懸濁を注ぐための窪みを着けたシートを図の下側に示す。上には鑄型の蓋及びミニプラグを示す。アガロース-細胞懸濁を分配するスパーテルを右に示す。

【図2】 ミニCHEF及びミニTAFE中で分離された*S. cerevisiae*及び*H. polymorpha*の染色体バンドパターンの写真。図の上：7 cm幅のミニCHEFミニゲル、その27穴及び*S. cerevisiae*染色体のバンドパターン。図の中央に4 cm幅のミニゲル、及び*H. polymorpha*染色体のバンドパターンを示す。検体は固定化細胞を含むミニプラグをNDSUでインキュベートする非酵素的な方法により調製した。泳動条件：10 V/cm, 20℃, 1.5%アガロース, 0.5×TBE, 50秒のパルス時間及び4時間の電気泳動。図の下に、*S. cerevisiae*染色体のバンドパターンを乗せたミニTAFEを示す。ミニTAFEにおいて10 V/cm, 1.5%アガロース, 0.5×TBE, 60秒のパルス時間及び6時間の電気泳動を使用した。検体はNDSUで細胞をインキュベートして調製し、次いでアガロースミニプラグに包埋した。

20

【図3】 *P. aeruginosa*のXba Iマクロ制限DNAフラグメントのミニCHEF中において得られたバンドパターン。左側、*P. aeruginosa*ミニプラグを液体LB培地中で増殖した細胞から調製した、一方右側、ミニプラグをLBプレートで増殖した細胞から調製した。ミニCHEFを10 V/cm, 20℃, 1.5%アガロース及び0.5×TBEにおいて使用し、20, 15, 10, 5及び3秒のパルスランプ及び5, 15, 320, 1020及び100パルスをそれぞれ適用した。

【図4】 *S. aureus*のSma Iマクロ制限DNAフラグメントのミニCHEFにより得られたバンドパターン。細胞を含むミニプラグをNDSUplusとインキュベートする非酵素的な方法により調製された検体のバンドパターンを左に示す。細胞をNDSUplusでインキュベートし次いでアガロースミニプラグに包埋して作製した検体のバンドパターンを右に示す。泳動条件は、10 V/cm, 20℃, 1.5%アガロース及び0.5×TBEにおいて使用し、パルス時間は1, 5, 9, 13, 17及び21。各ランプに130パルスを適用した。

30

【図5】 *E. histolytica*, *S. cerevisiae*及びλ-ファージコンカテマーのDNAバンドパターンの写真。電気泳動はミニTAFEのミニゲル中10 V/cm, 120 sパルス時間、20℃, 1%アガロース (SeaKem)、0.5×TBE緩衝液及び6時間の電気泳動により実施した。厚さ0.1 cmの検体を適用した。左から右へ、レーン1：*S. cerevisiae* 196-2のミニプラグ；レーン2, 3, 4, 及び5：NDSUplusと45℃で0.5, 1, 2及び16時間、それぞれインキュベートした*E. histolytica*トロフォゾイトを含むミニプラグ；レーン6：λ DNAラダー。

40

【図6】 *S. cerevisiae* 196-2染色体のバンドパターンを得るために使用した実際のミニCHEFミニゲル (40) の写真 (左) 及びシミュレーターで予測した仮説的ミニゲル (42) のグラフ (右)。実際の電気泳動はシミュレーターで予測した条件で実施した。この電気泳動で分析された*S. cerevisiae* 196-2の固定化完全DNA分子は本発明において開示した非酵素的な方法により調製した。10 V/cm電場強度、20℃緩衝液温度に対して、シミュレーターが予測した実施条件は5, 40, 75及び110秒の4パルスランプ及び各ランプ42パルスであった。移動データ及び分子のサイズを同定するために使用するカラーコードを表IIに示す。

【図7】 ミニCHEFのミニゲル中のDNAバンドパターンをシミュレートする方法のフローチャート。以下のパラメータ及び変数が図の中で使用される：DNAサイズ (kb)、DNA新方

50

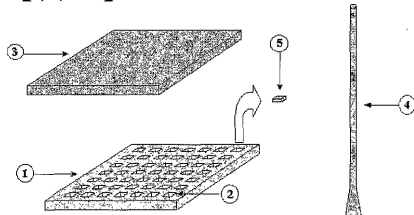
向時間 (t_r)、リオリエンテーションの間 (v_r) の及びリオリエンテーションの後 (v_m) のDNA移動速度。さらに、 tp_r ：各ランプにおけるパルス時間、 Np_r ：各ランプにおけるパルス数、実験温度 (T) の関数として粘度 (η) を記述するために求めた g_0 , g_1 , g_2 , g_3 , g_4 係数、 Dt ：この方法により予測される理論的距離、 n ：ランプの数、 E ：電場、 L ：DNA境界長、 bp ：塩基対、 Q ：DNAネット電荷。

【図 8】 *S. cerevisiae* 染色体のミニCHEF中で得られる電気泳動核型 (61)。電気泳動条件：10 V/cm、1.5%アガロース及び0.5×TBE、20°C、2.95秒と453パルス及び21.56秒と453パルス。

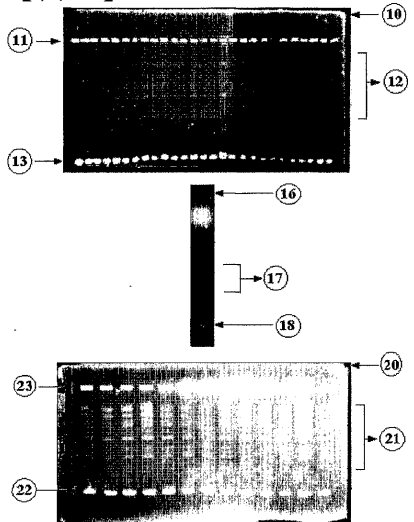
【図 9】 移動距離を入力してミニCHEFで分離した分子のサイズ (kb)、リオリエンテーション時間 (t_r)、リオリエンテーションの間の移動速度 (v_r)、及びリオリエンテーションの後の移動速度 (v_m) を推定するために必要な方法のフローチャート。 tp_r ：各ランプにおけるパルス時間、 Np_r ：各ランプにおけるパルス数、実験温度 (T) の関数として粘度 (η) を記述するために求めた g_0 , g_1 , g_2 , g_3 , g_4 係数、 D ：DNA分子がゲル中を移動した距離、 Dt ：この方法により予測される理論的距離、 n ：ランプの数、 E ：電場、 L ：DNA境界長、 bp ：塩基対、 Q ：DNAネット電荷。

【図 10】 そのDNA分子のXba I制限消化した後のINN3及びINN7 *E. coli* 単離体のミニCHEF型分類。検体調製に非酵素的方法を使用した。実施条件は：10 V/cm、20°C、1.5%アガロース及び0.5×TBEにおいて使用し、パルス時間は25, 20, 15, 10及び5秒及び35, 40, 50, 140及び800パルスを適用した。黒丸印 (90) は両単離体が共通して持つ制限フラグメントを示す。

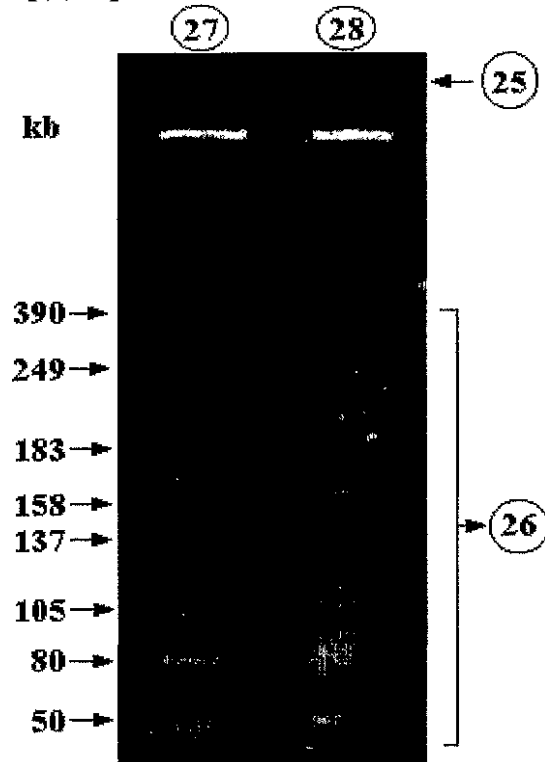
【図 1】



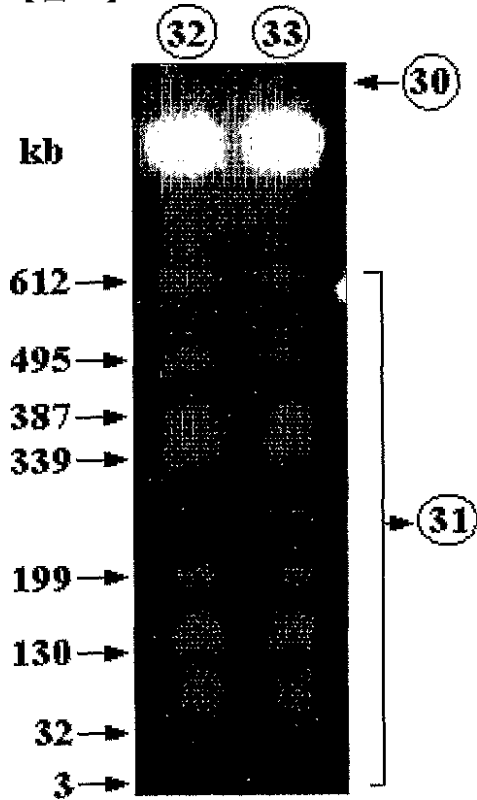
【図 2】



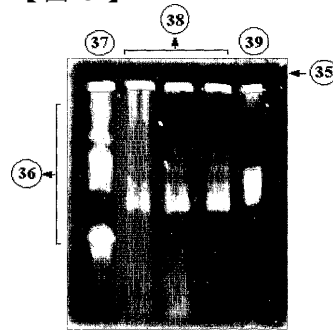
【図 3】



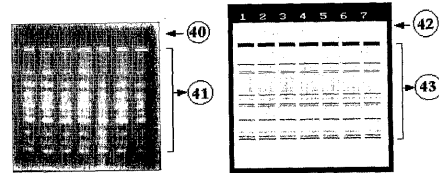
【図 4】



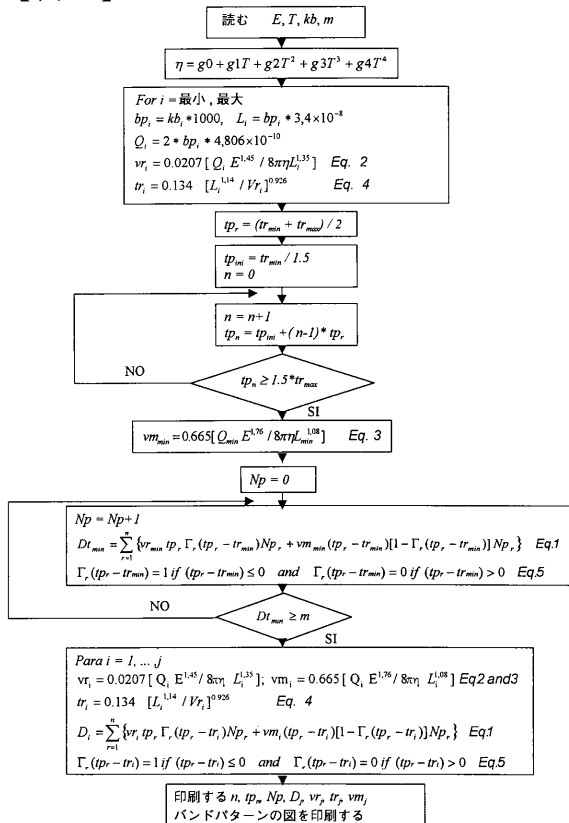
【図 5】



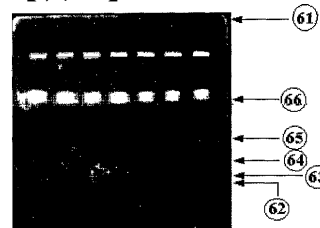
【図 6】



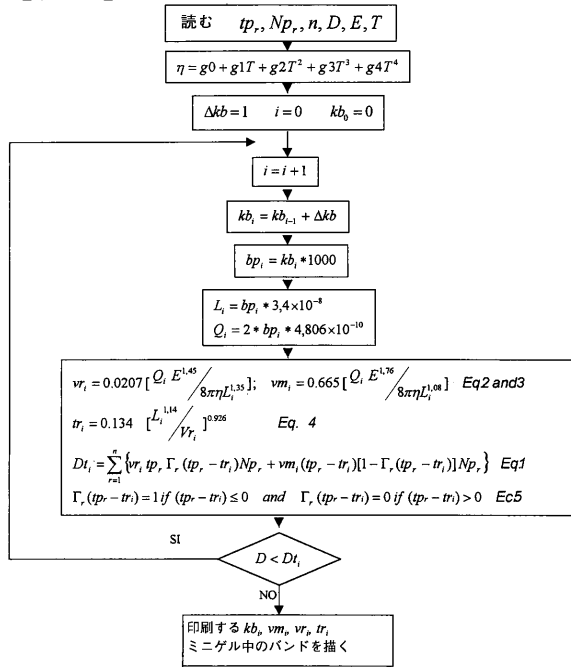
【図 7】



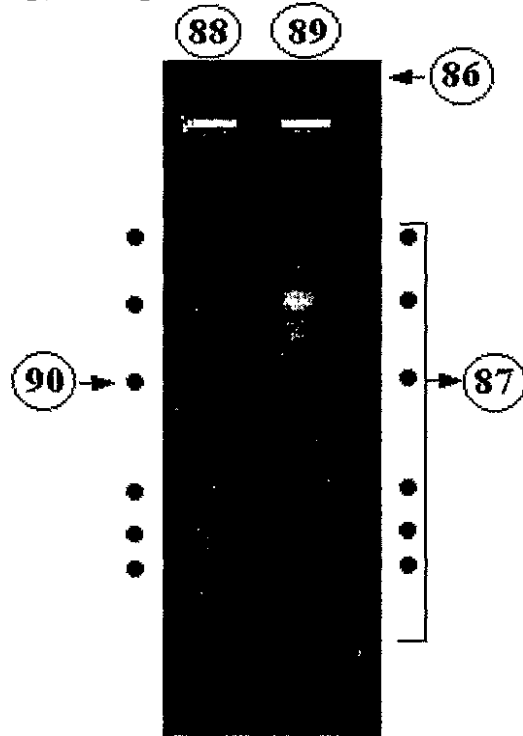
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

- (72)発明者 ロペス カノヴァス、リリア
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラヤ、アタベイ、 カレ 21エイ ナンバー 20
614 エントレ 206エイ イ 214
- (72)発明者 リヴェロン ロヤス、アナ マリア
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラヤ、アタベイ、 カレ 21エイ ナンバー 20
614 エントレ 206エイ イ 214
- (72)発明者 ヒギソン クラーク、ダヴィド
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、レパルテミエント フロレス、 カレ 176 エディ
フィシオ ビービーイー - 3 エントレ 1アールエイ イ 5ティーエイ
- (72)発明者 サンチェス アロンソ、アクセル
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、ラ リサ、 カレ 23エイ エントレ 230 イ
234、 アパルタミエント 52
- (72)発明者 オロスコ オロスコ、エステル
キューバ国 メキシコ ディ、エフ、プラネタリ リンダヴィスタ、 フラクシオン ルイス エ
ンリケ、ヴィア セティ ナンバー 20
- (72)発明者 アレンシビア ディアス、オスカル
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラヤ、 レパルテミエント フロレス、カレ 174
エディフィシオ ビービーイー - 1、アパルタミエント 6
- (72)発明者 アリオサ アクーニャ、マリア コンセプション
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォルシオン、カレ イー ナンバ
ー 658、 アパルタミエント 204 エントレ 27 イ 29
- (72)発明者 クラーク ドンデリス、ヒルダ テレサ
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォルシオン、カレ 25 ナンバ
ー 868、 アパルタミエント 1 エントレ エイ イ ビー
- (72)発明者 ヒガート ペレス、レグナル
キューバ国 シウダド デ ラ ハバナ、プラヤ、アタベイ、 カレ 206 ナンバー 192
2 エントレ 19 イ 21

審査官 郡山 順

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/447