



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116171319 A

(43) 申请公布日 2023.05.26

(21) 申请号 202180051930.8

(22) 申请日 2021.07.30

(30) 优先权数据

2020-145840 2020.08.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/028455 2021.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/044702 JA 2022.03.03

(71) 申请人 横河电机株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 宫内祐树 蓼沼崇 田口朋之

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

专利代理师 李成必 李雪春

(51) Int.Cl.

G12M 1/00 (2006.01)

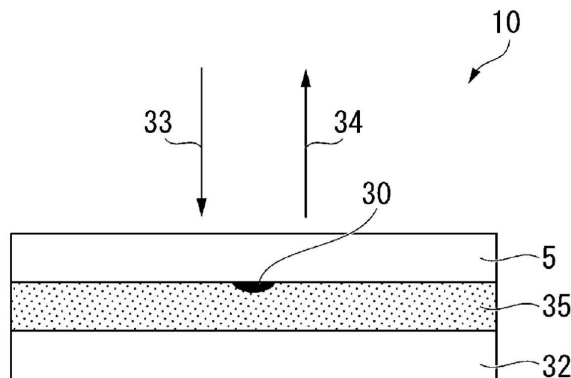
权利要求书2页 说明书15页 附图5页

(54) 发明名称

靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置及靶标检测用试剂盒

(57) 摘要

本发明提供靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒,检测样本中包含的靶标的靶标检测方法,在设置有用荧光分子修饰的由所述靶标与特异性地结合于所述靶标的捕捉分子结合而得到的结合物的基板的固相面与包含吸收激发所述荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质的溶液接触的状态下,从所述基板的与所述固相面相反的一侧检测从所述基板的与所述固相面相反的一侧照射所述激发光而得到的荧光。



1. 一种靶标检测方法,检测样本中包含的靶标,其特征在于,
在设置有用荧光分子修饰的由所述靶标与特异性地结合于所述靶标的捕捉分子结合而得到的结合物的基板的固相面与包含吸收激发所述荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质的溶液接触的状态下,从所述基板的与所述固相面相反的一侧检测从所述基板的与所述固相面相反的一侧照射所述激发光而得到的荧光。
2. 根据权利要求1所述的靶标检测方法,其特征在于,
用所述荧光分子修饰所述靶标,
使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物。
3. 根据权利要求1所述的靶标检测方法,其特征在于,
用所述荧光分子修饰所述捕捉分子,
使所述捕捉分子与固定化在所述固相面的所述靶标结合而得到所述结合物。
4. 根据权利要求1所述的靶标检测方法,其特征在于,
用所述荧光分子修饰所述捕捉分子,
使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物。
5. 根据权利要求1所述的靶标检测方法,其特征在于,
向固定化在所述固相面的所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方供给所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述荧光分子而得到所述结合物。
6. 根据权利要求1~5中任意一项所述的靶标检测方法,其特征在于,
所述靶标是具有特定的核酸序列的核酸,
所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针,
使所述靶标与所述检测探针进行杂交反应而得到所述结合物。
7. 一种靶标检测用器件,在检测样本中包含的靶标时使用所述靶标检测用器件,
所述靶标检测用器件的特征在于具备:
基板,所述靶标以及与所述靶标特异性地结合的捕捉分子的任意一方固定化在固相面;以及
容器,吸收激发修饰所述靶标与所述捕捉分子的结合物的荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质添加在所述容器,所述容器能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述吸光物质的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持。
8. 根据权利要求7所述的靶标检测用器件,其特征在于,
所述捕捉分子固定化在所述固相面,
向所述容器供给包含用所述荧光分子修饰的所述靶标的溶液。
9. 根据权利要求7所述的靶标检测用器件,其特征在于,
所述靶标固定化在所述固相面,
向所述容器供给包含用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子的溶液。
10. 根据权利要求7所述的靶标检测用器件,其特征在于,
用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子固定化在所述固相面,
向所述容器供给包含所述靶标的溶液。
11. 根据权利要求7所述的靶标检测用器件,其特征在于,

所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在所述固相面，

向所述容器供给包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方、以及结合于所述靶标与所述捕捉分子的结合体的所述荧光分子的溶液。

12. 根据权利要求7~11中任意一项所述的靶标检测用器件，其特征在于，

所述靶标是具有特定的核酸序列的靶标，

所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针。

13. 一种靶标检测装置，其特征在于具备：

如权利要求7~12中任意一项所述的靶标检测用器件；以及

荧光读取装置，测定来自所述靶标检测用器件的荧光量。

14. 一种靶标检测用试剂盒，在检测样本中包含的靶标时使用所述靶标检测用试剂盒，

所述靶标检测用试剂盒的特征在于包括：

基板，所述靶标以及与所述靶标特异性地结合的捕捉分子的任意一方固定化在固相面；

容器，能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持；以及

吸光物质，吸收激发修饰所述靶标与所述捕捉分子的结合物的荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光。

15. 根据权利要求14所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

所述吸光物质预先添加在所述容器中。

16. 根据权利要求14或15所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

所述捕捉分子固定化在所述固相面，

包含用所述荧光分子修饰的所述靶标以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

17. 根据权利要求14或15所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

所述靶标固定化在所述固相面，

包含用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

18. 根据权利要求14或15所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子固定化在所述固相面，

包含所述靶标以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

19. 根据权利要求14或15所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在所述固相面，

包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方、结合于所述靶标与所述捕捉分子的结合体的所述荧光分子、以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

20. 根据权利要求14~19中任意一项所述的靶标检测用试剂盒，其特征在于，

所述靶标是具有特定的核酸序列的靶标，

所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针。

靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置及靶标检测用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及靶标检测方法、靶标检测用器件(device)、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒。

背景技术

[0002] 作为对样本中包含的具有特定的核酸序列的靶标(target)进行检测的方法,广为人知的有使用DNA微阵列(具有特定的核酸序列的互补序列的检测探针设置在基板等的固相面上)的方法。该方法是利用通过杂交反应将添加到DNA微阵列的样本中包含的靶标捕集到DNA微阵列的检测探针的性质来检测靶标的方法。在该方法中,除了能够检测样本中是否包含靶标,还能够检测样本中包含的靶标的量。在以下的非专利文献1、2以及专利文献1中公开了使用DNA微阵列来检测靶标的以往的检测方法。

[0003] 现有技术文献

[0004] 非专利文献

[0005] 非专利文献1:平山幸一ら,UGT1A1の遺伝子多型を判別するDNAチップキットの開発,東洋鋼鉄Vol.38,51-56

[0006] 非专利文献2:Vivian G.C.,et al.Making and reading microarrays,Nature genetics supplement 21,15-19(1999)

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利公开公报特开2015-43702号

[0009] 但是,上述非专利文献1、2的核酸序列检测方法需要用于除去未被捕集到的靶标的清洗操作,因此存在由于进行该清洗操作而存在检测精度恶化的可能性这样的问题。另外,上述专利文献1的核酸序列检测方法虽然不需要上述非专利文献1、2那样的清洗操作,但是存在从供给到DNA微阵列的样本的溶液发出的偏移光(offset light)成为噪声而使检测精度恶化这样的问题。

发明内容

[0010] 本发明是鉴于上述情况而做出的发明,本发明的目的在于提供能够比以往提高样本中包含的靶标的检测精度的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒。

[0011] 为了达成上述的目的,本发明采用了以下的构成。

[0012] [1]一种靶标检测方法,检测样本中包含的靶标,在设置有用荧光分子修饰的由所述靶标与特异性地结合于所述靶标的捕捉分子结合而得到的结合物的基板的固相面与包含吸收激发所述荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质的溶液接触的状态下,从所述基板的与所述固相面相反的一侧检测从所述基板的与所述固相面相反的一侧照射所述激发光而得到的荧光。

[0013] [2]根据[1]所述的靶标检测方法,用所述荧光分子修饰所述靶标,使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物。

[0014] [3]根据[1]所述的靶标检测方法,用所述荧光分子修饰所述捕捉分子,使所述捕捉分子与固定化在所述固相面的所述靶标结合而得到所述结合物。

[0015] [4]根据[1]所述的靶标检测方法,用所述荧光分子修饰所述捕捉分子,使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物。

[0016] [5]根据[1]所述的靶标检测方法,对固定化在所述固相面的所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方供给所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述荧光分子而得到所述结合物。

[0017] [6]根据[1]~[5]中任意一项所述的靶标检测方法,所述靶标是具有特定的核酸序列的核酸,所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针,使所述靶标与所述检测探针进行杂交反应而得到所述结合物。

[0018] [7]一种靶标检测用器件,在检测样本中包含的靶标时使用所述靶标检测用器件,所述靶标检测用器件具备:基板,所述靶标以及与所述靶标特异性地结合的捕捉分子的任意一方固定化在固相面;以及容器,吸收激发修饰所述靶标与所述捕捉分子的结合物的荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质添加在所述容器,所述容器能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述吸光物质的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持。

[0019] [8]根据[7]所述的靶标检测用器件,所述捕捉分子固定化在所述固相面,向所述容器供给包含用所述荧光分子修饰的所述靶标的溶液。

[0020] [9]根据[7]所述的靶标检测用器件,所述靶标固定化在所述固相面,向所述容器供给包含用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子的溶液。

[0021] [10]根据[7]所述的靶标检测用器件,用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子固定化在所述固相面,向所述容器供给包含所述靶标的溶液。

[0022] [11]根据[7]所述的靶标检测用器件,所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在所述固相面,向所述容器供给包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方、以及结合于所述靶标与所述捕捉分子的结合体的所述荧光分子的溶液。

[0023] [12]根据[7]~[11]中任意一项所述的靶标检测用器件,所述靶标是具有特定的核酸序列的靶标,所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针。

[0024] [13]一种靶标检测装置,其具备:[7]~[12]中任意一项所述的靶标检测用器件;以及荧光读取装置,测定来自所述靶标检测用器件的荧光量。

[0025] [14]一种靶标检测用试剂盒,在检测样本中包含的靶标时使用所述靶标检测用试剂盒,所述靶标检测用试剂盒包括:基板,所述靶标以及与所述靶标特异性地结合的捕捉分子的任意一方固定化在固相面;容器,能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持;以及吸光物质,吸收激发修饰所述靶标与所述捕捉分子的结合物的荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光。

[0026] [15]根据[14]所述的靶标检测用试剂盒,所述吸光物质预先添加在所述容器中。

[0027] [16]根据[14]或[15]所述的靶标检测用试剂盒,所述捕捉分子固定化在所述固相面,包含用所述荧光分子修饰的所述靶标以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

[0028] [17]根据[14]或[15]所述的靶标检测用试剂盒,所述靶标固定化在所述固相面,包含用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

[0029] [18]根据[14]或[15]所述的靶标检测用试剂盒,用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子固定化在所述固相面,包含所述靶标以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

[0030] [19]根据[14]或[15]所述的靶标检测用试剂盒,所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在所述固相面,包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方、结合于所述靶标与所述捕捉分子的结合体的所述荧光分子、以及所述吸光物质的溶液保持在所述容器中。

[0031] [20]根据[14]~[19]中任意一项所述的靶标检测用试剂盒,所述靶标是具有特定的核酸序列的靶标,所述捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针。

[0032] 按照本发明的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒,具有能够比以往提高样本中包含的靶标的检测精度这样的效果。

附图说明

[0033] 图1是表示用荧光分子修饰靶标、将DNA探针固定化在基板的固相面、使用荧光分子修饰的靶标与固定化在固相面的DNA探针结合的方法的图。

[0034] 图2是表示用荧光分子修饰DNA探针、将靶标固定化在基板的固相面、使用荧光分子修饰的DNA探针与固定化在固相面的靶标结合的方法的图。

[0035] 图3是表示将用荧光分子修饰的DNA探针(供体荧光探针)以及与DNA探针特异性地结合的消光分子(消光探针)固定化在基板的固相面、使靶标与供体荧光探针结合的方法的图。

[0036] 图4是表示本发明的靶标检测用器件的构成的一个例子的图。

[0037] 图5是表示使用本发明的靶标检测用器件检测靶标的操作步骤的一个例子的流程图。

[0038] 图6是表示本发明的靶标检测装置的构成的一个例子的图。

[0039] 图7是表示实施例1的添加了吸光物质的情况与未添加吸光物质的情况下的溶液中的荧光分子的浓度与背景光的光量的关系的图。

[0040] 图8是表示实施例1的添加了吸光物质的情况与未添加吸光物质的情况下的将用荧光分子修饰的合成DNA固定化在基板上的斑点(spot)的荧光读取装置中的斑点图像的图。

[0041] 图9是表示实施例1的Cy3(注册商标)分子浓度为30nM时的斑点光量与背景光的关系的图。

[0042] 图10是表示实施例2的添加了吸光物质的情况与未添加吸光物质的情况下的斑点光量与背景光的关系的图。

具体实施方式

[0043] 以下,参照附图对基于本发明的实施方式的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒详细地进行说明。在以下,首先对本发明的实施方式的概要进行说明,接着对本发明的实施方式的详细进行说明。

[0044] [概要]

[0045] 本发明的实施方式能够比以往提高样本中包含的靶标的检测精度。上述的非专利文献1中公开的方法将使用荧光修饰引物对DNA样本进行PCR而得到的荧光修饰后的PCR产物添加到DNA微阵列进行杂交反应,由此检测样本中的靶标。上述的非专利文献2中公开的方法使将靶标固定化在微阵列而得到的固定化靶标与被荧光修饰了的荧光探针杂交反应,由此检测样本中的靶标。

[0046] 上述的专利文献1中公开的方法使用设置有作为检测探针的附加有荧光分子的荧光探针以及附加有对荧光分子的荧光进行消光的消光分子的消光探针的核酸序列检测器件(DNA微阵列)检测靶标。在该方法中,能够不进行相对于靶标的荧光分子的附加以及DNA微阵列的清洗(用于除去未被捕集的靶标等的清洗)地检测靶标。在该方法中,在使用DNA微阵列检测特定的核酸的有无以及特定的核酸的量的核酸序列检测器件中,在不存在靶标时,彼此独立的供体荧光探针以及消光探针通过结合部维持结合、通过消光分子使荧光分子的荧光消光。在供给了靶标的情况下,靶标与检测部结合,通过结合部的供体荧光探针与消光探针的结合消除,消光分子从供体荧光分子离开,由此供体荧光分子呈现荧光。通过使用该核酸序列检测器件,能够检测样本中包含的靶标。

[0047] 但是,在上述的非专利文献1的核酸序列检测方法中,需要进行用于除去未被捕集的靶标的清洗操作,由于清洗操作,所以存在反应了的靶标剥离、靶标的定量性降低、检测下限恶化的可能性。非专利文献2的核酸序列检测方法也同样需要进行用于除去未被捕集的探针的清洗操作,由于清洗操作,所以存在反应了的探针剥离、靶标的定量性降低、检测下限恶化的可能性。

[0048] 另外,在非专利文献1以及非专利文献2的核酸序列检测方法中,由于该方法所需要的清洗操作,所以存在样本混入在微阵列上相邻的孔之间从而无法正确地检测靶标的可能性。

[0049] 在上述的专利文献1中,能够不进行DNA微阵列的清洗(用于除去未被捕集的靶标等的清洗)地检测靶标。但是,作为靶标的制备从包括生物、微生物等的标本提取的核酸样本中大多包含来源于标本的蛋白质、糖类等残留分子。因此,核酸样本的溶液在取得荧光图像时发出荧光,成为背景光的光量变高的主要原因,从供给到核酸序列检测器件的样本的溶液发出偏移光。这样的偏移光成为噪声,因此使检测精度恶化。例如,在靶标仅有少量的情况下,当从供给到核酸序列检测器件的样本的溶液发出的荧光也成为微弱的荧光时,如果该微弱的荧光被偏移光埋没,则无法进行靶标的检测。

[0050] [实施方式]

[0051] 本实施方式的靶标检测方法在使设置有用荧光分子修饰的、靶标与和所述靶标特异性地结合的捕捉分子(以下也存在只称为“捕捉分子”的情况)的结合物的基板的固相面与包含吸收激发所述荧光分子的激发光或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质(以下也存在只称为“吸光物质”的情况)的溶液接触的状态下,从所述基板的与所述固相面相反的一侧检测从所述基板的与固相面相反的一侧照射激发所述荧光分子的激发光而得到的荧光。由此,能够比以往提高样本中包含的靶标的检测精度。另外,能够不需要DNA微阵列等的基板的清洗操作,从而能够消除基于清洗操作的定量性降低、检测下限的恶化的影响。另外,能够减少来源于标本的样本溶液的荧光,从而能够检测微弱光。

[0052] 在本实施方式的靶标检测方法中,是检测样本中包含的靶标的靶标检测方法,作为得到用荧光分子修饰的、所述靶标与和所述靶标特异性地结合的捕捉分子的结合物的方法,例如可以举出:用所述荧光分子修饰所述靶标、使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物的方法;用所述荧光分子修饰所述捕捉分子、使所述捕捉分子与固定化在所述固相面的所述靶标结合而得到所述结合物的方法;用所述荧光分子修饰所述捕捉分子、使所述靶标与固定化在固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物的方法;对固定化在所述固相面的所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方供给所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述荧光分子从而得到所述结合物的方法;等等。

[0053] 作为使所述靶标与固定化在所述固相面的用所述荧光分子修饰的所述捕捉分子结合而得到所述结合物的方法,例如可以举出如下的方法:将用荧光分子修饰的捕捉分子、以及用消光物质修饰的与所述捕捉分子特异性地结合的消光分子,以修饰所述捕捉分子的荧光分子被修饰所述消光分子的消光物质消光的方式固定化在固相面,在不存在靶标时,即使是用激发光激发荧光分子,也不产生荧光,在存在靶标时,使靶标与所述捕捉分子结合而得到结合物。如果靶标与所述捕捉分子结合,则修饰所述消光分子的消光物质从修饰所述捕捉分子的荧光分子离开,由此从固定化在固相面的所述捕捉分子产生荧光。

[0054] 作为对固定化在所述固相面的所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方供给所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述荧光分子从而得到所述结合物的方法,例如可以举出如下的方法:将具有特定的核酸序列的核酸以及具有与所述核酸的特定的核酸序列互补的核酸序列的核酸探针的任意一方固定化在所述固相面,向固相面供给所述核酸以及所述核酸探针的任意另一方、以及用荧光分子修饰的与所述核酸和所述核酸探针的结合体结合的嵌入剂,由此得到结合物。

[0055] 作为靶标,如果是成为样本中的检测的对象的靶标,则没有特别的限制,例如可以举出DNA、RNA等核酸、肽、蛋白质等。作为与靶标特异性地结合的捕捉分子,可以举出与核酸杂交的检测探针、与肽、蛋白质等抗原特异性地结合的抗体或抗体片段、与核酸特异性地结合的适配体等。作为所述抗体,可以使用多克隆抗体、单克隆抗体中的任意一种,但是优选的是单克隆抗体。作为抗体片段,例如可以举出 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 、这些的变体、包含抗体部分的融合蛋白质或融合肽等。另外,靶标也可以是抗体或抗体片段,捕捉分子也可以是与该抗体或抗体片段特异性地结合的肽、蛋白质等抗原。

[0056] 作为靶标与和所述靶标特异性地结合的捕捉分子的组合,例如可以举出:靶标是具有特定的核酸序列的核酸、捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针的组合;靶标是抗原、捕捉分子是与所述抗原特异性地结合的抗体或抗体片段的组合;等等。在靶标是具有特定的核酸序列的核酸、捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的检测探针的情况下,作为靶标的核酸通过杂交反应与作为捕捉分子的检测探针结合。

[0057] 图1中示出用所述荧光分子修饰所述靶标、使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物的方法的具体例。在图1中,靶标3是具有特定的核酸序列的DNA,该DNA用荧光分子4修饰,捕捉分子是具有与所述靶标3的特定的核酸序列互补的核酸序列亦即检测序列2的DNA探针1。所述DNA探针1通过接头21固定化在作为基板的DNA微阵列5。用荧光分子4修饰的靶标3通过杂交反应与固定化在DNA微阵列5的DNA探针1结合,

用激发光激发修饰了靶标3的荧光分子4,由此放射出荧光。

[0058] 图2中示出用所述荧光分子修饰所述捕捉分子、使所述捕捉分子与固定化在所述固相面的所述靶标结合而得到所述结合物的方法的具体例。在图2中,靶标3是具有特定的核酸序列的DNA,捕捉分子是具有与所述靶标3的特定的核酸序列互补的核酸序列亦即检测序列2的DNA探针1。DNA探针1用荧光分子4修饰,靶标3固定化在作为基板的DNA微阵列5。用荧光分子4修饰的DNA探针1通过杂交反应与固定化在DNA微阵列5的靶标3结合,用激发光激发修饰了DNA探针1的荧光分子4,由此放射出荧光。

[0059] 图3中示出用所述荧光分子修饰所述捕捉分子、使所述靶标与固定化在所述固相面的所述捕捉分子结合而得到所述结合物的方法的具体例。在图3中,靶标3是具有特定的核酸序列的DNA,捕捉分子是用荧光分子4修饰的具有与所述靶标3的特定的核酸序列互补的核酸序列亦即检测序列2的供体荧光探针6。供体荧光探针6通过接头21固定化在作为基板的DNA微阵列5,用消光物质8修饰的具有与供体荧光探针6的核酸序列互补的序列的消光探针7以在结合部22与供体荧光探针6杂交的方式固定化在作为基板的DNA微阵列5。在不存在靶标3时,成为荧光分子4被消光物质8消光的状态,即使用激发光激发荧光分子4,也不产生荧光。在存在靶标3时,靶标3通过杂交反应与用荧光分子4修饰的供体荧光探针6的检测序列2结合,所述消光探针7从供体荧光探针6离开,由此用激发光激发修饰了用荧光分子4修饰的供体荧光探针6的荧光分子4,从而放射出荧光。

[0060] 另外,在本发明中,互补是指一方的核酸序列具有能够与另一方的核酸序列形成双链状态的核酸序列,未必是完全互补的,也可以包括数个错配碱基对。

[0061] 作为在本发明中使用的荧光分子,只要是用特定的激发光激发而产生荧光的分子,则没有特别的限制,可以举出Alexa Fluor (注册商标) 系列、ATTO系列、Brilliant系列、Chromeo (注册商标) 系列、Bacteriochlorin系列、FAM、TAMRA、Cy色素系列、FITC、HiLyte Fluor (注册商标) 系列、Rhodamine系列、Tide Fluor (注册商标) 系列、iFluor (注册商标) 系列、DY色素系列等。

[0062] 作为在本发明中使用的基板,可以使用俯视时的形状形成为矩形形状的板状的石英、玻璃、硅、氟化钙以及蓝宝石等单结晶、陶瓷、以及树脂材料等。作为树脂材料,可以举出光学特性、化学以及热稳定性优异的COP (环烯烃聚合物)、COC (环状烯烃共聚物)、聚碳酸酯、丙烯酸系树脂、聚乙烯树脂等。另外,俯视基板时的形状也可以是任意的形状。在本发明中,从基板的与所述固相面相反的一侧检测从所述基板的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子的激发光而得到的荧光,因此在本发明中使用的基板优选的是使用激发所述荧光分子的激发光以及照射所述激发光而得到的荧光可透过的材料。

[0063] 接着,将所述靶标与所述捕捉分子结合的基板的固相面以使所述基板的固相面与包含所述吸光物质的溶液接触的方式保持。

[0064] 例如,在用荧光分子修饰样本溶液中的靶标、与所述靶标特异性地结合的捕捉分子固定化在基板的固相面的情况下,样本溶液中的用荧光分子修饰的靶标与固定化在所述基板的固相面的所述捕捉分子结合。将该荧光分子修饰的靶标与所述捕捉分子结合了的基板的固相面以使所述基板的固相面与包含所述吸光物质的溶液接触的方式保持。

[0065] 例如,在用荧光分子修饰与样本溶液中的靶标特异性地结合的捕捉分子、所述靶标固定化在基板的固相面的情况下,样本溶液中的用荧光分子修饰的所述捕捉分子与固定

化在基板的固相面的所述靶标结合。将该荧光分子修饰的捕捉分子与所述靶标结合了的基板的固相面以使所述基板的固相面与包含所述吸光物质的溶液接触的方式保持。

[0066] 作为将基板以使所述基板的固相面与包含所述吸光物质的溶液接触的方式保持的方法,可以举出:将基板以使所述基板的固相面与所述溶液接触的方式配置于保持有所述溶液的容器的方法;向与基板以使所述基板的固相面成为容器内部的方式一体地制作的容器中注入所述溶液以使基板的固相面与所述溶液接触的方法;等等。在向以使所述基板的固相面成为容器内部的方式一体地制作的容器中注入所述溶液以使所述基板的固相面与所述溶液接触的情况下,优选的是,注入所述溶液的容器具备注入所述溶液的注入口、以及在注入后能够密封注入口的结构。另外,可以是将吸光物质预先添加到容器中,在将包含靶标或捕捉分子的样本溶液注入容器时,所述吸光物质被添加到所述样本溶液,也可以是将所述吸光物质添加到包含靶标或捕捉分子的样本溶液之后注入到容器中。

[0067] 作为向样本溶液添加吸光物质的时机,只要是在向荧光分子照射激发光之前,则可以是任意的阶段,例如,可以是制备样本溶液的阶段,也可以是靶标与捕捉分子在基板的固相面上结合前的阶段,另外还可以是靶标与捕捉分子在基板的固相面上结合后的阶段。

[0068] 用荧光分子修饰靶标或捕捉分子,将所述靶标与所述捕捉分子结合了的基板的固相面以使所述基板的固相面与包含吸收激发所述荧光分子的激发光的吸光物质的溶液接触的方式保持,由此在向溶液中照射了激发所述荧光分子的激发光时,溶液中包含的吸光物质吸收想要透过溶液的激发光,从而能够抑制激发光的透过。通过抑制激发光透过溶液,能够抑制在溶液中游离的荧光分子的激发,能够抑制来自溶液的荧光的产生,从而能够减少背景光。另外,在作为吸光物质使用了吸收从荧光分子发出的荧光的物质的情况下,即使溶液中的所述荧光物质被激发光激发而发出荧光,所述吸光物质通过吸收从溶液中发出的荧光,能够抑制来自溶液的荧光的产生,从而能够减少背景光。

[0069] 另外,在制备包含靶标的溶液时,存在从包括生物、微生物等的标本提取的样本溶液中包含的来源于标本的蛋白质、糖类等残留分子包含在包含靶标的溶液中的情况。即使在该情况下,吸光物质也能够抑制该残留分子的激发或荧光的产生,因此即使在应用于本来不需要清洗的靶标检测用器件的情况下,也能够减少从该残留物质产生的荧光引起的背景光,能够进一步提高检测灵敏度。

[0070] 作为吸光物质,只要具有吸收激发荧光分子的激发光、或从荧光分子发出的荧光的波长的光的光学特性,则没有特别的限制,虽然能够根据在本发明中使用的荧光分子产生的荧光的波长适当地选择,但能够使用用于涂料、墨水、化妆品、食品等的着色的颜料等。颜料有金、银等金属、氧化铁等氧化物、氮化物、有机聚合物等各种各样的粒子,可以根据物质材料本身的吸光特性、着色粒子、表面着色的吸光的光学特性进行选择并用作吸光物质。另外,金属纳米粒子由于与粒子表面的电子通过光的相互作用在特定的波长产生表面等离子体共振,产生光的强烈的消光,因此可以用作吸光物质。

[0071] 作为在本发明中使用的吸光物质的具体例,例如在作为荧光分子使用Cy3(注册商标)的情况下,可以举出氧化铁(Fe_2O_3 、 Fe_3O_4)、金纳米粒子、银纳米粒子、黑色着色二氧化硅粒子、苯乙烯与丙烯酸共聚物等聚合物黑色着色粒子等。另外,吸光物质可以为干燥状态,也可以为溶液状态。

[0072] 在吸光物质是吸收激发光的物质的情况下,优选的是使透过固相并入射到包含吸

光物质的溶液的激发光的散射变小的吸光物质。这是因为如果是使入射到包含吸光物质的溶液的激发光的散射变小的吸光物质,则能够进一步抑制透过溶液中的光由于在吸光物质产生的散射而使光路长变长,从而进一步抑制更多地激发溶液中的荧光分子而使荧光增加的现象。

[0073] 该现象是如下的现象:类似于用针对将入射光与透过物质后的透过光的比的对数表示为吸光度并且对与浓度和光路长成比例关系进行公式化得到的定律亦即朗伯-比尔定律加进散射的影响的修正的朗伯-比尔定律进行了公式化的现象,是在存在散射物质时无法得到与该物质的浓度和光轴方向的直线的光路长成比例的吸光度的增加的现象。光的物质引起的散射现象根据粒径而不同,在比波长足够大的物质的情况下,用几何光学近似表示,在波长程度的粒径的情况下,用米氏散射表示,在比波长足够小的粒径的情况下,用瑞利散射表示。在本发明中,由于吸光物质添加在溶液中并分散,所以认为产生米氏散射或瑞利散射。已知的是,米氏散射的全散射强度根据粒径而不同,与粒径的二次方~六次方成比例地变大。另外,已知的是,瑞利散射的全散射强度与粒径的六次方成比例地变大。根据上述的理由,在本发明中,吸光物质的粒径优选的是小的一方。

[0074] 在吸光物质是吸收荧光的物质的情况下,来自溶液与固相面的接触面附近的荧光分子的荧光比来自溶液内部的荧光分子的荧光更早地到达设置在基板的与固相面相反的一侧的检测器,因此优选的是在溶液与固相的接触面附近产生的荧光在溶液侧被散射而未到达检测器侧,被吸光物质吸收,所以优选的是荧光的散射变小的吸光物质。

[0075] 另外,由于吸光物质添加到溶液中,所以优选的是在荧光的检测期间稳定地分散,在溶液中不产生不均等。粒子的分散稳定性通过目视观察、透过光强度变化的测定、散射光强度变化的测定等各种各样的测定方法来测定。例如,根据用于通过离心分离机使物质离心沉降的离心分离条件的参数推定沉淀的难度,能够推定分散稳定性。对于聚合物粒子,当粒径小于800nm时,离心分离所需要的参数为 $10000 \times g$ 、20分钟,难以沉淀,分散性优异,是优选的。在吸光物质是二氧化硅粒子的情况下粒径为200nm以下、是氧化铁粒子的情况下粒径为100nm以下、是金纳米粒子的情况下粒径为15nm以下的粒子分散性优异,是优选的。

[0076] 另外,在本发明中,吸光物质由于添加到溶液中并分散,所以优选是亲水性的。在吸光物质为疏水性的情况下,优选通过表面的向亲水性的改性,导入羧基、磺基等表面官能团,用氧化物覆盖,用PEG、PEO、葡聚糖(dextran)等亲水性聚合物的化学修饰等进行亲水化。

[0077] 在使靶标与捕捉分子结合之前向溶液添加吸光物质的情况下,优选的是,添加的吸光物质不吸附靶标、捕捉分子。例如,通过用所述PEG等亲水性聚合物修饰吸光物质的粒子的表面,能够抑制吸光物质非特异性地吸附于靶标、捕捉分子。另外,通过向包含吸光物质的溶液添加抑制生物分子的非特异吸附的BSA等封闭剂(blocking agent),能够抑制吸光物质非特异性地吸附于靶标、捕捉分子。

[0078] 接着,从所述基板的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子的激发光,从所述基板的与固相面相反的一侧检测所得到的荧光。

[0079] 作为从所述基板的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子的激发光并检测所得到的荧光的方法,只要能够检测从荧光分子发出的荧光,则没有特别的限制,例如可以举出,通过使用相机,使从荧光分子产生的荧光图像结合在相机的检测元件上,由此进行检测

的方法等。

[0080] 作为激发光源,例如可以使用射出单波长的激光或其扩展光的激光光源、LED (Light Emitting Diode:发光二极管)、放出白色光的灯、由LED与波长滤波器的组合构成的光源等。

[0081] 在检测中使用的相机以彩色以及黑白CCD、CMOS相机为首,可以使用以高灵敏度为特征的EM-CCD、数字CMOS等。另外,也可以是与斑点1对1地配置的单一检测器亦即光电二极管等的组合。

[0082] 通过本发明的靶标检测方法得到的荧光图像,能够取得同一斑点的靶标与捕捉分子的结合前后的图像。因此,不受固相间、斑点间的光量的不均的影响。另外,能够根据结合前后的荧光图像,计算荧光变化量,计算结合了的分子数。荧光变化量的计算可以使用斑点全体的平均光量,也可以使用斑点图像的各像素的荧光变化量。

[0083] 接着,对本发明的靶标检测用器件进行说明。本发明的靶标检测用器件可以用于本发明的靶标检测方法。

[0084] 本发明的靶标检测用器件在检测样本中包含的靶标时使用,所述靶标检测用器件具备:基板,所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在固相面;以及容器,吸收激发修饰所述靶标与所述捕捉分子的结合物的荧光分子的激发光、或从所述荧光分子发出的荧光的吸光物质添加在所述容器,该容器能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及所述吸光物质的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持。

[0085] 作为本发明的靶标检测用器件,可以举出:捕捉分子固定化在基板的固相面、向容器供给包含用荧光分子修饰的靶标的溶液的靶标检测用器件;靶标固定化在基板的固相面、向容器供给包含用荧光分子修饰的捕捉分子的溶液的靶标检测用器件;用荧光分子修饰了的捕捉分子固定化在基板的固相面、向容器供给包含所述靶标的溶液的靶标检测用器件;以及靶标以及捕捉分子的任意一方固定化在基板的固相面、向容器供给包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方以及与所述靶标和所述捕捉分子的结合体结合的荧光分子的溶液的靶标检测用器件;等等。作为靶标以及捕捉分子,可以举出前述的靶标以及捕捉分子。

[0086] 图4是表示本发明的靶标检测用器件的构成的一个例子的图。在图4中,作为固相表示了固定化有DNA探针的DNA微阵列的例子。

[0087] 在本发明的靶标检测用器件中靶标或捕捉分子固定化在基板的固相面。在图4中,具有成为靶标的特定的核酸序列的互补序列的DNA探针1固定化在作为基板的DNA微阵列5。本实施方式的靶标检测用器件将能够保持吸光物质添加靶标溶液35的容器32以使所述吸光物质添加靶标溶液35与固定化有所述DNA探针1的DNA微阵列5的固相面接触的状态保持,所述吸光物质添加靶标溶液35包含用荧光分子4修饰靶标3得到的用荧光分子4修饰了的靶标3、以及吸收激发所述荧光分子4的激发光33或从所述荧光分子4发出的荧光34的吸光物质。

[0088] 接着,以图4所示的靶标检测用器件为基础对通过靶标检测用器件检测靶标3的原理以及操作步骤进行说明。图5是表示使用图4所示的靶标检测用器件检测靶标3的操作步骤的流程图。

[0089] 首先,在基板上将用荧光分子4修饰了的DNA探针1固定化在DNA斑点30(步骤S1)。

接着,用荧光分子4修饰样本中的靶标3,制备靶标溶液(步骤S2)。在制备靶标溶液时,可以进行具有特定的核酸序列的靶标3的扩增。作为确认样本中是否存在靶标3的时机,不限于在扩增结束后,也可以是在扩增期间。在进行靶标3的扩增的情况下,用荧光分子4对靶标3进行的修饰可以在确认到扩增之后进行,仅在确认到扩增的情况下,向后述的步骤S3前进。另外,作为确认靶标3的存在的方法,可以适当利用电泳、抗原抗体反应、质量分析、实时PCR等。

[0090] 接着,将制备出的靶标溶液供给到添加有吸光物质的容器亦即固定化有DNA探针1的DNA微阵列配置在容器内部的容器32,使靶标溶液与DNA微阵列5的固相面接触(步骤S3)。添加在容器32中的吸光物质在向容器32供给靶标溶液时,被添加到靶标溶液中,成为吸光物质添加靶标溶液35。

[0091] 在使吸光物质添加靶标溶液35与固定化有DNA探针1的DNA微阵列5的固相面接触后,让用荧光分子4修饰的靶标3与固定化在DNA微阵列5的DNA探针1进行杂交反应(步骤S4)。通过该杂交反应,靶标3与DNA探针1结合,修饰了靶标3的荧光分子4被捕捉到固定化有DNA探针1的DNA斑点30。

[0092] 杂交反应后,从DNA微阵列5的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子4的激发光33(步骤S5)。

[0093] 接着,从DNA微阵列5的与固相面相反的一侧检测从修饰与固定化在DNA微阵列5的DNA探针1结合了的靶标3的荧光分子4产生的荧光34(步骤S6)。例如,用荧光读取装置40取得从荧光分子4产生的荧光图像。接着,根据取得的荧光图像计算荧光量(步骤S7)。

[0094] 如果从作为基板的DNA微阵列5的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子4的激发光33,则从修饰了靶标3的荧光分子4放射出荧光。

[0095] 在吸光物质是吸收激发荧光分子4的激发光33的物质的情况下,用于激发荧光分子4的激发光33虽然照射到吸光物质添加靶标溶液35,但是由于在吸光物质添加靶标溶液35中包含吸收激发荧光分子4的激发光33的吸光物质,所以能够抑制在所述溶液35中游离的未与DNA探针1杂交的未反应的用荧光分子4修饰的靶标3的荧光分子4的激发。另外,在吸光物质是吸收从荧光分子4发出的荧光34的物质的情况下,用于激发荧光分子4的激发光33虽然照射到吸光物质添加靶标溶液35,但是由于在吸光物质添加靶标溶液35中包含吸收从荧光分子4发出的荧光34的吸光物质,所以能够抑制来自在所述溶液35中游离的未与DNA探针1杂交的未反应的用荧光分子4修饰的靶标3的荧光分子4的荧光的产生。由此,由于能够抑制所述溶液35呈现荧光,所以在不清洗固相而在包含靶标3的溶液存在的情况下就能够检测从与固相结合的靶标3产生的荧光。另外,也能够进行杂交反应中的实时测定。

[0096] 另外,通过本发明的靶标检测方法,能够根据杂交反应前后的荧光分子4的荧光变化量,计算杂交反应了的靶标3的分子数。例如,使用具有已知的分子数的靶标3的标准液进行杂交反应,测定反应前后的荧光分子4的荧光变化量,预先制作表示分子数与荧光变化量的关系的校正曲线(calibration curve)。根据该校正曲线以及使用了样本的杂交反应前后的荧光分子4的荧光变化量,能够计算杂交反应了的靶标3的分子数。为了测定杂交反应前后的荧光分子4的荧光变化量,在步骤S2或步骤S3中,向溶液中添加吸光物质。

[0097] 接着,对本发明的靶标检测方法涉及的靶标检测用器件的制造方法进行说明。

[0098] (1) 溶液制备

[0099] 首先,制备包含靶标或与靶标特异性地结合的捕捉分子的溶液,调整靶标或捕捉分子的浓度。例如,在靶标是具有特定的核酸序列的DNA且捕捉分子是具有靶标的特定的核酸序列的互补的序列的DNA探针的情况下,制备DNA探针溶液,调整DNA探针溶液的浓度。

[0100] (2)向固相面的固定

[0101] 将靶标或捕捉分子固定化在基板的固相面。例如,在将DNA探针固定化在固相面时,使用点样仪 (spotter) 等将DNA探针1点样到固相面上,将DNA探针1固定化在固相面。将固相面浸渍到封闭液(blocking solution)中,使未反应的活性官能团失活。

[0102] 可以把点样有靶标或捕捉分子的固相面上的区域划分成各个以预先规定的数量为单位的区块(block)。针对每个区块进行针对靶标检测用器件的靶标溶液的添加。另外,大多针对每个区块进行靶标检测用器件的图像取得。即,区块可以说成是图像取得区域。

[0103] (3)清洗

[0104] 接着,清洗固相面,除去未固定化的剩余的靶标或捕捉分子,也除去清洗液。通过以上的步骤制造出的基板直到使用为止适当地保存在遮光、温度、湿度条件等适合基板以及固定化在基板的靶标、捕捉分子的性质的环境下。

[0105] (4)基板向保持包含吸光物质的溶液的容器的配置

[0106] 将在(3)中得到的固定化有靶标或捕捉分子的基板,以使固定化有靶标或捕捉分子的固相面成为用于保持包含吸光物质的溶液的容器侧的方式,配置到所述容器。基板可以与容器一体化,也可以将基板与容器分开并在靶标的检测时将基板配置于容器。另外,在使基板与容器一体化了的情况下,优选的是具有能够将溶液注入容器的注入口以及在注入后能够密封注入口的结构。

[0107] (5)吸光物质向容器的添加

[0108] 向在(4)中制备出的容器添加吸光物质。吸光物质可以是干燥状态,也可以是液状。通过将吸光物质预先添加到容器中,在向容器供给包含用荧光分子修饰的靶标或捕捉分子的溶液时,能够将吸光物质添加到所述溶液。另外,吸光物质向容器的添加可以在将基板配置到容器之前进行,也可以在将基板配置到容器之后进行。当在将基板配置到容器之后进行吸光物质的添加的情况下,可以从设置在容器的注入口添加吸光物质。

[0109] 接着,对本发明的靶标检测装置进行说明。

[0110] 本发明的靶标检测装置具备本发明的靶标检测用器件、以及测定来自所述靶标检测用器件的荧光分子的荧光量的荧光读取装置。

[0111] 图6是表示本发明的靶标检测装置的构成图的一个例子。本实施方式的靶标检测装置为了取得靶标检测用器件10的靶标与捕捉分子结合前后的图像,在取得结合前的图像后,通过温度调节台(stage)使靶标检测用器件10的固相面的温度上升,使结合反应进行,在再次降低到常温的状态下取得结合后的图像。例如,在将DNA探针1固定化在基板的固相面的情况下,让用荧光分子4修饰的靶标3与DNA探针1进行杂交反应,取得杂交反应前后的图像。

[0112] 为了促进靶标与捕捉分子的结合,优选的是,温度调节台具有在靶标与捕捉分子的反应中利用振动或靶标检测用器件的转动、旋涡混合器等的搅拌功能。

[0113] 在荧光读取装置40的光学系统中,从激光光源41射出的激光通过反射镜45被分色镜44反射并照射靶标检测用器件的固相面。照射的光成为针对位于靶标检测用器件10的固

相面上的荧光分子4的激发光33,荧光分子4成为激发状态,荧光分子4放射出荧光34。

[0114] 从靶标检测用器件10的固相面放射出的荧光透过分色镜44通过成像光学系统43在CCD相机42的检测元件上形成荧光图像并被检测。在此,以防止激发光33漏入荧光34中为目的,也可以在激发光33侧设置与激发光波长一致的带通滤光片(bandpass filter),也可以在荧光34侧设置与想要检测的荧光波长一致的带通滤光片。

[0115] 通过本发明的靶标检测装置得到的荧光图像能够取得同一斑点的靶标与捕捉分子的结合前后的图像。因此,不受固相间、斑点间的光量不均的影响。另外,能够根据结合反应前后的荧光图像计算荧光变化量,能够计算结合反应了的分子数。荧光变化量的计算可以使用斑点全体的平均光量,也可以使用斑点图像的各像素的荧光变化量。

[0116] 本发明的靶标检测装置也可以具备控制CCD相机42的计算机、计算图像的光量的计算装置、以及保存图像以及光量等的记录装置。

[0117] 本发明的靶标检测装置不限于上述实施方式。本发明的靶标检测装置由于从与固相面上的检测斑点的固定化面相反的一侧的面检测荧光,所以可以使用荧光显微镜、共焦点显微镜、倏逝荧光检测装置、薄膜斜光照明显微镜、片照明显微镜、结构化照明显微镜、多光子激发显微镜等。

[0118] 接着,对本发明的靶标检测用试剂盒进行说明。本发明的靶标检测用试剂盒可以用于本发明的靶标检测方法。

[0119] 本发明的靶标检测用试剂盒在检测样本中包含的靶标时使用,所述靶标检测用试剂盒包括:基板,所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在固相面;容器,能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方的溶液以与所述基板的所述固相面接触的状态保持;以及吸光物质,吸收激发对所述靶标与所述捕捉分子的结合物进行修饰的荧光分子的激发光、或从所述荧光分子发出的荧光。

[0120] 吸光物质可以在制备包含靶标或捕捉分子的样本溶液时添加到样本溶液中。作为将吸光物质添加到样本溶液中的时机,如果在向荧光分子照射激发光之前,则可以是任意的阶段,例如可以是制备样本溶液的阶段,也可以是靶标与捕捉分子在固相上结合前的阶段,另外还可以是靶标与捕捉分子在固相上结合后的阶段。

[0121] 吸光物质可以预先添加到所述容器中。吸光物质可以是干燥状态,也可以是液状。通过预先将吸光物质添加到容器中,在将包含用荧光分子修饰的靶标或捕捉分子的溶液供给到容器时,能够将吸光物质添加到所述溶液。

[0122] 例如,可以是捕捉分子固定化在所述基板的固相面,所述容器是能够将包含用荧光分子修饰的靶标以及所述吸光物质的溶液以与所述基板的表面接触的状态保持的容器,也可以是靶标固定化在所述基板的固相面,所述容器是能够将包含用荧光分子修饰的捕捉分子以及所述吸光物质的溶液以与所述固相面接触的状态保持的容器。

[0123] 另外,也可以是用荧光分子修饰了的捕捉分子固定化在所述基板的固相面,所述容器是能够将包含所述靶标以及所述吸光物质的溶液以与所述固相面接触的状态保持的容器。

[0124] 另外,也可以是所述靶标以及所述捕捉分子的任意一方固定化在所述基板的固相面,所述容器是能够将包含所述靶标以及所述捕捉分子的任意另一方、与所述靶标和所述捕捉分子的结合体结合的荧光分子、以及所述吸光物质的溶液以与所述基板的固相面接触

的状态保持的容器。

[0125] 作为靶标以及捕捉分子,可以举出前述的靶标以及捕捉分子。作为本发明的靶标检测用试剂盒,例如可以举出作为靶标是具有特定的核酸序列的靶标、作为捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的DNA探针的试剂盒等。

[0126] 本发明的靶标检测用试剂盒可以包括本发明的靶标检测用器件。

[0127] 在本发明的靶标检测用试剂盒中,基板、吸光物质、容器可以举出前述的基板、吸光物质、容器。本发明的靶标检测用试剂盒也可以包括用于对靶标进行定量所需要的标准液、必要的缓冲液、产品说明书等。

[0128] 接着,以包括图4所示的靶标检测用器件的试剂盒为例对本发明的靶标检测用试剂盒的使用方法进行说明。对于该靶标检测用试剂盒,靶标是具有特定的核酸序列的DNA,捕捉分子是具有与所述特定的核酸序列互补的序列的DNA探针。所述DNA探针固定化在DNA微阵列的固相面,用荧光分子对靶标进行了修饰。

[0129] 本实施方式的靶标检测用试剂盒包括:DNA微阵列5,固定化有DNA探针1;以及容器32,能够保持吸光物质添加靶标溶液35,以使所述溶液35与固定化有所述DNA探针1的DNA微阵列5的固相面接触的状态保持所述溶液35,容器32中添加有吸光物质。

[0130] 首先,用荧光分子4修饰样本中的靶标3,制备靶标溶液。在制备靶标溶液时,也可以进行具有特定的核酸序列的靶标3的扩增。接着,向容器32供给靶标溶液,使靶标溶液与DNA微阵列5的固相表面接触。添加在容器32的吸光物质在将靶标溶液供给到容器32时,添加到靶标溶液中,成为吸光物质添加靶标溶液35。在使吸光物质添加靶标溶液35与固定化有DNA探针1的DNA微阵列5的固相面接触后,让用荧光分子4修饰的靶标3与固定化在DNA微阵列5的DNA探针1进行杂交反应。通过该杂交反应,靶标3与DNA探针1结合,修饰靶标3的荧光分子4被捕捉在固定化有DNA探针1的DNA斑点30。

[0131] 杂交反应后,从DNA微阵列5的与固相面相反的一侧照射激发荧光分子4的激发光33。

[0132] 接着,从DNA微阵列5的与固相面相反的一侧检测从荧光分子4产生的荧光34,所述荧光分子4修饰与固定化在DNA微阵列5的DNA探针1结合了的靶标3。例如,用荧光读取装置40取得从荧光分子4产生的荧光图像。而且,根据取得的荧光图像计算荧光量。

[0133] 本发明的应用范围不限于上述实施方式。本发明可以广泛地应用于检测样本中包含的靶标的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒。

[0134] 本发明的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒可以用于荧光分子光量检测中的干图像测定、生物芯片的荧光分子光量的液中观察、以及连续反应中的实时观察等。具体地说,例如可以用于基于基因、高分子分析的菌种辨别、癌症基因、动植物辨别、肠内细菌的检查等。

[0135] 另外,本发明的靶标检测方法、靶标检测用器件、靶标检测装置以及靶标检测用试剂盒也应用于在临床检查等中使用的标记抗体法等这样的固相法。例如,作为一个例子可以举出使用荧光物质对组织、细胞内的特定的染色体、基因的表达进行荧光测定的FISH法(荧光in situ杂交)。此外,也应用于将钨等荧光发光物质作为标记来测定抗原抗体反应的FIA法(荧光免疫测定法)、测定用荧光物质对成为抗原的病原体等进行标记的血清(抗体)反应的IFA法(间接荧光抗体法)。

[0136] 实施例

[0137] 以下,根据实施例对本发明进一步详细地进行说明,但是本发明不限于这些实施例。

[0138] (实施例1)

[0139] 确认了吸光物质添加产生的背景光的减少效果。在容器内,作为荧光分子4将Cy3(注册商标)分子调整为0.3~3000nM的浓度,对容器配置了透明玻璃基板。透过透明玻璃基板照射532nm的激发光33,取得了荧光图像。

[0140] 图7中表示了在容器中的溶液中添加了吸光物质的情况与未添加的情况下根据取得的荧光图像计算背景光的光量的结果。另外,表1中示出了改变荧光分子的浓度时的背景光比(未添加吸光物质时的背景光的光量/添加了吸光物质时的背景光的光量)。另外,吸光物质使用了用葡聚糖覆盖的氧化铁(Fe_2O_3)的粒径50nm的吸光物质,添加到溶液中成为50mg/ml。

[0141] [表1]

[0142] 溶液Cy3分子浓度	0	0.3	3	30	300	3000
背景光比(未添加/添加)	2.0	4.0	4.3	17	15	15

[0143] 如图7以及表1所示,根据Cy3分子浓度,背景光从1/4减少到1/17,在背景光高的情况下减少效果变高。但是,在从微生物提取了基因组DNA时,判明了溶液的荧光存在 $10\mu\text{W}/\text{m}^2$ 左右,并且根据在背景光为 $10\mu\text{W}/\text{m}^2$ 左右的溶液中也显现了效果,判明了对于通过激发由从样本带入的靶标3以外的分子等产生的溶液而产生的荧光也具有效果。另外,即使在不包含Cy3分子的水的状态下也能够将背景光减少到1/2,但是认为这是由于激发光33变得不透过溶液中,因此容器底面的反射、自发荧光降低,确认了附属的效果。

[0144] 另外,研究了减少背景光造成的斑点的外观的不同。图8是将Cy3分子修饰的合成DNA固定化在基板上后的斑点的Cy3分子浓度3~300nM的溶液中的荧光读取装置的曝光时间1秒的斑点图像。判明了:在Cy3分子浓度为30nM以上的情况下,能够使背景光减少到1/10以上,因此即使在溶液呈现的荧光高的状态下也能够进行斑点观察。

[0145] 图9中示出了Cy3分子浓度为30nM时的斑点光量与背景光的关系。根据斑点的光量与背景光的差,计算被斑点的DNA探针1捕捉的荧光分子4的荧光量,但是如图9所示,无论有没有添加吸光物质,光量都没有发生变化,检测信号并未根据添加吸光物质而降低。另外,如果将斑点光量与背景光的比设为S/N,则未添加吸光物质时的S/N为1.3,与此相对,添加了吸光物质时,S/N成为5.3,S/N提高到4.2倍。

[0146] (实施例2)

[0147] 制作了将多个荧光分子4非修饰的DNA探针1配置在基板上得到的DNA微阵列5,在基于修饰了Cy3分子的靶标DNA的杂交的斑点观察中,如以下所示地确认了吸光物质添加的应用性。

[0148] 在容器中以成为0.25nM的方式制备了用Cy3分子修饰的靶标DNA,此时在与实施例1相同的条件下添加吸光物质,配置了DNA微阵列5。在 60°C 、5rpm下进行了30分钟的孵化,使DNA探针1与靶标DNA进行了杂交反应。返回到常温后,通过荧光读取装置取得斑点的荧光图像,计算了光量。其结果在图10中示出。

[0149] 如图10所示,在添加了吸光物质的情况下,在溶液中游离的未反应的用Cy3分子修

饰的靶标的荧光减少,背景光成为1/3.7。此时,如果将斑点光量与背景光的比设为S/N,未添加吸光物质时的S/N为1.5,相对于此,添加了吸光物质时的S/N成为3.7,S/N提高到2.5倍。判明了:与未添加吸光物质时相比较,添加了吸光物质时的斑点光量与背景光的差并未引起光量降低,因此吸光物质没有阻碍DNA探针1与靶标3的杂交反应。

- [0150] 附图标记说明
- [0151] 1DNA探针
- [0152] 2检测序列
- [0153] 3靶标
- [0154] 4荧光分子
- [0155] 5DNA微阵列
- [0156] 6供体荧光探针
- [0157] 7消光探针
- [0158] 8消光物质
- [0159] 10靶标检测用器件
- [0160] 30DNA斑点
- [0161] 32容器
- [0162] 33激发光
- [0163] 34荧光
- [0164] 35吸光物质添加靶标溶液
- [0165] 40荧光读取装置
- [0166] 41激光光源
- [0167] 42CCD相机
- [0168] 43成像光学系统
- [0169] 44分色镜
- [0170] 45反射镜
- [0171] 46台

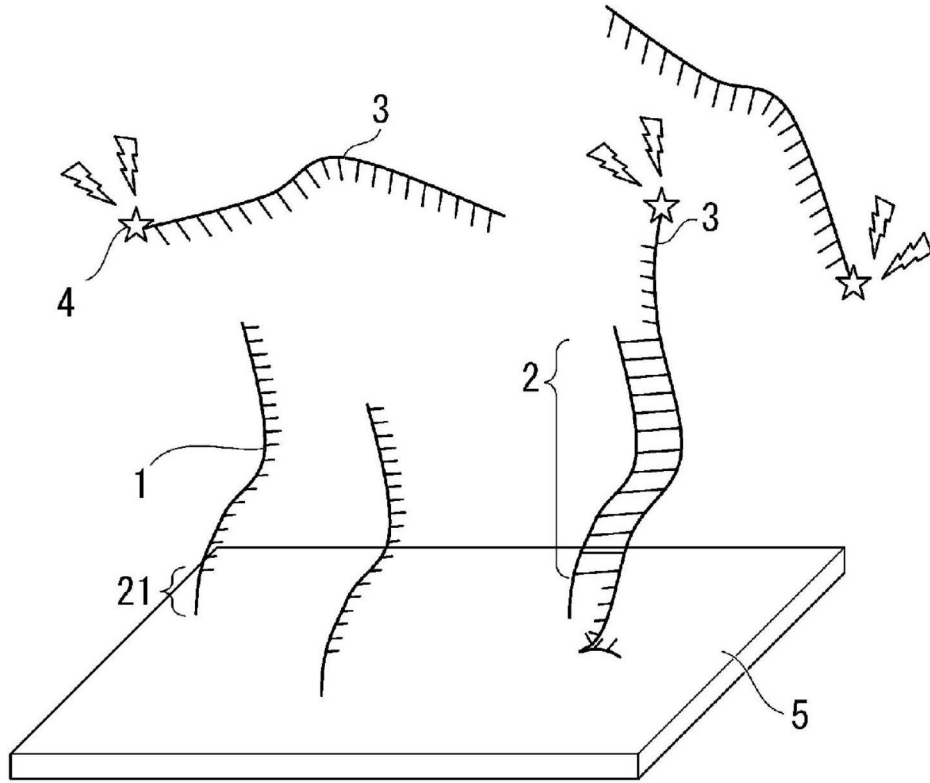


图1

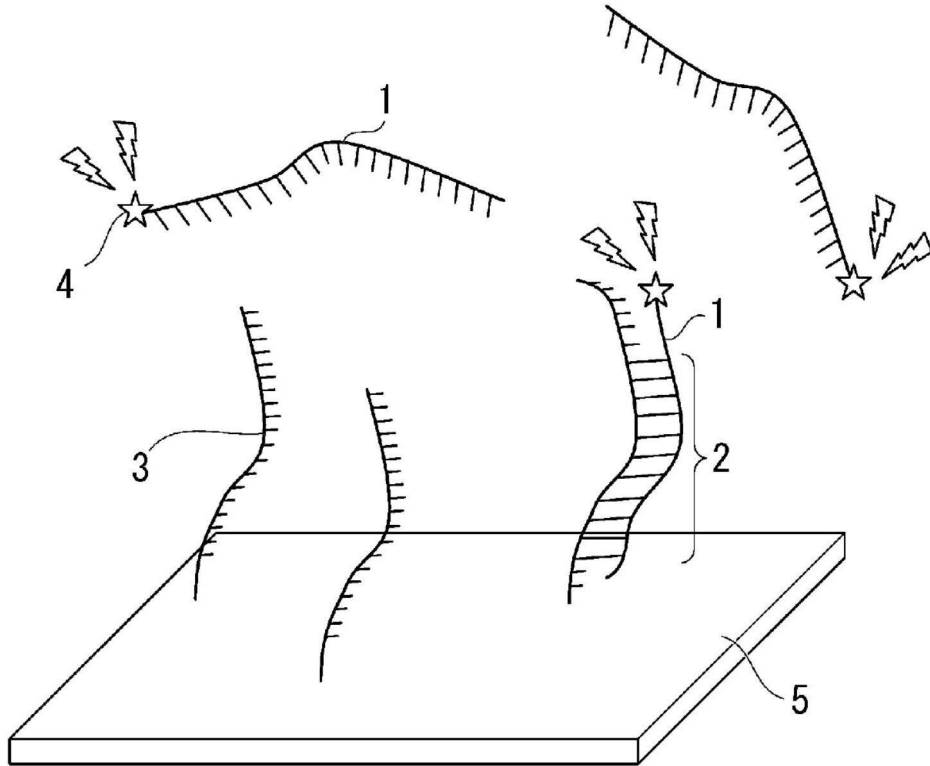


图2

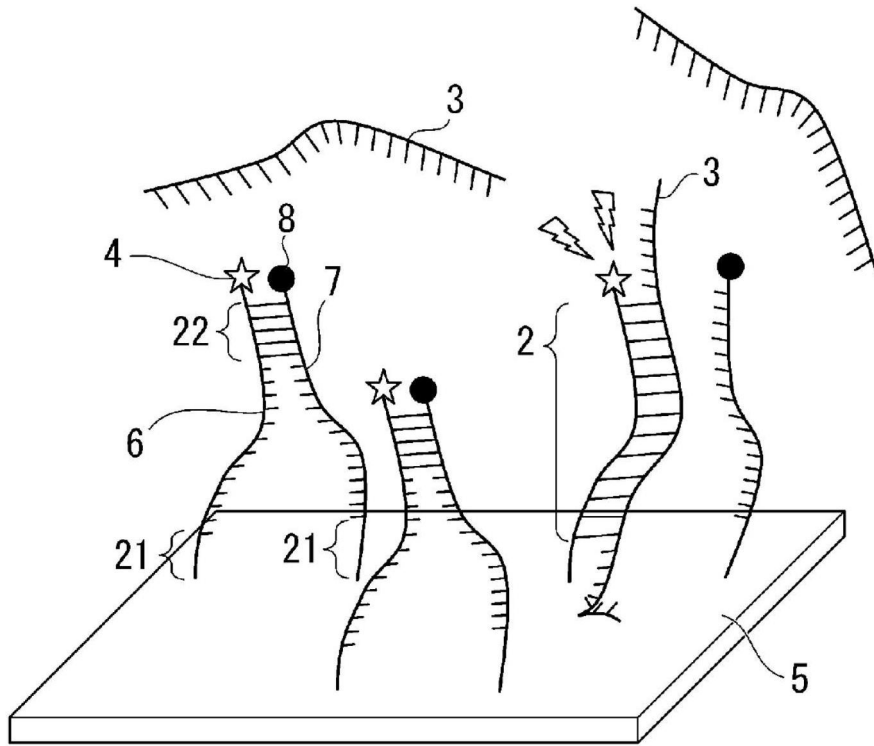


图3

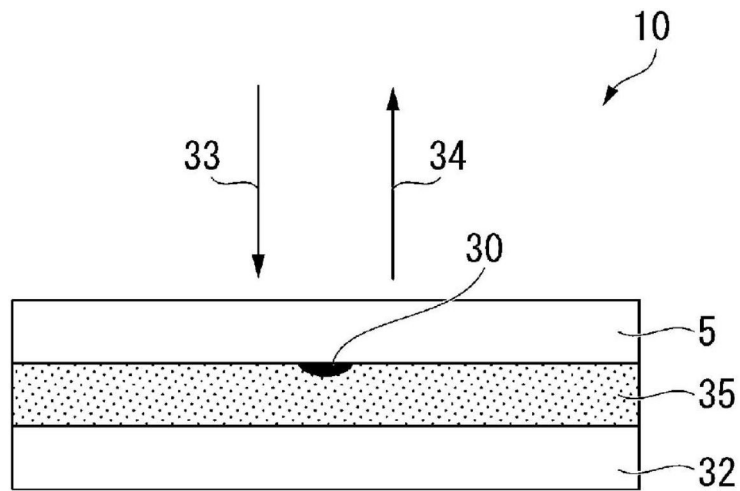


图4

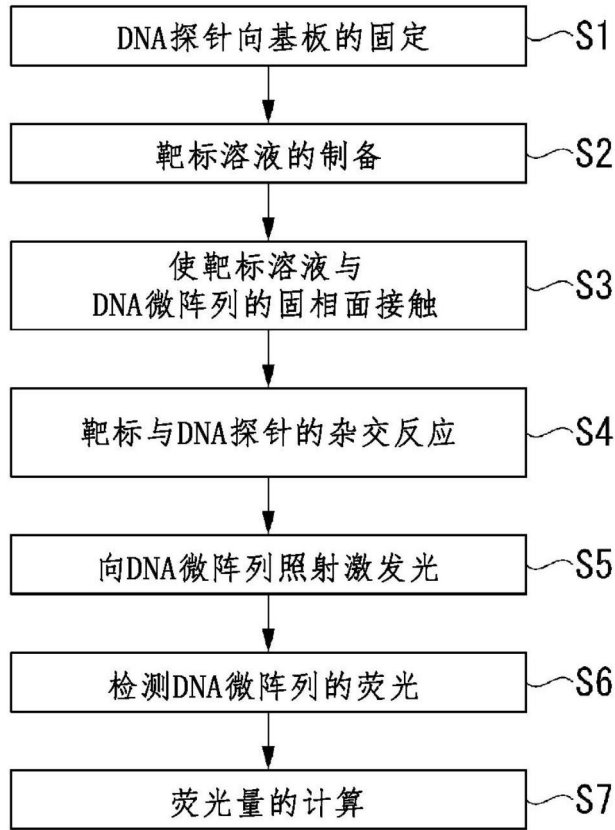


图5

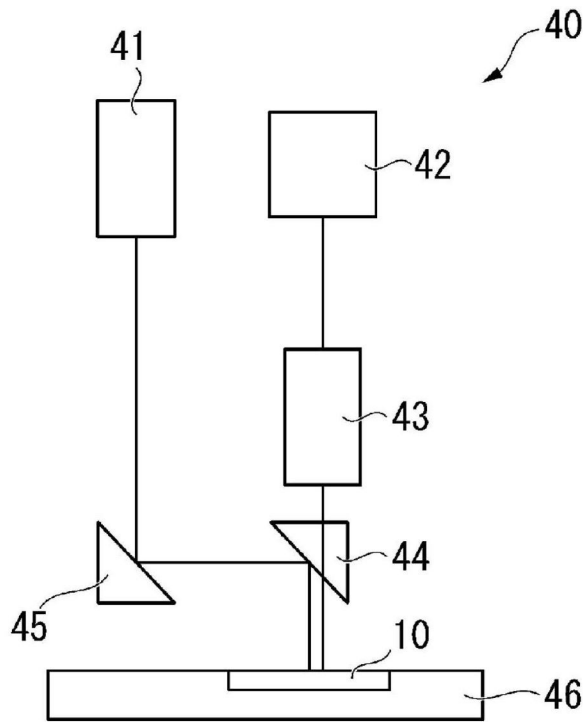


图6

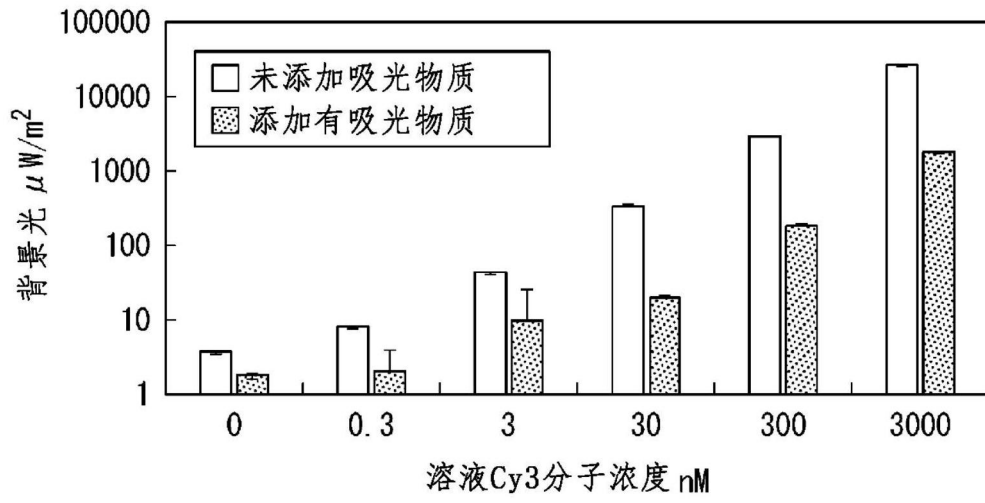


图7

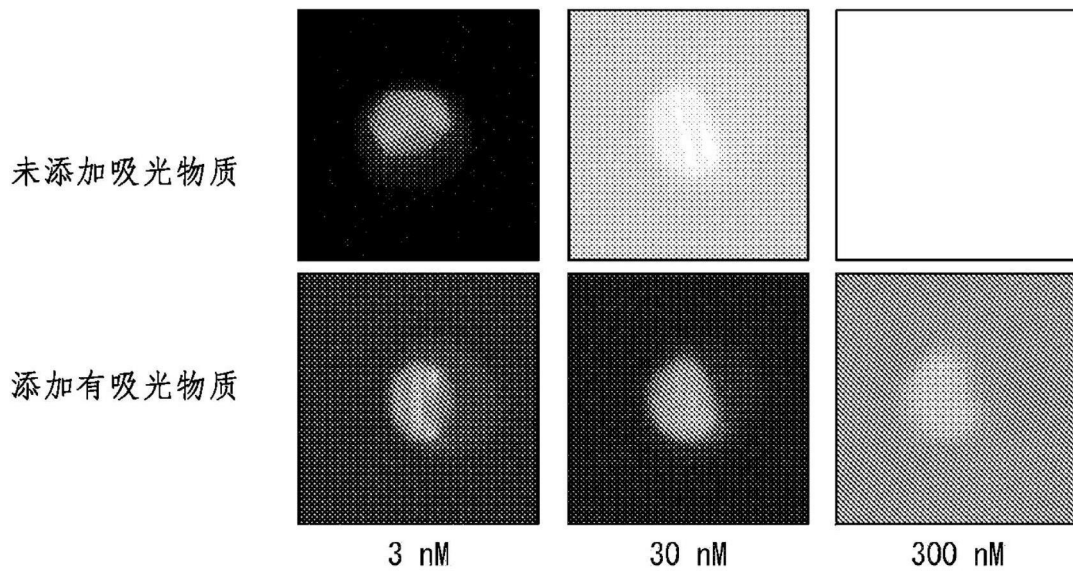


图8

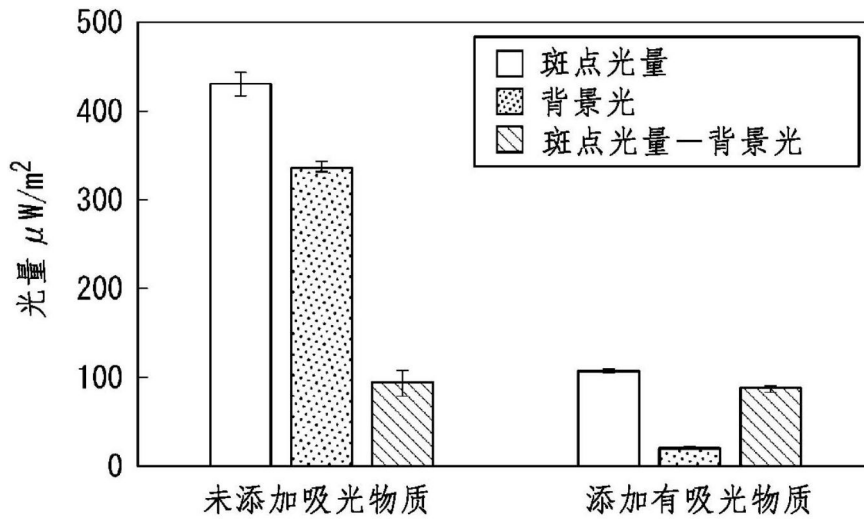


图9

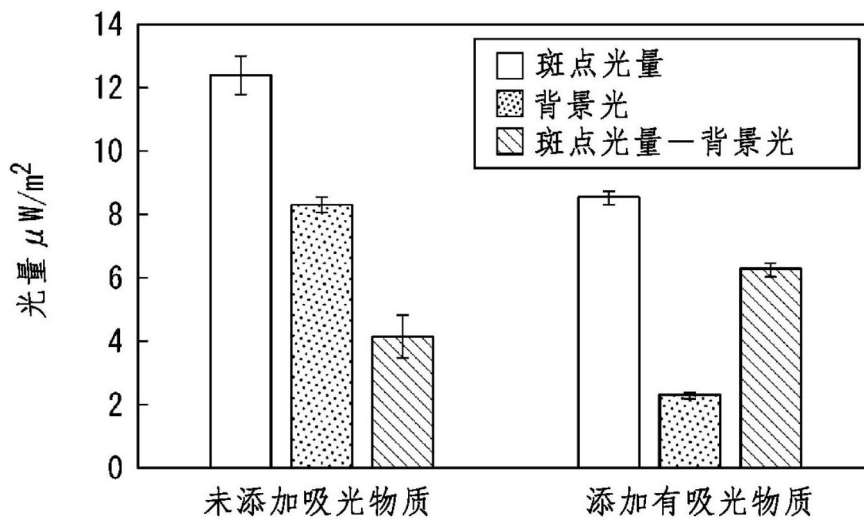


图10