

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670166号
(P7670166)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A
C 1 2 N	15/115(2010.01)	C 1 2 N	15/115	Z

請求項の数 7 (全18頁)

(21)出願番号	特願2023-565028(P2023-565028)	(73)特許権者	000004260 株式会社デンソー 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地
(86)(22)出願日	令和4年11月29日(2022.11.29)	(74)代理人	110000578 名古屋国際弁理士法人
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/044042	(72)発明者	新本 舞 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式 会社デンソー内
(87)国際公開番号	WO2023/100898	(72)発明者	糠塚 明 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式 会社デンソー内
(87)国際公開日	令和5年6月8日(2023.6.8)	(72)発明者	浅野 真菜 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式 会社デンソー内
審査請求日	令和5年10月5日(2023.10.5)	(72)発明者	中川 和久
(31)優先権主張番号	特願2021-196184(P2021-196184)		
(32)優先日	令和3年12月2日(2021.12.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分析方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

結合物質(1、1A、1B)を用いて目的物質(7)を検出する分析方法であって、前記結合物質は、
前記目的物質と結合する活性を有する核酸アプタマーと、
前記核酸アプタマーが前記目的物質と結合していない場合は、前記核酸アプタマーの3'末端領域(9)と塩基対を形成し、前記核酸アプタマーが前記目的物質と結合する場合は、前記3'末端領域から解離する相補核酸(5)と、
を備え、
前記結合物質と、前記目的物質を含む試料(21)とを混合して混合液を生成し、
前記目的物質と結合していない前記結合物質を含む前記混合液中で、前記核酸アプタマーを増幅し、
前記核酸アプタマーを増幅することで生じる現象を検出する、
分析方法。

【請求項2】

請求項1に記載の分析方法であって、
前記現象は、(a)増幅された前記核酸アプタマーに結合する検出試薬を用いて得られる発色、発光、又は蛍光、(b)前記核酸アプタマーの増幅によるヌクレオチド取り込みに伴う水素イオンの生成、及び(c)前記核酸アプタマーの増幅によるヌクレオチド取り込みに伴うピロリン酸の生成のうちの少なくとも1つである、

分析方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の分析方法であって、

前記現象が発色、発光、又は蛍光である場合、受光デバイス(29)を用いて前記現象を検出し、

前記現象が酸化還元電位の変化である場合、電位計測機(29)を用いて前記現象を検出し、

前記現象が水素イオンの生産、消費、又は吸収である場合、pH計測機(29)を用いて前記現象を検出する、

分析方法。

10

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の分析方法であって、

温度サイクルを必要としない等温核酸増幅法により前記核酸アプタマーを増幅する、

分析方法。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載の分析方法であって、

前記 3' 末端領域に相補的な配列を含む一本鎖環状核酸(25)と、前記核酸アプタマーとの複合体(26)を形成し、

前記複合体を起点とし、核酸増幅用反応液(23)を用い、ローリングサークル増幅法により前記核酸アプタマーを増幅する、

分析方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載の分析方法であって、

ローリングサークル増幅法により前記核酸アプタマーを増幅し、

前記核酸アプタマーを増幅するときの核酸増幅用反応液(23)は、トリス緩衝液を 0 mM 以上 10 mM 以下の終濃度で含み、

前記核酸増幅用反応液の pH は 7.0 以上 9.0 以下であり、

pH 計測機(29)を用いて前記現象を検出する、

分析方法。

【請求項 7】

30

請求項 1 又は 2 に記載の分析方法であって、

前記目的物質は、タンパク質、糖、脂質、核酸、又は低分子化合物である、

分析方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本国際出願は、2021年12月2日に日本国特許庁に出願された日本国特許出願第2021-196184号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願第2021-196184号の全内容を本国際出願に参照により援用する。

【技術分野】

40

【0002】

本開示は結合物質及び分析方法に関する。

【背景技術】

【0003】

従来、融合体を用いた目的物質の分析方法が開示されている。融合体は、結合物質及び標識物を備える。結合物質は、目的物質と結合する活性を有する。標識物は、観測可能な現象を生じる。

【0004】

目的物質の分析方法では、目的物質を含む試料と、融合体とを混合する。次に、目的物質と結合していない融合体を分離する。次に、目的物質と結合した融合体が生じる現象を

50

検出する。目的物質と結合していない融合体を分離する方法は、特許文献 1、2 に開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開 2019 - 020297 号公報

【文献】特開 2019 - 148556 号公報

【発明の概要】

【0006】

発明者の詳細な検討の結果、以下の課題が見出された。目的物質と結合していない融合体を分離する場合、様々な問題が生じることがある。例えば、分離の工程があることで、分析方法に要するコストや時間が増加する。また、分離の工程において、他の物質が試料に混入し、分析の精度が低下することがある。

10

【0007】

本開示の 1 つでは、目的物質と結合していない結合物質を分離する処理を行わなくてもよい結合物質及び分析方法を提供する。

【0008】

本開示の 1 つは、結合物質である。前記結合物質は、目的物質と結合する活性を有する一本鎖核酸製剤と、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合していない場合は、前記一本鎖核酸製剤の 3' 末端領域と塩基対を形成し、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合する場合は、前記 3' 末端領域から解離する相補核酸とを備える。

20

【0009】

本開示の 1 つである結合物質を用いれば、目的物質と結合していない結合物質を分離する処理を行わなくても、目的物質を分析できる。

【0010】

本開示の別の 1 つは、結合物質を用いて目的物質を検出する分析方法である。用いる結合物質は、前記目的物質と結合する活性を有する一本鎖核酸製剤と、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合していない場合は、前記一本鎖核酸製剤の 3' 末端領域と塩基対を形成し、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合する場合は、前記 3' 末端領域から解離する相補核酸とを備える。

30

【0011】

分析方法では、前記結合物質と、前記目的物質を含む試料とを混合し、前記一本鎖核酸製剤を増幅し、前記一本鎖核酸製剤を増幅することで生じる現象を検出する。

【0012】

本開示の別の 1 つである分析方法によれば、目的物質と結合していない結合物質を分離する処理を行わなくても、目的物質を分析できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】第 1 の結合物質の構成を表す説明図である。

【図 2】五炭糖の 3' 位の水酸基を表す説明図である。

40

【図 3】第 1 の結合物質が目的物質と共存するときの第 1 の結合物質の作用を表す説明図である。

【図 4】一本鎖核酸製剤と核酸鋳型とが複合体を形成している状態を表す説明図である。

【図 5】一本鎖核酸製剤と相補核酸とが二本鎖核酸を形成しているときの第 1 の結合物質と、核酸鋳型とを表す説明図である。

【図 6】第 2 の結合物質の構成と作用とを表す説明図である。

【図 7】分析方法を表す説明図である。

【図 8】試料に目的物質が含まれない場合の第 1 の結合物質の状態を表す説明図である。

【図 9】ローリングサークル増幅の進行の程度を表すグラフである。

【図 10】電気泳動ゲルの核酸染色結果を表す写真である。

50

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示の例示的な実施形態について図面を参照しながら説明する。

【0015】

1. 結合物質1

結合物質1は、一本鎖核酸製剤3と、相補核酸5とを備える。一本鎖核酸製剤3は、目的物質7と結合する活性を有する。結合物質1は、一本鎖核酸製剤3を備えることにより、目的物質7と結合する活性を有する。目的物質7とは、分析の対象となる物質である。目的物質7として、例えば、タンパク質、糖、脂質、核酸、又は低分子化合物等が挙げられる。

10

【0016】

一本鎖核酸製剤3として、例えば、核酸アプタマーが挙げられる。核酸アプタマーとして、例えば、DNAアプタマー、RNAアプタマーが挙げられる。一本鎖核酸製剤3は、例えば、インビトロプロセスにより化学的に合成できる。一本鎖核酸製剤3の塩基数は、例えば、20以上100以下である。

【0017】

一本鎖核酸製剤3は、例えば、核酸から成る単位が複数連結したものであってもよい。各単位の塩基数は、20以上100以下であることが好ましい。各単位の塩基数が100以下である場合、目的物質7が他の一本鎖核酸製剤3や他の物質に接近していても、一本鎖核酸製剤3は、他の一本鎖核酸製剤3や他の物質からの干渉を受け難く、目的物質7に結合し易い。

20

【0018】

一本鎖核酸製剤3の配列は、DNA配列であってもよいし、RNA配列であってもよいし、DNAとRNAとの混合配列であってもよい。

【0019】

一本鎖核酸製剤3の配列は、一本鎖核酸製剤3のアプタマーの結合特性、ハイブリダイズ特性、伸長特性等を損なわない限り、さらに修飾核酸や核酸アナログを含む配列であってもよい。

【0020】

相補核酸5は、一本鎖核酸製剤3が目的物質7と結合していない場合は、一本鎖核酸製剤3の3'末端領域9と塩基対35を形成する。相補核酸5は、一本鎖核酸製剤3が目的物質7と結合する場合は、3'末端領域9から解離する。

30

【0021】

結合物質1として、例えば、図1に示す第1の結合物質1Aが挙げられる。第1の結合物質1Aは、一本鎖核酸製剤3と、相補核酸5とを備える。一本鎖核酸製剤3が目的物質7と結合していない場合、相補核酸5は、一本鎖核酸製剤3とともに二本鎖核酸を形成している。二本鎖核酸は二重鎖に対応する。一本鎖核酸製剤3が目的物質7と結合していない場合、相補核酸5は、一本鎖核酸製剤3の3'末端領域9と塩基対35を形成している。

【0022】

3'末端領域9とは、一本鎖核酸製剤3のうち、3'末端の側にある領域である。3'末端領域9は、後述する核酸鋳型25の一部に相補的な塩基配列を含む。3'末端領域9の塩基数は10以上30以下であることが好ましい。3'末端領域9のGC含量は30%以上70%以下であることが好ましい。

40

【0023】

相補核酸5は、例えば、インビトロプロセスにより化学的に合成できる。相補核酸5の塩基数は、10以上50以下であることが好ましい。相補核酸5の配列は、DNA配列であってもよいし、RNA配列であってもよいし、DNAとRNAとの混合配列であってもよい。

【0024】

相補核酸5の配列は、相補核酸5のハイブリダイズ特性が損なわれない限り、修飾核酸

50

や核酸アナログをさらに含む配列であってもよい。相補核酸 5 は、一本鎖核酸製剤 3 とハイブリダイズする。一本鎖核酸製剤 3 は、例えば、3' 末端の側に、空白領域 10 を有する。空白領域 10 とは、相補核酸 5 と塩基対を形成しない領域である。空白領域 10 の塩基数は、例えば、0 以上 15 以下である。相補核酸 5 を構成する塩基のうち、好ましくは 70% 以上 100% 以下の塩基が、一本鎖核酸製剤 3 と相補する塩基である。

【0025】

相補核酸 5 の 3' 最末端は、例えば、図 2 に示すリボースやデオキシリボース等の五炭糖により構成される。五炭糖の 3' 位の水酸基は、例えば、水酸基とは異なる化学置換基に置換されている。水酸基とは異なる化学置換基は特に限定されない。水酸基とは異なる化学置換基として、例えば、アジド、アミン、ピオチン、リン酸、水素、蛍光等が挙げられる。水酸基とは異なる化学置換基は、リン酸エステル結合を行わない化学置換基である。

10

【0026】

第 1 の結合物質 1 A は、一本鎖核酸製剤 3 と相補核酸 5 とをハイブリダイズする処理により合成できる。第 1 の結合物質 1 A を合成するとき、一本鎖核酸製剤 3 のモル濃度に対する、相補核酸 5 のモル濃度の比率（以下ではモル比率 R とする）は 1 以上であることが好ましい。

【0027】

図 3 に示すように、第 1 の結合物質 1 A が目的物質 7 と共存するとき、第 1 の結合物質 1 A に含まれる一本鎖核酸製剤 3 と目的物質 7 とが結合する。これに伴い、相補核酸 5 が一本鎖核酸製剤 3 から解離する。目的物質 7 が存在しない試料においては、相補核酸 5 が一本鎖核酸製剤 3 から解離する現象は生じ難い。

20

【0028】

相補核酸 5 が一本鎖核酸製剤 3 から解離したとき、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することができる。一本鎖核酸製剤 3 の増幅は、例えば、図 4 に示す核酸鋳型 25 を用いて行うことができる。

【0029】

核酸鋳型 25 は、一本鎖核酸製剤 3 の 3' 最末端から始まる領域 28 に相補的な塩基配列を含む。核酸鋳型 25 と一本鎖核酸製剤 3 とは、塩基対 37 を形成することにより複合体 26 を形成する。

【0030】

核酸鋳型 25 の全塩基数は、50 以上 100 以下であることが好ましい。核酸鋳型 25 の全塩基のうち、3' 最末端から始まる領域 28 と相補する塩基の割合は、70% 以上 100% 以下であることが好ましく、100% であることがより好ましい。

30

【0031】

なお、図 5 に示すように、一本鎖核酸製剤 3 と相補核酸 5 とが塩基対 35 を形成しているときは、核酸鋳型 25 は、一本鎖核酸製剤 3 と複合体 26 を形成することはできない。すなわち、目的物質 7 が存在しない試料においては、核酸鋳型 25 と一本鎖核酸製剤 3 との複合体 26 は生じない。一本鎖核酸製剤 3 は、目的物質 7 と結合していないとき、増幅し難い。

【0032】

核酸鋳型 25 として、例えば、一本鎖環状核酸が挙げられる。一本鎖環状核酸として、例えば、一本鎖環状 DNA が挙げられる。一本鎖環状 DNA は、一本鎖直鎖 DNA を環状化することによって得られる。一本鎖直鎖 DNA の環状化は、例えば、CircLigase (Lucigen 社)、CircLigase II (Lucigen 社)、T4 DNA Ligase (NEB 社、その他各社) 等の DNA リガーゼを用いて行うことができる。

40

【0033】

結合物質 1 として、例えば、図 6 に示す第 2 の結合物質 1 B が挙げられる。第 2 の結合物質 1 B は、一本鎖核酸製剤 3 を備える。一本鎖核酸製剤 3 が目的物質 7 と結合していない場合、一本鎖核酸製剤 3 は分子内で折れ曲がった構造をとる。一本鎖核酸製剤 3 が分子内で折れ曲がった構造をとるとき、3' 末端領域 9 は、相補核酸 5 と対向している。相補核

50

酸 5 は一本鎖核酸製剤 3 の一部である。一本鎖核酸製剤 3 が折れ曲がっているとき、相補核酸 5 と、それに対向している 3' 末端領域 9 とは、塩基対 3 5 を形成している。

【 0 0 3 4 】

相補核酸 5 が 3' 末端領域 9 と塩基対 3 5 を形成しているとき、核酸鋳型 2 5 は、一本鎖核酸製剤 3 と複合体 2 6 を形成することはできない。よって、一本鎖核酸製剤 3 は、目的物質 7 と結合していないとき、増幅し難い。

【 0 0 3 5 】

一本鎖核酸製剤 3 が目的物質 7 と結合すると、相補核酸 5 は 3' 末端領域 9 から解離する。相補核酸 5 が末端領域 9 から解離したとき、3' 末端領域 9 は核酸鋳型 2 5 とともに複合体 2 6 を形成することができる。よって、一本鎖核酸製剤 3 が目的物質 7 と結合すると、一本鎖核酸製剤 3 は増幅し易い。

10

【 0 0 3 6 】

2 . 分析方法

本開示の分析方法では、結合物質 1 を用いて目的物質 7 を検出する。結合物質 1 は、前記「 1 . 結合物質 1 」の項で述べた結合物質 1 である。

【 0 0 3 7 】

第 1 の結合物質 1 A を使用し、目的物質 7 を含む試料 2 1 を分析する場合の分析方法を図 7 に示す。まず、図 7 の S T E P 1 に示すように、試料 2 1 を用意する。試料 2 1 は、例えば、目的物質 7 と、結合体形成用反応液 1 3 とを含む。目的物質 7 は、結合体形成用反応液 1 3 の中に存在する。

20

【 0 0 3 8 】

次に、図 7 の S T E P 2 に示すように、第 1 の結合物質 1 A と、試料 2 1 とを混合する。第 1 の結合物質 1 A は、目的物質 7 に結合する活性を有する。

【 0 0 3 9 】

このとき、図 7 の S T E P 3 に示すように、第 1 の結合物質 1 A の少なくとも一部は、目的物質 7 に結合し、結合体 3 3 を形成する。さらに詳しくは、第 1 の結合物質 1 A の少なくとも一部が備える一本鎖核酸製剤 3 が目的物質 7 に結合する。

【 0 0 4 0 】

目的物質 7 と結合した第 1 の結合物質 1 A において、相補核酸 5 が一本鎖核酸製剤 3 から解離し、3' 末端領域 9 は塩基対 3 5 を形成していない状態となる。目的物質 7 と結合した第 1 の結合物質 1 A が備える一本鎖核酸製剤 3 は、増幅し易い状態になる。

30

【 0 0 4 1 】

なお、試料 2 1 中に、目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A が存在する場合、その第 1 の結合物質 1 A に含まれる一本鎖核酸製剤 3 は、相補核酸 5 とともに塩基対 3 5 を形成しており、増幅し難い状態である。

【 0 0 4 2 】

次に、図 7 の S T E P 4 に示すように、結合体形成用反応液 1 3 に代えて、核酸増幅用反応液 2 3 を加える。核酸増幅用反応液 2 3 は、鎖置換型 DNA 合成酵素、核酸鋳型 2 5 、及び、核酸増幅用反応液における公知の成分を含む。鎖置換型 DNA 合成酵素として、例えば、phi 2 9 ポリメラーゼ (polymerase)、Vent DNA ポリメラーゼ、Bst DNA ポリメラーゼ等が挙げられる。鎖置換型 DNA 合成酵素は、核酸増幅酵素に対応する。

40

【 0 0 4 3 】

核酸増幅用反応液 2 3 の組成は、検出したい現象等に応じて適宜調整することができる。現象とは、核酸増幅により生じる現象である。核酸増幅とは、一本鎖核酸製剤 3 が増幅することである。例えば、核酸増幅用反応液 2 3 における緩衝液のモル濃度や pH を調整することができる。核酸増幅用反応液 2 3 を加えた後は、目的物質 7 と、第 1 の結合物質 1 A とは、核酸増幅用反応液 2 3 の中に存在する。

【 0 0 4 4 】

次に、図 7 の S T E P 5 に示すように、一本鎖核酸製剤 3 を増幅する処理を行う。目的

50

物質 7 と結合した第 1 の結合物質 1 A が備える一本鎖核酸製剤 3 は増幅し、増幅核酸 2 7 が生じる。なお、核酸増幅用反応液 2 3 中に、目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A が存在する場合、その第 1 の結合物質 1 A に含まれる一本鎖核酸製剤 3 は、相補核酸 5 とともに塩基対 3 5 を形成しており、増幅し難い。

【 0 0 4 5 】

一本鎖核酸製剤 3 の増幅は、例えば、以下に示すものである。核酸鋳型 2 5 に含まれる、3' 最末端から始まる領域 2 8 と相補的な配列の作用により、図 4 に示すように、一本鎖核酸製剤 3 と核酸鋳型 2 5 との塩基対 3 7 の形成が完成し、複合体 2 6 が形成される。複合体 2 6 を起点とし、核酸増幅酵素の作用によって、核酸増幅が生じる。

【 0 0 4 6 】

核酸増幅として、等温核酸増幅が好ましい。等温核酸増幅として、ローリングサークル増幅法 (Rolling circle amplification ; R C A)、ループ介在等温増幅法 (Loop-mediated isothermal amplification ; L A M P)、全ゲノム増幅法 (Whole Genome Amplification ; W G A)、多置換増幅法 (Multiple Displacement Amplification ; M D A)、ニッキング酵素増幅法 (Nicking Endonuclease Amplification Reaction ; N E A R) 等が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

等温核酸増幅は、昇温、降温等の温度サイクルを必要とせず、一定温度で反応が進行するため、昇温、降温等の温度サイクルを必要とするポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction ; P C R) と比べて、簡易検出法への応用が容易である。

【 0 0 4 8 】

次に、図 7 の S T E P 5 において、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することで生じる現象を検出する。現象は、例えば、(a) 増幅された一本鎖核酸製剤 3 に結合する検出試薬を用いて得られる発色、発光、又は蛍光、(b) 一本鎖核酸製剤 3 の増幅によるヌクレオチド取り込みに伴う水素イオンの生成、及び (c) 一本鎖核酸製剤 3 の増幅によるヌクレオチド取り込みに伴うピロリン酸の生成のうち少なくとも 1 つである。

【 0 0 4 9 】

核酸増幅用反応液 2 3 は、例えば、核酸検出試薬を含む。核酸検出試薬として、例えば、S Y B R Green I、S Y B R Green II 等が挙げられる。核酸増幅用反応液 2 3 が核酸検出試薬を含む場合、核酸増幅が生じたとき、核酸増幅用反応液 2 3 は、特定の波長の光により励起され、蛍光を発する。蛍光は、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することで生じる現象に対応する。蛍光の強度は、目的物質 7 と結合している一本鎖核酸製剤 3 の量が多いほど、高い。蛍光の強度は、試料 2 1 に含まれる目的物質 7 の量が多いほど、高い。

【 0 0 5 0 】

例えば、インターカレーター型発光色素、マイナーグループ型発光色素を使用することで、核酸増幅と並行し、特定波長の蛍光の強度が増加する。特定波長の蛍光は、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することで生じる現象に対応する。特定波長の蛍光の強度は、目的物質 7 と結合している一本鎖核酸製剤 3 の量が多いほど、高い。特定波長の蛍光の強度は、試料 2 1 に含まれる目的物質 7 の量が多いほど、高い。

【 0 0 5 1 】

核酸増幅用反応液 2 3 では、核酸増幅に伴ってヌクレオチドが増幅核酸 2 7 に取り込まれ、水素イオンが生成する。水素イオンの生成量は、取り込まれるヌクレオチドの量に比例する。水素イオンが生成するため、核酸増幅用反応液 2 3 の p H が低下する。水素イオンの生成、及び p H の低下は、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することで生じる現象に対応する。p H の低下量は、目的物質 7 と結合している一本鎖核酸製剤 3 の量が多いほど、大きい。p H の低下量は、試料 2 1 に含まれる目的物質 7 の量が多いほど、大きい。

【 0 0 5 2 】

核酸増幅用反応液 2 3 では、核酸増幅に伴ってヌクレオチドが増幅核酸 2 7 に取り込まれ、ピロリン酸が生成する。ピロリン酸が駆動する反応カスケードを触媒する酵素群が核

10

20

30

40

50

酸増幅用反応液 2 3 に含まれる場合、生成したピロリン酸が駆動する反応カスケードにより、発光や酸化還元電位変化が生じる。ピロリン酸の生成、発光や酸化還元電位変化は、一本鎖核酸製剤 3 を増幅することで生じる現象に対応する。発光や酸化還元電位変化の程度は、目的物質 7 と結合している一本鎖核酸製剤 3 の量が多いほど、大きい。発光や酸化還元電位変化の程度は、試料 2 1 に含まれる目的物質 7 の量が多いほど、大きい。

【 0 0 5 3 】

現象が発色、発光、又は蛍光である場合、例えば、受光デバイスを用いて現象を検出することができる。現象が酸化還元電位の変化である場合、例えば、電位計測機を用いて現象を検出することができる。現象が水素イオンの生産、消費、又は吸収である場合、例えば、pH 計測機を用いて現象を検出することができる。

10

【 0 0 5 4 】

核酸増幅により生じる現象を、図 7 の S T E P 5 に示す計測器 2 9 により検出することができる。計測器 2 9 は、例えば、受光デバイス、pH 計測機、電位計測機等である。

【 0 0 5 5 】

試料 2 1 に目的物質 7 が含まれない場合、図 7 の S T E P 1 ~ 5 の処理を行っても、図 8 に示すように、第 1 の結合物質 1 A に含まれる一本鎖核酸製剤 3 は、相補核酸 5 とともに塩基対 3 5 を形成している。塩基対 3 5 を形成している一本鎖核酸製剤 3 は増幅し難い。よって、試料 2 1 に目的物質 7 が含まれない場合、図 7 の S T E P 1 ~ 5 の処理を行っても、一本鎖核酸製剤 3 の増幅に起因する現象は生じ難い。

【 0 0 5 6 】

核酸鑄型 2 5 が一本鎖環状 DNA である場合、鎖置換型 DNA 合成酵素の作用により、ローリングサークル増幅による核酸増幅が起こる。

20

【 0 0 5 7 】

ローリングサークル増幅による核酸増幅は、等温下で行うことができる。鎖置換型 DNA 合成酵素として phi 2 9 ポリメラーゼが使用される場合、3 0 以上 4 0 以下の一定温度で、核酸増幅の反応を進行させることが好ましい。等温核酸増幅により、増幅核酸 2 7 が生じる。

【 0 0 5 8 】

等温核酸増幅により生じる現象を検出する計測器 2 9 として pH 計測機を用いる場合、ローリングサークル増幅により一本鎖核酸製剤 3 を等温増幅するための核酸増幅用反応液 2 3 は、緩衝液を 0 mM 以上 1 0 mM 以下の終濃度で含むことが好ましい。緩衝液として、例えば、トリス (t r i s) 緩衝液等が挙げられる。また、ローリングサークル増幅により一本鎖核酸製剤 3 を等温核酸増幅する場合、核酸増幅用反応液 2 3 の pH は 7 . 0 以上 9 . 0 以下であることが好ましい。核酸増幅用反応液 2 3 の組成及び pH を上記のとおりにした場合、核酸増幅用反応液 2 3 における pH の変化を検出することができる。pH の変化は一本鎖核酸製剤 3 を等温核酸増幅することで生じる現象に対応する。

30

【 0 0 5 9 】

3 . 結合物質 1 及び分析方法が奏する効果

(1 A) 目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A では、核酸増幅及び現象は生じ難い。そのため、図 7 の S T E P 4、5 に示す核酸増幅用反応液 2 3 の中に、目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A が存在していても、目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A は、目的物質 7 の検出を妨げ難い。その結果、図 7 の S T E P 3 と S T E P 4 との間において、目的物質 7 と結合していない第 1 の結合物質 1 A を分離する処理を行わなくてもよい。

40

(1 B) 第 1 の結合物質 1 A は、相補核酸 5 を備える。そのため、第 1 の結合物質 1 A は、前記 (1 A) の効果が一層高い。

【 0 0 6 0 】

(1 C) 図 7 の S T E P 5 において、目的物質 7 と結合している第 1 の結合物質 1 A は、核酸増幅及び現象を生じさせるので、生じた現象に基づき目的物質 7 を検出することができる。

50

【 0 0 6 1 】

(1 D) 本開示の分析方法では、例えば、核酸増幅の結果、核酸増幅用反応液 2 3 の水素イオン濃度が変化する。本開示の分析方法では、例えば、核酸増幅用反応液 2 3 に生じる水素イオン濃度の変化を、pH 計測機を用いて計測することができる。その場合、pH 計測機の計測結果に基づき、目的物質 7 を検出することができる。

【 0 0 6 2 】

(1 E) 本開示の分析方法では、例えば、核酸増幅の結果、核酸増幅用反応液 2 3 のピロリン酸濃度が変化する。本開示の分析方法では、例えば、核酸増幅用反応液 2 3 に生じるピロリン酸濃度の変化を、発光量変化や酸化還元電位変化に基づき計測することができる。その場合、発光量変化や酸化還元電位変化に基づき、目的物質 7 を検出することができる。

10

【 0 0 6 3 】

(1 F) 本開示の分析方法では、例えば、増幅核酸 2 7 に吸着するインターカレーター型発光色素又はマイナーグループ型発光色素を使用することで、核酸増幅用反応液 2 3 に生じる発色、発光、又は蛍光を計測することができる。本開示の分析方法では、例えば、核酸増幅用反応液 2 3 に生じる発色、発光、又は蛍光の計測結果に基づき、目的物質 7 を検出することができる。

【 0 0 6 4 】

(1 G) 本開示の分析方法では、例えば、目的物質 7 と結合した結合物質 1 のみが核酸増幅の対象となる。その場合、目的物質 7 の濃度が高い程、核酸増幅用反応液 2 3 に生じる発色強度、発光強度、蛍光強度、酸化還元電位変化量、又は pH 変化量が大きくなる。よって、本開示の分析方法によれば、免疫手法的に目的物質 7 の濃度を定量分析することができる。

20

【 0 0 6 5 】

(1 H) 本開示の分析方法では、例えば、等温核酸増幅を等温で行う。等温核酸増幅を等温で行う場合、一定温度で反応が進行する。等温核酸増幅を等温で行う場合は、昇温、降温等の温度サイクルを必要とするポリメラーゼ連鎖反応を行う場合に比べて、本開示の分析方法を簡易検出法へ応用することが容易である。

【 0 0 6 6 】

4 . 実施例

30

(4 - 1) 第 1 の結合物質 1 A の合成

配列番号 1 の DNA 配列を合成した。配列番号 1 の DNA 配列は、一本鎖核酸製剤 3 に対応する。配列番号 1 の DNA 配列は、Anal.Chem.2020,92,9895 - 9900 (以下では文献 1 とする)に記載された DNA 配列を一部改変したものであった。

【 0 0 6 7 】

配列番号 1 の DNA 配列は、配列番号 2 の DNA 配列を含む。文献 1 の記載によれば、配列番号 2 の DNA 配列は、新型コロナウイルス SARS - CoV - 2 のスパイク糖タンパク質の RBD 領域 (以下では RBD とする)を目的物質 7 とする DNA アプタマーとして同定されたものである。

【 0 0 6 8 】

配列番号 1 の DNA 配列は、配列番号 3 の DNA 配列を含む。配列番号 3 の DNA 配列は、相補核酸 5 と相補する DNA 配列であり、3' 末端領域 9 に対応する。

40

【 0 0 6 9 】

配列番号 1 の DNA 配列は、3' 最末端から始まる領域 2 8 に、配列番号 4 の DNA 配列を含む。配列番号 4 の DNA 配列は、核酸鋳型 2 5 と相補する DNA 配列である。

【 0 0 7 0 】

合成した配列番号 1 の DNA 配列を有する一本鎖核酸製剤 3 を純水に溶解し、一本鎖核酸製剤溶液を調製した。一本鎖核酸製剤溶液における一本鎖核酸製剤 3 の終濃度は 1 0 0 μ M であった。

【 0 0 7 1 】

50

配列番号5のDNA配列を有する相補核酸5を合成した。相補核酸5における3'最末端の3'位水酸基を、アミノ基に置換した。アミノ基への置換後、相補核酸5を純水に溶解し、相補核酸溶液を調製した。相補核酸溶液における相補核酸5の終濃度は100 μ Mであった。

【0072】

NaCl (Sodium Chloride) - トリス - EDTA バッファー (buffer) と、一本鎖核酸製剤3と、相補核酸5と、純水とを含む反応液を調製した。

【0073】

トリスの終濃度は10mMであった。EDTAの終濃度は1mMであった。NaClの終濃度は50mMであった。NaCl - トリス - EDTAのpHは7.5であった。一本鎖核酸製剤3の終濃度は0.5 μ Mであった。相補核酸5の終濃度は、0 μ M、0.5 μ M、5 μ M、又は50 μ Mであった。

10

【0074】

すなわち、反応液には、相補核酸5の終濃度において異なる4種類があった。反応液における一本鎖核酸製剤3のモル濃度を1としたとき、反応液における相補核酸5のモル濃度は、0、1、10、100であった。すなわち、反応液におけるモル比率Rは、0、1、10、100のいずれかであった。

【0075】

4種類の反応液のそれぞれについて、反応液を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後に、60分間かけて一定の速度で25 $^{\circ}$ Cに温度を下げた。その結果、モル比率Rが1、10、100の場合は、一本鎖核酸製剤3と相補核酸5とが塩基対35を形成し、第1の結合物質1Aが得られた。一本鎖核酸製剤3のうち、3'末端領域9は、相補核酸5と塩基対35を形成した。第1の結合物質1Aにおいて、一本鎖核酸製剤3と相補核酸5とは、塩基対35を形成した。モル比率Rが0の場合は、塩基対35が、塩基対35を形成しない状態で残存した。

20

【0076】

(4-2) 核酸鋳型25の合成

配列番号6のDNA配列を有する一本鎖直鎖DNAを合成した。次に、一本鎖直鎖DNAの5'末端をリン酸化修飾した。次に、一本鎖直鎖DNAを、CircLigase IIの作用により環状化し、一本鎖環状DNAとした。次に、環状化せずに残存した一本鎖直鎖DNAを、Exonuclease Iで処理することにより分解し、一本鎖環状DNAを精製抽出した。精製抽出した一本鎖環状DNAを、核酸鋳型25とした。核酸鋳型25は、一本鎖核酸製剤3の3'最末端から始まる領域28と相補する配列を含んでいた。一本鎖核酸製剤3の3'最末端から始まる領域28の配列は、配列番号4の配列であった。

30

【0077】

(4-3) 増幅の検証

第1の結合物質1Aを含む核酸増幅用反応液においてローリングサークル増幅が進行するか否かを、以下のようにして検証した。

【0078】

phi29 DNA ポリメラーゼ (NEB、M0269)、及び、SYBR Green II (Takara、5771A) を含む核酸増幅用反応液23を用意した。核酸増幅用反応液23は、より具体的には、10x phi29 バッファー (終濃度1x)、dNTP mix (終濃度0.2mM)、BSA (終濃度0.1mg/mL)、SYBR Green II (終濃度1x)、phi29 DNA ポリメラーゼ (終濃度0.05U/ μ L)、核酸鋳型25 (終濃度100nM)、前記(4-1)の工程の生成物 (一本鎖核酸製剤3の終濃度が100nM)、及び純水を含んでいた。核酸増幅用反応液23の体積は25 μ Lであった。

40

【0079】

前記(4-1)の工程の生成物は、モル比率Rが0の場合の生成物、モル比率Rが1の場合の生成物、モル比率Rが10の場合の生成物、又は、モル比率Rが100の場合の生

50

成物であった。

【0080】

リアルタイムPCR解析システム(Bio-Rad、CFX Connect(登録商標))を用い、上記で調整した核酸増幅用反応液23を、30℃で3時間インキュベートした。インキュベート中は、SYBR Green IIの蛍光カインティクスをリアルタイム計測した。

【0081】

測定結果を図9に示す。図9に示すように、前記(4-1)の工程の生成物が、モル比率Rが0の条件で生成したものである場合、経時的な蛍光強度の上昇が確認された。一方、図9に示すように、前記(4-1)の工程の生成物が、モル比率Rが1、10、100の条件で生成したものである場合、蛍光強度の上昇が確認されなかった。

10

【0082】

測定結果は、以下のことを示す。前記(4-1)の工程の生成物が、モル比率Rが0の条件で生成したものである場合、生成物は、塩基対35を形成していない一本鎖核酸製剤3であった。塩基対35を形成していない一本鎖核酸製剤3は、核酸鋳型25と新たな塩基対37を形成して複合体26を形成した。そして、複合体26の形成を起点とし、ローリングサークル増幅が起き、核酸が増幅した。その結果、核酸の増幅に起因する現象を観測することができた。

【0083】

前記(4-1)の工程の生成物が、モル比率Rが1、10、100の条件で生成したものである場合、生成物は、第1の結合物質1Aであった。第1の結合物質1Aに含まれる一本鎖核酸製剤3は、相補核酸5とともに塩基対35を形成していた。そのため、核酸鋳型25は、一本鎖核酸製剤3と複合体26を形成できなかった。その結果、核酸の増幅が生じず、核酸の増幅に起因する現象を観測することができなかった。

20

【0084】

(4-4) 解離の検証

目的物質7と第1の結合物質1とを共存させたとき、一本鎖核酸製剤3と目的物質7との結合物質形成に伴い、一本鎖核酸製剤3から相補核酸5が解離するか否かを、以下のようにして検証した。

【0085】

前記「(4-1) 第1の結合物質1Aの合成」で述べた方法で、第1の結合物質1Aを合成した。第1の結合物質1Aを合成するとき、反応液における一本鎖核酸製剤3のモル濃度と、反応液における相補核酸5のモル濃度とは、いずれも0.5 μMであった。すなわち、反応液におけるモル比率Rは1であった。

30

【0086】

目的物質7として、Spike S1-His Recombinant Protein(Sinobiological社、製品番号40591-V08H)(以下ではS1とする)を使用した。S1は、アミノ酸配列中にRBDを含むタンパク質である。

【0087】

第1の結合物質1(終濃度100 nM)、S1(終濃度0 nM、25 nM、50 nM、100 nM、又は200 nM)、及び1xPBS/Tを含む反応液を調製した。

40

【0088】

1xPBS/Tとは、界面活性剤Tween 20を0.05%(v/v)含むリン酸緩衝液である。リン酸緩衝液は、137 mMのNaClと、8.1 mMのNa₂HPO₄と、2.7 mMのKClと、1.47 mMのKH₂PO₄とを含んでいた。反応液を25℃で、30分間かけてインキュベートした。

【0089】

電気泳動により、インキュベート反応物をサイズ分離した。電気泳動ゲルとして、4%-20%濃度勾配ゲル(Thermo Fisher Scientific、EC62255BOX)を使用した。電気泳動ゲル及び泳動槽(Thermo Fisher Sci

50

entific、EI0001)を、1xTBE電気泳動バッファーで満たした。TBE電気泳動バッファーは、89mMのトリスト、89mMのホウ酸と、2mMのEDTAとを含んでいた。

【0090】

インキュベートを終えた反応液のうち5 μ Lを、電気泳動サンプルバッファー(Thermo Fisher Scientific、LC6678)2 μ L及び純水3 μ Lに再懸濁した。再懸濁した液のうち4 μ Lを電気泳動に供した。電気泳動に供した4 μ Lの液は、第1の結合物質1を0.2pmol含んでいた。

【0091】

電気泳動コントロールを、同様に電気泳動に供した。電気泳動コントロールは、相補核酸5を0.2pmol含んでいた。

10

【0092】

サイズマーカーを、同様に電気泳動に供した。サイズマーカーは、50bp-ladder(Promega、G452A)を27.2ng含んでいた。

【0093】

180ボルトの電圧を印加し、40分間かけて電気泳動を実施した。次に、電気泳動ゲルを取り外した。次に、SYBR Gold(Thermo Fisher Scientific、S11494、終濃度1x)を使用して核酸を染色した。次に、ゲル撮影機(Bio-Rad、Chemidoc MP)でゲルを撮影した。

【0094】

電気泳動ゲルの核酸染色結果を図10に示す。図10に示す各レーンに供された液の組成は以下のとおりであった。

20

【0095】

・1レーン：サイズマーカー(50bp-ladder)

・2レーン：100nMの相補核酸5のみを含む液。

【0096】

・3レーン：100nMの第1の結合物質1を含み、S1は含まない反応液。

【0097】

・4レーン：100nMの第1の結合物質1と、25nMのS1とを含む反応液。

【0098】

・5レーン：100nMの第1の結合物質1と、50nMのS1とを含む反応液。

30

【0099】

・6レーン：100nMの第1の結合物質1と、100nMのS1とを含む反応液。

【0100】

・7レーン：100nMの第1の結合物質1と、200nMのS1とを含む反応液。

【0101】

S1を含まない反応液が電気泳動されたレーンでは、相補核酸5の分子量に位置する信号が確認されなかった。S1を含む反応液が電気泳動されたレーンでは、相補核酸5の分子量に位置する信号が確認された。相補核酸5の分子量に位置する信号の強度は、S1濃度が高いほど強くなった。

40

【0102】

S1を含む反応液が電気泳動されたレーンでは、第1の結合物質1Aの分子量に位置する信号の強度は、S1濃度が高いほど弱くなった。また、S1を含む反応液が電気泳動されたレーンでは、一本鎖核酸製剤3とS1とが結合して成る、見かけ上の分子量が大きい結合体33に由来すると推測される信号が確認された。結合体33に由来すると推測される信号の強度は、S1濃度が高いほど強くなった。

【0103】

電気泳動ゲルの核酸染色結果は、以下のことを示す。第1の結合物質1Aは、S1と結合し、結合体33を形成する活性を有していた。結合体33の形成を起点とし、相補核酸5が一本鎖核酸製剤3から解離した。それと呼応し、一本鎖核酸製剤3は、S1との結合

50

体 3 3 を形成した。

【 0 1 0 4 】

5 . 他の実施形態

以上、本開示の実施形態について説明したが、本開示は上述の実施形態に限定されることなく、種々変形して実施することができる。

【 0 1 0 5 】

(1) 図 7 に示す分析方法、及び実施例において、第 1 の結合物質 1 A に代えて、第 2 の結合物質 1 B を使用してもよい。

【 0 1 0 6 】

目的物質 7 と結合していない第 2 の結合物質 1 B では、核酸増幅及び現象は生じ難い。そのため、図 7 の S T E P 4、5 に示す核酸増幅用反応液 2 3 の中に、目的物質 7 と結合していない第 2 の結合物質 1 B が存在していても、目的物質 7 の検出を妨げ難い。その結果、図 7 の S T E P 3 と S T E P 4 との間において、目的物質 7 と結合していない第 2 の結合物質 1 B を分離する処理を行わなくてもよい。

10

【 0 1 0 7 】

なお、図 7 の S T E P 5 において、目的物質 7 と結合している第 2 の結合物質 1 B は、核酸増幅及び現象を生じさせるので、目的物質 7 を検出することができる。

【 0 1 0 8 】

(2) 上記実施形態における 1 つの構成要素が有する複数の機能を、複数の構成要素によって実現したり、1 つの構成要素が有する 1 つの機能を、複数の構成要素によって実現したりしてもよい。また、複数の構成要素が有する複数の機能を、1 つの構成要素によって実現したり、複数の構成要素によって実現される 1 つの機能を、1 つの構成要素によって実現したりしてもよい。また、上記実施形態の構成の一部を省略してもよい。また、上記実施形態の構成の少なくとも一部を、他の上記実施形態の構成に対して付加又は置換してもよい。

20

【 0 1 0 9 】

(3) 上述した分析方法の他、結合物質の製造方法等、種々の形態で本開示を実現することもできる。

[本明細書が開示する技術思想]

[項目 1]

目的物質 (7) と結合する活性を有する一本鎖核酸製剤 (3) と、
前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合していない場合は、前記一本鎖核酸製剤の 3 ' 末端領域 (9) と塩基対 3 5 を形成し、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合する場合は、前記 3 ' 末端領域から解離する相補核酸 (5) と、
を備える、
結合物質 (1、1 A、1 B) 。

30

[項目 2]

項目 1 に記載の結合物質であって、
前記相補核酸は前記一本鎖核酸製剤の一部であり、
前記一本鎖核酸製剤が分子内で折れ曲がった構造をとることで、前記一本鎖核酸製剤の一部は前記 3 ' 末端領域と前記塩基対を形成する、
結合物質。

40

[項目 3]

結合物質 (1、1 A、1 B) を用いて目的物質 (7) を検出する分析方法であって、
前記結合物質は、
前記目的物質と結合する活性を有する一本鎖核酸製剤 (3) と、
前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合していない場合は、前記一本鎖核酸製剤の 3 ' 末端領域 (9) と塩基対 3 5 を形成し、前記一本鎖核酸製剤が前記目的物質と結合する場合は、前記 3 ' 末端領域から解離する相補核酸 (5) と、
を備え、

50

前記結合物質と、前記目的物質を含む試料(21)とを混合し、
前記一本鎖核酸製剤を増幅し、
前記一本鎖核酸製剤を増幅することで生じる現象を検出する、
分析方法。

[項目4]

項目3に記載の分析方法であって、

前記現象は、(a)増幅された前記一本鎖核酸製剤に結合する検出試薬を用いて得られる発色、発光、又は蛍光、(b)前記一本鎖核酸製剤の増幅によるヌクレオチド取り込みに伴う水素イオンの生成、及び(c)前記一本鎖核酸製剤の増幅によるヌクレオチド取り込みに伴うピロリン酸の生成のうちの少なくとも1つである、

分析方法。

10

[項目5]

項目3又は4に記載の分析方法であって、

前記現象が発色、発光、又は蛍光である場合、受光デバイス(29)を用いて前記現象を検出し、

前記現象が酸化還元電位の変化である場合、電位計測機(29)を用いて前記現象を検出し、

前記現象が水素イオンの生産、消費、又は吸収である場合、pH計測機(29)を用いて前記現象を検出する、

分析方法。

20

[項目6]

項目3~5のいずれか1項に記載の分析方法であって、

温度サイクルを必要としない等温核酸増幅法により前記一本鎖核酸製剤を増幅する、

分析方法。

[項目7]

項目3~6のいずれか1項に記載の分析方法であって、

前記3'末端領域に相補的な配列を含む一本鎖環状核酸(25)と、前記一本鎖核酸製剤との複合体(26)を形成し、

前記複合体を起点とし、核酸増幅用反応液(23)を用い、ローリングサークル増幅法により前記一本鎖核酸製剤を増幅する、

分析方法。

30

[項目8]

項目3~6のいずれか1項に記載の分析方法であって、

ローリングサークル増幅法により前記一本鎖核酸製剤を増幅し、

前記一本鎖核酸製剤を増幅するときの核酸増幅用反応液(23)は、トリス緩衝液を0mM以上10mM以下の終濃度で含み、

前記核酸増幅用反応液のpHは7.0以上9.0以下であり、

pH計測機(29)を用いて前記現象を検出する、

分析方法。

40

[項目9]

項目3~8のいずれか1項に記載の分析方法であって、

前記目的物質は、タンパク質、糖、脂質、核酸、又は低分子化合物である、

分析方法。

50

【図面】

【図 1】

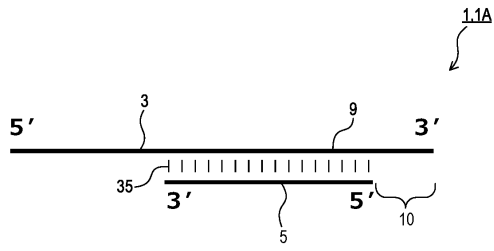


FIG. 1

【図 2】

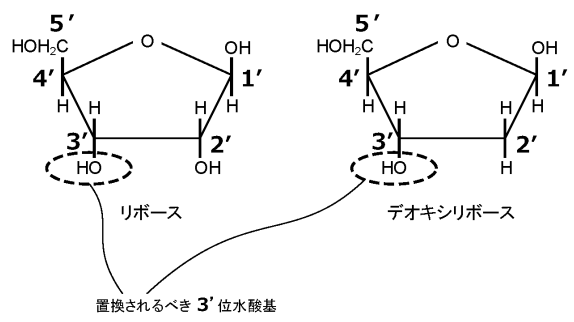


FIG. 2

【図 3】

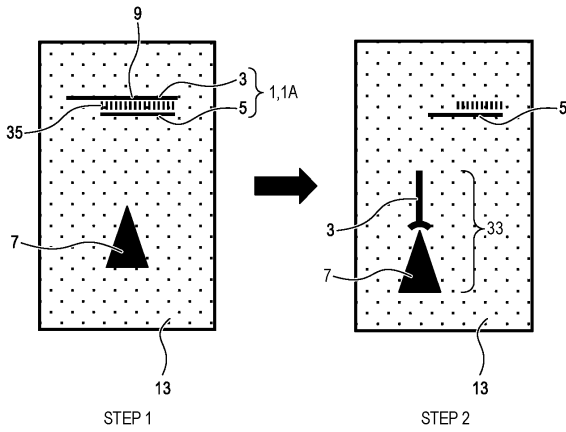


FIG. 3

【図 4】

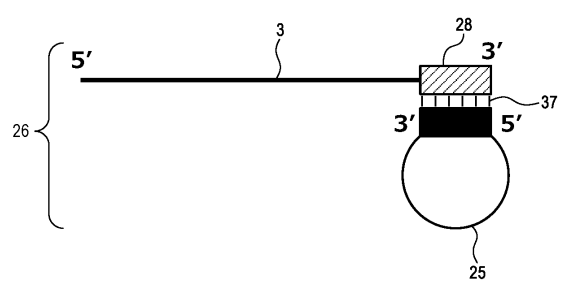


FIG. 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

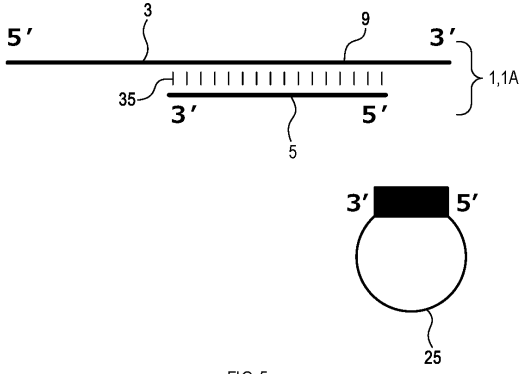


FIG. 5

【 図 6 】

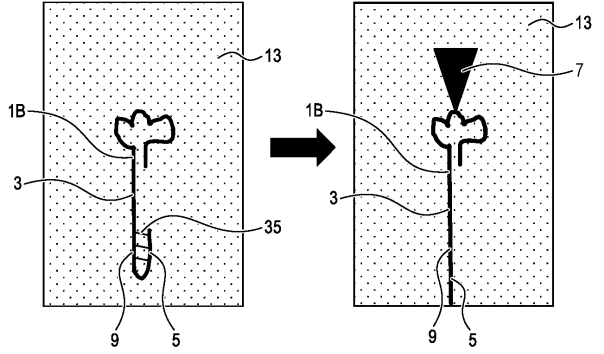


FIG. 6

10

【 図 7 】

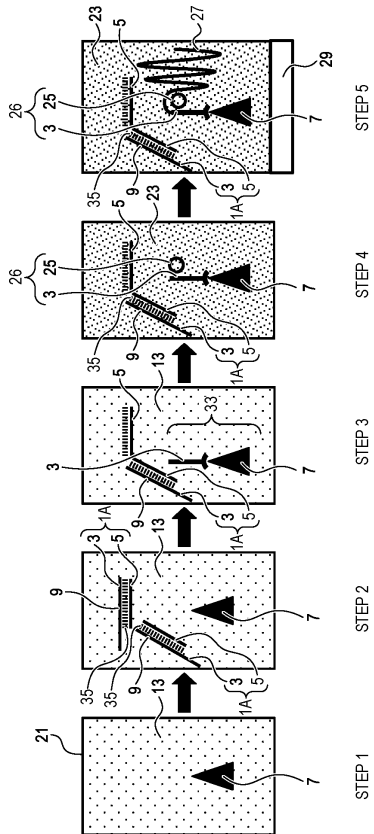


FIG. 7

【 図 8 】

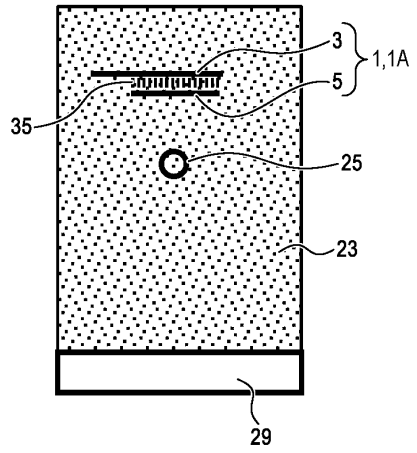


FIG. 8

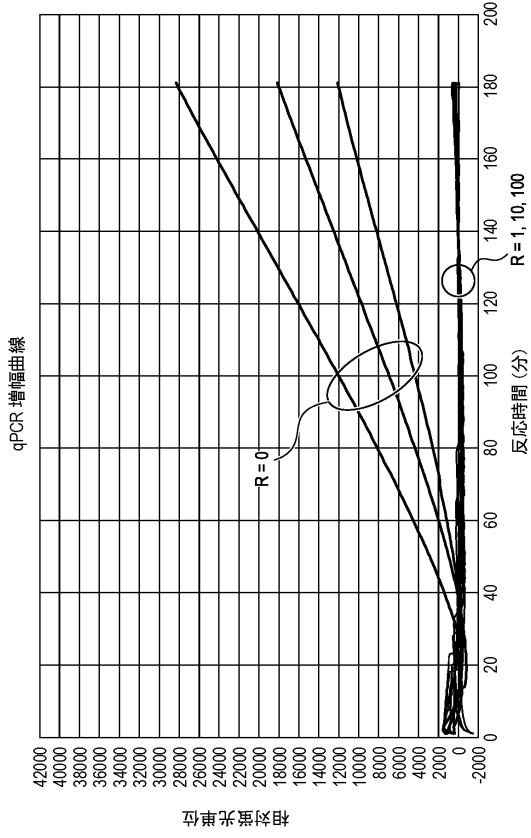
20

30

40

50

【 図 9 】



【 図 10 】

FIG. 9

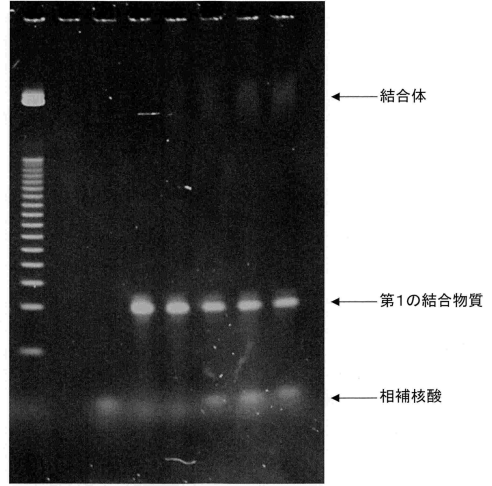


FIG. 10

【 配列表 】

[0007670166000001.xml](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 株式会社デンソー内

(72)発明者 早川 溪

愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 株式会社デンソー内

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献

特開 2 0 2 0 - 1 6 5 8 1 8 (J P , A)

特開 2 0 0 7 - 2 8 9 1 6 7 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 4 5 9 3 9 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 2 8 4 2 1 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 0 9 7 9 1 (W O , A 1)

特表 2 0 1 9 - 5 1 3 3 5 0 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 1 2 6 9 4 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 0 9 7 4 0 (J P , A)

特開 2 0 0 9 - 2 2 2 5 1 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 5 8 7 5 (W O , A 1)

LI, C.H., et al. , A graphene oxide-based strand displacement amplification platform for ricin detection using aptamer , Biosens. Bioelectron. , 2017年 , vol.91 , p.149-154, Supplementary Information

Talanta , 2019年 , vol.197 , p.406-412

Anal. Chem. , 2007年 , vol. 79, no.19 , p.7492-7500

(58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 6 8 4 4

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)