

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-537399

(P2013-537399A)

(43) 公表日 平成25年10月3日(2013.10.3)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/42	(2006.01)	C 1 2 Q	1/42	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2013-505162 (P2013-505162)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月15日 (2011. 4. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月14日 (2012. 12. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/032600
 (87) 国際公開番号 W02011/130584
 (87) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011. 10. 20)
 (31) 優先権主張番号 61/324, 939
 (32) 優先日 平成22年4月16日 (2010. 4. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/325, 413
 (32) 優先日 平成22年4月19日 (2010. 4. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/324, 949
 (32) 優先日 平成22年4月16日 (2010. 4. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

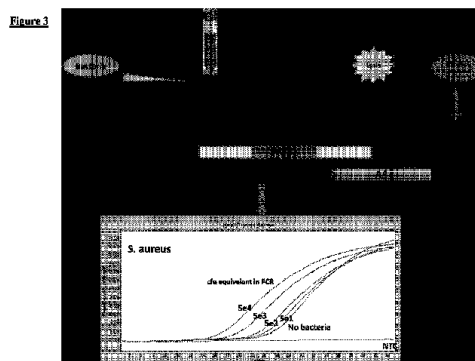
(71) 出願人 512267645
 ゼウス・サイエンティフィック・インコーポレイテッド
 ZEUS SCIENTIFIC, INC.
 アメリカ合衆国08876ニュージャージー州ブランチバーグ・タウンシップ、エバンズ・ウェイ200番
 (71) 出願人 512267656
 ショーン・マーク・オハラ
 Shawn Mark O' HARA
 アメリカ合衆国08876ニュージャージー州ブランチバーグ・タウンシップ、エバンズ・ウェイ200番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非精製サンプル中の細胞生存能力を決定することにおいて有用な酵素活性を測定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、微生物の検出、特に、細菌の検出の分野、酵素活性、例えば、DNAポリメラーゼ活性を測定するための方法に関し、特に、増幅シグナル発生器、例えば、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術に連結させることができる、微生物酵素活性を決定するために有用な微生物粗溶解物で行われ、それにより、サンプル、例えば、非精製血液および他の体液中の微生物病原体の決定を可能にするこのような方法に関する。本発明はまた、このような方法における使用のための試薬、および該方法を実施するためのこのような試薬を含む試験キットに関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の微生物の存在の指標として、ポリメラーゼ活性を検出するための方法であって、

(a) サンプルを、サンプル中でポリメラーゼ活性に対する基質として作用する核酸分子と接触させること；

(b) このように接触されたサンプルをポリメラーゼ活性に適切な条件下でインキュベートすること；および

(c) 基質核酸分子に対する微生物ポリメラーゼの作用から生じる核酸分子の存在（および/または量）を特異的に決定し、それにより、微生物の存在を示すこと

を含む方法。

10

【請求項 2】

ポリメラーゼが、DNA または RNA ポリメラーゼのいずれかである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

検出される微生物が、サンプル中の生存微生物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

検出される微生物が、サンプル中の無傷な微生物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

検出される無傷な微生物が、核酸ポリメラーゼ遺伝子およびその翻訳された活性タンパク質ポリメラーゼが、該微生物の生存能力に必須であるものである、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

ポリメラーゼ基質が固定されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

微生物が検出されるサンプルが、正常滅菌体液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

サンプルを差示的な細胞溶解サンプル調製方法を使用して調製し、それにより、生存能力のある微生物由来のポリメラーゼ活性のみがポリメラーゼ特異的基質を修飾することができる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

微生物が検出されるサンプルが、粗細胞溶解物または精製細胞画分から調製される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

完全または部分的微生物ゲノムおよび/またはトランスクリプトーム配列分析を行うことをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

完全または部分的微生物ゲノムおよび/またはトランスクリプトーム配列分析が、単一のサンプル調製を使用して、同時に、一斉に、または並行して行うことができる、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

微生物の完全または部分的微生物ゲノムおよび/またはトランスクリプトーム配列分析が、患者の管理において有用な抗 - 微生物および/または抗 - ポリメラーゼ活性を有する薬剤の診断測定および検出のための方法をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

微生物の非存在または存在に関して、正常滅菌体液をスクリーニングし、診断、予後患者管理情報を提供するための、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法において有用な試薬を含むアッセイキット。

【請求項 14】

サンプル中の微生物の存在の指標として、NAD- 依存性リガーゼまたはホスファター

50

ぜからなる群から選択される酵素またはそれらの混合物を検出するための方法であって、
(a) サンプルを、サンプル中で選択される酵素または混合物の酵素活性に対する基質として作用するが、DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない核酸分子と接触させること；

(b) このように接触されたサンプルを酵素活性に適切な条件下でインキュベートすること；および

(c) 基質核酸分子に対する選択される酵素または混合物の作用から生じる酵素修飾核酸分子の存在（および/または量）を特異的に決定し、それにより、微生物の存在を示すこと

を含む方法。

10

【請求項15】

微生物が、選択される酵素または混合物を発現する（または発現している）微生物である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

サンプルが差示的な細胞溶解サンプル調製方法を使用して調製され、それにより、生存能力のある微生物由来のリガーゼおよび/またはホスファターゼ活性のみがリガーゼ特異的基質を修飾することができる、請求項14または請求項15に記載の方法。

【請求項17】

サンプル中の微生物の存在の指標として、NAD-依存性リガーゼまたはホスファターゼからなる群から選択される酵素またはそれらの混合物を検出するためのアッセイを行うことができるアッセイキットであって、

20

(a) DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない、サンプル中で選択される酵素または混合物の活性に対する核酸分子を含む基質；

(b) 酵素活性に適切な条件下で該サンプルおよび基質をインキュベートするためのインキュベート手段；および

(c) 微生物の存在を示すものとして、基質核酸分子に対する選択される酵素または混合物の作用から生じる核酸分子の存在（および/または量）を特異的に決定するための手段を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は非仮出願であり、部分的に、2010年4月16日に出願された米国仮出願番号第61/324,939号、2010年4月16日に出願された米国仮出願番号第61/324,949号および2010年4月19日に出願された米国仮出願番号第61/325,413号を出典明示により包含させ、これらの優先権の利益を主張する。

【0002】

技術分野

本発明は、一般的に、微生物の検出の分野、さらに特に細菌の検出に関する。また、本発明により、細菌生存能力の指標としてリガーゼおよび/またはホスファターゼの存在に依存する、高度に感受性であり、非精製サンプルに適用することができ、多数の用途を有する改善された微生物検出方法が、アッセイキットと共に提供される。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

細胞生存能力と関連する特定の分子の存在およびレベルを測定することは、多くの状況において重要である。例えば、ATPのレベルを測定することは、増殖分析および毒物学的目的のために哺乳動物細胞において有用である。

【0004】

培養アプローチは、少数の細菌を検出するために使用することができるが、このような

50

技術は、とりわけ少数の細菌を検出しようと試みるとき、およびまた、ゆっくりと増殖する微生物を検出するときに、完了するまでに数日必要である。

【 0 0 0 5 】

別法では、汚染細胞または生物体のサンプル中の存在と関連し得る分子の存在を測定することに基づいた試験を行ってもよい。最も一般的に検出される分子は、アデノシン三リン酸 (ATP) である。DNA および RNA の検出もまた提案されているが、DNA および RNA の存在と生存能力との間の相関関係は、死後の細胞中での核酸の変化しやすい残留量 (variable persistence) のために明確でない (Keer & Birch, *Journal of Microbiological Methods* 53 (2003) 175-183)。生存能力の指標としてのアデニル酸キナーゼの検出もまた、提案されている (Squirrell DJ, Murphy MJ, Leslie RL, Green JCD: A comparison of ATP and adenylate kinase as bacterial cell markers: correlation with agar plate counts, in *Bioluminescence and Chemiluminescence Progress and Current Application*: Stanley RA, Kricka LJ. John Wiley および Sons によって編集された; 2002 および WO 96 / 02665)。ATP レベルを決定するために日常的に使用される方法は、生物発光の使用を含む。該方法は、発光ルシフェラーゼがルシフェリンの酸化を触媒する反応の ATP 依存性を使用する。該方法は、比較的 low 濃度の ATP を測定するために使用され得る。生物発光を使用して ATP を検出するために有用なキットは、Roche, New Horizons Diagnostics Corp, Celsis などから市販されている。しかしながら、多くの問題が生物発光検出に対して存在する。例えば、非微生物供給源由来の ATP の存在下での微生物 ATP のみの検出が問題であり得る。該問題は、ATP の非細菌供給源由来の細菌を分離し、したがってさらに正確なシグナルを提供することができるフィルターの使用により、ある程度解決されている。

10

20

【 0 0 0 6 】

したがって、多くの問題が微生物検出の慣用の分野に対して存在することが分かる。このような問題にさらに対処するために、リガーゼの検出が提案されており、例えば、1996年2月1日に公開された公開特許出願 WO / 1996 / 002665 に記載されており、サンプル中のアデニル酸キナーゼの量が、アデニル酸キナーゼをアデノシン二リン酸 (ADP) と混合し、該 ADP 由来のサンプルにより生産されるアデノシン三リン酸 (ATP) の量を決定し、そうして生産される ATP の量をアデニル酸キナーゼの存在および / または量ならびに微生物および / またはそれらの細胞内物質と関連させることにより概算されることを特徴とする、サンプル中に存在する微生物および / またはそれらの細胞内物質の存在および / または量を決定するための方法であって、ADP の ATP への変換がマグネシウムイオンの存在下で ADP の ATP への最大変換を可能にするために十分なモル濃度で行われる方法を記載している。存在するマグネシウムの量は、好ましくは、全 ADP 分子が少なくとも 1 つのマグネシウムイオンと競合し得るように、1 モルの ADP に対して 1 モルのマグネシウムを提供するために十分な量である。

30

【 0 0 0 7 】

タイトル DETECTION OF MICRO-ORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITY の 2009年1月15日に公開された公開特許出願 WO / 2009 / 007719 において、リガーゼ、特に NAD - 依存性リガーゼは、サンプル中の (生存) 微生物の存在の有用な指標として記載されている。リガーゼは、核酸分子のライゲーションを触媒する酵素である。該ライゲーション反応は、関連しているリガーゼに依存して補助因子として、ATP または NAD + のいずれかを必要とする。該記載において、NAD - 依存性リガーゼ活性の使用は、サンプル中の (生存) 微生物の存在の指標として利用される。NAD - 依存性リガーゼ活性と生存能力との間の関連は、該酵素の活性を、サンプル中の、特に細菌起源の生存能力のある微生物細胞の指標として使用することを可能にするので、NAD - 依存性リガーゼ活性と生存能力との間の関連は、本出願に記載されている本発明の中心となる (Korycka-Machalaら *Antimicrobials and Chemotherapy*, Aug. 2007, p2888-2897)。しかしながら、本発明の開発をもたらす実験において、公開特許出願 WO / 2009 / 007719 に記載されている技術および教示が、非精製サンプル、例えば、粗

40

50

微生物溶解物、血液または血液培養物中の生存微生物の測定に適用することができないことが見出され、それにより該文献に記載されている技術の主な欠点を構成した。しかしながら、これらの方法論もまた問題を有することが見出されている。例えば、一般的に、意図されるサンプル型（血液由来微生物粗細胞溶解物）に適用されるとき、慣用のリガーゼ基質アッセイ設計およびその得られる検出シグナルは、上記特許出願に記載されているとおり、リガーゼ特異的ではないことが見出されている。本発明は、これらの問題に対処し、解決しようとする。

【発明の概要】

【0008】

発明の概要

上記慣用の方法と対照的に、1つの局面において、本発明は、サンプル、特に、例えば、粗微生物溶解物または非精製血液または血液培養物であるサンプル中の（生存能力のある）微生物または細菌の存在の有用な指標としての、酵素、例えば、ポリメラーゼ、好ましい態様において、DNAまたはRNAポリメラーゼの検出に向けられる。本発明にしたがって見出された、酵素、例えばポリメラーゼ活性と微生物または細菌の生存能力との間の関連は、これらの酵素の活性の検出を、サンプル中の生存能力のある微生物細胞、特に細菌起源の指標として使用可能にする。

【0009】

同様に、本発明は、好ましい態様において、サンプル中の微生物の存在の指標としてDNAまたはRNAポリメラーゼを検出するための方法を提供する。このような方法は、
(a) サンプルを、サンプル中でポリメラーゼ活性に対する基質として作用する核酸分子と接触させること；
(b) このように接触されたサンプルをポリメラーゼ活性に適切な条件下でインキュベートすること；および
(c) 基質核酸分子に対する微生物ポリメラーゼの作用から生じる核酸分子の存在（および/または量）を決定し、微生物の存在を示すことを含むことができる。

【0010】

加えて、本発明は、前記方法において有用な試薬、および該方法を行うために有用な該試薬を含むアッセイキットを提供する。

【0011】

別の局面において、本発明は、（生存能力のある）微生物または細菌の存在の有用な指標として、リガーゼ、特にNAD-依存性リガーゼを同定しているタイトルDETECTION OF MICRO-ORGANISMS BASED ON THEIR NAD-DEPENDENT DNA LIGASE ACTIVITYの2009年1月15日に公開された公開特許出願WO/2009/007719に記載されている方法、組成物およびキットに対する改良を提供する。

【0012】

該WO/2009/007719において含まれている全記載を、出典明示により本明細書に包含させ、本出願の一部とする。

【0013】

したがって、本発明は、サンプル中の微生物の存在の指標として、NAD-依存性リガーゼまたはホスファターゼからなる群から選択される酵素、または前記の混合物を検出するWO/2009/007719に記載されているものに基づく方法および組成物およびキットの改良であって、改善された方法は、

(a) サンプルを、サンプル中で酵素活性に対する基質として作用するが、DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない核酸分子と接触させること、
(b) このように接触されたサンプルを酵素活性に適切な条件下でインキュベートすること；および
(c) 基質核酸分子に対する選択される酵素または混合物の作用から生じる酵素修飾核酸分子の存在（および/または量）を決定し、微生物の存在を示すこと

10

20

30

40

50

を含む方法を提供する。

【0014】

したがって、本発明の改善された方法が、このような酵素またはそれらの混合物を発現する（または発現している）全ての微生物を同定するために有用であることが認識される。

【0015】

本明細書に記載されているとおり、該方法における第1の工程は、サンプルを、サンプル中で酵素活性に対する基質として作用するが、DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない核酸分子と接触させることを含む。したがって、ライゲーションされると、特異的に検出することができるあらゆる適当なライゲーション可能な分子が、本発明の方法において利用され得ることを認識するべきである。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図AからDは、本明細書に記載されているとおりに本発明にしたがって行われた実験により得られた結果の鑄型の略図およびグラフ表示を示す。

【図2】図AからDは、ライゲート不可能(Non-Ligate-able)なポリメラーゼの優れた(favorable)基質が、微生物由来の粗細胞溶解物に感受性であり、特異的であることを示すグラフ表示である。

【図3】図3は、ライゲート不可能なポリメラーゼの優れた基質が、微生物添加血液培養物(Microbe Spiked Blood Culture)由来の粗細胞溶解物に感受性であり、特異的であることを示すグラフ表示である。

20

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

したがって、前記から、本発明の方法が、酵素、例えば、適当なポリメラーゼが発現される（または発現されている）全ての微生物を同定するために有用であることを認識することができる。1つの態様において、本発明の方法は、生存能力のある微生物の検出に適用され、したがって、サンプル中の生存能力のある微生物を検出するための方法として考えられ得る。特に、好ましい態様において、本発明の方法は、核酸ポリメラーゼ遺伝子およびその翻訳された活性タンパク質ポリメラーゼが生存能力のために必須である細菌または微生物を同定するために有用であり得る。しかしながら、（例えば、抗菌剤での処理により）最近生存不能にされた微生物、例えば、細菌は、検出可能なポリメラーゼ酵素が分解されるまで、検出可能なポリメラーゼ活性を保持し得る。

30

【0018】

本発明の開発において、機能性細胞生化学的成分のサンプル調製におけるパラダイムシフトは、本発明が、従来加えられていた高価な複雑化させる要因、およびしばしばの極度の変性ベースの単離プロトコルを用いることなしに、穏やかに溶解された細胞由来のサンプル上で、アッセイを直接的に行うことを可能にするという点において見出された。したがって、本発明が、サンプル、限定はしないが、全血および/または血液培養物由来の細胞画分を包含する粗臨床的溶解物、典型的には10 - 20 ml、好ましくは0.1 - 100 mlの範囲における大量の該サンプルから、生存生物体の検出を可能にするを見出した。本発明は、特に、敗血症を伴う全ての生物体、および、限定はしないが、菌血症、真菌血症ならびにウイルスおよび寄生状態を含む状態を伴う生物体の検出のために有用である。本発明によって、このような生物体の検出が、サンプル由来のポリメラーゼ阻害ならびにプロテイナーゼおよびヌクレアーゼを干渉する存在が、非精製サンプル中で行われる場合に、このようなアッセイ方法に対する障害であるという慣用の技術の教示とは対照的に、上記のとおり、このような非精製サンプルにおいて成し遂げることができることを、予想外に見出した。

40

【0019】

上記のとおり、リガーゼ、特にNAD - 依存性リガーゼは、サンプル中の（生存能力の

50

ある) 微生物の存在の推定の有用な指標として記載されている。しかしながら、対照的に、本発明は、生存能力のある細胞由来の活性を高感受性シグナル発生器、例えば、PCRなどの技術による増幅と関連付けるために使用することができる、リガーゼよりもむしろ有用な他の生存能力のある微生物細胞由来の酵素を提供する。本発明の特徴はまた、細菌を真菌と区別することが潜在的に可能である。本発明の態様の例において、この点において、以下のことが使用され得る：

- a . キナーゼが、リガーゼを使用可能にするか、またはポリメラーゼを停止するために使用することができたPO₄を加える
- b . リン酸は、PO₄を除去し、ポリメラーゼを使用可能にするために使用することができる
- c . DNA & RNAポリメラーゼは、下流の従来のPCRまたは等温増幅を可能にするように基質を伸長するために使用することができる
- d . 等温増幅は、エンドヌクレアーゼ酵素活性から外れることができる
- e . リボソーム
- f . miRNAメカニズム
- g . ジャイレース
- h . ヘリカーゼ
- i . エキソヌクレアーゼ、5' - 3'、3' - 5'、すなわちブロッキング基、例えば、PO₄、TagManなどを除去するもの
- j . エンドヌクレアーゼ
- k . プロテアーゼ
- l . DNase
- m . RNase
- n . UDGlycosylase
- o . 修復酵素

10

20

【0020】

本発明の好ましい態様において、DNAポリメラーゼ活性の測定が、本発明にしたがって、微生物粗溶解物由来の細胞生存能力の測定を可能にするを見出した。これは、非常に選択的な「ホットスタート(hot start)」(当分野でよく知られている)と組み合わせるさらには選択的な修飾オリゴ基質を使用し、RT、37、60C活性に関してコントロールして、証明され得る。

30

【0021】

あらゆる微生物増殖が血液製剤の廃棄の原因であるため、本発明の1つの態様において、本発明は、血液製剤スクリーニング、とりわけ血小板に対する用途を有し、細菌と真菌の区別が必要ではない。本発明のさらなる態様において、ホスファターゼが5'または3'リン酸いずれかを除去し、-OH-を残し、したがって、含まれる設計された5'Taqの除去、またはリガーゼ(3'を除去する)により任意のポリメラーゼを使用可能にするため、ホスファターゼが使用され得、おそらく、ポリメラーゼ活性を可能にするための別の優れた候補酵素である。加えて、ホスファターゼは強力であり、pHの最適化を介して酵母菌と細菌を区別するための手助けとなり得る。したがって、本明細書の教示により考えられるポリメラーゼを使用可能にするあらゆる適当な酵素が、本発明の実施において有用であり得ると認識される。

40

【0022】

本発明の実施において、微生物の検出は、DNAポリメラーゼが分解される時点まで、適宜、最近まで生存能力のあった微生物を含み得る。生存能力のある微生物と最近まで生存能力のあった微生物間の区別が必要な場合、単一の時間的経過または2つ以上の時点間のポリメラーゼ活性の比較は、適当な条件下で、ポリメラーゼ活性が時間とともに増加、持続または減少しているかを決定するために十分であるはずである。好ましい態様において、ポリメラーゼ活性が長期間にわたって、または後の時点で(最初の測定と比較して)持続または増加していることが見出されるとき、これは、微生物が生存能力があることを

50

示し得る。ポリメラーゼ活性が後の時点で減少しているとき、これは、検出された活性が最近まで生存能力のあった微生物由来であったことを示し得る。該時間的経過測定アプローチは、抗生物質感受性試験(AST)ならびに他の適当な治療の測定に対して適用されるとき、とりわけ有用であり得る。検出方法は、本明細書に詳細に記載されている。本発明の特定の好ましい態様において、微生物は本明細書に記載されているとおり細菌であり、本発明の方法は、さらに一般的に適用することができるであろう(Wilkinsonら, Molecular Microbiology (2001) 40(6), 1241-1248)。細菌は、同様に、例えば、中温性および/または好熱性細菌であり得る。

【0023】

本発明の文脈において、「サンプル」は、微生物、特に細菌の存在を試験するために望ましいあらゆるサンプルを含むように定義される。したがって、該サンプルは、臨床的に提供される粗微生物溶解物からなり得るか、または血液または血液培養物の臨床サンプルを含み得るか、または、例えばインビトロアッセイ系のために適当なサンプルを含む。サンプルはまた、飲料もしくは食品サンプルまたはそれらの調製物、または医薬品もしくは化粧品、例えば、パーソナルケア製品、例えばシャンプー、コンディショナー、保湿剤などを含み得、これら全ては、いつものこととして、微生物汚染に対して試験される。サンプルは組織または細胞を含み得、唾液または血小板サンプルを含み得る。加えて、本発明の方法およびキットは、例えば食品が製造されている場所において、表面の汚染をモニタリングするために使用され得る。好ましい態様において、汚染はポリメラーゼ活性の存在により示される。汚染は、何らかの微生物供給源由来のもの、特に細菌汚染であり得る。さらに、本発明はまた、環境条件、例えば、水道、廃水、海洋環境などをモニタリングすることにおいて有用である。本発明はまた、発酵処理および空気サンプリングにおける細菌増殖をモニタリングすることにおいて有用であり、細菌または胞子含有量を病院、産業施設または生物防御(biodefense)用途において評価することができる。

【0024】

本発明の方法は、1つ以上の(生存能力のある)微生物、特に細菌がサンプル中に存在するとき、酵素活性、好ましくはDNAポリメラーゼ活性が存在するという事実に基づく。したがって、該酵素は、適当な条件下で、(次の工程において)新規検出可能な核酸分子を産生するための反応を触媒することができる。該新規核酸分子は、任意の適当な手段、例えば、下記的手段により検出し、それにより、試験下のサンプル中の微生物の存在の決定を可能にする。

【0025】

したがって、微生物がサンプル中に存在しないとき、該サンプル中の酵素(例えば、ポリメラーゼ)活性がなく、したがって、該新規検出可能な核酸分子は産生されない。

【0026】

本発明の方法は、主に、新規核酸分子が方法の一部として産生されるという事実によって、有意な技術的利点を提供する。本発明の方法において、未反応核酸分子はシグナルに寄与せず、結果として、該方法が行われるときに、偽陽性シグナルが生産されないはずである。

【0027】

さらに、本発明により提供される方法は、高度に感受性であり、フェムトグラム、恐らくアットグラムレベルまでに至るまで、サンプル中に存在する酵素(例えば、ポリメラーゼ)の検出を提供し得る。該感受性は、全ての細菌細胞が何千もの酵素分子を含み、したがって、それぞれが、適当な条件下で、複数の事象を触媒することができるという事実由来する。細胞当たり1つの遺伝子の、1もしくは少数のコピーを標的化するか、またはリボソームまたはメッセンジャーRNAを検出するための、さらなる工程もしくは試薬を使用しなければならないダイレクトPCRアプローチとは違って、本明細書に記載されているアプローチは、単一のアッセイフォーマットにおいて細胞当たり酵素の多数のコピーの検出を標的化する。

【0028】

本明細書に記載されているとおり、本発明の方法における第1の工程は、サンプルを、サンプル中の酵素、例えばポリメラーゼ活性に対する基質として作用する核酸分子と接触させることを含む。

【0029】

本発明における使用のための適当な基質核酸分子は、以下により詳細に記載されている。核酸分子は、適宜、合成ヌクレオチド類似体を組み込んでいてもよく、または、RNAまたはDNAベースのもの、例えば、それらの混合物であり得る。それらは、1つの態様において、検出を容易にするために、例えば、蛍光標識またはFRETペアを使用して標識化され得る。適当な検出方法は、本明細書に記載されている。

【0030】

「核酸」は、本明細書において、ポリメラーゼの作用により検出可能な核酸分子を産生することができるあらゆる天然核酸および天然または合成類似体を含むように定義される。適当な核酸分子は、例えば、二本鎖または一本鎖DNAおよび二本鎖または一本鎖RNAを含み得る。

【0031】

核酸基質が平滑末端二本鎖DNA分子を含み得るが、本発明の態様において、ポリメラーゼに対する核酸基質は、結合される末端に相補的オーバーハングおよび5'リン酸基を有する2つの二本鎖DNA分子を含む。1つの特定の態様において、相補的オーバーハングは、2から10、例えば、3または5塩基対である。別の態様において、核酸基質は、5'リン酸を含有するニックを有するDNA分子を含む。合成核酸分子は市販されており、末端5'リン酸基を付加するように注文することができる。これは、本発明の方法において使用される100%の核酸分子が5'リン酸基で標識化されるという技術的利点を有する。

【0032】

本発明のとりわけ好ましい態様において、ポリメラーゼがサンプル中に存在するとき、それは触媒作用を及ぼし、本明細書に詳細に記載されるように、次の工程（例えばPCR）により検出することができる新規核酸分子（全新規配列を含む）が形成される。

【0033】

したがって、基質核酸分子は、実際に、適宜、2つ以上の核酸分子を含み得る。これは、一般的に、本発明の方法およびキットに適用する。

【0034】

1つの態様において、核酸基質は、一本鎖相補的オーバーハングを有する2つの二本鎖核酸分子を含む。

【0035】

本発明の新規方法は、ポリメラーゼおよびリガーゼの両方を含むと疑われるサンプルを採取し、別々の反応容器中で並行して両方を試験し、シグナルを引き、したがって、実際に、サンプル中で見出される真のリガーゼレベルを決定することにより、リガーゼをポリメラーゼと区別するために使用することができることを、認識すべきである。これは、以下の等式により示すことができる：

[ポリメラーゼシグナル - リガーゼシグナル(ポリメラーゼ+リガーゼ) = 真のリガーゼシグナル]

【0036】

本発明の任意の態様において、核酸に対するポリメラーゼの作用はよく知られており、したがって、核酸基質の多数の異なる型を使用のために選択することができ、本明細書に記載されているとおり、本発明の新規方法における利用の利点を有することが分かることもまた、認識すべきである。好ましくは、核酸基質は、サンプル中のポリメラーゼを越えて、過剰、特にモル大過剰に存在する。これは、先行技術方法を越える重要な技術的な違いである。新規重合核酸分子が検出されるため、サンプル中の該分子の存在のみが、有効に働く検出方法のために重要である。したがって、他の核酸分子が、例えば、検出される細菌、または、例えば、試験されるサンプル中で見いだされ得る哺乳動物ま

10

20

30

40

50

たは真菌供給源由来のサンプル中に存在するとき、本発明の方法にとって不利益でない。

【0037】

本発明は、本発明にしたがって行われた以下の実施例を参照することにより、さらに十分に記載することができる。また、本発明の特定の好ましい態様が上記されており、具体的に例示されているが、本発明がこのような態様に限定されることは意図しない。

【実施例】

【0038】

実施例1．リガーゼ非依存性メカニズムの発見：

3つの異なるDNA基質(A)を大腸菌リガーゼと共に、またはリガーゼを用いないでインキュベートし、UNGの存在/非存在下で全長DNAリガーゼ基質特異的PCRプライマーを含むPCRに付した。PCRをSYBRグリーン(gPCR)を介してモニタリングし、得られた反応物をゲル分析に付した(B)。3つの異なるDNA基質(A)を大腸菌リガーゼと共に、またはリガーゼを用いないでインキュベートし、UNGの存在/非存在下でS1-伸長検出プライマーを含むPCRに付した。PCRを市販されているZeus Probe(qPCR)方法論(Zeus Scientific, Inc., Raritan, NJ)を介してモニタリングし、得られた反応物をゲル分析に付した(C)。ライゲーション不可能なDNA基質(S1/ASのみ)の量を徐々に減らして、市販されている3つの異なるDNAポリメラーゼとインキュベートし、Zeus-Probe gPCR分析に付した。これらの実験の結果は、図1においてグラフで説明される。

10

【0039】

実施例2．ライゲート不可能なポリメラーゼの優れた基質が、微生物由来の粗細胞溶解物に感受性であり、特異的であることを見出した：

微生物の量を徐々に減らして、ビーズミル溶解し、37で30分間、DNAポリメラーゼバッファーおよびdNTPの存在下でDNA基質(S1/ASのみ)とインキュベートした(A)。次に、溶解物をS1-伸長特異的プライマーを含むZeus-Probe qPCRに付した。該結果は、図2においてグラフで説明される。

20

【0040】

実施例3．

ライゲート不可能なポリメラーゼの優れた基質が、微生物添加血液培養物由来の粗細胞溶解物に感受性であり、特異的であることを見出した：

微生物の量を徐々に減らして、10mlの血液培養液中に加えた。次に、微生物を回収し、ビーズミル溶解に付し、37で30分間、DNAポリメラーゼバッファーおよびdNTPの存在下でDNA基質(S1/ASのみ)とインキュベートした(A)。次に、溶解物をS1-伸長特異的プライマーを含むZeus-Probe qPCRに付した。該結果は、図3においてグラフで説明される。

30

【0041】

したがって、さらに別の局面において、本発明は、WO/2009/007719において記載および請求されている発明において改良する。本発明にしたがって、WO/2009/007719に記載されている方法が、意図されるサンプル型、例えば、敗血症サンプルに適用されるとき、DNAリガーゼを特異的にしないように、該WO/2009/007719の記載による推定DNAリガーゼ特異的基質は、精製DNAポリメラーゼまたは精製DNAリガーゼのいずれかからの強力なシグナルを生じることが発見された。例えば、本発明の開発において、WO/2009/007719により教示されるサンプル調製方法を使用する敗血症サンプルを、多量のDNAポリメラーゼを含む粗微生物細胞溶解物として、そこに教示されているアッセイプロトコールに投入した。DNAポリメラーゼは、全ての生存細胞において豊富である。臨床サンプルからの結果を得ようとするとき、リガーゼの単離は、WO/2009/007719に記載されているとおり、実際の処理でも日常的処理でもないため、WO/2009/007719に記載されているアッセイは、実際の観点から、全ての臨床サンプル投入を含む非リガーゼ精製サンプルを投入するとき、任意のDNAポリメラーゼとDNAリガーゼ由来のシグナル間で区別する

40

50

ことができないことを見出した。むしろ、該文献により教示されていることにしたがって実施された実験は、明らかに該文献による所望の結果である、DNAリガーゼ特異的シグナルではなくDNAポリメラーゼにより汚染されるアッセイシグナルを生じることを見出した。

【0042】

上記これらの知見は、WO/2009/007719の教示にしたがって生産されるシステムの生存能力のある細胞由来のDNAリガーゼを特異的に検出する能力に反する。活性なポリメラーゼが全ての生存能力のある細胞に共通であり、このようなアッセイ系において任意のリガーゼと区別することができないため、生存能力のある細胞誘導NAD依存性細菌リガーゼをATP依存性真菌リガーゼと区別することは、該文献の記載されているアッセイの意図される能力をさらに排除する。該文献またはあらゆる他の既知の技術により明らかに予期し得ないこの重要な問題をこのように同定すると、本発明は、下記のとおり、検出されるべきDNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない代替りのDNA基質を提供することにより、特定のリガーゼシグナルを非精製リガーゼサンプル、例えば、粗微生物溶解物から検出可能にする改良を提供する。

10

【0043】

したがって、本発明はまた、サンプル中の微生物の存在の指標として、NAD-依存性リガーゼまたはホスファターゼからなる群から選択される酵素またはそれらの混合物を検出する改良された方法であって、

(a) サンプルを、サンプル中で酵素活性に対する基質として作用するが、DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない核酸分子と接触させること；

20

(b) このように接触されたサンプルを酵素活性に適切な条件下でインキュベートすること；および

(c) 基質核酸分子に対する選択される酵素または混合物の作用から生じる酵素修飾核酸分子の存在（および/または量）を決定し、微生物の存在を示すことを含む方法、ならびにそれらに基づく組成物およびキットを提供する。

【0044】

したがって、本発明の改良された方法は、NAD-依存性リガーゼまたはホスファターゼまたはそれらの混合物を発現する（または発現している）全ての微生物を同定するために有用である。

30

【0045】

本発明の好ましい態様において、本明細書に記載されている改良された方法における第1の工程は、サンプルを、サンプル中でNAD-依存性リガーゼ活性に対する基質として作用するが、DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない核酸分子と接触させることを含む。いったんライゲーションされると、特異的に検出することができるあらゆる適当な酵素修飾分子またはライゲート可能な分子が、本発明の方法において利用され得る。

【0046】

本発明の方法における使用のための、および本発明のキット中に包含させるための基質核酸分子は、NAD-依存性リガーゼが検出可能な酵素修飾またはライゲート（新規）核酸分子を生産するように分子上で作用することができるような、かつそれがDNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できないような、配列および構造のものでなければならない。

40

【0047】

本発明の開発において、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）Taq-DNAポリメラーゼ由来の背景の除去は、別々に扱われるべきであり、したがって本願発明の範囲外である別々の検出システムの問題であると決定されたため、WO/2009/007719に記載されている現行の基質設計において見出された特異性の欠如に対する実行可能な解決策でなかったことに注目したことが評価されるべきである。

【0048】

したがって、本願の場合、本発明へと導く実験のために、具体的に、リガーゼを干渉し

50

ない阻害剤付加物で全てのDNAポリメラーゼ活性をブロックすることを目標として設定した。これを成し遂げるために、DNAポリメラーゼが、中和/コントロールされる必要がある十分に立証された酵素機能：

- (a) 5' - 3' DNAポリメラーゼ活性
- (b) 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性
- (c) 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性
- (d) 固有のエステラーゼ活性

を有することに注目した。

【0049】

WO/2009/007719の方法において使用されているような記載の基質分子の代わりとして適当な本発明の新規方法における使用のための適当な基質核酸分子戦略は、限定はしないが、以下のものを含み得ることが、本発明にしたがって決定された：

1. ポリメラーゼを任意の活性から阻害する修飾ヌクレオチド
2. 最初の塩基付加でポリメラーゼを停止し、その活性を封鎖する - 中和するが、リガーゼがdATPを使用して生産反応を享有する、ジデオキシヌクレオチドddCTP、ddGTP
3. ASオリゴを延長から防止するジデオキシオリゴヌクレオチド
4. DNA基質における活性をブロックするように組み込まれるポリメラーゼ阻害修飾塩基を有するS1オリゴ
5. 活性を阻害するDNAポリメラーゼ特異的抗体 - これらは、PCRの分野でよく知られている
6. アプタマーオリゴ阻害性複合体
7. 当分野で知られている真の「ホットスタート(Hot Start)」と組み合わせられた5'側のASを短縮することにより、ポリメラーゼ伸長基質を下流増幅、例えば、PCRにおいて検出されるものから除去するDNA基質ハイブリダイゼーション戦略
8. ポリメラーゼを3'側のASの短縮により結合および伸長から除去するが、リガーゼに影響しないDNA基質ハイブリダイゼーション戦略
9. リガーゼのためにバランスのとれたポリメラーゼ伸長の長さとは組み合わせられた相対速度動力学
10. Per-PCR S1 3' - ジデオキシ競合(全長、または、ASの3'に相補的である13mer)
11. Pre-PCR S1 3'リン酸競合
12. 最適UNG(標準UNG酵素)条件を使用するASの完全除去
13. 熱安定性のUNG(NEB)を使用するASの完全除去。UNGの加熱処理により、リガーゼ/ポリメラーゼ除去を可能にし、PCR mmがdTTPを有するべきであること
14. PCR前に、UNG/Rnase共処理を可能にするために、デオキシウリジン(UNG除去)および残りのRNA塩基を有するASを作製すること
15. ジデオキシ3'ASを得るための必要性
16. より高い温度(すなわち65)でのTaqドッキングを減少させるためのASの3'末端の短縮
17. ライゲーション/伸長工程中に固体支持体に共有的に結合されるAS
18. 3' - ジデオキシS2リバーズ補体(全長、またはおそらく、S1 Pol伸長に相補的であるちょうど13mer)
19. 背景減少のために - 当分野でよく知られている「ホットスタート」戦略 - 望ましくないオリゴまたは伸長オリゴハイブリダイゼーションの100%除去

【0050】

a. True Physical - 全ての接触物質が約90 の熱い温度でなければならず、約65 の域値温度以下に落としてはならないため、移動過程が温度低下を引き起こすという回避すべき問題があるので、真の物理的ホットスタートは容易ではない。

10

20

30

40

50

b . 非酵素ホットスタート、例えば、2 mMのMgCl₂ (. 1 mMのEDTA保護)、プライマー、dNTPまたは他の重要な成分に投入

c . Chem - プライマー ホットスタート

【0051】

本発明の改良は、WO/2009/007719に記載されている基質を本明細書に記載されている適当な基質核酸分子で置換することにより実現できることが示されたが、当然のことながら、本発明は、本明細書に記載されている特定の態様による範囲において限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されているものに加えて、本発明の種々の修飾が前記から当業者に明らかになる。全てのこのような修飾は、本発明の範囲内に属すると意図される。さらに、本明細書に記載されている全ての態様は、適宜、広く適用することができ、他の任意の、および全ての一貫性のある態様と組み合わせることができると考えられる。

10

【0052】

本発明の広範な基本原則および教示が、具体的に上記されている微生物または細菌だけではなく、種々の病原体、例えば、任意の細菌、真菌、ウイルス、寄生生物などに対しても、種々の生物学的組織サンプル(限定はしないが、血液、体液および軟組織を含む)の変性剤による粗溶解物(ビーズミルおよび超音波処理)直接-プローブ/SYBR-PCR分析の全てのバリエーションを最適化させるように適用可能であることが当業者により理解される。

【0053】

本明細書において特にPCRに言及するが、本発明の改良がPCRまたは同様の方法論に限定されないことをさらに理解すべきである。本発明における使用のために考慮される増幅アッセイは、限定はしないが、他のよく知られている核酸ベースの技術、例えば、DNA増幅アッセイ、熱安定性のポリメラーゼを含むPCRアッセイ、および等温増幅方法を含む。当然のことながら、当業者は、本発明の実施において有用であろう種々の適当な増幅方法を思いつくことができるので、本願発明がそれにより限定されることは意図されない。

20

【0054】

本発明はまた、DNA診断を含むいずれかの、および全ての方法、手段および工程における用途を有することが理解されるべきである。このような用途の例は、限定はしないが、食物、水の安全性、バイオテロ、医学/医薬を含むもの、および/または病原体検出を含むすべてのものを含む。食品産業において、本発明は、防腐剤の有効性をモニタリングするために使用することができる。本発明の方法は、全ての細胞に適用される可能性を有する。細菌細胞が実施例において例示されているが、当業者は、本発明の方法が多数の他の細胞型に適用することができることを容易に理解することができる。本発明はまた、膜を破壊することができ、および/または細胞、例えば細菌細胞を殺すことができる物質の同定のために使用することができる。多剤耐性生物体健康施設および患者において蔓延および拡散しているため、新規殺菌剤および/または抗生物質の同定は、現在、優先事項である。

30

【0055】

本発明の方法は、ツールとして定量PCRと組み合わせて、細胞を培養し、増殖を待つ時間をかけることなく、殺菌剤および/または抗生物質の影響を迅速に、および成功裏に同定することができることがさらに理解される。いくつかの例では、生物体は、培養するために数日から数週間かかるので、候補物質が微生物のような細胞を殺すことができたかどうかを知るために、かなりの時間がかかる場合がある。他の例では、ある種の生物体は細胞培養において増殖しないので、物質が有効であるかどうかを決定することは困難である。したがって、本発明の新規方法を適用することは、新規殺菌剤および/または抗生物質の同定のための時間および資源を節約することができる。

40

【0056】

本発明の新規方法のさらなる利点は、それらの使用の容易さである。例えば、これらの

50

方法を使用して、多量のサンプルを生存能力のある細胞、例えば細菌の存在に関して容易に試験することができる。例えば、サンプルは、無傷な細胞膜を有する潜在的に生存している細菌の存在に関して試験され得る。別の態様において、環境サンプルは、生存能力のある細胞、例えば細菌の存在に関して試験され得る。これらのサンプルは、例えば、土壌から回収されるか、または植物の一部であり得る。本発明の方法はさらに、放出の前後の両方で、処理された廃水の試験のために使用することができる。

【0057】

本発明の方法はさらに、医薬サンプル、例えば、糞便サンプル、血液培養物、唾液、組織サンプル（切片も）、創傷物質(wound material)、尿、および呼吸管、インプラントおよびカテーテル表面由来のサンプルを試験するために使用され得る。

10

【0058】

本発明の方法の適用の別の分野は、食品のコントロールであり得る。他の態様において、食品サンプルは、ミルクまたは乳製品（ヨーグルト、チーズ、スイートチーズ、バターおよびバターミルク）、飲料水、飲料（レモネード、ビールおよびジュース）、ベーカリー製品または肉製品から得られる。本発明の方法は、食品中の防腐剤または食品の抗微生物処置（例えば、低温殺菌）が細胞増殖を防止しているか否かを決定することができる。本発明の方法の適用のさらなる分野は、医薬品および化粧品、例えば、軟膏、クリーム、チンキ剤、ジュース、溶液、ドロップなどの分析である。

【0059】

加えて、本発明の方法は、生態学的試験に対する微生物集団の潜在的に生存能力のあるメンバー、農業および/または生態系に対する特定の土壌の状態を同定することができる。細菌集団の従来と同定は、培養ベースのアプローチまたはプレートカウントを使用して行われている。カウントされるコロニーが多ければ多いほど、より多くの細菌が元のサンプル中に依存すると概算される。しかしながら、時折、該方法を適時かつ正確な結果にとって不適当にする長期のインキュベーション時間（数日の範囲）から問題が生じる。これらの欠点は、本発明の方法を利用している。

20

【0060】

本発明の方法を使用する分析または本発明の方法を使用するサンプル中の潜在的な生存能力の検出に付すことができる細菌の非限定的な例は、例えば：百日咳菌、レプトスピラ・ポモナ、パラチフス菌 A および B、ジフテリア菌、破傷風菌、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌、フェセリ菌(*C. fesi*) および他のガス壊疽菌、炭疽菌、ペスト菌、パスツレラ・ムルトシダ、髄膜炎菌、淋菌、インフルエンザ菌 e、アクチノミセス（例えば、ノカルジア）、アシネトバクター、バシラス（例えば、バシラス・アンスラシス）、バクテロイデス（例えば、バクテロイデス・フラジリス）、プラストミセス、ボルデテラ、ボレリア（例えば、ボレリア・ブルグドルフェリ）、ブルセラ、カンピロバクター、クラミジア、コクシジオイデス、コリネバクテリウム（例えば、コリネバクテリウム・ジフテリア）、大腸菌（例えば、エンテロトキシン産生大腸菌および腸管出血性大腸菌）、エンテロバクター（例えば、エンテロバクター・エロゲネス）、エンテロバクター（クレブシエラ、サルモネラ（例えば、チフス菌、サルモネラ・エンテリティデス、セラチア、エルシニア、シゲラ）、エリジペロスリックス、ヘモフィラス（例えば、インフルエンザ菌 B 型）、ヘリコバクター、レジオネラ（例えば、レジオネラ・ニューモフィラ）、レプトスピラ、リステリア（例えば、リステリア・モノサイトゲネス）、*Mycobacterium* 血漿、マイコバクテリウム（例えば、マイコバクテリウム・レブラエおよび結核菌）、ピブリオ（例えば、コレラ菌）、パスツレラ、プロテウス、シュドモナス（例えば、緑膿菌）、リケッチア、スピロヘータ（例えば、トレポネーマ属、レプトスピラ属、ボレリア属）、シゲラ属、髄膜炎菌(*Meningiocooccus*)、肺炎球菌および全ての連鎖球菌（例えば、肺炎連鎖球菌および A₃ B、および C 群連鎖球菌）、ウレア血漿、梅毒トレポネーマ、黄色ブドウ球菌、パスツレラ・ヘモリチカ、コリネバクテリウム ジフテリアトキソイド、髄膜炎菌多糖、百日咳菌、肺炎連鎖球菌、破傷風菌トキソイド、およびウシ型結核菌を含む。上記リストは、単に説明的であることを意図し、決して本発明を特定の細菌生物体に対する検出に限定する意味

30

40

50

ではない。

【0061】

本発明の特に好ましい態様は、PCRを利用する。PCRの一般的な手順は、米国特許第4,683,195号(Mullisら)および米国特許第4,683,202号(Mullisら)において教示されている。しかしながら、それぞれの増幅反応のために使用される最適なPCR条件は、一般的に、経験的に、当業者により一般的に使用されるコンピュータソフトウェアで決定または概算される。多くのパラメーターが、反応の成功に影響する。それらの中でも、アニーリング温度および時間、伸長時間、 Mg^{2+} 、pH、およびプライマー、鋳型およびデオキシリボヌクレオチドの相対濃度がある。一般的に、鋳型核酸を、ポリメラーゼ反応前に1から10分間、少なくとも約95に加熱することにより変性させる。増幅の約20-99サイクルは、0.05から1分間、90から96の範囲で変性、0.05から2分間、48から72の範囲の温度でアニーリング、および最適の最終サイクルで少なくとも0.1分間、68から75で伸長を使用して達成される。1つの態様において、PCR反応は、約100ngの鋳型核酸、20uMの上流および下流プライマー、および0.05から0.5mMのそれぞれの種類のdNTP、および0.5から5ユニットの市販されている熱安定性DNAポリメラーゼを含み得る。

10

【0062】

慣用のPCRのバリエーションは、逆転写酵素が最初に、RNA分子を一本鎖cDNA分子に変換し、次にそれをポリメラーゼ連鎖反応における次の増幅に対して鋳型として使用する逆転写PCR反応(RT-PCR)である。RNAの単離は当分野でよく知られている。RT-PCRの実施において、逆転写酵素は、一般的に、標的核酸が熱変性された後に、反応サンプルに加えられる。次に、増幅の計画的サイクルが行われる前に、反応を十分な時間量(10-60分)適当な温度(例えば30-45)で維持し、cDNA鋳型を生産させる。当業者は、定量結果が望ましいとき、増幅された核酸の相対的コピー数に対して維持またはコントロールする方法を使用することに留意すべきであることを理解している。「定量」増幅の方法は、当業者によく知られている。例えば、定量PCRは、同じプライマーを使用して既知の量のコントロール配列を同時に共増幅することを含むことができる。これは、PCR反応を標準化するために使用され得る内部標準を提供する。

20

【0063】

別の代替PCRは定量PCR(qPCR)である。qPCRは、わずかな挿入または欠失により標的とサイズにおいて異なる内部同種対照を使用する競合技術により行うことができる。しかしながら、非競合および動力学的定量PCRも使用され得る。リアルタイム、動力学的PCR検出と、標的配列と共に同時に検出することができる内部同種対照との組合せが有利であり得る。

30

【0064】

PCR、RT-PCRおよび/またはqPCRのためのプライマーは、特定の生物体に対して選択されるDNA領域だけを増幅する領域または特定の細菌内で選択される。あるいは、プライマーは、全ての生物体に対して共通であるDNAの部分にハイブリダイズし、増幅するプライマーが選択される。プライマー選択および構築は、一般的に、当分野で知られている。一般的に、一方のプライマーは、増幅される配列のそれぞれの末端に位置する。このようなプライマーは、通常、10から35ヌクレオチド長であり、18から22ヌクレオチドの好ましい長さを有する。増幅することができる最も短い配列は、約50ヌクレオチド長である(例えば、配列中の位置が少なくとも10ヌクレオチドにより分離される両方とも20ヌクレオチド長のフォワードおよびリバースプライマー)。さらに長い配列を増幅することができる。一方のプライマーは「フォワードプライマー」と称され、増幅される領域の左末端に位置する。フォワードプライマーは、DNAの上段の鎖における領域と配列において同一である(二本鎖DNAが、上段の鎖が5'から3'方向における極性で示される慣例にしたがって描かれているとき)。フォワードプライマーの配列は、DNAの上段の鎖に相補的であるDNAの鎖にハイブリダイズするような配列である

40

50

。もう一方のプライマーは「リバースプライマー」と称され、増幅される領域の右末端に位置する。リバースプライマーの配列は、DNAの上段の鎖における領域と配列において相補的である、すなわち、配列の逆相補鎖であるような配列である。リバースプライマーは、DNAの上段の末端にハイブリダイズする。PCRプライマーはまた、多くの他の条件にしたがって選択されるべきである。PCRプライマーは、鋳型における1以上の領域へのハイブリダイゼーションを最小限にするのに、十分な長さであるべきである（好ましくは10から30ヌクレオチド長）。可能ならば、長い単一塩基を有するプライマーは回避するべきである。プライマーは、好ましくは、40から60%のG+C含有率を有するべきである。可能ならば、3'末端のプライマーのG+C含有率は、5'末端のプライマーのG+C含有率よりも高くなるべきである。プライマーは、プライマー内の別の配列とハイブリダイズすることができる配列（すなわち、パルンドローム）を含むべきではない。同じPCR反応において使用される2つのプライマーは、お互いにハイブリダイズ可能であるべきではない。PCRプライマーは、好ましくは上記推奨にしたがって選択されるが、プライマーがこれらの条件に従う必要はない。他のプライマーが働き得るが、良い結果を得る可能性は低い。

10

【0065】

所定の配列内のDNAを増幅するために使用することができるPCRプライマーは、利用できる多くのコンピュータプログラムの1つを使用して選択することができる。このようなプログラムは、所定の配列の増幅のために最適であるプライマーを選択する（すなわち、このようなプログラムは、上記条件、およびPCRプライマーの機能性を最大化し得る他の条件にしたがってプライマーを選択する）。1つのコンピュータプログラムは、PCRプライマーの選択のために日常的に用いられるGenetics Computer Group (GCGは、最近Accelrysになった)分析パッケージである。

20

【0066】

以下に記載されているオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、多くの方法において作製することができる。これらのオリゴヌクレオチドを作製するための1つの方法は、市販の核酸シンセサイザーを使用して合成することである。種々のこのようなシンセサイザーが存在し、当業者によく知られている。

【0067】

核酸はまた、ハイブリダイゼーション方法により検出され得る。これらの方法において、標識核酸が、標識もしくは非標識核酸プローブを含有する基質に加えられ得る。あるいは、非標識核酸が、標識核酸プローブを含有する基質に加えられ得る。ハイブリダイゼーション方法は、例えば、Micro Array Analysis, Marc Schena, John Wiley and Sons, Hoboken N.J. 2003において記載されている。

30

【0068】

核酸を検出する方法は、標識の使用を含むことができる。例えば、放射性標識は、（放射性リン酸取り込みを検出および定量するために）写真フィルムまたはホスフォイメージャーを使用して検出され得る。蛍光マーカは、放射光を検出するために光検出器を使用して検出および定量され得る（典型的な装置に関して米国特許第5,143,854号参照）。酵素標識は、一般的に、基質と共に酵素を提供し、基質に対する酵素の作用により生産された反応産物を測定することにより検出される。比色標識は、着色標識(colored label)を単に可視化することにより検出される。1つの態様において、増幅された核酸分子は、核酸挿入色素で増幅産物を直接染色することにより可視化される。当業者に明白であるとおり、典型的な色素は、に限定はしないが、SYBR グリーン、SYBR ブルー、DAPI、ヨウ素化プロピジウム、および臭化エチジウムを含む。増幅されたDNA分子中に挿入された発光色素の量は、製造業者の指示にしたがって、慣用の検出デバイスを使用して便利に定量することができる増幅産物の量に正に比例する。このようなアプローチのバリエーションは、増幅産物のゲル電気泳動、次に、選択された挿入色素の染色および視覚化である。あるいは、標識オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ（例えば、蛍光プローブ、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)プローブおよび

40

50

比色プローブ)が、増幅を検出するために使用され得る。所望により、試験されている生物学的存在物を表すゲノム配列の特異的増幅は、シーケンシングにより、または、増幅産物が予測されたサイズを有するか、予測される制限消化パターンを示すか、または正確なクローン化ヌクレオチド配列にハイブリダイズすることを明らかにすることにより立証され得る。

【0069】

本発明はまた、キットを含む。例えば、キットは、サンプル中で選択される酵素または混合物の活性に対する核酸分子を含む基質(DNAポリメラーゼ由来のシグナルを干渉できない)、酵素活性に適切な条件下でサンプルおよび基質をインキュベートするためのインキュベーション手段、および(微生物の存在を示すものとして)基質核酸分子に対する選択される酵素または混合物の作用から生じる核酸分子の存在(および/または量)を特異的に決定するための手段を含むことができる。このようなキットはまた、微生物の存在または非存在に関して正常滅菌体液をスクリーニングための、および診断、予後患者管理情報を提供するために、本発明の新規方法を行うために適当な他の試薬、ならびに特異的もしくは一般的に生物体に対応する核酸分子を増幅するために有用なプライマー、DNAを単離するためのバッファーおよび試薬、およびPCRのための試薬を含むことができる。キットは、興味ある生物体に対応するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズする検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドをさらに含み得る。キットはまた、アッセイし、含まれる試験サンプルと比較することができる対照サンプルまたは一連の対照サンプルを含むことができる。キットのそれぞれの成分は、個々の容器内に封入することができ、種々の容器の全てが、キットを使用して行われたアッセイの結果を解釈するための指示書と共に、単一のパッケージ内に包含され得る。

10

20

【0070】

また、本発明により提供される方法は、本明細書において提供される原理および教示を利用する完全または部分的微生物ゲノムおよび/またはトランスクリプトーム配列分析を行うことをさらに含み、該完全または部分的微生物ゲノムおよび/またはトランスクリプトーム配列分析は、本明細書に記載されている単一のサンプル調製を使用して同時に、一斉に、または並行して行うことができると理解されるべきである。また、本明細書における本発明の新規方法が、患者の管理において有用な抗-微生物および/または抗-ポリメラーゼ活性を有する薬剤の診断測定および検出のために提供できると理解されるべきである。

30

【0071】

本出願中で引用されている全ての文献、特許および公開特許出願の内容は、それぞれの個々の文献、特許または特許出願が具体的にかつ個々に出典明示により包含させることが示されているかのように、出典明示により同じ範囲まで本明細書に包含させる。

【0072】

前記詳細な説明は、明瞭な理解のためだけに与えられており、修飾が当業者に明らかであるため、該記載からの不必要な限定は推測されるべきではない。本明細書において提供されるいずれかの情報が先行技術もしくは本願発明に関連している技術であるとは認めず、または具体的に、もしくは暗に引用されているいずれかの文献が先行技術であるとは認めていない。

40

【0073】

他に定義がない限り、本明細書において使用される全ての専門および科学用語は、本発明が属する分野における通常の技術者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0074】

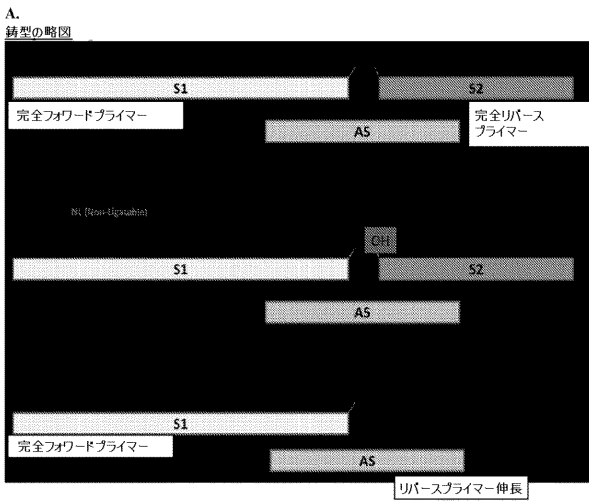
本発明は詳細に記載されているが、本明細書における具体例は、本発明の態様の具体的な説明の手段として、および理解の明確さの目的のために提供される。本明細書に記載の本発明の教示に照らして、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、記載されているこれらの態様に多数の変化および修飾を施すことができることは、当業者に容易に理解される。

50

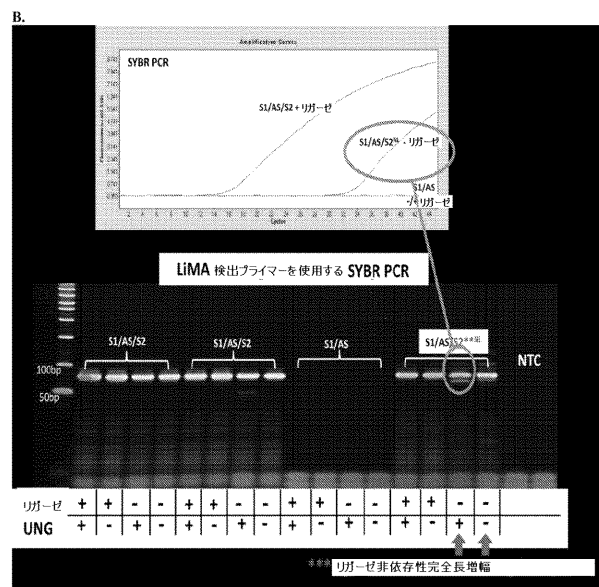
【 0 0 7 5 】

本発明は具体的態様に関連して記載されているが、さらなる修飾が可能であること、および、本出願は、一般的に、本発明の原理に従い、かつ、本発明が関係する分野内の既知のまたは慣習的な習慣内にあるような、上記重要な特徴に適用され得るような、および、特許請求の範囲に従うような、本記載からの逸脱を含む本発明のあらゆる変化、使用または適合を含むことが意図されることは、理解されよう。

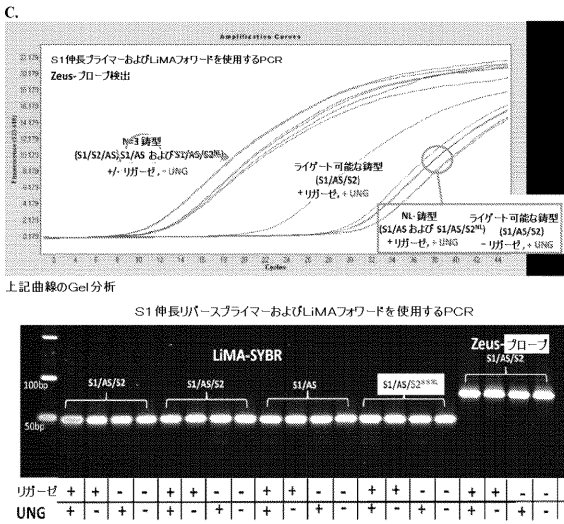
【 図 1 - A 】



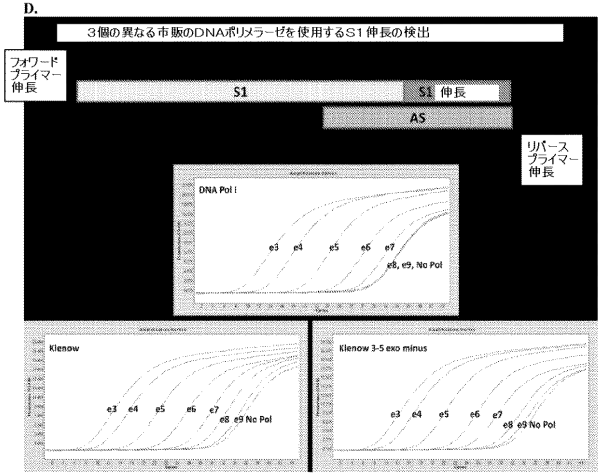
【 図 1 - B 】



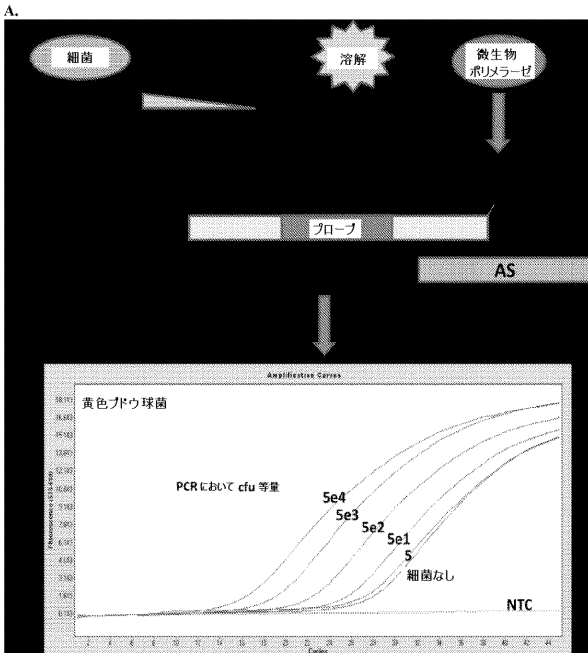
【 図 1 - C 】



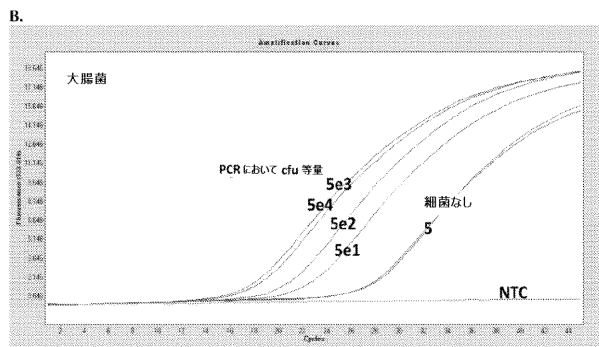
【 図 1 - D 】



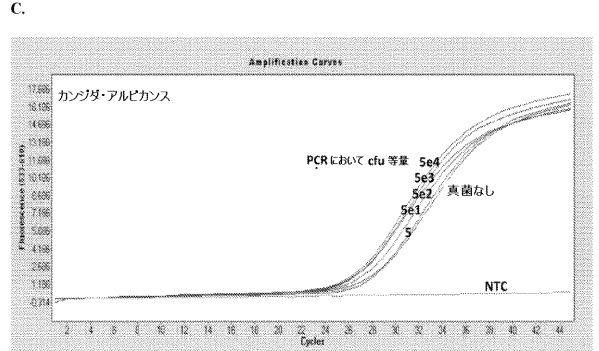
【 図 2 - A 】



【 図 2 - B 】

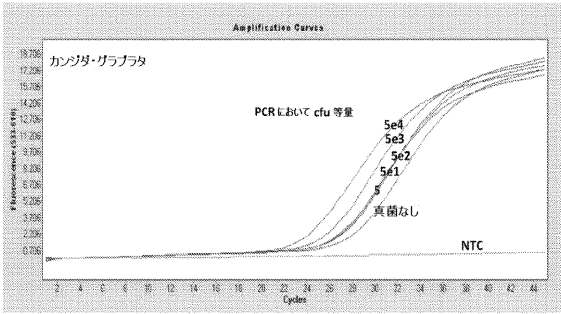


【 図 2 - C 】

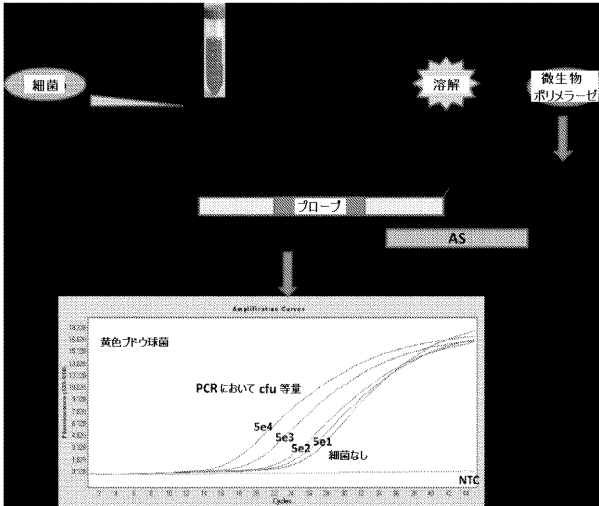


【 図 2 - D 】

D.



【 図 3 】



フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 512267667

ダニエル・アール・ズウェイツィグ

Daniel R. ZWEITZIG

アメリカ合衆国08876ニュージャージー州ブランチバーグ・タウンシップ、エバンズ・ウェイ
200番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 ショーン・マーク・オハラ

アメリカ合衆国08876ニュージャージー州ブランチバーグ・タウンシップ、エバンズ・ウェイ
200番

(72)発明者 ダニエル・アール・ズウェイツィグ

アメリカ合衆国08876ニュージャージー州ブランチバーグ・タウンシップ、エバンズ・ウェイ
200番

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ28 QQ33 QR57 QS26 QX01

专利名称(译)	以聚合酶活性为指标检测未纯化样品中微生物的方法		
公开(公告)号	JP2013537399A5	公开(公告)日	2016-03-10
申请号	JP2013505162	申请日	2011-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	宙斯公司 ZEUS SCI 肖恩·马克·奥哈拉 SHAWN MARK OHARA 丹尼尔·伯爵路梓ING 丹尼尔 - [R ZWEITZIG		
申请(专利权)人(译)	宙斯公司 肖恩·马克·奥哈拉 丹尼尔·厄尔Zuweitsuigu		
[标]发明人	シヨーンマークオハラ ダニエルアールズウェイツィグ		
发明人	シヨーン・マーク・オハラ ダニエル・アール・ズウェイツィグ		
IPC分类号	C12Q1/48 C12Q1/42 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/25 C12Q1/42 C12Q1/48 C12Q1/6834 C12Q1/6888		
FI分类号	C12Q1/48 C12Q1/42 C12Q1/02 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ28 4B063/QQ33 4B063/QR57 4B063/QS26 4B063/QX01		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/324939 2010-04-16 US 61/325413 2010-04-19 US 61/324949 2010-04-16 US		
其他公开文献	JP2013537399A		

摘要(译)

本发明一般涉及微生物的检测领域，特别是细菌的检测，测量酶活性的方法，例如DNA聚合酶活性，特别涉及对微生物粗裂解物进行的这种方法，用于测定微生物酶活性。其可以与诸如实时聚合酶链反应(PCR)技术的扩增信号发生器相关联，从而能够确定样品中的微生物病原体，例如未纯化的血液和其他体液。本发明还涉及用于这些方法的试剂，以及包含用于实施所述方法的试剂的试剂盒。