

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4839051号
(P4839051)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M

請求項の数 12 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2005-274912 (P2005-274912)	(73) 特許権者	390014960 シスメックス株式会社
(22) 出願日	平成17年9月22日 (2005. 9. 22)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(65) 公開番号	特開2006-129866 (P2006-129866A)	(74) 代理人	100109793 弁理士 神谷 恵理子
(43) 公開日	平成18年5月25日 (2006. 5. 25)		
審査請求日	平成20年9月4日 (2008. 9. 4)	(72) 発明者	蓮井 康嗣 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2004-296329 (P2004-296329)	(72) 発明者	阿部 滋樹 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(32) 優先日	平成16年10月8日 (2004. 10. 8)	(72) 発明者	大東 元就 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸プローブを用いる被検物質の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の被検物質を検出する方法であって、

第1固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第1核酸プローブと、該第1核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質と、該被検物質に結合可能な標識物質と、からなる第1複合体を形成させる工程；

第1複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した第2複合体を、鎖置換型DNAポリマーゼと、dATP、dGTP、dTTP及びdCTPからなる群より選択される少なくとも1種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第1核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び

解離された第2複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程を含む核酸プローブを用いる被検物質の検出方法。

【請求項2】

検出工程が、解離された第2複合体と、第2固相に固定され且つ前記核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な一本鎖を有する第2核酸プローブとからなる第3複合体を形成し、第3複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

前記第1複合体形成工程は、

10

20

第 1 核酸プローブと核酸リガンドを接触させ、第 1 核酸プローブ - 核酸リガンド複合体を形成させた後に、第 1 核酸プローブ - 核酸リガンド複合体に、被検物質及び標識物質を結合させることにより行なわれる請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

【請求項 4】

前記第 1 複合体形成工程は、

核酸リガンドと、被検物質と、標識物質を接触させ、第 2 複合体を形成させた後に、前記第 1 核酸プローブに、第 2 複合体を結合させることにより行なわれる請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

【請求項 5】

前記認識結合部は、被検物質と結合できるアプタマー、抗体、及び受容体からなる群より選ばれる 1 種である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の測定方法。

10

【請求項 6】

前記相補塩基配列部は DNA 又は RNA で構成され、

前記認識結合部は、前記相補塩基配列部の 3' 末端に結合している請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記標識物質は、

前記被検物質に結合可能な第 2 認識結合部と、

放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも 1 種とを有する請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の検出方法。

20

【請求項 8】

前記標識物質は、

前記被検物質に結合可能な第 1 物質と、

前記第 1 物質に結合可能であり、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも 1 種を有する第 2 物質とからなる請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 9】

試料から被検物質を採取する方法であって、

固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第 1 核酸プローブと、該第 1 核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質とを結合させて、被検物質 - 核酸リガンド - 第 1 核酸プローブ複合体を形成させる工程；

30

前記被検物質 - 核酸リガンド - 第 1 核酸プローブ複合体から、被検物質 - 核酸リガンド複合体を、鎖置換型 DNA ポリメラーゼと、dATP、dGTP、dTTP 及び dCTP からなる群より選択される少なくとも 1 種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第 1 核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び

解離された被検物質 - 核酸リガンド複合体を採取する工程；

を含む被検物質の採取方法。

【請求項 10】

試料中の被検物質を検出するために用いられる試薬キットであって、

40

一本鎖部分を有する第 1 核酸プローブを固定化した第 1 固相；

前記第 1 核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と、前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；

前記被検物質に結合可能な標識物質；

鎖置換型 DNA ポリメラーゼ；及び

dATP、dGTP、dTTP 及び dCTP からなる群より選択される少なくとも 1 種のデオキシヌクレオチド；

を含む被検物質検出用試薬キット。

【請求項 11】

さらに、前記第 1 固相を洗浄するための洗浄液を含む請求項 10 に記載の試薬キット。

50

【請求項 1 2】

前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第 2 核酸プローブを固定化した第 2 固相を、さらに含む請求項 1 0 又は 1 1 に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸プローブを用いて、特異性の高い塩基の相補反応を利用することにより、非特異吸着による誤差を低減させ、微量でも高精度で検出、定量することができる被検物質の検出方法、当該検出方法に用いられる被検物質検出用試薬キット、及び微量成分の高感度測定のための前処理等に利用できる被検物質の採取方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

微量の被検物質を高感度で検出、定量したいという要望は止まるところがない。また、近年の質量分析技術の発展から、微量タンパクの同定を質量分析を利用して行なわれることが多くなり、これに伴い、夾雑物から目的のタンパクを高精度に分離精製する必要が高まってきている。

このような事情から、高感度に標的物質を分離精製し、検出定量する方法が望まれている。

【0003】

特定の標的物質を検出定量する方法としては、特異性が高い免疫学的手法を利用した方法（イムノアッセイ）が一般に用いられている。

20

抗原 - 抗体反応を利用したイムノアッセイは、B / F 分離を行うヘテロジーニアスなアッセイと、B / F 分離を行わないホモジーニアスなアッセイに分類される。

【0004】

ヘテロジーニアスなイムノアッセイとしては、例えば図 9 に示すような E L I S A が一般に用いられている。これは、固相上に固定した第 1 抗体 1 により被検物質 2 を捕捉した（図 9（a））後、さらに被検物質 2 に特異的な第 2 抗体 3 を添加して、第 2 抗体 3 を被検物質 2 に結合させ（図 9（b））、被検物質 2 に結合しなかった第 2 抗体（F）と、被検物質 2 に結合して形成される第 1 抗体 - 被検物質 - 第 2 抗体の複合体 4（B）を分離した後、複合体 4 を検出又は定量する方法である。第 2 抗体に酵素等の標識を結合させることにより、複合体 4 の検出が容易かつ高感度で検出可能となる。

30

【0005】

しかしながら、固相上に第 2 抗体 3 が非特異吸着することがあり（図 9（c））、この固相に非特異吸着した第 2 抗体 3 は、洗浄による B / F 分離では除去されずに残存していることが多い。このため、非特異吸着した第 2 抗体 3 がノイズとなるため、バックグラウンドが高くなり、微量な被検物質の検出、定量についての感度アップの改良が求められている。

【0006】

非特異吸着によるノイズ低減、高感度なイムノアッセイとしては、特許文献 1（特開 2003 - 107089 号）で、被検物質と該被検物質と特異的に結合する物質との複合体を第 1 固相上に形成させた後、この複合体を溶出して第 2 の固相に移し替え、第 2 固相に結合した複合体を測定する方法を提案している。具体的には、図 10 に示すように、第 1 の固相にジニトロフェニル抗体 1 1 を固相化しておき、ジニトロフェニル基で標識した一次抗体 1 2 と該一次抗体 1 2 に結合する標的タンパク 1 3 と該標的タンパク 1 3 に結合する二次抗体（標識抗体）1 4 の複合体 1 5 を形成させて固相に添加すると（図 10（a））、ジニトロフェニル基（DN）がジニトロフェニル抗体 1 1 に結合するにしたがって、ジニトロフェニル基を介して、一次抗体 - 標的タンパク - 二次抗体複合体が第 1 の固相に結合固定化される。洗浄後、第 1 固相上に過剰の N - 2, 4 - ジニトロフェニル - L - リジン（NDL）を添加し（図 10（b））、これによりジニトロフェニル抗体に対して一次抗体と N - 2, 4 - ジニトロフェニル - L - リジンとの競合反応が起り、一次抗体 - 標

40

50

的タンパク - 二次抗体の複合体 15 が解離される (図 10 (c))。解離された複合体 15' を別の第 2 の固相上に移し替えて、第 2 の固相に結合固定化させた後、複合体を検出する。複合体を構成する抗体 (例えば一次抗体 12) を、例えば、予めビオチンなどで標識しておき、第 2 の固相にストレプトアビジンを使用することで、一次抗体 - 標的タンパク - 二次抗体複合体 15' を特異的に第 2 固相に結合固定化させることができる。このようにして、第 2 固相に結合した複合体を検出することで、二次抗体 14 が標的分子以外に吸着するような、第 1 固相で生じる非特異的吸着の影響を減らすことができる。また第 1 固相から特異的に解離した一次抗体が第 2 固相に結合することから、第 2 固相では複合体が精製されて結合することになる。よって、第 2 固相上では二次抗体 (標識抗体) 14 の非特異的吸着の影響が減少され、結果としてノイズが低減される。

10

【0007】

しかし、このような免疫学的手法による検出、定量方法では、第 1 の固相から複合体を解離させる際の競合反応は平衡反応であることから、第 1 の固相に結合固定化された複合体の全てが競合反応の相手物質 (上記例では N - 2, 4 - ジニトロフェニル - L - リジン) に置換されるということは少ないため、複合体の検出、分離される量は、第 2 固相に移し替える時点でのロスが少なくなく、試料中に含まれる標的物質の定量方法としては、精度的に満足できるものではなかった。従って、バックグラウンドが低く、精度の高い検出方法が望まれる。

【0008】

【特許文献 1】特開 2003 - 107089

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、バックグラウンドが低く、精度の高い被検物質の検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の核酸プローブを用いる被検物質の検出方法は、試料中の被検物質を検出する方法であって、第 1 固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第 1 核酸プローブと、該第 1 核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質と、該被検物質に結合可能な標識物質と、からなる第 1 複合体 (「核酸リガンド - 第 1 核酸プローブ複合体」を「第 1 ハイブリッド」と称し、第 1 複合体を「標識被検物質 - 第 1 ハイブリッド複合体」と称することがある) を形成させる工程；

30

第 1 複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した第 2 複合体 (「標識被検物質 - 核酸リガンド複合体」と称することがある) を、鎖置換型 DNA ポリメラーゼと、dATP、dGTP、dTTP 及び dCTP からなる群より選択される少なくとも 1 種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第 1 核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び

解離された第 2 複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程を含む。

40

【0011】

前記検出工程が、解離された第 2 複合体と、第 2 固相に固定され且つ前記核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な一本鎖を有する第 2 核酸プローブとからなる第 3 複合体 (「核酸リガンド - 第 2 核酸プローブ複合体」を「第 2 ハイブリッド」と称し、第 3 複合体を「標識被検物質 - 第 2 ハイブリッド」と称することがある) を形成し、第 3 複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出することが好ましい。

【0012】

前記第 1 複合体形成工程は、第 1 核酸プローブ - 核酸リガンド複合体を形成させた後に、第 1 核酸プローブ - 核酸リガンド複合体に、被検物質及び標識物質を結合させることにより行なってもよいし、核酸リガンドと、被検物質と、標識物質を接触させ、第 2 複合体

50

を形成させた後に、前記第1核酸プローブに第2複合体を結合させることにより行なってもよい。

【0013】

前記認識結合部は、被検物質と結合できるアプタマー、抗体、及び受容体からなる群より選ばれる1種であることが好ましい。

【0014】

また、前記相補塩基配列部はDNA又はRNAで構成され、前記認識結合部は、前記相補塩基配列部の3'末端に結合していることが好ましい。

【0016】

前記標識物質としては、前記被検物質に結合可能な第2認識結合部と、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも1種とを有するもの；あるいは、前記被検物質に結合可能な第1物質と、前記第1物質に結合可能であり、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも1種を有する第2物質とからなるものが好ましく用いられる。

10

【0017】

本発明の被検物質の採取方法は、試料から被検物質を採取する方法であって、固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第1核酸プローブと、該第1核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質とを結合させて、被検物質 - 核酸リガンド - 第1核酸プローブ複合体を形成させる工程；前記被検物質 - 核酸リガンド - 第1核酸プローブ複合体から、被検物質 - 核酸リガンド複合体を、鎖置換型DNAポリメラーゼと、dATP、dGTP、dTTP及びdCTPからなる群より選択される少なくとも1種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第1核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び解離された被検物質 - 核酸リガンド複合体を採取する工程を含む。

20

【0018】

本発明の被検物質検出用試薬キットは、試料中の被検物質を検出するために用いられる試薬キットであって、一本鎖部分を有する第1核酸プローブを固定化した第1固相；前記第1核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と、前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；前記被検物質に結合可能な標識物質；鎖置換型DNAポリメラーゼ；及びdATP、dGTP、dTTP及びdCTPからなる群より選択される少なくとも1種のデオキシヌクレオチドを含む。

30

【0019】

さらに、前記第1固相を洗浄するための洗浄液を含むことが好ましく、また前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第2核酸プローブを固定化した第2固相を含むことが好ましい。

【0020】

尚、本明細書における「核酸」とは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)の他に、PNA (Peptide Nucleic Acid)やBNA (Bridged Nucleic Acid)、及びこれらの類縁体などの人工的に合成された核酸(以下、「人工核酸」という)も含む。また、本明細書における「塩基配列」とは、DNAやRNAの塩基配列だけでなく、人工核酸の塩基配列をも含む。

40

【0021】

本明細書における「検出」とは、被検物質の有無だけでなく、被検物質の定量をも含む概念である。

【発明の効果】

【0022】

本発明の被検物質の検出方法は、被検物質を核酸リガンドに結合させ、この核酸リガンドを、核酸プローブを用いて捕捉し、さらに分離採取して第2の固相に移すことによって精製しているので、バックグラウンドノイズが少なく、高精度で微量の被検物質を検出することができる。

50

【0023】

また、本発明の被検物質の分離方法では、塩基の特異的反応を利用して、被検物質を核酸プローブに捕捉させ、洗浄後、解離させて採取しているため、高純度で微量の被検物質を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の被検物質の検出方法は、第1固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第1核酸プローブと、該第1核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドとがハイブリダイズした第1ハイブリッド；前記被検物質；及び該被検物質に結合可能な標識物質からなる標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を形成させる工程；

前記標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を解離させる工程；

解離された標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を分離採取する工程；並びに

前記標識被検物質 - 核酸リガンド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程を含む。

【0025】

本発明の方法が適用される被検物質としては、タンパク質、核酸、糖類、脂質、ホルモン、ハプテン、トキシソ、ウィルス、微生物などが挙げられる。前記微生物とは、バクテリア、プロチスタ、クロミスタなど、肉眼で観察できないような微小生物をいう。また、これらの被検物質を含む試料としては、例えば、血液、唾液、尿、鼻汁、涙液、糞便、組織抽出液、培養液、河川水、廃液などが挙げられ、これらの試料を精製したものも含まれる。

【0026】

本発明で用いられる第1固相としては、第1核酸プローブを安定に固定することができるものであればよく、プレート、チューブなどの容器、メンブレン、粒子などを用いることができる。具体的には、ポリプロピレン、ポリスチレン等の合成樹脂製又はガラス製のマイクロプレート、ニトロセルロースメンブレン、ラテックス粒子、磁性粒子などが挙げられる。

【0027】

本発明の方法で用いられる第1核酸プローブは、上記核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズ可能な塩基配列を有するものであればよい。第1核酸プローブは、1本鎖であってもよいし、長さの異なる2本の塩基配列がハイブリダイズして二本鎖部分と一本鎖部分とを有し、この一本鎖部分が核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズできる配列を有しているものであってもよい。また、一本鎖でステムループを形成し且つ核酸リガンドとハイブリダイズできる配列を有する一本鎖部分を有しているものであってもよい。これらのうち、ステムループ構造を有する第1核酸プローブが好ましい。プローブの二本鎖を形成しているステム部分は5～10merで、一本鎖部分が15～20merであることが好ましい。

【0028】

このような第1核酸プローブは、第1固相に固定されている。第1固相への固定は、第1核酸プローブが直接第1固相と結合を形成することにより固定されていてもよいし、間接的に固定されていてもよい。間接的固定方法としては、例えば、固相に特定の物質Aを固定し、さらにこの物質に結合できる物質Bを第1核酸プローブに結合させ、物質Aと物質Bとの結合を介して、第1核酸プローブを固相に固定化する方法；第1核酸プローブを構成する何れかの塩基にアミノ基を化合させ、このアミノ基を固相に固定化する方法；固相に特定の塩基配列Xを有する一本鎖の核酸を固定し、この一本鎖の核酸に、塩基配列Xに相補的な塩基配列Xcと、核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な塩基配列Yとを有する核酸プローブを結合させる方法などが挙げられる。上記物質Aと物質Bとの組み合わせとしては、ストレプトアビジンとビオチンとの組み合わせなどが挙げられ

体的には、被検物質に結合可能な第2認識結合部と標識との組み合わせ；又は被検物質に結合可能な第1物質と、該第1物質に結合可能な標識を有する第2物質との組み合わせなどが挙げられる。

【0037】

第2認識結合部としては、塩基配列、抗体、レセプター、アプタマーなどを用いることができる。第2認識結合部が認識する被検物質の領域は、核酸リガンドの認識結合部が認識する領域とは異なることが好ましい。

【0038】

標識としては、検出可能なシグナルを発する物質や、検出可能なシグナルを発する生成物を生じる反応を触媒する物質などを用いることができる。例えば、 ^{32}P 、 ^{125}I などの放射性同位元素、フルオレセインなどの蛍光色素、アルカリホスファターゼ（ALP）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）などの酵素、量子ドット、ナノ粒子などの蛍光・発光物質、フェロセンなどの電気化学活性をもつ物質、ルテニウム、ユーロピウム錯体などの電気化学発光物質などが挙げられる。

10

【0039】

標識物質が、被検物質に結合可能な第1物質と、該第1物質に結合可能な標識を有する第2物質との組み合わせで構成される場合、被検物質 - 第1ハイブリッド複合体に第1物質が結合し、さらにこの第1物質に第2物質が結合することにより、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を間接的に標識することができる。

【0040】

20

以下、本発明の検出方法の各工程について説明する。

まず、第一固相（反応容器など）において、被検物質と、第1核酸プローブと、核酸リガンドと、標識物質とを結合させ、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を形成させる（標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体形成工程）。

【0041】

被検物質、第1核酸プローブ、及び核酸リガンドの結合は、第一固相において第1核酸プローブと核酸リガンドとを先ず結合させて、第1ハイブリッドを形成し、次いで、被検物質を含む試料を添加して、第1ハイブリッド中の核酸リガンドに被検物質を結合させることによって行うことができる。また、予め核酸リガンドと被検物質とを結合させて形成された被検物質 - 核酸リガンド複合体を、第一固相に固定されている第1核酸プローブに結合させて、核酸リガンドと第1核酸プローブとがハイブリダイズした第1ハイブリッドを形成させることによって行うことができる。

30

標識物質と被検物質との結合は、被検物質と第1ハイブリッドとの複合体を形成させる前に行ってもよいし、後に行ってもよい。

【0042】

標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を第一固相上に形成した後、第一固相を洗浄することが好ましい。これにより、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を形成できなかった標識物質、核酸リガンド、被検物質などを第一固相上から除去することができる。洗浄には、洗浄液を用いることが好ましい。洗浄液としては、TBSやPBSなどの緩衝液を用いることができる。

40

【0043】

次に、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体から標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を解離させる（解離工程）。

解離方法としては、（1）温度上昇を利用する方法、（2）競合反応を利用する方法、（3）鎖置換反応を利用する方法などが挙げられ、使用した第1核酸プローブに応じて適宜選択される。

【0044】

（1）の方法は、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体が形成されている反応系（第1核酸プローブが固相に固定されている容器内）の温度を上昇させることにより、前記標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体中の第1核酸プローブと核酸リガンドの相補塩基配

50

列部とを解離させる方法である。

【0045】

室温で本発明を実施する場合、第1核酸プローブと相補塩基配列部とのハイブリッドの融解温度(T_m 値)が室温以上である必要がある。さらに、この T_m 値は、プローブや被検物質を変性させない程度の温度であることが好ましい。例えば、相補塩基配列部を構成する塩基がA又はTである場合には、鎖長12~16merであれば、 T_m 値は約24~33であるから、約40で解離させることができる。相補塩基配列部の塩基は、C及びGが含まれず、A及びTから構成されていることが好ましい。

【0046】

(2)の方法は、第1核酸プローブの一本鎖部分と相補的な配列を有し、且つ核酸リガンドの相補塩基配列部よりも長い鎖長を有する競合用の長鎖核酸を用いる。核酸リガンドと第1核酸プローブとのハイブリッド(第1ハイブリッド)が不安定な温度で、第1核酸プローブとより安定なハイブリッドを形成することができる競合用の長鎖核酸が共存する場合、核酸リガンドが解離して、競合用の長鎖核酸と第1核酸プローブとがハイブリッドを形成するようになる。

10

【0047】

従って、競合反応は、核酸リガンドと第1核酸プローブとがハイブリダイズしてなる第1ハイブリッドが不安定な温度で、競合用長鎖核酸と第1核酸プローブとのハイブリッドが安定に存在出来る温度で行なうことが好ましい。つまり、競合反応温度 T_c は、第1ハイブリッドの T_m 値(T_{m_1})よりも高く、第1核酸プローブと競合用の長鎖核酸とのハイブリッドの T_m 値(T_{m_2})よりも低い温度に設定することが好ましい($T_{m_1} < T_c < T_{m_2}$)。

20

【0048】

(3)の方法は、鎖置換用ポリメラーゼとデオキシヌクレオチド(dNTPs)との存在下で、第1核酸プローブを鋳型として、伸長反応をおこさせることにより、核酸リガンドを解離させる方法である。

【0049】

尚、用いられるデオキシヌクレオチド(dNTP)は、核酸プローブの一本鎖部分の配列によって選択される。核酸プローブがアデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの全てを有する場合にはdATP、dGTP、dTTP、及びdCTPの全てを用いる必要があるが、例えば、核酸プローブがアデニンを有するヌクレオチドのみからなる場合には、dATP、dGTP、dTTP、及びdCTPの全てを用いる必要はなく、dATPを用いるだけで足りる。

30

【0050】

また、第1核酸プローブとしては、DNAを用いることが好ましい。第1核酸プローブが一本鎖である場合は、ポリメラーゼの伸長反応の基点とするため、第1核酸プローブの、相補塩基配列部とハイブリダイズしない部分に結合することのできるプライマを用いることが好ましい。

また、第1核酸プローブがステムループ構造を有している場合は、第1核酸プローブの一本鎖部分が5'末端側であることが好ましい。この場合、第1核酸プローブの3'末端側は二本鎖となっており、これを伸長反応の基点とすることができるため、プライマを用いる必要がない。

40

【0051】

伸長反応に於いては、鎖置換型DNAポリメラーゼとdNTPの存在下で反応系を37~50にすることにより、鎖置換型DNAポリメラーゼは第1核酸プローブの3'末端を始点として、順次、ヌクレオチドを連結していく。つまり第1核酸プローブの一本鎖部分を鋳型として伸長反応が起るとともに、第1核酸プローブと核酸リガンドのハイブリダイゼーションが解かれて、核酸リガンドが解離する。

【0052】

この方法を用いる場合は、核酸リガンドの相補塩基配列部の5'末端の1~2塩基が第

50

1 核酸プローブと相補性を有しないことが好ましい。これにより、ポリメラーゼの伸長反応による鎖置換が起こりやすくなる。

【0053】

上記(1)～(3)のいずれかの方法により、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体から、標識被検物質 - 核酸リガンド複合体が解離したら、標識被検物質 - 核酸リガンド複合体が反応系で遊離状態となっている溶液を回収する(標識被検物質 - 核酸リガンド複合体の分離採取工程)。

【0054】

採取した標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を含む溶液を第1固相とは異なる容器に移し、この溶液に含まれる標識被検物質 - 核酸リガンド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する(検出工程)。

10

【0055】

採取した標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を含む溶液を、第2核酸プローブが固定されている第2固相に移し、標識被検物質 - 核酸リガンド複合体を第2核酸プローブとハイブリダイズさせて、標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体を形成させ(第2複合体形成工程)、標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体中の標識物質に基づいて、被検物質を検出してもよい。

【0056】

第2核酸プローブの構成は、第1核酸プローブの構成と同様のものを用いることができる。すなわち、上記核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズ可能な塩基配列を有するものであればよい。第2核酸プローブは、第1核酸プローブと同様に、1本鎖であってもよく、長さの異なる2本の塩基配列がハイブリダイズして二本鎖部分と一本鎖部分とを有し、この一本鎖部分が核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズできる配列を有しているものであってもよい。また、一本鎖でステムループを形成し且つ核酸リガンドとハイブリダイズできる配列を有する一本鎖部分を有しているものであってもよい。

20

【0057】

第2核酸プローブの塩基配列は、第1核酸プローブの塩基配列と同じであってもよいし、異なる配列であってもよい。

【0058】

本発明で用いられる第2固相は、第2核酸プローブを安定に固定することができるものであればよく、第1固相と同様に、プレート、チューブなどの容器、メンブレン、粒子などを用いることができる。

30

【0059】

標識被検物質 - 核酸リガンド複合体又は標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体中の被検物質の検出方法は、標識物質の標識の種類に応じて、公知の方法から適宜選択される。例えば、標識として蛍光色素を用いた場合には、反応系に紫外線等を照射し、蛍光強度を測定することができる。また、標識としてラジオアイソトープを用いた場合には、シンチレーションカウンタなどを用いて放射能を測定すればよい。標識として酵素を用いた場合には、当該酵素の基質となる物質を加え、酵素反応によって生成した物質を定量すればよい。

40

【0060】

第2核酸プローブがステムループ構造を有する場合、被検物質の検出の前に、ステム部分の末端と相補塩基配列部の末端とを連結してもよい。第2核酸プローブ及び相補塩基配列部がDNAの場合は、ライゲースを用いることにより、末端を連結することができる。また、第2核酸プローブ及び相補塩基配列部が人工核酸の場合は、光結合などによって連結させることができる。光結合による人工核酸の連結法としては、例えば米国特許US 6 5 9 3 0 8 8 B 1号公報記載の方法を用いることができる。

【0061】

本発明の被検物質検出用試薬キットは、第1固相から分離採取した標識被検物質 - 核酸リガンドを第2固相で標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体を形成し、かかる標識被検

50

物質 - 第 2 ハイブリッド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する検出方法に好適に用いられる試薬キットで、一本鎖部分を有する第 1 核酸プローブを固定化した第 1 固相；前記第 1 核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第 2 核酸プローブを固定化した第 2 固相；及び前記被検物質に結合可能な標識物質を含む。

【 0 0 6 2 】

さらに、第 1 固相を洗浄するための洗浄液を含むことが好ましい。また、解離工程として、伸長反応を利用するキットについては、鎖置換型 DNA ポリメラーゼ及び d N T P s を、更に含むことが好ましい。

10

【 0 0 6 3 】

次に、本発明の被検物質の測定方法の一実施態様を、図 1 及び図 2 に基づいて説明する。

図 1 の実施態様で使用されている第 1 核酸プローブ 2 1 は、1 本鎖ヌクレオチドで、ステムループを形成している。2 重らせんを形成していない第 1 核酸プローブの 1 本鎖部分 2 1 a は、ループの 3 ' 端から数塩基おいて、核酸リガンドの相補塩基配列部と相補的な配列を有している。ループを構成している塩基の一つは、ビオチンで修飾されている。このような第 1 核酸プローブとしては、例えば、「5 ' A G A A C A G C G T A T A A T C A T T A G C C C G C C C G G C C A A * A A A G G C C G G G C G G G C T A A 3 ' 」 (配列 I D No . 2) の配列を有するものが挙げられる。3 4 番目の「 A * 」はビオチン修飾アデニンを示している。このような配列のプローブは、例えば、タカラバイオ (株) に合成を依頼して得ることができる。

20

【 0 0 6 4 】

第 1 固相たるガラス容器の底面には、ストレプトアビジンが固定されている。このストレプトアビジンにビオチンが結合することにより、第 1 核酸プローブが第 1 固相に固定されている (図 1 (a)) 。

【 0 0 6 5 】

図 1 に示す実施態様では、被検物質 2 2 が蛋白質 (抗原) で、認識結合部 2 4 a として該抗原に特異的に結合できる抗体を使用した核酸リガンド 2 4 を用いている。核酸リガンド 2 4 は、第 1 核酸プローブ 2 1 の 1 本鎖部分 2 1 a と相補性ある相補塩基配列部 2 4 b (「 A T A C G C T G T T C T 」 など) の 3 ' 端にリンカーを介して認識結合部 2 4 a たる抗体が結合したものである。

30

【 0 0 6 6 】

被検物質 2 2 は、アルカリホスファターゼ (A L P) で標識した二次抗体 (第 2 認識結合物質) 2 3 によりラベル化されている。つまり、標識物質として、被検物質に結合可能な第 2 認識結合部として二次抗体と A L P との組み合わせを用いている。このような標識物質が結合した被検物質が認識結合部 2 4 a と結合してなる標識被検物質 - 核酸リガンド複合体 2 5 を、第 1 核酸プローブ 2 1 が固定化された容器に添加すると、核酸リガンド 2 4 の相補塩基配列部 2 4 b と第 1 核酸プローブ 2 1 の一本鎖部分 2 1 a とがハイブリダイズして、標識被検物質 - 第 1 ハイブリッド複合体が形成される (図 1 (b)) 。

40

【 0 0 6 7 】

鎖置換型ポリメラーゼ及び塩基を添加すると、鎖置換型ポリメラーゼ 2 6 が第 1 核酸プローブ 2 1 の 3 ' 端に結合し (図 1 (c)) 、第 1 核酸プローブ 2 1 の一本鎖部分 2 1 a であった配列を鋳型として、第 1 核酸プローブが 3 ' 端へ伸長していく (図 1 (d)) 。

伸長反応が進行するにつれ、核酸リガンド 2 4 の相補塩基配列部 2 4 b が剥がされ、鎖置換反応が生じる。第 1 核酸プローブ 2 1 の一本鎖だった部分 2 1 a が伸長反応により二本鎖となると、標識被検物質 - 核酸リガンド複合体 2 5 が完全に解離する (図 1 (e)) 。

【 0 0 6 8 】

解離により得られた標識被検物質 - 核酸リガンド複合体 2 5 を別の容器 (第 2 固相) に

50

移し替える。第2固相には、第2核酸プローブ31が固定されている(図2(a))。

【0069】

第2核酸プローブ31は、固相に結合した二本鎖DNAの片方のストランドが長く、一本鎖部分31aを有する(図2(a))。第2核酸プローブの一本鎖部分は5'末端側に位置している。

【0070】

第2核酸プローブ31が固定されている第二固相に、標識被検物質-核酸リガンド25を添加すると、第2核酸プローブの一本鎖部分31aと核酸リガンド24の相補塩基配列部24bとがハイブリダイズして、標識被検物質-第2ハイブリッド複合体を形成する(図2(b))。標識被検物質-第2ハイブリッド複合体を形成させた後、標識被検物質-第2ハイブリッド複合体の標識を測定することにより、被検物質22を検出することができる。

10

【0071】

本実施態様では、標識としてアルカリフォスファターゼ(ALP)を使用している。例えば、パラメトキシフェニルリン酸(pMPP)のようなALPの基質と、標識被検物質-第2ハイブリッド複合体のALPとを所定時間反応させると(図2(c))、pMPPがp-メトキシフェノール(pMP)に変化する。EDTAを添加することによりALPの反応を停止させた(図2(d))後、反応生成物であるpMPの発色を測定することにより、被検物質を検出できる。

【0072】

上述の方法を用いると、標識物質が被検物質と結合せずに固相に吸着することによって生じるバックグラウンドノイズを減らすことができ、正確に被検物質の検出を行うことができる。また、核酸リガンドを介して行なわれる核酸プローブとの解離、捕捉は、塩基の相補性に基づくもので、抗原-抗体反応よりも再現性、効率がよいので、高精度、高感度の検出、測定が可能となる。また、核酸反応を利用することは、塩基配列を随意に決定することにより核酸リガンドと核酸プローブとからなるハイブリッドのT_m値を設定することが可能となるので、検出方法での温度管理が簡便になる。

20

【0073】

尚、本発明の核酸リガンドは、上記本発明の検出方法の利用だけに限定されない。例えば、上記測定方法で被検物質-第1ハイブリッド複合体を形成させ、被検物質-第1ハイブリッド複合体から被検物質-核酸リガンド複合体を解離する工程、及び解離した被検物質-核酸リガンド複合体を採取する工程までを行うことで、混合物の測定試料から、目的の被検物質の分離採取することができる。すなわち高純度及び高濃度の測定試料を得ることが可能となる。従って、電気泳動や質量分析、LC、分子間相互作用測定装置(SPR-ROM)などに供する高純度の測定試料を得るための前処理として、被検物質-第1ハイブリッド複合体形成工程から分離採取工程までを利用することも可能である。

30

【実施例】

【0074】

〔実施例1〕

(1)第1核酸プローブの固相化

96穴プレートA(IWAKI製のELISAプレート)の各ウェルに、0.2 pmol/μlのストレプトアビジン(chemicon SA101 Lot, 21080929)を50 μl添加し、37℃で1.7時間保存して、ストレプトアビジンを結合させた(図3(a))。

40

【0075】

プレートAの各ウェルを、0.1%BSA(シグマ製)を含むTBS(TBS-T)で洗浄した後、各ウェルに、TBS-TでBSA3%Salmon-DNA(サケ精子DNA)を0.1 mg/mlの濃度に希釈した溶液300 μlを添加し、37℃で3時間静置して、非特異吸着をブロックした。

【0076】

50

第1核酸プローブとして、bio-Transfer用DNA(ステムループを形成したDNAでステム部分の1塩基にあたる34番目のAがビオチンで修飾されている:配列「5'AGAACAGCGTATAATCATTAGCCCCGCCCGGCCAA*AAAGGCCGGGCGGGCTAA 3'」(配列ID No.2))を用いた。このbio-Transfer用DNA1pmol/ μ lの50 μ lをストレプトアビジンが固定された各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで5時間静置した。第1核酸プローブ中のビオチンがストレプトアビジンと結合することにより、第1核酸プローブが各ウェルの固相に固定された(図3(b))。

【0077】

(2) 標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体の形成

核酸リガンドとして、第1核酸プローブの1本鎖にハイブリダイズ可能な配列を有し、3'端に認識結合部としてビオチンが結合したもの(「5'ATAGCGCGCTGTTCTTACTCAGGGCACTGCAATTGTGGTCCCAATGGGCTGAGTA-biotin 3'」(配列ID No.3))を用いた。第1核酸プローブ(配列ID No.2)の1~9番目までの塩基と、この核酸リガンド(配列ID No.3)の7~15番目の塩基が相補的關係にある。

【0078】

各ウェルに、上記核酸リガンドを添加し、室温で1.7時間静置することにより、核酸リガンドと第1核酸プローブとをハイブリダイズさせた(図3(c))。核酸リガンドの添加量は、ウェル50 μ lあたり、 0.1×10^{-14} mol、 1×10^{-13} mol、 1×10^{-12} mol、 1×10^{-11} mol、又は 3.3×10^{-10} molとした。

【0079】

(3) 被検物質の捕捉

次いで、被検物質(アルカリホスファターゼ(ALP)で標識したストレプトアビジン)を添加し、核酸リガンドのビオチンでこれらを捕捉した(図3(d))。尚、被検物質の捕捉は、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン(NORDIC社製、SAV-AP)の2000倍希釈液と核酸リガンドを、1時間反応させることにより行なった。これにより、核酸リガンドのビオチンと被検物質たるストレプトアビジンが結合し、その結果、標識被検物質-第1ハイブリッド複合体が形成された。

【0080】

尚、被検物質の添加量は、各ウェルにおける核酸リガンドの濃度にかかわらず、核酸リガンドのすべてに被検物質が結合する量とした。

【0081】

(4) 解離工程

鎖置換型DNAポリメラーゼとして、Takara製のReverse Transcriptionase XL(AMV)を用いた。

下記組成を含む反応液50 μ lを、各ウェルに1 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで15時間反応させた。

【0082】

Tris緩衝液(50mMのトリス塩酸、40mMのKCl、pH8.2)	40
塩化マグネシウム	6mM
dNTPs	250 μ l
DTT	2mM
AMV RTase XL(5U/ μ l)	

【0083】

鎖置換型DNAポリメラーゼAMVは、第1ハイブリッドの核酸プローブの3'端に結合し、第1核酸プローブを鋳型として伸長させた。このようにして鎖置換型反応が起り、標識被検物質-核酸リガンド複合体が解離した(図3(d))。

【0084】

(5) 第2核酸プローブの第2固相への固定

10

20

30

40

50

第2固相として、オリゴdT20が固定化されたプレートB（ベリタス製のGENE PLATE 21GP02-3RNA ture）を用いた（図3（g））。

【0085】

プレートBに、dA20を有し且つ核酸リガンドとハイブリダイズ可能な塩基配列とを有する1本鎖の核酸を、1時間、室温で静置することによりハイブリダイズさせ、第2核酸プローブを固定化した（図3（e））。

【0086】

プレートBを洗浄した後、BSAを3%含むSalmon Sperm DNA（サケ精子DNA）をTBS-Tで0.01%に希釈した溶液を添加し、室温で1.5時間以上静置し、ブロッキングを行った。

【0087】

（6）分離採取、移送工程

（4）で得られた標識被検物質-核酸リガンド複合体を含むプレートAの各ウェルに収容された溶液を、マイクロピペットを用いて採取し、第2核酸プローブを固定化したプレートBに移した（図3（e））。上澄み液中には、（4）の解離反応で得られた被検物質-核酸リガンド複合体が含有されている。室温で1時間静置することにより、第2核酸プローブの一本鎖と複合体中の相補塩基配列部をハイブリダイズさせて、被検物質-第2ハイブリッド複合体を形成させた（図3（f））。

【0088】

（7）検出測定工程

被検物質-第2ハイブリッド複合体が形成されている容器に、アルカリフォスファターゼ（ALP）の基質であるp-メトキシフェニルフォスフェイト（p-MPP）10mM（希釈液：0.5M、炭酸緩衝液）を10μlずつ添加して、ALP反応を37℃で30分間行った。ALP反応後、停止液（EDTA溶液：pH9）を10μlずつ添加した。

【0089】

ALP反応によりp-MPPがp-メトキシフェノール（p-MP）に分解される。

p-MP量はALPの分子数に応じて変化する。従って、p-MP量を測定することによって、核酸リガンド-ストレプトアビジン-ALP複合体の量を測定することができる。

【0090】

p-MP量は、図4に示すフロー式電気化学測定系を用いて測定した。結果を図5に示す。

【0091】

〔アルカリフォスファターゼ（ALP）標識の電気化学的手法での検出系〕

インジェクターに測定試料液（実施例1ではALP反応を終了させた溶液）を入れる。試料液は、インジェクトバルブ（Reodine製77251）を開いて、ODSカラム（YMC-Pack-ODS-AM、AM3C7AM12S05-L502WT No.0270458（W））、ショートカラム（YMCセミマイクロガードカートリッジカラム2×10、AM12S05-0102CC）を通して、電気化学検出部へ送液される。このときの溶出液としては、45v/v%又50v/v%メタノールを含む0.1Mのリン酸緩衝液を用いた。ショートカラムは、インジェクトバルブと電極検出部の間に配置されて、測定試料に混入するタンパク成分が電極検出部に到達することで電極表面の汚れを防止する。また、ショートカラムにより緩衝液由来のノイズ電流と検出成分の電流を検出器に到達する時間で分離する。

【0092】

溶出液を収納したデガッサ（Vacuum Degasser LC-27A）は溶出液の気泡を除去し、ポンプ（MICRO LCポンプLC-100）により、250μl/minで溶出液を電気化学検出部に送ることにより、インジェクターに収容した試料液が電気化学検出部に送られる。

【0093】

10

20

30

40

50

F I A - E C - D T (F l o w I n j e c t i o n A n a l y s y s - E l e c t r o c h e m i c a l - D e t e c t i o n) 流路への測定試料のサンプル量は $20 \mu\text{l}$ となるように設定した。

【0094】

F I A - E C - D T の電極検出部には3電極系を使用し、参照電極には Ag / AgCl (B A S R E 3 V)、カウンター電極には流路一体型電極、作用電極にはグラッシーカーボン電極 (B A S 0 0 3 4 5 6) を使用した。電気化学測定器には、B A S 社の A L S 8 3 2 a を使用した。

【0095】

各サンプルをフロー式電気化学測定系にインジェクトし、酸化電流値のピークを求めて、電気化学検出した。検出条件は、作用電極電位 (酸化電位) が $0.55 \text{ V vs Ag} / \text{AgCl}$ 、インジェクターから電極検出部までの出現時間は90秒である。

10

【0096】

〔比較例1〕

実施例1の操作(1)~(3)を同様に行ない、96穴プレートに標識被検物質-第1ハイブリッド複合体を形成させた。この状態で、ALP反応を利用して、標識被検物質-第1ハイブリッド複合体の量を測定した。

【0097】

アルカリフォスファターゼの測定は、図4に示すフロー式電気化学的検出系を用いて測定した。結果を図5に示す。

20

【0098】

図5の結果からバックグラウンドノイズを差し引いたシグナル値との関係を図6に示す。

【0099】

図5, 6中、「 \square 」は実施例、「 \triangle 」は比較例を示している。横軸は、使用した核酸リガンド(核酸リガンド-ストレプトアビジン複合体)量(mol)を示し、縦軸は、検出系で測定された電流値(A)を示している。

【0100】

〔評価結果〕

図5からわかるように、解離反応を行わなかったアッセイ系(比較例1)では、試料濃度が 10^{-12} mol までは、試料濃度と測定値がほぼ相関関係を有するが、それ未満では、ほぼ測定値は変化しなかった。このことは、バックグラウンドノイズが大きいため、 10^{-12} mol 未満の微量試料を区別して測定できないことを意味する。

30

【0101】

一方、解離反応を行ったアッセイ系(実施例1)では、試料濃度と測定値がほぼ相関関係にあった。従って、解離反応を行なうアッセイ系では、 10^{-14} mol 、少なくとも 10^{-13} mol まで測定することはできる。このことは、従来のアッセイ系より検出レベルが1桁以上向上したことを意味する。

【0102】

〔実施例2〕

(1) 第1核酸プローブの固相化

第1固相となる96穴プレートC(CORNING社、DNA-BIND plate)の各ウェルに、 $50 \text{ mM Na}_2\text{PO}_4$ 、 1 mM EDTA 、 100 pmol アミノ化オリゴDNA(第1核酸プローブ: $5' \text{ AGAACAGCGTATAATCATTAGCCCGCCCGGC CAA}(\text{NH}_2\text{-A})\text{AAGGCCGGCGGGCTAA} \text{ 3}'$ (配列ID No. 4、株式会社ベックス)を含む溶液($\text{pH} 8.5$)を $100 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C で1時間静置して、第1核酸プローブ41の35番目のアデニンに付加したアミノ基がプレートCに結合し、第1核酸プローブ41が固定された(図7(a))。

40

【0103】

プレートCの各ウェルを、 $200 \mu\text{l}$ のPBSで三回洗浄した後、各ウェルに 50 mM

50

Na_2PO_4 、1 mM EDTA、3% BSAを含むブロッキング用溶液を200 μl 添加し、37 で30分間静置して、非特異吸着をブロックした。

【0104】

(2) 標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体の形成

標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体を形成する際のハイブリダイゼーション用バッファとして、5 \times SSC (20 \times SSC (ニッポンジーン社)を希釈して調製)、0.05% SDS (10% SDS (ニッポンジーン社)を希釈して調製)及び0.005% BSAを超純水に溶解した溶液を用いた。

【0105】

被検物質として、M13mp18一本鎖DNA (タカラバイオ社:以下、「M13DNA A」という)を用いた。これを、サケ精子DNA (ナカライテクス社)を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含むTEバッファ (ニッポンジーン社)に添加し、調製した溶液を測定用試料とした。

10

【0106】

核酸リガンド44として、第1核酸プローブ41及びM13DNAの両者にハイブリダイズ可能な配列を持ち、3'末端をリン酸化したDNA (5' TGACCATACGCTGCTCTTTTTGTAAACGACGGCCAGT3':配列ID No.5、シグマジェノシス社)を用いた。

【0107】

標識物質としては、ビオチン化DNA (第1物質43a)とHRP標識ストレプトアビジン (第2物質43b)との組み合わせを用いた。第1物質43aであるビオチン化DNAは、核酸リガンド44とハイブリダイズ可能で且つ被検物質であるM13DNAともハイブリダイズ可能で、5'末端をビオチン化し、3'末端をリン酸化したDNA (5' TTTTTGTCGACTCTAGAGGATC3':配列ID No.6、シグマジェノシス社)である。

20

【0108】

第1核酸プローブ41を固定化したプレートCの各ウェルに、先ず上述のハイブリダイゼーション用バッファを100 μl ずつ添加した。次にプレートCの各ウェルに、測定用試料、核酸リガンド10 pmol 及び第1物質10 pmol を添加し、37 で1時間静置して、第1核酸プローブ41と、核酸リガンド44と、M13DNAと、第1物質43aとを結合させた (図7(b))。次に、プレートCの各ウェルを洗浄バッファ (2 \times SSC、0.1% SDSを含む)200 μl を用いて3回洗浄した。

30

【0109】

プレートCの各ウェルにブロッキング溶液 (3% BSAを含むPBS (ニッポンジーン社))を200 μl 添加して、37 30分間静置してプレートのブロッキングを行った。ブロッキング溶液をウェルから除去した後、このブロッキング溶液で1000倍希釈した標識用第2物質としてのHRP標識ストレプトアビジン (1000 U/ml、ロシュ社)溶液を各ウェルに100 μl ずつ添加し、37 で1時間静置し、第1物質43aと第2物質43bとの間で、ビオチンとストレプトアビジンを結合させた。これにより、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体が形成された (図7(c))。

40

【0110】

(3) 解離工程

以下の組成を含む反応液100 μl を各ウェルに添加し、37 1時間反応させた。

1 \times Thermopol バッファ (New England Labs社)

1 mM dATPs (インビトロジェン社)

1 mM dGTPs (インビトロジェン社)

1 mM dTTPs (インビトロジェン社)

1 mM dCTPs (インビトロジェン社)

2.4 U/ml Bst DNAポリメラーゼ (New England Labs社)

なお、Bst DNAポリメラーゼは、鎖置換型DNAポリメラーゼである。

50

この反応によって、標識被検物質 - 第1ハイブリッド複合体からHRPで標識された被検物質 - 核酸リガンド複合体を解離させ、反応液中に遊離させた。

【0111】

(4) 第2核酸プローブの固定化

第2固相となる96穴プレートD (CORNING社、DNA-BIND plate)の各ウェルに50 mM Na_2PO_4 、1 mM EDTA、100 pmol 3'末端アミノ化オリゴDNA (第2核酸プローブ: 5' AGAGCAGCGTATGGTCATTTT3' : 配列ID No. 7、シグマジエノシス社)を含む溶液 (pH 8.5)を100 μl 添加し、37 で1時間静置して、第2核酸プローブ51を結合させた。その後、プレートDに固定化されなかった第2核酸プローブを200 μl のPBSで3回洗浄することにより除去した。

10

【0112】

(5) 移送工程

(3)で得られたプレートCの反応液の全量をプレートDの各ウェルに移動した。移動後、37 で1時間静置することにより、反応液中のHRPで標識した被検物質 - 核酸リガンド複合体を第2核酸プローブ51とハイブリダイズさせ、標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体を形成させた (図10)。標識被検物質 - 第2ハイブリッド複合体の形成後、各ウェルを200 μl のPBSで3回洗浄した。

【0113】

(6) 検出工程

(5)の工程を終了した後、各ウェルの洗浄用のPBSを除去した。次に、各ウェルにHRPの基質であるTMB (3,3',5,5'-Tetramethylbensidine)を含む基質溶液100 μl を添加し、37 で反応させ、HRPの作用で基質であるTMBを分解し、発色させた。1時間後、各ウェルに100 μl の1N HCl (和光純薬社)を加えて反応を停止させた。各ウェルの450 nmにおける吸光度を、プレートリーダー (TECAN社、Safire2)を用いて測定した。

20

【0114】

また、測定の際のバックグラウンド値を測定するため、被検物質を含まない試料 (0 fmol)を用いて実施例2の(1)~(6)を実施し、吸光度測定を行った。測定結果を表1に示す。

30

【0115】

〔比較例2〕

実施例2と同様にして(1)~(2)の工程を実施した。その後、(3)~(5)の工程を行わず、(6)と同様にしてHRPによる発色反応を行い、吸光度を測定した。また、測定の際のバックグラウンド値を測定するため、被検物質を含まない試料 (0 fmol)を用いて実施例2の(1)~(2)を実施し、さらに(6)と同様にしてHRPによる発色反応を行い、吸光度測定を行った。測定結果を表1に示す。

【0116】

【表1】

	0 fmol	10 fmol	S/N比
実施例2	0.013	0.1674	12.4
比較例2	0.1405	0.347	2.47

40

【0117】

実施例2のバックグラウンド値 (被検物質量が0 fmolの場合の吸光度)は、比較例2のバックグラウンド値に比べ、約10分の1の値を示した。また、実施例2のシグナル値 (被検物質量が10 fmolの場合の吸光度)は、比較例2のシグナル値に比べ、約2

50

分の1の値を示した。シグナル値とバックグラウンド値（ノイズ）の比（S/N比）は、比較例2の2.47に比べて実施例2は12.4となり、約5倍の値を示した。

【0118】

実施例2及び比較例2より、第一固相から標識被検物質-核酸リガンド複合体を分離採取し、これを第二固相へ移送することによって被検物質の検出の際のバックグラウンド値が大幅に低下することが確認された。また、S/N比も大きく向上し、高精度で被検物質を検出することができた。従って、本発明の検出方法によると、バックグラウンドが少なく、試料に含まれる微量の被検物質を高精度で検出することができることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0119】

本発明の測定方法は、微量の被検物質、特に試料中に目的物質が微量に含まれている場合の、目的物質の検出、定量に利用できる。

また、試料に含まれる特定物質について、質量分析、電気泳動、分子間相補作用測定を行なうに際して、高純度の測定試料を得るための前処理として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】本発明の測定方法の一実施態様を説明するための図である。

【図2】本発明の測定方法の一実施態様を説明するための図である。

【図3】実施例1の操作を説明するための図である。

【図4】アルカリホスファターゼの反応の測定に用いたシステムの構成を示すブロック図である。

【図5】供した試料濃度と測定電流値との関係の測定結果を示すグラフである。

【図6】図5の結果からバックグラウンドノイズを差し引いたグラフである。

【図7】実施例2の操作を説明するための図である。

【図8】実施例2の操作を説明するための図である。

【図9】従来測定方法を説明するための図である。

【図10】従来測定方法を説明するための図である。

【符号の説明】

【0121】

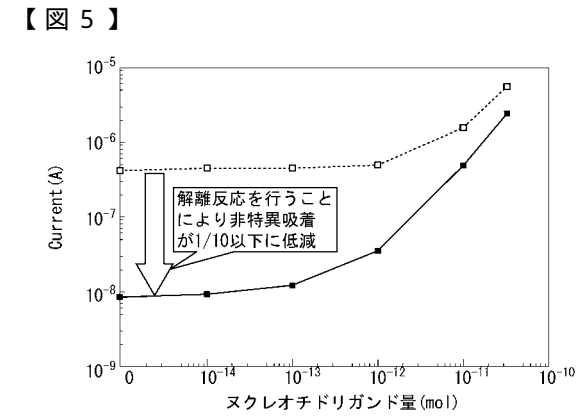
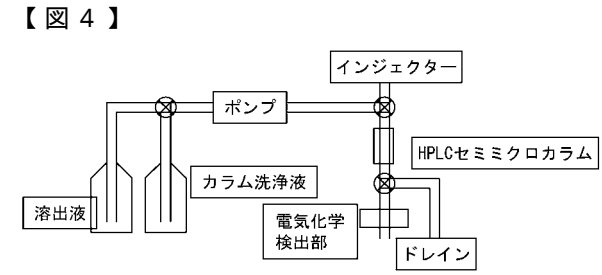
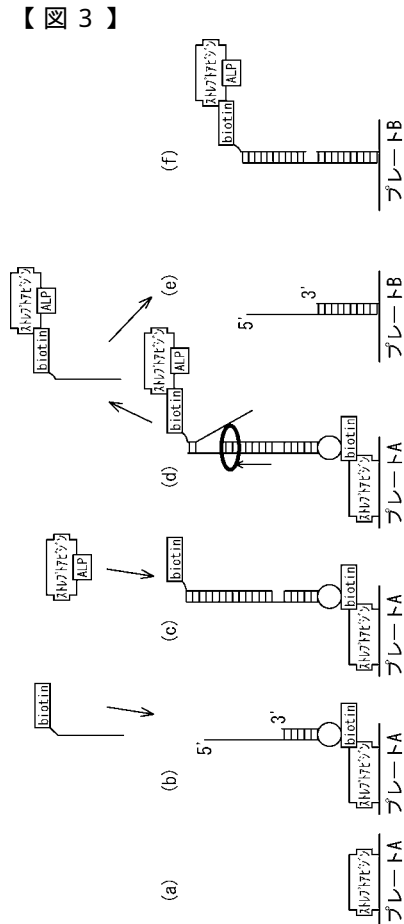
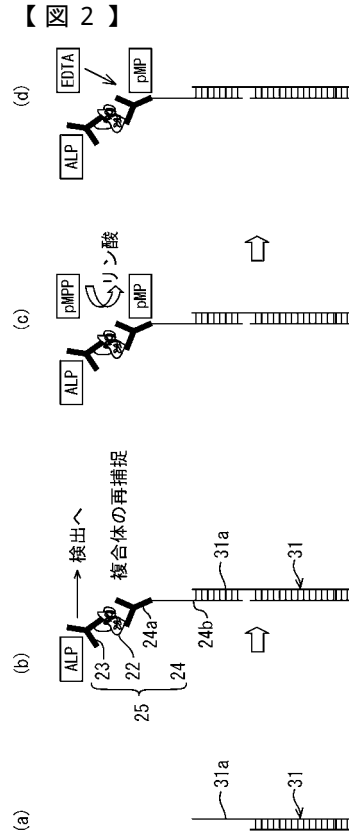
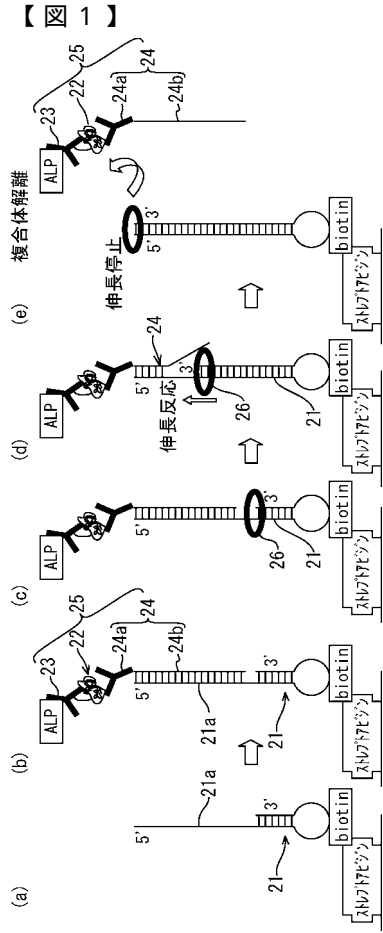
- 21 第1核酸プローブ
- 22 被検物質
- 23 二次抗体（第2認識結合物質）
- 24 核酸リガンド
 - 24a 認識結合部
 - 24b 相補塩基配列部
- 25 標識被検物質-核酸リガンド複合体
- 26 鎖置換型ポリメラーゼ
- 31 第2核酸プローブ
- 41 第1核酸プローブ
 - 43a 第1物質
 - 43b 第2物質
- 44 核酸リガンド
- 51 第2核酸プローブ

10

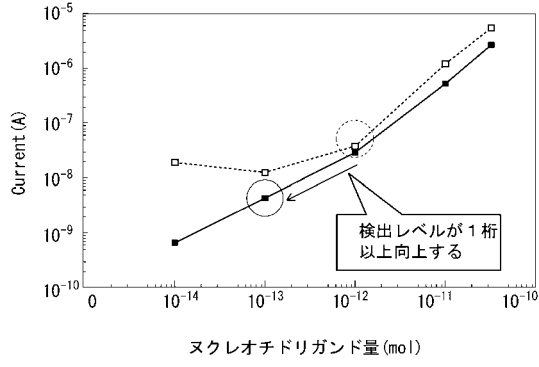
20

30

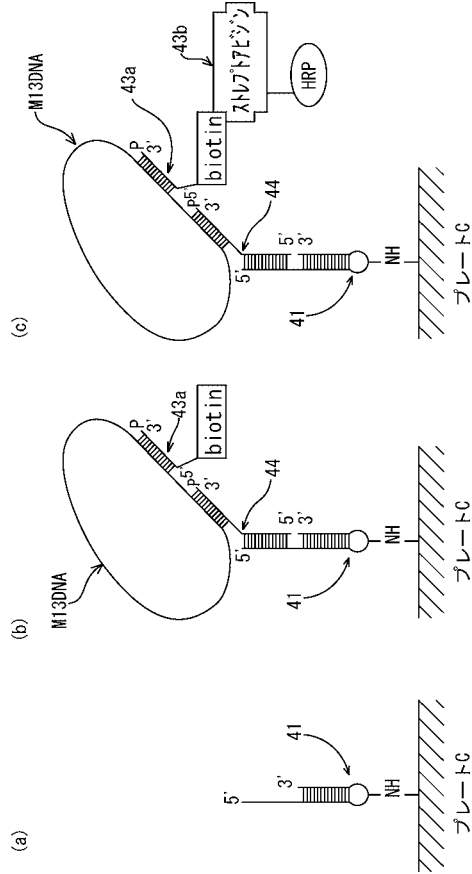
40



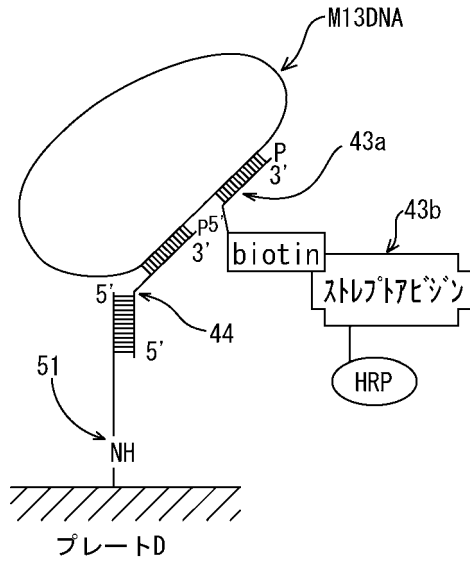
【図6】



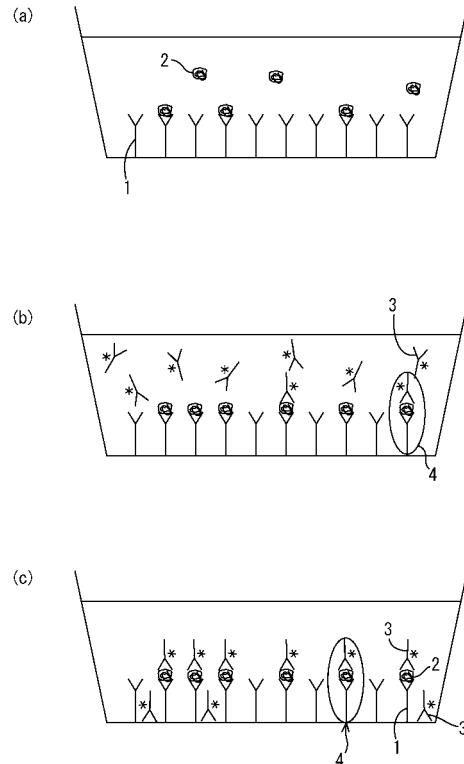
【図7】



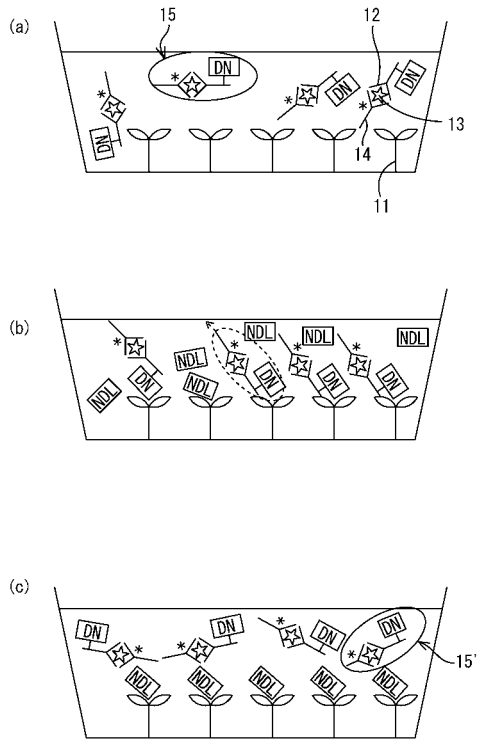
【図8】



【図9】



【 図 10 】



【 配列表 】

0004839051000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 山形 浩一
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2002/0146745(US,A1)
特開平10-185922(JP,A)
特表2003-505036(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
WPI
REGISTRY(STN)
MEDLINE(STN)
CAplus(STN)

专利名称(译)	使用核酸探针检测测试物质的方法		
公开(公告)号	JP4839051B2	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2005274912	申请日	2005-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	蓮井康嗣 阿部滋樹 大東元就 山形浩一		
发明人	蓮井 康嗣 阿部 滋樹 大東 元就 山形 浩一		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/00.A C12N15/00.H C12N15/00.AZN.A C12N15/115.Z C12Q1/24 C12Q1/48.Z G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR13 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR84 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX04		
审查员(译)	伊藤 佑一		
优先权	2004296329 2004-10-08 JP		
其他公开文献	JP2006129866A5 JP2006129866A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过使用碱的互补性，提供一种与免疫学技术相比高灵敏度测定痕量物质的方法。ZSOLUTION：用于检测测试物质的方法包括形成标记的测试物质的复合物（第一复合物）和由与核酸配体杂交的第一核酸探针组成的第一杂交体，标记的测试物质的解离 - 来自第1复合物的核酸配体复合物，分离和收集解离的标记的测试样品 - 核酸配体复合物并基于标记检测测试物质。作为替代方案，通过将收集的标记的测试物质 - 核酸配体的复合物（第二复合物）与固定于固相的第二探针形成复合物（第二复合物）并基于第二复合物中的标记检测测试物质来检测测试物质。Z

	0 fmol	10 fmol	S/N比
实施例2	0.013	0.1674	12.4
比较例2	0.1405	0.347	2.47