

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4441259号  
(P4441259)

(45) 発行日 平成22年3月31日(2010.3.31)

(24) 登録日 平成22年1月15日(2010.1.15)

(51) Int. Cl.		F 1	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N</b>	<b>37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F
<b>C 1 2 R</b>	<b>1/32</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 37/00 1 O 2
<b>C 1 2 R</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 16 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-500291 (P2003-500291)  
 (86) (22) 出願日 平成14年4月9日(2002.4.9)  
 (65) 公表番号 特表2004-534536 (P2004-534536A)  
 (43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/003956  
 (87) 国際公開番号 W02002/097126  
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日(2002.12.5)  
 審査請求日 平成17年3月15日(2005.3.15)  
 (31) 優先権主張番号 101 21 505.3  
 (32) 優先日 平成13年5月3日(2001.5.3)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 503398451  
 ハイン ライフサイエンス ゲー・エム・  
 ベー・ハー  
 ドイツ国 7 2 1 4 7 ネーレン ハード  
 ウィーゼンシュトラーセ 1  
 (74) 代理人 100077012  
 弁理士 岩谷 龍  
 (72) 発明者 ワイゼンエガー・ミハエル  
 ドイツ国 6 9 1 6 8 ウィースロッホ  
 ヨハン・フィリップ・ブローナー・シュトラ  
 ーセ 2 4 / 1

審査官 石丸 聡

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラム陽性菌の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 試料組成物を、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 7 および配列 I D 番号 9 の配列からなるプライマーからなる群より選択される第一のプライマーおよび配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 8 および配列 I D 番号 10 の配列からなるプライマーからなる群より選択される第二のプライマーが存在する核酸増幅反応に付して、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ノカルディア属、ロドコッカス属、及びツカムレラ属の細菌の 2 3 S r D N A / r R N A の H e l i x 5 4 の少なくとも一部を含む核酸領域を増幅する工程；

(b) 工程 (a) の増幅産物またはその一部を含む組成物を、配列 I D 番号 11 ~ 4 2 の配列およびそれに相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドからなる群より選択される 1 つ以上のプローブとハイブリダイズさせる工程；および

(c) ハイブリダイゼーションの度合いを測定する工程；  
 を含むことを特徴とするマイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ノカルディア属、ロドコッカス属、及びツカムレラ属の細菌を検出および / または同定する方法。

【請求項 2】

核酸増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

下記配列：

配列 I D 番号 1 / 配列 I D 番号 2 (プライマーペア 1)、

配列 I D 番号 3 / 配列 I D 番号 4 (プライマーペア 2)、  
 配列 I D 番号 5 / 配列 I D 番号 6 (プライマーペア 3)、  
 配列 I D 番号 7 / 配列 I D 番号 8 (プライマーペア 4) および  
 配列 I D 番号 9 / 配列 I D 番号 10 (プライマーペア 5)  
 を有するプライマーペアのいずれかが核酸増幅反応中に存在することを特徴とする請求項  
 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 つのプローブまたは 1 つのプライマーが標識されていることを特徴とする  
 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

標識が、蛍光標識、ビオチンおよびジゴキシゲニンからなる群より選択されることを特  
 徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

プライマーのうち少なくとも 1 つが標識を有することを特徴とする請求項 4 または 5 記  
 載の方法。

【請求項 7】

1 つ以上のプローブが固体相上に固定され、次に該固体相を工程 (a) の増幅産物また  
 はその一部を含む組成物と接触させることを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 2 つのプローブが固体相上に固定されることを特徴とする請求項 7 記載の方  
 法。

【請求項 9】

配列 I D 番号 11 ~ 42 の配列または対応する相補的な配列からなるプローブが、固体  
 相上に各プローブが間隔をあけた領域で固定されていることを特徴とする請求項 7 または  
 8 記載の方法。

【請求項 10】

プローブのうち少なくとも 1 つが標識を有することを特徴とする請求項 4 または 5 記載  
 の方法。

【請求項 11】

増幅産物またはその一部が固体相上に固定され、配列 I D 番号 11 ~ 42 の配列および  
 それに相補的な配列からなるプローブからなる群より選択される少なくとも 1 つのプロー  
 ブを含む組成物と接触させることを特徴とする請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

以下の (a) 及び (b) を含む、マイコバクテウム属、コリネバクテリウム属、ノカル  
 ディア属、ロドコッカス属、及びツカムレラ属の細菌の 23 S rDNA / rRNA の He  
 l i x 5 4 の少なくとも一部を含む核酸領域を増幅し、これらの細菌を検出及び / または  
 同定するためのキット。

(a) 第 1 のプライマーが配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 5、配列 I D  
 番号 7 および配列 I D 番号 9 の配列からなるプライマーからなる群より選択され、第 2 の  
 プライマーが配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 8 および  
 配列 I D 番号 10 の配列からなるプライマーからなる群より選択されるプライマーペアを  
 少なくとも一つ

(b) 配列 I D 番号 11 ~ 42 の配列およびそれに相補的な配列からなる群より選択され  
 る配列からなるオリゴヌクレオチドを少なくとも一つ

【請求項 13】

配列 I D 番号 1 / 配列 I D 番号 2 (プライマーペア 1)、  
 配列 I D 番号 3 / 配列 I D 番号 4 (プライマーペア 2)、  
 配列 I D 番号 5 / 配列 I D 番号 6 (プライマーペア 3)、  
 配列 I D 番号 7 / 配列 I D 番号 8 (プライマーペア 4) および  
 配列 I D 番号 9 / 配列 I D 番号 10 (プライマーペア 5)

10

20

30

40

50

であるプライマーペアのいずれかを含むことを特徴とする請求項 1 2 記載のキット。

【請求項 1 4】

配列 I D 番号 1 ~ 1 0 の配列からなるオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる 1 つ以上のオリゴヌクレオチドからなる、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ノカルディア属、ロドコッカス属、及びツカムレラ属の細菌の 2 3 S r D N A / r R N A の H e l i x 5 4 の少なくとも一部を含む核酸領域を増幅し、これらの細菌を検出及び/または同定するための核酸増幅反応用のプライマー。

【請求項 1 5】

( a ) の増幅産物またはその一部を含む組成物を、配列 I D 番号 1 1 ~ 4 2 の配列からなるオリゴヌクレオチドからなる各プローブとハイブリダイズさせる請求項 3 記載の方法

10

【請求項 1 6】

( b ) が、配列 I D 番号 1 1 ~ 4 2 の配列からなるオリゴヌクレオチドからなる各プローブを含むものである請求項 1 3 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、微生物診断の分野、特に、マイコバクテリアのように G C 含量の高いグラム陽性菌の臨床診断における検出に関する。

【背景技術】

20

【0 0 0 2】

バクテリアの検出とそれらの正確な同定は、臨床診断において非常に重要な役割を果たした。それゆえ、細菌感染症においては、適切な治療を施すことができるようそれぞれの病原体が可及的すみやかに同定されるべきである。

【0 0 0 3】

こうした状況において、グラム陽性菌、特にマイコバクテリアが重要な役割を果たす。現在のところ、これまでに臨床物質から発見され識別されてきた 1 0 0 種類を超えるマイコバクテリアが知られている。マイコバクテリウム・チューバークュロウセス コンプレックス ( *M. tuberculosis complex* )、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ ( *Mycobacterium intracellulare* )、マイコバクテリウム・アビウム ( *Mycobacterium avium* ) のような病原性マイコバクテリア種がここでは特に重要である。

30

【0 0 0 4】

通常の医学的診断や食品分析では、従来バクテリアは選択培地およびその後の生化学的特性の調査によって同定されてきた。しかしながら、それでは正確な種類を同定出来ないことが頻繁であった。更に、これらの調査は非常に時間がかかり、より詳しい調査のためには純粋な培養菌が存在しなければならない。特に、非常に複雑で多様なバクテリア群で生育条件が困難なものについては、従来の培養菌判別法によるアクセスが難しく、および/またはそれらの生育の遅さのため大幅に診断が遅れることになる。

【0 0 0 5】

近年、バクテリア検出のために、核酸をベースとする方法がますます導入されている。該方法は、例えば、種に特異的なプライマーを用いた核酸増幅反応を行うことを含む。検出は、通常ゲル電気泳動またはマイクロタイター皿に固定されたプローブにより行われる。しかし、このような技術は、可能性のある多数の病原性微生物の中から 1 つまたはそれ以上を検出するには適していない。この問題に対する 1 つのアプローチは、異なる種に特異的な増幅プライマーおよび対応するプローブ、および/または微生物群の塩基断片に相補的なプライマーペアの混合物を含む増幅反応混合物である。種特異性はプローブの構造によって確認される。

40

【0 0 0 6】

スパーサー構造を含むリボゾーム RNA ( r R N A ) またはリボゾーム DNA ( r D N A ) が、すでにバクテリア特異的核酸の増幅のための標的配列として用いられている。診

50

断で最もよく用いられている標的配列は16S rRNAである。それは妥当なデータベースにおいて最も代表的な配列である。しかしながら、その相対的に保持された形質のため、種に特異的な配列構造が常に見つかるとは限らない。対照的に16S-23S rDNAスペーサー領域は多くの種で非常に可变的であり、バクテリアを同定するのに良く適している。それはまた構造情報の内容に関して16S rRNAよりも優れている。しかしながら、これらの標的領域はまた、多種のマイコバクテリア間での判別においては限られた適性しか有さない。なぜならそれらの配列の可変性が高すぎるため、該標的領域に対するプローブへの感度が低下するからである

【0007】

F E B S L e t t . , 2 8 1 巻、 1 1 4 ~ 1 1 8 頁 ( 1 9 9 1 年 ) ( L i e s a c k ら ) に 10  
は、マイコバクテリウム・レブラ (Mycobacterium leprae) 23Sと5S RNAの完全なヌクレオチド配列、およびバクテリア検出用の種々の標的配列が明らかにされている。特にマイコバクテリウム・レブラ検出用のHelix 54領域のプローブが明らかにされている。これは、しかしながら、Helix 54標的領域に基づいて、非常に多くの異なる種類のマイコバクテリア等の高GC含量グラム陽性菌間で、識別が可能であるとの結論を導けるものではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、GC含量の高いグラム陽性菌を検出および/または同定するための方法に関 20  
する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本方法によれば、最初に核酸増幅反応が行われ、次にその増幅産物またはその一部分を含む組成物を1つ以上のプローブとハイブリダイズさせる。最後に、ハイブリダイゼーションの度合いが測定される。

【0010】

核酸増幅反応として種々の反応が利用されてもよい。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いることが好適である。様々なデザインのPCR技術が当業者に知られており、例えばDNA分析のためのポリメラーゼ連鎖反応による標的増幅 (Target amplification for 30  
DNA analysis by the polymerase chain reaction)、Mullis、Ann Biol Chem (Paris) 48 (8) 巻、579~582頁 (1990年) を参照されたい。適用される更なる増幅技術は、NASBA法 (nucleic acid strand-based amplification)、TMA法 (transcriptase mediated amplification)、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、Q-複製酵素増幅 (Q複製酵素) および一本鎖置換増幅法 (single strand displacement amplification: SDA) である。NASBA法および他の転写をベースとした増幅法が、医学的微生物学のレビュー (Reviews in Medical Microbiology)、10 (4) 巻、185~196頁 (1999年) (Chan and Fox) の中で検討されている。

【0011】

核酸増幅反応は、試料組成物を用いて行われる。該試料組成物は、バクテリア、特にGC含量の高いグラム陽性菌を含んでいると思われるいかなる組成物であってもよい。それは例えば気管分泌物、創傷塗沫、血液等の主要な材料、または予め液体培地または固体培地で生育させた微生物の菌株であってもよい。

【0012】

本発明によれば、核酸増幅反応中に存在するプライマーペアは、配列ID番号1、配列ID番号3、配列ID番号5、配列ID番号7、または配列ID番号9のいずれかの配列を有する第一のプライマーおよび配列ID番号2、配列ID番号4、配列ID番号6、配列ID番号8、または配列ID番号10のいずれかの配列を有する第二のプライマーである。個々のプライマーの配列を図1に示す。 50

好ましい態様では、下記の配列：

配列 I D 番号 1 / 配列 I D 番号 2 (プライマーペア 1)、  
 配列 I D 番号 3 / 配列 I D 番号 4 (プライマーペア 2)、  
 配列 I D 番号 5 / 配列 I D 番号 6 (プライマーペア 3)、  
 配列 I D 番号 7 / 配列 I D 番号 8 (プライマーペア 4) および  
 配列 I D 番号 9 / 配列 I D 番号 10 (プライマーペア 5)  
 を有するプライマーペアのいずれかが核酸増幅反応中に存在する。

【0013】

該プライマーペアのいずれもが、GC 含量の高いグラム陽性菌の 23S rDNA / rRNA の Helix 54 の少なくとも一部を含む核酸領域を増幅するために使用することができる。該プライマーは、異なる組み合わせで、すべての G + C - rich なグラム陽性菌の Helix 54 領域を増幅してもよい。特にプライマー配列 I D 番号 8 (図 1) は、適切な反応条件下で G + C - rich なグラム陽性菌の核酸のみに特異的に結合することができる。プライマー配列 I D 番号 3 (図 1) と配列 I D 番号 2 (図 1) または配列 I D 番号 4 (図 1) との組み合わせは、非常に特異的にマイコバクテリウム・ケロナエコンプレックス (*M. chelonae* complex)、マイコバクテリウム・カンサシイ (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・マルモエンセ (*M. malmoense*)、マイコバクテリウム・チューバークウセスコンプレックス (*M. tuberculosis* complex)、マイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウム (*M. scrofulaceum*) およびマイコバクテリウム・インタージェクタム (*M. interjectum*) を増幅する。

【0014】

当業者は、本発明の教示を出発点とすれば、本発明のプライマーから僅かにそれるがそれでも機能するプライマーが設計可能であることを十分に理解する。それゆえ、配列 I D 番号 1 ~ 10 の配列を有する本発明のプライマーと対照して、5' および / または 3' 末端で少なくとも 1 つ、2 つまたは 3 つのヌクレオチドにより伸長または切断されるプライマーもまた考えられる。特に、プライマーの 5' 末端での伸長または切断により、本発明により使用しうる機能的なプライマーを更に提供することが出来る。同様に、プライマーの個々またはいくつかのヌクレオチドは、該プライマーの特異性および該プライマーの溶融温度があまり変わらない限り、他のヌクレオチドで置き換えられることが考えられる。通常、ヌクレオチド A、G、C および T 以外に、イノシン等の修飾されたヌクレオチドもまた適用されてもよいことは、当業者には明白である。本発明の教示により、請求項に記載の対象事項を始めとするこのような修飾が可能となる。

【0015】

本発明では、増幅産物またはその一部を含む組成物を、1 つ以上のプローブとハイブリダイズさせる。プローブは、配列 I D 番号 11 ~ 42 またはそれに相補的な配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドである。図 2 A および図 2 B に個々のプローブの配列を示す。またプローブを僅かに修飾することも、僅かながら機能性が損なわれるが考えられる。本発明のプローブは、5' 末端および / または 3' 末端で少数のヌクレオチド、好ましくは 3 つ以下のヌクレオチド、より好ましくは 2 つ以下のヌクレオチド、最も好ましくは 1 つのヌクレオチドにより伸長および / または切断されてもよい。標的配列に対するハイブリダイゼーションがまだ可能である限り、本発明によるプローブの配列中の 1 つまたはいくつかのヌクレオチドを異なるヌクレオチドと置き換えることが同様に可能である。これは、修飾においては修飾されたプローブの溶融温度と元のプローブの溶融温度にあまり差がないという事実を含む。溶融温度は次式により計算される。

【0016】

$$\text{溶融温度} = (\text{G / C 塩基ペアの数}) \cdot 4 + (\text{A / T 塩基ペアの数}) \cdot 2$$

【0017】

原則的に、単一の特異的プローブとのハイブリダイゼーションによりバクテリアの種類を判断することができる。しかしながら、増幅産物またはその一部を含んでいる組成物を

10

20

30

40

50

、1つ以上のプローブとハイブリダイズさせることもまた可能である。これは本方法の有意性を高める。配列ID番号11～42の配列（またはそれらの相補的な配列）を有する全てのプローブとハイブリダイゼーションを行う場合に、最も正確に述べることが可能である。この場合、正確なプロファイルが得られ、バクテリアの種類を高い確率で判断することが出来る。従って、例えば、プローブ配列ID番号23（図2A）は、バクテリアM. intracellulare、M. scrophulaceumおよびM. interjectum由来の核酸とハイブリダイズする。しかしながら、M. intracellulareはプローブ配列ID番号24（図2A）により、M. scrophulaceumおよびM. interjectumから除かれるかもしれない。プローブ配列ID番号25（図2A）は、マイコバクテリウム・セラタム（M. celatum）、M. chelonae complex、マイコバクテリウム・ゴードナエ（M. gordonae）、M. kansasii、M. malmoense、M. tuberculosis complex、M. scrophulaceumおよびM. interjectumおよび他のマイコバクテリア種由来の核酸とハイブリダイズするが、われわれの知る限りでは、マイコバクテリア属の種とのみハイブリダイズする。現在知られているところによれば、プローブ配列ID番号25は、配列ID番号23（図2A）と共に、M. scrophulaceumおよびM. interjectumをすべての他のマイコバクテリアから除く。これは同様にプローブ配列ID番号24にもあてはまる。

#### 【0018】

ハイブリダイゼーションは通常、増幅産物またはその一部を含む組成物またはプローブのいずれかを固体相に固定し、それぞれの他のハイブリダイゼーションのパートナーと接触させる方法で行われる。使用可能な固体相は、多岐にわたる素材、例えばナイロン、ニトロセルロース、ポリスチレン、シリカ質素材である。固体相としてマイクロタイター皿を使用することも可能である。

#### 【0019】

通常、少なくとも1つのプローブまたは少なくとも1つのプライマーが標識される。非常に多様な標識が可能であり、例えば、蛍光染料、ビオチンまたはジゴキシゲニンが挙げられる。一般的な標識は、フルオレセイン、FITC、シアニン染料等である。標識は通常オリゴヌクレオチドに共有結合している。蛍光標識は直接検出することができるが、ビオチンおよびジゴキシゲニン標識は、培養後、適当な結合分子で検出することができる。例えばビオチンで標識されたオリゴヌクレオチドは、例えばパーオキシターゼまたはアルカリフォスファターゼ等の酵素と結合したストレプトアビジンを含む溶液と接触させ、色素を生成させるかまたは化学ルミネセンスを作る基質に変えることによって検出される。この種類の方法は当業者にとって自明である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0020】

本発明の実施態様の一つとして、使用されるプライマーの少なくとも1つが標識される。反応中に存在する多数のプライマーが標識されるのが好ましい。標識されたプライマーが使用される場合、プローブは通常標識されない。本方法の態様では、プローブは固体相上に固定され、次に増幅産物またはその一部を含む組成物と接触させる。この方法は固体相上に1つ以上のプローブを固定することができる点で好都合である。少なくとも2つのプローブ、より好ましくは少なくとも5つのプローブ、更により好ましくは少なくとも10のプローブ、最も好ましくは配列ID番号11～42のプローブまたは対応する相補的な配列を有するプローブを固体相上に固定するのが好適である。増幅産物またはその一部を上記のように調製した固定化プローブを有する固体相とともに培養すると、一度のハイブリダイゼーション工程によって、増幅産物とすべての固定化されたプローブとのハイブリダイゼーションに関する情報を得ることができる。従って、該固体相は固体相上に固定されたプローブのマイクロアレイが好適である。このような“DNAチップ”により、多数の異なるオリゴヌクレオチドを小さな領域に固定することができる。DNAチップに適した固体相は、ガラス等のようにシリカを含む材質からなることが好ましい。この態様では、プライマー標識は蛍光標識が好ましい。DNAチップは、増幅産物と培養後、スキャニング装置によって迅速に分析しうる。そのような装置は当業者では公知である。チップ

10

20

30

40

50

技術の概要は、分子診断のための小型化技術 (Miniaturization technologies for molecular diagnostics)、Mc Glennen、Clin Chem 47 (3) 巻、393 ~ 402 頁 (2001年) を参照できる。

【0021】

他の実施態様では、プローブの少なくとも1つが標識を有している。この場合、増幅産物またはその一部を含む組成物は通常固体相の上に固定され、配列ID番号11~42の配列およびその相補的配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも1つのプローブを含む組成物と接触させられる。この態様でもまた、1つ以上のプローブとハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。この目的のため、増幅産物が固定された多数の固体相を用意することが可能である。しかしながら、少量の増幅産物を、固体相上の間隔をあけた複数の領域に固定することもまた可能である。次に、いずれの場合にもこれらの様々なスポットを異なるプローブと接触させる (ハイブリダイゼーション)。

10

【0022】

ハイブリダイゼーション方法の手順は、当業者には自体公知である。したがって、ハイブリダイゼーションのパートナーを含んでいる可能性のある溶液と共に培養した後、通常固体相は非特異的に結合した核酸分子を除去するためストリンジেন্টな条件下に置かれる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング (Molecular Cloning)、Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory (1989年) に記載されているように、従来の方法によりナイロン上で行うか、従来の方法によりナイロンまたはニトロセルロース膜上で行うことができる。それに述べられている原理は、当業者によって更なる実施態様に転用することができる。

20

【0023】

本発明によれば、ハイブリダイゼーションの程度はハイブリダイゼーション後に測定される。これは通常、固体相に結合している標識の量を測定することによって行われる。この種類の検出反応および検出方法は当業者にとって自体公知である。

【0024】

本発明のもう1つの態様は、配列ID番号1~42の配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドである。本発明は同様に、配列ID番号11~42の配列のいずれかに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドに関する。

【0025】

本発明はまた、そのようなオリゴヌクレオチドの少なくとも1つを含む組成物に関する。該組成物は、好ましくは配列ID番号1、配列ID番号3、配列ID番号5、配列ID番号7および配列ID番号9の配列を有するプライマーからなる群より選択される第1のプライマーおよび配列ID番号2、配列ID番号4、配列ID番号6、配列ID番号8および配列ID番号10の配列を有するプライマーからなる群より選択される第2のプライマーからなるプライマーペアを含む。より好ましくは、組成物は下記配列：

30

配列ID番号1 / 配列ID番号2 (プライマーペア1)、  
配列ID番号3 / 配列ID番号4 (プライマーペア2)、  
配列ID番号5 / 配列ID番号6 (プライマーペア3)、  
配列ID番号7 / 配列ID番号8 (プライマーペア4) および  
配列ID番号9 / 配列ID番号10 (プライマーペア5)  
を有するプライマーペアのいずれかを含む。

40

【0026】

本発明のもう1つの態様は、配列ID番号11~42の配列またはそれに相補的な配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドの少なくとも1つが固定されている固体相である。多数のオリゴヌクレオチドが固定される場合、該オリゴヌクレオチドは固体相上で互いに間隔をあけて離れている。好ましい態様では、配列ID番号11~42の配列またはそれに相補的な配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドが固体相上に固定される。該固体相は好ましくはDNAチップとして設計される。

【0027】

50

本発明は更に、G C 含量の高いグラム陽性菌、特にマイコバクテリアを検出および/または同定するためのキットに関し、そのキットは本発明のオリゴヌクレオチドを少なくとも1つ含む。詳しい態様として、前述のキットは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 7 および配列 I D 番号 9 の配列を有するプライマーからなる群より選択される第 1 のプライマーおよび配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 8 および配列 I D 番号 10 の配列を有するプライマーからなる群より選択される第 2 のプライマーをからなるプライマーペア、および配列 I D 番号 11 ~ 42 の配列またはそれに相補的な配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドを少なくとも1つ含む。より好ましくは、該キットは下記配列：

配列 I D 番号 1 / 配列 I D 番号 2 (プライマーペア 1)、  
 配列 I D 番号 3 / 配列 I D 番号 4 (プライマーペア 2)、  
 配列 I D 番号 5 / 配列 I D 番号 6 (プライマーペア 3)、  
 配列 I D 番号 7 / 配列 I D 番号 8 (プライマーペア 4) および  
 配列 I D 番号 9 / 配列 I D 番号 10 (プライマーペア 5)  
 を有するプライマーペアを少なくとも1つを含む。

10

【0028】

本発明における組成物、固体相およびキットの好ましい態様は、本発明の方法におけるそれらと一致する。

【0029】

最後に、本発明は、特に G C 含量の高いグラム陽性菌を検出および/または同定するための、核酸増幅反応におけるプライマーとしての配列 I D 番号 1 ~ 10 の配列を有する1つ以上のオリゴヌクレオチドの使用に関する。

20

【0030】

本発明はまた、特に G C 含量の高いグラム陽性菌を検出および/または同定するための、ハイブリダイゼーション反応におけるプローブとしての配列 I D 番号 11 ~ 42 の配列またはそれに相補的な配列を有する1つ以上のオリゴヌクレオチドの使用に関する。

【0031】

ここに記載されている 23S rRNA / rDNA プローブと、それらを G C 含量の高いグラム陽性菌の系統発生分岐細菌を認識および判別するために適用させることは、臨床微生物学にとって非常に重要である。通常前記の種は形態学的または生化学的方法で判別可能であるが、非常に困難であり、および/またはそれらの生育が遅いため同定に相当な遅れが生じる。

30

保存性の非翻訳領域 (conservative flanking region) は、この遺伝子領域を1セットのプライマー (一般的な増幅プライマー) を用いる核酸増幅に利用できるようにする。これによりチップ技術が使用可能となる。

【実施例】

【0032】

下記の実施例は本発明をより詳細に説明するためのものである。

【0033】

実施例 1

40

DNA / RNA の単離：

細菌の核酸は、固体栄養培地、液体培地または主要材料のいずれかより、適切な調製を行った後に得られた。

表 1： 実施例 1 で検討された細菌の種類

【表1】

種類	略語	ATCC番号
<i>Mycobacterium avium</i>	M.avi	25291
<i>Mycobacterium celatum</i>	M.cel	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	M.che	14472
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	M.fo1	6841
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	M.fo2	
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	M.per	
<i>Mycobacterium gordonae</i>	M.gor	14470
<i>Mycobacterium malmoeense</i>	M.mai	29571
<i>Mycobacterium phlei</i>	M.phl	11758
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M.tub	27294 25177
<i>Mycobacterium xenopi</i>	M.xen	19971
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	M.int	13950
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	M.scr	19981
<i>Mycobacterium interjectum</i>	M.itm	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	M.kan	12478
<i>Mycobacterium marinum</i>	M.mar	827
<i>Escherichia coli</i>	E.col	
ヒト DNA	hDNA	
ネガティブコントロール	N-Kon	

10

20

## 【0034】

この目的のため、細菌物質を滅菌接種用ループを用いて固体培地から取り出し、300  $\mu$ lの10 mM Tris / HCl (pH 7.5) 中に懸濁した。液体培地から1 mlを採取し、卓上遠心機で13,000 rpmで5分間遠心分離にかけ、上澄み液を廃棄した後、300  $\mu$ lの10 mM Tris / HCl (pH 7.5) 中に再懸濁した。主要材料はアセチルシステインで液状にし、NaOH / SDSで“除染”した。このようにして得られた細胞懸濁液をサーモミキサー（エッペンドルフ社、ハンブルグ、ドイツ）中で95

30

## 【0035】

増幅：

すべてのプライマーは市販の合成物（Interactiva社、ウルム、ドイツ）であった。PCR混合物は1  $\times$  Taq 緩衝液（キアゲン社、ヒルデン、ドイツ）、1  $\mu$ Mの各プライマー、200  $\mu$ M dNTP（ロシュ社）、および1 UのHotstar Taqポリメラーゼ（キアゲン社、ヒルデン、ドイツ）を含有した。PCR増幅は、サーモサイクラーPE9600（ABI、Weiterstadt、ドイツ）上で、95 で15分間、95 で30秒間および60 で2分間を10サイクル、および95 で10秒間、55 で50秒間および70 で30秒間を20サイクル行った。

40

## 【0036】

ニュークリセンス増幅キット（NucliSens amplification kit）（オルガノンテクニカ社、ボクステル、オランダ）を、NASBA法を用いたRNA増幅のため、製造元の使用説明書に基づいて使用した。

## 【0037】

1. 増幅混合物の調製：緩衝液に溶解させた“試薬希釈(reagent dilution)”に“試薬領域(reagent sphere)”を溶解させた溶液（反応に必要な酵素を含む）8  $\mu$ l、KCl液（最終濃度70 mM）5  $\mu$ l、およびプライマー液（最終濃度0.5  $\mu$ M）2  $\mu$ l；
2. 5  $\mu$ lのRNA液を加え、41 の水浴中で60分間培養

50

## 【 0 0 3 8 】

DNA/RNAアンプリコンを、臭化エチジウムで着色された寒天ゲルを用いるかまたはハイブリダイゼーションによって検出した。

## 【 0 0 3 9 】

プローブハイブリダイゼーションによるアンプリコンの検出：

すべてのプローブは、ストレプトアビジンと結合したレポーター酵素によって目的とする配列/プローブのハイブリッドを検出できるよう、5'末端でビオチン標識された。用いられたプローブはオリゴヌクレオチド配列ID番号11~27である(図2A参照)。

## 【 0 0 4 0 】

10  
 吸取紙 (Blotting Papier GB002、Schleicher & Schull社、ダッセル、ドイツ)およびナイロン膜 (Biodyne A、ポール・コーポレーション、ポーツマス、イギリス)をプロックティング装置 (Minifold Schleicher & Schull社、ダッセル、ドイツ)のサイズに切り、 $10 \times 55 \text{ cm}$ に浸漬した。最初に $250 \mu\text{l}$ の変性液 ( $50 \text{ mM NaOH}$ ;  $1.5 \text{ M NaCl}$ )を組み立てた装置の口から注入し、ピペットを使ってアンプリコン $20 \mu\text{l}$ を加えた。真空状態にして液体を完全に吸い上げた。続いて $10 \times 55 \text{ cm}$ 緩衝液ですすいだ。膜が完全に乾燥した後、UVクロスリンカー (UV-Stratalinker 2400、Stratagene社、ラ・ホーヤ、アメリカ合衆国)内で $1200 \text{ J/cm}^2$ で固定し、蒸留水で洗浄後、乾燥した。

## 【 0 0 4 1 】

20  
 30  
 40  
 50  
 すべてのハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションオーブン (Hybaid Mini Oven MkII、MWG-Biotech社、エーバースベルク、ドイツ)のガラス管内で $50^\circ\text{C}$ で行われた。DNA/RNAアンプリコンでコーティングされた膜を乾燥した状態で巻き上げ、ガラス管に入れた。次に膜を予め暖めておいたハイブリダイゼーション緩衝液とともに、5分間絶えず回転させながら培養した。 $2 \text{ pmol}$ のビオチン標識されたプローブを加えた後、1時間ハイブリダイゼーション反応を行った。結合していないかまたは部分的にのみ結合したプローブを、ストリンジェント緩衝液 (stringent buffer)とともに $50^\circ\text{C}$ で30分間培養することにより除去した。その間、予め暖めておいたストリンジェント緩衝液を1度交換した。その後プロックング試薬を加え、さらに $37^\circ\text{C}$ で15分間培養した。ハイブリッドは、NBT/BCIPを加えて比色分析を行うかまたは化学蛍光基質 (Lumi-Phos 530、Cellmark Diagnostics社、アピンドン、イギリス)をスプレーしてオートラジオグラフィーを行い、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ結合体によって検出した。この目的のため、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ結合体を加え、 $37^\circ\text{C}$ で30分間培養した。続いて膜を基質緩衝液によって15分間ずつ2回洗浄した。次に膜を取り出し、Lumi-Phos試薬をその上にスプレーし、X線フィルムの露光を2時間行った。あるいは、NBT/BCIPを含む基質緩衝液を加えて発光させた。

## 【 0 0 4 2 】

## 使用した溶液

$10 \times \text{SSC}$  溶液 (標準クエン酸含有生理食塩水)：

$1.5 \text{ M NaCl}$ 、 $0.15 \text{ M}$  クエン酸三ナトリウム；

ハイブリダイゼーション緩衝液：

$7\%$  SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、 $0.25 \text{ M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH } 7.5$ )；

ストリンジェント洗浄液 (ストリンジェント緩衝液)：

$3 \text{ M TMC L}$  (塩化テトラメチルアンモニウム)、 $50 \text{ mM Tris/Cl}$ 、 $2 \text{ mM EDTA}$ 、 $0.1\%$  SDS；

膜の結合部位を飽和させる溶液：

$5 \text{ g/l}$  プロックング試薬 (ロシュ社)の $\text{pH } 7.5$  マレイン酸緩衝液 (水 $500 \text{ ml}$ 中、 $\text{NaCl } 4.13 \text{ g}$ およびマレイン酸 $5.53 \text{ g}$ 、 $\text{pH}$ は $5 \text{ M NaOH}$ で $7.5$ に

10

20

30

40

50

調整) 溶液 ;

基質緩衝液 :

274 mM Tris / Cl ( pH 7.5 )、68.6 mM クエン酸三ナトリウム ( Na<sub>3</sub> citrate )、200 mM NaCl、27.4 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O ;

BCIP :

50 mg / ml 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドニルホスフェート、トルイジニウム (toluidinium) 塩の 100 % ジメチルホルムアミド溶液 ;

10

NBT :

75 mg / ml ニトロブルーテトラゾリウム塩の 70 % ジメチルホルムアミド溶液

【 0043 】

オートラジオグラムをデンストメトリーにより評価した。使用した 100 % 基準値は、プローブ配列の由来元である種のアンプリコンドット (amplicondot) であった。膜上のドットとして常に平行して実行するコントロール群は、核酸溶液の代わりに水が添加された試料および 100 ng の単離したヒト DNA を含む試料であった。

【 0044 】

表 2 : 実施例 1 の結果。デンストメトリー評価でのパーセントを表にした。種に相同のプローブの値は 100 % とした。ここで用いられたプローブは重複する特性を有していてもよい。

20

【表 2】

グループ 分類群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
M avi	100.0	100.0	100.0	22.3	13.8	30.6	13.9	21.9	13.2	14.5	24.1	10.4	09.1	31.1	80.3	34.1	16.2	14.8
M cel	11.1	100.0	100.0	19.9	22.5	08.6	08.6	11.3	18.1	10.2	09.5	10.4	08.9	75.9	19.8	18.7	10.7	12.3
M che	14.0	75.4	21.1	100.0	11.2	14.8	14.8	10.4	20.7	12.9	08.4	07.3	12.3	17.6	19.3	82.0	23.9	10.2
M fol	19.1	92.9	11.1	17.8	100.0	22.6	22.6	40.7	09.5	15.0	08.9	09.4	11.3	19.2	11.9	19.6	10.8	08.4
M fo2	11.3	100.0	12.5	16.8	27.6	100.0	100.0	34.0	10.0	11.4	14.0	09.1	15.5	18.7	14.6	22.5	14.9	09.9
M per	17.3	100.0	24.6	19.4	14.2	11.4	100.0	100.0	22.6	14.6	24.6	21.4	19.8	19.2	10.2	21.6	28.0	14.6
M gor	08.6	100.0	17.4	21.4	02.3	10.9	14.6	14.6	100.0	04.8	14.6	17.5	14.1	20.1	01.6	88.2	09.9	10.4
M mal	08.4	94.2	12.6	19.7	09.6	11.4	14.2	14.2	17.5	100.0	10.2	10.8	18.4	12.6	17.6	74.3	09.7	12.4
M phi	14.6	100.0	09.5	04.5	06.4	05.5	05.5	08.4	08.1	03.5	100.0	01.9	09.6	11.8	09.8	04.1	05.3	02.4
M tub	17.8	88.6	11.5	18.1	20.1	14.2	14.2	12.6	18.4	14.6	14.9	100.0	16.2	21.4	14.6	82.4	24.5	10.0
M xen	04.6	100.0	02.4	03.7	02.6	01.8	01.8	05.4	01.2	01.6	01.6	01.7	100.0	01.4	02.0	02.1	01.4	01.8
M int	19.5	100.0	21.4	19.4	26.3	25.4	25.4	19.2	29.1	24.6	20.0	34.7	18.9	100.0	100.0	41.4	15.0	19.7
M scr	20.1	97.3	19.4	24.5	27.4	20.3	20.3	20.6	20.1	22.9	17.5	32.4	19.2	100.0	29.1	78.9	15.5	17.8
M itm	21.5	100.0	17.1	22.1	28.4	25.4	25.4	20.1	20.9	29.3	19.4	38.4	24.6	100.0	34.0	100.0	11.8	19.8
M kan	09.1	79.3	08.5	09.4	08.1	09.9	09.9	10.2	08.6	07.4	14.1	07.4	04.6	18.4	09.8	92.9	100.0	07.1
M mar	18.6	100.0	14.3	11.5	20.4	21.2	21.2	11.1	10.9	17.7	19.5	22.3	12.3	10.6	08.4	10.6	14.6	100.0
E col	07.5	08.0	07.4	07.2	06.8	06.3	06.3	07.4	06.9	06.8	07.9	07.8	06.4	07.2	07.4	07.4	07.8	06.1
hDNA	0.1	0.2	0.02	0.04	0.06	0.1	0.1	0.06	0.1	0.06	0.01	0.2	0.5	0.04	0.1	0.06	0.02	0.08
N-Kon	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.1	0.1	0.06	0.04	0.09	0.2	0.06	0.05	0.01	0.01	0.04

ここで述べられた方法は、主要材料（例えば気管分泌物、創傷塗沫、血液等）、または細菌の液体培地または固体培地のいずれかから、対応する細菌を同定および判別するために用いられてもよい。本来無菌でない物質の場合、付随する酸耐性でない細菌叢（flora）は、予め通常の汚染除去法によって除去されねばならない。これは培養菌の作製や主要材料の調製の両方に当てはまる。

## 【0046】

## 実施例 2

実施例 1 による方法を用いて、GC 含量の高いグラム陽性菌を含む更なる試料が検討された。検討された細菌の種類は以下の通りである。

## 【0047】

表 3： 実施例 2 で検討された細菌の種類

## 【表 3】

Corynebacterium amycolatum	C.amy	ATCC番号
Corynebacterium callunae	C.cal	
Corynebacterium diptheriae gravis	C.dpg	
Corynebacterium glutamicum	C.glu	
CDC Coryneform Group G	C.grG	
Corynebacterium jeikeium	C.jei	
Corynebacterium matrucchotii	C.mat	
Corynebacterium minutissimum	C.min	
Corynebacterium pseudodiphtheriticum	C.pdp	
Corynebacterium pseudotuberculosis	C.ptb	
Corynebacterium ulcerans	C.ulc	
Corynebacterium striatum	C.str	
Corynebacterium xerosis	C.xer	373
Nocardia asteroides	N.ast	
Rhodococcus equi	R.equ	
Tsukamurella paurometabolum	T.prm	
Escherichia coli	E.col	
ヒトDNA	hDNA	
ネガティブコントロール	N-Kon	

## 【0048】

使用したプローブは配列 ID 番号 28 ~ 42 の配列を有するオリゴヌクレオチドである。（図 2 B 参照）

評価は実施例 1 で述べたのと同様に実施した。結果は表 4 にまとめられている。

## 【0049】

表 4： 実施例 2 の結果

デンシトメトリーによる評価での比率を表にした。上記の種に相同するプローブの値を 100% とした。ここで用いられたプローブは、重複する特性を有していてもよい。

10

20

30

【表 4】

プローブ 分類群	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
C.amy	100.0	09.4	11.4	04.9	24.2	14.6	11.0	18.4	21.1	11.8	14.2	15.5	19.7	09.4	08.1
C.cal	19.5	100.0	11.7	18.8	20.6	20.0	11.8	14.6	14.5	16.4	19.2	12.1	11.5	16.6	18.4
C.dpg	14.4	16.5	100.0	12.7	17.6	13.7	14.4	19.4	20.0	26.1	09.7	11.1	17.6	13.2	17.1
C.glu	19.5	11.8	17.9	100.0	12.4	17.6	19.2	14.6	11.8	19.8	19.9	14.6	09.6	18.6	14.6
C.grG	21.9	12.8	18.2	18.3	100.0	15.8	20.3	11.6	14.4	15.9	22.1	13.6	17.6	11.2	16.9
C.jei	09.6	19.4	12.5	18.4	12.8	100.0	18.8	12.6	14.6	12.4	11.1	18.1	19.7	17.4	14.6
C.mat	15.4	13.6	13.8	12.7	17.6	16.5	100.0	10.9	11.7	11.2	13.5	15.6	17.2	12.5	13.7
C.min	16.5	14.6	13.8	17.6	12.6	12.1	20.5	100.0	15.4	16.4	17.6	17.4	12.5	04.6	22.9
C.pdp	15.2	16.8	17.1	11.2	20.1	08.6	15.4	14.9	100.0	08.9	16.4	18.4	13.8	14.6	20.1
C.ptb	14.6	14.6	18.6	17.6	14.2	14.3	16.5	14.8	16.7	100.0	23.4	11.3	10.9	17.3	26.1
C.ulc	16.4	16.9	21.4	19.6	15.4	13.5	17.2	17.5	17.4	100.0	24.9	12.3	10.0	19.1	27.4
C.str	05.6	19.4	14.6	12.4	18.4	16.9	18.3	12.1	14.1	16.2	100.0	10.2	10.9	19.5	20.4
C.xer	14.5	12.6	19.4	15.6	14.6	15.4	12.6	42.1	8	16.4	13.8	100.0	14.3	12.8	11.3
N.ast	07.4	06.1	09.2	10.3	04.2	03.6	08.8	04.6	09.5	10.8	02.6	11.5	100.0	06.5	05.2
R.equ	03.4	06.6	08.5	06.4	01.6	08.8	06.6	04.6	06.1	05.1	08.2	06.3	04.3	100.0	05.2
T.prim	04.3	02.6	06.5	02.9	09.1	06.6	06.3	08.2	08.6	01.6	05.4	06.4	04.2	03.6	100.0
E.col	06.5	05.3	07.1	06.5	04.2	04.2	09.1	07.2	01.4	05.4	04.1	02.2	06.5	05.1	04.2
hDNA	0.1	0.03	0.05	0.08	0.09	0.1	0.1	0.04	0.05	0.09	0.1	0.09	0.08	0.1	0.04
N.Kon	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.1	0.504	0.06	0.02	0.01	0.1	0.08	0.06	0.02

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】図1は、配列ID番号1～10の配列を有するプライマーの核酸配列を示す。

【図2A】図2Aは、配列ID番号11～27の配列を有するプローブのリスト、および各ケースに関する標的微生物を示す。

10

20

30

40

50

【図2B】図2Bは、配列ID番号28～42の配列を有するプローブの配列、および各ケースに関する標的微生物を示す。

【図1】

		配列ID番号:
フォワードプライマー No.1	GTC GAT GGA CAA CGG GTT GAT (1854-F)	1
フォワードプライマー No.2	GCG GTA CTA ACC ACC CAA AA (1915-F)	3
フォワードプライマー No.3	GGACCTAAGGCGAGGCCG (54F)	5
フォワードプライマー No.4	AGTGAGAATGCAGGCATGAG (1726)	7
フォワードプライマー No.5	GCGTAATAGCTCACT (1023)	9
リバースプライマー No.1	GGTACGGCTACCTTCCTGCGTCA (2052)	2
リバースプライマー No.2	TTACCACTGACTGGTACGGCTA (2049)	4
リバースプライマー No.3	GCCTTCCTGCGTCACCCC (2025)	6
リバースプライマー No.4	CTTAGGATGGTTATAGTTACCA ( HCG II )	8
リバースプライマー No.5	CGGAACCTACCCGA	10

【図2A】

プローブ番号	配列ID番号:	関連標的微生物	配列5'-3'
1	11	<i>Mycobacterium avium</i>	GCRTGGCGATTGCGG
2	12	Gram + mit hohem GC-Gehalt	CGACTACGCCTGTGCG
3	13	<i>Mycobacterium celatum</i>	GCACGGTCAGCGAGG
4	14	<i>Mycobacterium chelonae</i>	AGCGGGTTCACGTCG
5	15	<i>Mycobacterium fortuitum 1</i>	GGATCAGTCACGACG
6	16	<i>Mycobacterium fortuitum 2</i>	TGGTCACGGTGGTTT
7	17	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	GGATCGGTACGACG
8	18	<i>Mycobacterium gordonae</i>	TAGCACAATTGATTC
9	19	<i>Mycobacterium malmoense</i>	GTGGAGGTTGCGGGC
10	20	<i>Mycobacterium phlei</i>	ATCGGCCAGGTTTTG
11	21	<i>Mycobacterium tuberculosis-Komplex</i>	GGAGTTCTGGGGCTG
12	22	<i>Mycobacterium xenopi</i>	TTAGCAGATCCGATT
13	23	<i>Mycobacterium intracellulare/</i> <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium interjectum</i>	CCCCGAAACTCCAYGC
14	24	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ACGCSCATACACGGG
15	25	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium interjectum</i>	ACGCSCATATACGGG
16	26	<i>Mycobacterium kansasii</i>	GGGGCGTGGAGGTCT
17	27	<i>Mycobacterium marinum</i>	CAACGAACGTTCCAC

## 【図 2 B】

プローブ番号	配列ID番号:	関連種の微生物	配列5' - 3'
18	28	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CCTGAACATGCGCCGT
19	29	<i>Corynebacterium callunae</i>	ACCACCCGAATGCCTCC
20	30	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	CCATGGATCTGCTGG
21	31	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	TCCATAAGCACCCGC
22	32	CDC Coryneform Group G	ACCACCCGGATGCA
23	33	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ACCACCTGAAGCGTG
24	34	<i>Corynebacterium matrucchotii</i>	ACTGCCTCGGGATCA
25	35	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CGATTGGCGGTGTTCT
26	36	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	CGTGTGAGACTCATTG
27	37	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> / <i>Corynebacterium ulcerans</i>	TGTGTGGGTGTGTGT
28	38	<i>Corynebacterium striatum</i>	GTTACTGTGRTTASCCT
29	39	<i>Corynebacterium xerosis</i>	AGCATCCTTCGTAC
30	40	<i>Nocardia asteroides</i>	ATCCGGACGGATTCT
31	41	<i>Rhodococcus equi</i>	AGCCGCCCTTCGAACCT
32	42	<i>Tsukamurella paurometabolum</i>	CACCTTGATCACCTTCG

## 【配列表】

0004441259000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1:32  
C 1 2 Q 1/68 A  
C 1 2 R 1:15

(56)参考文献 米国特許第05703217 (US, A)  
特表平07-506723 (JP, A)  
国際公開第00/034517 (WO, A1)  
国際公開第00/052203 (WO, A1)  
国際公開第98/044153 (WO, A1)  
Microbiology, 142(4), 1996, pp.915-925  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39(12), 1995, pp.2625-2630  
FEBS Letters, 281(1-2), 1991, pp.114-118  
Mol. Microbiol., vol. 22, pages 207-215 (1996)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
C12Q 1/68  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq