(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6850965号
(P6850965)
(45)発行日　令和3年3月31日(2021.3.31)　(24)登録日　令和3年3月11日(2021.3.11)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/115 (2010.01)　C12N 15/115 ZNAZ
C12Q 1/68 (2018.01)　C12Q 1/68

請求項の数 3　外国語出願　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願2017-26600(P2017-26600)
(22)出願日　平成29年2月16日(2017.2.16)
(65)公開番号　特開2018-130072(P2018-130072A)
(43)公開日　平成30年8月23日(2018.8.23)
審査請求日　令和1年12月16日(2019.12.16)

(73)特許権者　314012076
パナソニックＩＰマネジメント株式会社
大阪府大阪市中央区城見２丁目１番６１号
(74)代理人　100106116
弁理士　鎌田　健司
(74)代理人　100115554
弁理士　野村　幸一
(72)発明者　小野寺　真里
大阪府門真市大字門真１００６番地　パナソニック株式会社内

審査官　小田　浩代

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規なコカインアプタマー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
コカインアプタマーであって、
配列番号：０６、配列番号：０７、配列番号：０８、および配列番号：０９からなる群から選択されるＤＮＡ配列によって表される、コカインアプタマー。
【請求項２】
コカインにコカインアプタマーを特異的に結合させる方法であって、
コカインを、配列番号：０６、配列番号：０７、配列番号：０８、および配列番号：０９からなる群から選択されるＤＮＡ配列によって表されるコカインアプタマーに接触させる工程を具備する、方法。
【請求項３】
複合体であって、
コカイン、および
コカインアプタマーを具備し、
前記コカインアプタマーは、配列番号：０６、配列番号：０７、配列番号：０８、および配列番号：０９からなる群から選択されるＤＮＡ配列によって表される、複合体。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、新規なコカインアプタマーに関する。

【背景技術】

【０００２】

アプタマーとは、所定の分子に特異的に結合できる核酸分子を意味する。非特許文献１は、５’－ＨＳ－（CH_2）$_{11}$－ＡＧＡＣＡＡＧＧＡＡＡＡＴＣＣＴＴＣＡＡＴＧＡＡＧＴＧＧＧＴＣＧ－（CH_2）$_7$－ＭＢ－３’（配列番号：０４、「ＭＢ」はメチレンブルーを表す）により表されるアプタマーを開示している。非特許文献１に開示されたアプタマーは、コカインに特異的に結合する。

特許文献１は、一塩基変異体の検出方法を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００３】

【特許文献１】特開２００９－０３８９８３号公報

【特許文献２】米国特許第８６０３７５９号明細書

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】James S. Swensen et al, "Continuous, Real-Time Monitoring of cocaine in Undiluted Blood Serum via a Microfluidic, Electrochemical Aptamer-Based Sensor" Journal of American Chemical Society, 2009, 131, 4262-4266

【非特許文献２】Hidenobu Yaku et., al., "Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes", Chem. Commun., 2010, Vol. 46, pp. 5740-5742

【非特許文献３】Richard T. Wheelhouse et. al. "Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA", Journal of the American Chemical Society, 1998, 120, 3261 - 3262

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明の目的は、新規なコカインアプタマーを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明によるコカインアプタマーは、配列番号：０６、配列番号：０７、配列番号：０８、および配列番号：０９からなる群から選択されるＤＮＡ配列によって表される、コカインアプタマーである。

【発明の効果】

【０００７】

本発明は、新規なコカインアプタマーを提供する。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】図１は、実施形態によるキャピラリー電気泳動装置１００の模式図を示す。

【図２】図２は、本発明に含まれる工程（ａ）および工程（ｂ）の模式図を示す。

【図３】図３は、本発明に含まれる工程（ｃ）の模式図を示す。

【図４】図４は、本発明に含まれる工程（ｄ）の模式図を示す。

【図５】図５は、実施例１の第１ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【図６】図６は、実施例１の第６ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【図７】図７は、実施例１の第８ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【図８】図８は、実施例１の第１１ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【図９】図９は、実施例１の第１２ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【図１０】図１０は、確認手順１におけるエレクトロフェログラムを示す。

【図１１】図１１は、確認手順２におけるエレクトロフェログラムを示す。

【図１２】図１２は、確認手順３におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１３】図１３は、確認手順４におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１４】図１４は、比較例１におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１５】図１５は、参考例１において、観測吸収波長が２６０ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１６】図１６は、参考例１において、観測吸収波長が４２４ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１７】図１７は、比較例２において、観測吸収波長が２６０ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１８】図１８は、比較例２において、観測吸収波長が４２４ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図１９】図１９は、参考比較例１におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図２０】図２０は、比較例３におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図２１】図２１は、比較例４におけるエレクトロフェログラムを示す。
【図２２Ａ】図２２Ａは、一般的な電気泳動キャピラリーの内部における複合体６０１の挙動の模式図を示す。
【図２２Ｂ】図２２Ｂは、電気浸透流抑制キャピラリーの内部における複合体６０１の挙動の模式図を示す。
【図２３】図２３は、有機化合物が高分子化合物５０２ｙである場合における複合体の模式図を示す。
【図２４Ａ】図２４Ａは、窒素原子が有機化合物に含まれない場合における複合体６０１の挙動の模式図を示す。
【図２４Ｂ】図２４Ｂは、電気浸透流抑制キャピラリーの内部において、有機化合物と結合しない一本鎖ＤＮＡ５０４の挙動の模式図を示す。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
以下、図面を参照しながら本発明が詳細に説明される。まず、本発明者は、コカインのような低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマーを、ＤＮＡライブラリから電気泳動法により取得する方法を説明する。当該方法は、工程（ａ）～工程（ｄ）を具備する。次いで、取得されたコカインアプタマーのＤＮＡ配列がアプタマー候補として特定される。アプタマー候補の中から、実際にコカインに結合するアプタマーが、本発明によるコカインアプタマーとして特定される。
【００１０】
（工程（ａ））
図２に示されるように、まず、低分子窒素含有有機化合物がＤＮＡライブラリ５０１と混合される。図２において、参照符号５０２は低分子窒素含有有機化合物を表す。このようにして、低分子窒素含有有機化合物５０２およびＤＮＡライブラリ５０１の水溶液が調製される。ＤＮＡライブラリ５０１は、異なる配列を有する極めて多数の一本鎖ＤＮＡを含有している。一例を挙げると、ＤＮＡライブラリ５０１は、4^{30}の種類（およそ１．１５×10^{18}の種類）の一本鎖ＤＮＡを含有している。これらの極めて多数の一本鎖ＤＮＡのごく一部は、低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマーとして機能し得る。以下、参照符号５０３は、低分子窒素含有有機化合物５０２に特異的に結合するアプタマーを表す。また、本明細書において、用語「アプタマー５０３」とは、低分子窒素含有有機化合物５０２に特異的に結合するアプタマーを意味する。
【００１１】
アプタマー５０３として機能し得るそのような一本鎖ＤＮＡは、工程（ａ）において、低分子窒素含有有機化合物５０２に結合する。このようにして、低分子窒素含有有機化合物５０２およびアプタマー５０３を含む複合体６０１が形成される。アプタマー５０３として機能しない一本鎖ＤＮＡ５０４は、低分子窒素含有有機化合物５０２に結合しない。この説明から明らかなように、水溶液は、低分子窒素含有有機化合物５０２、アプタマー

５０３、および一本鎖ＤＮＡ５０４を含有する。
【００１２】
（工程（ｂ））
工程（ｂ）は、工程（ａ）の後に実施される。工程（ｂ）では、工程（ａ）において調製された水溶液が、電気浸透流抑制キャピラリーを用いる電気泳動を介して分画される。
【００１３】
図１は、実施形態によるキャピラリー電気泳動装置１００の模式図を示す。キャピラリー電気泳動装置１００は、電源１０５、電気浸透流抑制キャピラリー１０１、第１電極１０４、第２電極１０６、第１容器２０１、および第２容器２０２を具備している。
【００１４】
電気浸透流抑制キャピラリー１０１は電気泳動のためのキャピラリーである。電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内壁の表面には、高分子が半永久的に結合している。当該高分子がキャピラリーの内壁のシラノール基の活性を抑制し、試料がキャピラリーの内壁に吸着することを抑制する。このようにして、電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部では、電気浸透流が抑制される。いいかえれば、電気浸透流抑制キャピラリー１０１は、高分子被覆電気泳動キャピラリー、すなわち、高分子により被覆された内壁を有する電気泳動キャピラリーである。電気浸透流抑制キャピラリー１０１は、アジレント・テクノロジー株式会社より商品名「ＣＥＰコーティングキャピラリー」として商業的に入手可能である。
【００１５】
電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部は、電気泳動媒体によって充填されている。電気泳動媒体の例は、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌのような緩衝液である。
【００１６】
本発明は、電気浸透流抑制キャピラリー１０１を用いる電気泳動法に特徴づけられる。後述される実施例および比較例の比較から明らかなように、電気浸透流抑制キャピラリー１０１が用いられない場合には、低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマーが取得されない。
【００１７】
（第１容器１０２および第１電極１０４）
第１容器１０２は第１電解液２０１を含有している。電気浸透流抑制キャピラリー１０１の一端は、第１電解液２０１に浸漬されている。第１容器１０２は、第１電極１０４を具備している。第１電極１０４は第１電解液２０１に接している。第１電極１０４は電源１０５に電気的に接続されている。第１電極１０４の材料の例は、チタン、クロム、タングステン、銅、アルミニウム、白金、又はそれらの合金である。第１電極１０４は、平板の形状を有することが望ましい。第１容器１０２の材料は、電気泳動媒体および第１電解液２０１と反応しない限り、特に限定されない。第１容器１０２の材料の例は、ガラスまたは樹脂（例えば、ポリスチレンまたはポリメチルメタクリレート）である。
【００１８】
（第２容器１０３および第２電極１０６）
同様に、第２容器１０３は第２電解液２０２を含有している。電気浸透流抑制キャピラリー１０１の他端は、第２電解液２０２に浸漬されている。第２容器１０３は、第２電極１０６を具備している。第２電極１０６は第２電解液２０２に接している。第２電極１０６は電源１０５に電気的に接続されている。第２電極１０６の材料および形状の例は、第１電極１０４のそれらと同様である。第２容器１０３の材料の例もまた、第１容器１０２のそれと同様である。
【００１９】
（電気浸透流抑制キャピラリー１０１）
電気浸透流抑制キャピラリー１０１には電気泳動媒体が充填されている。電気泳動媒体の材料は、第１電解液２０１および第２電解液２０２の材料と同一であることが望ましい。一例として、１０ｍＭの濃度を有する炭酸ナトリウム水溶液が電気浸透流抑制キャピラ

リー１０１に充填されている場合には、第１電解液２０１および第２電解液２０２もまた、１０ｍＭの濃度を有する炭酸ナトリウム水溶液である。

【００２０】

電気浸透流抑制キャピラリー１０１に充填される電気泳動媒体の例は、緩衝液、水溶液、または純水である。緩衝液の例は、ホウ酸バッファー、リン酸バッファー、またはトリス塩酸バッファーである。水溶液は、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、塩化物イオン、または炭酸イオンを含有し得る。水溶液の他の例は、グリシンを含む水溶液である。

【００２１】

２種類以上の電気泳動媒体の混合物が電気浸透流抑制キャピラリー１０１に充填され得る。この場合、第１電解液２０１および第２電解液２０２もまた、同一の混合物から構成される。

【００２２】

（電源１０５）

電源１０５は、電気的には、第１電極１０４および第２電極１０６の間に配置されている。電源１０５を用いて、第１電極１０４および第２電極１０６の間に直流電圧が印加される。直流電圧は、２０００ボルト以上３００００ボルト以下の電圧を有し得る。

【００２３】

よく知られているように、遺伝子はマイナスの電荷を有している。低分子窒素含有有機化合物と結合した一本鎖ＤＮＡ（すなわち、低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマー）のマイナスの電荷は、低分子窒素含有有機化合物との結合のために、いくぶんか低下する。言い換えれば、複合体６０１は、低分子窒素含有有機化合物５０２に結合していない一本鎖ＤＮＡ５０４よりも、より小さなマイナスの電荷を有している。

【００２４】

図１に示されるように、負極側から水溶液は供給される。電気浸透流抑制キャピラリー１０１においては、負極に対する斥力および正極への引力により、一本鎖ＤＮＡ５０４が、複合体６０１よりも早く正極側に向けて前進する。なぜなら、一本鎖ＤＮＡ５０４は、複合体６０１よりも大きなマイナス電荷を有するからである。このようにして、複合体６０１を含有する画分が得られる。言い換えれば、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離される。後述される比較例から明らかなように、電気浸透流抑制キャピラリー１０１が用いられない場合、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離されない。この事項は、後に詳しく説明される。

【００２５】

（工程（ｃ））

工程（ｃ）は、工程（ｂ）の後に行われる。図３に示されるように、工程（ｃ）では、複合体６０１に含まれる一本鎖ＤＮＡ（すなわち、アプタマー５０３）がＰＣＲ法により増幅される。参照符号６５１は、ＰＣＲ法において用いられるプライマーを示す。このようにして増幅された一本鎖ＤＮＡは、アプタマー５０３として取得される。言うまでもないが、一本鎖ＤＮＡ（すなわち、アプタマー５０３）に相補的な配列から構成される相補鎖５０５もまた、ＰＣＲ法により増幅される。後述されるように、ＰＣＲ法においては、ビオチン修飾プライマーが用いられることが望ましい。

【００２６】

（工程（ｄ））

工程（ｄ）が、工程（ｃ）の後に行われることが望ましい。工程（ｄ）では、工程（ｃ）において取得されたアプタマー５０３が精製される。工程（ｃ）の終了時点では、アプタマー５０３だけでなく、他の様々な物質を含有する水溶液が得られている。水溶液に含有される他の様々な物質（すなわち、不純物）の例は、低分子窒素含有有機化合物５０２、工程（ｂ）で十分に分離（すなわち、除去）されなかった一本鎖ＤＮＡ５０４の一部、またはＰＣＲ法における未反応の物質である。ＰＣＲ法における未反応の物質の例は、未反応のプライマー（未反応のビオチン修飾プライマーを含む）、未反応のｄＮＴＰ、また

は未反応の酵素である。

【００２７】

本発明には、以下２つの精製方法が含まれる。

（ｉ）　磁性ビーズを用いる方法

（ｉｉ）　工程（ｃ）の終了時点で得られた水溶液をＤＮＡライブラリとして用いて、実質的に工程（ａ）～工程（ｃ）を繰り返す方法。

【００２８】

まず、磁性ビーズを用いる方法（ｉ）が、以下、説明される。

【００２９】

この方法（ｉ）では、工程（ｃ）において実施されるＰＣＲ法において、アプタマー５０３の一部に相補的な遺伝子からなるプライマー６５１が、ビオチンおよびストレプトアビジンからなる群から選択される一方により修飾されている。図４では、プライマー６５１はビオチンにより修飾されている。プライマー６５１の末端が修飾されていることが望ましい。従って、プライマー６５１を用いるＰＣＲ法によって、２つの遺伝子が増幅される。増幅された一方の遺伝子は、アプタマー５０３であり、かつ増幅された他方の遺伝子はアプタマー５０３に相補的な配列からなる相補鎖５０５である。相補鎖５０５は、ビオチンおよびストレプトアビジンからなる群から選択される一方により修飾されている。言うまでもないが、アプタマー５０３および相補鎖５０５はいずれも一本鎖ＤＮＡである。二本鎖ＤＮＡが、アプタマー５０３および相補鎖５０５から構成される。言い換えれば、アプタマー５０３および相補鎖５０５は互いにハイブリダイズして、二本鎖ＤＮＡを形成する。

【００３０】

（工程（ｄａ１））

次に、図４に示されるように、アプタマー５０３および相補鎖５０５は、磁性ビーズ５０６と混合される。複数の磁性ビーズが用いられることが望ましい。具体的には、アプタマー５０３および相補鎖５０５から構成される二本鎖ＤＮＡを含有する水溶液が、磁性ビーズ５０６を含有する水溶液と混合される。磁性ビーズ５０６は、ビオチンおよびストレプトアビジンからなる群から選択される他方を表面に有している。図４では、磁性ビーズ５０６は、ストレプトアビジンを表面に有している。よく知られているように、ビオチンおよびストレプトアビジンは互いに強固に結合する。従って、ビオチンに修飾された相補鎖５０５は、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を介して、磁性ビーズ５０６に結合する。アプタマー５０３は相補鎖５０５に相補的であるので、アプタマー５０３もまた、相補鎖５０５を介して、磁性ビーズ５０６に結合する。

【００３１】

（工程（ｄａ２）および工程（ｄａ３））

次に、磁性ビーズ５０６が磁気により引き寄せられる。具体的には磁石が用いられる。磁性ビーズ５０６が磁石に引き寄せられる。言うまでもないが、この時点では、図４に示されているように、アプタマー５０３およびその相補鎖５０５が互いにハイブリダイズした二本鎖ＤＮＡが磁性ビーズ５０６の表面に結合している。工程（ｄａ１）の終了時点で、アプタマー５０３は、相補鎖５０５を介して磁性ビーズに結合し得る。これに代えて、まず、相補鎖５０５がビオチンおよびストレプトアビジンの結合を介して磁性ビーズ５０６の表面に結合され、次いで相補鎖５０５にアプタマー５０３がハイブリダイズしてもよい。いずれにせよ、相補鎖５０５およびアプタマー５０３から構成される二本鎖ＤＮＡが、磁気により引き寄せられた磁性ビーズ５０６の表面に結合している。最後に、磁気ビーズ５０６が回収される。このようにして、磁性ビーズ５０６は不純物から分離される。

【００３２】

（工程（ｄａ４））

最後に、回収された磁気ビーズ５０６に結合している二本鎖ＤＮＡから、アプタマー５０３が分離される。具体的には、二本鎖ＤＮＡにアルカリ性水溶液が添加される。このようにして、アプタマー５０３が精製される。

【００３３】
次に、方法（ｉｉ）が説明される。方法（ｉｉ）では、工程（ｃ）の終了時点で得られた水溶液をＤＮＡライブラリとして用いて、実質的に工程（ａ）～工程（ｃ）が繰り返される。
【００３４】
具体的には、工程（ｃ）において取得されたアプタマー５０３が、工程（ａ）の場合と同様に、低分子窒素含有有機化合物５０２と混合され、水溶液を得る。次いで、工程（ｂ）の場合と同様に、当該水溶液が、電気浸透流抑制キャピラリー１０１を用いる電気泳動を介して分画され、アプタマー５０３および低分子窒素含有有機化合物５０２を含む複合体６０１を含有する画分を得る。最後に、工程（ｃ）の場合と同様に、当該画分に含有される複合体６０１に含まれるアプタマー５０３がＰＣＲ法により増幅される。工程（ｄ）もまた、繰り返され得る。
【００３５】
方法（ｉ）の後に、方法（ｉｉ）が行われ得る。さらに、方法（ｉｉ）の後に、再度、方法（ｉ）が行われ得る。言い換えれば、方法（ｉ）および方法（ｉｉ）は交互に繰り返され得る。このようにして、アプタマー５０３はさらに精製され得る。
【００３６】
このように、本発明は、異なる配列を有する極めて多数の遺伝子を含有しているＤＮＡライブラリから低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマーを抽出する方法でもある。
【００３７】
以下、本明細書において用いられる用語「低分子窒素含有有機化合物」が、説明される。
【００３８】
用語「低分子」とは、１０００以下の分子量を有する分子を意味する。従って、タンパク質、樹脂、ＤＮＡ、またはＲＮＡのような有機化合物は、たとえその中に窒素原子が含有されている場合であっても、用語「低分子窒素含有有機化合物」に包含されない。なぜなら、タンパク質、樹脂、ＤＮＡ、およびＲＮＡは、一般的に１０００を超える分子量を有する高分子であるからである。
【００３９】
用語「窒素含有」とは、文字通り、窒素原子を含有することを意味する。従って、化学式$C_xH_yO_z$（ここで、ｘ、ｙ、およびｚは、それぞれ独立して、自然数である）により表される化合物は、たとえそれが低分子有機化合物である場合であっても、用語「低分子窒素含有有機化合物」に包含されない。なぜなら、当該化合物は、明らかに、窒素原子を含有しないからである。
【００４０】
用語「有機化合物」とは、文字通り、炭素を含む化合物を意味する。従って、窒化ガリウムのような無機化合物は、たとえそれが低分子化合物であり、かつ窒素原子を含有している場合であっても、用語「低分子窒素含有有機化合物」に包含されない。言うまでもないが、慣習上、無機化合物は、化学式CO_2により表される二酸化炭素、化学式ＣＯにより表される一酸化炭素、化学式ＨＣＮにより表されるシアン化水素、化学式CS_2により表される二硫化炭素、化学式CCl_4により表される四塩化炭素、および化学式$M_x(CO_3)_y$（ここで、Ｍは金属原子である）により表される炭酸塩を含む。
【００４１】
低分子窒素含有有機化合物の例は、コカイン、フタロシアニン、ポルフィリン、またはその誘導体である。
【００４２】
理論によって制限されることを意図するわけではないが、本発明者は、本発明の理論を以下のように考えている。
【００４３】

低分子窒素含有有機化合物５０２に含有される窒素原子は、水溶液に含まれるプロトンとの配位結合により、N^+として水溶液中に存在する。これに代えて、低分子窒素含有有機化合物５０２が第４級アンモニウム塩またはその誘導体である場合、低分子窒素含有有機化合物５０２に含有される窒素原子は、水溶液中ではN^+として存在する。いずれにせよ、低分子窒素含有有機化合物５０２は、水溶液中では、低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃとして存在する。

【００４４】

低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃに、アプタマー５０３が特異的に結合する。このようにして、複合体６０１が形成される。よく知られているように、その内部に含まれる多数のリン酸基のため、ＤＮＡは負電荷５０３ｃを有している。従って、ＤＮＡの１種であるアプタマー５０３もまた、負に帯電している。

【００４５】

図２２Ａおよび図２２Ｂに示されるように、分子量を考慮すると、アプタマー５０３の方が低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃよりもずっと大きい。従って、低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃと結合したアプタマー５０３の一部分５０３ａでは、正および負の電荷が互いに打ち消し合う。しかし、低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃと結合していないアプタマー５０３の他の部分５０３ｂは、負に帯電したままである。

【００４６】

電気泳動に一般的に用いられるキャピラリーは、その内部において、化学式Ｓｉ－ＯＨにより表される多数のシラノール基を有する。シラノール基のＯＨ基は負の電荷を有するため、斥力がアプタマーのようなＤＮＡおよびシラノール基の間に生じる。図２２Ａに示されるように、この斥力は、アプタマーを含むＤＮＡがアノード側に流れることを促進する。

【００４７】

一方、本発明では、電気浸透流抑制キャピラリーが用いられる。図２２Ｂに示されるように、電気浸透流抑制キャピラリーの内部においては、化学式Ｓｉ－ＯＨにより表されるシラノール基は、トリメチルシランまたは高分子のような保護基により保護されている。この保護基のため、上記の斥力は生じない。言い換えれば、本発明では、このような斥力は発生しない。

【００４８】

この斥力は、電気泳動に大きく影響を与えると本発明者は考えている。複合体６０１は、一本鎖ＤＮＡ５０４（すなわち、低分子窒素含有有機化合物５０２に結合していない一本鎖ＤＮＡ５０４）よりもアノード側に向けて遅く移動する。なぜなら、複合体６０１に含まれるアプタマー５０３の一部の負の電荷は、低分子窒素含有有機カチオン５０２ｃによって打ち消されているため、アノードに向けて複合体６０１に加えられる引力が、アノードに向けて一本鎖ＤＮＡ５０４に加えられる引力よりも小さいからである。言い換えれば、複合体６０１および一本鎖ＤＮＡ５０４との間には、アノード側への引力の差がある。しかし、斥力がこの引力の差を十分に補償する。従って、電気泳動に一般的に用いられるキャピラリーの内部に含まれる複合体６０１および一本鎖ＤＮＡ５０４の電気泳動速度の差は小さい。従って、電気泳動に一般的に用いられるキャピラリーが用いられる場合には、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離されない。

【００４９】

一方、本発明では、電気浸透流抑制キャピラリーが用いられるので、斥力が発生しない。そのため、引力の差は補償されない。従って、電気浸透流抑制キャピラリーの内部に含まれる複合体６０１および一本鎖ＤＮＡ５０４の電気泳動速度の差は大きい。従って、本発明では、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離される。

【００５０】

低分子窒素含有有機化合物５０２ではなく、高分子化合物５０２ｙが用いられた場合、図２３に示されるように、分子量を考慮すると、高分子化合物５０２ｙの方が、アプタマー５０３よりもずっと大きい。従って、アプタマー５０３は、高分子化合物５０２ｙの電

気泳動にほとんど影響を与えない。このため、低分子窒素含有有機化合物５０２に代えて高分子化合物５０２ｙに本発明を適用することは意味がない。言い換えれば、アプタマー５０３が表面に吸着した高分子化合物５０２ｙを、電気泳動に一般的に用いられるキャピラリーを用いて一本鎖ＤＮＡ５０４から分離することは容易である。後述される比較例４を参照せよ。

【００５１】

有機化合物が窒素原子を含有しない場合、図２４Ａおよび図２４Ｂに示されるように、複合体６０１に含まれるアプタマー５０３の負の電荷は、有機カチオン５０２ｘによって打ち消されないため、複合体６０１に加えられる引力および斥力は、一本鎖ＤＮＡ５０４に対するそれらと同じである。従って、有機化合物が窒素を含有しない場合、後述される比較例３において実証されているように、電気浸透流抑制キャピラリーを用いたとしても、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離されない。

【００５２】

アンモニアのような窒素含有無機物に結合するアプタマーは、おそらく存在しないであろう。上記の工程（ａ）～工程（ｄ）を具備する方法により取得されたアプタマー５０３のＤＮＡ配列がアプタマー候補として特定される。本発明では、有機化合物はコカインである。アプタマー候補の中から、実際にコカインに結合するアプタマーが、本発明によるコカインアプタマーとして特定される。

【００５３】

（実施例）

以下の実施例を参照しながら、本発明がさらにより詳細に説明される。

【００５４】

（実験例１）

実験例１では、低分子窒素含有有機化合物５０２としてコカインが用いられた。コカインは、化学式$C_{17}H_{21}NO_4$で表される低分子窒素含有有機化合物である。コカインの分子量は、およそ３０３である。実験例１は、実施例１（確認手順１～４を含む）および比較例１から構成される。コカインは、コカイン塩酸塩として購入された。

（実施例１）

以下の表１は、実施例１において用いられた電気浸透流抑制キャピラリー１０１の詳細を示す。以下の表２は、実施例１において用いられた試薬を示す。

【００５５】

【表１】

商品名	ＣＥＰコーティングキャピラリー（Agilent Technologies 社製）
内径	７５マイクロメートル
全長	４８．５センチメートル
有効長	３８センチメートル
材質	溶融石英

【００５６】

【表２】

電気泳動媒体	２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）
電気泳動物質	２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５） １０μＭ　ＤＮＡライブラリ 配列：5’-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-(N30)-CCTATGCGTGCTACCGTGAA-3’（配列番号：０１） N30：３０塩基のランダム配列（A:T:G:C=25%:25%:25%:25%） １０ｍＭ　コカイン ＤＮＡライブラリは、つくばオリゴサービス株式会社より入手した。
第１電解液	２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）
第２電解液	２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）

【００５７】

（電気泳動）

まず、電気泳動媒体が、１３８ｋＰａの圧力下で２０分間、電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部に供給された。このようにして、電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部が洗浄された。次いで、同様に、電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部が、電気泳動媒体により充填された。

【００５８】

ＤＮＡライブラリおよびコカインがＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファーに添加され、表２に示される電気泳動物質が調製された（図２を参照せよ）。この電気泳動物質が、電気泳動媒体によって充填された電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部に、３．４５ｋＰａの陰圧下で７．８秒間の間、供給された。このようにして、電気浸透流抑制キャピラリー１０１の内部に電気泳動物質が充填された。

【００５９】

第１容器１０２の内部に含まれている第１電解液２０１に第１電極１０４を接触させた。同様に、第２容器１０３の内部に含まれている第２電解液２０２に第２電極１０６を接触させた。

【００６０】

電源１０５を用いて、第１電極１０４および第２電極１０６の間に１２ｋＶの直流電圧が印加された（図１および図２を参照せよ）。第１電極１０４が負極として用いられた。第２電極１０６が正極として用いられた。１分ごとに第２電解液２０２を含有する第２容器１０３が他の第２容器１０３に速やかに交換されながら、このような電気泳動を介して電気泳動物質（すなわち、水溶液）が分画された。このようにして、複数の画分が得られた。図５は、この電気泳動において得られたエレクトロフェログラムを示す。エレクトロフェログラムにおける観測吸収波長は２３４ナノメートルであった。コカインは、２３４ナノメートルに吸収極大を有する。

【００６１】

図５に示されるように、エレクトロフェログラムは２つのピークを有する。一方のピーク（以下、「第１ピーク」という）は、８分～９分の間に現れている。他方のピーク（以下、「第２ピーク」という）は１０分～１１分の間に現れている。コカイン５０２と結合した一本鎖ＤＮＡ（すなわち、コカインに特異的に結合するアプタマー５０３）のマイナスの電荷は、コカイン５０２との結合のために、いくぶんか低下するため、本発明者は、第２ピークの画分が、コカイン５０２およびコカインに特異的に結合するアプタマー５０３を含む複合体６０１を含有すると考えた。

【００６２】

（ＰＣＲ）

次に、以下の表３に示される混合液（１ミリリットル）が調製された。混合液は、第２ピークの画分（１００マイクロリットル）を含有することに留意せよ。配列番号：０２および配列番号：０３により表されるプライマーは、つくばオリゴサービス株式会社より入

手した。
【００６３】
【表３】

緩衝液	以下の物質を含有する緩衝液 ２ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．０） １０ｍＭ　ＫＣｌ ０．０１ｍＭ　エチレンジアミン四酢酸 ０．１ｍＭ　ジチオスレイトール ０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０ ０．０５％　ポリ（オキシエチレン）ノニルフェニルエーテル（ナカライテスク株式会社より、商品名「Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０」として入手）、および ５％　グリセロール
ビオチン修飾リバースプライマー	5’-（ビオチン）-TTCACGGTAGCACGCATAGG-3’（１μＭ） （配列番号：０２）
フォワードプライマー	5’ -AGCAGCACAGAGGTCAGATG -3’（１μＭ） （配列番号：０３）
鋳型ＤＮＡ溶液	第２ピークの画分（１００マイクロリットル）
ｄＮＴＰ	０．４ｍＭ　ｄＮＴＰ（タカラバイオ株式会社より入手）
酵素	１００倍希釈されたＴａｋａｒａ　ＬＡ　Ｔａｑ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｖｅｒｓｉｏｎ（タカラバイオ株式会社より入手）

【００６４】
次に、混合液は、以下のＰＣＲ法に供された。
まず、混合液は、摂氏９４度で５分間、加熱された。
次いで、混合液の温度は、以下のサイクルに従って変化された。
摂氏９４度で１分間、
摂氏５５度で１分間、そして
摂氏７２度で１分間。
このサイクルが４０回繰り返された。
最後に、混合液は、摂氏７２度で１分間静置された後、摂氏４度まで冷却され、そして保存された。
【００６５】
このようにして、二本鎖ＤＮＡが、ＰＣＲ産物として得られた（図３参照）。図３に示されるように、このようにして得られた二本鎖ＤＮＡは、第２ピークの画分に含有されていたコカインに特異的に結合するアプタマー５０３およびビオチンによって修飾された５’末端を有するその相補鎖５０５から構成されていた。
【００６６】
（コカインに特異的に結合するアプタマーの精製）
次に、ストレプトアビジンによって表面が修飾された磁性ビーズ５０６の分散液（１ミリリットル、ThermoFisher scientific株式会社から入手、商品名：Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ－２８０　Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ）がマイクロチューブに供給された。磁性ビーズ５０６は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）および２Ｍ　ＫＣｌを含有する緩衝液を用いて３回、洗浄された。具体的には、マイクロチューブの底に磁石が近づけられた。２分間、磁石およびマイクロチューブは静置された。続いて、上清が除去された。これがもう一度、繰り返された。
【００６７】
次いで、洗浄された磁性ビーズ５０６は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）および２Ｍ　ＫＣｌを含有する緩衝液（１ミリリットル）に分散された。さらに、ＰＣＲ

産物を含有する混合液（１ミリリットル）が緩衝液に添加された。混合液は、摂氏２５度で１３００ｒｐｍで３０分間、撹拌された。混合液中では、図４に示されるビオチン‐ストレプトアビジン結合を介して、二本鎖ＤＮＡが磁性ビーズ５０６の表面に結合した。

【００６８】

再度、磁石を用いて磁性ビーズ５０６が集められた。次いで、上清が除去された。続いて、磁性ビーズ５０６は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）および１Ｍ　ＮａＣｌを含有する緩衝液を用いて、上記と同様に、３回、洗浄された。

【００６９】

洗浄された磁性ビーズ５０６に、水酸化ナトリウム水溶液（０．１５Ｍ、１ミリリットル）が添加され、混合液を得た。混合液は、摂氏２５度で１３００ｒｐｍの３０分間、撹拌された。このようにして、二本鎖ＤＮＡに含まれるコカインに特異的に結合するアプタマー５０３が、磁性ビーズ５０６から分離された（図４参照）。

【００７０】

最後に、磁石を用いて磁性ビーズ５０６が集められた。２分間、磁石および磁性ビーズは静置された。コカインに特異的に結合するアプタマー５０３を含有する上清が回収された。言い換えれば、コカインに特異的に結合するアプタマー５０３は、磁性ビーズ５０６および相補鎖５０５から分離された。このようにして、コカインに特異的に結合するアプタマー５０３が精製された。

【００７１】

（コカインに特異的に結合するアプタマーの乾燥および濃縮）

コカインに特異的に結合するアプタマー５０３を含有する上清が、脱塩カラム（GE Healthcare社製）を用いて脱塩された。脱塩のために用いられた溶出液はｍｉｌｌｉＱ水（すなわち、超純水）であった。脱塩された上清は、マイクロチューブに供給された。次いで、上清は真空下で乾燥された。このようにして、マイクロチューブに含有されているｍｉｌｌｉＱ水は蒸発し、コカインに特異的に結合するアプタマー５０３を濃縮した。最後に、濃縮されたコカインに特異的に結合するアプタマー５０３に、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（２０ｍＭ、ｐＨ７．５）およびコカイン（１０ｍＭ）が添加され、水溶液（５０マイクロリットル）を第１ラウンド産物として得た。第１ラウンドは、電気泳動、ＰＣＲ、コカインに特異的に結合するアプタマーの精製、およびコカインに特異的に結合するアプタマーの乾燥および濃縮の４つのプロセスを含む。

【００７２】

（さらなる精製）

第１ラウンド産物が電気泳動物質として用いられ、第１ラウンドと同様の４つのプロセスが第２ラウンドとして繰り返され、第２ラウンド産物を得た。これが繰り返された。その結果、第１ラウンド産物～第１２ラウンド産物が得られた。このようにして、コカインに特異的に結合するアプタマー５０３はさらに精製された。図６は、第６ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。図７は、第８ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。図８は、第１１ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。図９は、第１２ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【００７３】

（確認手順１）

確認手順１では、第１２ラウンド産物が、コカイン（濃度：１０ｍＭ）と混合され、混合液を得た。再度、電気浸透流抑制キャピラリーを用いる当該混合液の電気泳動が行われた。図１０は、確認手順１におけるエレクトロフェログラムを示す。

【００７４】

（確認手順２）

コカインの濃度が５ｍＭであったこと以外は、確認手順１と同様の電気泳動が行われた。図１１は、確認手順２におけるエレクトロフェログラムを示す。

【００７５】

（確認手順３）

コカインの濃度が１ｍＭであったこと以外は、確認手順１と同様の電気泳動が行われた。図１２は、確認手順３におけるエレクトロフェログラムを示す。

【００７６】

（確認手順４）

コカインの濃度が０ｍＭであった（すなわち、コカインは添加されなかった）こと以外は、確認手順１と同様の電気泳動が行われた。図１３は、確認手順４におけるエレクトロフェログラムを示す。

【００７７】

図１０～図１２を図１３と比較すれば明らかなように、図１０～図１２においては１０分の付近にピークが観察される一方、図１３では１０分の付近にピークが観察されない。これは、第１２ラウンド産物に含有されるアプタマーが、コカインに結合していることを意味している。

【００７８】

（比較例１）

比較例１では、電気浸透流抑制キャピラリー１０１（すなわち、ＣＥＰコーティングキャピラリー）に代えて、標準的なフューズドシリカキャピラリー（BECKMAN COULTER社製）が用いられたこと以外は、実施例１と同様の実験が行われた。このフューズドシリカキャピラリーにおいては、電気浸透流が発生する。以下の表４は、このフューズドシリカキャピラリーの詳細を示す。

【００７９】

【表４】

名称	フューズドシリカキャピラリー（BECKMAN COULTER 社製）
内径	７５マイクロメートル
全長	４８．５センチメートル
有効長	３８センチメートル
材質	溶融石英

【００８０】

図１４は、比較例１におけるエレクトロフェログラムを示す。図１４から明らかなように、１つのピークしか観察されなかった。これは、複合体６０１が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離できなかったことを意味する。

【００８１】

（参考例１）

参考例１では、表２に示される試薬に代えて、以下の表５に示される試薬が用いられたこと以外は、実施例１と同様の実験が行われた。参考例１では、低分子窒素含有有機化合物５０２として、およそ７４０の分子量を有する銅ポルフィリンが用いられた。

【００８２】

【表５】

電気泳動媒体	１００ｍＭ　$Na_2B_4O_7$・$10H_2O$（ｐＨ　９．３）
電気泳動物質	５０ｍＭ ＭＥＳ－ＬｉＯＨ（ｐＨ７．０） １００ｍＭ ＫＣｌ １０μＭ　Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４（分子量：７４０．３６）結合アプタマー 配列：5’-GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG -3’（配列番号：０５） １０μＭ　Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４ Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４は、Ｆｒｏｎｔｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社より入手した（品番：４１３９７）。 用語「Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４」とは、Cu(II) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine tetrachloride (CAS番号:79407-87-7)を意味する。 アプタマーは、つくばオリゴサービス株式会社より入手した。
第１電解液	１００ｍＭ　$Na_2B_4O_7$・$10H_2O$（ｐＨ　９．３）
第２電解液	１００ｍＭ　$Na_2B_4O_7$・$10H_2O$（ｐＨ　９．３）

【００８３】
非特許文献２および非特許文献３によれば、ポルフィリン骨格「ＴＭｐｙＰ４」は、配列番号：０５によって表されるＤＮＡ配列に含まれる「ＧＧＧ」および「ＴＴＡ」の繰り返し配列から形成されるグアニン四重鎖に結合する。

【００８４】
図１５は、参考例１におけるエレクトロフェログラムを示す。図１５は、図５に対応する。参考例１において、エレクトロフェログラムにおける観測吸収波長は、２６０ナノメートルであった。すなわち、図１５は、参考例１の第１ラウンドにおけるエレクトロフェログラムを示す。

【００８５】
図１６は、参考例１において、観測吸収波長が４２４ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４は、４２４ナノメートルに吸収極大を有する。

【００８６】
（比較例２）
比較例２では、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４が用いられなかったこと以外は、参考例１と同様の実験が行われた。図１７は、比較例２において、観測吸収波長が２６０ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。図１８は、比較例２において、観測吸収波長が４２４ナノメートルである場合におけるエレクトロフェログラムを示す。

【００８７】
図１７から明らかなように、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４が用いられなかった場合には、２６０ナノメートルの観測吸収波長において１つのピークのみが観察された。このピーク、すなわち、およそ７分４０秒の時間に位置する第１ピークは、配列番号：０５により表されるＤＮＡアプタマーに対応する。

【００８８】
図１８から明らかなように、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４が用いられなかった場合には、４２４ナノメートルの観測吸収波長においては、ピークは観測されなかった。

【００８９】
一方、図１５から明らかなように、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４が用いられた場合には、２６０ナノメートルの観測吸収波長において、２つのピークが観察された。

【００９０】
図１６から明らかなように、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４が用いられた場合には、４２４ナノメートルの観測吸収波長において、ピークが観測された。Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４およびアプタ

マーの複合体は負に帯電しているので、正に帯電している第２電極１０６および複合体の間では引力が生じる。

【００９１】

図１５に含まれる第２ピークの位置は、８分２０秒の時間で、図１６に含まれるピークの位置と一致する。従って、図１５に含まれる第２ピークは、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４およびアプタマーの複合体に対応する。

【００９２】

上記のように、図１５に含まれる第１ピークおよび第２ピークは、それぞれ、ＤＮＡアプタマーおよび複合体（すなわち、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４およびアプタマーの複合体）に対応している。従って、参考例１では、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４およびアプタマーの複合体が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離された。

【００９３】

（参考比較例１）

参考比較例１では、電気浸透流抑制キャピラリー１０１（すなわち、ＣＥＰコーティングキャピラリー）に代えて、標準的なフューズドシリカキャピラリー（BECKMAN COULTER社製、詳細は表４を参照せよ）が用いられたこと以外は、参考例１と同様の実験が行われた。このフューズドシリカキャピラリーにおいては、電気浸透流が発生する。

【００９４】

図１９は、参考比較例１におけるエレクトロフェログラムを示す。図１９から明らかなように、１つのピークしか観察されなかった。これは、Ｃｕ－ＴＭｐｙＰ４およびアプタマーの複合体が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離できなかったことを意味する。

【００９５】

（比較例３）

比較例３では、コカインに代えて、化学式$C_{12}H_8O_2$により表されるDibenzo[b,e][1,4]dioxin（CAS番号：262-12-4）を用いたこと以外は、実施例１と同様の実験が行われた。図２０は、比較例３におけるエレクトロフェログラムを示す。図２０から明らかなように、１つのピークしか観察されなかった。これは、Dibenzo[b,e][1,4]dioxinおよびアプタマーの複合体が一本鎖ＤＮＡ５０４から分離できなかったことを意味する。

【００９６】

（比較例４）

比較例４では、以下の事項（Ｉ）および（ＩＩ）を除き、実施例１と同様の実験が行われた。

（Ｉ）　コカインに代えて、ヒト血漿由来のトロンビン（濃度：１０μＭ、分子量：およそ３７．４キロダルトン、シグマアルドリッチ社より購入）が用いられたこと、および

（ＩＩ）　電気浸透流抑制キャピラリー１０１（すなわち、ＣＥＰコーティングキャピラリー）に代えて、標準的なフューズドシリカキャピラリー（BECKMAN COULTER社製、詳細は表４を参照せよ）が用いられたこと

【００９７】

図２１は、比較例４におけるエレクトロフェログラムを示す。図２１から明らかなように、２つのピークが観察された。これは、標準的なフューズドシリカキャピラリー（BECKMAN COULTER社製、詳細は表４を参照せよ）を用いて、トロンビンのような高分子化合物およびアプタマーの複合体は、一本鎖ＤＮＡ５０４から容易に分離できることを意味している。

【００９８】

（第１２ラウンド産物に含まれるＤＮＡの特定）

以下の手順に従って、第１２ラウンド産物に含まれるＤＮＡが、コカインに結合し得るＤＮＡとして特定された。

【００９９】

まず、ＰＣＲ法により、第１２ラウンド産物が増幅された。以下の表６に示されるように、当該ＰＣＲ法は、第１２ラウンド産物が鋳型ＤＮＡとして用いられ、かつ非標識リバ

ースプライマー（つくばオリゴサービス株式会社から入手）が用いられたこと以外は、実施例１において実施されたＰＣＲ法と同一であった。表３も参照せよ。

【０１００】

【表６】

リバース プライマー	5’-TTCACGGTAGCACGCATAGG-3’（１μＭ）（配列番号：０２） このリバースプライマーはビオチンに修飾されていなかった。
フォワード プライマー	5’ -AGCAGCACAGAGGTCAGATG -3’（１μＭ）（配列番号：０３）
鋳型ＤＮＡ溶液	第１２ラウンド産物（１００マイクロリットル）

【０１０１】

得られたＰＣＲ産物が、発現キット（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社より購入、商品名：ｐＥＦ６／Ｖ５－Ｈｉｓ ＴＯＰＯ ＴＡ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｋｉｔ）に含まれるベクターにライゲーションされ、プラスミドを得た。いうまでもないが、発現キットに添付されている説明書に従って、ＰＣＲ産物はライゲーションされた。

【０１０２】

このようにして得られたプラスミドは、コンピテントセル（株式会社ニッポンジーンより入手、商品名：ＥＣＯＳ Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ Ｅ．Ｃｏｌｉ ＤＨ５ α）を用いてクローニングされた。いうまでもないが、コンピテントセルに添付されている説明書に従って、プラスミドはクローニングされた。

【０１０３】

このようにしてクローニングされたＤＮＡが、プラスミド精製キット（株式会社キアゲンより入手、商品名：ＱＩＡｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔを用いて精製された。精製されたＤＮＡの配列が解析された。本発明者は、精製されたＤＮＡの配列を解析することを、株式会社ファスマックに依頼した。その結果、配列番号：０６～配列番号：６６によって表されるＤＮＡが、コカインに特異的に結合する能力を有するＤＮＡの候補として特定された。

【０１０４】

（各ＤＮＡのコカインに対する結合能力の評価：解離定数の算出）

配列番号：０６により表されるＤＮＡのコカインに対する結合能力が、表面プラズモン共鳴法（以下、「ＳＰＲ」という）に基づいて、分子間相互作用解析装置（ＧＥヘルスケア社より購入、商品名：ＢｉａｃｏｒｅＴ２００）を用いて以下のように評価された。

【０１０５】

本発明者は、ビオチンによって標識された５’末端を有し、かつ配列番号：０６により表されるＤＮＡを調製することを、つくばオリゴサービス株式会社に依頼した。本発明者が当該ＤＮＡを受領した後、当該ＤＮＡは超純水（すなわち、ミリＱ水）に溶解された。このようにして、ＤＮＡ水溶液が得られた。

【０１０６】

次に、ＤＮＡ水溶液は、ストレプトアビジンによって修飾された表面を有するセンサーチップ（ＧＥヘルスケア社より購入、商品名：Ｓｅｒｉｅｓ Ｓ Ｓｅｎｓｏｒ Ｃｈｉｐ ＳＡ）上に、１０分間、５マイクロリットル／分の流速で、リン酸緩衝液をランニング緩衝液として用いて流した。このようにして、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を介して、ビオチンによって標識された５’末端を有し、かつ配列番号：０６により表されるＤＮＡが、センサーチップ上に固定された。センサーチップは、分子間相互作用解析装置の内部にセットされた。

【０１０７】

コカイン水溶液が、分子間相互作用解析装置の内部で、２０マイクロリットル／分の流速でセンサーチップ上に流された。分子間相互作用解析装置によって平衡値が解析され、配列番号：０６によって表されるＤＮＡのコカインに対する解離定数が算出された。２つ

の分子（本実施例では、配列番号：０６により表されるＤＮＡおよびコカイン）がより強固に結合する場合には、解離定数が小さい。一方、２つの分子の結合が弱い場合には、解離定数が大きい。分子間相互作用解析装置を用いた解離定数の算出の詳細については、特許文献２も参照せよ。特許文献２は、本明細書に参照として援用される。

【０１０８】

配列番号：０７～配列番号：６６によって表されるＤＮＡの解離定数も、配列番号：０６によって表されるＤＮＡの場合と同様に算出された。

【０１０９】

以下の表７～表１５は、ＤＮＡの配列およびその解離定数を示す。コカインに結合し得る能力を有するＤＮＡとして、１×１０^{-5}以下の解離定数を有するＤＮＡ（すなわち、配列番号：０６～配列番号：２２）が望ましく、１×１０^{-8}以下の解離定数を有するＤＮＡ（すなわち、配列番号：０６～配列番号：０９）がより望ましい。配列番号：２３～配列番号：６６により表されるＤＮＡは、１×１０^{-5}を超える解離定数を有するが、コカインに結合し得る能力を有し得る。

【０１１０】

【表７】

配列番号		解離定数
配列番号：０６	CGTACGGTCGACGCTAGCGGTGCGGGAAACGCTTAAAGAGCTGGGCCCCACGTGGAGCTCGGATCC	3.66E-09
配列番号：０７	CGTACGGTCGACGCTAGCGGGTTTAGTTAGCAGGCGTTGCGTCAGCACACGTGGAGCTCGGATCC	2.26E-09
配列番号：０８	CGTACGGTCGACGCTAGCACAAAGTGGTAAGCGGTCGGACCCAGATGTCACGTGGAGCTCGGATCC	5.84E-09
配列番号：０９	CGTACGGTCGACGCTAGCAGACCCCGATGACATATCCATGGAAGTGCCACGTGGAGCTCGGATCC	8.81E-09

【０１１１】

【表８】

配列番号		解離定数
配列番号：１０	CGTACGGTCGACGCTAGCAATTATAAGAGTCCTCACAGACGAGATTCGCACGTGGAGCTCGGATCC	9.92E-07
配列番号：１１	CGTACGGTCGACGCTAGCTACAGTCTGCGACCTATCGGGGCTCACAGGCACGTGGAGCTCGGATCC	1.40E-06
配列番号：１２	CGTACGGTCGACGCTAGCCGGGGGTGTCTATTAATCGTCCTCGTCCTACACGTGGAGCTCGGATCC	4.42E-07
配列番号：１３	CGTACGGTCGACGCTAGCTTTGGGTTTTCACGGTGGCCAACCCTTCCACGTGGAGCTCGGATCC	2.06E-07
配列番号：１４	CGTACGGTCGACGCTAGCTCGAAAAACTGTTGGTTAGGTTCTCCGCTCCACGTGGAGCTCGGATCC	1.52E-07
配列番号：１５	CGTACGGTCGACGCTAGCACAGGATAACCTGACAGGGACATTACTATCCACGTGGAGCTCGGATCC	5.69E-07
配列番号：１６	CGTACGGTCGACGCTAGCAGTAGGTGGATGGGTTTTGTAAGTATTTGCCACGTGGAGCTCGGATCC	4.42E-07

【０１１２】

【表９】

配列番号		
配列番号：１７	CGTACGGTCGACGCTAGCCATCTATTATAAACTACAAGCCGGGTGTGACACGTGGAGCTCGGATCC	2.05E-07
配列番号：１８	CGTACGGTCGACGCTAGCCAGCTAGACAGCGCCTGTCGTACCTCAGCCCACGTGGAACTCGGATCC	2.15E-07
配列番号：１９	CGTACGGTCGACGCTAGCAATGCTGACGGTGATGGGTCTCTGTAACCGCACGTGGAGCTCGGATCC	9.33E-08
配列番号：２０	CGTACGGTCGACGCTAGCGCAGCAGAAACTATTCGAGGTGCTGGGATTCACGTGGAGCTCGGATCC	1.14E-07
配列番号：２１	CGTACGGTCGACGCTAGCAATAGAACATACTGATCGCGGCACCATCAGCACGTGGAGCTCGGATCC	4.09E-08
配列番号：２２	CGTACGGTCGACGCTAGCTGTGCTGTCTGATAAGGTCAAACGGCTTGTCACGTGGAGCTCGGATCC	9.45E-08

【０１１３】

【表１０】

配列番号		
配列番号：２３	CGTACGGTCGACGCTAGCGTCGTGGCGACTC GCTTGGCTGTTCAAGTTCACGTGGAGCTCGG ATCC	1E-5 超
配列番号：２４	CGTACGGTCGACGCTAGCACCAAACATCTCC GTCCCGGAAGTTTCACCCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：２５	CGTACGGTCGACGCTAGCGGTATGGCTGGTG CGAGACCTCAAGCATTACACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：２６	CGTACGGTCGACGCTAGCTGCCTACTCATTAA CGGAAGAGATCGGTGGCACGTGGAGCTCGGA TCC	
配列番号：２７	CGTACGGTCGACGCTAGCCCAGTGGCGCTCC GGCCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：２８	CGTACGGTCGACGCTAGCTGGTGCGAAATTT AATGTAAGTTTCGCAATCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：２９	CGTACGGTCGACGCTAGCCTAAGGGTACGGT GCGGGGGAGAGCATGCACACGTGGAGCTCG GATCC	
配列番号：３０	CGTACGGTCGACGCTAGCACACGTTGGTTCC AGCCGGCTCCATGCCACCACGTGGAGCTCGG ATCC	

【０１１４】

【表１１】

配列番号		
配列番号：３１	CGTACGGTCGACGCTAGCCGTACGGTCGACG CTAGCAGGCTCGCTTTCGACGTGACCTAAGC ACACACGTGGAGCTCGGATCC	1E-5 超
配列番号：３２	CGTACGGTCGACGCTAGCAAGTGTACTAATG GAATGGATTACGAAGTTCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：３３	CGTACGGTCGACGCTAGCCACCAATGTAAGA GTATCGACACTGTTGGACACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：３４	CGTACGGTCGACGCTAGCTTCGCTAAGTCTTT TGCCGACGGGTCCCTTCACGTGGAGCTCGGA TCC	
配列番号：３５	CGTACGGTCGACGCTAGCTGTCTCCGTAGCG TTTGGAGTTGGTTTTTACACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：３６	CGTACGGTCGACGCTAGCAAGGACCCACCCG GCCACTATGGACAGCCCACGTGGAGCTCGGA TCC	
配列番号：３７	CGTACGGTCGACGCTAGCTGATGAAGAGGCT ATATTATATGCGTGCTACACGTGGAGCTCGGA TCC	
配列番号：３８	CGTACGGTCGACGCTAGCGGCCCGTGAGGTT ATAGGGAGCCCAAATCACGTGGAGCTCGGAT CC	

【０１１５】

【表１２】

配列番号		
配列番号：３９	CGTACGGTCGACGCTAGCAACGCCATCACCATTGCCATGTGAATTGTTCACGTGGAGCTCGGATCC	1E-5 超
配列番号：４０	CGTACGGTCGACGCTAGCCATTAGGTCAGTCCCTCCTGACTCGGAACCCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４１	CGTACGGTCGACGCTAGCAGGTTTTGTGGAGATAAGTAGGTGGATGGACACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４２	CGTACGGTCGACGCTAGCTTAGCCGGCAGGTGGCGTTGGAGGCAATGTCACGTAGAGCTCGGATCC	
配列番号：４３	CGTACGGTCGACGCTAGCCTCCCGTTCGAATAGTCCTGTCTACCTTGCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４４	CGTACGGTCGACGCTAGCGGACCTTAGTGATATAGTTGGAACTATGTACACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４５	CGTACGGTCGACGCTAGCAGGCATCTCCAACTTCGTGGTCATGGCAAGCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４６	CGTACGGTCGACGCTAGCGAGGGTAGGAACTCCACCCACAATGGTCTACACGTGGAGCTCGGATCC	

【０１１６】
【表１３】

配列番号		
配列番号：４７	CGTACGGTCGACGCTAGCCCCCAGCAACTGGTGAATAACGATCATTACCACGTGGAGCTTGGATCC	1E-5 超
配列番号：４８	CGTACGGTCGACGCTAGCAGTGTGGGAATTACGCACAACAAGTTTCGCCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：４９	CGTACGGTCGACGCTAGCAAGCCTTCTCATTTGTCCGTGGATCGTTCCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：５０	CGTACGGTCGACGCTAGCCGTTCTGGGGCCTCGGTGTTCCTGCTGACGCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：５１	CGTACGGTCGACGCTAGCCAAGACCGCCCTCCTCGGCCGAGTTATCGCCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：５２	CGTACGGTCGACGCTAGCTAAGTAACGGTTCGAAGCCATTTGCGTGCACACGTGGAGCCGGATCC	
配列番号：５３	CGTACGGTCGACGCTAGCTCGGACGAAAGTCCCTAACCTGTTCAAGTACACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：５４	CGTACGGTCGACGCTAGCTGGTGCGGTGTCCGTTCGGTCCCTAAACGACACGTGGAGCTCGGATCC	

【０１１７】

【表１４】

配列番号		
配列番号：５５	CGTACGGTCGACGCTAGCCCCTGTGGTAATG TACCCACCTAATGGGGTCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：５６	CGTACGGTCGACGCTAGCTGTGGAAGGTTGG CTTCACGTGGAGCTCGGATCC	
配列番号：５７	CGTACGGTCGACGCTAGCCTAGTACCATCGG GCATTAAAGTTTTTGATCACGTGGAGCTCGGA TCC	
配列番号：５８	CGTACGGTCGACGCTAGCTTGGGTGTAGCGG TCTGGGGCCAGCACCGCCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：５９	CGTACGGTCGACGCTAGCAGGGATTGGGTAT TCGGTAGTCATGATTGTCACGTGGAGCTCGG ATCC	1E-5 超
配列番号：６０	CGTACGATGGATCCGAGCTCCACGTGTCTCA CATTACGGAATAGGTCTACAATGGTGCTAGCG TCGACCGTACGACGTGGATCC	
配列番号：６１	CGTACGGTCGACGCTAGCGTAGAAGGTCAAC CGAAAAATGCTCGTAATCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：６２	CGTACGGTCGACGCTAGCGGAGCAGGATCGT CTCGTTCAGAATTGGCCCACGTGGAGCTCGG ATCC	

【０１１８】

【表１５】

配列番号		
配列番号：６３	CGTACGGTCGACGCTAGCGGCAAAACCCGCC CTGACGGGTAGCCTAGTCACGTGGAGCTCGG ATCCACGTGCGCATGGTCGACGCTAGCCTGG ATGCCTTCTGTCACGCTCAGTAACACCACGTG GAGCTCGGATCC	
配列番号：６４	CGTACGGTCGACGCTAGCTCGGAGGTTCACA CTCCCCGGGACTACGGACACGTGGAGCTCGG ATCC	1E-5 超
配列番号：６５	CGTACGGTCGACGCTAGCGCCATTAGAAAAG TACCACGTAGAAGCTTTCACGTGGAGCTCGG ATCC	
配列番号：６６	CGTACGGTCGACGCTAGCCAGTACTTTTGTAG GATGGCATCTATGGTACACGTGGAGCTCGGA TCC	

【産業上の利用可能性】

【０１１９】

本発明によるコカインアプタマーは、コカインの検出に用いられ得る。

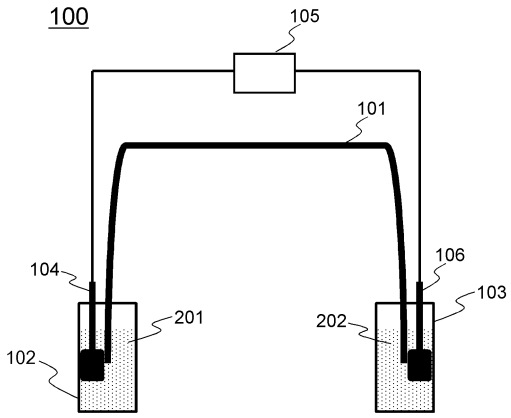
【符号の説明】

【０１２０】

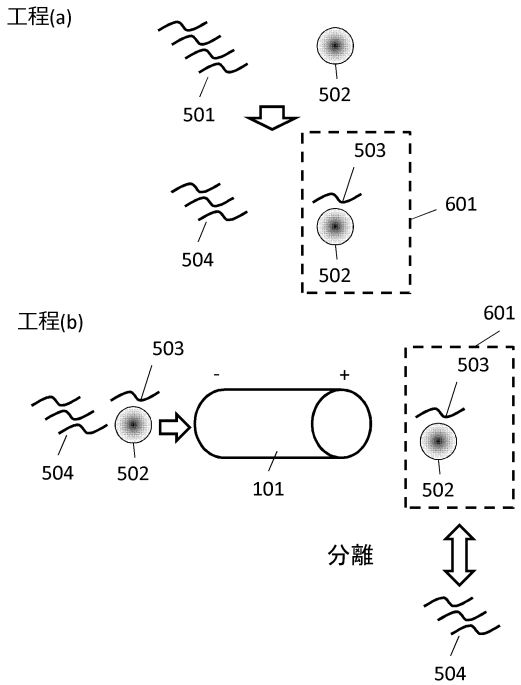
１００　キャピラリー電気泳動装置
１０１　電気浸透流抑制キャピラリー
１０２　第１容器
１０３　第２容器
１０４　第１電極
１０５　電源
１０６　第２電極
２０１　第１電解液
２０２　第２電解液

５０１　ＤＮＡライブラリ
５０２　低分子窒素含有有機化合物
５０３　低分子窒素含有有機化合物に特異的に結合するアプタマー
５０４　一本鎖ＤＮＡ
５０５　相補鎖
６０１　複合体
６５１　プライマー

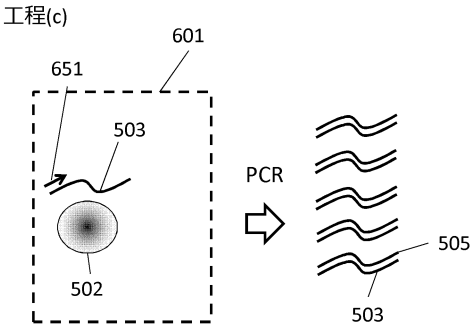
【図１】



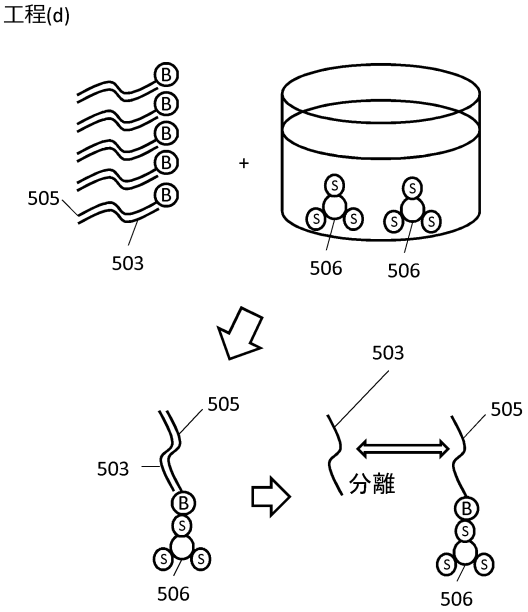
【図２】



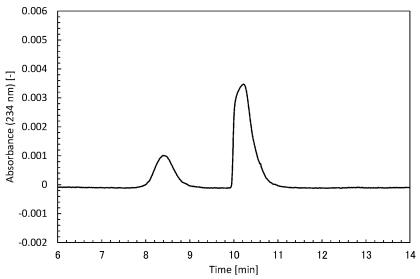
【図３】



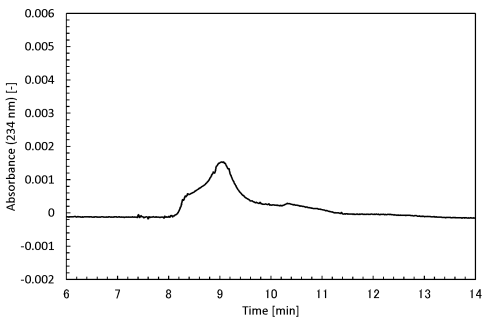
【図４】



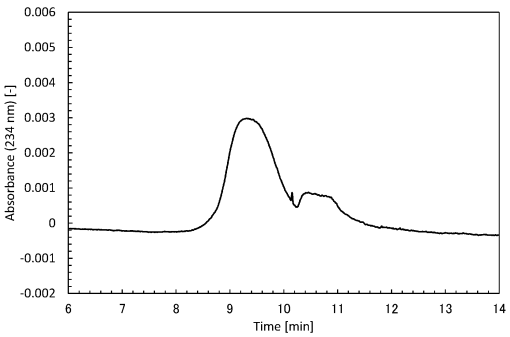
【図５】



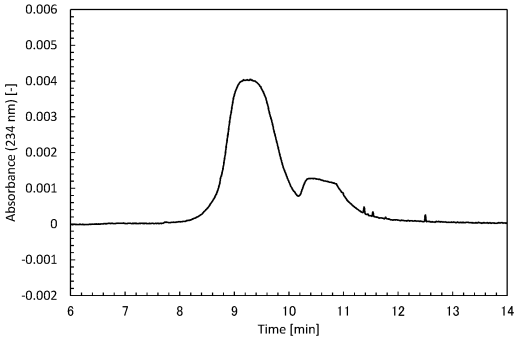
【図６】



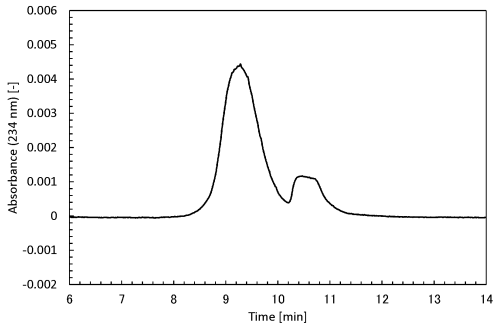
【図７】



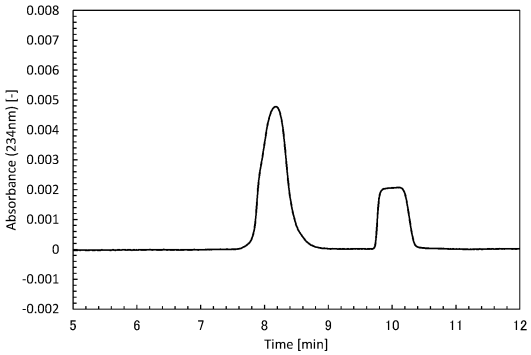
【図８】



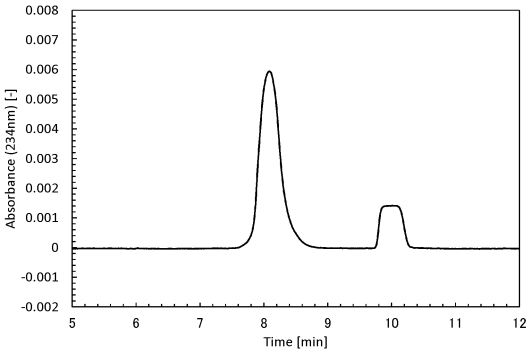
【図９】



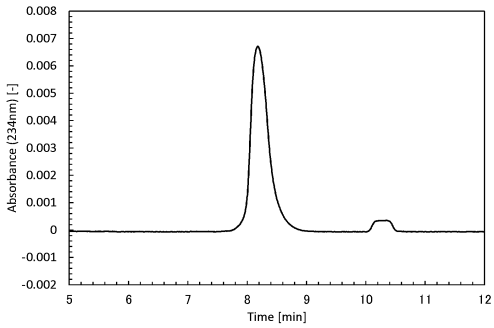
【図１０】



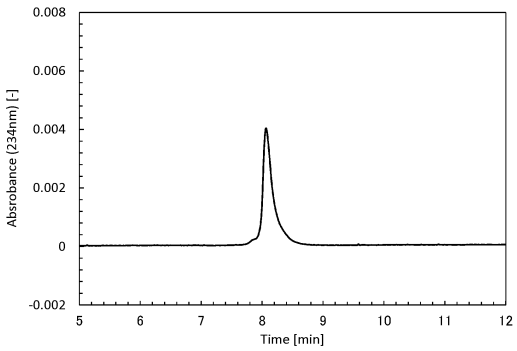
【図１１】



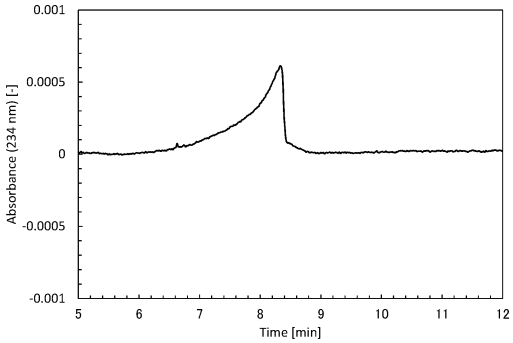
【図１２】



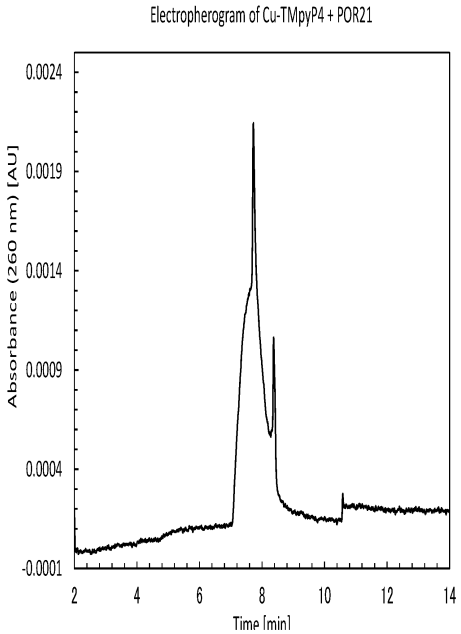
【図１３】



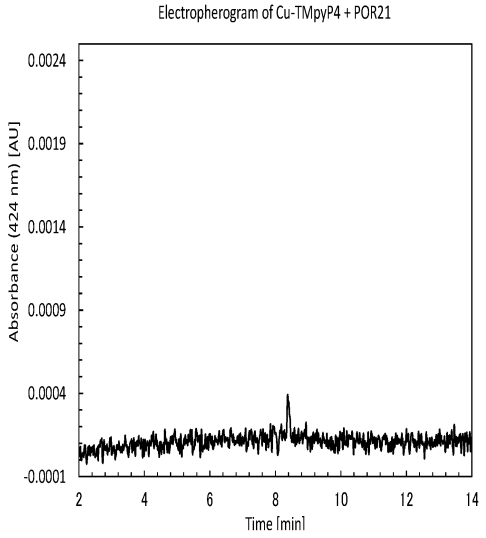
【図１４】



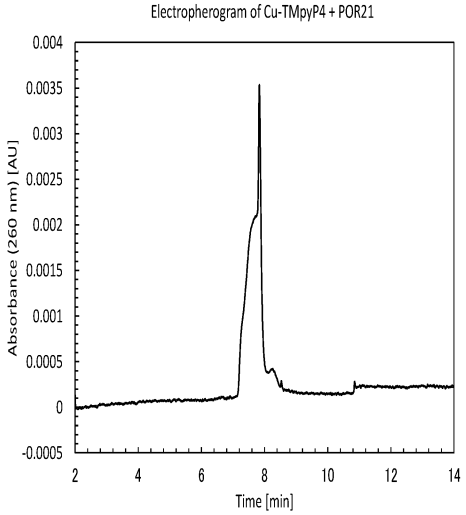
【図１５】



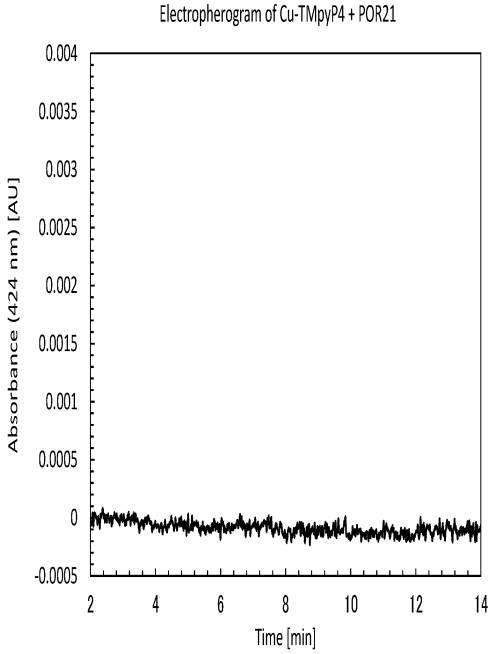
【図１６】



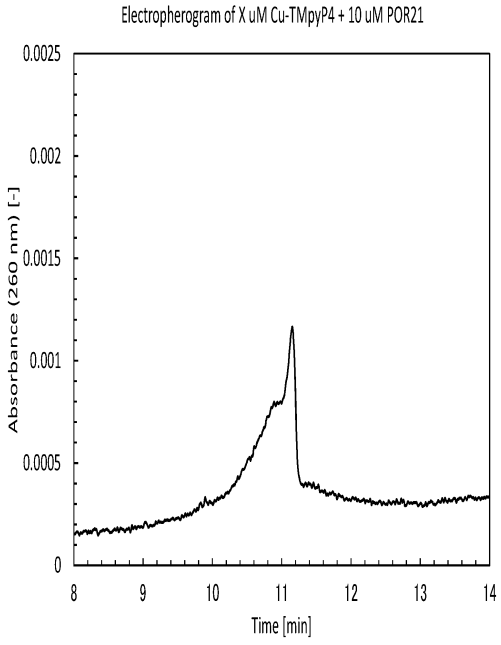
【図１７】



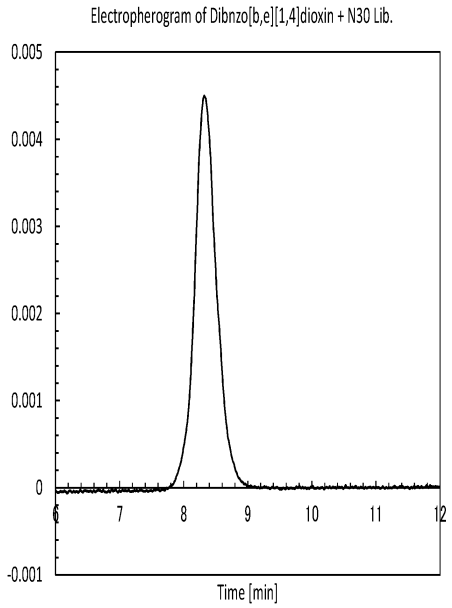
【図１８】



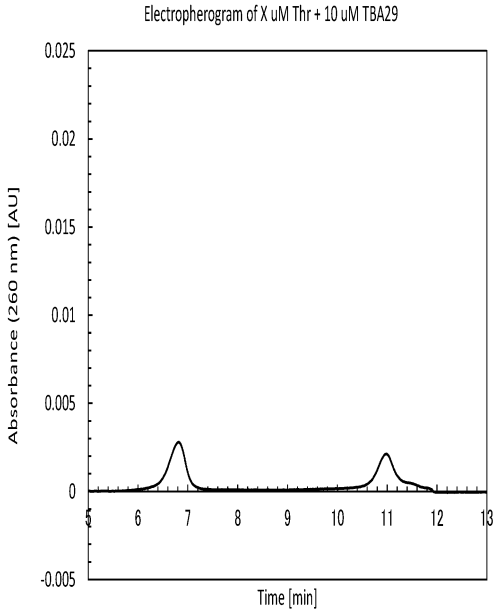
【図１９】



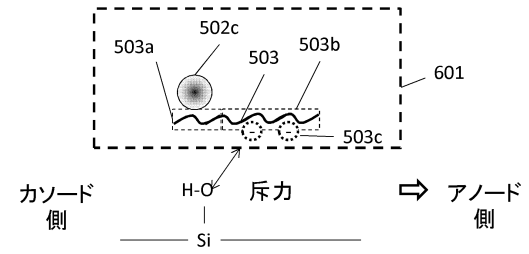
【図２０】



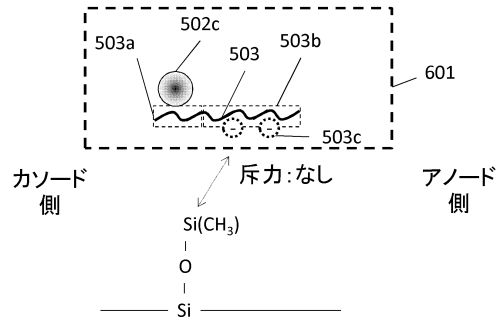
【図２１】



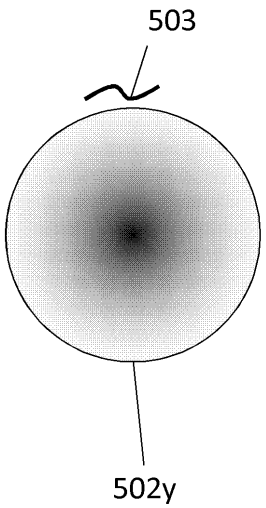
【図２２Ａ】



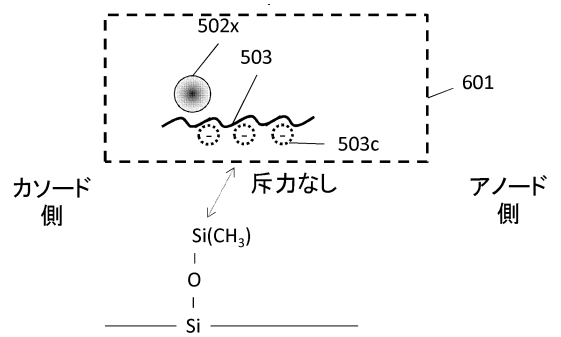
【図２２Ｂ】



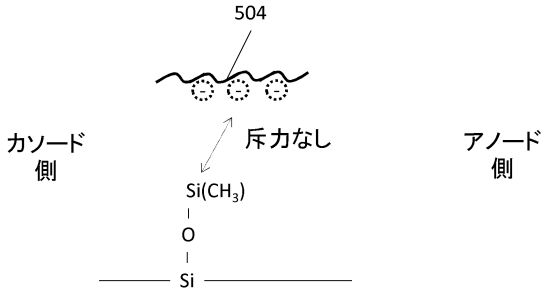
【図２３】



【図２４Ａ】



【図２４Ｂ】



【配列表】

0006850965000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１６／０１３１６６８（ＵＳ，Ａ１）
特表２００９－５０５６４１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１５－５０１９３４（ＪＰ，Ａ）
Swensen, J. S. et al., Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor, J. Am. Chem. Soc., ２００９年, Vol. 131(12), pp. 4262-4266

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ　１／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ