



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118339316 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 12

(21) 申请号 202280079237.6

(22) 申请日 2022.10.28

(30) 优先权数据

2021-196185 2021.12.02 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/040458 2022.10.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/100567 JA 2023.06.08

(71) 申请人 株式会社电装

地址 日本

(72) 发明人 早川溪 浅野真菜 糠塚明

中川和久 新本舞 加纳一彦

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 金世煜

(51) Int.Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

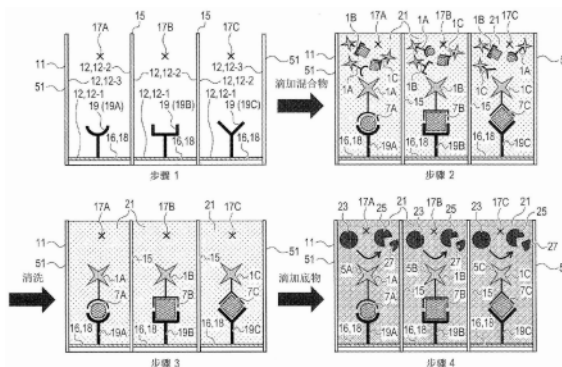
序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

分析方法

(57) 摘要

在分析方法中,将融合体(1A、1B、1C)与试样混合而生成混合物(21),上述融合体(1A、1B、1C)具备:具有与目标物质(7A、7B、7C)结合的活性的第1结合物质(3A、3B、3C)和标记物(5A、5B、5C)。使固定于基部(12)的第2结合物质(19、19A、19B、19C)与混合物接触。检测与结合有第2结合物质的目标物质结合的融合体所产生的现象。第1结合物质为由核酸构成的物质或者由氨基酸构成的物质。基部分别设置在多个区域(17A、17B、17C)。第2结合物质所结合的目标物质根据区域而不同。



1. 一种分析方法, 是如下进行的目标物质的分析方法:

将融合体 (1A、1B、1C) 与试样混合而生成混合物 (21), 所述融合体 (1A、1B、1C) 具备: 具有与目标物质 (7A、7B、7C) 结合的活性的第1结合物质 (3A、3B、3C) 和标记物 (5A、5B、5C), 所述试样包含所述目标物质,

使第2结合物质 (19、19A、19B、19C) 与所述混合物接触, 所述第2结合物质 (19、19A、19B、19C) 被固定于基部 (12、14), 且具有与所述目标物质结合的活性,

除去未与所述第2结合物质结合的所述目标物质、以及未与结合有所述第2结合物质的所述目标物质结合的所述融合体,

检测与结合有所述第2结合物质的所述目标物质结合的所述融合体具备的所述标记物所产生的现象,

所述第1结合物质为由核酸构成的物质或者由氨基酸构成的物质,

所述基部分别设置在多个区域 (17A、17B、17C),

所述第2结合物质所结合的所述目标物质根据所述区域而不同。

2. 根据权利要求1所述的分析方法, 其中, 所述区域由容器 (11) 的内表面 (12) 构成,

所述基部为所述容器的内表面或者粒状物 (13) 的表面 (14)。

3. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述第1结合物质为核酸适配体或者低分子蛋白质制剂。

4. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述第2结合物质为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或者脂质。

5. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述目标物质的至少一部分为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或者脂质。

6. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述标记物具有酶、DNA酶、RNA酶、磁标记、荧光标记、化学发光探针和纳米粒子中的至少一种。

7. 根据权利要求6所述的分析方法, 其中, 所述现象为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收、或者显色、荧光、发光、磷光、吸热、放热、氧化还原或沉淀。

8. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述第1结合物质和所述标记物分别具备化学取代基或核酸结合蛋白,

通过使所述标记物所具备的所述化学取代基或所述核酸结合蛋白与所述第1结合物质所具备的所述化学取代基或所述核酸结合蛋白结合, 从而所述标记物与所述第1结合物质融合,

所述化学取代基具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔炔、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-O-炔丙基、2'-O-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。

9. 根据权利要求1或2所述的分析方法, 其中, 所述第2结合物质和所述基部分别具备化学取代基或核酸结合蛋白,

通过使所述第2结合物质所具备的所述化学取代基或所述核酸结合蛋白与所述基部所具备的所述化学取代基或所述核酸结合蛋白结合, 从而将所述第2结合物质固定于所述基部,

所述化学取代基具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。

10. 根据权利要求1或2所述的分析方法,其中,所述现象为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收时,使用pH计或离子敏场效应晶体管检测所述现象,

所述现象为显色、发光、荧光或磷光时,使用光接收设备检测所述现象,

所述现象为吸热或放热时,使用热分析仪检测所述现象,

所述现象为氧化还原时,使用电位仪或离子敏场效应晶体管检测所述现象,

所述现象为沉淀时,使用质谱仪、吸光光度计或分光光度计检测所述现象。

## 分析方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本国际申请基于2021年12月2日在日本专利局申请的日本专利申请第2021-196185号主张优先权,以参照的形式将日本专利申请第2021-196185号的全部内容援用到本国际申请中。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及分析方法。

### 背景技术

[0004] 在专利文献1中公开了使用融合体的目标物质的分析方法。融合体具备结合物质和标记物。结合物质具有与目标物质结合的活性。标记物产生可观测的现象。

[0005] 在目标物质的分析方法中,使包含目标物质的试样与融合体混合。接下来,除去未与目标物质结合的融合体。接着,检测产生与目标物质结合的融合体的现象。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2019-33750号公报

### 发明内容

[0009] 经过本发明人的详细研究,结果发现以下的课题。有时试样中包含多种目标物质。这种情况下,需要分别检测多种目标物质。

[0010] 在本公开的一个方面,优选提供能够分别检测试样中包含的多种目标物质的分析方法。

[0011] 本公开的一个方面是目标物质的分析方法。在分析方法中,使融合体与试样混合而生成混合物,上述融合体具备:具有与上述目标物质结合的活性的第1结合物质和标记物,上述试样包含上述目标物质。使第2结合物质与上述混合物接触,上述第2结合物质被固定于基部,且具有与上述目标物质结合的活性。除去未与上述第2结合物质结合的上述目标物质、以及未与结合有上述第2结合物质的上述目标物质结合的上述融合体。检测与结合有上述第2结合物质结合的上述目标物质的上述融合体具备的上述标记物所产生的现象。上述第1结合物质为由核酸构成的物质或者由氨基酸构成的物质。上述基部分别设置在多个区域。上述第2结合物质所结合的上述目标物质根据上述区域而不同。

[0012] 根据作为本公开的一个方面的分析方法,能够分别检测试样中包含的多个目标物质。

### 附图说明

[0013] 图1是表示多种融合体的构成以及融合体与目标物质的结合的说明图。

[0014] 图2是表示分析方法的工序的说明图。

- [0015] 图3是表示固定于粒状物的第2结合物质的构成的说明图。
- [0016] 图4是表示将3种融合体与试样混合而得到的混合物的说明图。
- [0017] 图5是表示融合体的合成方法的流程图。
- [0018] 图6是表示将第2结合物质与板结合的方法的流程图。
- [0019] 图7是表示亲和素板的构成的说明图。
- [0020] 图8是表示目标物质的分析方法的流程图。
- [0021] 图9是表示在包含融合体和目标物质的混合物中形成有2种结合体的状态的说明图。
- [0022] 图10是表示在包含融合体和目标物质的混合物中形成有1种结合体的状态的说明图。
- [0023] 图11是表示在包含融合体和目标物质的混合物中形成有1种结合体的状态的说明图。
- [0024] 图12是表示各孔中的结合体的状态的说明图。
- [0025] 图13是表示以pNPP为底物的代谢的说明图。
- [0026] 图14是表示吸光度的测定结果的说明图。
- [0027] 图15是表示其它方式的分析方法的工序的说明图。

### 具体实施方式

[0028] 参照附图对本公开的例示性实施方式进行说明。

[0029] 1. 目标物质

[0030] 目标物质是指成为分析的对象物质。作为目标物质，例如，可举出蛋白质、糖、核酸、低分子化合物、脂质、抗原、病毒等。作为病毒，例如，可举出新型冠状病毒SARS-CoV2等。

[0031] 2. 融合体

[0032] 在本公开的分析方法中使用融合体。融合体具备第1结合物质和标记物。第1结合物质具有与目标物质结合的活性。第1结合物质例如具有与特定的目标物质特异性结合的活性，不易与其它的物质结合。作为第1结合物质，例如，可举出由核酸构成的物质、由氨基酸构成的物质等。作为由核酸构成的物质，例如，可举出核酸适配体等。作为由氨基酸构成的物质，例如，可举出低分子蛋白质制剂等。例如，融合体通过具备第1结合物质能够与目标物质结合。

[0033] 标记物产生可观测的现象。作为可观测的现象，例如，可举出氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收等。作为可观测的现象，例如，可举出显色、荧光、发光、磷光、吸热、放热、氧化还原或沉淀等。

[0034] 标记物例如诱导离子的生产、消耗或吸收。诱导离子的生产、消耗或吸收的标记物例如为酶。诱导离子的生产、消耗或吸收的标记物例如具有：1,3-丙二醇脱氢酶、15-羟基前列腺素脱氢酶、1H-吡咯-2-羰基-[肽酰载体蛋白]氯代酶(chlorinase)、2,4-二氯苯甲酰辅酶A还原酶、2,5-二氧戊酸脱氢酶、2-氨基苯磺酸2,3-双加氧酶、2-亚氨基丁酸酯/2-亚氨基丙酸酯脱氨酶、2-烯酸还原酶、2'-脱氢卡那霉素还原酶、3,4-二羟基苯丙氨酸还原脱氨酶、3 $\alpha$ -羟基类固醇3-脱氢酶、3-氨基丁酰辅酶A解氨酶、3-氧代-5 $\alpha$ -类固醇4-脱氢酶、3-氧代类固醇-1-脱氢酶、3-氯-D-丙氨酸脱氯化氢酶、4-氯苯基乙酸3,4-双加氧酶、4-氯苯甲酰基辅

酶A脱卤酶、4-氯苯甲酸脱卤酶、4-三甲基氨基丁醛脱氢酶、4-甲氨基丁酸酯氧化酶、4-亚甲基谷氨酸-氨连接酶、5-磷酸羟基-L-赖氨酸磷酸化酶、7,8-二去甲基-8-羟基-5-脱氮核黄素合成酶、7-羧基-7-脱氮鸟嘌呤合成酶、7-氯-L-色氨酸6-卤化酶、7-氰基-7-脱氮鸟嘌呤合成酶、AMP脱氨酶、CTP合成酶、DDT-脱氯化氢酶、dTDP-4-氨基-4,6-二脱氧-D-葡萄糖解氨酶、D-阿拉伯糖-1-脱氢酶、D-精氨酸脱氢酶、D-木糖还原酶、D-葡萄糖胺-6-磷酸解氨酶、D-丝氨酸解氨酶、D-乳酸脱氢酶、GDP-4-脱氢-6-脱氧- $\alpha$ -D-甘露糖3-脱水酶、GMP合成酶、L-2-氨基-4-氯戊-4-烯酸酯脱氯化氢酶、L-胱氨酸 $\beta$ -裂解酶、L-半胱氨酸脱硫酶、L-半胱氨酸磺基裂解酶、L-丝氨酸解氨酶、L-色氨酸解氨酶、L-赖氨酸环脱氨酶、N1-乙酰多胺氧化酶、N8-乙酰亚精胺氧化酶、NAD<sup>+</sup>-白喉酰胺ADP-核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>合成酶、NAD<sup>+</sup>-二氮还原酶ADP-D-核糖基转移酶、N-琥珀精氨酸双水解酶、S-(羟甲基)mycothiol脱氢酶、S-羧甲基半胱氨酸合成酶、UDP-2-乙酰胺-2,6- $\beta$ -L-阿拉伯六-4-糖还原酶、UDP-N-乙酰基-2-氨基-2-脱氧葡萄糖醛酸脱氢酶、UDP-N-乙酰基-D-甘露糖胺脱氢酶、UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-靛胺脱氢酶、UDP-N-乙酰基葡萄糖胺3-脱氢酶、UDP-N-乙酰基葡萄糖胺6-脱氢酶、UDP-葡萄糖醛酸脱氨酶、 $\beta$ -丙氨酰辅酶A解氨酶、 $\beta$ -脲基丙酸酶、 $\beta$ -内酰胺酶、 $\gamma$ -丁甜菜碱双加氧酶、天冬氨酰-tRNA合成酶、天冬氨酰合成酶、天冬氨酸解氨酶、天冬氨酸-氨连接酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、天冬氨酸脱氢酶、腺苷酰硫酸铵腺苷酸转移酶、腺苷氯合酶、阿特拉津氯水解酶、氨甲基转移酶、丙氨酸脱氢酶、尿囊酸脱亚胺酶、碱性磷酸酶、乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶、氨激酶、氨单加氧酶、异柠檬酸脱氢酶、咪唑甘油-磷酸合成酶、尿酸酶、脲酶、脲基乙醇酸酰胺水解酶、糖醛酸脱氢酶、乙醇胺解氨酶、赤式(erythro)-3-羟基-L-天冬氨酸解氨酶、章鱼胺脱水酶、鸟氨酸环脱氨酶、半乳糖脱氢酶、氨基甲酸酯激酶、氨基甲酰基-丝氨酸解氨酶、氨基甲酰基磷酸合成酶、羧基还原酶、甲酸脱氢酶、甘氨酸还原酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖脱氢酶、葡萄糖激酶、葡萄糖胺解氨酶、葡萄糖胺-6-磷酸脱氨酶、谷氨酰胺酰-tRNA合成酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶、谷氨酸脱氢酶、巴豆酸辅酶A水合酶、氯过氧化物酶、粪卟啉原脱氢酶、胆碱氧化酶、胆碱单加氧酶、胆固醇氧化酶、二乙酰还原酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基丙酸解氨酶、莽草酸脱氢酶、环己烷-1,2-二醇脱氢酶、二氯甘罗溴铵合成酶、二氯甲烷脱卤酶、胱硫醚 $\gamma$ -裂解酶、半胱氨酸-S-共轭 $\beta$ -裂解酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶、白喉素-氨连接酶、肉桂酰辅酶A-还原酶、琥珀酰谷氨酸-半醛脱氢酶、水苏碱N-脱甲基酶、苏式-3-羟基-D-天冬氨酸解氨酶、苏式-3-羟基-L-天冬氨酸解氨酶、苏氨酸解氨酶、丝氨酸硫酸解氨酶、硫氧还蛋白二硫键还原酶、酪氨酸解氨酶、酪氨酸苯酚裂解酶、四氯乙烯还原脱卤酶、四环素7-卤化酶、色氨酸酶、色氨酸5-卤化酶、色氨酸6-卤化酶、色氨酸7-卤化酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸-脱氢酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸-血红素蛋白还原酶、固氮酶、钒依赖性固氮酶、Hapalindole型生物碱氯代酶、组氨酸解氨酶、胍合成酶、胍脱氢酶、羟甲基双烷合酶、羟胺还原酶、吡哆醛5'-磷酸合成酶、砷酸还原酶、苯基丙氨酸/酪氨酸解氨酶、苯基丙氨酸2-单加氧酶、苯基丙氨酸解氨酶、铁氧还蛋白-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原酶、铁氧还蛋白-亚硝酸还原酶、富马酸还原酶、原卟啉原氧化酶、甜菜碱醛脱氢酶、甜菜碱还原酶、过氧化物酶、同型半胱氨酸脱硫酶、高精脘合成酶、亚胺甲酰基四氢叶酸环脱氨酶、髓过氧化物酶、甲醇脱氢酶、甲烷单加氧酶、蛋氨酸 $\gamma$ -裂解酶、甲基天冬氨酸解氨酶、甲胺脱氢酶、亚甲基二脲脱氨酶、乳醛脱氢酶、核糖-5-磷酸-氨连接酶、苹果酸脱氢酶、红氧还蛋白-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原酶、亚硝酸盐O<sub>2</sub>-裂

解酶、亚硝酸还原酶、亚硫酸脱氢酶、氯过氧化物酶、氯酸还原酶、脂质II异谷氨酰胺酰合成酶、碳酸酐酶和非特异性多胺氧化酶中的至少一种。

[0035] 标记物例如具有酶、DNA酶、RNA酶、磁标记、荧光标记、化学发光探针和纳米粒子中的至少一种。

[0036] 第1结合物质和标记物例如分别具备化学取代基或核酸结合蛋白。例如,通过使标记体所具备的化学取代基或核酸结合蛋白与结合物质所具备的化学取代基或核酸结合蛋白结合,从而标记体与结合物质融合。

[0037] 第1结合物质所具备的化学取代基例如具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。作为第1结合物质所具备的核酸结合蛋白,例如,可举出锌指、CRISPR等。作为5-卤代尿嘧啶,例如,可举出5-碘尿嘧啶、5-溴尿嘧啶等。5-卤代尿嘧啶为可进行UV交联的化学取代基。

[0038] 标记物所具备的化学取代基例如具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。作为标记物所具备的核酸结合蛋白,例如,可举出锌指、CRISPR等。作为5-卤代尿嘧啶,例如,可举出5-碘尿嘧啶、5-溴尿嘧啶等。5-卤代尿嘧啶为可进行UV交联的化学取代基。

[0039] 标记物所具备的化学取代基与第1结合物质所具备的化学取代基不同。例如,标记物所具备的化学取代基为生物素时,第1结合物质所具备的化学取代基为亲和素、链霉亲和素或中性亲和素。

[0040] 在本公开的分析方法中,例如,使用多种融合体。与融合体结合的目标物质根据融合体的种类而不同。

[0041] 在本公开的分析方法中,例如,使用图1所示的多种融合体1A、1B、1C。融合体1A具备第1结合物质3A和标记物5A。融合体1B具备第1结合物质3B和标记物5B。融合体1C具备第1结合物质3C和标记物5C。

[0042] 融合体1A与目标物质7A结合。更详细而言,融合体1A所具备的第1结合物质3A与目标物质7A结合。融合体1A不与后述的目标物质7B、7C。

[0043] 融合体1B与目标物质7B结合。更详细而言,融合体1B所具备的第1结合物质3B与目标物质7B结合。融合体1B不与目标物质7A和后述的目标物质7C结合。

[0044] 融合体1C与目标物质7C结合。更详细而言,融合体1C所具备的第1结合物质3C与目标物质7C结合。融合体1C不与目标物质7A、7B结合。目标物质7A、7B、7C分别为不同的物质。

[0045] 标记物5A、5B、5C可以相同,也可以分别不同。标记物5A、5B、5C产生的可观测现象可以相同,也可以分别不同。

[0046] 3. 基部和第2结合物质

[0047] 在本公开的分析方法中,使用基部和第2结合物质。作为基部,例如,可举出图2所示的容器11的内表面12、图3所示的粒状物13的表面14等。作为粒状物13,例如,可举出磁珠等。

[0048] 容器11具备外壁51。外壁51为隔开容器11的内部与外部的壁。容器11在外壁51的内部具备多个间隔壁15和多个孔17A、17B、17C。多个孔17A、17B、17C被间隔壁15隔开。

[0049] 容器11的内表面12分别存在于孔17A、17B、17C中。孔17A、17C的内表面12由底面12-1、第1侧面12-2和第2侧面12-3构成。孔17B的内表面12由底面12-1和第1侧面12-2构成。第1侧面12-2为间隔壁15的表面。第2侧面12-3为外壁51的内侧的表面。基部例如为底面12-1、第1侧面12-2和第2侧面12-3中的一个以上。

[0050] 容器11的内表面12为基部时,内表面12的至少一部分例如具备化学取代基16或核酸结合蛋白18。在图2所示的例子中,底面12-1为基部,底面12-1具备化学取代基16或核酸结合蛋白18。粒状物13的表面14为基部时,表面14例如具备化学取代基16或核酸结合蛋白18。

[0051] 基部分别设置在多个区域。例如,如图2所示,容器11所具备的多个孔17A、17B、17C分别对应一个区域。在多个孔17A、17B、17C分别设置有内表面12。孔17A、17B、17C为由容器11的内表面12构成的区域。分别设置于孔17A、17B、17C的底面12-1对应基部。作为基部的底面12-1具备化学取代基16或核酸结合蛋白18。

[0052] 例如,如图3所示,粒状物13被区分成一个或多个粒状物13A、一个或多个粒状物13B、一个或多个粒状物13C。例如,粒状物13A、13B、13C配置于不同的区域。例如,粒状物13A收容于容器11的孔17A,粒状物13B收容于容器11的孔17B,粒状物13C收容于容器11的孔17C。孔17A、17B、17C各自为一个区域。例如,粒状物13A、13B、13C带有磁性。例如,粒状物13A、13B、13C利用磁力留在对应的区域中。

[0053] 例如,粒状物13A的表面14与设置于孔17A的基部对应。粒状物13B的表面14与设置于孔17B的基部对应。粒状物13C的表面14与设置于孔17C的基部对应。

[0054] 第2结合物质被固定于基部。第2结合物质具有与目标物质结合的活性。第2结合物质例如为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或脂质。

[0055] 第2结合物质在多个区域中分别被固定于基部。图2所示的例子情况下,第2结合物质19在孔17A、17B、17C中分别被固定于底面12-1。底面12-1对应基部。

[0056] 如图3所示,基部为粒状物13的表面14时,第2结合物质19被固定于粒状物13A的表面14、粒状物13B的表面14、粒状物13C的表面14。

[0057] 第2结合物质所结合的目标物质根据区域而不同。在图2所示的例子中,固定于孔17A的底面12-1的第2结合物质19为第2结合物质19A。第2结合物质19A与目标物质7A结合。第2结合物质19A不与目标物质7B、7C结合。

[0058] 另外,固定于孔17B的底面12-1的第2结合物质19为第2结合物质19B。第2结合物质19B与目标物质7B结合。第2结合物质19B不与目标物质7A、7C。

[0059] 另外,固定于孔17C的底面12-1的第2结合物质19为第2结合物质19C。第2结合物质19C与目标物质7C结合。第2结合物质19C不与目标物质7B、7A结合。

[0060] 因此,第2结合物质19所结合的目标物质7在孔17A中为目标物质7A,在孔17B中为目标物质7B,在孔17C中为目标物质7C。即,第2结合物质19所结合的目标物质7根据区域而不同。

[0061] 在图3所示的例子中,第2结合物质19所结合的目标物质也根据区域而不同。粒状物13A、13B、13C配置于不同的区域。固定于粒状物13A的表面14的第2结合物质19为第2结合物质19A。第2结合物质19A与目标物质7A结合。第2结合物质19A不与目标物质7B、7C结合。

[0062] 另外,固定于粒状物13B的表面14的第2结合物质19为第2结合物质19B。第2结合物

质19B与目标物质7B结合。第2结合物质19B不与目标物质7A、7C结合。

[0063] 另外,固定于粒状物13C的表面14的第2结合物质19为第2结合物质19C。第2结合物质19C与目标物质7C结合。第2结合物质19C不与目标物质7B、7A结合。

[0064] 因此,第2结合物质19所结合的目标物质7在粒状物13A中为目标物质7A,在粒状物13B中为目标物质7B,在粒状物13C中为目标物质7C。即,第2结合物质19所结合的目标物质7根据区域而不同。

[0065] 第2结合物质19和基部例如分别具备化学取代基或核酸结合蛋白。例如,通过使第2结合物质19所具备的化学取代基或核酸结合蛋白与基部所具备的化学取代基16或核酸结合蛋白18结合,从而第2结合物质被固定于基部。

[0066] 第2结合物质19所具备的化学取代基例如具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。作为第2结合物质19所具备的核酸结合蛋白作为,例如,可举出锌指、CRISPR等。作为5-卤代尿嘧啶,例如,可举出5-碘尿嘧啶、5-溴尿嘧啶等。5-卤代尿嘧啶为可进行UV交联的化学取代基。

[0067] 基部所具备的化学取代基16例如具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。作为基部所具备的核酸结合蛋白18,例如,可举出锌指、CRISPR等。作为5-卤代尿嘧啶,例如,可举出5-碘尿嘧啶、5-溴尿嘧啶等。5-卤代尿嘧啶为可进行UV交联的化学取代基。

[0068] 第2结合物质19所具备的化学取代基与基部所具备的化学取代基16不同。例如,第2结合物质19所具备的化学取代基为生物素时,基部所具备的化学取代基16为亲和素、链霉亲和素或中性亲和素。

[0069] 4.分析方法

[0070] 在本公开的分析方法中,将融合体与包含目标物质的试样混合而生成混合物。混合物例如包含多种融合体。在混合物中,融合体的至少一部分与目标物质结合。更详细而言,融合体所具备的第1结合物质与目标物质结合。

[0071] 混合物包含多种融合体时,如果在混合物中存在对应的目标物质,则各个种类的融合体与对应的目标物质结合。对应的目标物质是指融合体具有与该目标物质结合的活性的目标物质。

[0072] 例如,在图4所示的例子中,将3种融合体1A、1B、1C与包含目标物质7A、7B、7C的试样混合而生成混合物21。在试样中存在目标物质7A时,融合体1A与目标物质7A结合。融合体1B、1C不与目标物质7A结合。

[0073] 另外,在试样中存在目标物质7B时,融合体1B与目标物质7B结合。融合体1A、1C不与目标物质7B结合。另外,在试样中存在目标物质7C时,融合体1C与目标物质7C结合。融合体1A、1B不与目标物质7C结合。

[0074] 接下来,在本公开的分析方法中,使被固定于基部的第2结合物质19与混合物21接触。此时,第2结合物质19与混合物21中包含的目标物质结合。

[0075] 基部分别设置于多个区域。第2结合物质19所结合的目标物质根据区域而不同。因此,与第2结合物质19结合的目标物质根据区域而不同。

[0076] 在图2所示的例子中,如步骤1、2所示,在孔17A、17B、17C中分别加入混合物21。孔17A、17B、17C分别为一个区域。加入孔17A中的混合物21、加入孔17B中的混合物21和加入孔17C中的混合物21分别被例如间隔壁15分隔开,相互不混合。

[0077] 在加入混合物21后,在孔17A中,被固定于底面12-1的第2结合物质19A与混合物21接触。混合物21中存在目标物质7A时,目标物质7A与第2结合物质19A结合。融合体1A与目标物质7A结合。因此,混合物21中存在目标物质7A时,如图2的步骤2所示,在孔17A中,融合体1A与目标物质7A结合,该目标物质7A成为与第2结合物质19A结合的状态。其结果,融合体1A介由目标物质7A被固定于第2结合物质19A。

[0078] 另外,在孔17B中,固定于底面12-1的第2结合物质19B与混合物21接触。混合物21中存在目标物质7B时,目标物质7B与第2结合物质19B结合。融合体1B与目标物质7B结合。因此,混合物21中存在目标物质7B时,如图2的步骤2所示,在孔17B中,融合体1B与目标物质7B结合,该目标物质7B成为与第2结合物质19B结合的状态。其结果,融合体1B介由目标物质7B被固定于第2结合物质19B。

[0079] 另外,在孔17C中,固定于底面12-1的第2结合物质19C与混合物21接触。混合物21中存在目标物质7C时,目标物质7C与第2结合物质19C结合。融合体1C与目标物质7C结合。因此,混合物21中存在目标物质7C时,如图2的步骤2所示,在孔17C中,融合体1C与目标物质7C结合,该目标物质7C成为与第2结合物质19C结合的状态。其结果,融合体1C介由目标物质7C被固定于第2结合物质19C。

[0080] 接下来,在本公开的分析方法中,从混合物21中除去未与固定于底面12-1的第2结合物质19结合的目标物质、以及未与结合有固定于底面12-1的第2结合物质19的目标物质结合的融合体。作为除去的方法,例如,可举出清洗的方法等。

[0081] 在图2所示的例子中,如步骤2、3所示,在孔17A中,从混合物21中除去未与固定于底面12-1的第2结合物质19A结合的目标物质7A、7B、7C、以及未与结合有固定于底面12-1的第2结合物质19A的目标物质7A结合的融合体1A、1B、1C。

[0082] 另外,在孔17B中,从混合物21中除去未与固定于底面12-1的第2结合物质19B结合的目标物质7A、7B、7C、以及未与结合有固定于底面12-1的第2结合物质19B的目标物质7B结合的融合体1A、1B、1C。

[0083] 另外,在孔17C中,从混合物21中除去未与固定于底面12-1的第2结合物质19C结合的目标物质7A、7B、7C、以及未与结合有固定于底面12-1的第2结合物质19C的目标物质7C结合的融合体1A、1B、1C。

[0084] 接下来,在本公开的分析方法中,检测与结合有第2结合物质19的目标物质结合的融合体具备的标记物所产生的现象。例如,在多个区域中,分别检测融合体具备的标记物所产生的现象。

[0085] 在图2所示的例子中,如步骤4所示,在孔17A中,进行检测融合体1A具备的标记物5A所产生的现象(以下记为A的现象)的处理。

[0086] 试样中包含目标物质7A时,可以检测A的现象。A的现象是由与结合有第2结合物质19A的目标物质7A结合的融合体1A产生的。试样中不含目标物质7A时,无法检测A的现象。

[0087] 因此,在孔17A中检测到A的现象时,可以判断为试样中包含目标物质7A。另外,可以根据A的现象的程度,推测目标物质7A的量、浓度。

[0088] 另外,在孔17B中,进行检测融合体1B具备的标记物5B所产生的现象(以下记为B的现象)的处理。试样中包含目标物质7B时,可以检测B的现象。B的现象是由与结合有第2结合物质19B的目标物质结合7B的融合体1B产生的。试样中不含目标物质7B时,无法检测B的现象。

[0089] 因此,在孔17B中检测到B的现象时,可以判断为试样中包含目标物质7B。另外,可以根据B的现象的程度,推测目标物质7B的量、浓度。

[0090] 另外,在孔17C中,进行检测融合体1C具备的标记物5C所产生的现象(以下记为C的现象)的处理。试样中包含目标物质7C时,可以检测C的现象。C的现象是由与结合有第2结合物质19C的目标物质结合7C的融合体1C产生的。试样中不含目标物质7C时,无法检测C的现象。

[0091] 因此,在孔17C中检测到C的现象时,可以判定为试样中包含目标物质7C。另外,可以根据C的现象的程度,推测目标物质7C的量、浓度。

[0092] 产生A、B、C的现象的区域各自不同,因此用户可以识别A、B、C的现象。

[0093] 例如,现象为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收时,例如,可以使用pH计或离子敏场效应晶体管检测现象。

[0094] 例如,现象为显色、发光、荧光或磷光时,例如,可以使用光接收设备检测现象。

[0095] 例如,现象为吸热或放热时,例如,可以使用热分析仪检测现象。

[0096] 例如,现象为氧化还原时,例如,可以使用电位仪或离子敏场效应晶体管检测现象。

[0097] 例如,现象为沉淀时,例如,可以使用质谱仪、吸光光度计或分光光度计检测现象。

[0098] 例如,标记物5A、5B、5C为酶。A、B、C的现象例如为通过酶的作用由底物23生成产物25、27,发生离子的生产、消耗或吸收的现象。应予说明,底物23例如在步骤3与步骤4之间与混合物21混合。

[0099] 5.分析方法发挥的效果

[0100] (1A)根据本公开的分析方法,可以分别检测试样中包含的多个目标物质。例如,在图1~图3所示的例子中,将混合物21分别放入孔17A、17B、17C中。在孔17A中检测A的现象。在孔17B中检测B的现象。在孔17C中检测C的现象。其结果,可以分别检测试样中包含的目标物质7A、7B、7C。特别是根据本公开的分析方法,可以分别检测试样中包含的多个目标物质。

[0101] (1B)基部例如为容器11的内表面12或者粒状物13的表面14。第2结合物质19例如被固定于容器11的内表面12或者粒状物13的表面14。在孔17A、17B、17C中加入混合物21后,第2结合物质19与目标物质7结合,该目标物质7与融合体1结合。基部为容器11的内表面12时,第2结合物质19被固定于容器11,因此将与第2结合物质19结合的目标物质7和与该目标物质7结合的融合体1留在孔17A、17B、17C内,能够容易地除去混合物21中包含的其它物质并清洗。基部为粒状物13的表面14时,例如,如果粒状物13为磁珠,则通过使用磁铁将磁珠留在孔17A、17B、17C内,能够容易地除去混合物21中包含的其它物质并清洗。

[0102] (1C)第2结合物质19例如为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或者脂质。根据本公开的分析方法,能够根据第2结合物质19的种类检测多样的目标物质7。

[0103] (1D)标记物5A、5B、5C例如为酶、DNA酶、RNA酶、磁标记、荧光标记、化学发光探针和纳米粒子中的至少一种。根据本公开的分析方法,能够呈现多样的现象,现象的检测方法没

有限定。

[0104] (1E)与目标物质7A、7B、7C结合的融合体1A、1B、1C产生的可观测的现象例如为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收、或者显色、荧光、发光、磷光、吸热、放热、氧化还原或沉淀。根据本公开的分析方法,能够呈现多样的现象,现象的检测方法没有限定。

[0105] 6. 实施例

[0106] (6-1)融合体1A、1C的合成

[0107] 用图5所示的方法合成融合体1A、1C。首先,在图5的S21的工序中,将第1结合物质3A、3C分别通过体外工序进行化学合成。第1结合物质3A为具有序列号1的碱基序列且对5'末端进行了生物素化修饰的DNA适配体。第1结合物质3C为具有序列号2的碱基序列且对5'末端进行了生物素化修饰的DNA适配体。

[0108] 第1结合物质3A的碱基序列为“5'-CAGCACCGAC CTTGTGCTT T GGGAGTGCTG GTCCAAGGGC GTTAATGGAC A-3'”。第1结合物质3A记载于Anal.Chem.2020,92,9895-9900(以下记为文献1)中。

[0109] 应予说明,根据文献1的记载,第1结合物质3A为将新型冠状病毒SARS-CoV-2的刺突蛋白中的RBD作为目标物质的DNA适配体。

[0110] 第1结合物质3C的碱基序列为“5'-GCTGGATGTCGCTTACGACAA TATTCCTTAGGGCACC GCTACATTGACACATCCAGC-3'”。第1结合物质3C的碱基序列记载于Chem.Comm.2020,56,10235-10238(以下记为文献2)中。

[0111] 应予说明,根据文献2的记载,第1结合物质3C为将新型冠状病毒SARS-CoV-2的核衣壳蛋白作为目标物质的DNA适配体。

[0112] 将第1结合物质3A溶解于磷酸缓冲液(以下记为1xPBS/T),制造第1结合物质3A溶液。另外,将第1结合物质3C溶解于1xPBS/T,制造第1结合物质3C溶液。

[0113] 第1结合物质3A溶液中的第1结合物质3A的浓度和第1结合物质3C溶液中的第1结合物质3C的浓度分别为10 $\mu$ mol/l。

[0114] 1xPBS/T是将10xPBS/T(FUJIFILM Wako Chemicals公司,产品编号MB-075-1000)用超纯水稀释至10倍而得的磷酸缓冲液。将第1结合物质3A溶液和第1结合物质3C溶液在95 $^{\circ}$ C加热,其后缓慢冷却。

[0115] 接下来,在图5的S22的工序中,准备标记物5。标记物5为链霉亲和素-碱性磷酸酶结合体(ThermoFisher Scientific公司,产品编号S921)。标记物5为酶。链霉亲和素-碱性磷酸酶结合体是通过用链霉亲和素修饰碱性磷酸酶而得的。链霉亲和素为修饰碱性磷酸酶的化学取代基。将标记物5溶解于1xPBS/T,制造标记物溶液。标记物溶液中的标记物的浓度为20 $\mu$ mol/l。

[0116] 将100 $\mu$ L的第1结合物质3A溶液与5 $\mu$ L的标记物溶液混合,在室温下静置1小时。此时,通过生物素-链霉亲和素的相互作用,第1结合物质3A与标记物5融合,合成融合体1A。

[0117] 另外,将100 $\mu$ L的第1结合物质3C溶液与5 $\mu$ L的标记物溶液混合,在室温下静置1小时。此时,通过生物素-链霉亲和素的相互作用,第1结合物质3C与标记物5融合,合成融合体1C。

[0118] 接下来,在图5的S23的工序中,将融合体1A、1C纯化,并回收。具体而言,使用超滤

器将未与标记物5融合的第1结合物质3A从融合体1A中分离。接下来,在1xPBS/T中溶解融合体1A,由此回收融合体1A。

[0119] 另外,使用超滤器将未与标记物5融合的第1结合物质3C从融合体1C中分离。接下来,在1xPBS/T中溶解融合体1C,由此回收融合体1C。

[0120] 接下来,分别制造包含融合体1A的融合体1A溶液和包含融合体1C的融合体1C溶液。融合体1A溶液中的标记物5的浓度和融合体1C溶液中的标记物5的浓度分别为20 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 。

[0121] 应予说明,第1结合物质3A、3C可以为DNA适配体以外的结合物质。第1结合物质3A、3C例如可以为低分子蛋白质制剂或者RNA适配体。作为低分子蛋白质制剂,例如,可举出片段抗体、单链抗体、双特异抗体(Diabody)、纳米抗体(Nanobody)、VHH、肽适配体等。

[0122] 另外,构成第1结合物质3A、3C的DNA适配体的碱基序列可以为除序列号1、2的碱基序列以外的碱基序列。DNA适配体的碱基序列可以根据目标物质选定。另外,第1结合物质3A、3C与标记物5的融合可以为基于生物素-链霉亲和素的相互作用的融合以外的融合。另外,使用核酸适配体作为第1结合物质3A、3C时,核酸适配体中的5'末端以外的末端可以与标记物5融合。

[0123] 另外,使用低分子蛋白质制剂作为第1结合物质3A、3C时,低分子蛋白质制剂中的N末端可以与标记物5融合,C末端也可以与标记物5融合。

[0124] (6-2) 第2结合物质19A、19C与板的结合

[0125] 用图6所示的方法将第2结合物质19A、19C固定于孔。首先,在图6的S31的工序中,将第2结合物质19A、19C通过体外工序进行化学合成。第2结合物质19A为具有序列号3的碱基序列且对5'末端进行了生物素化修饰的DNA适配体。第2结合物质19C为具有序列号4的碱基序列且对5'末端进行了生物素化修饰的DNA适配体。

[0126] 第2结合物质19A的碱基序列为“5'-GATATCAACCCATGGTAGGTATTGCTTGGTAGGGATAGTGGGCTTGATGTT-3'”。第2结合物质19A记载于Angew.Chem.2021,133,10367-10373(以下记为文献3)中。

[0127] 应予说明,根据文献3的记载,第2结合物质19A为将新型冠状病毒SARS-CoV-2的刺突蛋白中的非RBD部分作为目标物质的DNA适配体。

[0128] 第2结合物质19C的碱基序列为“5'-GCTGGATGTCACCGGATTGT CGGACATCGGATTGTCTGAGTCATATGACACATCCAGC-3'”。DNA适配体记载于文献2中。

[0129] 应予说明,根据文献2的记载,具有序列号4的碱基序列的DNA适配体为将新型冠状病毒SARS-CoV-2的核衣壳蛋白中的并非序列号2的碱基序列结合的部分作为目标物质的DNA适配体。

[0130] 将第2结合物质19A溶解于1xPBS/T,制造第2结合物质19A溶液。另外,将第2结合物质19C溶解于1xPBS/T,制造第2结合物质19C溶液。

[0131] 第2结合物质19A溶液中的第2结合物质19A的浓度和第2结合物质19C溶液中的第2结合物质19C的浓度分别为1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 。将第2结合物质19A溶液和第2结合物质19C溶液在95 $^{\circ}\text{C}$ 加热,其后缓慢冷却。

[0132] 接下来,在图6的S32的工序中,准备图7所示的亲合素板31(Sumitomo Bakelite公司,产品编号BS-X7603)。亲合素板31具备多个孔。各孔对应区域。各孔的内表面12具备亲和

素。内表面12对应基部。亲和素通过与生物素的相互作用在孔中修饰DNA适配体的化学取代基16。

[0133] 在亲和素板31具备的3个孔17A-1、17A-2、17A-3中分别加入100 $\mu$ L的第2结合物质19A溶液,在常温下静置1小时。此时,第2结合物质19A与孔17A-1、17A-2、17A-3的内表面12所具备的亲和素结合。

[0134] 另外,在亲和素板31具备的3个孔17C-1、17C-2、17C-3中分别加入100 $\mu$ L的第2结合物质19C溶液,在常温下静置1小时。此时,第2结合物质19C与孔17C-1、17C-2、17C-3的内表面12所具备的亲和素结合。

[0135] 接下来,用200 $\mu$ L的1xPBS/T分别对孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3进行清洗。清洗进行3次。此时,除去未与各孔的内表面12所具备的亲和素结合的第2结合物质19A、19C。

[0136] 接下来,在图6的S33的工序中,将生物素(东京化成工业公司,产品编号B0463)用1xPBS/T溶解,制造生物素溶液。生物素溶液中的生物素的浓度为250 $\mu$ mol/l。

[0137] 接下来,在孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3中分别加入200 $\mu$ L的生物素溶液,在常温下静置2小时。此时,各孔的内表面12所具备的亲和素中,未与第2结合物质19A、19C结合的亲和素与生物素结合。

[0138] 接下来,用200 $\mu$ L的1xPBS/T分别对孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3进行清洗。清洗进行3次。此时,除去未与孔结合的生物素。

[0139] 第2结合物质19A、19C所结合的目标物质7A、7C根据区域而不同。即,在孔17A-1、17A-2、17A-3中第2结合物质19A与目标物质7A结合。另外,在孔17C-1、17C-2、17C-3中第2结合物质19C与目标物质7C结合。孔17A-1、17A-2、17A-3、以及孔17C-1、17C-2、17C-3分别对应区域。

[0140] 应予说明,第2结合物质19A、19C可以为DNA适配体以外的结合物质。第2结合物质19A、19C例如可以为低分子蛋白质制剂或者RNA适配体。作为低分子蛋白质制剂,例如,可举出片段抗体、单链抗体、双特异抗体(Diabody)、纳米抗体(Nanobody)、VHH、肽适配体等。

[0141] 另外,构成第2结合物质19A、19C的DNA适配体的碱基序列可以为除序列号1、2的碱基序列以外的碱基序列。DNA适配体的碱基序列可以根据目标物质选定。另外,使用核酸适配体作为第2结合物质19A、19C时,核酸适配体中的5'末端以外的末端可以与基部结合。另外,使用低分子蛋白质制剂作为第2结合物质19A、19C时,低分子蛋白质制剂中的N末端可以与基部结合,C末端也可以与基部结合。

[0142] 另外,第2结合物质19A、19C向基部的固定可以为基于生物素-链霉亲和素的相互作用的结合以外的结合。例如,作为容器,可以使用马来酰亚胺封闭板(TOMSIC公司,产品编号MG22F-MAL)。马来酰亚胺封闭板在各孔的内表面12具备马来酰亚胺。内表面12对应基部。马来酰亚胺对应化学取代基16。内表面12包含底面12-1和第1侧面12-2。孔面向外壁51时,内表面12进一步包含第2侧面12-3。

[0143] 通过使内表面12具备的马来酰亚胺与第2结合物质19A、19C所具备的硫醇结合,从而将第2结合物质19A、19C固定于内表面12。

[0144] 另外,容器的内表面12不具备化学取代基16或核酸结合蛋白18时,通过将包含化学取代基16或核酸结合蛋白18的材料涂布在内表面12的方法、化学修饰的方法,使内表面

12具备化学取代基16或核酸结合蛋白18。

[0145] (6-3) 目标物质的分析方法的实施

[0146] 如图8所示,实施目标物质的分析方法。在图8的S41中,准备目标物质7A、7C。目标物质7A为SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1-His Recombinant Protein(Sinobiological公司,产品编号40591-V08H)。目标物质7A的氨基酸序列包含RBD。用1xPBS/T溶解目标物质7A,制造目标物质7A溶液。目标物质7A溶液中的目标物质7A的浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0147] 另外,目标物质7C为SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Nucleocapsid-His Recombinant Protein(Sinobiological公司,产品编号40588-V07E)。用1xPBS/T溶解目标物质7C,制造目标物质7C溶液。目标物质7C溶液中的目标物质7C的浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0148] 将200 $\mu\text{L}$ 的目标物质7A溶液与200 $\mu\text{L}$ 的目标物质7C溶液混合,制造目标物质溶液。目标物质溶液中的目标物质7A的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,目标物质7C的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0149] 将50 $\mu\text{L}$ 的融合体1A溶液和50 $\mu\text{L}$ 的融合体1C溶液与100 $\mu\text{L}$ 的目标物质溶液混合,在常温下静置1小时,制造融合体1A1C-目标物质混合物。

[0150] 在融合体1A1C-目标物质混合物中,融合体1A的浓度为5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ,融合体1C的浓度为5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ,目标物质7A的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,目标物质7C的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0151] 另外,将50 $\mu\text{L}$ 的融合体1A溶液和100 $\mu\text{L}$ 的目标物质溶液与50 $\mu\text{L}$ 的1xPBS/T混合,在常温下静置1小时,制造融合体1A-目标物质混合物。在融合体1A-目标物质混合物中,融合体1A的浓度为5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ,目标物质7A的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,目标物质7C的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0152] 另外,将50 $\mu\text{L}$ 的融合体1C溶液和100 $\mu\text{L}$ 的目标物质溶液与50 $\mu\text{L}$ 的1xPBS/T混合,在常温下静置1小时,制造融合体1C-目标物质混合物。融合体1C-目标物质混合物中的融合体1C的浓度为5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ,目标物质7A的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,目标物质7C的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0153] 此时,如图8的S42所示,形成了目标物质7A与融合体1A的结合体33A。另外,形成了目标物质7C与融合体1C的结合体33C。

[0154] 即,如图9所示,在融合体1A1C-目标物质混合物中,形成了目标物质7A与融合体1A的结合体33A,并且形成了目标物质7C与融合体1C的结合体33C。另外,如图10所示,在融合体1A-目标物质混合物中,形成了目标物质7A与融合体1A的结合体33A。另外,如图11所示,在融合体1C-目标物质混合物中,形成了目标物质7C与融合体1C的结合体33C。

[0155] 接下来,如图8的S43所示,在孔中加入混合物。即,在孔17A-1、17C-1中分别加入融合体1A1C-目标物质混合物,在常温下静置1小时。另外,在孔17A-2、17C-2中分别加入融合体1A-目标物质混合物,在常温下静置1小时。另外,在孔17A-3、17C-3中分别加入融合体1C-目标物质混合物,在常温下静置1小时。

[0156] 此时,如图8的S44所示,结合体与第2结合物质结合。即,如图12所示,在孔17A-1、17A-2中,结合体33A与第2结合物质19A结合。另外,在孔17C-1、17C-3中,结合体33C与第2结合物质19C结合。

[0157] 接下来,如图8的S45所示,用200 $\mu\text{L}$ 的1xPBS/T分别对孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3进行清洗。清洗进行3次。其结果,除去未结合的物质。

[0158] 在孔17A-1中,除与第2结合物质19A结合的结合体33A以外,其它的物质被除去。

[0159] 在孔17A-2中,除与第2结合物质19A结合的结合体33A以外,其它的物质被除去。

[0160] 在孔17A-3中,除与第2结合物质19A结合的目标物质7A以外,其它的物质被除去。

- [0161] 在孔17C-1中,除与第2结合物质19C结合的结合体33C以外,其它的物质被除去。
- [0162] 在孔17C-2中,除与第2结合物质19C结合的目标物质7C以外,其它的物质被除去。
- [0163] 在孔17C-3中,除与第2结合物质19C结合的结合体33C以外,其它的物质被除去。
- [0164] 接下来,在图8的S46中,准备4-硝基苯基磷酸二钠六水合物(东京化成工业公司,产品编号N0241)。以下将4-硝基苯基磷酸二钠六水合物记为pNPP。pNPP为碱性磷酸酶诱导的代谢底物。
- [0165] 接下来,将pNPP溶解于包含碳酸盐pH标准液(FUJIFILM Wako Chemicals公司,产品编号037-16145)和硫酸镁(FUJIFILM Wako Chemicals公司,产品编号137-12335)的溶液中,制造pNPP溶液。pNPP溶液中的pNPP的浓度为10mmol/l。包含碳酸盐pH标准液和硫酸镁的溶液包含1mmol/l的碳酸盐pH标准液和1mmol/l的硫酸镁。将包含碳酸盐pH标准液和硫酸镁的溶液的pH调整为9.6。
- [0166] 应予说明,溶解pNPP的溶液可以为除包含碳酸盐pH标准液和硫酸镁的溶液以外的溶液。作为溶解pNPP的溶液,例如,可举出Tris缓冲液、磷酸缓冲液、Good' s缓冲液等。作为Good' s缓冲液,例如,可举出MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHES、CAPSO、CAPS等。
- [0167] 溶解pNPP的溶液的pH可以为9.6以外的值。溶解pNPP的溶液优选为弱碱性的溶液。溶解pNPP的溶液的pH优选为8~11。溶解pNPP的溶液为弱碱性的溶液时,来自以pNPP为底物的代谢的pH的变化大。溶解pNPP的溶液的pH为8~11时,来自以pNPP为底物的代谢的pH的变化大。
- [0168] 接下来,如图8的S46所示,在孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3中分别加入100 $\mu$ L的pNPP溶液,在37 $^{\circ}$ C静置10分钟。此时,如图8的S47所示,在孔17A-1、17A-2、17C-1、17C-3中,利用融合体1A或融合体1C具备的标记物5的酶活性,诱导以pNPP为底物的代谢,从pNPP中分离磷酸基。将代谢的方式示于图13。
- [0169] 其结果,在孔17A-1、17A-2、17C-1、17C-3中,生成无机磷酸和对硝基苯酚。对硝基苯酚的吸收极大波长为405nm。因此,包含对硝基苯酚的溶液显色为黄色。另外,生成的无机磷酸在溶液中电离,释放出氢离子。因此,溶液的pH下降。
- [0170] 接下来,如图8的S48所示,在孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3中分别加入0.5mol/l的乙二胺四乙酸(FUJIFILM Wako Chemicals,产品编号311-90075)5 $\mu$ L。此时,利用碱性磷酸酶的代谢停止。
- [0171] 接下来,如图8的S49所示,在孔17A-1、17A-2、17A-3、17C-1、17C-2、17C-3中,分别使用酶标仪(microplate reader)(BioTek公司,CYTATION3),测定405nm波长的光的吸光度。另外,在仅有pNPP溶液中也同样地测定吸光度。
- [0172] 将吸光度的测定结果示于图14。图14中“○”表示与仅测定pNPP溶液时的吸光度相比,吸光度大。“×”表示与仅测定pNPP溶液时的吸光度相比,吸光度相同或小。应予说明,在仅有pNPP溶液中,不发生利用碱性磷酸酶的酶反应。
- [0173] 吸光度的测定结果表明以下的内容。吸光度大是由与结合有第2结合物质19A的目标物质7A结合的融合体1A产生的现象。另外,吸光度大是由与结合有第2结合物质19C的目标物质7C结合的融合体1C产生的现象。
- [0174] 在孔17A-1、17A-2中结合有第2结合物质19A,未结合第2结合物质19C,因此在孔

17A-1、17A-2中吸光度大表明在孔17A-1、17A-2中加入的混合物包含目标物质7A。因此,实施例中,能够检测到目标物质7A。

[0175] 另外,在孔17C-1、17C-3中结合有第2结合物质19C,未结合第2结合物质19A,因此在孔17C-1、17C-3中吸光度大表明在孔17C-1、17C-3中加入的混合物包含目标物质7C。因此,实施例中,能够检测到目标物质7C。

[0176] 另外,融合体1A、1C所具备的碱性磷酸酶即便在与第1结合物质3A、3C融合的状态下也具有诱导以pNPP为底物的代谢的酶活性。

[0177] 另外,融合体1A所具备的第1结合物质3A即便在与标记物5融合的状态下也具有与目标物质7A结合的活性。另外,融合体1C所具备的第1结合物质3C即便在与标记物5融合的状态下也具有与目标物质7C结合的活性。

[0178] 另外,第2结合物质19A即便在与孔17A-1、17A-2结合的状态下也会与结合体33A结合。因此,第2结合物质19A即便在与孔17A-1、17A-2结合状态下也具有与目标物质7A结合的活性。

[0179] 另外,第2结合物质19C即便在与孔17C-1、17C-3结合的状态下也会与结合体33C结合。因此,第2结合物质19C即便在与孔17C-1、17C-3结合的状态下也具有与目标物质7C结合的活性。

[0180] 另外,第2结合物质19A不与结合体33C结合。因此,第2结合物质19A不具有与目标物质7C结合的活性。

[0181] 另外,第2结合物质19C不与结合体33A结合。因此,第2结合物质19C不具有与目标物质7A结合的活性。

[0182] 7.其它的实施方式

[0183] 以上对本公开的实施方式进行了说明,但本公开不限于上述的实施方式,可以进行各种变形而实施。

[0184] (1)如图3所示,基部可以为粒状物13的表面14。例如,可以将第2结合物质19固定于粒状物13的表面14,将粒状物13收容于容器11。例如,可以将固定有第2结合物质19A的粒状物13A收容于孔17A,将固定有第2结合物质19B的粒状物13B收容于孔17B,将固定有第2结合物质19C的粒状物13C收容于孔17C。这种情况下,也能够发挥上述(1A)的效果。

[0185] (2)与试样混合的融合体的种类的数目没有特别限定,例如,可以为2、3、4、5、6、7、8…。区域的数目没有特别限定,例如,可以为2、3、4、5、6、7、8…。

[0186] (3)可以将试样分割,对被分割的一部分试样实施本公开的分析方法。

[0187] (4)作为分析方法中使用的容器11,可以使用图15所示的容器11代替图2所示的容器11。图15所示的容器11的情况下,隔开孔17A、17B、17C的间隔壁15的前端与容器11的外壁51的前端相比更位于底面12-1侧。因此,在从容器11中的底面12-1离开的容器11的开口侧构成了孔17A、17B、17C各自共通的共通区域。孔17A、17B、17C各自可以介由该共通区域相互连通。

[0188] 由于为上述的构成,所以如果在孔17A、17B、17C中的任一个孔中加入混合物21直至上述的共通区域,则混合物21也会进入其它的孔。在孔17A、17B、17C中加入混合物21时,可以不分割混合物21并在孔17A、17B、17C中分别独立地加入混合物21。可以不分割混合物21,将混合物21一次性分别加入到孔17A、17B、17C中。因此,在孔17A、17B、17C中加入混合物

21的操作变大容易。

[0189] (5)可以通过多个构成要素来实现上述实施方式中的一个构成要素所具有的多个功能,或者通过多个构成要素来实现一个构成要素所具有的一个功能。另外,可以通过一个构成要素来实现多个构成要素所具有的多个功能,或者通过一个构成要素来实现由多个构成要素所实现的一个功能。另外,可以省略上述实施方式的构成的一部分。另外,可以对其它的上述实施方式的构成附加或置换上述实施方式的构成的至少一部分。

[0190] (6)除上述的分析方法以外,也可以通过融合体、由多种融合体构成的组、融合体的制造方法、融合体的组的制造方法等各种方式实现本公开。

[0191] [本说明书所公开的技术思想]

[0192] [项目1]

[0193] 一种目标物质的分析方法,将融合体(1A、1B、1C)与试样混合而生成混合物(21),上述融合体(1A、1B、1C)具备:具有与目标物质(7A、7B、7C)结合的活性的第1结合物质(3A、3B、3C)和标记物(5A、5B、5C),上述试样包含上述目标物质,

[0194] 使第2结合物质(19、19A、19B、19C)与上述混合物接触,上述第2结合物质(19、19A、19B、19C)被固定于基部(12、14),且具有与上述目标物质结合的活性,

[0195] 除去未与上述第2结合物质结合的上述目标物质、以及未与结合有上述第2结合物质的上述目标物质结合的上述融合体,

[0196] 检测与结合有上述第2结合物质的上述目标物质结合的上述融合体具备的上述标记物所产生的现象,

[0197] 上述第1结合物质为由核酸构成的物质或者由氨基酸构成的物质,

[0198] 上述基部分别设置在多个区域(17A、17B、17C),

[0199] 上述第2结合物质所结合的上述目标物质根据上述区域而不同。

[0200] [项目2]

[0201] 根据项目1所述的分析方法,其中,上述区域由容器(11)的内表面构成,

[0202] 上述基部为上述容器的内表面或者粒状物(13)的表面。

[0203] [项目3]

[0204] 根据项目1或2所述的分析方法,其中,上述第1结合物质为核酸适配体或者低分子蛋白质制剂。

[0205] [项目4]

[0206] 根据项目1~3中任一个项目所述的分析方法,其中,上述第2结合物质为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或者脂质。

[0207] [项目5]

[0208] 根据项目1~4中任一个项目所述的分析方法,其中,上述目标物质的至少一部分为蛋白质、糖、核酸、低分子化合物或者脂质。

[0209] [项目6]

[0210] 根据项目1~5中任一个项目所述的分析方法,其中,上述标记物具有酶、DNA酶、RNA酶、磁标记、荧光标记、化学发光探针和纳米粒子中的至少一种。

[0211] [项目7]

[0212] 根据项目6所述的分析方法,其中,上述现象为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂

离子、铵离子、或者氯化物离子的生产、消耗或吸收、或者显色、荧光、发光、磷光、吸热、放热、氧化还原或沉淀。

[0213] [项目8]

[0214] 根据项目1~7中任一个项目所述的分析方法,其中,上述第1结合物质和上述标记物分别具备化学取代基或核酸结合蛋白,

[0215] 通过使上述标记物所具备的上述化学取代基或上述核酸结合蛋白与上述第1结合物质所具备的上述化学取代基或上述核酸结合蛋白结合,从而上述标记物与上述第1结合物质融合,

[0216] 上述化学取代基具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。

[0217] [项目9]

[0218] 根据项目1~8中任一个项目所述的分析方法,其中,上述第2结合物质和上述基部分别具备化学取代基或核酸结合蛋白,

[0219] 通过使上述第2结合物质所具备的上述化学取代基或上述核酸结合蛋白与上述基部所具备的上述化学取代基或上述核酸结合蛋白结合,从而将上述第2结合物质固定于上述基部,

[0220] 上述化学取代基具有生物素、伯胺、叠氮化物、炔烃、二苯并环辛炔、双环壬炔、2'-0-炔丙基、2'-0-炔丙基、硫醇、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、N-羟基琥珀酰亚胺、马来酰亚胺和5-卤代尿嘧啶中的至少一种。

[0221] [项目10]

[0222] 根据项目1~9中任一个项目所述的分析方法,其中,上述现象为氢离子、钾离子、钠离子、钙离子、锂离子、铵离子或氯化物离子的生产、消耗或吸收时,使用pH计或离子敏场效应晶体管检测上述现象,

[0223] 上述现象为显色、发光、荧光或磷光时,使用光接收设备检测上述现象,

[0224] 上述现象为吸热或放热时,使用热分析仪检测上述现象,

[0225] 上述现象为氧化还原时,使用电位仪或离子敏场效应晶体管检测上述现象,

[0226] 上述现象为沉淀时,使用质谱仪、吸光光度计或分光光度计检测上述现象。

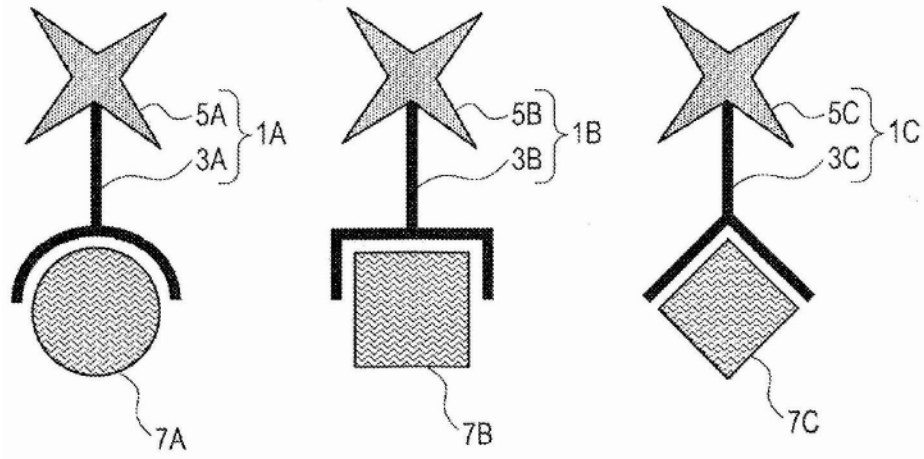


图1

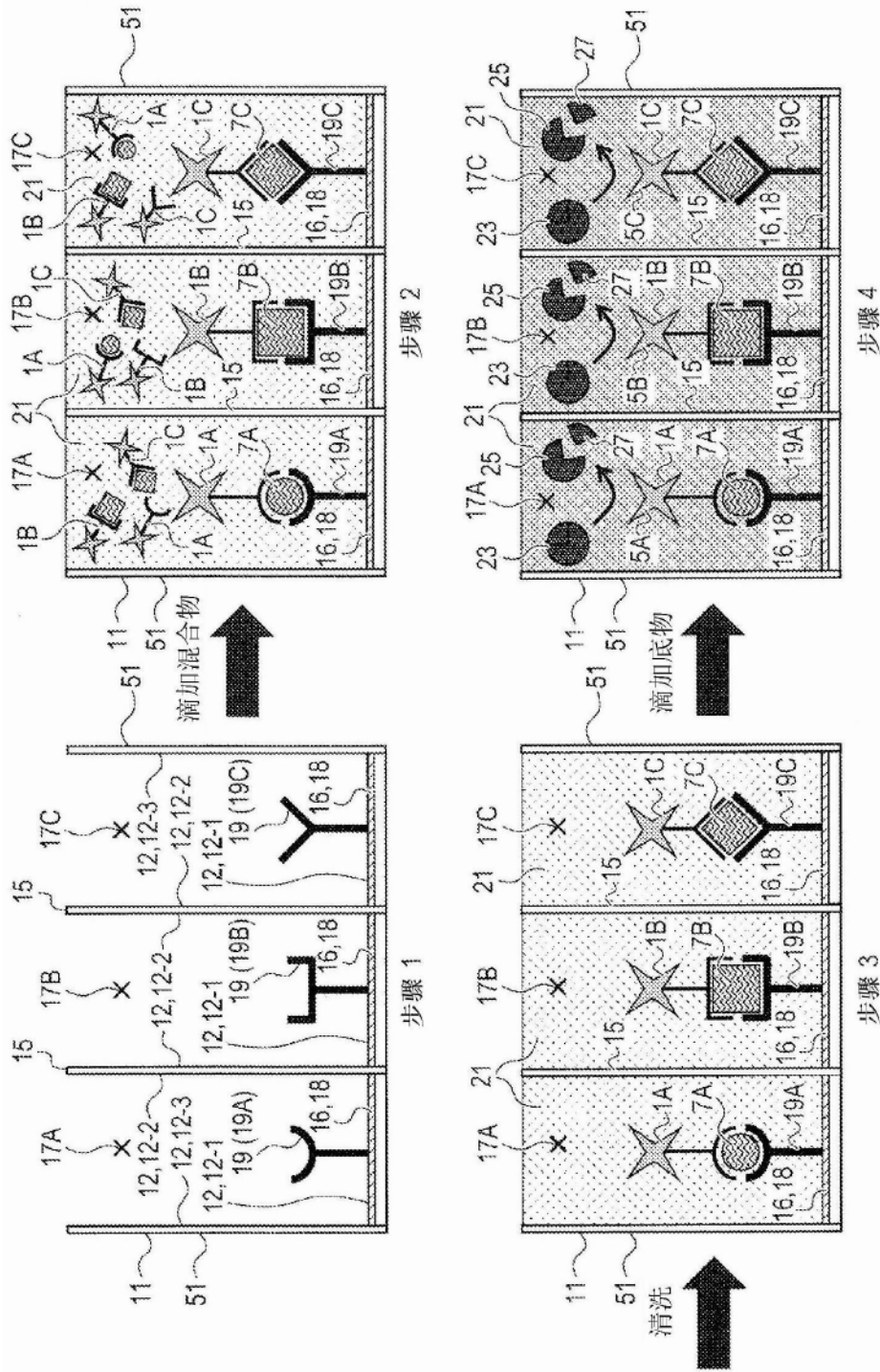


图2

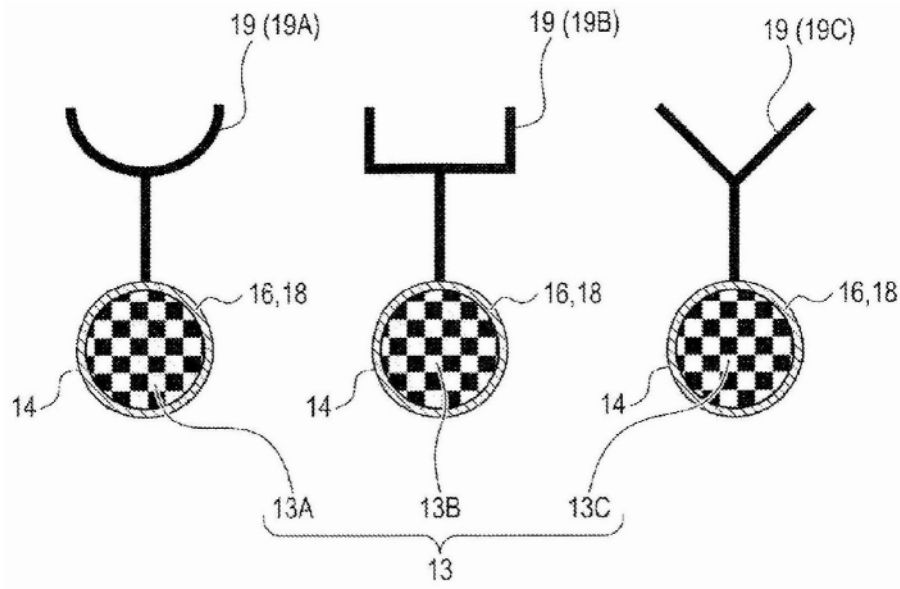


图3

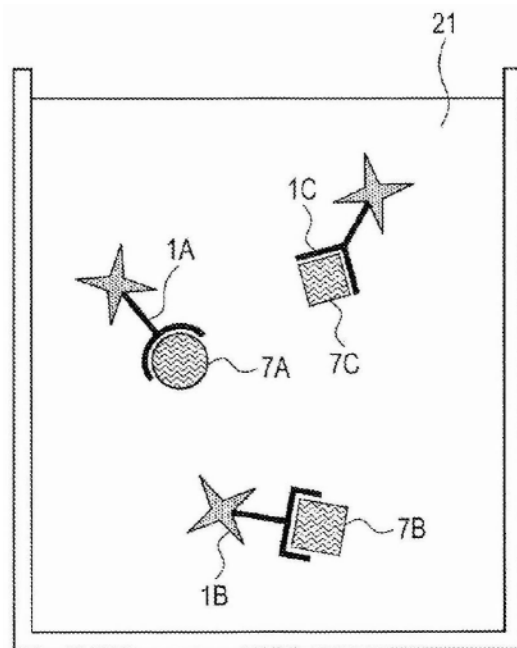


图4

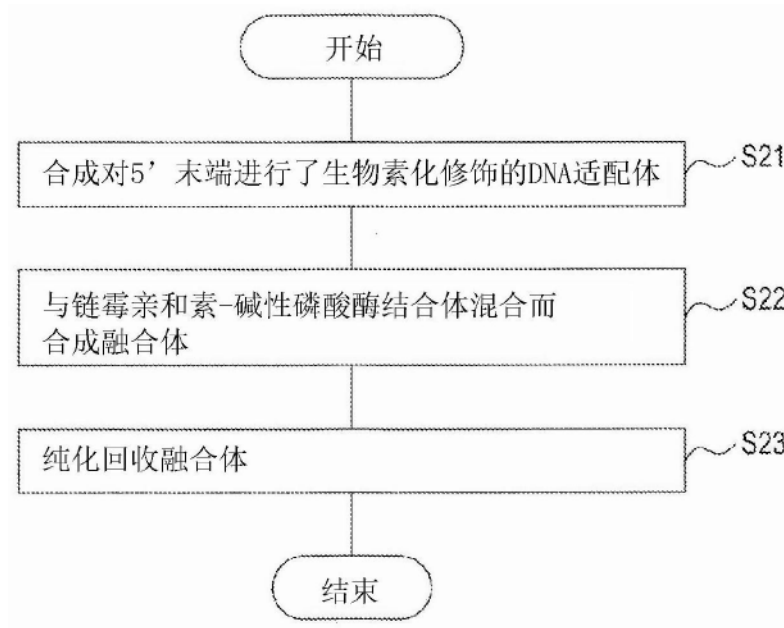


图5

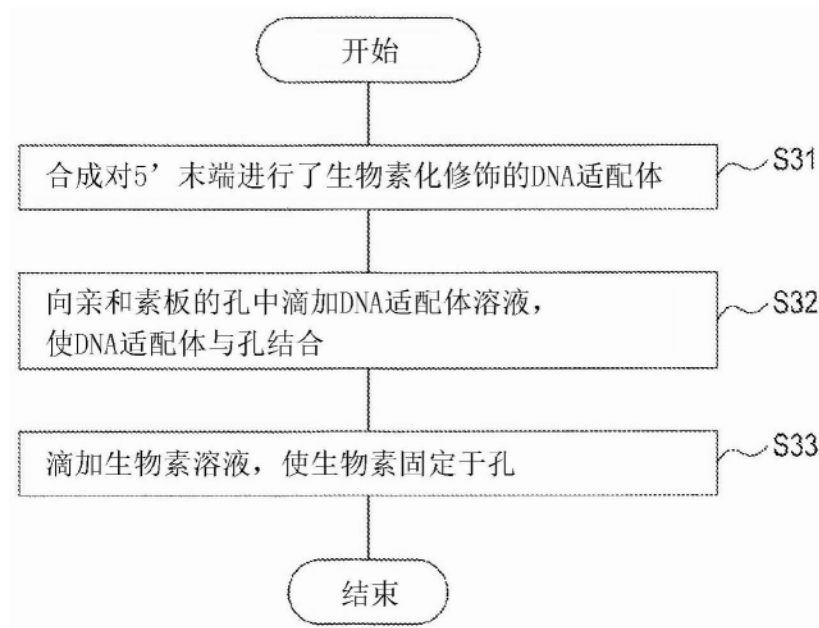


图6

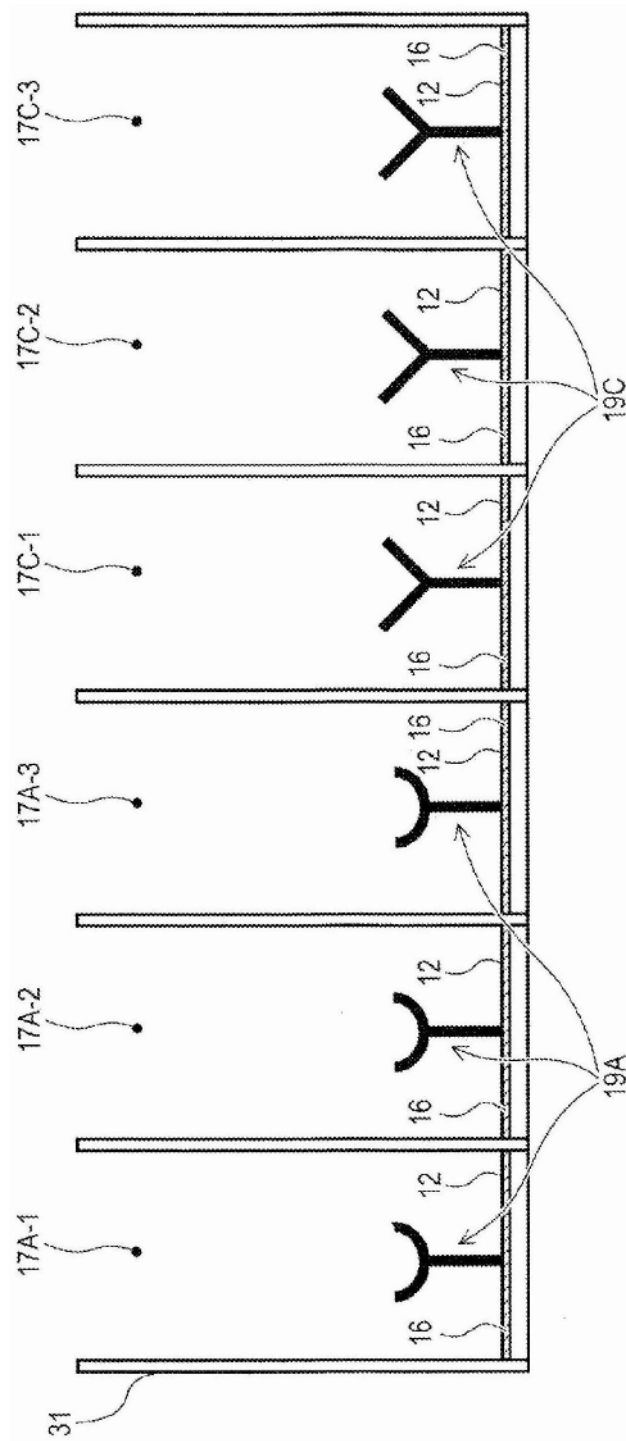


图7

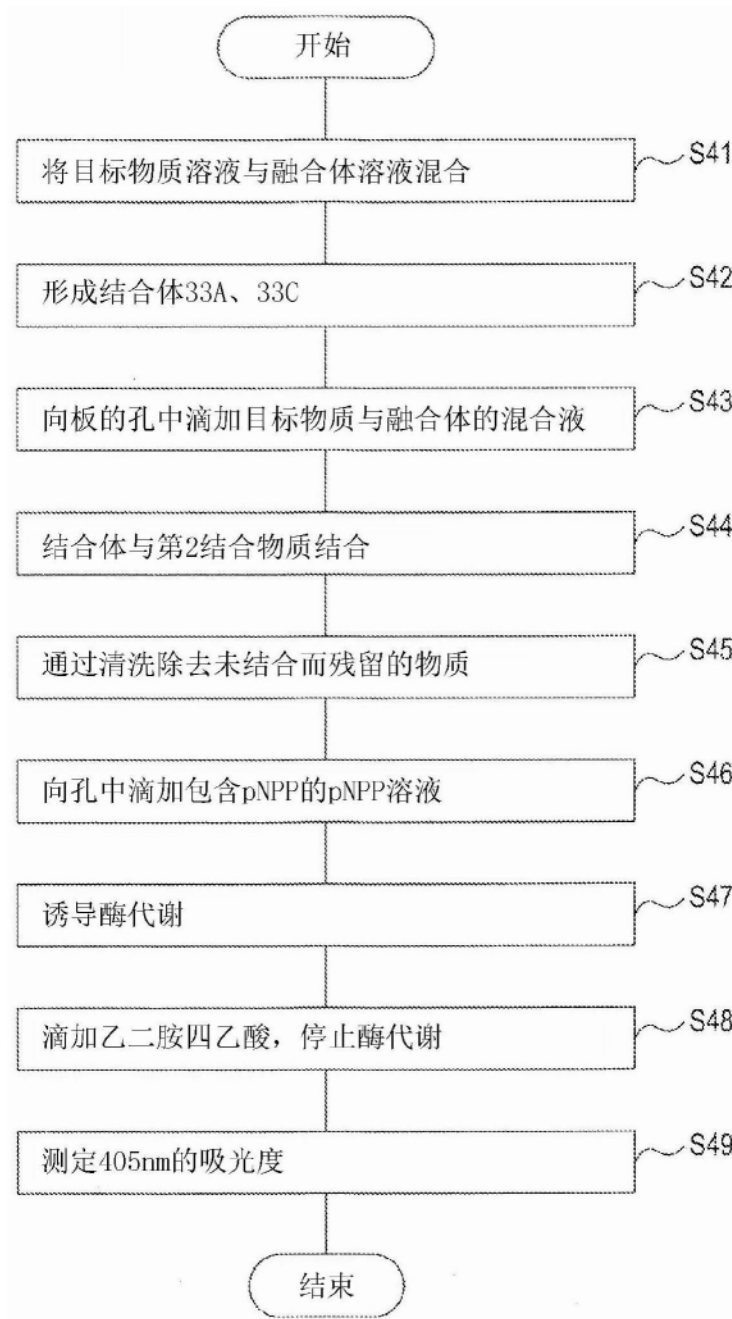


图8

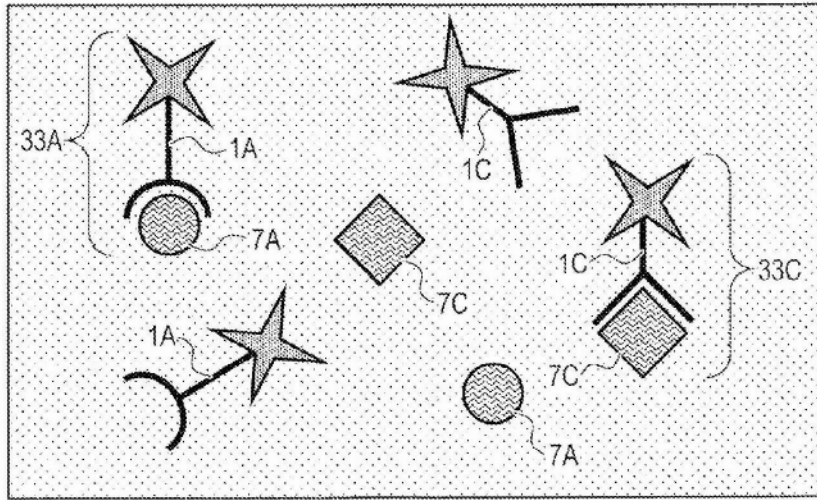


图9

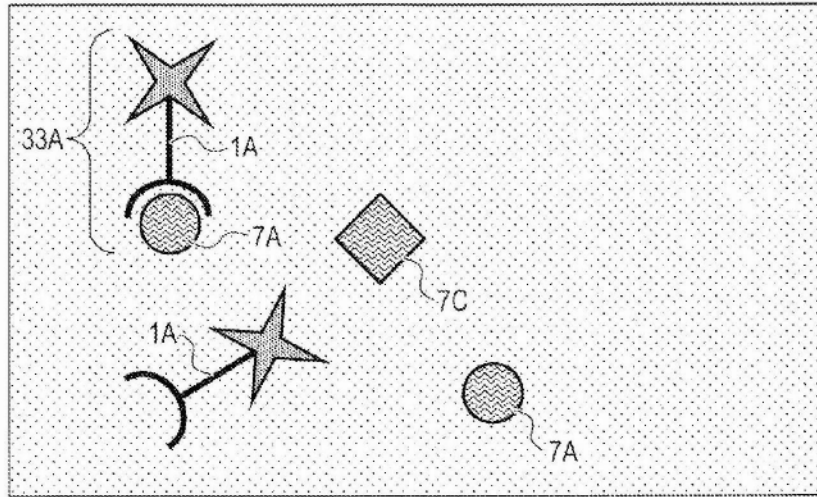


图10

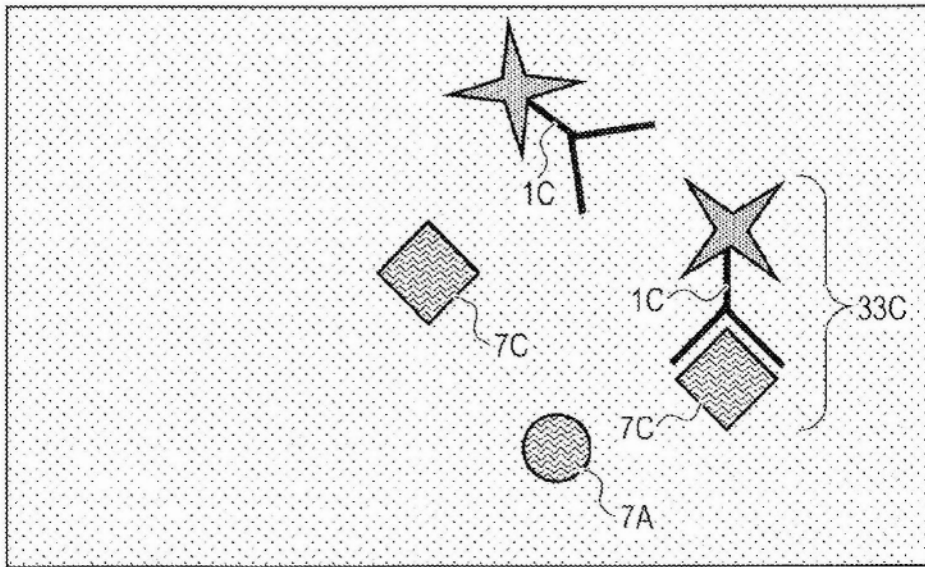


图11

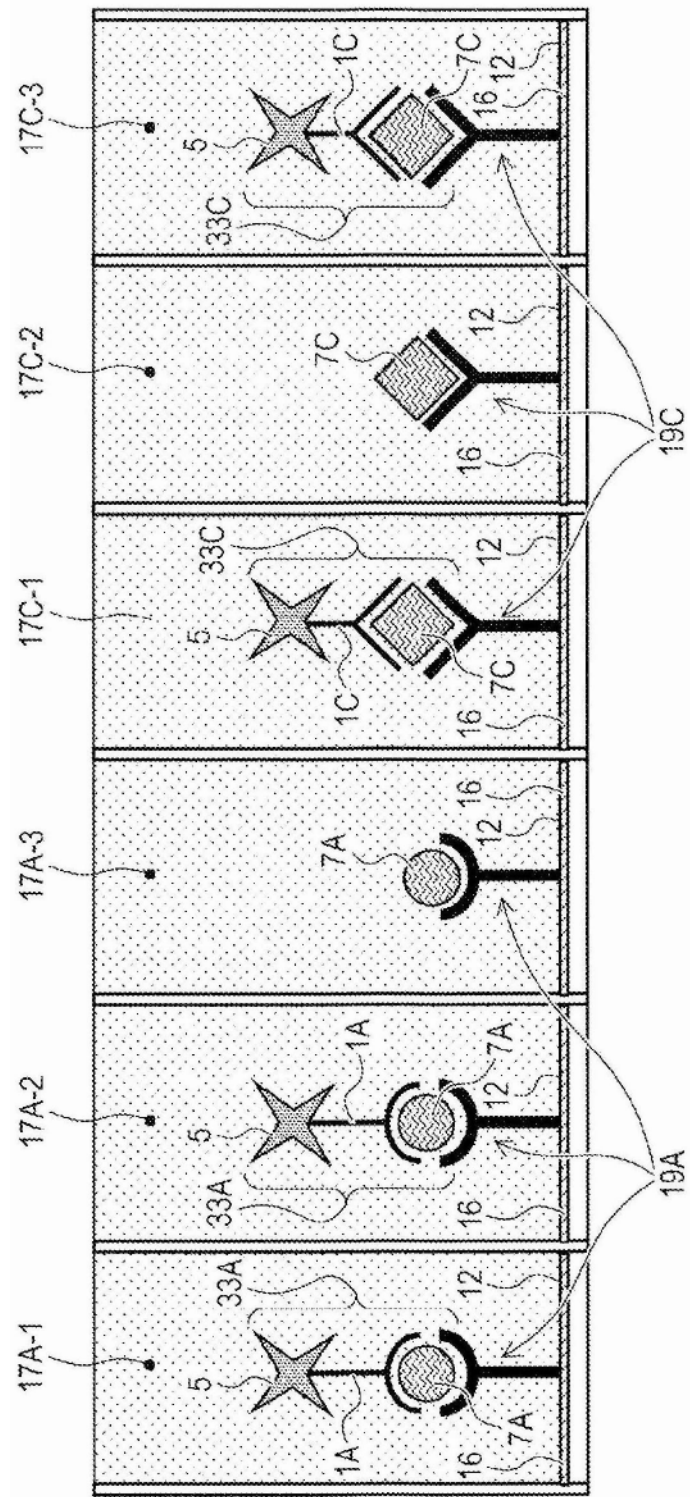


图12

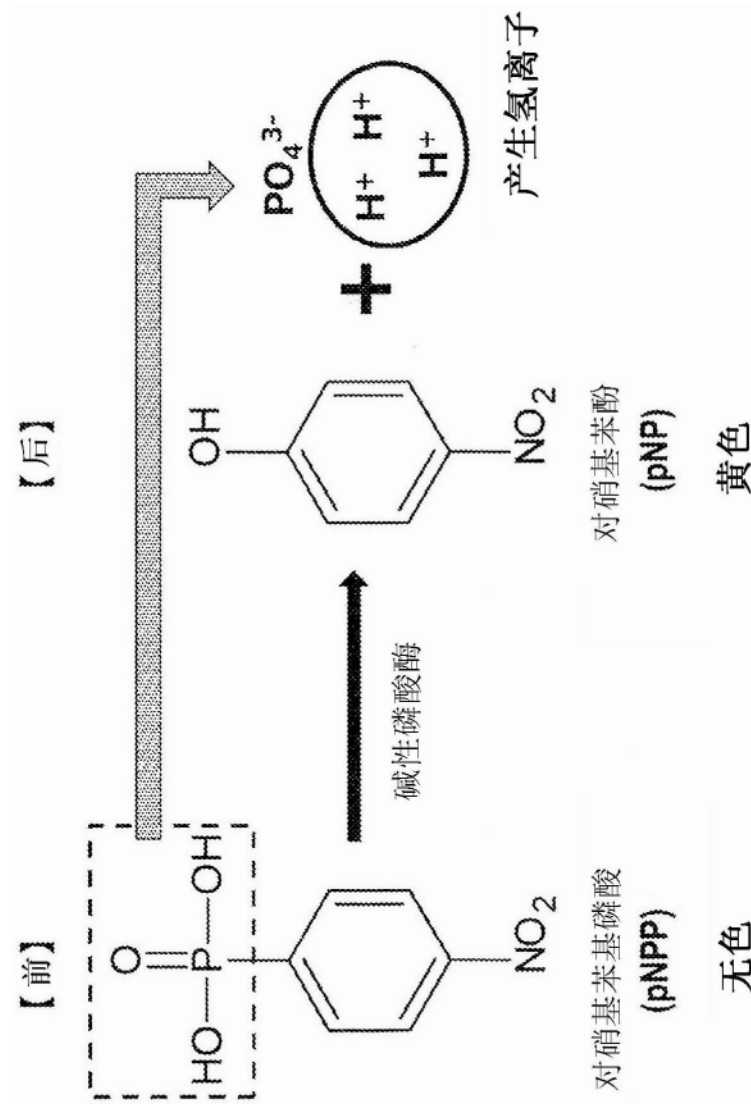


图13

孔	第2结合物质	投入融合体	投入目标物质	检测405nm的吸光度
17A-1	19A	1A, 1C	7A 7C	○
17A-2	19A	1A	7A 7C	○
17A-3	19A	1C	7A 7C	×
17C-1	19C	1A, 1C	7A 7C	○
17C-2	19C	1A	7A 7C	×
17C-3	19C	1C	7A 7C	○

图14

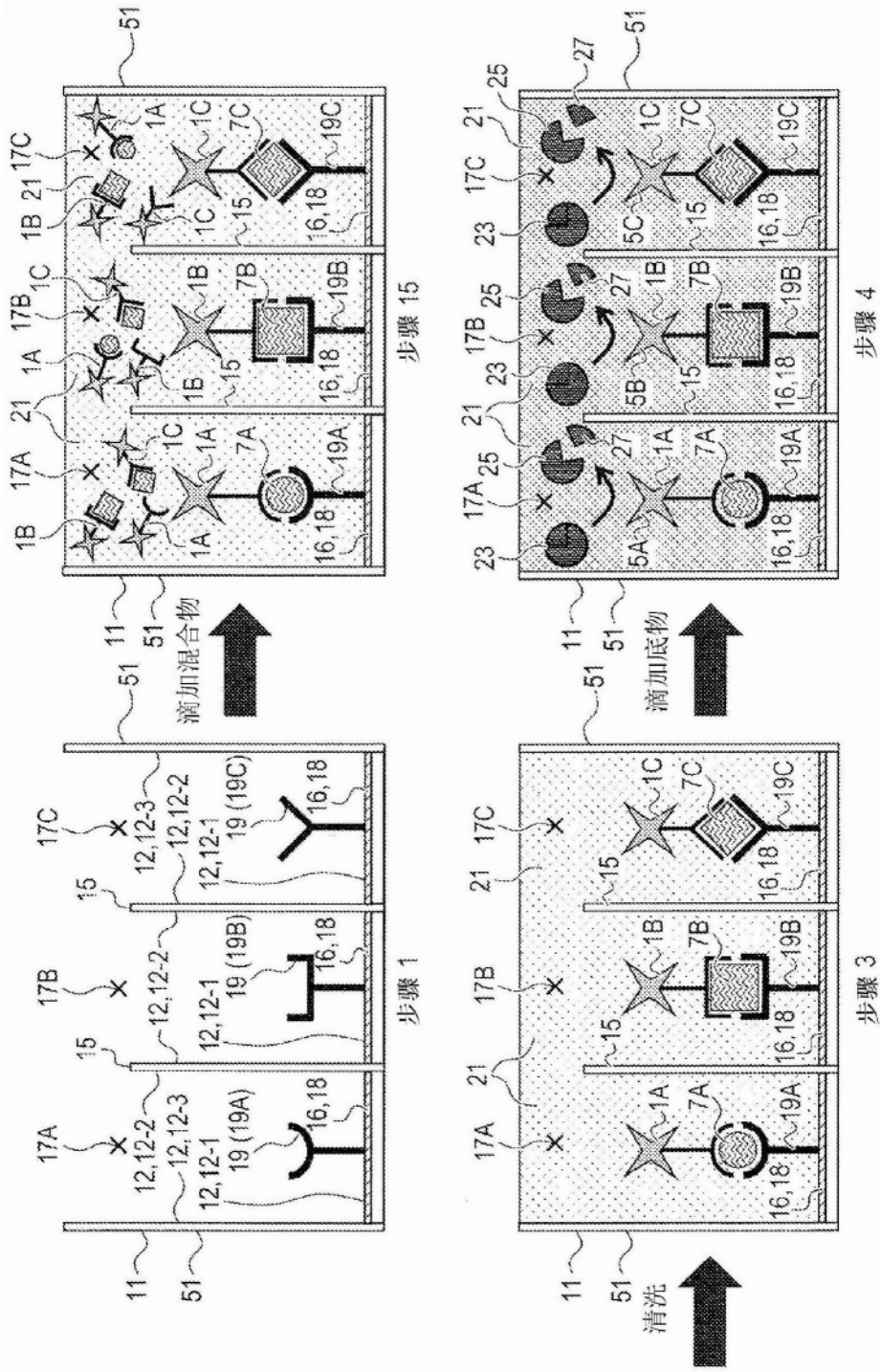


图15