

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4447459号
(P4447459)

(45) 発行日 平成22年4月7日 (2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日 (2010.1.29)

(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

請求項の数 11 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2004-542300 (P2004-542300)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月8日 (2003.8.8)
 (65) 公表番号 特表2005-538737 (P2005-538737A)
 (43) 公表日 平成17年12月22日 (2005.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/008825
 (87) 国際公開番号 W02004/033683
 (87) 国際公開日 平成16年4月22日 (2004.4.22)
 審査請求日 平成18年8月2日 (2006.8.2)
 (31) 優先権主張番号 02020904.5
 (32) 優先日 平成14年9月18日 (2002.9.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 502412190
 ジルスーラブ ゲーエムベーハー
 S I R S - L a b G m b H
 ドイツ連邦共和国 D - O 7 7 4 5 イエ
 ナ ヴィンツェルラーエル ストラーセ
 2 a
 W i n z e r l a e r S t r a s s e
 2 a D - O 7 7 4 5 J e n a G e r
 m a n y
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 原核生物DNAを分離する方法、体液を精製する方法および原核生物DNAを検出する方法、ならびに原核生物DNAを検出するための試験キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の体液中に存在する原核生物DNAを分離する方法であって、

a) 溶液中の少なくとも1種の原核生物DNAをTLR9と接触させることにより、TLR9と原核生物DNAとの複合体を形成させる工程と、

b) 前記複合体を分離する工程と

からなる方法。

【請求項 2】

前記複合体を分離する工程の次に、原核生物DNAとTLR9とを分離する工程を備える請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

TLR9は担体に結合される請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

TLR9は担体に直接結合される請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

TLR9は、TLR9に対する抗体を介して担体に結合される請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

担体がマトリクスとして、微粒子として、または膜として提供される請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記複合体を分離する工程は T L R 9 に対する抗体または抗血清を用いて実施される請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記複合体を分離する工程は電気泳動によって実施される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

原核生物 D N A を除去するために体液を精製する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法により原核生物 D N A を体外で無菌条件下において分離する工程からなる方法。

【請求項 10】

原核生物 D N A を検出する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法により原核生物 D N A を分離する工程と

b) 工程 a) の後で原核生物 D N A を増幅する工程と
からなる方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法を用いて原核生物 D N A を検出するための試験キットであって、配列番号 1 および配列番号 2 で表される 1 組のプライマー、および、配列番号 3 および配列番号 4 で表される 1 組のプライマーの少なくとも一方と、T L R 9 とを含む試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、原核生物の D N A を分離する方法、体液を精製する方法および原核生物 D N A を検出する方法ならびに原核生物 D N A を検出するための試験キットに関する。

【背景技術】

【0002】

細菌感染は、最も高頻度に炎症性疾患を引き起こす原因の 1 つである。臨床経過を予測するとともに、特に適切な治療手段を適時に選択するために、早期に病原性細菌を検出することが決定的に重要である。

【0003】

病原性細菌の検出においては、とりわけ、様々な細胞培養方法が用いられる。しかしながら、最近では、病原体に特異的な核酸の検出に基づく分子生物学的な方法の重要性が高まっている。この方法の特異性の高さに加えて、従来の方法をしのぐ根本的な利点として、所要時間が短いことに留意すべきである。とはいえ、体液から、また前処理していない試験材料から直接原核生物の D N A を検出する場合の感度は、これまで、微生物培養法に比べるとあまりにも低かった。それでも、前処理していない試験材料から直接病原性細菌を検出するのに十分な細菌の核酸の量は、16S m R N A 分子の範囲に達している。だがこのためには、検出すべき細菌が代謝している状態で存在し、かつ十分な 16S m R N A を発現している必要がある。

【0004】

上記のことは、特に抗生物質治療を受けている患者には通常当てはまらない。さらに、細菌由来のある種の病原性因子は、対応する遺伝子が細菌ゲノム中に存在するとはいえ、常時発現されているわけではない。従って、細菌の病原性因子および耐性を染色体レベルで検出することは、感染性疾患の状態を診断するために不可欠である。

【0005】

染色体レベルの場合、病原性細菌と共生細菌を識別することもできるので、前記の検出は一層好都合である。

病原体特異的な核酸の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) またはリガーゼ連鎖反応 (L C R) をそれぞれ用いて原核生物の D N A を増幅することにより行われることが非常に多い。特異性が高く迅速に結果が得られるのとは対照的に、混入物あるいは臨床試料

10

20

30

40

50

中の強力な阻害要因の影響を受けやすい。

【 0 0 0 6 】

従来の P C R 検出法では、血液中の病原体を首尾よく検出するためには少なくとも 1 ~ 5 m l の血液から全 D N A を単離する必要がある。しかしながら、その後 P C R 反応に直接使用するには全 D N A 濃度が高すぎる。

【 0 0 0 7 】

敗血症の病原体を検出するための血液培養物については状況が異なる。この場合、検出の下限は細菌 1 0 個 / m l よりも低い。この検出限界は、現時点では、その標的配列が 1 6 S R N A 領域中にあるので前記標的配列の発現に左右される P C R 法によってのみ達成される。P C R 法の標的配列が微生物の染色体中にある場合は、より信頼性の高い診断が期待できる。種々の遺伝子の発現の挙動は、殊に進行中の抗生物質治療の影響下では、たとえ使用された抗生物質が結局有効でないとしても、大幅に変化または制限される可能性がある。そのような状況は、ほとんどの患者が抗生物質治療を受けるので血液培養物その他の試料から関連細菌が全く増殖できない、集中治療病棟において特によくみられる。

【 0 0 0 8 】

感度が不十分なので、原核生物の D N A を直接検出すること（プローブ技法、F I S H 法）により増幅工程なしで病原体特異的な核酸を検出する方法は、試験材料中の病原菌の数が十分多い場合にのみ診断上重要である。

【 0 0 0 9 】

体液中の病原性細菌を同定するために原核生物の D N A を検出する際の根本的な問題点は、試験材料中の P C R 阻害成分に加えて、主に、原核生物の D N A に対して真核生物の D N A が過剰であるということにある。この点に関しては、D N A 分析における競合のプロセスならびに原核生物の D N A 量が少ないことが、病原体を定性的かつ定量的に検出するのを妨げているとみなすことができる。

【 0 0 1 0 】

通常の D N A 単離法では、体液の全 D N A が濃縮されて宿主 D N A と微生物 D N A の比率が $1 : 10^{-6} \sim 1 : 10^{-8}$ となりうる。この差が体液中の微生物 D N A を極めて明確に検出するのを困難にしている。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

したがって、本発明の目的は、病原体を迅速かつ容易に検出することにより病原性細菌による感染症の早期診断を可能にする、感染症患者由来の真核生物 D N A 含量の高い試験試料中の微生物 D N A を単離および / または濃縮する方法を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、上記目的は

a) 溶液中の少なくとも 1 種の原核生物 D N A を、原核生物 D N A に特異的に結合可能な少なくとも 1 種のタンパク質またはポリペプチドと接触させることにより、タンパク質またはポリペプチドと D N A との複合体を形成させる工程と

b) 前記複合体を分離する工程と

を含む、原核生物の D N A を濃縮する方法によって達成される。

好ましくは、上記目的は

哺乳動物の体液中に存在する原核生物 D N A を分離する方法であって、

a) 溶液中の少なくとも 1 種の原核生物 D N A を、T L R 9 と接触させることにより、T L R 9 と原核生物 D N A との複合体を形成させる工程と、

b) 前記複合体を分離する工程と

からなる方法によって達成される。

【 0 0 1 3 】

この場合、原核生物 D N A という用語は、ウイルス D N A および細菌 D N A のいずれに

も関する。DNAは、精製して再溶解したものでよいし、元の供給源（例えば、血液や血清などの体液）中にそのまま存在していてもよい。

【0014】

分離工程は、当業者によく知られた、DNAタンパク質複合体またはDNAポリペプチド複合体を単離または濃縮する種々の方法を用いて実施すればよい。分離の際には、試料溶液中のDNAを濃縮するためにDNA結合タンパク質を担体マトリクスに固定化する方法を用いることが好ましいであろう。

【0015】

好適な実施形態では、分離工程の次に、DNAとタンパク質/ポリペプチドとを分離する工程がある。この工程は、例えば当業者に知られた従来のDNA精製法により実施可能である。最も簡単な例では、培地/緩衝液のpH値もしくは塩濃度の変化（例えば1M NaClまで）、またはカオトロピック剤の添加など（すなわちタンパク質-DNA複合体の分離をもたらす適切なパラメータ）に基づいて分離する。そのような方法は当業者には周知である。

【0016】

さらに好適な実施形態では、タンパク質またはポリペプチドを担体に結合させる。この実施形態は原核生物のDNAを濃縮する特に簡単な方法である。というのも、例えばタンパク質またはポリペプチドが結合した担体を溶液中から（遠心分離などで）物理的に分離することにより、特に簡単に溶液から分離がなされるからである。

【0017】

原核生物DNAの溶液としては、基本的には任意の適当な溶媒が適している。しかしながら、本発明の方法は様々な生体分子種（特に様々な種類のDNA）を含む溶液から原核生物のDNAを濃縮するのに特に有用である。本発明は、好ましくは原核生物もしくはウイルスのDNAの混合物から、原核生物もしくはウイルスのDNAおよび真核生物DNAを分離かつ濃縮する方法に関する。分離かつ濃縮する際には、例えば、体液中に存在する原核生物DNAを、タンパク質またはポリペプチドに特異的に結合させて真核生物DNAから分離し、濃縮する。こうして濃縮された原核生物DNAを用いれば、分子生物学的手法の力を借りて容易に病原性原核生物を検出可能であり、病原体による疾患の診断にも貢献しうる。

【0018】

とりわけ、DNA結合タンパク質またはポリペプチドが担体の表面に固定化される実施形態は、体液（好ましくは血液）由来の原核生物DNAを吸着させるのに適している。さらに、この手法は、血液その他の体液中に存在する微生物DNA、または前記体液に由来する微生物DNAの除去も可能にする。それ自体も患者体内で重篤な炎症反応を誘発する微生物DNAを、この方法で取り除いた体液（例えば、全血、血清または分泌液）を、次いで体内に戻すことも可能である。

【0019】

本発明の意味における体液とは、その中に疾患の病原体が存在しうる、ヒトを含む哺乳類の体に由来する全ての液体であると理解すべきであり、例えば血液、尿、分泌液、胸膜液、心嚢液、腹水ならびに滑液などである。本発明のヒト血液に関する記載は、限定的なものではなく、単に典型的な応用例として解釈すべきである。

【0020】

本発明の意味におけるタンパク質またはポリペプチドとは、原核生物のDNAに特異的に結合可能な全ての真核生物タンパク質および原核生物タンパク質であると理解すべきである。非メチル化CpGモチーフに特異的に結合可能なタンパク質またはポリペプチドは、この目的に特に適している。

【0021】

病原性細菌とは敗血症の病原体であると理解するのが好ましいが、任意の他の感染症の病原性細菌であるとも考えられる。病原性細菌は、患者由来の試料中に見出されることはあるが何ら重大な病原性を持たない共生病原体と区別することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

感染した体液から全DNAを単離する際、宿主DNAと病原体DNAとの比率は多くの場合 $1 : 10^{-6} \sim 1 : 10^{-8}$ およびそれより低いであろう。原核生物のDNAに特異的に結合するという選択的な性質を有するタンパク質またはポリペプチドに、原核生物DNAを結合させることにより、本発明の方法は 10^3 以上の濃縮を可能にする。

【 0 0 2 3 】

タンパク質またはポリペプチドを、担体に直接結合しても間接的に結合してもよい。結合の種類は担体および担体材料によって変わる。適切な担体には、特に、膜、微粒子、および樹脂、あるいは親和性マトリクス用の類似の材料が挙げられる。タンパク質またはポリペプチドに結合するための好適な材料、ならびに（材料の種類によって異なるが）そのような結合を実施するための好適な材料は当業者によく知られている。間接的に結合させるためには、タンパク質またはポリペプチドに対する特異抗体が適しており、次いでこの抗体を既知の方法で担体に結合させる。

【 0 0 2 4 】

本発明の方法の1つの応用例は、原核生物DNAを濃縮することにある。さらなる応用例は、マトリクスに固定化済みの特異的タンパク質またはポリペプチドに原核生物DNAを結合させることによって、真核生物DNAおよび原核生物DNAの混合物から原核生物DNAを分離することにある。生体自身のDNAと原核生物DNAとの混合物を、適切な方法を用いて親和性マトリクスに接触させると、原核生物DNAは固定化されたタンパク質に結合し、真核生物DNAは、例えば分離用カラムを通過して別々に回収することができる。親和性マトリクスは、例えば、高分子多糖（アガロースなど）、その他の生体高分子、合成高分子、あるいはケイ酸骨格を有する担体（多孔質ガラスなど）または他の固体担体もしくは可撓性担体などでよく、そこにDNA結合タンパク質またはポリペプチドが固定化される。真核生物DNAから原核生物DNAを分離した後、親和性マトリクスを適切な試薬ですぐと、原核生物DNAが結合している結合タンパク質がマトリクスから分離され、および/または原核生物DNAが結合タンパク質から分離され、さらなる処理工程に利用可能な十分量の原核生物DNAが得られる。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法のさらなる応用例は、微粒子に固定化済みの特異的タンパク質に原核生物DNAを結合させることによって、真核生物DNAから原核生物DNAを分離および濃縮することにある。このことに関しては、DNA結合タンパク質またはポリペプチドを固定化可能な全ての微粒子が好適である。そのような微粒子は、ラテックス、プラスチック（例えば、発泡スチレン、ポリマーなど）、金属、または強磁性体から構成されていてもよい。さらに、例えばルミネクス社（Luminex company）より入手可能な蛍光微粒子などの蛍光微粒子を使用してもよい。微粒子上に固定化させたタンパク質に原核生物DNAを結合させた後、適切な方法（ろ過、遠心分離、沈殿、蛍光強度の測定による選別処理、または磁気を用いる方法など）を用いて前記微粒子を物質の混合物から分離する。該微粒子から分離した後は、原核生物DNAはさらなる処理に利用可能である。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法の別の応用例は、特異的タンパク質またはポリペプチドに原核生物DNAを結合させ、続いて該タンパク質またはポリペプチドを電気泳動により混合物の他の成分から分離することにより、真核生物DNAから原核生物DNAを分離および濃縮することにある。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法のさらなる応用例は、タンパク質またはポリペプチドに原核生物DNAを結合させることによって、真核生物DNAから原核生物DNAを分離および濃縮することにある。前記タンパク質を続いて対応する抗体に結合させる。該抗体を、固体基材または可撓性基材（例えばガラス、プラスチック、シリコン、微粒子、膜など）に結合させてもよいし、溶液中に存在させてもよい。原核生物DNAをタンパク質またはポリペプチドに結合させ、同タンパク質またはポリペプチドを特異抗体に結合させた後、当業者に周知

10

20

30

40

50

の方法を用いて物質の混合物からの分離を実施する。

【 0 0 2 8 】

タンパク質またはポリペプチドとしては、例えば非メチル化 C p G モチーフを備えた原核生物 D N A に結合する任意のタンパク質またはポリペプチドが特に適している。この目的には、原核生物 D N A に対する特異的な抗体または抗血清が適している。抗体または抗血清の調製と単離については当業者には周知である。

【 0 0 2 9 】

原核生物 D N A は、例えば非メチル化 C p G モチーフが存在するという点で真核生物 D N A とは異なっている。したがって、非メチル化 C p G モチーフを特異的に認識して結合するタンパク質 / ポリペプチドが好都合なタンパク質である。都合のよいことに、該タンパク質 / ポリペプチドには特異的な抗体または対応する抗血清も含まれる。一層好適な実施形態によれば、タンパク質またはポリペプチドは、T L R 9 遺伝子または C G B P 遺伝子によりコードされるタンパク質またはポリペプチドである。

【 0 0 3 0 】

本発明のこの実施形態は、真核生物 D N A と原核生物 D N A とが C p G モチーフの含有量という点で異なっているという知見に基づいている。原核生物 D N A には、シトシン グアノシン ジヌクレオチド (C p G モチーフ) が真核生物 D N A の 2 0 倍過剰量存在している。このモチーフは、原核生物 D N A ではメチル化されていないが、真核生物 D N A 中の大部分ではメチル化されている。非メチル化 C p G モチーフとは、原核生物ゲノム内またはその断片内の、メチル化されていないデオキシシチジル酸 デオキシグアニル酸 ジヌクレオチドである。

【 0 0 3 1 】

第 2 に、この本発明の好適な実施形態は、D N A の非メチル化 C p G モチーフに特異的に結合するタンパク質またはポリペプチドが存在するという知見に基づいている。これらのタンパク質 / ポリペプチドの結合特性を、本発明に従って、一方では原核生物 D N A への結合のために使用し、他方では主に真核生物 D N A を含む試料から原核生物 D N A を濃縮するために使用する。

【 0 0 3 2 】

真核生物 D N A 中のメチル化 C p G モチーフの存在を利用する、c D N A を単離するための応用については、クロス (Cross) ら、ネイチャー・ジェネティクス誌 (Nature Genetics)、第 6 巻、p . 2 3 6 2 4 4、1 9 9 4 年に記載されている。相当する C p G モチーフを備えた 1 本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチド (O D N) を免疫活性化に適用することについては、いくつか報告がある (ヘッカー (Haecker) ら、イムノロジー誌 (Immunology)、第 1 0 5 巻、p . 2 4 5 2 5 1、2 0 0 2 年、米国特許第 6 , 2 3 9 , 1 1 6 号)。原核生物の C p G モチーフを認識する分子としては、今のところ 2 つの受容体タンパク質が同定されている。トル様 (Toll-like) 受容体 9 は、国際公開第 0 2 / 0 6 4 8 2 号パンフレットにより、非メチル化 C p G モチーフを認識する分子として伝えられている。ブー (Voo) ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー誌 (Molecular and Cellular Biology)、p . 2 1 0 8 2 1 2 1、2 0 0 0 年には、原核生物の非メチル化 C p G モチーフを検出するための認識分子として分析手法において使用される別の受容体タンパク質、すなわちヒト C p G 結合タンパク質 (h C G B P) が記載されている。いずれの文献においても、C p G 結合タンパク質は原核生物 D N A を単離または濃縮する目的には使用されていない。

【 0 0 3 3 】

G e n B a n k アクセス番号 N M 0 1 4 5 9 3 (version N M 0 1 4 5 9 3 1, G I : 7 6 5 6 9 7 4 ; N C B I データベース) の配列に少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、特に好ましくは少なくとも 9 5 % 相同な配列を有する c D N A によってコードされるタンパク質またはポリペプチドが、特に好適である。これらは、C G B P に相当するかまたは C G B P に由来し、C p G モチーフを特異的に認識して結合するタンパク質またはポリペプチドである。

【 0 0 3 4 】

さらに好適な実施形態によれば、該タンパク質またはポリペプチドは、GenBank アクセス番号 AB045180 (TLR9 遺伝子のコード配列; NCBI データベース、version AB045180.1, GI:11761320) の配列またはその断片に少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90% 相同な配列を有する cDNA、好ましくは異型転写産物 A (GenBank アクセス番号 NM 138688、version NM-017442.1, GI:20302169; NCBI データベース) または異型転写産物 B (GenBank アクセス番号 NM 017442、version NM-138688.1, GI:20302170; NCBI データベース) に少なくとも 80%、特に好ましくは 90% 相同な配列を有する cDNA によってコードされる。

【 0 0 3 5 】

10

さらに、本発明は、原核生物 DNA を除去するために体液を精製する方法に関する。これに関しては、体液中に含まれる原核生物 DNA を除去することによって、感染の排除における生体自身の免疫系を補助するために、前記体液を再度体内へ戻せるように分離を体外で無菌条件下に実施する。

【 0 0 3 6 】

体外で体液から原核生物 DNA を除去するために、任意の好適な化学的、機械的、または電気化学的処理法が考えられる。さらに、他の体外的治療法、例えば血液灌流、人工心肺装置、またはエンドトキシン吸着などとの組合せは、さらに好都合な応用である。以上列挙したのは、方法の限定を意味するものではない。

【 0 0 3 7 】

20

特に好適な実施形態によれば、本発明は、原核生物 DNA を検出する方法に関する。この場合、原核生物 DNA を濃縮した後に前記原核生物 DNA を増幅する工程を実施するが、この工程には、あらゆる一般的な増幅法が適用可能である (PCR、LCR、LM-PCR など)。

【 0 0 3 8 】

さらに、本発明は、上述の方法のうちの 1 つを用いて原核生物 DNA を濃縮するためのキットに関し、該キットは、少なくともタンパク質 / ポリペプチド、好ましくは前記方法を実施するために好適な試薬をさらに含んでいる。

【 0 0 3 9 】

好適な実施形態によれば、前記キットは、タンパク質 / ポリペプチドに加えて、標準的な条件下である種の原核生物のゲノム DNA を増幅するのに好適な少なくとも 1 組のプライマーを含む。

30

【 0 0 4 0 】

本発明は、CpG モチーフ中に豊富な非メチル化状態の原核生物 DNA を、そのような構造に対する特異的親和性を備えたタンパク質と特異的に結合させることによって、感染状態にある宿主の全 DNA から原核生物 DNA を首尾よく濃縮し、ひいては体液中の病原体 DNA の検出感度を強力に高めるという利点を有する。

【 0 0 4 1 】

特異的に結合するタンパク質を用いて真核生物 DNA から原核生物 DNA を分離することから見込まれるのは、時間がかからないということでは既知の全 DNA 単離法と同じである。しかしながら、以降の検出は PCR 反応だけで実施可能である。ネステッド PCR は多くの場合必要ないと考えられ、このことは診断においてかなりの時間の節約を可能にする。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 4 2 】

本発明について、実施例を用いて以下に一層詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されない。

【 実施例 1 】

【 0 0 4 3 】

(従来 の 検 出 法)

50

病原体として 1.03×10^3 cfu/ml の化膿連鎖球菌（ストレプトコッカス・ピオゲネス）を含むヘパリン処理した新鮮なヒト血液を、病原体の検出用に使用する。体液からの全 DNA 単離用市販キットを用い、製造業者の修正版説明書に従って、DNA 結合マトリクスに吸着させることにより、DNA を単離する。この目的には、プロテイナーゼ K および SDS を含む完全溶解バッファ $200 \mu\text{l}$ を、エッペンドルフチューブに入れた感染血液 $100 \mu\text{l}$ に加える。混合物を 37°C で 30 分間インキュベートし、次いで 95°C で 20 分間加熱する。冷却後、 $20 \mu\text{g}$ のミュータノリシン（Mutanolysin）を添加して 37°C でさらに 60 分間インキュベートする。遠心分離した後、DNA 結合マトリクスを用いる遠心分離用カラムに上清を装入し、製造業者の説明書に従って DNA を精製する。精製した DNA を、 0.01 M トリスバッファ、 $\text{pH } 7.5$ に溶解して最終容量 $100 \mu\text{l}$ とするか、または製造業者の溶出バッファに溶解して同じ容量とする。病原体の検出用に、ストレプトリシンの遺伝子（slo）を特定するためのプライマーを選択する。

10

【0044】

1. PCR（465 bp 断片の増幅）

順方向プライマー 1：5' AGCATACAAAGCAAATTTTTCACACCG
(配列番号 1)

逆方向プライマー 2：5' GTTCTGTTATTGACACCCGCAATT (配列番号 2)

プライマー濃度 1 mg/ml

開始材料： $5 \mu\text{l}$ 単離 DNA

$0.5 \mu\text{l}$ プライマー fw 1

$0.5 \mu\text{l}$ プライマー rv 2

$14 \mu\text{l}$ 蒸留水

Ready-To-Go（商標）キット（アマシャム・バイオサイエンス（Amersham-Biosciences））に含めて総量 $25 \mu\text{l}$

反応：

1 x 95°C で 5 分

40 サイクル 1 サイクルあたり 95°C で 30 秒、 51°C で 30 秒、 72°C で 3 分

1 x 72°C で 7 分。

20

30

【0045】

ヒト血液中のストレプトコッカス DNA の PCR の結果を図 1 に示す。開始材料 $25 \mu\text{l}$ 中 $10 \mu\text{l}$ を分離した。1) $5 \mu\text{l}$ のテンプレート DNA を含む開始材料；2) $5 \mu\text{l}$ のテンプレート DNA（1：10 に希釈）を含む開始材料；3) 陽性対照：血液由来の真核生物 DNA を含まない状態で、テンプレートとして $0.2 \mu\text{l}$ のストレプトコッカス DNA を含む；ST）分子量標準品。

【0046】

結果：最初の PCR では可視量の PCR 産物は得られない。従って、2. PCR（ネステッド PCR）を以下のように実施した。

2. PCR（ネステッド）：上述の slo 断片に含まれる 348 bp 断片の増幅

順方向プライマー 3：5' CCTTCCTAATAATCCTGCGGATGT 3'
(配列番号 3)

逆方向プライマー 4：5' CTGAAGGTAGCATTAGTCTTTGATAACG 3' (配列番号 4)

プライマー濃度 1 mg/ml

開始材料：PCR 1 の試料 1（図 1）から $5 \mu\text{l}$

$0.5 \mu\text{l}$ プライマー fw 1

$0.5 \mu\text{l}$ プライマー rv 2

$14 \mu\text{l}$ 蒸留水

Ready-To-Go（商標）キット（アマシャム・バイオサイエンス）に含めて総量 2

40

50

5 μ l

反応：

1 \times 95 で5分
50 サイクル 1 サイクルあたり95 で30秒、54 で30秒、72 で3分

1 \times 72 で7分。

【0047】

図2は、図1のPCR産物をテンプレートとして用いたネステッドPCRを示す。試料は図1の試料に対応している。

結果：ネステッドPCRでは、血液100 μ lあたりストレプトコッカス細胞100個の病原体数の場合に所望のslo DNA断片が増幅されている(試料1)。1回目のPCR(図1)においてテンプレートDNA5 μ lの場合、これはテンプレート分子数が約5~10に相当する。1:10に希釈した場合(試料2)、検出感度に満たない(テンプレート分子数0.5~1)。

【実施例2】

【0048】

(本発明の方法の実施)

先のPCR法のために上述したように、細胞溶解物由来のDNAを溶解する。試験材料を1 ml~5 ml使用する点が異なっている。

【0049】

病原体として102 cfu/mlの化膿連鎖球菌を含むヘパリン処理またはクエン酸添加した新鮮なヒト血液3 mlを、病原体の検出用に使用する。体液からの全DNA単離用市販キットを用い、製造業者の修正版説明書に従って、SDSおよびプロテイナーゼKを含む溶解バッファを用いることにより、DNAを単離する。この目的には、プロテイナーゼKおよびSDSを含む完全溶解バッファ6 mlを、感染血液3 mlに加える。混合物を37 で30分間インキュベートし、次いで95 で20分間加熱する。冷却後、200 μ gのミュータノリシンを添加して37 でさらに60分間インキュベートする。遠心分離した後、混合物を終濃度70%のエタノールで沈殿させ、遠心分離後に、ペレットを70%エタノール2 mlで洗浄する。エタノール残渣を真空遠心分離機で除去し、沈殿したDNAを500 μ lのTEバッファ中に回収する。次いで、0.5 mlのセファロースを含むカラムにDNAを装入して1 mgのTLR9上に固定化する。カラムを5倍容量のTEバッファで洗浄する。高濃度のカオトロピックイオン、例えば6 MのNaJまたはKSCN溶液0.7 mlで溶出を実施する。次いで溶出物を直接市販のDNA単離用遠心分離カラムに装入することが可能であり、また、最初の実施例のように、説明書に従ってCpGが濃縮されたDNAを単離して20 μ l~100 μ lの少量とし、病原体のPCR分析などのさらなる分析に使用してもよい。

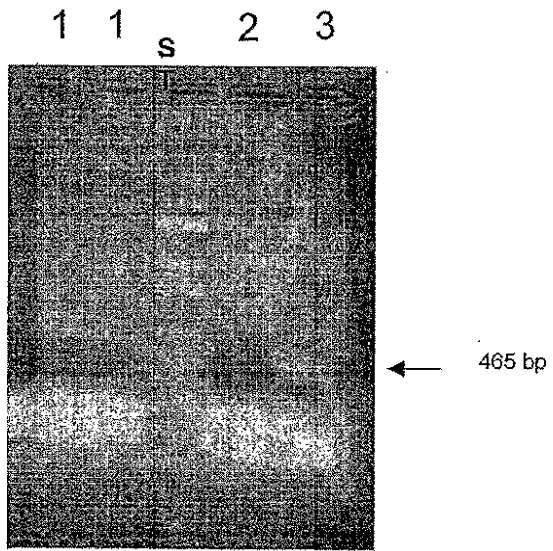
【図面の簡単な説明】

【0050】

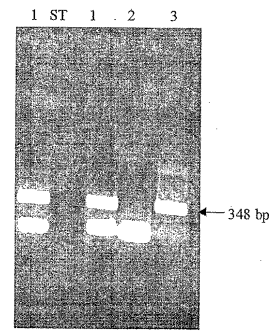
【図1】ヒト血液中のストレプトコッカスDNAのPCRを示す図。

【図2】図1のPCR産物を用いたネステッドPCRを示す図。

【図 1】
Abb. 1



【図 2】
Abb. 2



【配列表】
0004447459000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 シュミット、カール - ヘルマン
ドイツ連邦共和国 0 7 6 4 6 シュタトロダ バルトシュトラセ 1 5
- (72)発明者 シュトラウベ、エーバーハルト
ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イエナ ヘルマン - レンス - シュトラセ 5 8
- (72)発明者 ルースブルム、シュテファン
ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イエナ フォン ハーゼ - ベーク 3 2

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開2 0 0 2 - 0 3 4 5 6 5 (J P , A)
Nat.Genet., Vol.6, No.3(1994)p.236-244

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)