

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-100332  
(P2015-100332A)

(43) 公開日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2013-245115 (P2013-245115)	(71) 出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地
(22) 出願日	平成25年11月27日 (2013.11.27)	(72) 発明者	佐藤 寛 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社 東京研究センター内
		(72) 発明者	野口 惇 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社 東京研究センター内
		(72) 発明者	牧野 友理子 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社 東京研究センター内
		(72) 発明者	井出 輝彦 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社 東京研究センター内 最終頁に続く

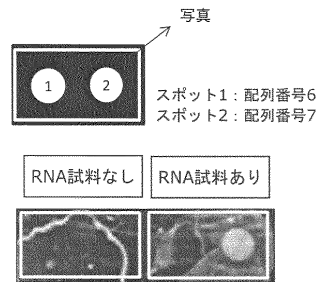
(54) 【発明の名称】 核酸の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 試料中に含まれる標的核酸を増幅し、増幅した前記標的核酸を検出する、遺伝子検査において、特別な装置を用いることなく、より簡易、迅速かつ特異的に標的核酸を検出する方法、および前記方法を利用したキットを提供すること。

【解決手段】 (1) 試料中に含まれる標的核酸を増幅する工程、(2) クロマトグラフィーの手法を用いずに(1)の工程で増幅した標的核酸と固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子とを特異的に結合させる工程、(3) (2)の工程で結合した標的核酸を第2の結合因子に結合した標識物質で検出する工程、を含む試料中に含まれる標的核酸の検出方法、および前記方法を用いたキットにより、前記課題を解決する。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の(1)から(3)の工程を含む、試料中に含まれる標的核酸の検出方法。

(1) 試料中に含まれる標的核酸を増幅する工程

(2) クロマトグラフィーの手法を用いず、(1)の工程で増幅した標的核酸と、固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子とを、特異的に結合させる工程

(3) (2)の工程で結合した標的核酸を第2の結合因子に結合した標識物質で検出する工程

## 【請求項 2】

標識物質が可視光を吸収または反射する物質である、請求項 1 に記載の検出方法。

10

## 【請求項 3】

第1の結合因子および第2の結合因子が、標的核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子の存在下で、試料中に含まれる標的核酸を増幅を行なう、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

標的核酸を増幅を N A S B A 法、T M A 法、T R C 法のいずれかの方法で行なう、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 6】

以下の(1)から(3)を含む、試料中に含まれる標的核酸を検出するためのキット。

(1) 試料中に含まれる標的核酸を増幅するための試薬

(2) 標的核酸に特異的に結合可能な、固相に結合した第1の結合因子

(3) 標的核酸に特異的に結合可能な、標識物質を結合した第2の結合因子

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、遺伝子検査における、試料中に含まれる標的核酸の検出方法および検出キットに関する。より詳しくは、本発明は、試料中に含まれる標的核酸を迅速、簡便、かつ特異的に検出可能な方法および検出キットに関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

遺伝子検査において、試料中に含まれる標的核酸を検出する際は、通常、試料中に含まれる標的核酸の量が微量であることから、当該標的核酸を増幅した後、検出を行なう。

## 【0003】

標的核酸を増幅方法としては、従来より P C R 法が用いられている。しかしながら、P C R 法は急激に反応温度を昇降させる必要があり、装置の小型化や低コスト化のための障壁となっていた。一方、N A S B A 法(特許文献 1 および 2)、T M A 法(特許文献 3)、T R C 法(特許文献 4 および非特許文献 1)といった、一定温度で核酸を増幅する方法も知られており、これらの方法は、反応温度の昇降が不要な点で簡便に核酸を増幅することができるため、装置の小型化や低コスト化に寄与することができる。

40

## 【0004】

増幅した標的核酸を検出する方法としては、従来より、アガロースゲルに代表されるゲル電気泳動が一般的である。本方法は電気泳動によって分離された増幅産物(増幅した標的核酸)を臭化エチジウムに代表されるインターカレーター(核酸に対する挿入結合性を持つ色素)を用いて染色することで、標的核酸の有無を判定する。しかしながら、前記インターカレーターによる染色は標的核酸特異的ではなく、増幅産物と分子量の似た非特異産物との識別は困難である。

50

## 【 0 0 0 5 】

増幅した標的核酸を特異的に検出する方法としては、前記標的核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む、標識物質と結合したプローブを、前記標的核酸にハイブリダイズさせた後、前記プローブに結合した標識物質で検出する核酸ハイブリダイゼーション法が知られている。しかしながら、本方法は操作が煩雑、かつ検出に長い時間が必要である。核酸ハイブリダイゼーション法の改良法として、蛍光共鳴エネルギー移動を利用したモレキュラービーコン（非特許文献1）等により増幅反応中の産物生成状況をモニタリングする、いわゆるリアルタイム検出法が知られている。しかしながら、リアルタイム検出法を実施するには、特殊な蛍光物質と高価な専用増幅、検出装置を必要とする。増幅した標的核酸を簡易かつ特異的に検出する方法としては、核酸クロマトグラフィー法（特許文献5および6）が知られている。本方法は、増幅した標的核酸や試薬等をキャピラリー作用により多孔性メンブレン上に展開することで、前記標的核酸の有無を目視で判定することができる。そのため、臨床検査目的の遺伝子検査として有用である。しかしながら、標的核酸の検出にはキャピラリー作用による展開が必要なため、標的核酸を増幅した後、さらに5分から15分を必要とする。そのため迅速性の点で課題は残る。

10

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特許第 2 6 5 0 1 5 9 号 公 報

20

【 特許文献 2 】 特許第 3 1 5 2 9 2 7 号 公 報

【 特許文献 3 】 特許第 3 2 4 1 7 1 7 号 公 報

【 特許文献 4 】 特開 2 0 0 0 - 0 1 4 4 0 0 号 公 報

【 特許文献 5 】 特開 2 0 0 1 - 1 5 7 5 9 8 号 公 報

【 特許文献 6 】 特許第 4 2 6 8 9 4 4 号 公 報

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 I s h i g u r o , T . e t a l , A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , 3 1 4 , 7 7 - 8 6 ( 2 0 0 3 )

【 非特許文献 2 】 N a t u r e B i o t e c h , 1 4 , 3 0 3 - 3 0 8 ( 1 9 9 6 )

30

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 8 】

本発明の課題は、試料中に含まれる標的核酸を増幅し、増幅した前記標的核酸を検出する、遺伝子検査において、特別な装置を用いることなく、より簡易、迅速かつ特異的に標的核酸を検出する方法、および前記方法を利用したキットを提供することにある。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明者らは上記課題を解決するべく鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

40

## 【 0 0 1 0 】

すなわち本発明の第一の態様は、以下の(1)から(3)の工程を含む、試料中に含まれる標的核酸の検出方法である。

( 1 ) 試料中に含まれる標的核酸を増幅する工程

( 2 ) クロマトグラフィーの手法を用いずに、( 1 )の工程で増幅した標的核酸と、固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子とを、特異的に結合させる工程

( 3 ) ( 2 )の工程で結合した標的核酸を第2の結合因子に結合した標識物質で検出する工程

また本発明の第二の態様は、標識物質が可視光を吸収または反射する物質である、前記

50

第一の態様に記載の検出方法である。

【0011】

また本発明の第三の態様は、第1の結合因子および第2の結合因子が、標的核酸とストリンジентな条件でハイブリダイズ可能な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、前記第一または第二の態様に記載の方法である。

【0012】

また本発明の第四の態様は、固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子の存在下で、試料中に含まれる標的核酸を増幅を行なう、前記第一から第三の態様のいずれかに記載の方法である。

【0013】

また本発明の第五の態様は、標的核酸を増幅をNASBA法、TMA法、TRC法のいずれかの方法で行なう、前記第一から第四の態様のいずれかに記載の方法である。

【0014】

さらに本発明の第六の態様は、以下の(1)から(3)を含む、試料中に含まれる標的核酸を検出するためのキットである。

(1) 試料中に含まれる標的核酸を増幅するための試薬

(2) 標的核酸に特異的に結合可能な、固相に結合した第1の結合因子

(3) 標的核酸に特異的に結合可能な、標識物質を結合した第2の結合因子

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

本発明において標的核酸とは、少なくとも1種類の細胞、細菌、真菌、ウイルスなどに由来した、一本鎖もしくは二本鎖DNAまたはRNAのうち、本発明の検出方法(1)の工程で増幅される領域のことをいう。なお標的核酸が一本鎖DNAまたはRNAの場合、それらの相補鎖も標的核酸に含まれる。なお本発明の検出方法(1)の工程でTRC法を用いた核酸増幅を行なう場合、標的核酸の長さは100から300塩基が好ましく、100から200塩基が特に好ましい。

【0016】

試料中に含まれる標的核酸を本発明の検出方法を用いて検出する際、あらかじめ試料から当該標的核酸を抽出する工程を行なうと好ましい。標的核酸を抽出する方法に限定はなく、EDTA-SDS-フェノール-エタノール法、塩化リチウム-尿素法、プロテアーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法、フェノール-SDS法、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法、グアニジンチオシアネート-トリフルオロ酢酸セシウム法、酸性グアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム法(AGPC法)、バナジリリボヌクレオシド複合法、磁性シリカ法が例示できる。また市販の核酸抽出キットを用いてもよい。

【0017】

本発明の検出方法(1)の工程で用いる核酸増幅法としては、PCR法、NASBA法、TMA法、TRC法といった公知の方法を用いることができる。なお増幅した標的核酸の検出に、固相に結合した前記標的核酸とストリンジентな条件でハイブリダイズ可能な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド(第1の結合因子)と、標識物質を結合した前記標的核酸とストリンジентな条件でハイブリダイズ可能な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド(第2の結合因子)とを用いる場合は、一本鎖DNAまたはRNAを増幅可能な非対称PCR法、NASBA法、TMA法、TRC法が好ましく、特に一定温度で一本鎖核酸の増幅が可能なNASBA法、TMA法、TRC法が好ましい。なお本明細書においてストリンジентな条件とは、既知の条件から選定可能で、特に限定されるものではないが、例えば、42において、50%(v/v)ホルムアミド、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%フィコール、0.1%のポリビニルピロリドン、50mMリン酸ナトリウムバッファー(pH6.5)、150mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムが共存する条件下でハイブリダイズ可能な条件や、本明細書の実施例に記載の核酸増幅条件下でハイブリダイズ可能な条件があげられる。

10

20

30

40

50

## 【0018】

本発明において第2の結合因子に結合させる標識物質は、固相に結合した第1の結合因子および前記第2の結合因子と標的核酸とが結合し、前記第2の結合因子が前記固相に一定量集まることで検出可能となる物質であればよく、着色高分子粒子、金コロイド、色素、蛍光物質が例示できる。特に可視光を吸収または反射する物質を標識物質として用いると、前記第2の結合因子が一定量集まることで目視での検出が可能となるため、好ましい。第2の結合因子と標識物質との結合は、結合因子の態様により、適宜選択でき、例えば、共有結合、静電気力による結合、抗原-抗体結合、リガンド-レセプター結合、ビオチン-アビジン結合、ヌクレオチド間のハイブリダイズ、またそれらの組み合わせがあげられる。

10

## 【0019】

本発明において第1の結合因子および第2の結合因子は、増幅した標的核酸に特異的に結合可能な物質であればよいが、前記標的核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを第1の結合因子および第2の結合因子として用いると好ましい。前記好ましい例における、オリゴヌクレオチドの長さは8塩基以上あればよく、15塩基以上あると好ましく、20塩基以上あるとさらに好ましい。またオリゴヌクレオチドはDNA、RNA、またはそのキメラであってもよく、さらにそれらに人工的な塩基や化学的修飾を施したものでよい。なお、本発明の検出方法(1)の工程で増幅される標的核酸に修飾を施す場合は、当該修飾した物質に対応した物質を第1の結合因子および第2の結合因子として用いることもできる。例えば、正電荷-負電荷、抗原-抗体、リガンド-レセプター、ビオチン-アビジン、またはそれらの組み合わせがあげられる。

20

## 【0020】

本発明において第1の結合因子を固定させる固相は、前記第1の結合因子と直接または間接的に結合可能な物質であり、増幅した標的核酸を含む溶液と分離可能な物質であり、かつ第1の結合因子および第2の結合因子と標的核酸とが結合した際、第2の結合因子に結合した標識物質を集積可能な物質であれば限定はなく、ニトロセルロース、ナイロンなどの多孔質メンブレン、スチレン、ポリエチレンなどの樹脂、ガラス、金属、またはそれらの組み合わせが例示できる。さらに第1の結合因子との結合を強固にするために、前記固相に適当な加工や官能基、結合因子の導入を行なってもよい。固相の形状は、増幅した標的核酸を含む溶液と接触が十分な形状であれば特に限定はなく、薄膜状、立方体、球状が例示できる。特に固相の形状を反応容器の内壁の一部を兼ねる形状とすると好ましい。第1の結合因子と固相との結合は、結合因子の態様により、適宜選択でき、例えば、共有結合、静電気力による結合、抗原-抗体結合、リガンド-レセプター結合、ビオチン-アビジン結合、ヌクレオチド間のハイブリダイズ、またそれらの組み合わせがあげられる。

30

## 【発明の効果】

## 【0021】

本発明は、(1)試料中に含まれる標的核酸を増幅する工程、(2)クロマトグラフィーの手法を用いずに(1)の工程で増幅した標的核酸と固相に結合した第1の結合因子および標識物質を結合した第2の結合因子とを特異的に結合させる工程、(3)(2)の工程で結合した標的核酸を第2の結合因子に結合した標識物質で検出する工程、を含む方法により、試料中に含まれる標的核酸を検出する方法である。前記方法および前記方法を用いた本発明のキットにより、クロマトグラフィーの手法を用いることなく、標的核酸の有無を迅速、簡便かつ特異的に試料中に含まれる標的核酸を検出することができる。なお標識物質として可視光を吸収または反射する物質を用いると、標的核酸の有無を目視により検出でき、特別な装置を用意する必要がなくなるため、より迅速、簡便かつ特異的に標的核酸を検出することができる。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

【図1】実施例3のうちアガロース電気泳動の結果を示した図である。

50

【図2】実施例4の結果を示した図である。

【実施例】

【0023】

以下、標的核酸としてRegIV (Regenerating islet-derived family, member 4)を用いたときの実施例で、本発明をさらに詳細に説明するが、本実施例は本発明の実施の一形態を説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。

【0024】

実施例1 固相に結合した第1の結合因子の作製

(1) 10 μMの配列番号6または配列番号7に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド溶液5 μLずつ、固相(オリゴDNA固定化用基板キット(アミノ修飾)(住友ベークライト社製))に添加し、特開2006-234712号公報に記載の方法に基づき、80℃で1時間加熱乾燥することで、前記オリゴヌクレオチドを固相に結合させた。

(2) 0.1Mの水酸化ナトリウム溶液を添加し、5分間振とうさせることで、活性エステル基を不活性化するブロッキングを行なった。

(3) ブロッキング後、前記固相を沸騰水中で2分間、続いて常温の水中で2分間振とう洗浄した後、乾燥することで、固相に結合したオリゴヌクレオチドを作製した。

【0025】

実施例2 標識物質を結合した第2の結合因子の作製

(1) 3'末端側にアミノ基を付加した配列番号6に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド150 ngに、ラテックス粒子(Estapor(メルク社製)、直径500 nm)を $1.4 \times 10^{10}$ 個添加し、室温で30分間静置した。

(2) 水溶性カルボジイミドを終濃度10 mg/mLとなるよう添加し、室温で2時間反応した。

(3) (2)の反応で得られたラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチドを遠心により回収し、Tween 20およびSDSを含む溶液により洗浄した。

(4) 洗浄した、ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチドを、バッファー(10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 mM EDTA、1 M NaCl、0.05% Tween 20)中に保存し、その後の検出に用いた。

【0026】

実施例3 等温増幅法を用いたRegIV RNAの増幅および検出(その1)

RegIV RNAを合成し、等温増幅法によるRegIV RNAの増幅および検出を試みた。

(1) 特開2007-116999号公報に基づき合成したRegIV RNA(配列番号8)を、注射用水を用いて $10^5$ コピー/5 μLとなるよう希釈し、これをRNA試料として用いた。

(2) 以下の組成の反応液を0.5 mL容量PCR用チューブ(GeneAmp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製)に14 μL/tubeで分注し、これに前記RNA試料または注射用水を5 μL添加した。

【0027】

反応液の組成：濃度は開始液添加後(30 μL中)の最終濃度

60 mM Tris-HCl (pH 8.6)

各0.3 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各3 mM ATP、CTP、UTP、GTP

3.4 mM ITP

0.16 μM 切断用オリゴヌクレオチド(配列番号4に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのうち3'末端の水酸基をアミノ基で修飾)

0.2 μM 第一のプライマー(配列番号1に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドの5'末端側にT7プロモータ(配列番号2)を付加したもの)

0.2 μM 第二のプライマー(配列番号3)

10

20

30

40

50

13% DMSO

6.4 U AMV 逆転写酵素

142 U T7 RNAポリメラーゼ (WO2010/016621号)

(以下、必要に応じ添加)

0.1% Tween 20

36 nM インターカレーター性蛍光色素標識核酸 (以下、INAFプローブ)

(配列番号5に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを特開2007-116999号公報に基づきインターカレーター性蛍光色素で修飾)

$5 \times 10^8$  個 ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド (実施例2)

(3) 上記の反応液を、43 で5分間保温後、以下の組成の開始液8  $\mu$ Lを添加した。

10

【0028】

開始液の組成：濃度は酵素液添加後(30  $\mu$ L中)の最終濃度

18 mM 塩化マグネシウム

100 mM 塩化カリウム

400 mM トレハロース

(4) 引き続きPCR用チューブを直接測定可能な温調機能付き蛍光分光光度計を用い、46 の一定温度で反応させると同時に反応溶液の蛍光強度(励起波長470 nm、蛍光波長520 nm)を経時的に測定した。

【0029】

開始液添加時を反応開始時(0分)とし、反応液の蛍光強度比が1.2を超えた場合を(+)判定とし、そのときの時間を検出時間とした。またアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により増幅産物を確認した。蛍光分光光度計による検出結果を表1に、アガロースゲル電気泳動の結果を図1に、それぞれ示す。

20

【0030】

【表1】

Tween 20		未添加	添加	未添加	添加
ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド		未添加	未添加	添加	添加
検出時間 [分]	RNA試料なし	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	RNA試料あり	4.0	4.2	4.1	4.8

30

N.D.：検出不可

RNA試料を添加せずに等温増幅法を行なった場合は、蛍光強度の増加はみられず、増幅産物も確認できなかった。一方、RNA試料を添加して等温増幅法を行なった場合は、蛍光強度の増加がみられ、増幅産物も確認できた。また界面活性剤、ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド、およびINAFプローブの有無に関係なく、等温増幅法によるRegIV RNAの増幅が可能であることがわかる。

40

【0031】

実施例4 等温増幅法を用いたRegIV RNAの増幅および検出(その2)

実施例3では等温増幅法により得られたRegIV RNA増幅産物の検出に蛍光分光光度計やアガロースゲル電気泳動(エチジウムブロマイド染色)を用いたが、本実施例では当該増幅産物の目視による検出が可能か検討した。

(1) 以下の組成の反応液を0.5 mL容量PCR用チューブ(GeneAmp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製)に14  $\mu$ L/tubeで分注し、これに実施例3(1)で調製したRNA溶液または注射用水を5  $\mu$ L添加した。

【0032】

50

反応液の組成：濃度は開始液添加後（30 μL中）の最終濃度

60 mM Tris-HCl (pH 8.6)

各0.3 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各3 mM ATP、CTP、UTP、GTP

3.4 mM ITP

0.16 μM 切断用オリゴヌクレオチド（配列番号4に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのうち3'末端の水酸基をアミノ基で修飾）

0.2 μM 第一のプライマー（配列番号1に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドの5'末端側にT7プロモータ（配列番号2）を付加したもの）

0.2 μM 第二のプライマー（配列番号3）

13% DMSO

6.4 U AMV逆転写酵素

142 U T7 RNAポリメラーゼ（WO2010/016621号）

5 × 10<sup>8</sup> 個 ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド（実施例2）

0.1% Tween 20

(2) 上記の反応液を、配列番号6または配列番号7に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを固定化した固相（実施例1）に滴下し、43℃のインキュベータ内で5分間保温後、以下の組成の開始液8 μLを滴下した。

【0033】

開始液の組成：濃度は酵素液添加後（30 μL中）の最終濃度

18 mM 塩化マグネシウム

100 mM 塩化カリウム

400 mM トレハロース

(4) 引き続き46℃のインキュベータ内で一定時間保温することで、Reg IV RNAの増幅、ならびに得られた増幅産物とオリゴヌクレオチドを固定化した固相（実施例1）およびラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド（実施例2）とのハイブリダイゼーションを行なった。

【0034】

反応終了後、固相をインキュベーターから取り出し、純水で洗浄後、目視により判定を行なった結果を図2に示す。RNA試料を添加せずに等温増幅法を行なった場合は、いずれのスポットも確認できなかった。一方、RNA試料を添加して等温増幅法を行なった場合は、Reg IV RNA増幅産物と配列番号7に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドを固定化した固相（実施例1）および配列番号6に記載の配列からなるラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド（実施例2）とが特異的にハイブリダイズしたことによるスポットが確認できた。

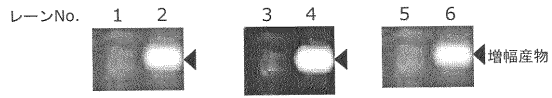
10

20

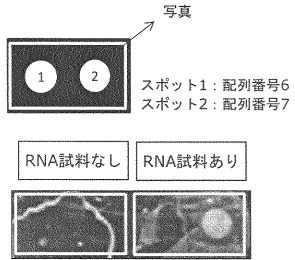
30

【 図 1 】

添加物	レーンNo.					
	1	2	3	4	5	6
Tween 20	なし	なし	なし	なし	あり	あり
ラテックス粒子を結合したオリゴヌクレオチド	なし	なし	なし	なし	あり	あり
INAFプローブ	あり	あり	なし	なし	なし	なし
RNA試料	なし	あり	なし	あり	なし	あり



【 図 2 】



【 配列表 】

2015100332000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA14  
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34