

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（１）～（３）を有することを特徴とする細菌同定方法。
- 。
- （１）同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAを調製するための逆転写用のプライマー、試料中の細菌から抽出されたRNA、及びRNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第一の反応系を用いて、逆転写反応を行い、合成されたcDNA及び前記逆転写用のプライマーを含む反応混合物を得る工程、
- （２）前記反応混合物、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア、及びDNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素を含む第二の反応系を用いて、PCRを行う工程、但し、第二の反応系において、前記反応混合物から供給される前記逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下である、及び
- （３）PCR後の前記第二の反応系から、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAの生成を検出する工程。
- [請求項2] 前記工程（１）及び（２）を、別の反応容器内で、あるいは、同一の反応容器内で、順に行なうことを特徴とする請求項１に記載の細菌同定方法。
- [請求項3] 前記同定対象細菌の同定用の塩基配列が、細菌の16S rDNAに含まれる塩基配列であり、前記RNAが前記試料中の細菌の16S rRNAを含むことを特徴とする請求項１または２に記載の細菌同定方法。
- [請求項4] 前記逆転写用のプライマーが配列番号１の塩基配列からなることを特徴とする請求項３に記載の細菌同定方法。
- [請求項5] 前記プライマーペアが、以下の（Ａ群）～（Ｃ群）からなる群から選択された少なくとも１つのプライマーペアであることを特徴とする請求項３または４に記載の細菌同定方法。
- （Ａ群）
- ・プライマーペア１a：配列番号２の塩基配列からなるフォワードプ

ライマーと配列番号 3 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 2 a : 配列番号 4 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 5 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 3 a : 配列番号 6 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 7 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 4 a : 配列番号 8 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 9 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 5 a : 配列番号 10 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 11 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 6 a : 配列番号 12 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 13 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア 7 a : 配列番号 14 の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号 15 の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ。

(B群) 前記 (A群) の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で 1 または 2 の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、及び (C群) 前記 (A群) 又は (B群) の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。

[請求項6]

前記工程 (3) において、生成された二本鎖DNAの T_m 値を測定し、得られた T_m 値と予め測定しておいた同定対象細菌の同定用の塩基配列

を含む二本鎖DNAの T_m 値またはそれらから二次的に得られるデータを比較して、前記試料中の細菌を同定することを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載の細菌同定方法。

[請求項7] 前記工程(1)の後、前記反応混合物を単独で直接又は希釈し、前記工程(2)に用いることを特徴とする請求項1乃至6のいずれか1項に記載の細菌同定方法。

[請求項8] 試料中の細菌から抽出されたRNAの逆転写反応による反応混合物に含まれるcDNAを鋳型とするPCRにより前記試料中の細菌を同定するためのキットであって、

下記(a)乃至(c)を有し、

(a) 前記逆転写反応のための第一の反応系の調製用としての、同定対象細菌の同定用の塩基配列を含むcDNAを調製するための逆転写用のプライマー、

(b) 前記PCRのための第二の反応系の調製用としての、前記同定対象細菌の同定用の塩基配列を含む二本鎖DNAを合成するためのプライマーペア、及び

(c) RNA依存型DNAポリメラーゼ活性を有する酵素、

前記第二の反応系が前記逆転写反応による反応混合物を含み、前記逆転写用のプライマーの量が、該反応混合物を介して前記第二の反応系に供給された際の逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下となるように調整されている、
ことを特徴とするキット。

[請求項9] 前記逆転写反応と前記PCRの手順が記載されている取扱説明書をさらに有することを特徴とする請求項8に記載のキット。

[請求項10] 前記取扱説明書には、前記第二の反応系に含まれる前記逆転写用のプライマーの濃度が0.08nM以上20nM以下となるように手順が記載されていることを特徴とする請求項9に記載のキット。

[請求項11] 前記同定対象細菌の同定用の塩基配列が、細菌の16S rDNAに含まれ

る塩基配列であり、前記RNAが前記試料中の細菌の16S rRNAを含むことを特徴とする請求項8乃至10のいずれか1に記載のキット。

[請求項12] 前記逆転写用のプライマーが配列番号1の塩基配列からなることを特徴とする請求項11に記載のキット。

[請求項13] 前記プライマーペアが、以下の(A群)～(C群)からなる群から選択された少なくとも1つのプライマーペアであることを特徴とする請求項11または12に記載のキット。

(A群)

・プライマーペア1a：配列番号2の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号3の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア2a：配列番号4の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号5の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア3a：配列番号6の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号7の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア4a：配列番号8の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号9の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア5a：配列番号10の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号11の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア6a：配列番号12の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号13の塩基配列からなるリバースプライマーと組合せ、

・プライマーペア7a：配列番号14の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号15の塩基配列からなるリバースプライマーと

組合せ。

（B群）前記（A群）の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列の一部をプライマーとしての機能を損なわない範囲で1または2の塩基が付加、欠失または置換したプライマーペア、及び

（C群）前記（A群）又は（B群）の各プライマーペアの一方又は両方のプライマーの塩基配列に対応する相補的配列からなるプライマーペア。