

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5339658号
(P5339658)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
G O 1 N 33/52 (2006.01)	G O 1 N 33/52	A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	B
請求項の数 10 (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-513625 (P2001-513625)	(73) 特許権者	500077845
(86) (22) 出願日	平成12年7月28日 (2000.7.28)		バイオメリュー・ソシエテ・アノニム
(65) 公表番号	特表2003-505105 (P2003-505105A)		フランス・69280・マルシ・レトワール・シュマン・ドゥ・ロルム (番地なし)
(43) 公表日	平成15年2月12日 (2003.2.12)	(74) 代理人	100099623
(86) 国際出願番号	PCT/DE2000/002495		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開番号	W02001/009370	(74) 代理人	100096769
(87) 国際公開日	平成13年2月8日 (2001.2.8)		弁理士 有原 幸一
審査請求日	平成19年7月23日 (2007.7.23)	(74) 代理人	100107319
審判番号	不服2011-4664 (P2011-4664/J1)		弁理士 松島 鉄男
審判請求日	平成23年3月1日 (2011.3.1)	(74) 代理人	100114591
(31) 優先権主張番号	199 36 047.2		弁理士 河村 英文
(32) 優先日	平成11年7月30日 (1999.7.30)	(74) 代理人	100118407
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 吉田 尚美
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 細菌株の検出および同定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a)細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質を支持体に直接結合によって結合するか、または細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質を支持体に固定したポリペプチドに直接結合することによって、細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質を支持体に結合するステップと、ここで、前記細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質は酵素活性を欠いており、

b)細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質を結合させた支持体を試料と共にインキュベーションするステップと、

c)任意選択的に、細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質に結合していない試料および試料中の細菌を除去するステップと、

d)任意選択的に、細菌膜を透過性にしたりは破壊する物質を添加するステップと、

e)細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質に結合した試料中の細菌を培養せずに検出するステップと、
を含む細菌の検出方法。

【請求項 2】

前記検出が、細胞成分および/またはファージ増殖の産生物の比色検出によって実施され、またはDNAおよび/またはRNAの検出によって実施され、または免疫学的検定法によって実施されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

支持体に直接的につながった、細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質が、吸着または化学的結合によって該支持体に結合されることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記支持体に固定したポリペプチドが、前記細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質に特異的な抗体、レクチン、受容体またはアンチカリンである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質が一時変異を示すことを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の方法。

10

【請求項6】

少なくとも2つの別個の種類および/または属の細菌を認識する少なくとも2つの別個の細菌に結合することができるバクテリオファージタンパク質を使用することを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記支持体が、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、PMMA、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラスまたはシリコンウエハーから成る、マイクロタイタープレート、試験用帯状物、スライド、ウエハー、フィルター材料またはフロースルー細胞チャンバーである、請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

20

医薬分野、食品産業分野および食品産業分析分野、家畜の飼育分野、淡水分析分野または環境分析分野において、細菌を検出するための請求項1乃至7のいずれかに記載の方法の使用。

【請求項9】

酵素活性を欠いたファージタンパク質が固定されている支持体および結合した細菌を検出するための分析試薬を含む、請求項1乃至7のいずれかに記載の方法を実施するためのキット。

【請求項10】

細菌膜を透過性にしたりまたは破壊する洗浄液および/または物質をさらに含む請求項9に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、細菌の検出方法であって、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質を支持体に結合するステップと、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質に結合した支持体を試料と共にインキュベーションするステップと、任意選択的に、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質に結合していない試料および試料中の細菌を除去するステップと、任意選択的に、細菌膜を透過性または破壊する物質を添加するステップと、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質に結合した試料中の細菌を検出するステップとを含む細菌の検出方法であって、ここで、結合した細菌にはいかなる培養ステップも実施しないことを特徴とする。

40

【0002】

細菌の迅速且つ正確な検出は、ヒトおよび動物における細菌感染の診断および治療のため、そして予防措置を開始するための最初の必須段階である。さらに、検出は原材料および加工食材の衛生および品質を管理するため、並びに淡水および洗浄水の衛生および品質並びに公共プールの水の品質の管理のために有用である。また、このような検出は環境分析におけるプロセスのモニタリングおよび最適化並びに品質管理に有用である。これまでに適用された手法のほとんどとは全く異なり、本明細書に記載される方法は必要な場所における簡単な検出を可能にする。

【0003】

50

ほとんどの場合において生物試料における細菌の検出は、代謝活性をモニタリングすることによる培養方法の組み合わせによる。1つの種類の細菌の細菌株のファージ分別のためには、細菌に対する感受性を有する培養方法をバクテリオファージの分別と組み合わせる。この方法は、軟寒天中でバクテリオファージの懸濁液を積層した分析対象の試料の寒天平板上の密集した細菌叢 (dense bacterial lawn) に関係し、前記細菌叢は単一のコロニーを単離し、その後前記コロニーを増殖させることによって得られる。結果は、通常ほとんどの場合において、37 °C である最適細菌増殖温度において終夜インキュベーションし、プラークを計数し、プラークの形態をコントロールすることによって得られる。分別の変形はファージ媒介性の細胞溶解後のアデニル酸キナーゼの測定を考慮している。この方法では、分析対象の細菌の終夜の培養物を緩衝液で希釈し、ファージをそれに添加し、アデニル酸キナーゼ活性あたりの特定のファージによって細胞溶解を測定する。

10

【0004】

これまでに記載したすべての方法では、検出は細胞溶解後に可能であり、または検出は溶解によってはじめて検出できる。これにより、感染源のモニタリングおよび感染源の検出を可能にする。この型別認識はサルモネラ ティフィ (*Salmonella typhi*)、サルモネラ パラティフィ (*Salmonella paratyphi*) B、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 並びに数多くのさらに別の細菌などの数多くの細菌に関して何年も前から確立されている。これらの確立されている検出方法は、ほとんどの場合数日間たってからしか結果が得られない。しかし、一方では、反応が早い場合に非常に重要なのは、細菌の種類 (型別認識、タイピング) の迅速で正確な決定である。

20

【0005】

国際公開公報第93/17129号は、細菌に結合することができ、2つの構成メンバーからなる結合対の結合パートナーが固定されているバクテリオファージによって細菌が検出される、試料中の特定の細菌を検出するための方法を記載している。2つの構成メンバーからなる結合対の第2の結合パートナーは、水に不溶性であるが、懸濁性である固相支持体に結合している。細菌は、試料中に存在する場合には、バクテリオファージによって結合され、バクテリオファージは結合パートナーを介して固相支持体に結合する。

最近では、ポリメラーゼ連鎖反応などのより迅速な分子生物学的検出方法が使用されているが、この方法は、汚染されやすいという欠点を有する。同様に、これらの方法では、結果は通常1日後にしか得られない。

30

【0006】

さらに、細菌属の同定には高度に特殊化された基準実験室へも試料を提出しなければならない場合があり、同様に時間と経費に大きな負担となる。

【0007】

従って、本発明は、細菌の迅速で経済的な検出方法であって、一方では実験室において特に微生物学を訓練した者によって実施することができ、他方では必要とする場所において、対応する従来の知識を必要としないで単純化され、改良された形態で実施することができる方法を提供する目的に基づいている。

【0008】

この目的は、請求の範囲に規定される本発明の要旨によって解決される。

40

【0009】

従って、本発明の一態様は、細菌の種類および細菌株に関する情報を提供し、任意選択的に、細菌の定量を可能にする細菌の迅速で正確な検出システムであって、バクテリオファージまたはバクテリオファージタンパク質によるこれらの細菌の認識に基づいているシステムである。

【0010】

バクテリオファージに基づいた従来の細菌検出方法は、時間がかかる培養段階および細菌のバクテリオファージによる溶解を含む。実際、本発明もバクテリオファージによる細胞の特異的な認識を利用しているが、これまでに記載されている方法と違って、特異的に細胞を認識させ、非特異的に結合した細菌を分離する段階の後に、対応する結合アッセイ

50

、例えば、分光学的シグナル変化（例えば、吸光度、蛍光、生物学的発光もしくは化学的発光または円二色性によるもの）または電気的シグナル変化（例えば、静電容量または電気伝導度の変化を測定することによる）の測定が実施される。こうすることにより、これまで可能であったそれぞれ数時間および数日ではなく、数分後に細菌を検出することができる。標的化した結合、特に好適な支持用構造物、例えば、マイクロタイタープレート、試験用帯状物、スライド、ウエハー、フィルター材料またはフロースルー細胞チャンバーへのバクテリオファージの共有結合固定によって、結合アッセイの作業段階は非特異的なバックグラウンドが低下され、すべての細菌に対して広く適用可能となる。支持用構造物は、一例として、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、PMMA、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラスまたはシリコンウエハーからなってもよい。本発明による方法を使用するとさらに、細菌検出に対して溶原性バクテリオファージを使用することができる。

10

【0011】

本発明の一態様は、従って、細菌を検出するための方法であって、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質を支持体に結合するステップと、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質を結合させた支持体を試料と共にインキュベーションするステップと、任意選択的に、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質に結合していない試料および試料中の細菌を除去するステップと、任意選択的に、細菌膜を透過性にする物質または破壊する物質を添加するステップと、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質に結合した試料中の細菌を検出するステップであって、結合した細菌にはいかなる培養ステップも実施しないステップとを含む方法を提供することである。

20

【0012】

検出が、細胞成分および/またはファージ増殖の産生物の比色検出によって、DNAおよび/またはRNAの検出によってまたは免疫学的検定法によって実施される方法が好ましい。また、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質が、吸着または化学的結合によって支持体に結合される方法も好ましい。別の好ましい方法は、バクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質が一時変異を示す方法である。さらに別の好ましい方法は、少なくとも2つの別個の種類および/または属の細菌を認識する少なくとも2つの別個のバクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質が使用される方法である。さらに別の好ましい方法は、支持体が例えば、マイクロタイタープレート、試験用帯状物、スライド、ウエハー、フィルター材料またはフロースルー細胞チャンバーであり、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、PMMA、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラスまたはシリコンウエハーからなる方法である。検出対象の細菌に特異的なバクテリオファージが、望ましくは、検出に使用される。ファージは1種類の細菌種類にだけ特異的である必要はないが、いくつかの種類の細菌または細菌属に特異的となりうる。どのファージが検出に使用されるかはどの細菌が検出予定であるかに依存する。さらに、いくつかの種類の細菌を同時に検出するため、または細菌の属を正確に分類するために2種以上のファージを1つの検出方法に使用することができる。使用するバクテリオファージはDSMもしくはATCCなどのストックコレクションから購入したバクテリオファージであっても、またはこの目的のために特別に単離したバクテリオファージであってもよい。細胞溶解性バクテリオファージおよび溶原性のバクテリオファージを使用することができるが、細胞溶解性ファージが好ましい。しかし、それらの形態的特性は選択されるファージを限定せず、ミオウィルス科（T4様ファージ）、シフォウィルス科（siphoviridae）（ λ 様ファージ）またはポドウィルス科（T7様ファージ、p22様ファージ）が好ましい。

30

40

【0013】

ファージは細菌の対応する受容体に結合して、タンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質-炭水化物相互作用またはタンパク質-脂質相互作用を生ずる。特異性高く宿主を認識したら、ファージは遺伝情報（1本鎖または2本鎖のDNAまたはRNA）を細胞に注入し

50

、溶原性形態で含有されるかまたは細胞溶解の場合には新たなファージ粒子を作製する。ファージの核酸の細菌への注入によりほとんどの場合非可逆的に細菌はファージに結合される。本発明の方法によると、認識段階後に、細菌の検出段階が実施される。本発明の方法は、ファージが記載されているまたは単離することができる全ての細菌に適用可能である。好ましい細菌は、リューコノストック属などの乳酸菌、シュドモナスおよび大腸菌 (*E. coli*) のような腸内細菌、サルモネラなどの食品産業、医学または環境分析に関連する細菌である。認識ステップは0 ~ 90 の任意の温度範囲において、好ましくは、4 ~ 45 の温度範囲において、特に好ましくは、15 ~ 37 の温度範囲において、さらに特に好ましくは20 ~ 37 の温度範囲において、よりさらに特に好ましくは室温において、実施することができる。

10

【0014】

また、検出のために、完全なファージではなく、別個のファージタンパク質、例えば、ファージ受容体、ファージアドヘシン(adhesines)またはT4のp12もしくはp22のp9-テイルスパイクのようなそれらの一部またはこれらのタンパク質の変異体を単離し、使用することができる。細菌に非可逆的に結合するアドヘシン(adhesines)または非可逆的に結合させるためにその細菌結合ポケットが組換え的または化学的な技法によって一時変異されているアドヘシン(adhesines)が好ましい。組換え的に一時変異されたファージタンパク質の一例はp22-テイルスパイクの「活性部位突然変異体」である(Baxa et al., *Biophys. J.* 71, 2040-2048: 1996参照)。ファージタンパク質およびバクテリオファージを本発明の方法において使用することができる。

20

【0015】

本発明により使用されるバクテリオファージおよび/またはバクテリオファージタンパク質は、それぞれ、部位特異的またはランダムな突然変異誘発によって宿主特異性および結合特性が支持用構造物に対して調節(adopted)されうる。突然変異誘発は、アミノ酸付加、欠損、置換または化学的修飾であってもよい突然変異を含む。これらの突然変異は、特異性および結合親和性をアッセイ要件に適合させることを目的として、例えば、必要に応じた洗浄段階を改善するよう細菌の単離されたファージタンパク質への結合を非可逆的なものにするために、ファージまたはファージタンパク質の結合領域のアミノ酸配列を一時変異する効果を有する。また、ファージタンパク質の組換え的または生化学的な修飾は、任意選択的に存在する酵素活性を遮断し、それによって結合を改善し、または結合を非可逆的にするために行なうことができる。

30

【0016】

本発明による検出の目的のためには、ファージまたはファージタンパク質は、マイクロタイタープレート、試験用带状物、スライド、ウエハー、フィルター材料またはフロースルー細胞チャンバーのような好適な支持用構造物に固定される。支持用構造物は、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、PMMA、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ガラスまたはシリコンウエハーからなってもよい。固定は吸着または共有結合による結合によって実施することができ、共有結合が好ましい。固定は機能性の固定であることが適切で、すなわちファージおよびファージタンパク質はそれぞれ支持体材料に結合されるが、細菌が接近できる構造を示す。

40

【0017】

検討対象の細菌の支持体材料との非特異的な反応を抑制するために、ウシ血清アルブミンまたはTween20またはELISAにおいて同様に使用されるミルク粉末などの物質によるブロッキングを実施することができる。さらに、吸着効率を増加するために、支持体系を好適なタンパク質(例えば、ファージタンパク質に対する特異的な抗体またはBSAなどの非特異的なタンパク質)、ペプチド、サッカライド(糖)(例えば、モノサッカライド、オリゴサッカライドまたはポリサッカライド)または洗浄剤(例えば、Tween 20またはオクチルグルコシド)で事前にコーティングしてもよい。これらのコーティングは4 ~ 20 の温度範囲において終夜または30 ~ 65 の温度において2 ~ 4時間の期間において実施することができる。その後、過剰な液体を除去し、支持用構造物を約60 ~ 70 において乾燥する。

50

基礎的なコーティングは一方では機能的なファージまたはファージタンパク質の吸着を保証し、他方では試験細菌の支持用構造物への非特異的な吸着を防ぎ、それによってアッセイの効率を増加する。基礎的なコーティング後に、ファージまたはファージタンパク質の緩衝水溶液を事前処理した支持用構造物に適用することによって適用する。上記のように、4 ~ 20 で終夜または30 ~ 65 で、2~4時間の吸着後、コーティング溶液を除去し、支持用構造物を乾燥する。コーティング効率を増加するために、その後、グルタル酸アルデヒドなどの化学的架橋剤（クロスリンカー）によるファージまたはファージタンパク質の共有結合固定を実施することができる。

【0018】

官能基による固定を改善するために、特定の支持用系に対する結合特性を規定するペプチドがファージヘッドタンパク質またはカプシドタンパク質上に発現されるファージディスプレイ方法（Gene, 1998, 215, 439-444参照）をミオウィルス科、シフォウィルス科（siphoviridae）またはポドウィルス科のような使用するファージに使用することができる。

【0019】

吸着によるファージおよびファージタンパク質の支持材料への固定は、ファージの緩衝水溶液、例えば、100mM Tris, pH7.3または100mMリン酸ナトリウム, pH7.5を5 ~ 45、好ましくは、15 ~ 37、さらに好ましくは、20 ~ 37、よりさらに好ましくは、室温において数時間または終夜インキュベーションすることによって実施することができる。

【0020】

ファージまたはファージタンパク質を支持体に直接固定する必要はない。むしろ、ファージまたはファージタンパク質はポリペプチドに結合され、ポリペプチドを支持体に固定することができる。これらのポリペプチドは、ファージまたはファージタンパク質に特異的な抗体、レクチン、受容体またはアンチカリン（anticalins）であってもよい。

【0021】

共有結合的カップリングによってファージおよびファージタンパク質を固定する場合には、よりストリンジェントな洗浄条件により非特異的に結合した細菌を除去することがより好ましい。共有結合的カップリングでは、ファージおよびファージタンパク質は、例えば、第一アミノ基またはカルボキシル基によって製造業者によって予め活性化された支持材料にカップリングすることができる。このような支持材料の例は、例えば、Nunc、XenobioまたはCostar製のマイクロタイタープレートである。さらに、ファージおよびファージタンパク質は、標準的な反応において例えば、 -NH_2 （Russian Chemical Rev., 1964, 33: 92-103）またはEDC（1-エチル-3-[3'-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド）を介して COO^- （Anal. Biochem. 1990, 185: 131-135）と共有結合によりカップリングすることができる。また、支持材料は好適な方法によって直接活性化してもよい。広範囲の支持材料への適用性により好ましい一方法はシラン化（silanization）である。例えば、ポリスチレンのシラン化は、炎光熱分解によって実施することができる。その後、例えば、第一アミノ基またはカルボキシル基を介するカップリングを可能にする好適な接着物を適用する。

【0022】

例えば、T4ファージでは「ヘッド」を介する支持体へのカップリングのような指向性固定を実施するために、規定されたサイズの孔を有する膨潤性ポリマーまたは金属表面上の異なる鎖長のアルキルチオール混合物を使用することができる。

【0023】

分析対象の細菌を固定したバクテリオファージまたはファージタンパク質に結合するためには、分析対象の試料を水溶液の形態でファージまたはファージタンパク質と接触させ、インキュベーションする。4 ~ 90 の温度範囲において、好ましくは4 ~ 45 の温度範囲において、さらに好ましくは15 ~ 37 の温度範囲において、よりさらに好ましくは20 ~ 37 の温度範囲において、特に室温において、6時間、好ましくは4時間、さらに好ましくは、2時間、特に1時間、さらに特に1~20分の期間の間、インキュベーションを実施する。一例として、インキュベーションは4~37において2~120分であっても

よく、好ましくは、25 または37 において20～30分であってもよく、さらに好ましくは37 において35分であってもよい。リファンピシンなどの翻訳阻害剤を添加することによって、結合効率を増加するためにインキュベーション時間を延長することができる。特異的な認識および細菌の強力な結合の後に、好ましくは中性pHのPBSまたはPBS-Tweenのような緩衝水溶液、例えば、50 mMリン酸ナトリウム、pH7.0で洗浄することによって非特異的に結合した物質を分離することができる。任意選択的に、Tween 20、Triton X-100のようなこれらの洗浄剤または塩化グアニジニウムまたは尿素のようなカオトロピック剤を洗浄効率を増加するために使用する緩衝液に添加してもよい。この洗浄段階は使用する試料材にかかわらず数回反復することができる。

【0024】

10

非特異的に結合した物質を分離した後、結合した細菌の膜を透過性にしてもよく、または望ましい場合には（使用する検出アッセイに応じて）洗浄剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、オクチルグルコシド）、化合物（例えば、ポリミキシンB）、孔形成ポリペプチド（例えば、ニシン(nisin)、ホリン(holin)、メリチン(mellitin)）またはタンパク質（例えば、リゾチーム）を添加することによって破壊してもよい。この膜透過性処理は10～50の温度範囲において5または10分間実施することができる。その後、結合した細菌を検出する。

【0025】

例えば、フロースルーチャンバー内またはフィルター上に固定したファージまたはファージタンパク質に接触させた試料では、検出を実施する前にファージまたはファージタンパク質への細菌の結合後にそれを除去するストリンジェントな必要性がない。

20

【0026】

ファージまたはファージタンパク質に結合したタンパク質の検出は比色アッセイを使用することによって、例えば、NADH(Bergmeyer&Bernt; Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer, U. VCH, Weinheim 1974)、 β -ガラクトシダーゼ活性(Apte et al., 1995, Wat. Res. 29, 1803-1806)または無機リン酸塩(Lanzetta et al., 1979, Anal. Biochem., 100, 95-97)を検出することによって、実施することができる。これらのアッセイは少なくとも 10^4 細胞/mlの検出を可能にするが、蛍光染料感受性の使用によって、 $10^2 \sim 10^3$ 細胞/mlに改善することができる。比色アッセイは、一般に、細胞内膜酵素もしくは周辺細胞質酵素の活性または細胞成分の活性またはファージタンパク質もしくはファージ核酸のようなファージ増殖の産生物を検出するのに利用可能である。ファージ核酸は、外因性核酸、例えば、ワサビペルオキシダーゼの遺伝子がファージゲノムにクローニングされるようにさらに一時変異することができる。結合した細菌にファージ核酸を注入した後、外因性遺伝子が発現される。遺伝子産物の活性は、従来の方法によって検出することができる。さらに、外因性核酸は、次いで検出することができる任意の非細菌性ポリペプチドをコードすることができる。

30

【0027】

比色アッセイは分析対象の全ての細菌に対して同じであってもよいが、それらは細菌/ファージの特定の組み合わせに特異的であってもよい。細胞質酵素または周辺細胞質酵素の酵素活性の測定は、結合した細菌の膜透過性処理後に実施される。好ましくは、乳酸デヒドロゲナーゼまたはタンパク質ジスルフィドイソメラーゼなどの偏在的酵素の反応が検出される。酵素の選択は試験されるそれぞれの細菌属または属に特異的な問題の状態に適合することができる。比色試験アッセイでは、望ましい感度に応じて、化学的発光または生物発光、吸光度、蛍光または円二色性の検出方法が使用される。

40

【0028】

ファージまたはファージタンパク質に結合した細菌の検出はDNAおよび/またはRNAを検出することによっても実施することができる。この目的のためには、DNAおよび/またはRNAに結合する物質を使用することができる。DNAおよび/またはRNAへの結合は、膜核酸により直接的にまたは膜透過により直接的に生ずることができる。臭化エチジウム、アクリジンオレンジ、4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)またはSYBRグリーンIおよ

50

び文献に記載されているそれぞれの検出プロトコールを使用することができる。

【 0 0 2 9 】

また、ファージまたはファージタンパク質に結合した細菌の検出は新たに作製されたDNAおよび/またはRNAの検出によって実施することができる。この目的のためには、膜透過性蛍光標識ヌクレオチドを新たに作製されたファージDNAおよび/またはRNAに組み込むことができる。

【 0 0 3 0 】

さらに別の検出方法は、16S-rRNAの蛍光標識した高度に保存されたオリゴヌクレオチド(Shine-Dalgarno配列)とのハイブリダイゼーションおよび蛍光によるハイブリダイゼーションシグナルの検出である。ファージタンパク質またはファージゴースト(ヌクレオチドを含有しない「空(empty)ファージカプシド」)を使用することによる検出方法はファージDNAまたはRNAのバックグラウンドシグナルを低下するので好ましい。

【 0 0 3 1 】

ファージまたはファージタンパク質に結合する細菌の別の検出方法は、細菌の細胞表面構造に向けられるFITCまたはアルカル性ホスファターゼのような標識に結合される抗体のようなポリペプチドの使用、または細菌の細胞表面構造に向けられるレクチンの使用によるものであり、ペルオキシダーゼ結合抗体のシグナル形成が光学的にモニターされる。抗体またはレクチンによって認識される細菌の細胞表面は、例えば、リポポリサッカライドまたは膜タンパク質であってもよい。ポリペプチドはまた固定されたファージタンパク質と同一のファージタンパク質であっても、固定されたファージタンパク質と異なるファージタンパク質であってもよい。また、検出は、固定されたファージと同一または異なる完全体のファージを使用して実施することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明による検出方法は二次抗体の使用を必要としない。分析対象の細菌を支持系にカップリングし、その後一次抗体および二次抗体により検出を実施する従来のELISAとは異なって、支持系にカップリングされたファージ粒子を使用して事前濃縮および選択を実施する。これは、ELISAアッセイの感度を現在の 10^4 から 10^6 細胞/mlにかなり低下させる(Bla sco et al., 1998; J. Appl. Microbiol., 84, 661-666)。

【 0 0 3 3 】

任意選択的に、対応する標準的な装置におけるそれぞれの試料の例えば、蛍光、発光、吸光度もしくは円二色性、導電性または静電容量の変化を検出する。細菌の濃度の正確な測定を可能にするために、対応する標準的な分子を用いた検量線を確立することができる。細菌属を正確に判定するために、当技術分野において以前に記載されている数多くの分別あるいは型別認識(typing)のシステムを使用することができる。必要な場合には、異なるファージの好適な組み合わせである新規な分別システムを構築し、菌株を正確に判定するために使用する。

【 0 0 3 4 】

本発明による方法の使用により、細菌を迅速且つ感度よく検出することができる。上記の好適な支持用構造物へのカップリングにより、1回のアッセイにおいて数多くの細菌株の迅速で経済的な判定、細菌属の非常に正確な判定および/または細菌の定量が可能になる。とりわけ、細菌属の正確な判定は、病原体の疫学的な特徴づけに関係する医学的診断分野において重要である。

【 0 0 3 5 】

本発明の方法は、いかなる試料においても、特に医薬、食品産業および分析、家畜の繁殖、淡水または環境分析の分野において、迅速で、感度が高く、経済的な細菌の検出に使用することができる。本発明の方法は簡単にできることより、顧客の要望に適合する細菌溶液および系溶液の最も重要な組み合わせのための両方のパッケージ溶液が可能になる。本発明の方法はまた本発明による方法の完全自動化を可能にする。さらに、本発明の方法は好適なファージが利用可能である、もしくは今後単離される全ての細菌、または対応する分別用ファージまたはファミリータンパク質が選択によって作製することができる細菌

に適用可能である。本発明の方法はまた家庭内での用途のために「誰か」のために細菌を検出するキットに使用することもできる。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらに別の態様は、細菌を検出するためのキットであって、ファージまたはファージタンパク質を固定した支持体および結合した細菌の検出に必要なアッセイ試薬溶液を含むキットに関する。支持体は、上記のようにファージまたはファージタンパク質が固定される、上記の支持体のいずれであってもよい。アッセイ試薬を含有する溶液は同様に本発明の方法において細菌の検出について記載した物質に相当する。任意選択的に、本発明のキットは洗浄液および細菌膜の崩壊に必要な酵素または洗浄剤をさらに含んでもよい。

10

【 0 0 3 7 】

以下の実施例は本発明を説明するが、限定するものではない。そうでないことを示さない限り、例えば、Sambrock et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されている分子生物学的な標準的な方法を使用した。

【 0 0 3 8 】

1. ファージの単離および精製

大腸菌(E.coli)ファージであるT4、T7、Q β およびPhiX174の精製は、標準的な手法に基づいて、DSMによって提供されるデータに対応する宿主細菌上でのファージの培養により実施した。細菌および細菌残渣を完全に分離するために、ファージ懸濁液を低速のrpm(5000 x g, 30分)で遠心分離した。ファージを濃縮し、単離するために、標準的な分取用超遠心分離およびポリエチレングリコールによる沈殿を実施した。細菌分離の成功は培養実験によって管理し、その後ファージを冷却下(4 ~ 8)または冷凍下(-20 または-80)で保存した。

20

【 0 0 3 9 】

2. ファージ受容体構造物の単離および精製

ファージ受容体構造物は、標準的なタンパク質の化学的分離方法によって無傷のファージから分離するか、または組換えにより作製し、タンパク質の化学的標準的分離方法によって分離し、完全なファージ粒子として保存した。

【 0 0 4 0 】

3. 吸着によるファージの固定

$10^8 \sim 10^{12}$ ファージ/mlの緩衝水溶液(100mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.03%(w/v)ゼラチンまたは50 mMリン酸ナトリウム, pH 7.0)を37 °Cにおいて数時間または20 °Cにおいて終夜Nunc Maxisorbプレートに吸着により直接固定した。その後、結合しなかったファージを100mM Tris, pH 7.3または50 mMリン酸ナトリウム, pH7.5で4回洗浄することによって除去した。

30

【 0 0 4 1 】

その後、細菌の支持系の物質との非特異的な副反応を抑制するためにブロッキング段階を実施した。先に記載したように、ファージで処理した支持系をブロッキング溶液PBS(4 mM KH₂PO₄, 16mM Na₂PO₄, 115 mM NaCl)および0.05 ~ 1.00% Tween 20, 1%ウシ血清アルブミンの添加と共に4 °Cにおいて終夜または37 °Cにおいて2時間インキュベーションし、上清を除去し、その後支持系を乾燥した。

40

【 0 0 4 2 】

4. 共有結合的結合によるファージの固定

製造業者のプロトコールに従って、Nunc製(登録商標CovaKink)およびCostar(NH₂基を有する)製のポリスチレンプレートをシアヌル酸塩化物(48mgを3 mlのアセトン、45 mlの100 mMリン酸ナトリウム, pH 7.0に溶解したもの)で活性化した。100 ~ 200 μ lのシアヌル酸塩化物を2分間でプレートのウェルに分注し(ピペットで入れて)、室温において5分間インキュベーションした。その後、100 mMリン酸ナトリウム, pH 7.0で3回洗浄し、50 °Cにおいて30分以上乾燥した。カップリングするために、ファージを100 mM炭酸ナトリウム

50

中、pH 10.0で室温において終夜ウェル中でインキュベーションした。結合しなかったファージは50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0で3回洗浄して除去した。終了したプレートは乾燥するかまたは緩衝水溶液を入れ、使用時まで4 ~ 20 において保存した。

【 0 0 4 3 】

5 . β -ガラクトシダーゼ活性による結合した細菌の検出

細菌試料 (200 μ l 試料/ml) を37 において35分間インキュベーションした。その後、非特異的に結合した細菌を200 μ l の100 mM Tris, pH 7.0または200 μ l のリン酸緩衝液, pH 7.0を使用して3回洗浄することによって分離した。染色アッセイのために、 $MgCl_2$ およびメルカプトエタノール並びに66 μ l のONPG(o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、4mg/ml)を含有する200 μ l 洗浄緩衝液を添加した。アッセイ試料を37 においてインキュベーションし、反応経過を数 (2 ~ 5) 時間分光光度的に405 nmにおいて追跡した。

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 2

(74)代理人 100125380
 弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100125036
 弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996
 弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298
 弁理士 角田 恭子

(72)発明者 ミラー, シュテファン
 ドイツ連邦共和国、デー 9 3 0 5 9 レーゲンスブルク、ホルツガルテンシュトラッセ 5 1

合議体

審判長 田村 明照

審判官 齊藤 真由美

審判官 安藤 倫世

(56)参考文献 特表平 8 - 5 0 3 8 4 7 (J P , A)
 特表平 4 - 5 0 2 7 0 1 (J P , A)
 国際公開第 9 3 / 1 7 1 2 9 (W O , A 1)
 特表昭 6 1 - 5 0 1 4 8 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12Q 1/00-3/00

专利名称(译)	检测和鉴定细菌菌株		
公开(公告)号	JP5339658B2	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	JP2001513625	申请日	2000-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	普罗福斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	Purofosu股份公司		
[标]发明人	ミラーシュテファン		
发明人	ミラー,シュテファン		
IPC分类号	C12Q1/70 C12Q1/06 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/569 G01N37/00 C12Q1/04		
CPC分类号	C12Q1/04 C12Q2304/10 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N2333/924		
FI分类号	C12Q1/70 C12Q1/06 G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/569.B G01N37/00.102		
代理人(译)	河村 英文 吉田直美 中村绫子 角田恭子		
优先权	19936047 1999-07-30 DE		
其他公开文献	JP2003505105A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种检测细菌的方法，该方法包括以下步骤：将噬菌体和/或噬菌体蛋白质偶联到支持物上，将与噬菌体和/或噬菌体蛋白质偶联的支持物与样品一起孵育，任选地除去细菌噬菌体和/或噬菌体蛋白质。样品和样品中的细菌不与噬菌体和/或噬菌体蛋白结合，任选地添加透化或破坏细菌膜的物质，并检测与噬菌体和/或噬菌体蛋白结合的样品中的细菌，其中结合的细菌是没有经过培养步骤。