

(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2004-298018

(P2004-298018A)

(43) 公開日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00 1 O 2	
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-92295 (P2003-92295)
 (22) 出願日 平成15年3月28日 (2003.3.28)

(特許庁注：以下のものは登録商標)
 パイレックス

(71) 出願人 000000376
 オリンパス株式会社
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号

(74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦

(74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲

(74) 代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100100952
 弁理士 風間 鉄也

(72) 発明者 大橋 陽子
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス光学工業株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA19 AA20 CA04 CA09 HA19
 最終頁に続く

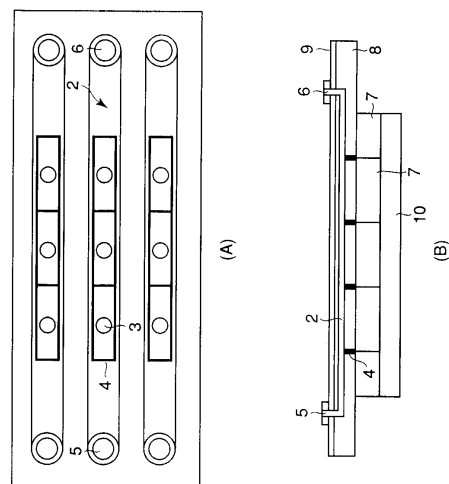
(54) 【発明の名称】 プローブ固相化反応アレイによる核酸の分離回収法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、プローブアレイを使用して、効率よく且つ高精度で核酸の分離回収を行う方法を提供することを目的とする。また、核酸の分離回収を行うためのプローブ固相化反応アレイを提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、所望の核酸を分離回収するためのプローブ固相化反応アレイであって、該プローブ固相化反応アレイは、プローブが支持体に固相化されたプローブ固相化反応アレイであり、該支持体には、独立して形成された1または複数の反応部を備え、該支持体の各反応部は、2以上の開口部を有し、該反応部には、反応部毎に分離回収したい核酸とハイブリダイズ可能なプローブが固定化されており、該反応部は、電極を具備することを特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。また、該プローブ固相化反応アレイを使用して核酸を分離回収する方法を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所望の核酸を分離回収するためのプローブ固相化反応アレイであって、
該プローブ固相化反応アレイは、プローブが支持体に固相化されたプローブ固相化反応アレイであり、

前記支持体は、該支持体に独立して形成された 1 または複数の反応部を備え、

前記支持体の各反応部は、2 以上の開口部を有し、

前記反応部には、反応部毎に分離回収したい核酸とハイブリダイズ可能なプローブが固定化されており、

前記反応部は、電極を具備すること、

を特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記反応部は、キャピラリ形状であることを特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のプローブ固相化反応アレイであって、

前記 2 以上の開口部は、1 の注排出口と、複数の溶液分取口であり、

前記注排出口は、前記反応部におけるキャピラリの一端に位置し、

前記注排出口からは、該キャピラリ他端に向けて主流路が形成され、

前記主流路の末端からは、複数の分岐流路が形成され、

前記分岐流路の各末端には、前記溶液分取口が形成されていること、

を特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

20

【請求項 4】

請求項 2 に記載のプローブ固相化反応アレイであって、

前記 2 以上の開口部は、1 の注入口と、1 の排出口と、複数の溶液分取口とであり、

前記注入口は、前記反応部におけるキャピラリの一端に位置し、

前記排出口は、前記反応部におけるキャピラリ他端に位置し、

前記注入口から前記排出口に向けて主流路が形成されており、

前記主流路には、複数の分岐流路が形成されており、かつ前記分岐流路は、前記主流路に固定化されたいずれのプローブよりも排出口側に形成されており、

前記分岐流路の各末端には、前記溶液分取口が形成されていること、

を特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

30

【請求項 5】

請求項 1 に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記反応部は、ウェル形状であることを特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記電極は、プローブ固定化位置に独立して設けられていることを特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記反応部は、さらにヒータを具備することを特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

40

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記アレイは、さらに伝熱層を具備することを特徴とするプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記プローブは、該プローブが固定されたビーズにより間接的に支持体に固相化されているプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 10】

50

請求項 1 または 2 に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記反応部には、反応部毎に 1 つのプローブが固定化されているプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のプローブ固相化反応アレイであって、前記反応部には、複数種類のプローブが固定化されているプローブ固相化反応アレイ。

【請求項 1 2】

プローブ固相化反応アレイにおいて核酸を分離回収するための方法であって、

1. 前記プローブ固相化反応アレイの反応部に被検試料を注入する工程と、
2. 前記被検試料に含まれる標的核酸を、プローブとハイブリダイゼーションさせる工程と、
3. 前記プローブにハイブリダイズしていない被検試料を除去する工程と、
4. 前記ハイブリダイズした核酸を検出する工程と、
5. 前記ハイブリダイズした核酸を解離して回収する工程と、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法であって、

前記工程 1 において、前記プローブ固相化反応アレイは、反応部毎に同一のプローブが固定化されたアレイであり、前記被検試料は、反応部毎に異なった被検試料であり、且つ該被検試料は、それぞれ異なった種類の標識物質で標識されており、各反応部に異なった被検試料を注入することと、

前記工程 5 において、前記工程 4 の検出の結果、被検試料間でハイブリダイゼーションに差が見出された核酸のみを解離して回収することと、

を特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の方法であって、

さらに、回収した核酸の塩基配列の決定を行うことを含む方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 に記載の方法であって、前記核酸の解離は、電気化学的に解離される方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 に記載の方法であって、前記核酸の解離は、電気化学的に解離および加熱による解離である方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 2 に記載の方法であって、前記工程 5 において、各プローブ固定領域毎に独立して電圧をかけて、各プローブ毎に解離した標的核酸を回収することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プローブ固相化反応アレイによる核酸の分離回収法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来の核酸分離回収法として、ディファレンシャルディスプレイ法のようなゲル上で泳動後、目的のバンドを切り出す手法や、サブトラクション法などが行われている。また、特許文献 1 に記載の方法では、複数種の核酸が固定化された基材を用いてハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズされた核酸のそれぞれを分離して、一体のままの基材から直接回収する方法が開示されている。

【0003】

しかしながら、特許文献 1 に記載の方法では、支持体に複数種の核酸が固定化されているため、ハイブリダイゼーション後にハイブリダイズした核酸を回収する際に、注意深く核酸固定化位置の同定を行う必要があり、チップ先端等で一つ一つの核酸をはぎ取るのは煩雑な操作である。また DNA マイクロアレイ基板を使用した場合、ハイブリダイゼーション

10

20

30

40

50

ン後には核酸がどの位置に固定化されているか目視できないため、核酸固定化位置の同定が難しく、目的以外の核酸を回収してしまう危険性もある。

【0004】

また、特許文献2には、マイクロアレイを利用したポリヌクレオチド分離方法が開示されているが、この方法ではハイブリダイズしたターゲットを加熱することにより解離させているが、局所的に溶液を加熱しても溶液中に熱が伝播して周囲のプロープにハイブリダイズしているターゲットについても解離してしまう可能性がある。

【0005】

【特許文献1】

特開2002-253238号公報

10

【0006】

【特許文献2】

特開2000-279169号公報

【0007】

【特許文献3】

特表平11-509423号公報

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記のような状況に鑑み、本発明は、プロープアレイを使用して、効率よく且つ高精度で核酸の分離回収を行うことを目的とする。

20

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、鋭意研究の結果、従来キャピラリアレイは、核酸を検出することにのみ使用されるものであったが、解析後の核酸を回収するという大胆な発想に基づいて本発明を完成するに至った。具体的には、キャピラリ形状などの反応部を有するプロープ固相化反応アレイを使用して、固定化したプロープに核酸をハイブリダイゼーションさせるとともに、該ハイブリダイゼーションした核酸を解離することが可能なプロープ固相化反応アレイを開発し目的を達成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明の一つの態様において、所望の核酸を分離回収するためのプロープ固相化反応アレイであって、

30

該プロープ固相化反応アレイは、プロープが支持体に固相化されたプロープ固相化反応アレイであり、

前記支持体は、該支持体に独立して形成された1または複数の反応部を備え、

前記支持体の各反応部は、2以上の開口部を有し、

前記反応部には、反応部毎に分離回収したい核酸とハイブリダイズ可能なプロープが固定化されており、

前記反応部は、電極を具備すること、

を特徴とするプロープ固相化反応アレイを提供する。

【0011】

40

また、上記プロープ固相化反応アレイであって、反応部は、キャピラリ形状であることを特徴とするプロープ固相化反応アレイを提供する。

【0012】

さらに、上記プロープ固相化反応アレイであって、

前記2以上の開口部は、1の注排出口と、複数の溶液分取口であり、

前記注排出口は、前記反応部におけるキャピラリの一端に位置し、

前記注排出口からは、該キャピラリ他端に向けて主流路が形成され、

前記主流路の末端からは、複数の分岐流路が形成され、

前記分岐流路の各末端には、前記溶液分取口が形成されていること、

を特徴とするプロープ固相化反応アレイを提供する。

50

【0013】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、
前記2以上の開口部は、1の注入口と、1の排出口と、複数の溶液分取口とであり、
前記注入口は、前記反応部におけるキャピラリの一端に位置し、
前記排出口は、前記反応部におけるキャピラリ他端に位置し、
前記注入口から前記排出口に向けて主流路が形成されており、
前記主流路には、複数の分岐流路が形成されており、かつ前記分岐流路は、前記主流路に
固定化されたいずれのプローブよりも排出口側に形成されており、
前記分岐流路の各末端には、前記溶液分取口が形成されていること、
を特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。

10

【0014】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記反応部は、ウェル形状であることを特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。

【0015】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記電極は、プローブ固定化位置に独立して設けられていることを特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。

【0016】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記反応部は、さらにヒータを具備することを特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。

【0017】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記アレイは、さらに伝熱層を具備することを特徴とするプローブ固相化反応アレイを提供する。

20

【0018】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記プローブは、該プローブが固定されたビーズにより間接的に支持体に固相化されているプローブ固相化反応アレイを提供する。

【0019】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記反応部には、反応部毎に1つのプローブが固定化されているプローブ固相化反応アレイを提供する。

【0020】

さらに、上記プローブ固相化反応アレイであって、前記反応部には、複数種類のプローブが固定化されているプローブ固相化反応アレイを提供する。

30

【0021】

本発明の第二の態様において、プローブ固相化反応アレイにおいて核酸を分離回収するための方法であって、

1. 前記プローブ固相化反応アレイの反応部に被検試料を注入する工程と、
 2. 前記被検試料に含まれる標的核酸を、プローブとハイブリダイゼーションさせる工程と、
 3. 前記プローブにハイブリダイズしていない被検試料を除去する工程と、
 4. 前記ハイブリダイズした核酸を検出する工程と、
 5. 前記ハイブリダイズした核酸を解離して回収する工程と、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

40

【0022】

また、上記方法であって、
前記工程1において、前記プローブ固相化反応アレイは、反応部毎に同一のプローブが固定化されたアレイであり、前記被検試料は、反応部毎に異なった被検試料であり、且つ該被検試料は、それぞれ異なった種類の標識物質で標識されており、各反応部に異なった被検試料を注入することと、
前記工程5において、前記工程4の検出の結果、被検試料間でハイブリダイゼーションに差が見出された核酸のみを解離して回収することと、

50

を特徴とする方法を提供する。

【0023】

さらに、上記方法であって、

さらに、回収した核酸の塩基配列の決定を行うことを含む方法を提供する。

【0024】

さらに、上記方法であって、前記核酸の解離は、電気化学的に解離される方法を提供する。

【0025】

さらに、上記方法であって、前記核酸の解離は、加熱による方法を提供する。

【0026】

さらに、上記方法であって、前記工程5において、各プローブ固定領域毎に独立して電圧をかけて、各プローブ毎に解離した標的核酸を回収することを特徴とする方法を提供する。

【0027】

【発明の実施の形態】

ここで、本明細書において使用される「核酸」の語は天然に存在する種々のDNAおよびRNA、並びにペプチド核酸、モルホリノ核酸、メチルフォスフォネート核酸およびS-オリゴ核酸などの人工的に合成された核酸類似体などを指す。

【0028】

本明細書において使用される「標的核酸」の語は、プローブにより検出されるべき核酸をいう。一般的に、核酸プローブは、標的核酸に相補的な塩基配列を有するように設計される。被検試料に含まれる被検核酸が標的配列が有する塩基配列を有している場合には、核酸プローブと標的配列の間にハイブリダイゼーションが生じる。したがって、このハイブリダイゼーションを検出することにより被検試料に含まれる核酸を解析することが可能である。ハイブリダイゼーションの検出はそれ自身公知の手段により行ってよい。標的核酸の標的になる塩基配列を「標的配列」と称す。

【0029】

本明細書において使用される「被検試料」の語は、生物個体から採取した細胞、組織、臓器、血液、血清、リンパ液、組織、毛髪および耳垢などの生物試料を所望に応じて調製した試料や、人工的に合成または製造した物質を含む試験に供したい試料をいう。また、「被検試料」は必要に応じて、生物試料をホモジネートおよび抽出などの必要な任意の前処理を行って得た試料であってもよい。このような前処理は、対象となる生物試料に応じて当業者によって選択され得るであろう。

【0030】

本明細書において使用される「個体」の語は、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、及びサルを含む任意の哺乳動物、並びに植物および昆虫など哺乳動物以外の生物を示す。

【0031】

以下、本発明のプローブ固相化反応アレイについて、反応部がキャピラリ形状のアレイを例にしてその一実施形態を説明する(図1)。

【0032】

図1(A)は、本発明のプローブ固相化反応アレイを上面から見た平面図である。プローブ固相化反応アレイ1は、シリコン基板8と透明なガラス製の基板9を用いて製造されたプローブ固相化反応アレイの例である。

【0033】

プローブ固相化反応アレイ1の基板の内部には複数のキャピラリ2を含む3つのキャピラリが、同一平面上に並列して平行に形成されている。それぞれのキャピラリは互いに独立して形成されるので、他のキャピラリに含まれる流体と互いに混じり合うことはない。また、それぞれのキャピラリの両端には、開口部が形成されている。具体的には、キャピラリ2には、それぞれ試料注入口5と、試料排出口6が形成されている。キャピラリ2の内

10

20

30

40

50

部には、ハイブリダイゼーションにより捕獲して回収したい核酸に応じて、適切なプローブ群 3 が固定されている。

【0034】

このプローブ固相化反応アレイのように、複数の反応部を有するプローブ固相化反応アレイを使用することにより、独立したキャピラリ毎に異なる被検試料について反応を行うことが可能となり、同一基板上で複数の反応を行うことができる。

【0035】

それぞれのキャピラリには、検出すべき標的核酸に特異的に結合する核酸をプローブとして固定化する。使用するプローブは、当業者であれば解析項目に応じて容易に選択することが可能であろう。また、このようなプローブは、当業者であれば容易に作成することができるであろう。たとえば、PCR産物または合成オリゴヌクレオチドなどを使用することができる。

10

【0036】

上述したとおり、一枚のプローブ固相化反応アレイに固定化されるプローブは、一種類に限定されず、解析項目に応じて、また、回収したい核酸に応じて、複数のプローブが固定化されていてもよい。この場合、一度に複数の核酸をハイブリダイズさせ、かつハイブリダイズした核酸を回収することが可能となり、効率化を図ることができる。たとえば、一枚のアレイにおいて、一個体に由来する種々の核酸配列についてハイブリダイゼーションおよび回収を行うことが可能となり、検体間で被検試料の取り扱いについてミスを減少することが可能となる。

20

【0037】

たとえば図1において、キャピラリ2において一個体に由来する被検試料についてハイブリダイゼーションを行い、もう一つのキャピラリにおいて、他の個体に由来する被検試料についてハイブリダイゼーションを行い、残りのキャピラリを対照用としていずれの解析も行わないとすることもできる。

【0038】

図1(B)は、本態様であるプローブ固相化反応アレイ1をキャピラリ2に沿って切断した断面図である。

【0039】

上記のプローブ固相化反応アレイ1は、たとえば、次のように製造することが可能である。同じ大きさのシリコン基板とガラス基板を用意し、基板8と基板9とする。基板8にエッチングにより溝を形成する。また、基板8には、非電導部位4のパターンに応じて穴が空けられ、非伝導体を充填しておく。

30

【0040】

一方、標的核酸に応じて所望のプローブを予め準備しておく。これらのプローブは、各反応部毎に各反応部の溝の底部に対してスポットティングすることによって固定すればよい。また、基板9には、基板8の溝の両端に対応する部分に対して貫通穴が空けられる。次に、基板8と基板9を接合する。それぞれの開口部に所望の長さのガラス管を接着することにより連結部5aおよび6bを形成するとともに、キャピラリを形成する。キャピラリ形状の空間のサイズは、用途に合わせて種々の大きさに設定することができるが、実用的には幅が10 μ m~数mm、深さ1 μ m~500 μ m、長さ数mm~100mm、キャピラリ間隔10 μ m~数mm程度で充分である。ただし、反応の効率性を考えると、測定対象となるmRNA、またはmRNAから転換したcDNAなどの核酸の拡散速度は毎秒数 μ mと遅いので、キャピラリ形状の空間の断面形状は、幅を広くしても深さは浅くするような扁平構造をとることにより、反応時間の短縮、試料の微量化、観察視野の増加等が期待できる。

40

【0041】

上記の例では、基板8に溝を形成したが、基板9でもよいし基板8と基板9の両方に形成されていてもよい。また、支持体の材料として、蓋として用いる基板にはガラス製基板を使用し、溝を形成する基板にはシリコン基板を使用した。これに限定されるものではない

50

く、蓋として用いる基板にシリコン基板を使用してもよい。また、使用される2枚の基板を同じ材質としてもよい。ただし、プローブを固定化する基板は、たとえばシリコン基材などの伝導性の基材でなければならない。また、観察の方向に透過性部材が配置されるように、使用する部材を決定してもよい。あるいは、プラスチック樹脂やゴムなどで形成された支持体を使用してもよい。また、これらの材質、ガラス、シリコン、プラスチック樹脂およびゴムなどの材質で形成された支持体を組み合わせて使用してもよい。ただし、この場合もプローブ固定化部分は、伝導性の基材でなければならない。さらに、図では基板8に非伝導体を組み込んだが、逆に、非伝導性の材質からなる基板8のプローブ固相化部分に伝導性の材質を組み込んでよい。また、非伝導体は基板8に組み込まれていなくてもよい。

10

【0042】

また、上記の例では支持体として板状の基板を使用しているが、これに限定されるものではない。

【0043】

ガラスやシリコンウエハ様の基板では、たとえば、フォトリソ・エッチングなどの技術により溝、非伝導体用の穴および貫通穴を形成することが可能である。また、プラスチック樹脂やゴムなどの場合には機械加工やモールド加工などにより溝、非伝導体用の穴および貫通穴を形成することが可能である。

【0044】

プローブの固定手段は、それ自身公知の何れかの手段を使用してよい。たとえば、核酸プローブの固定化であれば、スポットティング法および光固相化法などを使用してよい。上記の例では、基板8の溝の底部にプローブを固定したが、基板9にそれを固定してもよく、また、各反応部の側面にそれを固定してもよい。基板には、プローブを固相化するために適切な表面処理、たとえば、ポリシリジン処理、アミノシラン処理および酸化膜処理等の表面処理を行うことが可能である。

20

【0045】

さらに、固定化するプローブは、あらかじめビーズに固定化されたプローブを使用してもよい。この場合、該プローブが固定化されたビーズを基板に固定化することとなる。使用するビーズは、たとえば、平均直径0.05~200 μm のビーズを使用してもよく、好ましくは、0.1~30 μm のビーズである。また、使用するビーズの材質は、伝導性の

30

【0046】

このようなビーズに所望の核酸プローブを固相するための手段は、基体の材料により、それ自身公知の何れかの手段を使用することができる。たとえば、公知の手段を、立体状基体または粒状基体の曲面、特に球面に適用し得るように改良することが可能である。たとえば、曲面体に加工を施した基体上に核酸プローブを配するためには、光固相方式および点着方式の2つの手法を適宜組み合わせることで曲面の部分領域に対して定量的に核酸プローブを固相することが可能となる。

【0047】

上記ビーズを基板に固定化するには、たとえばそれ自体公知のいずれの手段を使用してもよい。特に、ビーズが磁性粒子であることが好ましく、あらかじめキャピラリ内の所望の位置に磁石を固定化しておくことにより、磁力でビーズを固定することも可能である。

40

【0048】

またビーズ表面は、プローブを結合させた後、不活性化処理を行うことにより非特異的な結合を防止しておくことができる。この不活性化処理はサケ精子DNA部分分解物、ランダムオリゴヌクレオチド、牛血清アルブミンなどで処理する方法や、未反応の官能基をエタノールアミンなどの公知の方法で処理することにより達成される。

【0049】

また、図1では、1つのキャピラリに3つのスポットが存在する例を示した。しかしながら、1キャピラリに固相化されるスポット数はこれに限定されるものではない。被検試料

50

に含まれる標的核酸の数に応じて、スポットの数は1または複数の任意の数でスポットしてもよい。したがって、キャピラリ毎に異なるスポット数としてもよい。また、プローブ固相化反応アレイに含まれる全てのキャピラリが複数種類のプローブを含んでいる必要はなく、また、何も固相化していない対照用のキャピラリを具備していてもよい。

【0050】

次いで、2枚の基板の接合は、それ自身公知の手段により、プローブの固定前または固定後に行われればよい。たとえば、核酸プローブを固定前に接合した場合には、光固相化法（たとえば特表平6-504997参照）を適用して核酸プローブを固定化するのが好ましい。たとえば、シリコン-石英ガラスの場合には、接着剤をスクリーン印刷機により印刷して接着すればよい。たとえば、シリコン-パイレックスガラスの場合には、半導体プロセスで使用される陽極接合法により、高温および高電圧の下で接合を行えばよい。

10

【0051】

また、本発明のプローブ固相化反応アレイは、電極を具備している。電極は、固定化したプローブにマイナスの電荷をかけるためのものである。したがって、上述のようにプローブが固定化される部分は伝導性であり、かつ該部分は、電極から電荷をかけることが可能なように構成されている必要がある。たとえば、図1(B)に示したように、伝導性基板のプローブ固相化部位の裏側に電極7が固定されていることが好ましい。電極は、アレイ底面を覆うものであってもよいが、プローブ固相化部位毎に独立した電極であることが好ましい。かかる構造によれば、プローブ毎に電極を制御することができる。しかし、この場合は、目的のプローブ固定化位置以外の部分に電気が伝わらないように基材に非伝導体を組み込んでおく必要がある（図1など）。このような構造により、回収したい領域にのみマイナスの電荷をかけることが可能となり、プローブ毎にハイブリダイズした核酸を分離することができる。

20

【0052】

また、本発明のプローブ固相化反応アレイは、温度を制御できることが好ましい。温度の制御は、いずれの方法で行われてもよいが、たとえば図1のようにヒータ10を具備することによって制御することができる。その他、アレイに伝熱部を具備することにより、外部から温度制御されてもよい。図1においては、1つのヒータ10を使用して、アレイ全体の温度を制御する場合を示している。しかし、各反応部毎に独立したヒータを具備し、反応部毎に温度制御がなされてもよい。

30

【0053】

また、本実施の形態では、電極およびヒータが本発明に従う反応アレイと別体である1例を示したが、電極、ヒータおよびセンサ並びに必要な配線等が反応アレイ内に組み込まれていてもよい。

【0054】

上記キャピラリ形状のプローブ固相化反応アレイの他に、PCR反応が可能なように容器形状の反応部を有し、試料注入口および試料排出口が作製された微量液体の反応装置（特許文献1に開示されている）にプローブを固定化したものも、本発明のプローブ固相化反応アレイとして使用することもできる。たとえば、該装置に電極を具備した構造であってもよい。

40

【0055】

本発明に従うプローブ固相化反応アレイに具備される反応部は、その領域において、化学反応または生化学反応等の使用者が意図する反応および処理を行う領域をいう。したがって、上記形状の他、たとえば、反応部の形状は、底面が角型、円または楕円であるようなウェル形状であってもよい。また、反応部の底面と天井面の面積は、等しくても異なってもよい。ここで使用される「ウェル形状」とは、たとえば、キャピラリ形状のように反応部の底面および天井面が特定の方向へのみに広がり示すような形態ではなく、底面や天井面を構成する二次元の何れの方向に対してもある程度同じような広がり示すような形状で、かつ複数のプローブ固定部位がグループとして一括処理できる程度に分割された凹部もしくは多孔質部を有するものを指す（たとえば、特表平9-504864を参照

50

)。

【0056】

また、本発明のプローブ固相化反応アレイは、物理的に互いに隔離された反応部が形成されたデバイス構造の種々の構造が考えられる。図1に示した例では、プローブ固相化反応アレイ1に含まれる反応部を3つとし、反応部のそれぞれに試料注入口および/または試料排出口として使用できる1以上の開口部を形成したが、この数に限定されるものではなく、1以上の反応部を具備すればよい。すなわち、該反応部は、互いに独立していればよく、たとえば、凹部または凸部により仕切られた領域に開口部を有する蓋または底部を配置し、有効容積のある反応部を形成すればよい。

【0057】

また、反応部の形状は、図1に示したような直線構造だけでなく、種々の構造を有していてもよい。たとえば図2に示すように、キャピラリ形状の反応部は、1の注排出口と、複数の溶液分取口が形成され、該注排出口は、キャピラリの一端に位置し、該注排出口からは、該キャピラリ他端に向けて主流路が形成され、該主流路の末端からは、複数の分岐流路が形成され、該分岐流路の各末端には、溶液分取口が形成された形状であってもよい。図2のアレイでは、各分岐流路の分流圧、流量を一定にするために、同一の断面形状および長さを有していることが好ましい。ただし、図2では、流路形状が直線であるが、曲線であってもよい。図2では、直線状に放射して伸びる分岐流路であるため、小型である。また、各分取口は同一円周上に円弧状に配置されている。図中の波線から波線までの領域が反応領域である。電極は、この領域の底面に、プローブ固相化部位毎に独立して具備されることが好ましい。

【0058】

図2のような形状のキャピラリアレイを使用した場合、注排口15の一箇所から注入と排出が行われ、分取口18は分取のみに用いられる。したがって、注排出と分離で流路を分担しているため、処理能力が大きくなり迅速な回収が可能となる。

【0059】

また、たとえば図3に示すように、キャピラリ形状の反応部は、1の注入口と、1の排出口と、複数の溶液分取口が形成され、該注入口は、キャピラリの一端に位置し、該排出口は、キャピラリ他端に位置し、注入口から排出口に向けて主流路が形成されており、該主流路には、複数の分岐流路が形成されており、かつ該分岐流路は、主流路に固定化されたいずれのプローブよりも排出口側に形成されており、該分岐流路の各末端には、溶液分取口が形成された形状であってもよい。図3のアレイにおいても、図2のアレイと同様に、断面と長さが同一であることが好ましい。また、図3と同様に電極が具備されていることが好ましい。また、図3のアレイは、中央の排水用主流路とは別に、分取用の分岐流路が主流路の異なる位置に配置されている。これにより、分取のタイミングを分岐流路毎に単独で行うことも、複数同時におこなうこともできる。また、同時に2以上の分取口からも回収できる。

【0060】

図4のような形状のキャピラリアレイを使用した場合、分岐流路が枝上に交互に分岐しているため、互いに誤って別の分岐流路に混入してコンタミネーションが生じるおそれを有効に防止することができる。

【0061】

また、本発明の態様に従うと、基板内部に内腔よりなる反応部を形成した閉鎖系の反応アレイばかりではなく、互いに独立し、かつ任意の方向に並列して複数の反応部を支持体に備えたものであれば、単に凹部または凸部により仕切られた容器に対しても、または平面からなる特に仕切のない領域であっても、十分に離間しているかあるいは多数の垂直孔に

10

20

30

40

50

よって液の拡散が妨げられていることで、互いに独立していれば本発明の態様に使用することが可能である。このような装置およびその使用も本発明の範囲に含まれる。

【0062】

また、本発明のプローブ固相化反応アレイは、特に自動化装置で使用可能な形態であることが好ましい。たとえば、特許2002-034197に示されるような自動化装置を使用することができる。このような形態であれば、被検溶液等の注入から洗浄、回収までを自動で行うことができる。

【0063】

本発明のプローブ固相化反応アレイを使用することにより、煩雑な操作を伴わずに該核酸の分離回収を行うことができるであろう。

10

【0064】

以下、図4を参照して本発明のプローブ固相化反応アレイを使用して核酸の分離回収を行う方法を説明する。一例として、既知の配列のプローブを使用して、該プローブにハイブリダイズする核酸を分離回収する場合について説明する。

【0065】

図4は、本発明のプローブ固相化反応アレイにおいて所望の核酸を分離回収するための方法の概略図である。図4には、図1のキャピラリ2を使用して核酸を分離回収した場合を示す。

【0066】

まず、標的核酸を含む被検試料溶液を、注入口5から注入する。

20

【0067】

使用する被検試料溶液は、ハイブリダイゼーション反応が可能な程度に精製された核酸を含む必要がある。たとえば、所望の組織または細胞からtRNAを抽出し、直接またはmRNAとして精製を行った後、以下に記載したような標識を行う。また、市販のキット等を使用して、ハイブリダイゼーション解析を行いたい個体から核酸を精製することができる。

【0068】

上述したとおり、後の検出が可能となるように、標的核酸を含む被検試料に追跡可能な光学的または物理的標識が行われていることが望ましい。したがって、被検試料として上記のような追跡可能な標識分子、たとえば、蛍光色素、発光色素等で標識された核酸を使用することが考えられる。標的核酸を含む被検試料の標識は、たとえば、被検試料中の核酸をランダムプライマー等によるPCRで増幅する際に、核酸の合成の際に蛍光標識されたデオキシヌクレオチド三リン酸(dUTP)を取り込みながら標識を行う方法、またはあらかじめ蛍光標識されたプライマーにより増幅を行って、標識物を導入する方法を使用することができる。その他にも、増幅後に色素を結合させる方法などを使用することができるが、これらに限定されない。使用可能な標識としては、Cy3、FITCおよびビオチン等であるが、これに限定されるものではない。また、ハイブリダイゼーションの検出方法として、ハイブリダイゼーション後の偏光性の変化を検出する方法を使用可能する場合等には、非標識のまま標的核酸を使用することもできる。

30

【0069】

標的核酸として1種類の標的核酸だけでなく、2種類以上の標的核酸を混合させて行うことも可能である。この場合は、数種類の標識で標的核酸を標識してもよい。また、各反応部毎に標識の種類を変更して反応を行ってもよい。

40

【0070】

次いで、被検試料に含まれる標的核酸をプローブにハイブリダイズさせる。

【0071】

たとえば、図1のプローブ固相化反応アレイ1において、それぞれの反応部に固定化されたプローブに適した反応条件でハイブリダイゼーションが行われる。ハイブリダイゼーション条件は、たとえば、それぞれのキャピラリ毎に温度管理をしてもよい。また、ハイブリダイゼーション時に使用する反応液を調節すればよい。全ての反応部を一定の温度に維

50

持してイオン濃度および塩濃度によって至適反応条件を得てもよい。

【0072】

たとえば、核酸ハイブリダイゼーションを行う場合に、各反応部における至適濃度が異なっているときであっても、被検試料の溶液として使用する緩衝液等の塩濃度を反応部毎に調節することによって達成することが可能である。また、実際のハイブリダイゼーション反応において用いられる溶液の成分にDNAの変性剤などが含まれる場合には、適宜、さらに塩濃度等を調整する必要がある。

【0073】

一般に、ハイブリダイゼーション反応は、45 から65 前後の恒温状態で、1時間から一晩の間、標的核酸と核酸プローブとの反応が行われるが、検出すべき核酸等の条件に応じて反応条件を変更することが可能である。使用する適切な反応条件は、当業者であれば容易に選択可能であろう。

10

【0074】

次いで、ハイブリダイズしていない被検試料溶液を除去する。たとえば、プレートウォッシャー等を用いて洗浄操作を行う。このような洗浄操作を施すことにより、未結合の標的核酸を除去される(図4上段)。この後、必要であれば、適切な塩濃度の洗浄液等で洗浄操作を行う。

【0075】

ここで、ビーズを介してプローブを固定化した場合において、ビーズが磁性粒子であり、該ビーズが磁石によって固定化されているときは、ビーズを懸濁して洗浄することができる。たとえば、磁石をアレイから隔離してビーズを懸濁し、洗浄後は、磁石によって再度ビーズを固定化すればよい。

20

【0076】

次いで、プローブとハイブリダイズした核酸を検出する。たとえば、各反応部ごとに、アレイ上に残った標識物質の有無または量を、標識物質の位置または標識物質の種類毎に分類しながら適宜の計測手段およびデータ処理手段によって決定することができる。特に、ハイブリダイゼーションは、支持体に含まれたままで観察され得ることが好ましい。たとえば、上述のように被検試料を視覚的に認識可能な標識(蛍光色素など)で標識しておくことにより、プローブと結合した標的物質の蛍光をそのまま視覚的に認識できるであろう。蛍光測定に限らず、電気化学的発光、発色反応、変更測定などによって検出してもよい。

30

【0077】

次いで、ハイブリダイズした核酸をプローブから解離させて、該核酸を回収する。プローブからの核酸の解離は、プローブをマイナスに荷電することによって行うことができる。

【0078】

また、プローブを荷電することに加えて加熱することによっても解離させることができる。加熱してプローブの T_m 近くの温度にしておくことにより、非特異的なハイブリダイゼーションを防止するとともに、荷電による核酸の解離が容易となる。たとえば、図1および図4に示したプローブ固相化反応アレイのように、電極が各プローブ固定領域毎に独立して具備されている場合は、各プローブ毎に荷電して標的核酸を解離させ、核酸を別々に回収することが可能である。たとえば、図4に示すように、排出口に最も近いプローブから順番にマイナスに荷電しながら洗浄液等を流し、解離した核酸を含む洗浄液等を排出口から回収してもよい。図4のように、排出口に最も近いプローブから順番に回収することにより、ハイブリダイズした核酸の上を他の核酸が通過することがなく、コンタミネーションを有効に防ぐことができる。

40

【0079】

次に、本発明のプローブ固相化反応アレイを使用して、被検試料間で遺伝子発現頻度に差が見出された遺伝子を同定する方法について説明する。本方法は、あらかじめ多数のプロ

50

ープDNAの塩基配列を同定することなく、遺伝子発現頻度に差のあった遺伝子のみの同定を可能とする方法である。

【0080】

まず、被検試料を作製する。たとえば、二種類の被検試料について遺伝子発現頻度を解析する場合、所望の組織または細胞から、およびコントロールとなる正常組織または細胞からtRNAを抽出し、直接またはmRNAに精製を行った後、上述したように被検試料を標識する。また、市販のキット等を使用して、核酸を精製することもできる。このとき異なる標識物質で標識を行っておく。

【0081】

次いで、同一のプローブが固定化された別々の反応部に、それぞれの被検試料を注入する 10

【0082】

次いで、上述したようにプローブとハイブリダイゼーションさせて、ハイブリダイゼーションしていない被検試料を除去する。

【0083】

その後、標識に基づいて両被検試料のハイブリダイズ量を測定する。両被検試料が異なる蛍光物質で標識されているのであれば、それぞれの蛍光物質に対応した2種類の蛍光波長において蛍光を測定する。

【0084】

両被検試料間で発現量に差のあるプローブを選択するにあたり、使用した2種類の被検試料の濃度などを補正する必要がある。この補正は、たとえば、アクチン遺伝子などの恒常的に発現していると考えられるハウスキーピング遺伝子を使用して行うことができる。2種類の被検試料DNAの濃度、標識効率、色素の差異などから生じる違いを補正しておく。補正を行った後、ハイブリダイゼーション量に差のあったもののみを選択する。 20

【0085】

次いで、上述したように、ハイブリダイゼーション反応により捉えられた被検試料DNAをプローブアレイから解離して回収する。得られた核酸は、エタノール沈殿法などを用いることにより回収することができる。また被検試料DNAにpoly A配列がある場合は、たとえば相補的なpoly T配列またはオリゴdT配列を固相化したカラムやビーズ担体などを用いて回収することも可能である。 30

【0086】

次いで、一分子技術を利用した方法により、またはクローニングを行った後で、塩基配列の決定を行う。

【0087】

得られたターゲットDNAは、様々な遺伝子断片が含まれると予想される。このため、複数回の塩基配列決定が必要になる。近年開発された一分子検出技術を使用いて、クローニング操作を伴わずに迅速に配列決定を行うことも可能である。詳細は、特許第2575270「核酸の塩基配列決定法、単一分子検出方法、その装置及び試料の作成方法」を参照することができる。

【0088】

また、塩基配列同定の方法として、回収された被検試料DNAを従来のクローニング技術を用いてクローン化後、従来の塩基配列決定技術を用いて配列を同定してもよい。複数のDNA断片について塩基配列決定を行い、逆転写PCR法などの手法を用いて、発現頻度に違いがあることをさらに確認することが好ましい。 40

【0089】

この手法の利点として、配列未知のプローブDNAを用いることが出来るため、これまでに同定されていない遺伝子を同定することも可能である。また、回収後、クローン化したDNAをその後の解析に用いることもできる。たとえば、回収されたDNAがある遺伝子の一部分だった場合でも、cDNAライブラリーを用いたコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより、全長の配列を得ることも可能である。全長遺伝子が同定された場合 50

には、大腸菌または酵母などの宿主細胞に遺伝子を発現させて、発現解析または機能解析などへ発展させることが可能である。

【0090】

【発明の効果】

本発明のプローブ固相化反応アレイにより、多数のプローブに対してターゲット核酸を高速で回収でき、しかも検体および試料は微量で済む。これまでのDNAマイクロアレイでは困難であった高精度な核酸分離回収を行うことが可能となる。一方、本発明の方法は、比較を行いたい複数の被検試料間で発現量の差を検出し、目的のプローブのみを分離回収してその塩基配列を決定することができる。したがって、従来のハイブリダイゼーション方法とは異なり、アレイに固定するプローブとして、配列が未知のプローブを使用することができるため、未知遺伝子解析を非常に効率よく行うことが可能となる。

10

【0091】

すなわち、従来の核酸プローブアレイでは、プローブとして使用する核酸配列が同定されている必要があったが、本発明では、たとえばショットガンシークエンスで得られたcDNA断片をクローン化した後、塩基配列決定することなしに直接プローブアレイに固定化を行い解析をおこなうことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施形態に係るプローブ固相化反応アレイを示す図。

【図2】本発明の一実施形態に係るプローブ固相化反応アレイを示す図。

【図3】本発明の一実施形態に係るプローブ固相化反応アレイを示す図。

20

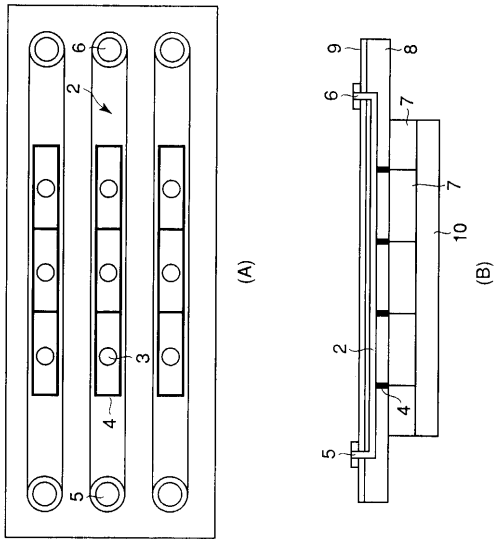
【図4】本発明のプローブ固相化反応アレイを使用して核酸の分離回収を行う方法の概略図。

【符号の説明】

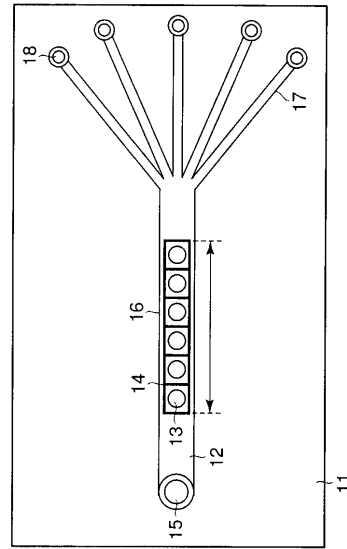
- 1 プローブ固相化反応アレイ
- 2, 12, 22 キャピラリ(反応部)
- 3, 13, 23 プローブ群
- 4, 14, 24 非伝導体
- 5, 15, 25 試料注入口
- 6, 15, 29 試料排出口
- 7 電極
- 8, 9 基板
- 10 ヒータ
- 5a、6b 連結部
- 16, 26 主流路
- 17, 27 分岐流路
- 18, 28 分取口
- 30 標的核酸

30

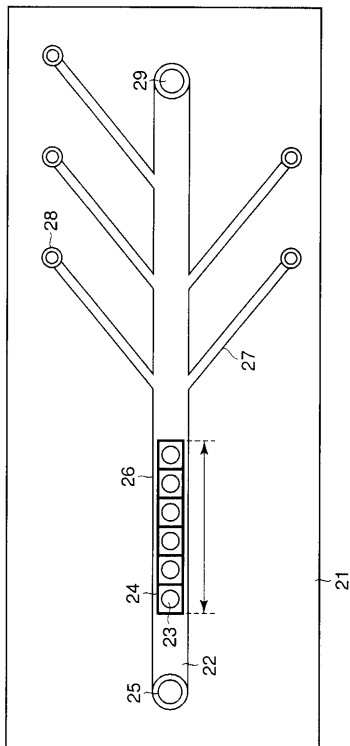
【 図 1 】



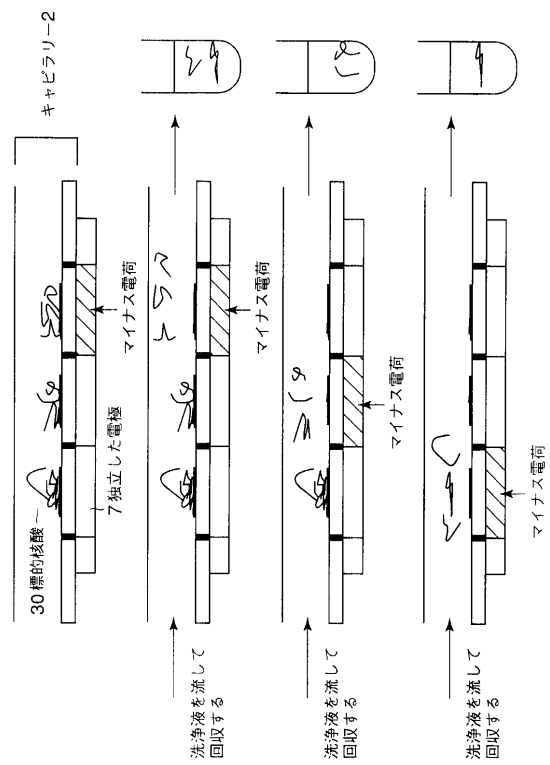
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 15/00

A

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC11 FA12
4B063 QA13 QQ41 QR32 QR55 QS34