

(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  
2019年12月5日(05.12.2019)



(10) 国際公開番号  
**WO 2019/229792 A1**

(51) 国際特許分類:  
*C12Q 1/6876* (2018.01) *C12Q 1/6844* (2018.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/020305

(22) 国際出願日: 2018年5月28日(28.05.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社ニコン (NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 上野 太郎 (UENO Taro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 鈴木 久皇 (SUZUKI Kuno);

〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

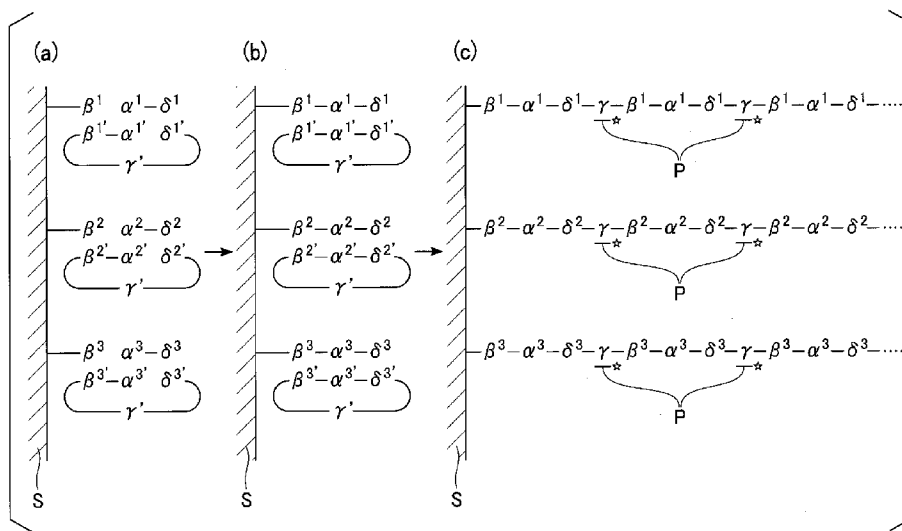
(74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

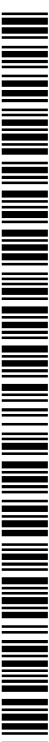
(54) Title: METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID FRAGMENT

(54) 発明の名称: 標的核酸断片を検出する方法

[図1]



(57) Abstract: A method for detecting a target nucleic acid fragment comprising a first part  $\alpha$  and a second part  $\delta$ , wherein the method comprises: (a) a step for reacting a target nucleic acid fragment, a capture probe that has a third part  $\beta$  and is immobilized on a solid support, and a single-stranded or circular nucleic acid probe in which a region  $\alpha'$  complementary to  $\alpha$ , a region  $\beta'$  complementary to  $\beta$ , a region  $\gamma'$ , and a region  $\delta'$  complementary to  $\delta$  are linked in the stated order in a single-stranded or circular form, binding the end of  $\alpha$  and the end of  $\beta$ , and obtaining a complex in which region  $\alpha'$  of



WO 2019/229792 A1

QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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))

the circular nucleic acid probe is hybridized with  $\alpha$ , region  $\beta'$  is hybridized with  $\beta$ , and region  $\delta'$  is hybridized with  $\delta$ ; (b) a step for synthesizing a single-stranded nucleic acid having a base sequence complementary to the circular nucleic acid probe by rolling circle amplification in which the circular nucleic acid probe is used as a template; and (c) a step for hybridizing a detection probe that has the same sequence as part of the nucleic acid region of the single-stranded or circular nucleic acid probe to the single-stranded nucleic acid, and detecting a complementary sequence in the amplified single-stranded nucleic acid.

(57) 要約：第1の部分 $\alpha$ 及び第2の部分 $\delta$ からなる標的核酸断片を検出する方法であって、(a) 標的核酸断片と、第3部分 $\beta$ を有し、固相担体に固定された捕捉プローブと、 $\alpha$ と相補的な領域 $\alpha'$ と、 $\beta$ と相補的な領域 $\beta'$ と、領域 $\gamma$ と、 $\delta$ と相補的な領域 $\delta'$ と、がこの順に連結した一本鎖又は環状の核酸プローブと、を反応させて、 $\alpha$ の末端と、 $\beta$ の末端とが結合し、環状の核酸プローブの領域 $\alpha'$ が $\alpha$ と、領域 $\beta'$ が $\beta$ と、領域 $\delta'$ が $\delta$ とそれぞれハイブリダイズした複合体を得る工程と、(b) 環状の核酸プローブを鋳型としたローリングサークル増幅により、環状の核酸プローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸を合成する工程と、(c) 一本鎖又は環状の核酸プローブの一部の核酸領域と同じ配列を有する、検出プローブを、一本鎖核酸にハイブリダイズさせ、増幅された一本鎖核酸中の相補的な配列を検出する工程と、を備える、方法。

## 明 細 書

発明の名称： 標的核酸断片を検出する方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、標的核酸断片を検出する方法に関する。より詳細には、標的核酸断片を検出する方法及び標的核酸断片を検出するためのキットに関する。

### 背景技術

[0002] 近年、体外診断分野における試験の高速化、高効率化、集積化、検査機器の超小型化等を目指した $\mu$ -TAS (Micro-Total Analysis Systems)と呼ばれる流体デバイスの開発が注目を浴びており、世界的に活発な研究が進められている。このような流体デバイスを用いて行う検査項目の一つとして、試料中の多種類の核酸を同時に簡便に検出する技術が求められている。

[0003] 例えば、非特許文献1には、DNAマイクロアレイ上でローリングサークル増幅を行う方法が記載されている。ローリングサークル増幅とは、一本鎖又は二本鎖の環状核酸を鋳型として、相補鎖を合成する核酸増幅の一種である。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1: Nallur G., et al., Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays, Nucleic Acids Res., 29 (23), E118, 2001.

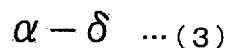
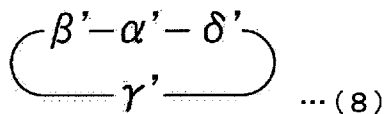
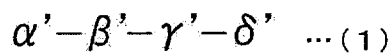
### 発明の概要

[0005] 一実施形態に係る方法は、第1の部分 $\alpha$ 及び第2の部分 $\delta$ からなる標的核酸断片を検出する方法であって、(a)前記標的核酸断片と、第3の部分 $\beta$ を有し、固相担体に固定された捕捉プローブと、前記第1の部分 $\alpha$ と相補的な核酸領域 $\alpha'$ と、前記第3の部分 $\beta$ と相補的な核酸領域 $\beta'$ と、核酸領域 $\gamma'$ と、前記第2の部分 $\delta$ と相補的な核酸領域 $\delta'$ と、がこの順に連結した

一本鎖又は環状の核酸プローブとを反応させて、前記標的核酸断片の前記第1の部分 $\alpha$ の末端と、前記捕捉プローブの前記第3の部分 $\beta$ の末端とが結合し、環状の前記核酸プローブの前記核酸領域 $\alpha'$ が前記第1の部分 $\alpha$ と、前記核酸領域 $\beta'$ が前記第3の部分 $\beta$ と、前記核酸領域 $\delta'$ が前記第2の部分 $\delta$ とそれぞれハイブリダイズした複合体を得る工程と、(b)環状の前記核酸プローブを鋳型としたローリングサークル増幅により、環状の前記核酸プローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸を合成する工程と、(c)前記一本鎖又は環状の核酸プローブの一部の核酸領域と同じ配列を有する、標識物質により標識された検出プローブを、前記一本鎖核酸の一部の核酸領域にハイブリダイズさせ、増幅された前記一本鎖核酸中の前記一部の核酸領域を検出する工程と、を備える。

[0006] 一実施形態に係る、標的核酸断片を検出するためのキットは、下記式(3)で表される標的核酸断片を検出するものであり、下記式(1)又は式(8)で表される核酸断片と、固相に結合された、下記式(2)で表される部分を含む核酸断片とを含む。

[0007] [化1]



[式(1)～(3)中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta$ は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\delta'$ はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

### 図面の簡単な説明

[0008] [図1] (a)～(c)は、捕捉プローブが核酸アレイである場合の標的核酸断片の検出方法を説明する模式図である。

[図2] (a) ~ (f) は、実験例1における代表的なスポットの蛍光顕微鏡写真である。

[図3] (a) 及び (b) は、実験例2において、蛍光顕微鏡写真に基づいて数値化したCy3の蛍光強度を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

#### [0009] [標的核酸断片を検出する方法]

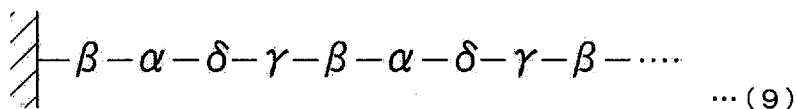
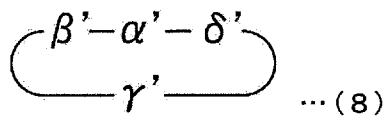
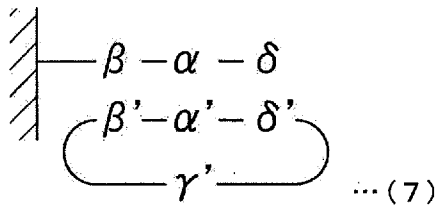
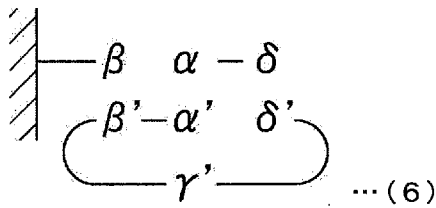
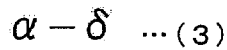
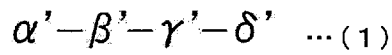
一実施形態において、本発明は、第1の部分 $\alpha$ 及び第2の部分 $\delta$ からなる標的核酸断片を検出する方法であって、(a) 前記標的核酸断片を、第3の部分 $\beta$ を有し、固相担体に固定された捕捉プローブと、前記第1の部分 $\alpha$ と相補的な核酸領域 $\alpha'$ と、前記第3の部分 $\beta$ と相補的な核酸領域 $\beta'$ と、核酸領域 $\gamma'$ と、前記第2の部分 $\delta$ と相補的な核酸領域 $\delta'$ と、がこの順に連結した一本鎖又は環状の核酸プローブと、を反応させて、前記標的核酸断片の前記第1の部分 $\alpha$ の末端と、前記捕捉プローブの前記第3の部分 $\beta$ の末端とが結合し、環状の前記核酸プローブの前記核酸領域 $\alpha'$ が前記第1の部分 $\alpha$ と、前記核酸領域 $\beta'$ が前記第3の部分 $\beta$ と、前記核酸領域 $\delta'$ が前記第2の部分 $\delta$ とそれぞれハイブリダイズした複合体を得る工程と、(b) 環状の前記核酸プローブを鋳型としたローリングサークル増幅により、環状の前記核酸プローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸を合成する工程と、(c) 前記一本鎖又は環状の核酸プローブの一部の核酸領域と同じ配列を有する、標識物質により標識された検出プローブを、前記一本鎖核酸の一部の核酸領域にハイブリダイズさせ、増幅された前記一本鎖核酸中の前記一部の核酸領域を検出する工程と、を備える方法を提供する。

#### [0010] (第1実施形態)

第1実施形態の方法は、下記式(3)で表される標的核酸断片と、下記式(1)で表される一本鎖の核酸プローブと、固相に結合された下記式(2)で表される第3の部分とを接触させて、下記式(6)で表される複合体を形成する工程と、下記式(6)で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ をそれぞれ結合させて、下記式(7)で表される複合体を形成す

る工程 (a) と、下記式 (7) で表される複合体における  $\beta - \alpha - \delta$  をプライマーとしたローリングサークル増幅により、下記式 (8) で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式 (9) で表される核酸断片を得る工程 (b) と、下記式 (9) で表される核酸断片に、下記式 (9) で表される核酸断片の一部と相補的な配列に特異的にハイブリダイズするプローブを接触させて、下記式 (9) で表される核酸断片中の一部の配列を検出する工程 (c) とを備える方法である。工程 (c) は、下記式 (9) で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブをハイブリダイズさせ、下記式 (9) で表される核酸断片の存在を検出する工程であるといいかえることもできる。

[0011] [化2]



[式 (1) ~ (3)、(6) ~ (9) 中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  は、それぞれ任

意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$  はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[0012] 第1実施形態の方法は、第1の部分 $\alpha$ 及び第2の部分 $\delta$ からなる標的核酸断片を検出する方法であって、工程(a)：前記標的核酸断片を含有する試料と、第3の部分 $\beta$ を有する捕捉プローブが固定された固相担体と、前記第1の部分 $\alpha$ と相補的な核酸領域 $\alpha'$ と、前記第3の部分 $\beta$ と相補的な核酸領域 $\beta'$ と、核酸領域 $\gamma'$ と、前記第2の部分 $\delta$ と相補的な核酸領域 $\delta'$ と、がこの順に連結した核酸プローブと、を接触させて、前記核酸領域 $\beta'$ が前記第3の部分 $\beta$ と、前記核酸領域 $\alpha'$ が前記第1の部分 $\alpha$ と、前記核酸領域 $\delta'$ が前記第2の部分 $\delta$ とそれぞれハイブリダイズした複合体を形成する工程と、前記複合体における前記標的核酸断片の前記第1の部分 $\alpha$ の末端を前記捕捉プローブの前記第3の部分 $\beta$ の末端と結合し、前記核酸領域 $\alpha'$ の末端を前記核酸領域 $\delta'$ の末端と結合し、環状の前記核酸プローブを得る工程と、工程(b)：環状の前記核酸プローブを鋳型としたローリングサークル増幅により、環状の前記核酸プローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸を合成する工程と、工程(c)：前記工程(b)において合成された一本鎖核酸の一部と相補的な配列を有するプローブを、前記工程(b)において合成された一本鎖核酸にハイブリダイズさせ、前記工程(b)において合成された一本鎖核酸の存在を検出する工程と、を備える方法であるといいかえることもできる。ここで、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$ は、上記式(1)～(3)、(6)～(9)におけるものと同じ意味を表す。

[0013] 一本鎖核酸の増幅反応が進行するのは、標的核酸断片と捕捉プローブと核酸プローブとがハイブリダイズして式(7)の複合体が形成されたときだけであり、標的核酸断片における一塩基単位での違いを検出することができる。また、増幅産物に存在する検出配列に検出プローブをハイブリダイズして検出するため、標的核酸断片が微量であっても検出することができる。

[0014] このため、本実施形態の方法によれば、1つの反応容器内で、試料中の多

種類の標的核酸断片を同時に簡便に検出することができる。また、等温増幅反応であるローリングサークル増幅を利用するため、検査機器の小型化が容易である。以下、各工程について説明する。

[0015] (工程 (a))

本工程では、上記式 (3) で表される標的核酸断片と、上記式 (1) で表される核酸断片と、固相に結合された上記式 (2) で表される核酸断片とを接触させて、上記式 (6) で表される複合体を形成する。また、上記式 (6) で表される複合体における  $\beta$  及び  $\alpha$ 、並びに  $\alpha'$  及び  $\delta'$  をそれぞれ結合させて、上記式 (7) で表される複合体を形成する。本明細書において、上記式 (1) で表される核酸断片を「パドロックプローブ」という場合がある。また、上記式 (2) で表される核酸断片を「捕捉プローブ」という場合がある。

[0016] 《式 (3) で表される標的核酸断片》

ここで、標的核酸断片は、検出対象の標的核酸断片である。標的核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。RNAとしては、マイクロRNA (miRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、ノンコーディングRNA (ncRNA) 等が挙げられる。

[0017] また、標的核酸断片は一本鎖核酸である必要がある。このため、検出対象の核酸が二本鎖核酸である場合には、熱変性、アルカリ変性等により、一本鎖核酸を調製し、これを標的核酸断片とするとよい。

[0018] 標的核酸は、生体由来試料に含まれるものであることが好ましい。生体由来試料としては、血液、尿、唾液等が挙げられる。

[0019] 標的核酸断片は、後述する工程において、固相に結合された上記式 (2) で表される核酸断片と結合される。結合は、好適にはT4DNAリガーゼ、E. coli DNAリガーゼ、耐熱性DNAリガーゼ等に代表される、隣接したDNA鎖の5' -リン酸化末端と3' -OH末端をホスホジエステル結合で連結する活性を有するリガーゼによって行う。このため、標的核酸断片の5' 末端にはリン酸基が存在していることが好ましい。

[0020] 一般的に、miRNAの5'末端にはリン酸基が存在している。このため、標的核酸断片がmiRNAである場合には、そのまま本工程を行えばよい。標的核酸断片の5'末端にリン酸基が存在しない場合には、T4ポリヌクレオチドキナーゼに代表される、ATPの $\gamma$ 位のリン酸をポリヌクレオチド（二本鎖及び一本鎖DNA、RNA）並びにヌクレオシド3'—リン酸塩の5'—ヒドロキシル末端への移転あるいは交換の触媒活性を有するキナーゼを反応させて、標的核酸断片の5'末端にリン酸基を付加することができる。

[0021] 標的核酸断片の5'末端にリン酸基を付加する場合、リン酸基の付加は、固相に結合された上記式（2）で表される核酸断片と結合する前であれば、いずれの段階において行ってもよい。

[0022] 標的核酸断片の長さは、15～500塩基程度であってもよく、30～500塩基程度であってもよく、30～200塩基程度であってもよい。標的核酸断片が上記範囲よりも長い場合には、例えば超音波処理、酵素処理等によって上記範囲内の長さに断片化してもよい。

[0023] 《式（2）で表される核酸断片（捕捉プローブ）》

捕捉プローブは、その5'末端側が固相に結合されている。固相としては、基板、粒子等が挙げられる。捕捉プローブと固相とは、直接結合していてもよいし、リンカーを介して結合していてもよい。リンカーとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリエーテル、ポリエステル、ポリウレタン、多糖類、これらのコポリマー、核酸断片等が挙げられる。

[0024] つまり、捕捉プローブは上記式（2）における $\beta$ の5'末端側にリンカーを有していてもよい。したがって、捕捉プローブは上記式（2）における $\beta$ を含む核酸断片であることができる。

[0025] 固相には、アレイ状に複数の捕捉プローブが配置されていてもよい。すなわち、捕捉プローブは、核酸アレイであってもよい。後述する工程において、上記式（2）で表される捕捉プローブと、上記式（3）で表される標的核

酸断片とが、配列特異的に結合される。そこで、捕捉プローブが核酸アレイであると、標的核酸断片を配列特異的に核酸アレイ上の個別の位置に配置して検出することが可能になる。ここで、核酸アレイ上に配置される捕捉プローブは、核酸アレイ上の各位置でそれぞれ異なる塩基配列を有していることが好ましい。前記固相は複数種類の捕捉プローブが、それぞれ異なる位置に固定された、核酸アレイであることが好ましい。固相の第1位置には第1核酸とハイブリダイズする第1捕捉プローブが、第2位置には第2核酸とハイブリダイズする第2捕捉プローブが固定されていることが好ましい。これにより、1つの反応容器内で、試料中の多種類の標的核酸断片を同時に簡便に検出することが可能となる。つまり、試料が複数種類の標的核酸断片を含む場合であっても、それぞれの種類の標的核酸断片を検出することができ、多項目検査、多項目測定が可能となる。

[0026] 標的核酸断片は、後述する工程において、捕捉プローブと結合される。結合は、上述したように、リガーゼによって行うことが好ましい。このため、捕捉プローブの3'末端には水酸基が存在していることが好ましい。

[0027] 《式(1)で表される核酸断片(パドロックプローブ)》

パドロックプローブは、上記式(3)で表される標的核酸断片、及び、捕捉プローブの双方と相補的な塩基配列を有している。そこで、本工程において、上記式(3)で表される標的核酸断片と、パドロックプローブと、固相に結合された捕捉プローブとを接触させると、互いに相補的な領域でハイブリダイズして、上記式(6)で表される複合体が形成される。

[0028] 上記式(6)で表される複合体において、 $\beta$ は捕捉プローブであり、5'末端側が固相に結合している。また、パドロックプローブの $\beta'$ とハイブリダイズしている。

[0029] また、 $\alpha - \delta$ は上記式(3)で表される標的核酸断片であり、パドロックプローブの $\alpha'$ 及び $\delta'$ とそれぞれハイブリダイズしている。工程(a)においては、上記式(6)で表される複合体の $\beta$ と $\alpha$ の間、及び $\alpha'$ と $\delta'$ の間は結合されていない。

- [0030] 上記式(6)で表される複合体を形成することによって、標的核酸断片を配列特異的に捕捉プローブに隣接させることができる。そこで、捕捉プローブが核酸アレイであると、標的核酸断片を配列特異的に核酸アレイ上の個別の位置に配置して検出することが可能になる。
- [0031] 一般的に、miRNAの5'末端にはリン酸基が存在している。このため、標的核酸断片がmiRNAである場合には、そのまま本工程を行えばよい。標的核酸断片の5'末端にリン酸基が存在しない場合には、T4ポリヌクレオチドキナーゼに代表される、ATPの $\gamma$ 位のリン酸をポリヌクレオチド(二本鎖及び一本鎖DNA、RNA)並びにヌクレオシド3'—リン酸塩の5'—ヒドロキシル末端への移転あるいは交換の触媒活性を有するキナーゼを反応させて、標的核酸断片の5'末端にリン酸基を付加することができる。
- [0032] 標的核酸断片の5'末端にリン酸基を付加する場合、リン酸基の付加は、固相に結合された捕捉プローブと結合する前であれば、いずれの段階において行ってもよい。
- [0033] パドロックプローブは、後述する工程において環状に結合される。具体的には、パドロックプローブの $\alpha'$ と $\delta'$ の間を結合する。この結合は、上述した標的核酸断片と捕捉プローブとの結合と同様にリガーゼによって行う。このため、パドロックプローブの $\alpha'$ の5'末端にはリン酸基が存在しており、 $\delta'$ の3'末端には水酸基が存在していることが好ましい。パドロックプローブの $\alpha'$ の5'末端にリン酸基が存在しない場合には、上述した標的核酸断片へのリン酸基の付加と同様にしてリン酸基を付加することができる。
- [0034] パドロックプローブにおいて、 $\gamma'$ は上記式(3)で表される標的核酸断片の存在を検出するための塩基配列である。
- [0035] 続いて、上記式(6)で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ をそれぞれ結合させて、上記式(7)で表される複合体を形成する。 $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ の結合は、上述したように、リガーゼによ

て行うことが好ましい。

[0036]  $\beta$  及び  $\alpha$  が結合した結果、上記式 (3) で表される標的核酸断片は固相上に結合される。また、上記式 (3) で表される標的核酸断片は、後述するローリングサークル増幅のプライマーとなる。

[0037] また、 $\alpha'$  及び  $\delta'$  が結合した結果、パドロックプローブは環状一本鎖核酸となり、後述したローリングサークル増幅の鋳型となる。

[0038] なお、変形例として、上記式 (1) で表されるパドロックプローブの代わりに、上記式 (1) で表されるパドロックプローブの  $\alpha'$  の 5' 末端と  $\delta'$  の 3' 末端が予め結合した環状核酸を用いてもよい。

[0039] (工程 (b))

本工程では、上記式 (7) で表される複合体における  $\beta - \alpha - \delta$  をプライマーとしたローリングサークル増幅により、上記式 (8) で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、上記式 (9) で表される核酸断片を得る。上記式 (9) で表される核酸断片を、増幅された前記一本鎖核酸といいかえてもよい。

[0040] ローリングサークル増幅は、基質となる dNTP 及び DNA ポリメラーゼの存在下で、温度を DNA ポリメラーゼが活性を発揮する温度に調整することにより行うことができる。ローリングサークル増幅は等温増幅反応系である。このため、簡便な装置で実施することができる。

[0041] ローリングサークル増幅を行うための DNA ポリメラーゼとしては、 $\phi 29$  DNA ポリメラーゼ、Csa DNA ポリメラーゼ、Bst DNA ポリメラーゼ等が挙げられる。ローリングサークル増幅の反応温度は、例えば  $\phi 29$  DNA ポリメラーゼを使用した場合には約 30℃ であり、Csa DNA ポリメラーゼを使用した場合には約 60℃ であり、Bst DNA ポリメラーゼを使用した場合には約 65℃ である。

[0042] また、ローリングサークル増幅の反応時間は、例えば 1~24 時間であってもよく、例えば 1~12 時間であってもよく、例えば 1~6 時間であってもよい。

[0043] ローリングサークル増幅を行った結果、パドロックプローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸が合成される。すなわち、上記式（9）で表される核酸断片が得られる。上記式（9）で表される核酸断片は、固相に結合された捕捉プローブの3'末端側に、標的核酸断片が結合し、更に標的核酸断片の3'末端側に、パドロックプローブに相補的な塩基配列の核酸断片が繰り返し結合した核酸断片である。

[0044] この結果、捕捉プローブが存在する位置に、上記式（3）で表される標的核酸断片が配置され、更に、上記式（3）で表される標的核酸断片が配置された位置において、パドロックプローブに相補的な核酸断片が繰り返し増幅されることになる。増幅産物は固相にアンカリングされている。

[0045] （工程（c））

本工程では、上記式（9）で表される核酸断片に、下記式（9）で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブを接触させてハイブリダイズさせ、上記式（9）で表される核酸断片中の前記一部の核酸領域を検出する。下記式（9）で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブとはすなわち、パドロックプローブの一部の核酸領域と同じ配列を有するプローブである。例えば、上記式（9）で表される核酸断片に、 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブを接触させて、上記式（9）で表される核酸断片中の $\gamma$ を検出する。プローブは、例えば標識物質により標識された検出プローブである。標識物質としては、例えば、蛍光色素、酵素、磁性体等が挙げられる。

[0046] ここで、 $\gamma$ は、パドロックプローブの $\gamma'$ に相補的な核酸断片であり、工程（c）のローリングサークル増幅によりコピー数が増加している。

[0047] この結果、上記式（3）で表される標的核酸断片の存在量に対応して増幅されたシグナルを検出することができる。

[0048] 本工程における検出対象は $\gamma$ 以外の部分でもよい。例えば、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ のいずれかであってもよく、これらの複数の部分にまたがった部分であってもよい。例えば、 $\beta$ を検出対象とした場合、結合する配列は核酸断片中の $\beta$ で

ある。そのため、検出プローブとしては $\beta$ の少なくとも一部と相補的な配列を有する検出プローブを用いることができる、いいかえると、 $\beta'$ の少なくとも一部と同じ塩基配列を有する検出プローブを用いることができる。

[0049] 一方で、後述するリアルタイム検出を行う場合には、増幅反応及び検出時には、 $\beta'$ の少なくとも一部と同じ配列を有する検出プローブと、上記式(1)で示される一本鎖核酸又は上記式(8)で表される環状一本鎖核酸が共存する。そして、 $\beta'$ の少なくとも一部と同じ配列を有する検出プローブの方が上記式(1)で示される核酸断片又は上記式(8)で表される環状一本鎖核酸と比べて分子量が小さいため、上記式(2)で表される核酸断片に優先的に結合してしまう。このことにより、上記式(1)で示される核酸断片又は上記式(8)で表される環状一本鎖核酸が上記式(2)で表される捕捉プローブと結合することが困難になり、ローリングサイクル増幅産物である式(9)で表される核酸断片の生成量が少なくなる場合がある。そのため、後述するリアルタイム検出を行う場合には、上記式(1)で示される一本鎖核酸又は上記式(8)で表される環状一本鎖核酸において検出領域 $\gamma'$ を設け、検出プローブとして $\gamma'$ プローブを用意することが好ましい。

[0050] 上記式(9)で表される核酸断片にハイブリダイズしたプローブの検出は、プローブに付された標識に応じて、例えば、蛍光顕微鏡、分光光度計、GM Rセンサー等により行うことができる。

[0051] また、本実施形態の方法では、ローリングサークル増幅を行う複合体の構成要素が少なく、パドロックプローブ、捕捉プローブ、及び上記式(3)で表される標的核酸断片の3者から構成されているため、バックグラウンドノイズが低い。

[0052] そこで、B/F分離、すなわち、結合物と遊離物の分離を必要としない検出系を用いてシグナルを検出することができる。B/F分離が不要な検出系としては、例えば、全反射照明蛍光顕微鏡を利用したシグナル検出、表面プラズモン共鳴を利用したシグナル検出、蛍光共鳴エネルギー移動を利用したシグナル検出、巨大磁気抵抗効果を利用したシグナル検出等が挙げられる。

[0053] 工程 (b) 及び工程 (c) は同時に行ってもよい。すなわち、ローリングサークル増幅による上記式 (9) で表される核酸断片の合成を、上記式 (9) における  $\gamma$  の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブの存在下で行ってもよい。これにより、例えば、工程 (b) 及び工程 (c) を同時に実施して、上記式 (9) で表される核酸断片中の  $\gamma$  をリアルタイムに検出することができる。

[0054] リアルタイムに検出することによる利点としては次のようなことが挙げられる。まず、等温増幅反応系を用いることで、温度制御機構を単純化することが可能になる。また、反応試薬を 1 液構成とすることが可能となるため、検査チップ構造を単純化することができる。

[0055] また、シグナル初速度評価を行うことにより、検出時間を短縮することができる。また、シグナルの変化量に基づいて定量を行うことができるため、肺蛍光強度のばらつきの影響を除外し、より正確な定量が可能となる。

[0056] また、増幅反応の阻害や減速を検出することができるため、これらが生じた場合にはデータを破棄し、増幅反応の阻害や減速が起きていないデータのみを取得することが可能となる。

[0057] また、一般的な定量 PCR と同様に、一定の蛍光強度に達するまでの反応時間を指標に定量することができるため、1桁程度のダイナミックレンジしか持たない安価な検出器を用いて測定することが可能となる。すなわち、検出系に求められるダイナミックレンジの要件が緩和される。

[0058] (捕捉プローブが核酸アレイである場合)

以下、図 1 (a) ~ (c) を参照しながら、捕捉プローブが核酸アレイである場合について説明する。図 1 (a) ~ (c) において、 $\alpha^1$ 、 $\alpha^2$ 、 $\alpha^3$ 、 $\beta^1$ 、 $\beta^2$ 、 $\beta^3$ 、 $\gamma$ 、 $\delta^1$ 、 $\delta^2$ 、 $\delta^3$  はそれぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha^{1'}$ 、 $\alpha^{2'}$ 、 $\alpha^{3'}$ 、 $\beta^{1'}$ 、 $\beta^{2'}$ 、 $\beta^{3'}$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta^{1'}$ 、 $\delta^{2'}$ 、 $\delta^{3'}$  はそれぞれ前記  $\alpha^1$ 、 $\alpha^2$ 、 $\alpha^3$ 、 $\beta^1$ 、 $\beta^2$ 、 $\beta^3$ 、 $\gamma$ 、 $\delta^1$ 、 $\delta^2$ 、 $\delta^3$  と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。また、S は固相を表し、P はプローブを表す。

[0059] 図1の例では、図1(a)に示すように、 $\beta^1$ 、 $\beta^2$ 、 $\beta^3$ で表される捕捉プローブがそれぞれ固相に結合され、核酸アレイを形成している。なお、以下の説明では、捕捉プローブ、標的核酸断片、パドロックプローブがそれぞれ3種類ずつしか存在していないが、これらは3種類に限られず、多数存在していてもよい。

[0060] 図1の例では、 $\alpha^1-\delta^1$ 、 $\alpha^2-\delta^2$ 、 $\alpha^3-\delta^3$ でそれぞれ表される3種類の標的核酸断片を同時に検出することができる。

[0061] まず、上述した工程(a)を実施する。ここでは、パドロックプローブとして、 $\alpha^1-\beta^1-\gamma^1-\delta^1$ 、 $\alpha^2-\beta^2-\gamma^2-\delta^2$ 、 $\alpha^3-\beta^3-\gamma^3-\delta^3$ 、でそれぞれ表される核酸断片を使用する。その結果、図1(a)に示すように、パドロックプローブ、捕捉プローブ、及び標的核酸断片の複合体が形成される。

[0062] 続いて、図1(a)に示す複合体における、 $\beta^1$ と $\alpha^1$ 、 $\beta^2$ と $\alpha^2$ 、 $\beta^3$ と $\alpha^3$ 、 $\alpha^{1'}$ と $\delta^{1'}$ 、 $\alpha^{2'}$ と $\delta^{2'}$ 、 $\alpha^{3'}$ と $\delta^{3'}$ をそれぞれ結合させて、図1(b)で表される複合体が形成される。

[0063] 続いて、上述した工程(b)を実施する。その結果、図1(c)に示すように、固相-捕捉プローブ-標的核酸断片に、更に、パドロックプローブの相補鎖が繰り返し結合される。

[0064] 続いて、上述した工程(c)を実施する。図1の例では、使用した3種類のパドロックプローブは全て $\gamma'$ の塩基配列が同一である。そこで、 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする1種類のプローブPを用いて、核酸アレイ上の全ての標的核酸断片を同時に検出することができる。図1の例では、プローブPは蛍光色素で標識されている。

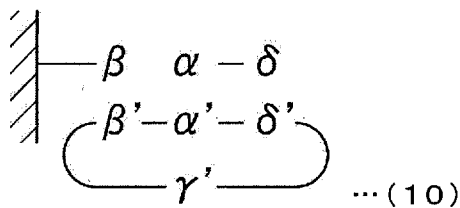
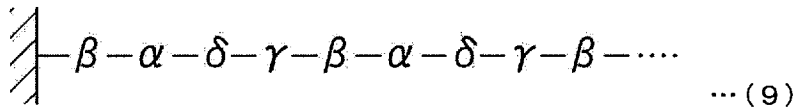
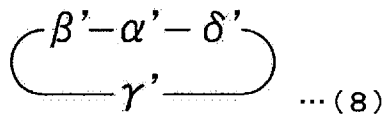
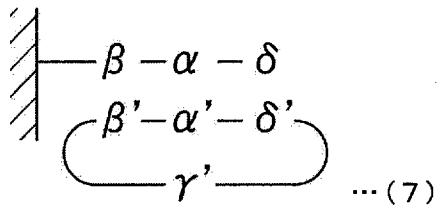
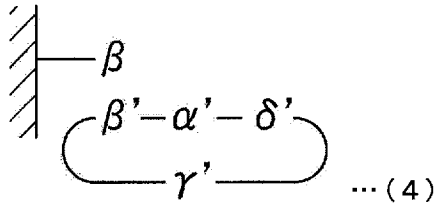
[0065] (第2実施形態)

第2実施形態の方法は、下記式(3)で表される標的核酸断片を検出する方法であって、下記式(3)で表される標的核酸断片と、下記式(4)で表される複合体とを接触させて、下記式(10)で表される複合体を形成する工程と、下記式(10)で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ を結合させて、

下記式（7）で表される複合体を形成する工程（a2）と、下記式（7）で表される複合体における $\beta - \alpha - \delta$ をプライマーとしたローリングサークル増幅により、下記式（8）で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式（9）で表される核酸断片を得る工程（b）と、下記式（9）で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブをハイブリダイズさせ、下記式（9）で表される核酸断片の存在を検出する工程と、を備える方法である。検出する配列が $\gamma$ である場合には、第2実施形態の方法における工程（c）は、下記式（9）で表される核酸断片に、 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブを接触させて、下記式（9）で表される核酸断片中の $\gamma$ を検出する工程である。

[0066]

[化3]



[式 (3)、(4)、(7) ~ (10) 中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$ はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[0067] 第2実施形態の方法は、第1実施形態の方法と、工程(a2)において主に異なる。より詳細には、第2実施形態の方法は、パドロックプローブの $\alpha'$ の5'末端と $\delta'$ の3'末端が予め結合した環状核酸である点、及び、この環状核酸が、固相に結合された捕捉プローブと予めハイブリダイズされている点において、第1実施形態の方法と主に異なり、その他の点については

、第1実施形態の方法と同様である。

[0068] 第2実施形態の方法によれば、予め上記式(4)で表される複合体が形成されていることから、上記式(3)で表される標的核酸断片を接触させるだけで、効率よく上記式(10)で表される複合体を得ることができる。

[0069] 上述した工程(a)では、上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを接触させて、上記式(6)で表される複合体を形成する。

[0070] ここで、上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを同時に接触させた場合、衝突頻度の高い上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片とのハイブリダイズが優先的に起こり、上記式(6)で表される複合体が形成される確率が低くなり検出感度が低下する場合がある。

[0071] このような場合、予め上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを接触させて上記式(4)で表される複合体を確実に形成させることにより検出感度を向上させることができる。

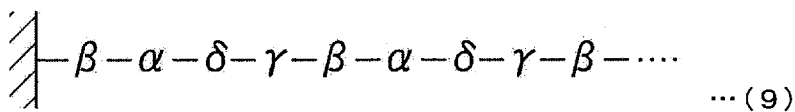
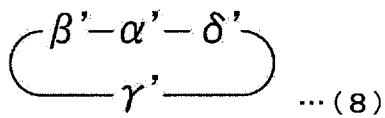
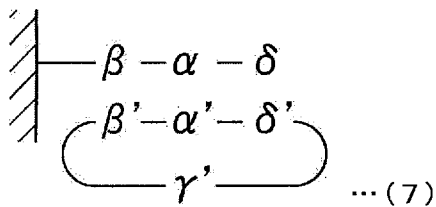
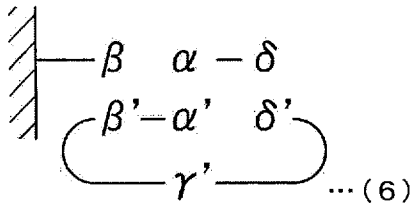
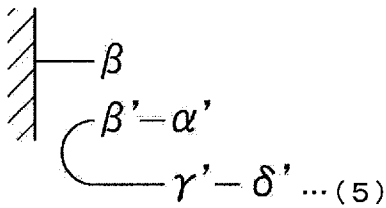
[0072] また、上記式(4)で表される複合体と上記式(3)で表される標的核酸断片とを接触させる前に、未反応の上記式(1)で表される核酸断片を除去することにより、更に効率よく上記式(6)で表される複合体を形成させることができる。

[0073] (第3実施形態)

第3実施形態の方法は、下記式(3)で表される標的核酸断片を検出する方法であって、下記式(3)で表される標的核酸断片と、下記式(5)で表される複合体とを接触させて、下記式(6)で表される複合体を形成する工程と、下記式(6)で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ をそれぞれ結合させて、下記式(7)で表される複合体を形成する工程(a3)と、下記式(7)で表される複合体における $\beta - \alpha - \delta$ をプライマー

としたローリングサークル増幅により、下記式（8）で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式（9）で表される核酸断片を得る工程（b）と、下記式（9）で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブをハイブリダイズさせ、下記式（9）で表される核酸断片の存在を検出する工程と、を備える方法である。検出する配列が $\gamma$ である場合には、第3実施形態の方法における工程（c）は、下記式（9）で表される核酸断片に、 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブを接触させて、下記式（9）で表される核酸断片中の $\gamma$ を検出する工程である。

[0074] [化4]



[式（3）、（5）、（6）～（9）中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ は、それぞれ任

意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$  はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[0075] 第3実施形態の方法は、第1実施形態の方法と、工程(a3)において主に異なる。より詳細には、第3実施形態の方法は、パドロックプローブが、固相に結合された捕捉プローブと予めハイブリダイズされている点において、第1実施形態の方法と主に異なり、その他の点については、第1実施形態の方法と同様である。

[0076] また、第3実施形態の方法は、第2実施形態の方法と、パドロックプローブの $\alpha'$ の5'末端と $\delta'$ の3'末端が予め結合していない点において主に異なり、その他の点については、第1実施形態の方法と同様である。

[0077] 第3実施形態の方法によれば、予め上記式(5)で表される複合体が形成されていることから、上記式(3)で表される標的核酸断片を接触させるだけで、効率よく上記式(6)で表される複合体を得ることができる。また、上記式(5)で表される複合体は、第2実施形態における上記式(4)で表される複合体よりも簡便に製造することができる。

[0078] 上述した工程(a)では、上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを接触させて、上記式(6)で表される複合体を形成する。

[0079] ここで、上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを同時に接触させた場合、衝突頻度の高い上記式(3)で表される標的核酸断片と、上記式(1)で表される核酸断片とのハイブリダイズが優先的に起こり、上記式(6)で表される複合体が形成される確率が低くなり検出感度が低下する場合がある。

[0080] このような場合、予め上記式(1)で表される核酸断片と、固相に結合された上記式(2)で表される核酸断片とを接触させて上記式(5)で表される複合体を確実に形成させることにより検出感度を向上させることができる。

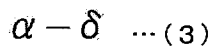
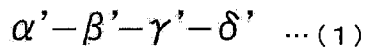
。

[0081] また、上記式（５）で表される複合体と上記式（３）で表される標的核酸断片とを接触させる前に、未反応の上記式（１）で表される核酸断片を除去することにより、更に効率よく上記式（６）で表される複合体を形成させることができる。

[0082] [標的核酸断片を検出するためのキット]

一実施形態において、本発明は、下記式（１）で表される核酸断片と、固相に結合された、下記式（２）で表される核酸断片と、を含む、下記式（３）で表される標的核酸断片を検出するためのキットを提供する。

[0083] [化5]



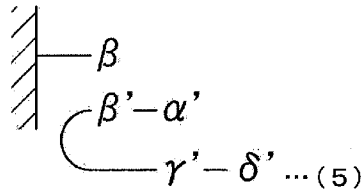
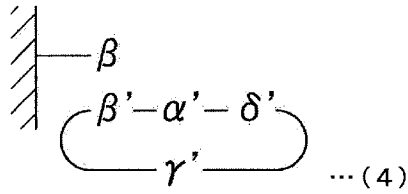
[式（１）～（３）中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta$ は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\delta'$ はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[0084] 本実施形態のキットは、上述した第１実施形態の方法を実施するために好適に用いることができる。本実施形態のキットにおいて、上記式（１）で表される核酸断片（パドロックプローブ）、上記式（２）で表される核酸断片（捕捉プローブ）、上記式（３）で表される標的核酸断片、捕捉プローブが結合された固相等については、上述したものと同様である。

[0085] 本実施形態のキットにおいて、パドロックプローブと、捕捉プローブとが、下記式（４）又は（５）で表される複合体を形成していてもよい。

[0086]

[化6]



[式(4)～(5)中、 $\alpha'$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$ は、前記式(1)及び(2)におけるものと同様の意味を表し、式(4)の $\alpha'$ 及び $\delta'$ は結合しており、式(5)の $\alpha'$ 及び $\delta'$ は結合していない。]

[0087] ここで、パドロックプローブと、捕捉プローブとが、上記式(4)で表される複合体を形成したキットは、上述した第2実施形態の方法を実施するために好適に用いることができる。

[0088] また、パドロックプローブと、捕捉プローブとが、上記式(5)で表される複合体を形成したキットは、上述した第3実施形態の方法を実施するために好適に用いることができる。

[0089] 本実施形態のキットは、パドロックプローブの $\gamma'$ に相補的な塩基配列 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブを更に備えていてもよい。核酸断片 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブについては上述したものと同様である。

[0090] 本実施形態のキットにおいて、固相に結合された捕捉プローブは核酸アレイであることが好ましい。上述したように、捕捉プローブが核酸アレイであることにより、1つの反応容器内で、試料中の多種類の標的核酸断片を同時に簡便に検出することが可能となる。

[0091] 本実施形態のキットは、核酸リガーゼを更に含んでもよく、核酸ポリメラーゼを更に含んでもよい。核酸リガーゼ、核酸ポリメラーゼについては上述したものと同様である。

## 実施例

[0092] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0093] [実験例 1]

(標的核酸断片の検出 1)

まず、基板に捕捉プローブを結合させて核酸アレイを作製した。使用した捕捉プローブは DNA 断片であった。基板には、エポキシ基修飾されたガラス基板を使用した。また、1枚の基板上に8個の反応室を形成し、各反応室内にそれぞれ5スポットずつ2種類の捕捉プローブを結合させた。使用した捕捉プローブを下記表 1 に示す。

[0094] 続いて、各反応室にローリングサークル増幅の反応液を導入した。反応液は、終濃度 0 mM、50 mM 又は 150 mM の塩化ナトリウムを含み、更に、標的核酸断片 (終濃度 25 nM)、パドロックプローブ、T4 DNA リガーゼ、 $\phi$ 29 DNA ポリメラーゼ、Cy3 標識プローブ (配列番号 1) を含んでいた。

[0095] 使用した標的核酸断片、パドロックプローブを下記表 1 に示す。なお、Cy3 標識プローブは、使用したいずれのパドロックプローブの相補鎖にもハイブリダイズできるものであった。また、標的核酸断片「Target DNA」(配列番号 4) は、パドロックプローブ「PD1503」(配列番号 3) 及び「PD1505」(配列番号 8) のいずれにもハイブリダイズできるものであった。

[0096] 続いて、基板をガasketセルホルダー (アジレントテクノロジー社) にセットして 30°C で 4 時間反応させた。続いて、基板を洗浄した後、蛍光顕微鏡で核酸アレイの各スポットにおける Cy3 の蛍光を観察した。Cy3 の蛍光は以下の評価基準により評価した。結果を表 1 に示す。また、図 2 (a) ~ (f) は、各反応室の代表的なスポットの蛍光顕微鏡写真である。図 2 (a) ~ (f) 中、各スポットに捕捉プローブ名を示す。図 2 (a) は反応室 1 の蛍光顕微鏡写真であり、図 2 (b) は反応室 2 の蛍光顕微鏡写真であ

り、図2(c)は反応室3の蛍光顕微鏡写真であり、図2(d)は反応室5の蛍光顕微鏡写真であり、図2(e)は反応室6の蛍光顕微鏡写真であり、図2(f)は反応室7の蛍光顕微鏡写真である。

[0097] (評価基準)

- : Cy 3の蛍光が認められなかった。
- + - : わずかにCy 3の蛍光が認められた。
- + : Cy 3の蛍光が認められた。
- ++ : Cy 3の蛍光が強く認められた。
- +++ : Cy 3の蛍光が更に強く認められた。

[0098] [表1]

反応室	捕捉プローブ名 (配列番号)	NaCl (mM)	パドロック プローブ名 (配列番号)	標的核酸名 (配列番号)	結果
1	c1503(2)	0	PD1503(3)	Target DNA(4)	+
1	c1508(5)	0	PD1503(3)	Target DNA(4)	-
2	c1503(2)	50	PD1503(3)	Target DNA(4)	++
2	c1508(5)	50	PD1503(3)	Target DNA(4)	-
3	c1503(2)	150	PD1503(3)	Target DNA(4)	+++
3	c1508(5)	150	PD1503(3)	Target DNA(4)	-
4	c1503(2)	600	-	t1503-FITC(6)	*1
4	c1508(5)	600	-	t1503-FITC(6)	*2
5	c1505(7)	0	PD1505(8)	Target DNA(4)	+ -
5	c1508(5)	0	PD1505(8)	Target DNA(4)	-
6	c1505(7)	50	PD1505(8)	Target DNA(4)	+ -
6	c1508(5)	50	PD1505(8)	Target DNA(4)	-
7	c1505(7)	150	PD1505(8)	Target DNA(4)	+
7	c1508(5)	150	PD1505(8)	Target DNA(4)	-
8	c1505(7)	600	-	t1505-FITC(9)	*1
8	c1508(5)	600	-	t1505-FITC(9)	*2

\* 1 : 陽性対照。FITCの蛍光が観察された。

\* 2 : 陰性対照。FITCの蛍光が認められなかった。

[0099] その結果、ローリングサークル増幅の反応液に終濃度150mM程度の塩化ナトリウムが含まれていると、標的核酸断片の検出効率が上昇する傾向が認められた。

[0100] [実験例2]

(標的核酸断片の検出2)

反応液中の塩化ナトリウムの濃度を終濃度150mMに固定し、標的核酸

の終濃度を6.25 nM、12.5 nM、25 nMに変化させた以外は実験例1と同様の反応を行い、蛍光顕微鏡で核酸アレイの各スポットにおけるCy3の蛍光を観察した。使用した捕捉プローブ、標的核酸断片、パドロックプローブを下記表2に示す。

[0101] [表2]

捕捉プローブ名 (配列番号)	NaCl (mM)	パドロック プローブ名 (配列番号)	標的核酸名 (配列番号)	標的核酸 (nM)
c1503(2)	150	PD1503(3)	Target DNA(4)	6.25
c1503(2)	150	PD1503(3)	Target DNA(4)	12.5
c1503(2)	150	PD1503(3)	Target DNA(4)	25
c1505(7)	150	PD1505(8)	Target DNA(4)	6.25
c1505(7)	150	PD1505(8)	Target DNA(4)	12.5
c1505(7)	150	PD1505(8)	Target DNA(4)	25

[0102] 図3(a)及び(b)は、蛍光顕微鏡写真に基づいて数値化したCy3の蛍光強度を示すグラフである(n=5)。図3(a)は、捕捉プローブに「c1503」を使用した場合の結果であり、図3(b)は、捕捉プローブに「c1505」を使用した場合の結果である。その結果、捕捉プローブとパドロックプローブを組み合わせた2種類の異なる反応系を用いて、それぞれの検出系において、標的核酸断片について、濃度依存的なシグナル強度の変化を確認できることが明らかとなった。

### 符号の説明

[0103] S…固相、P…プローブ。

## 請求の範囲

[請求項1] 第1の部分 $\alpha$ 及び第2の部分 $\delta$ からなる標的核酸断片を検出する方法であって、

(a) 前記標的核酸断片と、

第3の部分 $\beta$ を有し、固相担体に固定された捕捉プローブと、

前記第1の部分 $\alpha$ と相補的な核酸領域 $\alpha'$ と、前記第3の部分 $\beta$ と相補的な核酸領域 $\beta'$ と、核酸領域 $\gamma'$ と、前記第2の部分 $\delta$ と相補的な核酸領域 $\delta'$ と、がこの順に連結した一本鎖又は環状の核酸プローブと、を反応させて、

前記標的核酸断片の前記第1の部分 $\alpha$ の末端と、前記捕捉プローブの前記第3の部分 $\beta$ の末端とが結合し、環状の前記核酸プローブの前記核酸領域 $\alpha'$ が前記第1の部分 $\alpha$ と、前記核酸領域 $\beta'$ が前記第3の部分 $\beta$ と、前記核酸領域 $\delta'$ が前記第2の部分 $\delta$ とそれぞれハイブリダイズした複合体を得る工程と、

(b) 環状の前記核酸プローブを鋳型としたローリングサークル増幅により、環状の前記核酸プローブに相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸を合成する工程と、

(c) 前記核酸プローブの一部の核酸領域と同じ配列を有する、標識物質により標識された検出プローブを、前記一本鎖核酸の一部の核酸領域にハイブリダイズさせ、増幅された前記一本鎖核酸中の前記一部の核酸領域を検出する工程と、を備える、方法。

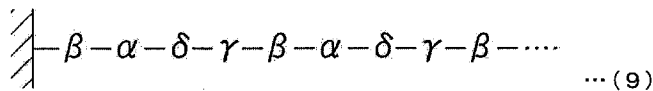
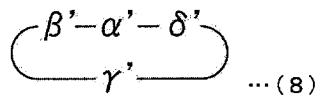
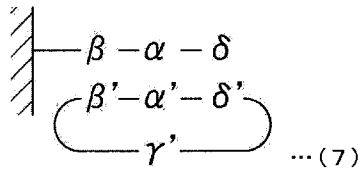
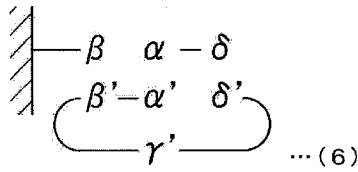
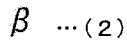
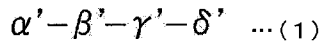
[請求項2] 前記工程(a)が、下記式(3)で表される標的核酸断片と、下記式(1)で表される一本鎖の核酸プローブと、固相に結合された下記式(2)で表される第3の部分とを接触させて、下記式(6)で表される複合体を形成する工程と、下記式(6)で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ をそれぞれ結合させて、下記式(7)で表される複合体を形成する工程とを含み、

前記工程(b)が、下記式(7)で表される複合体における $\beta - \alpha$

—  $\delta$  をプライマーとしたローリングサークル増幅により、下記式 (8) で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式 (9) で表される核酸断片を得る工程であり、

前記工程 (c) が、下記式 (9) で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブを、下記式 (9) で表される核酸断片にハイブリダイズさせ、下記式 (9) で表される核酸断片中の前記一部の核酸領域を検出する工程である、請求項 1 に記載の方法。

[化1]



[式 (1) ~ (3)、(6) ~ (9) 中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$  はそれぞれ前記  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[請求項3]

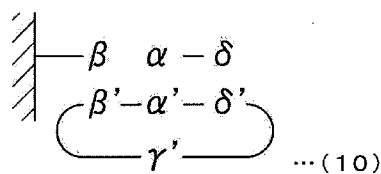
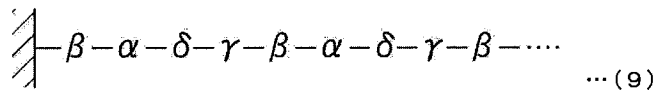
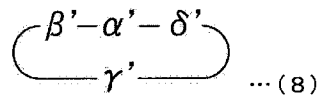
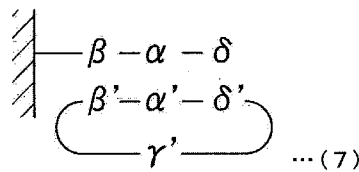
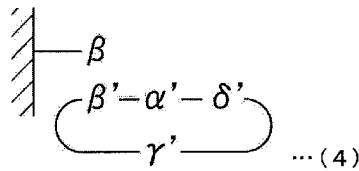
前記工程 (a) が、下記式 (4) で表される、前記捕捉プローブと前記環状の核酸プローブとの複合体を形成する工程と、下記式 (4) で表される複合体と下記式 (3) で表される標的核酸断片とを接触さ

せて、下記式（10）で表される複合体を形成する工程と、下記式（10）で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ を結合させて、下記式（7）で表される複合体を形成する工程とを含み、

前記工程（b）が、下記式（7）で表される複合体における $\beta - \alpha - \delta$ をプライマーとしたローリングサークル増幅により、下記式（8）で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式（9）で表される核酸断片を得る工程であり、

前記工程（c）が、下記式（9）で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブを、下記式（9）で表される核酸断片にハイブリダイズさせ、下記式（9）で表される核酸断片中の前記一部の核酸領域を検出する工程である、請求項1に記載の方法。

[化2]



[式（3）、（4）、（7）～（10）中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ は、そ

れぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$  はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

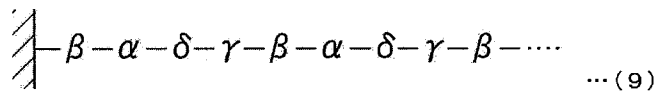
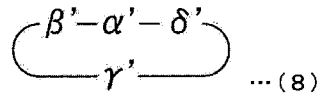
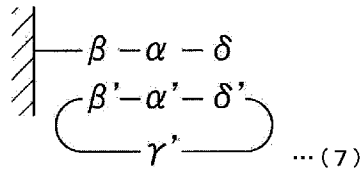
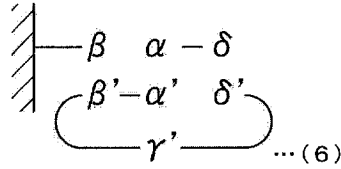
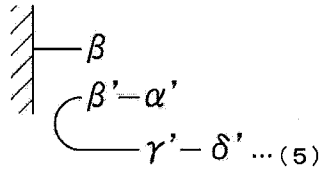
[請求項4]

前記工程 (a) が、下記式 (5) で表される、前記捕捉プローブと前記一本鎖の核酸プローブとの複合体を形成する工程と、下記式 (3) で表される標的核酸断片と、下記式 (5) で表される複合体とを接触させて、下記式 (6) で表される複合体を形成する工程と、下記式 (6) で表される複合体における $\beta$ 及び $\alpha$ 、並びに $\alpha'$ 及び $\delta'$ をそれぞれ結合させて、下記式 (7) で表される複合体を形成する工程とを含み、

前記工程 (b) が、下記式 (7) で表される複合体における $\beta - \alpha - \delta$ をプライマーとしたローリングサークル増幅により、下記式 (8) で表される環状一本鎖核酸の相補鎖を合成し、下記式 (9) で表される核酸断片を得る工程であり、

前記工程 (c) が、下記式 (9) で表される核酸断片の一部と相補的な配列を有するプローブを、下記式 (9) で表される核酸断片にハイブリダイズさせ、下記式 (9) で表される核酸断片中の前記一部の核酸領域を検出する工程である、請求項 1 に記載の方法。

[化3]



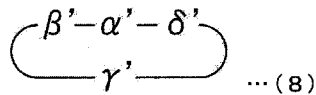
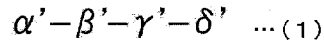
[式(3)、(5)、(6)～(9)中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$ はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[請求項5] 前記工程(c)は、前記一本鎖又は環状の核酸プローブの核酸領域 $\gamma'$ の少なくとも一部の核酸領域と同じ配列を有する、標識物質により標識された検出プローブを、前記一本鎖核酸にハイブリダイズさせ、増幅された前記一本鎖核酸中の、前記核酸領域 $\gamma'$ と相補的な配列を検出する工程である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 前記工程(b)及び工程(c)を同時に行い、ローリングサークル増幅により増幅された前記一本鎖核酸中の前記一部の核酸領域をリアルタイムに検出する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 下記式(1)又は式(8)で表される核酸断片と、  
 固相に結合された、下記式(2)で表される部分を含む核酸断片と、  
 を含む、  
 下記式(3)で表される標的核酸断片を検出するためのキット。

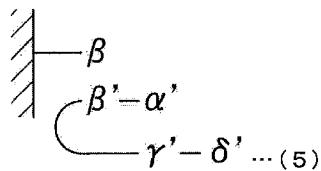
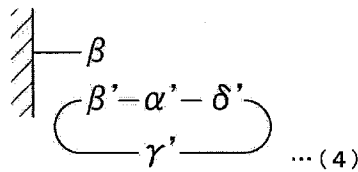
[化4]



[式(1)～(3)中、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta$ は、それぞれ任意の塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'$ 、 $\beta'$ 、 $\delta'$ はそれぞれ前記 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ と相補的な塩基配列からなる一本鎖核酸断片を表す。]

[請求項8] 前記式(1)で表される核酸断片と、前記固相に結合された、前記式(2)で表される核酸断片とが、下記式(4)又は(5)で表される複合体を形成している、請求項7に記載のキット。

[化5]



[式(4)～(5)中、 $\alpha'$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\gamma'$ 、 $\delta'$ は、前記式(1)及び(2)におけるものと同様の意味を表し、式(4)の $\alpha'$ 及び $\delta'$ は結合しており、式(5)の $\alpha'$ 及び $\delta'$ は結合していない。]

[請求項9] 前記 $\gamma'$ に相補的な塩基配列 $\gamma$ の少なくとも一部に特異的にハイブ

リダイズするプローブを更に備える、請求項7又は8に記載のキット

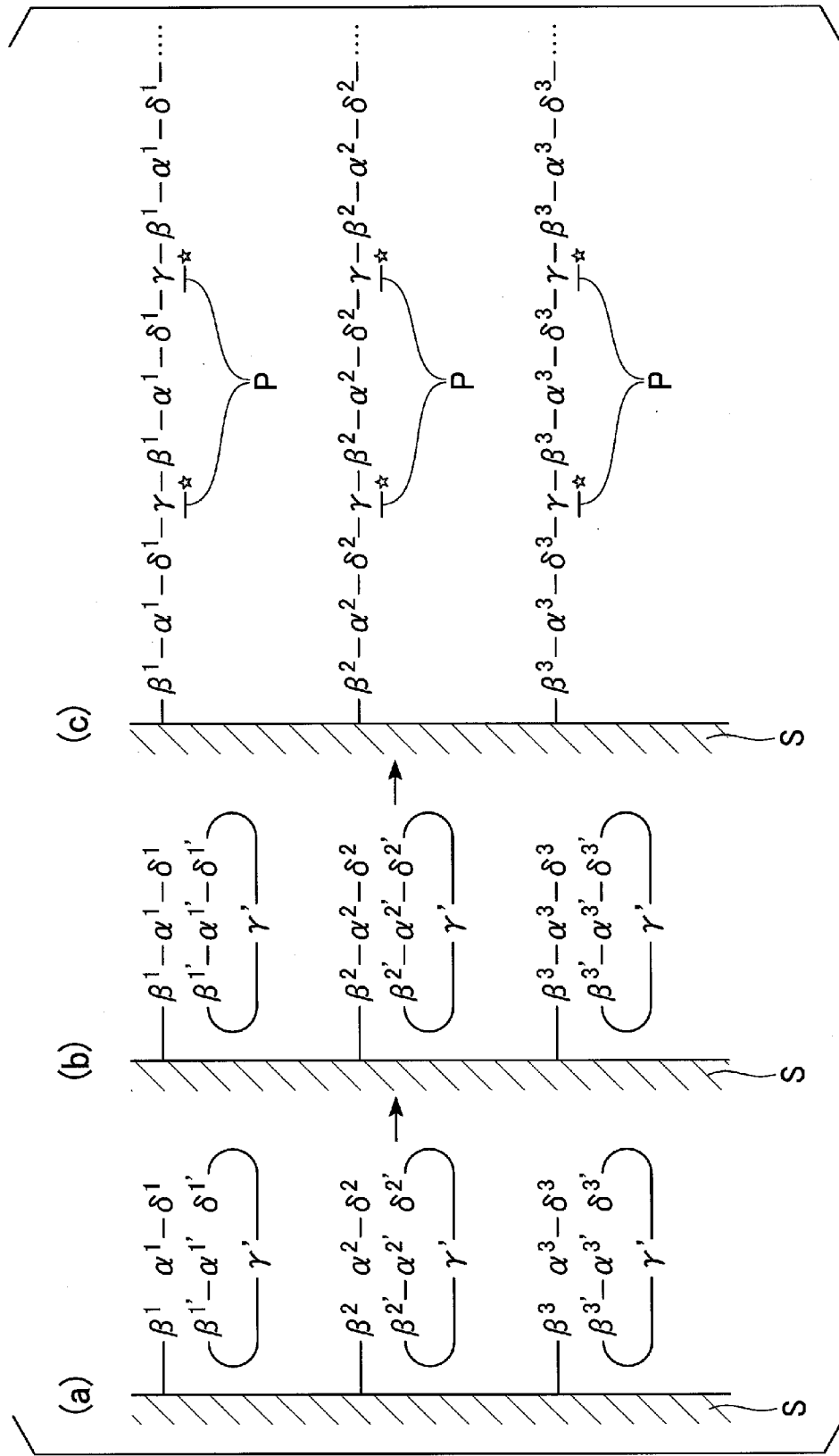
。

[請求項10] 前記固相は複数種類の前記式(2)で表される核酸断片が固定された、核酸アレイである、請求項7～9のいずれか一項に記載のキット

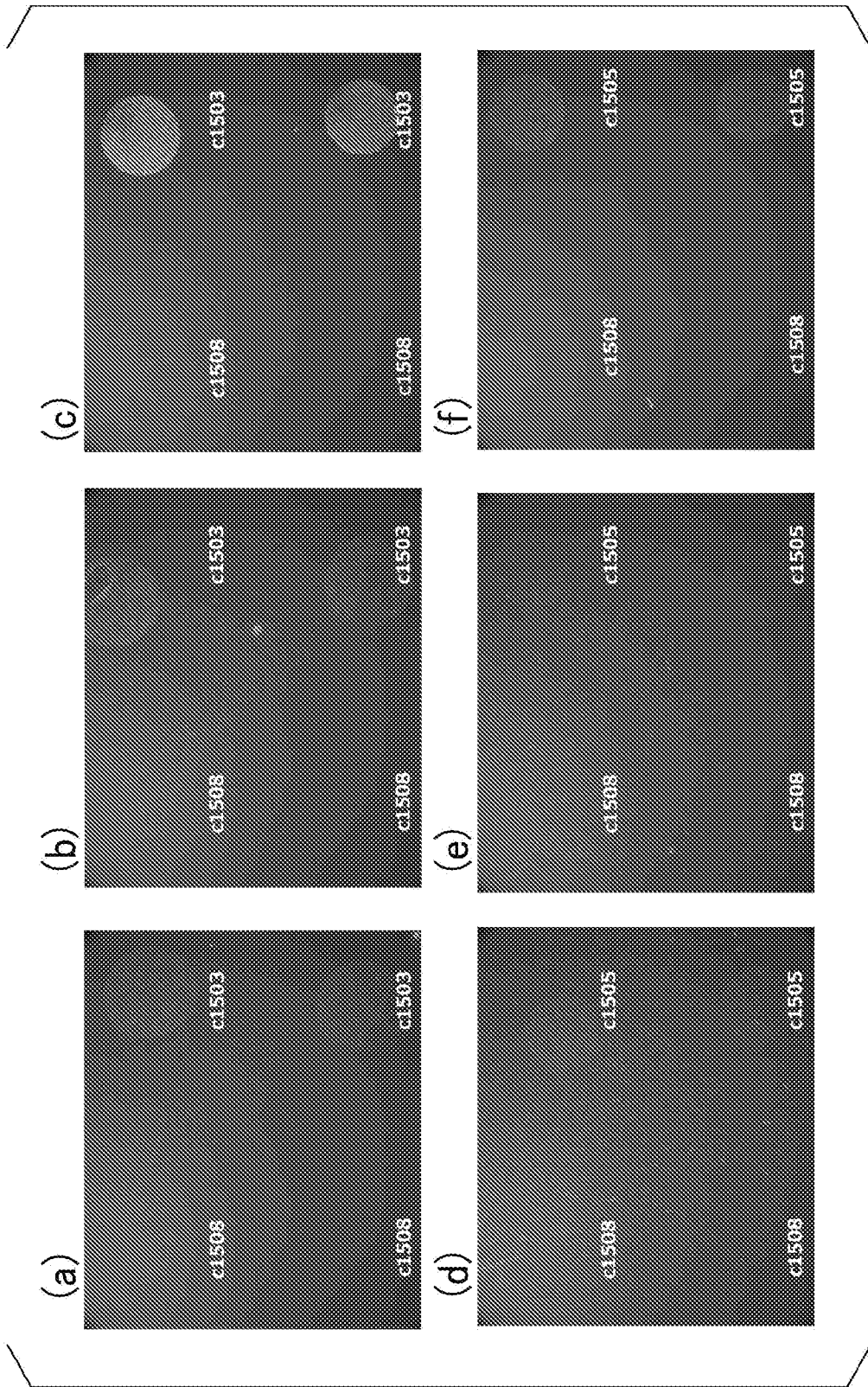
。

[請求項11] 核酸リガーゼ又は核酸ポリメラーゼを更に含む、請求項7～10のいずれか一項に記載のキット。

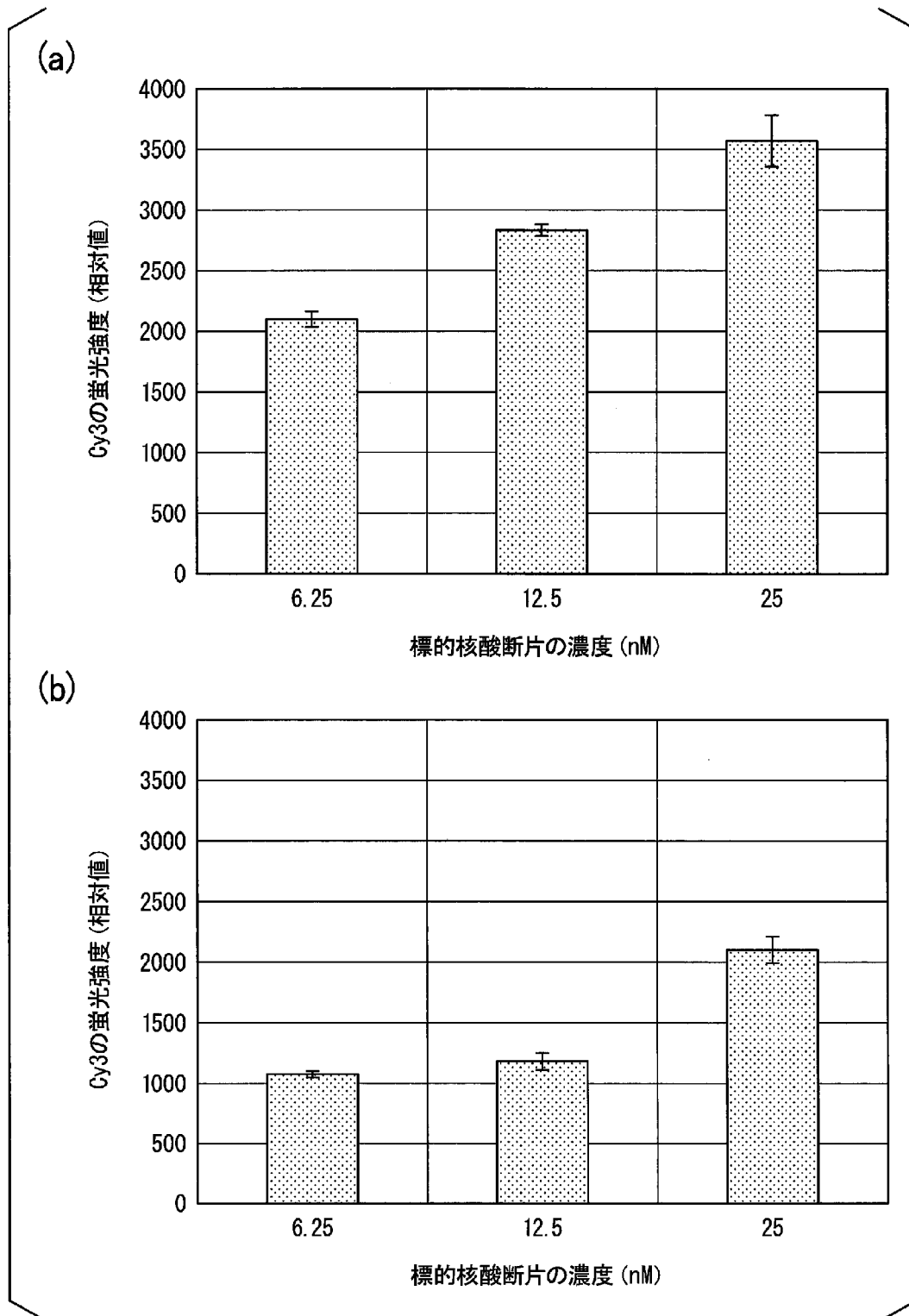
[図1]



[図2]



[図3]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/020305

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl. C12Q1/6876(2018.01) i, C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/6844(2018.01) 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)

Int. Cl. C12Q1/00-1/70, C12N15/00-15/90

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2002/0177141 A1 (GHEE, Mark S.) 28 November 2002 (fig. 7A-7F, paragraph [0040]) & WO 000/63437 A2 & EP 1196630 A1	7, 9-11 1-6, 8
A	HATCH, A. et al., Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection. Genet. Anal., 1999, vol. 15, no. 2, pp. 35-40 (fig. 1-2)	1-11
A	SCHOPF, E. et al., Sensitive and selective viral DNA detection assay via microbead-based rolling circle amplification. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, vol. 18, no. 22, pp. 5871-5874 (Scheme 1)	1-11

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  
16.08.2018

Date of mailing of the international search report  
28.08.2018

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
 Int.Cl. C12Q1/6876(2018.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/6844(2018.01)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（IPC））  
 Int.Cl. C12Q1/00-1/70, C12N15/00-15/90

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

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
X A	US 2002/0177141 A1 (CHEE Mark S.) 2002.11.28 (FIG. 7A-7F, [0040]) & WO 00/63437 A2 & EP 1196630 A1	7, 9-11 1-6, 8
A	HATCH A. et al., Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection. Genet. Anal., 1999, vol.15, no.2, pp.35-40 (Fig.1-2)	1-11

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 16.08.2018	国際調査報告の発送日 28.08.2018
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 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） 戸来 幸男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 3964

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
A	SCHOPF E. et al., Sensitive and selective viral DNA detection assay via microbead-based rolling circle amplification. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, vol.18, no.22, pp.5871-5874 (Scheme 1)	1-11