

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010年8月5日(05.08.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/087409 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051156
- (22) 国際出願日: 2010年1月28日(28.01.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-017906 2009年1月29日(29.01.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について):
エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジ
メント株式会社(EISAI R&D MANAGEMENT
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石
川四丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 藤川 利彦
(FUJIKAWA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒2100855 神奈川
県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会社
パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 林田 敏
郎(HAYASHIDA, Toshiro) [JP/JP]; 〒2100855 神奈
川県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会

社パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 田中
敏之(TANAKA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒2100855 神奈
川県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会
社パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 薄井
貢(USUI, Mitsugu) [JP/JP]; 〒2100855 神奈川県川
崎市川崎区南渡田町1-12 株式会社パル
マビーズ研究所内 Kanagawa (JP).

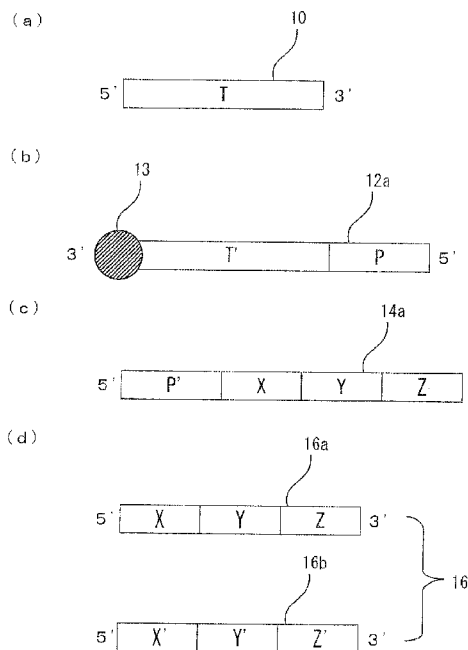
- (74) 代理人: 石原 詔二, 外(ISHIHARA, Shoji et al.);
〒1700013 東京都豊島区東池袋3丁目7番8号
若井ビル302号 石原国際特許事務所内
Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸の検出方法

[図1]



(57) Abstract: Provided are a method for detecting a nucleic acid and a detection kit, whereby a low-molecular nucleic acid such as microRNA can be highly sensitively and conveniently detected. A detection kit to be used for detecting a target nucleic acid which comprises a first nucleic acid probe, a second nucleic acid probe, and multiple kinds of signal amplification probes which have complementary base sequence regions hybridizable with each other and are capable of forming a probe polymer via a self-assembly reaction, wherein the first nucleic acid probe has a first base sequence that is complementary to the target nucleic acid and a second base sequence that is complementary to the second nucleic acid probe, and the first base sequence is adjacent to the second base sequence; and the second nucleic acid probe has a base sequence that is the same as a part or the whole of one signal amplification probe from among the aforesaid multiple kinds of signal amplification probes.

(57) 要約: マイクロRNA等の低分子核酸を高感度且つ簡便に検出することができる、核酸の検出方法及び検出用キットを提供する。第1の核酸プローブ、第2の核酸プローブ、及び互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し自己集合反応によるプローブポリマーの形成が可能な複数種のシグナル増幅用プローブを含む、標的核酸の検出に用いられる検出用キットであって、前記第1の核酸プローブは、標的核酸に相補的な第1の塩基配列及び前記第2の核酸プローブに相補的な第2の塩基配列を有し且つ該第1の塩基配列と該第2の塩基配列が隣接してなり、前記第2の核酸プローブは、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の1つのシグナル増幅用プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有するようにした。



NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：核酸の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロRNA等の低分子核酸を高感度且つ簡便に検出することができる、核酸の検出方法及び検出用キットに関する。

背景技術

[0002] マイクロRNA (microRNA、miRNA) はヒトを含む様々な真核生物で転写されている低分子RNAの一種である。ゲノム上の非遺伝子領域やイントロン部分から一次転写産物 (pri-miRNA) として転写され、プロセッシングにより、ヘアピン構造のマイクロRNA前駆体 (pre-miRNA) を生成した後、22塩基程度の成熟型のマイクロRNA (mature-miRNA) となる (非特許文献1)。このマイクロRNAは、転写されたmRNAからたんぱく質への翻訳過程における調節因子として働いていることが明らかにされた (非特許文献2)。現在、ヒトゲノム上には800種以上のマイクロRNAが存在すると予想されているが (非特許文献3)、その調節機能の対象となるmRNAが同定されていないものも多い。

[0003] しかしこれまでの研究から、多くのマイクロRNAが多細胞生物の発生や分化、細胞増殖などに関与している遺伝子の発現調節を行っていることが明らかになっている (非特許文献4)。また、細胞のがん化やがん抑制機構において機能していると考えられるマイクロRNAも報告され、それらはがん細胞内での発現量が正常細胞と比較して増加もしくは減少しているものも多い (非特許文献5)。そこで、将来的にはマイクロRNAの発現量を調べることで、その細胞や組織のがん化についてのプロファイリングを行うことも可能になると考えられ、今後は細胞や組織でのマイクロRNAの同定、定量を行うことが癌の診断にとって重要な項目のひとつとなると予期される。

[0004] これまでにマイクロRNA検出方法として、ノーザン・ブロット法 (非特許文献6)、プライマー伸長法 (非特許文献7及び8)、インベーター法 (

非特許文献 9)、リボザイムのシグナル増幅法(非特許文献 10)、mirMASA ビーズベースの技術(非特許文献 11)、ビーズベースのフロー・サイトメトリー(非特許文献 12)、リアルタイム RT-PCR(非特許文献 13 及び 14)、マイクロアレイ(非特許文献 15)等が報告されており、金粒子を用いたラベル方法(非特許文献 16)が試みられている。また研究用試薬として、RNアーゼプロテクションアッセイを用いたキットも発売されている(非特許文献 17)。

[0005] しかしながら、上記の方法は、感度が充分でない(ノーザン・ブロット法)、標的となるマイクロ RNA 前駆体を PCR によって増幅させる必要がある(リアルタイム RT-PCR 等)、検出までに時間がかかり操作が煩雑である(ビーズベースのフロー・サイトメトリー)、多種の標的核酸を同時に解析するのが難しい(プライマー伸長法)等の問題点がある。

[0006] 一方、特許文献 1~4 は、酵素を使用しない新規な等温でのシグナル増幅方法を開示している。この方法は、互いに相補的塩基配列領域を保持させた複数種のオリゴヌクレオチド・プローブを自己集合反応させてプローブ同士の集合体(プローブポリマー)を形成させる方法であり、該ポリマーを定量することにより、試料中の標的核酸の検出に応用するものである。この方法は、例えば、使用するプローブの相補的塩基配列領域の 1 箇所を試料中の標的核酸と相補的塩基配列とすることにより、該プローブと標的核酸とを結合させてからプローブのポリマーを形成させることにより標的核酸を有効に検出する方法であって、パルサー(PALSAAR)法と呼ばれている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第 3 2 6 7 5 7 6 号公報

特許文献2：特許第 3 3 1 0 6 6 2 号公報

特許文献3：国際公開第 0 2 / 3 1 1 9 2 号パンフレット

特許文献4：特開 2 0 0 2 - 3 5 5 0 8 1 号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1 : Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. Trends Genet. 2006 Mar; 22(3):165-73.

非特許文献2 : Sontheimer, E., J. Assembly and function of RNA silencing complex. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2005 Feb; 6 127-138

非特許文献3 : Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. Nat Genet. 2005 Jul; 37(7):766-70

非特許文献4 : Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. Development. 2005 Nov; 132(21):4653-62.

非特許文献5 : Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Apr; 6(4):259-269

非特許文献6 : Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. RNA. 2003 Feb; 9(2):175-179.

非特許文献7 : Zeng, Y. and Cullen, B.R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. RNA. 2003 Jan; 9(1):112-123.

非特許文献8 : Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. RNA. 2005 Nov; 11:1737-1744

非特許文献9 : Allawi, H.T., Dahlberg, J.E., Olson, S., Lund, E., Olson, M., Ma, W.P., Takova, T., Neri, B.P., and Lyamichev, V.I. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. RNA. 2004 Jul; 10(7):1153-1161.

非特許文献10 : Hartig, J.S., Grune, I., Najafi-Shoushtari, S.H., and F

amulok, M. Sequence-specific detection of MicroRNAs by signal-amplifying ribozymes. *J. Am. Chem. Soc.* 2004 Jan 28; 126(3): 722-723.

非特許文献11: Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* 2004 Dec; 14(12):2486-94.

非特許文献12: Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jackson T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9; 435(7043):834-8

非特許文献13: Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guigler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 27; 33(20):e179.

非特許文献14: Tang F, Hajkova P, Barton SC, Lao K, Surani MA. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 24; 34(2):e9.

非特許文献15: Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 29; 101(26):9740-4.

非特許文献16: Liang RQ, Li W, Li Y, Tan CY, Li JX, Jin YX, Ruan KC. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 31; 33(2):e17.

非特許文献17: mirVana miRNA Detection kit (Ambion Inc.)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、マイクロRNA等の低分子核酸を高感度且つ簡便に検出することができる、核酸の検出方法及び検出用キットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意研究を行った結果、驚くべきことに、パルサー法において用いられるシグナル増幅用プローブと、標的核酸に相補的な配列を有する第1の核酸プローブと、該第1の核酸プローブに相補的な配列を有し標的核酸と隣接する状態で第1の核酸プローブと結合可能であり且つシグナル増幅用プローブの一つと結合可能な第2の核酸プローブを用いて試料中の標的核酸を検出することにより、試料中に標的核酸が存在する場合は、シグナル増幅用プローブの自己集合反応により形成されたプローブポリマーが、標的核酸と第1の核酸プローブと第2の核酸プローブとを含む複合体に結合した状態で検出されるが、試料中に標的核酸が存在しない場合は、第2の核酸プローブが第1の核酸プローブから解離し、複合体に結合したプローブポリマーは検出されないことを見出した。
- [0011] 即ち、本発明の標的核酸の検出方法は、(a) 標的核酸、該標的核酸に相補的な第1の塩基配列と第2の塩基配列とを有する第1の核酸プローブ、及び該第1の核酸プローブの第2の塩基配列に相補的な塩基配列を有する第2の核酸プローブを反応させ、該標的核酸、該第1の核酸プローブ及び該第2の核酸プローブを含む複合体を形成させる工程；(b) 前記複合体に対し、互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し自己集合反応によるプローブポリマーの形成が可能な複数種のシグナル増幅用プローブを添加し、前記複合体と結合したプローブポリマーを形成させる工程；及び(c) 前記プローブポリマーを検出する工程；を含み、前記第1の核酸プローブの前記第1の塩基配列と前記第2の塩基配列は隣接してなり、前記第2の核酸プ

ローブは、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有することを特徴とする。

[0012] 前記第 1 の核酸プローブが、担体に固定されているか担体に固定可能な部分が導入されていることが好ましい。

前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列の長さが 6 塩基以上 20 塩基以下であることが好適である。

[0013] 前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列が、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部と相補的な配列であり、前記第 2 の核酸プローブとして、該 1 つのシグナル増幅用プローブを用いることが好適である。

[0014] 前記複数種のシグナル増幅用プローブの少なくとも 1 つが標識物質で標識されてなることが好ましい。

[0015] 前記複数種のシグナル増幅用プローブが第 1 のシグナル増幅用プローブと第 2 のシグナル増幅用プローブとからなり、該第 1 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも核酸領域 X、核酸領域 Y 及び核酸領域 Z を含む核酸プローブであり、該第 2 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも前記核酸領域 X に相補的な核酸領域 X'、前記核酸領域 Y に相補的な核酸領域 Y' 及び前記核酸領域 Z に相補的な核酸領域 Z' を含む核酸プローブであることが好適である。

[0016] 本発明の標的核酸の検出方法により、標的核酸としてマイクロ RNA 等の低分子核酸の検出も可能である。

本発明の標的核酸の検出方法において、前記標的核酸の塩基配列の長さが 15 塩基以上 25 塩基以下であることが好ましい。

[0017] 本発明の検出用キットは、第 1 の核酸プローブ、第 2 の核酸プローブ、及び互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し自己集合反応によるプローブポリマーの形成が可能な複数種のシグナル増幅用プローブを含む、標的核酸の検出に用いられる検出用キットであって、前記第 1 の核酸プロ

ープは、標的核酸に相補的な第 1 の塩基配列及び前記第 2 の核酸プローブに相補的な第 2 の塩基配列を有し且つ該第 1 の塩基配列と該第 2 の塩基配列が隣接してなり、前記第 2 の核酸プローブは、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有することを特徴とする。

[0018] 前記第 1 の核酸プローブが、担体に固定されているか担体に固定可能な部分が導入されていることが好ましい。

前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列の長さが 6 塩基以上 20 塩基以下であることが好適である。

[0019] 前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列が、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部と相補的な配列であり、前記第 2 の核酸プローブとして、該 1 つのシグナル増幅用プローブを用いることが好適である。

[0020] 前記複数種のシグナル増幅用プローブの少なくとも 1 つが標識物質で標識されてなることが好ましい。

[0021] 前記複数種のシグナル増幅用プローブが第 1 のシグナル増幅用プローブと第 2 のシグナル増幅用プローブとからなり、該第 1 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも核酸領域 X、核酸領域 Y 及び核酸領域 Z を含む核酸プローブであり、該第 2 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも前記核酸領域 X に相補的な核酸領域 X'、前記核酸領域 Y に相補的な核酸領域 Y' 及び前記核酸領域 Z に相補的な核酸領域 Z' を含む核酸プローブであることが好適である。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、標的核酸を高感度且つ簡便に検出することができる。本発明によれば、低分子核酸や少量の核酸分子を直接標的核酸として使用することが可能であり、逆転写反応や PCR を用いた増幅が不要であり、操作が簡便であり、比較的短時間で測定できるという甚大な効果を奏する。さらに

、本発明によれば、複数の標的核酸の同時検出も可能である。本発明は、マイクロRNAや少量のRNA分子の検出に特に著しい効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]標的核酸及び本発明に用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第1の例を示す概略説明図であり、(a)は標的核酸、(b)は第1の核酸プローブ、(c)は第2の核酸プローブ、及び(d)はシグナル増幅用プローブをそれぞれ示す。

[図2]本発明の標的核酸の検出方法の一例を示す概略説明図であり、試料中に標的核酸が存在する場合の工程(a)の概略説明図である。

[図3]本発明の標的核酸の検出方法の一例を示す概略説明図であり、試料中に標的核酸が存在する場合の工程(b)の概略説明図である。

[図4]本発明の標的核酸の検出方法の一例を示す概略説明図であり、試料中に標的核酸が存在しない場合の工程(b)の概略説明図である。

[図5]本発明に用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第2の例を示す概略説明図であり、(a)は第1の核酸プローブ、(b)は第2の核酸プローブ、及び(c)はシグナル増幅用プローブをそれぞれ示す。

[図6]本発明に用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第3の例を示す概略説明図であり、(a)は第1の核酸プローブ、(b)は第2の核酸プローブ、及び(c)はシグナル増幅用プローブをそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0024] 以下に本発明の実施の形態を添付図面に基づいて説明するが、図示例は例示的に示されるもので、本発明の技術思想から逸脱しない限り種々の変形が可能なことはいうまでもない。

[0025] 本発明は、第1の核酸プローブ、第2の核酸プローブ、及び複数種のシグナル増幅用プローブを用いて、試料中の標的核酸の存在を検出するものである。

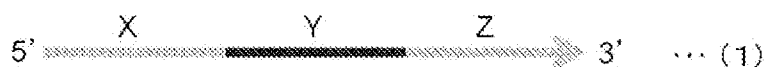
図1は、標的核酸及び本発明に用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第1の例を示す概略説明図である。図2～図4は、本発明の標

的核酸の検出方法の一例を示す概略説明図であり、図 1 記載の核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブを用いた例を示した。図 1 において、(a) は標的核酸 10、(b) は第 1 の核酸プローブ 12 a、(c) は第 2 の核酸プローブ 14 a、並びに (d) はシグナル増幅用プローブ 16 をそれぞれ示す。

[0026] 本発明方法に用いられる複数種のシグナル増幅用プローブは、互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し、自ら自己集合して集合体（プローブポリマー）を形成することができるものであり、例えば、特許文献 1 ～ 4 記載のオリゴヌクレオチド・プローブが用いられる。

[0027] 前記複数種のシグナル増幅用プローブとしては、例えば、図 1 (d) に示した如く、5' 端部から順に核酸領域 X、核酸領域 Y 及び核酸領域 Z が設けられ、下記化学式 (1) の構造を有する、3 箇所の核酸領域からなるプローブ（符号 16 a、HCP-1 と称する）と、5' 端部から順に核酸領域 X'、核酸領域 Y' 及び核酸領域 Z' が設けられ、下記化学式 (2) の構造を有する、3 箇所の核酸領域からなるプローブ（符号 16 b、HCP-2 と称する）と、からなる一対のプローブ（HCP と称する）が好適である。

[化1]

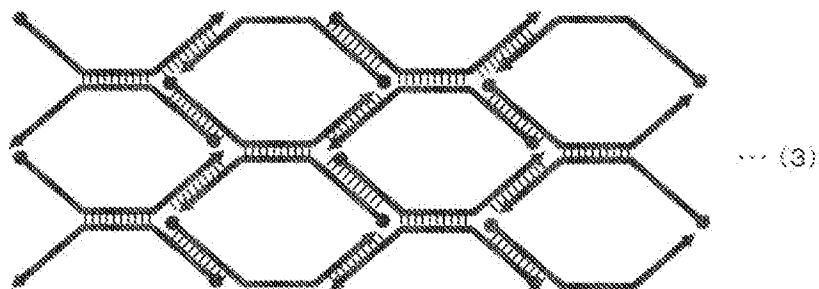


[化2]



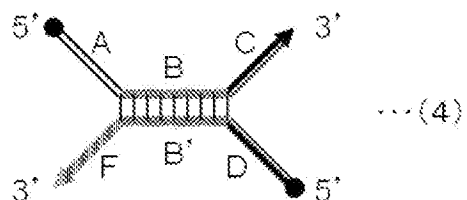
[0028] 前記化学式 (1) 及び (2) において、核酸領域 X と核酸領域 X'、核酸領域 Y と核酸領域 Y'、核酸領域 Z と核酸領域 Z' はそれぞれハイブリダイズ可能な相補的領域であり、前記第 1 及び第 2 プローブをハイブリダイズさせることにより、下記化学式 (3) に示されるポリマーを形成することができる。

[化3]

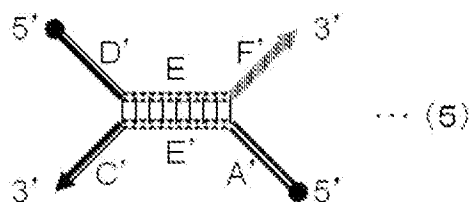


[0029] また、前記複数種のシグナル増幅用プローブとして、下記化学式（４）及び化学式（５）で示される第１及び第２ダイマープローブを使用することが好適である。各ダイマープローブは化学式（６）及び化学式（７）のヌクレオチドをハイブリダイズすることにより作製される。

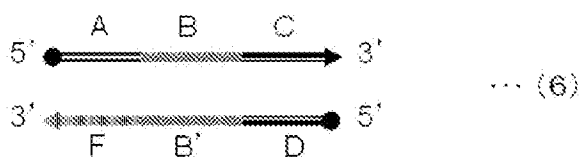
[化4]



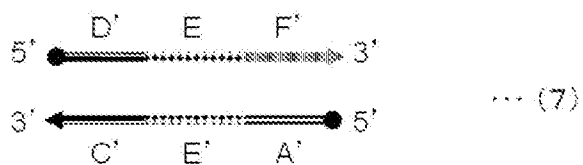
[化5]



[化6]



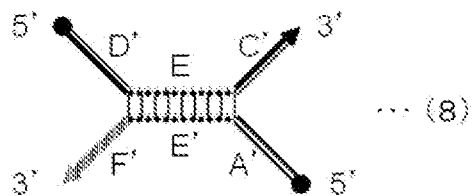
[化7]



[0030] ここで、核酸領域AとA'、BとB'、CとC'、DとD'、EとE'、FとF'はそれぞれハイブリダイズ可能な相補的領域であり、前記第1及び第2ダイマープローブをハイブリダイズさせることにより、前記化学式(3)に示されるポリマーを形成することができる。

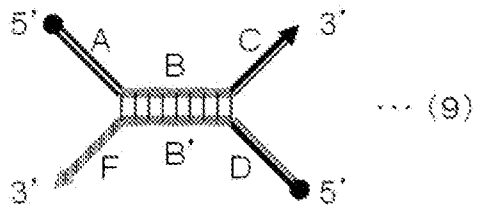
[0031] また、ダイマープローブとして、前記化学式(5)の構造を有するダイマープローブの代わりに下記化学式(8)の構造を有するダイマープローブを用いることもできる。

[化8]

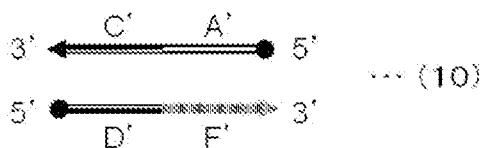


[0032] また、前記複数種のシグナル増幅用プローブとして、下記化学式(9)に示される第1ダイマープローブと下記化学式(10)に示される2本のオリゴヌクレオチドである架橋プローブを使用することが好ましい。

[化9]

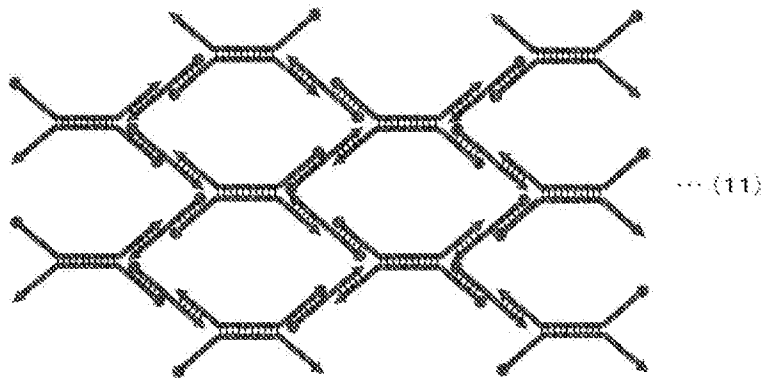


[化10]



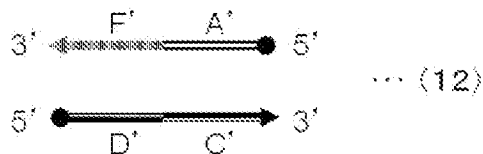
[0033] ここで、核酸領域AとA'、BとB'、CとC'、DとD'、EとE'、FとF'はそれぞれハイブリダイズ可能な相補的領域であり、前記第1ダイマープローブ及び架橋プローブをハイブリダイズさせることにより、前記化学式(12)に示されるポリマーを形成することができる。

[化11]



[0034] また、架橋プローブとして、前記化学式（１０）の構造を有するヌクレオチドの代わりに下記化学式（１２）の構造を有する２本のヌクレオチドを用いることもできる。

[化12]



[0035] 上記に加え、例えば相補的塩基配列領域の数が４箇所でも５箇所でもポリマーの形成は可能であり（特許文献１～４）、またダイマープローブは２種類を使用しているが、相補的塩基配列領域の位置関係を工夫すれば、さらに多種類のダイマープローブを使用することもできる（特許文献３）。このように、使用するプローブは、上記に記載のプローブの他にも相補的塩基配列領域の配置を工夫することによって他の種類のプローブも使用可能であり、自己集合するポリマーを形成するのであれば本発明に含まれる。

[0036] 前記シグナル増幅用プローブの各相補的塩基配列領域の長さは、塩基数にして、少なくとも５塩基であり、好ましくは少なくとも８塩基、さらに好ましくは１０塩基～１００塩基、さらに好ましくは１２～３０塩基である。また、それぞれのプローブにおける相補的塩基配列領域の長さは同じであることが望ましい。

[0037] 図１～図４では、複数種のシグナル増幅用プローブ１６として、一対のＨＣＰ〔符号１６ａ：ＨＣＰ－１（核酸領域ＸＹＺ）、符号１６ｂ：ＨＣＰ－

2（核酸領域X' Y' Z'）]を用いた場合の例を示した。

[0038] 前記複数種のシグナル増幅用プローブ16は、標識物質で標識されたものを用いることが好ましい。前記標識物質としては、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光物質、発光物質又は色素等が好適な例として挙げられる。

[0039] 図1（a）において、符号10は標的核酸であり、標的配列Tを含む。本発明において、標的核酸の種類は特に限定されず、DNA、RNA（例えば mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、dsRNA、snRNA、snoRNAなど）、その他の核酸が使用可能である。標的核酸及び標的核酸の標的配列の長さも特に限定されず、マイクロRNA等の低分子核酸の検出も可能である。本発明は、短い標的核酸の検出に好適に用いられるものであり、15塩基以上の標的核酸の検出に好適に用いられ、15～25塩基程度の標的核酸の検出に特に好適に用いられる。また、同時に多種の核酸分子を検出することも出来る。なお、図1では標的核酸10の全配列を標的配列Tとした例を示したが、本発明はこれに限定されず、標的核酸の一部の配列を標的配列としてもよい。

[0040] 図1（b）に示した如く、第1の核酸プローブ12aは、標的核酸10の標的配列Tに相補的な第1の塩基配列T'と、該第1の塩基配列T'に隣接する位置に任意の塩基配列からなる第2の塩基配列Pと、を含む。該第2の塩基配列Pは、標的核酸とはハイブリダイズしない配列であればよく、特に制限されないものである。

第1の核酸プローブ12aにおいて、第1の塩基配列T'の長さは特に制限はなく、標的核酸の標的配列の長さに応じて設定すればよいが、15塩基以上が好ましく、15～25塩基程度が特に好ましい。

第1の核酸プローブ12aにおいて、第2の塩基配列Pは、前記第1の塩基配列T'と間隔なく配置される。第2の塩基配列Pの長さは6～20塩基が好ましい。

[0041] 前記第1の核酸プローブ12aは、担体13に固定されているかもしくは

担体 1 3 に固定可能な部分が導入されていることが好ましい。

前記担体 1 3 としては、例えば、蛍光微小粒子、磁気粒子、マイクロプレート、マイクロアレイ、スライドガラス、電気伝導性基板等の基板を用いることが好ましい。なお、図は微小粒子を用いた場合の例を示したが、本発明において担体 1 3 は特に限定されないものである。

[0042] 担体 1 3 は、図 1 に示した如く、第 1 の塩基配列 T' 側に結合されることが好ましい。なお、図 1 では、第 1 の核酸プローブ 1 2 a に直接担体 1 3 を結合させた例を示したが、他の核酸プローブや有機物等を介して第 1 の核酸プローブ 1 2 a と担体 1 3 とを結合せしめてもよい。例えば、第 1 の核酸プローブ 1 2 a が捕捉領域 K をさらに有するように構成し、該捕捉領域 K に相補的な領域 K' を有する捕捉用プローブを固定化した担体 1 3 を用いてもよい。また、第 1 の核酸プローブ 1 2 a が、第 1 の塩基配列 T' と担体 1 3 との結合部分との間に、他の核酸領域や炭素鎖を始めとする有機物等を含んでもよく、図 5 (a) に示した如く、標的核酸及び使用するプローブのいずれとも結合しないスペーサー領域 S₁ を含むことが好適である。

[0043] なお、図 1 (b) では、第 1 の核酸プローブの核酸領域が、第 1 の塩基配列 T 及び第 2 の塩基配列 P からなる場合を示したが、本発明において、第 1 の核酸プローブは、第 1 の塩基配列 T 及び第 2 の塩基配列 P に加えて、他の核酸領域を含んでもよい [例えば、図 5 (a) 及び図 6 (a)]。但し、他の核酸領域を含む場合は、第 1 の塩基配列 T 及び第 2 の塩基配列 P が隣接されるように他の核酸領域を設けなければならない。

[0044] 図 1 (c) に示した如く、第 2 の核酸プローブ 1 4 a は、シグナル増幅用プローブ 1 6 中の 1 つのシグナル増幅用プローブ 1 6 a の一部又は全てと同じ塩基配列を含む第 1 の塩基配列 (例えば、配列 X Y Z) と、第 1 の核酸プローブ 1 2 a の第 2 の塩基配列 P に相補的な第 2 の塩基配列 P' と、を含む。

なお、図 1 (c) では、第 2 の核酸プローブの核酸領域が、第 1 の塩基配列 (配列 X Y Z) 及び第 2 の塩基配列 P' からなる場合を示したが、本発明

において、第2の核酸プローブは、第1の塩基配列及び第2の塩基配列に加えて、他の核酸領域を含んでいてもよい〔例えば、図5（b）〕。

[0045] 図1では、第2の核酸プローブ14aの第1の塩基配列が、シグナル増幅用プローブ16aの全てと同じ塩基配列（配列XYZ）を有する例を示したが、本発明において、該第1の塩基配列は第2の核酸プローブ14aとシグナル増幅用プローブ16が特異的に結合できる配列であれば特に限定されず、シグナル増幅用プローブの一部と同じ塩基配列を有する配列（例えば、配列X、配列Y、配列Z、配列XY、配列YZ、配列ZYZ、配列XYXまたはこれら配列の部分配列等）を用いてもよい。

[0046] 図2～図4は、図1記載の2種の核酸プローブ12a、14a及び2種のシグナル増幅用プローブ16a、16bを用いた本発明の標的核酸の検出方法の一例を示す概略説明図である。図2は、試料中に標的核酸10が存在する場合の工程（a）の概略説明図である。図3は、試料中に標的核酸10が存在する場合の工程（b）の概略説明図である。図4は、試料中に標的核酸10が存在しない場合の工程（b）の概略説明図である。

[0047] 標的核酸10を含む可能性のある試料、前記第1の核酸プローブ12a、前記第2の核酸プローブ14aを反応させる〔工程（a）〕。試料中に標的核酸が存在する場合は、標的核酸10と第2の核酸プローブ14aが隣接する状態で第1の核酸プローブ12aとハイブリダイズし、標的核酸10と第1の核酸プローブ12aと第2の核酸プローブ14aとを含む複合体18が形成される（図2）。

[0048] 前記工程（a）後、複数種のシグナル増幅用プローブ（16a、16b）を添加し、第2の核酸とシグナル増幅用プローブ16bをハイブリダイズさせると共にシグナル増幅用プローブ16a、16bの自己集合体反応によりプローブポリマー20を形成させる。試料中に標的核酸10が存在する場合は、標的核酸10と第2の核酸プローブ14aが隣接する状態で第1の核酸プローブ12aとハイブリダイズしているため、隣接効果によりプローブポリマー20形成時において第1の核酸プローブ12aと第2の核酸プローブ

1 4 a 間でのハイブリダイズの安定性を保つことができ、第 2 の核酸プローブ 1 4 a を介して複合体 1 8 と結合したプローブポリマー 2 0 が形成され、プローブポリマー 2 0 は担体 1 3 に捕捉される（図 3）。一方、標的核酸 1 0 が存在しない場合は、隣接効果がないために、プローブポリマー 2 0 形成時において第 1 の核酸プローブ 1 2 a と第 2 の核酸プローブ 1 4 a 間でのハイブリダイズの安定性が保てず、第 2 の核酸プローブ 1 4 a は第 1 の核酸プローブ 1 2 a から解離し、プローブポリマー 2 0 は担体 1 3 に捕捉されない（図 4）。

[0049] よって、プローブポリマー 2 0 を検出することにより、標的核酸 1 0 の存在を検出することができる [工程 (c)]。プローブポリマーの検出方法は特に限定されず、例えば、蛍光、発光、発色等により検出することが好適である。

[0050] なお、図 2～図 4 では、予め担体 1 3 に固定化させた第 1 の核酸プローブ 1 2 a を用いた例を示したが、第 1 の核酸プローブ 1 2 a を担体 1 3 に固定化させる時期は特に制限はなく、複合体形成時又は複合体形成後に第 1 の核酸プローブ 1 2 a と担体 1 3 とを直接又は間接的に結合せしめてもよい。

[0051] 本発明において、第 1 の塩基配列 T' が異なる複数の第 1 の核酸プローブ 1 2 a を併用することにより、複数種の標的核酸を同時に検出することが可能である。複数種の標的核酸の同時検出において、複数種のシグナル増幅用プローブ 1 6 及び第 2 の核酸プローブ 1 4 a は同一のものが使用可能であり、担体 1 3 及び第 1 の核酸プローブ 1 2 a のみを複数種準備すればよく、作業性に優れ、低コストである。

[0052] 図 5 は、本発明で用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第 2 の例を示す概略説明図であり、(a) は第 1 の核酸プローブ 1 2 b、(b) は第 2 の核酸プローブ 1 4 b、(c) はシグナル増幅用プローブ 1 6 をそれぞれ示す。図 5 は、シグナル増幅用プローブ 1 6 として、図 1 と同様の例を示した。

図 5 (a) において、第 1 の核酸プローブ 1 2 b は、標的核酸に相補的な

第 1 の塩基配列 T' 及び第 2 の塩基配列 P に加えて、標的核酸、第 2 の核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブのいずれとも結合しないスペーサー領域 S₁ をさらに有する。図 5 (a) に示した如く、第 1 の核酸プローブは、第 1 の塩基配列 T' 又は第 2 の塩基配列 P と、担体 1 3 との結合部分の間に、標的核酸、第 2 の核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブのいずれとも結合しないスペーサー領域 S₁ を含むことが好適である。

[0053] 第 1 の核酸プローブがスペーサー領域 S₁ を含む場合、該スペーサー領域 S₁ に相補的なアンチスペーサー領域 S₁' を含む核酸プローブをさらに用いることにより、検出感度をさらに向上させることができる。

[0054] 図 5 (b) において、第 2 の核酸プローブ 1 4 b は、シグナル増幅用プローブの一部と同じ塩基配列を含む第 1 の塩基配列 (配列 Z Y Z)、及び第 1 の核酸プローブに相補的な第 2 の塩基配列 P' に加えて、標的核酸、第 1 の核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブのいずれとも結合しないスペーサー領域 S₂ をさらに有する。図 5 (b) に示した如く、第 2 の核酸プローブは、第 1 の塩基配列及び第 2 の塩基配列の間に、標的核酸、第 1 の核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブのいずれとも結合しないスペーサー領域 S₂ を含むことが好適である。

[0055] 図 6 は、本発明で用いられる核酸プローブ及びシグナル増幅用プローブの第 3 の例を示す概略説明図であり、(a) は第 1 の核酸プローブ 1 2 c、(b) は第 2 の核酸プローブ 1 4 c、(c) はシグナル増幅用プローブ 1 6 をそれぞれ示す。図 6 は、シグナル増幅用プローブ 1 6 として、図 1 と同様の例を示した。

図 6 において、第 1 の核酸プローブ 1 2 c は、標的核酸に相補的な第 1 の塩基配列 T'、第 2 の塩基配列 P、及びスペーサー領域 S₁ を含む核酸プローブであり、第 2 の塩基配列 P が、シグナル増幅用プローブの一部 (配列 X) と相補的な配列 (配列 X') である。第 2 の核酸プローブ 1 4 c は、シグナル増幅用プローブの一部と同じ塩基配列を含む第 1 の塩基配列 (配列 Y Z) と、第 1 の核酸プローブに相補的な第 2 の塩基配列 P' (配列 X) とを含む

核酸プローブであって、シグナル増幅用プローブ 16 a と同一である。

図 6 に示した如く、第 1 の核酸プローブの任意の塩基配列である第 2 の塩基配列 P をシグナル増幅用プローブの一部と相補的な配列とすることにより、シグナル増幅用プローブの 1 つ (16 a) を第 2 の核酸プローブ 14 c として用いることができる。

実施例

[0056] (実施例 1)

標的核酸として 21 塩基のターゲットオリゴ DNA-1 を用いた。

ターゲットオリゴ DNA-1 の塩基配列 (5'-T₁-3')

5'-GCATTGAGGCTCGCTGAGAGT-3' (配列番号 1)

[0057] 第 1 の核酸プローブとして、標的核酸に相補的な塩基配列 (21 塩基) 及び任意の塩基配列 (12 塩基) からなる核酸プローブ [第 1 の核酸プローブ-1] を用いた。

第 1 の核酸プローブ-1 の塩基配列 (5'-P₁-T₁'-3')

5'-CCAATAAAAGTG ACTCTCAGCGAGCCTCAATGC-3' (配列番号 2)

前記第 1 の核酸プローブの 3' 末端を蛍光微小粒子 (Luminex bead、Luminex 社製) の表面に固定して用いた。第 1 の核酸プローブの蛍光微小粒子への固定は、架橋剤 EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) を用いて行った。

[0058] シグナル増幅用プローブとして、3' 末端が Cy3 で標識されている 2 種類の核酸プローブ [HCP-1 及び HCP-2] を用いた。

HCP-1 の塩基配列 (5'-X-Y-Z-3')

5'-CATCTCTGCTGGTC CCACATTCAGACCC GTTCGCCATAGACG-3' (配列番号 3)

HCP-2 の塩基配列 (5'-X'-Y'-Z'-3')

5'-GACCAGCAGAGATG GGGTCTGAATGTGG CGTCTATGGCGAAC-3' (配列番号 4)

[0059] 第 2 の核酸プローブとして、前記第 1 の核酸プローブ-1 に相補的な塩基配列 (12 塩基) 及び HCP-1 の一部と同じ塩基配列 (配列 ZYZ) を有する核酸プローブ [第 2 の核酸プローブ-1] を用いた。

第2の核酸プローブ1の塩基配列 (5'-P₁'-Z-Y-Z-3')

5'-CACTTTTATTGG GTTCGCCATAGACG CCACATTCAGACCC GTTCGCCATAGACG-3' (配列番号5)

[0060] 0.2 mL チューブに0.01、0.1、1、10又は100 fmolの標的核酸、第1の核酸プローブを表面に固定した微小粒子を 1×10^3 個、並びに10 fmolの第2の核酸プローブをTMAC緩衝液 [1.5M TMAC (tetra-methyl ammonium chloride)、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)、0.1% N-lauroylsarcosine] 50 μ Lに加え、95°Cで2分間反応させた後、56°Cで2時間反応させ、15°Cに保持した。

その後、2種のシグナル増幅用プローブ (HCP-1 及び HCP-2) を各々50 pmol 含むTMAC緩衝液50 μ Lを加え、計100 μ Lとし、56°Cで1時間反応させ、15°Cに保持した。

反応終了後、フローサイトメトリー (Luminex社、Luminex 100) でCy3の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した (Cy3の最大励起波長: 550 nm、最大蛍光波長: 570 nm、フローサイトメトリーのレーザー: 532 nm、検出波長幅: 565-585 nm)。結果を表1に示す。

[0061] (実施例2)

標的核酸として22塩基のオリゴRNAを用いた。

ターゲットオリゴRNAの塩基配列 (5'-T₂-3')

5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (配列番号6)

[0062] 第1の核酸プローブとして、任意の塩基配列 (10塩基)、標的核酸に相補的な塩基配列 (22塩基)、いずれのプローブ及び標的核酸とも結合しないスペーサー領域 (20塩基) からなる核酸プローブ [第1の核酸プローブ-2] を用いた。

第1の核酸プローブ-2の塩基配列 (5'-P₂-T₂'-S₁-3')

5'-GAGAAGGTGT TCAACATCAGTCTGATAAGCTA GATCTCGCTCACGGTAGTGC-3' (配列番号7)

前記第1の核酸プローブの3'末端を蛍光微小粒子 (Luminex bead、Lumin

ex社製)の表面に固定して用いた。

[0063] シグナル増幅用プローブとして、実施例1で用いた3'末端がCy3で標識されているHCP-1及びHCP-2を用いた。

[0064] 第2の核酸プローブとして、前記第1の核酸プローブ-2に相補的な塩基配列(10塩基)、いずれのプローブ及び標的核酸とも結合しないスペーサー領域(5塩基)、及びHCP-1の一部と同じ塩基配列(配列ZYZ)を有する核酸プローブ[第2の核酸プローブ-2]を用いた。

第2の核酸プローブ-2の塩基配列(5'-P₂'-S₂-Z-Y-Z-3')

5'-ACACCTTCTC GTTCA GTTCGCCATAGACG CCACATTCAGACCC GTTCGCCATAGACG-3' (配列番号8)

[0065] 0.2mLチューブに0.01又は1fmolの標的核酸、第1の核酸プローブを表面に固定した微小粒子を500個、並びに20fmolの第2の核酸プローブを4×SSC緩衝液[0.06M クエン酸ナトリウム、0.6M 塩化ナトリウム、0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25μLに加え、65℃で2分間反応させた後、46.3℃で2時間反応させ、15℃に保持した。

その後、2種のシグナル増幅用プローブ(HCP-1及びHCP-2)を各々12.5pmol含む溶液[0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25μLを加え、計50μLとし、53.7℃で1時間反応させ、15℃に保持した。

反応終了後、フローサイトメトリーでCy3の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した。結果を表1に示す。

[0066] (実施例3)

第1の核酸プローブ-2のスペーサー領域に相補的な核酸プローブ[アンチスペーサー領域オリゴ]を更に用いた以外は実施例2と同様に実験を行った。

アンチスペーサー領域オリゴの塩基配列(5'-S₁'-3')

5'-GCACTACCGTGAGCGAGATC-3' (配列番号9)

[0067] 0.2 mL チューブに 0.0.1 又は 1 fmol の標的核酸、第 1 の核酸プローブを表面に固定した微小粒子を 500 個、20 fmol の第 2 の核酸プローブ、並びに 100 fmol のアンチスパーサー領域オリゴを 4 × SSC 緩衝液 25 μL に加え、65 °C で 2 分間反応させた後、46.3 °C で 2 時間反応させ、15 °C に保持した。

その後、2 種のシグナル増幅用プローブ（HCP-1 及び HCP-2）を各々 12.5 pmol 含む溶液 [0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25 μL を加え、計 50 μL とし、53.7 °C で 1 時間反応させ、15 °C に保持した。

反応終了後、フローサイトメトリーで Cy 3 の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した。結果を表 1 に示す。

[0068] (実施例 4)

標的核酸として、22 塩基のターゲットオリゴ DNA-2 を用いた。

ターゲットオリゴ DNA-2 の塩基配列 (5'-T₃-3')

5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' (配列番号 10)

[0069] シグナル増幅用プローブとして、実施例 1 で用いた 3' 末端が Cy 3 で標識されている HCP-1 及び HCP-2 を用いた。第 2 の核酸プローブとして、実施例 1 で用いた HCP-1 を用いた。

[0070] 第 1 の核酸プローブとして、HCP-1 の一部に相補的な塩基配列 (11 塩基)、標的核酸に相補的な塩基配列 (22 塩基) 及びいずれのプローブ及び標的核酸とも結合しないスパーサー領域 (20 塩基) からなる核酸プローブ [第 1 の核酸プローブ-3] を用いた。

第 1 の核酸プローブ-3 の塩基配列 (5'-X₁'-T₃'-S₃-3')

5'-CAGCAGAGATG TCAACATCAGTCTGATAAGCTA GATCTCGCTCACGGTAGTGC-3' (配列番号 11)

前記第 1 の核酸プローブの 3' 末端を蛍光微小粒子 (Luminex bead、Luminex 社製) の表面に固定化した。

[0071] 0.2 mL チューブに 0.0.1、1 又は 10 fmol の標的核酸、第 1

の核酸プローブを表面に固定した微小粒子を 1×10^3 個、並びに 100 fmol の第2の核酸プローブ（HCP-1）をTMAC緩衝液 $50 \mu\text{L}$ に加え、 95°C で2分間反応させた後、 48°C で2時間反応させ、 15°C に保持した。

その後、2種のシグナル増幅用プローブ（HCP-1及びHCP-2）を各々 50 pmol 含むTMAC緩衝液 $50 \mu\text{L}$ を加え、計 $100 \mu\text{L}$ とし、 54°C で30分反応させ、 15°C に保持した。

反応終了後、フローサイトメトリーでCy3の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した。結果を表1に示す。

[0072] [表1]

オリゴヌクレオチド (fmol)	蛍光シグナル量(MFI)			
	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4
0	0	0	0	0
0.1	161	253.3	325.3	1358
1	364	2835.3	4276.3	5070
10	2566	—	—	9921
100	3595	—	—	—

[0073] 表1に示すように、試料中に標的核酸が存在しない場合は、十分なシグナルが検出されなかったのに対し、試料中に標的核酸が存在する場合は、その含有量に応じたシグナルが検出され、21塩基及び22塩基の低分子核酸が簡便且つ高感度に検出された。

[0074] (実施例5)

標的核酸として、実施例4で用いた22塩基のターゲットオリゴDNA-2、20塩基のターゲットオリゴDNA-3、18塩基のターゲットオリゴDNA-4、16塩基のターゲットオリゴDNA-5及び14塩基のターゲットオリゴDNA-6を用いた。

ターゲットオリゴDNA-3の塩基配列 (5'-T₄-3')

5'-GCTTATCAGACTGATGTTGA-3' (配列番号12)

ターゲットオリゴDNA-4の塩基配列 (5'-T₅-3')

5'-TTATCAGACTGATGTTGA-3' (配列番号13)

ターゲットオリゴDNA-5の塩基配列 (5'-T₆-3')

5'-ATCAGACTGATGTTGA-3' (配列番号14)

ターゲットオリゴDNA-6の塩基配列 (5'-T₇-3')

5'-CAGACTGATGTTGA-3' (配列番号15)

[0075] シグナル増幅用プローブとして、実施例1で用いた3'末端がCy3で標識されているHCP-1及びHCP-2を用いた。第2の核酸プローブとして、実施例2で用いた第2の核酸プローブ-2を用いた。

[0076] 第1の核酸プローブとして、実施例2で用いた第1の核酸プローブ-2、即ち、第2の核酸プローブ-2に相補的な塩基配列(10塩基)、標的核酸(22、20、18、16又は14塩基)に相補的な配列を含む塩基配列(22塩基)、及びいずれのプローブ及び標的核酸とも結合しないスペーサー領域(20塩基)からなる核酸プローブを用いた。

前記第1の核酸プローブの3'末端を蛍光微小粒子(Luminex bead、Luminex社製)の表面に固定して用いた。第1の核酸プローブの蛍光微小粒子への固定は、架橋剤EDC(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride)を用いて行った。

[0077] 0.2mLチューブに0又は1fmolの各標的核酸、第1の核酸プローブを表面に固定した微小粒子を500個、並びに20fmolの第2の核酸プローブを4×SSC緩衝液[0.06M クエン酸ナトリウム、0.6M 塩化ナトリウム、0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25μLに加え、65℃で2分間反応させた後、46.3℃で2時間反応させ、15℃に保持した。

その後、2種のシグナル増幅用プローブ(HCP-1及びHCP-2)を12.5pmol及び11.25pmol含む溶液[0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25μLを加え、計50μLとし、53.7℃で1時間反応させ、15℃に保持した。

反応終了後、フローサイトメトリーでCy3の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した。結果を表2に示す。

[0078] [表2]

実施例5

標的核酸(長さ)	蛍光シグナル量(MFI)
ターゲットオリゴDNA-2(22塩基)	6802.0
ターゲットオリゴDNA-3(20塩基)	7562.5
ターゲットオリゴDNA-4(18塩基)	2285.8
ターゲットオリゴDNA-5(16塩基)	754.3
ターゲットオリゴDNA-6(14塩基)	122.5
Blank	0.0

[0079] 表2に示すように、本発明により低分子核酸を直接標的核酸とした使用した検出が可能であり、16塩基長のDNA(1fmol/reaction)まで十分なシグナル量で検出できた。

[0080] (実施例6)

標的核酸として、実施例4で用いた22塩基のターゲットオリゴDNA-2を用い、標的核酸の濃度を0、0.1又は1fmolに変更した以外は、実施例5と同様に実験を行った。結果を表3に示す。

[0081] (比較例1)

標的核酸として、実施例4で用いた22塩基のターゲットオリゴDNA-2を用いた。シグナル増幅用プローブとして、実施例1で用いた3'末端がCy3で標識されているHCP-1及びHCP-2を用いた。

[0082] 第1の核酸プローブとして、標的核酸に相補的な塩基配列(11塩基)及びHCP-1の一部と同じ塩基配列(配列ZYZ)を有する核酸プローブ[第1の核酸プローブ-4]を用いた。

第1の核酸プローブ-4の塩基配列(5'-T_{3L}'-Z-Y-Z-3')

5'-CTGATAAGCTA GTTCGCCATAGACG CCACATTCAGACCC GTTCGCCATAGACG-3' (配列番号16)

[0083] 捕捉プローブとして、標的核酸に相補的な塩基配列(11塩基)からなる核酸プローブを用いた。

捕捉プローブの塩基配列(5'-T_{3R}'-3')

5'-TCAACATCAGT-3' (配列番号17)

前記捕捉プローブの5'末端を蛍光微小粒子（Luminex bead、Luminex社製）の表面に固定して用いた。捕捉プローブの蛍光微小粒子への固定は、架橋剤EDC（1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride）を用いて行った。

[0084] 0.2 mLチューブに0、0.1又は1 fmolの標的核酸、捕捉プローブを表面に固定した微小粒子を500個、並びに100 fmolの第1の核酸プローブを4×SSC緩衝液[0.06M クエン酸ナトリウム、0.6M 塩化ナトリウム、0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25 µLに加え、95℃で2分間反応させた後、46.3℃で2時間反応させ、15℃に保持した。

その後、2種のシグナル増幅用プローブ（HCP-1及びHCP-2）を12.5 pmol及び11.25 pmol含む溶液[0.1% N-lauroylsarcosine、50mM Tris-HCl (pH8.0)、4mM EDTA (pH8.0)] 25 µLを加え、計50 µLとし、53.7℃で1時間反応させ、15℃に保持した。

反応終了後、フローサイトメトリーでCy3の蛍光及び蛍光微小粒子の蛍光を測定した。結果を表3に示す。

[0085] [表3]

オリゴヌクレオチド (fmol)	蛍光シグナル量(MFI)	
	実施例 6	比較例 1
0	0.0	0.0
0.1	281.0	7.0
1	8489.5	14.5

[0086] 表3に示した如く、実施例6では短いオリゴヌクレオチドを高感度に検出することができたが、比較例1では短いオリゴヌクレオチドを検出するのは困難であった。

符号の説明

[0087] 10：標的核酸、12a, 12b, 12c：第1の核酸プローブ、13：担体、14a, 14b, 14c：第2の核酸プローブ、16, シグナル増幅

用プローブ、16a : HCP-1、16b : HCP-2、18 : 複合体、20 : プローブポリマー。

請求の範囲

- [請求項1] (a) 標的核酸、該標的核酸に相補的な第1の塩基配列と第2の塩基配列とを有する第1の核酸プローブ、及び該第1の核酸プローブの第2の塩基配列に相補的な塩基配列を有する第2の核酸プローブを反応させ、該標的核酸、該第1の核酸プローブ及び該第2の核酸プローブを含む複合体を形成させる工程；
- (b) 前記複合体に対し、互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し自己集合反応によるプローブポリマーの形成が可能な複数種のシグナル増幅用プローブを添加し、前記複合体と結合したプローブポリマーを形成させる工程；及び
- (c) 前記プローブポリマーを検出する工程；を含み、
- 前記第1の核酸プローブの前記第1の塩基配列と前記第2の塩基配列は隣接してなり、
- 前記第2の核酸プローブは、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の1つのシグナル増幅用プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有することを特徴とする標的核酸の検出方法。
- [請求項2] 前記第1の核酸プローブが、担体に固定されているか担体に固定可能な部分が導入されていることを特徴とする請求項1記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項3] 前記第1の核酸プローブの第2の塩基配列の長さが6塩基以上20塩基以下であることを特徴とする請求項1又は2記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項4] 前記第1の核酸プローブの第2の塩基配列が、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の1つのシグナル増幅用プローブの一部と相補的な配列であり、前記第2の核酸プローブとして、該1つのシグナル増幅用プローブを用いることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の標的核酸の検出方法。
- [請求項5] 前記複数種のシグナル増幅用プローブの少なくとも1つが標識物質

で標識されてなることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の標的核酸の検出方法。

[請求項6] 前記複数種のシグナル増幅用プローブが第 1 のシグナル増幅用プローブと第 2 のシグナル増幅用プローブとからなり、

該第 1 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも核酸領域 X、核酸領域 Y 及び核酸領域 Z を含む核酸プローブであり、

該第 2 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも前記核酸領域 X に相補的な核酸領域 X'、前記核酸領域 Y に相補的な核酸領域 Y' 及び前記核酸領域 Z に相補的な核酸領域 Z' を含む核酸プローブであることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の標的核酸の検出方法。

[請求項7] 前記標的核酸がマイクロ RNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の標的核酸の検出方法。

[請求項8] 前記標的核酸の塩基配列の長さが 15 塩基以上 25 塩基以下であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項記載の標的核酸の検出方法。

[請求項9] 第 1 の核酸プローブ、第 2 の核酸プローブ、及び互いにハイブリダイズ可能な相補的塩基配列領域を有し自己集合反応によるプローブポリマーの形成が可能な複数種のシグナル増幅用プローブを含む、標的核酸の検出に用いられる検出用キットであって、

前記第 1 の核酸プローブは、標的核酸に相補的な第 1 の塩基配列及び前記第 2 の核酸プローブに相補的な第 2 の塩基配列を有し且つ該第 1 の塩基配列と該第 2 の塩基配列が隣接してなり、

前記第 2 の核酸プローブは、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有することを特徴とする検出用キット。

[請求項10] 前記第 1 の核酸プローブが、担体に固定されているか担体に固定可

能な部分が導入されていることを特徴とする請求項 9 記載の検出用キット。

[請求項11] 前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列の長さが 6 塩基以上 20 塩基以下であることを特徴とする請求項 9 又は 10 記載の検出用キット。

[請求項12] 前記第 1 の核酸プローブの第 2 の塩基配列が、前記複数種のシグナル増幅用プローブ中の 1 つのシグナル増幅用プローブの一部と相補的な配列であり、前記第 2 の核酸プローブとして、該 1 つのシグナル増幅用プローブを用いることを特徴とする請求項 9 ～ 11 のいずれか 1 項記載の検出用キット。

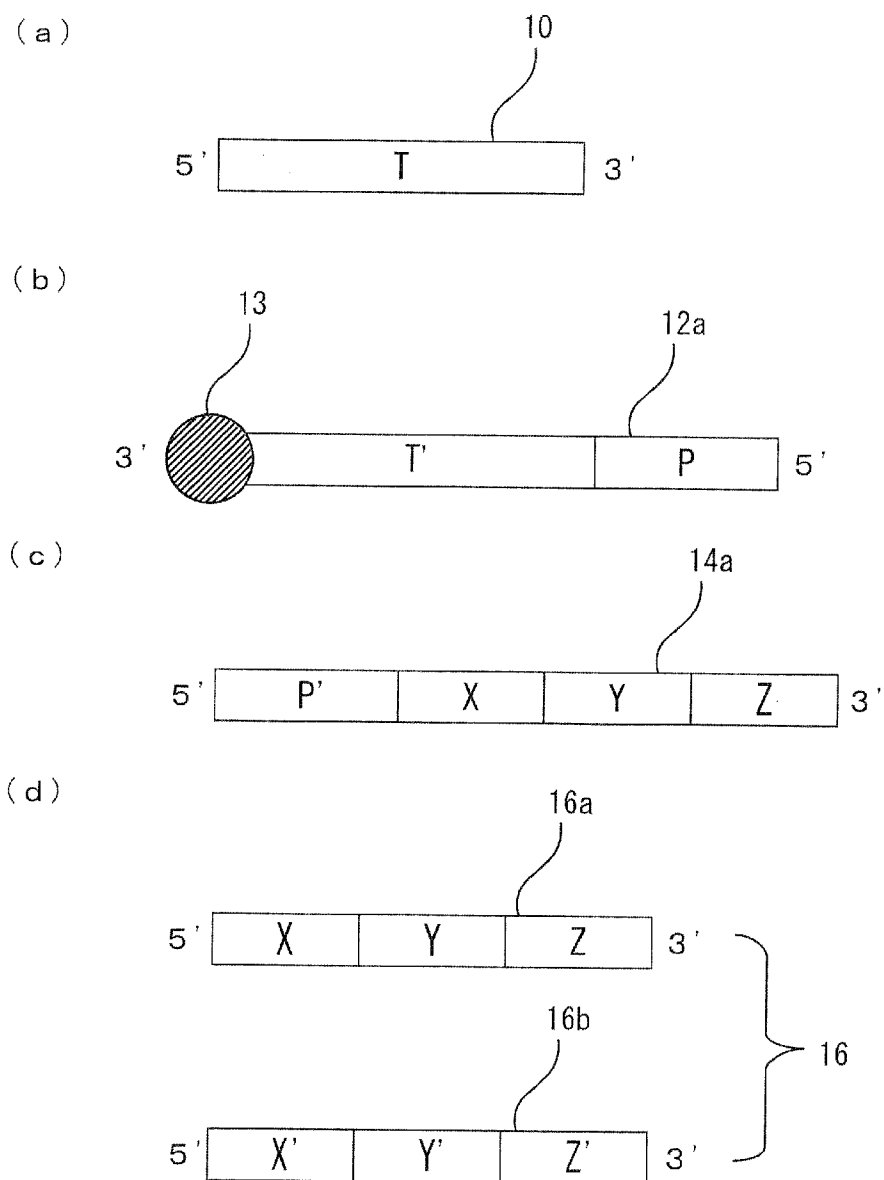
[請求項13] 前記複数種のシグナル増幅用プローブの少なくとも 1 つが標識物質で標識されてなることを特徴とする請求項 9 ～ 12 のいずれか 1 項記載の検出用キット。

[請求項14] 前記複数種のシグナル増幅用プローブが第 1 のシグナル増幅用プローブと第 2 のシグナル増幅用プローブとからなり、

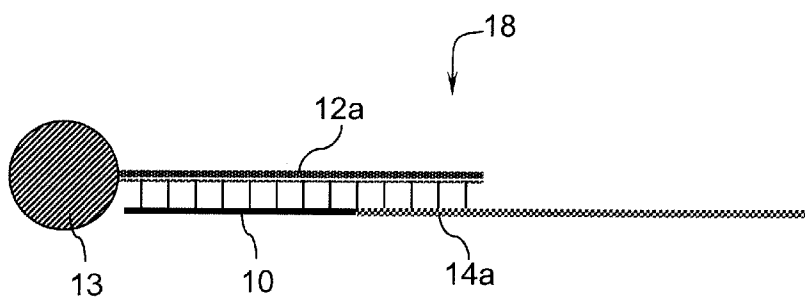
該第 1 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも核酸領域 X、核酸領域 Y 及び核酸領域 Z を含む核酸プローブであり、

該第 2 のシグナル増幅用プローブが 3 箇所以上の核酸領域を含み、且つ 5' 端側から順に少なくとも前記核酸領域 X に相補的な核酸領域 X'、前記核酸領域 Y に相補的な核酸領域 Y' 及び前記核酸領域 Z に相補的な核酸領域 Z' を含む核酸プローブであることを特徴とする請求項 9 ～ 13 のいずれか 1 項記載の検出用キット。

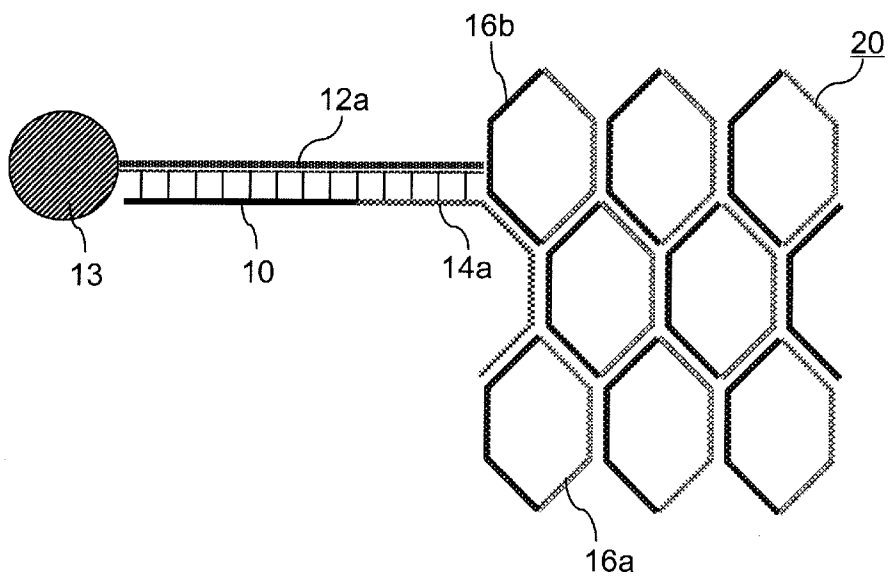
[図1]



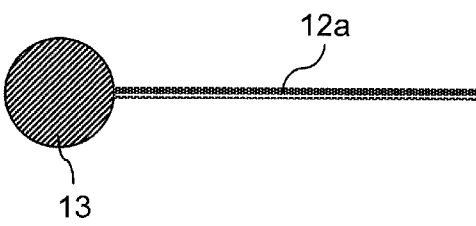
[図2]



[図3]

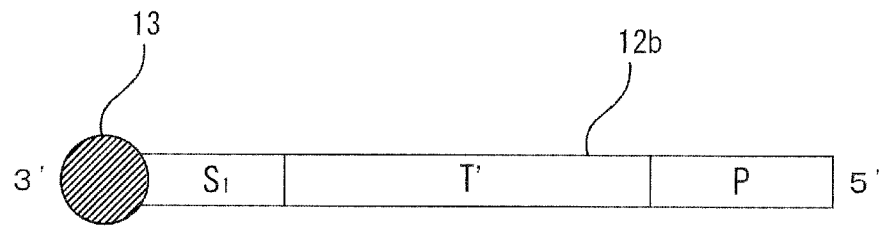


[図4]

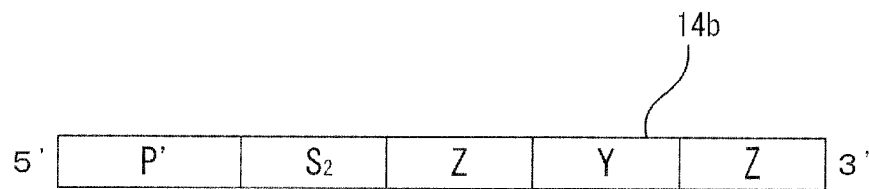


[図5]

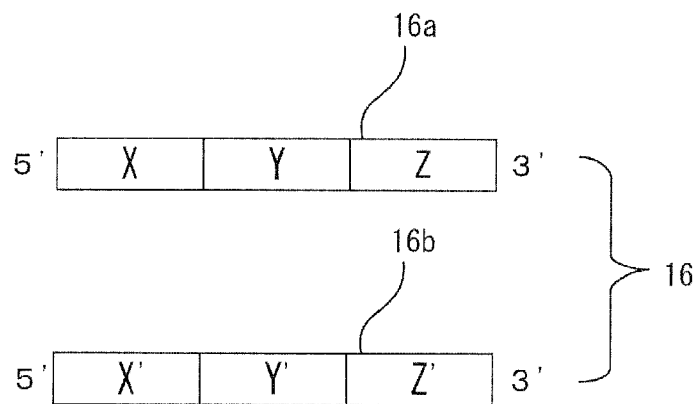
(a)



(b)

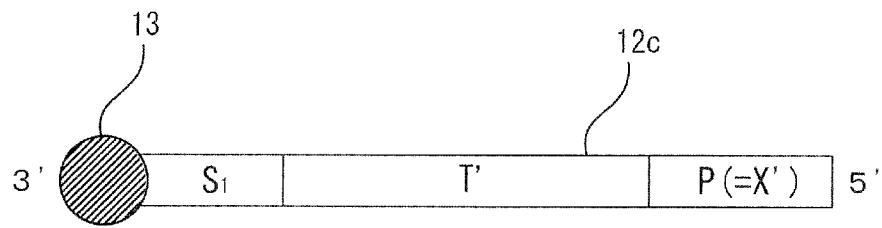


(c)

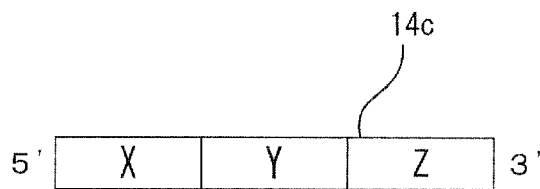


[図6]

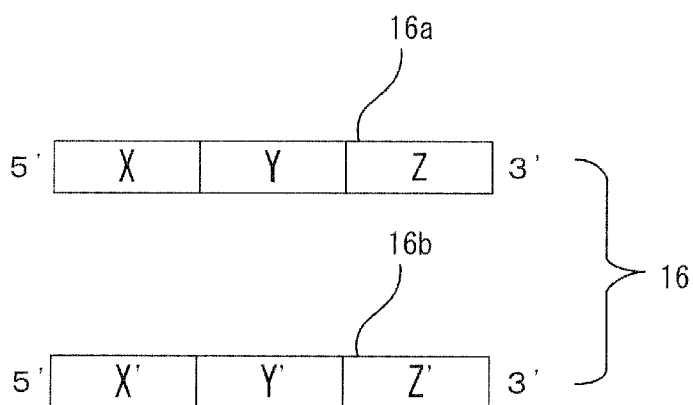
(a)



(b)



(c)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12M1/00(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, G01N33/53 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/09, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Toshihiko FUJIKAWA, "xMAP technology to PALSAR-ho ni yoru Idenshi Kaiseki Application", 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 10 December 2009 (10.12.2009), MBSJ2009 PROGRAM, vol. 32, page 559	1-14
X/Y	WO 2001/75157 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 11 October 2001 (11.10.2001), page 2, lines 17 to 26; page 13, lines 17 to 19; page 19, lines 23 to 26; page 20, lines 11 to 18; page 22, lines 11 to 25; fig. 26 & JP 3310662 B & US 2003/0008294 A1 & EP 1188841 A1 & AU 4458301 A & AU 747848 B & CA 2387755 A & CN 1364199 A & AT 418620 T & DK 1188841 T & ES 2317893 T	1-6, 9-14/7-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 February, 2010 (17.02.10)Date of mailing of the international search report
02 March, 2010 (02.03.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051156

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2000-201687 A (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 25 July 2000 (25.07.2000), paragraphs [0009], [0011], [0065]; fig. 11 (Family: none)	1, 4-6, 9, 12-14/2-3, 7-8, 10-11,
Y	JP 2008-146538 A (INTEC Web and Genome Infomatics Corp.), 26 June 2008 (26.06.2008), paragraph [0010] (Family: none)	7-8
Y	JP 2008-86296 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 17 April 2008 (17.04.2008), paragraph [0006] (Family: none)	7-8
Y	JP 2008-086201 A (Gifu Research and Development Foundation), 17 April 2008 (17.04.2008), paragraphs [0002] to [0009] (Family: none)	7-8
A	WO 2002/031192 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 18 April 2002 (18.04.2002), fig. 1 to 13 & JP 3912595 B & US 2003/0087262 A1 & EP 1304386 A1 & DE 60123626 T & AU 9419901 A & AT 341647 T & ES 2273892 T	1-14
A	JP 2002-355081 A (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 10 December 2002 (10.12.2002), fig. 1 to 26, 28, 30, 32, 35 (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/09, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
PX	藤川利彦, "xMAP technology と PALSAR 法による遺伝子解析アプリケーション", 第 3 2 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10, MBSJ2009 PROGRAM, Vol. 32, pp. 559	1-14

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 3 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高山 敏充

4 B

4 1 5 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	WO 2001/75157 A1 (三光純薬株式会社) 2001. 10. 11, 第2頁第17-26行、第13頁第17-19行、第19頁第23-26 行、第20頁第11-18行、第22頁第11-25行、第26図 & JP 3310662 B & US 2003/0008294 A1 & EP 1188841 A1 & AU 4458301 A & AU 747848 B & CA 2387755 A & CN 1364199 A & AT 418620 T & DK 1188841 T & ES 2317893 T	1-6, 9-14/7-8
X/A	JP 2000-201687 A (三光純薬株式会社) 2000. 07. 25, 段落【0009】、【0011】、【0065】、第11図 (ファミリーなし)	1, 4-6, 9, 12-1 4/2-3, 7-8, 10 -11,
Y	JP 2008-146538 A (インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフ ォマティクス株式会社) 2008. 06. 26, 段落【0010】 (ファミリーなし)	7-8
Y	JP 2008-86296 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008. 04. 17, 段落【0006】 (ファミリーなし)	7-8
Y	JP 2008-086201 A (財団法人岐阜県研究開発財団) 2008. 04. 17, 段落【0002】 - 【0009】 (ファミリーなし)	7-8
A	WO 2002/031192 A1 (三光純薬株式会社) 2002. 04. 18, 図1-13 & JP 3912595 B & US 2003/0087262 A1 & EP 1304386 A1 & DE 60123626 T & AU 9419901 A & AT 341647 T & ES 2273892 T	1-14
A	JP 2002-355081 A (三光純薬株式会社) 2002. 12. 10, 図1-26, 28, 30, 32, 35 (ファミリーなし)	1-14