

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-36150

(P2011-36150A)

(43) 公開日 平成23年2月24日(2011.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/542 (2006.01)	G O 1 N 33/542 A	
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64 B	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-184523 (P2009-184523)	(71) 出願人 000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(22) 出願日 平成21年8月7日(2009.8.7)	
(出願人による申告)平成21年度、国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成21年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構、機能性RNAプロジェクト委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願)	(74) 代理人 100106909 弁理士 棚井 澄雄
	(74) 代理人 100064908 弁理士 志賀 正武
	(74) 代理人 100094400 弁理士 鈴木 三義
	(74) 代理人 100086379 弁理士 高柴 忠夫
	(74) 代理人 100129403 弁理士 増井 裕士

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的核酸分子の定量方法及び標的核酸分子定量キット

(57) 【要約】

【課題】試料中に存在する核酸分子を、高感度に精度良く定量する方法の提供。

【解決手段】(a)核酸含有試料、第1マーカーが結合された標的核酸分子と相補的な配列を有する第1核酸分子プローブ、及び第2マーカーが結合された第1核酸分子プローブと相補的な配列を有する第2核酸分子プローブを添加した試料溶液を調製し、(b)この試料溶液中の核酸分子を変性させ、(c)さらに会合させた後、(d)温度及び塩濃度が会合体形成時と同じ条件下で、会合体中の2本の核酸鎖間に共有結合を形成した後、(e)当該試料溶液中の第1マーカー又は第2マーカーの光学的特性の時間変化を検出することにより前記標的核酸分子を定量する工程を有し、第1マーカーと第2マーカーの少なくともいずれか一方が、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとが会合している場合としていない場合とで光学的特性が変化する、核酸含有試料中の標的核酸分子の定量方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸含有試料中の標的核酸分子を定量する方法であって、

- (a) 核酸含有試料、第 1 マーカーが結合された第 1 核酸分子プローブ、及び第 2 マーカーが結合された第 2 核酸分子プローブを添加した試料溶液を調製する工程と、
- (b) 前記工程 (a) において調製された試料溶液中の核酸分子を変性させる工程と、
- (c) 前記工程 (b) の後、前記試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、
- (d) 前記工程 (c) の後、前記試料溶液の温度及び塩濃度が前記工程 (c) における会合体形成時と同じ条件下で、形成された会合体中の 2 本の核酸鎖間に共有結合を形成する工程と、

10

(e) 前記工程 (d) の後、前記試料溶液中の第 1 マーカー又は第 2 マーカーの光学的特性の時間変化を検出することにより、前記標的核酸分子を定量する工程とを有し、

前記第 1 核酸分子プローブは、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列を有しており、

前記第 2 核酸分子プローブは、前記第 1 核酸分子プローブと相補的な塩基配列を有しており、

前記第 1 マーカーと前記第 2 マーカーの少なくともいずれか一方が、前記第 1 核酸分子プローブと前記第 2 核酸分子プローブとが会合している場合と会合していない場合とにおいて、光学的特性が変化する物質であることを特徴とする、標的核酸分子の定量方法。

【請求項 2】

20

前記第 1 マーカーと前記第 2 マーカーの少なくともいずれか一方が蛍光色素であり、前記光学的特性の検出を、前記第 1 マーカー又は第 2 マーカーの発する蛍光強度の時間変化を検出することにより行うことを特徴とする請求項 1 記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 3】

前記工程 (c) における共有結合の形成反応が、光化学的反応であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 4】

前記第 1 核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも 1 の塩基が光反応性塩基誘導体に置換されており、

前記共有結合が、前記光反応性塩基誘導体を介して形成されることを特徴とする請求項 3 記載の標的核酸分子の定量方法。

30

【請求項 5】

前記第 1 核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも 1 の塩基が 3 - Cyanovinyl carbazole Nucleoside に置換されており、

前記共有結合が、前記試料溶液に 340 ~ 380 nm の光を照射することにより形成されることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 6】

前記工程 (d) における共有結合形成時の前記試料溶液の温度が、 T_m 値 ± 3 の範囲内の温度であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

40

【請求項 7】

共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度変化を検出した後、統計解析を行い、前記標的核酸分子と会合している第 1 核酸分子プローブ又は第 2 核酸分子プローブの分子数を算出することにより、前記標的核酸分子を定量することを特徴とする請求項 2 ~ 6 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 8】

共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを検出した後、統計解析を行い、前記標的核酸分子と会合している第 1 核酸分子プローブ又は第 2 核酸分子プローブの分子数を算出することにより、前記標的核酸分子を定量することを特徴とす

50

る請求項 2 ~ 6 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 9】

蛍光強度の揺らぎの解析を、自己相関解析により行うことを特徴とする請求項 8 記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 10】

前記第 1 マーカーが蛍光物質であり、前記第 2 マーカーが前記蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 11】

前記第 2 マーカーが蛍光物質であり、前記第 1 マーカーが前記蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

10

【請求項 12】

前記第 1 マーカー及び前記第 2 マーカーが蛍光色素であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 13】

前記標的核酸分子がマイクロ RNA であることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

【請求項 14】

前記標的核酸分子が siRNA であることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法。

20

【請求項 15】

核酸含有試料中の標的核酸分子を定量するために用いられるキットであって、標的核酸分子と相補的な塩基配列を有しており、かつ、第 1 マーカーが結合された第 1 核酸分子プローブと、

前記第 1 核酸分子プローブと相補的な塩基配列を有しており、かつ、第 2 マーカーが結合された第 2 核酸分子プローブとを有しており、

前記第 1 マーカーと前記第 2 マーカーの少なくともいずれか一方が、前記第 1 核酸分子プローブと前記第 2 核酸分子プローブとが会合している場合と会合していない場合とにおいて、光学的特性が変化する分子であり、

30

前記第 1 核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも 1 の塩基が光反応性塩基誘導体に置換されていることを特徴とする、標的核酸分子定量キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) 及び光クロスリンク反応を利用して、核酸含有試料中の標的核酸分子を定量する方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

試料中に存在する核酸分子の高感度定量方法としては、ポリメラーゼによる酵素反応により標的核酸分子を増幅することにより、又は得られた増幅産物を分解することにより蛍光シグナルを得る方法、いわゆる定量的 PCR (Polymerase chain reaction) 法を利用した方法が知られている。定量的 PCR 法を利用した方法は幾つかあるが、中でも、標的核酸分子に対して FRET を利用したプローブを用いる、いわゆる Taqman 法が広く行われている。例えば、マイクロ RNA (例えば、非特許文献 1 参照。) や RNA 干渉に用いられる siRNA 等のように 22mer 程度の短い RNA 分子を定量する方法としても、FRET プローブを用いた定量的 PCR が開発されている (例えば、非特許文献 2 参照。)。

50

【0003】

FRETプローブを用いた核酸検出方法の1つとして、例えば、蛍光共鳴エネルギーのドナーである蛍光物質が結合したドナープローブと、アクセプターである消光物質が結合したアクセプタープローブとを、標的核酸分子の隣接する2領域にそれぞれ会合（ハイブリダイズ）させ、生じるFRETを検出することにより、標的核酸分子を検出する方法が開示されている（例えば、特許文献1～3参照。）。また、蛍光物質と消光物質の両物質を結合させたプローブを、標的核酸分子と会合させた後、2本鎖DNA特異的なヌクレアーゼにより分解し、この結果生じた蛍光を検出する方法も開示されている（例えば、特許文献4参照。）。5'末端側と3'末端側が互いに相補的な塩基配列を有しており、かつ両末端が蛍光物質と消光物質を用いてそれぞれラベルされている1本鎖核酸を用いる、いわゆる分子トーチによる方法も開示されている（例えば、特許文献5参照。）。この方法では、当該1本鎖核酸は、単独で存在している場合には、両末端が会合して分子内ループを形成しているため消光状態であるが、標的核酸分子とハイブリダイズすることにより、分子内ループが解消されて蛍光を発する。

10

【0004】

その他、互いに塩基配列が相違する核酸分子を識別して検出する方法として、参照となる2本鎖DNAと検出対象となる2本鎖DNA_xとを用意し、参照となる2本鎖DNAの第1のマーカースとして蛍光物質を付与し、第2のマーカースとして第1のマーカースの第2のマーカースの間でエネルギー移動が生じ、新たなピーク波長の蛍光を得るようにすることにより、検出DNA_xと参照DNAとの塩基の相違を検出する方法が開示されている（例えば、特許文献6参照。）。

20

【0005】

一方で、核酸分子をより効率的に解析するためのツールも数多く開発されている。例えば、オリゴヌクレオチドを構成する塩基に反応性官能基を導入し、当該反応性官能基を介して、他のオリゴヌクレオチドやその他の分子との間に共有結合を形成する（クロスリンク）方法が開発されている。例えば、反応性官能基を導入した塩基誘導体を用いて核酸分子同士を共有結合的クロスリンクする技術として、2-Amino-6-Vinylpurineを用いる方法（例えば、非特許文献3参照。）や、光反応性の塩基誘導体である3-Cyanovinylcarbazole Nucleosideを用いる方法（例えば、非特許文献4又は5参照。）等が開示されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特許第4008996号公報

【特許文献2】国際公開第98/13524号パンフレット

【特許文献3】特許第3188303号公報

【特許文献4】国際公開第03/035864号パンフレット

【特許文献5】特表2002-519073号公報

【特許文献6】特開2002-171974号公報

【非特許文献】

40

【0007】

【非特許文献1】アルバーツ（Alberts）、外1名、モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル第5版（Molecular Biology of the Cell, 5th edition）、Garland Science社、2008年、第493～495ページ。

【非特許文献2】チェン（Chen）、外12名、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）、2005年、第33巻第20号、e179ページ。

【非特許文献3】佐々木茂貴、薬学雑誌（YAKUGAKU ZASSHI）、2002年、第122巻第12号、第1081～1093ページ。

【非特許文献4】フジモト（Fujimoto）、外2名、ヌクレイック・アシッズ・シンポジウム・シリーズ（Nucleic Acids Symposium Series）、2008年、第52巻、第423～

50

424 ページ。

【非特許文献5】ヨシムラ (Yoshimura)、外1名、オーガニック・レターズ (ORGANIC LETTERS)、2008年、第10巻第15号、第3227~3230ページ。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従来の定量的PCR法においては、ポリメラーゼによる増幅特性は、増幅対象である核酸の塩基配列の種類ごとに異なるため、標的核酸分子の濃度を定量的に測定するためには、標的核酸分子ごとに検量線を作成する必要がある、検出に要する工程が増え、煩雑であるという問題がある。一方、FRETプローブを用いた方法においては、FRETにより生じる蛍光を検出することにより、標的核酸分子を検出することができるが、蛍光分子の組み合わせによっては完全に消光されない等により、検出される蛍光には一定の蛍光強度のバックグラウンドがあり、このため、特に標的核酸分子が低濃度の場合に定量性に劣るという問題がある。

10

【0009】

また、ハイブリダイゼーションを用いた検出では、一般的には、形成された会合体の検出を通常の測定温度条件（例えば室温等）において行うため、会合体検出操作時に非特異的会合体（非特異的なハイブリダイゼーションにより形成された会合体）が形成されやすいという問題がある。しかしながら、非特異的会合体と特異的会合体との区別は困難である場合があり、両者を区別するためには、標的核酸毎に会合条件を変更する等の困難がある。

20

【0010】

本発明は、試料中に存在する核酸分子を、高感度に、かつ精度良く定量し得る方法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】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、FRETプローブを用いて標的核酸分子を定量する方法において、FRETによるエネルギー移動の蛍光強度解析を、一分子ごとに検出し解析することにより、試料中の標的核酸分子を直接的に定量解析し得ること、及び、特異的な会合に適した条件でFRETプローブと標的核酸分子とを会合させた後、反応溶液の温度及び塩濃度を変更することなく、形成された会合体中の2本の核酸鎖間に共有結合を形成することにより、試料中の標的核酸分子を精度良く定量解析し得ることを見出し、本発明を完成させた。

30

【0012】

すなわち、本発明は、

(1) 核酸含有試料中の標的核酸分子を定量する方法であって、(a) 核酸含有試料、第1マーカが結合された第1核酸分子プローブ、及び第2マーカが結合された第2核酸分子プローブを添加した試料溶液を調製する工程と、(b) 前記工程(a)において調製された試料溶液中の核酸分子を変性させる工程と、(c) 前記工程(b)の後、前記試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、(d) 前記工程(c)の後、前記試料溶液の温度及び塩濃度が前記工程(c)における会合体形成時と同じ条件下で、形成された会合体中の2本の核酸鎖間に共有結合を形成する工程と、(e) 前記工程(d)の後、前記試料溶液中の第1マーカ又は第2マーカの光学的特性の時間変化を検出することにより、前記標的核酸分子を定量する工程とを有し、前記第1核酸分子プローブは、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列を有しており、前記第2核酸分子プローブは、前記第1核酸分子プローブと相補的な塩基配列を有しており、前記第1マーカと前記第2マーカの少なくともいずれか一方が、前記第1核酸分子プローブと前記第2核酸分子プローブとが会合している場合と会合していない場合とにおいて、光学的特性が変化する物質であることを特徴とする、標的核酸分子の定量方法、

40

(2) 前記第1マーカと前記第2マーカの少なくともいずれか一方が蛍光色素であ

50

り、前記光学的特性の検出を、前記第1マーカ-又は第2マーカ-の発する蛍光強度の時間変化を検出することにより行うことを特徴とする前記(1)記載の標的核酸分子の定量方法、

(3) 前記工程(c)における共有結合の形成反応が、光化学的反応であることを特徴とする前記(1)又は(2)記載の標的核酸分子の定量方法、

(4) 前記第1核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも1の塩基が光反応性塩基誘導体に置換されており、前記共有結合が、前記光反応性塩基誘導体を介して形成されることを特徴とする前記(3)記載の標的核酸分子の定量方法、

(5) 前記第1核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも1の塩基が3-Cyanovinyl carbazole Nucleosideに置換されており、前記共有結合が、前記試料溶液に340~380nmの光を照射することにより形成されることを特徴とする前記(1)又は(2)記載の標的核酸分子の定量方法、

(6) 前記工程(d)における共有結合形成時の前記試料溶液の温度が、 T_m 値 ± 3 の範囲内の温度であることを特徴とする前記(1)~(5)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

【0013】

(7) 共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度変化を検出した後、統計解析を行い、前記標的核酸分子と会合している第1核酸分子プローブ又は第2核酸分子プローブの分子数を算出することにより、前記標的核酸分子を定量することを特徴とする前記(2)~(6)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(8) 共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを検出した後、統計解析を行い、前記標的核酸分子と会合している第1核酸分子プローブ又は第2核酸分子プローブの分子数を算出することにより、前記標的核酸分子を定量することを特徴とする前記(2)~(6)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(9) 蛍光強度の揺らぎの解析を、自己相関解析により行うことを特徴とする前記(8)記載の標的核酸分子の定量方法、

(10) 前記第1マーカ-が蛍光物質であり、前記第2マーカ-が前記蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であることを特徴とする前記(1)~(9)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(11) 前記第2マーカ-が蛍光物質であり、前記第1マーカ-が前記蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であることを特徴とする前記(1)~(9)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(12) 前記第1マーカ-及び前記第2マーカ-が蛍光色素であることを特徴とする前記(1)~(9)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(13) 前記標的核酸分子がマイクロRNAであることを特徴とする前記(1)~(12)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(14) 前記標的核酸分子がsiRNAであることを特徴とする前記(1)~(12)のいずれか記載の標的核酸分子の定量方法、

(15) 核酸含有試料中の標的核酸分子を定量するために用いられるキットであって、標的核酸分子と相補的な塩基配列を有しており、かつ、第1マーカ-が結合された第1核酸分子プローブと、前記第1核酸分子プローブと相補的な塩基配列を有しており、かつ、第2マーカ-が結合された第2核酸分子プローブとを有しており、前記第1マーカ-と前記第2マーカ-の少なくともいずれか一方が、前記第1核酸分子プローブと前記第2核酸分子プローブとが会合している場合と会合していない場合とにおいて、光学的特性が変化する分子であり、前記第1核酸分子プローブのうち、前記標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも1の塩基が光反応性塩基誘導体に置換されていることを特徴とする、標的核酸分子定量キット、
を提供するものである。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0014】

本発明の標的核酸分子の定量方法は、第1マーカ―が結合されたプローブと、当該第1マーカ―と近接することにより光学的特性が変化する第2マーカ―が結合されたプローブとを用いたFRETを利用し、試料中の一分子ごとにFRETによるエネルギー移動の蛍光強度解析を行うため、標的核酸分子を直接的に定量することができる。

また、本発明の標的核酸分子の定量方法は、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとが特異的に会合させた後、両者を共有結合させることにより、形成された会合体をエネルギー移動の蛍光強度解析時まで安定して維持することができるため、非特異的会合体の形成を効果的に抑制し、標的核酸分子の検出及び定量における特異性及び精度を改善させることができる。

10

このため、本発明の標的核酸分子の定量方法を用いることにより、標的核酸分子の塩基配列の特性や核酸含有試料中の濃度等の条件、FRETによるエネルギー移動の蛍光強度解析時の温度条件等を考慮することなく、精度よく標的核酸分子を定量することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】会合体を構成する標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの間に共有結合形成（クロスリンク）を生じさせることの効果を模式的に示した図である。

【図2】第1マーカ―として蛍光色素を、第2マーカ―としてダーククエンチャーを用いた場合の本発明の標的核酸分子の定量方法の一態様を示した図である。

20

【図3】第1マーカ―及び第2マーカ―として蛍光色素を用いた場合の本発明の標的核酸分子の定量方法の一態様を示した図である。

【図4】実施例1において、FIDA解析の結果を示した図である。

【図5】実施例2において、FIDA解析の結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の標的核酸分子の定量方法は、核酸含有試料中の標的核酸分子を定量する方法であって、FRETによるエネルギー移動の蛍光強度解析を一分子ごとに検出し、解析することを特徴とする。具体的には、標的核酸分子と相補的な塩基配列を有している第1核酸分子プローブと、第1核酸分子プローブと相補的な塩基配列を有している第2核酸分子プローブとを用いる方法であって、第1核酸分子プローブに対して、標的核酸分子と第2核酸分子プローブとを競合的に会合させ、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体を精度よく検出することにより、標的核酸分子を定量する。

30

【0017】

標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体は、第1核酸分子プローブに結合させた第1マーカ―と第2核酸分子プローブに結合させた第2マーカ―との間に生じるFRETを利用して検出する。第2核酸分子プローブに結合させた第2マーカ―は、第1核酸分子プローブに結合させた第1マーカ―と近接することにより光学的特性が変化する物質とする。具体的には、本発明における第1マーカ―及び第2マーカ―としては、第1マーカ―と第2マーカ―の少なくともいずれか一方が、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとが会合している場合と、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとが会合していない場合とにおいて、光学的特性が変化する物質であることを要する。

40

【0018】

ここで、「物質の光学的特性が変化する」とは、当該物質から発せられる蛍光の波長や強度が変化することを意味する。また、本発明において、「マーカ―の光学的特性を検出する」とは、当該マーカ―から発せられる特定の波長の蛍光シグナルを検出することを意味する。当該蛍光シグナルとしては、蛍光強度や蛍光偏光等がある。本発明においては、蛍光強度であることが好ましい。

【0019】

50

つまり、第1マーカーが結合された第1核酸分子プローブと第2マーカーが結合された第2核酸分子プローブとが会合した場合には、当該第1マーカーと第2マーカーとの間でFRETによるエネルギー移動が生じる。一方、両者が会合せず、解離している場合には、当該第1マーカーと第2マーカーとの間でFRETは生じない。このため、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとが会合している場合と、会合していない場合とでは、第1マーカーと第2マーカーの少なくとも一方の光学的特性は異なる。ここで、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブと標的核酸分子とが存在している試料溶液中においては、第2核酸分子プローブと会合していない第1核酸分子プローブは、標的核酸分子と会合すると考えられることから、第1マーカー又は第2マーカーの光学的特性の時間変化を検出することにより、標的核酸分子を検出することができる。

10

【0020】

本発明において、第1マーカー及び第2マーカーは、十分に近接した場合に、すなわち、第1核酸分子プローブと第2マーカーとが会合した場合にFRETが生じる物質同士の組み合わせであればよく、FRETにおいて一般的に用いられている物質の中から、適宜選択して用いることができる。例えば、第1マーカー及び第2マーカーの両方が蛍光色素であってもよく、いずれか一方が蛍光色素であり、他方が当該蛍光色素から受け取ったエネルギーを熱エネルギーとして放出する物質（いわゆる、ダーククエンチャー）であってもよい。

【0021】

また、本発明の標的核酸分子の定量方法においては、第1マーカーと第2マーカーのいずれが蛍光物質であってもよい。すなわち、第1マーカーが蛍光物質であり、第2マーカーが当該蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であってもよく、第2マーカーが蛍光物質であり、第1マーカーが当該蛍光物質から発される蛍光を消光する消光物質であってもよい。

20

【0022】

なお、本発明及び本願明細書において、「蛍光色素」とは、蛍光を発する性質を有する色素を意味する。一方、「蛍光物質」とは、FRETにおいてドナーとなる物質を意味し、[消光物質]とは、アクセプターとなる物質を意味する。

【0023】

第1核酸分子プローブ及び第2核酸分子プローブは、標的核酸分子の塩基配列情報に基づいて、塩基配列を設計し、合成した核酸プローブに、マーカーを結合させることにより作製されるが、核酸分子プローブの設計や合成、核酸分子プローブとマーカーとの結合反応は、常法により行うことができる。

30

【0024】

また、本発明の標的核酸分子の定量方法は、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体の形成を、両者が特異的に会合することができ、かつ、第1核酸分子プローブとは非相補的な塩基配列を有する核酸と第1核酸分子プローブとによる非特異的な会合が十分に抑制されている条件（以下、「特異的な会合条件」という。）で行った後、同じ条件下で、形成された会合体中の2本の核酸鎖（第1核酸分子プローブ及び標的核酸分子）間で共有結合を形成することによって標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体を安定化した後に、当該会合体を検出することを特徴とする。

40

【0025】

前述したように、本発明においては、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体はFRETを利用して検出するが、特異的な会合条件下でFRETを測定することは困難であり、また、高価な検出装置を要する。このため、一般的に、形成された会合体の検出は、室温等の比較的穏やかであって、第1核酸分子プローブとは非相補的な塩基配列を有する核酸と第1核酸分子プローブとによる非特異的な会合体も、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体と同様に形成可能な条件（以下、「非特異的な会合条件」という。）で行われる。この非特異的な会合条件では、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体は、第2核酸分子プローブと第1核酸分子プローブとの会合体や、第1核酸分子プローブ

50

とは非相補的な塩基配列を有する核酸と第1核酸分子プローブとによる会合体と置き換えることが可能である。つまり、FRET測定を非特異的会合条件で行うことにより、標的以外の核酸分子を誤って検出してしまう場合があった。これに対して、本発明の標的核酸分子の定量方法では、特異的会合条件において特異的に形成された標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体が、FRET検出時まで安定して保持されるため、標的核酸分子検出の特異性や定量性を顕著に改善することができる。

【0026】

なお、特異的会合条件は、標的核酸分子、第1核酸分子プローブ、及び第2核酸分子プローブの塩基配列の種類や長さ等に依存する。具体的には、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの特異的会合条件は、第1核酸分子プローブの融解曲線から求めることができる。

10

【0027】

会合体の形成は一般的に温度条件や塩濃度条件に依存するため、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブのみを含有する溶液の温度を、高温から低温へと変化させ、当該溶液の吸光度や蛍光強度を測定することにより、融解曲線を求めることができる。得られた融解曲線から、変性により1本鎖化していた第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブが、互いに会合体を形成し始めた温度から、ほぼ全てが会合体となった温度までの範囲の温度条件を、特異的会合条件とすることができる。温度に代えて、溶液中の塩濃度を低濃度から高濃度への変化させることによっても、同様にして融解曲線を決定し、特異的会合条件を求めることができる。

20

【0028】

このように、特異的会合条件は、標的核酸分子や第1核酸分子プローブの種類ごとに異なり、実験的に決定されるものであるが、一般には T_m 値（融解温度）で代用することができる。例えば、汎用されているプライマー/プローブ設計ソフトウェア等を用いることにより、第1核酸分子プローブの塩基配列情報から、 T_m 値（2本鎖DNAの50%が1本鎖DNAに解離する温度）を算出することができる。温度が T_m 値近傍の値である条件、例えば T_m 値 ± 3 程度である条件を、特異的会合条件とすることができる。算出された T_m 値近傍において実験的に融解曲線を求めることにより、より詳細に特異的会合条件を決定することもできる。

【0029】

図1は、会合体を構成する標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの間に共有結合形成（クロスリンク）を生じさせることの効果を模式的に示した図である。図1(A)は、会合体形成前の試料溶液中の、標的核酸分子(3)、非特異的核酸分子(4)、第1マーカ(1m)が結合された第1核酸分子プローブ(1)、及び第2マーカ(2m)が結合された第2核酸分子プローブ(2)を示している。なお、非特異核酸分子(4)は、第1核酸分子プローブとは非相補的な塩基配列を有する核酸分子であり、図中「x」は、第1核酸分子プローブと非相補的な塩基を示している。通常、変性工程前では、第1核酸分子プローブ(1)と第2核酸分子プローブ(2)とが会合体を形成している。一方、図1(B)は、図1(A)に示す試料溶液を変性し、第1核酸分子プローブ(1)と標的核酸分子(3)との会合に最適化した温度（特異的会合条件）にて会合を行った後、当該温度に試料溶液の温度を保持したまま、当該試料溶液に光を照射し、後述する光化学反応により、第1核酸分子プローブ(1)と標的核酸分子(3)との間、及び第1核酸分子プローブ(1)と第2核酸分子プローブ(2)との間に、それぞれ共有結合(5)を形成した状態を示した図である。共有結合を形成しない場合には、会合体形成処理後、試料溶液の温度を室温程度まで低下させると、非特異核酸分子(4)が標的核酸分子(3)と置換され、非特異核酸分子(4)と第1核酸分子プローブ(1)との会合体が形成されてしまうが、本発明においては、試料溶液の温度を室温まで低下させる前に、予め共有結合を形成することにより会合体を安定化させるため、FRET測定等による会合体検出時においても、図1(B)に示すような会合体形成処理後の状態を維持しているため、特異的に第1核酸分子プローブと会合した標的核酸分子数を定量解析することができる。

30

40

50

【0030】

このように、本発明の標的核酸分子の定量方法は、ハイブリダイゼーション反応により形成された会合体を、特異的会合条件下における会合時の状態で安定化するため、高い特異性でハイブリダイゼーション反応を検出することが可能である。このため、本発明の標的核酸分子の定量方法を用いることにより、標的核酸分子と当該分子とミスマッチ部位を有する核酸分子が混在している核酸含有試料から、第1核酸分子プローブと完全にマッチする標的核酸分子のみを特異的に検出することも可能となる。

【0031】

本発明の標的核酸分子の定量方法は、具体的には、下記工程(a)~(e)を有する。
(a)核酸含有試料、第1マーカが結合された第1核酸分子プローブ、及び第2マーカが結合された第2核酸分子プローブを添加した試料溶液を調製する工程。
(b)前記工程(a)において調製された試料溶液中の核酸分子を変性させる工程。
(c)前記工程(b)の後、前記試料溶液中の核酸分子を会合させる工程。
(d)前記工程(c)の後、前記試料溶液の温度及び塩濃度が前記工程(c)における会合体形成時と同じ条件下で、形成された会合体中の2本の核酸鎖間に共有結合を形成する工程。
(e)前記工程(d)の後、前記試料溶液中の第1マーカ又は第2マーカの光学的特性の時間変化を検出することにより、前記標的核酸分子を定量する工程。

【0032】

本発明において標的核酸分子とは、検出及び定量の標的である特定の塩基配列を有する核酸分子を意味する。当該標的核酸分子としては、第1核酸分子プローブ等の設計が可能な程度に塩基配列が明らかになっているものであれば、特に限定されるものではない。例えば、動物や植物の染色体や、細菌やウイルスの遺伝子に存在する塩基配列を有する核酸分子であってもよく、人工的に設計された塩基配列を有する核酸分子であってもよい。なお、本発明において、標的核酸分子としては、2本鎖核酸であってもよく、1本鎖核酸であってもよい。また、DNAとRNAのいずれであってもよい。該標的核酸分子として、例えば、マイクロRNA、siRNA、mRNA、hnRNA、ゲノムDNA、PCR増幅等による合成DNA、RNAから逆転写酵素を用いて合成されたcDNA等がある。本発明の標的核酸分子の定量方法としては、マイクロRNAやsiRNAであることが好ましい。なお、本発明において、標的核酸分子の長さは特に限定されるものではないが、10塩基以上であることが好ましく、10~500塩基程度であることがより好ましく、10~50塩基程度であることがさらに好ましい。中でも、10~30塩基程度の長さのマイクロRNAやsiRNAであることが特に好ましい。

【0033】

また、本発明において核酸含有試料とは、核酸分子を含有する試料であれば、特に限定されるものではない。該核酸含有試料として、例えば、動物等から採取した生体試料、培養細胞等から調製された試料、核酸合成反応後の反応溶液等が挙げられる。生体試料等そのものであってもよく、生体試料等から抽出・精製した核酸溶液でもよい。

【0034】

まず、工程(a)として、核酸含有試料、第1核酸分子プローブ、及び第2核酸分子プローブを、適当な溶媒に添加して、試料溶液を調製する。該溶媒は、第1マーカ又は第2マーカから発せられる蛍光の検出、及び、両マーカ間で生じるFRETを阻害しない溶媒であれば、特に限定されるものではなく、当該技術分野において一般的に用いられているバッファーの中から、適宜選択して用いることができる。該バッファーとして、例えば、PBS(リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4)等のリン酸バッファーやトリスバッファー等がある。

【0035】

一般的に、工程(a)における試料溶液の調製を、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブのT_m値以下の温度で行った場合には、両プローブは会合し、2本鎖核酸の状態が存在している。このため、第1マーカを蛍光物質、第2マーカを消光物質とした

場合には、第1マーカ-と第2マーカ-との間に生じるFRETにより、第1マーカ-から発される蛍光は消光されており、検出されないか、もしくは減弱している。

【0036】

次に、工程(b)として、調製された試料溶液中の核酸分子を変性させる。本発明において、「核酸分子を変性させる」とは、2本鎖核酸を1本鎖核酸とすることを意味する。本発明においては、蛍光物質への影響が比較的小さいことから、高温処理による変性(熱変性)又は低塩濃度処理による変性を行うことが好ましい。中でも、操作が簡便であるため、熱変性を行うことが好ましい。具体的には、熱変性は、当該試料溶液を、高温処理(例えば90以上)をすることにより、当該試料溶液中の核酸分子を変性することができる。変性させることにより、試料溶液中の各核酸分子プローブを、解離した1本鎖の状態とする。また、標的核酸分子が2本鎖核酸の場合には、同様に1本鎖核酸となる。一方、低塩濃度処理による変性は、例えば、精製水等により希釈することによって、当該試料溶液の塩濃度が十分に低くなるように調整することによって行うことができる。

10

【0037】

次いで、工程(c)として、前記試料溶液中の核酸分子を会合させる。熱変性を行った場合には、高温処理後、当該試料溶液の温度を、特異的会合条件に適う温度にまで低下させることにより、当該試料溶液中の核酸分子を適宜会合させることができる。好ましくは、試料溶液の温度を第1核酸分子プローブの T_m 値 ± 3 の温度程度まで低下させる。一方、高塩濃度処理による変性を行った場合にも、同様に、低塩濃度処理後、塩溶液を添加する等により、当該試料溶液の塩濃度を、特異的会合条件に適う濃度にまで上昇させることにより、当該試料溶液中の核酸分子を適宜会合させることができる。

20

【0038】

これらの処理により、第1核酸分子プローブを会合させるが、このとき、第1核酸分子プローブは、第2核酸分子プローブと標的核酸分子のいずれとも会合し得るため、核酸含有試料中に標的核酸分子が存在していた場合には、工程(c)後の試料溶液中には、第1核酸分子プローブと標的核酸分子との会合体と、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとの会合体とが存在する。

【0039】

その後、工程(d)として、試料溶液の温度及び塩濃度が前記工程(c)における会合体形成時と同じ条件下で、すなわち、特異的会合条件において、形成された会合体中の2本の核酸鎖間に共有結合を形成する。なお、「工程(c)における会合体形成時と同じ条件」とは、試料溶液の温度及び塩濃度が互いに同一条件であることが好ましいが、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体の形成しやすさと、第1核酸分子プローブとは非相補的な塩基配列を有する核酸と第1核酸分子プローブとの会合体の形成しやすさとが、工程(c)における会合体形成時と、工程(d)における共有結合形成時とで実質的に同じであればよく、必ずしも物理的に完全に同一でなくてもよい場合がある。例えば、工程(c)における会合体形成時の試料溶液の温度が T_m 値 ± 3 であった場合に、工程(d)における共有結合形成時の試料溶液の温度も T_m 値 ± 3 であればよい場合がある。標的核酸分子の塩基配列の種類によっては、 T_m 値 ± 3 の温度であれば、特異的会合条件であり、当該温度範囲内で多少の変動があったとしても、会合体形成の特異性に対する影響はほとんどないと考えられるためである。

30

40

【0040】

工程(d)における共有結合の形成方法は、1本鎖化された標的核酸分子と第1核酸分子プローブとが会合して形成された会合体の2本鎖間に共有結合を形成可能であれば、特に限定されるものではなく、核酸分子同士をクロスリンクする際に用いられるいずれの手法を用いてもよい。例えば、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体のみに対して選択的に共有結合を形成させる方法であってもよく、工程(c)後の試料溶液中に存在する当該会合体以外の他の会合体に対しても共有結合を形成させる方法であってもよい。

【0041】

50

本発明においては、光化学的反応により、共有結合を形成することが好ましい。光化学的反応とは、特定の波長の光を照射し、その光エネルギーを利用して行われる反応を意味する。光化学的反応により共有結合を形成する方法は、試料溶液に特定の波長の光を照射することによって会合体の核酸鎖間に共有結合を形成させることができるため、試料溶液の組成等の条件を変動させる必要がない。このため、試料溶液中の会合体に対して、共有結合形成以外に与える影響を抑えることができ、かつ操作も簡便である。

【0042】

例えば、標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも1の塩基を、光反応性塩基誘導体に置換されている第1核酸分子プローブを用いることにより、光化学反応によって、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体に、当該光反応性塩基誘導体を介した共有結合を形成することができる。ここで、光反応性塩基誘導体とは、特定の波長の光が照射されることにより、有機合成反応における反応性が活性化される部位（光反応性部位）を有し、天然のヌクレオチドと同様に核酸鎖を形成することが可能な塩基誘導体を意味する。光反応性塩基誘導体に置換されている第1核酸分子プローブと標的核酸分子との会合体を形成させた後、当該会合体が含まれている試料溶液に、当該光反応性塩基誘導体中の光反応性部位を活性化し得る波長の光を照射すると、当該光反応性部位が活性化され、この光反応性部位に近接する標的核酸分子中の原子との間に共有結合が形成される。

10

【0043】

このような光反応性塩基誘導体としては、例えば、3-Cyanovinyl carbazole Nucleoside ($C^{N^V}K$)（例えば非特許文献4又は5参照。）等が挙げられる。なお、光反応性塩基誘導体に置換されている第1核酸分子プローブは、例えば、第1核酸分子プローブを公知のオリゴヌクレオチド合成機を用いて合成する際に、光反応性塩基誘導体を原料として用いることにより製造することができる。また、未置換の第1核酸分子プローブを製造した後、公知の有機合成反応により、当該プローブを構成する塩基に適当な光反応性官能基を導入することによっても得ることができる。

20

【0044】

光反応性塩基誘導体として $C^{N^V}K$ を用いた場合には、具体的には、次のようにして、標的核酸分子と第1核酸分子プローブとの会合体を共有結合により安定化することができる。まず、第1核酸分子プローブ中の標的核酸分子と塩基対を形成する塩基のうち、当該塩基の5'側に隣接する塩基がプリン塩基である塩基を、少なくとも1つ $C^{N^V}K$ に置換した $C^{N^V}K$ 置換第1核酸分子プローブを調製する。次いで、この $C^{N^V}K$ 置換第1核酸分子プローブと標的核酸分子とを会合させた後、形成された会合体を含む試料溶液に340~380nmの光、好ましくは、366nmを含む紫外光を照射すると、 $C^{N^V}K$ の5'側に隣接するプリン塩基と塩基対を形成している標的核酸分子中のピリミジン塩基を構成する原子と $C^{N^V}K$ を構成する原子とが共有結合により結合する。

30

【0045】

その他、光反応性塩基誘導体として、チミン（T）又はアデニン（A）にリンカーを介してソラーレン（psoralen）（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 5602-5606, July 1991）を付加したものをを用いてもよい。例えば、第1核酸分子プローブ中の標的核酸分子と会合する領域に、TA配列があった場合に、当該TA配列中のT又はAにリンカーを介してソラーレンを結合させたソラーレン結合第1核酸分子プローブを調製する。次いで、このソラーレン結合第1核酸分子プローブと標的核酸分子とを会合させた後、254nm等の近紫外光を照射すると、このソラーレンを介して標的核酸分子とソラーレン結合第1核酸分子プローブとが架橋され、両者による会合体が安定化する。

40

【0046】

さらに、工程(e)として、当該試料溶液中の第1マーカ―又は第2マーカ―の光学的特性の時間変化を検出することにより、標的核酸分子を定量することができる。例えば、第2核酸分子プローブと会合した第1核酸分子プローブは消光状態となるが、標的核酸分子と会合した第1核酸分子プローブでは、近傍に消光物質が存在しないため、蛍光エネ

50

ルギー移動による消光状態にならず、第1マーカーから発される蛍光が検出される。したがって、第1マーカーの分光特性に最適な波長の光を照射し、第1マーカーから発される蛍光の蛍光強度の揺らぎ(時間変化)を測定することにより、当該試料溶液中の第1マーカーが、標的核酸分子と会合している分子か、第2核酸分子プローブと会合している分子かを、分子ごとに検出することができ、標的核酸分子を定量することができる。

【0047】

なお、工程(e)において、試料溶液中の第1マーカー又は第2マーカーの光学的特性の時間変化の検出方法は、溶液中の分子の蛍光シグナルの時間変化(揺らぎ)を検出し解析し得る方法であれば、特に限定されるものではない。例えば、共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光シグナルを検出し、解析することにより、溶液中の分子の蛍光シグナルの時間変化を測定・解析することができる。該方法として、例えば、蛍光強度分布解析法(Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA)、蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)、蛍光相互相関分光法(Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, FCCS)、蛍光偏光解析法(FIDA polarization, FIDA-PO)等がある。なお、このような分子の蛍光シグナルの時間変化の検出及び解析は、例えば、MF20(オリンパス社製)等の公知の一分子蛍光分析システム等を用いて行うことができる。

10

【0048】

本発明の標的核酸分子の定量方法においては、FRETにより生じる光学的特性の変化を検出していることから、各マーカーの光学的特性の時間変化を検出し解析する方法として、蛍光強度を解析するFIDA、FCS、FCCSを行うことが好ましく、FIDA又はFCSを行うことがより好ましく、FIDAを行うことがさらに好ましい。

20

【0049】

また、これらの一分子蛍光分析法では、試料溶液中の分子ごとの蛍光シグナルを検出し、統計解析を行うことにより、FRETが生じている核酸分子プローブと、FRETが生じていない核酸分子プローブとを識別することができる。ここで、FRETが生じていない第1核酸分子プローブの数が、標的核酸分子と会合している第1核酸分子プローブの数と理論的に等しくなるため、直接的に標的核酸分子数を計測することができる。

30

【0050】

例えば、FIDAにより、共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを検出した後、統計解析を行うことによって、標的核酸分子と会合している第1核酸分子プローブの分子数を算出することにより、標的核酸分子を定量することができる。また、標的核酸分子が2本鎖核酸であった場合には、標的核酸分子から解離した2本鎖のうち1本は第1核酸分子プローブと会合し、他方は第2核酸分子プローブと会合する。このため、標的核酸分子と会合している第2核酸分子プローブの分子数を算出することによっても、標的核酸分子を定量することができる。

【0051】

同様に、共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを、自己相関解析(FCS)又は相互相関解析(FCCS)によって検出した後、統計解析を行い、標的核酸分子と会合している第1核酸分子プローブ又は第2核酸分子プローブの分子数を算出することによっても、標的核酸分子を定量することができる。なお、FCSやFCCSの場合には、消光物質としてダーククエンチャーを用いることにより、より精度よく標的核酸分子を定量することができる。

40

【0052】

このように、本発明の標的核酸分子の定量方法は、いわゆる、FRETによるエネルギー移動による蛍光強度等の光学的特性の時間変化を、FIDAやFCS等の一分子蛍光分析法を用いて、個々の分子に対して検出し解析することにより、標的核酸分子と核酸分子プローブとの会合を、直接的かつ精度よく検出する方法であり、標的核酸分子の濃度を定

50

量することができる。

【0053】

図2は、第1マーカーとして蛍光色素を、第2マーカーとしてダーククエンチャーを用いた場合の本発明の標的核酸分子の定量方法の一態様を示した図である。図2(A)は、試料溶液調製前、すなわち、標的核酸分子Target NA (Target Nucleic Acids) (3)と混合される前の第1マーカーである蛍光色素TAMRA (1a)を結合させた第1核酸分子プローブ(1)と、TAMRAの消光物質である第2マーカーBHQ-2 (2a)を結合させた第2核酸分子プローブ(2)とが会合した状態を示したものである。一方、図2(B)は、これらの核酸分子プローブに対して、標的核酸分子(Target Nucleic Acids、図中、「Target NA」)(3)を含有する核酸含有試料を添加して混合した後、変性し、会合させて得られた会合体等の状態を示したものである。第1核酸分子プローブ(1)の一部は標的核酸分子(3)と会合し、残りの第1核酸分子プローブ(1)は第2核酸分子プローブ(2)と再会合する。第1核酸分子プローブ(1)と再会合しなかった第2核酸分子プローブ(2)は、第2マーカーBHQ-2 (2a)がダーククエンチャーであるため、蛍光は発しない。一方、標的核酸分子と会合した第1核酸分子プローブ(1)は、近傍に消光物質がないために、蛍光を発する。このため、この試料溶液をFIDAで計測し、統計解析することにより、図2(C)に示すように、蛍光強度の異なる2種類の蛍光分子として計測できる。図2(C)は、解析の結果得られた、試料溶液中の各蛍光強度を有する分子の分布を示している。蛍光強度の小さい分子が、第1核酸分子プローブ(1)と第2核酸分子プローブ(2)とが会合している分子を示し、蛍光強度の大きい分子が、第1核酸分子プローブ(1)と標的核酸分子(3)とが会合している分子を示す。つまり、蛍光強度の大きい分子の分子数が、標的核酸分子(3)の分子数であり、よって、標的核酸分子を定量することができる。

10

20

【0054】

図3は第1マーカー及び第2マーカーとして蛍光色素を用いた場合の本発明の標的核酸分子の定量方法の一態様を示した図である。図3(A)は、試料溶液調製前、すなわち、標的核酸分子Target NA (Target Nucleic Acids) (3)と混合される前の第1マーカーである蛍光色素Cy5 (1b)を結合させた第1核酸分子プローブ(1)と、Cy5の消光物質である第2マーカーである蛍光色素TAMRA (2b)を結合させた第2核酸分子プローブ(2)とが会合した状態を示したものである。図2に示す態様では、第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとの会合体は蛍光を発することはなかったが、図3に示す態様では、両者が会合している場合、第2マーカーCy5 (2b)は第1マーカーTMR (1b)と蛍光エネルギー共鳴を起こし、第1マーカーTMR (1b)の蛍光分子の励起波長で第2マーカーCy5 (2b)が励起される。よって、第1マーカーの励起波長を照射し、第2マーカーの蛍光を検出することにより、第1マーカーと第2マーカーが近傍にあること、すなわち第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとが会合していることがわかる。一方、図3(B)は、これらの核酸分子プローブに対して、標的核酸分子(Target Nucleic Acids、図中、「Target NA」)(3)を含有する核酸含有試料を添加して混合した後、変性し、会合させて得られた会合体等の状態を示したものである。第1核酸分子プローブ(1)の一部は標的核酸分子(3)と会合し、残りの第1核酸分子プローブ(1)は第2核酸分子プローブ(2)と再会合する。図3(C)は、この試料溶液を、TMRの励起波長である543nmで励起し、かつTMRの蛍光波長で検出し、FIDAにより統計解析を行った結果得られた、試料溶液中の各蛍光強度を有する分子の分布を示している。この場合には、標的核酸分子(3)と会合した第1核酸分子プローブ(1)からは強い蛍光シグナルが観察されるが、第2核酸分子プローブと会合した第1核酸分子プローブ(1)又は第2核酸分子プローブ(2)のみからは、弱い蛍光シグナルが観察される。つまり、蛍光強度の大きい分子の分子数が、標的核酸分子(3)の分子数となる。一方、図3(D)は、この試料溶液にTMRの励起波長である543nmで励起し、Cy5の蛍光波長(670nm

30

40

50

)で検出し、FIDAにより統計解析を行った結果得られた、試料溶液中の各蛍光強度を有する分子の分布を示している。この場合には、第1核酸分子プローブ(1)と第2核酸分子プローブ(2)との会合体のみから、蛍光エネルギー移動による強い蛍光シグナルを発する分子が分離・検出される。つまり、Cy5の蛍光波長で検出することにより、TMRの蛍光波長で検出した場合の裏の反応を確認することができ、精度が向上する。

【0055】

また、本発明の標的核酸分子の定量方法は、前述の第1核酸分子プローブと第2核酸分子プローブとを含むキットを用いることにより、より簡便に核酸含有試料中の標的核酸分子を定量することができる。特に、標的核酸分子と相補的な塩基配列中の少なくとも1の塩基が光反応性塩基誘導体に置換されている第1核酸分子プローブを含むキットであることが好ましい。当該キットは、これらの核酸分子プローブ以外にも、試料溶液を調製するために用いられるバッファー等の他の試薬等を含んでいてもよい。

10

【実施例】

【0056】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0057】

[実施例1]

ヒトのマイクロRNAであるmiR-21(hsa-miR-21, 5'-UAGCUUAUCAAGACUGAUGUUGA-3', The miRBase Sequence Database - Release 12.0, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>)と相同な配列をもつ1本鎖DNAを標的核酸分子として、本発明の標的核酸分子の定量方法により、未標識の標的核酸分子の濃度を効率よく測定した。

20

まず、miR-21に相補的な塩基配列を有し、5'末端に第1マーカとしてTAMRAを結合させ、かつ1の塩基を、クロスリンクする塩基誘導体として3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside(^CN^VK)に置換した第1核酸分子プローブと、当該第1核酸分子プローブと相同的な塩基配列を有し、5'末端に第2マーカとしてBHQ-2を結合させた第2核酸分子プローブとを用意した。各プローブを10nMとなるように混合した溶液に、標的核酸分子(miR-21と相同な配列をもつ1本鎖DNA)を最終濃度で0.08~10nMとなるように添加して、試料溶液を調製した。各試料溶液を、90℃で10分間変性させた後、62℃まで1℃/分で温度を下げることにより、ハイブリダイゼーション(会合)を行った後、62℃にて、366nmの光照射(クロスリンク)を行った。その後室温まで冷却した後、TAMRAの励起波長を照射してTAMRAの蛍光波長で検出し、FIDA解析を行った。

30

得られた解析結果を図4に示す。横軸は添加した1本鎖DNA(標的核酸分子)の濃度を表し、縦軸は共焦点領域におけるTAMRAの蛍光が検出された分子の個数、すなわち、第2核酸分子プローブの代わりに添加した1本鎖DNAと会合した結果、蛍光が回復した第1核酸分子プローブの個数を表している。添加した1本鎖DNAの濃度に比例して、蛍光が回復した第1核酸分子プローブの個数が増加していた。

40

これらの結果から、本発明の標的核酸分子の定量方法により、試料溶液中に存在する標的核酸分子を定量することができることが明らかである。なお、本実施例では添加した核酸(標的核酸分子)はDNAであるが、RNAでも同様である。

【0058】

[実施例2]

次に、特異性を検証するために、実施例1で用いたmiR-21と相同な配列をもつ1本鎖DNA(特異核酸)と、前記特異核酸中の1塩基をC(シトシン)からG(グアニン)に置換した1本鎖DNA(非特異核酸)との2種類の核酸を、本発明の標的核酸分子の定量方法によりそれぞれ定量した。また、共有結合形成の効果を検証するため、実施例1で用いた第1核酸分子プローブ及び第2核酸分子プローブに加えて、実施例1で用いた第

50

1 核酸分子プローブと同一の塩基配列を有し、かつ 5' 末端に第 1 マーカーとして T A M R A を結合させたもの (^C ^N ^V K が導入されていないもの) を、未置換第 1 核酸分子プローブとして調製した。

具体的には、第 1 核酸分子プローブ及び第 2 核酸分子プローブをそれぞれ 10 n M となるように混合した溶液に、特異核酸又は非特異核酸を最終濃度が 1 . 25 n M、2 . 5 n M、又は 5 n M となるように添加した試料溶液をそれぞれ調製した。さらに、未置換第 1 核酸分子プローブ及び第 2 核酸分子プローブをそれぞれ 10 n M となるように混合した溶液に、非特異核酸を最終濃度が 1 . 25 n M、2 . 5 n M、又は 5 n M となるように添加した試料溶液をそれぞれ調製した。各試料溶液を、実施例 1 と同様にして、変性及びハイブリダイゼーション (会合) を行った後、62 °C にて 366 nm の光照射 (クロスリンク) を行い、室温まで冷却した後、T A M R A の励起波長を照射して T A M R A の蛍光波長で検出し、F I D A 解析を行った。

得られた解析結果を図 5 に示す。なお、縦軸及び横軸は、図 4 と同様である。また、図中、「特異 (クロスリンクあり) 」は特異核酸及び ^C ^N ^V K で置換された第 1 核酸分子プローブを添加した試料溶液の結果を、「非特異 (クロスリンクあり) 」は非特異核酸及び ^C ^N ^V K で置換された第 1 核酸分子プローブを添加した試料溶液の結果を、「非特異 (クロスリンクなし) 」は非特異核酸及び未置換第 1 核酸分子プローブを添加した試料溶液の結果を、それぞれ示している。この結果、非特異核酸を添加した試料溶液のうち、^C ^N ^V K で置換された第 1 核酸分子プローブを用いてクロスリンク処理 (366 nm の光照射) を行ったものでは、T A M R A の蛍光シグナルを検出することはできず、第 2 核酸分子

プローブに換えて非特異核酸と会合した第 1 核酸分子プローブは試料溶液中に存在していなかった。一方、非特異核酸を添加した試料溶液のうち、未置換第 1 核酸分子プローブを用いたものでは、T A M R A の蛍光シグナルが検出され、非特異核酸と会合した第 1 核酸分子プローブが試料溶液中に存在していることが分かった。

第 1 核酸分子プローブと非特異核酸は、1 塩基のミスマッチを有するため、非特異核酸を含む試料溶液において検出された T A M R A の蛍光シグナルは、非特異的なシグナルである。これらの結果から、特異的会合条件下で予め会合体中の 2 本の核酸鎖間に共有結合を形成することにより、非特異的会合体の形成を顕著に抑制することができること、つまり、本発明の標的核酸分子の定量方法を用いることにより、1 塩基程度のミスマッチをも識別し、標的核酸分子を特異的に検出し得ることが明らかである。

【産業上の利用可能性】

【0059】

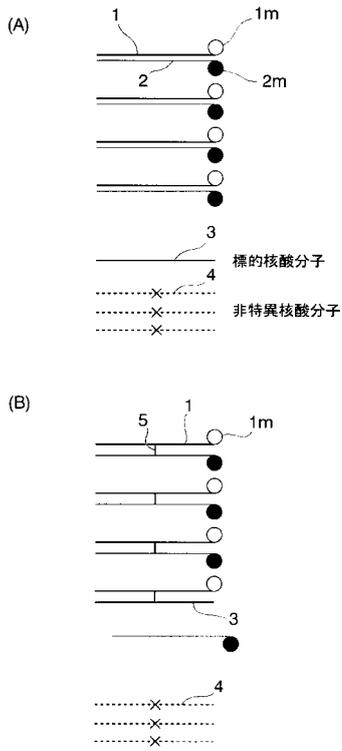
本発明の標的核酸分子の定量方法により、F R E T によるエネルギー移動を一分子ごとに検出し、解析することによって、試料中に存在する標的核酸分子を、高感度に、かつ精度良く定量することができるため、試料中の核酸を定量解析するような生化学、分子生物学、臨床検査等の分野で利用が可能である。

【符号の説明】

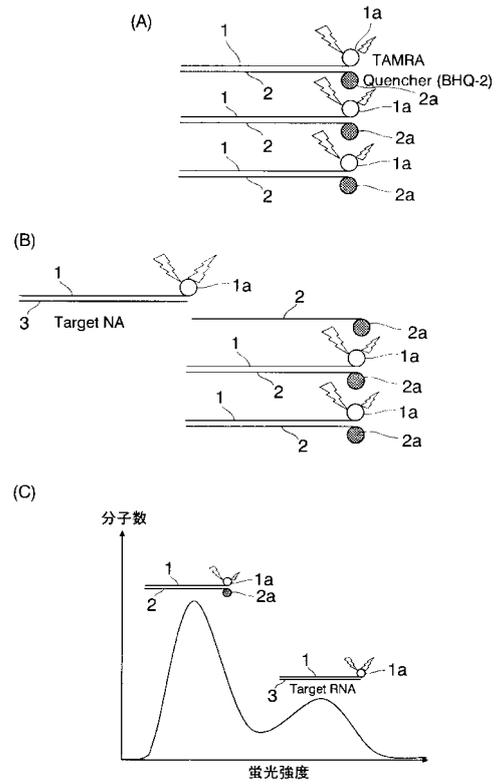
【0060】

1 ... 第 1 核酸分子プローブ、1 m ... 第 1 マーカー、1 a ... 第 1 マーカー (T A M R A)、1 b ... 第 1 マーカー (T M R)、2 ... 第 2 核酸分子プローブ、2 m ... 第 2 マーカー、2 a ... 第 2 マーカー (B H Q - 2)、2 b ... 第 2 マーカー (C y 5)、3 ... 標的核酸分子 (T a r g e t N A)、4 ... 非特異核酸分子、5 ... 共有結合。

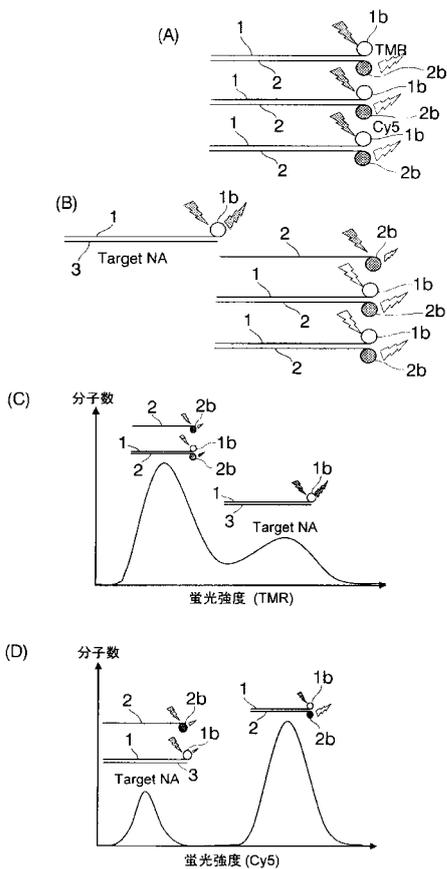
【 図 1 】



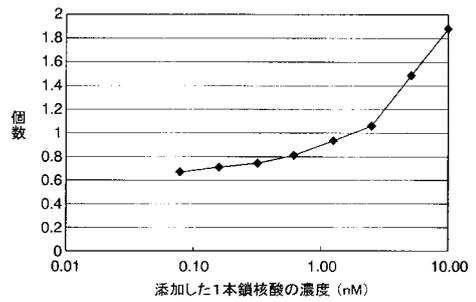
【 図 2 】



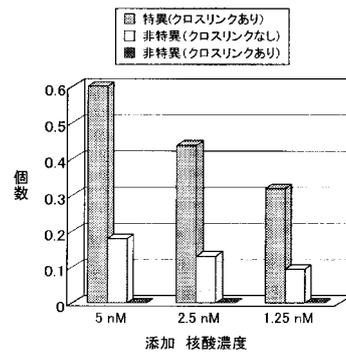
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2011036150000001.app

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 21/64	C
	G 0 1 N 21/64	F

(72)発明者 堀 邦夫
 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

(72)発明者 中田 秀孝
 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

(72)発明者 小林 佐代子
 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA01 EA01 FA02 FA03 HA01 KA02 KA03 KA05
 NA02
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA14
 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR56 QS34 QX02