(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4839051号
(P4839051)
(45)発行日　平成23年12月14日(2011.12.14)　(24)登録日　平成23年10月7日(2011.10.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M

請求項の数 12　(全 22 頁)

(21)出願番号	特願2005-274912 (P2005-274912)
(22)出願日	平成17年9月22日 (2005.9.22)
(65)公開番号	特開2006-129866 (P2006-129866A)
(43)公開日	平成18年5月25日 (2006.5.25)
審査請求日	平成20年9月4日 (2008.9.4)
(31)優先権主張番号	特願2004-296329 (P2004-296329)
(32)優先日	平成16年10月8日 (2004.10.8)
(33)優先権主張国	日本国(JP)

(73)特許権者　390014960
シスメックス株式会社
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
(74)代理人　100109793
弁理士　神谷　惠理子
(72)発明者　蓮井　康嗣
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号　シスメックス株式会社内
(72)発明者　阿部　滋樹
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号　シスメックス株式会社内
(72)発明者　大東　元就
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号　シスメックス株式会社内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸プローブを用いる被検物質の検出方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の被検物質を検出する方法であって、
第１固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第１核酸プローブと、該第１核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質と、該被検物質に結合可能な標識物質と、からなる第１複合体を形成させる工程；
第１複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した第２複合体を、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼと、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第１核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び
解離された第２複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程
を含む核酸プローブを用いる被検物質の検出方法。
【請求項２】
検出工程が、解離された第２複合体と、第２固相に固定され且つ前記核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な一本鎖を有する第２核酸プローブとからなる第３複合体を形成し、第３複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する、請求項１に記載の検出方法。
【請求項３】
前記第１複合体形成工程は、

第１核酸プローブと核酸リガンドを接触させ、第１核酸プローブ－核酸リガンド複合体を形成させた後に、第１核酸プローブ－核酸リガンド複合体に、被検物質及び標識物質を結合させることにより行なわれる請求項１又は２に記載の検出方法。

【請求項４】

前記第１複合体形成工程は、

核酸リガンドと、被検物質と、標識物質を接触させ、第２複合体を形成させた後に、前記第１核酸プローブに、第２複合体を結合させることにより行なわれる請求項１又は２に記載の検出方法。

【請求項５】

前記認識結合部は、被検物質と結合できるアプタマー、抗体、及び受容体からなる群より選ばれる１種である請求項１～４のいずれかに記載の測定方法。

【請求項６】

前記相補塩基配列部はＤＮＡ又はＲＮＡで構成され、

前記認識結合部は、前記相補塩基配列部の３’末端に結合している請求項１～５のいずれかに記載の方法。

【請求項７】

前記標識物質は、

前記被検物質に結合可能な第２認識結合部と、

放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも１種とを有する請求項１～６のいずれかに記載の検出方法。

【請求項８】

前記標識物質は、

前記被検物質に結合可能な第１物質と、

前記第１物質に結合可能であり、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも１種を有する第２物質とからなる請求項１～７のいずれかに記載の検出方法。

【請求項９】

試料から被検物質を採取する方法であって、

固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第１核酸プローブと、該第１核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質とを結合させて、被検物質－核酸リガンド－第１核酸プローブ複合体を形成させる工程；

前記被検物質－核酸リガンド－第１核酸プローブ複合体から、被検物質－核酸リガンド複合体を、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼと、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第１核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び

解離された被検物質－核酸リガンド複合体を採取する工程；

を含む被検物質の採取方法。

【請求項１０】

試料中の被検物質を検出するために用いられる試薬キットであって、

一本鎖部分を有する第１核酸プローブを固定化した第１固相；

前記第１核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と、前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；

前記被検物質に結合可能な標識物質；

鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼ；及び

ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチド；

を含む被検物質検出用試薬キット。

【請求項１１】

さらに、前記第１固相を洗浄するための洗浄液を含む請求項１０に記載の試薬キット。

【請求項１２】
前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第２核酸プローブを固定化した第２固相を、さらに含む請求項１０又は１１に記載の試薬キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、核酸プローブを用いて、特異性の高い塩基の相補反応を利用することにより、非特異吸着による誤差を低減させ、微量でも高精度で検出、定量することができる被検物質の検出方法、当該検出方法に用いられる被検物質検出用試薬キット、及び微量成分の高感度測定のための前処理等に利用できる被検物質の採取方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
微量の被検物質を高感度で検出、定量したいという要望は止まるところがない。また、近年の質量分析技術の発展から、微量タンパクの同定を質量分析を利用して行なわれることが多くなり、これに伴い、夾雑物から目的のタンパクを高精度に分離精製する必要が高まってきている。
このような事情から、高感度に標的物質を分離精製し、検出定量する方法が望まれている。
【０００３】
特定の標的物質を検出定量する方法としては、特異性が高い免疫学的手法を利用した方法（イムノアッセイ）が一般に用いられている。
抗原－抗体反応を利用したイムノアッセイは、Ｂ／Ｆ分離を行うヘテロジーニアスなアッセイと、Ｂ／Ｆ分離を行わないホモジーニアスなアッセイに分類される。
【０００４】
ヘテロジーニアスなイムノアッセイとしては、例えば図９に示すようなＥＬＩＳＡが一般に用いられている。これは、固相上に固定した第１抗体１により被検物質２を捕捉した（図９（ａ））後、さらに被検物質２に特異的な第２抗体３を添加して、第２抗体３を被検物質２に結合させ（図９（ｂ））、被検物質２に結合しなかった第２抗体（Ｆ）と、被検物質２に結合して形成される第１抗体－被検物質－第２抗体の複合体４（Ｂ）を分離した後、複合体４を検出又は定量する方法である。第２抗体に酵素等の標識を結合させることにより、複合体４の検出が容易かつ高感度で検出可能となる。
【０００５】
しかしながら、固相上に第２抗体３が非特異吸着することがあり（図９（ｃ））、この固相に非特異吸着した第２抗体３は、洗浄によるＢ／Ｆ分離では除去されずに残存していることが多い。このため、非特異吸着した第２抗体３がノイズとなるため、バックグラウンドが高くなり、微量な被検物質の検出、定量についての感度アップの改良が求められている。
【０００６】
非特異吸着によるノイズ低減、高感度なイムノアッセイとしては、特許文献１（特開２００３－１０７０８９号）で、被検物質と該被検物質と特異的に結合する物質との複合体を第１固相上に形成させた後、この複合体を溶出して第２の固相に移し替え、第２固相に結合した複合体を測定する方法を提案している。具体的には、図１０に示すように、第１の固相にジニトロフェニル抗体１１を固相化しておき、ジニトロフェニル基で標識した一次抗体１２と該一次抗体１２に結合する標的タンパク１３と該標的タンパク１３に結合する二次抗体（標識抗体）１４の複合体１５を形成させて固相に添加すると（図１０（ａ））、ジニトロフェニル基（ＤＮ）がジニトロフェニル抗体１１に結合するにしたがって、ジニトロフェニル基を介して、一次抗体－標的タンパク－二次抗体複合体が第１の固相に結合固定化される。洗浄後、第１固相上に過剰のＮ－２，４－ジニトロフェニル－Ｌ－リジン（ＮＤＬ）を添加し（図１０（ｂ））、これによりジニトロフェニル抗体に対して一次抗体とＮ－２，４－ジニトロフェニル－Ｌ－リジンとの競合反応が起り、一次抗体－標

的タンパク－二次抗体の複合体１５が解離される（図１０（ｃ））。解離された複合体１５’を別の第２の固相上に移し替えて、第２の固相に結合固定化させた後、複合体を検出する。複合体を構成する抗体（例えば一次抗体１２）を、例えば、予めビオチンなどで標識しておき、第２の固相にストレプトアビジンを使用することで、一次抗体－標的タンパク－二次抗体複合体１５’を特異的に第２固相に結合固定化させることができる。このようにして、第２固相に結合した複合体を検出することで、二次抗体１４が標的分子以外に吸着するような、第１固相で生じる非特異的吸着の影響を減らすことができる。また第１固相から特異的に解離した一次抗体が第２固相に結合することから、第２固相では複合体が精製されて結合することになる。よって、第２固相上では二次抗体（標識抗体）１４の非特異的吸着の影響が減少され、結果としてノイズが低減される。

【０００７】

しかし、このような免疫学的手法による検出、定量方法では、第１の固相から複合体を解離させる際の競合反応は平衡反応であることから、第１の固相に結合固定化された複合体の全てが競合反応の相手物質（上記例ではＮ－２，４－ジニトロフェニル－Ｌ－リジン）に置換されるということは少ないため、複合体の検出、分離される量は、第２固相に移し替える時点でのロスが少なくなく、試料中に含まれる標的物質の定量方法としては、精度的に満足できるものではなかった。従って、バックグラウンドが低く、精度の高い検出方法が望まれる。

【０００８】

【特許文献１】特開２００３－１０７０８９

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、バックグラウンドが低く、精度の高い被検物質の検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明の核酸プローブを用いる被検物質の検出方法は、試料中の被検物質を検出する方法であって、第１固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第１核酸プローブと、該第１核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質と、該被検物質に結合可能な標識物質と、からなる第１複合体（「核酸リガンド－第１核酸プローブ複合体」を「第１ハイブリッド」と称し、第１複合体を「標識被検物質－第１ハイブリッド複合体」と称することがある）を形成させる工程；

第１複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した第２複合体（「標識被検物質－核酸リガンド複合体」と称することがある）を、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼと、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第１核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び

解離された第２複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程を含む。

【００１１】

前記検出工程が、解離された第２複合体と、第２固相に固定され且つ前記核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な一本鎖を有する第２核酸プローブとからなる第３複合体（「核酸リガンド－第２核酸プローブ複合体」を「第２ハイブリッド」と称し、第３複合体を「標識被検物質－第２ハイブリッド」と称することがある）を形成し、第３複合体の標識物質に基づいて被検物質を検出することが好ましい。

【００１２】

前記第１複合体形成工程は、第１核酸プローブ－核酸リガンド複合体を形成させた後に、第１核酸プローブ－核酸リガンド複合体に、被検物質及び標識物質を結合させることにより行なってもよいし、核酸リガンドと、被検物質と、標識物質を接触させ、第２複合体

を形成させた後に、前記第１核酸プローブに第２複合体を結合させることにより行なってもよい。

【００１３】

前記認識結合部は、被検物質と結合できるアプタマー、抗体、及び受容体からなる群より選ばれる１種であることが好ましい。

【００１４】

また、前記相補塩基配列部はＤＮＡ又はＲＮＡで構成され、前記認識結合部は、前記相補塩基配列部の３’末端に結合していることが好ましい。

【００１６】

前記標識物質としては、前記被検物質に結合可能な第２認識結合部と、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも１種とを有するもの；あるいは、前記被検物質に結合可能な第１物質と、前記第１物質に結合可能であり、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、及び発光物質からなる群より選択される少なくとも１種を有する第２物質とからなるものが好ましく用いられる。

【００１７】

本発明の被検物質の採取方法は、試料から被検物質を採取する方法であって、固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第１核酸プローブと、該第１核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドと、前記被検物質とを結合させて、被検物質－核酸リガンド－第１核酸プローブ複合体を形成させる工程；前記被検物質－核酸リガンド－第１核酸プローブ複合体から、被検物質－核酸リガンド複合体を、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼと、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチドとの存在下で、前記第１核酸プローブを鋳型とする伸長反応により解離させる工程；及び解離された被検物質－核酸リガンド複合体を採取する工程を含む。

【００１８】

本発明の被検物質検出用試薬キットは、試料中の被検物質を検出するために用いられる試薬キットであって、一本鎖部分を有する第１核酸プローブを固定化した第１固相；前記第１核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と、前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；前記被検物質に結合可能な標識物質；鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼ；及びｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰからなる群より選択される少なくとも１種のデオキシヌクレオチドを含む。

【００１９】

さらに、前記第１固相を洗浄するための洗浄液を含むことが好ましく、また前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第２核酸プローブを固定化した第２固相を含むことが好ましい。

【００２０】

尚、本明細書における「核酸」とは、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）の他に、ＰＮＡ（Peptide Nucleic Acid)やＢＮＡ（Bridged Nucleic Acid）、及びこれらの類縁体などの人工的に合成された核酸（以下、「人工核酸」という）も含む。また、本明細書における「塩基配列」とは、ＤＮＡやＲＮＡの塩基配列だけでなく、人工核酸の塩基配列をも含む。

【００２１】

本明細書における「検出」とは、被検物質の有無だけでなく、被検物質の定量をも含む概念である。

【発明の効果】

【００２２】

本発明の被検物質の検出方法は、被検物質を核酸リガンドに結合させ、この核酸リガンドを、核酸プローブを用いて捕捉し、さらに分離採取して第２の固相に移すことによって精製しているので、バックグラウンドノイズが少なく、高精度で微量の被検物質を検出することができる。

【００２３】
また、本発明の被検物質の分離方法では、塩基の特異的反応を利用して、被検物質を核酸プローブに捕捉させ、洗浄後、解離させて採取しているので、高純度で微量の被検物質を得ることができる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２４】
本発明の被検物質の検出方法は、第１固相に固定され且つ一本鎖部分を有する第１核酸プローブと、該第１核酸プローブの該一本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部及び被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部を含む核酸リガンドとがハイブリダイズした第１ハイブリッド；前記被検物質；及び該被検物質に結合可能な標識物質からなる標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成させる工程；
前記標識被検物質－第１ハイブリッド複合体から、前記核酸リガンドと前記標識物質と前記被検物質とが結合した標識被検物質－核酸リガンド複合体を解離させる工程；
解離された標識被検物質－核酸リガンド複合体を分離採取する工程；並びに
前記標識被検物質－核酸リガンド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する工程を含む。
【００２５】
本発明の方法が適用される被検物質としては、タンパク質、核酸、糖類、脂質、ホルモン、ハプテン、トキシン、ウィルス、微生物などが挙げられる。前記微生物とは、バクテリア、プロチスタ、クロミスタなど、肉眼で観察できないような微小生物をいう。また、これらの被検物質を含む試料としては、例えば、血液、唾液、尿、鼻汁、涙液、糞便、組織抽出液、培養液、河川水、廃液などが挙げられ、これらの試料を精製したものも含まれる。
【００２６】
本発明で用いられる第１固相としては、第１核酸プローブを安定に固定することができるものであればよく、プレート、チューブなどの容器、メンブレン、粒子などを用いることができる。具体的には、ポリプロピレン、ポリスチレン等の合成樹脂製又はガラス製のマイクロプレート、ニトロセルロースメンブレン、ラテックス粒子、磁性粒子などが挙げられる。
【００２７】
本発明の方法で用いられる第１核酸プローブは、上記核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズ可能な塩基配列を有するものであればよい。第１核酸プローブは、１本鎖であってもよいし、長さの異なる２本の塩基配列がハイブリダイズして二本鎖部分と一本鎖部分とを有し、この一本鎖部分が核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズできる配列を有しているものであってもよい。また、一本鎖でステムループを形成し且つ核酸リガンドとハイブリダイズできる配列を有する一本鎖部分を有しているものであってもよい。これらのうち、ステムループ構造を有する第１核酸プローブが好ましい。プローブの二本鎖を形成しているステム部分は５～１０ｍｅｒで、１本鎖部分が１５～２０ｍｅｒであることが好ましい。
【００２８】
このような第１核酸プローブは、第１固相に固定されている。第１固相への固定は、第１核酸プローブが直接第１固相と結合を形成することにより固定されていてもよいし、間接的に固定されていてもよい。間接的固定方法としては、例えば、固相に特定の物質Ａを固定し、さらにこの物質に結合できる物質Ｂを第１核酸プローブに結合させ、物質Ａと物質Ｂとの結合を介して、第１核酸プローブを固相に固定化する方法；第１核酸プローブを構成する何れかの塩基にアミノ基を化合させ、このアミノ基を固相に固定化する方法；固相に特定の塩基配列Ｘを有する一本鎖の核酸を固定し、この一本鎖の核酸に、塩基配列Ｘに相補的な塩基配列Ｘｃと、核酸リガンドの相補塩基配列部にハイブリダイズ可能な塩基配列Ｙとを有する核酸プローブを結合させる方法などが挙げられる。上記物質Ａと物質Ｂとの組み合わせとしては、ストレプトアビジンとビオチンとの組み合わせなどが挙げられ

る。第１核酸プローブがステムループ構造である場合、ループ部分が固相に固定化されていることが好ましい。

【００２９】

本発明の方法で用いられる核酸リガンドは、第１核酸プローブの１本鎖部分にハイブリダイズ可能な塩基配列の相補塩基配列部と、被検物質を特異的に捕捉できる認識結合部とを含む。

【００３０】

認識結合部は、被検物質と特異的に結合できるものであればよく、被検物質の種類に応じて適宜選択される。認識結合部としては、抗体、レセプター、ペプチド、核酸リガンド（アプタマー）、ポリヌクレオチドなどを用いることができる。本明細書における抗体とは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体だけでなく、また、抗体フラグメント、及びその誘導体をも含む。具体的には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、及びＦｖフラグメントなど（Blazar et al., 1997, J. Immunol., 159: 5821-5833及びBird et al., 1988, Science, 242: 423-426）が例示される。抗体のサブクラスはＩｇＧに限定されず、ＩｇＭなどでもよい。

【００３１】

相補塩基配列部は、天然に存在するＤＮＡやＲＮＡで構成される場合に限らず、人工核酸で構成されていてもよいが、好ましくはＤＮＡの塩基配列である。

相補塩基配列部の配列は、使用する第１核酸プローブの配列に応じて適宜決められる。具体的には、第１核酸プローブの一本鎖部分とハイブリッドを形成できる相補性を有するものであればよく、一本鎖部分と完全な相補性を有するものに限定されない。特に後の解離工程を引き起こすためには、完全一致の相補性でないことが好ましく、相補塩基配列部における第１核酸プローブの相補部分との相同性は約５０％以上であればよい。

【００３２】

相補塩基配列部の長さとしては、第１核酸プローブと安定的に結合できる長さで、しかも採用する解離方法で容易に解離できる程度の長さの配列であることが好ましく、使用する解離方法に応じて配列、鎖長は適宜決定される。

【００３３】

例えば、解離反応が温度上昇により行われる場合、配列は、結合が比較的緩やかなＡ－Ｔ塩基対の組合わせのみで構成されることが好ましい。また、相補塩基配列部が、Ａ－Ｔ塩基対のみで形成される場合には、相補ヌクレオチド配列部長１２～１６ｍｅｒであることが好ましい。

【００３４】

認識結合部がアプタマーの場合、このアプタマーに相補塩基配列部が結合してもよいし、アプタマーの一部が相補塩基配列部となっていてもよい。例えば、配列「５’ＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＴＧＴＧＡＣＴＡＣＴＧＧＴＴＧＧＴＧＡＧＧＴＴＧＧＧＴＡＧＴＣＡＣＡＡＡ　３’」（配列ＩＤ　Ｎｏ．１）からなるアプタマーは、５’末端から２０塩基（ｄＴ２０部分）が相補塩基配列部で、残りの配列がトロンビンと特異的に結合する３次元構造を有する認識結合部である。

【００３５】

認識結合部は、相補塩基配列部の末端に接続されていることが好ましい。相補塩基配列部がＤＮＡ又はＲＮＡの場合、認識結合部は相補塩基配列部の３’末端に結合していることが好ましい。また、認識結合部がアプタマーで構成されているときは、相補塩基配列部が５’末端側に形成され、３’末端側にアプタマーを構成する配列が形成されていることが好ましい。認識結合部が抗体のときは、例えば、核酸リガンドのヌクレオチド３’端にチオール基を修飾し、マレイミド基を有するリンカー分子と結合させ、このマレイミド基の反対方向にグルタルアルデヒド基を修飾しておき、このアルデヒド基が抗体中に存在するアミノ基と共有結合することにより、抗体を結合させることができる。

【００３６】

本発明における標識物質は、被検物質に結合可能であり、標識を有する物質である。具

体的には、被検物質に結合可能な第２認識結合部と標識との組み合わせ；又は被検物質に結合可能な第１物質と、該第１物質に結合可能な標識を有する第２物質との組み合わせなどが挙げられる。

【００３７】

第２認識結合部としては、塩基配列、抗体、レセプター、アプタマーなどを用いることができる。第２認識結合部が認識する被検物質の領域は、核酸リガンドの認識結合部が認識する領域とは異なることが好ましい。

【００３８】

標識としては、検出可能なシグナルを発する物質や、検出可能なシグナルを発する生成物を生じる反応を触媒する物質などを用いることができる。例えば、^{32}Ｐ、^{125}Ｉなどの放射性同位元素、フルオレセインなどの蛍光色素、アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などの酵素、量子ドット、ナノ粒子などの蛍光・発光物質、フェロセンなどの電気化学活性をもつ物質、ルテニウム、ユーロピウム錯体などの電気化学発光物質などが挙げられる。

【００３９】

標識物質が、被検物質に結合可能な第１物質と、該第１物質に結合可能な標識を有する第２物質との組み合わせで構成される場合、被検物質－第１ハイブリッド複合体に第１物質が結合し、さらにこの第１物質に第２物質が結合することにより、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を間接的に標識することができる。

【００４０】

以下、本発明の検出方法の各工程について説明する。

先ず、第一固相（反応容器など）において、被検物質と、第１核酸プローブと、核酸リガンドと、標識物質とを結合させ、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成させる（標識被検物質－第１ハイブリッド複合体形成工程）。

【００４１】

被検物質、第１核酸プローブ、及び核酸リガンドの結合は、第一固相において第１核酸プローブと核酸リガンドとを先ず結合させて、第１ハイブリッドを形成し、次いで、被検物質を含む試料を添加して、第１ハイブリッド中の核酸リガンドに被検物質を結合させることによって行うことができる。また、予め核酸リガンドと被検物質とを結合させて形成された被検物質－核酸リガンド複合体を、第一固相に固定されている第１核酸プローブに結合させて、核酸リガンドと第１核酸プローブとがハイブリダイズした第１ハイブリッドを形成させることによっても行うことができる。

標識物質と被検物質との結合は、被検物質と第１ハイブリッドとの複合体を形成させる前に行ってもよいし、後に行ってもよい。

【００４２】

標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を第一固相上に形成した後、第一固相を洗浄することが好ましい。これにより、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成できなかった標識物質、核酸リガンド、被検物質などを第一固相上から除去することができる。洗浄には、洗浄液を用いることが好ましい。洗浄液としては、ＴＢＳやＰＢＳなどの緩衝液を用いることができる。

【００４３】

次に、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体から標識被検物質－核酸リガンド複合体を解離させる（解離工程）。

解離方法としては、（１）温度上昇を利用する方法、（２）競合反応を利用する方法、（３）鎖置換反応を利用する方法などが挙げられ、使用した第１核酸プローブに応じて適宜選択される。

【００４４】

（１）の方法は、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体が形成されている反応系（第１核酸プローブが固相に固定されている容器内）の温度を上昇させることにより、前記標識被検物質－第１ハイブリッド複合体中の第１核酸プローブと核酸リガンドの相補塩基配

列部とを解離させる方法である。

【００４５】

室温で本発明を実施する場合、第１核酸プローブと相補塩基配列部とのハイブリッドの融解温度（Ｔｍ値）が室温以上である必要がある。さらに、このＴｍ値は、プローブや被検物質を変性させない程度の温度であることが好ましい。例えば、相補塩基配列部を構成する塩基がＡ又はＴである場合には、鎖長１２～１６ｍｅｒであれば、Ｔｍ値は約２４～３３℃であるから、約４０℃で解離させることができる。相補塩基配列部の塩基は、Ｃ及びＧが含まれず、Ａ及びＴから構成されていることが好ましい。

【００４６】

（２）の方法は、第１核酸プローブの一本鎖部分と相補的な配列を有し、且つ核酸リガンドの相補塩基配列部よりも長い鎖長を有する競合用の長鎖核酸を用いる。核酸リガンドと第１核酸プローブとのハイブリッド（第１ハイブリッド）が不安定な温度で、第１核酸プローブとより安定なハイブリッドを形成することができる競合用の長鎖核酸が共存する場合、核酸リガンドが解離して、競合用の長鎖核酸と第１核酸プローブとがハイブリッドを形成するようになる。

【００４７】

従って、競合反応は、核酸リガンドと第１核酸プローブとがハイブリダイズしてなる第１ハイブリッドが不安定な温度で、競合用長鎖核酸と第１核酸プローブとのハイブリッドが安定に存在出来る温度で行なうことが好ましい。つまり、競合反応温度Ｔｃは、第１ハイブリッドのＴｍ値（Tm_1）よりも高く、第１核酸プローブと競合用の長鎖核酸とのハイブリッドのＴｍ値（Tm_2）よりも低い温度に設定することが好ましい（$Tm_1 < Tc < Tm_2$）。

【００４８】

（３）の方法は、鎖置換用ポリメラーゼとデオキシヌクレオチド（ｄＮＴＰｓ）との存在下で、第１核酸プローブを鋳型として、伸長反応をおこさせることにより、核酸リガンドを解離させる方法である。

【００４９】

尚、用いられるデオキシヌクレオチド（ｄＮＴＰ）は、核酸プローブの一本鎖部分の配列によって選択される。核酸プローブがアデニン、グアニン、チミン、及びシトシンの全てを有する場合にはｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、及びｄＣＴＰの全てを用いる必要があるが、例えば、核酸プローブがアデニンを有するヌクレオチドのみからなる場合には、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、及びｄＣＴＰの全てを用いる必要はなく、ｄＡＴＰを用いるだけで足りる。

【００５０】

また、第１核酸プローブとしては、ＤＮＡを用いることが好ましい。第１核酸プローブが一本鎖である場合は、ポリメラーゼの伸長反応の基点とするため、第１核酸プローブの、相補塩基配列部とハイブリダイズしない部分に結合することのできるプライマを用いることが好ましい。

また、第１核酸プローブがステムループ構造を有している場合は、第１核酸プローブの一本鎖部分が５’末端側であることが好ましい。この場合、第１核酸プローブの３’末端側は二本鎖となっており、これを伸長反応の基点とすることができるため、プライマを用いる必要がない。

【００５１】

伸長反応に於いては、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼとｄＮＴＰの存在下で反応系を３７～５０℃にすることにより、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼは第１核酸プローブの３’末端を始点として、順次、ヌクレオチドを連結していく。つまり第１核酸プローブの一本鎖部分を鋳型として伸長反応が起るとともに、第１核酸プローブと核酸リガンドのハイブリダイゼーションが解かれて、核酸リガンドが解離する。

【００５２】

この方法を用いる場合は、核酸リガンドの相補塩基配列部の５’末端の１～２塩基が第

１核酸プローブと相補性を有しないことが好ましい。これにより、ポリメラーゼの伸長反応による鎖置換が起こりやすくなる。

【００５３】

上記（１）～（３）のいずれかの方法により、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体から、標識被検物質－核酸リガンド複合体が解離したら、標識被検物質－核酸リガンド複合体が反応系で遊離状態となっている溶液を回収する（標識被検物質－核酸リガンド複合体の分離採取工程）。

【００５４】

採取した標識被検物質－核酸リガンド複合体を含む溶液を第１固相とは異なる容器に移し、この溶液に含まれる標識被検物質－核酸リガンド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する（検出工程）。

【００５５】

採取した標識被検物質－核酸リガンド複合体を含む溶液を、第２核酸プローブが固定されている第２固相に移し、標識被検物質－核酸リガンド複合体を第２核酸プローブとハイブリダイズさせて、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成させ（第２複合体形成工程）、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体中の標識物質に基づいて、被検物質を検出してもよい。

【００５６】

第２核酸プローブの構成は、第１核酸プローブの構成と同様のものを用いることができる。すなわち、上記核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズ可能な塩基配列を有するものであればよい。第２核酸プローブは、第１核酸プローブと同様に、１本鎖であってもよく、長さの異なる２本の塩基配列がハイブリダイズして二本鎖部分と一本鎖部分とを有し、この一本鎖部分が核酸リガンドの相補塩基配列部とハイブリダイズできる配列を有しているものであってもよい。また、一本鎖でステムループを形成し且つ核酸リガンドとハイブリダイズできる配列を有する一本鎖部分を有しているものであってもよい。

【００５７】

第２核酸プローブの塩基配列は、第１核酸プローブの塩基配列と同じであってもよいし、異なる配列であってもよい。

【００５８】

本発明で用いられる第２固相は、第２核酸プローブを安定に固定することができるものであればよく、第１固相と同様に、プレート、チューブなどの容器、メンブレン、粒子などを用いることができる。

【００５９】

標識被検物質－核酸リガンド複合体又は標識被検物質－第２ハイブリッド複合体中の被検物質の検出方法は、標識物質の標識の種類に応じて、公知の方法から適宜選択される。例えば、標識として蛍光色素を用いた場合には、反応系に紫外線等を照射し、蛍光強度を測定することができる。また、標識としてラジオアイソトープを用いた場合には、シンチレーションカウンタなどを用いて放射能を測定すればよい。標識として酵素を用いた場合には、当該酵素の基質となる物質を加え、酵素反応によって生成した物質を定量すればよい。

【００６０】

第２核酸プローブがステムループ構造を有する場合、被検物質の検出の前に、ステム部分の末端と相補塩基配列部の末端とを連結してもよい。第２核酸プローブ及び相補塩基配列部がＤＮＡの場合は、ライゲースを用いることにより、末端を連結することができる。また、第２核酸プローブ及び相補塩基配列部が人工核酸の場合は、光結合などによって連結させることができる。光結合による人工核酸の連結法としては、例えば米国特許ＵＳ６５９３０８８Ｂ１号公報記載の方法を用いることができる。

【００６１】

本発明の被検物質検出用試薬キットは、第１固相から分離採取した標識被検物質－核酸リガンドを第２固相で標識被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成し、かかる標識被検

物質－第２ハイブリッド複合体中の標識物質に基づいて被検物質を検出する検出方法に好適に用いられる試薬キットで、一本鎖部分を有する第１核酸プローブを固定化した第１固相；前記第１核酸プローブの一本鎖部分にハイブリダイズ可能な相補塩基配列部と前記被検物質に結合可能な認識結合部とを有する核酸リガンド；前記核酸リガンドの認識結合部にハイブリダイズ可能な一本鎖部分を有する第２核酸プローブを固定化した第２固相；及び前記被検物質に結合可能な標識物質を含む。

【００６２】

さらに、第１固相を洗浄するための洗浄液を含むことが好ましい。また、解離工程として、伸長反応を利用するキットについては、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼ及びｄＮＴＰｓを、更に含むことが好ましい。

【００６３】

次に、本発明の被検物質の測定方法の一実施態様を、図１及び図２に基づいて説明する。

図１の実施態様で使用されている第１核酸プローブ２１は、１本鎖ヌクレオチドで、ステムループを形成している。２重らせんを形成していない第１核酸プローブの１本鎖部分２１ａは、ループの３’端から数塩基おいて、核酸リガンドの相補塩基配列部と相補的な配列を有している。ループを構成している塩基の一つは、ビオチンで修飾されている。このような第１核酸プローブとしては、例えば、「５’ＡＧＡＡＣＡＧＣＧＴＡＴＡＡＴＣＡＴＴＡＧＣＣＣＧＣＣＣＧＧＣＣＡＡ＊ＡＡＡＧＧＣＣＧＧＧＣＧＧＧＣＴＡＡ３’」（配列ＩＤ　Ｎｏ．２）の配列を有するものが挙げられる。３４番目の「Ａ＊」はビオチン修飾アデニンを示している。このような配列のプローブは、例えば、タカラバイオ（株）に合成を依頼して得ることができる。

【００６４】

第１固相たるガラス容器の底面には、ストレプトアビジンが固定されている。このストレプトアビジンにビオチンが結合することにより、第１核酸プローブが第１固相に固定されている（図１（ａ））。

【００６５】

図１に示す実施態様では、被検物質２２が蛋白質（抗原）で、認識結合部２４ａとして該抗原に特異的に結合できる抗体を使用した核酸リガンド２４を用いている。核酸リガンド２４は、第１核酸プローブ２１の１本鎖部分２１ａと相補性ある相補塩基配列部２４ｂ（「ＡＴＡＣＧＣＴＧＴＴＣＴ」など）の３’端にリンカーを介して認識結合部２４ａたる抗体が結合したものである。

【００６６】

被検物質２２は、アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）で標識した二次抗体（第２認識結合物質）２３によりラベル化されている。つまり、標識物質として、被検物質に結合可能な第２認識結合部として二次抗体とＡＬＰとの組み合わせを用いている。このような標識物質が結合した被検物質が認識結合部２４ａと結合してなる標識被検物質－核酸リガンド複合体２５を、第１核酸プローブ２１が固定化された容器に添加すると、核酸リガンド２４の相補塩基配列部２４ｂと第１核酸プローブ２１の一本鎖部分２１ａとがハイブリダイズして、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体が形成される（図１（ｂ））。

【００６７】

鎖置換型ポリメラーゼ及び塩基を添加すると、鎖置換型ポリメラーゼ２６が第１核酸プローブ２１の３’端に結合し（図１（ｃ））、第１核酸プローブ２１の一本鎖部分２１ａであった配列を鋳型として、第１核酸プローブが３’端へ伸長していく（図１（ｄ））。

伸長反応が進行するにつれ、核酸リガンド２４の相補塩基配列部２４ｂが剥がされ、鎖置換反応が生じる。第１核酸プローブ２１の一本鎖だった部分２１ａが伸長反応により二本鎖となると、標識被検物質－核酸リガンド複合体２５が完全に解離する（図１（ｅ））。

【００６８】

解離により得られた標識被検物質－核酸リガンド複合体２５を別の容器（第２固相）に

移し替える。第２固相には、第２核酸プローブ３１が固定されている（図２（ａ））。
【００６９】
第２核酸プローブ３１は、固相に結合した二本鎖ＤＮＡの片方のストランドが長く、一本鎖部分３１ａを有する（図２（ａ））。第２核酸プローブの一本鎖部分は５’末端側に位置している。
【００７０】
第２核酸プローブ３１が固定されている第二固相に、標識被検物質－核酸リガンド２５を添加すると、第２核酸プローブの一本鎖部分３１ａと核酸リガンド２４の相補塩基配列部２４ｂとがハイブリダイズして、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成する（図２（ｂ））。標識被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成させた後、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体の標識を測定することにより、被検物質２２を検出することができる。
【００７１】
本実施態様では、標識としてアルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）を使用している。例えば、パラメトキシフェニルリン酸（ｐＭＰＰ）のようなＡＬＰの基質と、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体のＡＬＰとを所定時間反応させると（図２（ｃ））、ｐＭＰＰがｐ－メトキシフェノール（ｐＭＰ）に変化する。ＥＤＴＡを添加することによりＡＬＰの反応を停止させた（図２（ｄ））後、反応生成物であるｐＭＰの発色を測定することにより、被検物質を検出できる。
【００７２】
上述の方法を用いると、標識物質が被検物質と結合せずに固相に吸着することによって生じるバックグラウンドノイズを減らすことができ、正確に被検物質の検出を行うことができる。また、核酸リガンドを介して行なわれる核酸プローブとの解離、捕捉は、塩基の相補性に基づくもので、抗原－抗体反応よりも再現性、効率がよいので、高精度、高感度の検出、測定が可能となる。また、核酸反応を利用することは、塩基配列を随意に決定することにより核酸リガンドと核酸プローブとからなるハイブリッドのＴｍ値を設定することが可能となるので、検出方法での温度管理が簡便になる。
【００７３】
尚、本発明の核酸リガンドは、上記本発明の検出方法の利用だけに限定されない。例えば、上記測定方法で被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成させ、被検物質－第１ハイブリッド複合体から被検物質－核酸リガンド複合体を解離する工程、及び解離した被検物質－核酸リガンド複合体を採取する工程までを行うことで、混合物の測定試料から、目的の被検物質の分離採取することができる。すなわち高純度及び高濃度の測定試料を得ることが可能となる。従って、電気泳動や質量分析、ＬＣ、分子間相互作用測定装置（ＳＰＲ－ＲＯＭ）などに供する高純度の測定試料を得るための前処理として、被検物質－第１ハイブリッド複合体形成工程から分離採取工程までを利用することも可能である。
【実施例】
【００７４】
〔実施例１〕
（１）第１核酸プローブの固相化
９６穴プレートＡ（ＩＷＡＫＩ製のＥＬＩＳＡプレート）の各ウェルに、０．２ｐｍｏｌ／μｌのストレプトアビジン（ｃｈｅｍｉｃｏｎ　ＳＡ１０１　Ｌｏｔ，２１０８０９２９）を５０μｌ添加し、３７℃で１．７時間保存して、ストレプトアビジンを結合させた（図３（ａ））。
【００７５】
プレートＡの各ウェルを、０．１％ＢＳＡ（シグマ製）を含むＴＢＳ（ＴＢＳ－Ｔ）で洗浄した後、各ウェルに、ＴＢＳ－ＴでＢＳＡ３％Ｓａｌｍｏｎ－ＤＮＡ（サケ精子ＤＮＡ）を０．１ｍｇ／ｍｌの濃度に希釈した溶液３００μｌを添加し、３７℃で３時間静置して、非特異吸着をブロックした。
【００７６】

第１核酸プローブとして、ｂｉｏ－Ｔｒａｎｓｆｅｒ用ＤＮＡ（ステムループを形成したＤＮＡでステム部分の１塩基にあたる３４番目のＡがビオチンで修飾されている：配列「５’ＡＧＡＡＣＡＧＣＧＴＡＴＡＡＴＣＡＴＴＡＧＣＣＣＧＣＣＣＧＧＣＣＡＡ＊ＡＡＡＧＧＣＣＧＧＧＣＧＧＧＣＴＡＡ　３’」（配列ＩＤ　Ｎｏ．２））を用いた。このｂｉｏ－Ｔｒａｎｓｆｅｒ用ＤＮＡ１ｐｍｏｌ／μｌの５０μｌをストレプトアビジンが固定された各ウェルに添加し、３７℃で５時間静置した。第１核酸プローブ中のビオチンがストレプトアビジンと結合することにより、第１核酸プローブが各ウェルの固相に固定された（図３（ｂ））。

【００７７】

（２）標識被検物質－第１ハイブリッド複合体の形成

核酸リガンドとして、第１核酸プローブの１本鎖にハイブリダイズ可能な配列を有し、３'端に認識結合部としてビオチンが結合したもの（「５’ＡＴＡＧＣＧＣＧＣＴＧＴＴＣＴＴＡＣＴＣＡＧＧＧＣＡＣＴＧＣＡＡＴＴＧＴＧＧＴＣＣＣＡＡＴＧＧＧＣＴＧＡＧＴＡ－ｂｉｏｔｉｎ　３’」（配列ＩＤ　Ｎｏ．３））を用いた。第１核酸プローブ（配列ＩＤ　Ｎｏ．２）の１～９番目までの塩基と、この核酸リガンド（配列ＩＤ　Ｎｏ．３）の７～１５番目の塩基が相補的関係にある。

【００７８】

各ウェルに、上記核酸リガンドを添加し、室温で１．７時間静置することにより、核酸リガンドと第１核酸プローブとをハイブリダイズさせた（図３（ｃ））。核酸リガンドの添加量は、ウェル５０μｌあたり、０．１×１０$^{-14}$ｍｏｌ、１×１０$^{-13}$ｍｏｌ、１×１０$^{-12}$ｍｏｌ、１×１０$^{-11}$ｍｏｌ、又は３．３×１０$^{-10}$ｍｏｌとした。

【００７９】

（３）被検物質の捕捉

次いで、被検物質（アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）で標識したストレプトアビジン）を添加し、核酸リガンドのビオチンでこれらを捕捉した（図３（ｄ））。尚、被検物質の捕捉は、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン（ＮＯＲＤＩＣ社製、ＳＡｖ－ＡＰ）の２０００倍希釈液と核酸リガンドを、１時間反応させることにより行なった。これにより、核酸リガンドのビオチンと被検物質たるストレプトアビジンが結合し、その結果、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体が形成された。

【００８０】

尚、被検物質の添加量は、各ウェルにおける核酸リガンドの濃度にかかわらず、核酸リガンドのすべてに被検物質が結合する量とした。

【００８１】

（４）解離工程

鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼとして、Ｔａｋａｒａ製のＲｅｖｅｒｓｅ　ＴｒａｎｓｃｒｉｏｔａｑｓｅＸＬ（ＡＭＶ）を用いた。

下記組成を含む反応液５０μｌを、各ウェルに１μｌ添加し、３７℃で１５時間反応させた。

【００８２】

Ｔｒｉｓ緩衝液（５０ｍＭのトリス塩酸、４０ｍＭのＫＣｌ、ｐＨ８．２）
塩化マグネシウム　６ｍＭ
ｄＮＴＰｓ　２５０μｌ
ＤＴＴ　２ｍＭ
ＡＭＶ　ＲＴａｓｅＸＬ（５Ｕ／μｌ）

【００８３】

鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼＡＭＶは、第１ハイブリッドの核酸プローブの３’端に結合し、第１核酸プローブを鋳型として伸長させた。このようにして鎖置換型反応が起り、標識被検物質－核酸リガンド複合体が解離した（図３（ｄ））。

【００８４】

（５）第２核酸プローブの第２固相への固定

第２固相として、オリゴｄＴ２０が固定化されたプレートＢ（ベリタス製のＧＥＮＥＰＬＡＴＥ２１ＧＰ０２－３ＲＮＡｔｕｒｅ）を用いた（図３（ｇ））。

【００８５】

プレートＢに、ｄＡ２０を有し且つ核酸リガンドとハイブリダイズ可能な塩基配列とを有する１本鎖の核酸を、１時間、室温で静置することによりハイブリダイズさせ、第２核酸プローブを固定化した（図３（ｅ））。

【００８６】

プレートＢを洗浄した後、ＢＳＡを３％含むＳａｌｍｏｎ　Ｓｐｅｒｕｍａ　ＤＮＡ（サケ精子ＤＮＡ）をＴＢＳ－Ｔで０．０１％に希釈した溶液を添加し、室温で１．５時間以上静置し、ブロッキングを行った。

【００８７】

（６）分離採取、移送工程

（４）で得られた標識被検物質－核酸リガンド複合体を含むプレートＡの各ウェルに収容された溶液を、マイクロピペットを用いて採取し、第２核酸プローブを固定化したプレートＢに移した（図３（ｅ））。上澄み液中には、（４）の解離反応で得られた被検物質－核酸リガンド複合体が含有されている。室温で１時間静置することにより、第２核酸プローブの一本鎖と複合体中の相補塩基配列部をハイブリダイズさせて、被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成させた（図３（ｆ））。

【００８８】

（７）検出測定工程

被検物質－第２ハイブリッド複合体が形成されている容器に、アルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）の基質であるｐ－メトキシフェニルフォスフェイト（ｐ－ＭＰＰ）１０ｍＭ（希釈液：０．５Ｍ、炭酸緩衝液）を１０μｌずつ添加して、ＡＬＰ反応を３７℃で３０分間行った。ＡＬＰ反応後、停止液（ＥＤＴＡ溶液：ｐＨ９）を１０μｌずつ添加した。

【００８９】

ＡＬＰ反応によりｐ－ＭＰＰがｐ－メトキシフェノール（ｐ－ＭＰ）に分解される。

ｐ－ＭＰ量はＡＬＰの分子数に応じて変化する。従って、ｐ－ＭＰ量を測定することによって、核酸リガンド－ストレプトアビジン－ＡＬＰ複合体の量を測定することができる。

【００９０】

ｐ－ＭＰ量は、図４に示すフロー式電気化学測定系を用いて測定した。結果を図５に示す。

【００９１】

〔アルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）標識の電気化学的手法での検出系〕

インジェクターに測定試料液（実施例１ではＡＬＰ反応を終了させた溶液）を入れる。試料液は、インジェクトバルブ（Ｒｅｏｄｉｎｅ製７７２５１）を開いて、ＯＤＳカラム（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ－ＯＤＳ－ＡＭ、ＡＭ３Ｃ７ＡＭ１２Ｓ０５－Ｌ５０２ＷＴ　Ｎｏ．０２７０４５８（Ｗ））、ショートカラム（ＹＭＣセミミクロガードカートリッジカラム２×１０、ＡＭ１２Ｓ０５－０１０２ＣＣ）を通って、電気化学検出部へ送液される。このときの溶出液としては、４５ｖ／ｖ％又５０ｖ／ｖ％メタノールを含む０．１Ｍのリン酸緩衝液を用いた。ショートカラムは、インジェクトバルブと電極検出部の間に配置されて、測定試料に混入するタンパク成分が電極検出部に到達することで電極表面の汚れを防止する。また、ショートカラムにより緩衝液由来のノイズ電流と検出成分の電流を検出器に到達する時間で分離する。

【００９２】

溶出液を収納したデガッサ（Ｖａｃｃｕｍ　Ｄｅｇａｓｓｅｒ　ＬＣ－２７Ａ）は溶出液の気泡を除去し、ポンプ（ＭＩＣＲＯ　ＬＣポンプＬＣ－１００）により、２５０μｌ／ｍｉｎで溶出液を電気化学検出部に送ることにより、インジェターに収容した試料液が電気化学検出部に送られる。

【００９３】

ＦＩＡ－ＥＣ－ＤＴ（Ｆｌｏｗ Ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｙｓ－Ｅｌｅｃｔｒｏｃｈｅｍｉｃａｌ－Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）流路への測定試料のサンプル量は２０μｌとなるように設定した。

【００９４】

ＦＩＡ－ＥＣ－ＤＴの電極検出部には３電極系を使用し、参照電極にはＡｇ／ＡｇＣｌ（ＢＡＳ　ＲＥ３Ｖ）、カウンター電極には流路一体型電極、作用電極にはグラッシーカーボン電極（ＢＡＳ００３４５６）を使用した。電気化学測定器には、ＢＡＳ社のＡＬＳ８３２ａを使用した。

【００９５】

各サンプルをフロー式電気化学測定系にインジェクトし、酸化電流値のピークを求めて、電気化学検出した。検出条件は、作用電極電位（酸化電位）が０．５５ＶｖｓＡｇ／ＡｇＣｌ、インジェクターから電極検出部までの出現時間は９０秒である。

【００９６】

〔比較例１〕

実施例１の操作（１）～（３）を同様に行ない、９６穴プレートに標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成させた。この状態で、ＡＬＰ反応を利用して、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体の量を測定した。

【００９７】

アルカリフォスファターゼの測定は、図４に示すフロー式電気化学的検出系を用いて測定した。結果を図５に示す。

【００９８】

図５の結果からバックグラウンドノイズを差し引いたシグナル値との関係を図６に示す。

【００９９】

図５，６中、「■」は実施例、「□」は比較例を示している。横軸は、使用した核酸リガンド（核酸リガンド－ストレプトアビジン複合体）量（ｍｏｌ）を示し、縦軸は、検出系で測定された電流値（Ａ）を示している。

【０１００】

〔評価結果〕

図５からわかるように、解離反応を行わなかったアッセイ系（比較例１）では、試料濃度が10^{-12}ｍｏｌまでは、試料濃度と測定値がほぼ相関関係を有するが、それ未満では、ほぼ測定値は変化しなかった。このことは、バックグラウンドノイズが大きいために、10^{-12}ｍｏｌ未満の微量試料を区別して測定できないことを意味する。

【０１０１】

一方、解離反応を行ったアッセイ系（実施例１）では、試料濃度と測定値がほぼ相関関係にあった。従って、解離反応を行なうアッセイ系では、10^{-14}ｍｏｌ、少なくとも10^{-13}ｍｏｌまで測定することはできる。このことは、従来のアッセイ系より検出レベルが１桁以上向上したことを意味する。

【０１０２】

〔実施例２〕

（１）第１核酸プローブの固相化

第１固相となる９６穴プレートＣ（CORNING社、DNA-BIND plate）の各ウェルに、５０ｍＭ　Na_2PO_4、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１００ｐｍｏｌ　アミノ化オリゴＤＮＡ（第１核酸プローブ：５’ＡＧＡＡＣＡＧＣＧＴＡＴＡＡＴＣＡＴＴＡＧＣＣＣＧＣＣＣＧＧＣＣＡＡ（NH_2－Ａ）ＡＡＧＧＣＣＧＧＧＣＧＧＧＣＴＡＡ　３’（配列ＩＤ　Ｎｏ．４、株式会社ベックス）を含む溶液（ｐＨ８．５）を１００μｌ添加し、３７℃で１時間静置して、第１核酸プローブ４１の３５番目のアデニンに付加したアミノ基がプレートＣに結合し、第１核酸プローブ４１が固定された（図７（ａ））。

【０１０３】

プレートＣの各ウェルを、２００μｌのＰＢＳで三回洗浄した後、各ウェルに５０ｍＭ

Na_2PO_4、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、３％　ＢＳＡを含むブロッキング用溶液を２００μｌ添加し、３７℃で３０分間静置して、非特異吸着をブロックした。

【０１０４】

（２）標識被検物質－第１ハイブリッド複合体の形成

標識被検物質－第１ハイブリッド複合体を形成する際のハイブリダイゼーション用バッファーとして、５×ＳＳＣ（２０×ＳＳＣ（ニッポンジーン社）を希釈して調製）、０．０５％　ＳＤＳ（１０％ＳＤＳ（ニッポンジーン社）を希釈して調製）及び０．００５％　ＢＳＡを超純水に溶解した溶液を用いた。

【０１０５】

被検物質として、Ｍ１３ｍｐ１８一本鎖ＤＮＡ（タカラバイオ社：以下、「Ｍ１３ＤＮＡ」という）を用いた。これを、サケ精子ＤＮＡ（ナカライテクス社）を１０μｇ／ｍｌの濃度で含むＴＥバッファ（ニッポンジーン社）に添加し、調製した溶液を測定用試料とした。

【０１０６】

核酸リガンド４４として、第１核酸プローブ４１及びＭ１３ＤＮＡの両者にハイブリダイズ可能な配列を持ち、３’末端をリン酸化したＤＮＡ（５’ＴＧＡＣＣＡＴＡＣＧＣＴＧＣＴＣＴＴＴＴＴＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ３’：配列ＩＤ　Ｎｏ．５、シグマジェノシス社）を用いた。

【０１０７】

標識物質としては、ビオチン化ＤＮＡ（第１物質４３ａ）とＨＲＰ標識ストレプトアビジン（第２物質４３ｂ）との組み合わせを用いた。第１物質４３ａであるビオチン化ＤＮＡは、核酸リガンド４４とハイブリダイズ可能で且つ被検物質であるＭ１３ＤＮＡともハイブリダイズ可能で、５’末端をビオチン化し、３’末端をリン酸化したＤＮＡ（５’ＴＴＴＴＧＴＣＧＡＣＴＣＴＡＧＡＧＧＡＴＣ３’：配列ＩＤ　Ｎｏ．６、シグマジェノシス社）である。

【０１０８】

第１核酸プローブ４１を固定化したプレートＣの各ウェルに、先ず上述のハイブリダイゼーション用バッファーを１００μｌずつ添加した。次にプレートＣの各ウェルに、測定用試料、核酸リガンド１０ｐｍｏｌ及び第１物質１０ｐｍｏｌを添加し、３７℃で１時間静置して、第１核酸プローブ４１と、核酸リガンド４４と、Ｍ１３ＤＮＡと、第１物質４３ａとを結合させた（図７（ｂ））。次に、プレートＣの各ウェルを洗浄バッファー（２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳを含む）２００μｌを用いて３回洗浄した。

【０１０９】

プレートＣの各ウェルにブロッキング溶液（３％ＢＳＡを含むＰＢＳ（ニッポンジーン社））を２００μｌ添加して、３７℃３０分間静置してプレートのブロッキングを行った。ブロッキング溶液をウェルから除去した後、このブロッキング溶液で１０００倍希釈した標識用第２物質としてのＨＲＰ標識ストレプトアビジン（1000Ｕ／ｍｌ、ロシュ社）溶液を各ウェルに１００μｌずつ添加し、３７℃で１時間静置し、第１物質４３ａと第２物質４３ｂとの間で、ビオチンとストレプトアビジンを結合させた。これにより、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体が形成された（図７（ｃ））。

【０１１０】

（３）解離工程

以下の組成を含む反応液１００μｌを各ウェルに添加し、３７℃１時間反応させた。

１×Thermopol バッファ（New England Labs社）
１ｍＭ　ｄＡＴＰｓ（インビトロジェン社）
１ｍＭ　ｄＧＴＰｓ（インビトロジェン社）
１ｍＭ　ｄＴＴＰｓ（インビトロジェン社）
１ｍＭ　ｄＣＴＰｓ（インビトロジェン社）
２．４Ｕ／ｍｌ　ＢｓｔＤＮＡポリメラーゼ（New England Labs社）

なお、ＢｓｔＤＮＡポリメラーゼは、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼである。

この反応によって、標識被検物質－第１ハイブリッド複合体からＨＲＰで標識された被検物質－核酸リガンド複合体を解離させ、反応液中に遊離させた。

【０１１１】

（４）第２核酸プローブの固定化

第２固相となる９６穴プレートＤ（CORNING社、DNA-BIND plate）の各ウェルに５０ｍＭ Na_2PO_4、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１００ｐｍｏｌ ３’末端アミノ化オリゴＤＮＡ（第２核酸プローブ：５’ ＡＧＡＧＣＡＧＣＧＴＡＴＧＧＴＣＡＴＴＴＴＴＴ３’：配列ＩＤ Ｎｏ．７、シグマジェノシス社）を含む溶液（ｐＨ８．５）を１００μｌ添加し、３７℃で１時間静置して、第２核酸プローブ５１を結合させた。その後、プレートＤに固定化されなかった第２核酸プローブを２００μｌのＰＢＳで３回洗浄することにより除去した。

【０１１２】

（５）移送工程

（３）で得られたプレートＣの反応液の全量をプレートＤの各ウェルに移動した。移動後、３７℃で１時間静置することにより、反応液中のＨＲＰで標識した被検物質－核酸リガンド複合体を第２核酸プローブ５１とハイブリダイズさせ、標識被検物質－第２ハイブリッド複合体を形成させた（図１０）。標識被検物質－第２ハイブリッド複合体の形成後、各ウェルを２００μｌのＰＢＳで３回洗浄した。

【０１１３】

（６）検出工程

（５）の工程を終了した後、各ウェルの洗浄用のＰＢＳを除去した。次に、各ウェルにＨＲＰの基質であるＴＭＢ（3,3',5,5'Tetramethylbensidine ）を含む基質溶液１００μｌを添加し、３７℃で反応させ、ＨＲＰの作用で基質であるＴＭＢを分解し、発色させた。１時間後、各ウェルに１００μｌの１Ｎ ＨＣｌ（和光純薬社）を加えて反応を停止させた。各ウェルの４５０ｎｍにおける吸光度を、プレートリーダ（TECAN社、Safire2）を用いて測定した。

【０１１４】

また、測定の際のバックグラウンド値を測定するため、被検物質を含まない試料（0 fmol）を用いて実施例２の（１）～（６）を実施し、吸光度測定を行った。測定結果を表１に示す。

【０１１５】

〔比較例２〕

実施例２と同様にして（１）～（２）の工程を実施した。その後、（３）～（５）の工程を行わず、（６）と同様にしてＨＲＰによる発色反応を行い、吸光度を測定した。また、測定の際のバックグラウンド値を測定するため、被検物質を含まない試料（0 fmol）を用いて実施例２の（１）～（２）を実施し、さらに（６）と同様にしてＨＲＰによる発色反応を行い、吸光度測定を行った。測定結果を表１に示す。

【０１１６】

【表１】

	０ｆｍｏｌ	１０ｆｍｏｌ	Ｓ／Ｎ比
実施例２	０．０１３	０．１６７４	１２．４
比較例２	０．１４０５	０．３４７	２．４７

【０１１７】

実施例２のバックグラウンド値（被検物質量が０ｆｍｏｌの場合の吸光度）は、比較例２のバックグラウンド値に比べ、約１０分の１の値を示した。また、実施例２のシグナル値（被検物質量が１０ｆｍｏｌの場合の吸光度）は、比較例２のシグナル値に比べ、約２

分の１の値を示した。シグナル値とバックグラウンド値（ノイズ）の比（Ｓ／Ｎ比）は、比較例２の２．４７に比べて実施例２は１２．４となり、約５倍の値を示した。

【０１１８】

実施例２及び比較例２より、第一固相から標識被検物質－核酸リガンド複合体を分離採取し、これを第二固相へ移送することによって被検物質の検出の際のバックグラウンド値が大幅に低下することが確認された。また、Ｓ／Ｎ比も大きく向上し、高精度で被検物質を検出することができた。従って、本発明の検出方法によると、バックグラウンドが少なく、試料に含まれる微量の被検物質を高精度で検出することができることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【０１１９】

本発明の測定方法は、微量の被検物質、特に試料中に目的物質が微量に含まれている場合の、目的物質の検出、定量に利用できる。

また、試料に含まれる特定物質について、質量分析、電気泳動、分子間相補作用測定を行なうに際して、高純度の測定試料を得るための前処理として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【０１２０】

【図１】本発明の測定方法の一実施態様を説明するための図である。

【図２】本発明の測定方法の一実施態様を説明するための図である。

【図３】実施例１の操作を説明するための図である。

【図４】アルカリホスファターゼの反応の測定に用いたシステムの構成を示すブロック図である。

【図５】供した試料濃度と測定電流値との関係の測定結果を示すグラフである。

【図６】図５の結果からバックグラウンドノイズを差し引いたグラフである。

【図７】実施例２の操作を説明するための図である。

【図８】実施例２の操作を説明するための図である。

【図９】従来の測定方法を説明するための図である。

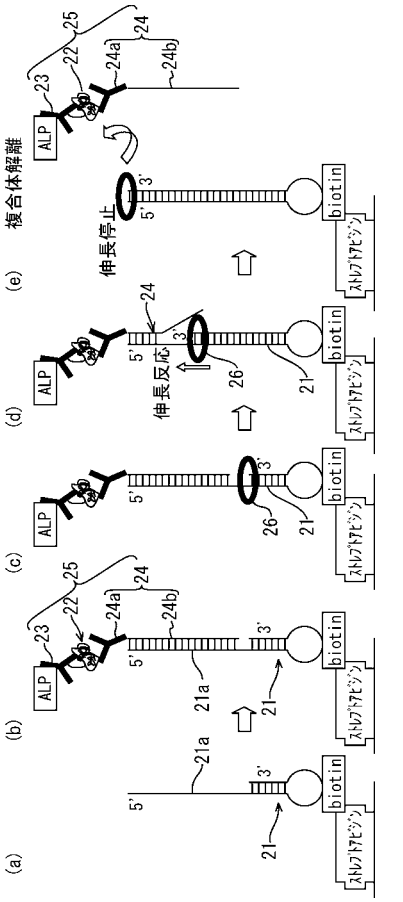
【図１０】従来の測定方法を説明するための図である。

【符号の説明】

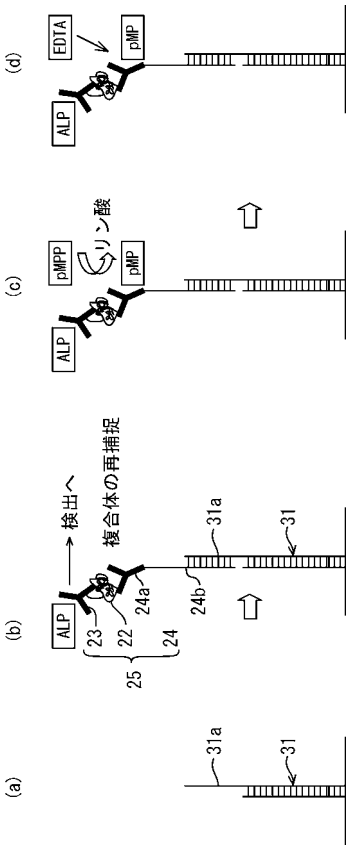
【０１２１】

２１　第１核酸プローブ
２２　被検物質
２３　二次抗体（第２認識結合物質）
２４　核酸リガンド
２４ａ　認識結合部
２４ｂ　相補塩基配列部
２５　標識被検物質－核酸リガンド複合体
２６　鎖置換型ポリメラーゼ
３１　第２核酸プローブ
４１　第１核酸プローブ
４３ａ　第１物質
４３ｂ　第２物質
４４　核酸リガンド
５１　第２核酸プローブ

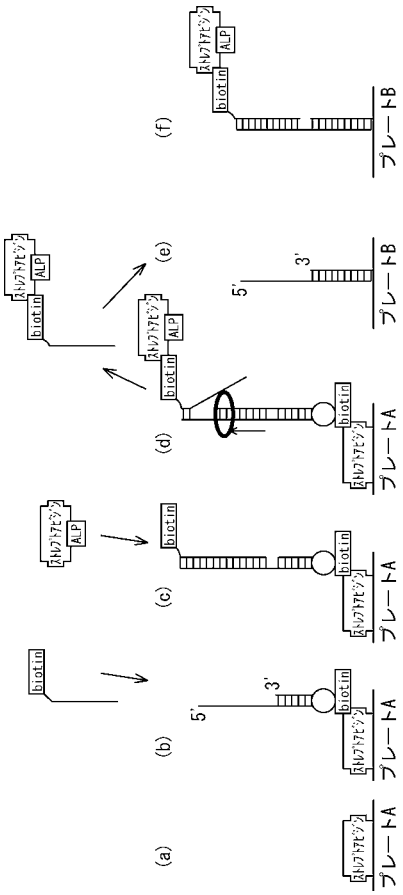
【図１】


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
複合体解離
伸長停止
伸長反応
ALP
biotin
ストレプトアビジン
プレートA
プレートB

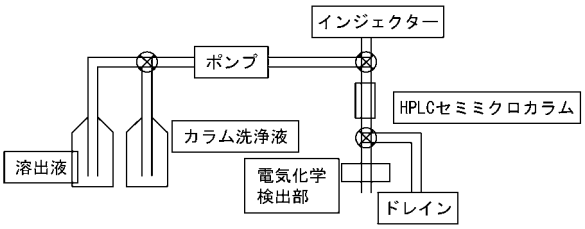
【図２】


(a)
(b)
(c)
(d)
検出へ
複合体の再捕捉
リン酸
ALP
EDTA
pMP
pMPP

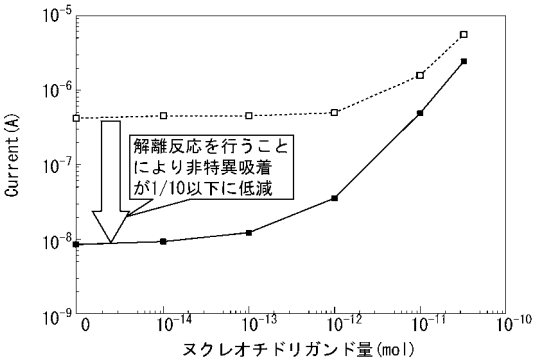
【図３】


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
biotin
ALP
ストレプトアビジン
プレートA
プレートB

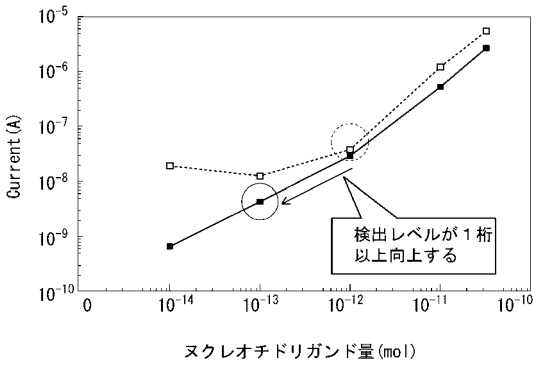
【図４】


インジェクター
ポンプ
HPLCセミミクロカラム
カラム洗浄液
溶出液
電気化学
検出部
ドレイン

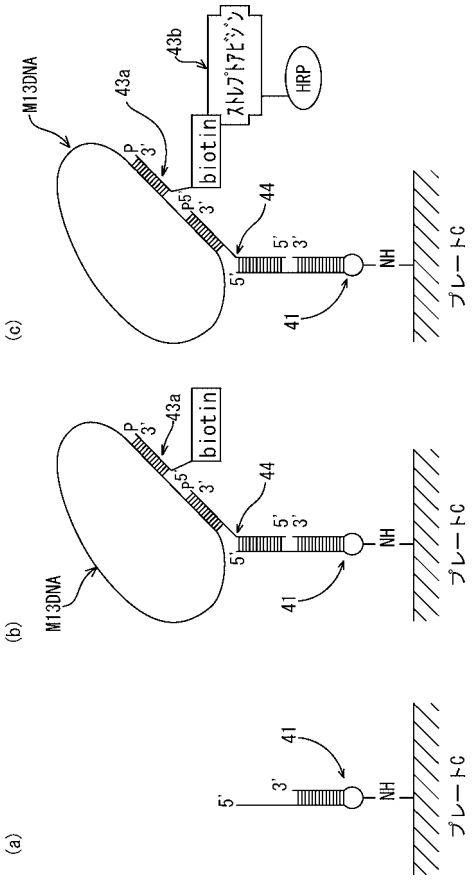
【図５】


Current(A)
解離反応を行うことにより非特異吸着が1/10以下に低減
ヌクレオチドリガンド量(mol)

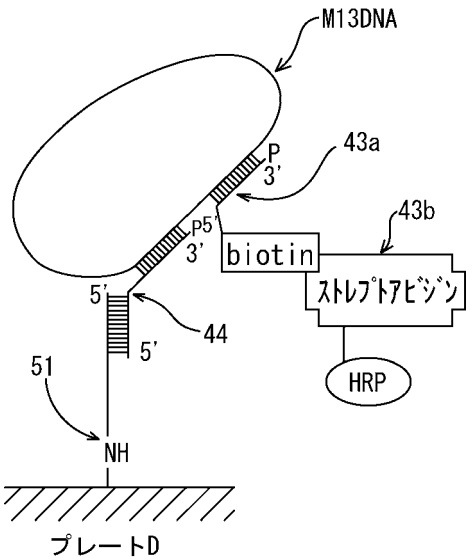
【図６】


Current (A)
検出レベルが１桁
以上向上する
ヌクレオチドリガンド量(mol)

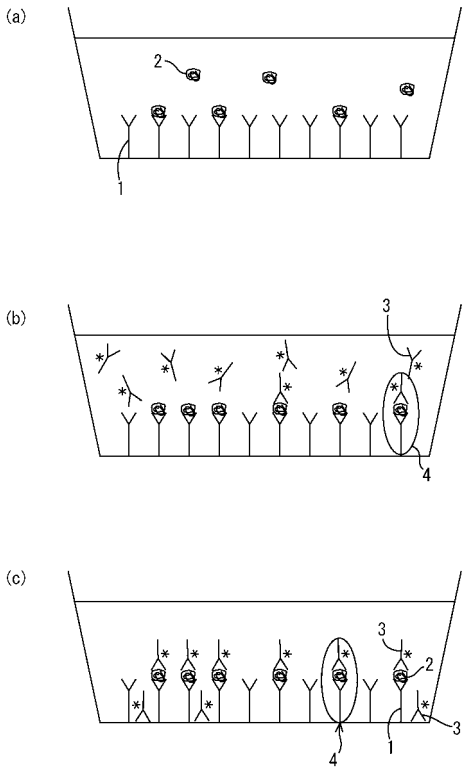
【図７】


M13DNA
43a
43b
ストレプトアビジン
HRP
biotin
P
3'
P5'
5'
44
41
NH
プレートC
(a)
(b)
(c)

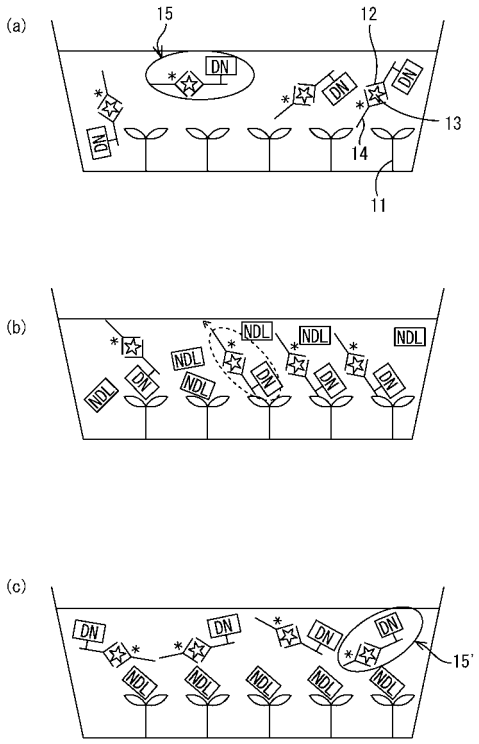
【図８】


M13DNA
43a
P
3'
P5'
3'
43b
biotin
ストレプトアビジン
5'
44
5'
51
HRP
NH
プレートD

【図９】


(a)
(b)
(c)
1
2
3
4

【図１０】



【配列表】

0004839051000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　山形　浩一
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号　シスメックス株式会社内

審査官　伊藤　佑一

(56)参考文献　米国特許出願公開第２００２／０１４６７４５（ＵＳ，Ａ１）
特開平１０－１８５９２２（ＪＰ，Ａ）
特表２００３－５０５０３６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　　１／６８
Ｃ１２Ｎ　１５／０９
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ
ＷＰＩ
ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）
ＣＡｐｌｕｓ（ＳＴＮ）