

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4417045号
(P4417045)

(45) 発行日 平成22年2月17日(2010.2.17)

(24) 登録日 平成21年12月4日(2009.12.4)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M
G O 1 N	33/566	(2006.01)	G O 1 N	33/53	U
G O 1 N	33/58	(2006.01)	G O 1 N	33/566	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G O 1 N	33/58	A

請求項の数 8 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-199250 (P2003-199250)
 (22) 出願日 平成15年7月18日(2003.7.18)
 (65) 公開番号 特開2005-34031 (P2005-34031A)
 (43) 公開日 平成17年2月10日(2005.2.10)
 審査請求日 平成18年5月15日(2006.5.15)

(73) 特許権者 503259598
 株式会社テクノメディカ
 神奈川県横浜市都筑区仲町台5-5-1
 (74) 代理人 100088546
 弁理士 谷川 英次郎
 (72) 発明者 中川 一人
 神奈川県横浜市都筑区仲町台5-5-1
 株式会社テクノメディカ内
 (72) 発明者 石河 美由樹
 神奈川県横浜市都筑区仲町台5-5-1
 株式会社テクノメディカ内
 (72) 発明者 山崎 浩樹
 神奈川県横浜市都筑区仲町台5-5-1
 株式会社テクノメディカ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的核酸の測定方法及びそのためのセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の標的核酸を同時に測定する方法であって、各標的核酸について、光学的なシグナルを発する標識と、ある物質に特異的に結合し得る特異結合性物質とが核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅する第1工程と、前記特異結合性物質と特異的に結合する対応特異結合性物質が不動化された、液体搬送能を有するマトリックスに、前記工程で得られた核酸増幅物を含む溶液を施し、該溶液を前記マトリックス内で移動させながら前記特異結合性物質と対応特異結合性物質とを結合させ、それによって前記マトリックスの前記対応特異結合性物質が不動化された部位である検出領域に前記核酸増幅産物を不動化する第2工程と、不動化された核酸増幅産物中の前記標識を測定する第3工程とを含み、各標的核酸の増幅産物中に含まれる特異結合性物質が、標的核酸の種類ごとに異なっており、前記マトリックスには、各特異結合性物質に対する対応特異結合性物質がマトリックス上の異なる部位に不動化されており、各部位に不動化された前記標識を測定することにより、複数種類の標的核酸を同時に測定し、かつ、前記マトリックスには、核酸増幅物を含む前記溶液を施す試料導入部位及び前記検出領域よりも下流の部位に、それぞれ水を吸収するパッドが設けられており、核酸増幅物を含む前記溶液は、前記試料導入部位に設けられた前記パッドに施され、前記検出領域よりも下流の部位に設けられた前記パッドに、前記検出領域を通過した後の前記溶液が吸収される、標的核酸の測定方法。

【請求項2】

前記第 1 工程は、前記標識が結合されたオリゴヌクレオチドを一方のプライマーとして用い、前記特異結合性物質が結合されたオリゴヌクレオチドを他方のプライマーとして用いて核酸増幅法を行うことにより行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記特異結合性物質が、ピオチン、抗原若しくはハプテン、 α -D-グルコース残基若しくは α -D-マンノース残基を含む糖、免疫グロブリン G 若しくはその定常領域、レセプターと結合可能なホルモン若しくは薬剤であり、前記対応特異結合性物質が、これらの特異結合性物質とそれぞれ特異的に結合する、アビジン若しくはその誘導体、抗体若しくはその抗原結合性断片、コンカナバリン A、プロテイン A、又は前記ホルモン若しくは薬剤と結合するレセプターである請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記特異結合性物質がピオチンであり、前記対応特異結合性物質がストレプトアビジンである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記標識は、蛍光物質又は色素物質である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記蛍光物質は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ルミノール又はアクリジウムエステルであり、前記色素物質は、メチレンブルー、メルドラブルー又はメチルオレンジである請求項 5 記載の方法。

20

【請求項 7】

前記マトリックスは、セルロース、ポリエーテルスルホン、ニトロセルロースの濾紙、ポリスチレン、ポリビニール、活性化されたナイロン膜のうちいずれか一つを材質として構成されたものである請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記マトリックスと、該マトリックス内の一領域であって、前記複数種類の対応特異結合性物質が互いに異なる部位に不動化された検出領域と、該検出領域よりも上流に位置し、前記核酸増幅物の溶液を施す試料導入部位と、前記検出領域よりも下流に位置し、前記検出領域を通過した後の溶液を吸収する溶液吸収部位とを含み、前記試料導入部位及び前記溶液吸収部位には、水を吸収するパッドが設けられている、請求項 1 記載の測定方法を行うためのセンサー。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標的核酸の測定方法及びそのためのセンサーに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来より、病原性の微生物やウイルス等の遺伝子の存在を調べたり、型判別を行ったりするため、さらに、各種疾病の遺伝子検査のために、PCR 等の核酸増幅法が広く行われている。従来の核酸増幅法では、増幅産物を電気泳動にかけ、そのバンドを検出したり、増幅産物と特異的にハイブリダイズするプローブを用いて増幅産物の検出を行ったりしている。

40

【0003】

しかしながら、電気泳動や、プローブとのハイブリダイゼーションは、操作が煩雑で時間もかかるという欠点を有する。

【0004】

【特許文献 1】

特開 2000-60570 号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

50

本発明の目的は、簡便な操作で短時間に核酸増幅物を測定できる手段を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、光学的なシグナルを発する標識と、ある物質に特異的に結合し得る特異結合性物質とが核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅し、液体搬送能を有するマトリックスに、前記工程で得られた核酸増幅物を含む溶液を施し、該溶液を前記マトリックス内で移動させながら前記特異結合性物質と対応特異結合性物質とを結合させ、それによって前記マトリックスの前記対応特異結合性が不動化された部位に前記核酸増幅産物を不動化し、次いで不動化された核酸増幅産物中の前記標識を測定することにより、簡便な操作で短時間に標的核酸の測定が可能であることを見出した。さらに、各標的核酸の増幅産物中に含まれる特異結合性物質を、標的核酸の種類ごとに異なったものとし、マトリックスには、各特異結合性物質に対する対応特異結合性物質をマトリックス上の異なる部位に不動化し、各部位に不動化された標識を測定することにより、複数種類の標的核酸を同時に測定できることに想到し、本発明を完成した。

10

【0007】

すなわち、本発明は、複数の標的核酸を同時に測定する方法であって、各標的核酸について、光学的なシグナルを発する標識と、ある物質に特異的に結合し得る特異結合性物質とが核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅する第1工程と、前記特異結合性物質と特異的に結合する対応特異結合性物質が不動化された、液体搬送能を有するマトリックスに、前記工程で得られた核酸増幅物を含む溶液を施し、該溶液を前記マトリックス内で移動させながら前記特異結合性物質と対応特異結合性物質とを結合させ、それによって前記マトリックスの前記対応特異結合性物質が不動化された部位である検出領域に前記核酸増幅産物を不動化する第2工程と、不動化された核酸増幅産物中の前記標識を測定する第3工程とを含み、各標的核酸の増幅産物中に含まれる特異結合性物質が、標的核酸の種類ごとに異なっており、前記マトリックスには、各特異結合性物質に対する対応特異結合性物質がマトリックス上の異なる部位に不動化されており、各部位に不動化された前記標識を測定することにより、複数種類の標的核酸を同時に測定し、かつ、前記マトリックスには、核酸増幅物を含む前記溶液を施す試料導入部位及び前記検出領域よりも下流の部位に、それぞれ水を吸収するパッドが設けられており、核酸増幅物を含む前記溶液は、前記試料導入部位に設けられた前記パッドに施され、前記検出領域よりも下流の部位に設けられた前記パッドに、前記検出領域を通過した後の前記溶液が吸収される、標的核酸の測定方法を提供する。さらに、本発明は、前記マトリックスと、該マトリックス内の一領域であって、前記複数種類の対応特異結合性物質が互いに異なる部位に不動化された検出領域と、該検出領域よりも上流に位置し、前記核酸増幅物の溶液を施す試料導入部位と、前記検出領域よりも下流に位置し、前記検出領域を通過した後の溶液を吸収する溶液吸収部位とを含み、前記試料導入部位及び前記溶液吸収部位には、水を吸収するパッドが設けられている、前記本発明の測定方法を行うためのセンサーを提供する。

20

30

【0008】

【発明の実施の形態】

上記の通り、本発明の方法の第1工程では、光学的なシグナルを発する標識と、ある物質に特異的に結合し得る特異結合性物質とが核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅する。

【0009】

ここで、標的核酸としては、何ら限定されるものではなく、その存在を検出し、又は定量しようとするいずれの核酸であってもよく、また、遺伝子の型判別やSNPsの検出等を行おうとするいずれの核酸であってもよい。典型的な例として、病原性の微生物やウイルス等の遺伝子やヒトや他の動物、植物の各種遺伝子を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

40

50

【0010】

光学的なシグナルを発する標識としては、蛍光物質や色素物質が好ましく、蛍光物質の例として、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ルミノール及びアクリジウムエステル等を挙げることができ、色素物質の例としてメチレンブルー、メルドラブルー及びメチルオレンジ等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0011】

また、本発明の方法に用いられる「特異結合性物質」は、ある物質に特異的に結合し得る物質を意味し、好ましい例として、ビオチン、抗原（ジゴキシゲニン等）及びハプテン、
- D - グルコース残基若しくは - D - マンノース残基を含む糖、免疫グロブリンG及びその定常領域、並びにレセプターと結合可能なホルモン（例えばエストロゲンとそのレセプター、アンドロゲンとそのレセプター）及び薬剤（例えばセロトニンやヒスタミンとそのレセプター）を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。これらのうち、ビオチンは分子量が小さくて核酸の増幅を妨害しないので、特に好ましい。

10

【0012】

第1工程では、上記した標識及び特異結合性物質が核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅する。PCRのような核酸増幅法は、この分野において周知であり、そのためのキットも市販されているので、核酸増幅法自体は市販のキットを用いて容易に行うことができる。上記標識及び特異結合性物質が核酸増幅産物中に含まれるように、核酸増幅法により標的核酸を増幅する方法としては、例えば、上記標識が結合されたプライマーと、上記特異結合性物質が結合されたプライマーを用いて核酸増幅法を行う方法を例示することができる。この場合、1つのプライマーに標識と特異結合性物質とを結合することも可能な場合があるが、増幅の妨げにならないように、1つのプライマーには標識か特異結合性物質かのいずれか一方を結合することが好ましい。また、プライマー中の結合部位は、特に限定されないが、増幅を妨害しないように、プライマーの5'末端に結合することが好ましい。プライマーに標識又は特異結合性物質を結合する方法自体は周知であり、また、ビオチン結合プライマーや、蛍光標識プライマーは市販されているので、市販品を用いることも可能である。あるいは、一方のプライマーとして特異結合性物質が結合されたプライマーを用い、他方のプライマーとしては通常のオリゴヌクレオチドプライマーを用い、増幅反応を蛍光標識ヌクレオシドトリフォスフェートの存在下で行うことによって、蛍光標識され、かつ、特異結合性物質が結合された核酸増幅産物を得ることが可能である。このような、蛍光標識ヌクレオシドトリフォスフェートも市販されているので、市販品を用いることができる。なお、感度を上げるために、異なるプライマー対を用いて2回増幅を行ってもよい（いわゆるnested PCR等）。すなわち、1回目の増幅で得られた増幅産物の中に2回目の増幅のためのプライマーを設定し、2回目の増幅を行ってもよい。この場合、前記標識又は特異結合性物質が結合されたプライマー対は、2回目の増幅のみに用いればよい。

20

30

【0013】

続く第2工程では、前記特異結合性物質と特異的に結合する対応特異結合性物質が不働化された、液体搬送能を有するマトリックスに、前記工程で得られた核酸増幅物を含む溶液を施し、該溶液を前記マトリックス内で移動させながら前記特異結合性物質と対応特異結合性物質とを結合させ、それによって前記マトリックスの前記対応特異結合性が不働化された部位に前記核酸増幅産物を不働化する。ここで、「対応特異結合性物質」は、上記特異結合性物質と特異的に結合する物質であり、上記特異結合性物質がビオチンの場合には、アビジンやストレプトアビジンのようなアビジン誘導体であり、抗原若しくはハプテンの場合には、これと抗原抗体反応する抗体又はそのFab断片やF(ab)₂のような抗原結合性断片であり、
- D - グルコース残基若しくは - D - マンノース残基を含む糖の場合には、コンカナバリンAであり、免疫グロブリンG若しくはその定常領域の場合には、プロテインAであり、ホルモン若しくは薬剤の場合にはそのホルモン若しくは薬剤と結合するレセプターである。なお、特異結合性物質と対応特異結合性物質の組み合わせはこれらに限定されるものではない。

40

50

【0014】

「液体搬送能を有するマトリックス」は、液体をマトリックスに施した場合に、毛管現象により該液体を搬送することができるものであり、好ましい例としてセルロース、ポリエーテルスルホン、ニトロセルロースの濾紙、ポリスチレン、ポリビニール、活性化されたナイロン膜のうちいずれか一つを材質として構成されたものを挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

【0015】

マトリックスは、前記対応特異結合性物質が不動化された領域を含む。ストレプトアビジンや抗体等の対応特異結合性物質をマトリックスに結合させる方法自体は周知であり、物理吸着による方法や、アミノ基等の官能基を利用して、リンカーを用いて共有結合させる方法

10

【0016】

を挙げることができる。後者の方法のためのキットも市販されており、それらを用いて容易に不動化を行うことができる。

対応特異結合性物質を不動化した領域（検出領域）以外の、マトリックス上の領域に第1工程で得られた核酸増幅産物の溶液を施すと、マトリックスの毛管現象により溶液が搬送され、溶液が前記マトリックス内で移動する。そして、溶液内に含まれる核酸増幅物が、検出領域まで移動してくると、特異結合性物質と対応特異結合性物質とが反応して結合し、核酸増幅物がマトリックスの検出領域上に不動化される。

【0017】

続く第3工程では、マトリックス上に不動化された核酸増幅物中の前記標識を測定する。なお、「測定」には検出、定量及び半定量が包含される。もっとも、簡便性を重視する場合には、目視による検出が好ましい。これらは、例えば蛍光標識の場合には、励起光を照射してその蛍光を測定するといった周知の方法により行うことができる。試料中に標的核酸が存在する場合には、核酸増幅産物が検出領域にトラップされ、標識が検出され、試料中に標的核酸が存在しない場合には、核酸増幅産物が検出領域にトラップされず、標識は検出されない。よって、本発明の方法により、試料中の標的核酸を検出することができる。また、標識の強度を測定することにより、標的核酸を半定量又は定量することも可能である。

20

【0018】

上記本発明の方法において、複数種類の標的核酸の増幅産物に含まれる特異結合性物質が、標的核酸の種類ごとに異なっており、前記マトリックスには、各特異結合性物質に対する対応特異結合性物質がマトリックス上の異なる部位に不動化しておき、各部位に不動化された前記標識を測定することにより、複数種類の標的核酸を同時に測定することが可能になる。なお、核酸増幅には、通常、増幅が正常に起きたか否かをチェックするための内部標準が用いられるが、標的核酸増幅産物中の特異結合性物質に対応する対応特異結合性物質と、内部標準の増幅産物中の特異結合性物質に対応する対応特異結合性物質とを同じマトリックスの異なる部位に不動化しておけば、内部標準の測定も同時に行うことができ簡便である。もっとも内部標準の増幅産物中の特異結合性物質に対応する対応特異結合性物質は、別のマトリックスに不動化しておいてもよい。

30

【0019】

本発明はさらに、上記本発明の方法に用いるためのセンサーをも提供する。すなわち、本発明のセンサーは、前記マトリックスと、該マトリックス内の一領域であって、前記複数種類の対応特異結合性物質が互いに異なる部位に不動化された検出領域と、該検出領域よりも上流に位置し、前記核酸増幅物の溶液を施す試料導入部位と、前記検出領域よりも下流に位置し、前記検出領域を通過した後の溶液を吸収する溶液吸収部位とを含む前記マトリックスと、該マトリックス内の一領域であって、前記対応特異結合性物質が不動化された検出領域と、該検出領域よりも上流に位置し、前記核酸増幅物の溶液を施す試料導入部位と、前記検出領域よりも下流に位置し、前記検出領域を通過した後の溶液を吸収する溶液吸収部位とを含むものである。ここで、「上流」及び「下流」は、核酸増幅産物の溶液の流れの方向を基準にした表現である。前記試料導入部位及び前記溶液吸収部位には、

40

50

水を吸収するパッドが設けられている。パッドは、例えば不織布やフェルト等により形成することができる。このようなパッドを設けておくと、比較的多量の溶液をマトリックスに施すことが可能になり、より高感度に測定を行うことができるので好ましい。また、試料導入部位側からキャリアー液（緩衝液）を導入し、洗浄効果をもたせることで定量性を向上する効果も併せ持つことができる。

【0020】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0021】

実施例1 センサーの作製

ニトロセルロースメンブレン（長さ25mm）を0.05%ポリビニルピロリドン含有リン酸緩衝液に浸し、乾燥させた。次いでマトリックスのレセプター結合部にストレプトアビジンを吸着固定した。これは、2.5mg/mLのストレプトアビジン溶液(5xPBS)を2 μ L/cmでディスペンサーを用いて塗布し、50 $^{\circ}$ Cで一晩乾燥させることにより行った。次に、メンブレンの両端に、セルロースから成る厚さ1mmのパッドを結合し、試料導入パッド及び吸収パッドとした。メンブレンを幅5mmに切断し、本発明のセンサーを作製した。なお、試料導入パッドの長さは5mmであり、その全体が上記ニトロセルロースメンブレンの一端領域に積層され、一方、上記吸収パッドの長さは20mmであり、ニトロセルロースメンブレンの他端領域上に5mmだけ積層し残りの15mmはニトロセルロースメンブレンの他端から突出させた。従ってセンサーの全長は40mmであった。また、ストレプトアビジンは、ニトロセルロースメンブレンの試料導入側の端部から10mmの位置にバンド状に塗布した。

【0022】

実施例2 大腸菌遺伝子の検出

大腸菌のラクト-スオペロン(ラクトース代謝に関するタンパク質をコードする遺伝子群)を、ダイレクトPCRにより増幅した。プライマーの配列及び増幅部位を図1に示す。PCRはnested PCRにより行った。図1中、「1st for」は第1回目の増幅に用いたフォワード側プライマー（配列番号1）、「1st-rev」は、第1回目の増幅に用いたリバーズ側プライマー（配列番号2）、「Biotinfor」は、第2回目の増幅に用いた、5'末端にビオチンを結合したビオチン結合フォワード側プライマー（配列番号3）、「FITCrev」は、第2回目の増幅に用いた5'末端にFITCを結合したFITC標識リバーズ側プライマー（配列番号4）である。4桁の数字は、大腸菌ラクトースオペロンのヌクレオチド番号を示す。なお、プライマーへのビオチン又はFITCの結合は、それぞれ次のようにして行った。ビオチン標識：プライマーの5'末端のリン酸をフォスファターゼで除き、ポリヌクレオチドキナーゼとビオチン化ヌクレオチドを用いて、リン酸化反応にてビオチン標識を行なった。

FITC標識：DNA合成機でプライマーの5'末端にアミノリンカーをカップリングさせ、その後アミノリンカーにFITCをカップリングさせてFITC標識プライマーを作製した。

【0023】

PCR反応液の組成は、次の通りであった。

10 \times PCR反作用緩衝液	10 μ l
塩化マグネシウム(25mM)	8 μ l(最終濃度 2mM)
dNTP(各2.5mM)	8 μ l(最終濃度 200 μ M)
フォワード側プライマー(100 μ M)	0.5 μ l(最終濃度 0.5 μ M)
リバーズ側プライマー(100 μ M)	0.5 μ l(最終濃度 0.5 μ M)
Taq DNAポリメラーゼ(TaKaRa Ex Taq)(5U/ μ l)	0.5 μ l
鋳型DNA	<1 μ g

なお、鋳型DNAの量は、大腸菌数を反応溶液当たり5 cfu、10 cfu、25 cfu、50 cfu、100 cfu、1000 cfu、10000 cfuと変化させた。また、鋳型DNAを含まないネガティブコントロールも行った。

【0024】

上記の溶液に滅菌水を加えて100 μ lとした。該反応液25 μ lを滅菌PCR用チューブに分注後サーマルサイクラーにセットし、サイクル前に熱変性95 / 5分を行い、1サイクル、熱変性95 / 30秒、アニーリング58 / 2秒、ポリメラーゼ反応72 / 10秒のプロトコールを30サイクル行い、第一回目のPCR増幅とした。その増幅産物1 μ Lを新しいPCR反応液に入れ、第一回目のPCR増幅と同様の条件で第二回目のPCR増幅を行った。

【0025】

得られた核酸増幅産物水溶液の25 μ Lを、実施例1で作製したセンサーの試料導入パッドに施した。次いで、キャリア液(PBS)25 μ Lを流し、1分後、検出領域に波長490nmの励起光を当て、蛍光を観察した。その結果、5 cfuの大腸菌を含む試料由来の増幅産物についても検出領域にバンドが観察された。これに対し、ネガティブコントロールでは、バンドは全く観察されなかった。これにより、本発明の方法により、高感度に、簡便、迅速に標的核酸の測定が可能になったことが明らかになった。

10

【0026】

実施例3 トウモロコシ遺伝子の検出

トウモロコシの実(種子)の部分を液体窒素下で凍結させて、乳鉢ですりつぶした。それを凍結乾燥させて、抽出キット(QIAGEN社 DNeasy Plant Mini Kit)を用いてDNAを抽出した。得られたDNA中の、トウモロコシの貯蔵タンパク質Zeinをコードする遺伝子を、PCRにより増幅した。PCRは1対のプライマー-Zeinfor及びZeinrevを用いて通常のPCR法により行った。「Zeinfor」は5'末端にFITCを結合したフォワード側プライマー(配列番号6)、「Zeinrev」は5'末端にビオチンを結合したリバース側プライマー(配列番号7)である。このプライマーデザインは厚生労働省発表のもので増幅領域は157bpである。

20

【0027】

PCR反応液の組成は次の通りであった。

10 \times PCR反作用緩衝液	10 μ l	
塩化マグネシウム(25mM)	8 μ l(最終濃度2mM)	
dNTP(各2.5mM)	8 μ l(最終濃度200 μ M)	
フォワード側プライマー(100 μ M)	0.5 μ l(最終濃度0.5 μ M)	30
リバース側プライマー(100 μ M)	0.5 μ l(最終濃度0.5 μ M)	
Taq DNAポリメラーゼ(5U/ μ l)	0.5 μ l	
鋳型DNA	<1 μ g	

30

【0028】

上記溶液に滅菌水を加えて100 μ lとした。該反応液25 μ lを滅菌PCRチューブに分注後サーマルサイクラーにセットし、サイクル前に熱変性95 / 5分を行い、1サイクル、熱変性95 / 30秒、アニーリング53 / 30秒、ポリメラーゼ反応72 / 10秒のプロトコールを30サイクル行った。

【0029】

得られた核酸増幅産物溶液の25 μ lを、実施例1で作製したセンサーの試料導入パッドに施した。ついで、キャリア液25 μ lを流し、1分後、検出領域に490nmの励起光を当て、検出領域の蛍光を観察した。その結果、試料由来の増幅産物について、バンドが確認された。

40

【0030】

【発明の効果】

本発明により、簡便な操作で短時間に核酸増幅物を測定できる新規な手段が提供された。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Techno Medica Co., Ltd.
 <120> Method for Measuring Target Nucleic Acid and Sensor Therefor
 <130> 03852
 <160> 5
 [0 0 3 2]
 <210> 1 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR
 <400> 1
 agtgagcgca acgcaatta 19 20
 [0 0 3 3]
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR 30
 <400> 2
 gtaaacgac ggccagtga 20
 [0 0 3 4]
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR
 <400> 3
 taggcacccc aggcattaca c 21
 [0 0 3 5]

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR
 <400> 4 10
 tccgtaatca tggtcatagc tg 22
 [0 0 3 6]
 <210> 5
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> E. coli
 <400> 5 20
 cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc 60
 accccaggct ttacacttta tgcctccggc tcgtaatgtg tgggaattg tgagcggata 120
 acaatttac acaggaaca gctatgacca tgattacgga ttcactggcc gtcgttttac 180
 [0 0 3 7]
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA 30
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR
 <400> 6
 cctatagctt ccctttctcc 20
 [0 0 3 8]

- <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer used in PCR
 <400> 7
tgctgtaata gggctgatga

10

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施例において用いたプライマー及び鋳型 DNA の配列とそれらの位置関係を示す図である。

【図 1】

```

          1st for →                Biotinfor →
1141 cgactggaaa ggggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcaattaggg
1201 aacccgggct ttacaattta tgcttcggc tcgtatgtg tgggaattg tgggggata
1261 acaatttcac acaggaaaca gctatgaccc tgcattacga ttcactggcc gtcgttttac
          ← FITCrev                ← 1st rev
  
```

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/00

A

審査官 三原 健治

(56) 参考文献 ホルモンと臨床, Vol. 50, No. 9 (2002) p. 883-894
Biosens. Bioelect ron., Vol. 18 (May, 2003) p. 661-666

(58) 調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	测量靶核酸的方法及其传感器		
公开(公告)号	JP4417045B2	公开(公告)日	2010-02-17
申请号	JP2003199250	申请日	2003-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	TECHNOMEDICA		
申请(专利权)人(译)	株式会社テクノメディカ		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社テクノメディカ		
[标]发明人	中川一人 石河美由樹 山崎浩樹		
发明人	中川 一人 石河 美由樹 山崎 浩樹		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA05 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	谷川荣次郎		
审查员(译)	三原贤治		
其他公开文献	JP2005034031A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，通过该方法可以在短时间内以简单的操作测量核酸扩增产物。解决方案：该测量靶核酸的方法包括通过核酸扩增方法扩增靶核酸的第一过程，以便包含发射光学信号的标记物质和能够特异性结合某种物质的特异性结合物质。在核酸扩增产物中，第二种将第一种方法中得到的含有核酸扩增产物的溶液应用于具有携带液体能力的基质的方法，该基质在基质中移动溶液并将同时特异性结合物质结合到基质中。相应的特异性结合物质，从而将核酸扩增产物固定在基质的特异性结合物质固定位点，以及测定固定化核酸扩增产物中的上述信号的第三种方法。Ž