

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6774047号
(P6774047)

(45) 発行日 令和2年10月21日(2020.10.21)

(24) 登録日 令和2年10月6日(2020.10.6)

(51) Int. Cl. F I
 C 1 2 Q 1/6834 (2018.01) C 1 2 Q 1/6834 Z
 C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 Z N A A

請求項の数 17 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2016-123934 (P2016-123934)	(73) 特許権者	504171134
(22) 出願日	平成28年6月22日 (2016. 6. 22)		国立大学法人 筑波大学
(65) 公開番号	特開2017-225396 (P2017-225396A)		茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(43) 公開日	平成29年12月28日 (2017.12.28)	(74) 代理人	100106909
審査請求日	令和1年6月20日 (2019.6.20)		弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100188558
			弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100169764
			弁理士 清水 雄一郎
		(72) 発明者	大石 基
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
			大学法人筑波大学内
		(72) 発明者	杉山 聡深
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
			大学法人筑波大学内

最終頁に続く

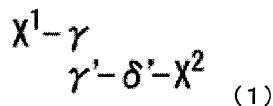
(54) 【発明の名称】 複合体、試料中の対象核酸の検出方法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

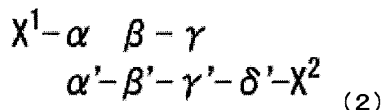
下記式(1)~(4)のいずれかで表される、第1の核酸構造体を介して第1の粒子と第2の粒子とが結合した複合体であって、前記第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、前記第1の粒子と前記第2の粒子との結合が解離する、複合体。

【化1】



[式(1)中、 X^1 又は X^2 は一方が前記第1の粒子を表し、他方が前記第2の粒子を表し、 γ 及び γ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 δ' は前記と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

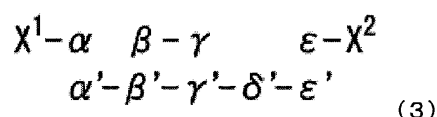
【化2】



[式(2)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 及び γ は前記式(1)における定義に同じであり、 α' 、 β' 及び γ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 δ' 及び δ はそ

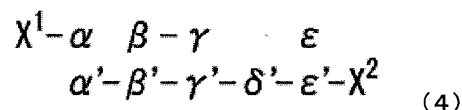
れぞれ前記 又は前記 と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

【化 3】



[式(3)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、 ε' 及び ' は前記式(2)における定義に同じであり、' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、' は前記 と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

【化 4】



[式(4)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、 ε' 、' 及び ' は前記式(3)における定義に同じである。]

【請求項 2】

前記第 1 の粒子が光学的に識別可能である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記第 1 の粒子に水溶性高分子化合物が結合している、請求項 1 又は 2 に記載の複合体。

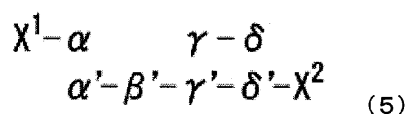
【請求項 4】

遠心分離又は磁石を近接させることにより前記第 2 の粒子が凝集する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

下記式(5)で表される、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した複合体であって、前記第 1 の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、対象核酸が生成される、複合体。

【化 5】



[式(5)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、' 及び ' は請求項 1 の式(3)における定義に同じであり、' は前記 ' 又と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

【請求項 6】

前記第 1 の粒子が光学的に識別可能である、請求項 5 に記載の複合体。

【請求項 7】

前記第 1 の粒子に水溶性高分子化合物が結合している、請求項 5 又は 6 に記載の複合体。

【請求項 8】

遠心分離又は磁石を近接させることにより前記第 2 の粒子が凝集する、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 9】

下記工程(a) ~ (c)を備える、試料中の対象核酸の検出方法。

工程(a)：前記試料と、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離する工程。

10

20

30

40

50

工程 (b) : 工程 (a) の後に、解離した前記第 2 の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第 1 の粒子が前記混合液中に分散する工程。

工程 (c) : 工程 (b) の後に、前記混合液中の前記第 1 の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

【請求項 10】

工程 (a) における前記複合体が請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の複合体であり、前記対象核酸が - [但し、 は前記式 (3) における定義に同じであり、 は前記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、請求項 9 に記載の検出方法。

10

【請求項 11】

前記工程 (a) が、前記試料と、前記式 (2) ~ (4) のいずれかで表される複合体と、 - - [但し、 、 、 は、前記式 (3) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを含む混合液をインキュベートする工程であって、

前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の核酸構造体から - の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する工程 (a 1) と、

- の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の核酸構造体から の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸が解離することにより、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が再生される工程 (a 2) とを含む、請求項 10 に記載の検出方法。

20

【請求項 12】

下記工程 (a a) 、 (b b) 及び (c c) を備える、試料中の対象核酸の検出方法。

工程 (a a) : 前記試料と、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、足場依存型鎖交換反応により前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離するとともに対象核酸が増幅される工程。

工程 (b b) : 工程 (a a) の後に、解離した前記第 2 の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第 1 の粒子が前記混合液中に分散する工程。

工程 (c c) : 工程 (b b) の後に、前記混合液中の前記第 1 の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

30

【請求項 13】

前記工程 (a a) が、前記試料と、下記式 (6) で表され、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した第 1 の複合体と、下記式 (7) で表され、第 2 の核酸構造体を介して前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子とが結合した第 2 の複合体と、下記式 (8) で表される第 3 の核酸構造体と、 - - - [但し、 、 、 は、下記式 (8) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを含む混合液をインキュベートする工程であって、

前記対象核酸が - [但し、 は前記式 (3) における定義に同じであり、 は前記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片であり、

40

前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第 3 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 3 の核酸構造体から - の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する工程 (a a 1) と、

- の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の核酸構造体から の塩基配列を有する一本鎖核酸及び - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離することにより、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が生成される工程 (a a 2) と、

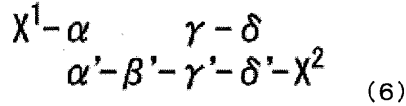
- の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が前記第 3 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 3 の核酸構造体から - の塩基配列を有す

50

る一本鎖核酸及び対象核酸が解離することにより、対象核酸が再生される工程 (a a 3) と、

- - の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第 2 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 2 の核酸構造体から の塩基配列を有する一本鎖核酸及び - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離することにより、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が生成される工程 (a a 4) とを含む、請求項 1 2 に記載の検出方法。

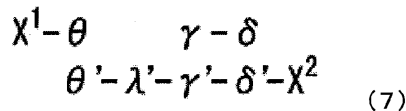
【化 6】



10

[式 (6) 中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は前記式 (3) における定義に同じであり、 θ は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

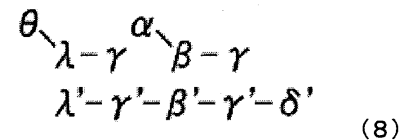
【化 7】



20

[式 (7) 中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は前記式 (6) における定義に同じであり、 θ 、 θ' 、 λ' 、 γ' 、 δ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 θ は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

【化 8】



[式 (8) 中、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' は前記式 (3) における定義に同じであり、 θ 、 θ' 、 λ' 、 γ' 、 δ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 θ は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

30

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の複合体を備える、試料中の対象核酸の検出キット。

【請求項 1 5】

前記式 (2) ~ (4) のいずれかで表される複合体と、 - - [但し、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' は、前記式 (3) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを備え、前記対象核酸が - - [但し、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' は前記式 (3) における定義に同じであり、 θ は前記式 (3) における前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、請求項 1 4 に記載のキット。

40

【請求項 1 6】

前記式 (6) で表され、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した第 1 の複合体と、前記式 (7) で表され、第 2 の核酸構造体を介して前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子とが結合した第 2 の複合体と、前記式 (8) で表される第 3 の核酸構造体と、 - - - [但し、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' は、前記式 (8) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを備え、前記対象核酸が - - [但し、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' は前記式 (3) における定義に同じであり、 θ は前記式 (3) における前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、請求項 1 4 に記載のキット。

50

【請求項 17】

増感剤を更に備える、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複合体、試料中の対象核酸の検出方法及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

近年の分子生物学の急速な発展に伴い、疾病に關与する様々な核酸（DNA及びRNA）の存在が明らかになりつつある。特に、タンパク質をコードしていない約20塩基の1本鎖の非翻訳RNAであるマイクロRNA（miRNA）が、自身の配列と相補的な配列を持つmRNAの翻訳を制御していることが明らかとなっている。miRNAは、癌、循環器疾患、神経系疾患を含むヒトの様々な疾患に關与していることからその重要性が広く認識されつつある。

10

【0003】

近年、疾患に關与するmiRNAがエクソソーム（脂質膜で構成された大きさ30~100nmのベシクル）に封入された状態で血中に安定に存在することが報告されている。したがって、臓器と比べてアクセスしやすい血中からmiRNAを高感度にその場で検出することができれば様々な疾患に対する早期診断が可能になると考えられる。

【0004】

20

現在、血中miRNA等の対象核酸を検出する手法としては、RT-PCR（Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction：逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応）法等が用いられている（例えば非特許文献1を参照。）。

【0005】

また、より簡便な対象核酸の比色検出システムとして、DNA化金ナノ粒子を用いた手法が数多く報告されている（例えば、非特許文献2を参照。）。これらは、金ナノ粒子表面に存在するDNAと対象核酸がハイブリダイゼーションすることでDNA化金ナノ粒子が凝集（架橋）し、溶液の色が赤色から紫色に変化する現象を利用したものである。また、DNA化金ナノ粒子を用いた手法にシグナル増幅機能を付与した検出システムも報告されている（例えば、非特許文献3を参照。）。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Chen C., et al., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR., *Nucleic Acids Res.*, 33 (20), e179. 2005.

【非特許文献2】Mirkin C. A., et al., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials., *Nature*, 382 (6592), 607-609, 1996.

【非特許文献3】Song T. and Liang H., Synchronized assembly of gold nanoparticles driven by a dynamic DNA-fueled molecular machine., *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (26), 10803-10806, 2012.

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、非特許文献1に記載の方法は、手間、時間、コストのかかる前処理（対象核酸の精製等）及び高価な装置（リアルタイムPCR装置等）が必要不可欠であり、対象核酸のその場検出には利用しにくい場合がある。また、非特許文献2に記載の方法は、検出感度が低く、対象核酸の検出限界濃度は10nM程度である。また、非特許文献3に記載の方法は、非特許文献2に記載の方法よりも検出感度が向上し、対象核酸の検出限界濃度は0.26nM程度であるが、検出に要する時間が極めて長く、約12時間を要する

50

。そこで、本発明は、対象核酸を簡便に検出する技術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】

【0008】

本発明は以下の態様を含む。

[1] 第1の核酸構造体を介して第1の粒子と第2の粒子とが結合した複合体であって、前記第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、前記第1の粒子と前記第2の粒子との結合が解離する、複合体。

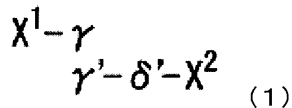
[2] 前記第1の粒子が光学的に識別可能である、[1]に記載の複合体。

[3] 前記第1の粒子に水溶性高分子化合物が結合している、[1]又は[2]に記載の複合体。

[4] 遠心分離又は磁石を近接させることにより前記第2の粒子が凝集する、[1]～[3]のいずれかに記載の複合体。

[5] 下記式(1)で表される、[1]～[4]のいずれかに記載の複合体。

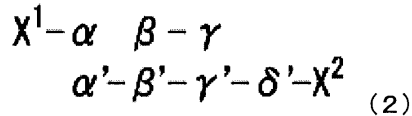
【化1】



[式(1)中、 X^1 又は X^2 は一方が前記第1の粒子を表し、他方が前記第2の粒子を表し、 γ 及び γ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 δ' は前記と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

[6] 下記式(2)で表される、[1]～[4]のいずれかに記載の複合体。

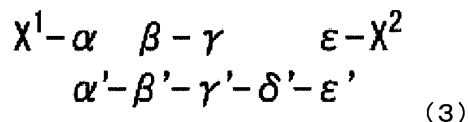
【化2】



[式(2)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 及び δ' は前記式(1)における定義に同じであり、 α' 及び β' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 γ' 及び δ' はそれぞれ前記 α 又は前記 β と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

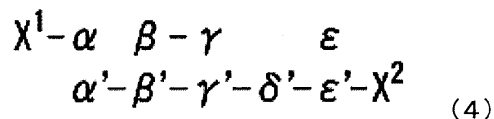
[7] 下記式(3)又は下記式(4)で表される、[1]～[4]のいずれかに記載の複合体。

【化3】



[式(3)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 δ' 及び ε' は前記式(2)における定義に同じであり、 α' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 β' は前記 α と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

【化4】



[式(4)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 δ' 、 ε' 及び δ' は前記式(3)における定義に同じである。]

[8] 第1の核酸構造体を介して第1の粒子と第2の粒子とが結合した複合体であって、前記第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、対象核酸が生成される、複合体。

10

20

30

40

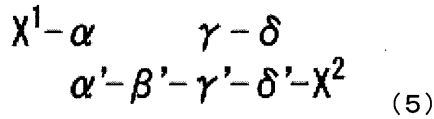
50

[9] 前記第 1 の粒子が光学的に識別可能である、[8] に記載の複合体。

[10] 前記第 1 の粒子に水溶性高分子化合物が結合している、[8] 又は [9] に記載の複合体。

[11] 遠心分離又は磁石を近接させることにより前記第 2 の粒子が凝集する、[8] ~ [10] のいずれかに記載の複合体。

[12] 下記式 (5) で表される、[8] ~ [11] のいずれかに記載の複合体。
【化 5】



10

[式 (5) 中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び ' は前記式 (3) における定義に同じであり、' は前記 ' 又と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

]

[13] 下記工程 (a) ~ (c) を備える、試料中の対象核酸の検出方法。

工程 (a) : 前記試料と、[1] ~ [7] のいずれかに記載の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離する工程。

工程 (b) : 工程 (a) の後に、解離した前記第 2 の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第 1 の粒子が前記混合液中に分散する工程。

20

工程 (c) : 工程 (b) の後に、前記混合液中の前記第 1 の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

[14] 工程 (a) における前記複合体が [5] ~ [7] のいずれかに記載の複合体であり、前記対象核酸が ' [但し、' は前記式 (3) における定義に同じであり、' は前記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、[13] に記載の検出方法。

[15] 前記工程 (a) が、前記試料と、[6] 又は [7] に記載の複合体と、' - ' -

[但し、'、'、' は、前記式 (3) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを含む混合液をインキュベートする工程であって、

30

前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の核酸構造体から ' の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する工程 (a 1) と、

' - ' の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第 1 の核酸構造体から ' の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸が解離することにより、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が再生される工程 (a 2) とを含む、[14] に記載の検出方法。

[16] 下記工程 (a a)、(b b) 及び (c c) を備える、試料中の対象核酸の検出方法。

40

工程 (a a) : 前記試料と、[12] に記載の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、足場依存型鎖交換反応により前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離するとともに対象核酸が増幅される工程。

工程 (b b) : 工程 (a a) の後に、解離した前記第 2 の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第 1 の粒子が前記混合液中に分散する工程。

工程 (c c) : 工程 (b b) の後に、前記混合液中の前記第 1 の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

[17] 前記工程 (a a) が、前記試料と、下記式 (6) で表され、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した第 1 の複合体と、下記式 (7) で表され、第

50

2の核酸構造体を介して前記第1の粒子と前記第2の粒子とが結合した第2の複合体と、下記式(8)で表される第3の核酸構造体と、
 [但し、 θ 、 λ 、 α 、 β 、 γ 、 δ は、下記式(8)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを含む混合液をインキュベートする工程であって、

前記対象核酸が θ - λ - α - β - γ - δ [但し、 θ は前記式(3)における定義に同じであり、 λ は前記式(3)における前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片であり、

前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第3の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第3の核酸構造体から θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する工程(a a 1)と、

10

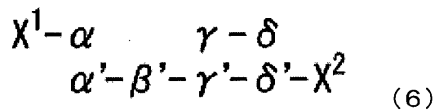
θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第1の核酸構造体から θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸及び θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離することにより、前記第1の粒子と前記第2の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が生成される工程(a a 2)と、

θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が前記第3の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第3の核酸構造体から θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸が解離することにより、対象核酸が再生される工程(a a 3)と、

θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第2の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第2の核酸構造体から θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸及び θ - λ - α - β - γ - δ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離することにより、前記第1の粒子と前記第2の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が生成される工程(a a 4)とを含む、[16]に記載の検出方法。

20

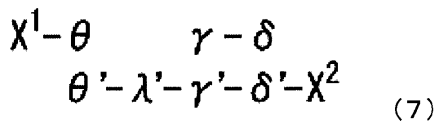
【化6】



[式(6)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 及び α' は前記式(3)における定義に同じであり、 α' は前記 α 又と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

30

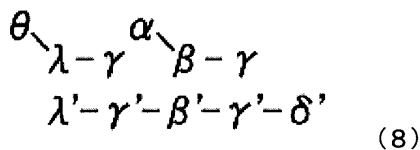
【化7】



[式(7)中、 X^1 、 X^2 、 θ 、 λ 、 α 、 β 、 γ 、 δ 及び θ' は前記式(6)における定義に同じであり、 θ' 及び λ はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 θ' は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

40

【化8】



[式(8)中、 θ 、 λ 、 α 、 β 、 γ 、 δ は前記式(3)における定義に同じであり、 λ 及び α はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 λ' は前記 λ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]

[18][1]~[12]のいずれかに記載の複合体を備える、試料中の対象核酸の検出キット。

50

[1 9] [6] 又は [7] に記載の複合体と、 - - [但し、 、 、 は、前記式 (3) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを備え、前記対象核酸が - [但し、 は前記式 (3) における定義に同じであり、 は前記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、 [1 8] に記載のキット。

[2 0] 前記式 (6) で表され、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した第 1 の複合体と、前記式 (7) で表され、第 2 の核酸構造体を介して前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子とが結合した第 2 の複合体と、前記式 (8) で表される第 3 の核酸構造体と、 - - - [但し、 、 、 は、前記式 (8) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを備え、前記対象核酸が - [但し、 は前記式 (3) における定義に同じであり、 は前記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片である、 [1 8] に記載のキット。

10

[2 1] 増感剤を更に備える、 [1 8] ~ [2 0] のいずれかに記載のキット。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、対象核酸を簡便に検出する技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】複合体の一例を示す模式図である。

20

【図 2】DNA の鎖交換反応の一例を示す模式図である。

【図 3】DNA の足場依存型鎖交換反応の一例を示す模式図である。

【図 4】実験例 2 において、波長 5 2 2 n m における吸光度を測定した結果を示すグラフである。

【図 5】実験例 3 において、波長 5 2 2 n m における吸光度を測定した結果を示すグラフである。

【図 6】実験例 4 において、波長 5 2 2 n m における吸光度を測定した結果を示すグラフである。また、挿入図は、m i R 3 4 c の濃度 0 ~ 1 . 0 n M の範囲の拡大図である。

【図 7】実験例 5 において、波長 5 7 5 n m における吸光度を測定した結果を示すグラフである。また、挿入図は、m i R 3 4 c の濃度 0 ~ 0 . 1 n M の範囲の拡大図である。

30

【図 8】実験例 5 の増幅反応の前後における反応液の写真である。

【図 9】実験例 6 の増幅反応の前後における反応液の写真である。

【図 1 0】実験例 6 の増幅反応前の波長 5 2 2 n m における吸光度の測定結果を示すグラフである。また、挿入図は、増幅反応後の波長 5 7 5 n m における吸光度の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

[複合体]

1 実施形態において、本発明は、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した複合体であって、前記第 1 の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離する、複合体を提供する。

40

【 0 0 1 2 】

図 1 は、本実施形態の複合体の一例を示す模式図である。図 1 に示すように、複合体 1 0 0 は、第 1 の粒子 1 1 0 と、第 2 の粒子 1 2 0 と、第 1 の核酸構造体 1 3 0 とを備える。第 1 の核酸構造体 1 3 0 の一部は第 1 の粒子 1 1 0 と結合している。また、第 1 の核酸構造体 1 3 0 の他の一部は第 2 の粒子 1 2 0 と結合している。すなわち、第 1 の粒子 1 1 0 と第 2 の粒子 1 2 0 とは、第 1 の核酸構造体 1 3 0 を介して結合している。後述するように、第 1 の核酸構造体が、足場依存型鎖交換反応を行うことにより、第 1 の粒子 1 1 0 と第 2 の粒子 1 2 0 との結合が解離する。

【 0 0 1 3 】

50

(鎖交換反応)

ここで、図2を参照しながら、鎖交換反応について説明する。図2は、DNAの鎖交換反応の一例を示す模式図である。図2では、一本鎖DNA断片210と、これに相補的な塩基配列を有する一本鎖DNA断片220とがハイブリダイズして、二本鎖DNA断片230を形成している。二本鎖DNA断片230に、一本鎖DNA断片220と同じ塩基配列を有する別の一本鎖DNA断片220'を混合してインキュベートすると、やがて、一本鎖DNA断片220と一本鎖DNA断片220'とが置換される。この、一本鎖DNA断片220と一本鎖DNA断片220'との置換反応を鎖交換反応という。

【0014】

鎖交換反応の結果、一本鎖DNA断片220と一本鎖DNA断片220'とが置換され、一本鎖DNA断片210と一本鎖DNA断片220'とがハイブリダイズした二本鎖DNA断片230'と、遊離した一本鎖DNA断片220とが生成される。しかしながら、図2に示す鎖交換反応は反応に長時間を必要とすることが知られている。

【0015】

(足場依存型鎖交換反応)

続いて、図3を参照しながら、足場依存型鎖交換反応について説明する。図3は、DNAの足場依存型鎖交換反応の一例を示す模式図である。図3では、一本鎖DNA断片310と、これに相補的な塩基配列を有する一本鎖DNA断片320とがハイブリダイズして、二本鎖DNA断片330を形成している。

【0016】

ここで、一本鎖DNA断片310のうち、一本鎖DNA断片320とハイブリダイズしていない領域311を足場 (t o e - h o l d) という。二本鎖DNA断片330に、一本鎖DNA断片310に相補的な塩基配列を有する別の一本鎖DNA断片340を混合してインキュベートすると、やがて、一本鎖DNA断片310の足場領域311に一本鎖DNA断片340の一部がハイブリダイズする。続いて、足場領域311におけるハイブリダイゼーションを起点として、一本鎖DNA断片340と一本鎖DNA断片320とが置換される。この、足場領域311を介した、一本鎖DNA断片340と一本鎖DNA断片320との置換反応を足場依存型鎖交換反応という。

【0017】

足場依存型鎖交換反応の結果、一本鎖DNA断片320と一本鎖DNA断片340とが置換され、一本鎖DNA断片310と一本鎖DNA断片340とがハイブリダイズした二本鎖DNA断片330'と、遊離した一本鎖DNA断片320とが生成される。

【0018】

二本鎖DNA断片330'において、一本鎖DNA断片310のうち、一本鎖DNA断片340とハイブリダイズしていない領域312は、再び足場として機能する。その結果、今度は一本鎖DNA断片320と一本鎖DNA断片340とが置換される逆反応が進む。

【0019】

足場依存型鎖交換反応は、上述した足場を介しない鎖交換反応と比較して、速度定数 k ($M^{-1} s^{-1}$) が $10^5 \sim 10^7$ 倍増加することが知られている。また、足場の長さは4~6塩基で十分であることが知られている。

【0020】

後述するように、本実施形態の複合体では、第1の粒子と第2の粒子とを結合する、第1の核酸構造体上で行われる足場依存型鎖交換反応によって、前記第1の粒子と前記第2の粒子との結合が解離する。そして、解離した第1の粒子を検出することにより、対象核酸を検出することができる。

【0021】

実施例において後述するように、本実施形態の複合体を利用することにより、対象核酸を簡便に検出する技術を提供することができる。また、実施例において後述するように、本実施形態の複合体を利用した対象核酸の検出では、対象核酸を精製することなく、細胞

10

20

30

40

50

抽出液等の生体試料中の対象核酸を直接検出することもできる。したがって、例えば、血中から miRNA を高感度にその場で検出すること等が可能となる。

【0022】

本実施形態の複合体において、第1の粒子110は光学的に識別可能であってもよい。ここで、光学的に識別可能とは、例えば、可視光の吸収、蛍光、酵素反応により発色、蛍光又は化学発光を生じること等により、第1の粒子110の存在を検出可能であることを意味する。

【0023】

例えば、第1の粒子110はナノオーダーの直径を有する金粒子（金ナノ粒子）であってもよい。金ナノ粒子は、そのサイズ、形状、表面の修飾、凝集状態等に依存して吸光特性が変化することが知られている。あるいは、第1の粒子110は、量子ドットであってもよく、色素、蛍光物質、酵素（アルカリフォスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等）等で修飾した樹脂粒子等であってもよい。

【0024】

また、第1の粒子110には、水溶性高分子化合物が結合していてもよい。水溶性高分子化合物としては、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリアクリルアミド、デキストラン等が挙げられる。水溶性高分子化合物は、非イオン性であってもよく、イオン性であってもよい。水溶性高分子化合物が非イオン性であると、第1の粒子110の表面の電荷を減らす効果が高い傾向にあり、好ましい。

【0025】

第1の粒子110の表面に水溶性高分子化合物を結合させることにより、第1の粒子110の表面への生体物質の非特異的吸着を抑制することができる。また、水溶性高分子化合物を結合させることにより、第1の粒子110の表面の電荷を減らすことができる。この結果、水溶性高分子化合物を有しない第1の粒子110における鎖交換反応よりも、水溶性高分子化合物が結合した第1の粒子110における鎖交換反応の方が、反応速度が向上する傾向にある。

【0026】

水溶性高分子化合物の分子量は、第1の粒子110の表面の第1の核酸構造体を水溶性高分子化合物の分子量が覆ってしまわない（第1の核酸構造体が露出する）程度の分子量であることが好ましい。水溶性高分子化合物の分子量としては、例えば200～1500程度が挙げられる。

【0027】

本実施形態の複合体において、第2の粒子120は、遠心分離又は磁石を近接させることにより凝集するものであることが好ましい。第2の粒子120が、遠心分離又は磁石を近接させることにより凝集するものであると、上述した足場依存型鎖交換反応で第1の粒子110と第2の粒子120との結合が解離した後、遊離の第1の粒子110とそれ以外の粒子（第2の粒子120、第1の粒子110と第2の粒子120との結合が維持されている未反応の複合体等）を容易に分離することができる。その結果、遊離の第1の粒子110の量を測定することが容易になる。

【0028】

遠心分離の条件としては、遊離の第1の粒子110とそれ以外の粒子を簡便且つ確実に分離することができれば特に制限されず、例えば15,000×g以下で5分間以内の条件等が挙げられる。

【0029】

あるいは、第2の粒子120は、磁気粒子であってもよい。第2の粒子120が磁気粒子であると、磁気スタンド等により磁場を適用することにより、反応チューブの壁面等に第2の粒子120を容易に凝集させることができる。これにより、遊離の第1の粒子110とそれ以外の粒子を簡便且つ確実に分離することができる。

【0030】

（複合体：第1実施形態）

10

20

30

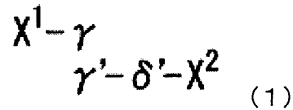
40

50

1実施形態において、上述した複合体は下記式(1)で表されるものであってもよい。

【0031】

【化9】



【0032】

式(1)中、 X^1 又は X^2 は一方が前記第1の粒子を表し、他方が前記第2の粒子を表し、 γ 及び γ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 δ 及び δ' は前記と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

10

【0033】

式(1)において、粒子 X^1 は一本鎖核酸断片 γ と結合している。また、一本鎖核酸断片 δ 及び δ' は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、粒子 X^2 は一本鎖核酸断片 δ' と結合している。また、一本鎖核酸断片 γ と δ とはハイブリダイズしている。その結果、一本鎖核酸断片 γ 、 δ 及び δ' は第1の核酸構造体を形成しており、第1の核酸構造体を介して粒子 X^1 と粒子 X^2 とが結合し、複合体を形成している。

【0034】

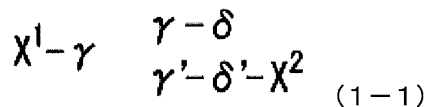
ここで、粒子 X^1 又は X^2 と核酸断片とは直接結合していてもよいし、スペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては任意の2価の基が挙げられ、例えば炭素数1~20のアルキレン基、炭素数2~20のポリオキシエチレン基、オリゴヌクレオチド鎖、ペプチド鎖等が挙げられる。

20

【0035】

式(1)で表される複合体に β [但し、 β は上記式(1)における定義に同じであり、 β は上記式(1)における前記 δ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させると、式(1)における γ の領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(1)における $X^1-\gamma$ が解離する。その結果、粒子 X^1 と粒子 X^2 との結合が解離する。粒子 X^1 と粒子 X^2 との結合が解離した状態を下記式(1-1)に示す。

【化10】



30

【0036】

式(1-1)において、一本鎖核酸断片 β 及び β' 、 γ 及び γ' は、それぞれハイブリダイズしている。また、 $X^1-\gamma$ は遊離している。

【0037】

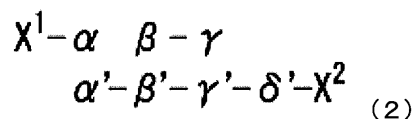
(複合体：第2実施形態)

1実施形態において、上述した複合体は下記式(2)で表されるものであってもよい。

40

【0038】

【化11】



【0039】

式(2)中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 及び β' は上記式(1)における定義に同じであり、 γ 及び γ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 α 及び α' はそれぞれ前記 β 又は前記 β' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

50

【 0 0 4 0 】

式(2)で表される複合体において、粒子X¹は一本鎖核酸断片と結合している。また、一本鎖核酸断片及びは連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片、及びは連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、粒子X²は一本鎖核酸断片と結合している。また、一本鎖核酸断片及び、及び、及びは、それぞれハイブリダイズしているが、とは結合していない。その結果、一本鎖核酸断片、及び、及びは第1の核酸構造体を形成しており、第1の核酸構造体を介して粒子X¹と粒子X²とが結合し、複合体を形成している。

10

【 0 0 4 1 】

式(1)で表される複合体と同様に、式(2)で表される複合体において、粒子X¹又はX²と核酸断片とは直接結合していてもよいし、スペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては上述したものと同様のものが挙げられる。

【 0 0 4 2 】

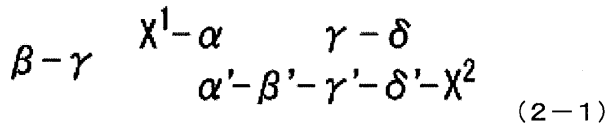
ここで、式(2)で表される複合体に [但し、は上記式(1)における定義と同じであり、は上記式(1)における前記と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させた場合の反応について説明する。の塩基配列を有する一本鎖核酸断片は、例えば、対象核酸(検出対象である一本鎖核酸断片)である。

20

【 0 0 4 3 】

式(2)で表される複合体にの塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させると、式(2)におけるの領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(2)におけるの塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離する。が解離した状態を下記式(2-1)に示す。

【化12】



【 0 0 4 4 】

式(2-1)において、一本鎖核酸断片及び、及びは、それぞれハイブリダイズしている。また、は遊離している。

30

【 0 0 4 5 】

続いて、式(2-1)で表される複合体に [但し、、は、上記式(2)における定義と同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させると、式(2-1)におけるの領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(2-1)におけるの塩基配列を有する一本鎖核酸断片、及びX¹が解離する。その結果、粒子X¹と粒子X²との結合が解離するとともに、の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が再生される。ここで、再生されるとは、一度足場依存型鎖交換反応に関与した、の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、再び新たな足場依存型鎖交換反応に関与できる状態になることを意味する。

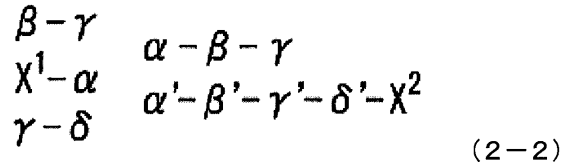
40

【 0 0 4 6 】

が再生され、粒子X¹と粒子X²との結合が解離した状態を下記式(2-2)に示す。

【 0 0 4 7 】

【化13】



【0048】

式(2-2)において、一本鎖核酸断片 $\beta-\gamma$ 、 $\alpha-\beta-\gamma$ 、及び $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ は、それぞれハイブリダイズしている。また、 $\gamma-\delta$ 、 $\chi^1-\alpha$ 、及び $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ はそれぞれ遊離している。このように、第2実施形態の複合体は、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を再生することができる。

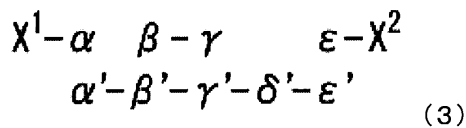
10

【0049】

1実施形態において、上述した複合体は下記式(3)又は下記式(4)で表されるものであってもよい。

【0050】

【化14】



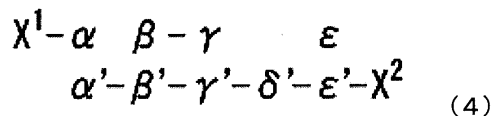
20

【0051】

式(3)中、 χ^1 、 χ^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、 ε' 及び χ^2 は上記式(2)における定義と同じであり、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ は前記 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。式(3)で表される複合体は、後述する実施例で使用した複合体に相当するものである。

【0052】

【化15】



30

【0053】

式(4)中、 χ^1 、 χ^2 、 α 、 β 、 γ 、 ε 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、 ε' 、 χ^2 及び χ^2 は上記式(3)における定義と同じである。

【0054】

式(3)で表される複合体は、上述した式(2)で表される複合体と類似した構成を有しており、一本鎖核酸断片 $\beta-\gamma$ 及び $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ が存在する点において、式(2)で表される複合体と相違している。

40

【0055】

式(3)で表される複合体において、粒子 χ^1 は一本鎖核酸断片 α と結合している。また、一本鎖核酸断片 $\beta-\gamma$ 及び $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ 、 $\beta-\gamma$ 、 α 、 χ^1 及び $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、粒子 χ^2 は一本鎖核酸断片 ε と結合している。また、一本鎖核酸断片 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 $\beta-\gamma$ 、 α 、 χ^1 、 ε 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 χ^2 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 χ^2 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ は、それぞれハイブリダイズしているが、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ と $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ とは結合していない。また、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ と $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\chi^2$ とは結合していない。その結果、一本鎖核酸断片 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 $\beta-\gamma$ 、 α 、 χ^1 、 ε 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 χ^2 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ 、 χ^2 、 $\alpha'-\beta'-\gamma'-\delta'-\varepsilon'$ は第1の核酸構造体を形成しており、第1の核酸構造体を介して粒子 χ^1 と粒子 χ^2 とが結合し、複合体を形成している。

【0056】

50

式(1)で表される複合体と同様に、式(3)で表される複合体において、粒子X¹又はX²と核酸断片とは直接結合していてもよいし、スペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては上述したものと同様のものが挙げられる。

【0057】

式(4)で表される複合体は、式(3)で表される複合体と類似した構成を有しており、粒子X²が結合している一本鎖核酸断片が'ではなく'である点において相違している。式(4)で表される複合体も、式(3)で表される複合体と同様に機能することができる。

【0058】

ここで、式(3)で表される複合体に - [但し、は上記式(1)における定義に同じであり、は上記式(1)における前記'と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させた場合の反応について説明する。 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片は、例えば、対象核酸(検出対象である一本鎖核酸断片)である。

10

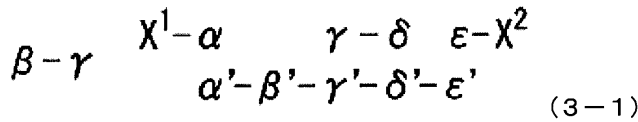
【0059】

式(3)で表される複合体に - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させると、式(3)における'の領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(3)における - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離する。 - が解離した状態を下記式(3-1)に示す。

【0060】

【化16】

20



【0061】

式(3-1)において、一本鎖核酸断片'及び'、及び'、及び'、及び'は、それぞれハイブリダイズしている。また、 - は遊離している。

【0062】

続いて、式(3-1)で表される複合体に - - [但し、'、'、'は、上記式(2)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を反応させると、式(3-1)における'の領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(3-1)における - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片、及びX¹ - が解離する。その結果、粒子X¹と粒子X²との結合が解離するとともに、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が再生される。ここで、再生されるとは、一度足場依存型鎖交換反応に関与した、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、再び新たな足場依存型鎖交換反応に関与できる状態になることを意味する。

30

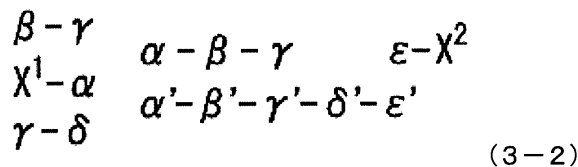
【0063】

- が再生され、粒子X¹と粒子X²との結合が解離した状態を下記式(3-2)に示す。

40

【0064】

【化17】



【0065】

式(3-2)において、一本鎖核酸断片'及び'、及び'、及び'、及び'

50

' は、それぞれハイブリダイズしている。また、 - 、 X¹ - 、及び - はそれぞれ遊離している。このように、第2実施形態の複合体は、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を再生することができる。

【0066】

式(4)で表される複合体に、上述した - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片、及び - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させた場合においても、粒子 X² が でなく ' と結合している点以外は、式(3)で表される複合体と同様の反応が生じる。

【0067】

(複合体：第3実施形態)

10

1実施形態において、本発明は、第1の核酸構造体を介して第1の粒子と第2の粒子とが結合した複合体であって、前記第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、対象核酸が生成される、複合体を提供する。

【0068】

本明細書において、対象核酸とは、検出対象である核酸を意味する。本実施形態の複合体によれば、第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、対象核酸が生成され、試料中の対象核酸を増幅することができる。このため、本実施形態の複合体を使用することにより、対象核酸の検出感度を飛躍的に向上することができる。

【0069】

本実施形態の複合体は、第1の核酸構造体の足場依存型鎖交換反応によって、対象核酸が生成されるとともに、第1の粒子と第2の粒子との結合が解離するものであってもよい。

20

【0070】

また、本実施形態の複合体においても、上述した第1実施形態の複合体と同様に、第1の粒子が光学的に識別可能であってもよい。光学的に識別可能な第1の粒子としては、上述したものと同様のものが挙げられる。

【0071】

また、本実施形態の複合体においても、上述した第1実施形態の複合体と同様に、第1の粒子に水溶性高分子化合物が結合していてもよい。これにより、第1の粒子の表面への生体物質の非特異的吸着を抑制することができる。また、水溶性高分子化合物を結合させることにより、第1の粒子の表面の電荷を減らすことができ、反応速度を向上させることができる傾向にある。水溶性高分子化合物の種類及び分子量は上述したものと同様のものが挙げられる。

30

【0072】

また、本実施形態の複合体においても、上述した第1実施形態の複合体と同様に、遠心分離又は磁石を近接させることにより第2の粒子が凝集するものであることが好ましい。第2の粒子としては、上述したものと同様のものが挙げられる。

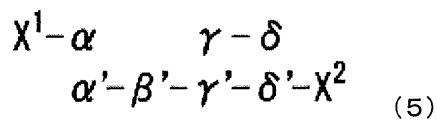
【0073】

本実施形態の複合体は、例えば、下記式(5)で表されるものであってもよい。

【0074】

40

【化18】



【0075】

式(5)中、X¹、X²、'、'、'、'及び'は上記式(3)における定義と同じであり、は前記'又と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

【0076】

50

式(1)で表される複合体と同様に、式(5)で表される複合体において、粒子X¹又はX²と核酸断片とは直接結合していてもよいし、スペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては上述したものと同様のものが挙げられる。

【0077】

ここで、式(5)で表される複合体に - - [但し、 、 、 は、上記式(2)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させた場合の反応について説明する。

【0078】

式(5)で表される複合体に - - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を接触させると、式(5)における ' の領域を足場として足場依存型鎖交換反応が生じる。その結果、式(5)における - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片、及びX¹ - が解離する。その結果、粒子X¹と粒子X²との結合が解離するとともに、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が生成される。ここで、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片は、対象核酸である(対象核酸と同一の塩基配列を有している。)。

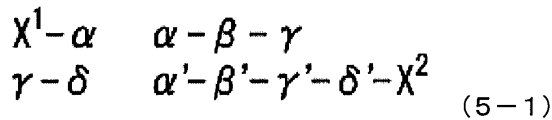
10

【0079】

- が生成され、粒子X¹と粒子X²との結合が解離した状態を下記式(5-1)に示す。

【0080】

【化19】



20

【0081】

式(5-1)において、一本鎖核酸断片 及び '、 及び '、 及び 'は、それぞれハイブリダイズしている。また、X¹ - 及び - はそれぞれ遊離している。このように、第3実施形態の複合体は、 - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を新たに生成することができる。

【0082】

[試料中の対象核酸の検出方法]

1実施形態において、本発明は、下記工程(a)~(c)を備える、試料中の対象核酸の検出方法を提供する。

30

工程(a)：前記試料と、上述した第1実施形態又は第2実施形態の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第1の粒子と前記第2の粒子との結合が解離する工程。

工程(b)：工程(a)の後に、解離した前記第2の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第1の粒子が前記混合液中に分散する工程。

40

工程(c)：工程(b)の後に、前記混合液中の前記第1の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

【0083】

本実施形態の検出方法により試料中の対象核酸を簡便に検出することができる。以下各工程について説明する。

【0084】

《工程(a)》

対象核酸としては、一本鎖の核酸が好適である。核酸はDNAであってもよく、RNAであってもよく、核酸アナログであってもよい。より具体的な対象核酸としては、miRNA、アプタマー等が挙げられる。アプタマーとしては、例えば、標的分子に結合するこ

50

とにより核酸断片をリリースする、構造スイッチングアダプター等が挙げられる。この場合においては、リリースされた核酸断片を対象核酸としてもよい。

【0085】

対象核酸の長さは、例えば10～100塩基であってもよく、10～50塩基であってもよく、10～30塩基であってもよい。

【0086】

また、対象核酸を含有する試料としては特に制限されず、例えば、血液、血清、血漿等の生体試料が挙げられるがこれに限定されない。

【0087】

混合液のインキュベーション温度は、検出対象である対象核酸が足場依存型鎖交換反応を行うことができる温度であればよく、例えば10～50の任意の温度であってもよく、例えば室温(約25)であってもよい。また、均一に反応を進行させる観点から、インキュベーション中に攪拌することが好ましい。

【0088】

本実施形態の検出方法は、従来法よりも短時間で対象核酸を検出することができる。したがって、インキュベーション時間は例えば10分間～10時間であってもよく、10分間～5時間であってもよく、10分間～3時間であってもよい。

【0089】

《工程(b)》

続いて、本工程において、解離した第1の粒子をその他の粒子と分離する。その他の粒子とは、解離した第2の粒子、及び、未反応の複合体(第1の粒子と第2の粒子とが結合した複合体)である。

【0090】

例えば、第2の粒子が磁性粒子である場合、磁気スタンド等により磁場を適用することにより、解離した第2の粒子及び未反応の複合体を凝集させることができる。あるいは、例えば、第2の粒子が容易に遠心可能な粒子である場合、遠心分離することにより、解離した第2の粒子及び未反応の複合体を凝集させることができる。その結果、解離した第1の粒子を混合液中に分散することができる。

【0091】

《工程(c)》

続いて、本工程において、混合液中に分散した第1の粒子の存在量を測定する。第1の粒子の存在量は、試料中の対象核酸の存在量に対応する。例えば、第1の粒子が特定の波長の光を吸収するものである場合には、分光光度計等により第1の粒子の存在量を測定することができる。

【0092】

また、第1の粒子が蛍光を発するものである場合には、励起光を照射して、発生する蛍光を蛍光分光光度計等により測定することにより、第1の粒子の存在量を測定することができる。

【0093】

また、第1の粒子が酵素で標識されている場合、第1の粒子に適切な基質を反応させることにより生じる、発色、発光、蛍光等を測定することにより、第1の粒子の存在量を測定することができる。

【0094】

(検出方法：第1実施形態)

上述した第1実施形態の複合体を用いて本実施形態の検出方法を実施する場合について説明する。一例として、上記式(1)で表される複合体を使用して試料中の対象核酸を検出する場合について説明する。ここで、対象核酸は - [但し、 は上記式(1)における定義と同じであり、 は上記式(1)における前記 'と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片(例えば、miRNA)であるものとする。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 5 】

《 工 程 (a) 》

本工程において、試料と、式(1)で表される複合体とを混合して混合液を調製し、インキュベートする。その結果、混合液中で、試料中の対象核酸が、式(1)で表される複合体を構成する第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第1の粒子と第2の粒子との結合が解離する。この足場依存型鎖交換反応、及び第1の粒子と第2粒子との結合の解離については、第1実施形態の複合体の説明において上述したものと同様である。

【 0 0 9 6 】

《 工 程 (b) 及 び 工 程 (c) 》

工程(b)及び工程(c)については、上述したものと同様である。本実施形態の検出方法により、対象核酸を簡便に検出することができる。

【 0 0 9 7 】

(検 出 方 法 : 第 2 実 施 形 態)

続いて、第2実施形態の検出方法について説明する。本実施形態の検出方法は、上述した第1実施形態の検出方法と、工程(a)が異なっている。本実施形態の検出方法の工程(a)は、下記工程(a1)及び(a2)を備える。

工程(a1)：試料と、上述した第2実施形態の複合体と、
[但し、
、
は、前記式(3)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、前記試料中の対象核酸が前記第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第1の核酸構造体から
の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する工程。

工程(a2)：
の塩基配列を有する前記一本鎖核酸断片が前記第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、その結果、前記第1の核酸構造体から
の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸が解離することにより、前記第1の粒子と前記第2の粒子の結合が解離し、更に対象核酸が再生される工程。

【 0 0 9 8 】

第2実施形態の検出方法では、試料中の対象核酸は、複合体中の第1の粒子及び第2の粒子を解離させた後、再生される。そして、再生された対象核酸は、更に別の複合体と反応し、第1の粒子と第2の粒子を解離させる。このため、本実施形態の検出方法では、対象核酸の検出速度又は検出感度が向上している。

【 0 0 9 9 】

ここで、検出速度が向上しているとは、所定のレベルのシグナルを生成するのに要する時間が短縮することを意味する。また、検出感度が向上しているとは、工程(a)を所定の時間実施した場合に得られるシグナルが高くなることを意味する。

【 0 1 0 0 】

ここで、一例として、上記式(2)で表される複合体を使用して試料中の対象核酸を検出する場合についてより詳細に説明する。ここで、対象核酸は
[但し、
は上記式(1)における定義に同じであり、
は上記式(1)における前記
'と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片(例えば、m i R N A)であるものとする。

【 0 1 0 1 】

《 工 程 (a 1) 》

本工程において、試料と、式(2)で表される複合体と、
の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを混合して混合液を調製し、インキュベートする。その結果、混合液中で、試料中の対象核酸が式(2)で表される複合体を構成する第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第1の核酸構造体から
の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する。この足場依存型鎖交換反応、及び
の塩基配列を有する一本鎖核酸の解離については、第2実施形態の複合体の説明において上述したものと同様である。

。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

《工程 (a 2) 》

続いて、本工程において、 - - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、 - が解離した第 1 の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第 1 の核酸構造体から、 の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離し、対象核酸が再生する。そして、第 1 の粒子と第 2 の粒子の結合が解離する。この足場依存型鎖交換反応、第 1 の粒子と第 2 粒子との結合の解離、及び対象核酸の再生については、第 2 実施形態の複合体の説明において上述したものと同様である。再生した対象核酸は、更に別の複合体と反応し、第 1 の粒子と第 2 の粒子を解離させる。このため、本実施形態の検出方法では、対象核酸の検出速度又は検出感度が向上している。

10

【 0 1 0 3 】

《工程 (b) 及び工程 (c) 》

工程 (b) 及び工程 (c) については、上述したものと同様である。

【 0 1 0 4 】

(検出方法 : 第 3 実施形態)

続いて、第 3 実施形態の検出方法について説明する。本実施形態の検出方法は、下記工程 (a a)、(b b) 及び (c c) を備えている。

工程 (a a) : 試料と、上述した第 3 実施形態の複合体とを含む混合液をインキュベートする工程であって、前記混合液中で、足場依存型鎖交換反応により前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子との結合が解離するとともに対象核酸が増幅される工程。

20

工程 (b b) : 工程 (a a) の後に、解離した前記第 2 の粒子及び未反応の前記複合体を凝集させる工程であって、その結果、解離した前記第 1 の粒子が前記混合液中に分散する工程。

工程 (c c) : 工程 (b b) の後に、前記混合液中の前記第 1 の粒子の存在量を測定する工程であって、測定された前記存在量が前記対象核酸の存在量に対応する工程。

【 0 1 0 5 】

ここで、対象核酸が増幅されるとは、対象核酸が新たに生成され、対象核酸の分子数が増加することを意味する。

【 0 1 0 6 】

第 3 実施形態の検出方法では、試料中の対象核酸は、複合体中の第 1 の粒子及び第 2 の粒子を解離させた後再生され、更に新たに生成 (増幅) される。そして、再生された対象核酸、及び新たに生成された対象核酸は、更に別の複合体と反応し、第 1 の粒子と第 2 の粒子を解離させ、更に対象核酸を増幅させる。このため、本実施形態の検出方法では、対象核酸の検出速度又は検出感度が格段に向上している。

30

【 0 1 0 7 】

第 3 実施形態の複合体としては、上述した式 (5) で表される複合体を利用することができる。第 3 実施形態の複合体は、1 種を単独で使用してもよいし、2 種以上を組み合わせて使用してもよい。

【 0 1 0 8 】

ここで、一例として、第 3 実施形態の複合体を 2 種類用いる検出方法について、より詳細に説明する。ここで、対象核酸は - [但し、 は上記式 (1) における定義に同じであり、 は上記式 (1) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片 (例えば、m i R N A) であるものとする。

40

【 0 1 0 9 】

本例においては、上述した工程 (a a) は、後述する工程 (a a 1)、工程 (a a 2)、工程 (a a 3) 及び工程 (a a 4) を備えている。また、対象核酸は - [但し、 は上記式 (3) における定義に同じであり、 は上記式 (3) における前記 ' と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片 (例えば、m i R N A) であるものとする。

50

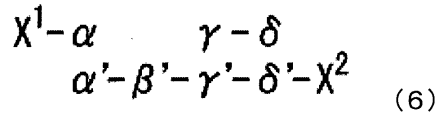
【 0 1 1 0 】

《 工程 (a a 1) 》

本工程において、試料と、下記式 (6) で表され、第 1 の核酸構造体を介して第 1 の粒子と第 2 の粒子とが結合した第 1 の複合体と、下記式 (7) で表され、第 2 の核酸構造体を介して前記第 1 の粒子と前記第 2 の粒子とが結合した第 2 の複合体と、下記式 (8) で表される第 3 の核酸構造体と、 - - - [但し、 、 、 は、下記式 (8) における定義に同じである。] の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを混合して混合液を調製し、インキュベートする。

【 0 1 1 1 】

【 化 2 0 】



10

【 0 1 1 2 】

式 (6) 中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は上記式 (3) における定義に同じであり、 θ は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

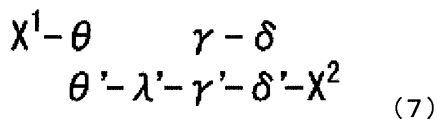
【 0 1 1 3 】

式 (6) で表される第 1 の複合体において、粒子 X^1 は一本鎖核酸断片 α と結合している。また、一本鎖核酸断片 β 及び γ は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 α' 、 β' 、 γ' 及び δ' は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、粒子 X^2 は一本鎖核酸断片 δ' と結合している。また、一本鎖核酸断片 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は、それぞれハイブリダイズしている。また、 α と θ とは結合していない。その結果、一本鎖核酸断片 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は第 1 の核酸構造体を形成しており、第 1 の核酸構造体を介して粒子 X^1 と粒子 X^2 とが結合し、複合体を形成している。

20

【 0 1 1 4 】

【 化 2 1 】



30

【 0 1 1 5 】

式 (7) 中、 X^1 、 X^2 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は上記式 (6) における定義に同じであり、 λ 及び λ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 θ は前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

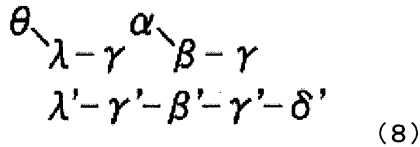
【 0 1 1 6 】

式 (7) で表される第 2 の複合体において、粒子 X^1 は式 (6) で表される複合体における粒子 X^1 と同じものであり、一本鎖核酸断片 θ と結合している。また、一本鎖核酸断片 α 及び β は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 α' 、 β' 、 γ' 及び δ' は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、粒子 X^2 は式 (6) で表される複合体における粒子 X^2 と同じものであり、一本鎖核酸断片 δ' と結合している。また、一本鎖核酸断片 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は、それぞれハイブリダイズしている。また、 θ と θ' とは結合していない。その結果、一本鎖核酸断片 α 、 β 、 γ 、 δ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 及び θ は第 2 の核酸構造体を形成しており、第 2 の核酸構造体を介して粒子 X^1 と粒子 X^2 とが結合し、複合体を形成している。

40

【 0 1 1 7 】

【化 2 2】



【0118】

式(8)中、 θ 、 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ は前記式(3)における定義に同じであり、 λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' はそれぞれ任意の塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表し、 θ は前記 λ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。

10

【0119】

式(8)で表される第3の核酸構造体において、一本鎖核酸断片 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' は連結して一本鎖の核酸断片を形成している。また、一本鎖核酸断片 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ 、 λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' は、それぞれハイブリダイズしている。また、 θ と λ は結合していない。

【0120】

ここで、上述した式(7)で表される複合体を構成する第2の核酸構造体、及び式(8)で表される第3の核酸構造体において、 θ = λ であってもよい。すなわち、 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ は同じ塩基配列を有する一本鎖核酸断片であってもよい。これにより、式(6)で表される第1の複合体における X^1 - と式(7)で表される第2の複合体における X^1 - を共通化することができる。

20

【0121】

第1の複合体と、第2の複合体と、第3の核酸構造体と、 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを含む混合液をインキュベートした結果、混合液中で、試料中の対象核酸 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ が式(8)で表される第3の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第3の核酸構造体から λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離する。

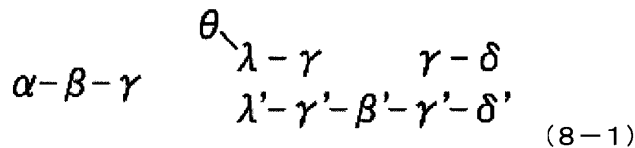
【0122】

対象核酸 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ が第3の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行い、第3の核酸構造体から λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ の塩基配列を有する一本鎖核酸が解離した状態を下記式(8-1)に示す。

30

【0123】

【化 2 3】



【0124】

式(8-1)において、一本鎖核酸断片 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ 、 λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' は、それぞれハイブリダイズしている。また、 θ 、 λ 、 γ は遊離している。

40

【0125】

《工程(a a 2)》

続いて、本工程において、工程(a a 1)で遊離した λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、上述した式(6)で表される複合体を構成する第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第1の核酸構造体から λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ の塩基配列を有する一本鎖核酸及び λ' 、 γ' 、 β' 、 γ' 、 δ' の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離する。そして、第1の粒子と第2の粒子の結合が解離し、更に対象核酸 λ 、 γ 、 α 、 β 、 γ が生成される。

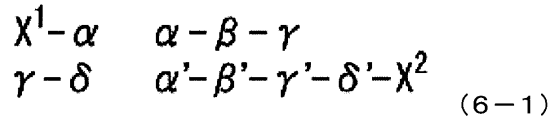
【0126】

50

- - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、式(6)で表される複合体を構成する第1の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行った結果、粒子 X^1 と粒子 X^2 との結合が解離し、対象核酸 - が生成された状態を下記式(6-1)に示す。

【0127】

【化24】



【0128】

式(6-1)において、一本鎖核酸断片 及び '、 及び '、 及び 'は、それぞれハイブリダイズしている。また、 X^1 - 及び - はそれぞれ遊離している。この反応により、第1の粒子と第2の粒子の結合が解離するとともに、試料中の - の分子数が増幅する。

10

【0129】

《工程(a a 3)》

一方、工程(a a 1)でインキュベートした混合液中の - - - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片は、上記式(8-1)で表される前記第3の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、式(8-1)で表される第3の核酸構造体から - - の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸 - が解離する。すなわち、一度足場依存型鎖交換反応を行った、試料中の対象核酸 - が再生され、再び反応に関与できる状態になる。

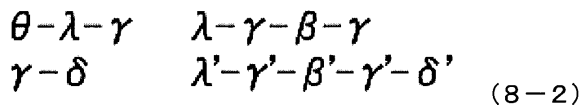
20

【0130】

式(8-1)で表される第3の核酸構造体から - - の塩基配列を有する一本鎖核酸及び対象核酸 - が解離した状態を下記式(8-2)に示す。

【0131】

【化25】



30

【0132】

式(8-2)において、一本鎖核酸断片 及び '、2組存在する 及び '、 及び 'は、それぞれハイブリダイズしている。また、 - - 及び - はそれぞれ遊離している。

【0133】

《工程(a a 4)》

本工程において、工程(a a 3)で遊離した - - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、上述した式(7)で表される複合体を構成する第2の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、第2の核酸構造体から - の塩基配列を有する一本鎖核酸及び - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が解離する。そして、第1の粒子と第2の粒子の結合が解離し、更に対象核酸 - が生成される。

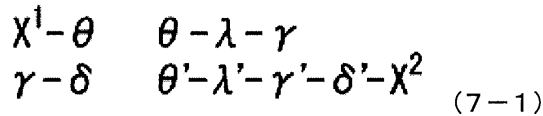
40

【0134】

- - の塩基配列を有する一本鎖核酸断片が、式(7)で表される複合体を構成する第2の核酸構造体と足場依存型鎖交換反応を行った結果、粒子 X^1 と粒子 X^2 との結合が解離し、対象核酸 - が生成された状態を下記式(7-1)に示す。

【0135】

【化 2 6】



【0136】

式(7-1)において、一本鎖核酸断片 X^1 及び θ 、 λ 、 γ 、 δ は、それぞれハイブリダイズしている。また、 X^1 及び θ はそれぞれ遊離している。この反応により、第1の粒子と第2の粒子の結合が解離するとともに、試料中の θ の分子数が増幅する。

10

【0137】

以上説明した工程(a a 1)~(a a 4)は、混合液をインキュベートしている間、繰り返し進行する。そして、工程(a a 2)、工程(a a 4)で新たに生成された対象核酸 θ 、及び、工程(a a 3)で再生された対象核酸 θ は、更に、未反応の第3の核酸構造体と反応し、第1の粒子 X^1 を解離させる。そして、遊離の粒子 X^1 の量は、工程(b b)及び工程(c c)を経て、試料中の対象核酸の量に対応するシグナルとして検出される。

【0138】

《工程(b b)及び工程(c c)》

工程(b b)は上述した工程(b)と同様である。また、工程(c c)は上述した工程(c)と同様である。

20

【0139】

《シグナル及び対象核酸の増幅》

本例の反応においては、工程(a a 1)~(a a 4)が1回ずつ実行された場合を1サイクルとし、反応がnサイクル実行されると、混合液中の対象核酸の存在量が 3^n 倍に増幅する。また、遊離の粒子 X^1 の量は $2 \times 3^{n-1}$ 倍ずつ増幅する。このように、第3実施形態の検出方法によれば、対象核酸の検出速度又は検出感度が格段に向上している。

【0140】

[試料中の対象核酸の検出キット]

1実施形態において、本発明は、上述したいずれかの複合体を備える、試料中の対象核酸の検出キットを提供する。実施例において後述するように、本実施形態のキットによれば、試料中の対象核酸を簡便に検出することができる。

30

【0141】

(検出キット：第2実施形態)

1実施形態において、検出キットは、対象核酸が θ [但し、 θ は前記式(3)における定義に同じであり、 λ は前記式(3)における前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片であり、上述した第2実施形態の複合体と、 θ [但し、 θ 、 λ 、 γ 、 δ は、前記式(3)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片とを備えるものであってもよい。

【0142】

本実施形態の検出キットは、上述した、第2実施形態の検出方法に使用することができる。本実施形態のキットによれば、対象核酸を再生することができるため、対象核酸の検出速度又は検出感度が向上している。

40

【0143】

(検出キット：第3実施形態)

1実施形態において、検出キットは、対象核酸が θ [但し、 θ は前記式(3)における定義に同じであり、 λ は前記式(3)における前記 θ と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を表す。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片であり、上述した第3実施形態の複合体と、上記式(8)で表される核酸構造体と、 θ [但し、 θ 、 λ 、 γ 、 δ は、前記式(8)における定義に同じである。]の塩基配列を有する一本鎖核酸断片

50

とを備えるものであってもよい。

【0144】

第3実施形態の検出キットが備える複合体は、1種であってもよく、2種以上の組み合わせであってもよい。複合体が2種の組み合わせである場合、例えば、上記式(6)で表される第1の複合体と、上記式(7)で表される第2の複合体との組み合わせであってもよい。複合体を2種以上組み合わせることにより、対象核酸及びシグナルの増幅量を更に増大することができる。

【0145】

本実施形態の検出キットは、上述した、第3実施形態の検出方法に使用することができる。本実施形態のキットによれば、対象核酸を再生させるだけでなく、対象核酸を新たに生成(増幅)させることができるため、対象核酸の検出速度又は検出感度を格段に向上させることができる。

10

【0146】

(増感剤)

上述した検出キットは、更に増感剤を備えていてもよい。増感剤としては、複合体から解離した第1の粒子に由来するシグナルを増幅するものであれば特に制限されない。例えば、第1の粒子が金ナノ粒子である場合、テトラクロリド金(III)酸と塩酸ヒドロキシルアミンの組み合わせ等が挙げられる。

【実施例】

【0147】

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

20

【0148】

<実験例1>

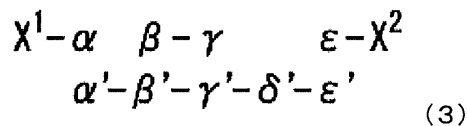
[複合体の調製]

下記式(3)で表される複合体を調製した。より具体的には、下記式(3)において、 X^1 が金ナノ粒子であり、 X^2 が磁気粒子であり、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 α' 、 β' 、 γ' 、 δ' 、 ϵ' 及び θ が下記表1に示す塩基配列の一本鎖DNAである複合体を調製した。本実験例で調製した複合体は、miRNAの1種であるmiR34c(配列番号16)を対象核酸として検出できるものである。

30

【0149】

【化27】



【0150】

【表 1】

	塩基配列	配列番号
α	5'-ggtcattcttcatat-3'	1
α'	5'-atatgaagaatgacc-3'	2
β	5'-cgag-3'	3
β'	5'-ctcg-3'	4
γ	5'-aggcagtgtagttagc-3'	5
γ'	5'-gctaactacactgcct-3'	6
δ	5'-tgattgc-3'	7
δ'	5'-gcaatca-3'	8
ϵ	5'-aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3'	9
ϵ'	5'-tttttttttttttttttttt-3'	10

【0151】

下記表 2 に、使用した DNA 断片及び RNA 断片の塩基配列の配列番号を示す。

【0152】

【表 2】

名称	内容	配列番号
s-1	$\beta - \gamma$	11
s-2	α	12
s-3	$\epsilon' - \delta' - \gamma' - \beta' - \alpha'$	13
fuel-DNA	$\alpha - \beta - \gamma$	14
capture-DNA	ϵ	15
mIR34c	$\gamma - \delta$ に対応する RNA	16

【0153】

(DNA / PEG - 金ナノ粒子の調製)

表面に DNA 及びポリエチレングリコール (PEG) を結合した金ナノ粒子 (以下、「DNA (x) / PEG - 金ナノ粒子」といい、ここで、x は金ナノ粒子 1 個あたりの DNA 鎖の平均数を表す。) を調製した。

【0154】

クエン酸で安定化した直径 15 nm の金ナノ粒子の溶液 (2.3 nM、 1.4×10^{12} 個/mL) 1000 μ L に、1.0 (v/v) % Tween 20 水溶液 10 μ L、及び 20 μ M の DNA (上記表 2 の「s-2」) の水溶液 (x = 22 では 30 μ L、x = 33 では 35 μ L、x = 42 では 40 μ L、x = 55 では 50 μ L) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。

【0155】

続いて 20 μ M の PEG (重量平均分子量 6000) の水溶液を 30 μ L 添加した。1 分間インキュベートした後、10 \times リン酸バッファー (PBS) を添加した。続いて、溶液を更に室温で 1 時間インキュベートした。

【0156】

続いて、溶液を 20,000 \times g で 20 分遠心し、遊離の DNA 及び PEG を除去することを 3 回繰り返した。上清を除去し、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 250 μ L を DNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の赤い油状の沈殿に添加して懸濁した。

【0157】

得られた DNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の溶液は 4 で保存した。調製の過程で元の量の約 30% の金ナノ粒子が失われた。

【0158】

(dsDNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の調製)

10

20

30

40

50

DNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の 0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 溶液 250 μ L (金ナノ粒子の濃度 6 nM、x = 22、33、42、55) に、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の 20 μ M の DNA (上記表 2 の「s - 1」) 14 μ L、及び 0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の 20 μ M の DNA (上記表 2 の「s - 3」) 12 μ L を添加し、室温で 6 時間インキュベートした。

【0159】

続いて、溶液を 20,000 \times g で 20 分遠心し、遊離の DNA を除去することを 3 回繰り返した。上清を除去し、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 200 μ L を dsDNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の赤い油状の沈殿に添加して懸濁した。

10

【0160】

続いて、各溶液の紫外光 / 可視光スペクトルを測定し、適切な量の 0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) を添加して、金ナノ粒子の濃度を 4 nM に調整した。得られた dsDNA (x) / PEG - 金ナノ粒子の溶液は 4 で保存した。

【0161】

(複合体の調製)

ストレプトアビジン修飾された磁気粒子 (20 μ L、10 mg/mL、 6×10^8 個/mL) を PBS (pH 7.4) 20 μ L で 3 回洗浄した。続いて、磁気粒子に 20 μ M の DNA (上記表 2 の「capture - DNA」) 7.5 μ L を添加して 25 で 30 分間穏やかに攪拌した。

20

【0162】

磁気スタンドを用いて DNA - 磁気粒子を反応チューブの壁面に集め、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 20 μ L で 3 回洗浄した。得られた DNA - 磁気粒子に、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の dsDNA (x) / PEG - 金ナノ粒子 (20 μ L、金ナノ粒子の濃度 = 4 nM) を添加し、25 で 30 分間穏やかに攪拌して、複合体を形成させた。磁気スタンドを用いて形成された複合体を反応チューブの壁面に集め、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 20 μ L で 3 回洗浄した。

【0163】

続いて、上清の波長 522 nm における吸光度 (A_{522}) を測定することにより複合体の収率を決定した。なお、金ナノ粒子は波長 522 nm に吸光のピークを有している。続いて、複合体を 0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 30 μ L に懸濁した。金ナノ粒子の終濃度は 2.67 nM であった。

30

【0164】

< 実験例 2 >

[金ナノ粒子 1 個あたりの DNA 鎖の平均数の最適化]

実験例 1 と同様にして調製した、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 30 μ L 中の各複合体 (金ナノ粒子の終濃度 = 2.67 nM、dsDNA (二本鎖 DNA) の濃度 = 58.67 ~ 146.85 nM、x = 22、33、42、55) を 9

40

【0165】

続いて、各複合体の溶液に、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 5 μ L、0.01 (v/v) % Tween 20 - 125 mM MgCl₂ - PBS (pH 7.4) 5 μ L、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の 1.0 μ M の DNA (上記表 2 の「fuel - DNA」) 5 μ L、及び 0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の 1.0 μ M の対象核酸 (上記表 2 の「miR34c」) 5 μ L を添加し、50 μ L の溶液を調製した。

【0166】

溶液中の Mg²⁺、金ナノ粒子、dsDNA、fuel - DNA 及び miR34c の終

50

濃度は、それぞれ 12.5 mM、1.6 nM、35 ~ 88 nM、100 nM 及び 100 nM であった。

【0167】

続いて、各溶液を 25 で 2 時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この過程において、まず、miRNA34c が複合体の dsDNA と足場依存型鎖交換反応を行う。続いて、fuel-DNA が複合体の dsDNA と足場依存型鎖交換反応を行う。その結果、金ナノ粒子と磁気粒子との結合が解離する。インキュベーションの過程で、 A_{522} を適切な時間間隔で測定した。 A_{522} の測定は、磁場の適用下でマイクロプレート分光光度計により行った。

【0168】

図 4 は、 A_{522} の測定結果を示すグラフである。その結果、金ナノ粒子 1 個あたりの DNA 鎖の平均数 x が 22 である複合体において、 A_{522} の変化が最も大きく最も速かった。この結果から、 $x = 22$ が最適であることが明らかとなった。そこで、後の実験においては、dsDNA(x)/PEG-金ナノ粒子($x = 22$)を使用した。

【0169】

<実験例 3>

[fuel-DNA 濃度の最適化]

dsDNA(x)/PEG-金ナノ粒子($x = 22$)を用いて調製した複合体を用いて、fuel-DNA の最適な濃度を検討した。具体的には、miR34c の終濃度を 0 又は 100 nM とし、fuel-DNA の終濃度を 50、100、120、150 又は 200 nM とした点以外は、実験例 2 と同様の反応を行い、 A_{522} を適切な時間間隔で測定した。

【0170】

図 5 は、 A_{522} の測定結果を示すグラフである。その結果、miR34c の濃度(図中、[miR34c]と表す。)が 0 nM の試料と 100 nM の試料との間で A_{522} の変化に明確な差が認められた。この結果は、本実験系により miR34c を特異的に検出できることを示す。

【0171】

また、fuel-DNA の終濃度(図中、[fuel]と表す。)が 150 nM である試料において、最も高いシグナル/ノイズ比が得られることが明らかとなった。この結果から、fuel-DNA の終濃度は 150 nM が最適であることが明らかとなった。

【0172】

<実験例 4>

[緩衝液中の miR34c の検出]

dsDNA(x)/PEG-金ナノ粒子($x = 22$)を用いて調製した複合体を用いて、緩衝液中で miR34c の検出を行った。具体的には、実験例 1 と同様にして調製した、0.01 (v/v)% Tween20 - PBS (pH 7.4) 30 μ L 中の複合体(金ナノ粒子の終濃度 = 2.67 nM、dsDNA(二本鎖 DNA)の濃度 = 58.67 nM、 $x = 22$)を 96 ウェルプレートのウェルに添加した。

【0173】

続いて、複合体の溶液に、0.01 (v/v)% Tween20 - PBS (pH 7.4) 5 μ L、0.01 (v/v)% Tween20 - 125 mM $MgCl_2$ - PBS (pH 7.4) 5 μ L、0.01 (v/v)% Tween20 - PBS (pH 7.4) 中の 1.5 μ M の DNA (上記表 2 の「fuel-DNA」) 5 μ L、及び 0.01 (v/v)% Tween20 - PBS (pH 7.4) 中の様々な濃度の対象核酸(上記表 2 の「miR34c」) 5 μ L を添加し、50 μ L の溶液を調製した。

【0174】

溶液中の Mg^{2+} 、金ナノ粒子、dsDNA、fuel-DNA 及び miR34c の終濃度は、それぞれ 12.5 mM、1.6 nM、35 nM、150 nM 及び 0 ~ 10 nM であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 5 】

続いて、各溶液を 25 で 2 時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。インキュベーションの過程で、 A_{522} を適切な時間間隔で測定した。 A_{522} の測定は、磁場の適用下でマイクロプレート分光光度計により行った。

【 0 1 7 6 】

図 6 は、 A_{522} の測定結果を示すグラフである。図中、 $miR34c$ の濃度を [$miR34c$] と表す。また、図 6 における挿入図は、 $miR34c$ の濃度 0 ~ 1.0 nM の範囲の拡大図である。その結果、反応時間 2 時間での検出限界濃度が 0.05 nM であることが明らかとなった。

【 0 1 7 7 】

< 実験例 5 >

[増幅反応の検討]

実験例 4 の反応後、金ナノ粒子の増幅反応を行い、検出感度の向上について検討した。具体的には、実験例 4 の反応後、磁気スタンドを用いて磁気粒子を壁面に集め、解離した DNA / PEG - 金ナノ粒子を含む上清を回収して新しい 96 ウェルプレートに入れた。

【 0 1 7 8 】

続いて、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 10 μ L、2.5 mM $H AuCl_4$ (テトラクロリド金 (III) 酸) 水溶液 5 μ L、及び 100 mM 塩酸ヒドロキシルアミン 5 μ L を添加して混合し、混合液の波長 575 nm における吸光度 (A_{575}) を 1 分以内に測定した。この反応により、溶液中の金ナノ粒子を核として金ナノ粒子が成長し、検出感度が向上した。

【 0 1 7 9 】

図 7 は、 A_{575} の測定結果を示すグラフである。図中、 $miR34c$ の濃度を [$miR34c$] と表す。また、図 7 における挿入図は、 $miR34c$ の濃度 0 ~ 0.1 nM の範囲の拡大図である。また、図 8 は、増幅反応の前後における反応液の写真である。その結果、反応時間 2 時間後の増幅反応 (1 分間) により、検出限界濃度が 0.005 nM に向上し、目視でも検出できることが明らかとなった。

【 0 1 8 0 】

< 実験例 6 >

[対象核酸の特異性の検討]

dsDNA (x) / PEG - 金ナノ粒子 (x = 22) を用いて調製した複合体を用いて、実験例 4 と同様にして、 $miR34c$ 、 $miR34a$ 及び $miR34b^*$ の検出を行った。なお、使用した複合体は、 $miR34c$ 検出用の塩基配列を有していた。 $miR34c$ 、 $miR34a$ 及び $miR34b^*$ の塩基配列を下記表 3 に示す。表 3 中、 $miR34a$ 及び $miR34b^*$ の塩基配列のうち、 $miR34c$ の塩基配列と相違する部分に下線を付す。

【 0 1 8 1 】

【表 3】

miRNA	塩基配列	配列番号
$miR34c$	5'-aggcaguguagu <u>u</u> agcugauugc-3'	16
$miR34a$	5'- <u>u</u> ggcaguguc <u>u</u> uagcugguugu-3'	17
$miR34b^*$	5'- <u>u</u> aggcaguguc <u>u</u> uagcugauug-3'	18

【 0 1 8 2 】

具体的には、実験例 1 と同様にして調製した、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 30 μ L 中の複合体 (金ナノ粒子の終濃度 = 2.67 nM、dsDNA (二本鎖 DNA) の濃度 = 58.67 nM、x = 22) を 96 ウェルプレートのウェルに添加した。

【 0 1 8 3 】

続いて、複合体の溶液に、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4

10

20

30

40

50

) 5 μ L、0.01 (v/v) % Tween 20 - 125 mM MgCl₂ - PBS (pH 7.4) 5 μ L、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の1.5 μ MのDNA (上記表2の「fuel-DNA」) 5 μ L、及び0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の1 nM又は50 nMの各miRNA (miR34c、miR34a及びmiR34b*) 5 μ Lを添加し、50 μ Lの溶液を調製した。

【0184】

溶液中のMg²⁺、金ナノ粒子、dsDNA及びfuel-DNAの終濃度は、それぞれ12.5 mM、1.6 nM、35 nM及び150 nMであった。また、溶液中のmiRNAの終濃度は100 pM又は5 nMであった。

10

【0185】

続いて、各溶液を25 で2時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした後A₅₂₂を測定した。A₅₂₂の測定は、磁場の適用下でマイクロプレート分光光度計により行った。また、実験例5と同様の増幅反応を行い、A₅₇₅を1分以内に測定した。

【0186】

図9は、増幅反応の前後における反応液の写真である。図中、miRNAの濃度を[mRNA]と表す。また、図10は、増幅反応前のA₅₂₂の測定結果を示すグラフである。また、図10における挿入図は、増幅反応後のA₅₇₅の測定結果を示すグラフである。

【0187】

20

その結果、対象核酸としてmiR34cを反応させた試料において、miR34a、miR34b*を反応させた試料よりも顕著に高い吸光が観察された。この結果は、本実験例の方法により、わずかな塩基配列の違いを識別することができ、miR34cを特異的に検出できることを示す。

【0188】

<実験例7>

[細胞抽出液中のmiR34cの検出]

健康なドナーから採取した口腔粘膜由来の細胞からヒト細胞抽出液を調製した。口腔粘膜由来の細胞は、口を1 mLの生理的食塩水で激しくリンスすることにより回収した。回収した細胞懸濁液を2,000 x gで90秒間遠心し、PBS (pH 7.4) で3回洗浄した。

30

【0189】

続いて、細胞の沈殿をRNA later (商標) (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 500 μ Lに懸濁し、内在性RNAの酵素的分解を抑制した。細胞数を測定した後、RNA later (商標) 75 μ Lを更に追加し、細胞密度を1 x 10⁶ 個/mLに調整した。細胞懸濁液は使用するまで-20 で保存した。

【0190】

続いて、細胞懸濁液100 μ L (1 x 10⁵ 個の細胞に相当) を2,000 x gで90秒間遠心し、RNA later (商標) を除去した。この細胞の沈殿に0.5 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 25 μ Lを添加し、25 で30分間穏やかに攪拌しながらインキュベートして細胞を破砕し、細胞抽出液を得た。

40

【0191】

続いて細胞抽出液を2,000 x gで90秒間遠心し、細胞の破片を除去した。細胞抽出液(上清25 μ L) (1 x 10⁵ 個の細胞に相当) を新しい反応チューブに移し、使用するまで-20 で保存した。

【0192】

続いて、複合体を用いてヒト細胞抽出液中のmiR34cを検出した。具体的には、0.01 (v/v) % Tween 20 - PBS (pH 7.4) 中の50 nM又は1 nMのmiR34c溶液5 μ Lを、上述したヒト細胞抽出液5 μ L (2 x 10⁴ 個の細胞に相当) にそれぞれ添加した。

50

【 0 1 9 3 】

続いて、96ウェルプレート中の複合体の溶液30 μ Lに、miR34cを含むヒト細胞抽出液10 μ L、0.01(v/v)% Tween 20 - 125mM MgCl₂ - PBS (pH7.4) 5 μ L、0.01(v/v)% Tween 20 - PBS (pH7.4) 中の1.5 μ MのDNA(上記表2の「fuel-DNA」) 5 μ Lを添加し、50 μ Lの溶液を調製した。miR34cの終濃度は100pM又は5nMであった。また、比較のために、細胞抽出液を含まない緩衝液中のmiR34cの検出も行った。

【 0 1 9 4 】

続いて、各溶液を25 μ Lで2時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした後A₅₂₂を測定した。A₅₂₂の測定は、磁場の適用下でマイクロプレート分光光度計により行った。

10

【 0 1 9 5 】

下記表4に、細胞抽出液中のmiR34cを検出した結果を示す。細胞抽出液を含まない緩衝液中のmiR34cの検出結果も示す。表4中、RSDは相対標準偏差を表す。

【 0 1 9 6 】

【表4】

miR34c	緩衝液中		細胞抽出液中		検出率 (%)
	A ₅₂₂	RSD (%)	A ₅₂₂	RSD (%)	
0 M	0.0215 \pm 0.0018	8.6	0.0232 \pm 0.0012	5.0	107.9
100 pM	0.0405 \pm 0.0023	5.9	0.0423 \pm 0.0024	5.8	104.4
5 nM	0.2290 \pm 0.0057	2.5	0.2380 \pm 0.0062	2.6	103.9

20

【 0 1 9 7 】

その結果、緩衝液中での測定値及び細胞抽出液中での測定値の間の誤差は8%以内であり、いずれも同じような値が測定された。この結果は、本実験例の方法による対象核酸の検出が、様々な生体物質に阻害されることがないことを示す。したがって、本実験例の方法により、細胞抽出液等の生体試料中の対象核酸を直接検出することができる。

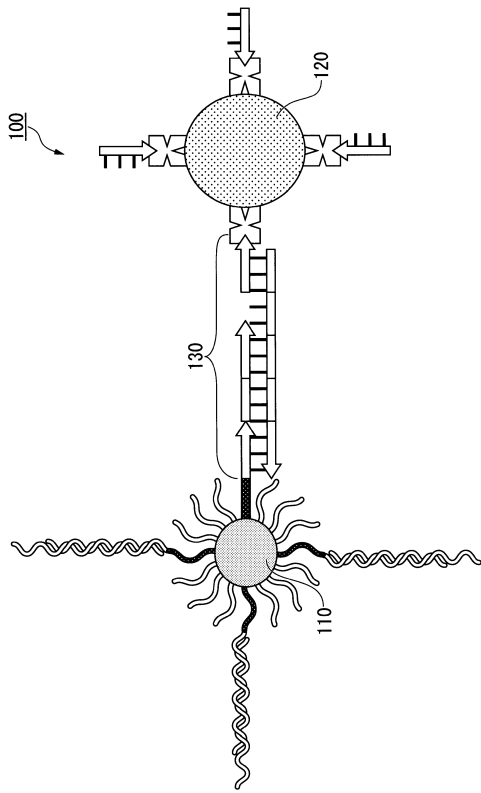
【産業上の利用可能性】

【 0 1 9 8 】

本発明によれば、対象核酸を簡便に検出する技術を提供することができる。

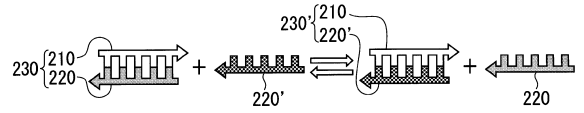
30

【図1】



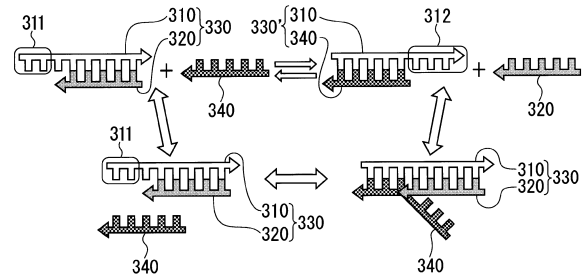
1

【図2】



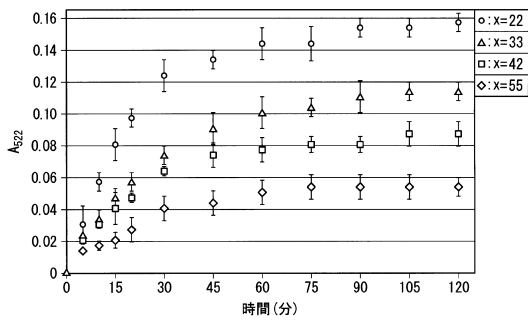
2

【図3】



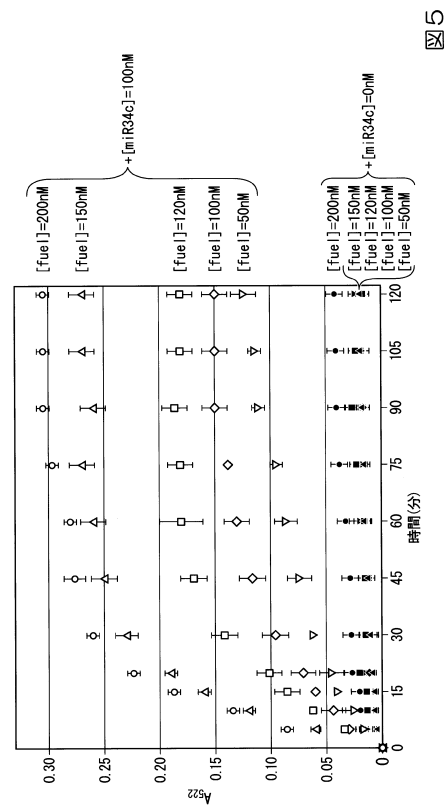
3

【図4】



4

【図5】



5

【 図 6 】

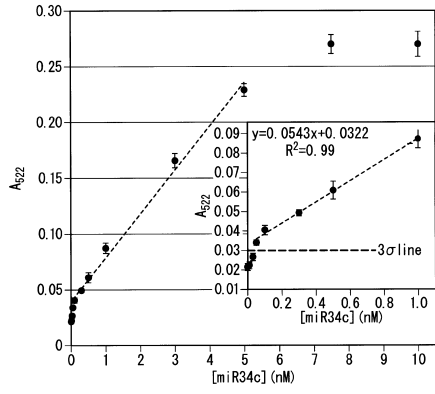


図6

【 図 7 】

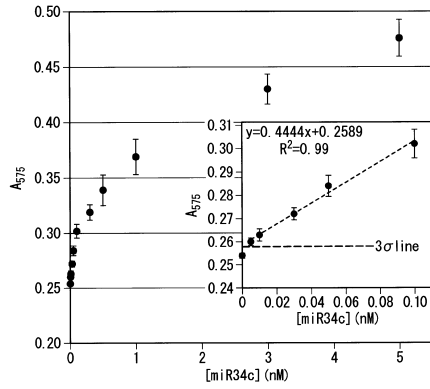


図7

【 図 10 】

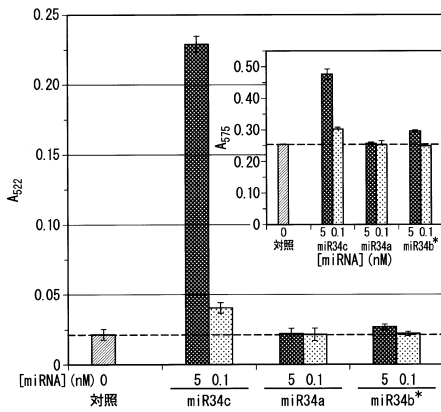


図10

【 図 8 】

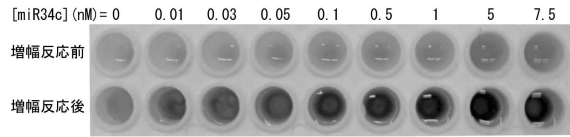


図8

【 図 9 】

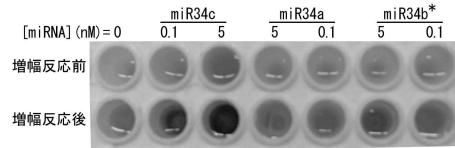


図9

【配列表】

0006774047000001.app

フロントページの続き

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 ACS Applied Materials and Interfaces , 2 0 1 5 年 , 7(41) , pp.22821-22830
Biosensors and Bioelectronics , 2 0 1 2 年 , 32(1) , pp.127-132
Biosensors and Bioelectronics , 2 0 1 5 年 , 67 , pp.419-423

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 6 8 3 4

C 1 2 M 1 / 0 0

W P I

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)