

(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
2009年5月7日 (07.05.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/057702 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

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).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/069778

(22) 国際出願日:

2008年10月30日 (30.10.2008)

(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 2007-283672

2007年10月31日 (31.10.2007) JP

特願2008-153974 2008年6月12日 (12.06.2008) 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

(72) 発明者; および

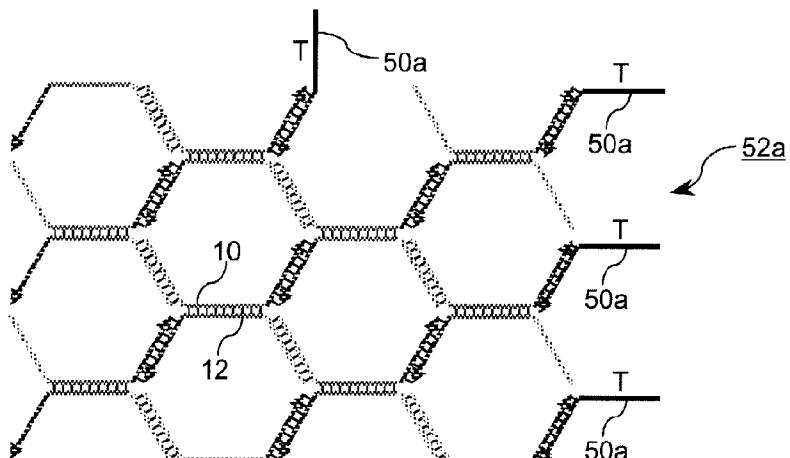
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 金島 才仁 (KANASHIMA, Motohito) [JP/JP]; 〒2100855 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会社パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 波木井 千雅子 (HAKII, Chikako) [JP/JP]; 〒2100855 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会社パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 薄井 貢 (USUI, Mitsugu) [JP/JP]; 〒2100855 神奈川県川崎市川崎区南渡田町1-12 株式会社パルマビーズ研究所内 Kanagawa (JP). 山田 孝 (YAMADA, Takashi) [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). 本間 公朗 (HONMA,

[続葉有]

(54) Title: POLYMER FOR DETECTION OF TARGET SUBSTANCE, AND METHOD FOR DETECTION OF TARGET SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 標的物質検出用ポリマー及び標的物質の検出方法

[図15]



(57) Abstract: Disclosed are: a method for detecting a target substance, which can detect the target substance with a high degree of efficiency, with high sensitivity and in a simple manner; a target substance detection polymer which can be used in the method; and a method for producing the polymer. The method for detecting a target substance comprises the following steps (A) to (C): (A) reacting two or more nucleic acid probes each capable of forming a polymer with a binding probe that has a domain capable of binding to the target substance and a domain capable of binding to at least one of the nucleic acid probes in a solution to form a target substance detection polymer; (B) binding the target substance detection polymer to the target substance; and (C) detecting the target substance detection polymer having the target substance bound thereto.

(57) 要約: 効率よく高感度且つ簡便に標的物質を検出することができる標的物質の検出方法、該方法に用いられる標的物質検出用ポリマー、及び該ポリマーの形成方法を提供する。標的物質の検出方法において、(A) ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する工程; (B) 前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質

[続葉有]

WO 2009/057702 A1



Hiroaki) [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 石原國際特許事務所内 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, 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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき國際事務局から入手可能

明細書

標的物質検出用ポリマー及び標的物質の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的物質検出用ポリマー、該ポリマーの形成方法及び該ポリマーを用いた標的物質の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 特許文献1～4は、互いに相補的な塩基配列を有する複数種の核酸プローブを用いて、自己集合反応(Probe alternation link self-assembly reaction)により核酸プローブの集合体(ポリマー)を形成する方法(以下、プローブの自己集合反応によるポリマーの形成法を、パルサー法(PALSAR法)と称する。)を開示している。

[0003] 特許文献1は、前記パルサー法を利用したターゲット遺伝子の検出方法として、ポリマー形成に用いられる核酸プローブに相補的な領域と標的核酸に相補的な領域を持つプローブとターゲット遺伝子を反応させた後、ポリマー形成用の複数の核酸プローブを添加し、自己集合反応により自己集合体を形成させ、シグナルを増幅させ、ターゲット遺伝子を検出する方法を開示している。

また、特許文献1は、前記パルサー法を利用した抗原・抗体の検出方法として、抗原に抗体を結合させた後、ポリマー形成に用いられる核酸プローブに相補的な領域を有しビオチン化した遺伝子、プロテインA及びストレプトアビジンを用いて、抗原、抗体、プロテインA、ストレプトアビジン及びビオチン化した遺伝子の複合体を形成し、その後、ポリマー形成用の複数の核酸プローブを添加し、自己集合反応により自己集合体を形成させ、シグナルを増幅させ、抗原・抗体を検出する方法を開示している。

[0004] また、特許文献5は、前記パルサー法を利用したターゲット遺伝子の検出方法として、マイクロプレート等の反応機材に標的核酸を捕捉可能なキャップチャープローブ(捕捉用プローブ)を結合させ、標的核酸を捕捉した後、ポリマー形成に用いられる核酸プローブに相補的な領域と標的核酸に相補的な領域とを持つ結合用プローブを加え、キャップチャープローブ、標的核酸及び結合用プローブの複合体を形成した後

、ポリマー形成用の複数の核酸プローブを添加し、自己集合反応により自己集合体を形成させ、シグナルを増幅させ、標的核酸を検出する方法を開示している。

[0005] 上記方法により、ターゲット遺伝子や抗原・抗体等の標的物質の検出感度を著しく向上させることが可能であるが、標的物質を結合させた固相表面上で核酸プローブの自己集合反応を行なう為、反応時の緩衝液の条件や温度条件が制約されるといった問題があった。特に、大きなポリマーを形成させるためにはポリマー形成に用いる核酸プローブの濃度を上げる必要があるが、固相上で短時間で大きなポリマーを形成させるためには反応条件に制限があり、効率よく自己集合反応させることは容易ではなかった。さらに、核酸プローブの濃度を上げることにより、反応に寄与しない核酸プローブが増加し、それに伴って固相への物理吸着や非特異反応が増すといった問題も生じる為、核酸プローブの濃度が最小限で最大の効果を発揮させることが望まれる。

[0006] また、抗原抗体反応により蛋白質や低分子を測定する際、抗体や蛋白は熱の安定性が良くないから反応温度は25～37°Cで行われるのが通常であるが、パルサー法による自己集合反応は抗体や蛋白を変性させる温度領域である45°C～65°Cで行われる為、パルサー法を利用した抗原抗体反応を効率よく行なうことが困難であった。

特許文献1:特許第3267576号公報

特許文献2:特許第3310662号公報

特許文献3:国際公開第02／31192号公報

特許文献4:特開2002-355081号公報

特許文献5:国際公開第03／029441号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、効率よく高感度且つ簡便に標的物質を検出することができる標的物質の検出方法、該方法に用いられる標的物質検出用ポリマー、及び該ポリマーの形成方法を提供することを目的とする。

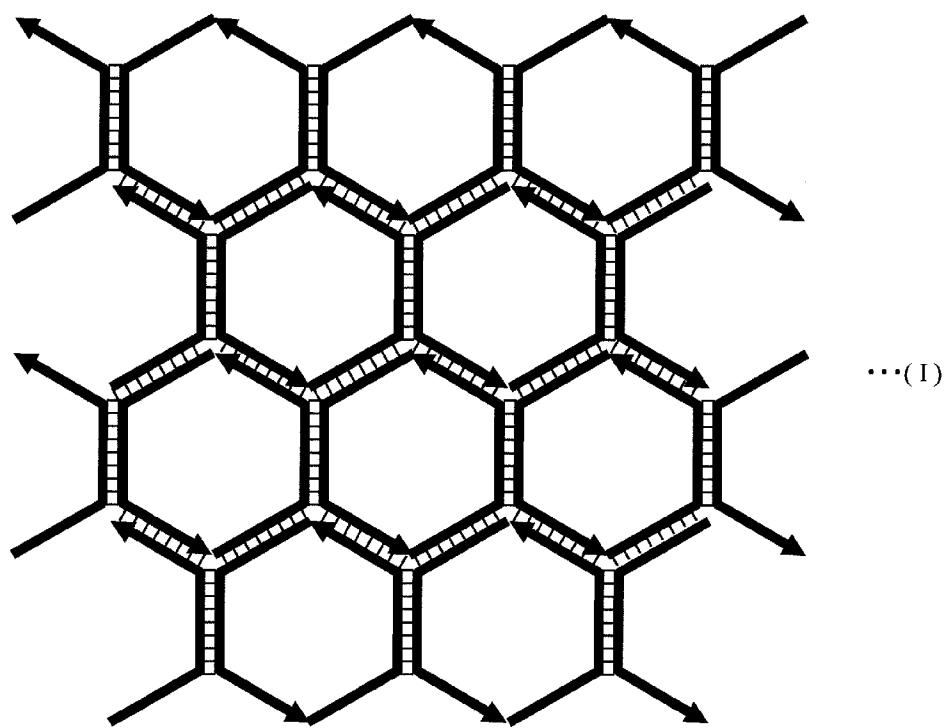
課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するために、本発明者は鋭意研究を行なった結果、予めポリマー

形成用の核酸プローブ及び結合用プローブを反応させ、標的物質と結合可能なポリマーを形成させた後、該ポリマーを標的物質と反応させることにより、反応溶液等の条件の制約を軽減させることができ、さらに検出感度を著しく向上させることができるを見出した。

なお、本願明細書において、結合用プローブとは、検出する標的物質と直接又は間接的に結合可能な部分を有し、且つポリマー形成に用いられる複数の核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域を有するプローブを意味する。

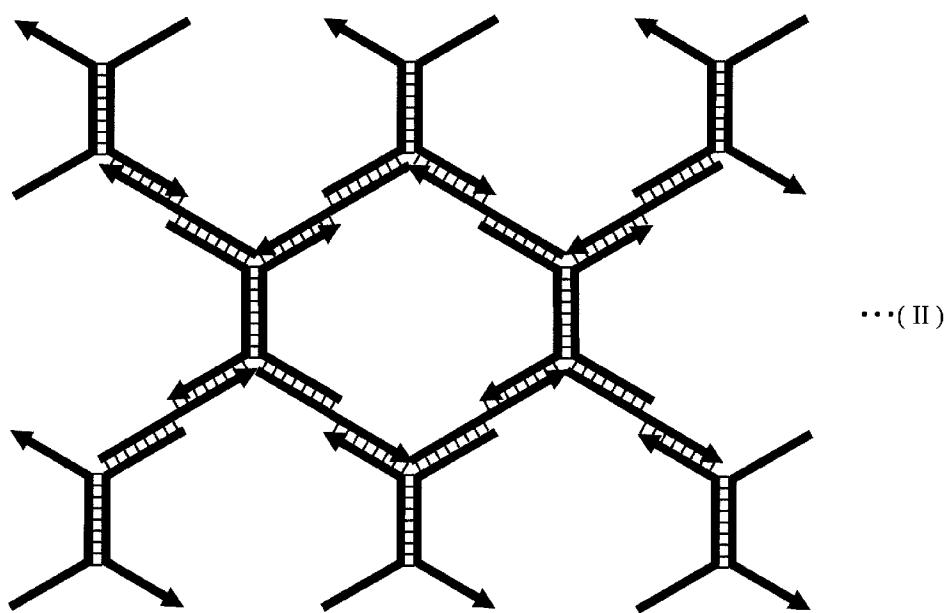
- [0009] 本発明の標的物質の検出方法の第一の態様は、(A)ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程；(B)前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び(C)前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含み、前記複数種の核酸プローブは、5'端側から順に少なくとも核酸領域 X_1 、核酸領域 X_2 、…核酸領域 X_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、5'端側から順に少なくとも前記核酸領域 X_1 に相補的な核酸領域 X'_1 、前記核酸領域 X_2 に相補的な核酸領域 X'_2 、…前記核酸領域 X_n に相補的な核酸領域 X'_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、からなることを特徴とする。
- [0010] 本発明の標的物質の検出方法の第二の態様は、(A)ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程；(B)前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び(C)前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含み、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする。
- [0011] [化1]



[0012] なお、前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表し、矢印方向は5'末端から3'末端方向を示す。また、本発明において、他の核酸プローブとハイブリダイズしている領域を相補的領域と称するが、核酸プローブ中の相補的領域の間にはギャップを含んでいてもよいが、ギャップはない方が好ましい。

[0013] 本発明の標的物質の検出方法の第三の態様は、(A)ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程；(B)前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び(C)前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含み、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする。

[0014] [化2]



[0015] なお、前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表し、矢印方向は5'末端から3'末端方向を示す。また、本発明において、他の核酸プローブとハイブリダイズしている領域を相補的領域と称するが、核酸プローブ中の相補的領域の間にはギャップを含んでいてもよいが、ギャップはない方が好ましい。

[0016] 本発明の標的物質の検出方法の第一～第三の態様において、前記形成工程が、前記複数種の核酸プローブをハイブリダイズさせ、第一のポリマーを形成する第1のハイブリダイズ工程、及び該第一のポリマーと前記結合用プローブをハイブリダイズさせ、前記標的物質検出用ポリマーを形成する第2のハイブリダイズ工程、を含むことが好ましい。

また、本発明の標的物質の検出方法の第一～第三の態様において、前記形成工程が、前記複数種の核酸プローブ及び前記結合用プローブを同時にハイブリダイズさせる工程を含んでいてもよい。

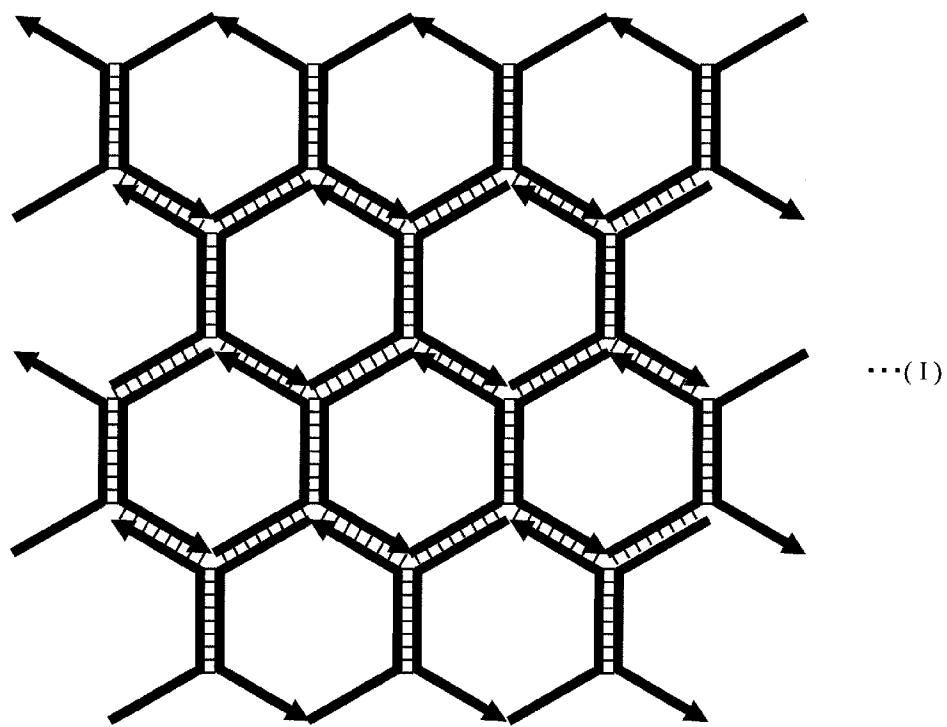
[0017] 本発明の標的物質の検出方法の第一～第三の態様において、前記形成工程後に、前記標的物質検出用ポリマーを含む溶液を希釈し、検出用溶液を調製する工程を含むことが好適である。

[0018] 本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法の第一の態様は、ポリマーを形成す

る複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、前記複数種の核酸プローブは、5'端側から順に少なくとも核酸領域 X_1 、核酸領域 X_2 、…核酸領域 X_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、5'端側から順に少なくとも前記核酸領域 X_1 に相補的な核酸領域 X'_1 、前記核酸領域 X_2 に相補的な核酸領域 X'_2 、…前記核酸領域 X_n に相補的な核酸領域 X'_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、からなることを特徴とする。

[0019] 本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法の第二の態様は、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする。

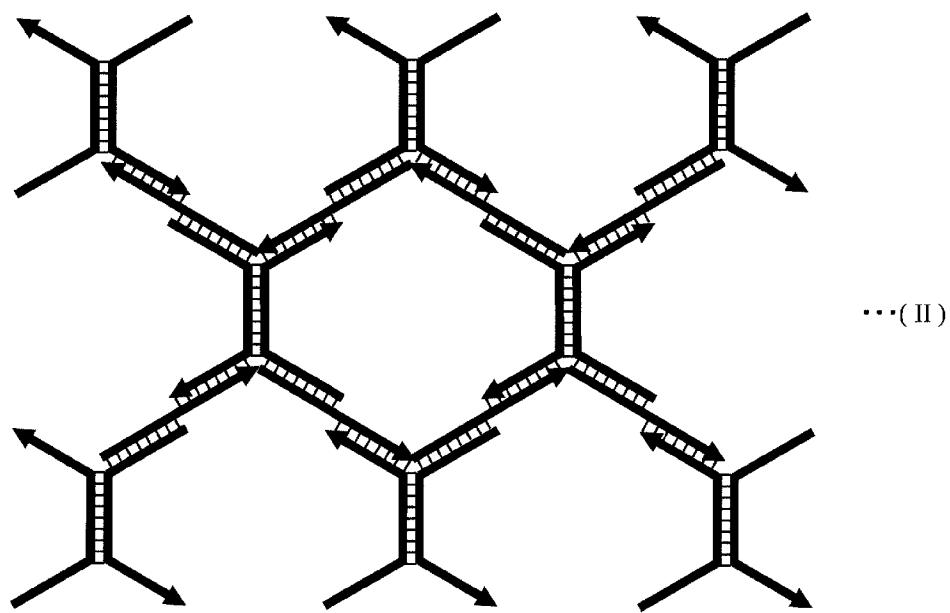
[0020] [化3]



[0021] (なお、前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す。)

[0022] 本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法の第三の態様は、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする。

[0023] [化4]



[0024] (なお、前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す。)

[0025] 本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法の第一～第三の態様において、前記標的物質検出用ポリマーを形成する工程が、前記複数種の核酸プローブをハイブリダイズさせ、第一のポリマーを形成する第1のハイブリダイズ工程と、該第一のポリマーと前記結合用プローブをハイブリダイズさせ、前記標的物質検出用ポリマーを形成する第2のハイブリダイズ工程と、を含むことが好ましい。

また、本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法の第一～第三の態様において、前記標的物質検出用ポリマーを形成する工程が、前記複数種の核酸プローブ及び前記結合用プローブを同時にハイブリダイズさせる工程を含んでいてもよい。

[0026] 本発明の形成方法において、前記複数種の核酸プローブの少なくとも1種の核酸プローブが、標識物質で標識されてなることが好ましい。

[0027] 本発明の形成方法において、前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することが好ましい。前記標的物質が核酸の場合は、前記結合用プローブの標的物質に結合可能な領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸領域であることが好ましい。

[0028] また、本発明の形成方法において、前記標的物質検出用ポリマーが、前記結合用

プローブを介してアビジン又はビオチンが結合されてなることが好適である。

前記標的物質検出用ポリマーにアビジン又はビオチンを結合する工程順は特に制限はない。例えば、予めアビジン又はビオチンを結合してなる結合用プローブを用いて、結合用プローブと、前記ポリマーを形成する複数種の核酸プローブとを反応させて、アビジン又はビオチンが結合した標的物質検出用ポリマーを形成することが好ましい。

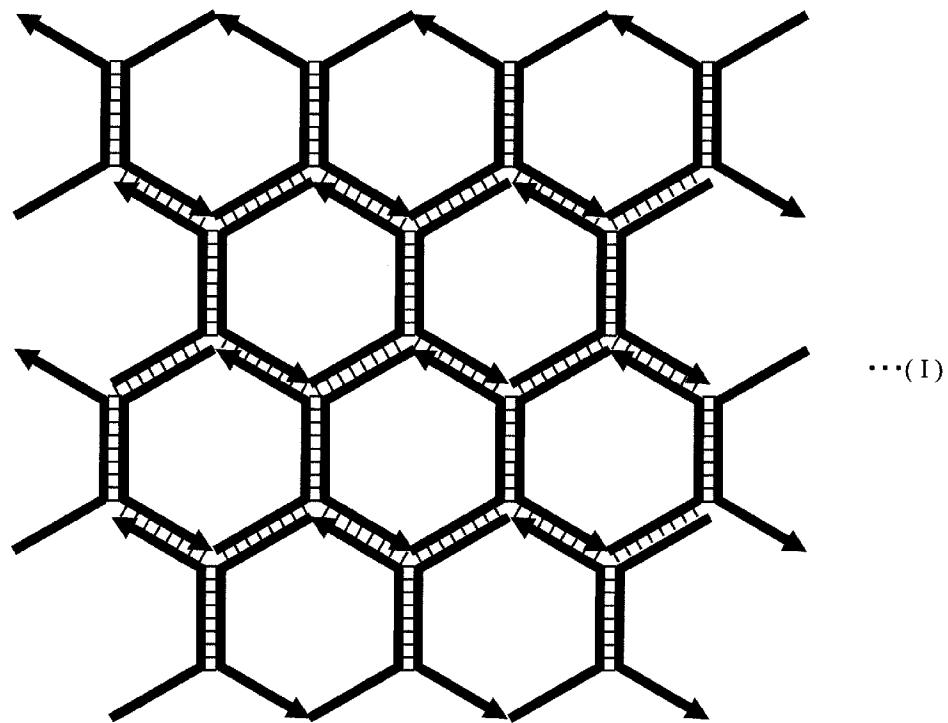
また、ターゲット領域が、アビジン又はビオチンを直接又は間接的に結合可能な領域である結合用プローブを用いて、ポリマー形成中又はポリマー形成後にアビジン又はビオチンを結合させることもできる。アビジン及びビオチンが結合していない結合用プローブを用いる場合、前記標的物質検出用ポリマーを形成する工程が、前記ポリマーを形成する複数種の核酸プローブと、前記結合用プローブとをハイブリダイズさせ、第二のポリマーを形成する工程と、前記第二のポリマーの結合用プローブにアビジン又はビオチンを結合させる工程と、を含むことが好ましい。

[0029] 本発明の標的物質検出用ポリマーの第一の態様は、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、前記複数種の核酸プローブは、5'端側から順に少なくとも核酸領域 X_1 、核酸領域 X_2 、…核酸領域 X_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、5'端側から順に少なくとも前記核酸領域 X_1 に相補的な核酸領域 X'_1 、前記核酸領域 X_2 に相補的な核酸領域 X'_2 、…前記核酸領域 X_n に相補的な核酸領域 X'_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、からなることを特徴とする。

[0030] 本発明の標的物質検出用ポリマーの第二の態様は、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プロ

ーブからなることを特徴とする。

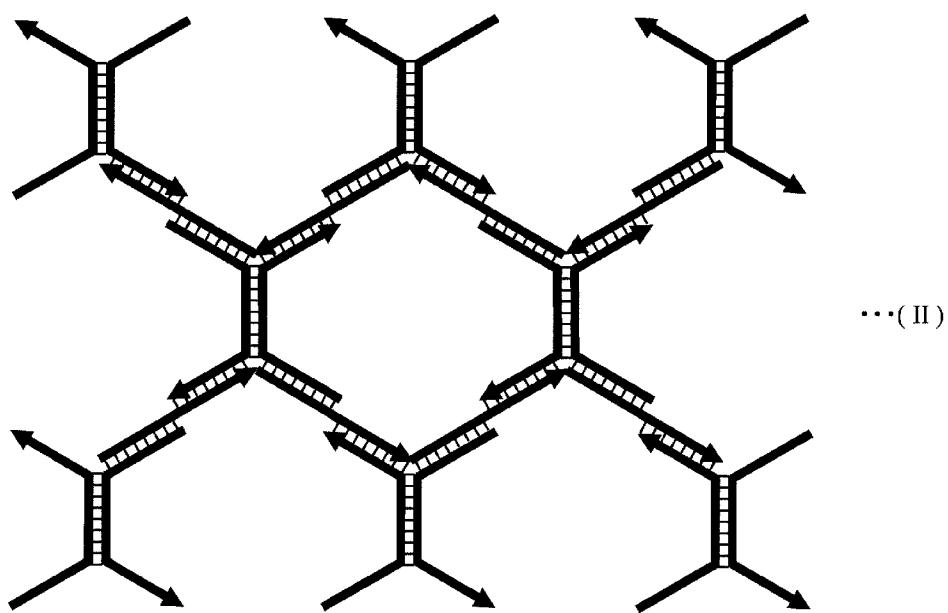
[0031] [化5]



[0032] (なお、前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す。)

[0033] 本発明の標的物質検出用ポリマーの第三の態様は、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする。

[0034] [化6]



[0035] (なお、前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す。)

[0036] 本発明の標的物質検出用ポリマーにおいて、前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することが好ましい。前記標的物質が核酸の場合は、前記結合用プローブの標的物質に結合可能な領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸領域であることが好ましい。

また、本発明の標的物質検出用ポリマーが、前記結合用プローブを介してアビシン又はビオチンが結合されてなることが好適である。

[0037] 本発明の標的物質検出用ポリマーの第四の態様は、前記本発明の標的物質検出用ポリマーの形成方法により形成されることを特徴とする。

[0038] 本発明の標的物質の検出方法の第四の態様は、前述した本発明の標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含むことを特徴とする。

[0039] 本発明の検出方法において、前記複数種の核酸プローブの少なくとも1種の核酸プローブが、標識物質で標識されてなることが好ましい。

[0040] 本発明の検出方法において、前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することが好ましい。前記標的物質が核酸の場

合は、前記結合用プローブのターゲット領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸からなることが好適である。

また、本発明の検出方法において、前記標的物質検出用ポリマーと前記標的物質の結合が、前記標的物質に結合可能な部位と前記結合用プローブのターゲット領域に結合可能な部位とを有するスペーサー物質を介してなされてもよい。

[0041] 本発明の検出方法において、前記標的物質検出用ポリマーは、前記結合用プローブを介してアビジン又はビオチンが結合されてなることが好ましい。該アビジン又はビオチンが結合されてなる標的物質検出用ポリマーを用い、前記標的物質検出用ポリマー及び前記標的物質を、ビオチンとアビジンの結合を介して結合させることが好適である。

発明の効果

[0042] 本発明によれば、反応溶液や反応温度等の種々の反応条件の制約を軽減させることができ、標的物質を効率よく高感度且つ簡便に検出することができる。また、本発明によれば、標的物質検出用ポリマーの大きさを制御することができる。

図面の簡単な説明

[0043] [図1]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第1の例を示す概略説明図である。

[図2]図1記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

[図3]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第2の例を示す概略説明図である。

[図4]図3記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

[図5]図3記載の複数の核酸プローブにおける第2ダイマープローブの他の例を示す概略説明図である。

[図6]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第3の例を示す概略説明図である。

[図7]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第4の例を示す概略説明

図である。

[図8]図7記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

[図9]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第5の例における2組のダイマー プローブを示す概略説明図である。

[図10]図7記載の複数の核酸プローブにおける架橋プローブの他の例を示す概略説明図である。

[図11]図7記載のダイマー プローブ及び図10記載の架橋プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

[図12]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第5の例における2組の架橋プローブを示す概略説明図である。

[図13]ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第6の例を示す概略説明図である。

[図14]図13記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

[図15]本発明の標的物質検出用ポリマーの一例を示す概略説明図である。

[図16]本発明の標的物質検出用ポリマーの他の例を示す概略説明図である。

[図17]実施例6の結果を示すグラフである。

[図18]実施例8の結果を示すグラフである。

[図19]実施例9の結果を示すグラフである。

符号の説明

[0044] 10:第1の核酸プローブ、12:第2の核酸プローブ、13:水素結合、14、22、34:ポリマー、20a:第1ダイマー プローブ、20b、20c、20d:第2ダイマー プローブ、20e:第3ダイマー プローブ、21a～21h、21j、21k:ダイマー形成用プローブ、30a, 30b:ダイマー プローブ、31a～31d:ダイマー形成用プローブ、32a～32d:架橋プローブ、40a, 40b:ダイマー プローブ、41a～41d:ダイマー形成用プローブ、42a～42d:架橋プローブ、50a, 50b:結合用プローブ、52a, 52b:標的物質検出用ポリマー、S:ストレプトアビジン。

発明を実施するための最良の形態

[0045] 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。

[0046] 本発明は、パルサー法により予め作製したポリマーを利用し、且つ結合用プローブを結合させたポリマー(本発明において、標的物質と結合していない結合用プローブを結合させたポリマーを標的物質検出用ポリマーと称する)を用いて標的物質を検出するものである。

即ち、本発明の標的物質の検出方法は、標的物質検出用ポリマーを準備する工程と、前記標的物質検出用ポリマーと標的物質を反応させ、前記標的物質検出用ポリマーと前記標的物質を直接又は間接的に結合させる工程と、前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する工程とを含むことを特徴とする。

[0047] 本発明の標的物質検出用ポリマーは、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能な領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより形成することができる。

前記複数種の核酸プローブとしては、互いに相補的な塩基配列を有し、自己集合反応により核酸プローブのポリマーを形成可能なものであれば特に限定されないが、具体的には、後述する3つの態様(パルサーI、パルサーII及びパルサーIII)が挙げられる。本発明において、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブは、アビシン及びビオチンのいずれも結合していない核酸プローブが用いられる。

[0048] (パルサーI)

図1は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第1の例を示す概略説明図である。図2は、図1記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブとしては、図1に示した如く、5'端側から順に少なくとも核酸領域 X_1 、核酸領域 X_2 、…核酸領域 X_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する第1の核酸プローブ10、及び5'端側から順に少なくとも前記核酸領

域 X_1 に相補的な核酸領域 X'_1 、前記核酸領域 X_2 に相補的な核酸領域 X'_2 、・・前記核酸領域 X_n に相補的な核酸領域 X'_n のn個($n \geq 3$)の核酸領域を有する第2の核酸プローブ12の2種の核酸プローブが挙げられる。なお、図1では、nが3の場合の例を示した。nの数は3以上であれば特に限定されないが、3以上5以下が好ましく、3がより好ましい。

[0049] 該2種の核酸プローブ10及び12をハイブリダイズさせることにより、図2に示した如く、2種の核酸プローブ10及び12が自己集合し、核酸プローブのポリマー14が形成される。なお、パルサーIにおいて、相補的な核酸領域数nが3である複数種の核酸プローブを用いる場合、該複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと前述した式(I)で示されるようにハイブリダイズするものである(図2及び式(I)参照)。

[0050] (パルサーII)

図3は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第2の例を示す概略説明図である。図4は、図3記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブとしては、図3に示した如く、ポリマーを形成する複数のダイマープローブ又は該ダイマープローブを形成するダイマー形成用プローブが挙げられる。前記複数のダイマープローブは、複数のダイマープローブの1つのダイマープローブの各5'側領域は他のダイマープローブのいずれかの5'側領域と相補的であり且つ前記複数のダイマープローブの1つのダイマープローブの各3'側領域は他のダイマープローブのいずれかの3'側領域と相補的であるように構成されており、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3記載の核酸プローブが用いられる。パルサーIIの複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと前述した式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有するものである(図4及び式(I)参照)。

[0051] 図3は2組のダイマープローブ(第1ダイマープローブ20a、第2ダイマープローブ20b)を用いた場合の一例を示した。

図3(a)に示した如く、第1ダイマープローブ20aは2種の一本鎖核酸プローブ(第1ダイマー形成用プローブ21a及び第2ダイマー形成用プローブ21b)をハイブリダイ

ズさせることにより形成される。第1ダイマー形成用プローブ21aは、5'側領域(領域A)、中央領域(領域B)及び3'側領域(領域C)の3領域を含み、第2ダイマー形成用プローブ21bは、5'側領域(領域D)、中央領域(領域B')及び3'側領域(領域F)の3領域を含み、第1ダイマー形成用プローブ21a及び第2ダイマー形成用プローブ21bは、中央領域(領域B及びB')が互いに相補的であり且つ該3'側領域(領域C及びF)及び該5'側領域(領域A及びF)が互いに非相補的である。

- [0052] 図3(b)に示した如く、第2ダイマープローブ20bは、2種の一本鎖核酸プローブ(第3ダイマー形成用プローブ21c及び第4ダイマー形成用プローブ21d)をハイブリダイズさせることにより形成される。第3ダイマー形成用プローブ21cは、5'側領域(領域A')、中央領域(領域E)及び3'側領域(領域C')の3領域を含み、第4ダイマー形成用プローブ21dは、5'側領域(領域D')、中央領域(領域E')及び3'側領域(領域F')の3領域を含み、第3ダイマー形成用プローブ21c及び第4ダイマー形成用プローブ21dは、中央領域(領域E及びE')が互いに相補的であり且つ該3'側領域(領域C'及びF')及び該5'側領域(領域A'及びF')が互いに非相補的である。

なお、本発明において、領域A'は領域Aに相補的な塩基配列を有する領域を、領域C'は領域Cに相補的な塩基配列を有する領域を、領域D'は領域Dに相補的な塩基配列を有する領域を、領域F'は領域Fに相補的な塩基配列を有する領域を、それぞれ意味する。

- [0053] 第1ダイマープローブ20aの5'側領域(領域A及びD)は第2ダイマープローブ20bの5'側領域(領域A'及びD')と相補的であり、第1ダイマープローブ20aの3'側領域(領域C及びF)は第2ダイマープローブ20bの3'側領域(領域C'及びF')と相補的であり、前記第1及び第2ダイマープローブ20a及び20bをハイブリダイズさせることにより、核酸プローブのポリマー22を形成することができる(図4)。

本発明において、ダイマープローブの代わりに、ダイマープローブ形成前のダイマー形成用プローブを用いてもよいが、ダイマープローブを用いることが好ましい。

- [0054] 図3では、第1ダイマー形成用プローブ21aの5'側領域及び3'側領域をそれぞれ第3ダイマー形成用プローブ21cの5'側領域及び3'側領域と相補的とし、第2ダイマー形成用プローブ21bの5'側領域及び3'側領域をそれぞれ第4ダイマー形成用プローブ21dの5'側領域及び3'側領域と相補的とし、各々の5'側領域及び3'側領域を組合せることにより、核酸プローブのポリマー22を形成する。

ロープ21dの5'側領域及び3'側領域と相補的とした例を示したが、本発明において、ダイマープローブは、1つのダイマープローブの5'側領域が他のダイマープローブの5'側領域と相補的であり且つ1つのダイマープローブの3'側領域が他のダイマープローブの3'側領域と相補的であればよいものである。

[0055] 図5は、図3記載の第1ダイマープローブ20aと共に用いられる第2ダイマープローブの他の例を示す概略説明図である。

図5に示した如く、5'側領域が第1ダイマー形成用プローブ21aの5'側領域に相補的な領域(領域A')であり且つ3'側領域が第2ダイマー形成用プローブ21bの3'側領域に相補的な領域(領域F')であるダイマー形成用プローブ21eと、5'側領域が第2ダイマー形成用プローブ21bの5'側領域に相補的な領域(領域D')であり且つ3'側領域が第1ダイマー形成用プローブ21aの3'側領域に相補的な領域(領域C')であるダイマー形成用プローブ21fと、ハイブリダイズさせて形成させたダイマープローブ20cを、第2ダイマープローブとして用いることもできる。

[0056] また、図1では、2種類のダイマープローブを使用した例を示したが、相補的な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)。

図6は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第3の例を示す概略説明図であり、3組のダイマープローブ(第1ダイマープローブ20a、第2ダイマープローブ20d、第3ダイマープローブ20e)を用いた場合の一例を示す概略説明図である。

図6(a)において、第1ダイマープローブ20aは図3(a)と同様に構成されている。

図6(b)において、第2ダイマープローブ20dは、2種の一本鎖核酸プローブ(ダイマー形成用プローブ21g、21h)をハイブリダイズさせることにより形成される。ダイマー形成用プローブ21gは、5'側領域(領域G)、中央領域(領域E)及び3'側領域(領域C')の3領域を含み、3'側領域(領域C')が第1ダイマープローブ20aの3'側領域(領域C)と相補的である。ダイマー形成用プローブ21hは、5'側領域(領域D')、中央領域(領域E')及び3'側領域(領域H)の3領域を含み、5'側領域(領域D')が第1ダイマープローブ20aの5'側領域(領域D)と相補的である。

[0057] 図6(c)において、第3ダイマープローブ20eは、2種の一本鎖核酸プローブ(ダイ

マー形成用プローブ21j, 21k)をハイブリダイズさせることにより形成される。ダイマー形成用プローブ11jは、5'側領域(領域A')、中央領域(領域J)及び3'側領域(領域H')の3領域を含み、5'側領域(領域A')が第1ダイマープローブ20aの5'側領域(領域A)と相補的であり、3'側領域(領域H')が第2ダイマープローブ20dの3'側領域(領域H)と相補的である。ダイマー形成用プローブ21kは、5'側領域(領域G')、中央領域(領域J')及び3'側領域(領域F')の3領域を含み、5'側領域(領域G')が第2ダイマープローブ20dの5'側領域(領域G)と相補的であり、3'側領域(領域F')が第1ダイマープローブ20aの3'側領域(領域F)と相補的である。なお、図中、領域J'は領域Jに相補的な領域である。

[0058] 即ち、図6において、第1ダイマープローブの1つの5'側領域及び1つの3'側領域は、第2ダイマープローブの1つの5'側領域及び1つの3'側領域と相補的であり、第1ダイマープローブの他の5'側領域及び他の3'側領域は、第3ダイマープローブの1つの5'側領域及び1つの3'側領域と相補的であり、第2ダイマープローブの他の5'側領域及び他の3'側領域は、第3ダイマープローブの他の5'側領域及び他の3'側領域と相補的であるように構成されている。

[0059] 図6に示した如く、各ダイマープローブの各3'側領域をそれぞれ他のダイマープローブのいずれかの3'側領域と相補的とし、且つ各ダイマープローブの各5'側領域をそれぞれ他のダイマープローブのいずれかの5'側領域と相補的となるように構成した複数種のダイマープローブを用いて、これら複数種のダイマープローブをハイブリダイズさせることにより、ダイマープローブの集合体であるポリマーが形成される。

なお、本発明において、相補的な関係を有するダイマープローブの組み合わせ特に制限はないが、図6に示した如く、各ダイマープローブ中の1つの3'側領域及び1つの5'側領域が、他の1つのダイマープローブ中の1つの3'側領域及び1つの5'側領域とそれぞれ相補的となるように構成することが好ましい。

[0060] (パルサーIII)

図7は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第4の例を示す概略説明図である。図8は、図7記載の複数の核酸プローブを用いて形成されるポリマーを示す概略説明図である。

ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブとしては、図7に示した如く、一対のダイマー形成用プローブもしくは該一対のダイマー形成用プローブから形成されるダイマープローブを1組以上と、1種以上の架橋プローブとが挙げられる。パルサーII Iの複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと前述した式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有するものである(図8及び式(II)参照)。

[0061] 図7は、1組の一対のダイマー形成用プローブ及び1組の一対の架橋プローブを用いた場合の第1の例を示した。

図7において、(a)は1組の一対のダイマー形成用プローブ(第1ダイマー形成用プローブ31a, 第2ダイマー形成用プローブ31b)、並びに該一対のダイマー形成用プローブ31a, 31bから形成されるダイマープローブ30aである。

図7(a)に示した如く、一対のダイマー形成用プローブは、2種の一本鎖核酸プローブ(第1ダイマー形成用プローブ31a及び第2ダイマー形成用プローブ31b)からなり、各ダイマー形成用プローブ31a, 31bは、中央領域、該中央領域より5'側に位置する5'側領域、及び該中央領域より3'側に位置する3'側領域の少なくとも3領域を含む。図7中、第1ダイマー形成用プローブ31aの5'側領域を領域A、中央領域を領域B、3'側領域を領域Cで示し、第2ダイマー形成用プローブ31bの5'側領域を領域D、中央領域を領域B'、3'側領域を領域Fで示した。第1ダイマー形成用プローブ31aと第2ダイマー形成用プローブ31bの中央領域(領域B及びB')は互いに相補的であり、第1ダイマー形成用プローブ31a及び第2ダイマー形成用プローブ31bのそれぞれの5'側領域(領域A及びD)及び3'側領域(領域C及びF)の4領域は全て互いに非相補的であり、両者をハイブリダイズさせることにより、1組のダイマープローブ30aが形成される。図中、符号13は水素結合である。

[0062] 本発明において、予め一対のダイマー形成用プローブをハイブリダイズさせて形成させたダイマープローブを用いてもよく、ダイマー形成用プローブをそのまま用いてよいが、ダイマープローブを用いることが好ましい。

[0063] 複数組の一対のダイマー形成用プローブを用いる場合、前述した1組の場合と同様に各組の一対のダイマー形成用プローブを構成する。複数組の一対のダイマー形成用プローブにより同数組のダイマープローブが形成される。

[0064] 図9は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第5の例における2組の一対のダイマー形成用プローブの一例及び該一対のダイマー形成用プローブから形成される2組のダイマープローブを示す概略説明図である。図9において、(a)は1組目の一対のダイマー形成用プローブ(第1ダイマー形成用プローブ41a, 第2ダイマー形成用プローブ41b)、並びに該一対のダイマー形成用プローブ41a, 41bから形成されるダイマープローブ40aであり、(b)は2組目の一対のダイマー形成用プローブ(第1ダイマー形成用プローブ41c, 第2ダイマー形成用プローブ41d)、並びに該一対のダイマー形成用プローブ41c, 41dから形成されるダイマープローブ40bである。

図9中、1組目の第1ダイマー形成用プローブ41aの5'側領域を領域A、中央領域を領域B、3'側領域を領域Cで示し、1組目の第2ダイマー形成用プローブ41bの5'側領域を領域D、中央領域を領域B'、3'側領域を領域Fで示し、2組目の第1ダイマー形成用プローブ41cの5'側領域を領域G、中央領域を領域E、3'側領域を領域Hで示し、2組目の第2ダイマー形成用プローブ41dの5'側領域を領域I、中央領域を領域E'、3'側領域を領域Jで示した。各組の第1及び第2ダイマー形成用プローブの中央領域(領域B及びB'、領域E及びE')はそれぞれ互いに相補的であり、各一対の第1及び第2ダイマー形成用プローブの5'側領域及び3'側領域の4領域(領域A、C、D及びF、領域G、H、I及びJ)は全て互いに非相補的であり、各組の一対のダイマー形成用プローブ41a, 41b, 41c, 41dをハイブリダイズさせることにより、2組のダイマープローブ40a, 40bが形成される。本発明において、パルサーIIIで用いるダイマー形成用プローブの3'側領域及び5'側領域が全て互いに非相補的であることが好ましい。

[0065] 本発明において、架橋プローブはダイマー形成用プローブから形成されるダイマープローブを架橋することができる1種以上の一一本鎖核酸プローブであり、少なくとも2領域を含む。該2領域の内、5'側に位置する領域を5'側領域と称し、3'側に位置する領域を3'側領域と称する。本発明において、各ダイマー形成用プローブの5'側領域は、架橋プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、各ダイマー形成用プローブの3'側領域は、架橋プローブのいずれかの3'側領域と相補的である。該構成と

することにより、架橋プローブは、ダイマー形成用プローブから形成される1種以上の複数のダイマープローブを架橋するように、ダイマー形成用プローブに結合し、プローブの集合体(プローブポリマー)を形成することができる。

[0066] 1組の一対のダイマー形成用プローブを用いる場合、1組の一対の架橋プローブを用いることが好ましい。1組の一対のダイマー形成用プローブ(第1ダイマー形成用プローブ及び第2ダイマー形成用プローブ)及び1組の一対の架橋プローブ(第1架橋プローブ及び第2架橋プローブ)は、一対のダイマー形成用プローブの各5'側領域が、一対の架橋プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、且つ一対の架橋プローブの各5'側領域が、一対のダイマー形成用プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、一対のダイマー形成用プローブの各3'側領域が、一対の架橋プローブのいずれかの3'側領域と相補的であり、且つ一対の架橋プローブの各3'側領域が、一対のダイマー形成用プローブのいずれかの3'側領域と相補的であるように構成される。

[0067] 図7(b)は、図7(a)記載の一対のダイマー形成用プローブ31a, 31bと共に用いられる1組の一対の架橋プローブ(第1架橋プローブ32a及び第2架橋プローブ32b)の一例を示す概略説明図である。

図7(a)記載の1組の一対のダイマー形成用プローブ31a, 31bと共に用いられる架橋プローブとしては、例えば、図7(b)に示した如く、第1架橋プローブ32aの5'側領域は、第1ダイマー形成用プローブ31aの5'側領域(領域A)と相補的であり、第1架橋プローブ32aの3'側領域は、第1ダイマー形成用プローブ31aの3'側領域(領域C)と相補的であり、第2架橋プローブ32bの5'側領域は、第2ダイマー形成用プローブ31bの5'側領域(領域D)と相補的であり、第2架橋プローブ32bの3'側領域は、第2ダイマー形成用プローブ31bの3'側領域(領域F)と相補的である、一対の架橋プローブが好適である。図7(a)記載のダイマー形成用プローブ13a-31d及び図7(b)記載の架橋プローブ32a、32bをハイブリダイズさせることにより、ポリマー34を形成することができる(図8)。

[0068] 図7では、第1ダイマー形成用プローブ31aの5'側領域及び3'側領域をそれぞれ第1架橋プローブ32aの5'側領域及び3'側領域と相補的とし、第2ダイマー形成用

プローブ31bの5'側領域及び3'側領域をそれぞれ第2架橋プローブ32bの5'側領域及び3'側領域と相補的とした例を示したが、本発明において、1つのダイマー形成用プローブの5'側領域が1つの架橋プローブの5'側領域と相補的であり且つ1つのダイマー形成用プローブの3'側領域が1つの架橋プローブの3'側領域と相補的であればよいものである。

[0069] 図10は、図7記載の一対のダイマー形成用プローブ31a, 31bと共に用いられる1組の一対の架橋プローブ(第1架橋プローブ32c及び第2架橋プローブ32d)の他の例を示す概略説明図である。

図10に示した如く、一対の架橋プローブの他の例として、第1架橋プローブ32cの5'側領域は、第1ダイマー形成用プローブ31aの5'側領域(領域A)と相補的であり、第1架橋プローブ32cの3'側領域は、第2ダイマー形成用プローブ31bの3'側領域(領域F)と相補的であり、第2架橋プローブ32dの5'側領域は、第2ダイマー形成用プローブ31bの5'側領域(領域D)と相補的であり、第2架橋プローブ32dの3'側領域は、第1ダイマー形成用プローブ31bの3'側領域(領域C)と相補的である、一対の架橋プローブが挙げられる。図7(a)記載のダイマー形成用プローブ31a-31d及び図10記載の架橋プローブ32c、32dをハイブリダイズさせることにより、ポリマー34を形成することができる(図11)。

[0070] 複数組の一対のダイマー形成用プローブを用いる場合、同数組の一対の架橋プローブを用いることが好ましい。具体的には、n組(nは2以上の整数)の一対のダイマー形成用プローブ(即ち、2n個のダイマー形成用プローブ)及びn組の一対の架橋プローブ(即ち、2n個の架橋プローブ)を用い、各ダイマー形成用プローブの5'側領域は、架橋プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、且つ各架橋プローブの5'側領域は、ダイマー形成用プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、各ダイマー形成用プローブの3'側領域は、架橋プローブのいずれかの3'側領域と相補的であり、且つ各架橋プローブの3'側領域は、前記ダイマー形成用プローブのいずれかの3'側領域と相補的である構成することが好適である。

[0071] 図12は、図9記載の2組の一対のダイマー形成用プローブ41a-41dと共に用いられる2組の一対の架橋プローブ42a-42dの一例を示す概略説明図である。図12に

おいて、(a)は1組目の一対の架橋プローブ(第1架橋プローブ42a, 第2架橋プローブ42b)であり、(b)は2組目の一対の架橋プローブ(第1架橋プローブ42c, 第2架橋プローブ42d)である。

図12に示した如く、図9記載の2組の一対のダイマー形成用プローブ41a-41dと共に用いられる架橋プローブとしては、2組の一対の架橋プローブ(即ち、4種の架橋プローブ)を用い、各ダイマー形成用プローブの5'側領域が架橋プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、各架橋プローブの5'側領域がダイマー形成用プローブのいずれかの5'側領域と相補的であり、各ダイマー形成用プローブの3'側領域が架橋プローブのいずれかの3'側領域と相補的であり、各架橋プローブの3'側領域がダイマー形成用プローブのいずれかの3'側領域と相補的であるように構成することが好適である。

[0072] 具体的には、図12に示した如く、1組目の第1架橋プローブ42aの5'側領域は、1組目の第1ダイマー形成用プローブ41aの5'側領域(領域A)と相補的であり、1組目の第2架橋プローブ42bの5'側領域は、1組目の第2ダイマー形成用プローブ41bの5'側領域(領域D)と相補的であり、2組目の第1架橋プローブ42cの5'側領域は、2組目の第1ダイマー形成用プローブ41cの5'側領域(領域G)と相補的であり、2組目の第2架橋プローブ42dの5'側領域は、2組目の第2ダイマー形成用プローブ41dの5'側領域(領域D)と相補的であり、1組目の第1架橋プローブ42aの3'側領域は、4種のダイマー形成用プローブ41a-41dのいずれか1つの3'側領域と相補的であり(図12では、領域Hと相補的である場合を示した)、1組目の第2架橋プローブ42bの3'側領域は、4種のダイマー形成用プローブ41a-41d中、1組目の第1架橋プローブ42aで選択したものと除くいずれか1つの3'側領域と相補的であり(図12では、領域Jと相補的である場合を示した)、2組目の第1架橋プローブ42cの3'側領域は、4種のダイマー形成用プローブ41a-41d中、1組目の第1及び第2架橋プローブ42a-42bで選択したものと除くいずれか1つの3'側領域と相補的であり(図12では、領域Cと相補的である場合を示した)、2組目の第2架橋プローブ42dの3'側領域は、4種のダイマー形成用プローブ41a-41d中、1組目の第1及び第2架橋プローブ42a-42b及び2組目の第1架橋プローブ42cで選択したものと除く1つの3'側

領域と相補的である(図12では、領域Fと相補的である場合を示した)、2組の一対の架橋プローブが好適である。図9記載のダイマー形成用プローブ41a-41d及び図12記載の架橋プローブ42a-42dをハイブリダイズさせることにより、ポリマー34を形成することができる。

- [0073] なお、図12では、1組目の第1架橋プローブ42aの3'側領域は、2組目の第1ダイマー形成用プローブ41cの3'側領域と相補的であり、1組目の第2架橋プローブ42bの3'側領域は、2組目の第2ダイマー形成用プローブ41bの3'側領域と相補的であり、2組目の第1架橋プローブ42cの3'側領域は、1組目の第1ダイマー形成用プローブ41aの3'側領域と相補的であり、2組目の第2架橋プローブ42dの3'側領域は、1組目の第2ダイマー形成用プローブ41bの3'側領域と相補的である場合を示したが、各架橋プローブの3'側領域と相補的となるダイマー形成用プローブの3側領域の組み合わせに制限はないものである。
- [0074] 本発明において、非相補的な塩基配列とは、互いにハイブリダイズしない塩基配列であればいかなるものでもよく、同一な塩基配列も非相補的な塩基配列に含まれるものである。

図13は、ポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの第6の例を示す概略説明図であり、1組の一対のダイマー形成用プローブ及び1種の一対の架橋プローブの第2の例を示す概略説明図である。図13(a)において、符号30bはダイマープローブであり、3'側領域並びに5'側領域をそれぞれ同一の塩基配列とした2種のダイマー形成用プローブ31c, 31dを用いてダイマーを形成した例を示した。即ち、図7のダイマープローブ30aにおいて、領域Aと領域Dを同一の塩基配列とし、領域Cと領域Fを同一の塩基配列としたものである。該構成とすることにより、図13(b)に示した如く、ダイマープローブ30bと共に用いられる一対の架橋プローブは同一となり、1種の架橋プローブ32cが用いられる。図13記載のダイマー形成用プローブ31c-31d及び架橋プローブ32cをハイブリダイズさせることにより、ポリマー34を形成することができる(図14)。

- [0075] 本発明のポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブにおいて、各プローブの各相補的な領域の長さは、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な領域の長さは同じであることが望ましい。

- [0076] 本発明のポリマー形成に用いられる複数種の核酸プローブの各領域の塩基配列は、ポリマーが形成されるように所定の領域が相補的な塩基配列となるように構成されればよく特に制限はないが、各領域の両末端の塩基がグアニン又はシトシンであることが好ましい。各領域の両末端の塩基をグアニン又はシトシンとすることにより、反応時間を短縮させることができ、さらにより低い反応温度で安定したプローブポリマーを形成させることができ、作業性及び検出感度を向上させることができる。
- [0077] 上記核酸プローブは、通常DNA又はRNAで構成されるが、核酸類似体でも構わない。核酸類似体として、たとえば、ペプチド核酸(PNA、国際公開第92/20702号公報等参照)やLocked Nucleic Acid(LNA、Koshkin AA et al. Tetrahedron 1998. 54, 3607-3630.、Koshkin AA et al. J. Am. Chem. Soc. 1998.120, 13252-13253.、W ahlesteds C et al. PNAS. 2000.97,5633-5638.等参照)が挙げられる。また、複数の核酸プローブは、通常、同じ種類の核酸で構成されるが、たとえばDNAプローブとRNAプローブが一対になつても差し支えない。即ち、プローブの核酸の種類はDNA、RNAまたは核酸類似体(たとえばPNAやLNA等)から選択することができる。又、一つのプローブ内での核酸組成は一種類、たとえばDNAのみから構成される必要はなく、必要に応じて、たとえば、DNAとRNAから構成されるオリゴヌクレオチド・プローブ(キメラプローブ)を使用することも可能であり、本発明に含まれる。
- [0078] これらプローブは公知の方法により合成することができる。たとえばDNAプローブの場合、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystem Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成することができる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであつてもよい。
- [0079] 本発明で用いられる結合用プローブは、標的物質と直接又は間接的に結合可能なターゲット領域Tと前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有するものであり、該結合用プローブが、ターゲット領域Tを有し、且つポリマー形成に用いら

れる複数の核酸プローブの1つの核酸プローブの一部又は全てと同じ塩基配列を有することが好適である。前記ターゲット領域は、結合用プローブの端部に位置することが好ましい。

[0080] 本発明において、結合用プローブと標的物質の結合は、両者を直接結合させてもよいが、他の物質を介して間接的に結合させてもよいものであり、前記ターゲット領域Tは、標的物質に直接結合可能な領域のみならず、他の物質を介して標的物質と間接的に結合可能な領域も含むものである。

前記ターゲット領域Tは標的物質に応じて適宜選択可能である。前記ターゲット領域Tを、標的物質と特異的に結合可能な部分を有するか、もしくは標的物質と特異的に結合可能な物質と直接又は間接的に結合可能な部位を有するように構成することにより、標的物質検出用ポリマーと標的物質を特異的に結合させることができる。具体的には、標的物質が核酸の場合は、ターゲット領域Tを標的核酸に相補的な塩基配列を有するように構成することが好ましい。標的物質が抗原等のタンパク質の場合は、抗体等の標的物質と特異的に結合する物質を直接又は間接的に結合させることが好ましい。

[0081] また、標的物質に結合可能な部位と前記ターゲット領域Tに結合可能な部位を有するスペーサー物質を用い、標的物質と結合用プローブをスペーサー物質を介して間接的に結合させることが好適である。スペーサー物質と結合用プローブの結合手段に制限はないが、例えば、一方をポリT配列(もしくはポリG配列)を有する領域とし、他方をポリA配列(もしくはポリC配列)を有する領域とする等の核酸の相補的結合を利用する方法や、ビオチンとアビジンの結合を利用する方法、抗原と抗体の結合を利用する方法、リガンドトリセプターの結合を利用する方法が好適である。

[0082] 本発明において、前記ターゲット領域Tを、アビジン又はビオチンが結合した領域もしくはアビジン又はビオチンが直接又は間接的に結合可能な領域Sとし、アビジンを結合させた標的物質検出用ポリマー、又はビオチンを結合させた標的物質検出用ポリマーを形成し、ビオチンとアビジンの結合を介して標的物質検出用ポリマーと標的物質を検出することが好適である。該標的物質検出用ポリマーとしては、アビジンを結合させた標的物質検出用ポリマーがより好適である。アビジンを結合させた標的物

質検出用ポリマーを用いる場合はビオチンを介して標的物質検出用ポリマーと標的物質を結合させ、ビオチンを結合させた標的物質検出用ポリマーを用いる場合はアビジンを介して標的物質検出用ポリマーと標的物質を結合させる。

- [0083] 標的物質検出用ポリマーとして、アビジンが結合された標的物質検出用ポリマーを用いる場合、結合用プローブにアビジンを結合させる方法は特に制限はないが、例えば、ポリマーを形成する核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域を有するプローブをビオチン標識し、ビオチンを介してアビジンを結合させることが好ましい。また、核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域を有するプローブをNH₂、CO₂OH又はSH等で修飾し、アビジンを化学的に結合させてもよい。
- [0084] 本発明に用いられるアビジンは、ビオチンを結合する活性を有する蛋白質であり、ストレプトアビジン及びアビジン(卵自由来)が挙げられ、ストレプトアビジンがより好ましい。
- [0085] 結合用プローブにアビジンを結合する時期に制限はないが、予めアビジンを結合してなる結合用プローブを用いて、該結合用プローブと、核酸プローブとを反応させて、アビジンが結合した標的物質検出用ポリマーを形成する方法や、アビジンが結合していない結合用プローブ(例えば、前述したビオチンが結合したプローブ)を用いて、核酸プローブと結合用プローブからなるポリマー(例えば、ビオチンが結合したポリマー)を形成した後、アビジンを反応させ、該ポリマーにアビジンを結合する方法が好適である。
- 予めアビジンを結合させた結合用プローブを用いる場合、標的物質検出用ポリマーを形成するためのハイブリダイゼーション工程の前に結合用プローブを精製することが好ましい。
- [0086] 標的物質検出用ポリマーとして、ビオチンが結合された標的物質検出用ポリマーを用いる場合、結合用プローブにビオチンを結合させる方法は特に制限はないが、例えば、ポリマーを形成する核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域を有するプローブをビオチン標識することが好ましい。
- 結合用プローブにビオチンを結合する時期に制限はないが、予めビオチン標識した結合用プローブを用いて、該結合用プローブと、核酸プローブとを反応させて、ビ

オチンが結合した標的物質検出用ポリマーを形成することが好適である。

[0087] 図15は、本発明の標的物質検出用ポリマーの一例を示す概略説明図であり、図1記載の複数種の核酸プローブを用いた例を示した。図15に示した如く、前記複数種の核酸プローブ10, 12及び結合用プローブ50aを溶液中で反応させることにより、標的物質と結合可能なターゲット領域Tを有する標的物質検出用ポリマー52aを形成することができる。

[0088] 該標的物質検出用ポリマーの形成は、複数種の核酸プローブ及び結合用プローブを同時にハイブリダイズさせてもよく、又は複数種の核酸プローブをハイブリダイズさせ、第一のポリマーを形成した後、該第一のポリマーと結合用プローブをハイブリダイズさせ、前記標的物質検出用ポリマーを形成してもよい。

該標的物質検出用ポリマーにおける核酸プローブと結合用プローブの組成比は、各核酸プローブ100モル部に対して結合用プローブを0. 1～20モル部の範囲とすることが好ましく、1～10モル部の範囲とすることがより好ましい。

[0089] 本発明は、ポリマー形成反応の際の核酸プローブの濃度に応じて標的物質検出用ポリマーの大きさを制御することができるものである。核酸プローブを高濃度とすることにより、大きな標的物質検出用ポリマーを得ることができる。

本発明において、核酸プローブの濃度条件は必要とする標的物質検出用ポリマーの大きさにより適宜選択すればよいが、各核酸プローブの濃度を50～1000pmol/mLとすることが好ましく、100～500pmol/mLとすることがより好ましい。

結合用プローブの濃度は、核酸プローブの濃度に応じて適宜選択すればよいが、各核酸プローブ100モル部に対して0. 1～20モル部の範囲とすることが好ましく、1～10モル部の範囲とすることがより好ましい。

[0090] 反応緩衝液の組成、濃度は特に限定されず、核酸增幅に常用される通常の緩衝液が好適に使用できる。pHも常用の範囲で好適であり、好ましくはpH7. 0～9. 0の範囲のものが使用できる。但し、アクリジニウムエステル標識の核酸プローブを用いる場合、pHは5. 0～6. 0の範囲が好ましい。ハイブリダイゼーション反応の温度条件も特に限定されず、通常の温度条件でよいが、40～80°Cが好ましく、55°C～65°Cがより好ましい。また、反応溶液中に反応温度領域を部分的に形成させ、当該反応

温度領域において自己集合反応を行わせるようにすることが好ましい(国際公開第2005/106031号公報)。部分的な反応温度領域に適用される反応温度は40～80°Cが好ましく、より好ましくは55～65°Cである。

- [0091] 標的物質検出用ポリマーを含む溶液は、作製後そのまま使用してもよいが、必要に応じて、適当な濃度に希釈(例えば、5～80倍希釈)することが好ましい。本発明においては、標的物質検出用ポリマーを予め作製させる為、標的物質検出の際に標的物質検出用ポリマーの濃度に依存せず、所定の大きさの標的物質検出用ポリマーを用いることができる。標的物質検出用ポリマーを低濃度とすることにより、非特異的反応を抑制することができる。
- [0092] 得られた標的物質検出用ポリマーは、未反応の核酸プローブをゲルろ過、限外ろ過、透析等で除去することが好ましい。また、一定の大きさに分画し、集めたものを用いることが好適である。
- [0093] 本発明の標的物質検出用ポリマーは、標識物質で標識されていることが好ましい。標識方法は特に制限されないが、予め標識物質で標識した核酸プローブを用いることが好ましい。前記標識物質としては、アクリジニウムエステル、ユーロピウム、ルテニウム、テレビウム、Cy3、Alexa、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシグニン、蛍光物質、発光物質又は色素等が好適に用いられ、操作性、定量性及び感度の点からアクリジニウムエステルが特に好ましい。
- また、形成されたポリマーに対して、核酸と結合する性質を持った蛍光物質(例えば、エチジウムプロマイド、Oligreen、SYBR Green I等のインターラーカー)を加えて、標的物質検出用ポリマーを標識してもよい。
- [0094] 前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を反応させ、前記標的物質検出用ポリマーと前記標的物質を結合させた後、該標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出することにより、標的物質が検出される。
- [0095] 本発明における標的物質測定用試料は、該標的物質を含む可能性のあるあらゆる試料が適用でき、例えば、血液、血清、尿、糞便、脳脊髄液、組織液、喀痰、細胞培養物等の生体由来試料、ウイルス、細菌、カビ等の含有または感染した可能性のある試料等が挙げられる。

前記標的物質としては、例えば、核酸、抗原、抗体、レセプター、ハプテン、酵素、たんぱく質、ペプチド、ポリマー、糖質及びそれらの組み合わせからなるものが挙げられる。該標的物質は試料より適宜調製または単離したものでもよい。また、試料中の標的核酸を公知の方法で増幅したDNAまたはRNA等の核酸も使用できる。前記標的核酸(ターゲット遺伝子)として、一本鎖のDNA及び／又はRNA、並びに二本鎖のDNA及び／又はRNAを用いることができる。また、前記標的核酸にSNPs(一塩基多形)を用いることができる。

[0096] 本発明の標的物質の検出方法は、標的物質を捕捉可能な物質を固定化させた担体を用いることが好ましい。例えば、標的物質が核酸の場合は、結合用プローブとの結合部位とは異なる部位に相補的な配列を有する核酸プローブを捕捉用プローブ(キャプチャープローブ)として用い、該捕捉用プローブを表面に固定化させた担体を用いることが好ましい。結合用プローブと捕捉用プローブが隣接する状態で標的核酸に結合するように構成することができる。

前記担体としては、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。

[0097] 図16は、本発明の標的物質検出用ポリマーの他の例を示す概略説明図であり、図1記載の複数種の核酸プローブを用い、且つ予めアビジンとして streptavidin を結合させた結合用プローブを用いた例を示した。なお、図16ではアビジンを結合させた結合用プローブの例を示したが、アビジンの代わりにビオチンを結合させた結合用プローブも同様に用いることができる。

図16に示した如く、前記複数種の核酸プローブ10, 12及び結合用プローブ50bを溶液中で反応させることにより、streptavidin Sが結合された標的物質検出用ポリマー52bを形成することができる。

[0098] 図16では、予めアビジン又はビオチンを結合してなる結合用プローブ(即ち、ターゲット領域がアビジン又はビオチンである結合用プローブ)を用いた例を示したが、アビジン又はビオチンが結合可能な領域を有する結合用プローブを用い、ポリマーを形成する複数種の核酸プローブと、該結合用プローブとをハイブリダイズさせ、ポリマーを形成した後、該ポリマーの結合用プローブにアビジン又はビオチンを結合させ、

標的物質検出用ポリマーを形成してもよい。

[0099] 前記標的物質検出用ポリマーと標的物質とをビオチンとアビジンの結合を介して結合させた後、該標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出することにより、標的物質が検出される。

標的物質検出用ポリマーとして、アビジンを結合させた標的物質検出用ポリマーを用いる場合、標的物質検出用ポリマーと標的物質はビオチンを介して結合する。

標的物質とビオチンの結合方法は特に制限はなく、公知の方法を用いることができる。例えば、標的物質が核酸の場合、該標的核酸と相補的な領域を有するビオチン標識プローブを用いることが好ましい。標的物質が抗原の場合、該抗原と特異的に結合する、ビオチン標識した抗体を用いることが好ましい。

[0100] 標的物質検出用ポリマーとして、ビオチンを結合させた標的物質検出用ポリマーを用いる場合、標的物質検出用ポリマーと標的物質はアビジンを介して結合する。

標的物質とアビジンの結合方法は特に制限はなく、公知の方法を用いることができる。例えば、標的物質が核酸の場合、該標的核酸と相補的な領域を有するビオチン標識プローブを用いて標的核酸とビオチンを結合させた後、アビジンを反応させ、標的核酸とアビジンを結合させることが好ましい。また、標的物質が抗原の場合、該抗原と特異的に結合する、ビオチン標識した抗体を用い、抗原とビオチンを結合させた後、アビジンを反応させ、抗原とアビジンを結合させることが好ましい。また、標的物質と結合可能な領域を有するプローブをNH₂、COOH又はSH等で修飾し、アビジンを化学的に結合させてもよい。

実施例

[0101] 以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は例示的に示されるもので限定的に解釈されるべきでないことはいうまでもない。

[0102] (実施例1)

ポリマー形成用の複数の核酸プローブとして、下記塩基配列(配列番号1)を有する核酸プローブ(以下、HCP-1と称する)、及び下記塩基配列(配列番号2)を有する核酸プローブ(以下、HCP-2と称する)を用いた。該HCP-1及びHCP-2の5'末端をアクリジニウムエステル(AE)で標識した。

HCP-1の塩基配列(5'-X₁-X₂-X₃-3')

5'-GATGTCTCGGGATG GCTTCGGAGTTACG CTGGCGGTATCAAC-3'(配列番号1)

HCP-2の塩基配列(5'-X₁'-X₂'-X₃'-3')

5'-CATCCCGAGACATC CGTAACTCCGAAGC GTTGATACCGCCAG-3'(配列番号2)

[0103] 標的物質として、下記塩基配列(配列番号3)を有するS.Aureus Oligo(以下、ターゲットオリゴと称する)を用いた。

ターゲットオリゴの塩基配列

5'-TTCGGGAAACCGGAGCTAATA CCGGATAATATTGAAACCGC ATGGTTC AAAAGTGAAGACG GTCTTGCTGTCACTTAGAT GGATCCGCGCTGCATT AGCTA-3'(配列番号3)

[0104] キャプチャープローブとして、ターゲットオリゴと相補的な配列を有する核酸プローブ(配列番号4)を用いた。

キャプチャープローブの塩基配列

5'-CGTCTTCACTTTGAACCAT GCGGTTCAAAATATTATCCGG-3'(配列番号4)

[0105] 結合用プローブとして、ターゲットオリゴDNAと相補的な塩基配列及びHCP-1の一部と同じ塩基配列を有する核酸プローブ(配列番号5)を用いた。

結合用プローブの塩基配列(5'-X₁-X₂-X₁-T-3')

5'-GATGTCTCGGGATG GCTTCGGAGTTACG GATGTCTCGGGATG ATCTAT AAGTGACAGCAAGAC-3'(配列番号5)

[0106] 反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、2mM EDTA、5%LD S、添加剤、pH5.0]に前記AE標識されたHCP-1及びHCP-2を250pmol/mLずつ添加した後、結合用プローブを6.25pmol/mL添加した。得られた反応液を55°Cで10分間攪拌しながら反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩

化リチウム、2mM EDTA、5%LDS、添加剤、pH5.0]で10倍に希釈し、検出用溶液を調製した。

- [0107] 前記キャプチャープローブを固相化したマイクロプレート(白色)のウェルに、10fmol/mLのターゲットオリゴを50 μ L、反応液[SSC 10X、Tris 62.5mM、pH8.0]を12.5 μ L添加した。ろ紙を貼り付けたアルミシートをプレートの上面に貼り付けた後、該プレートを上部10°Cと下部65°Cに設定したインキュベータにセットし、30分間反応させた。
- [0108] 反応後、アルミシートを剥がして、Washer(Bio-Rad社Model 1575)を用いて洗浄液[50mM Tris、300mM NaCl、0.01%Triton X-100、pH7.0]で5回マイクロプレートのウェルを洗浄した。洗浄液を完全にデカントした後、ウェルに前記調製した検出用溶液を100 μ L添加した。ろ紙を貼り付けたアルミシートをプレートの上面に貼り付けた後、上部10°Cと下部65°C設定したインキュベータにセットし、10分間反応させた。
- [0109] 反応後、アルミシートを剥がして、Washer(Bio-Rad社製Model 1575)を用いて前記洗浄液で5回マイクロプレートのウェルを洗浄した。洗浄液を完全にデカントしたあと、Berthold社ルミノメータのCentro LB960を用いてGen Probe社製の発光試薬Iと発光試薬IIを各50 μ L添加すると同時に発光強度を測定した。結果を表1に示した。
- [0110] (実施例2)
- 検出用溶液の調製方法を下記の通り変更した以外は実施例1と同様の方法でオリゴDNAを検出した。結果を表1に示した。
- 反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、2mM EDTA、5%LDS、添加剤、pH5.0]に前記AE標識されたHCP-1及びHCP-2を250pmol/mLずつ添加し、55°Cで10分間攪拌しながら反応させた後、結合用プローブを6.25pmol/mL添加し、55°Cで10分間攪拌しながら反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した以外は、実施例1と同様にして検出用溶液を調製した。
- [0111] (比較例1)
- 検出用溶液の代わりに、実施例1で用いたAE標識されたHCP-1及びHCP-2を各25pmol/ml、結合用プローブを0.625pmol/ml含む反応液[100mMコハ

ク酸リチウム、600mM 塩化リチウム、2mM EDTA、5% LDS、添加剤、pH5.0] を用いた以外は実施例1と同様の方法でオリゴDNAを検出した。結果を表1に示した。

[0112] [表1]

	相対発光強度	プランク
実施例 1	34374	45
実施例 2	27667	108
比較例 1	12052	52

[0113] 表1に示した如く、実施例1及び2は、比較例1に比べて2倍～3倍に高い発光強度を示した。

〔0114〕（実施例3）

反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、0.2%Triton X-100、添加剤、pH7.5]に、未標識のHCP-1(塩基配列:配列番号1)を250pmol/mL、未標識のHCP-2(塩基配列:配列番号2)を275pmol/mL添加した後、結合用プローブ(塩基配列:配列番号5)を6.25pmol/mL添加した。得られた反応液を5°Cで10分間攪拌しながら反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を室温に戻し、サイバグリーンI(CAMBREX Bio Science Rockland, Inc.製、商品名SYBR Green I Nucleic Acid)を最終希釈が4000倍になるよう加え、室温で15分間染色した。その後、反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、0.2% Triton X-100、添加剤、pH7.5]で5倍に希釈し、検出用溶液を調製した。

[0115] 標的物質捕捉用プローブとして、下記塩基配列(配列番号6)を有する核酸プローブ(以下、ヘルパー プローブと称する)を用いた。

ヘルパープローブの塩基配列

5'-CGTCTTCACTTGAAACCAT AAAAAAAA
AAAAAAAAA
AAAAAAA
AAAAAAA

A-3' (配列番号6)

- [0116] ポリスチレン試験管に前記調製した検出用溶液を200 μ L添加した後、ヘルパープローブを20pmol／mL、ターゲットオリゴ(配列番号3)を25 μ L(2000amol)添加し、55°Cで30分間攪拌させながらWater Bath中で反応させた。室温に戻してからdT14を固相化したマグネチックビーズを2. 5 μ L加え、室温15分間反応させた。
- [0117] ポリスチレン試験管をWater Bathから取り出し磁石にあて、洗浄液[HEPES 20mM、LiCl 600mM、EDTA2Na 1mM、0. 05%Triton X-100、pH7. 8]を加えて洗浄液の吸引・吐出を繰り返して3回マグネチックビーズを洗浄した。ポリスチレン試験管のマグネチックビーズの沈殿物にTE緩衝液(Tris 20mM、EDTA 1mM、pH7. 8)を100 μ L加えマグネチックビーズを再浮遊させた。再浮遊したマグネチックビーズの全量をすべて黒のマイクロプレートのウェルに移しかえ、蛍光リーダBerthold LB970で励起波長485nmと蛍光波長520nmでマグネチックビーズ上に固定化されたSYBRの蛍光強度を測定した。結果を表2に示した。
- [0118] (実施例4)
検出用溶液の調製方法を下記の通り変更した以外は実施例3と同様の方法でオリゴDNAを検出した。結果を表2に示した。
反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、0. 2%Triton X-100、添加剤、pH7. 5]に前記未標識のHCP-1を250pmol／mL、前記未標識のHCP-2を275pmol／mL添加し、55°Cで10分間攪拌しながら反応させた後、結合用プローブを6. 25pmol／mL添加し、55°Cで10分間攪拌しながら反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した以外は、実施例3と同様にして検出用溶液を調製した。
- [0119] (比較例2)
検出用溶液の代わりに、実施例3で用いた未標識のHCP-1を250pmol／mL、未標識のHCP-2を275pmol／mL、結合用プローブを1. 25pmol／mL含む反応液[100mMコハク酸リチウム、600mM塩化リチウム、0. 2%Triton X-100、添加剤、pH7. 5]を用いた以外は実施例3と同様の方法でオリゴDNAを検出した。結果を表2に示した。

[0120] [表2]

	蛍光強度 (ブランク補正後)
実施例3	722
実施例4	525
比較例2	329

[0121] 表2に示した如く、実施例3及び4は、比較例2に比べて1.5倍～2倍程に高い蛍光強度を示した。

[0122] (実施例5)

ポリマー形成用の複数の核酸プローブとして、下記塩基配列(配列番号7)を有する核酸プローブ(以下、ダイマープローブー1と称する)、下記塩基配列(配列番号8)を有する核酸プローブ(以下、ダイマープローブー2と称する)、下記塩基配列(配列番号9)を有する核酸プローブ(以下、ダイマープローブー3と称する)、下記塩基配列(配列番号10)を有する核酸プローブ(以下、ダイマープローブー4と称する)を用いた。該ダイマープローブー1～4の5'末端をアクリジニウムエステル(AE)で標識した。

ダイマープローブー1の塩基配列

5'-CATCTCTGCTGGTC CCTCGGCTGCGTCG GTTCGCCATAGACG-3'(配列番号7)

ダイマープローブー2の塩基配列

5'-GCACATTCACACCG CGACGCAGCCGAGG CCTGACCTCTATGC-3'(配列番号8)

ダイマープローブー3の塩基配列

5'-GACCAGCAGAGATG GCAGCGACGGCACC CGTCTATGGCGAAC-3'(配列番号9)

ダイマープローブー4の塩基配列

5'-CGGTGTGAATGTGC GGTGCCGTCGCTGC GCATAGAGGTCAGG-3' (配列番号10)

[0123] 結合用プローブとして、ターゲットオリゴDNAと相補的な塩基配列及びダイマープローブ-1の全てと同じ塩基配列を有する核酸プローブ(配列番号11)を用いた。

結合用プローブの塩基配列

5'-CATCTCTGCTGGTC CCTCGGCTGCGTCG GTTCGCCATAGACG ATCTAT AAGTGACAGCAAGAC-3' (配列番号11)

[0124] 反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム0.3M、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5.0]に、前記AE標識されたダイマープローブ-1及びダイマープローブ-2を250pmol/mLずつ加え、混合し、第1ダイマープローブ溶液とした。また、反応液に前記AE標識されたダイマープローブ-3及びダイマープローブ-4を250pmol/mLずつ加え、混合し、第2ダイマープローブ溶液とした。

結合用プローブ(配列番号11)の濃縮液をあらかじめ入れた試験官に第1ダイマープローブ溶液と第2ダイマープローブ溶液を等量ずつ加えた(なお、この時のダイマープローブ-1～4の濃度は各125pmol/mL、結合用プローブの濃度は6.25pmol/mLである。)後、60°Cで10分間静置で反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を、反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム600mM、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5.0]で40倍に希釈し、検出用溶液を調製した。

[0125] ポリスチレン試験管に前記調製した検出用溶液を200 μL添加した後、ヘルパープローブ(配列番号6)を20pmol/mL、ターゲットオリゴ(配列番号3)を25 μL(100amol/Tube)添加し、55°Cで30分間攪拌させながらWater Bath中で反応させた。室温に戻してからdT14を固相化したマグネチックビーズを2.5 μL加え、室温15分間反応させた。

[0126] ポリスチレン試験官をWater Bathから取り出し磁石にて、洗浄液[PIPES 20mM、LiCl 100mM、EDTA2Na 1mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)0.05%、p

H6. 0]を加えて洗浄液の吸引・吐出を繰り返して3回マグネチックビーズを洗浄した。ポリスチレン試験官のマグネチックビーズの沈殿物に洗浄液[PIPES 20mM、LiCl 100mM、EDTA2Na 1mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)0. 05%、pH6. 0]を100 μ L加えマグネチックビーズを再浮遊させた。再浮遊したマグネチックビーズの全量を新しいポリスチレン試験官に移しかえ、ルミノメータ(Berthold Lumat LB9507)にセットし、Gen Probe社製の発光試薬Iと発光試薬IIを200 μ Lずつ加え発光量を測定した。結果を表3に示した。

[0127] (比較例3)

前記AE標識されたダイマー探査プローブー1及び2(配列番号7及び8)を6. 25pmol/mLずつ反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム600mM、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5. 0]に加え混合し、第3ダイマー探査プローブ溶液とした。次に前記AE標識されたダイマー探査プローブー3及び4(配列番号9及び10)を6. 25pmol/mLずつ反応液に加え混合し、第4ダイマー探査プローブ溶液とした。

第3ダイマー探査プローブ溶液と第4ダイマー探査プローブ溶液を等量ずつ混合し、結合用プローブ(配列番号11)を0. 156pmol/mLの濃度になるよう加え、検出用溶液を調製した。

[0128] 前記得られた検出用溶液を用いた以外は実施例5と同様の方法によりターゲットオリゴの検出を行なった。結果を表3に示した。

[0129] [表3]

	蛍光強度(RLU) (プランク補正後)
実施例5	116569
比較例3	7401

[0130] 表3に示した如く、比較例3と比べて実施例5は16倍程高い発光強度を得た。

[0131] (実施例6)

添加するターゲットオリゴの濃度を0、0. 5、1、2、5、10及び50amol/tubeに変更した以外は実施例5と同様の方法でターゲットオリゴの検出を行なった。結果を図15に示した。図15に示した如く、原点を通る良好な直線性が得られた。

[0132] (実施例7)

ポリマー形成用の複数の核酸プローブとして、ダイマー探針-1(配列番号7)、ダイマー探針-2(配列番号8)、下記塩基配列(配列番号12)を有する核酸プローブ(以下、架橋探針-1と称する)、下記塩基配列(配列番号13)を有する核酸プローブ(以下、架橋探針-2と称する)を用いた。該ダイマー探針-1及び2の5'末端をアクリジニウムエステル(AE)で標識した。

架橋探針-1の塩基配列

5'-GACCAGCAGAGATG CGTCTATGGCGAAC-3'(配列番号12)

架橋探針-2の塩基配列

5'-CGGTGTGAATGTGC GCATAGAGGTCAGG-3'(配列番号13)

[0133] 前記AE標識されたダイマー探針-1及び2を250pmol/mLずつ反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム0. 3M、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5. 0]に加え混合し、さらに前記架橋探針-1及び2を各250pmol/mL加え、反応溶液とした。

結合用探針(配列番号11)の濃縮液をあらかじめ入れた試験官に前記反応溶液を加えた(なお、この時のダイマー探針-1及び2の濃度は各250pmol/mL、架橋探針-1及び2の濃度は各250pmol/mL、結合用探針の濃度は18. 75pmol/mLである。)後、60°Cで10分間静置で反応させ、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を、反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム600mM、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5. 0]で40倍に希釈し、検出用溶液を調製した。

[0134] 前記得られた検出用溶液を用いて、実施例5と同様の方法によりターゲットオリゴの検出を行なった。結果を表4に示した。

[0135] (比較例4)

前記AE標識されたダイマー探査プローブー1及び2を6. 25pmol／mLずつ反応液[コハク酸リチウム100mM、塩化リチウム600mM、EDTA2Na 2mM、EGTA 2mM、LDS(ドデシル硫酸リチウム)5%、添加剤、pH5. 0]に加え混合し、さらに前記架橋探査プローブー1及び2を各6. 25pmol／mL、結合用探査プローブ(配列番号11)を0. 489pmol／mL加え、検出用溶液を調製した。

[0136] 前記得られた検出用溶液を用いた以外は、実施例7と同様の方法によりターゲットオリゴの検出を行なった。結果を表4に示した。

[0137] [表4]

	蛍光強度(RLU) (ブランク補正後)
実施例7	165069
比較例4	13674

[0138] 表4に示した如く、比較例4と比べて実施例7は12倍程高い発光強度を得た。

[0139] (実施例8)

ポリマー形成用の複数の核酸探査プローブとして、実施例1で用いたAE標識されたHCP-1(配列番号1)及びHCP-2(配列番号2)を用いた。

結合用探査プローブとして、HCP-1と同じ塩基配列を有し、ビオチンを結合させた核酸探査プローブ(配列番号14)を用いた。

結合用探査プローブの塩基配列(5'-polyT-X₁-X₂-X₃-3')

5'-Biotin-TTTTTTTTTT GATGTCTCGGGATG GCTTCGGAGTTACG CTGGCG
GTATCAAC-3'(配列番号14)

[0140] 0. 5mlの反応液[コハク酸リチウム 100mM、塩化リチウム 600mM、EDTA 2mM、添加剤、pH 5. 0]にストレプトアビシン10pmol／mLと前記結合用探査プローブ10pmol／mLを加え、室温で30分間攪拌しながら反応させ、ストレプトアビシンが結合した結合用探査プローブを含む探査溶液を調製した。

[0141] 前記調製した探査溶液に、前記AE標識したHCP-1とHCP-2を250pmol

／mLずつ加え、60°C、30分間加熱し、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を反応液[コハク酸リチウム 100mM、塩化リチウム 600mM、EDTA 2mM、添加剤、pH7.0]で10倍に希釀し、検出用溶液を調製した。

- [0142] シアル化糖鎖抗原KL-6測定用キット(三光純薬(株)製、商品名:エイテスト(エーザイ(株)の登録商標)KL-6)を用いて、キット添付の操作法に準じて下記測定を行った。

KL-6モノクローナル抗体5 μg／mLを加えた20mMTris緩衝液(pH7.5)を白色マイクロプレートのウェルに100 μL加え、抗体をプレートの底面に固定化した。洗浄液(20mMTris、150mMNaCl、0.5%Tween20)で洗浄後、1%BSAを含むTris緩衝液(pH7.5)を350 μL加え、4°C、3時間静置した後、内溶液を捨て、KL-6モノクローナル抗体固相プレートを作製した。

- [0143] 前記作製したKL-6モノクローナル抗体固相プレートのウェルにキット添付の反応溶液100 μLを分注し、標準抗原(0、1、2.5、5、10、20U／mL)を20 μL分注した後、室温で2時間反応させた。

反応後、キット添付の洗浄液Iで各ウェルを3回洗浄した後、ビオチン標識KL-6抗体1 μg／mLを含むPBST(Sigma P3563、2%ウサギ血清添付)緩衝液を100 μL分注し、室温で1時間反応させた。

- [0144] 前記反応後、洗浄液Iで各ウェルを3回洗浄した後、前記調製した検出用溶液を100 μL分注し、室温でマイクロプレートを振り動かしながら30分反応させた。反応後、洗浄液II[Tris 50mM、NaCl 300mM、Triton X-100 0.01%、NaN₃ 0.01%、pH 7.0]で各ウェルを3回洗浄した。

洗浄後、Genprobe社の発光試薬Iと発光試薬IIを50 μLずつ加え、Berthold社LB-960を用いてAEの発光量を測定した。結果を図18に示した。図18に示した如く、本発明により抗原を高感度に定量的に測定することができた。

- [0145] (実施例9)

ポリマー形成用の複数の核酸プローブとして、実施例1で用いたAE標識されたHC

P-1(配列番号1)及びHCP-2(配列番号2)を用いた。

結合用プローブとして、HCP-1と同じ塩基配列を有し、ビオチンを結合させた核酸プローブ(配列番号15)を用いた。

結合用プローブの塩基配列(5'-polyC-X₁-X₂-X₃-3')

5'-Biotin-CCCCCCCCCC GATGTCTCGGGATG GCTTCGGAGTTACG CTGGC
GGTATCAA-3'(配列番号15)

[0146] 0.5mlの反応液[コハク酸リチウム 100mM、塩化リチウム 600mM、EDTA 2 mM、添加剤、pH 5.0]にストレプトアビシン10pmol/mLと前記結合用プローブ 10pmol/mLを加え、室温で30分間攪拌しながら反応させ、ストレプトアビシンが結合した結合用プローブを含むプローブ溶液を調製した。

[0147] 前記調製したプローブ溶液に、前記AE標識したHCP-1とHCP-2を250pmol/mLずつ加え、60°C、30分間加熱し、ポリマーを形成させ、ポリマー含有溶液を調製した。

前記得られたポリマー含有溶液を反応液[コハク酸リチウム 100mM、塩化リチウム 600mM、EDTA 2mM、添加剤、pH7.0]で20倍に希釈し、検出用溶液を調製した。

[0148] 標的物質として、実施例1で用いたターゲットオリゴ(配列番号3)を用いた。

標的物質捕捉用プローブとして、実施例3で用いたヘルパーープローブ(配列番号6)を用いた。

標的物質検出用ポリマーと標的物質とを結合させるためのプローブとして、ターゲットオリゴと相補的な塩基配列を有し、ビオチン標識された核酸プローブ(配列番号16、以下、ビオチン標識プローブと称する)を用いた。

ビオチン標識プローブの塩基配列

5'-Bitoin-CCCCCCCCCC CCATCTATAAGTGACAGCAAG-3'(配列番号16)

[0149] 白マイクロプレートのウェルに前記ヘルパーープローブと相補的な配列を有する核酸プローブ(配列番号17、以下、第2キャプチャープローブと称する)を固定化し、マイクロプレートを調製した。

第2キャプチャープローブの塩基配列



[0150] 試験官にヘルパー探査体5pmol/mLと前記ビオチン標識探査体0.25pmol/mLを含む反応液[コハク酸リチウム 100mM、塩化リチウム 600mM、EDTA 2mM、添加剤、pH7.0]を95μL、前記ターゲットオリゴを25μL[ターゲットオリゴ濃度; 0、100、500amol/well]加え、55°Cで30分反応させた後、前記調製した検出用溶液を5μL加えて室温で30分反応させた。

[0151] 次に試験官の内溶液全量を前記調製したマイクロプレートのウェルに移し換え、室温で30分間、マイクロプレートを振り動かしながら反応させた。

洗浄液でマイクロプレートのウェルを5回洗浄した後、Genprobe社の発光試薬Iと発光試薬IIを50μLずつ加え、Berthold社LB-960を用いてAEの発光量を測定した。結果を図19に示した。図19に示した如く、原点を通る良好な直線性が得られ、本発明によりターゲットオリゴを高感度に定量的に測定することができた。

請求の範囲

- [1] (A) ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程；
(B) 前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び
(C) 前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含み、

前記複数種の核酸プローブは、

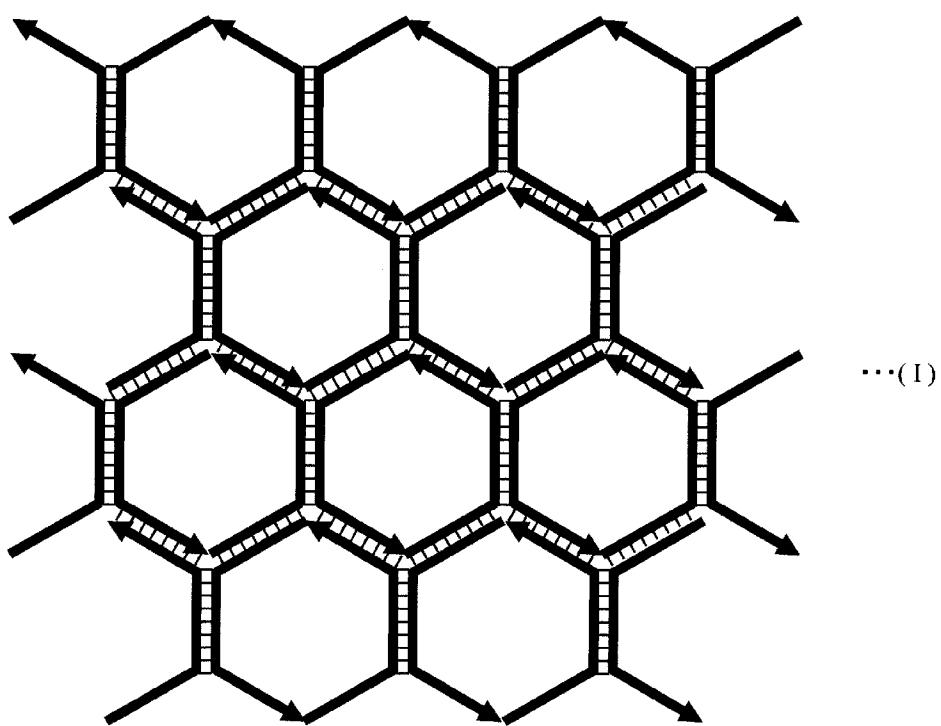
5' 端側から順に少なくとも核酸領域X₁、核酸領域X₂、…核酸領域X_nのn個(n≥3)の核酸領域を有する核酸プローブと、

5' 端側から順に少なくとも前記核酸領域X₁に相補的な核酸領域X₁'、前記核酸領域X₂に相補的な核酸領域X₂'、…前記核酸領域X_nに相補的な核酸領域X_n'のn個(n≥3)の核酸領域を有する核酸プローブと、

からなることを特徴とする標的物質の検出方法。

- [2] (A) ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する工程；
(B) 前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる工程；及び
(C) 前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する工程を含み、
前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする標的物質の検出方法。

[化1]

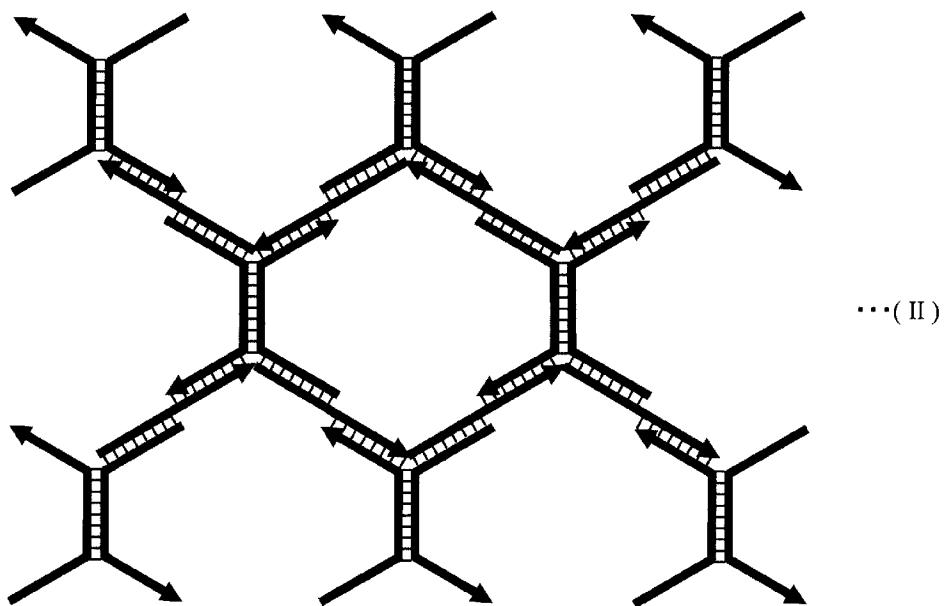


(前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

- [3] (A) ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブを溶液中で反応させることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程；
- (B) 前記標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結合させる結合工程；及び
- (C) 前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含み、

前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする標的物質の検出方法。

[化2]



(前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

- [4] 前記形成工程が、前記複数種の核酸プローブをハイブリダイズさせ、第一のポリマーを形成する第1のハイブリダイズ工程、及び
該第一のポリマーと前記結合用プローブをハイブリダイズさせ、前記標的物質検出用ポリマーを形成する第2のハイブリダイズ工程、を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [5] 前記形成工程が、前記複数種の核酸プローブ及び前記結合用プローブを同時にハイブリダイズさせる工程を含むことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [6] 前記形成工程後に、前記標的物質検出用ポリマーを含む溶液を希釈し、検出用溶液を調製する工程を含むことを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [7] 前記複数種の核酸プローブの少なくとも1種の核酸プローブが、標識物質で標識されてなることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [8] 前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することを特徴とする請求項1～7のいずれか1項記載の標的物質の検出方

法。

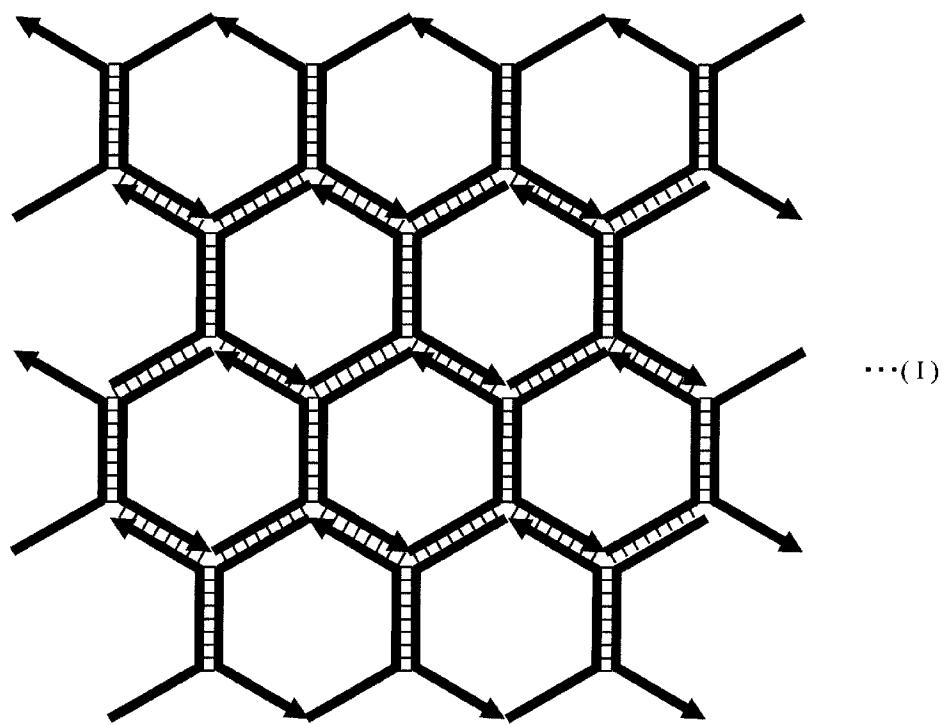
- [9] 前記標的物質が核酸であり、前記結合用プローブのターゲット領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸からなることを特徴とする請求項8記載の標的物質の検出方法。
- [10] 前記標的物質検出用ポリマーと前記標的物質の結合が、前記標的物質に結合可能な部位と前記結合用プローブのターゲット領域に結合可能な部位とを有するスペーサー物質を介してなされることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [11] 前記標的物質検出用ポリマーは、前記結合用プローブを介してアビジン又はビオチンが結合されてなることを特徴とする請求項1～8及び10のいずれか1項記載の標的物質の検出方法。
- [12] 前記結合工程が、前記標的物質検出用ポリマー及び前記標的物質を、ビオチンとアビジンの結合を介して結合させる工程であることを特徴とする請求項11記載の標的物質の検出方法。
- [13] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、
前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、
前記複数種の核酸プローブは、
5'端側から順に少なくとも核酸領域X₁、核酸領域X₂、…核酸領域X_nのn個(n≥3)の核酸領域を有する核酸プローブと、
5'端側から順に少なくとも前記核酸領域X₁に相補的な核酸領域X₁'、前記核酸領域X₂に相補的な核酸領域X₂'、…前記核酸領域X_nに相補的な核酸領域X_n'のn個(n≥3)の核酸領域を有する核酸プローブと、
からなることを特徴とする標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [14] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを

有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、

前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、

前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする標的物質検出用ポリマーの形成方法。

[化3]



(前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

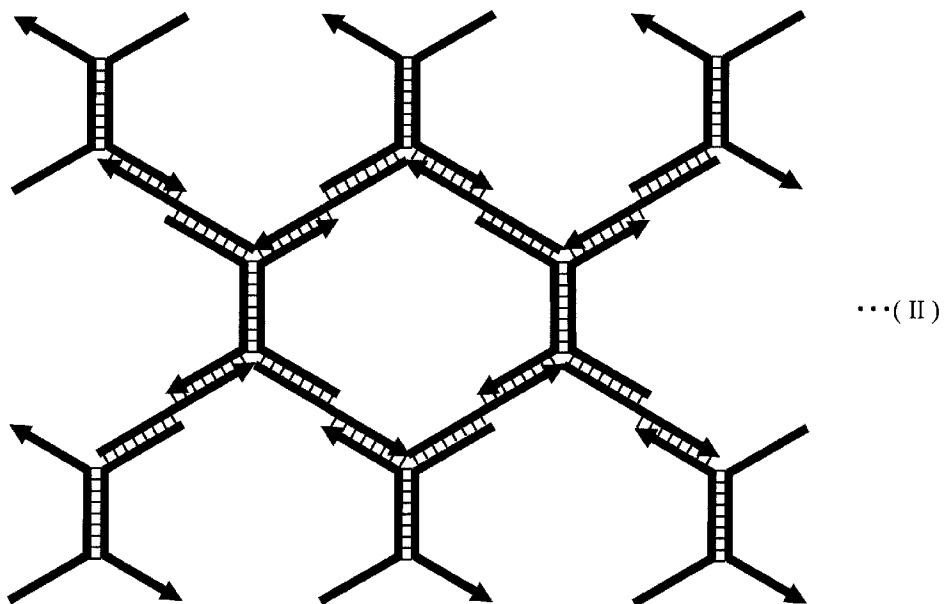
[15] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより標的物質検出用ポリマーを形成する形成工程を含む標的物質検出用ポリマーの形成方法であって、

前記結合用プローブは標的物質と結合しておらず、

前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とす

る標的物質検出用ポリマーの形成方法。

[化4]



(前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

[16] 前記形成工程が、

前記複数種の核酸プローブをハイブリダイズさせ、第一のポリマーを形成する第1のハイブリダイズ工程と、

該第一のポリマーと前記結合用プローブをハイブリダイズさせ、前記標的物質検出用ポリマーを形成する第2のハイブリダイズ工程と、

を含むことを特徴とする請求項13～15のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。

[17] 前記形成工程が、前記複数種の核酸プローブ及び前記結合用プローブを同時にハイブリダイズさせる工程を含むことを特徴とする請求項13～15のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。

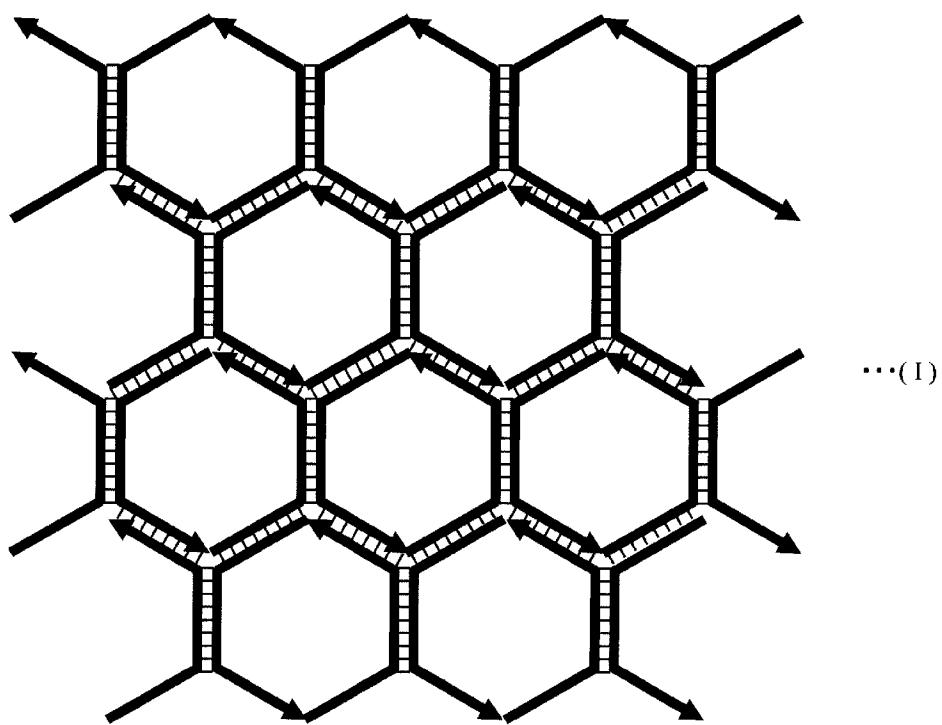
[18] 前記複数種の核酸プローブの少なくとも1種の核酸プローブが、標識物質で標識されてなることを特徴とする請求項13～17のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。

- [19] 前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することを特徴とする請求項13～18のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [20] 前記標的物質が核酸であり、前記結合用プローブのターゲット領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸からなることを特徴とする請求項19記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [21] 前記標的物質検出用ポリマーは、前記結合用プローブを介してアビジン又はビオチンが結合されてなることを特徴とする請求項13～19のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [22] 前記結合用プローブのターゲット領域がアビジン又はビオチンを結合してなることを特徴とする請求項21記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [23] 前記結合用プローブのターゲット領域が、アビジン又はビオチンを直接又は間接的に結合可能な領域であり、
前記形成工程が、
前記ポリマーを形成する複数種の核酸プローブと、前記結合用プローブとをハイブリダイズさせ、第二のポリマーを形成する工程と、
前記第二のポリマーの結合用プローブにアビジン又はビオチンを結合させる工程と
、
を含むことを特徴とする請求項21記載の標的物質検出用ポリマーの形成方法。
- [24] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、
前記複数種の核酸プローブは、
5'端側から順に少なくとも核酸領域X₁、核酸領域X₂、…核酸領域X_nのn個(n≥3)の核酸領域を有する核酸プローブと、
5'端側から順に少なくとも前記核酸領域X₁に相補的な核酸領域X₁'、前記核酸領域X₂に相補的な核酸領域X₂'、…前記核酸領域X_nに相補的な核酸領域X_n'のn個(

$n \geq 3$)の核酸領域を有する核酸プローブと、からなることを特徴とする標的物質検出用ポリマー。

- [25] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、
前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(I)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする標的物質検出用ポリマー。

[化5]

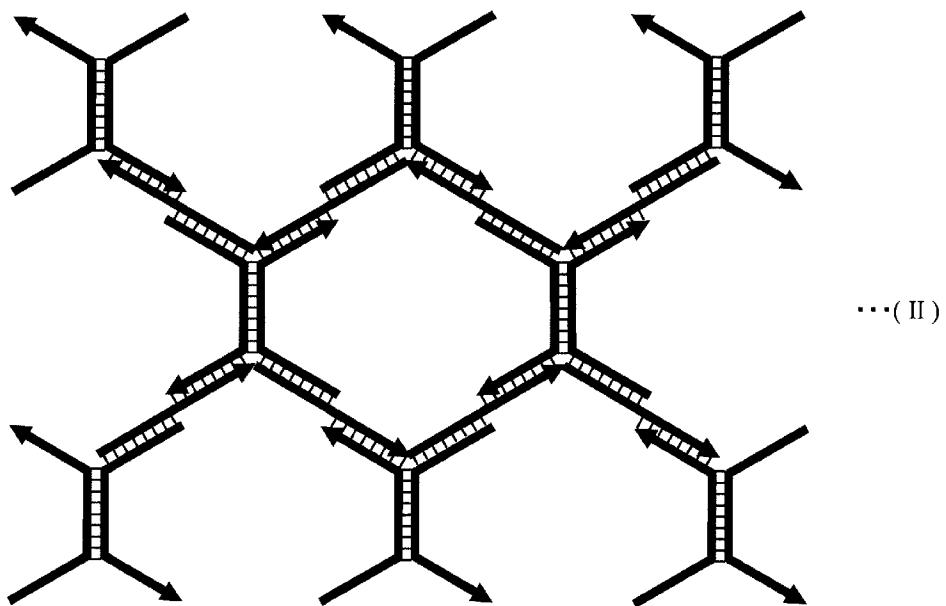


(前記式(I)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

- [26] ポリマーを形成する複数種の核酸プローブ、及び標的物質に直接又は間接的に結合可能なターゲット領域と前記核酸プローブの少なくとも1つと結合可能な領域とを有する結合用プローブ、をハイブリダイズさせることにより形成され、前記結合用プローブが標的物質と結合していない標的物質検出用ポリマーであって、

前記複数種の核酸プローブは、他種の核酸プローブと下記式(II)で示されるようにハイブリダイズする塩基配列を有する複数種の核酸プローブからなることを特徴とする標的物質検出用ポリマー。

[化6]



(前記式(II)において、梯子状に示した2本の直線は互いにハイブリダイズしている核酸を表す)

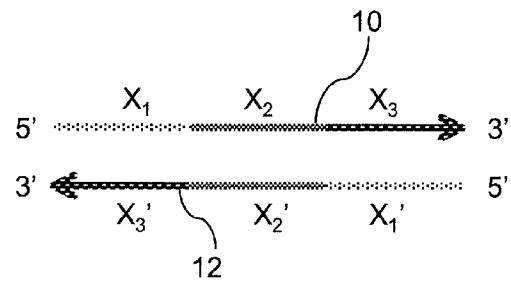
- [27] 前記結合用プローブのターゲット領域が、前記標的物質と特異的に結合可能な部分を有することを特徴とする請求項24～26のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマー。
- [28] 前記標的物質が核酸であり、前記結合用プローブのターゲット領域が前記標的核酸に相補的な塩基配列を有する核酸からなることを特徴とする請求項27記載の標的物質検出用ポリマー。
- [29] 前記標的物質検出用ポリマーは、前記結合用プローブを介してアビジン又はビオチンが結合されてなることを特徴とする請求項24～27のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマー。
- [30] 請求項13～23のいずれか1項記載の方法により形成されることを特徴とする標的物質検出用ポリマー。
- [31] 請求項24～30のいずれか1項記載の標的物質検出用ポリマー及び標的物質を結

合させる結合工程;及び

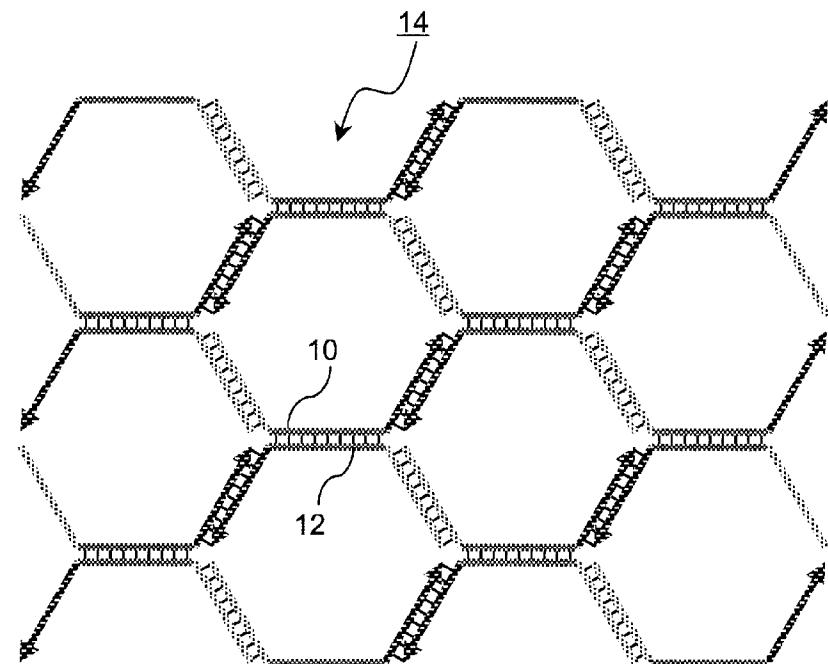
前記標的物質が結合した標的物質検出用ポリマーを検出する検出工程を含むことを特徴とする標的物質の検出方法。

- [32] 前記標的物質検出用ポリマーと前記標的物質の結合が、前記標的物質に結合可能な部位と前記結合用プローブのターゲット領域に結合可能な部位とを有するスペーサー物質を介してなされることを特徴とする請求項31記載の標的物質の検出方法。
- 。
- [33] 前記結合工程が、請求項29記載の標的物質検出用ポリマー及び標的物質を、ビオチンとアビジンの結合を介して結合させる工程であることを特徴とする請求項31記載の標的物質の検出方法。

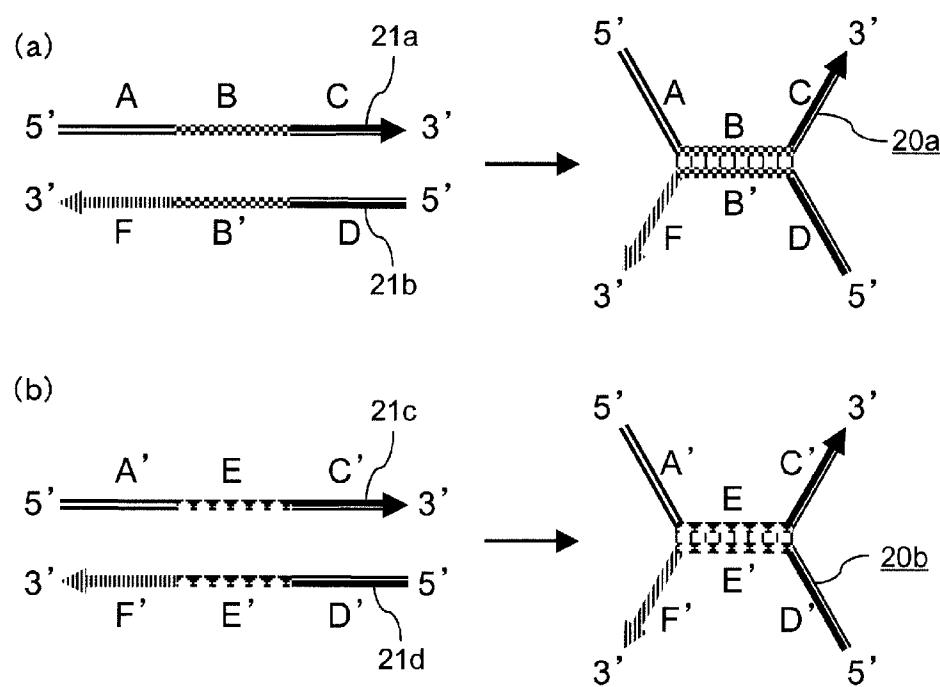
[図1]



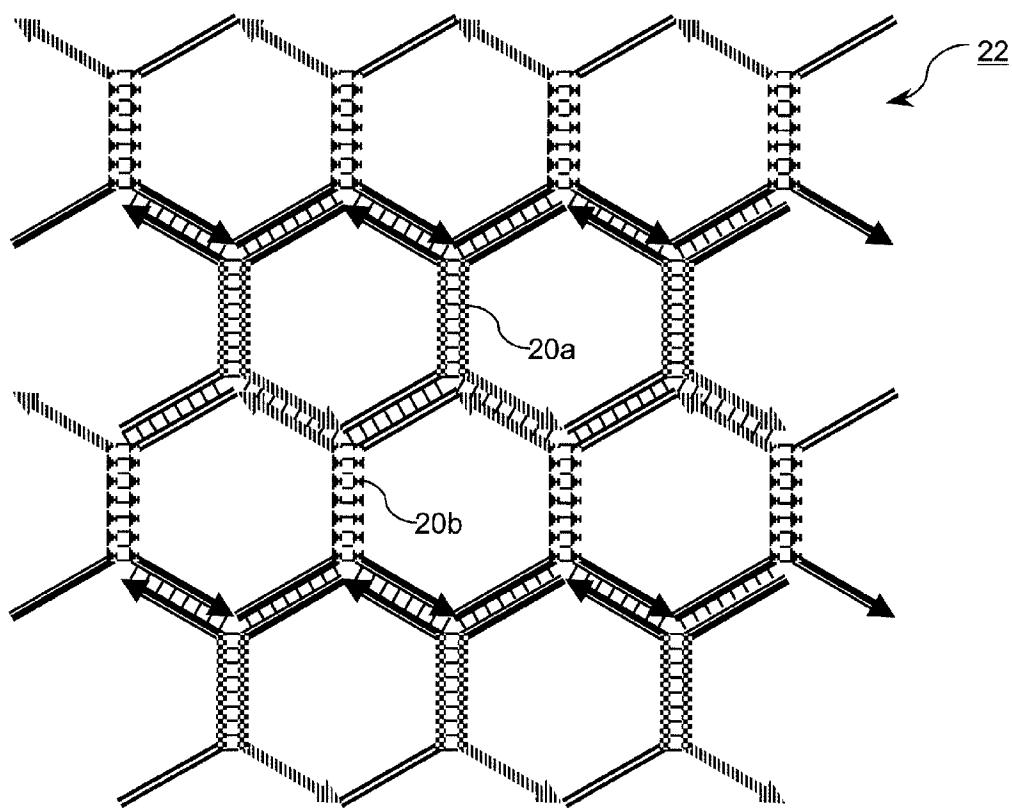
[図2]



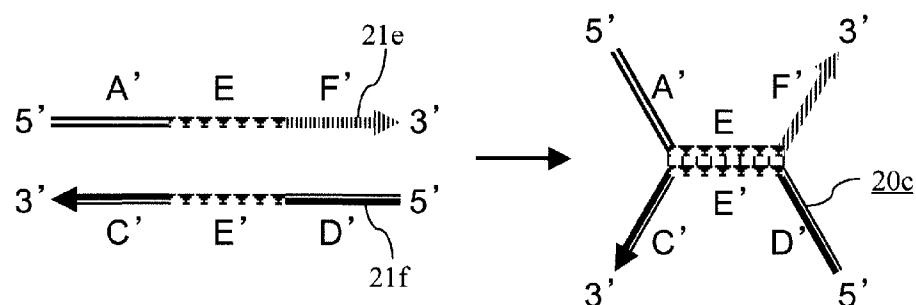
[図3]



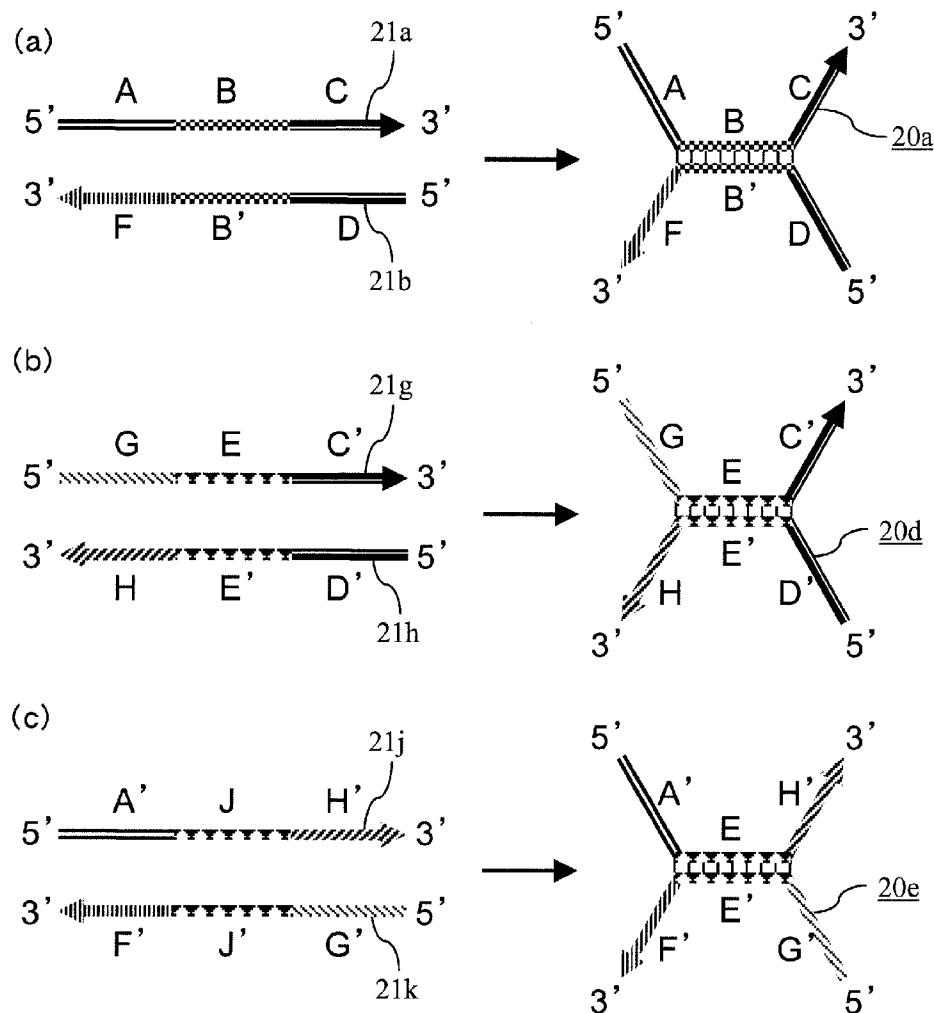
[図4]



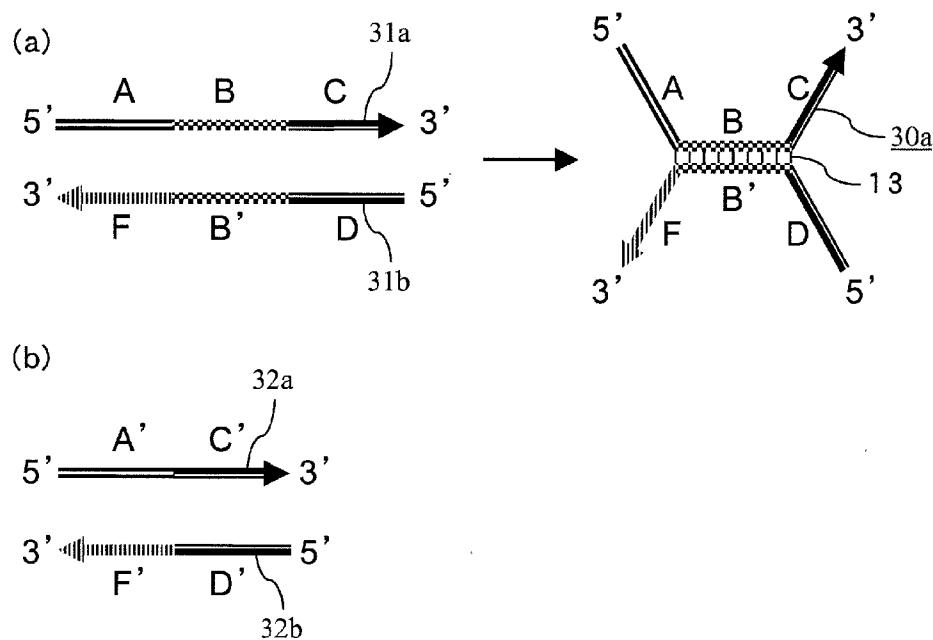
[図5]



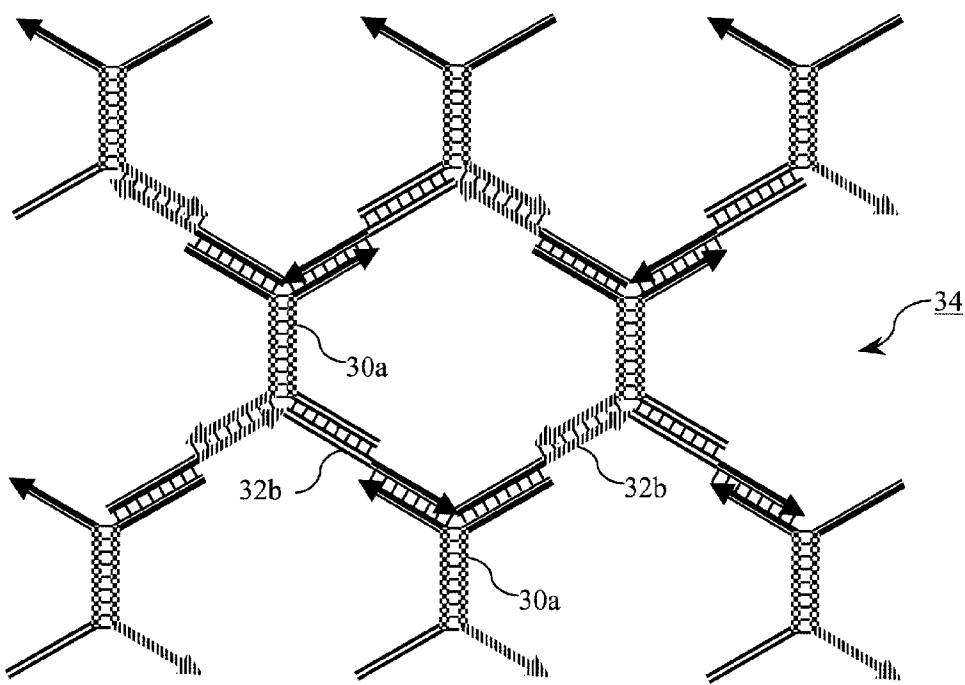
[図6]



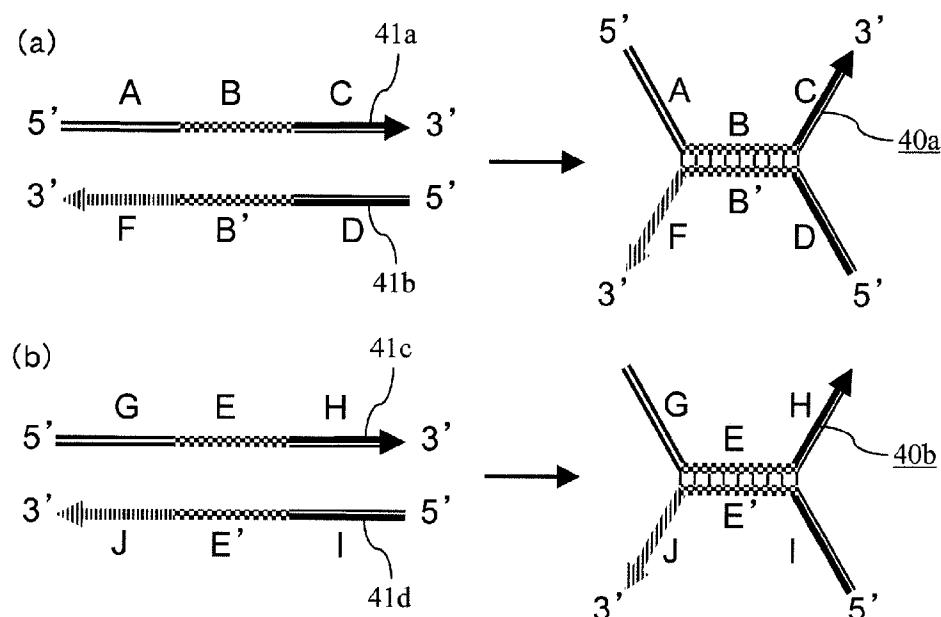
[図7]



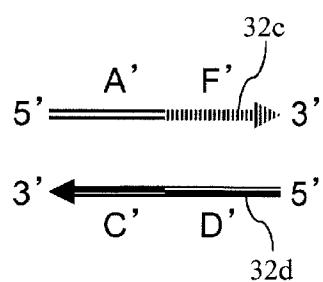
[図8]



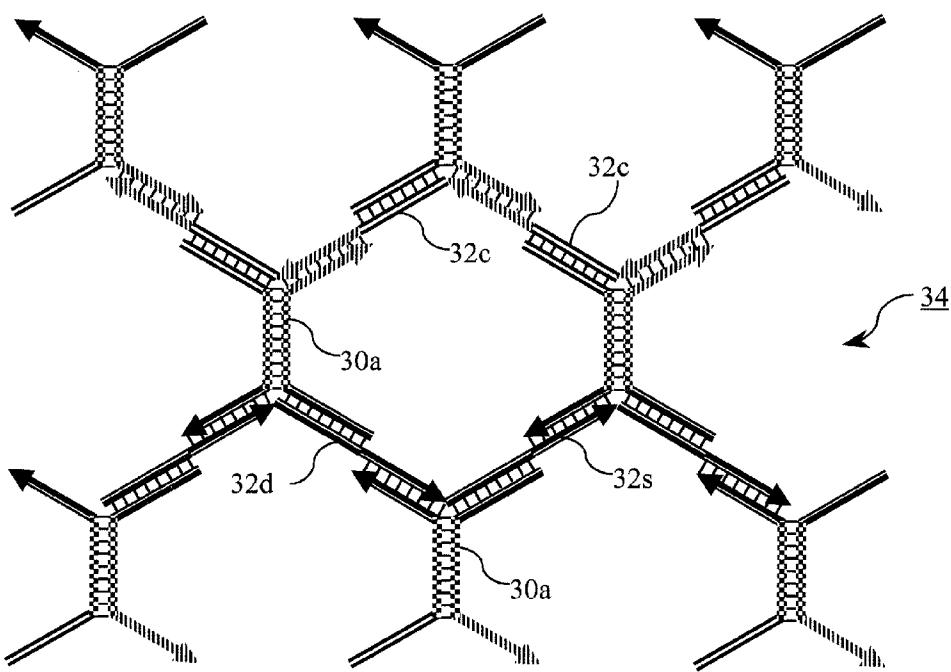
[図9]



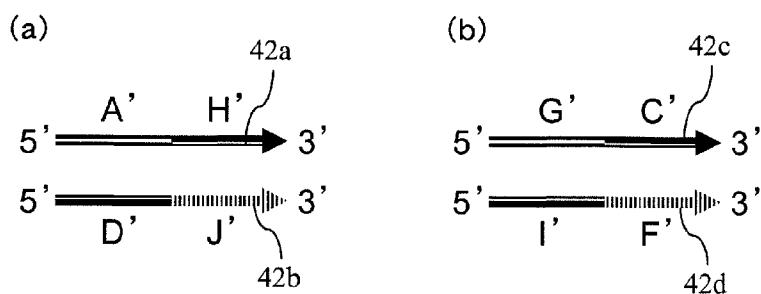
[図10]



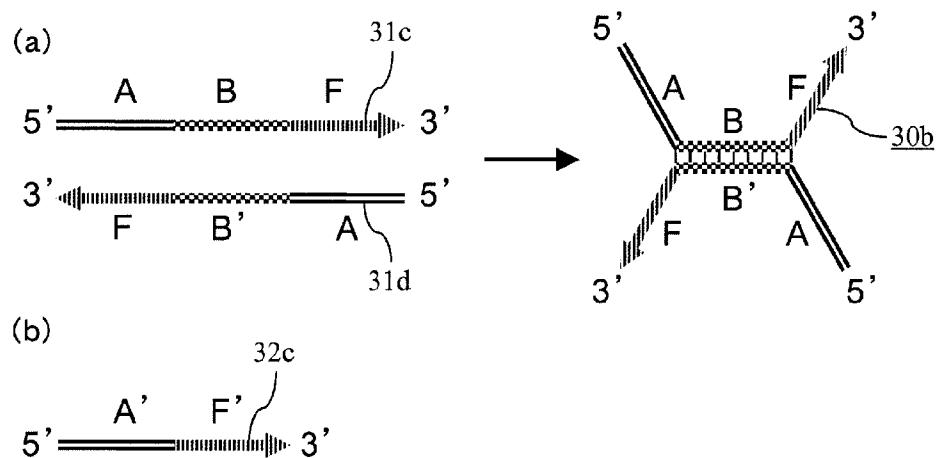
[図11]



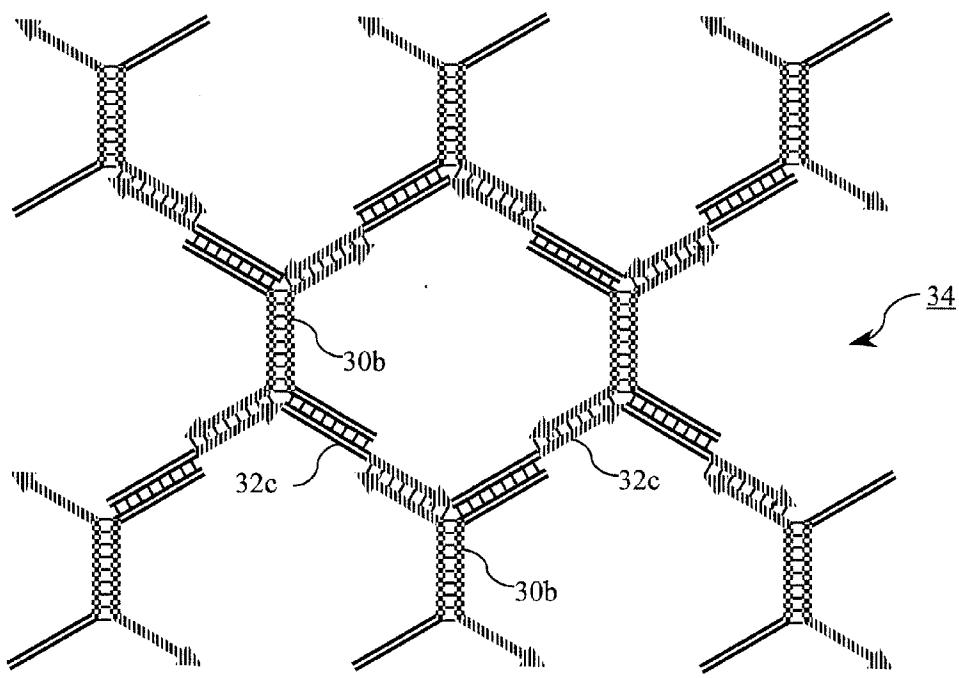
[図12]



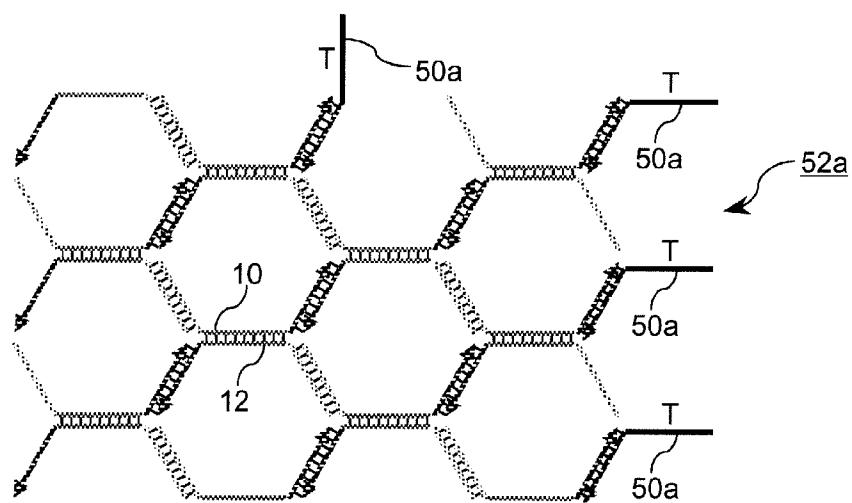
[図13]



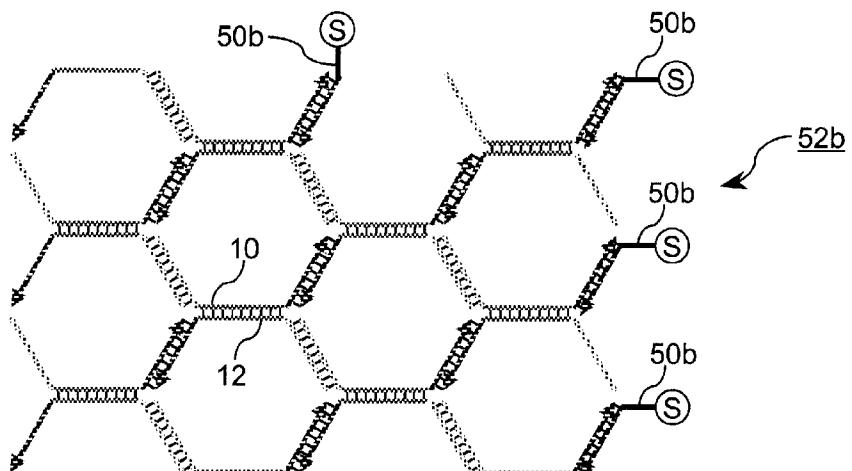
[図14]



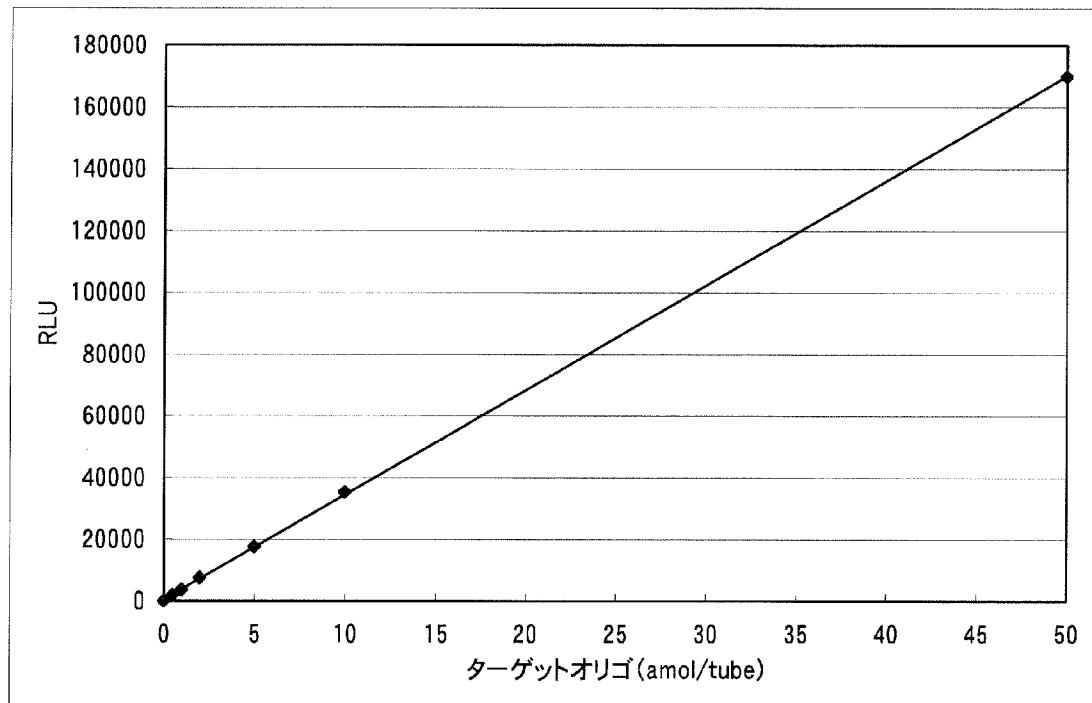
[図15]



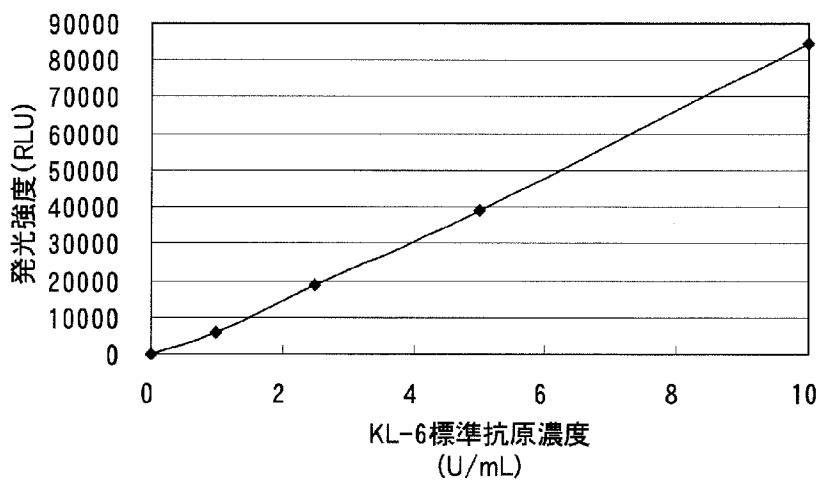
[図16]



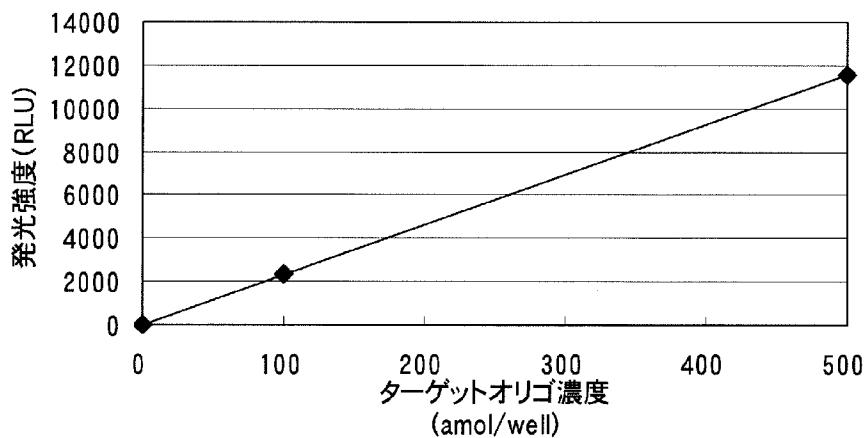
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01) i, G01N33/543 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) n, G01N33/53 (2006.01) n

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, C12N15/00-15/90

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS/EMBASE(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/029441 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 10 April, 2003 (10.04.03), & CN 1464910 A & EP 1431386 A1 & KR 2004041529 A & AU 2002343922 A1 & US 2005/0130139 A1	1-33
Y	JP 9-500378 A (Lynx Therapeutics, Inc.), 14 January, 1997 (14.01.97), & WO 1995/001365 A1 & AU 199473231 A & EP 706531 A1 & US 5571677 A & US 5830658 A	1-33

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
14 November, 2008 (14.11.08)

Date of mailing of the international search report
25 November, 2008 (25.11.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, G01N33/53(2006.01)n

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. C12Q1/68, 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

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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus/EMBASE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(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 請求の範囲の番号
Y	WO 2003/029441 A1 (三光純薬株式会社) 2003.04.10 & CN 1464910 A & EP 1431386 A1 & KR 2004041529 A & AU 2002343922 A1 & US 2005/0130139 A1	1-33
Y	JP 9-500378 A (リンクス セラピューティクス, インコーポレイテ イド) 1997.01.14 & WO 1995/001365 A1 & AU 199473231 A & EP 706531 A1 & US 5571677 A & US 5830658 A	1-33

□ 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 14. 11. 2008	国際調査報告の発送日 25. 11. 2008
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 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） 4N 2937 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1.cの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 紙形式
 電子形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれていたもの
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：