明　細　書

発明の名称 ： 増幅核酸検出方法及び検出デバイス

技術分野

[0001] 本発明は、増幅核酸の簡便な検出方法、およびそのデバイスに関する。

背景技術

[0002] 分子生物学の研究分野、遺伝子検査等の臨床応用分野において、標的核酸配列を特異的に増幅する方法は非常に重要な技術となっている。核酸増幅法により得られた増幅産物を特異的に検出する方法の一つとして、標的配列を含む核酸断片を固相に固定して検出する方法がある。この方法では、標的核酸を特異的に固相に捕捉することで、洗浄等により非特異的な核酸配列を容易に除去し、検出特異性を上げることが可能である。

[0003] この際、標的核酸を固相に捕捉する方法としては、特異的な結合を形成し得る抗原－抗体の組合せ、あるいは、リガンドーレセプターの組合せを利用する方法が挙げられる。例えば、非特許文献１では、一方のプライマーの末端をビオチン修飾し、他方のプライマーを蛍光物質修飾したプライマーを用いて増幅したＰＣＲ産物の検出法が開示されている。この方法では、ＰＣＲ産物をストレプトアビジンーアガロースからなる固相と接触させ、ストレプトアビジンービオチン複合体を形成させることにより固相に結合させ、その蛍光を測定することで目的の増幅産物の検出が可能である。

[0004] しかし、標識に使用可能な抗原／抗体やリガンド／レセプターの組合せには制限があるため、同時に多数の標的核酸を検出することは実質的には困難である。また、蛍光標識核酸は高価であるといったコスト面の問題も有する。

[0005] 標的核酸を固相に捕捉する別の方法として、標的核酸に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドからなるプローブを固相上に固定化し、標的核酸とプローブとのハイブリダイゼーションを介して、標的核酸を固相に間接的に固定化する方法がある。この方法ではハイブリッド形成によるシグナル強度の検出を行う。このような核酸解析法は、プローブ配列を変えることで複数の

標的配列を一度に解析することが可能である。

[0006] しかし、固定化したプローブと標的核酸とを固相上でハイブリダイゼーションさせるには、一般にＰＣＲ法で増幅した二本鎖核酸を、熱処理により一本鎖に変性する工程が必要であるが、加熱処理は煩雑であるだけでなく、再アニーリングによるハイブリダイゼーション効率の低下が問題である。また、一本鎖ＤＮＡは球状化し易く、検出感度に劣るという問題も有している。特許文献１では、加熱処理を行わず、ヌクレアーゼ処理によって一本鎖核酸を増幅する方法が開示されているが、これも操作は煩雑であり、一本鎖の球状化の問題がある。

[0007] 核酸の検出方法の中でも、操作性に優れ、迅速、簡便な標的核酸の検出方法として、特許文献２に記載のクロマトグラフィーに基づいた方法がある。この方法は、細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出する工程、任意抽出された遺伝子の断片化工程、および検出工程が、単一の遺伝子検出装置上で、任意抽出された遺伝子またはその断片を含む液体試料をキャピラリー作用によって移動させる事により連続して行われる遺伝子検出方法である。目的遺伝子の存否を判断し、さらにその種類を同定する事が可能になる。

[0008] ただし、特許文献２でもＮＡＳＢＡ法により一本鎖核酸を増幅している。一本鎖核酸の使用上の課題は前述の通りである。

[0009] 上記の問題を解決するために、特許文献３及び特許文献４では、プライマー領域の５’側にＤＮＡポリメラーゼによる核酸合成を阻害する非天然型核酸タグ、ヘアピン構造、またはシュードノット構造を有することで、ＰＣＲ反応後も二本鎖核酸の片方に一本鎖領域を残している。特殊なプライマーを用いてＰＣＲ反応を行うだけで、二本鎖ＤＮＡの片方の末端にハイブリダイゼーション可能な一本鎖領域を有する増幅産物を作製可能であるという点で優れている。しかし、検出には蛍光標識や、表面プラズモン共鳴差イメージングによる検出が必要であるため、高価な専用の装置が必要であり、迅速性、簡便性の面で問題がある。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開平５－２５２９９８号公報

特許文献2：特開２００６－２０１０６２号公報

特許文献3：国際公開第２００６／０９５５５０号パンフレット

特許文献4：特開２００９－２９６９４８号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Analytical biochemistry, 193, 231-235, (1991)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 臨床現場における遺伝子診断や検査においては、検査装置が大型かつ高価であること、及び、検査時間を要することで、患者の検査費用や数回の通院での手間や負担を要することが多い。そこで、検査の正確性を保ちつつも患者及び検査者の負担を軽減する必要があるという理由から、簡便、迅速かつ特異性の高い方法、低コストで特殊な装置を必要としない方法が求められる。本発明は、前記問題に鑑みてなされたものであって、その目的はハイブリダイゼーション法の特異性の高さを活用し、かつ、ＰＣＲ産物の検出工程に要する時間と工程を減らし、特殊な装置を必要とすることなく、簡便かつ高精度に、目視にて検出する核酸検出方法、および核酸検出デバイスまたはキットを提供することを課題とする。さらには、これまでは高価な標識タグを標的核酸ごとに作製する必要があり、手間とコスト面で改善の余地があった。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、標的核酸を、両末端それぞれに一本鎖領域を有する二本鎖核酸として増幅し、当該増幅断片を、前記一本鎖領域の一方とハイブリダイゼーションし得るオリゴヌクレオチドプローブを有する固相と結合させ、これを検出することにより、特殊な装置を必要とすることなく、前記ＤＮＡ増幅断片を簡便かつ高精度に検出できることを独自に見出し、本発明を完成させるに至った。

[0014] すなわち、本発明は、両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一方の一本鎖領域と、固相上に固定した第１のオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせる工程を含む核酸検出方法に関する。

[0015] 前記ＤＮＡ増幅断片の他方の一本鎖領域と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせる工程をさらに含むことが好ましい。

[0016] 標識物質が着色担体からなり、前記ＤＮＡ増幅断片を目視検出できることが好ましい。

[0017] 前記ＤＮＡ増幅断片を核酸検出デバイス上で検出する工程を含むことが好ましい。

[0018] クロマトグラフィーにて前記ＤＮＡ増幅断片を検出することが好ましい。

[0019] 下記工程（ａ）～（ｃ）：

（ａ）前記核酸検出デバイス上の、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは異なる領域に、前記ＤＮＡ増幅断片を配置する工程、

（ｂ）溶媒を用いて、前記ＤＮＡ増幅断片を、前記第１オリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域の方向に、上記デバイス上で拡散させる工程、及び

（ｃ）前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、前記第１オリゴヌクレオチドプローブと、前記ＤＮＡ増幅断片とを、ハイブリダイズさせる工程、

を含むことが好ましい。

[0020] 前記工程（ｃ）の前に、前記ＤＮＡ増幅断片と、前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせる工程をさらに含むことが好ましい。

[0021] （ｄ）前記核酸検出デバイス上の、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは各々異なる領域に、前記ＤＮＡ増幅断片、および

前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ配置し、

（ｅ）溶媒を用いて、前記ＤＮＡ増幅断片を、前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域の方向に拡散させ、

（ｆ）前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域において、前記ＤＮＡ増幅断片と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせ、

（ｇ）工程（ｆ）でハイブリダイズした複合体を前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている方向に、展開媒体上で拡散させ、

（ｈ）前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブと前記複合体とをハイブリダイズさせることが好ましい。

[0022] 前記天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域が、二本鎖ＤＮＡ領域と同一方向からなる配列であることが好ましい。

[0023] 前記ＤＮＡ増幅断片は、核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有する２つのプライマーを用いて核酸増幅法により得られた産物であることが好ましい。

[0024] 前記ＤＮＡ増幅断片が、標的核酸の鋳型にハイブリダイズ可能な配列、及び、該鋳型にハイブリダイズ不可能な共通配列を有するプライマーを含む第１プライマーセット、並びに、上記共通配列の相補配列とハイブリダイズ可能な配列、及び核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有するプライマーを含む第２プライマーセットを用いて、核酸増幅法により得られた産物であることが好ましい。

[0025] 前記核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域が、天然のヌクレオチドからなり、第２プライマーセットのプライマー全長が同一方向からなる配列であることが好ましい。

[0026] また、本発明は、前記核酸検出方法に用いる核酸検出デバイスであって、前記ＤＮＡ増幅断片を配置する領域、前記ＤＮＡ増幅断片と結合する前記第１

のオリゴヌクレオチドプローブを保持したクロマトグラフィー担体、及び、標識物質が結合した前記第２のオリゴヌクレオチドプローブとを具備してなる検出デバイスに関する。

[0027] また、本発明は、核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有する２つのプライマーを用いて核酸増幅法により得られる、両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片に関する。

[0028] プライマーの核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域が、天然のヌクレオチドからなり、プライマー全長が同一方向からなる配列であることが好ましい。

発明の効果

[0029] 本発明によれば、ＤＮＡ増幅産物の一本鎖領域を利用して特異的に固相と結合させることができ、更にもう一方の一本鎖領域を利用して標識化合物との複合体を形成することができ、特殊な装置を用いることなくＤＮＡ増幅産物を簡便、迅速に目視判定することが可能となる。さらに、構造的に安定な二本鎖ＤＮＡを検出することによって、全長１本鎖の検出と比較して検出感度が向上される。また、固相に結合させるための増幅産物の一本鎖領域と、これに相補的な固相上のオリゴヌクレオチドプローブの組み合わせを複数種用意することで、試料中に存在する２種以上の標的核酸を同時に判別することも可能となる。さらに、本発明の別態様を用いて安価なジョイントプライマーを介することによりあらゆる標的核酸に同一の一本鎖領域を付加することが可能となる。その同一の一本鎖領域を利用して、同一の標識タグおよびデバイスを用いて検出が可能となる。この場合、高価な標識タグを標的核酸ごとに作製する必要がなく、手間とコストを大幅に改善することができる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]本発明のＰＣＲ用プライマーの概念図である。

[図2]本発明のＰＣＲ用第１プライマーの概念図である。

[図3]本発明のＰＣＲ用第２プライマーの概念図である。

[図4]本発明における部分二本鎖核酸の合成法の概念図である。

[図5]本発明における部分二本鎖核酸の合成法の別様態の概念図である。

[図6]本発明の核酸クロマトグラフィーデバイスの一例を示す概略図である。

[図7]本発明におけるＰＣＲ産物検出原理の概念図である。

[図8]本発明のマイクロアレイ（ＤＮＡチップ）の一例を示す概略図である。

[図9]本発明のビーズ担体の一例を示す概略図である。

発明を実施するための形態

[0031] 本発明は、両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一方の一本鎖領域と、固相上に固定した第１のオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせる工程を含む核酸検出方法に関する。

[0032] 二本鎖ＤＮＡ増幅断片は、鋳型となる試料ＤＮＡに対して、特定のプライマーセットを用いて核酸増幅反応を行うことにより得られる。

[0033] 試料ＤＮＡは特に限定されず、核酸増幅反応の鋳型として用いることができればよい。具体的には、血液、体液、組織、口腔内粘膜、毛髪、爪、培養細胞、動物、植物、微生物等のあらゆる生物試料由来のＤＮＡを用いることができる。また、上記試料ＤＮＡはゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、および葉緑体ＤＮＡなどでもよい。また、ＲＮＡを鋳型に逆転写後に得られたｃＤＮＡを用いることもできる。これらＤＮＡは、増幅させるＤＮＡ断片に応じて、適時選択すればよい。また、試料ＤＮＡは精製されたＤＮＡである必要はなく、試料ＤＮＡを含む細胞や組織を、精製処理することなく、そのまま核酸増幅反応に適用することができる。

[0034] 両末端に一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片は、核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有する２つのプライマーを用いて核酸増幅法により得られた産物であることが好ましい。この場合において、二本鎖ＤＮＡ増幅断片の両末端の一本鎖領域は、核酸増幅反応に使用するプライマーのうち、核酸増幅反応により二本鎖化されないタグ領域に由来する領域である。

[0035] 図１に核酸増幅用プライマーを示す。このプライマーは、プライマー本体領

域１と、前記プライマー本体部の５’側に核酸増幅反応により二本鎖化されないタグ領域２からなる。また、プライマー本体領域とタグ領域との間に、ポリメラーゼ反応阻害領域３からなるスペーサー構造を有していても良い。

[0036] また、二本鎖ＤＮＡ増幅断片は、標的核酸の鋳型にハイブリダイズ可能な配列、及び、該鋳型にハイブリダイズ不可能な共通配列を有するプライマーを含む第１プライマーセット、並びに、上記共通配列の相補配列とハイブリダイズ可能な配列、及び核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有するプライマーを含む第２プライマーセットを用いて、核酸増幅法により得られた産物であることが好ましい。図２にＰＣＲ用第１プライマーセットを構成するプライマーを示す。ＰＣＲ用第１プライマー（ジョイントプライマー）は、標的核酸の鋳型にハイブリダイズ可能なプライマー本体領域４と、前記プライマー本体領域の５’側に第２プライマーと共通の配列からなる共通領域５からなることを特徴とする。図３にＰＣＲ用第２プライマーセットを構成するプライマーを示す。第２プライマーは、前記第１プライマーと共通の配列を有するプライマー本体領域６と、本体領域６の５’側に核酸増幅反応により二本鎖化されないタグ領域７からなることを特徴とする。第２プライマー本体領域とタグ領域との間に、ポリメラーゼ反応阻害領域８からなるスペーサー構造を有していてもよい。

[0037] プライマー本体領域とは、核酸増幅反応におけるプライマーとして機能し得る塩基配列を有するオリゴヌクレオチド領域を意味する。具体的には、標的核酸の標的塩基配列における５’末端側又は３’末端側とハイブリダイズし得る配列であり、一般的には、標的塩基配列の５’末端側または、３’末端側の塩基配列と相補的な塩基配列である。これらのプライマー本体領域は、標的核酸と特異的に結合可能であれば、塩基欠損や挿入、およびミスマッチ部位を有していても良い。プライマー本体領域の長さは、８塩基以上であることが好ましく、１２塩基以上であることがより好ましく、１５塩基以上であることがさらに好ましい。また、プライマーの鎖長には特に上限はないが、その合成のコストなどの観点から、通常は５０塩基以下、あるいは４０塩

基以下のものが好適である。

[0038] プライマーのタグ領域は、天然のヌクレオチドを含むものであれば特に限定されない。天然のヌクレオチドとは、天然のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシルの塩基、および、デオキシリボース、リボースの糖部、および、リン酸基から構成されるヌクレオチドのことであり、各部分が人工的な修飾を受けていないヌクレオチドのことである。天然のヌクレオチドは、Ｄ型ヌクレオチドであってもよく、Ｌ型ヌクレオチドであってもよい。Ｄ型ヌクレオチドとは、Ｄ型のデオキシリボースもしくはリボースからなるヌクレオチドを示す。また、Ｌ型ヌクレオチドとは、Ｌ型のデオキシリボースもしくはリボースからなるヌクレオチドを示す。タグ領域が天然のヌクレオチドを含むことにより、合成が安価で容易になるという効果を奏する。また、プライマーのタグ領域における天然のヌクレオチドの割合は、５％以上であることが好ましく、２０％以上であることがより好ましく、５０％以上であることがさらに好ましく、７０％以上であることがさらにより好ましく、９０％以上であることが最も好ましい。タグ領域の長さは特に限定されず、相補鎖核酸とハイブリダイズするために十分な長さを有していればよい。通常、５塩基～６０塩基であり、好ましくは６塩基～４０塩基である。

[0039] プライマーのタグ領域の核酸の向きはプライマー本体領域と同一方向に配列されていることが好ましい。プライマーのタグ領域の核酸の向きがプライマー本体領域と同一方向に配列されることにより、合成が安価で容易になるという効果を奏する。例えば、アゾベンゼンのような非天然の化合物がタグ領域とプライマー本体領域の間に入っている場合のように、タグ領域とプライマー本体領域が直接つながっていなくても、同一方向に配列されていることが好ましい。ここで、核酸が同一方向であるとは、隣り合うヌクレオチド同士が、ヌクレオチド中の糖の３’位同士や５’位同士ではなく、５’位と３’位の間でホスホジエステル結合していることをいう。例えば、タグ領域において、ヌクレオチド同士がホスホジエステル結合により糖の５’位と３’位の間で結合されている場合には、本体領域においても、ヌクレオチド同士

が糖の５’位と３’位の間で形成されていることをいう。

[0040] ポリメラーゼ反応阻害領域とは、ポリメラーゼによる核酸伸長反応を阻害し、当該領域を一本鎖構造に保つことが可能なら特に限定されない。このような構造には、強固なヘアピン構造やシュードノット構造のようにポリメラーゼの進行を阻害する立体構造を有する核酸配列や、Ｌ型核酸や人工核酸等の非天然型核酸や、ＲＮＡ、および、脂肪鎖のような非核酸構造が含まれる。

[0041] 「ヘアピン構造」や「シュードノット構造」とは、同一分子内の他の１本鎖領域と対合して形成される、安定なループ構造を意味する。Ｌ型ＤＮＡは、Ｌ型のデオキシリボースからなるＤＮＡであり、一般的に使用されているＤＮＡポリメラーゼに認識されないので、ＤＮＡ伸長反応の鋳型として機能しない。さらに、Ｌ型ＤＮＡは左巻きの二重らせん構造を形成するので、天然に存在するＤ型核酸とハイブリッドを形成することはなく、Ｌ型核酸同士でのみハイブリッドを形成できる。人工核酸とは、天然の核酸配列中に存在しない化合物を人工的に挿入したものを意味する。例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、架橋化核酸（ＢＮＡもしくはＬＮＡ）またはアゾベンゼン、Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ、Ｃｙ３、Ｃｙ５等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0042] ＰＮＡとは主鎖にペプチド構造を保持した、ＤＮＡやＲＮＡに似た構造を持つ分子であり、Ｎ－（２－アミノエチル）グリシンがアミド結合で結合したものが主鎖となっている。そして、核酸塩基に相当するプリン環やピリミジン環が、メチレン基とカルボニル基を介して主鎖に結合している。ＢＮＡ（ＬＮＡ）とは、ＤＮＡもしくはＲＮＡの糖部構造を架橋修飾することによって人工的に合成した核酸を示す。

[0043] タグ領域が天然のヌクレオチドのみからなり、タグ領域の核酸の向きがプライマー本体領域と同じ方向である場合には、通常、プライマー領域との間にポリメラーゼ反応阻害領域を要する。一方、タグ領域がＬ型核酸や人工核酸などのように、ＤＮＡポリメラーゼによる反応の鋳型にならず核酸増幅反応後も二本鎖化されない場合には、ポリメラーゼ反応阻害領域は省略すること

も可能である。また、本発明のプライマーは、ヘアピン構造、シュードノット構造などの安定なループ構造、Ｌ型核酸、人工核酸などの非天然核酸、および脂肪鎖などの非核酸構造等を単独で有するものであってもよく、複数を組み合わせて有するものであってもよい。

[0044] プライマーは、オリゴヌクレオチドの標識に通常用いられる様々な分子により標識することも可能である。このような分子としては、酵素、磁性粒子、蛍光色素、放射性同位元素等が挙げられる。これらを単独で使用してもよく、複数を組み合わせて使用してもよい。

[0045] 設計したプライマーを製造する方法は、特に限定されるものではなく、公知の方法により製造することができる。具体的には、ＤＮＡ合成装置を用いるか、受託合成サービスを利用することで、設計したプライマーを容易に得ることができる。

[0046] 核酸増幅法は、上述のプライマーを使用して、両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片を得られる方法であれば特に限定されない。例えば、ＰＣＲが挙げられる。また、ＬＡＭＰ法、ＩＣＡＮ法などの等温増幅法も用いることが出来る。

[0047] 核酸増幅法としてＰＣＲを用いる場合、ＰＣＲ反応に用いるリバースプライマーとフォワードプライマーの組み合わせとしては、両方のプライマーに異なるポリメラーゼ反応阻害領域を用いても良いし、片方にポリメラーゼ反応阻害領域を用いて、もう片方にはポリメラーゼ反応阻害領域を導入せずビオチンなどの修飾を行っても良い。

[0048] ＰＣＲ条件は特に限定されるものではなく、上述した試料ＤＮＡを鋳型として、前記プライマーセットを用いてＰＣＲを行ったときに、試料ＤＮＡの所望の領域が増幅される条件であればよい。具体的には、ＰＣＲに用いるポリメラーゼは、特に限定されるものではないが、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼであることがより好ましく、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を実質的に有さない耐熱性ＤＮＡポリメラーゼであることがより好ましい。このような耐熱性ＤＮＡポリメラーゼとしては、Ｅｘ－Ｔａｑ（タカラバイオ社製）等を

挙げることができるが、これに限定されない。また、温度、時間、緩衝液組成等のＰＣＲの反応条件も特に限定されるものではなく、選択したＤＮＡポリメラーゼ、プライマーの配列、目的配列部分の長さ等に応じて、適宜設定すればよい。核酸増幅反応により増幅されるＤＮＡの長さは、２０塩基以上であることが好ましく、４０塩基以上であることがより好ましい。２０塩基未満であると非特異的増幅が増える傾向がある。

[0049] 前記プライマーセットを使用して、定法によりＰＣＲを行うことで、標的核酸配列の両末端に１本鎖領域を付加した増幅産物を得ることができる。図４には、増幅反応の一例として、プライマー本体領域とタグ領域からなるプライマーを用いた場合の増幅反応の模式図を示す。フォワードプライマー１０は標的核酸配列９の５’末端側の一部と同一の配列からなるプライマー本体領域１１と、その５’末端側にタグ領域１２を有する。リバースプライマー１３は、標的核酸配列の３’末端側の一部と相補的な配列からなるプライマー本体領域１４と、その５’末端側にタグ領域１５を有する。両プライマーに結合するタグ領域の配列は通常、それぞれ異なる配列を有している。前記プライマーセットを使用してＰＣＲを行うと、両プライマーに付加されたタグ領域は実質的にＰＣＲ反応に関与しないため、両末端に一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅産物１６が得られる。両末端に一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅断片とは、図４で示すように標的ＤＮＡ領域と同一の二本鎖ＤＮＡ部、及び、その両側のそれぞれの５’末端にタグ部として一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅産物を意味する。つまり、前記ＤＮＡ増幅断片をより詳細に説明すると、両末端に修飾されていない核酸で構成される一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片を示しており、かつ、両末端の一本鎖領域はそれぞれ連続するＤＮＡ鎖と同一方向からなる配列を有している。

[0050] 図５には、増幅反応の一例として、ジョイントプライマーセットとしてプライマー本体領域と共通配列領域からなるプライマー、および、共通配列とタグ領域からなるプライマーを用いた場合の増幅反応の模式図を示す。第１、および、第２プライマーセットを使用して、定法によりＰＣＲを行うことで

、標的核酸配列の両末端に１本鎖領域を付加した増幅産物を得ることができる。

[0051] フォワード第１プライマー１８は標的核酸配列１７の５’末端側の一部と同一の配列からなるプライマー本体領域１９と、その５’末端側に共通配列領域２０を有する。リバース第１プライマー２１は、標的核酸配列の３’末端側の一部と相補的な配列からなるプライマー本体領域２２と、その５’末端側に共通配列領域２３を有する。両プライマーに付加する共通領域の配列は通常、それぞれ異なる配列を有している。前記第１プライマーセットを利用してＰＣＲ反応を行うと共通領域を有する２本鎖ＤＮＡ増幅産物２４が得られる。

[0052] さらにＤＮＡ増幅産物２４の両端の共通配列領域のフォワード第２プライマー２５は前記共通領域を有する２本鎖ＤＮＡ増幅産物２４の５’末端側の一部と共通の配列からなるプライマー本体領域２６と、その５’末端側にタグ領域２７を有する。リバース第２プライマー２８は、前記共通領域を有する２本鎖ＤＮＡ増幅産物２４の３’末端側の一部と共通の相補的な配列からなるプライマー本体領域２９と、その５’末端側にタグ領域３０を有する。両プライマーに結合するタグ領域の配列は通常、それぞれ異なる配列を有している。前記プライマーセットを使用してＰＣＲを行うと、両プライマーに付加されたタグ領域は実質的にＰＣＲ反応に関与しないため、両末端に一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅産物３１が得られる。本態様においては、第１プライマーを用いたＰＣＲ反応、および、第２プライマーを用いたＰＣＲ反応を図５のように連続して行うが、その順番は、第１プライマーと第２プライマーを同時に加えてもよい。或いは、第２プライマーを後から加えてもよい。

[0053] 両末端に一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅断片とは、図５の３１で示すように標的ＤＮＡ領域と同一の二本鎖ＤＮＡ部、及び、その両側のそれぞれの５’末端にタグ部として一本鎖領域を有するＤＮＡ増幅産物を意味する。

[0054] 第１、および、第２プライマーセットを用いることにより、標的核酸を変更しても、共通配列を同一の配列にしておくことで、第２プライマーは同一の

プライマーを使用でき、同一の１本鎖タグ配列を作り出すことが可能となる。前記ＤＮＡ増幅断片をより詳細に説明すると、両末端に修飾されていない核酸で構成される一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片を示しており、かつ、両末端の一本鎖領域はそれぞれ連続するＤＮＡ鎖と同一方向からなる配列を有している。

[0055] 前記プライマーを使用して得られた、前記増幅産物の一本鎖領域を利用して、ハイブリダイゼーション複合体を形成する。ハイブリダイゼーションとは核酸を含む分子が相補的に複合体を形成することをいい、ＤＮＡ／ＤＮＡのほか、ＤＮＡ／ＲＮＡ、ＤＮＡ／ＰＮＡ、Ｌ－ＤＮＡ／Ｌ－ＤＮＡなどが含まれる。本発明の核酸検出方法ではＤＮＡ増幅断片が一本鎖領域を有するので、核酸増幅工程で得られたＤＮＡ増幅産物は、熱処理等の一本鎖化処理等を行うことなく、ハイブリダイゼーション反応に使用することができる。

[0056] 両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域タグを有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一方の一本鎖領域と、捕捉用担体（固相）に固定した第１のオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせることができる。さらに、二本鎖ＤＮＡ増幅断片の他方の一本鎖領域と、標識物質が直接的又は間接的に結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズする工程を含むことが好ましい。二本鎖ＤＮＡ増幅断片、第１のオリゴヌクレオチドプローブ、及び第２のオリゴヌクレオチドプローブからなる３者複合体形成をサンドイッチハイブリダイゼーションと呼ぶ。なお、三者のハイブリダイゼーションの順は特に限定されない。

[0057] 第１のオリゴヌクレオチドプローブの長さは、二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一本鎖領域とハイブリダイズできれば特に限定されないが、５～６０塩基長であることが好ましく、１０～４０塩基長であることがより好ましい。

[0058] 第２のオリゴヌクレオチドプローブの長さは、二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一本鎖領域とハイブリダイズできれば特に限定されないが、５～６０塩基長であることが好ましく、１０～４０塩基長であることがより好ましい。

[0059] 第２のオリゴヌクレオチドプローブに結合する標識物質は、二本鎖ＤＮＡ増

幅断片の検出を実現するものであれば特に限定されないが、着色担体であって二本鎖ＤＮＡ増幅断片の目視検出を実現できるものであることが好ましい。このような着色担体としては、着色粒子や酵素、色素結合担体などが挙げられる。これらの中でも、着色粒子を用いることが好ましい。

[0060] 着色粒子としては、金、銀、銅、白金などの金属からなるコロイド粒子や、顔料や染料などでラテックスを着色してなる着色ラテックス、色素分子をシリカ（二酸化ケイ素）粒子内部に固定化したシリカナノ粒子などが挙げられる。これらの中でも、金コロイド粒子や、青色、赤色等に着色された水分散型高分子重合体からなる着色ラテックス粒子を用いることが好ましい。このような着色粒子を用いることにより、ＤＮＡ増幅断片の目視判定をより容易なものとすることができる。特に多項目を同時に検出する際には、項目ごとに異なる色の着色粒子を用いることにより、多数の項目を同時に目視判定することが容易となる。

[0061] 着色粒子を用いる場合、その粒径は、特に限定されるものではないが、サンドイッチハイブリダイゼーション複合体の形成、および、標的配列を含む増幅産物の固相への捕捉に悪影響が小さく、かつ、検出の際に発色のよいものであることが好ましい。着色粒子の粒径は、後述のクロマトグラフィー用媒体の孔径より小さい粒径から選択される。具体的には、通常５００ｎｍ以下が用いられ、中でも０．１ｎｍ～１００ｎｍとすることが好ましく、１ｎｍ～５０ｎｍとすることがより好ましい。着色担体として用いる酵素とは、発色、もしくは、発光する基質の反応を触媒するタンパク質のことである。例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられるが、肉眼で検出可能であればこれに限定されない。

[0062] 二本鎖ＤＮＡ増幅断片の末端の一本鎖領域と、第１又は第２のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションが起こる条件であれば特に限定されないが、室温下、１０ｍＭリン酸緩衝液中で反応させることが好ましい。このとき塩化ナトリウム等の塩を入れることで、ハイブリダイゼーションの効率は上昇する。

[0063] 捕捉用担体（固相）上の認識可能な位置に形成されたサンドイッチハイブリダイゼーション複合体に含まれる標識物質を検出することにより、標的核酸の有無を判定することができる。検出は、目視にて判別することが好ましい。本発明の検出法によれば、核酸増幅反応の増幅産物は熱変性等の一本鎖化処理を行うことなく、そのままハイブリダイゼーション反応に使用することが可能である。また、特殊な装置を必要とすることなく、標的核酸の有無を簡便、迅速に目視にて判別することが可能である。

[0064] 上記のサンドイッチハイブリダイゼーション複合体の形成による核酸検出方法は、核酸検出デバイス上で行われることが好ましい。また、クロマトグラフィーにてＤＮＡ増幅核酸が検出されることが好ましい。

[0065] 図６の核酸クロマトグラフィーデバイスは、基材となる部材３６の上に、サンプルパッド３２（ＤＮＡ増幅産物を添加するための担体）、コンジュゲートパッド３３（着色担体結合オリゴヌクレオチドを配置した担体）、捕捉用オリゴヌクレオチドを保持した担体３４（クロマトグラフィー用媒体）、及び吸収パッド３５を、粘着剤等を用いて貼り合わせたものである。担体３４の上には、捕捉用オリゴヌクレオチドを塗布したテストライン３７、および、コントロールライン３８が設けられている。着色担体結合オリゴヌクレオチドを展開溶液に混合する場合は、コンジュゲートパッド３３が無くても良い。

[0066] クロマトグラフィーでは、下記工程（ａ）～（ｃ）：（ａ）核酸検出デバイス上の、第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは異なる領域に、ＤＮＡ増幅断片を配置する工程、（ｂ）溶媒を用いて、ＤＮＡ増幅断片を、第１オリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域の方向に、デバイス上で拡散させる工程、及び（ｃ）第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、第１オリゴヌクレオチドプローブとＤＮＡ増幅断片とをハイブリダイズさせる工程、を含む方法により、二本鎖ＤＮＡ増幅断片が検出されることが好ましい。

[0067] 例えば、図６の核酸クロマトグラフィーデバイスの場合、工程（ａ）ではサ

ンプルパッド３２にＤＮＡ増幅断片を配置する。工程（ｂ）では矢印方向にＤＮＡ増幅断片を拡散させる。工程（ｃ）ではテストライン３７において、固定された第１のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイズにより、ＤＮＡ増幅断片を捕捉する。

[0068] 工程（ｃ）の前に、ＤＮＡ増幅断片と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせる工程をさらに含むことが好ましい。例えば、図６の核酸クロマトグラフィーデバイスの場合、コンジュゲートパッド３３において、ＤＮＡ増幅断片と第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせる。

[0069] また、クロマトグラフィーでは、（ｄ）核酸検出デバイス上の、第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは各々異なる領域に、ＤＮＡ増幅断片、および標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ配置し、（ｅ）溶媒を用いて、ＤＮＡ増幅断片を、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域の方向に拡散させ、（ｆ）標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域において、ＤＮＡ増幅断片と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせ、（ｇ）工程（ｆ）でハイブリダイズした複合体を第１のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている方向に、展開媒体上で拡散させ、（ｈ）前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブと前記複合体とをハイブリダイズさせることが好ましい。

[0070] 例えば、図６の核酸クロマトグラフィーデバイスの場合、工程（ｄ）ではサンプルパッド３２にＤＮＡ増幅断片を配置し、コンジュゲートパッド３３に第２のオリゴヌクレオチドプローブを配置する。工程（ｅ）では、ＤＮＡ増幅断片を、サンプルパッド３２から矢印方向に拡散させる。工程（ｆ）ではコンジュゲートパッド３３において、ＤＮＡ増幅断片と、第２のオリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズする。工程（ｇ）ではＤＮＡ増幅断片と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイ

ズによる複合体を、矢印方向に拡散させる。工程（ｈ）ではテストライン３７において第１のオリゴヌクレオチドプローブと複合体とをハイブリダイズさせる。

[0071] メンブレン上のテストラインには前記ＤＮＡ増幅断片の一方のタグ領域と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプローブが、捕捉用の第１のオリゴヌクレオチドプローブとして固定化されている。捕捉用の第１のオリゴヌクレオチドプローブは、直接メンブレンに結合しても良く、官能基を介して結合していても良く、何らかの物質を介してメンブレンに結合していても良い。その仲介となる物質は、ペプチド、タンパク質、核酸などが挙げられるが限定されない。仲介となる物質がアビジンの場合は、捕捉用オリゴヌクレオチドにビオチン修飾が必要となる。

[0072] メンブレン上のコントロールラインには、着色担体捕捉用のオリゴヌクレオチドプローブが固定化されている。コントロールライン用のオリゴヌクレオチドプローブは、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブと相補的な配列を有しており、溶液が展開すると必ず標識物質が捕捉されるようになっている。コントロールライン用のオリゴヌクレオチドプローブに関しても前述と同様に直接メンブレンに結合しても良いし、官能基を介して、結合していても良いし、何らかの物質を介してメンブレンに結合していても良い。その仲介となる物質は、ペプチド、タンパク質、核酸などが挙げられるが、限定されない。仲介となる物質がアビジンの場合は、捕捉用オリゴヌクレオチドにビオチン修飾が必要となる。

[0073] テストラインにおける呈色により、試料中のターゲット核酸の存在を目視で判別することが可能である。一方、コントロールラインにおける呈色により、正常な展開と呈色反応が行えていることを目視で判別することが可能である。ここで、目視とは肉眼で観察して色を判断することをいう。

[0074] クロマトグラフィー用媒体としては、定性濾紙、定量濾紙、分液濾紙、硝子繊維濾紙、シリカ繊維濾紙、複合繊維濾紙よりなる濾紙などが挙げられる。また、ニトロセルロースなどのセルロースよりなる濾紙や、ポリエーテルス

ルフォンメンブレンなどの合成樹脂の膜や、シリカゲル、アガロース、デキストラン、ゼラチンなどの多孔質ゲルも使用することができる。また、ナイロンメンブレンも好適に使用できる。実際の使用に際して、このクロマトグラフ媒体の形態および大きさは特に制限されるものではなく、操作および反応結果の観察において適切であればよい。

[0075] これらの担体は、親水性や化合物の結合性を向上させるために様々な修飾を施すことも可能である。操作をより簡便にするためには、反応部位が表面に形成されているクロマトグラフィー媒体の裏面に、プラスチックなどよりなる支持体を設けることが好ましい。

[0076] デバイス内の展開方向としては、図６に示すように水平方向でも良いし、垂直方向でも良く特に限定されない。展開溶媒としては、核酸増幅反応における溶媒を使用することができるので、核酸増幅反応後の反応液をそのまま、図６におけるサンプルパッド３２に滴下することができる。または、増幅反応後の反応液に、別途展開溶液を添加しサンプルパッドに添加することも可能である。展開溶媒としては、液体であれば特に限定されないが、リン酸緩衝液や、Ｔｒｉｓ緩衝液などのグッド緩衝液が使用可能である。また、溶媒には塩、界面活性剤、タンパク質、もしくは、核酸を溶解しておいても良い。

[0077] 図７にて、本発明の実施形態の一例として、クロマト担体上でのサンドイッチハイブリダイゼーション複合体の形成を例にとって説明する。核酸増幅工程で得られたＤＮＡ増幅断片１６は、熱処理等の一本鎖化処理等を行うことなく次の複合体形成工程に使用する。前記ＤＮＡ断片の一方のタグ領域１２と特異的に結合可能な核酸配列３９及び着色担体４０を含むオリゴヌクレオチドプローブと、ＤＮＡ増幅断片１６との間のハイブリダイゼーションにより、第１の複合体４１が形成される。複合体４１は、ＰＣＲの反応容器のように、展開媒体にアプライ前に形成してもよいし、ＤＮＡ増幅断片を担体上にアプライし、毛細管現象で移動中に前記標識分子結合オリゴヌクレオチドを塗布、乾燥させた担体を通過させて形成することも可能である。

[0078] 複合体４１は、多孔質メンブレン等からなるクロマトグラフィー用媒体４２上の識別可能な位置に予め結合した捕捉用オリゴヌクレオチドプローブ４３と、展開媒体上で接触する。前記捕捉用のオリゴヌクレオチド４３は、前記ＤＮＡ増幅断片のもう一方のタグ配列１５と相補的な配列を有しており、複合体４１と捕捉用オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、サンドイッチハイブリダイゼーション複合体が形成される。

[0079] サンドイッチハイブリダイゼーション複合体を形成する順序は特に限定されない。ＤＮＡ増幅断片と標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとの複合体４１を形成後、捕捉用の第２のオリゴヌクレオチドプローブとの複合体を形成するのが好ましいが、ＤＮＡ増幅断片を捕捉用の第１のオリゴヌクレオチドプローブで展開媒体上で濃縮後、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドを展開し、サンドイッチハイブリダイゼーション複合体を形成することも可能である。

[0080] その他の核酸検出デバイス形態としては、図８で示すようなマイクロアレイ（ＤＮＡチップ）が挙げられる。マイクロアレイ４４上の捕捉用オリゴヌクレオチドを固定したウェル内に、サンドイッチハイブリダイゼーションにより３者複合体を形成させることが可能である。

[0081] また、図９で示すようなビーズ形態が挙げられる。捕捉用オリゴヌクレオチドを保持したビーズ担体４５上で、サンドイッチハイブリダイゼーションによる３者複合体を形成させることが可能である。

[0082] 本発明の核酸検出方法、および核酸検出デバイスは、核酸増幅工程を含むあらゆる技術に用いることができる。換言すれば、核酸増幅法によるＤＮＡ増幅断片（例えば、ＰＣＲ産物）を検出することを含むあらゆる分野の技術に用いることができる。具体的には、例えば、分子生物学の研究分野、病原体の検出、アレルゲンなど食品中の混入物の検出、食品の品質管理（偽装表示食品、遺伝子組み換え食品などの検査）、家畜管理、塩基多型（以下、「ＳＮＰ」ともいう）の検出、ガンなどの疾患検査等に用いることができる。したがって、本発明には、本発明にかかる核酸検出方法を一工程として含む、

病原体による感染症の検出方法、食品中の混合物（例えば、アレルゲン）の検出方法、食品の品質管理、家畜の管理方法、および塩基多型の検出方法等も含まれる。

[0083] ここで、本発明の利用の一実施形態として、本発明にかかる病原体の検出方法、およびアレルゲンの検出方法、について詳細に説明する。

[0084] 本発明にかかる病原体の検出方法は、本発明にかかる核酸検出方法を用いて、病原体が特異的に有する遺伝子を検出する工程を含んでいればよい。上記病原体は、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、病原性細菌、病原性ウィルス、食中毒細菌、院内感染原因細菌およびウィルス等を挙げることができる。より具体的には、例えば、Ｃ型肝炎ウィルス（ＨＣＶ）、サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）、エプスタインーバーウィルス（ＥＢＶ）、ヘルペスウィルス、ヒト免疫不全ウィルス（ＨＩＶ）等のウイルス、Ｏ１５７等の大腸菌、結核菌、チフス菌、サルモネラ菌もしくは腸炎ビブリオ菌等の細菌、またはマイコプラズマ等の微生物を例示することができる。

[0085] 本発明にかかる病原体の検出方法について、より具体的に説明すると、例えば、病原体の有無を検査する対象となる試料から調製したＤＮＡ試料に、上記病原体が特異的に有する遺伝子が含まれるか否かを上記核酸検出方法を用いて判定する。また、ＤＮＡ試料を調製することなく、病原体の有無を検査する対象となる試料をそのまま核酸増幅法の鋳型として使用することもできる。例えば、病原体として大腸菌等の細菌を検出する場合に、細菌のコロニーの懸濁液を鋳型として使用することができる。その結果、病原体が特異的に有する遺伝子が検出された場合には、該試料には病原体が含まれていると判定する。これにより、特殊な装置を必要とすることなく、簡便に、かつ、高精度に、試料中に病原体が含まれているか否かを判定することができる。すなわち、本発明にかかる病原体の検出方法は、微生物の感染症の診断に用いることができる。

[0086] 本発明にかかるアレルゲンの検出方法は、本発明にかかる核酸検出方法を用いて、アレルゲンをコードする遺伝子を検出する工程を含んでいればよい。

上記アレルゲンは特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、食品中に含まれるアレルゲンを挙げることができる。より具体的には、卵白アレルゲン、乳アレルゲン、小麦アレルゲン、そばアレルゲン、および落花生アレルゲン等を挙げることができる。本発明にかかるアレルゲンの検出方法について、より具体的に説明すると、例えば、食品から調製したＤＮＡ試料に、卵、乳、小麦、そば、落花生などのアレルゲンをコードする遺伝子が含まれるか否かを上記核酸検出方法を用いて判定する。その結果、このような遺伝子が検出された場合には、該食品には、アレルゲンを含有する原料が含まれていると判定する。

[0087] これにより、特殊な装置を必要とすることなく、簡便に、かつ、高精度に食品等の試料中に、アレルゲンを含有する原料が含まれているか否かを判定することができる。なお、アレルゲンの由来は、上記例示したものに限定されるものではなく、例えば、穀類を例に取れば、イネ、トウモロコシ、アワ、キビ、ヒエ、ソバ、およびマメ類のすべてが含まれまた、ＤＮＡは、熱に安定であり、加工食品中でも微量に検出される。したがって、本発明にかかるアレルゲンの検出方法により得られたデータは、食品の表示に利用したり、食品のアレルギー情報として利用したりすることに加えて、加工助剤やキャリーオーバー等食品添加物のごく微量の残存、あるいは製造ライン問の相互汚染の有無等の生産者の意図していない物質の混入の検出に用いることができる。

[0088] そのほか、本発明は、ヒトを含む哺乳動物の親子鑑定、家畜の血統の特定、農産物の品種の特定、ＳＮＰ検出、遺伝子の変異による疾患（癌など）の検出等に用いることができる。具体的には、例えば、家畜についていえば、血統登録、個体識別、親子判定、病原遺伝子のキャリア個体の除去などの目的に利用することができる。なお本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示した技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

実施例

[0089] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

[0090] ＜実施例１＞

（１）Ｌ－ＤＮＡタグ付きプライマーの合成

本実施例では、鋳型としてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ）およびリバースプライマー（Ｒ）を設計した。さらにそれぞれの５’末端側に非天然型（Ｌ型）ＤＮＡ鎖からなるタグ配列Ｔ１およびＴ２を導入したＬ－ＤＮＡタグ付きプライマー、Ｔ１－ＦおよびＴ２－Ｒを設計した。Ｌ－ＤＮＡタグ付きプライマーの合成は、０．２μＭスケールのカラムを用いて、一般的なホスホロアミダイト法に基づいて、ＤＮＡ自動合成機（Ｈ－８－ＳＥ：Ｇｅｎｅ　Ｗｏｒｌｄ）で合成した。

[0091] 本検討で作製したプライマーセットを示す。

プライマーＦ：５’－^{D}ｄ（ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号１）

プライマーＲ：５’－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号２）

タグ配列Ｔ１：５’－^{L}ｄ（ＧＡＣＡＡＣＧＧＡＧＡＣＡＧＡＧＣＣＡＡ）－３’（配列番号３）

タグ配列Ｔ２：５’－^{L}ｄ（ＡＴＧＣＴＡＣＣＧＴＡＴＧＣＣＣＡＧＴＧ）－３’（配列番号４）

プライマーＴ１－Ｆ：５’－^{L}ｄ（ＧＡＣＡＡＣＧＧＡＧＡＣＡＧＡＧＣＣＡＡ）－^{D}ｄ（ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号５）

プライマーＴ２－Ｒ：５’－^{L}ｄ（ＡＴＧＣＴＡＣＣＧＴＡＴＧＣＣＣＡＧＴＧ）－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号６）。

[0092] （２）Ｌ－ＤＮＡタグ付きプライマーセットを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）で実施し作製したプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＦとプライマーＲを各１５ｐｍｏｌと、１０ｎｇのｐＵＣ１９とを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。その後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３５回行い、目的の約３３０ｂｐを増幅した。また、ｐＵＣ１９を添加しないで同様の反応を行い、ネガティブコントロールとした。

[0093] （３）ラテックス結合Ｌ型オリゴヌクレオチドプローブの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有Ｌ型オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号７、配列番号３の相補鎖）を、水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行った。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、グラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

ヌクレオチドプローブ１：５’－^{L}ｄ（ＴＴＧＧＣＴＣＴＧＴＣＴＣＣＧＴＴＧＴＣ）－NH_2－３’（配列番号７）。

[0094] （４）Ｌ型オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

カルボキシル基修飾ナイロンメンブレン（日本ポール社製、６ｍｍｘ６０ｍｍ）を水溶性カルボジイミドにより処理し、脱イオン水で洗浄した。活性化したメンブレンの一端から３０ｍｍの箇所に、配列番号４に対して相補的な配列（配列番号８）を有するアミノ基含有Ｌ型オリゴヌクレオチドプローブを、ディスペンサーを用いてライン上に塗布し、１５分間風乾した。その後、メンブレンをＴｒｉｓ緩衝液で処理し、ブロッキング後、メンブレンを水

洗、乾燥した。

ヌクレオチドプローブ２：５’－^{L}ｄ（ＣＡＣＴＧＧＧＣＡＴＡＣＧＧＴＡＧＣＡＴ）－NH_2－３’（配列番号８）。

[0095] （５）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したナイロンメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、Ｌ型ＤＮＡタグ付きプライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0096] （６）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（５）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。工程（２）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0097] ＜実施例２＞

（１）ヘアピンタグ付きプライマーの合成

実施例１の工程（１）と同様に、鋳型としてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ）およびリバースプライマー（Ｒ）を設計した。その５’末端側にヘアピン構造を有するポリメラーゼ反応阻害領域（Ｈ）、およびタグ配列Ｔ３およびＴ４を導入したタグ付きプライマー、Ｔ３－Ｈ－ＦおよびＴ４－Ｈ－Ｒを合成した。

[0098] 本検討で作製したプライマーセットを示す。

ポリメラーゼ反応阻害配列Ｈ：５’－^{D}ｄ（ＡＧＧＣＧＡＧＧＴＣＧＣＧＡＧＣＧＣＡＣＡＴＧＴＧＣＧＣＴＣＧＣＧＡＣＣＴＣ　ＧＣＣＴ）－３’（配

列番号９）

タグ配列Ｔ３：５’－Ｄｄ（ＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＴＡＡＴ）－３’（配列番号１０）

タグ配列Ｔ４：５’－Ｄｄ（ＴＧＣＴＣＴＧＴＡＣＡＣＴＴＧＣＴＣＡＡＴ）－３’（配列番号１１）

プライマーＴ３－Ｈ－Ｆ：５’－Ｄｄ（ＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＴＡＡＴＡＧＧＣＧＡＧＧＴＣＧＣＧＡＧＣＧＣＡＣＡＴＧ　ＴＧＣＧＣＴＣＧＣＧＡＣＣＴＣＧＣＣＴＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号１２）

プライマーＴ４－Ｈ－Ｒ：５’－Ｄｄ（ＴＧＣＴＣＴＧＴＡＣＡＣＴＴＧＣＴＣＡＡＴＡＧＧＣＧＡＧＧＴＣＧＣＧＡＧＣＧＣＡＣＡＴＧＴＧＣ　ＧＣＴＣＧＣＧＡＣＣＴＣＧＣＣＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号１３）。

[0099] （２）ヘアピンタグ付きプライマーセットを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）で実施し作製したプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＦとプライマーＲを各１５ｐｍｏｌと、１０ｎｇのｐＵＣ１９とを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。その後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３５回行い、目的の約３３０ｂｐを増幅した。また、ｐＵＣ１９を添加しないで同様の反応を行い、ネガティブコントロールとした。

[0100] （３）ラテックス結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号１４、配列番号１０の相補鎖）を、水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行っ

た。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、グラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

オリゴヌクレオチドプローブ３：５’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ）－NH_2－３’（配列番号１４）。

[0101] （４）オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

カルボキシル基修飾ナイロンメンブレン（日本ポール社製、６ｍｍｘ６０ｍｍ）を水溶性カルボジイミドにより処理し、脱イオン水で洗浄した。活性化したメンブレンの一端から３０ｍｍの箇所に、配列番号１１の相補的な配列（配列番号１５）を有するアミノ基含有Ｌ型オリゴヌクレオチドプローブを、ディスペンサーを用いてライン上に塗布し、１５分間風乾した。その後、メンブレンをＴｒｉｓ緩衝液で処理し、ブロッキング後、メンブレンを水洗、乾燥した。

オリゴヌクレオチドプローブ４： ５’－^{D}ｄ（ＡＴＴＧＡＧＣＡＡＧＴＧＴＡＣＡＧＡＧＣＡ）－NH_2－３’（配列番号１５）。

[0102] （５）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したナイロンメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、ヘアピンタグ付きプライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0103] （６）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（５）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。工程（２）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められな

かった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0104] ＜実施例３＞

（１）人工核酸（アゾベンゼン）挿入プライマーの合成

実施例１の工程（１）と同様に、鋳型としてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ）およびリバースプライマー（Ｒ）を設計した。それぞれの５’末端側に人工核酸であるアゾベンゼンを含むポリメラーゼ反応阻害領域（Ｘ）、およびタグ配列Ｔ５およびＴ６を導入したタグ付きプライマー、Ｔ５－Ｘ－ＦおよびＴ６－Ｘ－Ｒを合成した。この２種のアゾベンゼン挿入プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。本検討で作製したプライマーセットを示す。

[0105] タグ配列Ｔ５：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ）－３’（配列番号１６）

タグ配列Ｔ６：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ）－３’（配列番号１７）

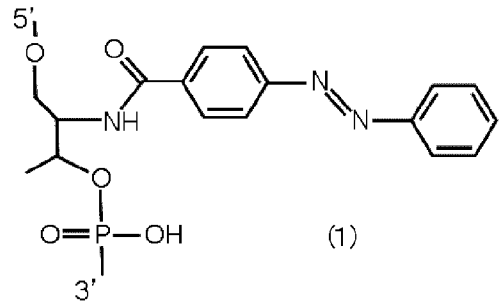
プライマーＴ５－Ｘ－Ｆ：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ　Ｘ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号１８）

プライマーＴ６－Ｘ－Ｒ：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ　Ｘ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号１９）

なお、プライマーに挿入されたアゾベンゼンは下記式（１）で表される。

[0106]

[化1]



(1)

[0107] （２）アゾベンゼン挿入プライマープセットを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）で実施し作製したプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＴ５－Ｘ－ＦとプライマーＴ６－Ｘ－Ｒを各１５ｐｍｏｌと、１０ｎｇのｐＵＣ１９とを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。その後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３５回行い、目的の約３３０ｂｐを増幅した。また、ｐＵＣ１９を添加しないで同様の反応を行い、ネガティブコントロールとした。

[0108] （３）ラテックス結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号２０、配列番号１６の相補鎖）を、水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行った。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、グラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

オリゴヌクレオチドプローブ５：５’－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＡＡＡＣＣＣＡＧＴＧＡＡＡＡＡＴＧＴＴＧＣＣＡ）－NH_2－３’（配列番号２０）。

[0109] （４）オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

カルボキシル基修飾ナイロンメンブレン（日本ポール社製、６ｍｍｘ６０ｍｍ）を水溶性カルボジイミドにより処理し、脱イオン水で洗浄した。活性化したメンブレンの一端から３０ｍｍの箇所に、配列番号１７の相補的な配列（配列番号２１）を有するアミノ基含有Ｄ型オリゴヌクレオチドプローブを、ディスペンサーを用いてライン上に塗布し、１５分間風乾した。その後、メンブレンをＴｒｉｓ緩衝液で処理し、ブロッキング後、メンブレンを水洗、乾燥した。

オリゴヌクレオチドプローブ６：５’－^{D}ｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－NH_2－３’（配列番号２１）。

[0110] （５）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したナイロンメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0111] （６）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（５）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。工程（２）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0112] ＜実施例４＞

（１）金コロイド結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

Ｇｏｌｄ　Ｃｏｌｌｏｉｄ（４０ｎｍ、９．０×１０１０（粒子数／ｍｌ）、Ｂｒｉｔｉｓｈ　ＢｉｏＣｅｌｌ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社製）と

チオール基含有オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号２２、配列番号１６の相補鎖）を混合し、５０℃で１６時間インキュベートした。６０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、上清を除去、０．０５Ｍ　塩化ナトリウム、５ｍＭリン酸バッファー、ｐＨ７を添加し混和後、再度５０℃で４０時間インキュベートした。

[0113] インキュベート後、遠心（６０００ｒｐｍ、１５分間）を行い、上清を除去し、５ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７）を添加した。このバッファー置換を再度行った。

[0114] 調製した金コロイド溶液をグラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

[0115] オリゴヌクレオチドプローブ７：５’－Ｄｄ（ＣＴＡＴＡＡＡＣＣＣＡＧＴＧＡＡＡＡＡＴＧＴＴＧＣＣＡ）－ＳＨ－３’（配列番号２２）。

[0116] （２）オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号１７に相補的な配列（配列番号２３）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブを、ストレプトアビジンと混合する。その混合液をニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ　１８０、ミリポア社製）にディスペンサーを用いてライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。

オリゴヌクレオチドプローブ８：５’－Ｄｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号２３）。

[0117] （３）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0118] （４）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

実施例３の工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工

程（３）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。実施例３の工程（２）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0119] ＜実施例５＞

（１）オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号１７に相補的な配列（配列番号２４）を有するオリゴヌクレオチドプローブをＵｌｔｒａＢｉｎｄアフィニティメンブレン（日本ポール社製）にディスペンサーを用いてライン上に塗布し、８０℃で１時間風乾した。

オリゴヌクレオチドプローブ９：５’－^{D}ｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－３’（配列番号２４）。

[0120] （２）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したＵｌｔｒａＢｉｎｄアフィニティメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0121] （３）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

実施例３の工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（２）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。実施例３の工程（２）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0122] ＜実施例６＞

（１）人工核酸（アゾベンゼン）挿入プライマーの合成

本実施例では、標的核酸の鋳型としてはｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類をテンプレートとして用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対、約２００塩基対、および、約１００塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ１）とリバースプライマー（Ｒ１）、フォワードプライマー（Ｆ２）とリバースプライマー（Ｒ２）、および、フォワードプライマー（Ｆ３）とリバースプライマー（Ｒ３）の３組のプライマーをそれぞれ設計した。それぞれの５’末端側に人工核酸であるアゾベンゼンを含むポリメラーゼ反応阻害領域（Ｘ）、およびタグ配列Ｔ１０とＴ１１、タグ配列Ｔ１２とＴ１３、および、タグ配列Ｔ１４とＴ１５を導入したタグ付きプライマー、Ｔ１０－Ｘ－Ｆ１とＴ１１－Ｘ－Ｒ１、Ｔ１２－Ｘ－Ｆ２とＴ１３－Ｘ－Ｒ２、および、Ｔ１４－Ｘ－Ｆ３とＴ１５－Ｘ－Ｒ３を合成した。この６種のアゾベンゼン挿入プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製した３組のプライマーセットを示す。

[0123] タグ配列Ｔ１０：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ）－３’（配列番号２５）

タグ配列Ｔ１１：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ）－３’（配列番号２６）

プライマーＴ１０－Ｘ－Ｆ１：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ　Ｘ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号２７）

プライマーＴ１１－Ｘ－Ｒ１：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ　Ｘ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号２８）

タグ配列Ｔ１２：５’－^{D}ｄ（ＣＧＣＡＴＴＧＡＧＣＡＡＧＴＧＴＡＣＡＧＡＧＣＡＴ）－３’（配列番号２９）

タグ配列Ｔ１３：5’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ）－3’（配列番号３０）

プライマーＴ１２－Ｘ－Ｆ２：5’－^{D}ｄ（ＣＧＣＡＴＴＧＡＧＣＡＡＧＴＧＴＡＣＡＧＡＧＣＡＴ　Ｘ　ＡＧＣＡＴＴＡＴＧＡＡＴＴＡＴＡＴＧＧＴ）－3’（配列番号３１）

プライマーＴ１３－Ｘ－Ｒ２：5’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ　Ｘ　ＴＴＧＴＴＴＡＣＡＴＴＴＡＴＡＧＣＡＴＣ）－3’（配列番号３２）

タグ配列Ｔ１４：5’－^{D}ｄ（ＡＡＴＴＧＣＧＣＡＴＧＴＣＣＡＴＧＴＧＴＡＡ）－3’（配列番号３３）

タグ配列Ｔ１５：5’－^{D}ｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ）－3’（配列番号３４）

プライマーＴ１４－Ｘ－Ｆ３：5’－^{D}ｄ（ＡＡＴＴＧＣＧＣＡＴＧＴＣＣＡＴＧＴＧＴＡＡ　Ｘ　ＴＧＧＴＴＴＴＡＡＡＡＣＴＣＴＧＡＴＡＣ）－3’（配列番号３５）

プライマーＴ１５－Ｘ－Ｒ３：5’－^{D}ｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ　Ｘ　ＡＧＴＡＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧＴＡＡＣＡ）－3’（配列番号３６）

[0124] （２）アゾベンゼン挿入プライマーセット３組を用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）で実施し作製した３組のプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＴ１０－Ｘ－Ｆ１、プライマーＴ１１－Ｘ－Ｒ１、プライマーＴ１２－Ｘ－Ｆ２、プライマーＴ１３－Ｘ－Ｒ２、プライマーＴ１４－Ｘ－Ｆ３、および、プライマーＴ１５－Ｘ－Ｒ３を各１５ｐｍｏｌと、各テンプレート１０ｎｇを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。反応液は次の５種類を用意した。

（ｉ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を添加、

（ｉｉ）テンプレートとしてＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｉｉ）テンプレートとしてＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｖ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類全て添加、そして、

（ｖ）テンプレートなし。

[0125] これら反応液を調製後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３０回行い、それぞれ目的の配列を有するＤＮＡ断片を次のように得た。（ｉ）約３３０ｂｐ、（ｉｉ）約２００ｂｐ、（ｉｉｉ）約１００ｂｐ、および、（ｉｖ）約３３０ｂｐ、約２００ｂｐ、約１００ｂｐの３種類、（ｖ）増幅ＤＮＡ断片なし（ネガティブコントロールとする）を増幅した。

[0126] （３）ラテックス結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（青色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ１６（配列番号３７、配列番号２５の相補鎖）、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（オレンジ色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ１７（配列番号３８、配列番号２９の相補鎖）、および、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（緑色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ１８（配列番号３９、配列番号３３の相補鎖）を、それぞれ水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行った。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、オリゴヌクレオチドプローブ１６結合ラッテックス（青色）、オリゴヌクレオチドプローブ１７結合ラテックス（オレンジ色）、オリゴヌクレオチドプローブ１８結合ラテックス（緑色）を作製した。

[0127] この３種のラテックスをグラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

オリゴヌクレオチドプローブ１６：５’－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＡＡＡＣＣＣＡＧＴＧＡＡＡＡＡＴＧＴＴＧＣＣＡ）－NH_2－３’（配列番号３７）。

オリゴヌクレオチドプローブ１７：５’－^{D}ｄ（ＴＴＧＣＴＣＴＧＴＡＣＡＣＴＴＧＣＴＣＡＡＴＧＣＧ）－NH_2－３’（配列番号３８）

オリゴヌクレオチドプローブ１８：５’－^{D}ｄ（ＴＴＡＣＡＣＡＴＧＧＡＣＡＴＧＣＧＣＡＡＴＴ）－NH_2－３’（配列番号３９）

（４）３種のオリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号２６に相補的な配列（配列番号４０）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブ、配列番号３０に相補的な配列（配列番号４１）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブ、および、配列番号３４に相補的な配列（配列番号４２）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブを、それぞれストレプトアビジンと混合する。それらの混合液をニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ　１３５、　ミリポア社製）上の３箇所にディスペンサーを用いて、上流側から順に互いに離れた位置でライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。３本の検出ラインを作製した。

オリゴヌクレオチドプローブ１９：５’－^{D}ｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号４０）。

オリゴヌクレオチドプローブ２０：５’－^{D}ｄ（ＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＴＡＡＴ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号４１）。

オリゴヌクレオチドプローブ２１：５’－^{D}ｄ（ＣＴＣＡＧＣＡＧＴＴＴＣＣＴＣＴＡＡＡＧＴＡ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号４２）。

[0128] （５）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、工程（３）で作製したコンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や

標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0129] （６）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（２）で作製した（ｉ）～（ｖ）のＰＣＲ産物をそれぞれ変性することなく、直ちに工程（５）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にそれぞれアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。その結果は以下に示す。

（ｉ）：１本目の検出ラインのみ青色に着色。

（ｉｉ）：２本目の検出ラインのみオレンジ色に着色。

（ｉｉｉ）：３本目の検出ラインのみ緑色に着色。

（ｉｖ）：１本目の検出ラインが青色に、２本目の検出ラインがオレンジ色に、３本目の検出ラインが緑色にそれぞれ着色。

（ｖ）：どの検出ラインも着色は認められなかった。

この結果から、それぞれの標的遺伝子特異的に検出が可能であり、３種類の同時検出も確認できた。

また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0130] ＜実施例７＞

（１）ジョイントプライマーの合成

本実施例では、標的核酸の鋳型としてはｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類をテンプレートとして用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対、約２００塩基対、および、約１００塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆｊ１）とリバースプライマー（Ｒｊ１）、フォワードプライマー（Ｆｊ２）とリバースプライマー（Ｒｊ２）、および、フォワードプライマー（Ｆｊ３）とリバースプライマー（Ｒｊ３）の３組のプライマーをそれぞれ設計した。それぞれの５’末端側に共通配列ＫＦ１とＫＲ１、共通配列ＫＦ２とＫ

Ｒ２、および、共通配列ＫＦ３とＫＲ３を導入した共通配列付加プライマー、ＫＦ１－Ｆｊ１とＫＲ１－Ｒｊ１、ＫＦ２－Ｆｊ２とＫＲ２－Ｒｊ２、および、ＫＦ３－Ｆｊ３とＫＲ３－Ｒｊ３を合成した。この６種の共通配列付加プライマー（ジョイントプライマー）はつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製した３組のプライマーセットを示す。

[0131] 共通配列ＫＦ１：5’－Ｄｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ）－3’（配列番号４３）

共通配列ＫＲ１：5’－Ｄｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ）－3’（配列番号４４）

プライマーＫＦ１－Ｆｊ１：5’－Ｄｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－3’（配列番号４５）

プライマーＫＲ１－Ｒｊ１：5’－Ｄｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－3’（配列番号４６）

共通配列ＫＦ２：5’－Ｄｄ（ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ）－3’（配列番号４７）

共通配列ＫＲ２：5’－Ｄｄ（ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ）－3’（配列番号４８）

プライマーＫＦ２－Ｆｊ２：5’－Ｄｄ（ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ　ＡＧＣＡＴＴＡＴＧＡＡＴＴＡＴＡＴＧＧＴ）－3’（配列番号４９）

プライマーＫＲ２－Ｒｊ２：5’－Ｄｄ（ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ　ＴＴＧＴＴＴＡＣＡＴＴＴＡＴＡＧＣＡＴＣ）－3’（配列番号５０）

共通配列ＫＦ３：5’－Ｄｄ（ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ）－3’（配列番号５１）

共通配列ＫＲ３：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ）－３’（配列番号５２）

プライマーＫＦ３－Ｆｊ３：５’－Ｄｄ（ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ　ＴＧＧＴＴＴＴＡＡＡＡＣＴＣＴＧＡＴＡＣ）－３’（配列番号５３）

プライマーＫＲ３－Ｒｊ３：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ　ＡＧＴＡＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧＴＡＡＣＡ）－３’（配列番号５４）

[0132] （２）人工核酸（アゾベンゼン）挿入プライマーの合成

本実施例では、工程１で作成したジョイントプライマーセットがそれぞれ増幅する３種類のＰＣＲ増幅断片に結合できるように、それぞれのジョイントプライマーと同一の共通配列を有するプライマーを３組設計した。それぞれのプライマーは、５’末端側に人工核酸であるアゾベンゼンを含むポリメラーゼ反応阻害領域（Ｘ）、およびタグ配列Ｔ２２とＴ２３、タグ配列Ｔ２４とＴ２５、および、タグ配列Ｔ２６とＴ２７を導入したタグ付きプライマー、Ｔ２２－Ｘ－ＫＦ１とＴ２３－Ｘ－ＫＲ１、Ｔ２４－Ｘ－ＫＦ２とＴ２５－Ｘ－ＫＲ２、および、Ｔ２６－Ｘ－ＫＦ３とＴ２７－Ｘ－ＫＲ３を合成した。この６種のアゾベンゼン挿入プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製した３組のプライマーセットを示す。

[0133] タグ配列Ｔ２２：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ）－３’（配列番号５５）

タグ配列Ｔ２３：５’－Ｄｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ）－３’（配列番号５６）

プライマーＴ２２－Ｘ－ＫＦ１：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ　Ｘ　ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ　）－３’（配列番号５７）

プライマーＴ２３－Ｘ－ＫＲ１：５’－Ｄｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣ

ＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ　Ｘ　ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ　）－３’（配列番号５８）

タグ配列Ｔ２４：５’－^{D}ｄ（ＣＧＣＡＴＴＧＡＧＣＡＡＧＴＧＴＡＣＡＧＡＧＣＡＴ）－３’（配列番号５９）

タグ配列Ｔ２５：５’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ）－３’（配列番号６０）

プライマーＴ２４－Ｘ－ＫＦ２：５’－^{D}ｄ（ＣＧＣＡＴＴＧＡＧＣＡＡＧＴＧＴＡＣＡＧＡＧＣＡＴ　Ｘ　ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ）－３’（配列番号６１）

プライマーＴ２５－Ｘ－ＫＲ２：５’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ　Ｘ　ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号６２）

タグ配列Ｔ２６：５’－^{D}ｄ（ＡＡＴＴＧＣＧＣＡＴＧＴＣＣＡＴＧＴＧＴＡＡ）－３’（配列番号６３）

タグ配列Ｔ２７：５’－^{D}ｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ）－３’（配列番号６４）

プライマーＴ２６－Ｘ－ＫＦ３：５’－^{D}ｄ（ＡＡＴＴＧＣＧＣＡＴＧＴＣＣＡＴＧＴＧＴＡＡ　Ｘ　ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ）－３’（配列番号６５）

プライマーＴ２７－Ｘ－ＫＲ３：５’－^{D}ｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ　Ｘ　ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ）－３’（配列番号６６）

[0134] （３）ジョイントプライマー、および、アゾベンゼン挿入プライマーを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）および（２）で実施し作製した６組のプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＫＦ１－Ｆｊ１、プライマーＫＲ１－Ｒｊ１、プライマーＫＦ２－Ｆｊ２、プライマーＫＲ２－Ｒｊ２、プライマーＫＦ３－Ｆｊ３、プライマーＫＲ３－Ｒｊ３、プライマーＴ２２－Ｘ－Ｋ

Ｆ１、プライマーＴ２３－Ｘ－ＫＲ１、プライマーＴ２４－Ｘ－ＫＦ２、プライマーＴ２５－Ｘ－ＫＲ２、プライマーＴ２６－Ｘ－ＫＦ３、プライマーＴ２７－Ｘ－ＫＲ３を各８ｐｍｏｌと、各テンプレート１０ｎｇを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。反応液は次の５種類を用意した。

（ｉ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を添加、

（ｉｉ）テンプレートとしてＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｉｉ）テンプレートとしてＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｖ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類全て添加、そして、

（ｖ）テンプレートなし。

[0135] これら反応液を調製後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３０回行い、それぞれ目的の配列を有するＤＮＡ断片を次のように得た。（ｉ）約３６０ｂｐ、（ｉｉ）約２３０ｂｐ、（ｉｉｉ）約１３０ｂｐ、および、（ｉｖ）約３６０ｂｐ、約２３０ｂｐ、約１３０ｂｐの３種類、（ｖ）増幅ＤＮＡ断片なし（ネガティブコントロールとする）を増幅した。

[0136] （４）ラテックス結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（青色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ２８（配列番号６７、配列番号５５の相補鎖）、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（オレンジ色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ２９（配列番号６８、配列番号５９の相補鎖）、および、カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（緑色

）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とアミノ基含有オリゴヌクレオチドプローブ３０（配列番号６９、配列番号６３の相補鎖）を、それぞれ水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行った。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、オリゴヌクレオチドプローブ２８結合ラッテックス（青色）、オリゴヌクレオチドプローブ２９結合ラテックス（オレンジ色）、オリゴヌクレオチドプローブ３０結合ラテックス（緑色）を作製した。

[0137] この３種のラテックスをグラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

オリゴヌクレオチドプローブ２８：５’－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＡＡＡＣＣＣＡＧＴＧＡＡＡＡＡＴＧＴＴＧＣＣＡ）－NH_2－３’（配列番号６７）。

オリゴヌクレオチドプローブ２９：５’－^{D}ｄ（ＴＴＧＣＴＣＴＧＴＡＣＡＣＴＴＧＣＴＣＡＡＴＧＣＧ）－NH_2－３’（配列番号６８）

オリゴヌクレオチドプローブ３０：５’－^{D}ｄ（ＴＴＡＣＡＣＡＴＧＧＡＣＡＴＧＣＧＣＡＡＴＴ）－NH_2－３’（配列番号６９）

[0138] （５）３種のオリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号５６に相補的な配列（配列番号７０）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブ、配列番号６０に相補的な配列（配列番号７１）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブ、および、配列番号６４に相補的な配列（配列番号７２）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブを、それぞれストレプトアビジンと混合する。それらの混合液をニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ　１３５、ミリポア社製）上の３箇所にディスペンサーを用いて、上流側から順に互いに離れた位置でライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。３本の検出ラインを作製した。

[0139] オリゴヌクレオチドプローブ３１：５’－^{D}ｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号７０）。

オリゴヌクレオチドプローブ３２：５’－Ｄｄ（ＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＴＡＡＴ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号７１）。

オリゴヌクレオチドプローブ３３：５’－Ｄｄ（ＣＴＣＡＧＣＡＧＴＴＴＣＣＴＣＴＡＡＡＧＴＡ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号７２）。

[0140] （６）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、工程（４）で作製したコンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0141] （７）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（３）で作製した（ｉ）～（ｖ）のＰＣＲ産物をそれぞれ変性することなく、直ちに工程（６）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にそれぞれアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。その結果は以下に示す。

（ｉ）：１本目の検出ラインのみ青色に着色。

（ｉｉ）：２本目の検出ラインのみオレンジ色に着色。

（ｉｉｉ）：３本目の検出ラインのみ緑色に着色。

（ｉｖ）：１本目の検出ラインが青色に、２本目の検出ラインがオレンジ色に、３本目の検出ラインが緑色に着色。

（ｖ）：どの検出ラインも着色は認められなかった。

この結果から、それぞれの標的遺伝子特異的に検出が可能であり、３種類の検出も確認できた。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0142] ＜実施例８＞

（１）ジョイントプライマーの合成

本実施例では、標的核酸の鋳型としてはｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を

テンプレートとして用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ）とリバースプライマー（Ｒ）を設計した。それぞれの５’末端側に共通配列ＫＦとＫＲを導入した共通配列付加プライマー、ＫＦ－ＦとＫＲ－Ｒを合成した。この２種の共通配列付加プライマー（ジョイントプライマー）はつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製したプライマーセットを示す。

[0143] 共通配列ＫＦ：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ）－３’（配列番号７３）

共通配列ＫＲ：５’－Ｄｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ）－３’（配列番号７４）

プライマーＫＦ－Ｆ：５’－Ｄｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号７５）

プライマーＫＲ－Ｒ：５’－Ｄｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号７６）

[0144] （２）ビオチン修飾プライマーおよびＦＩＴＣ修飾プライマーの合成

本実施例では、工程（１）で作成したジョイントプライマーセットが増幅するＰＣＲ増幅断片に結合できるように、それぞれのジョイントプライマーと同一の共通配列を有するプライマーをそれぞれ設計した。一方のプライマーは、５’末端側にビオチン修飾したものを合成し、もう一方のプライマーは５’末端側にＦＩＴＣ修飾したものを合成した。この２種の修飾プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製したプライマーセットを示す。

プライマーＫＦ２：５’－Ｂｉｏｔｉｎ－Ｄｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ）－３’（配列番号７７）

プライマーＫＲ２：５’－ＦＩＴＣ－Ｄｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ）－３’（配列番号７８）

[0145] （３）ジョイントプライマー、および、修飾プライマーを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）および（２）で実施し作製したプライマーセットを用いたＰ

ＣＲ反応を行った。プライマーＫＦ－Ｆ、プライマーＫＲ－Ｒ、プライマーＫＦ２、プライマーＫＲ２を各８ｐｍｏｌ、および、テンプレートとして１０ｎｇのｐＵＣ１９を０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。反応液を調製後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３０回行い、約３６０ｂｐの目的配列を有するＤＮＡ断片を増幅した。

[0146] （４）ラテックス結合ストレプトアビジンの作製

カルボキシル基含有ポリスチレンラテックス（青色）（固形分１０％（ｗ／ｗ）、Ｂａｎｇｓ社製）とストレプトアビジン（和光純薬工業社製）を、水溶性カルボジイミドを必要量添加したＭＥＳ緩衝液中で混合し、結合後、モノエタノールアミンでブロッキングを行った。前記反応液を遠心分離後、上清を除去し、得られた沈殿を水洗した。洗浄後、界面活性剤を含むＨＥＰＥＳ緩衝液に再懸濁し、ストレプトアビジン結合ラッテックス（青色）を作製した。このラテックス溶液をグラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

[0147] （５）抗ＦＩＴＣ（フルオロセインイソチオシアネート）抗体の固相への固定化

抗ＦＩＴＣ抗体（インビトロジェン社製）を５ｍＭ トリスバッファー（ｐＨ ７．５）に溶解し、ニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ １３５、 ミリポア社製）上にディスペンサーを用いて、ライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。検出ラインを作製した。

[0148] （６）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、工程（４）で作製したコンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や

標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、ビオチン修飾プライマーとＦＩＴＣ修飾プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0149] （７）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（３）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（６）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にそれぞれアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。その結果、工程（３）で検体としてｐＵＣ１９を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして水を添加した場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0150] ＜実施例９＞

（１）ジョイントプライマーの合成

本実施例では、標的核酸の鋳型としてはｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類をテンプレートとして用い、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対、約２００塩基対、および、約１００塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆｊ１）とリバースプライマー（Ｒｊ１）、フォワードプライマー（Ｆｊ２）とリバースプライマー（Ｒｊ２）、および、フォワードプライマー（Ｆｊ３）とリバースプライマー（Ｒｊ３）の３組のプライマーをそれぞれ設計した。それぞれの５’末端側に共通配列ＫＦ１とＫＲ１、共通配列ＫＦ２とＫＲ２、および、共通配列ＫＦ３とＫＲ３を導入した共通配列付加プライマー、ＫＦ１－Ｆｊ１とＫＲ１－Ｒｊ１、ＫＦ２－Ｆｊ２とＫＲ２－Ｒｊ２、および、ＫＦ３－Ｆｊ３とＫＲ３－Ｒｊ３を合成した。この６種の共通配列付加プライマー（ジョイントプライマー）はつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。以下に本検討で作製した３組のプライマーセットを示す。

[0151] 共通配列ＫＦ１：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ）

－３’（配列番号７９）

共通配列ＫＲ１：５’－^{D}ｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ）－３’（配列番号８０）

プライマーＫＦ１－Ｆｊ１：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号８１）

プライマーＫＲ１－Ｒｊ１：５’－^{D}ｄ（ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号８２）

共通配列ＫＦ２：５’－^{D}ｄ（ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ）－３’（配列番号８３）

共通配列ＫＲ２：５’－^{D}ｄ（ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号８４）

プライマーＫＦ２－Ｆｊ２：５’－^{D}ｄ（ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ　ＡＧＣＡＴＴＡＴＧＡＡＴＴＡＴＡＴＧＧＴ）－３’（配列番号８５）

プライマーＫＲ２－Ｒｊ２：５’－^{D}ｄ（ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ　ＴＴＧＴＴＴＡＣＡＴＴＴＡＴＡＧＣＡＴＣ）－３’（配列番号８６）

共通配列ＫＦ３：５’－^{D}ｄ（ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ）－３’（配列番号８７）

共通配列ＫＲ３：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ）－３’（配列番号８８）

プライマーＫＦ３－Ｆｊ３：５’－^{D}ｄ（ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ　ＴＧＧＴＴＴＴＡＡＡＡＣＴＣＴＧＡＴＡＣ）－３’（配列番号８９）

プライマーＫＲ３－Ｒｊ３：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ　ＡＧＴＡＴＧＡＴＧＡＧＧＧＴＧＴＡＡＣＡ）－３’（配列番号

９０）

[0152] （２）人工核酸（アゾベンゼン）挿入プライマー、および、ビオチン修飾プライマーの合成

本実施例では、工程（１）で作成したジョイントプライマーセットがそれぞれ増幅する３種類のＰＣＲ増幅断片に結合できるように、それぞれのジョイントプライマーと同一の共通配列を有するプライマーを３組設計した。３組のそれぞれの一方のプライマーとして５’末端をビオチン化修飾したプライマー、ＫＦ１、ＫＦ２、および、ＫＦ３を合成した。また、３組のそれぞれのもう一方のプライマーとして、５’末端側に人工核酸であるアゾベンゼンを含むポリメラーゼ反応阻害領域（Ｘ）、およびタグ配列Ｔ３４、タグ配列Ｔ３５、および、タグ配列Ｔ３６を導入したタグ付きプライマー、Ｔ３４－Ｘ－ＫＲ１、Ｔ３５－Ｘ－ＫＲ２、および、Ｔ３６－Ｘ－ＫＲ３を合成した。この６種の修飾プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。作製した３組のプライマーセットを以下に示す。

[0153] タグ配列Ｔ３４：5’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ）－3’（配列番号９１）

プライマーＫＦ１：5’－Ｂｉｏｔｉｎ－^{D}ｄ（ＴＧＧＧＣＴＧＡＣＣＴＡＧＡＧＧＴＣＴＴ）－3’（配列番号９２）

プライマーＴ３４－Ｘ－ＫＲ１：5’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ　Ｘ　ＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＣＡＴＴＣＧＧ）－3’（配列番号９３）

タグ配列Ｔ３５：5’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ）－3’（配列番号９４）

プライマーＫＦ２：5’－Ｂｉｏｔｉｎ－^{D}ｄ（ＣＣＧＧＡＡＣＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＴＴＴ）－3’（配列番号９５）

プライマーＴ３５－Ｘ－ＫＲ２：5’－^{D}ｄ（ＡＴＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＡＴＡＴＣＡＴＡ　Ｘ　ＧＡＡＧＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＡＴＧＡ）－3’（配列番号９６）

タグ配列Ｔ３６：5’－Ｄｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ）－3’（配列番号９７）

プライマーＫＦ３：5’－Ｂｉｏｔｉｎ－Ｄｄ（ＡＴＡＣＣＧＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＡＣＣ）－3’（配列番号９８）

プライマーＴ３６－Ｘ－ＫＲ３：5’－Ｄｄ（ＴＡＣＴＴＴＡＧＡＧＧＡＡＡＣＴＧＣＴＧＡＧ　Ｘ　ＴＧＧＣＣＴＧＴＧＴＧＡＣＡＣＴＡＴＧＣ）－3’（配列番号９９）

[0154] （３）ジョイントプライマー、および、アゾベンゼン挿入プライマーを用いたＰＣＲ反応

前記工程（１）および（２）で実施し作製した６組のプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＫＦ１－Ｆｊ１、プライマーＫＲ１－Ｒｊ１、プライマーＫＦ２－Ｆｊ２、プライマーＫＲ２－Ｒｊ２、プライマーＫＦ３－Ｆｊ３、プライマーＫＲ３－Ｒｊ３、プライマーＫＦ１、プライマーＴ３４－Ｘ－ＫＲ１、プライマーＫＦ２、プライマーＴ３５－Ｘ－ＫＲ２、プライマーＫＦ３、プライマーＴ３６－Ｘ－ＫＲ３を各８ｐｍｏｌと、各テンプレート１０ｎｇを０．２　ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑ　ＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、１００μｌのＰＣＲ反応液を調製した。反応液は次の５種類を用意した。

（ｉ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を添加、

（ｉｉ）テンプレートとしてＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｉｉ）テンプレートとしてＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子を添加、

（ｉｖ）テンプレートとしてｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）、ＥｃｏＲＩメチラーゼ遺伝子、および、ＢａｍＨＩメチラーゼ遺伝子の３種類全て添加、そして、

（ｖ）テンプレートなし。

これら反応液を調製後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒の

サイクルを３０回行い、それぞれ目的の配列を有するＤＮＡ断片を次のように得た。（ｉ）約３６０ｂｐ、（ｉｉ）約２３０ｂｐ、（ｉｉｉ）約１３０ｂｐ、および、（ｉｖ）約３６０ｂｐ、約２３０ｂｐ、約１３０ｂｐの３種類、（ｖ）増幅ＤＮＡ断片なし（ネガティブコントロールとする）を増幅した。

[0155] （４）金コロイド結合ストレプトアビジンの作製

Ｇｏｌｄ　Ｃｏｌｌｏｉｄ（粒径４０ｎｍ、Ｂｒｉｔｉｓｈ　ＢｉｏＣｅｌｌ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社製）とストレプトアビジンを混合し、５０℃で１６時間インキュベートした。６０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、上清を除去、０．０５Ｍ　塩化ナトリウム、５ｍＭリン酸バッファー、ｐＨ７を添加し混和後、再度５０℃で４０時間インキュベートした。

インキュベート後、遠心（６０００ｒｐｍ、１５分間）を行い、上清を除去し、５ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７）を添加した。このバッファー置換を再度行った。

調製した金コロイド溶液をグラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲーションパッドとした。

[0156] （５）３種のオリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号９１に相補的な配列（配列番号１００）を有するオリゴヌクレオチドプローブ、配列番号９４に相補的な配列（配列番号１０１）を有するオリゴヌクレオチドプローブ、および、配列番号９７に相補的な配列（配列番号１０２）を有するオリゴヌクレオチドプローブを合成する。それらのプローブ溶液をニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ　１３５、ミリポア社製）上の３箇所にディスペンサーを用いて、上流側から順に互いに離れた位置でライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。３本の検出ラインを作製した。

[0157] オリゴヌクレオチドプローブ３７：５’－Ｄｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－３’（配列番号１００）。

オリゴヌクレオチドプローブ３８：５’－Ｄｄ（ＴＡＴＧＡＴＡＴＧＣＴＴＣ

ＴＣＣＡＣＧＣＡＴＡＡＴ）－３’（配列番号１０１）。

オリゴヌクレオチドプローブ３９：５’－Ｄｄ（ＣＴＣＡＧＣＡＧＴＴＴＣＣＴＣＴＡＡＡＧＴＡ）－３’（配列番号１０２）。

[0158] （６）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、工程（４）で作製したコンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、ビオチン修飾プライマーとアゾベンゼン挿入プライマーのセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストリップを作製した。

[0159] （７）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（３）で作製した（ｉ）～（ｖ）のＰＣＲ産物をそれぞれ変性することなく、直ちに工程（６）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にそれぞれアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。その結果は以下に示す。

（ｉ）：１本目の検出ラインのみ着色。

（ｉｉ）：２本目の検出ラインのみ着色。

（ｉｉｉ）：３本目の検出ラインのみ着色。

（ｉｖ）：１本目、２本目、３本目の検出ラインがそれぞれ着色。

（ｖ）：どの検出ラインも着色は認められなかった。

この結果から、それぞれの標的遺伝子特異的に検出が可能であり、３種類の検出も確認できた。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

[0160] ＜実施例１０＞

（１）人工核酸（アゾベンゼン）挿入プライマーの合成

本実施例では、標的としてプラスミドｐＵＣ１９を導入した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５α）を用いる。ｐＵＣ１９が鋳型となるときに、ＰＣＲ増幅により約３３０塩基対が増幅するようにフォワードプライマー（Ｆ）および

リバースプライマー（Ｒ）を設計した。それぞれの５’末端側に人工核酸であるアゾベンゼンを含むポリメラーゼ反応阻害領域（Ｘ）、およびタグ配列Ｔ３７およびＴ３８を導入したタグ付きプライマー、Ｔ３７－Ｘ－ＦおよびＴ３８－Ｘ－Ｒを合成した。この２種のアゾベンゼン挿入プライマーはつくばオリゴサービス株式会社にて受託合成を行い購入した。本検討で作製したプライマーセットを示す。

タグ配列Ｔ３７：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ）－３’（配列番号１０３）

タグ配列Ｔ３８：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ）－３’（配列番号１０４）

プライマーＦ：５’－^{D}ｄ（ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号１０５）

プライマーＲ：５’－^{D}ｄ（ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号１０６）

プライマーＴ３７－Ｘ－Ｆ：５’－^{D}ｄ（ＴＧＧＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＧＴＴＴＡＴＡＧ　Ｘ　ＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡ）－３’（配列番号１０７）

プライマーＴ３８－Ｘ－Ｒ：５’－^{D}ｄ（ＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＴＡＧＡＴＣＡ　Ｘ　ＴＣＴＡＴＧＣＧＧＣＡＴＣＡＧＡＧＣＡＧ）－３’（配列番号１０８）

[0161] （２）アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ反応

プラスミドｐＵＣ１９を導入した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５α）のコロニーを取り、１ｍｌ水中に混和した。前記工程（１）で作製したプライマーセットを用いたＰＣＲ反応を行った。プライマーＦとプライマーＲを各５ｐｍｏｌと、前記大腸菌のけん濁液１μｌとを０．２ｍｌのＰＣＲ用チューブに入れ、ＥｘＴａｑＰＣＲデバイス（タカラバイオ社製）の説明書に従い、２５μｌのＰＣＲ反応液を調製した。その後、チューブをサーマルサイクラー（ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ、アプライドバイオシステム社

製）にセットし、９５℃で５分間熱処理後、９５℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒のサイクルを３０回行い、目的の約３３０ｂｐを増幅した。また、けん濁液を添加しないで同様の反応を行い、ネガティブコントロールとした。

[0162] （３）金コロイド結合オリゴヌクレオチドプローブの作製

Ｇｏｌｄ　Ｃｏｌｌｏｉｄ（１０ｎｍ、５．７×10^{12}（粒子数／ｍｌ）、Ｂｒｉｔｉｓｈ　ＢｉｏＣｅｌｌ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社製）と抗ＦＩＴＣ抗体溶液（５ｍＭリン酸バッファー、ｐＨ７）を混合し、２０分、室温で静置した。１％ＢＳＡ、０．１％ＰＥＧ溶液を１／２量添加し、１０００ｒｐｍで２５分間遠心分離し、上清を除去、１％ＢＳＡ、０．１％ＰＥＧ溶液を添加し混和後、１００００ｒｐｍで２５分間遠心分離した。遠心後に上清を除去し、５ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７）を添加した。このバッファー置換を再度行った。

[0163] 調製した金コロイド溶液に３’末端ＦＩＴＣ修飾オリゴヌクレオチドプローブ４０（配列番号１０９、配列番号１０３の相補鎖）を混合し、グラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、コンジュゲートパッドとした。

オリゴヌクレオチドプローブ４０：５’－^{D}ｄ（ＣＴＡＴＡＡＡＣＣＣＡＧＴＧＡＡＡＡＡＴＧＴＴＧＣＣＡ）－ＦＩＴＣ－３’（配列番号１０９）。

[0164] （４）オリゴヌクレオチドプローブの固相への固定化

配列番号１０４に相補的な配列（配列番号１１０）を有する３’末端ビオチン修飾オリゴヌクレオチドプローブ４１を、ストレプトアビジンと混合する。その混合液をニトロセルロースメンブレン（商品名：Ｈｉ－Ｆｌｏｗ　１８０、　ミリポア社製）にディスペンサーを用いてライン上に塗布し、４０℃で３０分間風乾した。

オリゴヌクレオチドプローブ４１：５’－^{D}ｄ（ＧＡＴＣＡＴＡＣＡＣＧＴＧＧＴＴＧＧＡＡＧＣＴＡＡＣＣ）－Ｂｉｏｔｉｎ－３’（配列番号１１０）。

[0165] （５）核酸クロマトグラフィー様テストストリップの作製

バッキングシートから成る基材に、上記で作成したニトロセルロースメンブレンからなるクロマトグラフィー媒体、コンジュゲーションパッド、試料添加部である汎用性のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを図６に示す様に貼り合わせ、アゾベンゼン挿入プライマーセットを用いたＰＣＲ増幅産物の検出用テストストリップを作製した。

[0166] （６）テストストリップによるＰＣＲ産物の検出

工程（２）で作製したＰＣＲ産物を変性することなく、直ちに工程（５）で作製したテストストリップ上の試料添加部位にアプライし、クロマトグラフィーによる検出を行った。工程（２）で検体として大腸菌を添加した場合、テストライン上に標的核酸特異的な着色ラインが検出された。一方、ネガティブコントロールとして大腸菌を添加しない場合、ラインの検出は認められなかった。また、クロマトグラフィーによる検出に要した時間は、１０～１５分と短時間であった。

符号の説明

[0167] １．プライマー領域

２．タグ領域

３．ポリメラーゼ反応阻害領域（スペーサー領域）

４．第１プライマー（ジョイントプライマー）のプライマー領域

５．第１プライマー（ジョイントプライマー）の共通領域

６．第２プライマーの共通領域

７．第２プライマーのタグ領域

８．第２プライマーのポリメラーゼ反応阻害領域（スペーサー領域）

９．標的核酸配列

１０．フォワードプライマー

１１．フォワードプライマーのプライマー領域

１２．フォワードプライマーのタグ領域

１３．リバースプライマー

１４．リバースプライマーのプライマー領域

１５．リバースプライマーのタグ領域

１６．部分二本鎖核酸構造をもつＰＣＲ産物

１７．標的核酸配列

１８．フォワード第１プライマー

１９．フォワード第１プライマーのプライマー領域

２０．フォワード第１プライマーのタグ領域

２１．リバース第１プライマー

２２．リバース第１プライマーのプライマー領域

２３．リバース第１プライマーのタグ領域

２４．第１プライマーによる二本鎖ＰＣＲ産物

２５．フォワード第２プライマー

２６．フォワード第２プライマーのプライマー領域

２７．フォワード第２プライマーのタグ領域

２８．リバース第２プライマー

２９．リバース第２プライマーのプライマー領域

３０．リバース第２プライマーのタグ領域

３１．部分二本鎖核酸構造をもつＰＣＲ産物

３２．サンプルパッド

３３．コンジュゲートパッド

３４．捕捉用オリゴヌクレオチドを保持した担体

３５．吸収パッド

３６．基材

３７．テストライン

３８．コントロールライン

３９．標識分子結合用オリゴヌクレオチド

４０．標識分子

４１．ＰＣＲ産物ー標識分子複合体

４２．多孔質メンブレン

４３．捕捉用オリゴヌクレオチド

４４．捕捉用オリゴヌクレオチドを各ウェルに保持した担体（マイクロアレイ）

４５．捕捉用オリゴヌクレオチドを保持したビーズ担体

請求の範囲

［請求項1］ 両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片の一方の一本鎖領域と、固相上に固定した第１のオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせる工程を含む核酸検出方法。

［請求項2］ 前記ＤＮＡ増幅断片の他方の一本鎖領域と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとを、ハイブリダイズさせる工程をさらに含む請求項１に記載の核酸検出方法。

［請求項3］ 標識物質が着色担体からなり、前記ＤＮＡ増幅断片を目視検出できることを特徴とする請求項２に記載の核酸検出方法。

［請求項4］ 前記ＤＮＡ増幅断片を核酸検出デバイス上で検出する工程を含む請求項１～３のいずれかに記載の核酸検出方法。

［請求項5］ クロマトグラフィーにて前記ＤＮＡ増幅断片を検出する請求項１～４のいずれかに記載の核酸検出方法。

［請求項6］ 下記工程（ａ）～（ｃ）：

（ａ）前記核酸検出デバイス上の、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは異なる領域に、前記ＤＮＡ増幅断片を配置する工程、

（ｂ）溶媒を用いて、前記ＤＮＡ増幅断片を、前記第１オリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域の方向に、上記デバイス上で拡散させる工程、及び

（ｃ）前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、前記第１オリゴヌクレオチドプローブと、前記ＤＮＡ増幅断片とを、ハイブリダイズさせる工程、

を含む、請求項４または５に記載の核酸検出方法。

［請求項7］ 前記工程（ｃ）の前に、前記ＤＮＡ増幅断片と、前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせる工程をさらに含む、請求項６に記載の核酸検出方法。

［請求項8］ （ｄ）前記核酸検出デバイス上の、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域とは各々異なる領域に、前記ＤＮＡ増幅断片、および前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ配置し、

（ｅ）溶媒を用いて、前記ＤＮＡ増幅断片を、前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域の方向に拡散させ、

（ｆ）前記標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている領域において、前記ＤＮＡ増幅断片と、標識物質が結合した第２のオリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせ、

（ｇ）工程（ｆ）でハイブリダイズした複合体を前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが配置されている方向に、展開媒体上で拡散させ、

（ｈ）前記第１のオリゴヌクレオチドプローブが固定されている領域において、前記第１のオリゴヌクレオチドプローブと前記複合体とをハイブリダイズさせる、

請求項４または５に記載の核酸検出方法。

［請求項9］ 前記天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域が、二本鎖ＤＮＡ領域と同一方向からなる配列であることを特徴とする請求項１～８のいずれかに記載の核酸検出方法。

［請求項10］ 前記ＤＮＡ増幅断片は、核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有する２つのプライマーを用いて核酸増幅法により得られた産物であることを特徴とする請求項１～９のいずれかに記載の核酸検出方法。

［請求項11］ 前記ＤＮＡ増幅断片が、標的核酸の鋳型にハイブリダイズ可能な配列、及び、該鋳型にハイブリダイズ不可能な共通配列を有するプライマーを含む第１プライマーセット、並びに、上記共通配列の相補配列とハイブリダイズ可能な配列、及び核酸増幅反応において二本鎖化され

ないタグ領域を有するプライマーを含む第２プライマーセットを用いて、核酸増幅法により得られた産物であることを特徴とする、請求項１～９のいずれかに記載の核酸検出方法。

［請求項12］ 前記核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域が、天然のヌクレオチドからなり、共通配列の相補配列とハイブリダイズ可能な配列と同一方向からなる配列であることを特徴とする請求項１１に記載の核酸検出方法。

［請求項13］ 請求項１～１２のいずれかに記載の核酸検出方法に用いる核酸検出デバイスであって、前記ＤＮＡ増幅断片を配置する領域、前記ＤＮＡ増幅断片と結合する前記第１のオリゴヌクレオチドプローブを保持したクロマトグラフィー担体、及び、標識物質が結合した前記第２のオリゴヌクレオチドプローブとを具備してなる検出デバイス。

［請求項14］ 核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域を有する２つのプライマーを用いて核酸増幅法により得られる、両末端に天然のヌクレオチドを含む一本鎖領域を有する二本鎖ＤＮＡ増幅断片。

［請求項15］ プライマーの、核酸増幅反応において二本鎖化されないタグ領域が、天然のヌクレオチドからなり、プライマー全長が同一方向からなる配列であることを特徴とする請求項１４に記載の二本鎖ＤＮＡ増幅断片。