

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4185185号
(P4185185)

(45) 発行日 平成20年11月26日(2008.11.26)

(24) 登録日 平成20年9月12日(2008.9.12)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 6 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平10-123371	(73) 特許権者	591086706
(22) 出願日	平成10年5月6日(1998.5.6)		軽部 征夫
(65) 公開番号	特開平11-332566		神奈川県横浜市青葉区美しが丘2-54-10
(43) 公開日	平成11年12月7日(1999.12.7)	(73) 特許権者	000002897
審査請求日	平成17年4月25日(2005.4.25)		大日本印刷株式会社
(31) 優先権主張番号	特願平9-117725		東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
(32) 優先日	平成9年5月8日(1997.5.8)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願平10-74442	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成10年3月23日(1998.3.23)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100107870
			弁理士 野村 健一
		(72) 発明者	軽部 征夫
			神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 部分二重鎖DNAを利用したDNAの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検出しようとするDNAをそのDNAと相補的なDNAを用いて検出する方法において、検出しようとするDNAを、その一部分において二重鎖構造をとり、他の部分において単鎖構造をとる部分二重鎖DNAに変換した後に、相補的なDNAを用いて検出することを特徴とするDNAの検出方法であって、

部分二重鎖DNAに変換する方法が、下記の工程を含む変換方法であること特徴とする前記DNAの検出方法。

(1) 検出しようとするDNAの一部と同一な塩基配列からなる1種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(2) 検出しようとするDNAの一部と相補的な塩基配列からなる2種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(3) 検出しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの一方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

(4) 検出しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの他方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

(5) 工程(3)の増幅産物と工程(4)の増幅産物を混合した後、加熱、冷却し、部分二重鎖DNAを得る

【請求項 2】

前記相補的なDNAを表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップに固定し、該バイオセンサーによりDNAを検出することを特徴とする請求項1記載のDNAの検出方法。

【請求項 3】

二種類以上のDNAを検出することを特徴とする請求項2記載のDNAの検出方法。

【請求項 4】

下記の工程を含むことを特徴とする部分二重鎖DNAの作製方法。

(1) 作製しようとするDNAの一部と同一な塩基配列からなる1種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(2) 作製しようとするDNAの一部と相補的な塩基配列からなる2種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(3) 作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの一方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

(4) 作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの他方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

(5) 工程(3)の増幅産物と工程(4)の増幅産物を混合した後、加熱、冷却し、部分二重鎖DNAを得る(ただし、工程(3)の増幅産物と工程(4)の増幅産物をそれぞれ精製した後に、混合、加熱、冷却し、部分二重鎖DNAを得る場合を除く)

【請求項 5】

作製される部分二重鎖DNAが、その単鎖構造をとる部分のDNAと相補的なDNAをフローセル型表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップに固定し、該バイオセンサーによりDNAを検出する方法に用いるためのものである、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

工程(2)が、作製しようとするDNAの一部と相補的な塩基配列からなる、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドよりもa又はa+bだけ3'末端側に位置する2種類のオリゴヌクレオチドを合成する工程であり、

工程(3)が、作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドのうち、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドよりもa+bだけ3'末端側に位置するオリゴヌクレオチドとをプライマーとして、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドを過剰に添加して非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程であり、

工程(4)が、作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドのうち、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドよりもaだけ3'末端側に位置するオリゴヌクレオチドとをプライマーとして、当該工程(2)で合成したオリゴヌクレオチドを過剰に添加して非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う工程である、

請求項4又は5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、部分二重鎖DNAを利用したDNAの検出方法、並びにその部分二重鎖DNA自体及びその作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

あるDNAをそのDNAと相補的なDNA(以下、「相補鎖DNA」という)を用いて検出する方法は、従来から数多く知られている。例えば、特定のDNAを検出するサザンブロットイング法はその代表的な例の一つである。また、DNAのクローニングの際に用い

10

20

30

40

50

るブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションもこのような検出方法の一種とみなすことができる。これらの方法は、いずれも検出しようとするDNAがその相補鎖DNAに特異的にハイブリダイズすることを利用するものなので、検出しようとするDNAを予め単鎖状態にしておかななくてはならない。しかし、サザンブロッティング法のように膜に固定している場合を除き、単鎖状態のDNAは球状構造をとることが多く、そのような球状のDNAはもはや相補鎖DNAとハイブリダイズすることはできない。また、二重鎖DNAを単鎖DNAにするためには、加熱などの処理が必要であるが、このような処理は一般に検出しようとするDNAに好ましくない影響を与えることが多い。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

このように相補鎖DNAを利用したDNA検出方法には未だに数多くの問題がある。本発明の目的は、このような問題を解決し、相補鎖DNAを利用した新たなDNA検出方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、検出しようとするDNAを部分二重鎖DNAに変換した後に、相補鎖DNAを用いて検出することにより、検出感度が著しく向上することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、検出しようとするDNAをそのDNAと相補的なDNAを用いて検出する方法において、検出しようとするDNAを、その一部分において二重鎖構造をとり、他の部分において単鎖構造をとる部分二重鎖DNAに変換した後に、相補的なDNAを用いて検出することを特徴とするDNAの検出方法である。

【0005】

また、本発明は、下記の工程を含むことを特徴とする部分二重鎖DNAの作製方法である。

(1) 作製しようとするDNAの一部と同一な塩基配列を有する1種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(2) 作製しようとするDNAの一部と相補的な塩基配列を有する2種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(3) 作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの一方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

【0006】

(4) 作製しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの他方をプライマーとして非対称ポリメラーゼ連鎖反応を行う

(5) 工程(3)の増幅産物と工程(4)の増幅産物を混合した後、加熱、冷却し、部分二重鎖DNAを得る

さらに、本発明は、一部分において二重鎖構造をとり、他の部分において単鎖構造をとる部分二重鎖DNAであって、単鎖構造をとる部分が6塩基以上である部分二重鎖DNAである。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAの検出方法は、検出しようとするDNAを部分二重鎖DNAに変換した後に、相補鎖DNAを用いて検出することを特徴とする。

ここで「部分二重鎖DNA」とは、その一部分において二重鎖構造をとり、他の部分において単鎖構造をとるDNAのことをいう。但し、この「部分二重鎖DNA」を本発明の検出方法に利用するためには、単鎖部分は相補鎖DNAとハイブリダイズするのに十分な長さを持たなければならない。従って、通常、本発明において「部分二重鎖DNA」といっ

10

20

30

40

50

た場合、前記定義のDNAのうち、単鎖部分の長さが6塩基以上であるものを意味する。また、「部分二重鎖DNAに変換する」とは、検出しようとするDNAを単純に加工して部分二重鎖DNAにする場合だけでなく、検出しようとするDNAをPCR法により増幅させて部分二重鎖DNAにする場合をも含む意である。

【0008】

検出しようとするDNAは、相補鎖DNAを調製できるものであればどのようなものでもよい。具体的には、病原性大腸菌のベロ毒素をコードするDNA、HIVの外殻タンパク質gp120をコードするDNA、各種微生物の16S rRNAの特異的塩基配列部分(cDNA)、メチシリン耐性ブドウ球菌(MRSA)の抗生物質結合タンパク質をコードするDNAなどの微生物由来のDNAのほか、ヒトの遺伝病に係るDNAなども例示することができる。また、検出しようとするDNAは、夾雑物を含んだ状態にあってもよく、例えば、ベロ毒素をコードするDNAを検出する場合、病原性大腸菌の加熱処理物をそのまま検出試料とすることも可能である。

10

【0009】

部分二重鎖DNAに変換する方法としては、下記の工程を含む方法を例示できるが、これに限定されるわけではない。

(1) 検出しようとするDNAの一部と同一な塩基配列を有する1種類のオリゴヌクレオチドを合成する

(2) 検出しようとするDNAの一部と相補的な塩基配列を有する2種類のオリゴヌクレオチドを合成する

20

【0010】

(3) 検出しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの一方をプライマーとして非対称PCRを行う

(4) 検出しようとするDNAを鋳型とし、工程(1)で合成したオリゴヌクレオチドと工程(2)で合成した2種類のオリゴヌクレオチドの他方をプライマーとして非対称PCRを行う

(5) 工程(3)の増幅産物と工程(4)の増幅産物を混合した後、加熱、冷却し、部分二重鎖DNAを得る

30

【0011】

工程(1)及び工程(2)で合成するオリゴヌクレオチドと検出しようとするDNAとの位置関係は図1に示す通りである。即ち、工程(1)のオリゴヌクレオチドは、工程(2)の2種類のオリゴヌクレオチドよりも、a又はa+bだけ5'末端側に位置する。このa及びbは、図1(A)に示すように、そのまま得られる部分二重鎖DNAの二重鎖部分の長さ及び単鎖部分の長さとなる。a及びbの長さは、検出に用いる相補的なDNAに応じて任意に決めることができるが、84塩基以下の場合にはPCRによる副生成物が多いなどの問題点もあり、aの長さは、100~2000塩基とするのが好ましく、bの長さは、85~1985塩基とするのが好ましい。

【0012】

工程(3)及び工程(4)では、工程(1)及び工程(2)で合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして非対称PCRを行う。非対称PCRとは、PCRの際に使用する2種類のプライマーのうち、一方を他方に対して過剰量添加して行うPCRをいう(Gyllensten, U.B. らProc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7652-7656(1988))。いずれのプライマーを過剰に添加するかは、図1(B)に示すように、長い増幅断片を得る場合は、工程(1)で作製したプライマーを過剰に添加し、短い増幅断片を得る場合は、工程(2)で作製したプライマーを過剰に添加する(図中の実線の矢印が過剰に添加するプライマーで破線の矢印が少量添加するプライマーである。)。プライマーの添加比は、過剰に添加するプライマーが、他方のプライマーの10~100倍とするのが好ましく、20倍とするのが更に好ましい。PCRにおける温度、時間、サイクル等は、増幅しようとするDNA断片に応じて決めればよく、特別な条件に限定されるものではない。以上のような条件で2種類のPCR

40

50

を行うと、図1(B)に示すような増幅断片が得られる(図中の実線が多量に得られた増幅断片、破線が少量得られた増幅断片である)。

【0013】

工程(5)では、工程(3)及び工程(4)で得られた増幅産物を混合した後、加熱、冷却を行い、部分二重鎖DNAを得る。加熱処理は、90~95で5~10分行うのが好ましく、冷却処理は20~30分かけて18~30まで冷却するのが好ましい。この混合、加熱、冷却の一連の処理により、図1(C)に示すような(イ)、(ロ)、(ハ)、(ニ)の4種類のDNA断片が得られる。但し、得られるDNA断片の量は(イ)だけが多く、他の3種類のDNA断片はいずれも少量しか得られない。

【0014】

相補的なDNAを用いて検出する方法としては、標識した相補鎖DNAを用いる一般的なハイブリダイゼーション法を例示できるが、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いる方法が好ましい。

以下、本発明のDNA検出方法に使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサー及びそれに用いる測定チップについて説明する。

本発明に使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサーの一例を図2に示す。この表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、カートリッジブロック7と、光源8と、検出器9とを有し、カートリッジブロック7の上に相補鎖DNAを固定した測定チップ10を設置して使用する。カートリッジブロック7の上には凹部が設けられており、この凹部と上記測定チップ10とで測定セル71が構成される。測定セル71は、流路72、73によりカートリッジブロック7の外部に連通しており、試料は流路72を通じて測定セル71中に流れ込み、測定に供された後流路73を通じて外部に排出される。

【0015】

光源8からは、測定チップ10の透明基板に向かって単色光が照射され(入射光80)、測定チップ10の裏面に設けられた金属膜で反射したその反射光90が、検出器9に入光する。検出器9では、反射光90の強度を検出することができる。

上記のような構造によって、ある入射角に対して谷を形成する反射光強度曲線が得られる。反射光強度曲線における谷は、表面プラズモン共鳴によるものである。即ち、光が測定チップ10の透明基板と外との界面で全反射するとき、その界面にエバネッセント波といわれる表面波が生じ、一方、金属膜にも表面プラズモンといわれる表面波が生じる。この2つの表面波の波数が一致すると共鳴が起こり、光のエネルギーの一部が表面プラズモンを励起するために使用され、反射光の強度が低下する。ここで、表面プラズモンの波数は、金属膜表面のごく近くにある媒質の屈折率の影響を受けるため、検出しようとするDNAと相補鎖DNAとの相互作用により媒質の屈折率が変化すると、表面プラズモン共鳴が生じる入射角が変化する。従って、反射光強度曲線の谷のずれによって、検出しようとするDNAの濃度の変化を検知することができる。入射角の変化量は共鳴シグナルといわれ、 10^{-4} °の変化を1RUとして表す。

【0016】

測定チップ10は、表面プラズモン共鳴に必要な透明基板及び金属膜を有し、相補鎖DNAを金属膜上に固定できるものであればどのようなものでもよく、市販の測定チップ(例えば、ファルマシアバイオセンサー社製、BIAcore2000用測定チップ)を使用することもできるが、図3に示すような構造を有する測定チップを使用することが好ましい。この測定チップは、透明基板1上に金属膜2、有機物質層3が形成されおり、その上にアビジン4が固定されており、このアビジンにビオチン5で標識された相補鎖DNA6が固定される。

【0017】

透明基板1としては、通常表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップに使用されるものであればどのようなものでもよく、一般的にはガラス、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用でき、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましく、その厚さは0.1~20mm程

10

20

30

40

50

度である。

金属膜 2 としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。この金属膜に使用することのできる金属の種類としては、金、銀、銅、アルミニウム、白金等が挙げられ、それらを単独で又は組み合わせて使用することができる。また、上記透明基板 1 への付着性を考慮して、透明基板 1 と金、銀等からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【 0 0 1 8 】

金属膜 2 の膜厚は、100 ~ 2000 であるのが好ましく、特に 200 ~ 600 であるのが好ましい。3000 を超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、5 ~ 50 であるのが好ましい。

金属膜 2 の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。これらの方法の中でもスパッタ法を用いるのが好ましい。

【 0 0 1 9 】

有機物質層 3 は、金属原子とアビジン分子の両者と結合することができる物質からなる層である。有機物質層 3 の厚さは、10 ~ 200 であるのが好ましく、特に 10 ~ 50 であるのが好ましい。また、アビジン - ビオチン結合を用いる以外にもエステル結合やアミド結合等の共有結合を利用して DNA を有機物質層 3 に固定化することも可能である。

有機物質層は、シランカップリング剤、メルカプト基と他の有機官能基を有する化合物（以下、単に「チオール化合物」という）を用いて形成させることができ、また、LB（ラングミュア・プロジェクト）法によっても形成させることができる。LB 法によって成膜した場合、シランカップリング剤やチオール化合物によって成膜した場合に比べ、金属膜との結合能が弱いという短所があるが、広範な物質に適用でき、また、凝集膜を形成できるので単位面積当たりに結合させる生理活性物質の数を増加させることができるという長所もある。

【 0 0 2 0 】

有機物質層形成に使用できるシランカップリング剤としては、3 - アミノプロピルトリエトキシシラン、3 - アミノプロピルトリメトキシシラン、3 - アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3 - (2 - アミノエチルアミノプロピル) トリメトキシシラン、3 - (2 - アミノエチルアミノプロピル) ジメトキシメチルシラン、3 - メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシ - 3 - メルカプトプロピルメチルシランなどが挙げられる。また、チオール化合物としては、メルカプトアミノメタン、2 - メルカプト - 1 - アミノエタン、3 - メルカプト - 1 - アミノプロパン、4 - メルカプト - 1 - アミノブタン、1, 1, 1 - トリアミノ - 2 - メルカプトエタン、メルカプト酢酸、2 - メルカプトプロピオン酸、3 - メルカプト酪酸、4 - メルカプト吉草酸、1, 1, 1 - トリアミノ - 3 - メルカプトプロパンなどが挙げられ、これらの中でも多官能物質であり、アビジンとの結合部位が多い 1, 1, 1 - トリアミノ - 2 - メルカプトエタン、1, 1, 1 - トリアミノ - 3 - メルカプトプロパンなどを用いるのが好ましい。LB 法に適用できる物質としては、21 - アミノドコサン酸、ステアシルアミン、ポリリジンなどを例示することができる。

【 0 0 2 1 】

シランカップリング剤を用いて有機物質層を形成する方法としては、シランカップリング剤の飽和蒸気中に金属膜を一定時間暴露する方法（飽和蒸気法）、シランカップリング剤を含む溶液中に金属膜を一定時間浸漬する方法（浸漬法）、スピコートを用いる方法（スピコート法）、グラビア印刷機を用いる方法（グラビア法）などを用いることができ、チオール化合物を用いて有機物質層 3 を形成する方法としては、飽和蒸気法、浸漬法、スピコート法、グラビア法などを用いることができる。

【 0 0 2 2 】

有機物質層 3 にアビジン 4 を固定することは、所定量のアビジン 4 を有機物質層 3 に所定時間接触させることにより形成させることができる。具体的な方法としては、フローセル

10

20

30

40

50

型の表面プラズモン共鳴バイオセンサーに有機物質層 3 を形成させた透明基板 1 を設置して一定流量のアビジン 4 を所定時間（所定量）流す方法を例示できる。

【 0 0 2 3 】

アビジン 4 に、ビオチンで標識した相補鎖 DNA 5 に固定化する方法としては、インクジェット法、マクロディスペンサー法などを例示することができる。インクジェット法は、極めて狭い領域に精度よく相補鎖 DNA 5 を含む液滴を発射できるので、固定化する相補鎖 DNA 5 を有効利用できるという点で有利である。また、フローセル型の表面プラズモン共鳴バイオセンサーに測定チップを設置して一定流量の相補鎖 DNA 5 を所定時間（所定量）流すことによっても固定化できる。この固定化方法によれば、アビジン 4 及び相補鎖 DNA 5 の固定を一連の操作で行うことができるという点で有利である。相補鎖 DNA 5 をビオチンで標識する方法としては、ビオチンを結合させたプライマーを用いて PCR を行う方法を例示することができる。

10

【 0 0 2 4 】

検出する DNA は 1 種類だけでなく、2 種類以上であってもよい。2 種類以上の DNA を検出するには、一つのチップに複数の DNA を固定するか、センサーに複数のチップを固定することにより行い得る。このように 2 種類以上の DNA を検出することにより、検出の精度を向上させることができる。例えば、ある微生物の持つ特異的な DNA と相補的な DNA を二つ以上チップに固定することにより、その微生物に由来する DNA が試料中に含まれているかどうかをより高い精度で判別することができる。また、固定化する DNA の中に目的の DNA とは結合しない DNA（陰性プローブ）を含ませておくことによっても精度を向上させることができる。さらに、固定化する DNA の選択を適切に行えば、例えば、試料中にペロ毒素が含まれるかどうかということだけでなく、そのペロ毒素が I 型なのか II 型なのかというようなことまで判別できる。

20

【 0 0 2 5 】

2 種類以上の DNA を固定する場合、使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、測定チップを水平方向に自由に移動可能なタイプのものが好ましい。このようなセンサーを使用すれば、光学系を固定したままチップ上の複数の試料のシグナルを測定できる。

【 0 0 2 6 】

【実施例】

〔実施例 1〕

市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー（ファルマシアバイオセンサー社製、BIAcore2000）の測定セルに 0.1 % アビジン溶液を流速 5 μ l/分で 10 分間流し込み、測定チップにアビジンを固定した。一方、図 4 に示す 2 型ペロ毒素をコードする DNA の塩基配列の 401 ~ 421 の塩基に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、その 5' 末端にビオチンを結合させた（以下、このオリゴヌクレオチドを「antiprobe VT2-2B」という）。antiprobe VT2-2B を含む溶液を前記バイオセンサーの測定セルに流速 1 μ l/分で 50 分間流し込み、測定チップ上にアビジンを介して固定した。

30

【 0 0 2 7 】

次に、図 4 に示す塩基配列に基づき、下記のプライマーを合成した。

P-VT2C : GCCGGGTTTCGTTAATACGGCA

asp-VT2-2a : CTGTCCGTTGTCATGGAACC

asp-VT2-2b : GAACGTTCCAGCGCTGCGACA

40

P-VT2C は図 4 に示す塩基配列の 301 ~ 321 塩基に対応し、asp-VT2-2a は 381 ~ 401 塩基に対応し、asp-VT2-2b は 433 ~ 433 に対応する。

【 0 0 2 8 】

病原性大腸菌 O - 157 から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、P-VT2C と asp-VT2-2b をプライマーとして非対称 PCR を行った。P-VT2C は、asp-VT2-2b の 20 倍量加えた。PCR は、初期変性（94 3 分）を行った後、変性（94 1 分）、アニーリング（59 0.5 分）、

50

伸長（72 1分）のサイクルを10～40に変化させて行った。

また、P-VT2Cとasp-VT2-2aをプライマーとして上記と同様に非対称PCRを行った。asp-VT2-2bは、P-VT2Cの20倍量加えた。

【0029】

上記で得られる2種類のPCR増幅産物を混合し、全量100 μlとした。95 °Cで10分加熱した後、30分かけて25 °Cまで冷却し、部分二重鎖DNAを作製した。この部分二重鎖DNAを含む混合増幅産物を、上記バイオセンサーの測定セルに流し込み、流量が10 μl、20 μl、30 μl、及び40 μlにおける共鳴シグナルを測定した。この結果を図5に示す。また、対照としてP-VT2Cとasp-VT2-2bをプライマーとしてPCR（対称PCR）を行い、その増幅産物を測定セルに流し込み、共鳴シグナルを測定した。この結果を図6に示す。図中の が10サイクル、 が20サイクル、 が25サイクル、 が30サイクル、 が40サイクルを示す。

10

図5及び図6に示すように、いずれの場合も30サイクル以上でハイブリダイゼーションによるシグナルを検出することができた。また、非対称PCR産物を部分二重鎖DNAにすることにより、検出感度が約2倍向上した。

【0030】

〔実施例2〕

病原性大腸菌O-157から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、P-VT2Cとasp-VT2-2bをプライマーとして非対称PCRを行った（この増幅産物を「増幅産物A」という）。P-VT2Cはasp-VT2-2bの20倍量加えた。PCRは、初期変性（95 3分）を行った後、変性（94 1分）、アニーリング（61 1分）、伸長（72 1分）を40サイクル繰り返した。

20

病原性大腸菌O-157から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、P-VT2Cとasp-VT2-2aをプライマーとして非対称PCRを行った（この増幅産物を「増幅産物B」という）。asp-VT2-2aはP-VT2Cの20倍量加えた。PCRの反応条件は、上記と同様にして行った。

【0031】

病原性大腸菌O-157から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、P-VT2Cとasp-VT2-2bをプライマーとして対称PCRを行った（この増幅産物を「増幅産物C」という）。PCRの反応条件は、上記と同様にして行った。

病原性大腸菌O-157から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、P-VT2Cとasp-VT2-2aをプライマーとして対称PCRを行った（この増幅産物を「増幅産物D」という）。PCRの反応条件は、上記と同様にして行った。

30

【0032】

増幅産物A～Dを、 1 増幅産物C + 増幅産物D、 2 増幅産物A + 増幅産物B、 3 増幅産物A + 増幅産物D、 4 増幅産物B + 増幅産物Cの4通りの組み合わせで混合し、その混合増幅産物を95 °Cで10分加熱した後、30分かけて25 °Cまで冷却した。この4種類の混合増幅産物を、上記バイオセンサーの測定セルに流し込み、流量が10 μl、20 μl、30 μl、及び40 μlにおける共鳴シグナルを測定した。この結果を図7に示す。図中の が混合増幅産物 1、 が混合増幅産物 2、 が混合増幅産物 3、 が混合増幅産物 4 を示す。

図7に示すように、非対称PCR増幅産物同士を混合した場合（混合増幅産物 2）が最も検出感度が良好であった。

40

【0033】

〔実施例3〕

実施例2で調製した増幅産物Aと増幅産物Bとの混合増幅産物を95 °Cで10秒加熱した後、30分かけて25 °Cまで冷却し、部分二重鎖DNAを作製した。この部分二重鎖DNAを含む混合増幅産物を、上記バイオセンサーの測定セルに流し込み、流量が10 μl、20 μl、30 μl、及び40 μlにおける共鳴シグナルを測定した。また、対照1として増幅産物Aのみを加熱、冷却して調製したサンプル、対照2として増幅産物Aと増幅産物Bとの混合増幅産物を加熱、冷却せずに調製したサンプル、対照3として増幅産物Aのみを加熱、冷却せずに調製したサンプル、についても上記と同様に共鳴シグナルを測定した。この結果を図

50

8に示す。図中の が部分二重鎖DNAを含むサンプル、 が対照1のサンプル、 が対照2のサンプル、 が対照3のサンプルを示す。

図8に示すように、増幅産物Aのみからなるサンプルでは十分なシグナルを検出できなかった。また、混合増幅産物からなるサンプルではいずれも一定のシグナルを検出することはできたが、加熱、冷却処理を施さない場合は明らかに感度が劣った。

【0034】

〔実施例4〕

13mm X 18mm、厚さ0.3mmの青板ガラス（松浪硝子工業社製）上にスパッタリングによりクロムからなる層、次いで金からなる層を形成し、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップを作製した。スパッタリングは、クロムについては100W、30秒間、金については100W、150秒間行った。得られたクロム層の厚さは32.2 nmであり、金属の厚さは474 nmであった。この測定チップを11-メルカプトウンデカン酸の1mMエタノール溶液に24時間浸漬し、金属層上に有機薄膜層を形成させた。次いで、50 μlの5%アビジン溶液を同一チップ上の3箇所へ滴下し、アビジン分子と有機薄膜層上の分子との間にアミド結合を形成させ、アビジン分子を固定化した。

【0035】

次に、5'末端にビオチンを結合させた下記の3種類のDNAを合成した（サワデー・テクノロジー社に合成を委託）。これらのDNAは、毒素産生菌 *Vibrio parahaemolyticus*（腸炎ビブリオ）の毒性の要因となる tdh1、tdh2、trh2 の3種類の遺伝子の一部と相補的な配列を持つ。

【0036】

配列1 (tdh1) : AAGTTATTAATCAAT

配列2 (tdh2) : TTTTTATTATATCCG

配列3 (trh2) : CCCAGTTAAGGCAAT

【0037】

上記DNAを含む溶液（10 μl）をアビジン溶液を滴下した位置に30 μl滴下し、DNAをアビジン・ビオチン結合を介して測定チップ上に固定化した。

DNAを固定化した測定チップを表面プラズモン共鳴バイオセンサー（電気化学計器社製のSPR-20型のセンサーヘッド、給排液液を改造したもの）に設置した（図9）。このバイオセンサーでは、測定チップを水平方向に自由に移動させることができるので、光学系を固定したままチップ上に存在する複数の試料の共鳴シグナルを測定することが可能である。

【0038】

被検出物であるDNAは、実施例1と同様に非対称PCRを利用し、部分二重鎖DNA（二重鎖部分143bp、単鎖部分101b）として増幅させた。増幅させた部分二重鎖DNAを含む溶液を、バイオセンサーの測定セルに流し込み、流量10 μlにおける共鳴シグナルを測定した。結果を表1に示す。

【0039】

【表1】

配列	1	2	3
共鳴シグナル (×10 ⁻⁴)	308 (RU)	298 (RU)	315 (RU)

【0040】

表1に示すよう配列1～3のいずれも300RU（換算値）前後のシグナルを得ており、DNAの結合がない場合（陰性）のシグナルが10～20RU（換算値）であることを考慮すると、固定した3種類のDNAに部分二重鎖が結合したもの（陽性）と考えられる。

【0041】

〔実施例 5〕

実施例 4 と同様に青板ガラス上に金属層、有機薄膜層を形成させ、4 枚の測定チップを作製した。次いで、50 μ l の 5 % アビジン溶液を 4 枚のチップ上の 2 箇所（合計 8 箇所）、アビジン分子を固定化した。

次に、5' 末端にビオチンを結合させた下記の 8 種類の DNA を合成した（サワデー・テクノロジー社に合成を委託）。配列 1 ~ 3 は、*Vibrio parahaemolyticus* の *tdh1*、*tdh2*、*trh2* 遺伝子のそれぞれの一部と相補的な配列を持つ DNA であり、配列 4 は *Salmonella enteritidis*（サルモネラ）の 18S rRNA、配列 5 は *Borderella pertussis*（百日咳菌）の百日咳毒素、配列 6 は *Vibrio cholera*（コレラ）のコレラ毒素、配列 7 は *Escherichia coli* 0157（病原性大腸菌 0157）のベロ毒素 1、配列 8 は *Escherichia coli* 0157 のベロ毒素 2 と相補的な配列を持つ DNA である。

【0042】

配列 1 : AAGTTATTAATCAAT

配列 2 : TTTTATTATATCCG

配列 3 : CCCAGTTAAGGCAAT

配列 4 : GGCAAACCGTATTAC

配列 5 : CCAAAGTATTTCCCT

配列 6 : AATTCGGGTTAATTG

配列 7 : GGGCGTTATGCCGTA

配列 8 : TGCAGAGTGGTATAA

【0043】

上記 DNA を含む溶液（10 μ l）をアビジン溶液を滴下した位置に 30 μ l 滴下し、DNA をアビジン・ビオチン結合を介して測定チップ上に固定化した。

DNA を固定化した測定チップを実施例 4 で使用した表面プラズモン共鳴バイオセンサーに設置した。被検出物である DNA は、実施例 4 と同様に非対称 PCR を利用し、部分二重鎖 DNA（二重鎖部分 143bp、単鎖部分 101b）として増幅させた。DNA は、大腸菌 0157、腸炎ビブリオ、サルモネラのそれぞれから調製した DNA と、大腸菌 0157 から調製した DNA とサルモネラから調製した DNA の混合物の 4 種類使用した。増幅させた部分二重鎖 DNA を含む溶液を、バイオセンサーの測定セルに流し込み、流量 10 μ l における共鳴シグナルを測定した。結果を表 2 に示す。

【0044】

【表 2】

	大腸菌0157	腸炎ビブリオ	サルモネラ	大腸菌0157 +サルモネラ
配列1	22	298	10	11
配列2	18	331	12	28
配列3	21	301	18	23
配列4	15	22	321	299
配列5	17	24	22	18
配列6	24	19	33	19
配列7	308	18	24	356
配列8	311	25	26	334

【0045】

表 2 に示すように、各種微生物に対して陽性の場合 300 RU 程度、陰性の場合 30 RU 以下のシグナルが得られた。

【0046】

【発明の効果】

10

20

30

40

50

本発明は、DNAの新規な検出方法を提供する。この方法は、DNAを部分二重鎖の状態で検出するので、加熱等の処理が不要であり、また、単鎖DNAのように球状化することもないので、検出感度においても優れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】非対称PCRを用いて本発明の部分二重鎖DNAを作製する方法の概要を示す図である。

【図2】本発明の検出方法に使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサーの一実施例を示す図である。

【図3】本発明の検出方法に使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの一実施例を示す図である。

【図4】病原性大腸菌O-157の二型ベロ毒素をコードするDNAの塩基配列を示す図である。

【図5】部分二重鎖DNAを用いた場合のPCRサイクルと共鳴シグナルとの関係を示す図である。

【図6】部分二重鎖DNAを用いない場合のPCRサイクルと共鳴シグナルとの関係を示す図である。

【図7】検出しようとするDNAの構造と共鳴シグナルとの関係を示す図である。

【図8】増幅産物混合後の加熱の有無と共鳴シグナルとの関係を示す図である。

【図9】本発明の検出方法に使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサーの一実施例を示す図である。

【符号の説明】

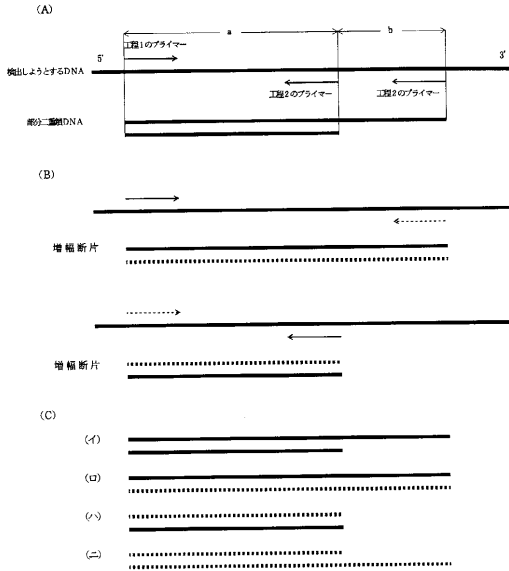
- 1 ... 透明基板
- 2 ... 金属膜
- 3 ... 有機物質層
- 4 ... アビジン
- 5 ... ビオチン標識相補鎖DNA
- 6 ... 部分二重鎖DNA
- 7 ... カートリッジブロック
- 71... 測定セル
- 72, 73... 流路
- 8 ... 光源
- 80... 入射光
- 9 ... 検出器
- 90... 反射光
- 10... 測定チップ

10

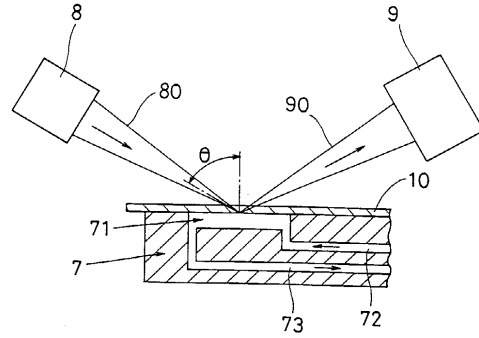
20

30

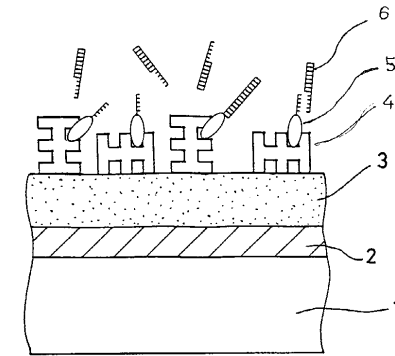
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

```

10      20      30      40      50      60
ATGAAAGTGA TATTATTTAA ATGGGTACTG TGCCTGTTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC

70      80      90      100     110     120
TATTCCCGGG AGTTTACGATC AGACTTTTTC ACCCAACAAA GTTATGTCCTC TTCGTTAAAT

130     140     150     160     170     180
AGTATACGGG CAGAGATATC GACCCCTGTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATGGGTG

190     200     210     220     230     240
TCTGTTATTA ACCACAGCCC ACCGGGCAGT TATTTTGGCTG TGGATATACC AGGGCTTGAT

250     260     270     280     290     300
GTCTATCAGG OCGGTTTTGA CCATCTTCGT CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG

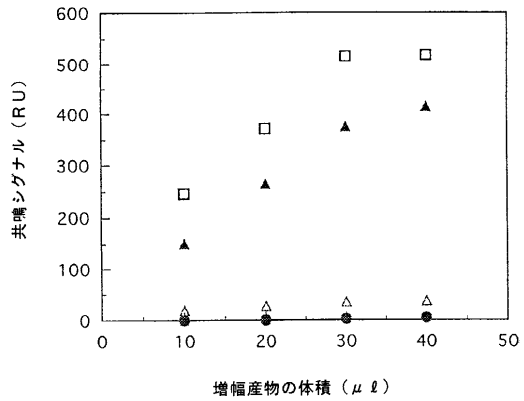
310     320     330     340     350     360
GCGGGTTTCG TTAATACGGC AACAAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATTT TACAGATATA
P-VT2C

370     380     390     400     410     420
TCAGTGCOCG GTGTGACAAAC GGTTCOCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGCAA
asp-VT-2a antiprobe VT2-2B

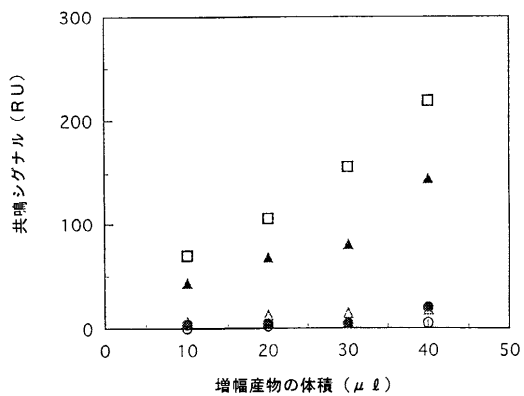
430     440     450     460     470     480
CCTCTCGCAG CGCTGGAACG TTCGGGAATG CAAATCAGTC GTCACTCACT GGTTCATCA
asp-VT-2b

490     500     510     520     530     540
TATCTGGCGT TAATGGAGTT CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT
    
```

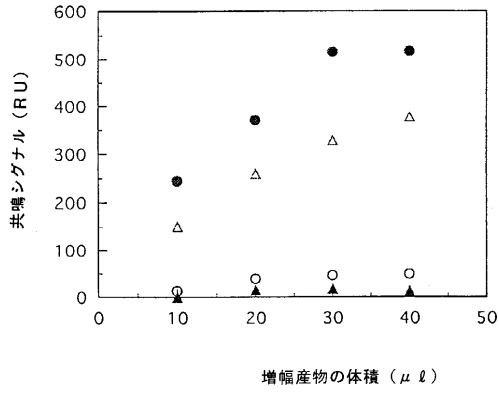
【図5】



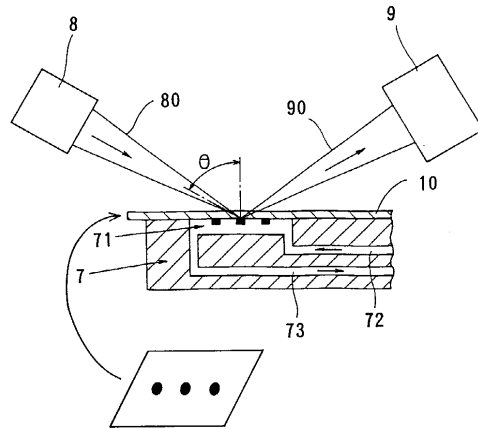
【図6】



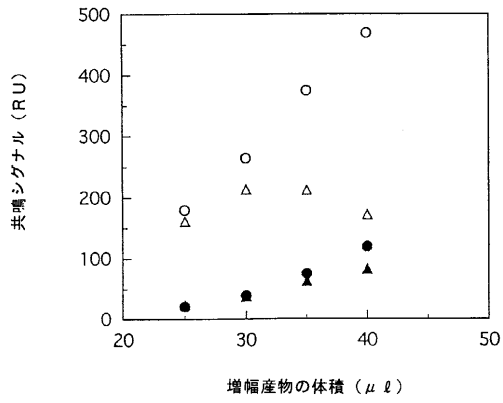
【図7】



【図9】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 澤田 慎矢

茨城県土浦市神立町3458-3

(72)発明者 永田 良平

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表平2-502250(JP,A)

特開平3-206899(JP,A)

特開平6-311899(JP,A)

特表平6-502766(JP,A)

特表平5-501957(JP,A)

特開平5-252998(JP,A)

特開平7-174693(JP,A)

Genome Res., 1996年 9月, Vol.6, No.9, p.886-892

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00- 1/70

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)