(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111479928 A
(43)申请公布日 2020.07.31

(21)申请号 201880070652.9

(22)申请日 2018.11.15

(30)优先权数据
2017-222128 2017.11.17 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/042362 2018.11.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/098301 JA 2019.05.23

(71)申请人 凸版印刷株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 平濑匠 牧野洋一 堀内阳介

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 白丽

(51)Int.Cl.
C12Q 1/02(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
C12M 1/34(2006.01)

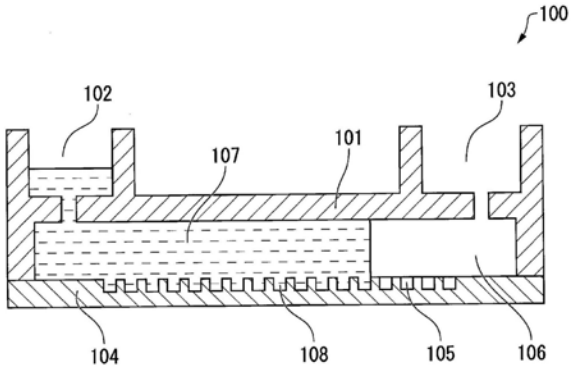
权利要求书1页 说明书22页
序列表3页 附图10页

(54)发明名称

靶分子的检测方法

(57)摘要

本发明的靶分子的检测方法具备以下工序：准备具备基材和配置于所述基材上的孔阵列的流体设备的工序；将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至所述流体设备中的所述孔阵列中，从而将所述结构体导入至所述孔阵列的孔中的工序；将密封液送液至所述孔阵列中，在已导入至所述孔中的所述液体的上层形成所述密封液的层，从而将所述液体封入在所述孔内的工序；从所述结构体中抽提所述靶分子的工序；以及检测所述靶分子的工序。



CN 111479928 A

1.一种靶分子的检测方法,其具备以下工序:

准备具备基材和配置于所述基材上的孔阵列的流体设备,将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至所述流体设备中的所述孔阵列中,从而将所述结构体导入至所述孔阵列的孔中的工序;

将密封液送液至所述孔阵列中,在已导入至所述孔中的所述液体的上层形成所述密封液的层,从而将所述液体封入在所述孔内的工序;

从所述结构体中抽提所述靶分子的工序;以及

检测所述靶分子的工序。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,抽提所述靶分子的工序在所述孔内进行。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,抽提所述靶分子的工序在将所述液体封入到所述孔内的工序之后进行。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,检测所述靶分子的工序在所述抽提靶分子的工序之后进行。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的方法,其中,检测所述靶分子的工序包含信号扩增反应。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的方法,其进一步具备检测所述结构体的工序。

7.根据权利要求6所述的方法,其中,同时进行检测所述靶分子的工序和检测所述结构体的工序。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的方法,其中,在检测所述靶分子的工序中,检测2种以上的所述靶分子。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的方法,其中,所述结构体是外泌体、细胞、细菌、病毒、真菌及内质网中的至少任一个。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的方法,其中,所述靶分子是核酸或蛋白质。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的方法,其中,所述导入的工序中,将1个以下的所述结构体导入至所述孔阵列中的1个孔中。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的方法,其中,通过物理的、化学的、生物学的手法中的任一种方法进行抽提所述靶分子的工序。

13.根据权利要求1～12中任一项所述的方法,其进一步具备使具有针对所述结构体的特异性结合物质的捕获物结合于所述结构体的工序。

14.根据权利要求13所述的方法,其中,通过将所述捕获物导入至所述孔阵列的所述孔中来进行导入所述结构体的工序。

15.根据权利要求13或14所述的方法,其中,所述特异性结合物质是抗体。

靶分子的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及靶分子的检测方法。

[0002] 本申请基于2017年11月17日在日本提出的日本特愿2017-222128号主张优先权，将其内容援引至此。

背景技术

[0003] 通过定量地检测生物体试样中的靶分子，进行疾病的早期发现或给药的效果预测。以往，蛋白质的定量利用酶联免疫吸附测定(ELISA)等进行，核酸的定量利用实时PCR法等进行。

[0004] 近年来，以更早期地发现疾病等为目的，精度更良好地检测靶分子的需求有所增高。作为精度良好地检测靶分子的手法，例如专利文献1、专利文献2、非专利文献1等中记载了在多个微小分区内进行酶反应的技术。

[0005] 这些手法被称作数字测量。

[0006] 在数字测量中，将试样溶液分割成极多的微小溶液。然后，将来自各微小溶液的信号进行二值化，仅判断靶分子是否存在，从而测量靶分子数。根据数字测量，与以往的ELISA或实时PCR法等相比，可以显著地提高检测灵敏度及定量性。

[0007] 数字PCR中，按照存在于1个微小液滴中成为模板的核酸变成0个～1个的方式，将PCR反应试剂与核酸的混合物进行稀释。数字PCR中，为了提高核酸扩增的灵敏度，并且为了对多个微小液滴同时地进行核酸扩增，优选各微小液滴的体积小。例如，专利文献3中公开了按照各孔的容积达到6nl(纳升)的方式形成的微阵列状的反应容器。另外，专利文献1中公开了下述方法：对于在流路内形成有多个深度为3μm、直径为5μm的孔的微阵列，向流路流入试样而将试样导入至各孔中之后，用油将流路内的剩余试剂挤出，从而将试样导入至各孔内。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1：日本专利第6183471号公报

[0011] 专利文献2：日本特表2014-503831号公报

[0012] 专利文献3：国际公开第2013-151135号

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:Kim S.H.,et al.,Large-scale femtoliter droplet array fordigital counting of single biomolecules.,Lab on a Chip,12(23),4986-4991,2012.

发明内容

[0015] 发明要解决的技术问题

[0016] 数字测量中，从包含靶分子的结构体(例如后述的作为具有核酸作为靶分子的结

构体的细胞等)中抽提靶分子,进行送液、分配之后,当在微小液滴内存在靶分子时,有产生信号、检测出靶分子的存在的情况。但是,在从结构体中抽提靶分子的阶段中,有靶分子损失、减少的情况。另外,在如专利文献1所记载的使用流路和油将试样导入至微阵列的各孔中的检测方法中,有试样中的靶分子残留在流路内、未被分配到各孔中而被油冲出、从而靶分子的数量减少的情况。

[0017] 其结果是,有时靶分子的检测精度会降低。

[0018] 本发明鉴于上述事实而作出,其目的在于提供能够精度良好地检测靶分子的技术。

[0019] 用于解决技术问题的手段

[0020] (1)本发明第一方式的靶分子的检测方法具备以下工序:

[0021] 准备具备基材和配置于所述基材上的孔阵列的流体设备,将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至所述流体设备中的所述孔阵列中,从而将所述结构体导入至所述孔阵列的孔中的工序;

[0022] 将密封液送液至所述孔阵列中,在已导入至所述孔中的所述液体的上层形成所述密封液的层,从而将所述液体封入在所述孔内的工序;

[0023] 从所述结构体中抽提所述靶分子的工序;和

[0024] 检测所述靶分子的工序。

[0025] (2)抽提所述靶分子的工序可以在所述孔内进行。

[0026] (3)抽提所述靶分子的工序可以在将所述液体封入到所述孔内的工序之后进行。

[0027] (4)检测所述靶分子的工序可以在抽提所述靶分子的工序之后进行。

[0028] (5)检测所述靶分子的工序可以包含信号扩增反应。

[0029] (6)可以进一步具备检测所述结构体的工序。

[0030] (7)可以同时进行检测所述靶分子的工序与检测所述结构体的工序。

[0031] (8)在检测所述靶分子的工序中,可以检测2种以上的所述靶分子。

[0032] (9)所述结构体可以是外泌体、细胞、细菌、病毒、真菌及内质网中的至少任一个。

[0033] (10)所述靶分子可以是核酸或蛋白质。

[0034] (11)所述导入的工序中,可以将1个以下的所述结构体导入至所述孔阵列中的1个孔中。

[0035] (12)可以通过物理的、化学的、生物学的手法中的任一种手法进行所述抽提靶分子的工序。

[0036] (13)可以进一步具备使具有针对所述结构体的特异性结合物质的捕获物结合于所述结构体的工序。

[0037] (14)可以通过将所述捕获物导入至所述孔阵列的所述孔中来进行所述导入结构体的工序。

[0038] (15)所述特异性结合物质可以是抗体。

[0039] 发明效果

[0040] 根据本发明,可以提供能够精度良好地检测靶分子的技术。

附图说明

[0041] 图1为说明将试剂液送液至流体设备的方法的示意截面图。

[0042] 图2为说明将油送液至流体设备的方法的示意截面图。

[0043] 图3为说明从流体设备内检测信号的方法的示意截面图。

[0044] 图4(a)及(b)为说明在微小分区内检测靶分子的第一实施方式的方法的示意截面图。

[0045] 图5(a)及(b)为说明在微小分区内检测靶分子的第二实施方式的方法的示意截面图。

[0046] 图6为实施例1的荧光显微镜观察的结果。

[0047] 图7为实施例2的荧光显微镜观察的结果。

[0048] 图8为表示实施例2的观察到荧光的孔的个数相对于噬菌体浓度的图表。

[0049] 图9为实施例3的荧光显微镜观察的结果。

[0050] 图10为表示实施例4的利用各种使噬菌体崩解的手法来研究噬菌体内部核酸的检测时的荧光强度相对于时间的变化的图表。

[0051] 图11为图10的放大图，为表示实施例4的利用各种使噬菌体崩解的手法来研究噬菌体内部核酸的检测时的荧光强度相对于时间的变化的图表。

[0052] 图12为实施例5的荧光显微镜观察的结果。

[0053] 图13为实施例6的荧光显微镜观察的结果。

[0054] 图14为实施例6的荧光显微镜观察的结果。

[0055] 图15为实施例6的荧光显微镜观察的结果。

具体实施方式

[0056] 以下一边根据情况参照附图一边详细地说明本发明的实施方式。此外，附图中，相同或相当部分带有相同或对应的符号，并省略重复的说明。此外，各图中的尺寸比有为了说明而有所夸张的部分，并非必须与实际的尺寸比一致。

[0057] [流体设备]

[0058] 本发明的一实施方式涉及使用流体设备检测靶分子的方法。本实施方式的流体设备具备基材和配置于所述基材上的孔阵列。

[0059] 另外，本实施方式的流体设备还可以具备流路和配置于所述流路内的孔阵列。

[0060] 孔的形状、尺寸及配置并无特别限定，但优选使用由可以收容在本实施方式的方法中使用的结构体、及在检测工序中使用的一定量的试剂液等的孔所构成的孔阵列。孔可以在无处理的情况下进行使用，也可根据目的预先实施在孔内壁上固定抽提试剂、抗体等检测试剂、特异性结合物质等，或者利用脂质双分子层将孔开口部覆盖等前处理。

[0061] 流路是用于对分散有结构体的液体及密封液进行送液的通路。流路的形状、结构、容量等并无特别限定，在流体设备中形成有流路时，优选使用具有下述流路的流体设备：在对分散有结构体的液体进行送液时结构体可以被导入至孔阵列的各孔中，并且在插入了密封液时能够单独分别地将各孔密封而形成微小液滴。

[0062] 此外，本实施方式中，流体设备中的流路只要是按照可填充、配置后述的试剂液、密封液等液体的方式形成的内部空间即可，有时将流路称作内部空间。

[0063] 例如，流体设备还可以具有以下构成：向孔阵列中滴加试剂液(例如水溶液)而填满后，从上方静静地滴加密封液(例如油)，从而能够用密封液将孔阵列上密封。

[0064] 另外，内部空间还可以通过用试剂液将孔阵列填满、用密封液将孔阵列密封后、盖上盖材来形成。

[0065] (流体设备的一例)

[0066] 图1为流体设备的示意截面图。如图1所示，流体设备100具备基材104和盖材101。

[0067] 基材104可以由透光性树脂形成。本实施方式的基材104可以实质上是透明的。

[0068] 基材104具有多个孔(以下有时将多个孔称作“孔阵列”)105。基材104的孔105在基材104的表面上开口。孔105的形状、尺寸及配置并无特别限定，优选设计成适于在1个孔105中导入1个结构体的形状及尺寸。通常，孔105优选制成容积小的微小孔。例如，作为1个孔105的容积，可以是1aL～100fL。

[0069] 图1所示的例子中，在基材104上形成有能够收容在使用流体设备100进行的生物化学分析中所用的一定量的试剂液107(分散有包含靶分子的结构体的液体)的同样形状同样大小的多个孔105。另外，当在使用流体设备100进行的生物化学分析中使用粒子时，还可以在基材104上形成有具有能够收容1个以上粒子的形状及尺寸、且能够收容包含粒子的一定量的试剂液107的同样形状同样大小的孔105。同样形状同样大小只要是以为了进行数字测量所要求的程度、为同一形状、同一容量即可，允许制造上的误差程度的不均。

[0070] 流体设备100中，孔105的直径例如可以为3μm左右，孔105的深度例如可以为4.5μm左右。另外，孔105可以按照形成三角形栅格状或正方形栅格状的方式进行排列而形成在基材104上。

[0071] 基材104的包含多个孔105的区域成为被填充在生物化学分析中作为分析对象的试剂液107的区域。流体设备100中，在被填充试剂液107的区域的内侧(内部空间)，在基材104与盖材101之间设置有流路106(成为流路的内部空间)。

[0072] 此外，本实施方式中，流体设备100中的流路106只要是按照填充、配置试剂液107、后述的密封液201等液体的方式形成的内部空间即可，有时将流路106称作内部空间。

[0073] 例如，流体设备100还可以具有以下构成：向多个孔105(孔阵列)中滴加试剂液107(例如水溶液)而填满后，从上方静静地滴加密封液201(例如油)，从而能够用密封液201将多个孔105上密封。

[0074] 盖材101可以焊接或粘接在基材104上。例如，盖材101优选选择自体荧光少的树脂，可以由环烯烃聚合物、环烯烃共聚物等热塑性树脂形成。另外，盖材101可以由在对信号进行荧光观察时不会透过所检测的波长的附近波长的光的材料形成，还可以由完全不透光的材料形成。例如，还可以由添加有碳或金属粒子等的热塑性树脂形成。

[0075] 基材104例如使用树脂形成。树脂的种类并无特别限定，优选使用对于试剂及形成液滴时的密封液具有耐受性的树脂。另外，在对信号进行荧光观察时，优选选择自体荧光少的树脂。例如，可举出环烯烃聚合物或环烯烃共聚物、硅、聚丙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚乙酸乙烯酯、氟树脂、无定形氟树脂等。此外，作为基材104的例子所示出的这些材质不过是例子，材质并不限定于这些。

[0076] 对于基材104，可以在板厚方向的一个面上形成多个孔105。作为使用了树脂的形成方法，除了注塑成型之外，还可以通过热压印或光压印等进行。另外，使用氟树脂时，例如

可以是在基材104上具有CYTOP(注册商标)(旭硝子)的层、形成于CYTOP(注册商标)上的微小的孔成为孔105。

[0077] 盖材101按照在组装时在面向基材104的面上具有凸部的方式来成型。

[0078] 例如,通过使用成型模具对热塑性树脂的流动体进行成型,可以成型为具有凸部的板状。另外,还可以在盖材101上形成有送液口102及废液口103。

[0079] 盖材101及基材104若如上那样地进行成型,则按照盖材的凸部接触于基材104中孔105进行开口一侧的面的方式,将盖材101与基材104重叠。由此,形成流路106。进而,在盖材101与基材104如上地进行重叠的状态下,利用激光焊接等进行焊接。

[0080] [以往的检测方法]

[0081] 首先,使用图1～图3所示的代表性流体设备的示意截面图对使用了流体设备的现有的靶分子的检测方法进行说明。

[0082] 首先,如图1所示,将按照流体设备100的孔105中每1个孔进入1个分子的靶分子的方式进行了稀释的试剂液107从盖材101的送液口102送液至基材104与盖材101之间的流路106。送液工序中,被送液至基材104与盖材101之间的流路106的试剂液107被收容在多个孔105的内部。接着,如图2所示,从盖材101的送液口102将密封液201、例如油性的油送液至基材104与盖材101的流路106中,单独分别地将多个孔105密封。在密封工序中,密封液201将在上述送液工序中被送液至基材104与盖材101的流路106的试剂液107中的未被收容在孔105中的试剂液107置换。由此,密封液201将多个孔105分别单独地密封,孔105变成独立的反应空间(微小分区202)。接着,如图3所示,在孔105内进行规定的生物化学反应(反应工序),之后观察通过反应工序中的信号扩增反应所扩增的信号。

[0083] 根据现有的检测方法,当对细胞或病毒等结构体中所含的核酸或蛋白质等靶分子进行检测时,预先将靶分子从结构体中抽提,在送液工序中制成试剂液107进行送液。此时,有时在从结构体中抽提靶分子的阶段及送液工序中会有靶分子损失、减少。另外,有时靶分子未被分配到孔105内而是留在流路106中,在密封工序中被密封液201冲走,在反应工序中观测不到信号扩增反应,从而检测不到存在。

[0084] 如上所述,在现有的检测方法中,当在送液、密封工序中发生靶分子未被完美地分配到孔中时,有无法准确地检测结构体所含靶分子的情况。

[0085] [靶分子的检测方法]

[0086] 本发明一实施方式的靶分子的检测方法具备以下工序:准备具备基材和配置在所述基材上的孔阵列的流体设备,将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至所述流体设备中的所述孔阵列中,从而将所述结构体导入至所述孔阵列的孔中的工序;将密封液送液至所述孔阵列,在已导入至所述孔内的所述液体的上层形成所述密封液的层,从而将所述液体封入到所述孔内的工序;从所述结构体中抽提所述靶分子的工序;以及检测所述靶分子的工序。

[0087] 另外,本实施方式中,当流体设备具有流路时,本实施方式的靶分子的检测方法可以具备以下工序:准备具备流路和配置在所述流路内的孔阵列的流体设备,将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至所述流体设备中的所述流路中,从而将所述结构体导入至所述孔阵列的孔中的工序;将密封液送液至所述流路内,在已导入至所述孔内的所述液体的上层形成所述密封液的层,从而将所述液体封入到所述孔内的工序;从所述结构体中抽提

所述靶分子的工序;以及检测所述靶分子的工序。

[0088] 根据本实施方式的检测方法,由于未被分配到孔中而损失的靶分子的数量变少,因此检测精度提高。另外,由于不需要事先将靶分子从结构体中抽提的工序,因此可以简便地检测靶分子。以下,对各工序详细地进行说明。

[0089] (将结构体导入至孔中的工序)

[0090] 本工序中,将分散有包含靶分子的结构体的液体送液至流体设备(流体设备的流路)中,将所述结构体导入至孔阵列的孔中。

[0091] 作为结构体并无特别限定,可以使用任意的结构体。作为具体的结构体,例如可举出生物体试样中的外泌体、细胞、细菌、病毒、真菌、内质网等。作为生物体试样并无特别限定,可举出血清、血浆、尿等。

[0092] 结构体包含靶分子。本申请说明书中,结构体“包含”靶分子可以是指结构体内包靶分子,或者靶分子的一部分或全部存在于结构体的表面。作为靶分子的具体例子,可举出DNA、RNA、miRNA、mRNA等核酸、结构蛋白、酶等蛋白质、糖、脂质等。

[0093] 使结构体分散的液体可以使用在使用流体设备进行的生化学分析中所用的通常的液体,优选为水性溶液。通过含有表面活性剂等,可以容易地将液体封入到孔内。另外,还可以含有后述的抽提靶分子的工序或检测靶分子的工序所需的试剂等。例如,当在靶分子的检测中使用Invasive Cleavage Assay(侵入裂解分析,ICA)反应时,可以在使结构体分散的液体中含有等位基因探针、ICA寡核苷酸、Flap endonuclease-1(侧翼核酸内切酶-1,FEN-1)、荧光底物等ICA反应试剂。

[0094] 将结构体“导入”至孔中是指将结构体分配到孔阵列的各孔中。例如,可以按照将包含靶分子的结构体整体纳入(收容)在微小液滴中的方式将结构体导入至各孔中,或者还可以通过将结构体配置在各孔的上部、在将结构体配置于各孔上部的状态下进行后述的抽提工序,由此仅将靶分子导入至孔中。作为后者的具体例子,可以举出使作为结构体的病毒附着在覆盖孔上部的开口部的脂质双分子层上,利用病毒感染机制将RNA抽提,仅将所抽提的RNA导入至孔的内部的方法。即,此例中,同时地进行导入工序和抽提工序。

[0095] 导入工序中被导入至1个孔中的结构体的数量并无特别限定,优选在1个孔中导入0个或1个结构体。由此,可以以1个单位进行结构体的检测,即能够进行数字测量。另外,无需将结构体导入至孔阵列的全部孔中。

[0096] 将结构体导入至孔中的手段并无特别限定,可以选择对应于所选结构体的适当的手段。例如可以举出通过自重使结构体在流体设备内(流路内)沉降来分配到孔中的方法。或者,还可以利用捕获结构体的物质(捕获物)、使捕获物结合于通过自重难以沉降的结构体上进行送液,或者预先将捕获物固定在孔中、对所送液的结构体进行捕获,从而可以提高导入效率。

[0097] (封入的工序)

[0098] 本工序中,将密封液送液至流体设备的内部空间(例如流路),在已导入至孔中的液体的上层形成密封液的层,从而将液体封入在孔内。通过该工序,在孔中形成微小液滴。

[0099] 此外,本工序中,还可以在流体设备中将试剂液(例如水溶液)滴加到孔阵列中而填满后,从上方静静地滴加密封液(例如油),用密封液将孔阵列上密封。

[0100] 密封液是能够将导入至多个孔中的液体之间按照相互间不会混合的方式单独分

别地密封而形成液滴(微小液滴)的液体,优选为油性溶液、更优选为油。作为油,可以使用氟系油、有机硅系油、烃系油或它们的混合物等,更具体地说可以使用Sigma公司制的商品名“FC-40”等。

[0101] (从结构体中抽提靶分子的工序)

[0102] 本工序中,从结构体中抽提靶分子。在抽提工序中,可以从结构体中将全部的靶分子抽提,还可以仅将结构体所含靶分子的一部分抽提。

[0103] 作为从结构体中抽提靶分子的方法,并无特别限定,可以使用公知的手法。例如可举出热、超声波、光、磁力、电磁波等物理手法,表面活性剂、抗生素、渗透压诱导剂、坏死/凋亡诱导剂等化学手法,酶、病毒、噬菌体等生物学手法等。

[0104] 更具体地说,作为抽提方法使用热时,通过将流体设备在70℃以上、优选75℃以上、例如约80℃下加热至少5分钟、优选至少10分钟、例如约15分钟或约30分钟,可以从结构体中抽提靶分子。

[0105] 作为利用生物学手法进行的抽提方法的具体例子,可举出使f1噬菌体等噬菌体感染到大肠杆菌等细菌中而使其发生溶菌的手法。另外,作为利用生物学手法进行的抽提方法的其它具体例子,有时从作为结构体的f1噬菌体等噬菌体中使核酸溶出作为靶分子。更具体地说,当使噬菌体(结构体)接触于细菌时,首先噬菌体识别细菌的表面膜结构(蛋白质、脂质双分子层)并进行结合。接着,核酸(靶分子)被从噬菌体注入到细菌内。接着,在细菌内核酸被复制,生成新的噬菌体。之后,通过在菌体内生成的噬菌体的作用,细菌的细胞膜崩解(溶菌),所注入并复制的靶分子的DNA被释放。或者,还可以代替利用上述噬菌体进行的自内部的溶菌,而是通过热等外力使菌体崩解,将其中的噬菌体取出。另外,在前述情况下,也可不使用细菌其本身,而是使用模拟了细菌的膜结构的脂质双分子层样物质。通过使噬菌体附着在该脂质双分子层样物质上,与使其附着在菌体上的情况相同地,噬菌体使噬菌体的内部所含的核酸溶出至噬菌体外。这种情况也可不进行溶菌的步骤。

[0106] 从结构体中抽提靶分子的工序还可以是在将孔密封后在孔内进行。由此,可以抑制靶分子的损失。其结果是,与从结构体中抽提靶分子后使用流路分配至微阵列的各孔中的现有方法相比,可以精度良好地检测靶分子。

[0107] (检测靶分子的工序)

[0108] 本工序中,对靶分子进行检测。检测靶分子的方法可以对应欲检测的靶分子的特性、使用公知的任意的检测方法。例如可如下进行:首先根据需要进行使靶分子来源的信号扩增至能够检测的水平的反应(信号扩增反应),接着使用适当的手段对被扩增的信号进行检测。本实施方式中,检测靶分子的工序利用检测核酸的方法进行。

[0109] 作为在本实施方式的检测方法中能够使用的信号的例子,可举出荧光、化学发光、显色、电位变化、pH变化等。

[0110] 信号扩增反应例如可以是生化学反应、更具体地说可以是酶反应。作为一例,信号扩增反应是在孔内收容有包含用于信号扩增的酶的试剂液的状态下、将流体设备在可获得所需酶活性的一定的温度条件下、例如60℃以上、优选约66℃下维持规定时间、例如至少10分钟、优选约15分钟的等温反应。

[0111] 作为信号扩增反应的例子,具体地说,在使用检测核酸的反应时,可举出Invader(注册商标)法等ICA反应、LAMP法(注册商标)、TaqMan(注册商标)法、荧光探针法等。特别优

选使用ICA反应。这与以下ICA反应的原理有关:通过(1)核酸之间的互补结合和(2)利用酶进行的三重链结构的识别及剪切的2个反应的循环,信号扩增得以进行。在这种信号扩增反应中,因靶分子以外的混杂物导致的反应循环阻碍的影响小。因此,即便是在抽提工序中将存在于结构体内的靶分子以外的各种成分释放到微小分区内时,也可通过使用ICA反应而精度良好地检测靶分子。例如,当在信号扩增反应中使用ICA反应时,用于将结构体导入至孔中的液体(使结构体分散的液体)包含ICA反应所需的反应试剂及模板核酸。反应工序中的生化学反应为ICA反应时,通过利用等温反应进行的酶反应,在孔中存在靶分子时,通过荧光物质从消光物质上离去,对应于激发光发出规定的荧光信号。

[0112] 或者,靶分子的检测也可通过使特异性结合于靶分子的物质(特异性结合物质)结合于靶分子,对结合后的特异性结合物质进行检测,从而进行。例如,当靶分子为蛋白质时,可使用ELISA进行检测。更具体地说,检测例如可通过使用了FRET原理的三明治ELISA进行。进行使用了FRET原理的三明治法时,首先准备用第一荧光物质(供体)进行了标记的第一特异性结合物质(例如抗体)、和用具有与第一荧光物质的荧光波长重复的吸光波长的第二荧光物质(受体)进行了标记的第二特异性结合物质。接着,使靶分子(例如抗原)与第一特异性结合物质和第二特异性结合物质这两者接触,形成复合体。形成复合体时,供体与受体的距离接近,可以利用供体的激发波长的照射对受体的荧光波长进行检测。或者,还可以利用核酸片段预先对特异性结合物质进行标记,利用ICA反应检测核酸片段。

[0113] 作为特异性结合物质,可以使用后述的与针对结构体的特异性结合分子相同的物质,例如抗体、抗体片段、核酸适配体等。为了检测已结合于靶分子的特异性结合物质,还可以利用例如辣根过氧化物酶(HRP)等酶将特异性结合物质直接或间接地进行标记。使用2个以上的特异性结合物质时,可以对各个特异性结合分子按照能够相互识别的方式进行标记。

[0114] 信号的观察方法可以根据所观察的信号的种类选择公知的适当方法。例如,进行明视野观察时,沿垂直于设置有孔阵列的基材的方向照射白色光。观察荧光信号时,从孔的底侧向孔内照射对应于荧光物质的激发光,观察荧光物质所发出的荧光。对所观察到的孔阵列的整体或一部分的图像进行拍摄并保存,利用计算机系统进行图像处理。

[0115] (检测工序的一例)

[0116] 本实施方式中,可以使用2个以上的特异性结合物质对1个靶分子进行检测。例如,可以使用所识别的抗原决定簇相互间不同的2种单克隆抗体对1种蛋白质进行检测。由此,即便是在特异性结合物质发生错误识别时或者在孔中混在有类似的靶分子时,也能够高精度地检测目标的靶分子。

[0117] 本实施方式的靶分子的检测方法可以使用2种以上的靶分子。此时,各个靶分子可以按任一种顺序进行检测。例如,检测2种靶分子时,可以在单一的检测工序中同时检测2种靶分子,或者也可在独立的2个检测工序中分别单独地检测。由此,可以检测结构体所具有的多个靶分子。

[0118] 另外,本实施方式的检测方法由于在将结构体分配到各微小液滴中之后进行抽提工序,因此对于各个结构体,可以对应各靶分子的检测数据进行评价。

[0119] 此外,在同时检测2种以上的靶分子时,或者在即便不同时但各靶分子以在能够检测的状态下共存的状况依次进行检测时等,需要按照表示各靶分子分别存在的信号并不混

同的方式设计反应体系。例如，通过荧光信号进行检测时，通过使第一靶分子和第二靶分子中激发光或荧光的波长为不同的带域，可以在不受到两者的存在所导致的干涉的情况下独立地对荧光进行检测。

[0120] 本实施方式的靶分子的检测方法还可以在进行抽提工序之前进一步具备检测靶分子的工序。该工序是以不从结构体中进行抽提的状态对结构体所含的靶分子进行检测的工序。该工序中被检测的靶分子可以是存在于结构体表面的靶分子，还可以是存在于结构体内部的靶分子。

[0121] 在抽提工序之前进行检测工序时，检测工序的温度优选是低于抽提靶成分的温度的温度，更具体地说可以在室温～约60℃的范围的温度下进行。

[0122] 以上详述的各工序可以按照上述顺序依次进行。通过如此进行(例如检测靶分子的工序在抽提靶分子的工序之后进行)，由于从结构体中抽提出的靶分子能够在停留在孔内部的状态下进行检测，因此能够高精度地检测目标的靶分子。或者，还可以改变顺序进行各工序，或者也可同时地进行2个工序。例如，可以在导入工序之后且进行密封工序之前进行抽提工序，此时，还可以同时地进行导入工序和抽提工序。另外，如上地具备多个检测工序时，也可在进行抽提工序之前进行多个检测工序的一部分。

[0123] [进一步具备检测结构体的工序的检测方法]

[0124] 本发明一实施方式的检测方法在上述实施方式的靶分子的检测方法中还可以进一步具备检测结构体的工序。检测结构体的工序可以在上述实施方式的检测方法中的任意的时间点进行，例如可以在将结构体导入至孔中的工序之后、从结构体中抽提靶分子的工序之前进行。或者，还可以在从结构体中将靶物质抽提后检测结构体。

[0125] 本发明的特定实施方式的方法中，还可以同时地进行检测靶分子的工序和检测结构体的工序。

[0126] 此外，在同时进行检测等时，对于按照相互间不干涉的方式在反应体系上下功夫的方面而言，与前述的同时检测2种以上靶分子的情况是同样的。

[0127] 此外，在孔内部抽提靶分子时，通过在孔内部对靶分子进行抽提，可以确认没有过失地将靶分子从结构体中抽提出来。

[0128] 结构体的检测可以通过对结构体进行明视野观察等直接地进行，或者也可以进行与上述检测工序同样的操作来检测结构体所含的靶分子等间接地进行。作为后者的例子，可举出使用对细胞膜进行染色的荧光色素或识别病毒包被蛋白质的抗体等的方法。

[0129] 以下关于本发明的上述实施方式的靶分子的检测方法，说明更具体的实施方式。

[0130] (第一实施方式)

[0131] 说明本发明第一实施方式的靶分子的检测方法。本实施方式具备以下工序：将具有靶分子的结构体导入至孔中的工序；对孔进行密封的工序；从结构体中抽提靶分子的工序；以及检测靶分子的工序。图4(a)及(b)是说明在微小分区内检测靶分子的本实施方式的方法的示意截面图。

[0132] 首先，将具有靶分子的结构体导入至孔中。将结构体导入至孔中的工序例如如图1所示，通过将试剂液107送液至流路106中，将结构体分配到孔105中，从而进行。

[0133] 接着，如图2所示，将密封液201送液至流路106中，分别单独地将孔105密封，形成微小分区202。

[0134] 图4(a)中，包含靶分子11的结构体12被收容在由基材104和密封液201形成的微小分区202中。接着，在经密封的孔内从结构物中抽提靶分子。

[0135] 图4(b)中，从抽提处理后的结构体12'中，靶分子11被抽提出。

[0136] 接着，对于在孔内被抽提出的靶分子，与以往的检测方法同样地在反应工序中使用信号扩增反应来检测靶分子。

[0137] (第二实施方式)

[0138] 对本发明第二实施方式的靶分子的检测方法进行说明。本实施方式是在第一实施方式的方法中进一步具备使捕获物结合于结构体的工序。图5(a)及(b)是说明在微小分区内检测靶分子的本实施方式的方法的示意截面图。

[0139] 图5(a)中，包含靶分子11的结构体12、特异性结合物质13和捕获物14被收容在由基材104和密封液201所形成的微小分区202内。

[0140] 在捕获物14中固定有特异性结合物质13。另外，特异性结合物质13识别结构体12并结合。图5(b)中，从抽提处理后的结构体12'中靶分子11被抽提出。

[0141] 使捕获物结合于结构体的工序可以在本实施方式的检测方法中的任意的时间点进行。例如，该工序可以在向孔中导入结构体的工序之前、通过在样品管内使结构体与捕获物接触来进行。或者，还可以在将捕获物导入到孔中之后使结构体接触来结合。

[0142] 捕获物是能够捕获结构体的物质。例如可以举出将特异性结合于靶分子的物质(特异性结合物质)固定在固相、例如粒子上的物质，但并不限定于此。捕获物所具有的特异性结合物质可以是1种，或者可以是2种以上，例如可以是3种、4种、5种以上。或者，例如作为结构体使用病毒时，还可以将病毒能够附着的细胞(例如具有病毒受体的细胞)作为捕获物使用。

[0143] 作为特异性结合物质，可举出抗体、抗体片段、核酸适配体等。抗体例如可以通过将靶分子或靶分子的片段作为抗原与小鼠等动物进行免疫反应来进行制作。或者，例如还可以通过噬菌体库的筛选来制作。作为抗体片段，可举出Fab、$F(ab')_2$、Fab'、单链抗体(scFv)、二硫化物稳定化抗体(dsFv)、二聚化物V区域片段(Diabody)、包含CDR的肽等。抗体可以是单克隆抗体，还可以是多克隆抗体。另外，还可以是市售的抗体。

[0144] 作为粒子并无特别限定，可以利用聚合物粒子、磁性粒子、玻璃粒子等。粒子优选是实施了用于避免非特异性吸附的表面处理的粒子。另外，为了对特异性结合物质进行固定化，优选使用表面具有羧基等官能团的粒子。更具体地说，可以使用JSR公司制的商品名“Magnosphere LC300”等。

[0145] 作为将特异性结合物质固定在粒子表面上的方法并无特别限定，可举出利用物理吸附的方法、利用化学键合的方法、利用抗生物素蛋白-生物素的结合的方法、利用蛋白质G或蛋白质A与抗体的结合的方法等。作为利用物理吸附的方法，可举出通过疏水性相互作用、静电相互作用将特异性结合物质固定在粒子表面上的方法。作为利用化学结合的方法，可举出使用交联剂的方法。例如，当粒子的表面具有羟基时，可以通过使交联剂与特异性结合物质所具有的羧基发生反应而进行活性酯化之后，使羟基与该酯基发生反应，从而将特异性结合物质固定在粒子表面上。另外，为了不阻碍特异性结合物质对靶分子的识别性能，优选在特异性结合物质与粒子表面之间设置间隔物。

[0146] 本发明的一实施方式中，还可以通过将捕获物导入至孔阵列的孔中来进行导入结

构体的工序。例如，还可以在上述方法中将分散有与结合有特异性结合物质的捕获物结合了的结构体的液体送液至流路，来导入至孔中。

[0147] 这里，优选在1个捕获物捕获0个或1个结构体的条件下来使捕获物与结构体接触。进而，优选按照在1个孔中导入0个或1个捕获物的方式来构成。由此，可以进行数字测量。即，本实施方式中，结构体的检测可以以1个单位进行。此时，以结构体1个单位来检测结构体所含的靶分子。

[0148] 另外，本发明的一实施方式中，可以利用捕获物进行从结构体中抽提靶分子的工序。进而，本发明的一实施方式中，可以通过检测捕获物所具有的特异性结合物质来进行检测结构体的工序。

[0149] (第三实施方式)

[0150] 对第三实施方式的靶分子的检测方法进行说明。本实施方式为在第一实施方式的方法中使用能够作用于结构体而抽提出靶分子的物质(抽提剂)来进行从结构体中抽提靶分子的工序。抽提剂可以是为了进行上述抽提工序中所列举的手法所使用的任意的物质，例如可举出化学手法中使用的表面活性剂、抗生素、渗透压诱导剂、坏死/凋亡诱导剂等，或生物学手法中使用的酶、病毒、噬菌体等。例如，作为结构体使用细胞时，作为抽提剂使病毒感染细胞而将细胞溶解，可以将核酸作为靶分子抽提出来。

[0151] 本实施方式的方法具备使结构体与抽提剂接触的工序。结构体和抽提剂可以以任一种顺序进行接触。例如，可以在将结构体导入至孔的工序之前将结构体与抽提剂混合，接着将混合后的液体进行送液，导入至孔中。此时，例如可以通过调整结构体与抽提剂的混合比等的方法，按照将孔密封之后在孔内从结构体中抽提靶分子的方式来设计抽提条件。或者，还可以在将抽提剂导入至孔中之后将分散有结构体的液体进行送液，在孔内使它们接触。

[0152] 将孔密封之后，在孔内，抽提剂发挥作用，结构体崩解，靶分子被抽提出。可以利用上述检测方法对抽提出的靶分子进行检测。

[0153] (第四实施方式)

[0154] 说明第四实施方式的靶分子的检测方法。本实施方式是在第一实施方式的方法中对存在于结构体表面上的第一靶分子和存在于结构体内部的第二靶分子进行检测。

[0155] 首先，与第一实施方式同样地将结构体导入至孔中并进行密封。接着，检测第一靶分子。第一靶分子可以利用上述的任意方法进行检测，例如可以使用针对第一靶分子的特异性结合物质进行，特异性结合物质可以在导入至孔中之前结合于第一靶分子，也可以在导入至孔中之后使其结合。

[0156] 接着，在孔内抽提第二靶分子，利用上述检测方法对抽提出的第二靶分子进行检测。

[0157] 第一靶分子和第二靶分子可以如上所述依次地检测，或者也可同时地检测。

[0158] 实施例

[0159] 以下基于实施例更为详细地说明本发明。本发明不受这些实施例的任何限定。

[0160] 本实施例中，为了制造实验用的流体设备，使用利用注塑成型形成的COP制基材和COP制的盖材(炭黑添加着色、带有送液及废液口)的2个树脂制构件。形成于基材上的孔(微小分区)的直径为5μm，具有利用侵入反应进行的信号检测能够在数分钟内进行的体积。基

材粘接在盖材上,形成高度为100μm的流体设备的内部空间(流路)。

[0161] [实施例1]

[0162] (噬菌体的崩解及核酸从噬菌体中的抽提研究)

[0163] 作为结构体,使用作为病毒之一种的f1噬菌体(试剂名:大肠杆菌噬菌体f1(Escherichia coli phage f1)、独立行政法人制品评价技术基础机构、型号:NBRC20010)(作为内包DNA(f1 phage oligo,f1噬菌体寡核苷酸),具有"序列号1"的碱基序列)(参照表1),进行噬菌体崩解的研究及以核酸、具体地说f1噬菌体内包DNA作为靶分子,进行靶分子的检测。

[0164] (核酸检测试剂的制备)

[0165] 为了进行ICA反应之一种的数字侵入反应,作为核酸检测试剂,制备侵入反应试剂(ICA反应试剂)。

[0166] 实施例1中的侵入反应试剂使用以下表1所示的试剂,按照含有0.5μM等位基因探针1((f1噬菌体)Allele probe1)(序列号2)、1μM Invader寡核苷酸1(序列号3)(ICA寡核苷酸1)(以上为Fasmac公司)、4μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(序列号4)(日本Bio Services公司)(荧光底物)、0.1mg/mL FEN-1(Flap endonuclease-1)、50mM Tris-HCl(pH为8.5)、及20mM $MgCl_2$的方式进行制备。

[0167] 此外,这些侵入反应试剂中各成分的浓度是实施例1的侵入反应试剂中的终浓度。

[0168] [表1]

[0169]

试剂名	碱基序列 (5'→3')
f1噬菌体寡核苷酸DNA (f1噬菌体内包DNA)	ACGTTAAACAAAAAATCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATAT GGCTGTTTATTTTGTAACTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCG TTAGCGTTGGTAAGATTCAGGATAAAATTGTAGCTGGGTGCAAAAT (序列号1)
等位基因探针1	CGCGCCGAGGGCCTAATTTGCCAGTTAC (序列号2)
Invader寡核苷酸1 (ICA寡核苷酸1)	GCTAACGAGCGTCTTTCCAGAT (序列号3)
FRET Cassette1 (Alexa488-BHQ)	XTTCTYAGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCGCG X:利用Alexa488-NHS修饰末端氨基 Y:BHQ1-dT 亚磷酰胺 (序列号4)
等位基因探针2	CGCGCCGAGGCGCAGCTCATGCCC (序列号5)
Invader寡核苷酸2 (ICA寡核苷酸2)	CCACCGTGCACTCATCAA (序列号6)

[0170] <噬菌体的崩解及核酸抽提反应的研究>

[0171] 通过表面活性剂,研究噬菌体是否能崩解。

[0172] 作为包含表面活性剂的试样,在样品管中制备将按照上述侵入反应试剂与作为包含表面活性剂的核酸抽提试剂的Bugbuster(Merck Millipore公司制)达到1:1的方式所制备的溶液和上述f1噬菌体(1%)混合而成的溶液(溶液A),在室温下搅拌15分钟。

[0173] 另外，作为对照实验，在样品管中制备将上述侵入反应试剂和上述f1噬菌体(1％)混合而成的溶液(不包含表面活性剂的试样)(溶液B)，在室温下搅拌15分钟。

[0174] 此外，本实施例及以下实施例中的f1噬菌体的浓度是作为以所售卖的f1噬菌体的混悬液的浓度设为100％时的稀释率进行表示。

[0175] <反应混合溶液的送液>

[0176] 向流体设备送液包含表面活性剂的上述溶液A 20μL，导入至各孔中。接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，将各孔密封。由此，在孔内密封了每1孔为1个以下的f1噬菌体。

[0177] 同样地，作为对照实验，向流体设备送液不包含表面活性剂的上述溶液B 20μL，导入至各孔中。接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，将各孔密封。

[0178] <核酸检测反应>

[0179] 将上述流体设备安装在加热板上，在66℃下使其反应15分钟。由此，发生利用等位基因探针及Invader寡核苷酸进行的噬菌体内包DNA的识别、利用FEN-1进行的等位基因探针的剪切、所释放出的等位基因探针片段在FRET Cassette上的结合、利用FEN-1进行的FRET Cassette的剪切、以及Alexa488的荧光信号的产生。

[0180] <孔的荧光观察>

[0181] 在66℃下加热15分钟后，利用荧光显微镜BZ-710(KEYENCE公司)使用10倍的物镜拍摄流体设备中的各孔的通过核酸检测反应所获得的荧光信号的荧光图像。曝光时间使用GFP的荧光滤波器设为3000msec。

[0182] 将实施例1的结果示于图6中。

[0183] 如图6(a)所示，在将使用侵入反应试剂(ICA试剂)和Bugbuster的混合溶液及f1噬菌体所制备的溶液A供至流体设备时，在流体设备的孔内观察到了多个作为检测对象的噬菌体内包DNA来源的荧光信号。

[0184] 另一方面，如图6(b)所示，在将不添加Bugbuster而使用侵入反应试剂(ICA试剂)和f1噬菌体所制备的溶液B供至流体设备时，在流体设备的孔内几乎未观察到作为检测对象的噬菌体内包DNA来源的荧光信号。

[0185] 根据本实施例，在添加了Bugbuster时，检测到噬菌体内部的核酸(f1phage oligo、f1噬菌体内包DNA)，认为从噬菌体内部将核酸抽提出来了。

[0186] 由此结果可知，仅通过侵入反应试剂，噬菌体是不会崩解的，若使用包含Bugbuster等表面活性剂的试剂，则噬菌体会发生崩解。

[0187] 此外认为，制备混合有按照上述侵入反应试剂与作为包含表面活性剂的核酸抽提试剂的Bugbuster达到1:1的方式制备的溶液和上述f1噬菌体(1％)的溶液(溶液A)，在样品管内、室温下搅拌15分钟后的时间点，虽然不过是部分的，但f1噬菌体的崩解已经开始，f1噬菌体内部核酸的抽提已经开始了。

[0188] [实施例2]

[0189] (流体设备的孔内的噬菌体的崩解、核酸抽提及核酸检测的研究)

[0190] 本实施例中，不是预先进行噬菌体的崩解及内部核酸的抽提之后再向流体设备导入测定试样，而是在流体设备的内部进行噬菌体的崩解，研究能否在流体设备的内部检测噬菌体内部的核酸。

[0191] 本实施例中，与实施例1同样地，作为结构体使用作为病毒之一种的f1噬菌体(试剂名:大肠杆菌噬菌体f1(Escherichia coli phage f1)、独立行政法人制品评价技术基础机构、型号:NBRC20010)(作为内包DNA，具有“序列号1”的碱基序列)(参照表1)。

[0192] 本实施例中，研究流体设备的孔内的噬菌体的崩解，在流体设备的孔内将核酸、具体地说f1噬菌体内包DNA作为靶分子，进行靶分子的检测。

[0193] (核酸检测试剂的制备)

[0194] 实施例2中的侵入反应试剂使用表1所示的试剂，含有0.5μM等位基因探针1(序列号2)、1μM Invader寡核苷酸1(序列号3)(ICA寡核苷酸1)(以上为Fasmac公司)、4μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(序列号4)(日本Bio Services公司)(荧光底物)、0.1mg/mL FEN-1、50mM Tris-HCl(pH为8.5)、20mM $MgCl_2$、0.05％Tween20。此外，这些侵入反应试剂中的各成分的浓度是实施例2的侵入反应试剂中的终浓度。

[0195] 制备按照上述侵入反应试剂与作为包含表面活性剂的核酸抽提试剂的Bugbuster(Merck Millipore公司制)达到1:1的方式所制备的溶液(溶液C)。

[0196] <混合溶液的送液>

[0197] 向流体设备中送液将作为病毒样品的上述f1噬菌体的混悬液和混合有上述侵入反应试剂及Bugbuster的溶液C进行混合而成的溶液20μL，导入至各孔中。

[0198] 此外，按照流体设备中的f1噬菌体的最终浓度达到0％(未添加f1噬菌体)、0.1％、0.5％、1.0％的方式，以4种f1噬菌体浓度送液f1噬菌体混悬液和溶液C的混合液。与上述实施例1同样地，f1噬菌体的浓度作为以所售卖的f1噬菌体的混悬液的浓度设为100％时的稀释率进行表示。

[0199] 另外，将溶液C的各成分的浓度调整为在与f1噬菌体的混悬液刚混合后不会发生f1噬菌体的崩解、在导入至孔内之后通过进行后述的核酸抽提反应而发生f1噬菌体的崩解那样的浓度。

[0200] 接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，对各孔进行密封。

[0201] <核酸抽提反应>

[0202] 将上述流体设备安装在加热板上，在66℃下使其反应30分钟。由此，在被密封的孔内，f1噬菌体的衣壳结构被破坏，DNA被抽提出来。

[0203] <核酸检测反应>

[0204] 通过上述流体设备的加热，与实施例1同样，侵入法的各反应进行，最终产生Alexa488的荧光信号。

[0205] <孔的荧光观察>

[0206] 在66℃下加热30分钟之后，利用荧光显微镜BZ-710(KEYENCE公司)使用10倍的物镜拍摄流体设备中的各孔的通过核酸检测反应获得的荧光信号的荧光图像。曝光时间使用GFP的荧光滤波器设为3000msec。

[0207] 将实施例2的结果示于图7及图8。

[0208] 如图7及图8所示，在作为靶分子的f1噬菌体内包DNA所存在的孔中，观察到了靶分子来源的荧光信号。

[0209] 另外，如图7的荧光图像及图8的图表所示，依赖于f1噬菌体的浓度的增加，观察到荧光的孔的数量增加。

[0210] 通过本实施例认为，依赖于f1噬菌体的浓度，f1噬菌体被导入至孔中，检测到了f1噬菌体内部的核酸。

[0211] 换而言之，通过上述的方法，可以抑制f1噬菌体中的DNA的损失、可以精度良好地检测作为靶分子的核酸。

[0212] [实施例3]

[0213] (珠粒对噬菌体的结合、珠粒结合噬菌体向孔内的导入及病毒(噬菌体)内核酸的检测)

[0214] 作为结构体使用作为病毒之一种的f1噬菌体(试剂名：大肠杆菌噬菌体f1(Escherichia coli phage f1)、独立行政法人制品评价技术基础机构、型号：NBRC20010)(作为内包DNA，具有“序列号1”的碱基序列)(参照表1)，进行作为靶分子的病毒内核酸的检测。另外，结构体在孔中的导入中，将具有抗体作为特异性结合物质的磁性珠粒作为捕获物使用。

[0215] <核酸检测试剂的制备>

[0216] 实施例3中的侵入反应试剂使用表1所示的试剂，含有0.5μM等位基因探针1((f1噬菌体)Allele probe1)(序列号2)、1μM Invader寡核苷酸1(序列号3)(ICA寡核苷酸1)(以上为Fasmac公司)、4μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(序列号4)(日本Bio Services公司)(荧光底物)、0.1mg/mL FEN-1、50mM Tris-HCl(pH为8.5)、20mM $MgCl_2$、0.05％Tween20。此外，这些侵入反应试剂中的各成分的浓度是实施例3的侵入反应试剂中的终浓度。

[0217] 制备按照上述侵入反应试剂与作为包含表面活性剂的核酸抽提试剂的Bugbuster(Merck Millipore公司制)达到1:1的方式所制备的溶液(溶液D)。

[0218] <抗体固定化磁性珠粒的制备>

[0219] 为了将噬菌体抗体固定在磁性珠粒上，在羧基修饰磁性珠粒(Magnosphere、LC300、JSR公司)溶液中添加抗f1噬菌体抗体(型号“Anti-M-13Phage Coat Protein”、Funakoshi公司)，混合成100μL，使用旋转器使其反应30分钟，进而添加缩合剂EDC使其反应3小时，进行抗体在羧基磁性珠粒上的固定化。

[0220] 为了将反应后未反应的抗体和试剂除去，使用磁性支架对抗体固定化羧基磁性珠粒进行磁捕集。接着，反复进行3次利用PBS-T(含有0.1％Tween20的PBS)的洗涤，制备抗体固定化羧基磁性珠粒。由此，制备具有特异性结合物质的捕获物。

[0221] <样品及抗体固定化珠粒的反应>

[0222] 按照总量达到100μL的方式将作为结构体的f1噬菌体(0％或1％)、作为具有特异性结合物质的捕获物的100μg/mL抗体固定化羧基磁性珠粒进行混合，在旋转器上、室温下反应1小时，形成复合体。

[0223] 反应后，使用磁性支架对所获得的磁性珠粒进行磁捕集，将除去上清及添加含有0.1％Tween的PBS(PBS-T)的操作反复进行3次来进行洗涤，最后将上清除去，获得复合体。

[0224] 该复合体通过固定在珠粒上的抗f1噬菌体抗体识别并结合于f1噬菌体表面的包被蛋白而形成。洗涤所得的复合体之后使用PBS进行稀释，制备反应混合液。

[0225] <反应混合溶液的送液>

[0226] 向流体设备中送液将上述反应混合液(通过珠粒回收的f1噬菌体0％、1％)和本实施例中的侵入反应试剂与Bugbuster为1:1的溶液D进行混合而成的溶液20μL，导入至各孔

中。接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，对各孔进行密封。由此，当包含通过珠粒回收的f1噬菌体时，每1个孔为1个以下的f1噬菌体被密封在孔内。

[0227] 〈孔的观察〉

[0228] 检测反应后，利用显微镜BZ-710使用10倍的物镜对流体设备的明视野图像进行拍摄。在导入有珠粒的孔中，如图9右侧所示，在明视野图像上观察到黑色。

[0229] 〈核酸抽提反应〉

[0230] 将上述设备安装在加热板上，在66℃下反应15分钟。由此，在经密封的孔内，f1噬菌体的衣壳结构被破坏、DNA被抽提出来。

[0231] 〈核酸检测反应〉

[0232] 通过上述66℃、15分钟的加热，与实施例1同样，侵入反应的各反应进行，最终产生Alexa488的荧光信号。

[0233] 〈孔的荧光观察〉

[0234] 在66℃下加热15分钟之后，利用显微镜BZ-710(KEYENCE公司)使用10倍的物镜对流体设备中各孔的利用核酸检测反应所获得的荧光信号的荧光图像进行拍摄。曝光时间使用GFP的荧光过滤器设为3000msec。

[0235] 将实施例3的结果示于图9中。

[0236] 如图9的右侧(明视野图像)所示，黑色显示的孔为导入有珠粒的孔。

[0237] 另外，如图9左侧的1％的荧光图像所示那样，在作为靶分子的f1噬菌体内包DNA所存在的孔中，观察到了靶分子来源的荧光信号。

[0238] 通过上述方法，抑制了f1噬菌体中的DNA的损失、精度良好地检测了作为靶分子的核酸。进而，通过将具有抗体作为特异性结合物质的磁性珠粒作为捕获物进行使用，高效地将结构体导入至孔中。

[0239] 另外，抗f1噬菌体抗体对f1噬菌体表面的包被蛋白进行识别。因此也可以说，通过上述方法，不仅检测到了f1噬菌体内所含的靶分子，而且通过使用捕获物还检测到了f1噬菌体表面的靶分子。

[0240] [实施例4]

[0241] (各种噬菌体崩解的手法的研究)

[0242] 本实施例中，使用各种手法研究噬菌体是否能够崩解。

[0243] 作为结构体，使用作为病毒之一种的f1噬菌体(试剂名：大肠杆菌噬菌体f1(Escherichia coli phage f1)、独立行政法人制品评价技术基础机构、型号：NBRC20010)(作为内包DNA，具有“序列号1”的碱基序列)(参照表1)，研究使用各种手法的噬菌体崩解，及以核酸、具体地说f1噬菌体内包DNA作为靶分子，进行靶分子的检测。

[0244] (核酸检测试剂的制备)

[0245] 为了进行作为ICA反应之一种的数字侵入反应，作为核酸检测试剂，制备侵入反应试剂(ICA反应试剂)。

[0246] 实施例4中的侵入反应试剂使用表1所示的试剂，按照含有0.5μM等位基因探针1((f1噬菌体)Allele probe1)(序列号2)、1μM Invader寡核苷酸1(序列号3)(ICA寡核苷酸1)(以上为Fasmac公司)、2μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(序列号4)(日本Bio Services公司)(荧光底物)、0.1mg/mL FEN-1(Flap endonuclease-1)、50mM MOPS(3-吗啉

代丙烷磺酸缓冲液)(pH为7.9)及20mM $MgCl_2$的方式进行制备。

[0247] 此外,这些侵入反应试剂中的各成分的浓度是实施例4的侵入反应试剂中的终浓度。

[0248] <利用各种手法进行的噬菌体的崩解研究、及核酸抽提反应的研究>

[0249] 利用以下的条件,进行噬菌体的崩解的研究。

[0250] • 试样1:对噬菌体(10%)施加Sonication(探针型超声波)1分钟。

[0251] • 试样2:在噬菌体(10%)中添加Bugbuster(50%),在37℃下搅拌30分钟。

[0252] • 试样3:在70℃下加热噬菌体(10%)30分钟。

[0253] • 试样4:在噬菌体(10%)中添加Bugbuster(50%),在70℃下搅拌30分钟。

[0254] 接着,在样品管中混合上述侵入反应试剂和试样1～4,制备噬菌体浓度为1%、容量达到10μL的溶液(试样1A～4A)。

[0255] 此外,作为阴性对照,准备仅为侵入反应试剂(试样5A)、及侵入反应试剂和噬菌体的混合溶液(试样6A),进行评价。

[0256] 另外,作为阳性对照,准备在侵入反应试剂中添加预先从噬菌体中抽提出的噬菌体来源核酸(phage oligo,噬菌体寡核苷酸)(序列号1)达到30pM的溶液(试样7A),进行评价。

[0257] 使用实时PCR装置Light Cycler(Roche Tissue Diagnostics株式会社制)在66℃下对这些试样1A～7A的试样溶液处理60分钟。

[0258] 将实施例4的结果示于图10、图11中。

[0259] 此外,图11为图10中至1200秒附近的放大图。

[0260] 图10及图11的图表中,横轴为处理时间(秒)、纵轴为荧光强度。

[0261] 图10、图11中的项目和试样序号的对应如下。

[0262] • 试样1A:ICA+噬菌体+sonic

[0263] • 试样2A:ICA+噬菌体+bug

[0264] • 试样3A:ICA+噬菌体+热

[0265] • 试样4A:ICA+噬菌体+bug+热

[0266] • 试样5A:ICA

[0267] • 试样6A:ICA+噬菌体

[0268] • 试样7A:ICA+噬菌体+噬菌体寡核苷酸30pM

[0269] 在经超声波处理的试样1A、噬菌体中添加有包含表面活性剂的Bugbuster的试样2A、对噬菌体施加了70℃的热处理的试样3A、在噬菌体中添加包含表面活性剂的Bugbuster且在70℃下加热处理了30分钟的试样4A、及阳性对照的试样7A中,均是从300秒、600秒这样处理时间短的阶段开始,荧光强度有所增加。

[0270] 在对噬菌体施加了超声波处理的试样1A、及在噬菌体中添加有包含表面活性剂的Bugbuster且进行了70℃的热处理的试样4A中,观察到了特别短时间内的荧光强度的增加。

[0271] 作为阴性对照,在仅将侵入反应试剂供至Light Cycler的试样5A中,几乎未观察到荧光强度的增加。

[0272] 此外,由于使用Light Cycler在66℃下进行处理,因此在试样6A(ICA+噬菌体)中,随着时间的经过也观察到了荧光强度的增加,但与试样1A～4A相比,是缓和的增加。

[0273] 与试样5A及试样6A相比，在利用各种手法使噬菌体崩解的试样1A～4A中，观察到了短时间内的荧光强度的增加。

[0274] 由这些结果可知，为了使噬菌体崩解，除了利用表面活性剂进行处理之外，例如超声波处理、热处理等多个手法、及多个手法的组合也是有效的。

[0275] 根据本实施例可知，通过组合上述多个手法，可以在短时间内进行噬菌体的溶解及噬菌体内部的核酸抽提。

[0276] [实施例5]

[0277] (病毒内核酸的检测、利用大肠杆菌的溶菌进行的内部核酸的检测)

[0278] 本实施例中，利用使用了噬菌体和大肠杆菌的溶菌，进行检测噬菌体来源的核酸的研究。

[0279] 作为结构体，使用作为病毒之一种的f1噬菌体(试剂名：大肠杆菌噬菌体f1(Escherichia coli phage f1)、独立行政法人制品评价技术基础机构、型号:NBRC20010)(作为内包DNA，具有“序列号1”的碱基序列)(参照表1)，检测病毒内核酸。另外，作为靶分子的病毒内核酸的抽提中，使用以大肠杆菌(Escherichia coli)(独立行政法人制品评价技术基础机构、型号:NBRC13965)为脂质双分子层供体的生物学手法。

[0280] <样品、脂质双分子层供体的混合液的制备>

[0281] 作为病毒样品，按照总量达到100μL的方式将终浓度为1％的f1噬菌体(NBRC20010)复原水溶液、及终浓度为1％的大肠杆菌(NBRC13965)的复原水溶液进行混合。

[0282] 通过f1噬菌体结合于位于大肠杆菌的细胞表面的病毒受体，形成f1噬菌体和大肠杆菌的复合体。

[0283] 此外，f1噬菌体的终浓度及大肠杆菌的终浓度为流体设备中的终浓度。

[0284] (核酸检测试剂的制备)

[0285] 为了进行作为ICA反应之一种的数字侵入反应，作为核酸检测试剂，制备侵入反应试剂(ICA反应试剂)。

[0286] 实施例5中的侵入反应试剂使用表1所示的试剂，按照含有0.5μM等位基因探针1((f1噬菌体)Allele probe1)(序列号2)、1μM Invader寡核苷酸1(序列号3)(ICA寡核苷酸1)(以上为Fasmac公司)、4μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(序列号4)(日本Bio Services公司)(荧光底物)、0.1mg/mL FEN-1、50mM Tris-HCl(pH为8.5)、20mM $MgCl_2$及0.05％Tween20的方式进行制备。

[0287] 此外，这些侵入反应试剂中各成分的浓度是实施例5的流体设备内的侵入反应试剂中的终浓度。

[0288] <混合溶液的送液>

[0289] 在流体设备中送液按照上述混合液(f1噬菌体与大肠杆菌的混合液)与上述侵入反应试剂达到1:1的方式混合的溶液20μL，导入至各孔中。接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，对各孔进行密封。由此，每1个孔为1个以下的f1噬菌体被密封在孔内。

[0290] 另外，在孔密封后，在室温下静置流体设备60分钟。

[0291] 此外，作为阴性对照，对代替上述反应混合液(f1噬菌体与大肠杆菌的反应混合液)、不使用大肠杆菌而仅使用f1噬菌体的溶液，也进行同样的操作。

[0292] 即，向流体设备中送液按照f1噬菌体与上述侵入反应试剂达到1:1的方式混合的

溶液20μL,导入至各孔中。接着,作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL,对各孔进行密封。

[0293] <核酸抽提反应、核酸的检测反应>

[0294] 将孔密封,使其反应60分钟,从而作为结构体的f1噬菌体识别并结合于大肠杆菌的表面膜结构(蛋白质、脂质双分子层),作为靶分子的DNA从f1噬菌体被注入到大肠杆菌内。即,在60分钟的反应期间,逐渐地形成f1噬菌体与大肠杆菌的复合体。进而,DNA在大肠杆菌内被复制,生成噬菌体。由于在菌体内生成的f1噬菌体,大肠杆菌发生崩解,注入并被复制的DNA释放出来。

[0295] 另外,使上述流体设备在加热板上、66℃下反应30分钟。由此,识别释放出的f1噬菌体DNA,与实施例1同样,侵入反应的各反应进行,最终产生Alexa488的荧光信号。

[0296] <孔的荧光观察>

[0297] 如上所述,在66℃下加热流体设备30分钟后,利用荧光显微镜BZ-710(KEYENCE公司)使用10倍的物镜对流体设备中各孔的通过核酸检测反应获得的荧光信号的荧光图像进行拍摄。曝光时间使用GFP的荧光滤波器设为3000msec。

[0298] 将实施例5的荧光图像撮影的结果示于图12。

[0299] 如图12的左侧所示,在f1噬菌体和大肠杆菌所存在的孔中,观察到了靶分子来源的荧光信号。

[0300] 如图12的荧光图像所示,在使f1噬菌体感染于大肠杆菌而导入至流体设备时(图12左侧),相比较于仅将f1噬菌体导入至流体设备时(图12右侧),检测到了更多的DNA。

[0301] 认为该结果的原因在于,f1噬菌体感染大肠杆菌,在大肠杆菌中,f1噬菌体来源的DNA被扩增,最终大肠杆菌发生溶菌,作为靶分子的f1噬菌体DNA被释放,由此观察到了靶分子来源的更多的荧光信号。

[0302] 另外,如图12的右侧所示,在不添加大肠杆菌、仅将f1噬菌体导入至流体设备时,稍微观察到了荧光信号。认为在未添加大肠杆菌的例子中,由于加热和缓冲液中所含表面活性剂Tween20的影响,极少量的DNA被释放到孔内。

[0303] 通过上述方法,抑制了f1噬菌体中的DNA的损失、精度良好地检测了作为靶分子的核酸。进而,利用具有脂质双分子层的大肠杆菌,在孔的内部将作为靶分子的DNA从作为结构体的病毒中抽提出来。

[0304] 另外,由此可知,即便是如噬菌体那样膜较硬的对象,通过暂时将DNA转移至其它物质(例如大肠杆菌)中后进行加热等,也可容易地对噬菌体内部的DNA进行检测。

[0305] [实施例6]

[0306] (细胞内核酸的检测1)

[0307] 作为结构体,使用人结肠腺癌细胞HT29,将核酸、具体地说将作为DNA的EGFR(表皮生长因子受体)基因的包含单核苷酸多态性(野生型)的区域作为靶分子,进行靶分子的检测。

[0308] <HT29细胞的PKH染色>

[0309] 为了确认HT29向流体设备的导入,制备对HT29细胞进行了PKH染色的物质。

[0310] 此外,HT29细胞的PKH染色顺序如下。

[0311] 将HT29培养细胞剥离,制备混悬液。另外,以3500rpm对混悬液离心分离1分钟,将

细胞回收。接着，在所回收的细胞中添加充分量的Dilluent C试剂。在添加有Dilluent C试剂的细胞中添加PKH溶液，在室温下静置10分钟。

[0312] 之后，以3500rpm对添加有PKH溶液的细胞混悬液离心分离1分钟，将经PKH染色的细胞进行回收，重悬至DMEM培养基液中。

[0313] 将重悬至DMEM培养基液中的PKH染色HT29细胞与后述的侵入反应试剂混合，用于向流体设备的导入。

[0314] 此外，对HT29细胞进行了PKH染色的细胞按照之后导入的流体设备中的细胞数为5.16×10^5cell/mL的方式进行制备。

[0315] <核酸检测试剂的制备>

[0316] 为了进行作为ICA反应之一种的数字侵入反应，作为核酸检测试剂，制备侵入反应试剂。本实施例中的侵入反应试剂使用表1所示的试剂，含有0.5μM等位基因探针2(序列号5)、1μM Invader寡核苷酸2(序列号6)(ICA寡核苷酸2)(以上为Fasmac公司)、4μM FRET Cassette1(Alexa488-BHQ)(日本Bio Services公司)(荧光底物)(序列号4)、0.1mg/mL FEN-1、50mM Tris-HCl(pH为8.5)、20mM $MgCl_2$、及0.05％Tween20。此外，这些侵入反应试剂中的各成分的浓度是实施例6的流体设备中的侵入反应试剂中的终浓度。

[0317] <反应混合溶液的送液>

[0318] 向流体设备中送液混合有经PKH染色的人结肠腺癌细胞HT29和上述侵入反应试剂的溶液(细胞数：5.16×10^5cell/mL)20μL，导入至各孔中。接着，作为密封液送液FC-40(Sigma公司)150μL，对各孔进行密封(图14、图15)。由此，每1个孔为1个以下的HT29细胞被密封在孔内。

[0319] 此外，作为对照实验，对于除了不添加侵入反应试剂以外、在相同的条件下将经PKH染色的人结肠腺癌细胞HT29溶液(细胞数：5.16×10^5cell/mL)送液至流体设备、将HT29细胞导入至孔内的情况也进行了研究(图13)。

[0320] <核酸抽提反应>

[0321] 将上述流体设备安装在加热板上，在66℃下反应15分钟。由此，在被密封的孔内，HT29细胞的细胞膜结构被破坏、基因组DNA被抽提出来。

[0322] <核酸检测反应>

[0323] 将抽提反应后的上述流体设备安装在加热板上，在66℃下反应15分钟。由此发生利用等位基因探针及Invader寡核苷酸进行的EGFR基因区域的识别、利用FEN-1进行的等位基因探针的剪切、释放出的等位基因探针片段在FRET Cassette上的结合、利用FEN-1进行的FRET Cassette的剪切、以及Alexa488的荧光信号的产生。

[0324] 此外，作为对照实验，对不进行上述流体设备的66℃、15分钟的加热的情况也进行了研究(图14)。

[0325] <孔的荧光观察及明视野观察>

[0326] 在66℃下加热15分钟之后，利用荧光显微镜BZ-710(KEYENCE公司)使用10倍物镜对流体设备中的各孔的通过核酸检测反应获得的荧光信号的荧光图像进行拍摄。

[0327] 曝光时间分别是，在Alexa488的荧光观察时使用GFP的荧光过滤器设为3000msec，在PKH的荧光观察时使用Texas Red的荧光滤波器设为2000msec。

[0328] 另外，在孔的密封后，还利用显微镜BZ-710使用10倍物镜拍摄了明视野图像。

[0329] 将实施例6的结果示于图13～15。

[0330] 图13为未添加侵入反应试剂的例子，为PKH染色HT29细胞的荧光图像。

[0331] 如图13所示，通过经PKH染色，可知细胞被导入至孔内。

[0332] 图14为将混合有经PKH染色的人结肠腺癌细胞HT29和上述侵入反应试剂的溶液导入至流体设备、在加热流体设备之前的(未进行66℃、15分钟的加热时的)荧光图像，仅检测到PKH来源的荧光。

[0333] 图15为将混合有经PKH染色的人结肠腺癌细胞HT29和上述侵入反应试剂的溶液导入至流体设备、加热流体设备之后的荧光图像，PKH来源的荧光及Alexa488的荧光均被检测到。

[0334] 如图13所示，通过对HT29细胞进行PKH染色，确认到了HT29细胞确实存在于流体设备的孔内。

[0335] 另外，Alexa488的荧光可以在存在于HT29细胞内部的DNA进入到了溶液中时检测到。

[0336] 因此，如图15所示，由于检测到了Alexa488，因此可知HT29细胞的细胞膜已经被破坏。

[0337] 本实施例中，如果将PKH的荧光图像与Alexa488的荧光图像重叠(图13～图15中的叠置的图像)，则未混合包含表面活性剂的侵入反应试剂时(图13)、和即便混合包含表面活性剂的侵入反应试剂但是在进行加热前时，都是仅能检测到PKH。

[0338] 但是，如图15所示，在加热后，在与检测到PKH的孔相同的孔中检测到了Alexa488的荧光。

[0339] 因此认为，在添加表面活性剂且进行了加热的图15的例子中，在HT29细胞所存在的孔中，侵入反应进行，检测到了HT29细胞内部的DNA。

[0340] 由这些结果可知，根据本实施例，通过加热将HT29细胞破坏，可以检测到内部的核酸，可以从存在于孔内部的细胞中将核酸抽提出来。

[0341] 如此，在作为靶分子的包含单核苷酸多态性的EGFR基因区域所存在的孔中，观察到了靶分子来源的荧光信号。

[0342] 可知，通过上述方法，能够抑制HT29细胞中的基因组DNA的损失、能够精度良好地检测作为靶分子的核酸。

[0343] 以上说明了本发明的实施方式，但实施方式的各构成及它们的组合等是一个例子，在不脱离本发明主旨的范围内，能够进行构成的附加、省略、置换及其它变更。另外，本发明并不受实施方式所限定。

[0344] 产业上的可利用性

[0345] 根据本发明，可以提供与将靶分子从结构体中抽提后再使用流路分配到微阵列的各孔中的现有方法相比、能够精度良好地检测靶分子的技术。

[0346] 符号说明

[0347] 100 流体设备

[0348] 101 盖材

[0349] 102 送液口

[0350] 103 废液口

[0351] 104 基材

[0352] 105 孔

[0353] 106 流路

[0354] 107 试剂液

[0355] 108 填充在孔中的试剂液

[0356] 201 密封液

[0357] 202 微小分区

[0358] 301 发出信号的微小液滴

[0359] 11 靶分子

[0360] 12 结构体

[0361] 12’ 抽提处理后的结构体

[0362] 13 特异性结合物质

[0363] 14 捕获物

序列表

<110> 凸版印刷株式会社

<120> 靶分子的检测方法

<130> P20171342

<150> JP 2017-222128
<151> 2017-11-17

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 140
<212> DNA
<213> 大肠杆菌噬菌体 f1

<400> 1
[0001] acgttaaaca aaaaatcgtt tcttatttgg attgggataa ataatatggc tgtttatttt 60

gtaactggca aattaggctc tggaaagacg ctcgttagcg ttggtaagat tcaggataaa 120

attgtagctg ggtgcaaaat 140

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 等位基因探针 1

<400> 2
cgcgccgagg gcctaatttg ccagttac 28

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ICA 寡核苷酸 1

<400> 3
gctaacgagc gtctttccag at 22

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Alexa488-BHQ

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n 是利用 Alexa488-NHS 修饰末端氨基

[0002] <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n 是 BHQ1-dT 亚磷酰胺

<400> 4
nttctnagcc ggttttccgg ctgagacctc ggcgcg 36

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 等位基因探针 2

<400> 5
cgcgccgagg cgcagctcat gccc 24

<210> 6

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

[0003] <220>
<223> ICA 寡核苷酸 2

<400> 6
ccaccgtgca ctcatcaa 18

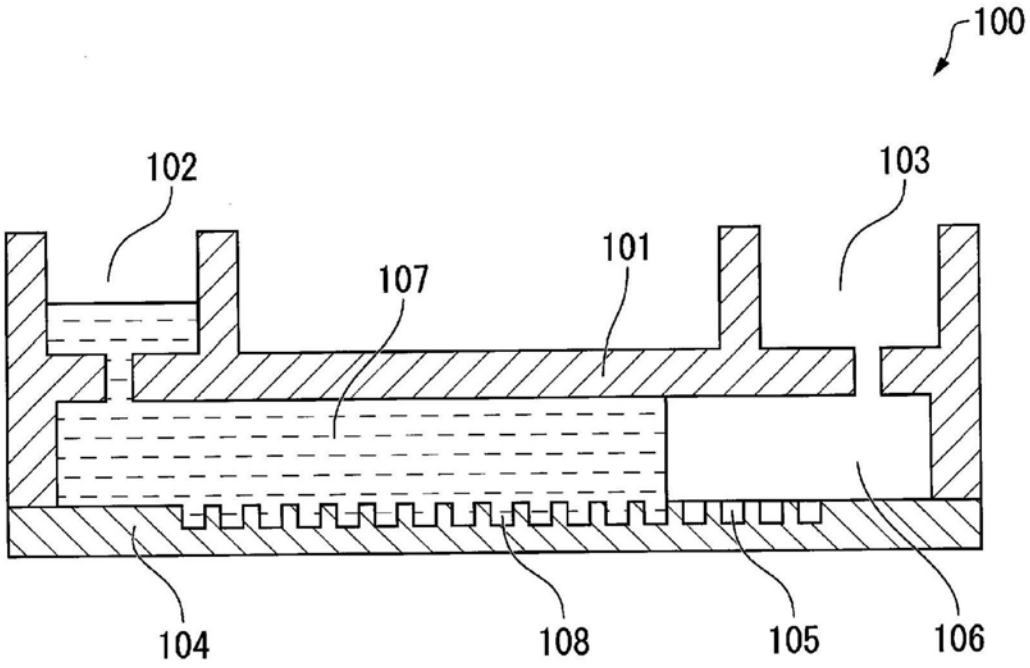

100
102
103
101
107
104
108
105
106

图1

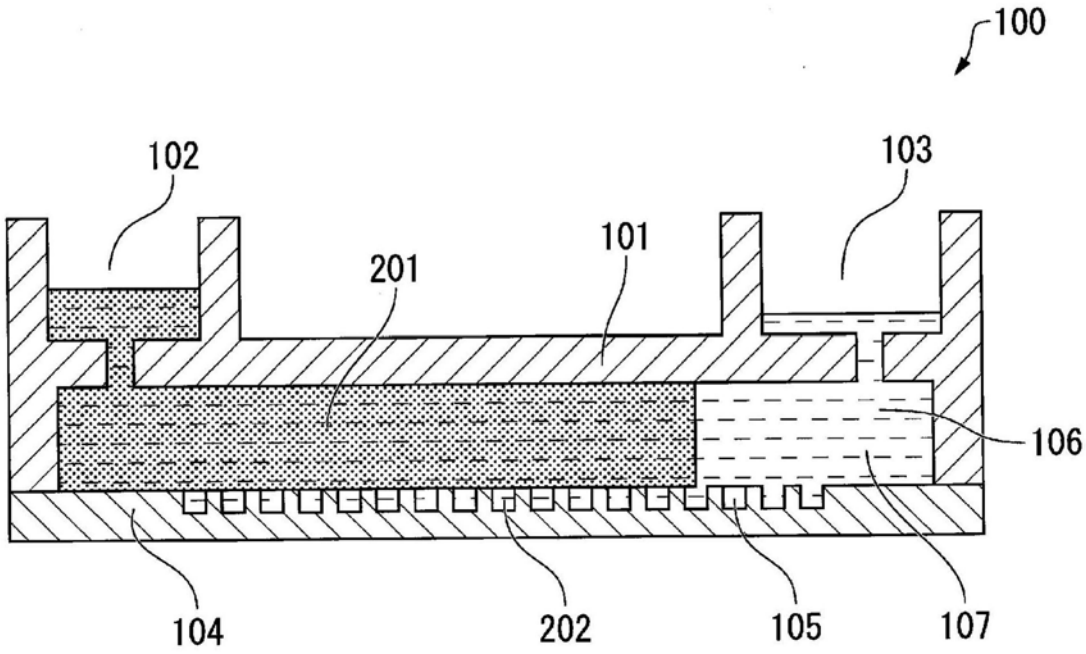

100
102
103
101
201
106
104
202
105
107

图2

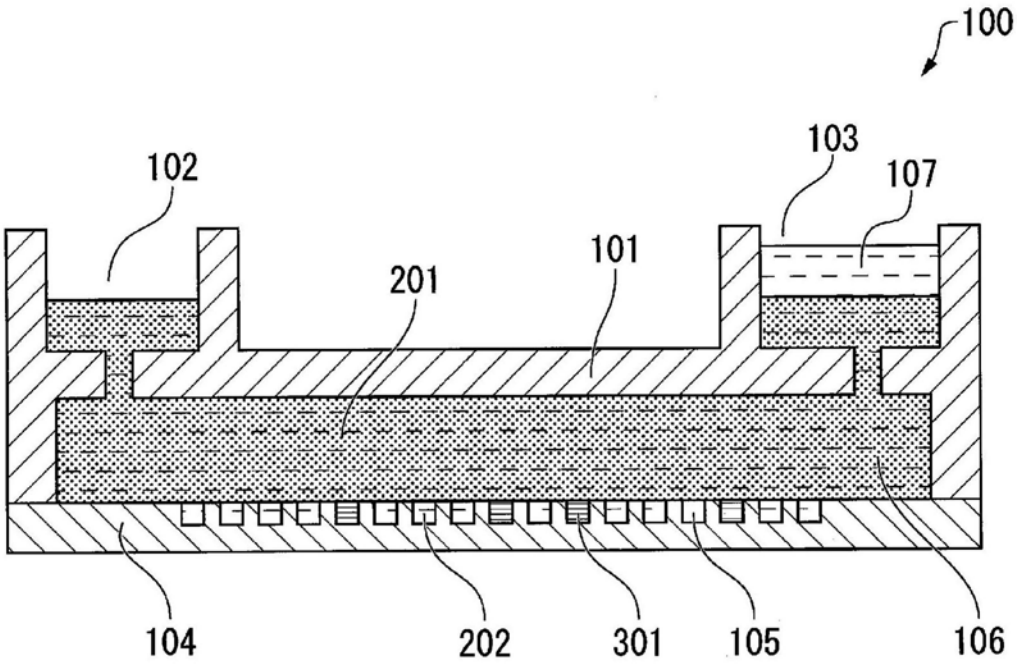

100
102
103
107
101
201
104
202
301
105
106

图3

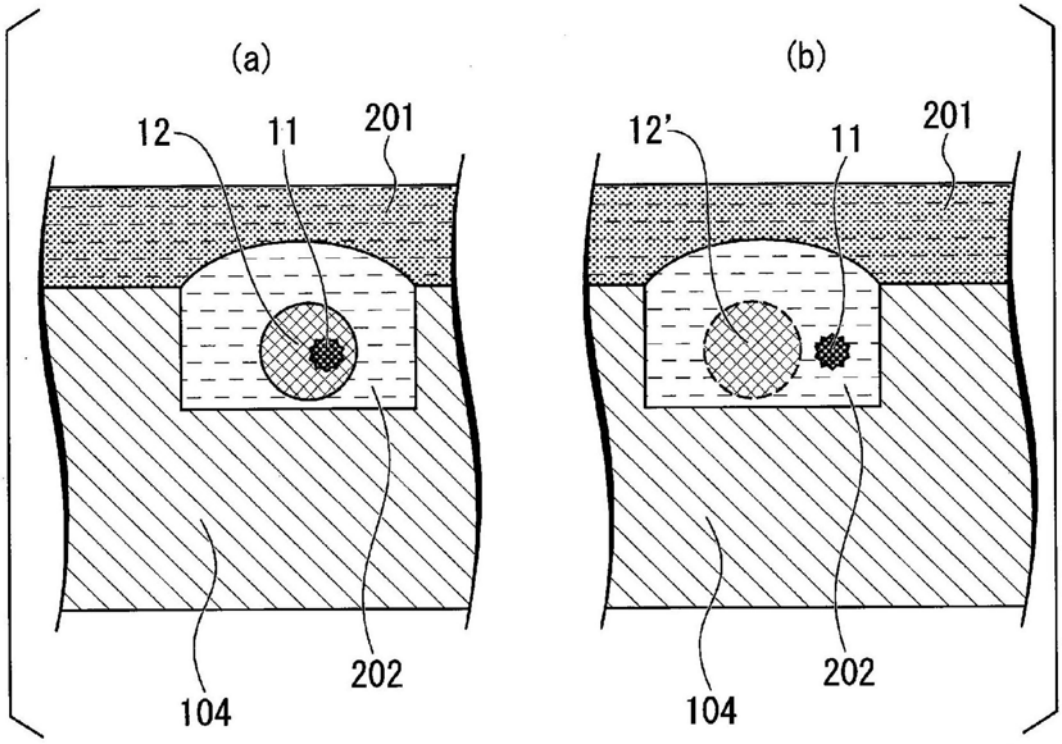

(a)
12
11
201
104
202
(b)
12'
11
201
104
202

图4

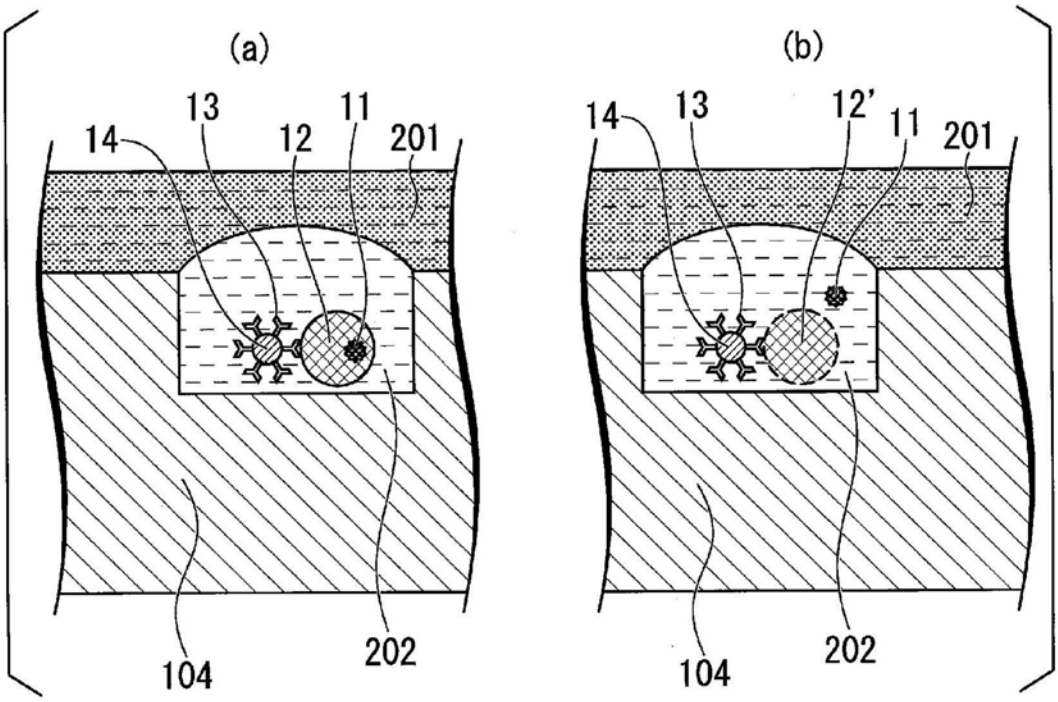

(a)
13
11
14
12
201
104
202
(b)
14
13
12'
11
201
104
202

图5

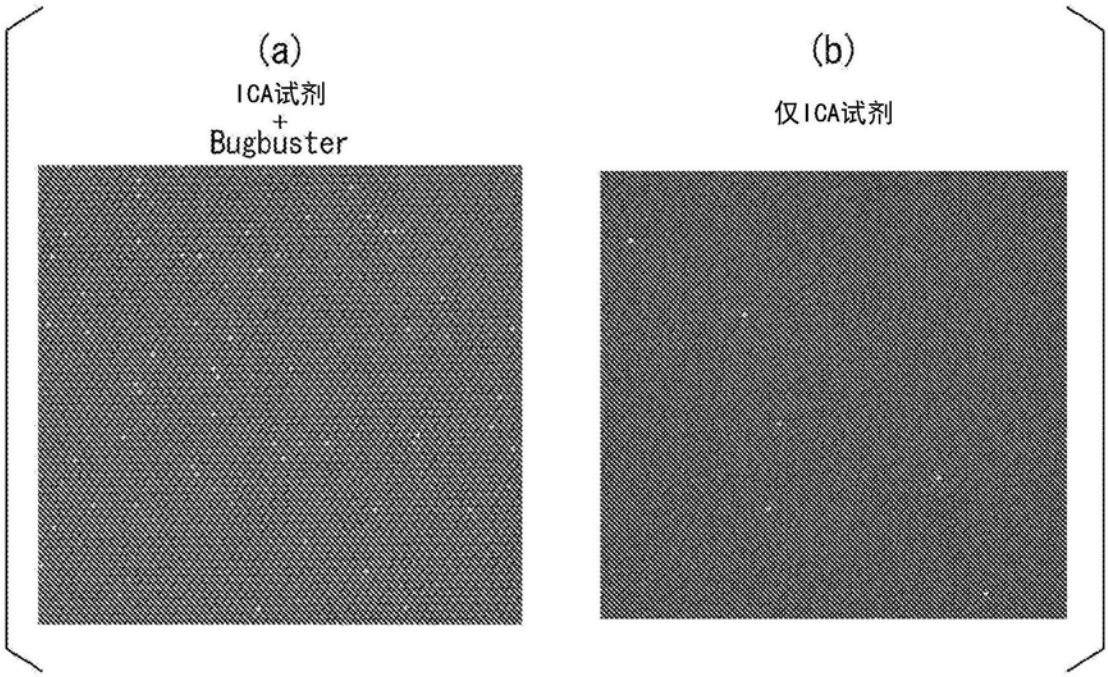

(a)
ICA试剂
+
Bugbuster
(b)
仅ICA试剂

图6

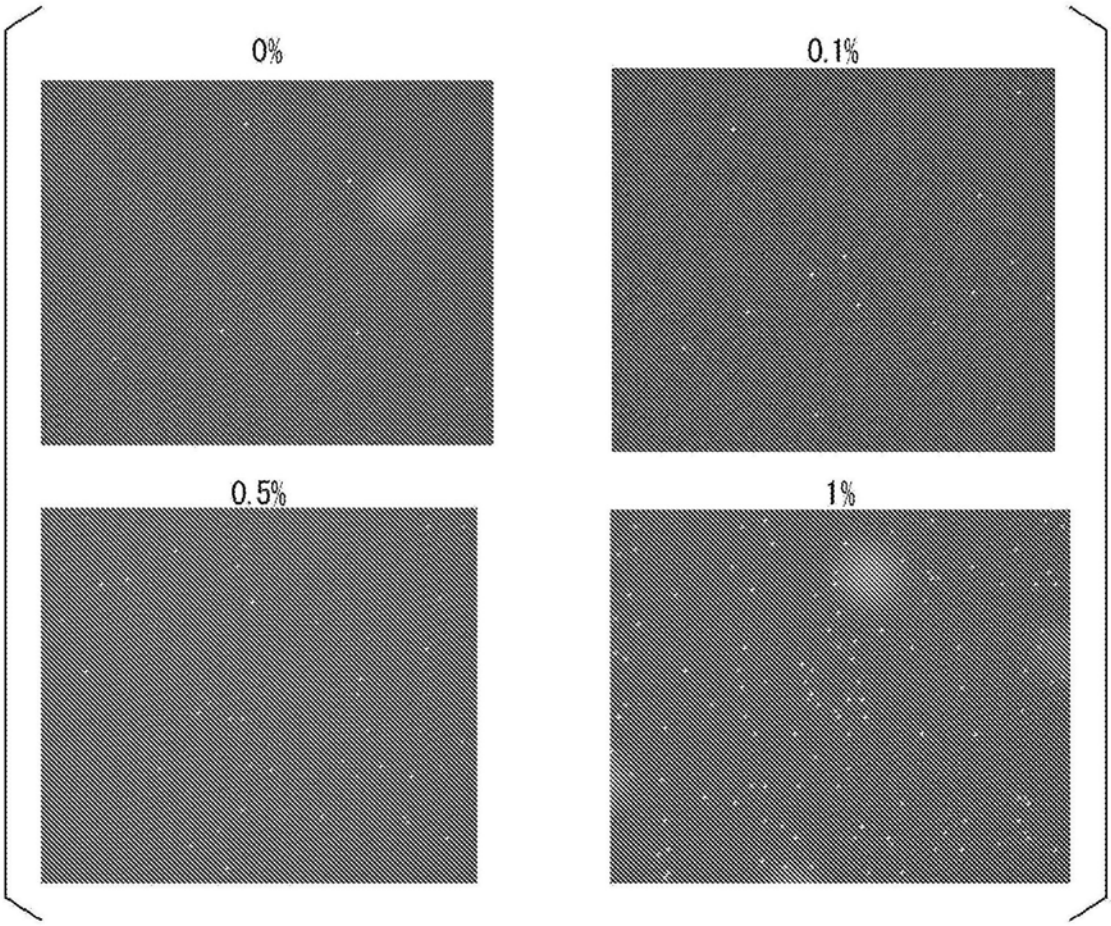

0%
0.1%
0.5%
1%

图7

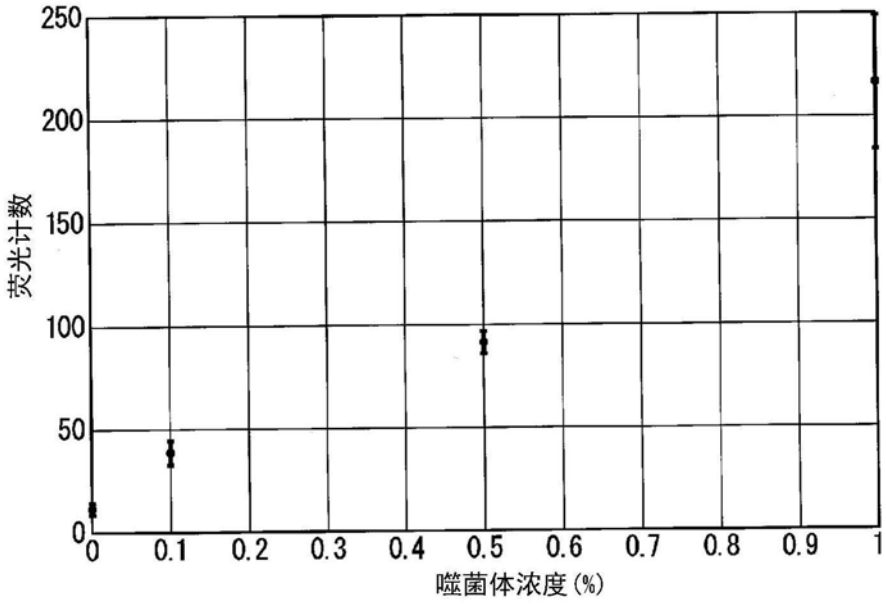

250
200
150
100
50
0
荧光计数
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
噬菌体浓度(%)

图8

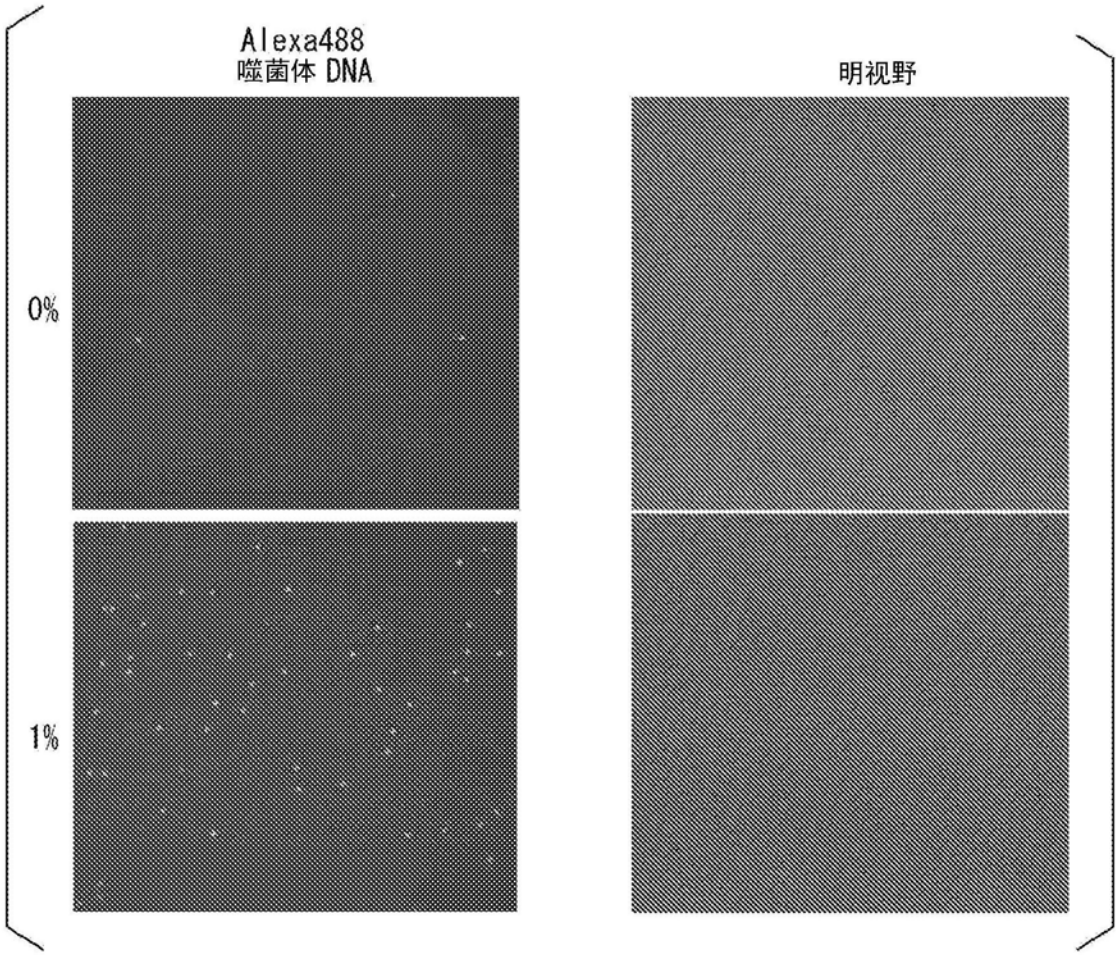


图9

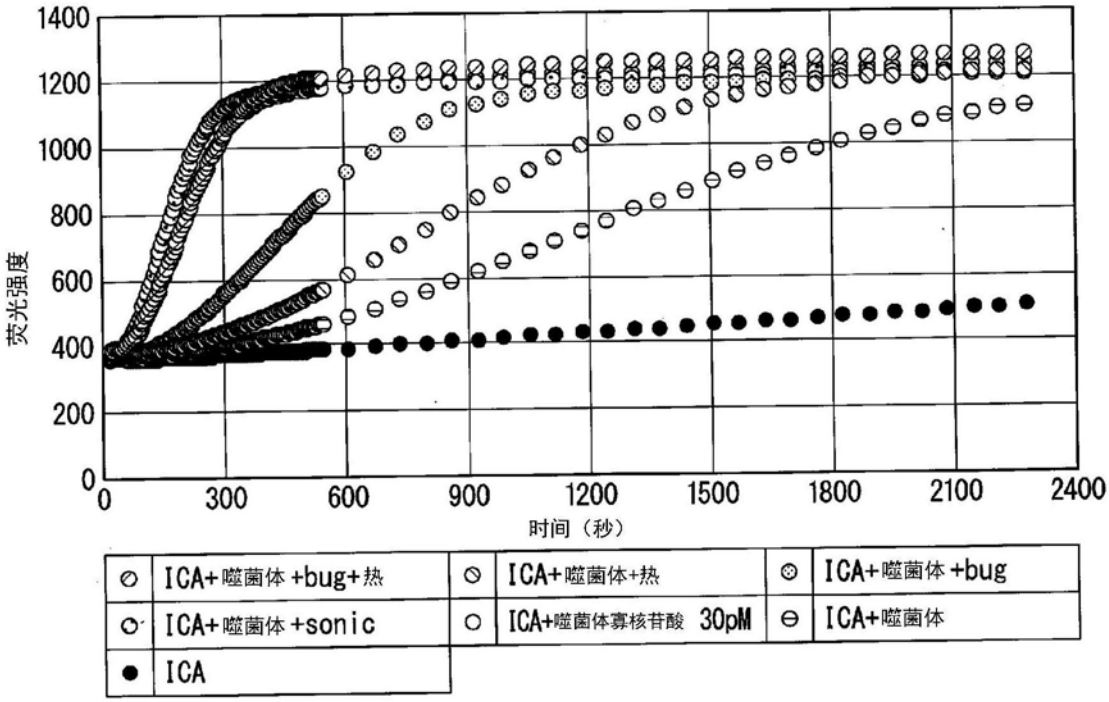

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
荧光强度
0
300
600
900
1200
1500
1800
2100
2400
时间（秒）
ICA+噬菌体 +bug+热
ICA+噬菌体+热
ICA+噬菌体 +bug
ICA+噬菌体 +sonic
ICA+噬菌体寡核苷酸 30pM
ICA+噬菌体
ICA

图10

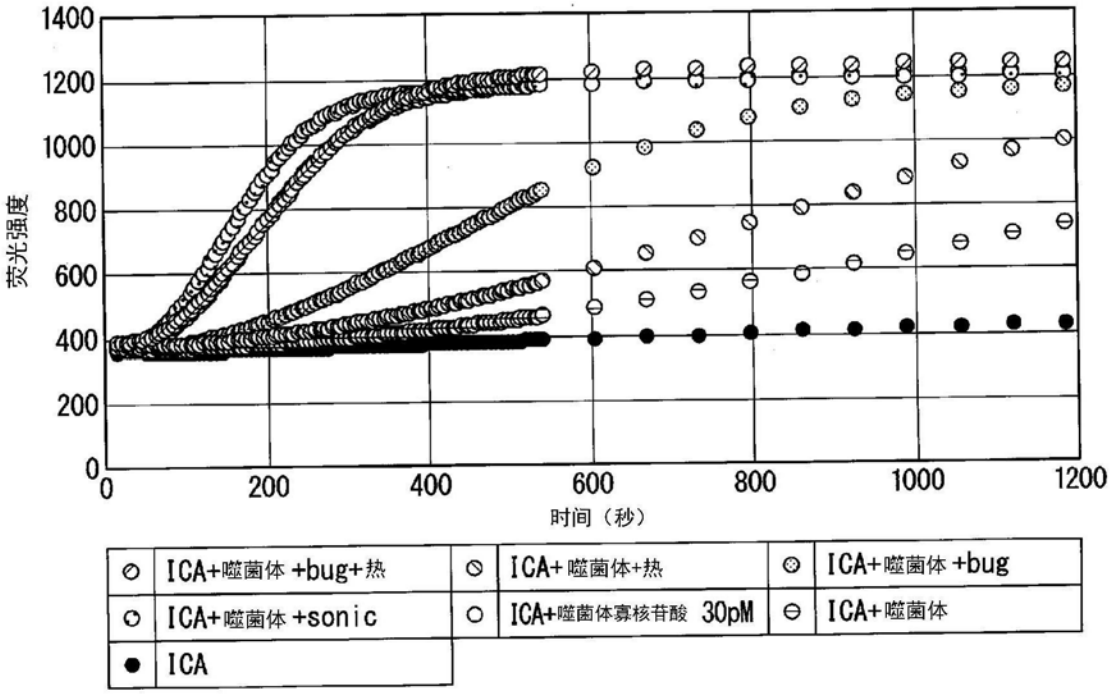

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
荧光强度
0
200
400
600
800
1000
1200
时间（秒）
ICA+噬菌体 +bug+热
ICA+噬菌体+热
ICA+噬菌体 +bug
ICA+噬菌体 +sonic
ICA+噬菌体寡核苷酸 30pM
ICA+噬菌体
ICA

图11

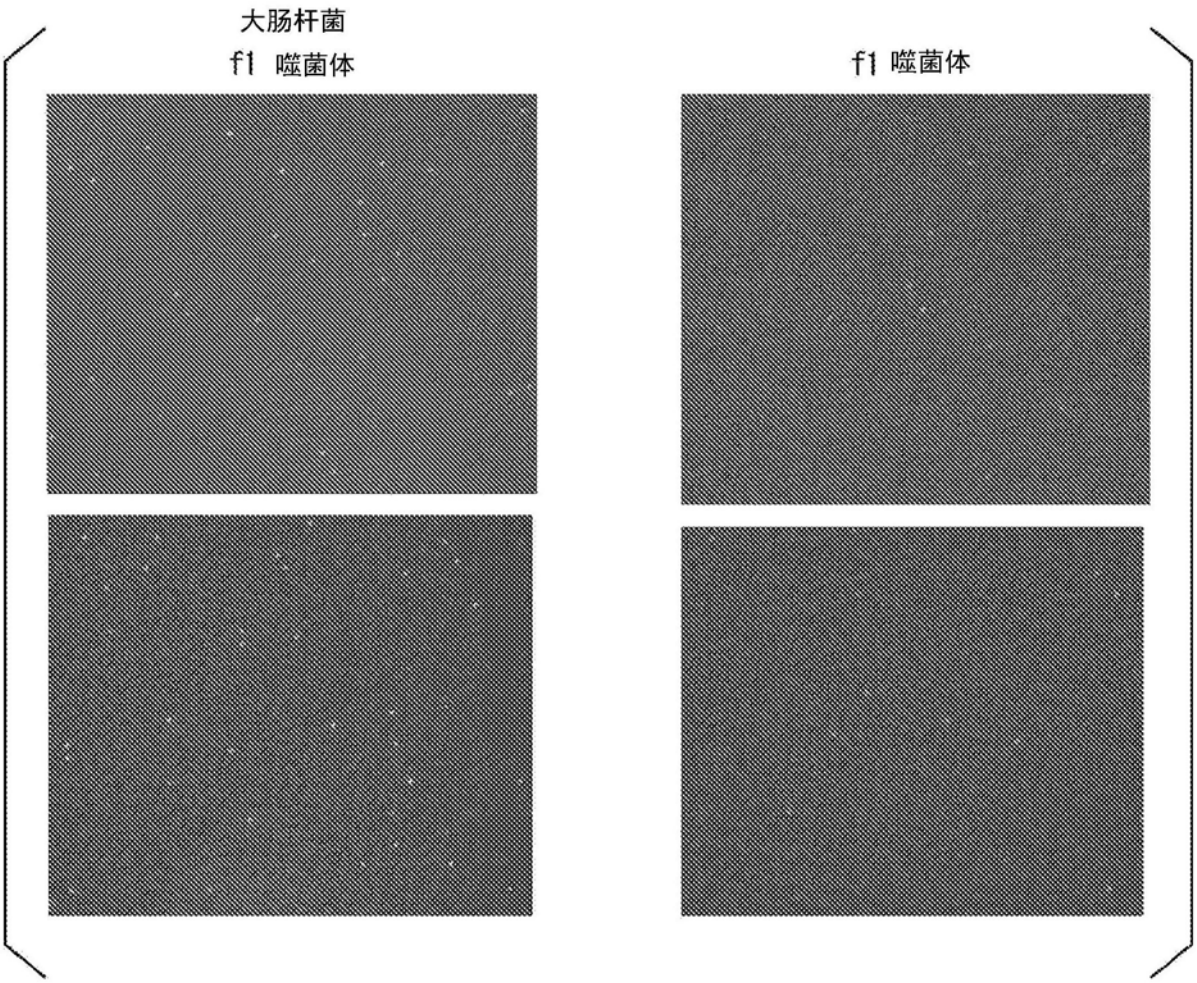


图12

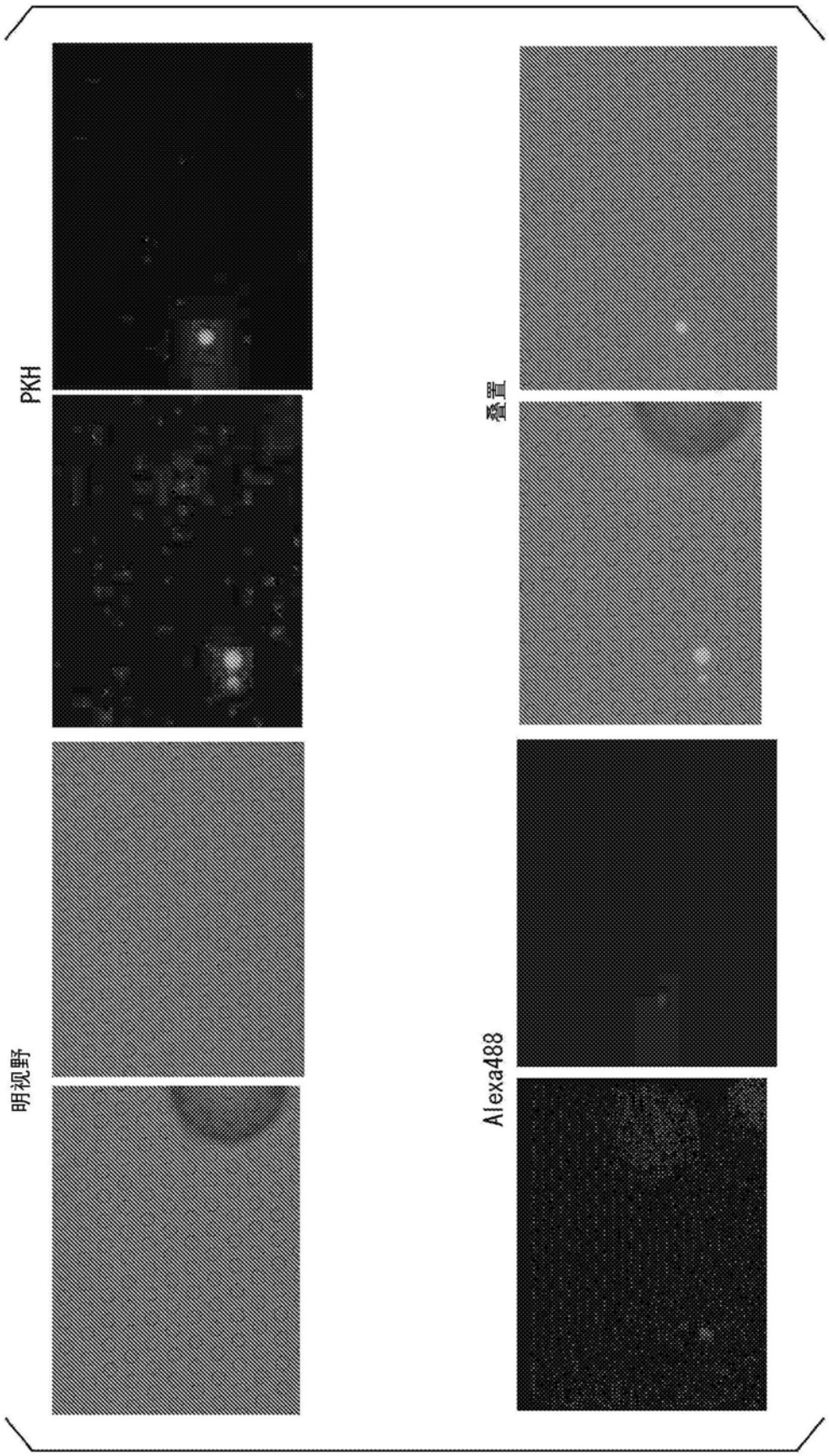


图13

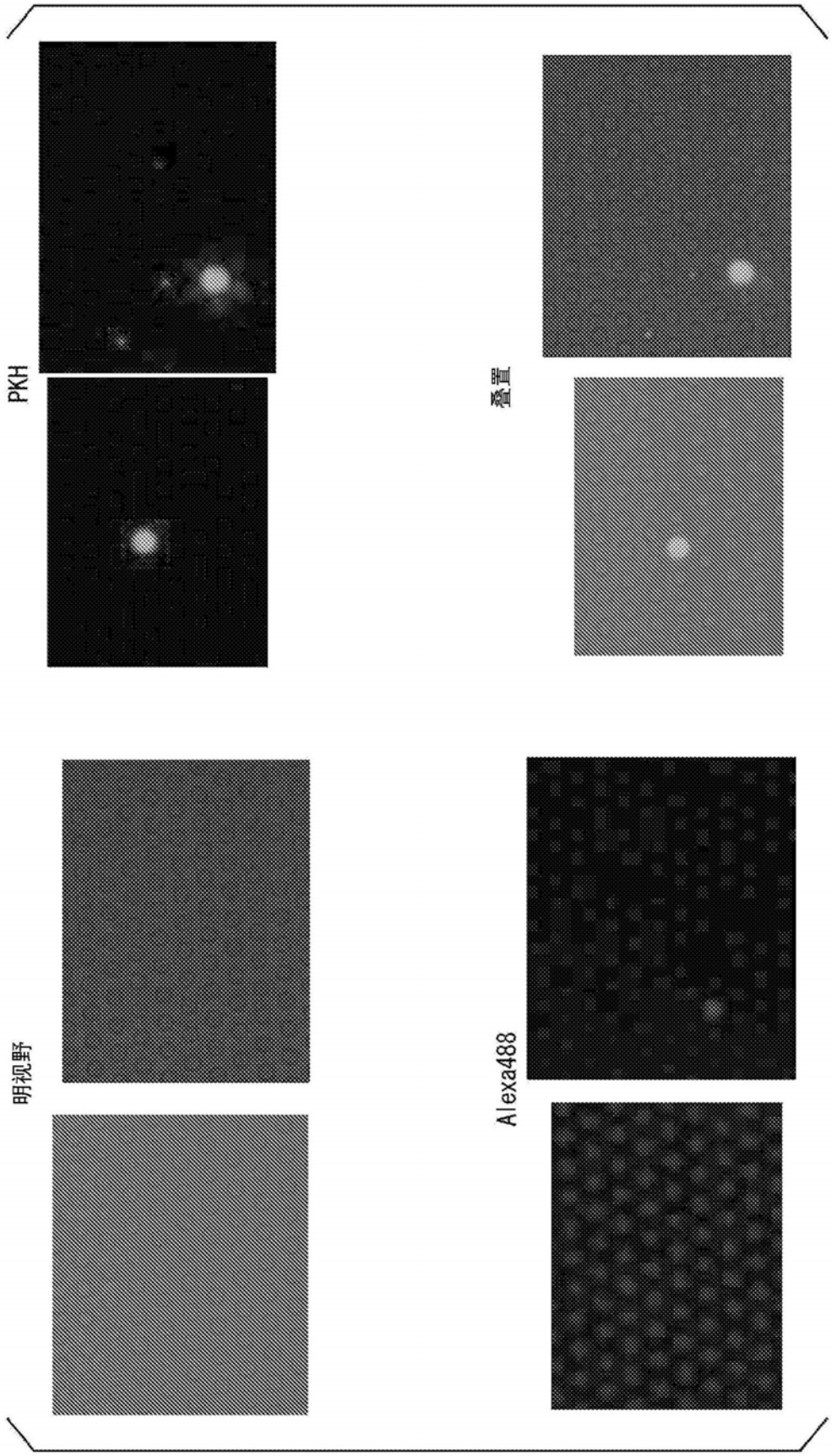


图14

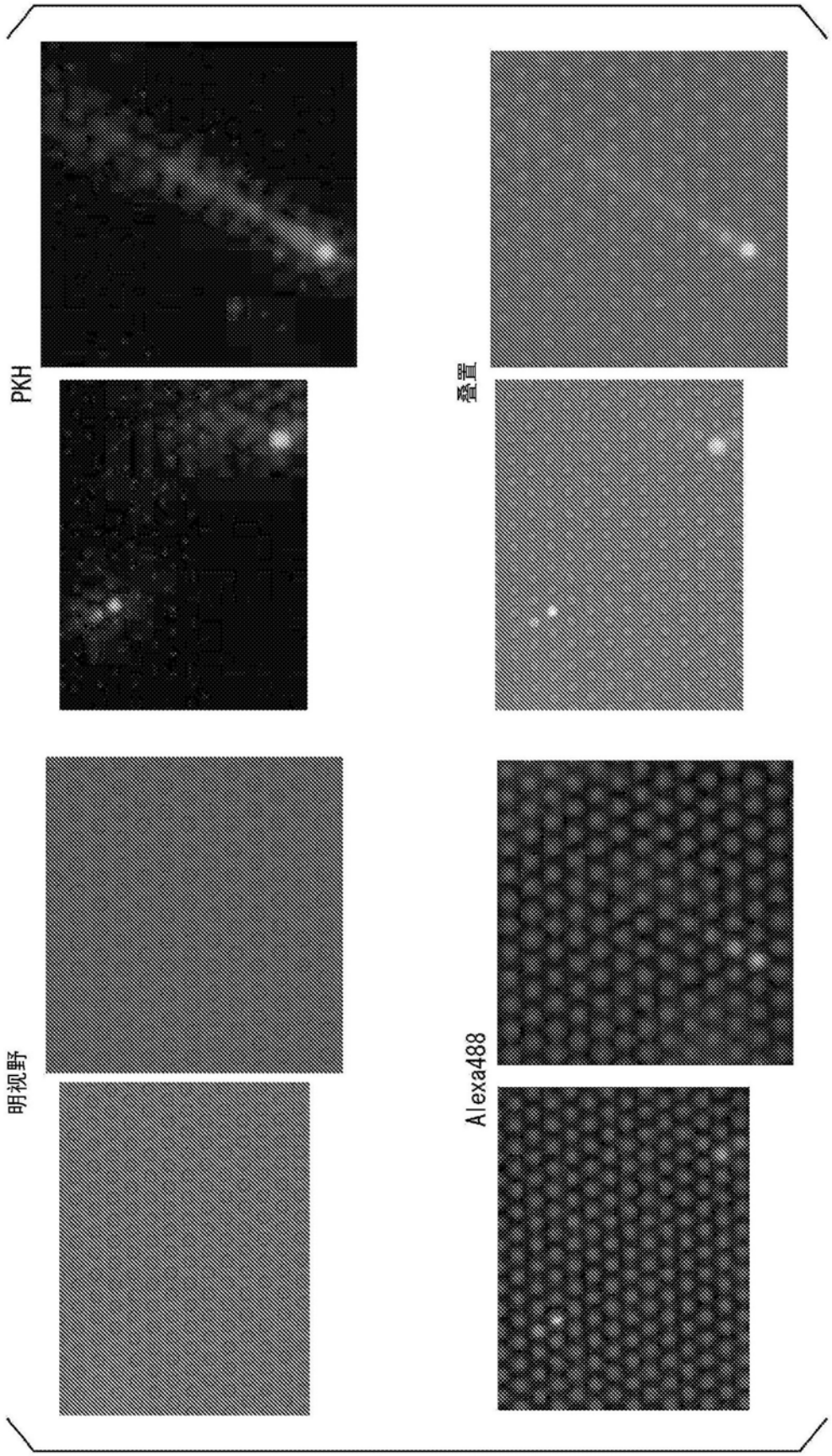


图15