

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年6月28日(28.06.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/086772 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079856
- (22) 国際出願日: 2011年12月22日(22.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-287590 2010年12月24日(24.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): NEC
ソフト株式会社(NEC Soft, Ltd.) [JP/JP]; 〒
1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号
Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 堀井 克紀
(HORI Katsunori) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区
新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会
社内 Tokyo (JP). 加藤 信太郎(KATOU Shintarou)

[JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP). 秋富 穰(AKITOMI Jou) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP). 和賀 巖(WAGA Iwao) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソフト株式会社内 Tokyo (JP).

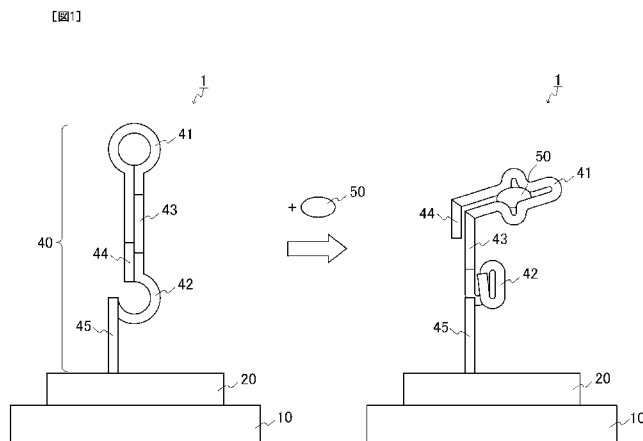
(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都市リサーチパーク1号館301号室 Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: ANALYTICAL DEVICE AND ANALYTICAL METHOD

(54) 発明の名称: 分析用デバイスおよび分析方法



(57) Abstract: Provided is a technique whereby a target to be analyzed can be easily analyzed. An analytical device comprising a substrate, a nucleic acid element and a signal detection unit, said nucleic acid element and said signal detection unit being positioned on said substrate, wherein the nucleic acid element comprises a first nucleic acid molecule and a second nucleic acid molecule. The first nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule capable of binding to a target, while the second nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule capable of binding to streptavidin. In the case where the target does not bind to the first nucleic acid molecule, the streptavidin-binding capacity of the second nucleic acid molecule is inactivated. In the case where the target binds to the first nucleic acid molecule, the streptavidin-binding capacity of the second nucleic acid molecule is activated. The detection unit detects the binding between the second nucleic acid molecule and streptavidin. By using the detection device, the target is bound to the first nucleic acid molecule and, as a result of the binding of the target to the first nucleic acid molecule, streptavidin is bound to the second nucleic acid molecule. Thus, the target can be analyzed by detecting the binding between the second nucleic acid molecule and streptavidin.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/086772 A1



- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

目的の分析対象物を簡易に分析可能な技術を提供する。本発明の分析用デバイスは、基板、核酸素子およびシグナルの検出部を含み、前記基板に、前記核酸素子および前記検出部が配置されたデバイスであり、前記核酸素子は、第 1 核酸分子および第 2 核酸分子を含む。前記第 1 核酸分子は、ターゲットと結合可能な核酸分子であり、前記第 2 核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、前記第 1 核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第 2 核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、前記第 1 核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第 2 核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化される。前記検出部は、前記第 2 核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出する検出部である。前記検出デバイスを用い、前記第 1 核酸分子に前記ターゲットを結合させ、前記第 1 核酸分子への前記ターゲットの結合により前記第 2 核酸分子にストレプトアビジンを結合させれば、前記第 2 核酸分子とストレプトアビジンとの結合の検出により、ターゲットを分析できる。

明 細 書

発明の名称：分析用デバイスおよび分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、分析用デバイスおよび分析方法に関する。

背景技術

[0002] 臨床医療、食品、環境等の様々な分野において、目的のターゲットの検出が必要とされている。前記ターゲットの検出には、一般的に、前記ターゲットとの相互作用が利用されている。中でも、前記ターゲットに特異的に結合する抗体を用いた手法が汎用されている（特許文献1）。この方法は、例えば、酵素で標識化された標識化抗体を使用する。具体的には、まず、試料中のターゲットと前記標識化抗体とを結合させる。そして、前記酵素に対する発色基質を使用し、前記標識化抗体における前記酵素の発色反応を検出することによって、前記ターゲットを分析する。

[0003] しかしながら、前記抗体は、動物への免疫によって取得されるため、以下のような問題がある。すなわち、毒性の高いターゲットは、免疫動物にとって致命的である。また、低分子のターゲットは、免疫動物において抗原として認識され難い。このため、これらのターゲットに特異的に結合する抗体を取得すること自体が、極めて困難である。このため、検出可能なターゲットに限界がある。

[0004] また、前記抗体を用いた場合、処理工程が煩雑という問題がある。さらに、臨床医療等においては、多数の試料を簡便に分析する必要があるため、前記検出方法は、小型化デバイスによって簡便に行うことが求められている。しかしながら、前記抗体を使用する場合、デバイスの小型化が困難である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2009-133712号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] そこで、本発明は、目的のターゲットを簡易に分析可能な新たな技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の分析用デバイスは、基板、核酸素子およびシグナルの検出部を含み、

前記基板に、前記核酸素子および前記検出部が配置され、

前記核酸素子は、第1核酸分子および第2核酸分子を含み、

前記第1核酸分子は、ターゲットに結合可能な核酸分子であり、

前記第2核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、

前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、

前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化され、

前記検出部は、前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出する検出部であることを特徴とする。

[0008] 本発明のターゲットの分析方法は、前記本発明の分析用デバイスを用い、前記分析用デバイスに試料およびストレプトアビジンを添加する工程、および、

前記検出部で前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出することによって、ターゲットを検出する工程を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、分析対象物を簡易に分析可能である。本発明は、例えば、アプタマーの技術を適用できる。アプタマーは、例えば、試験管内で取得されるため、毒性の高い化合物でも、それに結合可能なアプタマーを取得可能であり、また、低分子化合物と結合可能なアプタマーも取得可能である。したがって、本発明によれば、例えば、抗原抗体反応を用いた手法の問題点等を解消できる。また、本発明によれば、例えば、電気化学的検出等のシグ

ナル検出による簡易な分析が可能である。さらに、本発明によれば、例えば、前記核酸素子を使用することから、デバイスの小型化およびチップ化が可能であるため、多数の検体でも、簡便な分析が可能となる。本発明において、「分析」は、定量分析、半定量分析、定性分析を含む概念である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、本発明における分析デバイスの一例を模式的に示す説明図である。

発明を実施するための形態

[0011] 核酸素子

本発明において、前記核酸素子は、前述のように、前記第1核酸分子および前記第2核酸分子を含む。前記第1核酸分子は、ターゲットと結合可能な核酸分子である。前記第2核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能は不活性化され、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能は活性化される核酸分子である。

[0012] 前記第1核酸分子は、前記ターゲットと結合可能な核酸分子であればよい。前記第1核酸分子は、例えば、分析のターゲットの種類に応じて適宜選択できる。前記第1核酸分子が前記ターゲットと結合可能か否かは、例えば、表面プラズモン共鳴分子相互作用解析等により検出できる。具体的には、前記結合能は、例えば、ピアコア3000(商品名、GE Healthcare UK Ltd.)またはピアコアX(商品名、GE Healthcare UK Ltd.)等を用いて検出できる。

[0013] 前記第1核酸分子は、例えば、自己アニーリングによる二次構造を有してもよい。前記二次構造は、例えば、ステムループ構造があげられる。

[0014] 前記第1核酸分子は、例えば、一本鎖核酸分子および二本鎖核酸分子があげられる。

[0015] 前記第1核酸分子は、例えば、前記ターゲットの結合により、構造が変化

する核酸分子である。前記構造の変化は、例えば、二次構造の変化である。前記第1核酸分子は、例えば、前記ターゲットの結合により構造が変化しやすいことから、一本鎖核酸分子が好ましい。

[0016] 前記第1核酸分子は、例えば、その構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、修飾化ヌクレオチド残基の意味を含み、例えば、リボヌクレオチド残基の誘導体およびデオキシリボヌクレオチド残基の誘導体等でもよい。前記第1核酸分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみからなる核酸分子でもよいし、前記ヌクレオチド残基を含む核酸分子でもよい。前記第1核酸分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基として、リボヌクレオチド残基のみを含んでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基のみを含んでもよいし、両方を含んでもよい。具体的に、前記第1核酸分子は、例えば、ポリリボヌクレオチドからなるRNA、ポリリボヌクレオチドを含むRNA、デオキシリボヌクレオチドからなるDNA、デオキシリボヌクレオチドを含むDNA等があげられる。

[0017] 前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、糖残基が修飾されたヌクレオチド残基があげられる。前記糖残基は、例えば、リボース残基およびデオキシリボース残基があげられる。前記糖残基における修飾部位は、特に制限されず、例えば、前記糖残基の2'位および/または4'位があげられる。前記修飾は、例えば、メチル化、フルオロ化、アミノ化、チオ化等があげられる。前記修飾化ヌクレオチド残基は、例えば、2'-メチルピリミジン残基、2'-フルオロピリミジン等があげられ、具体例として、2'-メチルウラシル(2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基)、2'-メチルシトシン(2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基)、2'-フルオロウラシル(2'-フルオロ化-ウラシルヌクレオチド残基)、2'-フルオロシトシン(2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基)、2'-アミノウラシル(2'-アミノ化-ウラシル-ヌクレオチド残基)、2'-アミノシトシ

ン（2′-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基）、2′-チオウラシル（2′-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基）、2′-チオシトシン（2′-チオ化-シトシンヌクレオチド残基）等があげられる。

[0018] 前記ヌクレオチド残基における塩基は、例えば、天然塩基（非人工塩基）でもよいし、非天然塩基（人工塩基）でもよい。前記天然塩基は、例えば、A、C、G、T、Uおよびこれらの修飾塩基があげられる。前記非天然塩基は、例えば、修飾塩基および改変塩基等があげられ、前記天然塩基と同様の機能を有することが好ましい。前記同様の機能を有する人工塩基は、例えば、グアニン（g）に代えて、シトシン（c）に結合可能な人工塩基、シトシン（c）に代えて、グアニン（g）に結合可能な人工塩基、アデニン（a）に代えて、チミン（t）またはウラシル（u）に結合可能な人工塩基、チミン（t）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基、ウラシル（u）に代えて、アデニン（a）に結合可能な人工塩基等があげられる。前記修飾塩基は、例えば、メチル化塩基、フルオロ化塩基、アミノ化塩基、チオ化塩基等があげられる。前記修飾塩基の具体例としては、例えば、2′-メチルウラシル、2′-メチルシトシン、2′-フルオロウラシル、2′-フルオロシトシン、2′-アミノウラシル、2′-アミノシトシン、2′-チオウラシル、2′-チオシトシン等があげられる。本発明において、例えば、a、g、c、tおよびuで表わされる塩基は、前記天然塩基の他に、前記天然塩基のそれぞれと同様の機能を有する前記人工塩基の意味も含む。

[0019] 第1核酸分子は、例えば、前記構成単位として人工核酸モノマー残基を含んでもよい。前記人工核酸モノマー残基は、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2′-O, 4′-C-Ethylenebridged Nucleic Acids）等があげられる。前記モノマー残基における塩基は、例えば、前述と同様である。

[0020] 前記第1核酸分子が、一本鎖核酸分子の場合、例えば、一本鎖DNA、一本鎖RNA等があげられる。前記第1核酸分子が、二本鎖核酸分子の場合、

例えば、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA-RNAの二本鎖等があげられる。

[0021] 前記第1核酸分子は、例えば、天然由来の核酸配列でもよいし、合成した核酸配列でもよい。合成方法は、特に制限されず、例えば、DNA合成機およびRNA合成機等の核酸合成機により、NTPおよびdNTP等のヌクレオチド等を用いて、末端から化学合成する方法等があげられる。

[0022] 前記第1核酸分子は、例えば、アプタマーが好ましい。前記アプタマーは、一般的に、特定のターゲットに特異的に結合可能な核酸分子を意味する。前記アプタマーは、前述のように、例えば、DNAでもRNAでもよく、一本鎖RNAおよび一本鎖DNA等の一本鎖核酸分子、二本鎖RNAおよび二本鎖DNA等の二本鎖核酸分子でもよい。

[0023] 前記第1核酸分子の長さは、特に制限されない。前記長さは、特に制限されず、下限は、例えば、7塩基長であり、上限は、例えば、120塩基長であり、好ましくは80塩基長、より好ましくは35塩基長、さらに好ましくは20塩基長である。前記第1核酸分子の長さの範囲は、例えば、7~120塩基長であり、好ましくは7~80塩基長、より好ましくは7~35塩基長、さらに好ましくは7~20塩基長である。

[0024] 前記第1核酸分子は、前述のように、分析目的のターゲットの種類に応じて、適宜選択でき、何ら制限されない。

[0025] 前記アプタマーの製造方法は、特に制限されず、例えば、前述の公知の合成方法によって製造できる。また、特定のターゲットに結合可能なアプタマーは、例えば、公知のSELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 法等により、製造することもできる。

[0026] SELEX法によるアプタマーの製造は、特に制限されず、例えば、以下のようにして行える。まず、複数の核酸分子を含む核酸プールを準備し、前記核酸分子プールの核酸分子とターゲットとを結合（会合）させ、前記核酸分子と前記ターゲットとの複合体を形成する。そして、前記複合体から、前

記複合体の形成に関与した核酸分子のみを回収することにより、前記ターゲットに特異的に結合可能なアプタマーを製造できる。

[0027] 前記第2核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化される核酸分子である。

[0028] 本発明において、「ストレプトアビジンに結合可能」とは、例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの断片およびストレプトアビジン誘導体のいずれに結合可能でもよい。また、ストレプトアビジンが他の物質と複合体を形成している場合、前記第2核酸分子は、例えば、前記複合体におけるストレプトアビジンと結合可能である。

[0029] 前記第2核酸分子がストレプトアビジンと結合可能か否かは、例えば、前述と同様に、表面プラズモン共鳴分子相互作用解析等により決定できる。

[0030] 前記第2核酸分子は、例えば、自己アニーリングによる二次構造を有してもよい。前記二次構造は、例えば、ステムループ構造があげられる。

[0031] 前記第2核酸分子は、例えば、一本鎖核酸分子および二本鎖核酸分子があげられる。

[0032] 前記第2核酸分子は、例えば、前記第1核酸分子の前記構造変化により、構造が変化する核酸分子である。前記構造の変化は、例えば、二次構造の変化である。前記第2核酸分子は、例えば、前記第1核酸分子の前記構造変化により構造が変化しやすいことから、一本鎖核酸分子が好ましい。

[0033] 前記第2核酸分子は、例えば、その構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、前記第1核酸分子における例示と同様である。前記第2核酸分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみからなる核酸分子でもよいし、前記ヌクレオチド残基を含む核酸分子でもよい。前記第2核酸分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基として、リボヌクレオチド残基のみを含んでもよいし、デオキシリボヌクレオチド残基のみを含んでもよいし、両方を

含んでもよい。具体的に、前記第2核酸分子は、例えば、ポリリボヌクレオチドからなるRNA、ポリリボヌクレオチドを含むRNA、デオキシリボヌクレオチドからなるDNA、デオキシリボヌクレオチドを含むDNA等があげられる。

[0034] 前記第2核酸分子が、一本鎖核酸分子の場合、例えば、一本鎖DNA、一本鎖RNA等があげられる。前記第2核酸分子が、二本鎖核酸分子の場合、例えば、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA-RNAの二本鎖等があげられる。

[0035] 前記第2核酸分子は、例えば、天然由来の核酸配列でもよいし、合成した核酸配列でもよい。合成方法は、特に制限されず、例えば、前記第1核酸分子における例示と同様である。

[0036] 前記第2核酸分子は、例えば、アプタマーが好ましい。前記アプタマーは、前述のように、例えば、DNAでもRNAでもよく、一本鎖RNAおよび一本鎖DNA等の一本鎖核酸分子、二本鎖RNAおよび二本鎖DNA等の二本鎖核酸分子でもよい。

[0037] 前記第2核酸分子の長さは、特に制限されない。前記長さは、特に制限されず、下限は、例えば、7塩基長であり、上限は、例えば、120塩基長であり、好ましくは80塩基長、より好ましくは35塩基長、さらに好ましくは20塩基長である。前記第2核酸分子の長さの範囲は、例えば、7~120塩基長であり、好ましくは7~80塩基長、より好ましくは7~35塩基長、さらに好ましくは7~20塩基長である。

[0038] 前記第2核酸分子は、例えば、下記(a)、(b)、(c)または(d)のいずれかのポリヌクレオチドを含む核酸分子が好ましい。

(a) 配列番号1~10のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 前記(a)の前記塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加および/または挿入された塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

(c) 前記 (a) の前記塩基配列との同一性が50%以上の塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

(d) 前記 (a) の前記塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

[0039] 以下に、配列番号1～10の塩基配列を示す。各配列において下線部は、共通配列を表わす。

配列番号1 (85)

taatacgact cactatagca atggtacggt acttcccgac gcaccgatcg caggttcgg
g acaaaagtgc acgctacttt gctaa

配列番号2 (18)

AC GCACCGATCG CAGGTT

配列番号3 (20)

GAC GCACCGATCG CAGGTTC

配列番号4 (22)

CGAC GCACCGATCG CAGGTTTCG

配列番号5 (24)

CCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGG

配列番号6 (26)

CCCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGGG

配列番号7 (28)

TCCCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGGG A

配列番号8 (60_3-10)

GCA ATGGTACGGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGGG AAAAAAG

配列番号9 (60_5-10)

GGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGGG AAAAAAGTGC ACGCTAC

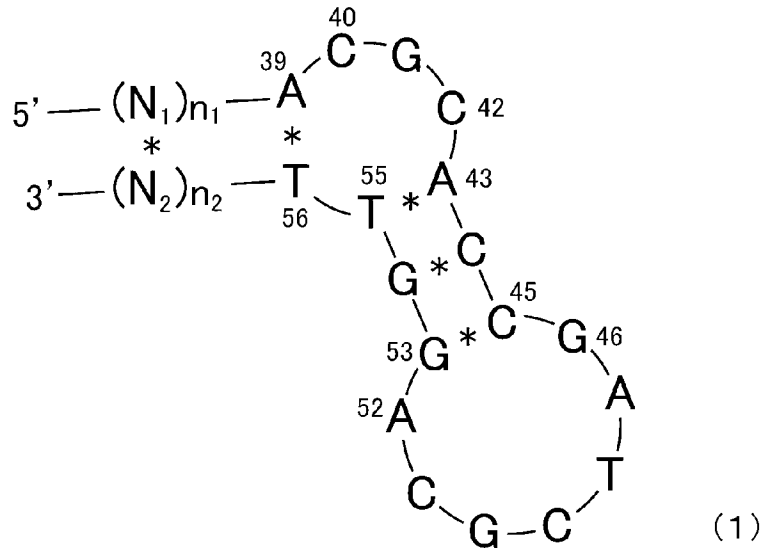
配列番号10 (60)

GCA ATGGTACGGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTTCCGGG AAAAAAGTGC ACGC

TAC

- [0040] 前記塩基配列の中でも、例えば、ストレプトアビジンへの結合性に優れ、また、前記第2核酸分子の設計が容易であることから、配列番号2～10の塩基配列が好ましい。
- [0041] 前記第2核酸分子は、例えば、前記塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む核酸分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子でもよい。
- [0042] 以下、前記(a)のポリヌクレオチドからなる核酸分子または前記ポリヌクレオチドを含む核酸分子を、(a)の核酸分子といい、前記(b)のポリヌクレオチドからなる核酸分子または前記ポリヌクレオチドを含む核酸分子を、(b)の核酸分子といい、前記(c)のポリヌクレオチドからなる核酸分子または前記ポリヌクレオチドを含む核酸分子を、(c)の核酸分子といい、前記(d)のポリヌクレオチドからなる核酸分子または前記ポリヌクレオチドを含む核酸分子を、(d)の核酸分子という。
- [0043] 前記(a)の核酸分子は、例えば、前記(a)のポリヌクレオチドからなる核酸分子または前記ポリヌクレオチドを含む核酸分子である。
- (a) 配列番号1～10のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド
- [0044] 前記(a)の核酸分子は、例えば、下記一般式(1)で表わされる構造を形成可能な核酸分子である。前記核酸分子は、例えば、前記一般式(1)を満たし、且つ、前記配列番号1の塩基配列もしくはその部分配列からなる核酸分子、または、前記配列番号1の塩基配列もしくはその部分配列を含む核酸分子である。

[化1]



[0045] 前記一般式(1)において、塩基に付記した数字は、前記配列番号1の塩基配列における塩基の番号を示すものであり、必ずしも前記一般式(1)で表わされる核酸分子における塩基の番号を示すものではない。前記一般式(1)において、アスタリスクは、水素結合であり、ステム構造を形成可能であることを示す。前記一般式(1)において、前記 N_1 および前記 N_2 は、ヌクレオチド残基を示す。前記一般式(1)において、前記 n_1 および前記 n_2 は、それぞれ前記ヌクレオチド残基 N_1 および前記 N_2 の数を示す。前記 $(N_1)n_1$ と前記 $(N_2)n_2$ とは、それぞれ、相互に水素結合してステム構造を形成可能である。前記 $(N_1)n_1$ が複数のヌクレオチド残基を有する場合、各ヌクレオチド残基は同じでも異なってもよい。前記 $(N_2)n_2$ が複数のヌクレオチド残基を有する場合、各ヌクレオチド残基は同じでも異なってもよい。

[0046] 前記核酸分子は、前記一般式(1)に示すように、前記配列番号1で表わされる塩基配列において、例えば、40番目~42番目の配列は、バルジ構造を形成可能であり、46番目~52番目の配列は、ループ構造を形成可能であり、43番目~45番目の配列と53番目~55番目の配列は、ステム構造を形成可能である。そして、前記核酸分子は、前記一般式(1)に示すように、さらに、前記配列番号1で表わされる塩基配列において、39番目

から上流（5'側）の配列「 $(N_1) n_1 - A$ 」と、56番目から下流（3'側）の配列「 $T - (N_2) n_2$ 」とにより、ステム構造を形成可能である。

[0047] 本発明において、「ループ構造形成可能」は、例えば、実際にループ構造を形成すること、および、ループ構造が形成されていなくても、条件によってループ構造を形成可能なことも含む。また、「ループ構造形成可能」は、例えば、実験的に確認した場合、および、コンピュータ等のシミュレーションで予測した場合、の双方を含む。本発明において、「ステム構造形成可能」は、例えば、実際にステム構造を形成すること、および、ステム構造が形成されていなくても、条件によってステム構造形成可能なことも含む。また、「ステム構造形成可能」は、例えば、実験的に確認した場合、および、コンピュータ等のシミュレーションで予測した場合、の双方を含む。

[0048] 前記一般式（1）において、前記 n_1 と前記 n_2 は、例えば、それぞれ、0、1、2、3、4または5であり、同一の数である。

前記 n_1 と前記 n_2 が0の場合、例えば、前記「 $(N_1) n_1 - A$ 」は「A」、前記「 $T - (N_2) n_2$ 」は「T」であり、前記一般式（1）の配列は、配列番号2で表わされ、前記ステム構造は1塩基対となる。

前記 n_1 と前記 n_2 が1の場合、例えば、前記「 $(N_1) n_1 - A$ 」は「GA」、前記「 $T - (N_2) n_2$ 」は「TC」であり、前記一般式（1）の配列は、配列番号3で表わされ、前記ステム構造は2塩基対である。

前記 n_1 と前記 n_2 が2の場合、例えば、前記「 $(N_1) n_1 - A$ 」は「CGA」、前記「 $T - (N_2) n_2$ 」は「TCG」であり、前記一般式（1）の配列は、配列番号4で表わされ、前記ステム構造は3塩基対である。

前記 n_1 と前記 n_2 が3の場合、例えば、前記「 $(N_1) n_1 - A$ 」は「CCGA」、前記「 $T - (N_2) n_2$ 」は「TCGG」であり、前記一般式（1）の配列は、配列番号5で表わされ、前記ステム構造は4塩基対である。

前記 n_1 と前記 n_2 が4の場合、例えば、前記「 $(N_1) n_1 - A$ 」は「CCCGA」、前記「 $T - (N_2) n_2$ 」は「TCGGG」であり、前記一般式（1）の配列は、配列番号6で表わされ、前記ステム構造は5塩基対である。

前記 n_1 と前記 n_2 が 5 の場合、例えば、前記 「 $(N_1) n_1 - A$ 」 は 「T C C C G A」、前記 「 $T - (N_2) n_2$ 」 は 「T C G G G A」であり、前記一般式 (1) の配列は、配列番号 7 で表わされ、前記ステム構造は 6 塩基対である。

[0049] 前記 (a) の核酸分子は、前述のように、例えば、前記一般式 (1) で表わされる構造からなる核酸分子でもよいし、前記一般式 (1) で表わされる構造を含む核酸分子でもよい。後者の場合、例えば、前記一般式 (1) における前記 $(N_1) n_1$ の上流および前記 $(N_2) n_2$ の下流のいずれか一方、または両方に、さらに配列が付加されていてもよい。前記付加配列は、例えば、前記配列番号 1 で表わされる塩基配列に基づいて設定でき、前記付加配列により形成される構造は、特に制限されない。

[0050] 前記 (b) の核酸分子は、例えば、前述のように、前記 (b) のポリヌクレオチドを含む核酸分子または前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子である。

(b) 前記 (a) の前記塩基配列において、1 または複数の塩基が、置換、欠失、付加および／または挿入された塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

[0051] 「1 または複数」は、特に制限されず、前記 (a) の前記塩基配列において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個であり、より好ましくは 1～3 個であり、さらに好ましくは 1 個または 2 個であり、特に好ましくは 1 個である。

[0052] 前記 (c) の核酸分子は、例えば、前述のように、前記 (c) のポリヌクレオチドを含む核酸分子または前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子である。

(c) 前記 (a) の前記塩基配列との同一性が 50% 以上の塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

[0053] 前記 (c) において、前記同一性 (相同性) は、例えば、60% 以上、好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90

%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。前記同一性は、例えば、BLAST等を用いてデフォルトの条件で計算することにより、算出できる。

[0054] 前記(d)の核酸分子は、例えば、前述のように、前記(d)のポリヌクレオチドを含む核酸分子または前記ポリヌクレオチドからなる核酸分子である。

(d) 前記(a)の前記塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列またはそれに相補的な塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド

[0055] 前記(d)において、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする」は、例えば、当該技術分野の当業者において、周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。具体的には、「ストリンジентな条件」は、例えば、0.7~1mol/LのNaCl存在下、60~68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍のSSC溶液を用い、65~68℃で洗浄することにより塩基配列を同定できる条件をいう。1×SSCは、150mmol/LのNaCl、15mmol/Lクエン酸ナトリウムからなる。

[0056] 前記(b)、(c)および(d)の核酸分子は、それぞれ、その全長が、例えば、18~60塩基長であり、18~50塩基長が好ましく、具体的には、18塩基長、20塩基長、22塩基長、24塩基長、26塩基長、28塩基長、50塩基長があげられる。

[0057] 前記第2核酸分子が前記二本鎖核酸分子の場合、例えば、前記(a)~(d)の一本鎖ポリヌクレオチドと、それに相補的な塩基配列からなる一本鎖ポリヌクレオチドとの二本鎖核酸分子があげられる。前記第2核酸分子が前記二本鎖核酸分子の場合、例えば、使用に先立って、変性等により一本鎖核酸分子にしてもよい。

[0058] 前記第2核酸分子は、例えば、前述した塩基配列の情報に基づき、公知の方法により製造できる。前記公知の方法は、特に制限されず、例えば、自動

合成装置を用いた化学合成法、各種ポリメラーゼを用いた酵素反応による合成法、DNAテンプレートからの in vitro 転写による合成等があげられる。

[0059] 前記第2核酸分子は、例えば、核酸分子プールと、ストレプトアビジンとを用いて、前記核酸分子プールとストレプトアビジンとの複合体を形成させ、前記複合体の形成に関与した候補核酸分子を選択する方法により、製造できる。このような方法は、例えば、SELEX法またはこれに準じた方法、ストレプトアビジンを固定化した担体を用いて、前記複合体を形成させた後、前記複合体の形成に関与した候補核酸分子を回収する方法等があげられる。前記担体は、例えば、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル等があげられる。

[0060] 前記第2核酸分子は、例えば、前述の方法により得られた核酸分子について、その一部を改変することで製造してもよい。この場合、例えば、前記得られた核酸分子の塩基配列に基づいた二次構造予測の手法を用いた結果を参照して、改変できる。前記二次構造予測は、特に制限されず、例えば、核酸分子の二次構造の候補を探索し、探索された二次構造候補のうち、エネルギー的に安定な二次構造を予測する方法があげられる。前記二次構造予測は、例えば、核酸分子の塩基配列を、ワトソン・クリック型等の塩基対を構成するステム領域と、前記ステム領域以外の塩基で構成されるループ構造等の一本鎖領域とに分割して得た二次構造候補のエネルギー関数を、最小化することに基づく二次構造予測でもよい。

[0061] 前記二次構造候補のエネルギー関数を最小化することに基づく二次構造予測について、説明する。まず、対象となる核酸分子の塩基配列のうち、ワトソン・クリック型等の塩基対を構成する塩基の候補と、この塩基対候補以外の一本鎖領域の候補とを探索する。探索された塩基対候補および一本鎖領域候補の全組合せのうち、塩基対候補を構成する塩基と一本鎖領域候補を構成する塩基とが重複する等、理論的に取り得ない組合せを除き、二次構造候補を同定する。同定された二次構造候補のうち、二次構造候補のエネルギー関

数を算出し、算出されたエネルギー関数が最小となる二次構造を探索する。この際、この二次構造候補のエネルギー関数の算出方法は、二次構造候補を構成する個々のステム領域および一本鎖領域の自由エネルギーに基づいて、この二次構造候補における自由エネルギーを、二次構造候補のエネルギー関数とする方法でもよい。このようにして、同定された二次構造候補のうち、エネルギー関数の最も小さい二次構造を、対象となる核酸分子の塩基配列の二次構造とする。

[0062] 前記第2核酸分子は、このようにして得た二次構造の結果を参照して、二次構造のうちの特徴ある部位を構成する塩基の置換もしくは欠失によって、または、二次構造のうちの特徴ある部分への塩基の挿入もしくは付加等によって、改変されてもよい。例えば、前述の通り調製した核酸分子を親分子として、二次構造のステム領域および／または一本鎖領域を構成する塩基の一部を置換してもよい。また、二次構造のステム領域および／または一本鎖領域を構成する塩基の一部を欠失させてもよい。また、二次構造のステム領域および／または一本鎖領域に、単数または複数の塩基を挿入または付加して、ステム長さおよび／または一本鎖領域の長さを短縮および／または延長してもよい。

[0063] 前記第1核酸分子および／または第2核酸分子がRNAの場合、例えば、RNA分解酵素耐性であることが好ましい。前記核酸分子をRNA分解酵素耐性にする手法は、特に制限されない。具体例は、例えば、RNAを構成するリボヌクレオチド残基の一部を、メチル化等により修飾する方法、前記リボヌクレオチド残基の一部または全部を、デオキシリボヌクレオチド化（DNA化）もしくはLNA化する方法等があげられる。前記核酸分子が、前記デオキシリボヌクレオチド残基を含むRNAの場合、前記デオキシリボヌクレオチド残基の部位は、特に制限されず、例えば、ステム構造を形成可能な領域であることが好ましい。また、前記核酸分子が、前記LNA等のモノマー残基を含むRNAの場合、前記モノマー残基の部位は、特に制限されず、例えば、ステム構造を形成可能な領域であることが好ましい。また、この他

にも、前記第1核酸分子および／または第2核酸分子の5'末端および／または3'末端に、数10kDaのPEG（ポリエチレングリコール）またはデオキシチミジンを結合させる方法等もあげられる。

[0064] 前記第1核酸分子および／または第2核酸分子は、例えば、前述のように、一部の前記ヌクレオチド残基が、修飾された修飾化ヌクレオチド残基でもよい。前記核酸分子において、前記修飾化ヌクレオチド残基の部位は、特に制限されず、例えば、ステム構造を形成可能な領域の末端であり、且つ、ループ構造またはバルジ構造を形成可能な領域の末端であることが好ましい。

[0065] 本発明において、前記核酸素子は、前述のように、前記第1核酸分子および前記第2核酸分子を含む。前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子および前記第2核酸分子のみからなる素子でもよいし、さらに、他の構成要素を含む素子でもよい。前記他の構成要素は、例えば、リンカーがあげられる。

[0066] 前記リンカーは、例えば、その構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、前述の第1核酸分子および第2核酸分子の例示と同様である。前記リンカーは、例えば、前記ヌクレオチド残基のみからなる核酸分子でもよいし、前記ヌクレオチド残基を含む核酸分子でもよい。前記リンカーは、例えば、一本鎖核酸分子でもよいし、二本鎖核酸分子でもよい。前記リンカーは、一本鎖核酸分子の場合、例えば、一本鎖DNA、一本鎖RNA等があげられ、二本鎖核酸分子の場合、例えば、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA-RNAの二本鎖等があげられる。前記リンカーの長さは、特に制限されない。

[0067] 前記核酸素子において、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とは、連結していることが好ましく、例えば、前記第1核酸分子の一方の末端と前記第2核酸分子の一方の末端とで連結している。前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とは、例えば、前記第1核酸分子の5'末端と、前記第2核酸分子の3'末端とが連結してもよいし、前記第1核酸分子の3'末端と、前記第2核酸分子の5'末端とが連結してもよいが、前者が好ましい。

- [0068] 前記第1核酸分子と前記第2核酸分子との連結は、例えば、直接的な連結でもよいし、間接的な連結でもよい。
- [0069] 前記直接的な連結の場合、例えば、前記第1核酸分子の一方の末端と前記第2核酸分子の一方の末端とがホスホジエステル結合により連結する。具体的には、直接的な連結は、例えば、前記第1核酸分子の5'末端と前記第2核酸分子の3'末端とのホスホジエステル結合による連結、または、前記第1核酸分子の3'末端と前記第2核酸分子の5'末端とのホスホジエステル結合による連結があげられ、前者が好ましい。
- [0070] 前記間接的な連結の場合、例えば、前記リンカーを介して、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とが連結する。前記第1核酸分子と前記第2核酸分子との間に介在するリンカーを、以下、介在リンカーまたは介在配列という。前記介在リンカーは、例えば、一方の末端が、前記第1核酸分子の一方の末端に連結し、他方の末端が、前記第2核酸分子の一方に連結する形態があげられる。具体的には、前記間接的な連結は、例えば、前記介在リンカーの一方の末端が、前記第1核酸分子の5'末端に連結し、他方の末端が、前記第2核酸分子の3'末端に連結してもよいし、一方の末端が、前記第1核酸分子の3'末端に連結し、他方の末端が、前記第2核酸分子の5'末端に連結してもよいが、前者が好ましい。前記リンカーと前記第1核酸分子または前記第2核酸分子との連結は、例えば、ホスホジエステル結合による連結があげられる。
- [0071] 前記核酸素子は、いずれか一方の末端側に、さらに、前記リンカーを有してもよい。このリンカーを、以下、付加リンカーまたは付加配列という。前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子における、前記第2核酸分子が連結する末端とは反対側の末端に、前記リンカーを有してもよいし、前記第2核酸分子における、前記第1核酸分子が連結している末端とは反対側の末端に、前記リンカーを有してもよい。また、前記核酸素子は、前記第1核酸分子の前記反対側の末端および前記第2核酸分子の前記反対側の末端に、それぞれ、前記付加リンカーを有してもよい。

- [0072] 前記核酸素子の全体の長さは、特に制限されず、例えば、前述した前記第1核酸分子および前記第2核酸分子の長さならびにリンカーの長さに応じて、適宜設定できる。前記核酸素子において、前記第1核酸分子および前記第2核酸分子の長さは、それぞれ、同じでもよいし、異なってもよい。
- [0073] 前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とが連結した一本鎖核酸分子であることが好ましい。前記核酸素子が一本鎖核酸分子であれば、例えば、前記第1核酸分子へのターゲットの結合により、前記第1核酸分子の構造が変化し、この変化が、前記第2核酸分子の構造を変化させやすい。前記構造の変化は、例えば、前述のように、二次構造の変化である。
- [0074] 前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とが連結していればよく、その設計方法は、特に制限されない。具体的には、前記核酸素子は、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合に、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化されるように、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とを連結するように、設計する。
- [0075] 前記核酸素子において、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能の制御は、例えば、以下のように行われることが好ましい。すなわち、前記核酸素子において、例えば、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない状態で、前記第2核酸分子は、ケージ化により、前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化される。そして、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合することにより、前記第2核酸分子は、自己会合により、前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化されることが好ましい。
- [0076] 具体例として、例えば、以下の形態があげられる。前記核酸素子において、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない状態で、例えば、前記第1核酸分子の一部と前記第2核酸分子の一部とが、ステム構造を形成し

、前記第2核酸分子は、前記ステム構造によりケージ化されて、前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、前記第1核酸分子は、前記ターゲットの結合部位となるステムループ構造を形成する。一方、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合することにより、前記第1核酸分子の一部と前記第2核酸分子の一部との前記ステム構造が解除され、これによって、前記第2核酸分子は、前記ケージ化が解除され、さらに自己会合することにより、前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化されることが好ましい。

[0077] また、前記核酸素子が、前記介在リンカーと前記付加リンカーとを有する場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能の制御は、例えば、以下のように行われることが好ましい。前記核酸素子において、前記介在リンカーは、例えば、一方の末端が、前記第1核酸分子の5'末端に連結し、他方の末端が前記第2核酸分子の3'末端に連結し、前記付加リンカーは、例えば、前記第1核酸分子の3'末端に連結する。前記核酸素子において、例えば、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない状態で、前記介在リンカーと前記第1核酸分子の3'末端領域とが、ステム構造を形成し、前記付加リンカーと前記第2核酸分子の3'末端領域とが、ステム構造を形成する。そして、前記ステム構造により、前記第2核酸分子はケージ化されて、前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化される。また、前記第1核酸分子は、前記ターゲットの結合部位となるステムループ構造を形成する。一方、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合することにより、前記介在リンカーとのステム構造および前記付加リンカーとのステム構造が解除され、これによって、前記第2核酸分子は、前記ケージ化が解除され、さらに自己会合することにより、前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化されることが好ましい。

[0078] 前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とをそれぞれ製造し、両者を結合してもよいし、前記両者を連結した配列をデザインして、前記配列に基づいて合成してもよい。この際、例えば、コンピュータ

等により、二次構造を予測し、配列を修正してもよい。

[0079] 分析用デバイス

本発明の分析用デバイスは、前述のように、基板、核酸素子およびシグナルの検出部を含み、

前記基板に、前記核酸素子および前記検出部が配置され、

前記核酸素子は、第1核酸分子および第2核酸分子を含み、

前記第1核酸分子は、ターゲットと結合可能な核酸分子であり、

前記第2核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、

前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化され、

前記検出部は、前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出する検出部であることを特徴とする。本発明において、前記核酸素子は、前述の通りである。

[0080] 前記検出部は、前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出できればよく、具体的には、例えば、前記結合に由来するシグナルを検出できればよい。前記シグナルは、例えば、発色シグナルおよび蛍光シグナル等の光学シグナル、電気シグナル等があげられる。

[0081] 前記分析用デバイスを使用した分析には、後述するように、ストレプトアビジンとして、標識物質で標識化された標識化ストレプトアビジンを使用することが好ましい。前記結合に由来するシグナルは、例えば、前記標識物質由来のシグナルが好ましい。

[0082] 前記標識物質は、前記シグナルを発生する標識物質が好ましい。前記標識物質は、例えば、それ自体が単独でシグナルを発生する標識物質でもよいし、間接的にシグナルを発生する標識物質でもよい。前者の場合、前記標識物質は、例えば、蛍光団、放射性同位元素等があげられ、前記標識物質の種類に応じた方法および条件で、そのシグナルを検出できる。後者の場合、前記

標識物質は、例えば、酵素があげられ、酸化還元反応を触媒する酵素が好ましい。この場合、前記シグナルは、例えば、前記酸化還元反応による基質からのシグナルであることが好ましく、具体的には、前記基質の存在下、前記酵素の反応を行うことによって、前記シグナルが発生する。前記酸化還元反応は、例えば、基質から生成物が生成される過程において、二つの基質の間に電子の授受を生じる反応であればよい。前記酵素は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ等があげられる。

[0083] 前記基質は、例えば、前記酵素の種類に応じて適宜決定できる。前記酵素がペルオキシダーゼの場合、前記基質は、特に制限されず、例えば、3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)、1, 2-Phenylenediamine (OPD)、2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt (ABTS)、3, 3'-Diaminobenzidine (DAB)、3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Hydrate (DAB4HCl)、3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC)、4-Chloro-1-naphthol (4C1N)、2, 4, 6-Tribromo-3-hydroxybenzoic Acid、2, 4-Dichlorophenol、4-Aminoantipyrine、4-Aminoantipyrine Hydrochloride、ルミノール等があげられる。

[0084] 本発明の分析用デバイスは、例えば、さらに、前記酸化還元反応の前記基質を含む試薬部を有してもよい。前記試薬部は、例えば、前記検出部に配置することが好ましく、後述する電極系の上に配置されることが好ましい。

[0085] 前記シグナルが前記電気シグナルの場合、前記検出部は、例えば、電極系を有する。前記電極系は、例えば、作用極および対極を含んでもよいし、作

用極、対極および参照極を含んでもよい。前記電極の材料は、特に制限されず、例えば、白金、銀、金、カーボン等があげられる。前記作用極および前記対極は、例えば、白金電極、銀電極、金電極、カーボン電極等があげられ、前記参照極は、例えば、銀／塩化銀の電極があげられる。前記銀／塩化銀の電極は、例えば、銀電極に塩化銀電極を積層することにより形成できる。

[0086] 前記検出部は、例えば、前記基板の上面に、前記電極を配置することによって形成できる。前記電極の配置方法は、特に制限されず、例えば、公知の方法が採用でき、具体例は、蒸着法、スパッタリング法、スクリーン印刷法、メッキ法等の薄膜形成方法があげられる。前記電極は、例えば、前記基板に、直接配置してもよいし、間接的に配置してもよい。間接的な配置は、例えば、他の部材を介した配置があげられる（以下、同様）。

[0087] 前記核酸素子は、前述のように、前記基板に配置すればよく、前記基板に固定化することが好ましい。前記核酸素子は、例えば、前記基板の表面に、直接的に配置してもよいし、間接的に配置してもよい。具体的には、前記核酸素子は、例えば、前記基板における前記検出部に配置することが好ましく、前記検出部における前記電極に配置することがより好ましく、前記電極の中でも前記作用極に配置することが好ましい。前記核酸素子は、例えば、前記検出部または前記電極に、直接的に配置してもよいし、間接的に配置してもよい。以下、「前記核酸素子の前記基板への配置または固定化」は、特に示さない限り、前記基板における前記検出部、前記検出部における前記電極への配置または固定化の意味も含む。

[0088] 前記核酸素子の配置方法は、特に制限されず、公知の核酸固定化方法が採用できる。前記核酸固定化方法は、予め準備した核酸素子を、例えば、前記基板、好ましくは前記検出部、より好ましくは前記電極に固定化する方法があげられる。この方法は、例えば、フォトリソグラフィーを利用する方法であり、具体例として、米国特許5,424,186号明細書等を参照できる。また、前記核酸固定化方法は、例えば、前記基板上、好ましくは前記検出部上、より好ましくは前記電極上で核酸素子を合成する方法があげられる。

この方法は、例えば、いわゆるスポット法があげられ、具体例として、米国特許5,807,522号明細書、特表平10-503841号公報等を参照できる。

[0089] 前記核酸素子は、例えば、前記第1核酸分子および前記第2核酸分子におけるいずれの末端側において、前記基板に配置されてもよい。前記末端側は、例えば、前記核酸素子における前記第1核酸分子の末端または前記第2核酸分子の末端があげられる。前記末端側は、前記第1核酸分子が前記付加リンカーを有する場合、例えば、前記付加リンカーにおける、前記第1核酸分子が連結している末端とは反対側の末端でもよい。また、前記末端側は、前記第2核酸分子が前記付加リンカーを有する場合、例えば、前記付加リンカーにおける、前記第2核酸分子が連結している末端とは反対側の末端でもよく、この形態が好ましい。

[0090] 本発明の分析用デバイスは、例えば、一種類のみ前記核酸素子を備えてもよいし、ターゲットが異なる二種類以上の前記核酸素子を備えてもよい。後者の場合、二種類以上の前記核酸素子が、それぞれ、結合可能なターゲットが異なる前記第1核酸分子を有することが好ましい。このように、本発明の分析用デバイスが、ターゲットが異なる二種類の核酸素子を備えることによって、例えば、一つの分析用デバイスにおいて、二種類以上のターゲットの検出が可能となる。本発明の分析用デバイスが、二種類以上の核酸素子を備える場合、前記分析用デバイスは、複数の検出部を有し、各検出部に、異なる核酸素子が配置されていることが好ましい。前記分析用デバイスは、例えば、前記基板の表面をマトリックスに分画し、各分画領域に前述のような電極系を形成して、検出部とし、各検出部に核酸素子を配置することで形成できる。本発明の分析用デバイスにおいて、1つの検出部に配置する核酸素子の数は、特に制限されない。

[0091] 前記基板は、特に制限されず、例えば、表面が絶縁性の基板が好ましい。前記基板は、例えば、絶縁材料からなる基板でもよいし、表面に絶縁材料からなる絶縁層を有する基板でもよい。前記絶縁材料は、特に制限されず、例

えば、ガラス、セラミック、絶縁性プラスチック、紙等の公知の材料があげられる。前記絶縁性プラスチックは、特に制限されず、例えば、シリコーン樹脂、ポリイミド樹脂、エポキシ樹脂、フッ素樹脂等があげられる。

[0092] 本発明の分析用デバイスにより分析するターゲットは、特に制限されない。前記ターゲットは、例えば、高分子化合物、低分子化合物、有機物、無機物等があげられる。前記高分子化合物または有機物は、例えば、微生物、ウイルス、多糖類、タンパク質、核酸、樹脂等があげられる。前記低分子化合物は、農薬、医薬品、化学薬品、オリゴ糖、単糖、脂質、オリゴペプチド、アミノ酸、ビタミン類、生理活性物質等があげられる。前記無機物は、例えば、ミネラル類、鉱酸、金属等があげられる。

[0093] 本発明において、分析の対象となる試料は、特に制限されず、例えば、食品、医薬品、化学薬品、土壌、動物、植物、微生物、ウイルス、水、ゴミ、廃棄物等があげられる。前記食品は、例えば、食料および飲料を含む。前記水は、例えば、水道水、排水、河川の水、海水、雨水、雪等を含む。

[0094] つぎに、本発明の分析用デバイスについて、具体例をあげて説明する。なお、本発明は、以下の例には、制限されない。

[0095] 図1に、本発明の分析用デバイスの一例の模式図を示す。図1に示すように、分析用デバイス1は、基板10、電極20および核酸素子40を備え、基板10上に、電極20が配置され、電極20上に核酸素子40が固定化されている。基板10において、電極20が配置された領域が検出部となる。核酸素子40は、第1核酸分子41、第2核酸分子42、介在リンカー43、第1の付加リンカー44および第2の付加リンカー45からなる一本鎖核酸分子である。核酸素子40において、第1核酸分子41と第2核酸分子42とは、介在リンカー43で連結し、第1核酸分子41の末端には第1の付加リンカー44、第2核酸分子42の末端には第2の付加リンカー45が連結している。そして、核酸素子40は、第2核酸分子42に連結した第2の付加リンカー45を介して、電極20に固定化されている。第1核酸分子41は、一本鎖であることが好ましく、ターゲットと結合していない状態で、

図1の左図に示すように、自己アニーリングによりステムループ構造をとることが好ましい。

[0096] 分析用デバイス1について、第1核酸分子41を、ターゲット50に結合可能なアプタマーとし、第2核酸分子42を、ペルオキシダーゼで標識化した標識ストレプトアビジンに結合可能なDNAとする例をあげて、使用方法について説明する。

[0097] まず、分析用デバイス1の前記検出部に、試料を添加する。前記試料中にターゲット50が存在しない場合、図1の左図に示すように、核酸素子40の第1核酸分子41にターゲットが結合しないため、第2核酸分子42は、ストレプトアビジンに結合しない。具体的には、第2核酸分子42が第1の付加リンカー44とステム構造を形成することにより、第2核酸分子42がケージ化され、第2核酸分子42のストレプトアビジンに対する結合能が不活性化される。したがって、ペルオキシダーゼによる電子授受が生じないため、検出部の電極20により電気シグナルを検出できない。他方、前記試料中にターゲット50が存在する場合、図1の右図に示すように、核酸素子40の第1核酸分子41にターゲットが結合するため、第2核酸分子42がストレプトアビジンに結合可能な二次構造に変化する。具体的には、第1核酸分子41にターゲット50が結合することにより、第1核酸分子41の構造が変化して、第2核酸分子42と第1の付加リンカー44とのステム構造が解除される。これによって、第2核酸分子42は、自己会合して、ストレプトアビジンに対する結合能が活性化される。

[0098] つぎに、前記検出部に、前記標識化ストレプトアビジンを添加する。前記結合能が活性化された第2核酸分子42に、前記標識化ストレプトアビジンが結合する。そして、前記検出部を洗浄して、第2核酸分子42に未結合の前記標識化ストレプトアビジンを除去する。続いて、前記検出部に、基質を添加して、前記標識化ストレプトアビジンにおけるペルオキシダーゼによる酵素反応を行う。前記ペルオキシダーゼにより前記基質から生成物が生成される過程において、電子の授受が生じる。その結果、検出部の電極20によ

り電気シグナルが検出できる。このように、分析用デバイス1によれば、電気シグナルの検出によって、試料中のターゲットの有無を分析可能である。

[0099] 前記試料および前記標識化ストレプトアビジンの添加順序は、特に制限されず、例えば、同時でもよいし、前記試料の添加後、前記標識化ストレプトアビジンを添加してもよいし、前記標識化ストレプトアビジンの添加後、前記試料を添加してもよい。前記基質の添加順序は、特に制限されず、例えば、前記試料および前記標識化ストレプトアビジンの添加後が好ましい。

[0100] 分析方法

本発明の分析方法は、前述のように、前記本発明の分析用デバイスを用い、
前記分析用デバイスに試料およびストレプトアビジンを添加する工程、および、
前記検出部で前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出することによって、ターゲットを検出する工程を含むことを特徴とする。

[0101] 本発明の分析方法は、例えば、前述の本発明の分析用デバイスにおける説明と同様にして行うことができる。

[0102] 前記試料および前記ストレプトアビジンの添加順序は、特に制限されない。前記試料および前記ストレプトアビジンは、例えば、同時に添加してもよいし、前記試料を添加した後、前記ストレプトアビジンを添加してもよいし、前記ストレプトアビジンを添加した後、前記試料を添加してもよい。前記ストレプトアビジンは、前記標識物質が結合した標識化ストレプトアビジンであることが好ましい。

[0103] 前記標識物質は、前述のように、例えば、それ自体が単独でシグナルを発生する標識物質でもよいし、間接的にシグナルを発生する標識物質でもよい。後者の標識物質は、例えば、前記酸化還元反応を触媒する酵素が好ましく、前記検出工程は、前記酸化還元反応の基質の存在下で行うことが好ましい。

[0104] 前記検出工程は、前述のように、前記第2核酸分子と前記ストレプトアビ

ジンとの結合を検出することによって、ターゲットを検出する工程である。前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合は、例えば、前記標識物質由来のシグナルの検出により行うことができる。前記シグナルの検出は、例えば、前記標識物質の種類に応じて適宜決定できる。前記検出は、例えば、前記電気シグナルを検出する電気化学的検出、光学シグナルを検出する光学的検出等があげられる。前記光学シグナルは、例えば、前記標識物質自体のシグナルでもよいし、前記基質の存在下で、前記標識物質による酵素反応で生じるシグナルでもよい。前記基質は、特に制限されず、前記酵素反応により発色または発光する基質が好ましい。前記電気化学的検出は、例えば、電気化学的シグナルの検出があげられ、電流等のシグナル強度を測定することにより行える。前記電気化学的シグナルは、例えば、前記基質の存在下で、前記酵素反応を行うことにより、電子の授受として生じる。前記電子の授受は、例えば、電極への印加により電流として測定可能である。

[0105] 本発明の分析方法は、例えば、前記試料および前記ストレプトアビジンを添加した後、前記第2核酸分子に未結合の前記ストレプトアビジンを洗浄により除去する工程を含んでもよい。

[0106] 本発明の分析方法は、さらに、前記基質を添加する工程を含んでもよい。前記基質の添加順序は、特に制限されず、例えば、前記試料および前記標識化ストレプトアビジンと同時でもよいし、前記試料および前記標識化ストレプトアビジンの添加後でもよいし、前記試料の添加後であって前記標識化ストレプトアビジンの添加前後いずれでもよい。また、前記分析デバイスが前記試薬部を有する場合、例えば、前記試料を添加した後、前記標識化ストレプトアビジンを添加することが好ましい。

[0107] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

[0108] この出願は、2010年12月24日に提出された日本出願特願2010-287590を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り

込む。

産業上の利用可能性

[0109] 本発明によれば、分析対象物を簡易に分析可能である。本発明は、例えば、アプタマーの技術を適用できる。アプタマーは、例えば、試験管内で取得されるため、毒性の高い化合物でも、それに結合可能なアプタマーを取得可能であり、また、低分子化合物と結合可能なアプタマーも取得可能である。したがって、本発明によれば、例えば、抗原抗体反応を用いた手法の問題点を解決でき、例えば、電気化学的検出等のシグナル検出による簡易な分析が可能である。

符号の説明

- [0110] 1 分析用デバイス
- 10 基板
- 20 電極
- 40 核酸素子
- 41 第1核酸分子
- 42 第2核酸分子
- 43 介在リンカー
- 44 第1の付加リンカー
- 45 第2の付加リンカー
- 50 ターゲット

請求の範囲

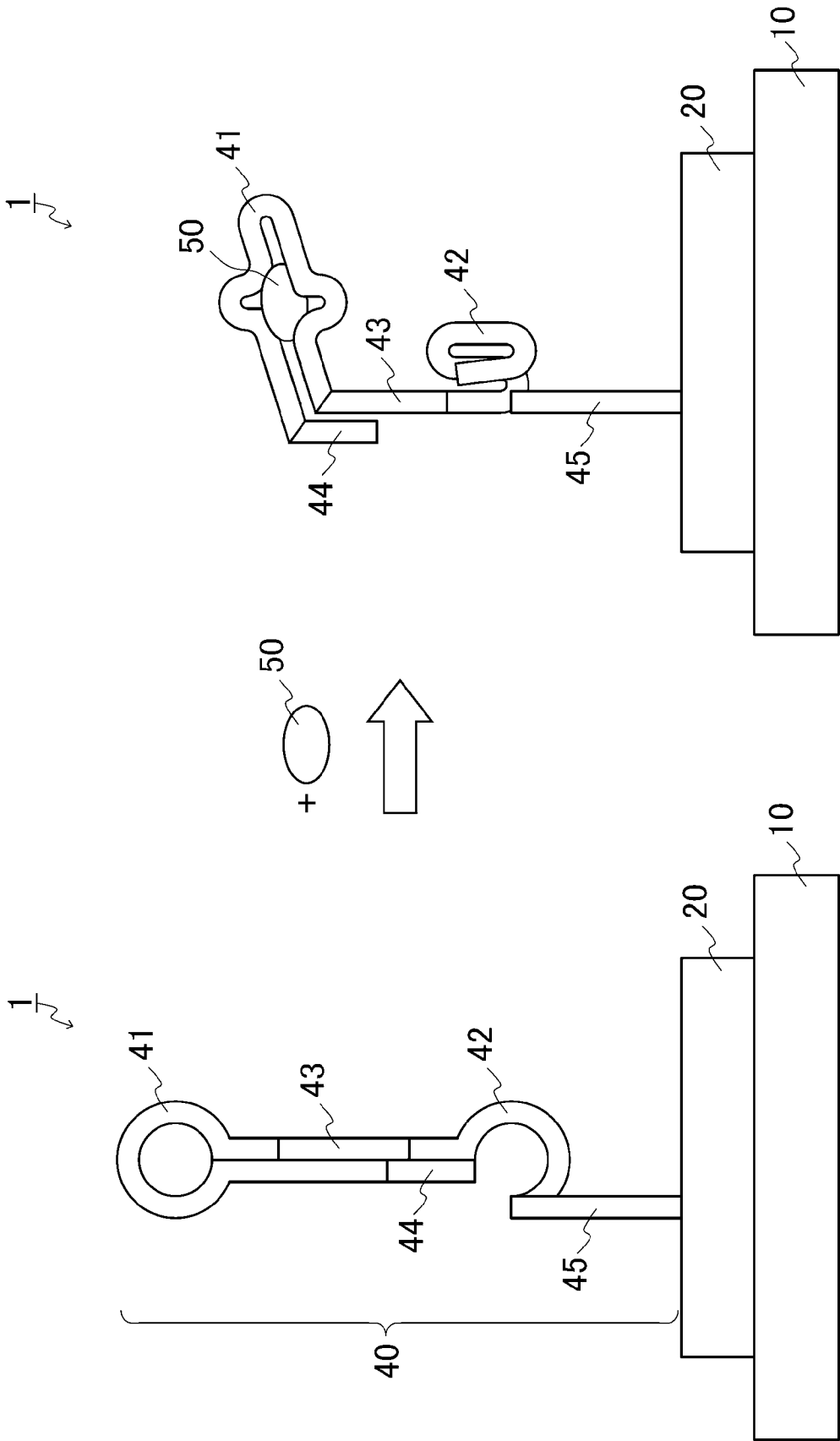
- [請求項1] 基板、核酸素子およびシグナルの検出部を含み、
前記基板に、前記核酸素子および前記検出部が配置され、
前記核酸素子は、第1核酸分子および第2核酸分子を含み、
前記第1核酸分子は、ターゲットと結合可能な核酸分子であり、
前記第2核酸分子は、ストレプトアビジンに結合可能な核酸分子であり、
前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合していない場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が不活性化され、
前記第1核酸分子に前記ターゲットが結合した場合、前記第2核酸分子の前記ストレプトアビジンに対する結合能が活性化され、
前記検出部は、前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出する検出部であることを特徴とする分析用デバイス。
- [請求項2] 前記第1核酸分子は、前記ターゲットの結合により構造変化する核酸分子であり、
前記第2核酸分子は、前記第1核酸分子の構造変化により構造変化する核酸分子である、請求の範囲1記載の分析用デバイス。
- [請求項3] 前記第1核酸分子および前記第2核酸分子は、アプタマーである、請求の範囲1または2記載の分析用デバイス。
- [請求項4] 前記第2核酸分子は、下記(a)、(b)または(c)のいずれかのポリヌクレオチドを含む核酸分子である、請求の範囲1から3のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- (a) 配列番号1～10のいずれかで表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド
 - (b) 前記(a)の前記塩基配列において、1または複数の塩基が、置換、欠失、付加および／または挿入された塩基配列からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド
 - (c) 前記(a)の前記塩基配列との同一性が50%以上の塩基配列

- [請求項5] からなり、且つ、ストレプトアビジンに結合可能なポリヌクレオチド前記核酸素子は、前記第1核酸分子と前記第2核酸分子とが連結した一本鎖の核酸分子である、請求の範囲1から4のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項6] 前記核酸素子は、さらに、リンカーを有する、請求の範囲1から5のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項7] ストレプトアビジンが、標識物質が結合した標識化ストレプトアビジンであり、
前記シグナルが、前記標識物質由来のシグナルである、請求の範囲1から6のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項8] 前記標識物質が、シグナルを発生する標識物質である、請求の範囲7に記載の分析用デバイス。
- [請求項9] 前記標識物質が、酸化還元反応を触媒する酵素である、請求の範囲7に記載の分析用デバイス。
- [請求項10] 前記標識物質が、酸化還元反応を触媒する酵素であり、
前記シグナルが、前記酸化還元反応による基質からのシグナルである、請求の範囲9に記載の分析用デバイス。
- [請求項11] さらに、試薬部を有し、
前記試薬部が、前記酸化還元反応の基質を含む、請求の範囲10に記載の分析用デバイス。
- [請求項12] 前記シグナルが電気化学的シグナルである、請求の範囲7から11のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項13] 前記検出部が、電極を有する、請求の範囲1から12のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項14] 前記核酸素子が、前記検出部に配置されている、請求の範囲1から13のいずれか一項に記載の分析用デバイス。
- [請求項15] 二種類以上の前記核酸素子を有し、
前記二種類以上の核酸素子が、それぞれ、結合可能なターゲットが異

なる前記第1核酸分子を有する、請求の範囲1から14のいずれか一項に記載の分析用デバイス。

- [請求項16] 請求の範囲1から15のいずれか一項に記載の分析用デバイスを用い、
前記分析用デバイスに試料およびストレプトアビジンを添加する工程、および、
前記検出部で前記第2核酸分子と前記ストレプトアビジンとの結合を検出することによって、ターゲットを検出する工程を含むことを特徴とするターゲットの分析方法。
- [請求項17] 前記ストレプトアビジンが、標識物質が結合した標識化ストレプトアビジンである、請求の範囲16記載の分析方法。
- [請求項18] 前記標識物質が、シグナルを発生する標識物質である、請求の範囲17記載の分析方法。
- [請求項19] 前記標識物質が、酸化還元反応によりシグナルを発生する標識物質である、請求の範囲18記載の分析方法。
- [請求項20] 前記標識物質が、酸化還元反応を触媒する酵素である、請求の範囲19記載の分析方法。
- [請求項21] 前記酸化還元反応の基質の存在下、前記検出工程を行う、請求の範囲20記載の分析方法。
- [請求項22] 検出工程における検出が、電気シグナルの検出である、請求の範囲18から21のいずれか一項に記載の分析方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N27/327(2006.01)i,
G01N27/416(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543, G01N21/78, G01N27/327, G01N27/416, G01N33/53, C12N15/115

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-207189 A (Tokyo University of Agriculture and Technology), 24 September 2010 (24.09.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-22
Y	JP 2004-125785 A (National Food Research Institute), 22 April 2004 (22.04.2004), example 1 & US 2004/0209294 A1	1-22
Y	WO 02/074978 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 26 September 2002 (26.09.2002), page 20, lines 25 to 35 & US 2003/0027180 A1 & AU 2002257076 A	1-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March, 2012 (02.03.12)

Date of mailing of the international search report
19 March, 2012 (19.03.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N27/327(2006.01)i, G01N27/416(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543, G01N21/78, G01N27/327, G01N27/416, G01N33/53, C12N15/115

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-207189 A (国立大学法人東京農工大学) 2010.09.24, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
Y	JP 2004-125785 A (独立行政法人食品総合研究所) 2004.04.22, 実施例 1 & US 2004/0209294 A1	1-22
Y	WO 02/074978 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2002.09.26, 第 20 頁第 25 - 35 行 & US 2003/0027180 A1 & AU 2002257076 A	1-22

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.03.2012

国際調査報告の発送日

19.03.2012

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

赤坂 祐樹

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

3316