明　細　書

発明の名称 ： 核酸解析法

技術分野

[0001] 本発明の実施形態は核酸解析法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子解析において、特定の配列を有する核酸を検出または定量する一般的な手法の１つにＰＣＲ増幅法を用いる方法がある。この方法では、検体をＰＣＲ増幅した後に、増幅産物について特定の配列の有無を検出またはその存在量を定量する。

[0003] ＰＣＲ増幅法では、検出または定量しようとする目的の配列を増幅するためのプライマーセットを使用し、検体に含まれる核酸を鋳型核酸として増幅する。得られた増幅産物は、熱処理などにより１本鎖に分解または分離された後に、例えば、目的の配列を検出するための核酸プローブと反応させる。それにより生じたハイブリダイゼーションの有無または量を指標として最終的に目的の配列の検出および／または定量が達成される。

[0004] 増幅産物からの１本鎖は、その配列によっては二次構造を形成する傾向を有する。また、ＰＣＲ増幅法により得られた増幅産物は、互いに相補な２本鎖からなる。従って、検出および／または定量に供するためには１本鎖化されるが、１本鎖化された試料には、互いに相補的な配列からなる二種類の１本鎖が存在することとなる。そのため、検出および／または定量中またはそれ以前に、試料中で出会う相補鎖同士が自然発生的に２本鎖を形成する傾向がある。１本鎖に関するこれらの傾向は、検出および／または定量を行う上で障害となる可能性がある。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明が解決しようとする課題は、正確、簡便且つ短時間で行うことが可能な核酸解析法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 実施形態は検体についての核酸解析法に関する。核酸解析法は、検体を第１のプライマーと第２のプライマーで増幅反応し、増幅反応産物を核酸プローブに反応させ、ハイブリダイズの有無および／または量を測定し、検体中の標的核酸の有無および／または存在量を決定することを含む。第１のプライマーおよび／または第２のプライマーによる増幅産物は、ステムループ構造体を形成する。ループ構造の配列に相補的な核酸プローブと増幅産物とのハイブリダイゼーションの有無および／または存在量を検出することにより検体について核酸解析する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図１は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図2]図２は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図3]図３は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図4]図４は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図5]図５は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図6]図６は、実施形態における増幅工程の１例を示すスキーム図である。

[図7]図７は、実施例１のプライマーおよびプローブの設計位置を示す図。

[図8]図８は、実施例１の電気泳動結果を示す図。

[図9]図９は、実施例１の検出結果を示すグラフ。

[図10]図１０は、実施例２の検出結果を示すグラフ。

[図11]図１１は、実施例２の検出結果を示すグラフ。

[図12]図１２は、実施例３の検出結果を示すグラフ。

[図13]図１３は、実施形態におけるＤＮＡチップの１例を示す図。

[図14]図１４は、実施形態におけるＤＮＡチップの１例を示す図。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。

[0009] ［定義］

「増幅」または「増幅反応」とは、プライマーセットを用いて鋳型核酸を

繰り返し複製することをいい、伸長工程および増幅工程などの工程を含む。増幅は、基本的に２つのプライマー、例えば、フォワードプライマーとリバースプライマーからなるプライマーセットを用いて鋳型核酸を複製できるそれ自身公知の何れの方法であってよい。例えば、ＰＣＲ増幅方法、ＬＣＲ増幅方法、ＲＣＡ増幅方法、ＴＭＡ増幅方法、ＮＡＳＢＡ増幅方法、ＳＤＡ増幅方法およびＩＣＡＮ増幅方法が好ましい。また、所望に応じて当該増幅反応と同時に、逆転写酵素を用いる逆転写反応を組み合わせて行ってもよい。増幅反応と逆転写反応を同時に行う技術は、それ自身公知の何れの技術を利用してよい。

[0010] 「核酸」とは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ、Ｓ－オリゴ、メチルホスホネートオリゴなど、その一部の構造を塩基配列によって表すことが可能な物質を総括的に示す語である。例えば、核酸は、天然由来のＤＮＡおよびＲＮＡなど、一部分または完全に人工的に合成および／または設計された人工核酸など、並びにそれらの混合物などであってよい。

[0011] 「検体」とは、本実施形態に従い解析方法を行なうべき対象であり、核酸を含む可能性のある試料であればよい。検体は、増幅反応および／またはハイブリダイゼーション反応を妨害しない状態であることが好ましい。例えば、生体などから得られた材料を、本実施形態に従う検体として使用するためには、それ自身公知の何れかの手段により前処理を行ってもよい。例えば、検体は液体であってもよい。

[0012] 検体に含まれる核酸を「被検核酸」と称する。検体核酸のうち、プライマーをアニーリングさせ複製しようとするポリヌクレオチドを含む核酸を「鋳型」と称す。鋳型のうち、プライマーセットに含まれる２つのプライマーにより規定される部分を「鋳型核酸」と称す。更に、「鋳型核酸」についてプライマーの結合領域（「アニーリング領域」ともいう）を除いた領域をここでは「鋳型配列」と称す。

[0013] 「標的配列」とは、核酸プローブを用いて検出または定量しようとする配列である。

[0014] 「標的核酸」とは、標的配列を含む核酸であり、且つ鋳型核酸からプライマーが複製した核酸のうち、標的配列を含む核酸をいう。プライマーによる複製が伸長である場合には、標的配列を含む伸長産物であり、プライマーによる複製が増幅である場合には標的配列を含む「増幅産物」をいう。また、「伸長産物」および「増幅産物」を「複製鎖」とも称す。

[0015] 「核酸プローブ」とは、標的配列に対して相補的な配列を含む核酸である。核酸プローブは、遊離した状態で使用されてもよく、それ自身公知の固相に対して固定化されてもよい。好ましい核酸プローブは、基体表面に固定化されて使用される。そのような基体と、基体に固定化された核酸プローブとを含む装置は、一般的にＤＮＡチップにより行われてよい。

[0016] 「ＤＮＡチップ」とは、検出しようとする核酸に相補的な配列を有する核酸プローブと、検出対象の核酸との間のハイブリダイゼーション反応を利用して、核酸を解析する装置である。ＤＮＡチップの語は、一般的に使用される「核酸チップ」、「マイクロアレイ」および「ＤＮＡアレイ」などの用語と同義であり、互いに交換可能に使用される。

[0017] 「鋳型配列に由来する配列」（または「「鋳型配列の相補配列に由来する配列」）とは、プライマーセットがそれぞれ鋳型核酸（またはその相補配列）にアニーリングした後に、それらのプライマーにより規定される鋳型配列（またはその相補配列）に含まれる領域の配列についての配列情報、即ち、塩基配列やその配列の向きなどについての情報を反映する配列である。

[0018] 「相補的である」および「相補鎖」は、２つの１本鎖核酸が、互いに少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％の相補性を有する場合に使用されてよい。「相同的である」および「相同鎖」は、２つの１本鎖核酸が、互いに少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または１００％の相同性を有する場合に使用されてよい。

[0019] （１）鋳型核酸

まず、実施形態の核酸解析方法を実施する前に検体を調製する。検体は、

核酸を含む可能性があり、そこに含まれる核酸について解析を行うことが望まれる対象であればよい。検体は、そこにおいて増幅反応が適切に行われる必要があるため、必要に応じて解析をしようとする対象から得た粗検体について前処理を行って検体としてもよく、また、増幅反応に適切である場合には、前処理を行わずに粗検体そのまま検体として使用してもよい。

[0020] 検体に解析しようとする配列を有する核酸が存在した場合、それらは最初の鋳型核酸として使用される。鋳型核酸として使用される被検核酸は１本鎖でも２本鎖でもよい。仮に１本鎖の被検核酸について増幅が開始された場合であっても、増幅過程においてその相補鎖が複製される。従って、当初から存在する鋳型核酸が、第１の鋳型核酸として機能し、複製されて増幅過程において形成された当該鋳型核酸の相補鎖が第２の鋳型核酸として機能する。

[0021] （２）ステムループ構造体

ステムループ構造体は、例えば、図１において符号１１０で示される分子内構造を有し、１本鎖ループ部分とステム部分を含む２本鎖部分とを有する。

[0022] 本実施形態では、２つのステムループ構造体が形成される。１つは、前述の符号１１０により示される５’末端側に存在するステム部分と、その３’側に隣接するループ部分と、更に当該ステム部分に相補的な配列を含む３’末端側に存在する２本鎖部分と直鎖の一本鎖部分を有するステムループ構造体である（図１）。もう１つは、符号１１５で示されるステムループ構造体である。このステムループ構造体は、ループ部分からなる１本鎖領域と、ステム部分を含む２本鎖領域とからなる。これらの２種類のステムループ構造体は、１つの鋳型核酸に対するフォワードプライマーとリバースプライマーからなる１組のプライマーセットを用いて増幅反応を行うことにより得ることが可能である。

[0023] （３）核酸解析法

実施形態の１例である核酸解析法について説明する。

[0024] 解析の対象となる検体は、まずフォワードプライマーとリバースプライマ

ーにより増幅される。次に、これにより得られた増幅産物について、特定の標的配列に相補的な配列を含む核酸プローブと反応させる。更に、核酸プローブと増幅産物とのハイブリダイゼーションを検出する、および／またはハイブリダイゼーション量を測定する。この結果に基づいて、検体に含まれる被検核酸について配列情報を得ることが可能となる。

[0025] また、解析される項目は、例えば、遺伝子発現量の測定、ウイルスおよび／または細菌などに由来する核酸などの定量、多型についての遺伝子型の同定および／または変異の有無の検出などであってよい。しかしながらこれらに限定されるものではない。

[0026] ＜増幅工程＞

増幅工程では、本解析において得ようとする情報を反映する指標核酸を選択し、これに基づいて鋳型核酸を設計する。

[0027] 増幅されるべき２本鎖核酸１０１は、第１の鋳型核酸１０２とその相補鎖である第２の鋳型核酸を含む。第１の鋳型核酸１０２は、３’端に位置する第１の配列１０３ａと、その５’側に隣接する第１の鋳型配列１０５ａと、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列１０４ａからなる。第２の鋳型核酸は、３’端に位置する第３の配列１０４ｂと、その５’側に隣接する第２の鋳型配列１０５ｂと、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列１０３ｂからなる。

[0028] このような鋳型核酸を増幅するためにフォワードプライマーとリバースプライマーが適宜選択される。図１では第１のプライマー１０６と、第２のプライマー１０９が示される。第１のプライマー１０６と第２のプライマー１０９はどちらがフォワードプライマーであってもリバースプライマーであってもよい。何れの場合も同様な手続きにより同様な増幅産物を得ることが可能である。

[0029] また第１のプライマー１０６は、第１の鋳型核酸１０２の第１の配列１０３ａに相補的なＳ１配列と、その５’側に隣接し、５’端側に連結したＳ２配列１０８とを含む。増幅反応において、第１のプライマー１０６は第１の

配列１０３ａに結合して伸長され、それにより伸長鎖１１０が形成される。ここで、Ｓ２配列１０８は、第１の鋳型核酸１０２に含まれる鋳型配列１０５ａの一部分に対して相補的な配列を有するように設計される。

[0030] 一方、第２のプライマー１０９は、増幅反応において、第２の鋳型核酸の第３の配列１０４ｂに結合して伸長され、それにより伸長鎖が形成される（図示せず）。

[0031] 第１のプライマー１０６の伸長鎖１１０は、変性により２本の１本酸鎖複製鎖に分離され、第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖１１０となる。第１の複製鎖１１０は、反応液中において自然発生的に分子内構造を形成する。この分子内構造は、ステムループ構造である。第１の複製鎖１１０は、第１のプライマーに由来するＳ２配列からなるステム部分１０８と、その相補配列であり、第１の鋳型配列の相補配列１０５ｂの一部分であるＳ２’配列との間で２本鎖領域を形成する。この２本鎖領域の形成に伴って１本鎖のループ部分１１１が形成される。ループ部分１１１には、第１のプライマーに由来するＳ１配列と、第１の鋳型配列の相補配列１０５ｂの一部分が含まれてよい。

[0032] ループ部分１１１に含まれる第１の鋳型配列の相補配列１０５ｂに由来する配列の長さは、第１のプライマーの配列Ｓ２の配列を選択することにより決定される。即ち、第１の配列１０３ａの５’端から３’方向にどれだけ離れた位置の配列に対してＳ２配列が相補的であるかにより、最終的に得られるステムループ構造体のループ部分に含まれる鋳型配列に由来する配列の長さが決まる。ループ部分の配列は、後述するように核酸プローブにより検出する標的配列が設計される。標的配列に鋳型配列に由来する配列を含ませることにより、未反応のプライマーに由来する検出信号を検出することに起因する偽陽性の検出結果を除外するのに有利である。

[0033] 言い換えれば、第１の配列１０３ａの５’端よりも５’側にあり、「Ｓ２’」で示されるＳ２’配列の３’端の３’側に存在する認識配列１１４の長さをどれくらいにするかにより、ループ部分に含まれる鋳型配列に由来する

配列の長さを選択することが可能である。認識配列１１４は、Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列と共に標的配列として核酸プローブにより検出されてよい。従って、鋳型配列に由来する配列であることが認識可能である長さであることも更に有利である。

[0034] このように、１つの実施形態における増幅工程では、複製鎖であるステムループ構造体のループ部分に対して、鋳型配列に由来する配列である認識配列を含ませ、更に、核酸プローブで検出しようとする標的配列にその認識配列を含ませる例を記載した。しかしながら、認識配列がループ部分に含まれなくてもよい。即ち、認識配列が存在せず、ループ部分が認識配列に由来する配列を含まないようにプライマーセットを設計してもよい。例えば、ステム配列を含む２本鎖を検出できるような検出原理を利用すれば、その２本鎖配列の存在を利用して、未反応のプライマーに由来する検出信号と増幅産物に由来する信号とを区別して検出することが可能となる。従って、認識配列は必ずしも必要ではない。その場合、ステム配列を含む２本鎖部分がある程度の長さを有する方が短い長さであるよりも有利である。

[0035] 例えば、認識配列１１４は、０塩基以上、１塩基以上、２塩基以上、３塩基以上、４塩基以上、５塩基以上、６塩基以上、７塩基以上、８塩基以上、９塩基以上、１０塩基以上、１１塩基以上、１２塩基以上、１３塩基以上、１３塩基以上、１４塩基以上、１５塩基以上、２０塩基以上、２５塩基以上、３０塩基以上または３５塩基以上であってよく、また５０塩基以下、４０塩基以下、３５塩基以下、３０塩基以下または２５塩基以下、２０塩基以下であってよく、これらの何れかの下限値および上限値を組み合わせた範囲であってもよい。好ましくは２０～８０塩基、更に好ましくは３０～５０塩基である。また、この長さは、解析しようとする鋳型核酸の長さを考慮して選択されてもよい。

[0036] 鋳型核酸の長さは、解析しようとする鋳型核酸および解析しようとする配列、および後述する検出工程における検出原理などに応じに適宜選択されればよい。例えば、１５塩基以上、２０塩基以上、２５塩基以上、３０塩基以

上、３５塩基以上、４０塩基以上、４５塩基以上、５０塩基以上、６０塩基以上、７０塩基以上、８０塩基以上、９０塩基以上、１００塩基以上、１５０塩基以上、２００塩基以上、２５０塩基以上、３００塩基以上、４００塩基以上、５００塩基以上、６００塩基以上、８００塩基以上、９００塩基以上または１０００塩基以上であってよく、１５００塩基以下、１０００塩基以下、９００塩基以下、８００塩基以下、７００塩基以下、６００塩基以下、５００塩基以下、４００塩基以下、３００塩基以下、２００塩基以下、１５０塩基以下、１００塩基以下、９０塩基以下、８０塩基以下、７０塩基以下、６５塩基以下、６０塩基以下、５５塩基以下、５０塩基以下、４５塩基以下、４０塩基以下、３５塩基以下、３０塩基以下、２５塩基以下、２０塩基以下または１５塩基であってよく、これらの何れかの下限値および上限値を組み合わせた範囲であってもよい。好ましくは５０～１０００塩基、更に好ましくは１００～３００塩基である。

[0037] また、第１のプライマーの長さは、解析しようとする鋳型核酸および解析しようとする配列、および後述する検出工程における検出原理などに応じに適宜選択されればよい。第１のプライマーの長さは、例えば、２塩基以上、３塩基以上、４塩基以上、５塩基以上、６塩基以上、７塩基以上、８塩基以上、９塩基以上、１０塩基以上、１１塩基以上、１２塩基以上、１３塩基以上、１３塩基以上、１４塩基以上、１５塩基以上、２０塩基以上、２５塩基以上、３０塩基以上、３５塩基以上、４０塩基以上、４５塩基以上、５０塩基以上、６０塩基以上、７０塩基以上、８０塩基以上、９０塩基以上、１００塩基以上、１１０塩基以上、１２０塩基以上、１５０塩基以上または２００塩基以上であってよく、また２００塩基以下、１５０塩基以下、１３０塩基以下、１２０塩基以下、１１０塩基以下、１００塩基以下、９０塩基以下、８０塩基以下、７０塩基以下、６０塩基以下、５０塩基以下、４０塩基以下、３５塩基以下、３０塩基以下または２５塩基以下、２０塩基以下であってよく、これらの何れかの下限値および上限値を組み合わせた範囲であってもよい。好ましくは２０～１００塩基、更に好ましくは３０～６０塩基であ

る。或いは、例えば、第１のプライマーの長さは、１３～４０塩基、例えば、１５～３０塩基であってよく、１６～４７塩基、例えば、１８～３７塩基であってもよい。

[0038] Ｓ１配列およびＳ２配列の長さは各々、２塩基以上、３塩基以上、４塩基以上、５塩基以上、６塩基以上、７塩基以上、８塩基以上、９塩基以上、１０塩基以上、１１塩基以上、１２塩基以上、１３塩基以上、１３塩基以上、１４塩基以上、１５塩基以上、２０塩基以上、２５塩基以上、３０塩基以上、３５塩基以上、４０塩基以上、４５塩基以上、５０塩基以上、６０塩基以上、７０塩基以上であってよく、また８０塩基以下、７５塩基以下、７０塩基以下、６５塩基以下、６０塩基以下、５５塩基以下、５０塩基以下、４５塩基以下、４０塩基以下、３５塩基以下、３０塩基以下または２５塩基以下、２０塩基以下であってよく、これらの何れかの下限値および上限値を組み合わせた範囲であってもよい。好ましくは１０～５０塩基、更に好ましくは１５～３０塩基である。

[0039] また、第２のプライマーの長さは、例えば、２塩基以上、３塩基以上、４塩基以上、５塩基以上、６塩基以上、７塩基以上、８塩基以上、９塩基以上、１０塩基以上、１１塩基以上、１２塩基以上、１３塩基以上、１３塩基以上、１４塩基以上、１５塩基以上、２０塩基以上、２５塩基以上、３０塩基以上、３５塩基以上、４０塩基以上、４５塩基以上、５０塩基以上、５５塩基以上、６０塩基以上、６５塩基以上、７０塩基以上、８０塩基以上、９０塩基以上、１００塩基以上、１１０塩基であってよく、また150塩基以下、１２０塩基以下、１１０塩基以下、１００塩基以下、９０塩基以下、８０塩基以下、７０塩基以下、６０塩基以下、５０塩基以下、４０塩基以下、３５塩基以下、３０塩基以下または２５塩基以下、２０塩基以下、１５塩基以下、１０塩基以下であってもよく、これらの何れかの下限値および上限値を組み合わせた範囲であってもよい。好ましくは１０～１００塩基、更に好ましくは１５～６０塩基である。或いは、例えば、第２のプライマーの長さは、１３～４０塩基、例えば、１５～３０塩基であってよく、１６～４７塩基、例

えば、１８～３７塩基であってもよい。

[0040] ステムループ構造を有する複製鎖の長さは、解析しようとする鋳型核酸および解析しようとする配列、および後述する検出工程における検出原理などに応じに適宜選択されればよい。これに限定するものではないが、例えば、約５塩基以上、約１０塩基以上、約１５塩基以上、約２０塩基以上、約３０塩基以上、約３５塩基以上、約４０塩基以上、約４５塩基以上、約５０塩基以上、約５５塩基以上、約６０塩基以上または約６５塩基以上であってよく、また、約１００塩基以下、約９５塩基以下、約９０塩基以下、約８５塩基以下、約８０塩基以下、約７５塩基以下、約７０塩基以下、約６５塩基以下、約６０塩基以下、約５５塩基以下、約５０塩基以下、約４５塩基以下、約４０塩基以下、約３５塩基以下、約３０塩基以下、約２５塩基以下または約２０塩基以下であってよく、これらの下限と上限の何れかを組み合わせた長さであってよい。例えば、約１０塩基～約８０塩基、約１０塩基～約６０塩基、約２０塩基～８０塩基、約２０塩基～６０塩基であってよい。例えば、所望する分子内構造を得られるように設計されればよい。

[0041] また、ステムループ構造体におけるステム部分を含む２本鎖の長さは、解析しようとする鋳型核酸および解析しようとする配列、および後述する検出工程における検出原理などに応じに適宜選択されればよい。これに限定するものではないが、例えば、約５塩基以上、約１０塩基以上、約１５塩基以上、約２０塩基以上、約３０塩基以上、約３５塩基以上、約４０塩基以上、約４５塩基以上、約５０塩基以上、約５５塩基以上、約６０塩基以上または約６５塩基以上、約７０塩基以上、約７５塩基以上、約８０塩基以上、約９０塩基以上、約１００塩基以上、約１１０塩基以上、約１２０塩基以上、約１３０塩基以上、約１４０塩基以上、約１５０塩基以上、約２００塩基以上、約３００塩基以上、約５００塩基以上、約８００塩基以上、約１０００塩基以上であってよく、また、約１８００塩基以下、約１５００塩基以下、約１３００塩基以下、約１２００塩基以下、約１１００塩基以下、約１０００塩基以下、約９００塩基以下、約８００塩基以下、約７００塩基以下、約６０

０塩基以下、約５００塩基以下、約４００塩基以下、約３５０塩基以下、約３００塩基以下、約２５０塩基以下、約２００塩基以下、約１５０塩基以下、約１００塩基以下、約９５塩基以下、約９０塩基以下、約８５塩基以下、約８０塩基以下、約７５塩基以下、約７０塩基以下、約６５塩基以下、約６０塩基以下、約５５塩基以下、約５０塩基以下、約４５塩基以下、約４０塩基以下、約３５塩基以下、約３０塩基以下、約２５塩基以下または約２０塩基以下であってよく、これらの下限と上限の何れかを組み合わせた長さであってよい。好ましくは１０～１０００塩基、更に好ましくは１５～３００塩基であってよい。

[0042] 更に。ステムループ構造体における１本鎖ループ部分の長さは、解析しようとする鋳型核酸および解析しようとする配列、および後述する検出工程における検出原理などに応じに適宜選択されればよい。これに限定するものではないが、例えば、約３塩基以上、約４塩基以上、約５塩基以上、約６塩基以上、約７塩基以上、約８塩基以上、約９塩基以上、約１０塩基以上、約１１塩基以上、約１２塩基以上、約１３塩基以上、約１４塩基以上、約１５塩基以上、約２０塩基以上、約３０塩基以上、約３５塩基以上、約４０塩基以上、約４５塩基以上、約５０塩基以上、約５５塩基以上、約６０塩基以上または約６５塩基以上、約７０塩基以上、約８０塩基以上、約９０塩基以上、約１００塩基以上、約１１０塩基以上、約１２０塩基以上、約１３０塩基以上、約１４０塩基以上、約１５０塩基以上、約１６０塩基以上、約１７０塩基以上、約１８０塩基以上、約１９０塩基以上、約２００塩基以上または約２５０塩基以上であってよく、また、約３００塩基以下、約２５０塩基以下、約２００塩基以下、約１９０塩基以下、約１８０塩基以下、約１７０塩基以下、約１６０塩基以下、約１５０塩基以下、約１４０塩基以下、約１３０塩基以下、約１２０塩基以下、約１１０塩基以下、約１００塩基以下、約９５塩基以下、約９０塩基以下、約８５塩基以下、約８０塩基以下、約７５塩基以下、約７０塩基以下、約６５塩基以下、約６０塩基以下、約５５塩基以下、約５０塩基以下、約４５塩基以下、約４０塩基以下、約３５塩基以下、

約３０塩基以下、約２５塩基以下、約２０塩基以下、約１５塩基以下または約１０塩基以下、約８塩基以下であってよく、これらの下限と上限の何れかを組み合わせた長さであってよい。好ましくは１０～２００塩基、更に好ましくは１５～６０塩基である。

[0043] また、この増幅反応においては、増幅工程により得られる複製鎖を鋳型核酸として更に増幅工程を繰り返すことにより、更なる複製鎖を得ることが可能である。詳細は後述するが、即ち、第２のプライマーの伸長鎖に対応する第２の複製鎖として図１の右側下から２段目に記載する複製鎖１１２が得られる。この複製鎖１１２は、３’末端のＳ２配列に相補的なＳ２’配列１１３と、その５’側に隣接するＳ１配列に相補的なＳ１’配列１０３ａと、その５’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列１０５ａと、その５’側に隣接する第２のプライマー配列１０９を含む。この第２の複製鎖は、第１の複製鎖１１０と同様にステムループ構造を形成する。即ち、Ｓ２’配列１１３に相補的な配列であって、第１の鋳型配列の相補配列１０５ａの一部分の配列に対して、Ｓ２’配列１１３が結合し、その結果、ループ部分１１４が形成される。また特に、第２の複製鎖は、反応場に存在するポリメラーゼによって３’末端が更に伸長される。それにより、ステム部分１１３がその相補鎖に沿って伸長し、より長いステム部分を含む２本鎖が得られる。

[0044] 図２は、第１のプライマーを、フォワードプライマー２０６として用い、第２のプライマーをリバースプライマー２０９として使用した場合の増幅の例を示す。特に、鋳型核酸のプラス鎖とマイナス鎖が明らかになるように記載した図面である。図１におけるＳ１配列を「Ｆ１配列」、Ｓ２配列を「Ｆ２配列」、Ｓ３配列を「Ｂ１配列」と記載していること、および第１の鋳型核酸をマイナス鎖（対応する各配列に「（－）」の記号を付した）、第２の鋳型核酸をプラス鎖（対応する各配列に「（＋）」の記号を付した）こと以外は図１と同様に増幅反応が開始され進行する。

[0045] 図３は、第１のプライマーを、リバースプライマー３０６として用い、第２のプライマーをフォワードプライマー３０９として使用した場合の増幅を

特に鋳型核酸のプラス鎖とマイナス鎖が明らかになるように記載した図面である。図１におけるＳ１配列を「Ｂ１配列」、Ｓ２配列を「Ｂ２配列」、Ｓ３配列を「Ｆ１配列」と記載していること、および第１の鋳型核酸をプラス鎖（対応する各配列に「（＋）」の記号を付した）、第２の鋳型核酸をマイナス鎖（対応する各配列に「（－）」の記号を付した）こと以外は図１と同様に増幅反応が開始され進行する。

[0046] 図４は、第１のプライマーがＳ１配列およびＳ２配列を有するのと同様に、第２のプライマーにおいてもＳ３配列に加えてその５’端側にＳ４配列を有する実施形態を示す。具体的には、第１のプライマーはフォワードプライマーとして使用され、Ｓ１配列に対応するＦ１配列と、Ｓ２配列に対応するＦ２配列を含む。第２のプライマーはリバースプライマーとして使用され、Ｓ３配列に対応するＢ１配列と、Ｓ４配列に対応するＢ２配列を含む。

[0047] 各々の増幅工程は、図１と同様に行われるが、図１の増幅反応では、２種類のステムループ構造体が得られたのに対して、図４の増幅反応では、計４種類のステムループ構造体が得られる。そのうちの２種類は、図１と同様に第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖と第２のプライマーの伸長鎖に対応する第２の複製鎖から構成される。更なる２種類は、図３に示す増幅工程において得られる第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖と第２のプライマーの伸長鎖に対応する第２の複製鎖から構成される。

[0048] 図５は、図１の第２のプライマーの伸長鎖に対応する複製鎖が形成される過程を示した図である。図１を更に具体的に記載した図２の反応の続く増幅過程として記載する。図５において最初の鋳型として使用される複製鎖は、図２においてフォワードプライマー２０６の伸長鎖に対応する複製鎖２１０である。図５では、伸長鎖２１０に結合したリバースプライマー２０９が伸長して、伸長鎖５０２が生じる。伸長鎖５０２は、その配列に依存して自然発生的な分子内構造が形成され、ステムループ構造体５０５が形成される。ステムループ構造体５０５は、３’端のＦ２’配列（これは「Ｆ２配列」の相補配列である）と、その５’端側に隣接するＦ１’配列（これは「Ｆ１配

列」の相補配列である）と、その５’端側に隣接するマイナス鎖の鋳型配列とその５’端側に隣接するＢ１配列とを含む。Ｆ２’配列は、マイナス鎖の鋳型配列の一部分に相補的な配列を有しているために、同一鎖上において分子内結合が生じ、それによりステム部分を含む２本鎖領域とループ部分からなる１本鎖領域が形成される。更に、ステムループ構造体５０５の３’末端は、反応液中のポリメラーゼにより更に伸長される。その伸長により、ループ部分５０８以外の領域は全て２本鎖となる。

[0049] 図６は、図５と同様にステムループ構造体のループ部分以外の領域が全て２本鎖である更なる複製鎖が形成される過程を示す。図６では、図３に示すリバースプライマー３０８の伸長鎖３１１を最初の鋳型核酸として使用する。図６では、伸長鎖３１１に結合したフォワードプライマー３０９が伸長され、伸長鎖６０２が生じる。伸長鎖６０２は、自然発生的な分子構造を形成し、ステムループ構造体６０５が形成される。ステムループ構造体６０５は、３’端のＢ２’配列（これは「Ｂ２配列」の相補配列である）と、その５’端側に隣接するＢ１’配列（これは「Ｂ１配列」の相補配列である）と、その５’端側に隣接するプラス鎖の鋳型配列と、その５’端側に隣接するＦ１配列とを有する。Ｂ１’配列は、プラス鎖の鋳型配列の一部分に相補的な配列を有しているために、同一鎖上において分子内結合が生じ、それによりステム部分を含む２本鎖領域とループ部分からなる１本酸領域とが形成される。更にステムループ構造体６０５の３’末端は、更に伸長される。この伸長により、ステムループ構造体６０６は、ループ部分６０７以外の領域が全て２本鎖となる。

[0050] ＜プライマーセット＞

実施形態において使用されるプライマーセットは、２つのプライマーによって増幅が達成されるそれ自身公知の何れかの増幅反応において使用される２種類のプライマー、即ち、第１のプライマーと第２のプライマーを含めばよい。

[0051] ＰＣＲ増幅の場合、第１のプライマーは、フォワードプライマーまたはリ

バースプライマーであればよい。第１のプライマーがフォワードプライマーである場合、第２のプライマーはリバースプライマーであればよい。また、第１のプライマーがリバースプライマーである場合、第２のプライマーはフォワードプライマーであればよい。

[0052] 例えば、増幅されるべき核酸が、第１の鋳型核酸と第２の鋳型核酸を含み、

第１の鋳型核酸が、３’端に位置する第１の配列と、その５’側に隣接する第１の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列とを含み、および

第２の鋳型核酸は、第１の鋳型核酸の相補鎖であり、その３’端に位置する第３の配列と、その５’側に隣接する第２の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列とを含む場合、

第１のプライマーと第２のプライマーは次のような構成であればよい。

[0053] ［例１］

第１のプライマーは、第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、Ｓ１配列の５’端側に連結したＳ２配列とを含む。Ｓ２配列は、第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列である。

[0054] 第２のプライマーは、第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列を含む。

[0055] このようなプライマーを使用して鋳型核酸を増幅した際に得られる増幅産物の一部は、ステムループ構造体である。このステムループ構造体は以下のような２つの構成を有する。

[0056] 第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖は、その同一鎖上で第１のステム部分を含む第１の２本鎖領域と第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域とを含む第１のステムループ構造体を形成する。第１の２本鎖領域は、Ｓ２配列に由来する第１のステム部分とそれに相補的な第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域はＳ１配列と、任意にその３’側に隣接する第１の鋳型配列の

相補配列に由来する配列とを含む。ここで、第１のプライマーにおいて、Ｓ２配列が第１の配列の５’側に隣接する場合には、第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域は、Ｓ１配列の３’側に第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0057] 第２のプライマーの伸長鎖に対応する第２の複製鎖は、その同一鎖上で第２のステム部分を含む第２の２本鎖領域と第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域とを含む第２のステムループ構造体を形成する。第２の２本鎖領域は、Ｓ２配列の相補配列に由来する第２のステム部分とそれに相補的な第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域はＳ１配列の相補配列と、任意にその５’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。ここで、第１のプライマーにおいて、Ｓ２配列が第１の配列の５’側に隣接する場合には、第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域は、Ｓ１配列の５’側に第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0058] ［例２］

或いは、第１のプライマーと第２のプライマーは次のような構成であってもよい。

[0059] 前記第１のプライマーは、第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、Ｓ１配列の５’側に連結したＳ２配列を含む。Ｓ２配列は、第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列である。

[0060] 第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列と、Ｓ３配列の５’側に連結したＳ４配列を含む。Ｓ４配列は、第２の鋳型配列の少なくとも一部分である、第３の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列である。

[0061] このようなプライマーを使用して鋳型核酸を増幅した際に得られる増幅産物の一部は、ステムループ構造体である。このステムループ構造体は以下のような４つの構成を有する。

[0062] 第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖は、その同一鎖上で第１のステム部分を含む第１の２本鎖領域と第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域とを含む第１のステムループ構造体を形成する。第１の２本鎖領域は、Ｓ２配列に由来する第１のステム部分とそれに相補的な第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域はＳ１配列と、任意にその３’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。ここで、Ｓ２配列が、第１の配列の５’側に隣接する場合には、第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域はＳ１配列の３’側に第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0063] 第１のプライマーの伸長鎖に対する第２の複製鎖は、その同一鎖上で第２のステム部分を含む第２の２本鎖領域と第２のループ部分を構成する第２の１本酸領域とを含む第２のステムループ構造体を形成する。第２の２本鎖領域は、Ｓ４配列の相補配列に由来する第２のステム部分とそれに相補的な第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域はＳ３配列の相補配列と、任意にその５’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。ここで、Ｓ４配列が、第３の配列の５’側に隣接する場合には、第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域は、Ｓ３配列の５’側に第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0064] 第２のプライマーの伸長鎖に対応する第３の複製鎖は、その同一鎖上で第３のステム部分を含む第３の２本鎖領域と第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域とを含む第３のステムループ構造体を形成する。第３の２本鎖領域は、Ｓ４配列に由来する第３のステム部分とそれに相補的な第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域はＳ３配列と、任意にその３’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含む。ここで、Ｓ４配列が、第３の配列の５’側に隣接する場合には、第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域は、Ｓ

３配列の３’側に第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0065] 第２のプライマーの伸長鎖に対する第４の複製鎖は、その同一鎖上で第４のステム部分を含む第４の２本鎖領域と第４のループ部分を構成する第４の１本酸領域とを含む第４のステムループ構造体を形成する。第４の２本鎖領域は、Ｓ２配列の相補配列に由来する第４のステム部分とそれに相補的な前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域はＳ１配列の相補配列と、任意にその５’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含む。Ｓ２配列が、第１の配列の５’側に隣接する場合には、第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域は、Ｓ１配列の相補配列の５’側に第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列を含まなくてよい。

[0066] ＜検出工程＞

鋳型核酸の増幅に続き、上述の増幅工程により得られた増幅産物中に目的の配列が存在しているか否か、またはどの程度の量で存在しているかを検出する。

[0067] 検出は、核酸プローブを用いて行う。核酸プローブは、検出しようとする標的配列に相補的な配列を含む。本核酸解析法においては、核酸プローブにより検出されるべき標的配列が上述の増幅産物のうちのステムループ構造体のループ部分に含まれるように設計されればよい。

[0068] 検出は、基体上に固定化した核酸プローブと増幅産物をハイブリダイゼーションさせて行う。その後、増幅産物と核酸プローブのハイブリダイゼーションを適宜の検出法により検出する。

[0069] ＜核酸プローブ＞

［例１］

上述の＜プライマーセット＞の項目の［例１］に記載のプライマーセットを使用する場合、例えば、次のような２種類の核酸プローブ、即ち、第１の核酸プローブおよび／または第２の核酸プローブが使用されてよい。

[0070] 第１の核酸プローブは、第１の複製鎖の第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでよい。このような第１の核酸プローブは、第１の核酸プローブの５’側に、更に任意に、前記一部分の配列の３’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第１の核酸プローブは、第１の複製鎖の第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列を含んでよい。このような第１の核酸プローブは、第１の核酸プローブの５’側に、更に任意に、前記一部分の配列の３’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。ここで、第１のプライマーにおいて、Ｓ２配列が第１の配列の５’側に隣接する場合には、第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

[0071] 第２の核酸プローブは、第２の複製鎖の第２のループ部分を構成する第２の一本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第２の核酸プローブは、第２の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第２の核酸プローブは、第２の複製鎖の第２のループ部分を構成する第２の一本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ１配列の相補配列（即ち、Ｓ１’配列）の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第２の核酸プローブは、第２の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。ここで、第１のプライマーにおいて、Ｓ２配列が第１の配列の５’側に隣接する場合には、第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

[0072] ［例２］

上述の＜プライマーセット＞の項目の［例２］に記載のプライマーセットを使用する場合、例えば、次のような４種類の核酸プローブ、即ち、第１の核酸プローブ、第２の核酸プローブ、第３の核酸プローブおよび第４の核酸プローブからなる群より少なくとも１を選択して使用してよい。

［0073］ 第１の核酸プローブは、前記第１の複製鎖の前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでよい。このような第１の核酸プローブは、第１の核酸プローブの５’側に、更に任意に、前記一部分の配列の３’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第１の核酸プローブは、前記第１の複製鎖の前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ１配列の相補的な配列の少なくとも一部分の配列を含んでよい。このような第１の核酸プローブは、第１の核酸プローブの５’側に、更に任意に、前記一部分の配列の３’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。ここで、ここで、Ｓ２配列が、第１の配列の５’側に隣接する場合には、第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

［0074］ 第２の核酸プローブは、第２の複製鎖の第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでよい。このような第２の核酸プローブは、第２の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第２の核酸プローブは、第２の複製鎖の第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ３配列の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第２の核酸プローブは、第２の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列

を含んでもよい。ここで、Ｓ４配列が、第３の配列の５’側に隣接する場合には、第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

[0075] 第３の核酸プローブは、第３の複製鎖の第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第３の核酸プローブは、第３の核酸プローブの５’側に、更に任意に前記一部分の配列の３’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第３の核酸プローブは、第３の複製鎖の第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ３配列の相補的な配列の少なくとも一部の配列を含んでよい。このような第３の核酸プローブは、第３の核酸プローブの５’側に、更に任意に、前記一部分の配列の３’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。ここで、Ｓ４配列が、第３の配列の５’側に隣接する場合には、第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

[0076] 第４の核酸プローブは、第４の複製鎖の第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第４の核酸プローブは、第４の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。或いは、第４の核酸プローブは、第４の複製鎖の第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列を含んでもよい。このような第４の核酸プローブは、第４の核酸プローブの３’側に、更に任意に、前記一部分の配列の５’側に隣接する第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配列に対して相補的な配列を含んでもよい。ここで、Ｓ２配列が、第１の配列の５’側に隣接する場合には、第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列の少なくとも一部分の配

列に対して相補的な配列を含まなくてよい。

[0077] ＜DNAチップ＞

本実施形態において使用されるDNAチップは、基体と基体上に固定化された核酸プローブとを具備すればよい。DNAチップの基体は、電流検出型を代表とする電気化学的検出型、蛍光検出型、化学発色型および放射能検出型など、従来公知の何れの種類のマイクロアレイ用の基体であってよい。

[0078] 何れの種類のマイクロアレイも、それ自身公知の方法により製造することが可能である。例えば、電流検出型マイクロアレイの場合、ネガティブコントロールプローブ固定化領域および検出用プローブ固定化領域は、それぞれ異なる電極上に配置されればよい。

[0079] ＤＮＡチップの例を模式図として図１３に示すが、これに限定するものではない。ＤＮＡチップ１３０は、基体１３１に固定化領域１３２を具備する。核酸プローブ１３３は該固定化領域１３２に固定化される。このようなＤＮＡチップ１３０は、当該分野で周知の方法によって製造することができる。基体１３１に配置される固定化領域１３２の数及びその配置は、当業者が必要に応じて適宜設計変更することが可能である。このようなＤＮＡチップは、蛍光を用いた検出方法のために好適に用いられてよい。

[0080] ＤＮＡチップの他の例を図１４に示す。図１４のＤＮＡチップ１４０は、基体１４１に電極１４２を具備する。核酸プローブ１４３は該電極１４２に固定化される。電極１４２は、パット１４４に接続される。電極１４２からの電気的情報はパット１４４を介して取得される。このようなＤＮＡチップ１４０は、当該分野で周知の方法によって製造することができる。基体１４１に配置される電極１４２の数及びその配置は、当業者が必要に応じて適宜設計変更することが可能である。さらに、本例のＤＮＡチップは、必要に応じて、参照電極及び対極を具備してもよい。

[0081] 電極は、金、金の合金、銀、プラチナ、水銀、ニッケル、パラジウム、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム又はタングステンのような金属単体及びそれらの合金、或いは、グラファイト、グラシーカーボンのような炭素又はそ

れらの酸化物又は化合物を用いることができるが、それらに限定されない。

[0082] 本例のようなＤＮＡチップは、電気化学的な検出方法のために好適に用いられてよい。

[0083] ＜ハイブリダイゼーション条件＞

ハイブリダイゼーションは、ハイブリッドが十分に形成される適切な条件下で行えばよい。適切な条件は、標的核酸の種類及び構造、標的配列に含まれる塩基の種類、核酸プローブの種類によって異なる。例えば、イオン強度が０．０１～５の範囲であり、ｐＨ５～９の範囲の緩衝液中でハイブリダイゼーションを行えばよい。反応温度は１０℃～９０℃の範囲であってよい。攪拌や振盪などにより、反応効率を高めても良い。反応溶液中には、硫酸デキストラン、サケ精子ＤＮＡ、及び牛胸腺ＤＮＡのようなハイブリダーゼション促進剤、ＥＤＴＡ、又は界面活性剤などを添加してもよい。

[0084] ＜洗浄条件＞

ハイブリダイゼーション後、ＤＮＡチップを洗浄するための洗浄液は、イオン強度が０．０１～５の範囲であり、ｐＨ５～９の範囲の緩衝液が好適に用いられる。洗浄液は塩及び界面活性剤などを含むことが好ましい。例えば、塩化ナトリウム又はクエン酸ナトリウムを用いて調製したＳＳＣ溶液、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ溶液、Ｔｗｅｅｎ２０溶液、又はＳＤＳ溶液などが好適に用いられる。洗浄温度は、例えば１０℃～７０℃の範囲で行う。洗浄液は、プローブ固定化基体の表面又は核酸プローブを固定化した領域に通過又は滞留させる。或いは、洗浄液中にＤＮＡチップを浸漬させてもよい。この場合、洗浄液は温度制御可能な容器中に収容されることが好ましい。

[0085] ＜検出方法＞

ハイブリダイゼーション工程により生じたハイブリッドの検出は、蛍光検出方式及び電気化学的検出方式を利用することができる。

[0086] （ａ）蛍光検出方式

蛍光標識物質を用いて検出する。核酸の増幅工程で用いるプライマーをＦＩＴＣ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、又はローダミンなどの蛍光色素のような、蛍光学

的に活性な物質で標識してもよい。或いは、それらの物質で標識したセカンドプローブを用いてもよい。複数の標識物質を同時に使用してもよい。検出装置により、標識された配列または２次プローブ中の標識を検出する。使用する標識に応じて適切な検出装置を用いる。例えば、蛍光物質を標識として用いた場合、蛍光検出器を用いて検出する。

[0087] （ｂ）電気化学的検出方式

当該分野で周知の２本鎖認識物質を用いる。２本鎖認識物質は、ヘキスト３３２５８、アクリジンオレンジ、キナクリン、ドウノマイシン、メタロインターカレーター、ビスアクリジン等のビスインターカレーター、トリスインターカレーター及びポリインターカレーターから選択してよい。更に、これらの２本鎖認識物質を電気化学的に活性な金属錯体、例えばフェロセン、ビオロゲンなどで修飾してもよい。

[0088] ２本鎖認識物質は、種類によって異なるが、一般的には１ｎｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬの範囲の濃度で使用する。この際には、イオン強度が０．００１～５の範囲であり、ｐＨ５～１０の範囲の緩衝液を用いることができる。

[0089] 測定は、例えば２本鎖認識物質が電気化学的に反応する電位以上の電位を印加し、２本鎖認識物質に由来する反応電流値を測定する。この際、電位は定速で印加するか、或いは、パルスで印加するか、或いは、定電位を印加してもよい。ポテンショスタット、デジタルマルチメーター、及びファンクションジェネレーターのような装置を用いて電流、電圧を制御してもよい。電気化学的検出は、当該分野で周知の方法によって実施することができる。

[0090] ＜アッセイキット＞

本実施形態は、アッセイキットの形態であってもよい。アッセイキットは、上述の何れかの実施形態のプライマーセットおよび核酸プライマーを含めばよく、更に、任意に、希釈液、各種酵素、反応容器、取扱説明書などを含んでもよい。

実施例 1

[0091] ループ形成プライマーを用いて増幅した産物をＤＮＡチップにより検出す

る方法について示す実施例を詳述する。

[0092] （１）増幅

＜鋳型＞

鋳型は枯草菌配列を導入したプラスミドを用いた。枯草菌の配列は配列番号１に示した。

[0093] ＜プライマー＞

２９７ｂｐを増幅する通常ＰＣＲプライマーとして、5’-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC-3’（Ｆプライマー、配列番号２）、5’-CTGACGACAACCATGCACC-3’（Ｒプライマー、配列番号３）、３２２ｂｐを増幅する通常ＰＣＲプライマーとして、5’-GTAGGTGGCAAGCGTTGTCC-3’（Ｆプライマー、配列番号４）、5’-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3’（Ｒプライマー、配列番号５）を準備した。プライマー位置を図７に示した。またステムが短いループ形成２９７ｂｐターゲット増幅用として、5’-CCCTAACACTTAGCACTCATCGTT-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC-3’（Ｆプライマー、配列番号６）、5’-GAAACCCCCTAACACTTAGC-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC-3’（Ｆプライマー、配列番号７）、5’-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC-3’（Ｆプライマー、配列番号８）を準備した。

[0094] Ｒプライマーは通常ＰＣＲプライマーと同様のもの（配列番号３）を用いた。さらに、ステムが長いループ形成３２２ｂｐターゲット増幅用として、5’-GGTAGTCCACGCCGTAAACG-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3’（Ｒプライマー、配列番号９）、5’-ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3’（Ｒプライマー、配列番号１０）、5’-GGAGCGAACAGGATTAGATACCCT-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3’（Ｒプライマー、配列番号１１）を準備し、Ｆプライマーは通常ＰＣＲプライマーと同様のもの（配列番号４）を用いた。配列番号６、７、８、９、１０および１１の１本鎖ループ長は各々４２ｂｐ、５２ｂｐ、６６ｂｐ、４０ｂｐ、５０ｂｐ、６０ｂｐとなる。

[0095] ＜増幅＞

増幅は、ＫＡＰＡ２Ｇ Ｆａｓｔ ＤＮＡキット（KAPA Biosystems社製）を用い、９５℃１分の熱変性の後、９５℃５秒→６５℃５秒を４０サイクル

行った。増幅装置は、ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ９７００（Applied Biosystems）で行った。増幅時間は４７分程度であった。増幅後、電気泳動により増幅産物の確認を行った。

[0096] （２）チップ検出

＜検出プローブ＞

（1）で増幅した枯草菌の増幅産物をチップ検出するため5’-ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT-3’（配列番号１７）、5’-CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG-3’（配列番号１８）の２種類の長さの異なるマイナス鎖のプローブを用意した。プローブ位置を図７に示した。また、ネガティブコントロールとして、枯草菌と無関係な配列を示す5’-TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA-3’（配列番号１９）を用意した。以上のプローブは、金電極に固定化するために３’末端側をチオール修飾した。

[0097] ＜プローブ固定化電極の作製＞

プローブの固定化は、チオールと金との強い共有結合性を利用して行った。１ｍＭメルカプトヘキサノール溶液を含むプローブ溶液を金電極上にスポットし、乾燥させた。同一プローブは各４電極にスポットした。乾燥後、超純水で洗浄、風乾し、プローブ固定化電極を得た。

[0098] ＜ハイブリダイゼーション＞

（１）で得た増幅産物を９５℃で５分熱変性をかけた後に２×ＳＳＣの塩を添加し、この溶液を上記のように作製したプローブ固定化電極に浸漬し、６４℃で５分間静置させて、ハイブリダイゼーションを行った。その後、プローブ固定化電極を０．２×ＳＳＣ溶液に２５℃で１分間浸漬して洗浄した。次いで、プローブ固定化電極を、挿入剤であるヘキスト３３２５８溶液を５０μＭ含むＰＩＰＥＳ緩衝液中に１分間浸漬した。その後、ヘキスト３３２５８溶液の酸化電流応答を測定した。

[0099] （３）結果

図８に電気泳動結果を示した。通常のＰＣＲプライマーで増幅した産物およびループ形成プライマーで増幅した産物、いずれも目的の領域にバンドが

確認された。ループ形成プライマー産物については、複数のバンドがあり、複数の構造のターゲット構造の産物が形成されていることが示唆された。図９にチップ検出結果を示した。通常ＰＣＲプライマーで増幅した産物については、シグナル増加が見られなかった。一方、ループ形成プライマーで増幅した産物については、シグナル増加が見られた。さらに、ステム部分が短い増幅産物と比較してステム部分が長い増幅産物を検出した場合の方が安定して高いシグナル増加が検出された。ループ長については、４０ｂｐ～６０ｂｐまで十分なシグナル増加が確認された。また鋳型の代わりにＴＥを添加したＮｅｇａｔｉｖｅ産物については、シグナル増加はないことが確認された。

実施例 2

[0100] ループ形成プライマーを用いて増幅した産物をＤＮＡチップにより検出する方法の更なる応用例として、異なるターゲット長、異なる高速ＰＣＲ酵素の検討を行った。さらにＦプライマー、Ｒプライマー両方をループ形成プライマーとした場合の検討を行った。

[0101] （１）増幅

＜鋳型＞

実施例１と同様の鋳型を使用した。

[0102] ＜プライマー＞

異なるターゲット長を示すステムが長いループ形成ターゲットを得るため、１６１ｂｐターゲット用として5'-GCGTAGAGATGTGGAGGAAC-3'（Ｆプライマー、配列番号１２）、３２２ｂｐターゲット用として5'-GTAGGTGGCAAGCGTTGTCC-3'（Ｆプライマー、配列番号４）、５１１ｂｐターゲット用として5'-AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC-3'（Ｆプライマー、配列番号１３）、７３４ｂｐターゲット用として5'-CCTGTAAGACTGGGATAACTCCG-3'（Ｆプライマー、配列番号１４）を準備した。さらに、ＦプライマーおよびＲプライマーの両方をループ形成プライマーとした場合の産物を得るため、１６１ｂｐターゲット用として5'-GCTCCTCAGCGTCAGTTACA-GCGTAGAGATGTGGAGGAAC-3'（Ｆプライマー、配列番

号１５）、322bpターゲット用として5'-GCTTTCACATCAGACTTAAGGAACC-GTAGGTGGCAAGCGTTGTCC-3'（Ｆプライマー、配列番号4)を準備した。Rプライマーは全て共通で5'-ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3'（配列番号１０）を用いた。

[0103] ＜増幅＞

増幅は、（1）で使用したＫＡＰＡ２Ｇ　Ｆａｓｔ、およびＴａｋａｒａ　ＳｐｅｅｄＳＴＡＲ™　ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ(TAKARA Bio社製)、Ｐｈｉｒｅ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＩＩ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ(Thermo Fisher Scientific社製)を用いた。

[0104] 反応条件は実施例1と同様の方法で行った。

[0105] （２）チップ検出

ハイブリダイゼーション前の増幅産物の熱処理は省略した。これを除き実施例１と同様の方法で行った。

[0106] （３）結果

図１０にターゲット長が異なる増幅産物の検出結果を示した。ターゲット長が長くなるにつれ、ややシグナル増加が低くなる傾向が見られたが、いずれも十分なシグナル増加が見られた。また、ＦおよびＲプライマー両方をループ形成プライマーとした場合においても、十分なシグナル増加が確認された。さらに、図１１に示すように検討した３種の高速ＰＣＲ酵素全てにおいて、シグナル増加が確認された。

実施例 3

[0107] ループ形成プライマーを用いて増幅した産物をＤＮＡチップにより検出する方法の更なる応用例として、ＲｏｂｏＣｙｃｌｅｒ　Ｇｒａｄｉｅｎｔ９６（Stratagene社製）およびＵＲ１０４ＭＫＩＩＩ（Trust Medical社製）の回転式ＰＣＲ装置を用いて増幅の短時間化を検討した。

[0108] （１）増幅

＜鋳型＞

実施例1と同様の鋳型を使用した。

[0109] ＜プライマー＞

ステムが長いループ形成１６６ｂｐターゲット増幅用として、5'-GCGTAGAGATGTGGAGGAAC-3'（Ｆプライマー、配列番号１２）、5'-ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-AGCACTAAGGGGCGGAAACC-3'（Ｒプライマー、配列番号１０）を用いた。

[0110] ＜増幅＞

増幅は、ＫＡＰＡ２Ｇ　Ｆａｓｔ　ＤＮＡキットを用い、ＲｏｂｏＣｙｃｌｅｒ　Ｇｒａｄｉｅｎｔ　９６については、９７℃１分の熱変性の後、９７℃１０秒→５３℃１０秒を４０サイクル行った。増幅時間は１８分３０秒程度であった。ＵＲ１０４ＭＫＩＩＩについては、酵素量を推奨濃度の２倍の組成とし、９５℃１分の熱変性の後、９５℃４秒→６５℃７秒を４０サイクル行った。増幅時間は１０分３０秒程度であった。

[0111] (2) チップ検出

実施例２と同様の方法で行った

（３）結果

図１２に示すようにＲｏｂｏＣｙｃｌｅｒおよびＵＲ１０４ＭＫＩＩＩで増幅した産物について、チップ検出できることが示された。

[0112] 上記実施例１～３において、鋳型配列として使用した枯草菌配列を表１に示す。

[表1]

配列番号１　　枯草菌配列

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAC
AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAG
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGGGCTCGCAGGCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCT
GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG
CCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCG
CGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT
TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCG
TAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC

[0113] 上記実施例１～３において使用した各プライマーの配列について表２に記す
。

[表2]

配列番号	名称	配列
2	通常 PCR Fプライマー297bp	GGGAGCGAACAGGATTAGATACC
3	通常 PCR Rプライマー297bp	*CTGACGACAACCATGCACC*
4	通常 PCR Fプライマー322bp	GTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
5	通常 PCR Rプライマー322bp	*AGCACTAAGGGGCGGAAACC*
6	ステムが短いループ形成ターゲット用 Fプライマーループ 42mer	*CCCTAACACTTAGCACTCATCGTT*-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC
7	ステムが短いループ形成ターゲット用 Fプライマーループ 52mer	*GAAACCCCCTAACACTTAGC*-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC
8	ステムが短いループ形成ターゲット用 Fプライマーループ 66mer	*AGCACTAAGGGGCGGAAACC*-GGGAGCGAACAGGATTAGATACC
9	ステムが長いループ形成ターゲット用 Rプライマーループ 40mer	GGTAGTCCACGCCGTAAACG－*AGCACTAAGGGGCGGAAACC*
10	ステムが長いループ形成ターゲット用 Rプライマーループ 50mer	ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-*AGCACTAAGGGGCGGAAACC*
11	ステムが長いループ形成ターゲット用 Rプライマーループ 60mer	GGAGCGAACAGGATTAGATACCCT-*AGCACTAAGGGGCGGAAACC*
12	通常 PCR Fプライマー161bp	GCGTAGAGATGTGGAGGAAC
13	通常 PCR Fプライマー511bp	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
14	通常 PCR Fプライマー734bp	CCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
15	両ループ形成ターゲット用 Fプライマー161bp	*GCTCCTCAGCGTCAGTTACA*-GCGTAGAGATGTGGAGGAAC
16	両ループ形成ターゲット用 Fプライマー322bp	*GCTTTCACATCAGACTTAAGGAACC*-GTAGGTGGCAAGCGTTGTCC

[0114] 上記実施例１～３において使用したプローブを表３に示す。

[表3]

配列番号	名称	配列
17	枯草菌検出 Rプローブ 30mer	ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACT
18	枯草菌検出 Rプローブ 40mer	CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
19	ネガティブコントロールプローブ	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA

請求の範囲

［請求項1］ 検体についての核酸解析法であって、

増幅されるべき核酸が、第１の鋳型核酸と第２の鋳型核酸を含み、

前記第１の鋳型核酸は、３’端に位置する第１の配列と、その５’側に隣接する第１の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列とを含み、および

前記第２の鋳型核酸は、前記第１の鋳型核酸の相補鎖であり、その３’端に位置する第３の配列と、その５’側に隣接する第２の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列とを含み、

（ａ－１）前記第１の鋳型核酸と前記第２の鋳型核酸を増幅するための第１のプライマーと第２のプライマーを準備することと、

ここで、

前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’端側に連結したＳ２配列とを含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、および

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列を含む；

および

前記第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖は、その同一鎖上で第１のステム部分を含む第１の２本鎖領域と第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域とを含む第１のステムループ構造体を形成し、前記第１の２本鎖領域は、前記Ｓ２配列に由来する第１のステム部分とそれに相補的な前記第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域は前記Ｓ１配列を含み；および

前記第２のプライマーの伸長鎖に対応する第２の複製鎖は、その同

一鎖上で第２のステム部分を含む第２の２本鎖領域と第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域とを含む第２のステムループ構造体を形成し、前記第２の２本鎖領域は、前記Ｓ２配列の相補配列に由来する第２のステム部分とそれに相補的な前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域は前記Ｓ１配列の相補配列を含む；

（ａ－２）前記第１の複製鎖および／または前記第２の複製鎖を検出するための第１の核酸プローブおよび／または第２の核酸プローブを準備することと、

ここにおいて、

前記第１の核酸プローブは、前記第１の複製鎖の前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列であり、

前記第２の核酸プローブは、前記第２の複製鎖の前記第２のループ部分を構成する第２の一本鎖領域の少なくとも一部分の配列である；

（ｂ）前記第１のプライマーおよび第２のプライマーを用いて前記検体を増幅することと、

（ｃ）前記（ｂ）において得られた増幅産物と前記第１の核酸プローブおよび／または第２の核酸プローブとを反応させることと、

（ｄ）前記第１の核酸プローブおよび／または第２の核酸プローブと前記増幅産物とのハイブリダイゼーションの有無を検出すること、および/またはハイブリダイゼーション量を測定することと、

（ｅ）前記（ｄ）の結果に基づいて、前記検体における前記標的核酸の有無を決定すること、および／または存在量を決定することと、

を具備する核酸解析法。

［請求項2］ 前記増幅がＰＣＲ増幅反応である請求項１に記載の核酸解析法。

［請求項3］ 前記核酸プローブが、基体上に固定化されている請求項２に記載の核酸解析法。

［請求項4］ 前記基体上に固定化された核酸プローブと、前記増幅産物とのハイ

ブリダイゼーションの検出および/または定量が、電気化学的な活性を示す挿入剤を用いて行われる請求項３に記載の核酸解析法。

[請求項5] 前記検体が遺伝子を含み、当該解析の対象が当該遺伝子である請求項４に記載の核酸解析法。

[請求項6] 請求項１に記載の核酸解析法において使用するためのアッセイキットであって、

前記アッセイキットはプライマーセットと核酸プローブとを含み、

前記プライマーセットにより増幅される第１の鋳型核酸は、３’端に位置する第１の配列と、その５’側に隣接する第１の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列とを含み、および

前記プライマーセットにより増幅される第２の鋳型核酸は、前記第１の鋳型核酸の相補鎖であり、その３’端に位置する第３の配列と、その５’側に隣接する第２の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列とを含み、

前記プライマーセットは以下の（１）および／または（２）であり、

（１）前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’端側に連結したＳ２配列とを含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、および

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列を含む；

（２）前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’側に連結したＳ２配列を含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列と、前記Ｓ３配列の５’側に連結したＳ４配列を含み、前記Ｓ４配列は、前記第２の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第３の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列である；

前記核酸プローブは、以下の群から少なくとも１選択される；

前記Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

前記Ｓ１配列の相補配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

前記Ｓ３配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；および

前記Ｓ３配列の相補配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

アッセイキット。

［請求項7］ 検体についての核酸解析法であって、

増幅されるべき核酸が、第１の鋳型核酸と第２の鋳型核酸を含み、

前記第１の鋳型核酸は、３’端に位置する第１の配列と、その５’側に隣接する第１の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列とを含み、および

前記第２の鋳型核酸は、前記第１の鋳型核酸の相補鎖であり、その３’端に位置する第３の配列と、その５’側に隣接する第２の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列とを含み、

（ａ－１）前記第１の鋳型核酸と前記第２の鋳型核酸を増幅するための第１のプライマーと第２のプライマーを準備することと、

ここで、

前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’側に連結したＳ２配列を含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列と、前記Ｓ３配列の５’側に連結したＳ４配列を含み、前記Ｓ４配列は、前記第２の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第３の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、

またここで、

前記第１のプライマーの伸長鎖に対応する第１の複製鎖は、その同一鎖上で第１のステム部分を含む第１の２本鎖領域と第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域とを含む第１のステムループ構造体を形成し、前記第１の２本鎖領域は、前記Ｓ２配列に由来する第１のステム部分とそれに相補的な前記第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域は前記Ｓ１配列を含む；

前記第１のプライマーの伸長鎖に対する第２の複製鎖は、その同一鎖上で第２のステム部分を含む第２の２本鎖領域と第２のループ部分を構成する第２の１本酸領域とを含む第２のステムループ構造体を形成し、前記第２の２本鎖領域は、前記Ｓ４配列の相補配列に由来する第２のステム部分とそれに相補的な前記第１の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域は前記Ｓ３配列の相補配列を含む；

前記第２のプライマーの伸長鎖に対応する第３の複製鎖は、その同一鎖上で第３のステム部分を含む第３の２本鎖領域と第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域とを含む第３のステムループ構造体を形成し、前記第３の２本鎖領域は、前記Ｓ４配列に由来する第３のステム部分とそれに相補的な前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域は前記Ｓ３配列とを含む；

前記第２のプライマーの伸長鎖に対する第４の複製鎖は、その同一鎖上で第４のステム部分を含む第４の２本鎖領域と第４のループ部分

を構成する第４の１本酸領域とを含む第４のステムループ構造体を形成し、前記第４の２本鎖領域は、前記Ｓ２配列の相補配列に由来する第４のステム部分とそれに相補的な前記第２の鋳型配列の相補配列に由来する配列とを含み、前記第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域は前記Ｓ１配列の相補配列を含む；

（ａ－２）前記第１の複製鎖および／または前記第２の複製鎖を検出するための第１の核酸プローブ、第２の核酸プローブ、第３の核酸プローブおよび第４の核酸プローブからなる群より少なくとも１を準備することと、

ここにおいて、

前記第１の核酸プローブは、前記第１の複製鎖の前記第１のループ部分を構成する第１の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列であり、

前記第２の核酸プローブは、前記第２の複製鎖の前記第２のループ部分を構成する第２の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である；

前記第３の核酸プローブは、前記第３の複製鎖の前記第３のループ部分を構成する第３の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、前記Ｓ３配列の相補的配列の少なくとも一部分の配列を含み；

前記第４の核酸プローブは、前記第４の複製鎖の前記第４のループ部分を構成する第４の１本鎖領域の少なくとも一部分の配列である、前記Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列を含む；

（ｂ）前記第１のプライマーおよび第２のプライマーを用いて前記検体を増幅することと、

（ｃ）前記（ｂ）において得られた増幅産物と前記第１の核酸プローブ、第２の核酸プローブ、第３の核酸プローブおよび第４の核酸プローブからなる群より少なくとも１とを反応させることと、

（ｄ）前記（ｃ）の反応により生じたハイブリダイゼーションの有無を検出すること、および/またはハイブリダイゼーション量を測定することと、

（ｅ）前記（ｄ）の結果に基づいて、前記検体における前記標的核酸の有無を決定すること、および／または存在量を決定することと、

を具備する核酸解析法。

[請求項8] 前記増幅がＰＣＲ増幅反応である請求項７に記載の核酸解析法。

[請求項9] 前記核酸プローブが、基体上に固定化されている請求項８に記載の核酸解析法。

[請求項10] 前記基体上に固定化された核酸プローブと、前記増幅産物とのハイブリダイゼーションの検出および/または定量が、電気化学的な活性を示す挿入剤を用いて行われる請求項９に記載の核酸解析法。

[請求項11] 前記検体が遺伝子を含み、当該解析の対象が当該遺伝子である請求項１０に記載の核酸解析法。

[請求項12] 請求項７に記載の核酸解析法において使用するためのアッセイキットであって、

前記アッセイキットはプライマーセットと核酸プローブとを含み、

前記プライマーセットにより増幅される第１の鋳型核酸は、３’端に位置する第１の配列と、その５’側に隣接する第１の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第２の配列とを含み、および

前記プライマーセットにより増幅される第２の鋳型核酸は、前記第１の鋳型核酸の相補鎖であり、その３’端に位置する第３の配列と、その５’側に隣接する第２の鋳型配列と、その５’側に隣接し、５’端に位置する第４の配列とを含み、

前記プライマーセットは以下の（１）および／または（２）であり、

（１）前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’端側に連結したＳ２配列とを含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、および

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列を含む；

（２）前記第１のプライマーは、前記第１の配列に相補的な配列であるＳ１配列と、前記Ｓ１配列の５’側に連結したＳ２配列を含み、前記Ｓ２配列は、前記第１の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第１の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列であり、

前記第２のプライマーは、前記第３の配列に相補的な配列であるＳ３配列と、前記Ｓ３配列の５’側に連結したＳ４配列を含み、前記Ｓ４配列は、前記第２の鋳型配列の少なくとも一部分である、前記第３の配列の５’側に隣接またはその近傍に位置する配列である；

前記核酸プローブは、以下の群から少なくとも１選択される；

前記Ｓ１配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

前記Ｓ１配列の相補配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

前記Ｓ３配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；および

前記Ｓ３配列の相補配列の少なくとも一部分の配列を含む核酸プローブ；

アッセイキット。