

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6117775号
(P6117775)

(45) 発行日 平成29年4月19日 (2017.4.19)

(24) 登録日 平成29年3月31日 (2017.3.31)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
G O 1 N	33/542 (2006.01)	G O 1 N	33/542 A
G O 1 N	33/569 (2006.01)	G O 1 N	33/569 F

請求項の数 10 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2014-511778 (P2014-511778)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年5月25日 (2012.5.25)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2014-519822 (P2014-519822A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成26年8月21日 (2014.8.21)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/002242		T
(87) 国際公開番号	W02012/159768		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成24年11月29日 (2012.11.29)		グレンツアーヘルストラツセ124
審査請求日	平成27年4月28日 (2015.4.28)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	13/116,975		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成23年5月26日 (2011.5.26)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スタフィロコッカス・アウレウスの検出のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 配列番号2及び17~20からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチド；並びに
- 配列番号3、6、25及び26からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチド；
を含むか、或いは、
- 配列番号8、12及び14~16からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチド；並びに
- 配列番号9及び21~24からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチド；
を含む、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) (SA) を検出するためのオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項2】

40個以下のヌクレオチドを有する、検出可能に標識された第三のオリゴヌクレオチドをさらに含み、ここで前記第三のオリゴヌクレオチドは、

前記第一のオリゴヌクレオチドが、配列番号2及び17~20からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、前記第二のオリゴヌクレオチドが、配列番号3、6、25及び26からなる群から選択される配列又はその相補配列を含む場合には、配列番号4、27~29及び32~34からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、或

いは、

前記第一のオリゴヌクレオチドが、配列番号 8、12 及び 14 ~ 16 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、前記第二のオリゴヌクレオチドが、配列番号 9 及び 21 ~ 24 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含む場合には、配列番号 10、30 及び 31 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含む、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 3】

試料中のスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) (SA) を検出する方法であって：

- 前記試料を 1 組の SA プライマーと接触させて、SA が前記試料中に存在する場合には増幅産物を生産することを含む、増幅ステップを行い；

- 前記増幅産物を、1 又は 2 以上の検出可能な SA プローブと接触させることを含む、ハイブリダイズステップを行い；そして

- 前記増幅産物の存在又は不存在を検出すること、ここで、前記増幅産物の存在は前記試料中の SA の存在の指標となり、そして前記増幅産物の不存在は前記試料中の SA の不存在の指標となる、

を含み、

ここで、前記 1 組の SA プライマーは、配列番号 2 及び 17 ~ 20 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチドプライマー、並びに、配列番号 3、6、25 及び 26 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチドプライマーを含み、そして前記 1 又は 2 以上の検出可能な SA プローブは、配列番号 4、27 ~ 29 及び 32 ~ 34 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有するか、或いは、

前記 1 組の SA プライマーは、配列番号 8、12 及び 14 ~ 16 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチドプライマー、並びに、配列番号 9 及び 21 ~ 24 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチドプライマーを含み、そして前記 1 又は 2 以上の検出可能な SA プローブは、配列番号 10、30 及び 31 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、前記方法。

【請求項 4】

- 前記ハイブリダイズステップは、前記増幅産物を、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位で標識されるプローブと接触させることを含む；そして

- 前記検出ステップは、前記プローブのドナー蛍光部位とアクセプター蛍光部位との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在又は不存在を検出することを含む、ここで蛍光の存在又は不存在は、前記試料中の SA の存在又は不存在の指標となる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記増幅において、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素を使用する、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第一及び第二の蛍光部位は互いに、前記プローブ上に 5 個以下のヌクレオチドの範囲内で存在する、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 SA プローブは、二次構造形成を可能とする核酸配列を含み、ここで、前記二次構造形成によって前記第一蛍光部位と第二蛍光部位との間が空間的に近接することとなる、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

スタフィロコッカス・アウレウスの核酸を検出するためのキットであって：

10

20

30

40

50

- 配列番号 2 及び 17 ~ 20 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチド；
- 配列番号 3、6、25 及び 26 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチド；並びに
- 配列番号 4、27 ~ 29 及び 32 ~ 34 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、検出可能に標識された第三のオリゴヌクレオチド

を含むか、或いは、

- 配列番号 8、12 及び 14 ~ 16 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第一のオリゴヌクレオチド；
- 配列番号 9 及び 21 ~ 24 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、第二のオリゴヌクレオチド；並びに
- 配列番号 10、30 及び 31 からなる群から選択される配列又はその相補配列を含み、40 個以下のヌクレオチドを有する、検出可能に標識された第三のオリゴヌクレオチドを含む、前記キット。

10

【請求項 9】

前記検出可能に標識された第三のオリゴヌクレオチドが、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位を含む、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

ヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼ、及び前記核酸ポリメラーゼの機能のために必要なバッファーからなる群から選択される、少なくとも 1 つの追加のコンポーネントをさらに含む、請求項 8 又は 9 に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の技術分野

本発明は微生物の診断分野に関し、より具体的にはスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の検出に関する。

【0002】

スタフィロコッカス・アウレウス (「*S. aureus*」又は「SA」) は、条件的嫌気性グラム陽性菌であり、その天然の存在場所としてヒトの皮膚と鼻があり、傷口にも生息することができる。*S. aureus* 保菌者の大半は感染の兆候を示すことはないが、*S. aureus* は、正常な障壁が破られると侵襲性となって身体に感染を起こす可能性がある。*S. aureus* は、多くの病気を起こす可能性があり、その範囲は、にきび、おでき、膿瘍といった深刻ではない皮膚の感染症から、肺炎、髄膜炎、敗血症といった大病にわたる。皮膚と鼻以外の組織は、障壁 (例えば皮膚や粘膜) が破られると感染する可能性があり、フルンケル (*furuncle*) やカルブンケル (*carbuncle*) になる。*S. aureus* の感染は、感染者との皮膚の接触や、感染者が使用した物との接触を通じて人々に広がる可能性がある。

30

【0003】

S. aureus は、ペニシリン (メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、フルクロキサシリン) を始めとする主要な抗生物質に対する抵抗性を発達させるという注目すべき能力を有するため、「スーパーバグ (*superbug*) 」と呼ばれてきた。メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) はペニシリン抵抗性になった細菌であり、治療が難しいヒトのいくつかの感染症の原因である。MRSA はオキサシリン耐性 *S. aureus* (ORSA) 及び多剤耐性 *S. aureus* としても知られている可能性があるが、*S. aureus* の非メチシリン耐性株は、メチシリン感受性 *S. aureus* (MSSA) と呼ばれることがある。

40

【0004】

S. aureus 感染の診断法として医師による患者の症状の評価があるが、それは通常は決定的ではない。なぜなら感染は別の細菌 (例えば化膿性連鎖球菌) によって起こっているかもしれないからである。血液検査や尿分析のほか、ときには X 線を利用して *S. aureus* 感

50

染を診断することができる。決定的な診断には培養試験が必要となる可能性があるが、多くの時間又は多くの日数が経過した後にしかわからないため、患者の治療が遅れる。

【0005】

病院や街中で感染する疾患におけるMRSAが臨床上重要になっていることが理由で、MRSAを特異的に検出する設計のPCRアッセイがいくつか開発されている。しかし文献には、*S. aureus*が抗生物質に耐性を持つかどうかに関係なく、*S. aureus*を検出することも臨床上大いに必要であることが示されている。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、生体試料中又は非生体試料中の*S. aureus*の存在又は不存在を迅速に検出する方法に関する。本発明は、少なくとも1回の反復ステップの実施を含む検出方法を含んでなり、その反復ステップには、増幅ステップとハイブリダイズステップが含まれる。さらに、本発明は、*S. aureus*を検出するために設計されたプライマー、プローブ、キットに関する。*S. aureus*を検出するための本発明の方法で標的とする遺伝子は、莢膜多糖酵素 (Capsular Polysaccharide Enzyme) (CPE) 遺伝子である。例えばCPE遺伝子標的cap5Nが選択された。なぜならこれは、*S. aureus*に特異的であり、他のスタフィロコッカス属には存在しておらず、しかも*S. aureus*同士で良好な相同性の実証されているからである。CPE遺伝子は、*S. aureus*の莢膜多糖を産生する経路におけるレダクターゼ酵素としての機能が確認されていない (O' Riordan他、2004年、Clin. Microbiol. Rev.、第17巻 (1) : 218 ~ 234 ページ)。

10

20

【0007】

1つの側面では、本発明により、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34の中から選択されるヌクレオチド配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなるオリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの実施態様では、オリゴヌクレオチドは100個以下のヌクレオチドを有するが、40個以下のヌクレオチドが好ましい。別の1つの側面では、本発明により、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34の中から選択されるヌクレオチド配列、又はその相補配列のうちの1つとの配列同一性が少なくとも80% (例えば少なくとも85%、90%、95%など) の核酸を含んでいて、100個以下のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの実施態様では、配列同一性は90%であることが好ましく、95%であることがより好ましい。一般に、これらオリゴヌクレオチドは、これらの実施態様において、プライマー核酸やプローブ核酸などになることができる。これら実施態様のいくつかでは、オリゴヌクレオチドは40個以下のヌクレオチドを有する (例えば35個以下のヌクレオチド、又は30個以下のヌクレオチド)。いくつかの実施態様では、オリゴヌクレオチドは、例えば修飾されていないヌクレオチドに対する核酸のハイブリダイゼーション安定性を変化させるため、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの標識及び/又は少なくとも1つのクエンチャー (quencher) 部位を含む。いくつかの実施態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの保守的修飾変異 (conservatively modified variation) を含む。

30

【0008】

別の1つの側面では、本発明により、オリゴヌクレオチドのセットが提供される。それらオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34からなる群から選択されるヌクレオチド配列、又はその相補配列を含む。いくつかの実施態様では、オリゴヌクレオチドのセットは、配列番号2、8、12、14~20からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含む第1のオリゴヌクレオチドと、配列番号3、6、9、21~26からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含む第2のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、オリゴヌクレオチドのセットはさらに、配列番号4、10、27~34からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含む第3のオリゴヌクレオチドを含む。特別な実施態様では、第3のオリゴヌクレオチドは検出可能に標識される。

40

【0009】

50

さらに別の側面では、本発明により、試料中のSAを検出する方法が提供される。この方法は、SAが試料中に存在する場合にはその試料を1組のSAプライマーと接触させて増幅産物を生産することを含む増幅ステップを行い；その増幅産物を、1又は2以上の検出可能なSAプローブと接触させることを含むハイブリダイズステップを行い；増幅産物の存在又は不存在を検出することを含む。そのとき増幅産物の存在は試料中のSAの存在の指標となり、増幅産物の不存在は試料中のSAの不存在の指標となる。一実施態様では、1組のSAプライマーの各プライマーは、配列番号2、3、6、8、9、12、14～26からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなり；1又は2以上の検出可能なSAプローブは、配列番号4、10、27～34からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなる。いくつかの実施態様では、ハイブリダイズステップは、増幅産物を、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位で標識したプローブと接触させる操作を含む。この方法はさらに、プローブのドナー蛍光部位とアクセプター蛍光部位の間の蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer) (FRET) の存在又は不存在を検出する操作を含む。蛍光の存在又は不存在は、試料中のSAの存在又は不存在の指標となる。1つの側面では、増幅において、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素を使用することができる。いくつかの実施態様では、第一蛍光部位と第二蛍光部位は、プローブの長さに沿って互いに5個以下のヌクレオチドの範囲内に存在することができる。別の1つの側面では、SAプローブは、二次構造の形成を可能にする核酸配列を含む。このような二次構造の形成により、一般に、第一蛍光部位と第二蛍光部位が空間的に近接する。この方法では、プローブ上の第二蛍光部位がクエンチャーとなることができる。

10

20

【0010】

さらに別の側面では、本発明により、SAの核酸を検出するキットが提供される。このキットは、配列番号2、8、12、14～20からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなる第1のオリゴヌクレオチドと；配列番号3、6、9、21～26からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなる第2のオリゴヌクレオチドと；配列番号4、10、27～34からなる群から選択される配列、又はその相補配列を含むか、その配列からなる第3のオリゴヌクレオチドを含む。1つの側面では、このキットは、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位ですでに標識したプローブを含むことができ、あるいは、プローブを標識するための蛍光体部位を含むことができる。いくつかの実施態様では、アクセプター蛍光部位がクエンチャーとなることができる。このキットは、ヌクレオシド三リン酸、及び/又は核酸ポリメラーゼ、及び/又は核酸ポリメラーゼが機能する上で必要なバッファーも含むことができる。このキットは、試料中のSAの存在又は不存在を検出するためのプライマー、プローブ、蛍光体部位を使用するためのパッケージ挿入物と指示書も含むことができる。

30

【0011】

特に断わらない限り、この明細書で使用するあらゆる科学技術用語は、本発明の属する当業者が一般に理解しているのと同じ意味を有する。この明細書に記載したのと同様又は同等の方法と材料を本発明の実施又は試験で使用できるが、適切な方法と材料を以下に記載する。それに加え、材料、方法、実施例は、単なる例示であり、本発明を制限する意図はない。矛盾する場合には、本明細書が、定義を含め、優先する。

40

【0012】

本発明の1又は2以上の実施態様の詳細を添付の図面と以下の説明に示す。本発明の他の特徴、目的、利点は、図面及び詳細な説明から、そして請求項から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】cap5Nスタフィロコッカス・アウレウス莢膜多糖酵素遺伝子の基準遺伝子配列を示している。

【図2A】スタフィロコッカス・アウレウスのためのアンプリコン配列を示しており、それぞれが、上流プライマー（一重下線）、下流プライマー（二重下線）、プローブ（点線

50

)を含む。

【図2 B】スタフィロコッカス・アウレウスのためのアンプリコン配列を示しており、それぞれが、上流プライマー（一重下線）、下流プライマー（二重下線）、プローブ（点線）を含む。

【図2 C】スタフィロコッカス・アウレウスのためのアンプリコン配列を示しており、それぞれが、上流プライマー（一重下線）、下流プライマー（二重下線）、プローブ（点線）を含む。

【図2 D】スタフィロコッカス・アウレウスのためのアンプリコン配列を示しており、それぞれが、上流プライマー（一重下線）、下流プライマー（二重下線）、プローブ（点線）を含む。

10

【図3 A】スタフィロコッカス・アウレウスを検出するための増幅曲線を示している。

【図3 B】スタフィロコッカス・アウレウスを検出するための増幅曲線を示している。

【図3 C】スタフィロコッカス・アウレウスを検出するための増幅曲線を示している。

【図3 D】スタフィロコッカス・アウレウスを検出するための増幅曲線を示している。

【発明を実施するための形態】

【0014】

試料中の*S. aureus*を検出するためのリアル-タイムアッセイをここに説明する。本発明により、*S. aureus*がメチシリン耐性であるかに関係なく、*S. aureus*を検出するための方法が提供される。*S. aureus*を検出するためのプライマーとプローブのほか、そのようなプライマーとプローブを含む製造製品又はキットが提供される。*S. aureus*を検出するためのリアル-タイムPCRの感度が他の方法と比べて向上していることと、試料の汚染や増幅産物のリアル-タイム検出などの特徴がリアル-タイムPCRで改善されていることにより、臨床実験室における*S. aureus*の感染の定型的な診断でこの技術を実現することが可能になる。

20

【0015】

この方法は、少なくとも1つの反復ステップを実施する操作を含み、その反復ステップには、一対のCPEプライマーを用いて試料からSA CPE核酸分子の一部を増幅することが含まれる。本明細書において、「CPEプライマー」は、CPEをコードする核酸配列に特異的にアニールし、適切な条件下でそれをもとにして合成を開始するオリゴヌクレオチドプライマーを意味する。CPEプライマーのそれぞれは、各増幅産物の少なくとも一部がCPEに対応する核酸配列を含むように、CPE核酸分子内の標的、又はCPE核酸分子に隣接する標的にアニールする。CPE核酸が試料中に存在する場合にはCPE増幅産物が産生されるため、CPE増幅産物の存在は、試料中にCPE核酸が存在することを示す。増幅産物は、1又は2以上の検出可能なCPEプローブと相補的な核酸配列を含むはずである。それぞれの反復ステップは、増幅ステップと、ハイブリダイズステップと、検出ステップとを含む。検出ステップでは、試料を1又は2以上の検出可能なCPEプローブと接触させて、試料中のSAの存在又は不存在を検出する。

30

【0016】

本明細書において、「増幅する」という用語は、鋳型核酸分子（例えばSA CPE核酸分子）の一方又は両方の鎖と相補的な核酸分子を合成するプロセスを意味する。核酸分子の増幅には、一般に、鋳型核酸を変性させ、プライマーの融解温度よりも低い温度でプライマーを鋳型核酸にアニールさせ、酵素によってプライマーから伸長させて増幅産物を生成させることが含まれる。増幅には、一般に、デオキシリボヌクレオシド三リン酸と、DNAポリメラーゼ（例えばPlatinum（登録商標）Taq）と、ポリメラーゼ酵素を最適な活性にする適切なバッファー及び/又は共因子（例えばMgCl₂及び/又はKCl）が必要とされる。

40

【0017】

本明細書において、「プライマー」という用語は、当業者に知られているようにして用いられ、オリゴマー化合物（主にオリゴヌクレオチド）だけでなく、鋳型依存性DNAポリメラーゼによってDNA合成を「開始させる」ことのできる修飾オリゴヌクレオチドも意味する。すなわち、例えばオリゴヌクレオチドの3'末端は、遊離の3'-OH基を提供し、3'

50

- 5' ホスホジエステル結合を確立する鋳型依存性DNAポリメラーゼによってそこにさらに「ヌクレオチド」を結合させることにより、デオキシヌクレオシド三リン酸を使用し、ピロリン酸を解放する。したがって、おそらくは想定される機能を除き、本発明による「プライマー」、「オリゴヌクレオチド」、「プローブ」の間に基本的な違いはない。

【0018】

「ハイブリダイズする」という用語は、1又は2以上のプローブを増幅産物にアニールすることを意味する。ハイブリダイゼーション条件は、一般に、プローブの融解温度よりも低い、プローブの非特異的なハイブリダイゼーションを回避する温度を含む。

【0019】

「3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性」という用語は、一般に核酸の鎖合成に付随する核酸ポリメラーゼの活性を意味する。その活性により、ヌクレオチドが核酸鎖の5' 末端から除去される。

【0020】

「耐熱性ポリメラーゼ (thermostable polymerase)」という用語は、熱に対して安定なポリメラーゼ酵素を意味する。すなわちこの酵素は、鋳型と相補的なプライマー伸長産物の形成の触媒となり、二本鎖鋳型核酸の変性に必要な時間高温に曝露するとき不可逆的に変性することはない。一般に、合成は、各プライマーの3' 末端から開始され、鋳型の鎖に沿って5' から3' の方向に進行する。耐熱性ポリメラーゼは、*Thermus flavus*、*T. ruber*、*T. thermophilus*、*T. aquaticus*、*T. lacteus*、*T. rubens*、*Basillus stearothermophilus*、*Methanothermus fervidus*から単離されている。しかし耐熱性ではないポリメ

【0021】

「その相補配列 (complement thereof)」という用語は、所与の核酸と同じ長さであって、その核酸と正確に相補的な核酸を意味する。

【0022】

核酸に関して用いるときの「延長 (extension)」又は「伸長 (elongation)」という用語は、追加のヌクレオチド (又は他の類似分子) が核酸に組み込まれるときを意味する。例えば核酸は、場合によっては生物触媒 (例えばヌクレオチドを核酸の3' 末端に一般に付加するポリメラーゼ) を組み込んだヌクレオチドによって延長される。

【0023】

2つ以上の核酸配列に関して「同一の」又は%「同一性」という用語は、例えば当業者が入手できる配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定する場合に、又は目視検査により、対応が最大になるように揃えて比較したとき、同じ2つ以上の配列又は部分配列が、同じヌクレオチドを特定の割合で有する2つ以上の配列又は部分配列を意味する。%配列同一性と配列類似性を判断するのに適したアルゴリズムの例は、BLASTプログラムであり、それが記載されているのは、例えば、Altschul他 (1990年)、「基本的な局所的アラインメント検索ツール」、*J. Mol. Biol.*、第215巻：403~410ページ、Gish他 (1993年)、「データベース類似性検索によるタンパク質コード領域の同定」、*Nature Genet.*、第3巻：266~272ページ、Madden他 (1996年)、「ネットワークBLASTサーバーの応用」、*Meth. Enzymol.*、第266巻：131~141ページ、Altschul他 (1997年)、「ギャップ付きBLASTとPSI-BLAST：タンパク質データベース検索プログラムの新世代」、*Nucleic Acids Res.*、第25巻：3389~3402ページ、Zhang他 (1997年)、「パワーBLAST：対話型又は自動式の配列分析と注釈付けへの新たなネットワークBLASTの応用」、*Genome Res.*、第7巻：649~656ページである。

【0024】

オリゴヌクレオチドに関して、「修飾ヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチド配列の少なくとも1つのヌクレオチドが、そのオリゴヌクレオチドに望ましい特性を与える異なるヌクレオチドによって置換されている改変を意味する。この明細書に記載したオリゴヌクレオチドにおいて置換できる修飾ヌクレオチドの例として、例えば、C5-メチル-dC、C5-エチル-dC、C5-メチル-dU、C5-エチル-dU、2,6-ジアミノプリン、C5-プロピニル-dC、C5-

10

20

30

40

50

プロピニル-dU、C7-プロピニル-dA、C7-プロピニル-dG、C5-プロパルギルアミノ-dC、C5-プロパルギルアミノ-dU、C7-プロパルギルアミノ-dA、C7-プロパルギルアミノ-dG、7-デアザ-2-デオキシアントシン、ピラゾロピリミジン類似体、シュード-dU、ニトロピロール、ニトロインドール、2'-0-メチルリボ-U、2'-0-メチルリボ-C、N4-エチル-dC、N6-メチル-dAなどがある。本発明のオリゴヌクレオチドにおいて置換できる他の多くの修飾ヌクレオチドが、この明細書で言及されるか、従来から知られている。いくつかの実施態様では、修飾ヌクレオチドは、対応する修飾されていないオリゴヌクレオチドと比べてオリゴヌクレオチドの融解温度 (T_m) を変化させる。さらに説明すると、いくつかの修飾ヌクレオチド置換により、非特異的な核酸増幅を減らし（例えばプライマーの二量体形成などを最少にする）、本発明のいくつかの実施態様において意図する標的アンプリコンなどの収率を増大させることができる。このタイプの核酸修飾の例は、例えば米国特許第6,001,611号に記載されている。

【0025】

*S. aureus*核酸およびヌクレオチド

【0026】

本発明により、例えばSA CPE遺伝子核酸の一部を増幅することによってSAを検出する方法が提供される。SAからの核酸配列は入手可能である（例えばGenBank受入番号NC002745参照）。具体的には、CPE核酸分子を増幅して検出するためのプライマーとプローブが、本発明によって提供される。

【0027】

SAを検出するため、CPE核酸分子を増幅するためのプライマーとプローブを用意する。この明細書に例示する以外のCPE核酸も、試料中のSAを検出するのに使用できる。当業者は、定型的方法を利用して、例えば機能性変異体（functional variant）の特異性及び/又は感受性を評価することができる。代表的な機能性変異体は、この明細書に開示したCPE核酸の中に、例えば1又は2以上の欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含む可能性がある。

【0028】

より詳細には、本発明のオリゴヌクレオチドは、それぞれ、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34の中から選択される配列を有する核酸を含むか、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34のうちの1つに対して例えば80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の配列同一性を有する、実質的に同一の変異体を含むか、或いは、配列番号2~4、6、8~10、12及び14~34、並びにその変異体の相補配列を含む。

【0029】

【表1】

表1：上流プライマー

配列番号	配列
2	5'-ACACCAATGAACCCTACGACC-3'
8	5'-GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAA-3'
12	5'-AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATC-3'
14	5'-AGGCGTACATGGATATATCGGTAA-3'
15	5'-GCTTATTGAACAAGGACATCAA-3'
16	5'-GATAAGCTTATTGAACAAGGACATC-3'
17	5'-ACACCAATGAACCCTACGAC-3'
18	5'-ACACCAATGAACCCTACGA-3'
19	5'-ACCAATGAACCCTACGACC-3'
20	5'-ATACACAAACACCAATGAACCCTAC-3'

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

【 表 2 】

表 II : 下流プライマー

配列番号	配列
3	5'- TAATTGATCAATAAATGCTGTCAGA -3'
6	5'- GATCAATAAATGCTGTCAGATGTTTAA -3'
9	5'- CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACC -3'
21	5'- TGCTTGAGGTGAATTGTTGTGAA -3'
22	5'- AGATAGCCTTGCTTGAGGTGAA -3'
23	5'- CTTGAGGTGAATTGTTGTGAA -3'
24	5'- TGAGGTGAATTGTTGTGAACC -3'
25	5'- CAATAAATGCTGTCAGATGTTTAA -3'
26	5'- TAATTGATCAATAAATGCTGTCA -3'

10

表 III : プローブ

配列番号	配列
4	5'- TTGCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
10	5'- TTAGGAATCAATTATGGAAGTCGACCTCGT -3'
27	5'- TGGTGCACATTGCCAGGAAATTT -3'
28	5'- CATTGCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
29	5'- CCCAGGAAATTTCCAACGGTT -3'
30	5'- CGAGGTCGACTTCCATAATTGATTCCT -3'
31	5'- ACGAGGTCGACTTCCATAATTGATTCCTAA -3'
32	5'- AAATTTCTGGGCAATGTGCACCA -3'
33	5'- AACCGTTGGAAATTTCTGGGCAATG -3'
34	5'- AACCGTTGGAAATTTCTGGGCAA -3'

20

表 IV : アンプリコン

配列番号	配列
5	5'- ACACCAATGA ACCCTACGAC CAACTATGGT ATTTCCAAAA AGTTCGCTGA ACAAGCATT CAAGAATTGA TTAGTGATTC GTTTAAAGTA GCAATTGTGA GACCACCAAT GATTTATGGT GCACATTGCC CAGGAAATTT CCAACGGTTA ATGCAATTGT CAAAGCGATT GCCAATCATT CCCAATATTA ACAATCAGCG CAGTGCATTA TATATTA AAC ATCTGACAGC ATTTATTGAT CAATTA -3'
7	5'- ACACCAATGA ACCCTACGAC CAACTATGGT ATTTCCAAAA AGTTCGCTGA ACAAGCATT CAAGAATTGA TTAGTGATTC GTTTAAAGTA GCAATTGTGA GACCACCAAT GATTTATGGT GCACATTGCC CAGGAAATTT CCAACGGTTA ATGCAATTGT CAAAGCGATT GCCAATCATT CCCAATATTA ACAATCAGCG CAGTGCATTA TATATTA AAC ATCTGACAGC ATTTATTGAT C -3'
11	5'- GATAAGCTTA TTGAACAAGG ACATCAAGTA GATCAAATTA ATGTTAGGAA TCAATTATGG AAGTCGACCT CGTTCAAAGA TTATGATGTT TTAATTCATA CAGCAGCTTT GGTTCACAAC AATTCACCTC AAG -3'
13	5'- AAGATAAGCT TATTGAACAA GGACATCAAG TAGATCAAAT TAATGTTAGG AATCAATTAT GGAAGTCGAC CTCGTTCAA GATTATGATG TTTAATTCA TACAGCAGCT TTGGTTCACA ACAATTCACC TCAAG -3'

30

40

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施態様では、表Iの上流プライマーを含むかその上流プライマーからなるオリゴヌクレオチドを、表IIの下流プライマーを含むかその下流プライマーからなるオリゴヌクレオチドと組み合わせ、適切な条件下でSAの増幅を可能にする1組のオリゴヌクレオチドを形成する。表Iの上流プライマーを含むかその上流プライマーからなるオリゴヌ

50

クレオチドの相補配列を使用するいくつかの実施態様では、表IIの下流プライマーを含むかその下流プライマーからなるオリゴヌクレオチドの相補配列も選択し、適切な条件下でSAの増幅を可能にする1組のオリゴヌクレオチドを形成する。いくつかの実施態様では、1組のオリゴヌクレオチドは、表IIIのプロープを含むかそのプロープからなる第3のオリゴヌクレオチドをさらに含む。

【0032】

本発明の一実施態様では、CPEプライマーとプロープの特定のセットを用い、SAを含むと思われる生物試料中のSAを検出する。プライマーとプロープのこのセットは、CPEに特異的な少なくとも1つのプライマーとプロープとして、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34からなる群から選択される核酸配列又はその相補配列を含むか、その配列からなるものを含むことができる。

10

【0033】

本発明の別の実施態様では、CPEに特異的な少なくとも1つのプライマーとプロープは、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34のプライマーのうちの任意のものの機能的活性変異体を含むか、その変異体からなる。配列番号2~4、6、8~10、12、14~34のプライマー及び/又はプロープのうちの任意のものの機能的活性変異体は、本発明の方法においてそれらプライマー及び/又はプロープを用いて同定することができる。配列番号2~4、6、8~10、12、14~34のプライマー及び/又はプロープの機能的活性変異体は、本発明の方法又はキットにおいて、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34の各配列と比べて同じかより高い特異性と感受性を提供するプライマーに関する。

20

【0034】

この変異体は、例えば配列番号2~4、6、8~10、12、14~34と比べると、配列番号2~4、6、8~10、12、14~34の各配列の5'末端及び/又は3'末端において1個以上のヌクレオチドの付加、又は欠失、又は置換がある点が異なっている可能性がある。上に詳述したように、プライマー（及び/又はプロープ）は、化学的に修飾することができる。すなわちプライマー及び/又はプロープは、修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチド化合物を含むことができる。「修飾ヌクレオチド」（又は「ヌクレオチド類似体（nucleotide analog）」）は、何らかの修飾がある点が天然の「ヌクレオチド」とは異なっているが、それでも、塩基化合物又は塩基様化合物、ペントフラノシル糖化合物又はペントフラノシル糖様化合物、リン酸部位又はリン酸様部位のいずれかか、これらの組み合わせからなる。例えば「標識」を「ヌクレオチド」の塩基部位に結合させることにより、「修飾ヌクレオチド」を得ることができる。「ヌクレオチド」内の天然の塩基を、例えば7-デスアザプリンで置換して「修飾ヌクレオチド」を得ることもできる。「修飾ヌクレオチド」又は「ヌクレオチド類似体」という用語は、本出願では同じ意味である。「修飾ヌクレオチド」（又は「ヌクレオチド類似体」）は、「修飾ヌクレオチド」（又は「ヌクレオチド類似体」）に関して上述したように、何らかの修飾がある点が天然のヌクレオチドとは異なっている。特定の核酸配列の「保存的修飾変異」は、同じアミノ酸配列又は実質的に同じアミノ酸配列をコードしている核酸を意味し、核酸がアミノ酸配列をコードしていない場合には、実質的に同じ配列をコードしている核酸を意味する。当業者であれば、コードされた配列中で単一のアミノ酸又はわずかな割合のアミノ酸（典型的には5%未満、より典型的には4%未満、又は2%未満、又は1%未満）を変化させる、又は付加する、又は欠失させる個々の置換、又は欠失、又は付加は、「保存的修飾変異」であり、その変化により、アミノ酸の欠失、又はアミノ酸の付加、又は化学的に似たアミノ酸によるアミノ酸の置換が起こることを認識している。

30

40

【0035】

SAをコードしている核酸分子（例えばCPEのさまざまな部分をコードしている核酸）を増幅する修飾オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類似体を含むオリゴヌクレオチドは、例えばコンピュータプログラム（例えばOLIGO（Molecular Biology Insights社、カスケード、コロラド州））を用いて設計することができる。増幅用プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを設計する際の重要な特徴として、（例えば電気泳動による）

50

検出を容易にするため増幅産物が適切なサイズであること、一対のプライマーの各メンバーが似た融解温度を持つこと、各プライマーの長さ（すなわちプライマーは、配列特異的にアニールして合成を開始させるのに十分な長さを持つが、オリゴヌクレオチド合成の間に忠実度が低下するほど長くはない必要がある）などがあるが、特徴がこれらに限定されることはない。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーは、長さが8～50個のヌクレオチド（例えば長さが8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、46、48、50個のヌクレオチド）である。

【0036】

本発明の方法では、SAの存在又は不存在を検出するため、プライマーのセットに加え、1又は2以上のプローブを使用することができる。「プローブ」という用語は、合成した核酸（DNA又はRNA）、又は生物によって産生された核酸を意味する。この核酸は、設計又は選択により、所定の特別な（すなわち好ましい）条件下で「標的核酸」（ここではSA CPE（標的）核酸）とハイブリダイズできる特定のヌクレオチド配列を含む。「プローブ」は、「検出プローブ」と呼ぶことができ、標的核酸を検出することを意味する。

10

【0037】

本発明によれば、CPEプローブは、少なくとも1つの蛍光標識で標識することができる。一実施態様では、CPEプローブは、ドナー蛍光部位（例えば蛍光染料）及び対応するアクセプター蛍光部位（例えばクエンチャー）で標識することができる。

【0038】

本発明の一実施態様では、少なくとも1つのプローブは、蛍光部位と、（標識なしで示した）配列番号4、10、27～34からなる群から選択される核酸配列を含むか、その蛍光部位と核酸配列からなる。

20

【0039】

ハイブリダイゼーションプローブとして使用するオリゴヌクレオチドの設計は、プライマーの設計と同様にして実行できる。本発明の実施態様では、増幅産物の検出に単一のプローブ又は一対のプローブを使用することができる。実施態様によっては、使用するプローブは、少なくとも1つの標識及び/又は少なくとも1つのクエンチャー部位を含むことができる。プライマーと同様、プローブは、通常は、互いに似た融解温度を持ち、各プローブの長さは、配列特異的ハイブリダイゼーションが起こるのに十分である必要があるが、合成中に忠実度が低下するほど長くなってはならない。一般に、オリゴヌクレオチドプローブは、長さが15～30個（例えば16、18、20、21、22、23、24、25個）のヌクレオチドである。

30

【0040】

本発明のコンストラクトは、SA CPE核酸分子（例えば配列番号2～4、6、8～10、12、14～34）を含むベクターを含む。本発明のコンストラクトは、例えば対照鋳型核酸分子として使用できる。本発明で用いるのに適したベクターは、市販されているものを入手する、及び/又は組み換え核酸法によって製造される。SA CPE核酸分子は、例えば化学合成によって得ること、又はSAから直接クローニングすること、又はPCR増幅によって得ることができる。

【0041】

本発明の方法で用いるのに適したコンストラクトは、一般に、SA CPE核酸分子（例えば配列番号2～4、6、8～10、12、14～34のうちの1又は2以上の配列を含む核酸分子）に加え、所望のコンストラクト及び/又は形質転換細胞を選択するための選択可能なマーカー（例えば抗生物質耐性遺伝子）をコードする配列と、複製起点を含む。ベクター系の選択は、通常は、いくつかの因子に依存する。因子として、宿主細胞の選択、複製の効率、選択可能性、誘導可能性、回収の容易さなどがあるが、これらに限定されない。

40

【0042】

CPE核酸分子を含む本発明のコンストラクトは、宿主細胞の中で増幅させることができる。本明細書において、宿主細胞という用語は、原核生物と真核生物（例えば酵母細胞、植物細胞、動物細胞）を含む。原核宿主として、大腸菌、ネズミチフス菌、霊菌、枯草菌

50

が可能である。真核宿主として、酵母（例えばサッカロミセス・セレビジエ、サッカロミセス・ポンベ、ピキア・パストリス）、哺乳動物の細胞（例えばCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）、昆虫細胞、植物細胞（例えばシロイヌナズナ、タバコ）がある。本発明のコンストラクトは、当業者に一般に知られている任意の技術を利用して宿主細胞に導入することができる。例えばリン酸カルシウム沈降、電気穿孔、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクション、ウイルスを媒介とした核酸導入が、核酸を宿主細胞に導入する一般的な方法である。それに加え、裸のDNAを細胞に直接送達することができる（例えば米国特許第5,580,859号、第5,589,466号参照）。

【0043】

ポリマー連鎖反応（PCR）

10

【0044】

米国特許第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号、第4,965,188号に、従来のPCR技術が開示されている。PCRでは、一般に、選択した核酸鋳型（例えばDNA又はRNA）に結合する2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。本発明で有用なプライマーとして、SA CPE核酸配列（例えば配列番号2、3、6、8、9、12、14～27）内で核酸合成の開始点として機能することのできるオリゴヌクレオチドがある。プライマーは、従来法による制限消化から精製することができる。あるいはプライマーは、合成して製造することができる。プライマーは、増幅における効率を最大にするため一本鎖であることが好ましいが、二本鎖も可能である。二本鎖のプライマーは、最初に変性させる。すなわち処理して鎖を分離させる。二本鎖の核酸を変性させる1つの方法は、加熱である。

20

【0045】

核酸鋳型が二本鎖である場合には、PCRで鋳型として使用できるようにするためその二本の鎖を分離する必要がある。鎖の分離は、適切な任意の方法（例えば物理的手段、化学的手段、酵素による手段）によって実現できる。核酸の鎖を分離する1つの方法は、核酸の大半が変性する（例えば50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超が変性する）まで加熱する操作を含む。鋳型核酸を変性させるのに必要な加熱条件は、例えばバッファの塩濃度、変性させる核酸の長さとのヌクレオチド組成に依存するであろうが、反応の特徴（例えば温度と核酸の長さ）に応じた時間にわたって一般には約90～約150の範囲にする。変性は、一般に約30秒間～4分間（例えば1分間～2分30秒間、又は1.5分間）にわたって実行される。

30

【0046】

二本鎖鋳型核酸が熱によって変性する場合には、反応混合物を放置し、各プライマーがCPE核酸上で標的配列とアニールするのを促進する温度まで冷却する。アニールリングの温度は、通常は約35～約65（例えば約40～約60；約45～約50）である。アニールリングの時間は、約10秒間～約1分間（例えば約20秒間～約50秒間；約30秒間～約40秒間）が可能である。次に、反応混合物を、ポリメラーゼの活性が促進又は最適化される温度、すなわちアニールしたプライマーからの延長が十分に起こる温度に調節し、鋳型核酸と相補的な産物が生成するようにする。温度は、鋳型核酸にアニールする各プライマーからの延長産物が合成されるのに十分でなければならぬが、その延長産物とその相補的な鋳型から変性するほど高くなつてはならない（例えば延長の温度は、一般に約40～約80（例えば約50～約70；約60）の範囲である）。延長の時間は、約10秒間～約5分間（例えば約30秒間～約4分間；約1分間～約3分間；約1分30秒間～約2分間）が可能である。

40

【0047】

PCRアッセイでは、SA核酸（例えばRNA又はDNA（cDNA））を使用できる。鋳型核酸は、複合体混合物のわずかな一部（例えばヒト細胞に含まれるSA核酸）であると考えられるため精製する必要がない。SA核酸は、定型技術（例えば「診断分子微生物学：原理と応用」（Persing他編、1993年、アメリカ微生物学会、ワシントンD.C.）に記載されている技術）によって生体試料から抽出することができる。核酸は、任意の数の供給源（例えばプラスミド）、又は天然の供給源（例えば微生物、酵母、ウイルス、オルガネラ、より高

50

等な生物（例えば植物や動物）から得ることができる。

【0048】

オリゴヌクレオチドプライマー（例えば配列番号2、3、6、8、9、12、14～27）は、プライマーの延長を誘導する反応条件下でPCR試薬と組み合わせられる。例えば鎖延長反応物は、一般に、50mMのKCl、10mMのトリス-HCl（pH 8.3）、15mMのMgCl₂、0.001%（w/v）のゼラチン、0.5～1.0 μgの変性した鋳型DNA、50ピコモルの各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5UのTaqポリメラーゼ、10%のDMSOを含む。この反応物は、通常は、dATP、dCTP、dTTP、dGTPのそれぞれ、又はその1又は2以上の類似体を150～320 μM含む。

【0049】

新たに合成された鎖は、反応の以後のステップで使用できる二本鎖分子を形成する。鎖分離、アニーリング、伸長のステップは、標的となるCPE核酸分子に対応する増幅産物が所望の量になるまで、必要なだけ繰り返すことができる。反応の制限因子は、反応物の中に存在しているプライマー、熱安定酵素、ヌクレオシド三リン酸の量である。反復ステップ（すなわち変性、アニーリングおよび延長）は、少なくとも1回繰り返すことが好ましい。検出に使用する場合、反復ステップの数は、例えば試料の性質に依存することになる。試料が核酸の複合混合物である場合、検出に十分な標的配列を増幅するのにより多くの反復ステップが必要となる。一般に、反復ステップは、少なくとも約20回繰り返すが、40回又は60回、それどころか100回繰り返してもよい。

10

【0050】

蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）

20

【0051】

FRET技術（例えば米国特許第4,996,143号、第5,565,322号、第5,849,489号、第6,162,603号参照）は、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位が互いに所定の距離内に位置するとき、これら2つの蛍光部位の間でエネルギーの移動が起こり、それを可視化すること、又は他の方法で検出及び/又は定量することができるという考え方に基づいている。ドナーは、一般に、適切な波長の光照射によって励起されると、エネルギーをアクセプターに移動させる。アクセプターは、一般に、移動されたエネルギーを異なる波長の光照射の形態で再放出する。

【0052】

一例では、オリゴヌクレオチドプローブは、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位を含むことができ、アクセプター蛍光部位は、移されたエネルギーを光以外の形態で散逸させる。プローブが完全であるとき、エネルギー移動は、一般に、2つの蛍光部位の間で起こり、ドナー蛍光部位からの蛍光発光が抑制される。ポリメラーゼ連鎖反応の延長ステップの間、増幅産物に結合したプローブは、例えばTaqポリメラーゼの5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性によって開裂するため、ドナー蛍光部位からの蛍光発光はもはや抑制されない。この目的のプローブの例が、例えば米国特許第5,210,015号、第5,994,056号、第6,171,785号に記載されている。一般に使用されるドナー-アクセプターのペアとして、FAM-TAMRAペアがある。一般に使用されるクエンチャーは、DABCYLとTAMRAである。一般に使用されるダーククエンチャーとして、BlackHole Quenchers（登録商標）（BHQ）（Biosearch Technologies社、ノヴァト、カリフォルニア州）、Iowa Black（登録商標）（Integrated DNA Tech社、コラルヴィル、アイオワ州）、BlackBerry（登録商標）Quencher 650（BBQ-650）（Berry & Assoc.社、デキスター、ミシガン州）がある。

30

40

【0053】

別の一例では、2つのオリゴヌクレオチドプローブ（それぞれが蛍光部位を含む）を、CPE標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの相補性によって決まる特定の位置でハイブリダイズさせて増幅産物にすることができる。オリゴヌクレオチドプローブが適切な位置で増幅産物核酸にハイブリダイズすると、FRET信号が発生する。ハイブリダイゼーションの温度は、約10秒間～約1分間にわたって約35～約65の範囲にすることができる。

【0054】

例えば（特定の範囲の蛍光発光をモニターするための適切な二色ミラーとフィルタを備

50

える) フォトン計数落射顕微鏡システム、又はフォトン計数光増倍管システム、又は蛍光計を用いて蛍光分析を実行することができる。エネルギーの移動を開始させる励起は、アルゴンイオンレーザー、又は高強度水銀(Hg)アークランプ、又は光ファイバー光源、又は所望の範囲で励起させるため適切にフィルタされた他の高強度光源を用いて実施することができる。

【0055】

本明細書において、ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位に関して、「対応する(corresponding)」とは、ドナー蛍光部位の励起スペクトルと重複する発光スペクトルを持つアクセプター蛍光部位を意味する。アクセプター蛍光部位の発光スペクトルの最大波長は、ドナー蛍光部位の励起スペクトルの最大波長よりも少なくとも100nm大きい必要がある。したがって、効率的な非照射性のエネルギー移動を両者の間で起こすことができる。

10

【0056】

ドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位は、一般に、(a) 高効率のフォルスターエネルギー移動；(b) 大きな最終的ストークスシフト(>100nm)；(c) 可視スペクトルの赤色部分にできるだけシフトした発光(>600nm)；(d) ドナー励起波長において励起によって生じるラマン水蛍光発光よりも大きな波長にシフトした発光、となるように選択される。例えばドナー蛍光部位は、レーザー光線(例えばヘリウム-カドミウムの42nm、又はアルゴンの488nm)に近い励起最大値、大きな吸光係数、大きな量子収率、対応するアクセプター蛍光部位の励起スペクトルとよく重複した蛍光発光、を持つように選択することができる。対応するアクセプター蛍光部位は、大きな吸光係数、大きな量子収率、ドナー蛍光部位の発光とよく重複した励起、可視スペクトルの赤色部分での発光(>600nm)、を持つように選択することができる。

20

【0057】

FRET技術においてさまざまなアクセプター蛍光部位とともに使用できる代表的なドナー蛍光部位として、フルオレセイン、ルシファーイエロー、B-フィコエリトリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエロー-VS、4-アセタミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、1-ピレンブチル酸スクシンイミジル、4-アセタミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体などがある。代表的なアクセプター蛍光部位として、使用するドナー蛍光部位に応じ、LCレッド640、LCレッド705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ローダミンXイソチオシアネート、エリスロシンイソチオシアネート、フルオレセイン、五酢酸ジエチレントリアミンや、ランタニドイオン(例えばユーロピウム又はテルビウム)の他のキレートなどがある。ドナー蛍光部位とアクセプター蛍光部位は、例えばMolecular Probes社(ジャンクションシティ、オレゴン州)又はSigma Chemical社(セントルイス、ミズーリ州)から入手できる。

30

【0058】

ドナー蛍光部位とアクセプター蛍光部位は、リンカーアームを通じて適切なプローブオリゴヌクレオチドに結合させることができる。各リンカーアームの長さが重要である。なぜならリンカーアームは、ドナー蛍光部位とアクセプター蛍光部位の間の距離に影響を与えることになるからである。本発明の目的でのリンカーアームの長さは、ヌクレオチド塩基から蛍光部位までの距離である(単位はオングストローム())。一般に、リンカーアームは約10 ~ 約25 である。リンカーアームは、国際公開第84/03285号に記載されているタイプのものが可能である。国際公開第84/03285号には、リンカーアームを特定のヌクレオチド塩基に結合させる方法と、蛍光部位をリンカーアームに結合させる方法も開示されている。

40

【0059】

アクセプター蛍光部位(例えばLCレッド640-NHS-エステル)をC6-ホスホロアミド(ABI社(フォスターシティ、カリフォルニア州)又はGlen Research社(スターリング、ヴァ

50

ージニア州)から入手可能)と組み合わせ、例えばLCレッド640-ホスホロアミダイトを作ることができる。ドナー蛍光部位(例えばフルオレセイン)をオリゴヌクレオチドにカップルさせるのに頻繁に使用されるリンカーとして、チオ尿素リンカー(FITCに由来する例えばGlen Research社又はChemGene社(アッシュランド、マサチューセッツ州)からのフルオレセイン-CPG)、アミド-リンカー(フルオレセイン-NHS-エステルに由来する例えばBioGenex社(サンラモン、カリフォルニア州)からのフルオレセイン-CPG)、オリゴヌクレオチド合成の後にフルオレセイン-NHS-エステルのカップリングを必要とする3'-アミノ-CPGなどがある。

【0060】

スタフィロコッカス・アウレウスの検出

10

【0061】

本発明により、生体試料中又は非生体試料中のSAの存在又は不存在を検出する方法が提供される。本発明で提供される方法により、試料の汚染、偽陰性、偽陽性の問題が回避される。この方法は、一对のCPEプライマーを用いた試料からのSA CPE核酸分子の一部の増幅と、FRET検出ステップとを含む少なくとも1回の反復ステップの実施を含む。多数の反復ステップが、好ましくは熱サイクラーの中で実行される。本発明の方法は、CPEの存在を検出するCPEプライマーとプローブを用いて実行することができ、CPEの検出は、試料中にSAが存在することを示す。

【0062】

この明細書に記載されているように、増幅産物は、FRET技術を生かした標識付きハイブリダイゼーションプローブを用いて検出することができる。1つのFRETの形式では、TaqMan(登録商標)技術を利用して、増幅産物の存在又は不存在、したがってSAの存在又は不存在を検出する。TaqMan(登録商標)技術では、2つの蛍光部位で標識した1つの一本鎖ハイブリダイゼーションプローブを使用する。第一蛍光部位を適切な波長の光で励起するとき、吸収されるエネルギーは、FRETの原理に従って第二蛍光部位に移動する。第二蛍光部位は、一般に、クエンチャー分子である。PCR反応のアニーリングステップにおいて、標識付きハイブリダイゼーションプローブは標的DNA(すなわち増幅産物)に結合し、続く伸長段階において、Taqポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解する。その結果として、励起した蛍光部位とクエンチャー部位は互いに空間的に分離される。その帰結として、クエンチャーの不存在下で第一蛍光部位が励起されるとき、第一蛍光部位からの蛍光発光を検出することができる。例えばABI PRISM(登録商標)7700配列検出システム(Applied Biosystems社、フォスターシティ、カリフォルニア州)ではTaqMan(登録商標)技術を利用するが、このシステムは、この明細書に記載した方法を実行して試料中のSAの存在又は不存在を検出するのに適している。

20

30

【0063】

FRETと組み合わせた分子ビーコンを使用し、本発明のリアル-タイムPCR法を利用して増幅産物の存在を検出することもできる。分子ビーコン技術では、第一蛍光部位と第二蛍光部位を用いて標識したハイブリダイゼーションプローブを使用する。第二蛍光部位は一般にクエンチャーであり、蛍光標識は一般に、プローブの各端部に位置する。分子ビーコン技術では、二次構造(例えばヘアピン)の形成を可能にする配列を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用する。プローブ内に二次構造が形成される結果として、両方の蛍光部位は、プローブが溶液中にあるときに空間的に近接する。プローブの二次構造は標的核酸(すなわち増幅産物)にハイブリダイズした後に破壊され、その結果として蛍光部位は互いに分離するため、適切な波長の光で励起した後に第一蛍光部位の発光を検出することができる。

40

【0064】

FRET技術の別の一般的な形式では、2つのハイブリダイゼーションプローブを使用する。各プローブは異なる蛍光部位を用いて標識することができる。各プローブは、一般に、標的DNA分子(例えば増幅産物)内で互いに近接してハイブリダイズするように設計される。ドナー蛍光部位(例えばフルオレセイン)をLightCycler(登録商標)装置の光源に

50

よって470nmで励起する。FRETの間、フルオレセインはエネルギーをアクセプター蛍光部位（例えばLightCycler（登録商標）-レッド640（LC Red 640）又はLightCycler（登録商標）-レッド705（LC Red 705））に移動させる。するとアクセプター蛍光部位はより長い波長の光を発生させ、それがLightCycler（登録商標）装置の光検出システムによって検出される。効率的なFRETは、蛍光部位同士が局所的に近接しているとき、かつドナー蛍光部位の発光スペクトルがアクセプター蛍光部位の吸収スペクトルと重複しているときにだけ起こり得る。発光信号の強度は、元の標的DNA分子の数（例えばSAゲノムの数）と関連させることができる。CPE核酸の増幅が起こって増幅産物が産生される場合、ハイブリダイズステップにより、プローブ対のメンバーの間にFRETに基づく検出可能な信号が発生する。

10

【0065】

一般に、FRETの存在は、試料中にSAが存在することを示し、FRETの不存在は、試料中にSAが存在しないことを示す。しかし試料の不十分な回収、輸送の遅延、不適切な輸送条件、ある種の回収用スワブ（アルギン酸カルシウム又はアルミニウムシャフト）の使用は、すべて、試験結果の成功及び/又は正確さに影響を与える可能性のある条件である。この明細書に記載した方法を利用する場合、例えば45回以内の反復ステップでのFRETの検出はSA感染を示す。

【0066】

本発明の方法を実施する際に使用できる代表的な生体試料として、皮膚スワブ、鼻スワブ、傷スワブ、血液培養物、皮膚、軟組織感染物などがあるが、これらに限定されない。生体試料の回収法と保管法は、当業者に公知である。生体試料を（例えば公知の核酸抽出法及び/又はキットによって）処理してSA核酸を放出させることができ、いくつかのケースでは、生体試料をPCR反応コンポーネント及び適切なオリゴヌクレオチドと直接接触させることができる。

20

【0067】

融解曲線分析が、反復プロファイルに含めることのできる追加ステップである。融解曲線分析は、DNAが融解温度（ T_m ）と呼ばれる特徴的な温度で融解するという事実に基づいている。融解温度は、複製されたDNAの半分が単独の鎖に分離する温度と定義される。DNAの融解温度は、主としてそのDNAのヌクレオチド組成に依存する。例えばヌクレオチドGとCが豊富なDNA分子は、ヌクレオチドAとTが豊富なDNA分子よりも T_m が高い。信号が消える温度を検出することにより、プローブの融解温度を求めることができる。同様に、信号が発生する温度を検出することにより、プローブのアニリング温度を求めることができる。CPE増幅産物からのCPEプローブの融解温度により、試料中のSAの存在又は不存在を確認することができる。

30

【0068】

熱サイクラーを1回作動させるごとに、対照試料にも反復ステップを実施する。陽性対照試料は、例えば対照プライマーと対照プローブとを用いて（CPE以外の）SA核酸対照鑄型を増幅することができる。陽性対照試料は、例えばSA CPE核酸分子を含むプラスミドコンストラクトも増幅することができる。このような対照プラスミドは、内部（例えば試料内）で増幅させること、又は患者の試料と並行して走らせる別の試料の中で増幅させることができる。熱サイクラーの各試行には、例えばSA鑄型DNAが欠けた陰性対照も含めることができる。このような対照は、増幅及び/又はハイブリダイゼーション及び/又はFRET反応の成功又は失敗の指標である。したがって対照反応により、例えばプライマーが配列特異的にアニールして伸長を開始する能力と、プローブが配列特異的にハイブリダイズしてFRETが発生する能力を容易に判断することができる。

40

【0069】

一実施態様では、本発明の方法は、汚染を回避するステップを含む。熱サイクラーを1回作動させて次に作動させるまでの間の汚染を減らすかなくすため、例えばウラシル-DNAグリコシレートを用いた酵素法が、米国特許第5,035,996号、第5,683,896号、第5,945,313号に記載されている。

50

【0070】

従来のPCR法をFRET技術と組み合わせて用いて本発明の方法を実施することができる。一実施態様では、LightCycler（登録商標）装置を使用する。以下の特許出願には、LightCycler（登録商標）技術で使用されるリアル-タイムPCRが記載されている：国際公開第97/46707号、国際公開第97/46714号、国際公開第97/46712号。

【0071】

LightCycler（登録商標）は、PCワークステーションを使用して操作することができ、ウインドウズNTオペレーティングシステムを利用できる。試料からの信号は、この装置がキャピラリーを光学ユニット上に順番に配置するのに合わせて得られる。ソフトウェアは、蛍光信号を各測定の後直ちにリアルタイムで表示することができる。蛍光取得時間は、10 ~ 100ミリ秒である。各反復ステップの後、蛍光と反復数の間の関係の定量的表示をすべての試料について連続的に更新することができる。生成したデータを保管してさらに分析することができる。

10

【0072】

FRETに代わる方法として、蛍光DNA結合染料（例えばSYBR（登録商標）グリーン又はSYBR（登録商標）ゴールド（Molecular Probes社））などの二本鎖DNA結合染料を用いて増幅産物を検出することができる。このような蛍光DNA結合染料は、二本鎖核酸と相互作用すると、適切な波長の光で励起した後に蛍光信号を発生させる。二本鎖DNA結合染料（例えば核酸層間染料）も使用できる。二本鎖DNA結合染料を使用するときには、増幅産物の存在を確認するため、通常は融解曲線分析を実施する。

20

【0073】

本発明は、1又は2以上の市販されている装置の構成による制限を受けないことが理解されよう。

【0074】

製品/キット

【0075】

本発明により、SAを検出するための製品又はキットがさらに提供される。本発明による製品は、SAを検出するためのプライマー及びプローブとともに、適切な包装材料を含むことができる。SAを検出するための代表的なプライマーとプローブは、SA CPE核酸分子にハイブリダイズすることができる。それに加え、キットは、DNAの固定化、ハイブリダイゼーション、検出に必要な適切に包装された試薬と材料（例えば堅固な支持体、バッファー、酵素、基準DNA）も含むことができる。プライマーおよびプローブの設計法は本明細書に開示されており、増幅してSA CPE核酸分子にハイブリダイズするプライマーとプローブの代表例が提供されている。

30

【0076】

本発明の製品は、プローブを標識するための1又は2以上の蛍光部位を含むこと、又はキットとともに供給されるプローブを標識することができる。例えば製品は、一方のCPEプローブを標識するためのドナー蛍光部位と、他方のCPEプローブを標識するためのアクセプター蛍光部位をそれぞれ含むことができる。適切なFRETドナー蛍光部位及び対応するアクセプター蛍光部位の例は上に提示してある。

40

【0077】

本発明の製品は、試料中のSAを検出するためのCPEプライマーとプローブを使用するための指示が記載されたパッケージ挿入物又はパッケージラベルも含むことができる。製品は、さらに、この明細書に開示した方法を実施するための試薬（例えばバッファー、ポリメラーゼ酵素、共因子、汚染防止試薬）を含むことができる。このような試薬は、この明細書に記載した市販の装置の1つに専用のものにできる。

【0078】

以下の実施例において本発明をさらに説明するが、これら実施例が請求項に記載されている本発明の範囲を制限することはない。

【実施例】

50

【0079】

以下の実施例と図面は、本発明を理解するための助けとなるよう提示したものであり、本発明の真の範囲は、添付の請求項に記載されている。本発明の精神から逸脱することなく、ここに記載した手続きにおいて改変が可能であることが理解されよう。

【0080】

実施例 1

莢膜多糖酵素遺伝子標的の選択

【0081】

標的とするCPE遺伝子は、*S. aureus*と他のいくつかのスタフィロコッカス属に関して公開されている全ゲノムを用いたBLAST配列分析により、*S. aureus*に特異的であって他のスタフィロコッカス属には存在しないものに決定した。

10

【0082】

プライマー部位は、CPE遺伝子の中で、長さが250塩基対未満のアンプリコンを産生させ、(可能ならば)3'末端に二重dAヌクレオチド又は二重dCヌクレオチドを有するように選択した。プライマーは、64 よりも高いT_mを持つようにも選択し、3' t-ブチルベンジル修飾基を用いてPCR中にプライマーの二量体化を減らし、特異性を増大させた。最初のプライマー部位を選択した後、それらの部位をBLASTで検索して*S. aureus*に対する特異性を検討し、Oligo 6プライマー分析ソフトウェアを用いてプライマーの二量体形成の確率と、CPE遺伝子内の別の位置での間違っただけのプライマー部位の確率を調べた。

【0083】

20

*S. aureus*内のCPE遺伝子の相同性は、20通りの独自の*S. aureus*単離体からのCPE遺伝子のシーケンシングと、公開されている配列データベースのBLAST検索によって確認した。各プライマーセットの排他性(exclusivity)は、他のスタフィロコッカス属(*S. capitis*、*S. haemolyticus*、*S. ludgunensis*、*S. carnosus*、*S. saprophyticus*、*S. scirui*)を用いた増幅によって確認した。

【0084】

*S. aureus*内のCPE遺伝子cap5Nは、長さが約880塩基対であり、*S. aureus*内での独自の存在と高い相同性を理由として、この生物に対する特異性と排他性に関して理想的な標的である。可能なPCRアンプリコンをいくつか設計し、この遺伝子内での最適な性能に関して試験したところ、以下の4つのオリゴセットの選択肢が、最大の産物(ゲル電気泳動によって観察)と、TaqMan(登録商標)分析によって観察された最大の蛍光と最も早い屈曲値を示した。

30

【0085】

【化1】

CPEオリゴセット#1

上流プライマー：ACACCAATGAACCCTACGACI (J=t-ブチルベンジルdC) (配列番号2)下流プライマー：TAATTGATCAATAAATGCTGTCAGI (J=t-ブチルベンジルdA) (配列番号3)プローブ：ETTGCCCOAGGAAATTTCCAACGGTTP (E=thFAM, Q=BHQ2, P=3'リン酸) (配列番号4)

10

オリゴセット#1から生じたアンプリコン：

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAACAAG
CATTACAAGAATTGATTAGTGATTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGACCACCAAT
GATTTATGGTGCACATTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATGCAATTGTCAAAG
CGATTGCCAATCATTCCCAATATTAACAATCAGCGCAGTGCATTATATATTAAC
ATCTGACAGCATTATTGATCAATTA (配列番号5)

20

CPEオリゴセット#2:

上流プライマー：ACACCAATGAACCCTACGACI (J=t-ブチルベンジルdC) (配列番号2)下流プライマー：GATCAATAAATGCTGTCAGATGTTAI (J=t-ブチルベンジルdA) (配列番号6)プローブ：ETTGCCCOAGGAAATTTCCAACGGTTP (E=thFAM, Q=BHQ2, P=3'リン酸) (配列番号4)

30

オリゴセット#2から生じたアンプリコン：

ACACCAATGAACCCTACGACCAACTATGGTATTTCCAAAAAGTTCGCTGAACAAG
CATTACAAGAATTGATTAGTGATTCGTTTAAAGTAGCAATTGTGAGACCACCAAT
GATTTATGGTGCACATTGCCCAGGAAATTTCCAACGGTTAATGCAATTGTCAAAG
CGATTGCCAATCATTCCCAATATTAACAATCAGCGCAGTGCATTATATATTAAC
ATCTGACAGCATTATTGATC (配列番号7)

【0086】

40

【化2】

CPEオリゴセット#3:

上流プライマー: GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAI (J=t-ブチルベンジルdA) (配列番号8)

下流プライマー: CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACI (J=t-ブチルベンジルdC) (配列番号9)

プローブ: EITAGGAQATCAATTATGGAAGTCGACCTCGTP (E=thFAM, Q=BHQ2, P=3'リン酸) (配列番号10)

10

オリゴセット#3から生じたアンプリコン:

GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAATCAAT
TATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTTAATTCATACAGCAGCTTT
GGTTCACAACAATTCACCTCAAG (配列番号11)

CPEオリゴセット#4:

20

上流プライマー: AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATI (J=t-ブチルベンジルdC) (配列番号12)

下流プライマー: CTTGAGGTGAATTGTTGTGAACI (J=t-ブチルベンジルdC) (配列番号9)

プローブ: EITAGGAQATCAATTATGGAAGTCGACCTCGTP (E=thFAM, Q=BHQ2, P=3'リン酸) (配列番号10)

オリゴセット#4から生じたアンプリコン:

AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAATC
AATTATGGAAGTCGACCTCGTTCAAAGATTATGATGTTTTAATTCATACAGCAGC
TTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG (配列番号13)

30

【0087】

PCRの条件: 25 μ lの*S. aureus*のゲノムDNAを、30mMのトリス (pH 8.5) と、18 μ lのマスター混合物 (154mMのトリシン、110mMの水酸化カリウム、190mMの酢酸カリウム、19%のグリセロール (v/v)、2.3%のDMSO、1.16mMのdATP、1.16mMのdCTP、1.16mMのdGTP、1.16mMのdUTP、1.0 μ Mのアッセイ用上流プライマー、1.0 μ Mのアッセイ用下流プライマー、0.185 μ Mのプローブ、308U/mlのZ05 DNAポリメラーゼ、150U/mlのUNG、0.09%のナトリウムアジド (w/v) (pH 8.5)) と、7 μ lの活性化混合物 (50mMの塩化マグネシウム) に希釈したもの。

40

【0088】

PCR装置: Cobas (登録商標) z480フィルタ装置を備えるLightCycler (登録商標) 480

【0089】

実施例2

CPEオリゴの性能評価法

【0090】

図3A~図3Dからわかるように、培養した12種類の独自の*S. aureus*からのゲノムDNAを評

50

価することにより、CPEオリゴセット#1～#4を評価した。各*S. aureus*からのゲノムDNAを30mMのトリス（pH 8.5）に希釈して約 10^5 c/PCRにした後、あらかじめ調製しておいたマスター混合物18 μ lと活性化試薬7 μ lにゲノムDNAを25 μ l添加した。あらかじめ調製しておいたマスター混合物は、以下の成分を以下の濃度で含んでいた：154mMのトリシン、110mMの水酸化カリウム、190mMの酢酸カリウム、19%のグリセロール（v/v）、2.3%のDMSO、1.16mMのdATP、1.16mMのdCTP、1.16mMのdGTP、1.16mMのdUTP、1.0 μ Mのアッセイ用上流プライマー、1.0 μ Mのアッセイ用下流プライマー、0.185 μ Mのプロープ、308U/mlのZO5 DNAポリメラーゼ、150U/mlのUNG、0.09%のナトリウムアジド（w/v）（pH 8.5）。活性化試薬は、50mMの塩化マグネシウムを含んでいた。

【0091】

実施例3

排他性評価法

【0092】

30mMのトリス（pH 8.5）の中で約 10^6 c/ μ lに希釈した1 μ lのスタフィロコッカス属のゲノムDNAを、再構成したマスター混合物50 μ lと組み合わせることによってCPEオリゴセット#4の排他性を評価した。再構成したマスター混合物は、30mMのトリス（pH 8.5）25 μ l中のゲノムDNAと、あらかじめ調製しておいたマスター混合物18 μ lと、活性化試薬7 μ lで構成されていた（全体積50 μ l）。あらかじめ調製しておいたマスター混合物は、以下の成分を以下の濃度で含んでいた：154mMのトリシン、110mMの水酸化カリウム、190mMの酢酸カリウム、19%のグリセロール（v/v）、2.3%のDMSO、1.16mMのdATP、1.16mMのdCTP、1.16mMのdGTP、1.16mMのdUTP、1.0 μ Mのアッセイ用上流プライマー、1.0 μ Mのアッセイ用下流プライマー、6.0 μ Mの他のアッセイ用プライマー（非CPE標的）、0.185 μ MのCPE標的プロープ、1.0 μ Mの他のアッセイ用プロープ（非CPE標的）、308U/mlのZO5 DNAポリメラーゼ、150U/mlのUNG、0.09%のナトリウムアジド（w/v）（pH 8.5）。活性化試薬は、50mMの塩化マグネシウムを含んでいた。

【0093】

10

20

【表 3】

GPE オリゴセット#4			GPE オリゴセット#4 (cont.)		
生物	ID	Ct's	生物	ID	Ct's
<i>S. capitis</i>	1194	-1	<i>S. haemolyticus</i>	6760	-1
<i>S. capitis</i>	3104	-1	<i>S. haemolyticus</i>	6762	-1
<i>S. capitis</i>	5662	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10734	-1
<i>S. capitis</i>	10728	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10735	-1
<i>S. capitis</i>	10729	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10736	-1
<i>S. capitis</i>	10730	-1	<i>S. haemolyticus</i>	10737	-1
<i>S. capitis</i>	10731	-1	<i>S. haemolyticus</i>	1207	-1
<i>S. capitis</i>	10732	-1	生物	ID	Ct's
<i>S. capitis</i>	10733	-1	<i>S. ludgunensis</i>	5743	-1
生物	ID	Ct's	<i>S. ludgunensis</i>	7039	-1
<i>S. saprophyticus</i>	10738	-1	<i>S. ludgunensis</i>	10739	-1
<i>S. saprophyticus</i>	10740	-1	生物	ID	Ct's
生物	ID	Ct's	<i>S. hominis</i>	3106	-1
<i>S. sciuri</i>	323	-1	<i>S. hominis</i>	5651	-1
<i>S. sciuri</i>	10741	-1	<i>S. hominis</i>	10742	-1
生物	ID	Ct's	<i>S. hominis</i>	10743	-1
<i>S. aureus</i> (ctrl)	10710	29.42	<i>S. hominis</i>	10744	-1
<i>S. aureus</i> (ctrl)	10714	28.54	<i>S. hominis</i>	10745	-1
			生物	ID	Ct's
			<i>S. epidermidis</i>	5657	-1

10

20

30

【 0 0 9 4 】

上記の本発明を明確にし、かつ理解できるようにするため、いくらか詳細に説明してきたが、この開示内容を読めば、形態と詳細に対してさまざまな変更が可能であることは当業者にとって明らかであろう。例えば上に記載したあらゆる技術と装置は、さまざまに組み合わせて使用できる。

【 図 1 】

```

atgagaaaa atatttaac tacaggcgtc catggatata tcggaatgc tttaaaagat 60
aagcttattg aacaaggaca tcaagtagat caaattaatg ttaggatca atattggaag 120
tcgacctcgt tcaagatta tgatgttita attcacacag cagctttggt tcacaacaat 180
tcacctcaag caaggctatc tgattatag caagtgaata tgttgctgac gaaacaattg 240
gcacaaaagg ctaaagctga agacgttaaa caatttatt ttatgagtac tatggcagtt 300
tatggaaaag aaggctatg ttgtaaatca gatcaagtgc atacacaac accaatgaac 360
cctacgacca actatggtat ttccaaaag ttgctgtaac aagcattaca agaattgatt 420
atgattcgt ttaaagtgc aattgtgaga ccaccaatga tttatggtgc acattgccca 480
ggaaattcc aacggtlaa tcaattgca aagcgattgc caatcattcc caatattaac 540
aatcagcgca gtgcattata tattaacaac ctgacagcat ttattgatca attaatatca 600
ttagaagtga caggtgtgta ccaatctcaa gatagttitt actttgatc atcgtcagta 660
atgtatgaaa tacgtgccca atcacatcgt aaaacgggat tgatcaaac gccttcaatg 720
ctaaataagt atttaataa gttgtcggtc tttagaaaat tattcgcaa tttaataac 780
agcaatacgt tatatgaaa taataatgca ctggaatta ttctggaaa aatgtcaact 840
gttattgagg acatcatgga tgaacgaca ccaaaagata aggcataa 888
(配列番号1)

```

FIGURE 1

【 図 2 A 】

```

ACACCAATGAACCCCTACGACCAACTATGGTATTTCAAAAAGTTCGCTGAA
CAAGCATTACAAGAATTGATTAGTGATTTCGTTAAAGTAGCAATTGTGAGA
CCACCAATGATTTATGGTGACATTCGCCAGGAAAATTCGAACGGTTAATG
CAATTGTCAAAGCGATTGCCAATCATTCCCAATTTAACAAATCAGCGCAGT
GCATTATATATTAACAATCTGACAGCATTATTGATCAATTA (配列番号5)

```

FIGURE 2A

【 図 3 A 】

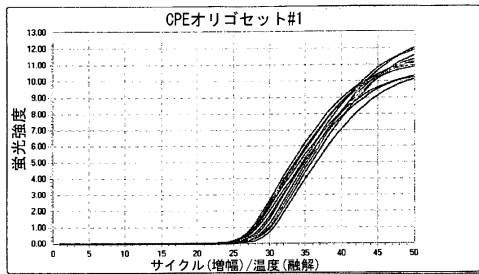


FIGURE 3A

【 図 3 B 】

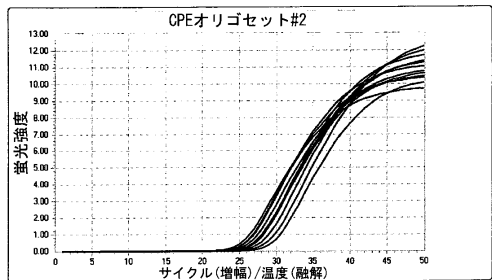


FIGURE 3B

【 図 2 B 】

```

ACACCAATGAACCCCTACGACCAACTATGGTATTTCAAAAAGTTCGCTGAA
CAAGCATTACAAGAATTGATTAGTGATTTCGTTAAAGTAGCAATTGTGAGA
CCACCAATGATTTATGGTGACATTCGCCAGGAAAATTCGAACGGTTAATG
CAATTGTCAAAGCGATTGCCAATCATTCCCAATTTAACAAATCAGCGCAGT
GCATTATATATTAACAATCTGACAGCATTATTGATCAATTA (配列番号7)

```

FIGURE 2B

【 図 2 C 】

```

GATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGAAT
CAATTAATGGAAGTGGACCTTCGGTCAAAGATTATGATGTTTAAATTCATACAG
CAGCTTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG (配列番号11)

```

FIGURE 2C

【 図 2 D 】

```

AAGATAAGCTTATTGAACAAGGACATCAAGTAGATCAAATTAATGTTAGGA
ATGAATTAATGGAAGTGGACCTTCGGTCAAAGATTATGATGTTTAAATTCATAC
AGCAGCTTTGGTTCACAACAATTCACCTCAAG (配列番号13)

```

FIGURE 2D

【 図 3 C 】

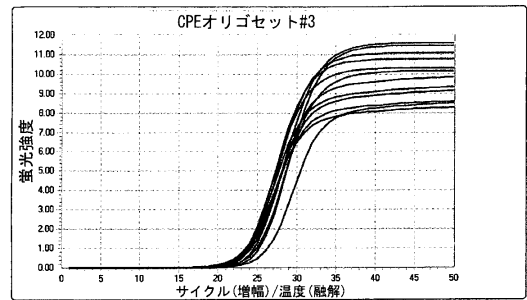


FIGURE 3C

【 図 3 D 】

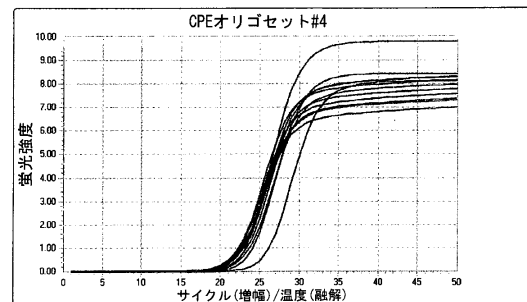


FIGURE 3D

【配列表】

0006117775000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100164563
弁理士 佐々木 貴英
- (72)発明者 ジェニー エー . ジョンソン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94546, カストロ バレー, ドー アベニュー 21105

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0055130 (US, A1)
国際公開第2005/108579 (WO, A1)
特表2002-514439 (JP, A)
特開平10-279593 (JP, A)
Clinical Microbiology reviews, 2004年, Vol.17, p.218-234

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
C12Q 1/68
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY (STN)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)