

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4387479号
(P4387479)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(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 外国語出願 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願平10-312798	(73) 特許権者	595117091
(22) 出願日	平成10年11月4日(1998.11.4)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公開番号	特開平11-221088		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公開日	平成11年8月17日(1999.8.17)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7417-1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
審査請求日	平成17年11月2日(2005.11.2)		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(31) 優先権主張番号	08/963927	(74) 代理人	100060069
(32) 優先日	平成9年11月4日(1997.11.4)		弁理士 奥山 尚男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トラコーマクラミジア潜在プラスミドの増幅および検出による、トラコーマクラミジアの検定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CTpB4.S1（配列番号 9）とCTpB4.S1.1（配列番号 10）からなるグループから選択される塩基配列からなるプライマー。

【請求項 2】

CTlpB4.S2（配列番号 12）とCTpB4.S2.1（配列番号 13）からなるグループから選択される塩基配列からなるプライマー。

【請求項 3】

CTpB4.B1（配列番号 11）とCTpB4.B2（配列番号 14）からなるグループから選択される塩基配列からなるプライマー。

【請求項 4】

CTpB4.D1（配列番号 15）の塩基配列からなる核酸、配列番号 15 の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTpB4.D2（配列番号 16）の塩基配列からなる核酸、配列番号 16 の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTlpB4.FD1（配列番号 17）の塩基配列からなる核酸および配列番号 17 の塩基配列からなる核酸に相補する核酸からなるグループから選択したプローブ。

【請求項 5】

CTpB4.FD1（配列番号 17）およびCtpF8.FD1（配列番号 29）からなるグループから選択される塩基配列からなるプローブ。

【請求項 6】

CTpFPL（配列番号５）、CTpFPR（配列番号６）、CTpFSL（配列番号７）およびCTpFSR（配列番号８）からなるグループから選択される塩基配列からなるプライマー。

【請求項７】

（ａ）CTpB4.S1（配列番号９）とCTpB4.S1.1（配列番号１０）からなるグループから選択される塩基配列からなる１以上のプライマーと、

（ｂ）CTpB4.S2（配列番号１２）とCTpB4.S2.1（配列番号１３）からなるグループから選択される塩基配列からなる１以上のプライマーと、

（ｃ）バンパープライマーCTpB4.B1（配列番号１１）およびCTpB4.B2（配列番号１４）と、

（ｄ）CTpB4.D1（配列番号１５）の塩基配列からなる核酸、配列番号１５の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTpB4.D2（配列番号１６）の塩基配列からなる核酸、配列番号１６の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTpB4.FD1（配列番号１７）の塩基配列からなる核酸および配列番号１７の塩基配列からなる核酸に相補する核酸からなるグループから選択された１以上のプローブと、
からなるキット。

10

【請求項８】

サンプル中のトラコーマクラミジアの存在の有無を検出するための方法であって、

（ａ）核酸増幅反応中に、第一の核酸プライマーがCTpB4.S1（配列番号９）とCTpB4.S1.1（配列番号１０）からなるグループから選択される塩基配列からなり、第二の核酸プライマーがCTpB4.S2（配列番号１２）とCTpB4.S2.1（配列番号１３）から選択される塩基配列からなる一組のプライマーを用いて前記のサンプルを処理するステップと、

20

（ｂ）増幅生成物の検出がトラコーマクラミジアの存在を表す、増幅核酸生成物の検出ステップと、

からなるサンプル中のトラコーマクラミジアの存在の有無を検出するための方法。

【請求項９】

前記の核酸増幅反応が鎖置換増幅反応（S D A）であることを特徴とする請求項８に記載のサンプル中のトラコーマクラミジアの存在の有無の検出法。

【請求項１０】

前記のS D A反応がCTpB4.B1（配列番号１１）およびCTpB4.B2（配列番号１４）をバンパープライマーとして利用する請求項９に記載のサンプル中のトラコーマクラミジアの存在の有無の検出法。

30

【請求項１１】

前記の増幅核酸生成物の検出を、該増幅核酸生成物とCTpB4.D1（配列番号１５）の塩基配列からなる核酸、配列番号１５の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTpB4.D2（配列番号１６）の塩基配列からなる核酸、配列番号１６の塩基配列からなる核酸に相補する核酸、CTpB4.FD1（配列番号１７）の塩基配列からなる核酸および配列番号１７の塩基配列からなる核酸に相補する核酸からなるグループから選択されるプローブとのハイブリッド形成により実施する請求項８に記載のサンプル中のトラコーマクラミジアの存在の有無の検出法。

【発明の詳細な説明】

40

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、患者体内のトラコーマクラミジア（Chlamydia trachomatis）の存在の有無を決定する方法に関する。この方法は、トラコーマクラミジア潜在プラスミドを特異的に増幅するための核酸プライマーの使用を含み、鎖置換増幅（Strand Displacement Amplification：S D A）、好熱性鎖置換増幅（Thermophilic Strand Displacement Amplification：t S D A）もしくは蛍光リアルタイム型鎖置換増幅（Fluorescent Real Time Thermal Strand Displacement Amplification）のうちのいずれか一つの方法を使用することが好ましい。

【０００２】

50

【従来の技術】

トラコーマクラミジアは、トラコーマ（単一原因での失明の最大原因）、封入体性結膜炎、乳児肺炎、尿道炎および性病性リンパ肉芽腫の原因微生物である。この微生物の分析および検出は、多くの場合病理学的もしくは臨床的所見を基礎とし、隔離法および染色法により確認されることもある。トラコーマクラミジアは、大きさ約7.5kbで、生体内に多数の複製が存在する潜在プラスミドを含む。多数の複製が存在するので、このプラスミドは、核酸増幅法を用いた検定による診断目的に好都合な標的である。

【0003】

本明細書中で使用する用語を以下に定義する。増幅プライマーは、標的配列とハイブリッド形成した後、このプライマーが伸長することで標的配列の増殖を開始させる役割を果たすものである。増幅プライマーの長さは通常、約10～75ヌクレオチドであり、約10～50ヌクレオチドであることが好ましい。S D A用の増幅プライマーの全長は通常約25～50ヌクレオチドである。S D A増幅プライマーの3'末端（標的結合配列）は標的配列の5'末端とハイブリッド形成する。標的結合配列の長さは通常、約10～25ヌクレオチドで、増幅プライマーにハイブリッド形成特異性を与えている。S D A増幅プライマーは標的結合配列へのエンドヌクレアーゼ5'の識別部位を有する。ウォーカーらが詳述しているように（G.Walker, et al. 1992. PNAS 89:392-396 and 1992 Nucl. Acids Res. 20:1691-1696）、この識別部位は不完全修飾（hemimodify）される際の、D N A二体鎖のうちの一つを切断する制限エンドヌクレアーゼに対する識別部位である。制限酵素認識部位への核酸5'（尾部（tail））は、S D A中に増幅プライマーの残りの部分が切断され、変位した際にポリメラーゼ再開始（repriming）部位として機能する。尾部核酸の再開始機能は、S D A反応を持続させ単一の標的分子から多数のアンプリコンを合成するのを可能にする。尾部の長さは通常、約10～25ヌクレオチドである。その長さで配列は一般に重要ではなく、通常のやり方で選択し、修正することができる。標的結合配列はプライマーの標的特部分であるので、標的末端部に特殊配列が要求されない増幅法では、増幅プライマーは実質的に標的結合配列のみからなる。中断可能な制限酵素認識部位とS D Aの尾部以外に標的に付加する特殊配列が要求される増幅法（例えば、3 S Rに対するR N Aポリメラーゼプロモーター、N A S B A、転写ベースの増幅）では、要求される特殊配列は、プライマーハイブリッド形成特異性を変えることなしに、オリゴヌクレオチドを培養するごくありふれた方法で使用する標的結合直列に連鎖させてよい。

【0004】

「バンパープライマー」または「外部プライマー」は、等温反応でプライマー伸長生成物を転位するのに使用されるプライマーである。バンパープライマーはその伸長部分が増幅プライマーの標的配列下流部分およびその伸張生成物を置換することにより、増幅プライマーの標的配列上流部分にアニールする。

【0005】

「標的」もしくは「標的配列」という用語は増幅される核酸配列を指す。これらは増幅される元の核酸配列と相補関係にある第二D N A鎖、増幅される核酸配列の複製のうちのいずれかのD N A鎖を含む。これらの複製は増幅プライマーとハイブリッド形成する配列の複製を含むことにより、増幅可能な標的としての役割を担う。

【0006】

増幅反応中に生成する標的の複製は、増幅生成物、アンプリマー（amplimer）またはアンプリコンと呼ばれる。

【0007】

「伸張生成物（extension product）」という用語は、プライマーのハイブリッド形成および鋳型として標的配列を用いたポリメラーゼによるプライマーの伸張によって生成した標的配列の複製を指す。

【0008】

「種特異性」という用語は、ある種の微生物または一群の関連した種の微生物を、同一の属内の他の種または他の属内の種の実質的な検出、増幅またはオリゴヌクレオチドハイブ

10

20

30

40

50

リッド形成を伴うことなく、検出、増幅またはオリゴヌクレオチドハイブリッド形成することを指す。

【0009】

「検定プローブ (assay probe)」という用語は、核酸の検出または同定を容易にするために使用するオリゴヌクレオチドを指す。例えば、本発明において、検定プローブはトラコーマクラミジア潜在プラスミド核酸の検出または同定に使用される。以下に詳述するように、検定プローブの実例には、検出プローブ、検出プライマー、捕捉プローブおよび信号プライマーがある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明は、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*) の特異的検出および同定のための増幅プライマーおよび検定プローブとして有用なオリゴヌクレオチドを提供する。特異的プローブはヒトのDNAや他の微生物のDNAを全く検出しないか、またはほとんど検出することなくトラコーマクラミジア潜在プラスミドを増幅する。ヒトのDNAや他の微生物のDNAと交差反応性を示すことなく、このプラスミドを特異的に増幅するため、二つの領域のトラコーマクラミジア潜在プラスミドが選択された。

【0011】

本発明のオリゴヌクレオチドは、培養された微生物の同定を確認するために培養後に使用してもよい。また、既知の増幅法を用いたトラコーマクラミジア潜在プラスミドの検出および同定のため、培養前または培養時に使用してもよい。いずれかのケースにおいて、本発明のオリゴヌクレオチドと検定法はトラコーマクラミジアと他の微生物の迅速な識別法を提供し、医師が習慣的に使用しているより伝統的な手順を利用することなく本微生物を迅速に同定することを可能にする。伝染病に含まれる特異的な病因学上の医薬の迅速な同定は、短期間内に適切な治療法を決定するために使用する情報を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、核酸増幅反応においてトラコーマクラミジア特異性を示すオリゴヌクレオチド、増幅プライマーおよび検定プローブに関する。本発明はまた、前記のオリゴヌクレオチドを用いたトラコーマクラミジアの検出および同定のための方法を提供する。好ましい方法はSDA、tSDA、均一リアルタイム型蛍光tSDAのいずれかである。これらの方法は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許第5,548,861号、5,648,211号、1997年5月30日出願の米国特許第08/865,675号および1997年5月13日出願の米国特許第08/855,085号等の引用文献により当業者に知られている。

【0013】

本発明のプライマーは、GenBankより入手可能なトラコーマクラミジア潜在プラスミド (*C. trachomatis* cryptic plasmid) の配列を基に設計された。プラスミド配列は整列され、管理可能な領域 (300~500bp) にセクション化されている。以下の研究のために2つの領域 (BおよびF) が選定された。領域BおよびFがトラコーマクラミジアのいくつかの血清型に合わせて配列され、tSDAシステムがこれらの分野について設計された。BおよびF領域への増幅および配列のために使用されるプライマーはそれぞれ以下の通りである。

B領域増幅・配列プライマー

CTpB1P 5'-GAAGATCGAGTAGACGTAATAT-3' (配列番号1)

CTpB2P 5'-ATAGCAGATATATCTAGAACCTT-3' (配列番号2)

CTpB3N 5'-TTGGATCGAA ATGTAATACCGA-3' (配列番号3)

CTpB4N 5'-ACTTCTGATTTTCAAGGTGG AT-3' (配列番号4)

F領域増幅・配列プライマー

CTpFPL 5'-CAAACTGCGTCTTTGCTGATA-3' (配列番号5)

CTpFPR 5'-GGGTGTGACTGTGAATTTTCC-3' (配列番号6)

CTpFSL 5'-AGTTGGGCAAATGACAGAGC-3' (配列番号7)

10

20

30

40

50

CTpFSR 5'-TGAATAACCCGTTGCATTGA-3' (配列番号 8)

【0014】

領域 B および F の分析に関する検出システムを以下に示す。t S D A 反応および蛍光リアルタイム型 t S D A 反応における特異性と感度に関して、様々なプライマーのコンペネーションが試験された。

【0015】

核酸はハイブリッド形成するための完全な相補性は要求されないもので、ここに示されているプローブおよびプライマー配列は、トラコーマクラミジア特異的なプローブおよびプライマーとしての実用性を損なうことなく、ある程度改変することができる。当業者に知られているように、相補的または部分相補的核酸は、ストレンジェンシーの増加、または減少するためハイブリッド形成条件の調整（例えば、ハイブリッド形成温度やバンパー液の含有塩分量の調節）により得ることができる。開示されている配列の小規模の改変とトラコーマクラミジア特異性を維持するためのハイブリッド形成条件の必要な調整は通常の日常的に行われている実験作業であり、当業者の能力の範囲内である。

【0016】

発明のプライマーを用いて生成した増幅生成物は、例えば、臭化エチジウムで着色したポリアクリルアミドまたはアガロースゲルの特性サイズによって検出してよい。また、増幅されたトラコーマクラミジア潜在クラミジアは、検定プローブ（検出可能な標識により標識付けされたオリゴヌクレオチド）により検出してよい。一つの実施態様において、最低一つの標識された検定プローブを、ウォーカーらが記載しているような (Walker, et al, Nucl. Acids Res, 前出) (検出用配列プライマーの) ハイブリッド形成またはハイブリッド形成とその後の伸長による増幅された標的配列の検出、もしくは欧州特許公報第 0 678 582 号に記載されているような (EP 0 678 582)、(単一のプライマーの) 増幅、伸長および二重鎖形状への転換による増幅された標的配列の検出に使用してよい。検定プローブは、増幅プライマーのうちのいずれかの標的中の一つの配列とハイブリッド形成する、いわゆる内部検定プローブが選定されることが好ましい。また、増幅プライマーもしくはその標的結合配列を検定プローブとして使用してよい。

【0017】

検定プローブの検出可能な標識は、標的核酸の存在の指標として直接、または間接的に検出可能な部分 (moiety) である。標識の直接検出については、当業者に知られているように、検定プローブは放射性同位体で標識して、オートラジオグラフ法で検出しても、蛍光部分で標識して蛍光 X 線検出してもよい。また、検定プローブは、検出可能にするために追加の試薬が必要な標識を用いて間接的に検出してもよい。間接的に検出可能な標識の実例には、化学発光試薬、目視可能な反応生成物を生成する酵素および標識された特定の結合パートナー (例: 抗体、抗原/ペプトン) と結合することによって検出されるリガンド (例: ペプトン、抗体、抗原) がある。リガンドはまた、リガンドで標識されたオリゴヌクレオチド (捕捉プローブ) を検出を容易にするため、固体状態に固定するのにも有用である。特に有用な標識はビオチン (標識付けされたアビジンやストレプトアビジンと結合することにより検出可能となる) と西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼのような酵素 (有色の反応生成物を生成するための酵素基質を付加することにより目視可能となる) を含む。オリゴヌクレオチドに標識を付加もしくは含有させるための方法は当業者に良く知られており、そのうちのいくつかの方法は本発明に適用可能である。

【0018】

適用可能な特定の検出法の実例には、米国特許第 5,470,723 号に記載されているような (U.S. Patent No. 5,470,723)、増幅プライマーをビオチニル化捕捉プローブおよび酵素抱合型検出プローブを用いて検出する化学発光法を含む。これら二つの検定プローブを標識配列の検定領域内の異なる部位にハイブリッド形成させた後、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレート上で鎖体を捕捉プローブを用いて検出し、化学発光信号を発生させルミノメーターで読み取る。増幅プライマーの他の検出法として、欧州特許公報第 0 678 582 号 (EP 0 678 582) に記載されているような信号プライマーを S D A

10

20

30

40

50

反応に含めてよい。本実施態様において、標識された二次増幅生成物はS D A中に、標的の増幅に依存する形で生成し、関連する標識を媒体に用いて標的増幅の指標として検出してよい。

【0019】

商業上の便宜のため、トラコーマクラミジア潜在プラスミド特異性検出および同定のための増幅プライマーは、キットの形でパッケージすることができる。本発明によれば、そのようなキットは通常、最低1組の増幅プライマーを含む。核酸増幅反応を実施するための試薬は、トラコーマクラミジア潜在プラスミド特異増幅プライマーと共に、例えばバンパー、追加のプライマー、ヌクレオチド、三リン酸塩、酵素等を含めてもよい。キットの構成要素は共通のコンテナに梱包され、必要に応じて本発明の特定の実施態様を実施するための指示書を含めてもよい。検定プローブとして使用するため、適当な標識を付加したオリゴヌクレオチドや標識検出用の試薬または手段といった任意の構成要素をキットに含めることができる。

【0020】

増幅プライマーの標的結合配列は、オリゴヌクレオチドに種ハイブリッド形成特異性を与え、従って、増幅反応に種特異性を付与する。選択した増幅反応の性能に関する要求に応じて、オリゴヌクレオチドの種特異性を変更することなく、ここに開示した標的配列に他の配列を選択的に追加してよい。例えば、本発明のトラコーマクラミジアの潜在プラスミド特異性の増幅プライマーは、S D A反応時に切断される（ニックされる）制限エンドヌクレアーゼに対する認識部位BsoBIを含んでいてもよい。欧州特許公報第0 684 315号（EP 0 684 315）に開示されている認識部位を含むBsoBI部位を他の制限エンドヌクレチアーゼ認識部位に置換できることは当業者にとって明白であろう、認識部位は増幅反応を好熱性S D A（t S D A）条件下でも実施できるよう、好熱性制限エンドヌクレアーゼに対するものが好ましい。同じく、増幅プライマーの尾部配列（制限エンドヌクレチアーゼ認識部位への5'）は一般に重要ではないが、S D Aを用いる認識サイトおよび自己の標的結合配列や他のプライマーとハイブリッド形成する配列は避けるべきである。本発明によれば、S D A用の増幅プライマーのいくつかは、3'標的結合配列、標的結合配列に対する切断可能な制限エンドヌクレチアーゼ認識部位5'および長さが約10~25ヌクレオチドの制限エンドヌクレチアーゼ認識部位に対する尾部配列5'からなる。切断可能な制限エンドヌクレチアーゼ認識部位および尾部配列はS D A反応のために必要とされる配列である。他の増幅反応に関して、本発明による増幅配列は、開示された標的結合配列のみからなるもの（例：P C Rに対する配列）であったり、標的結合配列と選択された増幅反応のために必要とされる追加の配列（例：上述したようなS D Aのために必要な配列や3 S RのためのR N Aポリメラーゼによって認識されるプロモーター）からなるものであってよい。

【0021】

バンパープライマーはS D Aの際、その下流側の種特異的な増幅プライマーを置換するよう機能するため、種特異性に関して必須なものではない。バンパープライマーは伸長した際に増幅プライマーとその伸長生成物を置換するように、増幅プライマーの上流側にハイブリッド形成することのみ要求されている。そのため、バンパープライマーの特定の配列は一般に重要ではなく、バンパープライマーの伸長の際に増幅プライマーの伸長生成物を置換させるために増幅プライマーの結合部位の十分近くにあるいかなる上流標的配列から得てもよい。時折発生するバンパープライマー配列内の標的との誤配合や標的以外の配列とのクロスハイブリット形成は、バンパープライマーが特異的な標的配列にハイブリッド形成できるかぎり増幅効率に悪影響しない。しかし、ここに記載されているバンパープライマーはトラコーマクラミジアに対して種特異的であるため、必要があれば増幅プライマー内の標的結合配列として使用してよい。

【0022】

本発明のプライマーを用いた増幅反応は、ウォーカーらが指摘するように（Walker, et al, 前出）、チミンを組入れてもよいし、欧州特許公報第0 624 643号に指摘されているように（EP 0624 643）、その後の増幅反応のクロス汚染を減少させるため、反応中にT T

10

20

30

40

50

Pの代わりに2'デオキシウリジン5'三リン酸塩を完全にまたは部分的に代用してよい。dU（ウリジン）は増幅生成物に組込まれ、ウラシルDNAグリコシアーゼ（UDG）を用いた処理によって切除され得る。これらの塩基性喪失（abasic）部位はその後の増幅反応の際に増幅生成物を増幅不能にする。新たに形成した増幅生成物中のdUの切除を防止するため、その後の増幅反応を実施する前にUDGをウラシルDNAグリコシアーゼ阻害剤で処理してよい。

【0023】

プライマー、バンパーおよび検出用配列（detector）の異なるコンビネーションを用いてtSDAを実施するため、他の系が開発された。しかし、これらの他の系は適切な特異性の欠如、最適条件の領域のせまさおよび確実性の欠如のような様々な理由のため好ましく

10

【0024】

図1に系Bのためのプライマー、バンパーおよび検出用配列（detector）を示す。この系は例の中で検討されている。系Bは領域Bの5'末端に位置する。初期実験において、2つの上流プライマーと2つの下流プライマーが1つの上流バンパーと1つの下流バンパーと共に設計された。これらは検出用配列と共に様々なコンビネーションで使用された。系Bで使用されたプライマー、バンパーおよび検出用配列を以下に示す。プライマーのハイブリッド形成領域は下線にて表し、BsoB0制限部位はイタリック体で表した。

【化1】

上流プライマー

CTpB4.S1

5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGCGATTACTTGCAGTTG-3'

(配列番号 9)

CTpB4.S1.1

5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGGATTACTTGCAGTTG-3'

(配列番号 10)

10

上流バンパー

CTpB4.B1 5'-GAGTAGACGTAATATT-3' (配列番号 11)

下流プライマー

CTpB4.S2

5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGATATCTGCTATTTTCATT-3'

(配列番号 12)

CTpB4.S2.1

5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGATATCTGCTATTTTCAT-3'

(配列番号 13)

20

下流バンパー

CTpB4.B2 5'-CTCTTAAGGTTCTAG-3' (配列番号 14)

³²P 検出用配列

CTpB4.D1 5'-CTCATCGGTTGGAGA-3' (配列番号 15)

CTpB4.D2 5'-TCTCCAACCGATGAG-3' (配列番号 16)

蛍光検出用配列

30

CTpB4.FD1

5'-TAGCACCCGAGTGCTTTGACGATTTTCTCCAACCGATGAGTTGAT-3'

|

FAM

|

ROX

(配列番号 17)

【0025】

初期のスクリーニング実験において、1つの上流プライマーと1つの下流プライマーを含めるようプライマー混合物が調製された。4つの可能なプライマー混合物を以下に示す。

コンビネーション 1

40

CTpB4.S1 (配列番号 9)

CTpB4.S1 (配列番号 12)

コンビネーション 2

CTpB4.S1.1 (配列番号 10)

CTpB4.S2 (配列番号 12)

コンビネーション 3

CTpB4.S1 (配列番号 9)

CTpB4.S2.1 (配列番号 13)

コンビネーション 4

CTpB4.S1.1 (配列番号 10)

50

CTpB4.S2.2 (配列番号 1 3)

【0026】

プライマー混合物は全て上流および下流のバンパーをも含む。プライマーとバンパーはおのおの最終濃度0.5および0.05 μ Mで使用された。

【0027】

上記のプライマー混合物は潜在プラスミドの領域Bに関する研究で使用されており、例の中でさらに詳しく検討されている。潜在プラスミドの領域Fとハイブリッド形成し、トラコーマクラミジアの検定に対しても有用な池のプライマーについても例の中で検討されている。後程示す例では、均一リアルタイム型蛍光t S D Aで使用する領域Fに対するプライマーを用いる方法も開示している。系Bのプライマーおよびプローブは、t S D Aリアルタイム型蛍光エネルギー転位法で使用するのが好ましい。鎖置換増幅 (S D A) は、プライマーの伸長、不完全修飾制限エンドヌクレアーゼ認識・切断部位の切断 (ニッキング)、一本鎖伸長生成物の置換、伸長生成物 (もしくは元の標的配列) へのプライマーのアニールリングおよびその後のプライマーの伸長が反応混合物中で平行して起こる核酸増幅の等温方法である。これは、反応のステップが不連続的に起こるか、もしくは反応の熱サイクル特性の結果として循環するポリメラーゼ鎖反応 (P C R) とは対照的である。S D Aは以下の能力に基づく。すなわち、(1) 二重鎖認識・切断部位のヘミモスホロチオ酸エステル体の無修飾鎖を切断する制限エンドヌクレアーゼの能力と、(2) ある種のポリメラーゼの切り目での複製の開始および下流側の鋳型のない鎖の置換を行う能力である。

【0028】

プライマーのアニールリングに関し、二重鎖標的配列を変性するために増加させた温度 (約95°C) で初期培養した後、その後の重合と新たに合成した鎖の転位を一定温度で実施した。個々の標的配列の新たな複製の生成は以下の5つのステップからなる。すなわち、(1) 元の標的配列または前もって重合した置換一本鎖伸長生成物への増幅プライマーの結合、(2) α チオデオキシヌクレオチド三リン酸 (α -チオd N T P) を組込んだ5' - 3'エキソヌクレチアーゼ欠失ポリメラーゼによるプライマーの伸長と、(3) 半修飾二重鎖制限部位の切断 (ニッキング) と、(4) 切れ目部位 (ニック部位) からの制限酵素の分離と、(5) 下流に新たに合成した鎖の置換を伴う5' - 3'エキソヌクレチアーゼ欠失ポリメラーゼによる、切れ目 (ニック) の3'末端からの伸長である。

【0029】

切れ目 (ニック) からの伸長は他の切断 (ニック) 可能な制限部位を再生させるため、切断 (ニック)、重合および置換は一定温度で平行して継続的に起こる。おのおのが二重鎖標的配列の二本の鎖のうちのいずれか一本の鎖とハイブリット形成する一組の増幅プライマーを使用した際、増幅は指数関数的に増加する。これは有効鎖および非転写鎖がその後の増幅ラウンドの際に、他方のプライマーの鋳型の役割を果たすためである。一本鎖増幅プライマーを使用した際、唯一の鎖はプライマー伸長のための鋳型の役割を果たすため、増幅は線形的に増加する。 α チオデオキシヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を組込んだ際、その二重鎖認識または切断部位を切断する制限エンドヌクレチアーゼの実例は、HincII、HindIII、AvaI、NciIおよびFnu4HIである。これらの制限エンドヌクレチアーゼの全てと要求されるニッキング活性を示す他の制限エンドヌクレチアーゼは、従来通りのS D Aに適している。しかし、これらは比較的高温感受性であり、40°Cで活性を失う。

【0030】

S D Aによる増幅の標的は、標的配列を切断しないエンドヌクレチアーゼを用いて制限による大きな核酸の切断により調製することができる。しかし、ウォーカーらが記載し (Walker et al. 1992, Nuc. Acids Res., 前出) および引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許第5,270,184号 (U.S. Patent No. 5,270,184) に記載されているように、S D A反応においてニッキングに関し、選択された制限エンドヌクレチアーゼ認定/切断部位を有する標的核酸を生成することが好ましい。手短には、標的配列が二重鎖である場合、4つのプライマーがこれとハイブリット形成する。プライマーのうち二

10

20

30

40

50

つ（S 1およびS 2）はS D A増幅プライマーであり、二つ（B 1およびB 2）は外部もしくはバンパープライマーである。S 1およびS 2は標的配列に隣接する二重鎖核酸の他方の鎖と結合する。B 1およびB 2は、それぞれS 1およびS 2の標的配列5'（上流側）に結合する。その後、3つのデオキシヌクレオチド三リン酸と最低一つの修飾されたデオキシヌクレオチド三リン酸（例：2'デオキシアデノシン5'オルトチオ酸リン酸（2'-deoxyadenosine 5'-0-（1-thiotriphosphate）：“d A T P α S”））の存在下で4つ全てのプライマーを同時に伸長させるためにエキソヌクレアーゼ欠失ポリメラーゼが使用される。その結果、S 1およびS 2の伸長生成物はB 1およびB 2の伸長により、元の標的配列鋳型から置換される。増幅プライマーの置換された一本鎖伸長生成物は他方の増幅およびバンパープライマーとの結合の標的として作用する（例えば、S 1の伸長生成物はS 2およびB 2と結合する）。伸長および置換（displacement）の次のサイクルでは、末端に不完全修飾制限エンドヌクレアーゼ認識・切断部位を有する断片を生じる。これらはS D A増幅に対する適当な基質である。S D A実施中、標的生成反応の個々のステップは平行して、かつ継続して起こり、S D Aの制限酵素によるニッキングに関し必要とされる末端に認識・切断部位を有する標的配列を生成する。S D A反応の構成要素は全て標的生成反応中にすでに存在するので、生成した標的は自動的かつ継続的にS D Aサイクルに入り、増幅される。

10

【0031】

他の増幅の生成物によるS D A反応のクロス汚染を防止するため、増幅反応の害することなく、d T T Pの代わりにd U T PをS D Aで増幅されたD N Aを組入れてよい。ウラシル修飾核酸はその後、ウラシルD N Aグリコジラーゼ（U D G）で処理することにより、特異的に認識され、不活性化されてよい。それゆえ、先の反応においてd U T PがS D Aで増幅したD N Aに組み入れられた場合、その後のいかなるS D A反応も二重鎖標的の増幅より前にU D Gで処理することができ、先の増幅反応からのD N Aに含まれるいかなるd Uも増幅不能となる。その後の反応で増幅される標的D N Aはd Uを含まず、U D G処理により影響されない。U D Gは標的の増幅より前に、U g iを用いた処理で阻害することができる。また、U D Gは熱不活性であってよい。吸熱性S D Aにおいて、反応自体による高い温度（50℃以上）はU D Gの不活性化と標的の増幅の同時実行に使用してよい。

20

【0032】

S D Aは5'-3'エキソヌクラーゼ活性を欠き、二重鎖核酸中の一本鎖切れ目（ニック）で重合を開始し、鋳型としてニックされていない鎖を用いて新たな相補鎖を生成しながらこの切れ目の下流側の鎖を置換するポリメラーゼを必要とする。ポリメラーゼは遊離3'水酸基にヌクレオチドを付加することで伸長する必要がある。S D A反応を最適化するため、ポリメラーゼは増幅される標的配列の長さを最大化するよう高進行的であることが望ましい。高度に進行的なポリメラーゼは解離または伸張生成物の合成の終了する前に、十分な長さの新たな鎖を重合することができる。置換活性（displacement activity）は標的をさらなる複製の合成のために利用可能にし、指数関数的増幅反応で二次増幅プライマーのハイブリット形成する可能性のある一本鎖生成物を生成するため、置換活性は増幅反応にとって必要不可欠である。ニッキングは反応を持続させ、さらに続く標的増幅のラウンドを開始させるので、ニッキング活性も大いに重要である。

30

40

【0033】

ウォーカーらが記載しているように（Walker, et al., 1992, PNAS and Nuc. Acis Res., 前出）、吸熱性S D Aは従来通りのS D Aとして、望ましい熱安定ポリメラーゼおよび熱安定制限エンドヌクレアーゼの置換を伴って必然的に実施される。もちろん、反応温度は置換酵素にとって適当なより高い温度に調整され、HicII制限エンドヌクレアーゼ認識・切断部位は選択された熱安定エンドヌクレアーゼにとって適切な制限エンドヌクレアーゼ認識・切断部位に交換される。また、ウォーカーらとは対照的に、酵素が変性温度で十分安定である場合、実施者は初期の変性ステップの前に反応混合物中に酵素を含めて良い。吸熱性S D Aでの使用に好ましい制限エンドヌクレアーゼは、BsrI、BsrtNI、BsmAI、BslI、BsoBI（ニューイングランド生物学的研究所（New England BioLabs））とBstOI（

50

Promega) である。好ましい吸熱性ポリメラーゼはBca (Panvera) とBst (ニューイングランド生物研究所 (New England BioLabs)) である。

【0034】

均一リアルタイム型蛍光tSDAはtSDAの改良である。この方法は、標的に依存する形で還元蛍光の消光を実施するため検出用オリゴヌクレアーゼを使用する。検出用オリゴヌクレアーゼは、蛍光の消光が標的が存在しない状態で起こるよう連鎖された供与体／受容体色素対を含む。標的存在下での検出用配列オリゴヌクレアーゼ中の分子間塩基対二次構造の展開および線状化は、色素間の距離を増加させ、蛍光の消光を減少させる。塩基対二次構造の展開は通常、二次構造を最小限に部分分裂させるような、二次構造と相補鎖の間の分子間塩基対を含む。十分な長さの相補鎖が存在する場合、これは完全に線状化され得る。好ましい実施態様において、制限エンドヌクレアーゼ認識部位 (RERS) は二次構造と相補鎖の間の分子間塩基対が制限エンドヌクレアーゼにより、RERSを二重鎖化し、切断可能もしくは分裂可能な状態にできるよう、2つの色素の間に存在する。制限エンドヌクレアーゼによる分裂または切断は、供与体および受容体色素を、さらなる消光に寄与するように、別々の核酸断片上に分離する。いずれの実施態様においても、蛍光パラメータに関連する変更 (例: 供与体蛍光強度の増加、受容体蛍光強度または展開前後での蛍光発光比率の減少) は標的配列の存在の指標としてモニタされる。蛍光寿命の変化のような他の蛍光パラメータをモニタしてもよい。

【0035】

均一リアルタイム型蛍光tSDAに対する検出用オリゴヌクレオチドは、標的とハイブリット形成する一本鎖の5'または3'部分 (標的結合配列) と標的結合配列に隣接する分子内塩基対二次構造からなる。発明の検出用オリゴヌクレオチドは、二次構造が分子内塩基対を形成し、二次構造の展開または線状化により結果的に蛍光の消光が減少した場合に、供与体蛍光が消光するように連鎖した供与体／受容体色素対からなる。オリゴヌクレオチドの分裂は、DNA二本鎖の両方の鎖のリン酸ジエステル結合の切断または一本鎖DNAのリン酸ジエステル結合の切断を指す。これはDNA二重鎖の2つの鎖のうちの1本のみのリン酸ジエステル結合が切断されるニッキングとは対照的である。

【0036】

均一リアルタイム型蛍光tSDAに対する本発明の検出用オリゴヌクレオチドは、プライマー伸張またはハイブリット形成のために選定された反応条件の下、分子内塩基対二次構造を形成する配列を含む。二次構造体は、標的配列の少なくとも一部分が一本鎖3'または5'尾部を形成するように、検出用配列オリゴヌクレオチドの標的結合配列に隣接して配置される。ここで使用されているように、「標的結合配列に隣接」という語は、標的結合配列の全てまたは一部が標的とのハイブリット形成に利用できるよう、5'または3'に一本鎖が残されていることを意味する。つまり二次構造体は全ての標的結合配列を含むものではない。標的結合配列の一部は二次構造中の分子内塩基対合に含まれてよく、一次配列の全てもしくは一部が二次構造中の分子内塩基対合に関係するものを含んでよく、一次配列の全てもしくは一部が二次構造中の分子内塩基対合に関連するが、好ましくはその相補配列へと伸張しないものを含んでよい。例えば、二次構造がステム・ループ構造 (stem-loop structure) (例: 「ヘアピン」) であり、検出用オリゴヌクレオチドが一本鎖化された3'尾部として存在している場合、標的結合配列はステムの第1アームの全てもしくは一部を介して伸張してもよく、随意にループの全てまたは一部を介して伸張してもよい。しかし、標的結合配列はステム分子内塩基対合に関わる配列の第2アームに伸張しないことが好ましい。検出用配列オリゴヌクレオチド二次構造体の分子内塩基対部分におけるミスマッチは、標的存在下での蛍光の変化の強度を減少させ得るが、検定感度が重要でなければ許容し得る。一本鎖尾部での標的結合配列でのミスマッチも許容できるものであるが、同様に検定感度および／または特異性を減少させる。しかし、二次構造と標的結合配列の両方における完全な塩基対合が反応に悪影響を及ぼさないことは本発明の特徴である。ハイブリット形成に関連する配列の完全な適合は反応速度論の悪影響を及ぼすことなく、検定特異性を改善する。

【0037】

本発明の検出用オリゴヌクレオチド信号プライマーは、増幅反応に添加された際、上述の増幅プライマーのハイブリット形成および伸張により二重鎖体に変換される。ポリメラーゼによる鎖置換もまた、相補鎖の合成により二次構造を展開もしくは線状化させ二重鎖体に転換させる。R E R Sが存在する場合には、R E R Sも二重鎖となり、制限エンドヌクレアーゼにより分解もしくは切断可能となる。二次構造はポリメラーゼの鎖置換活性により展開もしくは線状化されるので、受容体および供与体色素間の距離は増加し、その結果供与体蛍光の消光は減少する。供与体または受容体色素に関連する変更は標的配列の増幅の兆候としてモニターもしくは検出してよい。R E R Sの分解もしくはニッキングは、互いに連鎖した2つの色素のうちの1つを持った二重鎖増幅生成物の2つの別々の断片を生成することにより、蛍光の変化強度をはるかに増加させる。これらの断片は反応溶液中を自由に拡散し、供与体・受容体色素対の間の距離をはるかに増加させる。供与体蛍光強度の増加または受容体蛍光強度の減少は、標的配列の増幅の進行もしくは完了の指標としてモニターまたは検出してよく、また、受容体／供与体色素対の近接により影響される他の蛍光パラメータをモニターしてもよい。受容体または供与体の蛍光強度の変化は、受容体および/または供与体の蛍光強度の比率の変化として検出してもよい。例えば、蛍光強度の変化は、二次構造の展開または線状化の前後での検出用オリゴヌクレオチド中の供与体発蛍光団の蛍光の比率の増加か、もしくは線状化または展開の前後の検出用配列オリゴヌクレオチド中の受容体色素の比率の減少として検出して良い。

10

【0038】

S D Aに加えて、発明の検出用オリゴヌクレオチドは、他のプライマー伸張増幅法（例：P C R、3 S R、T M A、N A S B A）の信号プライマーとして使用してもよい。例えば、P C R増幅プライマーと5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を欠いた鎖置換D N Aポリメラーゼ（例：Sequencing Grade Taq from Promega or exo-Vend or exo-Deep Vent from New Endland Biolabs）を用いることにより、P C Rでの使用に適用してよい。検出用オリゴヌクレオチド信号プライマーはP C R信号増幅プライマーから標的の下流にハイブリット形成し、置換され、S D Aについて記述したように必然的に二重鎖となる。P C Rでは通常、R E R Sの分裂よりむしろニッキングを誘導する修飾デオキシヌクレオチド三リン酸は存在しないため、検出用オリゴヌクレオチドでの使用において、いかなるR E R Sも随意に選定してよい。ヒートサイクルはP C Rによる増幅の特徴であるので、制限エンドヌクレアーゼはプライマーのアニーリングの最終サイクルおよび増幅の終点検出のための伸張の後、低温で添加するのが好ましい。しかし、P C R反応の高温段階での活性を維持する制限エンドヌクレアーゼはリアルタイム型の検定を提供するため増幅時に存在することも可能である。S D A系と同様に、二次構造の線状化と色素対の分離は、標的増幅の指標として作用する強度のような蛍光パラメータの変化を伴って、蛍光の消光を減少させる。

20

30

【0039】

検出用オリゴヌクレオチドの展開または線状化から生じる蛍光の変化は、選定された反応の終了点で検出してよい。しかし、線状化された二次構造はハイブリット形成やプライマー伸張と同時に進行するため、蛍光の変化は反応進行時にリアルタイムに検出してもよい。この均一なリアルタイム型の検定様式は標的の開始時の存在量に関する半定量的または定量的な情報を提供するために使用される。たとえば、展開反応または線状化反応（標的増幅反応の一部か、もしくは非増幅検出法に含まれる）の際の蛍光強度の変化速度は開始時の標的のレベル指標である。結果的に、より多くの標的配列の初期複製が存在する場合、供与体蛍光はより早く選定された敷居値に到達する（すなわち、より短時間で陽性となる）。受容体蛍光の減少も選定した最小値に到達するのに要する時間として検出したが、同様に、より短時間で陽性を示す。加えて、反応過程中的蛍光パラメータの変化速度は、標的の初期量の高いサンプルの方が初期量の低いサンプルに比べて速い。当業者に知られているように、これらの測定法または他の測定法は、標的の存在に関する指標もしくは標的の増幅に関する指標として実施してよい。通常、標的の初期量は標的の既知の量と実験

40

50

的結果を比較することで決定される。

【0040】

本発明の方法によれば、選定された標的配列の存在に対する検定は、溶液中で実施しても、固体相で実施してもよい。検出用オリゴヌクレオチドがプライマーとして機能するリアルタイムでの、もしくは終了点での均一検定は、通常溶液中で実施される。発明の検出用オリゴヌクレオチドを使用するハイブリット形成検定は、均一リアルタイム型検定のように溶液中で実施してもよいが、標的のリアルタイムでの、もしくは終了点での検出に関する固体相検定にも特によく適合する。固体相検定において、検出用オリゴヌクレオチドは、当業者に知られている方法を周して内部標識または末端標識経由で固体相（床、隔膜、反応容器）に固定してよい。例えば、ビオチンで標識した検出用配列オリゴヌクレオチドは、適切なハイブリット形成条件の下で標的にさらした場合、蛍光に変化を生じるアビジン修飾固体相に固定してよい。この方法での標的の捕捉はサンプルからの標的の分離を容易にし、信号の検出の障害や検定における他の問題を引き起こす可能性のあるサンプル中の基質を除去させる。

10

【0041】

【実施例】

以下の実施例において、発明の具体的な実施態様を示す。当業者にとって明らかなように、記載した本発明の範囲内で様々な変更および改良が可能であり、かつ計画されている。

【0042】

例 1

20

確実性に関するプライマーコンビネーションの検定

【0043】

大半の条件においていずれのコンビネーションが最も良く機能するかを決定するため、4つの全てのコンビネーションが条件のマトリックスに対して試験された。反応条件は以下のように変化させた。

増幅温度：52°C、54°C

リン酸カリウム（pH7.6）：35mM、45mM

酢酸マグネシウム：5mM、6mM

ジメチルスルホン酸：3%、7%（体積％）

グリセロール：3%、7%（体積％）

30

【0044】

反応（50 μ L）はまた、Bstポリメラーゼ9ユニット、BsoB1制限エンドヌクレアーゼ165ユニット、ヒト胎盤DNA1,200mg、dATPおよびdGTP 0.2mM、dCTP 1.4mM、dUTP 0.5mM、アセチル化年血清アルブミン0.1mg/mL、トレハロース1.8%、ジチオドレイトール0.36mM（DTT）および標的プラスミドDNAの 1×10^6 コピーを含む。標的プラスミドはpUC18に挿入した潜在プラスミド（血清型Jから）の領域BおよびFを含むプラスミドである。

【0045】

サンプルは30 μ L中にリン酸塩、DMSO、グリセロール、ヒトDNAを含むように調製された。サンプルは湯浴で2分間熱変性させ、手短に遠心分離した後、45°C Thermal-Lok Dry Bath（US Scientific, Florida）に入れた。2、3分間平衡化させた後、体積10 μ Lのサンプルに対し、以下の要素を加えた。

40

リン酸カリウム、プライマー、パンパー、dGTP、dATP、dCsTP、BSA、DTT、トレハロース、マグネシウム、ウラシル-N-DNAグリコジラーゼ（UDG）1ユニットを加えた。次の30分間で発熱SDAを実施した。反応はサンプルを5分間沸騰させることにより停止させた。増幅生成物はアンプリコンの中央部に特異的にハイブリット形成した ^{32} Pで標識したプローブCTpB4.D1（配列番号15）の伸張により検出した。検出されたサンプルは8%ポリアクリルアミドゲルを通した後、リン光分析もしくはオートラジオグラフィフィルムに終夜露出することで可視化した。

【0046】

図2、図3に試験条件マトリックスのリン光分析を示す。プライマーコンビネーションは

50

各欄の底部に記した。特定の条件下でいくつかのプライマーコンビネーションのみが作用し、4つのコンビネーションのうちいくつかのものについては他の条件が有利であった。いくつかの条件下では、コンビネーション1および2がよりよく作用するように思われたが、あるコンビネーションが他の全てのコンビネーションよりも優れているという明確な証拠はない。

【0047】

同一の実験において、サンプル（52℃、 KPO_4 35mM、 MgOAc 5mM、DMSO 3%、グリセロール7%）のうち4つは相補的検出用配列CTpB4.D2（配列番号16）により検出された。結果を図4に示す。有効鎖にハイブリット形成した検出用配列はリン光分析の強度において50 foldの増加を示した。これは上記の検出用配列がその補体に比べ優れた感度を呈したことを示す。そのため、B系を用いた以下の全てのサンプルにおいて検出用配列CTpB4.D2（配列番号16）を使用した。

10

【0048】

例2

最大感度を示す条件に関する検定

【0049】

最大感度を持つプライマーコンビネーションと緩衝条件を選定するため、上記の4種のプライマーコンビネーション各々を例1での2つの最適条件で試験した。これらの2つの条件を以下に示す。

条件1

リン酸カリウム（pH7.6）：35mM
酢酸マグネシウム：6mM
ジメチルスルホン酸：3%
グリセロール：3% 増幅温度：54℃

20

条件2

リン酸カリウム（pH7.6）：35mM
酢酸マグネシウム：6mM
ジメチルスルホン酸：3%
グリセロール：7%
増幅温度：54℃

30

【0050】

他の全ての反応条件は例1に示した通りである。ゲルのリン光分析を図5、図6に示す。これらの結果はプライマーの全てのコンビネーションが条件2の下でより良く作用したこと、および両条件においてプライマーコンビネーション1および2がより高い感度を示したことを表している。以降の研究において、プライマーコンビネーション2が選定された。その結果、系Bでの以降の全ての例ではプライマーコンビネーション2（CTpB4.S1.1（配列番号10）とCTpB4.S2（配列番号12））を使用する。

【0051】

例3

系Bの特異性および交差反応性の検定

40

【0052】

トラコーマクラミジアの多数の血清型を増幅するためのプライマー系Bの能力を試験するため検定が実施された。14種の血清型を例2に記載した条件2を用いて試験した。各々の血清型は 10^4 のゲノムコピーおよび 10^3 のゲノムコピーで試験された（サンプル中に存在する潜在プラスミドの実際の数是不明である）。14種の血清型のうち13種が 10^4 のレベルで増幅され、14種の血清型のうち7種が 10^3 のレベルで増幅された（図7参照）。血清型Bは増幅しなかった。血清型Bはプライマーおよびバンパーと100%同一であり、増幅の欠如は不純なサンプルであるためか、もしくはプラスミドの複製数が低いためであると信じられた。クラミジアの他の2つの種とNeisseria gonorrhoeaeの一つの鎖が投入レベル 10^7 のゲノムコピーで試験された。これらからは増幅生成物は何ら生成しなかった。

50

【0053】

例 4

ヒト DNA の存在下での感度検定

【0054】

ヒト DNA 存在下での系の感度を試験するための検定を例 2 に記載した条件 2 を用いて実施した。300～3,000 ng のヒト DNA の存在に対して、標的プラスミドが 10 コピーまで滴定された。結果を図 8 に示した。反応は各々のレベルのヒト DNA に対して、標的プラスミド DNA を 10（重複遺伝子）、100（重複遺伝子）、1,000 コピー含む。負の制御（標的プラスミドなし）もヒト DNA が 1,200 ng のレベルで実施された。系はヒト DNA が 600～2,500 ng で 10 コピーの感度、ヒト DNA 300～3,000 ng で 100 コピーの感度を示した。

10

【0055】

例 5

他の微生物との交差反応性の検定

【0056】

潜在的な泌尿生殖器汚染菌との交差反応性の存在の有無を試験するため検定が実施された。例 2 に概略を示した条件 2 が使用された。30 種から抽出した合計 35 種類の微生物が試験された。これらの微生物を表 1 に示した。1 つの種当り 10^7 のゲノムコピーで、各々 3 ないし 4 つの種を包含する 9 つのプールを調製した。各々のプールは標的プラスミドが存在しない状態、もしくはプラスミド pCT16 が 200 コピー存在する状態で増幅された。標的プラスミドを添加しなかったプールでは増幅は示されなかったが、添加した全てのプールで特異生成物が増幅した。これらの結果を図 9 に示す。

20

【表 1】

プール	微生物	鎖
1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 19424
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 35541
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDMS 2900
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDMS 1632
2	<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23970
	<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23972
	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13090
	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12598
	<i>Staphylococcus faecalis</i>	ATCC 29212
	グループ A 連鎖球菌	ATCC 16915
	グループ B 連鎖球菌	ATCC 12386
4	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
	<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
5	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906
	<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33533
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 19001
6	<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018
	<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC 73714
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC 30001
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 44808
7	単純ヘルペスウイルス 1	McIntyre
	HSV-1	
	単純ヘルペスウイルス 1	G
	HSV-2	
8	<i>Peptostreptococcus</i>	ATCC 27340
	<i>Productus</i>	
	<i>Neisseria flavescens</i>	ATCC 13120
	<i>Neisseria sicca</i>	ATCC 29193
9	<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC 14685
	<i>Neisseria elongata</i>	ATCC 25295
	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696
	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 14799
	<i>Neisseria catarrhalis</i>	ATCC 25240
	<i>Branhamella catarrhalis</i>	ATCC 25240
	<i>Kingella kingae</i>	ATCC 23330

10

20

30

【0057】

例 6

t S D A の実施に対する潜在プラスミド、領域Fからのプライマー、バンパーおよび検出用配列

【0058】

トラコーマクラミジアの4種のヒト血清型からの潜在プラスミドの配列データが、GenBank データベースから入手できた。4種の他の血清型がこの領域に配列された。配列の変異を克服して t S D A プライマーセットを設計するため、合成アラインメントが使用された。領域Fで使用するよう選定されたプライマー、バンパーおよび検出用配列を以下に示す。t S D A 内の BsoBI 部位をイタリック体で示し、ハイブリット形成領域を下線で示した。検出用プローブ D1L および D2L を放射性同位体標識伸張検定 (Radiolabel extension assay) で使用し、D3L および D4L を捕捉検定 (capture assay) または検出用配列検定 (detector assay) で使用し、FD1 を蛍光標識検出用配列として使用した。

40

【化2】

バンパー

CtpF8.BL 5'-CAGCAAATAATCCTTGG-3' (配列番号 1 8)

CtpF8.BR 5'-CATTTGGTTGATGAATTATT-3' (配列番号 1 9)

t S D A プライマーCtpF8.AL1 5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGACAAAATCAACACCTG-3'
(配列番号 2 0)CtpF8.AL2 5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGACAAAATCAACACCTGT-3'
(配列番号 2 1)CtpF8.AR1 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAGACTGTTAAAGATA-3'
(配列番号 2 2)CtpF8.AR2 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAGACTGTTAAAGATAT-3'
(配列番号 2 3)CptF8.AR3 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAGACTGTTAAAGATATT-3'
(配列番号 2 4)³²P 検出用配列

CtpF8.D1L 5'-GTTCGCAGCCAAAATG-3' (配列番号 2 5)

CtpF8.D2L 5'-ACAGCTTCTGATGGAA-3' (配列番号 2 6)

化学発光捕捉／検出プローブCtpF8.D3L 5'-GTTCGCAGCCAAAAT- (アルカリホスファターゼ×3) -3'
(配列番号 2 7)

CtpF8.D4L 5'- (ビオチン×3) -GACAGCTTCTGATGGAA-3' (配列番号 2 8)

均一 (蛍光) 検出プローブ

CtpF8.FDI

FAM

ROX

5'-TAGCACCCGAGTGCTCGCAGCCAAAATGACAGCTTCTGATGGAA-3'
(配列番号 2 9)**【 0 0 5 9 】**

例 7

領域Fに関するプライマーのスクリーニング**【 0 0 6 0 】**

異なる長さのプライマー (結果的にTm (輸送速度) が異なる) を温度 (50℃、52℃)、リン酸カリウム (25 mM、35 mM)、グリセロール (3.5%、7%)、DMSO (3%、8%) およびヒト胎盤DNA (300 mg、1,200 mg、) を変えて実験することでスクリーニングした。t S D A 反応の他の要素は以下の通りである。BsoBI (160ユニット)、Bstポリメラーゼ (9ユニット)、dATP (0.2 mM)、dsCTP (1.4 mM)、dGTP (0.2 mM)、dUTP (0.5 mM)、各プライマー (0.5 μM)、各バンパー (0.05 μM)、UDG (1ユニット)、UD1 (5ユニット)、BSA (100 μg/ml)、DTT (0.36 mM)、トレハロース (1.86%)。標的はトラコーマクラミジアLGVIIの10⁶ゲノムであった。汚染除去は45℃で30分間実施し、増幅は50℃ないし52℃で30分間実施した。

【 0 0 6 1 】

全てのプライマーコンビネーション (6) が試験された。増幅生成物は、放射性同位体

10

20

30

40

50

で標識した検出プローブCtpF8.D1L（配列番号25）を用いて伸張反応により検出した。増幅生成物をアクリルアミドゲル8%で分離した後、放射性同位体で標識した生成物の強度の定量評価をMolecular Dynamics社の445SI PhosphoimagerとImage QUant社のv1.1ソフトウェアにより実施した。

【0062】

全てのプライマーコンビネーションは以下の表2に示し、試験した8つの条件のうち最低5つの条件で検出可能な増幅生成物を生成した。

【表2】

温度	50℃	50℃	50℃	50℃	52℃	52℃	52℃	52℃
リン酸	25mM	25mM	35mM	35mM	25mM	25mM	35mM	35mM
グリセロール	3.5%	7%	3.5%	7%	3.5%	7%	3.5%	7%
DMSO	3%	8%	8%	3%	8%	3%	3%	8%
ヒトDNA	1,200ng	300ng	300ng	1,200ng	1,200ng	300ng	300ng	1,200ng

10

【0063】

一つのプライマーコンビネーションAL1/AR1は、試験した条件のうち6つの条件で強い増幅を示した。最も良い増幅は、リン酸カリウム35 mM、DMSO 3%、グリセロール7%、ヒトDNA 1,200mg、50℃増幅で観察された。バンパーと共にこのプライマーコンディションは、プライマーセットFを構成する。

【0064】

20

例8

プライマーセットFに対する感度滴定

【0065】

トラコーマクラミジア血清型Jから標的領域の1つの複製を含むように構築された1種のプラスミドpCT16の滴定が 10^6 コピーから1コピーまで試験された。また、トラコーマクラミジアからの基本小体からのゲノムDNA培養物の滴定が比較のために実施された。tSDAのために使用した条件は、例7に記載した条件と同じで、リン酸カリウム35 mM、DMSO 3%、グリセロール7%、酢酸マグネシウム6 mM、ヒト胎盤DNA 1,200ng、増幅温度50℃である。増幅後、生成物は放射性同位体で標識したプローブ伸張反応においてCTpF8.D1L（配列番号25）を用いて検出され、ImageQuant v1.1ソフトウェアを用いて定量された。結果を表3に示した。バックグラウンド値の2倍以下の強度はゼロと報告した表に示したデータは、tSDAプライマーが10コピー（3/3複製）を検出可能で、標的領域の1コピー（1/3複製）を検出可能であることを示している。

30

【表3】

pCT16のコピー数	強度	血清型 LGV II のゲノムコピー	強度 (ピクセル)
10^6	54,336,500	10^6	64,616,550
10^5	62,185,822	10^5	76,821,582
10^4	61,722,424	10^4	57,716,379
10^3	44,104,645	10^3	14,191,912
10^3	37,944,957		
10^2	6,427,450	10^2	1,534,883
10^2	14,184,075		
10^2	9,067,676		
10	2,004,088	10	32,110
10	717,772		
10	2,178,641		
1	101,144	1	31,291
1	0		
1	0		
0	0		

40

【0066】

50

例 9

トラコーマクラミジア血清型に対するプライマーセットFの特異性

【0067】

系Fがトラコーマクラミジア血清型の全てを増幅することができるか否かを決定するため、13種の血清型からの全てのDNA培養物が試験された。血清型LGV I試験用に入手できなかった。これらは例8と同一の条件の下、 10^8 ゲノムを用いて試験された。個々の検定は正副二通りで実施された。結果を表4に示した。バックグラウンド強度の2倍以下のいかなる強度もゼロとして報告した。

【表4】

血清型	強度(ピクセル)	強度(ピクセル)
A	218,413	56,556
B	0	0
B a	187,056	122,053
C	178,899	126,053
D	51,968	205,425
E	256,928	715,980
F	309,899	402,525
G	0	53,155
H	465,217	553,424
I	265,694	446,492
J	250,981	281,921
K	60,013	148,717
L III	220,077	119,152
ネガティブコントロール	0	0

【0068】

表4のデータは、例8のデータとともにプライマーセットFが 10^3 ゲノムでのトラコーマクラミジアの15種の血清型のうちの13種を検出可能であることを示している。血清型LGV Iが入手できなかったため、15種のうち14種のみが試験された。陰性の結果を示した一つの血清型は血清型Bであった。血清型BのゲノムDNAは、トラコーマクラミジアに対するいかなる特異増幅系で検出されず（上述の実施例を参照）、血清型BのDNA培養物が疑

【0069】

例 10

トラコーマクラミジアに対するプライマーセットBとFのさらなる特異性試験

【0070】

例9で報告したように、血清型BのDNA培養物の感受性の問題と血清型LGV Iが入手できなかったことから、系BおよびFがトラコーマクラミジアの血清型BとLGV Iをも増幅できるか否かを決定するため、これら2つの血清型が例9と同一の条件下で試験された。個々の検定は 10^3 コピーおよび 10^4 コピーで正副二通りで実施した。結果を表5に示した。バックグラウンド値の2倍以下のいかなる強度もゼロとして報告した。

【表5】

血清型	ゲノム数	系F	系B
B	10 ⁴	14,592	71
B	10 ⁴	8,072	1,286
B	10 ³	9,859	0
B	10 ³	134	52
LGV I	10 ⁴	8,888	8,260
LGV I	10 ⁴	15,663	5,371
LGV I	10 ³	1,032	140
LGV I	10 ³	6,728	0

10

【0071】

表5の結果から、系Fは血清型Bおよび血清型LGV Iのいずれについても10³ゲノムで増幅および検出することが可能であり、系Bも血清型Bについては10⁴ゲノムで、血清型LGV Iについては10³ゲノムで増幅および検出可能であると結論した。

【0072】

例11

プライマーセットFに対する反応条件の最適化

【0073】

プライマーセットFは、様々な反応条件を利用した一連の検定で使用された。検定はpCT16の100コピーレベルの標的を使用した。増幅は以下の反応条件領域の全てにおいて確認さ

20

増幅温度 : 50～54℃
 リン酸カリウム : 25～35mM
 DMSO : 3～7% (体積%)
 グリセロール : 3～7% (体積%)
 酢酸マグネシウム : 5～6mM
 ヒト胎盤DNA : 300～3,050 ng

【0074】

いくつかの実施例において、上記の領域は試験された領域を限定するものであり、上記の領域以外の反応条件でも増幅は起こる可能性があった。増幅生成物の生成量が最大であっ

30

増幅温度 : 52℃
 リン酸カリウム : 35mM
 DMSO : 7% (体積%) グリセロール : 7% (体積%) 酢酸マグネシウム : 5mM
 ヒト胎盤DNA : 1,200 ng

【表6】

微生物	鎖	結果	微生物	鎖	結果
<i>Chlamydia psittaci</i>	TWAR	—	<i>Branhamella catarrhalis</i>	ATCC 25240	—
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Borg	—	<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDMS 1632	—	<i>Kingella kingae</i>	ATCC 23330	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 19424	—	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BDMS 2900	—	<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 35541	—	<i>Staph. aureus</i>	ATCC 12598	—
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13090	—	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 19001	—
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13077	—	<i>E. coli</i>	ATCC 11775	—
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23970	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	—
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23972	—	<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	—
<i>Neisseria flavescens</i>	ATCC 13120	—	<i>Streptococcus Group A</i>	ATCC 16915	—
<i>Neisseria sicca</i>	ATCC 29193	—	<i>Streptococcus Group B</i>	ATCC 12386	—
<i>Neisseria subflava</i>	ATCC 14799	—	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	—
<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC 14685	—	<i>Haemophilus influenza</i>	ATCC 33533	—
<i>Neisseria elongata</i>	ATCC 25295	—	<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC 23714	—
<i>Neisseria mecusa</i>	ATCC 19696	—	単純ヘルペス V-1	McINTYRE	—
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 27340	—	単純ヘルペス V-2	鎖 G	—
<i>Candida albicans</i>	ATCC 44808	—	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC 30001	—
<i>Peptostreptococcus Productus</i>	ATCC 27340	—			

10

20

【0075】

例 1 2

プライマーセットFの交差反応性の検定

【0076】

泌尿生殖器の臨床試料の共通に見つかる潜在的交差反応性を有するバクテリアとウイルスがある。発熱性 S D A 反応が、プライマーセット F と例 1 1 の最適検定条件を用いて実施された。潜在的交差体試料は 10^7 ゲノムで試験された。これらは、増幅の阻害が起こらないことを示すため、内標準として100コピーのpCT16を含む同一のプール管理条件を持つ4つの種のプールサンプルで試験された。結果を表6に示した、いずれの場合においても、交差反応体は増幅または検出されなかった。

30

【0077】

例 1 3

系BおよびFでのトラコーマクラミジアの均一リアルタイム型蛍光 t S D A 検出

【0078】

プライマーセット F および B は、均一蛍光リアルタイム型 t S D A 反応の実施にも有用である。この種の反応はヘアピン配列と受容体および供与体蛍光分子を含む検出用配列を使用する。系 F プライマーセットとの使用において有効に作用する検出用配列の一つがCTpF 8.FD1

40

5' -TAGCACCCGAGTGCTCGCAGCCAAAATGACAGCTTCTGATGGAA-3'

(配列番号 2 9) である。系 B との使用において有効に作用にする検出用配列はCTpB4.FD 1

5' -TAGCACCCGAGTGCTTTGACGATTTTCTCCAACCGATGAGTTGAT-3'

(配列番号17) である。これらの配列の最初の15塩基はBsoBI制限部位と共にヘアピン構造を含む。塩基 2 ~ 6 は、塩基15~11と塩基対合し得る。さらに、塩基1はFAMの添加によって修飾され、塩基15はROXの添加によって修飾される。このヘアピン構造(配列番号 2 9 の最初の15塩基)は

50

【化 3】

5'-(FAM)*TAGCA~~CCC~~GAGTGCT*(ROX)-3'

(配列番号 30) である。塩基 6～11はイタリック体で表記し、BsoBI制限部位を表した。

【0079】

均一リアルタイム型蛍光 t S D A の実施に関する実験計画は、通常の t S D A のものと類似している。マイクロタイターウェル形式でのより大容量の反応での使用に適用されていたものであるが、t S D A の実験計画が構成要素の比率に従う実験手順の一つを以下に示す。すなわち、(1) ウェルを 1 ミリリットルの水で満たした後、Electro-Them1 デジタル温度計を用いて 1 つの Thermal-Lok バスを 45℃ に、もう一つの Thermal-Lok バスを 52℃ に平衡化させ、または、乾燥している Thermal-Lok バスを 54℃ に平衡化させ、(2) t S D A 緩衝液を調製し、汚染除去混合物を調製し、室温でこれらを保存し、(3) 個々の 0.5ml Eppendorf Safelok 試験管に t S D A 反応緩衝液 0.65 μl を添加し、(4) 0.5 μl の鋳型を添加し、試験管当たり ヒト DNA 10ng/μl に希釈し、(5) 試験管をふっとう水バス中に 2 分間置き、(6) 試験管をマイクロ遠心分離機およびパルススピン (Pulse spin) に移し、(7) 試験管を 45℃ Thermal-Lok に 5 分間移し、(8) 個々の試験管に汚染除去混合物を 15 μl ずつ添加し、短時間攪拌させ、20 分間培養し、(9) 増幅混合物を調製し、室温で貯蔵し、(10) マイクロタイターを金属トレイ内に置き、予熱のため 54℃ Thermal-Lok の上部に置き、(11) 試験管を 52℃ Thermal-Lok に 5 分間移し、(12) 反応液 85 μl を適当なマイクロタイターウェルに移し、終点反応のための、サンプルを試験管内に放置し、(13) 個々のウェルに増幅混合物 15 μl を添加し、自己粘着性酢酸塩シートでシールし、終点反応のため、個々の試験管に増幅混合物 15 μl を添加して攪拌し、引き続き 60 分間 Thermal-Lok 中で培養し、(14) トレイを 52℃ で蛍光板読取装置内に置き、60 分間かけて R F U データを収集する。終点反応のため、マイクロタイターウェルに試験管の内容物を移し、個々のウェルを 1 回ずつ読み取る。

【0080】

例 14

均一検出を用いた系 b および F の感度

【0081】

均一リアルタイム型蛍光 t S D A 反応における使用中のプライマー系 F および B の CtpF8. FD1 との感度を試験するため、標的として異なるコピー数の pCT16 プラスミドを用いて t S D A 反応を実施した。系 B に関しては、例 12 に記載した終点実施手順を使用した。最終的な反応条件は以下の通りである。

【0082】

リン酸カリウム 35mM、DMSO 3%、グリセロール 7%、酢酸マグネシウム 6 mM、Bst 40 ユニット、BsoBI 640 ユニット、ヒト胎盤 DNA 2,400mg、dATP 0.2mM、dGTP 0.2mM、dCsTP 0.4mM、dUTP 0.5mM、アセチル化牛血清アルブミン 0.1mg/ml、トレハロース 1.8%、DTT 0.36mM、CTpB4.FD1 (配列番号 17)。

【0083】

増幅は 54℃ で実施し、汚染除去酵素 (UDG) と阻害剤 (UD1) が使用された。表 8 に示す結果は、60 分間の培養後のサンプルの読取りから得られたものである (励起 485nm、放射 538nm)。

【表 7】

プラスミドコピー	終点 RFU	終点 RFU/平均バックグラウンド
500	2.52	4.8
	7.27	14.0
	14.35	27.6
200	6.72	12.9
	2.14	4.1
	11.64	22.4
50	1.20	2.3
	0.66	1.3
	0.43	0.8
0, バックグラウンド値	0.57	
	0.51	
	0.48	

10

【0084】

結果は、正の感度を平均バックグラウンド値の2倍以上として定義した場合、3種類の複製のうち1つに対する50コピーのpCT16の感度を示している。

【0085】

系Fに関し、汚染除去および増幅混合物が例12に示した手順で調製された。ただし、全ての試薬について濃度は10倍レベルとした。汚染除去混合物15 μ lもしくは増幅混合物10 μ lをマイクロタイターウェルの底にスポットし、低湿度乾燥室内で乾燥させた。汚染除去ウェルと増幅ウェルは、使用時まで乾燥剤を用いて別々に密封されている。

20

【0086】

汚染除去混合物がスポットされたウェルはThermal-Lok加熱ブロックで45℃で5分間予熱された。純水、リン酸カリウム、グリセロール、DMSP、ヒト胎盤DNA、プラスミドpCT16を含むサンプルは2分間沸騰した後、プールするためにマイクロ遠心分離器中ですばやく遠心分離された。個々のサンプル

150 μ lがピペットを用いて予熱された汚染除去ウェルに加えられ、粘着フィルムを用いて密封した後、45℃で20分間培養された。ウェルは温度を52℃にするため、第二のThermal-Lok加熱ブロックに移された。これに合わせて、汚染除去混合物がスポットされたウェルと同数のウェルに上述の増幅混合物をスポットし、予熱のため同じ加熱ブロック内に置いた。5分から10分の後、汚染除去混合物ウェルから粘着フィルムが取り除かれ、各々の汚染除去混合物ウェルから10 μ lのサンプルが取り出され、増幅混合物ウェルにピペットを用いて滴下された（一つの増幅混合物ウェルに対し一サンプルを投入）。増幅混合物スポットの再水和作用後のマイクロウェル中の最終的な反応条件はリン酸カリウム35mM、グリセロール7%、DMSO7%、酢酸マグネシウム5mM、アセチル化BSA 0.2mg/ml、トレハロース0.36mM、ジチオドレイトール0.36mM、 α チオラート化dCTP 0.7mM、dUTP 0.25mM、dATP 0.1mM、dGTP 0.1mM、Bstポリメラーゼ40ユニット、ウラシルDNAグルコジラーゼ1ユニット、ウラシルDNAグルコジラーゼ阻害剤5ユニット、AR1（プライマー）0.3 μ M、BL1およびBR1（バンパー）0.05 μ M、FD1（検出用オリゴ）0.2 μ M、ヒト胎盤DNA2,400ngである。増幅混合物ウェルは新しい粘着フィルムシートを用いて密封され、常時培養温度52℃を維持するように設定されたPerSeptivesプレートリーダーに直ちに移された。ウェルの読取りは直ちに開始され、1分間隔で60分間読取りが行われた。サンプルは485nmで励起され、放出された蛍光は530nmでモニタされた。結果を表8に示す。これらの結果は標的DNA10コピーの系の感度を表している。

30

40

【表8】

プラスミドコピー数	開始時 RFU	最終 RFU	差
0	298	334	36
0	361	407	46
10	370	726	356
10	295	299	4
50	390	718	328
50	357	1076	719
100	299	1164	865
100	391	1706	1315

10

【0087】

例 15

均一検出を用いた系Fの感度

【0088】

系Fの感度をチェックするため、2組の実験が実施された。例14では標的としてpCT16が使用されたが、今回の2組の実験ではトラコーマクラミジアの基本小体LGV2が標的として使用された。反応は例13に示した手順で実施された。最終的な反応条件は以下に示した点を除き、例14と同様である。チオラート化dCTP 1.4mM、dUTP 0.5mM、dATPおよびdGTP 0.2mM。RFUデータが60分間の増幅時間を通して毎分収集された。個々のレベルでの2種の複製に関して、時間0と時間60の間でのRFUの差を表9に示した。ふたたび、この蛍光検出用配列ベースの系Fは、10コピーのトラコーマクラミジア基本小体を増幅し、バックグラウンド値を上回るレベルで検出することができる。

20

【表9】

基本小体数	RFU の変化 複製1	RFU の変化 複製2
300	1142	769
250	1430	1015
200	836	813
150	401	307
100	262	573
80	717	407
60	381	424
40	257	461
20	468	349
10	158	66
正の対照 pCT16 150 コピー	586, 215, 524	
ネガティブコントロール	75	

30

【0089】

例 16

均一検出を用いた系Fの特異性

【0090】

均一リアルタイム型蛍光 t S D Aでの使用する際のCtpF811.FD1系の特異性が試験された。反応は例14と同様に実施した。交差反応体プールは反応当たり 10^7 ゲノムで試験された。増幅反応はPerSeptive Biosystems CytoFluor 4000プレートリーダーで実施された。RFUデータは60分間の増幅時間を通して毎分収集された。時間0から時間60までRFUの差を表10に示した。いずれのプールでも、試験した交差反応体の増幅や検出は確認されなかった。

40

【表10】

プール	交差反応体	R F U の変化
1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 35541 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> BDMS 2900 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> BDMS 1632	25
2	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077 <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	24
3	<i>Staph. aureus</i> ATCC 12598 <i>Sterptococcus</i> grp A ATCC 16915 <i>Sterptococcus</i> grp B ATCC 12386 <i>Sterptococcus faecalis</i> ATCC 29212	13
4	<i>Salmonella minnesota</i> ATCC 9700 <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 <i>E. coli</i> ATCC 11775 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	20
5	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 <i>Moraxella lacunata</i> ATCC 17967 <i>Haemophilus influenza</i> ATCC 33533	13
6	<i>Gardnella vaginalis</i> ATCC 14018 <i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714 <i>Trichomonas vaginalis</i> ATCC 30001 <i>Candida albicans</i> ATCC 44808	28
7	HSV 1 McIntyre HSV 2 G <i>Peptostreptococcus productus</i> ATCC 44808	13
8	<i>Neisseria flavescens</i> ATCC 13120 <i>Neisseria sicca</i> ATCC 29193 <i>Neisseria cinerea</i> ATCC 14685 <i>Neisseria elongata</i> ATCC 25295	- 1
9	<i>Neisseria mucosa</i> ATCC 19696 <i>Neisseria subflava</i> ATCC 14799 <i>Branhamella catarrhalis</i> ATCC 25240 <i>Kingella kingae</i> ATCC 23330	23
10	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 14632 <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077 <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13102 <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13113 <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 35559	0
11	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 44418 <i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142 <i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23971 <i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23972	15
12	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970	30
13	正の対照 pCT 16 500 コピー	401, 150
14	ネガティブコントロール	22, 27

10

20

30

【0091】

発明はいくつかの特異性について記載されているが、発明の範囲から逸脱することなく、当業者にとって明らかな改良を実施してよい。本発明の様々な特徴を後述する請求の範囲に述べる。

【0092】

本発明の様々な目的、利点および新規な特徴は、以下の詳細な説明を添付した図面と併せて読むことにより、容易に理解できる。

【0093】

【配列表】

40

(1) 一般情報

(i) 出願人: Berger, Dolores M., Foxall, Paul A.

(ii) 発明の名称: トラコーマクラミジア潜在プラスミドの増幅および検出によるトラコーマクラミジアの検定

(iii) 配列数: 30

(iv) 住所欄 Richard J. Rodrick-Becton, Dickinson and Company

1 Beacon Drive, Franklin Lakes, NJ, USA

10

(v) 読取り可能なコンピューター形式

(A) 媒体: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換機

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: PatentIn Release No.0, Version No. 1.30

(vi) 現在の出願情報

(A) 出願番号:

20

(B) 出願日:

(C) 分類:

(vii) 弁理士情報

(A) 氏名: Highet, David W.

(B) 登録番号: 30,265

(C) 明細書番: p-3889

(ix) 電話通信情報

30

(A) 電話番号: (201)847-5317

(B) ファクス番号: (201)848-9228

配列番号: 1

配列の長さ: 22塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖

40

配列

GAAGATCGAG TAGACGTAAT AT

22

配列番号：2

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

10

配列

ATAGCAGATA TATCTAGAAC CTT

23

配列番号：3

配列の長さ：22塩基対

配列の種類：核酸

鎖の数：一本鎖トポロジー：直鎖

20

配列

TTGGATCGAA ATGTAATACC GA

22

配列番号：4

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

30

トポロジー：直鎖

配列

ACTTCTGATT TTCAAGGTGG AT

22

配列番号：5

配列長さ：22塩基対

配列の型：核酸

40

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CAAACTGCG TCTTTGCTGA TA

22

配列番号：6

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

10

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GGGTGTGACT GTGAATTTTC C

21

配列番号：7 配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

AGTTGGGCAA ATGACAGAGC

20

配列番号：8

配列の長さ：20塩基対

30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

TGAATAACCC GTTGCATTGA

20

配列番号：9

40

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGCGATT A CTTGCAGTTG 40

配列番号：1 0

10

配列の長さ：39塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGGATTAC TTGCAGTTG 39

20

配列番号：1 1

配列の長さ：16塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GAGTAGACGT AATATT 16

30

配列番号：1 2

配列の長さ：41塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGATATCT GCTATTTTCAT T 41

40

配列番号：1 3

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

10

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGATATCT GCTATTTTCAT 40

配列番号：1 4

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

20

配列

CTCTTAAGGT TCTAG 15

配列番号：1 5

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

30

配列

CTCATCGGTT GGAGA 15

配列番号：1 6

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

40

トポロジー：直鎖

配列

TCTCCAACCG ATGAG

15

配列番号：1 7

配列の長さ：45塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10

トポロジー：直鎖

配列

TAGCACCCGA GTGCTTTGAC GATTTTCTCC AACCGATGAG TTGAT 45

配列番号：1 8

配列の長さ：17塩基対

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CAGCAAATAA TCCTTGG

17

配列番号：1 9

配列の長さ：19塩基

30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CATTGGTTGA TGAATTATT

19

配列番号：2 0

40

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGACAAAA TCAACACCTG 40

配列番号：2 1

10

配列の長さ：41塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGACAAAA TCAACACCTG T 41

配列番号：2 2

20

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGGAGACT GTTAAAGATA 40

30

配列番号：2 3

配列の長さ：41塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGGAGACT GTTAAAGATA T 41

40

配列番号：2 4

配列の長さ：42塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGGAGACT GTTAAAGATA TT 42 10

配列番号：2 5

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

GTCGCAGCCA AAATG 15 20

配列の番号：2 6

配列の長さ：16塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

配列

ACAGCTTCTG ATGGAA 16 30

配列番号：2 7

配列の長さ：14塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖

40

配列

GTCGCAGCCA AAAT

14

配列番号：28**配列の長さ：17塩基対****配列の型：核酸****鎖の数：一本鎖**

10

トポロジー：直鎖**配列**

GACAGCTTCT GATGGAA

17

配列番号：29**配列の長さ：44塩基対****配列の型：核酸**

20

鎖の数：一本鎖**トポロジー：直鎖****配列**

TAGCACCCGA GTGCTCGCAG CCAAAATGAC AGCTTCTGAT GGAA 44

配列番号：30**配列の長さ：15塩基対**

30

配列の型：核酸**鎖の数：一本鎖****トポロジー：直鎖****配列**

TAGCACCCGA GTGCT

15

【図面の簡単な説明】

40

【図1】システムBに対して使用するバンパー、プライマー、および検出用配列（detector）を示すものである。

【図2】標的としてトラコーマプラスミド潜在プラスミド（プラスミドpCT16）の一部を用いてtSDAを実施するために、プライマーや、バンパー条件温度の様々な組み合わせた試験条件マトリックスを使用しりん光分析の結果の一つを示すものである。

【図3】標的としてトラコーマプラスミド潜在プラスミド（プラスミドpCT16）の一部を用いてtSDAを実施するために、プライマーやバンパー条件温度の様々な組み合わせた試験条件マトリックスを使用しりん光分析の結果の別の一つを示すものである。

【図4】2つの異なるが、相補的な検出用配列のpCT16を標的として用いて実施したtSDA反応のりん光分析を示すものである。反応はDMSO 3%、グリセロール 7%、マグネシウ

50

ム 6 mM、りん酸カリウム 35 mM を用いて実施し、増幅は 52℃ で行った。4 種のプライマーコンビネーション (1, 2, 3, 4) が使用された。図 4 A の 4 種のプライマーサンプルは図 4 B の増幅生成物の非転写鎖 DNA 鎖とハイブリッド形成した伸長プライマーを用いて検出された。同じ 4 種のサンプルが図 4 A で使用した検出用配列の補体を用いて検出された。図 4 B に示す実験に使用された検出用配列は増幅生成物の有効鎖にハイブリッド形成する。

【図 5】 標的として pCT16 を用い、感度試験のためにプライマーやバンパー条件の様々なコンビネーションで行った t S D A のりん光分析の結果の一つを示すものである。標的は 10^2 コピーから 10^6 コピー存在していた。4 種のプライマーコンビネーションはそれぞれ、標的コピー数の各々の範囲にわたって試験された。実験は、例 2 で説明するように、2 つのバンパー条件設定の下で実施した。

10

【図 6】 標的として pCT16 を用い、感度試験のためにプライマーやバンパー条件の様々なコンビネーションで行った t S D A のりん光分析の結果の別の一つを示すものである。

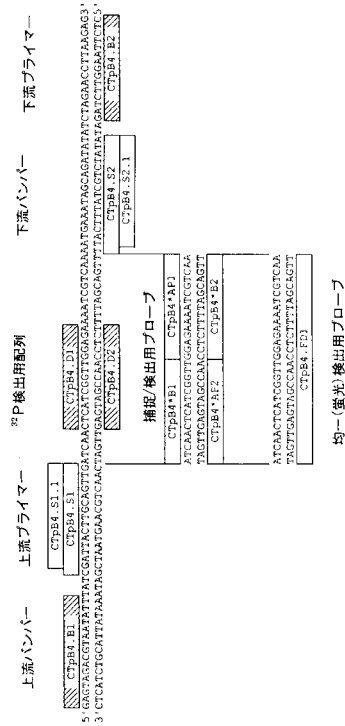
【図 7】 プライマーコンビネーション 2 の特異性および交差反応性をチェックするための検定の結果を示すものである。標的核酸は、特異性を試験用のトラコーマクラミジアの 14 種の血清型 (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L2, L3) と交差反応性を試験用の *C. pneumoniae*、*C. psittaci*、*N. gonorrhoeae* からなる。各々の血清型は 10^3 のゲノムコピーおよび 10^4 のゲノムコピーで試験され、交差反応性試験では 10^7 のゲノムコピーの微生物が使用された。試験サンプルには pCT16 (with control と表記する欄) と標的なしも含まれる。

【図 8】 300 ng から 3,000 ng の範囲の様々な量のヒト DNA の存在下でのトラコーマクラミジアに対するプライマーコンビネーション 2 の感度を試験するための検定の結果を示すものである。

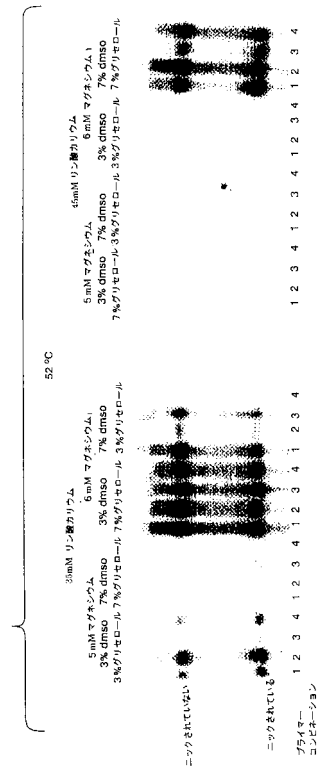
20

【図 9】 プライマーコンビネーション 2 を用いた交差反応性に関する検定結果を示したものである。30 種類の異なる種を代表する合計 35 種類の異なる微生物からなる 9 つのプールが交差反応性の有無を決定するために試験された。各々の種は 10^7 個のゲノムコピーで試験された。各々のプールの左の欄はプールのみでの増幅を示し、右の欄は pCT16 200 コピー加えた場合の増幅を示す。

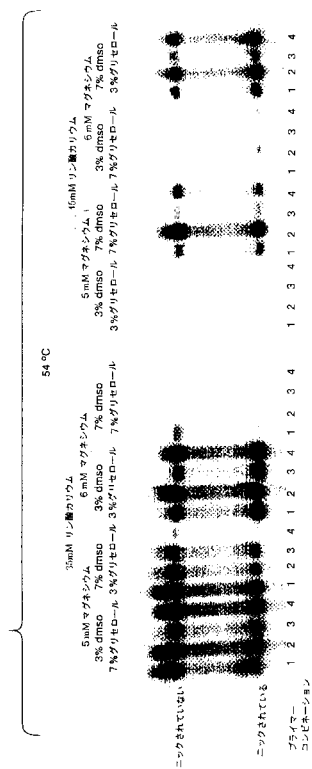
【図 1】



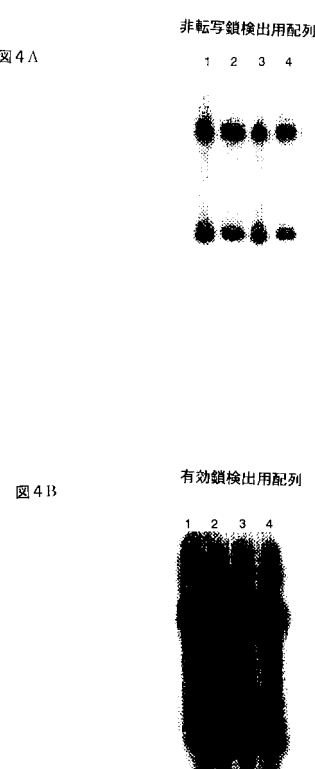
【図 2】



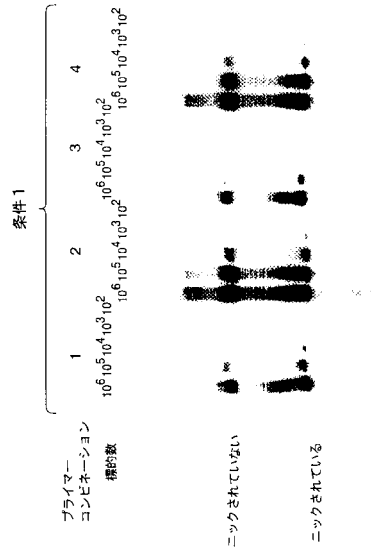
【図 3】



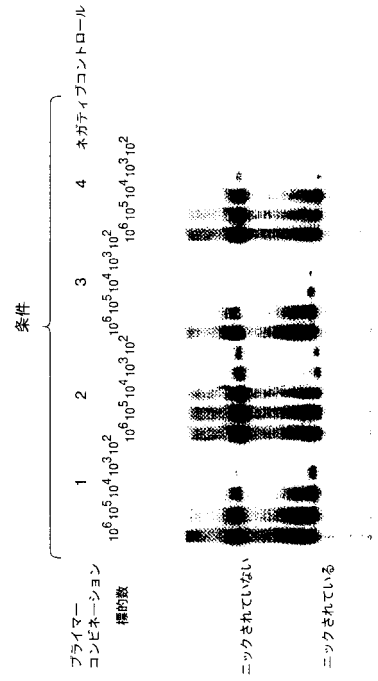
【图 4】



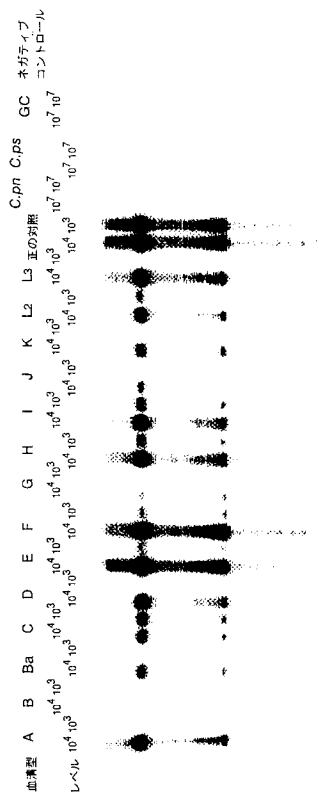
【図 5】



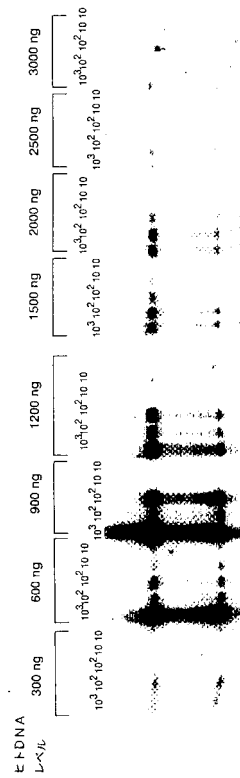
【図 6】



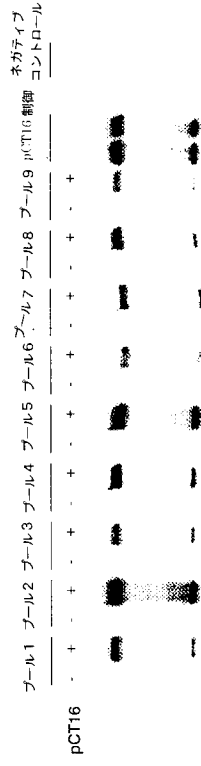
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(74)代理人 100072143

弁理士 秋山 暢利

(74)代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人 100096769

弁理士 有原 幸一

(72)発明者 ポール・エイ・フォクソール

アメリカ合衆国カリフォルニア州94401, サン・マテオ, ハイワード・アヴェニュー 33,
アパートメント 211

(72)発明者 ドロレス・エム・バーガー

アメリカ合衆国メリーランド州21239, ボルチモア, ロック・ヒル・コート 6505

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表平09-503910 (JP, A)

Nucl. Acids Res., (1988), 16, [9], p.4053-4067

Anal. Biochem., (1997.04), 247, [1], p.130-137

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed