

明 細 書

発明の名称：核酸の検出方法及びデバイス、キット

技術分野

[0001] 本発明は、多重鎖核酸の検出方法、及び、多重鎖核酸検出デバイス又はキットの技術分野に属する。

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、ターゲット核酸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。

[0003] 核酸増幅法としては、PCR法（Polymerase Chain Reaction）が最も汎用されているが、複雑な温度制御が必要であるため、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）法などの等温増幅法も開発されている。

[0004] PCR法やLAMP法、ICAN法などにより増幅された核酸は二本鎖であり、検出法には蛍光色素を利用する方法が盛んに研究されている。

[0005] 最も一般的な方法は、増幅反応後の溶液をアガロース電気泳動にかけ、Ethidium BromideやSYBR Greenなどの蛍光性インターカレーターを結合させ、特異的な蛍光を観察する方法である（非特許文献1）。しかし、電気泳動後に蛍光性インターカレーターで検出する方法は、30分～1時間程度の泳動時間を要する上、蛍光を検出するためのUV照射装置や蛍光検出器等の高価な機械が必要である。

[0006] 他のDNAの混在の可能性が無く、増幅産物の有無のみを判別する場合には、PCR開始前の反応液に予め、蛍光性インターカレーターを添加し、増幅反応後の蛍光検出を行うことで、電気泳動を省略することは可能である（特許文献1）。しかし、蛍光性インターカレーターはプライマー等の一本鎖核

酸に結合するためバックグラウンドシグナルが増強され、検出感度の低下を招く問題がある。これに対し、一本鎖核酸と結合した蛍光性インターカレーターに優先的に反応する化合物で処理することで、バックグラウンドシグナルを低減する方法（特許文献2）、及び、一本鎖核酸と比べて二本鎖核酸との反応特異性を向上させた蛍光色素（特許文献3）が開発されているが、蛍光検出を行う点に変わりはない。

[0007] あるいは、蛍光標識されたプライマーを用いて核酸増幅反応を行うことで、蛍光偏光で検出する方法（特許文献4）も開発されているが、蛍光プライマーは一般に高価であり、また、増幅産物に取り込まれなかった蛍光標識プライマーの分離操作が必要となるため煩雑であるなどの問題がある。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開平5－237000号公報
特許文献2：国際公開第2002／103053号
特許文献3：特開2003－240780号公報
特許文献4：特開平9－187275号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Molecular Cloning Second Edition, vol. 1, 6.15 (1989)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、核酸増幅反応によって増幅された多重鎖核酸を、複雑な操作や特殊な装置を必要とせずに、簡便かつ迅速に可視光で検出する多重鎖核酸の検出方法、及び多重鎖核酸検出デバイス又はキットを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

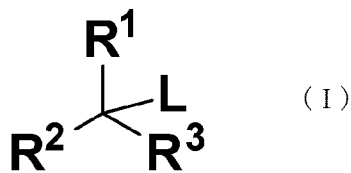
- [0011] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、多重鎖核酸

を発色性のロイコ型色素と接触させることにより、ロイコ型色素の脱離基が解離して呈色し、核酸を可視光で検出できることを見出した。さらには、この原理を利用した多重鎖核酸検出デバイス又はキットの作製が可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち、本発明は、発色性のロイコ型色素を多重鎖核酸と接触させる工程を含み、ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によって呈する色調を可視光で検出することを特徴とする多重鎖核酸の検出方法に関する。

[0013] ロイコ型色素は、一般式（I）：

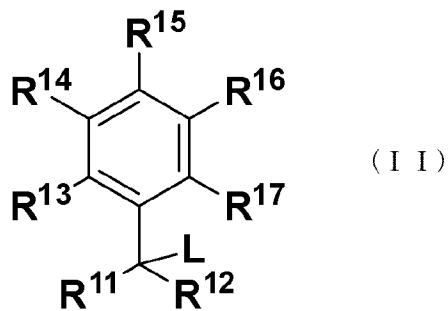
[化1]



（式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立に置換又は無置換のアリール基を表す。 L は、 $-\text{SO}_3\text{R}^4$ 、 $-\text{NO}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^6)(\text{COR}^7)$ 、 $-\text{SR}^8$ 、 $-\text{SSR}^9$ 、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{NHSNH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、又は、 $-\text{H}$ を表す。ここで、 R^4 はアルカリ金属又は水素原子を表す。 X はハロゲン原子を表す。 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、アルケニル基、又はアルキニル基を表す。）で表される化合物であって、ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によってロイコ型色素の脱離基が解離し、脱離基の解離によって可視光で検出可能な色調を呈することが好ましい。

[0014] 前記一般式（I）で表される化合物は、
一般式（II）：

[化2]



(式中、Lは前記と同じ。R¹¹及びR¹²は、それぞれ独立に、置換又は無置換のアリール基を表す。R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶及びR¹⁷は、それぞれ独立に、ハロゲン原子、カルボキシ基、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、アミド基、アミノ基、アルキル基、アリール基、アルケニル基、アルキニル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基を表す。)で表される化合物であることが好ましい。

[0015] ロイコ型色素は、トリアリールメタン系色素と求核剤との反応物であることが好ましい。

[0016] トリアリールメタン系色素が、ゲンチアナバイオレット、クリスタルバイオレット、メチルグリーン、マラカイトグリーン、ビクトリアブルー、パラロザニリン及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる1以上の色素であることが好ましい。

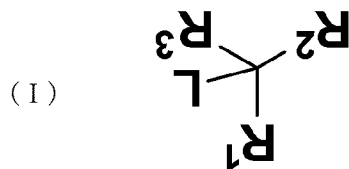
[0017] 求核剤が、亜硫酸イオン、亜硫酸水素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、シアニドイオン、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、及びヒドリド求核剤からなる群から選ばれる1以上の求核剤であることが好ましい。

[0018] また、本発明は、(d) ロイコ型色素を保持する担体、(e) 検体が担体(d)を通過する経路、及び(f) 検体とロイコ型色素との相互作用によって呈する色調を可視光で検出し、多重鎖核酸の存在を判定する部位、を有する

、多重鎖核酸検出デバイス又はキットに関する。

[0019] ロイコ型色素は、一般式(1)：

[化3]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立に、置換又は無置換のアリール基

を表す。 L は、 $-SO_3R^4$ 、 $-NO_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-X$ 、 $-NHR^5$ 、

$-N(COR^6)(COR^7)$ 、 $-SR^8$ 、 $-SSR^9$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-NHSN$

H_2 、 $-OH$ 、又は、 $-H$ を表す。ここで、 R^4 はアルカリ金属又は水素原子

を表す。 X はハロゲン原子を表す。 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、

それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、アルケニル基、又は

アルキニル基を表す。)で表される化合物であって、ロイコ型色素と多重鎖

核酸との相互作用によってロイコ型色素の脱離基が解離し、脱離基の解離に

よって可視光で検出可能な色調を呈することが好ましい。

[0020] 担体(d)は、トリアリールメタン系色素と求核剤との混合液を保持するこ

とが好ましい。

[0021] トリアリールメタン色素が、ゲンチアナバイオレット、クリスタルバイオレ

ット、メチルグリーン、エラカイトグリーン、ピクトリアブルー、パラロザ

ニン及びこれらの誘導体からなる群から選ばれる1以上の色素であること

が好ましい。

[0022] 求核剤が、亜硫酸イオン、亜硫酸水素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、

シアニドイオン、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ

金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、及びヒドリド求核剤からなる群

から選ばれる1つ以上の求核剤であることが好ましい。

発明の効果

[0023] 本発明の方法によれば、特別な検出機器を使用することなく、多重鎖核酸と

ロイコ型色素との接触により生じる呈色反応によって、核酸合成又は増幅の有無を目視検出することができる。また、本発明に係る核酸検出デバイスは、多重鎖核酸を含む検体をデバイス上に添加するだけで、呈色反応により迅速に被験物質を目視検出することができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]本発明の核酸検出用クロマト型デバイスの一例を示す概略図である。

[図2]本発明の核酸検出用フィルター型デバイスの一例を示す概略図である。

[図3]本発明の核酸検出用吸引型デバイスの一例を示す概略図である。

[図4]本発明の核酸検出用流路型デバイスの一例を示す概略図である。

[図5]本発明の核酸検出用チューブ型デバイスの一例を示す概略図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明を詳細に記載する。

[0026] 1. 核酸の検出方法

本発明は、発色性のロイコ型色素を多重鎖核酸と接触させる工程を含み、ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によって呈する色調を可視光で検出することを特徴とする多重鎖核酸の検出方法に関する。

[0027] 検出対象である多重鎖核酸には二本鎖核酸、三本鎖核酸、又は、四本鎖核酸などが含まれる。核酸としてはDNA又はRNAのほか、これらの化学修飾体が数多く知られており、さらにPNAと呼ばれるポリペプチド鎖を主鎖に有する核酸類縁体なども知られているが、多重鎖核酸にはこれらがすべて含まれる。より好ましく用いられる核酸は、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNAとRNAのハイブリッド鎖、及びPNAなどの人工核酸の二本鎖などである。ただし、一本鎖核酸であっても、複数混在する等、色素による染色が可能である場合、上記の検出方法で確認することが可能となる。

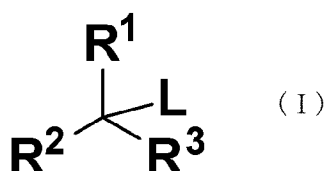
[0028] 発色性のロイコ型色素とは、ロイコ型色素であって顕色剤を反応させた際に発色状態となるものを意味する。ロイコ型色素とは無色又は淡色の色素であり、顕色剤との反応や、光等の物理刺激によりその構造を変化し色調の変化を示す色素を意味する。顕色剤としては、酸化剤やアルコールなどが知られ

ているが、上記の検出方法では、多重鎖核酸が顕色剤として用いられる。

[0029] 上記の検出方法では、多重鎖核酸に発色性のロイコ型色素を添加し、多重鎖核酸とロイコ型色素を接触させ相互作用させることにより色調の変化を示すことを検出原理としている。相互作用とは、多重鎖核酸との可逆的な結合により、ロイコ型色素に何らかの物理化学的な影響が生じることを意味する。

[0030] ロイコ型色素としては、一般式 (I) :

[化4]



で表される化合物であって、多重鎖核酸との相互作用によってロイコ型色素の脱離基が解離し、脱離基の解離によって可視光で検出可能な色調を生じる化合物が好ましい。

[0031] 前記一般式 (I) において、 R^1 、 R^2 、 R^3 は、それぞれ独立して置換又は無置換のアリール基を表す。アリール基としては、フェニル基、ナフチル基、アントラセニル基等が挙げられる。これらアリール基は、更に、アミノ基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、カルボニル基、カルボキシ基、スルホン酸基、アルキル基等の官能基、及び／又はハロゲン原子のような他の原子で置換されていてもよい。

[0032] Lは脱離基を表し、具体的には、 $-\text{SO}_3\text{R}^4$ 、 $-\text{NO}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^6)(\text{COR}^7)$ 、 $-\text{SR}^8$ 、 $-\text{SSR}^9$ 、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、又は、 $-\text{H}$ を表す。

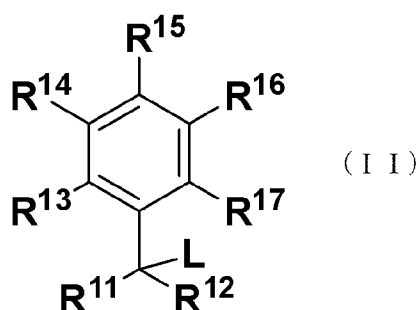
[0033] R^4 はアルカリ金属又は水素原子を表す。Xは、F、Cl、Br、I等のハロゲン原子を表す。 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、アルケニル基、アルキニル基を表し、これらの置換基はさらに、他の一般的な官能基や原子、例えばアミノ基などのヘテロ官能基やハロゲン原子等によって置換されていてもよい。

[0034] ロイコ型色素は、酸化還元などの反応により発色する色素であり、発色状態にある色素と求核剤との反応物であってもよい。例えば、トリアリールメタン系の発色状態にある色素に求核剤を反応させることで、ロイコ型色素に変換できる。この場合、単一のトリアリールメタン系色素を用いても、使用する求核剤を変えれば、異なる構造を有するロイコ型色素が得られる。

[0035] 色素としては、酸化還元などの反応により発色し、多重鎖核酸との相互作用により可視光で検出可能な色調を呈するものあれば特に制限はないが、トリアリールメタン系色素、キサンテン系色素、キノリン系色素、フェノチアジン系色素、フェノキサジン系色素及びこれらの混合物が挙げられる。この中でも、トリアリールメタン系色素であることが好ましい。

[0036] トリアリールメタン系色素としては、一般式 (I I) :

[化5]



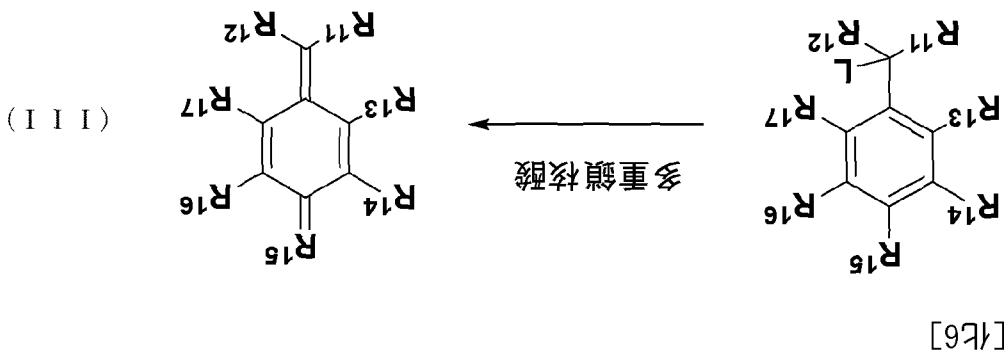
で表される化合物であることがより好ましい。式中、Lは前記と同様である。R¹¹及びR¹²は、それぞれ独立に、置換又は無置換アリール基を表す。

[0037] 置換アリール基とは、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、アルコキシ基、ハロゲン原子で置換されたアルコキシ基、アリール基で置換されたアルコキシ基、アリールオキシ基、アルキル基、ハロゲン原子で置換されたアルキル基、ヒドロキシ基で置換されたアルキル基、カルボキシ基のエステルで置換されたアルキル基、シアノ基で置換されたアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、複素環基、アミノ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、アルキルスルホニル基で置換されたアミノ基、アシル基で置換されたアミノ基、メルカプト基、アルキルチオ基、ハロゲン原子

で置換されたアルキルチオ基、アリールチオ基、カルボキシ基又はそのエス
 テル若しくはそのアミド、カルボニル基（オキシ基）、ホルミル基、アルキ
 ルカルボニル基、アリールカルボニル基、チオカルボニル基（チオキシ基）
 、シアノ基、ニトロ基、スルホニル基、アルキルスルホニル基、ハロゲン
 子で置換されたアルキルスルホニル基、及びアリールスルホニル基から選択
 される1又は複数の基を置換基として有するアリール基を示す。

[0038] R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶及びR¹⁷は、それぞれ独立に、例えば、ハロゲン原
 子、カルボキシ基、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、アミド基、アミノ基
 、アルキル基、アリール基、アルケニル基、アルキニル基、ヒドロキシ基、
 アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アル
 キルアミノ基、アリールアミノ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、ア
 リールオキシカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基
 等を表す。

[0039] 当該色素は、多重鎖核酸との相互作用により反応式（111）：



で表される機構で呈色すると考えられるが、呈色機構は特に限定されるもの
 ではない。

[0040] トリアリールメタン系色素の具体例としては、メチルグリーン、アラカイ
 トグリーン、クリスタルバイオレット、パラロザニン、ゲンチアバイオレ
 ットB、ゲンチアバイオレットR、サイトズル、ピクトリアズル-B、
 ピクトリアズル-Rなどのロイコ型誘導体が挙げられる。この中でも、クリ
 スタバイオレット、ゲンチアバイオレット、メチルグリーン、アラカイ
 トグリーンが好ましく、クリスタルバイオレット、ゲンチアバイオレット

がより好ましい。

[0041] トリアリールメタン系色素の他に、キノリン系色素である4-(p-ジメチルアミノスチリル)キノリン、フェノチアジン系色素であるフェノチアジン、ベンゾイルロイコメチレンブルー、フェノキサジン系色素であるフェノキサジンなどのロイコ型誘導体が挙げられる。ただし、多重鎖核酸と接触し発色すればこれらの色素に限定されない。

[0042] 発色状態にある色素と反応し、ロイコ型色素に変換させる求核剤としては、例えば、亜硫酸ナトリウム等の亜硫酸イオン含有物、亜硫酸水素ナトリウム等の亜硫酸水素イオン含有物、硝酸ナトリウム等の硝酸イオン含有物、亜硝酸ナトリウム等の亜硝酸イオン含有物、ナトリウムシアニド等のシアニドイオン含有物、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、ヒドリド求核剤等の求核剤が使用可能であるが、ロイコ型に変換可能であり、多重鎖核酸との相互作用により発色型に再変換可能であれば特に限定されない。

[0043] ハロゲン化物イオンとしては、例えば、フッ化物イオン、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン等が挙げられる。

[0044] 窒素求核剤としては、例えば、アンモニア、メチルアミン、n-プロピルアミン、ジメチルアミン、ベンジルアミン、N-メチルベンジルアミン、アニリン、n-ヘプチルアミン、1-アミノデカン、1,3-ジアミノプロパンなどのアミン系求核剤；アセチルアミド等のアミド系求核剤；ジアセチルイミド、ジホルミルイミド、フタルイミド、フタルイミドの金属塩等のイミド系求核剤；ベンゼンスルホニルアミド、p-ニトロベンゼンスルホニルアミド、o-ニトロベンゼンスルホニルアミド、m-ニトロベンゼンスルホニルアミド、p-トルエンスルホニルアミド等のスルホニルアミド系求核剤等が挙げられる。

[0045] 硫黄求核剤としては、例えば、チオール、ジスルフィド、又はチオ尿素が挙げられる。

[0046] アルカリ金属アルコキシドとしては、例えば、ナトリウムメトキシド、ナト

リウムエトキシド、カリウム第3級ブトキシド等が挙げられる。

[0047] アルカリ金属水酸化物としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等が挙げられる。

[0048] ヒドリド求核剤とは、求核剤として水素供与することができる試薬を意味し、例えば、トリアセトキシヒドロほう酸ナトリウム、水素化ほう素ナトリウム、テトラヒドロほう酸リチウム、ピリジンボラン錯体、テトラヒドロフランボラン錯体、2-ピコリンボラン錯体、硫化ジメチルboron錯体、シアノ水素化ほう素ナトリウム、水素化トリエチルほう素リチウム、水素化リチウムアルミニウム、Red-Al〔水素化ビス(2-メトキシエトキシ)アルミニウムナトリウム〕、Li-Selectride〔水素化トリ(sec-ブチル)ほう素リチウム〕、K-Selectride〔水素化トリ(sec-ブチル)ほう素カリウム〕、DIBAL-H(水素化ジイソブチルアルミニウム)等が挙げられる。

[0049] 求核剤としては、具体的には、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、n-プロピルアミン、メルカプトエタノール、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが好ましく、亜硫酸ナトリウム、メルカプトエタノール、水酸化ナトリウムがより好ましい。

[0050] 色素と求核剤との組み合わせとしては、クリスタルバイオレットと亜硫酸ナトリウム、ゲンチアナバイオレットと亜硫酸ナトリウム、クリスタルバイオレットと水酸化ナトリウム、メチルグリーンと2-メルカプトエタノール、メチルグリーンと亜硫酸ナトリウム、マラカイトグリーンと亜硫酸ナトリウムの組み合わせが好ましく、これらの中でも、クリスタルバイオレットと亜硫酸ナトリウム、ゲンチアナバイオレットと亜硫酸ナトリウム、メチルグリーンと亜硫酸ナトリウムの組み合わせがより好ましい。

[0051] 発色性のロイコ型色素を多重鎖核酸と接触させる工程では、発色性のロイコ型色素が多重鎖核酸と接触して、両者に反応が生じれば、どのように接触させてもよい。

[0052] ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によって呈する色調の可視光下での

検出では、紫外線のような、可視光ではない光を照射することなく、一般的な実験室における照明のような可視光下で色調を検出する。可視光であれば、紫外線照射する場合のように特別な装置が必要ではなく、簡便に検出することができる。

[0053] 多重鎖核酸検出の最も簡単な方法は、ロイコ型色素と多重鎖核酸との接触による色調の変化を目視で観察することである。ここで、目視での観察とは、ロイコ型色素と多重鎖核酸が結合した場合の色調の変化、又は、多重鎖核酸と結合していないロイコ型色素の色調の変化を目視で観察することをいう。可視光下での色調の変化に基づき、多重鎖核酸の存在の有無を確認できる。

[0054] 色調の変化とは、具体的には、可視光下で色の種類が変化すること（可視光波長）、又は、色の濃淡が変化すること（反射率）などが挙げられるが、可視光で検出できるものであればこれらに限定されない。色の種類の変化としては、例えば、赤紫色から水色への変化、及び黄色から赤紫色への変化が挙げられる。

[0055] また、試料溶液の可視光領域の吸光度を測定することによっても、核酸を検出することができる。ここで、可視光とは特に380nm～800nmの波長の光を指す。測定波長は使用する色素によって適宜設定すればよい。また、吸光度測定により、試料中の核酸濃度を定量することも可能である。その他、色素と核酸による不溶性の沈殿物を生じる場合、フィルターやメンブレンを用いて検出してもよいし、遠心分離により沈殿を検出することも可能である。また、核酸の有無の判定を容易にするように他の色調の色素を混合しても良い。

[0056] 上記の検出方法では、検体に含まれる多重鎖核酸を検出することができるが、検体は多重鎖核酸を含んでいれば特に限定されない。核酸増幅法の反応液だけでなく、微生物や動物細胞、或いは植物細胞からの抽出液でも構わないし、食品からの抽出液も好適に使用できる。

[0057] 核酸増幅法としてはPCR法に代表される核酸配列を増幅させるものであればどのようなものでもかまわない。例えば、PCR法以外に、LCR（L i

gase Chain Reaction) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法、RCA (Rolling Circle Amplification) 法、CPT (Cycling Probe Technology) 法、Q-Beta Replicase Amplification Technology 法、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic Acids) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA) 法、NASBA (Nucleic acid Sequence-based Amplification method) 法、及びTMA (Transcription mediated amplification method) 法等の公知の方法が例示できるが、これらに限定されるものではない。Q-Beta Replicase Amplification Technology 法、RCA 法、NASBA 法、SDA 法、TMA 法、LAMP 法、ICAN 法などは一定温度で増幅反応を行う方法であり、その他のPCR 法やLCR 法などは温度サイクリングで増幅反応を行うものである。また、RNA を逆転写酵素等によりDNA に逆転写し、このDNA を鋳型として上記の核酸増幅法を使用すれば間接的にRNA を検出することが可能である。

[0058] 核酸増幅法の増幅産物である多重鎖核酸を検出する際は、核酸増幅反応後の反応液にロイコ型色素を添加することが好ましいが、核酸増幅反応の前に、あらかじめロイコ型色素を反応液に添加してもよい。

[0059] また、ロイコ型色素は、多重鎖核酸を含む検体に単独で添加してもよいし、安定化剤との混合物の形で添加することも可能である。

[0060] 安定化剤とは、ロイコ型色素が発色することを防ぐ化合物を意味し、例えば、還元剤やアミン、チオール化合物等であるが、発色を防止できればこれらに限定されない。安定化剤は単独で添加しても良いし、複数を組み合わせて

添加しても良い。

[0061] さらに、ロイコ型色素は、多重鎖核酸を含む検体に直接添加しても良いし、発色状態にある色素を求核剤等で処理してロイコ型色素に変換後に添加しても良い。あるいは、発色状態にある色素と求核剤の混合物を添加してもよい。例えば、クリスタルバイオレットと亜硫酸ナトリウムとを混合してロイコ型に変換後、この混合液を用いて多重鎖核酸を目視検出可能である。発色状態にある色素と求核剤の混合液は、ロイコ型色素が不安定で単離困難である場合、特に有効な使用法となる。

[0062] 核酸を含む検体へのロイコ型色素の添加量は、着色が確認できれば特に限定されるものではないが、終濃度は、通常10%以下であり、好ましくは1%以下であり、さらに好ましくは0.1%以下である。

[0063] 核酸検出後の着色した検体液は、他の分子生物学的な操作にそのまま使用することも可能である。そのような分子生物学的な操作には、制限酵素処理、シーケンス反応、PCRの様な酵素反応や、電気泳動による確認操作等が含まれる。

[0064] 2. 核酸検出デバイス及びキット

本発明は、また、(d) ロイコ型色素を保持する担体、(e) 検体が担体(d)を通過する経路、及び(f) 検体とロイコ型色素との相互作用によって呈する色調の変化を可視光で検出し、多重鎖核酸の存在を判定する部位を有する多重鎖核酸検出デバイス又はキットに関する。

[0065] ロイコ型色素を保持した担体(d)の素材としては、色素を保持でき、核酸を含む検体が通過できるものであれば特に限定はない。好ましい具体例としては、不織布、濾紙、ガラスファイバー濾紙、ガラス繊維布、ガラスフィルター、ニトロセルロースフィルター、ポリエチレンやポリプロピレン等からなる多孔質材などが挙げられる。担体(d)へのロイコ型色素の固定は、物理的吸着又は化学的結合等、公知の方法で行うことができる。物理的吸着としては、例えば、一定量の色素溶液に担体を含浸した後に乾燥する乾燥吸着等が挙げられる。

[0066] 担体 (d) に保持されるロイコ型色素の量は、色調の変化を可視光で検出することが可能であれば特に制限されないが、核酸を含む検体との混合後の色素の終濃度が、好ましくは 10% 以下であり、より好ましくは 1% 以下であり、さらに好ましくは 0.1% 以下である。

[0067] ロイコ型色素を保持する担体 (d) を検体が通過する際に、検体中に多重鎖核酸が含まれる場合、多重鎖核酸とロイコ型色素との相互作用により、ロイコ型色素から脱離基が解離して色調の変化が生じる。ここで、相互作用とは、例えば、ペプチド結合やジスルフィド結合のような共有結合、イオン結合、配位結合、ファンデルワールス結合、 $\pi-\pi$ 相互作用のような非共有結合、挙げられるが、これに限定されない。

[0068] 担体 (d) における多重鎖核酸とロイコ型色素との相互作用は、多重鎖核酸と担体との親和性や、担体の吸湿性によっても影響を受ける。したがって、これらの担体は、多重鎖核酸の非特異的吸着や、吸湿性を調整するために、表面を親水性重合体や界面活性剤で被覆したり、含浸させたりしてもよい。

[0069] 検体が担体 (d) を通過する経路 (e) とは、本発明のデバイス又はキットにアプライされた検体が移動する経路のことをいう。経路とは、検体の移動が誘導されるようなものであれば特に限定されず、溝が形成されていても良いか、必ずしも必要ではない。経路 (e) は、担体 (d) 及び判定部位 (f) と連結しており、検体は、経路 (e) に沿って、担体 (d) 及び判定部位 (f) へ移動することができる。経路 (e) の素材としては、多重鎖核酸を含む検体が通過できるものであれば特に限定はない。

[0070] 検体と色素との相互作用による色調の変化を可視光下で検出し、多重鎖核酸の存在を判定する判定部位 (f) とは、担体 (d) を通過した検体が経路 (e) を移動して到達する部位をいう。

[0071] 判定部位 (f) における色調の変化を可視光で検出することにより、多重鎖核酸の有無を UV 照射装置や蛍光検出器等の特別な機器を使用することなく判定することができる。

[0072] 判定部位 (f) の素材としては、多重鎖核酸を含む検体が通過又は吸収され

得るものであれば特に限定はない。好ましい具体例としては、不織布、濾紙、ガラスファイバー濾紙、ガラス繊維布、ガラスフィルター、ニトロセルロースフィルター、ポリエチレンやポリプロピレン等からなる多孔質材などが挙げられる。これらの素材は、適度な吸湿速度を有するとともに、多重鎖核酸が着色して発色した際の目視確認性に優れるなどの利点を有する。

[0073] さらに、多重鎖核酸の量に応じた呈色の度合いを示す対比表を作成すれば、検体中の多重鎖核酸濃度を推定することも可能である。また、濃度を規定した標準核酸を用いて検量線を作成しておけば、分光光度計や色差計、反射計等の汎用的な分析機器を使用して、試料中の多重鎖核酸量を定量することも可能である。

[0074] 多重鎖核酸検出デバイス又はキットへの、検体のアプライ方法には特に制限はないが、検体は、例えば滴下や浸漬、又は吸引や遠心でアプライされる。また、検体の添加後、別途溶媒で展開することも可能である。溶媒で展開する場合、使用する溶媒は色素の色調に影響を与えるものでなければ特に限定されるものではないが、水や緩衝液などが挙げられる。本発明の多重鎖核酸検出デバイス又はキットには試料添加部位を別に設けてもよい。また、検体を、ロイコ型色素を保持した担体（d）に直接アプライすることも可能である。

[0075] なお、上記の担体（d）にはロイコ型色素を単独で保持させても良いし、ロイコ型色素と安定化剤とを保持させることもできる。安定化剤としてはアミン、チオール、還元剤等が使用できるが、ロイコ型色素の自然発色を抑制できればこれに限定されない。さらに、ロイコ型色素を直接担体に保持させるのではなく、発色状態にある色素と反応してロイコ型に変化させる化合物を混合し担体に共存させることも可能である。発色状態にある色素と反応してロイコ型に変化させる化合物としては、亜硫酸イオン、亜硫酸水素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、シアニドイオン、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、ヒドリド求核剤等の求核剤が挙げられるが、これらに限定されない。また、担

体（d）の下流及び／又は上流側に安定化剤や他種の色素を保持した担体を配置することも出来る。この場合、担体（d）と（e）とは、互いに接触していてもよいし、非接触であってもよい。また、両担体の中間及び／又はその前後に別の担体を配置することもできる。さらに必要であれば検体をアプラインする領域や呈色を判定する領域等を別に備えることも可能である。

[0076] 担体を配置するための基材となる部材は、担体を保持できるものであれば特に限定されず、例えばプラスチック、紙、ガラスなどの材質を用いることができる。また、表面に粘着性を有していてもよい。

[0077] 上記の多重鎖核酸検出デバイス又はキットによれば、多重鎖核酸とロイコ型色素との反応による発色により、多重鎖核酸を迅速かつ簡便に検出することが可能である。

[0078] 本態様における多重鎖核酸検出デバイス又はキットの形態の具体例を、図1～4に示す。

[0079] 図1には、クロマト型多重鎖核酸検出デバイスを示す。この検出デバイスは、ロイコ型色素を保持した担体1、試料添加部位2、判定部位3を基材となる部材4の上に、粘着剤等を用いて張り合わせたものである。

[0080] 図2には、フィルター型多重鎖核酸検出デバイスを示す。図2のデバイスでは、検体は支持体5の内部にアプラインされ、担体1に保持されたロイコ型色素に接触しながら、検体収容容器6に収容される。上記構成によれば、検体収容容器6に収容された検体溶液の色調により、検体に含まれる多重鎖核酸の有無又は量を判定することができる。検体のフィルター型担体中の通過を、遠心や、加圧等によって行えば、非常に迅速にかつ簡便に多重鎖核酸の有無又は量を判定できる。

[0081] 図3には、吸引型多重鎖核酸検出デバイスを示す。図3に示した検出デバイスは、ロイコ型色素を保持した担体1、及び、吸引用具からなる支持体7により構成される。図3では、吸引用具からなる支持体としてマイクロピペット用のチップを例示しており、この場合には上部口にマイクロピペッターを装着して吸引口から検体を吸引する。本形態はマイクロピペット用のチップ

に限定されるものではなく、パスツールピペットや、駒込ピペットなどのピペット類、キャピラリー、注射器等が好適に使用できる。この構成によれば、それぞれの担体を備える吸引用具を使用して検体を吸引することにより、多重鎖核酸の有無を、色素の色調によって、極めて迅速かつ簡便に目視検出することが可能である。

[0082] 図4には、流路型多重鎖核酸検出デバイスを示す。図4に示した流路型デバイスは、ロイコ型色素を保持した担体1が流路を切ったチップ8に配置されることを特徴とする。このチップには、核酸精製や核酸増幅などを目的とした仕組みが備わっていてもよい。本形態の検出デバイスにおいて、試料添加部位9にアプライされた検体は、流路10を移動して担体1を通過し、最後に判定部位14に到達する。多重鎖核酸の有無又は量は、判定部位14における呈色を可視光下で観察し、目視で判定することにより、判断できる。なお、流路10の形状は特に限定されず、例えば直線や曲線であってもよい。図4に示すように、チップ8の上に流路と担体の複数の組み合わせを保持し、流路の長さにより、検体が判定部位14に到達するまでの流路10の通過時間に差をつける工夫をすることも可能である。チップ8が核酸増幅を目的とする仕組みを有する場合、検体の通過時間の差により核酸の増幅量に差をつけ、段階的な核酸の増幅、及びその産物の検出を行うことができる。

[0083] 3. 核酸検出デバイス及びキット

本発明は、また、(g) ロイコ型色素を保持し、外力により開口し、ロイコ型色素を放出する開口部を備えた担体、(h) 放出されたロイコ型色素を判定部位へ導く経路、及び(i) 導入された検体を保持し、担体(g)から経路(h)を経由して導入されたロイコ型色素と保持された検体との反応により生じる色調の変化を可視光で検出し、多重鎖核酸の存在を判定する判定部位を有する多重鎖核酸検出デバイス又はキットに関する。

[0084] ロイコ型色素を保持し、外力により開口し、ロイコ型色素を放出する開口部を備えた担体(g)の素材としては、ロイコ型色素を一定期間安定に保持できるものであれば特に限定されない。担体(g)にはロイコ型色素が充填さ

れており、ロイコ型色素を放出する開口部は通常は閉じられており、外力により担体（g）が開口した場合にのみロイコ型色素が放出される。ここで、外力とは、担体の開口を可能とするものであれば特に限定されず、例えば指による押し下げや、機械による押し下げが挙げられる。外力による開口の態様は、ロイコ型色素を放出できれば特に限定されないが、例えば、ロイコ型色素を保持する膜の破壊が挙げられる。本態様のデバイス又はキットは、担体（g）の開口を容易にするために針状構造を備えていてもよい。

[0085] 放出されたロイコ型色素を判定部位へ導く経路（h）とは、上記担体（g）から放出されたロイコ型色素が通過する経路のことをいう。経路（h）の形状・材質は、ロイコ型色素が通過できるものであれば特に限定されない。例えば、放出されたロイコ型色素が、重力により落下して判定部位（i）に到達する場合には、経路（h）はロイコ型色素の落下を阻害しないものであればよい。

[0086] 導入された検体を保持し、担体（g）から経路（h）を経由して導入されたロイコ型色素と保持された検体との反応により生じた物質を可視光下で観察し、多重鎖核酸の存在を目視で判定する判定部位（i）は、本発明の第一の態様に係る多重鎖核酸の検出デバイス又はキットで説明したとおりである。

[0087] 本態様における多重鎖核酸検出デバイスの形態の具体例を、図5に示す。

[0088] 図5には、チューブ型多重鎖核酸検出デバイスを示す。このチューブ型デバイスには、外部からの物理的作用により核酸溶液に色素を添加させる仕組みを持つものも含まれる。例えば、図5においてチューブ13の蓋部分に、膜によってロイコ型色素11を保持し、蓋に仕込まれた針状構造12を介して、例えば指で押すなどの外部からの物理的作用により膜を破ることによってロイコ型色素11をチューブ下部に滴下し、チューブ下部の検体に含まれる多重鎖核酸を染色することができる。

[0089] 本発明において、多重鎖核酸検出キットとは、多重鎖核酸を特異的に発色するロイコ型色素を含む溶液からなる検出用ユニットに加え、各種試薬や器具等を備えた形態を指す。上述のデバイスをさらに加えたものもキットとみな

す。前記各種試薬には目的核酸を増幅するためのプライマー、DNAポリメラーゼ、核酸増幅反応に用いられる緩衝液や制限酵素等が含まれる。

[0090] これらのデバイスを使用して得られた、多重鎖核酸を含む着色した検体を、他の分子生物学的な操作にそのまま使用することも可能である。そのような分子生物学的な操作には、制限酵素処理、シークエンス反応、PCRの様な酵素反応や、電気泳動による確認操作等が含まれる。

[0091] また、検体を自動的に処理し、塩基配列等を解析する装置に本発明の多重鎖核酸検出デバイスを組み込むことも可能である。例えば、核酸精製・増幅装置に本発明の核酸検出デバイスを組み込むことによって核酸の有無を判定したり、DNA自動解析装置に組み込むことによって、確実にPCRで増幅・ラベルされたサンプルのみを選別し、解析を行ったりすることも可能である。

実施例

[0092] 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。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。

[0093] (実施例1) ロイコ型色素(1)を用いたPCR産物の検出

(1) ロイコ型色素(1)の合成

クリスタルバイオレット500mgを水に溶解後、n-プロピルアミン200mgを添加し、30分撹拌した。生じた沈殿を乾燥し、ロイコ型色素(1)(1, 1-tris(4-N, N-dimethylamino)phenyl)-N-amino propane) 450mgを得た。

[0094] (!!) PCR産物の調製

鑄型として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以下のプライマーF: 5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'及びプライマーR: 5'-CTATGCGGCATCAGAGCAG-3'を設計した。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、ExTag PCRキット(タカラバイオ社製)の説明書に従

い、 $100\mu\text{l}$ 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ズ社製））にセットし、 95°C で5分間熱処理後、 95°C で30秒、 55°C で30秒、 72°C で30秒のサイクルを35回行い、目的の約330bpの増幅を行い、ポジティブコントロールとした。また、ExTaq DNAポリメラーゼ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。

[0095] (iii) PCR産物の検出

ポジティブコントロール、及びネガティブコントロール $50\mu\text{l}$ に、上記で合成したロイコ型色素(1) $2\mu\text{g}$ を添加し色調変化の観察及び、吸光度（ $A_{590\text{nm}}$ ）の測定を行った。その結果を表1に示した。

[0096] (比較例1)

ロイコ型色素のかわりにゲンチアナバイオレットを使用した以外は実施例1と同様の方法でPCR産物の検出を行った。その結果を表1に示した。

[0097] (実施例2) ロイコ型色素(1)を用いたLAMP産物の検出

(i) LAMP法産物の調製

「Loopamp (R) サルモネラ検出試薬キット」（栄研化学社製）を使用し、LAMP法による核酸増幅反応液を調製した。 $10\mu\text{l}$ のControl DNA Salと $40\mu\text{l}$ のマスターMix (Reaction Mix, SalとBst DNA Polymeraseを容量比で20:1の割合で別途混合したもの)を混合し、 65°C で1時間反応後、さらに、 80°C で20分反応することで、核酸が増幅された反応液（ポジティブコントロール）を調製した。また、 $10\mu\text{l}$ のControl DNA Salと $40\mu\text{l}$ のReaction Mix, Salを混合し、 65°C で1時間反応後、さらに、 80°C で20分反応することで、核酸が増幅されていない反応液（ネガティブコントロール）を調製した。

[0098] (ii) LAMP法産物の検出

検体としてLAMP法産物を使用した以外は、実施例1と同様に行った。そ

の結果を表 1 に示した。

[0099] [表1]

	実施例1		比較例1		実施例2	
	PCR		PCR		LAMP法	
核酸増幅	—	+	—	+	—	+
吸光度(590nm)	0.013	0.456	0.510	0.537	0.024	0.421
色調	無色	青紫	青紫	青紫	無色	青紫
目視検出	可		不可		可	

[0100] 実施例 1 において、P C R による核酸増幅が有るポジティブコントロールの場合は、ロイコ型色素の添加後すぐに青紫色に変化した。一方、P C R による核酸増幅が無いネガティブコントロールの場合、ロイコ型色素の添加による着色が認められず、核酸増幅の有無を目視にて容易に判別することが可能であった。また、色素による検出に要した時間は 1 分以内であった。

[0101] 比較例 1 では、核酸増幅の有無にかかわらず青紫色を呈してしまい、核酸の有無を判定することは困難であった。

[0102] 実施例 2 において、L A M P 法による核酸増幅が有るポジティブコントロールの場合は、ロイコ型色素の添加後すぐに青紫色に変化した。一方、L A M P 法による核酸増幅が無いネガティブコントロールの場合、ロイコ型色素の添加による着色が認められず、核酸増幅の有無を目視にて容易に判別することが可能であった。また、色素による検出に要した時間は 1 分以内であった。

[0103] (実施例 3) メチルグリーンを用いた多重鎖核酸の検出

0. 2%メチルグリーン水溶液 100 μ l と 2-メルカプトエタノール 50 μ l を混合し、室温で 10 分間反応した。実施例 1 及び 2 と同様の方法で、P C R 産物及び L A M P 法産物を調製した。それぞれの核酸増幅産物のポジティブコントロール、及びネガティブコントロール 50 μ l に、上記の混合液 2 μ l を添加し、色調変化の観察を行った。その結果を表 2 に示した。

[0104]

[表2]

	実施例3			
	PCR		LAMP法	
核酸増幅	－	＋	－	＋
吸光度(630nm)	0.013	0.256	0.021	0.338
目視検出	可		可	

[0105] PCR、LAMP法による核酸増幅が有るポジティブコントロールの場合は、メチルグリーンと2-メルカプトエタノールからなる混合液を添加後すぐに青緑色に変化した。一方、核酸増幅が無いネガティブコントロールの場合、混合液の添加による着色が認められず、核酸増幅の有無を目視にて容易に判別することが可能であった。また、色素による検出に要した時間は1分以内であった。

[0106] (実施例4) ゲンチアナバイオレットBを用いた多重鎖核酸の検出

0.2%ゲンチアナバイオレットBの50%エタノール溶液と、6%亜硫酸ナトリウム水溶液を等容量ずつ混合した。PCR反応液とLAMP法反応液を実施例1及び2と同様の方法で調製した。それぞれの核酸増幅産物のポジティブコントロール、及びネガティブコントロール50 μ lに、上記で調製した混合液1 μ lを添加後の色調変化の観察を行った。その後、590nmにおける吸光度を測定した。その結果を表3に示した。

[0107] [表3]

	実施例4			
	PCR		LAMP法	
核酸増幅	－	＋	－	＋
吸光度(590nm)	0.013	0.389	0.015	0.442
色調	無色	青紫	無色	青紫
目視検出	可		可	

[0108] PCR及びLAMP法による核酸増幅が有るポジティブコントロールの場合は、混合液の添加後すぐに青紫色に変化した。一方、核酸増幅が無いネガティブコントロールの場合、混合液の添加による着色が認められず、核酸増幅

の有無を目視にて容易に判別することが可能であった。また、色素による検出に要した時間は1分以内であった。

[0109] (実施例5) 吸引型デバイスの作製

実施例1で合成したロイコ型色素(1)の0.2%溶液を調製し、この溶液1 μ lを円形に打ち抜いた多孔質ポリエチレンシート(気孔径50 μ m、厚さ1.5mm、直径1.5mm)に含浸した。これを室温で乾燥させて、色素を保持した担体とした。前記担体を、図3に示したように、200 μ l用のピペットチップの先端に充填し、吸引型デバイスを作製した。

[0110] (実施例6) 吸引型デバイスによる多重鎖核酸の検出

PCR産物とLAMP法産物をそれぞれ実施例1及び2と同様の方法で調製し、ポジティブコントロール、及びネガティブコントロールを準備した。実施例5で作製した吸引型デバイスをマイクロピペットに装着し、それぞれの検体100 μ lを吸引し、ピペットチップ内の検体溶液の色調を観察した。その結果を表4に示した。

[0111] (実施例7) 吸引型デバイスの作製

0.2%ゲンチアナバイオレットと6%亜硫酸ナトリウムを等容量ずつ混合し、この混合液1 μ lを円形に打ち抜いた多孔質ポリエチレンシート(気孔径50 μ m、厚さ1.5mm、直径1.5mm)に含浸した。これを室温で乾燥させて、色素を保持した担体とした。前記担体を、図3に示したように、200 μ l用のピペットチップの先端に充填し、吸引型デバイスを作製した。

[0112] (実施例8) 吸引型デバイスによる多重鎖核酸の検出

PCR産物とLAMP法産物をそれぞれ実施例1及び2と同様の方法で調製し、ポジティブコントロール、及びネガティブコントロールを準備した。実施例7で作製した吸引型デバイスをマイクロピペットに装着し、それぞれの検体100 μ lを吸引し、ピペットチップ内の検体溶液の色調を観察した。その結果を表4に示した。

[0113]

[表4]

	実施例6				実施例8			
	PCR		LAMP法		PCR		LAMP法	
核酸増幅	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋
色調	無色	青紫	無色	青紫	無色	青紫	無色	青紫
目視検出	可		可		可		可	

[0114] 実施例6において、PCR法及びLAMP法による核酸増幅が有る場合、チップ内の検体液は青紫色を呈し、一方、増幅核酸が存在しない場合は、無色透明であった。吸引型デバイスを用いた増幅核酸の検出に要した時間は僅か数秒であり、迅速かつ簡便に目視による判定が可能であった。

[0115] 実施例8においても、PCR法及びLAMP法による核酸増幅が有る場合、チップ内の検体液は青紫色を呈し、一方、増幅核酸が存在しない場合は、無色透明であった。吸引型デバイスを用いた増幅核酸の検出に要した時間は僅か数秒であり、迅速かつ簡便に目視による判定が可能であった。

[0116] (実施例9) 着色後のサンプルを用いた処理の検討

実施例1及び3と同様の方法で、PCR産物の着色を行い、着色後のサンプルを用いて、電気泳動、PCR、制限酵素処理、シーケンス反応を行った。その結果、本発明による核酸の着色は後処理に影響することなく、全て良好に実施することが可能であった。

符号の説明

- [0117] 1. 多重鎖核酸と接触することで発色するロイコ型色素を保持した担体
 2. 試料添加部位（グラスファイバー濾紙）
 3. 判定部位（濾紙）
 4. 基材
 5. 担体を保持する支持体
 6. 検体収容容器
 7. ピペットチップ
 8. 流路を有するチップ

9. 試料添加部位

10. 流路

11. 色素

12. 針状構造

13. チューブ

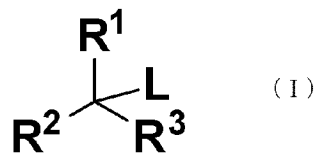
14. 判定部位

請求の範囲

[請求項1] 発色性のロイコ型色素を多重鎖核酸と接触させる工程を含み、
ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によって呈する色調を可視光
で検出することを特徴とする多重鎖核酸の検出方法。

[請求項2] ロイコ型色素が、一般式（I）：

[化1]



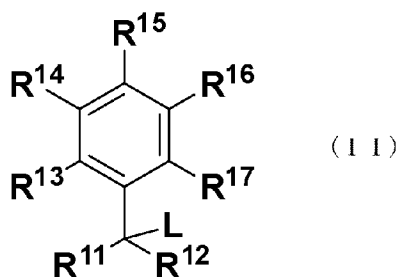
（式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立に置換又は無置換のアリール基を表す。Lは、 $-\text{SO}_3\text{R}^4$ 、 $-\text{NO}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^6)(\text{COR}^7)$ 、 $-\text{SR}^8$ 、 $-\text{SSR}^9$ 、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{NHSNH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、又は、 $-\text{H}$ を表す。ここで、 R^4 はアルカリ金属又は水素原子を表す。Xはハロゲン原子を表す。 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、アルケニル基、又はアルキニル基を表す。）

で表される化合物であって、

ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によってロイコ型色素の脱離基が解離し、脱離基の解離によって可視光で検出可能な色調を呈することを特徴とする請求項1に記載の検出方法。

[請求項3] 前記一般式（I）で表される化合物が、
一般式（II）：

[化2]



(式中、Lは前記と同じ。R¹¹及びR¹²は、それぞれ独立に、置換又は無置換のアリール基を表す。R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶及びR¹⁷は、それぞれ独立に、ハロゲン原子、カルボキシル基、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、アミド基、アミノ基、アルキル基、アリール基、アルケニル基、アルキニル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基を表す。)

で表される化合物であることを特徴とする請求項2に記載の検出方法。

[請求項4] ロイコ型色素が、トリアリールメタン系色素と求核剤との反応物であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

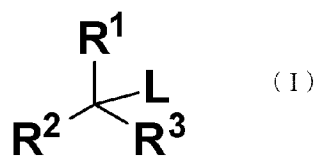
[請求項5] トリアリールメタン系色素が、ゲンチアナバイオレット、クリスタルバイオレット、メチルグリーン、マラカイトグリーン、ビクトリアブルー、パラロザニリン及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる1以上の色素である請求項4に記載の検出方法。

[請求項6] 求核剤が、亜硫酸イオン、亜硫酸水素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、シアニドイオン、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、及びヒドリド求核剤からなる群から選ばれる1以上の求核剤である、請求項4又は5に記載の検出方法。

- [請求項7] (d) ロイコ型色素を保持する担体、
 (e) 検体が担体 (d) を通過する経路、及び
 (f) 検体とロイコ型色素との相互作用によって呈する色調を可視光で検出し、多重鎖核酸の存在を判定する部位、
 を有する、多重鎖核酸検出デバイス又はキット。

[請求項8] ロイコ型色素が一般式 (I) :

[化3]



(式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立に、置換又は無置換のアリール基を表す。Lは、 $-\text{SO}_3\text{R}^4$ 、 $-\text{NO}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^6)(\text{COR}^7)$ 、 $-\text{SR}^8$ 、 $-\text{SSR}^9$ 、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{NHSNH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、又は、 $-\text{H}$ を表す。ここで、 R^4 はアルカリ金属又は水素原子を表す。Xはハロゲン原子を表す。 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、アルケニル基、又はアルキニル基を表す。)

で表される化合物であって、

ロイコ型色素と多重鎖核酸との相互作用によってロイコ型色素の脱離基が解離し、脱離基の解離によって可視光で検出可能な色調を呈することを特徴とする請求項7に記載のデバイス又はキット。

[請求項9] 担体 (d) が、トリアリールメタン系色素と求核剤との混合液を保持することを特徴とする、請求項7又は8に記載のデバイス又はキット。

[請求項10] トリアリールメタン色素が、ゲンチアナバイオレット、クリスタルバイオレット、メチルグリーン、マラカイトグリーン、ビクトリアブルー、パラロザニリン及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる1以

上の色素である請求項 9 に記載のデバイス又はキット。

[請求項11] 求核剤が、亜硫酸イオン、亜硫酸水素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、シアニドイオン、ハロゲン化物イオン、窒素求核剤、硫黄求核剤、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物、及びヒドリド求核剤からなる群から選ばれる 1 つ以上の求核剤である、請求項 9 又は 10 に記載のデバイス又はキット。