

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-198443

(P2013-198443A)

(43) 公開日 平成25年10月3日(2013.10.3)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	Z N A A	4 B O 2 9
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2012-69255 (P2012-69255)	(71) 出願人	000003078 株式会社東芝 東京都港区芝浦一丁目1番1号
(22) 出願日	平成24年3月26日 (2012. 3. 26)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100159651 弁理士 高倉 成男
		(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100109830 弁理士 福原 淑弘
		(74) 代理人	100075672 弁理士 峰 隆司

最終頁に続く

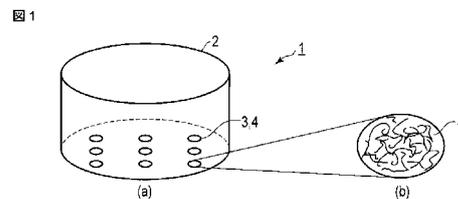
(54) 【発明の名称】 マルチ核酸反応具、マルチ核酸反応担体およびマルチ核酸反応方法

(57) 【要約】

【課題】複数種類の標的配列の増幅および/または検出反応を独立して同時に行うことのできるマルチ核酸反応具、反応担体およびマルチ核酸反応方法を提供することである。

【解決手段】実施形態によれば、マルチ核酸反応具は、液相の反応場を支持するように構成された支持体と、前記液相により前記反応場が形成された際に、前記反応場に接する前記支持体の少なくとも1つの面に独立して配置された複数のプライマー固定化領域と、前記複数のプライマー固定化領域に種類毎に遊離可能に独立して固定され、複数種類の標的配列をそれぞれに増幅するように構成された複数種類のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定化された増粘剤とを含む。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

液相の反応場を支持するように構成された支持体と、前記液相により前記反応場が形成された際に、前記反応場に接する前記支持体の少なくとも 1 つの面に独立して配置された複数のプライマー固定化領域と、前記複数のプライマー固定化領域に種類毎に遊離可能に独立して固定され、複数種類の標的配列をそれぞれに増幅するように構成された複数種類のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定された増粘剤とを具備するマルチ核酸反応具。

**【請求項 2】**

前記支持体の前記反応場を支持する面に取り付けられた被覆体を更に具備する請求項 1 に記載のマルチ核酸増幅反応具であって、前記被覆体は、前記支持体の少なくとも全てのプライマー固定化領域を含む領域に対応する部分に形成された溝部と、前記溝部の一端と他端とにそれぞれ開口する貫通孔とを有し、前記被覆体の前記溝部と前記支持体の前記反応部を支持する面とによって、反応部が形成されるマルチ核酸反応具。

10

**【請求項 3】**

更に、前記複数のプライマー固定化領域の近傍に配置された複数のプローブ固定化領域と、前記複数のプローブ固定化領域に固定化された複数のプローブ核酸とを具備する請求項 1 または 2 に記載のマルチ核酸反応具。

**【請求項 4】**

前記増粘剤が、寒天またはゼラチンである請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応具。

20

**【請求項 5】**

前記増粘剤が、前記プライマーを覆うように固定されている請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応具。

**【請求項 6】**

前記増粘剤が、前記プライマーと共に、前記プライマー固定化領域に固定されている請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応具。

**【請求項 7】**

支持体と、前記支持体の少なくとも 1 つの表面の互いに独立した複数のプライマー固定化領域に種類毎に遊離可能に固定化された、複数種類の標的配列をそれぞれに増幅するように構成された複数種類のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定化された増粘剤とを具備するマルチ核酸反応担体。

30

**【請求項 8】**

更に、前記複数のプライマー固定化領域の近傍に配置された複数のプローブ固定化領域と、前記複数のプローブ固定化領域に固定化された複数のプローブ核酸とを具備する請求項 7 に記載のマルチ核酸反応担体。

**【請求項 9】**

前記増粘剤が、寒天またはゼラチンである請求項 7 または 8 に記載のマルチ核酸反応担体。

**【請求項 10】**

前記増粘剤が、前記プライマーを覆うように固定化されている請求項 7 ~ 9 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応担体。

40

**【請求項 11】**

前記増粘剤が、前記プライマーと共に、前記プライマー固定化領域に固定化されている請求項 7 ~ 9 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応担体。

**【請求項 12】**

板状の支持体と、前記支持体の 1 つの面に固定され、軸方向に伸びる溝部を前記支持体側の面に開口する被覆体と、前記被覆体の前記溝部と前記支持体の前記 1 つの面とにより構成される流路と、前記流路の一端に開口された第 1 の貫通孔と、前記流路の他端に開口された第 2 の貫通孔と、前記流路内壁のプライマー固定化領域にそれぞれ遊離可能に固定

50

された複数のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定された増粘剤とを具備するマルチ核酸増幅反応具であって、前記複数のプライマーセットは、種類毎に独立してプライマー固定化領域に固定され、1つのプライマーセットは1つの標的核酸を増幅するための複数のプライマーを含むマルチ核酸反応具。

【請求項13】

更に、前記複数のプライマー固定化領域の近傍に配置された複数のプローブ固定化領域と、前記複数のプローブ固定化領域に固定化された複数のプローブ核酸とを具備する請求項12に記載のマルチ核酸反応具。

【請求項14】

(a) 板状の支持体と、前記支持体の1つの面に固定され、軸方向に伸びる溝部を前記支持体側の面に開口する被覆体と、前記被覆体の溝部と前記支持体の前記1つの面とにより構成される流路と、前記流路の一端に開口された第1の貫通孔と、前記流路の他端に開口された第2の貫通孔と、前記流路内壁に互いに独立して配置された複数のプライマー固定化領域と、前記複数のプライマー固定化領域にそれぞれ遊離可能に固定された複数のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定された増粘剤とを具備するマルチ核酸反応具を準備することと、

10

ここで、前記複数のプライマーセットは、種類毎に独立してプライマー固定化領域に独立して固定され、1つのプライマーセットは1つの標的核酸を増幅するための複数のプライマーを含む、

(b) 前記第1の開口部から、前記流路に対して標的核酸を含む反応液を添加することと、

20

(c) 前記標的核酸を増幅することと、  
を具備するマルチ核酸反応方法。

【請求項15】

(a) 板状の支持体と、前記支持体の1つの面に固定され、軸方向に伸びる溝部を前記支持体側の面に開口する被覆体と、前記被覆体の溝部と前記支持体面の前記1つの面とにより構成される流路と、前記流路の一端に開口された第1の貫通孔と、前記流路の他端に開口された第2の貫通孔と、前記流路内壁に互いに独立して配置された複数のプライマー固定化領域と、前記複数のプライマー固定化領域にそれぞれ遊離可能に固定された複数のプライマーセットとを具備するマルチ核酸反応具を準備することと、

30

ここで、前記複数のプライマーセットは、種類毎に独立してプライマー固定化領域に固定され、1つのプライマーセットは1つの標的核酸を増幅するための複数のプライマーを含む、

(b) 前記第1の開口部から、前記流路に対して標的核酸と増粘剤とを含む反応液を添加することと、

(c) 前記標的核酸を増幅すること、  
を具備するマルチ核酸反応方法。

【請求項16】

前記マルチ核酸反応具が更に、前記複数のプライマー固定化領域のそれぞれの近傍に配置された複数のプローブ固定化領域と、前記複数のプローブ固定化領域に固定化されたプローブ核酸とを具備し、

40

(e) 前記(c)において得られた増幅産物と前記プローブ核酸とのハイブリダイズ信号を検出すること、

を更に具備する請求項14または15に記載のマルチ核酸反応方法。

【請求項17】

前記プライマー固定化領域への前記プライマーセットが固定化された後に、前記増粘剤が、前記プライマー固定化領域に固定される請求項14～16に記載のマルチ核酸反応方法。

【請求項18】

前記プライマー固定化領域に対して、前記プライマーセットと前記増粘剤との混合物が

50

固定化される請求項 14 ~ 16 に記載のマルチ核酸反応方法。

【請求項 19】

前記反応液の添加が、10 mm / 秒以上の流速により行われる請求項 14 ~ 18 の何れか 1 項に記載のマルチ核酸反応方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、マルチ核酸反応具、マルチ核酸反応担体およびマルチ核酸反応方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、遺伝子検査技術の進展に伴い、臨床現場や犯罪捜査など、様々な場面で遺伝子検査が実施されている。これらの遺伝子検査では、複数の対象遺伝子を検出し、それらの結果を総合することで初めて有用なものとなることが多い。例えば、臨床現場では病原菌特定などが行われる。その場合、患者の症状に基づいて感染が疑われる複数種の微生物、または各微生物の型が判定される。それにより、診断が行われる。犯罪捜査現場では、例えば、個人特定などが行われる。その場合、全ての人があるゲノム上に持っている複数の遺伝子座における繰り返し配列について、繰り返しの回数が特定される。特定された複数の遺伝子座における繰り返し数から総合的に個人を特定する。それにより、高確率で個人を特定することができる。このように複数の対象遺伝子を検出する技術が非常に重要なものとなっている。

【0003】

従来、複数の対象遺伝子を検出する場合、初めに特定の反応容器内で試料核酸の増幅が行われる。その後、得られた増幅産物についての検出が更なる検出用の反応装置内において行われる。

【0004】

増幅は、主に次の複数または 1 つの反応容器内で行われる。複数の反応容器内で増幅を行う場合には、それぞれの対象遺伝子を増幅するための反応容器がそれぞれ用意される。1 つの反応容器内で増幅を行う場合には、全ての対象遺伝子を検出するための試薬が 1 つの反応容器に収納されて、マルチ核酸増幅反応が行われる。検出されるべき核酸の検出は、一般的には、増幅産物を DNA チップや電気泳動などに供することにより行われる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、複数種類の標的配列の増幅および / または検出反応を独立して同時に行うことのできるマルチ核酸反応具、反応担体およびマルチ核酸反応方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

実施形態によれば、マルチ核酸反応具は、液相の反応場を支持するように構成された支持体と、前記液相により前記反応場が形成された際に、前記反応場に接する前記支持体の少なくとも 1 つの面に独立して配置された複数のプライマー固定化領域と、前記複数のプライマー固定化領域に種類毎に遊離可能に独立して固定され、複数種類の標的配列をそれぞれに増幅するように構成された複数種類のプライマーセットと、前記プライマー固定化領域に遊離可能に固定化された増粘剤とを含む。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1】マルチ核酸増幅反応具の 1 例を示す図。

【図 2】マルチ核酸増幅反応具の 1 例を示す図。

【図 3】マルチ核酸増幅反応具の 1 例を示す図。

10

20

30

40

50

【図4】マルチ核酸増幅反応具の1例を示す図。

【図5】マルチ核酸増幅反応具の1例を示す図。

【図6】マルチ核酸増幅検出反応具の1例を示す図。

【図7】マルチ核酸増幅検出反応具の1例を示す図。

【図8】チップ素材の1例を示す図。

【図9】マルチ核酸増幅検出反応具の1例を示す図。

【図10】マルチ核酸増幅検出反応具の1例を示す図。

【図11】マルチ核酸増幅検出反応具の1例を示す図。

【図12】マルチ核酸反応具の1例を示す図。

【図13】マルチ核酸反応具により得られた実験結果を示す図。

10

【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】

#### 1. 定義

「マルチ核酸増幅」とは、増幅されるべき複数種類の標的配列を同時に増幅することをいう。「増幅」とは、プライマーセットを用いて鋳型核酸を連続して複製する工程をいう。使用可能な増幅法は、プライマーセットを用いて標的核酸を増幅する方法であればよく、これらに限定するものではないが、例えば、PCR増幅、LAMP増幅、RT-LAMP増幅、SMAAP増幅およびICAN増幅などを含む。

20

【0010】

「標的配列」とは、プライマーセットにより増幅しようとする配列をいい、使用されるプライマーが結合する領域をも含む。

【0011】

「標的核酸」とは、標的配列を少なくとも含む配列であり、使用されるプライマーセットにより鋳型として使用される核酸であり、「鋳型核酸」とも称する。

【0012】

「プライマーセット」とは、1つの標的核酸を増幅するために必要なプライマーの集合体である。例えば、PCR増幅用のプライマーセットの場合、1つのプライマーセットは、1つの標的核酸を増幅するための1種類のフォワードプライマーと1種類のリバースプライマーとを含めばよい。また例えば、LAMP増幅用のプライマーセットの場合、1つのプライマーセットは、少なくとも1つの標的核酸を増幅するためのFIPプライマー、BIPプライマーを含めばよく、必要に応じてF3プライマー、B3プライマー、LPプライマー、即ち、LFプライマーおよび/またはLBプライマーを含んでもよい。

30

【0013】

#### 2. マルチ核酸反応具

##### < 第1の実施形態 >

マルチ核酸反応具の1例を図1(a)および(b)を参照しながら説明する。このマルチ核酸反応具は、複数種類の標的核酸をマルチ増幅するためのマルチ核酸増幅反応具の例である。

40

【0014】

図1(a)は、マルチ核酸増幅反応具の1例の斜視図である。図1(a)に記載のマルチ核酸増幅反応具1は、容器形状の支持体2を有する。支持体2の底面には、互いに独立した複数の固定化領域3が配置される。図1(b)は固定化領域3の部分を拡大した模式図である。そこに示されるように、1つの固定化領域3には1つの種類のプライマーセット4が固定される。複数の固定化領域3のそれぞれには、種類毎に複数のプライマーセット4がそれぞれ固定される。

【0015】

プライマーセット4は、目的とする複数の標的核酸をそれぞれ増幅するために複数種類が用意される。1つの固定化領域3には、特定の1つの標的核酸を増幅するための1種類

50

のプライマーセット4が固定される。例えば、PCR増幅用の反応具の場合には、1つの固定化領域に、1種類の特定の標的核酸を増幅するために必要なフォワードプライマーとリバースプライマーがそれぞれ複数本で含まれる。また、LAMP増幅用の反応具の場合には、1つの固定化領域に、1種類の特定の標的核酸を増幅するために必要なFIPプライマー、BIPプライマー、必要に応じてF3プライマー、B3プライマー、及びLPプライマーがそれぞれ複数本で含まれる。

#### 【0016】

プライマーセット4は、反応場を提供するための液相と接触して遊離するように遊離可能な状態で固定化領域3に固定される。プライマーセット4の固定化領域3への固定化は、例えば、1組のプライマーセットを含む溶液を1つの固定化領域3に滴下し、その後乾燥させることにより達成することが可能である。更に、同様に、他の固定化領域3について、それぞれ所望のプライマーセット4を含む溶液を滴下および乾燥し、所望する数の複数のプライマーセットを支持体2に固定すればよい。これにより、支持体2の1つの面に独立して配置される全ての固定化領域3にプライマーセット4が固定される。しかしながら、プライマーセット4の固定化領域3への固定化は、反応場を提供するための液相と接触して遊離可能な状態で固定されればよい。従って、そのような固定化が可能なそれ自身公知の何れの固定化法が使用されてもよい。プライマーセットを含む溶液を滴下する方法の場合、プライマーセットを含む溶液は、例えば、水、緩衝液または有機溶剤などであってよい。

10

#### 【0017】

支持体2に配置される複数の固定化領域3は、互いに独立して配置されればよい。独立して配置されるとは、反応場においてプライマーセット毎に開始および/または進行される増幅を妨げることのない間隔で配置されることである。例えば、隣り合う固定化領域3は、互いに接して配置されてもよく、僅かな距離を隔てて互いに近傍に配置されてもよく、或いは、通常使用される所謂DNAチップなどの検出装置において固定化されるプローブと同様な距離を隔てて互いに配置されてもよい。例えば、隣り合う固定化領域3の間の距離は、 $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、 $1\text{mm} \sim 10\text{mm}$ 、またはそれ以上でもよく、好ましくは $100\mu\text{m} \sim 10\text{mm}$ であってよい。

20

#### 【0018】

反応場を提供するための液相は、固定されたプライマーが遊離された後に、それらを用いて増幅反応を進行できる液相であればよく、例えば、所望の増幅に必要な反応液であってよい。

30

#### 【0019】

容器形態の支持体は、例えば、チューブ、ウェル、チャンバー、流路、カップおよびディッシュ並びにそれらを複数個備えたプレート、例えば、マルチウェルプレートなどであってよい。また支持体の材質は、それ自身反応に関与しない材質であればよく、そこにおいて増幅反応を行うことが可能な材質であればよい。例えば、シリコン、ガラス、樹脂および金属などから任意に選択されてよい。また、容器形態の支持体は、商業的に入手可能な何れの容器を利用してよい。

40

#### 【0020】

図1では、固定化領域3が支持体2の底面に配置された例を示したが、これに限定するものではなく、支持体2の内部側面の少なくとも一部分に配置されてもよく、底面および内部側面、天井面のいずれか、または全てに配置されてもよい。

#### 【0021】

<マルチ核酸増幅反応具を用いた核酸の増幅反応>

図2には、第1の実施形態と同様のマルチ核酸増幅反応具21を用いた核酸増幅反応の様子を示す図である。図2(a)は反応前のマルチ核酸増幅反応具21である。支持体22の底面に配置された複数の固定化領域23に複数のプライマーセット24がそれぞれ固定されている。マルチ核酸増幅反応具21に反応液26を添加し、それを収容した状態を

50

図 2 ( b ) に示す。

【 0 0 2 2 】

反応液 2 6 は、所望の増幅反応に必要な成分を含めばよい。これらに限定するものではないが、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含んでよい。

【 0 0 2 3 】

反応液は、固定されたプライマーセットが遊離された後に、プライマーセットと標的核酸との間の増幅反応が可能な液相であればよい。この反応液は、プライマーが固定化されている反応場（最初は空気で満たされている）に対し、増幅反応開始前に機械的に若しくは人為的に、何らかの手法で注入されればよい。固定化されたプライマーが遊離された後に局所的な拡散に留まるように、増幅反応を阻害しない増粘剤を含む反応液であることが好ましい。増粘剤についての詳細は後述する。

10

【 0 0 2 4 】

図 2 ( b ) に示すように、反応液 2 6 を添加された後のマルチ核酸増幅反応具では、図 2 ( c ) に模式的に示すように、底面に固定されたプライマーが遊離し徐々に拡散する。遊離および拡散した領域を模式的に領域 2 7 で表す。遊離し、拡散していくプライマーは、その近傍に存在する鑄型核酸、ポリメラーゼおよび基質などの増幅に必要な他の成分と出会い、増幅反応が開始される。種類毎に独立して複数固定化されたプライマーセットは、その種類毎に独立して鑄型核酸について増幅反応を開始および進行することが可能である。それにより、複数種類のプライマーセットを用いた複数の鑄型配列についての増幅が、独立に、且つ同時に達成される。ここにおいて、「反応場」は、理論上、そこにおいて増幅反応の進行が可能な反応液 2 6 により規定される領域、即ち、反応液が存在する領域という。また、反応場のうち、実際にそこにおいて増幅反応が開始され進行する領域を「反応領域」という。仮に実際に増幅反応が領域 2 7 内のみで進行する場合には、領域 2 7 が反応領域と解される。

20

【 0 0 2 5 】

上記の例では、プライマーセットのみが支持体に固定化された例を示した。しかしながら、これに限定されるものではなく、プライマーセットが種類毎に各固定化領域に固定される条件において、増幅に必要な他の成分、例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素などの酵素、基質、基質および/または緩衝剤などをプライマーと共に支持体に固定してもよい。その場合、固定しようとする物質をプライマーと一緒に所望の液体媒体に含ませて、上述の方法と同様に滴下および乾燥などにより固定すればよい。そのようなマルチ核酸増幅反応具において、増幅反応を行う場合には、固定された成分に応じてそこに添加される反応液の組成が選択されればよい。

30

【 0 0 2 6 】

また、増幅反応をより効率的に達成するために、反応液の反応場への添加速度を制御する手段も有効である。例えば、プライマー固定化位置上を流れる反応液の流速は、1 mm / 秒以上が好ましく、さらには、1 0 mm / 秒以上が好ましい。これにより、固定化されたプライマーセットの遊離が影響を受けるため、プライマーセットのより局所的な拡散が可能になる。しかしながら、プライマー固定化位置上を流れる反応液の流速は、反応場を規定する支持体および他の部材により構成される反応部の形状および大きさにより、任意の値を取り得る。

40

【 0 0 2 7 】

上述した第 1 の実施形態を用いてマルチ増幅反応を行う際に、使用する反応液に増粘剤を含ませることによって、より効率よくマルチ増幅反応を達成することが可能である。

【 0 0 2 8 】

反応液に増粘剤を含ませる方法は、反応液自体に増粘剤を添加してもよく、或いは、プライマーセットを支持体に固定する際に、プライマーセットを固定するための溶液に増粘

50

剤を含ませることにより、使用されるべきプライマーセットと共にプライマー固定化領域に増粘剤を固定してもよい。或いは、プライマーを固定した後に、プライマー固定化領域に更に増粘剤を被覆することにより固定してもよい。更にまた、フィルム状の増粘剤を貼付するなどの手段でもよく、特に限定されない。

【0029】

増粘剤を、反応液に含ませることにより、固定されたプライマーセットが反応液に遊離する速度、即ち、溶出速度を低下することが可能である。それにより、プライマーセットは、より長時間に亘り局所に留まる。その結果、固定されたプライマーセット毎の反応効率に左右されずに複数のプライマーセットによるマルチ増幅がより効率的に達成される。

【0030】

増粘剤は、その比粘度がプライマーよりも大きい物質であり、且つ核酸増幅反応を阻害しない物質であることが好ましい。増粘剤の例は、樹液に由来する増粘剤、例えば、アーモンドガム、エレミ樹脂、ダンマル樹脂、アラビアガム、カラヤガム、トラガントガム、アラビノガラクトン、ガティガムおよびモモ樹脂など、豆類などの種子に由来する増粘剤、例えば、アマシードガム、グァーガム酵素分解物、タマリンド種子ガム、カシアガム、サイリウムシードガム、タラガム、カロブピーンガム＝ローカストピーンガム、サバクヨモギシードガム、トリアカンソスガム、グァーガムおよびセスバニアガムなど、海藻に由来する増粘剤、例えば、アルギン酸、フクロノリ抽出物、ファーセラランおよびカラギナンなど、果実類、葉および地下茎などに由来する増粘剤、例えば、アロエベラ抽出物、キダチアロエ抽出物、ペクチン、オクラ抽出物およびトロロアオイなど、微生物由来の増粘剤、例えば、アエロモナスガム、エンテロバクターガム、納豆菌ガム、アウレオバシジウム培養液、カードラン、プルラン、アゾトバクター・ビネランジーガム、キサンタンガム、マクロホモプシスガム、ウェランガム、ジェランガム、ラムザンガム、エルウイニア・ミツエンシスガム、スクレロガム、レバン、エンテロバクター・シマナスガムおよびデキストラン、並びに、その他増粘安定剤、例えば、酵母細胞膜、キチン、オリゴグルコサミン、微小繊維状セルロース、キトサン、微結晶セルロースおよびグルコサミンなどを含む。更に、増粘剤は、一般に飲食物添加物として使用される、例えば、寒天、大豆多糖類、ナタデココ、澱粉、コンニャクイモ抽出物、ゼラチンなどであってもよい。好ましくは、アガロースなどの寒天および/またはゼラチン、ポリエチレングリコールなどであるが、これらに限定されるものではない。

【0031】

増粘剤を反応液に添加する場合、反応液の作製時に、反応液を作製するための溶媒に対して増粘剤を直接に溶解してもよい。または、先ず、溶媒に増粘剤を溶解して作製した増粘剤溶液を用意する。別途、反応に必要な他の成分を溶媒に溶解することにより反応液を作製する。得られた増粘剤溶液と反応液とを混合してもよい。溶媒は、水、塩水および緩衝液などであってよい。

【0032】

プライマーセットを固定する溶液に増粘剤を添加する場合、増粘剤の濃度は、室温（25）で液体であり、且つ反応場に滴下可能な状態であることが好ましい。増粘剤の濃度は、例えば、終濃度30%～0.01%程度の範囲であればよい。例えばアガロースであれば、終濃度10%～0.01%の範囲であればよく、さらには、5%～0.05%の範囲が好ましく、3%～0.1%の範囲で混合することがより好ましい。プライマー固定領域に増粘剤を固定する場合も同様であってよい。

【0033】

また、反応液に増粘剤を添加する場合、増粘剤の濃度は、室温（25）で液体であることが好ましい。増粘剤の濃度は、例えば、終濃度30%～0.01%程度の範囲であればよい。例えばアガロースであれば、終濃度10%～0.01%の範囲であればよく、さらには、5%～0.1%の範囲で混合することがより好ましい。

【0034】

従来の方法では、それぞれの対象遺伝子を増幅するための反応容器を用意する方法の場

10

20

30

40

50

合、対象遺伝子数の増加に伴って、必要な反応容器の数や、検査時の作業量が増加する。また、全ての対象遺伝子を検出するための試薬を1つの反応容器に入れる場合、増幅反応効率に偏りが生じるなどの原因から、対象遺伝子数に限界がある。また、従来のマルチ増幅の場合では、複数種のプライマーセットが溶出して拡散した場合、プライマー同士の非特異結合による増幅効率の低下、または、特性の良いプライマーセットのみが優先して増幅する恐れがあり、増幅反応の感度低下、増幅種類の制限などが生じる。このような問題も本実施形態により解消される。

【0035】

< 第2の実施形態 >

上述では、反応液に増粘剤を含ませる例を示したが、反応液に増粘剤を含ませずに、少なくともプライマーセットが固定される領域に増粘剤を固定してもよい。第1の実施形態に増粘剤を固定する例を以下に記す。

【0036】

増粘剤を支持体上に固定する場合、プライマーセットの固定の前であっても、プライマーセットの固定と同時であっても、プライマーセットを固定した後であってもよい。好ましくは、増粘剤は、プライマーセットの固定と同時またはプライマーセットの固定後に支持体に固定される。

【0037】

プライマーセットの固定と同時に増粘剤を支持体に固定する場合、プライマーセットを溶解した液に対して増粘剤を溶解してもよい。或いは、先ず増粘剤を溶媒に溶解して増粘剤溶液を用意し、別途調製されたプライマーセット固定用の溶液と混合してもよい。得られたプライマーセットと増粘剤を含む溶液を、滴下および乾燥などにより固定すればよい。

【0038】

プライマーセットの固定化前または後に、増粘剤溶液を固定する場合には、増粘剤を含む溶液を滴下、スプレー、印刷、刷毛で塗布または増粘剤溶液に支持体を浸漬した後に、乾燥などによりプライマー固定化領域を含む支持体表面に固定すればよい。

【0039】

増粘剤溶液、またはプライマーセットと増粘剤とを含む溶液の乾燥方法は、ヒートブロック、ホットプレートおよびインキュベータなどを用いて、室温以上の温度で加熱することによる熱乾燥を行ってもよい。または、常温で放置し、自然乾燥を行ってもよい。或いは、真空乾燥や凍結乾燥を行ってもよい。例えばアガロースを用いる場合は、熱乾燥を行い、乾燥後の状態がフィルム状になっていることが好ましい。

【0040】

固定に用いる増粘剤溶液中の増粘剤の濃度は、固定時の状態が室温(25)で液体であり、且つ支持体上に滴下可能な状態であればよい。増粘剤を固定する際の増粘剤の濃度は、例えば、終濃度30%~0.01%程度の範囲であればよい。例えばアガロースであれば、終濃度10%~0.01%の範囲であればよく、さらには、5%~0.05%の範囲が好ましく、3%~0.1%の範囲で混合することがより好ましい。

【0041】

さらに、固定に用いる増粘剤溶液には、プライマーセットが含まれてもよく、プライマーセット以外にも、増幅反応に必要な他の物質が含まれていてもよい。

【0042】

増粘剤の使用により、マルチ増幅反応における感度低下、増幅種類の制限などが解消される。

【0043】

< 第3の実施形態 >

マルチ核酸増幅反応具の更なる1例を、図3を参照しながら説明する。

【0044】

図3は、マルチ核酸増幅反応具の更なる1例を示す平面図である。図3に記載のマルチ

10

20

30

40

50

核酸増幅反応具 3 1 は、基板を支持体 3 2 として用いる例である。支持体 3 2 の 1 つの面には、互いに独立した複数の固定化領域 3 3 が配置される。固定化領域 3 3 には、図 1 と同様に、1 つの固定化領域 3 3 には 1 つの種類のプライマーセット 3 4 が固定される。複数の固定化領域 3 3 のそれぞれには、種類毎に複数のプライマーセット 3 4 がそれぞれ固定される。1 つ固定化領域 3 3 に含まれるプライマーセット 3 4 の構成は、第 1 の実施形態と同様に 1 種類の特定の標的核酸を増幅するために必要な異なる種類のプライマーを含む。更に、固定化領域 3 3 には、プライマーセット 3 4 を覆うように増粘剤 3 5 がコーティングにより固定されている。

【 0 0 4 5 】

第 2 の実施形態を用いる増幅は、少なくとも支持体 3 2 のプライマーセット 3 4 が固定化された領域に対して、反応液を載せることにより反応場を形成すればよい。

10

【 0 0 4 6 】

固定化領域 3 3 は、支持体 3 2 表面に予め形成された凹部面、または凹部により形成される流路の内壁に配置されてもよい。

【 0 0 4 7 】

基板を支持体として使用する場合、その材質は、それ自身反応に関与しない材質であればより、そこにおいて増幅反応を行うことが可能な材質であればよい。例えば、シリコン、ガラス、樹脂および金属などから任意に選択されてもよい。また、支持体へのプライマーの固定化は、第 1 の実施形態と同様に行えばよい。

【 0 0 4 8 】

更にまた、第 2 の実施形態のマルチ核酸増幅反応具を、これを維持できる容器内に配置し、その容器内に反応液を添加することにより反応場を形成してもよい。またこの場合、支持体 3 2 の両面にプライマーセット 3 4 を固定してもよい。更に、プライマーセット 3 4 を覆うように増粘剤 3 5 がコーティングにより固定されてもよい。これにより、本マルチ核酸増幅反応具に対してより多くの種類のプライマーセットを固定することが可能になり、より多くの標的配列を増幅することが可能になる。この側面において、マルチ核酸増幅反応具は、少なくとも 1 表面に複数のプライマーセットを独立して固定した支持体であれば、どのような形状の支持体であってもよい。この場合の支持体の材質およびプライマーの固定化法は、第 1 の実施形態および第 2 の実施形態と同様であってよい。このようなマルチ核酸増幅反応具は、基体とその少なくとも 1 つの表面の互いに独立した固定化領域に種類毎に遊離可能に固定された複数種類のプライマーセットを具備するマルチ核酸増幅反応担体として用いられてもよい。この場合、基体の大きさおよび形状は実施者が任意に選択してよい。例えば、板状、球状、棒状およびそれらの一部分からなる形状であってよい。

20

30

【 0 0 4 9 】

増粘剤の固定は、プライマーセットと同時にであっても、プライマーセットの固定化の前であってもよい。また、増粘剤の固定を行わずに、反応時に反応液に増粘剤を含ませてもよい。

【 0 0 5 0 】

< 第 4 の実施形態 >

40

( 1 ) マルチ核酸増幅反応具

マルチ核酸増幅反応具の更なる 1 例を、図 4 を参照しながら説明する。図 4 に示すマルチ核酸増幅反応具 4 1 は、流路を有する支持体を使用する例である。図 4 ( a ) は平面図であり、図 4 ( b ) は、線 m - m ' で切断した断面図である。

【 0 0 5 1 】

マルチ核酸増幅反応具 4 1 は、支持体 4 2 の内部に形成された流路 4 4 の底面に配置された互いに独立した複数の固定化領域 4 3 に、種類毎に遊離可能に固定された複数のプライマーを具備する。

【 0 0 5 2 】

このマルチ核酸増幅反応具は、例えば、第 1 の基板と第 2 の基板を用いて製造される。

50

まず、第1の基板の予め決定された固定化領域43に、複数のプライマーセット44と増粘剤の混合物45が遊離可能に固定される。プライマーセット44は種類毎に固定される。この固定化は、上述したように行うことが可能である。一方で、第2の基板には、所望の流路に形状に対応させて凹部46を形成する。凹部46の形成は、使用される基板の材質に応じてそれ自身公知の方法により行うことが可能である。また、固定化領域43の配置は、第2の基板に形成された凹部46により形成される流路内に含まれるように決定される。次に、第1の基板と第2の基板を一体化する。一体化により、凹部46の内壁と第1の基板の第2の基板側の面とにより流路形状の反応部47が形成される。この時、第2の基板の凹部46が第1の基板側を向くように一体化される。また、第2の基板の凹部46の一部に貫通孔(図示せず)が設けられてもよい。この貫通孔は、流路への反応液などの出し入れ口として利用されてよい。

10

#### 【0053】

第1の基板の材質と第2の基板の材質は同じであっても、異なってよい。また、第1の基板および第2の基板の材質は、それ自身反応に関与しない材質であればよく、そこにおいて増幅反応を行うことが可能な材質であればよい。例えば、シリコン、ガラス、樹脂および金属などから任意に選択されてよい。

#### 【0054】

この実施形態では、流路を有した支持体の流路底面にプライマーセットを固定した例を示したが、流路の配置および形状はこれに限定されるものではない。また、プローブセットを固定化する面は流路を規定する何れの面であってもよく、流路を規定する全ての面にプローブセットが固定されてもよく、また複数の面に固定されてもよい。

20

#### 【0055】

或いは、予め凹部または溝を形成することにより流路を形成した第1の基板に、その流路の一部の壁面に配置されたプライマー固定化領域に対して、複数のプライマーセットを独立して固定してもよい。その後、シリコンゴムなどの蓋体を取り付けることにより、マルチ核酸増幅反応具が製造されてもよい。

#### 【0056】

##### (2) プライマー

当該プライマーの長さは、これに制限されるものではないが、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15塩基以上、約20塩基以上、約25塩基以上、約30塩基以上、約35塩基以上、約40塩基以上、約45塩基以上または約55塩基以上であってよく、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25塩基以下または約20塩基以下であってもよく、これらの下限上限の何れかを組み合わせた範囲であってもよい。例えば、好ましい塩基長の例は、約10塩基~約60塩基、約13~40塩基、約10~30塩基などであってよい。また、1つの支持体に同時に固定されるプライマーの長さは、全てのプライマーで同じであってもよく、全てのプライマーで異なってもよく、一部のプライマーが同じ長さであってもよく、一部のプライマーが異なる長さであってもよい。また、プライマーセット毎に異なってもよい。また、1つの領域に固定されるプライマーセットが、種類毎に異なる長さであってもよく、1つの領域に固定されるプライマーセットが全て同じ長さであってもよい。

30

40

#### 【0057】

##### (3) マルチ核酸増幅と検出

図5に示すように、マルチ核酸増幅反応具51は、支持体としてのチューブ52と、チューブ52の内面に独立して固定された複数のプライマーセットを備える。このようなチューブ型のマルチ核酸増幅反応具51においても複数種類の標的核酸を増幅することが可能である。その後、得られた増幅産物を異なる複数の核酸プローブ56を固定したDNAチップ55などの装置に加え検出を行うことが可能である。このように実施形態に例を示したマルチ核酸増幅反応具は、検出用サンプルの調製を従来に比べてより簡便に且つ複

50

数の増幅を独立して行うことが可能である。

【0058】

(4) マルチ核酸増幅法

例として上述したようなマルチ核酸増幅反応具を使用して、複数の標的核酸を増幅する方法も1つの実施形態として提供される。

【0059】

また、特定の容器、チューブ、ディッシュまたは流路を形成した基板などの支持体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定する工程を含むマルチ核酸増幅反応も更なる実施形態として提供される。

10

【0060】

そのようなマルチ核酸増幅反応は、例えば、所望の支持体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定することと、複数種類のプライマーセットが1つの反応場に含まれるように増幅に必要な試薬、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含む反応液を添加することと、当該プライマーが固定された支持体を加熱または冷却することによる温度調節など、増幅反応に適した反応環境を調節することと、それによりマルチ核酸増幅反応を行うこととを具備してよい。

20

【0061】

具体的な増幅反応は、増幅反応の種類に応じてそれ自身公知の技術を利用して行われてよい。

【0062】

更に、マイクロビーズ、板小片または棒などの基体の表面に対して複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定する工程を含むマルチ核酸増幅反応も更なる実施形態として提供される。

【0063】

そのようなマルチ核酸増幅反応は、例えば、所望の基体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定することと、基体を、増幅に必要な試薬、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含む反応液内に配置することと、反応液を加熱または冷却することによる温度調節など、増幅反応に適した反応環境を調節することと、それによりマルチ核酸増幅反応を行うこととを具備する。

30

【0064】

< 第5の実施形態 >

40

(1) マルチ核酸増幅検出反応具

マルチ核酸反応具は、マルチ核酸増幅検出反応具として提供されてもよい。マルチ核酸増幅検出反応具は、上述のような第1の実施形態～第4の実施形態に加えて、更にプローブ固定化領域およびそこに固定されたプローブ核酸を備える。マルチ核酸増幅検出反応具の例を次に説明する。

【0065】

マルチ核酸増幅検出反応具の1例を図6(a)、(b)および(c)を参照しながら説明する。

【0066】

図6(a)は、マルチ核酸増幅検出反応具の1例の斜視図である。図6(a)に記載の

50

マルチ核酸増幅検出反応具 6 1 は、容器形状の支持体 6 2 を有する。支持体 6 2 の底面 6 3 には、互いに独立した複数のプライマー固定化領域 6 4 が配置される。複数のプライマー固定化領域 6 4 に近接して、またそれぞれのプライマー領域に対応して複数のプローブ固定化領域 6 5 が配置される。

【 0 0 6 7 】

図 1 ( b ) はプライマー固定化領域 6 4 の断面を拡大した模式図である。そこに示されるように、1つのプライマー固定化領域 6 4 には1つの種類のプライマーセット 6 6 が固定される。複数のプライマー固定化領域 6 4 のそれぞれには、種類毎に複数のプライマーセット 6 4 がそれぞれ固定される。

【 0 0 6 8 】

プライマーセット 6 6 は、目的とする複数の標的核酸をそれぞれ増幅するために複数種類が用意される。1つのプライマー固定化領域 6 4 には、特定の1つの標的核酸を増幅するための1種類のプライマーセット 6 6 が固定される。例えば、PCR増幅用の反応具の場合には、1つのプライマー固定化領域に、1種類の特定の標的核酸を増幅するために必要なフォワードプライマーとリバースプライマーがそれぞれ複数本で含まれる。また、LAMP増幅用の反応具の場合には、1つのプライマー固定化領域に、1種類の特定の標的核酸を増幅するために必要なFIPプライマー、BIPプライマー、必要に応じてF3プライマー、B3プライマー、及びLPプライマーがそれぞれ複数本で含まれる。

【 0 0 6 9 】

プライマーセット 6 6 は、反応場を提供するための液相と接触して遊離するように遊離可能な状態でプライマー固定化領域 6 4 に固定される。プライマーセット 6 6 のプライマー固定化領域 6 4 への固定化は、例えば、1組のプライマーセットを含む溶液を1つのプライマー固定化領域 6 4 に滴下し、その後乾燥させることにより達成することが可能である。更に、同様に、他のプライマー固定化領域 6 4 について、それぞれ所望のプライマーセット 6 6 を含む溶液を滴下および乾燥し、所望する数の複数のプライマーセットを支持体 6 2 に固定すればよい。これにより、支持体 6 2 の1つの面に独立して配置される全ての固定化領域 6 4 にプライマーセット 6 6 が固定される。しかしながら、プライマーセット 6 6 の固定化領域 6 4 への固定化は、反応場を提供するための液相と接触して遊離可能な状態で固定されればよい。従って、そのような固定化が可能なそれ自身公知の何れの固定化法が使用されてもよい。プライマーセットを含む溶液を滴下する方法の場合、プライマーセットを含む溶液は、例えば、水、緩衝液または有機溶剤などであってよい。

【 0 0 7 0 】

支持体 6 2 に配置される複数のプライマー固定化領域 6 4 は、互いに独立して配置されればよい。独立して配置されるとは、反応場においてプライマーセット毎に開始および/または進行される増幅を妨げることのない間隔で配置されることである。例えば、隣り合うプライマー固定化領域 6 4 は、互いに接して配置されてもよく、僅かな距離を隔てて互いに近傍に配置されてもよく、或いは、通常使用される所謂DNAチップなどの検出装置において固定化されるプローブ核酸と同様な距離を隔てて互いに配置されてもよい。

【 0 0 7 1 】

例えば、隣り合うプライマー固定化領域 6 4 の間の距離は、 $0.1\ \mu\text{m} \sim 1\ \mu\text{m}$ 、 $1\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m} \sim 1\ \text{mm}$ 、 $1\ \text{mm} \sim 10\ \text{mm}$ 、またはそれ以上でもよく、好ましくは、 $100\ \mu\text{m} \sim 10\ \text{mm}$ であってよい。

【 0 0 7 2 】

反応場を提供するための液相は、固定されたプライマーが遊離された後に、それらを用いて増幅反応を進行できる液相であればよく、例えば、所望の増幅に必要な反応液であってよい。

【 0 0 7 3 】

容器形態の支持体 6 2 は、例えば、チューブ、ウェル、チャンバー、流路、カップおよびディッシュ並びにそれらを複数個備えたプレート、例えば、マルチウェルプレートなどであってよい。また支持体の材質は、それ自身反応に関与しない材質であればよく、そこ

10

20

30

40

50

において増幅反応を行うことが可能な材質であればよい。例えば、シリコン、ガラス、樹脂および金属などから任意に選択されてよい。また、容器形態の支持体は、商業的に入手可能な何れの容器を利用してよい。

【0074】

図1では、プライマー固定化領域64が支持体62の底面63に配置された例を示したが、これに限定するものではなく、支持体62の内部側面の少なくとも一部分に配置されてもよく、底面および内部側面、被覆体により規定される天井面のいずれか、または全てに配置されてもよい。

【0075】

図6(c)には、プライマー固定化領域64に近接して配置されたプローブ固定化領域65の拡大図である。プローブ固定化領域65には、検出されるべき所望の配列の相補配列を含むプローブ核酸67が複数で固定される。

10

【0076】

検出されるべき所望の配列は、目的配列であってよい。プローブ固定化領域65は、プローブ核酸67と目的配列鎖とのハイブリダイズ信号が、複数のプローブ固定化領域65間で独立して検出されるように配置される。

【0077】

プローブ核酸67のプローブ固定化領域65への固定は、それ自身公知の所謂DNAチップにおいて基板表面に対してプローブ核酸を固定する一般的な何れの技術を利用してよい。プローブ核酸67の固定した後にプライマー66を固定してもよく、プライマー66を固定した後にプローブ核酸67を固定してもよく、プライマー66の固定とプローブ核酸67の固定を同時に行ってもよい。

20

【0078】

例えば、隣り合うプローブ固定化領域65の間の距離は、 $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、 $1\text{mm} \sim 10\text{mm}$ 、またはそれ以上でもよく、好ましくは、 $100\mu\text{m} \sim 10\text{mm}$ であってよい。

【0079】

また例えば、プローブ固定化領域65とプライマー固定化領域64の間の距離は、 $0\mu\text{m} \sim 0.1\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ 、 $1\text{mm} \sim 10\text{mm}$ 、またはそれ以上でもよく、好ましくは、 $100\mu\text{m} \sim 10\text{mm}$ であってよい。

30

【0080】

例えば、プローブ固定化領域65とプライマー固定化領域64の間の距離が $0\mu\text{m}$ である場合には、プローブ固定化領域65とプライマー固定化領域64は、支持体表面の同じ位置にあると解されてよい。また、プローブ固定化領域65がプライマー固定化領域64に含まれてもよく、プライマー固定化領域64がプローブ固定化領域65に含まれてもよい。

【0081】

(2) マルチ核酸増幅検出反応具を用いた核酸の増幅検出方法

図7には、第5の実施形態と同様のマルチ核酸増幅検出反応具70を用いて行われた核酸増幅反応後の反応場の様子を示す模式図である。図7(a-1)および(b-1)は、反応前のマルチ核酸増幅検出反応具70である。支持体71の底面72に複数のプライマー固定化領域73が配置される。複数のプライマー固定化領域73の近傍にはプローブ固定化領域74が配置される。複数のプライマー固定化領域73には、複数のプライマーセット75がそれぞれ固定されている。それぞれのプライマー固定化領域73に対応して、それぞれの近傍に配置されたプローブ固定化領域74には、複数のプローブ核酸76が所望の種類毎に固定されている。

40

【0082】

マルチ核酸増幅検出反応具70に反応液78を添加し、それを収容した状態を図2(a-2)および(b-2)に示す。

50

## 【0083】

反応液78は、所望の増幅反応に必要な成分と増粘剤とを含めばよい。これらに限定するものではないが、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含んでよい。

## 【0084】

増粘剤は、実施例1と同様の種類の物質を同様の濃度で含めばよい。

## 【0085】

反応場への試料の添加は、マルチ核酸増幅検出反応具70に反応液78を添加する以前に反応液78に予め添加することにより行ってもよく、反応液78をマルチ核酸増幅検出反応具70に添加した後に行ってもよく、マルチ核酸増幅検出反応具70に反応液78を添加する以前に試料をマルチ核酸増幅検出反応具70に添加することにより行ってもよい。

10

## 【0086】

図7(a-2)および(b-2)に示すように反応液78を添加された後のマルチ核酸増幅検出反応具70では、図7(a-3)および(b-3)に模式的に示すように、支持体71の内部の底面72に固定されたプライマー76が遊離し、徐々に拡散する。遊離および拡散した領域を模式的に領域79で示す。遊離し、拡散していくプライマーセット76は、その近傍に存在する鋳型核酸、ポリメラーゼおよび基質などの増幅に必要な他の成分と出会い、その後、増幅反応が開始される。種類毎に独立して複数固定されたプライマーセット76は、その種類毎に独立して鋳型核酸について増幅反応を開始および進行することが可能である。それにより、複数種類のプライマーセット76を用いた複数の鋳型配列についての増幅が、独立に、且つ同時に達成される。ここにおいて、「反応場」は、理論上、そこにおいて増幅反応の進行が可能な反応液78により規定される領域、即ち、反応液が存在する領域という。また、反応場のうち、実際にそこにおいて増幅反応が開始され進行する領域を「反応領域」という。仮に実際に増幅反応が領域79内のみで進行する場合には、領域79が反応領域と解される。図7(a-3)の図は、全てのプライマー固定化領域73に固定されたプライマーセット76により増幅反応が生じた場合の模式図である。図7(b-3)は、固定されたプライマーセット76により、底面72に固定された全てのプライマー固定化領域73のうち的一部分、図7(b-3)では3つの領域のみにおいて増幅が生じた場合の模式図である。

20

30

## 【0087】

プローブ固定化領域74は、領域79において増幅された増幅産物中に目的配列を含む核酸が存在した場合、その核酸とハイブリダイズする。プローブ固定化領域74に固定されたプローブ核酸77は、対応するプライマー固定化領域73における増幅産物とのみハイブリダイズするように固定される。即ち、1つのプローブ固定化領域74に固定されたプローブ核酸77は、対応するプライマー固定化領域73における増幅産物とのみハイブリダイズするように距離を維持して、それぞれのプローブ固定化領域74およびプライマー固定化領域73が配置される。

40

## 【0088】

プローブ核酸77と目的配列鎖とのハイブリダイズの検出は、それ自身公知のハイブリダイズ信号の検出手段により行われてよい。例えば、予めプライマーセットに蛍光物質を付与してもよく、デオキシヌクレオシド三リン酸などの基質に蛍光物質を付与してもよい。それらの蛍光物質からの蛍光強度を指標にハイブリダイズの有無および量が決定されてもよい。或いは、電気化学的手段によりハイブリダイズ信号が検出されてもよい。

## 【0089】

ハイブリダイズの検出は、マルチ核酸増幅検出反応具70内部の洗浄後に実行されてもよく、洗浄を行わずに実行されてもよい。電気化学的手段により検出する場合には、インタカレータを用いてハイブリダイズ信号を検出してもよい。この場合、例えば、予め反応

50

液 7 8 にインタカレータを含ませておいてもよく、ハイブリダイズ反応が開始する前、ハイブリダイズ反応中、ハイブリダイズ反応後に添加してもよい。これらの場合、何れもマルチ核酸増幅検出反応具 7 0 内部の洗浄後に検出を行ってもよく、洗浄を行わずに検出を実行してもよい。ハイブリダイズ反応の開始、反応中、反応後の判定は、プライマー、プローブ核酸および鋳型核酸の配列、反応温度などの反応条件に応じて行ってもよく、予備実験により決定してもよい。

【 0 0 9 0 】

当該プライマーの長さは、第 4 の実施形態において記載された長さと同じでよい。

【 0 0 9 1 】

プローブ核酸の長さは、例えば、3 塩基 ~ 1 0 塩基、1 0 塩基 ~ 2 0 塩基、2 0 塩基 ~ 3 0 塩基、3 0 塩基 ~ 4 0 塩基、4 0 塩基 ~ 5 0 塩基、5 0 塩基 ~ 6 0 塩基、好ましくは 1 0 塩基 ~ 5 0 塩基であってよい。プローブ核酸は、検出されるべき目的配列の相補配列を含む。プローブ核酸は、目的配列の相補配列に加えて更なる配列例えば、スペーサ配列などを含んでもよい。

10

【 0 0 9 2 】

標的配列の長さは、例えば、1 0 塩基 ~ 1 0 0 塩基、1 0 0 塩基 ~ 2 0 0 塩基、塩基 2 0 0 ~ 3 0 0 塩基、3 0 0 塩基 ~ 4 0 0 塩基、好ましくは 1 0 0 塩基 ~ 3 0 0 塩基であってよい。

【 0 0 9 3 】

目的配列の長さは、例えば、3 塩基 ~ 1 0 塩基、1 0 塩基 ~ 2 0 塩基、2 0 塩基 ~ 3 0 塩基、3 0 塩基 ~ 4 0 塩基、4 0 塩基 ~ 5 0 塩基、5 0 塩基 ~ 6 0 塩基、好ましくは 1 0 塩基 ~ 5 0 塩基であってよい。

20

【 0 0 9 4 】

1 つのプライマー固定化領域 7 3 に固定されるプライマーセット 7 6 の種類は、1 種類の標的核酸を増幅するための 1 種類であってよく、2 種類以上の標的核酸をそれぞれ増幅するために複数種類であってよい。

【 0 0 9 5 】

1 つのプローブ固定化領域 7 4 に固定されるプローブ核酸 7 7 群の種類は、1 種類の目的配列とハイブリダイズするための 1 種類であってよく、2 種類以上の標的核酸をそれぞれ増幅するために複数種類であってよい。また、目的配列の部分が共通であり、更に他の目的配列とは異なる配列を含むプローブ核酸であってよい。

30

【 0 0 9 6 】

1 つのアレイ型マルチ核酸増幅検出反応具 7 0 に配置されるプライマー固定化領域 7 3 の数の下限は、1 以上、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、1 0 以上、1 5 以上、2 0 以上、2 5 以上、3 0 以上、5 0 以上、7 5 以上、1 0 0 以上、1 2 5 以上、1 5 0 以上、1 7 5 以上、2 0 0 以上、3 0 0 以上、4 0 0 以上、5 0 0 以上、1 0 0 0 以上、1 5 0 0 以上、2 0 0 0 以上であってよく、上限は、1 0 0 0 0 以下、5 0 0 0 以下、2 5 0 0 以下、2 0 0 0 以下、1 5 0 0 以下、1 0 0 0 以下、5 0 0 以下、2 5 0 以下、2 0 0 以下、1 5 0 以下であってよく、これらの上限下限の何れかを組み合わせた範囲であってよい。

40

【 0 0 9 7 】

1 つのマルチ核酸増幅検出反応具 7 0 に配置されるプライマー固定化領域 7 3 とプローブ固定化領域 7 4 の数は同じであって異なってもよい。即ち、全てのプライマー固定化領域 7 3 に対応するように同数のプローブ固定化領域 7 4 が配置されてもよく、プライマー固定化領域 7 3 の数がプローブ固定化領域 7 4 の数よりも多くてもよく、プライマー固定化領域 7 3 の数がプローブ固定化領域 7 4 の数よりも少なくてもよい。また、増幅反応状態を確認するため、またはハイブリダイズ反応の状態を確認するためのポジティブコントロールおよび/またはネガティブコントロールを含ませてもよい。このようなポジティブコントロールおよび/またはネガティブコントロールは、プライマーセットおよび/またはプローブ核酸について設けてよい。

50

## 【0098】

上記の例では、プライマーセット76のみが支持体71に固定化された例を示した。しかしながら、これに限定されるものではなく、プライマーセット76が種類毎に各固定化領域に固定される条件において、増幅に必要な他の成分、例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素などの酵素、基質、基質および/または緩衝剤などをプライマーセット76と共に支持体71に固定されてもよい。その場合、固定しようとする物質をプライマーセット76と一緒に所望の液体媒体に含ませて、上述の方法と同様に滴下および乾燥などにより固定すればよい。そのようなマルチ核酸増幅検出反応具70において、増幅反応を行う場合には、固定された成分に応じてそこに添加される反応液の組成が選択されればよい。

## 【0099】

また、上述の例では、増粘剤を反応液に添加する例を示したが、増粘剤を反応液に含ませずに、支持体71に固定してもよい。固定は、上述の通りに行ってもよい。

## 【0100】

支持体71は、容器形状に限定されるものではなく、上述したように、板状、球状、棒状およびそれらの一部分からなる形状であってよく、基体の大きさおよび形状は実施者が任意に選択してよい。また、第4の実施形態のように流路を有する基板を支持体71として使用することは好ましい。

## 【0101】

< 第6の実施形態 >

第6の実施形態のマルチ核酸増幅検出反応具を図8～図11を参照しながら説明する。

## 【0102】

(1) チップ素材

まず、電気化学的検出によりハイブリダイズ信号を検出するマルチ核酸増幅検出反応具のチップ素材の構成および製造方法の1例について図8(a)および(b)を用いて説明する。図8(a)は、チップ素材の平面図であり、図8(b)は、図8(a)のチップ素材の線B-Bに沿う断面図である。

## 【0103】

チップ素材91は、矩形状の基板81上にその長手方向に沿って配置された例えば4つの電極84a～84dを備えている。各電極84a～84dは、第1の金属薄膜パターン82および第2の金属薄膜パターン83をこの順序で積層した構造を有する。また、各電極84a～84dは大矩形部85と小矩形部86を細線87で連結した形状を有する。絶縁膜88は、各電極84a～84dを含む基板81上に被覆されている。円形窓89は、大矩形部85に対応する絶縁膜88部分に開口されている。矩形窓90は、小矩形部86に対応する絶縁膜88部分に開口されている。電極84aの円形窓89から露出する大矩形部85は第1の作用極92aとして機能する。電極84bの円形窓89から露出する大矩形部85は第2の作用極92bとして機能する。電極84cの円形窓89から露出する大矩形部は対極93として機能する。電極84dの円形窓89から露出する大矩形部は参照極94として機能する。また、電極84a～84dの矩形窓90から露出する小矩形部86はプローバ接触部として機能する。

## 【0104】

このようなチップ素材は、次のような方法により作製することができる。

## 【0105】

まず、基板81上に第1の金属薄膜および第2の金属薄膜を例えば、スパッタリング法または真空蒸着法によりこの順序により堆積する。続いてこれらの金属薄膜を例えば、レジストパターンをマスクとして順次選択的にエッチングして、第1の金属薄膜パターン82および第2の金属薄膜パターン83をこの順序で積層した、例えば4つの電極84a～84dを基板81の長手方向に沿って形成する。これらの電極84a～84dは、大矩形部85と小矩形部86を細線87で連結した形状を有する。

## 【0106】

次いで、電極84a～84dを含む基板81上に、絶縁膜88を例えば、スパッタリン

10

20

30

40

50

グ法またはCVD法により堆積する。続いて、各電極84a~84dの大矩形部85に対応する絶縁膜88部分および小矩形部86に対応する絶縁膜88部分をレジストパターンをマスクとして選択的にエッチングして、大矩形部85に対応する絶縁膜88部分に円形窓89を、および小矩形部86に対応する絶縁膜88部分に矩形窓90を開口する。それにより前述したチップ素材91を作製する。

【0107】

基板81は、例えば、パイレックス（登録商標）ガラスのようなガラスまたは樹脂から作られる。

【0108】

第1の金属薄膜は、第2の金属薄膜を基板81に密着させるための下地金属膜として働き、例えば、Tiから作られる。第2の金属薄膜は、例えば、Auから作られる。

10

【0109】

第1および第2の金属薄膜をパターンニングするときのエッチングの例は、エッチングガスを用いるプラズマエッチングまたは反応性イオンエッチングを含む。

【0110】

絶縁膜88は、例えば、シリコン酸化膜のような金属酸化膜、シリコン窒化膜のような金属窒化膜を挙げることができる。

【0111】

絶縁膜88をパターンニングするときのエッチングの例は、エッチングガスを用いるプラズマエッチングまたは反応性イオンエッチングを含む。

20

【0112】

(2) マルチ核酸増幅検出反応具

次に、上記(1)において製造されたチップ素材91にプライマーセットとプローブ核酸を固定したマルチ核酸増幅検出反応具の構成および製造方法の1例を図9(a)および図9(b)を参照しながら説明する。図9(a)はマルチ核酸増幅検出反応具の平面図であり、図9(b)は図9(a)のマルチ核酸増幅検出反応具の線B-Bに沿う断面図である。

【0113】

チップ素材91上に形成された電極84aの第1の作用極92aを第1のプローブ固定化領域とし、この第1のプローブ固定化領域に第1の目的配列の相補配列を含む第1のプローブ核酸95aを固定する。固定される第1のプローブ核酸95aは、その複数本を1つのプローブ核酸群として固定される。同様に、電極84bの第2の作用極92bを第2のプローブ固定化領域とし、この第2のプローブ固定化領域に第1の目的配列とは異なる第2の目的配列の相補配列を含む第2のプローブ核酸95bを固定する。

30

【0114】

プローブ核酸95aおよび95bをプローブ固定化領域に固定する方法の例は、金電極を具備したチップ素材91については3'末端にチオール基を第1のプローブ核酸96aに導入する方法などが含まれる。

【0115】

次いで、第1の作用極92aの近傍に第1のプライマー固定化領域96aを、第2の作用極92bの近傍に第2のプライマー固定化領域96bを配置する。この第1のプライマー固定化領域96a上に第1のプライマーセット98aを、第2のプライマー固定化領域96b上に第2のプライマーセット98bを固定する。それによりマルチ核酸増幅検出反応具を作製する。

40

【0116】

第1のプライマーセット98aは第1の標的配列を増幅するように設計された配列を有し、第2のプライマー固定化領域96bは第1の標的配列とは異なる配列からなる第2の標的配列を増幅するように設計された配列を有する。

【0117】

第1および第2のプライマーセット98aおよび98bをそれぞれ第1および第2のプ

50

ライマー固定化領域 9 6 a および 9 8 b への固定は、例えば、水、緩衝液または有機溶剤のような液体にプライマーセットを含ませて滴下して、その後例えば、室温などの適切な温度条件下で乾燥するまでの時間例えば、室温の場合では 10 分間放置することにより行う。

【0118】

(3) 使用時のマルチ核酸増幅検出反応具

上記(2)において作製されたマルチ核酸増幅検出反応具の使用方法について図 10 および図 11 を参照しながら説明する。

【0119】

図 10 (a) は、使用時のマルチ核酸増幅検出反応具の平面図であり、図 10 (b) は、図 10 (a) のマルチ核酸増幅検出反応具の線 B - B に沿う断面図である。

10

【0120】

本実施形態のマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 を使用する場合、電極 8 4 a ~ 8 4 d にそれぞれ形成された第 1 の作用極 9 2 a、第 2 の作用極 9 2 b、対極 9 3 および参照極 9 4、並びに第 1 のプライマー領域 9 6 a および第 2 のプライマー領域 9 6 b が同じ 1 つの反応場に含まれるように反応液が維持される。そのために、例えば、シリコンゴムのようなシリコン樹脂および/またはフッ素樹脂などのような樹脂を例えば、押出成形、射出成形または型押成形および/または接着剤による接着などのそれ自身公知の何れかの樹脂成形法により形成された被覆体 10 1 が、マルチ核酸増幅検出反応具 9 1 の使用前にマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 上に装着される。被覆体 10 1 が装着された後に、鑄型核酸 10 3 を含む反応液 10 2 がマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 と被覆体 10 1 とにより形成される空間に添加される。

20

【0121】

被覆体 10 1 が装着されたマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 において、電極 8 4 a ~ 8 4 d のそれぞれの矩形窓 9 0 から露出する小矩形部 8 6 は露出している。

【0122】

被覆体 10 1 をマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 に装着する例は、例えば、圧着、接着剤による接着などが含まれる。

【0123】

次いで、反応液 10 2 は被覆体 10 1 がマルチ核酸増幅検出反応具 9 1 に装着された後に添加される。

30

【0124】

マルチ核酸増幅検出反応具 9 1 と被覆体 10 1 とにより形成される空間に液体を添加する方法は、例えば、被覆体 10 1 の一部に開口部を予め設けておき、その開口部から添加してもよく、また先端の鋭利な例えば、針のような先端を有した注入器を用いて被覆体 10 1 の一部に差し込んで添加してもよい。

【0125】

反応液 10 2 は、試料と、増粘剤と、増幅試薬、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤および例えば、ヘキスト 3 3 2 5 8 のような 2 本鎖核酸を認識して信号を生ずるインタカレータを含んでよい。検査されるべき試料中に特定のプライマー固定化領域に固定されたプライマーセットにより増幅されるべき標的配列を含む鑄型核酸が存在した場合、そのプライマー固定化領域とそれに対応するプローブ固定化領域を含む反応場において増幅産物が形成される。その様子を模式的に図 11 に示す。

40

【0126】

図 11 (a) は、反応場 11 1 において増幅産物が形成された状態を模式的に示す。図 11 (a) は、使用時のマルチ核酸増幅検出反応具の平面図であり、図 11 (b) は、図 11 (a) のマルチ核酸増幅検出反応具の線 B - B に沿う断面図である。上述のように図

50

10において添加された試料中には、第2のプライマーセット98bが結合できる配列を含む核酸が含まれていたために、図11(a)および図11(b)に示すように、反応場111に第2のプライマーセットは遊離および拡散し、鋳型核酸と出会った後に増幅反応が行われ、それにより増幅産物が形成される。第2のプライマーセット98bによる増幅産物は、第2のプライマー固定化領域97bの周辺に拡散し、第2のプローブ固定化領域92bに到達する。到達した増幅産物が、目的配列を含む場合、第2のプローブ核酸95bと増幅産物がハイブリダイズして2本鎖核酸を形成する。この2本鎖核酸に対して、反応液102に含まれるインタカレータが結合してハイブリダイズ信号を生じる。

【0127】

ハイブリダイズ信号は、例えば、電極84a~84dのそれぞれの矩形窓90から露出する小矩形部86にプローバを接触させ、ヘキスト33258のようなインタカレータの電流応答を測定することにより行われる。

10

【0128】

電気化学的検出を利用するアレイ型プライマープローブチップを使用することによって、より簡単に且つ短時間に試料に含まれる標的核酸を増幅した後に、その増幅産物に含まれる目的核酸の検出を行うことが可能である。

【0129】

<目的核酸の検出方法>

例として上述したようなマルチ核酸増幅検出反応具を使用して、複数の標的核酸を増幅して、ハイブリダイズ信号を指標として目的核酸を検出する方法も更なる実施形態として提供される。

20

【0130】

また、特定の容器、チューブ、ディッシュまたは流路を形成した基板などの支持体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定する工程および/または1種類以上のプローブ核酸をプローブ固定化領域に固定する工程を含む目的核酸の検出方法も更なる実施形態として提供される。

【0131】

そのような目的核酸の検出方法は、例えば、所望の支持体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定することと、複数のプライマー固定化領域の位置またはその近傍のプローブ固定化領域に、プローブ固定化領域毎にハイブリダイズ信号を独立して検出可能に種類毎に、目的配列の相補配列を含む少なくとも1種類のプローブ核酸を固定することと、複数種類のプライマーセットが1つの反応場に含まれるように増幅に必要な試薬、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含む反応液を添加することと、例えば、反応液またはアレイ型プライマープローブチップへの添加などにより反応場に試料を持ち込むことと、当該プライマーが固定された支持体を加熱または冷却することによる温度調節など、増幅反応に適した反応環境を調節することと、それによりマルチ核酸増幅反応を行うことと、マルチ核酸増幅反応により生じた増幅産物と少なくとも1種類のプローブ核酸との間のハイブリダイズの有無および/または量を検出および/または測定することと、を具備してよい。また、前記反応液には増粘剤が含まれてよい。

30

40

【0132】

具体的な増幅反応は、増幅反応の種類に応じてそれ自身公知の技術を利用して行われてよい。

【0133】

具体的な検出手段は、それ自身公知のハイブリダイズ信号の検出手段、例えば、蛍光標識を利用する蛍光強度の検出および/または測定、或いはインタカレータを利用する電流

50

応答を検出および/または測定する方法を利用して行われてよい。

【0134】

更に、マイクロビーズ、板小片または棒などの基体の表面に対して複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定する工程と、複数のプライマー固定化領域の位置またはその近傍のプローブ固定化領域に、プローブ固定化領域毎にハイブリダイズ信号を独立して検出可能に種類毎に、目的配列の相補配列を含む少なくとも1種類のプローブ核酸を固定することを含む目的核酸の検出方法も更なる実施形態として提供される。

【0135】

そのような目的核酸の検出方法は、例えば、所望の基体の少なくとも1つの表面に対して、複数種類の標的核酸をそれぞれ増幅するために設計された複数種類のプライマーセットを遊離可能に固定することと、複数のプライマー固定化領域の位置またはその近傍のプローブ固定化領域に、プローブ固定化領域毎にハイブリダイズ信号を独立して検出可能に種類毎に、目的配列の相補配列を含む少なくとも1種類のプローブ核酸を固定することと、基体を、増幅に必要な試薬、例えば、ポリメラーゼなどの酵素、プライマーを起点とし新たなポリヌクレオチド鎖を形成する際に必要なデオキシヌクレオシド三リン酸などの基質、逆転写を同時に行う場合には、逆転写酵素およびそれに必要な基質など、更に、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含む反応液内に配置することと、適切な増幅環境を維持するための塩類などの緩衝剤を含む反応液を添加することと、反応液への添加により反応場に試料を持ち込むことと、反応液を加熱または冷却することによる温度調節など、増幅反応に適した反応環境を調節することと、それによりマルチ核酸増幅反応を行うことと、マルチ核酸増幅反応により生じた増幅産物と少なくとも1種類のプローブ核酸との間のハイブリダイズの有無および/または量を検出および/または測定することと、を具備する。また、反応液に増粘剤が含まれてもよい。

10

20

【0136】

例として実施形態に示したマルチ核酸増幅検出反応具によれば、異なる配列による干渉を受けずに複数種類の標的配列についての増幅を独立して同時に行うことができる。更に、増幅反応と同時または増幅反応に引き続いて、増幅反応を行ったのと同じ反応場において、増幅反応により生じた増幅産物について目的核酸の有無および/または量を検出および/または測定することができる。また、増粘剤の適用により、複数種類の標的配列につ

30

【0137】

また、増粘剤の反応液への添加に代えて、増粘剤を上述した通りに支持体に固定してもよい。

【0138】

更に、増幅反応をより効率的に達成するために、反応液の反応場への添加を、注入速度25mm/秒以上の速度で注入することが好ましい。これにより、固定化されたプライマーセットの遊離は影響を受けため、プライマーセットのより局所的な拡散が可能になる。

【0139】

従来の技術では、複数種類のプライマーを1つの容器内で使用してマルチプレックス増幅を行った場合、反応効率に偏りが生じ、種類の数に限りがあることが問題となっている。即ち、異なる種類のプライマー間で、必要な酵素やdNTPの取り合いが生じることがある。また、標的配列の配列やプライマーの配列により、反応特異性および/または反応効率に違いがでることもある。その場合、プライマーの種類によって増幅反応開始点が異なること、一部のプライマーセットについての増幅のみが開始され進行されること、或いは、一部のプライマーセットについての増幅が十分に達成されないことなどの問題が生じてしまう。このような従来の問題も、本明細書において開示される実施形態により解決される。

40

【0140】

即ち、実施形態を例に示したマルチ核酸増幅検出反応具を使用して増幅反応を行うと、

50

固定した増幅試薬付近でのみ増幅反応が進行するため、同一容器中および/または同一溶液中でありながら、互いの増幅反応に干渉せず、各種ターゲットの増幅反応を独立に進行させることが可能であり、そのような増幅反応と同時または引き続いて、増幅反応を行ったのと同じ反応容器において目的核酸の有無および/または量を検出および/または測定することができる。また、ある程度個別の増幅反応が進行した後で、更に異なるプライマーセットを追加してもよく、第1の実施形態に示した容器形態のマルチ核酸増幅検出反応具と、上記のマルチ核酸増幅検出反応具とを組み合わせ使用してもよい。

【0141】

[例]

例1

第4の実施形態を用いて、プライマーの核酸状態を評価した。

10

【0142】

蛍光標識したプライマーセットを用意した。図12に使用したマルチ核酸反応具121を示す。

【0143】

用意したプライマーセットを終濃度200 $\mu$ MとなるようにTE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。この溶液に終濃度0.3%となるようにアガロースを溶解して固定溶液を調製した。支持体122としてガラス基板を使用した。この固定溶液を支持体122上の中央(図中、123で示す)と、支持体122の2点の隅部(図中、124および125で示す)の3点に滴下して室温に放置して乾燥した。その一面に溝126を形成したシリコンゴム板を被覆体127として使用した。被覆体127の溝126の二端にはそれぞれ貫通孔128および129が形成されている。支持体122のプライマーセットおよびアガロースを固定した領域が被覆体127の溝部126内に含まれるように、支持体122に被覆体127を接着した。これにより、マルチ核酸反応具を得た。このマルチ核酸反応具には、被覆体127の溝部126と支持体122の面とによって流路130が形成されている。

20

【0144】

被覆体127の2つの貫通孔をそれぞれ流入口128および排出口129として使用することにより行った。流入口128からPBSを添加した。その後、プライマーの拡散状態を蛍光強度を指標にして観察した。

30

【0145】

対象として、アガロースを固定せずに蛍光標識したプライマーセットのみを上述と同様に固定して作製した対照用マルチ核酸反応具を用意した。この対照用マルチ核酸は農具にも同様に流入口AからTE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) を添加して、プライマーの核酸状態を蛍光強度を指標にして観察した。

【0146】

結果を図13(a)および(b)に示す。図13(a)は、プライマーのみを固定した対照用マルチ核酸反応具において得られた結果である。図13(b)は、プライマーセットおよびアガロースを固定したマルチ核酸反応具において得られた結果である。

40

【0147】

対照用マルチ核酸反応具の方が、プライマーセットおよびアガロースを固定したマルチ核酸反応具よりもTE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) 添加により移動した距離が大きかった。この結果から、プライマーセットおよびアガロースを固定したマルチ核酸反応具により、より局所的なプライマーの拡散が可能となることが明らかになった。

【0148】

例2

第6の実施形態と同様の電気化学的検出用のマルチ核酸増幅検出反応具を作製した。

【0149】

50

( 1 ) チップ素材の作製

図 8 に示すようなマルチ核酸増幅検出反応具用のチップ素材を形成した。パイレックスガラス表面にチタン及び金の薄膜をスパッタリングにより形成した。その後、エッチング処理により、チタンおよび金の電極パターンをガラス表面上に形成した。更にその上に絶縁膜を塗付して、エッチング処理により電極、即ち、作用極、対極、参照極およびプローブ用電極を露出させた。これをマルチ核酸増幅検出反応具のためのチップ素材とした。

【 0 1 5 0 】

( 2 ) マルチ核酸増幅検出反応具の作製

上記のように作製したチップ素材の作用極上にプローブ DNA を固定化した。使用したプローブ DNA の塩基配列を表 1 に示す。

【表 1】

配列名	配列	塩基数	配列番号
A	ACAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATC	35	1
B	TGGTCCTGGCACTGATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAACAACACAAA	55	2
C	TTGTAACCCAGTACGGTTTATTAATAAATTGGGATTCTGAGG	41	3
D	AGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAATAATTAATCAGTACC	55	4
E	GCCCCGACCGATTTCAACACCTACACAGGCCCCAGACCCAAAGCGT	43	5
F	AGCTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGATAATGTGTCAGTTGATTATAAG	55	6
G	ACCAATAAGGTTTATTGAATAATTTGGGCATCAGA	34	7
H	ATTATCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTT	55	8
I	CTTTAATATAAAGGTCATCCGGGACAGCCCTGCCAAGTTT	41	9
J	TCCTAGTAGTTATGTATATGCCCCCTCGCCTAGTGGGT	38	10
K	CTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAG	55	11
L	ACATCTGTTGACAACAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTG	46	12
M	TTTGGTCAATGGATTTTACTACATTACAAGCTAATAAAGTGATGTTCCC	51	13

10

20

30

40

## 【0151】

配列番号 1 ~ 13 に示す 13 種類のプローブ DNA (A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)、(G)、(H)、(I)、(J)、(K)、(L) および (M) を上記のように作製したチップ素材に固定化した。プローブ DNA をそれぞれ 3 μM ずつ含むプローブ DNA 溶液をそれぞれ調製した。これらの溶液の 100 nL を作用極上に各種類毎にスポットした。40 で乾燥後、超純水により洗浄した。その後、作用極表面に残った

50

超純水を除去し、プローブDNAがチップ素材の電極に固定化されたDNAチップを作製した。

【0152】

次に上記でシリコンゴム板製の被覆体を用意した。被覆体の一面には、プローブ固定化領域に対応する位置に溝が形成されている。

【0153】

被覆体の溝の底面に対して複数のプライマーセットを固定した。プライマーセットの固定化領域は、先に固定したプローブDNAの位置に対応する位置となるように調整した。

【0154】

まず、使用するプライマーDNAを用意した。使用するプライマーDNAは、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による増幅のためのプライマーセットである。プライマーDNAの塩基配列を表2A、2Bおよび2Cに示す。

【表 2 A】

表2 DNAプライマー塩基配列

セット名	配列名	配列	塩基数	配列番号
A	A-FIP	GCACTGCTTTGAATAGAGGCACCTGTTCCCGATGACCTG	38	14
	A-BIP	CCATATTGGCTACAACGCTGCTACCTGATTGCCCAACA	38	15
	A-F3	AGGGCTGGTACATTAGGAGA	20	16
	A-B3	GTCATATTAGTACTGCGAGTGG	22	17
	A-LPF	CAGTAGTTCCTGAACCTTTAATGTACA	27	18
B	B-FIP	GGATGACCACTAATACCTACACCCCTGTTGGTTAGAGGTAGGTC	46	19
	B-BIP	CACTGAAAACCTCTAATAGATATGCCGGTGCAACCAAGTAACACAGTTGTG	51	20
	B-F3	AACTCAACGCTTAGTTGGGC	21	21
	B-B3	CCTTTACCCCAATGCTCTCC	20	22
	B-LPF	TAATGGCTGCCCGGA	16	23
C	C-FIP	ATTATTGTGGCCCTGCCACGTTTCTATGGTAACCTCAGAATCCC	44	24
	C-BIP	ACCACTCGTAGCACCTAACATGACTCGCCATGACGGAAGGTATTCCT	45	25
	C-F3	GCCACTGTACAAAGCAGTGC	20	26
	C-B3	TGAATGTATGTCATAACATCAGCTG	25	27
	C-LPB	GCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACA	24	28
D	D-FIP	AATTGATTACCCGCAAAATGCCGTCTATGATTACGCTGAGGCAC	46	29
	D-BIP	ATACTACTAGAAGTACTAACATGACCCTCCACATGTCTAAGGTAAGTCTG	47	30
	D-F3	GTATATGTTGCTACGCCTAGTG	22	31
	D-B3	GCCATAACCTCTGCAGACAAAG	22	32
	D-LPF	GCACGTTGCAACCAATAAAGG	20	33

10

20

30

40

【表 2 B】

(表2Aのつづき)

E	E-FIP	CACTGAGTCCTACCCCTAAAGGTTGTCTCAACGCTTGGTCTGG	43	34
	E-BIP	GATGACACTGAAAACCTCTCATGTAGCGCTGAGTTTGTATAATCCACAG	50	35
	E-F3	CCAGATAACACACAGTATATGATCCTAAC	27	36
	E-B3	GCAGGTACACACAGCCCAATAATACAC	24	37
	E-LPB	GCTGTTGATACCAAGATACACGTG	25	38
F	F-FIP	TAAAATGGATGGCCACTTAGGCCGGTATGGAAATTGGTCTGGGGC	45	39
	F-BIP	GGATGATACAGAAAGTGCTCAAAATACACAGCTGTGTTTGC	41	40
	F-F3	GAAACACAACGTTTGGTTTGGGC	23	41
	F-B3	GTGCTCACCAATAGCAGGTAC	21	42
	F-LPF	CAATACCTAAAGGCTGCC	18	43
G	G-FIP	GTGGCCCTGTGCTCGTTGTCTATGGTTACCTCTGATGCC	39	44
	G-BIP	CACGCAGTACAAAATATGTCACCCCATGTGGTAGGTACTCC	40	45
	G-F3	CAAATTAATTTCTACACCTAGTGG	25	46
	G-B3	GTCATAACGCTGCAGTTAAGG	22	47
	G-LPB	GCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACA	27	48
H	H-FIP	AACATATACCATTTGTGGCCCTTCCATGGTAACCTCTGATTCCC	46	49
	H-BIP	CTACCCGTAGTACCAACTTTACCCACGTCCTGGTATATTCC	42	50
	H-F3	GTTCTGTATACTGCCCCCTCTC	21	51
	H-B3	GACATAACATCAGTTGTTAATGTGAC	26	52
	H-LPF	CCTTATGTAGCCCAATAAGGC	20	53

10

20

30

40

【 0 1 5 6 】

【表 2 C】

(表 2B のつづき)

I	I-FIP	GGATAACTGCAGTATTACCGGACCTAGGGCTGGAACAACTTGG	42	54
	I-BIP	TCCAACCTCCTAGTGGCTCTATAGCGCTGTAGCCAATAAGGC	41	55
	I-F3	GACGTGAGCAGATGTTTGT	19	56
	I-B3	CCATTGTTATGACCTTGTGC	20	57
	I-LPB	CCTCAGAATCACAAATTAATAAGCC	28	58
J	J-FIP	AGTGCCCTACCATGCCCCACGTAGGGAACAGTTATTTGCT	43	59
	J-BIP	TAAGGCCACTGACATACGTGACAGCCATAGACCCACTAGGGCAG	45	60
	J-F3	CTGCAGATGTATATGGAGACAGTA	25	61
	J-B3	GTTAAATAACTGGGAGTCTGAGGAT	26	62
	J-LPF	CTCTATTCCAAAATGCCTAGCA	23	63
K	K-FIP	GCCAGCAACACCATTGTTACTCTATTGTTACCTCTGACTCCC	43	64
	K-BIP	ACCACTCGCAGTACCAATTTAACCCCTCAACATGTCTGCTATACTGC	46	65
	K-F3	TGTATTCTCCCCTCTCCAAGTG	21	66
	K-B3	GAATATAGGACATAACATCTGCAG	24	67
	K-LPF	ACCTGTGCCTTATGTAACC	20	68
L	L-FIP	GCTATGGGTGAATTTCTGTGCCCTTGGTGGCCCTTAG	40	69
	L-BIP	GCACAACAAGATGTTAGAGATAACAATAGGTGGAGCACAGCC	42	70
	L-F3	GTTGAGGTGGCAGAGGAC	19	71
	L-B3	TTGCATGTAGTGCCAATACCC	21	72
	L-LPF	CATATTTAATAAAGGGATGACCAC	27	73
M	M-FIP	GTTTAGTAACCTCCAAGGAGGACAAGGCACACCTTGTATGC	43	74
	M-BIP	GGACATGGTAGACACAGGACATATATCTAGGGGAACATCAC	42	75
	M-F3	CCTATAGGTGAACATTGGG	19	76
	M-B3	GGATATTTGCAAAATGGAACCTG	21	77
	M-LPF	CATTCTCCTGCTTTTACCTGGT	22	78

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 7 】

プライマー DNA (セット A)、(セット B)、(セット C)、(セット D)、(セット E)、(セット F)、(セット G)、(セット H)、(セット I)、(セット J)、(セット K)、(セット L)、(セット M) については、200  $\mu$ M の FIP、BIP、F3、B3 および LPF をそれぞれ準備した。FIP、BIP、F3、B3、LPF をそれぞれ 0.036  $\mu$ L、0.036  $\mu$ L、0.005  $\mu$ L、0.005  $\mu$ L および 0.01

8  $\mu$ L で含む 0.100  $\mu$ L の溶液に対して、0.6% アガロース溶液を 0.100  $\mu$ L 混合した。この水溶液を、被覆体であるシリコンゴムの溝部の底面のプライマー固定化領域に固定した。

【0158】

具体的には、用意したそれぞれ 0.200  $\mu$ L のそれらの溶液を、被覆体の溝部の底部にスポットし、40℃ で 2 分間乾燥させた。スポットは、被覆体が DNA チップに取り付けられたときに、それぞれのプローブ DNA が対応するプライマーセットと対向する位置になるように行った。被覆体の溝部と、プローブ DNA が固定化された面が対向するように、被覆体と上記で作製したチップ素材とを接着した。これにより、マルチ核酸増幅検出反応具を得た。被覆体であるシリコンゴムの溝部の 2 つの端部には、2 つの貫通孔が開口されている。

10

【0159】

(3) LAMP 反応液の作製

LAMP 反応液の組成を表 3 ~ 表 6 に示す。

【表 3】

表3 LAMP反応液組成評価

組成(1)

試薬	種類	Total 50
Reaction Mixture		14.00
DNA Polymerase		8.00
鋳型 DNA	A	2.00
	C	2.00
	E	2.00
	G	2.00
	I	2.00
	K	2.00
	M	2.00
DW		14.00
Total		50.00

20

30

【0160】

【表 4】

表4 LAMP反応液組成評価

組成(2)

試薬	種類	Total 50
Reaction Mixture		14.00
DNA Polymerase		8.00
鋳型 DNA	B	2.00
	D	2.00
	F	2.00
	H	2.00
	J	2.00
	L	2.00
DW		16.00
Total		50.00

40

50

【 0 1 6 1 】

【 表 5 】

表5 LAMP反応液組成評価

組成(3)

試薬	種類	Total 50
Reaction Mixture		14.00
DNA Polymerase		8.00
鋳型 DNA	A	2.00
	B	2.00
	C	2.00
	D	2.00
	E	2.00
	F	2.00
	G	2.00
	H	2.00
	I	2.00
	J	2.00
	K	2.00
L	2.00	
M	2.00	
DW		2.00
Total		50.00

10

20

【 0 1 6 2 】

【 表 6 】

表6 LAMP反応液組成評価

組成(4)

試薬	種類	Total 50
Reaction Mixture		14.00
DNA Polymerase		8.00
DW		28.00
Total		50.00

30

【 0 1 6 3 】

組成(1)から(4)には、共通して、Bst DNAポリメラーゼ、リアクションミックスが含まれ、後述の鋳型溶液と合わせ総量が50 $\mu$ Lとなるように蒸留水(即ち、DW)が添加されたものを使用した。

40

【 0 1 6 4 】

組成(1)には、鋳型A、鋳型C、鋳型E、鋳型G、鋳型I、鋳型Kおよび鋳型Mが含まれる。

【 0 1 6 5 】

鋳型Aは、プライマーセットAによりLAMP増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブDNA(A)とハイブリダイズする。鋳型Cは、プライマーセットCによりLAMP増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブDNA(C)とハイブリダイズする。鋳型Eは、プライマーセットEによりLAMP増幅される。それにより生じる増幅産物はプローブDNA(E)とハイブリダイズする。鋳型Gは、プライマーセットGによりLAMP増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブDNA(G)とハイ

50

ブリダイズする。鋳型 I は、プライマーセット I によって LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (I) とハイブリダイズする。鋳型 K は、プライマーセット K により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (K) とハイブリダイズする。鋳型 M は、プライマーセット M によって LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (M) とハイブリダイズする。

【0166】

組成(2)は、鋳型 B、鋳型 D、鋳型 F、鋳型 H、鋳型 J および鋳型 L を含む。

【0167】

鋳型 B は、プライマーセット B により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (B) とハイブリダイズする。鋳型 D は、プライマーセット D により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (D) とハイブリダイズする。鋳型 F は、プライマーセット F により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (F) とハイブリダイズする。鋳型 H は、プライマーセット H により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (H) とハイブリダイズする。鋳型 J は、プライマーセット J により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (J) とハイブリダイズする。鋳型 L は、プライマーセット L により LAMP 増幅される。それにより生じる増幅産物は、プローブ DNA (L) とハイブリダイズする。

10

【0168】

組成(3)は、鋳型 A、鋳型 B、鋳型 C、鋳型 D、鋳型 E、鋳型 F、鋳型 G、鋳型 H、鋳型 I、鋳型 J、鋳型 K、鋳型 L および鋳型 M を全て含む。

20

【0169】

組成(4)は鋳型を含まない。

【0170】

鋳型 A、鋳型 B、鋳型 C、鋳型 D、鋳型 E、鋳型 F、鋳型 G、鋳型 H、鋳型 I、鋳型 J、鋳型 K、鋳型 L および鋳型 M の塩基配列を表 7 A、表 7 B および表 7 C に示す。

【表 7 A】

<p>鑄型A (配列番号79)</p>	10
<p>AGGGCTGGTACATTAGGAGAGGCTGTTCCCGATGACCTGTACATTAAG  G TTCAGGAACTACTGCCTCTATTCAAAGCAGTGCTTTTTTCCCCTCC  TAGTGGATCAATGGTTACTTCCGAATCTCAGTTATTTAATAAGCCATATT  GGCTACAACGTGCACAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCA  GGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACTAATATGAC</p>	
<p>鑄型B (配列番号80)</p>	
<p>AACTCAACGCTTAGTTTGGGCCTGTGTTGGTTTAGAGGTAGGTCGCGGG  CAGCCATTAGGTGTAGGTATTAGTGGTCATCCATTATTAATAAATTTG  ATGACACTGAAAACCTAATAGATATGCCGGTGGTCCTGGCACTGATAA  TAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAACAAACACAACCTGTGTTTACTT  GGTTGCAAACCACCTATTGGAGAGCATTGGGGTAAAGG</p>	
<p>鑄型C (配列番号81)</p>	20
<p>GCCACTGTACAAAGCAGTGCTTTTTTTCCTACTCCTAGTGGTTCTATGG  TAACCTCAGAATCCCAATTATTTAATAAACCGTACTGGTTACAACGTGC  GCAGGGCCACAATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTTTGTGACA  GTTGTGGATACCACTCGTAGCACTAACATGACTTTATGTGCTGAGGTTA  AAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTTAAGGAATACCTTCGTCA  TGGCGAGGAATTTGATTTACAATTTATTTTTCAATTGTGCAAATACAT  TAACAGCTGATGTTATGACATACATTCA</p>	
<p>鑄型D (配列番号82)</p>	30
<p>GTATATGTTGCTACGCCTAGTGGGTCTATGATTACGTCTGAGGCACAGT  TATTTAATAAACCTTATTGGTTGCAACGTGCCCAAGGCCATAATAATGG  CATTTGCTGGGGTAATCAATTATTTGTTACTGTAGTAGATACTACTAGAA  GTACTIONCATGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGA  TGACCGAAAAATTAATCAGTACCTTAGACATGTGGAGGAATATGAATTA  CAATTTGTTTTTCAATTATGCAAATTAATTTGTCTGCAGAGGTTATGGC</p>	

【 0 1 7 1 】

## 【表 7 B】

(表7Aのつづき)

<p>鋳型E (配列番号83)</p>	10
<p>CCAGATAACACAGTATATGATCCTAACTCTCAACGCTTGGTCTGGGCCT GTGTAGGTGTTGAAATCGGTCCGGGGCCAACCTTTAGGGGTAGGACTCA GTGGTCATCCATTATATAATAAATTGGATGACACTGAAAACCTCTCATGT AGCATCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGGAT TATAAACAACTCAGCTGTGTATTATTGGCTGTGTACCTGC</p>	
<p>鋳型F (配列番号84)</p>	
<p>GAAACACAACGTTTGGTTTGGGCATGTGTAGGTATGGAAATTGGTCGT GGGCAGCCTTTAGGTATTGGCCTAAGTGGCCATCCATTTTATAATAAA TTGGATGATACAGAAAGTGCTCATGCAGCTACAGCTGTTATTACGCAG GATGTTAGGGATAATGTGTCAGTTGATTATAAGCAAACACAGCTGTGT ATTTTAGGTTGTGTACCTGCTATTGGTGAGCAC</p>	20
<p>鋳型G (配列番号85)</p>	
<p>CAAATTATTTTCCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATG CCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACA ATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATAC TACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAA ACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAG GAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAATAACCTTAACTG CAGACGTTATGAC</p>	30
<p>鋳型H (配列番号86)</p>	
<p>GTTCTGTATACTGCCCTCTCCCAGCGGTTCCATGGTAACCTCT GATTCCCAGTTATTTAATAAGCCTTATTGGCTACATAAGGCCCAGGGC CACAACAATGGTATATGTTGGCATAATCAATTATTTCTTACTGTTGTGG ACACTACCCGTAGTACCAACTTTACATTATCTACCTCTATAGAGTCTTC CATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAAGGAATATACCAGGCAC GTGGAGGAGTATGATTTACAATTTATATTTCAACTGTGTACTGTACAT TAACAACCTGATGTTATGTC</p>	40

【 0 1 7 2 】

## 【表 7 C】

(表7Bのつづき)

鑄型I (配列番号87)	
GACGTGAGCAGATGTTTGTAGACACTTTTTTAATAGGGCTGGAAAAC TTGGCGAGGCTGTCCCGGATGACCTTTATATTAAGGGTCCGGTAATA CTGCAGTTATCCAAAGTAGTGCATTTTTTCCAACCTAGTGGCTCTAT AGTTACCTCAGAATCACAATTATTTAATAAGCCTTATTGGCTACAGCGT GCACAAGGTCATAACAATGG	10
鑄型J (配列番号88)	
CTGCAGATGTATATGGAGACAGTATGTTCTTTTGTACGTAGGGAAC AGTTATTTGCTAGGCATTTTTGGAATAGAGGGGGCATGGTAGGGGACA CTATACCTACTGAATTGTATATTAAGGGCACTGACATACGTGACAGTC CTAGTAGTTATGTATATGCCCCCTCGCCTAGTGGGTCTATGGTATCCT CAGACTCCAGTTATTTAAC	20
鑄型K (配列番号89)	
TGTATTCTCCCTCTCCAAGTGGCTCTATTGTTACCTCTGACTCCCAG TTGTTTAATAAACCATATTGGTTACATAAGGCACAGGGTCATAACAA TGGTGTGGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGTGGTAGATACCA CTCGCAGTTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGC TACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTGC AGTTTATTTTTCAGTTGTGTAATAACTTAACTGCAGATGTTATGT CCTATATTC	30
鑄型L (配列番号90)	
GTTGAGGTGGGCAGAGGACAGCCCCTTGGTGTGGCCTTAGTGGTC ATCCCTTATTTAATAAATATGATGACACAGAAAATTCACGCATAGCA AATGGCAATGCACAACAAGATGTTAGAGATAACACATCTGTTGACAA CAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTGCTCCACCTATTGGGG AACACTGGGGTATTGGCACTACATGCAA	40
鑄型M (配列番号91)	
TCCTATAGGTGAACATTGGGGAAAAGGCACACCTTGTAATGCTAACC AGGTAAAAGCAGGAGAATGTCCTCCTTTGGAGTTACTAAACACTGTA CTACAAGACGGGGACATGGTAGACACAGGATTTGGTGCAATGGATT TTACTACATTACAAGCTAATAAAAAGTGATGTTCCCTAGATATATGC AGTTCCATTTGCAAATATCC	50

## 【0173】

(4) マルチ核酸増幅検出反応具上でのLAMP増幅反応及び、プローブDNAによる目的核酸の検出

被覆体であるシリコンゴム板に設けられた2つの貫通孔のうち的一方を流入口とした。シリコンゴム板に設けられた溝部とチップ素材の一面とにより構成される流路を反応部と

して、そこにおいて反応を行った。反応液がプライマー固定化位置上を流速  $2.5 \text{ mm/s}$  で通過するよう、流入口から反応部に LAMP 反応溶液を注入した。その後速やかに、DNA 自動検査装置内にマルチ核酸増幅検出反応具を設置した。DNA 自動検査装置内のペルチェ上で  $64 \sim 60$  分間 LAMP 反応を行った。

【0174】

60 分間の LAMP 反応の後、 $55^\circ\text{C}$  で 10 分間ハイブリダイゼーション反応を行い、 $30^\circ\text{C}$  で 3 分間洗浄を行った。その後、洗浄溶液を除去し、 $3.5 \sim 5 \mu\text{M}$  ヘキスト 33258 溶液を流入口から注入した。

【0175】

各プローブ核酸固定化作用極に電位を掃引し、プローブ DNA と LAMP 産物により形成された二本鎖に特異的に結合したヘキスト 33258 分子の酸化電流を計測した。上記一連の反応は、SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration, Vol. 1, No. 3, pp. 266-270, 2008 に記載の DNA 自動検査装置にて実施した。

10

【0176】

(5) 検出結果

検出結果を表 8 に示した。

【表 8】

表8 13種類の鋳型(A~M)を検出して得られた電流値(単位:nA)

反応 試薬	プローブ名												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
組成 (1)	37.52*	17.26	39.55*	18.50	50.45*	20.08	53.93*	17.29	36.76*	17.34	47.73*	18.86	50.31*
組成 (2)	18.20	57.34*	23.10	55.59*	20.72	51.53*	20.53	46.82*	18.96	34.02*	19.81	41.07*	15.29
組成 (3)	43.67*	65.60*	52.46*	36.45*	61.80*	64.96*	53.40*	45.91*	41.27*	38.45*	51.35*	37.79*	40.84*
組成 (4)	22.50	22.91	23.80	21.43	21.94	21.67	22.67	21.68	20.01	18.55	18.06	18.17	18.41

\*  $\geq 30\text{nA}$ 

【0177】

[LAMP反応溶液組成(1)の結果]

10

20

30

40

50

鋳型 A、鋳型 C、鋳型 E、鋳型 G、鋳型 I、鋳型 K、鋳型 M を含む LAMP 反応溶液組成 (1) を添加した場合の結果は次の通りである。

【0178】

電流値が得られたプローブ DNA は、プローブ DNA (A)、プローブ DNA (C)、プローブ DNA (E)、プローブ DNA (G)、プローブ DNA (I)、プローブ DNA (K) およびプローブ DNA (M) であった。これらのプローブ DNA (A)、プローブ DNA (C)、プローブ DNA (E)、プローブ DNA (G)、プローブ DNA (I)、プローブ DNA (K) およびプローブ DNA (M) の全てのプローブについて 30 nA 以上の電流値が得られた。

【0179】

従って、組成 (1) の LAMP 反応液の場合、シリコンゴムの底面に固定されているプライマーセット A、プライマーセット C、プライマーセット E、プライマーセット G、プライマーセット I、プライマーセット K およびプライマーセット M による LAMP 反応が各々局所的に進行し、生じた増幅産物が、上記のプローブ DNA とハイブリダイズしたことが明らかとなった。

【0180】

一方、シリコンゴムの底面に固定されているプライマー DNA がプライマーセット B、プライマーセット D、プライマーセット F、プライマーセット H、プライマーセット J、プライマーセット L の場合には電流値は得られなかった。

【0181】

これらの結果より、実施形態のマルチ核酸増幅検出反応具により、LAMP 反応溶液に含まれる鋳型 A、鋳型 C、鋳型 E、鋳型 G、鋳型 I、鋳型 K および鋳型 M がそれぞれに対応するプライマーセットに増幅され、且つ対応するプローブ核酸とハイブリダイズしたことが検出できた。

【0182】

この結果から、LAMP 反応溶液には、鋳型 A、C、E、G、I、K および M が含まれていたことを判定することが可能である。

【0183】

[ LAMP 反応溶液組成 (2) の結果 ]

また、鋳型 B、鋳型 D、鋳型 F、鋳型 H、鋳型 J および鋳型 L を含む LAMP 反応溶液組成 (2) を添加した場合の結果は次の通りである。

【0184】

組成 (2) の反応溶液の添加により、プローブ DNA (B)、プローブ DNA (D)、プローブ DNA (F)、プローブ DNA (H)、プローブ DNA (J) およびプローブ DNA (L) の全てのプローブについて 30 nA 以上の電流値が得られた。

【0185】

従って、鋳型 B、鋳型 D、鋳型 F、鋳型 H、鋳型 J および鋳型 L は、シリコンゴムの底面に固定されているプライマー DNA、即ち、プライマーセット B、プライマーセット D、プライマーセット F、プライマーセット H、プライマーセット J およびプライマーセット L によりそれぞれ局所的に増幅され、生じた増幅産物が、対応するプローブ DNA にハイブリダイズしたことが確認された。

【0186】

一方、シリコンゴムの底面に固定されているプライマー DNA、プライマーセット A、プライマーセット C、プライマーセット E、プライマーセット G、プライマーセット I、プライマーセット K およびプライマーセット M) では電流値は得られなかった。

【0187】

この結果から、LAMP 反応溶液には、鋳型 B、D、F、H、J、L が含まれていたことを判定することが可能である。

【0188】

[ LAMP 反応溶液組成 (3) の結果 ]

10

20

30

40

50

13種類の鋳型が全て含まれるLAMP反応溶液組成(3)を添加した場合の結果は次の通りである。

【0189】

全てのプローブDNAについて、30nA以上の電流値が得られた。これにより、シリコンゴムの底面に固定されている13種類のプライマーDNAによるLAMP反応が各々局所的に進み、生じたLAMP産物が13種類のプローブDNAと反応したことが明らかとなった。

【0190】

この結果から、LAMP反応溶液には、13種類の鋳型が含まれていたことが判定することが可能である。

10

【0191】

また、鋳型を含まないLAMP反応溶液組成(4)を添加した場合、シリコンゴムの底面に固定されている13種類のプライマーDNAによるLAMP増幅反応は進まず、電流値は得られなかった。

【0192】

以上の結果から、本実施例に記載したアレイ型プライマープローブチップを用いて、LAMP反応溶液中に含まれる複数種類の鋳型を検出し、且つその配列を識別することが可能であることが示された。

【0193】

例3

増粘剤の代わりに水を混合したプライマーを固定した以外は、例2と同様に試験を行った。即ち、4種類のLAMP反応液は、上記増粘剤を添加した場合に用いた試薬と全く同一であり、含まれる鋳型の種類も等しいものを使用した。

20

【0194】

その結果を表9に示した。

【表 9】

表9 13種類の鋳型(A~M)を検出して得られた電流値(増粘剤添加無し)(単位:nA)

反応 試薬	プローブ名												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
組成 (1)	29.08	22.58	37.10*	18.47	38.62*	20.65	40.71*	19.08	26.37	16.63	33.33*	16.27	21.36
組成 (2)	20.00	48.04*	24.71	40.00*	22.87	52.06*	24.24	34.69*	18.29	22.41	21.04	23.37	17.67
組成 (3)	20.34	38.05*	31.24*	26.46	43.55*	34.43*	44.45*	25.22	22.50	26.98	28.88	27.10	36.64*
組成 (4)	21.20	22.83	24.94	20.70	23.94	22.47	23.77	21.65	18.70	17.50	19.26	18.35	17.81

\*黄色のセル:  $\geq 30\text{nA}$ 

10

20

30

40

## 【0195】

鋳型を含まないLAMP反応液(4)では、何れのプローブDNAについても電流値は検出されなかった。

## 【0196】

一方、LAMP反応液(1)、(2)および(3)を添加した結果であっても、そこに含まれる鋳型に由来する電流値が得られない場合もあった。これは、LAMP反応液(1

50

)、(2)および(3)に含まれる鋳型の一部についての増幅が得られなかったために、LAMP増幅による増幅産物が生じず、従って、プローブDNAとのハイブリダイズが生じなかったためであると考えられる。また更に、電流値が得られたプローブDNAについての電流値も、増粘剤をプライマーセットと共に固定した場合と比べて、得られた電流値は小さい値であった。

【0197】

これらの結果から、プライマーセットを固定化する際に増粘剤を添加しないと、プライマーDNAの溶出範囲が広がり、本来得られるべき増幅反応が達成されない可能性が大きいことが示唆された。

【0198】

上記の例2および3の結果から次のことが示された。本例に記載されたように、実施形態に従うマルチ核酸増幅検出反応具においてプライマーセットの固定と共に増粘剤を添加することにより、LAMP反応溶液中に含まれる複数種類の鋳型をより高精度に検出することが可能であり、且つその配列を識別することが可能であることが示された。

10

【0199】

例4

上述した例2の(1)において作製したチップ素材に対して増粘剤とプライマーセットを固定した。

【0200】

増粘剤の調製方法を記載する。増粘剤として、ナカライテスク社製「Agarose-Super LM (melting temperature 60 )」を用いた。アガロースの場合、分子量や構造により固有の融解温度、ゲル化温度、再融解温度を有しており、特性に合わせて条件を設定する必要がある。

20

【0201】

アガロース0.6gを100mLのDWに添加し、よく混合した後に、80 で過熱することで完全に溶解させ、0.6%アガロース溶液を作製した。プライマー溶液と混合する際は、再度80 に過熱して完全に溶解させた後に、プライマーと等量ずつ混合し、アガロース濃度が終濃度0.3%となるよう調製した。

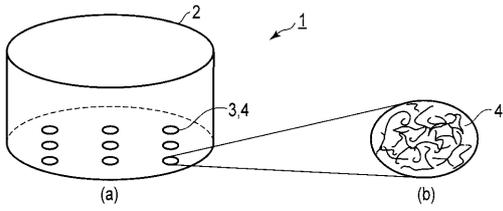
【0202】

上記のように調製した終濃度0.3%アガロース混合プライマー溶液を支持体上に滴下した。その後、40 に設定したホットプレート上で2分間加熱することで乾燥させた。乾燥後の状態がフィルム上になり、完全に固定化されていることを確認した後、使用するまで支持体と共に-20 で保管した。

30

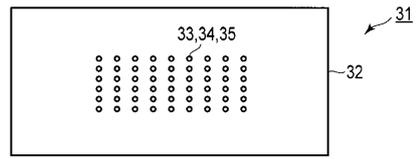
【 図 1 】

図 1



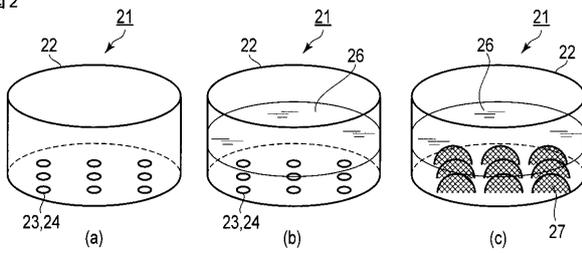
【 図 3 】

図 3



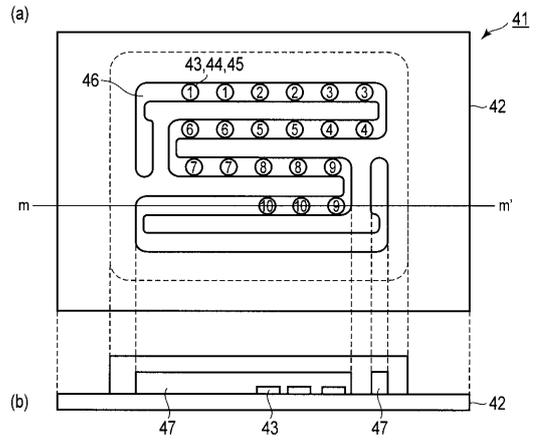
【 図 2 】

図 2



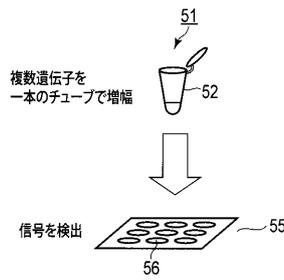
【 図 4 】

図 4



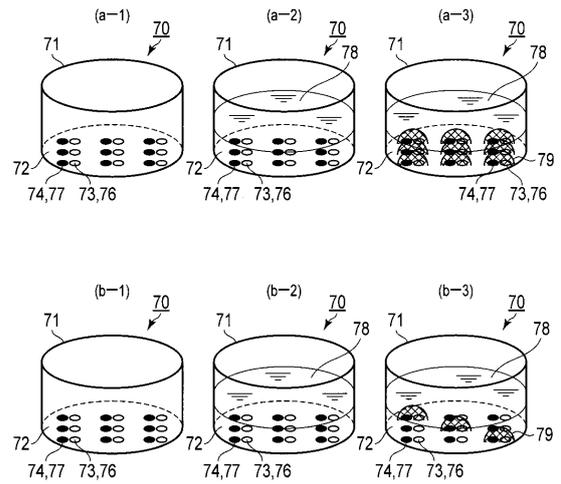
【 図 5 】

図 5



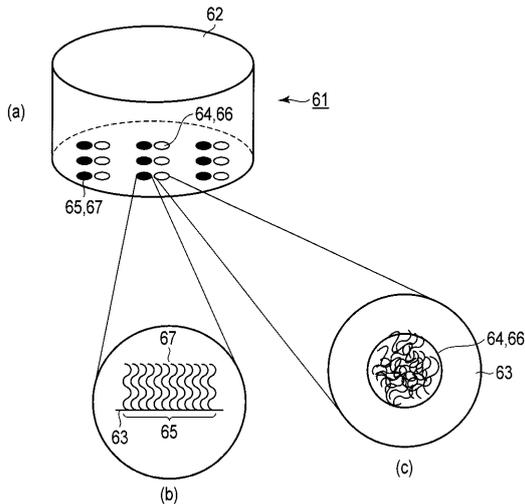
【 図 7 】

図 7



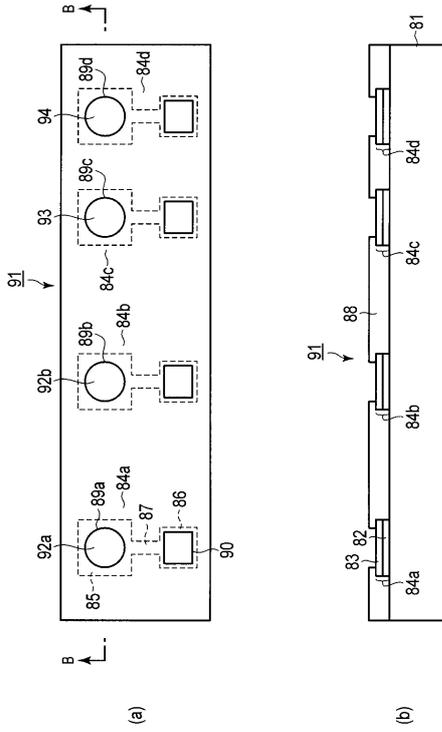
【 図 6 】

図 6



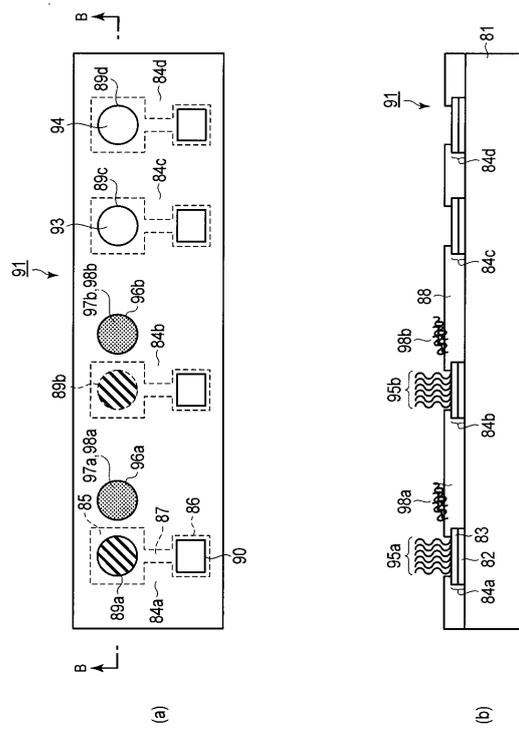
【 図 8 】

図 8



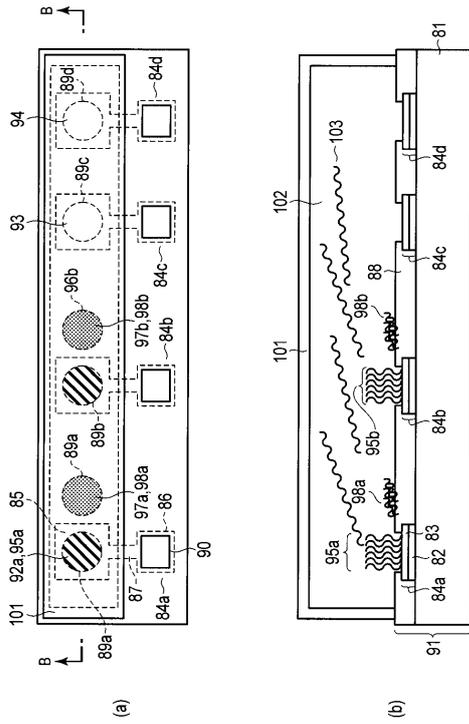
【 図 9 】

図 9



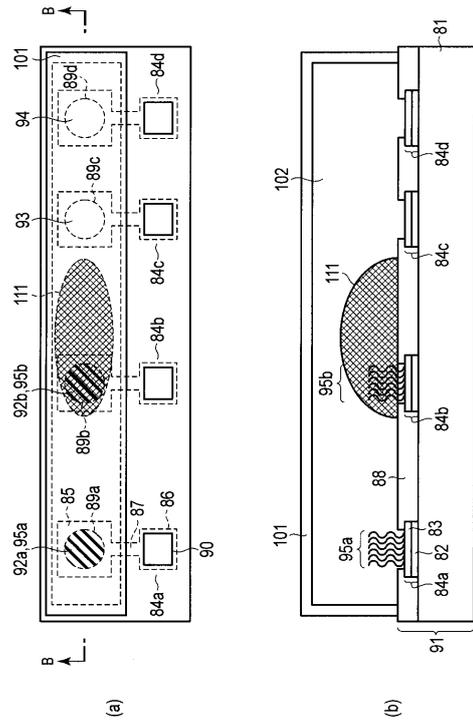
【 図 10 】

図 10



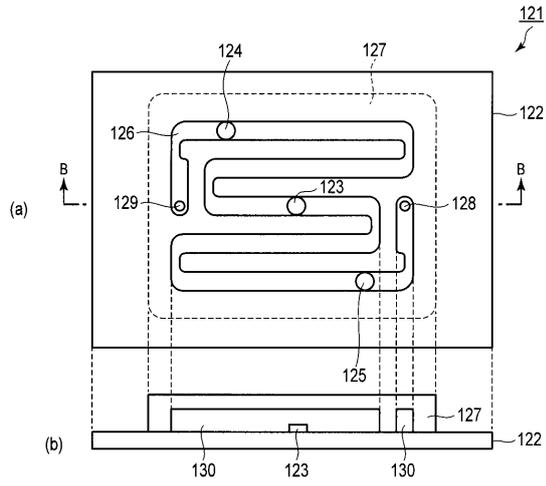
【 図 11 】

図 11



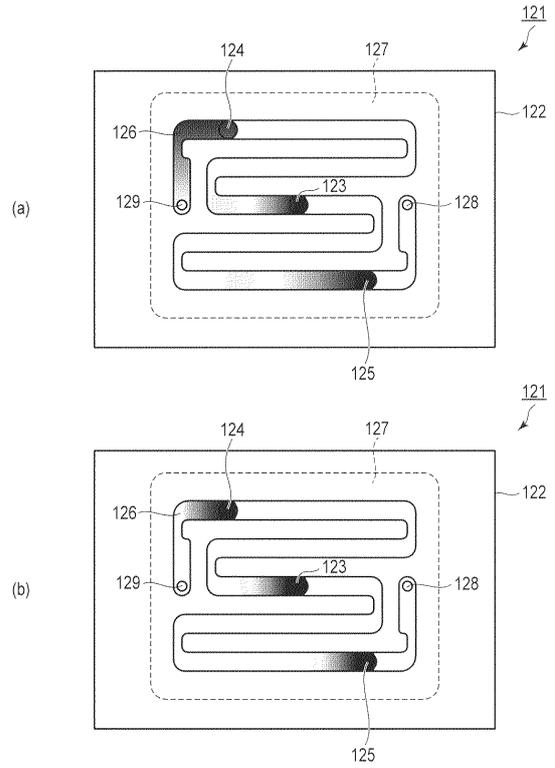
【 図 1 2 】

図 12



【 図 1 3 】

図 13



【 配 列 表 】

2013198443000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976  
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051  
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100158805  
弁理士 井関 守三
- (74)代理人 100172580  
弁理士 赤穂 隆雄
- (74)代理人 100179062  
弁理士 井上 正
- (74)代理人 100124394  
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807  
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073  
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290  
弁理士 竹内 将訓
- (72)発明者 高瀬 まどか  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 岡田 純  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 高橋 匡慶  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 橋本 幸二  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 廣澤 大二  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 二階堂 勝  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 源間 信弘  
東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- Fターム(参考) 4B029 AA07 BB20 CC08 FA12  
4B063 QA13 QQ28 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55 QR62 QS02  
QS34 QS38 QX01 QX04