



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03817055.8

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668765A

[22] 申请日 2003.7.16 [21] 申请号 03817055.8
[30] 优先权
[32] 2002. 7. 18 [33] DE [31] 10232776.9
[32] 2003. 2. 14 [33] DE [31] 10307732.4
[86] 国际申请 PCT/EP2003/007717 2003.7.16
[87] 国际公布 WO2004/009839 德 2004.1.29
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.17
[71] 申请人 汉高两合股份公司
地址 德国杜塞尔多夫
[72] 发明人 安德烈亚·萨特勒 克劳迪亚·亚绍
雷吉内·斯科尔蒂塞克
威拉·马廷沙因 西尔克·尼韦勒
阿尔布雷克特·韦斯
卡尔-海因茨·特雷贝修斯
克劳迪亚·拜姆弗尔

沃尔夫冈·路德威格
理查德·罗伯特·班贝格
卡尔·海因茨·施莱费尔
斯特凡·米尔纳
克里斯特尔·阿多马特
英格里德·贝格迈尔
[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司
代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 9 页 说明书 36 页 序列表 13 页

[54] 发明名称 检测微生物的寡核苷酸

[57] 摘要

本发明涉及用于检测微生物的寡核苷酸，检测微生物的方法以及实施所述方法的试剂盒。

ISSN 1008-4274

1. 一种用于检测微生物的寡核苷酸，选自：

i) 带有 SEQ ID NO. 01 至 30 中所示序列的寡核苷酸，以及

5 ii) 与 i) 中寡核苷酸对应至少 80%，优选为至少 84%，更优选为至少 90%，最优选为 95%的寡核苷酸，以及

iii) 衍生自上述 i) 和 ii) 的寡核苷酸之一的寡核苷酸，其序列被删除或延长了一个或多个核苷酸，以及

10 iv) 在严格条件下，能和与所提及的 i) ， ii) 或 iii) 的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸。

2. 权利要求 1 所述的寡核苷酸，其特征在于所述微生物选自葡萄球菌属，消化链球菌属，丙酸菌属，棒状杆菌属，韦荣氏球菌属，鳞斑霉菌属或 *Sporomusa* 类。

15

3. 权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸，其特征在于所述寡核苷酸带有可检测的标记物，所述标记物尤其是共价连接至寡核苷酸。

20

4. 权利要求 3 所述的寡核苷酸，其特征在于可检测的标记物选自：

a) 荧光标记物，

b) 化学发光标记物，

c) 放射性标记物，

d) 酶活性基团，

25

e) 半抗原，

f) 通过杂交可检测的核酸。

5. 权利要求 4 所述的寡核苷酸，其特征在于酶标记物选自过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶，以及磷酸酶，优选为碱性磷酸酶。

30

6. 用于检测微生物的组合寡核苷酸，其含有至少一种，优选地两种或者多种权利要求 1 至 5 任一项所述的寡核苷酸。

7. 权利要求 1 至 6 任一项所述的组合寡核苷酸，含有：

- 5 i) 至少一种用于特异性检测葡萄球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：
- a) 带有 SEQ ID NO.01 至 03 中所示序列的寡核苷酸，以及
- b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
- 10 c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
- d) 在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，
- 和/或
- 15 ii) 至少一种用于特异性检测消化链球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：
- a) 带有 SEQ ID NO.04 至 06 及 27 至 29 所示序列的寡核苷酸，以及
- b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
- 20 c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
- d) 在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，
- 25 和/或
- iii) 至少一种用于特异性检测棒状杆菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：
- a) 有 SEQ ID NO.07 至 12 及 19 至 26 所示序列的寡核苷酸，以及
- 30 b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸

酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

5 d) 在严格条件下，能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

iv) 至少一种用于特异性检测韦荣氏球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

a) 带有 SEQ ID NO.13 至 15 所示序列的寡核苷酸，以及

10 b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

15 d) 在严格条件下，能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

v) 至少一种用于特异性检测痤疮丙酸杆菌种细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

a) 带有 SEQ ID NO.16 及 17 所示序列的寡核苷酸，以及

20 b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

25 d) 在严格条件下，能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

vi) 至少一种用于特异性检测鳞斑霉菌属真菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

a) 带有 SEQ ID NO.18 所示序列的寡核苷酸，以及

30 b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸

酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

5 d) 在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

vii) 至少一种用于特异性检测源自 *Sporomusa* 类微生物的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

a) 带有 SEQ ID NO.30 所示序列的寡核苷酸，以及

10 b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

15 d) 在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸。

8. 权利要求 7 所述的寡核苷酸，含有

i) 至少一种，尤其是几种用于特异性检测葡萄球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

20 a) 带有 SEQ ID NO.01 至 02 中所示序列的寡核苷酸，以及

b) 如权利要求 1 ii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c) 如权利要求 1 iii) 中所述，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

25 d) 在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

ii) 至少一种，尤其是几种用于特异性检测消化链球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

30 a)带有 SEQ ID NO.04 及 27 至 29 所示序列的寡核苷酸，以及

b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

5 d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列
杂交的寡核苷酸,

和/或

iii) 至少一种, 尤其是几种用于特异性检测棒状杆菌属细菌的寡
核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

10 a)带有 SEQ ID NO.07, 8, 10, 11 及 19 至 26 所示序列的寡核苷
酸, 以及

b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

15 c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列
杂交的寡核苷酸,

和/或

20 iv) 至少一种, 尤其是几种用于特异性检测韦荣氏球菌属细菌的
寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

a)带有 SEQ ID NO.13 和 14 所示序列的寡核苷酸, 以及

b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

25 c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸,
以及

d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列
杂交的寡核苷酸,

和/或

30 v) 至少一种, 尤其是几种用于特异性检测痤疮丙酸杆菌种细菌
的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

- a)带有 SEQ ID NO.16 所示序列的寡核苷酸, 以及
- b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- 5 d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸,
- 和/或
- vi) 至少一种, 尤其是几种用于特异性检测鳞斑霉菌属真菌的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:
- 10 a)带有 SEQ ID NO.18 所示序列的寡核苷酸, 以及
- b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- 15 d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸,
- 和/或
- vii) 至少一种, 尤其是几种用于特异性检测源自 *Sporomusa* 类微生物的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:
- 20 a)带有 SEQ ID NO.30 所示序列的寡核苷酸, 以及
- b)如权利要求 1 ii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- c)如权利要求 1 iii) 中所述, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及
- 25 d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)的寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸。

9. 权利要求 6 到 8 任一项所述的组合寡核苷酸, 含有一种、几种或者全部带有 SEQ ID NO.01, 02, 04, 07, 08, 10, 11, 13, 14,

30

16, 18 和 19 至 30 所示序列的寡核苷酸。

10. 一种通过原位杂交检测微生物的方法，尤其是检测葡萄球菌属，消化链球菌属，丙酸菌属，棒状杆菌属，韦荣氏球菌属，鳞斑霉菌属和/或 *Sporomusa* 类微生物的方法，其特征在于所述方法包含如下步骤：

- a) 采集样品，
- b) 对存在于所采集样品中的微生物进行固定，
- c) 用至少一种权利要求 1 至 9 任一项所述的寡核苷酸或组合寡核苷酸培育固定的微生物，以诱导杂交，
- d) 去除未杂交的寡核苷酸，以及
- e) 对与寡核苷酸杂交的微生物进行检测以及任选地进行定量。

11. 权利要求 10 所述的方法，其特征在于在步骤 a) 中，从下述来源采集样品：

- i) 皮肤表面，
- ii) 食品，
- iii) 环境，尤其是水，土壤或者空气，
- iv) 废水或者生物膜，
- v) 临床检验材料或者
- vi) 药品或者化妆品。

12. 权利要求 10 或 11 所述的方法，其特征在于通过如下试剂和步骤进行固定：

- i) 优选自乙醇、丙酮和乙醇/乙酸混合物的变性剂，
- ii) 优选自甲醛、低聚甲醛和戊二醛的交联剂，或
- iii) 加热固定。

13. 如权利要求 10 至 12 任一项所述的方法，其特征在于固定后将微生物固定于载体上。

14. 如权利要求 10 至 13 任一项所述的方法，其特征在于杂交前对微生物进行渗透化。

5 15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于通过采用细胞壁溶解酶进行的部分降解而实施渗透化，所述细胞壁溶解酶优选自溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K、链霉蛋白酶和变溶菌素。

10 16. 如权利要求 10 到 14 任一项所述的方法，其特征在于未标记的寡核苷酸与标记的寡核苷酸一起使用。

15 17. 一种实施权利要求 10 到 16 任一项所述的方法的试剂盒，含有至少一种权利要求 1 至 5 任一项所述的寡核苷酸，优选地是含有权利要求 6 至 9 任一项所述的组合寡核苷酸。

18. 权利要求 17 所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种没有寡核苷酸的杂交溶液。

20 19. 权利要求 17 或者 18 所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种合适的洗液或洗液的浓缩液。

20. 权利要求 17 至 19 任一项所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种合适的渗透化溶液。

25 21. 权利要求 17 至 20 任一项所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种合适的固定液。

22. 权利要求 17 至 21 任一项所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种合适的阳性对照溶液。

30

23. 权利要求 17 至 22 任一项所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有至少一种合适的阴性对照溶液。

5 24. 权利要求 17 至 23 任一项所述的试剂盒，其特征在于所述试剂盒另外含有一种包埋溶液。

25. i)如权利要求 1 至 9 任一项所述的寡核苷酸或者组合寡核苷酸，

ii)如权利要求 10 至 16 任一项所述的方法和/或

10 iii)如权利要求 16 至 24 任一项所述的试剂盒
在对微生物进行检测和/或定量中的应用。

检测微生物的寡核苷酸

5 本发明涉及检测微生物的寡核苷酸，检测微生物的方法以及实施所述方法的试剂盒。

10 迄今对微生物的检测主要通过血清或显微镜的方法来实现。该方法对于少量微生物的直接检测不够敏感。因此，迄今在检测之前是对微生物进行繁殖的培养步骤。这种方法的一个不足之处是，一些微生物在可利用的营养物培养基上根本就不生长，因而不能被检测出。各种环境样品的分析表明，可培养的细菌仅为全部细菌的 0.1-14%。尤其是，已经证明依赖于培养的过程对于复合生物群落组分的分析是不适合的。这是因为，依赖于所选择的培养条件，只有能很好适应于这些培养条件的那些微生物的增殖才得到了促进，其结果是起始样品中占优势的种群比例严重失真。由于这些种群的变化，对微生物的定量分析是完全不可能的。这种方法的另一不足之处是，一些已知的培养过程是非常费力的，并且结果通常是不明确的。这可导致假阳性和假阴性的分析结果。

20 鉴于所述培养的不足之处，现代微生物检测方法都具有一个共同的目标：通过去除对培养的需求，从而寻求避免培养的不足之处。

25 用于检测微生物的现代方法的实例有：基于 DNA 或基于 RNA 的杂交或扩增方法（DNA=脱氧核糖核酸，RNA=核糖核酸）。对杂交特别的理解为形成两条单链互补寡或多核苷酸的双螺旋。杂交可尤其发生在两个 DNA 或两个 RNA 分子之间及 DNA 和 RNA 分子之间。各种分子只有当靶序列与另一序列足够互补时才会发生杂交。

30 也可对用于检测的互补靶序列进行固定，如所谓的 DNA 芯片通

常所采用的。德国实用新型专利 201 10 013 要求了用于口腔疾病，尤其是牙周炎诊断和治疗的这样一种载体（DNA 芯片）的权利。与口腔菌群中某些细菌或病毒的已知参照序列互补的寡核苷酸固定于该载体上。由于互补性，施用于该基因芯片的寡核苷酸在特定条件下能与对应的参照序列杂交。该载体的不足之处是，要么必须通过培养繁殖微生物，要么杂交前必须对所提供样品的遗传信息在芯片上进行扩增。因此，初始存在于样品中的微生物也不能定量。

已知的扩增方法是聚合酶链式反应（PCR）。在 PCR 中，采用特异性引物对特定微生物基因组的特征片段进行扩增。如果引物发现其靶位点，则可对遗传物质片段进行百万倍的扩增。随后的分析中可进行定性评估，例如采用分离 DNA 片段的琼脂糖凝胶。在最简单的情况下，这提供的信息是所采用引物的靶位点存在于分析样品中。无任何其他信息可提供。这些靶位点既可源于活细菌也可源于死细菌或裸 DNA。此处不可能发生分化。另外，分析样品中存在的各种物质可诱导对 DNA 扩增酶，taq 聚合酶的抑制。这是假阴性结果的普遍原因。PCR 技术的进一步发展是定量 PCR，所述定量 PCR 目的在于在微生物的存在量和扩增 DNA 的量之间建立一种关联。PCR 的优点包括其高特异性及所需时间较短。主要不足之处是其对污染的高度敏感性及所致的假阳性结果，上面提及的不能区分活细胞和死细胞或裸 DNA，并且，最后，由于存在抑制性物质而所致的假阴性结果。

上世纪九十年代初，开发出了采用荧光标记的寡核苷酸进行原位杂交方法，并且已成功用于许多环境样品中（Amann 等，（1990），J.Bacteriol.172,762）。该方法被命名为“FISH”（荧光原位杂交），并且利用了每一细胞中存在的核糖体核糖核酸既带有高度保守的又带有高度可变的，即属甚或种特异性序列。以这些序列结构域可产生出互补寡核苷酸，并且用可检测的标记物也可另外提供互补寡核苷酸。采用这些所谓的核酸探针，可直接以高特异性鉴定出样品中的微生物种、属或群，并且如果必要，甚至可肉眼观察到或可定量。该方法是

提供了生物群落实际原位状况的不失真表述的唯一方法。甚至可鉴定从未培养因而也从未描述过的微生物。

5 在 FISH 中，探针渗入存在于分析样品中的细胞。如果分析样品中存在开发探针所用种、属或群的微生物，则微生物细胞内的探针结合至其靶序列，并且通过探针标记可检测出细胞。

FISH 技术优于上面另外描述的微生物鉴定技术（培养，PCR）的优点是多方面并且是多样化的。

10

首先，许多以常规培养不能检测的微生物可用探针检测。通过培养至多只有 15% 的样品细菌菌群可见，而 FISH 技术则使得许多样品中高达 100% 的总细菌菌群可被检测。其次，通过 FISH 技术对微生物的检测可比通过培养快得多。通过培养进行的微生物鉴定通常要花好几天，而采用 FISH 技术，即使在种的水平，取样和微生物鉴定之间也只需花费几个小时。第三，与培养基相比较，对探针的特异性几乎可进行自由选择。采用探针可检测单个种，及至整个属或微生物菌群。第四，可对样品本身中的微生物种或整个微生物菌群进行精确定量。第五，可对样品中各种微生物的群丛进行肉眼观察。

20

与 PCR 相比较，FISH 只能可靠地检测活微生物。采用 PCR 得到的裸 DNA 或死微生物的假阳性结果不会发生于 FISH 中。另外，与可归因于污染的假阳性结果差不多，由于抑制性物质存在而导致的假阴性结果也被排除。

25

因此，FISH 技术对于快速和高特异性地直接检测样品中的微生物是一种出色手段。与培养方法相比，它是直接的并且甚至能使样品中存在的微生物得以定量。

30

例如面积为约 2m^2 的人体肌肤，是微生物寄居的最大人体器官之

一。在进化过程中，宿主与其微生物寄居者之间形成了紧密的关系。由肌肤通过各种腺体提供的营养物被微生物代谢。由此导致的肌肤表面的酸化防止了肌肤被病原微生物所寄居。

5 然而，微生物的代谢活性也可产生有害效果。例如，肌肤气味和头皮屑的产生以及各种肌肤疾病的发生均可归因于微生物的活性。

 例如，酵母样鳞斑霉属 (yeast *Malassezia*)被怀疑特别地与诸如头皮的肌肤鳞屑有关。此外，这种微生物也被认为是皮肤病变色糠疹 (Pityriasis versicolor)的根源。

10

 痤疮丙酸杆菌存在的增加也是痤疮发生的信号，即使是在早期。

 原则上，所有的微生物均属于可从肌肤分离的肌肤菌群。根据 Price 的观点，有两个不同的菌群 (Price,P.B.: 正常肌肤的细菌学：用于研究细菌菌群和机械去污的消毒活性的新定量试验 (The bacteriology of the normal skin: A new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing.) J. Infect. Dis., 63:301-318,1938) 。

15

20

 a)常住菌：能够在人体肌肤上增殖的微生物，或者在肌肤样品分析中，发现能规则地大量或高百分比存在的微生物。需要声明的是，上述属性可归因于这些常住微生物对肌肤的坚固锚定（附着）。

25

 b)过渡菌：不能在人体肌肤上增殖的微生物，或者分析中仅发现不规则地且以少量/百分比存在的微生物。理论上，这些微生物是游离的，即不能粘附于肌肤成分上。

30

 鉴于寻求新药用或化妆品用活性组分所需，对肌肤常住菌的更全面认识是尤为重要的。另外，各种微生物之间的相互作用可开启对健

康肌肤和肌肤疾病之间关系的更广阔理解，并促进更好的有效成分、治疗剂或药物的开发。诸如除臭剂、乳膏等化妆产品对相关肌肤微生物的选择性影响，也可推测出对肌肤微生态体系结构和功能的全面认识。

5

因此，目前需要适合作为其它更广泛微生物的核酸探针的寡核苷酸，从而可以开新的应用领域。尤其是，目前需要用于检测与人和/或动物接触的微生物，例如食品中，废水中，环境样品中或者来自皮肤表面微生物的探针。

10

因此，本发明致力于解决的问题是：提供检测微生物或者微生物群的寡核苷酸，其能对样品中的这些微生物进行快速及任选定量的确定，并且，尽管同时存在其他微生物，仍能安全地检测出单个微生物种或微生物种群。

15

这个问题已经通过提供用于检测微生物的寡核苷酸以及通过使用这些寡核苷酸的方法以及实施所述方法的试剂盒得以解决，所述寡核苷酸选自：

i)带有 SEQ ID NO. 01 至 30 中所示序列的寡核苷酸，以及

20

ii)与 i) 中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，其核苷酸对应比率至少为 80%，优选为至少 84%，更优选为至少 90%，最优选为 95%，以及

iii)衍生自所提及的 i) 和 ii) 的寡核苷酸之一的寡核苷酸，序列被删除或延长了—个或多个核苷酸，以及

25

iv)在严格条件下，能和与所提及的 i) 、 ii) 或 iii) 寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸。

在本发明上下文中，对术语“微生物群”的理解是包含了至少两个微生物种，所述微生物种可属于同一属，或者具有非常类似的 rRNA。例如，根据本发明的微生物群也可包含某一属的所有种。

30

除了带有 SEQ ID NO.01 至 18 中所示序列的寡核苷酸，以及与其核苷酸对应比率至少为 80%，优选为至少 84%，更优选为至少 90%，最优选为 95%的寡核苷酸之外，本发明还包含衍生自所提及寡核苷酸，被延长或删除了一个或多个核苷酸的寡核苷酸。

5

另外，除了带有 SEQ ID NO.19 至 30 中所示序列的寡核苷酸，以及与其核苷酸对应比率至少为 77%，优选为至少 83%，更优选为至少 88%，最优选为 94%的寡核苷酸外，本发明还包含衍生自所提及寡核苷酸，被延长或删除了一个或多个核苷酸的寡核苷酸。

10

更特别地，还可将 1-40 个，优选为 1-25 个，更特别地为 1-15 个核苷酸连接至所提及寡核苷酸的 3'末端和或 5'末端。

15

根据本发明，也可采用衍生自所提及寡核苷酸的寡核苷酸，所述衍生方法为从序列中删去 1-7 个，优选为 1-5 个，更优选为 1-3 个核苷酸，例如 1 个或 2 个核苷酸。

20

在一个特别的实施方案中，待选择的微生物选自葡萄球菌属、消化链球菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属、荣氏球菌属、鳞斑霉菌属和/或 *Sporomusa* 类。

25

迄今，仅通过已知培养方法调查研究过肌肤微生物群落。由于此类方法的上述缺陷，仅有可培养的细菌或真菌可被检测出。这些种的实例包括金黄色葡萄球菌，表皮葡萄球菌，科氏葡萄球菌，溶血葡萄球菌，人葡萄球菌，头状葡萄球菌，沃氏葡萄球菌，松鼠葡萄球菌，施氏葡萄球菌，中间葡萄球菌，*Veillonella spec.*，痤疮丙酸杆菌，*Malassezia sloffiae*，厚皮鳞斑霉菌，秕糠鳞斑霉菌，微小棒状杆菌，无枝菌酸棒状杆菌，纹状棒状杆菌及结膜干燥棒状杆菌。

30

采用本发明的寡核苷酸，可方便地检测出这些和其他所提及属的

种，不仅仅是定性，还能定量。这些定量信息可用于，首要的是用于试验有效成分或者肌肤疾病的早期诊断。此外，上述的微生物属也可以存在于其它样品中，例如食品中，临床检验材料或者环境样品中。

5 在本发明上下文中，对“肌肤”的理解是人体肌肤和/或动物肌肤或粘膜以及肌肤附属物（毛发、毛囊、指甲、腺体）。

10 在一个特定实施方案中，寡核苷酸带有可检测的标记（优选为荧光标记物），所述标记物优选为共价结合至寡核苷酸。寡核苷酸与靶序列所完成的杂交的可检测性对于鉴定以及任选的微生物定量是必要的。尤其是，这通常通过将可检测标记物共价结合至寡核苷酸而实现。所使用的可检测标记物通常是荧光基团，例如 Cy-2, Cy-3 或 Cy-5 (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), FITC (荧光素异硫氰酸酯), CT(5,(6)-羧基四甲基若丹明-N-羟基琥珀酰亚胺酯)
15 (Molecular Probes Inc., Eugene, USA)), TRITC(四甲基若丹明-5,6-异硫氰酸酯 (Molecular Probes Inc., 见上) 或 FLUOS(5,(6)-羧基荧光素-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)。或者，可采用化学发光基团或放射性标记物，例如 35S, 32P, 33P, 125J。然而，通过将寡核苷酸偶联至酶活性分子也可获得可检测性，所述酶
20 活性分子例如为碱性磷酸酶，酸性磷酸酶，过氧化物酶，辣根过氧化物酶， β -D-半乳糖苷酶或葡萄糖氧化酶。这些酶各自都有许多已知的生色团，所述生色团代替天然底物与酶反应，并产生带颜色或荧光的产物。这种生色团的实例列于如下表 1 中。

表 1	
酶	生色团
碱性磷酸酶及酸性磷酸酶	4-甲基伞形基-磷酸盐 (*) 双 (4-甲基伞形基磷酸盐), (*) 3-O-甲基荧光素, 黄酮-3-二磷酸三铵盐 (*), 对-硝基苯基磷酸二钠盐
过氧化物酶	盐酸酪胺 (*), 3-(对-羟基苯基)-丙酸 (*), 对-羟基苯乙基醇 (*), 2,2'-连氨基-双- (3-乙基苯并噻唑啉磺酸) (ABTS), 邻- -亚苯基二胺二盐酸化物, 邻-联茴香胺, 5-氨基水杨酸, p-ucresol (*), 3,3'-二甲氧 基联苯胺, 3-甲基-2-苯并噻唑啉脒, 四甲基联苯胺
辣根过氧化物酶	H ₂ O ₂ +二铵联苯胺 H ₂ O ₂ +四甲基联苯胺
β -D-半乳糖苷酶	邻-硝基苯基-β -D-吡喃半乳糖苷 4-甲基伞形基-β -D-半乳糖苷
葡萄糖氧化酶	ABTS, 葡萄糖和噻唑基蓝
*发荧光	

最后，寡核苷酸可以设计为适合于杂交的另一核酸序列位于其 5' 或 3' 末端。该核酸序列同样含有约 15-1,000 个核苷酸，优选 15-50 个核苷酸。该二级核酸区域可通过上面述及的手段检测的寡核苷酸依次识别。

另一可能性是将可检测的寡核苷酸偶联至半抗原，所述半抗原随后可与识别半抗原的抗体相接触。地高辛配基可以作为这种半抗原的实例。除那些已提及的外，其他实例是本领域技术人员所熟知的。

更特别地，酶标记物选自过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶，以及磷酸酶，优选为碱性磷酸酶。

本发明也涉及用于检测微生物的组合寡核苷酸，含有至少一种并且优选地两种或者多种上述的寡核苷酸。

在本发明的上下文中，组合寡核苷酸被理解为含有以诸如溶液（例如缓冲溶液）或混合物（例如冻干状态）形式存在的至少一种或多种寡核苷酸。另外，该寡核苷酸也可与另一寡核苷酸（例如在芯片上或者在试剂盒中）一同存在，但是相互分开（例如在不同的容器中）。

5

在一个特定实施方案中，本发明的组合寡核苷酸含有：

i)至少一种用于特异性检测葡萄球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

a)带有 SEQ ID NO.01 至 03 中所示序列的寡核苷酸以及

10 b)如权利要求 1 ii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c)如权利要求 1 iii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

15 d)在严格条件下，能和与 a), b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

ii)至少一种用于特异性检测消化链球菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

20 a)带有 SEQ ID NO.04 至 06 及 27 至 29 所示序列的寡核苷酸，以及

b)如权利要求 1 ii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

c)如权利要求 1 iii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及

25 d)在严苛条件下，能和与 a),b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，

和/或

iii)至少一种用于特异性检测棒状杆菌属细菌的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：

30 a)带有 SEQ ID NO.07 至 12 及 19 至 26 所示序列的寡核苷酸，以

及

b)如权利要求 1 ii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

5 c)如权利要求 1 iii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸,

和/或

10 iv) 至少一种用于特异性检测韦荣氏球菌属细菌的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

a)带有 SEQ ID NO.13 至 15 所示序列的寡核苷酸, 以及

b)如权利要求 1 ii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

15 c)如权利要求 1 iii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸,

和/或

20 v) 至少一种用于特异性检测痤疮丙酸杆菌种细菌的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

a)带有 SEQ ID NO.16 及 17 所示序列的寡核苷酸, 以及

b)如权利要求 1 ii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

25 c)如权利要求 1 iii) 中所提及, 与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸, 以及

d)在严格条件下, 能和与 a), b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸,

和/或

30 vi) 至少一种用于特异性检测鳞斑霉菌属真菌的寡核苷酸, 所述寡核苷酸选自:

- 5 a)带有 SEQ ID NO.18 所示序列的寡核苷酸，以及
b)如权利要求 1 ii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
c)如权利要求 1 iii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
d)在严格条件下，能和与 a)，b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸，
和/或
vii) 至少一种用于特异性检测源自 *Sporomusa* 类微生物的寡核苷酸，所述寡核苷酸选自：
10 a)带有 SEQ ID NO.30 所示序列的寡核苷酸，以及
b)如权利要求 1 ii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
c)如权利要求 1 iii) 中所提及，与 a)中寡核苷酸相对应的寡核苷酸，以及
15 d)在严苛条件下，能和与 a)，b)或 c)寡核苷酸之一互补的序列杂交的寡核苷酸。

20 本发明的寡核苷酸特别适合于葡萄球菌属、消化链球菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属、荣氏球菌属、鳞斑霉菌属和/或 *Sporomusa* 类微生物的特异性检测。

25 因此，从组 i) 至组 vii) 的一种或多种寡核苷酸的如下组合是可能的。这是指，例如，从组 i),ii),iii),iv),v),vi)或 vii)之一选择一种或多种寡核苷酸。

30 组 i) 的一种或多种寡核苷酸与组 ii) 的一种或多种寡核苷酸的组合，以及类似地，组 i) 与组 iii)，组 i) 与组 iv)，组 i) 与组 v)，组 i) 与组 vi)，组 i) 与组 vii)，组 ii) 与组 iii)，组 ii) 与组 iv)，组 ii) 与组 v)，组 ii) 与组 vi)，组 ii) 与组 vii)，组 iii) 与组 iv)，

组 iii) 与组 v), 组 iii) 与组 vi), 组 iii) 与组 vii), 组 iv) 与组 v), 组 iv) 与组 vi), 组 iv) 与组 vii), 组 v) 与组 vi), 组 v) 与组 vii), 以及组 vi) 与组 vii) 寡核苷酸的组合是本发明所含范围。

5 根据本发明, 组 i), ii) 和 iii) 的一种或多种寡核苷酸的组合, 以及类似地, 组 i) 与 ii) 和 iv); 组 i) 与 ii) 和 v); 组 i) 与 ii) 和 vi); 组 i) 与 ii) 和 vii), 组 i) 与 iii) 和 iv); 组 i) 与 iii) 和 v); 组 i) 与 iii) 和 vi), 组 i) 与 iii) 和 vii); 组 i) 与 iv) 和 v); 组 i) 与 iv) 和 vi); 组 i) 与 iv) 和 vii), 组 i) 与 v) 和 vi), 组 i) 与 v) 和 vii); 组 ii) 与 iii) 和 iv); 组 ii) 与 iii) 和 v); 组 ii) 与 iii) 和 vi); 组 ii) 与 iii) 和 vii); 组 ii) 与 iv) 和 v); 组 ii) 与 iv) 和 vi), 组 ii) 与 iv) 和 vii); 组 ii) 与 v) 和 vi), 组 ii) 与 v) 和 vii); 组 iii) 与 iv) 和 v); 组 iii) 与 iv) 和 vi), 组 iii) 与 iv) 和 vii); 组 iii) 与 v) 和 vi), 组 iii) 与 v) 和 vii) 以及组 iv) 与 v) 和 vi), 组 iv) 与 v) 和 vii), 组 iv) 与 vi) 和 vii), 组 v) 与 vi) 和 vii) 寡核苷酸的组合也是可以的。

各自选自四组的一种或多种寡核苷酸的组合, 即组 i) 与 ii), iii) 和 iv); 组 i) 与 ii), iii) 和 v); 组 i) 与 ii), iii) 和 vi); 组 i) 与 ii), iii) 和 vii); 组 i) 与 ii), iv) 和 v); 组 i) 与 ii), iv) 和 vi); 组 i) 与 ii), iv) 和 vii); 组 i) 与 ii), v) 和 vi); 组 i) 与 ii), v) 和 vii); 组 i) 与 ii), vi) 和 vii); 组 i) 与 iii), iv) 和 v); 组 i) 与 iii), iv) 和 vi); 组 i) 与 iii), iv) 和 vii); 组 i) 与 iii), v) 和 vi); 组 i) 与 iii), v) 和 vii); 组 i) 与 iv), v) 和 vi); 组 i) 与 iv), v) 和 vii); 组 i) 与 iv), vi) 和 vii); 组 ii) 与 iii), iv) 和 v); 组 ii) 与 iii), iv) 和 vi); 组 ii) 与 iii), iv) 和 vii); 组 ii) 与 iii), v) 和 vi); 组 ii) 与 iii), v) 和 vii) 或者组 iii) 与 iv), v) 和 vi); 组 iii) 与 iv), v) 和 vii); 组 iii) 与 iv), vi) 和 vii) 的组合也可采用。

来自五组的一种或多种寡核苷酸的组合, 即组 i) 与 ii), iii), iv) 和 v); 组 i) 与 ii), iii), iv) 和 vi); 组 i) 与 ii), iii), iv) 和 vii); 组 i) 与 ii), iii), v) 和 vi); 组 i) 与 ii), iii), v) 和 vii); 组 i) 与 iii), iv), v) 和

vi); 组 i) 与 iii), iv), v) 和 vii); 组 i) 与 ii), iv), v) 和 vi); 组 i) 与 ii), iv), v) 和 vii); 组 i) 与 ii), iv), vi) 和 vii); 组 ii) 与 iii), iv), v) 和 vi); 组 ii) 与 iii), iv), v) 和 vii) 的组合也包含在本发明范围内。

5 来自六组的一种或多种寡核苷酸的组合, 即组 i) 与 ii), iii), iv), v) 和 vi); 组 i) 与 ii), iii), iv), v) 和 vii); 组 i) 与 iii), iv), v), vi) 和 vii); 组 ii) 与 iii), iv), v), vi) 和 vii), 以及选自全部七组的一种或多种寡核苷酸的组合也是本发明的范围。

10 因此, 本发明的组合寡核苷酸适合于检测微生物种或微生物群。为此目的, 选择组 i) 的一种或多种寡核苷酸, 例如可用于检测葡萄球菌属的某几个种。

15 另外, 然而, 通过组合寡核苷酸的合适组分(根据所提及的可能组合), 可同时和/或彼此并列地、方便地实施对所提及各种属的微生物种和/或群的检测。

20 例如, 采用合适的组合寡核苷酸, 可同时实施对葡萄球菌属微生物(通过选择一种或多种组 i) 的寡核苷酸) 和/或与棒状杆菌属微生物的同时检测, 一道(通过选择一种或多种组 iii) 寡核苷酸)。通过各种组合可个别地适合于满足特定需求。

25 迄今考虑到用于检测微生物的寡核苷酸的选择, 在待检测的微生物中存在合适的互补序列是尤为重要的。满足如下条件的序列认为合适的: 一方面, 该序列对待检测微生物具有特异性, 另一方面, 可实际接受插入的寡核苷酸, 即不会被核糖体蛋白质或 rRNA 二级结构所掩蔽。即使 Fuchs 等人(B.M.Fuchs, G.Wallner, W. Besiker, I. Schwippi, W. Ludwig and R. Amann: Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled
30 oligonucleotide probes. Appl. Environ Microbiol. 1998,64(12):4973-

4982) 显示以初级序列数据为基础开发的大量寡核苷酸如果存在的话, 只可以用于限制范围的原位杂交。rRNA 次级结构域或者核糖体蛋白覆盖的可能寡核苷酸结合位点被引用作为上述寡核苷酸不能令人满意的结合。这种不能结合的区域对每种生物而言是不同的并且每种生物都必须重新去发现。因此, 具有良好结合特性的寡核苷酸的序列不能从 rRNA 的初级序列被揭示, 即使是专业人员, 因此也不能源于这种程序的共有序列。

通过选择本发明的特定序列, 则可能检测出微生物种, 微生物属或微生物群。对于 15 个核苷酸的寡核苷酸而言, 序列存在的互补性应在 100%之上。对于含 15 个以上核苷酸的寡核苷酸, 允许有一至数个错配位点。

尤其是, 本发明提供了含有用于葡萄球菌属微生物特异性检测的寡核苷酸, 所述寡核苷酸与 rRNA 互补, 并选自带有 SEQ ID NO.01 至 03 中所示序列的寡核苷酸。

每一种所提及的寡核苷酸检测葡萄球菌属的至少一种如下种: 金黄色葡萄球菌, 表皮葡萄球菌, 解糖葡萄球菌, 山羊葡萄球菌, 头状葡萄球菌, 沃氏葡萄球菌, 巴斯德葡萄球菌, 阿尔莱特葡萄球菌, 鸡葡萄球菌, 科氏葡萄球菌, *S. succinus*, 克氏葡萄球菌, 腐生葡萄球菌, 马胃葡萄球菌, 木糖葡萄球菌, 溶血葡萄球菌, 人葡萄球菌, *S. lugdunensis*, 产色葡萄球菌, 耳葡萄球菌, 施氏葡萄球菌, 松鼠葡萄球菌, 缓慢葡萄球菌, *S. vitulus*, *S. pulveri*, *S. felis*, 猪葡萄球菌, *S. piscifermentans*, 肉葡萄球菌, 模仿葡萄球菌, 中间葡萄球菌, *S. delphini*, *S. muscae* 和 *S. condimenti*。

具有类似的 rRNA 序列, 但不属于葡萄球菌属的微生物, 不会被这些探针方便地检测出来: 多粘类芽孢杆菌, 豆形杆菌, 蜡样芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 炭疽芽孢杆菌, 普通变形菌, 洋葱伯克霍尔德菌

(*Burkholderia cepacia*), 单形拟杆菌, *Pediococcus damnosus*。这是一特别的优点, 显示出探针的高特异性。

5 带有 SEQ ID NO.02 所示序列的寡核苷酸适合于葡萄球菌属微生物的检测, 尤其适用于中间葡萄球菌, *S. delphini*, *S. muscae*, *S. condimenti*, *S. piscifermentans*, 肉葡萄球菌, 施氏葡萄球菌, *S. felis* 和模仿葡萄球菌, 优选为中间葡萄球菌和施氏葡萄球菌。

10 本发明带有 SEQ ID NO.01 至 02 中所示序列的寡核苷酸的组合是特别优选的。这种组合可检测出葡萄球菌属的至少如下种: 金黄色葡萄球菌, 表皮葡萄球菌, 山羊葡萄球菌, 头状葡萄球菌, 沃氏葡萄球菌, 巴斯德葡萄球菌, 阿尔莱特葡萄球菌, 鸡葡萄球菌, 科氏葡萄球菌, *S. succinus*, 克氏葡萄球菌, 腐生葡萄球菌, 马胃葡萄球菌, 木糖葡萄球菌, 溶血葡萄球菌, 人葡萄球菌, *S. lugdunensis*, 产色葡萄球菌, 耳葡萄球菌, 施氏葡萄球菌, 松鼠葡萄球菌, 缓慢葡萄球菌, *S. vitulus*, *S. pulveri*, 中间葡萄球菌, *S. delphini*, *S. felis*, *S. muscae*, *S. condimenti*, *S. piscifermentans*, 肉葡萄球菌和模仿葡萄球菌。

20 更特别地, 本发明也提供了用于消化链球菌属微生物特异性检测的寡核苷酸, 所述寡核苷酸与 rRNA 互补, 并选自带有 SEQ ID NO.04 至 06 和 27 至 29 中所示序列的寡核苷酸。

25 根据最新知识, 属名为消化链球菌的已知细菌可归为各个亚群, 尤其是 *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* 和 *Finegoldia* 属。

每一种所提及的寡核苷酸可检测出合称为“消化链球菌”的 *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* 和 *Finegoldia* 属的至少一种如下种: *P. assaccharolyticus*, *P. lacrimalis*, *P. hareii*, *F. magnus*, *A. tetradius*, *A. hydrogenalis*, *A. lactolyticus*, *A. octavius* 和 *A. vaginalis*。

30

带有 SEQ ID NO.04 至 06 序列的寡核苷酸是特别优选的。这些寡核苷酸各自可检测出消化链球菌属，尤其是 *Anaerococcus* 属的至少如下种：*Anaerococcus hydrogenalis*, *A.lactolyticus*, *A.octavius*, *A.prevotii*, *A.tetratidius* 和 *A.vaginalis*。

5

如下所提及消化链球菌属的种，以及具有相似 rRNA 序列但不属于消化链球菌属，尤其是 *Anaerococcus* 属的其他微生物，不会被方便地检测出：*Peptoniphilus lacrimalis*, 厌氧消化链球菌, *Finnegoldia magnus* 和 *Ruminococcus productus*, 表皮短杆菌, *Abiotropha elegans* 和 矛形梭菌。

10

在一个特别优选实施方案中，带有 SEQ ID NO.04 中所示序列的寡核苷酸尤其优选。该寡核苷酸可检测出属名为“消化链球菌”的微生物的至少如下种：*Anaerococcus hydrogenalis*, *A.lactolyticus*, *A.octavius*, *A. prevotii* 和 *A.vaginalis*。

15

尤其是，本发明还提供了用于消化链球菌属微生物特异性检测的寡核苷酸，所述寡核苷酸与 rRNA 互补，并选自带有 SEQ ID NO.27 至 29 中所示序列的寡核苷酸。

20

如下所提及消化链球菌属的种，以及具有相似 rRNA 序列但不属于消化链球菌属的其他微生物，不会被方便地检测出：*Micromonas micros*, *Helcococcus kunzii*, *Helcococcus ovis*。

25

带有 SEQ ID NO.27 和 28 中所示序列的寡核苷酸尤其优选。这些寡核苷酸可检测出 *Peptoniphilus* 属的至少如下种：*Peptoniphilus assaccharolyticus*, *P. hareii*, *P. indolicus*(更特别为菌株 ATCC29427 和紧密相关菌株，即具有极相似 rRNA 的菌株)和 *P.lacrimalis*。

30

具有相似 rRNA 的如下种不被这些寡核苷酸检测出：嗜糖假单胞

杆菌, *Variovorax paradoxus*, *Finegoldia magna*, 表皮葡萄球菌, 痤疮丙酸杆菌, *Micromonas micros*, *Gallicola baranese*, *Atopobium parvulum*, 殊异韦荣氏菌, 恶臭假单胞菌, 以及 *Anaerococcus* 和棒状杆菌属的种。

5

带有 SEQ ID NO.28 中所示序列的寡核苷酸可特别地检测出 *Peptoniphilus lacrimalis* 种的微生物。

10

带有 SEQ ID NO.29 中所示序列的寡核苷酸也尤其优选。这种寡核苷酸可从属名为“消化链球菌”的已知微生物中, 检测出至少 *Finegoldia magna* 种及 rRNA 序列与该种非常相似的其他微生物, 而如下微生物则不能被同时检测出: *Anaerococcus hydrogenalis*, 厌氧消化链球菌, *Peptoniphilus lacrimalis*, 表皮葡萄球菌, *Halocella cellulolytica*, 痤疮丙酸杆菌, *Micromonas micros*, 殊异韦荣氏菌, 恶臭假单胞菌, 以及 *Anaerococcus*, 棒状杆菌属和 *Peptoniphilus* 属的其他种。

15

20

尤其是, 本发明的提供了用于棒状杆菌属微生物特异性检测的寡核苷酸, 所述寡核苷酸与 rRNA 互补, 并选自带有 SEQ ID NO.07 至 12 中所示序列的寡核苷酸。

25

30

所提及的寡核苷酸各自可检测棒状杆菌属的至少一种如下种: 谷氨酸棒状杆菌, *Corynebacterium lipophiloflavum*, *C. glucuronolyticum*, 麦氏棒状杆菌, 拥挤棒状杆菌, *C. fastidiosum*, *C. segmentosum*, 嗜氨棒状杆菌, 极小棒状杆菌, *C. flavescens*, *C. coyleiae*, 非发酵棒状杆菌, *C. pseudogenitalium*, *C. genitalium*, *C. mucofaciens*, 耳棒状杆菌, *C. mycetoides*, 膀胱炎棒状杆菌, 多毛棒状杆菌, 假结核棒状杆菌, 溃疡棒状杆菌, 白喉棒状杆菌, *C. vitarumen*, 库氏棒状杆菌, *C. genitalium*, *C. argenteratens*, *C. callunae*, 牛棒状杆菌, *C. variabilis*, 无枝菌酸棒状杆菌, *C. tuberculostearicum*, 结膜干燥棒状杆菌, *C.*

matruchotii, 杰氏棒状杆菌, *C. efficiens*, *C. thomsenii*, 黑色棒状杆菌, *C. auriscanis*, *C. mooreparkense*, 干酪棒状杆菌, *C. camporealensis*, *C. sundsvallense*, *C. mastidis*, *C. imitans*, *C. riegelii*, *C. asperum*, *C. freneyi*, 纹带棒状杆菌, *C. coyleiae* 和模仿棒状杆菌。

5

具有相似 rRNA 序列, 但不属于棒状杆菌属的微生物, 不会被这些寡核苷酸方便地检测出: 丙酮丁醇梭杆菌, *Eubacterium moniliforme* 和核粒梭杆菌。属于肌肤微生物群落的如下细菌也不会被检测出: 藤黄微球菌、变异微球菌、*Micrococcus lyae*、醋酸钙不动杆菌和化脓性链球菌。这是一特别优点, 显示出探针的高特异性。

10

带有 SEQ ID NO.10 中所示序列的寡核苷酸特别优选用于纹带棒状杆菌和/或结膜干燥棒状杆菌种的棒状杆菌的检测。

15

另外, 带有 SEQ ID NO.11 中所示序列的寡核苷酸用于杰氏棒状杆菌种的棒状杆菌检测。

20

带有 SEQ ID NO.07, 08, 10 和 11 中所示序列的寡核苷酸的组合尤其优选。这种组合可检测棒状杆菌属的至少如下种: 谷氨酸棒状杆菌, *Corynebacterium lipophiloflavum*, *C. glucuronolyticum*, 麦氏棒状杆菌, 拥挤棒状杆菌, *C. fastidiosum*, *C. segmentosum*, 嗜氨棒状杆菌, 极小棒状杆菌, *C. flavescens*, *C. coyleiae*, 非发酵棒状杆菌, *C. pseudogenitalium*, *C. "genitalium"*, *C. mucofaciens*, 耳棒状杆菌, *C. mycetoides*, 膀胱炎棒状杆菌, 多毛棒状杆菌, 假结核棒状杆菌, 溃疡棒状杆菌, 白喉棒状杆菌 (*C. diphtheriae*), *C. camporealensis*, *C. vitarumen*, 库氏棒状杆菌, *C. argentoratens*, *C. callunae*, 牛棒状杆菌, 牛肾盂炎棒状杆菌, *C. riegelii*, 变异棒状杆菌, 无枝菌酸棒状杆菌, *C. "tuberculostearicum"*, 结膜干燥棒状杆菌, *C. matruchotii*, 杰氏棒状杆菌。

25

30

在一个特定实施方案中，本发明提供了用于棒状杆菌属微生物特异性检测的寡核苷酸，所述寡核苷酸与 rRNA 互补，并选自带有 SEQ ID NO.19 至 26 中所示序列的寡核苷酸。

5 所提及的每一种寡核苷酸可检测棒状杆菌属的至少如下种之一：
C. coyleiae，非发酵棒状杆菌，C. “genitalium”，C. mucifaciens，无枝
菌酸棒状杆菌，C. “tuberculostearicum”和 C. riegelii。这些寡核苷酸适
合用于棒状杆菌属的一个或多个非常紧密相关种群的特异性检测。

10 具有相似 rRNA 序列的如下微生物不会被这些寡核苷酸方便地检
测出：丙酮丁醇梭杆菌，Eubacterium yurii 和核粒梭杆菌。属于肌肤
微生物群落的如下细菌也不会被检测出：藤黄微球菌、变异微球菌、
Micrococcus lyae、醋酸钙不动杆菌和化脓性链球菌。这是一特别优点，
并且显示出探针的高特异性。

15 在尤其优选的实施方案中，带有 SEQ ID NO.19 中所示序列的寡
核苷酸用于检测如下微生物：源于棒状杆菌属、由
C. “tuberculostearicum”（更特别为 ATCC 35692）形成的微生物群，或
者名为 CDC G5840（存取号 X80498）菌株的周围群，以及带有非常
20 相似的 rRNA 的微生物，即与所提及微生物极紧密相关的微生物，或
者其 rRNA 同一性程度很高，和/或在与所提及寡核苷酸杂交的区域，
与所提及微生物的 rRNA 完全或几乎完全对应（即带有一个或多个偏
差，优选为一至三个核苷酸偏差）的微生物。

25 这种探针可方便检测出 C. “tuberculostearicum”和带有极相似 rRNA
的棒状杆菌属种，而不会检测出如下棒状杆菌属的更不相关种：极小
棒状杆菌，白喉棒状杆菌，纹带棒状杆菌，结膜干燥棒状杆菌，C.
“fastidiosum”，C. camporealensis，拥挤棒状杆菌以及
C. “pseudogenitalium”，核非发酵棒状杆菌，杰氏棒状杆菌，C. durum，
30 C. mucifaciens，牛肾盂炎棒状杆菌，C. riegelii，谷氨酸棒状杆菌，C.

lipophiloflavum, *C. glucuronolyticum*, 嗜氨棒状杆菌, *C. coyleiae*, 假结核棒状杆菌, 库氏棒状杆菌, *C. callunae* 和解脲棒状杆菌。

5 带有 SEQ ID NO.20 中所示序列的探针尤其优选用于无枝菌酸棒状杆菌和紧密相关种的特异性检测。这种探针可方便地检测无枝菌酸棒状杆菌和带有非常相似的 rRNA, 且在与所提及寡核苷酸杂交的 rRNA 部分仅有少数错配, 优选为没有错配的棒状杆菌属的种, 而不会检测出如下棒状杆菌属的更不相关种: *C. "asperum"*, 杰氏棒状杆菌, 牛棒状杆菌, *C. freneyi*, 非发酵棒状杆菌, *C. durum*, *C. matruchotii*,
10 *C. mucifaciens*, 牛肾盂炎棒状杆菌, 谷氨酸棒状杆菌和结膜干燥棒状杆菌, 以及 *C. lipophiloflavum*, *C. glucuronolyticum*, 极小棒状杆菌, 嗜氨棒状杆菌, *C. camporealensis*, *C. coyleiae*, 假结核棒状杆菌, *C. riegelii*, 库氏棒状杆菌, *C. callunae* 和解脲棒杆菌。

15 带有 SEQ ID NO.21 中所示序列的探针尤其优选地用于某些种的微生物的检测, 更特别地用于棒状杆菌属的检测, 所述棒状杆菌属与 SEQ ID NO.31 中所示 16S rRNA 的部分序列的核苷酸对应至少为 60%, 优选为至少 70%, 更优选为至少 80%, 最优选为至少 90%, 例如至少 95%。

20 这种探针可方便地检测出棒状杆菌属的上述种, 而不会检测出如下棒状杆菌属的更不相关种: *C. "genitalium"*, *C. mucifaciens*, *C. coyleiae*, *C. glucuronolyticum*, 非发酵棒状杆菌, *C. pseudogenitalium*, *C. lipophiloflavum*, 以及无枝菌酸棒状杆菌, 杰氏棒状杆菌, *C. durum*,
25 牛肾盂炎棒状杆菌, 纹带棒状杆菌, 谷氨酸棒状杆菌, 拥挤棒状杆菌, 结膜干燥棒状杆菌, 极小棒状杆菌, *C. camporealensis*, *C. coyleiae*, 假结核棒状杆菌, 库氏棒状杆菌, *C. callunae* 和解脲棒状杆菌。

30 带有 SEQ ID NO.23 中所示序列的探针特别优选地用于非发酵棒状杆菌种的棒状杆菌检测。

这种探针可方便地检测出非发酵棒状杆菌，以及带有非常相似的 rRNA 的棒状杆菌属的种，而不会检测出如下棒状杆菌属的更不相关种：C. “genitalium”，C. mucifaciens，嗜氨棒状杆菌，C. coyleiae，C. glucuronolyticum，C.riegelii，C. thomssenii，C. pseudogenitalium 和 C. lipophiloflavum，以及无枝菌酸棒状杆菌，杰氏棒状杆菌，C.durum，牛肾盂炎棒状杆菌，纹带棒状杆菌，谷氨酸棒状杆菌，拥挤棒状杆菌，结膜干燥棒状杆菌，极小棒状杆菌，C. camporealensis，C. coyleiae，假结核棒状杆菌，库氏棒状杆菌，C. callunae 和解脲棒状杆菌。

带有 SEQ ID NO.25 中所示序列的探针尤其优选地用于非发酵棒状杆菌，C. mucifaciens，C. coyleiae 和/或 “C. genitalium” 种的棒状杆菌检测。

这种探针可方便地检测出非发酵棒状杆菌，C. mucifaciens，C. coyleiae 和/或 “C. genitalium” 和具有非常相似的 rRNA 的棒状杆菌属的种，而不会检测出如下棒状杆菌属的更不相关种：结膜干燥棒状杆菌，杰氏棒状杆菌，解脲棒状杆菌，无枝菌酸棒状杆菌，谷氨酸棒状杆菌，纹带棒状杆菌，拥挤棒状杆菌，牛肾盂炎棒状杆菌，嗜氨棒状杆菌，库氏棒状杆菌，以及 C. glucuronolyticum，C. camporealensis，假结核棒状杆菌，C.durum，极小棒状杆菌，C. lipophiloflavum，C. callunae 和 C.thomssenii。

另外，这种寡核苷酸也不会检测出虽然不属于棒状杆菌属，但具有非常相似的 rRNA 的如下微生物：Nanomurea fastidiosa，棘孢小单孢菌，Abiotropha elegans 和化脓隐秘杆菌。

带有 SEQ ID NO.26 中所示序列的探针尤其优选用于 C. riegelli 的特异性检测。

在另一特定实施方案中，本发明还提供了用于韦荣氏球菌属微生物特异性检测的寡核苷酸，所述探针与 rRNA 互补，并选自带有 SEQ ID NO.13 至 15 中所示序列的寡核苷酸。

5 每一种所提及的寡核苷酸可检测韦荣氏球菌属的至少一个如下种：殊异韦荣菌，小韦荣菌和非典型韦荣菌。由于韦荣氏球菌属在系统进化树中被大量隔离，非靶标微生物不会方便地被检测出。

10 带有 SEQ ID NO.13 至 14 中所示序列的寡核苷酸的组合。这种组合可检测韦荣氏球菌属的至少如下种：殊异韦荣菌，小韦荣菌和非典型韦荣菌。

在尤其优选的实施方案中，本发明还提供了用于痤疮丙酸杆菌种微生物的特异性检测的寡核苷酸，所述探针与 rRNA 互补，并选自带有 SEQ ID NO.16 至 17 中所示序列的寡核苷酸。

每一种所提及的寡核苷酸可特异性地检测痤疮丙酸杆菌种。

特别优选的是带有 SEQ ID NO.16 中所示序列的寡核苷酸。

20 具有非常相似的 rRNA 序列，但不属于痤疮丙酸杆菌种的下列微生物，不会被方便地检测出：P. propionicus，颗粒丙酸杆菌，亲合丙酸杆菌，孚罗伊登氏丙酸杆菌，滕里氏丙酸杆菌，嗜淋巴丙酸杆菌，极小丙酸杆菌，Sacchromonospora viridis，Nocardiodes spec.，
25 Propioniferax innocua，Gordonia sputi 和隐秘杆菌。

在另一特定实施方案中，本发明还提供了用于鳞斑霉菌属微生物的特异性检测的寡核苷酸，所述寡核苷酸与 rRNA 互补，并带有 SEQ ID NO.18 中所示序列。

30

所提及的寡核苷酸可检测鳞斑霉菌属的至少一个如下种：*M. sloffiae*，厚皮鳞斑酶菌和秕糠状鳞斑酶菌。

5 带有相似的 rRNA，但不属于鳞斑霉菌属的微生物，不会被方便地检测出：白色念珠菌和 *Candida krucei*。

10 带有 SEQ ID NO.30 中所示序列的寡核苷酸特别优选地用于 *Sporomusa* 类的某些微生物的检测，优选为形成 *Sporomusa* 类亚群的 *Phascolarctobacterium* 和氨基酸球菌属微生物，以及与所提及微生物的 rRNA 非常相似的微生物。

15 所提及的寡核苷酸至少可检测 *Acidaminococcus fermentans*，*Phascolarctobacterium faecium* 种，以及带有极相似 rRNA 的紧密相关的微生物，但下列微生物除外：*Veillonella spec.*，*Halobacillus halophilus*，*Sporomusa paucivorans*，*Macrococcus caseolyticus*，*Anaeromusa acidaminophila*，*Halocella cellulolytica*，厌氧消化链球菌，*Succiniclasticum ruminis* 和 *Succinispira mobilis*。

20 在一个特定优选实施方案中，未标记的寡核苷酸可与标记的寡核苷酸一起使用。培育同时含未标记和标记的寡核苷酸的样品，优选地以增加探针的特异性。例如，在选定条件下，通过采用用于与待检测种紧密相关的不被检测的微生物种的寡核苷酸，所述寡核苷酸与不被检测的微生物的 rRNA 的靶序列杂交好于标记探针，从而可区分出紧密相关的微生物种。由于未标记探针与不被检测的微生物的 rRNA 杂
25 交好于标记探针与不被检测的微生物的 rRNA 的结合，因而，通过采用未标记的寡核苷酸（竞争体）可防止假阳性结果。由此使某些微生物种或微生物群的特异性检测成为可能，首要的甚至在带有极相似 rRNA 序列的紧密相关种存在情况下。

30 例如，根据本发明，采用 SEQ ID NO.22 的寡核苷酸连同 SEQ ID

NO.21 的寡核苷酸是合适的。在此情况下，优选地标记 SEQ ID NO.21 中所示寡核苷酸，而 SEQ ID NO.22 中所示寡核苷酸则不标记。由此可毫不费劲地检测出 16S rRNA 序列含有 SEQ ID NO.31 中所示序列的微生物种，而不会同时检测出非发酵棒状杆菌（比较实施例中的分析结果）。

根据本发明，采用 SEQ ID NO.23 和 24 结合的寡核苷酸也是较合适的。鉴于带有 SEQ ID NO.23 的寡核苷酸进行标记作为检测非发酵棒状杆菌的探针，SEQ ID NO.24 的寡核苷酸则掩盖其中 16S rRNA 序列包括 SEQ ID NO.31 中所示序列的微生物种的极相似的靶序列。

另外，SEQ ID NO.26 的寡核苷酸可与根据 SEQ ID NO.25 的寡核苷酸一起用作为未标记的竞争体。这样，系统进化树中彼此紧邻的棒状杆菌属的如下种可被检测出来：非发酵棒状杆菌，*C.genitalium*, *C.mucifaciens*, *C.coyleiae*，带有极类似 rRNA 序列的 *C.riegelii* 棒状杆菌种则不能被同时检测出。

在本发明特别优选的实施方案中，SEQ ID NO.19 至 30 的一种或者多种组合寡核苷酸含有一种或多种其他寡核苷酸，以用于检测葡萄球菌属，韦荣氏球菌属，鳞斑霉菌属和/或丙酸杆菌属的种。一份样品中可同时或并行地方便检测出各种肌肤相关微生物，更尤其是在单个过程中。另外，此处公开的寡核苷酸，尤其是根据 SEQ ID NO.1 至 18 的寡核苷酸尤其适合。

序列协议（sequence protocol）的序列如以下表 2 中所示。

表 2

SEQ ID NO.	序列 5' → 3'	特异性
01	CAC ATC AGC GTC AGT TAC	葡萄球菌 I
02	CAC ATC AGC GTC AGT TGC	葡萄球菌 II
03	AAG CTT AAG GGT TGC GCT	葡萄球菌 III
04	GCC TTC TAA ATC ACG CGG	消化链球菌 I
05	AGC CCA AGT CAT AAA GGG	消化链球菌 II
06	TAC ACT CTC TCA AGC CGG	消化链球菌 III
07	AGC ACT CAA GTT ATG CCC	棒状杆菌 I
08	AGT ACT CAA GTT ATG CCC	棒状杆菌 II
09	AGC ACT CAA GTA ATG CCC	棒状杆菌 III
10	AGC ACT CAA GTC A-G CCC	棒状杆菌 IV
11	AGC ACT CTA GTT ATG CCC	棒状杆菌 V
12	GGC CGG CTT TCA GCG ATT	棒状杆菌 VI
13	GCT TCC ATC GCT CTT CGT	韦荣氏球菌 I
14	GTT CTG TCC ATC AAT GTC	韦荣氏球菌 II
15	TTC CGT CTA TTA ACT CCC	韦荣氏球菌 III
16	TCA CGC TTC GTC ACA GGC	痤疮丙酸菌
17	CAG GCT CGC CAC TCT CTG	痤疮丙酸菌
18	TAC GGC GAT TCC AAA AAC C	鳞斑霉菌
19	CAC ACT AAA AAT GGC TCC	棒状杆菌 VII
20	TCC ACA CCA TGG TCC TAT	棒状杆菌 VIII
21	CCA TCC AAA ATG CGG TCC	棒状杆菌 IX
22	CCA TCC AAA ATG TGG TCC	棒状杆菌 X
23	CAC CAT CCA AAA TGT GGT C	棒状杆菌 XI
24	CAC CAT CCA AAA TGC GGT C	棒状杆菌 XII
25	CTG CAG TCC CGC AGT TA	棒状杆菌 XIII
26	CTG CAG TCC CAC AGT TA	棒状杆菌 XIV
27	GCA TTT CCG CCT GCG AAC	消化链球菌 IV
28	GCA TTG CCG CCT GCG AAC	消化链球菌 V
29	CAC TAT ATA GCT T/GCC CTC	消化链球菌 VI
30	CAT CTC AGC GTC AGA CAC	Sporomusa-Gruppe

根据本发明的方法包含如下步骤：

- a)采集肌肤样品，
b)对存在于所采集肌肤样品中的微生物进行固定，
c)与至少一种寡核苷酸培育固定的微生物，以诱导杂交，
d)去除未杂交的寡核苷酸，以及
5 e)检测与寡核苷酸杂交的微生物，并任选地进行定量。

在本发明的上下文中，微生物的“固定”应理解为对微生物的处理，使其细胞壁可被寡核苷酸穿透。通常采用乙醇用于固定。如果这些措施后细胞壁不能被寡核苷酸穿透，则专业人员所熟知的其他措施
10 可达到同样的结果。这些措施包括，例如甲醇，醇类混合物，低百分比的低聚甲醛溶液或稀释的甲醛溶液等等。

根据本发明，特别地采用荧光标记的寡核苷酸对固定细胞进行培育，以用于“杂交”。这些标记的寡核苷酸能够将其自身结合至与寡
15 核苷酸对应的靶序列，任选地是在穿透细胞壁之后。结合应理解为互补核酸片段之间的氢桥的形成。

在根据本发明的方法中，以合适的杂交溶液使用根据本发明的寡核苷酸。这种溶液的合适组成是专业人员所熟知的。对应的溶液含有，
20 例如浓度为 0%至 80%的甲酰胺，优选浓度为 0%至 45%，特别优选为 20%至 40%，以及例如盐浓度（优选的盐是 NaCl）为 0.1mol/l 至 1.5mol/l，优选浓度为 0.5mol/l 至 1.0mol/l，更优选为 0.9mol/l。另外，通常存在浓度为 0.001%至 2%的去垢剂（通常为 SDS），优选浓度为 0.005%至 0.1%，更特别为 0.01%。存在合适的缓冲物质（例如 Tris-HCl，
25 柠檬酸钠，HEPES，PIPES 等）以对溶液起缓冲作用，典型的浓度为 0.01mol/l 至 0.1mol/l，优选浓度为 0.01mol/l 至 0.05mol/l，更特别浓度为 0.02mol/l。杂交溶液的 pH 通常在 6.0 至 9.0 之间，优选为 7.0 至 8.0 之间，更特别为约 8.0。

30 其他可使用的添加剂包括，例如成片段的鲑精 DNA，或用于预

防杂交反应中非特异性结合的阻断剂，或用于加快杂交反应的均一聚乙二醇，聚乙烯吡咯烷酮，或葡聚糖硫酸酯。另外，也可加入物质，使对样品中存在的所有活和/或...微生物的 DNA 着色(例如 DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸化物)。对应的添加剂都是专业人员所熟知的，并可以已知和典型的浓度加入。

杂交溶液中寡核苷酸的浓度的确定方法为通过其标记的性质及通过靶结构的数量进行。为了提供快速和有效的杂交，寡核苷酸数量应超出靶结构数量几个数量级。然而，重要的是要记住过量的荧光标记寡核苷酸会导致背景荧光增加。相应地，寡核苷酸的浓度范围应该为 0.5 至 500ng/ml。用于根据本发明方法的优选浓度是每 μ l 杂交溶液使用 1 至 10ng 的每种寡核苷酸。所使用杂交溶液的体积应是 8 μ l 至 100ml 之间；在本发明的优选实施方案中是 10 μ l 至 1000 μ l 之间，在特别优选实施方案中是 20 μ l 至 40 μ l 之间。

杂交的持续时间通常是 10 分钟至 12 小时之间，优选为约 1.5 小时。杂交温度优选地为 44°C 至 48°C 之间，更特别为 46°C。可依赖于寡核苷酸，尤其是其长度及与待检测细胞内靶序列的互补程度，而对杂交温度参数以及杂交溶液中盐和去垢剂浓度进行优化。在这点上，专业人员对关联性的计算是熟悉的。

杂交完成后，应除去或洗掉未杂交和多余的寡核苷酸，通常采用常规洗涤溶液来完成。如果需要，这种洗涤溶液可含有 0.001-0.1% 的去垢剂，例如 SDS，优选浓度为 0.01%，以及浓度为 0.001-0.1mol/l 的 Tris-HCl 或其他合适的缓冲物质，优选为 0.02mol/l，pH 范围为 6.0-9.0，优选为约 8.0。可存在去垢剂，但不是绝对必需。另外，洗涤溶液通常含有浓度为根据所需严格性，0.003mol/l 至 0.9mol/l 的 NaCl，优选浓度为 0.01mol/l 至 0.9mol/l。NaCl 浓度为 0.07mol/l 为特别优选。NaCl 浓度为 0.05mol/l 至 0.22mol/l 特别适合于杂交，杂交中可采用根据 SEQ ID NO.19 至 30 的寡核苷酸实施特异性检测。另外，洗涤溶液可含有

优选浓度为 0.005mol/l 的 EDTA。洗涤溶液还可含有专业人员熟知的合适量的防腐剂。

5 未结合的寡核苷酸通常在 44℃至 52℃之间的温度下洗去，优选温度为 44℃至 50℃，更特别地为 44℃至 48℃的温度，洗涤时间为 10 至 40 分钟，优选时间为 15 分钟。

依赖于所使用寡核苷酸标记的性质，可采用光学显微镜、落谢荧光显微镜、化学发光检测仪、荧光计的实施最终评价。

10

本发明方法的优点是多种的且多样化的。

15

特别的优点是这种检测方法的速度。常规的培养需要高达 7 天以用于检测，而应用根据本发明的方法后，可在 3 小时内获得结果。这就首先提供了所应用处理的效果和不期望效果的随附诊断对照。这点上的另一有利之处是，根据本发明的方法使所有提及的微生物都能被同时检测，这是另一时间优势，因为从取样到评价的所有步骤只需实施一次。

20

另一优点是微生物检测可以定量。

另一优点是常规检测方法可能检测不出的肌肤微生物群落的微生物，而今在此方法中采用本发明寡核苷酸可第一次检测出。

25

根据寡核苷酸或者所采用寡核苷酸的特异性，可检测微生物的各种群。一方面，大的微生物群以及另一方面，相对较小的紧密相关群以及甚至单个种，可与其他甚至是紧密相关的微生物种一道被特异性检测出。

30

另外，在阳性信号情况下，通过本发明的方法，可引入系统进化

树中的未知微生物种，或者通过与特异性探针的杂交，在生物化学检测的基础上确认所采用的分组。

5 另一优点是所述寡核苷酸的高特异性。因此，微生物的某些属或者群可被特异性检测出而属的单个种可以高特异性的检测得出。

在本发明所述方法的优选实施方案中，在所述方法步骤 a)中从下列来源采集样品：

- 10 vii) 皮肤表面，
 viii) 食品，
 ix) 环境，尤其是水，土壤或者空气，
 x) 从废水或者从生物膜，
 xi) 从临床检验材料或者
 xii) 从药品或者化妆品。

15

在本发明方法的优选实施方案中，样品从皮肤表面通过从待试验的区域在去垢剂的帮助下去除皮肤菌落的微生物。

20 另一主要优点是，肌肤微生物群落的这些药物和化妆品相关微生物第一次可被同时检测出。由此，通过采用用于寡核苷酸的不同标记物，可并行检测出所有、一些或个别微生物群或种，并可清晰地相互区分开来。另外，这些微生物群或种的种群比例（population ratios）以及其之间的相互作用由此可首次分析出来。这就第一次开启了以医药和/或化妆品方式明确诊断和选择性治疗相关肌肤问题的可能性。
25 现在第一次可以确定药物治疗或化妆品治疗对于肌肤总微生物群落的效果。由此可尽早识别出某一治疗的可能效果和有害效果，并且在进一步治疗中扩大或受到抑制。

30 本发明的另一优点是，可对被检测的微生物进行定量。由此可首次获得上述肌肤微生物群落的微生物的绝对与相对量比值的知识。这

就能给出药物或化妆品治疗的结果，以及在治疗前、治疗过程中及治疗后监控全部效果。关于这一点的另一优点是，根据本发明的方法只能检测活微生物。

5 为了从志愿者采集肌肤样品，将肌肤与去垢剂溶液接触，所述去垢剂用以促进微生物从肌肤表面的去除。优选采用的生理安全的去垢剂为，例如浓度为 ca. 0.01-1 重量%的 Tween 或 Triton。pH 为 5 至 10，尤其为 7 至 9 的范围，例如 8，证明是较有利的。

10 为了达到微生物更好的移除，将肌肤表面用刮擦仪器进行摩擦。合适的刮擦仪器有直径可变的各种材料制成的小棒，所述直径例如从 0.05 至 1.5cm，所述材料例如为玻璃、金属或塑料。同样材料的圆形刮刀也是较合适的。优选采用直径介于 0.4 至 0.8cm 之间的玻璃小棒或塑料刮刀。也可优选采用玻璃吸液管的管嘴，例如 5ml 的玻璃吸液
15 管。已经证明它对于擦掉肌肤上的相对粗糙表面特别适合，从而促进微生物的去除。

 带有粗糙表面的塑料刮刀，例如玻璃纤维加固的聚酰胺（Merck, Art.No.231J2412，双刮刀，长度 180mm）制成的取样刮刀是特别合适的。用药签进行摩擦，并通过用相对粘性介质轻敷进行取样，或者甚至用粘性薄膜（例如可市售的家用胶带）进行肌肤取样，也适合于本
20 发明目的。以这些方法可获得微生物，例如通过用合适的缓冲溶液洗涤。甚至可直接在胶带上实施其他方法。

25 本发明的方法也优选用于食品控制。食品样品尤其是从牛奶或者乳制品（酸奶，奶酪，乳清，黄油，酪乳），饮用水，饮料（碳酸饮料，啤酒，果汁），糖果或者肉类从采集的。

 此外，例如环境样品也可被用于利用本发明的方法检验。这些样
30 品也可以从空气，水或者从土壤中采集。

5 本发明的方法也可用于临床样品的分析。其适合于检验组织样品，例如生物活体解剖材料，来自肺，肿瘤或者感染组织，来自分泌物，诸如汗液，唾液，精液和来自鼻，尿道或者阴道的排泄物以及尿液和大便样品。

本发明方法的另一应用是废水分析，例如活性淤泥，降解淤泥或者厌氧淤泥。此外，适合于分析工厂中的生物膜以及天然形成的生物膜或者废水处理中形成的生物膜。

10

本发明的方法也可用于分析药品个化妆品的分析，例如油膏，乳膏，酊剂，浆糊等，例如被微生物污染。

15

在本发明的另一优选实施方案中，通过如下试剂进行固定：i) 优选自乙醇、丙酮和乙醇/乙酸混合物的变性剂，ii) 优选自甲醛、低聚甲醛和戊二醛的交联剂，或 iii) 加热固定。

在一个特定实施方案中，微生物可于固定后固定于载体上。

20

在特别优选的实施方案中，微生物的固定细胞在根据本发明方法的步骤 c) 之间可进行渗透化。

25

在本发明的上下文中，“渗透”应理解为细胞的酶处理。这种处理使得真菌和革兰氏阳性细菌对寡核苷酸可渗透。适合用于这种处理的酶，酶合适浓度及合适的溶剂是专业人员所熟知的。本发明的方法显然也适合于革兰氏阴性细菌的分析；这样可对用于渗透化的酶处理进行相应调整，或者甚至可以完全略去。

30

杂交之前对细胞的渗透化具有的优点是，虽然寡核苷酸可穿透进入细胞，但核糖体以及 rRNA 不能从细胞逃逸。这种全细胞杂交技术

的主要优点是，细菌的形态仍保持完整，并且这些完整的细菌可被原位检测出，即处于其天然环境中。相应地，不仅可对细菌进行定量，各个细菌群之间可能的关联也可被检测出。

5 在最优选实施方案中，可通过采用细胞壁溶解酶进行部分降解，从而实施渗透化，所述细胞壁溶解酶优选自溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K、链霉蛋白酶和变溶菌素。

10 另外，在特别优选实施方案中，本发明提供了适合作为阳性对照的寡核苷酸。这种寡核苷酸的特征在于，它可检测分析样品中存在的许多，任选的所有细菌或真核生物。例如，Amann 等（1990）所描述的寡核苷酸 EUB338（细菌）或者寡核苷酸 EUK（真核生物）适合用于此目的。诸如这样的阳性对照可用于监视所应用的方法是否被准确的实施。然而最重要的是，它能够在作为整体的待确定的细菌群落中，
15 特异性地检测出一部分微生物。

 本发明还提供了实施本发明方法的试剂盒。所述试剂盒含有作为重要组分（尤其是用于原位杂交过程）的特定杂交溶液，所述杂交溶液含有待检测微生物的特异性寡核苷酸。另外，试剂盒可含有不带寡
20 核苷酸的相应杂交溶液，以及相应的洗液或相应洗液的浓缩物。另外，试剂盒可任选地含有酶溶液，固定液及任选的包埋溶液。可任选地提供用于同时实施阳性对照和阴性对照（例如不带有或带有非杂交的寡核苷酸）的杂交溶液。

25 在特别的实施方案中，所述试剂盒用于检测皮肤菌群的微生物。由此，该试剂盒在寻找活性物质，分析肌肤微生物群落及含活性物质的化妆品的活力测试中是较有利的。采用本发明的试剂盒，可有效实施人体肌肤和动物肌肤的直接分析或从中采集的样品进行分析，甚至
30 能抵抗高背景的其他微生物。

含有几种寡核苷酸或者组合寡核苷酸的试剂盒尤其适合。在尤其优选的实施方案中，能够检测较大群待测微生物的寡核苷酸或者组合寡核苷酸被用于含有能够只检测属于所述群的一种或者几种的一种或者多种寡核苷酸的试剂盒中。例如，可以首先采用一种或多种探针鉴定含有棒状杆菌属微生物的样品，然后研究棒状杆菌属内的单个微生物种或群特异性的阳性样品。优选采用的，尤其是组合使用的，用于检测棒状杆菌属多个不同种，优选用于检测棒状杆菌属的肌肤相关种的优选寡核苷酸，是带有 SEQ ID NO.7 至 12 中所示序列，更优选为带有 SEQ ID NO.7, 8, 10 和 11 中序列的寡核苷酸，尤其是如果同时采用 SEQ ID NO. 7, 8, 10 和 11 的寡核苷酸的话。为达此目的，依赖于目标棒状杆菌属的微生物种，可于试剂盒中加入一种或多种所提及的 SEQ ID NO.19 至 26 的寡核苷酸。

如下实施例旨在例述本发明，而不是以任何方式限制本发明范围。

实施例

肌肤微生物群落的微生物检测

取样

通过去垢剂洗涤方法实施取样 (P.Williamson , A.M.Kligman(1965), J.Invest.Derm., Vol. 45, No.6).

步骤:

1. 将两端开口的塑料圆桶用完好末端压至待检查的肌肤上，并装入 1.5ml 的去垢剂溶液 (生理 Tween 缓冲液, pH8.0, 含 0.523g/l 的 KH_2PO_4 , 16.73g/l 的 K_2HPO_4 , 8.50g/l 的 NaCl, 10.00g/l 的 Tween80 和 1.00g/l 的胰蛋白胍)。

2. 采用一种上述的刮擦仪器，在 6×水平和 6×垂直光压下对待处理的表面进行摩擦。

3. 抽吸移除液体后，重复上述步骤。

将两份液体合并。两份合并液体的样品的一部分用于随后的寡核苷酸检测；另一部分通过对存在于样品中的微生物进行培养，用于作为对照的并行检测。

5

应采用无菌水（例如 millipore 水）来制备去垢剂溶液。

固定

10 然后，将一个体积的无水乙醇加入所采集的样品，随后进行离心（室温，8,000r.p.m., 5 分钟）。弃去上清液，用一个体积的 1×PBS 溶液洗涤沉积颗粒。最后，将沉积颗粒重悬浮于 1/10 体积的固定液（50% 乙醇）种，并在-20℃下储存待用。

15 将一个等分的细胞悬浮液施用于显微镜玻片上并干燥（46℃，30 分钟，或直至完全干燥）。然后通过应用另一固定液（无水乙醇）将细胞完全脱水并干燥（46℃，3 分钟，或直至完全干燥）。

渗透化

20 然后，施用合适体积的合适酶溶液，并培育样品（室温，15 分钟）。任选地以其他的合适酶溶液重复该步骤。

用蒸馏水除去渗透化溶液，再次将样品完全干燥（46℃下培育直至完全干燥）。然后通过应用固定液（无水乙醇）对细胞进行再次的完全脱水，并干燥（46℃，3 分钟，或直至完全干燥）。

25

杂交

然后，将含有对待检测微生物具有特异性的上述寡核苷酸的杂交溶液施用于固定的，完全被消化和脱水的细胞。然后，将玻片置于以杂交溶液湿润的腔室内（杂交溶液不含核苷酸，46℃下持续 90 分钟）。

30

洗涤

然后，将显微镜玻片置于充满洗涤溶液的腔室内，并进行培育（46℃，15 分钟）。

- 5 然后，将玻片短暂浸入充满蒸馏水的腔室内，并在侧面进行风干（46℃，30 分钟，或直至完全干燥）。

检测

- 10 然后，将样品支持物包埋入合适的包埋介质中。然后采用荧光显微镜分析样品。

分析结果

- 1.采用上述取样方法，从混合型肌肤（通过化妆师来分类，并通过皮脂测定仪测量来确定）的女性志愿者前额采集微生物样品。

- 15 通过计算荧光信号并将结果与总细胞计数对比，确定出极高百分比的丙酸菌（>90%）。发现低百分比的葡萄球菌（<10%）。未发现棒状杆菌。

- 20 2.通过上述取样方法，从另一女性志愿者肌肤上采集微生物样品。

- 25 从样品的一部分分离到某一微生物的 16S rRNA。随后的序列测定表明，虽然该微生物可归为棒状杆菌属，但该序列是一个新序列。这一序列如序列表 SEQ ID NO.31 所示，在这一序列的基础上开发出能检测出这一微生物的相应探针（根据 SEQ ID NO.21）。

- 30 另一部分样品与前述的细菌特异性探针 EUB 及探针混合物（SEQ ID NO.07 至 11）杂交，用于检测肌肤相关的棒状杆菌。

通过计算荧光信号并将结果与总细胞计数对比，确定出高百分比的棒状杆菌（ca.73%），所述总细胞计数由细菌特异性探针来确定。

- 5 这一样品的低百分比（ca.5%）的棒状杆菌与根据 SEQ ID NO.21 的标记寡核苷酸杂交，这是通过计算荧光信号并将结果与前面检测的棒状杆菌计数对比确定的，根据 SEQ ID NO.22 的未标记寡核苷酸被同时用作为竞争体。

<110> 汉高两合股份公司 (Henkel KGaA)

<120> 检测微生物的寡核苷酸 (Oligonukleotide zum Nachweis von Mikroorganismen)

<130> SCT045178-47

<150> DE 102 32 776.9; DE 103 07 732.4

<151> 2002-07-18; 2003-02-14

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 1

cacatcagcg tcagttac

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 2

cacatcagcg tcagttgc

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 3

aagcttaagg gttgcgct

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 4

gccttctaaa tcacgcgg

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 5

agcccaagtc ataaaggg

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 6

tacactctct caagccgg

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 7

agcactcaag ttatgccc

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 8

agtactcaag ttatgccc

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 9

agcactcaag taatgccc

18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 10

agcactcaag tcagccc

17

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 11

agcactctag ttatgccc

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 12

ggccggcttt cagcgatt

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 13

gcttccatcg ctcttcgt

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 14

gttctgtcca tcaatgtc

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 15

ttccgtctat taactccc

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 16

tcacgcttcg tcacaggc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 17

caggctcgcc actctctg

18

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 18

tacggcgatt ccaaaaacc

19

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 19

cacactaaaa atggctcc

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 20
tccacaccat ggtcctat 18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 21
ccatccaaaa tgcggtcc 18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 22
ccatccaaaa tgtgtgcc 18

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 23

caccatccaa aatgtggtc

19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 24

caccatccaa aatgcggtc

19

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 25

ctgcagtccc gcagtta

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 26
ctgcagtccc acagtta 17

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 27
gcatttcgc ctgcgaac 18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 28
gcattgccgc ctgcgaac

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> variation

<222> (13)..(13)

<223> "k"=G,T; 寡核苷酸

<400> 29
cactatatag ctkccctc

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 30
catctcagcg tcagacac

18

<210> 31

<211> 1431

<212> RNA

<213> 棒状杆菌

<220>

<221> misc_feature

<222> (1308)..(1308)

<223> "n"=A, C, G, U

<400> 31
 gaugaacgcu ggcggcgugc uuaacacaug caagucgaac ggaaaggccu cugcuugcag 60
 ggguaucuga guggcgaacg ggugaguaac acguggguga ucugcccugc acuucgggau 120
 aagccuggga aacugggucu aauaccggau aggaccgcau uuuggauggu gugguggaaa 180
 guuuuucggu gugggaugag cucgcggccu aucagcuugu ugguggggua auggccuacc 240
 aaggcgucga cggguagccg gccugagagg guguacggcc acauugggac ugagauacgg 300
 cccagacucc uacgggaggc agcagugggg aaauuugcac aaugggcgca agccugaugc 360
 agcgacgccg cgugggggau gacggccuuc ggguuuguaaa cuccuuucgc uagggacgaa 420
 gcguuuuugu gacgguaaccu ggagaagaag caccggcuaa cuacgugcca gcagccgcgg 480
 uaauacguag ggugcgagcg uuguccggaa uuacugggcg uaaagagcuc guaggugguu 540
 ugucgcgucg uuuguguaag cccgcagcuu aacugcggga cugcaggcga uacgggcaua 600
 acuugagugc uguaggggag acuggaauuc cugguguagc gguggaauuc gcagauauca 660
 ggaggaacac cgauggcgaa ggcaggucuc ugggcaguaa cugacgcuga ggagcgaaag 720
 cauggguagc gaacaggauu agauaccug guagucaug ccguaaacgg ugggcgcuaug 780
 gugugagucc cuuccacggg guucgugccg uagcuaacgc auuaagcgcc ccgccugggg 840
 aguacggccg caaggcuaaa acucaagga auugacgggg gcccgcacaa gcggcggagc 900
 auguggauua auucgaugca acgcgaagaa ccuuaccugg gcuugacaua caccagaucg 960
 ccguagagau acgguuuccc uuugugguug guguacaggu ggugcauggu ugucgucagc 1020
 ucgugucgug agauguuggg uuaagucccg caacgagcgc aaccuuguc uuauguugcc 1080

agcacguugu gguggggacu cgugagagac ugccgggguu aacucggagg aaggugggga	1140
ugacgucaaa ucaucauguc ccuuauqucc agggcuucac acaugcuaca auggucggua	1200
caacgcgcuu gcgagccugu gagggugggc uaaucgcugu aaagccgguc guaguucgga	1260
uuggggucug caacucgacc ccaugaaguc ggagucgcua guaaucgnag aucagcaacg	1320
cugcggugaa uacguucccg ggccuuguac acaccgcccg ucacgucaug aaaguuggua	1380
acaccgaag ccaguggccu gucaugggag cugucgaagg ugggaucggc g	1431