

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6183917号
(P6183917)

(45) 発行日 平成29年8月23日(2017.8.23)

(24) 登録日 平成29年8月4日(2017.8.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 22 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-506266 (P2014-506266)	(73) 特許権者	000232092
(86) (22) 出願日	平成25年3月21日 (2013.3.21)		N E C ソリューションイノベータ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/058042		東京都江東区新木場一丁目18番7号
(87) 国際公開番号	W02013/141291	(74) 代理人	100115255
(87) 国際公開日	平成25年9月26日 (2013.9.26)		弁理士 辻丸 光一郎
審査請求日	平成26年9月9日 (2014.9.9)	(74) 代理人	100129137
審判番号	不服2016-10638 (P2016-10638/J1)		弁理士 中山 ゆみ
審判請求日	平成28年7月13日 (2016.7.13)	(74) 代理人	100154081
(31) 優先権主張番号	特願2012-67947 (P2012-67947)		弁理士 伊佐治 創
(32) 優先日	平成24年3月23日 (2012.3.23)	(72) 発明者	堀井 克紀
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都江東区新木場一丁目18番7号 N
(出願人による申告) 平成21年度、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター、イノベーション創出基礎的研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	金子 直人
			東京都江東区新木場一丁目18番7号 N
			E C ソリューションイノベータ株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレプトアビジンの分析用デバイスおよび分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

触媒機能を生起する触媒核酸分子（D）と、ストレプトアビジンに結合する結合核酸分子（A）とを有する下記（I）、（II）または（II'）の核酸素子を含むことを特徴とする、ストレプトアビジンの分析用核酸センサ。

（I）第1鎖と第2鎖とから構成される二本鎖の核酸素子であり、
 前記第1鎖（s s 1）は、前記結合核酸分子（A）、ループ形成配列（L 1）および前記触媒核酸分子（D）が、この順序で連結しており、
 前記第2鎖（s s 2）は、ステム形成配列（S_A）、ループ形成配列（L 2）およびステム形成配列（S_D）が、この順序で連結しており、
 前記第1鎖（s s 1）における前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L 1）側の末端領域と、前記第2鎖（s s 2）における前記ステム形成配列（S_A）とが、相補的であり、
 前記第1鎖（s s 1）における前記触媒核酸分子（D）のループ形成配列（L 1）側の末端領域と、前記第2鎖（s s 2）における前記ステム形成配列（S_D）とが、相補的であり、
 前記第1鎖（s s 1）における前記ループ形成配列（L 1）と、前記第2鎖（s s 2）における前記ループ形成配列（L 2）とが、非相補的であり、
 ストレプトアビジンの非存在下、
 前記第1鎖（s s 1）における前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L 1）側の末

端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_A ）とが、ステムを形成し、

前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記触媒核酸分子（ D ）のループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_D ）とが、ステムを形成し、

前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）とが、2つの前記ステムの間に内部ループを形成し、

前記ステム形成配列（ S_A ）および前記ステム形成配列（ S_D ）における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子（ D ）の触媒機能が阻害され、

ストレプトアビジンの存在下、前記ストレプトアビジンと前記結合核酸分子（ A ）との結合により、前記ステム形成配列（ S_A ）および前記ステム形成配列（ S_D ）における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子（ D ）の触媒機能が生起される核酸素子

10

（II）一本鎖の核酸素子であり、

前記結合核酸分子（ A ）、ループ形成配列（ $L 1$ ）、ステム形成配列（ S_D ）、前記触媒核酸分子（ D ）、ループ形成配列（ $L 2$ ）およびステム形成配列（ S_A ）が、この順序で連結しており、

前記結合核酸分子（ A ）のループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_A ）とが、相補的であり、

前記触媒核酸分子（ D ）のループ形成配列（ $L 2$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_D ）とが、相補的であり、

20

前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）とが、非相補的であり、ストレプトアビジンの非存在下、

前記結合核酸分子（ A ）のループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_A ）とが、ステムを形成し、

前記触媒核酸分子（ D ）のループ形成配列（ $L 2$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_D ）とが、ステムを形成し、

前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）とが、2つの前記ステムの間に内部ループを形成し、

前記ステム形成配列（ S_A ）および前記ステム形成配列（ S_D ）における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子（ D ）の触媒機能が阻害され、

30

ストレプトアビジンの存在下、前記ストレプトアビジンと前記結合核酸分子（ A ）との結合により、前記ステム形成配列（ S_A ）および前記ステム形成配列（ S_D ）における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子（ D ）の触媒機能が生起される核酸素子

（II'）一本鎖の核酸素子であり、

前記触媒核酸分子（ D ）、ループ形成配列（ $L 2$ ）、ステム形成配列（ S_A ）、前記結合核酸分子（ A ）、ループ形成配列（ $L 1$ ）およびステム形成配列（ S_D ）が、この順序で連結しており、

前記触媒核酸分子（ D ）のループ形成配列（ $L 2$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_D ）とが、相補的であり、

40

前記結合核酸分子（ A ）のループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_A ）とが、相補的であり、

前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）とが、非相補的であり、ストレプトアビジンの非存在下、

前記結合核酸分子（ A ）のループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_A ）とが、ステムを形成し、

前記触媒核酸分子（ D ）のループ形成配列（ $L 2$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_D ）とが、ステムを形成し、

前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）とが、2つの前記ステムの

50

間で内部ループを形成し、

前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、
ストレプトアビジンの存在下、前記ストレプトアビジンと前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される核酸素子

【請求項 2】

前記核酸素子 (I) において、

前記第 1 鎖 (ss1) は、5' 側から、前記結合核酸分子 (A)、前記ループ形成配列 (L1) および前記触媒核酸分子 (D) が、この順序で連結しており、

前記第 2 鎖 (ss2) は、3' 側から、前記ステム形成配列 (S_A)、前記ループ形成配列 (L2) および前記ステム形成配列 (S_D) が、この順序で連結しており、

前記第 1 鎖 (ss1) における前記結合核酸分子 (A) の 3' 末端領域と、前記第 2 鎖 (ss2) における前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、

前記第 1 鎖 (ss1) における前記触媒核酸分子 (D) の 5' 末端領域と、前記第 2 鎖 (ss2) における前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的である、請求項 1 記載の核酸センサ。

【請求項 3】

前記第 1 鎖 (ss1) における前記ループ形成配列 (L1) と、前記第 2 鎖 (ss2) における前記ループ形成配列 (L2) は、それぞれ、0～30 塩基長である、請求項 1 または 2 記載の核酸センサ。

【請求項 4】

前記第 2 鎖 (ss2) において、前記ステム形成配列 (S_A) は、0～60 塩基長であり、前記ステム形成配列 (S_D) は、0～30 塩基長である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

【請求項 5】

前記核酸素子 (II) において、

3' 側から、前記結合核酸分子 (A)、前記ループ形成配列 (L1)、前記ステム形成配列 (S_D)、前記触媒核酸分子 (D)、前記ループ形成配列 (L2) および前記ステム形成配列 (S_A) が、この順序で連結しており、

前記結合核酸分子 (A) の 5' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、

前記触媒核酸分子 (D) の 5' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的である、請求項 1 記載の核酸センサ。

【請求項 6】

前記ループ形成配列 (L1) と前記ループ形成配列 (L2) は、それぞれ、0～30 塩基長である、請求項 1 または 5 記載の核酸センサ。

【請求項 7】

前記ステム形成配列 (S_A) は、0～60 塩基長であり、前記ステム形成配列 (S_D) は、0～30 塩基長である、請求項 1、5 および 6 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

【請求項 8】

前記結合核酸分子 (A) が、18～85 塩基長である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

【請求項 9】

前記結合核酸分子 (A) が、下記 (a1)、(a2) または (a3) のポリヌクレオチドを含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

(a1) 配列番号 1～10 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

(a2) 前記 (a1) の前記塩基配列において、1 個または 2 個の塩基が、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する

ポリヌクレオチド

(a 3) 前記 (a 1) の前記塩基配列との同一性が 90% 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

【請求項 10】

前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が、酸化還元反応の触媒機能である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

【請求項 11】

前記触媒核酸分子 (D) が、15 ～ 30 塩基長である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

【請求項 12】

前記触媒核酸分子 (D) が、下記 (d 1)、(d 2) または (d 3) のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の核酸センサ。

(d 1) 配列番号 11 ～ 31 および 61 ～ 80 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

(d 2) 前記 (d 1) の前記塩基配列において、1 個 または 2 個 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、酸化還元反応の触媒機能を生起するポリヌクレオチド

(d 3) 前記 (d 1) の前記塩基配列との同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、且つ、酸化還元反応の触媒機能を生起するポリヌクレオチド

【請求項 13】

基材、核酸センサおよび検出部を含み、

前記基材に、前記核酸センサおよび前記検出部が配置され、

前記核酸センサは、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の核酸センサであり、

前記検出部は、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能を検出する検出部であることを特徴とするストレプトアビジンの分析用デバイス。

【請求項 14】

前記核酸センサが、リンカーを介して、前記基材に連結されている、請求項 13 記載の分析用デバイス。

【請求項 15】

前記核酸センサが、前記検出部に配置されている、請求項 13 または 14 記載の分析用デバイス。

【請求項 16】

前記検出部は、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能により生成されるシグナルを検出する検出部である、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の分析用デバイス。

【請求項 17】

前記シグナルが、光学的シグナルまたは電気化学的シグナルである、請求項 16 記載の分析用デバイス。

【請求項 18】

さらに、試薬部を有し、

前記試薬部が、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能に対する基質を含む、請求項 13 ～ 17 のいずれか一項に記載の分析用デバイス。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のストレプトアビジンの分析用核酸センサに試料を接触させる接触工程、および、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能を検出することによって、前記試料中のストレプトアビジンを検出する検出工程を含むことを特徴とする、ストレプトアビジンの分析方法。

【請求項 20】

前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能に対する基質の存在下、前記検出工程を行う、請求項 19 記載の分析方法。

【請求項 21】

請求項 13～18 のいずれか一項に記載の分析用デバイスに試料を接触させる接触工程、および、前記分析用デバイスの前記検出部において、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能を検出することによって、前記試料中のストレプトアビジンを検出する検出工程を含むことを特徴とするストレプトアビジンの分析方法。

【請求項 22】

前記触媒核酸分子（D）の触媒機能に対する基質の存在下、前記検出工程を行う、請求項 21 記載の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、ストレプトアビジンの分析用核酸センサ、分析用デバイスおよび分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ストレプトアビジン（以下、「SA」という）は、例えば、ビオチンへの強い結合能、高い安定性等の特性から、臨床医療、食品、環境等の様々な分野において、研究および検査用の物質として使用されている。例えば、ターゲットの検出方法においては、前記ターゲット、ビオチンおよび SA の間での結合を利用して、SA の検出により、間接的な前記ターゲットの検出および定量が行われている。

【0003】

20

このように、様々な分野において SA の検出が利用されていることから、SA の検出について、様々な手法が研究されている。中でも、簡便で効率的な測定が可能なセンサの構築は、SA 検出の用途の広さからも求められている（非特許文献 1）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Carsten Teller ら、Anal. Chem. 2009, 81, 9114-9119

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0005】

そこで、本発明は、SA を検出するための新たなセンサ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】

【0006】

本発明の分析用核酸センサは、SA の分析用核酸センサであり、触媒機能を生起する触媒核酸分子（D）と、SA に結合する結合核酸分子（A）とを有する下記（I）、（II）、（II'）または（III）の核酸素子を含むことを特徴とする。

（I）第 1 鎖と第 2 鎖とから構成される二本鎖の核酸素子であり、

前記第 1 鎖（ss1）は、前記結合核酸分子（A）、ループ形成配列（L1）および前記触媒核酸分子（D）が、この順序で連結しており、

40

前記第 2 鎖（ss2）は、ステム形成配列（S_A）、ループ形成配列（L2）およびステム形成配列（S_D）が、この順序で連結しており、

前記第 1 鎖（ss1）における前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第 2 鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_A）とが、相補的であり、

前記第 1 鎖（ss1）における前記触媒核酸分子（D）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第 2 鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_D）とが、相補的であり、

前記第 1 鎖（ss1）における前記ループ形成配列（L1）と、前記第 2 鎖（ss2）における前記ループ形成配列（L2）とが、非相補的であり、

50

S Aの非存在下、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、
S Aの存在下、前記 S Aと前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される核酸素子

(II) 一本鎖の核酸素子であり、

前記結合核酸分子 (A)、ループ形成配列 (L 1)、ステム形成配列 (S_D)、前記触媒核酸分子 (D)、ループ形成配列 (L 2) およびステム形成配列 (S_A) が、この順序で連結しており、

前記結合核酸分子 (A) のループ形成配列 (L 1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、

前記触媒核酸分子 (D) のループ形成配列 (L 2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であり、

前記ループ形成配列 (L 1) と、前記ループ形成配列 (L 2) とが、非相補的であり、

S Aの非存在下、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、

S Aの存在下、前記 S Aと前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される核酸素子

(II') 一本鎖の核酸素子であり、

前記触媒核酸分子 (D)、ループ形成配列 (L 2)、ステム形成配列 (S_A)、前記結合核酸分子 (A)、ループ形成配列 (L 1) およびステム形成配列 (S_D) が、この順序で連結しており、

前記触媒核酸分子 (D) のループ形成配列 (L 2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であり、

前記結合核酸分子 (A) のループ形成配列 (L 1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、

前記ループ形成配列 (L 1) と、前記ループ形成配列 (L 2) とが、非相補的であり、

S Aの非存在下、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、

S Aの存在下、前記 S Aと前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される核酸素子

(III) 一本鎖の核酸素子であり、

前記触媒核酸分子 (D)、介在配列 (I) および前記結合核酸分子 (A) が、この順序で連結しており、

前記介在配列 (I) は、前記触媒核酸分子 (D) および前記結合核酸分子 (A) と非相補的であり、

S Aの非存在下、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、

S Aの存在下、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される核酸素子

【0007】

本発明の分析用デバイスは、S Aの分析用デバイスであり、基材、核酸センサおよび検出部を含み、前記基材に、前記核酸センサおよび前記検出部が配置され、前記核酸センサが、前記本発明の核酸センサであり、前記検出部は、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能を検出する検出部であることを特徴とする。

【0008】

本発明の分析方法は、S Aの分析方法であり、前記本発明の S Aの分析用核酸センサに、S Aを含む試料を接触させる工程、および、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能を検出することによって、前記試料中の S Aを検出する工程を含むことを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0009】

本発明の分析方法は、S Aの分析方法であり、前記本発明の分析用デバイスに、S Aを含む試料を接触させる工程、および、前記分析用デバイスの前記検出部において、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子(D)の触媒機能を検出することによって、前記試料中のS Aを検出する工程を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0010】

本発明の核酸センサによれば、前記結合核酸分子(A)とS Aとが結合したか否かによって、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能のON-OFFをスイッチできる。このため、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能を検出することで、S Aの有無または量を、容易に検出可能である。また、本発明の分析用デバイスは、前述のように、前記核酸センサを使用することから、例えば、デバイスの小型化およびチップ化等も可能であり、多数の検体でも簡便な分析が可能となる。このため、本発明は、例えば、臨床医療、食品、環境等の様々な分野における研究および検査に、極めて有用な技術といえる。本発明において、「分析」は、例えば、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】

【0011】

【図1】図1は、本発明の核酸センサにおける核酸素子の一例を示す模式図である。

【図2】図2は、本発明の核酸センサにおける核酸素子の他の例を示す模式図である。

【図3】図3は、本発明の核酸センサにおける核酸素子の他の例を示す模式図である。

【図4】図4は、本発明の核酸センサにおける核酸素子の他の例を示す模式図である。

【図5】図5(A)は、実施例1における反応液の写真であり、図5(B)は、前記実施例1における吸光度測定の結果を示すグラフである。

【図6】図6は、実施例2における吸光度測定の結果を示すグラフである。

【図7】図7は、実施例3における吸光度測定の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

(核酸センサおよびそれを用いた分析方法)

本発明のS Aの分析用核酸センサは、前述のように、触媒機能を生起する触媒核酸分子(D)と、S Aに結合する結合核酸分子(A)とを有する前記(I)、(II)、(II')または(III)の核酸素子を含むことを特徴とする。

【0013】

前記結合核酸分子(A)は、特に制限されず、S Aに結合する核酸分子であればよい。本発明において、「S Aに結合する」とは、例えば、S Aの他、S Aの断片およびS A誘導体のいずれに結合可能でもよい。

【0014】

前記結合核酸分子(A)は、例えば、一本鎖である。前記結合核酸分子(A)の長さは、特に制限されず、下限は、例えば、18塩基長であり、好ましくは20塩基長であり、より好ましくは24塩基長であり、上限は、例えば、120塩基長であり、好ましくは85塩基長であり、より好ましくは60塩基長であり、さらに好ましくは26塩基長である。

【0015】

前記結合核酸分子(A)は、例えば、下記(a1)、(a2)、(a3)または(a4)のポリヌクレオチドを含むものがあげられる。前記結合核酸分子(A)は、例えば、前記ポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。前記(a1)、(a2)、(a3)または(a4)のポリヌクレオチドを含む前記結合核酸分子(A)は、例えば、結合DNA分子ということもできる。

(a1) 配列番号1~10のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

(a2) 前記(a1)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、S Aに結合するポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

(a 3) 前記 (a 1) 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、S A に結合可能なポリヌクレオチド

(a 4) 前記 (a 1) の前記塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列に相補的な塩基配列からなり、且つ、S A に結合可能なポリヌクレオチド

【0016】

配列番号 1 (85)

taatacgact cactatagca atggtacggt acttcccgac gcaccgatcg caggttcggg acaaaagt
gc acgtacttt gctaa

配列番号 2 (18)

AC GCACCGATCG CAGGTT

10

配列番号 3 (20)

GAC GCACCGATCG CAGGTT

配列番号 4 (22)

CGAC GCACCGATCG CAGGTT

配列番号 5 (24)

CCGAC GCACCGATCG CAGGTT

配列番号 6 (26)

CCCGAC GCACCGATCG CAGGTT

配列番号 7 (28)

TCCCGAC GCACCGATCG CAGGTT A

20

配列番号 8 (60_3-10)

GCA ATGGTACGGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTT AAAAAAG

配列番号 9 (60_5-10)

GGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTT AAAAAAGTGC ACGCTAC

配列番号 10 (60)

GCA ATGGTACGGT ACTTCCCGAC GCACCGATCG CAGGTT AAAAAAGTGC ACGCTAC

【0017】

前記 (a 2) において、「1 または複数」は、特に制限されず、前記 (a 2) のポリヌクレオチドが、S A に結合すればよい。前記置換された塩基の数は、前記塩基配列 (a 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1 個または 2 個、特に好ましくは 1 個である。前記付加または挿入された塩基の数は、前記塩基配列 (a 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1 個または 2 個、特に好ましくは 1 個である。前記欠失された塩基の数は、前記塩基配列 (a 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 2 個または 1 個、特に好ましくは 1 個である。

30

【0018】

前記 (a 3) において、前記同一性は、前記塩基配列 (a 1) に対して、例えば、70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、特に好ましくは 99% 以上である。前記同一性は、例えば、B L A S T 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。

40

【0019】

前記 (a 4) において、「ストリンジェント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、「ストリンジェントな条件」は、例えば、0.7～1 mol/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、150 mmol/L の NaCl、15 mmol/L クエン酸ナトリウムからなる。

【0020】

50

前記結合核酸分子（A）は、これらの例示には限定されず、前述のように、S Aに結合する核酸分子であればよい。

【0021】

前記結合核酸分子（A）は、例えば、ヌクレオチド残基を含む分子であり、ヌクレオチド残基のみからなる分子でもよいし、ヌクレオチド残基を含む分子でもよい。前記ヌクレオチドは、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびそれらの誘導体である。前記結合核酸分子（A）は、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびそれらの誘導体のいずれか一種類のみを含んでもよいし、二種類以上を含んでもよいし、全てを含んでもよい。具体的に、前記核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはその誘導体を含むDNAでもよいし、リボヌクレオチドおよび／またはその誘導体を含むRNAでもよいし、前者と後者とを含むキメラ（DNA／RNA）でもよい。

10

【0022】

前記ヌクレオチドは、塩基として、例えば、天然塩基（非人工塩基）および非天然塩基（人工塩基）のいずれを含んでもよい。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。前記非天然塩基は、例えば、2'-フルオロピリミジン、2'-O-メチルピリミジン等があげられ、具体例としては、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-O-メチルウラシル、2'-チオウラシル等があげられる。前記ヌクレオチドは、例えば、修飾されたヌクレオチドでもよく、前記修飾ヌクレオチドは、例えば、2'-メチル化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-メチル化-シトシンヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-フルオロ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-アミノ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-アミノ化-シトシンヌクレオチド残基、2'-チオ化-ウラシルヌクレオチド残基、2'-チオ化-シトシンヌクレオチド残基等があげられる。前記結合核酸分子（A）は、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）等の非ヌクレオチドを含んでもよい。

20

【0023】

前記触媒核酸分子（D）は、触媒機能を生起する核酸分子であればよい。前記触媒機能は、例えば、酸化還元反応の触媒機能である。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。前記酸化還元反応の種類は、特に制限されない。前記酸化還元反応の触媒機能は、例えば、酵素と同様の活性があげられ、具体的には、例えば、ペルオキシダーゼと同様の活性（以下、「ペルオキシダーゼ様活性」という）等があげられる。前記ペルオキシダーゼ活性は、例えば、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP）活性があげられる。前記触媒核酸分子（D）は、後述するようなDNAの場合、DNAエンザイムまたはDNAzymeと呼ぶことができ、また、後述するようなRNAの場合、RNAエンザイムまたはRNAzymeと呼ぶことができる。

30

【0024】

前記触媒核酸分子（D）は、G-カルテット（またはG-tetradという）の構造を形成する核酸が好ましく、より好ましくはグアニン四重鎖（またはG-quadruplexという）の構造を形成する核酸である。前記G-tetradは、例えば、グアニンが四量体となった面の構造であり、G-quadruplexは、例えば、前記G-tetradが複数面重なった構造をいう。前記G-tetradおよび前記G-quadruplexは、例えば、反復してGリッチの構造モチーフを有する核酸において、形成される。前記G-tetradは、例えば、パラレル型およびアンチパラレル型があげられるが、パラレル型が好ましい。前記核酸素子において、前記触媒核酸分子（D）は、例えば、前記結合核酸素子（A）にS Aが結合していない状態で、前記ステムが形成されることにより、前記G-tetradの形成が阻害され、前記結合核酸分子（A）にS Aが結合することにより、前記ステム形成が解除され、前記G-tetradを形成すること

40

50

が好ましい。

【0025】

前記触媒核酸分子(D)は、ポルフィリンと結合可能な核酸が好ましく、具体的には、前記G-tetradを形成し且つ前記ポルフィリンと結合可能な核酸が好ましい。前記G-tetradを有する核酸は、例えば、前記ポルフィリンと結合して複合体を形成することによって、前述のような酸化還元反応の触媒機能を生起することが知られている。前記核酸素子において、前記触媒核酸分子(D)は、例えば、前記結合核酸分子(A)にSAが結合していない状態で、前記ステムが形成されることにより、前記ポルフィリンとの結合が阻害され、前記結合核酸分子(A)にSAが結合することにより、前記ステム形成が解除され、前記ポルフィリンと結合することが好ましい。具体的には、前記核酸素子において、前記触媒核酸分子(D)は、例えば、前記結合核酸分子(A)にSAが結合していない状態で、前記G-tetradの形成が阻害され且つこれにより前記ポルフィリンとの結合が阻害され、前記結合核酸分子(A)にSAが結合することにより、前記G-tetradを形成し且つ前記ポルフィリンと結合することが好ましい。

10

【0026】

前記ポルフィリンは、特に制限されず、例えば、無置換体のポルフィリン、その誘導体があげられる。前記誘導体は、例えば、置換体のポルフィリンおよび金属元素と錯体を形成した金属ポルフィリン等があげられる。前記置換体のポルフィリンは、例えば、N-メチルメソポルフィリン等があげられる。前記金属ポルフィリンは、例えば、三価鉄錯体であるヘミン等があげられる。前記ポルフィリンは、例えば、前記金属ポルフィリンが好ましく、より好ましくはヘミンである。

20

【0027】

前記触媒核酸分子(D)は、例えば、一本鎖である。前記触媒核酸分子(D)の長さは、特に制限されず、下限は、例えば、11塩基長であり、好ましくは13塩基長であり、より好ましくは15塩基長であり、上限は、例えば、60塩基長であり、好ましくは36塩基長であり、より好ましくは18塩基長である。

【0028】

前記触媒核酸分子(D)は、例えば、ペルオキシダーゼ活性を有するDNAとして、下記論文(1)～(4)等が開示されているDNAzymeが例示できる。

(1) Travascioら, Chem. Biol., 1998年, vol.5, p.505-517

30

(2) Chengら, Biochemistry, 2009年, vol.48, p.7817-7823

(3) Tellerら, Anal. Chem., 2009年, vol.81, p.9114-9119

(4) Taoら, Anal. Chem., 2009年, vol.81, p.2144-2149

【0029】

前記触媒核酸分子(D)は、具体例として、下記(d1)、(d2)、(d3)または(d4)のポリヌクレオチドを含むものがあげられる。前記触媒核酸分子(D)は、例えば、前記ポリヌクレオチドからなる分子でもよいし、前記ポリヌクレオチドを含む分子でもよい。前記(d1)、(d2)、(d3)または(d4)のポリヌクレオチドを含む前記触媒核酸分子(D)は、例えば、触媒DNA分子、DNAzymeということもできる。

40

【0030】

(d1) 配列番号11～31および61～80のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド

(d2) 前記(d1)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、前記酸化還元反応の触媒機能を生起するポリヌクレオチド

(d3) 前記(d1)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、前記酸化還元反応の触媒機能を生起するポリヌクレオチド

(d4) 前記(d1)の前記塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列に相補的な塩基配列からなり、且つ、前記酸化還元反応の触媒機能を生起するポ

50

リヌクレオチド

【 0 0 3 1 】

E A D 2 (配列番号 1 1)

CTGGGAGGGAGGGAGGGA

c - M y c (配列番号 1 2)

TGAGGGTGGGAGGGTGGGGAA

m__c - M y c - 0 5 2 7 (配列番号 1 3)

TGAGGGGAGGGAGGGCGGGAA

m__c - M y c - 0 5 7 9 (配列番号 1 4)

TGAGGGGTGGGAGGGAGGGGAA

10

m__c - M y c - 0 5 8 0 (配列番号 1 5)

TGAGGGGTGGGAGGGACGGGAA

m__c - M y c - 0 5 8 3 (配列番号 1 6)

TGAGGGGTGGGAGGGTGGGGAA

m__c - M y c - 0 5 8 4 (配列番号 1 7)

TGAGGGGTGGGAGGGTCGGGAA

n e c o 0 5 8 4 (配列番号 1 8)

GGGTGGGAGGGTCGGG

m__c - M y c - 0 5 8 6 (配列番号 1 9)

TGAGGGGTGGGAGGGGTGGGAA

20

m__c - M y c - 0 5 8 8 (配列番号 2 0)

TGAGGGGTGGGAGGGCGGGAA

m__c - M y c - 0 6 0 5 (配列番号 2 1)

TGAGGGGTGGGTGGGCAGGGAA

m__c - M y c - 0 6 0 8 (配列番号 2 2)

TGAGGGGTGGGTGGGCCGGGAA

m__c - M y c - 0 6 2 7 (配列番号 2 3)

TGAGGGGTGGGCGGGAGGGGAA

m__c - M y c - 0 6 3 2 (配列番号 2 4)

TGAGGGGTGGGCGGGTCGGGAA

30

m__c - M y c - 0 7 0 6 (配列番号 2 5)

TGAGGGGCGGGAGGGATGGGAA

m__c - M y c - 0 7 1 1 (配列番号 2 6)

TGAGGGGCGGGAGGGTGGGGAA

m__c - M y c - 0 7 1 2 (配列番号 2 7)

TGAGGGGCGGGAGGGTCGGGAA

m__E A D 2 - 0 0 3 2 (配列番号 2 8)

CTGGGTGGGCGGGCGGGA

m__c - M y c - 0 5 2 0 (配列番号 2 9)

TGAGGGGAGGGAGGGTCGGGAA

40

m__c - M y c - 0 7 1 4 (配列番号 3 0)

TGAGGGGCGGGAGGGGTGGGAA

m__T A - 0 4 2 0 (配列番号 3 1)

GGGCGGGAGGGAGGG

【 0 0 3 2 】

配列番号 6 1 GTGGGTCATTGTGGGTGGGTGTGG

配列番号 6 2 GTGGGTAGGGCGGGTTGG

配列番号 6 3 GGTGGGTGTGGTTGG

配列番号 6 4 GGGTTGGGGTGTGGGGTTGGG

配列番号 6 5 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG

50

配列番号 6 6 GGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG
 配列番号 6 7 GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG
 配列番号 6 8 GTGGGTAGGGCGGTTGG
 配列番号 6 9 CGAGGTGGGTGGGTGGGA
 配列番号 7 0 CTGGGTGGGTGGGTGGGA
 配列番号 7 1 CTGGGAGGGAGGGAGGGA
 配列番号 7 2 CTGGGCGGGCGGGCGGGA
 配列番号 7 3 CTGGGTTGGGTTGGGTTGGGA
 配列番号 7 4 CTGGGGTGGGGTGGGGTGGGA
 配列番号 7 5 GGGCGGGCCGGGGCGGG
 配列番号 7 6 TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGA
 配列番号 7 7 CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG
 配列番号 7 8 GGGAGGGAGAGGGGGCGGG
 配列番号 7 9 GGGCGGGCGGGCGGGG
 配列番号 8 0 GGGTAGGGCGGGTTGGG

【0033】

前記 (d 2) において、「1 または複数」は、特に制限されず、前記 (d 2) のポリヌクレオチドが、前記酸化還元反応の触媒機能を生起すればよい。前記置換された塩基の数は、前記塩基配列 (d 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1 個または 2 個、特に好ましくは 1 個である。前記付加または挿入された塩基の数は、前記塩基配列 (d 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1 個または 2 個、特に好ましくは 1 個である。前記欠失された塩基の数は、前記塩基配列 (d 1) において、例えば、1～5 個であり、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 2 個または 1 個、特に好ましくは 1 個である。

【0034】

前記 (d 3) において、前記同一性は、前記塩基配列 (d 1) に対して、例えば、70 % 以上、好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 90 % 以上、さらに好ましくは 95 % 以上、96 % 以上、97 % 以上、98 % 以上、特に好ましくは 99 % 以上である。前記同一性は、例えば、B L A S T 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。

【0035】

前記 (d 4) において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、前述と同様である。

【0036】

前記触媒核酸分子 (D) は、例えば、前記 (d 1) ～ (d 4) の例示には限定されず、前述のように、前記触媒機能を生起する核酸分子であればよい。

【0037】

前記触媒核酸分子 (D) は、例えば、ヌクレオチド残基を含む分子であり、ヌクレオチド残基のみからなる分子でもよいし、ヌクレオチド残基を含む分子でもよい。前記ヌクレオチドは、前述と同様である。前記触媒核酸分子 (D) は、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびそれらの誘導体のいずれか一種類のみを含んでもよいし、二種類以上を含んでもよいし、全てを含んでもよい。具体的に、前記核酸分子は、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはその誘導体を含む DNA でもよいし、リボヌクレオチドおよび／またはその誘導体を含む RNA でもよいし、前者と後者とを含むキメラ (DNA / RNA) でもよい。

【0038】

前記ヌクレオチドは、前記結合核酸分子 (A) における例示を援用できる。また、前記触媒核酸分子 (D) は、例えば、PNA (ペプチド核酸)、LNA (Locked Nucleic Acid) 等の非ヌクレオチドを含んでもよい。

【0039】

本発明において、前記核酸素子は、前述のように、前記（I）、（II）、（II'）および（III）があげられる。以下に、これらの3つの形態について説明するが、特に示さない限り、各形態は、それぞれの説明を援用できる。

【0040】

前記核酸素子（I）は、前述のように、（I）第1鎖と第2鎖とから構成される二本鎖の核酸素子である。前記第2鎖は、ブロック鎖ともいう。前記第1鎖（ss1）は、前記結合核酸分子（A）、ループ形成配列（L1）および前記触媒核酸分子（D）が、この順序で連結しており、前記第2鎖（ss2）は、ステム形成配列（S_A）、ループ形成配列（L2）およびステム形成配列（S_D）が、この順序で連結している。前記第1鎖（ss1）における前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第2鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_A）とが、相補的であり、前記第1鎖（ss1）における前記触媒核酸分子（D）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第2鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_D）とが、相補的であり、前記第1鎖（ss1）における前記ループ形成配列（L1）と、前記第2鎖（ss2）における前記ループ形成配列（L2）とが、非相補的である。そして、S_Aの非存在下、前記ステム形成配列（S_A）および前記ステム形成配列（S_D）における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が阻害される。前記触媒機能の阻害は、例えば、このステム形成で、前記触媒核酸分子がケージ化されて起こる。つまり、ステム形成により、前記触媒核酸分子（D）が、触媒機能を生起する構造をとれないことで、触媒機能が阻害される。他方、S_Aの存在下、前記S_Aと前記結合核酸分子（A）との結合により、前記ステム形成配列（S_A）および前記ステム形成配列（S_D）における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が生起される。前記触媒機能の生起は、例えば、ステム形成が解除され、前記触媒核酸分子のケージ化が解除されて起こる。つまり、ステム形成の解除により、前記触媒核酸分子（D）が、触媒機能を生起する本来の構造をとることで、触媒機能が生起される。なお、本発明は、これらのメカニズムには制限されない。

【0041】

前記核酸素子（I）は、このように、S_Aが非存在の場合、前記ステム形成により、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が阻害され（スイッチOFF）、S_Aが存在の場合、前記ステム形成が解除され、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が生起される（スイッチON）。前記核酸素子（I）は、具体的には、例えば、S_Aの非存在下、前記第1鎖（ss1）における前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第2鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_A）とが、ステムを形成し、前記第1鎖（ss1）における前記触媒核酸分子（D）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記第2鎖（ss2）における前記ステム形成配列（S_D）とが、ステムを形成し、前記ループ形成配列（L1）と、前記ループ形成配列（L2）とが、2つの前記ステムの間で内部ループを形成する。本発明において、「相補的」とは、例えば、アライメントする2つの領域間が、完全に相補であってもよいし、ステム形成可能な程度に相補であってもよい（以下、同様）。また、本発明において、「非相補的」とは、例えば、アライメントする2つの領域間が、完全に非相補であってもよいし、内部ループを形成可能な程度に非相補であってもよい（以下、同様）。

【0042】

前記S_Aの非存在下における前記核酸素子（I）の状態を、図1の模式図に示す。図1（A）および（B）は、互いに、前記第1鎖（ss1）と前記第2鎖（ss2）の向きが逆となっている形態を示す。図1において、矢印は、5'側から3'側へ方向を示す（以下、同様）。

【0043】

図1において、上側の鎖が、前記第1鎖（ss1）であり、Aは、前記結合核酸分子（A）、L1は、前記ループ形成配列（L1）、Dは、前記触媒核酸分子（D）を示し、下

側の鎖が、前記第2鎖（ $s s 2$ ）であり、 S_A は、前記ステム形成配列（ S_A ）、 $L 2$ は、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）、 S_D は、前記ステム形成配列（ S_D ）を示す。図1に示すように、 S_A が非存在下では、前記第1鎖（ $s s 1$ ）と前記第2鎖（ $s s 2$ ）との間で、二カ所にステムが形成され、前記ステムの間に内部ループが形成される。具体的には、前記結合核酸分子（ A ）の、ループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_A ）との間でステムが形成され、前記触媒核酸分子（ D ）の、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）側の末端領域と、前記ステム形成配列（ S_D ）との間でステムが形成され、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と前記ループ形成配列（ $L 2$ ）との間で内部ループが形成される。そして、 S_A が存在すると、前記結合核酸分子（ A ）に S_A が結合することによって、前記2つのステム形成が解除され、これによって、前記触媒核酸分子（ D ）の触媒活性が生起される。

10

【0044】

前記核酸素子（ I ）において、前記各構成の方向は、特に制限されない。図1（A）に示すように、前記第1鎖（ $s s 1$ ）は、例えば、5'側から、前記結合核酸分子（ A ）、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）および前記触媒核酸分子（ D ）が、この順序で連結し、前記第2鎖（ $s s 2$ ）は、3'側から、前記ステム形成配列（ S_A ）、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）および前記ステム形成配列（ S_D ）が、この順序で連結していることが好ましい。この場合、前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記結合核酸分子（ A ）の3'末端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_A ）とが、相補的であり、前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記触媒核酸分子（ D ）の5'末端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_D ）とが、相補的であることが好ましい。また、図1（B）に示すように、前記第1鎖（ $s s 1$ ）は、例えば、3'側から、前記結合核酸分子（ A ）、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）および前記触媒核酸分子（ D ）が、この順序で連結し、前記第2鎖（ $s s 2$ ）は、5'側から、前記ステム形成配列（ S_A ）、前記ループ形成配列（ $L 2$ ）および前記ステム形成配列（ S_D ）が、この順序で連結してもよい。この場合、前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記結合核酸分子（ A ）の5'末端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_A ）とが、相補的であり、前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記触媒核酸分子（ D ）の3'末端領域と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_D ）とが、相補的であることが好ましい。前記核酸素子（ I ）は、このように内部ループを形成することによって、優れた感度の検出が可能になると推測されるが、本発明は、この推測には制限されない。

20

30

【0045】

前記核酸素子（ I ）において、前記内部ループの長さは、特に制限されない。前記第1鎖（ $s s 1$ ）における前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ループ形成配列（ $L 2$ ）は、それぞれ、例えば、0～30塩基長であり、好ましくは1～30塩基長であり、より好ましくは1～15塩基長であり、さらに好ましくは1～6塩基長である。また、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）と前記ループ形成配列（ $L 2$ ）の長さは、例えば、同じでも、異なってもよい。後者の場合、長さの差は、特に制限されず、例えば、1～10塩基長、好ましくは1または2塩基長、より好ましくは1塩基長である。また、前記核酸素子（ I ）は、前記ループ形成配列（ $L 1$ ）および前記ループ形成配列（ $L 2$ ）のいずれか一方のみを有してもよい。前記核酸素子（ I ）は、このように内部ループを形成することによって、優れた感度の検出が可能になると推測されるが、本発明は、この推測には制限されない。

40

【0046】

前記核酸素子（ I ）において、前記各ステムの長さは、特に制限されない。前記ステムの長さは、例えば、前記第2鎖（ $s s 2$ ）における前記ステム形成配列（ S_A ）および前記ステム形成配列（ S_D ）の長さで調節できる。前記ステム形成配列（ S_A ）の長さは、例えば、0～60塩基長、1～60塩基長であり、好ましくは0～10塩基長、1～10塩基長である。前記ステム形成配列（ S_D ）の長さは、例えば、0～30塩基長、1～30塩基長でありであり、より好ましくは0～10塩基長、1～10塩基長でありであり、

50

さらに好ましくは1～6塩基長である。前記ステム形成配列（S_A）と前記ステム形成配列（S_D）は、例えば、同じ長さでもよいし、前者が長くてもよいし、後者が長くてもよい。

【0047】

前記核酸素子（I）において、前記第1鎖（ss1）および前記第2鎖（ss2）の長さは、特に制限されない。前記第1鎖（ss1）の長さは、例えば、40～200塩基長であり、好ましくは42～100塩基長であり、より好ましくは45～60塩基長である。前記第2鎖（ss2）の長さは、例えば、4～120塩基長であり、好ましくは5～25塩基長であり、より好ましくは10～15塩基長である。

【0048】

前記核酸素子（I）の具体例を以下に示すが、本発明は、これには制限されない。まず、前記第1鎖（ss1）を、以下に例示する。下記配列において、5'側の下線部が、配列番号5のSAアプタマー（図1（A）においてA）、ポリdTが、前記ループ形成配列（図1（A）においてL1）、3'側の下線部が、配列番号18（neco0584）のDNAzyme（図1（A）においてD）である。

SA.neco.D3A2 （配列番号32）

5' -CCGACGCACCGATCGCAGGTTTCGGTTTTTTTTTGGGTGGGAGGGTCGGG-3'

【0049】

つぎに、前記第1鎖（ss1）に対する前記第2鎖（ss2）を、以下に例示する。下記配列において、5'側の下線部が、前記第1鎖（ss1）のDNAzymeの5'側領域と相補な前記ステム形成配列（図1（A）においてS_D）であり、ポリdTが、前記ループ形成配列（図1（A）においてL2）であり、3'側の下線部が、前記第1鎖（ss1）のSAアプタマーの3'側領域と相補な前記ステム形成配列（図1（A）においてS_A）である。

【0050】

SA.neco.D5.A5 （配列番号33）

5' -CACCCTTTTTTTTCCGAA-3'

SA.neco.D5.A6 （配列番号34）

5' -CACCCTTTTTTTTCCGAAC-3'

SA.neco.D5.A7 （配列番号35）

5' -CACCCTTTTTTTTCCGAACC-3'

SA.neco.D5.A8 （配列番号36）

5' -CACCCTTTTTTTTCCGAACCT-3'

SA.neco.D6.A5 （配列番号37）

5' -CCACCCTTTTTTTTCCGAA-3'

SA.neco.D6.A6 （配列番号38）

5' -CCACCCTTTTTTTTCCGAAC-3'

SA.neco.D6.A7 （配列番号39）

5' -CCACCCTTTTTTTTCCGAACC-3'

SA.neco.D6.A8 （配列番号40）

5' -CCACCCTTTTTTTTCCGAACCT-3'

SA.neco.D7.A5 （配列番号41）

5' -CCCACCCTTTTTTTTCCGAA-3'

SA.neco.D7.A6 （配列番号42）

5' -CCCACCCTTTTTTTTCCGAAC-3'

SA.neco.D7.A7 （配列番号43）

5' -CCCACCCTTTTTTTTCCGAACC-3'

SA.neco.D7.A8 （配列番号44）

5' -CCCACCCTTTTTTTTCCGAACC-3'

SA.neco.D8.A5 （配列番号45）

5' -TCCCACCCTTTTTCGAA-3'

【0051】

つぎに、前記核酸素子 (II) は、前述のように、一本鎖の核酸素子であり、前記結合核酸分子 (A)、ループ形成配列 (L1)、ステム形成配列 (S_D)、前記触媒核酸分子 (D)、ループ形成配列 (L2) およびステム形成配列 (S_A) が、この順序で連結している。前記結合核酸分子 (A) のループ形成配列 (L1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、前記触媒核酸分子 (D) のループ形成配列 (L2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であり、前記ループ形成配列 (L1) と、前記ループ形成配列 (L2) とが、非相補的である。

【0052】

そして、前記核酸素子 (II) は、S_A の非存在下、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害される。前記触媒機能の阻害は、例えば、このような自己会合によるステム形成で、前記触媒核酸分子がケージ化されて起こる。つまり、ステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) が、触媒機能を生起する本来の構造をとれないことで、触媒機能が阻害される。他方、S_A の存在下、前記 S_A と前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される。前記触媒機能の生起は、例えば、自己会合によるステム形成が解除され、前記触媒核酸分子のケージ化が解除されて起こる。つまり、ステム形成の解除により、前記触媒核酸分子 (D) が、触媒機能を生起する本来の構造をとることで、触媒機能が生起される。なお、本発明は、これらのメカニズムには制限されない。

【0053】

前記核酸素子 (II) は、前記核酸素子 (I) と同様に、S_A が非存在の場合、前記ステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され (スイッチ OFF)、S_A が存在の場合、前記ステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される (スイッチ ON)。前記核酸素子 (II) は、具体的には、例えば、S_A の非存在下、前記結合核酸分子 (A) のループ形成配列 (L1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、ステムを形成し、前記触媒核酸分子 (D) のループ形成配列 (L2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、ステムを形成し、前記ループ形成配列 (L1) と、前記ループ形成配列 (L2) とが、2つの前記ステムの間で内部ループを形成する。

【0054】

前記 S_A の非存在下における前記核酸素子 (II) の状態を、図2の模式図に示す。図2 (A) および (B) は、互いに、向きが逆となっている形態を示す。

【0055】

図2において、Aは、前記結合核酸分子 (A)、L1は、前記ループ形成配列 (L1)、S_D は、前記ステム形成配列 (S_D)、Dは、前記触媒核酸分子 (D)、L2は、前記ループ形成配列 (L2)、S_A は、前記ステム形成配列 (S_A) を示す。図2に示すように、S_A が非存在下では、前記核酸素子 (II) の自己アニーリングによって、二カ所にステムが形成され、前記ステムの間に内部ループが形成される。具体的には、前記結合核酸分子 (A) の、ループ形成配列 (L1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) との間でステムが形成され、前記触媒核酸分子 (D) の、前記ループ形成配列 (L2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) との間でステムが形成され、前記ループ形成配列 (L1) と前記ループ形成配列 (L2) との間で内部ループが形成される。そして、S_A が存在すると、前記結合核酸分子 (A) に S_A が結合することによって、前記2つのステム形成が解除され、これによって、前記触媒核酸分子 (D) の触媒活性が生起される。

【0056】

前記核酸素子 (II) において、前記各構成の方向は、特に制限されない。図2 (B) に示すように、前記核酸素子 (II) は、例えば、3' 側から、前記結合核酸分子 (A)、前

10

20

30

40

50

記ループ形成配列 (L₁)、前記ステム形成配列 (S_D)、前記触媒核酸分子 (D)、前記ループ形成配列 (L₂) および前記ステム形成配列 (S_A) が、この順序で連結していることが好ましい。この場合、前記結合核酸分子 (A) の 5' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、前記触媒核酸分子 (D) の 5' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であることが好ましい。また、図 2 (A) に示すように、前記核酸素子 (II) は、例えば、5' 側から、前記結合核酸分子 (A)、前記ループ形成配列 (L₁)、前記ステム形成配列 (S_D)、前記触媒核酸分子 (D)、前記ループ形成配列 (L₂) および前記ステム形成配列 (S_A) が、この順序で連結してもよい。この場合、前記結合核酸分子 (A) の 3' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的であり、前記触媒核酸分子 (D) の 3' 末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であることが好ましい。

10

【0057】

前記核酸素子 (II) において、前記内部ループの長さは、特に制限されない。前記ループ形成配列 (L₁) と、前記ループ形成配列 (L₂) は、それぞれ、例えば、0~30 塩基長であり、好ましくは 1~30 塩基長であり、より好ましくは 1~15 塩基長であり、さらに好ましくは 1~6 塩基長である。また、前記ループ形成配列 (L₁) と前記ループ形成配列 (L₂) の長さは、例えば、同じでも、異なってもよい。後者の場合、長さの差は、特に制限されず、例えば、1~10 塩基長、好ましくは 1 または 2 塩基長、より好ましくは 1 塩基長である。また、前記核酸素子 (II) は、前記ループ形成配列 (L₁) および前記ループ形成配列 (L₂) のいずれか一方のみを有してもよい。前記核酸素子 (II) は、このように内部ループを形成することによって、優れた感度の検出が可能になると推測されるが、本発明は、この推測には制限されない。

20

【0058】

前記核酸素子 (II) において、前記各ステムの長さは、特に制限されない。前記ステムの長さは、例えば、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) の長さで調節できる。前記ステム形成配列 (S_A) の長さは、例えば、0~60 塩基長、1~60 塩基長であり、好ましくは 1~10 塩基長であり、より好ましくは 1~7 塩基長である。前記ステム形成配列 (S_D) の長さは、例えば、0~30 塩基長、1~30 塩基長であり、好ましくは 0~10 塩基長、1~10 塩基長であり、より好ましくは 0~7 塩基長、1~7 塩基長である。前記ステム形成配列 (S_A) と前記ステム形成配列 (S_D) は、例えば、同じ長さでもよいし、前者が長くてもよいし、後者が長くてもよい。

30

【0059】

前記核酸素子 (II) の長さは、特に制限されない。前記核酸素子 (II) の長さは、例えば、40~120 塩基長であり、好ましくは 45~100 塩基長であり、より好ましくは 50~80 塩基長である。

【0060】

前記核酸素子 (II) の具体例を以下に示すが、本発明は、これには制限されない。下記配列において、5' 側から、小文字配列が前記ステム形成配列 (図 2 (B) において S_A)、大文字のポリ d T が、前記ループ形成配列 (図 2 (B) において L₂)、下線部が、配列番号 18 (neco0584) の DNAzyme (図 2 (B) において D)、小文字配列が、前記ステム形成配列 (図 2 (B) において S_D)、大文字のポリ d T が、前記ループ形成配列 (図 2 (B) において L₁)、下線部が、配列番号 5 の SA アプタマー (図 2 (B) において A) である。

40

【0061】

SA.neco.D3A2 (配列番号 46)

5' -ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D3A3 (配列番号 47)

5' -cggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D3A4 (配列番号 48)

5' -tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

50

SA.neco.D3A5 (配列番号 4 9)

5' -gtcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A2 (配列番号 5 0)

5' -ggTTTGGGtGGGAGGGTCGGGacccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A3 (配列番号 5 1)

5' -cggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGacccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A4 (配列番号 5 2)

5' -tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGacccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A5 (配列番号 5 3)

5' -gtcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGacccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

10

SA.neco.D5A2 (配列番号 5 4)

5' -ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcaccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D5A3 (配列番号 5 5)

5' -cggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcaccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D5A4 (配列番号 5 6)

5' -tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcaccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D5A5 (配列番号 5 7)

5' -tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcaccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D6A2 (配列番号 5 8)

5' -ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGccaccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

20

【0062】

つぎに、前記核酸素子 (II') は、前記核酸素子 (II) に対して、前記結合核酸分子 (A) と前記触媒核酸分子 (D)、前記ステム形成配列 (S_A) と前記ステム形成配列 (S_D)、前記ループ形成配列 (L1) と前記ループ形成配列 (L2) とが、それぞれ入れ替わった位置関係にある一本鎖の核酸素子である。なお、前記核酸素子 (II') は、特に説明しない限り、前記核酸素子 (II) の記載を援用できる。

【0063】

前記核酸素子 (II') は、前述のように、前記触媒核酸分子 (D)、ループ形成配列 (L2)、ステム形成配列 (S_A)、前記結合核酸分子 (A)、ループ形成配列 (L1) およびステム形成配列 (S_D) が、この順序で連結している。前記触媒核酸分子 (D) のループ形成配列 (L2) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_D) とが、相補的であり、前記結合核酸分子 (A) のループ形成配列 (L1) 側の末端領域と、前記ステム形成配列 (S_A) とが、相補的である。

30

【0064】

そして、前記核酸素子 (II') は、 S_A の非存在下、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害される。前記触媒機能の阻害は、例えば、このような自己会合によるステム形成で、前記触媒核酸分子がケージ化されて起こる。つまり、ステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) が、触媒機能を生起する本来の構造をとれないことで、触媒機能が阻害される。他方、 S_A の存在下、前記 S_A と前記結合核酸分子 (A) との結合により、前記ステム形成配列 (S_A) および前記ステム形成配列 (S_D) における、それぞれのステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起される。前記触媒機能の生起は、例えば、自己会合によるステム形成が解除され、前記触媒核酸分子のケージ化が解除されて起こる。つまり、ステム形成の解除により、前記触媒核酸分子 (D) が、触媒機能を生起する本来の構造をとることで、触媒機能が生起される。なお、本発明は、これらのメカニズムには制限されない。

40

【0065】

前記核酸素子 (II') は、前記核酸素子 (II) と同様に、 S_A が非存在の場合、前記ステム形成により、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され (スイッチ OFF)、 S_A が存在の場合、前記ステム形成が解除され、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起

50

される（スイッチON）。前記核酸素子（II'）は、具体的には、例えば、SAの非存在下、前記結合核酸分子（A）のループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記ステム形成配列（S_A）とが、ステムを形成し、前記触媒核酸分子（D）のループ形成配列（L2）側の末端領域と、前記ステム形成配列（S_D）とが、ステムを形成し、前記ループ形成配列（L1）と、前記ループ形成配列（L2）とが、2つの前記ステムの間で内部ループを形成する。

【0066】

前記SAの非存在下における前記核酸素子（II'）の状態を、図3の模式図に示す。図3（A）および（B）は、互いに、向きが逆となっている形態を示す。

【0067】

図3において、Aは、前記結合核酸分子（A）、L1は、前記ループ形成配列（L1）、Dは、前記触媒核酸分子（D）、L2は、前記ループ形成配列（L2）、S_Aは、前記ステム形成配列（S_A）、S_Dは、前記ステム形成配列（S_D）を示す。図3に示すように、SAが非存在下では、前記核酸素子（II'）の自己アニーリングによって、二カ所にステムが形成され、前記ステムの間に内部ループが形成される。具体的には、前記結合核酸分子（A）の、ループ形成配列（L1）側の末端領域と、前記ステム形成配列（S_A）との間でステムが形成され、前記触媒核酸分子（D）の、前記ループ形成配列（L2）側の末端領域と、前記ステム形成配列（S_D）との間でステムが形成され、前記ループ形成配列（L1）と前記ループ形成配列（L2）との間で内部ループが形成される。そして、SAが存在すると、前記結合核酸分子（A）にSAが結合することによって、前記2つの

【0068】

前記核酸素子（II'）において、前記各構成の方向は、特に制限されない。図3（B）に示すように、前記核酸素子（II'）は、例えば、3'側から、前記触媒核酸分子（D）、前記ループ形成配列（L2）、前記ステム形成配列（S_A）、前記結合核酸分子（A）、前記ループ形成配列（L1）および前記ステム形成配列（S_D）が、この順序で連結していることが好ましい。この場合、前記結合核酸分子（A）の5'末端領域と、前記ステム形成配列（S_A）とが、相補的であり、前記触媒核酸分子（D）の5'末端領域と、前記ステム形成配列（S_D）とが、相補的であることが好ましい。また、図3（A）に示すように、前記核酸素子（II'）は、例えば、5'側から、前記触媒核酸分子（D）、前記ループ形成配列（L2）、前記ステム形成配列（S_A）、前記結合核酸分子（A）、前記ループ形成配列（L1）および前記ステム形成配列（S_D）が、この順序で連結してもよい。この場合、前記結合核酸分子（A）の3'末端領域と、前記ステム形成配列（S_A）とが、相補的であり、前記触媒核酸分子（D）の3'末端領域と、前記ステム形成配列（S_D）とが、相補的であることが好ましい。

【0069】

つぎに、前記核酸素子（III）は、前述のように、一本鎖の核酸素子であり、前記触媒核酸分子（D）、介在配列（I）および前記結合核酸分子（A）が、この順序で連結しており、前記介在配列（I）は、前記触媒核酸分子（D）および前記結合核酸分子（A）と非相補的である。そして、SAの非存在下、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が阻害され、他方、SAの存在下、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が生起される。

【0070】

前記核酸素子（III）は、前記核酸素子（I）、（II）および（II'）と同様に、SAが非存在の場合、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が阻害され（スイッチOFF）、SAが存在の場合、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能が生起される（スイッチON）。

【0071】

前記SAの非存在下における前記核酸素子（III）の状態を、図4の模式図に示す。図4において、Aは、前記結合核酸分子（A）、Iは、前記介在配列（I）、Dは、前記触媒核酸分子（D）を示す。図4（A）および（B）は、互いに、向きが逆となっている形

態を示す。

【0072】

前記核酸素子 (III) について、S A の非存在下で、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が阻害され、S A の存在下で、前記触媒核酸分子 (D) の触媒機能が生起されるのは、例えば、以下の理由が推測される。なお、本発明は、これらの推測には制限されない。前記核酸素子 (III) は、S A 非存在下において、前記触媒核酸分子 (D) の一部と前記結合核酸分子 (A) の一部とが相互作用し、前記触媒核酸分子 (D) が、非 G カルテット構造を形成していると推測される。そして、S A が存在すると、前記核酸素子 (III) のメインフォームが、前記結合核酸素子 (A) の本来の構造、すなわち S A に結合する三次元構造に傾き、全体の構造変化が生じ、結果として、前記触媒核酸分子 (D) が G カルテット構造を形成し、その触媒機能が生起されると考えられる。

10

【0073】

前記核酸素子 (III) において、前記各構成の方向は、特に制限されない。図 4 (A) に示すように、前記核酸素子 (III) は、例えば、5' 側から、前記触媒核酸分子 (D)、前記介在配列 (I) および前記結合核酸分子 (A) が、この順序で連結していることが好ましい。また、図 4 (B) に示すように、前記核酸素子 (III) は、例えば、3' 側から、前記触媒核酸分子 (D)、前記介在配列 (I) および前記結合核酸分子 (A) が、この順序で連結してもよい。

【0074】

前記核酸素子 (III) において、前記介在配列 (I) の長さは、特に制限されない。前記介在配列 (I) の長さは、例えば、0~30 塩基長、1~30 塩基長であり、好ましくは 0~10 塩基長、1~10 塩基長であり、より好ましくは 0~8 塩基長、1~8 塩基長である。

20

【0075】

前記核酸素子 (III) の長さは、特に制限されない。前記核酸素子 (III) の長さは、例えば、30~120 塩基長であり、好ましくは 35~80 塩基長であり、より好ましくは 40~60 塩基長である。

【0076】

前記核酸素子 (III) の具体例を以下に示すが、本発明は、これには制限されない。下記 SA.EAD2.D0.A0 において、5' 側の下線部が、配列番号 11 (EAD2) の DNAzyme (図 4 (A) において D) であり、3' 側の下線部が、配列番号 5 の S A アプタマー (図 4 において A) であり、両者間のポリ d T が介在配列 (図 4 (A) において I) である。下記 SA.neco.D0.A0 において、5' 側の下線部が、配列番号 18 (neco0584) の DNAzyme (図 4 (A) において D) であり、3' 側の下線部が、配列番号 5 の S A アプタマー (図 4 (A) において A) であり、両者間のポリ d T が介在配列 (図 4 (A) において I) である。

30

SA.EAD2.D0.A0 (配列番号 59)

5' - CTGGGAGGGAGGGAGGGATTTTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTTCGG - 3'

SA.neco.D0.A0 (配列番号 60)

5' - GGGTGGGAGGGTCGGGTTTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTTCGG - 3'

40

【0077】

前記核酸素子 (I)、(II)、(II') および (III) において、各領域は、例えば、それぞれ、直接的な連結でも、間接的な連結でもよい。前記直接的な連結の場合、例えば、各領域がホスホジエステル結合により連結する。また、前記間接的な連結の場合、例えば、介在リンカーを介して、各領域が連結する。前記介在リンカーは、例えば、前述のようなヌクレオチドおよび／または非ヌクレオチドで構成される核酸分子があげられる。前記介在リンカーは、例えば、一本鎖が好ましい。

【0078】

本発明の核酸センサは、例えば、前記核酸素子のみからなるセンサでもよいし、さらに他の構成要素を含むセンサでもよい。本発明の核酸センサは、例えば、S A を検出するた

50

めのデバイスということもできる。前記他の構成要素は、例えば、前記核酸素子を配置する基材があげられる。前記基材は、例えば、基板、ビーズ、チューブ等の容器等があげられる。前記他の構成要素は、この他に、例えば、リンカーがあげられる。前記リンカーは、例えば、前記核酸素子を前記基材に固定化する際、前記核酸素子と前記基材との連結に使用できる。前記核酸センサの前記基材への配置は、例えば、後述する本発明の分析用デバイスを参照できる。

【0079】

前記核酸素子において、前記リンカーとの連結部位は、特に制限されず、例えば、前記核酸素子のいずれかの末端が好ましい。前記二本鎖の核酸素子（I）は、例えば、前記結合核酸分子（A）および前記触媒核酸分子（D）を有する前記第1鎖（ss1）のいずれかの末端、および／または、前記第2鎖（ss2）のいずれかの末端が好ましい。前記一本鎖の核酸素子（II）、（II'）および（III）は、例えば、いずれかの末端が好ましい。この場合、前記リンカーは、末端リンカーともいう。前記リンカーは、例えば、前述のようなヌクレオチドおよび／または非ヌクレオチドで構成される核酸分子があげられる。前記末端リンカーは、例えば、一本鎖が好ましい。

10

【0080】

本発明の核酸センサは、例えば、前記核酸素子を遊離状態で使用してもよいし、前記核酸素子を固定化した状態で使用してもよい。後者の場合、例えば、前記基材に固定化し、デバイスとして使用できる。

【0081】

20

本発明の核酸センサの使用方法は、特に制限されず、以下のように、本発明のSAの分析方法に使用できる。

【0082】

本発明の分析方法は、前述のように、SAの分析方法であり、前記本発明の核酸センサに、SAを含む試料を接触させる接触工程、および、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子（D）の触媒機能を検出することによって、前記試料中のSAを検出する検出工程を含むことを特徴とする。

【0083】

前記試料は、特に制限されない。前記試料は、例えば、SAを含む試料、SAを含有するか否かが不明な試料のいずれでもよい。前記試料は、例えば、液体試料が好ましい。

30

【0084】

本発明の核酸センサとして、前記核酸素子を遊離状態で使用する際は、例えば、チューブ等の容器内で、前記核酸素子と前記試料とを接触させることが好ましい。また、本発明の核酸センサとして、前記核酸素子を前記基材に配置した状態で使用する際は、例えば、前記基材上の前記核酸素子に、前記試料を接触させることができる。

【0085】

前記検出工程は、例えば、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能により生成されるシグナルを検出することが好ましい。前記シグナルは、例えば、光学的シグナルおよび電気化学的シグナル等があげられる。前記光学的シグナルは、例えば、発色シグナル、発光シグナル、蛍光シグナル等があげられる。

40

【0086】

前記シグナルは、例えば、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能により、基質から生成されることが好ましい。そこで、前記検出工程は、例えば、前記触媒核酸分子（D）の触媒機能に応じた基質の存在下で、行うことが好ましい。

【0087】

前記基質は、例えば、前記触媒機能によって、発色、発光もしくは蛍光の生成物を生成する基質、発色、発光もしくは蛍光の基質であり、且つ、前記触媒機能によって、発色、発光もしくは蛍光が消失する生成物を生成する基質、また、前記触媒機能によって、異なる発色、発光もしくは蛍光の生成物を生成する基質等があげられる。このような基質によれば、例えば、発色、発光もしくは蛍光の有無、または、発色、発光もしくは蛍光の変化

50

や強度等をシグナルとして、目視で確認することにより、前記触媒機能を検出できる。また、例えば、吸光度、反射率、蛍光強度等をシグナルとして、光学的な手法で測定することにより、前記触媒機能を検出することもできる。前記触媒機能は、例えば、前述のような酸化還元反応の触媒機能があげられる。

【0088】

また、前記触媒核酸分子(D)が、前記酸化還元反応の触媒機能を有する場合、例えば、電子の授受が可能な基質があげられる。この場合、前記触媒核酸分子(D)により、例えば、前記基質から生成物が生成され、その過程において、電子の授受が生じる。この電子授受は、例えば、電極への印加により、電気シグナルとして、電気化学的に検出できる。前記電気シグナルの検出は、例えば、電流等のような、前記電気シグナルの強度を測定

10

【0089】

前記基質は、特に制限されず、例えば、過酸化水素、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 (DAB 4HCl)、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。

20

【0090】

前記検出工程において、前記基質は、例えば、前記核酸センサに前記試料を接触させる前に、予め、前記核酸センサに供給してもよいし、前記試料の接触と同時または前記試料を接触させた後、前記核酸センサに供給してもよい。前記基質は、例えば、液体に混合した基質液として、前記核酸センサに供給することが好ましい。前記基質を混合する液体は、例えば、Tris-HCl等の緩衝液が好ましい。前記基質液における前記基質の濃度は、特に制限されず、例えば、0.1~5mmol/Lであり、好ましくは0.5~2mmol/Lである。また、前記基質液のpHは、例えば、6~9であり、好ましくは6.8~9である。

30

【0091】

前記検出工程において、前記触媒核酸分子(D)による反応条件は、特に制限されない。温度は、例えば、15~37℃であり、時間は、例えば、10~900秒である。

【0092】

また、前記検出工程において、前記基質の他に、例えば、ポルフィリンを共存させてもよい。公知のDNAzymeには、例えば、ポルフィリンと複合体を形成することによって、さらに高い酸化還元活性を示すものがある。そこで、本発明においても、例えば、ポルフィリンを共存させて、前記触媒核酸分子(D)とポルフィリンとの複合体として、酸化還元活性を検出してもよい。前記ポルフィリンの供給は、特に制限されず、前記基質と同様に行うことができる。

40

【0093】

前記ポルフィリンは、特に制限されず、例えば、無置換体のポルフィリン、その誘導体があげられる。前記誘導体は、例えば、置換体のポルフィリンおよび金属元素と錯体を形成した金属ポルフィリン等があげられる。前記置換体のポルフィリンは、例えば、N-メチルメソポルフィリン等があげられる。前記金属ポルフィリンは、例えば、三価鉄錯体であるヘミン等があげられる。前記ポルフィリンは、例えば、前記金属ポルフィリンが好ましく、より好ましくはヘミンである。

【0094】

50

本発明の核酸センサによれば、前述のようにS Aを検出できる。また、本発明の核酸センサによれば、例えば、ビオチンを間接的に検出でき、具体例としては、ビオチン化されたターゲットまたはビオチンの結合濃度等を間接的に検出できる。この場合、例えば、前記結合核酸分子として、ビオチンの結合部位に結合するS Aアプタマーを使用する。前記S Aアプタマーとビオチンは、それぞれS Aの同じ部位に結合するため、S Aにビオチンが結合すると、前記S Aアプタマーは結合できない。このため、ビオチン量が増加するに従って、前記S AアプタマーとS Aとの結合が阻害される。そこで、本発明の核酸センサと、S Aと、ビオチンまたはビオチン化ターゲットとを反応させ、前記本発明の核酸センサにおける前記触媒核酸分子の触媒機能を検出することで、ビオチンまたはビオチン化ターゲットの量を評価することが可能となる。

10

【0095】

(分析用デバイスおよびそれを用いた分析方法)

本発明の分析用デバイスは、S Aの分析用デバイスであり、基材、核酸センサおよび検出部を含み、前記基材に、前記核酸センサおよび前記検出部が配置され、前記核酸センサは、前記本発明の核酸センサであり、前記検出部は、前記核酸センサにおける前記触媒核酸分子(D)の触媒機能を検出する検出部であることを特徴とする。

【0096】

本発明の分析用デバイスは、前記本発明の核酸センサを使用することが特徴であって、その他の構成に関しては何ら制限されない。特に説明しない限り、本発明の分析用デバイスは、例えば、前記本発明の核酸センサの説明を援用できる。

20

【0097】

本発明の分析用デバイスにおいて、前記核酸センサの配置方法は、特に制限されず、例えば、前記核酸センサにおける前記核酸素子が、前記基材に固定化されてもよいし、固定化されていなくてもよい。前者の場合、前記核酸素子は、例えば、前記基材に、直接的に固定化されてもよいし、間接的に固定化されてもよい。前記固定化は、例えば、化学的結合による連結が例示できる。前記間接的な固定化は、例えば、前記核酸素子が、リンカーを介して、前記基材に固定化される形態があげられる。前記リンカーは、例えば、前述の末端リンカーがあげられる。前記核酸素子の配置に関しては、例えば、前記本発明の核酸センサにおける説明を援用できる。

【0098】

前記核酸素子の固定化は、この他に、例えば、公知の核酸固定化方法が採用できる。前記方法としては、例えば、フォトリソグラフィーを利用する方法があげられ、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としては、例えば、前記基材上で前記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。

30

【0099】

前記基材における前記核酸素子の配置部位は、特に制限されず、例えば、前記検出部に配置されている形態があげられる。

【0100】

本発明の分析用デバイスは、例えば、さらに、試薬部を有してもよい。前記試薬部は、例えば、前記検出部に配置してもよい。前記試薬部は、例えば、予め試薬が配置されてもよいし、使用時に試薬を供給してもよい。前記試薬としては、例えば、前述のような基質、前記ポルフィリン等があげられる。

40

【0101】

本発明の分析用デバイスにおいて、前記検出部は、前述のように、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能を検出する検出部である。前記検出部は、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能として、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能により生成されるシグナルを検出する検出部であることが好ましい。前記シグナルは、前述のように、例えば、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能による、基質からのシグナルがあげられる。前記シグナルは、例えば、

50

前述のような、光学的シグナルまたは電気化学的シグナルがあげられる。

【0102】

前記シグナルが光学的シグナルの場合、前記検出部は、例えば、光学的シグナルの検出部であり、吸光度、反射率、蛍光強度等の検出部が例示できる。

【0103】

前記シグナルが前記電気化学的シグナルの場合、前記検出部は、例えば、電極系を有する。この場合、前記検出部は、例えば、前記基材の表面に、前記電極系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、前記基材に、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。

10

【0104】

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、銀電極への塩化銀電極の積層により形成できる。

【0105】

本発明の分析用デバイスが、前記電極系を有する場合、前記核酸素子は、例えば、前記電極系に配置すること好ましく、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。本発明の分析用デバイスが、前記電極系と前記試薬部とを有する場合、例えば、前記電極系の上に、前記試薬部を配置することが好ましい。

20

【0106】

本発明の分析用デバイスは、例えば、複数の検出部を備えてもよい。この場合、前記分析用デバイスは、例えば、前記基材の表面をマトリックスに分画し、各分画領域に、前述のような検出部を備えることが好ましい。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センサの数は、特に制限されない。

【0107】

前記基材は、特に制限されない。前記基材は、例えば、表面が絶縁性の基板が好ましい。前記基材は、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材でもよい。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。

30

【0108】

本発明の分析方法は、前述のように、SAの分析方法であり、前記本発明の分析用デバイスに試料を接触させる接触工程、および、前記分析用デバイスの前記検出部において、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能を検出することによって、前記試料中のSAを検出する検出工程を含むことを特徴とする。

【0109】

本発明の分析方法は、前記本発明の核酸センサを備える前記分析用デバイスを使用することが特徴であって、その他の条件は、何ら制限されない。本発明の分析方法は、例えば、前記本発明の核酸センサにおける分析方法の説明を援用できる。

40

【0110】

(分析用試薬)

本発明の分析用試薬は、前記本発明の核酸センサを含むことを特徴とする。本発明の分析用試薬は、前記核酸センサを含むことが特徴であり、その他の構成は何ら制限されない。

【0111】

本発明の分析用試薬は、例えば、前記核酸センサの他に、例えば、前記基質、前記ポフ

50

ェリン、前記緩衝液、および／または前記基材等の構成成分を含んでもよい。

【0112】

また、本発明の分析用試薬は、例えば、分析用キットでもよい。この場合、例えば、前記核酸センサと、前述したその他の構成成分とを含み、それぞれ別個に収容されてもよい。前記分析用キットは、例えば、さらに、使用説明書を含んでもよい。

【実施例】

【0113】

(実施例1)

結合核酸分子(A)としてSAアプタマー、触媒核酸分子(D)としてEAD2とを備える一本鎖の前記核酸素子(III)を作製し、核酸センサとしての性能を確認した。

10

【0114】

前記核酸素子として、下記配列のDNAを合成した(図4(A)参照)。前記配列において、5'側の下線部が、配列番号11のEAD2(D)であり、3'側の下線部が、配列番号5のSAアプタマー(A)であり、両者間のポリdTが介在配列(I)とした。

SA.EAD2.D0.A0 (配列番号59)

5'-CTGGGAGGGAGGGAGGGATTTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

【0115】

エッペンドルフチューブに、所定濃度のSA(0、2、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)を含む下記組成の反応液100 μL を調製し、25 $^{\circ}\text{C}$ で5分反応させた後、反応液の発色を目視で確認した。また、反応開始から2分後の反応液について、吸光度の測定(波長415nm)を行った。基質は、ABTS(2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt))を使用した。

20

【0116】

(反応液の組成)

核酸センサ	2 $\mu\text{mol/L}$
基質	1 mmol/L
ヘミン	3 $\mu\text{mol/L}$
SA	所定濃度

【0117】

同時に、ポジティブコントロールとして、前記核酸センサに代えて、前記配列番号11のEAD2を使用した反応液(PC)についても、同様に反応を行った。また、ネガティブコントロール1として、前記核酸センサに代えて、前記配列番号5のSAアプタマーを使用した以外は、前述と同様にして、反応を行い(NC)、ネガティブコントロール2として、前記核酸センサを除いた反応液(W/O)についても、同様に反応を行った。

30

EAD2(配列番号11)

CTGGGAGGGAGGGAGGGA

SAアプタマー(配列番号5)

CCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG

【0118】

これらの結果を図5に示す。図5は、前記反応液の発色を示す結果である。図5(A)は、反応液の着色を示す写真であって、色が黒い程、青色への発色が強いことを示す。また、図5(B)は、SA濃度が0 $\mu\text{mol/L}$ と10 $\mu\text{mol/L}$ の反応液に関する吸光度を示すグラフである。

40

【0119】

図5(A)に示すように、実施例の核酸センサを使用した結果、SA濃度の増加に伴って、発色が強くなっていることから、反応液の着色がSA濃度に依存していることがわかった。このため、実施例の核酸センサによれば、目視によって、SAの有無および濃度を判断することが可能であると言える。

【0120】

また、図5(B)に示すように、実施例の核酸センサを使用した結果、SA濃度の増加

50

によって、吸光度の増加が確認された。この結果から、実施例の核酸センサによれば、吸光度測定によって、S Aの有無および濃度を測定可能であると言える。

【0121】

(実施例2)

結合核酸分子(A)としてS Aアプタマー、触媒核酸分子(D)としてD N A z y m eとを備える一本鎖の前記核酸素子(II)を作製し、核酸センサとしての性能を確認した。

【0122】

前記核酸素子として、下記配列のD N Aを合成した(図2(B)参照)。前記配列において、5'側から、小文字配列が前記ステム形成配列(S_A)、大文字のポリdTが、前記ループ形成配列(L₂)、下線部が、配列番号18(neco0584)のD N A z y m e(D)、小文字配列が、前記ステム形成配列(S_D)、大文字のポリdTが、前記ループ形成配列(L₁)、下線部が、配列番号5のS Aアプタマー(A)とした。

【0123】

SA.neco.D3A2 (配列番号46)

5'-ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D3A3 (配列番号47)

5'-cggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D3A4 (配列番号48)

5'-tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D3A5 (配列番号49)

5'-gtcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcccTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A2 (配列番号50)

5'-ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGaccctTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D4A4 (配列番号52)

5'-tcggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGaccctTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D5A2 (配列番号54)

5'-ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGcaccctTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

SA.neco.D6A2 (配列番号58)

5'-ggTTTGGGTGGGAGGGTCGGGccaccctTTTCCGACGCACCGATCGCAGGTTCGG-3'

【0124】

エッペンドルフチューブに、下記組成の反応液 100 μLを調製し、25℃で60秒反応させた後、前記反応液について、吸光度の測定(波長415 nm)を行った。測定は、吸光度測定装置(商品名T E C A N i n f i n i t e、T E C A N 社)を使用した。前記反応液において、前記D N A z y m eバッファの組成は、50 mmol/L T r i s-H C l (pH 7.4)、20 mmol/L K C l、0.05% T r i t o n X-100とした。基質は、A B T S (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt)を使用した。

【0125】

(反応液の組成)

1 μmol/L	核酸センサ
3 μmol/L	ヘミン
1 μmol/L	S A
1 mmol/L	基質
0.5 mmol/L	H ₂ O ₂
1 x	D N A z y m e バッファー

【0126】

同時に、ポジティブコントロールとして、前記核酸センサに代えて、配列番号18(neco0584)のD N A z y m eを使用した。また、ネガティブコントロールとして、核酸センサを除いた反応液(W/O)についても、同様に反応を行った。

neco0584 (配列番号18)

GGGTGGGAGGGTCGGG

【0127】

これらの結果を図6に示す。図6は、前記反応液の吸光度を示すグラフである。図6に示すように、実施例の核酸センサを使用した結果、 $1\ \mu\text{mol/L}$ のSAを含む反応液の吸光度は、SA無添加の反応液の吸光度に対して、有意差を示した。この結果から、実施例の核酸センサによれば、吸光度測定によって、SAの有無および濃度を測定可能であると言え、具体的には $1\ \mu\text{mol/L}$ のSAであっても検出可能であると言える。

【0128】

(実施例3)

結合核酸分子(A)としてSAアプタマー、触媒核酸分子(D)としてDNAzymeとを備える二本鎖の前記核酸素子(I)を作製し、核酸センサとしての性能を確認した。

10

【0129】

前記第1鎖(ss1)として、下記配列のDNAを合成した(図1(A)参照)。下記配列において、5'側の下線部が、配列番号5のSAアプタマー(A)、ポリdTが、前記ループ形成配列(L1)、3'側の下線部が、配列番号18(neco0584)のDNAzyme(D)とした。

SA.neco.D3A2 (配列番号32)

5'-CCGACGCACCGATCGCAGGTTTCGGTTTTTTTTGGGTGGGAGGGTCGGG-3'

【0130】

つぎに、前記第1鎖(ss1)に対する第2鎖(ss2)として、下記配列のDNAを合成した(図1(A)参照)。下記配列において、5'側の下線部が、前記第1鎖(ss1)のDNAzymeの5'側領域と相補な前記ステム形成配列(S_D)であり、ポリdTが、前記ループ形成配列(L2)であり、3'側の下線部が、前記第1鎖(ss1)のSAアプタマーの3'側領域と相補な前記ステム形成配列(S_A)とした。

20

SA.neco.D8.A5 (配列番号45)

5'-TCCCACCCTTTTTTTTCCGAA-3'

【0131】

エッペンドルフチューブに、下記組成の反応液100 μL を調製し、25℃で60秒反応させた後、前記反応液について、吸光度の測定(波長415nm)を行った。測定は、吸光度測定装置(商品名TECAN infinite、TECAN社)を使用した。前記反応液において、DNAzymeバッファの組成は、50mmol/L Tris-HCl(pH7.4)、20mmol/L KCl、150mmol/L、0.05% Triton X-100とした。基質は、ABTSを使用した。

30

【0132】

(反応液の組成)

1 $\mu\text{mol/L}$	第1鎖(ss1)
2 $\mu\text{mol/L}$	第2鎖(ss2)
3 $\mu\text{mol/L}$	ヘミン
1 $\mu\text{mol/L}$	SA
50mmol/L	DNAzymeバッファ
1mmol/L	基質
0.5mmol/L	H ₂ O ₂

40

【0133】

同時に、ポジティブコントロール(PC)として、前記核酸センサに代えて、配列番号18(neco0584)のDNAzymeを使用した反応液についても、同様に反応を行った。また、ネガティブコントロール(NC)として、核酸センサを除いた反応液についても、同様に反応を行った。また、前記第2鎖(ss2)を未添加とし、前記第1鎖(ss1)のみを添加した反応液についても、同様に反応を行った。

neco0584 (配列番号18)

GGGTGGGAGGGTCGGG

50

【0134】

これらの結果を図7に示す。図7は、前記反応液の吸光度を示すグラフである。図7に示すように、実施例の核酸センサを使用した結果、 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ のSAを含む反応液の吸光度は、SA無添加の反応液の吸光度に対して、有意差を示した。この結果から、実施例の核酸センサによれば、吸光度測定によって、SAの有無および濃度を測定可能であると言え、具体的には $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ のSAであっても検出可能であると言える。

【0135】

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、本願発明の範囲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。

10

【0136】

この出願は、2012年3月23日出願された日本出願特願2012-067947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。

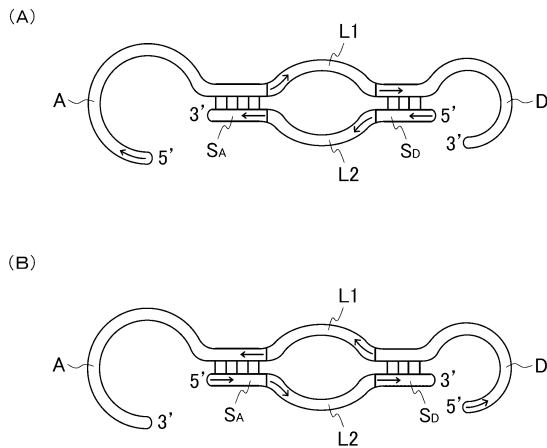
【産業上の利用可能性】

【0137】

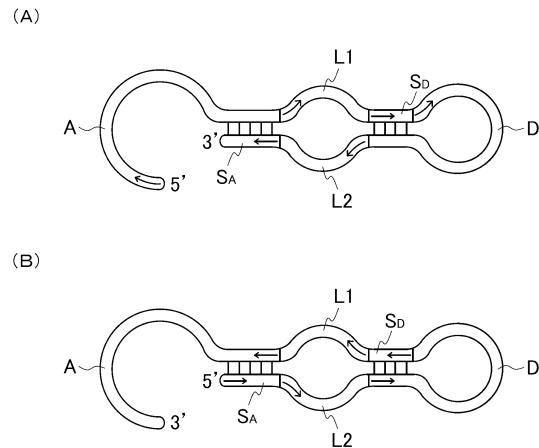
本発明によれば、前記結合核酸分子(A)とSAとが結合したか否かによって、前記触媒核酸分子(D)の触媒機能のON-OFFをスイッチできる。このため、前記触媒核酸分子の触媒機能を検出することで、SAの有無または量を、容易に検出可能である。また、本発明の分析用デバイスは、前述のように、前記核酸センサを使用することから、例えば、デバイスの小型化およびチップ化等も可能であり、多数の検体でも簡便な分析が可能となる。このため、本発明は、例えば、臨床医療、食品、環境等の様々な分野における研究および検査に、極めて有用な技術といえる。

20

【図1】

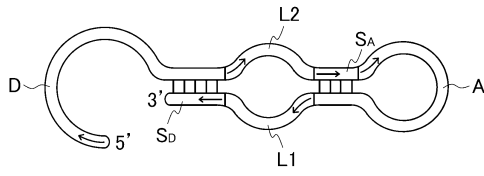


【図2】

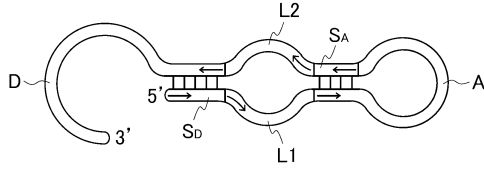


【図 3】

(A)

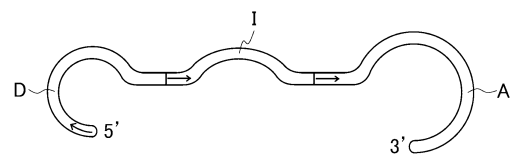


(B)

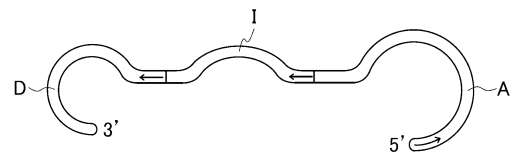


【図 4】

(A)

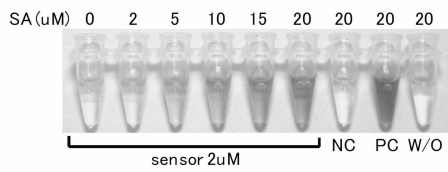


(B)

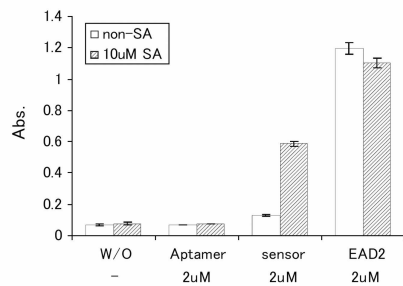


【図 5】

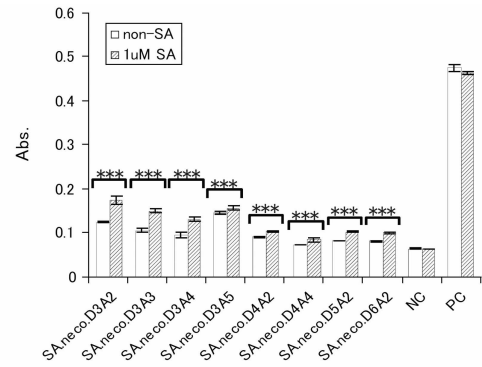
(A)



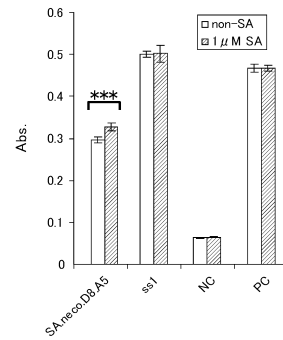
(B)



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006183917000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N 33/566

(72)発明者 秋富 穰
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者 加藤 信太郎
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内
(72)発明者 和賀 巖
東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 山本 匡子

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第2011/016565 (WO, A1)
国際公開第2012/002541 (WO, A1)
国際公開第2009/063969 (WO, A1)
国際公開第02/74978 (WO, A2)
国際公開第2005/106035 (WO, A1)
特開2009-296948 (JP, A)
特表2011-503176 (JP, A)
特表2002-508191 (JP, A)
特開2011-155913 (JP, A)
特開2010-130933 (JP, A)
Anal Chem, 2009, Vol. 81, pp. 9114-9119.
Angew Chem Int Ed, 2009, Vol. 48, pp. 3512-3515.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-90
Pubmed